

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370037

研究課題名（和文） シダ植物の無配生殖種における遺伝的多様性の獲得機構

研究課題名（英文） Mechanisms of obtaining genetic diversity in apogamous fern species

研究代表者

村上 哲明（MURAKAMI NORIAKI）

首都大学東京・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：60192770

研究成果の概要（和文）：シダ植物には有性生殖を二次的にやめて、胞子を通して親と遺伝的に全く同一なクローンを生産する生殖様式（無配生殖）を獲得したものが少なからず存在する。しかし、シダの無配生殖種にも遺伝的な多様性が見られる。本研究では、無配生殖種であっても近縁な有性生殖種と交雑をする能力を高いレベルで（有性生殖種の約20%）維持していること、さらに遺伝的分離も数%程度起こして遺伝的に多様な子孫を生産していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Some species of ferns ceased their sexual reproduction in their evolutionary process and produce their next generation through apogamy without fertilization. In that case, all their offspring are expected to be genetically identical. However, apogamous fern species frequently show large genetic variation. In this study, we clarified that apogamous fern species can obtain genetic variation from its related sexual species through hybridization. We could also show that apogamous fern can produce genetically variable offspring through genetic segregation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：植物・進化・分類学・性

1. 研究開始当初の背景

シダ植物における無配生殖（apogamy, agamospory）とは、胞子体上に染色体の減数

を伴わずに胞子が形成され、その胞子から生じた配偶体が受精を伴わずに次世代の胞子体を形成する無性生殖様式のことである。全

世界のシダ植物の 10%以上もの「種 (species)」が、また日本でも 13%のシダ植物種が無配生殖を行うと報告されている (Takamiya 1996)。無配生殖種では、基本的に生じる子供はすべて母親と遺伝的に同一なクローンとなると考えられる。しかしながら、無配生殖を行うシダ植物種では、通常の有性生殖を行う近縁種と比較しても種内の形態変異がより大きいものがむしろ一般的である。さらにアロザイム多型解析などによって、無配生殖種内に大きな遺伝的変異がみられるものがあることもわかってきた。しかし、シダ植物の無配生殖種がどのような機構によって有性生殖と同等、あるいはそれ以上の遺伝的変異を獲得・維持しているのかはよく分かっていなかった。

申請者らは、無配生殖種が複数の近縁な有性生殖種との交雑によって、それらの遺伝的変異を取り込むことにより高い遺伝的変異をもつようになったのではないかという仮説の下で、これまで研究を行ってきた。実際に比較的近縁な無配生殖型と有性生殖型の間で交雑が起こりうること、その際、無配生殖型が精子親になって交雑が起こること、F1雑種は無配生殖型になることが報告されていた (Walker 1962)。

しかし、非減数の精子を形成する無配生殖種と有性生殖種が交雑すれば、無配生殖種に有性生殖種のもつゲノムが付け加わって、どんどん高次倍数化が進んでしまうと考えられる。ところが、シダ植物の無配生殖種の大半は3倍体で、4倍体や5倍体などはごく稀である。なぜ3倍体の無配生殖種が高次倍数体化することなく近縁な有性生殖種の遺伝的変異を取り込めるのかは謎であった。

研究分担者の林は、オシダ科のイタチシダ類を材料にして、不等減数分裂によって、まれに (1%程度) 3倍体無配生殖型の親個体から2倍体無配生殖型の子孫が生じることを明らかにした (Lin et al. 1994)。このように倍数性が減少する過程も存在すれば、近縁の2倍体有性生殖種のゲノムを次々取り込んでも3倍体のままでいられることが理解できる。近縁な有性生殖種との交雑&高次倍数化→不等減数分裂&低次倍数化→近縁な有性生殖種との交雑というサイクルを繰り返すことで、無配生殖種のもつ遺伝的多様性は高次倍数化することなく有性生殖種以上に

高められることがあるという仮説を申請者らは考えた。

さらに、最近、3倍体無配生殖種のトウゴクシダ (オシダ科) において、おそらく同祖性の染色体間で対合がおきて、母親とは遺伝的に異なる (母親のもつ遺伝子の一部だけをもつ) 3倍体の子孫が 1-2%ながら生じることが報告された (Ishikawa et al. 2003)。現在では、上記のサイクルに加えて、このような同一倍数性レベルでの遺伝的分離も起こることが、無配生殖種の種内の遺伝的多様性を3倍体のままで高めることにつながっているという仮説を申請者らは立てている。

しかしながら、これらの仮説は、まだ実証されたわけではない。これまで、個々の過程 (無配型と有性型の交雑、不等分裂による胞子形成、同祖性染色体対合による分離など) が起こりうるものが別々のシダ植物の無配生殖種の研究材料で確認されてきただけで、これらが自然界において同時複合的に働いていることを示せてはいないからである。上述したサイクルは、個々の過程が同時複合的に起きなければ無配生殖種が3倍体のままで遺伝的多様性を高めることにつながらない。またその際に、個々の過程が自然界でどのような頻度で起きるのかも解明できていないので、現在、無配生殖種内に見られる遺伝的多様性が現時点の仮説でどこまで説明できるのかも不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的の一つ目は、無配生殖種およびそれと交雑可能と予想される近縁な有性生殖種が共存している場所で、これらの交雑サイクルを形成しうるすべての過程が本当に同時複合的に起きているかどうか、起きているとすればどの程度の頻度で起きているかを明らかにすることである。具体的には、無配・有性個体が多数混生している野生集団で、細胞学的、遺伝学的比較を行い、3倍体以外の倍数性の個体がどのくらいの頻度で存在しているか、倍数性レベルごとに無配生殖型と有性生殖型がどのように遺伝的変異を共有しているかを明らかにする。同時に、配偶体の培養、人工交配実験などを通じて、無配型と有性型の交雑、無配型の不等分裂や遺伝的分離がどのくらいの頻度で起っているかも明らかにする。これらの情報を総合し

て、上述の仮説で無配生殖種集団のもつ遺伝的変異量の高さがどこまで説明できるのかを明らかにする。

この研究のための材料となるシダ植物としては、先行研究で有性・無配、両生殖型の混生集団の存在が示唆されていたオシダ科のベニシダ類 (*Dryopteris erythrosora* complex) を本研究では用いた。ちなみに、形態ではっきり区別することが難しいくらいに近縁な有性・無配の両生殖型が同一集団内に共存するのはきわめて稀である。

一方、日本には多数の無配生殖シダ植物種が存在しているが、日本には近縁な有性生殖種が存在していない無配生殖種の方が大多数である (Takamiya 1996)。しかし、申請者らが日本で無配生殖型しか見いだされていないヤブソテツ類 (*Cyrtomium fortunei* complex) の遺伝的変異を予備的に調べたところ、一つの小地域集団内でも非常に大きな遺伝的変異が存在することがわかった。また、同様の状況が遠く離れた埼玉県、兵庫県、広島県、福岡県の地域集団でも見られた。したがって、近縁な有性生殖種と交雑しなくても、無配生殖種はかなり大きな遺伝的変異を生み出し、集団内に維持できる機構をもっている可能性がある。

そこで本研究の2つめの目的は、このように遺伝的に多様な無配生殖型のみからなるヤブソテツ類の集団についても、不等分裂による遺伝的分離と低次倍数化、同祖性染色体対合による遺伝的分離などがどの程度起きているかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

研究の目的を達成するためにベニシダ類とヤブソテツ類のそれぞれについて、細胞学的ならびに遺伝学的解析を行った。具体的な方法については、次の「4. 結果」のところと一緒に説明する。

なお、細胞学的解析については、Partec社製のプロイディー・アナライザーを1台購入して、効率よく解析を行った。プロイディー・アナライザーとは、フローサイトメトリー法でDAPI染色した核を一つずつ細かいチューブの中に流しながら、その蛍光量を測定し、それぞれの核に含まれているDNA量を定量する装置である。3倍体や4倍体の核は2倍体のそれぞれ、1.5倍、2倍のDNA量を持っているので、この方法により倍数性を推定できる。この方法を用いると少量の生の葉サンプルさえあれば、迅速に大量の各孢子体個体の倍数性を調べること

ができる。

ベニシダ類については、これらの細胞学的、遺伝学的解析結果を総合して、無配生殖種の遺伝的多様化が近縁な有性生殖種との交雑を通じて起きるのか、それはどのような頻度で起きるのか、そして近縁な有性生殖種との交雑はどのくらい無配生殖型の寄与しているのかを解明する。

一方、基本的に3倍体無配型のみしか日本に分布していないと考えられているヤブソテツ類については、一つの無配生殖型の孢子体から採取した孢子から発芽して形成された前葉体と孢子体をプロイディー・アナライザーにかけ、倍数性の異なる配偶体や孢子体が形成されていないかどうか調べる。さらに、配偶体の残りの部分から *pgiC* 遺伝子をPCR増幅・その塩基配列を調べることで、親個体と異なる遺伝子型をもっている (遺伝的分離を起こした) 配偶体と孢子体がどのくらいあるかも明らかにする。

4. 研究成果

(1) ベニシダ類

① 野生集団解析：

まず、分布域が狭い有性生殖型ハチジョウベニシダの分布調査を標本庫に保管されている標本を用いて行った。そして、ベニシダ類の両生殖型が確認された東京都伊豆大島において、孢子囊あたりの孢子数の計数による生殖型の推定、プロイディー・アナライザーを用いての全サンプルの倍数性の推定、ならびに全サンプルの遺伝子型の決定 (アロザイム多型解析) を行った。また、生育環境を両生殖型で比較したところ、伊豆大島の有性生殖型は比較的最近に溶岩が流れ、遷移の初期段階である場所にのみ分布していたことがわかった (図1)。

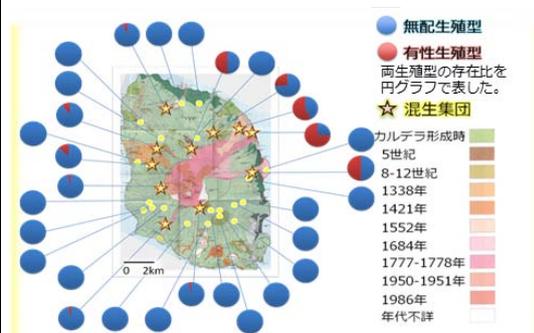


図1 伊豆大島における両生殖型の分布と火山活動による土地形成との比較。赤い部分が主に最近の溶岩流の跡。中心部は砂漠である。

②両生殖型の混生集団と無配生殖型のみ
の集団の比較、ならびに混戦集団の解析：

伊豆大島における無配生殖型のみ
の集団と、有性生殖型との混生集団、それ
ぞれの無配生殖型個体の遺伝的多様性
の比較を行った。その結果、混生集団
の無配生殖型は、有性生殖型に高頻度
でみられる対立遺伝子をより多く持ち、
有意に遺伝的により多様であることが
わかった。

また、両生殖型の混生集団内にコド
ラートをはり、交雑サイクル仮説を支持
する個体の検出を試みた。その結果、混
生集団では無配生殖型は有性生殖型と
対立遺伝子を共有していた。また、集
団内に2倍体有性生殖型と3倍体無配
生殖型の交雑によって生じたと考えら
れる4倍体個体と、2倍体無配生殖型
個体が確認された。この2倍体無配生
殖型個体は、3倍体無配生殖型の不等
減数分裂だけでなく、4倍体雑種の分
離によって生じたとも考えられる遺伝
子型であった。いずれにしても、2倍
体無配生殖型が存在していたため、交
雑サイクルが自然界で起こっている場
合に予想される状況が野外でも観察さ
れた。

③無配生殖型と有性生殖型の人工交配
実験：

造精器を形成することが知られてい
る無配生殖型を父親、有性生殖型を母
親にして定量的な人工交配実験を行っ
た。また、造精器誘導フェロモン
antheridiogenについては、有性生殖
種の前葉体から分泌され、有性生殖
型に作用することは知られているが、
無配生殖種については調べられてい
なかつたのでその効果の有無も調べ
た。

人工交配実験は5つの対照実験を設
定し、24穴シャーレを用いて、596
回の交配を以下の手順で行った(図2)。



図2 人工交配実験の手順

この人工交配実験には、複数の遺伝子
型を組み合わせ、同じ遺伝子型につい
て3個体以上の胞子体から採集した胞
子を用いた。まず、有性生殖型の成熟
した前葉体を寒天培地上に単離後、無
配生殖型の胞子をその前葉体の周りに
追い蒔きした。次に、無配生殖型の胞
子を後から蒔くことで、有性生殖型の
前葉体から分泌される antheridiogen
に誘導され、無配

生殖型の前葉体上に造精器がより高頻
度に形成されることを期待した。胞子
を追い蒔きした後、定期的に両生殖
型の前葉体に水をかけて受精させた。
対照実験としては、有性生殖型同士
の人工交配実験、有性生殖型の前葉
体を単離しただけのもの、無配生殖
型の前葉体を単離しただけのもの、有
性生殖型の胞子のみを密に蒔いたもの、
無配生殖型の胞子のみを密に蒔いたも
の5種類の処理を行った。そして、生
じた胞子体の倍数性をプロイディ・ア
ナライザーを用いて調べ、アロザイム
多型解析によって遺伝子型を調べた(4
倍体、かつ両親の遺伝マーカーを併
せもつかを調べた)。

その結果、4倍体であり、かつ両親
の遺伝マーカーを併せ持つ雑種は596
回のうち23回(3.9%)で形成された。
一方、有性生殖型同士の交配では、
596回のうち108回(18.1%)で次
世代の胞子体が形成された。有性生
殖型の1つの前葉体内の自殖は全く起
こらなかつたため、この値は有性生
殖型同士で交雑した頻度となる。有
性生殖型同士が交雑する場合を100%
としたとき、無配生殖型はその21.5%
と高いレベルで交雑する能力を保持
していることが明らかになった。

さらに、交配のために胞子を追い
蒔きして形成させた無配生殖型の前葉
体上には、596回のうち9回(1.5%)
で造精器が確認できた(図2*の部分参
照)。一方、無配生殖型の前葉体を単
離した場合と、無配生殖型の前葉体
のみを密に培養した場合には、造精
器は観察されなかつた。有性生殖型
の前葉体が近接していたときにのみ、
無配生殖型の前葉体上に造精器が観
察されたことから、無配生殖型の前葉
体も有性生殖型の前葉体から分泌さ
れる antheridiogen に反応すると考
えられた。

本研究の結果からは、ベニシダ類
の無配生殖型と有性生殖型個体は比
較的に容易に(有性型同士の約20%
もの頻度で)交雑することが示され
た。さらに、無配生殖型個体が、交
雑する能力を失っていないのみならず、
近くに有性生殖型個体がいると積極
的に(擬人的な表現であるが)造精器
を形成するのは、交雑すること、す
なわち有性生殖をすることが進化的
に有利である(より適応的である)こ
を示唆していて、非常に興味深い。

(2) ヤブソテツ類

①野生集団解析：

ヤブソテツ類の地理的に離れた4つ
の地域集団(埼玉県毛呂山, 静岡県
河津, 兵庫県神戸, 広島県府中)か
ら葉のサンプルを

採取し、アロザイム酵素多型解析、*rbcL*遺伝子の塩基配列解析、生殖様式・倍数性の確認、形態観察等を行った。*rbcL*遺伝子の塩基配列解析の結果、7塩基の置換が見られる2種類の配列(aとb)が見出された。4酵素種(PGM, HK, 6PG, LAP)によるアロザイム酵素多型解析の結果、バンドパターンの違いから8種類(A-H)のアロザイムタイプが認識された。

生殖様式の確認は、孢子嚢中の孢子数の計数によって行い、A-Hいずれのアロザイムタイプも無配生殖型であることが確かめられた。そして、最も多くのアロザイムタイプが共存していた神戸集団において、染色体数の計数とプロイディ・アナライザーによる各個体の倍数性の推定を行った。その結果、観察したいずれの個体も3倍体であることが確かめられた。

②同祖染色体の対合による遺伝的分離の頻度：

このように3倍体の無配生殖をするシダ植物種が単独で(有性生殖種との交雑を経ないで)遺伝的多様性を獲得できるメカニズムの仮説としては、同祖染色体の対合による遺伝的分離(Klekowski 1973)が提唱されている。これは、孢子形成過程の途中の減数分裂時に同祖性の染色体(もとは互いに相同染色体であったが、今は対合しなくなったもの)がまれに対合することによって、結果として遺伝的分離を起こす過程のことである(Klekowski 1973)。本研究では、無配生殖を行うヤブソテツ類において実際に遺伝的分離が起こっているのか、起こっているなら、その頻度はどの程度かを実験的に調べた。

もし、無配生殖種において遺伝的分離が起これば、次世代の個体の中に、親の遺伝情報の一部しかもっていない子孫が存在しているはずである。本研究では遺伝的分離をした個体を効率よく検出するために、核にコードされ、シダ植物ではシングルコピーであるとされる*pgiC*遺伝子を遺伝マーカーとして用いた。最初にヤブソテツ類からPCR増幅した*pgiC*遺伝子をクローニングして、その塩基配列決定を行った。その結果、親株として選定したK220株から6塩基に置換が見られるa, bの2種類の配列が見出された。次に、この親株より孢子を採取して、

その孢子に由来する配偶体を培養した。そして、その*pgiC*遺伝子を解析した。調べた250個体の配偶体のうち、11個体(4.4%)はaのみの*pgiC*遺伝子しかもっていない。さらにこれらの配偶体上に生じた次世代孢子体を482個体解析したところ、aのみの*pgiC*遺伝子しかもっていない次世代孢子体が8個体(1.7%)見つかった。

一方、親株であるK220株、およびそれに由来する子孫配偶体と次世代孢子体について倍数性の確認を行ったところ、調べた限り全て3倍体であった。このことから、無配生殖をおこなうヤブソテツ類において不等減数分裂ではなく、同祖性染色体の対合によると考えられる遺伝的分離によって確かに新たな遺伝子型をもつクローンが1-4%の頻度で生じていると結論された。

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4件)

①Ootsuki, R., Sato S., Nakato N. and N. Murakami. 2012. Evidence of genetic segregation in the apogamous fern species *Cyrtomium fortunei* (Dryopteridaceae). J. Plant Res. 125: (電子出版済み DOI 10.1007/s10265-012-0483-9). 査読あり.

②Ootsuki, R., Shinohara, W., Suzuki, T. and N. Murakami. 2011. Genetic variation in the apogamous fern *Cyrtomium fortunei* (Dryopteridaceae). Acta Phytotax. Geobot. 62:1-14. 査読あり. [日本植物分類学会 Best Paper Award 2011受賞]

③Yamamoto, K., Murakami, N. and A. Ebihara. 2010. The distribution of *Dryopteris caudipinna* (Dryopteridaceae), a sexually reproducing counterpart of the apogamous *D. erythrosora*, in Japan. Acta. Phytotax. Geobot. 61:109-114. 査読あり.

④Lin, S.-J. and Iwatsuki, K. 2010. A new sexual diploid of *Dryopteris erythrosora* complex (Dryopteridaceae) from Oki Islands, Japan. 島根大学生物資源科学部研究報告 15:11-14. 査読なし.

[学会発表] (計18件)

①山本薫・岡利雄・岡武利・海老原淳・村上哲明「筑波山で見出されたタニヘゴとハチジョウベニシダの新雑種」日本植物分類学会第11回大会(大阪)平成24年3月22日-25日
②村上哲明「生殖様式が異なるシダ植物と臈

火活動の関係」日本植物学会第75回大会(東京)公開講演会「東京都の島の植物と生物多様性-伊豆諸島から小笠原まで-」平成23年9月19日

③山本薫(首都大・理工)・角川(谷田辺)洋子・海老原淳・林蘇娟・村上哲明「ベニシダ類の無配生殖型における交雑と分離の頻度」日本植物学会第75回大会(東京)平成23年9月17日-19日

④ Yamamoto, K., Yatabe-Kakugawa, Y., Ebihara, A. and Murakami, N. "Do apogamous fern *Dryopteris erythrosora* obtain genetic variation from its related sexual species?" XVIII International Botanical Congress (Melbourne, Australia) 平成23年7月24日-30日

⑤ Ootsuki, R., Sato, H., Nakato, N., Murakami, N. "Genetic segregation observed in sporophytes and gametophytes of the apogamous fern *Cyrtomium fortunei*." East Asian Botany: International Symposium 2011(Tsukuba, Japan) 平成23年3月19日-20日

⑥ Yamamoto, K., Yatabe-Kakugawa, Y., Ebihara, A. and Murakami, N. "Do apogamous fern *Dryopteris erythrosora* have ability to cross with its related sexual species?" East Asian Botany: International Symposium 2011(Tsukuba, Japan) 平成23年3月19日-20日

⑦山本薫・瀬尾明弘・角川(谷田辺)洋子・村上哲明「伊豆大島におけるベニシダ類の無配生殖型と有性生殖型の生育値と火山活動との関係」種生物学会第42回シンポジウム(京都)平成22年12月10日-12日

⑧Yamamoto, K., Yatabe-Kakugawa, Y., Seo, A. and N. Murakami. "Do apogamous ferns obtain genetic variation through hybridization with sexual relatives?" The 5th Symposium on Asian Pteridology and Fern Show (Shenzhen, China).平成22年11月15日-21日

⑨Murakami, N. and K. Yamamoto. "Crossing ability of apogamous ferns". East Asian Plant Diversity and Conservation (Seoul, Korea) 平成22年8月20日-21日

⑩大槻涼・村上哲明「無配生殖をするヤブソテツにおける遺伝的分離の頻度」日本植物学会第74回大会(中部)平成22年9月9日-11日

⑪山本薫・小川信正・大槻涼・中路真嘉・加藤英寿・菅原敬・村上哲明「伊豆大島における有性生殖型ハチジョウベニシダと無配生殖型ベニシダ類の分布」日本植物分類学会第9回大会(愛知)平成22年3月26日-28日

⑫山本薫・角川(谷田辺)洋子・海老原淳・林蘇娟・村上哲明「3倍体無配生殖型ベニシ

ダと2倍体有性生殖型ハチジョウベニシダの人工交配実験」日本植物分類学会第9回大会(愛知)平成22年3月26日-28日

⑬大槻涼・佐藤博俊・村上哲明「*pgiC*遺伝子の分離に基づくヤブソテツ類の同祖染色体対合の頻度」日本植物分類学会第9回大会(愛知)平成22年3月26日-28日

⑭林蘇娟・宮本明奈「ベニシダ類の生殖多型を生む有性生殖型の女王と母親になる無配生殖型?」日本植物分類学会第9回大会(愛知)平成22年3月26日-28日

⑮村上哲明「進化・多様性研究の材料としてのシダ植物の特性とおもしろさ」種生物学会第41回シンポジウム(八王子)平成21年12月11日-13日

⑯山本薫・大槻涼・角川(谷田辺)洋子・海老原淳・林蘇娟・村上哲明「ベニシダ類における無配生殖型と有性生殖型との交雑」種生物学会第41回シンポジウム(八王子)平成21年12月11日-13日

⑰大槻涼・佐藤康・村上哲明「イズヤブソテツについて」日本植物学会第73回大会(山形)平成21年9月17日-20日

⑱山本薫・大槻涼・海老原淳・林蘇娟・角川(谷田辺)洋子・村上哲明「ベニシダ類の無配生殖型と有性生殖型が混生する伊豆大島集団の解析」日本植物学会第73回大会(山形)平成21年9月17日-20日

〔その他〕

ホームページ等

<http://dept.biol.metro-u.ac.jp/labo.asp?ID=plasy>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 哲明 (MURAKAMI NORIAKI)

首都大学東京・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 60192770

(2) 研究分担者

林 蘇娟 (LIN SU-JIANG)

島根大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 10362914

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

大槻 涼 (OTSUKI RYO)

首都大学東京・大学院理工学研究科・
博士後期課程大学院生

山本 薫 (YAMAMOTO KAORU)

首都大学東京・大学院理工学研究科・
博士後期課程大学院生