

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19103

研究課題名（和文）次世代DNAバーコーディングによる近縁生物混合試料の構成解析

研究課題名（英文）Analysis of the composition of a mixed sample of closely related organisms using next-generation DNA barcoding

研究代表者

陶山 佳久（Suyama, Yoshihisa）

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：60282315

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：近縁な生物組織の混合試料の構成を明らかにするDNA分析技術を開発した。具体的には、1）加工食品等における構成品種の識別と、2）堆積土壤に含まれる植物種の構成解析を行なった。1）については、MIG-seq法（Suyama & Matsuki 2015）を応用することで、単純な混合試料であれば基本的な構成解析は可能であることをマメ類の市販加工食品によって明らかにした。2）については、複数の典型的な森林植生下の堆積土壤を試料としたほか、古代遺跡の堆積土壤を対象試料とし、MPM-seq法（Suyama et al. 2022）やターゲットキャプチャー法等によってその分析が可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、加工食品等において使用されているごく近縁な品種を見分けることができることを示しているため、たとえば品種偽装を抑制できる可能性がある。また、たとえば環境DNA分析においてより近縁な生物種等を識別できる可能性を示している。特に考古学における古代DNA分析において、過去に存在していた近縁種の識別を可能にするだけでなく、たとえば地域系統の識別や個体数の推定など、その応用の範囲は広い。この分野の研究の進展に寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We developed a DNA analysis technology to clarify the composition of mixed samples of closely related biological tissues. Specifically, we 1) identified the constituent varieties of processed foods, and 2) analyzed the composition of plant species contained in sedimentary soil. Regarding 1), we demonstrated that basic compositional analysis is possible with simple mixed samples using commercially available processed foods of legume varieties by applying the MIG-seq method (Suyama and Matsuki, 2015). Regarding 2), in addition to samples of sedimentary soil under typical forest vegetation, sedimentary soil of ancient ruins was also used as a target sample, and the MPM-seq (Suyama et al. 2022) and target capture methods were used to analyze them. It has become clear that analysis is possible.

研究分野：森林分子生態学

キーワード：次世代DNAシーケンシング DNA品種識別 古代DNA 環境DNA 品種偽装抑制

## 1. 研究開始当初の背景

DNA バーコーディング技術は、DNA 塩基配列情報によって生物種を識別・特定する手法として広く用いられている。しかしながら、例えば植物を対象とした場合には、一般的なバーコーディング領域の情報では種レベルの識別力が不十分で、分類群によっては属レベルの特定が精一杯ということも珍しくない。また、動物や菌類であっても、ごく近縁な種間や種内の品種・系統間等を見分けるためには、従来の手法ではその識別力に限界がある。したがって、近縁な種等が混在した試料を対象とした場合、従来法では当然それらを見分けることができないという大きな問題点がある。また、例えば加工食品試料や古代試料等、DNA が断片化した試料を対象とする場合、比較的長い配列情報を必要とする従来法では、目的とする配列が得られないという問題点がある。一方、本研究代表者らが開発した次世代シーケンシング技術である Multiplexed ISSR Genotyping by sequencing (MIG-seq) 法 (Suyama & Matsuki, 2015: 引用文献) を用いれば、既存のバーコーディング技術では識別できない対象間であっても、生物種に関わらず簡便・迅速・安価に識別が可能であり、新たなタイプの DNA バーコーディング法として利用できることがわかっている。この方法では、ゲノム中に散らばる数千領域以上の短い DNA 塩基配列をマルチプレックス PCR によって収集してその情報を比較するため、例えば親子関係にあるようなごく近縁な個体間や近縁品種間、あるいは DNA がある程度断片化した試料であっても、短い配列を対象とした多数の情報に基づいて極めて高精度に識別することができる。当研究グループでは、すでに日本の維管束植物種のおよそ 7 割 (約 3500 種) や、食用きのこ全品種 (約 400 品種) 東南アジア熱帯林植物 (約 20000 種) 等を対象として、この手法を用いたデータ構築を進めている。

## 2. 研究の目的

本研究では、この技術をさらに一步進めて挑戦的な対象に応用することとし、種内レベルの近縁な生物組織の混合試料を対象として、その構成を明らかにする技術開発を実施することとした。このような識別が期待されている具体的な試料の例としては、加工食品における混入品種検査 (例: 輸入シイタケ粉末における盗用品種の有無) や、環境 DNA 分析として堆積土壌に含まれる植物 DNA の分析など、幅広い分野の対象への応用が想定される。従来これらの目的を達成するためには、対象品種等ごとに特異的なマーカーをいちいち作出する必要があり、そのために多くの労力を必要とするだけでなく、結果的に識別に足るマーカーを作出できないということも珍しくない。一方で、本研究のアプローチを用いれば、検出目的対象の参照データを取得しておきさえすれば、それらとの比較によって検出目的対象の存在の有無を検出できる。

そこで本研究では、まず基礎的な技術開発として、少数系統 (品種) の単純な混合試料や市販の加工食品等を用いて、各系統等の混合の有無を正確に特定することを確認した。次に、より挑戦的な分析対象として、森林や古代遺跡の堆積土壌を対象とした植生解析が可能であるのかを確認した。最終的には、混合試料の DNA バーコーディング技術を幅広く応用可能な技術として醸成することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 加工食品における混入品種の識別技術開発

加工食品における混入品種の識別に関しては、少数品種の単純な混合試料の分析として、食用マメの 2 品種を粉碎して混合し、混合試料を構成する 2 品種を特定する技術開発を進めた。またその前段階として、20 品種以上の食用マメから抽出した DNA を用いて MIG-seq 法によって DNA 品種識別するためのデータを取得した。

### (2) 堆積土壌を対象とした植生解析

堆積土壌を対象とした植生解析については、異なる植生下の森林土壌と遺跡土壌を対象とした予備調査実験を実施し、土壌から抽出された DNA 情報が周辺に分布する植物種の構成と一致するのかが確認された。分析用土壌試料は、東北大学川渡フィールドセンター内 (宮城県大崎市鳴子温泉) のブナ林およびハルニレ林内において深さ 5cm から採取した森林土壌試料 (合計 16 サンプル) と、徳之島 (南西諸島・奄美群島) における 2 ヶ所の縄文時代の遺跡から採取した古代土壌試料 (深さ 10, 30, 55, 165cm) 8 サンプルとし、市販の土壌 DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出した。抽出 DNA からは複数の植物 DNA バーコード領域を増幅させ、次世代 DNA シーケンシングによって配列データを取得した。また、森林土壌を採取した場所の周辺に生育する植物 55 サンプルも採取し、DNA 抽出後に同様の方法で配列データを取得した。そのほかの手法として、抽出した DNA を縮約せずにライブラリ化し次世代シーケンサーを用いて DNA 情報を取得するショットガンシーケンス法と、対象種のゲノム領域の一部を標的配列として、ピオチン結合させた標的配列プローブと磁気ビーズを用いて抽出 DNA 中の標的配列を選択的に濃縮するターゲットキャプチャー法を実施した。これらの手法間で、対象種の目的配列の検出率や検出精度、データ量、必要コストなどの比較を行うことで、土壌堆積物試料を対象とした効率的な植物 DNA 分析手法の検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 加工食品における混入品種の識別技術開発

食用マメ 20 品種以上から抽出した DNA を用いて MIG-seq 法によって DNA 品種識別するためのデータを取得した。その結果、ある品種とその突然変異品種と考えられている品種間以外では、明瞭に品種識別が可能であることがわかった。そこで、それらの品種の中から 2 品種を選び、合計 4 つの組み合わせで 2 品種のマメを粉砕して混合した模擬混合試料を作成した。この模擬試料を対象として MIG-seq 法による構成品種の特定を試みたところ、それら 4 つの組み合わせ試料すべてにおいて、混合した 2 品種を正確に特定することができた。さらに、試験的に市販のマメ加工食品における使用品種の特定を試みたところ、1 つの製品については 2 品種の構成によって 99% 以上の配列が説明できることがわかり、少なくとも主要構成品種の特定はほぼ可能であることがわかった。

これらの成果は、加工食品等において使用されている品種等が、ごく近縁な関係であっても基本的には見分けることができる可能性があることを示しているため、たとえば表示品種と実際の使用品種を比較することが技術的に可能になる。すなわち、このような情報を周知することによって、品種偽装を抑止できる可能性がある。そのほかにも、たとえば作物等の種苗生産時における純度検査（例：生産種子の品質管理としての他品種混入検査）や、作物生産圃場菌叢における病原性系統の検出（例：連作等による病原菌動態把握）さらには昆虫等の食性解析（例：胃腸管内容物や糞を対象とした近縁餌生物の特定）などにも応用できると考えられる。

##### (2) 堆積土壌を対象とした植生解析

まず予備的な分析として、3 つの異なる方法で植生解析が可能かどうかを確かめた。すなわち、本研究代表者らが開発した次世代シーケンシング技術である Multiplexed phylogenetic marker sequencing (MPM-seq) 法 (Suyama et al. 2022: 引用文献) によってその分析の可否を確かめた (表)。また、抽出した DNA を縮約せずにライブラリ化し、次世代シーケンサーを用いて DNA 情報を取得するショットガンシーケンス法による分析を実施した。さらに、対象種のゲノム領域の一部を標的配列として、ビオチン結合させた標的配列プローブと磁気ビーズを用いて抽出 DNA 中の標的配列を選択的に濃縮するターゲットキャプチャー法による分析を行った。その結果、試料の状態にはよるものの、いずれの手法によっても植物種の構成解析が可能であることが確認できたほか、手法間の違いが明らかになり、ターゲットキャプチャー法による効率のよい解析が可能であることが示された。

表 森林および遺跡土壌 DNA を試料として MPM-seq 法によって各サンプルで検出された植物種

	ブナ林				ハルニレ林				コウモリイロー		下原洞窟遺跡	
	地点1	地点2	地点3	地点4	地点1	地点2	地点3	地点4	10 cm	55 cm	30 cm	165 cm
ブナ	○	○	○	○								
ササ sp.	○											
ツルアリドオシ		○										
ノリウツギ			○									
エゴノキ				○	○	○	○					
ハルニレ					○	○	○	○				
バイケイソウ					○	○	○	○				
フジ					○	○	○	○				
サワフタギ						○	○	○				
コマユミ							○	○				
アカシデ					○	○						
ヤマグワ					○	○						
ツルアジサイ							○	○				
ミヤマイボタ					○							
ミズキ						○						
イタヤカエデ						○						
マルバゴマギ							○					
チヂミザサ							○					
アコウ									○	○		
ギョボク											○	
カモガヤ									○			

印は検出されたことを示す。

種名の赤字は、別途採取した植物サンプルから読み取った配列と一致したものの。青字は、その植物が採取地に分布していることを確認したもの（なお、遺跡については黒字で示した）。

「コウモリイロー」および「下原洞窟遺跡」は、それぞれ縄文時代の遺跡。

これらの成果は、たとえば海水などの環境中の DNA を分析することによってその環境に生息

する魚種などを調べることができる「環境 DNA 分析」において、より近縁な生物種等を識別できる可能性を示している。また、考古学における古代 DNA の分析においては、過去に存在していたごく近縁な種の識別の可能性を示しているだけでなく、たとえば地域系統の識別や生息個体数の推定など、その応用の範囲は広いため、この分野の研究の進展に大きく寄与できると考えられる。

<引用文献>

Suyama Y, Matsuki Y (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next generation sequencing platform. *Scientific Reports* 5: 16963

Suyama Y, Hirota SK, Matsuo A, Tsunamoto Y, Mitsuyuki C, Shimura A, Okano K (2022) Complementary combination of multiplex high-throughput DNA sequencing for molecular phylogeny. *Ecological Research* 37: 171-181

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 陶山佳久	4. 巻 12
2. 論文標題 MIG-seq法を用いたゲノムワイドSNP分析による森林遺伝学研究	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 森林遺伝育種	6. 最初と最後の頁 63-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32135/fgtb.12.2_63	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 6件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yoshihisa Suyama
2. 発表標題 Forest genetic studies using genome-wide SNP data by MIG-seq analysis
3. 学会等名 Forest Genetics and Tree Breeding: past progress and future prospects, The 10th Anniversary International Symposium of Japanese Society of Forest Genetics and Tree Breeding（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kodai Hamatsu, Hiroya Taguchi, Daiki Takahashi, Yoshihisa Suyama
2. 発表標題 Development of plant environmental DNA analysis method for forest soil
3. 学会等名 The 20th International Symposium on Integrated Field Science “Biodiversity and Phylogeography”（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshihisa Suyama
2. 発表標題 Next-generation biodiversity monitoring using genome-wide SNPs and eDNA analysis
3. 学会等名 International Symposium on Environmental DNA for Conservation and Biomonitoring in Southeast Asia（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshihisa Suyama
2. 発表標題 Current and future application of the MIG-seq and MPM-seq methods for eDNA study
3. 学会等名 4th International Workshop for Mangrove Biodiversity Studies by eDNA Metabarcoding 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 陶山佳久
2. 発表標題 MIG-seq法：DNA品種識別のための新しい手法の有効性
3. 学会等名 魅力あふれる農林水産業へ！タネからはじまる新たな未来「DNAで農林水産分野の未来を開く」キックオフイベント(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陶山佳久
2. 発表標題 次世代シーケンシング技術を用いた食用きのこ品種のDNA鑑定技術開発
3. 学会等名 糸状菌遺伝子研究会 第43回例会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 陶山佳久
2. 発表標題 新しいDNA分析技術による個体・集団・種の高精度識別と系統解析
3. 学会等名 宮城植物の会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱津幸大, 高橋大樹, 石川直子, 陶山佳久
2. 発表標題 森林及び古代土壌を対象とした植物環境DNA分析
3. 学会等名 日本生態学会東北地区会大会第68回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱津幸大, 高橋大樹, 石川直子, 陶山佳久
2. 発表標題 標本および土壌より抽出した植物 DNA の分析手法の検討
3. 学会等名 日本植物分類学会第23回仙台大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松尾 歩  (Matsuo Ayumi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------