

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19289

研究課題名（和文）糞石ゲノム解析による縄文人の栄養・衛生・健康状態のマルチプロファイリング

研究課題名（英文）Multi-profiling of Jomon people's nutrition, hygiene, and health status by coprolite genome analysis

研究代表者

太田 博樹（Oota, Hiroki）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・教授

研究者番号：40401228

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）：本研究では糞石からDNA抽出し、次世代シーケンサをもちいたゲノム解析をおこなう技術の開発・改良に取り組んだ。従来はPCRアンプリコンシーケンス法で植物性摂食物由来と思われるDNAの「科」や「属」レベルでの同定をおこなってきたが、本研究では「種」レベルまで精度を上げる目的で、DNAキャプチャー法の応用をこころみだ。キャプチャーには、一定以上のDNA濃度が必要であるが、糞石の場合、得られるDNA量が著しく少ないという問題点があった。私達はこうした超微量DNAに特化した条件の最適化をすすめ、これを達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境（湖沼や河川の水、空気、土壌）中に存在するDNAを分析する技術（環境DNA分析）は、生態系における個体数や生物分布の把握などの情報を得る目的で、広く応用されている。私たちの研究グループは過去10年以上、古人骨DNA分析に取り組んできたが、糞石に残存するDNAは、より微量で難易度が高い。糞石は過去の生物の糞便であるが、ほぼ土壌と同化しており、いわば古代環境DNA分析である。この技術は学術的な応用範囲は広く、目に見える形で生物遺物が残っていないような古い時代の堆積土壌などのDNA分析などへも応用も可能である。過去の環境のゲノム情報は、現在の環境を知るリファレンスとしても重要な意味を持つ。

研究成果の概要（英文）：In this study, we worked on the development and improvement of the technology for extracting DNA from coprolites and performing genome analysis using next generation sequencers. Previously, we have performed the PCR amplicon sequencing method, and identified DNAs derived from plant foods at the "family" or "genus" level. To improve it to identify at the "species" level, we applied the DNA capture method. A certain level of DNA concentration is required for DNA capture, but in the case of coprolites, the amount of DNA obtained was remarkably small. We have achieved this by optimizing the conditions specifically for such ultra-small amounts of DNA.

研究分野：ゲノム人類学

キーワード：糞石 ゲノム DNAキャプチャー法 NGS 古環境 超微量DNA 環境DNA 生態

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、生物の古い遺物からの DNA を分析する研究である「古代ゲノム学」が、特に人類進化研究に大きなインパクトを与えている。DNA が残存する生物遺物として、骨以外に糞石(過去の生物の糞便)をあげることができる。糞石には、過去の生物の摂食物、腸内細菌、その生物自身の DNA が含まれている。

私達は、これまでに古人骨ゲノム解析と並行して、現代人の糞便に関する PCR アンプリコン・シーケンスによる摂食物同定のためのゲノム解析法の改良を進めてきた。これら 2 つの技術を融合することで糞石のゲノム解析は可能となる。

これまでに PCR アンプリコン・シーケンス法により、私達は既に約 10 検体の糞石から植物性摂食物を「科」レベルで同定した。しかし「属」レベルの絞り込みは難しく、ほとんどの植物について「種」レベルの同定までには至らなかった。

### 2. 研究の目的

糞石をもちいて摂食物を「種」レベルで同定する技術を開発し、縄文人の栄養・衛生・健康状態のマルチプロファイリングを実現する。

### 3. 研究の方法

- ① 標的キャプチャー法のためのベイトをデザイン
- ② 「種」レベルで同定するためのデータベースの構築
- ③ 現代人の糞便をもちいた糞石ゲノム評価法の確立

### 4. 研究成果

標的となる特定のゲノム領域の濃縮に関して、これまで私たちは、PCR アンプリコンシーケンス(PCR 産物を NGS ライブラリ化しシーケンスする方法)をおこなってきた。その主な対象として植物の葉緑体ゲノムをターゲットとした。葉緑体ゲノムにある *trnL* 遺伝子のイントロン領域にプライマーをセットし、70bp 以下の短い DNA 断片を増幅する。この葉緑体ゲノム領域は、多くの植物種でよく調べられており、データベースに各種の配列の登録が多いため、短くても植物種の同定に使える。私たちの研究グループは、この領域の PCR アンプリコンシーケンス法を応用し、糞石由来の植物ゲノム解析を試みた。その結果、多くの植物種を「科」レベルで同定することに成功した。しかし、「属」レベルへの絞り込みは困難で、「種」を特定できたのは、ほんの数種であった。

この植物ゲノム同定の解像度を上げる目的で、DNA キャプチャー法を応用することをこころみた。私達は私達オリジナルのベイト(baits)のデザインをおこなった。*trnL* 遺伝子のイントロンだけでなく、遺伝子の全体(約 500bp)と、同じく植物ゲノム上に存在する *matK* 遺伝子の全体(約 1500bp)をカバーするベイトをデザインした。このカスタム・ベイトをもちいることで、ライブラリ化した DNA をキャプチャーし、NGS でシーケンスする方法で、理論上ほとんど全ての植物 DNA を「種」レベルで同定できる。

ただし、問題があった。ベイトをもちいたキャプチャーをおこなうためには、キャプチャーされる対象となる DNA は一定以上の量が必要となる。糞石からの抽出液は DNA 濃度が著しく少なく、その濃度ではうまくいかないことが明らかであった。もちろん物理的に濃縮すれば一定液中の DNA 量の割合は大きくなるが、どうしても夾雑物の濃度は高くなってしまったため、キャプチャー法の効率を高めるためには、最適条件の検討が必要であった。

そこでカスタム・ベイトをもちいた古代ゲノムに特化した条件の最適化をすすめた。まず八百屋で売っている野菜を 6 種類(キャベツ、サツマイモ、ダイズ、レタス、しそ、パセリ)をもちいて実験をおこなった。これらから DNA 抽出をおこない、ライブラリを 0.5ng/ $\mu$ l(糞石から抽出できる DNA 濃度に近い濃度)にまで希釈し、混合した。いったんキャプチャーが可能な濃度にまで PCR 増幅し、混合し、カスタム・ベイトでキャプチャーした。その結果、種間のバラつきも少なく、キャプチャーに成功した。このように、カスタム・ベイトの最適化が上手くいったため、現在、糞石 DNA のライブラリ化および標的キャプチャーを実施している。

また、現代人の糞便をもちいた摂食物同定実験をおこなった。2 週間、摂食物を記録し、1 週間分の糞便を採取し、これを PCR アンプリコンシーケンスする方法で、摂食物記録との整合性を分析した。その結果、植物種によっては検出されにくいものなど、種ごとに特徴が観察された。たとえば、ダイズは加工されていても(たとえば納豆)、検出されるが、ゴマやオレンジは、そのまま食べてもほとんど検出

されない。また、ダイズについて翌日は検出されるが、2日後にはリード数が半分になり、3日後にはほとんど検出されないという結果が得られた。これらの結果は、1名の現代日本人男性でのみ得られた結果であるため、個人差がある可能性がある。今後、対象人数を増やして検証する可能性がある。さらに、現代のパプアニューギニア人の3つの村から採取された糞便について、PCRアンプリコンシーケンスをおこなった。こうした現代人の糞便ゲノム解析データをもちいて、糞石ゲノム評価法を構築するのが、今後の課題である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 D. Waku, K. Koganebuchi, T. Gakuhari, M. Yoneda, O. Kondo, T. Masuyama, Y. Yamada*, H. Oota*	4. 巻 130
2. 論文標題 Complete Mitochondrial genome sequencing reveals double-buried Jomon Individuals excavated from the Ikawazu shell-mound site were not in a mother-child relationship	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anthropological Science (in press)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1537/ase.220129	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 該当する
1. 著者名 AKHTAR MUHAMMAD SHOAIB, ASHINO RYUICHI, OOTA HIROKI, ISHIDA HAJIME, NIIMURA YOSHIHITO, TOUHARA KAZUSHIGE, MELIN AMANDA D., KAWAMURA SHOJI	4. 巻 130
2. 論文標題 Genetic variation of olfactory receptor gene family in a Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anthropological Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1537/ase.211024	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 該当する
1. 著者名 Robbeets Martine, (17名略)、Oota Hiroki, (20名略)、 Hudson Mark J., Ning Chao	4. 巻 599
2. 論文標題 Triangulation supports agricultural spread of the Transeurasian languages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 616 ~ 621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-04108-8	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 該当する
1. 著者名 Sato Takehiro, Adachi Noboru, Kimura Ryosuke, Hosomichi Kazuyoshi, Yoneda Minoru, Oota Hiroki, Tajima Atsushi, Toyoda Atsushi, Kanzawa-Kiriyama Hideaki, Matsumae Hiromi, Koganebuchi Kae, Shimizu Kentaro K, Shinoda Ken-ichi, Hanihara Tsunehiko, Weber Andrzej, Kato Hirofumi, Ishida Hajime	4. 巻 13
2. 論文標題 Whole-Genome Sequencing of a 900-Year-Old Human Skeleton Supports Two Past Migration Events from the Russian Far East to Northern Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/gbe/evab192	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 該当する

1. 著者名 Matsumae Hiromi, Ranacher Peter, Savage Patrick E., Blasi Dani?n E., Currie Thomas E., Koganebuchi Kae, Nishida Nao, Sato Takehiro, Tanabe Hideyuki, Tajima Atsushi, Brown Steven, Stoneking Mark, Shimizu Kentaro K., Oota Hiroki, Bickel Balthasar	4. 巻 7
2. 論文標題 Exploring correlations in genetic and cultural variation across language families in northeast Asia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd9223	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 該当する

1. 著者名 Koganebuchi Kae, Sato Kimitoshi, Fujii Kiyotaka, Kumabe Toshihiro, Haneji Kuniaki, Toma Takashi, Ishida Hajime, Joh Keiichiro, Soejima Hidenobu, Mano Shuhei, Ogawa Motoyuki, Oota Hiroki	4. 巻 85
2. 論文標題 An analysis of the demographic history of the risk allele R4810K in RNF213 of moyamoya disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 166 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ahg.12424	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 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hiroki Oota
2. 発表標題 Our ongoing projects based on ancient genome: coprolite, iPS, and transcriptome of Jomon people
3. 学会等名 SEBES Seminar (@Zurich Univ.) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊谷真彦、谷野彰勇、若林賢、塩野貴之、高木世里、片岡新、鶴野愛美、稲田健一、鯨本真友美、和久大介、覚張隆史、澤藤りかい、小金 澁佳江、勝村啓史、小川元之、米田穰、太田博樹
2. 発表標題 縄文糞石のDNAメタバーコーディングによる植物性摂食物の同定
3. 学会等名 第76回日本人類学会大会・第38回日本霊長類学会大会連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片岡新、谷野彰勇、小金渕佳江、渡部裕介、鯨本眞友美、熊谷眞彦、勝村啓史、小川元之、太田博樹
2. 発表標題 古代土壌ゲノム解析に向けたDNA精製・濃縮法の開発
3. 学会等名 第76回日本人類学会大会・第38回日本霊長類学会大会連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤木雅、小金渕佳江、渡部裕介、澤藤りかい、石田貴文、熊谷眞彦、太田博樹
2. 発表標題 糞石からの古代摂食物の同定を目指したDNAキャプチャー・シーケンシング法の検討
3. 学会等名 第76回日本人類学会大会・第38回日本霊長類学会大会連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Oota
2. 発表標題 Our ongoing projects based on ancient genome: coprolite, iPS, and transcriptome of Jomon people
3. 学会等名 SEBES Seminar in Zurich Univ. (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊谷眞彦、谷野彰勇、若林賢、塩野貴之、高木世里、片岡新、鶴野愛美、稲田健一、鯨本眞友美、和久大介、覚張隆史、澤藤りかい、小金渕佳江、勝村啓史、小川元之、米田穰、太田博樹
2. 発表標題 縄文糞石のDNAメタバーコーディングによる植物性摂食物の同定
3. 学会等名 第76回日本人類学会大会・第38回日本霊長類学会大会連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤木雅、小金淵佳江、渡辺裕介、澤藤りかい、石田貴文、熊谷真彦、太田博樹
2. 発表標題 糞石からの古代摂食物の同定を目指したDNAキャプチャー・シーケンシング法の検討
3. 学会等名 第76回日本人類学会大会・第38回日本霊長類学会大会連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Oota
2. 発表標題 Genome of Jomon people and peopling history of East Eurasians
3. 学会等名 Genome Concept Centennial Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田博樹
2. 発表標題 Jomon genome analysis verifying “Northern” or “Southern” route into East Eurasia from Africa
3. 学会等名 日本進化学会第23回オンライン大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田博樹
2. 発表標題 古代ゲノム解読によるサピエンス全史
3. 学会等名 第28回多文化間精神医学会・学術総会「ポスト・コロナ時代の異世代間コミュニケーションと多文化共生」特別講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村瑠佳、谷野彰勇、鯉本真友美、稲田健一、勝村啓史、小川元之、小金淵佳江、和久大介、熊谷真彦、杉本竜太、太田博樹、井ノ上逸郎
2. 発表標題 縄文人糞石を用いたマイクロバイオーム解析
3. 学会等名 日本進化学会第23回東京大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 高橋 龍三郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 同成社	5. 総ページ数 216
3. 書名 科学で読みとく縄文社会	

1. 著者名 井原 泰雄、梅崎 昌裕、米田 穰	4. 発行年 2021年
2. 出版社 東京大学出版会	5. 総ページ数 296
3. 書名 人間の本质にせまる科学	

1. 著者名 太田 博樹	4. 発行年 2023年
2. 出版社 吉川弘文館	5. 総ページ数 272
3. 書名 古代ゲノムから見たサピエンス史	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ゲノム人類学研究室  
<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~genomeanthro/>

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
研究分担者	梅崎 昌裕  (Umezaki Masahiro)  (30292725)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授    (12601)	
研究分担者	澤藤 りかい  (Sawafuji Rikai)  (50814612)	総合研究大学院大学・先導科学研究科・日本学術振興会特別 研究員(CPD)   (12702)	
研究分担者	和久 大介  (Waku Daisuke)  (60793578)	東京農業大学・国際食料情報学部・助教   (32658)	
研究分担者	熊谷 真彦  (Kumagai Masahiko)  (80738716)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度分 析研究センター・主任研究員   (82111)	

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
---------	---------