

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291089

研究課題名(和文) シダ植物の無配生殖(無性生殖)を引き起こす遺伝領域の特定

研究課題名(英文) Identification of the genetic regions responsible for apogamous reproduction in ferns

研究代表者

村上 哲明 (Murakami, Noriaki)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：60192770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：無配生殖(無性生殖の一型)を行うシダ植物の種は近縁な有性生殖種と容易に交雑すること、それらの間の雑種個体からは高頻度で減数した子孫が生じることを我々は明らかにしていた。そこで本研究では、3倍体無配生殖種のおニヤブソテツ(オシダ科)と、それに非常に近縁な2倍体有性生殖型のヒメオニヤブソテツあるいはムニンオニヤブソテツの間に生じた4倍体雑種個体に生じた胞子を寒天培地上で培養し、F2世代の子孫における無配生殖型と有性生殖型の分離比を調べた。その結果、両生殖型がほぼ1:1で生じ、無配生殖型がただ一つの遺伝的領域(無配生殖遺伝子)によって支配されていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have revealed that apogamous fern species, which usually asexually reproduce, can easily hybridize with closely related sexual species and make hybrids. We collected spores from the tetraploid hybrids between triploid apogamous *Cyrtomium falcatum* and its diploid sexual forms, and cultivated gametophytes generated from the spores. Apogamous gametophytes, which could form next-generation sporophytes without fertilization, and sexual one, which could not, were observed in 1:1 ratio. These results indicate that apogamous reproduction in ferns is controlled by a single DNA region.

研究分野：植物分類学・進化学

キーワード：遺伝子 ゲノム 植物 進化 シダ

1. 研究開始当初の背景

シダ植物には二次的に有性生殖をやめて、無配生殖と呼ばれる無性生殖を行うようになったものが10%以上存在する (Takamiya 1996)。シダ植物における「無配生殖 (apogamy, agamospory)」とは、孢子体上に染色体の減数を伴わずに孢子が形成され、その孢子から生じた配偶体が受精を伴わずに次世代の孢子体を形成する無性生殖様式のことである (図1-B)

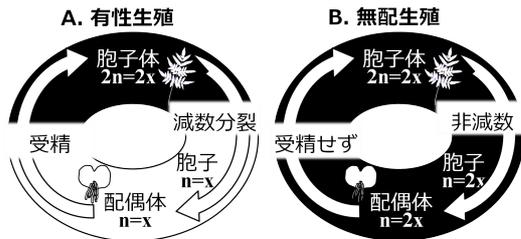


図1 シダ植物の生活環

無配生殖をすると、生じる子孫はすべて母親と遺伝的に同一なクローンになるはずである。ところが実際の無配生殖種では、近縁な有性生殖種と同程度以上の形態的、遺伝的変異を示すことがむしろ一般的である。そこで申請者は、シダ植物の無配生殖種が遺伝的変異を獲得・維持する機構を解明すべく、継続的に研究を行ってきた。

我々はまず、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という交雑サイクル仮説の下で研究を行ってきた。無配生殖種の配偶体にも造精器は形成され、実際に比較的近縁な無配生殖種 (雄親) と有性生殖種 (雌親) の間で交雑が起こりうること、生じた雑種も無配生殖能をもつこと (無配生殖の方が優性) は以前から分かっていたからである (Walker 1962)。

しかし、無配生殖種が雄親としてどの程度、交雑する能力を維持しているかは分かっていなかった。我々が3倍体無配生殖種のベニシダ (オシダ科) とそれに非常に近縁な2倍体有性生殖種のハチジョウベニシダ (以後、両者を併せてベニシダ類と呼ぶ) の間で定量的な人工交配実験を行い、無配生殖種の交雑能力を調べてきた。その結果、無配生殖種が有性生殖種の約30%の高いレベルで交雑能力を維持していることを明らかにすることができた。

一方で、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、高次倍数化が進むと考えられる。ところが、シダ植物の無配生殖種の大半は3倍体である。Lin et al. (1994) は、ベニシダ類に近縁な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数%程度の低頻度ではあるが、3倍体無配生殖種の親個体から2倍体無配生殖種の子孫が生じること、すなわちシダ

植物の無配生殖種には減数して低次倍数化する過程が存在することを明らかにしていた。さらに、申請者らもベニシダ類において無配型と有性型の交雑によって生じた4倍体雑種個体から、36.4%もの高い割合で減数した2倍体の子孫を生じるという結果を得ている。

つまり、普段は無性生殖をしているシダ植物の無配生殖種も、近縁な2倍体有性生殖種と稀に交雑をして、遺伝子の分離や組換えを起こしうるということである。分離や組換えが起きれば、遺伝学的解析によって無配生殖を生じさせている遺伝子や遺伝的領域を特定することも可能であると考えられる。

そこで今回、我々が注目したのが、オニヤブソテツ (やはりオシダ科) で報告されていた3倍体無配生殖型とヒメオニヤブソテツと呼ばれる2倍体有性生殖型との自然雑種である (Matsumoto 2003)。この無配生殖型と有性生殖型の雑種の4倍体個体の子孫を調べると、2倍体無配生殖型と2倍体有性生殖型の子孫配偶体が分離したことが報告されていた。同様の結果は我々のベニシダ類を材料とした研究でも得られている。

無配生殖種と近縁な有性生殖種との雑種において遺伝マーカーが分離し、さらに無配生殖を引き起こす対立遺伝子 (= 無配生殖遺伝子) と有性生殖をする対立遺伝子も分離するとすれば、遺伝マーカーとの連鎖解析を行うことによって無配生殖遺伝子を特定できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) 本研究の一つ目の目的は、オニヤブソテツ類における3倍体無配生殖型のオニヤブソテツと2倍体有性生殖型のヒメオニヤブソテツあるいはムニンオニヤブソテツとの間に生じた4倍体雑種のF2世代において、無配生殖型と有性生殖型が1:1に分離するかどうかを定量的に調べることである。もし、本当に1:1に分離するのであれば、一つの遺伝的領域によって無配生殖が支配されていることが強く示唆されるからである。

(2) さらに、そのように1:1に分離するのであれば、多数の遺伝マーカーを開発して、それと分離する無配生殖型、有性生殖型との連鎖解析をすれば、無配生殖を司る遺伝的領域がどの連鎖群のどのあたりに存在するのかを特定できるはずである。これをオニヤブソテツ類で実施するのが2つめの目的である。

(3) 一方で、近縁な有性生殖種と無配生殖種が交雑をして3倍体や4倍体の雑種を形成し、さらにF2世代で無配生殖型と有性生殖型が分離するような現象がシダ植物において一般的であれば、他のシダ植物でもそのようなことが見られるはずである。また、もし同じような現象が複数のシダ植物の群で見られるのであれば、将来的にそれぞれの群におい

て無配生殖を司っている遺伝領域に共通する機能を持つ遺伝子、すなわち無配生殖遺伝子と呼べる物が存在するののかも調べられる可能性が出てくる。そこで、本研究では、オニヤブソテツ類と同じくオシダ科に属し、しかしながら無配生殖種が独立に進化したと考えられているイタチシダ類についても、核遺伝マーカーを開発して無配生殖種と有性生殖種の交雑や交雑を通じての網状進化について調べることを第3の目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず、オニヤブソテツ類の3倍体無配生殖型と2倍体有性生殖型の間に生じた4倍体雑種を野外で探索した。その結果、4倍体で、他の有性生殖種と同様に64個の胞子が入っている胞子嚢と、無配生殖種と同様に32個の胞子が入っている胞子嚢の両方をつけて、2倍体有性生殖型のヒメオニヤブソテツと3倍体無配生殖型の間に生じた4倍体のF1雑種と考えられる個体を採した。倍数性は、フローサイトメーター (Partec社のプロイディ・アナライザー) を用いて調べた。そして、静岡県伊東市城ヶ崎海岸で見つけた4倍体雑種個体から胞子を採取した。

同時に、松本定博士 (国立科学博物館) によって見出され、つくば実験植物園において栽培されていた2つの雑種4倍体個体、すなわちアツバオニヤブソテツ (2倍体有性生殖型のヒメオニヤブソテツ×3倍体無配生殖型のオニヤブソテツ)、ウスバオニヤブソテツ (2倍体有性生殖型のムニンオニヤブソテツ×3倍体無配生殖型のオニヤブソテツ) から胞子を採取した。

そして、その胞子を寒天培地上で培養して、F2世代における生殖様式 (無配生殖 or 有性生殖) の分離を調べた。具体的には、これらの胞子が発芽して生じた配偶体を1個体ずつ24穴のプラスチックシャーレの各穴に単離して、受精せずに胞子体を形成した配偶体 (すなわち、無配生殖能をもつ) と形成しなかった (無配生殖能のない、すなわち有性生殖をする) 配偶体に分けた。そして、無配生殖型と有性生殖型の間に生じた雑種のF2世代における無配生殖型と有性生殖型の子孫の分離比を調べた。

(2) オニヤブソテツ類の3倍体無配生殖型と2倍体有性生殖型の間に生じた4倍体雑種の子孫 (F2世代) のうち、受精を経ずに胞子体を形成できた無配生殖能を持つ子孫 (無配生殖型) とそれができなかった子孫 (有性生殖型と考えた) のそれぞれから全DNAを抽出して、オニヤブソテツ用に開発された核DNAマーカー (G6pdg遺伝子の塩基配列多型) を用いた解析を行い、核DNAマーカーがF2世代で分離するのかどうかを調べた。生殖様式 (無配生殖型と有性生殖型) と核DNAマーカーの両方が遺伝的分離をするのであれば、連鎖解析を通じて、無配生殖を司

る遺伝領域を特定することが可能になるからである。

さらに、これらF2世代で分離した無配生殖型の配偶体と有性生殖型の配偶体を41個体ずつ選び、龍谷大学農学部のクロノミクスNGS解析係に委託して、RAD-seq解析も行った。この方法は、特定の制限酵素による切断サイトの周辺の塩基配列だけを次世代シーケンサーを用いて集中的に繰り返し解読することによって、核DNAの様々な位置に塩基配列多型に基づくマーカーを見出すことができる方法である。そして、生殖様式の違いと良く対応して、それを司る遺伝領域と強く連鎖している核SNIPマーカーを探索した。

(3) シダ植物の無配生殖種はクローン繁殖に加えて、不等減数分裂した直後に有性生殖種との交雑も行って、3倍体のままで有性生殖種のゲノムを繰り返し取り込んでいるとすると、様々な有性生殖種由来のゲノムを合わせもった無配生殖種が生じて、複雑な網状進化が起こることが予想される。そこで、オシダ科においてシングルコピー遺伝子であることが示され、さらにオシダ属用のPCR増幅プライマーが開発されていた*PgiC*遺伝子 (解糖系を司るグルコースリン酸イソメラーゼをコードする遺伝子) を核DNAマーカーとして用いて、連続的な形態変異を示す複数の無配生殖種ならびにその元になったと考えられる2倍体の有性生殖種の両方が日本で見られるイタチシダ類 (オシダ科オシダ属) を材料にして、そのゲノム構成を解析する研究を行った。

具体的には、日本列島に分布するイタチシダ類の種をできるだけ網羅的に採集して、胞子嚢あたりの胞子数を係数することによって生殖様式を推定し、プロイディ・アナライザーを用いて倍数性を調べた。その上で、葉サンプルから全DNAを抽出して、それから*PgiC*遺伝子の一部をPCR増幅した。そして、SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 法を用いて、3倍体で最大3種類含まれる*PgiC*の同祖遺伝子を分離した。その上で、再度、最初に用いたのと同じプライマーを用いて、*PgiC*遺伝子をPCR増幅して、得られた断片をキャピラリーDNAシーケンサー (ABI 3130) を用いてダイレクトシーケンスして、その塩基配列を明らかにした。次に、得られた全ての塩基配列を分子系統解析して、2倍体有性生殖型から得られた*PgiC*遺伝子の配列と同じクレードを形成するものをその有性生殖種由来の同祖性遺伝子とした。このような手順で、3倍体無配生殖種の核個体の遺伝子構成を調べた。

同様の実験を核*GapCP*遺伝子についてもを行い、無配生殖種におけるゲノム組成を調べた。

4. 研究成果

(1) オニヤブソテツ類の2倍体有性生殖型

のヒメオニヤブソテツと3倍体無配生殖型のオニヤブソテツの間の4倍体雑種(アツバオニヤブソテツ)ならびに同じく2倍体有性生殖型のムニンオニヤブソテツと3倍体無配生殖型のオニヤブソテツの間に形成された4倍体雑種(ウスバオニヤブソテツ)の胞子をそれぞれ調べたところ、どちらも無配生殖型に典型的な非減数の胞子を含む胞子嚢に加えて、減数分裂をして2倍体になった胞子(減数性胞子)を含む胞子嚢もほぼ同数、観察された。さらに、その減数性胞子を寒天培地上で培養し、生じた配偶体を1匹ずつ単離して培養したところ、いずれに雑種の子孫においても、ほぼ半数が受精をせず次世代の胞子体を配偶体上に形成した(アツバ、胞子体形成:未形成=209:235;ウスバ、形成:未形成=105:135)。すなわち、無配・有性生殖型間の雑種の子孫において、無配生殖能をもつ子孫ともたない子孫がほぼ1:1に分離することを、2組の雑種を用いて示すことができた。このことは、オニヤブソテツ類の無配生殖がたった一つの遺伝領域によって支配されていることを強く示唆している。

(2) オニヤブソテツ類の3倍体無配生殖型(オニヤブソテツ)と2倍体有性生殖型のヒメオニヤブソテツの間に生じた4倍体F1雑種の胞子を蒔いて培養することによって得られた無配生殖型の配偶体と有性生殖型の配偶体、それぞれ41個体ずつを龍谷大学農学部のクロノミクスNGS解析係に委託してRAD-seq解析を行った。その結果、Q30値の高い7Gbpの塩基配列情報が得られた。これらの情報に基づいて、F2世代の生殖様式(有性生殖型 or 無配生殖型)と連鎖している1塩基多型(SNA)を探索した。しかし、これらの生殖様式ときれいに対応しているSNPは一つも見出されなかった。その理由としては、無配生殖能がない(有性生殖型)であると判断した配偶体の中に無配生殖能をもつが、生理的あるいは環境条件などのせいでまだ胞子体を形成するのに至っていない配偶体が含まれていたことが考えられる。先に述べたように、統計学的検定では、F2における無配生殖型と有性生殖型は1:1から有意にずれていないものの、数の上では有性生殖型の方が多くなっているため、そちらに無配生殖型が一部混ざっている可能性は十分に考えられる。今後、RAD-seq解析をするF2の配偶体数を増やすことによって、無配生殖を司る遺伝子と連鎖しているSNPが見つかるのではないかと考えている。

(3) *PgiC*遺伝子を核DNAマーカーとして用いて無配生殖種のゲノム構成を解析する研究を行った結果、イタチシダ類の無配生殖種(オオイタチシダ、ヤマイタチシダ)の多くの個体は、この群の3つの有性生殖種(ナンカイイタチシダ、イワイタチシダ、モトイタチシダ)のゲノムが2つあるいは3つ、組み

合わさったものであることが強く示唆された。さらに驚くべきことに、これまでイタチシダ類の一員とは考えられてこなかったベニシダ類(ハチジョウベニシダ)や、さらに遠縁であることが *rbcl* 遺伝子の塩基配列情報に基づく分子系統解析によって示されていたミサキカグマのゲノムも、イタチシダ類の3つの無配生殖種(オオイタチシダの一部、ヒメイタチシダ、リョウトウイタチシダ)に含まれていることが明らかになった(図2)。

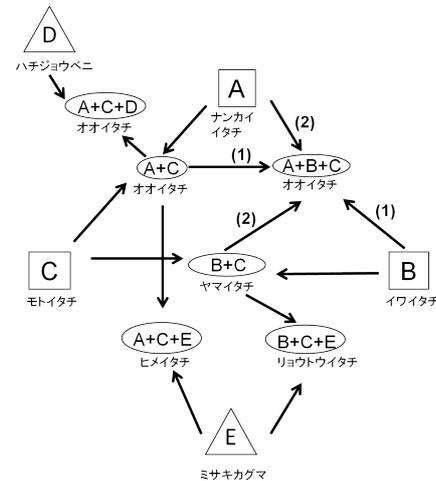


図2 イタチシダ類の網状進化

- , 2倍体有性生殖種;
- , 3倍体無配生殖種;
- , イタチシダ類以外の有性生殖種

通常、かなり近縁でも異なる有性生殖種の間でできた雑種は、胞子形成時に正常な減数分裂が起きずに稔性のない胞子のみが形成され、胞子繁殖能力をもたない。それに対して、シダ植物の無配生殖種が他種と交雑して生じた雑種は、無配生殖が優性遺伝するため、胞子繁殖能力を維持できる。この性質のため、かなり遠縁の種のゲノムさえも取り込むことが可能となっているのだろうと考えられる。無配生殖をするようになったからといって、遠縁な他種との交雑能力そのものが高まるとは考えにくいからである。実際に、無配生殖種ベニシダの雄親としての交雑能力は、ごく近縁な有性生殖種ハチジョウベニシダの3割程度であった。無配生殖種の交雑能力が、有性生殖種よりも高いわけではない。

さらに、無配生殖種が容易に有性生殖種と交雑するのであれば、繰り返し交雑が起きて、例えば3倍体無配生殖種であっても、4種、5種の2倍体有性生殖種に由来するゲノムが一つに無配生殖種の中にキメラ状に混じっていても不思議ではない。つまり、調べる核マーカーによって、その組み合わせが異なっても良いはずである。ところが、イタチシダ類について、2つめの核マーカーとして *GapCp* 遺伝子を用いて調べたところでは、

*PgiC*の組成とほぼ完全に一致していた。

そこで私たちは、無配・有性種間の交雑は有限な回数しか起こっていない、あるいは元の有性生殖種でのゲノム構成が維持されている子孫のみが生き残っているという仮説を立てている。無配生殖種が片親の雑種は、正常な減数分裂ができずに繁殖ができないという恐れがないとはいえ、かなり遠縁の4種、5種のゲノムが染色体ごとに、あるいは一本の染色体内でもキメラ状に混じり合っただけでは、さすがに安定して生存できないのかもしれない。このように無配生殖種のゲノム構成を明らかにする研究は、異種間のゲノム間の不和合性などについても情報を与えてくれる可能性がある。遠縁の種のゲノムが一つの個体内に共存している状況は、シダ植物の無配生殖種以外では、なかなか見られないからである。

いずれにしても、上述した仮説は、今後、次世代シーケンサーをフルに活用して核DNAマーカーを増やして検証する計画である。

<引用文献>

Takamiya, M. (1996) Index to chromosomes of Japanese Pteridophyta (1910-1996). Japan Pteridological Society, Tokyo.

Walker, T.G. (1958) Hybridization in some species of *Pteris* L. *Evolution* 12: 82-92.

Lin, S.-J., Kato, M., and K. Iwatsuki. (1992) Diploid and triploid offspring of triploid agamosporous fern *Dryopteris pacifica*. *J. Plant Res.* 105: 443-452.

Matsumoto, S. (2003) Species ecological study on reproductive systems and speciation of *Cyrtomium falcatum* complex (Dryopteridaceae) in Japanese archipelago. *Ann. Tsukuba Bot. Gard.* 22: 1-141.

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)

Hori, K., Watano, Y., and N. Murakami. 2016. Hybrid origin of the apogamous fern species *Dryopteris hondoensis* (Dryopteridaceae). *Acta Phytotax. Geobot.* 67: (in press). 査読有.

Hori, K., Ebihara, A., Nakato, N. and N. Murakami. 2015. *Dryopteris protobissetiana* (Dryopteridaceae), a new diploid sexual species of the *Dryopteris varia* complex (subg. *Erythrovariae*, sect.

Variae) from Yakushima Island, Kagoshima, Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* 66: 47-57. 査読有.

Hori, K., Matsumoto, M., Nakato, N., Ebihara, A. and N. Murakami. 2015. Geographical distribution of sexual and apogamous types of *Dryopteris chinensis* (Dryopteridaceae) in Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* 66: 35-45. 査読有.

Hori, K., Tono, A., Fujimoto, K., Kato, J., Ebihara, A., Watano, Y. and N. Murakami. 2014. Reticulate evolution in the apogamous *Dryopteris varia* complex (Dryopteridaceae, subg. *Erythrovariae*, sect. *Variae*) and its related sexual species in Japan. *J. Plant Res.* 127: 661-684. 査読有.

DOI 10.1007/s10265-014-0652-0

[学会発表](計11件)

堀清鷹・奥山雄大・海老原淳・綿野泰行・村上哲明「複数の核マーカーを用いたイタチシダ類の分子分類」日本植物分類学会第15回大会 富山大学(富山県・富山市) 2016/3/6/-3/8 .

Yamamoto, K., Yatabe-Kakugawa, Y., Ebihara, A., Murakami, N. "Crossing ability of triploid apogamous fern *Dryopteris erythrosora*." Next Generation Pteridology: 12th Symposium of the International Organization of Plant Biosystematists (Washington DC, USA) 2015/6/1-6/5.

Hori, K., Tono, A., Fujimoto, K., Kato, L., Ebihara, E., Watano, Y., and N. Murakami. "Reticulate evolution in the apogamous *Dryopteris varia* complex and its sexual relatives." Next Generation Pteridology: 12th Symposium of the International Organization of Plant Biosystematists (Washington DC, USA) 2015/6/1-6/5.

堀清鷹・綿野泰行・村上哲明「無配生殖種オオベニシダの雑種起源」日本植物分類学会第14回大会 福島大学(福島県・福島市) 2015/3/5/-3/9.

松本めぐみ・山本薫・堀清鷹・村上哲明「ベニシダ類(オシダ科)における有性生殖種ホコザキベニシダの実体と無配生殖種との交雑」日本植物分類学会第14回大会 福島大学(福島県・福島市) 2015/3/5/-3/9.

森絵里菜・松本定・堀清鷹・山本薫・綿野泰行・角川洋子・村上哲明「オニヤブソテツ

類(オシダ科)の有性生殖型と無配生殖型の雑種における無配生殖の遺伝的分離」日本植物分類学会第14回大会 福島大学(福島県・福島市) 2015/3/5/-3/9.

山本薫・加藤英寿・村上哲明「伊豆大島の混生集団におけるベニシダ類の無配生殖型と有性生殖型の競争の程度」日本植物分類学会第14回大会 福島大学(福島県・福島市) 2015/3/5/-3/9.

Murkami, N.. 2014. Plenary Address "Genetic diversification of apogamous ferns through hybridization with sexual relatives." The 6th Asian Fern Symposium (Bali, Indonesia) 2014/8/26-8/29.

Hori, K., Tono, A., Fujimoto, K., Kato, J., Ebihara, A., Watano, Y., and N. Murakami. 2014. "Reticulate evolution in the apogamous *Dryopteris varia* complex (Dryopteridaceae, subg. *Erthrovariae*, sect. *Variae*) and its related sexual species in Japan." The 6th Asian Fern Symposium (Bali, Indonesia) 2014/8/26-8/29.

Yamamoto, K., Yatabe-Kakugawa, Y., Ebihara, A., and N. Murakami. 2014. "Artificial crossing experiments between the triploid apogamous *Dryopteris erythrosora* and the diploid sexual *D. caudipinna*." The 6th Asian Fern Symposium (Bali, Indonesia) 2014/8/26-8/29.

堀清鷹・海老原淳・中藤成実・村上哲明「イタチシダ類の新しい2倍体有性生殖種、モトイタチシダ *Dryopteris protobissetiana* (仮称)」日本植物分類学会第13回大会 熊本大学(熊本県・熊本市) 2014/3/21/-3/23.

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=plasys>

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

綿野 泰行 (WATANO, Yasuyuki)
千葉大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 70192820

角川 洋子 (KAKUGAWA, Yoko)

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 70575141

(3) 研究協力者

山本 薫 (YAMAMOTO, Kaoru)
堀 清鷹 (HORI, Kiyotaka)
森 恵里菜 (MORI, Erina)
松本 めぐみ (MATSUMOTO, Megumi)