

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32661
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：20K15884
研究課題名（和文）列島日本人形成の解明：旧石器時代人のゲノム分析

研究課題名（英文）Genome Analysis of Paleolithic people

研究代表者

水野 文月（MIZUNO, Fuzuki）

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：50735496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：旧石器時代人、早期ならびに前期縄文時代人のミトコンドリアゲノムの全長配列を解読した。得られたすべての縄文時代人ミトコンドリアDNA配列は現代日本人配列クラスターに含まれ、縄文時代人と現代日本人の間では連続性が見られた。一方、港川人のもつ配列を直接的な祖先とする現代人は存在せず、港川人から現代日本人への直線的連続性は見られなかった。なお、予想以上に港川人のDNA保存状態は厳しく、系統解析をするに十分な核ゲノムデータ量は得られなかったが、一定量以上の次世代シーケンス・リード配列は得られた。そこで、確度の高い性別判定方法を新たに開発し、港川1号は男性であるとのゲノム判定結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出アフリカを果たした現代型ホモサピエンスが日本列島に到達したのは数万年前の後期旧石器時代であるが、酸性土壌が多い日本列島では骨などが残り難いだけでなく、人骨に残されたDNAへのダメージも大きい。このため、日本列島旧石器時代人骨のゲノム情報は皆無であったが、本研究によって、そのミトコンドリアゲノムの全長配列解読が初めて成し遂げられた。また、一定量以上の次世代シーケンス・リード配列が得られたことで、ゲノム情報に基づく性別判定も成し遂げられた。これは、“最初の列島日本人”である旧石器時代人の全ゲノム解明への第一歩となる成果であり、列島日本人を体系的に理解するための始点に到達した学術的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We sequenced the complete mitochondrial genomes of Paleolithic, Initial and Early Jomon individuals. All Jomon mitochondrial DNA sequences obtained were included in the modern Japanese sequence cluster, and continuity was observed between Jomon and modern Japanese. On the other hand, there were no modern humans with direct ancestors from the Minatogawa 1, and no linear continuity from Minatogawa 1 to modern Japanese was observed. In addition, the DNA preservation of Minatogawa 1 was more severe than expected, and the amount of nuclear genome data sufficient for phylogenetic analysis was not obtained, but more than a certain amount of next-generation sequencing and lead sequences were obtained. Therefore, we developed a new method for sex determination with high accuracy, and obtained a result that Minatogawa 1 was male.

研究分野：古代ゲノム

キーワード：列島日本人 古代ゲノム 旧石器時代 性別判定

1. 研究開始当初の背景

アフリカを出た現代型ホモ・サピエンスは4万～3万5千年頃前に日本列島に到達した。日本列島人は、石器や土器などの文化的要素を指標として、旧石器時代人・縄文時代人・弥生時代人等々と時代軸に沿って区分されている。形態学的差異に基づくそれぞれの時代人の類縁性分析の研究の歴史は長いが、遺伝的な分析は限られたDNA領域の類縁性に関する研究が主体であった。10年ほど前に次世代シーケンサが開発されたことを契機に、古人骨から抽出したDNAの塩基配列を大量に得ることが可能となり、縄文時代の後期から晩期、弥生時代後期の古人骨ゲノムデータが発表されている。その結果、縄文時代人と弥生時代人との関係が、形態学的特徴から類型された在来系(縄文系)弥生人と渡来系弥生人との遺伝的相違と共に、明らかにされつつある。一方、旧石器時代人と縄文時代人との遺伝的関係の解明には障壁があった。ヨーロッパと比較して高温多湿なアジアの気候に加えて、酸性土壌に覆われた日本列島では古人骨の残りが悪い。加えて、かろうじて残った古人骨に含まれるDNAの残存状況は劣悪である。残存しているDNA量が極めて微量で、得られたDNAは断片化が進んでおり(短いDNA断片しか得られない)、化学修飾(脱アミノ化など)を受けている等が原因である。しかし、日本列島人の系譜を辿るためには、旧石器時代人のゲノム情報、そして、その後続く縄文時代人との遺伝的関係を明らかにすることは不可欠である。

本課題代表者である水野は、港川人のDNA分析では、次世代シーケンサをもちいた実験手法に様々な改良を重ねることで、ミトコンドリアDNAの全長配列を得ることに成功した。その後も得られた結果の再現性検証を重ねることで、“信頼度の高い旧石器時代人のミトコンドリアDNA塩基配列の全長”を明らかにした。その結果、港川人のミトコンドリアのハプロタイプは、ハプログループMの共通祖先型(祖型)であることが明らかとなった。この配列は、3000人以上の現代日本人ならびに2万人以上の現代中国人のどちらにも一致する配列(ハプロタイプ)はなく、また、データベースに登録されている全世界の現代人のどれとも一致していなかった。一方、同じく全塩基配列が決定された日本列島各地の様々な時期(早・前・中・後・晩期)の縄文時代人のミトコンドリアDNAは、現代日本人のサブハプログループのクラスターに含まれており、縄文時代人と現代日本人の間では連続性が見られた。他の様々な分子系統学的解析によって、港川人のもつ配列を直接的な祖先とする現代人の配列が存在しないこと、すなわち、港川人から現代日本人への連続性は見られない(港川人のDNAは縄文人にも現代日本人にも引き継がれていない)との結果を得た(これらの研究成果は本課題申請時には論文としては未発表であったが、その後、査読付オープンアクセスの論文として発表)。

港川人のミトコンドリアDNAは、ハプロタイプとしては現代日本人に受け継がれていない(残されていない)“消失したハプロタイプ”であったが、同様の報告として、4万年前の後期更新世の地層から出土した田園洞人(中国)が知られている。田園洞人のミトコンドリアDNA配列は、ハプログループBの共通祖先型(祖型)に独自の塩基置換を複数加えた配列であった。田園洞人と同一の配列ならびに田園洞人の配列から派生するミトコンドリアDNA配列は、2万人以上の現代漢民族集団にも存在していなかった。その後、田園洞人は現在の東アジアならびに東南アジアの人々の直接的な祖先ではないことが、ミトコンドリアゲノムだけでなく核ゲノムの分析によっても示されている。

最終氷期が終わり、温暖化が進んだ後期更新世のこの時代は、世界規模で様々な動物の生存にとって厳しい時代であることが報告されている。このような環境変動が人類へ与えた影響、特にアフリカ後の人類の拡散と適応にどのような影響を及ぼしたのかを知るアプローチとして集団内多様性は良い手がかりである。一方、日本列島においては1万ヶ所を超える旧石器時代の遺跡の存在が知られているが、残された人骨は極めて限られていた。加えて、そのわずかな残された人骨のDNAの保存状態は厳しいことは、港川人のミトコンドリアゲノムが解読できていたとはいえ困難が予想された。

2. 研究の目的

本課題は、日本列島旧石器時代人の核ゲノム情報解読を目的とする。それにより、旧石器時代港川人のミトコンドリアゲノム解読によって明らかにされた「旧石器時代人から(縄文時代人、そして現代日本人)への遺伝的不連続性」が、母系遺伝形質であるミトコンドリアゲノムだけでなく、父母両系からの遺伝形質である核ゲノムにおいても同様であるのか、すなわち、列島日本人の形成における旧石器時代人の位置付けを明らかにすることが可能になるからである。日本列島人の系譜に関して、かつては旧石器時代人から縄文時代人、そして弥生時代人と、連続的であると考えられていた。しかし、土井ヶ浜遺跡発掘を契機に、弥生時代人は渡来系と在来系(縄文系)の2系があることが形態人類学的研究により明らかにされた。そして今、分子人類学的研究により、旧石器時代人から縄文時代人(そして現代日本人)への遺伝的不連続性が示された。本課題では、港川人の核ゲノム情報解析を実施することで、(1)後期更新世に日本列島に渡って

きた旧石器時代人とはどのような遺伝的特徴をもっていたのか、(2)北東ならびに東アジアの後期更新世時代人とはどのような遺伝的類縁性をもっていたのか、を明らかにする。加えて、次世代シーケンスを単に利用するのではなく、高温多湿に加えて酸性土壌で、悪条件の日本列島から出土した古人骨DNAに最適化した研究方法を確立する。これによって得られる研究成果は、独自性と創造性の両面で、列島日本人の系譜解明に新たな局面を切り拓くものである。これは同時に、中国・田園洞人のミトコンドリアゲノムならびに核ゲノムの分析によって示された「現代の東アジア大陸ならびに東南アジアの人々の直接的な祖先ではない後期更新世人の存在」が日本列島を含めたアジア広範で起こっていたのかの検証でもある。なおこれまで、日本列島旧石器時代人のゲノム情報は、前述のミトコンドリアゲノム(ミトコンドリアDNA全塩基配列情報)解読を除いて、先例は皆無であった。このような状況の下で、日本列島旧石器時代人の核ゲノム解読を目指すことは極めて挑戦的ではあるが、部分的であれ成功したことによって得られる科学的知見の意義は大きいと考える。

3. 研究の方法

本課題では、研究経費の大部分を次世代シーケンス大規模ランに用いることで、情報解析に必要とされる港川人核ゲノム情報を得る。具体的には、少なくともデプス10以上を得ることを目標とした。この値は現代人核ゲノム解析で基準とされるデータのデプス値(30~35)からすると少ないが、古人骨核ゲノム論文で報告されている(北東ならびに東南アジアを含めた)東アジアの後期更新世時代人の核ゲノム情報量(デプス)と比べると、遥かに上回る値である。このデータ量の港川人核ゲノム情報をもちて、東アジアの後期更新世時代人、縄文時代人(早期から晩期)、そして、日本人を含む現代アジア諸集団を含めて、主成分分析・ADMIXTURE解析・f3解析などの分析をおこなう。相互の遺伝的類縁関係・共有する遺伝情報の様相と割合・共有する遺伝情報の時間軸的变化の様相などに関して得られる結果などから、旧石器時代人・港川人の姿、そして、港川人が示した「旧石器時代人から縄文時代人への遺伝的不連続性」が母系遺伝形質であるミトコンドリアに特異的であるのか、父母両系遺伝形質である核ゲノムにおいても同様であるのか、を明らかにする。

なお、考古学的知見から区分された縄文時代であるが、年代的には1万年以上にわたる。その1万年以上にわたる人々をひとくくりに「縄文時代人」とする科学的な妥当性(根拠)は示されていない。したがって、旧石器時代人から縄文時代人への遺伝的不連続性/連続性を論じるためには、多様な縄文時代人骨との比較が不可欠である。しかしながら、縄文人データのほとんどは後晩期縄文時代人骨に偏っていた。そこで本課題では、早期ならびに前期の縄文人骨のミトコンドリアゲノムならびに核ゲノム分析を並行しておこなう。

4. 研究成果

ミトコンドリアゲノムの全塩基配列を得ることに成功した旧石器時代・港川人骨のDNAを用い、核ゲノム解読のための大規模なショットガンシーケンスを実施したが、少ないデータ量しか得られなかった。そこで、核ゲノム情報のうち、系統解析での主要なマーカーとして用いられている一塩基多型(SNP)部位を対象を絞り、ターゲット・エンリッチメント法による濃縮を組み合わせた大規模シーケンスを実施した。配分予算で可能な範囲の大規模シーケンスを多数回(10ラン以上)実施したが、予想していた以上にDNAの保存状態は厳しく、一塩基多型(SNP)情報を用いた系統解析をするに十分なデータ量(目標としていたデプス10以上の核ゲノム情報)を得られなかった。

一方で、一定量以上の次世代シーケンス・リード配列が得られたので、ゲノム情報に基づく性別判定(性染色体XならびにYにマッピングされる次世代シーケンス・リード数の比に基づく方法での識別)を実施した。なお、従来の方法では古人骨の性別判定の根拠が曖昧であるため、統計学的な基準を導入した確度の高い性別判定方法を新たに開発した(論文査読中)。この新たな性別判定法により港川人は男性であると判定され、その結果は骨形態により推測されていた性別結果と同一であった。

本課題の背景である「港川人から現代日本人への連続性は見られない(港川人のDNAは縄文人にも現代日本人にも引き継がれていない)」との研究成果は論文未発表であったが、原著論文として査読付オープンアクセスの論文として発表した。また、本課題の参照データとして重要な意味を持つ早期ならびに前期の縄文人骨(複数個体)のミトコンドリアゲノム(全塩基配列)解読を成功した研究成果は、その一部は既に査読付オープンアクセスの論文として発表済みであり、他の一部は査読付オープンアクセスの論文として受理・印刷中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Mizuno F., Taniguchi Y., Kondo O., Hayashi M., Kurosaki K., and Ueda S. | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 Diversity in matrilineages among the Jomon individuals of Japan | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Human Biology | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 水野 文月 | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Ancient DNA studies of human remains | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 文明動態学 | 6. 最初と最後の頁 46～55 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18926/64202 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Mizuno, F., Gojobori, J., Kumagai, M., Baba, H., Taniguchi, Y., Kondo, O., Matsushita, M., Matsushita, T., Matsuda, F., Higasa, K., Hayashi, M., Wang, L., Kurosaki, K., and Ueda, S. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Population dynamics in the Japanese Archipelago since the Pleistocene revealed by the complete mitochondrial genome sequences | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1-11 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91357-2 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 水野文月 | 4. 巻 764 |
| 2. 論文標題 旧石器時代人のゲノム分析 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 月刊考古学ジャーナル | 6. 最初と最後の頁 31-34 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Mizuno F, Naka I, Ueda S, Ohashi J, Kurosaki K. | 4. 巻 49 |
| 2. 論文標題 The number of SNPs required for distinguishing Japanese from other East Asians | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Legal Medicine | 6. 最初と最後の頁 101849 ~ 101849 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2021.101849 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Mizuno F, Taniguchi Y, Kondo O, Hayashi M, Kurosaki K, and Ueda S. | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 A study of 8,300-year-old Jomon human remains in Japan using complete mitogenome sequences obtained by next-generation sequencing | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Human Biology | 6. 最初と最後の頁 555-559 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03014460.2020.1797164 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

[学会発表] 計6件(うち招待講演 4件/うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 水野文月 |
| 2. 発表標題 港川旧石器時代人と土井ヶ浜弥生時代人の古代人ゲノム |
| 3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会第28回日本遺伝子診療学会大会合同開催(招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 水野文月、谷口康浩、近藤 修、石谷孔司、林美千子、山田孝、植田信太郎、黒崎久仁彦 |
| 2. 発表標題 群馬県居家以岩陰遺跡から出土した縄文早期人骨の親族関係 |
| 3. 学会等名 日本DNA多型学会第30回学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 水野文月 |
| 2. 発表標題 居家以岩陰遺跡出土人骨のDNA分析 |
| 3. 学会等名 第76回日本人類学会大会・第38回日本霊長類学会連合大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 水野文月、植田信太郎 |
| 2. 発表標題 姥山貝塚ならびに加首利貝塚出土人骨のDNA分析 |
| 3. 学会等名 第76回日本人類学会大会・第38回日本霊長類学会連合大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 水野文月、植田信太郎、日笠幸一郎、松田文彦、黒崎久仁彦 |
| 2. 発表標題 ゲノムワイドデータからおこなう性別判定 |
| 3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 水野文月、植田信太郎 |
| 2. 発表標題 DNA分析が明らかにする縄文早期人の系統関係 |
| 3. 学会等名 日本第四紀学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計3件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 谷口康浩、大日方一郎、茅原明日香、近藤修、米田穰、尾寄大真、大森貴之、植田信太郎、水野文月 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 六一書房 | 5. 総ページ数 150 |
| 3. 書名 居家以人骨の研究1 早期縄文人の社会と葬制 | |

| | |
|-----------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 坂詰秀一、松原典明 分担：黒崎久仁彦、水野文月 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 雄山閣 | 5. 総ページ数 332 |
| 3. 書名 近世大名の葬制と社会 | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 森良和、フレデリック・クレインス、小川秀樹 分担：水野文月 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 玉川大学出版部 | 5. 総ページ数 340 |
| 3. 書名 三浦按針の謎に迫る | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|