

インダス文明期のヒト及び家畜生物種の古代 DNA

齋藤 成也

国立遺伝学研究所集団遺伝研究部門

神澤 秀明

総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻

1 はじめに

古代 DNA を対象とした研究は近年非常に活発に行われ、徐々に情報が蓄積されてきている。これらの研究により古代人類集団や、植物・動物種の家畜化の理解・解明に、遺伝学的側面からアプローチすることが可能となった。しかしながら、南アジアは人類集団の歴史を解明する上で重要であるにも関わらず、古代 DNA を対象とした研究成果が非常に少なく、その重要性に対して情報量が極めて少ない。

そこで遺伝班では、インダス文明期のヒトおよび家畜生物種に焦点を絞り、その古代骨を用いて遺伝的背景を明らかにする。遺伝的背景を明らかにすることによって、インダス文明期以降のインド亜大陸の人類集団、家畜生物種の変遷が明らかになると考えられる。本報告では、研究に必要な実験環境の確立と、古代骨数点に関する結果を報告する。

2 実験方法の確立

実験方法の調査

古代 DNA に関する研究は、1980 年代から研究が行われており、最近では非常に盛んに研究が行われている。これらの研究の中で用いられている手法は多岐に渡っており、まずはその手法に関する情報収集を行った。

古代 DNA の抽出法は、大きく分けて2つの方法に分けることができる。一つは「Silica 法」、もう一つは「フェノール・クロロホルム抽出法」である。それぞれの方法はさらに細かく分類され、最近では DNA 精製用のキットも各メーカーから発売されている (表 1)。

抽出法の検討

表 1 に挙げたように、古代 DNA の抽出法に関しては多くの方法が知られており、サンプルによって各抽出法の適不適があることも知られている。そこで、研究室内での抽出法の確立に際し、① phenol-chloroform DNA-extraction、② QIAquick purification, 1998, Dongyay Yang *et al*、③ Silica method, 2007a, Nadin Rohland and Michael Hofreiter の以上の3点を検討することにした。なお、これらの3点に焦点を当てた理由として、方法として多く用いられていること (①、③) と、

表 1 古代 DNA の抽出法

これまで多くの手法で抽出が行われており、表の方法はそれらの内の代表的なものである。

フェノール・クロロホルム抽出法	phenol:chloroform DNA-extraction	Sato et al, 2007 他
Silica 法	Glassmilk	Hummel <i>et al.</i> 2002 他
	Silica method	Hoss and Paabo 1993 他
	QIAquick purification	Yang <i>et al.</i> 1998
	QIAamp 1 DNA Stool Mini Kit	Shinoda <i>et al.</i> 2006 他
	GeneClean Kit	Igawa <i>et al.</i> 2009, Shinoda <i>et al.</i> 2006
	Fast ID DNA extraction Kit	Adachi <i>et al.</i> 2009
	silica-filter columns	Keyser-Tracqui and Ludes 2003
フェノクロ法 + Silica 法	phenol-chloroform-isoamyl alcohol + Silica extraction	Kemp <i>et al.</i> 2007 他

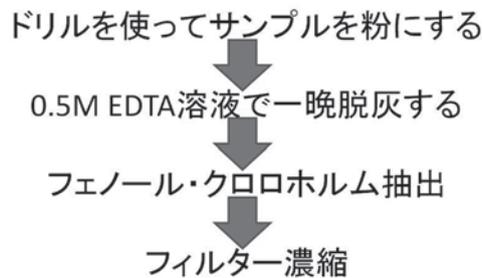


図 1

作業が簡便である (②) ということが挙げられる。なお、キットは作業としては簡便であるが、サンプルごとに保存状態が異なった場合の抽出条件の変更・応用に不向きであることから今回は検討に用いなかった。

まず phenol:chloroform DNA-extraction を、インダス文明期の家畜ウシサンプルを用いて検討した。手順は Sato *et al.*, 2007 の論文を参考にした (図 1)。粉にしたサンプルを脱灰することで、骨に含まれる余分なカルシウムを取り除くことができる。脱灰作業後に遠心して得られる沈殿を用いて今後の実験を行う。しかしながら、今回用いている家畜ウシのサンプルは脱灰作業の結果、ほとんどが溶液中に溶けてしまい、フェノール・クロロホルム抽出に用いる粉末量が非常に少なくなることが分かった (図 2)。このことから、今回用いているインダス文明期の古代骨サンプルの場合は、含まれている DNA が脱灰により溶液中に多く溶出している可能性が考えられ、本研究で適切な方法であるとは言いがたい。

次に QIAquick purification を検討した。この方法は非常に簡便であり作業ステップも少ないことから、外部からの現代 DNA の混入を防ぐ意味では非常に有用である。手順は Yang *et al.*, 1998 を参考にした。作業によって抽出液が得られたが、抽出液が着色し、骨の不純物を取り除けていないことは明らかであったことから、簡便ではあるものの本研究で適してはいないと判断した。

最後に Silica method を検討した。手順は Nadin Rohland and Michael Hofreiter, 2007a を参考にした。作業過程に問題点は無く、抽出液を正確に得ることができた。一般に、Silica method では、フェ

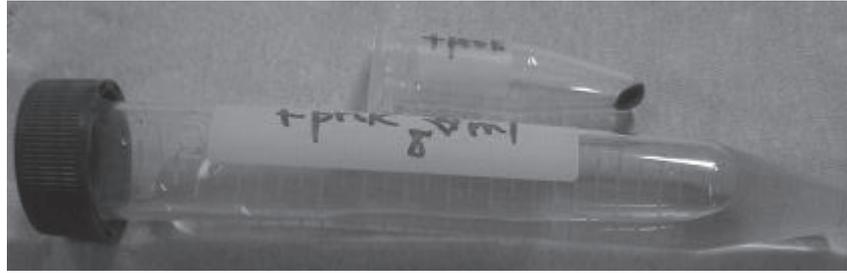


図 2

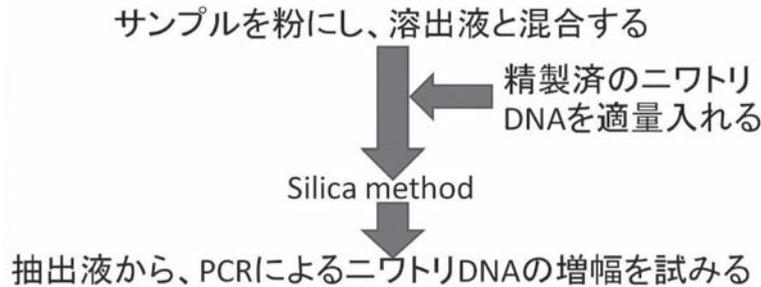


図 3

ノール・クロロホルム抽出法に比べて DNA の回収率が悪いとされているが、Nadin Rohland and Michael Hofreiter, 2007b の論文では、Silica method が最も骨からの不純物の混入を最小限に抑え、その後の過程への影響が少ないことが示されていることから、今回の古代 DNA の抽出に際して最も適切な方法の候補として挙げられる。

抽出法の決定

続いて、Silica method によって骨に残される DNA がきちんと回収されているかを検討することにした。抽出液から、ウシ特異的な primer (AN2F:16022-16041, 5'-GCCCCAT GCATATA-AGCAAG-3', AN1R:16178-16159, 5'-CACGCGGCATGGTAATTAAG-3'), S. Troy *et al*, 2001 を用いて PCR による増幅を試みたが、目的の長さの配列を得ることはできなかった。

そこで手法を変えて、インダス文明期のウシ骨サンプルの粉を含む溶液に、精製済のニワトリ DNA を混入させ、先ほどと同様の手順で抽出液を得た。抽出液から、ニワトリ特異的な primer (5'-ATTTATTGATCGTCCACCTC-3', 5'-CATCTTGGCATCTTCAGTGCC-3'), Komiyama T *et al*, 2004 を用いて PCR を行い、増幅が行われるかを確認した (図 3)。この過程は、以下の二つの点で意味を持つ。まず一つは、Silica method によって正確に DNA が回収されているかを確認するためである。もう一つは、古代骨に含まれている PCR 阻害物質がこの方法で取り除かれているかどうかを確認するためである。これらの実験の結果、抽出液からニワトリ DNA の増幅を行うことができた (図 4)。このことから、インダス文明期の古代骨サンプルを用いるときは、Silica method が最も適していると考えられる。

3 実験環境の整備

古代骨を用いた遺伝学的研究を行う際の最大の注意点は、外部からの DNA の混入である。

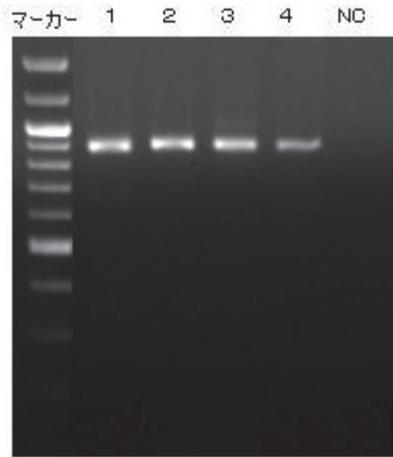


図 4

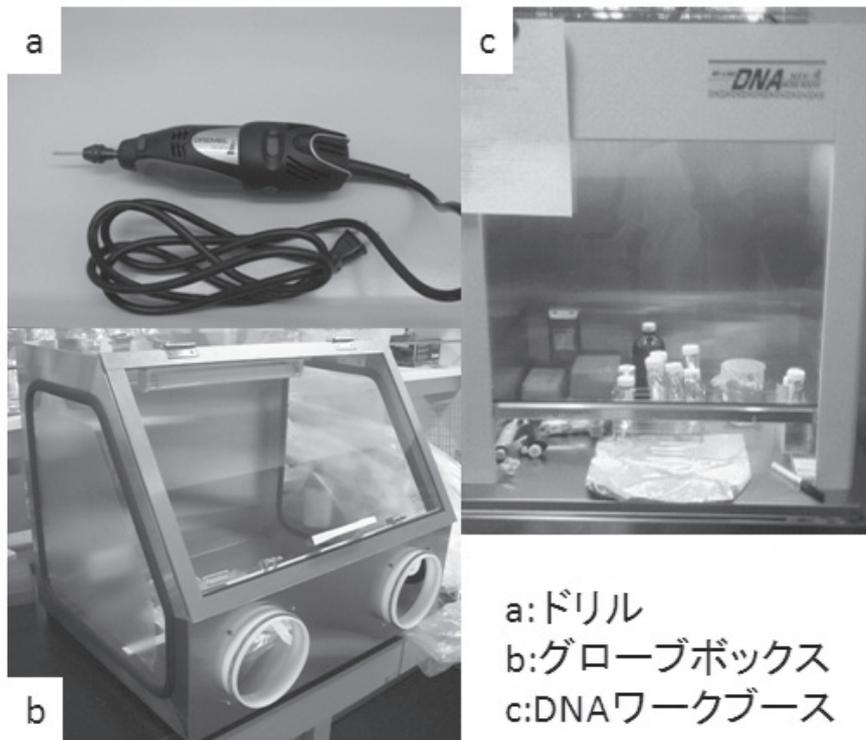


図 5

これには二つの場合が考えられ、一つは現在の生物の DNA が混入する場合で、もう一つは既に PCR によって増幅した別の古代骨サンプルの DNA が混入する場合である。

以上の問題を解決するために、古代骨実験専用の実験器具が必要とされた。2009 年度は、実験手法の確立と実験環境の整備に重点を置いていたことから、外部からの DNA 混入に大きな影響を受けないウシ骨サンプルを中心に用いた。予定としては、2010 年度にヒトのサンプルを用いることが可能な実験環境を整備する計画である。新たに用意した実験器具としては主に、ドリル、グローブボックス、DNA ワークブースである (図 5)。

その他実験で使用する器具・試薬については、以下に記すように、通常の実験よりも厳重に取り扱うことを徹底した。器具については、乾熱滅菌できるものは 200°C、12 時間で混入している DNA を完全に破壊した。乾熱滅菌できないものは、器具をあまり外部と接触が無いよう

に保存し、使用する際には 254nm 波長の紫外線で最低 15 分照射することで DNA を脱プリンし、PCR による増幅反応に影響が無いようにした。試薬については、他の研究者と共有せず、専用の試薬とし、試薬から溶液を調製するときには、クリーンベンチ内の綺麗な環境で作業を行った。

4 実験結果

実験サンプル

外部からの DNA の混入の影響が少ない、インダス文明期の家畜ウシの骨を用いて実験を行った。骨のサンプルは、ファルマーナー遺跡で得られたものを用いた。サンプルの状態は、歯のサンプルは亀裂の入っているサンプルがほとんどで、粉砕しているものも多くあった。歯髓内部に土が侵入しており、DNA の抽出は困難であるように思われた。骨のサンプルは計 3 点あり、部分的に割れていたことから、骨内部への土の侵入が見られた。

実験方法

サンプルをグローブボックス内に持ち込み、用意したサンプルの表面の土を、紫外線滅菌したプラスチックのブラシで落とす。次に、表面をダイヤモンドドリルで 1 mm 削る。内部の骨をダイヤモンドドリルで削って粉にし、回収する。

回収した粉を用いて、Nadin Rohland and Michael Hofreiter, 2007a の論文を参考にし、抽出液を得た。簡潔に述べると、まず、100mg ~ 500mg までの粉を、proteinaseK を含む 0.5M EDTA 溶液 2~10ml に入れ、一晚室温でゆっくり攪拌する。溶液を遠心して上清を回収し、4 倍量の Binding buffer と 100 μ l の Silica pellet を入れ、pH 4.0 で 3 時間ゆっくり攪拌する。遠心して Silica pellet を Washing buffer で二度洗浄し、15 分乾燥させる。最後に Tris-EDTA 溶液 50 μ l を混ぜて DNA を溶出し、DNA を含む抽出液を得た。

抽出した溶液を用いて、PCR を試みた。PCR の条件は、最終量を 20 μ l とし、HotStart ExTaq kit を用いた。buffer 2 μ l、dNTP 0.8 μ l、primer 各 0.25 μ M、HotStart ExTaq polymerase を 0.1 μ l、抽出液を 2 μ l 用いた。PCR のサイクルは、94°C 5 分のプレヒートをし、その後 94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒を 30 サイクル行い、最後に 72°C 5 分、4°C の手順で行った。PCR 後溶液を用い、2nd PCR を行った。buffer 2 μ l、dNTP 0.8 μ l、primer 各 0.5 μ M、HotStart ExTaq polymerase を 0.1 μ l、1st PCR 溶液を 2 μ l 用いた。PCR のサイクルは、94°C 5 分のプレヒートをし、その後 94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒を 30 サイクル行い、最後に 72°C 5 分、4°C の手順で行った。

PCR 反応後の溶液を、2.0% アガロースゲル電気泳動を行い、目的の配列があるかを確認した。目的の配列と思われるバンドが見られる場合には、その後の配列決定まで行った。配列決定には ABI の 3130xl を用い、メーカー推奨のプロトコルに従った。

結果

歯のサンプル 4 点、骨のサンプル 3 点を実験に用い、複数回の抽出と PCR による増幅を試みたが、目的の配列を得ることはできなかった。

今後の展望

今回用いた家畜ウシの古代骨サンプルからは、目的の DNA を得ることはできなかった。このことから、この遺跡から得られたサンプルから DNA を得ることは難しいことが示唆された。この遺跡の古代骨サンプルからの DNA 抽出を目標とするならば、より状態の良いサンプルを用いる必要がある。また、インドという気候上、DNA の保存には厳しい条件であることから、確実に古代骨から DNA を得るためには、先に述べた条件のほかに、より新しい時代のものやより寒冷な地域のサンプルを使用することが望ましい。また、外部と閉鎖された構造の歯や、大腿骨などの大きなサンプルはよく DNA が保存されていることが一般に言われていることから、それらのサンプルを使うことも今後検討していかなければならない。

【引用・参考文献】

- Takehiro Sato *et al.* (2007) Origins and genetic features of the Okhotsk people, revealed by ancient mitochondrial DNA analysis. *Journal of Human Genetics* 52: 618–627.
- Susanne Hummel *et al.* (2002) ABO blood group genotyping of ancient DNA by PCR-RFLP. *International Journal of Legal Medicine* 116: 327–333.
- Matthias Hoss and Svante Paabo (1993) DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research* Vol. 21, No. 16: 3913–3914.
- Dongyay Yang *et al.* (1998) Technical Note: Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns. *American Journal of Physical Anthropology* 105: 539–543.
- Ken-ichi Shinoda *et al.* (2006) Mitochondrial DNA analysis of ancient Peruvian highlanders. *American Journal of Physical Anthropology* 131: 98–107.
- Kazunari Igawa *et al.* (2009) Mitochondrial DNA analysis of Yayoi period human skeletal remains from the Doigahama site. *Journal of Human Genetics* 54: 581–588.
- Noboru Adachi *et al.* (2009) Mitochondrial DNA analysis of Jomon skeletons from the Funadomari site, Hokkaido, and its implication for the origins of Native American. *American Journal of Physical Anthropology* 138: 255–265.
- Keyser-Tracqui, C., Crubezy, E. and Ludes, B. (2003) Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *American Journal of Physical Anthropology* 73(2): 247–260.
- Brian M. Kemp *et al.* (2007) Genetic analysis of early holocene skeletal remains from Alaska and its implications for the settlement of the Americas. *American Journal of Physical Anthropology* 132: 605–621.
- Nadin Rohland and Michael Hofreiter (2007a) Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature protocols* Vol.2 No.7: 1756–1762.
- Nadin Rohland and Michael Hofreiter (2007b) Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques* 42: 343–352.
- Christopher S. Troy *et al.* (2001) Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* 410: 1088–1091.
- Tomoyoshi Komiyama *et al.* (2004) Japanese domesticated chickens have been derived from Shamo traditional fighting cocks. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 16–21.