

(4) 三瓶埋没林スギのDNA分析

津村義彦・谷 尚樹

(農林水産省林野庁森林総合研究所)

1.はじめに

化石生物のDNA分析はPCR (Polymerase Chain Reaction, Saiki et al. 1988) 法の開発がブレイクスルーになり活発に行われるようになった。PCR法はある特定の遺伝子を数百万倍に増幅させることができる手法であるため、化石中に微量でもDNAが残存していれば分析が可能である。高等植物ではモクレン, *Magnolia* (Golenberg et al. 1990) とヌマスギ, *Taxodium* (Soltis et al. 1992) の研究が有名で、これらはどれも葉緑体DNA内の遺伝子の塩基配列を分析して中新生の植物種と現存の近縁種を比較したのもである。わが国でも幾つかの植物種で試みられており、15万年前のモミ属の化石花粉で同様の研究が行われている (Suyama et al. 1996)。これまで行われてきた植物の化石DNA研究では種レベルの研究の系統関係を議論しているのがほとんどであった。これは集団での保存性の良いサンプルの収集が難しいことが原因であった。

三瓶山は活火山で最後の噴火が年代測定により約3500年ほど前だと言われている。その際に火山灰及び土石流により幾つかの埋没林が形成されスギの大径木が集団で埋没状態にあることが明らかになっている。このような一度期に埋没した植物体は保存状態が極めて良いことが考えられる。一般的に数千年ほど前の試料からのDNA抽出は比較的抽出し易いと言われている。特に保存状態の良い試料では集団でのDNA抽出の可能性が高く、過去の森林の遺伝的変異及び構造が明らかにすることができる。また現存林との比較では過去の集団が祖先集団となり現存集団が形成されたのか、またはその後に移住があったのかが明らかにできる可能性がある。

本研究では約3500年前に三瓶山の噴火で埋没したスギの材からのDNA分析の可能性について検討を行った。

2.材料及び方法

3500年前に埋没したスギ林で得られた木材及び針葉の各1サンプルを材料にDNAの抽出を試みた。

—試料の準備—

埋没林の材木を鉋で割り、中の白い材木部を取り出し、鉋で砕いて小木片にした。この試料からDNAを抽出を試みた。方法は概ねQIAGEN社のDNeasy Plant Mini Kitを用い、そのプロトコルに従った。

—DNAの抽出—

小木片を液体窒素中に沈め凍結させる。これをミルサーで完全にパウダー状になるまで破碎する。400mgのパウダーを2mlのマイクロチューブに入れる。すぐにこのチューブに400µlのAP1バッファと4µlのRNase Aを加えて、ボルテックスで激しく攪拌する。その後65°Cの恒温槽中に浸し、10分間インキュベートを行う。この間2~3回チューブを振って攪拌した。バッファAP2を130µl加え、攪拌し、氷上で5分間インキュベートを行う。氷上でインキュベートすることで界面活性剤やタンパク質、ポリサッカライドを析出させた。

QIAshredder spin columnをCollection tubeの上に置き、QIAshredder spin columnにこの溶液を添加する。最高速で2分間遠心を行った。その後、Collection tubeたまった液体を新しい2mlのマイク

ロチューブに移した。DNAの精製のために得られた液量の半量のバッファーAP3および当量のエタノールを添加し、ゆっくり攪拌する。このうちの650ulを新しいCollection tubeの上にセットされたDNeasy mini spin columnに添加する。6000g程度で1分間遠心する。Collection tubeにたまった液体は廃棄する。残った液体を用いて上記の操作を繰り返す。この操作でDNeasy mini spin columnのシリカメンブレンにDNAが吸着する。新しいCollection tubeの上にDNeasy mini spin columnをセットし、バッファーAW500ulをDNeasy mini spin columnに添加後、6000g程度で1分間遠心する。Collection tubeにたまった液体は廃棄する。さらにバッファーAW500ulをDNeasy mini spin columnに添加後、最高速で2分間遠心し、シリカメンブレンを乾燥させる。完全に乾燥させエタノールを次のステップに持ち越さないようにする。Collection tubeにたまった液体は廃棄する。新しいマイクロチューブ上にDNeasy mini spin columnを置き、あらかじめ65°Cに暖めておいたBufferAEを直接シリカメンブレンの上へそそぎ込む。5分間室温でインキュベート後6000g程度で1分間遠心する。得られた溶液を8ulとりアガロースゲルに添加し電気泳動後エチジウムブロマイドで染色を行った。分光光度でDNAの濃度の測定を行った。

3. 結果及び考察

2%のアガロースゲルで電気泳動を電気泳動行った結果、十分な量のDNAが抽出できたことが明らかになった (図4.4.4-1)。分光光度計でDNA濃度を計った結果、400mgスタートの試料から約2.5 μg (25ng/ μl)、また、100mgの試料からでも約1.5 μg (15ng/ μl) の濃度でDNAを得ることができた。

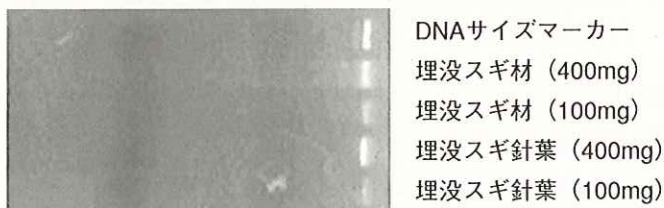


図4.4.4-1 埋没スギから抽出したDNA

今回の結果から量及び質的にも十分解析可能なDNAを得ることができた。これまでスギの遺伝的変異はアイソザイム及びDNAマーカーを用いて行われてきた (Tsumura and Ohba 1992, 1993)。アイソザイムの結果ではスギは集団内にすべての変異の約97%ほどを保有しており、集団間にはわずかに3%ほどの変異しか保有していない結果であった。また地理的傾向は *6Pg-1* 遺伝子座でe対立遺伝子が東北地域に多く見られる傾向があった (Tomaru et al. 1994)。またDNAマーカーを用いた調査でも同様に集団内に変異のほとんどを含んでおり、明瞭な地理的な傾向は見られなかった (Tsumura and Tomaru 1999)。しかしながらこれらの研究は十数座の遺伝子だけを対象に解析しているために、十分にゲノムの変異をとらえていない可能性もある。現在、スギゲノムプロジェクトで多くの遺伝情報が得られている (Muakai et al. 1995, Tsumura et al. 1997, Ihara et al. 2000)。これらを活用することにより埋没林から得られる集団サンプルの遺伝的多様性及び現存集団との正確な比較を行うことができるものと期待される。

引用文献

- Golenberg, E.M., D.E. Giannasi, M.T. Clegg, C.J. Smiley, M. Durbin, D. Henderson, G. Zurawski. 1990. Chloroplast DNA sequence from a miocene *Magnolia* species. *Nature* 344: 656-8.
- Ihara, U. T., K. Yoshimura, Y. Ugawa, H. Yoshimaru, K. Nagasaka and Y. Tsumura. Large-scale analysis of ESTs derived from the inner bark of *Cryptomeria japonica*. *Plant Mol Biol* (in press)
- Mukai, Y., Y. Suyama, Y. Tsumura, T. Kawahara, H. Yoshimaru, T. Kondo, N. Tomaru, T. Kuramoto and M. Murai. 1995. A linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD and isozyme loci. *Theor. Appl. Genet.* 90:835-840.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 4839:487-491
- Soltis P.S., D.E. Soltis, C.J. Smiley. 1992. An *rbcL* sequence from a Miocene *Taxodium* (bald cypress). *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 449-51
- Suyama, Y. K. Kawamuro, I. Kinoshita, K. Yoshimura, Y. Tsumura, and H. Takahara. 1996. DNA sequence from a fossil pollen of *Abies* spp. from Pleistocene peat. *Genes and Genetic System* 71: 145-149.
- Tomaru, N., Y. Tsumura and K. Ohba. 1994. Genetic variation and population differentiation in natural populations of *Cryptomeria japonica*. *Plant Species Biol.* 9:191-199
- Tsumura, Y. and K. Ohba. 1993. Genetic structure of geographical marginal populations of *Cryptomeria japonica*. *Can. J. For. Res.* 23:859-863.
- Tsumura, Y. and K. Ohba. 1992. Allozyme variation of five natural populations of *Cryptomeria japonica* in western Japan. *Jpn. J. Genet.* 67:299-308.
- Tsumura, Y. and N. Tomaru. 1999. Genetic diversity of *Cryptomeria japonica* using co-dominant DNA markers based on Sequenced-Tagged Site. *Theor. Appl. Genet.* 98:396-404
- Tsumura, Y., Y. Suyama, K. Yoshimura, N. Shirato, Y. Mukai. 1997. Sequence-Tagged-Sites (STSs) of cDNA clones in *Cryptomeria japonica* and their evaluation as molecular markers in conifers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 764-772.