

機関番号：82617

研究種目：基盤研究（A）（海外）

研究期間：2007～2010

課題番号：19255007

研究課題名（和文） アジアの極限環境水生被子植物カワゴケソウ科の進化と多様性

研究課題名（英文） EVOLUTION AND DIVERSITY OF AQUATIC ANGIOSPERMS PODOSTEMACEAE IN ASIA ADAPTED TO EXTREME ENVIRONMENT

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）：アジア各地で野外調査し、収集した標本等を用いて、タイ、ラオス、カンボジア、ベトナム、マレーシアのカワゴケソウ科の新属・新種を含む種属を取りまとめた。分子系統、生物地理、形態形成、遺伝子発現等について解析し、系統関係、歴史的生物地理、特異な器官形成とボディプランの多様性、および一般の被子植物とは異なる遺伝子発現パターンを明らかにした。これにより、本科に独特の進化と多様性を示した。

研究成果の概要（英文）：Field exploration was performed for Podostemaceae in tropical Asia, e.g., Thailand, Laos, India, and Indonesia. Using the results of field observations and specimens collected, we revised the Podostemaceae of Thailand, Laos, Cambodia, Vietnam, and Malesia, including a new genus, new species and new records. Molecular phylogenetic, biogeographic, developmental morphological, and gene-expression analyses revealed the worldwide phylogenetic relationships of the family, historical biogeography, unique organogenesis and body plan, and the underlying unusual gene expression patterns.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
総計	25,400,000	7,620,000	33,020,000

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：カワゴケソウ科、分類、形態進化、系統、適応、植物相、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

生物は普通、ある環境に遭遇すると、その当面の環境にその都度適応し進化する。陸上植物の中でカワゴケソウ科ほど形態が奇異であり、極端な環境に適応し、進化の特性を具現している植物はいない。進化の最前線でそれぞれの生物が新しい環境に進出し適応進化する過程と機構を明らかにすることは、植物の進化と自然史を理解するためにこの上なく重

要であり、生態的、形態的に「面白い」カワゴケソウ科は他の植物からは得られない現象と情報を提供するであろう。

植物は基本的には陸上に生活するように進化したが、一部は水生植物として二次的に水中・水上に進出した。カワゴケソウ科は熱帯・亜熱帯の河川の早瀬や滝の岩場にのみ生え、雨期は急流に水没して栄養成長するが、水位が下がる乾期になると空中に露出し枯

死する一方で、開花・結実を果たす。カワゴケソウ科は約 300 種が約 50 もの多くの属に分類され、そのうち約 20 属が単型属であるように、種間の差異は著しい (Cook 1996, Aquatic Plant Book)。これは、適応進化に伴って顕著な形態変化が起こったことを意味する。たとえば、根をもたず茎が葉のように扁平になった *Dalzellia* が、根を持ち茎が通常の軸状である *Indotristicha* と近縁であり、属間で根の欠失と茎の葉状化という劇的な変化が起こったとされる (Kita & Kato 2001, Plant Biol. 3, 156)。カワゴロモ属のように根の葉状化が起こった例も知られ、根の周縁分裂組織が拡大することにより葉状化したと推定される Koi & Kato (2003)。一方、実生の形態形成の観察から、上記のような変化が実生段階のボディプランの急激な変更による可能性が示された (Suzuki, Kita & Kato, 2002)。また、オトギリソウ科からカワゴケソウ科の起源においても跳躍的な変化が起こった可能性がある。カワゴケソウ科の進化において幼芽 (主茎) と幼根 (主根) が退化して主軸が欠失し、陸上生活に不可欠な垂直主軸に代わって不定根による水平軸が獲得され、根底的なボディプランの変更が起こったとする仮説が唱えられた (Kita & Kato 2005)。これに関連して、カワゴケソウ属など一部で茎頂分裂組織 (SAM) が存在しないにもかかわらず葉が次々と発生することがわかったが (Koi, Imaichi & Kato 2005)、SAM のない部位から葉や花 (生殖シュート) が発生する分子機構は未解明である。

2. 研究の目的

かつて「形態レベルの中立進化」と解釈されることがあるカワゴケソウ科の劇的な形態進化を発生形態学的観察、さらには遺伝子発現解析によって明らかにすることが研究目的の 1 つである。カワゴケソウ科は極限環境植物として、さらに特異形態植物として注目を浴び続け、コケにも似た姿の進化と藻類的環境への特殊適応が大きな謎とされてきた。被子植物の形態の基本設計は、茎と根が垂直の主軸を構成しそれに葉が側生する形態であるが、カワゴケソウ科はそれから最も逸脱している。植物にとって分裂組織という胚幹組織はボディプラン形成の根幹をなすものであるが、その分裂組織に焦点を当てた形態発生の観察を行う。さらに形態形成調節相同遺伝子の発現パターンを解明し、形態進化の分子機構に迫る。主軸の変更、主要器官の交代、分裂組織の欠失

などが関与したカワゴケソウ科の種・属レベルの独特の形態進化を明らかにする。

一方、カワゴケソウ科は微小な種が多くかつ生育環境が特異なため、収集調査が不十分であり、その多様性と進化の解明には、未知の種を含む全種の把握が不可欠である。タイには 1992 年時点で (Cusset & Cusset 1992, *Adansonia* 14, 13) 10 種しか知られていなかったが、申請者による最近 7 年間に十数回行った調査で 4 倍近いカワゴケソウ科を報告した (Kato 2004, 2006)。近隣地域も既知の種よりもはるかに多い可能性が高い。本研究の 2 つ目の目的として、南アジア・東南アジアで集中的かつ徹底的に野外調査して、カワゴケソウ科の多様性と植物相の基礎的な調査研究を行う。併せて、さまざまな解析用の材料 (種子、生植物) を収集する。

南アジア (南インド・スリランカ) とタイを中心とする東南アジアは熱帯アメリカ、熱帯アフリカと同様に、カワゴケソウ科の種多様性が高い地域である。さらに、アジアには原始のおよび特異な種属が多く、本科の歴史的生物地理を解析する上でアジアという地域は鍵となる。アジアの歴史的生物地理を解析することが本研究の 3 つ目の目的である。

3. 研究の方法

(1) 野外調査: タイ (チャンマイ、ロエイ、チャンタブリ、トオラ、ウボンラチャタニの各県)、ラオス (サイソンブン、ピエンチャン、ポリカムサイ、チャンパサク、サラバンの各県)、東北インド (カーシー高原)、インドネシア (西カリマンタン) で生態調査し、標本資料を採集した。調査は、タイ、インド、インドネシアの研究者の協力を得て行なった。鹿児島県でも調査した。

カワゴケソウ科はほとんどが固有種であるため、各地域の河川の早瀬・滝で野外調査を行なった。保存証拠標本その他、形態観察用に FAA (固定液) 液浸資料、系統解析用にシリカゲル乾燥サンプル、実生培養・形態観察用に種子を採集した。遺伝子単離と発現解析用にアルコール液浸資料と RNA later 液浸資料を現地で作成した。

(2) 分類学的研究: 収集した標本と収蔵している標本との比較、文献調査により種属を同定し、分類した。正確な同定を期すために、分子系統解析結果と照合して、DNA バーコーディング法を行なった。

(3) 実生培養: 種子を寒天培地と液体培地 (種子を発泡スチロール片につける) で発芽、培養装置を使って実生培養し実験材料を得る (Suzuki, Kita & Kato 2002 の方法か、さら

に改良した)。これを実生形態観察、遺伝子解析に用いた。

(4) 形態観察：実生および成体の形態を、特に分裂組織（およびその有無）、ボディプラン形成、葉・根の器官形成に着目して、超薄切片法を用いて観察した。従来の研究(Suzuki, Kita & Kato 2002; Imaichi, Maeda, Suzuki & Kato 2004; Kita & Kato 2005) から、実生の胚軸から2次根が、あるいは子葉の腋から2次シュートが発生し個体の主要器官に成長することが観察され、種属によってボディプラン形成が異なる可能性が高いので、系統上の節目にある種について観察した。種属に特異な形態の形成様式を比較して、系統関係を基に、種属の形態進化・分化を調べた。

(5) 分子系統解析：収集したサンプルを用いて、*matK*遺伝子などの塩基配列を決定し、系統樹を作成する。これにより系統関係を推定するとともに、種属の同定に用いる（形態が単純で小型のため、分子（バーコード）同定法を活用した。データは、分類学、形態進化、生物地理の解析に活用して、それらを系統的に裏付けることを試みた。

(6) 遺伝子単離と発現解析：モデル植物・シロイヌナズナなど一般的なボディプランをした植物の茎頂分裂組織 SAM で特異的に発現する *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*、*WUCHEL (WUS)* 遺伝子の他、側生器官の葉で発現する *ASYMMETRIC LEAVES1 (APR)* 遺伝子などの相同遺伝子がカワゴケソウ科（カワゴケソウ属、カワゴロモ属、*Terniopsis* 属）に存在し、SAM や側生器官で発現するかどうかを比較した。前者2属は SAM がないので、遺伝子が存在しても発現しないのか、どこで発現するのかを調べた。SAM がある後者属では茎頂で発現するかを調べた。そのために、3', 5' RACE 法による相同遺伝子の単離とリアルタイム PCR 法を用いた網羅的な組織別発現確認と、発現部位をより詳細に確認する *in situ hybridization* 法を用いた解析を行った。

遺伝子発現様式と形態進化を合わせて、カワゴケソウ科のボディプランの進化と、異なる複数器官の単一器官への統合の可能性など器官相同性の変化を推定した。SAM がいない種属で、本来 SAM が不可欠な花形成がどのように遺伝子制御されているかを比較し、生殖器官の形成様式の進化を探った。祖先に近いと思われる姉妹群オトギリソウ科について同様の遺伝子発現解析を行い、それからカワゴケソウ科の跳躍的な進化を推定することを試みた。

(7) 歴史的生物地理解析：分布データと系統

関係を基に生物地理を解析した。カワゴケソウ科の種属の多くが狭分布種であるので、系統解析、ハプロタイプ解析によって、特異な環境伝いに進んだと思われる種の分布拡大と地域固有種形成の独特の過程を推定した。また、カワゴケソウ科の起源大陸を推定した。(8) まとめ：得られた結果を総合して、極限環境でこの植物がたどったユニークな進化と多様化の具体的な姿を明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

(1) タイ（北部・東北部・東部・南東部）、ラオス（北部・南部）、インド（ケララ州）、インドネシア（カリマンタン）で野外調査し、資料収集を行った。また、鹿児島県でも野外調査と資料収集した。証拠標本の他、形態観察用液浸資料、系統解析用乾燥サンプル、実生培養・形態観察用種子を採集した。遺伝子単離と発現解析用にアルコール液浸資料と RNAlater 液浸資料を現地で作成した。さらに、タイ人研究者が本研究に協力者として参加して、東北タイで綿密な共同調査を行なった。(2) 収集したサンプルを用いて、*matK* 遺伝子の塩基配列を決定し、全球的な規模で系統樹を作成した。その結果、新規の系統関係や、従来の属の定義を覆す系統関係が推定された。カワゴケソウ科が3亜科14系統からなり、属以上のレベルでの系統をはじめめて明らかにした（図1）。さらに、アジア全域の本科の詳細な系統関係を明らかにした。

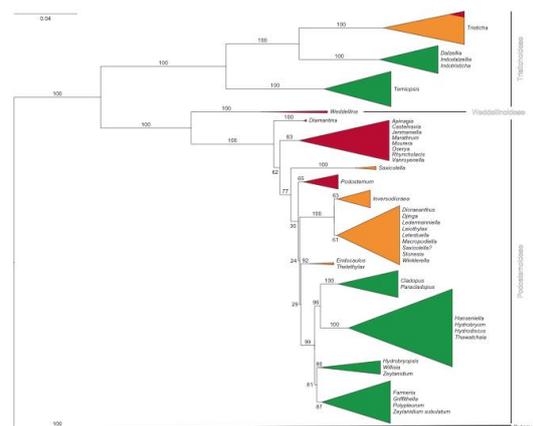


図1. カワゴケソウ科の系統樹

(3) アジアの本科の分類学的研究を行って、*Dalzielia gracilis*、*Diplobryum koyamae* が別の新属 (*Indodalzielia*、*Hydrodiscus*) に分類されることを提唱した。タイの本科が10属43種（30種以上の新種を含む；従来の研究では10種）、ラオスのカワゴケソウ亜科が15種（7新種を含む）からなることを明らかに

し、これらの地域の多様性が著しく高いことを示した。カワゴロモ属は従来、葉状の根をもち、シュートが退化した群であると定義されてきたが、新種の中には軸状、帯状の根をもった種や見かけ上シュートをもった種が含まれ、本属が今までの理解よりも多様であることを示した。そのほか、日本、マレーシア Malesia (マレーシア、インドネシア、フィリピンなどからなる地域)、カンボジア・ベトナムの本科の分類を整理した。カメルーンから1新種を記載した。本成果は、「タイ国植物誌」カワゴケソウ科の編纂に生かす予定である。

(4) カワゴケソウ科の歴史生物地理学的解析を進め、カワゴケソウ科がアジアで起源した(インド亜大陸の可能性が高い)後、トリスティカ亜科はアジアで多様化した後、1種(*Tristichia trifaria*)のみがアフリカに移動し、そこから1回長距離散布によりアメリカに分布拡大したと推定した。一方、カワゴケソウ亜科とウェデリナ亜科がアメリカに散布された後、カワゴケソウ亜科はアメリカ大陸で著しく多様化し、1つの系統からアフリカおよびアジアに二次的に分布拡大し、それぞれで多様化したと推定した(図2)。これは、ゴンドワナ大陸(西アフリカ・インド)起源説を否定する結論である。

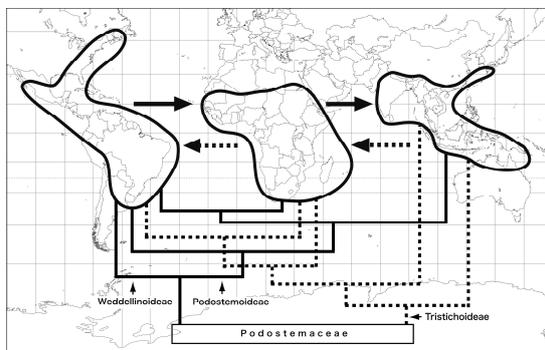


図2. カワゴケソウ科の生物地理

(5) カワゴケソウ科の形態が被子植物の中で特異であることを示した。3亜科の中のカワゴロモ亜科は茎頂分裂組織を欠くことを確かめた。カワゴロモの花シュートの形態形成の観察により、まず苞は栄養シュートがつくられた位置に内生的に、しかも普通葉と同じように、茎頂分裂組織が存在しない状態で、周辺細胞の液胞化と離脱(細胞死)を伴って個別化しながら起こることを明らかにした。一方、花自身は通常通り外生的に形成された。

発生形態学研究から、*Weddellina squamulosa*は、茎頂分裂組織をもって一般的な形態形勢を行なう一方、求基的にも葉をつくる点で

特徴的であることを示した。

跳躍的な形態進化が起こったことをいくつかの種属で明らかにした。*Indodalzellia gracilis*が、無根の*Dalzellia zeylanica*と有根の*Indotristichia ramosissima*からなる系統に対して姉妹群であることを示し、実生から根は形成されず、代わって不定シュートが生じるが、その後シュートから不定根が生じた。*Hydrodiscus koyamae*は特異な単子葉類的ボディプランをもち、しかも胚軸から不定根(カワゴケソウ亜科ではふつう)の変わりに不定シュートがつくられ、その結果根を欠くことを示した。ラオスから報告するカワゴロモ属の新種には、見かけ上のシュートをもった種、扁平な半円柱状、帯状の根をもった種などが含まれ、シュートがなく、葉状の根をもった近縁種と際立った違いを示すことが明らかになった(図3)。

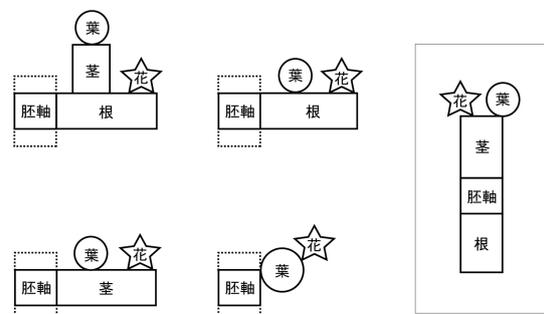


図3. カワゴケソウ科のボディプランの例。右は一般的な被子植物

(6) カワゴケソウ亜科で胚発生形態学的観察を行ない、細胞分裂パターンと胚形態を比較した。トリスティカ亜科の種では、子葉原基の間に茎頂分裂組織の原基が、基部には根分裂組織の基となるハイポフィシス細胞が形成される一方、カワゴケソウ亜科の種では両組織が作られないことを示した。このことから2亜科で異なるボディプランは、胚発生段階で確立することが示唆された。

(7) カワゴケソウ科の特徴的な形態進化の遺伝的基盤を明らかにするために、遺伝子発現解析を行った。モデル植物ではSAMで特異的に発現する*STM*、*WUS*、葉で発現する*APR*の各相同遺伝子を3', 5'RACE法によって単離し、系統解析からそれらのオーソログであることを明らかにした。in situ hybridization、リアルタイムPCR法により、*STM*、*WUS*遺伝子が根の先端部で発現することを確かめた(シュートが根から不定的にできることと一致)。その後、トリスティカ亜科の種では、モデル植物シロイヌナズナと同様、SAMでシロイヌナズナと同じ部位で発現するのに対

して、SAMがないカワゴケソウ亜科のカワゴロモとカワゴケソウでは、*STM*、*WUS*は初期葉原基で発現し、発生が進むと*STM*が葉原基先端部から、*WUS*は全体から発現しなくなり、それに代わって*APR*相同遺伝子が葉原基先端部で発現することが明らかになった。これにより、トリスティカ亜科のシュートは一般的な被子植物と同じ発現様式を維持しているが、カワゴケソウ亜科の葉は、葉と茎の性質を併せもった複合器官であることを示唆した(図4)。

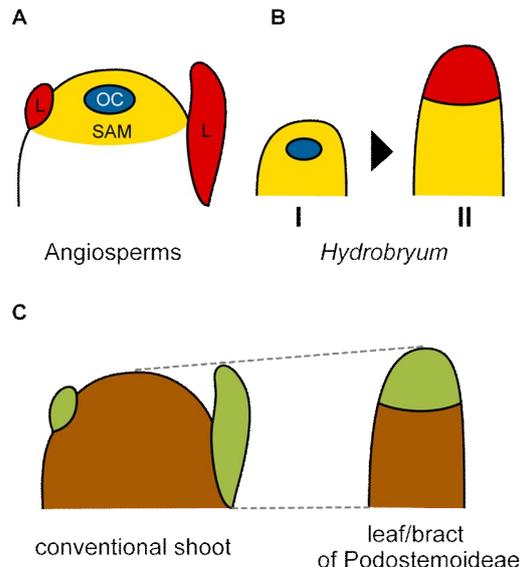


図4. 一般的な被子植物・トリスティカ亜科 (A) とカワゴケソウ亜科 (B) の遺伝子発現、および器官の相同性 (C)

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 14 件)

- ① Katayama, N., M. Kato, T. Nishiuchi and T. Yamada. Comparative anatomy of embryogenesis in three species of Podostemaceae and evolution of the loss of embryonic shoot and root meristems. *Evol. Dev.* (in press) (査読有り)
- ② Koi, S. and M. Kato. Taxonomic study of Podostemaceae subfamily Podostemoideae of Laos with phylogenetic analyses of *Cladopus*, *Paracladopus* and *Polypleurum*. *Kew Bull.* (in press) (査読有り)
- ③ Kato, M. 2011. Taxonomic enumeration of Podostemaceae of Cambodia and Vietnam. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., ser. B (Bot.)* 37: 1-8. (査読有り)
- ④ Katayama, N., S. Koi and M. Kato. 2010. Expression of *SHOOT MERISTEMLESS*, *WUSCHEL*, and *ASYMMETRIC LEAVES1* homologs in the shoots of Podostemaceae:

implications for the evolution of novel shoot organogenesis. *Plant Cell* 22: 2131-2140. (査読有り)

⑤ Koi, S. and M. Kato. 2010. Developmental anatomy of seedling of *Indodalzellia gracilis* (Podostemaceae). *Plant Biol.* 12: 794-799. (査読有り)

⑥ Koi, S. and M. Kato. 2010. Developmental morphology of shoot and seedling and phylogenetic relationship of *Diplobryum koyamae* (Podostemaceae). *Amer. J. Bot.* 97: 373-387. (査読有り)

⑦ Kato, M. and S. Koi. 2009. Taxonomic studies of Podostemaceae of Thailand. 3. Six new and a rediscovered species. *Gard. Bull. Singapore* 61: 55-72. (査読有り)

⑧ Kato, M. 2009. Podostemaceae of Malesia: taxonomy, phylogeny and biogeography. *Blumea* 54: 198-202. (査読有り)

⑨ Koi, S., R. Rutishauser and M. Kato. 2009. Phylogenetic relationship and morphology of *Dalzellia gracilis* (Podostemaceae, subfamily Tristichoideae) with proposal of a new genus. *Int. J. Plant Sci.* 170: 237-246. (査読有り)

⑩ Kita, Y., S. Koi, R. Rutishauser and M. Kato. 2008. A new species of *Ledermanniella* (Podostemaceae) from Cameroon. *Acta Phytotax. Geobot.* 53: 223-227. (査読有り)

⑪ Kato, M. 2008. A taxonomic study of Podostemaceae of Japan. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., ser. B (Bot.)* 34: 63-73. (査読有り)

⑫ Katayama, N., S. Koi and M. Kato. 2008. Developmental anatomy of the reproductive shoot in *Hydrobryum japonicum* (Podostemaceae). *J. Plant Res.* 121: 417-424. (査読有り)

⑬ Koi, S., Y. Kita and M. Kato. 2008. *Paracladopus chanthaburiensis*, a new species of Podostemaceae from Thailand, with notes on its morphology, phylogeny and distribution. *Taxon* 57: 201-210. (査読有り)

⑭ Koi, S. and M. Kato. 2007. Developmental morphology of shoot in *Weddellina squamulosa* (Podostemaceae) and implications for shoot evolution in the Podostemaceae. *Ann. Bot.* 99: 1121-1130. (査読有り)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 片山なつ, 加藤雅啓, 西内, 山田敏弘. カワゴケソウ科の胚発生における茎頂分裂組織と根端分裂組織の喪失。日本植物形態学会第22回大会(平成22年9月9日。中部大学)
- ② 厚井聡, 加藤雅啓, 中島敬二. カワゴケソウ科の「不定シュート形成を行う根」の獲得機構の解明。日本植物形態学会第22回大会(

平成22年9月10日。中部大学)

③厚井聡, 加藤雅啓, 中島敬二。オトギリソウ科とカワゴケソウ科の比較形態学的研究。日本植物形態学会第22回大会 (平成22年9月10日。中部大学)

④ Kato, M. Diversity and evolution of Podostemaceae in Southeast Asia. The 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (平成22年7月22日。インドネシア、バリ島)

⑤厚井聡, 加藤雅啓, 中島敬二。セイヨウトドリ (オトギリソウ科) の実生の形態学的研究。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)

⑥片山なつ, 厚井聡, 加藤雅啓。カワゴケソウ科の杯発生における垂直軸のボディプランの喪失。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)

⑦片山なつ, 厚井聡, 加藤雅啓。カワゴロモ (カワゴケソウ科) のシュートにおける特異な遺伝子発現パターン。日本植物学会第73回大会 (平成21年9月18日。山形大学)

⑧片山なつ, 厚井聡, 加藤雅啓。茎頂分裂組織がないカワゴケソウ科植物のシュートにおける発生と進化。第11回日本進化学会大会 (平成21年9月3日。北海道大学)

⑨厚井聡, 加藤雅啓。ラオスのカワゴケソウ科カワゴロモ属及びその近縁種の形態形成に関する研究。日本植物分類学会第8回大会 (2009年3月13日。仙台)

⑩厚井聡, 加藤雅啓。水生被子植物カワゴケソウ科のシュートの形態進化に関する遺伝子発現解析。日本植物学会第72回大会 (2008年9月27日。高知大学)

⑪片山なつ, 厚井聡, 加藤雅啓。カワゴケソウ科カワゴロモの生殖シュート形成における遺伝子発現。日本植物学会第72回大会 (2008年9月27日。高知大学)

⑫加藤雅啓。カワゴケソウ科の系統と進化。日本植物分類学会第7回大会 (2008年3月21日。首都大学東京)

⑬厚井聡, 加藤雅啓。ラオスのカワゴケソウ科カワゴロモ属及びその近縁種の分類学的研究。日本植物分類学会第7回大会 (2008年3月21日。首都大学東京)

⑭厚井聡, 加藤雅啓。水生被子植物カワゴケソウ科カワゴケソウ属のシュート形態形成に関する遺伝子発現解析。日本植物学会第71回大会 (2007年9月7日。東京理科大学)

⑮片山なつ, 厚井聡, 加藤雅啓。溪流沿い被子植物カワゴケソウ科カワゴロモの生殖シュート発生過程の解明。日本植物学会第71回大会 (2007年9月7日。東京理科大学)

[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

カワゴケソウ科データベース Asian Podostemaceae (URL: <http://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/podostemaceae/index.html>)

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

岡田 博 (OKADA HIROSHI)
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 40089892
(H20→H22: 連携研究者)
山田 敏弘 (YAMADA TOSHIHIRO)
金沢大学・大学院自然科学研究科・講師
研究者番号: 70392537
(H20→H22: 連携研究者)
田中 法生 (TANAKA NORIO)
国立科学博物館・植物研究部・研究員
研究者番号: 10311143
(H20→H22: 連携研究者)

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

