

令和元年6月18日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03104

研究課題名(和文) プラント・オパールからの遺伝情報抽出手法の実用化に向けた開発的研究

研究課題名(英文) Study for practical use of the technique of salvaging the genetic information existing in the rice phytolith

研究代表者

宇田津 徹朗 (Udatsu, Tetsuro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：00253807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、残留性に優れた植物遺存体の一つであるプラント・オパールに内在する遺伝情報を取り出し活用する技術を実用化レベルに引き上げるべく、次の3点に取り組んだ。

堆積環境・土性などが異なる生産遺構土壌における当該手法の有効性の検証、土壌からのプラント・オパールの抽出工程の効率性と普及性の向上、手法のマニュアル化と第三者による手法の実用性と効果の検証

結果、「水田土壌100gから分析に必要なプラント・オパールと内在する遺伝情報の抽出が可能であり、基礎実験スキルを有する者であれば、当該手法を利用できること」を明らかにでき、当該技術の実用化を達成できたと判断される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

稲作の存否の検証に用いられるイネのプラント・オパールから遺伝情報が得られることにより、稲作史研究における限界の一つであった「時間と空間を網羅したイネ情報の整備」への道が拓かれたと言えます、国内外の関連研究分野の進展に大きく貢献できる成果と言える。

また、本研究により復元される過去のイネの遺伝情報は、学術研究のみならず育種など農学部分野における社会実装にも繋がる可能性を有する成果でもある。

研究成果の概要(英文)：Rice phytolith is a highly persistent plant remains and is used to study about ancient rice cultivation. In the previous study, we developed a basic technique to recovery remained genetic information from inside of rice phytolith. However, some problems remained with the basic technique. Therefore, in this research, we improved for the following three agendas with practical applications and presented a new method to examine rice phytolith DNA. (1) Verification of the effectiveness of this technique for various sedimentary environments and soils of production residual soil. (2) Improvement of efficiency in extraction process of phytolith from the soil. (3) Verification of the practicality and effectiveness of this technique by a third party

As a result, it becomes clear that anyone who has basic experiment skills can recovery genetic information from rice phytolith extracted from paddy soil by using the method constructed in this research.

研究分野：地域農学

キーワード：プラント・オパール 遺伝情報の抽出 イネの多様性評価

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請時における背景

プラント・オパールは細胞壁に蓄積された珪酸で形作られており、その形成過程で内部に細胞質が取り込まれている。その大部分は土壤中で分解消失してゆくが、中には、それらを留めたものが見つかる（写真1 矢印部分）。ここに遺伝情報が存在することは、イネのプラント・オパールを対象とした DAPI 法により、指摘されていた（高橋・佐藤 2001）。もし、土壤からプラント・オパールを大量に抽出し、内在する遺伝情報を利用できれば、過去に栽培されたイネの情報が質・量ともに飛躍的に高まることが期待された。

土壤からプラント・オパールを抽出する技術は、研究代表者により、一般的な土壤 500 g から 300 万～600 万個を抽出できる方法が確立された。そこで、平成 25～27 年度の 3 年間（挑戦的萌芽研究）で、その抽出技術と研究分担者（田中）が有する DNA 分析技術を組み合わせ、イネのプラント・オパールに内在する遺伝情報の存否の確認と遺伝情報を取り出す手法の検討を行ってきた。その結果、遺伝情報が存在していること、ならびにその遺伝情報を DNA 増幅法により復元（図 1）して利用できること（田中・宇田津 2015）をほぼ明らかにできた。

このように、内在する遺伝情報へのダメージを抑えながら土壤からプラント・オパールを抽出し、遺伝情報を復元するまでの基本的な手法はほぼ構築できた。しかし、抽出の工程など、手法の工程に試行錯誤的な要素が残っており、実用化には今一步という状況であった。



写真 1 土壤中から検出されたイネのプラント・オパール

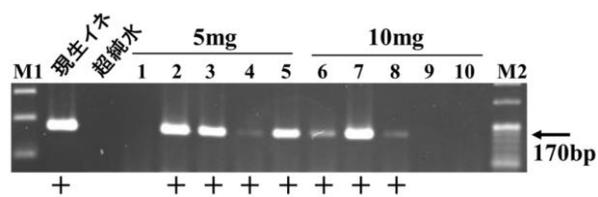


図 1 水田土壤に含まれるプラント・オパールから抽出し増幅された DNA

(2) 申請時における動機

これまでに当該手法によって復元された遺伝情報には、脱粒性遺伝子、モチ・ウルチ遺伝子、開花制御遺伝子、栽培化関係遺伝子（*PROG1*）など、稲作の伝播や発達を評価する上で有効なものが多数含まれていた（田中・宇田津 2015）。故に、当該手法が一般的な研究設備を有している大学や研究機関等で活用できる実用的手法にできれば、残留性に優れる（ほぼ確実に検出できる）というイネのプラント・オパールの特性を利用して、稲作の起源・伝播・技術発達の研究に必要な「時代と地域を網羅したイネの情報」をこれまでにない質と量で収集蓄積することが可能となると期待された。

そこで、これまでの研究代表者らの研究成果と実績を踏まえ、当該手法の実用化を柱とした本申請研究を発想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、残留性に優れた植物遺存体の一つであるプラント・オパールに内在する遺伝情報を取り出し活用する技術を実用ステージまで引き上げ、稲作分野の研究における一般的な手法として確立することを目的とした。具体的には、以下の 3 点について取り組み、土壤からのプラント・オパールの抽出から内在する遺伝情報の抽出までの一連の手法の実用化を目指した。

【実用化にむけた 3 つの取組】

- 取組 1：堆積環境・土性などが異なる生産遺構土壤を対象に当該手法の有効性を検証する
- 取組 2：土壤からのプラント・オパールの抽出工程や時間の短縮化ならびに当該手法の工程を汎用機材で構成し、処理工程のルーティン化と分析マニュアルの作成を行う
- 取組 3：構築した手法の実用性と効果の再現性（プラント・オパールから遺伝情報が抽出できるか？）についてクロスチェック（第三者による検証）を実施する

3. 研究の方法

本研究では現有する技術を基礎として、研究目的に挙げた 3 つの取組について、それぞれ、以下の方法で具体的に調査・分析・改善を行った。

(1) 取組 1：堆積環境・土性などが異なる生産遺構土壤を対象に手法の有効性を検証

当該取組については、右図に示したとおり、北海道を除き、本州、四国、九州、沖縄を対象として、生産遺構土壤を収集し、分析の試行に供した。生産遺構の立地とそれに伴う堆積環境については、以下の内容を網羅するように選定した。沖縄を加えることで、気候区分も、温帯から亜熱帯までをカバーした。

立地・堆積環境：後背湿地、谷底平地、扇状地扇中央の谷状の凹部、扇状地の扇端

土性：砂～シルトを中心とする水田土壤、砂礫を主体とする水田・畠土壤、砂を主体とする畠の可能性をもつ土壤

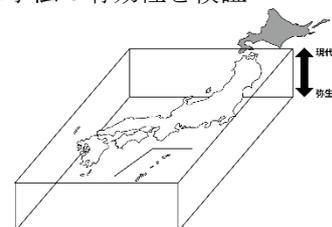


図 2 遺跡の範囲と時代

(2) 取組 2：土壌からのプラント・オパールの抽出工程や時間の短縮化ならびに当該手法の工程を汎用機材で構成し、処理工程のルーティン化と分析マニュアルの作成

土壌からのプラント・オパールの抽出工程は、プラント・オパールに該当する粒径と比重を利用し、フィルターと沈底法による粒径分画ならびに SPT 重液を利用した比重分画を組み合わせることを基本としているが、プラント・オパールを含む土壌構成粒子の分散にばらつきが大きく、実験者が試料の状態を観察しながら、それぞれの分画処理を調整する必要があった。

そこで、実験者による調整作業を汎用機材による画一的な処理工程に置換できるように（ルーティン化）、条件の検討を行った。また、重液による分画の程度、超音波処理の有無や乾燥方法（低温乾燥・低圧乾燥・凍結乾燥）は、全ての処理の組み合わせについて、プラント・オパールからの DNA 抽出を行い、最適化を検討した。検討結果は、マニュアルとしてまとめた。

また、プラント・オパールからの DNA 抽出についても、効率化と普及性を視野にいれ、必要なプラント・オパールの最少化やよりニーズの高いマーカーの開発にも取り組んだ。

(3) 取組 3：構築した手法の実用性と効果の再現性（プラント・オパールから遺伝情報が抽出できるか？）についてクロスチェック（第三者による検証）を実施

土壌からのプラント・オパール抽出工程のクロスチェックは、マニュアルに従って、同一試料を複数の実験者により抽出操作を実施し、抽出量と純度の比較から主に実用性を検証した。プラント・オパールに内在する遺伝情報の抽出については、試料汚染の可能性も考慮し、研究分担者の実験室とは異なる他大学の実験室で第三者による抽出実験を実施し、その再現性を検証した。

4. 研究成果

(1) 実用化に関する 3 つの取組に関する研究成果

①取組 1：堆積環境・土性などが異なる生産遺構土壌を対象に当該手法の有効性を検証

供試した 8 つの遺跡の土壌から抽出したプラント・オパールに内在する遺伝情報の増幅を行った結果、全ての土壌からプラント・オパール中の遺伝情報を抽出することができた。

時代についても、弥生時代、古墳時代、現代の水田土壌を供試して、後述する新しい工程により抽出したプラント・オパールからは、葉緑体ゲノムだけでなく核ゲノムの DNA 断片を還元できた（写真 2）。葉緑体ゲノムや核ゲノムの抽出状況については、試料による違いはあるものの、堆積環境・土性・気候区分との関連性は特に認められなかった。以上の結果から、生産遺構土壌による当該手法の有効性には特段の差異がないことが確認された。

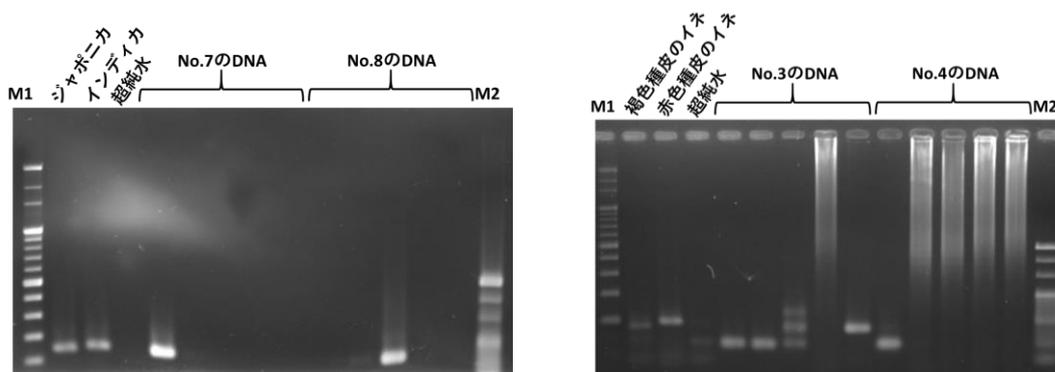
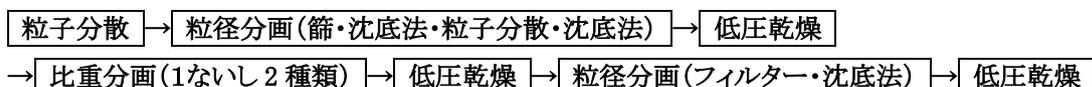


写真 2 電気泳動の結果（左：葉緑体ゲノム、右：核ゲノム）

②取組 2：土壌からのプラント・オパールの抽出工程や時間の短縮化ならびに当該手法の工程を汎用機材で構成し、処理工程のルーティン化と分析マニュアルの作成

土壌からのプラント・オパールの抽出工程については、粒子分散の工程を従来にくらべて、8 倍に希釈した沈底法による処理を行った後に機械による粒子分散処理を行うことで、土性にかかわらず、ほぼ一律な時間管理によって、粒径分画を行うことが可能な条件を見だし、設定することができた（ルーティン化）。また、実験者を長く拘束する沈底法についても、事前にフィルターによる分画を加えることにより、大幅に時間を短縮することができた。結果、構築した抽出工程により、従来に比べて、実験者の拘束時間を従来の 20～25%程度に短縮できた。

【土壌からのプラント・オパールの抽出工程】



また、当該技術の普及性を目的とした、汎用機材による工程の代替は、粒子分散を沈底法とスターラー、乾燥工程を低圧乾燥ユニット（減圧チャンバー+凍結トラップ+真空ポンプ）とすることで、汎用性と効率性を高めることができた。

さらに、DNA 抽出の効率をより高めるために、イネプラント・オパール以外のプラント・オパ

ールならびに、炭化物などの夾雑粒子を除去する条件設定も行い、これまで以上に良好かつイネプラント・オパール含有率の高い試料（写真3）が作成可能となった。

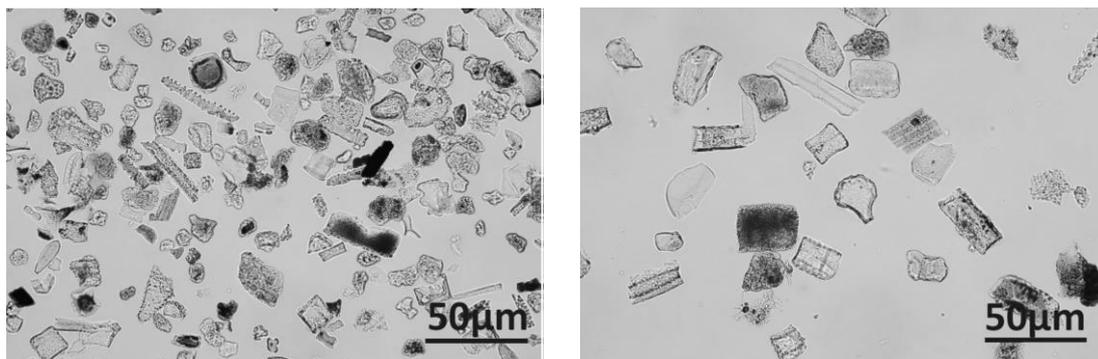


写真3 抽出処理の効果（左：処理前、右：処理後）

また、プラント・オパールからの遺伝情報の抽出についても、効率性と普及性の向上に繋がる以下の2つの成果が得られた。

・遺伝情報の抽出ならびに復元に必要なプラント・オパールの最少化

プラント・オパールから抽出したDNA溶液について、復元可能な量を検討した結果、10,000倍希釈でも、領域によっては復元可能であることが判明し、より少量（10mg程度）のプラント・オパールでも分析の対象になり得ることが明らかとなった。現在、100gの土壌からは、プラント・オパールが300mg～600mg程度抽出されるものが多いことから、理論上は、数gの生産遺構土壌から、遺伝情報が抽出できる可能性が示唆された。

また、プラント・オパールからの遺伝情報の抽出では、葉緑体ゲノム領域（rps16 intron1）と核ゲノムの第6染色体領域（IDJ6）についてPCR増幅をした結果では、わずか5回の反復によってDNAが復元可能という結果が得られた。これらの成果から、より少量の土壌やプラント・オパールでも分析対象とすることが可能であると判断された。

・栽培されたイネの多様性評価について

日本の基幹品種や在来品種を識別可能なSSRマーカーを開発することができた。当該マーカーを用いることで、栽培されたイネの多様性を評価できる見通しを得ることができた。

③取組3：構築した手法の実用性と効果の再現性（プラント・オパールから遺伝情報が抽出できるか？）についてクロスチェック（第三者による検証）を実施

土壌からのプラント・オパールの抽出工程については、複数の実験者にマニュアルに従い、それぞれ100gの土壌について抽出を行った結果、抽出量およびプラント・オパールの純度に大きな差異は認められなかった。また、当該手法の再現性についても、研究分担者（弘前大学）により遺伝情報が抽出されたプラント・オパールについて、岡山大学にてマニュアルに従って基本的な実験スキルを有する分析初心者による抽出を実施した結果、同様の結果が得られることが確認できた。以上の結果から、構築した手法の実用性と効果の再現性を明らかにできた。

(3) まとめと展望

今回の取組の結果、稲作の存否の検討や水田遺構の探査に用いられるプラント・オパールを土壌から効率的に抽出し、さらにそこから遺伝情報を抽出するという一連の技術の実用性を高め、一般的に利用可能な実用レベルに引き上げることができた。

今後は、当該分析技術を国内の主要な時代と地域の稲作遺跡に適用することで、これまでの考古学・農学・歴史学などの研究成果を補完・連携しながら、時間と空間を網羅した稲作データ（特に栽培されたイネの情報）を蓄積し、稲作史の解明に寄与してゆきたい。

<引用文献>

- ① 高橋 光子、佐藤 洋一郎、出土プラント・オパールにDNAが含まれる可能性、日本文化財科学会第18回大会 研究発表要旨集、2001、82-83
- ② 田中 克典、宇田津 徹朗、プラント・オパールからのDNA復元、日本文化財科学会第32回大会 研究発表要旨集、2015、304-305

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

- ① 宇田津 徹朗、橋通東1丁目の埋没水田土壌のプラント・オパール形状解析結果について、宮崎県埋蔵文化財センター発掘調査報告書、査読無、244巻、2018、44-46

〔学会発表〕（計6件）

- ① 田中 克典、宇田津 徹朗、イネプラント・オパール中に内在する遺伝情報抽出手法の実用化

に向けた研究（第3報）、日本文化財科学会、2018

② 田中 克典、コメは何処から・植物 DNA から探る稲作伝来、第 62 回明治大学博物館公開講座考古学ゼミナール『DNA から探る古代の日本列島』、2018

③ 宇田津 徹朗、右田 晋太郎、石川 隆二、一谷 勝之、プラント・オパール形状を利用した野生イネの分化と変遷に関する基礎的研究、日本文化財科学会、2018

④ 田中 克典、宇田津 徹朗、古賀 達朗、イネプラント・オパール中に内在する遺伝情報抽出手法の実用化に向けた研究（第2報）、日本文化財科学会、2017

⑤ 宇田津 徹朗、田中 克典、古賀 達朗、イネプラント・オパール中に内在する遺伝情報抽出手法の実用化に向けた研究（第1報）、日本文化財科学会、2017

⑥ 田崎 博之、土中に残された環境変化と人間活動を読む、日本植生史学会、2017

〔図書〕（計4件）

① 佐藤 洋一郎、宇田津 徹朗、平川 南、猪谷 富雄、花森 功仁子、仲田 雅博、臨川書店、日本のイネ品種考、2019、264

② 上條信彦、田崎 博之、宇田津 徹朗、高瀬克彦、田中 克典 他、弘前大学人文社会学部 北日本考古学研究センター、東日本における農耕文化の展開、2019、64

③ 小泉 翔太、田中 克典、上條 信彦、弘前大学人文学部北日本考古学研究センター、日本の出土米 IV 東日本出土米の粒形質・DNA 分析、2019、354

④ 上條 信彦、田崎 博之、宇田津 徹朗 他、弘前大学人文社会学部 北日本考古学研究センター、岩木山麓における弥生時代前半期の研究、2019、241

⑤ 田崎 博之、高瀬 克範、岩井 浩介、上條 信彦、禰亙田 佳男、弘前市教育委員会、砂沢遺跡シンポジウム—弥生最北・東日本最北の水田の実像を追う—、2017、50

〔その他〕

アウトリーチ活動

ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI

講座名『土の粒子から農業や環境の歴史を科学する』

【課題番号 HT28307】2016 年 7 月 26 日実施 対象：中学生

【課題番号 HT29319】2017 年 7 月 25 日実施 対象：中学生

【課題番号 HT30264】2018 年 7 月 27 日実施 対象：中学生

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：田中 克典

ローマ字氏名：(TANAKA, katsunori)

所属研究機関名：弘前大学

部局名：農学生命科学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：00450213

研究分担者氏名：田崎 博之

ローマ字氏名：(TASAKI, hiroyuki)

所属研究機関名：愛媛大学

部局名：埋蔵文化財調査室

職名：教授

研究者番号（8桁）：30155064

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山本 悦世

ローマ字氏名：YAMAMOTO, etsuyo

研究協力者氏名：井上 智博

ローマ字氏名：INOUE, tomohiro

研究協力者氏名：佐藤 洋一郎

ローマ字氏名：SATO, yoichiro

研究協力者氏名：加藤 謙司

ローマ字氏名：KATO, kenji

研究協力者氏名：石川 隆二

ローマ字氏名：ISHIKAWA, ryuji

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。