

## アジサイ新品種コウベイチゴウ

～親はどれ？新品種開発に向けてのゲノムからのアプローチ～

神戸大学 人間発達環境学研究所

石黒更

### 研究背景

神戸市の花アジサイは、梅雨の時期に神戸の街中や六甲山のアジサイロードなどで色鮮やかに咲き誇る。特に人気の観賞スポットである神戸市立森林植物園には、約 350 品種、5 万株のアジサイが保存されている。植物園で自然発生的に誕生した独自の新品種「コウベイチゴウ」「コウベニゴウ」はガク咲きでピンク色の花を咲かせる(森林植物園アジサイ情報センター)。神戸市独自の品種開発を促進するためには、アジサイ品種の親系統や分類の整理を行うことが重要である。そこで、本研究ではゲノム分類学的アプローチから神戸市が開発したアジサイ品種コウベイチゴウ、コウベニゴウの親系統を特定し、神戸市立森林植物園のアジサイの遺伝情報の整理を行うことを目的とした。

本研究では、まずガクアジサイとエゾアジサイを重点的に調査した。これらの種は野生種として日本国内に広く分布しており、自然交雑によって生まれた多様な系統が存在する。また、本州に多く自生するガクアジサイと北日本に広く自生するエゾアジサイは古くから育種に広く利用されており、自然発生によって誕生したコウベイチゴウ、コウベニゴウもこれらの系統に由来している可能性が高いと考えられる。このように、遺伝的背景が曖昧なまま、野生の亜種や栽培品種が次々と登場した結果、親系統の特定や系統分類が複雑化している。現時点では、ガクアジサイとエゾアジサイを正確に区別するための分子育種マーカーが存在しないため、両種間の差を示す遺伝情報の解明が急務である。分子レベルでの解析は、曖昧であった系統分類基準の明確化や、森林植物園内で見られる多様なアジサイの起源を探索する上で重要な手掛かりとなる。本研究では、植物ゲノム内で最も近縁種間の差を反映しやすい遺伝情報の一種である「反復配列」と、ゲノム全体の種間差が視覚的に観察可能な「染色体」に注目することで、種間差を示すマーカーの解明を目指す。この遺伝学的調査を通じて、品種の親系統特定や分類の精度を向上させ、将来的な品種開発における基盤を強化できると考える。

## 材料と方法

### 1. 植物材料

本研究に用いる植物材料は、全て神戸市立森林植物園のアジサイ保存園にて春から夏にかけて採取された（図1）。この調査は植物園職員のご協力のもと植物体を分譲頂いた。コウベイチゴウ、コウベニゴウと、それらの親系統候補種であるガクアジサイ、エゾアジサイについて、DNA解析用に葉を、染色体観察用に花蕾を2024年5-9月に計4回採取した。



図1 森林植物園アジサイ保存園

### 2. 親系統候補種間での特異的反復配列の解析

親系統候補2種の種間差を示すマーカーを発見するために、種特異的な反復配列の特定と、そのゲノム組成の比較を行った。2種のゲノムDNAは凍結乾燥した葉から、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN、ドイツ) を使用して抽出した（図2）。



図2 DNA抽出の様子

全ゲノム解析はAZENTA株式会社（東京）に依頼した。全ゲノム解析データを基に反復配列解析用ソフトウェア RepeatExplorer2 (Novák *et al.*, 2013) を用いて反復配列の同定を行った。

### 3. コウベイチゴウ、コウベニゴウにおける反復配列の確認

1で特定された特異的な配列が実際にコウベイチゴウ、コウベニゴウゲノム中に存在するかを調べるために、各種ゲノムDNAを鋳型にして目的の配列をPCR法で増幅し、電気泳動によってその存在パターンを観察した。PCRプライマーは、RepeatExplorer2で特定された反復配列に基づき、Primer3プログラムを使用して設計した。PCRの条件は94°C（2分）—{94°C（30秒）—53°C（30秒）—72°C（30秒）}×35サイクル—72°C（5分）とした。PCR産物は、アガロースゲル電気泳動によって泳動され、UVトランスイルミネーターを用いて泳動パターンをデジタルカメラで撮影した。

### 4. 染色体の観察

4種の染色体数や構造を比較するために、花蕾（直径：0.7~1.7 mm）を用いて、細胞分裂が盛んな組織から染色体標本作製した（図3）。蕾はメタノールと氷酢酸（3:1）の混合液で固定し、使用するまで-20°Cで保存した。染色体標本作製の際、蕾を水で十分に洗浄した後、酵素処理液（2.5% ペクトリナーゼ Y-23、1% セルラーゼ Onozuka RS）に浸漬した。37°Cで60分間インキュベートした後、蕾をエタノールと酢酸（3:1）の混合液の数滴でピンセットを用いて解離し、エアドライ

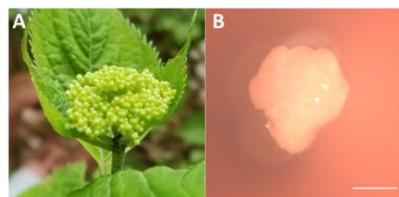


図3 染色体標本に使用された花蕾（A）体細胞分裂が盛んな花蕾は5~7月にかけて採取した。（B）0.7~1.7 mmの大きさの花蕾を使用した。スケールバー：0.5 mm

法 (Ohmido *et al.*, 1998) に従って処理した。また、種特異的な反復配列の染色体上での局在を示すために、Ishiguro *et al.* (2025) の手順に従って蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH 法) を行った。

## 結果と考察

### 1. エゾアジサイに特異的な反復配列の発見

親系統候補種であるガクアジサイおよびエゾアジサイに存在する反復配列を特定するため、反復配列解析ツール RepeatExplorer2 を用いて比較クラスタリング解析をした。

各種における反復配列の構成および存在量を比較した結果、ガクアジサイおよびエゾアジサイに存在する反復配列が明らかになった (図4)。これらの反復配列は「アジサイタンデムリピート (*Hydrangea* tandem repeat, *Hydrangea*TR)」と命名され、ゲノム全体における存在量に基づいて番号付けされた。

*Hydrangea*TR01、03、04、05a、05b については、2 種間で存在量に大きな差は見られなかった。一方、TR02 はエゾアジサイに特異的に豊富であった。この結果から、TR02 はガクアジサイとエゾアジサイを区別する分子指標として有用であると考えられた。

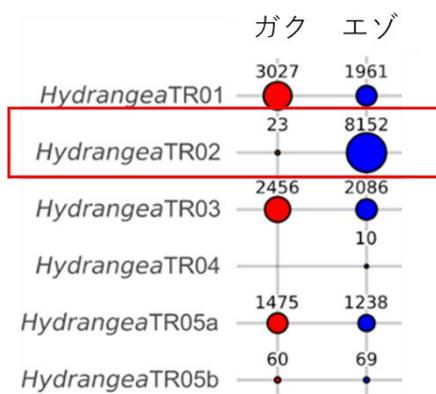


図4 ガク、エゾゲノムに存在する反復配列の種類と割合の比較  
円が大きいほど、ゲノムにおける存在量が多いことを表している。

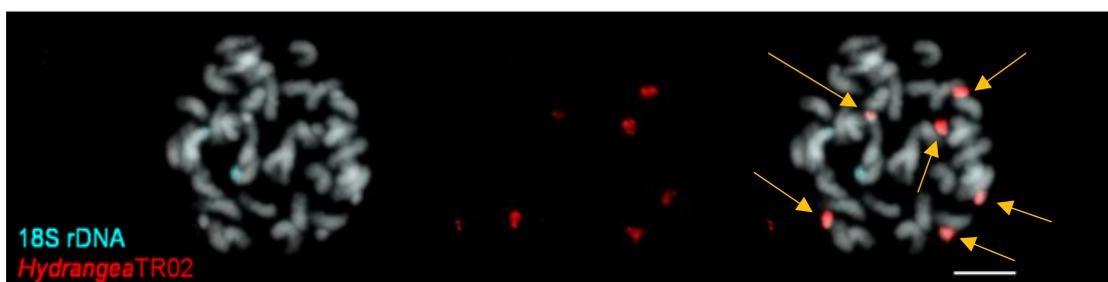


図5 エゾアジサイの染色体におけるマルチカラーFISH 灰色：エゾアジサイ染色体、赤：*Hydrangea*TR02 シグナル、青：18S rDNA シグナル、スケールバー：5  $\mu$ m

次に、FISH 法を用いて *Hydrangea*TR02 の染色体上での局在を観察した (図5)。TR02 (赤色) は、エゾアジサイの余剰染色体断片 (黄色矢印) に分布し、ヘテロクロマチン領域に局在していることが確認された。また、18S rDNA (青色) とは異なる位置に局在していることも明らかになった。これらの結果から、余剰染色体が B 染色体であること、さらに TR02 がエゾアジサイの B 染色体に特異的に局在することが示された。

### 2. コウベイチゴウ、コウベニゴウにおける *Hydrangea*TR02 の存在様式

1でエゾアジサイに特異的と同定したTR02の各ゲノムにおける存在様式を比較するために、ガクアジサイ、エゾアジサイ、コウベイチゴウ、コウベニゴウのゲノムを用いてPCRを行った。ガクアジサイではTR02のバンドは確認されなかったが、エゾアジサイでは明確なバンドが確認された(図6)。この結果は、1の結果を支持している。また、コウベイチゴウおよびコウベニゴウでもエゾアジサイと同じ位置にバンドが確認されたことから、これら2系統にTR02が存在すると推定される。しかし、コウベイチゴウおよびコウベニゴウにおけるDNAの増幅はエゾアジサイのものと比較して少ないと考えられる。したがって、これらの2系統にはTR02が存在するものの、その量はエゾアジサイほど豊富ではないと推定される。

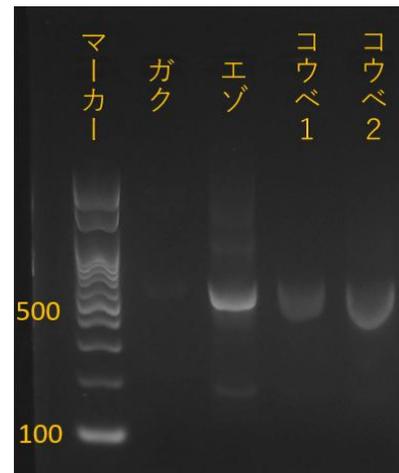


図6 アジサイ4種におけるTR02の存在様式  
増幅された基本DNAサイズは595 bp

### 3. アジサイ近縁種における染色体の数・形態比較



図7 ガクアジサイ、エゾアジサイ、コウベイチゴウ、コウベニゴウの花の写真ならびに染色体像 スケールバー：5 μm

アジサイ4種の染色体数や構造を観察するため、各種で染色体標本を作製し、蛍光顕微鏡で観察した(図7)。ガクアジサイは $2n=36$ の染色体数を示した。エゾアジサイにおいては、2で確認されたように、余剰染色体であるB染色体が確認された(図7、黄色矢印)。一方で、コウベイチゴウ、コウベニゴウの染色体数はガクアジサイと同じ $2n=36$ であり、B染色体は確認されなかった。したがって、コウベイチゴウ、コウベニゴウは染色体レベル

ではエゾアジサイと一致しないことが示された。

#### 4. コウベイチゴウ、コウベニゴウの親系統はどれ？

以上の結果から、コウベイチゴウおよびコウベニゴウはエゾアジサイに特異的な配列である *Hydrangea*TR02 は少量ながら保持している一方で、エゾアジサイ特異的な B 染色体は保持していないことが分かった。B 染色体とは環境ストレスに応答して生じることもある一つの染色体異常の事例である。これら 2 種の親系統について、本研究で用いたエゾアジサイが直接の親系統ではない可能性が示唆される。しかしながら、反復配列とは異なり、B 染色体が交雑の際に親から子へ確実に受け継がれるかどうかは明らかではない。B 染色体は交雑種において均等に分配されるわけではなく、その分裂時の挙動については未解明の点が多い。このことから、コウベイチゴウ、コウベニゴウの成立について以下の 2 つのシナリオが考えられる。

1) 2 系統の親系統がエゾアジサイのゲノム情報を一部に持つ *Hydrangea serrata* に近い系統であり、交雑によりその遺伝情報が受け継がれた。しかし、エゾアジサイとは遠縁であるため、TR02 の存在量が少なく、染色体構成も異なる。

2) エゾアジサイ由来の交雑が起こったものの、B 染色体は交雑の過程で分配されなかった。

以上を総合すると、コウベイチゴウおよびコウベニゴウは、異なる二種であるガクアジサイとエゾアジサイのいずれかに極端に近いわけではなく、*H. serrata* のいずれかの別系統と考えられる。このことは、両種の交雑による遺伝情報の混在が見られるアジサイ園芸品種として妥当であり、交雑過程や遺伝的背景についてさらに詳細な解析が求められることを示唆している。

#### 今後の展望

本研究では、育種に頻繁に用いられているものの、形態の多様さゆえに体系的な分類が困難であったガクアジサイとエゾアジサイの 2 種について、識別可能なマーカーを発見した。また、コウベイチゴウおよびコウベニゴウとこれら野生種のアジサイに関して遺伝的関係性を示唆する新たな情報が明らかになった。本研究結果を基礎的な遺伝情報として森林植物園に提供することにより、今後の育種活動において重要な役割を果たすことが期待される。すでに別途、森林植物園には作成した植物標本を 20 種程度寄贈している。更に、森林植物園に保存されている他の種においても、エゾアジサイに特異的な TR02 の存在の有無やそのパターンを解析することにより、親系統の特定や野生種との系統関係の解明に貢献すると考えられる (表)。今後は、ガクアジサイおよびエゾアジサイと同様に日本に広く自生し、自然交雑や育種において頻繁に用いられているヤマアジサイにも注目したい。ヤマアジサイは特にエゾアジサイに近縁であるため、これらの種間差を示す遺伝情報を特定することが求められる。

このように、反復配列や染色体といった遺伝情報を用いて、系統関係を研究することは、

これまで形態的特徴を重視して行われてきたアジサイの育種や分類に新たな視点を提供することができる。遺伝情報に基づいた効率的な交配や選抜を通じて、神戸市独自の新たなアジサイ品種の育成・改良を促進することで、神戸市民の生活に深く結びついているアジサイの魅力強化し、市の緑地空間の形成に貢献するように尽力したい。

表 *Hydrangea*TR02 を用いた系統解析が可能なアジサイ種

種名	学名	詳細
ヤマアジサイ	<i>Hydrangea serrata</i>	本州や九州の山岳地帯に分布する。近年、エゾアジサイと独立した種として認められた。
ヒメアジサイ	<i>Hydrangea serrata</i> (Thunb. ex Murr.) <i>Ser. forma cuspidata</i> (Thunb.) Nakai	牧野富太郎によって信越地方で発見された。
キヨスミサワアジサイ	<i>Hydrangea serrata</i> (Thunb. ex Murr.) <i>Ser. forma pulehella</i> Hayashi	千葉県清澄山に分布し、育種によく使われる。
ジョセフバンクス	<i>Hydrangea macrophylla</i> (Thunb. ex J. Murr.) <i>Ser. forma normalis</i> (E. H. Wils.) Hara	日本に逆輸入された西洋アジサイ。

## 謝辞

神戸市立森林植物園にはアジサイ植物体調査、植物体の分譲、助言、意見交換で多くのご協力を頂いたことを深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- Ishiguro S, Taniguchi S, Schmidt N, Jost M, Wanke S, Heitkam T, Ohmido N. 2025. Repeatome landscapes and cytogenetics of hortensias provide a framework to trace *Hydrangea* evolution and domestication. *Annals of Botany*, DOI:10.1093/aob/mcae184
- Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J. 2013. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics* 29: 792–793.
- Ohmido N, Akiyama Y, Fukui K. 1998. Physical mapping of unique nucleotide sequences on identified rice chromosomes. *Plant molecular biology* 38: 1043–1052.
- 神戸市立森林植物園アジサイ情報センター <https://www.kobe-park.or.jp/shinrin/ajisai/>