

令和元年6月20日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07481

研究課題名(和文) 退化的な孢子体をもつコケ植物の形態進化：蘚類センボンゴケ科を例に

研究課題名(英文) Evolutionary study on cleistocarpous bryophytes with special reference to the Pottiaceae (Bryophyta)

研究代表者

坪田 博美 (Tsubota, Hiromi)

広島大学・理学研究科・准教授

研究者番号：10332800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：閉鎖果をもつ蘚類センボンゴケ科について進化的研究を行った。センボンゴケ科はコケ植物の中でもっとも多く属や種が含まれる群である。コドンモデルを用いた分子系統解析により科内に4つのクレードを認め、新亜科エゾネジクチゴケ亜科を提案した。また、平行進化または収斂進化が科内で認められた。閉鎖果をもつ蘚類の代表例として日本産コゴケ属の再検討を行った。分子系統学的・形態学的再検討の結果、1新種を含む4種が認められた。葉緑体 $rbcl$ と $rps4$ 遺伝子の塩基配列にもとづく解析からコゴケ属内で急速な孢子体の形態進化が起こったことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蘚類を含むコケ植物は陸上植物の初期進化を考える上で重要な群である。コケ植物は退化的な孢子体を持つことが知られているが、その中でもとくにさまざまな段階の退化的な孢子体を持つコゴケ属を含む蘚類センボンゴケ科を例に研究を行った。本研究ではコケ植物でこれまで用いられていなかったコドンモデルを用いた分子系統解析を行うことで、より精度の高い系統関係の推定を行うことができた。また、新亜科や新種の提案を行い、植物分類学上の貢献を行うことができた。退化的な孢子体である閉鎖果が同属内で複数回生していることを明らかにし、比較的短期間で形態進化が生じうることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Evolutionary studies on cleistocarpous bryophytes with special reference to the family Pottiaceae (Bryophyta) were conducted. The Pottiaceae are the most generic and species rich family in Bryophyta. Molecular phylogenetic inference based on a new approach using a codon substitution model is also undertaken and confirm four clades within the Pottiaceae, and a newly proposed subfamily Streblotrichoideae. Parallel or convergent evolution and sterility were observed in the family. As a case study, the Japanese *Weissia* was reviewed. Four species, including one newly described, of Japanese cleistocarpous species of *Weissia* are recognized based on molecular phylogenetic inference and morphological reassessment. Rapid sporophyte modifications in *Weissia* and monophyletic positions of these four species are supported by the analysis using concatenated chloroplast $rbcl$ and $rps4$ gene sequences.

研究分野：植物系統・分類学

キーワード：センボンゴケ科 孢子体 閉鎖果 セン類 系統解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) コケ植物は陸上植物で2番目に大きな群である。また、陸上植物の初期進化を考える上で適した材料として研究されてきた。その理由として、コケ植物は孢子体と配偶体の各世代の独立性が非常に高く、細胞分裂や組織分化の点からも各世代で独立に組織分化が見られ、それぞれの世代に特有な形態が見られることがあげられる。コケ植物は枝分かれしない退化的な孢子体を持つことが知られているが、その形態進化の課程を明らかにすることは植物の陸上化やその後の進化を考える上で進化生物学的に重要である。

(2) さまざまな段階の退化的な孢子体を持つ群としてコゴケ属を含む蘚類センボンゴケ科がある。本科はコケ植物の中でもっとも多く属および種を含む群である。また稀少種も含み、孢子体の形態もさまざまで、コケ植物の孢子体の形態進化を研究する上でモデルケースとなり得る群である。そこで本研究ではコケ植物の孢子体の形態進化、とくに退化的な孢子体に着目して蘚類センボンゴケ科を例に研究を行うこととした。また、本研究を通じて得られた知見により、センボンゴケ科の系統・分類学的な再検討を行うことが可能となり、植物分類学的にも貢献することが期待できる。

(3) これまで申請者は、コケ植物蘚類、とくに腋生蘚類の系統・分類学的な研究を行い、分子系統解析からその系統関係を明らかにしてきた。これまでの研究の結果から、センボンゴケ科の分類学的再検討の必要性も明らかになっている。これらの分子系統学的研究は、申請者が先導的に行ってきたもので、その学術的な意義は大きいと考える。現在、日本国内でセンボンゴケ科を対象とした分子系統学的研究を行っているのは申請者のグループだけであり、稀少種の保護という観点からも本研究を実施する意義は大きく、波及効果も大変大きいと考える。

2. 研究の目的

(1) 1の研究開始当初の背景でも述べたように 蘚類を含むコケ植物は陸上植物の初期進化を考える上で重要な群である。孢子体の進化の過程を明らかにすることで、陸上植物の進化に関する知見を得ることができる。蘚類センボンゴケ科は孢子体の形態が非常に多様化し、通常の裂開果をもつ種に加えて幼形成熟的な状態とされる閉鎖果をもつ種を擁する。閉鎖果は複数の系統で平行的に生じたことが示唆されているが、現生の閉鎖果種がどのような過程を経て生じたかは明らかになっていない。

(2) 本研究では、センボンゴケ科を対象に分子系統解析と形態形質の再検討を行うことで分類体系の再構築を行うとともに、分類体系構築の際に重要な孢子体の形態をその発生過程から陸上植物の孢子体発達を理解する基礎情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) コケ植物蘚類の孢子体の形態進化について、材料の収集とマーカーの選定、塩基配列の決定、得られた塩基配列にもとづいた系統樹の構築、形態データの取得・再配置、形態進化の推定を行った。

(2) 材料の収集では 国内外の主要な植物標本庫の収蔵標本や文献情報も用いて調査地を選定した。センボンゴケ科の閉鎖果種を中心に研究に必要な材料を入手した。また、*Astomum* 属および *Weissia* 属タイプ標本の再検討も含め、標本庫に収蔵されている標本の検討も行った。マーカーの選定と塩基配列の決定では、葉緑体 *rbcL* および *rps4* 遺伝子について既存のプライマーセットで増幅して良好な結果が得られることを確認し、それぞれの領域について塩基配列の決定を行った。また、核 ITS 領域やミトコンドリア *nad5* の配列についても増幅確認を行った。新規系統マーカーの検討を行い、核 *BRK1* 遺伝子や葉緑体 *trnM-V* 領域についてもユニバーサルプライマーの設計と増幅の確認を行った。系統樹の構築では、得られた塩基配列にもとづいた系統樹の構築を行った。センボンゴケ科全体の系統関係の再構築を葉緑体マーカーのデータにもとづいて、コドンモデルを用いて行った。*Astomum* 属および *Weissia* 属周辺については核マーカーも併用した。形態データの取得・再配置では、得られた標本について、孢子体の形態を中心に形態データを測定した。また、*Astomum* の2種については定点で定期的なサンプリングを行い、孢子体の発達過程を調査し、孢子体の発達に関して種毎の時期的・地域的な違いの有無を確認した。これらの結果をもとに、標本の再検討を行った。また、発生段階毎の孢子体について形態学的研究を行った。

(3) 当初の計画に加えて、遺伝的多型や雑種の判定を念頭に研究を進展させた。解析用のコンタミネーションの少ないDNAを得るため、胞子から培養を行った。確立した培養株を用いて、次世代シーケンサーを使った多型の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 平成28年度は、近畿地方や中国地方、四国地方、九州地方の材料の採集を行うことができた。採集した材料および標本庫に収蔵されていた標本を用いて研究を行った。系統マーカー

については、既存のユニバーサルプライマーでの増幅が良好であった葉緑体コードのマーカーの配列の決定を進めた。核 ITS については予想と異なり同一サンプル内で多型がほとんど存在せず、雑種性の判定に利用できる可能性が示唆されたので、配列決定を行った。予定よりも早く、主だった群について配列が得られた。葉緑体マーカーのデータにもとづいて、センボンゴケ科の系統関係についてコドンモデルを用いて分子系統解析を行った。解析により科内に4つのクレードを認め、新亜科エゾネジクチゴケ亜科を提案した。

(2) 平成29年度は、平成28年度に入手できなかった地域を中心に、本州の中部地方から東日本も含めて材料の採集を行った。また、韓国など東アジアのサンプリングも行う機会を得た。平成28年度の系統マーカーについてデータを得るとともに、新たな系統マーカーについても検討を行った。雑種性の判定の有用性が確認されている核 *BRK1* 遺伝子については安定した増幅が確認できなかった。一方、葉緑体 *trnM-V* 領域のユニバーサルプライマーは設計することができ、一部のサンプルについて配列を決定することができた。これらのデータにもとづいて系統解析を行うとともに、形態データの取得をすすめた。これらの結果にもとづいて形態データの系統樹上への再配置を行った。

(3) 平成30年度は、平成28・29年度に入手できていなかった産地での材料の収集を進め、センボンゴケ科の閉鎖果種を中心に研究に必要な材料を入手した。また、入手済みの材料についてマーカーの塩基配列の決定を進めるとともに、形態測定を行った。海外の材料については生物多様性条約や植物防疫等の関係で入手が難しくなったため、既存の標本を主体として研究を進めた。既存の標準マーカーに加えて、核 ITS 領域の配列決定を行った。また、葉緑体 *trnM-V* 領域と *trnT-L-F* 領域について主要な種群で配列が決定できた。ミトコンドリア *nad5* については配列決定を行った材料については変異が少なかった。有効なマーカーを選抜するため、一部の種について葉緑体ゲノムの配列決定を進めた。この際、培養株を用いて次世代シーケンサーを用いた実験を行った。得られた塩基配列にもとづいた系統解析を行うとともに、形態データの取得をすすめた。

(4) 採集した標本から得られた胞子をもとに、数種についてコンタミネーションのない培養株が確立できた。また、当初の計画よりも研究が大幅に進進したため、この培養株を用いて、次世代シーケンサーを使った多型の検出にも着手できた。本研究では、雑種判定のため系統マーカーによる研究に加えて、次世代シーケンサーを用いた実験として MIG-seq 法を用いた種内多型の検出を試みた。現時点では結果が得られたサンプル数に限りがあり、データ解析が暫定的であるが、容易に多型を得られる可能性があることが明らかになった。またデータ解析の結果、短い断片長の配列が多く含まれ、DNA 抽出法やサンプルの調整やサンプル特有の性質である可能性も含めて課題が確認できた。維管束植物で用いられる手法をそのまま適用できないことが示されたので、手法を改変して今後研究を進める計画である。

(5) 研究期間を通じて、胞子体の発達に関して種毎の時期的な違いが示唆された。時期や地域性を加味する必要があるため、標本庫の標本を用いた比較を行うとともに、野外での定期的なサンプリングを行い、発生段階毎の形態測定を行った。この結果、胞子体の発達に関して種毎の時期的な違いが確認された。

(6) 本研究ではコケ植物でこれまで用いられていなかったコドンモデルを用いた分子系統解析を行うことで、センボンゴケ科内の系統関係についてより精度の高い推定を行った。閉鎖果をもつ蘚類の代表例として日本産コゴケ属の再検討を行った。分子系統学的・形態学的再検討の結果、1新種を含む4種が認められた。一連の結果にもとづいて形態データの系統樹上への再配置を行い、閉鎖果種の起源について考察を行った。退化的な胞子体である閉鎖果が同属内で複数回生じていることを明らかにし、比較的短期間で形態進化が生じうることを見いだした。また、平行進化または収斂進化が科内で認められた。葉緑体 *rbcL* と *rps4* 遺伝子の塩基配列にもとづく解析からコゴケ属内で急速な胞子体の形態進化が起こったことが明らかになった。タイプ標本の再検討も含め、世界各地の標本庫に収蔵されている標本の検討を行った。これらの検討の結果も含めて、センボンゴケ科全体の分類体系の再構築を行うとともに、精度の高い系統関係の推定にもとづいて新亜科や新種の提案を行い、植物分類学上の貢献を行うことができた。

(7) 本研究では、いずれの年度も当初の研究実施計画をほぼ達成あるいはそれ以上の成果を得ることができ、研究全体としてはおおむね順調に進展した。当初の予想よりも、センボンゴケ科内の主要な群のサンプルが早い時期に得られたことが大きい。これは他の研究テーマで行った調査の際に採集ができたためである。発生過程の理解のための解剖学的な観察や培養株の確立に研究協力者から技術的な面で協力を得られたことが大きく影響した。また、次世代シーケンサーの学内での利用が容易になった点も研究の進展に影響した。

(8) 本研究で得られた知見の一部は、国内外の学会と国際シンポジウムで発表を行った(17件)。また、専門誌に論文投稿を行うとともに、調査の際に得られたサンプルに関する報告や研

究内容に関する報告を専門誌および学内研究報告に行い、10報（印刷中のもも含む）の論文で発表した。さらに研究成果で公開可能なものについては、広島大学デジタル自然史博物館等で公開した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

Inoue, Yuya, Kučera, Jan, Kubo, Harumori, Tsubota, Hiromi, *Barbula chenii* (Pottiaceae) new to Japan, APG, 査読有、2019、印刷中

Suzuki, Tadashi, Inoue, Yuya, Tsubota, Hiromi, Molecular phylogeny of the genus *Fissidens* (Fissidentaceae, Bryophyta) and a refinement of the infrageneric classification, Mol. Phylogenet. Evol., 査読有、127巻、2018、190 - 202
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.05.020>

Inoue, Yuya, Tsubota, Hiromi, A taxonomic revision of cleistocarpous species of *Weissia* (Pottiaceae, Bryophyta) in Japan, Phytotaxa, 査読有、306巻、2017、1 - 20
<http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.306.1.1>

Inoue, Yuya, Tsubota, Hiromi, Lectotypification and taxonomic identity of *Astomum japonicum* G.Roth (Pottiaceae, Bryophyta), Cryptogam. Bryol., 査読有、38巻、2017、85 - 90
<https://doi.org/10.7872/cryb/v38.iss1.2017.85>

Inoue, Yuya, Tsubota, Hiromi, Systematics of the family Pottiaceae (Bryophyta) with special reference to the familial and subfamilial circumscriptions, Hikobia, 査読有、17巻、2016、117 - 129
https://www.digital-museum.hiroshima-u.ac.jp/~main/images/c/cd/Inoue_Tsubota_2016_Hikobia_17_117-129.pdf

〔学会発表〕(計17件)

井上 侑哉・坪田 博美、コケ植物セン類センボンゴケ科内の閉鎖果種の系統関係、日本植物学会第82回大会、2018年9月14 - 16日、広島

井上 侑哉、Jiménez, Juan A., 佐藤 匠、坪田 博美、日本産カイガネクロゴケ *Didymodon nigrescens* の実体、日本蘚苔類学会第47回富山大会、2018年8月27 - 29日、富山

坪田 博美、井上 侑哉、内田 慎治、山口 富美夫、広島大学デジタル自然史博物館のコケ植物に関するコンテンツ、日本蘚苔類学会第47回富山大会、2018年8月27 - 29日、富山

井上 侑哉・久保 晴盛・Kučera, Jan・坪田 博美、瀬戸内海島嶼部の石灰岩地から見つかった *Barbula chenii* Redf. & B.C.Tan (センボンゴケ科, セン類)、中国四国植物学会第75回大会、2018年5月12 - 13日、山口

井上 侑哉、鈴木 直、坪田 博美、セン類ホウオウゴケ属の分子系統学的研究、日本植物分類学会第17回大会、2017年3月7 - 10日、金沢

井上 侑哉、神山 隆之、中原 坪田 美保、坪田 博美、栃木県で確認されたホンモンジゴケとイワマセンボンゴケの胞子体集団、日本蘚苔類学会第46回群馬大会、2017年8月29 - 31日、みなかみ町

Inoue, Yuya, Tsubota, Hiromi, Molecular phylogeny and subfamilial classification of the family Pottiaceae (Bryophyta), XIX International Botanical Congress, 2017年7月23 - 29日、Shenzhen, China

井上 侑哉・坪田 博美、セン類コゴケ属閉鎖果種の起源、日本植物分類学会第16回大会、2017年3月9 - 12日、京都

内田 慎治・井上 侑哉・山口 富美夫・坪田 博美、小笠原・琉球諸島に産するコゴケ属の閉鎖果種について、日本蘚苔類学会第45回屋久島大会、2016年8月29 - 31日、屋久島町

Inoue, Yuya, Tsubota, Hiromi, Phylogenetic notes on *Trachycarpidium lonchophyllum* (G.Roth) R.H.Zander (Pottiaceae, Bryophyta), East Asian Plant Diversity and Conservation 2016, 2016年8月23 - 25日、Tokyo

〔その他〕

ホームページ等

広島大学デジタル自然史博物館

<https://www.digital-museum.hiroshima-u.ac.jp/~main/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Belén Estébanez

ローマ字氏名：(Belén Estébanez)

研究協力者氏名：出口 博則

ローマ字氏名：(DEGUCHI, Hironori)

研究協力者氏名：井上 侑哉

ローマ字氏名：(INOUE, Yuya)

研究協力者氏名：Jan Kučera

ローマ字氏名：(Jan Kučera)

研究協力者氏名：Juan A. Jiménez

ローマ字氏名：(Juan A. Jiménez)

研究協力者氏名：Kim Wonhee

ローマ字氏名：(Kim Wonhee)

研究協力者氏名：久保 晴盛

ローマ字氏名：(KUBO, Harumori)

研究協力者氏名：中原-坪田 美保

ローマ字氏名：(NAKAHARA-TSUBOTA, Miho)

研究協力者氏名：山口 富美夫

ローマ字氏名：(YAMAGUCHI, Tomio)