

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05634

研究課題名(和文) 遺伝子解析から考察するジュゴンの歴史の変遷

研究課題名(英文) Historical changes in Dugongs analyzed from genetic analysis

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では次世代シーケンサー(NGS)を用いて遺跡出土したジュゴン骨を対象とし、古代DNAの分析から当時の遺伝的多様性の推定を目的とした。遺跡出土ジュゴン骨の古代DNA残存量は僅かであることが判明しているため、各試料のDNAを濃縮・増幅することで分析の進行をはかったが、入手していた試料では濃縮と増幅が確認できなかった。そこで新たな遺跡資料にアクセスし、対象種DNAの濃縮と増幅実験を進めたが、さらなる詳細な分析を進めることができなかった。この原因として出土ジュゴン骨における古代DNA残存率は予想よりも遥かに少なく、古代人をはじめとする遺跡骨以上に対象資料の精査が非常に重要であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物保全・生物地理学において遺伝的多様性は重要な項目であり、対象生物の歴史の変遷を辿る古代DNA分析は、次世代シーケンサーによる分析によって、ミトコンドリアゲノムそして核ゲノムの解析まで可能となってきた。一方で、高温多湿地域から出土する遺跡骨の古代DNAは、寒冷地域と比較して残存率は概ね低いことが多く報告されている。本研究ではわが国南端に位置する遺跡出土骨を対象としたが、古人骨では古代DNAの残存が高いとされている部位でも対象種によって、その残存率に違いがあることが明らかになった。高温多湿地域の古代DNA分析では資料の選定は最も優先すべきであり、試料量も対象種によって熟考する必要がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to analyze Dugong bones excavated from archaeological sites using next generation sequencing (NGS) to estimate the genetic diversity of that age through the analysis of ancient DNA. It has been found that really small amount of ancient DNA remains in Dugong bones excavated from the site, so we attempted to proceed with the analysis by concentrating and amplifying the DNA of each sample, but the concentration and amplification were not possible with our samples. I accessed new archaeological materials and conducted experiments to enrich and amplify the DNA of the target species, but was unable to conduct further detailed analysis.

The reason for this is that the survival rate of ancient DNA in excavated Dugong bones is much lower than expected, it is clear that examining ancient materials from the southern region in detail is necessary, not just the remains of ancient humans.

研究分野：分子考古生物学

キーワード：古代DNA 生物多様性保全 南方試料

1. 研究開始当初の背景

わが国では沖縄近海にのみ、生息が確認されている海生哺乳類であるジュゴン *Dugong dugon* (Müller, 1776) は、海牛目ジュゴン科に属する唯一の種で、国際自然保護連合 (IUCN) により絶滅危惧種に認定されている。沖縄近海のジュゴンは現代において、まさに絶滅に瀕している状況であるが、およそ 4,000 年前の新石器時代から近代の琉球列島周辺には、相当数の個体が生息していた可能性が高く、多くの遺跡や貝塚から貴重な動物性食糧源として消費されていたと考えられる骨の出土が報告されている (①)。2001 年から 2005 年に実施された「ジュゴンと藻場の広域的調査」(②) では、上記海域における各種調査が行われ、本種の遺伝的特性分析も対象となり、沖縄近海における近現代の個体はフィリピンの個体群とは若干の相違をもちつつも、同様もしくは同じ塩基配列の組成を共有している可能性が示唆された一方で、およそ数千年前の遺跡試料は、現在よりもはるかに遺伝的多様性の高い個体群が生息していた可能性を示したが、これは当時の技術上の観点から極めて暫定的な結果であり、本種の詳細な遺伝的実像を始め、生態情報など多くが解明されずにいる。

2. 研究の目的

2010 年以降、DNA 解析技術は次世代シーケンサー (NGS) の登場によって解析能力、精度ともに飛躍的に向上し、広い分野において目覚ましい結果を産出している。本研究では NGS 分析を活用し、現在、絶滅の危機にある沖縄ジュゴンの遺伝的多様性と変遷を、主として遺跡出土骨を対象とし、ミトコンドリア全ゲノム配列から推定を行うことを目的とした。また、沖縄本島付近で少なくとも数年間は確認されていた 3 頭のうち 1 頭の死亡が 2019 年に確認されており、本研究では死亡漂着した現生ジュゴンの全ゲノム配列を決定しリファレンスデータとして活用することで沖縄県の各遺跡から出土する骨試料と県下の博物館・資料館に保管されている近現代の骨標本から遺伝情報を獲得し解析を行う。

3. 研究の方法

1) DNA 抽出対象資料の選定と試料の採取

遺伝的分析を進めるにあたり、所蔵資料の使用に関してご快諾を頂いた沖縄県埋蔵文化財センターの標本を対象として古代 DNA 抽出を進めた。標本の選定には、これまで研究代表者が数多く手掛けてきた古人骨のサンプリング時に培った選択基準に沿って行った。

2) DNA の抽出とライブラリの作成、ライブラリの濃縮

これまでに数百の古人骨試料から微量な古代 DNA の抽出に成功している手法 (③, ④, ⑤ほか) を用いた。ライブラリの作成は (⑥) の手法に従い、濃縮には arbor biosciences 社で開発された myBaits Mito キットを用い、濃縮作業を進めた。

3) NGS によるシーケンス

ライブラリに含まれる DNA の断片長と濃度を確認し、iSeq (Illumina) を用い、ペアエンドリードで 150 塩基ずつシーケンスを実行することとした。

4) 現生ジュゴンの全ゲノムシーケンス

当初は先端ゲノム支援に応募し共同で分析を進める予定であったが不採択となり、一方で本種の新規ゲノムの配列が公表されていたため (⑦)、マクロジェン・ジャパン社に受託解析を依頼し、全ゲノムデータの取得を行った。

4. 研究成果

1) 続くコロナ禍の影響により、沖縄県立埋蔵文化財センターでの再サンプリングが大幅に遅れたが、最終年度末ようやくサンプリングを実現できた。古人骨において対象 DNA の残存している可能性が高い側頭骨付近の硬質部に相当する耳包骨 4 点、下顎骨 2 点、頭骨 2 点、肩甲骨 3 点、上腕骨 1 点、肋骨片 1 2 点、計 24 点の骨試料から骨粉を採取し実験に用いた。図 1 に資料の一部を示す。DNA 抽出は (③) に記載された方法に準じて行なった。また、古代 DNA の抽出に関して今後、革新的な方法が確立された際のために全資料からの DNA 抽出は行わず、既存の方法で古代 DNA を回収できる可能性が高い耳包骨 2 点と肩甲骨 4 点、肋骨 4 点を対象とした。抽出作業を行わなかった骨粉試料は-80℃の冷凍庫内で保管とした。



図 1 DNA抽出に用いた標本 (一部)

2) DNA 抽出を行った 10 試料とともに抽出済みであった 4 点の古代 DNA のライブラリ作成を行った。(⑥) に従って Half UDG 処理を行い、精製後に 2 回の PCR を行ったところ、4 試料で目的の長さの増幅が確認できた(図 2)。これら試料のミトコンドリアゲノム配列を濃縮するため、myBaits Mito キットを用い、ジュゴンと比較的近縁であるアフリカゾウのミトコンドリアパ

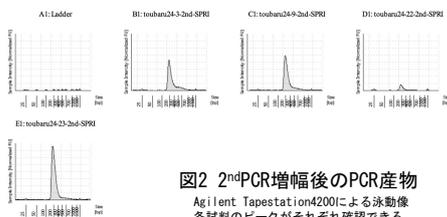


図 2 2ndPCR増幅後のPCR産物
Agilent TapeStation4200による泳動像
各試料のピークがそれぞれ確認できる。

ネルを使用して濃縮作業を進めた。しかし結果として、全ての試料で濃縮が見られず、目的 DNA の回収ができなかった (図 3)。この原因としては、濃縮の際に近縁種のパネルを使用したことも考えられるが、濃縮作業時の設定は精確なものとしたため、対象とした古代 DNA の残存率が予想よりも極めて低かったことが最

も高い可能性と考えられる。古人骨を対象とした場合では、側頭骨錐体硬質部からのサンプリングでは、非常に高い確率で古代 DNA の回収に成功しているが、ジュゴンにおいては完全には当てはまらなかったと考えられる。埋葬形態で出土する人骨と、食用とされた動物骨の違いもあるのかもしれない。一方で、同様の環境から出土するリュウキュウイノシシの遺跡骨からは古代 DNA の抽出が成功しているため (神澤 私信)、今後継続する分析においては、資料の選定と骨粉試料採取量など、非常に重要な課題と考える。

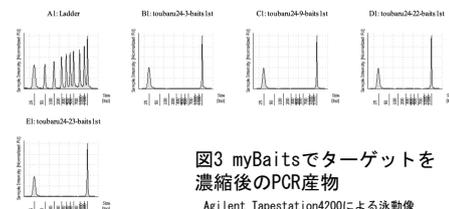


図 3 myBaitsでターゲットを濃縮後のPCR産物
Agilent TapeStation4200による泳動像
各試料のピークが確認できない (marker間)。

3) 今回の研究ではシーケンスに用いるだけの古代 DNA が濃縮できなかったため、実施まで至っていない。

4) 受託解析が無事完了し、現生ジュゴンのゲノムデータを入手することができた。今後の古代 DNA 分析を進める際のリファレンスデータとして活用できるとともに、近現代のジュゴン DNA の全ゲノム分析を進めていく上で大変重要なデータであり、今後進める全ゲノムデータを用いた日本近海に現在生息する本種の遺伝的実像の解明、集団サイズの歴史の変遷の推定などを進めることが期待できる。

引用文献

- ① 「ジュゴン骨に関する出土資料の集成(補遺・1)」 盛本勲 沖縄埋文研究 / 沖縄県立埋蔵文化財センター 編 (3) 39-42, 2005
- ② 「ジュゴンと藻場の広域的調査 平成 13 年～17 年度」 環境省 2006
- ③ Ancient genomes from the initial Jomon period: new insights into the genetic history of the Japanese archipelago. Adachi N, Kanzawa-Kiriyama H, Nara T, Kakuda T, Nishida I, Shinoda K. *Anthropological Science*, 129(1), 13-22, 2021.
- ④ An integrated study of the human skeletal remains discovered in Escalon Cave, northeastern Mindanao, the Philippines. 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. *Science*, 128(3), 93-111, 2020.
- ⑤ Ethnic derivation of the Ainu inferred from ancient mitochondrial DNA data. Adachi N, Kakuda T, Takahashi R, Kanzawa-Kiriyama H, and Shinoda K. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSICAL ANTHROPOLOGY*, 165(1), Jan., 139-148. 2018.
- ⑥ A partial nuclear genome of the Jomons who lived 3000 years ago in Fukushima, Japan. Kanzawa-Kiriyama H., Kryukov K., Jinam T., Hosomichi K., Saso A., Suwa G., Ueda S., Yoneda M., Tajima A., Shinoda K., Inoue I., and Saitou N. *Journal of Human Genetics*, advance online publication 2016. (doi: 10.1038/jhg.2016.110).
- ⑦ Genomic basis for skin phenotype and cold adaptation in the extinct Steller's sea cow. Le Duc D, Velluva A, Cassatt-Johnstone M, Olsen RA et al., *Science advances*, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|