

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

花森功仁子*^{1,2}・石川智士*¹・齋藤寛*¹・田中克典*³・佐藤洋一郎*⁴・岡田喜裕*¹

Making divergent marker of tropical and temperate types of *Oryza sativa* L. var. *japonica* based on insertion/deletion DNA region and its utilization of carbonated rice from Toro I site

Kuniko HANAMORI, Satoshi ISHIKAWA, Hiroshi SAITO, Katsunori TANAKA, Yo-Ichiro SATO, Yoshihiro OKADA

Abstract

Thirty one varieties of tropical and temperate types of *japonica* from fourteen countries and twenty three varieties of *indica* from eleven countries, totally fifty four rice (*Oryza sativa* L.) varieties were used. Genetic differentiation was detected between tropical and temperate type. The differentiation is shown apparently in the divergence in which there are two hundred twenty one base pairs in a region (DJ6) insertion/deletion on the chromosome 6. In this region, temperate type showed a deletion, whereas tropical type and *indica* type indicated specific sequences in DJ6 region. Ten primers were designed for detection of DJ6 region. The combinations of new primers were performed in the deleted region and obviously identified tropical type. Also carbonated rice was analyzed using the set of those primers. Only seven grains of carbonated rice which were excavated from Toro I site in Yayoi era were used. The results showed two temperate types and one hybrid type including in tropical and temperate types. It is shown there were already been naturally hybridized tropical and temperate types in the Late Yayoi era.

緒言

栽培イネ, *Oryza sativa* L. はインディカ型とジャポニカ型に大別される (Oka, 1958). さらに, ジャポニカ型のイネには, 熱帯ジャポニカ型と温帯ジャポニカ型が存在することが知られている (Oka, 1988). ジャポニカ型のイネは, 縄文時代晩期に日本列島に伝来して以来 (佐藤, 2008), 日本人の生活や列島の環境に大きな影響を及ぼしている. イネは弥生時代以降, 我々の主要なエネルギー源となっており, イネの品種や稲作文化の起源や伝播, 多様性の研究が文化的側面や科学的側面から行われてきた (佐々木, 1993; 坪井, 1982; 富山, 1993; 渡部, 2000). 遺跡から出土したイネ遺物は, 粒形 (佐藤, 1971; 直良, 1956; 花森ら, 2007; 和佐野, 2009) やプラントオパール

分析 (杉山, 2000; 藤原, 1998) を含む形態分析および DNA 分析 (佐藤ほか, 2001; 佐藤ほか, 2005) によって調査が進んでいる. イネの伝播経路については, フィリピン, 琉球を経由して九州に伝播した南の経路, 中国南部から直接伝わった経路, 中国から朝鮮半島を経由した経路の3つの仮説が提唱されている (佐藤, 1996; 柳田, 1978; 渡部, 1993). 南の海上からもたらされた経路であれば, 当初日本に伝播したイネは, 熱帯気候に合った熱帯ジャポニカ型が考えられる. 一方, 朝鮮半島を経由した経路であれば, 耐寒性のある温帯ジャポニカ型の可能性が高い. 温帯ジャポニカ型の起源は長江中下流域と考えられており (佐藤, 1996), 日本各地の遺跡から出土したイネ種子が温帯ジャポニカ型のみであった場合は, イネの伝播経路は中国を経由した2経路であると考えられることができる.

熱帯ジャポニカ型と温帯ジャポニカ型には遺伝的な差異

2011年7月29日受付 2011年12月14日受理

* 1 東海大学大学院地球環境研究科学科地球環境科学専攻 (Doctor's Course of Earth and Environmental Science, Graduate School of Earth and Environmental Science, Tokai University)

* 2 株式会社ジェネテック (Genetec CO., LTD)

* 3 弘前大学人文学部 (Faculty of Humanities, Hirosaki University)

* 4 (独) 総合地球環境学研究所 (Research Institute for Humanity and Nature (RIHN))

があることが報告されている（佐藤，1992；佐藤・花森，2005）。また，それぞれの型内の栽培品種の識別には RAPD プライマー，SNP マーカ，STS マーカ，マイクロサテライトマーカなどを用いた品種鑑定を目的とした分析がおこなわれている（大坪ら，1997；Shirasawa *et al.*，2004；赤木，2000；花森，2007）。しかし，熱帯ジャポニカ型と温帯ジャポニカ型を配列レベルで判別する手法は確立されていない。従来熱帯ジャポニカ型と温帯ジャポニカ型の識別には RAPD プライマーが用いられている。この RAPD プライマーによる DNA 分析では，出土遺物の DNA を増幅することは極めて困難であり，その再現性に問題があることが指摘されている。さらに，出土遺物から DNA 断片を増幅した場合には，その DNA 断片がイネ由来であるかを判定するため，サザンブロットング分析をおこなう必要があることから，多くの時間と費用を労する。

本研究では現生する温帯ジャポニカ型と熱帯ジャポニカ型の DNA の差異を検出し，欠失・挿入領域を特定した。この欠失領域をはさむプライマーを作成することで，両者の識別を容易に行える手法を開発した。ただし，このプライマーのみでは，出土遺物の DNA 増幅の再現性が低かったことから，イネ種子の型判別をおこなうために，欠失・挿入領域に別のプライマーを作成した。これらのプライマーを使用することによって，出土遺物においても簡便で再現性の高い DNA 分析が可能となったため，ここに報告する。

材料と方法

現存するイネの系統の標本として，温帯型と熱帯型を含むジャポニカ型31系統（14ヶ国に由来），インディカ型23系統（11ヶ国に由来）（Table 1）の計54系統を用いた。これらの種子は，収集後，国立遺伝学研究所および静岡大学農学部育種学研究室で系統保存されていたものである。なお，Table 1の登録名や採集国や地名は National Bio Resource Project (NBRP) によった。遺物標本としては，登呂遺跡の遺構番号 SD-2003より出土した2粒，遺構番号 SD-2055より出土した5粒の計7粒の炭化米を用いた（Table 2）。遺構番号は特別史跡登呂遺跡・再発掘調査報告書（佐藤・花森，2006）によった。

熱帯ジャポニカ型と温帯ジャポニカ型の遺伝的差異を検出するためには，形態学的に典型的な両者を先述した在来系統の標本から各4系統（Table 1の Sample 1~4，17~20）を選抜し実験に用いた。これら各4系統を対象に，従来から熱帯ジャポニカ型と温帯ジャポニカ型の識別に用いられているランダムプライマー（CMNS-B22；5'-TCT GCT GAC CGG-3'）を用いて両者で断片長に差異のある DNA 断片の増幅と各1系統（Sample 17）の塩基配列決定を行った。熱帯ジャポニカ型と温帯ジャポニカ型の形態学的分類には，糊の形質データをもとに算出した Z 値を利用した。なお，Z 値は佐藤ら（1991）の方法で下記により

算出した。Z 値が 0 以下の場合は温帯ジャポニカ型，0 を超える場合は熱帯ジャポニカ型で，Table 1の Tm は温帯ジャポニカ型，Tr は熱帯ジャポニカ型を示す。

$$Z = R + 0.093M - 0.044E - 2.01$$

R：糊の長さ／幅比

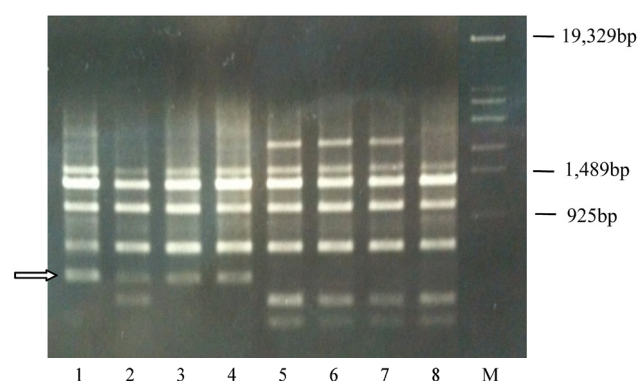
M：メソコチル長（mm）

E：胚乳のアルカリ崩壊性（%）

全 DNA の抽出は，Nakamura ら（1991）によって改変されたフェノール・クロロフォルム法によりおこなった。種子はエタノールを噴霧して消毒後，液体窒素で冷却し，マルチビーズショッカー（ST-250，安井器械，大阪）を用いて粉末状にした後，DNA 抽出に用いた。

PCR の反応条件は，94℃・30s，48℃・30s，72℃・1 min を1サイクルとし，30サイクルの反応をおこなった。PCR には Takara EX taq（タカラバイオ）を使用した。PCR 産物を 1% アガロースゲルで 20分，100V で電気泳動後，30分エチジウムブロマイド染色し，DNA 断片を確認した（Fig. 1）。型判別に使用する増幅 DNA 断片は，サザンブロットング分析でイネに由来することを確認した。型によって異なる DNA 断片（Fig. 1矢印）をゲルから切り出し，DNA を回収した。この DNA をテンプレートとしてシーケンス反応を行い，ABI Prism 遺伝子解析システムも用いて塩基配列を決定した。なお，塩基配列決定後，増幅断片の染色体上の位置を MEGA Blast (NCBI) によって検索した。

新たに決定した温帯ジャポニカ型と熱帯ジャポニカ型で差異のある塩基配列データを基に，両者を識別するプライマーセット（DJ6-F・R）を作成した。このプライマーセットを用いて，残りのジャポニカ型とインディカ型23系統（Table 1）について PCR をおこない，増幅断片長の差を検出した。なお，DJ6プライマーセットを用いた PCR の



1-4: Tropical *japonica* (See Table 1 for sample numbers).
5-8: Temperate *japonica* (See Table 1 for sample numbers).
M: λ -Eco T-14 I digest DNA marker (Takara co.LTD)

Fig. 1 Amplifying DNA using random primer CMNS-B22. Arrow indicates DNA fragment was amplified in tropical *japonica*.

Table 1 List of temperate and tropical types of japonica based on Z score and results using DJ6 primers.

Sample no.	Type	Accession ¹⁾	Origin ¹⁾		Z score ²⁾	Tm/Tr ³⁾	Type of DJ6 region ⁴⁾
			Country	Area			
1	Tropical <i>japonica</i>	Ac221	Taiwan	–	4.00	Tr	ND
2	Tropical <i>japonica</i>	LL8c	Laos	–	7.00<	Tr	ND
3	Tropical <i>japonica</i>	LN9k	Laos	–	7.01<	Tr	ND
4	Tropical <i>japonica</i>	Th13	Thailand	Kanchanaburi	7.00<	Tr	ND
5	Tropical <i>japonica</i>	Is29	Indonesia	SE.,Surawesh	5.00	Tr	ND
6	Tropical <i>japonica</i>	Ba5	Bangladesh	Patuakhali	4.00	Tr	ND
7	Tropical <i>japonica</i>	Bh5	Bhutan	–	6.00	Tr	ND
8	Tropical <i>japonica</i>	Ch4	China	Shanshii	7.00	Tr	ND
9	Tropical <i>japonica</i>	A17	India	Saida	2.00	Tr	ND
10	Tropical <i>japonica</i>	L4	Laos	Houeisai	3.00	Tr	ND
11	Tropical <i>japonica</i>	M3	Malaysia	Sarawak	4.00	Tr	ND
12	Tropical <i>japonica</i>	Bs1	Myanmar	30km NE Rangoon	4.00	Tr	ND
13	Tropical <i>japonica</i>	P10	Philippines	Palawan	6.00	Tr	ND
14	Tropical <i>japonica</i>	Th40	Thailand	C9064	7.00	Tr	ND
15	Tropical <i>japonica</i>	Gs5916	Thailand	–	3.00	Tr	ND
16	Tropical <i>japonica</i>	Gs5854	Thailand	–	7.00	Tr	ND
17	Temperate <i>japonica</i>	T65wx	Taiwan	–	–2.00	Tm	D
18	Temperate <i>japonica</i>	J46	Japan	–	< –3.00	Tm	D
19	Temperate <i>japonica</i>	OKA451	China	–	–2.00	Tm	D
20	Temperate <i>japonica</i>	J359	Japan	Amami	–2.00	Tm	D
21	Temperate <i>japonica</i>	Km4	Cambodia	–	–2.00	Tm	D
22	Temperate <i>japonica</i>	Ch28	China	Kankou	–2.00	Tm	D
23	Temperate <i>japonica</i>	Ch494	China	–	< –3.00	Tm	D
24	Temperate <i>japonica</i>	OKA424	China	–	< –3.00	Tm	D
25	Temperate <i>japonica</i>	OKA431	China	–	0.00	Tm	ND
26	Temperate <i>japonica</i>	OKA441	China	–	< –3.00	Tm	D
27	Temperate <i>japonica</i>	Is93	Indonesia	IL20P	–1.00	Tm	ND
28	Temperate <i>japonica</i>	OKA563	Indonesia	–	0.00	Tm	D
29	Temperate <i>japonica</i>	J1	Japan	–	–2.00	Tm	D
30	Temperate <i>japonica</i>	Bm1	Myanmar	–	–1.00	Tm	D
31	Temperate <i>japonica</i>	V4	Vietnam	Tuyen Duc	–2.00	Tm	D
32	<i>indica</i>	Ba6	Bangladesh	Dinajpur	3.30	–	ND
33	<i>indica</i>	OKA419	China	–	–	–	ND
34	<i>indica</i>	Ch11	China	Funan	2.27	–	ND
35	<i>indica</i>	Ch26	China	Kankou	2.39	–	ND
36	<i>indica</i>	Ch30	China	Fupei	2.46	–	ND
37	<i>indica</i>	Ch33	China	Goubi	2.99	–	ND
38	<i>indica</i>	Ch40	China	Joujuku	3.36	–	ND
39	<i>indica</i>	In5	India	–	2.63	–	ND
40	<i>indica</i>	In25	India	–	2.10	–	ND
41	<i>indica</i>	A05	India, Assam	Titabar	2.67	–	ND
42	<i>indica</i>	Sm9	India, Sikkim	–	2.87	–	ND
43	<i>indica</i>	Is98	Indonesia	IL45P	2.58	–	ND
44	<i>indica</i>	L8	Laos	Kham	1.81	–	ND
45	<i>indica</i>	LN11D	Laos	Luang Namtha	–	–	ND

46	<i>indica</i>	Bs39	Myanmar	Myitkyina	3.08	-	ND
47	<i>indica</i>	N2	Nepal	C5869	1.42	-	ND
48	<i>indica</i>	P60	Philippines	-	2.75	-	ND
49	<i>indica</i>	Tw10	Taiwan	Plain	2.93	-	ND
50	<i>indica</i>	NE111B	Thailand	Northeast	-	-	ND
51	<i>indica</i>	Th5	Thailand	Chiangrai	3.22	-	ND
52	<i>indica</i>	Th15	Thailand	-	3.42	-	ND
53	<i>indica</i>	Gs5263	Thailand	-	2.70	-	ND
54	<i>indica</i>	V2	Vietnam	Tuyen Duc	2.15	-	ND

- 1) Accession name, origin was registered by Oryzabase of NBRP (National Bio Resource Project). The unknown date was indicated by “-”.
- 2) Temperate *japonica* type: ≤ 0 , Tropical *japonica* type: > 0
- 3) Tr: Tropical *japonica*, Tm: Temperate *japonica* based on Z score
- 4) D: Deletion type, ND: Non deletion type

Table 2 Results of using new primer sets by artifacts excavated from Toro I site.

Sample No.	Site No. ¹⁾	Primer set			Tm/Tr ²⁾	
		F1/R2	A1/B3	A2/B2	Tm	Tr
1	SD-2003, i-⑨	-	-	Tm	Tm	
2	SD-2003, i-⑨	-	-	-	-	
3	SD-2055, c-(1)	-	-	-	-	
4	SD-2055, c-(1)	-	-	-	-	
5	SD-2055, c-(1)	-	-	Tm	Tm	
6	SD-2055, c-(1)	-	-	-	-	
7	SD-2055, c-(1)	Tr	Tr	Tr/Tm	Tm/Tr	

-: Non band

1) Site Number were registered by Toro relics.

2) Tr: Tropical *japonica*, Tm: Temperate *japonica*.

Table 3 Primer List and sequences

Primer	Sequences	Length
F	TGCTGACCGG TTCTGTAGCA GTG	23
R	CGTGTTCGAGA TCAATGGAA	20
F1	TGACCGGTTT TGTAGCAGTG	20
R1	CCAGTTTAAT GTTTTYTCAT TGCC	24
R2	GATTTTCCGT TTTCCGTGCC	20
A1	CGGTTCTGTA GCAGTGGACG AG	22
A2	GTAGCAGTGG ACGAGTCAGA ACGA	24
B2	TGTTTTCTCA TTGCCAAAGC TATATAG	27
B3	TGTGATTTTC CGTTTTCCGT G	21
B4	AGGTTCTAC GGAGTACAAT AC	22

Case of tropical Japonica type, the nucleotide sequence G: G, and the temperate Japonica, the sequence is substituted in A.

反応条件は、94℃・30s, 56℃・30s, 72℃・1 min を1 サイクルとし、40サイクルの反応をおこなった。PCR 反応

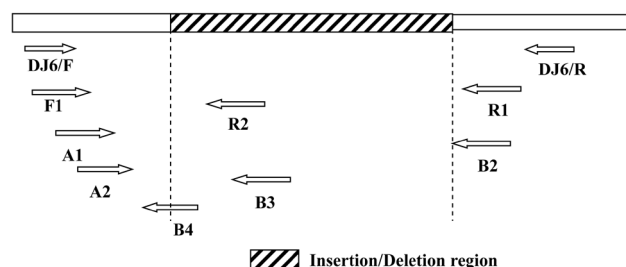


Fig. 2 Location of primers on chromosome 6 (Refer Table 3 for sequences of primers).

Table 4 Results of amplifying DNA using sets of primers and annealing temperature

Primer set	Temperate <i>japonica</i>	Tropical <i>japonica</i>	Annealing temperature (°C)
F/R	+	+	56
F1/R1	+	+	56
F1/R2	-	+	56
A1/B2	+	+	56
A1/B3	-	+	56
A2/B2	+	+	56
A2/B4	-	+	61

+: Band, -: Non Band

後の処理は先述したランダムプライマー CMNS-B22を用いた場合と同様に泳動し、DNA 断片長により判別した。

出土遺物の DNA 増幅を安定的におこなうために、DJ6 プライマーの内側に Nested プライマーとして、5' 末端側に F1, A1, A2, の3 プライマーを、3 末端側に R1, B2の2 プライマーを作成した (Table 3, Fig. 2)。加えて、熱帯ジャポニカ型と温帯ジャポニカ型で増幅 DNA 断片長の差を生む欠失・挿入部位に、プライマー R2, B3, 欠失領域を含む B4を設定した (Fig. 2)。後者の R2, B3, B4

を用いたPCR産物は、熱帯ジャポニカ型で増幅型、温帯ジャポニカ型で非増幅型となり、多型が視認可能である。Table 4に示した7通りのプライマーセットでPCRをおこない、DNA断片増幅の有無を確認することで、ジャポニカ型イネの型判別をおこなった。なお、アニーリング温度はA2・B4は61℃、その他のプライマーセットでは56℃に設定し、その他のPCR反応条件は上記と同様とした(Table 4)。

さらに、F1・R2, A1・B3, A2・B2のプライマーセットを用いて登呂遺跡より出土した炭化米7粒(Table 2)よりDNAを抽出し、同様にPCR増幅をおこない、DNA断片の有無によってジャポニカ型の判別をおこなった。

結果

ジャポニカ型のイネ種子について、ランダムプライマーCMNS-B22を用いてDNA断片を増幅し、増幅断片長の比較から、Table 1の4系統(Sample 1-4)が温帯ジャポニカ型、残り4系統(Sample 5-8)が熱帯ジャポニカ型を示し、明確な差異(Fig. 1の矢印)があることが判明した。なお、DNA断片がイネ由来のDNAであるかを確認するため、サザンブローディング分析を行ない、熱帯ジャポニカ型と温帯ジャポニカ型の2本鎖DNAの確認を行なった。このDNA解析の結果は、Z値による型判別の結果と一致した。CMNS-B22を用いたPCRによる増幅DNA断片の塩基配列を特定し、熱帯ジャポニカ型(Sample 1)と温帯ジャポニカ型(Sample 17)で塩基配列を比較したとこ

```

Tm      GACCGGTCCTGTAGCAGTGGACAGTTCAGAACCGTACAGTGTGTTACTCTGTATGTACT--
Tr      GACCGGTCCTGTAGCAGTGGACAGTTCAGAACGA-----CAGTGTGTTACTCTGTATGTACTCC
*****

Tm      -----
Tr      GTAGGAACCTTCCCTCCCGGCACGGAAACGGAAATCACATTAGCATATATTAATTA

Tm      -----
Tr      GGTATAGCTAAAACCTAACCTTGAAAATAGATTAAATTAATTTTTTAAAGCAGCTTTCCIA

Tm      -----
Tr      TAAAAATATTTTTTAAAAAATCATACCATTTAGTAGTTTGAAAAGCGTGCACGGGAAA

Tm      -----
Tr      -----CTATATAGCTTTGGCAATGA

Tm      -----
Tr      CGAGAGGAGAGAGAGTGAACCAATTTCAAAAGAAACGACGCTATATTAACCTTTGGCAATGA
*****

Tm      GAAAACATTAACCTGGATTAGTTTTGTGTTTTCCATTTGATCTCGACACG
Tr      AAAACATTAACCTGGATTAGTTTTGTGTTTTCCATTTGATCTCGACACG
*****
    
```

Fig. 3 Sequences of tropical and temperate types.

Tm: Temperate type of *japonica*

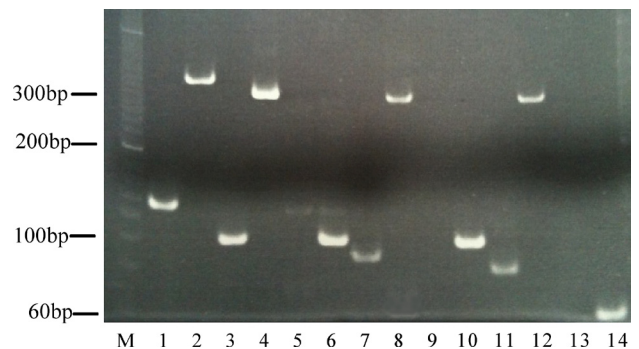
Tr: Tropical type of *japonica*

* Same sequence

ろ、両者には、221塩基の欠失・挿入部位の有無が確認された(Fig. 3)。MEGA Blastを用いて検索の結果、この部位は‘日本晴’の第6染色体上に位置することが判明した。Sample 1-4の温帯ジャポニカ型はこの領域が欠失しており、Sample 5-8の熱帯ジャポニカ型は塩基配列を有していた。この欠失・挿入部位の塩基配列に基づいて、温帯ジャポニカ型と熱帯ジャポニカ型とを識別するプライマーセットを設計した(Table 3)。

プライマー DJ6-F・Rのセットを用いて、Z値によって判別された温帯ジャポニカ型11系統と熱帯ジャポニカ型12系統をPCR増幅した(Table 1)。この増幅の結果、温帯ジャポニカ型9系統、熱帯ジャポニカ型12系統はそれぞれZ値から判別される温帯ジャポニカ型と熱帯ジャポニカ型とほぼ一致した。しかし、Z値0.00で温帯ジャポニカ型と判別された中国由来のSample 25 (OKA431)と、Z値-1.00で温帯ジャポニカ型と判別されたインドネシア由来のSample 27 (Is93)の2系統が非欠失型を示した(Table 1)。比較として用いたインディカ型23系統はすべて非欠失型を示した(Table 1)。

出土遺物のDNAを増幅するため、8プライマーを新たに作成した(Fig. 2, Table 3)。このプライマーの組み合わせの結果、F1・R1, A1・B2, A2・B2の3プライマーセットでは温帯ジャポニカ型と熱帯ジャポニカ型の両方についてDNA断片が増幅された(Fig. 4, Table 4)。また、



M: 100bp DNA ladder

1: Temperate type of *japonica* (Tm) using primer F and R.

2: Tropical type of *japonica* (Tr) using primer F and R.

3: Tm using primer F1 and R1.

4: Tr using primer F1 and R1.

5: Tm using primer F1 and R2.

6: Tr using primer F1 and R2.

7: Tm using primer A1 and B2.

8: Tr using primer A1 and B2.

9: Tm using primer A1 and B3.

10: Tr using primer A1 and B3.

11: Tm using primer A2 and B2.

12: Tr using primer A2 and B2.

13: Tm using primer A2 and B4.

14: Tr using primer A2 and B4.

Fig. 4 Amplifying DNA using new primers (See Table 3).

F1・R2, A1・B3, A2・B4の3つのプライマーセットでは熱帯ジャポニカ型のみDNA断片の増幅が認められた(Fig. 4, Table 4). ただし, A1・B2, A2・B4のプライマーセットはDNAの薄い濃度や低い純度ではダミーバンドが検出され, A2・B4のプライマーセットではDNA断片がプライマーダイマーと約10塩基程度の差で判別しにくいいため, 遺物の判別には除外した.

登呂遺跡の登呂I期より出土した遺物7粒について, 熱帯ジャポニカと温帯ジャポニカの両型について増幅をおこなうA2・B2のプライマーセットと, 熱帯ジャポニカ型のみでDNA断片の増幅をおこなうF1・R2とA1・B3の2プライマーセットを用いてDNA増幅した結果, 3粒(No.55, 59, 61)では, 温帯ジャポニカ型のDNAの増幅が確認された(Table 2). なお, No.61についてはA2・B2のセットで増幅した場合, わずかに熱帯ジャポニカ型の位置に断片がみとめられた. このサンプルはF1・R2とA1・B3のプライマー使用時にも熱帯ジャポニカ型のDNAの増幅が確認された(Table 4). しかし, そのほかのサンプルについてDNA断片の増幅は確認できなかった. この結果から, 温帯ジャポニカ2点と温帯ジャポニカ型と熱帯ジャポニカ型のDNA配列をもつ雑種1点(No. 61)が判別された.

考察

11形質の主成分分析によって4形質を組み合わせるMorishimaら(1981)や3形質を用いる佐藤ら(1991)の方法によって当初, インディカ型とジャポニカ型の判別が行われた. その後, DNAのPS-ID領域(Nakamura et al, 1997)の配列を特定するか, ORF領域を増幅することにより簡便に両型の判別がなされるようになった(佐藤, 1999). これらにより, それまで一般的にインディカ型が長粒系でジャポニカ型が短粒系とされてきたが, ジャポニカ型でも長粒系のあることが示された(佐藤, 1996). さらに, ジャポニカ型において, 温帯ジャポニカ型と熱帯ジャポニカ型の判別には, イネを栽培し, その籾の長さ, 幅やメソコチル長の計測, 胚乳のアルカリ崩壊度などの形質調査の判別式に基づくZ値や再現性の低いランダムプライマーの組み合わせによって行われてきた(佐藤, 1991; 2002). しかし, 本研究では温帯ジャポニカ型と熱帯ジャポニカ型にはDNA配列において明確な遺伝的相違が発見された. これにより, これまでのような栽培試験の労力と時間を費やすことなく, 再現性も格段に進歩したものと考えられる. なお, 今回の31系統中2系統がZ値と異なる非欠失型を示したが, 中国由来のOKA431のZ値は0.00であり, 境界値であった. インドネシア由来のIs93についてはZ値が-1.00であり, 再度形質調査をおこなう必要性が示唆された.

出土遺物のDNAの場合, 200bpを超えるDNA断片長を増幅することはむずかしく, 温帯ジャポニカ型の欠失領

域に熱帯ジャポニカ型のDNA増幅をおこなうプライマーを作成した. その結果, 登呂遺跡の比較的古い登呂I期の遺構からの出土遺物から3点のDNA断片が増幅された. これまで遺跡から出土した遺物のDNA分析をおこなっているが, 西郷遺跡のように129点からDNAを抽出してまったくDNA増幅しない場合もある(佐藤・花森, 2009). 遺物から抽出したDNAは微量であるためDNA濃度の測定が不能であり, その有無を確認できない. DNAが増幅しないのは土中に長年埋っていたためDNAが短く断片化しているか, 被熱ですでに分解されてしまったと推定される. A1・B2のプライマーセットは目的以外のダミーバンドが検出されたが, このプライマーでは第1染色体上に類似の配列が認められたため, これを増幅したものと推定された. 以上の結果から出土遺物において熱帯ジャポニカ型の判別には, 短いDNA断片の増幅を対象とする3プライマーセット(F1・R2, A1・B3, A2・B2)の使用が有効であることが判明した.

今回の出土したイネ種子では温帯ジャポニカ型と熱帯ジャポニカ型のDNA断片が検出された. 温帯ジャポニカ型の伝播は中国からの2つの経路が推定される. 一方, 熱帯ジャポニカ型は南方から九州に伝播した南の経路が推定される. 本実験から3つの経路のいずれの可能性もあるが, 南の経路の存在が示唆された. イネは中国から伝播した短日性の晩生のウルチの温帯ジャポニカ型と南から伝播した短日性をもたない晩生の熱帯ジャポニカ型が自然交配すると早生の雑種ができる(佐藤, 1992). このことから, 本実験の温帯ジャポニカ型と熱帯ジャポニカ型の雑種はこの早生の可能性がある. この短日性を示さない早生の誕生が東北地方の環境でもイネが栽培可能となった主な要因と考えられる. しかし, 一遺跡からの出土遺物だけではこれを裏付けるものではなく, 今後更なる分析が必要である.

温帯ジャポニカ型であるか, 熱帯ジャポニカ型であるかを判別する場合, 従来ランダムプライマーによる増幅後, サザンプロット分析によって遺物由来のDNA断片であることを確認して判別をおこなってきた. しかし, 本研究の結果, DNAの特定領域を増幅することで迅速かつ簡便に分析することが可能となった. 近年, 遺跡の発掘あるいは野生イネや在来イネの分析によりアジアにおけるイネの伝播が推定されつつある(Crawford, 2003; Fuller, 2010). 今後は, 全国および周辺諸国の出土遺物を分析することにより, 国内でのイネの伝播経路が解明される可能性が高いと考えられる.

参考文献

- 赤木宏守(2000): DNA多型によるイネの品種識別, 育種学研究: Vol.2-2, 89-96.
Crawford G. W., Lee G. (2003): Agricultural origins in the Korean Peninsula, *Antiquity*: 77(295), 87-95.

- 藤原宏志 (1998) : 稲作起源を探る, 岩波書店, 東京, 201pp.
- Fuller D.Q. (2010): Consilience of genetics and archaeobotany in the entangled history of rice, *Archaeol Anthropol Science*: 2, 115-131.
- 花森功仁子・大角信介・望月峰子・向井讓・佐藤洋一郎 (2007) : 全国の遺跡から出土したイネ種子の遺伝的傾向, 日本文化財科学会第24回大会・研究発表要旨集, 162-163.
- 花森功仁子・向井讓・大角信介・望月峰子・齋藤寛・佐藤洋一郎 (2007) : 胃内容物および加工食品のコメのDNA鑑定, *DNA多型 Vol.15*, 126-129.
- Morishima H, H.Oka (1981): Phylogenetic differentiation of cultivated rice, XXII. Numerical Evaluation of the Indica-Japonica differentiation, *Japan. J. Breed.*: 31, 402-413.
- Nakamura I, Y.I.Sato (1991): Amplification of DNA fragments isolated from a single seed of ancient rice (A.D.800) by polymerase chain reaction. *Chinese J.Rice Sci.*: 5: 175-179.
- Nakamura I, N.Kameya, Y.Kato, S.Yamanaka, H.Jomori and Y.I. Sato (1997): A proposal for identifying the short ID sequence which addresses the plastid subtype of higher plants. *Breeding Science* 4: 385-388.
- 直良信夫 (1956) : 日本古代の稲, 日本古代農業発達史, さ・え・ら書房, 東京, 40-46.
- Oka H.I. (1958): Intervarietal and classification of cultivated rice, *Ind. J. Genet. & Pl. Breed*: 18, 79-89.
- Oka H.I. (1988): *Origin of Cultivated Rice*, JSPS/Elsevier, Tokyo/Amsterdam, 1988.
- 大坪研一・藤井剛・橋野陽一・豊島英親・岡留博司・中村澄子・川崎信二 (1997) : RAPD法を用いた国内産精米の品種判別技術, *食科工* : 44, 386-390.
- 佐々木高明 (1993) : 日本文化の基層を探る, 日本放送出版協会, 253pp.
- 佐藤敏也 (1971) : 日本の古代米, 雄山閣, 東京, 346pp.
- 佐藤洋一郎 (1991) : アジア栽培イネのインド型-日本型品種群における糊形の差異, *育種*41, 121-134.
- 佐藤洋一郎 (1992) : 稲のきた道, 裳華房, 東京, 166pp.
- 佐藤洋一郎 (1996) : DNAが語る稲作文明, 日本放送出版協会, 東京, 227pp.
- 佐藤洋一郎 (1999) : DNA考古学, 東洋書店, 東京, 201pp.
- 佐藤洋一郎・榎ジェネテック (2001) : 領家遺跡 (I-C, I-D区) の自然科学分析, 領家遺跡II・梅橋古墳, 静岡県埋蔵文化財調査研究所調査報告第126集, 静岡県埋蔵文化財調査研究所, 278-284.
- 佐藤洋一郎 (2002) : 稲の日本史, 角川選書337, 東京, 197pp.
- 佐藤洋一郎・花森功仁子 (2005) : 自然遺物およびその自然科学的分析, 本郷坪遺跡, 静岡県埋蔵文化財調査研究所調査報告第164集, 静岡県埋蔵文化財調査研究所, 44-60.
- 佐藤洋一郎・榎ジェネテック (2005) : 京都府加悦町日吉ヶ丘遺跡出土の炭化米のDNA分析, 日吉ヶ遺跡, 加悦町文化財調査報告第33集, 京都府加悦町教育委員会, 200-204.
- 佐藤洋一郎・花森功仁子 (2006) : 特別史跡登呂遺跡・再発掘調査報告書 (自然科学分析・総括編), 静岡市教育委員会, 90-97.
- 佐藤洋一郎 (2008) : イネの日本史, 京都大学学術出版会, 京都, 251pp.
- 佐藤洋一郎・花森功仁子 (2009) : 西郷遺跡の自然科学分析, 一般国道49号亀田バイパス関係発掘調査報告書, 新潟県埋蔵文化財調査報告書第200集, 新潟県教育委員会, 163-167.
- Shirasawa, K, Monna L, Kishitani S. (2004): Single Nucleotide Polymorphism in Randomly Selected Genes among japonica Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties Identified by PCR-RF-SSCP, *DNA Research*: 11-4, 275-283.
- 杉山真二 (2000) : 植物珪酸体 (プラント・オパール), 考古学と植物学, 同成社, 189-213.
- 坪井洋文 (1982) : 稲を選んだ日本人, 未来社, 東京, 236pp.
- 富山和子 (1993) : 日本の米, 中央公論社, 東京, 232pp.
- 柳田国男 (1978) : 海上の道, 岩波書店, 東京, 328pp.
- 和佐野喜久生 (2009) : 炭化米の粒形質の変異分布と古代日本稲作の起源, *日本考古学*第28号, 23-40.
- 渡部忠世 (1993) : 稲の大地, 小学館, 東京, 254pp.
- 渡部忠世 (2000) : 稲にこだわる, 小学館, 東京, 206pp.

要 旨

14カ国に由来する温帯型と熱帯型を含むジャポニカ型イネ31系統と, 11カ国に由来するインディカ型イネ23系統, 合わせて54系統を用いて, 温帯・熱帯ジャポニカ型の遺伝的相異点を調べた. その結果, 第6染色体上に221塩基の欠失/挿入領域 (DJ6領域) を発見した. この領域では温帯ジャポニカ型は欠失を示し, 熱帯ジャポニカ型とインディカ型は非欠失を示す. このDJ6領域にPCRプライマーを10個設計し, これらを用いて, 温帯・熱帯ジャポニカ型の識別手法を開発した. また, このプライマーを用いて, 弥生時代後期の登呂遺跡第1期の地層から出土したイネ種子の型判別をおこなった. その結果, 温帯ジャポニカ型と熱帯ジャポニカ型のDNAを持つ雑種1点と温帯ジャポニカ型2点が検出された. このことから, 弥生時代後期には温帯ジャポニカ型と熱帯ジャポニカ型が栽培されており, 両者のイネが自然交雑していたことが示唆された.