

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580008

研究課題名(和文)栽培ギクの起源の解明

研究課題名(英文)The origin of the cultivated Chrysanthemum

研究代表者

谷口 研至(Taniguchi, Kenji)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10163627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：キメラ遺伝子NCED3aについて、キク属25野生種79系統、390ハプロタイプの塩基配列から、種又は地域特異的相同断片を特定し、栽培ギク10品種、48ハプロタイプと比較解析を行った。全ての栽培ギク系統はシマカンギク及びリュウノウギク群の相同断片より構成され、そのうち日本型が中国型の2倍以上の高い割合で構成されていた。以上の結果に基づいて、栽培ギクは、中国でシマカンギクとリュウノウギク群が雑種化し原始栽培ギクが生じた、又は作成された。その後日本で日本型シマカンギクまたは日本型リュウノウギク群(ノジギク)と交雑することにより現代型の栽培ギクが成立したと考える、栽培ギクの2段階起源仮説を提唱した。

研究成果の概要(英文)：NCED3a gene with intragenic recombination was used for elucidating the origin of the cultivated Chrysanthemum. The single nucleotide polymorphisms were detected from 438 haplotypes in 79 strains and 10 races of 25 wild and a cultivated Chrysanthemum species.

All the cultivated Chrysanthemum races investigated were constituted of the homologous segments derived from *C. indicum* and *C. makinoi* group consisting of the segments both Chinese and Japanese species. The Japanese segments had two times more size than the Chinese segments. Based on the obtained result, a theory speculates that the cultivated Chrysanthemum was created through two steps, firstly in China and next in Japan. The primitive cultivated Chrysanthemum arose or created by hybridization between *C. indicum* and *C. makinoi* group in China, and then the cultivar was crossed with Japanese *C. indicum* and/or *C. makinoi* group (*C. japonense*) in Japan, and a modern cultivar was established.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：キク属 栽培ギクの起源

## 1. 研究開始当初の背景

栽培ギクは我が国の切り花生産の40%を占める産業上もっとも重要な花卉である。これまでに栽培ギクの起源を解明するために、多くの研究者が取り組んできたて、多くの考えが提唱された。これらの中で、現在では北村(1934)による、黄花系の四倍体シマカンギクと白花イワギク系の二倍体チョウセンノギクとの雑種化により三倍体ができ、これが複二倍体化して、六倍体の栽培ギクができたとする考えが一般に採用されている。分類学的な立場に細胞遺伝学的な視点を加えた仮説は仮定的な要素が強く、しかも遺伝学的な点からの証明はなされていない。

さらに注意を要するのは、倍数性種における染色体分配様式である。一般に同質倍数体は相同染色体がランダムに分配されると考えられてきたが、近年、選択的に分配するという報告がなされ、改めて議論になっている。もし、選択的分配であれば、雑種化・倍数化した際に受け継がれた親の染色体は子孫に受け継がれることになるが、ランダム分配であれば、後代子孫においては片方の親の染色体が失われてしまう可能性もある。したがって、栽培ギクの起源を解析する時に、この染色体の分配様式についても考慮して仮説を立てる必要がある。

ゲノムの相同性が極めて高いキク属種間においても、種を区別出来る分子マーカーが設計出来るようになった現在、長年の懸案であったこの問題を直接的な証拠により解明する時が来たと言える。

## 2. 研究の目的

1934年に北村による分類学的と細胞遺伝学的な視点から、黄花系の四倍体シマカンギクと白花の二倍体イワギク系チョウセンノギクの複二倍体化によって六倍体の栽培ギクができたとする考えが提唱され、70年以上過ぎた今でも通説となっている。しかしながら、当時の考えは形態学及び細胞遺伝学に基づいたもので仮定的要素が多く、現在ではさらに説得力をもつ根拠を必要としている。分子レベルの技術が進歩した現在、遺伝学及び分子レベルで検証を加えていくことが可能となっている。そこで本研究では分子レベルでキク属野生種の種特異性を調べ、栽培ギクと比較することにより、栽培ギクに含まれる野生種の特異性を解析し、起源を明らかにしていく。

## 3. 研究の方法

材料：野生ギク 24 種（無舌状花群 7 種 (6x, 8x, 10x), 黄花群 2 種 3 taxa: キクタニギク (2x), シマカンギク (2x, 4x), 白花リュウノウギク群 9 種: 中国種 2 種 (2x, 6x), 台湾種 1 種 (2x), リュウノウギク (2x), ワカ

サハマギク (4x), ナカガワノギク (4x), ノジギク (6x), サツマノギク (8x), オオシマノジギク (10x), 白花イワギク群 6 種 (2x, 6x, 8x, 10x)), 栽培ギク 5 品種群 10 品種 (大輪ギク: ‘国華の静’, ‘泉郷可憐’, 中国ギク: ‘翡翠嶺’, ‘粉毛刺’, スプレーギク: ‘ゴールデンシルク’) の計 90 系統を用いて解析を行った。

候補 DNA: キク属の種特異性、地域特異性、個体特異性マーカーDNA の探索として、我々がすでにキク属から単離して塩基配列を確かめている種特異的反復 DNA 24 種、rDNA および NCED3a, 3b, CCD4a, 4b 遺伝子から、プライマーを設計し、キク属の 4 グループ (無舌状花系、黄花系、白花系 2 群) の二倍体 5 種について塩基配列を調べ、グループ、種、あるいは集団に特異的な多型サイトを PCR プライマー設計、あるいは制限酵素分解によって比較し栽培ギクの起源解析に有効な遺伝子の選別を行った。

DNA 抽出・クローニング: キク属 25 種 90 系統の DNA を常法に従って抽出し、NCED3a 遺伝子 (カロテノイド合成酵素) の PCR 増幅断片をクローニングした。予備実験により多型性が非常に多いことが確認されていたので、ゲノム中の全ての多型を検出するために各系統につき 72~240 クロオンをピックアップし、5 種の制限酵素を用いて制限酵素型を決定した後、ゲノム中に出現した 1 クロオンのみの制限酵素型は除き、残りの型の各 1-3 クロオンについて、塩基配列の解析を行った。塩基配列の解析には、塩基置換の位置情報のデータ解析プログラムを独自に作成し、456 クロオンについて種群・種・産地・品種・個体の特異性を調べ、NCED3a 遺伝子のハプロタイプ間の相同断片の比較解析を行った。

倍数体の遺伝的分配解析: 六倍体栽培ギクの遺伝的分離解析が目的であるが、キクを含む植物では四倍体に関してもほとんどわかっていない。そこで本課題では動植物を含め最近議論が盛んにされるようになってきている四倍体に限定して解析した。同質四倍体と複二倍体 (部分異質倍数体) を作成した。同質倍数体は自殖キクタニギク AEV2 を、複二倍体はリュウノウギク (ABP23) とキクタニギク (AEV2) の F1 種子を用いた。播種から 3-6 日の発芽種子に 0.02% コルヒチンを 2-3 日処理し、染色体数を調べ、遺伝的分配のための交配材料とした。

## 4. 研究成果

### 1) キク属二倍体種の多型解析

マーカーDNA の探索とゲノム DNA の多型解析について、予定どおり、特異的反復 DNA 24 種、rDNA の IGS 領域、CCD4a, CCD4b, NCED3a, NCED3b 遺伝子 4 種について、キク属の 4 グ

ループ（無舌状花系、黄花系、白花系 2 群）の二倍体 5 種について塩基配列を調べ、RCR バンド、あるいはその制限酵素分解によって、キク属 27 種のグループ、種、あるいは集団に特異的なマーカーが同定された。

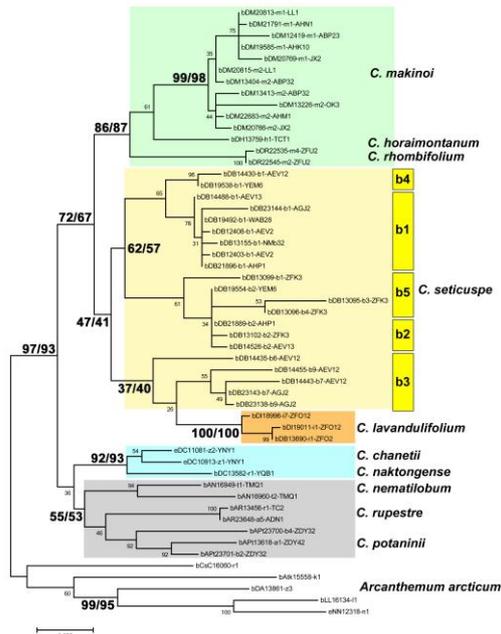


図 1. NCED3a 遺伝子による二倍体キク属植物の近隣結合法と最尤法による系統樹。

以上の遺伝子のうち NCED3a 遺伝子から描かれた二倍体キク属種の分子系統樹はこれまでの形態分類によるグループ区分と非常によく対応しており、無舌状花群、黄花群、白花リュウノウギク群、白花イワギク群の 4 クレードが区別された。さらに従来から問題となっていた分類群であるチシマコハマギク *Chrysanthemum arcticum* L. はハマギクと同じクレードに含まれた。本種は瘦果の形態がキク属とは大きく異なり、ハマギクのグループとよく似ていることから本種を別属とした *Arcanthemum arcticum* (L.) Tzvelev を採用する。しかし倍数体種の分子系統樹は形態分類群を全く反映しなかった。これは NCED3a 遺伝子が遺伝子内で複数の野生種の DNA 断片より構成された、すなわち遺伝子内組み替えを起こしたキメラ遺伝子を構成していた。遺伝子内組み替えにより 2 種の遺伝子の複合体を形成することにより新しくできたはずのハプロタイプは、分子系統樹上ではルートの方に位置し、古い系統として認識される。しかし、この特徴が逆に倍数体種の祖先親を推定する重要な決め手となることが確かめられた。

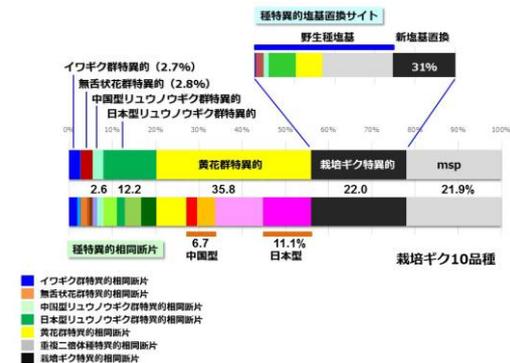
## 2) 倍数体種の多型解析

田中 (1959) はワカサハマギクの起源について白花種の二倍体リュウノウギクと黄花種のキクタニギクあるいはシマカンギクの雑種

起源であると推定していたが、黄花種はキクタニギクとシマカンギクのいずれかについては決定できなかった。そこでこの詳細な研究に対し、キメラ遺伝子を利用した起源解析がどの程度有効性をもつか確かめた。ワカサハマギク 6 系統について NCED3a 遺伝子の 38 ハプロタイプの塩基配列を解析した結果、シマカンギクとリュウノウギクの相同断片より構成されており、さらにワカサハマギクに特異的な、新たに生じた相同断片より構成されていた。以上の結果より、ワカサハマギクは黄花種のキクタニギクではなく、シマカンギクとリュウノウギクの雑種起源であることが確かめられた。これまで残されていた問題も併せて解決された。

## 3) 栽培ギクの起源

ワカサハマギクを含め、解析した NCED3a 遺伝子は、すべての倍数体種において祖先種の遺伝子断片より構成された、キメラ遺伝子であった。この特性を利用して、野生種との遺伝子断片のマッチングを行うことで、祖先野生種を探ることが可能であることが確認された。栽培ギク 10 品種、46 ハプロタイプの比較を行った結果、栽培ギク 10 品種はいずれも黄花シマカンギク群、白花リュウノウギク



群、栽培ギクの特異的相同断片を主要な構成要素とし、構成割合はそれぞれ 36%、15%、22%であった。また、栽培ギクに特異的な相同断片は全く新しく創られたものではなく、組み替え過程で野生種特異的塩基置換部位の組み合わせの変更が起こったことが主要因であることが確かめられた。野生種の相同断片のうち、シマカンギクとリュウノウギク群の相同断片は、日本型が約 75%、中国型が 25%と予想に反して日本型が 3 倍の割合を占めていた。シマカンギクは日本と中国あるいは中国の地域間で、お互いに特異性を示し、栽培ギクのシマカンギク特異的相同断片が日本型と中国型の断片を区別することができ、日本型が高い割合を示していた。また日本型リュウノウギク群のうちノジギクの相同断片が品種間で幅広く見られた。一方、栽培ギク 3 品種で日本産サツマノギク、2 品種で日本産イソギクの相同断片を多く含んでいた。

以上の結果より、栽培ギクは二段階で現代

の栽培ギクが成立したものである。すなわち、中国のシマカンギクとリュウノウギク群の雑種化により原始的栽培ギクが作成され、その後日本のシマカンギク及び日本型リュウノウギク群（特にノジギク）が交配されることにより現代の栽培ギクが成立したと考えられる。そう考えると高い割合の日本型野生種の相同断片を含むことが無理なく考えられる。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2件）

① Taniguchi, K., Kusaba, M., Nakata, M. and Kadota, Y. Unique Forms of Leaf and Capitulum in *Chrysanthemum seticuspe* (Maxim.) Hand.-Mazz. f. *seticuspe* is contained within Morphological Diversity of *C. seticuspe* f. *boreale* (Makino) Mem. Natl. Mus. Nat. Sci., Tokyo、査読無、49、2014、11-15

② Kenji Taniguchi, Koshiro Motohara, Makoto Kusaba and Masashi Nakata: The phylogenetic relationships between *Chrysanthemum seticuspe* and *C. seticuspe* f. *boreale* based on NCED3a gene. Mem. Natl. Mus. Nat. Sci., Tokyo、査読無、49、2014、17-22

〔学会発表〕（計 6件）

①中田政司・本原宏志郎・山根虹子・谷口研至（2013. 6. 2）外来キクタニギクによる固有種リュウノウギクの遺伝的汚染が始まっている?! 植物地理・分類学会 2013 年度大会（福島大学）

②本原宏志郎・谷口研至・韓晶・山根虹子・中田政司・世羅徹哉・井上尚子・陳瑞陽・納海燕・マムテイミン・陳力・G.-L. Liang・李先源・鄧紅紅・草場信（2013. 9. 20）NCED3a 遺伝子から見た栽培ギクの起源 園芸学会 平成 25 年度秋季大会（岩手大学上田キャンパス）

③本原宏志郎・山根虹子・谷口研至・韓晶・中田政司・世羅徹哉・井上尚子・陳瑞陽・納海燕・マムテイミン・陳力・G.-L. Liang・李先源・鄧紅紅・草場信（2013. 10. 13）雑種形成による同質倍数性ゲノム進化過程の解析ーキク属植物の NCED3a と NCED3b 遺伝子の挙動の違いー 育種学会 2013 年秋季第 124 回講演会（鹿児島大学）

④中野道治・谷口研至・増田優・草場信（2014. 3. 29-30）自家和合性キクタニギク:キク属分子遺伝学研究のためのプラットフォーム 園芸学会 平成 26 年度春季大会（筑波大学）

⑤谷口研至・中野 道治・草場信（2014. 3. 30）キクを種子からつくる 園芸学会 平成 26 年度春季大会（筑波大学）

⑥中田政司・谷口研至・上原歩・岩科 司・本原宏志郎・草場信・門田裕一（2014. 3. 21-22）皇居にのみ現存するカモメギクの正体 日本植物分類学会第 13 回大会（熊本大学）

〔図書〕（計 1件）

①谷口研至（2013）11 章：イエギクー東アジアの野生ギクから鮮やかな栽培品種へ。栽培植物の自然史 II-東アジア原産有用植物と照葉樹林帯の民族文化。北海道大学出版会、139-158.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷口研至 (Taniguchi, Kenji)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10163627

### (2) 研究分担者

草場信 (Kusaba, Makoto)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20370653

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：