

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：62611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00529

研究課題名(和文) 氷河掘削試料中の花粉DNA解読とその遺伝情報を用いた中央アジア半乾燥域の環境復元

研究課題名(英文) DNA analysis of ancient pollen in an ice core and reconstruction of past environments in a semi-arid region of Central Asia

研究代表者

中澤 文男 (Nakazawa, Fumio)

国立極地研究所・研究教育系・助教

研究者番号：80432178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ロシア・アルタイ山脈にあるベルーハ氷河にて、2003年夏に採取したアイスコアを用いて、それに含まれる古代花粉1粒ずつを、全ゲノム増幅法を用いて、花粉種の同定を試みた。本研究では、約470年前のトウヒ属とモミ属、約4870年前のモミ属の化石花粉についてDNAの解読に成功した。さらにトウヒ属については種レベルの同定を試みた。トウヒ属は世界に約35種の存在が知られている。本研究では、候補を5種まで絞ることができた。その1つに、現在も氷河周辺に分布するシベリアトウヒが含まれていた。このことから、約470年前においても、氷河周辺にはシベリアトウヒが分布していたと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得た成果の学術的意義は、アイスコアに含まれる古代花粉のDNA分析をおこない、その遺伝情報の解読に成功したことにより、過去の生物集団の遺伝的情報を直接得る道を切り開いた点にある。また、アイスコア試料の特性から、過去に遡って経時的に再構築できる点も意義は大きい。

アイスコアに含まれる古代花粉だけでなく古代微生物までも対象とし、研究を発展させれば、その成果をモデルケースとして、今後の気候変動が生物多様性に与える影響を考えるヒントとなる。また、生物保全への対応を探る基礎的な情報を提供することもできるだろう。

研究成果の概要(英文)：This study attempted to identify ancient pollen by whole genome amplification method one by one. The ancient pollen grains used in this study were extracted from an ice core obtained from the Belukha glacier, Russian Altai Mountains, in the summer of 2003.

We succeeded in reading DNA in Abies and Picea pollen grains at around 470 years old and an Abies pollen at around 4870 years old. Subsequently, we attempted to identify Picea pollen grains at species level. Picea includes approximately 35 recognized species. Five species, including Picea obovata, were thought as a possible candidate for the Picea pollen. The tree species Picea obovata is currently found at the periphery of the glacier. Therefore, Picea obovate likely have been distributing around the glacier in at least the past 470 years.

研究分野：雪氷学

キーワード：氷河 花粉 DNA アイスコア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

花粉分析は約 100 年の歴史を持ち、植生変遷・古気候・古環境の復元研究において極めて多くの成果を挙げてきた。従来の花粉分析では、花粉の識別は形態観察にもとづいてなされており、その同定は一般に属あるいは科レベルが限界であり、種レベルで識別するためには花粉の遺伝情報を調べる必要があった。堆積物中の花粉の DNA 分析は、1996 年に初めて成功例が報告されたものの、その後の成果は今日まで極めて限られており (Suyama et al., 1996; Parducci et al., 2005; Paffetti et al., 2007) 研究の進展が遅れている。先行研究では湖沼堆積物や泥炭堆積物中の花粉が使用されてきたのだが、DNA の劣化・分解が進んでおり、成功率が極めて低い(0~数パーセント)という問題を抱えていた。

このような背景のもと、研究代表者らは先行研究とはタイプの異なる、氷河に封じ込められた花粉に着目し、研究を進めてきた (Nakazawa et al., 2013)。そして、大量の遺伝情報が取得できる全ゲノム増幅技術を導入し、約 100 年前の花粉を種レベルで同定することに成功した。また、DNA 分析の成功率は数 10 パーセントに達し、先行研究を大きく凌いだ (Nakazawa et al., 2018)。

2007 年に中央アジアキルギス天山山脈グリゴレア氷河にて、過去 13,000 年間に渡るアイスコアが掘削された。中央アジアの過去の植生や気候・環境は、これまでの研究は非常に限られており (e.g. Huang et al., 2015) 情報が乏しい地域であった。本研究課題では、これまで培った化石花粉の DNA 分析技術を用いて、古代花粉の種を同定し、中央アジア半乾燥域の過去の植生、ならびに関連する気候・環境の復元を目指した。

<参考文献>

Huang, X.Z. et al. (2015), Vegetation and climate history reconstructed from an alpine lake in central Tianshan Mountains since 8.5 ka BP, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 432, 36–48.

Nakazawa, F., J. Uetake, Y. Suyama, R. Kaneko, N. Takeuchi, K. Fujita, H. Motoyama, S. Imura, and H. Kanda (2013), DNA analysis for section identification of individual *Pinus* pollen grains from Belukha glacier, Altai Mountains, Russia, *Environ. Res. Lett.*, 8, 014032, doi:10.1088/1748-9326/8/1/014032.

Nakazawa, F., Y. Suyama, S. Imura, and H. Motoyama (2018), Species identification of *Pinus* pollen found in Belukha glacier, Russian Altai Mountains, using a whole-genome amplification method, *Forests*, 9(8), 444, doi:10.3390/f9080444.

Paffetti D, et al. (2007), Unexpected presence of *Fagus orientalis* complex in Italy as inferred from 45,000-year-old DNA pollen samples from Venice lagoon. *BMC Evol. Biol.*, 7(Suppl 2):S6, doi:10.1186/1471-2148-7-S2-S6.

Parducci L., Y., Suyama, M. Lascoux, K.D. Bennett (2005), Ancient DNA from pollen: a genetic record of plant population history, *Mol. Ecol.*, 14, 2873-288, doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02644.x.

Suyama, Y., K. Kawamuro, I. Kinoshita, K. Yoshimura, Y. Tsumura, and H. Takahara (1996), DNA sequence from a fossil pollen of *Abies* spp. from Pleistocene peat, *Genes & Genetic Systems*, 71(3), 145-149, doi: 10.1266/ggs.71.145.

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 中央アジアの山岳氷河に封じ込められた、極めて保存状態の良好な化石花粉を材料として、過去 13,000 年間に渡る化石花粉の DNA 分析を、高時間分解能・連続で実施すること、2) 分析により取得される遺伝情報から化石花粉の種を同定し、3) 過去の植生や気候・環境の復元を試みることにある。

3. 研究の方法

本研究では、アイスコアに含まれる化石花粉を DNA 分析するために、1) 既に確立している全ゲノム増幅技術を用いた方法について、古代 DNA 分析用に反応条件等の最適化をおこない、次に解読塩基配列データの解析により、2) 花粉粒の種同定、3) 種の変遷を経時的に解明、4) アイスコアの物理・化学的解析による気候・環境情報と組み合わせ、植生変遷と気候変動等の関係解析を行うこととした。

4. 研究成果

初年度 (2016 年度) は、キルギス天山山脈グリゴレア氷河で掘削されたアイスコア試料について、放射性炭素年代測定によって氷の年代が推定されている 4 つの深度 (年代は、5235 ~ 7180 ¹⁴C BP) で花粉濃度を調べた。その結果、10mL あたり数粒 ~ 数十粒と、当初の見積もりより少な

いことが分かった。また、見つかった花粉種はトウヒ属のものが多かった。一方、化石花粉 1 粒子ずつの DNA 分析については、ロシア・アルタイ山脈ペルー八氷河で採取されたアイスコアを利用して、実験条件を検討した。そして、数百年前の化石花粉についても、既存の花粉 1 粒子ずつの全ゲノム増幅法を、反応条件を僅かに変更することで適用できることがわかった。

2016 年度の結果から、必要な花粉粒を抽出するためには、当初計画していたよりも多量のアイスコア融解水試料が必要なことがわかった。直径の大きなフィルターで多量の試料をろ過すれば都合が良いと考え、実際行ってみたが、フィルター上に捕集された花粉を顕微鏡観察から見つけ出し、1 粒子ずつ補足するには効率が悪かった。また、直径 13 mm のフィルターに再度ろ過する方法も検討したが、夾雑物であるダスト等の微粒子が多いため、ろ過速度の低下や、顕微鏡観察が困難になる問題が生じた。

そこで 2017 年度は、雪氷試料から花粉粒を効率良く回収するために、誘電泳動 (Dielectrophoresis: DEP) 法を利用した花粉粒補足システムの検討を開始した。本研究で検討した DEP 法は、細胞・微生物固有の電気特性を利用して、液体中にある細胞や細菌のみを微小電極上に補足し、ダストのような夾雑物と分離することが可能となる。ロシアの山岳氷河で採取された氷の融解試料 1 mL を使用して DEP 法の予備実験を行ったところ、粒径 20 ~ 50 μm 程度の花粉を捕集できることを確認した。

2018 年度は、DEP 装置を導入し、アイスコア融解水試料の処理方法を検討した。直径 25 mm のフィルターをもちいて、花粉を含むアイスコア融解水試料をろ過する。次にろ過済みのフィルターを 50 mL の遠沈管にセットし、約 10 mL の超純水を注ぎ、フィルター上の花粉を一旦はく離させる。そして DEP 法を利用したシステムにはく離された花粉が含まれる水を導入し、花粉を補足することができた。しかしながら、多数の試料をルーチンで処理するところまでは行かなかった。

そこで本研究を 1 年間延長し、また試料中の花粉がグリゴレア氷河よりも多く含まれていることが分かっている、ロシア・アルタイ山脈 (中央ユーラシアに位置する) ペルー八氷河で採取されたアイスコア試料に切り替えて研究を進めた。約 470 年前のトウヒ属とモミ属、約 4870 年前のモミ属の化石花粉について、マツ属の種同定用に開発されたプライマーを用いて DNA の解読に成功した。次に詳細な種同定を目指して、種特異性の高いプライマーの開発を進めた。トウヒ属は世界に約 35 種の存在が知られている。葉緑体 DNA 上の 18 領域でプライマーを開発し、14 領域から塩基配列データを取得した。この組み合わせの結果、5 種まで候補を絞ることができた。その 1 つに、現在も氷河周辺に分布するシベリアトウヒが含まれていた。このことから、約 470 年前においても、氷河周辺にはシベリアトウヒが分布していたと考えられた。また、モミ属については、プライマーの開発まで至らなかった。

本研究では、約 4870 年前の化石花粉から DNA 情報を取得することに成功したことが大きな成果の 1 つといえる。また、モミ属の種同定に特化したプライマーも開発した。さらに、アイスコアから花粉粒を効率良く回収するために、誘電泳動 (Dielectrophoresis: DEP) 法を利用した処理方法についても検討し、ルーチン化に向けた道筋を示すことができた。今後、他の氷河から取得される化石花粉 1 粒子ずつの DNA 研究においても、本研究で開発したプライマーや分析方法が広く適用できることも大きな成果と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakazawa Fumio, Suyama Yoshihisa, Imura Satoshi, Motoyama Hideaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Species Identification of Pinus Pollen Found in Belukha Glacier, Russian Altai Mountains, Using a Whole-Genome Amplification Method	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Forests	6. 最初と最後の頁 444 ~ 444
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/f9080444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakazawa, F., Y. Suyama, S. Imura, H. Motoyama, N. Takeuchi, K. Fujita, J. Uetake
2. 発表標題 DNA analysis of 470-year-old Pinus pollen grains preserved in a Russian glacier
3. 学会等名 The Seventh Symposium on Polar Science（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中澤文男, 陶山佳久, 伊村智, 本山秀明, 竹内望, 藤田耕史, 植竹淳
2. 発表標題 ペルー八氷河に含まれていた470年前のマツ属花粉のDNA分析
3. 学会等名 雪氷研究大会（2016・名古屋）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中澤文男, 陶山佳久, 伊村智, 本山秀明
2. 発表標題 アイスコアに含まれる花粉を利用した植物種の古代ゲノム解析の可能性
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2016年大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://researchmap.jp/f_nakazawa/
http://researchmap.jp/f_nakazawa/?lang=japanese

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	竹内 望 (Takeuchi Nozomu) (30353452)	千葉大学・理学部地球科学科・教授 (12501)	
連携研究者	藤木 利之 (Fujiki Toshiyuki) (10377997)	岡山理科大学・理学部基礎理学科・准教授 (35302)	