

# インダス文明期の古代骨 DNA の保存状態

齋藤 成也

国立遺伝学研究所集団遺伝研究部門

神澤 秀明

総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻

## 1 はじめに

古代 DNA を対象とした研究は近年非常に活発に行われ、徐々に情報が蓄積されてきている。これらの研究により古代人類集団や、植物・動物種の家畜化の理解・解明に、遺伝学的側面からアプローチすることが可能となった。しかしながら、南アジアは人類集団の歴史を解明する上で重要であるにも関わらず、古代 DNA を対象とした研究成果が非常に少なく、その重要性に対して情報量が極めて少ない。これは、南アジア地域が非常に温暖であり、DNA の保存には適していないことがひとつの要因であると考えられる。

そこで遺伝班では、インダス文明期のヒトおよび家畜生物種に焦点を絞り、その古代骨を用いて遺伝的背景を明らかにする。解析可能なほどの DNA が残存しているならば、遺伝的背景を明らかにすることによって、インダス文明期以降のインド亜大陸の人類集団、家畜生物種の変遷が明らかになると考えられる。

本報告では、ヒトおよびウシ骨を用いた解析結果について報告する。

## 2 実験方法

サンプルから DNA を抽出し、古代骨でも比較的保存されているミトコンドリア DNA (mtDNA) の増幅を行い配列を決定する。決定された配列の解析を行う。

### 2-1 使用したサンプル

インド、ファルマーナー遺跡で発掘されたウシ骨 3 サンプルとヒトの歯 7 サンプルの、計 10 サンプルを用いた (表 1)。

### 2-2 Pre-PCR

DNA 抽出時の作業場所は、PCR を行う場所と分けた。

#### 2-2-1 ウシ骨

クリーンベンチ内にサンプルを持ち込む。持ち込んだサンプルを紫外線照射 (表裏をそれぞれ

表 1 ウシ骨 (a)、ヒトの歯 (b) の情報

(a)	個体	サンプル数	lab ID
Tr.1G5-1	A	1	IFC 1a1
Tr.1C8	A	1	IFC 2a1
Tr.1G5-2	A	1	IFC 3a1

(b)	個体	サンプル数	lab ID
Burial no.13	A	1	IFH 1a1
	B	1	IFH 1b1
Burial no.23	A	～5	IFH 2a1-
Burial no.39	A	1	IFH 3a1
Burial no.41	A	1	IFH 4a1
Burial no.45	A	3	IFH 5a1-5a3
	B	～4	IFH 5b1-
Burial no.53	A	～5	IFH 6a1-
Burial no.54	A	1	IFH 7a1
	B	4	IFH 7a1-7a4

れ 30min ずつ) し、実験に必要な量の骨 (～9cm<sup>2</sup>) を切り取る。切り取った骨の表面を紫外線照射 (表裏をそれぞれ 30min ずつ) した後、ダイヤモンドドリルで 1 mm 削り、細かく切断 (～6 個) する。切断した骨を HPLC grade water で 2～3 回洗浄し、紫外線照射下で乾燥 (表裏をそれぞれ 30min ずつ) する。乾燥したサンプルをクールミルに回収し、液体窒素で冷却した状態で破碎して粉にした。破碎して得られた粉を 50ml チューブに回収する。

### 2-2-2 ヒトの歯

サンプルの保存状態から判断し、まずドリルを用いて歯と下顎骨を分離し、分離した歯をクリーンベンチ内に持ち込んだ。持ち込んだサンプルを紫外線照射した後に、サンプルの状態から以下の 2 点に作業過程を分けた。

A：次亜塩素酸処理を行った

B：次亜塩素酸処理を行わなかった

過程 A は処理後に HPLC grade water で 2～3 度洗浄し、紫外線照射下で乾燥させた。次に、サンプル表面を～1 mm 削る。HPLC grade water で 2～3 回洗浄した後、紫外線照射下で乾燥 (表裏をそれぞれ 30min ずつ) させる。乾燥したサンプルをクールミルに回収し、液体窒素で冷却した状態で破碎して粉にした。破碎して得られた粉を 50ml チューブに回収する。

### 2-2-3 DNA 抽出

回収した粉を用いて、Nadin Rohland and Michael Hofreiter 2007a の論文を参考にし、抽出液を得た。簡潔に述べると、まず、100mg～500mg までの粉を、proteinaseK を含む 0.5M EDTA 溶液 2-10ml に入れ、一晩室温でゆっくり攪拌する。溶液を遠心して上清を回収し、VivaSpin6 で溶液の濃縮・Buffer 置換を行う。溶液を 15ml チューブに回収し、4 倍量の Binding buffer と 200ul の Silica pellet を入れ、36%HCl 溶液で pH 4.0 に調整し、3hr じっくり攪拌する。遠心して Silica pellet を 1ml Binding buffer で一度洗浄後、1mm Washing buffer で二度洗浄し、15min 乾燥さ

表 2 Primer、(a) ウシ mtDNA、(b) ヒト mtDNA

(a) Bos taurus 1for	AACCAGCAACCCGCTAGG	This study
Bos taurus 1rev	TGCCTGGTAAAATTCATTGGA	This study
Bos taurus 2for	GGGGTCGCTATCCAATGAA	This study
Bos taurus 2rev	GATGAGATGGCCCTGAAGAA	This study
Bos taurus 3for	ACATTATGTCAAATTCATTCTTGATAG	This study
Bos taurus 3rev	GCGGCATGGTAATTAAGCTC	This study
(b) D4-E 3010, 3027 for	TGTA AACGACGGCCAGTCTCGATGTTGGATCAGGACA	This study
D4-E 3010, 3027 rev	TGTGGAATTGTGAGCGGTCTGTAACAAACGAACCTT	This study
A-G 4824, 4833 for	TGTA AACGACGGCCAGTTAGCCCCCTTCACTTCTGA	This study
A-G 4824, 4833 rev	TGTGGAATTGTGAGCGGAAGAAGCAGGCCGGATGT	This study
A 4248 for	TGTA AACGACGGCCAGTTGATATGTCTCCATACCCATTACAA	This study
A 4248 rev	TGTGGAATTGTGAGCGGCTTTATCAGACATATTTCTTAGGTTTGAG	This study
D 5178 for	TGTA AACGACGGCCAGTACCCTACTACTATCTCGCACCTGA	This study
D 5178 rev	TGTGGAATTGTGAGCGGCTAGGGAGAGGAGGGTGGAT	This study
M 10400 for	TGTA AACGACGGCCAGTAAGTCTGGCCTATGAGTGACTACAA	This study
M 10400 rev	TGTGGAATTGTGAGCGGTGAGTCGAAATCATTGTTTTG	This study
N 10873 for	TGTA AACGACGGCCAGTCCACAGCCTAATTATTAGCATCATC	This study
N 10873 rev	TGTGGAATTGTGAGCGGGCTAAATAGGTTGTTGTTGATTTGG	This study
B 8280del for	TGTA AACGACGGCCAGTAATAGGGCCCGTATTTACCCTATA	This study
B 8280del rev	TGTGGAATTGTGAGCGGAGGTTAATGCTAAGTTAGCTTTACAGTG	This study
HVR 16129-16223 4 for	GGTACCATAAATACTTGACCACCTG	This study
HVR 16129-16223 4 rev	GGGTTGATTGCTGTACTTGCT	This study
HVR 16166-16284 5 for	ACCCAATCCACATCAAAC	This study
HVR 16166-16284 5 rev	TTGTTGGTATCCTAGTGGGTGA	This study
HVR 16234-16340 6 for	CACATCAACTGCAACTCCAAAG	This study
HVR 16234-16340 6 rev	TTGACTGTAATGTGCTATGTACGG	This study
HVR 16286-16403 7 for	CCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTAC	This study
HVR 16286-16403 7 rev	GTGGTCAAGGGACCCCTATC	This study
M13-L127	AGCACCTATGTCGCAGTAT	Adachi <i>et al.</i>
M13R-H257	TCTGTGTGGAAAGCGGCTGT	Adachi <i>et al.</i>
M13-L10286	CCCTCCTTTTACCCCTACCA	Adachi <i>et al.</i>
M13R-H10426	TAATTTAATGAGTCGAAATCATTCCG	Adachi <i>et al.</i>
M13-L15998	CCATTAGCACCCAAAGCTA	Adachi <i>et al.</i>
M13R-H16142	ATGTA CTACAGGTGGTCAAG	Adachi <i>et al.</i>
M13-L16120	TTACTGCCAGCCACCATGAA-	Adachi <i>et al.</i>
M13R-H16239	TGGCTTTGGAGTTGCAGTTG	Adachi <i>et al.</i>
M13-L16208	CCCCATGCTTACAAGCAAG	Adachi <i>et al.</i>
M13R-H16367	CTGAGGGGGGTCATCCAT	Adachi <i>et al.</i>

せる。最後に Tris-EDTA 溶液 100ul を混ぜて DNA を溶出し、DNA を含む抽出液を得た。

抽出した溶液を用いて、PCR を試みた。PCR の条件は、最終量を 20ul とし、Multiplex PCR kit(Qiagen) を用いた。Primer 各 0.25ul (表 2)、抽出液を 1ul 用いた。PCR のサイクルは、95°C 15min のプレヒートをし、その後 94°C 30min、54°C 15min、72°C 20min を 42 サイクル行い、最後に 72°C 10min、4°C の手順で行った。

PCR 反応後の溶液を、2.0% アガロースゲル電気泳動を行い、目的の配列があるかを確認した。目的の配列と思われるバンドが見られる場合には、その後の配列決定まで行った。配列決定には ABI の 3130xl を使い、メーカー推奨のプロトコルに従った。

### 3 結果と考察

#### 3-1 Primer

Product サイズの異なる複数の primer を作成し、増幅可能な古代骨サンプル (Fukagawa-D) を用いて Primer の増幅効率の確認を行った。+α は、それぞれの Primer の末端に Universal Primer が加わっていることを示す (それぞれ 18bp, 17bp で合計 35bp)。図 1 より、短い Primer ほど増幅効率が高いことがわかる。

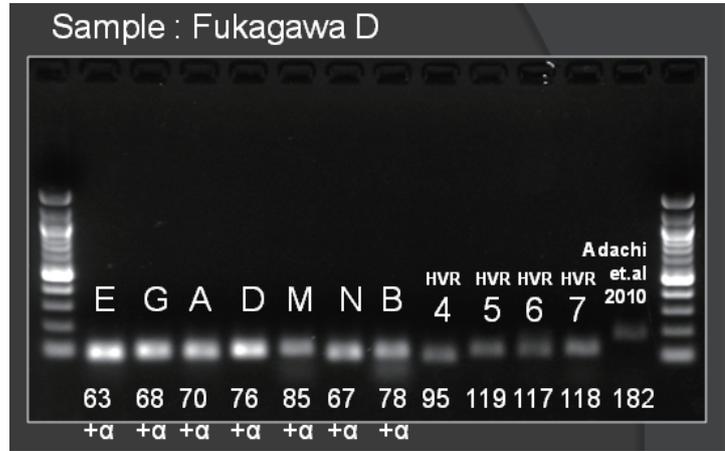


図 1 各 Primer の増幅効率

#### 3-2 PCR

ヒトの歯のサンプル 7 点、ウシ骨のサンプル 3 点を解析に用い、PCR による増幅を試みたが、良い結果を得ることは出来なかった。理由のひとつとして、サンプルの保存状態が悪かったことが考えられる。特にヒトの歯のサンプルを用いた作業は非常に困難であった。具体的には、①長年の侵食によってヒトの下顎骨と歯が脱灰され非常に脆くなっていること、②下顎骨からの歯を取り出す段階で、容易に壊れてしまい完全な状態で取り出すのが困難であったこと、③現代人 DNA の混入を防ぐための歯の表面の除去作業で、多くの歯が壊れてしまうこと、が挙げられる。

##### 3-2-1 ウシ骨

PCR 産物を多く取るために、短い Product サイズを生成する Primer を作成したが、PCR による産物は得られなかった。

##### 3-2-2 ヒトの歯

複数 Primer を用いて PCR を行なった。1, 2, 3 は DNA 抽出の時に次亜塩素酸処理を行なったもので、4, 5, 6, 7 は次亜塩素酸処理をしていないものである。処理をするかしないかは、歯根

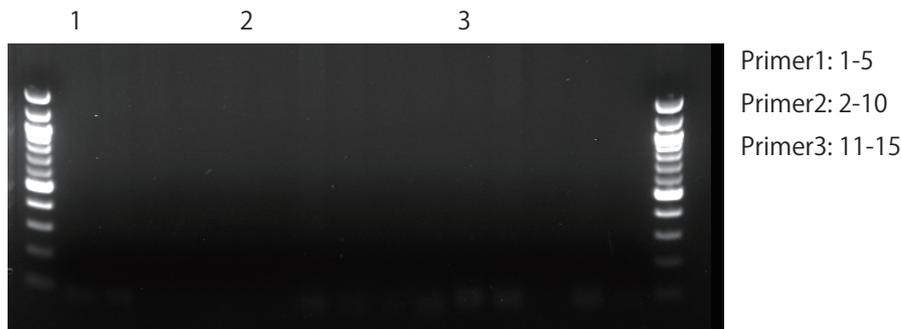


図 2 PCR の結果

部の破損の状態と判断した。破損がある場合、DNA を破壊する次亜塩素酸が内部に侵入してしまうことから、次亜塩素酸による処理を行うことができない。

問題点としては、処理をしないと表面に存在している現代人の DNA を取り除くことが出来ない。作業過程で、破損している歯根部から内部に現代人の DNA が侵入する可能性がある (Washing のときなど)。

PCR の結果、次亜塩素酸処理をしていないサンプルでバンドが見られた。特に、Product サイズの大きいサンプルでバンドが見られた。通常、図 1 に見られるように、Product サイズの小さいものの方が増幅効率をはるかに高く、図 3 の結果はそれと矛盾していることから、骨を取り扱っている際の現代人 DNA の混入があったと思われる。

DNA の混入を確認する目的で、得られた PCR 産物の内、十分取量のある 5FR (M13-L16208, M13R-H16367, Adachi et al. size=195) の配列決定を行なった (表 3)。

IF7a1, IF7a2 の配列パターンは中国、タイなどに見られる配列であり、研究室で用いている他の古人骨を用いた際にたまに見られる、コンタミと推測される配列に頻発するパターンであった。

IF6a1 は、これだけではミトコンドリアのハプロタイプに分類できないが、同じ配列の有無を BLAST を用いて検索したところ、ヨーロッパの一個体だけと一致しました。mtDNA の D-loop は非常に多くの突然変異を蓄積しているため、この結果はいずれかの突然変異を持つハプロタイプが新たに突然変異を蓄積した結果であると考えられます。通常、DNA が混入した際にはシーケンスの波長が一致せず、配列結果を得るのは非常に難しいのですが、今回は配列が特定されたことから、ごく少量の DNA から増幅されたものであることが予想される。

【参考文献】

Noboru Adachi et al (2009) "Mitochondrial DNA analysis of Jomon skeletons from the Funadomari site, Hokkaido, and its implication for the origins of Native American", *American Journal of Physical Anthropology* 138: 255-265.

Nadin Rohland and Michael Hofreiter (2007a) "Ancient DNA extraction from bones and teeth", *Nature protocols* Vol.2, No.7: 1756-1762.

Nadin Rohland and Michael Hofreiter (2007b) "Comparison and optimization of ancient DNA extraction", *BioTechniques* 42:

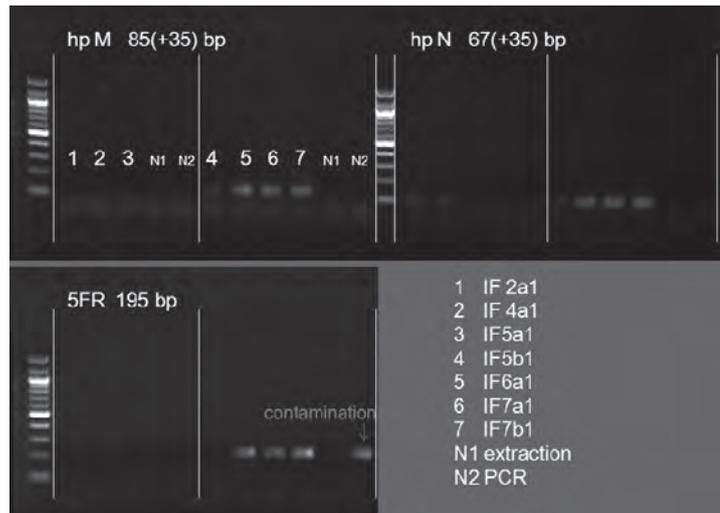


図 3 ヒトサンプルの PCR

表 3 PCR 産物の塩基配列

	rCRS と異なる部位
IF6a1	16256-16294
IF7a1	16223-16274-16362
IF7a2	16223-16274-16362
Ne2	rCRS

343-352.

Christopher S. Troy *et al.* (2001) "Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle", *Nature* 410: 1088-1091.