

分子系統樹によるスハマソウ属(*Hepatica*)の進化史の推定

前田 修佑*¹, 大野 好弘*², 佐藤 尚衛*³, 芳賀 明日香*⁴
清水 あやか*⁴, 井内 勝哉*⁵, 久富 寿*⁶

Classification comparison of *Hepatica* in Japan with *Hepatica* in the world
by molecular phylogenetic tree of chloroplast gene.

Syusuke MAEDA*¹, Yoshihiro OHNO*², Naoe SATO*³, Asuka HAGA*⁴,
Ayaka SHIMIZU*⁴, Katsuya IUCHI*⁵, Hisashi HISATOMI*⁶

ABSTRACT : There are 18 species of *Hepatica* in the world, there are 6 species of *Hepatica* in Japan. In the present study, to characterize variation in the chloroplast gene of *Hepatica* from various locations, we examined nucleotide sequences of the chloroplast from matK gene to psbA gene. We performed PCR of chloroplast gene using 18 specimens of *Hepatica* and compared the result from around the world using a neighbor joining tree. Molecular phylogenetic tree of *Hepatica* from around the world revealed that all species of *Hepatica* in Japan belonged to a different group from *Hepatica* in Europe, China and Korea. Molecular phylogenetic trees showed that that *Hepatica* in Japan had the closest relationship with *Hepatica* in America. All scientific names of *Hepatica* in Japan are treated as subspecies of *H. nobilis* in Europe (e.g. *H. nobilis* var. *japonica* f. *variegata*). In this study, the molecular phylogenetic tree suggests that 6 species of *Hepatica* in Japan are unlikely to be subspecies of *H. nobilis* in Europe.

Keywords :

(Received May 18, 2021)

1. 緒言

世界には 18 種類のスハマソウ属 *Hepatica* が自生している。日本ではスハマソウ、ミスミソウ、オオミスミソウ、ケスハマソウ、アシガラスハマソウ、ザオウスハマソウの 6 種類が自生している。一般には雪割草として総称で呼ばれることも多い。それぞれが交雑可能であり、園芸家の間では交雑種として多様な雪割草が楽しまれている。一方、自生している雪割草は山奥の涼しい木陰で生育している。雪割草と呼ばれている個体において、そ

の形態は多様であり、スハマソウ、ミスミソウ、オオミスミソウ、ケスハマソウ、アシガラスハマソウ、ザオウスハマソウを区別するのは容易である。逆に言えば、遺伝子多様性に富むと言っても過言ではない。それぞれの個体の特徴や栽培環境は専門書に譲るとして、本研究ではその分類に着目する。日本の雪割草は、そのすべてが学名に *nobilis* var. がつく。つまり、*Hepatica nobilis* の変種扱いになっている。18 種類の世界の雪割草の中で変種扱いなのは日本の 6 種類以外ではわずかに、スウェーデンの *Hepatica nobilis* var. *glabrata*、ピレネー山脈の *Hepatica nobilis* var. *pyrenaica* そして欧州の *Hepatica nobilis* var. *nobilis* のみである。一方、アメリカ、中国、韓国、ルーマニア、東アジアに分布する 9 種類の学名には *nobilis* var. がつかない。そこで、世界の雪割草の葉緑体 DNA を用いた分子系統樹による分類を試みた。

分子系統樹の概念は 1987 年に発表された論文で有名になった²⁾。人類の祖先はアフリカの女性(ミトコンドリ

*1 : 大学院理工学研究科物質生命コース

*2 : World *Hepatica* Laboratory

*3 : 成蹊中学高等学校

*4 : 理工学部 物質生命理工学科 学部生

*5 : 理工学部 助教

*6 : 理工学部 教授



図1 ミスミノウとスハマソウ

左 学名 *Hepatica nobilis* var. *japonica* f. *japonica*右 学名 *Hepatica nobilis* var. *japonica* f. *variegata*

アイブ)として分子系統樹から推測されている。一方、雪割草の学名は1937年の「日本領内ノすはまそう *Hepatica* 属植物 (其一) 1937」で詳しく命名されている³⁾。つまり、現在使用されている学名は分子系統樹での進化史を参考にできない時代に命名されており、その遺伝的背景は形態に現れない限り学名命名に影響していない。

本研究では世界の18種類の雪割草における分子系統樹の作製には葉緑体DNA上の *matK* 遺伝子を用いた。*matK* 遺伝子の一部728塩基対(bp)は植物の分子系統樹には頻繁に使用される領域にあたる^{4,5)}。本研究では雪割草 *matK* 遺伝子のCDS 1527 bpにおける分子系統樹を作製した。

2. 実験方法

2.1 葉緑体DNAの抽出

世界に分布する雪割草を栽培している神奈川県の世界 *Hepatica Laboratory* から18種類の世界各国の雪割草の葉、各約1gを収集した。収集した葉をグラインダーで細断し、セルラーゼおよびマセロチームにて酵素処理した。その後、Chloroplast Isolation kit (Sigma)により葉緑体を単離した。単離した葉緑体からDNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen)により葉緑体DNAを抽出した。

2.2 *matK*領域の塩基配列の決定

matK のCDS領域の外側にprimerを作成し、*matK* forward primer 5'-ACC TTG ATA CCT TGT TTT GAC TGT AT CGT AC-3', *matK* reverse primer 5'-TCA ATT ACT ACT GCA TAG GCA TTT CAG AAT A-3' (1723 bp)とした。葉緑体DNA 5 ngを用いて、95°C25秒、56°C25秒、72°C80秒を1サイクルとしたPCR反応を35サイクル実施した

(KAPA HiFi HS DNA polymerase (日本ジェネティックス))。PCR反応終了後、PCR productを精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)によって塩基配列を決定した。

2.3 分子系統樹の作製

塩基配列の決定後、*matK* 遺伝子のCDS 1527 bpの塩基配列からMEGA ver.7 softwareを用いて最尤法⁶⁾により分子系統樹を作製した(図2)。また、分子系統樹の外群にはニチリンソウ (*H. anemone flaccida*)を用いた。

3. 結果および考察

世界の雪割草18種類の *matK* 遺伝子による分子系統樹を図2に示した。限られた領域での分子系統樹ではあるが、日本の6種類の雪割草は中国、韓国などの東アジア地区や欧州の雪割草とは全く別の分岐を描いた。日本の雪割草はアメリカの雪割草と近縁と判断された。日本の雪割草の中でケスハマソウ (*H. nobilis* var. *pubescens*) では他の5種類とは異なる分岐が観察された。ケスハマソウは4倍体植物である。今回実験に用いた雪割草で4倍体植物は *H. henryi*, *H. yamatutai*, *H. transsilvanica* およびケスハマソウであり、ケスハマソウが日本の他の5種とは異なる分岐を描いても不思議ではない。*H. falconeri* における総苞葉から花弁までの長さや葉縁の鋸歯数はイチリンソウ属とスハマソウ属の中間を示す⁷⁾。このため、*H. falconeri* が雪割草の起源種として考えられている⁸⁾。

本研究における分子系統樹でも *H. falconeri* は最も早く分岐しており、起源種の可能性が示された。

matK の塩基配列から作製した分子系統樹から、日本

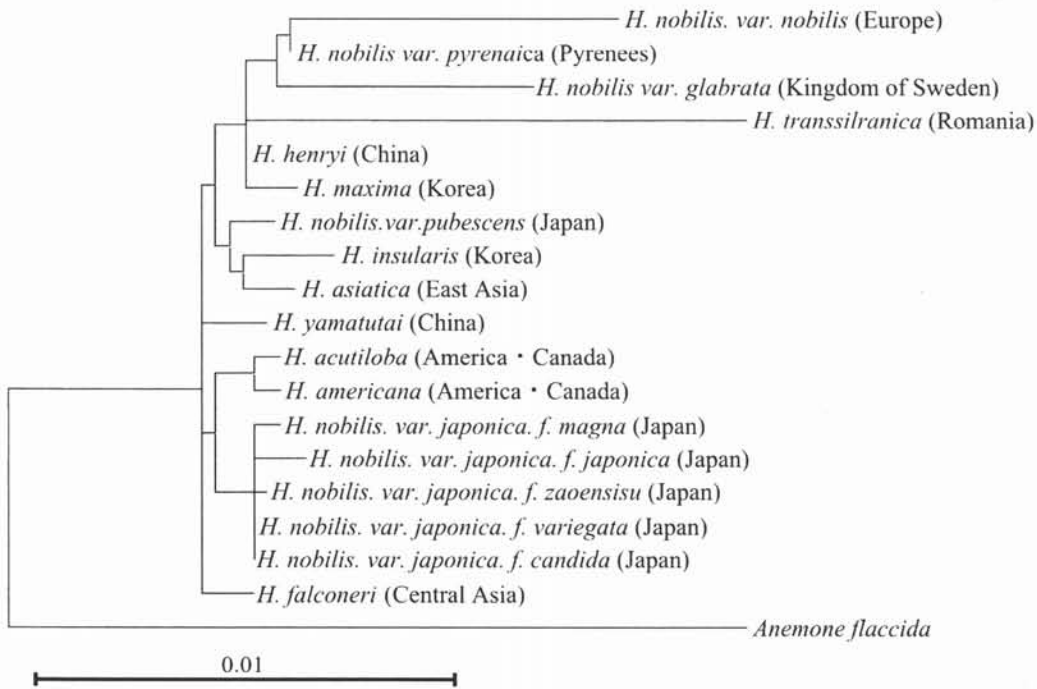


図2 matK遺伝子による雪割草の分子系統樹

の雪割草における欧州の雪割草との全く異なる独自の進化が推測された。地理的な分布を考慮すると、日本の雪割草が欧州の雪割草から分岐したとは考えにくい。1735年にリンネが「自然の体系」第一版で生き物の新しい分類体系を提唱し、日本の雪割草に学名がついたのが1856年「草本図説」である³⁾。その約120年の間に発見・命名された過程で欧州の雪割草との形態的な類似から、日本の雪割草は欧州の雪割草の変種とされた。しかし、葉緑体のわずかな領域での結果ではあるが、本研究の分子系統樹では日本の雪割草の変種説は明確に否定されている。したがって、我々は本研究の結果から日本の雪割草において、新しい学名を提案する(表1)。

さらに多型が確認されやすい領域を使った雪割草の分子系統樹の作製により、新種の雪割草の発見の可能性が高められると期待している。

4. 参考文献

1. 国際雪割草協会事務局 雪割草 世界のHepatica(スハマソウ属) 第20号4-25, 2020.
2. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. Nature 325, 31-36, 1987.
3. 長島義介 新潟の雪割草(Hepatica属)について 新潟青陵女子短期大学研究報告,22,1-16, 1992.
4. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 106, 12794-12797, 2009.
5. Yoo KO, Jang SK. Infrageneric relationships of Korean Viola based on eight chloroplast markers. Journal of Systematics and Evolution 48, 474-481, 2010.
6. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10, 512-526, 1993.

表1 日本の雪割草の新しい学名

和名	学名	新学名
スハマソウ	<i>Hepatica nobilis</i> Schreb. var. <i>japonica</i> Nakai f. <i>variegata</i> (Makino) Nakai	<i>Hepatica japonica</i> Nakai var. <i>variegata</i> (Makino) Ohno
ミスミソウ	<i>Hepatica nobilis</i> Schreb. var. <i>japonica</i> Nakai f. <i>japonica</i> (Nakai) Yonek.	<i>Hepatica japonica</i> Nakai var. <i>japonica</i> (Nakai) Ohno
オオミスミソウ	<i>Hepatica nobilis</i> Schreb. var. <i>japonica</i> Nakai f. <i>magna</i> (M.Hiroe) Kitam.	<i>Hepatica japonica</i> Nakai var. <i>magna</i> (M.Hiroe) Ohno
ケスハマソウ	<i>Hepatica nobilis</i> Schreb. var. <i>pubescens</i> (M.Hiroe) Kitam.	<i>Hepatica pubescens</i> (M.Hiroe) var. <i>pubescens</i> (M.Hiroe) Ohno
アシガラスハマソウ	<i>Hepatica nobilis</i> Schreb. var. <i>japonica</i> Nakai f. <i>candida</i> Ohno	<i>Hepatica japonica</i> Nakai var. <i>candida</i> (Ohno) Ohno
ザオウスハマソウ	<i>Hepatica nobilis</i> Schreb. var. <i>japonica</i> Nakai f. <i>zaoensis</i> Ohno&S.Tsuru.	<i>Hepatica japonica</i> Nakai var. <i>zaoensis</i> (Ohno&S.Tsuru.) Ohno