

NCED3a 遺伝子からみたカモメギクとキクタニギクの系統関係

谷口 研 至^{1*}・本原宏志郎¹・草 場 信¹・中田政司²

¹広島大学大学院理学研究科
〒739-8526 広島県東広島市鏡山 1-4-3

*E-mail: taniken@hiroshima-u.ac.jp

²富山県中央植物園
〒939-2713 富山県富山市婦中町上轡田 42

Phylogenetic Relationships between *Chrysanthemum seticuspe* f. *seticuspe* and *C. seticuspe* f. *boreale* Based on *NCED3a* Gene

Kenji Taniguchi^{1*}, Koshiro Motohara¹, Makoto Kusaba¹ and Masashi Nakata²

¹ Laboratory of Plant Chromosome and Gene Stock, Graduate School of Science, Hiroshima University,
1-4-3 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8511, Japan

*E-mail: taniken@hiroshima-u.ac.jp

² Botanic Gardens of Toyama,
42 Kami-kutsuwada, Fuchu-machi, Toyama 939-2713, Japan

Abstract. *Chrysanthemum seticuspe* f. *seticuspe* (Maxim.) Hand.-Mazz. cultivated only in the Imperial Palace, Tokyo, had been distinguished from *C. seticuspe* f. *boreale* (Makino) H. Ohashi & Yonek. only by the unique forms of leaf and capitulum. To find out the phylogenetic relationship between two taxa at the molecular level, we analyzed the phylogenetic tree and the intragenic homologous segments using *NCED3a* sequences. In *C. seticuspe* f. *boreale*, five types (b1, b2, b3, b4 and b5) were identified from 38 haplotypes in eight individuals, and each genotype was composed of a combination of some types. On the other hand, the genotype of *C. seticuspe* was a combination of b1 and b2 types common in *C. seticuspe* f. *boreale*. The unique morphological phenotypes characterized as *C. seticuspe* also were confirmed to be contained in a part of morphological variations of *C. seticuspe* f. *boreale* (Taniguchi *et al.*, 2013). Considering all the evidence from these results, it may be accepted suggestion that *C. seticuspe* is the same taxon as *C. seticuspe* f. *boreale*, because it is one of the natural variation in the other and is considered to be selected from wild population and thoroughly cultivated with keeping the wild genotypes.

Key words: Asteraceae, *Chrysanthemum*, haplotype, molecular phylogenetic tree, *NCED3a* gene.

はじめに

キク属の類縁関係については、これまで細胞学的知見と形態、生態を加味した系統図が描かれているが(田中・下斗米, 1978; Nakata and Tanaka, 1989; 中田 1994), これらは厳密な形質評価を行った系統解析ではない。一方、分子遺伝学的情報に基づく系統図もあるが、解析した遺伝子に

よって異なる系統樹が描かれている。また、キク属内のサブクレードにおいて有意な差が認められず、形態分類との関係を比較することが困難である(Masuda *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012)。いずれにしても、これらはカモメギク *Chrysanthemum seticuspe* (Maxim.) Hand.-Mazz. f. *seticuspe* を扱ってはならず、キク属の中でのカモメギクの系統的位位置は不明であった。

谷口はカロテノイド生合成酵素の一つである 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase の遺伝子 *NCED3a* の塩基配列に基づく解析がキク属の類縁研究に有効であることを明らかにし、栽培ギクの起源の解明を試みている（谷口ほか、未発表：園芸学会 2013）。今回、国立科学博物館の「皇居の生物相調査第Ⅱ期」の一環として、カモメギクの系統的位置付け、特にキクタニギク *C. seticuspe* f. *boreale* との関係を明らかにするために、*NCED3a* 遺伝子の塩基配列について比較検討を行ったのでその結果を報告する。

材料および方法

材料としては、すでに解析している二倍体野生ギク 14 種（外群 4 種、無舌状花群 3 種、黄花群 2 種、白花群 5 種）（谷口ほか 未発表：園芸学会 2013）の塩基配列と、カモメギク、皇居東御苑本丸跡に植栽されていたもので、2012 年 11 月 30 日より借用中）、系統番号 AHP1 の 1 個体葉標本を使用した。

カモメギクの DNA 抽出から塩基配列解析までの操作方法は以下のとおりである。成長中の若い葉の DNA を CTAB 法により抽出し (Doyle and Doyle, 1987)、カロテノイド合成酵素をコードする 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3a (*NCED3a*) 遺伝子 (Ohmiya *et al.*, 2006) の PCR 増幅断片をクローニングした。DNA の増幅は Nested PCR 法によって行った。プライマーは *NCED3a* 遺伝子の CDS 領域 1805 bp について、一段階目は 312R (CTAAATCACGGGCTGGAATAAA), 311F (5'-CAACAATGGCAACTTCTTCAAA-3'), 2段階目は 415R (5'-AGGCCAAAAT ATGACCATCG-3'), 414F (5'-TCAAACGCCCTCAATTCTTC-3') として最終的に 1493 bp が増幅されるように設計した。PCR 反応液は 1 段階目も 2 段階目も、KOD FX Neo (東洋紡) を用いて調製し、DNA 増幅装置は ABI GeneAmp PCR System 9700 を使用した。反応条件は 94°C で 2.5 min denature 後、94°C で 45 sec, 57°C で 1 min, 72°C で 2 min の 35 サイクルとし、最後に 72°C で 10 min DNA 伸長を行った。増幅 DNA は PEG 沈により精製し、蒸留水で 50 ng/μl になるように調製した。クローニングは TA クローニングキット (T-Target Clone(TM)-Plus-, 東洋紡) と pT7Blue T-Vector (Novagen) を使用して、ライゲーションを行い、大腸菌 DH5α 株 (RBC Bioscience) を用い

て形質転換を行った。予備実験により多型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 クローンをピックアップし、種特異性を検出する 5 種の制限酵素 (*HaeIII*, *TaqI*, *AfaI*, *HinfI*, *MboI*) を用いて制限酵素型を決定した後、全ての型から 1-3 クローンを選択し、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer により各クローンの塩基配列の解読を行った。ただし、1 クローンのみの多型は PCR recombination のために生じたものと判断し、解析から除外した。

塩基配列の解析は MEGA5 の解析ソフトの近隣結合法 (NJ 法; Saitou and Nei, 1987; Felsenstein, 1985; Tamura *et al.*, 2004; Tamura *et al.*, 2011) により系統樹を作成して行った。また、系統樹による解析では種内の多様なハプロタイプ間の塩基配列の違いを有意差をもって比較することは一般的に困難であることから、塩基置換サイトの変異を生データのまま比較した。小数のハプロタイプ程度の比較ではそのまま塩基置換サイトを比較すれば良いが、キク属全体として比較するとなれば数千ハプロタイプの中からの比較が必要となる。そこで、塩基置換の変異サイトの位置情報と変異塩基について、隣接した変異サイト間の相同断片を最小単位とした情報をデータベース化し、解析したハプロタイプ間の塩基配列の相同性を検索するプログラムを独自に作成した (谷口 未発表)。この情報に基づいて、*NCED3a* 遺伝子 38 クローンについて、ハプロタイプ特異領域をマッピングし、ハプロタイプ間の相同断片解析を行った。相同断片の比較はハプロタイプ間および個体間で共通性をもつ断片を対象とし、1 ハプロタイプのみの特異的塩基配列の変異に関しては除外した。この方法で、キクタニギクの 6 集団 8 系統とカモメギク 1 系統を解析した (図 1)。

結果と議論

キク属二倍体種は、すでに *NCED3a* 遺伝子の分子系統樹からリュウノウギク群、キクタニギク群、無舌状花群、イワギク群の 4 群に区別され、キクタニギク群を除く各群の種は高いブートストラップ確率でクレードを形成し、形態分類と一致することが確かめられている (谷口ほか 未発表：園芸学会 2013)。二倍体のキクタニギク群は中国のホソバアブラギク *C. lavandulifolium* (Fisch.

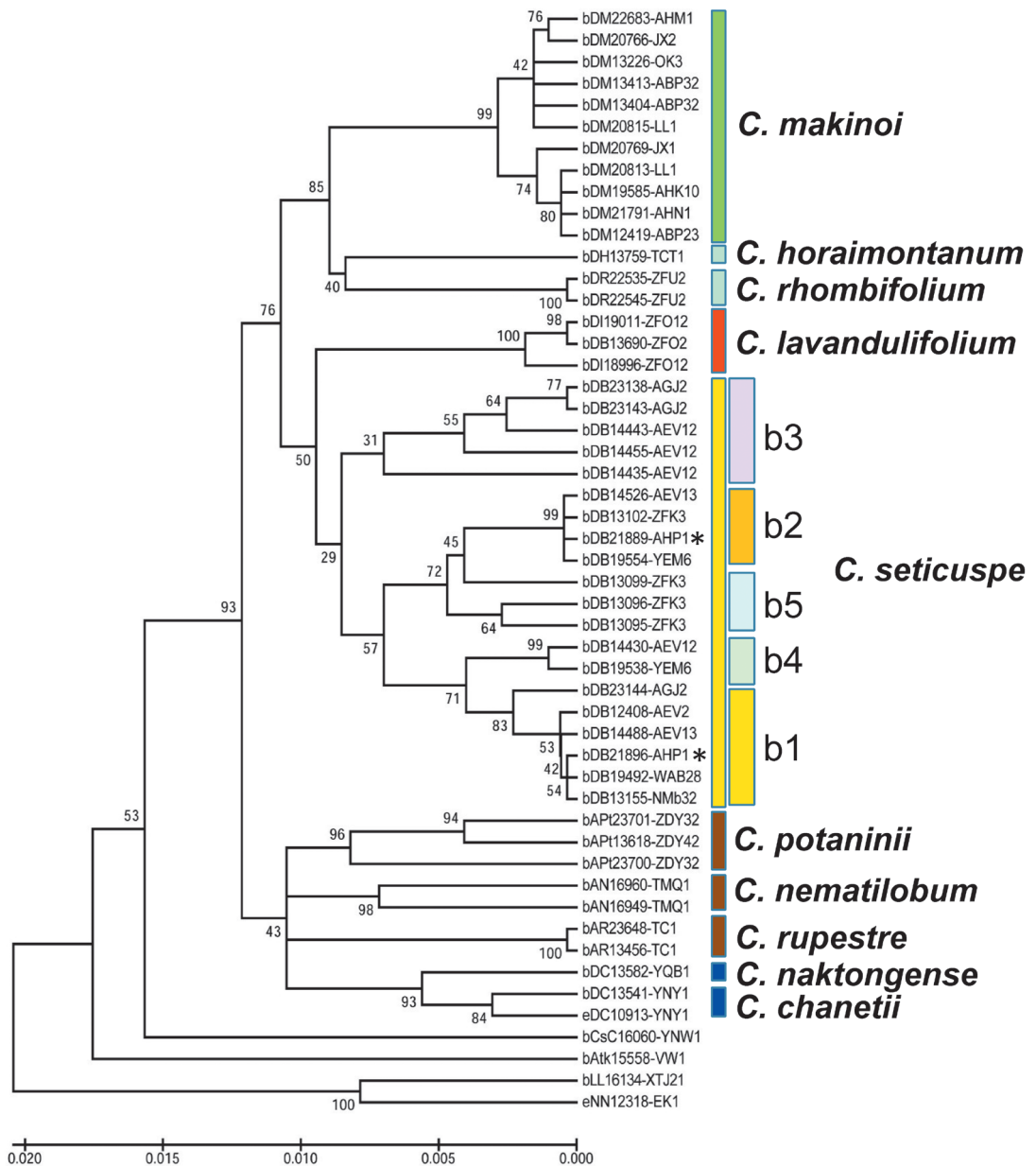


図1. *NCED3a* 遺伝子の二倍体キク属10種の近隣結合法による系統樹とキクタニギクのハプロタイプ型。キク属以外の外群として、CsC (*Crossostephium chinense* (L.) Makino), AtK (*Artemisia keiskeana* Miq.), LL (*Leucanthemella linearis* (Matsum. ex Matsum.) Tzvelev.), NN (*Nipponanthemum nipponicum* (Franch. ex Maxim.) Kitam.) を使用。それぞれの種の省略記号は系統樹に付しているDNA系統の先頭記号として表示。

ex Trautv.) Makino とキクタニギクのサブクレードに区別された。ホソバアブラギクは高いブートストラップ確率を示し、1クレードにまとまっていたのに対し、キクタニギクのハプロタイプは多型

的で、ブートストラップ確率が非常に低く、下位のサブクレード（ハプロタイプ型：b1, b2, b3, b4, b5）に区別された。解析した8個体内、b1型が5個体、b2型が3個体、b3とb4型が2個体、b5型

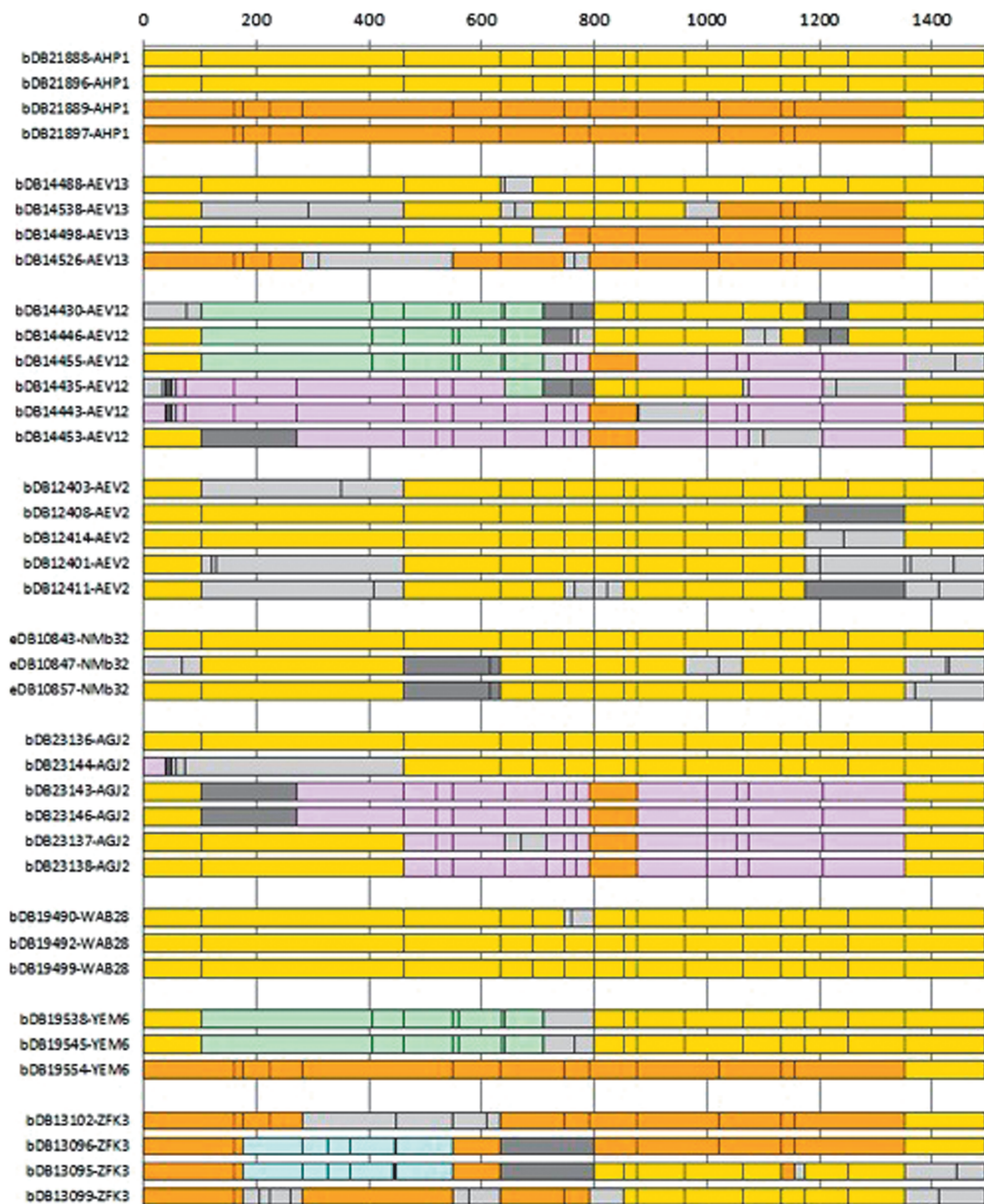


図2. *NCED3a* 遺伝子におけるカモメギクとキクタニギクのハプロタイプ多型. 各ハプロタイプの縦区切りは二倍体キク属種のコンセンサス配列に対する塩基置換部位を示す. 黄色はb1型特異的, 橙色はb2型特異的, ピンク色はb3型特異的, 淡緑色はb4型特異的, 水色はb5型特異的, 淡灰色はハプロタイプ特異的相同断片, 灰色は個体特異的相同断片を示す.

が1個体に見られた. これらのハプロタイプ型は地域型としてそれぞれの型が存在するのではなく, 個体内で異なるハプロタイプ型の組合せと

してもっているものが多くあった (図2).

解析に供試したカモメギクはキクタニギクに多く見られるb1とb2型ハプロタイプの組合せから

構成されていた。b1型ハプロタイプはAEV（奈良）、NM（佐賀）、WAB（韓国）集団個体のハプロタイプと全く同じ塩基配列であった。b2型ハプロタイプはYEM（中国）集団と全く同じ塩基配列であり、2塩基違いの個体はAEV（奈良）集団に見られた。またb1とb2型の組合せは奈良集団のAEV13と同一であった。

NCED3a 遺伝子からはキクタニギクとカモメギクは同一クレードに属しており、構成ハプロタイプも一般的なキクタニギクに見られる型であることから、カモメギクは多様なキクタニギクの一型とみなすことができる。カモメギクやキクタニギクを中国のホソバアブラギクのシノニムとする見解(Shi *et al.* 2011)もあるが、*NCED3a* 遺伝子からは支持されない。

谷口ほか(2013)は、キクタニギクにみられる葉形の変異を分析し、カモメギクに似た細い側裂片の葉をもつ日本（奈良）の個体群内の個体間交配子孫にも同じ葉形が出現することを報告している。遺伝的にもまた形態的にも、カモメギクはキクタニギクの変異の範疇に入ることから、両分類群を品種ランクで区別する必要がないという見解も可能である。その場合、多くの変異を包括する母体のキクタニギクの学名が、変異の一型であるカモメギクの学名のシノニムとなってしまうが、命名法上のことなので仕方がない。

NCED3a 遺伝子によるキクの系統解析はまだ始まったばかりである。日本、韓国、中国のキクタニギクの解析個体数が増えれば、カモメギクがどのキクタニギク個体群に由来するか明らかになるかもしれない。

謝 辞

本調査の実施に便宜を図っていただいた宮内庁管理部庭園課の矢藤光三氏にお礼を申し上げます。また、本研究の一部はJSPS科研費 23580008の助成を受けたものです。

引 用 文 献

Doyle, J. J. and J. L. Doyle, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11–15.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783–791.

北村四郎, 1967. 日本の野生菊の分布に関する報告. 植物分類・地理, **22**: 109–137.

北村四郎, 1987. 合弁花類3種について. 植物分類・地理, **38**: 380–382.

Ohashi, H. and K. Yonekura, 2004. New contribution in *Chrysanthemum* (Compositae-Anthemideae) of Asia with a list of Japanese species. *The Journal of Japanese Botany* **79**: 186–195.

Ohmiya, A., S. Kishimoto, R. Aida, S. Yoshioka and K. Sumitomo, 2006. Carotenoid cleavage dioxygenase (*CmCCD4a*) contributes to white color formation in *Chrysanthemum* petals. *Plant Physiology*, **142**: 1193–1201.

Liu, P.-L., Q. Wan, Y.-P. Guo, J. Yang, G.-Y. Rao, 2012. Phylogeny of the Genus *Chrysanthemum* L.: evidence from single-copy nuclear gene and chloroplast DNA sequences. *PLOS ONE*, 7, Issue 11, e48970.

Masuda, Y., T. Yukawa and K. Kondo, 2009. Molecular phylogenetic analysis of members of *Chrysanthemum* and its related genera in the tribe Anthemideae, the Asteraceae in East Asia on the basis of the internal transcribed spacer (ITS) region and the external transcribed spacer (ETS) region of nrDNA. *Chromosome Botany*, **4**: 25–36.

中田政司, 1994. 日本産キク属の分化. 門田裕一（編）, 週刊 朝日百科 植物の世界2, アザミ ノジグク ハマギク. 1–51. 朝日新聞社, 東京.

Nakata, M. and R. Tanaka, 1989. Species of *Chrysanthemum* in Japan in the study of chromosomes. In: Hong, D.-Y. (ed.), Plant Chromosome Research 1987. 17–22. Organizing Committee of the Sino-Japanese Symposium on Plant Chromosomes, Hiroshima.

Saitou, N. and M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 406–425.

Shi, Z., C. J. Humphries and M. G. Gilbert, 2011. *Chrysanthemum*. In: Wu, Z. Y., P. H. Raven and D. Y. Hong (eds.), Flora of China **20–21**: 669–677. Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden, St. Louis.

Tamura, K., M. Nei and S. Kumar, 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, **101**: 11030–11035.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**: 2731–2739.

田中隆荘・下斗米直昌, 1978. 日本産野生菊の種類. 植物と自然, **12**(9): 6–11.

谷口研至・草場 信・中田政司・門田裕一, 2013. カモ

メギクの葉形と頭状花はキクタニギクの変異に含まれる. 国立科学博物館専報, (49): 11–15.

Zhao, H.-B., F.-D. Chen, S.-M. Chen, G.-S. Wu and W.-M. Guo, 2010. Molecular phylogeny of *Chrysanthemum*,

Ajania and its allies (Anthemideae, Asteraceae) as inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast *trnL-F* IGS sequences. *Plant Systematic and Evolution*, **284**: 153–169.