

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20248017

研究課題名（和文） 森林資源保全のための樹木遺伝子バーコードの基盤構築と有効性に関する研究

研究課題名（英文） Study on basic construction of tree DNA barcoding for forest resource conservation and its effectiveness

研究代表者

吉丸 博志 (YOSHIMARU HIROSHI)

独立行政法人森林総合研究所・多摩森林科学園・園長

研究者番号：20353914

研究成果の概要（和文）：日本産樹木は1,100種以上あるが、このうち約1,000種、約7,000個体の標本を収集した。これらの標本について葉緑体DNA上の3領域の塩基配列情報を解析し、それらを用いるDNAバーコーディングにより約75%の樹種の同定が可能となった。樹木の個体のどの組織も同じDNAを持っているので、根、材、種子や葉の断片など、形態だけでは識別しにくい材料の同定など幅広い応用が考えられる。

研究成果の概要（英文）：There are more than 1,100 woody plant species in Japan. The specimen of about 7,000 individuals including about 1,000 species were collected and their DNA sequences of three regions on chloroplast DNA were analyzed. It is clarified that 75% of all species can be identified by DNA barcoding with these sequences. Since all tissues of plant body hold the same DNA, DNA barcoding can be applied to identify species name using samples of root, timber, and pieces of seed and/or leaf which are difficult to identify by observation of outer shape.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2009年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2010年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2011年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
年度			
総計	36,000,000	10,800,000	46,800,000

研究分野：森林集団遺伝学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：DNAバーコード、日本産樹木、種識別、葉緑体DNA、塩基配列情報

1. 研究開始当初の背景

なるべく短いDNA断片の塩基配列情報によって生物の種を識別しようとするDNAバーコーディングの手法は、Hebert et al (2003)によって提唱され、これを推進する国際的連携をはかるため2005年に最初のInternational Barcode of Life (BOL) Conferenceが開催された。動物に関しては、

ミトコンドリアDNAのCOI (Cytochrome Oxidase subunit I)領域の約650個の塩基配列の多型性が非常に高く、種の識別に有効であることから、この領域を対象としてバーコードとなるDNA塩基配列情報の蓄積が、各国の魚類、鳥類、鱗翅類などで先行して進められた。いっぽう、植物においては、動物のCOIのような識別効率の高いDNA領域がな

く、どの領域をバーコードとして用いるかの議論が長く続けられ、2007年10月の第2回 International Barcode of Life Conference において、葉緑体 DNA の rbcL と trnH-psbA の2つの領域を対象とすることが了解された。DNA バーコーディングは国際協調を基本として、DNA 上の同じ領域の塩基配列を各国の研究者が解析することにより、国の違いを超えて世界中の樹種の種識別情報が完成することが重要である。

2007年には、DNA バーコーディングに関して日本国内でそれを啓蒙、推進するために、「日本バーコードオブライフイニシアティブ (Japanese Barcode of Life Initiative; JBOLI) が、ホームページを立ち上げて本格的な活動を開始した。このような背景の中で、本研究課題は2008年4月から4年計画で開始された。

2. 研究の目的

樹木のいかなる部位からでも樹種の特長ができるような DNA バーコード情報の構築を目指して、本研究課題では、日本産樹木種を対象とする証拠標本・DNA 試料の収集完備と樹種識別に必要な DNA 塩基配列情報の基盤構築を進め、国際協力の下に情報の統合化・実用化を推進することを目的とする。

そのために、(1)日本産樹種の試料(さく葉、木材標本、DNA 試料)の収集の推進(但し木材標本については可能な樹種のみ)、(2)DNA バーコード領域の塩基配列の解析、(3)JBOLI や CBOL (Consortium for the Barcode of Life、国際的な連携を図るためのコンソーシアム)と連携して、「証拠標本」「DNA バーコード」のデータベースと同定支援システムの構築、(4)種識別の有効性の評価、などを行う。

3. 研究の方法

(1) 試料収集

国内の広い範囲から自生個体の試料を収集する。それぞれの種について、複数個体、複数地域の試料収集を目指す。収集作業の目安として、国内を11のブロックに分けて考え、各ブロックから2個体以上の収集を目指す。これにより、分布範囲の狭い種は2個体程度となるが、分布範囲が全国に広がる種では22個体以上が目標となる。複数個体は実験ミスのチェック、複数地域は地域変異のチェックを行うための、最低限の個体数である。

(2) 塩基配列解析

収集した全ての個体試料から DNA 抽出を行い、第2回国際 BOLD 会議の申し合わせに従い、rbcL 領域と trnH-psbA 領域の塩基配列情報を解析する。

(3) データベースの構築

CBOL の運営する BOLD SYSTEM (Barcode of

Life Data System) に塩基配列情報を入力する。これにより将来的に、国際的なデータと同じシステムの中で相互比較でき、種同定できるようなることを目指す。

(4) 種識別の有効性

DNA 塩基配列のアラインメントなどを行った後に、種間の塩基配列の比較を行い、DNA バーコーディングによる種識別の効率を評価する。

4. 研究成果

(1) 樹木種の試料収集については、研究開始前の約10年間に森林総合研究所と東北大学が共同で行ってきた木材採集会により、木材標本、さく葉標本、乾燥葉試料が約3,000個体分収集されており、これらの利用が期待されたが、乾燥葉試料が常温保存であり、良好な DNA 試料を得るための材料としては不十分ではなかった。このため、使用不能な試料は除外して、新たな試料の収集を年々進めた。

木材採集会の収集として、2008年度は佐賀県、長野県木曾郡、滋賀県から550個体の収集、2009年度は茨城県北部、岩手県南部、北海道南部から470個体、2010年度は宮崎県、和歌山県南部から380個体、2011年度は熊本県、東京都から310個体の収集を行った。また、2009年度からは木材採集会以外による収集も進め、2010年度からは各地の大学演習林などにも協力をお願いして、収集を強力に進めた。

その結果、現在までに6,997個体、1,037種(変種も数える)、419属、143科を収集した。主な収集地域は、図に示すとおり、広く全国にわたっている。



(2) DNA バーコード領域の塩基配列情報として、2008年当初は葉緑体 DNA の rbcL (約600塩基) と trnH-psbA 領域(約152ないし983塩基)が、有力なバーコードのターゲットと考えられていた。本研究では、これらの領域を増幅するプライマーの合性を行い、両領域の塩基配列情報の解析を進めた。

これに対して、trnH-psbA 領域が存在しない植物分類群があることもひとつの理由として、バーコード領域の再検討が行われ、2009年11月の第3回 International Barcode of Life Conference において、rbcL と matK (約840塩基) を主要なバーコード領域とし

て、trnH-psbAなどは予備的なバーコード領域とすることが最終結論となった。本研究でも matK にターゲットを切り替えて対応を進めた。

塩基配列の解析には、ユニバーサルなプライマーDNAを用いて、DNAバーコード領域をPCR増幅することが必要であるが、非常に広い範囲の分類群を対象とするため、ユニバーサルと言われるプライマーでも増幅効率が低い場合も多く、増幅効率は rbcL で 92.4%、matK で 66.5%、trnH-psbA で 87.5%であった。

現在までに、rbcLについて6,001個体、matKについて2,454個体、trnH-psbAについて5,104個体の塩基配列情報の解析を終えた。

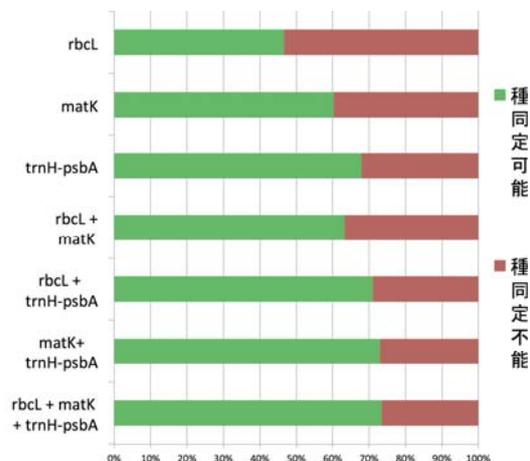
(3)これらの、標本情報、DNA塩基配列情報は、データベースに集約して、将来的に公開することを目指している。

木材標本がある試料については、木材標本とそのさく葉標本について、森林総合研究所のホームページ上の「木材データベース」

(<http://f030091.ffpri.affrc.go.jp/index.html>)に入力した。また、得られたすべての試料の証拠標本情報、DNA塩基配列情報は、BOLD SYSTEMS (Barcode of Life Data System)

(<http://www.boldsystems.org/index.php/Login/page>)の中に、JWP (Japanese Woody Plants、日本産樹木)プロジェクトのページを立ち上げ、収録している。現在は未公開であるが、約2年後に公開を予定している。

(4)種識別の有効性については、図に示すとおり、rbcLのみでは47%、matKのみでは60%、rbcLとmatKを合わせて用いると63%、さらにtrnH-psbAを加えると74%の種が、DNAバーコーディングにより他の種から明確に区別することができた。残りの26%の種は、少なくとも1つの別の種と同じ塩基配列を持ち、区別できないというものである。DNAによる識別は、根、材、種子や葉の断片など、形態だけでは識別しにくい材料の同定などに、今後幅広い応用が考えられる。



(5)その他に、DNAバーコーディングで得られた試料や塩基配列情報を用いて、以下の発展研究が行われている。「木材の樹種識別へのDNA分析の応用(安部、能城、藤井、鈴木)」「ジンチョウゲ属の種分類および産地識別におけるバーコード情報の可能性(河原)」「DNAバーコーディングを用いた食植動物の食性解析の試み(鈴木、吉村)」「系統関係を考慮した森林の生物多様性評価の試み(大谷、吉丸)」「ミカン科樹種における分子進化的研究(館田)」(森林学会シンポジウムなどの発表から)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

(1) 吉村研介・鈴木節子・田中孝尚・鈴木三男・神保宇嗣・伊藤元己・館田英典・大谷雅人・勝木俊雄・津村義彦・藤井智之・能城修二・河原孝行・吉丸博志、日本産樹木DNAバーコーディングの現状 2010、関東森林研究、査読有、63、2012、印刷中(掲載確定)

(2) 吉村研介・鈴木節子・田中孝尚・鈴木三男・神保宇嗣・伊藤元己・館田英典・大谷雅人・勝木俊雄・津村義彦・藤井智之・能城修二・河原孝行・吉丸博志、日本産樹木DNAバーコーディングの現状 2009、関東森林研究、査読有、62、2011、79-82

(3) Yoshida T, Nagai H, Yahara T, Tachida H、Genetic structure and putative selective sweep in pioneer tree, *Zanthoxylum ailanthoides*. *Journal of Plant Research*, 査読有、123、2010、607-616

(4) 神保宇嗣・吉武啓・伊藤元己、DNAバーコーディングによる同定支援システムとJBOLI構想、*日本生態学会誌*、査読有、58、2008、123-130

[学会発表] (計18件)

(1) Settsuko S, Yoshimura K, Katsuki T, Ohtani M, Noshiro S, Fujii T, Suzuki M, Tanaka T, Tachida H, Ito M, Jinbo U, Kawahara T, Tsumura Y, Yoshimaru H、DNA barcoding of woody plants in Japan - Focus on some taxonomic groups、Fourth International Barcode of Life Conference、2011.12.01、University of Adelaide (Adelaide, Australia)

(2) Kawahara T, Yoshimura K, Yamashita N, Miyaura T, Lei T, Yoshimaru H、Possibility of identification at species and population levels for the genus *Daphne* (Thymelaeaceae) by DNA barcoding、Fourth International Barcode of Life Conference、2011.12.01、University of Adelaide (Adelaide, Australia)

(3) Jinbo U, Ito M、Current status of the

Japanese Barcode of Life Initiative (JBOLI)、Fourth International Barcode of Life Conference、2011. 12. 01、University of Adelaide (Adelaide, Australia)

(4) Kawahara T, Yamashita N, Lei T, Miyaura T, Ohi-Toma T, Murata J、Molecular phylogeny and ecological evolution on *Daphne* (Thymelaeaceae)、XVIII International Botanical Congress、2011.07.24、University of Melbourne (Melbourne, Australia)

(5) Yoshimura K, Ohtani M, Suzuki S, Katsuki T, Suzuki M, Tanaka T, Noshiro S, Fujii T, Tachida H, Ito M, Jinbo U, Tsumura Y, Kawahara T, Yoshimaru H、DNA barcoding of Japanese woody plants、ISBDS2010 International Symposium on Biodiversity "Genome, Evolution and Environment"、2010.08.01、Nagoya Municipal University (Nagoya, JAPAN)

(6) Yoshimaru H, Ohtani M, Yoshimura K, Noshiro S, Fujii T, Katsuki T, Setsuko S, Tsumura Y, Kawahara T, Suzuki M, Tanaka T, Tachida H, Ito M, Jinbo U、Progress of DNA barcoding on woody plants in Japan、The tree Barcode of Life and Cullman Symposia、2010.04.16、The New York Botanical Garden (New York, USA)

(7) Yoshimaru H, Ohtani M, Yoshimura K, Suzuki M, Tanaka T, Noshiro S, Fujii T, Tachida H, Nagai H, Ito M, Jinbo U, Tsumura Y, Kawahara T、DNA barcoding on woody plants in Japan、Third International Barcode of Life Congress、2009.11.10、Mexican Academy of Science (Mexico City, Mexico)

[その他]

(1) データベース

BOLD SYSTEMS (Barcode of Life Data System) (<http://www.boldsystems.org/index.php/Login/page>) の中に、JWP (Japanese Woody Plants、日本産樹木) プロジェクトのページを立ち上げ、収集した日本産樹種の個体別の標本情報、DNA塩基配列情報を収録している。現在は未公開であるが、約2年後に公開を予定している。

(2) シンポジウム

「樹木のDNAバーコーディングの進捗と今後の展開に向けて」コーディネータ：吉丸博志、第121回日本森林学会大会テーマ別シンポジウム、2010.04.04

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉丸 博志 (YOSHIMARU HIROSHI)

独立行政法人森林総合研究所・多摩森林科

学園・園長

研究者番号：20353914

(2) 研究分担者

鈴木 三男 (SUZUKI MITSUO)

東北大学・植物園・教授

研究者番号：80111483

伊藤 元己 (ITO MOTOMI)

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：00193524

舘田 英典 (TACHIDA HIDENORI)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：70216985

津村 義彦 (TSUMURA YOSHIHIKO)

独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・領域長

研究者番号：20353774

藤井 智之 (FUJII TOMOYUKI)

独立行政法人森林総合研究所・関西支所・支所長

研究者番号：60353835

能城 修一 (NOSHIRO SHUICHI)

独立行政法人森林総合研究所・木材特性研究領域・チーム長

研究者番号：30343792

河原 孝行 (KAWAHARA TAKAYUKI)

独立行政法人森林総合研究所・北海道支所・グループ長

研究者番号：70353654

吉村 研介 (YOSHIMURA KENSUKE)

独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・チーム長

研究者番号：30353915

(3) 連携研究者

神保 宇嗣 (JINBO UTSUGI)

東京大学・総合文化研究科・特任研究員

研究者番号：10568281

鈴木 節子 (SUZUKI SETSUKO)

独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・研究員

研究者番号：70456622

勝木 俊雄 (KATSUKI TOSHIO)

独立行政法人森林総合研究所・多摩森林科学園・主任研究員

研究者番号：10353640

大谷 雅人 (OHTANI MASATO)

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・研究員

研究者番号：50582756

田中 孝尚 (TANAKA TAKAHISA)

東北大学・植物園

研究者番号：40463773