

植物遺体のDNA多型解析手法の確立による 縄文時代前期三内丸山遺跡のクリ栽培の可能性

山中慎介^{1, 2)}・岡田康博³⁾・中村郁郎⁴⁾・佐藤洋一郎²⁾

1. 序論

縄文時代の栽培植物もしくは農耕の存在を証明することは、日本における農耕の起源を探る上で大きな課題の1つである。この問題に関しては農学を含む自然科学の分野でも、花粉やプラントオパールなどの長時間安定して地中に残る遺物の形態学的な側面からの研究が数多く行われてきた(中村1967, 中村1977, 佐藤ら1990, 宇田津ら1994, 王ら1994)。これらの研究では、出土植物遺体の大きさなどから栽培行為の有無が推測されてきたが(南木1994)、植物体そのものが完全な状態で発見されることは少なく、またその遺伝子レベルでの本格的な研究は行われていない。

遺跡等から出土した植物遺体が野生のものであるのか栽培の産物であるのかを遺伝学的に判断する基準の1つとして、集団内に存在する遺伝的に有利でも不利でもない中立な変異(Kimura 1968)の遺伝的多様性を挙げることができる。野生の集団内では遺伝的なばらつきが大きく、栽培集団内では小さくなると考えられ、この中立な変異の多様性を利用して野生か栽培かを推測することが可能になるからである(図1)。

青森県青森市の三内丸山遺跡(所在地:青森市三内字丸山223, ほか)は古く江戸時代からその存在が知られている縄文遺跡(縄文時代前・中期; 5,500~4,000 B.P.)で、1992年の野球場建設に伴う発掘調査により発見された集落でその名が世間一般に知られるようになった。ここからは直径1mのクリ(学名*Castanea crenata*)材の大型掘立柱や大量のクリの子実が良好な保存状態で発見されており、クリが当時の人間の生活に大きく関わっていたことが考えられる。出土したクリ遺体の量の多さや、集落の規模の大きさ、さらには花粉分析等の調査・研究はクリ栽培の可能性を示唆している(安田1995)。一方、縄文時代が採集狩猟経済にあったという従来からの説を唱える研究者はこれを認めず、両者の間で議論が起こっている。

¹⁾ 岐阜大学大学院連合農学研究科(静岡大学):〒422-8529 静岡県静岡市大谷836

²⁾ 静岡大学農学部:〒422-8529 静岡県静岡市大谷836

³⁾ 青森県教育庁:〒030-8540 青森県青森市新町2-3-1

⁴⁾ 千葉大学大学院自然科学研究科:〒271-0092 千葉県松戸市松戸648

キーワード: DNA考古学(DNA archaeology), クリ(Chestnut), 縄文時代(Jomon period),
集団の遺伝的多様性(Genetic diversity in a population), 栽培化(Domestication)

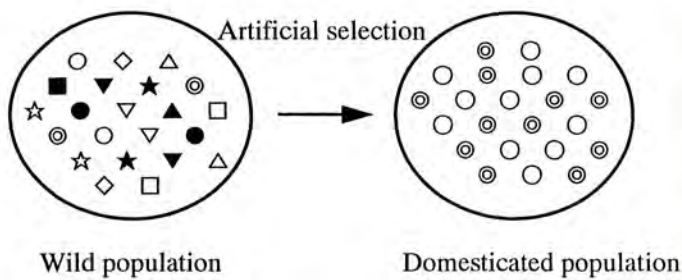


図1 野生集団と栽培集団における中立な変異の多様性の相違
Fig.1 Difference of genetic diversity of neutral mutation
between wild and domesticated population



図2 出土した「クリ炭化子葉」
Fig.2 Excavated "Charred seed leaf"
of Chestnut (*Castanea crenata*)

本研究は三内丸山遺跡の約5,000年前の地層より出土したクリ遺体を材料に、出土植物遺体のDNA解析手法を確立した上で、その遺伝的多様性を現生の野生集団とDNAレベルで比較することにより、同遺跡におけるクリ栽培の可能性について分子遺伝学の観点からの検討を行ったものである。なお、これらの結果の一部はすでにいくつかの記事で触れているが（佐藤1996, 1997, 1998a, 1998b）、今回は具体的な手法・解析方法等の問題も含め正式な学術報告として公表する。

2. 材料および方法

(1) 供試試料

三内丸山遺跡の1992年度の発掘調査において約5,000年前の第6鉄塔地区の住居跡（pit No.712, 層位：フク土上位）の泥炭層からなる貯蔵穴より貝塚状で出土したクリ子実20サンプル（標本名：クリ炭化子葉No.1～20）と1995年に掘り出された第26号堀立柱建物跡の大型堀立柱6本のうちの比較的保存状態の良い3本（標本名：P₃, P₄およびP₅, 青森県教育委員会1996）の小断片を解析に供試した。これらのサンプルからそれぞれ約0.5gをDNA抽出の試料に用いた。出土したクリ子葉の一例を図2に示す。

またこれらの出土遺体と比較するために遺跡周辺半径約10kmの圏内に自生する野生のクリ（シバグリ）の生葉22サンプルを現生の試料として用いた。これらのサンプルそれぞれ約0.1gからDNA抽出を行った。

(2) DNA抽出

植物体からのDNA抽出に関しては種々の方法が開発されているが、今回は以前に行われている炭化米のDNA解析（Nakamura and Sato 1991）で成果が挙げられているアルカリ-SDS法（Dellaporta et al. 1983, 中村1995）を用いた。出土遺体に関しては木本植物の出土遺体用に改

変したSDS法により、また現生のものについては通常の本植物用のSDS法で抽出した。本植物用のSDS法はベースとなったアルカリ-SDS法のプロパノール沈殿をエタノール沈殿に置き換え、またフェノール抽出を工程に加えてある。さらに出土遺体用には最初の遠心分離の時間を通常倍の20分にする措置をとった。現生木本の組織中にはDNAの増幅を阻害する多糖類が多く含まれている。これを除去するために、上述の方法で抽出したDNAは、不純物を取り除くためにカラム (Sephadex G-50) による精製処理を行った。

このDNA抽出と以下に述べるPCR増幅の過程では出土遺体と現生それぞれについて実験の場所・器具・時間を完全に区別して相互のDNAの混入 (コンタミネーション) を防ぐ措置をとった。

(3) PCR法による抽出DNAの増幅

クリ遺体のDNA解析法確立のために、以上の手順により出土遺体20サンプルのうちの5サンプル (標本No. 1～5) および静岡県内で採取した現生のクリの生葉2サンプルからDNA抽出を行い、12-merのプライマーCMN-A71 (5'-GGTGCCGGAGCA-3' ; コモンプライマー A71 : ベックス社) を用い、DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus社) で94℃ 30秒・51℃ 30秒・72℃ 1分を1サイクルとする計40サイクルの条件でPCR増幅した。このプライマーとはDNAのどの部分を増幅するかを決定する開始配列のことである。

増幅したPCR産物は11cm × 6 cmの1%のアガロースゲルを用い1 × TBEバッファー中で電気泳動 (100V, 30分) を行った。このゲルをエチジウムブロマイド (EtBr ; 1 g/ml) で30分染色した後にUVトランスイルミネーターを用いてDNA断片を視覚化し、ポラロイド写真に撮った。なお、遺体DNAの1回目のPCR産物からはDNA断片を確認することができなかったので、この1回目の産物をテンプレートに用いて同じプライマーで再度PCR増幅した。

(4) サザンプロット解析

出土遺体は長期にわたって土壌中にとどまり、また発掘後は多くの人の手に触れるなどして微生物等による汚染を受けている可能性が高い。したがって、出土遺体から抽出・増幅されたDNAが微生物等、外部から混入したDNAのものでないことを厳密に証明する必要がある。出土遺体から抽出・増幅されたDNAが真にクリ由来のものであることを確認するために、サザンプロット法 (Southern 1975) を適用した。サザンプロット法とは2つのDNA断片の相同性を簡便に調べる方法で、調べたいDNA断片にあらかじめ当該種のものであることが確実なDNA断片 (プローブ) が結合 (ハイブリダイゼーション) するか否かで判断する。まず大型のアガロースゲル (20cm × 20cm) で分離をよくした上記の5サンプルの増幅DNA断片をキャピラリー法でナイロンメンブレンHybond N+ (Amersham社) に転写し、非放射性蛍光検出キット (ECL direct nucleic acid labeling and detection system, RPN3000, Amersham社) により蛍光標識

した現生のクリのPCR産物をプローブに用い、遺体由来のDNAへのハイブリダイゼーションを試みた。なお、これらの詳細な手順に関してはECLキット添付のプロトコールに従った。

蛍光シグナルの検出は、オートラジオグラフィーによりX線フィルムにナイロンメンブレンを1時間から数時間感光させ、フィルムを現像して視覚化した。

(5) DNAフィンガープリンティング

ブナ (*Fagus crenata*) の集団内多様性の調査で、再現性のある安定した多型バンドを産生したCMNシリーズのプライマー (ベックス社) の中から (斉藤秀之, 私信), クリの遺伝的多様性を調べるのに有効であると思われるプライマーの選抜を行った。これにより3種類のプライマーCMN-A10 (5'-GCCTGCCTCACG-3'), B01 (5'-AAGAAGCAGGCG-3'), B09 (5'-ACTCAC-CACGCA-3') を選び出した。そこで、出土遺体20サンプルと現生22サンプルからそれぞれ抽出したDNAをテンプレートにしてこれら3プライマーによるPCR増幅 (出土遺体については1次増幅産物ではバンドが認められないため、1次産物をテンプレートにさらにもう1回増幅) を行い、バンドパターンの多型性を調べた。PCR条件はプライマーA10については94℃30秒・51℃30秒・72℃1分の40サイクルで、B01およびB09では94℃30秒・44℃30秒・72℃1分の40サイクルで行った。

なお、得られたDNA断片がプライマーによる人工増幅産物 (Artifact) でないことを示すために、滅菌蒸留水をテンプレートに用いた陰性対照 (Negative control) をすべてのロットに設けた。この陰性対照にバンドが認められなかったロットのデータのみを以下の解析に用いた。

3. 結果

(1) 解析手法の確立

図3に遺物からのDNA抽出および増幅のための予備実験の結果を示す。先述のように出土遺体には微生物等の混入の可能性があるが、PCR増幅 (A) とその産物のサザンブロッティング解析 (B) の結果、出土遺体から抽出・増幅されたDNA断片は現生のクリとの間に相同性が認められた。このことは、少なくとも遺体由来のDNAの当該増幅断片がクリまたはその近縁植物に由来するものであり、他の微生物等のDNAではないことを示すものと考えられる。さらに本研究ではその形態から明らかにクリであると判別されている出土遺体を供試していることや、日本に分布するクリは*Castanea crenata*の1種のみであることから、遺体由来のDNAがクリではなくその近縁種である可能性は低いと考えられる。

これより今回、植物遺体からのDNA抽出に改変SDS法を適用することに問題はないと考え、同法により本格的に解析を進めることにした。

また実際のフィンガープリンティング解析用に選抜した前述の3プライマーによる、安定して多

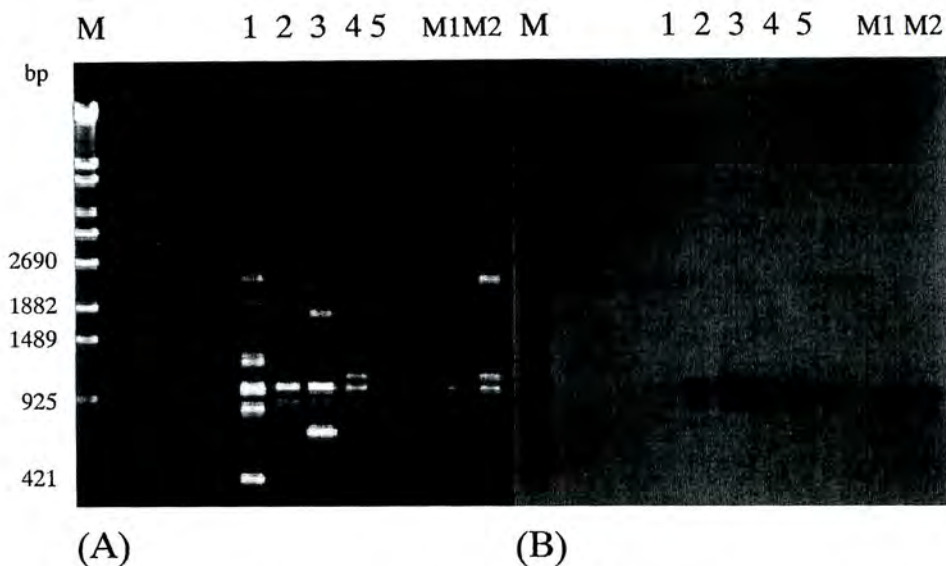


図3 出土クリ遺体5サンプル (1~5) と現生のクリ2サンプル (M1, M2) のプライマーCMN-A71によるPCR増幅 (A) およびM1をプローブにしたサザンブロッティング解析 (B)
M : 分子量マーカー (λ -EcoT14I digest)

Fig. 3 Preliminary experiments for establishment of ancient DNA extraction
(A) PCR products of five excavated (1~5) and two modern (M1, M2) Chestnuts amplified with a primer; CMN-A71. M; Molecular weight marker (λ -EcoT14I digest)
(B) Southern blotting analysis probed with M1

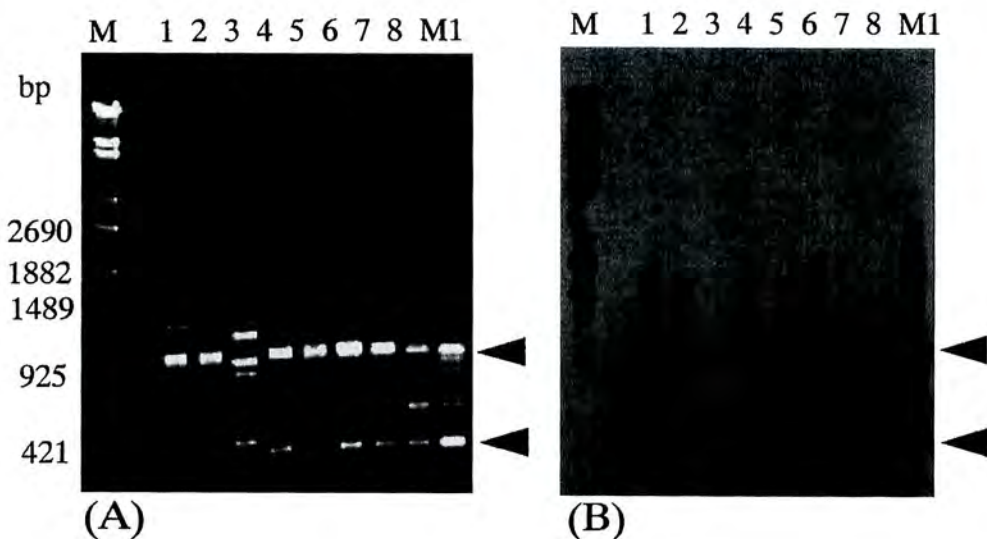


図4 選抜プライマーによる多型バンドの相同性の確認の一例
プライマーCMN-B01による出土クリ遺体 (1~8) と現生のクリ (M1) のPCR増幅 (A) およびM1をプローブにしたサザンブロッティング解析 (B) M : 分子量マーカー (λ -EcoT14I digest)

Fig. 4 One example for confirmation of selected polymorphic fragments
PCR products of excavated (1~8) and modern (M1) Chestnuts amplified with a primer, CMN-B01 and Southern blotting analysis probed with M1. M; Molecular weight marker (λ -EcoT14I digest)

型が得られ再現性のある4増幅断片；CMN-A10（約800bp）、-B01（約400bpおよび1 kbp）、-B09（約800bp）、についてもサザンブロッティング解析を行ったところ、遺体由来の増幅断片と現生の増幅断片との間に相同性が認められた。この結果の一例を図4に示す。図4（A）はプライマーCMN-B01を用いた出土遺体8サンプル（1～8、それぞれ標本No.1～8に対応）および静岡県内で採集した現生のクリ1サンプル（M1）のPCR増幅より得られたバンドパターンを示している。図の矢印で示した約400bpおよび1 kbpの増幅断片に注目してM1をプローブにサザンブロッティングを行った結果（B）、当該の断片に相同性が認められた。レーン3の遺体についてはPCR増幅により当該の位置に増幅断片は認められず多型を示していると考えられ、サザンブロッティングによっても相同性は認められないことから多型を示していることが確認できた。

（2）出土クリ子実のフィンガープリンティング

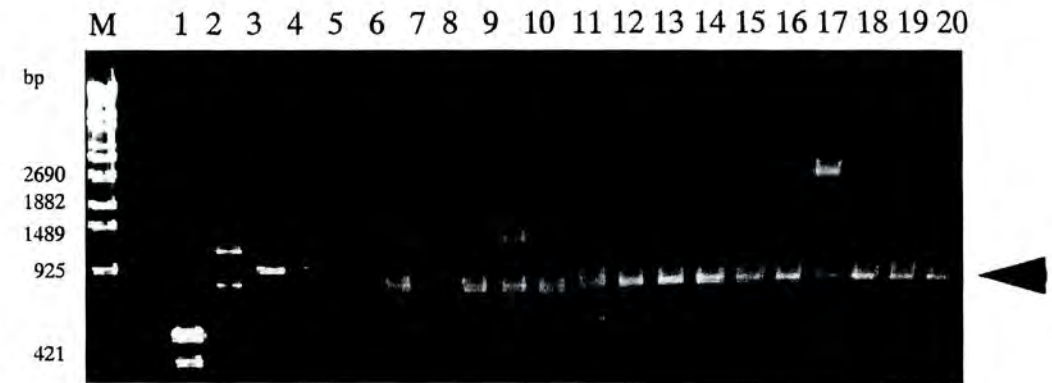
貯蔵穴（pit No.712）から出土した20の子実サンプルの1つ1つについて3プライマーCMN-A10、-B01および-B09によるPCR増幅を行った。その結果を図5に示す。上述のとおりプライマーCMN-A10では800bp付近、-B01では400bp付近および1 kbp付近、-B09では800bp付近（図5の各矢印）のバンドが多型を示し、またこれらの4バンドについてはサザンブロッティング解析により現生のクリとの間に相同性が確認されている。いずれのプライマーにおいてもバンドパターンのばらつきが小さく、遺伝的多様性が小さく、集団が均一な遺伝構成からなる個体で形成されていたことが考えられる。つまりこの集団は自然集団と考えるよりは、何らかの要因により急激に集団のサイズが小さくなる、いわゆる「びん首効果（bottle neck effect）」により遺伝的多様性が小さくなった集団であることが予想される。

（3）現生野生集団のフィンガープリンティング

遺跡周辺に自生する現生の野生のクリ22サンプルのPCR増幅によるDNAフィンガープリントの結果を図6に示す。これらの結果を図5の出土遺体のDNAフィンガープリントのバンドパターンと比較すると、上記の出土遺体集団で注目した4つのバンド（図6の各矢印）は同様に多型を示したが、いずれのプライマーでもバンドの有無のばらつきが大きく、現生野生集団は遺伝的多様性が大きいことが示唆された。人間の手による栽培行為を受けていない野生の集団ではこのようにバンドのばらつきが大きいことが予想される。

（4）遺伝的多様性の評価

出土遺体・現生野生集団それぞれ3プライマーでのPCR増幅によるDNAフィンガープリントのバンドパターンからその遺伝的多様性に明らかな違いがあることが推測できるが、集団の遺伝的多様性を具体的数値で評価するためにNei（1973）による平均遺伝子多様度（average gene



(A)



(B)



(C)

図5 出土クリ子実20サンプル (1~20) のDNAフィンガープリンティング
 (A) プライマーCMN-A10, (B) -B01, (C) -B09によるPCR増幅
 M: 分子量マーカー (λ -EcoT14I digest)

Fig. 5 DNA fingerprint patterns of 20 excavated Chestnut seeds (1~20) amplified with CMN-A10 (A), -B01 (B) and -B09 (C). M: Molecular weight marker (λ -EcoT14I digest)

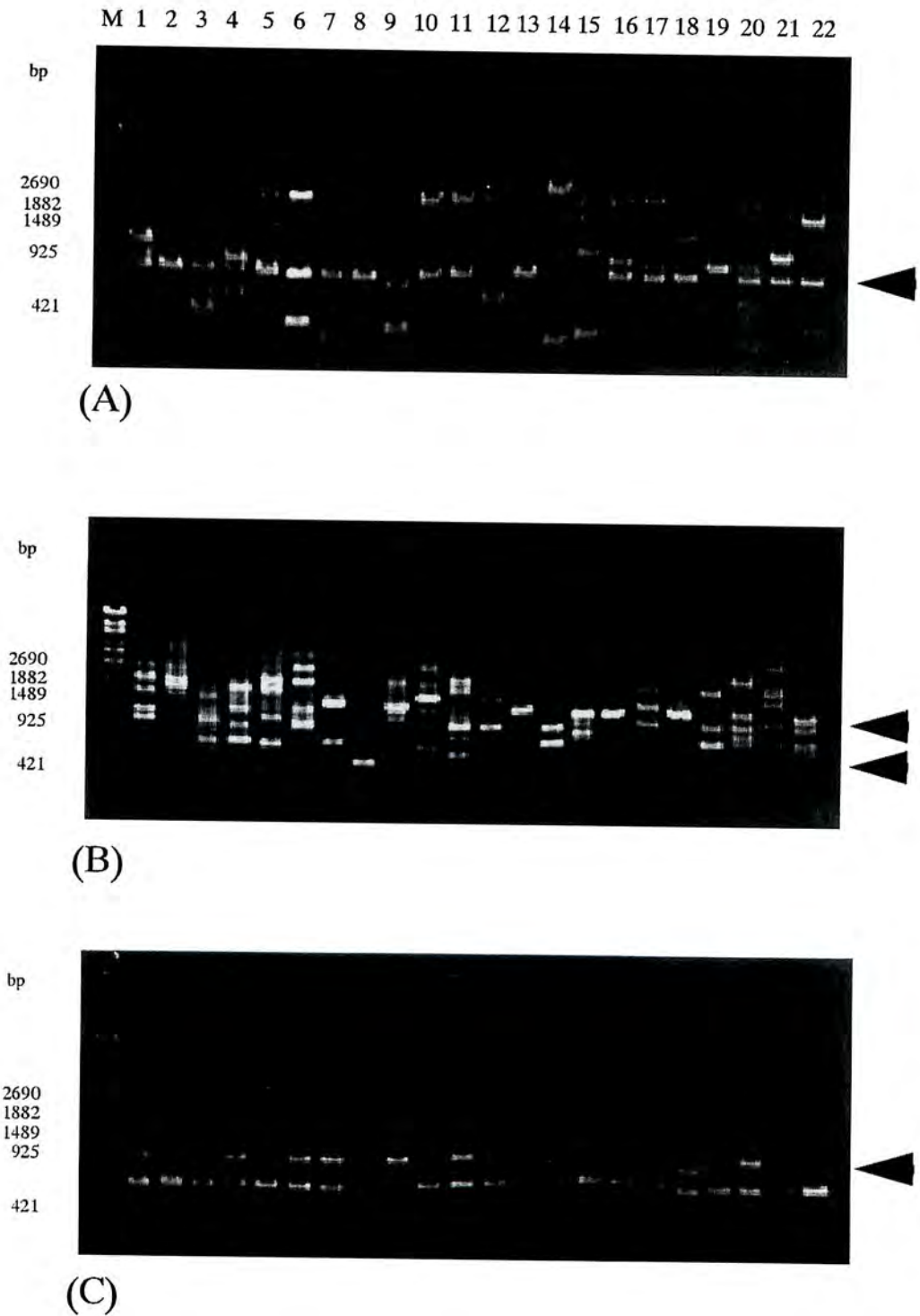


図6 現存野生クリ22サンプル(1~22)のDNAフィンガープリンティング
 (A) プライマーCMN-A10, (B) -B01, (C) -B09によるPCR増幅
 M: 分子量マーカー (λ -EcoT14I digest)

Fig. 6 DNA fingerprint patterns of 22 modern wild Chestnuts (1~22) amplified with CMN-A10 (A), -B01 (B) and -B09 (C). M: Molecular weight marker (λ -EcoT14I digest)

diversity: H) を以下の式により求めた。

$$H = (1/n) \sum_j (1 - \sum_i x_{ij}^2)$$

ここでは x_{ij} は j 遺伝子座における対立遺伝子 i の出現頻度、 n は遺伝子座の数であるが、本研究ではPCR増幅によるDNAフィンガープリントの結果をもとに増幅断片の有無を対立形質 ($i=1, 2$) とみなした。すなわち x_{1j} を j 番目の増幅断片をもつ個体の割合、 x_{2j} を j 番目の増幅断片をもたない個体の割合、 n を多型を示した増幅断片の数と定義した。この場合、理論上 H の値のとり範囲は $0 \leq H \leq 0.5$ となり、複数の集団を比較する場合、相対的にこの値が0.5に近いと遺伝的多様性は大きく、0に近いと遺伝的多様性が小さいことを表す。

ここではPCR増幅により安定して多型が得られ（再現性が認められ）、Negative controlによりArtifactでないことが確認され、さらに出土遺体と現生のクリとの間に相同性が認められた上述の3プライマーによる4増幅断片（図5および6の各矢印で示す断片）の有無に着目して H 値を求めた。

これより求めた出土遺体および現生野生の各集団の H 値はそれぞれ0.236および0.436となった。

(5) 大型堀立柱の解析

供試した3サンプルの大型堀立柱材から抽出したDNAの増幅断片の電気泳動の結果を図7に示す。図中のサンプル番号1, 2および3はそれぞれ供試標本 P_3 , P_4 および P_5 に対応している。上述

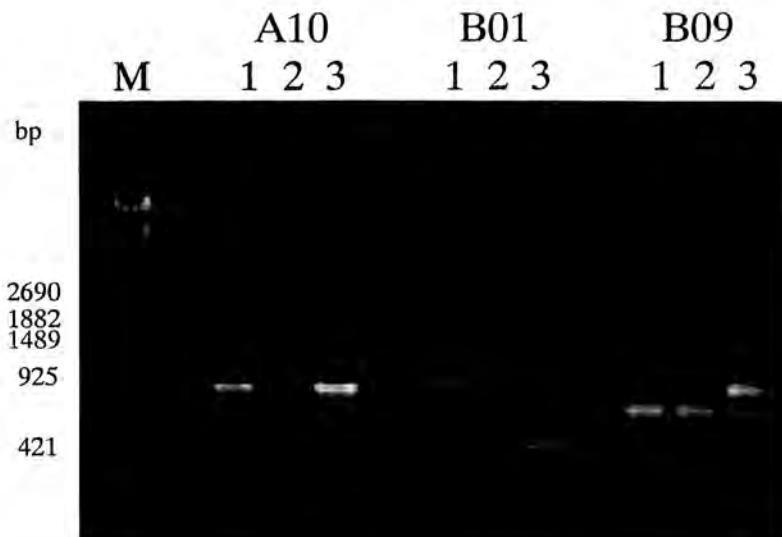


図7 出土木柱3サンプルのプライマーCMN-A10, B01およびB09によるPCR増幅
M: 分子量マーカー (λ -EcoT14I digest)

Fig. 7 PCR products of three excavated Chestnut timbers (pillars) amplified with CMN-A10-B01 and -B09. M; Molecular weight marker (λ -EcoT14I digest)

のサザンブロッティングによりクリ由来であると確認された3プライマーによる4増幅断片に注目すると、プライマーCMN-A10では個体1および3に約800bp付近に増幅断片が認められるが、個体2には認められなかった。プライマー-B01では個体2および3に約1kbpの増幅断片が認められるが個体1はこの位置には見られず若干短い断片が認められた。約400bpの断片についてはすべての個体に共通して確認できた。プライマー-B09では個体3のみに約800bpの断片が確認された。このようにどの個体もいずれかのプライマーで他の2個体とは異なる増幅パターンを示している。もしこれらの3サンプルが同一個体であればどのプライマーを用いた場合でもDNAの増幅断片は3サンプルとも同じパターンを示すと考えられることから、この結果より3本とも異なる個体であることがわかった。

4. 考察

(1) 植物遺体の遺伝情報解析の可能性

遺跡等から出土する生物遺体の研究は従来は主に形態の解析を中心に行われてきた。土中での保存状態の良好なものは形態からも種レベルの判別が可能であるが、このようなものはまれであり属レベルでの分類にとどまったケースが多い。植物に関しては種子や花粉やプラントオパールなどの長期間比較的安定して残存する組織の分析が主流を占めており、その形態や量から過去の植生を推測することができる (Crawford 1983, 南木1994, D'Andrea et al. 1995, 岡田・伊藤1995)。いずれにせよその当時にその植物が存在していたことの証明は可能であるが、栽培の有無を議論する上では状況証拠の域を越えていない。

1980年代になって分子生物学的技術の発達により生物遺体からのDNA抽出が可能になり、出土遺物の遺伝情報の解析が精力的に行われるようになった。特にヒトでは初期から数多くの事例が報告されているが、このことは現生のDNA解析がヒトを中心に動物ではかなり進んでいたため、比較対照となりうるバックグラウンドデータが豊富なことによると思われる。出土植物遺体についてもDNA抽出・解析の事例がいくつか報告されているが (Rogers and Bendich 1985, Rollo 1985, Rollo et al. 1987, Nakamura and Sato 1989, 1991, Golenberg et al. 1990, Soltis et al. 1992, Goloubinoff et al. 1993, Allaby et al. 1994), 植物ではイネやシロイヌナズナのように研究が進んでいる植物を除くと現生植物のDNAのデータは乏しく、クリに関しても直接的に野生・栽培を判別しうるようなDNAデータは報告されていない。このようなバックグラウンドのない植物の栽培化の程度を遺伝学的に判断する基準の1つとして、本研究では集団遺伝学の知見をもとに出土遺体および現生野生の集団の遺伝的多様性を検討した。栽培化の過程は連続的であるために、野生と栽培の間に明確な境界線を引くことは不可能である。また、遺伝学的・進化的にもさまざまな性質の連続的な変化を伴うために、ある特定の遺伝子またはDNA領域から野生・栽培を絶対的に区別することは現時点では困難である。そこで野生・栽培両集団の遺伝的多様性の相違に

着目することにした。

系統間の分子レベルでの変異の大部分は適応的に有利でも不利でもない、いわゆる中立な変異であると考えられる (Kimura 1968)。こうした適応的に中立な変異の多様性は、野生集団内では大きく、人為的な選択を受けた栽培集団内では小さくなると考えられる。この性質を利用することにより、様々な植物の栽培化の過程や程度を推察することが可能になると考えられる。

(2) 出土クリ遺体からのDNA抽出および増幅

古代遺跡から出土した動植物遺体のDNA解析で、最大の問題になるのがDNA抽出・PCR増幅におけるDNAの質および量である。PCR増幅ではごく微量のDNAが大量に増幅されるので、目的としないわずかな他のDNAのコンタミネーションが誤った解析結果をもたらすことになる (Kwok and Higuchi 1989)。今回供試したクリ遺体は超音波洗浄機で土壌等の付着物を可能な範囲で除去し、実際に解析するまで70%エタノール中で冷蔵保存して微生物等の繁殖を抑える措置をとった。しかし上述の方法だけでは、DNA抽出時のコンタミネーションを完全に防ぐことは困難であると考えられ、PCR増幅による増幅産物がクリ遺体のDNAに由来するものであることを確認する必要があった。

遺体からのDNA抽出効率は現生のものと比べると著しく低くなり (Rogers and Bendich 1985, Nakamura and Sato 1989; 1991)、また出土するまでの遺体の保存条件によっては抽出そのものが不可能なことがまれではない。そのため現生の植物体のDNA抽出に用いている通常のアリカリ-SDS法に改良を加えた。こうした改良にもかかわらず、抽出DNAを電気泳動で確認することはできなかった。またPCR一次産物を鋳型とし、再度PCR増幅を行った二次産物から増幅バンドが確認できたことも上の推定を裏付けている。こうしたことは遺体に含まれる増幅可能なDNAがいかに少量であるかを示している。1回目のPCR増幅で増幅産物が認められなかった原因として、出土するまでの間の遺体の炭化や温度・湿度等の物理的条件の変化によって生じるDNA鎖の切断、塩基の脱落・付加、酸化等による塩基の化学修飾などの分子レベルでの損傷が考えられ、これらが反応の障害となって増幅効率を低下させたと思われる。またこれらのDNA損傷により増幅が完全に不可能であったり、人工的な増幅産物 (Artifact) がつくられるなどPCRの結果に大きく影響することが報告されている (Pääbo and Wilson 1988, Pääbo et al. 1990)。今回供試したクリ遺体は低湿地の泥炭層から出土しているために、空気による酸化や好気性細菌による分解のダメージは小さかったと考えられる。また黒色化していたものの、一瞥してクリであると判断できる程度に原型をとどめていたものが多かったこと (青森県教育委員会) など比較的保存状態が良好であったことが考えられる。

抽出DNAのPCR二次産物は現生のクリのプロープとの相同性が認められ、少なくとも今回注目した多型を示す増幅断片に関してはクリに由来するDNAである可能性が確認できた。また滅菌

蒸留水をテンプレートに用いたNegative controlのPCR増幅では増幅断片が全く認められなかったことから目的の断片がプライマーダイマーなどのArtifactでないことも判断できた。このように抽出DNAの質に関しては今回の手法が有効であることが明らかになった。抽出DNAそのものを電気泳動で確認できず、2度のPCR増幅の後でないDNA抽出の成否が確認できない点など収量に関してはさらに改善の余地があると思われる。

(3) 大型堀立柱の個体識別

三内丸山遺跡の縄文中期(5,000B.P.)の集落跡から発見された6本の建造物の木柱(大型堀立柱)は、直径1mという大きさ、4.2m間隔で整然と並んでいたこと立てる際に垂直よりわずかに内側に倒されていたこと、柱の表面を焦がして腐食防止を図っていたことなど、高度な技術が用いられていた点が注目されている。これらの木柱については6本すべてがクリ材であることが木片の細胞の形態による樹種同定で示唆されている(青森県教育委員会1996)。

また、柱穴の底面の土壌に加えられていた圧力を土木工学的に解析した結果より、これらの木柱は高さ10m前後はあったと推定されている(安田1995)。しかしこの6本の柱が同一個体を分割したものか、すべてが異なる個体に由来するのかの結論は出ていない。

選抜3プライマーによるPCR増幅の結果、3サンプルともいずれかのプライマーで異なるフィンガープリントが得られ、同一個体ではなくすべて異なる個体に由来することが明らかになった。サンプル数が少なく、集団として遺伝的多様性を求めることができないため、野生・栽培に関しては言及できないが、これらの個体は直径1m、樹高10mに達することができるような好環境にあったことが推測できる。

クリが生育するのに都合のよかった環境が、全く自然の状態であったのか何らかの人間の手が加わった攪乱環境であったのかは当時の植生や生態系を復元するうえでも重要な問題であり、以下に述べる出土クリ子実の遺伝的多様性からこの問題を検討する。

(4) 縄文時代におけるクリ栽培の可能性

人間による植物の利用行為のうち、単なる採集から特定のものの選抜・増殖への変化、すなわち栽培に注目した場合、その起源がいつであるのかに関しては古くから様々な分野で議論がなされてきた問題である。一般的には日本における本格的な栽培の始まりは弥生時代の水田稲作からであるというのが通説であり、縄文時代は「狩猟と採集の時代」と位置づけられてきた。

植物が利用されていた痕跡を残すと思われる古代遺跡は国内でも多数発見されているが(鳥浜貝塚、粟津湖底遺跡、池上遺跡、菜畑遺跡、登呂遺跡など)、今回調査した三内丸山遺跡からも大量の植物遺体が発見されている。なかでもクリ子実は極めて保存状態がよく、当時のクリの植生がナラ・ハンノキの森林を焼き払った後に人工的につくられた二次林であると推定されていることや、

建造物がほとんどクリ材で構成されていたことからクリの積極的な利用が明らかになっている(安田1995)。そこでクリ遺体の集団の遺伝的多様性をもとに栽培行為の有無を検討した。

出土遺体の平均遺伝子多様度 $H=0.236$ は現生の野生集団の $H=0.436$ に比べて著しく小さく、樹木の自然集団とは考えにくい。遺伝的多様性が小さくなる要因としては環境の変化による自然淘汰と人為的な選択の2つが考えられる。この年代の土壌の花粉分析により自然状態では考えられない程の多量のクリ花粉が発見されていることから(安田1995)、気候変動や病害虫等の環境要因により集団のサイズが急激に小さくなったことに起因する遺伝的多様性の減少とは考えにくい。また、生態学的にも自然の状態でクリが優占種となるような林は認められず、大量の花粉が検出されるほど大きな自然集団をつくることはない。

また、今回は1つの貯蔵穴から出土したサンプルを用いたことから、すべて同じ一本の野生の個体に結実したものを供試したのではないかという可能性も考えられたが、クリは部分自殖性(自家結実率20%以下)で実用上は他殖性とされており、もし同一個体に結実したものであっても自然条件下(野生の状態)で遺伝的に均一になるとは考えにくい。このことから遺伝的に均一な状態になるということは、人間がある特定の個体、系統を選抜し増殖することを繰り返した結果であると考えられる。

本報告は出土植物遺体のDNA解析手法の確立およびその応用により、今回のクリのケースのように現生植物のバックグラウンドデータに乏しい出土遺物の遺伝情報から栽培植物化の有無を検討し、栽培行為や農耕の実証の一助とするという初めての試みのあらましを記したものである。今回の結果から、縄文時代の三内丸山遺跡でクリ栽培が行われた可能性が高くなったわけであるが、特定の1集団の解析だけでは遺跡全体の栽培行為を議論することはできないために可能性の域を越えていないことも事実である。経時的な遺伝的多様性の変化から栽培化の過程を明らかにする上でもサンプル数を増やし、異なる年代・出土サイトではどうであったのかを検討することは必要不可欠である(Yamanaka et al. in preparation)。さらに幅広い研究分野の成果と統合することで、総合的に当時の農業生態系を復元できると考えられる。

(1999. 5. 14 受理)

引用文献

- 青森県教育委員会(1996)「三内丸山遺跡Ⅵ」青森県埋蔵文化財調査報告書 第205集 pp. 108
- 宇田津徹朗・王才林・柳沢一男・佐々木章・鄒江石・湯陵華・藤原宏志(1994)中国草鞋山遺跡における古代水田址調査(第1報)遺跡周辺部における水田址探査. 考古学と自然科学 30: 23-36
- 王才林・宇田津徹朗・藤原宏志・佐々木章・湯陵華(1994)中国草鞋山遺跡における古代水田址調査(第2報)遺跡土壌におけるプラントオパール分析. 考古学と自然科学 30: 37-52
- 岡田康博・伊藤由美子(1995)円筒土器文化の植物利用, 三内丸山遺跡の事例. 考古学ジャーナル

- 佐藤洋一郎・藤原宏志・宇田津徹朗 (1990) イネの *indica* および *japonica* の機動細胞にみられるケイ酸体の形状および密度の差異. 育種学雑誌 40 : 495-504
- 佐藤洋一郎 (1996) 縄文人はクリを栽培していた. 日経サイエンス 26 (6) : 16-17
- 佐藤洋一郎 (1997) 「埋蔵遺伝資源」の情報化と情報処理. ESTRELA 38: 8-13
- 佐藤洋一郎 (1998a) DNA から栽培と農耕の歴史を探る. 遺伝 52 (6) : 29-33
- 佐藤洋一郎 (1998b) DNA 考古学事始. DNA 多型 6 : 1-4
- 中村郁郎 (1995) DNA フィンガープリント法. 「植物遺伝育種学実験法」(谷坂隆俊・編) 朝倉書店 p. 113-117
- 中村純 (1967) 「花粉分析」古今書院 pp. 232
- 中村純編 (1977) 稲作の起源と伝播に関する花粉分析学的研究 文部省科学研究費特定研究「古文化財」中間報告 pp. 68
- 南木陸彦 (1994) 縄文時代以降のクリ (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) 果実の大型化. 植生史研究 2 : 3-10
- 安田喜憲 (1995) クリ林が支えた高度な文化. 「縄文文明の発見」(梅原猛・安田喜憲編) PHP 研究所 p. 118-153
- Allaby, R.G., M.K. Jones and T.A. Brown (1994) DNA in wheat grains from the Iron Age hillfort at Danebury, England. *Antiquity* 68 : 126-132
- Crawford, G.W. (1983) Paleoethnobotany of the Kameda Peninsula Jomon. Museum of Anthropology, University of Michigan. *Anthropological Papers* 73 : pp. 200
- D' Andrea, A.C., G.W. Crawford, M. Yoshizaki and T. Kudo (1995) Late Jomon cultigens in northeastern Japan. *Antiquity* 69 : 146-152
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks (1983) A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rept.* 1 : 19-21
- Golenberg, E.M., D.E. Giannasi, M.T. Clegg, C.J. Smiley, M. Durbin, D. Henderson and G. Zurawski (1990) Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species. *Nature* 344 : 656-658
- Goloubinoff, P., S. Pääbo and A.C. Wilson (1993) Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *Adh2* gene segment from archaeological specimens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 1997-2001
- Kimura, M. (1968) Evolutionary Rate at the Molecular Level. *Nature* 217 : 624-626
- Kwok, S. and R. Higuchi (1989) Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339 : 237-238
- Nakamura, I. (1990) New DNA Fingerprinting Procedure. *Amplified Fragment Length*

- Polymorphism of Hazy Association (ALPHA) . Annu. Rep. Natl. Inst. Genet. 41 : 105-106
- Nakamura, I. and Y.I.Sato (1989) Extraction and Amplification of a Chloroplast DNA Fragment from a Single Ancient Rice Seed. Annu. Rep. Natl. Inst. Genet. 40 : 114-115
- Nakamura, I. and Y.I. Sato (1991) Amplification of DNA fragments Isolated from a Single Seed of Ancient Rice (AD 800) by Polymerase Chain Reaction. Chinese J. Rice Sci. 5 : 175-179
- Nei, M. (1973) Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 : 3321-3323
- Pääbo, S. and A.C. Wilson (1988) Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. Nature 334 : 387-388
- Pääbo, S., D.M. Irwin and A.C. Wilson (1990) DNA damage Promotes Jumping between Templates during Enzymatic Amplification. J. Biol. Chem. 265 : 4718-4721
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol. Biol. 5 : 69-76
- Rollo, F. (1985) Characterisation by molecular hybridization of RNA fragments isolated from ancient (1400 B.C.) seeds. Theor. Appl. Genet. 71 : 330-333
- Rollo, F., A.L. Marca and A. Amici (1987) Nucleic acids in mummified plant seeds: screening of twelve specimens by gel-electrophoresis, molecular hybridization and DNA cloning. Theor. Appl. Genet. 73 : 501-505
- Soltis, P.S., D.E. Soltis and C.J. Smiley (1992) An *rbcL* sequence from a Miocene Taxodium (bald cypress) . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 449-451
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 : 503-517

Evidence for Ancient Plant Domestication Based on DNA Analysis of Plant Remains — Chestnut Domestication in Sannai-Maruyama sites —

Shinsuke YAMANAKA ^{1,2)}, Yasuhiro OKADA ³⁾,
Ikuo NAKAMURA ⁴⁾ and Yo-Ichiro SATO ²⁾

- 1) The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University
(Shizuoka University), Ohya 836, Shizuoka 422-8529, Japan
- 2) Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Ohya 836, Shizuoka 422-8529, Japan
- 3) Educational Board, Aomori Prefecture, Shin-machi 2-3-1, Aomori 030-8540, Japan
- 4) The Graduate School of Science and Technology, Chiba University,
Matsudo 648, Matsudo 271-0092, Japan

This paper reports a successful extraction and an amplification of the ancient DNA from seeds and timbers of Chestnut (*Castanea crenata*) excavated at the neolithic archaeological sites, Sannai-Maruyama, in northeastern Japan (dated 5,500 ~ 4,000 years B.P. by ¹⁴C). Molecular genetic analyses using the polymerase chain reaction (PCR) and Southern blotting indicated that the genetic diversity among the excavated charred seeds was significantly lower than that of the modern wild population. Low diversity of the ancient population was likely a result of artificial selection under domestication rather than gathered from wild stand. This is the first evidence for the prehistoric domestication of plants based on molecular genetics of the plant remains.