

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750102

研究課題名(和文)メロン仲間における種子遺存体の分子遺伝学的研究 - 核ゲノムマーカーの開発と応用

研究課題名(英文)Development of DNA marker for melon seed remains and the application for Japanese melon

研究代表者

田中 克典(TANAKA, KATSUNORI)

弘前大学・人文学部・特任助教

研究者番号：00450213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺跡から出土した作物種子について多様性を解析ならびに評価する研究は、作物が成立した要因の検討や作物育種へ貢献できる。そこで、出土種子を解析できるDNAマーカーを開発するため、本研究では葉緑体ゲノムと核ゲノムで計102箇所の塩基配列多型を検出し、現生メロンの系統解析によって、28のDNAマーカーを開発した。岡山県の鹿田遺跡で出土したメロン種子の解析では、多様なメロンの利用、導入、選抜が示唆され、開発したDNAマーカーは日本における作物の多様性を時系列で評価できることがわかった。今後、作物への嗜好と選抜との対応、これに関わる社会や政治的背景を研究するため、これらDNAマーカーを利用する。

研究成果の概要(英文)：To develop DNA marker for seed remains excavated at archaeological site, we found a total of 102 DNA polymorphisms after sequencing the chloroplast and nuclear genome in melon. Of them, 28 sequence polymorphisms were converted to DNA marker. Phylogenetic analysis using the DNA marker presented following results: genetic differentiation between Euro-American and East Asian melons, large genetic diversity in South Asian melon including landrace, and melon introduction to Japan. Application of the DNA marker for DNA analysis in melon seed remains excavated at the Shikata archaeological site in Okayama Prefecture indicated utilization, introduction of diversified melon from the Yayoi to Edo Period and selections in respective periods as well as modern, and showed usefulness of the DNA marker for evaluating genetic diversity in Japanese crop. The DNA marker will be applied for the future study to concern social and political condition, and preference, which associate with crop selection.

研究分野：植物細胞遺伝学

キーワード：作物育種 遺伝的多様性 ウリ 考古学 選抜 種子遺存体 DNAマーカー メロン

1. 研究開始当初の背景

日本では遺跡から作物の種子遺存体が出土する(Crawford “Archeology of Asia” 2006 他, 図 1)。これらは人が選抜と利用を繰り返してきた植物である。故に、種子遺存体は時代毎の食文化のみならず、人がモノに対して選抜するに至った背景を検討する貴重な材料である。



図1 遺跡から出土した作物の種子。左から、イネ、オムギ、コムギ、メロン。この他にも様々な種子が出土しているが、中でも、イネとメロンの出土件数が多い。

マクワウリとシロウリは、日本を含む東アジアに固有なメロンの仲間 (*Cucumis melo* L.)であり、インド東部に起源する(Tanaka et al. 2007)。それらは、選抜を受けながら伝播したとされる(Nhi et al. 2010 他)。

日本において、メロン仲間は、考古学的知見(藤下 1983 他)、また数々の史実(『古事記』他)から鑑みて、古くから庶民に利用されていたと考えられる。これらの種子遺存体は、長さや幅が時代の経過とともに大きくなっている(藤下 1992, 田中 2012, 図 2)。

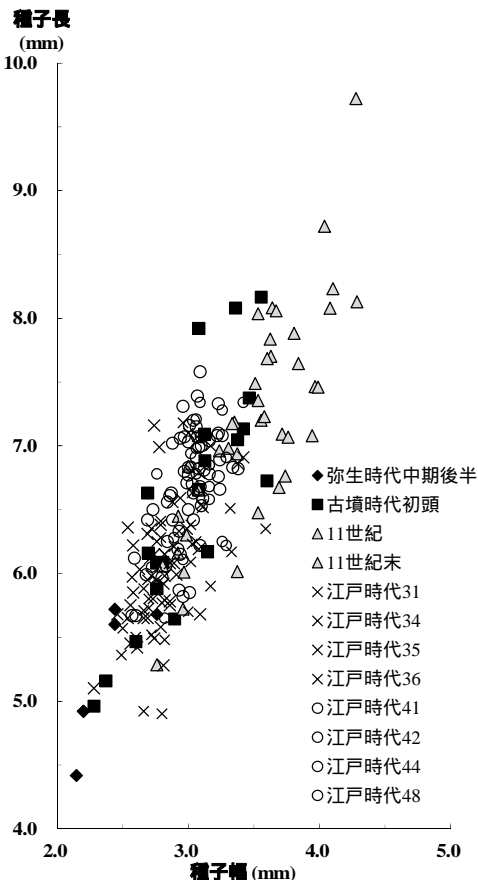


図2 岡山県鹿田遺跡から出土したメロン仲間の種子遺存体におけるサイズの変異。データは田中ら (2013) より引用。

申請者が先の科研費(「若手 B」)において、葉緑体ゲノムの DNA マーカーで岡山県鹿田遺跡の種子遺存体を分析したところ、結果は 11 世紀までメロン仲間の細胞質型が現代のマクワウリやシロウリと比べて多様であった(田中 2011 他)。そこで、人が日本においてメロン仲間に選抜を加えていたとする理論構築にむけて課題を克服すべく、申請研究に至った。

2. 研究の目的

申請研究の目的は各時代におけるメロン仲間の遺伝的多様性を通じて、作物に選抜が加えられたことを解明することであった。このために、下記の 2 点の課題を実施した(図 3)。

- ・メロン仲間の種子遺存体に適用できる葉緑体ゲノム、核ゲノムの DNA マーカーの開発。
- ・メロン仲間の種子遺存体の分析による、遺伝的多様性の変動解明。

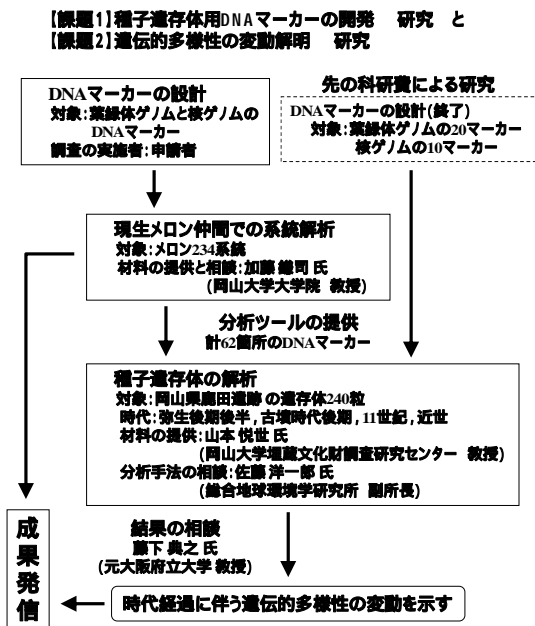


図3 申請研究の課題と研究の行程

3. 研究の方法

申請者は核ゲノムの DNA マーカーを開発して、メロン仲間の種子遺存体に適用した。このために、下記 3 つの項目を実施した。

葉緑体ゲノムの 48 の遺伝子内イントロンまたは遺伝子間領域について、データベース上のメロン全ゲノム配列に基づいてプライマーセットを設計した。これらのプライマーセットを用いて、細胞質型変異をカバーしうるメロン 6 系統(マクワ、雑草メロン、ネットメロン、ハネデュー、アフリカの在来メロン 2 系統)とその近縁野生種 2 系統について塩基配列を解析した。核ゲノムマーカーの開発では、Tanaka et al. (2007)の系統解析に用いられた RAPD マーカーのうち、12 のマーカーについてについて現生メロン 12 系統で DNA 配列を解読した。これらの配列変異に基づいて種子遺存体用の DNA マーカーを設計した。

設計した DNA マーカーについて分類の特性を調査すべく、世界各地の現生メロン 234 系統を解析した。この作業によりバックデータを蓄積した。

先行研究と申請研究とで開発した DNA マーカーを用いて、先行研究で用いた岡山県鹿田遺跡の種子遺存体（弥生後期後半、古墳時代初頭，11 世紀，江戸時代）の計 240 粒を分析した。各時代の遺伝的多様性を比べて、メロン仲間が日本で選抜されたことを検討した。

#### 4. 研究成果

葉緑体ゲノムの解析では 48 領域について、世界各地のメロンの変異をカバーする 6 系統のメロンと 2 系統の野生種について塩基配列（約 33kb）を解読したところ、90 箇所においてメロン固有の配列変異が認められた（表 1）。このうち、一塩基多型（SNP）は 57 箇所であった。これらの SNP のうち、16 箇所の SNPs によって、メロンの細胞質型は特定可能であった。そこで、これら 12 箇所の SNPs を、種子遺存体用の DNA マーカーとして設計した。

核ゲノムでは、12 の RAPD マーカーについてプライマー結合領域を含む領域を解読し、データベースに登録されているメロンの全ゲノム配列と比較した。その比較により、これらのマーカーの座上位置を特定するとともに、プライマーサイトの配列変異により、メロンの系統解析が可能であることがわかった。そこで、これらプライマーサイトの配列変異を種子遺存体用の DNA マーカーへ変換した。

表 1 葉緑体ゲノムの解析で配列変異が認められた領域

解析領域	長さ (bp)	配列変異数	マーカー数
<i>atpA</i>	473	1	-
<i>atpB-rbcL</i>	748	3	1
<i>psaI-ycf4</i>	583	3	-
<i>psaJ-rpl33</i>	584	1	-
<i>atpI-rps2</i>	417	3	-
<i>rpoC1 intron</i>	886	2	-
<i>petN-psbM</i>	1,106	6	1
<i>atpA-atpF</i>	379	2	-
<i>atpF-atpH</i>	560	1	-
<i>psaA-ycf3</i>	955	2	-
<i>ycf3 intron 1</i>	980	2	-
<i>ycf3 intron 2</i>	443	2	-
<i>ndhJ-ndhK</i>	433	1	-
<i>rbcL-psaI</i>	1,119	6	1
<i>accD-psaI</i>	684	5	1
<i>ycf4-cemA</i>	706	2	-
<i>petA-psbJ</i>	1,347	4	1
<i>psbE-petL</i>	1,582	5	1
<i>petL-petG</i>	272	1	-
<i>rps18-rpl20</i>	403	2	-
<i>rpl20-rps12</i>	1,127	2	-
<i>rps12-clpP</i>	2,101	10	2
<i>clpP-psbB</i>	1,738	8	2
<i>psbB-psbH</i>	940	2	-
<i>psbH-petB</i>	2,356	6	1
<i>rps11-rpl14</i>	1,426	4	1
<i>rpl16-rps3</i>	1,460	4	-
計	25,808	90	12

16 の葉緑体 DNA マーカーについて

て、251 系統の現生メロンコレクションで系統解析したところ、メロンの細胞質型は大きく Ia 型と Ib 型の 2 つに分けられ、それぞれ欧米のメロンと東アジアのメロン（中国、韓国、日本）とで分化していたことがわかった（図 4）。また、インドを含む南アジアではメロンでは、Ia 型と Ib 型とが混在しており、多様であった。

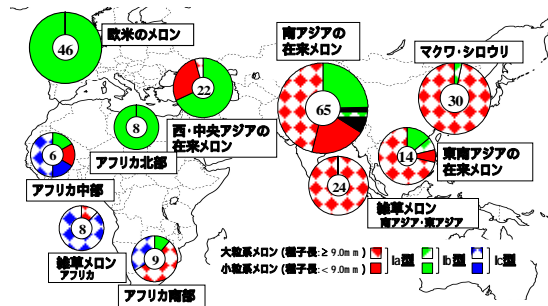


図 4 葉緑体ゲノムの配列多型に基づいて決定した栽培メロンの細胞質型とその地理的分布

核ゲノムの系統解析では、RAPD マーカーと開発した DNA マーカーとで分類の結果が一致していた。この分類の結果は、南アジアの在来メロンが幅広い遺伝的変異を示したこと、これらのうちの一部は東アジアに固有のマクワやシロウリと同じグループに分類され、その起源に関わったことを示しており、既報の研究結果（Tanaka et al. 2007; Yi et al. 2009）を支持していた（図 5）。また、系統解析では、ミャンマーや東南アジアの山岳部のメロンがマクワやシロウリとは別のグループに分けられた。この結果は、東アジアに固有のマクワとシロウリが、南アジアからミャンマー、雲南省の山岳部を経由するルートではなく（Tanaka et al. 2007）、バングラデシュ、ミャンマーの低地部を経由したルートで導入された可能性を示唆していた。

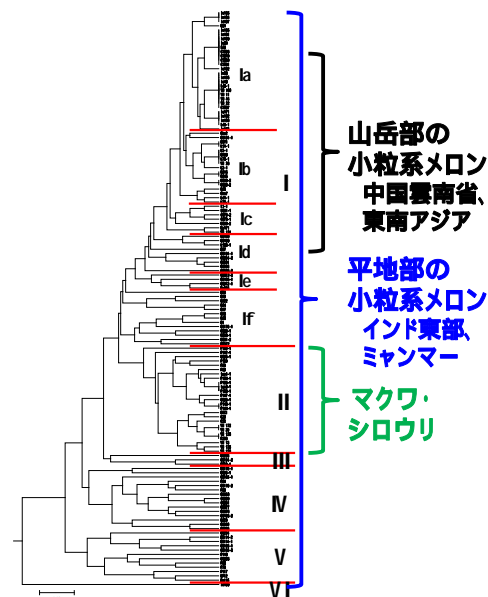


図 5 メロン 134 系統の UPGMA 系統樹。遺伝的距離は RAPD マーカーのバンドスコアを用いて Apostol (1993) の方法で算出した。

種子遺存体用 DNA マーカーを用いた 240 粒のメロン種子遺存体の解析によって、122 粒において DNA を復元できた (表 2)。これらの種子遺存体は 2 つのグループに分けられた。それぞれのグループは、Ia 型と Ib 型の細胞質型と対応していた。弥生時代、11 世紀および江戸時代のメロン集団は、2 つのグループで構成されており、多様なメロンの利用と導入が考えられた。また、江戸時代の 4 つの集団では、Ib 型のグループのみで構成されていた。これらの結果は、先の科研費の研究の結果を支持していた。現生メロンの研究結果を加味すると、日本においてメロン集団を構成する DNA 型が Ia 型と Ib 型の 2 タイプから Ia 型へと遷移しており、研究結果は、日本の在来メロンが成立する過程で幾度かの選抜を受けたことを示唆していた。

**表 2 現生メロンと種子遺存体におけるメロングループの頻度構成**

地域/日本 考古学年代	グループ/ 集団番号	系統数/ 粒数	グループ		
			Ia	Ib	不明 <sup>1</sup>
欧米	ネットメロン	27	-	27	-
	ハネデュー	17	-	17	-
南アジア	在来メロン	77	56	21	-
東南アジア	在来メロン	22	19	3	-
東アジア	在来メロン	33	32	1	-
小計		176	107	69	-
弥生時代中期後半		20	2	6	12
古墳時代初頭		20	4	2	14
11世紀前		20	1	4	15
11世紀中		20	4	9	7
江戸時代	32	20	3	13	4
	34	20	5	8	7
	35	20	5	10	5
	36	20	1	16	3
	41	20	-	8	12
	42	20	-	8	12
	44	20	-	5	15
	48	20	-	8	12
小計		240	25	97	118

<sup>1</sup>PCR増幅で特異的領域が増幅しなかった個体。

## <結 論>

本研究により葉緑体ゲノムと核ゲノムにおいて、計 102 箇所の塩基配列多型を検出できた。

系統解析によって、南・東アジアの現生メロンを分類する、28 箇所の配列変異を種子遺存体用 DNA マーカーとして開発した。

メロン種子遺存体の解析によって、多様なメロンの利用、導入、選抜が示唆され、開発した DNA マーカーは日本における作物の多様性を時系列で評価できることがわかった。今後、作物への嗜好と選抜との対応、これに関わる社会や政治的背景を研究するため、これら DNA マーカーを利用する。

## 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 1 件)

Tanaka, K., Akashi, Y., Fukunaga K., Yamamoto, T., Aierken, Y., Nishida H., Long, C.L, Yoshino, H., Sato, Y.I., Kato, K. Diversification and genetic differentiation of cultivated melon inferred from sequence polymorphism in the chloroplast genome, *Breeding Science*, 査読有、63 巻、2013、183-196

[学会発表](計 2 件)

Tanaka, K., Yamamoto, E., Kato, K., Selection of crop cultivar in Japan – the analysis of melon seed remains from Shikata area in Okayama Prefecture. 16th Conference of the International Workgroup for Palaeoethnobotany, Aristotle University of Thessaloniki, Greece, 2013 年 6 月 17 日 ~ 22 日、発表要旨集、85

田中克典・杉山充啓・斎藤新・Vilayheuang Koukham・Chanthanom Deuanhaksa・松永啓・齊藤猛雄・坂田好輝・加藤鎌司、ラオス在来 *Cucumis* 属遺伝資源の形態および遺伝的特性、日本育種学会第 126 回講演会、南九州大学、2014 年 9 月 27 日、育種学研究、16 巻、別冊 2 号、69

[図書](計 1 件)

田中克典・大庭重信、高志出版、ウリ、大坂豊臣と徳川の時代、近世都市の考古学、大阪歴史博物館/大阪文化財研究所(編)、2015、149-150

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 克典 (TANAKA, Katsunori)

弘前大学・人文学部・特任助教

研究者番号：00450213