

【原著論文】

静岡県伊豆半島東部城ヶ崎海岸に生育するガクアジサイ
変わり咲き型個体と野生型個体の遺伝的關係

砂川 悠太¹・平澤 哲²・渡辺 洋一^{*,3}

Genetic relationships between individuals of horticultural and wild types of *Hydrangea macrophylla*, which grows along Jogasaki coast in the east side of Izu Peninsula, Shizuoka Prefecture, Japan

Yuta Sunakawa¹, Tetsu Hirasawa², Yoichi Watanabe^{*,3}

要旨：園芸植物として利用されるアジサイは、その野生種であるガクアジサイを含めいくつかの異なる花型が知られている。その中でも手まり咲き型の園芸品種は野生には見られない特徴的な花型として多く植栽されている。しかし、この手まり咲き型は静岡県伊豆半島東部の城ヶ崎海岸において野生型の個体と同所的に見られ、この花型が自生である可能性が考えられる。この仮説を検証するために MIG-seq 法を用いた一塩基多型 (SNPs) の検出を行い、伊豆半島の石廊崎および伊豆諸島の神津島の自生個体も加えた遺伝解析を行った。検出された 281 SNPs を用いて解析を行った結果、神津島と伊豆半島の集団は明瞭に区別でき、伊豆半島の城ヶ崎海岸と石廊崎集団はゆるやかには区別できた。城ヶ崎海岸の野生型と手まり咲き型を含む変わり咲き型はヘテロ接合度の期待値に差が見られず、遺伝的關係は高い類似性を示した。加えて、城ヶ崎海岸内において地理分布と遺伝的類似性は弱い空間自己相関を示した。これらの結果から、城ヶ崎海岸の手まり咲き型の個体は自生であると考えられ、重要な遺伝的資源として保全の重要性が高いと言える。

キーワード：アジサイ属、集団遺伝解析、手まり咲き、自生集団、MIG-seq

Abstract: The ornamental plant *Hydrangea macrophylla* has various inflorescence types, including its wild forma. The mophead inflorescence, which is considered to be a cultivated type, is particularly distinctive compared with the wildtype (lacecap) inflorescence. However, plants with mophead inflorescences grow with the wildtype along the Jogasaki coast on the Izu Peninsula, Shizuoka Prefecture, Japan, indicating that this inflorescence type may be a natural form. To test the hypothesis, we conducted genetic analysis of wild individuals from the Jogasaki coast, along with examples from Irozaki on the Izu Peninsula and Kozu Island, based on single nucleotide polymorphisms (SNPs) obtained by MIG-seq. Based on 281 SNPs, we were able to distinguish individuals from the populations on Kozu Island and the Izu Peninsula, and slightly distinguish those from populations of Jogasaki and Irozaki in the Izu Peninsula. Expected heterozygosity did not differ between the two types of inflorescence from Jogasaki. Furthermore, geographic distribution and genetic similarity exhibited weak spatial autocorrelation in Jogasaki. This evidence suggests that mophead inflorescences appear naturally in Jogasaki. This is an important genetic resource that should be conserved.

Key words: *Hydrangea*, population genetic analysis, hortensia, wild populations, MIG-seq

* E-mail: ashitaka3776@gmail.com

¹ 千葉大学園芸学部 Faculty of Horticulture, Chiba University, 648 Matsudo, Matsudo, Chiba, 271-8510, Japan

² 静岡県伊東市 Izu City, Shizuoka Prefecture, 1156-2 Yawatano, Ito, Shizuoka 413-0232, Japan

³ 千葉大学大学院園芸学研究院 Graduate School of Horticulture, Chiba University, 648 Matsudo, Matsudo, Chiba, 271-8510, Japan

2024 年 4 月 8 日受付、2024 年 5 月 31 日受理

はじめに

アジサイ [*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.] は、代表的な日本原産の園芸植物である。この学名は園芸品種に与えられており、その花は装飾花が 20 個以上認められる‘手まり咲き’と呼ばれる特徴を有している (Wilson 1923)。一方、自生個体では装飾花の数は 8 前後であり、花の周囲にのみ認められる‘額咲き’と呼ばれる特徴を有している。この特徴を持つ個体はガクアジサイ [*H. macrophylla* f. *normalis* (E.H.Wilson) H.Hara] として区別されている (原 1955)。ガクアジサイは日本固有種で、本州の伊豆半島・三浦半島・房総半島、伊豆諸島および小笠原諸島の北硫黄島・南硫黄島に分布する。その生育環境は、分布北限では海岸部に限定されている。

手まり咲きの特徴を有する個体はアジサイ属の他の野生種と比べても特徴的な形態であるため、品種改良されたものであるとの考えがある。しかし、ごくわずかながら野生での観察事例もあり、この形態変異が昔から自生集団に存在していた可能性もある。野生でまとまった数の手まり咲き型の個体が観察できる集団として、静岡県伊豆半島東部に位置する城ヶ崎海岸がある (図-1)。当地は、大室山付近からの溶岩流によって形成された崖地状の海岸であり、1990 年代以降、平澤哲により手まり咲き個体 (手まり咲き型) および額咲きで装飾花が八重化した個体 (八重の額咲き型) が発見されている (図-2)。本論文ではこれらを変わり咲き型と定義する。しかし、アジサイが江戸時代から観賞

されてきた歴史や当地が住宅地に隣接している点を踏まえると、これらの個体はアジサイ園芸品種が野生化した可能性も棄却できない。もし、当地の個体が真の自生であった場合、天然遺伝資源として保全の重要性が高いと言える。

自生か野生化かを検証する方法として、複数地点から採取した個体の遺伝的変異の比較がある。特に、変わり咲き型が認められる城ヶ崎海岸と周辺地域に生育する自生個体を対象とすることで、城ヶ崎海岸における変わり咲き型の遺伝的関係から出自を明らかにすることが期待される。本研究では、これらの変わり咲き型の個体および近隣に多数生育する額咲き型の自生個体を対象に複数の一塩基多型 (SNPs) を用いた遺伝解析を行うことで、変わり咲き型が自生なのか検証し、天然資源の遺伝的特徴を解明することを目的とした。

材料と方法

調査地と材料

変わり咲き型の遺伝的変異を野生型である額咲き型と比較するために、両型の生育する城ヶ崎海岸に加え、分布が近接し額咲き型のみが生育する伊豆半島の石廊崎と伊豆諸島の神津島を調査地とした (図-1)。変わり咲き型が観察される城ヶ崎海岸は、ガクアジサイの分布北限地帯に相当する。同じく分布北限地帯である関東地方では、三浦半島や房総半島にも分布するとされるが、いずれの地域でも都市化の影響で海岸部付近に

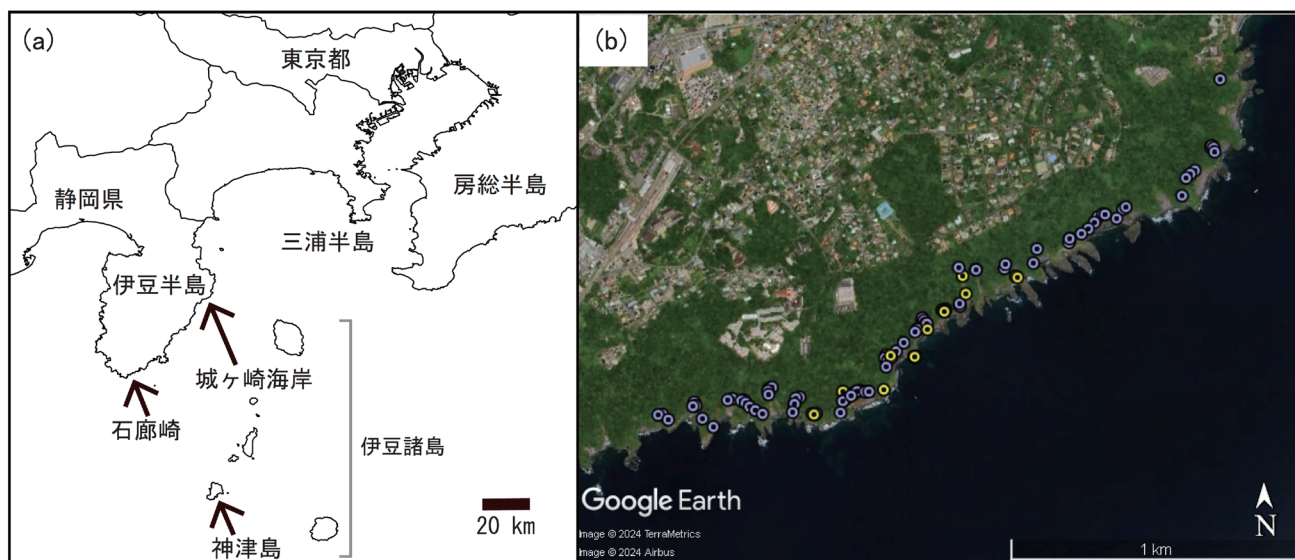


図-1 (a) 調査対象地の位置と (b) 城ヶ崎海岸における対象個体の分布

青丸は額咲き個体、黄丸は変わり咲き個体の位置を示す。変わり咲きには手まり咲きと八重咲きを含む。



図-2 (a) 城ヶ崎海岸における生育地の状況および (b、c、d) 変わり咲き個体の形態変異

も園芸アジサイが多く植栽されている。そのため本解析では、都市化の進んでいない伊豆半島南端の石廊崎と神津島を調査地とした。城ヶ崎海岸では、大きく 2 種類の変わり咲き型（手まり咲き型・八重の額咲き型）が認められている。ただし、八重の額咲き型は 3 個体のみ確認され個体数が少ないため、本解析では 2 つの花型を区別せず変わり咲き型として解析を行った。城ヶ崎海岸では変わり咲き型 19 個体と額咲き型 83 個体、石廊崎および神津島から確実に自生であると思われる額咲き型をそれぞれ 9 および 15 個体採取し解析に用いた（表-1）。城ヶ崎海岸では、詳細な空間遺伝構造を解析するため採取個体の位置を GPS（Garmin 社）で記録した（図-1）。

DNA 抽出、ライブラリ作成および次世代シーケンス

DNA 抽出は葉組織よりソルビトールを用いた多糖類精製 (Wagner et al. 1987) を行ったのち改変 CTAB 法 (Murray and Thompson 1980) により行った。本研究では SNPs を用いた解析を行うため、MIG-seq (multiplexed ISSR genotyping by sequencing) 法 (Suyama and Matsuki 2015) によりゲノム縮約ライブラリを作成し、次世代シーケンサーを用いて配列決定を行った。ライブラリの作成は Suyama ら (2022) に従って行い、作成したライブラリは HiSeq X (イルミナ社) を用いた 150 bp ペアエンドシーケンスによる配列決定をマクロジェン・ジャパン社に依頼した。

表-1 解析集団の個体数と全集団に共通する 281 SNPs から計算された遺伝的多様性

集団	個体数	多型サイト数	ヘテロ接合度期待値 (標準誤差)	ヘテロ接合度 観察値	近交係数
城ヶ崎海岸 (額咲き型)	83	233	0.124 (0.009)	0.080	0.355
城ヶ崎海岸 (変わり咲き型)	19	144	0.113 (0.009)	0.082	0.274
石廊崎 (額咲き型)	9	135	0.140 (0.010)	0.117	0.164
神津島 (額咲き型)	15	151	0.129 (0.010)	0.093	0.279

変わり咲きには手まり咲きと八重咲きを含む。

データ解析

得られた配列は fastp v. 0.20.0 (Chen et al. 2018) を用いてアダプター配列の除去および低品質配列 (Q-value < 30) の除去を行った。SNPs の検出は Stacks v. 2.3 (Catchen et al. 2013) を用い、パラメーターはサンプル内で 1 つの stack を作るための最小リード数を 5 ($-m\ 5$)、サンプル内の複数リードを同じ stack に組み込むとき許容する最大の不一致数を 2 ($-M\ 2$)、サンプル間の stack を共通座とすると許容する最大の不一致数を 1 ($-n\ 1$) と設定して行った。得られた SNPs は Stacks のパッケージである populations を用い、城ヶ崎海岸集団 (額咲き型)、城ヶ崎海岸集団 (変わり咲き型)、石廊崎集団、神津島集団の 4 つを定義して、4 集団すべてで確認され ($-p\ 4$)、各集団での最大欠損率が 0.3 ($-r\ 0.7$)、低頻度対立遺伝子の最低頻度が 0.01 ($-min_maf\ 0.01$)、ヘテロ接合度の観察値の最大値が 0.4 ($-max_obs_het\ 0.4$) の条件を満たす SNPs を選抜した。選抜した SNPs に基づき、遺伝的多様性の指標である集団内での多型サイト数、ヘテロ接合度の期待値と観察値を populations により計算した。本解析に用いる遺伝子型データは欠損を許容したものであるため、遺伝子型の決定割合を plink v. 2.0 (Chang et al. 2015) により計算した。個体間の系統関係を明らかにするために、近隣結合ネットワーク (neighbor-net ; Bryant and Moulton 2004) を SplitsTree 4 (Huson and Bryant 2006) を用いて作成した。遺伝的構造を推定するため、主成分分析を R v. 4.1.1 のパッケージ adegenet v. 2.1.4 (Jombart 2008) を用いて行った。城ヶ崎海岸における地理的な遺伝的構造を明らかにするために、Smouse and Peakall (1999) に基づく遺伝的距離と地理的距離の相関の高さを決定係数 (r) により評価する空間自己相関解析を GenAlEx v. 6.5 (Peakall and Smouse 2012) を用いて行った。地理的距離は 100 m 単位での階級に設定して評価した。この解析では城ヶ崎海岸における額咲き型と変わり咲き型の類似性を評価するため、全個体・額咲き型

のみ・変わり咲き型のみの 3 つのデータセットを作成して行った。

結 果

配列決定の結果、129 個体より十分な数のリードを決定し、1 個体あたりのリード数は 340,618 ~ 2,441,940 (平均 1,283,090) であった。この配列から選抜した 281 SNPs に基づく遺伝子型の決定割合は 83.6% であった。ヘテロ接合度の期待値は各地域および花型で 0.113 ~ 0.140 を示し、城ヶ崎海岸の 2 つの花型におけるヘテロ接合度の期待値には有意差が認められなかった (表-1)。ヘテロ接合度の観察値はいずれの集団でも期待値より低い傾向が見られた。3 地域の個体を用いて個体間の遺伝的関係を近隣結合ネットワークにより推定したところ、伊豆諸島の神津島は長い枝で他より区別される傾向にあったが、伊豆半島の 2 集団 (城ヶ崎海岸・石廊崎) は区別することができず、城ヶ崎海岸の 2 つの花型も区別することができなかった (図-3)。加えて、個体間の遺伝的関係を主成分分析によって推定したところ、神津島は 2 つの主成分によって他から明瞭に区別され、城ヶ崎海岸と石廊崎はゆるやかに区別された (図-4)。城ヶ崎海岸の個体を対象に決定係数 (r) による空間自己相関を検証した結果、いずれのサンプルセットでも弱い空間自己相関が確認され、最も小さい距離階級 (0.0 ~ 0.1 km) においてランダム分布よりも正に偏る傾向が見られた (図-5)。

考 察

遺伝的関係を推定した結果、伊豆諸島の神津島と伊豆半島の間では明瞭な遺伝的構造が確認された一方で、

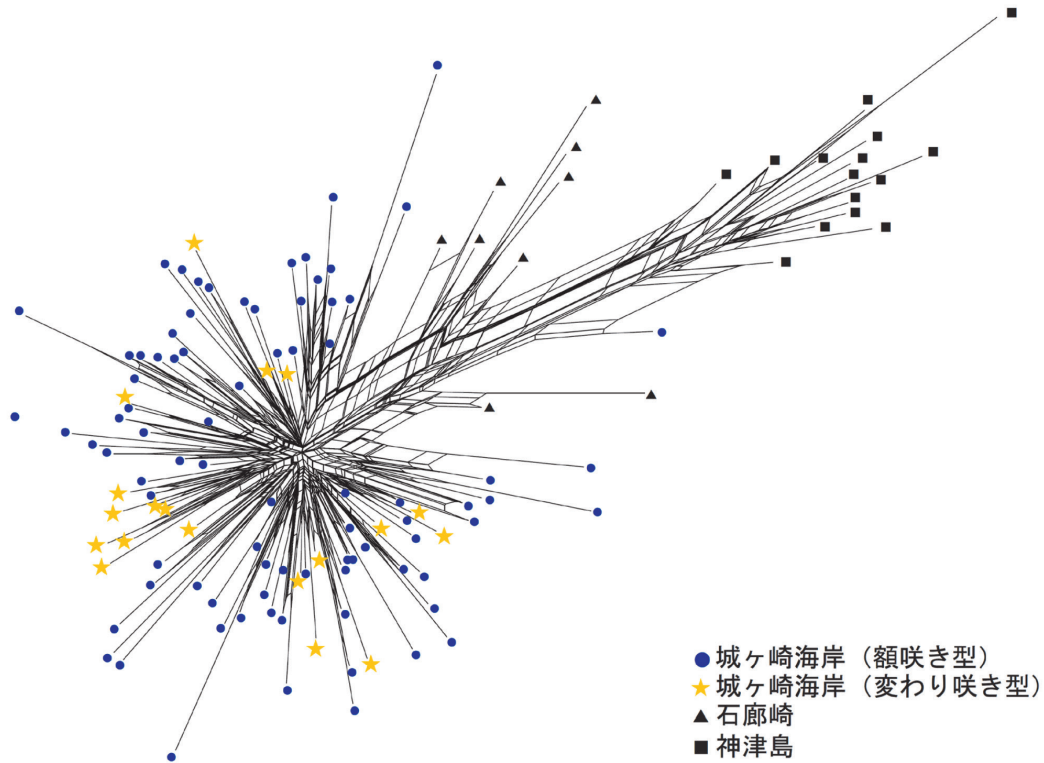


図-3 近隣結合ネットワークにより推定された個体間の遺伝的関係

青丸は額咲き個体、黄星は変わり咲き（手まり咲き・八重咲き）個体、三角は石廊崎、四角は神津島の個体を示す。

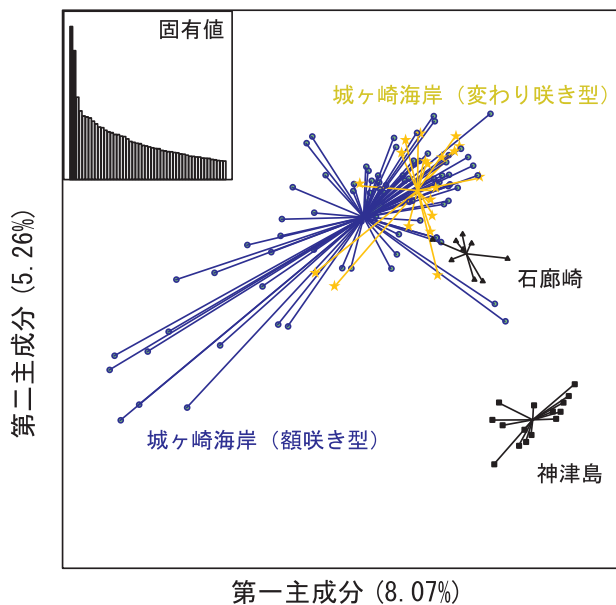


図-4 主成分分析により推定された個体間の遺伝的関係。寄与率は値の大きい上位 50 の固有値積算に占める割合

青丸は額咲き個体、黄星は変わり咲き（手まり咲き・八重咲き）個体、三角は石廊崎、四角は神津島の個体を示す。

伊豆半島の 2 カ所では不明瞭な遺伝的構造が確認された。ただし、近隣結合ネットワークによる遺伝的関係から城ヶ崎海岸と石廊崎は緩やかではあるが遺伝的構造を有し、城ヶ崎海岸において額咲き型の個体と変わり咲き型の個体は類似した遺伝的変異を有することが示された。本研究では 3 地域の個体のみを対象としている。広範なガクアジサイの分布を考慮すると対象集団数は不足しているが、その自生地のお多くは島嶼であるため他の植物種と同様に島による地理的隔離および遺伝的分化が生じていると考えられる (Yamamoto et al. 2017 ; Yoichi et al. 2021)。そのため、伊豆諸島および小笠原諸島のサンプルが不足している点は大きな問題にならないと思われる。

城ヶ崎海岸の個体のみを用いて計算した空間自己相関を示す r の値は、2 つの花型を含む全個体で解析した結果、近距離個体間で高い値を示した。これは、近距離で高頻度な遺伝子流動が生じ周囲に兄弟など血縁度の高い個体が生育することを示す。つまり、解析集団は種子散布や花粉散布の距離が短いことにより緩やかな距離による隔離が成立した天然更新による集団である可能性が高いことを示している。この傾向は変わり咲き型のみを対象とした解析でも検出された。変わり

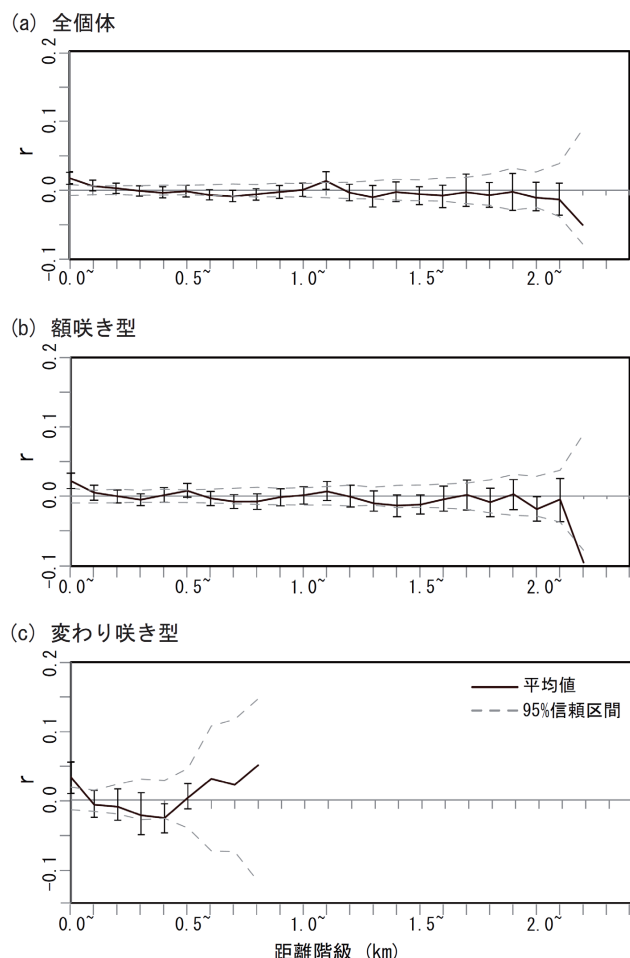


図-5 城ヶ崎海岸の個体における遺伝的な空間自己相関。(a) 全個体、(b) 額咲き個体、(c) 変り咲き（手まり咲き・八重咲き）個体
実線は平均値、点線は空間自己相関がないと仮定した時の並べ替えリサンプリングによって計算された 95% 信頼区間、エラーバーは 5 組み合わせ以上を含む距離階級においてブートストラップによって計算された 95% 信頼区間。

咲き型の多型サイト数は 144 であり、同程度の個体を解析に加えた神津島集団の 151 と同程度の値を示した（表-1）。このことは、変り咲き型の個体は十分な多型を有し、植栽による限られた創始個体から拡散した可能性は低いと考えられる。2 つの花型別に計算されたヘテロ接合度の期待値に差が見られなかったことから、いずれの花型も同程度の対立遺伝子頻度を有していると思われる。このことから、当地域では花型間で交配様式に差はないと思われる。ヘテロ接合度の観察値はいずれの花型も期待値より低い値を示し、近交係数は正に偏る傾向が見られた（表-1）。個体数が少ない集団

では近親交配が進むことで近交係数は正に偏るが、植物では自殖によっても近交係数が正に偏る（Frankham et al. 2010）。当地域での個体数が 10,000 個体以上（渡辺洋一；観察）と十分に多いことを考えるとガクアジサイの自殖頻度が高いために近交係数が正に偏ったと考えられる（巢山ら 2013）。これらの結果から、城ヶ崎海岸には低頻度で変わり咲き変異を引き起こす対立遺伝子が存在し、自殖頻度が高く加えて自生個体数が多いことで、潜性の表現型であると考えられている変わり咲き型が確率的に発見されやすい状況にあると考えられる（巢山ら 2013）。変わり咲き変異の 1 つである八重の額咲き変異を引き起こす遺伝子については、複数要因あるとする報告がなされており（Nashima et al. 2021）、当地域の変わり咲き変異についても園芸品種とは異なる遺伝的変異によって生じている可能性がある。このような野外における変わり咲き個体は、真の自生かどうか判別が難しいものも含めガクアジサイだけでなくヤマアジサイ [*H. serrata* (Thunb.) Ser.] の自生集団でも知られている（Uemachi and Okumura 2012）。

手まり咲きの園芸アジサイは江戸期より園芸利用されていたことが知られている（Ohba and Akiyama 2013, 2014）。本研究により手まり咲き個体が自生することが強く示唆され、このことは江戸期の園芸アジサイは育種による改良の結果ではなく野生選抜により登場した可能性も示唆される。城ヶ崎海岸の変り咲き個体は平澤らによって見い出され、現在ではこれらを親とした園芸品種も作出されている。そのため、当地域におけるガクアジサイ集団は自生の遺伝資源として重要な価値を持つと言え、保全の重要性が高い。

引用文献

- Bryant D, Moulton V (2004) Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution* 21: 255–265
- Catchen J, Hohenlohe PA, Bassham S, Amores A, Cresko WA (2013) Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology* 22: 3124–3140
- Chang CC, Chow CC, Tellier LCAM, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ (2015) Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience* 4: 7
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34: i884–i890
- Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD (2010) Introduction to

- Conservation Genetics, 2nd Edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- 原 寛 (1955) 欧米にある東亜植物基準標本の検討 (5). 植物研究雑誌 30: 271–278
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254–267
- Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403–1405
- Murray M, Thompson W (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321–4326
- Nashima K, Shirasawa K, Ghelfi A, Hirakawa H, Isobe S, Suyama T, Wada T, Kurokura T, Uemachi T, Azuma M, Akutsu M, Kodama M, Nakazawa Y, Namai K (2021) Genome sequence of *Hydrangea macrophylla* and its application in analysis of the double flower phenotype. *DNA Research* 28: 1–10
- Ohba H, Akiyama S (2013) A revision of the species of *Hydrangea* (Hydrangeaceae) described by Siebold and Zuccarini, Part 1. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany* 39: 173–194
- Ohba H, Akiyama S (2014) A revision of the species of *Hydrangea* (Hydrangeaceae) described by Siebold and Zuccarini, Part 2. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany* 40: 29–45
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539
- Smouse PE, Peakall R (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* 82: 561–573
- 巢山拓郎・谷川孝弘・山田明日香・松野孝敏・國武利浩・佐伯一直・中村知佐子 (2013) 蕾受粉および温湯処理によるアジサイ種間雑種の自家不和合性打破. 園芸学研究 12: 343–349
- Suyama Y, Matsuki Y (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Scientific Reports* 5: 16963
- Suyama Y, Hirota SK, Matsuo A, Tsunamoto Y, Mitsuyuki C, Shimura A, Okano K (2022) Complementary combination of multiplex high-throughput DNA sequencing for molecular phylogeny. *Ecological Research* 37: 171–181
- Uemachi T, Okumura A (2012) The inheritance of inflorescence types in *Hydrangea macrophylla*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 81: 263–268
- Wagner DB, Furnier GR, Saghai-Maroo MA, Williams SM, Dancik BP, Allard RW (1987) Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *PNAS* 84: 2097–2100
- Wilson EH (1923) The hortensias *Hydrangea macrophylla* DC. and *Hydrangea serrata* DC. *Journal of the Arnold Arboretum* 4: 233–246
- Yamamoto S, Kikuchi T, Yamagiwa Y, Handa T (2017) Genetic diversity of *Lilium auratum* var. *platyphyllum* endemic to the Izu archipelago and its relationship to a nearby population of *L. auratum* var. *auratum* by morphological and SSR analysis. *The Horticulture Journal* 86: 379–388
- Yoichi W, Takahashi M, Nagano AJ, Uehara K, Abe H (2021) Evolutionary effects of geographic and climatic isolation between *Rhododendron tsusiophyllum* populations on the Izu Islands and mainland Honshu of Japan. *Heredity* 126: 859–868