

令和 4 年 9 月 11 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03288

研究課題名(和文) シダ植物の独立配偶体のDNAバーコーディングを活用した探索とその成立要因の解明

研究課題名(英文) Search of new independent gametophytes of ferns in Japan using DNA barcoding

研究代表者

村上 哲明 (Murakami, Noriaki)

東京都立大学・理学研究科・教授

研究者番号：60192770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：シダ植物は、孢子体と配偶体の二つの世代をもつが、配偶体のみで生育している例(「独立配偶体」と呼ばれる)が北米や欧州で知られていた。本研究では、シダの配偶体を日本国内から広く採集し、それぞれの光合成に関わる遺伝子の塩基配列に基づいて種の同定を行った。その結果、50年以上にわたって孢子体が全く見つかっていなかった「幻のシダ」、イトシシラン(イノモトソウ科)の独立配偶体を奥秩父山塊の広い範囲から見出すことができた。日本列島には、まだ他にも独立配偶体として生育している未報告種のシダ植物があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シダ植物には孢子体と配偶体の二つの世代が存在するが、配偶体は小型で単純な形をしているので、野外ではほとんど認識されない。どのようなシダ植物種が日本国内に生育しているか既に分かっていると一般的に考えられているが、これは孢子体についてである。本研究では栄養繁殖により配偶体のみで生育し続けている「独立配偶体」に着目し、DNA情報を用いて種同定を行ったところ、50年以上にわたって、その孢子体が全く見つからず、「幻のシダ」と呼ばれていたイトシシラン(イノモトソウ科)の配偶体が奥秩父山塊に広く分布していることがわかった。日本国内で希少種のシダ植物が配偶体として広く生育していたことは、興味深い発見である。

研究成果の概要(英文)：Ferns have two generations: sporophyte and gametophyte generations. It was known that gametophytes of some fern species reproduce only asexually through gemma, and they are called “fern independent gametophytes.” So far, fern gametophytes have been well studied only in USA and Europe. In this study, fern independent gametophytes were searched in Japan. As a result, those of *Haplopteris mediosora* (Pteridaceae), whose sporophytes have never been found for more than 50 years in Japan, were re-discovered in the Oku-Chichibu mountains. The independent gametophytes of this rare fern species are widely distributed in the regions. We can expect that several other unrecorded fern species might be distributed in Japan as independent gametophytes, and more numbers of fern independent gametophytes, including those of new fern species might be growing in the tropical Asia whose fern species diversity is much higher than in Japan.

研究分野：植物系統分類学

キーワード：生物多様性 シダ植物 配偶体 無性生殖 長距離分散 DNAバーコーディング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

シダ植物は、孢子体と配偶体という二つの世代をもち、普通にシダ植物として見られているのは孢子体である (図 1)。ところが、配偶体が無性芽等によって栄養繁殖し、配偶体のみで生育している例 (「独立配偶体」と呼ばれる) が北米や欧州で知られていた (Farrar 1967; Ramsey et al. 1990)。しかし、日本国内では、そもそも小型で単純な形態をもつシダの配偶体については、その分布がまだほとんどわかっていなかった。日本国内からは、まだ報告されたことがないシダの種の独立配偶体が見つかることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、日本国内に生育するシダ植物の配偶体を採集し、それらの *rbcL* 遺伝子 (光合成に関わる遺伝子) の塩基配列を決定し、DNA データベース上の配列と比較することによって種同定を行い、まだほとんど分かっていなかった日本産シダ植物の独立配偶体の種多様性を解明することが第一の目的である。さらに、見出された独立配偶体がどのように起源したかを解明することも 2 つ目の重要な目的である。

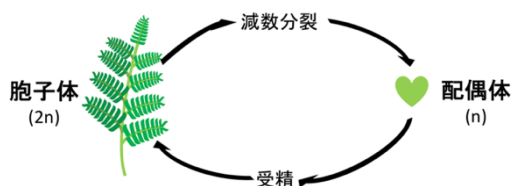


図 1 シダ植物の生活環

### 3. 研究の方法

本研究では、形態情報だけでは種の同定が困難な配偶体の種同定を DNA の情報を利用して行い、日本国内の配偶体の地理的分布を詳しく調べることを着想した。現在では、DNA の塩基配列情報を用いてシダ植物の種を同定すること (DNA バーコーディング) が既に可能になっている。特に日本国内では、孢子体が認識されているほぼ全ての日本産シダ植物種について、葉緑体 DNA 上にある *rbcL* 遺伝子 (光合成における炭酸固定の最初のステップを触媒するリブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ大サブユニットの遺伝子) の塩基配列が決定されて、DNA データベースに登録されている (Ebihara 2011)。この遺伝子は、少なくとも生殖的隔離のある種間では、最も近縁な種間でも 3-5 塩基/1,200 塩基以上は異なり (Yatabe et al. 2009)、この 1 遺伝子の塩基配列を調べるだけで基本的に種の同定、すなわち DNA バーコーディングが可能である。さらに、この方法を使えば、小型で形態形質に乏しい配偶体でも、容易に種の同定ができる。そのような方法を用いて、日本国内におけるシダ植物の配偶体の分布を詳細に明らかにし、さらに配偶体のみで生育している日本新産種のシダ独立配偶体を探索することを目指した。

さらに配偶体のサンプル採集においても、独自の工夫をした。栄養繁殖で増殖するシダ植物の独立配偶体は、リボン状の形態をしているものがほとんどである。さらには、配偶体に多数の無性芽をつけて増殖した結果、多数のリボン状の配偶体が集まった 1 cm~数 cm の大きさの配偶体マットを形成することが多い (図 2)。そこで、本研究では個々の配偶体ではなく、肉眼でも見える大きさの配偶体マットを探索することにした。もし、数十年以上の長期間にわたって配偶体のみで生育している日本未記録種の独立配偶体があれば、それは少なくとも 1 cm 以上の大きさの配偶体マットを形成していることが期待されるからである。本研究では、研究代表者、分担者、さらには研究協力者で手分けをして、日本国内の様々な場所でシダ植物の配偶体マットを探索・採集し、上述した *rbcL* 遺伝子の配列情報に基づく種同定を行った。



図 2 シダ植物の配偶体マット (A) 配偶体マット; (B) A の写真の中央部を拡大したもの。

#### 4. 研究成果

我々は奥秩父山塊において、幻のシダと言われていたイトシシラン（イノモトソウ科）の独立配偶体を発見した。奥秩父山塊は、北は両神山（埼玉県）、南は大菩薩嶺（山梨県）、東の端は雲取山（東京都）、西の端は野辺山（長野県）にまたがる大きな山塊である。その1つである雲取山の山頂付近の岩場でシダ植物の独立配偶体マット採取することができた。その *rbcL* 遺伝子の塩基配列を決定して、DNA データベース上の配列と比較したところ、台湾産のイトシシラン（*Haplopteris mediosora*）と完全に一致した。イトシシランは、最初に台湾の阿里山から記載されたシダ植物の種で、ヒマラヤ～チベットの高地と、台湾・フィリピンの高山に広く分布している種である。日本では、1968年に芹沢俊介博士が奥秩父の梓白岩～十文字峠でその孢子体を採集した記録（伊藤 1969）しかなく、「幻のシダ」と言われていた。また、この時の採集標本には孢子囊群がついておらず（孢子囊群の形状は、イトシシランと同定する上で重要な識別形質である）、誤同定の可能性も指摘されていた。

今回、独立配偶体としてではあるが、確かに奥秩父の山塊にイトシシランが生育していることが確認された。また、芹沢博士がその孢子体を発見した梓白岩、さらには両神山でも、我々はイトシシランの配偶体を発見した（図3）。配偶体が見いだされた雲取山、梓白岩、両神山の付近を詳しく調査したが、イトシシランの孢子体は見出せなかった（そもそも、シシラン類の孢子体が全く見られなかった）。このように奥秩父山塊の遠く離れた3つの山頂付近からイトシシランの独立配偶体が見いだされたことから、この種の配偶体は秩父山塊に広く分布しているのではないかと我々は考えた。



図3 奥秩父山塊（雲取山と梓白岩）で見出されたイトシシラン（イノモトソウ科）の生育環境（左）と独立配偶体の形態（右）

雲取山と梓白岩は約 20 km 離れている。いずれの場所でも、尾根付近の岩の割れ目に独立配偶体が生育していた。番号は、サンプル No. を示す。

そこで、本研究ではイトシシランの独立配偶体のさらに詳しい分布の調査、ならびに外国（台湾、ヒマラヤ産）の孢子体の配列との比較によって、奥秩父に生育するイトシシランの独立配偶体の起源についても解明するべく研究を進めた。上述したように、イトシシランは最初に台湾の阿里山から記載され、ヒマラヤ地域からチベット、台湾、フィリピンに隔離分布することが知られているシダ植物種である。本研究で、*rbcL*に加えて、同じく葉緑体 DNA 上にある *matK*、*trnL-F* の塩基配列も取得して解析した結果、奥秩父に 2 種類の葉緑体 DNA ハプロタイプが認められ、この山塊内に DNA 多型が存在することも分かった。さらに、一方が台湾産のイトシシラン、他方がチベット・ヒマラヤ地域のイトシシランの塩基配列と完全に一致した。すなわち、異なる地域から独立に 2 回、奥秩父山塊に長距離分散してきた可能性も考えられた。このように、日本国内にイトシシランが独立配偶体として確かに生育していること、ならびにその起源についても考察することができた。

孢子体については、個々の種の詳しい地理的分布まで明らかにされている日本産シダ植物である（倉田・中池 1079-1997）が、本研究で独立配偶体が高頻度で含まれていると考えられる配偶体マットを採集して、*rbcL* 遺伝子の塩基配列情報を用いて分子種同定を行ったところ、イトシシランのような希少種を見出すことができた。さらに、奥秩父山塊には、その独立配偶体が広く分布し、起源が異なると考えられる 2 型が生育していることも、本研究によって明らかになった。これは独立配偶体を探索することで、シダ植物相（どのような種が国内の何処に生育しているか）が詳細に解明されていると考えられてきた日本でさえも、シダ植物の新産種を比較的に発見できたことを意味する。今後、本研究と同様の調査・研究を生物多様性が日本よりもはるかに高いにもかかわらず、その解明が遅れている東南アジア地域などで展開すれば、シダ植物の新産種を見つけられるに止まらず、地球上にその孢子体が存在しない新種のシダ植物の独立配偶体なども発見できるのではないかと期待が膨らむ。このように、今後の発展がさらに期待できる研究成果を本研究では得ることができた。

<引用文献>

- ① 伊藤洋 1969. 台湾・ヒマラヤに次いで奥秩父が第3の産地となったイトシシラン. 秩父自然科学博物館研究報告 (15): 65-66.
- ② Ebihara, A. (2011) *RbcL* phylogeny of Japanese pteridophyte flora and implications on infrafamilial systematics. Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B 37: 63-74.
- ③ Farrar, D. R. (1967) Gametophytes of four tropical fern genera reproducing independently of their sporophytes in the southern appalachians. Science 155: 1266-1267.
- ④ 倉田悟・中池敏之 1979-1997. 日本のシダ植物図鑑 分布・生態・分類 全8巻. 東京大学出版会. 東京.
- ⑤ Yatabe, Y., Shinohara, W., Matsumoto, S., & Murakami, N. (2009) Patterns of hybrid formation among cryptic species of bird-nest fern, *Asplenium nidus* complex (Aspleniaceae), in West Malesia. Bot. J. Linn. Soc. 160: 42-63.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 村上 哲明, 酒井 絵理佳, 米岡 克啓	4. 巻 12
2. 論文標題 DNA情報を活用したシダ植物の配偶体フロラの調査: 日本でも, まだまだ新産種は見つかる	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物科学最前線 (BSJ-Review)	6. 最初と最後の頁 159-168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24480/bsj-review.12c3.00211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また, その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米岡克啓・堀清鷹・片岡利文・海老原淳・村上哲明
2. 発表標題 半世紀ぶりに再発見された奥秩父産イトシシランの独立配偶体における葉緑体DNAハプロタイプ解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会（八王子、オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米岡克啓・片岡利文・堀清鷹・藤原泰央・村上哲明
2. 発表標題 ナンゴクホウビシダ（チャセンシダ科）は独立配偶体を形成できる
3. 学会等名 日本植物分類学会第21回大会（神奈川、オンライン）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上哲明
2. 発表標題 DNA情報を活用したシダ植物の配偶体フロラの調査: 日本でもまだまだ新産種は見つかる
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会（名古屋、オンライン） シンポジウム 「国立沖縄自然史博物館設立計画と多様性植物学の未来」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 常木静河・小野笑実・柿嶋聡・村上哲明・芹沢俊介
2. 発表標題 希少種ミカワコケシノブの孢子体生育地の近傍におけるコケシノブ科配偶体の生育状況
3. 学会等名 日本植物分類学会第20回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米岡克啓・酒井絵理佳・岩切彩夏・片岡利文・堀清鷹・村上哲明
2. 発表標題 配偶体での生育が基本となるシダ植物？半世紀ぶりに奥秩父一帯で再発見されたイトシシラン（イノモトソウ科）
3. 学会等名 日本植物分類学会第20回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米岡克啓・酒井絵理佳・岩切彩夏・堀清鷹・村上哲明
2. 発表標題 幻のシダ・イトシシラン（ <i>Haplopteris mediosora</i> , イノモトソウ科）の50年ぶりの独立配偶体での再発見
3. 学会等名 日本植物分類学会第19回大会(岐阜)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京都立大学 生命科学専攻 研究紹介 植物系統分類学研究室  
<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/ID-plasys>

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 薫 (Yamamoto Kaoru)  (00766016)	横須賀市自然・人文博物館・その他部局等・学芸員  (82701)	
研究分担者	常木 静河 (Tsuneki Shizuka)  (10632789)	愛知教育大学・教育学部・講師  (13902)	
研究分担者	海老原 淳 (Ebihara Atsushi)  (20435738)	独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究主幹  (82617)	
研究分担者	堀 清鷹 (Hori Kiyotaka)  (20806004)	公益財団法人高知県牧野記念財団・その他部局等・研究員  (86401)	
研究分担者	篠原 涉 (Shinohara Wataru)  (30467443)	香川大学・教育学部・准教授  (16201)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	米岡 克啓 (Yoneoka Katsuhiro)  (22604)	東京都立大学・理学研究科・大学院生  (22604)	
研究協力者	酒井 絵理佳 (Sakai Erika)  (22604)	東京都立大学・理学研究科・大学院生  (22604)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小野 笑実  (Ono Emi)	愛知教育大学・教育学部・大学院生     (13902)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関