

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24248025

研究課題名(和文) 山岳氷河の掘削試料から得られた樹木花粉のDNA分析による古森林遺伝学的研究

研究課題名(英文) Development of forest paleogenetic approaches using ancient pollen grains found in an ice core from mountain glacier

研究代表者

陶山 佳久 (Suyama, Yoshihisa)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60282315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,600,000円

研究成果の概要(和文)：山岳氷河から得られた雪氷試料中に存在する花粉の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しようとする研究のための基礎技術開発を行った。まず、花粉一粒ずつに含まれるゲノムDNAを全ゲノム増幅法によって増幅して、ゲノム内の複数領域のDNA分析に用いるための技術を完成させた。また、次世代シーケンサーを用いてゲノム全体から網羅的に塩基配列を得る新たな手法を開発し、MIG-seq法として発表した。これらの技術を氷河から得られた花粉の分析に応用した。

研究成果の概要(英文)：We developed basic methods for paleogenetic approaches using conifer pollen grains found in a mountain glacier. First, we developed a protocol for single-pollen DNA analysis using whole-genome amplification (WGA) method. Second, we developed a novel approach that we termed “multiplexed ISSR genotyping by sequencing” (MIG-seq), which is a PCR-based procedure for constructing highly reduced representation libraries involving de novo SNP discovery, and their genotyping using next generation sequencing. Then we applied these methods to pollen samples found in a glacier.

研究分野：森林分子生態学

キーワード：古代DNA 遺伝的多様性 花粉分析 次世代シーケンサー アイスコア 集団遺伝

## 1. 研究開始当初の背景

近年注目されている生物多様性と気候変動の関係について、それらを直接明らかにするためには、将来に渡って長期の観測をするか、過去に遡ってその変化を再構築するしかない。しかし特に遺伝的多様性については、過去の情報の直接的な取得法がこれまでほとんどなかったと言える。また、地域集団の遺伝的な違いを研究する分子系統地理学では、しばしば過去の分布変遷や集団サイズ、遺伝的多様性などに言及するが、それらはあくまでも推定でしかないことがジレンマの一つでもある。過去の遺伝子情報を再構築する研究は、特に人類を対象とした「古遺伝学」として(例えば Reich et al. 2010)、あるいは堆積土壌からメタゲノムとして解析する方法(例えば Anderson-Carpenter et al. 2011)を中心として近年発展している分野であるが、特定の植物種を対象とするアプローチはこれまで極めて限られている(例えば Suyama et al. 2008)。

過去の遺伝情報を得るための独自のアプローチとして、本研究代表者らは世界で初めて花粉化石の DNA 分析に成功し(Suyama et al. 1996)、その後共同研究者とともに二例目の成果を発表した(Parducci et al. 2005)。さらに 2011 年には「Single-Pollen Genotyping (Isagi & Suyama eds. 2011)」と題する英文書籍を出版してこの分野を牽引している。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(例えば Paffetti et al. 2007)、世界的に未だに同様の成果が限られている理由の一つとしては、一般に DNA 分析が可能な花粉化石を得ることが困難なため、その分析の成功率が極めて低いことが影響していると考えられる。

このような背景のもと、本研究代表者らは 2010 年度からの「挑戦的萌芽研究」により、山岳氷河に封じ込められた花粉試料の DNA に初めて着目し、その保存状態が極めて良好で、DNA 分析が可能であることを発見・確認した。そこで本研究課題では、この挑戦的萌芽研究における予備的成果をもとに、山岳氷河掘削試料中の花粉 DNA を対象とした本格的な研究に乗り出すものである。

他方、古代 DNA の分析でしばしば問題になるのが、DNA の断片化により限られた情報しか得られないことであった。しかし、近年技術開発の目覚ましい次世代シーケンサーを用いることで、DNA 断片を網羅的に解析するアプローチが可能となった。ただし、ごく近年まではその機器価格および分析費用が高額であったために、現実的には導入の障害となっていたが、近年に相次いで発売されたパーソナルタイプの次世代シーケンサーを用いれば、これらの問題が格段に軽減されることになる。つまり、技術的・経済的な背景としても本研究を推進する条件が整ったと言える。

## 2. 研究の目的

(1) 分析手法の確立(山岳氷河掘削試料中の花粉 DNA 分析による遺伝情報の復元法)

これまでにすでに花粉一粒ずつから特定領域を PCR 増幅して DNA 塩基配列を解析する技術は完成させているが、本研究では全ゲノム増幅と次世代シーケンサーの利用により、格段に大量の遺伝情報を再構築する手法を完成させる。さらにこの方法をアイスコア(氷河掘削試料)から得られた異なる年代の試料に適用し、比較的多くの花粉が得られる樹木種を対象として過去の遺伝情報を経時的に復元する、いわば「古森林遺伝学」としての方法論を確立する。

(2) 種間レベルでの植生変遷史解明アプローチ(花粉の種識別)

花粉の形態観察では種レベルの識別は困難だが、DNA 情報による花粉の種識別によって、過去の植生を種レベルで解明することができる。したがって、試料採取地域の植生変遷が種レベルで明らかになる。本研究では、その前段階として、花粉 DNA 情報を用いた種識別法を完成させる。

(3) 種内レベルでの分布変遷史解明アプローチ(種内変異の検出)

試料採取地付近は、氷期において亜寒帯性針葉樹のレフュージア(逃寒地)として推定されているため、現生の空間的遺伝構造と比較することにより、種内レベルの分布変遷の直接的な証拠が得られる。本研究では、このような研究アプローチが可能であることを示すため、種内レベルの遺伝的変異の取得法を完成させる。

## 3. 研究の方法

ベルー八氷河(アルタイ山脈・ロシア)から得られたアイスコア中の、さまざまな年代の樹木花粉(マツ科)を材料として、花粉一粒ずつの全ゲノム増幅およびパーソナル次世代シーケンサーによる DNA 断片の網羅的解読を行う。まず、これら 2 つの手法の開発を行い、手法の確立を目指す。次に解読データの解析により、花粉粒の種同定と、種内変異の解析法の確立を行う。

## 4. 研究成果

山岳氷河から得られた掘削雪氷試料中の古代花粉の 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った。

(1) 分析手法の確立(山岳氷河掘削試料中の花粉 DNA 分析による遺伝情報の復元法)

次世代シーケンサーを用いてゲノム全体から網羅的に塩基配列を得る新手法を開発し、「MIG-seq (Multiplexed ISSR Genotyping by

sequencing) 法としてオープンアクセス電子ジャーナルのScientific Reportsに論文を発表した (Suyama and Matsuki, 2015)。

また、ロシア・アルタイ山脈にあるペルー八氷河から採取した表層積雪中のマツ属花粉を用い、花粉に含まれるゲノムDNAを全ゲノム増幅法によって増幅して複数領域のDNA分析に用いる基礎技術を完成させた。この手法に関して学会発表を行ったほか (中澤ら、2015; Nakazawa et al. 2015) 論文としてまとめて現在投稿中である。

本研究で開発したMIG-seq法では、従来の一般的な次世代シーケンシングによるゲノム変異分析とは異なり、ごく微量の鋳型DNAであっても分析が可能であるため、花粉DNAを対象とした分析に用いることが可能である。そこで、この手法を用いて上記の全ゲノム増幅後の表層積雪中マツ属花粉DNAの分析を行った。その結果、約半数のサンプルからマツ科の塩基配列が確認され、この手法が有効であることが示された。

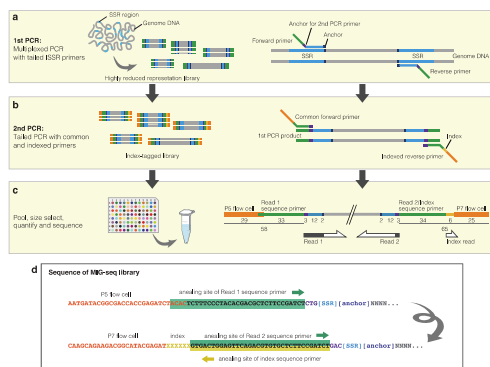


図1 本研究で開発したゲノム変異検出のための新手法であるMultiplexed ISSR Genotyping by sequencing (MIG-seq)法の概要 (Suyama & Matsuki, 2015より引用)。まず1st PCRとして、特定のTail配列を付加した複数のISSR (inter-simple sequence repeat) プライマーによってマルチプレックスPCRを行う (a)。2nd PCRでは1st PCRプライマーのTail部に結合するプライマーを用いてPCRを行い、シーケンシングに必要な配列とインデックス配列を増幅フラグメントに付加したライブラリーを作成する (b)。このサンプル別ライブラリーを混合・精製・サイズ選択・定量の後 (c)、完成したライブラリー (d) を次世代シーケンサーで読み取り、数千領域の塩基配列データを得る。これらの配列データからサンプル間で共有する座にあるSNPを検出し、遺伝マーカーとして用いた解析を行う。

(2) 種間レベルでの植生変遷史解明アプローチ (花粉の種識別)

まず、花粉一粒のDNA分析技術開発用試料と

して、ペルー八氷河から採取した表層積雪中のマツ属花粉を用いた。本研究では、花粉に含まれるゲノムDNAを、全ゲノム増幅法によって増幅し、さらに葉緑体DNAの複数領域を増幅して塩基配列解析を行った。それらの配列データを用いて、花粉種の候補を絞りこむことに成功した。また、花粉1粒ずつから特定の領域をPCR増幅して情報を得る方法では、約150bpの葉緑体DNA断片を増幅し、得られた配列によって節レベルでの識別まで可能なことを示した。この成果はEnvironmental Research Lettersに発表した (Nakazawa et al. 2013)。

関連した技術開発に関する研究成果として、スカンジナビア中部の湖底堆積物を分析用試料として用い、その花粉分析 (花粉の外部形態によって分類群を識別する分析) とメタ・バーコーディング解析 (汎用性のあるPCRプライマーを用いて堆積物等から抽出したDNAをテンプレートとしたPCR増幅を行い、その配列によって分類群を推定する方法) の結果の比較を行った。この成果をとりまとめて学術雑誌Molecular Ecologyに発表した (Parducci et al. 2013)。さらにこれらに加え、植物大型遺体の分析結果との比較を行った。この成果をとりまとめて学術雑誌Philosophical Transactions of the Royal Society Bに発表した (Parducci et al. 2015)。また、古代花粉のDNA分析等によってどのような研究が可能なのかをまとめた総説を日本生態学会誌 (岩崎ら2014) および英文書籍の章 (Morinaga et al. 2014) に発表した。

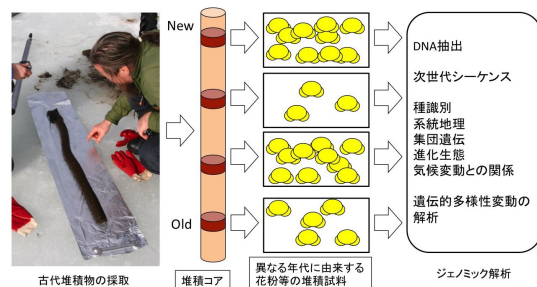


図2 種レベルでの植生変遷史の解明に用いることができるアプローチ法の概念図 (Morinaga et al. 2014の図を改変)。湖底堆積物や山岳氷河アイスコア等の保存性が良い連続古代堆積試料を採取し、その中に含まれる花粉等の生物試料や堆積層自体を試料として利用してDNAを抽出する。それらから次世代シーケンシングにより遺伝的データを取得して、遺伝的多様性の変動解析に用いることができるという発想を示している。

(3) 種内レベルでの分布変遷史解明アプローチ (種内変異の検出)

本研究で開発したMIG-seq法を用いて、上記の全ゲノム増幅後の表層積雪中マツ属花粉DNAの分析を行った。その結果、約半数のサンプルからマツ科の塩基配列が確認され、この手法が有効であることが示された。この成果については学会発表を行い(松木ら、2015)、現在追加解析を実施している。

#### <引用文献>

Anderson-Carpenter LL, et al. (2011) Ancient DNA from lake sediments: Bridging the gap between paleoecology and genetics. *BMC Evol Biol* 11:30

Isagi Y & Suyama Y (Eds.) (2011) Single-Pollen Genotyping. 127pp. Springer, Tokyo

Reich D, et al. (2010) Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* 468: 1053-1060

Suyama Y, et al. (1996) DNA sequence from a fossil pollen of *Abies* spp. from Pleistocene peat. *Genes Genet Sys* 71: 145-149

Suyama Y, Gunnarsson U, Parducci L (2008) Analysis of short DNA fragments from Holocene peatmoss samples. *The Holocene* 18 (6): 1003-1006

Parducci L, Suyama Y, Lascoux M, Bennett KD (2005) Ancient DNA from pollen: a genetic record of plant population history. *Mol Ecol* 14, 2873-288

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* 16 Suppl 2: S6

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計5件)

Yoshihisa Suyama, Yu Matsuki (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Scientific Reports* 5: 16963 査読有 DOI:10.1038/srep16963

Laura Parducci 他 8 名中 8 番目 Yoshihisa Suyama (2015) Proxy comparison in ancient peat sediments: pollen, macrofossil and plant DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 370 (1660), 20130382. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0382>

岩崎貴也、阪口翔太、横山良太、高見泰興、

大澤剛士、池田紘士、陶山佳久(2014) 生物地理学とその関連分野における地理情報システム技術の基礎と応用. *日本生態学会誌* 64 (3) : 183-199. 査読有 <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009892536>

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. 査読有 DOI:10.1088/1748-9326/8/1/014032

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* 22 (13): 3511-3524. 査読有 DOI:10.1111/mec.12298

##### [学会発表](計22件)

Yoshihisa Suyama, Yu Matsuki, Fumio Nakazawa: Single-pollen genotyping using the next-generation sequencing. The 13th International Symposium on Integrated Field Science: Conservation and Utilization of Biodiversity, 2016年3月10日、東北大学大学院農学研究科(宮城県仙台市)

中澤文男, 陶山佳久, 伊村智, 本山秀明: 全ゲノム増幅法を用いたペルー八氷河(アルタイ山脈・ロシア)中のマツ属花粉の種同定. 雪氷研究大会(2015・松本), 2015年9月13-16日、信州大学理学部(長野県松本市)

Fumio Nakazawa, Yoshihisa Suyama, Satoshi Imura, Hideaki Motoyama: Species identification of *Pinus* pollen found in a glacier using a whole genome amplification method. 国際第四紀学会第19回大会(国際学会), 2015年7月26日~8月2日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Yoshihisa Suyama, Yu Matsuki: An effective PCR-based method for genome-wide SNP genotyping using NGS platform. 11th Clonal Plant Workshop (Clone 2015), August 4-7, 2015, トジエボニ(チェコ)

Yoshihisa Suyama: MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide SNP genotyping using NGS platform. Workshop of Young Scientists on Biodiversity and Conservation Biology in Southwest China: Advances in Conservation

Genetics. July 10-13, 2015, 昆明 (中国)

松木悠、中澤文男、陶山佳久：次世代シーケンサーを用いた山岳氷河中樹木花粉のDNA分析.第62回日本生態学会大会、2015年3月18~22日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

Yoshihisa Suyama, Yu Mastuki: Development of a novel method for conservation genetics with next-generation sequencing: Multiplexed ISSR (inter-simple sequence repeat) Genotyping by sequencing (MIG-seq). Contribution of Genetics to Plant Conservation: Brazil-Japan International Workshop 2015, Feb. 2-4, 2015, ピラシカバ(ブラジル)

中澤文男、陶山佳久、伊村智、本山秀明：全ゲノム増幅法を用いた氷河中の花粉1粒ずつの同定．日本地球惑星科学連合 2014年大会、2014.4.28-5.2、パシフィコ横浜会議センター(神奈川県横浜市)

松木悠、陶山佳久：山岳氷河アイスコアから得られた樹木花粉のDNA分析．日本生態学会東北支部会第58回大会、2013年10月19日、星と森のロマンピア(青森県弘前市)

中澤文男、陶山佳久：Whole genome amplification 法による氷河中の花粉1粒ずつのゲノム増幅．雪氷研究大会(2013・北見) 2013年9月17-21日、北見工業大学(北海道北見市)

[図書](計1件)

Shin-ichi Morinaga, Takaya Iwasaki, Yoshihisa Suyama (2014) Eco-evolutionary genomic observation for local and global environmental changes. In: S.-i. Nakano et al. (eds.) Integrative Observations and Assessments, Ecological Research Monographs. Pp. 327-337, Springer DOI:10.1007/978-4-431-54783-9\_17

6. 研究組織

(1)研究代表者

陶山 佳久(SUYAMA, Yoshihisa)  
東北大学・大学院農学研究科・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

牧野 能士(MAKINO, Takashi)  
東北大学・生命科学研究科・准教授  
研究者番号：20443442

(3)研究協力者

松木 悠(MATSUKI, Yu)  
東北大学・大学院農学研究科・研究支援者