

(3) 三瓶小豆原埋没林から出土した材，および針葉からのDNAの単離と，葉緑体DNAの部分塩基配列の決定による種同定について

谷 尚樹（森林総合研究所森林遺伝研究領域ゲノム解析研究室）・津村義彦（同）

1. はじめに

化石生物のDNA分析は高等植物においてはモクレン, *Magnolia* (Golenberg et al. 1990) とヌマスギ, *Taxodium* (Soltis et al. 1992) の研究が有名である。化石生物のDNAは現存する生物組織のDNAに比べて分解が進んでいると考えられ，化石中には微量にしか含まれていないと思われる。そこで，PCR (Polymerase Chain Reaction, Saiki et al. 1988) 法の開発がブレイクスルーとなり，ごく微量のDNAが残存していれば，そこから特定領域を数百万倍に増幅することが可能になり，化石中の微量なDNA分子からDNAシーケンスの解析が行えるようになった。これらの研究においては，分子量が小さく環状で安定し，コピー数が核DNAに比べて多い葉緑体DNA上の遺伝子がDNA分析に用いられ，中新世の化石個体の塩基配列と現存する近縁種との系統関係が論ぜられた。また，わが国においても15万年前のモミ属花粉から単離されたDNAを用いて同様の研究が行われている (Suyama et al. 1996)。これらの研究で行われているように葉緑体DNA上の遺伝子や遺伝子間領域 (スパーサー) はこれまで膨大な塩基配列情報が蓄積されており (Soltis and Soltis 1998)，化石植物の葉緑体DNAの部分塩基配列を決定することで，その化石植物の種同定が容易に行える。よって，本報告では三瓶埋没林から出土した埋没木および針葉からDNAを採取した結果とPCRによる葉緑体DNAの特定部位の増幅，増幅されたDNA断片の塩基配列の決定と種識別の結果を報告する。

2. DNAの単離

掘り出された材を鉋で割り，心材が変色していない部分があるものに関してはその部分をDNA抽出用の材料として用いた。それ以外のものに関しては比較的新鮮と思われる部分を用いた。発掘された針葉はよく水洗いし，そのままDNA抽出用の材料とした。これらの材料は液体窒素で凍結後，食品用の電動ミルで粉状になるまで細かく砕いた。以降の過程はQIAGEN社のDneasy Plant Mini Kitを用いて，QIAGEN社のプロトコルに沿ってDNAを抽出した。ただし，QIAGEN社のプロトコルでは粉碎された組織を100mg使用するが，今回はDumolin-Lapegue et al. (1999) が報告した方法にならい，出発材料の量を400mgに増加させた。抽出されたDNAは0.8%アガロースゲル電気泳動後，エチジウムブロマイド染色によって可視化し，DNAの収量，品質を確認した。その結果，DNAが可視化されるのに十分な量が回収されている個体と，そうでない個体があった。また，十分な量のDNAが回収されていても，そのDNAは激しく断片化していた (図4.3.3-1)。

3. PCRによる増幅

抽出されたDNAを用いて葉緑体のDNAの特定部位をPCR法によって増幅した。使用した領域は *rbcL*，*trnL* のイントロン，*trnR-N* のスパーサーの部分塩基配列の増幅を試みた。抽出したDNAは滅菌済み蒸留水で20倍に希釈し，PCR用のサンプルとした。PCR法による増幅の結果，*rbcL* の領

域では針葉サンプル (1) の一つ, A2, A3, A4, A10で安定した増幅が確認され, シークエンスを決定した。*trnL*のイントロンの領域ではA9と針葉サンプル (1) で良好な増幅が確認され, シークエンスを決定することが出来た。*trnR-N*のスペーサー領域ではA9のみで増幅が確認されシークエンスを決定することが出来た。これまで化石植物のDNA分析は葉緑体DNAのシークエンスのみで行われている。すなわち, 年月を経て品質が悪くなったDNAからPCR法によって特定の領域の増幅を行う場合, 環状で安定しておりコピー数も多い葉緑体DNAを用いるとPCR法の成功率が高いと思われるからである。Golenberg et al. (1990) やSoltis et al. (1992) が扱った材料は中新世の地層から発掘されたかなり古い植物遺体を利用しているのに対し, 三瓶埋没林の材料は約3,600年前の三瓶火山の噴火時に形成された比較的新しい植物遺体であり, 保存状態も良好である。しかしながら, DNA抽出とPCR法によるDNA増幅の成功率はそれほど高くなかった。このことから植物遺体からのDNA分析は保存状態の良い材料だとしてもそれほど容易ではないと言える。

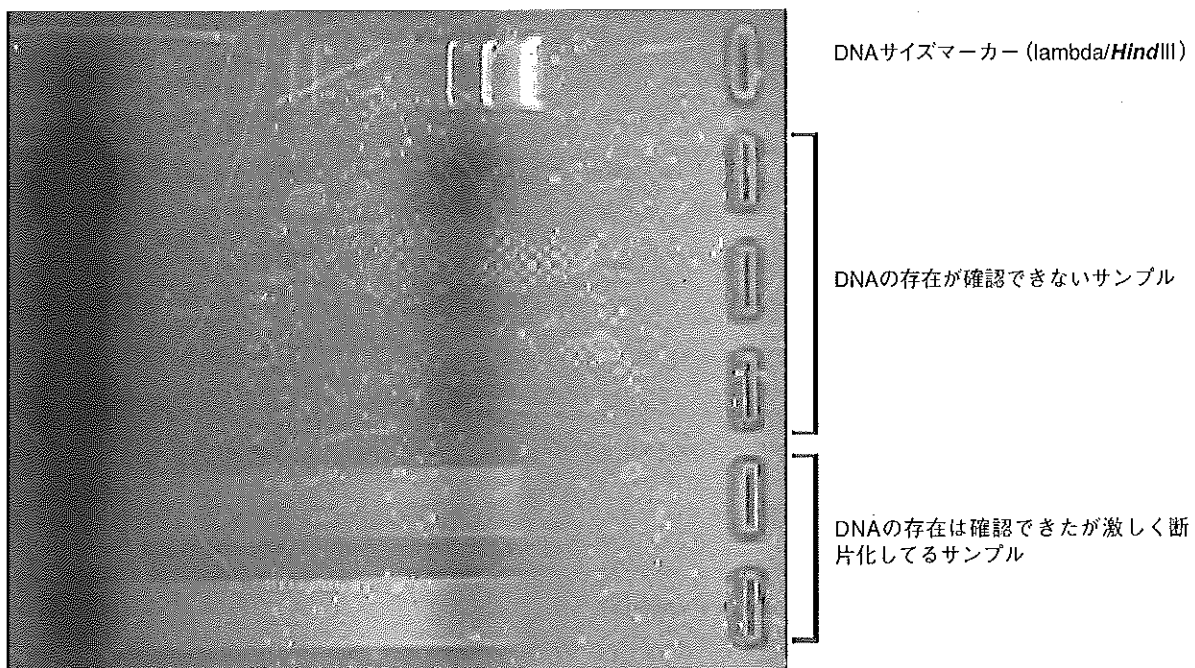


図4.3.3-1 抽出されたDNAの電機泳動像

4. シークエンス情報を用いたホモロジーサーチの結果

埋没木もしくは針葉サンプルのDNAを用いてPCR法をによって増幅された葉緑体DNAの特定領域の断片を用いて, その塩基配列を決定した。さらに種同定を行うため既存のDNAデータベースに登録されている塩基配列とのホモロジーサーチを行った。現在, 世界にはアメリカのGeneBank, ヨーロッパのEBI, そして日本のDDBJの3つのDNAデータベースが構築されている。各データベースは世界中で報告された塩基配列データの収集を行い, 新規または更新データは1日単位でデータベース間で交換されている。登録されるDNAシークエンスの量は加速度的に増加しており, 登録されたDNA情報は誰でもネットワークを通じて閲覧できる。この膨大なDNAデータベースの中から, 配列間の類似性を検索するプログラムがホモロジーサーチプログラムである。今回はホモロジーサーチプログラムの一つであるBLAST (Altschul et al. 1990) を用いて, 埋没林のサンプルから得られたシークエンスのホモロジーサーチを行い, 得られた類似配列を

表4.3.3-1 増幅した葉緑体DNA上の領域とBLASTによるホモロジーサーチの結果

サンプル	領域	プライマーペア		ホモロジーサーチの結果	
		前	後	学名	和名
Needle1	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> (43102F)	<i>rbcL</i> (44453R)	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	ヒノキ
A2	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> (43102F)	<i>rbcL</i> (44453R)	<i>Cryptomeria japonica</i>	スギ
A3	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> (43102F)	<i>rbcL</i> (44453R)	<i>Cryptomeria japonica</i>	スギ
A4	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> (43102F)	<i>rbcL</i> (44453R)	<i>Cryptomeria japonica</i>	スギ
A10	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> (43102F)	<i>rbcL</i> (44453R)	<i>Cryptomeria japonica</i>	スギ
A9	<i>trnL</i> intron	<i>trnL</i> (UAA) intronF	<i>trnL</i> (UAA) intronR	<i>Cryptomeria japonica</i>	スギ
Needle1	<i>trnL</i> intron	<i>trnL</i> (UAA) intronF	<i>trnL</i> (UAA) intronR	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	ヒノキ
A9	<i>trnR</i> -N spacer	<i>trnR</i> (q91945F)	<i>trnN</i> (q92640R)	<i>Cryptomeria japonica</i>	スギ

特定することで種同定を行った。

*rbcL*では埋没木のうちA2, A3, A4, A10および発掘された針葉 (1) で特異的な増幅が確認され、シーケンスを決定した。決定されたシーケンスをBLASTサーチによって類似性のあるシーケンスを調べたところ埋没木由来のA2からA10までの4つの*rbcL*のシーケンスは既に登録済みのスギの*rbcL*のシーケンスと相同であった。このことからA2からA10までの4個体はスギであることが確認された。しかしながら針葉 (1) のシーケンスをBLASTサーチによって相同性検索を行ったところヒノキのシーケンスと相同であった。このことは*trnL* intronのシーケンスでも同様に示された。ヒノキの幼木や初生葉の針葉形態は鱗片葉にはならず、スギのような針状になる。このことから、スギ状の針葉が埋没林から採取されたが、その中にヒノキの幼木もしくは初生葉の針葉が採取されたと思われる。*trnL* intronや*trnR*-NのスペーサーにおいてA9からDNA断片の増幅を確認し、シーケンスを決定することが出来た。これらのシーケンスはホモロジーサーチの結果、スギであることが示された。

以上のように、葉緑体DNAからのPCRによる増幅およびシーケンスの決定は、PCRが成功した場合有効であった。しかし、その成功率は必ずしも高くなく、技術的な問題点が残された。

5. 文献

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Dumolin-Lap gue S, Pegmonge M, Gielly L, Taberlet P, Petit R (1999) Amplification of oak DNA from ancient and modern wood. *Molecular Ecology*, 8, 2137-2140.
- Golenberg EM, Giannasi DE, Clegg MT, Smiley CJ, Durbin M, Henderson D, Zurawski G (1990) Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species. *Nature*, 344, 656-658.

- Soltis DE, Soltis PS (1998) Choosing an approach and appropriate gene for phylogenetic analysis. In: *Molecular Systematics of Plant II* (ed. Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ), pp. 1-42. Kluwer Academic Publishers, New York, USA.
- Soltis PS, Soltis DE, Smiley C (1992) An *rbcL* sequence from Miocene *Taxodium* (bald cypress). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89, 449-451.
- Suyama Y, Kawamuro K, Kinoshita I, Yoshimura Y, Tsumura Y, Takahata H (1996) DNA sequence from a fossil pollen of *Abies* spp. From Pleistocene peat. *Gene and Genetic System* 71: 145-149.