

# ヒト mtDNA からみた静岡県人の集団形成

静岡県立掛川西高等学校 自然科学部  
2年 夏目翔太郎 藤野朗 薄田隼弥 丸山海成

## 1 実験背景

ヒトミトコンドリアND2 遺伝子の5,178番目にはSNPが見られ、アデニン(5178A)である場合とシトシン(5178C)である場合が存在するということが知られている。日本人では、渡来系(弥生系)の人には5178Aが、先住民族とされる縄文系の人には5178Cがみられる。また、日本人の祖先は北海道アイヌから流入してきたハプロタイプNを持つ北方系縄文人と沖縄・九州地方から流入してきたハプロタイプMを持つ南方系縄文人との二系統に分類することができることが知られている。これについてはヒトミトコンドリアND3 遺伝子の10398番目の塩基を比較して、グアニン(10398G)であれば南方縄文系、アデニン(10398A)であれば北方縄文系であるというように判別することができる。とされている。

私たちは昨年度から本校理数科生徒を対象にmtDNAが母系遺伝であることに着目し、サンプルDNA提供者とその母親の出身地情報から5178A/Cのどちらの多型を持つ集団がどの地域から移住してきているのかということ調査して世代間の集団構成の推移を予測してきたが、10398多型による北方南方縄文系の分布推移については未調査のままだった。

本年度は昨年度よりもデータの信憑性を高めるために全校生徒とその母親及び母方の祖母を調査対象とし、本校生徒において縄文系弥生系がどのように分布しているのか調査を行うことを第一目標とした。さらに今回調査したデータをもとに静岡県内で北方南方縄文系がどのように分布しているのか調査することを第二目標とした。

## 2 実験方法

### (1) DNA サンプル回収

本校全校生徒に耳垢、腕毛もしくは爪のサンプルと生徒と生徒の母親、生徒の母方の祖母の出身地情報の提供の依頼をするために校内に校長先生を責任者とする倫理委員会を設置した。サンプル提供の依頼、収集方法、収集日時、実験の範囲などを記した保護者あての文書を作成し、委員会に提出して了解を得た。全校生徒に提供依頼の文書とサンプル採取キットを配布し、耳垢の場合は綿棒を用いて採取し、1.5mlまたは0.5mlのエッペンドルフチューブに入れてもらった。キットには出身地記入用紙を折りたたんで同封してもらったようにした。記入の方法は、個人を特定しうる筆跡が残らないよう地域名に丸を付けるだけという方式をとった。サンプルは全部で183個回収することができた。

### (2) サンプルからのDNAの抽出と増幅

タンパク質を分解し、DNAのみを取り出すために、タンパク質分解酵素であるプロテイナーゼKを用いた。サンプルがツメの場合はコンタミを防ぐためにセラミックビーズ入りのエッペンドルフチューブで攪拌し、表層を削った後同様の処理を行った。

### (3) DNAの増幅

DNA増幅にはPCR法を用いた。サーマルサイクラーを使用し、94°Cで2分間の熱変性を行い、98°Cで30秒間のDNA鎖の解離、53°Cで30秒間のアニーリング、68°Cで1分間の伸長反応を35回繰り返した。PCR法に用いた溶液は以下に示す。

溶液等	添加量 (μl) (1 サンプルあたり)
Quick Taq HS Dyemix	12.5μl
各 DNA	1μl
混合プライマー	
F primer : R primer : 滅菌水= 1 : 1 : 8 で混合	1μl
滅菌水	11μl
合計	25.5μl

表1 PCR 溶液の組成

(4) 電気泳動

PCR 後、DNA の増幅を確認するために 1.5% のアガロースゲルを用いて 100V で約 30 分間電気泳動にかけ泳動が十分に行われていることが確認された後、10,000 倍に薄めた蛍光色素 (GelRed、Biotium 社製) で 30 分間染色し紫外線蛍光装置で増幅を確認した。

(5) 制限酵素による DNA の切断処理

今回は制限酵素 Alu-1 を用いることで多型の識別を行った。Alu-1 は塩基配列 AGCT を認識して切断する酵素である。目的の 5178 番周辺の塩基配列が AGCT と AGAT であるため、5178C なら 221bp と 186bp と 408bp に、5178A なら 221bp と 594bp に切断される。同様に 10398 番周辺の塩基配列が AACC と AGCT であるため、10398A なら 174bp に 10398G なら 54bp と 120bp に切断される。

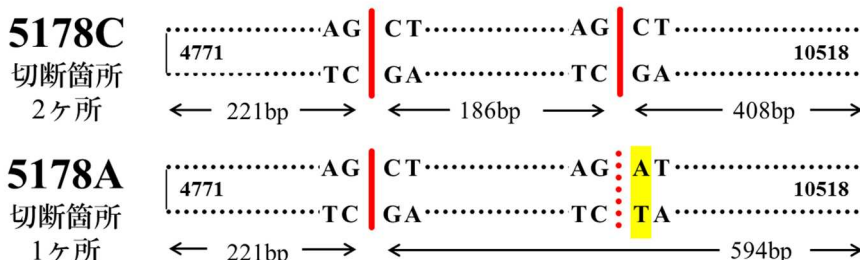


図1 制限酵素による処理の様子 (5178A/C)

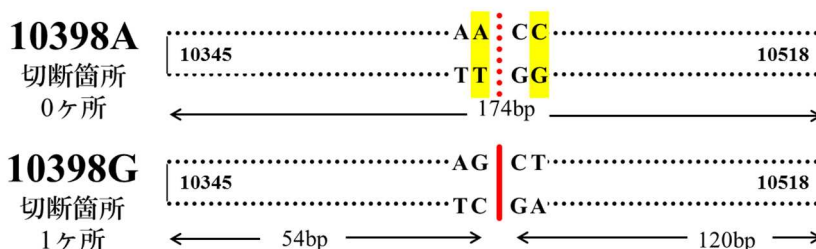


図2 制限酵素による処理の様子 (10398A/G)

生じる DNA 断片長のうち、長さの差が最も大きい 5178C の 408bp と 5178A の 594bp を、10398G の 120bp 及び 54bp と 10398A の 174bp を電気泳動で判別する。

増幅した DNA 5 μl と Alu-1 混合液 (Alu-1、L Buffer、滅菌水を 1 : 2 : 17 で混合)

5 μl を PCR 用 0.2ml エッペンドルフチューブに入れ遠心分離した後、37°C で一時間

インキュベートした。

(6) DNA バンドの確認

PCR 後と同様の方法で、切断した DNA バンドの確認を行った。図 3 (5178 多型) は 100bp ラダーマーカーの 400bp に近い位置にバンドが現れれば 5178C、600bp に近ければ 5178A となる。図 3 では右から 5178C、5178C、5178C、5178A…となる

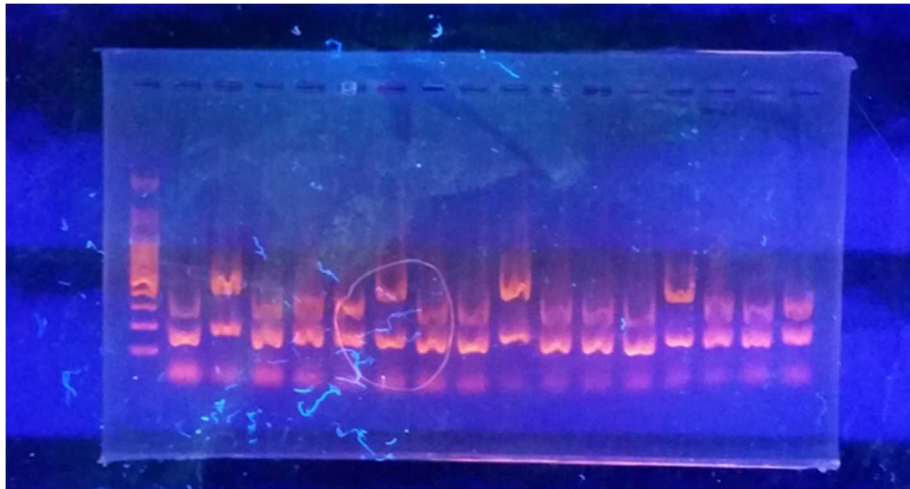


図 3 電気泳動結果 5178A/C

3 実験結果

5178 多型の結果を表に示す。183 サンプル中 171 サンプルの解析に成功した。

多型 出身地	生徒の世代		母親の世代		祖母の世代	
	5178C	5178A	5178C	5178A	5178C	5178A
静岡県内	85	81	65	68	57	57
静岡県外	-	-	20	14	26	20
出身地不明	4	1	4	-	6	5
合計	89	82	89	82	89	82

表 2 出身地別の結果 (5178A/C)

10398 多型は、5178C を示した 89 サンプル中 42 サンプルの解析に成功した。

	生徒の世代		母親の世代		祖母の世代	
	10398G	10398A	10398G	10398A	10398G	10398A
静岡県内	22	17	18	12	14	10
静岡県外	-	-	4	5	8	7
出身地不明	-	3	-	3	-	3
合計	22	20	22	20	22	20

表 3 出身地別の結果 (10398A/G)

#### 4 考察

表2の結果から静岡県内だけを選び出し、グラフにまとめたものを図4にまとめる

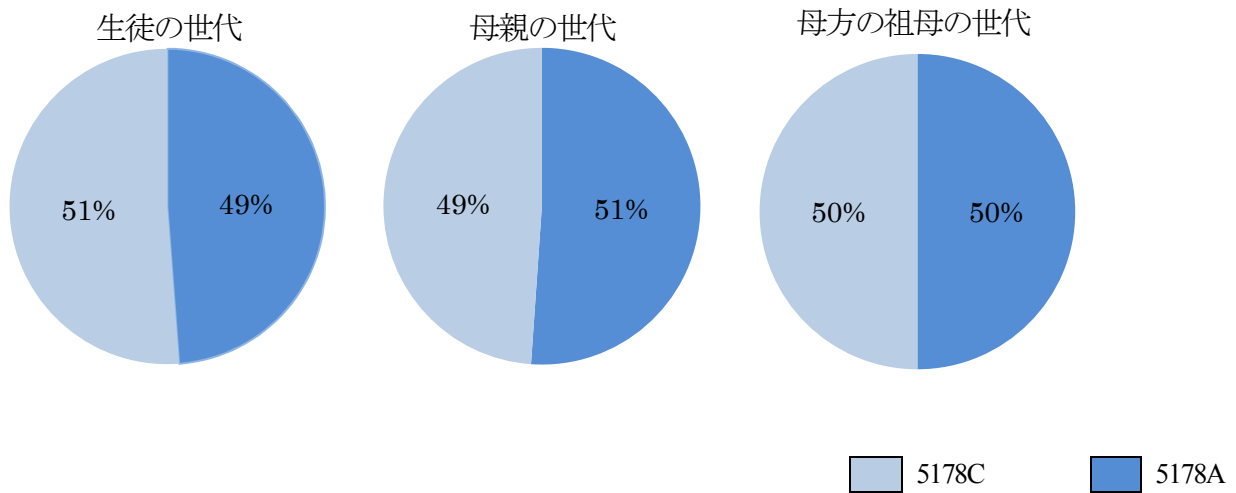


図4 5178A/Cの結果を世代別に割合で示したグラフ

この結果より、生徒、母親、母方の祖母の3世代において、5178Cと5178Aの割合はほとんど変化せず、同じであると考えられる。このことは、世代を経るにしたがって5178A/Cの割合にほとんど変化はみられないだろうということも示している。

表3の結果から静岡県内出身者だけを選び出し、グラフにまとめたものを図5にまとめる。

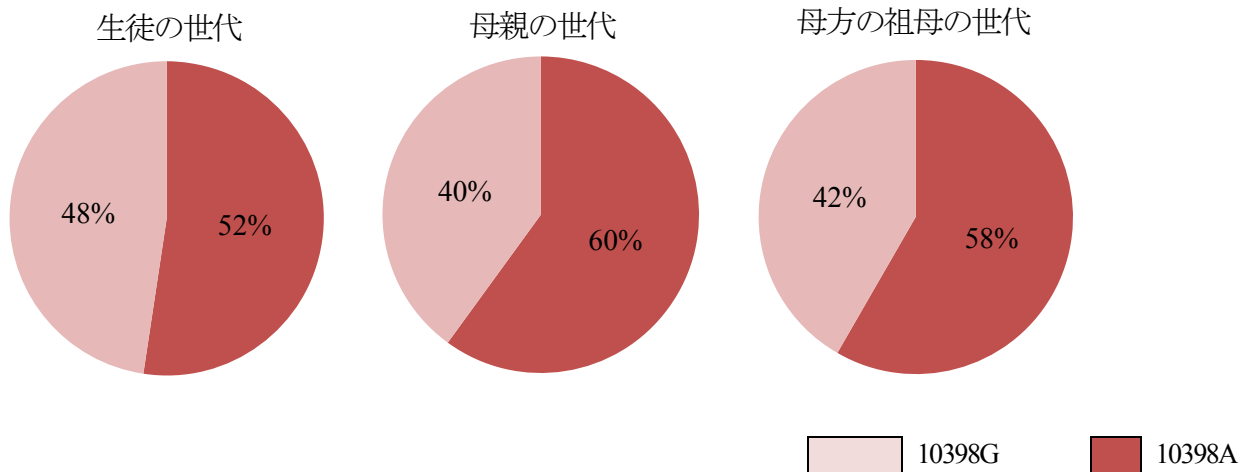


図5 10398A/Gの結果を世代別に割合で示したグラフ

この結果より、祖母と母親の世代間では大きな変化はないことがわかる。一方、母親から生徒の世代にかけて10398Gの割合が増加していることがわかる。このことから今後、静岡県内において南方縄文系の遺伝子をもつ人の割合が増加している可能性があると考えられる。

表2及び表3から弥生系、北方縄文系、南方縄文系の静岡県内出身者だけを選び出し、グラフにまとめたものを図6に示す。

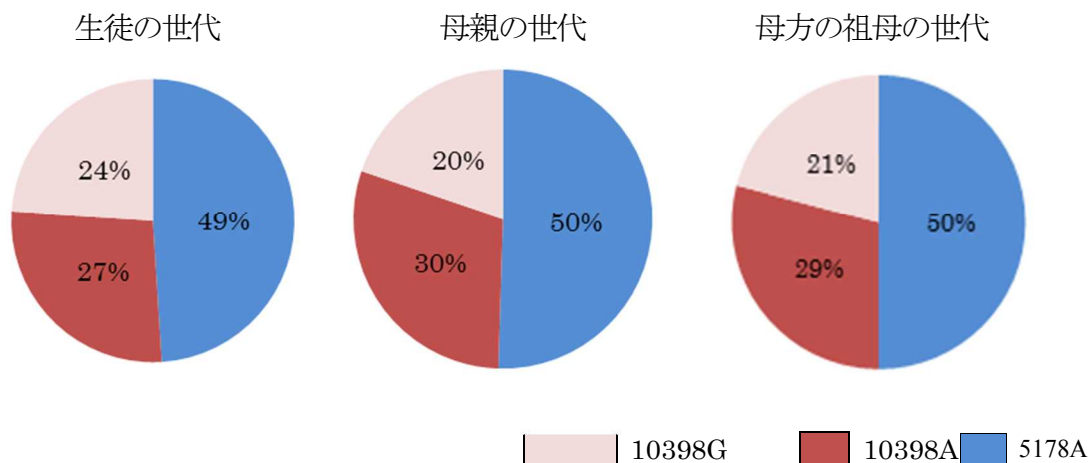


図6 5178A、10398G、10398A の割合世代別で示したグラフ

この結果から祖母の世代から母親の世代にかけては5178A、10398G、10398A ともに変化はほとんどみられないが、母親と生徒の世代にかけては10398Gの割合が4%増加していることがわかる。このことから今後、縄文系弥生系全体でみても南方縄文系の遺伝子を持つ人の割合が増加する可能性があると考えられる。

## 5 反省・課題

反省すべき点は、データ数が十分でなかったこと、コンタミネーションが発生してしまった可能性があること、実験期間の見通しが甘かったために10398多型をすべて解析することができなかったことであろう。実験技術のさらなる向上に努めたい。

## 6 謝辞

今回の研究にあたり、サンプルを提供してくださった生徒とご家族の皆様、校長先生をはじめとする倫理委員会の先生方に深く御礼申し上げます。また、様々な助言をしていただいた静岡県立大学・河原崎泰昌准教授、実験資金を提供して下さった山崎自然科学教育振興会様に御礼申し上げます。

今年度は科学技術振興機構中高生の科学研究活動推進プログラムに参加しています。

## 7 参考文献

- (1) H27. 静岡県高等学校理科教育研究会 日本生物教育会静岡県支部夏期研修会資料 掛川西高校教諭 松下保男
- (2) ヒトミトコンドリアDNAの比較による多型分析 (青森県・三沢高校)  
<http://www.misawa-h.asn.ed.jp/topdadta/DNA.pdf>
- (3) 東京都健康長寿医療センター研究所ホームページ ミトコンドリア遺伝子と長寿  
[http://www.tmig.or.jp/J\\_TMIG/kouenkai/koza/62koza\\_3.html](http://www.tmig.or.jp/J_TMIG/kouenkai/koza/62koza_3.html)
- (4) Homo sapiens haplotype M\*1 mitochondrion, complete genome  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/af382012.1>
- (5) DNAで語る日本人起源論 篠田謙一 著 (岩波現代全書)
- (6) 日本人になった祖先たち DNAから解明するその多元的構造 篠田謙一 著 (NHK BOOKS)
- (7) 人類の足跡 10万年全史 Stephen Oppenheimer 著 仲村明子 訳 (草思社)
- (8) 細胞の働きに影響するミトコンドリアDNAの個人差を特定