

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 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：82657

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710023

研究課題名（和文） 南極に飛来する花粉の起源推定を目的とした花粉 1 粒ずつの DNA 分析

研究課題名（英文） DNA analysis of a single pollen grain to identify the provenance of pollen transported to Antarctica

研究代表者

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・融合プロジェクト特任研究員

研究者番号：80432178

研究成果の概要（和文）：本研究では、南極雪氷に含まれる花粉の起源を推定するために、花粉 1 粒ずつの DNA 分析から種を同定するための手法開発に取り組んだ。開発に際して、ロシアの氷河に含まれていたマツ属花粉を使用した。マツ属花粉は、南極雪氷中で出現頻度が高い（50%以上）花粉である。従来の花粉の同定は、顕微鏡による形態観察によってなされており、マツ属花粉の場合は属レベルまでであったが、本研究により、種の一階級上である亜節レベルでの同定が可能になった。

研究成果の概要（英文）：This study attempted to develop a method to identify the pollen grain at species level by analyzing its DNA in order to define a provenance of the pollen that can be found in Antarctic snow and ice. For the development, *Pinus* pollen grains extracted from a glacier in Russia was analyzed as a preliminary approach. *Pinus* pollen is a major type (>50%) of pollen in Antarctic snow and ice. Modern pollen analysis observes pollen morphology with a microscope, identification of *Pinus* pollen is limited to genus level only. This study allowed us to identify the pollen at subsection level that is one rank higher of species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：雪氷学

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：南極・物質循環・DNA・花粉・氷河・マツ属・ロシア

1. 研究開始当初の背景

南極氷床へ輸送される固体微粒子の起源は、アイスコア（氷床掘削によって得られる氷の円柱状試料）に含まれるダスト（土壌粒子）をトレーサーにもちいて、その成分であるストロンチウム（Sr）とネオジム（Nd）の同位体組成から推定されてきた。但し、ダス

ト量が増加する氷期の試料に限られていた。近年、間氷期（現在も含む）の試料をもちいたダストの Sr・Nd の微量分析も試みられるようになって来ているものの、未だ萌芽的段階にある。さらに、ダストから明らかになる発生源は必然的に乾燥帯になってしまう。

氷床中から見つかる固体微粒子としては

ダストの他に花粉がある。これは乾燥帯を除く地域が発生源の候補となるため、起源推定のトレーサーにもちいた場合、従来のダスト研究を補完・充実できる可能性がある。花粉を起源推定のトレーサーにもちいるとは、具体的には花粉1粒ずつのDNA分析からその種を同定し、その植物種の分布域から起源を推定しようとするものである。しかしながら、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た。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分析の成功率が極めて低い(0~数パーセント)という大きな問題を抱えていた。そこで本研究では、それとはタイプの異なる氷河中の花粉に着目した。氷河・氷床中の花粉は低温下で保存されるため、100年以前の花粉であっても細胞内物質(原形質)を残存している。したがって、南極氷床中の花粉を使用してDNA分析をおこなった場合、高い成功率が期待される。

2. 研究の目的

物質循環の研究において物質の発生源(場所)を特定することは、大気の流れを議論するうえで重要な情報となる。南極氷床へ輸送される物質の起源は、数値実験によって推定された研究報告が近年発表されるようになって来ているものの、室内実験によるものは未だ少ない。本研究の目的は、(1)南極氷床に輸送される現代の花粉を氷床の表層雪から採集し、これを固体微粒子のトレーサーとして起源推定に利用する方法を開発すること。具体的には花粉1粒ずつのDNA分析からその種を同定し、その植物種の分布域から起源を推定する。さらに、(2)南極氷床で広域的に採取した表層雪氷試料を(1)の方法で解析し、氷床へ輸送される固体微粒子の起源を時空間的に明らかにし、数値実験による結果と本研究から明らかになる室内実験の結果との比較から、南極における物質循環の理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

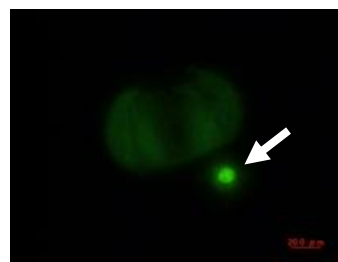
本研究では、ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction: PCR)と呼ばれる酵素反応を利用してDNAを多量に複製し、そのDNA塩基配列を読みとる方法でおこなった。DNAの複製は、葉緑体DNA上の種間変異性の高い領域を対象とした。葉緑体DNAは進化速度が遅いため種同定に適している。また、DNAは時間が経つと劣化したり断片化するため、堆積物中のDNAは生体からの新鮮なDNAと比べPCRがうまく進行しない場合が多々あ

る。この問題を克服するために、反応試薬の選定、反応温度・反応時間を十分検討するとともに、断片化したDNAでも複製できるように、その長さは150塩基対(塩基数が150の意味)以内に留めた。但し、この長さは種の絞込みに必要な遺伝情報の取得に大きな制約となる。すなわち、複数種の候補が残ってしまう場合が想定された。そこで本研究では、多重PCR法と呼ばれる複数箇所のDNA領域を同時にPCRする方法を採用することでこの問題を克服し、得られた複数箇所の遺伝情報をもとに種同定を試みた。

4. 研究成果

本研究ではロシア・アルタイ山脈のペルーハ氷河に含まれていたマツ属花粉をもちいて予備実験を進めてきた。マツ属の下位の階級には、2亜属、4節、17亜節、約111種が存在する。これまでの研究成果として、マルチプレックスPCR法を採用し、亜節レベルでの同定が可能になったことが挙げられる。塩基配列の取得率は暫定的な値であるが約35%に達し、先行研究のそれ(数パーセント以下)を大きく凌ぐ結果が得られている。塩基配列は、氷河周辺に分布するシベリアマツ(*Pinus sibirica*)と考えられる *Quinquifoliae* 節とヨーロッパアカマツ(*Pinus sylvestris*)と思われる *Pinus* 亜節のもの取得された。そのほかに、北アメリカにのみ分布する *Australes* 亜節に同定される配列も検出された。これはマツ属花粉が長距離輸送によってアメリカからアルタイ山脈に飛来した証拠であり、雪試料に含まれる化学物質のデータ等も利用しながら、物質輸送に関する考察を今後進めていく予定である。

また、本手法が古い花粉試料にも適用可能か検討するために、ペルーハ氷河で採取したアイスコアをもちいて、そこに含まれる花粉のDNA残存について調べた。実験には、2003年と1965年の層から抽出したマツ属花粉を使用した。花粉を核酸染色液(SYBR Gold)で染色したところ、双方の花粉とも生殖核が明瞭に観察でき、花粉内にDNAが残存していることが確認された(図1)。また、経年変化に伴う染色の差異は特に見られず、DNAの保存は良好であると考えられた。本実験により、花粉1粒ずつのDNA解析が古い花粉試料にも適用できることが示唆された。



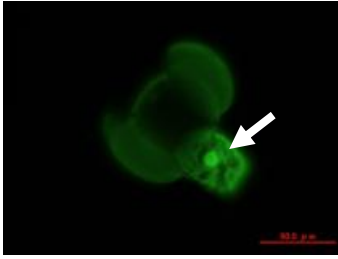


図1 マツ属花粉を核酸染色液で染色した結果。上が2003年、下が1965年の層から抽出したもの。いずれも生殖核(矢印)が明瞭に観察できる。

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1件)

Nakazawa F., T. Miyake, K. Fujita, N. Takeuchi, J. Uetake, T. Fujiki, V. Aizen and M. Nakawo, Establishing the timing of chemical deposition events on Belukha glacier, Altai Mountains, Russia, using pollen analysis, Arctic, Antarctic, and Alpine Research, 43(1), 66-72, 2011, <http://dx.doi.org/10.1657/1938-4246-43.1.66>.

[学会発表] (計9件)

中澤文男・植竹淳・陶山佳久・金子亮・竹内望・藤田耕史・本山秀明・神田啓史、節レベルでの同定を目的としたベルーハ氷河中のマツ属花粉1粒ずつのDNA分析、第2回極域科学シンポジウム、2011.11.16、国立極地研究所(東京都立川市)

中澤文男・植竹淳・陶山佳久・金子亮・竹内望・藤田耕史・本山秀明・神田啓史、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、2011.10.9、名城大学(愛知県名古屋市)

中澤文男・植竹淳・陶山佳久・金子亮・竹内望・藤田耕史・本山秀明・神田啓史、節レベルでの識別を目的としたベルーハ氷河中のマツ属花粉1粒ずつのDNA分析、雪氷研究大会(2011)、2011.9.21、ハイブ長岡(新潟県長岡市)

中澤文男・植竹淳・陶山佳久・金子亮・竹内望・藤田耕史・本山秀明・神田啓史、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、2011.5.24、幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)

中澤文男・植竹淳・陶山佳久・金子亮・竹内望・藤田耕史・本山秀明・神田啓史、DNA分析による氷河中のマツ属花粉の詳細分類、第32回極域生物シンポジウム、2010.11.30、国立極地研究所(東京都立川市)

中澤文男・植竹淳・陶山佳久・金子亮・竹内望・竹内望・藤田耕史・本山秀明・神田啓史、DNA分析による氷河試料中のマツ属花粉の分類、日本花粉学会第51回大会、2010.10.10、中央大学後楽園キャンパス(東京都文京区)

中澤文男・植竹淳・陶山佳久・金子亮・竹内望・竹内望・藤田耕史・本山秀明・神田啓史、氷河試料中のマツ属花粉1粒ずつDNA分析(2)、雪氷研究大会(2010)、2010.9.27、東京エレクトロンホール宮城(宮城県仙台市)

Nakazawa F., J. Uetake, Y. Suyama, R. Kaneko, N. Takeuchi, K. Fujita and H. Kanda, DNA analysis of a single *Pinus* pollen grain in a glacier for identification of the species, International Symposium on Snow, Ice and Humanity in a Changing Climate, 2010.6.22, Hokkaido University (Sapporo, Japan)

中澤文男・植竹淳・陶山佳久・金子亮・竹内望・藤田耕史・神田啓史、種レベルでの花粉分析を目的とした氷河中のマツ属花粉1粒ずつのDNA分析(2)、日本地球惑星科学連合2010年大会、2010.5.27、幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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・融合プロ
ジェクト特任研究員
研究者番号：80432178

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：