

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658046

研究課題名（和文） 樹木の花粉化石DNA情報を利用した森林分布変遷史の解析

研究課題名（英文） Analysis of distribution history of forest trees based on DNA sequences from pollen grains in sediment samples

研究代表者

陶山 佳久（SUYAMA YOSHIHISA）

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：60282315

研究成果の概要（和文）：湖底堆積物や山岳氷河に含まれる古代花粉試料のDNA分析により、花粉試料の種識別や種内系統に関する情報を取得する研究を行った。湖底堆積花粉のDNA分析では、スカンジナビア半島の北方針葉樹が最終氷期から生き残っていたことを明らかにした。また、花粉分析法と堆積物DNA分析による古植生解析の比較を行った。山岳氷河から得られた花粉のDNA分析では、形態からは同定できない節レベルの識別に成功した。これらの成果は、堆積花粉のDNA分析による過去の植物の遺伝情報取得法として新たな提案となる。

研究成果の概要（英文）：We developed a method for DNA analysis of ancient pollen from lake sediments and glaciers to retrieve genetic information for past spatial dynamics of intra- and/or inter-specific lineage. We reported genetic analysis of fossil pollen collected from lake sediment in central Norway and showed that conifer trees survived in ice-free refugia of Scandinavia during the last glaciation. And we compared DNA- and pollen-based vegetation analysis of the lake sediment samples. We also reported DNA analysis of *Pinus* pollen grains collected from Belukha glacier in Russia and identified them at the section level in the genus. These results have major implications for plant phylogeography by allowing direct analysis of past genetic information in ancient pollen.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	570,000	3,570,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：古代DNA・分子系統地理・花粉分析・針葉樹・湖底堆積物・山岳氷河

1. 研究開始当初の背景

近年のDNA分析技術の発展はめざましく、古代DNAの分析については主に動物を材料とした分野で発展してきた。しかし植物化石

DNAの分析については、材料の制約や技術的な困難性等により、新知見が次々得られるような段階には至っていない。本研究代表者らは、1996年に世界で初めて花粉化石のDNA分

析に成功し (Suyama et al. 1996)、その後さらに共同研究者とともに2例目の成果を発表した (Parducci et al. 2005)。この技術を利用して、近年ではようやく同様の研究が他にも発表されるようになったが (Paffetti et al. 2007)、未だにその成果が極めて限られており、萌芽的段階にある分野と言える。この理由として、現状では花粉化石 DNA 分析の成功率が極めて低いところに大きな問題があり、その手法に関しても十分に完成しているとはいえず、さらなる技術開発が必要な段階にある。一方、花粉化石の DNA 分析研究に対する関係分野 (特に花粉分析学) からの要求は非常に強く、基礎的技術の確立や成功例の蓄積が熱望されている。

2. 研究の目的

本研究では、花粉化石の DNA 分析によって、過去に分布した樹木の遺伝的情報を直接取得し、樹木個体群の分布変遷史を時空間的に明らかにする研究の基礎技術開発を行うことを目的とした。この手法により、例えば最終氷期におけるレフュージア (避寒地) の位置や、現在の分布が形成された過程が明らかになる可能性があるなど、全く新しい分子系統地理学のアプローチ法として提案できる。

3. 研究の方法

(1) 材料

花粉化石 DNA 分析用として、以下の2つの異なる由来の試料を用いた。

① 湖底堆積物中の花粉

スウェーデンおよびノルウェー中部の湖沼において採取した湖底堆積物から得られたドイツウヒの花粉を用い、スカンジナビア半島における分布変遷史解析に関する研究を行った。

② 山岳氷河の雪氷試料中の花粉

ロシアのアルタイ山脈に位置するベルーハ氷河から採取された雪氷試料中のマツ属花粉を用い、花粉 DNA の分析によるマツ属花粉の種識別を試みた。

(2) 方法

① スカンジナビア半島におけるドイツウヒの分布変遷史の解析

まず、現在ヨーロッパに広く分布しているドイツウヒ (*Picea abies*) を対象種として、ミトコンドリア DNA の種内変異を探索した。また、検出した種内多型 (ハプロタイプ) について、分布域内の地域分布を調べ、スカンジナビアに特有の系統が存在するかどうかを探索した。次に、この地域の湖の堆積物から得られた古代 DNA の分析によって、どのようなハプロタイプのドイツウヒが過去

に分布していたのかを調べた。

② 雪氷試料中のマツ属花粉の種識別

まず、DNA データベースの塩基配列情報により、マツ属の種識別が可能な葉緑体 DNA 上の領域を探索した。次に、ベルーハ氷河から採取された雪氷試料中のマツ属花粉1粒ずつを対象とした DNA 分析によって、上記の探索によって候補とした葉緑体 DNA の短い領域を PCR 増幅し、その塩基配列の解読を行なって種識別を試みた。

③ 花粉分析法と堆積物の DNA 分析による古植生解析結果の比較

①で用いた試料と同じ由来のスカンジナビア中部の湖底堆積物を用い、以下の2つの古植生手法を比較した。すなわち、花粉分析法 (花粉の外部形態によって分類群を識別する分析方法) と、堆積物のメタ・バーコーディング DNA 分析 (堆積物から抽出した DNA を材料として、広い分類群の植物に対応する汎用性のある PCR プライマーを用いて PCR 増幅を行い、その配列によって分類群を推定する方法) による解析結果の比較を行った。

4. 研究成果

(1) スカンジナビア半島におけるドイツウヒの分布変遷史の解析

まず現在ヨーロッパに広く分布しているドイツウヒのミトコンドリア DNA ハプロタイプの地域分布を調べ、スカンジナビアに特有の希な系統が存在することを見いだした。

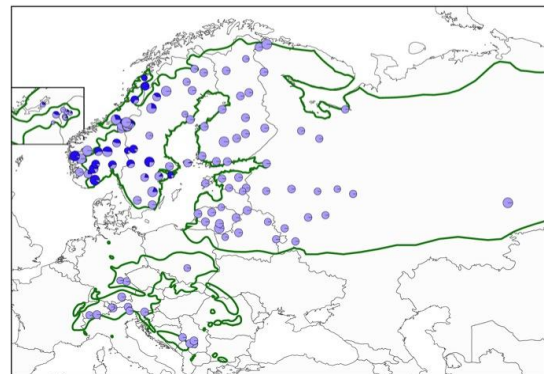


図1 現生のドイツウヒの分布域 (緑線内) におけるミトコンドリア DNA ハプロタイプ (mh05 領域の DNA 塩基配列の違いによって識別することができる2タイプ: 種内系統) の分布。各地域集団において検出された2種類のハプロタイプの割合を円グラフで示した。スカンジナビア半島には他の地域では検出されない固有のタイプ (濃い青色) が分布していることがわかる。(Parducci et al. 2012 の図を改変)

次に、この地域の湖の堆積物から得られた古代花粉および堆積物 DNA の分析によって、

この系統がおおよそ 10,300 年前に存在していたことをつきとめた。さらに、共同研究によって別の湖から得られた古代 DNA および植物遺体の分析によっても、おおよそ 2 万年近く前からマツやトウヒがこの地域に分布していたことを明らかにした。

写真 1：スカンジナビア中部の湖での湖底堆積物（表層泥）の採取。このような堆積物に含まれる針葉樹花粉を取り出して、花粉中の DNA を増幅し、それらの塩基配列を分析した。



これまで、スカンジナビア半島は最終氷期には氷河に覆われており、そこに現在分布している北方針葉樹は当時分布していなかったと考えられていたが、今回の研究の成果は、最終氷期においてスカンジナビア半島に氷河に覆われない“避寒地”があり、北方針葉樹がそこに生き残っていたということを示している。このことは、これまでの氷河時代からの植物の分布に関する常識を覆すものであり、気候変動下における樹木の分布・生残に関して新たな視点を提供するものである。

これらの成果は、Science 誌（2012：主な発表論文の③）に発表した。

(2) 雪氷試料中のマツ属花粉の種識別

ロシアのベルーハ氷河から採取された雪氷試料から得られたマツ属の花粉を用い、花粉 1 粒ずつの DNA 分析による節レベルでの同定を試みた。すなわち、約 150 塩基の葉緑体 DNA 断片を増幅して塩基配列情報を取得し、その配列をデータベースの配列と比較した。その結果、得られた配列はマツ属 *Quinquefoliae* 節の *Gerardiana* 亜節あるいは *Strobos* 亜節であると判定され、少なくとも節レベルでの識別までは可能なことが示された。現在この氷河の周辺には、*Strobos*

亜節であるシベリアマツ (*Pinus sibirica*) が分布するため、氷河に堆積していた分析対象のマツ属花粉は、シベリアマツであると考えられ、DNA 分析によって得られた結果は現在の分布から推定される結果と矛盾しない。

また、この研究では、初めて氷河の雪氷試料に含まれる花粉試料の DNA に注目してその分析を行った。これまでに主に湖沼堆積物中の花粉を対象としてきた古代花粉 DNA の分析に比べて（成功率は 0~3.2%）、本研究での分析成功率は高い値であり（105 粒中 8 粒：成功率は 7.6%）、古代 DNA 分析において、氷河から得られた花粉試料を用いることの有効性が示された。

これらの成果をとりまとめて、学術雑誌 *Environmental Research Letters*（2013：主な発表論文の②）に発表した。

表 1：マツ属内の 4 節における現生サンプルおよび、ベルーハ氷河で採取されたマツ属花粉から得られた葉緑体 DNA 上の *rpoB* 遺伝子内の一部の塩基配列。最上段の数字は、解析した DNA 断片の中で変異が見られた塩基配列の位置を示す。氷河サンプルから得られた花粉の塩基配列（最下段）と一致するものについては黄色で示した。分析に成功した氷河花粉の配列はすべて同一で、それらは *Quinquefoliae* 節の *Strobos* 亜節あるいは *Gerardiana* 亜節の配列と一致した（Nakazawa et al. 2013 の表を一部改変）。

節/亜節	15	18	22	71	72	73	75
<i>Trifoliae</i>							
<i>/Austroales</i>	A	M	C	T	T	G	A
<i>/Ponderosae</i>	A	C	C	T	T	G	A
<i>/Contortae</i>	A	C	C	T	T	G	C
<i>Pinus</i>							
<i>/Pinus</i>	A	C	C	W/-	A/-	A/-	A
<i>/Pinaster</i>	A	C	M	H	A	A	A
<i>Quinquefoliae</i>							
<i>/Strobos</i>	R	A	G	T	A	G	A
<i>/Gerardiana</i>	A	A	G	T	A	G	A
<i>/Krempfianae</i>	-	-	G	T	A	G	A
<i>Parrya</i>							
<i>/Cembroides</i>	G	C	G	T	A	G	A
<i>/Balfourianae</i>	G	C	G	T	A	G	A
<i>/Nelsoniae</i>	G	C	G	T	A	G	A
氷河花粉	A	A	G	T	A	G	A

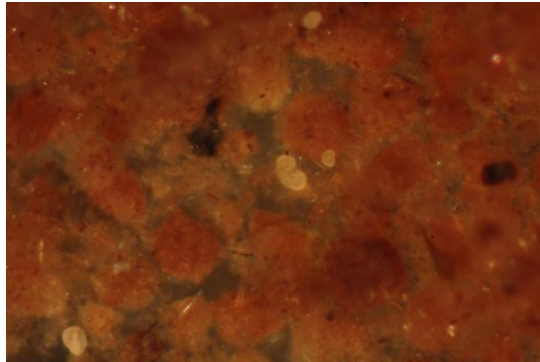
(3) 花粉分析法と堆積物の DNA 分析による古植生解析結果の比較

スカンジナビア中部において採取した湖底堆積物を用い、その花粉分析とメタ・バーコーディング解析による古植生解析結果の比較を行った。その結果、花粉分析では 48 の分類群が検出され、そのうち 79% はメタ・バーコーディング解析では検出されないも

のだった。一方、メタ・バーコーディング解析では14の分類群が検出され、そのうち43%は花粉分析では検出されないものだった。これらのことから、過去の植生の組成を推定する上で、これら2つ手法はそれぞれ代替するものというよりは、補完的なものとして用いられるべきだと考えられた。

これらの成果をとりまとめて学術雑誌 *Molecular Ecology* に投稿し、受理された (2013 印刷中：主な発表論文の①)。

写真 2：分析試料として使用した湖底堆積物に含まれる針葉樹花粉 (写真中央などに見える黄色い粒子)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Laura Parducci, Irina Matetovici, Sonia L. Fontana, K.D. Bennett, Yoshihisa Suyama, 他 5 名 (2013) Molecular and pollen-based vegetation analysis in lake sediments from central Scandinavia. *Molecular Ecology* (in press) (巻数、ページ数未定) 査読有
DOI: 10.1111/mec.12298
- ② Fumio Nakazawa, Jun Uetake, Yoshihisa Suyama, 他 6 名 (2013) DNA analysis for section identification of individual *Pinus* pollen grains from Belukha glacier, Altai Mountains, Russia. *Environmental Research Letters* 8 (1) 014032 (8pp) 査読有
DOI: 10.1088/1748-9326/8/1/014032
- ③ Laura Parducci, Tina Jørgensen, Mari Mette Tollefsrud, 他 21 名中 7 番目に Yoshihisa Suyama (2012) Glacial Survival of Boreal Trees in Northern Scandinavia. *Science* 335 (6072) 1083-1086. 査読有
DOI: 10.1126/science.1216043

[学会発表] (計 13 件)

- ① Fumio Nakazawa: DNA analysis for

identification of a *Pinus* pollen grain at subsection level from the Belukha glacier, Altai Mountains, Russia. 13th International Palynological Congress and 9th International Organisation of Palaeobotany Conference -IPC/IOPC 2012, 2012 年 8 月 30 日, 中央大学 (東京)

- ② 中澤文男: 節レベルでの同定を目的とした氷河中のマツ属花粉 1 粒ずつの DNA 分析. 日本花粉学会第 52 回大会, 2011 年 10 月 9 日, 名城大学 (名古屋)
- ③ 中澤文男: ベルーハ氷河に含まれるマツ属花粉 1 粒ずつの DNA 分析. 日本地球惑星科学連合 2011 年大会, 2011 年 5 月 23 日, 幕張メッセ国際会議場 (千葉)

[図書] (計 4 件)

- ① 陶山佳久: 文一総合出版, 森の分子生態学 2 (第 3 部第 8 章: 花粉 1 粒 DNA 分析法), 2012 年, pp. 389-404
- ② Martin Lascoux・陶山佳久: 文一総合出版, 森の分子生態学 2 (第 2 部第 3 章: 樹木集団の系譜推定), 2012 年, pp. 109-135
- ③ Yoshihisa Suyama: Springer, Single-pollen genotyping (Chapter 2: Procedure for single-pollen genotyping), 2011, pp. 7-15

6. 研究組織

(1) 研究代表者

陶山 佳久 (SUYAMA YOSHIHISA)
東北大学・大学院農学研究所・准教授
研究者番号: 60282315

(2) 連携研究者

中澤 文男 (NAKAZAWA FUMIO)
大学共同利用機関法人情報・システム研究機構 (新領域融合研究センター、DBCLS)・新領域融合研究センター・融合プロジェクト特任研究員
研究者番号: 80432178

(3) 海外研究協力者

Laura Parducci
Uppsala Univ. (Sweden), Evolutionary Biology Centre, Associate Professor
Keith D. Bennet
Queen's University Belfast (UK), School of Geography, Archaeology & Palaeoecology, Professor