

機関番号：82617

研究種目：基盤研究（A）（一般）

研究期間：2008～2010

課題番号：20247006

研究課題名（和文）ゼンマイの系統進化と種分化に関する研究

研究課題名（英文）STUDIES ON THE PHYLOGENETIC EVOLUTION AND SPECIATION OF OSMUNDA

研究代表者

加藤 雅啓 (KATO MASAHIRO)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・部長

研究者番号：20093221

研究成果の概要（和文）：ゼンマイ属の分子系統解析を行ない、ゼンマイとアメリカ産レガリスがかつて浸透性交雑したことがあり、ゼンマイとヤシヤゼンマイの間で今も交雑が起っており、ラオス・ミャンマー産の *Osmunda hybrida* が雑種起源の4倍体種であり、中国南部の *O. mildei* が不稔雑種であって、ゼンマイ属の多様化に交雑が関与していることを明らかにした。化石解析から、東アジアに今は分布しないレガリスゼンマイ（の祖先種）が分布していたことを示唆した。

研究成果の概要（英文）：We performed phylogenetic analyses of chloroplast and nuclear DNA sequences, with results that hybridation events were involved in diversification of *Osmunda*, e.g., *O. japonica* x American *O. regalis*, *O. intermedia* (F1, F2, backcrosses) = *O. japonica* x *O. lancea*, *O. hybrida* (4x) = *O. japonica* x Indian *O. regalis*, *O. mildei* (2x) = *O. japonica* x *O. vachellii*. Fossil analysis implied that an ancestor to *O. regalis*, which does not occur in eastern Asia, was distributed in the past in eastern Asia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
2009年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2010年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
年度			
年度			
総計	37,500,000	11,250,000	48,750,000

研究分野：植物分類学

科研費の分科・細目：生物学・生物多様性・分類

キーワード：ゼンマイ、分子系統、種分化、雑種

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体 *rbcL* 遺伝子を用いた系統解析 (Yatabe et al. 1999) から、ヤマドリゼンマイはゼンマイ亜科の中でもっとも早く（約3億年前）分岐したと推定された。しかし、約2億年前とする化石データや、ゼンマイ科の別亜科がペルム紀（2.25-2.8億年前）に分かれたことを示す化石データと大きく食い違うので、正確な分岐年代を知ることが本科の系

統進化の理解にとっても、シダ類全体の系統の分岐年代推定 (Schneider et al. 2004; Pryer et al. 2004) に対しても意義深い。一方、ゼンマイ亜属は変異に富む3種（変種を多く含む、または16種）に分類され、化石研究により第三紀終期の鮮新世以降に分化したと推定され (Miller 1967, 1971 他)、分子系統解析からは互いに近縁な新しい種であるとされる (Yatabe et al. 1999)。その1種溪流沿い

植物ヤシャゼンマイの適応形質である細葉が異時性によってもたらされたことが明らかにされている (Imaichi & Kato 1992, 1993, 他)。このように、このシダ類の系統分類、形態進化研究、化石研究は進んでおり、本研究を行う素地が整っている。

倍数性と進化は深く関連する。中でも同形胞子シダ類の現在の2倍体は古倍数体であり、同一配偶体上で自配受精してできた子孫で致死遺伝子を含む全遺伝子が発現して適応度が低下し、遺伝的変異も低下する生殖上の短所を同祖的組合せにより補うとされる (Klekowski & Baker 1966)。古倍数性仮説はシダ類の進化を理解するうえで重要な課題である。ヤマドリゼンマイなどは2倍体ながら自家受精種であり (Li & Haufler 1994)、現生シダ全般でも新倍数体は自配受精の傾向が高い。2-3億年もの長い間、基本数  $x=22$  の2倍体が維持されてきた本科の古倍数性仮説の是非が検証できる。

シダ類の種分化に関して、申請者は無配生殖種が同一の有性生殖両親種から複数回交雑起源したことを示し、シダ類の種分化の理解に一石を投じた (Park & Kato 2003)。本研究はもっと基本的な種分化を解明しようとする。溪流沿い植物の進化に関する研究を行い、1つの種から複数の溪流沿い種が分化し、結果として母種が“側系統”になると推定した (Kato et al. 1991)。本研究は、祖先種は生物学的種概念が当てはまる“側系統”種であるのが一般的であり、単純な種分化などはむしろ稀という作業仮説を検証する。

種分化を地理的及び年代的に特定することにより、理論的解釈 (Harrison 1991) の域から踏み出して種分化の過程を時間空間軸に沿って具体的に捉えることが可能になる。ゼンマイ亜属3種 (の一部) の種分化が起こった地域と年代が推定でき、これらが“側系統”的な有性生殖種であるか否かを示すことができる。これにより、系統的に姉妹関係にある種は2又分岐した結果ではなく、“側系統”祖先種-派生種の関係にあることがわかり、この関係は他生物群にも当てはまる可能性が示される。生態的隔離により溪流沿い植物が分化した過程は謎が多かったが、真の溪流帯の上部に移行的な準溪流帯が位置し、そこで溪流沿い種の初期分化が起こったかが分かる。それにより、溪流沿い植物の生態的種分化がより具体的に明らかになると期待される。本科の歴史的生物地理を大陸移動、気候変動などと関連づけて他科よりも明確に理解することが可能になる。系統関係に基づいて分類系をつくる研究が多いが、それ

だけでは系統関係を生み出した過程は分からず、複合的研究が必要である。

## 2. 研究の目的

(1) ゼンマイ科の各種属 (とりわけヤマドリゼンマイ属、ゼンマイ亜属3種) の系統関係と分岐年代を高い信頼度で推定し、ゼンマイとヤシャゼンマイが種分化した地域と年代を、分子データと化石データを基に推定する。また、古い年代に現れ分岐しなかったと示唆されるヤマドリゼンマイ属、オニゼンマイ亜属と最近分化したゼンマイ亜属3種について、分岐進化の際立った違いと背景を明らかにする。

ゼンマイ亜属の種が、一部の集団から派生種を生じた母種が集団間で有性生殖できる“側系統”種なのか、真の側系統種複合体あるいは複数の地域種・生態種からなる単系統種群かを明らかにする (図1)。地理的に見て3種は世界的に分布する広域複合体とみることができるが、これが異所的に分布域を拡大し末端集団がついに同所的に分布するに至った際に別種に分化していたいわゆる“環状種分化” (ring species) の例にあたるのであれば、3種の間にはどのような分化が起こったのかを明らかにする。

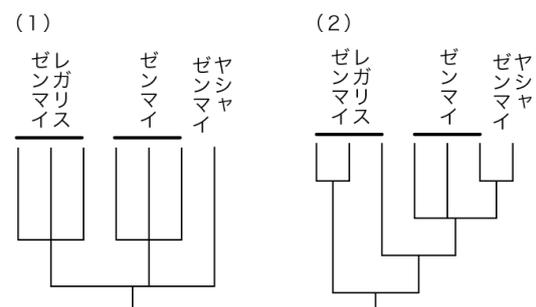


図1. ゼンマイ類の種の単系統性と側系統性

(2) 溪流沿い種は陸生種から分化し細葉など適応形質を獲得して溪流帯に進出した。溪流沿い植物の初期段階の可能性のあるホソバゼンマイ (済州島) が準溪流帯に生育する初期適応であるかどうかを明らかにし、そうならばそれを経る溪流沿い種の種分化を推定する。さらに、細葉化と葉裂片基部の楔形化を推定する。

(3) 現在のゼンマイ科は全種が2倍体 ( $2n=44$ ,  $n=x=22$ ) であるが、それが古倍数体 ( $x=11$ ) か、倍数体は存在しないかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 系統解析: ゼンマイ科の系統樹でヤマド

リゼンマイ属が基部で分岐し、次いでレプトプテリス属とトデア属の1群が分岐し、最後にゼンマイ属の3亜属が分岐するというYatabe et al.(1999)の系統仮説を検証し、本科のたしかな系統分類をつくる。そのため、解析遺伝子を1遺伝子から下記のように葉緑体遺伝子の領域を増やすとともに、核遺伝子も解析する。

ゼンマイ亜属はふつう3種に分類されているが、種間の系統関係は不明で、かつ種分類の妥当性は検証されていない。そのため、大量のサンプルが解析しやすく母性遺伝する葉緑体 *rbcL* 遺伝子及び周辺領域の塩基配列を決定して、遺伝子系統関係を推定する。さらに、核遺伝子を比較して、系統関係と生殖集団としての種のまとまりを明らかにする。この研究のために、材料採集を国内外で行うが、ゼンマイとレガリスゼンマイが分布するヒマラヤ、地理上の要衝である南インドを含めて調査する。EST (Expressed sequence tags)解析も並行して行い、なるべく多くの遺伝子座を調べることにより、本格的な系統解析を行う。

(2) 種分化が起こった地域と年代の推定：ゼンマイ亜属の化石データ（第三紀終期の鮮新世から祖先種 *Osmunda nathorsii* が知られている）と分子データを基に、現生3種の分岐年代を推定する。また、上記の分子系統解析結果を併せて、ゼンマイがレガリスゼンマイの中から派生したとすると、どの地域集団から由来したかをハプロタイプ解析により探る。

現生種が存在しない東北アジアからゼンマイの祖先種の可能性のある *Osmunda sachalinensis* などの化石が豊富に採集されている（第三紀には北半球に広く分布したことを示す）。現生のゼンマイとレガリスゼンマイの葉の形態差（葉脈間距離を含む）を明らかにし、その差異を指標にして、現生種ゼンマイが出現した年代を特定する。それにより、分布域の縮小と地理的隔離を伴って種分化が起こったことが示唆される。そのための化石研究を国立科学博物館、東北大学、スウェーデン自然史博物館などで行う。

これまでの分類学的研究、分子系統解析からヤシャゼンマイとゼンマイはきわめて近縁であるとされ、われわれの予備実験からも *rbcL* 遺伝子がほとんど変異していないほどである。そこで、大量塩基を用いた系統地理解析を行って、ヤシャゼンマイの出現した地域を特定する。

(3) 溪流沿い種ヤシャゼンマイの系統分化、形態分化および初期進化の解析：本種とゼン

マイの系統分化の浅さに比べて形態分化は著しい (Imaichi & Kato 1992)。溪流沿い種の端的な適応形態は葉裂片基部がくさび形で水流抵抗が少ないことである。この基部変形の形態的要因を明らかにするため、個体発生上の変化、葉の形態形成を比較する。最下側脈の欠失が現れる個体発生段階と、ゼンマイが溪流帯から淘汰される時期の相関を調べる。

雑種オオバヤシャゼンマイを指標にして、準溪流帯が存在するかどうかを確かめる。そのため、冠水頻度に起因する真溪流帯と準溪流帯の差異を野外調査するとともに、葉の流水抵抗実験から形態と環境の相関を明らかにして、準溪流帯の特性（淘汰圧の程度など）を探る。

オオバヤシャゼンマイの自配生殖実験を行い、得られる形質の分離比から、適応形態の遺伝的背景を探り、遺伝地図の作成及びQTL解析を行う更なる解析につなげる。

ホソバゼンマイ *Osmunda japonica* var. *sublancea* は細い葉（裂片）がヤシャゼンマイ *O. lancea* に似る。本変種が準溪流帯に適応した種分化の初期段階にある準溪流沿い植物であるか否かについて野外調査し、系統解析、形態観察、とくに葉裂片基部からも明らかにする。異なる進化段階にある溪流沿い植物の比較研究によって、溪流沿い種の漸進進化を明らかにする。

(4) 環状種分化および適応的な種分化の解析：レガリスゼンマイの周辺集団からゼンマイが分化し、汎世界的に分布するようになったとする解釈が妥当であれば、植物では初めての“環状種分化”の例といえる。精度の高い系統関係を推定して環状種分化を示し、その地理的隔離と適応的分化の解明につなげる。

ゼンマイはレガリスゼンマイとは葉が完全二型である点で異なっている。ゼンマイは環境変動に対応して春先に展葉するように東アジアで分化したとする仮説を抱いているが、まず完全二型と部分二型の種差を、展葉のフェノロジー観察と、茎頂での葉原基から葉への形態形成・分化の観察を行う。

(5) ヤマドリゼンマイ、オニゼンマイの非分岐進化の解析：ゼンマイ亜属3種が最近に分岐進化したのに対して、ヤマドリゼンマイは7000 万年以上もほとんど変化しなかったとされ (Serbet & Rothwell 1999)、他方、同属とされたほどオニゼンマイに酷似する。各種について東アジアとアメリカに隔離分布する集団（変種）間の分岐年代を推定し、分岐後に生じた形態差の大きさを解析する。こ

れからその形態の保守性の解明につなげる。  
 (6) 古倍数性解析：EST 解析を行い、どの程度遺伝子重複が起こっているかを調べる。さらに、多くの EST について雑種オオバヤシャゼンマイの自配受精個体における分離比を調べる。これにより遺伝地図を作成し、実際に染色体対が重複しているかを調べて、古倍数性仮説の妥当性を検証する。

#### 4. 研究成果

(1) インド、タイ、ラオスで植物調査を行い、材料を収集した。静岡県と埼玉県、宮崎県他で集団構造について現地調査を行い、系統解析、形態観察用にゼンマイ亜属の材料を収集した。中国・深圳で野外調査し、*Osmunda angustifolia*、*O. vachellii*を採集した。ブータン、ネパール、マケドニア、スペイン、アルゼンチンなどからの材料の提要を受けた。

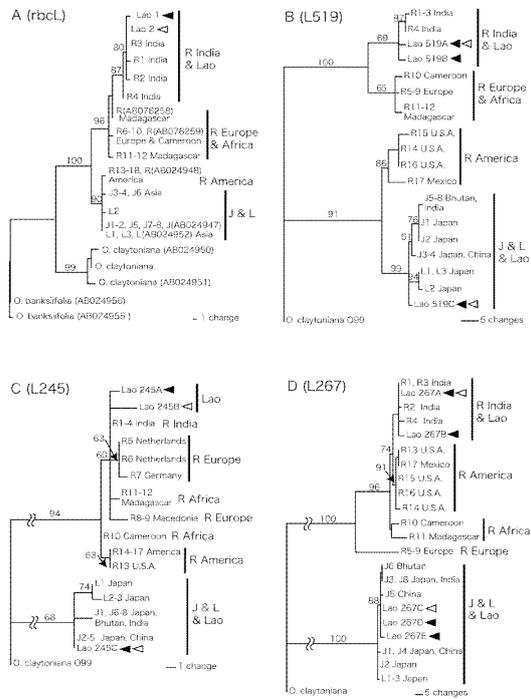


図2. 葉緑体遺伝子 (A) と核DNA領域 (B-D) の系統樹

(2) ゼンマイ、ヤシャゼンマイ、レガリスゼンマイについて複数の核遺伝子領域と葉緑体遺伝子を系統解析した。調べた遺伝子の間で系統関係は大きく食い違い、一部の核遺伝子領域ではゼンマイとレガリスゼンマイがそれぞれ単系統群をなし、ヤシャゼンマイはそのいずれかに近縁であった (図2)。一方、残りの核遺伝子領域と葉緑体遺伝子では、レガリスゼンマイはアメリカの亜系統とヨーロッパ・アフリカ・アジアの亜系統に分かれ、側系統群となり、アメリカ産のレガリスゼンマイ

はゼンマイに近縁であった。この結果から、東アジアのゼンマイと現在ではアメリカに分布するレガリスゼンマイの間で浸透性交雑が起こった可能性が示唆された。

(3) ゼンマイとヤシャゼンマイの間の推定雑種オオバヤシャゼンマイの生態調査と系統解析及び集団遺伝学的解析から、オオバヤシャゼンマイは両親種の間で雑種1代、2代、戻し交配を含み、部分的に胞子繁殖する複合雑種であり、両親種のゼンマイとヤシャゼンマイの間で浸透性交雑が起こっていることが示唆された。

(4) ゼンマイとレガリスゼンマイの間で葉の比較し、葉の二型性以外に、側脈の間隔に有意義な差異があることを発見した。

(5) 兵庫県立人と自然の博物館、スウェーデン自然史博物館、パリ自然史博物館所蔵の化石種の形態比較を行ない、第三紀の東アジアにはレガリスゼンマイとゼンマイに葉脈間距離が似た化石が存在し、日本の化石種は葉脈間距離がレガリスゼンマイ (現在は東アジアに分布しない) に似ていることを確かめた。このことから、過去にレガリスゼンマイ (あるいはその祖先種) が日本を含む東アジアに存在していた可能性を示唆した。

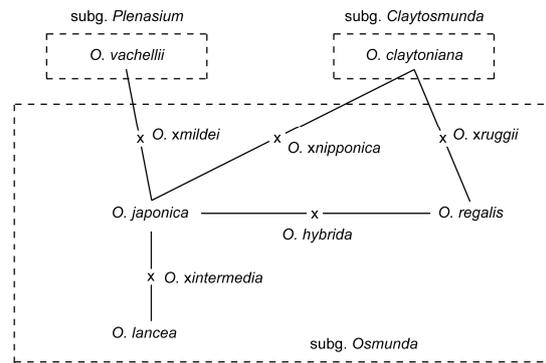


図3. ゼンマイ属の雑種

(6) ラオスとミャンマーのレガリスゼンマイ様のシダの染色体を観察し、フローサイトメーターでDNA量を測定した結果、4倍数体であることを自生ゼンマイ科として世界で初めて見いだした。葉緑体遺伝子解析と核遺伝子解析の結果を総合して、ラオスゼンマイは、インドのレガリスゼンマイを母親とし、ゼンマイを父親とする複2倍体であると推定した (図3)。4倍体の本新種はゼンマイ科で初めての発見である。ベトナム最北部・ミャンマー北部を除く東南アジアには現在ゼンマイ類が分布しないことを考慮すると、過去の分布は現在のものと異なり、分布域が重なるか近接していた際に種間雑種と倍数化が起こったと示唆された。この雑種由来の4倍

体種を新種 *Osmunda hybrida* として発表した (Tsutsumi et al. 印刷中)。

(7) 香港と中国東南部に分布する推定亜属間雑種 *Osmunda mildei* の母種を推定するために、複数の核遺伝子領域と葉緑体遺伝子を用いて系統解析を行なった。得られたデータから、本雑種はゼンマイ (ゼンマイ亜属) を父種、*O. vachellii* (シロヤマゼンマイ亜属) を母種として生じたことを明らかにした。

(8) 世界のいくつかの植物標本室および化石資料室に保管されている標本を調べ、現生種と化石種の詳細な形態比較を行なった。ゼンマイ類の化石種は現生種と類似する一方、レガリスゼンマイの形態変異は大きいことを明らかにした。

#### 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5件)

① Tsutsumi, C., S. Matsumoto, Y. Yatabe, Y. Hirayama and M. Kato. (in press) A new allotetraploid species of Osmundaceae from Laos and Myanmar. Syst. Bot. (査読有り)

② Yatabe, Y., K. Yamamoto, C. Tsutsumi, W. Shinohara, N. Murakami and M. Kato. 2011. Fertility and precocity of *Osmunda x intermedia* offspring in culture. J. Plant Res. 124: 265-268. (査読有り)

③ Kato, M. 2010. Evolution of early land plants: a review. Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., ser. B (Bot.) 36: 1-11. (査読有り)

④ Yatabe, Y., C. Tsutsumi, Y. Hirayama, K. Mori, N. Murakami and M. Kato. 2009. Genetic population structure of *Osmunda japonica*, rheophilous *O. lancea* and their hybrids. J. Plant Res. 122: 585-595. (査読有り)

⑤ Kato, M. 2009. Hybrids in the fern genus *Osmunda* (Osmundaceae). Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., ser. B (Bot.) 35: 63-69. (査読有り)

[学会発表] (計5件)

① 堤千絵、角川洋子、松本定、加藤雅啓。ゼンマイ亜属の分子系統とゼンマイの起源。日本植物学会第74回大会 (平成22年9月9日。中部大学)

② Tsutsumi, C. and M. Kato. Phylogeny of *Osmunda* subgen. *Osmunda*. 5th Symposium on Asian Pteridology and Fern Show (平成22年11月16日。中国・深圳)

③ 角川 (谷田辺) 洋子、堤千絵、加藤雅啓。ゼンマイ類における連鎖地図と細葉形質に関する相関解析。日本植物分類学会第9回大会 (平成22年3月28日。愛知教育大学)

④ 加藤雅啓。複数の核遺伝子解析によるゼンマイ亜属の系統。日本植物学会第73回大会 (平成21年9月18日。山形大学)

⑤ 堤千絵、加藤雅啓。ゼンマイ属の雑種と倍数体。日本シダ学会 (平成21年9月18日。山形大学)

[図書] (計0件)

[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:

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

加藤 雅啓 (KATO MASAHIRO)

国立科学博物館・植物研究部・部長

研究者番号: 20093221

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

植村 和彦 (UEMURA KAZUHIKO)

国立科学博物館・地学研究部・グループ長

研究者番号: 50000138

松本 定 (MATSUMOTO SADAMU)

国立科学博物館・植物研究部・研究主幹

研究者番号: 80132695

堤 千絵 (TSUTSUMI CHIE)

国立科学博物館・植物研究部・研究員

研究者番号: 30455422

