

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850113

研究課題名(和文)花粉化石のDNA多型に基づく最終氷期以降のスギの分布変遷の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the distribution change of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) since the last glacial period based on the polymorphism of fossil pollen DNA

研究代表者

長谷川 陽一 (Hasegawa, Yoichi)

秋田県立大学・付置研究所・研究員

研究者番号：30634034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、東北地方の湿地の堆積物からスギ花粉化石を採集し、DNAを増幅して、これを現生のスギ天然林集団のDNAと比較することを試みた。花粉化石からのDNA増幅に使用する葉緑体マイクロサテライトマーカー17座の遺伝的多様性は十分に高く、花粉DNA分析に使用できることが明らかになった。また、これらの葉緑体マーカーを使用して、青森県八甲田山の湿地に隣接する2つのスギ孤立林では、伏条更新によって生じた同一クローンに由来する幹が多数分布することが明らかになった。しかし、湿地から採集した堆積物から、DNAの増幅は見られなかった。堆積物からのDNAの抽出方法を改良する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I tried to collect the fossil pollen grains of *Cryptomeria japonica* from the sediments of the marsh of the Tohoku region, and tried to amplify ancient DNA and compare the aDNA with DNA of present *C. japonica* populations. The genetic diversity of 17 chloroplast microsatellite markers was high enough to use for DNA analysis of fossil pollen grains. Furthermore, in two-isolated *C. japonica* populations adjacent to the marshes of Mt. Hakkoda, I identified the many trunks reproduced from a same individual by layering using the chloroplast microsatellite markers. However, DNA amplification was not observed from the sediments collected from the marsh. It was considered necessary to improve the method for DNA extraction from sediments.

研究分野：分子生態学

キーワード：スギ 花粉化石 葉緑体DNA マイクロサテライトマーカー

1. 研究開始当初の背景

スギは日本を代表する樹木であり、その分布変遷を明らかにすることは、日本列島の景観の歴史を明らかにする上で重要である。日本海側に分布するアシウスギ(別名ウラスギ: *Cryptomeria japonica* (L.f.) D.Don var. *radicans* Nakai)は多雪地に適応して伏条更新をするなど、太平洋側に分布するスギ(別名オモテスギ: *Cryptomeria japonica* (L.f.) D.Don)とは生態的特性および遺伝的組成が異なることが知られている。現在、アシウスギは東北地方から中国地方にかけての日本海側に天然分布しているが、その起源はどこなのか、またいつから現在の分布となったのかはよくわかっていない。塚田(1980)は花粉分析の結果から、最終氷期以降に若狭湾(福井県・京都府)から北上して東北地方日本海側に到達したと述べている。一方で、近年の DNA 解析を用いたスギ天然林の系統地理的研究によって、若狭湾と東北地方日本海側に分布するスギ天然林では遺伝的組成が異なることが明らかになったことから、塚田の説は支持されず、東北地方日本海側にスギのレフュージアが存在していた可能性が示唆されている(例えば、Tsumura et al. 2007)。

しかしながら、現生の樹木集団を対象とする分子系統地理的手法では、いつの時代にその遺伝構造が成立したのかはわからず、また消滅してしまった樹木集団を検出することもできない。さらに、花粉化石の形態形質の同定によってなされる花粉分析では、過去と現在の植物集団間の系統関係を明らかにすることはできない。花粉化石の DNA 解析によって、これら2つの研究手法をつないで過去と現在の植物集団間の系統関係を明らかにすることで、植物の分布変遷の歴史をより詳細に明らかにすることが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、(1) まず、花粉化石からの DNA 増幅に使用する葉緑体マイクロサテライトマーカの多型性を明らかにした。(2) そして、東北地方日本海側の湿地の堆積物からスギ花粉化石を採集し、そこから葉緑体 DNA に含まれるマイクロサテライト領域を PCR 法を用いて増幅することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 低標高の現生スギ天然林として鱒ヶ沢・碓ヶ関・鳥海・雄勝峠の4集団と、高標高のスギ孤立林として青森県八甲田山の横沼・ソデカ谷地の2集団を調査地とした。調査地のスギ成木から針葉を採集し、DNA 抽出を行った。葉緑体マイクロサテライトマーカ-17 座と核マイクロサテライトマーカ-5 座を用いて各集団の遺伝的多様性と、スギのクローン構造を明らかにした。

(2) 八甲田山のスギ孤立林に隣接する湿地から堆積物を採集し、スギ花粉化石の採集を試みた。また、堆積物から DNA 抽出を行い、葉緑体マイクロサテライトマーカ-を用いてスギ DNA の増幅を試みた。

4. 研究成果

(1) 葉緑体マイクロサテライトマーカの遺伝的多様性は十分に高く、花粉 DNA 分析に使用できることが明らかになった。また、葉緑体マイクロサテライトマーカ-17 座を用いることで、低標高のスギ天然林4集団では、69~96%(平均 82%)の個体を識別することができた。また、八甲田山のスギ孤立林2集団では、全ての個体を識別することができ、同一クローンに由来する幹が多数分布することが明らかになった。

(2) 採集した堆積物から花粉化石一粒ずつの採集を試みた。しかし、スギ花粉の直径は 30 μm と小さく、また、含まれるスギ花粉の量も少なかったため、スギ花粉化石一粒ずつ

を集めることはできなかった。次に、堆積物から市販のキットを用いて DNA 抽出を試みたところ、抽出溶液に DNA が含まれていることが確認された。抽出した DNA 溶液をテンプレートにスギに特異的な葉緑体マイクロサテライトマーカーを用いて PCR を行ったところ、DNA の増幅は見られなかった。これらのことから、PCR 反応が夾雑物によって阻害されている場合を想定して、用いる PCR キットを変更して PCR 効率を高めることと、堆積物に含まれる微量のスギ DNA を抽出できていないことを想定して、DNA の抽出方法を改良する必要があると考えられた。

引用文献

塚田松雄. (1980) 杉の歴史: 過去一万五千年間. 科学 50: 538-546.

Tsumura Y, Kado T, Takahashi T, Tani N, Ujino-Ihara T, Iwata H (2007) Genome scan to detect genetic structure and adaptive genes of natural populations of *Cryptomeria japonica*. Genetics 176: 2393-2403.

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 5 件)

長谷川陽一, 鈴木三男. (2013) 仙台市富沢遺跡のモミ属花粉化石からの DNA 増幅と種同定に関する試み. 植生史研究 22: 3-12, 査読有. http://hisbot.jp/journals/backnumber/2201_2013

Kitashiba H, Li F, Hirakawa H, Kawanabe T, Zou Z, Hasegawa Y, Tonosaki K, Shirasawa S, Fukushima A, Yokoi S, Takahata Y, Kakizaki T, Ishida M, Okamoto S, Sakamoto K, Shirasawa K, Tabata S, Nishio T. (2014) Draft sequences of the radish (*Raphanus sativus* L.) genome. DNA Research 21: 481-490, 査読有.

doi:10.1093/dnares/dsu014

長谷川陽一. (2014) 森の研究: 私のテーマ (第 47 回)花粉の DNA 解析で探る訪花昆虫と植物との関係. グリーン・パワー 432: 12, 査読無.

Sato M, Hasegawa Y, Mishima K, Takata K. (2015) Isolation and characterization of 22 EST-SSR markers for the genus *Thujaopsis* (Cupressaceae). Applications in Plant Sciences 3: 1400101, 査読有. doi:10.3732/apps.1400101

Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K. (2015) Variation in pollen-donor composition among pollinators in an entomophilous tree species, *Castanea crenata*, revealed by single-pollen genotyping. PLoS ONE 10: e0120393, 査読有. doi:10.1371/journal.pone.0120393

[学会発表](計 8 件)

小林慧, 高田克彦, 長谷川陽一, 織部雄一朗, 古本良. スギ雪害抵抗性品種「出羽の雪」の成長と材質 II. 第 64 回日本木材学会大会, 2014 年 3 月 13 日~15 日, 愛媛大学(愛媛県松山市).

長谷川陽一, 吉田明弘, 三嶋賢太郎, 高田克彦. スギ花粉化石の DNA 解析のための、秋田スギ天然林の cpSSR 多型分析. 第 125 回日本森林学会大会, 2014 年 3 月 26 日~30 日, 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市).

佐藤都子, 長谷川陽一, 三嶋賢太郎, 蒔田明史, 高田克彦. EST-SSR マーカーを用いたヒノキアスナロ(ヒバ)天然林の遺伝的多様性解析. 第 125 回日本森林学会大会, 2014 年 3 月 26 日~30 日, 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市).

長谷川陽一, 濱田茂樹, 熊丸敏博, 松坂弘明, 鈴木保宏. 米の主要なトリアシルグリセロールリパーゼ候補遺伝子の推定と TILLING 法による変異系統候補の選抜. 第 126 回日本育種学会講演会, 2014 年 9 月 25

日～28日, 南九州大学(宮崎県宮崎市).

永田俊文, 長谷川陽一, 濱田茂樹, 熊丸敏博, 松坂弘明, 鈴木保宏. 米の主要なトリアシルグリセロールリパーゼの同定と酵素化学的特性の解明. 第127回日本育種学会講演会, 2015年3月20日～22日, 玉川大学(東京都町田市).

佐藤都子, 長谷川陽一, 三嶋賢太郎, 高田克彦. アスナロ属(ヒバ、アスナロ)天然林を対象とした EST-SSR マーカーによる遺伝構造解析. 第126回日本森林学会大会, 2015年3月26日～29日, 北海道大学(北海道札幌市).

長谷川陽一, 浅野亮樹, 高田克彦. 次世代シーケンサーを用いたハチミツに含まれる花粉の種の同定. 第126回日本森林学会大会, 2015年3月26日～29日, 北海道大学(北海道札幌市).

中村桃子, 長谷川陽一, 佐藤奈美子, 高橋秀和, 渡辺明夫, 赤木宏守, 岡田和馬, 櫻井健二. リンゴ花粉一粒からのPCR法による遺伝子解析. 園芸学会大会, 2015年3月28日～29日, 千葉大学(千葉県千葉市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 陽一 (HASEGAWA Yoichi)

秋田県立大学 木材加工研究所・研究員

研究者番号: 30634034