

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25304025

研究課題名(和文) 熱帯有用樹木ウリンの系統地理と遺伝的多様性解析に基づく遺伝子保存

研究課題名(英文) Phylogeography and genetic conservation of Ulin (*Eusideroxylon zwageri*), a tropical useful tree species.

研究代表者

井出 雄二 (IDE, Yuji)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：90213024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、絶滅のリスクが高いクスノキ科熱帯樹木ウリンについて、系統地理学的研究を行い木材の違法流通阻止と保全区域の設定に寄与することを目的とした。次世代シーケンサーを用いて、遺伝解析に必要な核SSRマーカー16座の開発と葉緑体シーケンシング領域の決定を行った。次に、インドネシアのスマトラ島およびカリマンタン島の9つの森林に生育する全310個体の遺伝解析を行った。その結果、本種が明瞭な遺伝構造を有し、集団間の遺伝的分化も生じていることが明らかとなり、保全区域設定のための基礎情報を得ることができた。また、葉緑体ハプロタイプは各森林に固有のものが多く、違法流通チェックに有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to prevent the illegal sell of wood and to contribute the establishment of conservation area of Ulin (*Eusideroxylon zwageri*), which is highly threatened, we conducted the phylogeographic study of this tropical Lauraceae tree species. Sixteen nuclear microsatellite markers are developed and sequencing regions in chloroplast are decided by Next generation sequencer analysis. Totally 310 individuals in 9 populations located in Sumatra Island and Kalimantan Island, Indonesia, are genetically analyzed. The essential information for establishment of the conservation area is obtained, that this species have clear genetic structure and the genetic differentiation among populations. Most of chloroplast haplotypes, being peculiar to each population, are useful for checking of illegal sell of this species.

研究分野：森林遺伝育種学

キーワード：希少樹種 核SSR 葉緑体DNA 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

ウリン(*Ulin; Eusideroxylon zwageri*)は、スマトラ島南部、ボルネオ島、両島間の島々、フィリピンのスルー諸島及びパラワン島に分布するクスノキ科の高木であり、その堅牢で白アリに強く、腐朽しにくい性質から、外構材として世界的に賞用される樹木である(PROSEA,1994)。我が国におけるウッドデッキ用の板材の販売価格は、板幅にもよるが、およそ15万円/m³から40万円/m³と高価である。そうしたことから、熱帯樹木の中でも伐採圧が高く、違法伐採も横行しており、IUCNのレッドリストにおいてVulnerable(危急)A1cd+2cdに分類されている。特に、インドネシアのカリマンタンでは、直接の伐採の他、石炭採掘による林地開発などにより、その天然林は著しく減少している。そのため、天然林の保全と同時に人工林による資源造成の早急な実施が望まれている。人工林の造成が進むことによって、天然林の伐採圧を低下させることが可能と考えられるが、ウリンの成長は16年生で樹高9~14mと比較的遅く(PROSEA,1994)、育種による成長改善や造林法の確立が求められる。そこでまず、保全区域設定と造林のための種苗配布区や育種区の設定が必要となるが、本種の遺伝的多様性に関する情報は、東カリマンタン(Rimbawanto and Widyatmoko, 2006)やスマトラ島(Widyatmoko et al., 2011)の集団についてのRAPD分析によるものしかなく、必要な情報は決定的に不足している。さらに、ウリンの分布域を網羅した、系統地理学的研究もおこなわれておらず、世界で流通している本種木材の出所や適法性を検証する手立てはない。そのため、本種の遺伝的多様性の解明と、保護区や種苗配布区の設定や育種は急務である。

2. 研究の目的

世界的に外構材として賞用され、絶滅のリスクが高いとされるクスノキ科熱帯樹木ウリン(*Ulin; Eusideroxylon zwageri*)について、その分布域全体を対象にした系統地理学的研究を行い、木材の違法流通阻止と保全区域の設定に寄与する。また、個別集団の核DNAマイクロサテライト分析により、集団内・集団間の遺伝的多様性の状態を測定し、集団の保全策立案に資する。これらの情報を統合し、遺伝的多様性に配慮した現地外保存林の決定を行うとともに、育種集団としての活用を目指す。

3. 研究の方法

(1) マーカー開発

ウリンの集団解析に資する核DNAマーカーと葉緑体DNAマーカーを開発する。まず初めに、両DNAマーカーの開発のために、次世代シーケンサー(Ion ProtonおよびIon PGM)を用いて、ゲノムワイドにDNAの塩基配列情

報を取得する。得られたDNA断片をCLC Genomics Workbench (CLC bio)を用いてアセンブリし、コンチグを得る。

核DNAのSSRマーカー開発時には、MISA(ソフトウェア)を用いて、得られたコンチグからSSR部位を抽出しマーカーを開発する。開発したマーカーはKutai自然公園(インドネシア東カリマンタン)から採取したウリン32個体を用いて、多型性の確認を行う。

葉緑体のDNAマーカー開発時には、得られたコンチグをBLASTにかけ、葉緑体DNAの可能性が高いコンチグを抽出し、それをレファレンス配列とする。レファレンス配列にプライマーを設計し、設計したプライマー領域を異なる集団由来のウリンサンプルでPCR増幅し、PCR産物をシーケンシングし、比較することで葉緑体DNA変異の有無を確認する。

(2) 集団遺伝解析

インドネシアのカリマンタン島の7つの森林とスマトラ島の2つの森林から採取したウリンを実験材料とする。

(1)で開発した核SSRマーカーを用いた解析では、DNA抽出キットを用いて、各集団30個体以上のウリンからDNA抽出を行う。開発した核SSRマーカーを用いて、集団間および個体間の遺伝的比較を行う。具体的な比較項目は、遺伝的多様性の各種指標(ヘテロ接合度、アレリックリッチネス、近交係数)、遺伝構造の各種指標(ストラクチャー解析、地理的遺伝構造解析)である。

(1)で開発した葉緑体DNAマーカーを用いた解析では、各集団から8個体ずつウリンを選び、PCR増幅と、増幅産物のシーケンシングを実施し、集団間の遺伝的比較を行う。具体的には、葉緑体ハプロタイプネットワークの作成と葉緑体ハプロタイプ分布を明らかにする。

(3) 植林用苗木の遺伝的多様性

今後、本種の保全を考えるうえで現地外保全林の設立や林業利用の人工造林が不可欠であり、これらの遺伝的多様性を担保する必要がある。そこで、すでにムラワルマン大学の圃場で植林のために育てている実生苗について遺伝的多様性を評価した。実生苗96個体の葉を採取し、(1)で開発した5つのマイクロサテライトマーカーを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) マーカー開発

核SSRマーカーに関して、2塩基繰り返しと3塩基繰り返しを中心に、計16座のマーカー開発に成功した。特に、Kutaiのウリンサンプルを用いて行ったマーカーの多型性の確認において、対立遺伝子数が2-19個あり、連鎖平衡はほとんどなく、集団遺伝解析に資する質のマーカーであった。

葉緑体DNAマーカーに関して、葉緑体DNA

上の 16 か所の異なる場所に設計した領域で SNP、INDEL、SSR などの種内変異が発見され、葉緑体変異に着目する遺伝解析に有用なマーカー開発に成功した。

(2) 集団遺伝解析

開発した核 SSR マーカーの内、特に多型性の高かった 11 個のマーカーを用いて、310 個体の遺伝子型決定を行った。検出された遺伝子型は 299 タイプで、同一の遺伝子型が同一の森林内から検出され、栄養繁殖由来の個体が定着している実態が示唆された。遺伝的多様性の指標のヘテロ接合度およびアレリックリッチネスの値は、スマトラ島で低く、カリマンタン島で高く、ウリンの分布の中心はスマトラ島ではないことが示唆された。

表 1 ウリンの島ごとの遺伝的多様性

	H_e^*	A_s^*	近交係数*
スマトラ島	0.53	1.49	-0.097
カリマンタン島	0.66	1.62	0.122

H_e ヘテロ接合度, A_s アレリックリッチネス
*2つの島で有意に異なる ($p < 0.05$)

ストラクチャー解析の結果から、カリマンタン中部と東部は遺伝的に類似していて、カリマンタン西部、スマトラ島にはそれぞれ異なる遺伝的集団が分布していた(図 1)。また、遺伝的距離と地理的距離の間には有意な相関があり(図 2)、明瞭な集団間の遺伝的分化が明らかになった。

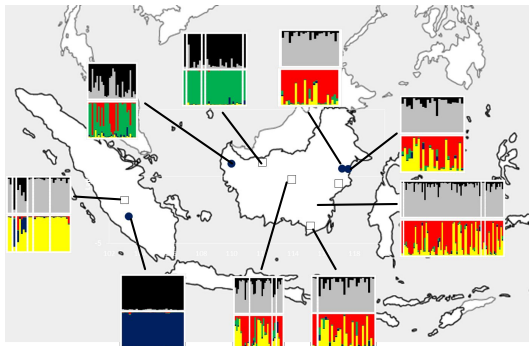


図 1 ストラクチャー解析の結果
上段は2つのジーンプール、下段は4つのジーンプールを仮定

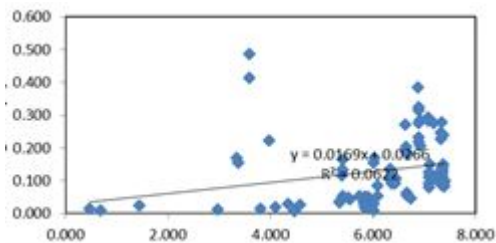


図 2 集団間の地理的距離と遺伝的距離の関係

葉緑体 DNA 解析では、計 72 個体ウリンについて、それぞれ約 3100bp の塩基配列を決定した。その結果、葉緑体ハプロタイプが 21 タイプ(A~U)検出された。検出された葉緑体ハプロタイプの遺伝的關係を図 3 に示した。また、ハプロタイプの地理的分布を図 4 に示した。15 タイプはそれぞれ一つの森林のみから検出された。一方、6 タイプは複数の森林から検出され、さらに、そのうちの 2 タイプはカリマンタン島とスマトラ島の両方から検出され、人為による種苗の移動が示唆された。

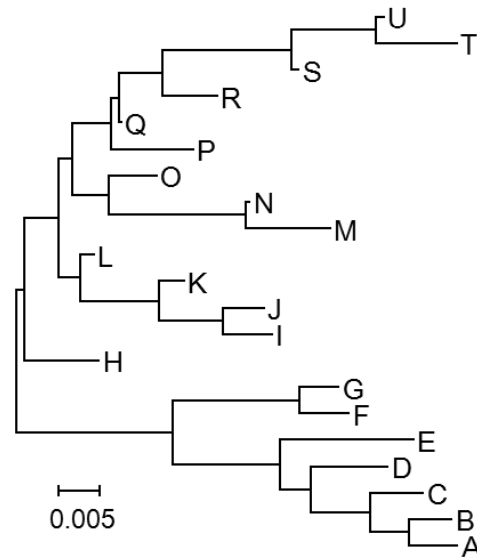


図 3 検出された 21 の葉緑体ハプロタイプの遺伝的關係

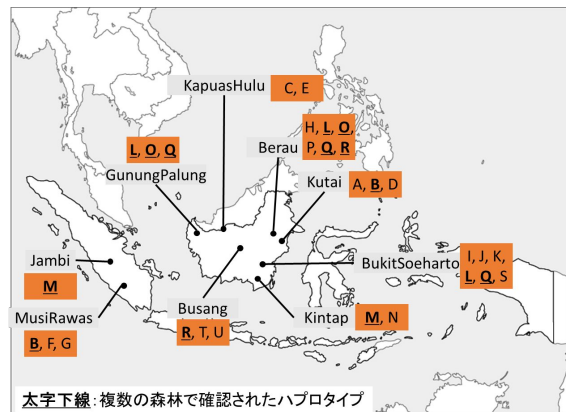


図 4 葉緑体ハプロタイプの地理的分布

以上のことから、インドネシアにおいて、ウリンが明瞭な遺伝構造を有していることが明らかとなり、保全区域設定の基礎的情報を得ることができた。種苗の移動に際しては、これらの遺伝構造へ悪影響が及ばないように細心の注意を払うべきであろう。また、検出された葉緑体ハプロタイプは各森林に固有のものが多いことから、本研究で開発した葉緑体シーケンシング領域は違法流通チエ

ックに有用であると考えられた。

(3) 植林用苗木の遺伝的多様性

5つのマイクロサテライトマーカーで解析した実生集団の遺伝的多様性 ($H_e = 0.78$) はカリマンタンの成木集団の遺伝的多様性 (5座の平均 $H_e = 0.76$) と同程度で、スマトラの遺伝的多様性 (5座の平均 $H_e = 0.64$) よりも高かった。このことから、ムラワルマン大学で育てている実生苗は十分な遺伝的多様性を保持しているといえる。

<引用文献>

Rimbawanto, A. and Widyatmoko, A.Y.P.B.C. (2006) Keragaman populasi *Eusideroxylon zwageri* Kalimantan Timur berdasarkan penanda RAPD. Jurnal Penelitian Tamanan Hutan 3(3):201-208.

Soerianegara, I. and Lemmens, R.H.M.J. eds. (1994) Plant Resources of South-East Asia (PROSEA), Prosea Foundation, Bogor Indonesia.

A.Y.P.B.C. Widyatmoko, I.L.G. Nurtjahjaningsih, and Prastyono (2011) Study on the level of genetic diversity of *Disospyros celebica*, *Eusideroxylon zwageri* and *Michelia* spp. using RAPD markers. ITTO PROJECT PD 539/09 Rev.1 (F), Bogor Indonesia.

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 2件)

Hirokyu Kurokochi, Ida Luh Gede Nurtjahjaningsih, Sukartiningsih, Engkong Tan, Shuichi Asakawa, Yoko Saito, Yuji Ide (2015) Development of polymorphic chloroplast DNA markers for the endangered tree *Eusideroxylon zwageri* through chloroplast isolation and next-generation sequencing. Conservation Genetic Resources 7:845-850 査読有
DOI:10.1007/s12686-015-0485-8

Hirokyu Kurokochi, Engkong Tan, Shuichi Asakawa, Sukartiningsih, Yoko Saito, Yuji Ide (2014) Development of 16 microsatellite markers in *Eusideroxylon zwageri* by next-generation sequencing. Conservation Genetic Resources 6:593-595 査読有
DOI:10.1007/s12686-014-0148-1

[学会発表](計 1件)

Ida Luh Gede Nurtjahjaningsih, Sukartiningsih, 黒河内寛之、齊藤陽子、井出雄二、 Genetic diversity of *Eusideroxylon zwageri* (Teijsm. & Binn.) in Indonesia revealed by nuclear microsatellite markers、第126回日本森林学会大会、2015年3月26日~28日 北海道札幌市

[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

井出 雄二 (IDE, Yuji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号: 90213024

(2) 研究分担者

齊藤 陽子 (SAITO, Yoko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 00302597

(3) 研究協力者

黒河内 寛之 (KUROKOCHI, Hiroyuki)

東京大学・アジア生物資源環境研究センター・助教

研究者番号: 00609000