

令和元年6月24日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02960

研究課題名(和文) 微化石の分子科学的情報を活用した人類紀の新しい古環境解析

研究課題名(英文) Estimate of Quaternary paleoenvironment from molecular information of microfossils

研究代表者

高田 将志 (TAKADA, Masashi)

奈良女子大学・人文科学系・教授

研究者番号：60273827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：花粉化石のDNA解析や植物珪酸体化石の酸素同位体比組成から、第四紀古環境復元にどのような新手法を導入可能かを検討した。現生針葉樹を試験試料とした検討から、種レベル以下の系統比較進化の解析に適したプライマーを得ることができたものの、トータルDNA試料からは種の同定に適した増幅条件を見出すことができなかった。経年劣化が予想される花粉化石のDNA解析に向けては更なる増幅条件の検討が必要である。また、現生植生から抽出した植物珪酸体試料について、測定方法による酸素同位体比分析結果の違いが認められたため、標準試料の測定を交えたルーチンの測定方法の確立が必要となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古植生や生態学的な植生-環境相互関係の地史の変遷に関して、陸域に分布する連続堆積物である火山灰土に含まれ残存性にすぐれた植物珪酸体の分子科学的情報に着目した解析と、陸域有機物のDNA情報から新しい解析手法が導入できれば、当該関連研究分野に新たな情報をもたらすことが期待できる。これらは日本はもちろん世界的にみてもまだ十分手のつけられていない研究分野であり、今後の研究の進展が与える波及効果は決して小さくない。本研究によって本格的な対象サンプルの解析に向けて必要となる具体的な検討事項が明らかにされたので、今後は、本研究の成果を踏まえた解析手法の確立に向けた取り組みを進める予定である。

研究成果の概要(英文)：We examined possibilities that new methods could be introduced into Quaternary paleoenvironment reconstruction using DNA analysis of pollen fossils and oxygen isotope ratio of phytolith fossils. We examined PCR amplification conditions for chloroplast genome analysis using modern conifers as test samples. Although we could obtain primers suitable for analysis of phylogenetic comparison evolution above the genus level, we could not find the amplification condition suitable for species identification from total DNA samples. Further examination of amplification conditions is necessary for the DNA analysis of pollen fossils, which are anticipated to decrease and fragment the DNA content itself due to aging. Since differences in oxygen isotope ratio analysis results by different methods were recognized for phytoliths extracted from modern plants, it is necessary to establish a routine way to measure the oxygen isotope ratio of phytoliths with standard samples.

研究分野：自然地理学

キーワード：植物珪酸体 微化石 同位体比 古環境 火山灰土 有機物 花粉化石 DNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人間活動の痕跡が数多く残される第四紀中～後期の古環境解析は、撓乱の少ない連続的な堆積物の残る深海底や、同じく撓乱の少ない連続的な氷が残されているグリーンランド・南極などの大陸氷床内陸部から得られる試料をターゲットとして、1970年代以降、急速な発展を遂げてきた(たとえば Shackleton and Opdayke, 1976; Dansgaard et al. 1982; Lorius et al. 1985, GRIP Members, 1993 など)。一方、人間の生活の場となる中～低緯度の陸域における古環境像は、深海底コアや氷床コアからの推定も援用しながら、陸域に分布する堆積物の花粉分析などから推定されてきた。近年では、年縞をもとに、高精度の時代目盛を入れた古環境解析の試みも進められており(たとえば、Nakagawa et al., 2012; Smith et al., 2013 など)。人類紀である第四紀の古環境復元・解析は、新たな研究の局面を迎えつつある。しかしながら、花粉は大気中では長く保存されにくいいため、湖底や湿原など、陸域でも嫌氣的なかなり限られた場所にしか残存しないのが普通である。また花粉分析から復元される植物群は、通常、属レベルまでの分類群で、植物生態を考える上での基礎となる種レベルの分類群をもとにした古環境解析が難しい場合も少なくない。

本研究では、前述のような堆積物コアの解析による古環境復元の現状を踏まえ、陸域に残存する連続堆積物である火山灰土と、これに含まれ残存性にすぐれた植物珪酸体の分子科学的情報に着目した解析によって、どのような古環境復元が可能かについて検討することを、研究目的の一つとして設定した。具体的には、火山灰土に含まれる植物珪酸体の酸素同位体比分析から、ある程度定量的な古気候情報(主に古気温情報)を復元可能かについて検討する。また併せて、陸域の堆積物に含まれる有機物の DNA 情報から、古植生や生態学的な植生・環境の相互関係の地史的変遷に関して、どのような解析が可能かについても検討を試みることを考えた。

前者については、古環境解析用の試料採取などの段階から、後者については、現生植物の系統解析など基本的な分析検討から始める必要があり、いずれの視点からの解析についても、日本はもちろん、世界的にみてもまだ十分手のつけられていない研究分野であると言って良い。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでほとんど用いられてこなかった陸域に分布する微化石の分子科学的情報を活用して、どのような古環境復元が可能かについて、第四紀の日本列島を対象として、具体的に明らかにすることを目指している。前者に関しては、研究代表者が予察的な検討を行い、植物珪酸体の酸素同位体比情報から、ある程度の気温の復元が可能である見込みを得ているので、これを古環境復元にどこまで応用可能かという視点から、さらなる具体的な検討を進めた。後者に関しては、陸域の堆積物に残された有機物からどのように DNA 情報を抽出可能かについて手法的な検討を進めながら、現生植生の DNA 情報との比較検討を加味しつつ、古環境解析的にどのような活用が可能かについて検討することを目指した。そして、分子生物学的観点からの解析と環境変化との関連性から、古環境復元への応用の道筋を探ることを目指した。

### 3. 研究の方法

上記の目的に照らし、火山灰土から植物珪酸体を抽出・濃集する作業や、現生植生を対象とした植物珪酸体の酸素同位体比データを収集するための基本的な方法についての検討から始めた。前者については、重液などを用いた各種の分離抽出を試行錯誤的にみ合わせた方法で酸素同位体比分析用の試料の抽出を進める方法などを志向錯誤した。これと併せて、現生植生の植物珪酸体に関する酸素同位体比の基礎データを蓄積するための基本的な調査を継続し、分析用の試料処理も進めた。

花粉や有機物の DNA 解析・系統解析については、泥炭層に含まれる花粉化石の抽出・濃集方法に関して、研究代表者研究室所蔵の各種試料や新たに採取した試料などから DNA 解析・系統解析に適すると思われる試料のピックアップと花粉化石の抽出方法について試行錯誤的に検討した。また、花粉化石からの樹木種同定の精密化、すなわち、花粉化石からの葉緑体ゲノム遺伝子配列による樹木種同定の精密化を行うためには、まず、PCR 増幅条件の検討を行う必要がある。そこで本研究では、マツ科針葉樹葉緑体ゲノムに含まれる遺伝子断片の PCR 増幅条件の検討を行った。針葉樹では葉緑体ゲノムは父性遺伝(花粉由来)であることが知られているので、花粉化石中の葉緑体ゲノムの部分塩基配列に基づいて、花粉化石と現生の植物の系統解析を行うために、増幅する DNA・遺伝子領域の選定、現生種の葉から調整したトータル DNA を試料とする予備実験を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 葉緑体ゲノム遺伝子配列を用いた樹種同定に向けた PCR 増幅条件

花粉化石として採取される可能性が高いモミ属を含むマツ科の針葉樹の葉緑体ゲノムに着目し、Suyama ら(1996 Genes Genet. Sys. 71:145-149) で用いられたリボソーム RNA 5S サブユニット遺伝子 *rrn5* とアルギニン転移 RNA 遺伝子 *trnR* 領域を増幅するプライマーセット(表 1. 8a, 8b)に加えて、9 セットのプライマーを設定した。すなわち、

- ・比較的近縁種の系統比較に多用されるマチュレーヌ (*maturase*) 遺伝子 *matK* 内部領域の

約 640 塩基対 (bp) 用セット (表 1 . 1a, 1b)

- ・ 比較的保存度の高い遺伝子の配列による属レベルの同定用に、炭酸固定酵素リブローズ二リン酸カルボキシラーゼ ( Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase ) の大サブユニットの遺伝子 *rbcL* 内部領域の約 1.3 kbp 用セット (表 1 . 5a, 5b)
- ・ 光化学Ⅰサブユニット遺伝子 *psaB* とその下流の遺伝子 *rps14* を含む領域の約 500bp 用セット, やはり光化学中心サブユニットの遺伝子 *psbB* 内部領域の約 1.3kbp 用, 同じく *psbD* 内部の約 1.4kbp 用 (表 1 . 2-4a, 2-4b)
- ・ 各種転移 RNA 遺伝子や RNA ポリメラーゼ遺伝子 *rpoC* 等を含む各種領域の 300bp から 1kbp 以下の増幅用 (表 1 . 6-10a, 6-10b)

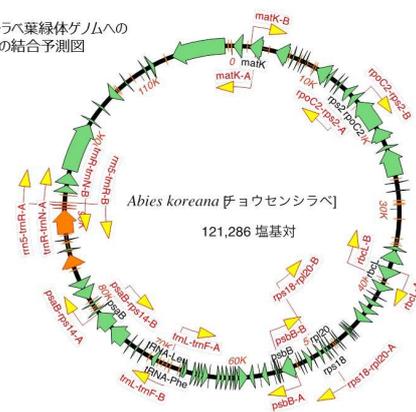
を作製した。

これらのプライマーと現存種のヒマラヤスギから調整したトータル DNA を対象に、TKs Gflex DNA ポリメラーゼを用いて増幅実験を行った結果を示した (表 1)。モミ属の *Abies koreana* チョウセンシラベの決定済葉緑体ゲノム (Jung ら 2015, アクセッション番号 KP751905) のどの位置にプライマーが結合するかを示したのが図 1 である。

表 1. 作製したPCRプライマーと有効性

番号	対象遺伝子	塩基配列 (5' - 3')	ヒマラヤスギDNAからの増幅サイズ
1a	<i>matK-A</i>	TAAAGCATCCTCTGATTCACGA	得られず
1b	<i>matK-B</i>	CGTACTTTTATGTTTACAGGCTAA	得られず
2a	<i>psaB-rps14-A</i>	GCACGATTAGTTGGATTAGC	0.5 kbp
2b	<i>psaB-rps14-B</i>	CCATCTCACGGAGTATGTGT	0.5 kbp
3a	<i>psbB-A</i>	ATGGTTTGGCCTGGTATCGTTCATAC	1.3 kbp
3b	<i>psbB-B</i>	CCAAAAGTRAACCAACCCCTGGAC	1.3 kbp
4a	<i>psbD-A</i>	ATGACTGGTTCAGRAGGGACCA	得られず
4b	<i>psbD-B</i>	CATACCCRAAGAAGGAAAGAATC	得られず
5a	<i>rbcL-A</i>	ATGTCACCAAAAAACAGAGACT	1.35 kbp
5b	<i>rbcL-B</i>	CAGCAGCTAGTTCAGGACTC	1.35 kbp
6a	<i>rpoC2-rps2-A</i>	AAGGGCATCTCTGAATACTC	0.55 kbp
6b	<i>rpoC2-rps2-B</i>	TTCCAATATCTTCTGCTCAT	0.55 kbp
7a	<i>rps18-rpl20-A</i>	AGTCGATTATTAGTGAGCA	0.6 kbp
7b	<i>rps18-rpl20-B</i>	CTTCGTCGTTTGGGATTAC	0.6 kbp
8a	<i>rns5-trnR-A</i>	TCTACTGCGGTGACGATAC	0.3 kbp
8b	<i>rns5-trnR-B</i>	CACGTGCTCTAATCCTCTG	0.3 kbp
9a	<i>trnL-trnF-A</i>	TTGGCTTTATAGACCGTGAG	0.5 kbp
9b	<i>trnL-trnF-B</i>	CCAGGAACCAAGATTGAATCT	0.5 kbp
10a	<i>trnR-trnN-A</i>	GCCTGTAGCTCAGAGGATTA	0.9 kbp
10b	<i>trnR-trnN-B</i>	TCCTCAGTAGCTCAGTGGA	0.9 kbp

図1 チョウセンシラベ葉緑体ゲノムへのプライマーの結合予測図



今回設計したプライマーは、比較的保存度の高い遺伝子の配列による属レベルの同定に利用可能な *rbcL* を含めたが、*matK* とともにヒマラヤスギのトータル DNA 試料からは増幅しなかった。今後、プライマーデザインを検討する必要がある。

なお、変異蓄積の早い遺伝子間非翻訳領域の配列による種以下のレベルでの系統比較進化に適したプライマーセットでは、増幅できたものが多い。しかしながら、花粉化石に含まれる葉緑体ゲノム DNA は、経年劣化により、DNA 含量自体の減少と断片化が予想されるため、より微量な鋳型 DNA からの増幅を可能とする条件を精査した後に、実際の花粉化石を用いた実験に挑むべきであると考えている。

(2) 葉緑体ゲノム遺伝子配列解析に向けた陸域有機物試料からの花粉化石抽出方法について

前述した現生のマツ科針葉樹葉緑体ゲノムに含まれる遺伝子断片の PCR 増幅条件の検討と並行して、葉緑体ゲノムの部分塩基配列解析を行うための花粉化石の抽出方法について検討した。その結果、泥炭などの堆積物から以下のような手順で抽出することが可能であるとの見通しが得られた。具体的には、

- 堆積物数 g を 60 の乾燥機で数時間乾燥させる。
- 乾燥した試料を乳鉢と乳棒で軽くほぐす。
- 篩で、250 μm 以下の試料を遠心分離用チューブに入れ蒸留水を加える。
- 約 3000rpm で約 30 分遠心分離をかける。
- 沈殿物を回収し、乾燥させる。
- 比重 1.6 g/cm<sup>3</sup> の重液で遠心分離する。
- 重液に浮遊する試料を回収し、蒸留水で洗浄する。

の試料からピコピペット<sup>(注)</sup>と実体顕微鏡を用い、花粉 1 粒づつをピックアップする。でピックアップした花粉を PCR 用サンプルチューブに 1 粒づつ投入する。

以上のような工程で、ゲノム解析用の花粉試料を用意することが可能との見通しが得られた。

(注) ネットパ ジーン株式会社製 PicoPipet システム

(3) 現生植物から抽出した植物珪酸体の酸素同位体比

現生のササから抽出した植物珪酸体の酸素同位体比と試料採取地点の気温との関係について、これまで行ってきた研究代表者の検討結果を、さらに精査した (図 2、表 2)。その結果、同一

試料の酸素同位体比（表2の試料W04、W16）でも、計測方法が異なると分析値に大きな値の違いが認められる場合があることがわかった。今回のケースでは、(株)地球科学研究所に依頼分析したデータ（表2の試料番号17-32：CO2レーザー・5フッ化臭素（BrF5）法 質量分析法）とElementar社とIsoprime社のvarioPYRO cube - visIONの安定同位体比質量分析装置（ジャスコインタナショナル株式会社：東京都八王子市明神町）で測定したデータ（表2の試料番号なしのデータ。黄色で着色。）の間で、測定値に大きな違いが認められることとなった。この原因についてはまだ、十分特定できていないので、今後のルーチン的な分析測定については、標準試料の測定による検証などを複合した更なる精査が必要ながわかった。

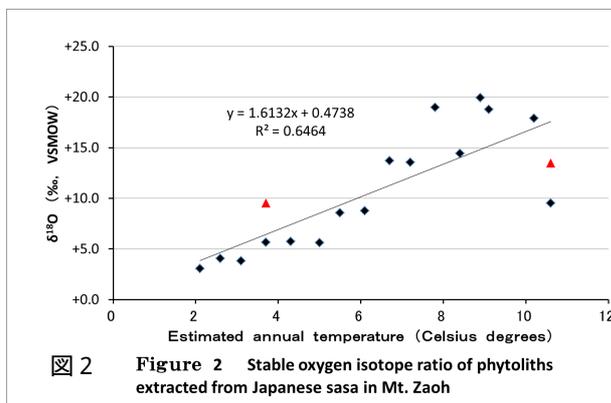


図2 Figure 2 Stable oxygen isotope ratio of phytoliths extracted from Japanese sasa in Mt. Zaoh

表2

Table 2. Stable isotope ratio of phytoliths of Japanese bamboo and Sasa.

No.	識別記号	sample name	altitude (m)	latitude (° N)	longitude (° E)	Inland index <sup>1)</sup> (km)	annual temperature <sup>2)</sup> (°C)	warmth index <sup>2)</sup> (° month)	Therohmite potential evapotranspiration (mm/year)	δ <sup>18</sup> O (‰, VSMOW)	δ <sup>3</sup> S (‰, VSMOW)
17	W01	蔵王山-W01-1700m	1,695	38.1261	140.4496	42	2.1	32	436.0	+3.0	-95.6
18	W02	蔵王山-W02-1600m	1,602	38.1232	140.4501	43	2.6	36	449.9	+4.1	-99.2
19	W03	蔵王山-W03-1500m	1,518	38.1253	140.4273	45	3.1	38	462.8	+3.8	-98.8
20	W04	蔵王山-W04-1400m	1,409	38.1202	140.4225	45	3.7	42	481.5	+5.7	-102.7
	W04	蔵王山-W04-1400m	1,409	38.1202	140.4225	45	3.7	42	481.5	+9.5	*
21	W05	蔵王山-W05-1300m	1,305	38.1176	140.4158	46	4.3	45	497.9	+5.7	-95.3
22	W06	蔵王山-W06-1200m	1,193	38.1179	140.4114	45	5.0	49	514.5	+5.6	-95.4
23	W07	蔵王山-W07-1100m	1,098	38.1223	140.4040	46	5.5	52	528.4	+8.6	-96.8
24	W08	蔵王山-W08-1000m	999	38.1224	140.3921	47	6.1	55	542.9	+8.8	-96.7
25	W09	蔵王山-W09-900m	897	38.1219	140.3921	48	6.7	58	557.9	+13.7	-100.0
26	W10	蔵王山-W10-800m	810	38.1267	140.3820	48	7.2	61	570.6	+13.6	-99.4
27	W11	蔵王山-W11-700m	702	38.1298	140.3765	48	7.8	65	586.7	+19.0	-103.6
28	W12	蔵王山-W12-600m	602	38.1289	140.3703	49	8.4	70	602.1	+14.4	-96.2
29	W13	蔵王山-W13-500m	505	38.1328	140.3570	50	8.9	74	618.8	+19.9	-99.8
30	W14	蔵王山-W14-400m	422	38.4476	140.3385	51	9.1	75	624.2	+18.8	-97.2
31	W15	蔵王山-W15-300m	287	38.1507	140.3306	53	10.2	84	657.6	+17.9	-101.3
32	W16	蔵王山-W16-200m	218	38.1615	140.3067	55	10.6	87	670.6	+9.5	-96.9
	W16	蔵王山-W16-200m	218	38.1615	140.3067	55	10.6	86.5	670.6	+13.5	*

1) The inland index is the distance between the location and the nearest coastline.

2) The values of No.5-7 calculated from the equation of multi-regression analysis by Ohmori and Yanagimachi (1988).

#### (4) 陸域堆積物からの花粉化石と植物珪酸体試料の抽出

(1)~(3)の基礎的な研究に加え、本研究では、尾瀬ヶ原の湿原堆積物から完新世前期~後期のいくつかの堆積層準から花粉化石を、栃木県那須郡那珂川町芳井の火山灰土から後期更新世のいくつかの堆積層準から植物珪酸体試料を抽出した。これらの解析については、(1) (3)の検討課題のさらなる精査をふまえた上で実施する予定で、今後の検討課題としたい。

#### 5. 主な発表論文等

##### 【雑誌論文】(計7件)

1. Itoh., Hori K. and Takada M. (2017): Latest pleistocene to holocene alluvial basin construction: An example from the Nara Basin, central Japan. *Quaternary International*, 455, 102-112. (査読有)
2. Shimada, A., Takada, M. and Toyoda, S. (2017): Electron Spin Resonance Signals of Quartz in Present-day River Bed Sediments and Possible Source Rocks in the Kizu River Basin, Western Japan, *Geochronometria*, 43, 155-161. DOI 10.1515/geochr-2015-0039 (査読有)
3. Yoshida, M., Toyoda, S., Ninagawa, K., Takada, M. and Shimada, A. (2016): TL and ESR signals in quartz of Kurobe River Sediments. *Advances in ESR Applications*, 32, 4-10.
4. 前迫ゆり. 2019. 世界遺産阿須賀神社の社叢蓬萊山の植生とカワウの影響. *社叢学研究*, 16: 64-71
5. 前迫ゆり・幸田良介・佐々木燦・杉浦聖斗・花谷祐哉. 2018. 世界遺産春日山原始林におけるニホンジカの森林利用. *地域自然史と保全*. 40(2): 83-91.
6. 前迫ゆり・鈴木 亮・平芝 健・西浦大智. 2018. 照葉樹林に生育する不嗜好植物クリンソウに対するニホンジカの採食. *地域自然史と保全*. 40(123-33) (査読有)
7. 高田将志 (2015): 環境指標としてみた植物珪酸体の酸素同位体比. *奈良女子大学地理学・地域環境学研究報告*, , 63-70. (査読なし)

### 【学会発表】(計6件)

1. **高田将志** (2018): ジルコンのルミネッセンス信号、第35回 ESR 応用計測研究会、2018年度ルミネッセンス年代測定研究会、第43回日本フィッション・トラック研究会、合同研究会(神戸市) 2018/11/29
2. **高田将志**・大田千絵・三浦英樹 (2018): 植物のバイオクリスタルを用いた線量計測。第34回 ESR 応用計測研究会・2017年度ルミネッセンス年代測定研究会・第42回フィッション・トラック研究会合同大会(国立極地研究所)
3. 疋田真穂、谷佳美、**佐伯和彦** (2018): 宮古島の土壌とミヤコグサから単離された根粒菌多様性調査。植物微生物研究会・第28回研究交流会(鳥取大学)。
4. Toyoda S., Shimada A. and **Takada M.** (2017): ESR signals in quartz for the studies of earth surface processes. 2017 AGU Fall Meeting (San-Franshisco, USA) (国際学会)
5. Shimada, A., **Takada M.** and Toyoda S. (2017): Estimation of the mixing ratios from ESR signals of quartz in the possible source rocks that make up the present river bedsediments. ISMAR 2017 (Quebec, Canada)
6. Shimada, A., **Takada, M.** and Toyoda, S. (2016): ESR signals of quart in the present river bed sediments and in the possible source rocks. RSC Tokyo International Conference, JASIS Conference, Makuhari Messe, Japan, September 8-9, 2016. (poster)

### 【図書】(計1件)

1. 大田千絵・**高田将志** (2018): 甘葛煎とツタ樹液に含まれる針状結晶について。山辺規子編著『甘葛煎再現プロジェクト“よみがえる古代の甘味料”』かもがわ出版、102-105頁。(査読なし)

### 【その他】(計5件)

1. **高田将志** (2019): 附編2. 美濃庄遺跡における下部堆積層の火山噴出物。(奈良県遺跡調査概報 2017年度 第2分冊) 145-146、奈良県立橿原考古学研究所、2019/03/22
2. **高田将志** (2018): 第編 基準ポーリング 2.2.5 OSL年代測定。KG-NET・関西圏地盤研究会・一般社団法人 関西地質調査業協会 編『新関西地盤 奈良盆地』240-242頁。2018/09/28
3. **高田将志** (2017): 第4章第1節 堆積層の光ルミネッセンス(OSL) 特に post-IR IRSL年代。奈良県立橿原考古学研究所 調査報告第122冊 『名勝 奈良公園・興福寺跡 興福寺子院観音院跡の調査』所収、152頁(pp.121-123)
4. **高田将志** (2017): 第4章第1節 堆積層の光ルミネッセンス年代。奈良県文化財調査報告書 第172集 『藤原京右京十一條三坊・四坊 県道橿原神宮東口停車場飛鳥線建設事業に伴う発掘調査報告書V』所収、120頁(pp.87-89)
5. **高田将志** (2016): 空間の科学と時間の科学(リレーエッセイ 地球を俯瞰する自然地理学)。科学, 86, 995-997. (査読なし)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: **佐伯 和彦**

ローマ字氏名: Saeki Kazuhiko

所属研究機関名: 奈良女子大学

部局名: 自然科学系

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40201511

研究分担者氏名: **浅田 晴久**

ローマ字氏名: Asada Haruhisa

所属研究機関名: 奈良女子大学

部局名: 人文科学系

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 20713051

研究分担者氏名: **前迫 ゆり**

ローマ字氏名: Maesako Yuri

所属研究機関名: 大阪産業大学

部局名：デザイン工学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：90208546

(2)研究協力者

研究協力者氏名：**島田 愛子**

ローマ字氏名：Shimada Aiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。