

森林総合研究所

交付金プロジェクト研究 成果集 36

合法性・持続可能性木材の証明のための 樹種・産地特定技術の開発

独立行政法人 森林総合研究所

2011. 12

「交付金プロジェクト」は、平成13年度に森林総合研究所が独立行政法人となるにあたり、これまで推進してきた農林水産技術会議によるプロジェクト研究（特別研究など）の一部、および森林総合研究所の経費による特別研究調査費（特定研究）を統合し、研究所の運営費交付金により運営する新たな行政ニーズへの対応、中期計画の推進、所の研究基盤高揚のためのプロジェクト研究として設立・運営するものである。

この成果集は、交付金プロジェクト研究の終了課題について、研究の成果を研究開発や、行政等の関係者に総合的且つ体系的に報告することにより、今後の研究と行政の連携協力に基づいた効率的施策推進等に資することを目的に、「森林総合研究所交付金プロジェクト研究成果集」として公表するものである。

ISSN1349－0605

森林総合研究所交付金プロジェクト研究成果集 36

「合法性・持続可能性木材の証明のための樹種・

産地特定技術の開発」

発行日 平成23年12月31日

発 行 独立行政法人森林総合研究所

〒305－8687茨城県つくば市松の里1番地

電話 029－873－3211（代表）

研究課題：合法性・持続可能性木材の証明のための樹種・産地特定技術の開発

目 次

研究の要約	1
第1章 熱帯材の違法性のパターン化	10
第2章 分光スペクトルによる簡易樹種識別技術の開発	13
第3章 酸素・炭素安定同位体比等年輪情報を用いた木材産地識別手法の確立	17
第4章 フタバガキ科樹木の DNA による樹種識別・産地識別マーカーの開発	23
第5章 熱帯材木材製品からの効率的な DNA 抽出および増幅技術の開発	28

研究の要約

I 研究年次及び予算区分

研究年次：平成 20 年～平成 22 年（3 カ年）

予算区分：運営費交付金（交付金プロジェクト）

II 主任研究者

主査：関西支所長 藤井 智之

取りまとめ責任者：木材特性研究領域 安部 久

プロジェクトオフィサー：研究コーディネータ

福山 研二 （平成 20 年 4 月 1 日～平成 22 年 3 月 31 日）

松本 光朗 （平成 22 年 4 月 1 日～平成 23 年 3 月 31 日）

III 研究場所

森林総合研究所 本所

IV 研究目的

違法伐採が国際的な問題となり、違法に伐採された木材の流通を阻止する取り組みが世界的に進められてきている。その中で、木材及び木材製品の樹種と産地を表示することは違法に伐採される木材の流通阻止に一定の効果があるとして、先進国では法の整備が進められている。たとえば米国においては、野生生物の輸出入に関する法律であるレイシー法（Lacey Act）を 2008 年に改正し、輸入される全ての木材・木材製品に樹種名と原産国を含む申告を課している。わが国においては、林野庁の後援により木材表示推進協議会が全国木材組合連合会によって発足し、木材取扱業者の自主的な木材の樹種と産地の表示を推進している。

一方で、木材の樹種や産地といった情報の表示を科学的に証明する技術開発も進められている。たとえば従来の顕微鏡を用いた分析方法に加えて、DNA 分析、化学成分分析、同位体分析も適用が可能になってきている。しかしながら、樹木においては木材として利用されている樹種の数が多く、すべての樹種を対象にデータベースを構築して分析を実施することは非常に困難である。

そのため本研究においては、対象となる樹種をワシントン条約の対象樹種となっているラミン（*Gonystylus* 属：Gonystylaceae）、世界的に高級材として利用量の多いチーク

(*Tectona grandis* : クマツヅラ科)、日本で最も多く利用されている南洋材メランティ (*Shorea* 属: フタバガキ科) の木材に限定して研究を行った。ラミンについては、化学成分分析を用いて他の樹種から分別する方法を開発する。チークについては、安定同位体比を用いて産地を判別する技術を開発する。

メランティについては、フタバガキ科樹木の世界的に共通な DNA バーコード解析を進めるとともに、広域生育樹種である *Shorea parvifolia* および *S. leprosula* について地域識別 DNA マーカーを開発し、同時に木材製品等から効率的に DNA を抽出・増幅するため技術を開発することで、メランティ材製品の樹種と産地を判別する。また、社会科学的な分析方法によって、違法性のある木材を違法性のタイプごとに体系化し、開発した技術の効率的な応用を進める。

V 研究方法

第1章

熱帯材の違法伐採に関する情報を収集・整理し、熱帯材の違法性を分類した。インドネシア・ジャワ島の林業公社 **Perhutani** を訪問し、違法伐採に関して聞き取るとともに統計資料および報告書を収集し、違法伐採のパターンを整理した。

第2章

フタバガキ科の各樹種の木材に含まれる抽出成分を核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて分析し、抽出成分の組成の樹種による違いを調べる。ラミン心材に含まれる抽出成分を単離し、機器分析によって構造決定するとともに、赤外吸収 (IR) スペクトル、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて、化学成分の情報からラミン材とその類似樹種とを簡易に判別する方法を検討する。

第3章

インドネシア産、ミャンマー産、インド産、ガーナ産の複数個体のチークの年輪幅の時系列から国別標準年輪幅時系列を作成し、それを元にチークの産地国が判別可能であるかを検討した。インドネシア・ジャワ島中部において入手したチーク試料の年輪ごとの炭素・酸素同位体比の時系列を作成し、成長期の降水量との相関により産地判別を試みた。

第4章

遺伝子バーコードデータベースを構築するために東南アジア広域から DNA サンプルを収集した。それらについて葉緑体 DNA の *matK* 及び *rbcL* の塩基配列を解読した。産地識別のために広域分布種である *Shorea leprosula* と *S. parvifolia* の集団サンプルをボルネオ島、スマトラ島、マレー半島から収集し、葉緑体 DNA の遺伝子間領域の塩基配列を解読し、

遺伝的多様性、遺伝的分化や地域識別可能なマーカーの探索などを行い、地域識別がどの程度まで可能かを検討した。

第5章

マレーシア半島部で製材されたフタバガキ科 *Shorea* 属木材およびマレーシア・ボルネオ島で伐採された同属木材から日本で製造された合板及び合板用単板を用いて、DNA による樹種識別の可能性を検討した。木材からの DNA 検出のための最適な条件として、抽出に供する試料の形状と抽出方法、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による増幅の条件及び増幅できる DNA の長さについて検討した。最終的には、増幅された DNA の塩基配列を決定し、森林総合研究所で構築した *Shorea* 葉緑体 DNA データベースを検索し、配列に基づいて樹種を判定した。

VI 研究結果

研 究 計 画 表

構成課題	H20	H21	H22
熱帯材の違法性のパターン化（第1章）	○	○	○
分光スペクトルによる簡易樹種識別技術の開発（第2章）	○	○	○
酸素・炭素安定同位体比等年輪情報を用いた木材産地識別手法の確立（第3章）	○	○	○
フタバガキ科樹木の DNA による樹種識別・産地識別マーカーの開発（第4章）	○	○	○
熱帯材木材製品からの効率的な DNA 抽出および増幅技術の開発（第5章）	○	○	○

第1章

熱帯材の違法性について、生産・加工・流通の各過程での違法行為に分類し、さらに最も重要な「生産の違法行為」の中でも主要な「伐採の違法行為」について、①アクター、②伐採場所、③伐採対象木の3ファクターで整理し、11パターンの違法伐採に分類した。それを元に、実際にインドネシアで発生した事例について検証した。

インドネシアでは1998年から違法伐採が多発し、ピーク時の1998～2001年にインドネシアで伐採された木材の73%から80%を越える量が違法伐採されたとみられているが、2002年以降違法伐採材の割合は減少し、2006年には40%にまで下がったと推定される。ジャワ島では、ピーク時に年間250～300万本が違法に伐採されたが、2001年にジャワ島の全人工林を管理する違法伐採対策として住民参加型森林管理システムを導入した結果、2008年には年間5万本までに縮小するなど大幅な抑制に成功した。

また、シンガポールにある熱帯の合法材証明を扱う企業の方法を調査した。合法性証明

の方法として「伐採地の切り株」と「製材工場の製材品」の DNA 分析による個体識別方法を採用していた。樹種・産地識別の技術は材が合法であることを証明できないので合法性証明には有効でないものの、材が（樹種や産地について）違法であることを検出するのは可能であり、樹種・産地偽装などの違法性検出には有用であると考えられる。

第2章

フタバガキ科木材の心材メタノール抽出物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定し、標品と比較することにより、個々の成分を単離することなく、抽出成分の存在を明らかにすることができた。属レベルで抽出成分の分布に特徴があった。*Parashorea* 属、*Dipterocarapus* 属、*Dryobalanops* 属ではフェノール酸が多かった。*Dryobalanops* 属はエラグ酸を多く含んでおり、隣接するフェノール性水酸基に対して発色する塩化第二鉄水溶液を木粉に含浸させると青黒く呈色するため、簡易識別が可能であった。*Anisoptera* 属、*Hopea* 属、*Vatica* 属ではレスベラトロールオリゴマー類が多く、特に *Anisoptera* では hopeaphenol を多く含んでいた。レスベラトロールオリゴマー類の分布を比較すると、hopeaphenol はフタバガキ科全体に広く分布していたが、shorealactone は *Shorea* 属では多いものの、他の属では少なかった。

ラミン材のメタノール抽出物から、フェノール酸類、リグナン類、フラボノイド類を単離し、塩化アルミニウムを検出試薬として TLC を行い、紫外線ランプ下での sakuranetin などの化学物質の蛍光を調べることで、ラミン材とそれ以外の材を区別することができた。IR スペクトルによるラミンと類似した樹種の判別では、区別が容易な樹種とそうでない樹種とがあった。

第3章

インド、ミャンマー、インドネシア、ガーナで得られたチーク材を用いて、国別の年輪幅指数時系列間の相関係数をすべての時系列に共通する 1967 年～1999 年について計算した。最も相関が高かったミャンマーとインド間でも 0.16 であり、有意な相関は得られなかった。また、成長が良い年と悪い年を示す指標年もほとんど一致しなかった。これらのことは、年輪幅指数時系列が国によって異なる変動を示すこと意味し、国別の産地判別が可能であることを示唆している。

個体別、方向別に作成した年輪幅指数時系列と国別標準年輪幅指数時系列との間の相関から産地を判別する際の境界を p 値の大きさで定め、 p が 0.01 のときに年輪年代が誤っているときに誤判定の危険性を確認したところ、年輪年代の決定と産地判別を同時に行うことが、産出国の判別率を高めると考えられる。

中央ジャワ産のチーク年輪の酸素同位体比の年変化および季節変化（一年輪内での変化）を測定したところ、成長期の始めと終わりに同位体比が高く、中間で低いという結果が得

られた。2月の降水量との相関を計算することにより、中央ジャワ産のチーク試料の産地判別を行ったところ、「中央ジャワ産」という結果が得られ、産出国レベルだけではなく、国内のどの地域かというレベルまで推定することができた。

第4章

DNA バーコードでは、*Anisoptera* 属 4 種、*Cotylelobium* 属 1 種、*Dipterocarpus* 属 14 種、*Dryobalanops* 属 3 種、*Hopea* 属 10 種、*Neobalanocarpus* 属 1 種、*Parashorea* 属 2 種、*Shorea* 属 50 種、*Upuna* 属 1 種、*Vatica* 属 5 種で、すべての属にわたっている。得られた塩基配列データの長さは、*rbcL* の一部については 625～671 塩基対 (bp)、*matK* の一部については 826～846 bp であった。これらの配列について、マルチプルアラインメントの後、近隣結合法により系統樹を作成した。*rbcL* 領域、*matK* 領域のシーケンスデータをそれぞれ単独で用いた場合には、樹種識別は不十分であったが、2つの領域を合わせて解析することで、樹種識別はほぼ可能であることが示された。

マレーシア及びインドネシアの広域に分布する *S. leprosula* の遺伝的分化を調査した結果、ボルネオ島の集団とそれ以外（マレー半島、スマトラ島）で大きな遺伝的な違いが見られた。葉緑体 DNA の 5 領域（合計 4393 bp）を解析した結果、21 のハプロタイプが検出された。集団間の遺伝的な違いを表す遺伝子分化係数は $F_{st}=0.5851$ と高い値を示した。これから *S. leprosula* については、葉緑体 DNA の多型データで大きな地域の産地識別はある程度可能であることが示された。核の DNA マーカーでは同様にボルネオ島とそれ以外（マレー半島とスマトラ島）が遺伝的に分化していたが、遺伝子分化係数は $F_{st}=0.089$ と葉緑体に比べ低かった。DNA による地域識別は島レベルでは可能であるが、狭い地域を特定するには至らなかった。

第5章

DNA 抽出液を PCR で増幅する場合、板目切片を 60℃の DNA 抽出溶液中で超音波処理する方法では、木粉から抽出する場合と同等の増幅結果が得られた。マレーシア半島の製材所から得たレッドメランティ製材は *S. leprosula* と判別された。日本で採取した合板用単板は、2枚が *S. leprosula*、1枚が *S. parvifolia* または *S. dasyphylla* であった。

レッドメランティの乾燥単板および合板においては分析に十分な量と質の DNA を得ることは困難であったが、切片を作製して抽出した DNA を、カラム精製段階で濃縮後、PCR を行ったところ、増幅領域を 200 bp 程度に設定すると増幅される場合があった。

VII 成果の利活用

違法に伐採された木材の流通を阻止するため、国際社会は、流通段階で樹種・産地等の表示の適正性を監視することを求めている。表示の正確性を検証するためには、木材を科

学的に調べ、樹種や産地などの情報を得ることが必要であり、樹種・産地識別の技術は、樹種・産地偽装などの違法性検出に有用である。本研究プロジェクトにおいては、違法伐採され、流通される可能性が高いと考えられる東南アジア産のレッドメランティとラミンの樹種識別方法、チークの産地判別方法を開発した。これらを、現在実施されている木材の樹種・産地識別方法の中に組み込んで実用化する。

要約すると、科学的な分析が必要となる木材や木製品について、木材の組織学的な分析をすることによって、属レベルで樹種が特定される。それによりそれらの樹種が生育している範囲が限定され、産地もある程度推定できる。1) 木材の組織学的な分析で樹種がレッドメランティであった場合には、DNA 分析によって、レッドメランティの樹種を種レベルで特定することができる。それにより、その樹種の生育範囲が特定され、ある程度の産地を推定できる。2) 木材の組織学的な分析で樹種がラミンであった場合には、化学成分分析によってラミン材であることを確認する。同樹種はワシントン条約（CITES）登録樹種などの国際的に保護の対象とされているため、樹種識別が直接木材の違法性の取り締まりにつながる。3) 木材の組織学的な分析で樹種がチークであった場合には、年輪幅時系列を用いた産地判別法および安定同位体分析によって、チークの原産国を判別する。それにより、違法性の高いチーク材を市場から閉め出すことができる。

このように、本研究で取り上げた樹種は世界に流通する木材の樹種のうちでもほんの一部であるが、それらはすべて東南アジア地域で生産される木材の中でも違法性の高い木材が含まれている可能性が比較的高い樹種である。得られた成果は、木材の樹種や産地の申告や表示内容の適正性を科学的証明に証明する個別事例として、公的検査機関での利用が期待される。また、本研究の成果は、森林保護のための地球環境政策の実行を技術的な面から支援できる。成果を活用するため、共同研究機関であるマレーシア森林研究所及びガジャマダ大学において、現場での適用を進めることにしている。

VIII 今後の問題点

本プロジェクトにおいては、違法性のある木材またはその可能性が高い木材として、レッドメランティ、ラミン、チークを取り上げ、研究開発を進めたが、木材の種類や産地を網羅的に調べるためには、これだけでは不十分である。樹種や産地を判別する精度を高めるため、いくつかの方法を組み合わせ、事例に応じて、手法を開発していく必要がある。また、技術開発と平行して重要なのがデータベースの構築である。これは、すべての分析方法において必須であり、樹種・産地識別の精度向上のためデータ収集が急がれる。そのためにも現在約 26,000 点の木材標本がある森林総合研究所の木材標本庫をさらに充実させ、平行して行っている樹木の DNA データの収集も継続して行う必要がある。

IX 研究発表

1. Abe H., Fujii T. (2008) Horizontal resin canals of *Shorea* spp. Journal of Wood Science 54: 520 (査読有)
2. Kagawa A., Abe H., Fujii T., Itoh Y. (2008) Stable isotopes and inorganic elements as potential indicators of timber geographic origin. Eos Trans. AGU, 89(48), doi:10.1029/2008EO4800112008.12 (査読無)
3. 香川聡・安部久・藤井智之・伊藤優子 (2009) 安定同位体比による木材の産地識別 第 59 回木材学会要旨集 (査読無)
4. 加藤厚、菱山正二郎 (2009) フタバガキ科木材のケモタクソノミー (1) NMR スペクトルによる *Shorea* 属以外の木材の分類 第 59 回日本木材学会研究発表要旨集(査読無)
5. 加藤厚 (2009) ケモタクソノミーを利用した木材の識別, 生物資源 2(4), 8-11. (査読無)
6. 吉田和正・安部久・津村義彦・藤井智之 (2009) 乾燥されたレッドメランティ (*Shorea* 属 *Rubroshorea* 節) 材の樹種識別, 第 59 回日本木材学会大会研究発表要旨集(査読無)
7. Ng K. K. S., Lee S. L., Tsumura Y., Ueno S., Ng C. H., Lee C. T. (2009) EST-SSRs isolated from *Shorea leprosula* and their transferability to 36 species within the Dipterocarpaceae. Molecular Ecology Resources 9: 393-398 (査読有)
8. 安部久、香川聡、藤井智之、吉田和正 (2009) 木材・木製品の樹種・産地表示と科学的検証の現状と今後. 日本分析化学会・表示分析技術研究懇談会 第 2 回講演会 (査読無)
9. 香川聡、Leavit S. W. (2009) 安定同位体比時系列による木材の産地識別. 日本分析化学会・表示分析技術研究懇談会 第 2 回講演会 (査読無)
10. Fujii T., Abe H., Kagawa A., Kato A., Yoshida K., Tsumura Y., Yoshimaru H., Miyamoto M. (2009) FFPRI research project on the improved methods of identifying tree species and their origins of Southeast Asian timbers. Abstract of 7th Pacific Regional Wood Anatomy Conference. P.6 (査読無)
11. Abe H., Watanabe U., Yoshida K., Kuroda K., Zhang C., Lim S.C. (2009) DNA distribution and its change in wood during some processes for the utilization. Abstract of 7th Pacific Regional Wood Anatomy Conference. P.8 (査読無)
12. Abe H., Yoshida K., Zhang C., Watanabe U., Kuroda K., Tsumura Y., Fujii T. (2010) Application of DNA analysis to wood identification. Final program of IAWA/IAWS/IUFRO Joint Conference. 16. (査読無)
13. Kagawa A., Leavitt S.W. (2010) Stable carbon isotopes of tree rings as a tool to

- pinpoint the geographic origin of timber. Journal of Wood Science 56: 175-183 (査読有)
14. 加藤厚 (2010) 高耐久性輸入木材の抽出成分, 木材保存 36: 2-7 (査読有)
 15. 加藤厚、菱山正二郎 (2010) ラミン (*Gonystylus bancanus* Kurz.) 材から単離した新規ネオリグナンの構造, 第 60 回日本木材学会研究発表要旨集 (査読無)
 16. 津村義彦 (2010) フタバガキ科樹木の DNA による樹種識別. 海外の森林と林業 79: 21-25 (査読無)
 17. 吉田和正、安部久、吉村研介、津村義彦、藤井智之 (2010) *Shorea* 属製材品および合板用単板の樹種識別. 第 60 回日本木材学会研究発表要旨集 (査読無)
 18. 安部久 (2010) 木材の樹種識別の重要性と研究の現状. 山林 1517: 87-93 (査読無)
 19. Masuda, S., Tani N., Ohtani M., Tsumura Y. (2011) Characterization of 12 microsatellite loci for important tropical tree species *Shorea maxwelliana* and *S. laevis* (Dipterocarpaceae). Conservation Genetics Resources 2: 109-111 (査読有)
 20. Ohtani M., Ueno S., Tani N., Lee L.S., Tsumura Y. (2011) Twenty-four additional microsatellite markers derived from expressed sequence tags of the endangered tropical tree *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae). Conservation Genetics Resources (DOI: 10.1007/s12686-011-9546-9, in press) (査読有)
 21. Tsumura, Y., Kado T., Yoshida K., Abe H., Ohtani M., Taguchi Y., Fukue Y., Tani N., Ueno S., Yoshimura K., Kamiya K., Harada K., Takeuchi Y., Diway B., Finkeldey R., Na'iem M., Indrioko S., Ng K. K. S., Muhammad N., Lee S. L. (2011) Molecular database for classifying *Shorea* species (Dipterocarpaceae) and techniques for checking the legitimacy of timber and wood products. Journal of Plant Research 124: 35-48 (査読有)
 22. 安部久、吉田和正、渡辺宇外 (2008) 木材の DNA を分析するための前処理方法. 特願 2008-249892. 特開 2010-75152

X 研究担当者

第 1 章

宮本基杖 (林業経営・政策研究領域、現 北海道支所)

第 2 章

加藤厚 (バイオマス化学研究領域、現 産学官連携推進室)

第 3 章

香川聡 (木材特性研究領域)、藤原健 (木材特性研究領域)

第4章

津村義彦（森林遺伝研究領域）、吉丸博志（森林遺伝研究領域、現 多摩森林科学園）、吉村研介（森林遺伝研究領域）

第5章

安部久（木材特性研究領域）、吉田和正（生物工学研究領域）

第1章 熱帯材の違法性のパターン化

ア 研究目的

熱帯材の違法性に関する情報を分類・整理することにより、樹種・産地識別技術の違法材検出への有益性を判断する材料を提供する。また、事例として違法伐採が深刻なインドネシアを取り上げる。

イ 研究方法

熱帯材の違法伐採に関する情報を収集・整理し、熱帯材の違法性を分類する。インドネシア・ジャワ島の林業公社 Perhutani を訪問し違法伐採に関して聞き取るとともに統計資料および報告書を収集した。ジャワ島以外については文献調査を行った。

ウ 結果

熱帯材の違法性は、まず生産・加工・流通の3つの違法行為に分かれる。最も重要なのが「生産の違法行為」であり、その中でも主要な「伐採の違法行為」について、アクター、伐採場所、伐採対象木の3ファクターで整理し、11パターンの違法伐採に分類した(表1)。例えば、ジャワ島で起こった違法伐採を、「伐採の違法行為」の①アクター、②場所、③木についてみると、①アクターは、ライセンス不保有者で、ジャワ都市部の資本家が主体である。かれらが盗伐を組織し、主に製材業、家具業などの輸出業者に売る。地元住民は組織的盗伐の下働きを行うとともに、土地耕作のアクターである。②「伐採の違法行為」の場所は、伐採許可地域(生産林内)である。③「伐採の違法行為」の木は、許可木と不許可木(生産林内の過剰伐採、中小径木、年次伐採計画の対象木以外など)の両方である。

表1 「伐採の違法行為」のパターン：アクター、場所、木の3要素で整理

	アクター	ライセンス保有者	ライセンス不保有者	
場所		企業	組織的	地域住民
コンセプション内	許可地	不許可木	許可木 不許可木	許可木 不許可木
	局所的に不許可地	不許可木	不許可木	不許可木
コンセプション外	国立公園、保護林	不許可木	不許可木	不許可木

熱帯の合法材証明を扱う企業 Certisource (シンガポール) は、合法性証明の方法として「伐採地の切り株」と「製材工場の製材品」の大量サンプルを用いた「DNA分析による個体識別」を採用していた。この方法はサンプリングに多大な労力がかかるため、価格はか

なり高い（FOB 価格の 3 %）。ここで得た情報から、「樹種・産地識別」の技術は「材が合法であること」を証明できないので合法性証明には有効でないものの、「材が（樹種や産地について）違法であること」を検出するのは可能であり、樹種・産地偽装などの違法性検出には有益であると考えられる。

一方、インドネシアでは金融危機の影響で政権崩壊した 1998 年から違法伐採が多発した。近年の違法伐採は大幅に減少したものの、依然大きな割合を占めている。違法伐採ピーク時の 1998～2001 年にインドネシアで伐採された木材の 73%から 80%を越える量が違法伐採されたとみられているが、2002 年以降伐採量に占める違法伐採材の割合は減少し、2006 年には 40%にまで下がったと推定される（Lawson & MacFaul, 2010）。また、インドネシア政府の報告（2007 年）によると、41 のうち 37 国立公園で違法伐採が依然行われていた。

インドネシアの中でジャワ島は違法伐採の抑制に成功している。ピーク時の 1999 年～2001 年に年間 250～300 万本が違法に伐採されたが、2001 年にジャワ島の全人工林を管理する林業公社が違法伐採対策として住民参加型森林管理システムを導入した結果、翌年の 2002 年から盗伐が減少しはじめ、2008 年には年間 5 万本までに縮小するなど大幅な抑制に成功した。

エ 考察

「樹種・産地識別」の技術は、合法性証明には有効でないものの、樹種・産地偽装などの違法性検出に有益である。

熱帯材の違法性を 11 パターンに分類した。このような分類は、「樹種・産地識別」の技術がどのようなパターンの違法材に適用できるかを判断する材料を提供すると考えられる。

オ 今後の問題的

樹種産地識別技術が違法性摘出にどの程度有効かを具体的に検証することが今後の課題である。

カ 要約

熱帯材の違法性を、生産・加工・流通の 3 つの違法行為に分け、中でも重要な「生産の違法行為」における「伐採の違法行為」について、アクター、伐採場所、伐採対象木の 3 ファクターで整理し、11 パターンの違法伐採に分類した。熱帯材の違法性の分類は、「樹種・産地識別」の技術がどのようなパターンの違法材に適用できるかを判断する材料を提供する。

違法伐採が深刻なインドネシアの現状について、近年国内の違法伐採が大幅に減少傾向

にあるものの、依然大きな割合を占めることを報告するとともに、違法伐採対策として住民参加型森林管理が成功しているジャワ島の事例を報告した。

キ 引用文献

Lawson, S., MacFaul, L. (2010) Illegal logging and related trade: indicators of the global response. Chatham House (http://www.chathamhouse.org/sites/default/files/public/Research/Energy,%20Environment%20and%20Development/0710pr_illegallogging.pdf)

(林業経営・政策研究領域（現 北海道支所） 宮本基杖）

第2章 分光スペクトルによる簡易樹種識別技術の開発

ア 研究目的

植物分類の手法の一つとして、化学成分の分析結果に基づいて植物を分類するケモタクソノミー（化学植物分類）が古くから行われている。木材の化学成分の内、主要成分（セルロース、ヘミセルロース、リグニン）は樹種による差は小さいが、フェノール類のような抽出成分は心材に多く含まれており、量的にも質的にも樹種による特徴が大きく現れるため、この分布に基づく大まかな分類が可能である（笹谷，1983）。

Shorea 属はフタバガキ科の中では最も種類が多く、経済的にも重要な属であるが、木材流通や利用の現場においては、心材色の特徴などを基にホワイトメランティ、イエローメランティ、レッドメランティ、バラウ（セランガンバツ）に分類され、これらはそれぞれ *Anthoshorea*、*Richetioides*、*Rubroshorea*、*Shorea* の4つの節に相当する。*Shorea* 属の心材抽出成分の分布を精査した結果、レスベラトロールオリゴマー類およびガリックス酸などの加水分解タンニン類が存在し、ガリックス酸を指標成分としてレッドメランティを識別できることが明らかとなった（加藤，2008）。

木材からの心材成分の抽出・単離・構造決定には多大な労力を要するため、多数の構成種を有する科・属における分布を明らかにすることは困難であり、分光スペクトルの活用による成分分布の把握と樹種識別技術が求められている。本研究では NMR（核磁気共鳴）スペクトルによりフタバガキ科木材の属レベルでの成分分布を明らかにした。さらに、IR（赤外吸収）スペクトルや TLC（薄層クロマトグラフィー）の活用により、ワシントン条約（CITES）附属書掲載樹種であり違法伐採が問題となっているラミン（*Gonystylus bancanus*）材とその類似樹種との識別技術を開発した。

イ 研究方法

1. フタバガキ科木材の NMR スペクトルによる識別

森林総合研究所木材標本庫で所蔵するフタバガキ科木材標本を試料とし、心材木粉をメタノール抽出し、粗抽出物の ^1H -NMR スペクトルを測定した。そのスペクトルをレスベラトロールオリゴマー類や加水分解タンニン類の標品のスペクトルと比較し、成分分布を明らかにした。

2. ラミン材の識別

（1）ラミン材の心材成分の解明

ラミン材をメタノール抽出し、メタノール抽出物のヘキサン不溶部を遠心遠心液々分配クロマトグラフィー（ CHCl_3 - MeOH - H_2O ）、Sephadex LH-20 のカラムクロマトグラフィー

ー (EtOH) 等で心材成分を単離した。単離した成分について、NMR、MS (質量分析法) 等の機器分析により、その構造を決定した。

(2) 類似樹種との識別

ラミン材および類似木材 (トラフィックイーストアジアジャパン, 2006) として掲載されている *Jacaranda copaia* (パラパラ)、*Simarouba amara* (マルパ)、*Brosimum alicastrum* (カポモ) について IR スペクトルを測定するとともに、その木粉をメタノール抽出し、抽出物の TLC による識別を行った。

ウ 結果

1. フタバガキ科木材の NMR (核磁気共鳴) スペクトルによる識別

表 1 フタバガキ科木材における心材成分の分布

	bergenin	フェノール酸類				レスベラトロールオリゴマー類									
		vamlinic acid	syringic acid	gallic acid	ellagic acid	ε-vimiferin	ampelopsin A	balanocarpol	heimiol A	hopeafuran	shorealactone	vaticanol G	hopeaphenol	isohopeaphenol	vaticanol B
Anisoptera (11)		+											+++		
Cotylelonium (1)						+						+++			
Hopea (15)	+						++	++	++	+			++	+	
Vatica (15)						+++	++				+	+	++		+
Neobalanocarpus (1)								++	++				++		
Upuna (1)						+++									+
Pentacme (2)		+	+					+					+		
Vateria (1)	+++												++		+
Parashorea (8)	++	++	++	+	++								+		
Dipterocarapus (9)	++	+	+	++											
Dryobalanops (8)	++	+	+	+	+++										
Monotes (2)	+		+	++	+										
Shorea (White) (12)		+	+		+		+	++			++				
Shorea (Yellow) (12)		+	+		++						+++		+		
Shorea (Red) (35)	++	+	+	+++	+						++				
Shorea (Balau) (20)	+	+	+	+	+						+++				

カッコ内は供試種数

フタバガキ科木材の心材メタノール抽出物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定し、標品と比較することにより、個々の成分を単離することなく、抽出成分の存在を明らかにすることができた（表1）。

属レベルでは、その分布に特徴があり、*Parashorea* 属、*Dipterocarapus* 属、*Dryobalanops* 属ではフェノール酸が多かった。特に *Dryobalanops* 属はエラグ酸を多く含んでおり、隣接するフェノール性水酸基に対して発色する塩化第二鉄水溶液を木粉に含浸させると青黒く呈色するため、簡易識別が可能であった。

Anisoptera 属、*Hopea* 属、*Vatica* 属ではレスベラトロールオリゴマー類が多く、特に *Anisoptera* では hopeaphenol を多く含んでいた。レスベラトロールオリゴマー類の分布を比較すると、hopeaphenol はフタバガキ科全体に広く分布していたが、shorealactone は *Shorea* 属では多いものの、他の属では少なかった。

2. ラミン材の識別

ラミン材のメタノール抽出物から、フェノール酸類、リグナン類、フラボノイド類を単離した。ラミン材中のフラボノイド類は5位に水酸基を有するが、これらはアルミニウムとのキレート形成によって深色化するため、塩化アルミニウムを検出試薬として TLC を行った。その結果、sakuranetin などは紫外線ランプ（365nm）下で青緑色の蛍光を発するため、ラミン材とそれ以外の材を区別することができた。

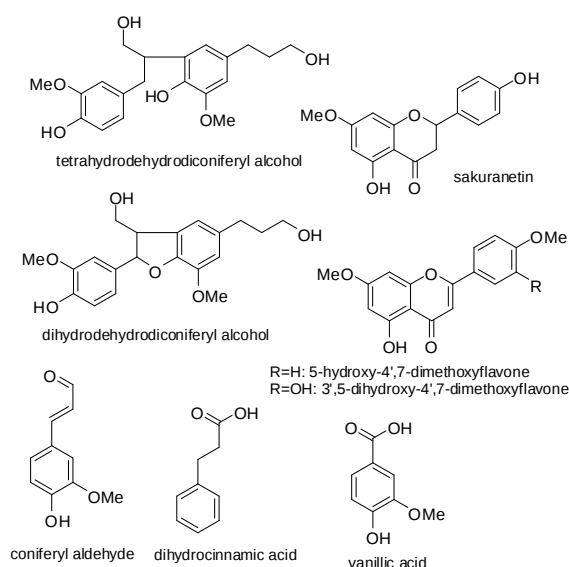


図1 ラミン材から単離した抽出成分の構造

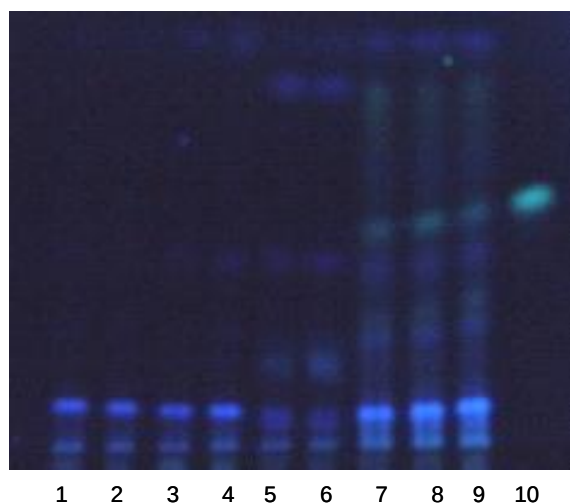


図2 ラミンおよび類似材のメタノール抽出物のTLC
1,2: Simarouba amara, 3,4: Jacaranda copaia, 5,6: Brosimum alicastrum, 7-9: Gonystylus bancanus, 10: sakuranetin

IR スペクトルではラミン材と *Brosimum alicastrum* とは 1600-1670cm 付近が大きく異なっているため、容易に区別できたが、*Jacaranda copaia* や *Simarouba amara* とは類似

しており、識別は困難であった。

エ 考察

化学成分による識別は DNA 識別のような種レベルでの高精度の識別は困難であるが、「A か B かの判別」や「A であることの確認」には有効であり、他の識別手法を補完する手法として活用できるものと思われる。

オ 今後の問題点

木材の抽出成分については個体や部位による差が大きいため、信頼性を高めるためには、多くの試料についてのデータが必要であり、ケモメトリクス等を活用した手法を開発する必要がある。

カ 要約

フタバガキ科木材の心材メタノール抽出物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定し、標品と比較することにより、個々の成分を単離することなく、抽出成分の分布を明らかにすることができた。ラミン材について、sakuranetin 等のフラボン類を指標として、TLC により類似樹種との識別が可能になった。

キ 引用文献

加藤厚（2008）木材抽出成分の化学分類学的手法による樹種識別技術の開発．南洋材の樹種識別及び産地特定の技術開発，森林総合研究所交付金プロジェクト研究成果集 22, pp. 15-20

笹谷宣志（1983）木材の化学識別．木材利用の化学，今村博之他編，共立出版, pp. 105-119

トラフィックイーストアジアジャパン（2006）CITES 木材識別ガイドー熱帯産木材

（（バイオマス化学研究領域（現 産学官連携推進室） 加藤厚）

第3章 酸素・炭素安定同位体比等年輪情報を用いた木材産地識別手法の確立

ア 研究目的

木材の産地識別には安定同位体比が有効なことが知られている。先行の交付金プロジェクトでは、レッドメランティの酸素・炭素安定同位体比により、フィリピンとボルネオの木材が区別できたものの、違法伐採対策上重要なボルネオ内の異なる産地のレッドメランティを区別することはできなかった。一般に、熱帯材には年輪が形成されないため、同一形成年の木部同士での同位体比の比較が不可能であるという問題がある。年輪情報に基づく産地識別は、主要な産地別に標準パターンを作成することが必要となるが、熱帯地域についてはこれらの研究は行われていない。違法伐採が深刻なロシア材などの冷温帯樹種や、熱帯でもチークのように年輪の形成される樹種では、同一形成年の木部同士を比較できるため、より精度が高く実用的な木材の産地識別が期待できる。個体間の年輪幅変動を比較する手法に加えて安定同位体比の年変動時系列の比較を行うことで、より精度の高い木材の産地識別手法を確立する。

イ 研究方法

(1) 年輪幅情報を用いた産地判別技術の開発

インドネシア産、ミャンマー産、インド産、ガーナ産のチークの円盤あるいは成長錐コアを用いた。試料を 1.5 mm 厚さの木口薄片に加工し、軟 X 線デンシトメトリにより年輪幅を測定した。個別の年輪幅時系列を常法にしたがってクロスデートし、年輪年代を決定した。個別の年輪幅時系列を下式によって指数に変換し (Heneca, 2005)、さらに国別に平均することによって国別標準年輪幅時系列を作成した。

$$I_i = \log \left(\frac{y_i}{y_{i+1}} \right)$$

I_i : i 年における指数、 y_i : i 年における年輪幅、 y_{i+1} : $i+1$ 年における年輪幅

個体別、方向別に作成したチークの年輪幅指数時系列と国別に作成した 4 つの標準年輪幅指数時系列との間で回帰を行い、相関係数 R 、 t 値及び p 値を計算により得た。このとき、 R が正でかつ p 値が最小となった国を産地とした。

(2) 安定同位体比情報を用いた産地判別技術の開発

インドネシア・ジャワ島中部の Boyolali において入手した試料を年輪ごとに小片を切り出し、 α セルロースを抽出した後、炭素同位体比時系列を作成した。円盤の 2 半径方向で時系列を作成し、成長期の降水量との相関により産地判別を試みた。高温熱分解型元素分

析計 (Hekatech 社 HTO) を導入し、酸素同位体比の測定精度を検証した。さらに、インドネシア・ジャワ島中部の Cilacap において入手した試料について、高温熱分解型元素分析計年輪ごと及び年輪をさらに細分した季節ごとの酸素同位体比時系列を作成した。

表 1 国別標準年輪幅時系列間の相関

	ジャワ	ミャンマー	インド
ミャンマー	0.08		
インド	0.11	0.16	
ガーナ	-0.06	0.02	-0.01

ウ・エ 結果と考察

(1) 個体別チーク年輪幅時系列と国別時系列

中部インドの 8 サイトについてサイト間の相関係数を 1900～1999 年の 100 年間で対照に計算した。得られた相関係数は、0.084～0.689 の範囲にあり、平均値は 0.362 であった。また、サイト間の距離 (10～400 km、平均 207 km) とサイト間の相関係数との間には正の相関 ($r^2 = 0.558$) があり、近いサイト間で相関係数が高く、サイト間距離が大きくなると相関係数が小さくなる傾向にあった (図 1)。ミャンマー中部 (Mandalay 近郊) 及び南西部 (Pyae 近郊) の 2 サイトについて年輪幅時系列を作成し、期間が重複する 1965 年～2000 年について両者間の相関係数を計算したところ、相関係数は 0.344 と 5% レベルで有意であった。また、ガーナ国内の北緯 7 度 11 分～35 分、西経 1 度 29 分～2 度 56 分の範囲の 4 サイトについてサイト別年輪幅時系列を作成した。4 サイトともに経年変動に共通する傾向が見られ、サイトと全平均時系列間の相関係数は、平均して 0.715 (0.615～0.900) を示した。

国別に作成した 4 つの年輪幅指数時系列をすべての時系列に共通する 1967 年～1999 年について互いに相関係数を計算した。最も高い相関が得られたミャンマーとインド間でも 0.16 であり (表 1)、有意な相関は得られなかった。また、成長が良い年と悪い年を示す指標年もほとんど一致しなかった (図 2)。これらのことは、年輪幅指数時系列が国によって異なる変動を示すこと意味し、国別の産地判別が可能であることを示唆している。

(2) 年輪幅情報による産地判別

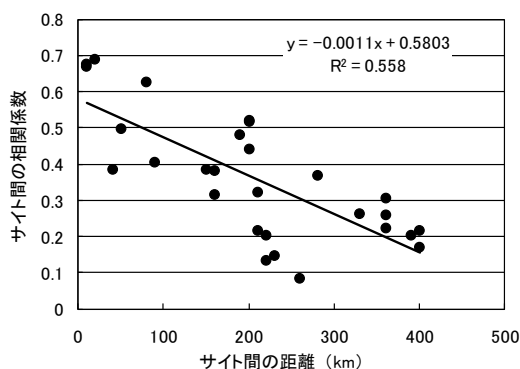


図 1 インド中部におけるサイト間距離とサイト別標準年輪幅時系列間の相関係数との関係

個体別, 方向別に作成した年輪幅指数時系列と国別標準年輪幅指数時系列との間の相関から産地を判別する際の境界を p 値の大きさで定め, p 値が 0.05, 0.01, 0.001 の 3 種類の場合について国別に産地判別の正答率, 誤答率を求めた (図 3)。いずれの国においても産地判別の正答率は, p 値が 0.05 のときに最大で, p 値が

0.01, 0.001 と小さくなるにつれて正答率は低下した。また, 誤答率も p 値が 0.05 の時が最も大きく, p 値が 0.01, 0.001 の時には 2%以下となった。しきい値である p 値を小さくしていくと, いずれの国別標準時系列との相関が基準に達せず帰属産地が不明なものの割合が増加した。すべての年輪幅時系列をまとめてみると 3 つの p 値のうち, 0.01 が年輪幅

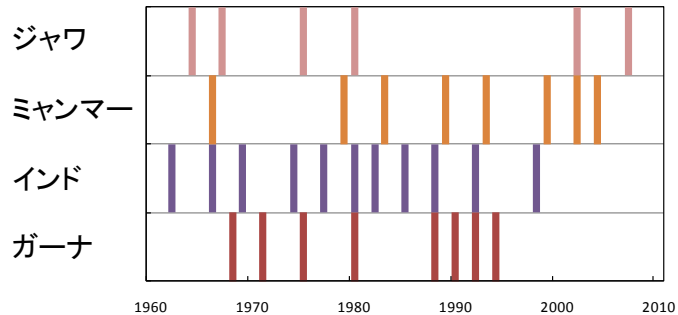


図 2 インドネシア産, ミャンマー産, インド産, ガーナ産チークにおける指標年の分布

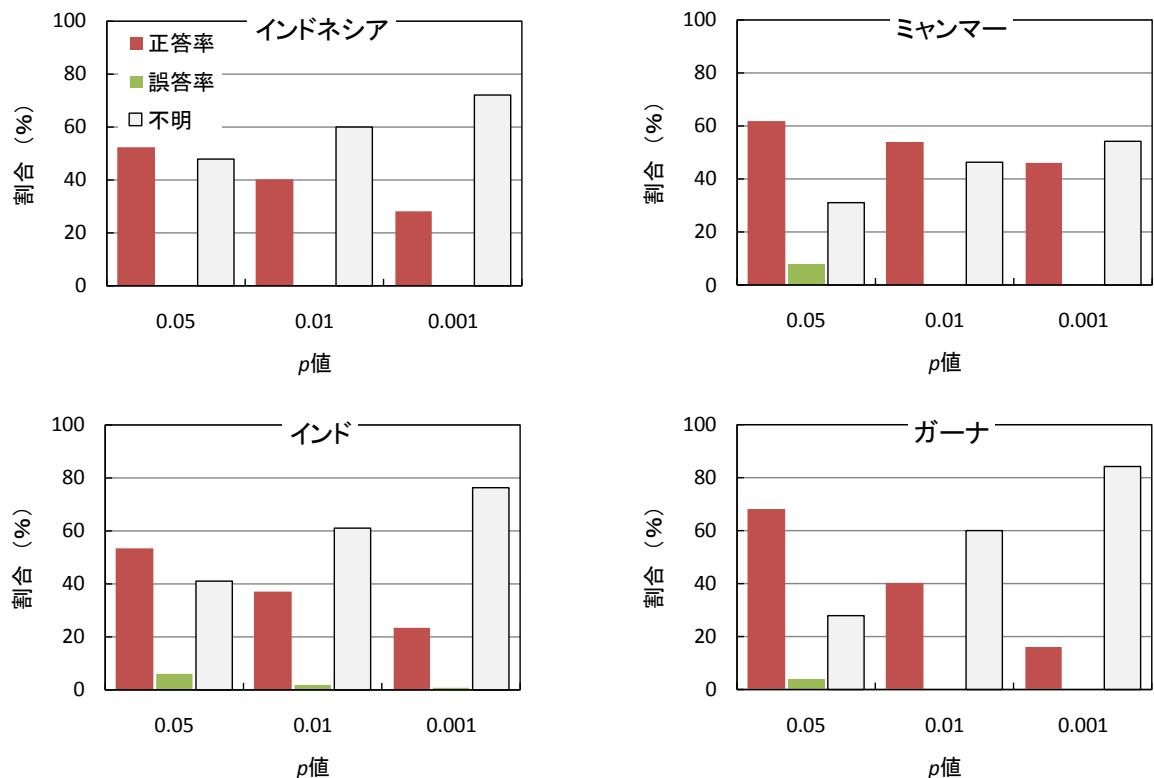


図 3 国別に求めたしきい値 p 値による正答率, 誤答率の違い
産地既知の個々の年輪幅時系列と国別標準時系列との相関を求め, R が正で p 値が最小となる国を産地とした場合における正答率と誤答率。 p 値が基準 (0.05, 0.01, 0.001) に達しなかったものは不明に区分されている。

時系列を用いた産地判別に適していると考えられる。

しきい値 p が 0.01 のときに年輪年代が誤っている場合の誤判定の危険性を確認するために、個別の年輪幅時系列の年輪年代を 0～10 年ずらした場合の正答率と誤答率を求めた。正答率は、年輪年代がずれている場合には 10%未満であったが、誤答率が 10%を超える場合があった。年輪年代を-10 年～+10 年ま

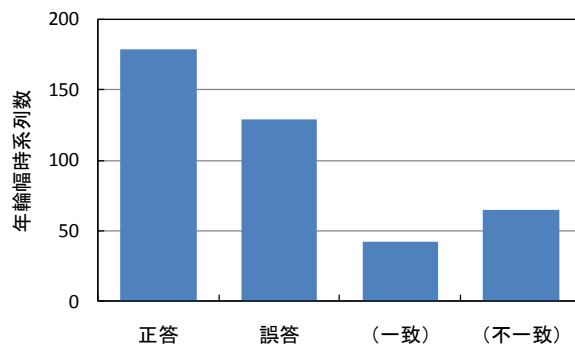


図 4 年代決定と産地判別を同時に行った場合における正答数と誤答数

でずらして、年輪年代の変化を加えて産地判別を行ったところ、正答率が 43%であるのに対し、誤答率が 31%に達した（図 4）。年輪年代が確定している試料の場合の誤答率が 2%未満であったことから、年輪年代の決定と産地判別を同時に行うことは、誤判別の可能性を高めると考えられる。

（3）安定同位体比による産地判別

インドネシア中部の Boyolali (110° 45'6.67"E, 7° 10'32.16"S) で採取した個体を用いて、2 方向で炭素同位体比の変動パターンを測定した。成長期間降水量（10 月～翌年 5 月）

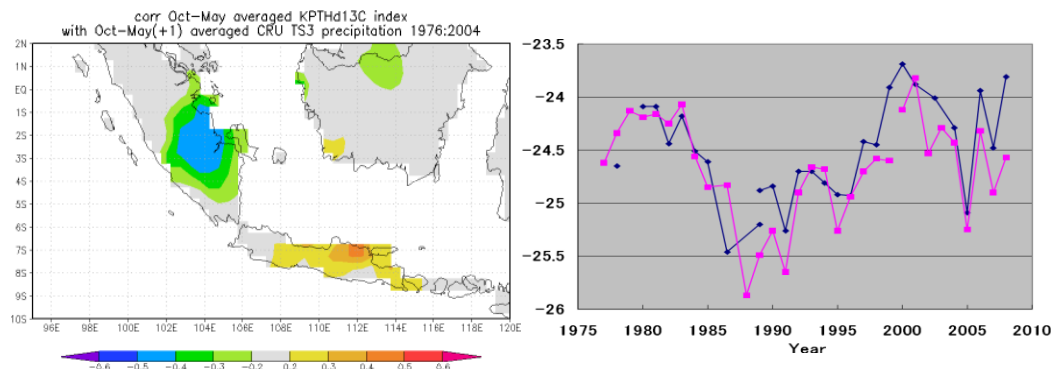


図 5 炭素同位体比時系列を用いた気候相関法によるジャワ島産チークの産地判別
左図は、気候相関法によるチークの産地判別例で、スマトラ島南部付近に炭素同位体比と降水量の負の相関がみとめられた。右図は解析に用いた炭素同位体比時系列を示す。

との相関を計算して産地推定を試みたところ、実産地から 900 km 離れたスマトラ島南部で降水量と弱い負の相関が見られた（有意水準 5%，図 5）。標準サンプルを用いて高温熱分解型元素分析計（Hekatech 社 HTO）による酸素同位体比の測定精度を検証し、誤差 $\sigma < 0.3\text{‰}$ の高精度測定が可能であることを確認した。これにより、中央ジャワ産のチーク年輪の酸素同位体比の年変化および季節変化（一年輪内での変化）を測定したところ、図 6 の

ように成長期の始めと終わりに同位体比が高く、中間で低いという結果が得られた。2月の降水量との相関を計算することにより、中央ジャワ産のチーク試料の産地判別を行ったところ、「中央ジャワ産」という結果が得られ(図7)、産出国レベルだけではなく、国内のどの地域かというレベルまで推定することができた。

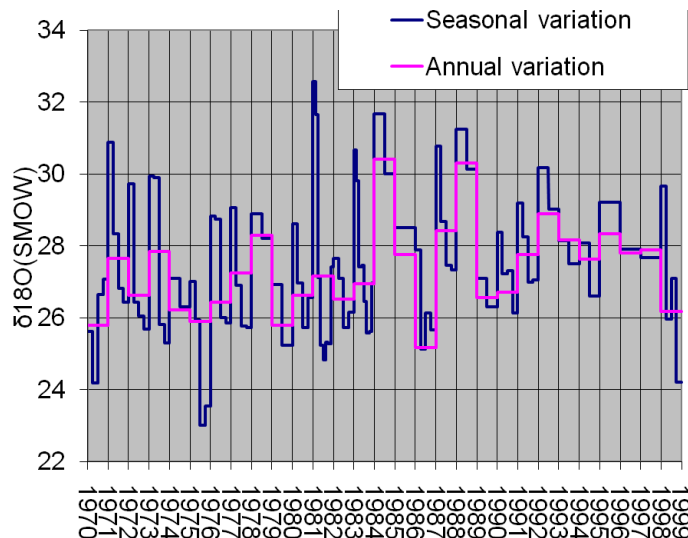


図6 ジャワ島産チークの酸素同位体比時系列

オ 今後の問題点

個別の年輪幅時系列を対照と

する国別時系列と照合する産地判別では、正答率が37~54%にとどまった。また、インドネシア産チークの酸素安定同位体比時系列と降水量との関係から判別した産地は、ほとんど誤差がない場合(図7)もある一方で、インドネシア国内であったものの、実産地から900 kmの誤差がある場合(図5)もあった。正答率が低かった理由として、試料数が少なく、国内地域別の標準年輪幅時系列を作成することができず、複数地域の試料を1つの標準曲線で産地判別したことが考えられる。今後、年輪幅、安定同位体比時系列ともに地域別の標準曲線を作成することが必要であると考えられる。

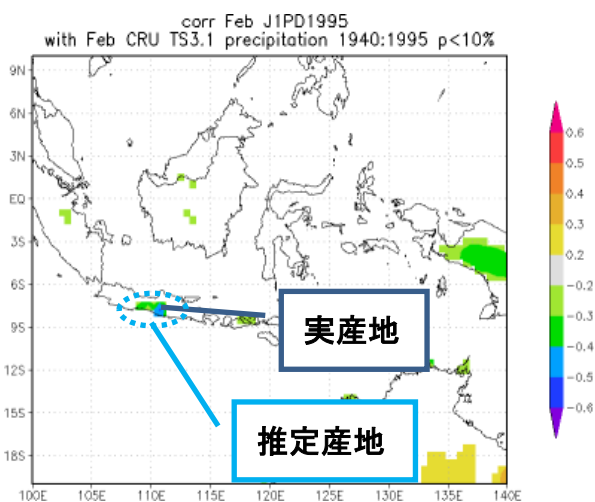


図7 酸素同位体比時系列を用いたジャワ島産チークの気相相関法による産地判別

カ 要約

違法伐採対策の一つのアプローチとして木材の産地を判別することが有効であると考えられる。本研究では、木材の年輪が成育地の環境の変化を反映していることを利用して、チークの年輪幅時系列及び炭素・酸素安定同位体比時系列を用いた産地判別法を検討した。

インドネシア，ミャンマー，インド，ガーナ産のチーク年輪幅時系列を用いて国別標準時系列との相関を解析することにより産地判別を試みた。産地判別のしきい値としてp値0.01に設定した場合，正答率が37～54%，誤答率が2%未満となった。また，インドネシア産チークの酸素安定同位体比時系列と降水量との関係から試みた産地判別では，インドネシア産であることは判別できたものの，得られた推定産地は実産地から約900kmの誤差があった。

キ 引用文献

Haneca K., Wazny T., Van Acker J., Beeckman H. (2005) Provenancing Baltic timber from art historical objects: success and limitations. *Journal of Archaeological Science*, 32:261-271.

(木材特性研究領域 香川聡、藤原健)

第4章 フタバガキ科樹木の DNA による樹種識別・産地識別マーカーの開発

ア 研究目的

フタバガキ科樹種どうしの分子識別に加え、他の科の樹種間との分子識別に適用できるよう、手法をより普遍化するために、遺伝子バーコードデータベースの構築を推進する。またマレーシアの熱帯林で優占するフタバガキ科樹木の産地識別を行うための DNA マーカーの開発を行う。対象とする樹種はマレー半島及びボルネオ島に分布する *Shorea parvifolia* とする。科研費で実施している *S. leprosula* を対象とした類似の研究と本研究の成果を併せて実用的な DNA による識別マーカーの開発を試みる。

イ 研究方法

遺伝子バーコードデータベースを構築するために東南アジア広域から DNA サンプルを収集した。それらについて葉緑体 DNA の *matK* 及び *rbcL* の塩基配列を解読した。産地識別のために広域分布種である *Shorea leprosula* と *S. parvifolia* の集団サンプルをボルネオ島、スマトラ島、マレー半島から収集し、葉緑体 DNA の遺伝子間領域の塩基配列を解読し、遺伝的多様性、遺伝的分化や地域識別可能なマーカーの探索などを行い、地域識別かどの程度まで可能か検討する。

ウ 結果

DNA バーコードでは、*Anisoptera* 属 4 種、*Cotylelobium* 属 1 種、*Dipterocarpus* 属 14 種、*Dryobalanops* 属 3 種、*Hopea* 属 10 種、*Neobalanocarpus* 属 1 種、*Parashorea* 属 2 種、*Shorea* 属 50 種、*Upuna* 属 1 種、*Vatica* 属 5 種で、すべての属にわたっている (Ashton 1982, Syminton 1943)。得られた塩基配列データの長さは、*rbcL* の一部については 625～671 bp、*matK* の一部については 826～846 bp のデータを得た。これらの配列について、マルチプルアラインメントの後、近隣結合法により系統樹を作成した (図-1)。*rbcL* 領域のシーケンスデータのみを用いた場合には、2 種が同じシーケンスとなるものが 3 グループ、3 種が同じシーケンスとなるものが 2 グループ、4 種が同じシーケンスとなるものが 1 グループ、8 種が同じシーケンスとなるものが 1 グループとなり、樹種識別は不十分であった。一方、*matK* 領域のシーケンスデータのみを用いた場合には、2 種が同じシーケンスとなるものが 4 グループ、3 種が同じシーケンスとなるものが 2 グループ、4 種、5 種、6 種が同じシーケンスとなるものがそれぞれ 1 グループずつあり、樹種識別は不十分であった。2 つの領域を合わせて解析したところ、2 種が同じシーケンスとなるものが 2 グループのみであり、樹種識別はほぼ可能であることが示された。

マレーシア及びインドネシアの広域に分布する *S. leprosula* の遺伝的分化を調査した結果、ボルネオ島の集団とそれ以外（マレー半島、スマトラ島）で大きな遺伝的な違いが見られた。葉緑体 DNA の 5 領域（合計 4393 bp）を解析した結果、21 のハプロタイプが検出された（図-2）。集団間の遺伝的な違いを表す遺伝子分化係数は $F_{st}=0.5851$ と高い値を示した。*S. parvifolia* については遺伝的分化程度は *S. leprosula* に似ていたが、遺伝的分化係数は低い値であった。これから *S. leprosula* については、葉緑体 DNA の多型データで大きな地域の産地識別はある程度可能であることが示された。核の DNA マーカーでは同様にボルネオ島とそれ以外（マレー半島とスマトラ島）が遺伝的に分化していたが、遺伝子分化係数は $F_{st}=0.089$ と葉緑体に比べ低かった。DNA による地域識別は島レベルでは可能であるが、狭い地域を特定するには至らなかった。これは例えば島内の地域間の遺伝的分化があまり高くなかったことが原因であった。地域識別の研究は科研費及び環境省地球環境総合推進費の研究課題と連携して研究を進めた。

エ 考察

DNA バーコードでは葉緑体 DNA の二つの領域である *rbcL* の一部 (625-671 bp)、*matK* の一部 (826-846 bp) のデータを用いることによって分析対象とした 10 属 81 種がほぼ識別が可能であった。しかし、属内の近縁種については識別が完全でないものも存在したため、これらについては遺伝子間領域など、近縁種を識別できる DNA 領域を対象にして解析を行うべきである。

また、地域識別については対象とした種に歴史的変遷や種内多型の程度によって地域識別が可能な場合がある。本研究で対象とした 2 種はボルネオ島とその他（マレー半島とスマトラ島）は明瞭に識別が可能であった。しかし、ボルネオ島内では地域間の遺伝的な違いは見られたが、その違いは明瞭でなく全てを識別するには至らなかった。しかし、大きな地域、例えばボルネオの北部と南部などは遺伝的な違いがある程度存在したため、識別が可能な場合もあった。本研究では母性遺伝の葉緑体 DNA と両性遺伝する核 DNA の EST-SSR マーカーを用いたが、どちらもボルネオ島とその他を明瞭に識別できた。しかし遺伝的な分化程度が大きい葉緑体 DNAの方がより識別には適していた。ボルネオ島とその他の地域の違いは氷期に東南アジアがスンダランドと大陸化したり、間氷期に島として分離されたことを過去に何度も繰り返した結果で明瞭な遺伝構造ができたものと考えられる。

オ 今後の問題的

DNA での種識別は可能であった。また広域分布種の種内の地域識別は島間では可能であるが、島内の地域間では容易でないことが明らかとなった。そのため、局所的に分布する

種について遺伝的分化係数が高く出る葉緑体 DNA 領域でのデータの蓄積が必要かもしれない。

カ 要約

フタバガキ科の種識別の DNA バーコードでは2つの葉緑体 DNA 領域を用いて10属81種の識別を行った。その結果、ほぼ全ての識別が可能であったが、一部の近縁種では識別ができなかった。また、東南アジアで広域に分布する *S. leprosula* と *S. parvifolia* を分布域全体から集団材料を収集し、母性遺伝する葉緑体 DNA 及び両性遺伝する核 DNA の EST-SSR を用いて地域識別ができるかどうか調査を行った。その結果、2つのゲノムともボルネオ島とその他を明瞭に識別できた。しかし遺伝的な分化程度が大きい葉緑体 DNA の方がより識別には適していた。

キ 引用文献

- Ashton P. S. (1982) Flora Malesiana. Series I-Spermatophyta. Flowering Plants Vol.9, part 2, Dipterocarpaceae. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands
- Symington C. F. (1943) Malayan Forest Records No.16. Foresters' Manual of Dipterocarps. (Reprinted with plates and historical introduction, University of Malaya Press, Kuala Lumpur, 1974)

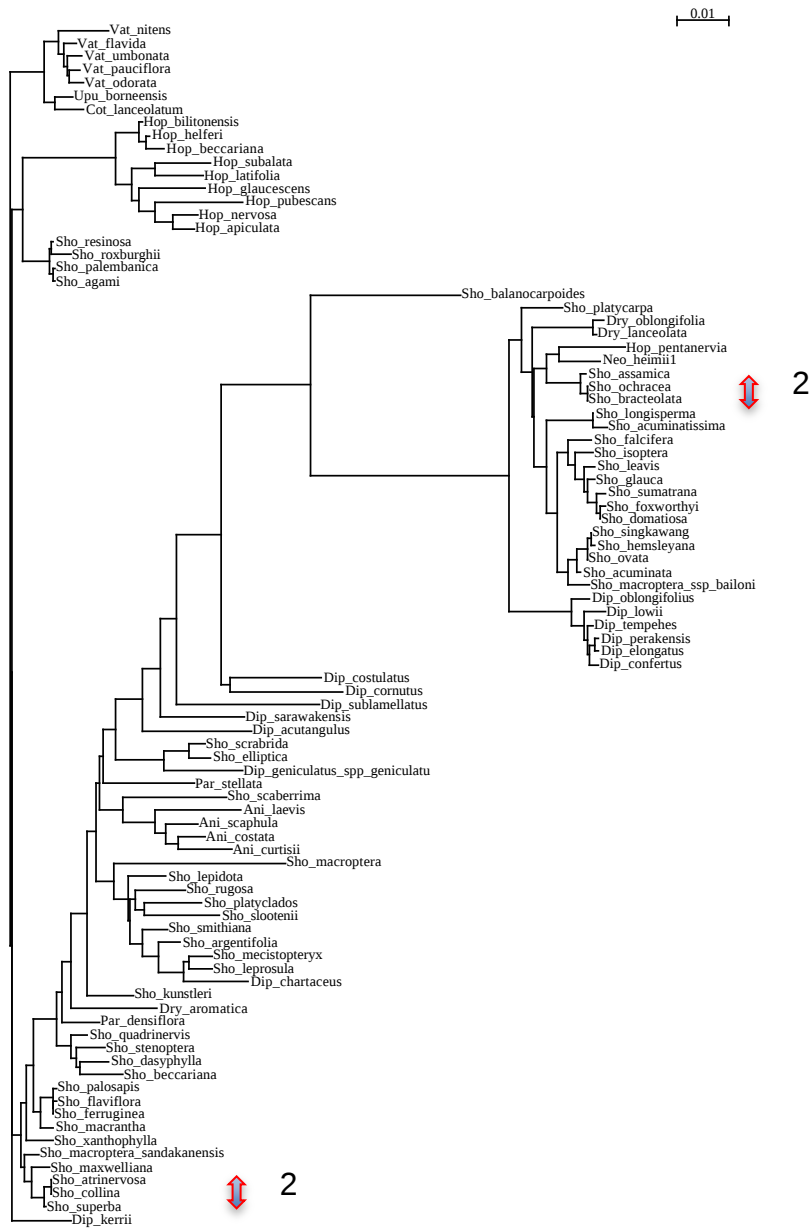


図-1 フタバガキ科 10 属 81 種の分子系統樹、識別できない近縁種は矢印と種数で示してある。

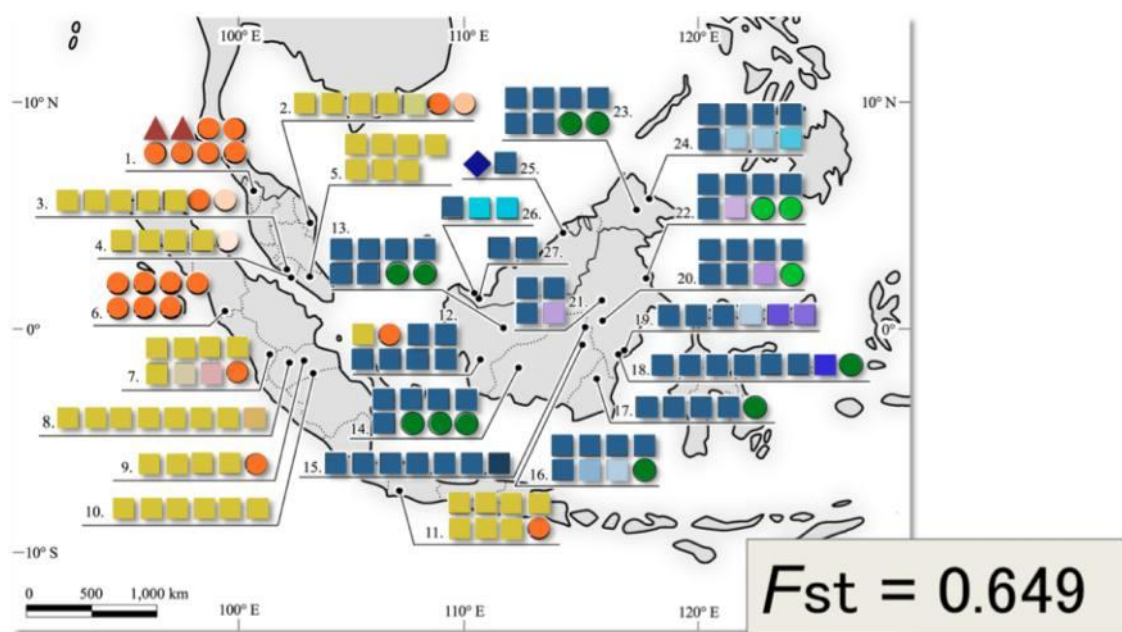


図-2 東南アジアの *S. leprosula* 天然林で検出された葉緑体 DNA ハプロタイプ分布図、
遺伝子分化係数 (F_{st}) は高くボルネオ島とそれ以外が明瞭に遺伝的に分化していた。

(森林遺伝研究領域 津村義彦、吉丸博志 (現 多摩森林科学園)、吉村研介)

第5章 熱帯材木材製品からの効率的な DNA 抽出および増幅技術の開発

ア 研究目的

木材の樹種を種レベルで知るためには DNA の分析が必要である。しかしながら、木材に含まれる DNA の量は多の植物に比べても微量であり、しかも、樹木の伐採後の時間経過に伴い木材中の DNA は減少・断片化（劣化）する（Abe et al., 2011）。木材製品として利用される場合には、経年劣化に加え、熱処理や乾燥によって DNA が低分子化したり、他の物質と化学変化を起こしていることが多く、分析に必要な量と質の DNA を得ることが非常に難しい（吉田ら, 2006）。本研究では、合板、合板用材、製材として東南アジアから日本に最も多く輸入されている Dipterocarpaceae（フタバガキ科）*Shorea* 属（通称メランティ、ラワン等）の木材および木材製品から DNA 分析による樹種および産地識別に利用可能な DNA の抽出および増幅技術を開発するとともに、その技術の限界にも言及する。

イ 研究方法

1. 試料

(A) 製材試料：2007 年 10 月にマレーシア半島部のヌガリ・スンビラン州にある製材所で製材後、井桁に組んで屋外で約 2 週間乾燥された挽き材（26 mm x 103 mm x 1 m）を用いた。辺材と心材が認められたため、それぞれの部位から試料を採取し試料とした。他に 2009 年に森林総合研究所に樹種鑑定を依頼された製材を用いた。2007 年にマレーシアジョホール州において製材乾燥されたという記載があった。顕微鏡による識別の結果、イエローメランティ(*Shorea* 属 *Richetioides* 節)と識別された。

(B) 単板・合板試料：2007 年 3 月及び 2010 年 3 月に合板製造会社（それぞれ株式会社マルヒ、株式会社キーテック）より入手した、乾燥前と乾燥後の合板用単板を用いた。材色が異なる辺材と心材が認められたため、それぞれの部位から試料を採取し試料とした。

合板：2010 年 3 月に株式会社キーテックから入手した 5 プライの合板を用いた。

2. 方法

(A) 前処理：DNA 抽出に供する試料の形状と抽出方法及びポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅の条件について検討した。抽出に用いる試料の形状としては、1) 木粉と 2) 切片について検討した。それぞれの木材製品の表面が空気に露出している部分を削り取り、その部分から、1) 木粉は、断面形状が数 mm 角、長さ 10 mm のマッチ棒状にカミソリで細切し、凍結した後、遠心管に移し、液体窒素温度に冷やしたメタルコーンを用いて破砕機（マルチビーズショッカー、安井器械）で粉砕し調製した。2) 切片は片刃または両刃カミソリを用いて薄切片（数～数百 μm 厚）を作製した。

(B) DNA 抽出 : DNeasy Plant Mini Kit または DNeasy Plant Max Kit (ともに Qiagen 社) を用いてプロトコールにしたがって行ったが、60℃に設定した高温槽で 15～60 分間超音波処理、抽出時間の延長、DNA 精製時にカラムを用いた DNA の濃縮なども行った。

(C) DNA 増幅 : 得られた抽出液から、PCR で *Shorea* 属の種の識別に必要な葉緑体 DNA 上の 4 領域 (*trnL* intron (585bp)、*trnL-trnF* (517bp)、*psbC-trnS* (414bp)、*trnH-psbA* (260bp)) を増幅し、電気泳動法で増幅の可否を判断した。PCR で増幅できなかった場合には、その中のさらに短い領域を設定して増幅を行った。PCR は Multiplex PCR Kit (Qiagen 社) または DNA 合成酵素 (Blend Taq Plus : 東洋紡社) とバッファー (Ampdirect Plus : 島津製作所) の組合せを用いて実施した。PCR の成功率を上げるため、DNA 溶液へのポリビニルポリピロリドン(PVPP)の添加の効果を調べた。

(D) 樹種決定 : 増幅された DNA については塩基配列を決定し、森林総合研究所で構築した *Shorea* 葉緑体 DNA データベースを検索し、配列に基づいて樹種を決定した。

ウ 結果

DNA 抽出液を PCR で増幅する場合、板目切片を 60℃の DNA 抽出溶液中で超音波処理する方法では (図 1)、細胞の内容物が木材の細胞壁から遊離し (図 2)、木粉から抽出する場合と同等の増幅結果が得られた (図 3)。また、試料を木粉にすると、PCR による増幅産物が得られないことがあった。

解剖学的特徴からイエローメランティと判別されたマレーシアからの製材品について、DNA 抽出を行い、PCR を行ったところ、*Shorea* 属の樹種識別に用いる領域のうち、最も長い DNA 領域である *trnL* intron は増幅されなかったが、DNA 溶液に PVPP を添加すると増幅され (図 4)、検索の結果、樹種は *S. patoiensis* と判別された。

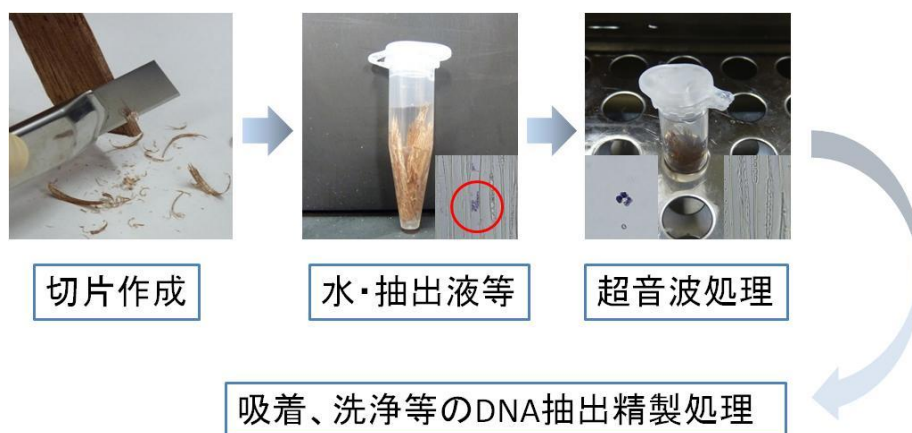


図 1 切片から DNA を抽出するための前処理

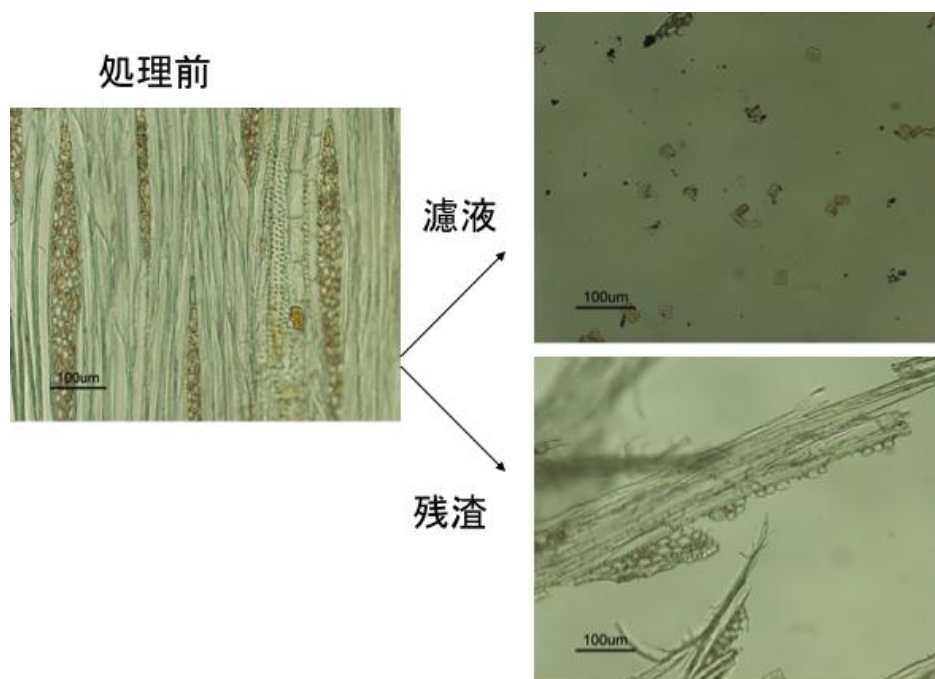


図2 超音波処理前後の切片と濾液。I₂-KI 溶液でデンプンを染色。濾液中に葉緑体 DNA を持つと考えられるアミロプラストが多く含まれている。

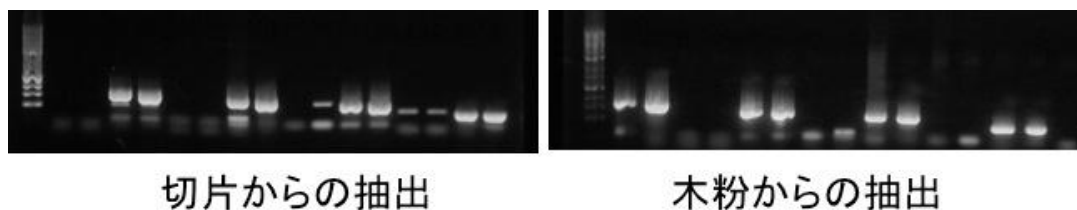


図3 切片と木粉から抽出した DNA からの PCR による葉緑体 DNA 領域の増幅

マレーシア半島の製材所から得たレッドメランティ製材は *S. leprosula* と判別された。キーテック社で得られた合板用単板は、2 枚が *S. leprosula*、1 枚が *S. parvifolia* または *S. dasyphylla* であった。

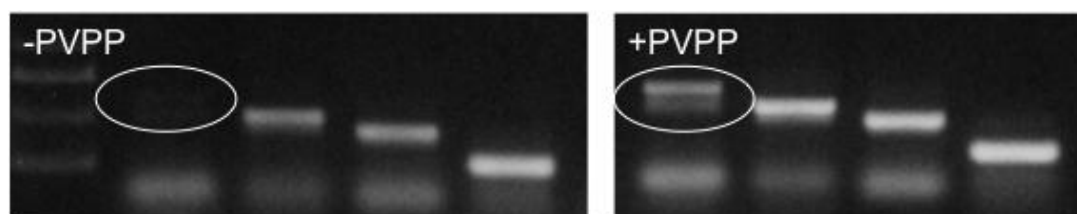


図4 PCR による DNA 増幅時の PVPP 添加の効果

一方、採取したそれらのレッドメランティの乾燥単板および合板において DNA を分析す

るための良好な DNA を得ることは困難であったが、切片を作製して抽出した DNA を、カラム精製段階で濃縮後、PCR を行ったところ、増幅領域を 200 程度に設定すると増幅される場合があった（図 5）。しかし、単板や合板の試料を室内で保管すると、PCR によって増幅される DNA は、他の植物由来のものが多く、しかもその植物種は多種多様であった。



図 5 乾燥した単板および合板からの DNA 検出の成功例

エ 考察

本研究で用いた、木材を切片化後に超音波処理で細胞内容物を細胞壁から遊離させた後に DNA を抽出する方法では（安部ら，2008）、木粉にした場合と同等の PCR による DNA が増幅が確認された。それに加え、この方法は作業が単純で容易であり、同時に多くの試料を扱うことができるため、作業時間もかなり短縮された。

高温乾燥した単板や合板からの DNA 抽出および PCR による増幅・分析については、増幅効率が低く、他の植物由来の DNA が混入することがあるため、成功する確率は低かった。これに対処するためには、抽出方法の改良や分析する DNA の領域を短く設定するといった工夫が考えられる（Abe et al., 2011）。しかしながら、分析する DNA の領域が短くなることで情報量が少なくなること、それに伴う分析の手間の増加が増加するなどの理由から、木材を解剖学的な手法で属レベルまで識別し、種レベルの識別については、種の識別が可能なできるだけ短い DNA 領域を選んで増幅し、識別する方法が有効であると考えられる（Tsumura et al., 2011）。

Shorea 属の木材に限らず伐採後長期間経過した木材や熱処理を施された木材については、残存する DNA の長さを分析するなどの、最適条件設定のための予備分析が必要となる。そのため識別の対象となる木材の重要性和照らし合わせながら必要に応じて DNA 分析を行うことが最も適切と考えられる。

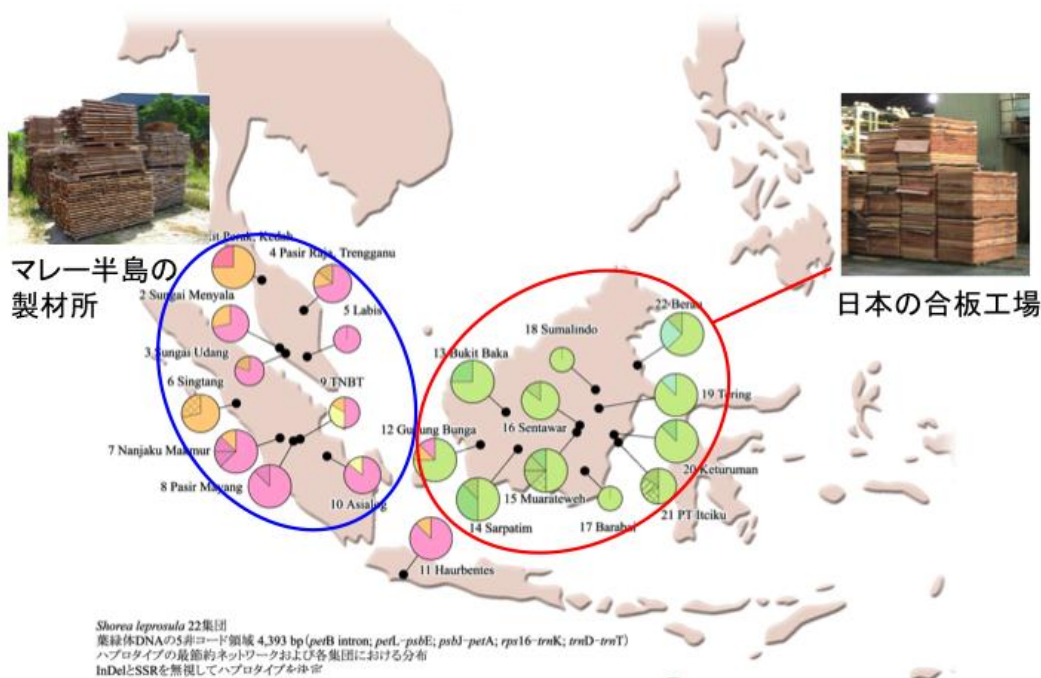


図6 *Shorea leprosula* の葉緑体 DNA のタイプの違いを利用した産地識別

一方、今回樹種識別に用いたマレー半島で採取した製材と日本の合板工場から供試された合板用の単板の中で、樹種が *S. leprosula* と識別された個体について葉緑体 DNA ハプロタイプの違いを用いた集団遺伝的分析によって産地を分析した。その結果、マレー半島で得られた製材は、マレー半島またはスマトラ島、日本で得られた合板用単板はボルネオ島と産地が判別された（図6）。また、イエローメランティ材は *Shorea patoiensis* と判別され、本種はボルネオ島の、マレーシア・サバ州南部からサラワク州東部およびインドネシア・東カリマンタンに分布していることが分かっているため（Soerianegara & Lemmens, 1993）、材の産地についても同地域と推定できる。このように、樹種を識別することで木材の産地がある程度特定できる場合がある。

オ 今後の問題的

現段階においては、あらゆる製品に用いられる木材について、すべての樹種を対象に DNA 分析だけで樹種識別が可能になるというわけではなく、木材の組織構造の分析も同時に行う必要がある。また、*Shorea* 属については種レベルの識別が可能であるが、さらに詳細な分析を行うには、DNA 抽出方法の改良とデータベースの拡充を図る必要がある。

カ 要約

東南アジアから日本に用材として最も多く輸入されている Dipterocarpaceae（フタバガ

キ科) *Shorea* 属 (通称メランティ、ラワン等) の木材および木材製品の DNA 分析のために利用可能な DNA の抽出および増幅技術の開発を行った。

木材を切片化し、超音波処理で細胞内容物を細胞壁から遊離させた後に DNA を抽出する方法によって、従来法と同様な DNA が得られ、しかも作業効率を大幅に向上できた。高温乾燥した単板や合板からの DNA 抽出および PCR による増幅・分析については、増幅効率が低く、他の植物由来の DNA が混入することがあるため、成功する確率は低かった。製材品や高温乾燥されていない単板においては、DNA 分析によって樹種が特定でき、それにより、ある程度の産地が推定できるケースがあった。伐採後長期間経過した木材や熱処理を施された木材については、識別の対象となる木材の重要性と照らし合わせながら必要に応じて DNA 分析を行うことが適切と考えられる。

キ 引用文献

Abe H., Watanabe U., Yoshida K., Kurada K., Zhang C. (2011) Changes in the organelle and quantity, quality, and distribution in the wood of *Cryptomeria japonica* over long-term storage. IAWA Journal 32: 263-272

安部久、吉田和正、渡辺宇外(2008) 木材の DNA を分析するための前処理方法. 特願 2008-249892. 特開 2010-75152

Soerianegara I., Lemmens R. H. M. J. (1993) PROSEA 5 (1) Timber trees: Major commercial timbers. pp. 605

Tsumura Y., Kado T., Yoshida K., Abe H., Ohtani M., Taguchi Y., Fukue Y., Tani N., Ueno S., Yoshimura K., Kamiya K., Harada K., Takeuchi Y., Diway B., Finkeldey R., Na'iem M., Indrioko S., Ng K. K. S., Muhammad N., Lee S. L. (2011) Molecular database for classifying *Shorea* species (Dipterocarpaceae) and techniques for checking the legitimacy of timber and wood products. Journal of Plant Research 124: 35-48

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

(木材特性研究領域 安部久、生物工学研究領域 吉田和正)