

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380096
 研究課題名（和文） 葉緑体ゲノムの SNP を用いたブナの分子系統地理学的・環境適応的研究
 研究課題名（英文） Phylogeographic and environment adaptability study of *Fagus crenata* using SNPs in chloroplast genome
 研究代表者
 高橋 誠 （TAKAHASHI MAKOTO）
 独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター遺伝資源部・研究室長
 研究者番号：90370824

研究成果の概要（和文）：

森林に対するニーズの多様化に伴い、広葉樹造林が拡大しつつある。広葉樹については種苗配布に関するルールがない現状にある。地域固有の適応的変異の保全のためには遺伝子攪乱のリスクを回避し、適切な種苗を用いることが重要である。ブナを対象樹種として、葉緑体ゲノム上の DNA 多型を探索し SNP マーカーを開発した。また、分布域全体を網羅する 698 地点の 4,321 個体から分析用試料を採取し、葉緑体 DNA の LSC 領域の 3 領域の 18SNP を分析し、ハプロタイプを明らかにした。ハプロタイプの類縁関係を明らかにするとともに、得られたデータを用いて精細なハプロタイプ地図を作成した。

研究成果の概要（英文）：

As needs of human society to forest ecosystem diversifying, planting of broad-leaved trees is now increasing. Currently, there are no rules regarding the seed transfer of broad-leaved trees. It is crucial to use appropriate planting stocks to achieve conservation of adaptive genetic variation that harbored in each of different regions, avoiding the risks of genetic disturbance. *Fagus crenata* as targeted species, we identified DNA polymorphisms on chloroplast genome, and developed SNP markers. 4,321 samples were collected from 698 locations covering almost whole range of *F. crenata*, and surveyed 18 SNPs at three regions in the large single copy region of the chloroplast genome, and determined their haplotype. We investigated relationship of chloroplast haplotypes, and constructed fine haplotype map.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野： 農学
 科研費の分科・細目： 林学、林学・森林工学
 キーワード： 森林生態・保護・保全、遺伝子攪乱、ブナ、葉緑体ゲノム、SNP

1. 研究開始当初の背景

近年の森林に対するニーズの多様化に伴い、森林には生態系サービスの提供や生物多様性保全の場としての機能も求められている。木材生産以外の森林の多面的機能が期待されるようになり、ブナ等の有用樹種を用いた広葉樹造林が拡大しつつある。スギ、ヒノキなどの林業造林樹種については、林業種苗法により造林に用いる種苗の流通範囲が種苗配布区域として定められているが、広葉樹については、種苗配布に関わるルールが定められておらず、広域での種苗の流通が行われている (小山, 2005)。

ブナ等の森林樹木はしばしば広い分布域を持ち、異なる自然環境下で生育している。また、森林樹木は一般的に長寿命で固着性が高く、更新の際に花粉と種子の撒布により遺伝変異を移動させる以外は、定着した場所でその長い世代時間を過ごす。このため、同一種であっても、異なる地域の個体群は異なる環境適応性を有していると考えられる。人為により種苗を移動させるなどして、遺伝的に異なる系統で交配が行われた場合、遺伝子間相互作用などが原因となって遠交弱勢が生じ、地域個体群の適応性が低下する。このため、広域的な種苗の流通を伴った造林は、各地域に適応した遺伝子プールを攪乱し、適応的な地域固有性の破壊 (遺伝子攪乱) をもたらす危険性が高いとされている (Hufford & Mazer, 2003)。このため、主要な有用広葉樹について、種内の系統地理学的な構造を解析し、異なる地域系統の有無とその分布パターンを詳細に明らかにすることは、地域固有の遺伝変異を適切に保全するために重要である。

2. 研究の目的

本研究では、日本の冷温帯落葉樹林の主要な広葉樹であり国内に広く分布し、なおかつ林業上有用な樹種でもあるブナを対象樹種とし、葉緑体ゲノム上の DNA 多型を分析することにより、異なる遺伝的系統グループ (葉緑体ハプロタイプ) を把握し、精細なハプロタイプ地図を作成する。また、系統地理学的な構造をもとに、ブナにおける種子散布を介した過去の地史的分布変遷を解明する。

3. 研究の方法

葉緑体ゲノムは被子植物では一般的に母性遺伝する。葉緑体ゲノム上の DNA 多型 (1塩基多型 (SNP) と挿入/欠失 (InDel)) を分析することで、ブナの葉緑体ハプロタイプを明らかにすることができ、各地域からサンプルを採取し分析することにより、ハプロタイプ地図を作成することができる。

本研究の特色は、1) 葉緑体ゲノム上の広範

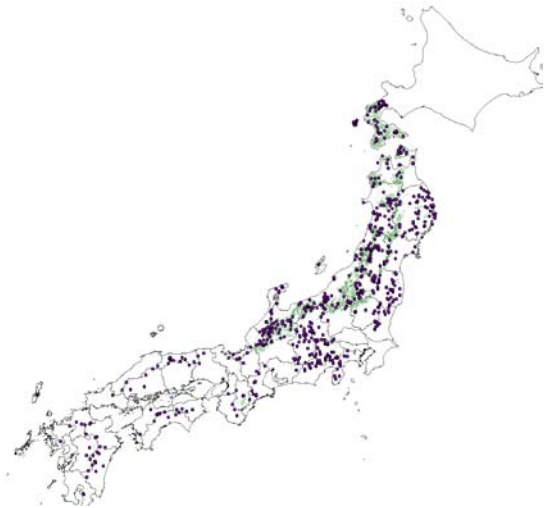


図-1 試料を採取した 698 地点の位置
緑色のメッシュは第 5 回環境省自然環境保全基礎調査・植生調査によるブナ群落とされていた 3 次メッシュ

囲での SNP と InDel の探索とマーカー化、2) 多地点サンプリングによる精細なハプロタイプの作成である。

(1) SNP と InDel の探索

地域が異なるブナ 16 個体をパネル集団として葉緑体の Large Single Copy (LSC) 領域の 11 領域の塩基配列を分析して変異を探索した。SNP と InDel の隣接塩基配列をもとに、1 塩基伸長法で多型を検出可能なプライマーの設計を行った。

(2) ハプロタイプ分析

ブナの分布域全体を網羅するように 698 地点 4,321 個体から試料を採取し (図-1)、DNA 分析を行った。葉緑体 DNA の *trnL-trnF* の遺伝子間領域と *matK* を含む *trnK* 領域、および *trnQ-trnS* の遺伝子間領域の 18 の SNP について 1 塩基伸長法による SNP 分析を行い、各個体の SNP 多型を明らかにし、ハプロタイプに区分した。各ハプロタイプの類縁関係を明らかにするために、プログラム NETWORK 4.5.0.0 を用いて解析し、ハプロタイプ・ネットワークを構築した。また、各サンプルの緯度・経度データとハプロタイプ・データをもとにハプロタイプ地図を作成した。

4. 研究成果

(1) SNP と InDel の探索

葉緑体ゲノムの LSC 領域の 11 領域の 28.6kb について、パネル集団の塩基配列を明らかにし、38 の SNP と 3 つの InDel を同定した。38SNP の内、16SNP についてはプライマーを開発した。

(2) ハプロタイプ分析

①ハプロタイプの分布と類縁関係

698 地点 4, 321 個体から採取したサンプルを用いて SNP 分析を行い、核ハプロタイプを同定したところ、15 のハプロタイプが検出された。ハプロタイプ間の類縁関係を表すハプロタイプ・ネットワークを図-2 に示す。また、ハプロタイプの分布図を図-3 に示す。

ハプロタイプは、A, B₁, B₂, C から成るグループ (グループ 1)、F1, F2, G から成るグループ (グループ 2)、K, L, M, N から成るグループ (グループ 3)、それらの中間型である D と E から成るグループ (中間グループ 1) と O (中間グループ 2)、遺伝的に顕著に異なる I (グループ 4) とに区分され、各グループは明確に異なった地理的分布を有していることが分かる。各グループの分布域は下記のようになっている。

グループ 1：北限地域にあたる北海道渡島半島から大山までの日本海側に分布し、東北地方では分布域が東側にせり出し、北上山地などの太平洋側にも広がっている。

ハプロタイプ：A, B₁, B₂, C

グループ 2：三陸沿岸から阿武隈山地、関東山地の比較的積雪量が少ない地域と紀伊半島に分布している。分布は中間グループ 1 のハプロタイプ D と E によって分断されている。本研究では H は検出されていないが、H は F と類似したタイプであるためこのタイプに含めた。

ハプロタイプ：F₁, F₂, G, H

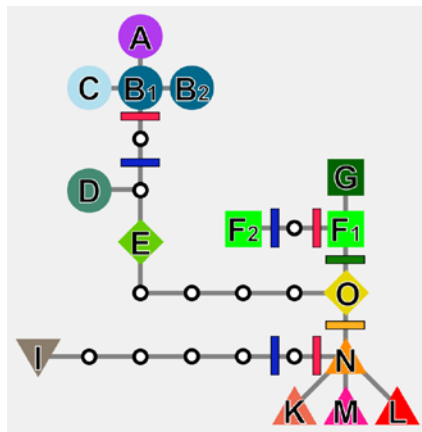


図-2 ハプロタイプ間の類縁関係を表すネットワーク

(図中の○印(節)は分析では検出されなかったハプロタイプを表し、節と節の間の線分は 1 突現変異を表す。節間に長方形が描かれている箇所は、その突然変異がホモプラスリーであり、同一色の長方形は同一塩基のホモプラスリーであることを意味する。任意の 2 つのハプロタイプ間のパスが長い程、その 2 ハプロタイプが遺伝的に異なった類縁関係にあることを示す。本研究で分析したサン

ルからは Fujii *et al.* (2002) でみられた H と J は検出されなかった。)

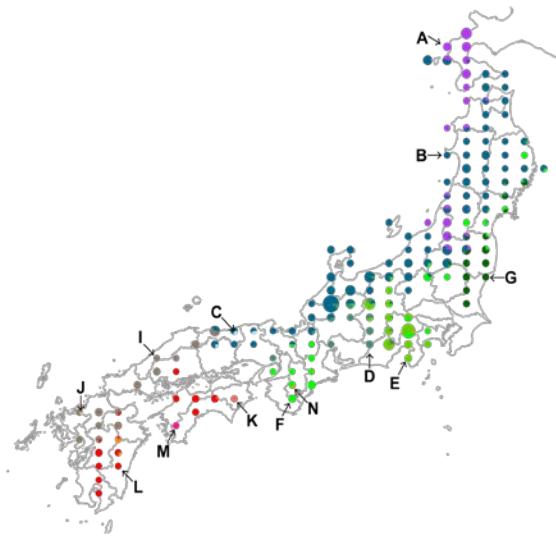


図-3 ブナの葉緑体ハプロタイプ地図

(約 80km 四方の 1 次メッシュを 4 分割した約 40km×40km のメッシュごとにハプロタイプの組成をパイグラフで示した。各パイグラフの大きさは、そのメッシュでのおおよそのサンプル・サイズを表している。各ハプロタイプの色は、図-2 と同一の配色を用いた。本図には Fujii *et al.* (2002) のデータも含めている。)

グループ 3：四国と九州南部に分布する。また広島県の一部で分布が見られた。ただし、K, L, M の祖先型と考えられるハプロタイプ N は奈良県や静岡県のごく限られた地点で散在して検出された。

ハプロタイプ：K, L, M, N

グループ 4：大山から九州北部に分布する。J は本研究では検出されなかったが、Fujii *et al.* (2002) で I と類似したタイプであるためこのグループに含めた。

ハプロタイプ：I, J

中間グループ 1：伊豆半島から富士山周辺および長野県南部、岐阜県の積雪量の少ない地域にみられる

ハプロタイプ：D, E

中間グループ 2：山梨県と神奈川県境のごく限られた地域でのみ検出された。

ハプロタイプ：O

このようにブナの葉緑体ハプロタイプには明確な系統地理学的構造が検出された。Fujii *et al.* (2002) では、ハプロタイプ A から L が検出され、ハプロタイプ A から E をクレード I、F~H をクレード II、I~L をクレード III と区分した。ハプロタイプ N, O は今回の研究で始めて検出され、また、B₁ と

B₂、F₁とF₂は今回の研究で *trnQ-trnS* 領域で SNP が同定されたことにより区分された。大山ではクレード I とクレード III が、また蔵王山系などではクレード I とクレード II の境界がみだされた。これらの地域ではブナ林が連続的に分布しているが、葉緑体ハプロタイプからみた遺伝的系統という意味では明瞭に異なった系統が接して分布している。

分析個体数が 3 個体以上の 553 集団の内、535 集団 (96.7%) は単一ハプロタイプのみによって占められ、複数のハプロタイプがみられるのは、異なるハプロタイプの分布境界域周辺のみに限られていた。このことはブナの種子が主に重力散布によって散布されることと関係があると考えられる。また、赤石山地はハプロタイプ D と E の分布境界となり、越後山地はハプロタイプ B と F の分布境界になっており、急峻な山地が種子散布の際の障壁となりハプロタイプの境界となっている地域がみられた。

②葉緑体ハプロタイプから推測される ブナの地史的な分布変遷

ハプロタイプ L は四国と九州南部、広島県のサンプルから検出された。日向灘や瀬戸内海は 13,000~10,000 年前頃から次第に形成されたことを考えると、このような分布にはそれ以前の時代のブナの分布が影響していると考えられる。

ハプロタイプ N はグループ 3 の他の 3 つのハプロタイプの祖先型、0 はグループ 2 と 3 の全てのハプロタイプの祖先型と考えられる。N は九州中部の数地点と奈良県の数地点、富士山周辺の地質的に古い山地に散在していた。0 は富士山周辺の地質的に古い山地の 1 箇所でのみ検出された。これら 2 つのハプロタイプが、グループ 3 の主たる分布域とは離れた中部日本で散在的に分布がみられるのは、最終氷期以前の過去の分布変遷の影響を遺存的に残しているためと思われる。

葉緑体ゲノムの進化速度は、核ゲノムよりも遅いため (Wolfe, 1987)、ある領域で 1 塩基が異なると、それは数万年前に分岐したことを意味する (Okaura & Harada, 2002)。ブナの葉緑体では多くの変異がみられるため、ブナは地史的に古い時代の歴史を現在に遺しているものと考えられる。葉緑体は母性遺伝するため、葉緑体ハプロタイプの違いは種子散布を通じて伝播された母系の歴史が異なることを意味する。日本列島は日本海側と太平洋側で大きく気候が異なる。葉緑体のハプロタイプの分布もそれとほぼ対応して、東日本では、日本海側にグループ 1 のハプロタイプが、太平洋側にはグループ 2 のハプロタイプが分布している。これらの二つの母系グ

ループは長年に渡って異なった自然選択の歴史を経てきたとすると、核 DNA の構成も異なっていると予想される。Hiraoka & Tomaru (2009) はブナ 23 集団の核 SSR14 マーカーについて解析し、遺伝的構成が太平洋側と日本海側で大きく異なり、またそれらの分布は植物社会学的にみたブナ林の種組成のパターンの違いともよく一致することを明らかにした。このような結果は、ブナでは葉緑体ハプロタイプで把握される遺伝的系統の違いは、核 DNA の遺伝的構成とも対応関係があることから、葉緑体ハプロタイプを遺伝的系統の指標として用いることができ、遺伝的多様性の保全に配慮した適切な種苗配布の検討に有効であると考えられる。

引用文献

- Fujii *et al.* (2002) *Plant Systematics and Evolution*, 232: 21-33.
Hiraoka & Tomaru (2009) *J. Pl. Res.*, 122: 269-282.
Hufford & Mazer (2003) *Trends Ecol. Evol.*, 18: 147-155.
小山 (2005) 林木の育種特別号 2005, 17-19.
Okaura & Harada (2002) *Heredity*, 88: 322-329.
Tsukada (1982a) *Bot. Mag. Tokyo*, 95: 203-217.
Tsukada (1982b) *Jap. J. Ecol.*, 32: 113-118.
Wolfe (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9054-9058.

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 9 件)

- ① Koyama, Y., Takahashi, M., Murauchi, Y., Fukatsu, E., Watanabe, A., Tomaru, N., Japanese beech (*Fagus crenata*) plantations established from seedlings of non-native genetic lineages. *Journal of Forest Research*, Vol. 16, 2011, In Press
- ② 片井秀幸、高橋誠、平岡宏一、山田晋也、山本茂弘、加藤公彦、袴田哲司、戸丸信弘、葉緑体 DNA と核マイクロサテライト変異に基づく静岡県内ブナ集団の遺伝的系統の推定、*日本森林学会誌*、査読有、93 号、2 号、2011、印刷中
- ③ Hara, M., Climatic and historical factors controlling horizontal and vertical distribution patterns of two sympatric beech species, *Fagus crenata* Blume and *F. japonica* Maxim.,

in eastern Japan. Flora, 査読有, Vol. 205, Issue 3, 2010, 161-170

- ④ 高橋誠、渡邊次郎、小澤創、宮本尚子、ブナ高嶺個体のさし木増殖、北海道の林木育種、査読なし、52 巻、1 号、2009、24-27
- ⑤ 渡邊次郎、小澤創、宮本尚子、壽田智久、蛭田利秀、今井辰雄、高橋誠、高齢なブナのさし木増殖、日本森林学会誌、査読有、91 巻、5 号、2009、344-347
- ⑥ Takahashi, M., Hara, M., Fujii, N., Suyama, Y., Watanabe, A., Fukatsu, E., Tomaru, N., Phylogeography of *Fagus crenata* revealed by chloroplast SNPs. The Proceedings of the 8th IUFRO International Beech Symposium, 査読なし、2008, 37-39
- ⑦ Tomaru, N., Hiraoka, K., Takahashi, M., Tsumura, Y., Torii, Y., Mitsutsuji, T., and Ohba, K., Geographical trends in genetic diversity within and among populations of Japanese beech species, *Fagus crenata* and *F. japonica*. The Proceedings of the 8th IUFRO International Beech Symposium, 査読なし、2008, 34-36
- ⑧ Suyama, Y., Gene flow, genetic structure and conservation genetics of *Fagus crenata*. The Proceedings of the 8th IUFRO International Beech Symposium, 査読なし、2008, 22-24
- ⑨ 原正利、関剛、小澤洋一、鈴木まほろ、菅野洋、分布北限域におけるイヌブナの生態地理、植生学会誌、査読有、24 巻、2 号、2007、153-170

[学会発表] (計 22 件)

- ① 片井秀幸、山本茂弘、山田晋也、高橋誠、平岡宏一、戸丸信弘、袴田哲司、静岡県内に植栽されたブナ個体の葉緑体DNAハプロタイプによる系統と生育等の関係、2009 年 10 月 10 日、第 58 回日本森林学会中部支部大会、名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- ② 袴田哲司、山本茂弘、片井秀幸、山田晋也、平岡宏一、津田吉晃、武津英太郎、高橋誠、戸丸信弘、津村義彦、静岡県におけるブナ、ケヤキの地理的変異と広葉樹植栽、第 120 回日本森林学会大会、2009 年 3 月 28 日、京都大学 (京都府京都市)
- ③ 高橋誠、平岡宏一、後藤晋、原正利、藤井紀行、渡邊敦史、武津英太郎、小山泰弘、片井秀幸、陶山佳久、戸丸信弘、ブナの地理的変異と広葉樹種苗、第 120 回日本森林学会大会、2009 年 3 月 28 日、京都大学 (京都府京都市)
- ④ 戸丸信弘、高橋誠、三浦真弘、津村義彦、

なぜ種苗の移動を制限した方がよいのか?、第 120 回日本森林学会大会、2009 年 3 月 28 日、京都大学 (京都府京都市)

- ⑤ 片井秀幸、高橋誠、山田晋也、山本茂弘、平岡宏一、戸丸信弘、袴田哲司、静岡県におけるブナ集団の葉緑体DNAハプロタイプの地理的分布—伊豆半島を中心として—、第 120 回日本森林学会大会、2009 年 3 月 27 日、京都大学 (京都府京都市)
- ⑥ 渡邊次郎、小澤創、宮本尚子、高橋誠、ブナのさし木増殖、ブナのさし木増殖—ブナの発根に対するさし木後の光条件の影響—、第 120 回日本森林学会大会、2009 年 3 月 26 日、京都大学 (京都府京都市)
- ⑦ 小澤創、高橋誠、矢野慶介、宮本尚子、渡邊次郎、ブナのさし木増殖—光条件を変えた時のさし穂の物質生産—、第 120 回日本森林学会大会、2009 年 3 月 26 日、京都大学 (京都府京都市)
- ⑧ 原正利、東日本におけるブナとイヌブナの水平・垂直分布とこれを規定する環境・歴史要因、第 56 回日本生態学会大会、2009 年 3 月 19 日、岩手県立大学 (岩手県滝沢村)
- ⑨ 高橋誠、平岡宏一、戸丸信弘、葉緑体・核DNAと形態形質の系統地理学的解析にもとづくブナの種苗配布区域設定の試み、第 56 回日本生態学会大会、2009 年 3 月 19 日、岩手県立大学 (岩手県滝沢村)
- ⑩ 陶山佳久、遺伝的地域特性に配慮した植林のための保全遺伝学的研究—宮城県におけるブナの天然林と植林地の実態—、日本植物学会東北支部第 21 回大会、福島大会公開シンポジウム、2008 年 12 月 13 日、福島大学 (福島県福島市)
- ⑪ 片井秀幸、山本茂弘、山田晋也、高橋誠、平岡宏一、戸丸信弘、袴田哲司、静岡県におけるブナ植栽木の葉緑体DNAハプロタイプと遺伝的多様性、第 57 回日本森林学会中部支部大会、2008 年 10 月 11 日、岐阜大学 (岐阜県岐阜市)
- ⑫ 原正利、東日本におけるブナの水平・垂直分布とこれを規定する気候・歴史要因について、植生学会第 13 回大会、2008 年 10 月 12 日、東京農工大学 (東京都府中市)
- ⑬ Takahashi, M., Hara, M., Fujii, N., Suyama, Y., Watanabe, A., Fukatsu, E., Tomaru, N., Phylogeography of *Fagus crenata* revealed by chloroplast SNPs, 2008 年 9 月 9 日、大沼国際セミナー・ハウス (北海道七飯町)
- ⑭ Suyama, Y., Gene flow, genetic structure and conservation genetics of *Fagus crenata*, The 8th International Beech Symposium, 2008

年9月9日、大沼国際セミナー・ハウス
(北海道七飯町)

- ⑮ 渡邊次郎、小澤創、宮本尚子、高橋誠、高嶺ブナのさし木の試み、第119回日本森林学会大会、2008年3月28日、東京農工大学(東京都府中市)
- ⑯ 片井秀幸、高橋誠、平岡宏一、袴田哲司、山本茂弘、山田晋也、戸丸信弘、静岡県におけるブナ集団の遺伝的多様性、第119回日本森林学会大会、2008年3月28日、東京農工大学(東京都府中市)
- ⑰ 小山泰弘、成瀬友季、高橋誠、渡邊敦史、戸丸信弘、長野県ブナ人工林の系統と環境適応性、第119回日本森林学会大会、2008年3月28日、東京農工大学(東京都府中市)
- ⑱ 高橋誠、後藤晋、梶幹男、渡邊敦史、ブナ産地試験地における葉緑体ハプロタイプと表現型形質との関係、第119回日本森林学会大会、2008年3月28日、東京農工大学(東京都府中市)
- ⑲ 高橋誠、原正利、藤井紀行、陶山佳久、津田吉晃、小山泰弘、片井秀幸、小谷二郎、斎藤真己、上野満、伊藤聡、小山浩正、西川浩己、小澤創、宮崎祐子、瀧井忠人、和田覚、島田博匡、花岡創、吉丸博志、松本麻子、渡邊敦史、武津英太郎、岩泉正和、福田陽子、橋本光司、戸丸信弘、葉緑体SNPによるブナの系統地理学的な研究—分布域全体をほぼ網羅したハプロタイプ地図の作成—、第55回日本生態学会大会、2008年3月15日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)
- ⑳ 原正利、東日本におけるイヌブナの分布とこれを規定する環境要因について、植生学会第12回大会、2007年10月7日、岡山理科大学(岡山県岡山市)
- ㉑ 小山泰弘、成瀬友季、高橋誠、渡邊敦史、戸丸信弘、長野県ブナ人工林の系統と環境適応性、第118回日本森林学会大会、2007年4月3日、九州大学(福岡県福岡市)
- ㉒ 高橋誠、原正利、小山泰弘、小谷二郎、斎藤真己、小澤創、西川浩己、陶山佳久、菅野学、渡邊敦史、武津英太郎、戸丸信弘、ブナ葉緑体ハプロタイプの地理的分布とハプロタイプ間の類縁関係、第118回日本森林学会大会、2007年4月3日、九州大学(福岡県福岡市)

[図書] (計1件)

- ① 戸丸信弘、文一総合出版、「ブナ林再生の応用生態学」(寺澤和彦・小山浩正 編)、ブナ集団の遺伝的変異と遺伝的構造、187~211 ページ、2008、310 ページ
- ② 河原孝行、高橋誠、ブナ、「北海道における林木育種と森林遺伝資源」(北海道

林木育種協会監修)、191~202 ページ、2008、216 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 誠 (TAKAHASHI MAKOTO)
独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター遺伝資源部・研究室長
研究者番号：90370824

(2) 研究分担者 (50 音順)

陶山 佳久 (SUYAMA YOSHIHISA)
東北大学・農学研究科・准教授
研究者番号：60282315

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
(H21:連携研究者)

原 正利 (HARA MASATOSHI)
千葉県立中央博物館・環境科学研究科・主席研究員
研究者番号：20250144

渡邊 敦史 (WATANABE ATSUSHI)
独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター育種部・研究室長
研究者番号：10360471
(H21:連携研究者)