

岩手県一関市蝦島貝塚出土 縄文晩期人骨のミトコンドリア DNA 分析

Mitochondrial DNA Analysis of Final Jomon Human Skeletons
Excavated from Ebishima Shell Mound in Ichinoseki-city, Iwate Pref.
KANZAWA Hideaki, KAKUDA Tsuneo, ADACHI Noboru,
SHINODA Ken-ichi and YAMADA Yasuhiro

神澤秀明・角田恒雄・安達 登・篠田謙一・山田康弘

I. はじめに

縄文時代の墓地・墓域においては、墓が群集する埋葬群を形成する場合がある。これらの埋葬群はいくつかの埋葬小群が集まって形成されており、このような全体の構造が区画された墓域は縄文時代中期以降にみられるようになる。この区画の最小単位である埋葬小群が何を示しているのかは依然として明らかではないが、遺伝的な関係にある小家族集団が可能性として考えられる。そのため、これらの埋葬人骨間の関係性を知ることは、縄文時代の親族構造を明らかにする上で重要な情報である。これまで形質人類学の分野からは、抜歯形式により同一のムラ出身者（ミウチ）と婚入者（ヨソモノ）を識別する [春成 1973]、頭蓋形態小変異のあり方から埋葬個体間の遺伝的関係を推測する [山田 2008]、歯冠計測値にもとづいて統計学的手法から人骨間の血縁関係を分析する [松村・西本 1996, 加藤・松村 2003] などの手法が取られてきた。ただし、歯冠計測値にもとづく推定方法は、本来的に遺伝的に均質性の高い縄文人集団では、血縁関係になくとも形態の類似度が高いと考えられるなど、課題もある [西本 2008]。一方で最近では、人骨に残存する DNA を分析することで、従来の形態学的手法と比べて精度の高い判定が可能となっている。分析では主に、母系系統に遺伝する環状のミトコンドリア DNA が用いられてきた。その理由として、古人骨の DNA は経年的な変性によって劣化しており、細胞中に鋳型が2つしかない核 DNA よりも、鋳型が多数あるミトコンドリア DNA の方が解析に成功する可能性が高いことがある。これまで、ミトコンドリア DNA の一部領域を分析することで、ミトコンドリア DNA のハプログループを推定し、古代の人々の血縁関係が判定されてきた [篠田 2008, Adachi et al., 2003, 2006]。また、2010 年に次世代シーケンサが古代 DNA 研究に導入されて以降はミトコンドリア DNA の全周の塩基配列 (16569 塩基) を、従来よりもはるかに容易に決定できるようになったことから、全周の配列情報による詳細かつ精度の高い血縁推定も技術的に可能となっている。

本研究では、国立科学博物館が収蔵する岩手県一関市花泉町の蝦島貝塚（貝取貝塚）から出土した縄文晩期人骨に着目した。従来の考古学的研究において、頭位方向によって蝦島貝塚の墓域が区分可能であるとの結果が出されている。また、人骨の年代分析の結果から埋葬は連続的に行わ

れているが、頭位方向の差は概ね時期差と関係があるとされる [山田 2003]。また、山田他の先行研究により、頭蓋形態小変異の前頭縫合・舌下神経管二分が共通する事例が報告されている [山田 2002]。さらに本遺跡では、同じ抜歯形式を共有する人骨や合葬される人骨がみられる。これらの埋葬属性は、埋葬人骨間の関係性を推定し、縄文時代の親族構造を明らかにする上で重要な情報である。そこで今回、埋葬属性の共通性がどのような遺伝的關係性と相関するのかを明らかとするために、DNA 分析を試みた。特に本研究では、ミトコンドリア DNA を分析し、母系系統での埋葬個体間の遺伝的關係性について検証した。なお、遺跡の地理的位置は、本研究報告の総論を参照されたい [藤尾他 2023]。

II. 方法

1. 人骨の選定と DNA 抽出

頭蓋形態小変異の前頭縫合・舌下神経管二分が共通する 43・45・51 号人骨、抜歯形式を共有する 51・52 号人骨、合葬される 57・58 号人骨を分析対象とした。また、同一集落内での比較対象として、上記人骨と埋葬位置が少し離れたところに位置する 59・60 号人骨を選定した。この外群 2 体は、形態小変異・抜歯・合葬個体で同一の配列が見られた場合、それが血縁関係にあるのか、同一集落内での遺伝的な多様性が著しく低いために生じているのかを判断するために選定した。分析には、蝸牛や半規管を収納する側頭骨錐体を用いた (表 1)。サンプリング後の形態研究への影響を最小限に抑えるために、事前に CT 撮影および写真撮影を行ったうえで、DNA 抽出用の試料粉末 (約 200 mg) を採取した。採取では、骨の形状をなるべく壊すことなく行う為に、錐体部の上面にドリルで小さな穴を空けて、そこから内耳にアプローチした。

DNA の抽出は [Takahashi et al. 2019] に従って行った (詳しくは [神澤他 2023] を参照)。

表 1 解析した人骨と分析部位

人骨番号	使用部位
蝦島 43	左側頭骨
蝦島 45	右側頭骨
蝦島 51	右側頭骨
蝦島 52	左側頭骨
蝦島 57	左側頭骨
蝦島 58	左側頭骨
蝦島 59	左側頭骨
蝦島 60	左側頭骨

2. APLP 法および次世代シーケンサによるミトコンドリア DNA 分析

抽出した DNA 溶液からのミトコンドリア DNA 分析には APLP 法 (Amplified Product-Length Polymorphism method) と次世代シーケンサ (Next Generation Sequencer : NGS) を用いたミトコンドリアゲノム全配列の決定の 2 つの方法で実施した。APLP 法による分析によって、ミトコンドリア DNA ハプログループ分析を行うとともに、抽出 DNA のクオリティチェックを行った。APLP 法は [Kakuda et al. 2016] の方法に従って実行した。ミトコンドリア DNA のマクロハプログループである M および N と、それぞれの下位のハプログループを決定するプライマーセット M および N を用いた 6-plex の PCR を行い、マクロハプログループの M と N の判定、およびその下位のハプログループの推定を行った。この実験で増幅が確認されたサンプルに対し、更にハプログループを細分するためサブハプログループを細分可能なプライマーセットを用いて PCR 反応を

行った。得られた APLP-PCR 溶液を電気泳動し、ハプログループの判定を行った。

続いて、NGS によるミトコンドリアゲノム解析のために、DNA ライブラリの作成とミトコンドリアゲノムを myBaits Expert Mito (Daicel Arbor Biosciences 社) にて濃縮した (以下、詳しくは [神澤他 2023] を参照)。濃縮後の DNA ライブラリを MiSeq (Illumina 社) にてシーケンスし、配列情報を取得した。また、濃縮前の DNA ライブラリのヒト DNA 含有率を明らかにするために、未濃縮の DNA ライブラリも MiSeq にてシーケンスして配列情報を取得した。配列情報のマッピングおよびフィルタリングは、篠田他 [2017] に Kanzawa-Kiriyama et al [2019] に示した修正を加えて実施した。

Ⅲ. 結果

1. APLP 分析の結果、および NGS による分析で得られたリードの信頼性

はじめに、人骨 8 点について APLP 分析を行った。マクロハプログループの M と N を判定するプライマーセットでの分析では、57 号、58 号以外の人骨で明瞭な PCR 増幅によるバンドが見られた (図 1)。続いて、ミトコンドリアゲノムの全配列に基づいてハプログループを判定するために、NGS を用いたミトコンドリアゲノム分析を実施した。フィルタリング後に得られたミトコンドリアゲノム由来の DNA 断片数は 201 ~ 51,708 リードと個体ごとに幅があったが、全ての個体から、データの信頼性が検証できるだけのリード数が得られた。そこでそれらの個体について、得られたリードが古代人に由来するかを調べるために、リード長および C/T、G/A の置換率を調べた。その結果、リード長のピークは多くが 40 ~ 50 bp 前後と非常に短い一方で、59 号はその中でも比較的長い傾向にあった (図 2, 表 2)。また、古代 DNA の特徴である C/T、G/A の置換は多くの個体で観察されたものの、59 号と 60 号ではほとんど見られなかった (図 3, 表 2)。以上の結果から、59 号と 60 号から得られた DNA 配列は、おそらく現代人 DNA の混入によるものと思われるが、それ以外の個体で得られた DNA 配列は、当該個体に由来するものであると判断された。現代人 DNA の混入による汚染率は、概ね 1 ~ 3 % と推定され、ミトコンドリア DNA ハプログループ推定への影響は無いと判断できた。

2. NGS によるミトコンドリア DNA ハプログループ推定

59 号と 60 号を除いた 6 個体からは、ハプログループ推定に必要なだけの DNA の断片配列が得られた。決定されたハプログループは、いずれも縄文人的遺伝子型である M7a と N9b であった (表 2)。43 号と 45 号、および 51 号は、既知のサブハプログループに分類されず、祖型段階から分岐した系統であった。ミトコンドリアゲノム全周に基づく比較から、配列決定した 6 体はいずれも配列が異なった。これは、母系系統での血縁関係は無いことを示している。

3. 古代人由来の DNA 含有率

NGS を用いたミトコンドリア DNA 分析で十分な量のデータが得られた個体については、将来的に核ゲノム分析を対象として分析できる可能性がある。特に、側頭骨の錐体では大白歯と比べてヒト DNA の含有率が高い可能性がある。濃縮する前の DNA ライブラリに含まれるヒト DNA の

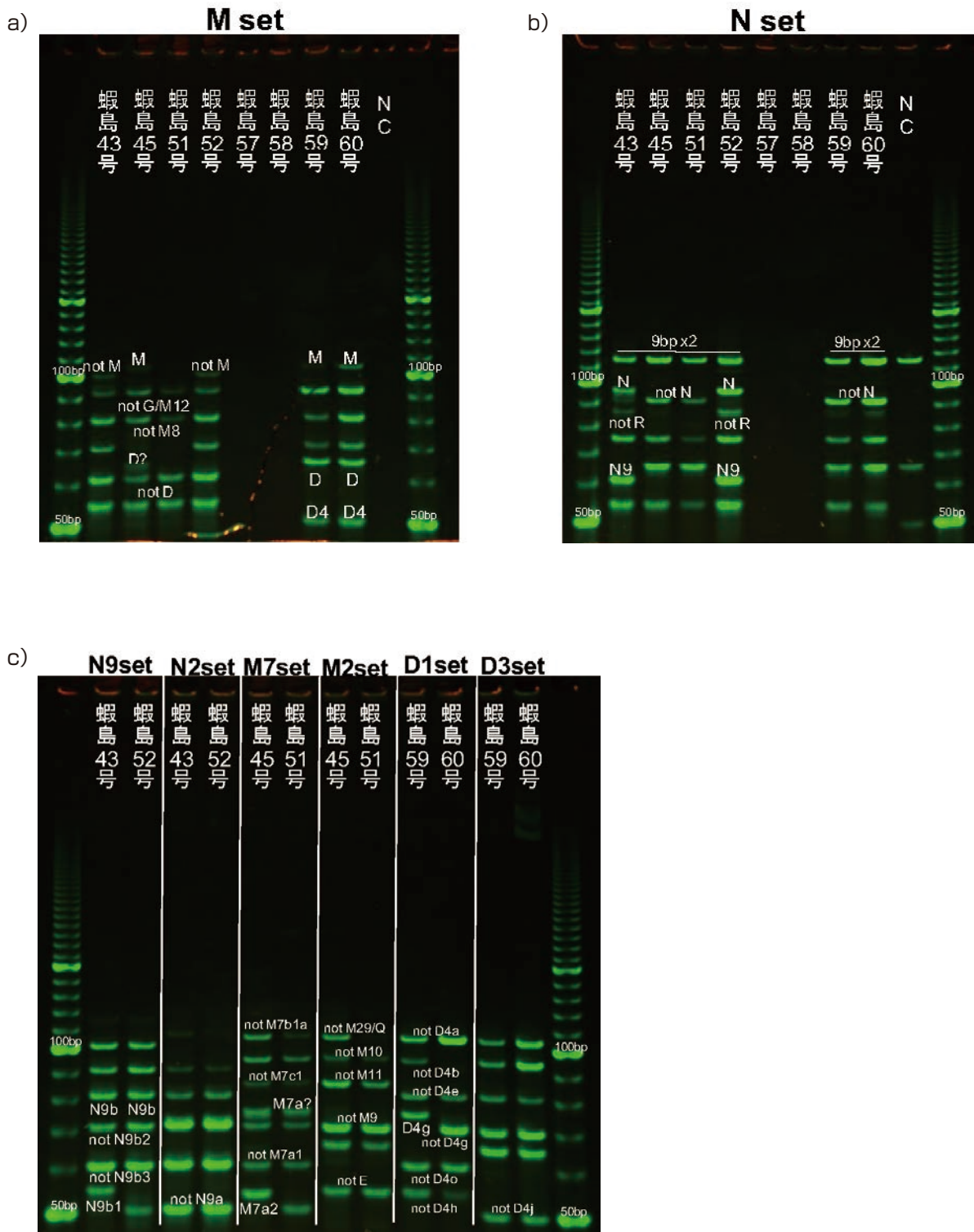


図1 APLP分析の結果
a) Mセット, b) Nセット, c) 細分APLP分析

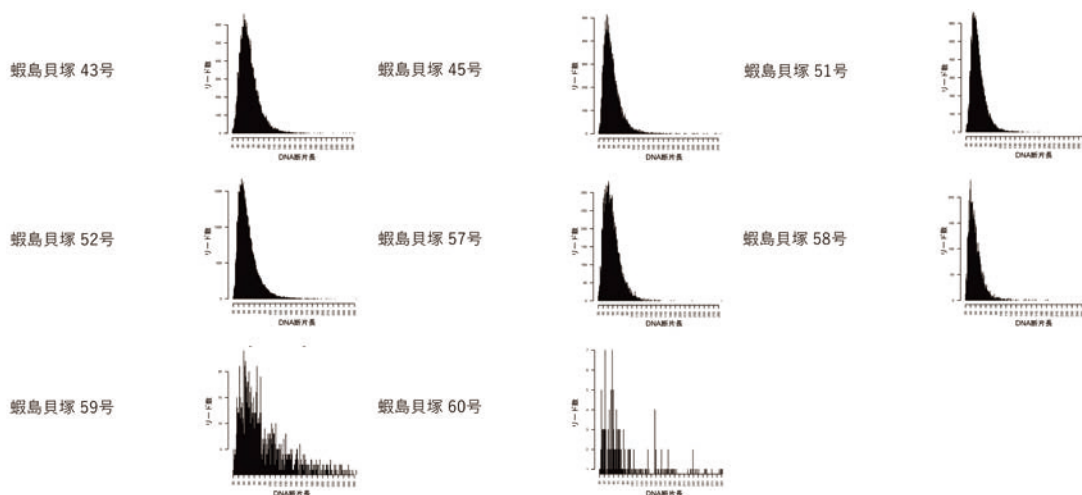


図 2 DNA 断片長の分布

表 2 ミトコンドリア DNA 分析の結果

人骨番号	総ペアリード数 [n]	フィルタリング後の MtDNA 断片数 [n]	ピークリード長 [bp]	平均深度 [x]	ミトコンドリアゲノムのカバレッジ	5' 末端 C/T 置換率	ハプログループ推定			
							APLP	Haplogrep2.0 [quality]	[1]	ハプログループ
蝦島 43	332,615	21,772	53	81.53	1.000	0.120	N9	N9b1 (0.9311)	N9b1*	N9b1*
蝦島 45	313,087	14,395	46	49.35	1.000	0.124	D?	M7a2a1 (0.9653)	M7a2a1*	M7a2a1*
蝦島 51	423,756	17,513	46	57.72	1.000	0.124	M (D, M8, G/M12 でない)	M7a+16324 (0.9388)	M7a+16324	M7a+16324
蝦島 52	459,984	51,708	46	178.02	1.000	0.100	N9	N9b (0.9339)	N9b4	N9b4
蝦島 57	386,709	11,282	44	39.69	1.000	0.144	不明	N9b1 (0.9758)	N9b1d	N9b1d
蝦島 58	381,400	4,745	40	14.23	0.998	0.153	不明	N9b2a (0.8793)	N9b2a	N9b2a
蝦島 59	394,384	1,132	75	5.99	0.992	0.010	D4	D4b2b1 (0.8840)	Contamination	判定不可
蝦島 60	412,205	201	58	1.17	0.684	0.029	D4	D (0.5707)	判定不可	判定不可

[1] Kanzawa-Kiriyama et al. [2017] の方法で判定した。C/T の程度の弱い個体は“Contamintion”と記載し、決定できなかったものは“判定不可”と記載した。

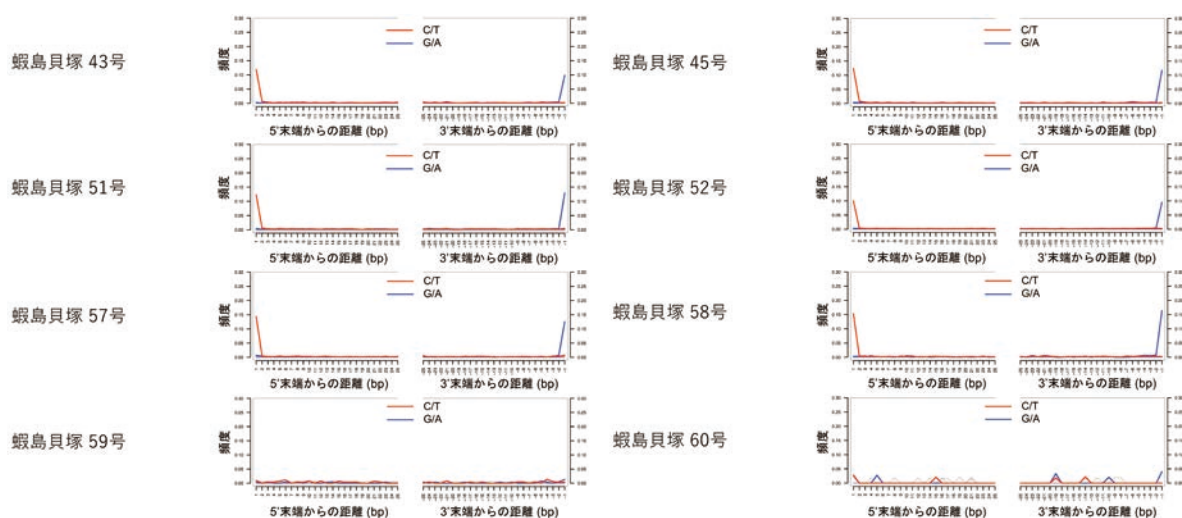


図 3 DNA 断片の末端のダメージ

キャプチャ後、ミトコンドリアゲノムにマッピングされたリードの末端の置換率を示す。横軸は末端からの距離、縦軸は各距離での置換率。リファレンスでシトシン (C)、古代 DNA でチミン (T) となる塩基置換の頻度を、末端からの距離ごとに示す。3' 末端からの場合は、リファレンスでグアニン (G)、古代 DNA でアデニン (A) となる。

含有率を調べた結果、0.6～3.7%ほどと推定された(表3)。59号および60号は、ミトコンドリアDNAハプログループ推定で判定不能であったことから、古代人に由来するDNAはほぼ含まれないと判断し、解析からは除外した。

IV. 考察

今回、形態小変異(43・45・51)、抜歯(51・52)、合葬(57・58)、および比較対象として外群2体(59・60)を選出し、ミトコンドリアDNA分析から、母系系統における血縁関係を解析した。APLP法とNGSによる分析結果が一致する個体があった一方で、一致しない個体も見られた。これは、APLP法では検出が難しいほどにDNAが断片化していた可能性を示している。また、57号と58号がAPLP法でバンドが出なかった理由としては、抽出液に残存する夾雑物により、PCR反応が阻害されたためと推測される。外群2体から結果が得られなかったが、残りの個体からはミトコンドリアDNAハプログループが推定された。着目したペアで血縁関係が期待されたが、いずれも異なるハプログループと判定され、母系系統で血縁関係に無いことが示された。これまで、埋葬小群内の埋葬個体の関係性として、小家族集団である可能性が考えられたが、少なくとも今回着目した蝦島貝塚の人骨については母系系統で血縁関係になく、他の要因を含めて検討する必要性を改めて示した。一方で、父系での血縁の可能性については、本方法では検証できておらず、課題が残る。そのため、今後は核ゲノム解析をおこない、全ゲノム情報に基づいた血縁関係を検証する必要がある。幸い、本研究でミトコンドリアDNAの結果の得られた個体は、いずれも核ゲノム解析が可能だけのヒトDNAが残存していることも確認された。

今回DNA分析した6体のミトコンドリアDNAハプログループの内訳は、ハプログループN9bが4体、M7aが2体であった。両系統はいずれも縄文人集団に広く見られ、「縄文人的遺伝子型⁽¹⁾」とされる[Adachi et al. 2009]。これらの個体は、サブハプログループのレベルでは全て異なっており、当該地域における縄文人集団の遺伝的多様性を考える上でも興味深い。北海道の縄文時代人のミトコンドリアDNAハプログループを分析したAdachi et al. [2011]は、54個体のうち実に35個体をN9bと同定したが、少なくとも12系統の異なるN9bのハプロタイプを検出している。それに基づいてAdachiらは、特定の母系系統が集中したわけでは無いと言及している。また、我々がDNA分析した熊本県宇城市三角町戸馳島の浜ノ洲貝塚の16体の縄文人骨からは、12系統の異なるミトコンドリアDNAハプロタイプを検出しており、集団内の遺伝的多様性は高かった可能性がある[神澤他 2022]。北海道船泊遺跡の縄文時代後期人骨の核ゲノム解析では、縄文人の遺伝的多様性は過去5万年間低かった一方で、内婚を示すような特徴は検出されなかったことから[Kanzawa-Kiriyama et al. 2019]、婚姻の範囲は広がった可能性が考えられる。今後、より多くの縄文遺跡でミトコンドリアDNAにおける母系系統での遺伝的多様性を検討するとともに、より膨大な情報を有する核DNAのゲノム解析からも、縄文人集団の遺伝的多様性と周辺地域との遺伝的交流について検証す

表3 ヒトDNAの含有率

人骨番号	ヒトDNA含有率(%)
蝦島43	1.10
蝦島45	2.37
蝦島51	0.68
蝦島52	3.41
蝦島57	3.68
蝦島58	0.62
蝦島59	-
蝦島60	-

る必要があろう。

謝辞

今回分析に用いた人骨のサンプリングに際し、中塚彰子氏、国立科学博物館人類研究部の坂上和弘氏に感謝致します。なお、本研究は新学術領域（研究領域提案型）「古代人ゲノム配列解析にもとづくヤポネシア人進化の解明」（代表 篠田謙一、課題番号 18H05507）を用いて実行した。

註

(1)——Adachi et al., 2009 で使われている Jomon genotype に関する神澤の訳語。

参考文献

- Adachi N., Dodo Y., Ohshima N., Doi N., Yoneda M., Matsumura H. 2003: Morphologic and genetic evidence for the kinship of juvenile skeletal specimens from a 2000 year-old double burial of the Usu-Moshiri site, Hokkaido, *Japan. Anthropological Science*. 111(3), pp.347-363.
- Adachi N., Suzuki T., Sakaue K., Takigawa W., Ohshima N., Dodo Y. 2006: Kinship analysis of the Jomon skeletons unearthed from a double burial at the Usu-Moshiri site, Hokkaido, *Japan. Anthropological Science*. 114, pp.29-34.
- Adachi N., Shinoda K., Umetsu K., and Matsumura H. 2009: Mitochondrial DNA analysis of Jomon skeletons from the Funadomari site, Hokkaido, and its implication for the origins of native American. *American Journal of Physical Anthropology*, 138: pp.255-265.
- Adachi N., Shinoda K., Umetsu K., Kitano T., Matsumura H. et al. 2011: Mitochondrial DNA analysis of Hokkaido Jomon skeletons: remnants of archaic maternal lineages at the southwestern edge of former Beringia. *American Journal of Physical Anthropology*, 146: pp.346-360.
- 藤尾慎一郎・木下尚子・坂本 稔・瀧上 舞・篠田謙一 2023: 「考古学データによるヤポネシア人の歴史の解明—2021年度の調査(2)—」『国立歴史民俗博物館研究報告』第242集. pp. 3-14.
- 春成秀爾 1973: 「抜歯の意義(1)」『考古学研究』20(2): pp.25-48.
- Kakuda, T., Shoji, H., Tanaka, M., et al. 2016: Multiplex APLP System for High-Resolution Haplogrouping of Extremely Degraded East-Asian Mitochondrial DNAs. *PLoS ONE* 11(6): e0158463.
- Kanzawa-kiriyama H., Kryukov K., Jinam T.A., Hosomichi K., Saso A. et al. 2017: A partial nuclear genome of the Jomons who lived 3000 years ago in Fukushima, Japan. *Journal of Human Genetics* 62: pp.213-221.
- Kanzawa-Kiriyama H., Jinam T.A., Kawai Y., Sato T., Hosomichi K., Tajima A., Adachi N., Matsumura H., Kryukov K., Saitou N. and Shinoda K. 2019: Late Jomon male and female genome sequences from the Funadomari site in Hokkaido, Japan. *Anthropological Science*, 127: pp.83-108.
- 神澤秀明・角田恒雄・安達 登・篠田謙一 2022: 「熊本大学医学部所蔵人骨のミトコンドリア DNA 分析」『国立歴史民俗博物館研究報告』第237集, 国立歴史民俗博物館, pp.141-156.
- 神澤秀明・角田恒雄・安達 登・篠田謙一 2023: 「兵庫県内出土縄文・弥生・古墳人骨のミトコンドリア DNA 分析」『国立歴史民俗博物館研究報告』第242集, 国立歴史民俗博物館, pp.111-121.
- 加藤久雄・松村博文 2003: 「歯冠計測値からみた下太田貝塚出土縄文人の血縁関係の推定」『財団法人総南文化財センター調査報告第50集: 千葉県茂原市下太田貝塚』, 財団法人総南文化財センター, pp.183-199.
- 松村博文・西本豊弘 1996: 「中妻貝塚出土多数合葬人骨の歯冠計測値にもとづく血縁関係」『動物考古学』6, pp.1-17.
- 西本豊弘 2008: 「血縁関係の推定—中妻貝塚の事例—」『縄文時代の考古学10』, pp.36-41.
- 篠田謙一 2008: 「縄文人骨のミトコンドリア DNA 分析」『縄文時代の考古学10』, pp.52-62.
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達 登 2017: 「佐世保市岩下洞穴および下本山岩陰遺跡出土人骨のミトコンドリア DNA 分析」『Anthropological Science (Japanese Series)』125: pp.49-63.

Takahashi R, Koibuchi R, Saeki F, Hagihara Y, Yoneda M, Adachi N, Nara T. 2019: Mitochondrial DNA analysis of the human skeletons excavated from the Shomyoji shell midden site, Kanagawa, Japan. *Anthropological Science* 127(1): pp.65-72.

山田康弘 2002: 『人骨出土例の検討による縄文時代墓制の基礎的研究 (課題番号 12710215)』平成12・13年度科学研究費補助金〔奨励研究 (A)〕成果研究報告書.

山田康弘 2003: 「埋葬頭位は社会組織を表すのか—縄文時代の人骨出土例による再検討—」立命館大学考古学論集刊行会編『立命館大学考古学論集Ⅲ』, pp.341-366.

山田康弘 2008: 『人骨出土例にみる縄文の墓制と社会』同成社.

神澤秀明 (国立科学博物館人類研究部)

角田恒雄 (山梨大学医学部法医学講座)

安達 登 (山梨大学医学部法医学講座)

篠田謙一 (国立科学博物館)

山田康弘 (東京都立大学人文社会学部)

(2022年11月21日受付, 2023年3月31日審査終了)