

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02553

研究課題名(和文) 東南アジアの森林植物を対象とした種および遺伝子多様性の包括的解析

研究課題名(英文) Plant species and genetic diversity assessment of tropical forests in Southeast Asia

研究代表者

陶山 佳久 (Suyama, Yoshihisa)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60282315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,000,000円

研究成果の概要(和文)：東南アジアの熱帯林は、数多くの植物種が分布する生物多様性のホットスポットとして知られている。しかし、どのような種が何種分布するのかという情報すら正確に得られないまま、それらは各地で急速に失われつつあり、その科学的調査が急務である。そこで、東南アジア各地100箇所以上の熱帯林で集められた1万種以上の植物試料を対象として、新しいDNA分析技術によって生物の系統関係解析や種同定等を行った。その結果、形態による分類が困難な種についても系統関係や種を明らかにできたほか、各地で新種・新産地記載種を発見し、生物多様性の包括的把握に貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な生物種の間系統関係や種を同定するための遺伝学的データを取得するために、研究代表者らが開発したDNA分析手法を改良するとともに、新たに複数の「DNAバーコーディング」領域を同時に簡便に解析する手法を開発した。これらの手法を組み合わせることにより、これまで解析が困難であった近縁種群等であっても、簡便で正確な解析が可能であることを示した。主な成果として、東南アジア各地の森林で数多くの新種・新産地記載種を発見したことで、破壊が進む各地の熱帯林の生物多様性を正確に評価することにつながり、このことが熱帯林保全の学術的根拠の一つとなることで、将来にわたる生態系サービスの享受に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Tropical forests in Southeast Asia are known as one of the global centers of species richness, and also as the area where forest loss is most rapid. However, it remains uncertain how many species of vascular plants are there. Therefore, we conducted a new method of molecular phylogenetic analysis for more than 10,000 vascular plant species collected from more than 100 research plots in Southeast Asia. Consequently, we discovered more than 100 new species and newly recorded species in several countries.

研究分野：森林分子生態学

キーワード：熱帯林保全 新種 分子系統解析 種同定 次世代シーケンシング

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

### 1. 研究開始当初の背景

東南アジアの森林は、生物多様性の宝庫としてその重要性が認識されていながら、多様性情報の根幹である分類学的研究すら不十分で、未だに未記載種が数多く発見される。これに対し、熱帯の多様な分類群に対して十分な種同定能力をもつ分類学者が不足しており、さらに現地調査の困難性や自然林の消失等も影響し、現実的にはこの分野の研究遂行が困難な状況にあると言える。一方で、東南アジアの熱帯林は急速に失われており、生物多様性全体像の把握は一刻の猶予もならない。本代表者らのグループでは、2011年から環境研究総合推進費によって、アジア規模での大規模な生物多様性観測プロジェクトを進めてきた。これにより、2015年までに東南アジアの100カ所以上において、100m×5mのプロット内に分布するすべての植物種を記録し、約13,000種2万点におよぶ標本・DNA分析用試料を採取した。これは世界的にも注目すべき貴重な研究資源だと言える。本申請課題では、この唯一無二の研究材料を有効活用できることに最大のメリットがあり、これまで現実的に実施困難であった研究を、一気に実現化させる条件が揃った状態にある。

東南アジアの森林植物を対象とした遺伝子多様性について言えば、ごく一部の有用樹種や希少種についての散在的な研究があるのみで、「生態系構成種全体にどれだけの遺伝子多様性があるか?」という疑問に答えるには程遠い現状である。また、近年まで遺伝子多様性を評価する手法の主流はマイクロサテライト分析であり、この手法の最大の弱点は、種ごとに異なるマーカーを開発して利用しなければならないことであった。その結果として、多数の種間での多様性比較が困難であり、「どのような種において多様性が高いか?」という疑問に答えられていない。しかし近年発達した著しい次世代シーケンサー(NGS)を用いることで、遺伝子多様性解析の新たな可能性が一気に開けた。代表者らは、NGSを用いて簡便に一塩基多型(SNP)を検出して解析することのできる新たな手法(Multiplexed ISSR Genotyping by sequencing MIG-seq法、Suyama & Matsuki, 2015)を開発し、遺伝子多様性の簡便な種間比較への道を開いた。この手法を用いれば、ゲノム情報が全くない未知の植物であっても、即座に数百座以上のSNP情報を得ることができ、系統関係や種内変異の解析が可能である。つまり、たとえ13,000種が対象であっても、同じ手法によって各種の遺伝子多様性の把握が可能で、さらには多様性レベルの種間比較も可能である。このことは、単に従来のような種ごとの分子系統学的解析や集団遺伝学的評価にとどまらず、多数の種によって構成された群集レベルの種・遺伝子多様性を包括的に把握できる可能性を開いたことになる。このような解析は、これまで技術的な制約によって実現できなかったものである。本研究では以上のように、1)群集内の全植物種の網羅的試料および2)新たな多様性分析技術の2点において、他の追従を許さない研究の遂行が可能である。

### 2. 研究の目的

生物多様性ホットスポットである東南アジアの森林を対象として、網羅的(全植物種)かつ包括的(種および遺伝子)生物多様性解析を行うことを目的とする。特に、各地で網羅的に採取した未記載種や分類困難種を含む各種の分子系統学的位置付け(近縁種群ごとの分類学的解析・種同定)を行うことによって、東南アジア各地における種多様性のより正確な評価に貢献する。また、そのために必要なDNA分析・データ解析技術の開発を行う。

### 3. 研究の方法

生物多様性ホットスポットである東南アジアの森林において、すでに分担者らが実施した7カ国30地域100カ所以上の全植物種プロット調査データと、約13,000種2万点以上のDNA試料を利用する。これらを対象として、代表者らが開発したゲノムワイドSNP分析の新手法であるMIG-seq法を用い、各サンプル数百座以上のSNP情報を取得する。これにより、各種の分子系統学的解析を行い、形態による種識別情報を合わせることで、分類学的検討を行う。また、そのための分析手法の改良およびデータ解析技術の開発を実施するとともに、MIG-seq法だけではデータ解析が困難な広い範囲の分類群を対象としたDNA分析手法を開発する。

### 4. 研究成果

(1) MIG-seq法における細かな反応条件等の改良を目的とし、さまざまなPCR条件(PCRキット、プライマー濃度、アニーリング温度、サイクル数など)によりMIG-seqライブラリを構築し、得られたSNPデータの量や精度を比較検討した。その結果、より高精度で情報量の多いデータの取得が可能になり、本研究におけるDNA分析手法の基礎技術が大きく改善された。また、得られたデータの解析法として、SNPの検出や分子系統解析に用いる各種パラメータの比較検討を行った。その結果、系統解析に用いることのできる情報量が増大し、最終的な解析精度が著しく向上した。これらの改善により、東南アジアの森林植物を対象とした分子系統解析が大きく前進した。改良法の詳細については、現在投稿論文として発表準備を行っている。

(2) MIG-seq法による分子系統解析の技術的限界として、属レベル以上の遠縁な系統関係の解析では共通した情報を得難いため、分子系統解析が困難であることがわかってきた。そこで、より遠縁な系統を対象とする場合の解決法として、既存のDNAバーコーディング領域である*rbcL*、ITS等の領域をマルチプレックスPCRによって増幅してNGSで同時に配列取得する「マルチプレックスDNAバーコーディング法」を開発した。これにより、遠縁な系統のサンプルが

含まれているサンプルグループであっても、一旦「マルチプレックス DNA バーコーディング法」によって大まかな系統的な位置付けを行い、次にその結果をもとにして近縁なグループごとに MIG-seq 法によって詳細な系統解析を行うという手順が可能になった。この一連の分析手順により、比較的遠縁な系統を含む様々なグループにおいて詳細な系統関係の解析が可能になった。この新手法については、投稿論文として発表予定である。

(3) 東南アジア各地の森林で収集した試料について、外部形態による同定が困難な種・未記載種・新産地記載種を含む各種の分子系統学的位置付けを行った。その主な成果として、ベトナム産のコナラ属を対象とした詳しい解析では、合計 4 種を新種、2 種をベトナムでの新産地記載種として報告したほか、関連した近縁種の分子系統学的位置付けを明らかにし、これらを 2 報の論文として発表した (Binh et al. 2018a,b)。

そのほか、マメ科シタン属では 34 種中 5 種が、ハカマカズラ属では 43 種中 10 種が、*Spatholobus* 属では 29 種中 10 種が新種であることを明らかにした。さらに、東南アジアで特に種数が多いアカネ科ルリミノキ属にこの方法を適用した結果、146 種中 77 種 (53%) が新種であることがわかった。

MIG-seq 法を適用する以前の解析結果としても、クスノキ科では ITS にもとづく解析結果を論文として発表したほか (Mitsuyuki et al. 2018)、ブナ科ではマテバシイ属の新種を発表した (Ngoc et al. 2018)。

以上のような分類学的解析結果を今後も随時論文として発表していく予定のほか、地域単位でとりまとめた種多様性の情報を、インターネット上よりダウンロード可能な図鑑 (ピクチャーガイド) として発表し (Nagahama et al. 2019)、同様の出版を今後も継続して行く予定である。

#### < 引用文献 >

Yoshihisa Suyama, Yu Matsuki, MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Scientific Reports*, Vol. 5, 2015, 16963

#### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 )

陶山佳久、森林遺伝育種学的研究における MIG-seq 法の利用、森林遺伝育種、査読無、8 巻、2019、85 - 89

Natsuki Moriguchi, Kentaro Uchiyama, Ryutaro Miyagi, Etsuko Moritsuka, Aya Takahashi, Koichiro Tamura, Yoshihiko Tsumura, Kosuke M. Teshima, Hidenori Tachida, Junko Kusumi, Inferring the demographic history of Japanese cedar, *Cryptomeria japonica*, using amplicon sequencing. *Heredity*, 査読有、印刷中、2019

DOI: 10.1038/s41437-019-0198-y

Nguyen Van Ngoc, Nguyen Viet Hung, Hoang Thi Binh, Shuichiro Tagane, Hironori Toyama, Hoang Thanh Son, Ha Tran Viet, Tetsukazu Yahara, *Lithocarpus vuquangensis* (Fagaceae), a new species from Vu Quang National Park, Vietnam. *PhytoKeys*, 査読有、Vol. 95, 2018, 15-25

DOI: 10.3897/phytokeys.95.21832

Hoang Thi Binh, Nguyen Van Ngoc, Shuichiro Tagane, Hironori Toyama, Keiko Mase, Chika Mitsuyuki, Joeri Sergej Strijk, Yoshihisa Suyama, Tetsukazu Yahara, A taxonomic study of *Quercus langbianensis* complex based on morphology and DNA barcodes of classic and next generation sequences. *PhytoKeys*, 査読有、Vol. 95, 2018, 37-70

DOI: 10.3897/phytokeys.95.21126

Haruna Nakamura, Kosuke Teshima, Hidenori Tachida, Effects of cyclic changes in population size on neutral genetic diversity. *Ecology and Evolution*, 査読有、Vol. 8, 2018, 9362-9371

DOI: 10.1002/ece3.4436

Hoang Thi Binh, Nguyen Van Ngoc, Bon Trinh Ngoc, Shuichiro Tagane, Yoshihisa Suyama, Tetsukazu Yahara, A new species and two new records of *Quercus* (Fagaceae) from northern Vietnam. *PhytoKeys*, 査読有、Vol. 92, 2018, 1-15

DOI: 10.3897/phytokeys.92.21831

Chika Mitsuyuki, Shuichiro Tagane, Nguyen Van Ngoc, Hoang Thi Binh, Somran Suddee, Sukid Rueangruea, Hironori Toyama, Keiko Mase, Chen-Jui Yang, Akiyo Naiki, Tetsukazu Yahara, Two new species of *Neolitsea* (Lauraceae), *N. kraduengensis* from Thailand and *N. vuquangensis* from Vietnam and an analysis of their phylogenetic positions using ITS sequences. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 査読有、Vol. 69, 2018, 161-173

DOI: 10.18942/apg.201810

Etsuko Moritsuka, Phourin Chhang, Shuichiro Tagane, Hironori Toyama, Heng Sokh, Tetsukazu Yahara, Hidenori Tachida, Genetic variation and population structure of a

threatened timber tree *Dalbergia cochinchinensis* in Cambodia. Tree Genetics & Genomes, 査読有、Vol. 13, 2017, 115  
DOI: 10.1007/s11295-017-1199-8

[学会発表](計25件)

Yoshihisa Suyama, Advanced approaches to the study of genetic and phylogenetic diversity in tropical forests. Workshop on the ecological research of plant diversity and forest ecosystem in Bidoup - Nui Ba National Park and surrounding areas, 2018

Tetsukazu Yahara, Legume diversity assessment as an example of plant diversity assessment. 7th International Legume Conference, 2018

Yoshihisa Suyama, Ayumi Matsuo, Shun Hirota, MIG-seq and multiplexed DNA barcoding: efficient tool for phylogeography and conservation genetics. The 2nd International Academic Conference on the Formation Mechanism of Plant Diversity and Conservation of Endangered Plants in East Asia, 2018

田金秀一郎, 満行知花, 陶山佳久, 矢原徹一, 東南アジアの植物多様性評価. 第66回日本生態学会大会, 2018

満行知花, 田金秀一郎, 遠山弘法, 間瀬慶子, 矢原徹一, 松尾歩, 陶山佳久, 東南アジア熱帯林構成種における多数の新種発見に活かされる MIG-seq. 第65回日本生態学会大会, 2018

Yoshihisa Suyama, Chika Mitsuyuki, Motomi Ito, Tetsukazu Yahara: Genome-wide DNA barcoding: new concept of species identification tool using next-generation sequencing. 7th International Barcode of Life Conference. 2017

Hoang Thi Binh, Nguyen Van Ngoc, Shuichiro Tagane, Hironori Toyama, Keiko Mase, Chika Mitsuyuki, Joeri S. Strijk, Yoshihisa Suyama, Tetsukazu Yahara, A taxonomic study of *Quercus langbianensis* complex based on morphology, and DNA barcodes of classic and next generation sequences. IUFRO 2017 Genetics & Genomics of Fagaceae. 2017

Tetsukazu Yahara, Diversity of tropical forests in South East Asia under the threat of rapid loss. XIX International Botanical Congress, 2017

Yoshihisa Suyama, Chika Mitsuyuki, Yoshihiro Tsunamoto, MIG-seq: efficient PCR-based method for genome-wide sequencing. Evolution 2017, 2017

満行知花, 綱本良啓, 陶山佳久, MIG-seq 法による熱帯林樹木の保全遺伝学的研究, 第128回日本森林学会大会, 2017

[図書](計1件)

Ai Nagahama, Shuichiro Tagane, Nguyen Van Ngoc, Binh Hoang Thi, Truong Quang Cuong, Hironori Toyama, Hidetoshi Nagamasu, Kojin Tsuchiya, Zhang Meng, Thu Nguyen Thi Anh, Nguyen Cuong Thinh, Yoshihisa Suyama, Ayumi Matsuo, Shun Hirota, Etsuko Moritsuka, Akiyo Naiki, Le Van Son, Pham Huu Nhan, Tetsukazu Yahara, A Picture Guide for the Flora of Bidoup Nui Ba National Park I: Mt. Langbian, Center for Asian Conservation Ecology, Kyushu University. 2019, 134

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 館田 英典

ローマ字氏名: (TACHIDA, Hidenori)

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 大学院理学研究院

職名: 教授

研究者番号(8桁): 70216985

研究分担者氏名: 矢原 徹一

ローマ字氏名: (YAHARA, Tetsukazu)

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 大学院理学研究院

職名: 教授

研究者番号(8桁): 90158048

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 満行 知花

ローマ字氏名: (MITSUYUKI, Chika)

研究協力者氏名: 松尾 歩

ローマ字氏名 : ( MATSUO, Ayumi )

研究協力者氏名 : 田金 秀一郎

ローマ字氏名 : ( TAGANE, Shuichiro )

研究協力者氏名 : 遠山 弘法

ローマ字氏名 : ( TOYAMA, Hironori )