

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601  
研究種目：研究活動スタート支援  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26890010  
研究課題名(和文) 古代遺跡出土イネ遺物のゲノム解読：実験系と情報基盤の確立

研究課題名(英文) Genomic analysis of ancient rice remains

## 研究代表者

熊谷 真彦 (Kumagai, Masahiko)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80738716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：アジア栽培イネの2大グループであるジャポニカとインディカのそれぞれの起源と栽培過程における両者の関係性、また栽培化の各ステップにおいて遺伝的な背景がどのように変遷してきたのかは遺伝学、人類学等の分野における大きな興味である。この謎を明らかにするためには、古代の遺跡から出土する遺物“炭化米”のDNAを分析することが有用である。本研究では、炭化米DNAに次世代シーケンサーを応用する古ゲノミクスを行うための実験系を確立した。同時に1375系統の現生イネを用いた葉緑体ゲノムの分子系統解析を行い、情報基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：The domestication history of two Asian cultivated rice varietal groups, japonica and indica, are one of the big interests; how have they been related and how have domestication related genes changed. To answer these questions, the investigation of DNAs of ancient rice remains excavated from archaeological sites is promising. In this study, experimental procedures for paleogenomics, obtaining DNAs applicable to NGS technology from ancient rice remain, were established. And also, information basis of chloroplast genome sequences to analyze ancient rice data were constructed by phylogenetic analyses for 1375 modern rice strains.

研究分野：分子進化

キーワード：古代ゲノミクス 次世代シーケンサー 分子進化 栽培イネ

## 1. 研究開始当初の背景

栽培植物の起源と進化の歴史は数十年に渡り、遺伝学、人類学等の分野における興味深い研究対象である。近年ゲノム規模の解析が可能となり、主要な穀物の1つであるイネに関しても様々な知見が得られてきたが、その進化史は複雑であり依然として謎が残されている。アジア栽培イネの2大グループであるジャポニカとインディカのそれぞれの起源と栽培過程における両者の関係性、また栽培化の各ステップにおいて遺伝的な背景がどのように変遷してきたのかは大きな興味である。古代の遺跡から出土するイネの遺物“炭化米”に着目し、このDNAを分析し過去を直接“観る”ことにより上に挙げた謎に迫ることが可能である。イネにおいてはさまざまな栽培化関連遺伝子が同定されているが、これらの遺伝子がいつ、どこで栽培型のalleleを獲得したのかは非常に興味深い。これらの遺伝的变化を時代ごとに追うことができればイネ栽培化の歴史を直接的に明らかにすることができ、イネ研究における最も大きな疑問の一つであるジャポニカとインディカの成り立ちについても決定的な知見を得ることが期待される。イネ古ゲノミクスの第一歩としてはコピー数の多いオルガネラ全ゲノム配列を決定することが目標となる。近年1500品種を超える栽培・野生イネのゲノム配列が解析されている(Huang et al., 2012)が、オルガネラ由来のDNAは未解析である。

## 2. 研究の目的

アジア地域で約1万年前に始まったヒトのイネ栽培の歴史においてイネのゲノムはどのような変遷を辿ってきたのだろうか？この謎を古代の遺跡から出土するイネ遺物のゲノムを解析する“古ゲノミクス”により明らかにすることを目的とする。近年主に動物遺物の骨や歯から得たDNAを、次世代シーケンサー(NGS)を用いて分析する古ゲノミクス研究が大きな成果を挙げている。しかしながら植物遺物ではDNA抽出効率が非常に悪く、実験手法の改良と最適化が必要である。また、得られた炭化米データの解釈には現代のイネ試料の背景データが必須となる。そこで、本研究では炭化米において古ゲノミクスを行うための(1)実験系の確立と(2)情報基盤の整備を目的とする。

## 3. 研究の方法

イネ古ゲノミクスを推進するための基盤となる実験手法の確立と現在入手可能な大規模データの分子系統解析による栽培・野生イネ遺伝的多様性の基盤情報の整備を目指す。

### (1) 古ゲノミクス実験系の確立

イネ遺存体へ古ゲノミクスを適用するための基礎研究として、これまでにPCR法によるDNA分析に成功している日本の中世および

弥生時代期の遺跡のイネ遺物からの微量DNA抽出法の改良と次世代シーケンサーで解析するための一連の実験手法の確立を行う。これまでイネ遺物においてはシリカゲル法で1粒の米からのDNA抽出に成功しているが、その収量は非常に少なかった。そこで従来のごDNA抽出法に収量を上げる、夾雑物を除くための改良、および新たに磁性ビーズを用いる方法の検討を行う。

### (2) イネオルガネラゲノム多様性情報基盤の整備

古ゲノミクスを行う上での情報基盤の一部となるオルガネラゲノムの多様性情報を整備し、オルガネラゲノムから品種群の遺伝的背景としてどのような特徴が見いだせるのかを明らかにする。先行研究(Huang et al., 2012)の約1500品種のデータをNGSの生データから再解析し、葉緑体、ミトコンドリアの全ゲノム配列を決定し、多型情報を抽出する。このデータは主に中国の栽培イネとアジアの広い地域由来の野生イネから成る。得られた情報を元に分子系統解析を行いオルガネラのゲノム情報からどの程度、栽培イネの品種群が分類可能かを明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 古ゲノミクス実験系の確立

中世の遺跡出土の炭化米試料を用いて抽出方法の改良を試みた。DNAの精製度および収量を上げることを目標とし、従来用いていたシリカゲルを用いた抽出法やフェノール・クロロフォルムを用いた手法の改良および磁性ビーズを用いた新規手法の検討を行った。手法の評価はDNA濃度の定量およびPCR法による増幅度合いからイネ内源性DNA量を各手法においてテストした。その結果、DNAの回収量が高い手法を見出すことに成功した。他方で、マルチプレックスPCRの効率化について新しい技術であるドロップレットPCRをテストしたが、これについては良い結果を得ることはできなかった。

古DNAのNGSのライブラリ作製には初発DNAが微量であるので、適したlibrary作製kitの検討が必要である。現在市販されている、微量のスタートDNA量から作製が可能なkitおよび増幅酵素の比較検討を行い比較的良好な成績を持つkitを選定できた。また炭化米から抽出した葉緑体DNAはバクテリアDNAが多量に混入することが想定されているため、葉緑体ゲノムをキャプチャーするためのベイトを作製した。今後、キャプチャー試薬とライブラリ作製kitの適合性を検討する必要があるが、以上をもって炭化米から古ゲノミクスを行うために重要な実験についてその手法を確立できた。

### (2) イネオルガネラゲノム多様性情報基盤の整備

ゲノムリシーケンシングデータをイネ参照ゲノムに対してマッピングおよびジェノタイプコールを行う情報解析パイプラインを作製し(図1)栽培・野生イネ 1,528 サ

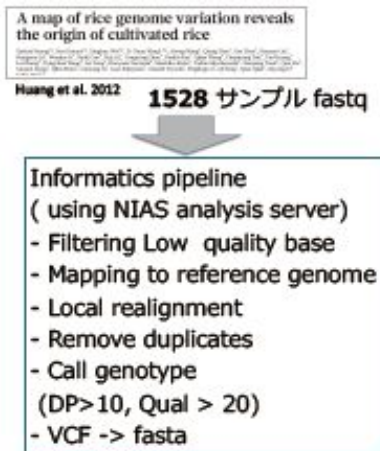


図1. 情報解析パイプライン

ブルの解析を行った結果、葉緑体ゲノムは十分量のデータが得られたのに対し、ミトコンドリアゲノムは多くのサンプルで解析に耐えうる量のデータを得られなかった。本データは平均 1X 程度の低カバレッジのデータであるので、1細胞あたりのコピー数のより多い葉緑体は解析に耐えうる程度のデータ量が得られたものの、比較してコピー数の少ないミトコンドリアについては多くのサンプルで十分なデータ量が得られなかった。したがって、以降の配列解析には葉緑体ゲノムデータのみを用いた。十分なカバレッジが得られた 1,375 サンプルについて、さらになお欠けているサイトのデータの穴埋め “imputation” を KNN 法により行い、分子系統解析の入力データとした。遺伝距離を Maximum Composite Likelihood model により求め、近隣結合法により分子系統樹を作製した(図2)。解析の結果、インディカとジャポニカは異なる 2 つの大きなメインクラス

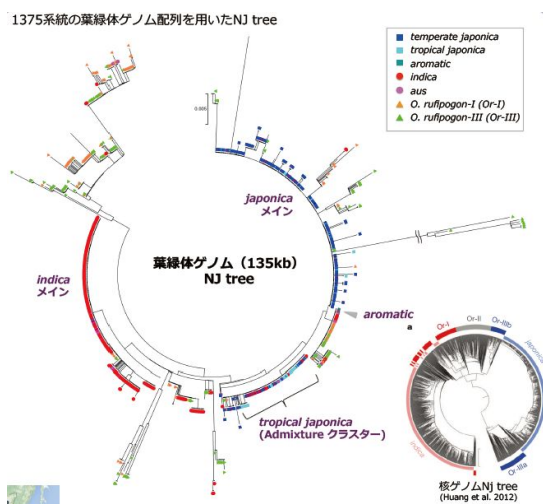


図2. 現生イネ 1375 系統の葉緑体ゲノム系統樹と核ゲノム系統樹

ーを形成した。この結果は核ゲノムでの系統樹と一致するものであり、葉緑体ゲノムの遺伝情報を調べることにより、ジャポニカ、インディカを高い精度で分類することが可能であることが示された。さらに細かい品種群の分類については、ジャポニカは多様性がかなり限定的であるが、インディカにはメインクラスターとは側系統的な関係のクラスターも複数見られ、インディカの母系起源は多系統であることが示された。さらにジャポニカのメインクラスターとは遺伝的にある程度離れた、熱帯ジャポニカの多くが属する特徴的なクラスターが見出された。このクラスターにはインディカおよび温帯ジャポニカもある程度含まれる。この結果は温帯ジャポニカと熱帯ジャポニカの成立について知見を与えるものであり、今後詳細な検討が必要である。また本研究に用いた栽培イネは全て中国由来サンプルであるため、本研究で得た基盤情報を今後他の地域の栽培イネを加えて栽培イネの遺伝的多様性をより網羅したデータセットへ拡張する必要がある。

古代 DNA は非常に断片化が進み、極微量であるため、葉緑体ゲノムの完全長を複数サンプルから得ることは困難であることが予想される。分子系統解析では欠けのあるサイトの情報は捨てるのが定法であるが、古代 DNA では複数サンプルでこれを行った場合には、データ量が著しく減少してしまう。そこで、データが欠けているサイトの遺伝子型を多数のデータからなるパネルデータを元に、統計的にもっともらしい遺伝子型で補完する手法 “data imputation” を適用することにした。葉緑体 DNA は基本的に組み換えを起こさないため、適切なパネルデータを揃えることで、非常に確度の高い穴埋めが可能である。近年いくつか手法が報告されているが、その中でも有用と考えられた KNN 法を用いることとした。実際、古 DNA はダメージ、外来 DNA のコンタミネーション、また極微量からサイクル数の多い増幅をかけるといった要因で、通常の現代 DNA とは異なった性状であることが知られている。そのため、実際古 DNA データで本手法の検討を行った。人骨由来の DNA についてミトコンドリアゲノムをターゲットとしキャプチャーした NGS データについて KNN 法による一連の imputation 処理を行い、古 DNA に適したさまざまな条件を得ることができた。重要なものとしてはヘテロと判定されたサイトの遺伝子型決定に従来よく行われてきた、多数決をとるもしくは最も base quality の高い read の遺伝子型とするといった手法と、このサイトを欠けのあるサイトとして imputation を行った時の結果がしばしば(全体の数%)逆転するという結果を得た。このことは、従来法では現代 DNA のパネルを用いたもっともらしい遺伝子型とは異なる遺伝子型を選択するケースが生じていることを示す。先行研究で KNN 法での核ゲノムの imputation の正答率は 98%ほどで

あり、組み換えのないオルガネラ DNA ではこの値はさらに高いことは明らかであるので、従来法ではヘテロのサイトについて誤った遺伝子型が選択されている可能性が高い。古 DNA 研究での imputation の有用性が示され、現在論文を投稿中である。

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教  
研究者番号：80738716

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Endo M, Kumagai M, et al. (2015) Whole genome analysis of herbicide tolerant mutant rice generated by Agrobacterium-mediated gene targeting. Plant Cell Phys. 56(1):116-25、査読有 DOI:10.1093/pcp/pcu153

Tsukazaki H, . . Kumagai M (9/16 番目), et al. (2015) Development of transcriptome shotgun assembly-derived markers in bunching onion (*Allium fistulosum*). Molecular Breeding. 35:55、査読有 DOI: 10.1007/s11032-015-0265-x

〔学会発表〕(計 4 件)

熊谷真彦、王瀝、植田信太郎、栽培イネ古 DNA 解析のための現生イネ大規模ゲノムデータ解析、第 69 回日本人類学会大会、産業技術総合研究所臨海副都心センター（東京都江東区）、2015 年 10 月 10 日

水野文月、熊谷真彦 et al. 低カバレッジ NGS データから集団レベルの解析を可能にする配列構築のアプローチ、第 69 回日本人類学会大会、産業技術総合研究所臨海副都心センター（東京都江東区）、2015 年 10 月 10 日

熊谷真彦、初めて触れるデータ解析～NGS の現場から、第 2 回次世代シーケンサー研究推進のためのデータ解析ワークショップ、農業生物資源研究所（茨城県つくば市）、2014 年 12 月 12 日

Kumagai Masahiko, Domestication history of rice inferred by ancient DNA and modern genomics, Chile-Japan Academic Forum in UTokyo, 東京大学（東京都文京区）、2014 年 10 月 8 日

〔図書〕(計 1 件)

熊谷真彦、遺伝情報から見た家畜化と栽培化 ～人類史における動植物～、植田信太郎監修「古代ゲノムでたどる人類史」、細胞工学、35(1)、70-73

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

熊谷 真彦 (KUMAGAI, Masahiko)