

平成 30 年 5 月 20 日現在

機関番号：82617

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14615

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた古代病原菌解析法の開発

研究課題名(英文)Developing methods for analysis of ancient pathogens using next-generation sequencing

研究代表者

篠田 謙一 (SHINODA, Ken-ichi)

独立行政法人国立科学博物館・その他部局等・研究調整役

研究者番号：30131923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：古人骨から病原性の微生物や歯石に含まれる細菌のDNAを解析できれば、従来の研究では知ることのできなかつた病の起源や口腔環境の再現などの情報を得ることができる。本研究では実際の古人骨から抽出したゲノム情報をもとに、その可能性を追求した。病原菌のゲノム解析では、明瞭な結果を得ることができなかつたが、ポリオに罹患していると判断されてきた縄文人について、ゲノム解析から筋ジストロフィーに罹患していた可能性が示された。また、縄文人と江戸時代人の口腔細菌のゲノム解析では、両者に違いが見られ、食性と口腔細菌叢の間に関係がある可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：DNA analysis of pathogenic microorganisms and tartar from ancient human remains can help in obtaining information such as the origins of diseases and the reproduction of oral environment, which could not be studied by conventional methods. In this study, we pursued the possibility of analyzing ancient pathogens based on the genomic information extracted from human remains. Genomic analysis of pathogenic bacteria failed to produce clear results; however, for the Jomon people, who were considered to be affected by polio, genomic analysis revealed the possibility of them having muscular dystrophy. In the genomic analysis of oral bacteria of the Jomon and the Edo people, bacterial flora differed between the two, indicating the possibility of a relationship between food intake and oral bacterial flora.

研究分野：自然人類学。特に古人骨から抽出したDNAの分析による人類の拡散と集団の起源の研究

キーワード：古代DNA解析 メタゲノム解析 次世代シーケンサー 縄文人 歯石 江戸時代人 バクテリアDNA

1. 研究開始当初の背景

これまで古人骨に由来する DNA は、目的とする部位を PCR 法によって増幅することによって解析されてきた。しかし含まれる DNA を網羅的に解析する NGS(Next Generation Sequencer) の出現によって、その手法は大きく変わることになり、これまでミトコンドリア DNA の解析が主流だったこの分野も一気に核ゲノム DNA の解析が行われるようになってきている。ただし、古人骨に含まれる DNA の大半はヒト以外の生物に由来することも判明し、現在では古人骨から回収された DNA の中から効率的にヒト固有の DNA を解析する様々な手法が考案されている。実際、我々が解析を進めている縄文人骨では、回収された DNA に含まれるヒト由来の DNA は 0.3%~10%程度のもので大部分である。ヒト以外の DNA の大部分は土壌微生物や菌類のものであると考えられるが、中には生前罹患していた病菌に由来するものや、歯の解析では歯石に含まれる口内細菌の DNA が混ざっている可能性がある。これまで結核やライ菌など病原菌の DNA も菌特異的な DNA を PCR 法によって増幅することによって解析されてきたが、国外では NGS を用いた研究によってその全塩基配列を決定する研究も行われている(例えば Science 341,179,2013)。

病原菌の系統解析からは、その病の起源や拡散の様子などを再現できるので、これまでの疫学的な研究に大きな貢献をすることが予想される。また、歯石に含まれる細菌の変化が、人類の食性と関連するという研究も行われており(Nat Genet. 45:450, 2013)、これまで安定同位体の分析で推定されてきたこの分野に新たな知見を加えることができると考えられる。しかし、これまでの古人骨由来の DNA 分析ではヒト由来の DNA を解析することを一義的な目的としてきたために、ヒト DNA へのコンタミネーションの対応はできているものの、国内には他の生物由来の DNA に対してどの程度の予防対策をしなければならないか等のノウハウの蓄積はない。また、最大の問題となるのは、回収された膨大な量の DNA データから、効率的に目的とする DNA 配列を選び出していくバイオインフォマティクスに関するプロセスの整備である。この手法を確立できれば、様々な微生物 DNA への応用が可能となり、この分野の研究を飛躍的に進めることが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、これまで我々が過去 20 年以上に渡って蓄積してきた古代 DNA 分析のノウハウをもとにして、海外の事例を参照しながら、DNA 回収からデータ解析の全てのステップで、ヒト由来の DNA に加えて病原菌の DNA を解析するためにはどのようなプロセスや手法が必要なのかを明らかにしてい

くことにした。三年間の研究期間で、NGS が生み出す DNA 配列データの中から、各種の病原菌や歯石に含まれる DNA をアラインメントし、系統解析が可能な質と量の DNA データを得ることを目指す。この方法が確立すれば、単一の病原菌をターゲットとしてきた従来の方法とは比較にならない、多くの病原菌に関する DNA 情報を一回の分析で獲得することが可能になるはずである。

ある環境の中に棲む生物全体のゲノムを解析するメタゲノム解析は、NGS の開発によって可能となり、近年多くの成果を上げている。網羅的に解読された DNA 情報を解析し、遺伝子配列からどのような微生物が含まれ、どのような機能(遺伝子)があるかを知る手法をメタゲノム解析と呼び、その研究分野はメタゲノミクスと称される。本研究は古代試料に含まれる DNA が、メタゲノムであるという視点に立って、回収された全ての DNA 情報を解釈しようとするもので、これまでこのような発想から古代ゲノム解析を捉えた研究はない。

病原菌のゲノム解析は自然人類学だけではなく、医学の分野にも大きな貢献を為すことが予想される。これまで骨の変形を伴う疾病の研究は、発掘人骨を調べることで、いつの時代、どの地域にその疾病が拡散したかを直接的な証拠として提示してきた。しかしこの方法では拡散の詳しい状況などを知ることが難しい。これに対し病原菌ゲノムの系統解析を行えば、地域に拡散する病原菌同士の関係を知ることができるので、より詳細な疾病の拡散の状況を明らかにすることができる。また、骨に病変を残さない数多くの病原菌に対してもゲノムの解析を行うことで遺伝情報を明らかにすることができる可能性があり、そこから得られる情報は疫学の分野に大きな貢献を為すことが予想される。日本のように各時代、地域でかなりの人骨試料を蓄積している国では、他国ではできない歴史疫学的な研究が可能になる。

病原菌のゲノム解析と共に、今回解析のもうひとつの柱としている歯石に含まれる DNA の解析では、異なる成果が期待される。口腔内のメタゲノミクスは、食性や健康状態に関する情報を提供する可能性がある。この分野は今後現代人でも多くの情報が蓄積していくと考えられるので、それを参照しながら得られたデータの解釈を進めて行けば、この分野にも新たな展開をもたらすことが予想される。

本研究は、主としてヒトの系統解析の基礎的なデータを得るために行われてきた DNA 解析を質的に転換し、これまで形態学的な研究に重きを置いてきた古病理学的な研究に新たな展開をもたらすポテンシャルを持っており、その意義は大きいと考えられる。そのために DNA 抽出からデータ解析にいたる全ての過程で、新たにどのような操作が必要なのかを洗い出し、NGS が生み出す DNA デ

一タから病原菌に関する情報を得る方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は二つの実験から構成されており、それぞれの過程で古人骨試料からヒト以外に由来する DNA を解析する際の問題点について考える。最初の実験は病原性細菌の分析で、形態からハンセン氏病を罹患していると判断される江戸時代人骨 2 体から DNA を抽出し、NGS による分析を行った。次に結核を罹患している江戸人骨を用いて同様の解析を行い、それぞれから得られた DNA データをもとに、リファレンスデータを使ってライ菌と結核菌の全ゲノムデータを復元する事を目的とした。もう一方の実験では縄文時代人と江戸時代人を対象に歯石を用いた NGS による解析を行った。生業の異なる二つの集団の歯石由来 DNA データを比較することで、口腔細菌の解析に際しての問題点を洗い出し、このような研究で得られたデータが社会状況を再現することができるのかを検討した。

(1) いずれも形態学的な研究からハンセン氏病に罹患しているということが明らかになっている人骨を使って、NGS を用いた網羅的な DNA 解析を行う。

用いるサンプルは患者の四肢及び顔面領域で、患部付近の骨片を 1 g 程度用いる。骨からの DNA 抽出は通常の古人骨 DNA 解析に用いるシリカを持った精製法を予定しているが、それと同時に細菌の DNA を効率よく回収するために適した方法を検討する。これまで我々の研究室では古代試料の DNA 抽出際には、シリカカラムを用いる方法と限界濾過膜を用いた手法を併用している。骨の状態によって両者を使い分けているが、両者を併用することで結果に違いがあるかを検討する。また海外の事例を調査し、細菌の DNA を最も効率よく回収する方法を確立する。

抽出 DNA からライブラリを作成した後に、イルミナ社の Miseq を用いたシーケンスを実行する。ハンセン氏病に関しては全ゲノム配列が公開されているので、それをリファレンスとして得られた DNA 配列からライ菌のゲノムを再構築する。また系統解析を行うことによって日本のライ菌がどの地域のものに近似するかを明らかにする。

(2) 縄文人骨と江戸時代人骨の歯石のサンプルから DNA を抽出し、ショットガンメタゲノムライブラリを作成した。そこからショットガン PCR 法を用いて、目的の DNA を増幅し、シーケンスを行った。これを既に構築されている古代歯石ゲノムデータベース (<https://www.oagr.org.au/experiment/view/65/>) に登録されているデータと併せて、系統分析を行った。なおこの部分の研究は、特に DNA 抽出法の効率化と authentication の基準を作るために、海外の先行研究を参考にすが、論文等では具体的な問題点などが把握しきれないので、現時点でこの分野の研

究が最も進んでいる Australian Centre for Ancient DNA, School of Earth and Environmental Sciences and Environment Institute, The University of Adelaide と共同で行う事にした。

4. 研究成果

(平成 27 年度)

古人骨から抽出した DNA に含まれる病原菌の解析例として、2 つのケースについて実験を行った。ひとつは歯石に含まれる細菌の DNA の解析で、この分析に関してはオーストラリアの The University of Adelaide との共同研究を行った。縄文時代人骨と江戸時代人骨合計 8 体から歯石を採取し、DNA を抽出後、PCR 法によってバクテリアの DNA の増幅を試みた。その結果、いずれのサンプルからもバクテリアの DNA の増幅が認められ、これらのサンプルに歯石由来の DNA が含まれている可能性が示されたので、次世代シーケンスを使った解析を実施した。もうひとつの例は、札幌医科大学に所蔵されている北海道の縄文晩期の人骨で、形態学的な研究によってポリオに罹患した可能性があるとされている個体から DNA を抽出し、メタゲノム解析を行ったものである。この個体の持つ形態学的な特徴がポリオによるものなのかは、異論もあり確定しているわけではない。そこで DNA 分析によって、この問題を解決できるのかを検証することにした。ポリオは 1 本鎖の RNA 型ウイルスなのでそのままの形で古代試料に残っているとは考えにくい。もしメタゲノム解析によって、他の病原菌が特定できればポリオ説を否定できる可能性がある。今回は、この個体の歯髓から抽出した DNA を、HiSeq2500 を使ったゲノム解析を行った。

(平成 28 年度)

結核菌の検出を目的とした分析を行った。対象としたのは北海道利尻島の種屯内(タネトンナイ)遺跡から発掘された人骨で、形態学的な調査から結核に罹患した個体であると考えられている。利尻町博物館に収蔵されている種屯内人骨から歯のサンプルを採取し、DNA を抽出した。最初に、分析可能な DNA が含まれているかを確認するために、APLP 法を用いてミトコンドリア DNA のハプログループを決定した。その結果、この人骨が持つハプログループは Y であることが判明した。次に、抽出 DNA からライブラリを作成し、ミトコンドリア DNA をキャプチャした後に Miseq によるシーケンスを行ってミトコンドリア DNA の全配列を決定した。系統解析の結果、ハプログループは pre-Y1a2 であることを確認した。また、このライブラリには十分な量の DNA が含まれていることが確認できたので、更に HiSeq による分析を行うことにした。分析では 3 つのライブラリを製し、HiSeq の 2 レーンを使った分析を行った。その結果、総数で 893,786,196 本の reads が得られた。更にヒトゲノムに mapping し、PCR

duplicates を除去後は 19,424,713reads が得られている。末端のダメージはヒトゲノムにマップしたリードにおいて確認されており、4.8%程度と古代人ゲノムの中ではかなり低いことから、保存状態の良さがわかる。現時点では結核菌ゲノムへのマッピングは行っていないが、ダメージはバクテリアゲノムにおいても同様と思われるので、結核菌のゲノムが抽出 DNA に残存していれば、検出することが可能であると考えられる。なお、ヒトを対象としてコンタミ率を推定したところ、1%以下であり、ヒトゲノム分析を始め、バクテリアゲノム分析にも適していることが認められている。

(平成 29 年度)

前年までに取得したゲノムデータの解析を行った。オホーツク文化期初期の人骨である北海道利尻島タネトンナイ遺跡から出土した人骨は、結核に罹患している可能性があることが指摘されていたが、今回の分析では結核菌のゲノムを抽出することはできなかった。これまでの結核菌分析の成功例を見ると、その多くは患部付近の人骨を材料としている場合が多い。今回は歯髄に含まれる DNA を解析しているので、これが検出に失敗した原因である可能性がある。古人骨からの病原菌 DNA の検出は未だに成功例が少なく、定型的な手法が確立していないのが現状で、本研究期間でもそれをなし遂げることができなかった。

一方、四肢骨が強く萎縮した北海道の縄文人(入江 9 号人骨)のゲノムデータを見直した結果、この人物は男性であることが示唆された。この人骨はこれまで女性のものとしてそれを根拠にして筋ジストロフィーではなく、ポリオに罹患していると判断されてきた。しかし男性であることが分かったので、筋ジストロフィーであった可能性が示されることになった。今回の分析は従来見直しを迫るものとなった。

オーストラリアのアデレード大学との共同で行った縄文人と江戸時代人の口腔細菌のゲノム解析では、両者に違いが見られた。このことから食性と口腔細菌叢の間に関係がある可能性が示され、食性が不明な集団についても、口腔細菌叢の分析によって見当を付けることができる可能性があることが示された。

(まとめ)

2010 年に発表されたネアンデルタール人のゲノム解析 (Science, 328,710, 2010) 以来、古人骨から抽出された DNA の分析は、PCR 法を用いた特定塩基配列の検出から、次世代シーケンサー (NGS) を用いた分析に移行しつつある。この手法では膨大な量の DNA 配列情報を得ることができるが、古代試料の場合、そこから得られた DNA 配列の大部分はヒト以外の生物に由来し、ヒト由来の DNA は数パーセントしか含まれていない。そのため、研究の多くは NGS の解析に持ち込むまでに如

何にヒト由来の DNA の割合を増やしていくかという方法の開発が主となっている。

しかし、古代試料から回収される DNA の大部分は土壌微生物に由来すると考えられるが、中には生前にその人物が持っていた微生物に由来するものも含まれているはずである。そしてそれらの持つ遺伝情報は、健康状態や食性などの情報を知るための鍵となることが期待される。本研究では、近年の研究の傾向を逆転させ、これまで不要のものとして無視してきた DNA 情報の中に古代社会を復元するための重要な情報を見出すことにした。ただしヒトに寄生する多くの細菌の DNA 配列は土壌微生物と共通のものも多く、それが本来の病原菌に由来するのかを判定することには困難が伴う。種特異性のある DNA 情報を選び出し、全ゲノムを決定するためにはデータ処理の工程で新たな工夫をすることが必要である。

この部分に関しては、いくつかの方法を用いて検討したが、3 年間の研究で、細菌のゲノムを特定することはできなかった。対象としたのが骨から抽出した DNA であったことが、細菌由来の DNA を効率的に回収できなかった原因である可能性がある。ただし、この分野の研究は世界各地で進んでおり、最近では古代 DNA から B 型肝炎ウイルス型を決定して解析したという報告もある (<https://www.nature.com/articles/s41586-018-0097-z>)。我々も今回の研究で全ゲノムデータを取得しているサンプルを多数集めているので、これらの研究成果を参照して検討することは可能である。今後の検討課題としたい。

一方、歯石の分析では一定の結果を得ることができた。江戸と縄文では歯石に含まれるバクテリアの系統が異なっており、江戸のものは東アジアの農耕民集団と類似した。これは食性によって歯石を構成するバクテリアが異なっていることを示しており、逆に食性の分からない個体の歯石を分析することによって、その生業形態などを類推する手掛かりを得ることができていることが示された。

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 8 件)

1. 篠田 謙一, 神澤 秀明, 角田 恒雄, 安達登 (2017) 佐世保市岩下洞穴および下本山岩陰遺跡出土人骨のミトコンドリア DNA 分析. Anthropological Science (Japanese Series) (査読あり) Vol.125, 49-63. 10.1537/asj.170509

2. Adachi N., Kakuda T., Takahashi R., Kanzawa-Kiriyama H. Shinoda K. (2017) Ethnic derivation of the Ainu inferred from ancient mitochondrial DNA data.

American Journal of Physical Anthropology (査読あり) Vol.165, 139-148
10.1002/ajpa.23338

3. 篠田謙一 (2016) 人類史研究の最前線 - 化石とゲノムの研究はどこに向かうのか-. 生物の科学遺伝(査読無し) Vol.70, 442-445.

4. Kanzawa-Kiriyama H., Kryukov K., Jinam T. A., Hosomichi K., Saso A., Suwa G., Ueda S., Yoneda M., Tajima A., Shinoda K., Inoue I., and Saitou N. (2017) A partial nuclear genome of the Jomons who lived 3000 years ago in Fukushima, Japan. Journal of Human Genetics. (査読あり) Vol.62, 213-221.
doi:10.1038/jhg.2016.110

5. 篠田謙一 (2017) 日本人の起源に関する最近のDNA人類学の動向. 岩波「科学」(査読無し) Vol.87, 162-165.

6. 篠田謙一 (2015) 遺伝情報から見た日本人の起源と成立の過程. 細胞工学 (査読無し) Vol.34, 902-905.

7. Jinam A.T., Kanzawa-Kiriyama H., Saitou N. (2015) Human genetic diversity in the Japanese Archipelago: dual structure and beyond. Genes & genetic systems. Vol.90, 147-152.
<http://doi.org/10.1266/ggs.90.147>

8. Jinam A.T., Kanzawa-Kiriyama H., Saitou N. (2015) Human genetic diversity in the Japanese Archipelago: dual structure and beyond. Genes & genetic systems, Vol.90, 147-152.
doi.org/10.1266/ggs.90.147

[学会発表](計11件)

1. 篠田謙一 (2017) Analysis of the ancient human genome. 第71回日本人類学会大会

2. 篠田謙一 (2017)ゲノムから探る日本人の成り立ち. 第9回泌尿器抗加齢医学研究会.(招待講演)

3. 篠田謙一 (2016) DNA分析で知る日本列島住民の起源と成り立ち. 基盤研セミナー(招待講演)

4. 篠田謙一 (2016) DNAで探る人類の拡散と日本人のルーツ. 読売テクノフォーラム(招待講演)

5. 篠田謙一 (2016) 古代ゲノムで読む日本人の起源と成立. 平成28年動物学会近畿支部秋の公開講演会(招待講演)

6. 篠田謙一 (2015) DNAから見た日本人の形成と北東アジア. 東北大学東北アジア研究センター創立20周年記念国際シンポジウム(招待講演)(国際学会)

7. Shinoda, K., Kanzawa-Kiriyama, H., Adachi, N., Kakuda, T., Tamae, T., Doi, N. (2015) DNA analysis of Kaizuka skeletal remains excavated from Ie Island in Okinawa. 第69回日本人類学会総会.

8. 篠田謙一 (2015) DNAから見た日本人の形成と北東アジア. 東北大学東北アジア研究センター創立20周年記念国際シンポジウム(招待講演)(国際学会)

9. 神澤秀明, Kirill Kryukov, Timothy Jinam, 佐藤孝雄, 奈良貴史, 安達登, 細道一善, 田嶋敦, 井ノ上逸朗, 斎藤成也, 篠田謙一 (2015) 古代日本列島人の核ゲノム解析(第3報) 第69回日本人類学会総会.

10. 神澤秀明, Kirill Kryukov, Timothy Jinam, 細道一善, 佐宗亜衣子, 諏訪元, 植田信太郎, 米田穰, 田嶋敦, 井ノ上逸朗, 篠田謙一, 斎藤成也 (2015) 縄文人核ゲノム分析から見た日本列島人の成立史. 第17回日本進化学会大会.

11. 神澤秀明 (2015) 縄文人核ゲノムから見る東ユーラシア人の成立史. 第4回NGS現場の会.

[図書](計3件)

1. 篠田謙一 (2017) DNAから見た南西諸島集団の成立 奄美・沖縄諸島先史学の最前線(共著) 69-84ページ. 南方新社.

2. 篠田謙一 (2016) DNAで読む日本人の形成史. 國學院大學日本文化研究所編:日本文化はどこにあるか. 19-64ページ. 春秋社

3. 篠田謙一 (2015) DNAで語る日本人起源論 岩波書店 245ページ

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 篠田 謙一
(国立科学博物館・研究調整役)
研究者番号：30131923

- (2) 研究分担者 神澤 秀明
(国立科学博物館・人類研究部・研究員)
研究者番号：80734912