

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290080

研究課題名(和文) マングローブ林の保全と再生に必要な遺伝的多様性の解析：主要構成種5群の解析

研究課題名(英文) Genetic diversity analyses of mangroves for their conservation and reforestation on five major component groups

研究代表者

梶田 忠 (Kajita, Tadashi)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：80301117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：マングローブは熱帯・亜熱帯の海岸に広がるマングローブ林を中心に構成される生態系で、人類にとって重要な生態系サービスを提供している。しかし、人間活動の影響により、マングローブ林は近年急速に破壊されつつある。そこで我々は、世界のマングローブ林を構成する主要樹種5群に注目し、分布域をおおよそ網羅するようなサンプルを用いて、統一的な手法で遺伝的多様性を解析・評価することで、(1)マングローブ林の遺伝的多様性の全球的空間分布の把握、(2)遺伝構造の形成要因の解析、(3)遺伝的多様性を用いたマングローブ林保全の検討等について、研究を実施した。4年間で5群の遺伝構造をほぼ終了し、報告書に記載の成果をあげた。

研究成果の概要(英文)：Mangroves are intertidal forest ecosystem that distribute in tropics and subtropics of the world. Mangroves provide critical ecological services to the human being, but it has recently been destroyed rapidly according to human activities. To analyze and access the genetic diversity of mangrove forest tree species in the global distribution range, we focused on five groups of tree species. Using the integrated molecular genetic methods to the samples obtained from populations scattering over the whole distribution range of species, we tried to analyze and assess genetic diversity of the mangroves. Our aims are (1) to understand the present spatial distribution pattern of genetic diversity (genetic structure), (2) to study the process that form the genetic structure, and (3) to use the information of genetic diversity for conservation of mangroves. In the study of four years for the five groups of mangroves, we obtained the results shown in the report.

研究分野：植物分類学、保全遺伝学、植物系統学

キーワード：保全遺伝学 マングローブ 系統地理学 広域分布種 海流散布種

1. 研究開始当初の背景

マングローブは、熱帯・亜熱帯の海岸域に広がるマングローブ林を中心に構成される生態系である。河口などの汽水域を中心に発達し、2007年に出版された統計によれば全世界における総面積はおよそ20万km²に及ぶと言われている。マングローブの持つ生態的機能は極めて多岐にわたっており、地球環境の維持において、代替不可能な貴重な生態系として認識されている。例えば、マングローブはそれに接した海域の生物だけでなく、サンゴ礁や外洋の生物の生産性をも高め、海水順変動時には生物多様性のレフュジアとして働き、また、海洋における炭素循環のソースにもなり、津波を防除するなど、様々な重要機能を持つ。しかし、その一方で、マングローブは1年あたり1-2%の割合で失われている。減少速度は極めて急速で、FAOの試算によると、この四半世紀のうちに、マングローブ保有国120のうち26で、マングローブは絶滅の危機に瀕し、総面積の35%-85%は失われる可能性があるという。2010年にまとめられたWorld Atlas of Mangrovesは、近年の人間活動の影響で、マングローブは総面積の4分の1が失われ、現在の総面積は15万km²に減少したとしている。このようなマングローブの減少が、地球環境に与える影響は計り知れない。そこで、IUCNやUN等、多くの国際的な機関がマングローブ減少の抑止と再生を目指した国際プロジェクトを開始している。

このように、国際的なマングローブの保全・再生活動が組織的に行われる一方で、これらの活動の科学的基盤情報であるマングローブ林主要構成樹種の遺伝的多様性は、十分には把握されていなかった。本研究の開始当時までには、何種類かの樹種については研究が比較的進んでいたが、特にアジアのマングローブ林で優先樹種となるものについては広域的な研究はほとんど進んでいなかった。その理由としては、これらのマングローブ林主要構成種は、あまりにも広範囲に、かつ、多くの国にまたがって分布しているため、統一的なサンプリングや研究が困難だったためだと思われる。

また、マングローブのような広域分布種の遺伝的多様性保全については、研究開始当時には学問的なコンセンサスがほとんど得られていなかった。世界各地でマングローブ林再生のための植林活動が行われてはいるものの、多くの場合、植林には、近隣地域や近隣国から得られた苗が、遺伝的多様性を考慮することなく用いられている。その背景には、マングローブ林は熱帯海岸域で広域かつ普遍的に存在しており、マングローブ植物の特徴の一つである胎生種子を海流で長距離散布することによって集団間の遺伝子流動が保たれているため、近くの集団なら遺伝的組成はそれほど変わらないはずだという考えがあったのだろう。しかし、このような考え方について科学的根拠は明らかではない。

そこで我々は、マングローブ植物の全球的な保全遺伝学的研究を目指して、国際的な研究ネットワークを構築して研究を開始した。平成21年度と23年度には、日本学術振興会の若手研究者招聘事業の助成を受けて、アジア地域の9ヶ国13研究者を含む研究者ネットワークを構築し、また、メキシコやブラジルの研究者も含めるように研究ネットワークを拡大してきた。このような国際研究ネットワークによる活動は順調に進み、本研究の開始当時の平成25年には、オオバヒルギ属を含むマングローブ林の主要構成種5群(*Rhizophora*, *Bruguiera*, *Sonneratia*, *Xylocarpus*, *Acrostichum*)のサンプルを、21ヶ国175集団から採集し、総計5,511サンプルからなるサンプルセットを構築することができた。

2. 研究の目的

本研究では、平成25年から28年の4年間で、上記の研究活動で得られたサンプルセットを利用して、新大陸に比べて研究が遅れているインド洋-西太平洋地域(IWP地域)のマングローブ林主要構成種5群の遺伝的多様性の全体像を、分布域全体を網羅するように明らかにすることを目的とした。そのために、葉緑体マーカー、SSRマーカー、核のローコピー遺伝子という3つの遺伝マーカーを用いた集団遺伝学的解析を分布域全体について分類群横断的に実施し、さらに、得られた結果を解析して、マングローブ植物の地理的構造、遺伝的多様性の地理的分布パターンを明らかにし、それらを考慮した保全ユニットを策定することで、マングローブ植物の遺伝的多様性保全のためのコンセンサス形成を目指した。

3. 研究の方法

(1) 研究組織

代表者、分担者、連携研究者と研究協力者が対象分類群ごとに研究協力者とチームを作り、研究を実施した。このうち、特筆すべき研究協力者と日本国内での参加期間は以下の通り。Mohd Nazre Saleh 博士(JSPS 外国人招へい研究者:2013年6月から2014年5月)博士、Alison Wee Kim Shan 博士(2014年2月から7月〔4月からは千葉大学大学院理学研究科特任研究員〕・琉球大学外国人研究員:2015年10月から2016年1月)、Orlex Baylen Yllano 博士(JSPS 再招へい研究者:2015年7月から8月)、Gustavo Maruyama Mori 博士(FAPESP(ブラジル)ポスドク:2015年3月から1年間)。その他、千葉大学大学院生数名が研究協力者として参加した。

(2) 具体的研究方法

対象とした5群のマングローブ植物のそれぞれについて、分布域全体をできるだけカバーできるような広い範囲から収集した集団サンプルを用いて、集団遺伝学的解析、系

統地理学的解析を行った。また、マングローブ植物との比較対象のために、同様に広域分布する海流散布植物である *Ipomoea pes-caprae* (グンバイヒルガオ) や *Vigna marina* (ハマアズキ) も同様の方法で研究した。葉緑体マーカーとしては、被子植物でよく用いられるユニバーサルマーカーの塩基配列を用いた。また、核 SSR マーカーは、それぞれの植物について次世代シーケンサ解析で得られたデータを用いて開発した。核のローコピー遺伝子は、DNA データベースに登録されている近縁種等のデータをもとに開発した。

これらの遺伝マーカーを用いて、植物群ごとに集団内の遺伝的変異を検出し、それらを地図上にプロットすることで、地理的構造を概観した。また、各種統計的手法を用いて、地理的構造の成り立ちを考察し、また、集団間の遺伝子流動なども推定した。

なお、研究代表者の梶田は、2015年5月から琉球大学熱帯生物圏研究センター西表研究施設に異動になったため、異動以降の研究は、主に、西表研究施設で行われた。

4. 研究成果

(1) 研究課題の主な成果 (- については発表論文の番号に対応)

ミモチシダ (*Acrostichum aureum*) の SSR マーカーの開発

マングローブ植物のうち唯一、汎熱帯域に分布すると言われ、胞子を風散布することで分布を広げる植物であるミモチシダの全球的な遺伝構造を調べるために必要な SSR マーカー (マイクロサテライトマーカー) 27 個を、次世代シーケンシング解析で得られた塩基配列情報をもとにして開発した。また、近年種である *A. speciosum* と *A. danaeifolium* についても、マーカーの使用の可否を確認し、その結果を論文として発表した (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5033363/>)。

開発できたマーカーについては、世界各地から収集したミモチシダの集団サンプルについて用いることを準備している。研究代表者の異動に伴い、オートシーケンサを用いたのフラグメント解析を容易に行うことは出来なくなったため、次世代シーケンシング技術を用いた代替方法の適用を検討中である。

Bruguiera hainesii の雑種性の検証

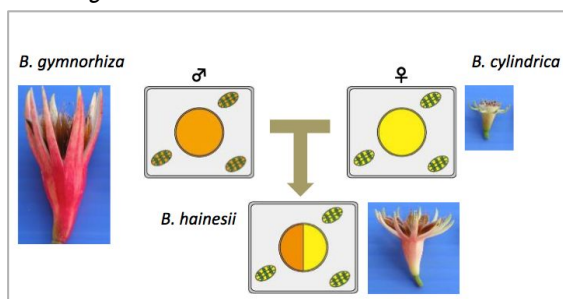


図 1. *Bruguiera hainesii* が近縁 2 種の雑種であることを示す模式図

マングローブ植物のうちの絶滅危惧種である *B. hainesii* の正体を、葉緑体マーカーと核のローコピー遺伝子の塩基配列を用いて明らかにした。アジア各地から採集した *B. hainesii* 及び他の *Bruguiera* 属植物の遺伝子型と地理的分布を調べたところ、*B. hainesii* は核マーカーでは常に *B. gymnorrhiza* と *B. cylindrica* のヘテロ接合体となり、葉緑体マーカーでは *B. cylindrica* と共通のハプロタイプを持っていた。このことから、*B. hainesii* は *B. cylindrica* を母方とする両者の雑種であることが示された (図 1)。この結果から、*B. hainesii* の絶滅危惧種 (CR) のランク指定を再検討すべきであることを示唆した。

SSR マーカーを用いた *Rhizophora stylosa* と *R. mucronata* の遺伝構造の研究

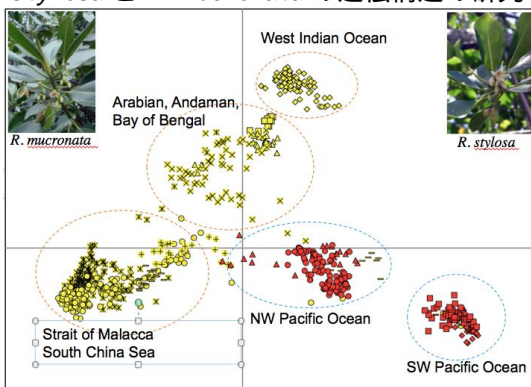


図 2. *Rhizophora mucronata* と *R. stylosa* の地域的な分化を示す PCA 解析の結果。

日本にも分布するヤエヤマヒルギ (*R. stylosa*) と *R. mucronata* は、形態的にもよく似た近縁種であり、しばしば混同されることもある。この両種の遺伝的な違いおよび地域的な分化を調べるために、20 個のマイクロサテライトマーカーを用いて解析した。両種の分布域が接するところでは、雑種と思われるものが検出されたが、両種は概ね明瞭に区別することができた。また、それぞれの種内には地域ごとの遺伝的なまとまりが検出され (図 2)、結果を論文として発表した (<https://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12862-015-0331-3>)。

また、未発表ではあるが、葉緑体マーカーを用いて同様の分布域を対象にした実験においても、地理的構造が検出されている。

汎熱帯海流散布植物グンバイヒルガオの全球的な遺伝構造

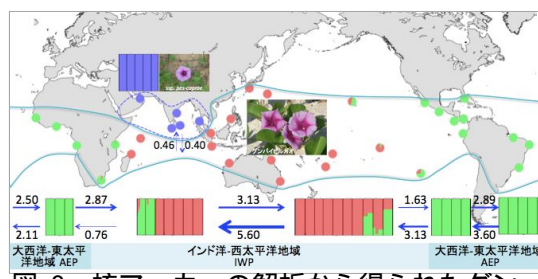


図 3. 核マーカーの解析から得られたグンバイヒルガオの全球的な遺伝構造。

マングローブ植物と同様の分布パターンを持つ、汎熱帯海流散布植物の代表種であるグンバイヒルガオ (*Ipomoea pes-caprae* ssp. *brasiliensis*) の遺伝構造と集団間の遺伝子流動を、核のローコピー遺伝子を用いて明らかにした。その結果、グンバイヒルガオもマングローブ植物と同様の IWP (インド洋-西太平洋) 地域と AEP (大西洋-東太平洋) 地域に大きく 2 分される構造を持つことが分かった。しかし、地域間の遺伝子流動の程度を定量すると、隣接するどの地域間でも遺伝子流動が保たれており、グンバイヒルガオは、海流を介した種子散布による遺伝子流動を全球的な分布域内で維持していることが示唆された。一方、インド洋北部にのみ分布する亜種 (ssp. *pes-caprae*) との間では、大きな遺伝子流動は生じていなかったことが明らかになり (図 3)、論文発表した。(<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091836>)

海流によって形成されたマレー半島域における *Rhizophora mucronata* の遺伝構造

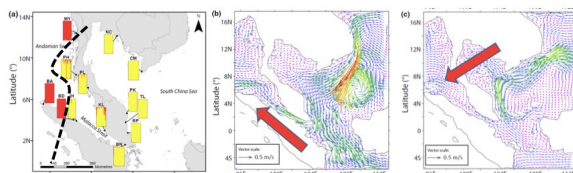


図 4. *Rhizophora mucronata* のマレー半島域における遺伝構造 (左) と、季節ごとの海流の強さと方向の変化 (中・右)。

マレー半島域は海洋を東西に分断する障壁として、多くのマングローブ植物の遺伝構造を形成する要因になると考えられていた。しかし *R. mucronata* のマレー半島域の遺伝構造は、半島の東西で分化するのではなく、マラッカ海峡側にずれたところに遺伝構造を形成する障壁があることが分かった。この障壁を維持・形成する要因が海流にあると考えて、海流の強さと方向を推定して遺伝構造と比較したところ、*R. mucronata* の遺伝構造をうまく説明することができ、論文発表した (図 4)。

ハウガンヒルギのマイクロサテライトマーカーの開発

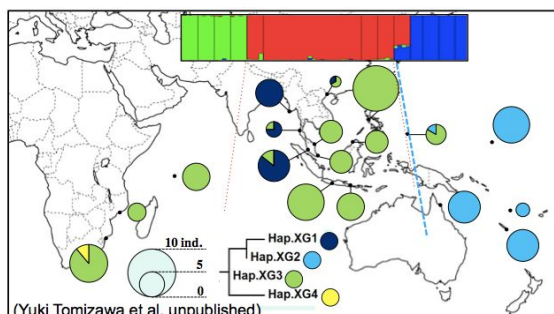


図 5. 葉緑体マーカー (円グラフ) と SSR マーカー (バープロット) によって示された、ハウガンヒルギの分布域内の遺伝構造。

ハウガンヒルギ (*Xylocarpus granatum*) は、IWP のマングローブ植物の中で最も広い分布域を持つ植物の一つである。本種の分布域内における遺伝構造を明らかにするために、次世代シーケンサを用いて得られたゲノム配列情報から、11 個のマイクロサテライトマーカーを開発し、論文発表した。

また、このマーカー及び葉緑体マーカーを用いてハウガンヒルギの遺伝構造を明らかにしたところ、マレー半島域における東西の分化と、西太平洋域における遺伝構造が観察された (図 5 投稿準備中)。

ハマザクロ (*Sonneratia alba*) の遺伝構造

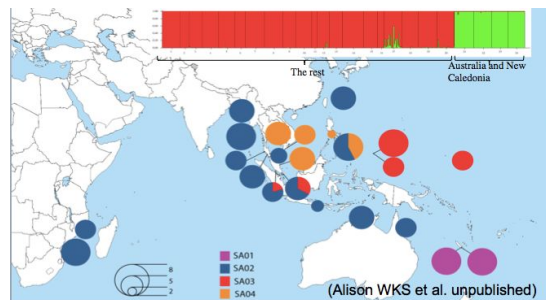


図 6. 葉緑体マーカー (円グラフ) と SSR マーカー (バープロット) によって示された、ハマザクロの分布域内の遺伝構造。

ハマザクロ (*Sonneratia alba*) もハウガンヒルギと同様に、IWP 地域のマングローブ植物の中で最も広い分布域を持つ植物の一つである。本種の分布域内での遺伝構造を明らかにするために、マイクロサテライトマーカーおよび葉緑体マーカーを用いた解析を行った。その結果、葉緑体には変異がほとんど見られないことから、この種は他のマングローブ植物よりも最近に分化し、分布を広げたと推測された。また、マイクロサテライトマーカーによって示される遺伝構造は、西太平洋域の海域で分断される遺伝構造を示唆した (図 6 投稿準備中)。

オヒルギ (*Bruguiera gymnorhiza*) の遺伝構造

オヒルギ (*Bruguiera gymnorhiza*) も、ハウガンヒルギ、ハマザクロと同様に、IWP 地域のマングローブ植物の中で最も広い分布域を持つ植物の一つである。ハマザクロの場合と同様にマイクロサテライトマーカーおよび葉緑体マーカーを用いた解析を行ったところ、すでに報告されているマレー半島域における東西の遺伝的分化に加え、インド洋内、太平洋内でも明瞭な遺伝構造が見られた。さらにこれらの遺伝構造は、核マーカーでも、葉緑体マーカーでも同様に示されたことから、地域間での遺伝子流動はかなり制限されていることが示唆された。オヒルギは海流を用いた長距離種子散布をすることが知られて、インド洋の東西、東太平洋と南太平洋という広域レベルで見た場合、種子散布は集

団間の遺伝子流動にはそれほど貢献していないことを示唆している。

複数種の遺伝構造の比較から推測される歴史の違いと遺伝構造の形成に関わった共通要因の存在

本研究の統一的な方法で得られた遺伝構造を複数種で比較することにより、マングローブ植物の遺伝構造の形成過程と要因について、さらに理解を進めることができた。

まず、葉緑体の塩基配列に見られる変異量は、それぞれの種の歴史を反映していると考えられるため、それらの比較により種の歴史の深さを推定することができる。概算による推定ではあるが、新しいものから並べると、ハマザクロ < ホウガンヒルギ < ヤエヤマヒルギ・*R. mucronata* < オヒルギ という順になる。この順番は、核マーカーで推定されたインド洋内における遺伝構造の程度（あるいは有無）とも相関している。ことから、ハマザクロやホウガンヒルギは、ヤエヤマヒルギやオヒルギよりも最近に分布域を拡大したものと推測できる。一方、オヒルギについては、インド洋内でも太平洋内でも、海洋で繋がった地域間に明瞭な分化が見られた。このことは、海流散布は分布域の拡大には貢献したが、現在の分布域ができてからはかなりの長い時間が経過しており、また、その間、地域間での遺伝子流動はそれほど起こっていないということができる。海流散布によって特徴づけられるマングローブ植物が、インド洋のような海域において、長距離種子散布による遺伝子流動をそれほど起こしていないというのは、新たな発見であった。

一方、西太平洋地域においては、これら全ての種において、東太平洋と南太平洋の間で明瞭な遺伝的分化がみられた。このような分化は、同様に海流散布をする広域分布種であるハマアズキでも観察された。太平洋地域の海洋内で、明瞭な陸地の障壁の無い場所を境界として検出される遺伝構造には、いくつかの理由が考えられる。ハマアズキでは集団動態の詳細な研究から、この構造が最終氷期再寒冷期における分布域の縮小・分断と、その後の分布拡大によって生じたと推測した。マングローブ各種も、おそらく、ハマアズキと同様に、最終氷期以降の分断と分布拡大によって、現在の遺伝構造が作られているのだろう。ただ、地史的要因の他にも、海流と、地域環境への適応も要因としては考えられるので、今後の検証が待たれる。

遺伝的多様性保全のためのコンセンサス形成に向けて

本研究の結果、多くのマングローブ植物が分布域内に明瞭な遺伝構造を持ち、地域集団間の遺伝的組成は明らかに異なる場合があることが分かった。このことは、植林活動における種苗の選定には、遺伝的違いを考慮すべきであることを示している。これらの遺伝

的な違いを用いた保全ユニットの策定方法や、異なる遺伝子型を持つ個体が地域環境にどの程度適応しているかという疑問については、今後の研究が待たれる。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

4年間の研究で、研究対象としていた5群のマングローブ植物および関連する広域分布植物について、分布域を広くカバーするような形で、複数種の遺伝構造を把握することができた。また、本研究の実施機関内に、ブラジルおよびメキシコの研究者と緊密な共同研究体制を築くことに成功し、今後のグローバルレベルでの研究をさらに進展させるための準備ができた。

未発表のデータも含めると、我々の4年間の研究内容は、マングローブの保全遺伝学的研究および系統地理学的研究を、格段に進進させたと言えることができる。最近になって中国のグループが同様の対象植物についてゲノム解析を用いた研究成果を発表したが、それらとあわせることで、マングローブのグローバルな遺伝的多様性保全について、さらに理解が進むだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- Yamamoto T, Tsuda Y, Mori GM, Cruz MV, Shinmura Y, Wee AKS, Takayama K, Asakawa T, Yamakawa T, Suleiman M, Núñez-Farfán J, Webb EL, Watano Y and Kajita T. 2016. Development and characterization of 27 microsatellite markers for mangrove fern *Acrostichum aureum* L. (Pteridaceae), Applications in Plant Sciences, 4, apps.1600042. 査読有
- Ono J, Yong J W H., Takayama K, Saleh M H, Wee A K S, Asakawa T, Yllano O B, Salmo S G III, Suleiman M, Tung N X, Soe K K, Meenakshisundaram S H, Watano Y, Webb E, Kajita T. 2017. *Bruguiera hainesii*, a critically endangered mangrove species, is a hybrid between *B. cylindrica* and *B. gymnorhiza* (Rhizophoraceae). Conservation Genetics. 17(5):1137-1144. 査読有
- Wee AKS, Takayama K, Chua JL, et al. 全著者 20 名中 20 番目 Kajita T. 2015. Genetic differentiation and phylogeography of partially sympatric species complex *Rhizophora mucronata* Lam. and *R. stylosa* Griff. using SSR markers. BMC Evolutionary Biology. 15:57 doi:10.1186/s12862-015-0331-3. 2015. 査読有
- Miryeganeh M, Takayama K, Tateishi Y, and Kajita T. Long-distance dispersal by sea-drifted seeds has maintained the

global distribution of *Ipomoea pescaprae* subsp. *brasiliensis* (Convolvulaceae). PlosOne. DOI: 10.1371/journal.pone.0091836. 2014. 査読有

Wee AKS, Takayama K, Asakawa T, Thompson B, Onrizal, Sungkaew S, Tung NX, Saleh N, Soe KK, Tan H, Watano Y, Baba S, Kajita T, and Webb EL. Oceanic currents, not land masses, maintain the genetic structure of mangrove *Rhizophora mucronata* Lam. (Rhizophoraceae) in Southeast Asia. Journal of Biogeography. 954-964. 2014. 査読有

Tomizawa Y, Shinmura Y, Wee AKS, et al. 全著者 22 名中 4 番目 Takayama K, 22 番目 Kajita T. Development of 11 polymorphic microsatellite markers of *Xylocarpus granatum* (Miliaceae) using next generation sequencing technology. Conservation Genetics Resources. 5: 1159-1162. 2013.

〔学会発表〕(計 29 件)

Kajita T, Takayama K, Maruyama Mori G, Wee A K S, Ono J and Yamamoto T. Toward the conservation genetics of mangroves on a global scale. MMM4: 4th Mangrove & Macroenthos Meeting. 2016 年 7 月 18-22 日. Flagler College, St. Augustine, Florida (USA).

Kajita T. Conservation of genetic diversity of mangroves in asia: Status, challenge and findings. IUCN SSC Mangrove Specialist Group 3rd Annual Symposium. 2015 年 11 月 12-14 日. Xiamen University, Xiamen (China).

梶田 忠. 広域分布する海流散布植物の系統分類・系統地理学的研究 (2015 年度第 14 回日本植物分類学会賞受賞講演). 日本植物分類学会第 14 回大会. 2015 年 3 月 5-8 日. 福島大学 (福島県・福島市). Yamamoto T, Takayama K, Nagashima R, Tateishi Y and Kajita T. Refugia might affect the genetic structure of a sea-dispersal plants: *Vigna marina*. Botany 2014. 2014 年 7 月 26-30 日. Boise, Idaho (USA).

Kajita T. Conservation of Genetic diversity of mangroves: Knowledge gaps and progress. International Symposium on Indonesian Biodiversity. 2013 年 8 月 31 日. Jenderal Soedirman University, Purwokerto (Indonesia).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: <http://nesseiken.info>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶田 忠 (KAJITA, Tadashi)
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授
研究者番号: 80301117

(2) 研究分担者

高山 浩司 (TAKAYAMA, Koji)
ふじのくに地球環境史ミュージアム・その他部局等・准教授
研究者番号: 60647478

(2) 連携研究者者

綿野 泰行 (WATANO, Yasuyuki)
千葉大学大学院・理学研究科・教授
研究者番号: 70192820
(H27 年度のみ 研究分担者)

朝川 毅守 (ASAKAWA, Takeshi)
千葉大学大学院・理学研究科・講師
研究者番号: 50213682

(4) 研究協力者

小野 潤哉 (ONO, Junya)
富澤 祐紀 (TOMIZAWA, Yuki)
Wee Kim Shan (WEE, Kim Shan)
Mori Gustavo (MORI, Gustavo)
Saleh Nazre (SALEH, Nazre)
Yllano Orlex (YLLANO, Orlex)
Gutierrez Jose (GUTIERREZ, Jose)
山本 崇 (YAMAMOTO, Takashi)
Miryeganeh Matin (MIRYEGANEH, Matin)