

宮城県北小松遺跡出土人骨の NGS によるミトコンドリア DNA 解析

相原 淳一・小野 章太郎（東北歴史博物館）
安達 登（山梨大学）・神澤 秀明（国立科学博物館）

-
- 1. はじめに
 - 2. 北小松遺跡の概要と調査人骨
-

1. はじめに

2020 年度に東北地方における縄文時代晚期から弥生時代にかけての社会変動を考える上で、人骨のミトコンドリア DNA 解析は高い有効性があると考え、山梨大学法医学講座に共同研究を申し出た。特に東北地方の縄文晩期末から弥生初頭にかけては、岩手県熊穴洞穴（岩手県立博物館 1985）の分析例（安達ほか 2008）があるのみで、宮城県大崎市北小松遺跡の集団墓に埋葬された人骨のミトコンドリア DNA 解析は東北地方における弥生時代の成り立ちを解明する大きな契機となることが期待された。

試料採取にあたり、人骨の目立たぬ部位として人と、高解像度の写真を記録として残すこと、試料採取箇所は修復すること、研究成果の公表は当館研究紀要とすることを山梨大学医学部法医学講座と協定し、共同研究を行った。

2020 年 4 月 6 日に、北小松遺跡出土人骨のミトコンドリア DNA 解析のための悉皆的な調査を行った。北小松遺跡は内陸遺跡であるだけに、人骨がかろうじて残存している状況で、ほとんどすべての人骨が分析に堪えないことが判明した。SK46 土壙墓埋葬人骨側頭骨と遊離歯の上顎左第 1 小臼歯（ヒト 44）2 点が分析に供されることとなった。

その結果、SK46 埋葬人骨からは DNA を得ることはできず、ヒト 44 からハプログループ D に属する DNA とハプログループ N9b1 の 2 種類の DNA が検出された。このことは古人骨由来の DNA と現代人による汚染 DNA の混在の可能性を示しており、さらに次世代シークエンサー（NGS, next generation

3. 出土人骨の NGS によるミトコンドリア DNA 解析

4. おわりに

sequencer）による検証が必要であることが指摘された。今回の報告はその続報である。

第 1・4 章を相原淳一、第 2 章を小野章太郎、第 3 章を安達登・神澤秀明が執筆する。

2. 北小松遺跡の概要と調査人骨

北小松遺跡は宮城県北部の大崎平野北縁部に位置し、大崎市田尻小松ほかに所在する。遺跡の位置する大崎平野北縁部では、奥羽山脈から東へ延びる清



図 1 北小松遺跡の遺構・遺物包含層の分布（晩期前葉）
※宮城県教育委員会 2021b (第 351 図) を一部改変

滝丘陵が低くなり、低丘陵が南にさらに樹枝状に伸びている。これらの低丘陵の裾部および周囲に広がる低地部に遺跡は立地する。2007年から2010年にかけて行われた発掘調査では、周辺の遺跡も含めて19地点で縄文時代晩期を主体とする遺構や遺物包含層を検出し、掘立柱建物跡や人骨を伴う土坑墓、埋葬犬骨などを多数検出するとともに、動植物遺存体などの有機質遺物を含む膨大な量の遺物が出土した（宮城県教育委員会 2021b ほか）。遺構や遺物包含層は隣接する低地部を囲むように分布し、その規模も大小さまざまである。この低地部は縄文時代当時湖沼域であり、これを囲むように多様な規模の集落が展開したと考えられる。

今回、NGSによりミトコンドリアDNA解析をおこなった人骨は、北小松遺跡D-57区西（東7地点、2009年度調査）VI i-k層（南4B層群）出土の上顎左第1小白歯（ヒト44）である（写真1）。東7地点は、湖沼に岬状に延びる低丘陵の突端部に位置する。晩期末葉には、丘陵上の広場の周りに居住・倉庫域とみられる掘立柱建物群がつくられ、さらにその周りには遺物包含層が形成される。これと重複する丘陵南斜面には土坑墓などの祭祀関連遺構が展開する。このような集落構造をもつ地点は本地域では他に確認されなかったことから、本地域における拠点的な役割をもった地点と言える。

分析に供した人骨はそれよりも下位の晩期前葉の層準から出土した資料である。本地点は、北小松遺跡とその周辺地域の遺跡では遺物が最も豊富に出土している。遺構についても、丘陵上では掘立柱建物が複数存在していた可能性があり、またその周囲で埋葬犬骨を検出するなど（図1）、晩期末葉と同様の場の機能が想定される。人骨は丘陵南斜面から出

土していることから、この想定を補強する材料となり、この時期においても、拠点的な役割をもった地点の可能性が十分に考えられる。

3. 出土人骨のNGSによるミトコンドリアDNA解析

(1) 序言

我々は、これまで、北海道および本州東部の縄文時代人のミトコンドリアDNA(mtDNA)を解析することにより、これらの地域では現代日本人では2%程度しかみられないハプログループ（ミトコンドリアDNAの遺伝子型）N9bが約半数あるいはそれ以上を占めることを明らかにしてきた¹⁻⁷⁾。しかし、縄文時代人の遺伝的データは未だ多いとはいえず、また、出土地が海岸の貝塚遺跡に集中しているため、上記の仮説を検証するためには可能な限り個体数を増加させ、分析地域を内陸部に広げる必要性がある。

昨年度の報告⁸⁾で、我々は宮城県内陸部に位置する北小松遺跡から出土した2個体の縄文人骨について APLP法³⁾を用いたmtDNA分析をおこない、ヒト44人骨の遺伝子型がN9bのサブハプログループであるN9b1である可能性を指摘した。ただし、DNAの変性が極めて高度で、かつ、現代人DNAによる試料汚染の可能性も否定できなかったことから、信頼性には不安の残る結果だった（図2・表1参照）。

近年、古人骨のDNA分析に次世代シーケンサー（NGS）という機器を用いることが普及してきている。NGSの大きな利点として、現代人による汚染DNAがどれくらい溶液中に存在しているのかを割り出すことができる。今回我々は、北小松遺跡ヒト44人骨（写真1）から昨年度に抽出したDNA溶液の残余を用いて、NGS解析をおこなう機会を得たので、結果を報告する。

(2) 試料および方法

①試料

2021年に北小松遺跡ヒト44縄文人骨の上顎左第1小白歯より抽出されたDNA溶液⁸⁾を試料として用いた。

②NGSを用いたミトコンドリアDNA解析

抽出DNAをNGSで分析するために、Rohland et al. 2015⁹⁾ の "partial uracil-DNA-glycosylase treatment"（以下、half-UDG）および "no uracil-DNA-glycosylase

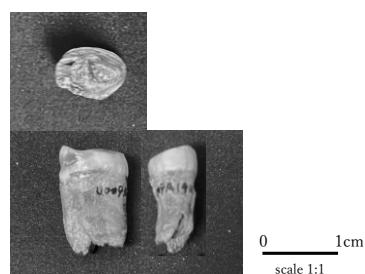


写真1 解析対象とした人骨（ヒト44）

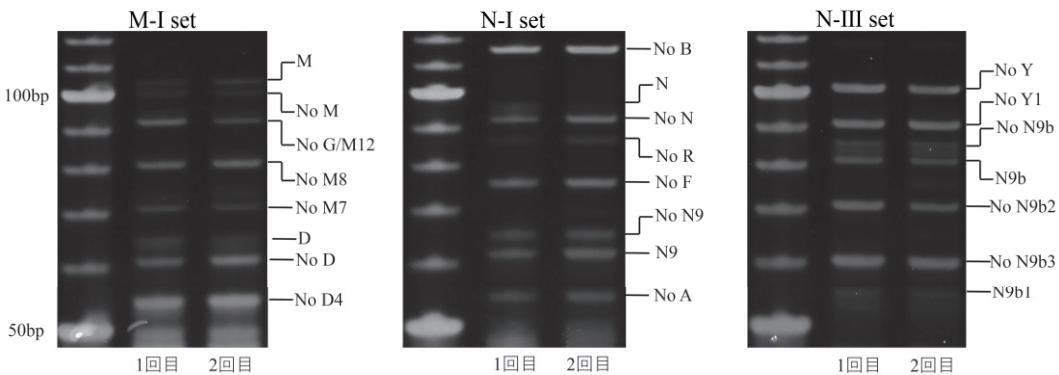


図2 北小松遺跡ヒト44のAPLP解析結果（相原・小野・安達2021）

表1 APLP法による分析結果（相原・小野・安達2021）

M- I セット	15043 (M)	14569 (G, M12)	7196 (M8)	6455 (M7)	5178 (D)	3010 (D4)
標準塩基配列 ^(a)	G	G	C	C	C	G
変異型	A	A	A	T	A	A
SK-46	増幅なし	増幅なし	増幅なし	増幅なし	増幅なし	増幅なし
ヒト44	GとAの混合	G	C	C	CとAの混合	G

N- I セット	9bp deletion (B)	10873 (N)	12705 (R)	6392 (F)	5417 (N9)	4248 (A)
標準塩基配列 ^(a)	欠損なし	C	T	T	G	T
変異型	欠損あり	T	C	C	A	C
SK-46	増幅なし	増幅なし	増幅なし	増幅なし	増幅なし	増幅なし
ヒト44	欠損なし	CとTの混合	T	T	GとAの混合	T

N- III セット	14178 (Y)	3834 (Y1)	13183 (N9b)	16294 (N9b2)	14996 (N9b3)	12501 (N9b1)
標準塩基配列 ^(a)	T	G	G	C	G	G
変異型	C	A	A	T	A	A
SK-46	増幅なし	増幅なし	増幅なし	増幅なし	増幅なし	増幅なし
ヒト44	T	G	GとAの混合	C	G	A

a) Reconstructed Sapience Reference Sequence^[15]

treatment"（以下、no-UDG）の方法に一部修正を行い、NGS分析用ライブラリの作成を行った。作成後のDNAライブラリは、MYbaits Expert Mito (H. sapiens Representative Global Diversity Panel) (Daicel Arbor Biosciences社)にてミトコンドリアDNAを濃縮し、MiSeq (Illumina社)にて150塩基ペアエンドでシークエンスした。得られたDNA配列データの解析は、篠田ら2017^[10]の方法に一部修正を加えて行った。取得したミトコンドリアゲノムデータの信頼性を確認するために、古代DNAに見られるDNA配列のシトシン塩基末端部の脱アミノ化および低断片化の有無を検証した。

続いて、ミトコンドリアDNAのハプログループを決定するためにSNPs（一塩基多型、single nucleotide polymorphisms）の検出を行った。検出されたSNPsからPhyloTree-Build 17 (van Oven and Kayser 2009)^[11]を参照してハプログループを判定し、また、HaploGrepソフトウェア(2.1.14) (Weissensteiner et al. 2016)^[12]によるハプログループ推定も合わせて行った。最後に、判定されたハプログループの結果をAPLP法で得られた結果と比較した。最後に、決定したハプログループの信頼性を確認するために、Kanzawa-Kiryama et al. 2017^[13]の手法を用いて現代人DNAによる汚染率を推定した。

(3) 結果

今回、残存する DNA が極少量だったため、可能な限り多くのデータを得るべく合計 3 つの DNA ライブラリを作成し、ミトコンドリアゲノムのターゲットエンリッチメントを実施した。それにより、ミトコンドリアゲノム由来の DNA 断片配列が 1,343 配列分得られた。得られた断片配列が古代人に由来するかを調べるために、その長さおよび C/T、G/A の置換率を調べた。古代人の DNA であれば、経年変化によって DNA 断片の長さは短くなり、さらに、断片の末端部分には、脱アミノ化の結果としての C(シトシン)から T(チミン)、および G(グアニン)から A(アデニン)への、塩基配列の変化が多くの断片で観察されることになる。今回の結果についても、リード長のピークは 40 ~ 55 bp と非常に短く（図 3）、また古代 DNA の特徴である C/T、G/A の置換も明瞭にみられた（図 4）。

以上の結果から、得られた DNA 配列には、この個体が本来持っていたものであるものを含むと判断された。続いて、現代人 DNA の混入による汚染率を推定したところ、汚染の割合は低いことが確認された (0.031 [0-0.171])。そのことから、取得データは基本的に古人骨由来であり、現代人による汚染の影響は、あったとしても限られると言える。

取得データに基づいて推定されたミトコンドリア DNA ハプログループは N9b1 であったが、現在までに報告されている N9b1 の 3 つのサブハプログループ (N9b1a, N9b1b, N9b1c) のいずれにも分類されないものであった。また、ハプログループを規定する遺伝子変異の他に、北小松遺跡ヒト 44 は、16248 番目の塩基がヒト標準塩基配列¹⁴⁾におけるシトシンから、チミンに変異していた。

(4) 考察

今回の NGS を用いた解析によって、北小松遺跡ヒト 44 から抽出した DNA に現代人 DNA 汚染の影響はほとんどみられないことが明らかとなった。また、昨年度の APLP 解析⁸⁾でみられた結果の不明瞭さは、DNA の高度の変性に起因することが証明された。さらに今回、ヒト 44 の mtDNA ハプログループは N9b1 であり、しかも現在までに報告されている N9b1 の 3 つのサブハプログループ (N9b1a, N9b1b, N9b1c) の

いずれにも分類されないものであることが明らかとなった。以上の結果は、古人骨 DNA 解析における NGS の有用性を明白に示すものである。上記の通り、今回ヒト 44 から得られた mtDNA のハプログループはこれまで報告例のないものだが、今後縄文人骨の遺伝的解析を積み重ねていくことで、同様の遺伝子型を持つ個体が出現する可能性は十分ある。

試料中の DNA の状態が極めて不良であるため、残念ながらヒト 44 については核 DNA の分析まではおこなうことができなかった。しかし今後、東北地方の内陸部から DNA の保存状態の良い縄文時代人骨が発掘され、核 DNA の分析をおこなうことが出来れば、東北地方沿岸部と内陸部の縄文時代人の遺伝的比較が可能となり、縄文時代人の遺伝的特徴について新しい知見を加えることができるものと考えられる。

4. おわりに

当初目的とした縄文晩期末葉から弥生前期にかけてのミトコンドリア DNA 解析は、埋葬人骨の遺存状況が良好ではなく、見送らざるを得なかった。

一方、縄文晩期前葉のヒト 44 はハプログループ N9b1 に属することが明らかとなった。N9b は沿海州先住民集団に特徴的な北方系要素とされ、宮城県内では青島貝塚 3 個体・里浜貝塚 3 個体の 6 個体中、N9b3 個体、M7a (大陸南部・東南アジア島嶼部の南方系) 2 個体、D4b (中国東北部から朝鮮半島) 1 個体の検出例 (安達ほか 2008) に貴重な 1 例を加えることができた。

縄文時代後期中葉ころの気仙沼市前浜貝塚出土人骨からの DNA 調査では、分析に耐える DNA を採取することはできなかつたが、ヒト・イヌの食性分析では興味深い結果が得られた。ヒトは陸獣動物に近く、イヌは海産魚類に近い点が指摘され、前浜貝塚のイヌの飼育には、魚のアラなど北方諸民族の飼育法に近いことが指摘された (相原ほか 2013)。

日本人の起源を考える上で、今後ともミトコンドリア DNA 解析は重要な方法であり、さらに多方面からの自然科学分析を加えることによって、より確実性が担保されることは言を俟たず、今後の学際的な展開を期待したい。

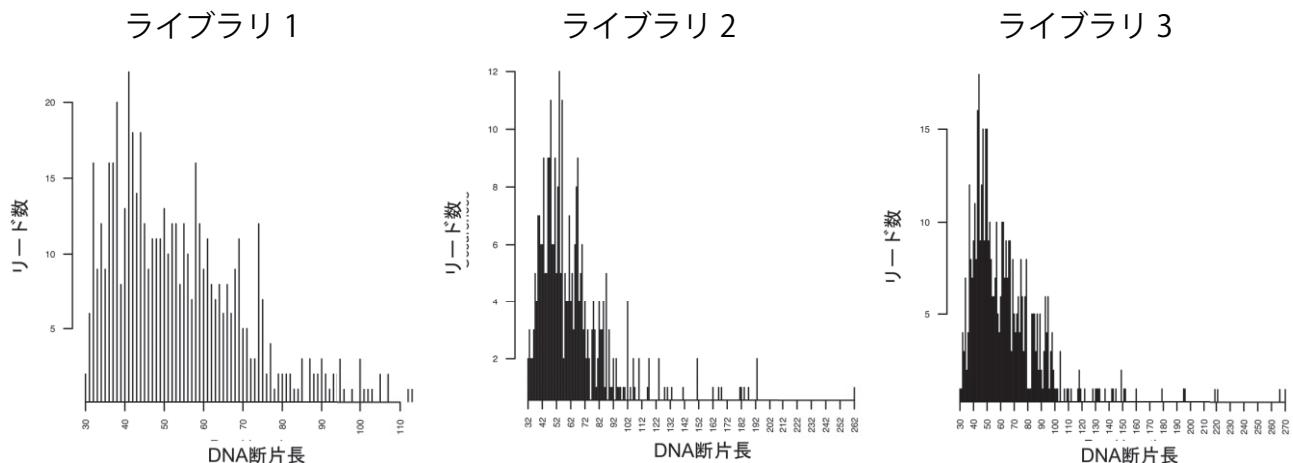


図3 DNAの断片長

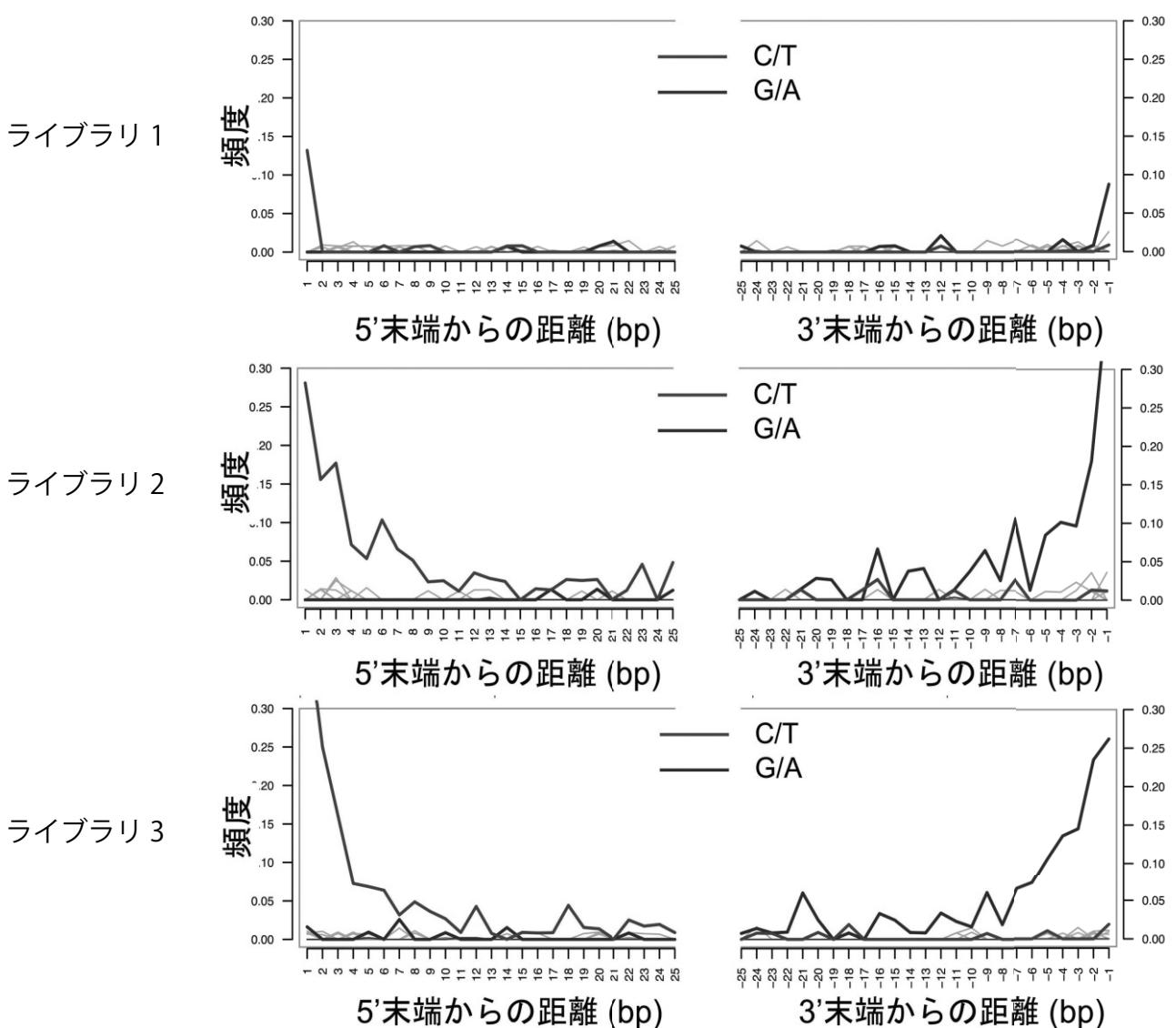


図4 DNA変性の状況

最後に、試料とした人骨は2021年4月28日に東北歴史博物館に返却されたことを付記する。

【註】

- 1) 安達 登・篠田謙一・梅津和夫 2009「ミトコンドリアDNA多型からみた北日本縄文人」『DNA多型』vol.17, 265-269

- 2) Adachi N, Shinoda K, Umetsu K, 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: 346-360.
- 3) Kakuda T, Shojo H, Tanaka M, et al. 2016. Multiplex APLP system for haplogrouping extremely degraded East-Asian mtDNAs. *PLoS ONE* 11 (6): e0158463.
- 4) 佐伯史子・安達 登・米田 積, 他 8 名 2016 「大船渡市野々前貝塚縄文時代人骨の形態人類学的および理化学的分析」『Anthropological Science (Japanese series)』 124 -1, pp.1-17.
- 5) 安達 登 2018 「神明貝塚出土人骨についてのミトコンドリア DNA 解析」『埼玉県春日部市神明貝塚包括報告書』春日部市埋蔵文化財発掘調査報告書第 20 集 pp.214-216, 春日部市教育委員会
- 6) 安達 登 2018 「野々前貝塚および長谷堂貝塚群第 14 次調査出土人骨の DNA 分析」『岩手県大船渡市長谷堂貝塚群平成 26 年度緊急発掘調査報告書』 pp.199-201, 大船渡市教育委員会
- 7) Takahashi R, Koibuchi R, Saeki F, et al. 2019. Mitochondrial DNA analysis of the human skeletons excavated from the Shomyoji shell midden site, Kanagawa, Japan. *Anthropological Science* 127 (1): 65-72.
- 8) 相原淳一・小野章太郎・安達 登 2021 「宮城県大崎市北小松遺跡出土人骨についてのミトコンドリア DNA 解析」『東北歴史博物館研究紀要 22』 pp.37-42, 東北歴史博物館
- 9) Rohland N., Harney E., Mallick S., et al. 2015. Partial uracil-DNA-glycosylase treatment for screening of ancient DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370 (1660): 20130624.
- 10) 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)』 Vol.125 , pp. 49-63
- 11) Van Oven M, Kayser M. 2009. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 30 (2): E386-E394. <http://www.phylotree.org>
- 12) Weissensteiner H, Pacher D, Kloss-Brandstatter A, Forer L, Specht G, et al. 2016. HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res* 44: W58-63. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw233>
- 13) Kanzawa-Kiryama H, Kryukov K, Jinam TA, 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.
- 14) Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, et al. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 23:147.
- 15) Behar D, Van Oven M, Rosset S, Metspalu M, Loogväli EL, Silva NM, et al. 2012. A "Copernican" reassessment of the human mitochondrial DNA tree from its root. *American Journal of Human Genetics* 90, pp. 675-684
- 【引用参考文献】
相原淳一・須藤 隆・百々幸雄・五十嵐由里子・安達 登・西本豊弘・金憲夷・小林正史・早瀬亮介 2013 「宮城県気仙沼市前浜貝塚の学際的研究－東北地方における縄文時代の葬制－」(『SAITO HO-ON KAI MUSEUM OF NATURAL HISTORY RESEARCH BULLETIN』 No.77 (separate volume), 齋藤報恩会自然史博物館
伊東信雄 1957 「古代史」『宮城県史』第 1 卷, 宮城县
安達 登・篠田謙一・梅津和夫 2008 「縄文人に遺伝的地域差は存在するのか—北海道縄文人と東北縄文人の比較—」『DNA 多型』第 16 号, pp.287-290, 日本 DNA 多型学会
岩手県立博物館 1985 『熊穴洞穴遺跡発掘調査報告書－岩手県東山町一』 岩手県立博物館調査研究報告書 第 1 冊, 岩手県立博物館
興野義一 1958 「迫川流域の石器時代文化」『仙台郷土研究』第 18 卷第 3 号, pp.20-30, 仙台郷土研究会
篠田謙一 2012 「DNA による日本人の形成－ミトコンドリア DNA と Y 染色体」『季刊考古学』第 118 号, pp.79-84, 雄山閣
宮城県教育委員会 2005 「北小松遺跡」『壇の越遺跡ほか』 pp.67-72, 宮城県文化財調査報告書第 202 集
宮城県教育委員会 2008 『北小松遺跡ほか－平成 19 年度発掘調査概報－』 宮城県文化財調査報告書第 216 集
宮城県教育委員会 2010 『北小松遺跡ほか－田尻西部地区ほか整備事業に係る平成 19 年度発掘調査報告書－』 宮城県文化財調査報告書第 223 集
宮城県教育委員会 2011 『北小松遺跡－田尻西部地区ほか整備事業に係る平成 20 年度発掘調査報告書－』 宮城県文化財調査報告書第 226 集
宮城県教育委員会 2014 『北小松遺跡－田尻西部地区ほか整備事業に係る平成 21 年度発掘調査報告書－』 宮城県文化財調査報告書第 234 集
宮城県教育委員会 2021a 『北小松遺跡－田尻西部地区ほか整備事業に係る平成 22 年度発掘調査報告書－』 宮城県文化財調査報告書第 254 集
宮城県教育委員会 2021b 『北小松遺跡ほか－田尻西部地区ほか整備事業に係る発掘調査総括報告書－』 宮城県文化財調査報告書第 255 集