様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 ２２ 日現在

機関番号：１４３０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2024
課題番号：２１Ｋ０６３１６

研究課題名（和文）現生シダ植物小葉類から探る維管束植物の分枝の進化

研究課題名（英文）Morphological study of extant lycophytes to elucidate evolution of branching system in vascular plants

研究代表者
藤浪　理恵子（Fujinami, Rieko）

京都教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：４０５８０７２５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：茎と根の起源を解明するために、原始的維管束植物の小葉類の茎と根の分枝時における細胞分裂動態とオーキシン投与による成長解析実験を実施した。小葉類の茎と根は、植物群ごとに異なる頂端構造をもつが、分枝形成時の細胞分裂動態は異なる構造であっても非常によく似ていることが明らかとなった。また、ヒカゲノカズラ科ヒカゲノカズラとトウゲシバの根頂端部でオーキシン輸送の阻害が生じると、細胞分裂の停止と根頂端部の構造が消失するという結果が得られ、小葉類の根の成長と構造の維持にオーキシンが重要な役割をもつことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究は、原始的な形態をもつシダ植物小葉類の茎と根の分枝メカニズムを解明し、両器官の起源を探ることを目的とした。解析の結果、茎と根は異なる器官でありながら同一の分枝動態を示し、比較可能であることが明らかとなった。さらに、植物ホルモンであるオーキシンが小葉類の根の形態形成に重要な役割を果たし、維管束植物の根はオーキシンが関与する共通の維持機構が保存されている可能性が推測された。これらの成果は、初期陸上植物の軸状器官が、やがて地上部と地下部へと分化し、茎と根という普遍的な植物器官へと発達したという仮説を、生きた植物種からも支持するものであり、今後の生理学的・分子遺伝学的研究への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：The cell division dynamics during branching of shoots and roots of lycophytes, and growth analysis experiments with auxin treatment were conducted to elucidate the origin of shoots and roots. It was clarified that although the shoot and root apical structures differ among plant groups, the cell division dynamics during branching are very similar among different structures. Furthermore, when auxin transport was inhibited in the root apices of Lycopodium and Huperzia, cell division stopped and the root apices disappeared, suggesting that auxin is important for root growth and maintenance in lycophytes.

研究分野：植物形態学

キーワード：維管束植物　分枝　根　茎　シダ植物小葉類

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

陸上植物はコケ植物段階からシダ植物段階へと進化したとき、１本の軸が二又状に分枝する能力を獲得したと考えられている。二又分枝は、まだ茎、葉、根の器官が分化していない時代のテローム植物と呼ばれる植物群にみられるとともに、現生のシダ植物小葉類にも受け継がれている。維管束植物は、分枝能力を獲得した後、茎、葉、根を進化させ、多様な形態が生じたと推定されていることから、二又分枝は植物進化にとって重要な形質である。したがって、小葉類は、初期の維管束植物の分枝の仕組みを明らかにするために、鍵を握るグループとして考えられている。

これまでの小葉類研究から、小葉類の根と茎の頂端分裂組織の構造の多様性や、根が小葉類内の科ごとに独立して起源したことを提唱した（Fujinami et al. 2017）。例えば、根頂端分裂組織の構造は、種子植物（被子植物と裸子植物）で複数の始原細胞群をもつ頂端細胞群型、シダ植物大葉類は１つの始原細胞をもつ頂端細胞型であることが知られている。それに対し、小葉類はヒカゲノカズラ科とミズニラ科が頂端細胞群型、イワヒバ科が頂端細胞型を示すことから、非常に小さなグループである小葉類は、種子植物と大葉類に匹敵するほど多様な RAM 構造を進化させている。また、ヒカゲノカズラ科ヒカゲノカズラは、茎と根の分枝における頂端分裂組織の動態を比較したところ、どちらも頂端部が新たな分裂細胞によって二分割されるという、同じ分枝原理に従うことが明らかとなっている（Fujinami et al. 2020）。この知見から、小葉類の茎と根は、同じ軸由来の器官として起源したと考えられるが、原理を決める詳細な形態学的な機構は未だ解明できていない。そして、初期の陸上植物がどのようなメカニズムで分枝を形成したのか、それに伴う根や茎の器官はどのような過程を経て獲得されたのか、ということについては空白のままである。この難問の解決の糸口は、現生の植物群から探ることが最も必要で、原始的な維管束植物である小葉類の形態形成を明らかにし、共通祖先との比較を行う必要がある。

２．研究の目的

本研究では、シダ植物小葉類の根と茎の二又分枝の形態形成のメカニズムを明らかにし、維管束植物の軸の分枝の形態進化解明を行うことを目的とした。

３．研究の方法

小葉類はヒカゲノカズラ科、ミズニラ科、イワヒバ科の３科に分類される。異なる RAM と SAM 構造をもつ３種の植物種として、ヒカゲノカズラ科ヒカゲノカズラ、トウゲシバ、イワヒバ科コンテリクラマゴケを選定した。ヒカゲノカズラは頂端細胞型で、根頂端分裂組織（RAM）に QCL（静止中心様領域）、茎頂分裂組織（SAM）に OCL（形成中心領域）をもつ。トウゲシバも頂端細胞型であるが、RAM は QCL をもたず、SAM に OCL があるかは不明である。コンテリクラマゴケは頂端細胞型で、QCL と OCL はもたないとされている。これら３種を用いて、以下の実験を行った。

（１）根頂端分裂組織（RAM）と茎頂分裂組織（SAM）の分枝時における細胞分裂動態解析

ヒカゲノカズラの根と茎の分枝様式はすでに報告されているため、トウゲシバとコンテリクラマゴケの根と茎の分枝時の頂端分裂組織の細胞分裂動態解析を実施した。根ではチミジンのアナログ物質で細胞周期 S 期に取り込まれる EdU を用いて蛍光顕微鏡による解析を行った。茎では、細胞分裂 S 期に発現する *HistoneH4* 相同遺伝子を分裂細胞の標識として用い、RNA *in situ* Hybridization（ISH）法による遺伝子発現解析を行った。

（２）ヒカゲノカズラとトウゲシバの根のオーキシン投与実験

オーキシン及びオーキシン輸送阻害剤を投与した根と茎で、成長の違いや分枝形成、外部形態、そして、RAM の細胞分裂動態への影響を解析した。

根端に、合成オーキシンである 1-ナフチル酢酸（NAA）またはオーキシン極性輸送阻害剤 NPA をラノリンペーストに混ぜて塗布し、約１か月間培養した。培養前後で根の長さを測定して伸長量を算出し、対照区（薬剤無処理）と比較した。また、根端を NAA または NPA を含む培地に EdU 試薬を添加し、24 時間の取り込みを行い、RAM の細胞分裂頻度を計測した。

４．研究成果

（１）小葉類３科の根と茎の分枝時の細胞分裂頻度と分枝様式の比較

本研究において、トウゲシバとコンテリクラマゴケの根と茎の分枝時の細胞分裂動態が明らかとなり、小葉類３科の根と茎の分枝様式が非常によく似ていることが示唆された。

トウゲシバの場合、根はQCLをもたず、RAM全体が細胞分裂を行う。根の分枝時、RAM全体の分裂頻度が上昇し、RAMが分枝方向に拡大する。拡大したRAMのほぼ中央部の２，３細胞層が垂層分裂し、細胞層が中央部だけ増加する。この働きによってRAMが二分され、二又分枝が形成される。一方、茎は頂端部に細胞分裂頻度の低いOCL領域をもち、その周縁は細胞分裂頻度の高い領域であった。分枝初期、OCLを含むSAM全体に*HsHistoneH4*の発現がみられ、OCLが消失した。さらに発生が進むと、拡大したSAMのほぼ中央部の分裂頻度が低下し、その両端に新たなSAM領域が生じた。その後、２つのSAMにOCLが出現し、二又分枝が形成された。以上の結果から、トウゲシバの根と茎の分枝様式は、元の頂端分裂組織の構造が消失し、拡大した分裂組織が二分されることによって形成されることが明らかとなった。

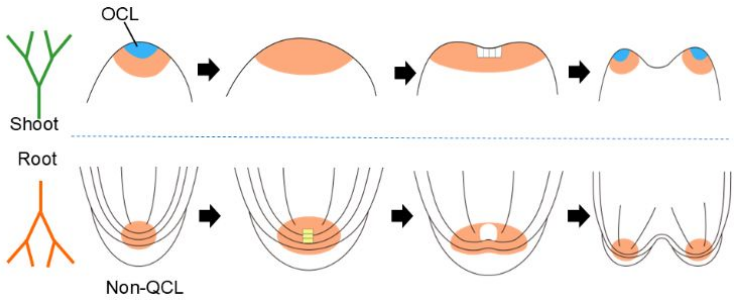

図１　トウゲシバの茎と根の分枝様式の模式図。
上段は茎の分枝様式、下段は根の分枝様式である。OCLは形成中心様領域、Non-QCLは静止中心様領域をもたないことを示す。

イワヒバ科コンテリクラマゴケは、根をEdU蛍光染色法で解析した結果、分枝時に元の頂端細胞が消失し、新たな２つの頂端細胞が形成されることによって二又分枝を形成することが観察された。茎の分枝時の細胞分裂動態は、予備的解析から、分枝時にSAM領域内に多数の頂端細胞が生じ、やがて２つの新たな頂端細胞が明瞭になることが観察された。したがって、根と同様に、元の頂端細胞とその周辺を含むSAM構造が消失し、新たなSAMが形成されることによって分枝すると推察される。

（２）RAM構造の異なる小葉類２種の根のオーキシン投与実験による根の成長とRAMの細胞分裂動態の解析

ヒカゲノカズラとトウゲシバの根を用い、オーキシンが根の成長とRAMの細胞分裂動態に与える影響を解析した。その結果、NAA処理の場合、ヒカゲノカズラとトウゲシバの根の伸長量が対照区より大きく増加した。一方、NPA処理の根は、２種とも成長が著しく抑制されるという結果が得られた。

さらに、NPA処理を行った２種の根をEdU蛍光染色法で細胞分裂頻度を調べた結果、QCLをもつヒカゲノカズラのRAMは、NPA処理で著しく細胞分裂頻度が低下し、QCLとその周辺の細胞分裂がほぼ検出されなかった（図２）。NPA処理後７日以上経過したRAMは、根冠の細胞層の減少がみられ、RAM全体の細胞層が著しく乱れ、QCLの領域を特定できないほど構造が維持されていなかった。同様にQCLをもたないトウゲシバのRAMでも、NPA処理では細胞分裂が抑制され、NPA処理１日後の分裂頻度は約５%、２日後には約３%と極度に低い細胞分裂頻度を示した。RAM構造もヒカゲノカズラと同じく、NPA処理後7日目のRAMは、根冠の細胞層が減少し、根端分裂組織の層構造が乱れる様子が確認された。

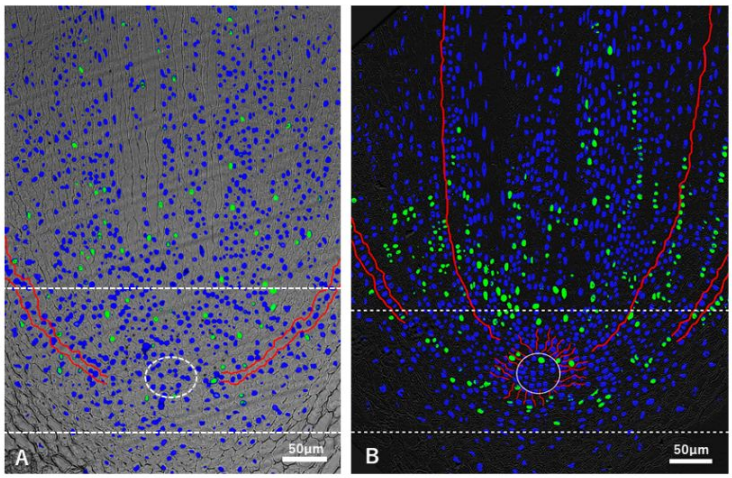

図２　ヒカゲノカズラRAMのEdU、DAPI、位相差像の重ね画像。
A. 100 μl NPA処理（1日間）したRAM, B. 対照区。点線の間をRAM領域と設定し、その間のEdU取り込み核（緑色）数とDAPI染色核（青色）数を計測し、細胞分裂頻度を算出した。白丸点線はQCLの領域を示す。

以上の結果から、ヒカゲノカズラとトウゲシバの根において、オーキシンがRAM構造の維持と根の成長に不可欠な役割を果たすことが示唆された。種子植物の根では根頂端部のオーキシンの局在がQCの維持やRAMの制御機構に機能していることから、小葉類の根においても同様の機構が機能している可能性が考えられ、オーキシンを介したRAM構造の調節機構が、初期の維管束植物段階からすでに獲得されていたと推定される。

３．まとめと今後の展望

本研究から、小葉類の根と茎は、異なる頂端分裂組織の構造であっても、同じ分枝様式をもつ可能性が高いことが示唆された。これは、根と茎が１本の軸由来から起源したとする仮説を強く支持する証拠となりうる。頂端細胞型のイワヒバ科の茎の分枝動態については研究継続中であるが、元の SAM 構造の消失後、新たな２つの頂端細胞が形成されることが観察されている。さらに、ISH 法による細胞分裂動態の解析を進め、詳細な分枝形成の実態を明らかにする予定である。また、小葉類の根の形態形成にオーキシンが非常に重要で、被子植物で数多く報告されている RAM 内のオーキシンの機能と比較できる可能性が明らかとなった。現在、オーキシン関連遺伝子の PIN、GH3 相同遺伝子をヒカゲノカズラとトウゲシバで単離し、それらの発現解析を実施している。これらの研究成果から、分枝時のオーキシンの機能を推察し、小葉類の分枝原理の解明をさらに進めていく予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Ito Yuki、Fujinami Rieko、Imaichi Ryoko、Yamada Toshihiro	４．巻 10
２．論文標題 Shared body plans of lycophytes inferred from root formation of Lycopodium clavatum	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Frontiers in Ecology and Evolution	６．最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fevo.2022.930167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　2件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 藤浪理恵子
２．発表標題 シダ植物小葉類からみる根と茎の成長と形態進化
３．学会等名 日本植物学会（招待講演）
４．発表年 2023年

１．発表者名 藤浪 理恵子，大江 夏希，木下 もか，山田 敏弘，今市 涼子
２．発表標題 シダ植物小葉類の根頂端分裂組織の形成とオーキシンの影響
３．学会等名 日本植物学会
４．発表年 2022年

１．発表者名 陸野里音，藤原基洋，藤浪理恵子，犬飼義明，郷達明，藤本仰一
２．発表標題 根端分裂組織の輪郭の形は維管束植物で共通するか-数理解析から-
３．学会等名 日本植物形態学会
４．発表年 2022年

１．発表者名 伊藤雄氣，藤浪理恵子，今市涼子，山田敏弘
２．発表標題 ヒカゲノカズラの根の特徴から推定する小葉類の地下器官の進化
３．学会等名 日本植物分類学会
４．発表年 2023年

１．発表者名 藤浪理恵子
２．発表標題 シダ植物小葉類の二又分枝と根と茎の進化
３．学会等名 日本植物分類学会（招待講演）
４．発表年 2021年

１．発表者名 伊藤雄氣、藤浪理恵子、山田敏弘
２．発表標題 根の形成位置から考える小葉類の根と根形成器官の進化
３．学会等名 日本植物分類学会
４．発表年 2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関