氏　　　名　大　山　幹　成（おお やま もと なり）

学位(専攻分野)　博　士（農　学）

学 位 記 番 号　農　博　第 1145 号
学位授与の日付　平 成 12 年 7 月 24 日
学位授与の要件　学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研究科・専攻　農 学 研 究 科 林 産 工 学 専 攻

学位論文題目　Wood identification of Fagaceae species in Japan by DNA polymorphism
（DNA 多型に基づく日本産ブナ科樹木の樹種同定）

論文調査委員　（主　査）教 授 伊 東 隆 夫　教 授 酒井富久美　教 授 藤 田　稔

## 論　文　内　容　の　要　旨

現在まで，木材の樹種同定は光学顕微鏡などを用いて木材組織の特徴を巨視的あるいは微視的に観察することにより行われてきた。しかし，この方法は，一般的に言って属レベルでの同定が限界であり，より詳細に木材を同定できる方法が求められていた。本論文は，新たな種レベルの樹種同定の方法として，日本産ブナ科樹木を対象としたDNA 多型に基づく木材の樹種同定法の開発を目指して研究を行ったものである。

第1章では，従来の光学顕微鏡による樹種同定法の有効性とその限界を示すため，琵琶湖湖底にある赤野井湾遺跡（縄文後期～鎌倉時代）から出土した2152点の出土木材の樹種同定を行った。その結果，52分類群の樹木が同定された。最も多量に用いられていたのはスギで，57.2%を占め，次いでアカガシ亜属，ヒノキが多用されていた。広葉樹材の6割は，アカガシ亜属をはじめとするブナ科の樹木で占められていた。樹種選択の傾向は，既存の琵琶湖周辺地域のデータと一致していたが，特定のタイプの鋤には大量に強度の低いスギが用いられている例があり，その用途の考察に重要なデータを提示した。

日本産ブナ科樹木はその重要性にもかかわらず，ほとんどの樹種の木材を種のレベルで同定することは不可能である。第2章では，日本産ブナ科樹木の樹種同定を行う基礎となる遺伝情報の収集を行った。同定に必要な種特異的DNA マーカーを探すために，日本産ブナ科樹木20種の葉から抽出したDNA を用い，葉緑体DNA 上の *rbc*L 遺伝子の前半部を調査した。PCR-RFLP 分析および塩基配列の決定に基づき，この20種は7つのDNA タイプに分けられ，ブナ，イヌブナ，シリブカガシ，クリの4種について種に特異的な塩基置換があることが明らかになった。特にブナ属の2種およびシリブカガシについては，光学顕微鏡を用いての樹種同定は不可能であり，この結果はDNA 多型に基づく樹種同定の有効性を示すものである。

第2章で得られたデータから，コナラ属13種は，3つのDNA タイプに分けられた。これらのグループ内で種に特異的な変異を見つけるには，*rbc*L 遺伝子よりもさらに進化速度の速い領域を調べる必要がある。第3章では，コナラ属アカガシ亜属の6種について種特異的マーカーを探すため，この条件を満たす4つの領域を調査した。対象としたのは葉組織に含まれる葉緑体DNA 上の *mat*K, *trn*L のイントロン領域，*trn*F-*trn*L 間のスペーサー領域，*trn*T-*trn*L 間のスペーサー領域の4カ所である。これらの領域の塩基配列を決定したところ，*trn*F-*trn*L 間のスペーサー領域と *trn*T-*trn*L 間のスペーサー領域においてイチイガシに特異的な変異が見つかった。さらに *trn*T-*trn*L 間のスペーサー領域の塩基置換に基づき，6種を3つのグループ（Ⅰ：アカガシ，ツクバネガシ，ウラジロガシ，Ⅱ：アラカシ，シラカシ，Ⅲ：イチイガシ）に分けることができた。この結果は他の形態的な特徴の相違と一致した。

第3章の結果により，*trn*T-*trn*L 間のスペーサー領域に基づいてイチイガシを同定し，他の5種が2つのグループに分けられる可能性があることが明らかとなった。この領域を用いて，木材についての樹種同定が可能であることを示すためには，この領域の種内変異を調査し，さらに木材からDNA を抽出，増幅できることを示す必要がある。第4章では日本国内の様々な地域由来のアカガシ亜属材のサンプル6種26個体の樹種同定を試みた。粉末化した木材サンプルから，改変した

CTAB 法で DNA を抽出した。アガロースゲル電気泳動の結果，木材に残存している DNA は，著しく断片化していることが明らかになった。*trn*T-*trn*L 間のスペーサー領域の一部を増幅するプライマーを設計し，このDNA を鋳型に PCR 法で増幅を行い，塩基配列を決定した。その結果，供試した26個体の木材サンプルは，葉から得られたデータと同様に３つのグループ（Ⅰ：アカガシ，ツクバネガシ，ウラジロガシ，Ⅱ：アラカシ，シラカシ，Ⅲ：イチイガシ）に分けられることがわかり，木材を用いて DNA 多型に基づく樹種同定が可能であることが示された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

光学顕微鏡による木材の樹種同定法は，考古学，古生物学など様々な分野に多大な貢献をしてきた。しかしながら，木材組織学に基づく樹種同定では，原則的に，属レベルでの同定が限界であり，より詳細に木材を同定できる方法が求められていた。本論文は，光学顕微鏡による従来の方法を補完するため，新たな樹種同定法として，DNA 多型に基づく木材の樹種同定法の開発を試みたものであり，評価すべき主な点は以下の通りである。

1．従来の光学顕微鏡による樹種同定法の有効性とその限界を示すため，琵琶湖湖底にある赤野井湾遺跡から発掘された2152点の出土木材の樹種同定を行った。その結果，スギが全体の約６割を占め，次いでアカガシ亜属，ヒノキなどが多用されていたことを明らかにした。また広葉樹材の６割にブナ科樹木が使用されていたことを明らかにした。

2．日本産ブナ科樹木20種の樹種同定に必要な遺伝情報を得るため，rbcL 遺伝子の塩基配列を調査した。その結果，20種が７つの DNA タイプに分けられること，ブナ，イヌブナ，シリブカガシ，クリの４種については，種に特異的な塩基置換があることを明らかにした。特にブナ属の２種とシリブカガシについては，光学顕微鏡を用いての樹種同定は不可能であり，この結果は DNA 多型に基づく樹種同定の有効性を示すものである。

3．光学顕微鏡による樹種同定が不可能なコナラ属アカガシ亜属の６種について，葉緑体 DNA 上の４カ所の領域を調査した結果，*trn*F-*trn*L 間のスペーサー領域と *trn*T-*trn*L 間のスペーサー領域においてイチイガシに特異的な変異を見つけた。さらに *trn*T-*trn*L 間のスペーサー領域の塩基置換に基づき，６種を３つのグループ（Ⅰ：アカガシ，ツクバネガシ，ウラジロガシ，Ⅱ：アラカシ，シラカシ，Ⅲ：イチイガシ）に分けられることを明らかにした。

4．アカガシ亜属材６種26個体をサンプルとして実際に木材から DNA を抽出し，*trn*T-*trn*L 間のスペーサー領域の一部を PCR 法で増幅した。塩基配列を決定した結果，葉と同様にアカガシ亜属６種の材は３つのグループに分けられ，DNA 多型に基づく木材の樹種同定が可能であることを示した。

以上のように，本論文は日本産ブナ科樹木を DNA 多型に基づき樹種同定しようとした最初の試みであり，木材組織学および木材の樹種同定に関わる関連諸分野への寄与が大きい。

よって本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお，平成12年５月18日，論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果，博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。