

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23770089

研究課題名(和文) 分子マーカーを用いた日本列島のコケ植物の遺伝構造と空中のリソースに関する研究

研究課題名(英文) An analysis of the relationships between the immigrant aerial resources of bryophytes and the genetic structure of the extant Japanese bryoflora based on molecular markers

研究代表者

坪田 博美 (Tsubota, Hiromi)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10332800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：コケ植物のフロラの成立過程を明らかにするため、大気中から回収された散布体と地上に生育する植物体のハプロタイプの比較を行った。また、得られたサンプルについてDNAバーコーディングを行い、サンプルの同定を試みた。本研究の結果、葉緑体ゲノムを対象としたDNAハプロタイプマーカーが開発できた。また、大気中から得られたサンプルとして、コケ植物とシダ植物、藻類が確認された。DNAバーコーディングの結果、コケ植物の一部の種は日本で未記録の種と推定された。アカイチゴケについては葉緑体ハプロタイプが4つ確認された。一方でコケ植物のDNAバーコードライブラリの必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To reveal the establishment and colonisation processes of the bryoflora of the Japanese Archipelago, haplotype variation in the chloroplast genome was studied. Identification of immigrant propagule samples from aerial sources was also attempted based on DNA barcoding. Some key new genetic markers for the chloroplast genome were identified and obtained. Analysis of the results revealed: a greater diversity of potential immigrant taxa than are represented in the established bryoflora; in addition to bryophytes, some ferns and green algal taxa were detected using DNA barcoding. *Pseudotaxiphyllum pohliaecarpum*, one of the dominant bryophyte species in aerial samples, showed four distinct chloroplast haplotypes in Japanese samples, most likely representing separate historical colonisation events. To effectively monitor the aerobiota and potential advent of additional taxa in the Japanese bryoflora there is an urgent need to enrich and expand the DNA barcoding library for bryophytes.

研究分野：植物系統・分類

キーワード：コケ植物 散布 分布 DNAバーコーディング ハプロタイプ 藻類 シダ植物

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本列島を含むアジア地域は地球上でもっとも多様なコケ植物フロアの存在する場所であり、日本列島には北米大陸に匹敵する約 2000 種が存在する。しかしながら、その成立要因については地質や地史などに要因が求められるだけで推測の域を出ず、系統地理学的な知見がない。現在、日本列島のコケ植物フロアの成立過程を明らかにするため、系統地理学的な研究が望まれている。またこの多様性は、コケ植物が孢子で分布範囲を広げていることが要因のひとつとして考えられ、大気中のリソースを明らかにする必要がある。

(2) コケ植物をはじめとした地衣類やシダ植物、藻類を含む隠花植物は孢子や無性芽のような小型の散布体を使って繁殖していることが知られている。しかしながら、それを直接的に証明した研究は少なかった。近年発展がめざましい DNA バーコーディングの手法を用いることで、大気中から回収したサンプルから直接あるいは培養後、マーカーの塩基配列を得ることで種同定が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、コケ植物を対象に、地理的な遺伝構造を明らかにする。また、空中に浮遊する孢子や無性芽を回収・培養し、その遺伝構造を地理的な構造と比較する。当該期間中に行う研究については、遺伝構造の解明に情報が蓄積されつつある葉緑体 DNA のハプロタイプを用いる。また、併せてコケ植物用のマーカー開発のため葉緑体ゲノムの解析を行う。孢子や無性芽は大陸からの季節風を考慮して、日本列島の数か所でサンプルを回収する。回収したサンプルを培養して、DNA 抽出に用いる。これら一連の研究により、日本列島のコケ植物の地理的な遺伝構造の概略が明らかになるとともに、空中のリソースとの関連性について明らかにすることができる。

3. 研究の方法

日本列島のコケ植物フロアの成立要因と空中のコケ植物リソースについて明らかにすることを目標とした。今回、限られた研究期間であるため、当初は以下の 1～3 の項目について研究を行うこととした。また、得られた産地情報と標本庫の標本から得られた産地情報にもとづいて、地理情報システム (GIS) を用いたコケ植物の分布に関する基礎的な解析を行った。

(1) 葉緑体ゲノムに関するコケ植物用マーカーの開発を行った。これまでにコケ植物で系統地理学的な研究があまり行われていない原因のひとつとして、葉緑体 DNA ハプロタイプマーカーが開発されていないことがあげられた。今回、既知の葉緑体ゲノムの配

列等を参考にコケ植物用マーカーを開発した。

(2) ソースである大気中に浮遊している孢子や無性芽といった散布体を回収・培養した。また、得られたサンプルのマーカーの塩基配列を決定した。

(3) 開発したマーカーを用いて、代表的な種で実際のハプロタイプの分布と遺伝構造、その多様性に関する情報を得た。地上に生育する同種のサンプルから得られたハプロタイプと、大気中から得られたサンプルのハプロタイプを比較して、遺伝構造の違いを検討した。

4. 研究成果

(1) 葉緑体ゲノムを対象としたマーカー開発では、既存の葉緑体 *rbcL* 遺伝子に加えて *rps4* 遺伝子、*atpB* 遺伝子、*atpB-rbcL* 遺伝子間領域、*rbcL-rps4* 遺伝子間領域のユニバーサルプライマーが開発できた。*matK* 遺伝子については、コケ植物全体でユニバーサルプライマーは得られなかったが、頂蘚類で利用可能なプライマーが開発できた。蘚類の葉緑体ゲノムについて、全体の 3/4 程度の領域を増幅できるプライマーセットを 12 セット開発することができた。プライマーウォーキング法により配列を読み進めているが、本研究期間中では最後まで読み終えることができなかった。また、次世代シーケンサーの利用については、東日本大震災に伴う初年度の費用削減の影響が挽回できなかった。

(2) 大気中からの散布体の回収では、予想していたよりも多くのサンプルを得ることができた。コケ植物については 98 コロニーを得ることができた。また、コケ植物内では蘚類の割合が大きかった。その他、シダ植物や藻類のサンプルも得ることができた。藻類については、地衣類の共生藻となり得るスミレモ科の一種も得ることができた。得られたサンプルについて、マーカーの塩基配列を決定して比較を行った。コケ植物では、DNA バーコーディングの結果多くのサンプルが近隣に生育する種あるいは属であった。ただし、一部のサンプルには数百 km 以上離れた場所で生育したり、日本からは報告されていないものであった。これは長距離散布の直接的な証拠をとらえたものであると考えている。スミレモ科藻類については、種同定を行うため、形態観察とともに核 18S rRNA 遺伝子の塩基配列にもとづいて分子系統解析を行った。

(3) 大気中から見つかったサンプルのうち、採集場所の近隣でも見つかるコケ植物であるアカイチイゴケ *Pseudotaxiphyllum pohliaecarpum* およびその近縁種についてハプロタイプの比較を行った。その結果、ア

カイチイゴケの種内に4タイプの葉緑体ハプロタイプが見つかった。また、同じハプロタイプが広島と徳島といった離れた産地で確認されたのと同時に、別のハプロタイプ同士が比較的近い距離にある産地で確認された。これはアカイチイゴケの種内で遺伝的に分化が起こっていることを示すものであるとともに、散布体の長距離散布で説明できる現象である。このような知見はこれまで知られておらず、本研究ではじめて確認された。

(4) 本研究で、アカイチイゴケについて新たな産地情報が得られたため、標本庫の標本から得られた産地情報を追加して、地理情報システム(GIS)を用いたコケ植物の分布に関する基礎的な解析を行った。また、過去に日本列島全体で網羅的な分布調査が行われ、湿地生態系を代表する植物であるミズゴケ属の産地情報を比較に用いた。標本にもとづいた産地情報についてGISを用いて潜在的な分布の計算を行い、潜在的な分布と実際の分布の間どの程度の差が生じるか比較を行った。この結果、ミズゴケ属については、最低400から500点程度の産地情報があれば、ある程度正確な分布予測が可能であることが明らかになった。一方、アカイチイゴケについては産地情報が現時点では不十分であることが分かった。

(5) DNAバーコーディングの結果、日本産コケ植物についてはDNAバーコードライブラリが存在せず、DNAデータベースに蓄積された配列情報では種の同定ができないサンプルが多くあった。多くの種で正確な同定が行えず、コケ植物のDNAバーコードライブラリの構築が今後の課題であることが明らかになった。今後、コケ植物のDNAバーコードライブラリの構築を進めることで、今回分からなかったサンプルの種同定が可能となる。これについては、今後の研究課題としたい。

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21件)

Aoyama, M. & Tsubota, H., Karyotype analysis of Japanese *Burmannia* (Burmanniaceae), *Acta Phytotax. Geobot.* 査読有、65巻、2014、37-42
井上 侑哉、長谷 信二・坪田 博美、センボンウリゴケ(センボンゴケ科、蘚類)の新産地と日本国内での分布、植物研究雑誌、査読有、89巻、2014、189-192
Inoue, Y. & Tsubota, H., On the systematic position of the genus *Timmiella* (Dicranidae, Bryopsida) and its allied genera, with the description of a new family Timmiellaceae、

Phytotaxa、査読有、181巻、2014、151-162

坪田 博美、宮島の自然 - その現状と課題 -、*厳島研究*、査読無、10巻、2014、1-18

坪田 博美、井上 侑哉、中原・坪田 美保、島本 俊樹、松田 伊代、内田 慎治、向井 誠二、標本同定のツールとしてのDNAバーコーディングと分子系統解析 - 広島県宮島で採集された標本の例 -、*Hikobia*、査読有、16巻、2014、475-490
坪田 博美、中原・坪田 美保・井上 侑哉・内田 慎治・向井 誠二、広島の帰化植物5. ヒメムラサキハナナ、*Hikobia*、査読有、16巻、2014、491-497

坪田 博美、井上 侑哉、中原・坪田 美保、内田 慎治、向井 誠二、標本同定のツールとしてのDNAバーコーディング - 植物標本の例 -、*広島大学総合博物館研究報告*、査読有、6巻、2014、41-49

Inoue, Y., Uchida, S. & Tsubota, H., Notes on rhizoidal tubers in *Tortula truncata* (Pottiaceae, Bryophyta) from Japan, *Hikobia*、査読有、16巻、2013、299-302

井上 侑哉、立石 幸敏、坪田 博美、コモチネジレゴケが長野県で見つかる、*蘚苔類研究*、査読有、10巻、2013、420

Katagiri, T., Sadamitsu, A., Miyauchi, H., Tsubota, H. & Deguchi, H., Taxonomic studies of the Trichocoleaceae in Southeast Asia. III. The genus *Trichocolea* Dumort., *Hattoria*、査読有、4巻、2013、1-42

Oguri, E., Yamaguchi, T., Tsubota, H., Deguchi, H. & Murakami, N., Geographical origin of *Leucobryum boninense* Sull. & Lesq. (*Leucobryaceae*, Musci) endemic to the Bonin Islands, Japan, *Ecol. Evol.*、査読有、3巻、2013、753-762

Suzuki, T., Inoue, Y., Tsubota, H. & Iwatsuki, Z., Notes on *Aptychella* (*Sematophyllaceae*, Bryopsida): *Yakushimabryum longissimum*, syn. nov., *Hattoria*、査読有、4巻、2013、107-118

坪田 博美、久保 晴盛、大野 彰洋、井上 侑哉、中原・坪田 美保、武内 一恵、松井 健一、内田 慎治、向井 誠二、広島の帰化植物4. イヌカキネガラシおよびその近縁種、*Hikobia*、査読有、16巻、2013、321-334

Inoue, Y., Tsubota, H., Sato, H. & Yamaguchi, T., Phylogenetic note on *Pachyneuropsis miyagii* T.Yamag. (*Pottiaceae*, Bryophyta), *Hikobia*、査読有、16巻、2012、221-228

井上 侑哉、立石 幸敏、片桐 知之、坪田 博美、*Trichocolea japonica* (新称: イボイボムクムクゴケ) の新産地、*蘚苔類研*

究、査読有、10巻、2012、291-292
久保 晴盛、井上 侑哉、長谷 信二、坪田 博美、ニセツリガネゴケが広島県で見つかる、蘚苔類研究、査読有、10巻、2012、228-229

Oguri, E., Yamaguchi, T., Tsubota, H., Deguchi, H. & Murakami, N., Genetic differentiation between *Dendroceros japonicus* and *D. tubercularis*, Hikobia, 査読有、16巻、2012、215-220

坪田 博美、久保 晴盛、武内 一恵、中原 坪田 美保、井上 侑哉、内田 慎治、向井 誠二、広島県の帰化植物 3. トゲヂシャとマルバトゲヂシャ、Hikobia, 査読有、16、2012、197-202

Inoue, Y., Tsubota, H., Kubo, H., Uchida, S., Mukai, S., Shimamura, M. & Deguchi, H., A note on *Pottia intermedia* (Turner) Fűrnr. (Pottiaceae, Bryopsida) with special reference to its phylogeny and new localities in SW Japan, Hikobia, 査読有、16巻、2011、67-78

Masuzaki, H., Furuki, T., Dalton, P. J., Tsubota, H., Seppelt, R. D. & Deguchi, H., The phylogenetic position of *Vandiemenia ratkowskiana* (Metzgeriales, Marchantiophyta), Hikobia, 査読有、16巻、2011、51-57
他1件

〔学会発表〕(計41件)

坪田 博美・島本 俊樹・久保 晴盛・半田 信司・井上 侑哉・中原 坪田 美保・正田 いくみ・内田 慎治・向井 誠二、大気中から捕捉された隠花植物とくにコケ植物、日本植物学会第78回大会、2014年9月11日-14日、川崎市

井上 侑哉・佐藤 裕幸・坪田 博美、閉鎖果蘚類の系統的位置について、日本進化学会第16回大会、2014年8月21-24日、高槻市

井上 侑哉・久保 晴盛・坪田 博美、瀬戸内海島嶼部で見つかったイボスジネジクチゴケ(センボンゴケ科, セン類)について、中国四国植物学会第71回大会、2014年5月10-11日、岡山市

島本 俊樹・坪田 博美、大気中から捕捉されたコケ植物、中国四国植物学会第71回大会、2014年5月10-11日、岡山市
久保 晴盛・向井 誠二・坪田 博美、日本産ミズゴケ類の潜在分布域の推定、日本生態学会第61回大会、2014年3月14-18日、広島市

島本 俊樹・正田 いくみ・久保 晴盛・井上 侑哉・半田 信司・中原 坪田 美保・内田 慎治・向井 誠二・坪田 博美、大気中から捕捉された隠花植物とくにコケ植物について、日本生態学会第61回大会、2014年3月14-18日、広島市

坪田 博美・島本 俊樹・久保 晴盛・半田 信司・井上 侑哉・中原 坪田 美保・内田 慎治・向井 誠二、大気中から捕捉されたコケ植物、日本植物学会第77回大会、2013年9月13-15日、札幌市

坪田 博美・久保 晴盛・井上 侑哉・内田 慎治・向井 誠二、DNA マーカーで見たセン類アカイチイゴケの地理的変異、日本蘚苔類学会第42回大会、2013年8月5-7日、岡山市

久保 晴盛・向井 誠二・坪田 博美、GIS(地理情報システム)を用いた日本産ミズゴケ類の分布特性の解析、日本蘚苔類学会第42回大会、2013年8月5-7日、岡山市

井上 侑哉・内田 慎治・坪田 博美、広島県で再発見されたハナシセンボンゴケ *Tortula truncata* (Hedw.) Mitt. について、日本蘚苔類学会第42回大会、2013年8月5-7日、岡山市

久保 晴盛・向井 誠二・坪田 博美、三分分布図とGISを活用したコケ植物における分布要因の推定(予報) - ミズゴケ類の事例、日本生態学会中国四国地区会第57回大会、2013年5月11-12日、徳島市

井上 侑哉・坪田 博美・山口 富美夫、*Pachyneuroopsis miyagii* (Pottiaceae) の系統的位置、日本蘚苔類学会第41回大会、2012年9月7-9日、斜里町

内田 慎治・井上 侑哉・坪田 博美、広島県宮島の *Tuyamaella molischii* Schiffn. モーリッシュシゲリゴケについて、日本蘚苔類学会第41回大会、2012年9月7-9日、斜里町

正田 いくみ・半田 信司・中原 坪田 美保・坪田 博美・溝淵 綾、日本新産の気生藻類 *Trentepohlia prolifera* (スミレモ科) とその分類学的位置、日本藻類学会第36回大会、2012年7月13-15日、札幌市

井上 侑哉・内田 慎治・向井 誠二・坪田 博美、広島県宮島の蘚苔類フロラ、日本植物学会中国四国支部第69回大会、2012年5月12-13日、松江市

久保 晴盛・向井 誠二・坪田 博美、コケ植物の散布様式と潜在的な遺伝的多様性について - 蘚類アカイチイゴケ *Pseudotaxiphyllum pohliicarpum* (Sull. & Lesq.) Z.Iwats. の例 - 、日本生態学会中国四国地区会、第55回大会、2011年5月14-15日、高松市

他25件

〔図書〕(計2件)

坪田 博美、講談社、コケ植物の分子系統、2012、22-33

坪田 博美、有川 智己、日本蘚苔類学会、新・分子系統解析法、2011、69-82

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

該当なし

○取得状況（計 0 件）

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.digital-museum.hiroshima-u.ac.jp/~museum/>(広島大学デジタル自然史博物館)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坪田 博美 (TSUBOTA, Hiromi)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10332800

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし