

フタバガキ科樹木の DNA による樹種識別

津村 義彦

はじめに

DNA バーコーディングと呼ばれる DNA の一部の塩基配列を読み取って生物の種の同定を行う研究が世界中で大規模に行われている (<http://www.jboli.org/>)。これにはいくつかの理由がある。1) 専門家でなくても種の識別が可能になる, 2) 動物の肉片や植物の根などの個体の一部からでも種の同定ができる, 3) 芽生えなどの未成熟な個体でも種の同定ができるようになる。これらの多くの利点があるため菌類, 昆虫, 鳥類, 動物, シダ植物, 樹木など多くの生物で特定領域の遺伝子の塩基配列データが蓄積されている。樹木でも同様の研究が進んでおり, また熱帯産の樹木についても研究が始められている。これらの研究は一部の組織からでも DNA の塩基配列情報を用いて種同定ができるため, 製品化された木材でも種同定が可能になる画期的な方法として期待される。

東南アジア熱帯林の主要な構成樹種であるフタバガキ科樹木はこれまでに大量に伐採され輸出されてきた。近年では各国ともに択伐の基準を定めたり, 森林認証制度を導入して持続的林业経営を目指している。しかし違法伐採は現在でも起こっており, これらを有効に減少させる方法の模索が続いている。樹木の種識別や産地識別の DNA データベースが構築されると, 産出された材の種が同定でき, またその産地も明らかにできる可能性がある。ここではフタバガキ科の種同定が DNA でどの程度可能かにつ

いて議論をし, DNA を用いて産地識別が可能かどうかについても述べたい。

フタバガキ科の DNA による樹種識別

フタバガキ科の DNA による属間や種間の系統間の違いは比較的早くから研究が行われてきた。フタバガキ科樹木は基本染色体が $n=7$ と 11 の樹種があるが, これらは明瞭に分岐している。ラワン材の主な原料となる *Shorea* 属については材についても分類が行われており, レッドメランチ, イエローメランチ, ホワイトメランチ, パラウの 4 つに区分される。これらが遺伝的に異なっているかどうか, また全ての種が DNA で分類できるかどうかを *Shorea* 属の 84 種について調査を行った¹⁾。解析したのは葉緑体 DNA の 4 つの領域で, 合計 4,286 塩基についてである。葉緑体 DNA は植物の系統解析を行うのに最も適したゲノムだと言われている。それは近縁な種同士は塩基配列が似ており, 遠縁になればなるほど塩基配列が異なってくるため, 種間の系統関係がよく反映されるためである。

解析の結果, 4 領域で識別能力に差はあったが, 一部の種を除いてほとんどの種の識別が可能であった。2 つの種が全く同じ塩基配列をもつものの組み合わせはわずかに 1.64% しかなかった。また同種でも一部異なる塩基配列をもつ個体が 28 種存在した。このことは一部の種を除いてほとんどの種が DNA で種同定が可能であることを示している。これらは生育地域識別の DNA マーカーとして活用が期待さ

Yoshihiko Tsumura : Species Identification of Dipterocarp Species by DNA

(独) 森林総合研究所 森林遺伝研究領域

れる。今後、分布域広範に同種の材料を集めて地域識別が可能かどうかの検証を行う必要がある。

またレッドメランチ、イエローメランチ、ホワイトメランチ、バラウの4つの材のグループを識別する塩基は分析した4,286塩基中それぞれ5, 11, 9, 6塩基が見つかった。そのため材の専門家でなくてもこれらの数塩基の組み合わせでどの材グループであるか簡単に識別が可能となる。またこれら4つの材のグループのうちグループ内の遺伝的多様性が最も高いものはホワイトメランチで、次がバラウ、レッドメランチ、イエローメランチの順であった。これは別の言い方をすると遺伝的多様性の低いイエローメランチはコンパクトにまとまった属で種間の関係が非常に近縁だといえることができる(図1)。

我が国では材の種類によって関税が異なり、レッドメランチの税率が最も高く設定されている。しかしレッドメランチに属しているアラン(*Shorea albidia*)などは何故か税率が低いグループにされている。そのために虚偽の申告も起こっていたらしい。伊藤ら(2004)によると合板の表層の材料として使われるフタバガキ科のうちレッドメランチが1994年に94.9%であったものが2000年には0.4%まで減少していることを報告している。これはレッドメランチの資源量の多さから考えてもおかしな現象である。現在では、材での識別が税関で簡便にできるようになったとアナウンスすることで、この数値が正常な値まで戻っているという²⁾。

実際にアランがDNAで識別できるかどうかの解析を行ったところ2箇所の塩基が他の樹種とは異なっており識別が可能であることが明らかとなった。このように種レベルの同定までDNAで可能になったことから、このようなDNAのデータベースが合法的なフタバガキ科材の輸入の一助になることが期待される。ここで得られたデータは以下のサイト(<http://f5002.ffpri-108.affrc.go.jp/shorea/>)で公開し、塩基配列情報があれば*Shorea*属の種の同定ができるようになった。

材を用いた樹種同定と違法伐採対策

輸入された材を用いてDNAの分析が可能かどうかを調べる必要がある。これまでに材や木材製品からDNAが抽出され分析された例が複数ある。例えばフランスではナラ材で作られたワイン樽や家具からDNAを抽出して産地を特定する試みがなされた。また我が国では江戸時代に伐採された屋久島の天然スギの切り株からDNAを抽出して、切り株の周辺に生育しているスギとの親子関係が調査されている。また約3500年前に三瓶山の噴火で埋没したスギの材からDNAを抽出して、現世のスギとの系統関係を比較した例もある。このように保存状態が良ければ材からのDNA抽出及び分析は可能である。また吉田ら(2006)³⁾は複数の樹種でどのような条件であれば分析可能なDNA抽出ができるかを部位、保存状態、熱処理など詳細に検討している。

フタバガキ科の材でDNAの抽出を試みたところ、熱処理や接着処理をしていない単版などではDNAの抽出が比較的容易で、分析できる量と質が確保できた。これらのDNAを解析し種の同定を試みたところ、10サンプルのうち4個体については1種に絞り込むことができ、残りの6個体についても2種まで絞り込むことができた。これに材の組織のデータを組み合わせると1個体を除いて全ての種について種の同定が可能であった。また材組織だけのデータだと5種程度の候補種があり、絞り込みが難しかった(表1)。

また1サンプルだけであるが、合板のサンプルについて上記のサンプルと同様にDNAの抽出及び解析を試みたが、目的のDNAをPCR増幅することができなかった。熱処理や接着処理をした合板はDNAが物理的に壊れていることが予想されたため、特定の遺伝子領域の短いDNA断片をPCR増幅したところ、目的のDNAを得ることができた。これを解読し種の同定を試みたところ、*Hopea*属の種であることが明らかになった。この研究では*Shorea*属のデータしかないために、*Hopea*属の種の同定までは至らなかった。

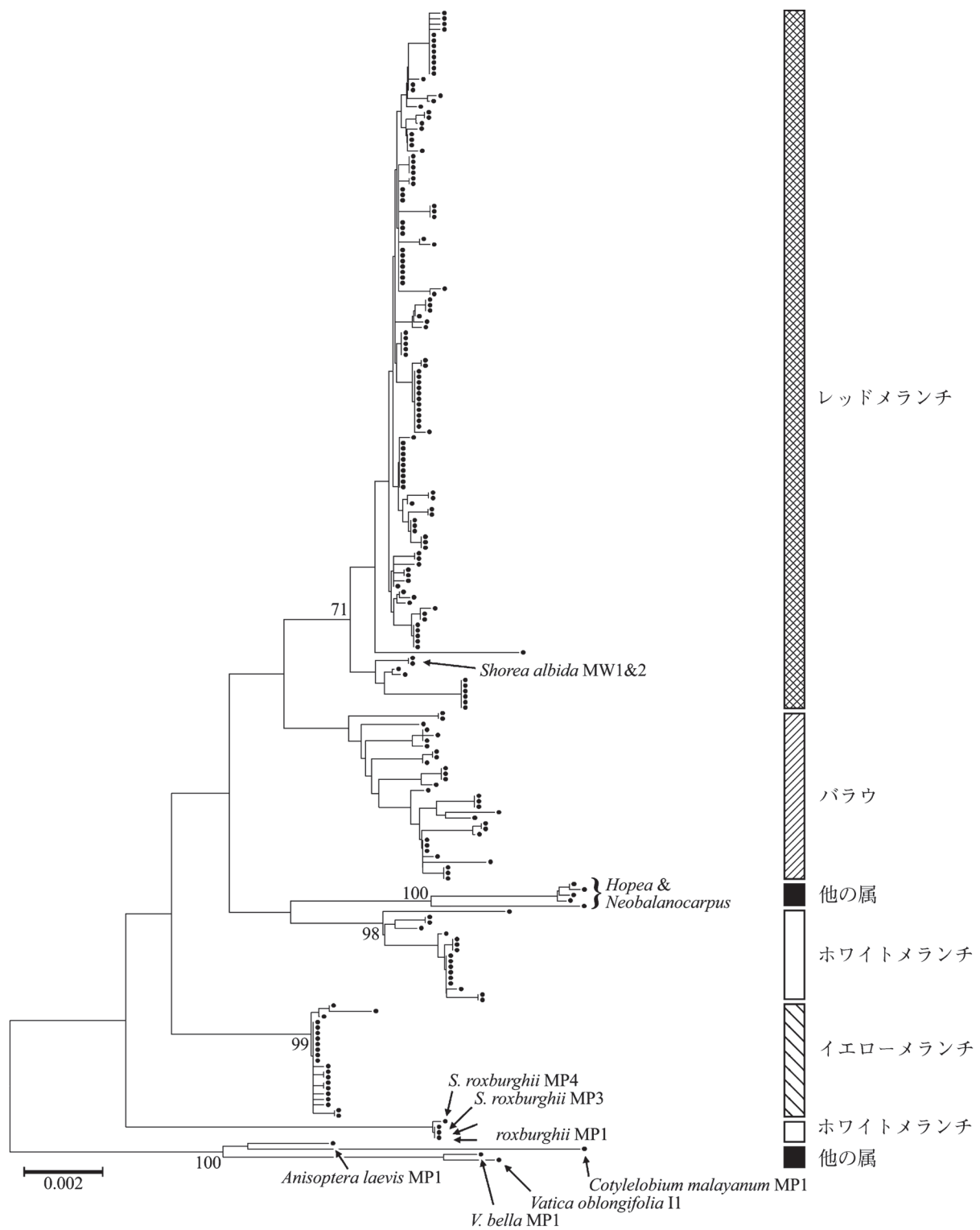


図 1 *Shorea* 属 84 種 200 個体の葉緑体 DNA の塩基配列データに基づく系藤樹。黒丸は分析個体を示す。また枝の分岐の数値はブートストラップ値で分岐の信頼性を示し、100 が最も高い値である。材質の 4 つのグループは明瞭に識別でき、*S. albida* (アラン) も識別できた。

表 1 フタバガキ科材の組織学的及び DNA を用いた樹種同定 (Tsumura et al. 2010 を改変)

材料	材の組織学的特徴			葉緑体 DNA 塩基配列			
	軸方向 柔細胞 の結晶	放射柔 細胞中 の結晶	道管壁 内表面 のイボ 状構造	候補樹種	候補樹種	最終候補樹種	候補樹種の分布
単板 1	有り	有り	有り	<i>S. fallax</i> , <i>S. parvistipulata</i> , <i>S. macrophylla</i> , <i>S. almon</i> , <i>S. johorensis</i> , <i>S. palembanica</i> , <i>S. ovalis</i>	<i>S. fallax</i> , <i>S. johorensis</i> ,	<i>S. fallax</i> <i>S. johorensis</i>	サラワク州北東部, サバ州, ブルネイ マレーシア, スマトラ島, ボルネオ島
単板 2	有り	無し	有り	<i>S. parvifolia</i> , <i>S. smithiana</i> , <i>S. mecistopteryx</i> , <i>S. ovalis</i> , <i>S. rubra</i>	<i>S. parvifolia</i> , <i>S. dasyphylla</i>	<i>S. parvifolia</i>	タイ, マレーシア, インドネシア
単板 3	有り	無し	有り	<i>S. parvifolia</i> , <i>S. smithiana</i> , <i>S. mecistopteryx</i> , <i>S. ovalis</i> , <i>S. rubra</i>	<i>S. parvifolia</i> , <i>S. dasyphylla</i>	<i>S. parvifolia</i>	タイ, マレーシア, インドネシア
単板 4	有り	無し	有り	<i>S. parvifolia</i> , <i>S. smithiana</i> , <i>S. mecistopteryx</i> , <i>S. ovalis</i> , <i>S. rubra</i>	<i>S. parvifolia</i> , <i>S. dasyphylla</i>	<i>S. parvifolia</i>	タイ, マレーシア, インドネシア
単板 5	無し	無し	有り	<i>S. smithiana</i> , <i>S. curtisii</i> , <i>S. scaberrima</i> , <i>S. waltonii</i> , <i>S. ovalis</i> , <i>S. rubra</i>	<i>S. quadrinervis</i> , <i>S. rubra</i>	<i>S. rubra</i>	ボルネオ島北部
単板 6	有り	無し	有り	<i>S. parvifolia</i> , <i>S. smithiana</i> , <i>S. mecistopteryx</i> , <i>S. ovalis</i> , <i>S. rubra</i>	<i>S. parvifolia</i> , <i>S. dasyphylla</i>	<i>S. parvifolia</i>	タイ, マレーシア, インドネシア
単板 7	有り	無し	有り	<i>S. parvifolia</i> , <i>S. smithiana</i> , <i>S. mecistopteryx</i> , <i>S. ovalis</i> , <i>S. rubra</i>	<i>S. argentifolia</i>	<i>S. argentifolia</i>	ボルネオ島北東部
単板 8	有り	無し	v	<i>S. parvifolia</i> , <i>S. smithiana</i> , <i>S. mecistopteryx</i> , <i>S. ovalis</i> , <i>S. rubra</i>	<i>S. argentifolia</i>	<i>S. argentifolia</i>	ボルネオ島北東部
材 1	有り	有り	有り	<i>S. leprosula</i>	<i>S. leprosula</i>	<i>S. leprosula</i>	タイ, マレーシア, インドネシア
材 2	—	—	—	Sect. Rechetioides	<i>S. patoensis</i>	<i>S. patoensis</i>	ボルネオ島北部
合板	—	—	—	—	<i>Hopea</i> spp.		

このように葉緑体 DNA データだけで、種の同定がある程度可能となった。今後も、データベースを充実させていくところにより精度よく種の同定が可能になることが期待される。

地域識別の可能性

Shorea 属の葉緑体 DNA の種同定データベースを作成するにあたり、1 種について 1 から 10 個体のサンプルを分析した。複数個体分析した 47 種のうち 28 種で種内変異がみられた。これらの変異は同種での地域識別に利用できる可能性がある。

広域分布種の *Shorea leprosula* についてボルネオ島、スマトラ島、マレー半島から材料を収集して解析を行ったところ、種内変異は比較的高くボルネオ島とその他（マレー半島、スマトラ島）は明瞭に遺伝的に分化していた。またボルネオ島も北部と南部では遺伝的に異なる系統が存在し、ある程度は識別が可能であるかもしれない。またマレー半島及びスマトラ島の北部では同様の遺伝子タイプであったが

南部は別の遺伝子タイプを保有しており、識別の可能性が示唆された。これらの違いは東南アジアの地形の成立と関係があるようで、約 2 万年前の最終氷期のころはスマトラ島からボルネオ島までは陸続きであり、当時はこの大きな陸地の中心部分はサバンナで、熱帯林は東部と西部の一部にしか分布していなかったとされている。この一部の熱帯林が気候の変化とともに東南アジア全域に広がったものと考えられる。我々が得たデータもこの仮説を支持する結果であった。

DNA による地域識別を行うためには種の分布域全体から多くのサンプルを収集して分析し、地域特異的な DNA の配列があるかどうかを確認する必要がある。今後の研究の進展が待たれる。

手法の可能性と限界

この解析に用いているのは葉緑体 DNA と呼ばれるゲノムであり、これは高等植物では一般的に母性遺伝する。そのため母親の系統しか分からない。も

し雑種ができている場合は、父親が別種でも母親と同種という結論しか得られない。その場合には核 DNA の分析を行う必要がある。また葉緑体 DNA だけだと極めて近縁な種は、識別できない可能性がある。種の定義の問題もあるが、このような場合も核 DNA の分析を行う方がよいかもしい。しかし、木材の DNA から種の同定を行う場合は葉緑体 DNA の方が核 DNA に比べ解析がしやすい。なぜなら核 DNA は細胞あたり 1 個しか存在しないが、葉緑体 DNA は種によって異なるが数十から数百コピー存在している。これは分析対象が多い葉緑体 DNA が分析を行いやすいことを示している。また葉緑体 DNA は DNA バーコード研究で多くの種で塩基配列情報が蓄積されているため種の識別に適している (<http://www.jboli.org/>)。

材からの DNA 抽出はまだ完全ではなく改良の余地がある。特に合板からの DNA 抽出は難しく簡単ではない。微量な DNA でも分析できるように実験手法を改良していくことが重要である。

また地域識別の DNA マーカーについてもどれだけの集団数を分析するかによって精度が異なる。また種がもっている遺伝的多様性及び遺伝的分化の程度によっても解像度が異なる。そのため地域識別の精度を求めると存在している同種の個体全てでデータベースを作成する必要がでてくる。これは実際に

は不可能であるため、分布域広域になるべく多くの集団、例えば東南アジア全域で 40 集団くらいを分析し、でてきたサンプルがどの集団に最も近縁かを統計的に調査する方法が現実的であろう。そのため大きな地域までの識別までは可能となる。また個体数の少ない希少種などは全個体を採取して分析しておくことができる。

これらの情報は違法伐採の抑止力として、東南アジア熱帯林の保全だけでなく持続的林业経営の一助になることを期待したい。

〔参考文献〕 1) Tsumura, Y., T. Kado, K. Yoshida, H. Abe, M. Ohtani, Y. Taguchi, Y. Fukue, N. Tani, S. Ueno, K. Yoshimura, K. Kamiya, K. Harada, Y. Takeuchi, B. Diway, R. Finkeldey, M. Na'iem, S. Indrioko, K. K. S. Ng, N. Muhammad, and S. L. Lee (2010) Molecular database for classifying *Shorea* species (Dipterocarpaceae) and techniques for checking the legitimacy of timber and wood products. *Journal of Plant Research* (in press). 2) 伊藤聡美, 柴田正志, 熊沢 勉, 安部 久, 藤井智之, 緒形 健 (2004) 輸入合板の表面単版 (表板, 裏板) におけるレッドメランチ材の使用割合, *木材工業* 59: 217-220. 3) 吉田和正, 香川 聡, 伊ヶ崎知弘, 西口 満, 向井 譲 (2006) 木材の部位, 保存期間, 熱処理が木材からの DNA 抽出効率と DNA の質に及ぼす影響, *森林総合研究所研究報告*, 5: 289-298