

平成30年 5月28日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07240

研究課題名(和文) 西日本出土古人骨に対するゲノム解析の可能性調査

研究課題名(英文) A feasibility study for genome analysis of ancient human skeletons excavated from the western part of Japan

研究代表者

佐藤 丈寛 (Sato, Takehiro)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：10558026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の起源を探るには先史時代人骨からゲノム情報を取得し、集団の遺伝的特徴の時間変化を知ることが重要である。本研究では、日本列島の中で古人骨ゲノムデータが不足している関西から琉球列島にかけての遺跡から出土した古人骨について、ゲノム解析に耐えうるDNAの保存状態を有している試料の選別を試みた。

古人骨からDNAを抽出するためには数百mgの骨粉が必要となるが、そのような試料の大きな破壊を伴わずにDNAの保存状態を推測するため、まずアスパラギン酸のラセミ化率を測定した。ラセミ化率が良好な値を示した試料のみからDNAを抽出することで、試料の破壊を最小限に留めながら、スクリーニングを行うことができた。

研究成果の概要(英文)： Ancient genome analysis is necessary to investigate the genetic origin of Japanese people. In this study, we tried the screening ancient human bone samples excavated from the sites located in western part of the Japanese Archipelago, from which ancient genome data have not been reported.

To extract genomic DNA from an ancient human bone, several hundreds mg of bone powder is required. To avoid such destruction of ancient human bone samples, we measured the racemization rate of aspartic acid included in collagen of bone samples at first because measuring of racemization rate can be performed using only 20 mg of bone power. We could carry out the screening of ancient bone samples without superfluous destruction, by the screening based on racemization rate.

研究分野：分子人類学

キーワード：古代DNA

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム解析技術の急速な進歩の恩恵を受け、日本列島の人々のゲノム多様性データが徐々に蓄積され、日本人の成り立ちを明らかにする上で極めて有用な情報を提供している。一方で、現生のゲノムデータのみでは推定することが困難な問題を解決する上で、先史時代人骨の DNA 解析は非常に重要な役割を果たすことができる。

DNA は生物の死後、断片化や変性といった様々な化学変化を経て急速に劣化していくが、この劣化の程度は、生物遺体が埋まっていた土中の pH や温度、湿度に大きく影響される。そのため、古代 DNA 分析では分析される試料がどのような環境にさらされていたかが、分析の成否を分ける極めて重要なファクターとなる。次世代シーケンサーの登場によって、近年ではゲノムレベルでの古代 DNA 分析が盛んに行われるようになった。集団遺伝学では分析する個体数を増やすよりも分析する遺伝子座数を増やす方が解析の精度を向上させるには効果的であり、全ゲノムデータを利用すれば、各集団につき 1 個体のサンプルでも高い精度の解析が可能となる。解析の精度だけでなく、分析に必要な最小試料数という観点からも、ゲノム解析は古人骨 DNA 分析に適した方法であると言える。一方で、分析の成功に必要な DNA のクオリティーは、mtDNA 分析で要求されるものよりも遥かに高くなる。試料の無駄な破壊を防ぐためには、本格的なゲノム解析の前に多面的な方法を用いた試料のスクリーニングが不可欠となる。また今後発掘される人骨試料については、将来的にゲノム解析を行う可能性があるのかを発掘段階から考慮し、ゲノム解析の可能性が考えられる場合には出土後の DNA の劣化を極力抑える処置を施すことが、分析の成功率を高める上で重要になる。近年の研究では、出土後すぐに骨試料を冷凍保存することで、DNA の劣化を防げることが報告されている。

2. 研究の目的

琉球列島を中心に、古人骨 DNA データが不足している西日本の古人骨試料を収集し、全ゲノム解析に耐えうる保存状態の DNA が残存している試料のスクリーニングを行う。これには、既に出土している人骨に加え、現在進行中もしくは今後実施予定の発掘調査で出土する人骨も含まれる。

微量の骨サンプルを用いて残存する DNA の保存状態を予測する。まずは、コラーゲン中のアスパラギン酸のラセミ化率から間接的に試料の埋葬環境を評価する。保存状態が良好と推測された試料について、DNA 抽出を行い、次世代シーケンシング用のライブラリー作製を試みる。

また、発掘現場において骨試料を出土後すぐに冷凍保存する等の古代 DNA 分析を見据えた処置を施すための作業マニュアルの作

成し、発掘現場での適用を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、沖縄本島出土の貝塚時代人骨、沖縄本島出土のグスク時代人骨、宮古・八重山諸島出土の下田原期および無土器期人骨のそれぞれから、ゲノム解析に適用可能な試料をスクリーニングした。また、琉球列島の人々の起源を探る上で日本本土西部の縄文人との遺伝的関係を調査することは極めて重要であるため、関西以西で発見された縄文人骨も収集対象とした。試料は以下に記載する遺跡から出土したものをを用いた。

武芸洞遺跡・サキタリ洞遺跡：沖縄県南城市の武芸洞からは、石棺墓の中から 3 体の貝塚時代人骨（が出土しており、沖縄県立博物館・美術館に保管されている。他にグスク時代人骨も出土しており、貝塚時代からグスク時代にかけての琉球集団の遺伝的特徴の変遷を追う上で極めて有用である。武芸洞の付近に位置するサキタリ洞遺跡では、沖縄県立博物館・美術館のグループにより発掘作業が進められており、旧石器時代のものともみられる人骨も出土した。

長墓遺跡：沖縄県宮古島市長墓遺跡からは、下田原期と無土器期の人骨が出土している。宮古・八重山諸島における下田原文化および無土器文化の担い手は、台湾やフィリピンに由来する人々であるとの仮説があるものの未だに最終的な結論は出ていない。これらの人骨に対し、DNA 解析を行うことが可能であれば、この問題に最終的な結論を出すことができる。

石山貝塚遺跡・国府遺跡・里木貝塚遺跡・船穂貝塚遺跡・地ノ島遺跡：これらの遺跡からは保存状態の良い縄文人骨が多数出土しており、現在大阪市立大学に保管されている。西日本の縄文人の遺伝的特徴を把握する上で、これらの古人骨は極めて有用である。

また、発掘現場でのコンタミネーションや古代 DNA の劣化を防ぐための処置として、ラテックスグローブやマスク、クリーンウェア等を装着して人骨の取り上げを行い、出土後速やかに冷凍庫で保管するなどの内容を盛り込んだ発掘マニュアルを作成した。このマニュアルの内容は礼文島浜中 2 遺跡の発掘調査委で実施した。

4. 研究成果

本研究で収集された西日本各地の古人骨計 46 個体についてアスパラギン酸のラセミ化率を測定することで DNA の保存状態を推測した。結果として、PCR 法による DNA 増幅が可能と判定された古人骨試料は武芸洞遺跡出土の 1 試料、長墓遺跡出土の 3 試料、地ノ島遺跡出土の 1 試料の計 5 試料と、割合としては非常に低いものであった。これは、琉球列島をはじめ、温暖湿潤な地域に埋葬されて

いたことが主な要因と考えられる。

良好なラセミ化率の値を示した5試料について DNA 抽出を行い、アジレント 2100 バイオアナライザ電気泳動システムを用いて、DNA 断片のサイズおよび濃度を測定した。その結果、琉球列島から出土した古人骨4試料については DNA が検出されなかった。地ノ島遺跡から出土した1試料(OSK200)からは DNA が検出されたが、DNA 断片長のピークが 2,000 bp 付近にある一方で、200 bp 未満の短い断片が全く観察されなかった(図1)。これは抽出溶液中に含まれる DNA 分子の大部分が古人骨由来のものではなく、バクテリア等に由来するコンタミナント DNA であることを示唆している。OSK200 の DNA 抽出液を用いて、次世代シーケンシング用のライブラリー作製を試みたが、DNA 断片が長すぎたためか PCR 増幅が成功しなかった。

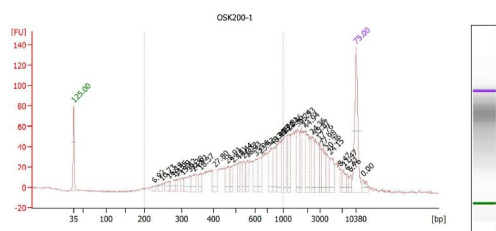


図1 . OSK200 の DNA 抽出液に含まれる DNA 断片長の分布

発掘現場での古代 DNA の劣化とコンタミネーションを防ぐための作業マニュアルは、遺伝学者以外のスタッフでも実施可能な簡易なものを作成し、礼文島浜中2遺跡で実際に使用した。浜中2遺跡の古人骨の保存状態が元来非常に良好であることにもよるところが大きいですが、本研究で作製したマニュアル通りに取り上げた古人骨試料から得られたシーケンスデータは、0.05%と非常に低いコンタミネーション率を示した(図2)。作業マニュアルは今後も改良を重ねて、より多くの発掘現場で利用可能なものを作成する予定である。

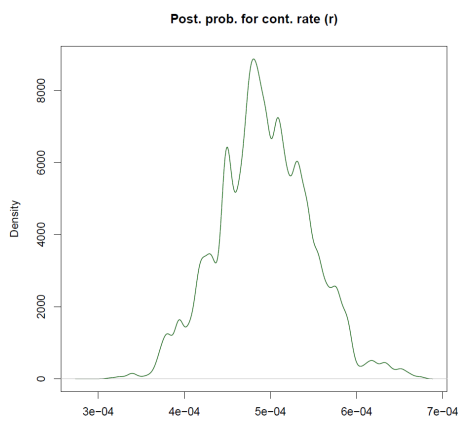


図2 . 発掘作業マニュアルに従って取り上げた古人骨のコンタミネーション率の事後確率

結論として、研究課題では期間内にゲノム解析に耐えうる保存状態を有した西日本出土の古人骨を同定することはできなかった。しかしながら、日本人集団の成立過程を考える上で西日本の古人骨ゲノムデータは非常に重要な役割を果たすと考えられるため、引き続き試料の収集とスクリーニングを実施していく予定である。また、本研究課題で検討された発掘現場での作業マニュアルや DNA 抽出・ライブラリー作製の条件等は他の地域から出土した古人骨試料にも適用され、良好な結果を得ている。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

1. Fukase H, Ito T, Ishida H (2016) Geographic variation in nasal cavity form of three human groups from the Japanese Archipelago: its ecogeographic and functional implications. *American Journal of Human Biology*, 28: 343-351. (査読有)
2. Okamoto Y, Ishida H, Kimura R, Sato T, Tsuchiya N, Murayama S, Fukase H, Nagaoka T, Adachi N, Yoneda M, Weber A, Kato H (2016) An Okhotsk adult female human skeleton (11th/12th century AD) with SAPHO syndrome from Hamanaka 2 site, Rebun Island, northern Japan. *Anthropological Science* 124: 107-115. (査読有)
3. Suzuki S, Sunagawa M, Shindo M, Kimura R, Yamaguchi K, Sato T, Yoneda M, Nagaoka T, Saiki K, Wakebe T, Hirata K, Tsurumoto T, Ishida H (2016) Degenerative changes in the appendicular joints of ancient human populations from the Japan Islands. *Quaternary International*, 405: 147-159. (査読有)

[学会発表](計 5件)

1. 佐藤文寛、安達登、木村亮介、米田穰、太田博樹、田嶋敦、豊田敦、松前ひろみ、小金淵佳江、清水健太郎、埴原恒彦、ウェーバー・アンジェイ、加藤博文、石田肇. 古代ゲノム解析から推定される北アジアの人類集団史. 日本人類遺伝学会第62回大会 神戸 2017年11月
2. 小金淵佳江、覚張隆史、武島弘彦、笠木聡、佐藤文寛、田嶋敦、柴田弘紀、小川元之、太田博樹. 古代ゲノム解析への応用に向けたBACダブルキャプチャー法の検討. 第71回日本人類学会大会 東京 2017年11月
3. 佐藤文寛、安達登、木村亮介、米田穰、太田博樹、田嶋敦、豊田敦、松前ひろみ、小金淵佳江、清水健太郎、埴原恒彦、ウェーバー・アンジェイ、加藤博文、石田肇. NGSを使用した古人骨ゲノム解析 - 浜中2遺跡出土オホーツク文化人骨の研究事例 -. NGS現場の会第5回研究会 仙台 2017年5月
4. 佐藤文寛、安達登、木村亮介、米田穰、太田博樹、田嶋敦、松前ひろみ、清水健太郎、埴原恒彦、ウェーバー・アンジェイ、加藤博文、石田肇. 北海道礼文島浜中2遺跡出土オホーツク文化期人骨のゲノム解析. 第70回日本人類学会大会 新潟 2016年10月

5. 覚張隆史、シコラ・マーチン、コルネリウセ・トーフイン、シュミット・ライアン、松前ひろみ、小金淵佳江、勝村啓史、埴原恒彦、小川元之、佐藤文寛、木村亮介、石田肇、設楽博己、山田康弘、田嶋敦、ウィラースレヴ・エスケ、太田博樹. 愛知県渥美半島・伊川津貝塚遺跡出土縄文人骨のゲノム解析(予報). 第70回日本人類学会大会 新潟 2016年10月

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 文寛 (SATO, Takehiro)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号: 10558026

(2)研究分担者

ハドソン マーク (HUDSON, Mark)
ふじのくに地球環境史ミュージアム・学芸課・教授
研究者番号: 20284052

覚張 隆史 (GAKUHARI, Takashi)
金沢大学・国際文化資源学研究センター・特任助教
研究者番号: 70749530

深瀬 均 (FUKASE, Hitoshi)
北海道大学医学研究科・准教授
研究者番号: 00582115