

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07780

研究課題名(和文) リュウキュウマツの遺伝的多様性と進化的位置の解明

研究課題名(英文) Phylogenetic analysis of *Pinus luchuensis* among pine species distributed in east Asia

研究代表者

渡辺 敦史 (Watanabe, Atsushi)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：10360471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の結果、リュウキュウマツは台湾マツやカントンマツなどの中国、台湾に分布するマツ属植物と近縁である一方で、独自の進化的位置を示すことが明らかとなった。さらに、リュウキュウマツの現在の分布域を古地理学的知見と併せることで推定した。リュウキュウマツは、西表島から奄美大島までの西南諸島群に分布することから、これら島嶼群に生育するリュウキュウマツを採取し、これら島嶼群の遺伝構造を調査することによって、各島嶼群の関係性を明らかにすることを試みた。そのため、核SSRマーカーの開発に取り組み、SSR領域が含まれるライブラリーの構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

沖縄県では、リュウキュウマツ枯損を引き起こすマツノザイセンチュウに対する抵抗性を示すクローンの選抜を行ってきた。しかし、抵抗性マツが島嶼群に植栽された場合、各島嶼で固有の遺伝子を持つ場合には、人為による遺伝的攪乱を生み出す可能性がある。既報では島嶼群間における固有の遺伝子はなく、島嶼間で近縁種も混在する形で分布するとされていたが、本研究から島嶼間で固有の遺伝子が存在する可能性が示唆されることから、リュウキュウマツを人工的に植栽する際には遺伝的攪乱に配慮した植栽を行うことを提言する初めての研究として社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：As a result of this study, it is clear to indicate an original evolutionary position of *Pinus luchuensis*, which is closely related to pine species distributed over China and Taiwan. Furthermore, distribution of *P. luchuensis* under phylogenetic process, was inferred with knowledge of the paleogeography. Since *P. luchuensis* is distributed naturally to Amami-Oshima from Iriomote-Jima, needle sample was collected to reveal genetic diversity and genetic structure among islands. Development of genomic SSR markers have been attempted, and a library including SSR region was constructed.

研究分野：森林遺伝育種

キーワード：リュウキュウマツ 進化的位置 遺伝的攪乱

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リュウキュウマツは、琉球諸島および薩南諸島に分布する固有のマツ属植物である。しかし、過去の大戦に加え、近年ではマツノザイセンチュウによる松枯れ被害にさらされた結果、リュウキュウマツの個体数は著しく減少した。このような状況下で、沖縄県では、平成14年に「沖縄県松くい虫の防除に関する条例」を制定し、防除だけでなく、ごく最近になってマツノザイセンチュウ抵抗性品種開発に向けた取り組みを本格的に開始した。

研究代表者は、リュウキュウマツに先行してマツノザイセンチュウによる松枯れ被害に直面し、抵抗性品種が開発されているクロマツを対象として、抵抗性品種が植栽された場合に周囲クロマツ林に与える遺伝的攪乱の可能性について検討してきた。リュウキュウマツについても抵抗性品種による植栽が本格的に進められる以前に、遺伝的多様性研究を含むゲノム科学的研究を実施し、リュウキュウマツが現在保有する遺伝的多様性や島嶼群が保有する固有性について基礎的知見を得ることが重要であることから本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

リュウキュウマツの葉緑体全ゲノムを決定し、NCBI等公共データベースに登録されたクロマツ・アカマツを含む東アジアのマツ属植物の情報と比較することで、リュウキュウマツの進化的位置を解明する。さらに、DNAマーカーを利用してリュウキュウマツの遺伝的多様性および琉球列島等島嶼群間の遺伝構造を解明する。これら学術研究から集積された基礎的知見と現存の資源量を統合した上で、リュウキュウマツ遺伝資源保全戦略を構築する。

### 3. 研究の方法

#### (1) リュウキュウマツの進化的位置の解明

葉緑体ゲノムは針葉樹において父性遺伝することが知られており、花粉による遺伝子交流解明に利用出来るほか、NCBI等公共データベースに塩基配列情報が豊富に蓄積されていることから、種間の系統関係解明に利用されている。そこでリュウキュウマツの葉緑体DNA全ゲノムの解読を行う。既に公開されているクロマツと併せて3種の葉緑体ゲノム配列とデータベース上に登録されている東アジアに分布するマツ属植物のデータに基づいてリュウキュウマツの進化的位置を決定する。

#### (2) SSR (simple sequence repeat) マーカーの開発と遺伝的多様性の解明

クロマツ等で開発されたSSRマーカーは、リュウキュウマツでも適用可能であることを既に確認している。一部のDNAマーカーについては、リュウキュウマツへの適用を再検証するため、クロマツで開発したマーカー領域についてリュウキュウマツを対象に再度塩基配列を決定し、場合によってはプライマーを再設計することで利用する。これらマーカーを利用することによって各集団単位で分析を進め、リュウキュウマツ集団の遺伝的構造の把握と各島嶼群におけるプライベートアレル等の特異性の解明を行う。

#### (3) リュウキュウマツ遺伝資源確保戦略

研究協力機関である沖縄県森林資源研究センターと共に沖縄本島および周囲島嶼群へのリュウキュウマツ残存資源量調査を行う。分析に必要なサンプリングについては、沖縄本島については3カ所以上、その他については残存資源量に応じて2カ所以上から、1カ所あたり48個体程度の針葉を採取する。その際に、GPS等でサンプリング箇所や樹高・胸高データなど基礎データを収集する。明らかにされた沖縄本島および各島嶼群の遺伝的多様性の結果と松枯れ被害拡大や伐採等による多様性喪失の可能性を考慮したリュウキュウマツ遺伝資源確保戦略を構築す

る。多様性が失われた場合を考慮して、本課題遂行中に調査各集団より適宜種子の収集を行う。収集した種子の一部は苗畑に播種し、遺伝的多様性を評価する。また、適正に種子を保存するための保存法の検討および収集した種子の緊急時における活用法の検討を行う。

#### 4. 研究成果

リュウキュウマツは地理学的に琉球弧に分布するマツ属植物であり、中国大陸・台湾から日本へマツ属植物が分布域を拡大する過程で種分化したと考えられる。南西諸島は、複数の島嶼群から構成されており、地史的影響からこれまで動物・植物を問わず、島嶼単位で固有の生物相や特異的な遺伝子型が存在することが明らかとされてきた。Chiangら（2006）は、リュウキュウマツに加え、台湾に分布する *P. taiwanensis* や中国本土に分布する *P. hwangshanensis* を対象として、葉緑体ゲノム中に存在する遺伝子間スペーサー領域の塩基配列を決定し、これら異なる種に分類されていた近縁種群が南西諸島島嶼群に混在することを報告した。この結果が事実とすれば、リュウキュウマツを含む3種間は極めて近縁な関係にあり、ケラマギャップが成立する以前に南西諸島全体に分布域を拡大し、多様性を維持したまま現在に至ったこととなる。しかし、ケラマギャップは、150万年前の前期更新世以前に成立していたことが地理学的に明らかとなっている。リュウキュウマツ以外の他の生物では島嶼間で異なる生物相を有しているにも関わらず、中国本土から奄美大島までの分断化された幅広い範囲で、多様性を包含したまま同一種が混在する可能性は低い。但し、南西諸島では、リュウキュウマツが古来より木材として利用されており、琉球王朝時代の蔡温の指示によるリュウキュウマツの植林が記録上にあることから、この時代以降に種苗の流通が行われた可能性はある。

本研究では、まず Chiangら（2006）の結果を追試するため、西表島・石垣島・宮古島・沖縄島・奄美大島からそれぞれリュウキュウマツの針葉を採取し、彼らが報告した同一領域を検証

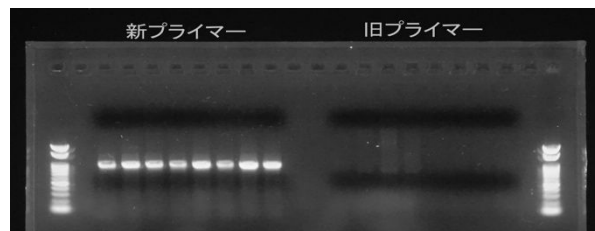


図1. 新旧プライマーによる増幅確認

した。その結果、Chiangら（2006）が報告した *atpB-rbcL* 遺伝子間スペーサー領域を対象に新旧プライマーを利用してPCR増幅した結果、新プライマーを用いたサンプルは増幅が確認できた一方、旧プライマーを用いたサンプルでは増幅が認められなかった（図1）。さらに、新プライマーを利用して、西表島から奄美大島までの各島嶼で得られたサンプルの塩基配列を決定した結果、全てが同一の塩基配列となった。そこで、Chiangら（2006）が報告した塩基配列をデータベースから検索し、その配列を調べた結果、マツ属とは全く異なる塩基配列であった。この結果は、Chiangら（2006）

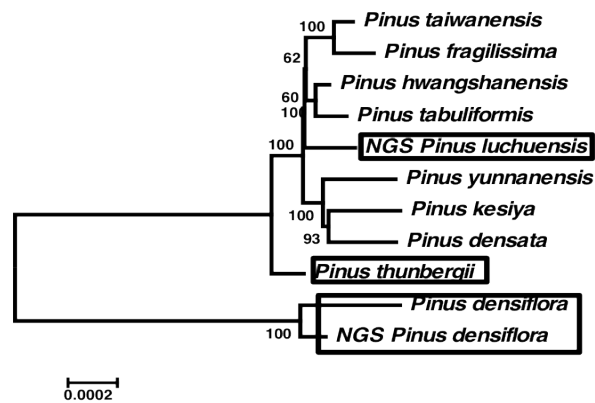


図2. 東アジアに分布する主要なマツ類

の結果には問題があることを示しており、リュウキュウマツを中心とした台湾・中国本土に分布する種間との関係性は依然不明であり、リュウキュウマツの進化的位置や島嶼間の特異性を考察するための信頼性の高いゲノム情報は皆無となった。

クロマツとアカマツについては葉緑体ゲノム全塩基配列の決定が行われており、近縁とされる *P. taiwanensis* についても最近葉緑体全ゲノム情報が報告された。そこで、リュウキュウマツの葉緑体ゲノム情報を収集し、これら情報を利用してリュウキュウマツを中心とした東アジアに分布するそれぞれのマツ（図2）との進化的関係性を検討した。クロマツの葉緑体ゲノム情報を基に、リュウキュウマツの葉緑体ゲノムについて構築を行った。本研究では葉緑体ゲノム完全長が決定されている他のマツ

属から推定されるおよそ99%の情報に相当する葉緑体ゲノム情報を取得した。本研究によって得られた葉緑体ゲノム情報はリュウキュウマツから得られた情報としては初めてのものであることから、東アジアに分布し、葉緑体ゲノム完全配列が決定されている種を中心として系統樹を作成した



（図3）。その結果、日本に分布する二葉マツ類三種のうち、アカマツは比較的

図3. 東アジアに分布するマツ属植物の系統関係

遠縁な種であり、クロマツは、雲南地方・フィリピン・中国東北部・南西諸島に広がるマツ属植物の中では最も早い時期に分岐していた。リュウキュウマツは予想されるように、*P. taiwanensis* や *P. hwangshanensis* と近年な関係にあるものの、少なくとも葉緑体ゲノム情報からは独自の系統を示す種であることが明らかとなった。しかし、本研究で葉緑体ゲノムに供試したサンプルは沖縄本島で採取しており、依然として他島嶼群との関係性は明らかではない。特に、台湾と西表・石垣島は、沖縄本島とはケラマギャップで少なくとも150万年前から分断されていることが明らかとなっており、真のリュウキュウマツとは沖縄本島から奄美諸島までに分布するマツを指す可能性もある。

そこで、集団間の遺伝構造を解明するために利用されるSSRマーカーによる遺伝構造解明に着手した。近縁種であるクロマツのSSRマーカーは既に開発・報告されていたことから、これらSSRマーカーを利用して予備的に試験を行った結果、良好な増幅が認められた。そこで、本課題で沖縄県森林資源研究センターと共同で奄美本島・沖縄本島・宮古島・石垣島・西表島から収集した約400サンプルについてクロマツSSRマーカーを適用した。しかし、多くの個体でnull alleleと考えられる結果が得られた。SSRマーカーはゲノム由来であり、近縁種といえども良好な結果が得られない可能性があることは他報告から指摘されていた。進化的位置が明らかとなったリュウキュウマツはクロマツとはやや異なる系統に属しており、クロマツSSRマーカーはリュウキュウマツの集団構造や遺伝的多様性を正しく評価できない可能性が高い事が明らかとなった。そこで、新たにリュウキュウマツ特異的なSSRマーカー開発に取り組んだ。既に、SSR領域を含むライブラリーについては開発できたものの、研究期間内に良好なマーカーの開発までには至らなかった。現在も継続して良好なマーカーのスクリーニングおよび最近集団構造の解明等に次世代シーケンサーを活用した新たな手法が提示されており、これら手法を

利用して今後も当初の目的であるリュウキュウマツの遺伝的多様性と集団構造解明については継続する予定である。

最終目標であるリュウキュウマツの遺伝資源量の確保または遺伝的攪乱を避けるための戦略については、沖縄県森林資源研究センターと協力して、各島嶼におけるリュウキュウマツ遺伝資源量の把握、種子の採取と保存等当初予定通りに進めてきた。現在、沖縄県では、マツノザイセンチュウ被害にさらされるリュウキュウマツの抵抗性品種開発を進めており、これについても共同して取り組んでいる。島嶼群で構成される沖縄県では安易な種苗の流通が固有の生物相を破壊する要因となる可能性があることについては、沖縄県森林資源研究センターでも十分理解が進んでいる。

マツ属植物は、針葉樹類では最も繁栄した種群であり、中でもリュウキュウマツは、琉球弧といった島嶼群に点在するマツ属植物の中でも特異的な分布をする樹種である。本課題から、リュウキュウマツの固有性については明らかとなり、遺伝資源保全戦略や遺伝的多様性の維持を含めたマツノザイセンチュウ抵抗性品種戦略の骨格は出来上がりつつある。今後明らかとなる遺伝的多様性研究も加味出来れば、より明確な保全戦略を構築できると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計2件）

1. 田村美帆（九州大学大学院）・玉城雅範（沖縄県森林資源研究センター）・渡辺敦史（九州大学大学院）、葉緑体ゲノムによるリュウキュウマツの進化的位置、第128回日本森林学会大会、2017
2. 渡辺敦史（九州大学大学院）・田村美帆（九州大学大学院）・玉城雅範（沖縄県森林資源研究センター）、リュウキュウマツ保全に向けた遺伝構造の解明、亜熱帯研究会、2017

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：玉城 雅範

ローマ字氏名：Masanori Tamashiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。