

E - 4 熱帯域におけるエコシステムマネージメントに関する研究

(2)多様性評価のためのラピッドアセスメント開発に関する研究

熱帯雨林の遺伝的多様性の指標化に関する研究

独立行政法人森林総合研究所

森林遺伝研究領域 ゲノム解析研究室

津村義彦

谷 尚樹

<研究協力者>

独立行政法人国立環境研究所

生物圏科学研究領域 熱帯生態系保全研究室

奥田敏統

近藤俊明・沼田真也・西村 千

平成 14～16 年度合計予算額 17,355 千円

(平成 16 年度合計予算額 5,669 千円)

[要旨] 熱帯林における樹木の遺伝的多様性を簡便に評価する手法(ラピッドアセス)の開発を目的に、マレーシアのパソ森林保護区に構築した 40ha 試験地で遺伝解析を行い、択伐による個体密度の低下や土地利用改変に伴う森林面積の減少が遺伝子流動パターンや遺伝的多様性に及ぼす影響を把握した。まず、開発したマイクロサテライトマーカーの近縁種への応用を試みた結果、*Shorea* 属内であれば、開発したマーカーの半数以上が利用可能であることが明らかとなった。これらの遺伝マーカーを用いて、開花個体密度の異なる 2001 年と 2002 年に、天然林および択伐林において収集した種子の DNA 解析を行い、択伐がフタバガキ科 2 樹種の交配様式に及ぼす影響を調査した。その結果、*Shorea leprosula* の他殖率については択伐の影響は不明瞭であったものの、*S. parvifolia* の他殖率は択伐林で低い値を示した。また、断片化した森林の林縁部と林内で *S. leprosula* の遺伝的多様性を比較した結果、林縁部において多様性が減少している可能性が示唆された。

本研究成果は、東南アジア熱帯林で優占するフタバガキ科樹木の遺伝的多様性の維持機構や遺伝子流動パターンだけでなく、森林伐採などの人為改変が及ぼす影響の解明に重要な役割を果たすものと考えられる。また本研究では、樹木個体群の遺伝的多様性の減少パターンを把握するのに、繁殖可能個体数や森林の形状が有効な指標となることを明らかにした。しかしながら、繁殖可能個体数の把握は、現在のところ全個体調査が必要であり、それには長い時間と費用がかかる。現在、一斉開花の種子成熟期における色特性を利用し、広域的にフタバガキ科の繁殖を評価するための技術開発についても研究を進めている。

[キーワード] 遺伝子流動、フタバガキ科、マイクロサテライトマーカー、保全、遺伝的多様性

1. はじめに

種多様性および遺伝子資源の宝庫であると言われている熱帯林も急速な開発とともに、その森林面積は減少の一途をたどってきた。このような森林減少や伐採に伴う個体密度の低下は、種多様性の減少にとどまらず、種が長い時間をかけて蓄積してきた遺伝的多様性の消失も引き起こしている可能性がある。遺伝的多様性の低下は、血縁個体間の交配機会の増加によって更なる遺伝的劣化をもたらし、局所個体群の絶滅リスクを高めるため、森林が本来保持している各種の公益機能(エコロジカルサービス)の消失が危惧される。遺伝子資源としても貴重な熱帯林の質の低下をこれ以上引き起こさないためにも、また将来にわたって進化する可能性を含んだ遺伝的多様性を維持するためにも適切な保全方法が望まれている。

一方で、東南アジア熱帯林を構成する林冠木、突出木の多くは一斉開花・結実という現象を通して世代交代する。一斉開花とは多くの樹種、個体が不規則な隔年周期で同調的に開花、結実を行う現象である。東南アジアにおいては、マレー半島からスマトラ、ボルネオ島が含まれる一年中降水の多い非季節性熱帯と呼ばれる地域でこの現象が見られる。伐採の対象であり、熱帯林の突出木・林冠層を形成するフタバガキ科をはじめとする樹木の多くは一斉開花の時にのみ開花、結実を行うため、この一斉開花が遺伝的多様性を決定するものと考えられるが、一斉開花の開花、結実、およびその遺伝子流動に関する情報は非常に限られている。そのため、開花個体密度の異なる場所またはイベント間で、遺伝子流動および遺伝的多様性の違いを集積し、開花個体密度とこれらの関係を明らかにできれば、広域な地域でのラピッドアセスメントにも繋がる重要な知見となり得る。

2. 研究目的

上記の背景を踏まえ、東南アジア熱帯林の主要構成樹種であるフタバガキ科樹木を対象に、マイクロサテライトマーカーを用いて一斉開花における遺伝子流動範囲を把握し、保全のための遺伝的ガイドライン作りの基礎データの収集を行うことを目的とする。また、熱帯林における樹木の遺伝的多様性を簡便に評価する手法の開発や、一斉開花が発生している森林を広域的に評価するための方法を検討する。

3. 研究方法

(1)40ha 調査地の再センサス

マレー半島パソ森林保護区に40haの調査地を設定した(図1、2)。遺伝子流動を正確に把握するためには調査地での母樹の位置および種同定が極めて重要な情報となる。そのため現在取得している情報のなかで不確かな地域および倒木の多い地域の母樹の位置および種同定を再度行った。

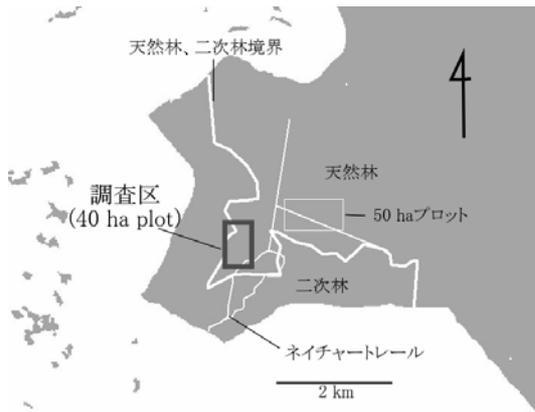


図1 マレー半島パプア森林保護区に構築した40haプロット

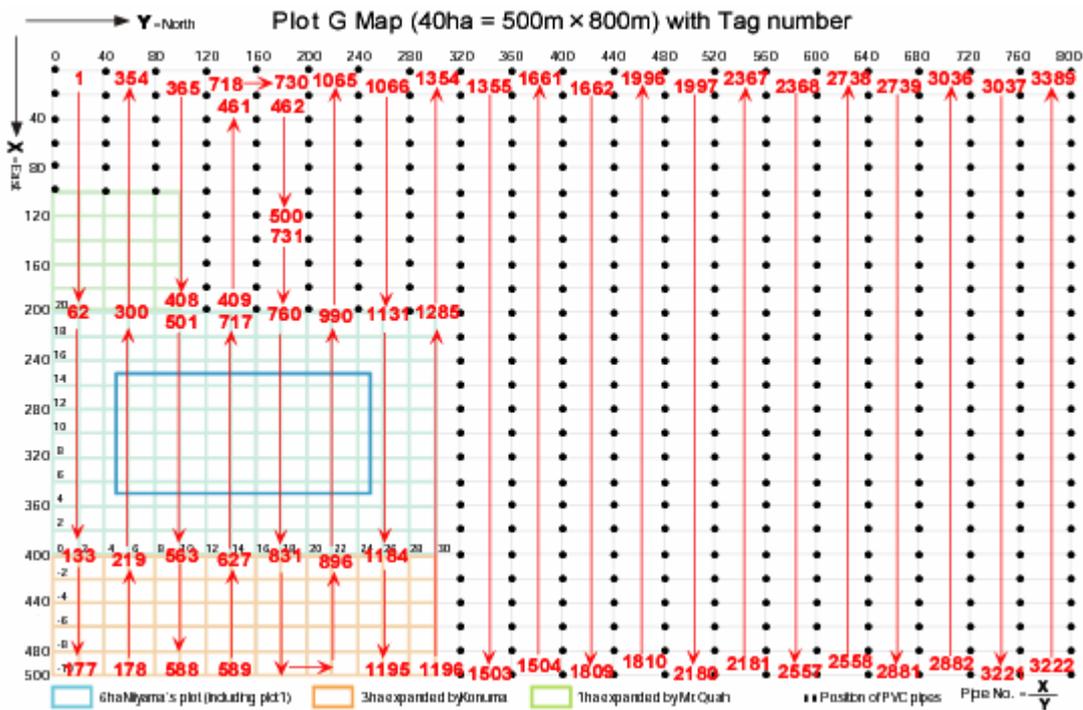


図2 パプア森林保護区に構築した40haプロット(500m x 800m)。赤数字は母樹の個体番号

(2) マイクロサテライトマーカーの開発と近縁種への応用

これまでに *Shorea curtisii*¹⁾、*Neobalanocarpus heimii*²⁾、*S. leprosula*、*S. lumutensis*、*Hopea bilitonensis* の5種でマイクロサテライトマーカーの開発を行ってきた。これらのマーカーが他種にも利用可能かを把握するため、他のフタバガキ科樹種のDNAを鋳型として開発したマイクロサテライトマーカーを用いてPCR増幅を行った。PCR条件は以下のとおりである。混合溶液...10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.16 mM 各 dNTP, 0.128 μM 各プライマー, 12.5 ng の鋳型 DNA と 0.5 units の Taq ポリメラーゼ。反応条件...94 で3分に続いて、94 で45秒, 50-60 (プライマー組ごとに異なる) で30秒, 72 で45秒の温度変化を35サイクル行った後、72 で3分間放置。これらは GeneAmp PCR System Model 9600 または 9700(Perkin-Elmer ABI Co. Ltd)を用いて行った。

(3) マイクロサテライトマーカーを用いたフタバガキ科 2 種の交配様式の解明

開花個体密度の異なる 2001 年および 2002 年に、天然林および択伐林において種子の採集を行い、人為改変に伴う繁殖個体数の減少がフタバガキ科樹種の交配様式に及ぼす影響を評価した。解析対象としたのは十分な種子数が確保できたフタバガキ科樹種 2 種 *S. leprosula* と *S. parvifolia* である。なお、交配様式の推定にはフタバガキ 5 種で開発したマイクロサテライトマーカーを用いた。*S. leprosula* には同種で開発したマイクロサテライトマーカー 4 遺伝子座³⁾、Sle79, Sle111a, Sle294, Sle303a を用いた。また *S. parvifolia* については *S. leprosula* で開発した 3 遺伝子座、Sle79, Sle111a, Sle294 を用いた。

(4) 断片化された森林の遺伝的多様性

現在、熱帯林の多くで人為的な開発に伴う森林の細分化・断片化が進んでおり、これらの森林では種多様性の減少が危惧されている。しかしながら、このような森林の断片化が樹木の遺伝子流動パターンや遺伝的多様性に及ぼす影響についての知見は多くない。そこで断片化された森林の周辺部と中心部で、フタバガキ科の *S. leprosula* について調査を行った。周辺部および中心部で母樹を探し出し、フタバガキ科樹木である *S. leprosula* を対象に林縁部で 6 母樹、中心部で 8 母樹からそれぞれ 30 個体以上の実生を収集した。これらから DNA を抽出し、8 遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型の決定を行い遺伝的多様性の比較を行った。

4. 結果・考察

(1) 40ha 調査地の再センサス

遺伝子流動を正確に把握するためには、調査地の母樹の位置および樹種同定が重要な情報となる。調査地が十分に使えるためには、一般的には数回のセンサスが必要だと言われている。今回は設定した調査地を再確認する目的と、最近、強風による倒木が多く見られたので、マップした母樹の再確認を行った。調査した箇所は倒木が多い場所で、母樹数で 100 個体のフタバガキ科樹種の再確認を行った。その結果、倒木その他による枯死個体は、そのうち 34 個体であった。また樹種同定を再度行ったところ、11 個体で種同定の誤りが見つかり、データベースの修正を行った。

今回の再センサスで倒木が多く、樹種の約 1 割で種同定の誤りが見られた。今後、マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝子型の情報をもとに、種の範囲を外れた対立遺伝子等が見られた場合は、種同定の再確認をする必要があることが明らかになった。今後、母樹の遺伝子型を決めていく際に、慎重に対立遺伝子を確認して作業を進めることとした。

(2) マイクロサテライトマーカーの開発と近縁種への応用

フタバガキ科 5 樹種で開発したマイクロサテライトマーカーの近縁フタバガキ科樹種への応用性を調査した。今回対象とするのは *Shorea* 属の樹種が主体であるため *S. leprosula* で開発したマーカーの他種へ応用を試みた。この場合、null 対立遺伝子が存在し、正確な遺伝子型の決定ができない遺伝子座は使用できないこととした。*S. leprosula* で開発した 18 遺伝子座を、*S. leprosula* を含め、*S. parvifolia*、*S. maxwelliana*、*S. lepidota* に応用した。その結果、*S. leprosula* の 7 遺伝子座で null 対立遺伝子の存在が疑われたため、今後の実験では残りの 11 遺伝子座を対象に分析を行うこととした(表 1)。また *S. parvifolia* では 8 遺伝子座が利用可能であることが明らかとなった。また *S. maxwelliana* と *S. lepidota* で

はそれぞれ 7 遺伝子座、13 遺伝子座が利用可能であると明らかとなった。4 種共通して利用可能なものは 18 遺伝子座中、わずかに 4 遺伝子座であった。これは null 遺伝子座の存在等により、共通で利用可能な遺伝子座が少なくなったものと考えられる。また系統的には *S. leprosula*、*S. parvifolia*、*S. lepidota* の 3 種が red meranti グループに属し、*S. maxwelliana* だけが Balau グループに属す。そのため、*S. maxwelliana* で利用可能な遺伝子座数は、他の 3 種に比較して少ないものであった。*S. maxwelliana* を除いた 3 種で共通に使用できる遺伝子座は 7 座もあり、やはり系統的に近縁な種ほど利用可能なものが多い傾向であった。今後は、これらの遺伝子座を用いて正確な遺伝子流動を明らかにしていく予定である。

表 1 *Shorea leprosula* で開発したマイクロサテライトマーカーの近縁種への応用性。

A で示したのが多型があり利用可能な遺伝子座。

遺伝子座	<i>Shorea leprosula</i>	<i>Shorea parvifolia</i>	<i>Shorea maxwelliana</i>	<i>Shorea lepidota</i>
<i>Sle074a</i>				A
<i>Sle079</i>	A	A		A
<i>Sle105</i>	A			
<i>Sle111a</i>	A	A	A	A
<i>Sle118</i>	A	A		A
<i>Sle267</i>			A	
<i>Sle280</i>			A	
<i>Sle291a</i>				A
<i>Sle294</i>	A	A		A
<i>Sle303a</i>	A	A	A	A
<i>Sle384</i>				A
<i>Sle392</i>	A	A	A	A
<i>Sle465</i>	A	A	A	A
<i>Sle475</i>	A	A		
<i>Sle556</i>				A
<i>Sle562</i>	A			A
<i>Sle566</i>	A			
<i>Sle605</i>			A	A

(3) マイクロサテライトマーカーを用いたフタバガキ科 2 種の交配様式の解明

2001 年と 2002 年で収集した種子は、一部は直接 DNA 抽出を行い、一部は発芽率測定のために発芽試験を行った。発芽試験終了後、発芽個体からも DNA を抽出し、種子および実生の 2 つの段階の他殖率の推定を行った(表 2)。これは近交弱勢がどの成長段階で起こっているかを検証するために行っている。また種子の収集は、構築した 40ha プロットだけでなく、近隣の択伐林である 12ha プロットでも行っているため、天然林と択伐林での母樹密度および構造が異なる森林で、遺伝子流動がどのように変化するかを把握することができる。現段階で解析できる母樹は表 2 に示したもので、40ha プロットでは *S. leprosula* で 7 母樹の種子および実生で交配様式の推定を行った。12ha では 14 母樹の種子と 1 母樹の実生の解析を行った。*S. parvifolia* では 40ha、12ha プロットそれぞれで、種子 14 母樹と 16 母樹で実生は 1 母樹と 9 母樹であった。それぞれの母樹で 30 種子の解析を行った。

表 2 フタバガキ 2 樹種で交配様式を調査した母樹数

		<i>S. lepurosula</i>		<i>S. parvifolia</i>		
		2001	2002	2001	2002	
分析母樹数	40ha	種子	5	2	2	-
		実生	-	7	-	4
	12ha	種子	2	14	12	4
		実生	1	-	9	-
計(分析個体数)		9(270)	23(690)	23(690)	8(240)	

その結果、40ha の *S. lepurosula* では 70% 以上の他殖率があり、種子および実生段階でも大きな差はなかった(表-3)。一方、*S. parvifolia* では種子段階では 68.6% の他殖率があったが、実生段階では 48.1% であった。これは母樹の個体が異なることと、それらの母樹の周辺個体密度の違いによるものだと推測される。また種子が小動物等によって移動しているのも比較的多く見られ、約 1 割の種子がこの移動に分類された。これらは他樹種でも同様の現象が指摘されているため、一般的にかなりの頻度で小動物が種子の移動に関与していると考えられた。まだ分析していない母樹も存在するため、これだけのデータでは一般的な傾向は把握するのは難しい。今後も継続して、残りのサンプルの解析を続ける必要がある。一方、択伐林である 12ha プロットでは *S. lepurosula* の種子の他殖率は 97.2% と非常に高い値を示したが、実生では 74.5% であった(表-4)。また *S. parvifolia* の他殖率は低く、48.5% であることが明らかとなった。また持ち込みは両種とも低く、わずかに 0.8% と 1.9% であった。これはこの択伐林が 40ha の天然林と比較して個体密度が低いことが原因ではないかと考えられる。この場合、将来の遺伝的多様性減少の一要因になる可能性もあり、種または分類群ごとの適正個体密度の管理が森林の持続的な利用には欠かせないことになるであろう。

表 3 40ha プロットで明らかになった他殖率

		<i>S. lepurosula</i>		<i>S. parvifolia</i>	
		2001	2002	2001	2002
Outcrossing rate	seed	79.6	78.2	68.6	-
	seedling	-	81.8	-	48.1
Migration		22.9	13.5	11.9	4.0

表 4 12ha プロットで明らかになった他殖率

		<i>S. lepurosula</i>	<i>S. parvifolia</i>
Outcrossing rate	seed	97.2	48.5
	seedling	74.5	-
Migration		0.008	0.019

(4)断片化された森林の遺伝的多様性

森林の林縁部および林内で遺伝的多様性と他殖率の比較を行った結果、他殖率は林縁部で 0.57 ~ 1.00 で平均値は 0.93、中心部は 0.96 ~ 1.00 で平均値はほぼ 1.00 に近い値を示し、林縁部の1母樹を除いては高い他殖率を示した。これはこれまでに報告されているフタバガキ科樹木の他殖率と同じような値であった。林縁部と中心部で実生群の保有している対立遺伝子数が異なり、林縁部の方が明らかに少ない値を示した。実生段階での花粉親から受け取った対立遺伝子数の平均値は林縁部で 6.38、中心部で 6.81 であった。また実生段階での稀な対立遺伝子数は林縁部で 3.33、中心部で 5.50 であった。これら二つのグループの母樹個体間での遺伝的多様性には大きな違いはみられなかった。このことは林縁部の母樹が受け取れる花粉が限られた花粉親に由来することを意味し、林縁部での将来の遺伝的多様性の減少を示唆するものである。

(5)遺伝的多様性評価のためのラピッドアセスメント手法の開発

これまでの結果から、熱帯林での遺伝的多様性の減少は、主に種の個体密度に大きく依存する傾向があることが示唆されている。そのため、個体密度と遺伝的多様性との関係を明確にするために、複数の事例研究を蓄積する必要がある。またラピッドアセスメント手法の開発のためには、衛星データ等の活用により、それぞれの森林での種ごとの個体密度の情報を収集する技術開発が不可欠である。現在、一斉開花の種子成熟期における色特性を利用し、広域的にフタバガキ科の繁殖を評価するための技術開発を進めている。

5. 本研究により得られた成果

本研究ではフタバガキ科の遺伝子流動を把握するために、40ha プロットの構築を行った。その正確性を期するために、一部の再センサスを行い、種同定、倒木等の調査を行った。また *S. leprosula* で開発したマイクロサテライトマーカーを近縁種3種に適応したところ、系統的に遠い系統である *S. maxwelliana* で適応できるマーカー数が少し少ない傾向が見られた。しかし、遺伝子流動解析には十分な数のマーカーが利用可能であった。2001年および2002年の一斉開花の際に収集した種子および発芽させた実生を用いて、フタバガキ科2樹種 *S. leprosula* および *S. parvifolia* で交配様式の調査を行った結果、*S. leprosula* では高い他殖率が見られたが、*S. parvifolia* では一般的なフタバガキ科樹種よりも低い他殖率であった。小動物等による種子の持ち込みは、40haと12haで大きく異なり、個体密度がこの持ち込みに大きく関与していると考えられた。また断片化された森林の林縁部でも遺伝的多様性が減少している可能性が示唆された。

6. 引用文献

- 1) Ujino, T., T. Kawahara, Y. Tsumura, T. Nagamitsu, Wickneswari R. and H. Yoshimaru (1998) Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity* 81: 422-428.
- 2) Iwata, H., A. Konuma, and Y. Tsumura 2000. Development of microsatellite markers in the tropical tree *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae). *Molecular Ecology* 9:1684-1685
- 3) Lee, S. L., N. Tani, K. K. S. Ng and Y. Tsumura (2004) Characterization of 15 polymorphic

7. 国際共同研究等の状況

この研究はすべてマレーシア森林研究所との共同研究により行なわれた。

カウンターパート: Norwat Muhammad, Lee Chai Ting, Lee Soon Leong, Kevin K. S. Ng

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文 (査読あり) >

S. L. Lee, N. Tani, K. K. S. Ng and Y. Tsumura : Molecular Ecology Note 4, 222-225 (2004)

”Isolation and characterization of 20 microsatellite loci for an important tropical tree *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae) and their applicability to *S. parvifolia*.”

(2) 口頭発表

内藤洋子、神崎謙、沼田真也、小沼明弘、西村千、太田誠一、津村義彦、奥田敏統、S.L.Lee and M. Norwati : 日本生態学会大会講演要旨集、51,145 (2004)

「*Shorea acuminata* の繁殖戦略: 不定期に大量開花結実することの適応的意義」

福江陽子、S. L. Lee、K. K. S. Ng、M. Norwati and 津村義彦 : 日本生態学会大会講演要旨集、51,236 (2004)

「森林断片化による *Shorea leprosula* の遺伝的多様性に与える影響」

福江陽子、S. L. Lee、K. K. S. NG、M. Norwati and 津村義彦 : 日本生態学会大会講演要旨集、52,776 (2005)

「半島マレーシアにおける *Shorea leprosula* の遺伝的多様性に対する林縁部の影響」

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

本研究は、遺伝学的アプローチを用いて熱帯域の多様性保全機能やそのメカニズムを評価する手法を確立した点において重要な成果をもたらした。今後は、森林の外形や内部構造から、森林の遺伝的多様性を詳細かつ迅速に評価する技術開発 (スケールアップ技術開発とラピッドアセスメント) を同時並行的に進め、様々な関係機関を通じ、成果の広報・普及に努める。

