

平成23年3月1日現在

機関番号：17301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19570227  
 研究課題名（和文） 縄文系弥生人と渡来系弥生人の耳垢型決定遺伝子の解析  
 研究課題名（英文） Earwax gene analysis of the Yayoi skeletal remains of native and immigrant lineage.  
 研究代表者  
 佐伯 和信（SAIKI KAZUNOBU）  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：80195966

研究成果の概要（和文）：2006年にABCC11遺伝子上の一塩基多型（rs17822931）が耳垢の湿型、乾型のタイプを決定していると明らかにされたのを受けて、弥生時代人骨への応用を試みた。佐賀県鳥栖市の安永田遺跡出土の渡来系弥生人骨51例について、試行錯誤の中、微量の核DNAからでも高感度なタイピング結果を得られるTaqMan-PCR法による遺伝子解析を行った結果、5例の耳垢遺伝子の型を決定することができた。その内訳はGA（表現型は湿型）が3例、AA（表現型は乾型）が2例であった。

研究成果の概要（英文）：The locus of the earwax gene was found by Yoshiura *et al.* in 2006. We tried the analysis of the earwax gene in Yayoi period human skeletal remains. 【Materials】 Fifty-one human skeletal remains excavated from the Yasunagata site in Tosu city, Saga prefecture, were analyzed very carefully. 【Methods】 We analyzed a SNP (rs17822931) of the *ABCC11* by the Taq-Man PCR method got the high sensitivity results from a very small amount of nucleus DNA. 【Result】 We were able to decide the earwax type of 5 skeletal remains; the allele GA (the phenotype is *Wet*) were 3 samples, AA (the phenotype is *Dry*) were 2 samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：自然人類学、分子遺伝学、肉眼解剖学

科研費の分科・細目：人類学・自然人類学

キーワード：弥生人骨、耳垢型遺伝子、古代DNA

## 1. 研究開始当初の背景

九州地方北半の弥生人骨は、骨格形態（計測的形質、頭蓋形態小変異）や歯冠形態などの研究によって、西北九州地域の海浜部出土

の低・広顔、低身長を特徴とする縄文系弥生人骨と、北部九州地域（佐賀、福岡県）の平野部出土の高・狭顔、高身長を特徴とする渡来系弥生人骨に大別されている。これらの弥

生人は日本人の起源の問題や日本人の形成過程を考える上で重要で、最近では、渡来系弥生人の原郷を探るため、大陸の古人骨の形態学的研究やミトコンドリア DNA 研究も進められ、両系統の弥生人骨と比較分析する研究が進められている。

一方、耳垢の研究については、耳垢のタイプが遺伝的に決められていることやコーカソイドやニグロイドの殆どが湿型を示すのに対してモンゴロイドには乾型も出現し、しかもその頻度が地域や集団で異なっていることが古くから知られていた。松永(1959)の研究によると、東アジア集団の湿型の頻度は、韓国、中国北部、モンゴル等はかなり低頻度を示し、そこから南に行くほど湿型頻度が増加する傾向にある。日本においては、本土の人々の湿型頻度に比べて北海道のアイヌや沖縄やその周辺の人々は湿型がかなり高頻度で出現しており、これらの頻度差から日本人の由来や形成を考察されてもいる。

耳垢は形質人類学的に意義ある形質であるが、古人骨については推測するしかなかった。しかし、2006年に本研究の分担者である吉浦氏が ABCC11 遺伝子上の一塩基多型(rs17822931)が耳垢型を決定し、この座における塩基対の組み合わせが AA ならば乾型、GA または GG ならば湿型の耳垢となることを明らかにしたことで耳垢の研究は古代人へ応用が可能なものとなった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的として、まず古人骨の微量な核 DNA から効率良く耳垢型遺伝子を解析する手法を開発することがあげられる。古人骨の DNA 研究はミトコンドリア DNA 解析が主であるが、形質発現のほとんどに関わっている核 DNA の解析を進展させるためにもこのことは重要である。

そしてなるべく多くの人骨から耳垢の湿型/乾型のタイプを導き出すことを目的とした。さらに最終的な目的として、骨格の形態的特徴が大きく異なる縄文系弥生人骨と渡来系弥生人骨の耳垢型の出現頻度を明らかにし、縄文系弥生人(ひいては縄文人)と渡来系弥生人の起源や系統、さらに日本人の形成史について類推することができればと考えていた。

## 3. 研究の方法

### (1) 分析試料

今回分析に使用した試料は、佐賀県鳥栖市の安永田遺跡出土の弥生人骨の 51 例である。各人骨ともに、計測や観察に支障のない人骨片数センチを使用した。

### (2) DNA 解析

古人骨の DNA は微量であるため、コンタ

ミネーションを起こさないように細心の注意を払い、DNA 除去剤やフィルターチップなどを利用して、その可能性を最大限排除した。以下、サンプル採取から塩基対の解析までの課程を記す。

#### ① サンプル採取

主に四肢骨の破片を 1cm 程度切り取り、その表面を歯科用ドリルで削り、DNA 除去剤に 5 分程度浸し、蒸留水で洗浄した後、よく乾燥させる。その後、紫外線照射を施す。試料の重量は 0.2~0.5 グラム程度。

#### ② DNA の抽出・精製

試料を粉碎器で粉状にし、抽出液を入れ 55°C で一晩以上置いた後、一般的なフェノール処理、フェノ・クロ処理、エタノール沈殿を行い、市販の DNA 精製・回収キットを用いて DNA を精製した。

ここまでの過程は、コンタミネーションを起こす恐れがあるのでクリーンベンチや隔離された部屋で行った。

#### ③ ミトコンドリア DNA の増幅

耳垢 DNA の解析を行う前に、ミトコンドリア DNA の Hypervariable region1 の領域を増幅を試みて DNA が回収されているかどうか、またコンタミネーションについてチェックした。増幅が確認できた試料について耳垢遺伝子の解析に進んだ。

#### ④ 耳垢遺伝子の増幅

古人骨の核 DNA は微量で劣化および断片化も進行しているため、増幅効率を高めるために、増幅させる塩基対を可能な限り短く設定したプライマーを使用した。増幅させる領域の塩基対はプライマーを含めて 46 塩基対。また、標的領域を確実に増幅させるために nested PCR を行った。

1st PCR は 20 サイクル。2nd PCR は TaqMan で解析するために priming site をつけるための PCR でサイクルは 15 サイクル。

#### ⑤ TaqMan-PCR 法による遺伝子型決定

増幅された生成物を 100 倍に希釈して、TaqMan-PCR 法で遺伝子型を解析した。

#### ⑥ 遺伝子型の決定

古人骨の核 DNA は微量であることから、耳垢型の遺伝子型(AA, GA, GG)の決定は、5 回以上の TaqMan-PCR によるタイピング結果から決定した。タイピング結果例を図 1 に示す。

## 4. 研究成果

### (1) 解析方法の開発

本研究で行った解析方法、特に TaqMan PCR を用いた遺伝子型の解析方法は、微量な核 DNA から高感度な一塩基多型解析が可能で、また一度に大量のサンプルを扱えるので、古人骨試料を対象とした解析の方法としては有効である。さらに、同時に複数の部位を

解析する multiplex PCR も可能なので貴重な試料を有効に活用できる。

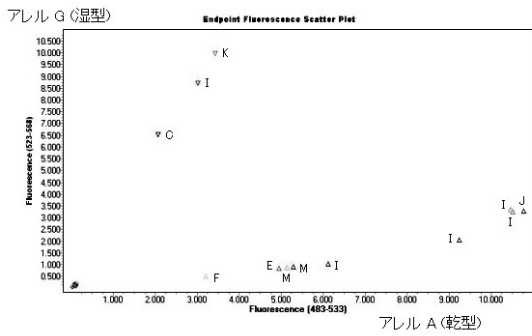


図1 渡来系弥生人骨11体の耳垢決定遺伝子のタイピング結果例  
記号は人骨番号。各人骨で16回ずつ分析。例えばMは16分析中2つがタイピングされ、ともにA(乾型)と単軌。Iは5つでタイピングされ、うち4つがA(乾型)、1つがG(湿型)とタイピング、これから人骨Iの遺伝子型はGA、表現型は湿型(Gが優性のため)となる。

## (2) 渡来系弥生人の耳垢型

耳垢型を分析する前段階としてミトコンドリア DNA の解析を行い、ある程度増幅・解析結果が得られた人骨 31 例について、耳垢遺伝子の解析を試みた。

それぞれの人骨について上記方法で最低、16回のタイピングを行った結果、5例(湿型3例、乾型2例)で遺伝子型が決定できた。表1はABCC11のタイピング結果の例を示したものである。

表1 耳垢遺伝子の解析結果例

(各人骨とも16回以上分析した結果。例えば、人骨004は16回のうち5回がタイピングされ、耳垢型はGAである。人骨006は1回だけタイピングでき、結果がAであった。しかし、5回の分析数にみえないので耳垢型は決定していない)

分析番号	解析結果						耳垢型
	1	2	3	4	5	6	
004	G	G	GA	A	A		GA
006	A						
007	A	A	G	A	G		GA
010	A	A					
015	A						
016	A	A	A	G	A		GA
017	A	A	A	A	A		AA
019	A						
026	G						
028	A	G					
030	A	A					
032	A	A	A	A	A	A	AA
034	G	A	A				
039	G						
043	A						
046	A	A					

決定できた例は5例と少なかったが、耳垢遺伝子を増幅できた人骨は51例中の20例近くに及ぶ。しかし、今回ある程度、効率良く増幅できたと考えているが、更なる成果を得るためには、より効率の良い解析が必要と考えている。ABCC11については、現代の東ア

ジア集団や日本人およびアイヌ等の耳垢の湿型/乾型頻度から推測して、渡来系弥生人の耳垢は乾型がほとんどで湿型はごく少ないことを予想したが、本研究の結果は渡来系弥生人には湿型がある程度存在している可能性を示している。また表題にある縄文系弥生人の分析については進行中であり、現段階でまとめることはできない。今後解析データを増やしていきたい。これら弥生人骨のDNA分析は日本人の起源や移動の問題にも関わることでもあるので、慎重にかつ根気よく研究を進めていきたい。

## 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 2 件)

① Nakano M, Miwa N, Hirano A, Yoshiura K, Niikawa N. A strong association of axillary osmidrosis with the wet earwax type determined by genotyping of the ABCC11 gene. BMC Genet. 2009 査読有

② Miura K, Yoshiura K, Miura S, Shimada T, Yamasaki K, Yoshida A, Nakayama D, Shibata Y, Niikawa N, Masuzaki H. A strong association between human earwax-type and apocrine colostrum secretion from the mammary gland. Hum Genet. 2007 Jun;121 (5): 631-633. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

① 進藤美咲、金城美奈子、山口京子、深瀬均、木村亮介、分部哲秋、弦本敏行、長岡朋人、石田肇：西北九州および北部九州・山口地方弥生時代人骨における四肢の変形性関節症。第 64 回日本人類学会大会。2010 年 10 月 2 日。北海道伊達市だて歴史の杜カルチャーセンター

② 金城美奈子、進藤美咲、深瀬均、山口京子、木村亮介、分部哲秋、弦本敏行、長岡朋人、石田肇：西北九州弥生時代人骨と北部九州・山口弥生時代人骨の変形性脊椎関節症。第 64 回日本人類学会大会。2010 年 10 月 2 日。北海道伊達市だて歴史の杜カルチャーセンター

③ 分部哲秋、佐伯和信、岡本圭史：南九州古墳人の地域性と系統関係—頭蓋の計測的形質による分析—。第 63 回日本人類学会大会。2009 年 10 月 3 日。東京千代田区シェーンバツハ・サボー

④ 佐伯和信、岡本圭史、分部哲秋：南九州(宮崎)古墳人のミトコンドリア DNA 解析—第 2 報—。第 62 回日本人類学会大会。2008 年 11 月 1-2 日。愛知学院大学歯学部

⑤ 分部哲秋、佐伯和信、岡本圭史：長崎県原城跡本丸出土の人骨—2003~2007 年発掘調査分—。第 62 回日本人類学会大会。2008 年 11 月 1-2 日。愛知学院大学歯学部

⑥ 佐伯和信、吉浦孝一郎、新川詔夫、岡本圭史、分部哲秋：古人骨における耳垢遺伝子解析の試み—続報—。日本人類遺伝学会第 53 回会大会。2008 年 9 月 29 日。横浜市パ

シフィコ横浜会議センター

⑦ 佐伯和信、岡本圭史、分部哲秋：南九州(宮崎)古墳人のミトコンドリア DNA 解析—予報—。第 61 回日本人類学会大会。2007 年 10 月 6-8 日。日本歯科大学新潟生命歯学部

⑧ 佐伯和信、吉浦孝一郎、新川詔夫、岡本圭史、分部哲秋：古人骨における耳垢遺伝子解析の試み。日本人類遺伝学会第 52 回会大会。2007 年 9 月 15 日。京王プラザホテル

[図書] (計 3 件)

① 分部哲秋、佐伯和信、岡本圭史：大分市教育委員会出版、横尾貝塚(担当部表題：大分県大分市横尾貝塚出土人骨の形態的特徴(概報)) 2008。6 頁(pp280-285)

② 分部哲秋：頭蓋形態小変異の研究，四肢骨の計測的研究。(山口 敏，中橋孝博(編)：中国江南・江淮の古代人—渡来系弥生人の原郷をたずねる—，てらぺいあ，東京，pp. 51-67, 99-114 所収) 2007

③ 分部哲秋，佐伯和信，岡本圭史：溝口遺跡 1 号箱式石棺墓出土の古墳時代人骨。(諫早市教育委員会(編)：諫早市文化財調査年報，諫早，pp. 31-34 所収) 2007

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐伯 和信 (SAIKI KAZUNOBU)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：80195966

### (2) 研究分担者

吉浦 孝一郎 (YOSHIURA KOICHIRO)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：00304931

分部 哲秋 (WAKEBE TETSUAKI)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師  
研究者番号：50124847