

論文の内容の要旨

Application of new analytical method in biological archaeology:
proteomics of archaeological human bones and
DNA analysis of dental calculus
(生物考古学における新たな分析手法の応用:
古人骨プロテオミクス解析と歯石 DNA 分析)

氏 名 澤藤りかい

自然人類学においては形態学・DNA 配列解析・同位体分析など様々な手法を組み合わせ、古人骨から過去のヒトの生活・遺伝情報などを復元してきた。それぞれの手法には利点・欠点があり、様々な手法を組み合わせることでヒトの歴史の全体像を知る必要がある。次世代シーケンサなど、新たな分析手法の導入によって自然人類学の研究は発展を遂げてきた。本研究の目的は、古人骨から過去のヒトの営みを知るための新たなアプローチ手法を開発することである。従来の手法では得られなかった情報を取得することによって、新たな視点からも過去に起こった事実を精査でき、より高い確証を得ることができる。今回2つの新たな分析手法を古人骨に適用し、従来の手法では知ることのできなかつた知見が得られた。

① 古人骨のショットガンプロテオミクス解析

ショットガンプロテオミクス解析は、主に動物骨の種同定に用いられてきたが、古人骨に適用されたことはなかった。そこから生前の生理的情報が読み取れることを期待し、江戸時代の一橋高校遺跡から出土した8個体の肋骨（各30-50mg）を用いて、nanoLC-MS/MSによるショットガンプロテオミクス解析を行った。Maxquantを用いてタンパク質を同定し、emPAIを指標として定量化を行った。その結果、合計で668種類のタンパク質が同定され、骨有機質の大部分を占め

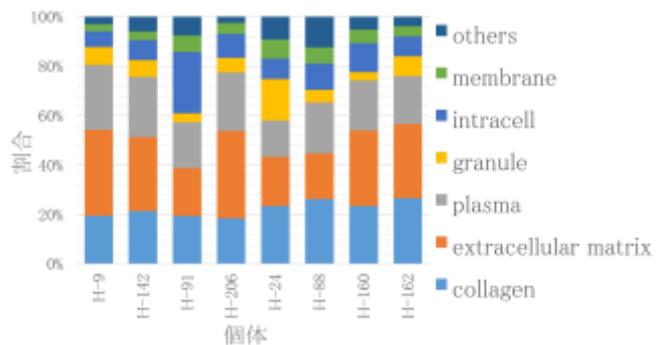


図1 得られたタンパク質の種類（存在場所）。

るコラーゲンだけでなく、細胞外マトリックスなど様々な種類のタンパク質が同定された（図1）。古代動物骨の先行研究で得られた結果と大きく異なる点は、顆粒球で発現しているタンパク質が得られたことである。これは今までの先行研究で得られたことはなく、大腿骨（現代人の大腿骨）でも発現はほとんど見られない。顆粒球は肋骨・胸椎・寛骨に多く存在する赤色骨髓に含まれる。本研究では肋骨を用いた

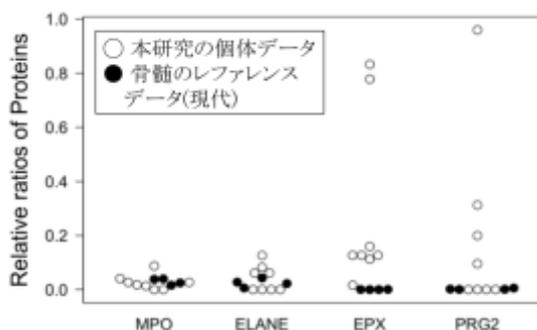


図2 顆粒球に発現しているタンパク質の割合. MPO, ELANE: 好中球に発現. EPX, PRG2: 好酸球に発現. (好中球に多く発現している DEFA1/3 を基準として割合を示した)

たので、赤色骨髓由来の顆粒球において発現しているタンパク質が得られたと考えられる。顆粒球のうち、好酸球に発現しているタンパク質の割合を現代人の骨髓レファレンスデータと比較したところ、好酸球由来のタンパク質の発現が高い個体が見られた（図2）。好酸球由来のタンパク質の高い発現は、生前の免疫応答を反映していると考えられる。また、年齢と相関するタンパク質群を調べたところ、特に alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG) が有意に負の相関を示すことが分かった ($p < 0.001$)。AHSG など年齢と相関のあるタンパク質の発現量を指標として、将来的に破片骨から年齢層を推定できる可能性がある。

② 歯石からの食物 DNA 解析

過去の食性を知る上で困難なことの1つは、種・属レベルでの食物の同定である。特に植物においては葉・茎・根などの柔組織は遺存体として残りにくく、食物の品目を知ることが難しい。人骨に残る歯石（歯垢が石灰化したもの）にはバクテリア DNA が多く含まれ、ごく僅か（～0.01%）にバクテリア以外の DNA も含まれている。歯石に含まれる微量の食物 DNA から、当時の食性を復元できるか調べるため、江戸時代の雲光院遺跡から出土した人骨 13 個体の歯石（各 10-40 mg）と、比較のため下顎孔内に残存する土試料を用いて食物 DNA の配列解析を行った。まず始めに、当時の主食であったコメが検出されるかどうか、増幅されやすく特異性の高いプライマーを用いて PCR 解析・サンガー法によるシーケンスを行った。その結果、イネ属特異的な配列を半数以上の個体で増幅・解読することができた（8 個体/13 個体）。土、ネガティブコントロールでは同様の DNA 配列は増幅されなかった。更に主食だけでなく、食性の多様性を知るため、イネ属の配列が得られた 8 個体を用いて葉緑体中の trnL 領域を標的とした DNA metabarcoding を行った。また、あわせて動物（肉・魚）、菌類を標的とした DNA metabarcoding も行った。2-step PCR 法を用

いて次世代シーケンサで解析したところ、植物においてはシソ属、イネ属、アブラナ属などを含む7科・10属が同定された。ネギ属など、遺跡に残りにくくデンプン粒解析の難しい植物のDNA配列も歯石から検出された。ほとんどの分類群は日本に存在しているが、唯一存在していないのはフタバガキ科 (*Dipterocarpaceae*、熱帯に生息) であった。当時は竜腦というフタバガキ科の竜腦樹 (*Dryobalanops aromatica*) 由来の生薬が歯磨剤として使われていたことから、このDNA配列は歯磨剤の成分に由来する可能性が高い。また、菌類に関しては複数の分類群が検出されたが、動物(肉・魚)に関しては検出できなかった。以上のことから、当時の食の多様性と生活習慣について分析できる可能性が示唆された。この方法は更に古い試料に適用することで、歴史文献のない時代の食性も明らかにできると考えられる。