

E-2 熱帯林生態系における野生生物種の多様性に関する研究

(3) 遺伝的多様性の解析に関する研究

① 熱帯林生態系におけるフタバガキ科植物の遺伝的多様性に関する研究

研究代表者 森林総合研究所 津村義彦

農林水産省 森林総合研究所

生物機能開発部

遺伝分析研究室

津村義彦・村井正文・前田武彦

吉村研介

平成2-4年度合計予算額 14,564千円

〔要旨〕熱帯林を構成している主要樹種の一つであるフタバガキ科樹木の系統関係及び遺伝的多様性を明らかにする事を目的に以下の研究を行った。フタバガキ科を構成する主要な属を含んだ系統関係を明らかにするため7属21種のフタバガキ科樹木のDNAを用い、葉緑体DNAのRFLP解析を行った。その結果、*Shorea*属、*Hopea*属、*Dipterocarpus*属、*Dryobalanops*属、*Neobalanocarpus*属、*Vatica*属、*Anisoptera*属の系統関係が明らかになった。また交配様式については *Neobalanocarpus heimii* についてアイソザイムの5遺伝子座を用いて1.065 (SD;.212)という極めて高い他殖を行っている事が明らかになった。

〔キーワード〕フタバガキ科、熱帯林、分子系統分類、交配様式、遺伝的多様性

1. 序

熱帯林は種多様性及び遺伝的多様性に富み、遺伝子資源の宝庫と言われている。しかし、近年これらの地域で起こっている急速な破壊は、種多様性の減少にとどまらず、種が長い(進化的)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ものと考えられる。そこで遺伝子資源の宝庫とされる熱帯林を今後、遺伝子供給源として保全するためには、そこで将来にわたり進化が起こる可能性を備えた形で保全計画を立てる必要がある。しかし、これまでに熱帯林を遺伝的側面から研究した例はほとんどなく、熱帯林樹種間の系統分化等の関係も全く明らかにされていない。

本研究では、新たに遺伝子マーカー(アイソザイム遺伝子、葉緑体DNAのRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)、RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)等)を用いて熱帯林の中でも特に重要なフタバガキ科樹木を遺伝子レベルで解明することによって、熱帯林を構成している種(フタバガキ科植物)がどの程度の遺伝的多様性を保有しているか、またどのような遺伝的な構造を呈しているかを明らかにすると共に、これらの種の系統関係及び進

化的関係を明らかにする。これらの研究によって得られた知見をもとに、遺伝子資源としての熱帯林の重要性を明らかにし、種多様性と各々の保有する遺伝的多様性を最大限に維持するための最適な生態系 (*in situ*) 保全法を確立する。

2. 材料及び方法

(1) 分子系統

フタバガキ科植物の系統分類解析用材料としてマレーシア森林研究所の樹木園及び苗畑から採取したフタバガキ科植物7属21種を対象とした(表-1)。これらの材料から全DNAの抽出を改良CTAB法を用いて行った。これらのDNAを20種の制限酵素 (*Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Hae*III, *Hin*FI, *Pvu*II, *Eco*RV, *Sal*I, *Pst*I, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I, *Bgl*II, *Kpn*I, *Sac*I, *Xho*I, *Dra*I, *Rsa*I, *Hha*I, *Sty*I) を用いて消化後、0.7%アガロースゲルにて電気泳動を行った。その後ナイロンメンブレン (Hybond-N) にDNAを移し取り、タバコ葉緑体DNA¹⁾をプローブとし非放射性ラベリングシステムであるDIGシステム (Boehringer Mannheim Co.Ltd.) を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。検出されたフラグメントをスコアリングし、系統樹作成プログラムであるPHYLI P²⁾及びPAUP³⁾を用いて系統樹の作成を行った。

(2) 交配様式

また交配様式の解明のために、Pasoh試験地内の*Neobalanocarpus heimii*の5母樹を選出した。これらの5母樹の周囲約100mには同種の交配可能な母樹はなく、孤立木であるものを選んだ。これら5母樹及び周囲の実生合計79個体から小枝及び葉組織の採取を行った(表-3)。これらの葉組織から改良CTAB法により全DNAを抽出した。抽出した個体別DNAに関してRAPD分析を行った。また小枝の内樹皮を用いてエステラーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコムターゼ、シキミ酸脱水素酵素等のアイソザイム分析を行った。

3. 結果及び考察

(1) フタバガキ科植物の分子系統分類

比較的近縁の種間・属間の系統分類を行う際、最も適していると言われている葉緑体DNAを指標としてフタバガキ科植物の科内の種間・属間の系統関係を調査した。指標としたのはタバコ葉緑体ゲノムで、そのゲノムサイズは約155kbpである。また20種の制限酵素を用いてフタバガキ科各種のDNAを切断し、多型を調査した。用いたプローブ11種はタバコ葉緑体ゲノム全領域をカバーするもので、制限酵素との組み合わせで11プローブ×20種制限酵素=220組み合わせのRFLPデータを得ることができる。本解析では110組み合わせのデータをすでに得た(表-2、図-1)。その結果は、各属ごとにまとめ、*Shorea*属及び*Hopea*属は近縁な関係あり、*Dipterocarpus*属、*Dryobanops*属と*Neobalanocarpus*属はこれらから比較的等距離に位置した。また*Anisoptera*及び*Vatica*は*Shorea*属から最も遠くに位置した。本解析にあたり形態から見ると*Vatica*属が最も古い種の仲間であると言われているためこれをoutgroupとし、系統樹の作成を行った。また、この系統樹の確からしさを調べるためにブートストラップ法によりデータの繰り返しを許し1000回の系統樹を再構築を行った。その結果、いくつかの分岐で不安定な部分はあるが、本系統樹がほぼ確からしいことが明らかとなった(図-2)。これらの結果からフタバガキ科植物の分化年代は比較的新しいと思われた。また形態から見ると従来古い種だと言われてい

た *Anisoptera* 属は *Vatica* 属と近縁関係にある事が明らかになった。また種数の最も多い *Shorea* 属、また次に多い *Hopea* 属は近年に急速に分化した属である事が明らかになった。これらの系統樹は Ashton⁴⁾ の分類と極めてよく一致していた。

(2) フタバガキ科植物の交配様式の解明

フタバガキ科の交配様式を明らかにする目的で各々の属等を代表する種について調査を試みる。今回 *Neobalanocarpus heimii* について調査した。これらの母樹及び母樹の周囲の実生群を調査対象とした。これらすべての個体から全 DNA の抽出を行い (表-3)、10 種類のプライマーを用い RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) 分析⁵⁾ を行い各家系間で有効なプライマーの探索を行った (表-4)。その結果、親個体が持っていないフラグメントが多数見られた。これらのデータの解析についてはまだ確定した方法がないため現在解析方法及び理論の構築を行っている。少なくとも以上のデータからいえることは複数の花粉親が関与していることは間違いなく、高い他殖率をしていると推定される。

また理論の確立しているアイソザイム分析も併せて行った。アイソザイム分析は 5 遺伝子座 (*Est-1*, *Gpi-2*, *Pgm-2*, *Shd-1*, *Ugp-1*) の分析を行った (表-5)。それぞれの遺伝子座で 2~3 個の対立遺伝子が見られた。これらの個体別の遺伝子型データを Ritland and Jain⁶⁾ の他殖率推定の多遺伝子座推定法 (Multilocus) 及び単一遺伝子座推定法 (Singlelocus) を用いて解析を行った。その結果 *Neobalanocarpus heimii* は 1.065 (SD: .212) という極めて高い他殖率を示した。RAPD 法はほとんどが優性遺伝型の遺伝をするため、ヘテロ接合型が優性のホモ接合型と区別できないので外交配率を算出する上で不利になる。しかしながら、RAPD 法はプライマーを増やせばいくらかでも遺伝子座を増やす事が可能である。そのため RAPD 法でヘテロ接合型の検出が可能になれば、より正確な交配様式の解明ができるようになることが期待される。

4. 国際共同研究等の状況

国際共同研究計画名: N I E S - F R I M プロジェクト

協力案件名: 熱帯林生態系におけるフタバガキ科植物の遺伝的多様性に関する研究

カウンターパート: Wickneswari Ratnam

参加・連携状況等: マレーシア現地での研究材料の収集及び F R I M での実験等を共同で行っている。またアイソザイム分析についてはすべてマレーシアにて行っている。

5. 研究発表の状況

講演発表

津村義彦・Wickneswari R. フタバガキ科植物の系統分類の再考 日本林学会講演要旨 p.127
平成4年4月

津村義彦・Wickneswari R. フタバガキ科植物の分子系統分類 日本熱帯生態学会講演要旨
平成4年6月

Tsumura, Y., Wickneswari, R., T. Kawahara and K. Yoshimura (1993) Phylogeny of Dipterocarpaceae using RFLP of chloroplast DNA. XV International Botanical Congress (Yokohama, Japan)

論文

Tsumura, Y., T. Kawahara, Wickneswari, R. and K. Yoshimura (準備中) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae using restriction endonuclease analysis of PCR amplified chloroplast genes.

引用文献

- 1) Sugiura, M., Shinozaki, K., Zaita, N., Kusuda, M., and Kumano, M. 1986. Clone bank of tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments: Mapping of eleven ribosomal protein genes. *Plant Sci.* 44:211-216.
- 2) Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- 3) Swofford, D.L. 1990. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, Version 3.0q. Champaign, Illinois: Illinois Natural History Survey.
- 4) Ashton, P.S. 1982. Dipterocarpaceae. *Flora Malesiana. Series I - Spermatophyta. Flowering Plants Vol. 9, part 2.* pp.552.
- 5) Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- 6) Ritland, K. and Jain, S.K. 1981 A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity* 47:35-52

表-1 フタバガキ科の分子系統分類に用いた材料

No.	属	種	No.	属	種
1.	<i>Shorea</i>	<i>macroptera</i>	12.	<i>Dipterocarpus</i>	<i>kunstleri</i>
2.	<i>Shorea</i>	<i>acuminata</i>	13.	<i>Dipterocarpus</i>	<i>baudii</i>
3.	<i>Shorea</i>	<i>maxwelliana</i>	14.	<i>Dryobalanops</i>	<i>lanceolata</i>
4.	<i>Shorea</i>	<i>assamica</i>	15.	<i>Dryobalanops</i>	<i>aromatica</i>
5.	<i>Shorea</i>	<i>ovalis</i>	16.	<i>Dryobalanops</i>	<i>oblongifolia</i>
6.	<i>Shorea</i>	<i>atrinervosa</i>	17.	<i>Vatica</i>	<i>odorata</i>
7.	<i>Shorea</i>	<i>sumatrana</i>	18.	<i>Vatica</i>	<i>wallichii</i>
8.	<i>Shorea</i>	<i>materialis</i>	19.	<i>Vatica</i>	<i>bella</i>
9.	<i>Hopea</i>	<i>odorata</i>	20.	<i>Anisoptera</i>	<i>oblonga</i>
10.	<i>Hopea</i>	<i>sangal</i>	21.	<i>Neobalanocarpus</i>	<i>heimii</i>
11.	<i>Hopea</i>	<i>nervosa</i>			

表-2 本研究に用いたタバコ葉緑体DNAプローブと制限酵素

制限酵素	プローブ										
	pTB25	pTB7	pTBa3	pTS6	pTS9	pTS8	pTB15	pTB20	pTB10	pTB8	pTBa2
1. <i>Bam</i> HI			○	○	○	○	○	○		○	
2. <i>Hind</i> III			○	○	○	○	○	○		○	
3. <i>Eco</i> RI	○		○	○	○	○	○			○	
4. <i>Hae</i> III	○		○	○	○	○	○			○	
5. <i>Hinf</i> I	○			○		○	○		○	○	○
6. <i>Pvu</i> II	○			○		○	○		○	○	○
7. <i>Eco</i> RV			○	○	○	○				○	
8. <i>Scal</i>			○	○	○	○				○	
9. <i>Pst</i> I				○	○	○	○		○	○	
10. <i>Sal</i> I				○	○	○	○		○	○	
11. <i>Sma</i> I	○			○	○	○			○	○	
12. <i>Xba</i> I	○			○	○	○			○	○	
13. <i>Bgl</i> II	○			○	○	○			○	○	
14. <i>Xpn</i> I	○			○	○	○			○	○	
15. <i>Sac</i> I			○	○	○	○		○		○	
16. <i>Xho</i> I			○	○	○	○		○		○	
17. <i>Dra</i> I	○		○	○	○	○				○	
18. <i>Rsa</i> I	○		○	○	○	○				○	
19. <i>Hha</i> I	○	○				○		○	○	○	
20. <i>Syl</i> I	○	○				○		○	○	○	

○ ; 分析したもの

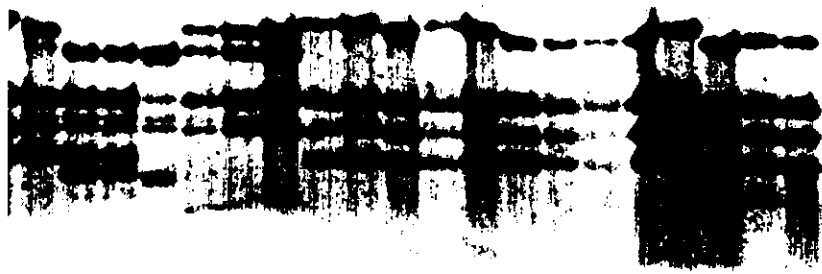


図-1 サザンハイブリダイゼーションの一例
制限酵素 B g I II と p T S 6 プローブの組み合わせ。

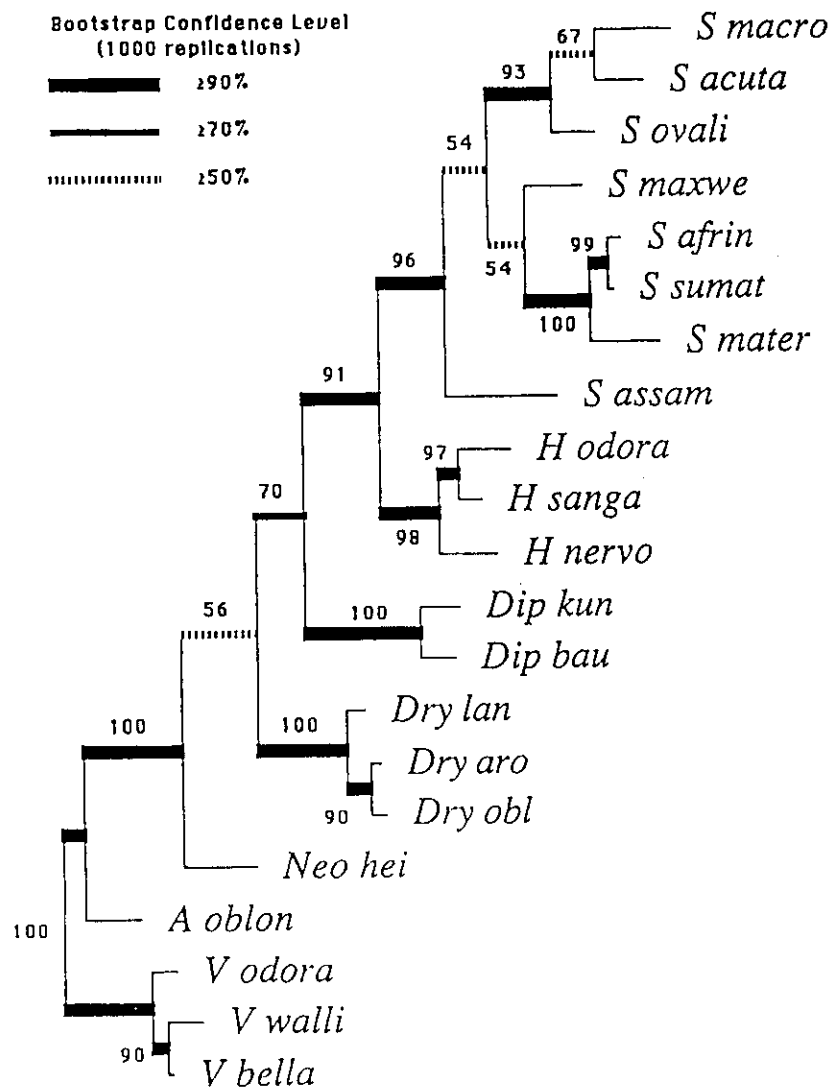


図-2 フタバガキ科 21 種の葉緑体 DNA の RFLP をもとにした系統樹
図中の数字はブートストラップの際の各枝の再現性の確立を示す。