

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05685

研究課題名(和文) 沖縄遺跡群より出土するジュゴン骨の遺伝的解析

研究課題名(英文) Genetic analysis of dugong skeletal remains excavated from archeological sites in Okinawa.

研究代表者

角田 恒雄 (KAKUDA, Tsuneo)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：80446575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は沖縄各地の遺跡より発掘されるジュゴン骨の古代DNAを対象とし、遺伝的多様性の推定を目的とした。沖縄県の遺跡から出土した骨試料を対象に実験を行なった結果、数十塩基対程度の古代DNAを抽出に成功した。本ミトコンドリアDNAデータと海外データを比較したところ、少なくともフィリピンを除く他海域集団とは異なるSNPを持つという結果が得られた。一方、NGSによる分析を試みた結果、対象由来のDNA回収量が予想を超えて遥かに微量であったことが影響し、詳細な分析が困難であった。2021年度からの研究課題では、ジュゴンのゲノムデータ取得と利用を予定しており、NGSによる詳細な分析の実施ができると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国際自然保護連合によって絶滅危惧種に指定されている本種は、各国で食性や生息域といった生態調査から、個体群や地域集団のDNA分析など活発な研究活動が幅広く行われている。一方、わが国では目視観察や鳴音探知調査といった生息状況調査の他は、環境省(2004)以降行われていなかった。現生ジュゴン最北の生息地である沖縄近海を対象とし、かつ遺跡時代の個体を対象とした本DNA分析での成果は、得られたデータは僅かであったが、遺跡骨から抽出できるDNAの状態を把握し、現在進めているNGS分析の貴重な基礎データとして活用されている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to estimate the genetic diversity of ancient DNA of dugong bones excavated from archaeological sites in various parts of Okinawa. As a result of conducting experiments on bone samples excavated from archaeological sites in Okinawa Prefecture, we succeeded in extracting ancient DNA of about several tens of base pairs. Comparing this mitochondrial DNA data with the published overseas data, it was found that the SNP was different from that of other marine populations, at least except for the Philippines. On the other hand, as a result of attempting analysis by NGS, detailed analysis was difficult due to the fact that the amount of DNA recovered from the subject was much smaller than expected. In the research project from 2021, we plan to acquire and use the dugong genome data, and we believe that detailed analysis by NGS will be possible.

研究分野：古代DNA分析

キーワード：古代DNA 生物多様性保全 海生哺乳類

(2) 次世代シーケンサー(NGS)による分析

APLP-PCRにより沖縄県東岸の平敷屋トウバル遺跡から出土した骨を対象に、次世代シーケンサー(NGS)による分析を行った。各試料のライブラリの作成後、インサートされているDNA配列の長さや濃度をそれぞれ計測・記録し、実験を進めた。1st PCR後の諸情報の計測後、目的とする配列のみを選択的に実験に用いるためサイズセレクションを行い、NGSを用いたショットガン・シーケンスを実施した。

結果として、APLP-PCRでは9試料から50bp-90bp程度の増幅は見られたが、NGS分析では10試料のうち3試料で、対象とするミトコンドリア由来の配列が得られたが、それぞれ1から数リードと極くわずくであり、以降の詳細な分析を進めること困難であった(図2)。原因として対象由来のDNA回収量が当初の予想よりも少なく、ショットガンシーケンスでは分析が難しかった可能性がもっとも高いと考えられた。古代DNAを抽出した際には多くの場合、バクテリア由来のDNAが99%を

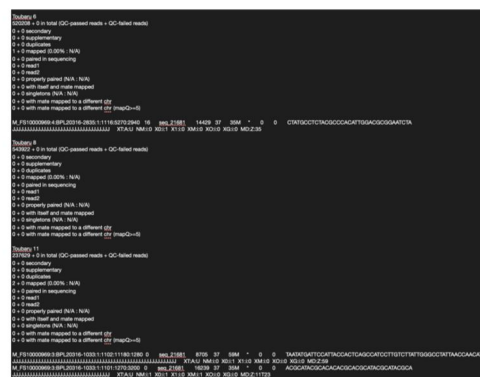


図2 iSeq 100による分析結果
Toubaru6(肋骨), Toubaru8(肋骨) Toubaru11(肋骨)での結果

閉めることが指摘されており(), 得られたリードの割合から今回の実験も当てはまると予想される。抽出できた僅かな古代DNAを濃縮を行うため、良好なジユゴンDNA(現生ジユゴン試料)の獲得を行い、ベイトという手法を用いて濃縮処理(DNAチャプチャ)のための実験を進めたが、DNA抽出用試料の入手までに時間を要したこと、昨年発生し、未だ終息の様子が見られない新型コロナウイルスの影響で試薬・消耗品等が枯渇していたことなどから実験が大幅に遅れ、年度末となり、ようやく古代DNAの濃縮処理に必要な試薬が整いつつある状況にあった。

本研究課題では、当初の目的を達成することは叶わなかったが、これまで多くの動物古代DNA分析で対象とするには困難と考えられてきた肋骨片から、絶対量は多くはないが、DNA抽出に成功し、NGS分析に進める可能性があることを明らかにできた。本種の古代DNA分析には、濃縮処理が必須であるが、同処理とともに本種の全ゲノムデータをリファレンスデータとして活用することで、分析で得られた塩基配列データをリカバーし、多くの骨試料ミトコンドリア全ゲノム分析が可能になるのでないかと考える。

今後の研究課題では、ジユゴンの全ゲノムデータを取得し、その利用を目標としているため、DNA濃縮試薬の作成とともにNGSによる詳細な分析の実施が大いに期待できると考える。

引用文献

- Adachi N, Kanzawa-Kiriyama H, Nara T, Kakuda T, Nishida I, Shinoda K. Ancient genomes from the initial Jomon period: new insights into the genetic history of the Japanese archipelago. *Anthropological Science*, 129(1), 2021, 13-22.
- Omoto K, Baba H, Kanazawa E, Yoneda M, Shinoda K, Kanzawa-Kiriyama H, Kakuda T, Adachi N, Sakaue K, Almeda, Jr. F A, Bauzon L E. An integrated study of the human skeletal remains discovered in Escalon Cave, northeastern Mindanao, the Philippines. *Anthropological Science*, 128(3), 2020, 93-111.
- Adachi N, Kakuda T, Takahashi R, Kanzawa-Kiriyama H, and Shinoda K. Ethnic derivation of the Ainu inferred from ancient mitochondrial DNA data. *American Journal of Physical Anthropology*, 165(1), Jan, 2018, 139-148.
- Kakuda T et al., Multiplex APLP System for High-Resolution Haplogrouping of Extremely Degraded East-Asian Mitochondrial DNAs. *PLoS One*, Jun 2016, 29;11(6): e0158463.
- Kanzawa-Kiriyama H, Kryukov K, Jinam TA, Hosomichi K, Saso A, Suwa G, Ueda S, Yoneda M, Tajima A, Shinoda K, Inoue I, Saitou N. A partial nuclear genome of the Jomons who lived 3000 years ago in Fukushima, Japan. *Journal of Human Genetics*, 2017, 62, 213-221.
- Maricic T, Whitten M, Pääbo S. Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS One*, 2010, 5(11): e14004.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角田恒雄
2. 発表標題 ミトコンドリアDNA分析からみた日本人の起源
3. 学会等名 湘南ひらつかキャンパス開設30年記念 理学部・理学研究科卒業生による講演会（第4回）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本佳那, 藤井元人, 猩々英紀, 角田恒雄, 上木耕一郎, 安達登
2. 発表標題 新規プライマーセットを用いた高感度性別判定法の開発
3. 学会等名 日本DNA多型学会第28回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本佳那, 小泉舞, 齋藤正夫, 藤井元人, 猩々英紀, 角田恒雄, 井口蘭, 上木耕一郎, 安達登
2. 発表標題 Development of a highly sensitive sex determination method using the novel primer set
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 核酸抽出装置 及び核酸抽出方法	発明者 石原敬三、赤池東、 細谷明宏、安達登、 角田恒雄、田中隆弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、MOC-047JPS, 特願2020-029141	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<https://www.med.yamanashi.ac.jp/social/legal0me/>

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

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