

フィリピン（ミンダナオ島）で収骨された遺骨
の DNA 鑑定報告書

2012 年 10 月 15 日

山形大学医学部法医学教室

梅津和夫

1. 目的

検体であるフィリピンのミンダナオ島から収骨された人骨から定法に従って DNA を抽出する（別紙1）。そして、DNA 鑑定を行い個々のご遺骨は日本の集団に属する個体であるか、フィリピンの集団に属する個体であるかの可能性を統計学的な検討により行なう。DNA 鑑定は核ゲノムを用いた性別および Y 染色体のハプログループ、並びにミトコンドリア DNA の D-ループの塩基配列および SNP を解析することで、ミトコンドリア DNA のハプログループを決定する。

2. 方法

検体から必要量の骨片あるいは歯の断片を回収し、0.5 M の EDTA で一晩脱灰した。次に、Protenase K を含む溶解液で分解し、シリカ法を用いて DNA を溶出・抽出した。抽出された DNA を用いて PCR 増幅を行い、得られた PCR 産物の塩基配列を 310 Genetic Analyzer を用いて決定した。なお、SNP の判定は APLP 法を用いて PCR を行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で判定した。得られた塩基配列および SNP のデータから父性遺伝する Y 染色体および母性遺伝するミトコンドリア DNA のハプログループを推定した。世界中の Y 染色体とミトコンドリア DNA のハプログループの集団頻度データは公表されている。ただしフィリピン集団のデータは限定的なものである。今回、得られたこれらのハプログループから個々の遺骨は日本／フィリピン集団に特有（多い）か否かを判断基準として帰属集団を推定する。

a. 性別の判定

性別は X 染色体に存在する男女に共通なアンドロゲンレセプター (AR) および男性の Y 染色体に特異的に存在する性決定遺伝子 (SRY) に特有な塩基配列の有無で判定する。

b. Y 染色体のハプログループの判定

Y 染色体のハプログループは Karafe ら (2008)の論文を参考に、ハプログループを特徴づける SNP を APLP 法 (Umetsu ら 2005) を用いて判定した。分析に用いた SNP は M130 (C), M217 (C3), M174 (D), M55 (D2), P14 (F-T), M9 (K-N), M175 (O), M119 (O1a), M176 (O2), M122 (O3)の 10 個である。なおカッコ内は Y のハプログループを示す。

c. ミトコンドリア DNA のハプログループの判定

ミトコンドリア DNA の D-loop 領域の HV1 および HV2 の塩基配列を判定した。D-loop 領域の PCR 用のプライマーは Adachi ら (2009)を参考にして次のプライマーセットを用いた。

プライマーセット	判別領域	プライマーの配列
HV1 領域の前半	15999-16238	CCATTAGCACCCAAAGCTA
		TGGCTTTGGAGTTGCAGTTG
HV1 領域の後半	16209-16366	CCCCATGCTTACAAGCAAG
		CTGAGGGGGGTCATCCAT
HV2	128-256	AGCACCCCTATGTTCGCAGTAT
		CTGAGGGGGGTCATCCAT

ミトコンドリア DNA のハプログループを決定する際には、D-loop の塩基配列と Umetsu ら (2005)の方法を用いて 36 個 [10398A (N), 9 bp del (B), 5178C (D), 3010A (D4), 14979C (D4a), 8020A (D4a), 13104G (D4g), 11215T (D4e), 11959G (M12), 10400T (M), 8793C (M10), 4833G (G), 8200C (G1), 3394C (M9), 14178C (Y), 3970T (F), 5417A (N9), 13183G (N9b), 3594T (L1/L2), 11969A (M11), 11696A (D4j), 6455T (M7), 4386C (M7a), 12811C (M7b), 15487T (M8), 8684T (M8a), 1736G (A), 10873T (N), 8994A (W), 4580A (V), 10550G (K), 12308G (K/U), 1719A (I/X), 15607G (T), 7028C (H), 12612G (J)]の SNP のデータおよび、必要に応じて 12705C (R), 3834A (Y1), 4850T (M7cef), 12882 (F1), 14318C (C), 752T (D5a)を規定する SNP を加えて総合的に判定した。D-loop の塩基配列は rCRS (revised Cambridge Reference Sequence) と異なる塩基番号と置換した塩基で示した。最終的なハプログループの決定は、Plylotree.org を参考にした (<http://www.phylotree.org/>)。

3. 検体・解析のデータ

骨および歯から得られた 110 検体を解析し、性別、Y染色体のハプログループおよびミトコンドリア DNA の結果は「別紙 2」に記載した。

解析結果

核ゲノムで性別が判定できた個体は 52 検体で、この中で男性と判定されたものが 33 検体、残りの 19 検体は女性であった。なお、女性の場合は無条件に日本人ではない可能性が高いと判定した。

男性と判定された 33 検体の中で 32 検体は Y 染色体のハプログループが判定された。フィリピンの Y 染色体のハプログループは Hammer ら (2006)や Loo ら (2011)の限定的な集団のデータがあるのみである。大雑把に日本のデータと比較すると次のようになる。

ハプログループ	日本	フィリピン
C	少ない	少ない
D	D2 は非常に多い	少ない

O1	かなり少ない	かなり多い
O2	非常に多い	かなり少ない
O3	やや多い	かなり多い

この知見を基に、核ゲノムのデータが得られた**52**検体について、日本人の可能性が高い、フィリピン人の可能性が高い、どちらともいえない、の**3**つに区分した（別紙3、参照）。

DNAを抽出した**110**個体について、ミトコンドリアDNAの塩基配列とSNPのデータからハプログループの解析を試みた。その結果、PCRで増幅されずハプログループを決定できなかったものが**44**個体、ハプログループを決定できたものが**66**個体だった。

ハプログループを決定できた**66**個体について、日本人に多く見られるハプログループはTanaka ら (2004) に公表されているデータ（サンプル数は**1,312**個体、サンプルの収集地点は中部地域にやや偏っている）を、フィリピン人に多く見られるハプログループについては、Tabbada ら (2010)に公表されているデータ（サンプル数は**423**個体、サンプルの収集地点は偏っている）を参考として比較した。なお、この表は遺伝学研究所によって作成されたものである。

日本人に統計的に有意（1%水準）に多く見られるハプログループに一致するものは一例も見られなかった、フィリピン人に統計的に有意（1%水準）に多く見られるハプロタイプに一致するものが**64**個体（ただし、**47**個体のハプログループは低い頻度ながら日本人にも見られた。）、どちらにも多く見られないハプログループに属するものが**2**個体であった。

このように核ゲノムによる性別やY染色体のハプログループ分析とミトコンドリアDNAのハプログループの結果が得られた**66**検体についてDNA鑑定の結果から、総合判定したところ、日本人かフィリピン人かはっきりしない個体が**2**検体、フィリピン人と思われる個体は**64**検体と推定された（別紙3、参照）。

地域特異的ミトコンドリアハプログループの選定

日本人／フィリピン人特異的なハプログループを選定した(Tanaka ら 2004, Tabbada ら 2010)。

	日本	フィリピン
M/N	1.3	-
A1a	2.13	0
A1b	4.57	0

A1b1	0.15	0
N*	-	0.24
N9a	4.57	0
N9b	2.13	0
N22	0	0.24
P8	0	0.95
P10	0	0.47
Y	0.15	0
Y2	0.23	4.73
HV	0.91	0
R9a	0.08	0
R9c	0	4.96
R9e	0	0.47
R24	0	3.07
B	1.3	0
B4	0.76	0
B4a	0.84	0.47
B4a1	0.84	0
B4a1a	0	10.87
B4a1a1	0	0.47
B4b	0.53	0
B4b1	2.13	7.57
B4c1	1.6	0
B4c1b	0.61	4.96
B4c2	0.08	0
B4f	0.3	0
B5a1	0	0.47
B5a2	0.61	0.24
B5b	0.3	0
B5b1	0.99	7.1
B5b2	2.29	0.71
B5b3	0.08	0
B6 (B7?)	0	0.24
F	0.23	0
F1a	0	0
F1a1	1.52	0

F1a1a	0	0.24
F1a3	0.15	3.07
F1a4	0	4.26
F1b	3.13	0
F2a	0.15	0
F2a1	0.08	0
F3	0.08	0
F3b	0	1.89
F4b	0	0.47
M*	0.38	2.36
M5/D4a/G1	0.46	0
M7a	7.39	0.24
M7a1	0.08	-
M7b		0.24
M7b1	0.08	1.18
M7b2	4.73	0
M7b3	0	3.31
M7c	0.76	1.18
M7c3c	0	11.35
M8	0.15	0
M8a	1.22	0.24
C1	0.3	0
C4a	0.08	0
C5	0.08	0
Z	1.3	0
Z6	0	0.24
G	0.53	0
G1a1/D	2.13	0
G2a	1.68	0
G2a1	2.52	0
M9a	2.44	0
M10	1.3	0
M12	0.08	0
M21a	0	0.47
M21c1a	0	0.24
M17c1a	0	1.18

M71	0	0.47
M72	0	0.24
M73a	0	0.47
D	–	0.24
D4	18.9	0
D4a	7.39	0
D4a1	0.53	0
D4b	2.36	0
D4d	2.67	0
D4k	0.15	0
D4n	0.61	0
D5	2.97	–
D5a	1.07	0
D5b	0.76	0
D5b1c	0	0.47
D6	0.08	1.42
E1	0	0.24
E1a1a	0	11.11
E1a2	0	0.24
E1b	0	1.42
E2	0	3.07
E2b	0	0.24
合計	100.0	100.0

個体数 1312 423

4. 引用文献

Adachi N, Shinoda K, Umetsu K, and Matsumura H (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*, vol. 138, 255-265.

Tanaka M, Vicente M, Cabrera VM et al. (2004) Mitochondrial genome variation in Eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Research*, vol. 14, 1832-1850.

Tabbada KA, Trejaut J, Loo J-H et al. (2010) Philippine mitochondrial DNA diversity: A populated viaduct between Taiwan and Indonesia? *Molecular Biology and Evolution*, vol. 27, 21-31.

Karafe TM, Mendez FL, Meilerman MB et al. (2008) New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Research*, vol. 18, 830-838.

Umetsu K, Tanaka M, Yuasa I et al. (2005) Multiplex amplified product-length polymorphism analysis of 36 mitochondrial single-nucleotide polymorphisms of haplogrouping of East Asian population. *Electrophoresis* vol 26, 91-98.

Loo JH, Trejaut JA, Yen JC et al. (2011) Genetic affinities between the Yami tribe people of Orchid Island and the Philippine Islanders of the Batanes archipelago. *BMC Genet.* vol 12, 21.

Hammer MF, Tatiana M. Karafet TM, Park H et al. (2006) Dual origins of the Japanese: common ground for hunter-gatherer and farmer Y chromosomes. *J Human Genetics*, vol 51, 47-58.

別紙1. サンプル(フィリピンのミンダナオ島 : CDO)の状態

山大No.	厚労省No.	部位	状態	DNA抽出日	DNA溶出量
1	29C	歯1	上顎付着歯の2本のうちの1本	2011.12/16	35ul
2	29C	歯2	3本の遊離歯の1本	12/16	35
3	89A	歯	遊離歯	12/16	35
4	91B	歯	5本のうちの1本(上顎骨に付着)	12/16	35
5	29C	歯	3本の遊離歯の1本	12/16	35
6	37B	大腿骨		12/16	35
7	54A	上腕骨		12/16	35
8	99A	大腿骨	脆く白い	12/16	35
9	58A	左大腿骨		12/16	35
10	26B	脛骨		12/16	35
11	49B	左上腕骨		12/20	35
12	3B	左上腕骨	軽く脆い	12/20	35
13	13B	大腿骨	脆い	12/20	35
14	37A	左上腕骨		12/20	35
15	26B	大腿骨	やや脆い	12/20	35
16	36B	尺骨		12/20	35
17	29C	歯	3本の遊離歯の1本	12/20	35
18	58B	大腿骨?	どちらか不明(短い)	12/20	35
19	58B	右脛骨?	どちらか不明(長い)	12/20	35
20	78	左大腿骨		12/20	35
21	62A	大腿骨	脆い	12/22	35
22	98B	大腿骨	脆い	12/22	35
23	29B	左脛骨		12/22	35
24	62B	大腿骨		12/22	35
25	20A	大腿骨		12/22	35
26	18A	右上腕骨	やや脆い	12/22	35
27	6A	大腿骨		12/22	35
28	36A	左脛骨		12/22	35
29	73A	左上腕骨		12/22	35
30	88B	左上腕骨	脆い	12/22	35
31	36A	歯	下顎骨に付着	12/24	35
32	18C	上腕骨		12/24	35
33	98C	大腿骨	脆い	12/24	35
34	18B	右上腕骨		12/24	35
35	33A	右上腕骨		12/24	35
36	SB*	右上腕骨	やや脆い	12/24	35
37	3A	上腕骨		12/24	35
38	99B	大腿骨	脆い	12/24	35
39	98A	左上腕骨		12/24	35
40	98A	遊離歯	下顎骨に付着	12/24	35
41	15	左大腿骨		2012. 1.4	35
42	15	右上腕骨	やや脆い	1/4	35
43	43B	付着歯	やや不良	1/4	35
44	67A	付着歯		1/4	35
45	98A	遊離歯1	やや不良	1/4	35
46	98A	遊離歯2		1/4	35
47	98A	遊離歯3	やや不良	1/4	35
48	98A	遊離歯4		1/4	35
49	98A	遊離歯5		1/4	35
50	98A	遊離歯6		1/4	35
51	98A	遊離歯7		1/10	35
52	98A	遊離歯8	やや不良	1/10	35
53	98A	下顎骨		1/10	35
54	71A	大腿骨		1/10	35
55	13A	大腿骨	大	1/10	35

56	13A	大腿骨		1/10	35
57	2A	顎骨		1/10	35
58	96A	大腿骨		1/10	35
59	96A	上腕骨		1/10	35
60	33B	大腿骨		1/10	35
61	14A	遊離歯1		1/14	35
62	14A	遊離歯2		1/14	35
63	14A	遊離歯3		1/14	35
64	14A	遊離歯4		1/14	35
65	14A	遊離歯5		1/14	35
66	14A	遊離歯6		1/14	35
67	14A	遊離歯7		1/14	35
68	33B	右脛骨		1/14	35
69	62C	大腿骨	脆い	1/14	35
70	62C	脛骨	かなり脆い	1/14	35
71	20C	長管骨	脆い	1/16	35
72	20A	大腿骨	脆い	1/16	35
73	20A	右側頭骨		1/16	35
74	61B	下顎骨	5本のうちの1本（下顎骨に付着）	1/16	35
75	88A	左大腿骨		1/16	35
76	88A	右上腕骨		1/16	35
77	53B	左大腿骨	大きい	1/16	35
78	53B	左大腿骨		1/16	35
79	69	上下顎骨	長い:脆い、バラバラになる	1/16	35
80	69	上下顎骨	短い:脆い	1/16	35
81	36C	上腕骨		1/25	35
82	36C	大腿骨		1/25	35
83	54B	大腿骨		1/25	35
84	30	右大腿骨		1/25	35
85	30	右大腿骨	長い	1/25	35
86	30	右上腕骨	やや脆い	1/25	35
87	69	距骨	大、脆い	1/25	35
88	69	距骨	小、脆い	1/25	35
89	20B	遊離歯1		1/25	35
90	20B	遊離歯2		1/25	35
91	20B	遊離歯3	門歯	1/29	35
92	20B	遊離歯4		1/29	35
93	20B	遊離歯5		1/29	35
94	20B	遊離歯6		1/29	35
95	20B	遊離歯7		1/29	35
96	20B	遊離歯8	中が褐色、全体から抽出	1/29	35
97	20B	遊離歯9		1/29	35
98	20B	遊離歯10		1/29	35
99	20B	遊離歯11		1/29	35
100	20B	遊離歯12	門歯	1/29	35
101	20B	遊離歯13		1/31	35
102	20B	遊離歯14		1/31	35
103	20B	遊離歯15		1/31	35
104	20B	遊離歯16		1/31	35
105	20B	遊離歯17	門歯、全体から抽出	1/31	35
106	20B	遊離歯18		1/31	35
107	20B	遊離歯19		1/31	35
108	20B	遊離歯20		1/31	35
109	20B	遊離歯21	門歯	1/31	35
110	20B	遊離歯22		1/31	35

別紙3. 核ゲノムおよびミトコンドリアDNAのデータによる総合判定

山大No.	厚労省 No.	部位	性別	Y染色体の ハプログループ	核ゲノム による判定	ミトコンドリアの ハプログループ	Tabaka et al.	Tabbada ei al.	ミトコンドリアの	核ゲノムとミトコンドリア による総合判定
							(2004) %	(2010) %	P-value	
1	29C	歯1	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
2	29C	歯2	X	-		B4a1a	0	10.87	0.00	
3	89A	歯	X	-		E1a1a	0	11.11	0.00	
4	91B	歯	-	-		不可				
5	29C	歯	XY	O1a		B4a1a	0	10.87	0.00	
6	37B	大腿骨	XY	O3		B4c1b	0.61	4.96	0.00	
7	54A	上腕骨	X	-		B4a1a	0	10.87	0.00	
8	99A	大腿骨	-	-		不可				
9	58A	左大腿骨	XY	O3		R24	0	3.07	0.00	
10	26B	脛骨	-	-		R*	17.15	51.06	0.00	
11	49B	左上腕骨	-	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
12	3B	左上腕骨	-	-		不可				
13	13B	大腿骨	-	-		不可				
14	37A	左上腕骨	-	-		M*				
15	26B	大腿骨	-	-		B4b1	2.13	7.57	0.00	
16	36B	尺骨	XY	O*		R*	17.15	51.06	0.00	
17	29C	歯	XY	O1a		B4a1a	0	10.87	0.00	
18	58B	大腿骨?	XY	O3		B5b1	0.99	7.1	0.00	
19	58B	右脛骨?	-	-		M7c3c	0	11.35	0.00	
20	78	左大腿骨	XY	O3		B4b1	2.13	7.57	0.00	
21	62A	大腿骨	XY	O1a		B5b1	0.99	7.1	0.00	
22	98B	大腿骨	-	-		不可				
23	29B	左脛骨	XY	O3		R24	0	3.07	0.00	
24	62B	大腿骨	-	-		不可				
25	20A	大腿骨	-	-		不可				
26	18A	右上腕骨	-	-		R*	17.15	51.06	0.00	
27	6A	大腿骨	-	-		R*	17.15	51.06	0.00	
28	36A	左脛骨	XY	O3		R*	17.15	51.06	0.00	
29	73A	左上腕骨	-	-		不可				
30	88B	左上腕骨	XY	O1a		E1a1a	0	11.11	0.00	
31	36A	歯	XY	O1a		R24	0	3.07	0.00	
32	18C	上腕骨	-	-		不可				
33	98C	大腿骨	-	-		不可				
34	18B	右上腕骨	XY	F-R		D6	0.08	1.42	0.00	
35	33A	右上腕骨	-	-		R24	0	3.07	0.00	
36	SB*	右上腕骨	-	-		M7c3	0	11.35	0.00	

37	3A	上腕骨	-	-		F*	5.11	9.46	0.00	
38	99B	大腿骨	-	-		不可				
39	98A	左上腕骨	-	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
40	98A	遊離齒	XY	O1a		E1a1a	0	11.11	0.00	
41	15	左大腿骨	XY	O3		F1a4	0	4.26	0.00	
42	15	右上腕骨	-	-		不可				
43	43B	付着齒	-	-		不可				
44	67A	付着齒	-	-		F*	5.11	9.46	0.00	
45	98A	遊離齒1	XY	C1*		Y2	0.23	4.73	0.00	
46	98A	遊離齒2	X	-		D5				
47	98A	遊離齒3	-	-		D5				
48	98A	遊離齒4	XY	C1*		Y2	0.23	4.73	0.00	
49	98A	遊離齒5	-	-		M7b3	0	3.31	0.00	
50	98A	遊離齒6	-	-		E1a1a	0	11.11	0.00	
51	98A	遊離齒7	XY	O*		E1a1a	0	11.11	0.00	
52	98A	遊離齒8	XY	C1*		Y2	0.23	4.73	0.00	
53	98A	下顎骨	-	-		M7c3	0	11.35	0.00	
54	71A	大腿骨	-	-		D6	0.08	1.42	0.00	
55	13A	大腿骨	-	-		不可				
56	13A	大腿骨	-	-		不可				
57	2A	顎骨	-	-		不可				
58	96A	大腿骨	-	-		F*	5.11	9.46	0.00	
59	96A	上腕骨	-	-		不可				
60	33B	大腿骨	XY	O3		M*				
61	14A	遊離齒1	XY	-		E1a1a	0	11.11	0.00	
62	14A	遊離齒2	X	-		M7c3	0	11.35	0.00	
63	14A	遊離齒3	-	-		E1a1a	0	11.11	0.00	
64	14A	遊離齒4	-	-		不可				
65	14A	遊離齒5	-	-		不可				
66	14A	遊離齒6	XY	O3		M7c3	0	11.35	0.00	
67	14A	遊離齒7	-	-		不可				
68	33B	右脛骨	XY	O*		R*	17.15	51.06	0.00	
69	62C	大腿骨	-	-		不可				
70	62C	脛骨	-	-		不可				
71	20C	長管骨	-	-		不可				
72	20A	大腿骨	-	-		不可				
73	20A	右側頭骨	-	-		不可				
74	61B	付着齒	-	-		不可				
75	88A	左大腿骨	-	-		不可				
76	88A	右上腕骨	-	-		不可				
77	53B	左大腿骨	-	-		不可				

78	53B	左大腿骨	-	-		不可				
79	69	上下顎骨	-	-		不可				
80	69	上下顎骨	-	-		不可				
81	36C	上腕骨	-	-		Q1			*	
82	36C	大腿骨	XY	D*		M7c	0.76	1.18	0.42	
83	54B	大腿骨	XY	O3		B4b1	2.13	7.57	0.00	
84	30	右大腿骨	XY	K-N		B4a1a	0	10.87	0.00	
85	30	右大腿骨	XY	O*		F1a4	0	4.26	0.00	
86	30	右上腕骨	-	-		不可				
87	69	距骨	-	-		不可				
88	69	距骨	-	-		不可				
89	20B	遊離歯1	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
90	20B	遊離歯2	XY	O3		Y2	0.23	4.73	0.00	
91	20B	遊離歯3	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
92	20B	遊離歯4	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
93	20B	遊離歯5	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
94	20B	遊離歯6	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
95	20B	遊離歯7	XY	O3		Y2	0.23	4.73	0.00	
96	20B	遊離歯8	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
97	20B	遊離歯9	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
98	20B	遊離歯10	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
99	20B	遊離歯11	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
100	20B	遊離歯12	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
101	20B	遊離歯13	XY	O3		Y2	0.23	4.73	0.00	
102	20B	遊離歯14	-	-		M7c	0.76	1.18	0.42	
103	20B	遊離歯15	XY	O3		Y2	0.23	4.73	0.00	
104	20B	遊離歯16	XY	O3		Y2	0.23	4.73	0.00	
105	20B	遊離歯17	-	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
106	20B	遊離歯18	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
107	20B	遊離歯19	XY	O3		Y2	0.23	4.73	0.00	
108	20B	遊離歯20	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
109	20B	遊離歯21	X	-		Y2	0.23	4.73	0.00	
110	20B	遊離歯22	-	-		Y2	0.23	4.73	0.00	

*36CのQ1は日本から見出されておらず、フィリピンの島から見出されているのでフィリピン人の可能性が高い (Loo ら 2011)。

	日本人かフィリピン人かはっきりしない
	フィリピン人の可能性が高い
	フィリピン人の可能性が極めて高い