

考古資料に対するDNAバーコーディングの可能性

広島大学大学院理学研究科附属宮島自然植物実験所 坪田 博 美
広島大学大学院理学研究科生物科学専攻 井 上 侑 哉
千葉県立中央博物館共同研究員 中原-坪田美保

キーワード：DNA、生物遺骸、PCR、分子生物学、配列情報

はじめに

建築材や木造品の年輪や、土中に埋蔵された木材、湿地や湖底などから得られる花粉などの生物遺骸は考古資料として利用される。これらの生物遺骸は、その来歴に関する情報を取り出すことで、はじめて考古資料として活用できる。その情報を得るための方法の一つとして理化学的な分析がある。理化学的な分析にこれまで利用されてきたものとして、花粉分析や植物珪酸体（プラントオパール）、同位体などを用いた手法がある。これらの分析手法により、過去の植生や気候が推定されたり、水田遺構や土器胎土の調査から過去の農耕に関する情報が得られたりしている。これら以外にも理化学的な分析手法としてさまざまなものがあるが、その中で今後利用の機会が増すと考えられる手法としてデオキシリボ核酸（DNA）を対象とした分析手法がある。本稿では考古資料に対するDNAを用いた分析、とくにDNAバーコーディングについて、その基礎と利用の可能性、利用の際の現時点での限界、注意点など述べたい。

1. DNAについて

DNAという用語は、「我社のDNA」や「DNA革命」などと別の意味で使われることが最近多いが、本来はデオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid、以下DNAと表記）という物質の名称である。DNAは核酸の一種で、鎖状の分子構造をもった生体高分子であり、細胞の中に収められている。地球上に現存する大多数の生物はDNAの形で遺伝情報を保持し、子孫に伝える。また、DNA自体も遺伝情報の発現調整に関わっている。DNAが遺伝情報を担っていることが明らかになったのは、科学史的には比較的最近である。1940年代から50年代に遺伝情報の本体がDNAであることが複数の実験で明らかになった（Avery et al. 1944、Hershey & Chase 1952。中内 1997も参照）。そして、1953年にワトソンとクリックはDNAの二重らせんモデルを提唱し、遺伝情報の本体がDNAであることが決定的となった（Watson & Crick 1953）。現在、DNAから得られるさまざまな情報が生物学的な研究を進める上で必須になっている。これは、多くの生物が遺伝情報の保持にDNAを利用していることや、以前よりもDNAを使った実験手法が発達したこと、情報処理に必須の計算機やデータベースが充実したことなどが背景にある。もちろん、DNAだけですべてが明らかになったり、理解できるようになったりした訳ではない。しかしながら、DNAのもつ情報を読み解くことで、20世紀後半から21世紀にかけて生物学は大きく発展し、生物学的な現象の理解が深まったことは事実である。

DNAの基本単位はリン酸と糖（五炭糖のデオキシリボース）、塩基から構成されるヌクレオチドである。DNAはこのヌクレオチドが鎖状につながったポリヌクレオチド鎖が2本より合わさった二重らせん構造を成す。ヌクレオチドを構成する塩基にはアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）の4種類がある。これらの塩基は二重らせんの内側に配しており、水素結合によりAはTと、GはCと相補的に結びついている。したがって二重らせんを構成する2本のポリヌクレオチド鎖の向きは互いに逆である。この二重らせん構造のためDNAは常温では比較的安定した物質である。一方で、DNAは細胞分裂の際に複製される。このときDNAの二重らせんは一旦ほどかれ、2本のポリヌクレオチド鎖をそれぞれ鋳型として相補的に新しいDNAが合成される。したがって新しく合成されたDNAは鋳型となった古いポリヌクレ

オチド鎖と新たに合成されたポリヌクレオチド鎖を半分ずつ持つことになる（半保存的複製）。このようにしてDNAのもつ遺伝情報は正確に保持される。しかし、正確に複製されるDNAであっても、非常にまれではあるが長い時間の間にエラーが生じることがある。この現象を塩基置換とよび、遺伝病などの原因になる一方、生物進化の原動力ともなる。とくに進化的に中立な箇所ほど時間に比例して塩基置換が蓄積しやすいことが知られている（Kimura 1968。太田 2009、更科 2012も参照）。したがって共通祖先から分かれた後、経過した時間が長いほど置換された塩基が多くなる。この情報を統計学的に処理することで、生物進化の歴史を数学的な根拠をもって復元することができる。

生物学の中でも分類学や生態学などのフィールドサイエンス分野では、基礎的な研究資料の一つに標本を利用する。DNAは比較的安定した物質であるため、条件さえ整えば長期に渡って存在する。近年、技術の発達に伴い、これまでは研究対象とされてこなかった古い資料からDNAの情報が得られるようになってきている。考古資料について考えた場合、生物とくに植物に由来するものが少なくない。このような資料がDNAの分解が進むような処理や埋蔵状態におかれなければ、現在の生物学で使われている手法を適用することで、DNAの配列情報が得られる可能性が高い。標本にもとづいた研究手法は、方法論から考えても生物学のフィールドサイエンス分野は考古学や歴史学に近く、DNAの配列情報もそのような資料から得られる情報の一つととらえれば十分活用の余地があると考えられる。

2. DNAを利用した種や個体の区別

生物個体は細胞でできている。細胞の中にはさまざまな細胞小器官が存在し、核とミトコンドリア、植物の場合には葉緑体などが存在する。とくにミトコンドリアや葉緑体は核とは別に独自のゲノムを有している。ゲノムとは、その生物がもつ全遺伝情報の全体を含むDNAを意味する。一般的な生物の体細胞では、父方および母方それぞれから来たゲノムをもつため、全体で2組のゲノムをもつことになる。DNAはその生物が生存している限り原則として変化しない。ヒトも1個の受精卵から最終的に約60兆個の細胞からなる成体になるが、一部の特殊な細胞を除いて、同じ遺伝情報を共有している。細胞1個に含まれるDNAは、一般的に数億-60億塩基対程度である。また、細胞小器官のミトコンドリアや葉緑体のゲノムでは数万から数十万塩基対である。現在、一般的に用いられる方法ではゲノムのすべての塩基配列を調べるわけではなく、一部の塩基配列を用いて区別する（DNA型鑑定）。このため、確率的には非常に小さいが、一部の塩基配列の比較だけでは区別できない場合があることも認識しておく必要がある。

DNA型鑑定は、ゲノム中に存在する配列の多型を検出するいくつかの方法を含む。1985年、ジェフェリーズがこの点に着目して、個体や個人の特定に用いることができると発表した（Jeffreys et al. 1985a, b）。現在では反復配列を検出するマイクロサテライト[microsatellite。単純反復配列simple sequence repeat (SSR)あるいは縦列型反復配列short tandem repeat (STR)ともよばれる]や、ミトコンドリアや葉緑体の特定部位の塩基配列の比較（ハプロタイプの比較）など、多くの方法が開発されている。ちなみにDNA型鑑定という言葉は基礎生物学分野ではあまり用いられない用語であり、おもに犯罪捜査や血縁調査のような個体判定、作物や家畜の品種判定など応用的な分野でよく用いられる。これらの方法は次に述べるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）とよばれるDNAの増幅方法の開発により可能になったものが多い。

3. PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）について

DNAバーコーディングを行う際に必須の基礎技術としてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）があげられる。PCRとは英語polymerase chain reactionの略語で、生物学全般で現在必要不可欠な手法である。PCRは容器内でDNAを人工的に合成する反応で、1983年にキャリー・マリスにより原理が考えられた。PCRの方法自体はMullis & Faloona（1987）で発表されているが、その方法はSaiki et al.（1985）で利用され、オリジナルの論文よりも先に知られることとなった。手法をさす場合はPCR法と呼ばれることもある。ある程度の長さまでの制限はあるが、遺伝子組み換えの手法を用いることなく微量なDNAをもとに目的とするDNA

断片を選択的にPCRにより増幅させることができる。また、必要とするDNAがごく僅かで済むため、基礎生物学での利用以外にも、DNA型鑑定や医療での診断などにも使われる。

PCRの反応では、鋳型となるDNA（増幅対象、テンプレート）と、DNA合成酵素、DNAの素材となるデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）、合成の足がかりとなるプライマーと呼ばれる短いDNA断片（オリゴヌクレオチド）を2種類加えた緩衝液（バッファー）内で行う。プライマーは、増幅したい領域の両端の塩基配列に対応する相補配列をもつDNAを人工的に合成したもので、通常15-30塩基程度の長さで設計する。PCR反応は、変性（denaturation）・アニーリング（annealing）・伸長（extension/elongation、合成）の3つの過程を繰り返すことで行われる。変性・アニーリング・伸長の1回の繰り返しが1サイクルと呼ぶ。実際の反応では、上記の溶液を混合し、PCR装置に入れ、あらかじめ設定したプログラムに従って温度の上下を繰り返すだけでDNA合成が進む。変性は、94-98℃に加熱することで水素結合を外して鋳型となるDNAを変性（2本鎖のDNAを1本鎖にする）させる過程である。アニーリングは、一般的に50-65℃程度まで温度を下げて急速冷却することで、1本鎖になったDNAに対して、相補的な配列をもつプライマーを水素結合させて、2本鎖にする過程である。その結果、鋳型DNAの一部にプライマーが結合したものができる。長いDNA同士よりも短いDNAの方が結合しやすく、またプライマーの濃度は高いため、結果的にプライマーが優先的に結合する。下げる温度はプライマーのT_m値（2本鎖の状態のDNAの50%が変性して1本鎖の状態になる温度）よりも3-5℃程度低い値にするのが一般的である。変性が起こる温度はDNAの塩基組成や塩基数に依存し、塩基のGとCの含量が高く、また塩基数が多いDNAほど高くなるため、実際には実験目的に応じて変更する。伸長は、60-72℃の温度でDNA合成酵素に活性をもたせ、プライマーを起点としてDNAを合成する過程である。アニーリングにより鋳型DNAにプライマーが結合した状態になる。プライマーを起点として1本鎖になった鋳型DNAの相補鎖が合成される。実際の反応ではサイクルの前後に、初期化（initialization）として94-96℃程度で数分間加熱してDNAを完全に1本鎖化させたり、反応後に最終伸長（final elongation）として70-74℃で数分間反応させて伸長反応の完全性をたかめたり、反応を停止させるため冷却（final hold）として4-20℃に温度設定するのが一般的である。

PCRでは、理論的には鋳型になるDNAが1分子でもあれば、反応が行われる。1回のサイクルを行うと1分子の鋳型DNAの目的領域が2分子になるので、理論上は反応をn回のサイクルで行うと2ⁿ倍に増幅する。実際には、鋳型DNAやプライマーの塩基配列との相性、サイクル中の設定温度や時間、装置の特性などに依存する。これらの条件のひとつでも不適切であれば、増幅が見られなかったり、非特異的な領域が増幅されたり、エラー率が増加する。

DNA合成酵素はタンパク質の一種である。一般にタンパク質は熱に弱く、高温になると変性が起こり、活性を失ってしてしまう（失活）。一般的な生物がもつDNA合成酵素では、変性の温度になると失活して酵素活性が失われてしまう。このため、開発当初は1サイクル毎に酵素を補充する必要があった。その後、高温条件下で活性をもつ耐熱性のDNA合成酵素（DNAポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ）が海底火山にすむ高熱細菌*Thermus aquaticus*から発見され、DNA合成酵素をはじめに1回だけ入れるだけで連続して反応を行うことができるようになった。この結果、卓上型のPCR装置をつかった反応の自動化が進み、数時間以内で反応を終えることができるようになり、PCRは非常に簡単に行える手法になった。さらに現在では、PCRが普及し始めた頃と比べると、酵素の改良などにより増幅効率が良くなり、必要な経費が低減するなど非常に利用が容易になっている。また、PCRは生物教育の分野でも分子情報の利用が必須かつ一般的になっており、現在ではSSH（スーパーサイエンスハイスクール）のような高等学校レベルの実習でも利用されるほど一般的な技術になっている。

4. DNAバーコーディングについて

遺伝的に分化した生物種や個体群間で比較した場合に見られるDNAの塩基配列の違いは、生物の同定に利用することもできる。これをDNAバーコーディング（DNA barcoding）とよぶ。DNAバーコーディン

グは、2003年にポール・エベールらによって提唱された手法で、DNAの塩基配列情報を使って生物を同定するものである (Hebert et al. 2003)。近年、PCRが普及すると同時に、DNAの塩基配列の決定（シーケンス）が容易になり、様々な分野で広く行われるようになってきている (Meier 2008、星野ほか 2011、菅原 2011。坪田ほか 2014a, cにも解説あり)。

狭義のDNAバーコーディングは、生物多様性の保全と活用のため、種多様性に関する知識のライブラリ構築とその共有を目的としている。専門家の同定した証拠標本から得られたDNAの配列情報のデータベース (DNAバーコードライブラリ) を構築し、そのデータベース上でもっとも類似する配列情報を同定結果とする (Hebert et al. 2003、神保ほか 2008、Krishnamurthy & Francis 2012)。この手法を用いるためには、網羅的な配列情報のデータベースの構築やオンライン検索システムなどの生物種同定支援システムの構築が必須である。現在、GBIFなどが中心になって世界的なレベルで標本や文献も含んだデータベースが構築されつつある (Speers & Edwards 2008。GBIFの詳細については菅原 2011)。日本国内ではJBIF (Japan Node of Global Biodiversity Information Facility、地球規模生物多様性情報機構日本ノード) やJBOLI (Japanese Barcode of Life Initiative、日本バーコードオブライフ・イニシアチブ) を中心にDNAバーコーディングに関するプロジェクトが進行している [神保ほか 2008、星野ほか 2011。DNAバーコードデータベース (JBOL-DB) のサイトも参照]。DNAバーコーディングによる同定支援システムが利用できる生物種はまだ限られているものの、同定支援システムの整備が世界中で進んでいる (Hebert et al. 2004、Ward et al. 2009、Jinbo et al. 2011、Schoch et al. 2012、Saitoh et al. 2015など)。しかしながら、DNAバーコーディングによる同定支援システムが利用できる生物はまだ限られているのが現状である。植物では樹木やシダ植物でDNAバーコードライブラリの構築が先行している。

一方で、DNAバーコーディングの手法が用いられる以前から、国際塩基配列データベース [DDBJ/EMBL/GenBank International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC)] を代表とするDNAデータベースに大量の塩基配列情報が蓄積されている。例えば魚類ではミトコンドリアゲノムのデータが充実している (Inoue et al. 2003、Ishiguro et al. 2003、Miya et al. 2003、Saitoh et al. 2003。佐藤・西田 2009も参照)。このような形で蓄積された配列情報には、証拠標本のデータも登録されているものが含まれる。とくに、専門家が研究に用いたものやモノグラフなどで使われている証拠標本のように、網羅的で同定の信頼性が高いものも少なくない。一方、このようなデータベースには精度や正確性に問題がある配列も含まれている。また、配列長に違いがあるのが一般的である。これらの点に注意すれば、DNAバーコーディングの際に利用可能である。

5. DNAバーコーディングに用いられる領域と同定の精度

DNAバーコーディングでは、標準化された領域のDNAの塩基配列 (マーカー) を用いて生物種を特定する。マーカーとして利用される領域は、種内の変異が小さくかつ種間の差が大きく、比較的短い領域が理想的である。そのような性質をもつ領域がDNAバーコーディングのマーカーとしていくつか提案されている。またマーカーは、PCRを使った増幅の際に、多くの分類群で利用できる共通性の高いプライマー (ユニバーサルプライマー) であることが望ましい。このような性質をもった標準マーカーとして、維管束植物では葉緑体の*rbcl*や*matK*遺伝子が利用されることが多く、標準的バーコード領域として提唱されている (CBOL Plant Working Group 2009)。ただし、*rbcl*遺伝子は他の領域にくらべると進化速度が遅いため、進化速度が速い葉緑体*trnH-psbA*遺伝子間領域や核ITS領域などが利用される場合もある (Hollingsworth et al. 2011)。

日本産樹木についてはDNAバーコーディングにより約75%の樹種の同定が可能になっている (吉村ほか 2011、吉丸ほか 2012)。さらに、分子系統解析を組み合わせることで、既存のDNAデータベースのデータを使ったDNAバーコーディングであっても、ある程度精度の高い同定が可能であることも示されている (坪田ほか 2013、2014a, b, c)。

6. 考古資料に対するDNAバーコーディングの利用

花粉や植物珪酸体などの生物遺骸を用いた分析には、その形態が重要な情報源となる。一方で、分子生物学的な手法ではDNAの塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列といった分子のもつ配列情報を利用する。DNAから得られる配列情報は、基本的には誰が実験を行っても同じ情報が得られる。また、配列情報は容易に蓄積が可能であると同時に、情報の再利用が容易である。

分子生物学的な手法は20世紀の後半以降急速に発達し、現代の生物学では広く利用されている。近年、生物学とりわけ分類学や生態学などのフィールドサイエンス分野でもDNAから得られる情報は研究を進める上で必須になっている。分類学は数十年前までは枯れた学問と見なされることがあったが、分子系統解析やDNAバーコーディングといった新しい方法が使われるようになってきている。例えば、分子系統解析により新しい科が提案されたり、逆に分類群の独立性が再考されたりなど大きな変化が起きている(Masuzaki et al. 2010、Inoue & Tsubota 2014など。坪田 2012、坪田ほか 2014a, cも参照)。若い世代を中心に会員が増加している学会が現在あるように、DNAを基礎とする新しい方法論が学問への刺激となつて、フィールドサイエンス分野は勢いがある学問分野のひとつになっている。これは、生物多様性が重要とされる時代背景もあるが、DNAから得られる配列情報の影響も大きい。また、海底資源の調査に関わる地学分野でも生物由来の物質の研究にDNAを使ったアプローチがなされている。考古学でもDNA考古学という新しい分野が起これ、農作物として栽培されるイネやムギなどの植物遺骸から新たな知見が得られている(佐藤 1996、1999、2000、2002など)。

DNAバーコーディングが利用され貢献できるものとして、環境や天然資源の維持、絶滅危惧種の保護、移入生物のような国境を超えた種の移動の管理とくに農業害虫の管理や病原体媒介生物の同定、農業利用、食品の安全性や水質のモニタリングなど、より広い分野で利用されることが想定されている(Hajibabaei et al. 2007、Frézal & Leblois 2008、Wong & Hanner 2008、Valentini et al. 2010、Jinbo et al. 2011、Krishnamurthy & Francis 2012、Galimberti et al. 2013。JBLIのパンフレットも参照)。生物遺骸を資料とする研究分野にもDNAバーコーディングの手法は適応できるものであり、考古資料も例外ではない。

7. 広島県内で出土した木材の例

厳島研究に対する最新の自然科学的アプローチ、とくに本稿で紹介する考古資料に対するDNAを用いた分析が厳島神社をはじめとする宮島全体の研究にとって秘める可能性について述べたい。DNAバーコーディングのようなDNAを用いた分析を行うことで、文書や考古資料だけでは分からなかったことが明らかになり、従来の情報自体もより深く理解できることが期待できる。例えば、建築物や像などの素材となっている木材が、広島近辺に由来するものなのか、逆に遠方に由来するものであるかなど産地に関する情報が得られる可能性がある。あるいは、とある場所で来歴の明らかになっている木材と同じものあるいは同じ産地のものが使われていることが明らかになれば、宮島のものが現時点では来歴が不明であっても、作成年代やそれに関与した人物などの情報がつながってくる可能性もある。実際に、静岡県長崎遺跡ではDNAを使って材の由来に関して知見が得られ、木材の再利用の可能性が示唆されている(佐藤 1999)。このように、これまでの考古資料から得られる情報を否定するものではなく、それだけでは見えない部分を補うものとしてとらえるべきであろう。厳島神社の社殿の部材を分析対象とすることで、今後その材木がどのあたりから運ばれてきた可能性があるか、つまりは過去にあった交流の可能性が生物学的な知見から裏付けされることが期待できる。

広島県内で出土した木材について、予備的な実験としてはあるが、実際にDNAバーコーディングを試みた結果を例として示したい。この木材については、調査過程にあるため、その詳細については現時点では記すことができない点ご承知おきたい。この木材は、広島県内で海に近い場所で出土したもので、予備的な調査では約1000年前のものとされた。出土の時点で水に漬かった状態であったり、出土後時間が

経過していたためDNAの保存は期待できないものであったが、DNAバーコーディングを使った分析依頼があった。木材から分析資料を採集し、DNAを抽出してPCRを行った。実験は外部からの異物の混入（コンタミネーション）に最大限注意するとともに、複数回独立した実験として行った。PCRにはこれまで植物で増幅の実績があるプライマーを用いた。実際には、約250塩基対（rbcL7とrbcL270Rの組み合わせ）と約600塩基対（HrL1とrbcL600Rの組み合わせ）、約1300塩基対（HrL1とrbcL1301RLの組み合わせ）のプライマーセットを用いた。また、確実に反応が行われたことを確認するためのポジティブコントロールと、コンタミネーションによる増幅ではないことを確認するためのネガティブコントロールの両方の反応も同時に行った。過去のさまざまな文献からは200-300塩基対程度の長さを対象とした場合に良い結果が得られることが期待される。また、経験的には600塩基対程度であっても増幅が見られることがある。一方、1300塩基対の組み合わせについては目的のサンプルに対する増幅は期待できないが、ポジティブコントロールをおもな対象として反応に含めた。PCRの条件や用いたプライマーの詳細や反応条件については、坪田ほか（2013、2014a, b）およびInoue & Tsubota（2014）を参照のこと。また、プライマーの配列については広島大学デジタル自然史博物館のサイトに掲載されている。

反応の結果、目的のサンプルについて、250塩基対の組み合わせについては増幅が確認できなかった。一方、600塩基対の組み合わせについては目的の長さを含む複数のPCR産物がわずかに得られた。目的の長さのPCR産物について塩基配列を決定した。この結果、本来目的としていた植物ではなく、別の草本植物の配列であることが分かった。DNAバーコーディングおよび系統解析の結果、この配列は海岸に生育するあるいはその可能性の高い植物の配列であった。今回、試料の木材の種そのものの特定はできなかったが、実際にその試料に含まれていた生物遺骸に由来する可能性が高い。今後、このサンプルについてはDNA抽出法の改良や、想定される種に対応したプライマーの設計と選定を行うなど、研究を継続する予定である。

8. DNAバーコーディングの実験上の注意点とその可能性

生物遺骸はもともと生きた細胞や細胞由来の物質からできていたものである。細胞中のDNAは細胞が死ぬと同時に分解がはじまり、時間経過とともに断片化（低分子化）が進み、情報が得られにくくなる。また、樹木では分裂しているのは樹皮の直下の形成層だけである。このため木材の場合、辺材の木部柔細胞を除き材の大部分は死細胞となっており、葉や種子よりもDNAの抽出が難しいことが知られている。一部の樹木では、樹脂のようにPCRを阻害する物質も多く含まれる。さらに、DNAそのものは比較的安定した物質であるが、時間経過にともなう物理的・化学的な反応によりDNAが修飾・劣化する（詳細については更科 2012、Willis & McElwain 2014を参照）。よく誤解されているのが水中や湿った土中では木材が分解されないというものである。植物は細胞壁が存在し、とくに木材ではセルロースやヘミセルロース、リグニンなどの物質で成り立っており、水中や湿った土中でも形そのものは残る場合が多いが、長い時間かけてバクテリアにより分解される。ましてやDNAやタンパク質などの生体高分子は分解されているのが普通である。反対に土中であっても、試料が新しかったり、保存状態が良ければPCRは可能であり、DNAバーコーディングにより種名が分からない植物体の一部から同定できるのが普通である（佐藤 1999、山内ほか 2015など）。しかしながら、土中に長い期間とどまっているものや、埋没してから時間が経過したものはその限りではない。酸素が存在することで進む物理化学的な反応は酸素が少ないことで多少抑えられるが、生物がまったく存在しない場所は地球上にほとんど無いため、一部のバクテリアのような嫌気的な環境でも生育できる生物によりDNAの分解が進む。このため海水中や湿った土壌内からの生物遺骸については、検出可能なDNAの存在はあまり期待できない。一方、木像のように、乾燥条件下で保存された木材では生物によるDNAの分解は少ないことが予想され、木材の加工の過程でDNAが変化してしまうような処理がなされていなければDNAの検出が期待できる。ただし、同じ木材であっても、心材（材の中心に近い、色の濃い部分。赤身ともよばれる）と辺材（材の樹皮に近い、色の薄い部分。白太ともよば

れる)でDNAの残存状態が異なることが知られている。例えば、スギやクロマツなどの木材中のDNAの残存状態に関する研究では、木材中にDNAが残存すること、その量は辺材部分で多く心材部分で少ないこと、残存するDNAはほとんどが低分子化していることが確認されている(白石ほか 1993、安部ほか 2009)。これらの研究から示唆されるように、実際の実験では対象とする試料の状態や部位によってDNAの残存状態が大きく結果が異なるため、それぞれについて試行錯誤が必要となる。

PCR可能なDNAが得られない場合はそもそもDNAバーコーディングが利用できないが、それ以外でも利用に問題がある場合が想定される。例えば、データベースに該当するデータが登録されていなかったり、得られた配列では種の同定には解像度が十分でなかったりする場合もある。あるいは、DNAデータベースに登録されている情報が正確でなかったり、不十分である場合も想定される。このようなデータベースに登録された配列情報に含まれるエラーもDNAバーコーディングの際に問題となる(Shen et al. 2013、坪田ほか 2014a, c)。

PCRにより簡単に増幅が可能となり、さらにDNA合成酵素や装置の改良でごく微量のDNAからも情報が得られるようになってきている。逆にこのことは、DNAバーコーディングに限らず微量のDNAを対象としたPCRを行う実験では、以前にも増して実験の工夫により外部からのDNAのコンタミネーションを絶対に避ける必要があることを意味している。例えば、独立して複数回同じ実験を行うことで正確性を確保したり、器具の汚染を未然に防いだりするなどの方策をとる必要がある。また、古い試料や劣化した試料ではDNAの断片化が進むため、情報を多く含みながらも長さの短い領域を使ったマーカーを開発する必要もあろう。さらに、考古学分野で対象となるような木材の樹種についてDNAバーコードライブラリの充実も今後必要である。過去の多くの研究例とその訂正の例は更科(2012)にまとめられているので参照されたい。

本研究で出土した木材は湿った土中から見つかり、今回の手法では配列情報が得られなかった。また、今回行った文献調査では、古い木材に対してDNAを用いた研究例を数例しか確認することができなかった(佐藤 1999)。一方で、イネやムギ、クリなどの植物ではこれまでに数千年前の試料からDNAの配列情報が得られている(佐藤 1996、1999、2000、2002、2003)。とくに、古代米からDNAが得られ情報が得られた例では日本列島の稲作や品種に関する重要な知見が得られている(佐藤 2003、花森ほか 2011)。また、人類化石の例でも、非常に古い時代の骨から得られたDNAを使って多く知見が得られている(尾本 1996、宝来 1997、Noonan et al. 2006、Green et al. 2006、篠田 2007、更科 2012)。今後、DNAを使った手法が考古学全体やその他の分野に普及することで、新しい情報が得られることが期待される。例えば、スギの種内で見られる現在の遺伝的構造が明らかになっている(Tsumura et al. 1996、2007 ; Tsumura & Tomaru 1999 ; Kado et al. 2003)。このような情報にもとづいて、古い木材から得られた情報からその木材産地や性質が以前よりも精度良く推定できる可能性がある。日本と済州島だけに分布するコウヤマキの材が朝鮮半島の王の棺に用いられているような例もあるが、コウヤマキよりも一般的な木材についても産地や来歴に関する情報が得られる可能性がある。例えば、現在は離れた場所にある木像が同じ材から作られたものであることが示され、その来歴が明らかになるかもしれない。その木材が植物体のどこの部位に由来するのも重要な要素であるが、1000年程度の考古資料であっても条件が良ければ、これまで得られなかった情報を得られる可能性が出てくる。

試料の保存についても、できるだけ現状を保ったままで保存する必要がある。しかしながら、生物分野を対象としたDNAバーコーディングでは、証拠標本の重要性が十分に認識されていないという問題点も指摘されている(星野ほか 2011)。これは考古学や歴史学でも同様の状況であろう。フィールドサイエンス分野で利用される標本は研究を行う上でもっとも基礎となるものであり、標本を活用するために標本庫の維持・管理は欠かせない。まったく同じものが存在しないという点で、考古学や歴史学、文学などの資料と似た性格をもつ。条件さえそろえばDNAは長期間残存するため、技術革新により出土した1つの花粉や孢子からもDNAの情報が得られるかもしれない。現在用いられている次世代シーケンサーの原理で

は短い配列を直接読み取るため、物質としてDNAが残っていれば断片化が大きな問題とならず、200-500塩基対程度に断片化していても、データが得られることが想定される。あるいは、配列情報を取り出すことが現在の技術では困難であっても、今後新しい技術によりごく微量のサンプルから配列決定できる時代が来る可能性もある。例えば、DNAが1分子あれば塩基配列が決定できるようなシーケンサーが普及すれば、シーケンスの効率が上がり、より簡単にDNAバーコーディングを行うことが可能になることが期待される。多くの資料が適切に保管されることで、将来の再検証が可能になり、新たな手法の適用や発見につながる。このため、現在ある生物遺骸の考古資料として保存は極めて重要である。

まとめにかえて

人文学分野の研究でも、14世紀に書かれたカンタベリー物語の系譜について生物学で用いられる系統解析の手法を用いた例があり、興味ある知見が得られている (Barbrook et al. 1998)。今後、DNAバーコーディングのような生物学的な手法を用いることで、考古学や歴史学だけでなく人文学全般の研究のさらなる発展が期待できる。また、DNAを直接用いた手法が適用しにくい石の文化に対して、日本の文化は木の文化であるため、DNA利用の観点からは木が素材であることが研究上の利点になる可能性も秘めている。新知見を得るという目的だけでなく、既存の方法で得られている結論の再検証にも利用できる。DNAから得られる塩基配列はデータとしての汎用性が高く、情報の劣化がなく、再利用が容易であるという特徴をもっているため、生物学におけるDNAバーコーディングのようにデータを利用する仕組みが世界レベルで整ってくれば、世界的なレベルでの研究の発展も期待できる。今回紹介したように、生物遺骸から得られるDNAの情報は将来重要なものとなる。その重要性を鑑み、この分野の研究基盤の確立と利用促進のため、カナダのように国家予算を使ってDNAバーコーディングに関する研究を推進するとともに、DNAライブラリの充実や試料の保存を行う必要がある。DNAバーコーディングによる研究の進展は、歴史や社会・文化の理解の深化につながり、結果的に地域にも大きく貢献する。これまで述べて来たようにDNAのような分子情報は非常に有効なものであり、今後の考古学や歴史学、さらには人文学全般の発展のためにも積極的に利用されることを期待したい。

謝 辞

本研究を行う機会を与えて頂いた広島県教育委員会事務局の中村光則主事にお礼申し上げます。また、本稿を執筆する機会を与えて頂いた本多先生に深謝いたします。本研究で用いたプライマーの一部は、科研費MEXT/JSPS (23770089) の助成を受けたものである。シーケンスは広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学実験部門生命科学機器分析部で行われた。

引用文献

- 安部 久・黒田克史・張 春花・吉田和正・渡辺宇外. 2009. 木材の中のDNAはどこに多く残っているのか? . 森林総合研究所研究成果選集 (平成21年版) : 52-53.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M. & McCarty, M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. J. Exp. Med. 79: 137-158.
- Barbrook, A. C., Howe, C. J., Blake, N. & Robinson, P. 1998. The phylogeny of the Canterbury Tales. Nature 394: 839.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 12794-12797.
- Frézal, L. & Leblois, R. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. Infect. Genet. Evol. 8: 727-736.
- Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S. & Labra, M. 2013. DNA barcoding as a new tool for food traceability. Food Res. Int. 50: 55-63.
- Green, R. E., Krause, J., Ptak, S. E., Briggs, A. W., Ronan, M. T., Simons, J. F., Du, L., Egholm, M., Rothberg, J. M., Paunovic, M. & Pääbo, S. 2006. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. Nature 444: 330-336.

- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. & Hickey, D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* 23: 167-172.
- 花森功仁子・石川智士・齋藤寛・田中克典・佐藤洋一郎・岡田喜裕. 2011. DNAの欠失領域を用いた栽培イネ *Oryza sativa* L. の熱帯ジャポニカ型と温帯ジャポニカ型の識別マーカの作出と登呂 I 期遺跡から出土した炭化種子への応用. 東海大学紀要海洋学部「海—自然と文化」9(3): 19-25.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & de Waard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 313-321.
- Hebert, P. D., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S. & Francis, C. M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* 2: e312.
- Hershey, A. D. & Chase, M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36: 39-56.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W. & Little, D. P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE* 6: e19254.
- 宝来 聰. 1997. DNA人類進化学. ix + 120 pp. 岩波書店、東京.
- 星野浩一・岡本 誠・猿渡敏郎・大原一郎・柳本 卓. 2011. 種判別における鑑定基準DNAの証拠標本保存に関する近年の動向、とくにDNAバーコーディングの推進について. *DNA鑑定* 3: 71-81.
- Inoue, J. G., Miya, M., Tsukamoto, K. & Nishida, M. 2003. Basal actinopterygian relationships: a mitogenomic perspective on the phylogeny of the “ancient fish”. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: 110-120.
- Inoue, Y. & Tsubota, H. 2014. On the systematic position of the genus *Timmiella* (Dicranidae, Bryopsida) and its allied genera, with the description of a new family Timmiellaceae. *Phytotaxa* 181: 151-162.
- Ishiguro, N., Miya, M. & Nishida, M. 2003. Basal euteleostean relationships: a mitogenomic perspective on the phylogenetic reality of the “Protacanthopterygii”. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27: 476-488.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. & Thein, S. L. 1985a. Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. & Thein, S. L. 1985b. Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. *Nature* 316: 76-79.
- Jimbo, U., Kato, T. & Ito, M. 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomol. Sci.* 14: 107-124.
- 神保宇嗣・吉武 啓・伊藤元己. 2008. DNAバーコーディングによる同定支援システムとJBOLI構想. *日本生態学会誌* 58: 123-130.
- Kado, T., Yoshimaru, H., Tsumura, Y. & Tachida, H. 2003. DNA variation in a conifer, *Cryptomeria japonica* (Cupressaceae sensu lato). *Genetics* 164: 1547-1559.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.
- Krishnamurthy, P. K. & Francis, R. A. 2012. A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodivers. Conserv.* 21: 1901-1919.
- Masuzaki, H., Shimamura, M., Furuki, T., Tsubota, H., Yamaguchi, T., Mohamed, A. M. H. & Deguchi, H. 2010. Systematic position of the enigmatic liverwort *Mizutania* (Mizutaniaceae, Marchantiophyta) inferred from molecular phylogenetic analyses. *Taxon* 59: 448-458.
- Meier, R. 2008. DNA sequences in taxonomy: Opportunities and challenges. In Wheeler, Q. D. (ed.), *The New Taxonomy*, 95-127 pp. CRC Press, Boca Raton.
- Miya, M., Takeshima, H., Endo, H., Ishiguro, N. B., Inoue, J. G., Mukai, T., Satoh, T. P., Yamaguchi, M., Kawaguchi, A., Mabuchi, K., Shirai, S. M. & Nishida, M. 2003. Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: 121-138.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- 中内光昭. 1997. DNAがわかる本. 195 pp. 岩波書店、東京.
- Noonan, J. P., Coop, G., Kudaravalli, S., Smith, D., Krause, J., Alessi, J., Chen, F., Platt, D., Pääbo, S., Pritchard, J. K. & Rubin, E. M. 2006. Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science* 314: 1113-1118.
- 尾本恵市. 1996. 分子人類学と日本人の起源. vii + 188 pp. 裳華房、東京.
- 太田朋子. 2009. 分子進化のほぼ中立説, 偶然と淘汰の進化モデル. 176 pp. 講談社、東京.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification

- of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saitoh, K., Miya, M., Inoue, J. G., Ishiguro, N. B. & Nishida, M. 2003. Mitochondrial genomics of ostariophysan fish: perspectives on phylogeny and biogeography. *J. Mol. Evol.* 56: 464-472.
- Saitoh, T., Sugita, N., Someya, S., Iwami, Y., Kobayashi, S., Kamigaichi, H., Higuchi, A., Asai, S., Yamamoto, Y. & Nishiumi, I. 2015. DNA barcoding reveals 24 distinct lineages as cryptic bird species candidates in and around the Japanese Archipelago. *Mol. Ecol. Res.* 15: 177-186.
- 更科 功. 2012. 化石の分子生物学、生命進化の謎を解く. 236 pp. 講談社、東京.
- 佐藤行人・西田 睦. 2009. 全ゲノム重複と魚類の進化. *魚類学雑誌* 56: 89-109.
- 佐藤洋一郎. 1996. DNAが語る稲作文明、起源と展開. 227 pp. 日本放送出版協会、東京.
- 佐藤洋一郎. 1999. DNA考古学. v + 201 pp. 東洋書店、東京.
- 佐藤洋一郎. 2000. 縄文農耕の世界、DNA分析で何がわかったか. 218 pp. PHP研究所、京都.
- 佐藤洋一郎. 2002. DNA考古学のすすめ. 164 pp. 丸善、東京.
- 佐藤洋一郎. 2003. イネの文明、人類はいつ稲を手にしたか. 219 pp. PHP研究所、京都.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W. & Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 6241-6246.
- Shen, YY., Chen, X. & Murphy, R. W. 2013. Assessing DNA barcoding as a tool for species identification and data quality control. *PLoS ONE* 8: e57125.
- 篠田謙一. 2007. 日本人になった祖先たち、DNAから解明するその多元的構造. 219 pp. 日本放送出版協会、東京.
- 白石 進・山中研二・青木伸子. 1993. 木材中に残存しているDNAの2,3の特性. *日林九支研論集* 46: 223-224.
- Speers, L. & Edwards, J. L. 2008. International infrastructure for enabling the new taxonomy: the role of the Global Biodiversity Information Facility (GBIF). In Wheeler, Q. D. (ed.), *The New Taxonomy*, 87-94 pp. CRC Press, Boca Raton.
- 菅原秀明. 2011. 生物多様性情報とバーコード・オブ・ライフ. *DNA多型* 19: 1-12.
- 坪田博美. 2012. コケ植物の分子系統. 日本植物分類学会 (監修)、戸部博・田村実 (編著)、新しい植物分類学II, pp. 22-33. 講談社、東京.
- 坪田博美・久保晴盛・大野彰洋・井上侑哉・中原-坪田美保・武内一恵・松井健一・内田慎治・向井誠二. 2013. 広島 の帰化植物4. イヌカキネガラシおよびその近縁種. *Hikobia* 16: 321-334.
- 坪田博美・井上侑哉・中原-坪田美保・島本俊樹・松田伊代・内田慎治・向井誠二. 2014a. 標本同定のツールとしての DNAバーコーディングと分子系統解析ー広島県宮島で採集された標本の例ー. *Hikobia* 16: 475-490.
- 坪田博美・中原-坪田美保・井上侑哉・内田慎治・向井誠二. 2014b. 広島の帰化植物5. ヒメムラサキハナナ. *Hikobia* 16: 491-497.
- 坪田博美・井上侑哉・中原-坪田美保・内田慎治・向井誠二. 2014c (2015). 標本同定のツールとしてのDNAバーコーディングー植物標本の例ー. 広島大学総合博物館研究報告6: 41-49.
- Tsumura, Y. & Tomaru, N. 1999. Genetic diversity of *Cryptomeria japonica* using co-dominant DNA markers based on sequenced-tagged sites. *Theor. Appl. Genet.* 98: 396-404.
- Tsumura, Y., Ohba, K. & Strauss, S. H. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.* 92: 40-45.
- Tsumura, Y., Kado, T., Takahashi, T., Tani, N., Ujino-Ihara, T. & Iwata, H. 2007. Genome scan to detect genetic structure and adaptive genes of natural populations of *Cryptomeria japonica*. *Genetics* 176: 2393-2403.
- Valentini, A., Miquel, C. & Taberlet, P. 2010. DNA barcoding for honey biodiversity. *Diversity* 2: 610-617.
- Ward, R. D., Hanner, R. & Hebert, P. D. N. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J. Fish Biol.* 74: 329-356.
- Watson, J. D. & Crick, F. H. C. 1953. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738.
- Willis, K. J. & McElwain, J. C. 2014. *The Evolution of Plants*, 2nd ed. -ix + 398 pp. Oxford University Press, Oxford.
- Wong, E. H.-K. & Hanner, R. H. 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Res. Int.* 41: 828-837.

- 山内大輝・丸山隼人・内田慎治・向井誠二・坪田博美・和崎 淳. 2015. 日本産ヤマモガシ（ヤマモガシ科）のクラスター根の発見. 植物研究雑誌 90: 111-115. (印刷中)
- 吉丸博志・吉村研介・鈴木節子・津村義彦・能城修一・勝木俊雄・大谷雅人・河原孝行・藤井智之. 2012. 日本産樹木におけるDNAバーコード分類システムの開発<http://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/seikasenshu/2012/documents/p56-57.pdf> (2014年7月7日閲覧)
- 吉村研介・鈴木節子・田中孝尚・鈴木三男・神保宇嗣・伊藤元己・舘田英典・大谷雅人・勝木俊雄・津村義彦・藤井智之・能城修一・河原孝行・吉丸博志. 2011. 日本産樹木DNAバーコーディングの現状（2009）. 関東森林研究 62: 171-174.

インターネットリソース

- DNAバーコードデータベース (JBOL-DB). <http://db.jboli.org/> (2014年7月7日閲覧)
- 広島大学デジタル自然史博物館. プライマー一覧. https://www.digital-museum.hiroshima-u.ac.jp/~main/index.php/PCR_primers (2014年7月7日閲覧)
- JBLI (日本バーコードオブライフ・イニシアチブ, Japanese Barcode of Life Initiative). DNAバーコーディング、生物の同定と種の多様性管理のための新しいツール. http://www.jboli.org/wp/wp-content/uploads/2011/01/DNAbarcoding_JR.pdf (2014年7月7日閲覧)