

フィリピンで採集された遺骨の DNA 解析
報告書

2011年9月28日

国立遺伝学研究所 集団遺伝研究部門 教授

齋藤成也

1. 目的

検体である人骨から DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA の配列を解析することで、日本人類集団に属する個体であるかフィリピン人類集団に属する個体であるかの可能性を明らかにする。

2. 方法

はじめに、検体から必要量の骨片を回収し、クールミルを用いて粉にする。次に、シリカ法を用いて DNA を溶出・抽出する。抽出された DNA を用いて PCR を行い、得られた PCR 産物の配列を 3130xl Genetic Analyzer を用いて決定する。得られた配列からミトコンドリア DNA のハプロタイプを決定する。このハプロタイプが日本人／フィリピン人特有か否かを判断基準とする。

3. 検体・解析データ

130 検体を解析。

解析結果は、「別紙 1」に記載。

4. 解析結果

130 検体の遺骨から骨の一部を採取し、それらを破碎して、DNA 抽出を試みた。PCR 法で DNA が抽出されたと判定された 110 個体について、ミトコンドリア DNA 塩基配列のハプロタイプ解析を試みた。ハプロタイプを決定できなかったものが 44 個体、ハプロタイプを決定できたものが 66 個体だった。

ハプロタイプを決定できた 66 個体について、日本人に多く見られるハプロタイプは Tanaka et al.(2004) に公表されているデータ (サンプル数は 1,312 個体) を、フィリピン人に多く見られるハプロタイプについては、Tabbada et al.(2010) に公表されているデータ (サンプル数は 423 個体) を参考として比較した。

日本人に統計的に有意 (1%水準) に多く見られるハプロタイプに一致するものが 5 個体 (ただし、2 個体のハプロタイプは低い頻度ながらフィリピン人にも見られた。)、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 54 個体 (ただし、13 個体のハプロタイプは低い頻度ながら日本人にも見られた。)、どちらにも多いともいえないハプロタイプに一致するものが 5 個体、これまでに日本人でもフィリピン人でも発見されていないハプロタイプに一致するものが 2 個体あった。

5. PCR

ミトコンドリア DNA の D-loop 領域を中心に PCR を行った。D-loop 領域のプライマーは Adachi et al. (2009)を参考にした。

表1 D-loop 領域解析用のプライマー

Primer	判別領域 (mitochondrial DNA)	参考論文	配列
1FR	128-256	Adachi et al. 2009	AGCACCCCTATGTCGCAGTAT
			TCTGTGTGGAAAGCGGCTGT
2FR	10287-10425	Adachi et al. 2009	CCCTCCTTTTACCCCTACCA
			TAATTTAATGAGTCGAAATCATTCG
3FR	15999-16141	Adachi et al. 2009	CCATTAGCACCCAAAGCTA
			ATGTACTACAGGTGGTCAAG
4FR	16121-16238	Adachi et al. 2009	TTACTGCCAGCCACCATGAA-
			TGGCTTTGGAGTTGCAGTTG
5FR	16209-16366	Adachi et al. 2009	CCCCATGCTTACAAGCAAG
			CTGAGGGGGGTCATCCAT

ハプロタイプ (hp) を決定する際に、必要に応じて以上のプライマーに加えて表2のプライマーを用いた。作成時に参考として CRS (Cambridge Reference Sequence) を用いた (補助資料1)。hp の決定に必要な hp 特異的 SNPs は、Plylotree.org を参考にし選択した (<http://www.phylotree.org/>)。

表2 hp 特異的 SNPs 解析用のプライマー

ハプロタイプ	nucleotide positions	primer code	配列
B	8281-8289del	hp B 8280del for	agggcccgattttacccat
		hp B 8280del rev	ttagttggggcatttcaactg
M7	9824	hp M7 9824 for	ccctctacaagcctcagagta
		hp M7 9824 rev	gcggatgaagcagatagtgag
M7c	5442	hp M7c 5442 for	cgctaactactccacctcaa
		hp M7c 5442 rev	gtggaaggcgatgagtggt
M9	3394	hp M9 3394 for	gcattcctaattgctaccgaac
		hp M9 3394 rev	gggctcttgggtgaagagtttt
D	5178	hp D 5178 for	ccctactactatctcgcacctga
		hp D 5178 rev	ttttgtgaattctctcgataatgg

G	4833	hp G 4833 for	ctaggaatagecccccttact
		hp G 4833 rev	ggcttacgtttagtgagggaga
D4	3010	hp D4 3010 for	ggataacagcgcaatcctatcc
		hp D4 3010 rev	aatcggtgaacaaacgaacctt
E	13626	hp E 13626 for	aaacgcctgagccctatcta
		hp E 13626 rev	gggtggggttattttcgta
M7c3	3606	hp M7c3 3606 for	tagctctcaccatcgctcttc
		hp M7c3 3606 rev	cacctgatcagaggattgag
Y2a	12161	hp Y2a 12161 for	acacctatccccattctcc
		hp Y2a 12161 rev	aggggtcgtaagcctctggt
F1a1,4	9548	hp F1a1&4 9548 for	cactccagcctageccctac
		hp F1a1&4 9548 rev	tggtgagctcaggtgattga
F1a4	8277	hp F1a4 8277 for	gcccgtattaccctatagcac
		hp F1a4 8277 rev	atttagttggggcatttcaactg
R24	4260	hp R24 4260 for	ccattacaatctccagcattcc
		hp R24 4260 rev	tgggttcgatttcatagctct
B4a	5465	hp B4a 5465 for	catacaaaaaccccccattc
		hp B4a 5465 rev	gctttgaaggctcttggtctg
Y	8392	hp Y 8392 for	cagtgaatgcccactaaa
		hp Y 8392 rev	tttggtgagggaggtaggtg
Y2/B5a1	6941/6960	hp Y2 6941 for	acggaagcaatatgaaatgatct
		hp Y2 6941 rev	acgtgctgtagtacgatgtct
B4b	4820	hp B4b 4820 for	tccggacaatgaaccataacc
		hp B4b 4820 rev	agaggggtgccttgggtaac
M33	2361	hp M33 2361 for	aaaacattctcctccgcataag
		hp M33 2361 rev	ctttccttatgagcatgctgt
B4a1a	12239	hp B4a1a 12239 for	cgacccttatttaccgaga
		hp B4a1a 12239 rev	ttttgggcctaagaccaat
B4a1c	709	hp B4a1c 709 for	aaaatgtttagacgggctcaca
		hp B4a1c 709 rev	cgtggtgatttagagggtgaac
B4c	1119	hp B4c 1119 for	gctaagacccaaactgggatt
		hp B4c 1119 rev	atatgaagcaccgccaggt
B5a	15235	hp B5a 15235 for	ttctgagggggccacagtaat
		hp B5a 15235 rev	tgaagggcaagatgaagtga
M7b3	10497	hp M7b3 10497 for	aaacaaaacgaatgatttcgac

		hp M7b3 10497 rev	aggatatgaggtgtgagcgata
D6	12654	hp D6 12654 for	ttgttcgttacatgggtccatca
		hp D6 12654 rev	agccgatgaacagttggaatag
B5a2	11149/11151	hp B5a2 11149/11151 for	aaaccacacttatccccacct
		hp B5a2 11149/11151 rev	gagtaggggaaggggagccta
M7b	4164	hp M7b 4164 for	gattccgctacgaccaactc
		hp M7b 4164 rev	ggggaatgctggagattgta
JT	15452	hp JT 15452 for	gcctcggcttacttctctt
		hp JT 15452 rev	gaggggtgtttaaggggttg
R9c	14227	hp R9c 14227 for	ccccgagcaatctcaattac
		hp R9c 14227 rev	gagaggggtcaggggttgatt
Q	5843	hp Q 5843 for	acctcggagctggtaaaaagag
		hp Q 5843 rev	ttccaatgtctttgtggtttgt

6. 地域特異的 hp の選定

日本人／フィリピン人特異的な hp を選定した(Tanaka et al. 2004, Tabbada et al. 2010)。

表3 日本人及びフィリピン人のハプロタイプ頻度 (%)。太字で記された値は、ハプロタイプで日本人／フィリピン人の区別がつくと思われるものを示す。

	Japanese	Philippine
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

7 引用文献

Noboru Adachi, Ken-ichi Shinoda, Kazuo Umetsu, and Hirofumi Matsumura (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, pp. 255-265.

Tanaka Masashi, Vicente M. Cabrera, Ana M. González et al. (2004) Mitochondrial Genome Variation in Eastern Asia and the Peopling of Japan. *Genome Research*, vol. 14, pp. 1832-1850.

Kristina A. Tabada, Jean Trejaut, Jun-Hun Loo, Yao-Ming Chen, Marie Lin, Marta Mirazo'n-Lahr, Toomas Kivisild, and Maria Corazon A. De Ungria (2010) Philippine Mitochondrial DNA Diversity: A Populated Viaduct between Taiwan and Indonesia? *Molecular Biology and Evolution*, vol. 27, pp. 21-31.

	No.	ハプロタイプ(hp)	Tanaka et al.(2004) (%)	Tabbada et al.(2010) (%)	P-value
ミンドロ 島	1	B*	13.26	33.1	0.00 **
	2	不可			
	3	M7c3c	0	11.35	0.00 **
	4	M7c*	0.76	1.18	0.42
	5	不可			
	6	不可			0.00 **
		E1a1a	0	11.11	
		E1a1a	0	11.11	
7	M7c3c	0	11.35	0.00 **	
8	M7c3c	0	11.35	0.00 **	

ネグロ ス島	1	R24	0	3.07	0.00 **
	2	M75	0	0	
	3	B4a1a	0	10.87	0.00 **
	4	R24	0	3.07	0.00 **
	5	R24	0	3.07	0.00 **
	6	B4b1	2.13	7.57	0.00 **#
	7	E1a1a	0	11.11	0.00 **
	8	R24	0	3.07	0.00 **
	9	R24	0	3.07	0.00 **
	10	M7c3c	0	11.35	0.00 **
	11	M7c3c	0	11.35	0.00 **
	12	不可			
	13	不可			
	14	F*	5.34	9.93	0.00 **#
	15	R24	0	3.07	0.00 **
	16	不可			
	17	B4a*	1.68	11.81	0.00 **#
	18	不可			
	19	不可			
	20	R9c	0	4.96	0.00 **
	21	B*	13.26	33.1	0.00 **#
	22	Y2	0.23	4.73	0.00 **#
	23	B*	13.26	33.1	0.00 **#

ミンダナ オ島	1	E1a1a	0	11.11	0.00 **
	2	R24	0	3.07	0.00 **
	3	E1a1a	0	11.11	0.00 **
	4	不可			
	5	E1a1a	0	11.11	0.00 **
	6	不可			
	7	不可			
	8	不可			
	9	不可			
	10	不可			
	11	R24	0	3.07	0.00 **
	12	不可			
	13	不可			
	14	M7c3c	0	11.35	0.00 **
	15	不可			
	16	不可			
	17	不可			
	18	E*	0	16.32	0.00 **
	19	不可			
	20	不可			
	21	E*	0	16.32	0.00 **
	22	不可			
	23	不可			
	24	E1a1a	0	11.11	0.00 **
	25	D4	32.61	0	0.00 **

ミンダナ オ島	26	Y2	0.23	4.73	0.00 **#
	27	D4	32.61	0	0.00 **
	28	B4a	0.84	0.47	0.45
	29	Y2	0.23	4.73	0.00 **#
	30	B4c1b	0.61	4.96	0.00 **#
	31	不可			
	32	不可			
	33	D*	0	0.24	0.08
	34	B*	13.26	33.1	0.00 **
	35	不可			
	36	D6	0.08	1.42	0.00 **
	37	F1a4	0	4.26	0.00 **
	38	B*	13.26	33.1	0.00 **
	39	D4	32.61	0	0.00 **
	40	Y2	0.23	4.73	0.00 **
	41	不可			
	42	不可			
	43	不可			
	44	不可			
	45	不可			
	46	不可			
	47	不可			
	48	M7b3	0	3.31	0.00 **
	49	B5a*	0.61	0.71	0.82
	50	不可			
51	D*	37.49	2.13	0.00 **#	
52	M7b3	0	3.31	0.00 **	
53	B*	13.26	33.1	0.00 **#	
54	D*	4.88	2.13	0.01 **#	
55	不可				

ボホール 島	1	B5a*	0.61	0.71	0.82
	2	不可			
	3	不可			
	4	不可			
	5	R24	0	3.07	0.00 **
	6	R24	0	3.07	0.00 **
	7	M7c3c	0	11.35	0.00 **
	8	不可			
	9	R24	0	3.07	0.00 **
	10	F1a4	0	4.26	0.00 **
	11	不可			
	12	不可			
	13	E*	0	16.32	0.00 **
	14	R24	0	3.07	0.00 **
	15	不可			
	16	不可			
	17	不可			
	18	Q	0	0	
	19	D6	0.08	1.42	0.00 **#
	20	M7c3c	0	11.35	0.00 **
	21	不可			
	22	B*	13.26	33.1	0.00 **#
	23	B4b1	2.13	7.57	0.00 **#
	24	F1a4	0	4.26	0.00 **

日本人に統計的に有意に多く見られる	5	5%	注1
比人に統計的に有意に多く見られる	54	49%	注2
どちらに多いともいえない	5	5%	
どちらの集団にも見つからない	2	2%	
解析不能	44	40%	
合計	110	101%	

注1: 5個体のうち2個体(#印)は比人にもハプロタイプが存在する
注2: 54個体のうち13個体(#印)は日本人にもハプロタイプが存在する