

氷河中の花粉 1 粒ずつの全ゲノム増幅

中澤文男¹、陶山佳久²

¹国立極地研究所

²東北大学

Whole genome amplification using single pollen grains found in glaciers

Fumio Nakazawa¹, Yoshihisa Suyama²

¹National Institute of Polar Research

²Tohoku University

Pollen taxon in sediment samples can be identified by analyzing pollen morphology. Identification of related species based on pollen morphology is difficult and is limited primarily to genus or family. Because many pollen grains in glaciers contain protoplasm, genetic information of pollen grains should be able to identify the plant taxa below the genus level. We showed that the multiplex PCR using a *Pinus* pollen grain obtained from a glacier should be effective in identifying pollen grains at subsection level. However, the obtained genetic sequences provided only limited information for species identification, due to their short length. Therefore, identification of *Pinus* pollen at species level has been difficult until now. This study attempted to improve our current method through the introduction of a whole genome amplification method in order to obtain the sufficient information for the identification.

氷河から見つかる花粉は、他の堆積物試料から見つかる花粉と異なり、細胞内物質（原形質）を残存しているものが多い。このことは、氷河中の花粉から遺伝情報が取得できる可能性を示唆する。従来の花粉分析は、花粉の形態によって分類群を同定するため、形態の類似した近縁種の識別は難しく、科あるいは属レベルでの同定に留まる場合が多かった。氷河に含まれる花粉を DNA 分析しその遺伝情報が得られれば、属より下位の階級で同定が可能となる。著者らは昨年の本シンポジウムにおいて、氷河中のマツ属花粉 1 粒ずつをマルチプレックス PCR をおこなうことによって、従来の形態観察では不可能であった亜節レベルでの同定が可能になることを示した。しかしながら得られた遺伝情報は限られており、種の同定までには至らなかった。そこで本研究では、大量の遺伝情報取得を目的として Whole genome amplification 法（WGA 法）を取り入れた手法改良を試みた。

WGA 法は DNA を $10^4 \sim 10^6$ 倍に増幅できるため、希少な試料から大量の DNA を取得する有効な手法である。本研究では現在、WGA 法の中で PCR を基本とする増幅を試みている。この方法では先ず、花粉粒から抽出された DNA の両端を Sigma 社の WGA4 を使用してプライミングし、アダプターを付加することによりライブラリを作製する。次に、ライブラリを本研究でこれまで実施してきた PCR 法で増幅する。WGA 法で特に留意すべきことは、材料（DNA）が極微量であることから、試料とは別に混在（コンタミネーション）した DNA を増幅してしまう点にある。そこでコンタミネーション DNA を除去するために、エンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼをもちいて花粉表面に付着した DNA の除去、さらに PCR キャリーオーバー防止試薬を使用してキャリーオーバーによる偽陽性を防止した。

氷河中の花粉 1 粒ずつを使用して、上記のコンタミネーション除去処理をおこなった後、PCR を実施した。その結果、これら 2 つ処理をおこなった花粉粒からも増幅は確認された。従って、上記 2 つの処理にともなう PCR への阻害は生じないことがわかった。また、ヒマラヤスギの DNA 抽出物を、花粉 1 粒と同程度の DNA 量（< 数 pg/ μ l）まで希釈し、それをテンプレートにもちいて全ゲノム増幅をおこなったところ、増幅が確認された。そして、この増幅産物をテンプレートにもちいて *rpoB* 領域をターゲットにした PCR をおこない、得られた PCR 産物の塩基配列がヒマラヤスギであることも確認した。すなわち、極微量の DNA から WGA 法によって全ゲノム増幅することが可能となった。現在、氷河中のマツ属花粉 1 粒ずつを使用して同様の実験を進めており、発表当日はその結果についても報告する。