

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450206

研究課題名(和文)先史時代における有用樹種クヌギおよびイチガシの遺伝構造

研究課題名(英文) Genetic structures of *Quercus acutissima* and *Q. gilva*, useful tree species in prehistoric times

研究代表者

齊藤 陽子 (SAITO, Yoko)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：00302597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：先史時代の遺跡から堅果が発見される樹種のうち、クヌギおよびイチガシを対象として、現生と先史時代の遺伝構造を解明することを目的とした。葉緑体シーケンシングにより、イチガシの現生の遺伝構造はおおむね天然の分布変遷を反映していると考えられた。このことは遺伝構造が存在しないクヌギとは異なり、両種の分布変遷に人為がかかった程度に違いがあることが示唆された。さらに両種とも次世代シーケンサーを用いることによりさらに詳細な遺伝構造を検出できる可能性が示された。一方、先史時代のサンプルを入手しDNA抽出を行ったが、葉緑体シーケンシングおよび次世代シーケンサーでは解析ができず、今後の課題として残った。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study are to clarify the genetic structure in the present age and prehistory in *Quercus acutissima* and *Q. gilva*, useful tree species excavated from remains. *Q. gilva* have clear genetic structure revealed by chloroplast sequencing, which might be reflected natural distribution changings. On the other hand, in prior research, *Quercus acutissima* has no genetic structure. The difference of genetic structure of two species may suggest the difference of human impact on distribution change. Furthermore, next generation sequencer detected difference among the same haplotype defined by chloroplast SSR markers or sequencing. The analysis of plant residue by next generation sequencer was failed.

研究分野：森林分子生態学

キーワード：核SSR 葉緑体DNA 次世代シーケンサー 人為影響

1. 研究開始当初の背景

樹木は進化や種分化、分布変遷などの影響を受け、種内に地理的な遺伝構造を持つことがほとんどである。さらに、交配様式や種子散布様式などがこの遺伝構造に影響を与えることが分かっている。一方で、人為的な活動、例えば種苗流通や栽培化などによっても遺伝構造は影響を受ける。日本列島においては、ブナ科樹木のクヌギやイチイガシは縄文時代や弥生時代といった先史時代からドングリを食用として、材を道具として利用してきた(島地と伊東 1998; 鈴木 2002)。クヌギには系統地理学的構造がなく、日本全国が同じ一つのハプロタイプに固定されていることがこれまでの研究で明らかになっている。このことからクヌギの現在の分布は自然のものではなく、過去に人為により急激に分布を拡大したと考えられている。一方、イチイガシについては、現在個体数が非常に少なくなっており、主に九州を中心として分布するが、関西地方以東にはまとまった林がなく、これら関西地方以東にある個体が自然分布によるものなのか否か、全く知見がない。

ところで、縄文時代や弥生時代の遺跡から、ドングリピットと呼ばれる堅果の貯蔵庫が西日本を中心に出土している(広川 1997)。研究代表者は、このドングリピットの堅果の DNA 分析により、先史時代における遺伝構造を明らかにすることができると考えた。さらにそれと現在の遺伝構造との比較により、対象樹種の遺伝構造に対する人為的影響が明らかになると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ドングリピットの中から堅果が発見される樹種のうち、自然の分布域が明確ではないクヌギおよびイチイガシの 2 種を対象として、現在の遺伝構造と先史時代の遺伝構造を解明する。それぞれの種について、その過去と現在の遺伝構造とを比較して、人為的影響の有無や、人為的影響が先史時代から及んでいたのか、それ以降の時期に及ぶようになったのか、さらに現在の林や個体の由来についても明らかにする。また、両種の比較により、樹種により人為の及び方の相違についても明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 現世の遺伝構造

イチイガシ

a) 日本国内の千葉県～鹿児島県までの森林および社寺林全 25 集団および中国 1 集団、台湾の森林 5 集団から全 265 個体の葉のサンプリングを行った。外群として千葉県清澄山のアカガシおよび都立林試の森公園のハナガシを設定し、イチイガシと同様の操作を行った。サンプルは抽出までシリカゲルの入ったチャック付きビニール袋に入れ、乾燥状態で保存した。

b) 葉緑体ハプロタイプ決定のため、改変 CTAB

法で DNA を抽出し、4 領域 psbA-trnH, trnF-3' trnL, 3' trnG-5' trnG2S, rpS4-trnT (Sang et al., 1997, Tate and Simpson, 2003, Taberlet et al.), 合計 1815bp について 182 個体のシーケンスを行った。

c) さらに次世代シーケンサーを用い、詳細な遺伝構造把握の試みを行った。上記のユニバーサルプライマーを用いた葉緑体ハプロタイプでは同一と認識されるため検出できない遺伝構造を検出するため、より解像度の高い次世代シーケンサーを使用してイチイガシの葉緑体 DNA の全塩基配列を解読した。次世代シーケンサー (Ion Proton) を用いて、異なる集団に由来する 17 サンプルを解析した。

クヌギ

クヌギは、葉緑体 SSR マーカーを用いた先行研究で、日本全国の多くの集団が 1 つのハプロタイプに固定されていることが明らかになっている。このことは、クヌギが急激に分布を拡大したことを示唆する。一方で、使用したマーカーの多型性が低く解像度が低すぎるため、実際の構造を検出できていないことも危惧される。そこで、次世代シーケンサー (Ion Proton) を用いて、優占しているハプロタイプのサンプル 10 個およびその他 10 サンプル、計 20 サンプルの葉緑体 DNA の塩基配列を決定した。

(2) 先史時代の遺伝構造

DNA の抽出

イチイガシについては大阪市立自然史博物館から 9 堅果サンプルと 1 葉サンプル、山口県埋蔵文化財センターより 31 堅果サンプルの貸与を受けた。サンプルは縄文～中世の遺跡から発掘され、水漬け、アルコール漬け、PEG 処理、自然乾燥および炭化のいずれかの状態で保存されていた。これらは、改変 CTAB 法により DNA の抽出を試みた。大阪市立自然史博物館からクヌギ 2 個体のサンプルも貸与されたが、保存状態から DNA の抽出が難しいと考えられた。

葉緑体 DNA のハプロタイプの決定

本研究でイチイガシで開発した 3 領域と既存の 8 領域 (Deguilloux et al. 2003) の計 11 領域の増幅を試みた。ポジティブコントロールとして現生 1 個体の DNA も実験に供試した。

次世代シーケンサーを用いた塩基配列の決定

次世代シーケンサーから得られた DNA 断片の塩基配列を *Quercus rubra* の葉緑体の環状 DNA にマッピングして、サンプルごとの全ての DNA 変異を検出した。

4. 研究成果

(1) 現世の遺伝構造

イチイガシ

葉緑体 DNA のシーケンシングの結果、8 つの塩基置換、2 つの欠失、1 つの逆位変異と 6 つのモノヌクレオチドリピートが検出された。これらの変異をもとに 10 ハプロタイプ (Hap1~10) が定義され、Hap4 と Hap9 は更に Hap4a、4b、9a、9b および 9c のサブタイプに分かれた。ハプロタイプの類縁関係は図 1 のネットワークのように推定された。また、外群として設定したアカガシサンプルの配列は Hap1 と一致し、ハナガシサンプルからは psbA-trnH 領域にイチイガシでは検出されなかった MNP が検出された。千葉県で検出された Hap1 が祖先的なハプロタイプである可能性が示唆される。

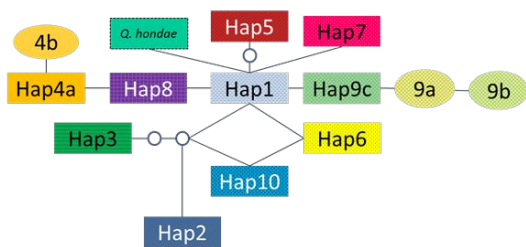


図 1 ハプロタイプネットワーク

ハプロタイプの地理的分布を図 2 に示す。Hap1 から 5 は日本に、Hap6 は大陸中国に、Hap7 から 10 は台湾島に分布し、地域間での共有は無かった。日本国内では、Hap1 と Hap2 が千葉県に、Hap3 は東京都および伊豆半島に分布した。Hap4 は埼玉県~鹿児島県までの 17 集団で観察され、最も高頻度で出現した。このうち宮崎県の集団には Hap5 の個体が生育していたが、そのほかの集団に属する個体はすべて Hap4 であった。和歌山県に生育する 1 個体からはモノヌクレオチドリピート部分の変異によって分類された Hap4b が検出された。Hap5 は宮崎県で検出された。

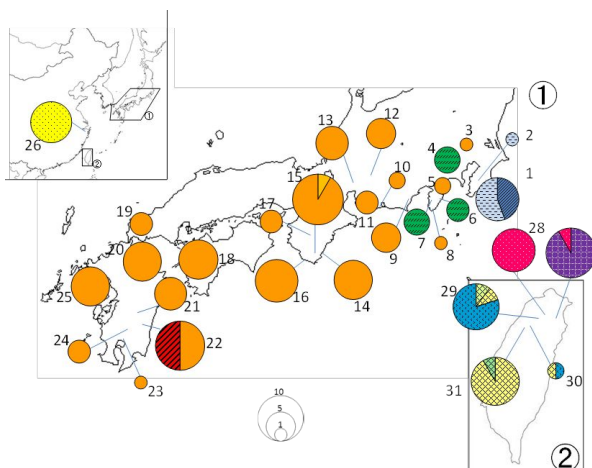


図 2 ハプロタイプの地理的分布

以上の結果から、イチイガシは天然林では

その個体数を減らしているが、主な社寺林集団では周辺と同じ地域固有の葉緑体 DNA ハプロタイプを有していることが明らかになった。今回の調査ではこのような社寺境内に生育している個体も含めて、イチイガシのハプロタイプが日本全体にわたり地域性を持っていることが示された。一方で、埼玉県の場合のように他地域からの種苗移動に起源をもつ可能性が高いケースも存在する。どちらのケースにおいてもサンプル採取元の個体は地域の中で保護されてきたものであり、イチイガシの天然個体が少なくなっている現在においては貴重な存在である。今回の結果から、イチイガシは人間活動の影響で個体数を減らした一方で、社寺林という人為の大きな土地で保護され、遺伝構造を維持してきた一面を持つと考えられた。更に、房総半島・伊豆半島と多摩でそれより西とは異なるハプロタイプが検出され、これまで古花粉同定だけで記述されてきた紀伊半島以東の太平洋側半島のレフュージアの存在が示唆される。

b) 次世代シーケンサーを用いた詳細な遺伝構造の把握

次世代シーケンサーを使用して解析したイチイガシ 17 サンプルの遺伝的関係を図 3 に示した。広範囲に分布していた Hap4 (オレンジ色) の 12 サンプルは 1 つのクレードにまとまったが、さらに詳細に分けられた。また、Hap2 は同所的に生育しているアラカシ、アカガシおよびウラジロガシと同じクレードに属した。

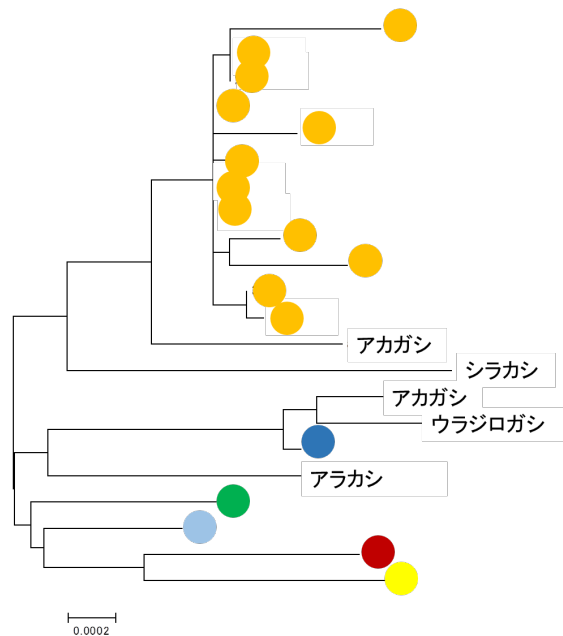


図 3 次世代シーケンサーを持っていて解析したイチイガシの 6 ハプロタイプの遺伝的関係

これらのことから、次世代シーケンサーを用いることにより、さらに詳細にイチイガシ

の遺伝構造を解明することができることが指摘される。また、同所的な近縁種と遺伝的に近いハプロタイプが存在していたことから、浸透交雑が生じていることが示唆された。

クヌギ

次世代シーケンサーを用いて既知のハプロタイプの遺伝的関係を得た(図4)。葉緑体 SSR マーカーを用いた研究で同一であるとされていたハプロタイプのサンプルのうち、できるだけ広範囲のサンプル 10 個体を解析した結果、朝鮮半島や中国大陸で検出されていた他のハプロタイプと比べると互いに近いものの、それぞれ塩基配列に違いがあった。このことから、これまでは日本国内の現生のクヌギ集団にはハプロタイプの多様性はないと考えられていたが、全塩基配列を決定することにより多様性を検出することができると可能性が示唆された。

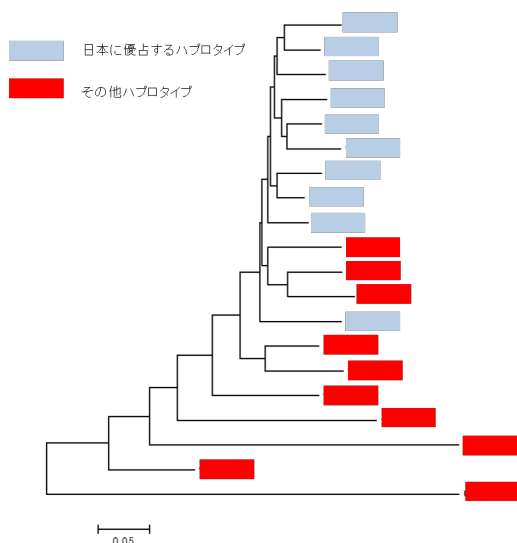


図4 次世代シーケンサーで解析したクヌギの既知の葉緑体ハプロタイプの遺伝的関係

(2)先史時代の遺伝構造

葉緑体 DNA ハプロタイプ

ポジティブコントロールのサンプルを除く全てのサンプルでシーケンシング結果が解読できず、ハプロタイプを決定することができなかった。古代サンプルの DNA が増幅しなかった理由としては、サンプル中の DNA が劣化によって短く分解されてしまい(Dumolin-Lapègue et al. 1999)、両プライマー間が完全に残っている状態の DNA 鎖がなかったか、非常に少なかったことが考えられる。この問題を緩和するためこの研究では 1 細胞中に複数存在する葉緑体 DNA を使用し、また読解領域も短いものを選択したが、成功に至らなかった。

次世代シーケンサーを用いた解析

古代ドングリから抽出された DNA を処理して、次世代シーケンサーを用いた解析を実施

した。得られたデータのアセンブリ後、BLAST を実行し DNA が何に由来するのかを確認したところ、細菌や動物で発見された DNA にヒットすることが多く、目的の葉緑体 DNA はほとんど入手できなかった。

以上、本研究では、イチイガシの葉緑体シーケンシングにより、現生のイチイガシの遺伝構造を明らかにすることができた。イチイガシは人間により長年利用されてきたにもかかわらず地理的遺伝構造が存在することが分かった。このことは、日本国内に遺伝構造が見いだせなかったクヌギとは異なる結果である。このような違いは、両種の分布そのものにかかわった人為の強度の違いにより生じたのではないかと考えられる。また、両種とも特定のハプロタイプが広範囲に存在していることは共通していた。この特定のハプロタイプについて、結果の解像度を上げることができればより詳しい考察ができると考え、次世代シーケンサーでの解析を試みた。その結果、イチイガシ、クヌギともに、国内に広範囲に広がっていたハプロタイプを細分化できる可能性が生じた。次世代シーケンサーでの解析は高価であるため数多くのサンプルを解析することはできないが、これまでの手法では検出できなかった葉緑体ハプロタイプ内の差異を検出できるため、今後、手法を検討して、より詳細な遺伝構造を明らかにしていきたい。

一方、先史時代の両種の遺伝構造については、イチイガシは分析可能と考えられるサンプルの提供を受けることができた。しかし、抽出した DNA は、通常のシーケンスおよび次世代シーケンサーでの解析もできなかった。今後は、この点を重点的に改善していく必要がある。

<引用文献>

Deguilloux, M.F., Pemonge, M.H., Bertel, L., Kremer, a., Petit, R.J. (2003). Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools. *Mol. Ecol.* 12: 1629-1636. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01836.x.

広川達麻(1997)縄文時代における堅果類の貯蔵 - 静岡県坂田北遺跡のドングリピット 3 例から. *民具マンスリー*30:6567-3573

Sang, T., Crawford, D. J., Stuessy, T. F. (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120-1136

島地 謙 伊東隆夫/編 (1998) 日本の遺跡出土木総覧:259ppt. 雄山閣出版

鈴木三男 (2002) 日本人と木の文化:255ppt.

八坂書房

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17: 1105-1109

Tate, J. A., Simpson, B. B. (2003). Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and Diverse Origins of the Polyploid Species. *Systematic Botany*, 28: 723-737

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)

Nami Sugiura, Dingquin Tang, Hiroyuki Kurokochi, Yoko Saito, Yuji Ide (2015) Genetic structure of *Quercus gilva* Blume in Japan as revealed by chloroplast DNA sequences. *Botany* 93:873-880 査読有
DOI:10.1139/cjb-2015-0025

Nami Sugiura, Hiroyuki Kurokochi, Engkong Tan, Shuichi Asakawa, Naoki Sato, Yoko Saito, Yuji Ide (2014) Development of 13 polymorphic chloroplast DNA markers in *Quercus gilva*, a regionally endemic species in Japan. *Conservation Genetic Resources* 6:961-965 査読有
DOI:10.1007/s12686-014-0256-y

[学会発表](計 2件)

杉浦奈美、齋藤陽子、井出雄二、古代有用樹種イチイガシの遺伝的多様性、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

杉浦奈美、井出雄二、齋藤陽子、湯定欽、葉緑体 DNA シーケンスによる日本・中国・台湾におけるイチイガシ(*Quercus gilva*)の遺伝的多様性、第125回日本森林学会大会、2014年3月27日～29日 埼玉県大宮市

[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

齋藤 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

(2)研究分担者

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

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