

論文の内容の要旨

論文題目 Genetic structure of indigenous Mesoamerican populations revealed by mitochondrial genome and analysis of ancient genome by next-generation sequencing

(ミトコンドリアゲノムから明らかになった
メソアメリカ現生人類集団の遺伝構造ならびに
次世代シーケンサによる古人骨ゲノム分析法構築と解析)

氏名 水野文月

人類集団の歴史を遺伝的多様性から解明していくことは、自然人類学において重要な主題のひとつである。現代集団の遺伝情報を分析することで、移住の歴史や異なる集団の遺伝的類似性の知見を得ることが可能である。遺跡から出土した古人骨 DNA を分析することは古代集団の遺伝的特徴を明らかにし、過去から現在に至る遺伝構造の変化の過程、すなわち人々の営みを再現する上で貴重である。

アジアを起源とし、ベーリング陸橋を渡りアメリカ大陸へ移住した人々は、その後、短期間で南アメリカ大陸の南端にまで広がったと考えられている。しかし、その拡散の過程、すなわち移住ルートや集団間の遺伝的交流に関しては現在も議論が続いている。南北アメリカ大陸を結ぶパナマ地峡への玄関口に位置するメソアメリカ (図1) は、アメリカ大陸全体へと広がった集団の移住の歴史において中継地点として重要な役割を果たしてきた。アメリカ大陸最大の古代都市テオティワカンをはじめ数々の文明が勃興し、メソアメリカ文化要素を共有してきた。

遺伝学において母系マーカーのミトコンドリアゲノムを用いた先行研究からは、メソアメリカと周辺地域 (図1) の先住民集団について「メソアメリカ」「北アメリカ南西部」「中央アメリカ南部」「南アメリカ北部」それぞれの地域内ならびに隣接する地域集団間に関する報告に限られ、これらの地域を俯瞰してメソアメリカ集団を捉えた研究は少ない。メソアメリカおよび周辺

地域の集団を広範かつ詳細に調べることで、周辺地域との遺伝的関係性や文化要素を共有するメソアメリカ内の地域特性が明らかになると期待できる。さらに、メソアメリカの遺跡から出土した古人骨DNAを分析することができれば、メソアメリカの遺伝構造に関する時系列的な変遷を直接的に知ることができる。

そこで本研究では、ミトコンドリアゲノムを用いて、現代メソアメリカ先住民集団間の遺伝的類似性を探るとともに、時系列的な変遷を古代人集団の解析から探るために必須となる新規の実験手法を構築した。

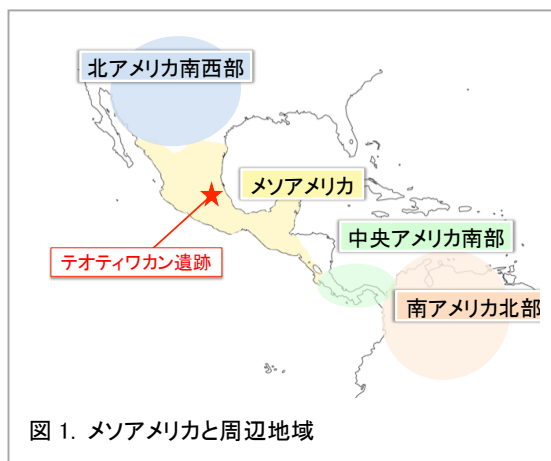


図 1. メソアメリカと周辺地域

1. メソアメリカ現生先住民集団単位でのミトコンドリアゲノム全塩基配列解析

数十万の人口を擁する2つのメソアメリカ現生先住民集団、Zapotec (サポテカ族) ならびにMazahua (マサウア族)合計113個体のミトコンドリアゲノム全塩基配列を決定した。マサウア族とサポテカ族それぞれの集団に、特異的なハプロタイプを認め、アメリカ先住民の人々はアジアを起源とする主要なハプログループA2、B2、C1、D1、さらにマイナーハプログループを含め、少なくとも15系統に分類されることが知られている。サポテカ族とマサウア族のハプログループを決定すると、112個体は主要なA2、B2、C1、D1に分類され、マサウア族の1個体はマイナーハプログループであるD4h3aに分類された。これまでに報告されているD4h3aの大部分は、南北アメリカ大陸の太平洋側海岸沿いに見られることが知られており、今回の結果はメソアメリカ地域を経由して海岸ルートを使った移動がおこなわれていたことを支持する。

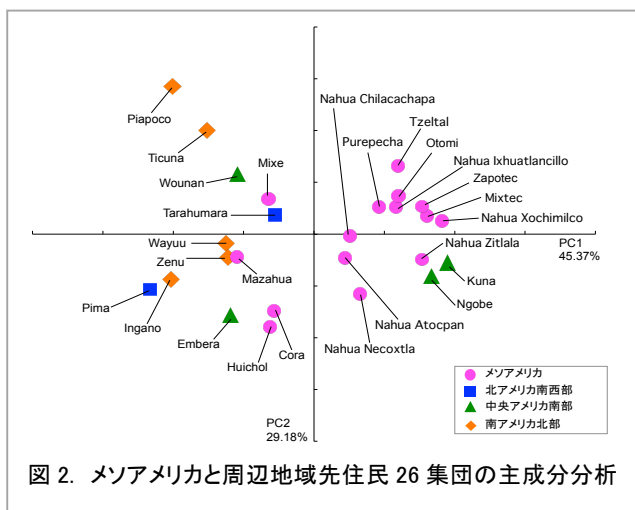


図 2. メソアメリカと周辺地域先住民 26 集団の主成分分析

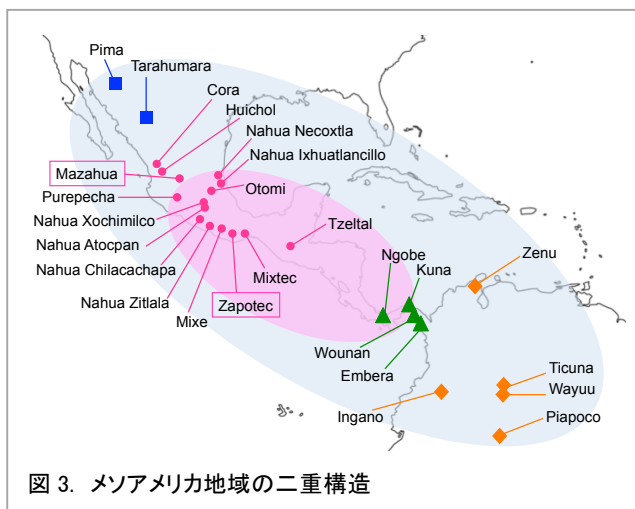


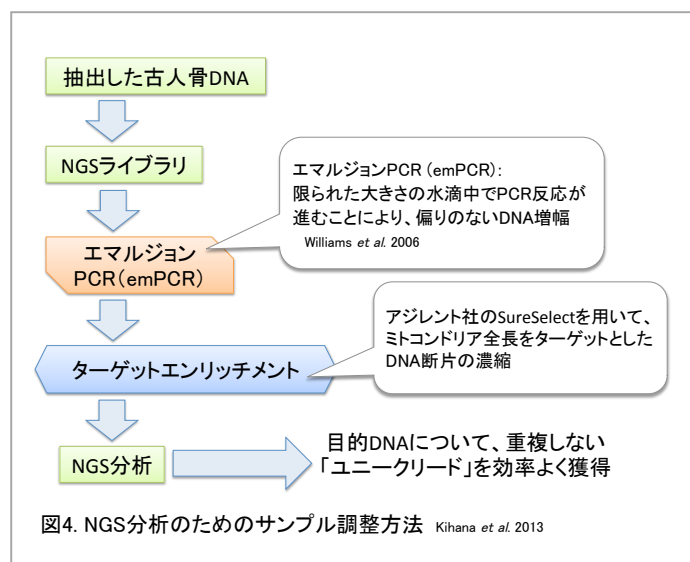
図 3. メソアメリカ地域の二重構造

次に、ハプログループ頻度を用いて、メソアメリカと周辺地域を含む先住民26集団で主成分分析をおこなった。その結果、これらの集団はメソアメリカ中心部および中央アメリカ集団のクラ

スターと北アメリカ南西部ならびに南アメリカ北部集団のクラスターに大別され、サポテカ族は前者、マサウア族は後者のクラスターに属し、遺伝的に異なる集団であることが示された(図2)。このことは、メソアメリカおよび周辺地域の集団は、北アメリカからメソアメリカを経て南アメリカへ広がるグループと、メソアメリカ中心部グループの2つの大きなグループに分けられることを示している(図3)。なお、考古学的な研究からは、メソアメリカでは8000年前には栽培化トウモロコシが確認されており、その後、北アメリカ南西部へと伝播したと考えられている。他方、中央アメリカ南部は食糧の調理や運搬に必要な土器発祥地であることに加え、南アメリカ北部では農耕をおこなう上で必要な灌漑や冶金技術などの伝達がおこなわれていたと考えられている。以上のことから、現在の遺伝構造はこのような各地域間における人々の移動や文化の伝達に伴う遺伝的交流によって形成されたと推察される。

2. 次世代シーケンサ(NGS)を用いた古代ミトコンドリアゲノム全塩基配列決定法構築

永久凍土や石灰岩層など極めて良好な保存状態の試料ではなく「普通の出土古人骨」試料では、DNAは断片化され微量しか含まれない。さらに、その99%以上は土壌菌など他生物由来のDNAである。次世代シーケンサ(NGS)により、古人骨ゲノム分析への新たなアプローチが可能になった。しかし、抽出したDNAをそのままNGS分析した場合、膨大なNGSランとデータ解析が必要となるため非常に効率が悪い。そこで、目的



とするDNA断片の濃縮(ターゲットエンリッチメント)をおこなうことで、古人骨由来の目的DNAを効率的に分析できることが期待される。他方、少量の古人骨DNAからスタートしてターゲットエンリッチ

表1. unique mapped readsの割合

Sample Name	unique mapped reads (%)	reference
Neandertal Vindija 33.25	8.91	Briggs et al. (2009)
Neandertal Feldhofer 1	5.53	Briggs et al. (2009)
Neandertal Feldhofer 2	5.53	Briggs et al. (2009)
Neandertal Sidron 1253	8.62	Briggs et al. (2009)
Neandertal Mezmaiskaya 1	38.74	Briggs et al. (2009)
Kostenki	1.14	Krause et al. (2010a)
Denisova	32.61	Krause et al. (2010b)
Yinxu(ターゲットエンリッチメント+従来のPCR)	22.7	this study
Yinxu(ターゲットエンリッチメント+emPCR)	80.1	this study

メントをおこなうためにはDNA増幅が必要である。「通常のNGSライブラリ増幅」や「Whole Genome Amplification (WGA)」のような「従来PCR法」を用いた手法が一般的であるが、検討の結果、増幅されるDNAには偏りが生じることが分かった。そこで新規に、限られた大きさの水滴内でPCR反応をおこなう「エマルジョンPCR(emPCR)」を用いたところ、偏りのないDNAを得ることができた。emPCRにより増幅した古人骨DNAに対し、ミトコンドリア全長をプローブとしてタ

ターゲットエンリッチメントをおこない、NGSによるシーケンシングをおこなった（図4）。NGS分析のための本研究のサンプル調整方法によって、普通の出土古人骨DNAからでも、目的領域にユニークにマップされるリード（unique mapped reads）を効率良く得ることができるようになった（表1）。

3. テオティワカン遺跡から出土した古人骨ミトコンドリアゲノム解析

中央メキシコ高原に位置するメソアメリカの古代都市「テオティワカン」（図1）は、1～6世紀に繁栄したアメリカ大陸最大の都市遺構で、最盛期には人口10万以上を有する巨大計画都市であった。「月のピラミッド」から出土した古人骨サンプルPPL99_3Aについて、NGSによるミトコンドリアゲノム解析をおこなった。テオティワカン遺跡の古人骨試料は、保存状態が極めて悪くDNAの劣化が進んでいることが、従来のPCR法による分析から予想された。そのためNGSによっても十分なリード数を得るのは困難であったが、ミトコンドリアゲノム全長の89.3%をユニークにマップされるリードでカバーできた。また、Depth2以上、Quality20以上の信頼性の高いサイトでカバーしたのは76.3%で、ハプログループはA2と推定することができた（図5）。

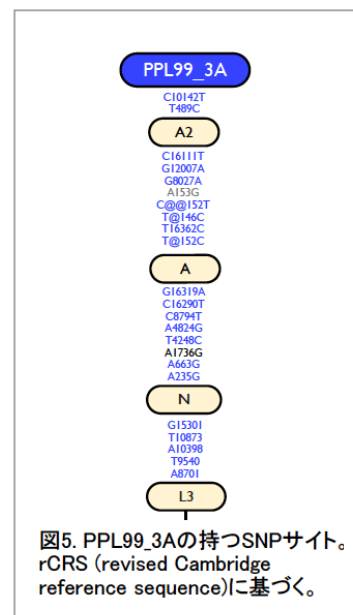


図5. PPL99_3Aの持つSNPサイト。rCRS (revised Cambridge reference sequence)に基づく。

保存が極めて悪い古人骨試料の場合、集団レベルで古人骨ミトコンドリアゲノム全配列を決定することは困難である。そこで、リードの欠けたゲノム配列をインピュテーションで補完する方法の有用性を検討した。この方法で構築される配列情報は、シングルトンはレスキューできない欠点があるが、できる限り多数個体の解析結果を不可欠とする集団レベルでの解析においては有用であると期待できる。試行の結果、頻度の高い多型サイト1箇所を除いた3930塩基をレスキューすることができ、それ以外のミトコンドリアゲノム全塩基配列をカバーすることができた。NGSでも十分な配列情報を得ることが困難な古人骨試料であっても、得られた配列情報の処理によって十分に蓋然性のある配列データを得られることが示された。

以上、本研究では、メソアメリカ現生先住民集団単位でのミトコンドリアゲノム全塩基配列決定と広範な集団の解析をおこない、メソアメリカ地域の遺伝的な二重構造を明らかにした。また、この結果を古代メソアメリカの集団遺伝学的解析によって時間軸を遡って検証するための実験と情報処理を組み合わせた有効な手法を提案した。実際におこなったテオティワカン遺跡の古人骨試料から、ミトコンドリアゲノム塩基配列を得てハプログループを推定し、さらにインピュテーションから蓋然性のある配列データを得ることができた。今後、古代ミトコンドリアゲノム集団解析を進めることで、メソアメリカ地域の時間軸を遡った遺伝構造を明らかにできることが期待される。