

森林植物園アジサイの遺伝資源カタログの構築

神戸大学大学院 人間発達環境学研究科 人間環境学専攻
谷口 聖太

1. はじめに

アジサイはアジサイ科アジサイ属の植物で、和歌にも用いられるなど観賞用や薬草として使用され、日本人に馴染みのある植物である。日本原産のアジサイは欧州へ持ち込まれ、園芸品種として改良、育種の後に日本に逆輸入された歴史もある。現在では観賞用として世界中で人気であり、多くの品種が開発されている。原産地の日本では多種多様な野生種が自生している。アジサイの形態は多様であるが、特に地域による形態の多様性が高く、土地固有の都市景観づくりへの利用が期待できる。六甲山にも幅広く自生しており、ヤマアジサイ系の「シチダンカ」など、六甲山の特産種もみられる。神戸市では、1970年5月に「神戸市の花」に指定された。神戸市立森林植物園には350品種のアジサイが保存され栽培されており、日本原産種に加えて中国産、アメリカ産など世界樹のアジサイが存在する。

アジサイの形態は多様であるが、それを示す遺伝的多様性に関する研究や知見は少ない。アジサイの染色体数は $2n=2x=36$ が基本とされているが、タマアジサイや中国種はそれぞれ $2n=2x=30$ 、 $2n=2x=34$ など異数性を示す(Cerbah *et al.*, 2001)。またノリウツギは $2n=2x=36$ 、 $2n=4X=72$ 、 $2n=6x=108$ など多倍数性を持つ種も確認されている(Funamoto *et al.*, 1988)。

アジサイなどの木本性植物の育種には長い年月が必要であり、効率的な育種の課題となっている。アジサイは交配後、開花まで2年以上の時間が必要であり、有用形質が潜性遺伝子の場合、2世代分の4年の年月を要する。種子などの育種初期段階において、DNAマーカーやゲノムサイズによって有用個体の選抜は有用な手法であり、ゲノム情報は効率的な育種に寄与できる。

遺伝的多様性を解析するにあたりrDNAを利用した核型解析が有用である。rDNAはリボソームを構成するrRNAの遺伝子であり、幅広い種において高度に保存されている。これはrDNAパターンが異なる種同士は遺伝的距離が遠く、系統的に遠い植物であることが示唆される。45S、18Sや5SなどのrDNAをマーカーとして用いることで種間の系統分類をすることができる。

本研究の目的は、神戸市立森林植物園に保存されているアジサイにおいて、核型解析やゲノム解析を実施することにより、世界のアジサイ属の遺伝的多様性様式を明らかにすることである。先行研究で明らかになっているデータに加え、日本・中国・欧州・北米など産地による遺伝的差異を同定する。これに形態的データを付与し、アジサイ属の形態、遺伝的データを集めたデータカタログの構築を目指す。本研究で収集したデータは遺伝資源としてのアジサイの価値を高め、神戸市独自の品種育種に寄与できる。神戸市独自の品種は神戸市の都市景観づくりに利用することができ、独自性の高い都市景観が可能になると予想できる。

2. 材料と方法

i) 材料

神戸市立森林植物園「アジサイ園」に保存されているアジサイ 22 種から枝を採取し、神戸大学実習観察園ガラス温室内にて、挿し木栽培を実施した。2021 年度は 3 度採取を行った (表 1)。挿し木の栽培には発根促進剤であるメネデール (メネデール株式会社製) を使用した。

細胞核の単離には挿し木栽培に成功したアジサイの葉を利用した。DNA 単離には、神戸市立森林植物園で採取した葉や挿し木栽培したアジサイの葉を利用した。

ii) PCR による rDNA の増幅およびプローブの作製

マーカーとして利用する rDNA を PCR で増幅した。5SrDNA のプライマーには 5' -CGA TCA TAC CAG CAC TAA CG-3' と 5' -TAC TAC TCT CGC CCA AGC AC-3' を使用した (S Kitaura *et al.*, 2000)。18SrDNA のプライマーには pTa71 を利用した (Gerlach *et al.*, 1979)。PCR の条件は以下の通りである。94°C (3 分) — {94°C (30 秒) —60°C (30 秒) —72°C (30 秒)} ×35 サイクル—72°C (3 分)。

増幅された PCR プロダクトをニックトランスレーションによって蛍光標識後、エタノール沈殿で標識しプローブ化した。

iii) FISH 法による rDNA の可視化

Fluorescence in situ hybridization 法 (以下 FISH 法) を用いて、作成したプローブの可視化を実施した。挿し木栽培したガクアジサイの葉から Ishi *et al.*, 2019 のプロトコルに基づいて単離した細胞核を用いた。スライドは蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, BX60) および超高度冷却 CCD カメラ (Charge Coupled Device カメラ、関テクノトロン SPOT-RT 3) を用いて蛍光画像を撮影した。

iv) 次世代シーケンサーによる全ゲノム解析

日本原産種のガクアジサイの全ゲノム解析を実施した。DNA は RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN、オランダ) を用いて単離し、アガロースゲル電気泳動でバンドを確認した。単離した DNA 濃度や品質は、Thermo Scientific NanoDrop (Thermo Scientific、米国) と Invitrogen Qubit 4 Fluorometer (Thermo Scientific、米国) を用いて測定した。次世代シーケンサーによるゲノムの読み取りは日本ジーンウイズ株式会社 (東京、現アゼンタ株式会社) に委託をした。得られたゲノムデータを RepeatMasker と TAREAN (RepeatExplore) を用いて、タンDEMリピート解析を行った。

また異数性を示すタマアジサイ、中国種ストリゴサについても DNA を単離し、同様にアゼンタ株式会社に委託をして解析を実施している。

3. 結果

i) 森林植物園アジサイの挿し木栽培評価

2021 年度に神戸市立森林植物園にて採取したアジサイ 22 種の枝を挿し木栽培した (表 1)。22 種のうち、8 種について挿し木栽培に成功した。中国種のウィローサとストリゴサは初めて挿し木に成功した。ガクアジサイ、ヤマアジサイ、エゾアジサイは挿し木に成功した。タマアジサイ、ヨウラクタマアジサイの挿し木成功率は低かったものの、それぞれ採取した枝 10 本に対して 2, 3 本の挿し木に成功した。中国原産種のストリゴサ、ウィローサはタマアジサイよりも成功率が低く、20 本に対してそれぞれ 2, 3 本の割合で挿し木に成功した。その他、アメリカ原産のアルボレスケンスや韓国原産サンスズクなどは挿し木に成功しなかった。

ii) FISH 法による rDNA の可視化

PCR 法によって増幅した 5SrDNA 断片は想定通りの 72bp の単一バンドが確認された。

ガクアジサイの単離した細胞核において、18SrDNA の可視化に成功した。18SrDNA は Digoxigenin-FITC で標識したため、蛍光波長 520nm の黄緑色のシグナルを発する (図 1)。18SrDNA は核小体に明瞭なシグナルを検出した。5SrDNA は Cy3 で標識したため、蛍光波長 570nm の赤色のシグナルを発する。しかし、非特異的シグナルも同時に確認された (図 2)。

iii) ガクアジサイのゲノム解析

ガクアジサイの反復配列解析の結果、存在可能性がある配列を 10 配列特定した。10 配列のうち、2 配列の存在確率は 98%、93% であるが、残りの 8 配列の存在確率は 2~57% と低い (表 2)。

4. 考察

森林植物園アジサイのサンプルは同時期に採取をし、同条件・同環境で挿し木栽培をしたが、生育状態に大きな差が出た。日本に自生するガクアジサイ、ヤマアジサイ、エゾアジサイは挿し木に成功した。これはアジサイ属の主要種であり、日本の環境に適応しやすい形質を持っているからだと考えられる。一方で、タマアジサイやヨウラクタマアジサイは挿し木に成功したものの、成功確率はガクアジサイ、ヤマアジサイ、エゾアジサイと比較して低くなった。これはタマアジサイの染色体数は $2n=2x=30$ (Cerbah *et al.*, 2001) であり、藤井, 2017 による異数性を示す種の挿し木成功率は低いという研究結果と一致する。ヨウラクタマアジサイもタマアジサイ同様に異数性を示すと予想され、挿し木成功率が低下したと考えられる。ストリゴサとウィローサの中国種も染色体数 $2n=2x=34$ の異数性を示す (Cerbah *et al.*, 2001)。中国原産種の挿し木成功率は同じ異数性を示すタマアジサイ系よりも低いことから、異数性以外の要因も考えられる。中国種は日本のアジサイと異なり、寒冷乾燥地域に自生している。そのことから形質も日本種とは異なっている。このことから、中国原産のアジサイは日本の環境に適しておらず、挿し木の成功率が下がったと推測できる。

FISH 法の結果から、アジサイゲノムには他の植物と同様に 18SrDNA が存在する事が確認

された。18SrDNA は核小体に存在する rDNA であり、ガクアジサイにおいても核小体にシグナルが確認された。また、シグナルが明瞭に確認できることから、他のプローブに対するポジティブコントロールとしても利用できる。

5SrDNA のシグナルは確認されたが、非特異的なシグナルも同時に検出された。2倍体のアジサイの5SrDNAの遺伝子座は2つである (Mortreau *et al.*, 2010)。よって予想されるシグナル数は2つである。非特異的なシグナルはプローブの精度が低い事が原因だと考えられる。今回使用した、5SrDNAのプローブのサイズは72bpで、サイズが小さい。そのため、非ターゲットの配列にも結合してしまい、非特異的なシグナルとして検出された。通常、5SrDNAは100数bpの反復配列であり、PCR産物のバンドが複数現れる場合がある。しかし、今回プローブに使用したPCR産物は72bpのシングルバンドであり、複数バンドがみられるPCR産物をプローブに使用すれば、特異性が向上しシグナル数が適正になる可能性がある。

ゲノム解析の結果、10個のタンデムリピートを特定した。このうち存在確率が高い2配列については、PCRを実施後FISH法で可視化することで、種を特定できるようなDNAマーカーの作成を目指す。

今後は、FISH法による5SrDNAの可視化精度を上げ、シグナル数で簡易倍数性検出ができるようになることを目指す。これが可能になれば、アジサイ属について簡易倍数性検出を実施し、染色体に関する遺伝的多様性について解明することができる。染色体数は新品種の育種において、親の選定に重要な情報である。これらの情報が充実すれば、神戸市独自のアジサイ品種を開発する時の親品種選定に寄与できると考える。

5. 参考文献

Gerlach, WL, Bedbrock, JR (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA gene
s from wheat and barley. Nucl Acids Res, 7: 1869-1885.

Funamoto, T., and R. Tanaka. 1988. Karyomorphological studies in some taxa of Hydrangea from Japan. La Kromosomo 49:1583-1594.

Kitamura S, Inoue M, Ohmido N, Fukui K (2000) Quantitative chromosome maps and rDNA localization in the T subgenome of *Nicotiana tabacum* L. and its putative progenitors. Theor Appl Genet 101:1180-1188

Ishii T, Schubert V, Khosravi S, Dreissig S, Metje-Sprink J, et al: RNA-guided endonuclease - in situ labelling (RGEN-ISL): a fast CRISPR/Cas9-based method to label genomic sequences in various species. New Phytol 222:1652-1661 (2019).

Mortreau, E.; Siljak-Yakovlev, S.; Cerbah, M.; Brown, S. C.; Bertrand, H.; Lambert, C. Cytogenetic characterization of *Hydrangea involucrata* Sieb. and *H. aspera* D. Don complex (Hydrangeaceae): genetic, evolutionary, and taxonomic implications. Tree genetics & genomes 2010, 6, 137-148.

表1) 本年度採取したアジサイサンプル

種名	学名	産地
タマアジサイ(玉)	<i>Hydrangea involucrata</i> Sieb.	日本
ラセイタタマアジサイ	<i>Hydrangea involucrata</i> Sieb. var. <i>idzuensis</i> Hayashi	日本
ミドリタマアジサイ(緑玉)	<i>Hydrangea involucrata</i> Sieb. "Midori Tama-ajisai"	日本
ヤエタマアジサイ(八重玉)	<i>Hydrangea involucrata</i> Sieb. "Yae Tama-ajisai"	日本
ヨウラクタマアジサイ(瓔珞玉)	<i>Hydrangea involucrata</i> Sieb. forma <i>multiplex</i> Okuyama	日本
ヤマアジサイ(山)	<i>Hydrangea serrata</i> (Thunb. ex Murr.) Ser.	日本
エゾアジサイ(蝦夷)	<i>Hydrangea serrata</i> (Thunb.) Ser. var. <i>yesoensis</i> (Koidz.) H. Ohba	日本
ノリウツギ(糊空木)	<i>Hydrangea paniculata</i> Sieb.	日本
エゾノリウツギ(蝦夷糊空木)	<i>Hydrangea paniculata</i> Sieb. "Ezo-nori-utsugi"	日本
ガクアジサイ(額)	<i>Hydrangea macrophylla</i> (Thunb. ex J. Murr.) Ser. forma <i>normalis</i> (E. H. Wils.) Hara	日本
ガクウツギ(額空木)	<i>Hydrangea scandens</i> (L. fil.) Ser.	日本
ベニガク(紅額)	<i>Hydrangea serrata</i> (Thunb. ex Murr.) Ser. forma <i>rosalba</i> (Van Houtte) E. H. Wils.	日本
コアジサイ(小)	<i>Hydrangea hirta</i> (Thunb.) Sieb.	日本
ツルアジサイ(蔓)	<i>Hydrangea petiolaris</i> Sieb. et Zucc.	日本
ウイロサ	<i>Hydrangea aspera</i> D. Don ssp. <i>villosa</i> (Rehd.) Mc Clint.	中国
サージェンティアナ	<i>Hydrangea aspera</i> D. Don ssp. <i>sargentiana</i> (Rehd.) Mc Clint.	中国
ストリゴサ	<i>Hydrangea aspera</i> D. Don ssp. <i>strigosa</i> (Rehd.) Mc Clint.	中国
クサントネウラ	<i>Hydrangea xanthoneura</i>	中国
台湾ツルアジサイ(台湾蔓)	<i>Hydrangea anomala</i> D. Don	台湾
ハイドランジア・シーマニー	<i>Hydrangea seemanii</i>	メキシコ
サンスグク(山水菊)	<i>Hydrangea serrata</i> (Thunb. ex Murr.) Ser. "Sansuguk"	韓国
アルボレスケンス	<i>Hydrangea arborescens</i> L.	アメリカ

表2) ガクアジサイのタンデムリピート (RepeatExplore)

	Number	Number of reads	Satellite probability	Consensus length	consensus
high confidence	1	541	0.981	185	CAAAATGCTCGCCGTTCCGANTACGGTAAAGACTAAAAATTAACAATTTGAAATTTGGACTATAAAACAAATGAGACATCGAAMGA ACTTTCCCTTTGTAAGACGGAAATTAAGAGTACACATATGGAAATAAATTTCCACACAGTGGGATTTTTGAGTCTAAAAAT TGCAAATTTTGTGGAGACGGTA
	2	355	0.933	846	AATATCCTAAGGCACCCTAATTTGAAATTCCTGGCCATATCTCTCTGGTGGCTTGATATAATGGACTTTAAACTCTGATGCTAT TTTAGGTTAACAATFAGGAAACCACAGCTTGTCTCTGGATGTGCTTTGCAGAGGAGTTAGCCGTAGCAGAGTTATCACTA TGTAAATTTAGCCTCAAGTGCCTCAGCAGTAGGTAGGGTTCACTTTGGGTATCAGACTGGTGTGGGGCTGTGGAAAGAACCT TTTGTACCAACTCCAGCCTTAGGAATFAGGACCCGTGGTTATGTGCTGCCATGGGGTGGTGGATTTCTTTGATTAAGTGG TACAAACATCCCTCATTACCACTCAAGCAGGTATGCTAAATFAGATGGCCAGCAGGGTCAATGTAATGACAAAGTGGTTGG CATTGAACATTTGGTGAAGTGTGGCCACGTGGCAAGCACTACCCTGGATATTTGTAACTTGCATCATGCTCTTAGAGG TCATGCCGAGACAAGTTTTCCGGATTCCTGGGTAAAGCAATCACAAAACCATGTGACTGCCCTGCAGAGCCCTACGTGAGTTC TGTGCATGAAGGTTCTCGGCCAGAACCTFAGCTTAAAGTGAAGCAAGCCGTTCAAGCCTAAGTCTTGATCAGCT GCAGAGCTTTTCCAGCTGGAAAAATGAGGACAGCACCTTTCATCTTTGGAAATTTGAAATTTGAAAAAAGTAAAGCTGATT CCATFAGCTAACATATCTTCAAGTCCCAATCTAACCCAGAGTCTFAGAGGATGCAAGATTTCAACCAAAAGAGTAAAGGAAAGCCTT CTAACCTATGAAGTGGCCCAAGAGTGTACTCCCAAGCTTTTGTGCTTGAATCTGTGTC
	3	382	0.574	40	AGTCTCCGTGACGAAGTGAAGATTGAGTTGAAATCACTTTCG
	4	1455	0.147	178	ACTACAAAAACAACCTTTTTTACCCTCGTAGACTATGAAAACTAAGTTTTGGGGTTTTGGGGGTCAAAAATGCAAACCCTCG ATCCGGTAAACCAAGAACCTTAACTCGCACCTCCACACAGTCTAAAGAAAGTTGCAAGAAAGAAACGAAACAGGAATCGGA CTCCCGGTTATCAAGATAC
	5	141	0.0641	156	ATTTATGGTTATGAACAATAATTTAAATTAAGAACCTTACTTCTGAAACCTTTGTTTCTTTCATCATTAAGTTGTTCCCT GACCATAAATGTTTGTCCAAAAATTTGAGGTTCTCTTAGATTCTGAAACAAATATTTTATGATTATGAACAATAAT
	6	2780	0.0461	60	CCCAAAACGAGGGTTAAACGCAAAATCTGTTGCCGAAATCGAAGATATAAATCCGTTATATTT
	7	1173	0.0417	46	GAAGCGGTGATTTCTGTACTCAAGACTCCTTTCCGGTTCTTCGTTGAC
	8	132	0.0369	81	ACTTTCGTACGAAGAATCGAAGTGTTCACCCGTATCCATTTCTGTCAGGAAGAATCGAAATGATACACAACTTTATAACCGT C
	9	2608	0.0287	179	ACGCCAGAAACCTTACACGCACCTCAAAACATGCCCTAAATAAACCTTGCGGGAACCTAACGGAAATGCATAACGGATTCACG GTTTCACAAAAAATGCGAAAAAATGACTCTTTAGTCACTTAGGCTTGAAAAAAGCTTAGTTTTTGGAGTTTTTGGAGTAGTAAT CGGTAACCCGTTAACCAA
low confidence					

図1) ガクアジサイの細胞核上の 18SrDNA シグナル

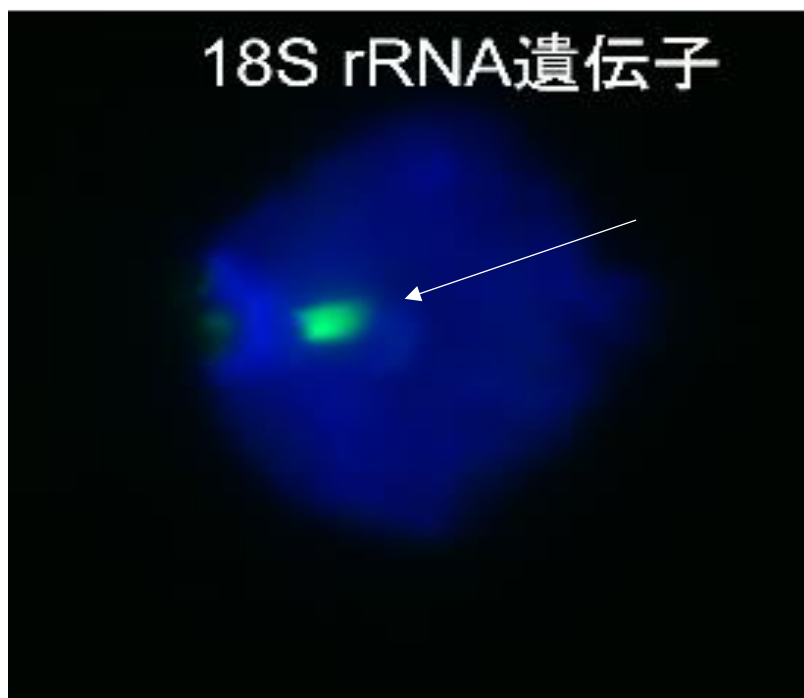


図2) ガクアジサイの細胞核上の 5SrDNA シグナル

