

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2012～2015

課題番号：24405023

研究課題名(和文) 中国大陸起源木本類の日本への伝搬に関する環境文化史学的研究

研究課題名(英文) Study of propagation route of trees originated from China

研究代表者

藤井 英二郎 (FUJII, Eijiro)

千葉大学・園芸学研究科・教授

研究者番号：40125951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：日本国内の幹周8m以上のイチョウ巨樹を対象に、原産国である中国からの初期伝搬経路を明らかにするためマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝解析を行った。同時に中国と韓国の巨樹について調査・採集を行い、結果を比較した。解析の結果、中国、韓国、日本のイチョウは8つのグループに分けられ、中国、韓国、日本に分布する系統、中国と日本に分布する系統、日本国内に分布する系統、の存在が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The Ginkgo biloba naturally distributes in China. It is considered that the Ginkgo introduced to Japan in thirteenth century. The purpose of the study is to make clear the early stage of artificial propagation route from China to Japan, and distribution expansion in Japan. We investigated Ginkgo giant trees of more than eight meters of trunk girth in Japan, and genetically analyzed using a microsatellites marker. We also investigate and sampled in China and Korean, and the genetic analysis result was compared. A Ginkgo in China, Korea and Japan were divided into eight groups (A-H group) as a result of the analysis. Four groups are distributed in China, Korea, and Japan (A, C, D, F), and two groups are distributed in China and Japan (E, G). And, two groups are distributed only in Japan (B, H).

研究分野：造園学

キーワード：造園樹木 イチョウ 伝播経路 分子系統 遺伝子解析 中国の巨樹 韓国の巨樹 日本の巨樹

1. 研究開始当初の背景

イチヨウは、社寺境内や街路樹、公園樹木として広く利用されている樹木であるが、第四紀鮮新世(150万年程前)に日本列島から地域的に絶滅し、その後13世紀前後になってから仏教に関わって日本にもたらされ、各地に広がったと考えられている(堀,2005)。中国、韓国、日本の各地にはイチヨウの巨樹が生育しているが、これらのイチヨウが中国を起源として、どのような経路・背景で韓国・日本へ伝播していったのかということは、未だに明らかにされていない。

一方で、分子生物学分野の研究手法の発展に伴い遺伝的多様性や系統地理学的分析が高い精度で行えるようになり、中国南西部と東部の2カ所がイチヨウの自生地として推定されたが、西天目山については異なった見解が出されている(W. Gong *et al.* 2008, Shen *et al.* 2005)。また、日本におけるイチヨウの伝搬経路に関する研究は(Tsumura *et al.* 1997)西日本を中心とした地域で推定樹齢100年以上の個体を対象にアイソザイムを用いた遺伝学的手法で行われ、日本のイチヨウが高い遺伝変異を保持しており、日本に導入された種子がある程度まとまった量であったか、中国の異なった地域に由来するものであったことが示唆されるとしている。しかし、日本国内に生育しているイチヨウが中国や韓国とどのような関係にあるのか、高い精度で分析するような研究成果は現在まで明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では以上を踏まえ、イチヨウが中国で発見され韓国や日本に伝播していったという仮定のもとで、中国・韓国・日本において現存するイチヨウの巨樹を中心とした個体から得られる分子系統地理学的特性と生育背景に基づいてイチヨウの伝播経路を推定する。

3. 研究の方法

(1) 調査対象地域および対象個体の選定

中国については、既往研究(Shen *et al.* 2005; W. Gong *et al.* 2008)を参考に貴州省金佛山を中心とした地域、および西天目山を中心とした地域の2カ所を重点調査地域とし、韓国については、韓国政府文化庁発行の文献(Cultural Heritage Administration of Korea 2009)を参考に調査した。日本については、環境省の巨樹巨木林データベースから胸高幹周が800cm以上の個体を調査対象とした。

調査対象個体を可能な限り胸高幹周の大きな個体としたのは、イチヨウは寿命が長く、特に推定樹齢800年以上の個体も複数あり、伝播の初期段階の遺伝情報や文化的背景に関する情報が保存されている可能性が高いと判断したからである。

(2) 現地調査とサンプルの採取・保管

現地調査では、調査票に所在地およびその属性(寺社境内、田畑、屋敷庭等。)形状などを記入して、併せて生育状況の写真による記録も行った。さらに、調査対象個体から直接葉(検体)を採取して、保管した。調査対象木によっては、樹幹の形状から複数個体の融合と考えられるものがあり、1個体から複数の検体を採取する場合があった。このため、調査個体数よりも検体数が多くなった。この報告では26年度までに得られた251検体についてマイクロサテライトマーカーを用いた解析を行った。27年度以降も未調査個体の調査・サンプル採集を進め27年度中に78個体の調査・サンプル採集を行った。

(3) DNA抽出

採取した葉のDNAの抽出はCTAB抽出法(Doyle & Doyle 1987)を基本として、イソプロパノール層に沈殿した状態のDNAペレットをよく乾燥させてイソプロパノールを除去した後で、春木のエタノール沈殿(春木2005)に従い、チューブにエタノール1000mlを加え、-30℃で12時間以上静置する。その後、エタノールリンスを行い、エタノールを乾燥させて除去した後に、TEを50 μ l加える。抽出が完了したDNA溶液をNanoDropsで濃度測定後、溶液が20ng/ μ lになるようにTEで希釈し、-30℃で保管する。

(4) マイクロサテライト領域の増幅とフラグメント解析

イチヨウ用に開発されたプライマーを用いて、マイクロサテライト計8遺伝子座について解析を行った。サーマルサイクラ(BIORAD社 iCycler version4.0006)を用いて、98℃1分のプレヒート後、98℃10秒、アニーリング温度+5℃で15秒、72℃で1分のパターンを3サイクル、98℃10秒、アニーリング温度+3℃で15秒、72℃で1分のパターンを3サイクル、98℃10秒、アニーリング温度で15秒、72℃で1分のパターンを28サイクル、最後に72℃で8分処理するPCR反応を行った。PCR酵素にはMighty Amp DNA Polymerase(タカラバイオ製)を用いた。反応液は総量10 μ lとし、その組成は2x Mighty Amp Bufferを5 μ l、Primer 1(F)とPrimer 2(R)をそれぞれ3pmol、テンプレートとなる20ng/ μ lのDNAを1 μ l、Mighty Amp DNA Polymeraseを1 μ l、ミリQを5 μ l以下で調整する。PCR産物の断片サイズはオートシーケンサー(ABI 3100xl Genetic Analyzer)を用いて特定した。サイズマーカーはGeneScan 600 LIZ internal ladder (Applied Biosystems)を使用した。マイクロサテライトの多型のパターンは、GeneMapper TM Analysis 4.0 software (Applied BioSystems)を用いて解析した。結果の統計的処理にはGenAEx 6.41software (PeakAll and Smouse 2006)を使用し、ハーディ・ワインバーク平衡から

のヘテロ接合度のずれを二乗検定により検定した。さらに STRUCTURE(2.3.4) を使用して集団解析を行った。

4. 研究成果

(1) フラグメント解析による遺伝子座の解析結果

遺伝子座あたりの対立遺伝子数 (Na) [最大, 最少, 平均] は、中国[26, 9, 17.0]、韓国[25, 8, 16.3]、日本[31, 11, 19.9]であった。ハーディ・ワインバーグ平衡からの有意なヘテロ接合度のずれは中国グループの1遺伝子座を除いて、全ての遺伝子座で確認された。

(2) ストラクチャー解析と生育背景の解析結果

解析ソフト STRUCTURE(2.3.4) を用いて、フラグメント解析の結果得られたデータをクラスター解析にかけた。一般的に LNP(D) が最も高くなる K の値を採用することが適当とされ、これに従うと、解析に用いたサンプルは A~H の8種類の祖先系統に由来することが推定される。8種類の系統は分布の特徴によって、中国、韓国、日本に分布する系統、

中国、日本に分布する系統、日本だけに分布する系統の3つに分類された。

中国、韓国、日本に分布する系統

Aグループは、中国、韓国、日本で確認された。中国は西天目山の寺院や周辺の村にみられ、韓国は北部の寺院や宮殿、郷校、村の中(儒教的施設)などにみられ、日本では仏教施設と神社でみられた。中国は雌雄不明で、韓国では雌が多く、日本では雄であった。日本と韓国で遺伝子型が特に類似している個体があった。韓国の忠清南道錦山要光里とソウル市の昌徳宮、および新潟県五泉市切畑と福島県喜多方市の新宮熊野神社の遺伝子型が特に類似していた。

Cグループは、中国に広く分布する集団で、韓国や日本でもみられた。中国や韓国では、仏教施設や村の中に生育し、日本では仏教施設や神社に生育している。雌雄の割合は同程度であった。

Dグループは、特に韓国に広く分布し、中国と日本の一部の地域にもみられる。中国でも2カ所に分布し仏教施設にみられた。韓国では村の内外や田畑に最も多く見られるが(これらは、しばしば祖先崇拜や集落の守り木信仰の対象となり儒教的役割を担う)郷校、文廟、祠堂などの儒教に関わる施設も含まれていた。また、本グループにはソウル文廟や韓国で最も太いと考えられる「磻溪里」に生育する個体が含まれる。日本では、神社の個体が多く、学校や仏教施設にもみられる。雌雄比は同程度であった。また、本グループの韓国ソウル市成均大学構内の孔子文廟(胸高幹周7.5m)と福島県南会津町の伊南小学校(11m)の個体が特に類似した遺伝子型をもっていた。

Fグループは、中国と韓国の一部の地域と日本の九州を中心とした地域に分布している。中国では西天目山や周辺の村に分布していた。日本では仏教施設や神道施設に分布がみられた。雌雄の割合は同程度であった。

中国、日本に分布する系統

Eグループは、日本の対馬・九州北部地域を中心に分布しており、中国・四国地方と栃木・福島に分布している。雄よりも雌の方が多かった。中国では仏教施設に生育し、日本では神道施設が多く、次に仏教施設が多かった。

Gグループは、九州と中国・四国地方を中心に分布しており、青森の一部にもみられ、中国では1カ所で確認された。本グループは、日本では仏教施設や神道施設に多く分布し、中国では仏教施設にみられた。また雄が雌に比べて多かった。

日本だけに分布する系統

Bグループは、東北と四国、関東と九州の一部地域にみられ、雌雄の割合は同程度であった。生育場所は7割が仏教施設で、2割は神道施設に関係した場所であった。東北地方から関東地方にかけて分布し、四国地方でも広く確認された。解析対象の中で最も多い77検体がこのグループに分類される。本グループの約8割以上が雄個体であり、生育場所は約5割が仏教施設で、3割が神道施設であった。本グループでは互いに遺伝子型が特に類似した個体で構成されるサブグループが4グループ確認された。それぞれのサブグループはBa集団(48検体)、Bb集団(9検体)、Bc集団(2検体)、東北Bd集団(2検体)に分類した。Ba集団は、東北地方の日本海側から岩手県の太平洋側を中心に分布している。一方で、他のサブグループも東日本を中心に分布しているが、Ba集団とは対照的に東日本岩手県以南の太平洋側に分布していた。

Hグループは、20検体が属し、関東から東北と、四国に分布した。生育場所は、7割が仏教施設、2割が神道施設で、雌雄の割合は半々であった。

(3) 考察

A・Dグループの韓国と福島・新潟には特に類似した系統がみられることから、韓国と福島・新潟には何らかの関係性が示唆された。対馬を含めた九州、四国、中国地方には韓国に少ないか、あるいは分布が確認されないE、G、F、の各グループが中心になっており、西日本地域に分布するイチョウは、朝鮮半島との関係性は小さく、中国との直接的な関係が推定される。朝鮮半島と何らかの関係性をもって、日本に伝播した可能性が検討できるイチョウは、福島・新潟地域に局所的に分布する個体に限られる。

東日本地域にはH・Bグループが多く分布しており、HとBの分布パターンが類似していることから、何らかの関係性をもって伝播

した可能性が考えられるが、いずれのグループも日本だけに分布が確認された系統で、どの地域に由来するものかは不明である。一方、Bグループには遺伝子型が特に類似し、クローンである可能性が示唆される集団が確認され、いずれもギンナンをつけない雄個体であり、それぞれの個体の胸高幹周が多様であることから(最少5.1m~最大22m) 植栽時期もばらばらであることが分かる。また、Bグループだけではなく、韓国と日本の解析対象個体の一部に伝わるイチヨウの起源に関して、「僧侶などが諸国巡錫の折に立ち寄った場所で刺した杖や箸が根付いたもの」という伝承が伝わっており、これは挿し木でイチヨウを植栽していた様子を表現した伝承である可能性がある。以上の事実と推察から、Bグループのクローンである可能性が示唆される集団は、ギンナンの採取を目的とせず、敢えて雄個体を挿し木による栄養繁殖で増やした個体の集団であることが推定される。しかし、雄木を挿し木で増やすという行為がどのような意味をもっていたのかということに関してはさらなる研究が必要である。

27年度は、国内未調査地域について不足サンプルの集中的な調査、サンプリングを行い、得られたサンプルからDNA抽出、遺伝解析を進めた。検討結果がまとめ次第、27年度の調査結果と併せて再解析を行い、イチヨウの中国から伝搬、韓国の関連、日本国内の伝搬の全体像を明らかにしたい。

引用文献

Shen, L., Chen, X.Y., Zhang, X., Li, Y.Y., Fu, C.X., Qiu, Y.X., 2005. Genetic variation of *Ginkgo biloba* L.

(*Ginkgoaceae*) based on cpDNA PCR-RFLPs: inference of glacial refugia. *Heredity* 94, 396-401.

Willis KJ, McElwain JC. 2002. *The Evolution of Plants*. Oxford University Press: New York.

Yoshihiko Tsumura・Kihachiro Ohba. 1997. The genetic diversity of isozymes and the possible dissemination of *Ginkgo biloba* in ancient times in Japan.

Shen, L., Chen, X.Y., Zhang, X., Li, Y.Y., Fu, C.X., Qiu, Y.X., 2005. Genetic variation of *Ginkgo biloba* L.

(*Ginkgoaceae*) based on cpDNA PCR-RFLPs: inference of glacial refugia. *Heredity* 94, 396-401.

Wei Gong, Chuan Chen, Christoph Dobeš, Cheng-Xin Fu, Marcus A. Koch, Phylogeography of a living fossil: Pleistocene glaciations forced *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgoaceae*) into two refuge areas in China with limited subsequent postglacial expansion, *Molecular*

Phylogenetics and Evolution, Volume 48, Issue 3, September 2008, Pages 1094-1105.

Tsumura, Y., Ohba, K., 1997. The genetic diversity of isozymes and the possible dissemination of *Ginkgo biloba* in ancient times in Japan. In: Hori, T., Ridge, R.W., Tulecke, W., Del Tredici, P., Trémouillaux-Guille, J., Tobe, H. (Eds.), *Ginkgo biloba A Global Treasure: From Biology to Medicine*. Springer, Tokyo, Japan, pp.159-172.

Cultural Heritage Administration of Korea, 2009. Overview of Korean Natural Heritage Natural Monuments・Scenic Site (Plants)

堀照三・堀志保美. 2005. 写真と資料が語る 総覧・日本の巨樹イチヨウ 幹周7m以上22m台までの全巨樹. 内田老鶴圃, 東京.

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)

T. Otao, T. Kobayashi, K.Uehara, Development and Characterization of 14 Microsatellite Markers for *Indigofera pseudotinctoria* (Fabaceae), *Applications in Plant Sciences* 4 (4), 2015, 1500110 doi:10.3732/apps.1500110 査読有

Nakamura, I., H. Takahashi, S. Ohta, T. Moriizumi, Y. Hanashiro, Y-i. Sato, M. Mii, Origin of *Prunus x yedoensis* 'Somei-yoshino' based on sequence analysis of *PolA1* gene, *Adv. Hort. Sci.* 29, 2015, 17-23 査読有

中村郁郎・土屋有沙・高橋弘子・真壁壮, 上野公園のソメイヨシノ原木候補について、*育研17別1*, 2015, 56 査読有

Aragane, M., D. Watanabe, J-I. Nakajima, M. Yoshida, M. Yoshizawa, T. Abe, R. Nishiyama, J. Suzuki, T. Moriyasu, D. Nakae, H. Sudo, H. Sato, A. Hishida, N. Kuwahara, So. Makabe, I. Nakamura, M. Mii, Rapid identification of a narcotic plant *Papaver bracteatum* using flow cytometry. *J. Nat. Med.* 68, 2014, 677-685 査読有

Nakamura, I., H. Takahashi, Y-I. Sato, Diversity and flowering cherry in Japan. *Adv. Hort. Sci.* 28, 2014, 236-243 査読有

Tang, C.Q., Yang, Y., Osawa M., Momohara, A., Mu, J., and Robertson, K., Survival of a Tertiary relict species, *Liriodendron chinense* (Magnoliaceae), in southern China, with special reference to village fengshui forests. *American Journal of Botany*, 100(10), 2013, 2112-2119 査読有

Satowa, M., Ootsuka, K., Kobayashi, Y., Tanaka

,K., Ichitani, K., Flowers, J.M., Puruggana, M.D., Nakamura, I., Sato, Y., Sato, T., Crayn, D., Simon, B., Waters, D.L., Henry, R. and Ichikawa, R. Molecular relationships between Australian annual wild rice, *Oryza meridionalis*, and two related perennial forms, *Rice*, 6:26, 2013, 1-18
DOI: 10.1186/1939-8433-6-26 査読有

〔学会発表〕(計1件)

中村郁郎, 'ソメイヨシノ'誕生の謎について、
(特別講演)第10回日本櫻学会研究発表会、
2015年6月21日、富山県中央植物園研修室(富山・富山市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 英二郎 (FUJII, Eijiro)
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授
研究者番号: 40125951

(2) 研究分担者

上原 浩一 (UEHARA, Kouichi)
千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号: 20221799

中村 郁郎 (NAKAMURA, Ikuro)
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授
研究者番号: 50207867

百原 新 (MOMOHARA, Arata)
千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号: 00250150

章 俊華 (SHO, Shunka)
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授
研究者番号: 40375613