

平成 22 年 4 月 9 日現在

研究種目：基盤研究 (A)
研究期間：2006～2009
課題番号：18255010
研究課題名 (和文) フタバガキ科の系統地理学的研究と産地識別のための塩基配列データベースの構築
研究課題名 (英文) Phylogeographical study of dipterocarp species and development of molecular database for identification of its origin.
研究代表者
津村 義彦 (TSUMURA YOSHIHIKO)
独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・室長
研究者番号：20353774

研究成果の概要 (和文)：東南アジアの広域に分布する *Shorea leprosula* と *S. parvifolia* を対象に分布域広域から集団材料を採取し、*S. leprosula* ではマレー半島、ボルネオ島、スマトラ島、ジャワ島で 28 集団を収集し、合計で 920 個体を採取した。*S. parvifolia* は同様に 4 地域で 13 集団 (個体数 404 個体) を収集した。遺伝解析用のマーカーとして EST-SSR マーカーを 40 遺伝子座で開発した。また葉緑体 DNA 多型のスクリーニングでは 17 領域を探索して、*S. leprosula* では 5 領域 (trnD - trnT, petB intron, petL - psbE, psbJ - petA, rps16 - trnK) で多型がみられ、*S. parvifolia* では 4 領域 (petL - psbE, psbJ - petA, rpl32 - trnL, trnQ - rps16) で多型が見られた。22 集団の *S. leprosula* を 34 遺伝子座の EST-SSR で解析した結果、遺伝子分化係数は $F_{st}=0.0671$ でボルネオ島の集団とそれ以外が明瞭に分化していた。また葉緑体 DNA 多型の解析結果は 21 のハプロタイプが検出され、 $F_{st}=0.5851$ で、遺伝的分化が大きく、核 DNA 同様にボルネオ島の集団とそれ以外が明瞭に分化していた。またボルネオ島の中でも特に東南部は遺伝的多様性が高い傾向が見られた。葉緑体 DNA の多型性の結果から、ボルネオ島南部、北部、スマトラ北部などの大きな地域では DNA による地域識別が可能であることが示されたが、集団レベルでの識別は難しいところが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：We have collected 920 individuals of 28 populations in *Shorea leprosula* throughout its distribution area such as Malaysia and Indonesia. In *S. parvifolia*, 404 individuals of 13 populations were collected from Malaysia and Indonesia. DNA markers for population samples were developed which are 40 loci of EST-SSR markers derived from cDNA sequence data. Intraspecific chloroplast DNA polymorphisms were screened of 17 regions of intergenic regions, and found 5 regions (trnD - trnT, petB intron, petL - psbE, psbJ - petA, rps16 - trnK) were polymorphic in *S. leprosula* and 4 regions (petL - psbE, psbJ - petA, rpl32 - trnL, trnQ - rps16) in *S. parvifolia*. The result of nuclear DNA markers such as 34 loci of EST-SSRs showed clear genetic differentiation between Borneo and the other populations, although the $F_{st}=0.0671$ was low. The result of chloroplast DNA (cpDNA) polymorphism showed much clear genetic differentiation between Borneo and the other populations, and 21 cpDNA haplotypes was found and the coefficient of genetic differentiation, F_{st} value was quite high, 0.5851. These results suggest that there were two different origins of current tropical forest in Southeast Asia. According to cpDNA results, region identification was possible but the identification of each population would be difficult by only DNA data.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 8,000,000 | 2,400,000 | 10,400,000 |
| 2007年度 | 10,100,000 | 3,030,000 | 13,130,000 |
| 2008年度 | 9,100,000 | 2,730,000 | 11,830,000 |
| 2009年度 | 5,200,000 | 1,560,000 | 6,760,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 32,400,000 | 9,720,000 | 42,120,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・森林工学

キーワード：フタバガキ科、遺伝構造、産地識別、系統地理、遺伝的多様性

1. 研究開始当初の背景

生物多様性条約により各国の生物種の保全がさらに重要な問題として認識されるようになってきた。特に東南アジアなどの発展途上国では生物資源の保全とその有効利用に関心が高くなってきているが、貴重な植物資源の流出が現在でも続いている。また森林認証制度も始まり、東南アジアでもそれぞれの国で森林認証への動きが始まっている。これは発展途上国における違法伐採を減少させるためにも特に重要になると考えられている。しかしながら森林認証制度も発展途上国各地域に普及するまでにはかなりの時間を要するであろう。特に東南アジアの熱帯林では違法伐採による森林伐採が後を断たず、現在でも多くの森林が違法に伐採され、第三国を経由して先進国へ輸出されている。我が国も多くの材及び製品が輸入されており、国際的な問題となっている。これらはそれぞれの国の社会問題を解決しないと根本的には解消しないであろう。しかし、これらを未然に防ぐための対応策の一つとして市場にでてきた材の産地識別のためのDNAデータベースの構築が挙げられる。このためには対象とする植物種の分布域全体をカバーする地域の集団を調査する必要があるが、広範な材料収集が難しいこともあり現在までにこのような大規模な調査は行われてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では東南アジア地域で優占している樹種で生態的にも林業的にも重要であるフタバガキ科の数種を対象として、東南アジア各国と協力しDNAレベルでの大規模な系統地理学的研究を行なう。フタバガキ科内で東南アジアに広範囲に分布し、生態学的にも林業上も重要な *S. leprosula* 及び *S. parvifolia* の2種をモデルとして、系統地理学的な情報の収集を行う。そのため現在残されている限られた集団でどの程度の遺伝的多様性が残

り、また集団間分化が人間活動によって促進されたかの興味深いモデルとなると考える。また *S. leprosula* で開発したDNAマーカーをフタバガキ科内の他種への応用も試みる。それぞれの地域の保有する遺伝的な特徴を明らかにし、最終的には材の産地識別のためのDNAデータベースの構築を行うことを目的として実施する。

3. 研究の方法

(1) 材料の収集

マレーシア及びインドネシアを対象し、全体でそれぞれの地域で10~20集団で1集団あたり約20個体の母樹から葉組織を採取した。広域分布種である *S. leprosula*、*S. parvifolia* の2種の材料採取を行った。採取した研究材料は現地の大学または研究所で粗DNAの抽出を行った。抽出した粗DNAは日本に持ち帰り精製の後、分析を行った。インドネシアでは設備が十分でなくDNA抽出に問題があったため、乾燥したサンプルとして日本に持ち帰り、森林総合研究所でDNAの抽出を行った。

(2) DNAマーカー開発

遺伝的多様性の調査のために葉緑体DNA多型及び核DNAマーカーであるEST-SSRマーカーを開発して使用した。葉緑体DNAの多型のスクリーニングは遺伝子間領域の17箇所を用いて行った。核DNAマーカーについては *S. leprosula* でcDNAライブラリーを構築し、EST (Expressed Sequence Tag) の情報を取得して、その情報を用いてEST-SSRマーカーの開発を行った。

(3) 集団解析

開発した葉緑体DNA多型領域とEST-SSRのDNAマーカーを用いて収集した集団のDNAの分析を行った。分析したデータは集団遺伝学的解析を行い、遺伝的多様性や集団間分化のパラメータを算出した。

4. 研究成果

(1) 研究材料の収集

東南アジアの広域に分布する *S. leprosula* と *S. parvifolia* を対象に分布域広域から集団材料を採取し、*S. leprosula* ではマレー半島、ボルネオ島、スマトラ島、ジャワ島で 28 集団を収集し、合計で 920 個体を採取した。*S. parvifolia* は同様に 4 地域で 13 集団 (個体数 404 個体) を収集した。

(2) DNA マーカー開発

情報量の多い DNA マーカー作成のために *S. leprosula* の実生及び内樹皮から RNA を抽出し生成後、cDNA ライブラリーの構築を行なった。このライブラリーの cDNA クローンの約 10000 について塩基配列の読み取りを行なった。このうち unigene は約 6000 クローンあった。最終的に *S. leprosula* の EST ベースの DNA マーカーは 40 遺伝子座が開発できた。葉緑体 DNA 多型のスクリーニングでは 17 領域を探索して、*S. leprosula* では 5 領域 (trnD - trnT, petB intron, petL - psbE, psbJ - petA, rps16 - trnK) で多型がみられ、*S. parvifolia* では 4 領域 (petL - psbE, psbJ - petA, rpl32 - trnL, trnQ - rps16) で多型

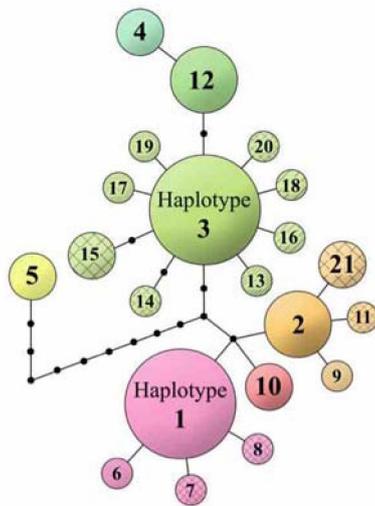


図1 *S. leprosula* の葉緑体 DNA のハプロタイプネットワーク

が見られた。

(3) 広域分布種の集団間分化

22 集団の *S. leprosula* を 34 遺伝子座の EST-SSR で解析した結果、遺伝子分化係数は $F_{st}=0.0671$ でボルネオ島の集団とそれ以外が明瞭に分化していた。葉緑体 DNA 多型の解析結果は 21 のハプロタイプが検出され (図-1)、 $F_{st}=0.5851$ で、遺伝的分化大きく、核 DNA 同様にボルネオ島の集団とそれ以外が明瞭に分化していた (図-2)。またボルネオ島

の中でも特に東南部及びスマトラ島中部から北部にかけての地域は遺伝的多様性が高い傾向が見られた。

葉緑体 DNA の多型性の結果から、ボルネオ島南部、北部、スマトラ北部などの大きな地域では DNA による地域識別が可能であることが示されたが、集団レベルでの識別は難しいところが明らかとなった。また葉緑体 DNA 多型及び核 DNA の解析結果から、現在の熱帯は大

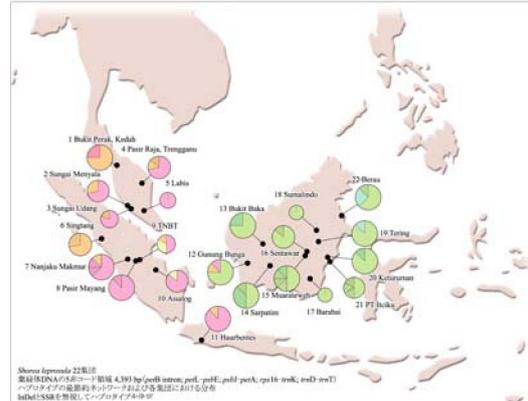


図-2 *S. leprosula* の葉緑体 DNA ハプロタイプの分布

きく二つの起源、ボルネオ島とそれ以外 (マレー半島とスマトラ島)、から成立している可能性を強く示唆していた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

① Masuda, S., N. Tani, M. Ohtani and Y. Tsumura (2010) Characterization of 12 microsatellite loci for important tropical tree species *Shorea maxwelliana* and *S. laevis* (Dipterocarpaceae). Conservation Genetics Resources (in press) (査読あり)

② Tsumura, Y., T. Kado, K. Yoshida, H. Abe, M. Ohtani, Y. Taguchi, Y. Fukue, N. Tani, S. Ueno, K. Yoshimura, K. Kamiya, K. Harada, Y. Takeuchi, B. Diway, R. Finkeldey, M. Naim, S. Indrioko, K. K. S. Ng, N. Muhammad, and S. L. Lee (2010) Molecular database for classifying *Shorea* species (Dipterocarpaceae) and techniques for checking the legitimacy of timber and wood products. Journal of Plant Research (in press) (査読あり)

③ Ng, K. K. S., S. L. Lee, Y. Tsumura, S.

Ueno, C. H. Ng, C. T. Lee (2009) EST-SSRs isolated from *Shorea leprosula* and their transferability to 36 species within the Dipterocarpaceae. Molecular Ecology Resources 9:393-398 (査読あり)

④Tani, N., Tsumura, Y., Kado, T., Taguchi, Y., Lee, S. L., Muhammad, N., Ng. K. K. S., Numata, S., Nishimura, S., Konuma, A., Okuda, T. (2009) Paternity analysis-based inference of pollen dispersal patterns, male fecundity variation and influence of flowering tree densities in two dipterocarp species. Annals of Botany 104:1421-1434 (査読あり)

⑤Naito Y., M. Kanzaki, H. Iwata, K. Obayashi, S. L. Lee, N. Muhammad, T. Okuda, Y. Tsumura (2008) Density dependent selfing and its effects on seed performance in a tropical canopy tree species, *Shorea acuminata* (Dipterocarpaceae). Forest Ecology and Management 256:375-383 (査読あり)

⑥Naito, Y., M. Kanzaki, S. Numata, K. Obayashi, A. Konuma, S. Nishimura, S. Ohta, Y. Tsumura, T. Okuda, Lee S. L. and N. Muhammad (2007) Size-related flowering and fecundity in the tropical canopy tree species, *Shorea acuminata* (Dipterocarpaceae) during two consecutive general flowerings. 121:33-42 (査読あり)

⑦Fukue, Y., T. Kado, S. L. Lee, K. K. S. Ng, N. Muhammad and Y. Tsumura (2007) Effects of flowering tree-density on mating system and gene flow in *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae) in Peninsular Malaysia. Journal of Plant Research 120: 413-420 (査読あり)

[学会発表] (計5件)

①増田真佑, 谷尚樹, 大谷雅人, 上野真義, Norwati Muhammad, Soon Leong Lee, 津村義彦、マレー半島におけるフタバガキ科樹木 *Shorea maxwelliana* の遺伝子流動の年次変動、日本生態学会、2010年3月17日、東京大学

②谷尚樹、角友之、深澤圭太、田口由里子、Lee S. L.、Ng K. K. S.、M. Norwati、R. b. Azizi、沼田真也、西村千、小沼明弘、奥田敏統、新山馨、津村義彦、東南アジア熱帯雨林における花粉散布研究、日本森林学会、2009年3月27日、京都大学

③増田真佑・谷尚樹・上野真義・Norwati Muhammad・Soon Leong Lee・津村義彦、マイクロサテライトマーカーを用いたフタバガキ科 *Shorea maxwelliana* の遺伝子流動、日本森林学会、2009年3月27日、京都大学

④Tsumura Y., T. Kado, K. Yoshida, H. Abe, M. Ohtani, Y. Taguchi, Y. Fukue, N. Tani, S. Ueno, K. Yoshimura, K. Kamiya, K. Harada, Y. Takeuchi, B. Diway, R. Finkeldey, M. Na'iem, S. Indrioko, K. K. S. Ng, N. Muhammad, and S. L. Lee、Molecular database for classifying *Shorea* species (Dipterocarpaceae) and searching the origin of timber in some *Shorea* species. International Forest Genetic Resources Symposium - Conservation and sustainable utilization towards climate change mitigation and adaptation、2009年10月6日、Kuala Lumpur.

⑤津村義彦、角友之、福江陽子、谷直樹、柴田正志、上谷浩一、原田光、竹内やよい、Diway Bibian, Lee Soon Leong, Norwati Muhammad, Finkeldey Reiner、違法伐採抑止のためのフタバガキ科 *Shorea* 属種識別DNAデータベースの構築、日本森林学会、2007年4月2日~4日、九州大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津村 義彦 (TSUMURA YOSHIHIKO)
森林総合研究所・森林遺伝研究領域・室長
研究者番号：20353774

(2) 研究分担者

上野 真義 (UENO SANEYOSHI)
森林総合研究所・森林遺伝研究領域・主任
研究員
研究者番号：40414479
谷 尚樹 (TANI NAOKI)
国際農林水産業研究センター・林業領域・
主任研究員
研究者番号：90343798

(3) 連携研究者

戸丸 信弘 (TOMARU NOBUHIRO)
名古屋大学・生命農学研究科・教授
研究者番号：50241774
Szmids E. Alfred (SZMIDT E. ALFRED)
九州大学・理学部・准教授
研究者番号：70325497
岩田 洋佳 (IWATA HIROYOSHI)
農業・生物特定産業技術研究機構・中央農
研・主任研究員
研究者番号：00355489

