

原 著

長谷川陽一^{1,2}・鈴木三男¹：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

Yoichi Hasegawa^{1,2} and Mitsuo Suzuki¹: An attempt to identify species
by amplifying ancient pollen DNA at the Tomizawa site, Sendai, Japan

要 旨 過去の植物の分布は、当時の堆積物に含まれる植物化石の分類群を形態形質を用いて同定することで明らかにされてきた。しかし、その分類群の同定は種子などの一部を除いて一般に属のレベルにとどまり、種のレベルで過去の植生を明らかにすることは難しかった。そこで本研究では、採集した花粉化石から PCR 法を用いて DNA を増幅し、その塩基配列を現生種のものと比較することで種の同定を試みた。仙台市富沢遺跡の約 2 万年前の堆積物から双眼実顕微鏡を用いてマツ科モミ属・トウヒ属の花粉化石を識別して取り出し、採集した花粉化石から葉緑体 DNA の *trnT-trnL* と *trnW-trnP* の 2 つの遺伝子間領域（それぞれ 160 bp, 158 bp）を増幅して、種の識別を試みた。その結果、採集した花粉化石 61 粒のうち、両遺伝子間領域で 1 粒ずつ計 2 粒の花粉化石から DNA の増幅が確認された。DNA の塩基配列を決定したところ、共にモミ属の DNA であり、ひとつは現生のモミ属 5 種の塩基配列と少なくとも 1 塩基の違いで異なった。もうひとつは現生のウラジロモミとシラビソの塩基配列と一致した。この結果、当時の仙台市には、現生モミ属樹種のうち少なくともウラジロモミまたはシラビソが生育していた可能性が示唆された。現在よりも寒冷な氷河期に、温かい南方に分布するこれらの樹種が北上して分布していたという意外な結果が得られた。

キーワード：花粉化石 DNA, 最終氷期, 種同定, モミ属, 葉緑体 DNA

Abstract The past vegetation has been clarified by identifying taxa based on morphological characteristics of fossil plant remains such as fossil pollen grains found in sediments. The identification of taxa from pollen grains is, however, generally at the genus level, and the species level identification from pollen grains has been difficult. To identify species from fossil pollen grains, we amplified DNA from fossil pollen grains using PCR methods. Fossil pollen samples were collected from the sediments of ca. 20,000 years ago at the Tomizawa site, Sendai. Two intergenic chloroplast DNA regions, *trnT-trnL* and *trnW-trnP* (160 and 158 bp long, respectively), were amplified from pollen grains that had been identified as *Abies* or *Picea* spp. morphologically. The PCR amplification was successful for two of the 61 pollen samples. The *trnT-trnL* sequence of one pollen sample differed from five *Abies* species occurring in Japan by at least one substitution. The other pollen sample had the same *trnW-trnP* sequence as *A. homolepis* and *A. veitchii*. The current northern limit of distribution of these species is in Fukushima Prefecture to the south. Thus, the results unexpectedly showed a northward distribution of *Abies* species growing in the south during the last glacial period.

Keywords: *Abies*, chloroplast DNA, fossil pollen DNA, last glacial period, species identification

はじめに

過去の植物の分布は、当時の堆積物に含まれる植物化石の分類群を形態形質を用いて同定することで明らかにされてきた。花粉化石の分析により約 2 万年前の東北地方には、トウヒ属が最も優勢でこれにモミ属、カラマツ属、ツガ属、マツ属をともなう針葉樹林が広がっていたことが明らかになっている（相馬・辻, 1987）。しかし気候の温暖化が進むにつれて、モミ属、トウヒ属といった北方系の針葉樹は分布域を狭め、現在その多くは分布域が北海道あるいは高標高地域に限られており、東北地方の平野には太平洋側に

モミ *Abies firma* が分布するのみである。現在、日本にはモミ属 *Abies* が 5 種、トウヒ属 *Picea* が 7 種分布している。最終氷期当時、東北地方に分布していたのがどの種であったのかは、同定が一般に属のレベルに留まる花粉化石からでは明らかにならない。最終氷期に広く東北地方に分布していたモミ属とトウヒ属がどのような分布変遷を経て現代へと至るのかを種のレベルで明らかにすることは、最終氷期から現代にかけての気候変動と植物の分布変遷との関係を明らかにするうえで重要である。

古植生を種のレベルで明らかにするためには、種のレベ

¹ 〒980-0862 宮城県仙台市青葉区川内 12-2 東北大学理学部附属植物園

Botanical Gardens, Tohoku University, Kawauchi 12-2, Aoba, Sendai, Miyagi 980-0862, Japan

² 〒016-0876 秋田県能代市海詠坂 11-1 秋田県立大学木材高度加工研究所

Institute of Wood Technology, Akita Prefectural University, Kaiezaka 11-1, Noshiro, Akita 016-0876, Japan

ルで同定が可能な大型植物遺体を同じ地層から取り出して、あわせて分析する必要があった。マツ科植物は主に球果の形態をもとに種の同定がなされている(岩田・草下, 1952)。トウヒ属は東北地方の最終氷期最寒冷期(およそ2万年前)の堆積物から保存状態の良い球果が多数産出している(例えば, Kobayashi et al., 2000)。一方、モミ属では球果が熟するとバラバラになってしまうため、モミ属球果の産出は少ない。東北地方では青森県の1カ所でトドマツ *A. sachalinensis* とされる球果が、また福島県の7カ所でシラビソ *A. veitchii* とされる球果が産出したのみであり、宮城、岩手、山形、新潟の各県では過去に産出例がない(Suzuki, 1991)。このため、最終氷期最寒冷期の青森県、福島県以外の東北地方に分布していたモミ属の種は明らかになっていない。

近年になり、過去の生物の遺体に残存するDNAをPCR法を用いて増幅して解析し、これを現代の生物のDNAと比較して、過去と現代の生物のつながりを明らかにしようとするAncient DNAの研究が盛んに行われるようになってきた(Handt et al., 1994; Gugerli et al., 2005; Parducci et al., 2012)。生物遺体からDNAを増幅しこれを現生種のDNAと比較することで、形態形質からでは不可能であった生物遺体の種レベルでの同定が可能になる。しかし、生物遺体に含まれるDNAは堆積物に埋積している間に、酸化反応や加水分解によって短く断片化されてしまっており、長いDNA鎖を増幅することは難しいと考えられる(Lindahl, 1993)。このため、Ancient DNA研究においては増幅するDNA鎖をできる限り短く設定し、PCRによる増幅効率を高めることが行われている(Handt et al., 1994)。

Suyama et al. (1996) は、約15万年前のモミ属の花



図1 花粉化石試料の採集地(宮城県仙台市富沢遺跡)。

Fig. 1 Map showing the sampling locality of the fossil pollen at the Tomizawa site, Sendai, Miyagi, Japan.

から390塩基の葉緑体DNAを増幅し、この花粉化石がモミ *A. firma* のものであることを明らかにした。この研究で用いられた手法で特筆すべき点は、現生・遺体を問わず必ず行われていた植物細胞からのDNA抽出の作業を行わずに、花粉化石1粒を直接PCR反応液に入れてDNAの増幅に成功したことである。これにより、抽出作業を省略し効率化を図るとともに、抽出操作によるDNAの損失を避けて、花粉化石に残るDNAを効率よく増幅することが可能になった。

そこで、本研究では、花粉化石から葉緑体DNAを増幅してそのDNA多型性を利用して種の識別を行う手法を用いて、最終氷期の東北地方に広く分布していたモミ属の種の分布を明らかにすることを目指した。そのために、1) モミ属において、できる限り短いDNA領域で種の識別が可能な領域の発見と、その領域を増幅するプライマーの開発を行った。その後、2) 東北地方の最終氷期の堆積物から採集した花粉化石1粒ずつからDNAの増幅を行い、その種の識別を試みた。

材料と方法

1. 堆積物からのモミ属・トウヒ属花粉の同定と採集

形態形質に基づいたモミ属・トウヒ属花粉の同定を行った。同じマツ科に属するモミ属、トウヒ属、マツ属の花粉は、本体が楕円形で左右に球形の気嚢が2個付くことが特徴で

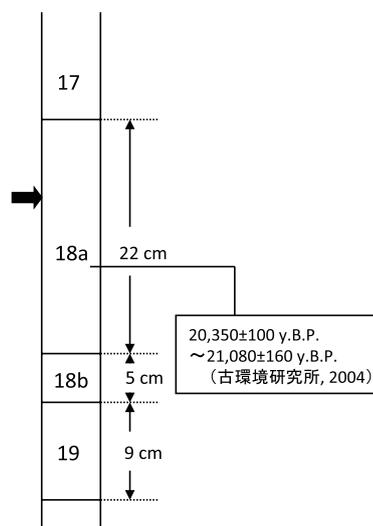


図2 堆積物採集地点の柱状図。柱状図内の数字は富沢遺跡第126次調査における層序番号。18a層の年代は木材の放射性炭素年代測定の結果。柱状図左側の矢印は花粉採集地点。

Fig. 2 Stratigraphic sequence of the sampling location. The layer numbers follow the 126th report of the Tomizawa site. Radiocarbon dates are obtained from wood remains. Arrow indicates the sampling horizon of the fossil pollen grains.

表 1 DNA 分析用の現生モミ属・トウヒ属の試料

Table 1 DNA samples of extant *Abies* and *Picea*

| 学名 | 和名 | 採集地 | 採集者 | TUS |
|---|----------|----------|-------------------|-----------------------------------|
| <i>Abies firma</i> | モミ | 宮城県仙台市 | 東北大学大学院理学研究科附属植物園 | Y. Hasegawa |
| <i>A. homolepis</i> | ウラジロモミ | 宮城県仙台市 | 東北大学大学院理学研究科附属植物園 | * Y. Hasegawa |
| <i>A. mariesii</i> | オオシラビソ | 青森県十和田湖町 | 高田菟飯泉沼西 | K. Yonekura et al. 260386 |
| <i>A. sachalinensis</i> | トドマツ | 北海道中川町 | 北海道大学中川演習林 | S. Noshiro et al. |
| <i>A. veitchii</i> | シラビソ | 山梨県芦安町 | 野呂川北沢 | S. Noshiro et al. 258201 |
| <i>Picea alcoquiana</i> | イラモミ | 栃木県日光市 | 東京大学理学部附属植物園日光分園* | J. Yokoyama & K. Kobayashi 214007 |
| <i>P. glehnii</i> | アカエゾマツ | 岩手県下閉伊郡 | 早池峰山 | K. Kobayashi et al. |
| <i>P. jezoensis</i> | エゾマツ | 北海道雨竜郡 | 北海道大学雨竜演習林 | K. Kobayashi et al. 169278 |
| <i>P. jezoensis</i> var. <i>hondoensis</i> | トウヒ | 栃木県日光市 | 東京大学理学部附属植物園日光分園* | J. Yokoyama & K. Kobayashi 214003 |
| <i>P. koyamae</i> | ヤツガタケトウヒ | 栃木県日光市 | 東京大学理学部附属植物園日光分園* | J. Yokoyama & K. Kobayashi 214001 |
| <i>P. maximowiczii</i> | ヒメバラモミ | 長野県川上村 | | M. Suzuki & J. Yosikawa 293305 |
| <i>P. maximowiczii</i> var. <i>senanensis</i> | アズサバラモミ | 長野県南佐久郡 | 梓山千丈平 | M. Suzuki & J. Yosikawa 217844 |
| <i>P. torano</i> | ハリモミ | 奈良県当麻町 | | R. Hirano |
| <i>P. sibirica</i> | ヒメマツハダ | 長野県富士見町 | 八ヶ岳山系西岳 | K. Kobayashi et al. 169328 |

*: 植栽, TUS: 東北大学大学院理学研究科生物学教室植物標本庫

*: cultivated, TUS: voucher specimens in the Herbarium of the Botanical Gardens, Graduate School of Science, Tohoku University

ある (中村, 1980)。マツ属の花粉を他の 2 つの属と分ける特徴は花粉の大きさにあり, マツ属の花粉は 43–67 μm であり, トウヒ属 65–95 μm , モミ属 75–110 μm より特に小さいため識別が可能である (藤, 1987)。一方で, トウヒ属とモミ属の花粉の識別には, 顕微鏡を用いた詳細な形態の判別が必要である (鳥倉, 1973; 中村, 1980)。しかしながら, 本研究では花粉化石を同定した後に取り出して分析しなければならないため, カバーガラスを掛けることをせず, 顕微鏡に比べて低倍率な双眼実体顕微鏡を用いて花粉化石の同定を行った。そこで, まず大きさとマツ属を区別して, 形態からの判別の難しいモミ属とトウヒ属の花粉は花粉からの DNA 増幅の有無および増幅した DNA 塩基配列をもとにして識別することとした。

本研究に用いた最終氷期の堆積物の試料は, 2003 年 10 月に宮城県仙台市太白区長町南四丁目の富沢遺跡第 126 次調査 (E140° 52', N38° 13') において採集した (図 1)。18a, 18b, 19 の連続する層をブロックで採集し, 18a 層を花粉化石採集のための試料とした (図 2)。この 18a 層から産出した木材遺体は 20,350 \pm 100 ~ 21,080 \pm 160 yBP と年代測定がされている (古環境研究所, 2004)。

採集した堆積物からモミ属・トウヒ属の花粉化石を取り出した。以下の操作は, Suyama et al. (1996) で行われた操作を参考に行った。堆積物のブロックの表面を削り落とした後, 高さ 2 mm, 幅 1 cm, 奥行き 1 cm ほどの堆積物を切り出し, これを乳鉢に滅菌水とともに加えた。乳棒ですりつぶした後, 0.5 mm と 0.125 mm のふるいにかけた。

けん濁液をスライドガラスに一滴落とし, 双眼実体顕微鏡下でマイクロピペットを用いてモミ属・トウヒ属の花粉を 1 粒だけ取り出し, スライドガラスに置いた滅菌水で 10 回洗浄した。スライドガラスには, スーパーレイン・X (錦之堂) を塗布し, 水がスライドガラス上で球になるようにした。また, マイクロピペットは, 現生の DNA を一度も扱っていないものを使用し, 現生 DNA のコンタミネーションを防止した。花粉 1 粒ずつを滅菌水と共に PCR チューブに取り, これを DNA 増幅用のテンプレートとした。

2. 現生モミ属・トウヒ属の葉緑体 DNA の塩基配列決定

現生の日本産モミ属およびトウヒ属の解析に用いた DNA は針葉から抽出した。針葉は, 東北大学理学研究科附属植物園標本庫 (TUS) に収められたさく葉標本から採集したもの, あるいは生葉を採集しシリカゲルで乾燥させたものを用いた (表 1)。

針葉は個体ごとに約 50 mg ずつ測り取ってチューブに入れ, チューブごと液体窒素で凍結させた後, ミキサーミル (MM200, Retsch) を用いて粉碎した。粉碎した針葉から Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA の抽出を行った。

日本産モミ属 5 種各 1 個体 (表 1) について葉緑体 DNA の 2 つの遺伝子間領域 *trnT-trnL* と *trnW-trnP* の塩基配列を決定した。使用したプライマーは, それぞれ *trnTL a* と *trnTL b*, *psaJ-petG F* と *psaJ-petG R* である (表 2, 図 3)。また, 日本産トウヒ属 7 種 2 変種 (表 1) につ

表2 モミ属・トウヒ属の葉緑体 DNA 塩基配列決定のためのプライマー

Table 2 PCR primers used to amplify the chloroplast DNA sequences of *Abies* and *Picea*

| プライマー名 | 位置 | 配列 (5'-3') | プライマーサイトに対する配列のマッチング (%) | | PCR 産物の長さ (bp) | アニーリング温度 (°C) | 対象 | 引用 |
|-------------------------|-------|------------------------|--------------------------|--------|----------------|---------------|--------|------------------------|
| | | | モミ属 | トウヒ属 | | | | |
| <i>trnT-trnL</i> 遺伝子間領域 | | | | | | | | |
| trnTL a | 54051 | CATTACAAATGCGATGCTCT | - | - | 477 | 55.0 | 現生モミ属 | Taberlet et al. (1991) |
| trnTL b | 54527 | TCTACCGATTTGCGCCATATC | - | - | | | | |
| PtrnTL F | 54242 | GGGAAAGAAAAGGGAAGTAA | 90 | 100 | 160 | 53.6 | 花粉化石 | ※ |
| PtrnTL R | 54401 | TCTCGCCATCTCTATCTCTAC | 100 | 100 | | | | |
| <i>trnW-trnP</i> 遺伝子間領域 | | | | | | | | |
| psaJ-petG F | 76279 | TCCGGAATTGTGTTAGGTC | - | - | 863 | 50.5 | 現生モミ属 | ※ |
| psaJ-petG R | 75417 | CGCTGTGGAAAGATAGGTC | - | - | | | | |
| trnW-trnP f | 76024 | TGGAGACCCACGTTCTACC | - | - | 223 | 55.0 | 現生トウヒ属 | 陶山佳久 (私信) |
| trnW-trnP r | 75802 | TCAAATCCTGTGCATCCCTACC | - | - | | | | |
| PtrnWP F | 76009 | TACCGAACTGAACTAAGAG | 100 | 100 | 158 | 51.3 | 花粉化石 | ※ |
| PtrnWP 1R | 75853 | AACGAAAGATCATTTTATATC | 100 | 91-100 | | | | |
| PtrnWP 2R | 75879 | GAATCGAACATCAAATAAT | 100 | 58 | 131 | | | |

位置: *Picea morrisonicola* (ニイタカトウヒ) の葉緑体 DNA 塩基配列 (Wu et al., 2011; Accession No. NC_016069.1) における 5' 端塩基の位置。

※ 印のプライマーは本研究で作成したもの。

Position: positions of the 5' end base are numbered according to the *Picea morrisonicola* chloroplast DNA sequence (Wu et al., 2011; Accession No. NC_016069.1). ※ PCR primers designed in this study.

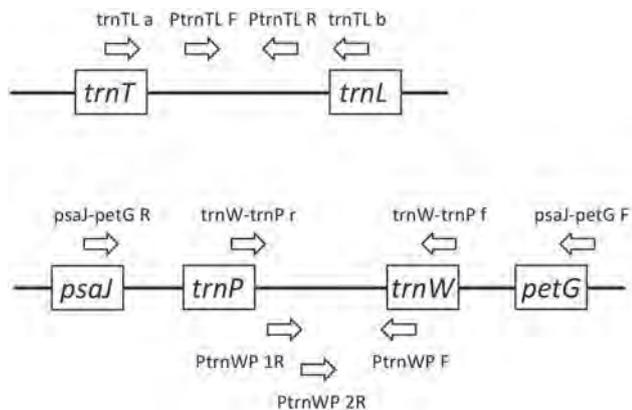


図3 遺伝子領域とプライマーサイトの位置。

Fig. 3 Positions of the gene regions and the primer sites.

いて葉緑体 DNA の1つの遺伝子間領域 *trnW-trnP* の塩基配列を決定した。使用したプライマーは、*trnW-trnP f* と *trnW-trnP r* である (表2, 図3)。日本産トウヒ属の *trnT-trnL* 遺伝子間領域の塩基配列は Kobayashi et al. (2000) (アクセッション番号: AB045054, AB045056-AB045063) から引用した。

DNA 抽出溶液 1 µl に dNTP Mix (2 mM each dNTP) 5 µl, 10×PCR Buffer (Contains 15 mM MgCl₂) 5 µl, プライマー (25 µM) 0.5 µl ずつ, AmpliTaq Gold™ DNA polymerase (Applied Biosystems) 1.25 U, 滅菌水 37.75 µl を加え, サーマルサイクラー (iCycler, Bio-Rad) を用いて, 95°C 10 分の後, 95°C 20 秒, アニーリング

温度で 1 分, 72°C 1 分を 40 ~ 50 サイクル, 72°C 7 分の条件で PCR を行った。アニーリング温度は使用するプライマーに合わせて設定した (表2)。以降に行うサイクル PCR を除く PCR 反応において, 反応条件は上記のものを用い, アニーリング温度のみプライマーに合わせて変更した。PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

増幅した DNA 断片の塩基配列決定には, BigDye Terminator Cycle Sequencing v2.0 (Applied Biosystems) を用いた。塩基配列の決定はフォワードプライマー側, リバースプライマー側の両端から行い, 双方の配列を比較して配列決定の正確さを期した。精製した PCR 産物 3 µl に BigDye Terminator Ready Reaction Mix を 2 µl, プライマー (1 µM) を 1.6 µl, 10×PCR Buffer (Contains 15 mM MgCl₂) を 0.5 µl, 滅菌水 2.9 µl を加え, iCycler で 96°C 1 分 30 秒の後, 96°C 10 秒, 50°C 5 秒, 60°C 4 分を 25 サイクルの条件でサイクル PCR を行った。増幅産物を DyeEX Spin Columns (QIAGEN) を用いて精製し, シーケンサー (310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列は, GENETYX-MAC 10.1.6 (Software Development Co., Ltd.) を用いてアライメントを取り, 必要な箇所には手動で補正を加えた後に種間で比較し, 種の識別が可能な変異を探した。

3. 花粉化石の葉緑体 DNA の塩基配列決定

trnT-trnL 遺伝子間領域の 160 塩基を増幅するプライマー P

同様に、*trnW-trnP* 遺伝子間領域の 158 塩基を増幅するプライマー P

採集した花粉化石 1 粒を滅菌水 15 μ l を加えたチューブに取り、これに、dNTP Mix (2 mM each dNTP) 2 μ l, 10 \times PCR Buffer (Contains 15 mM MgCl₂) 2 μ l, プライマー (25 μ M) 0.2 μ l ずつ、AmpliTaq Gold™ DNA polymerase 0.31 U を加え、iCycler を用いて PCR を行い DNA 断片の増幅を試みた。また、PCR を行った全ての花粉化石について、スライドガラス上で最後に花粉化石の洗浄に用いた滅菌水を 0.5 μ l とり、これに PCR 反応試薬を加えてネガティブコントロールとした。ポジティブコントロールには、モミ *Abies firma* (表 1) 1 種を常に用いた。

塩基配列を決定する際に必要となる PCR 産物の量の不足を補うために、アガロース電気泳動によって DNA の増幅が認められた 2 つの花粉化石試料 (花粉化石_1, 花粉化石_2) について PCR 産物を鋳型にして 2 回目の PCR を行った。滅菌水 35.75 μ l に PCR 増幅溶液 3 μ l, dNTP Mix (2 mM each dNTP) 5 μ l, 10 \times PCR Buffer (Contains 15 mM MgCl₂) 5 μ l, プライマー (25 μ M) 0.5 μ l ずつ、AmpliTaq Gold™ DNA polymerase 1.25 U を加え、iCycler を用いて PCR を行った。増幅は花粉化石_1 において P

結 果

1. 現生のモミ属・トウヒ属の葉緑体 DNA 塩基配列

モミ属 5 種各 1 個体 (表 1) について *trnT-trnL* 遺伝子間領域の塩基配列を決定した。アライメントを行った結果、コンセンサス配列長は 428 塩基となった (アクセッション番号: AB750619–AB750623)。この領域では、4 塩基座

位で塩基置換を認めた。また、モミ、ウラジロモミ、トドマツ、シラビソは同じ配列であった。この領域に含まれる塩基置換によって、モミ、ウラジロモミ、トドマツ、シラビソの 4 種と、オオシラビソの 2 群に分類できた。そこで、モミ属 5 種をこの 2 群に分類することのできる *trnT-trnL* 遺伝子間領域の 160 塩基を花粉化石から増幅することにした。

次に、モミ属 5 種各 1 個体 (表 1) について *trnW-trnP* 遺伝子間領域の塩基配列を決定した。アライメントを行った結果、コンセンサス配列長は 837 塩基となった (アクセッション番号: AB750624–AB750628)。この領域では、11 塩基座位で塩基置換を、1ヶ所で欠失を認めた。これらの塩基置換と挿入/欠失によって、モミ、ウラジロモミ、オオシラビソ、シラビソ、オオシラビソの 5 種に分類できた。そこで、モミ属 5 種をモミ、ウラジロモミ・シラビソ、オオシラビソ、トドマツの 4 群に分類することのできる *trnW-trnP* 遺伝子間領域の 158 塩基を花粉化石から増幅することにした。

また、これらの領域の塩基配列を比較することで、モミ属 5 種をトウヒ属 7 種 2 変種と識別することが可能であった (図 4, 5)。

2. 花粉化石の葉緑体 DNA 塩基配列

富沢遺跡の 18a 層の堆積物から採集した花粉化石 61 粒は保存状態が良く立体的な形態を保っており、形態形質に基づいてモミ属花粉あるいはトウヒ属花粉と同定された。これらのうち 43 粒を *trnT-trnL* 領域の増幅に、残り 18 粒を *trnW-trnP* 領域の増幅に供試した。プライマー PtrnT-trnL 遺伝子間領域におけるモミ、ウラジロモミ、シラビソ、トドマツの対応する領域の塩基配列と 1 塩基の違いで異なった (図 4, 8)。この 1 塩基は、現生のモミ属 5 種おいてはいずれの種もシトシン (C) であったが、花粉化石_1 から増幅した塩基配列においてはチミン (T) であった。また、花粉化石_2 から増幅した DNA の塩基配列は、*trnW-trnP* 遺伝子間領域におけるウラジロモミとシラビソの対応する領域の塩基配列に完全に一致した (図 5, 9)。これにより、花粉化石_2 はウラジロモミあるいはシラビソのものであると同定された。

花粉化石を洗浄するために用いた滅菌水を PCR 反応試薬に加えて行ったネガティブコントロールにおいては、DNA の増幅は確認されなかった。

| | | | |
|---|----|--|-----|
| Fossil pollen_1 | 1 | GGAAGGGTCAATTGATATTGATAATTTGACTCACTATTCCAATTCGACTAGAGGAGGATAATAACATTGCATTGAAAAATGCAGAAATAATATAAT | 95 |
| <i>Abies firma</i> | 1 |C..... | 95 |
| <i>A. homolepis</i> | 1 |C..... | 95 |
| <i>A. mariesii</i> | 1 |C.....T..... | 95 |
| <i>A. sachalinensis</i> | 1 |C..... | 95 |
| <i>A. veitchii</i> | 1 |C..... | 95 |
| <i>Picea alcoquiana</i> | 1 | ..TT----.T...C...CG...T.....C.....G.....T...A..... | 91 |
| <i>P. glehnii</i> | 1 | ..T.----.TC...C...CG...T.....C.....G.....T..... | 91 |
| <i>P. jezoensis</i> | 1 | ..T.----.T...C...CG...T.....C.....G.....T..... | 91 |
| <i>P. jezoensis</i> var. <i>hondoensis</i> | 1 | ..T.----.T...C...CG...T.....C.....G.....T..... | 91 |
| <i>P. koyamae</i> | 1 | ..T.----.TC...C...CG...T.....C.....G.....T..... | 91 |
| <i>P. maximowiczii</i> | 1 | ..T.----.T...C...CG...T.....C.....G.....T...A..... | 91 |
| <i>P. maximowiczii</i> var. <i>senanens</i> | 1 | ..T.----.T...C...CG...T.....C.....G.....T...A..... | 91 |
| <i>P. torano</i> | 1 | ..T.----.T...C...CG...T.....C.....G.....T...A..... | 91 |
| <i>P. shirasawae</i> | 1 | ..T.----.TC...C...CG...T.....C.....G.....T..... | 91 |
| Fossil pollen_1 | 96 | GATTCCAGTCAC----ATTTCGATTGGG | 119 |
| <i>Abies firma</i> | 96 | | 119 |
| <i>A. homolepis</i> | 96 | | 119 |
| <i>A. mariesii</i> | 96 | | 119 |
| <i>A. sachalinensis</i> | 96 | | 119 |
| <i>A. veitchii</i> | 96 | | 119 |
| <i>Picea alcoquiana</i> | 92 | ...A...C..GTAAT..... | 119 |
| <i>P. glehnii</i> | 92 | ...A...C..GTAAT..... | 119 |
| <i>P. jezoensis</i> | 92 | ...A...C..GTAAT..... | 119 |
| <i>P. jezoensis</i> var. <i>hondoensis</i> | 92 | ...A...C..GTAAT..... | 119 |
| <i>P. koyamae</i> | 92 | ...A...C..GTAAT..... | 119 |
| <i>P. maximowiczii</i> | 92 | ...A...C..GTAAT..... | 119 |
| <i>P. maximowiczii</i> var. <i>senanens</i> | 92 | ...A...C..GTAAT..... | 119 |
| <i>P. torano</i> | 92 | ...A...C..GTAAT..... | 119 |
| <i>P. shirasawae</i> | 92 | ...A...C..GTAAT..... | 119 |

図 4 花粉化石_1 および現生のモミ属・トウヒ属から増幅した *trnT-trnL* 遺伝子間領域の葉緑体 DNA の塩基配列。点 (.) は花粉化石_1 と同じ塩基を示し、ハイフン (-) は挿入/欠失を示す。塩基配列のアクセッション番号は、AB750638 (花粉化石_1), AB750619–AB750623 (モミ属), AB045054, AB045056–AB045063 (トウヒ属; Kobayashi et al., 2000)。

Fig. 4 Sequences of the spacer region between *trnT* and *trnL* in chloroplast DNA from fossil pollen_1 and extant species of *Abies* and *Picea*. Dots indicate identical bases to those of fossil pollen_1, and dashes indicate insertions/deletions. Accession Nos. AB750638 (fossil pollen_1), AB750619–AB750623 (*Abies* species), AB045054, AB045056–AB045063 (*Picea* species; Kobayashi et al., 2000).

| | | | |
|---|---|---|----|
| Fossil pollen_2 | 1 | CGCTTTCTTAAAAAATATG-GAGATAAAGGGAATAAAAAATACCTTTTCGTTGATACTCTACGAGTATCAAAACATTTTTGCATCTGATACGATTCA | 94 |
| <i>Abies firma</i> | 1 |GTA..... | 94 |
| <i>A. homolepis</i> | 1 | | 94 |
| <i>A. mariesii</i> | 1 | | 93 |
| <i>A. sachalinensis</i> | 1 |A..... | 94 |
| <i>A. veitchii</i> | 1 | | 94 |
| <i>Picea alcoquiana</i> | 1 |A..T..C.TCCG.A...A.GGAAAGGA.C.....T.....T.....TA.....C...C..... | 92 |
| <i>P. glehnii</i> | 1 |A..TC.C.TCCG.A...A.GGAAAGGA.C.....T.....T.....TA.....C...C..... | 92 |
| <i>P. jezoensis</i> | 1 |A..TC.C.TCCG.A...A.GGAAAGGA.C.....T.....T.....TA.....C...C..... | 92 |
| <i>P. jezoensis</i> var. <i>hondoensis</i> | 1 |A..TC.C.TCCG.A...A.GGAAAGGA.C.....T.....T.....TA.....C...C..... | 92 |
| <i>P. koyamae</i> | 1 |A..TC.C.TCCG.A...A.GGAAAGGA.C.....T.....T.....TA.....C...C..... | 92 |
| <i>P. maximowiczii</i> | 1 |A..T..C.TCCG.A...A.GGAAAGGA.C.....T.....T.....TA.....C...C..... | 92 |
| <i>P. maximowiczii</i> var. <i>senanens</i> | 1 |A..T..C.TCCG.A...A.GGAAAGGA.C.....T.....T.....TA.....C...C..... | 92 |
| <i>P. torano</i> | 1 |A..T..C.TCCG.A...A.GGAAAGGA.C.....T.....T.....TA.....C...C..... | 92 |
| <i>P. shirasawae</i> | 1 |A..TC.C.TCCG.A...A.GGAAAGGA.C.....T.....T.....TA.....C...C..... | 92 |

図 5 花粉化石_2 および現生のモミ属・トウヒ属から増幅した *trnW-trnP* 遺伝子間領域の葉緑体 DNA の塩基配列。点 (.) は花粉化石_2 と同じ塩基を示し、ハイフン (-) は挿入/欠失を示す。塩基配列のアクセッション番号は、AB750639 (花粉化石_2), AB750624–AB750628 (モミ属), AB750629–AB750637 (トウヒ属)。

Fig. 5 Sequences of the spacer region between *trnW* and *trnP* in chloroplast DNA from the fossil pollen_2 and extant species of *Abies* and *Picea*. Dots indicate identical bases to those of fossil pollen_2, and dashes indicate insertions/deletions. Accession Nos. AB750639 (fossil pollen_2), AB750624–AB750628 (*Abies* species), AB750629–AB750637 (*Picea* species).

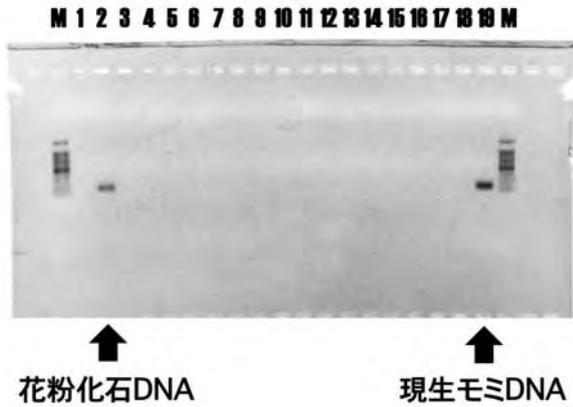


図6 花粉化石_1から増幅した *trnT-trnL* 遺伝子間領域 160塩基の DNA 断片. Mは DNA サイズマーカーを, 偶数のレーンは花粉化石からの DNA 増幅産物を, レーン2は花粉化石_1からの増幅成功を示す. 1-17の奇数のレーンはネガティブコントロールを, レーン19は現生モミ *Abies firma* の DNA をテンプレートとしたポジティブコントロールを示す.

Fig. 6 Amplification product of DNA recovered from fossil pollen_1 using the first PCR primers showing a 160-bp fragment of the region between *trnT* and *trnL* in chloroplast DNA. M is molecular weight marker. Even-numbered lanes are amplification products from fossil pollen, with a positive result in lane 2. Odd-numbered lanes 1-17 are amplification-negative controls. Lane 19 is a positive control (amplification product from extant *Abies firma*).

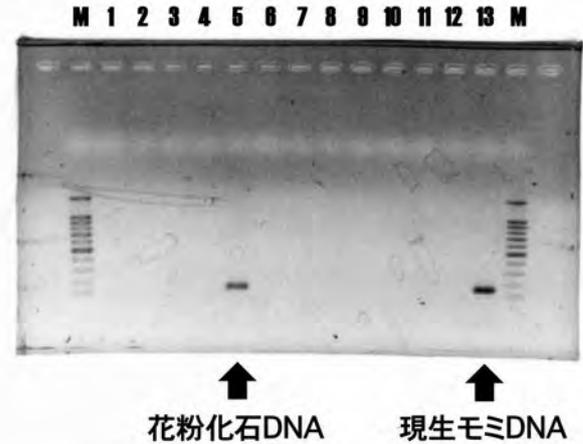


図7 花粉化石_2から増幅した *trnW-trnP* 遺伝子間領域 158塩基の DNA 断片. Mは DNA サイズマーカーを, 1-11の奇数のレーンは花粉化石からの DNA 増幅産物を, レーン5は花粉化石_2からの増幅成功を示す. 偶数のレーンはネガティブコントロールを, レーン13は現生モミ *Abies firma* の DNA をテンプレートとしたポジティブコントロールを示す.

Fig. 7 Amplification product of DNA recovered from fossil pollen_2 using the first PCR primers showing a 158-bp fragment of the region between *trnW* and *trnP* in chloroplast DNA. M is molecular weight marker. Odd-numbered lanes 1-11 are amplification products from fossil pollen, with a positive result in lane 5. Even-numbered lanes are amplification-negative controls. Lane 13 is a positive control (amplification product from extant *Abies firma*).

考 察

1. 増幅した DNA が花粉化石由来であることの根拠

遺物から DNA を増幅する研究において, 現生の植物由来の組織や DNA が混入し, これが PCR によって増幅されるコンタミネーションの危険は, 常についてまわる問題である。しかし, 花粉化石の洗浄水を用いたネガティブコントロールにおいて DNA 断片の増幅が確認されなかったことから, 現生植物の DNA によるコンタミネーションは発生しなかったと推測される。

2. 最終氷期の宮城県仙台市に分布していたモミ属の種に関して

本研究において, 宮城県仙台市にある富沢遺跡から採集したモミ属の花粉化石は DNA 多型を解析した結果, 1粒(花粉化石_1; *trnT-trnL* 領域)はモミ, ウラジロモミ, シラビソ, トドマツの4種と1塩基の違いで異なり, いずれの種にも同定されなかった。もう1粒(花粉化石_2; *trnW-trnP* 領域)はウラジロモミとシラビソの塩基配列と一致し, 2種のうちのどちらかのもと同定された。従って, 花粉化石_2の結果から最終氷期約2万年前の宮城県仙台

市には, 現生モミ属樹種のうち少なくともウラジロモミまたはシラビソが生育していた可能性が示唆された。

仙台市富沢遺跡 18a 層の調査区内に分布していた樹木に関して, 化石が産出したその場の植生を表す根株の木材化石は, トウヒ属とカラマツ属のものが産出し, モミ属のものは産出していない(吉川, 2004a)。一方で, より広域的な植生を反映する花粉分析では, 18a 層から採集された425個の植物花粉のうちモミ属の花粉は47個(11.1%)と, カバノキ属(89個; 20.9%), トウヒ属(89個; 20.9%)について3番目に多く産出している(吉川, 2004b)。モミ属の花粉は, 一般に他の風媒樹木のものに比べて散布距離が短いことが知られている(Janssen, 1984; Jackson et al., 1997; Jackson & Lyford 1999; Poska & Pidek, 2010)。Janssen (1984) は, モミ属を主として, カバノキ属, トウヒ属, カラマツ属を伴う現生の森林において, モミ属樹木からの距離と地表の花粉組成の関係を調べ, およそ200mでモミ属の花粉が確認されなくなることを示している。このモミ属花粉の散布パターンに当てはめると, 富沢遺跡 18a 層における11.1%のモミ属花粉の比率は, 調査区から約110m離れた場所にモミ属の樹木が分布していたこ

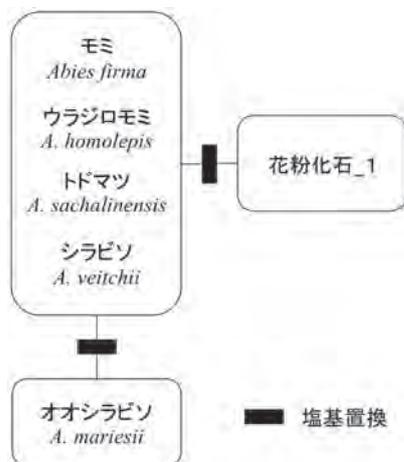


図 8 花粉化石_1 と現生モミ属の *trnT-trnL* 遺伝子間領域の葉緑体 DNA の塩基配列に基づくハプロタイプネットワーク。黒いボックス 1 個は、1 塩基の置換を表す (図 4 参照)。

Fig. 8 Haplotype network of fossil pollen_1 and extant *Abies* species based on the sequence of the spacer region between *trnT* and *trnL* in chloroplast DNA. One solid box shows a base substitution mutation (see Fig. 4).

とを示唆している。

これまで、東北地方の最終氷期の終わり頃 (約 1 ~ 2 万年前) のモミ属の種の分布については、種レベルまで同定が可能な球果の植物遺体によって研究されており、青森県にトドマツが、福島県にはシラビソが、福島県より南の地域にはウラジロモミが分布していたことが明らかになっている (Suzuki, 1991; 守田, 2000)。しかし、モミ属の球果は比較的分解されやすい性質を持つことから、宮城、岩手、山形、新潟の各県では過去に産出例がない。本研究において、宮城県富沢遺跡の約 2 万年前のモミ属の花粉がウラジロモミあるいはシラビソのものであることが明らかになったことで、現在よりも寒冷な氷河期に、温かい南方に分布するこれらの樹種が北上して分布していたという意外な結果が得られた。

では、当時宮城県に分布していたのはウラジロモミであろうか、シラビソであろうか。シラビソは現代の分布においてウラジロモミよりも気温の低い地域に分布していることから、より寒冷な気候に適応した種であると考えられる (吉良・吉野, 1967)。一方で、両種の全産地数の 16% では共存関係が認められている (大島, 1994)。このようにシラビソとウラジロモミの分布は重なることがあることから、富沢遺跡に分布していた樹種はウラジロモミあるいはシラビソのどちらかが分布していた可能性や 2 種が共存していた可能性も考えられる。

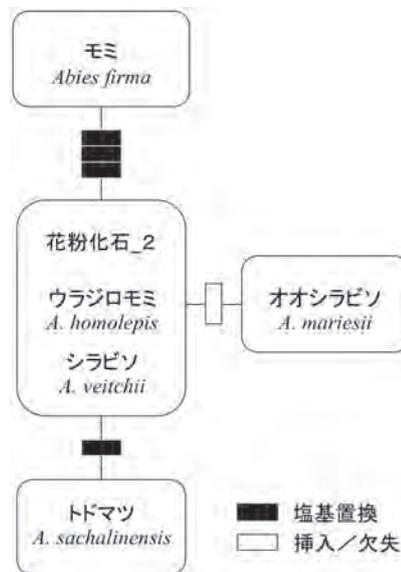


図 9 花粉化石_2 と現生モミ属の *trnW-trnP* 遺伝子間領域の葉緑体 DNA の塩基配列に基づくハプロタイプネットワーク。黒いボックス 1 個は 1 塩基の置換を表し、白いボックス 1 個は 1 塩基の挿入/欠失を表す (図 5 参照)。

Fig. 9 Haplotype network of fossil pollen_2 and extant *Abies* species based on the sequence of the spacer region between *trnW* and *trnP* in chloroplast DNA. One solid box shows a base substitution mutation, and one open box shows an insertion/deletion (see Fig. 5).

3. 花粉化石のみに見られたチミン (T) 塩基置換

花粉化石_1 から *trnT-trnL* 遺伝子間領域の塩基を増幅し、これを現生のモミ属の塩基配列と比較したところ、1 つの塩基座位で現生の 5 種には見られない変異が確認された。現生種ではいずれの種においてもシトシン (C) であったが、花粉化石_1 から増幅した塩基配列においてはチミン (T) であった。

現生種には見られず、遺物から増幅した DNA にのみ確認される変異について、Hofreiter et al. (2001) は動物の骨や歯の遺体から PCR を用いて DNA の増幅を行った際に、シトシン (C) →チミン (T)、グアニン (G) →アデニン (A) への変異が高い頻度で確認されることを明らかにし、これを遺物に含まれる損傷した DNA を PCR によって増幅する際に生じるものと述べている。本研究においても、同様な現象が起きた可能性がある。一方、本研究で行なった現生種の DNA 塩基配列の解析では見つけることのできなかつた種内変異 (チミン (T)) である可能性や、2 万年前から現在への時間の経過に伴って消滅してしまった種内変異である可能性も考えられる。

4. 花粉化石からの DNA 増幅成功率と種同定の精度を向上させるために

本研究における花粉化石からの DNA 増幅成功率は 3.3% (2/61 粒) であった。この値は、およそ 15 万年前の花粉化石から DNA の増幅に成功した Suyama et al. (1996) における 3.2% (4/125 粒) とほぼ同じであった。この増幅成功率が向上すれば作業時間の短縮が可能になる。

PCR 法を用いて DNA を増幅する際には、使用したプライマーの塩基配列と鋳型となる DNA 上のプライマーサイトとの間にミスマッチが存在すると、DNA 増幅効率が低下すると考えられる。本研究において作成したプライマー PtrnTL F の塩基配列とモミ属の葉緑体 DNA 塩基配列には 10% のミスマッチが、PtrnWP 1R および 2R とトウヒ属の塩基配列との間には 0~9% および 42% のミスマッチがそれぞれ存在した (表 2)。従って、本研究において PtrnTL F・R とモミ属および PtrnWP F・1R・2R とトウヒ属の組合せで花粉化石に対してプライマーを使用した場合には、増幅成功率が低下していた可能性が考えられる。花粉化石からの DNA 増幅成功率を高めるためには、モミ・トウヒの両属に対してミスマッチの無いプライマー領域を探索する必要がある。

本研究では、*trnT-trnL* と *trnW-trnP* 遺伝子間領域 (それぞれ 160bp, 158bp) のいずれを用いてもモミ属花粉化石を単一の種にまで同定することはできなかった。近年、複数の遺伝子領域を一度の PCR によって増幅させるマルチプレックス PCR 法が開発され、花粉一粒からの DNA 増幅においてもこの手法が有効であることが示されている (例えば、Matsuki et al., 2007; Hasegawa et al., 2009)。種の識別に有効な多型を含む遺伝子領域の探索をさらに進めると共に、この手法を用いることで、複数の遺伝子領域の多型情報を用いた花粉化石のより高精度の種同定が可能になると考えられる。

謝 辞

東北大学大学院農学研究科の陶山佳久准教授からはプライマーの作成や花粉からの DNA 増幅にあたっての技術的御指導をいただき、また、未発表の PCR プライマーを提供していただきました。東北大学大学院生命科学研究所の米倉浩司助教、大山幹成助教、長谷部智洋氏、大和田めぐみ氏には研究に対する議論など様々な助言をいただきました。小林和貴博士と菅野宗武博士には実験を行うにあたっての技術的指導と助言をいただきました。古代の森研究舎の吉川昌伸氏、吉川純子氏には堆積物採集をはじめ花粉の同定について御指導いただきました。仙台市教育委員会文化財課の荒井格氏には富沢遺跡での堆積物採集

にあたって御協力をいただきました。皆様の御指導、御協力に感謝いたします。

引用文献

- 藤 則雄. 1987. 考古花粉学 (考古学選書). 251 pp. 雄山閣出版, 東京.
- Gugerli, F., Parducci, L. & Petit, R. J. 2005. Ancient plant DNA: review and prospects. *New Phytologist* 166: 409–418.
- Handt, O., Höss, M., Krings, M. & Pääbo, S. 1994. Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia* 50: 524–529.
- Hasegawa, Y., Suyama, Y. & Seiwa, K. 2009. Pollen donor composition during the early phases of reproduction revealed by DNA genotyping of pollen grains and seeds of *Castanea crenata*. *New Phytologist* 182: 994–1004.
- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., Haeseler, A. V. & Pääbo, S. 2001. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research* 29: 4793–4799.
- 岩田利治・草下正夫. 1952. 邦産松柏類図説. 243 pp. 産業図書, 東京.
- Jackson, S. T. & Lyford, M. E. 1999. Pollen dispersal models in Quaternary plant ecology: assumptions, parameters, and prescriptions. *Botanical Review* 65: 39–75.
- Jackson, S. T., Overpeck, J. T., Webb-III, T., Keatts, S. E. & Anderson, K. H. 1997. Mapped plant-macrofossil and pollen records of late quaternary vegetation change in eastern North America. *Quaternary Science Reviews* 16: 1–70.
- Janssen, C. R. 1984. Modern pollen assemblages and vegetation in the Myrtle Lake peatland, Minnesota. *Ecological Monographs* 54: 213–252.
- 吉良竜夫・吉野みどり. 1967. 日本産針葉樹の温度分布—中部地方以西について. 「自然 生態学的研究」(森下正明・吉良竜夫編), 133–161. 中央公論社, 東京.
- Kobayashi, K., Yoshikawa, J. & Suzuki, M. 2000. DNA identification of *Picea* species of the Last Glacial Age in northern Japan. *Japanese Journal of Historical Botany* 8: 67–80.
- 古環境研究所. 2004. 富沢遺跡第 126 次調査における放射性炭素年代測定. 「富沢遺跡第 126 次発掘調査報告書 (仙台市文化財調査報告書第 273 集)」, 47–48. 仙台市教育委員会, 仙台.
- Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709–715.
- Matsuki, Y., Isagi, Y. & Suyama, Y. 2007. The determination of multiple microsatellite genotypes and DNA sequences from a single pollen grain. *Molecular Ecology Notes* 7: 194–198.
- 守田益宗. 2000. 最終氷期以降における亜高山帯植生の変遷 気候温暖期に森林帯は現在より上昇したか? 植生史研究 9: 3–20.

- 中村 純. 1980. 日本産花粉の標徴 (大阪市立自然史博物館収蔵試料目録第12-13集). 91 pp. 大阪市立自然史博物館, 大阪.
- 大島誠一. 1994. モミ属の地理分布に関する研究—マツ属の種分化に関連して—. 京都大学農学部演習林報告 **66**: 24-36.
- Parducci, L., Jørgensen, T., Tollefsrud, M. M., Elverland, E., Alm, T., Fontana, S. L., Bennett, K. D., Haile, J., Matetovici, I., Suyama, Y., Edwards, M. E., Andersen, K., Rasmussen, M., Boessenkool, S., Coissac, E., Brochmann, C., Taberlet, P., Houmark-Nielsen, M., Larsen, N. K., Orlando, L., Gilbert, M. T. P., Kjær, K. H., Alsos, I. G. & Willerslev, E. 2012. Glacial survival of boreal trees in northern Scandinavia. *Science* **335**: 1083-1086.
- Poska, A. & Pidek, I. A. 2010. Pollen dispersal and deposition characteristics of *Abies alba*, *Fagus sylvatica* and *Pinus sylvestris*, Roztocze region (SE Poland). *Vegetation History and Archaeobotany* **19**: 91-101.
- 島倉巳三郎. 1973. 日本植物の花粉形態 (大阪市立自然史博物館収蔵試料目録第5集). 60 pp. 大阪市立自然史博物館, 大阪.
- 相馬寛吉・辻 誠一郎. 1987. 植生. 「日本第四紀地図 解説」(日本第四紀学会編), 80-86. 東京大学出版会, 東京.
- Suyama, Y., Kawamuro, K., Kinoshita, I., Yoshimura, K., Tsumura, Y. & Takahara, H. 1996. DNA sequence from a fossil pollen of *Abies* spp. from Pleistocene peat. *Genes & Genetic Systems* **71**: 145-149.
- Suzuki, K. 1991. *Picea* cone-fossils from Pleistocene strata of northeast Japan. *Saito-Ho-on Kai Museum Research Bulletin* **59**: 1-41.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**: 1105-1109.
- Wu, C. S., Lin, C. P., Hsu, C. Y., Wang, R. J. & Chaw, S. M. 2011. Comparative chloroplast genomes of Pinaceae: insights into the mechanism of diversified genomic organizations. *Genome Biology and Evolution* **3**: 309-319.
- 吉川純子. 2004a. 富沢遺跡第126次調査で産出した木材化石. 「富沢遺跡第126次発掘調査報告書 (仙台市文化財調査報告書第273集)」, 64-71. 仙台市教育委員会, 仙台.
- 吉川昌伸. 2004b. 富沢遺跡第126次調査区18層における最終氷期最寒冷期の花粉化石群. 「富沢遺跡第126次発掘調査報告書 (仙台市文化財調査報告書第273集)」, 72-76. 仙台市教育委員会, 仙台.

(2012年11月26日受理)