

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07857

研究課題名(和文)九州のスギの起源を探る - 系譜情報に基づく九州スギ遺伝的リソースの成り立ちの解明 -

研究課題名(英文)The research on the origin of Cryptomeria japonica in Kyushu island

研究代表者

武津 英太郎 (Fukatsu, Eitaro)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等

研究者番号：10370826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：九州の林木育種の基盤となるスギ遺伝的リソースである在来品種と精英樹について、その起源や遺伝構造の解明を行った。

九州の複数の試験研究機関に保存されている在来品種をSSRマーカーを使って遺伝子型を決定し、90の遺伝子型に集約し、在来品種の名称と遺伝子型の関係を明らかにした。

九州の在来品種・精英樹およびリファレンス集団として本州・四国・屋久島の天然生個体について、SNPジェノタイピングを行った。遺伝距離に基づいたクラスタリングの結果、九州の在来品種の大部分は、本州・四国・屋久島の個体とは異なるクラスターに分類された。本州の他集団と比較すると異なる遺伝的構造を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

九州におけるスギ在来品種は、精英樹とともに九州の林木育種の基盤となるスギ遺伝的リソースであり、その起源・血縁関係や遺伝構造の解明は、九州におけるスギの起源の解明や林木育種を通じた森林の生産性の向上や多様性の維持に向けて必須である。本研究により、スギ在来品種の名称と遺伝子型の関係を明らかにし、今後の在来品種を用いた研究の基盤情報を構築することができた。九州の在来品種の大部分は、本州の天然林由来の個体群とは異なる遺伝構造を持っていることが示され、今後の林木育種や遺伝資源保全に向けた基礎情報を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the genetic structure of local varieties and plus trees of *Cryptomeria japonica* in Kyushu island, Japan. We genotyped local varieties preserved in prefectural forest research institutes in Kyushu island using SSR-markers, and listed up the relationships between the names and the genotypes in local varieties. We genotyped SNPs in local varieties, plus trees, in Kyushu, and other individuals collected from natural populations in Japan. The clustering analysis revealed that the major part of local varieties in Kyushu island have different genetic structure compared with natural populations in Japan.

研究分野：林木育種学

キーワード：スギ在来品種 遺伝構造

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

九州は温暖多雨でスギの成長に適した地域であり、この地域の人工林面積の 56%をスギが占める。九州のスギ造林は優良個体をさし木によりクローン化した、いわゆるさし木造林であり、優良個体を遺伝的に集約することで生産性向上を図る造林形態を数百年間にわたり維持してきた。このような歴史は世界的に見ても特徴的である。九州における在来品種は、さし木造林の歴史的過程で成立したと考えられており、この地域では数百に上る特徴的な在来品種が知られている。また、林木育種を目的として戦後に実施された精英樹選抜育種事業において選抜された精英樹にも在来品種は含まれており、他地域には認められない特異的な過程を経て九州のスギ遺伝資源集団(スギ遺伝的リソース)が成立した。

さし木造林の歴史的過程で成立した在来品種の起源については諸説が存在し、社寺を中心とした老齢林を起源とする説がある一方で、江戸期に本州・四国からの苗木の導入の記録が存在することや明治以降に当時の林業先進地とされた吉野地方からの苗木の導入事例より江戸期以降に他地域から導入された少数の優良種苗を出発点とする可能性も指摘されている。花粉分析結果からは、九州では約一万年(最終氷期終了時期)以前にスギは姿を消し、2500年ほど前に突然、九州各地で見られるようになったとされている(塚田 1980)。突然の増加には人為起源説が唱えられる一方で、宮崎県では天然林と考えられる集団の報告もあり(中尾ら 1986)、九州全体におけるスギの起源自体が不明な状況である。歴史的起源を明らかにするため 1990年代に DNA マーカーが在来品種を中心に適用されたが、当時の技術では DNA マーカーの解像度が低く、分析数も不十分であり、明確な結論が得られるまでに至っていない。2000年代に入り、大規模な DNA マーカーを用いて全国を網羅した形での研究が報告されてきた(例えば Tsumura et al. 2012、Kimura et al. 2014)。一方で、九州のスギについては、一部の天然林または老齢林が研究の対象であり、現在の九州スギ遺伝的リソースを含めた九州全域の網羅的な解析は行われてこなかった。九州のスギ造林が数百年以上の歴史を有することを考慮すれば、在来品種を中心とした詳細な解析は九州におけるスギの成立過程解明の端緒になり、同時に九州におけるスギの林木育種や遺伝資源保全のために必要な基礎的な知見につながると考えられる。

### 2. 研究の目的

従来在来品種は表現型や植栽履歴等に基づいてラベリングされてきたが、必ずしもその分類方法は統一されておらず、ラベリングミスや同名異遺伝子型や異名同遺伝子型が存在すると考えられる。DNA マーカーによる分類は試みられてきたが、九州全体の材料を対象に包括的に整理した事例はほとんどなかった。在来品種の遺伝的構成を明らかにするためには、まず九州における在来品種の名称と遺伝子型に関する整理を行う必要がある。そこで、本研究では、九州のスギ在来品種の全体をカバーするように収集し、SSR マーカーを用いた分析により得られた遺伝子型に基づいて在来品種を再整理するとともに、ゲノムワイドな SNP マーカーセットを用いた分析・解析により九州におけるスギ個体群の成立過程を推論することを目的として行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 研究用試料の収集

福岡県・佐賀県・大分県・熊本県・宮崎県・鹿児島県の林業研究機関の協力により、各研究機関に保存されていた在来品種のスギ個体より、葉もしくは形成層サンプルを収集した。同様に、九州育種場に保存されていた在来品種のスギ個体よりサンプルを収集した。

林木育種センター、東北育種場、関西育種場、九州育種場に植栽されている、全国のスギ天然集団より収集されたスギ精英樹および遺伝資源よりサンプルを収集した。また、隠岐島のスギ天然林よりサンプルを収集した。

#### (2) SSR マーカーによる在来品種の整理

収集したスギ在来品種のサンプルより DNA を抽出し、7 座のスギ SSR マーカーを用いて遺伝子型を決定した。決定した遺伝子型に基づき、九州における在来品種の遺伝子型を集約した。

#### (3) SNP 情報の取得と遺伝構造解析

集約されたスギ在来品種の遺伝子型より、代表的な在来品種に属する個体を選び、供試個体とした。また、九州育種基本区の実生集団から選抜された精英樹も供試個体とした。関西育種基本区・関東育種基本区・東北育種基本区に保存されていた天然個体のクローンは、SSR マーカーによりラメート間で遺伝子型に違いがなく、間違いなく保存されていると判断された遺伝子型を用いた。在来品種、精英樹および天然集団の合計 192 個体より、DNA を抽出した。ランダムプライマーを用いてランダムに増幅した PCR 産物のシーケンスを基にしたタイピング技術である GRAS-Di (Genotyping by Random Amplicon Sequencing, Direct; Enoki 2019; トヨタ自動車の登録商標)を用いた。ランダムプライマーには 13 種類を用い、トヨタ自動車からライセンスを受けた企業において、ライブラリ作成、および HiSeq2500 もしくは HiSeq4000 によるアンプリコンの両端 100bp の塩基配列の取得を行った。得られた塩基配列をソフトウェア Trimmomatic (Bolger et al. 2014) を用いてプライマー配列除去およびクオリティフィルタリングを行った。ソフトウェアパイプライン Stacks (Catchen et al. 2011) を用いて SNP を検出した。5%以上の個体で欠損値がある座は除いた。また、Minor Allele Frequency (MAF) が 5%以下の座も除いた。アンプリコンごとの SNP 座数は 1 に限定した。得られた SNP を用いて、個体間の遺伝距離に基づくクラスタリングを行なった。また、祖先集団を仮定したモデルベースのクラスタリング

を、統計パッケージ R の LEA (Frichot and François 2015) を用いて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) SSR マーカーを使った在来品種の整理

本研究で収集した在来品種のサンプルは、111 品種、800 個体であった。これらの品種ごとの平均的な保存機関数は 2.01 であり、43 品種は単一の機関でしか保存されていなかった。最大で 6 機関で保存されていた品種は 2 品種であった。これらの個体を、SSR マーカーを用いてタイピングを行った。その結果、111 品種は 90 の遺伝子型に集約された。また、研究機関間で、同じ遺伝子型の個体が、異なる品種名で保存されている事例が複数確認されたため、各研究機関と、品種名と遺伝子型との関係の整理を進めた。

##### (2) 遺伝構造解析

整理を進めた在来品種の遺伝子型の中から、代表的な 58 遺伝子型を選んで SNP ジェノタイピングに供試した。また、九州の実生林から選抜された精英樹を 26 個体、屋久島 9 個体、九州で古くに造林されたと言われる行者スギ群の個体を 5 個体、九州における天然林の可能性を指摘されている鬼の目スギ群から 6 個体、四国での天然林から 8 個体、関西育種基本区内で、四国以外での天然林から 34 個体、隠岐島の天然林から 5 個体、関東育種基本区内の天然林から 19 個体、東北育種基本区内の天然林から 22 個体を選び、SNP ジェノタイピングに供試した。全個体の 95% 以上、MAF>5% でフィルタリングされて残った座数は 2876 であり、この 2876 座での SNP を用いて以後の解析を行った。

個体間の SNP のユークリッド距離に基づいたクラスタリングを行った (図 1)。この結果、在来品種は大きく 2 つのクラスタに分かれた。一つの在来品種クラスタは他のクラスタから大きく離れており、主に宮崎県のオビスギ群の在来品種により構成されていた。また、もう一つの在来品種クラスタは、他地域の個体とともに一つの大きなクラスタを構成しており、その中で独立したクラスタとなっていた。他地域の個体では、屋久島の個体群が一つのクラスタを構成していた。それ以外の個体群は、複数のクラスタに分散した結果となった。

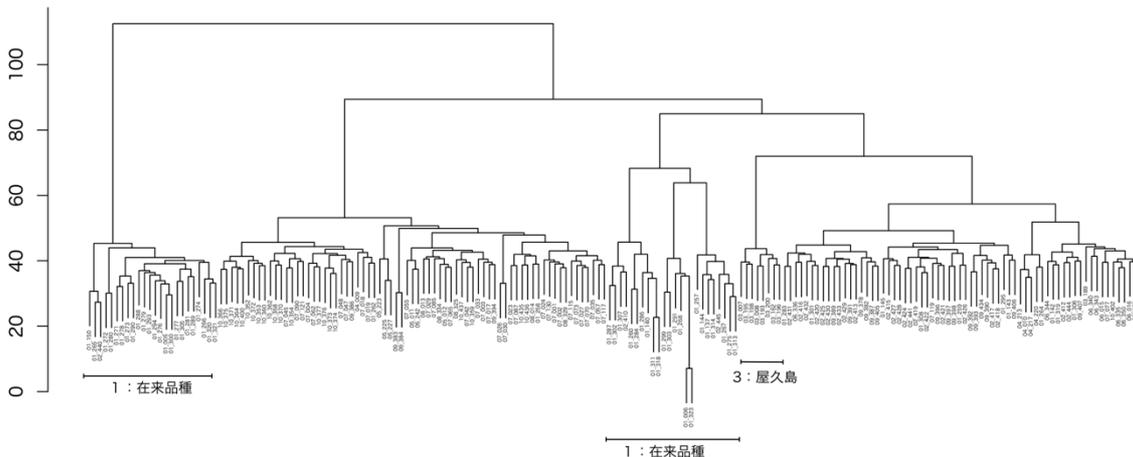


図 1: 個体間距離に基づいたクラスタリングの樹状図

192 個体について示した。距離行列はユークリッド距離で作成し、クラスタリングは Ward 法で行った。各個体のラベルは「個体群番号\_個体番号」を示す。個体群番号は、01: 在来品種、02: 九州精英樹、03: 屋久島、04: 行者スギ、05: 鬼の目スギ、06: 四国天然林、07: 関西育種基本区内天然林 (四国以外)、08: 隠岐島天然林、09: 関東育種基本区内天然林、10: 東北育種基本区内天然林を示す。大部分が同じクラスタになった個体群のみ、図中に表記した。

祖先集団を仮定したモデルベースのクラスタリングを行った。Cross Entropy は祖先クラスター数  $K$  が 8 の時に最小になった。ここでは  $K=4$  の結果を図 2 に示した。在来品種は、個体間距離に基づいたクラスタリングの結果と同様に、大きく 2 つのグループに分かれた。オビスギ群に属する在来品種は、祖先クラスター C が大部分を占めた。オビスギ群以外の在来品種は、その構成は様々であったが、祖先クラスター D が大部分を占める個体が複数存在した。祖先クラスター D と祖先クラスター C は在来品種以外の個体群にはほとんど認められなかった。九州の実生林由来の精英樹の大部分は、祖先クラスター B がその遺伝的構成の大部分を占めていた。天然個体群では屋久島に祖先クラスター C が一部含まれており、他の天然個体群とは異なっていた。主に日本海側に位置する、隠岐島、関西育種基本区の個体群、および東北育種基本区の個体群は祖先クラスター A が高い割合を占めていた。一方、主に太平洋側に位置する四国および関東育種基本区の個体群は祖先クラスター B が高い割合を占めていた。九州の古い人工林と考えられている行者スギ、天然林の可能性が指摘されている鬼の目スギの個体群はその構成は太平洋側の個体群と類似した結果であった。

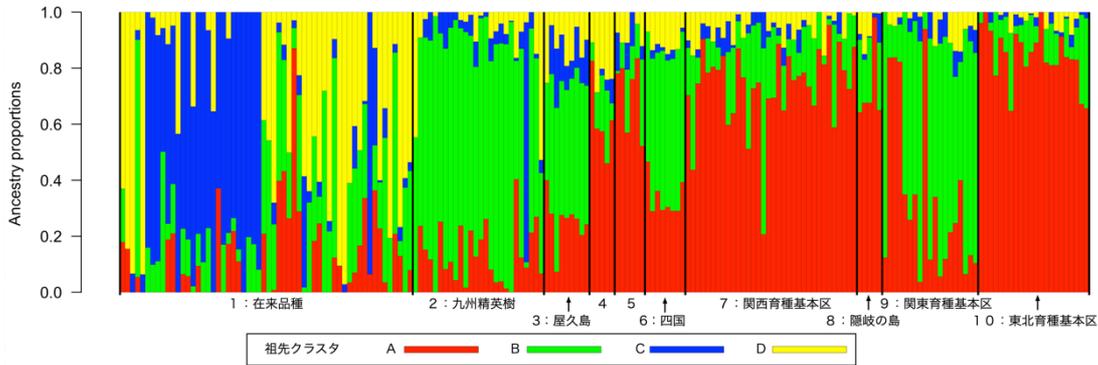


図2：個体間距離に基づいたクラスタリングの樹状図  
192 個体について示した。各バーは1 個体の祖先クラスタの構成を示す。個体群番号は図1 と同様。

本研究により、九州の在来品種は、その遺伝的構成は他地域と比べると特異的であることが明らかとなった。全国レベルのスギの遺伝的構成についてはすでに多くの報告があり (Tsumura et al. 2012, Uchiyama et al. 2014, Kimura et al. 2014, Hiraoka et al. 2018, Tsumura et al. 2020)、大きく分けて太平洋側のオモテスギ、日本海側のウラスギ、および屋久島の3 グループに分かれることが示唆されている。本研究においても天然個体群については同様の傾向が見られた。一方で、在来品種群は従来のグループとは異なる遺伝的組成を示していた。これらのことから、過去に強いボトルネックがかかった可能性や、隔離されてから長い時間が経過している可能性が示唆される。前述のように、九州のスギは人為起源が唱えられる一方で、「今日、九州本島に分布しているスギ老大木の起源がすべて九州以外の土地からもたらされたという確実な証拠もまた見いだされてはいない」(宮島 1989) 状態である。本研究で得られた、九州のスギ在来品種の特徴的遺伝的構成が、人為起源により他地域から持ち込まれた個体群によって成立し得るかどうかは、さらに検討の必要がある。九州の実生造林地帯から選抜された精英樹は大部分が太平洋側の個体群と類似しており、この精英樹群と比較して大きく遺伝的構成が異なる在来品種群は精英樹と共に九州の林木育種を進める上で重要な遺伝的リソースであり、この九州スギ遺伝的リソースの遺伝的構成が明らかにできたことは今後の林木育種や遺伝資源保全の基礎となる重要な知見といえる。

#### <引用文献>

- Bolger AM, Lohse M, Bioinformatics BU, 2014 (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114-2120.
- Catchen JM, Amores A, Hohenlohe P, Cresko W, Postlethwait JH (2011) Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *Genes & Genomes Genetics* 1:171-182.
- Enoki, H. (2019). The construction of pseudomolecules of a commercial strawberry by DeNovoMAGIC and new genotyping technology, GRAS-Di. *Proceedings of the Plant and Animal genome conference XXVII*. San Diego, CA. Retrieved from <https://pag.confex.com/pag/xxvii/meetingapp.cgi/Paper/37002>
- Frichot E, François O (2015) LEA: An R package for landscape and ecological association studies *Methods Ecol Evol* 6:925-929.
- Hiraoka Y, Fukatsu E, Mishima K, Hirao T, Teshima KM, Tamura M, Tsubomura M, Iki T, Kurita M, Takahashi M, Watanabe A (2018) Potential of Genome-Wide Studies in Unrelated Plus Trees of a Coniferous Species, *Cryptomeria japonica* (Japanese Cedar). *Front Plant Sci* 9:271-15.
- Kimura MK, Uchiyama K, Nakao K, Moriguchi Y, San Jose-Maldia L, Tsumura Y (2014) Evidence for cryptic northern refugia in the last glacial period in *Cryptomeria japonica*. *Ann Bot* 114:1687-1700.
- 宮島寛 (1989) 九州のスギとヒノキ. 九州大学出版会.
- 中尾登志雄, 黒木嘉久, 細山田典昭, 外山三郎 (1986) 九州本土の天然杉 -大崩山系鬼ノ目山のスギ群落-. *森林立地* 28:1-10.
- 塚田松雄 (1980) 杉の歴史: 過去一万五千年間. *科学* 50:538-546.
- Tsumura Y, Uchiyama K, Moriguchi Y, Ueno S, Ihara-Ujino T (2012) Genome scanning for detecting adaptive genes along environmental gradients in the Japanese conifer, *Cryptomeria japonica*. *Heredity* 109:349-360.

- Tsumura Y, Kimura M, Nakao K, Uchiyama K, Ujino-Ihara T, Wen Y, Tong Z, Han W (2020) Effects of the last glacial period on genetic diversity and genetic differentiation in *Cryptomeria japonica* in East Asia. *Tree Genet Genomes* 16:19.
- Uchiyama K, Miyamoto N, Takahashi M, Watanabe A, Tsumura Y (2014) Population genetic structure and the effect of historical human activity on the genetic variability of *Cryptomeria japonica* core collection, in Japan. *Tree Genet Genomes* 10:1257-1270.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武津英太郎、平尾知土、三浦真弘、栗田学、井城泰一、宮原文彦、佐藤太一郎、江島淳、横尾謙一郎、上杉基、三樹陽一郎、永吉健作、久保田正裕、渡辺敦史
2. 発表標題 九州におけるスギ在来品種の遺伝的リソースの整理と遺伝的関係の解明
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡辺 敦史  (Watanabe Atsushi)  (10360471)	九州大学・農学研究院・准教授    (17102)	
研究分担者	栗田 学  (Kurita Manabu)  (40370829)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所林木育種センター・主任研究員 等   (82105)	
研究協力者	宮原 文彦  (Miyahara Fumihiko)	(元所属)福岡県農林業総合試験場資源活用研究センター	
研究協力者	佐藤 太一郎  (Sato Taichiro)	大分県農林水産研究指導センター林業研究部	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	江島 淳 (Ejima Atsushi)	佐賀県林業試験場	
研究協力者	横尾 謙一郎 (Yokoo Kennichiro)	熊本県林業研究・研修センター	
研究協力者	上杉 基 (Uesugi Motoi)	宮崎県林業技術センター	
研究協力者	三樹 陽一郎 (Mitsugi Yoichiro)	宮崎県林業技術センター	
研究協力者	永吉 健作 (Nagayoshi Kensaku)	鹿児島県森林技術総合センター	
連携研究者	平尾 知士 (Hirao Tomonori)  (90457763)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等  (82105)	
連携研究者	三浦 真弘 (Miura Masahiro)  (60370821)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等  (82105)	