

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06122

研究課題名（和文）樹木少数集団の探索手法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for the finding of small populations of trees

研究代表者

齊藤 陽子（Saito, Yoko）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：00302597

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は樹木種の少数個体を森林内で発見する効率的な手法を開発することを目的とした。千葉県におけるアサダを例に、GIS解析と生態ニッチモデリングおよび衛星データを組み合わせて用い、12地域の潜在的な生育地を推定した。この中には実際の生育地として参照した2地域以外に、過去にアサダの生育が記録されている2地域が含まれていた。また、河川水を念頭にアサダの検出に水中の環境DNAを用いる方法も検討した。アサダが近傍に生育する池の水から葉緑体DNAのtrnLP6loop領域を用いてアンプリコン解析を行い、アサダを含む推定7樹種を確認した。さらに、デジタルPCRで利用可能なアサダ特異的なプローブを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹木種の保全を考えるうえで、対象種の個体の位置を確認することは不可欠であるが多大な労力を必要とする。本研究で推定したアサダの生育地域は、過去に記録のある2か所を含んでいた。このことは、本手法が生育地の絞り込みに有効であり、探索の労力の軽減に寄与するものであることを示す。また、アンプリコン解析で水中の環境DNAから樹木種を検出することができた。これは環境DNA分析に陸上樹木の探索への利用という新しい可能性を示したと言える。さらに、対象種のアサダについて種特異的プローブを開発したことにより、デジタルPCRを用いた環境DNAからのアサダの検出手法の開発に端緒をつけることができた。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to develop an efficient method for detecting small numbers of individuals based on GIS analysis and environmental DNA analysis. Using *Ostrya japonica* in Chiba Prefecture as an example, GIS analysis, ecological niche modeling, and satellite data were used to estimate potential growing areas in 12 regions. These included two areas where *Ostrya japonica* growth had been recorded in the past, in addition to the two referenced areas. For environmental DNA analysis, we succeeded in developing a probe specific to *Ostrya japonica*. Furthermore, amplicon analysis was performed using the trnLP6loop region of chloroplast DNA from pond water near where *Ostrya japonica* grows, and we were able to detect 7 genera of tree species, and also confirmed a tree species presumed to be *Ostrya japonica*.

研究分野：森林分子生態学

キーワード：立地環境 環境DNA GIS デジタルPCR アンプリコンシーケンス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

個体数の少なくなった地域での個体の保全を考える場合、現存する個体の位置を確認する必要がある。しかし、広大な森林の中で踏査と目視のみで対象とする樹種の少数個体を見つけることは、非常に困難である。本研究は、地理情報システム(GIS)と環境 DNA 分析の二つの手法を組み合わせて、樹木個体の生育場所を特定できるか、試みるものである。

森林内では、樹木の生育適地には地形的な要因が大きくかかわっているため、GIS を用いて生育地の標高や傾斜、斜面方位などを解析しその立地条件を明らかにし、さらにその条件に当てはまる場所は潜在的生育地として推定される。この潜在的生育地を推定する手法は、対象種の個体を探索するのに応用できる可能性がある。このような技術は、人的パワーが減少すると考えられる今後に向けて効率的な保全対象集団の発見に有用であると考えられる。

他方、環境 DNA 分析は、近年急速に発展してきた水や土壌などの中に存在する DNA の中からどのような生物種が生息しているか、あるいは目的とする生物種が生息しているか、を検出する技術である。溪畔林の構成樹種など、河川近くに生育する樹種は、多くの落葉落枝が河川に流れ、沈殿物あるいは水中の浮遊物になっていると考えられる。そこで、この河川中の沈殿物や水を解析することにより、特定の樹木種の生育の有無が確認できるか、を明らかにすることは、環境 DNA 分析に新しい可能性を開くと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、樹木の少数個体を森林内で非常に現実的な必要性を満たすための手法を開発するものである。解析対象とするアサダ(*Ostrya japonica*)は北海道から九州まで分布する冷温帯性の落葉広葉樹である。暖温帯に位置する千葉県房総半島においては、生育本数が減少し、希少種となっている。そのため、植物誌などに過去の分布情報がある場所でも生育個体が著しく少なくなっているか、消失していると考えられる。温暖化が進んでいく中で、このような冷温帯性の樹種はさらに増えていくと予想される。樹木の保全には現状把握が欠かせないが、このように過去の生育記録があっても、現在実際に生育しているかは、現地踏査による確認しかない。しかし、過去の記録にある地名は範囲が広く具体的地点の特定が困難であるため、現地踏査は不確実性が高く労力も大きいため、本研究では房総半島におけるアサダを例に、既知の個体の位置情報および溪流の環境 DNA 分析から少数個体を発見する効率的な手法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) GIS 解析

国土地理院から提供されている 10mメッシュ DEM データを用いて GIS 上で千葉県中南部の標高、斜度、曲率、方位を求め、生態ニッチモデリングを用いてアサダ個体の生育可能地点を推定した。GIS は ArcGIS Desktop 10.8 を用いた。アサダ生育地位置データは、東京大学千葉演習林内の生育地 4 地点および元清澄山頂付近の計 5 地点を用いた。生態ニッチモデリングには MaxEnt(ver.3.4.0)を用い、標高と方位は個別に、傾斜と曲率については組み合わせて推定を行った。3 つの確率の合計が 2.5/3 以上の地点を生育適地とした。さらに衛星画像 Sentinel2 の 2023 年 3 月 8 日のデータから NDVI を算出した。アサダは落葉樹であるため植被が少ないと判定される NDVI が 0.25 以下の場所を抽出した。MaxEnt と NDVI の地図を重ね合わせ、両方の条件を満たす生育確率が高く落葉樹林と推定される場所を抽出し、抽出地点がまとまって現れる地域を生育可能地域とした。

#### (2)環境 DNA 分析

環境水からアサダ DNA を検出する手法を検証する。核マイクロサテライトマーカ、葉緑体 DNA のプローブ法および葉緑体のアンプリコン解析の 3 つの手法を検討した。

##### 核マイクロサテライトマーカによる検出

アサダの核マイクロサテライトマーカ 2 座(安藤ら、未発表)を用いて、水中のアサダ DNA が増幅されるか否かの検証を行った。アサダの生葉を東京大学理学部附属植物園の池の水を入れたビーカーに投入し、25 度暗黒条件下で 3 週間攪拌し続けたのち、水および濾過残渣からエタノール沈殿法で DNA を抽出した。これらについて 2 つのマーカが増幅するか確認を行った。

##### 葉緑体プローブの開発と適用

###### a. 開発

東京大学理学部附属植物園に生育するアサダ、イロハモミジ、イチイガシの生葉より DNA を抽出し、葉緑体 DNA の trnL-P6loop 領域(Taberlet et al. 2007, Ando et al 2016)の塩基配列を決定した。これらの塩基配列を比較し、アサダ特異的と考えられるプライマーセットとプローブを作成した。

## b. 種特性の確認

開発したアサダの種特異的プローブの種内の汎用性と種特異性を確認するための実験を行った。全国 8 都道府県(北海道・千葉県・東京都・京都府・鳥取県・岡山県・宮崎県)に生育するアサダの葉から抽出した DNA に対して、デジタル PCR(Qiagen)を用いてアサダの DNA が検出できるか確認した。また、秩父演習林苗畑に植栽されているアサダの近縁種のカバノキ属シラカンバ・ウダイカンバ・オノオレカンバ・ミズメ・ヤエガワカンバの 5 種の冬芽から抽出した DNA についてアサダのプローブが反応するか否かを確認した。

## c. プローブの環境 DNA への適用

開発したアサダの葉緑体プローブが実際に水中のアサダ DNA の検出に適用が可能であるかを検証した。アサダが汀に生育する東京大学理学部附属植物園内の池の水を 2024 年 11 月に 500ml 採取し、ステリベクスフィルターで吸引ろ過した。このステリベクスフィルターから DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)を用いて DNA を抽出した。デジタル PCR を用いて抽出した DNA からアサダの DNA が検出できるかを検証した。

### アンプリコン解析

上記 b で用いた池の水から抽出した DNA を用いて、葉緑体 DNA のバーコーディングに用いられる trnH-psbA 領域(Ando et al 2016)と trnL-P6loop 領域(Taberlet et al. 2007, Ando et al 2016)について、次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスを行い、アサダの DNA が検出されるか検証した。得られたシーケンスデータは NCBI データベースで BLAST 検索を行い、検出された DNA の植物種の属を推定した。さらに、サンプル地点周辺の植物相から検出された DNA の樹木種を推定した。

## (3)現地踏査

(1)の GIS 解析において生育可能地域とされた場所のうち、アプローチが可能な高宕山・鋸山・富山・白石峠で現地踏査を行い、実際にアサダ個体が生育しているかを確認した。

## 4. 研究成果

### (1)GIS 解析

千葉県内南部の山地に 12 地域が抽出された(下図)。この中には、モデリングの際に生育地データを利用している千葉演習林および元清澄山だけでなく、生育地データを利用していないが過去に生育が確認されている高宕山および富山が含まれていた。このことから、本手法によりアサダの生育地を一定程度適切に推定することができたと判断できる。



左図：千葉県南部の推定されたアサダ生育可能地域  
黒色は生育確率が 2.5/3 未満。赤色は NDVI が 0.25 以下、黄緑色は NDVI が 0.25 より大きい。  
上図：鋸山地域の拡大図

### (2)環境 DNA 分析

#### 核マイクロサテライトマーカーによる検出

水から抽出した DNA はアサダプライマーで増幅しなかった。一方、残渣から抽出した DNA は期待される断片長に増幅する場合としない場合とがあり、再現性に乏しかった。また、用いたマイクロサテライトマーカーは、他種の DNA に対しても不明瞭ではあるが増幅を示すことが分かった。この結果から、核マイクロサテライトマーカーを水中のアサダ DNA 検出に用いることは不適當であると判断した。

### 葉緑体プローブの開発と適用

#### a. 開発

葉緑体 DNA の trnL-P6Loop 領域にアサダの種特異的なプライマーセットとプローブを作成で

きた(配列未発表)。

#### b. 種特性の確認

全国8地域のアサダから抽出したDNAを用いたところ、デジタルPCRで検出できた(下図左)。このことはプライマーを設計した領域には地域変異がなく、開発したプローブの利用が全国で可能であることを示す。一方、シラカンバ・ウダイカンバ・オノオレカンバ(下図中央)・ミズメ・ヤエガワカンバはデジタルPCRでは検出できず、プローブが種特異的であることが確認できた。このことは、近縁種のカバノキ属を誤って検出することはないことを示す。

#### c. プローブの環境DNAへの適用

池の水から抽出したDNAからはデジタルPCRでアサダのDNAが検出されなかった(下図右)。

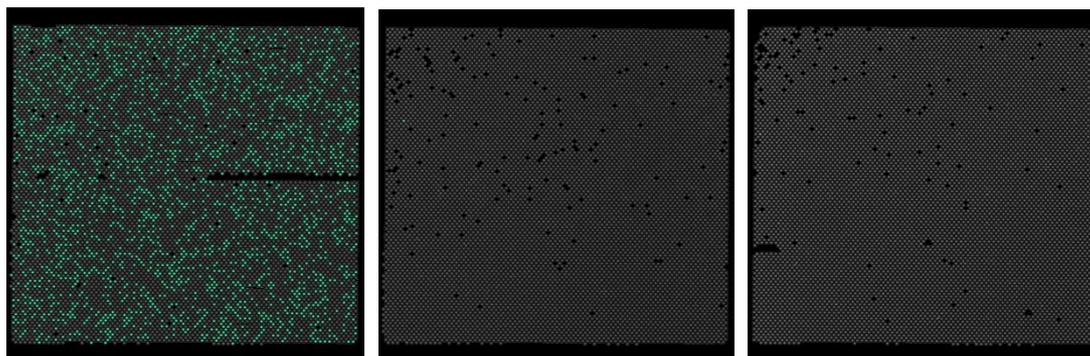


図 アサダの種特異的プローブを用いたアサダ DNA のデジタル PCR での検出。緑色に光るドットがアサダ DNA が検出されたナノプレート 左：北海道のアサダ個体 中央：オノオレカンバ 右：池の水

#### アンプリコン解析

2 領域のうち trnH-psbA 領域で表の通り 9 属の植物種が検出され、池の近傍に生育する樹木種と照らし合わせるにより推定された樹種は 7 樹種となった。その中にアサダの属するアサダ属の DNA も含まれた。このことから、池の水にアサダ DNA が含まれており、検出が可能であることが分かった。一方、他の樹木種と比較して、得られたシーケンス数はアサダが最も少なかった。このことは、落葉時期や落葉の分解されやすさなどの種特性が影響すると考えられる。今後はこの点も考慮し、サンプリング時期などを検討する必要がある。

表 アンプリコン解析で検出されたシーケンス数、属、推定された樹木種

シーケンス数	属名	推定された樹木種
629	ナス科ナス属	-
10617	エノキ属	エノキ
411	エノキ属	エノキ
434	アサ科セイタン属	セイタン
642	マメ科エンジュ属	エンジュ
1355	カバノキ科カバノキ属	ウダイカンバ
2413	カバノキ科カバノキ属	ウダイカンバ
105	カバノキ科アサダ属	アサダ
2122	カツラ科カツラ属	カツラ
136	カツラ科カツラ属	カツラ
112	マメ科クス属	-
79	マツ科ヒマラヤスギ属	ヒマラヤスギ
577	マツ科ヒマラヤスギ属	ヒマラヤスギ
合計	19632	

アンプリコン解析の結果から池の水に検出可能なアサダ DNA が含まれていることが示されたにもかかわらず、開発したアサダのプロープで検出することができなかった。現時点では、デジタルPCRを用いたプロープ法よりも次世代シーケンサーを用いたアンプリコン解析の方が水中の少量のDNAの検出に有用であった。しかし、デジタルPCRを用いた検出は短時間に結果が得られることから、さらなる検討をする価値がある。また、アサダ属は国内で1属1種のみであり、葉緑体DNAを用いる方法が可能である。しかし、近縁種間で葉緑体DNAを共有し種特異的なマーカーの開発が困難な例が多く、今後他種にも応用する際には、核DNAを用いた手法を開発する必要がある。なお本研究では核マイクロサテライトマーカーも検討したが、安定した結果が得られず、除外すべきであると考えられる。

### (3)現地踏査

踏査した4地域でアサダ個体は発見できなかった。鋸山では、アサダの生育地近くで見られることの多いカゴノキの生育1個体は確認できた。また、高宕山は過去に生育が確認されている地点付近を踏査しているにもかかわらず見つけることができなかった。このことにより狭い範囲に候補地が絞られていても現地踏査での目視のみによる発見のむずかしさを再確認した。

以上、本研究はGIS解析と生態ニッチモデリングおよび衛星データを用いることにより、一定程度の信頼性があると考えられるアサダの生育地域推定を行うことができた。しかし、推定された生育地域の現地踏査では個体を発見するには至らず、アサダ個体を発見するという最終的な目標は達成することはできなかった。一方、環境DNAのアンプリコン解析により、水中からアサダのDNAを検出することができ、水中にアサダのDNAが存在することを示した。しかし、実際に生育が推定された地域での河川中の環境DNA分析には至っていない。河川中のDNA量は池のDNA量よりも少ないことが予想される。今後は河川水からの低濃度の環境DNA分析手法を開発し、実際の推定生育地に適用することが必要である。

### <引用文献>

Ando H, Setsuko S, Horikoshi K, Suzuki H, Umehara S, Yamasaki M, Hanya G, Inoue-Murayama M, Isagi Y (2016) Seasonal and inter-island variation in the foraging strategy of the critically endangered Red-headed Wood Pigeon *Columba janthina nitens* in disturbed island habitats derived from high-throughput sequencing. *Ibis* 158: 291–304

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermet, T., Corthier, G., Brochmann, C. & Willerslev, E. 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res.* 35: e14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒河内寛之・萬代哲也・齊藤陽子
2. 発表標題 水サンプルからの樹木DNAの検出ーイチイガシ、アサダ、イロハモミジー
3. 学会等名 第133回日本森林学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	黒河内 寛之 (Kurokochi Hiroyuki)  (00609000)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教   (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------