

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560137

研究課題名(和文) イネのプラント・オパール中に内在する遺伝情報の抽出と利用にむけた開発的研究

研究課題名(英文) Fundamental study for 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、優れた残留性を持つイネ遺物であるプラント・オパールから遺伝情報を取り出す技術の開発に取り組んできた。その結果、以下の3つの成果を挙げることができた。1. プラント・オパール内部に遺伝情報が存在することを確認、2. 数百グラムの土壌が確保できれば、内部の遺伝情報に対する物理的・化学的なダメージを抑えて、DNA抽出に十分なプラント・オパールを抽出する技術の構築、3. プラント・オパールに内在する特定の遺伝情報のいくつかを増幅・復元できる技術の構築
以上の成果から、時代や地域を網羅して、イネの遺伝情報を悉皆的に収集することが可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Ancient rice grain was important materials to consider following issues:1. How did ancient people accept agriculture in their lifestyle with hunting and gathering?,2. How was rice cultivation become popular in the agriculture?,3. Which traits ancient people demanded for Japanese rice? However, excavation of rice grain was less from the archaeological site than plant phytolith. In this study, we found method to extract DNA from rice phytolith remained in soil. To construct the method, we focused on following three problems:1. Recognizing DNA in plant phytoliths,2. Sifting rice phytolith from these plant phytoliths without damages for DNA,3. Recovering of DNA from the rice phytolith. By resolution of these problems, we almost constructed the method, by which we recovered DNA from the rice phytolith in soil at most several hundred grams. Further study has been conducted with different-aged-soils and with soils from different condition such as inland and coast.

研究分野：農業技術史学

キーワード：遺伝子 プラント・オパール 植物遺体 栽培イネ 多様性評価

1. 研究開始当初の背景

炭化米などの植物遺体から DNA を取り出すことが成功してからすでに四半世紀が経過している。その間、様々な技術の改良や開発が行われ、取り出す技術については着実な進歩が見られている。しかし、その一方で、対象となる遺体の検出状況は、限定的かつ偶発的である。現状においては、「遺伝情報の回収率の向上」と「栽培イネの多様性評価」の2点に明らかな限界があり、稲作技術の歴史的な変遷（技術の発達と伝播・拡散）を研究する上では、DNA 分析の有効性はまだ限定的と言わざるを得なかった。そのため、時間と空間を網羅して悉皆的に遺伝情報を取り出し、DNA 分析を実施できる手法の開発が待たれてきた。

イネ科やブナ科などの植物の表皮細胞に由来するプラント・オパールは、基本組成がガラスと同じであり、乾燥した葉 1g に約 20 万個が生産されるなど、残留性・残留量において優れたイネ遺物である。そのため、炭化米などと異なり、イネや稲作、水田などの存在を調査する指標として用いられてきた。また、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、その内部には、細胞質等が閉じ込められている。無論、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 の矢印部分）。ここに遺伝情報が残存しているかについては、イネのプラント・オパールを対象とした DAPI 法による検討から、その可能性が指摘されていた（高橋・佐藤 2001）

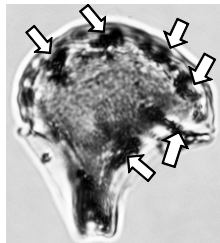


写真 1 プラント・オパール中の残留物質

もし、この遺伝情報を取り出し利用できれば、過去に栽培されたイネに関する情報が質・量ともに飛躍的に高まることが期待された。しかし、土壌からプラント・オパールを大量に回収する方法が障害となり、進展が遅れていた。その後、回収技術については、研究代表者により、一般的な土壌 500 g から 300 万～600 万個を回収できる方法が確立され（宇田津ほか 2012）、研究進展の障害が取り除かれる状況となった。

こうした背景と各種研究の進展状況に立脚し、研究代表者（宇田津）の回収技術と研究分担者（田中）が有する DNA 分析技術（国内外のイネ遺物や植物遺物からの遺伝情報を取り出し、その亜種・生態型等を評価）を組み合わせることにより、「イネのプラント・オパ

ールに内在する遺伝情報を取り出し分析する」という、冒頭に述べた 2 つの限界を打ち破る新しい手法の構築を目指す本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、土壌中に残留しているイネプラント・オパールを抽出し、そこに内在する遺伝情報を取り出し増幅する一連の技術の構築を目指すものである。具体的には、技術構築に必要な不可欠な以下の 3 つの目的を設定して、研究を行った。

- (1) プラント・オパール中の遺伝情報の存否の確認
- (2) 内在する遺伝情報にダメージを与えないように土壌からイネプラント・オパールを大量に抽出する技術の開発
- (3) 抽出したイネプラント・オパールから遺伝情報を取り出し増幅する技術の開発

3. 研究の方法

先に述べた 3 つの研究目的ごとに以下の方法を用いて研究を実施した。プラント・オパールの給源土壌としては、国内外の 9 つの遺跡の水田土壌を供試した。特に、国内については、図 1 に示す、様々な時代（弥生時代から中世）と堆積環境を網羅した 8 つの遺跡のものをを用いることにより、目標とする手法の実用性（時代と空間を網羅した悉皆的な調査に利用可能であるのか）について検討できるようにした。

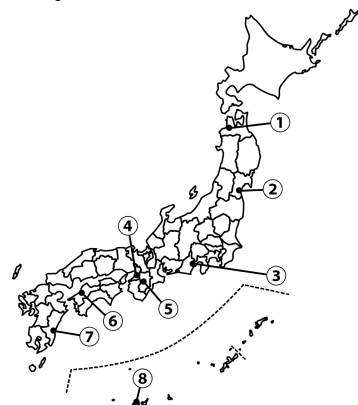


図 1 試料を供試した国内遺跡の所在

- (1) プラント・オパール中の遺伝情報の存否の確認

プラント・オパール中の遺伝物質の存否は、DAPI 染色法（細胞膜透過性を持つ蛍光色素化合物を用いて、細胞内の DNA を染色し、視覚化する手法）を用いて確認を行った。

- (2) 内在する遺伝情報にダメージを与えないように土壌からイネプラント・オパールを大量に抽出する技術の開発

温度、酸・アルカリなどの化学処理の影響を除去できるように、研究代表者が構築して

きたプラント・オパール抽出工程の見直しを行う。構築した抽出技術は、抽出率、抽出に要する時間や工程数、そして遺伝情報の復元状況から評価を行った。

(3)抽出したイネプラント・オパールから遺伝情報を取り出し増幅する技術の開発

当該技術については、プラント・オパール破壊と完全には除去できない他の植物由来のプラント・オパールならびに夾雑しているタンパク質等の増幅の障害となる物質の影響を抑制する具体的な方法を構築あるいは選定する事によって行った。技術の評価は、既報研究から設定した増幅の難易度や増幅領域が異なる8つの領域の復元状況から行った。

4. 研究成果

(1)プラント・オパール中の遺伝情報の存否の確認

抽出したプラント・オパール中の遺伝物質の有無を、DAPI染色法を用いて確認を行った。その結果、写真2に示すようにイネやヨシ属のプラント・オパール中に蛍光発光(写真右:実線で囲んだ部分)が認められた。

こうした現象は、プラント・オパールに圧力をかけて蛍光色素化合物が内部に侵入する状態で顕著であることから、表面ではなく、内存する遺伝物質との反応と考えられた。

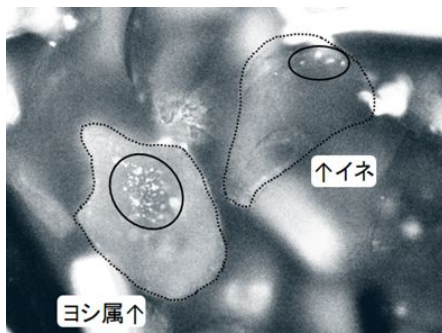
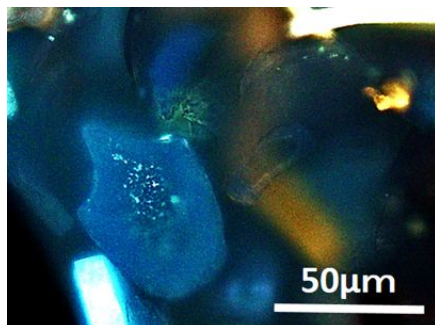


写真2 DAPI染色後の蛍光観察の結果
(上:撮影画像、下:補助線解説入り)

以上の結果から、プラント・オパール内部に遺伝物質が存在していることがほぼ確認できた。写真2は古墳時代の土壌のものであるが、他の時代の試料についても同様に確認でき、経過時間や土壌による深刻な影響は認められなかった。

(2)内在する遺伝情報にダメージを与えないように土壌からイネプラント・オパールを大量に抽出する技術の開発

土壌からのプラント・オパール抽出については、粒径分画と比重分画を組み合わせる方法によって、一般土壌500gから300mg程度を抽出する技術が確立されている(宇田津ら2012)。本研究では、以下の2点に留意して既存の抽出工程のいくつかを改良し抽出実験を行った。

乾燥工程の改善

これまでは、100~120℃で乾燥を行ってきたが、温度による遺伝情報へのダメージを抑制するため、水田や畑の表面温度を参照し、乾燥工程における設定温度を40℃未満(38℃前後)とした。また、よりダメージを小さくする方法として室温での低圧乾燥も試みた。

超音波洗浄による付着有機物の分解処理工程(化学分解)の代替

コンタミネーション(試料汚染)対策として、プラント・オパール表面に付着した有機物(汚染源)を除去することが望ましい。効果の高さでは、湿式あるいは乾式灰化が挙げられるが、試料が200℃から500℃程度の温度にさらされるため、遺伝情報へのダメージが懸念される。そのため、今回は、代替方法として超音波洗浄を採用した。超音波処理も継続すると水が沸騰するまで温度上昇するため、温度をモニタしながら40℃未満を維持するようにして行った。

【構築した抽出処理の効果について】

乾燥工程の時間が延びたが、抽出ならびに超音波洗浄により付着有機物の除去についても、光学顕微鏡による観察からは既存のものと遜色ない質と効果が確認された(写真3)。

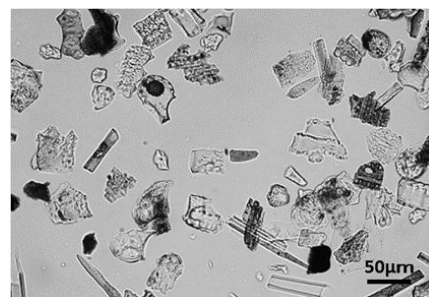
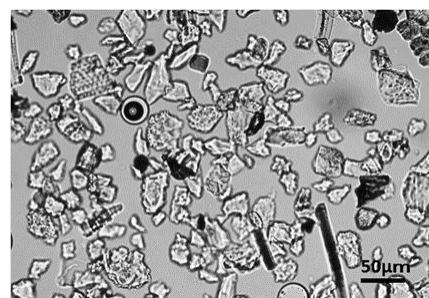


写真3 抽出処理の効果
(上:処理前、下:処理後)

これらの結果と成果を踏まえ、さらに、乾燥の工程については、下記の新しい工程の構築と導入を行った。

凍結トラップによる低圧乾燥工程
温度によるダメージを完全になくすために、室温下で試料を乾燥できる凍結トラップ装置を組み込んだ低圧乾燥工程を構築した(図2)。密閉容器(チャンバー)内の空気圧を下げ、蒸発した水分を凍結トラップ装置で取り除くとともに、チャンバー内にシリカゲルを敷き詰めることで、トラップ装置で除去しきれなかった水分を吸収させた。

乾燥所要時間は、これまでの40での乾燥工程では約2日かかっていたが、今回の方法を用いると、1日足らずと、飛躍的な短縮を図ることができた。以上の結果から、当該工程による乾燥が有効と判断された。

なお、当該工程は、凍結乾燥装置で代替できることは言うまでもないが、当該装置一式は小型の凍結乾燥装置の半分以下の価格で構築でき、比較的多い試料乾燥が可能である。

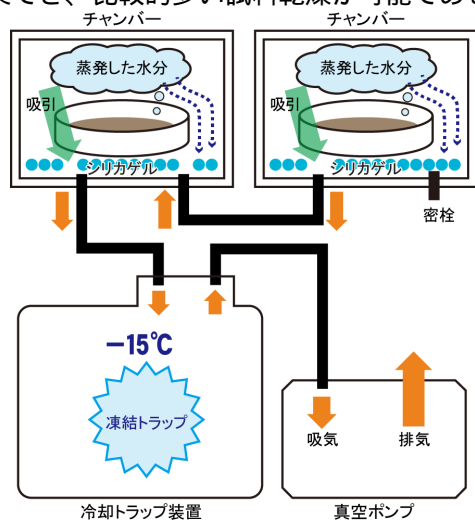


図2 凍結トラップによる低圧乾燥装置

【抽出したプラント・オパールからの遺伝情報の復元状況について】

抽出したプラント・オパールについてDNA分析を行った結果、現生イネと同じサイズのDNA断片を確認することができた。また、従来の40乾燥工程と新しい乾燥工程による試料から抽出できた葉緑体内の2つの遺伝子について抽出率を比較したところ、*rps16* 遺伝子は従来の80%が100%となった。*Orf100* 遺伝子では、10%が40%近くに上昇しているという結果を得ている。

以上の結果から、乾燥工程を凍結トラップへ代替したプラント・オパール抽出方法は、実用性が高いことが明らかとなった。

【抽出量・抽出率・処理時間について】

抽出試料についての光学顕微鏡下の観察では、プラント・オパールの純度の高い試料が抽出されている。ガラスビーズを用いて定量

した元土と抽出試料中のプラント・オパール数から求めた抽出率は、14~87%と試料によるバラつきが見られたものの、抽出量としては、どの試料も採取時重量500gの土壌から、DNA分析80~500回分を確保できている。また、新しい乾燥工程を導入したプラント・オパール抽出方法は、乾燥時間が短縮でき(2日1日)DNA分析の必要量を確保するだけであれば、3日程度で処理可能であることが明らかとなった。

(3)抽出したイネプラント・オパールから遺伝情報を取り出し増幅する技術の開発

先に述べた2つの抽出方法(乾燥工程38前後、凍結トラップ)により土壌から抽出したプラント・オパール(土壌は、図1に示した遺跡のもの)を供試し、以下に述べる方法により内在する遺伝情報を取り出す実験を行い、その復元状況から、抽出試料の最適用量や手法の有効性を検討した。

DNAの抽出法と復元対象とした領域

38 前後の乾燥工程でプラント・オパールを採集した5.0mg、10.0mg、20.0mgの試料について超純水で洗浄した。外部のDNAをDNaseI(TaKaRa Ltd, Japan)で分解後に、試料からDNAをアルカリ法で抽出した(Mutou et al. 2014)。反復数は10とした。

DNAを復元する領域は既報研究で増幅の難易度や増幅領域を鑑みて以下の8つの領域を選んだ(Castillo et al. 2015)。

増幅易：葉緑体ゲノムの2つの領域(*rps16*, *orf100*)

増幅中：核ゲノムのイネ第6染色体領域(DJ6: 2セット)

増幅難：核ゲノムの遺伝子領域(*PROG1 M5*, *qSH1*, *sh4*, *Waxy*)

各領域に特異的なプライマーで2nd PCR増幅後、増幅の有無はPCR産物をアガロース電気泳動することにより確認した。

抽出量の検討(2014年度)

プラント・オパールより抽出したDNA溶液から、葉緑体ゲノム領域において、増幅長が100~530bpまでのDNA断片を確認できた。各領域の断片の検出数は、300bp以上の2領域(総計30本: 2領域×3区×5反復)で計7本(23.3%)であったが、*orf100*を除く200bp未満の3領域(45本: 3×3×5)では計30本(66.7%)であった。各分量区でDNA断片が増幅した本数は、30本(6領域×5反復)のうち5.0mgで12本(40.0%)、残り2区で13本(43.3%)であった。特に、10.0mgや20.0mgの抽出溶液では、*orf100*または*petN-trnC*領域のDNA断片を検出することができ、イネ亜種の推定はPCR増幅で可能であった。

核ゲノム領域では、栽培化関連遺伝子(*PROG1 M6*)や形質関連遺伝子(*Rc*, *Waxy*)の

DNA断片が確認できた。特に、10.0mgや20.0mgの抽出溶液では、*qSH1* 遺伝子 (脱粒性) または *Waxy* 遺伝子 (モチ性・ウルチ性) の DNA断片が認められた。

以上のことから、葉緑体ゲノムや核ゲノムのイネ DNA は、10.0mg 以上のプラント・オパールから抽出した溶液において、反復を重ねることで増幅が可能であった。

凍結トラップによる DNA 遺存の効果 (2015 年度)

凍結トラップによる乾燥を経たプラント・オパールに由来する DNA 抽出溶液は、特異的プライマーによる PCR 増幅によって、核ゲノムの *Waxy* 領域を除く領域で現生イネに DNA断片が認められた。以下、葉緑体ゲノムと核ゲノムについての結果をそれぞれ示す。

【葉緑体ゲノム領域の復元】

抽出した DNA 溶液において、葉緑体ゲノムの *rps16* 遺伝子領域は 10 反復とも現生イネと同じ長さの DNA断片を復元することができた (図 3)。 *Orf100* 領域においても現生イネと同じ長さの DNA断片を確認することができた。しかしながら、その増幅数は、埋没時代と関連していないようであった。

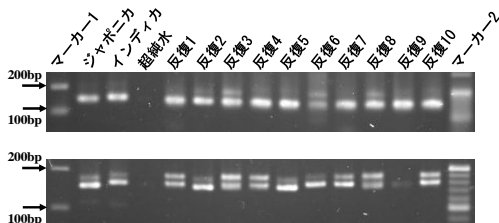


図 3 *Rps16* の特異的プライマーで PCR 増幅した産物の電気泳動。上段: *Orf100* 領域、下段: *rps16* 領域。

【核ゲノム領域の復元】

DJ6 領域の PCR 増幅により、F5-R1 の領域では現生の温帯ジャポニカと同じ長さの DNA断片は、の遺跡の試料のみで 6 反復と高頻度で認められた (図 4 上段)。

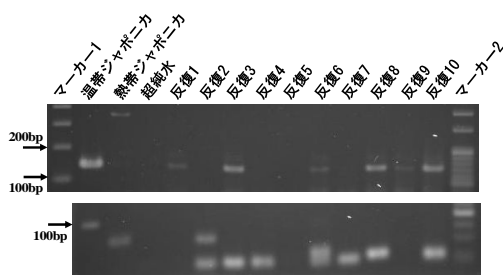


図 4 試料において核ゲノムの特異的プライマーで PCR 増幅した産物の電気泳動。上段: DJ6 F5-R1 領域、下段: *qSH1* 遺伝子領域。下段において左側二つの試料はマーカー1、ジャポニカの順で、他は上段と同一の並びである。

F5-R2 の領域では現生の熱帯ジャポニカと同じ DNA断片が 4~7 反復で認められた。これらのことから、DJ6 領域の復元は、遺跡で利用されていたイネの品種群に依存していた。その他、栽培化関連遺伝子 (*PROG1 M5*, *qSH1*, *sh4*) の PCR 増幅では増幅数が低かったものの、DNA の復元は 3 つの領域ともいずれかの遺跡において認められた。特に、*qSH1* 遺伝子領域では、を除く遺跡で増幅が認められた (図 4 下段)。本領域は増幅長が他の遺伝子領域より短く、増幅数は長さを短くすることで改善される可能性を示していた。

凍結トラップによる乾燥工程によって、プラント・オパールの遺伝情報は、抽出工程による損傷が抑えられており、埋没時代や堆積環境に関わりなく復元が可能であった。栽培化関連遺伝子など、核ゲノムの 1 遺伝子領域では増幅が難しく、従来、イネの黒化種子と同様の結果であった。ただし、今後、プラント・オパールの集積法、DNA 抽出法、および DNA 増幅法を改良することで、それら遺伝子領域を復元することも可能であると考えられた。

(4) まとめと今後の展望

まとめ

3 年間の研究により、「プラント・オパールに遺伝情報が内在することの確認」、「内在する遺伝情報へのダメージを抑えた土壌からのプラント・オパールの抽出技術の開発」そして「内在する遺伝情報の復元技術の開発」をおおむね達成することができたと言えよう。

今後は、当該手法の第三者チェックを含め、実用技術へとブラッシュアップしてゆきたい。

今後の展望

イネのプラント・オパールの優れた点として、「水田などの生産遺構土壌であれば、栽培された期間のイネに由来する全種類のプラント・オパールが存在する」が挙げられる。

今回、構築した一連の技術を実用技術にすることができれば、イネのプラント・オパールに内在する遺伝情報を利用することで、現生イネの調査に匹敵する「これまででない高精度な栽培イネの多様性評価」を実現化することが可能となることを期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Tanaka, K., Kamijo, N., Tabuchi, H., Hanamori, K., Matsuda, R., Suginomori, J., Sato, Y.-I., Udatsu, T., Ishikawa, R., Morphological and molecular genetics of ancient remains and modern rice (*Oryza*

sativa) confirm diversity in ancient Japan, Genetic Resources and Crop Evolution, 査読有、63 巻、2015、447-467、国際共著、DOI: 10.1007/s10722-015-0262-2.

石川隆二、宇田津徹朗、松田隆二ほか 3 名、イネ種子の形態および DNA 配列からみた東北における水稲農耕受容の検討、日本文化財科学会誌、査読有、67 巻、2015、57-72

宇田津徹朗、藤原宏志、植物珪酸体分析反映の水田稲作技術進歩、河姆渡文化国際学術論壇論文集、査読無、1 巻、2013、130-146

〔学会発表〕(計 9 件)

宇田津徹朗、田中克典、丹羽里奈、イネプラント・オパール中に内在する遺伝情報抽出手法構築に向けた基礎的研究(第 2 報)、日本文化財科学会第 33 回大会、2016 年 6 月 4 日・5 日、奈良大学

田中克典、丹羽里奈、宇田津徹朗、埋没時代や状況の異なる遺跡から採集したプラント・オパールからの DNA 復元、日本文化財科学会第 33 回大会、2016 年 6 月 4 日・5 日、奈良大学

田中克典、東日本への稲作の展開 形状分析と DNA 考古分析から、弘前大学特別プロジェクトシンポジウム考古学と遺伝学の新地平 イネの来たる道、2015 年 10 月 24 日、弘前大学 50 周年記念会館

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、2015 年 7 月 11 日・12 日、東京学芸大学

宇田津徹朗、田中克典、イネプラント・オパール中に内在する遺伝情報抽出手法構築に向けた基礎的研究(第 1 報)、日本文化財科学会第 31 回大会、2014 年 7 月 5 日、奈良教育大学

宇田津徹朗、田崎博之、中村慎一、金原正明、小柳美樹、藤原宏志、浦谷綾香、李小寧、劉斌、王寧遠、鄭雲飛、東アジアにおける基盤整備型水田の成立期に関する実証的研究(第 1 報)、日本文化財科学会第 31 回大会、2014 年 7 月 5 日、奈良教育大学

宇田津徹朗、田崎博之、外山秀一、試料採取段階におけるプラント・オパール分析の試料汚染対策の検討 切り替え畑などの初期農耕検証のために、日本文化財科学会第 30 回大会、2013 年 7 月 7 日、弘前大学

宇田津徹朗、中村俊夫、田崎博之、外山秀一、杉山真二、松田隆二、プラント・オパール中の炭素による生産遺構の年代決定法に関する研究() 前処理方法(夾雑炭素の分解)の検討、日本文化財科学会第 30 回大会、2013 年 7 月 6 日・7 日、弘前大学

田崎博之、外山秀一、宇田津徹朗、松田順一郎、三吉秀充、縄文時代後期～晩期における稲作農耕空間の探求 松山市文京遺跡 44 次調査の試み、日本考古学協会第 79 回(2013 年度)総会、2013 年 5 月 26 日、駒沢大学

〔図書〕(計 5 件)

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、日本の出土米イネの種子遺存体の形態・DNA 分析結果報告書、2015、332

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、日本の出土米イネの種子遺存体の形態・DNA 分析結果報告書、2014、313

宇田津徹朗、石川隆二、佐藤雅志、山口聰、ドリアン・Q・フラー、田中克典、玉川大学出版、フィールド科学の入口 イネの歴史を探る(佐藤洋一郎、赤坂憲雄 編)、2013、226(分担: 130-146)

田中克典、宇田津徹朗、石川隆二、佐藤雅志、山口聰、ドリアン・Q・フラー、玉川大学出版、フィールド科学の入口 イネの歴史を探る(佐藤洋一郎、赤坂憲雄 編)、2013、226(分担: 209-222)

Mutou C, Tanaka K, Ishikawa R, Springer Science, Cereal Genomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology vol.1099, 2014、300(分担: 7-15)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

田中 克典 (TANAKA, Katsunori)
弘前大学・人文社会学部・特任助教
研究者番号: 00450213