

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32670

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870088

研究課題名(和文)シダ植物小葉類の根の分枝様式と分枝メカニズムの解明

研究課題名(英文)Developmental morphology of branching system in the roots of lycophytes

研究代表者

藤浪 理恵子 (Fujinami, Rieko)

日本女子大学・理学部・助教

研究者番号：40580725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シダ植物小葉類は維管束植物の系統関係で最も基部に位置し、根と茎の形態進化を明らかにする上で重要なグループであると考えられる。本研究は、小葉類の根頂端分裂組織(RAM)の構造と、根と茎の分枝様式を解析し、真葉類(大葉類と種子植物)との比較から進化過程を明らかにすることを目的とした。その結果、小葉類のRAM構造は真葉類に匹敵するほど多様であり、根は小葉類と真葉類で平行的に進化したと推定された。また、小葉類の根の分枝様式は二又分枝であるのに対し、茎は二又分枝だけでなく単軸分枝をもつと示唆された。従って、小葉類の根と茎の分枝様式が違うことから、根と茎の起源は小葉類の時点で異なる可能性が推測される。

研究成果の概要(英文)：Lycophytes are the basal clade of extant vascular plants and are key for clarifying the evolution of three main organs of vascular plants: stem, leaf, and root. To assess the evolutionary origin of roots and shoots in vascular plants, we examined the root apical meristem (RAM) organization, and root and shoot branching system in lycophytes. The present results suggested that RAM organizations of lycophytes are much more diverse than expected. It is assumed that RAM organizations parallelly evolved in the both clades, lycophytes and euphyllophytes. The *Lycopodium clavatum* RAM has a large group of common initial cells which is similar to the quiescent center of angiosperm RAM. When this RAM branched, the quiescent center like area was divided in two, and two new RAMs formed. The roots of *L. clavatum* divide dichotomously. In contrast, the branching of shoots of *L. clavatum* was monopodial system. Thus, the root and shoot of lycophytes are different in branching system.

研究分野：植物形態学

キーワード：小葉類 根 進化 根頂端分裂組織 分枝 維管束植物 静止中心

1. 研究開始当初の背景

「分枝」は植物の見かけ上の形を決める重要な形質であり、全ての維管束植物(シダ植物小葉類、シダ植物大葉類、裸子植物、被子植物)がもつ形態である。陸上植物の進化の過程で、分枝の形質は1本の軸をもつコケ植物段階から維管束植物段階へと進化をしたとき、二又状に分枝する能力を獲得したと推定される。その後、さらなる複雑な形態進化を経て、根、茎、葉の3器官が生じたと考えられている。陸上植物にとって軸の分枝を獲得したことは、最大の形態進化であるといっても過言ではない。茎と葉の起源については、化石植物研究からテロム説が提唱された。テロム説とは、二又分枝した軸に主軸の形成や扁平化、有限成長化などが生じ、葉と茎が生じたとする、有力な仮説である。一方、根に関しては、化石データや植物群ごとの構造の解析が断片的であるため、ほとんどわかっていない(Kenrick and Crane 1997)。したがって、分枝の進化解明は、根の起源を明らかにする上で重要であると考えられる。

2. 研究の目的

現生の維管束植物は系統関係より、シダ植物小葉類が最初に分岐し、次にシダ植物大葉類(いわゆる一般的なシダ植物)と種子植物(裸子植物と被子植物)が分岐する(Pryer et al. 2004)。このうち、シダ植物小葉類は茎に多数の小葉(葉脈が1本)をもち、根は外生的に二又分枝する特徴をもつ。この形態は、初期の維管束植物(リアア類、ゾステロフィルム類、トリメロフィトン類)の二又分枝する特徴と似ており、小葉類は原始的な形質が多く残されているのではないかと推定されている。さらに、小葉類の根は茎と同様に外生分枝し、大葉類と種子植物が内生的に側根を形成する特徴とは大きく異なる。

本研究では、外生的に二又分枝する根をもつシダ植物小葉類に着目し、根の構造と分枝様式を明らかにすることを目的とした。

シダ植物小葉類は、イワヒバ科、ミズニラ科、ヒカゲノカズラ科に分類される。根頂端分裂組織(Root Apical Meristem: RAM)の構造は、イワヒバ科が1つの頂端細胞をもち、ミズニラ科は層状構造をもつと報告されている(Imaichi and Kato 1989, Yi and Kato 2001)。ヒカゲノカズラ科も層状構造であると一般的に知られていた(Guttenberg 1966)が、近年の筆者らの解析から、ヒカゲノカズラ科のRAMは層状構造をもたないということが示唆された。ヒカゲノカズラ科ヒカゲノカ

ズラのRAMは、中央の始原細胞群がランダムに分裂し、一見被子植物のRAM構造に似ていた。したがって、小葉類内のRAM構造は、大葉類(頂端細胞群型)と種子植物(頂端細胞群型)のRAM構造と比較できる可能性がある。さらに、小葉類の根の分枝は、二又分枝だけでなく、三又分枝や単軸状分枝しているように見える種も存在し、その動態は明らかではなかった。

本研究の解析は、シダ植物小葉類3科の根のRAM構造と分枝様式について、樹脂切片法による発生解剖学的解析と、分裂細胞を標識するEdU取り込み法による細胞分裂動態解析を行った。また、シダ植物小葉類のRAM構造と他の維管束植物のRAM構造との比較、および茎頂端分裂組織(SAM)や分枝との関連を検証するため、分子遺伝学的手法を用いて分枝メカニズムを明らかにする。すでにシロイヌナズナやイネなどのモデル植物で報告されているRAMとSAMの構造維持に関わる遺伝子(class 1 *KNOX*, *WOX*)を単離し、遺伝子発現解析を行うこととした。

3. 研究の方法

シダ植物小葉類(ヒカゲノカズラ科、イワヒバ科)とシダ植物大葉類を各生育地で採集し、以下の解析を行った。

(1) 材料と採集場所

ヒカゲノカズラ科(2種、小葉類)

- ・ヒカゲノカズラ：京都府高雄山清滝川周辺
- ・トウゲシバ：静岡県函南市函南原生林

イワヒバ科(1種、小葉類)

- ・コンテリクラマゴケ

：東京大学理学研究科附属植物園

コバノイシカグマ科(1種、大葉類)

- ・イワヒメワラビ

：京都府高雄山清滝川周辺

(2) RAM構造の解剖学的解析

根の先端を採集し、4%PFA in 0.1Mリン酸バッファー(pH7.2)で24時間固定した。固定後、定法で準超薄連続切片を作成した。切片はトルイジンブルー、サフラニン、オレンジGによる3重染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察を行った。

(3) EdU蛍光法のRAM細胞分裂動態解析

チミジンのアナログ物質でDNA合成が活発な期間のDNAに取り込まれるEdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)を用いて、分裂細胞を標識し、分枝前後のRAMの細胞分裂動態を発生段階を追って観察した。EdUの植物体への取り込み方法は、生育場所でEdU溶液の入った容器に植物体の根を浸し、テ-

ブで固定後, 24 時間静置した。その後, 根先端部を 4% PFA in 0.1M リン酸バッファー (pH7.2) で固定し, 脱水、樹脂包埋後、蛍光染色による蛍光顕微鏡観察を行った。

(4) 根と茎の遺伝子発現解析

RAM と SAM で機能する遺伝子 (class 1 *KNOX*, *WOX*) と細胞周期 S 期 (DNA 合成期) に発現する遺伝子 (*Histone H4*) をヒカゲノカズラとトウゲシバから単離し、RNA *in situ* hybridization 法による発現解析実験を行った。

4. 研究成果

(1) シダ植物小葉類の RAM 構造

ヒカゲノカズラ科ヒカゲノカズラの RAM 構造は、解剖学的解析から種子植物の開放型によく似た構造をもつことが明らかとなった (図 1)。EdU 蛍光法の細胞分裂動態解析の結果、RAM 中央に EdU の取り込みが極度に少ない領域が存在することが発見された。この領域は種子植物の細胞分裂頻度が低い静止中心 (QC) に似ていることから、静止中心 (QC) 様領域と名付けた。種子植物の QC に発現し、機能することが知られている *WOX* family 遺伝子の単離をヒカゲノカズラで行い、発現解析を行った。単離された *WOX* 相同遺伝子全てにおいて、QC 様領域での発現は見られず、小葉原基、維管束始原細胞群で発現が確認された。

一方、ヒカゲノカズラ科トウゲシバは、表皮始原細胞群が明確な 1 層を示し、根冠始原細胞群と皮層始原細胞群とは区別される構造であることが明らかとなった。この RAM 構造は、種子植物の閉鎖型に似ていると考えられる。トウゲシバに加え、トウゲシバ属 10 種でも同様の RAM 構造が確認された。また、細胞分裂動態解析を行った結果、トウゲシバの RAM には分裂頻度の低い領域はみられず、QC 様領域に相当する領域は確認されなかった。

以上のヒカゲノカズラ科 2 種の RAM 構造解析から、ヒカゲノカズラ属が開放型、トウゲシバ属が閉鎖型に相当する 2 タイプの RAM が存在することが明らかとなった。

小葉類 3 科のうち、ミズニラ科はこれまでの形態学的研究によって、細胞群が層状を示すことが知られている (Guttenberg 1966, Yi and Kato 2001)。ミズニラ科の RAM 構造は表皮と根冠の始原細胞群が共通し、種子植物の閉鎖型と一致する。本研究で、ミズニラ科ミズニラモドキの細胞分裂動態解析を行った結果、トウゲシバと同様に QC 様領域に相当

する領域は存在しなかった。したがって、小葉類の閉鎖型に似た RAM 構造をもつグループは、種子植物の閉鎖型 RAM とは異なる維持機構をもつと推測される。

イワヒバ科は、1 つの頂端細胞をもつ RAM 構造を示し (Guttenberg 1966)、大葉類の RAM 構造と同じである。さらに、イワヒバ科コンテリクラマゴケと大葉類コバノイシカグマ科イワヒメラビで RAM の細胞分裂頻度を解析した結果、両者とも頂端細胞とその周囲の派生細胞群に EdU 取り込みがみられ、RAM 中央部に QC 様領域に匹敵する領域はないことが明らかとなった。したがって、頂端細胞型 RAM をもつ小葉類と大葉類は、同じ RAM の構造維持機構をもつと考えられる。

小葉類 3 科の RAM 構造の解析結果から、小葉類は頂端細胞をもつグループ (イワヒバ科)、頂端細胞群が層状構造を示す 2 つのグループ (ミズニラ科とヒカゲノカズラ科トウゲシバ属)、頂端細胞群が開放型を示すグループ (ヒカゲノカズラ科ヒカゲノカズラ属) に分けられ、シダ植物大葉類と種子植物の RAM 構造の多様性に匹敵し、平行的に RAM 構造を進化させたと推定される (図 1)。小葉類の開放型は QC 様領域をもつことから、種子植物の RAM の構造維持機構と比較できるのではと考えられたが、*WOX* family 相同遺伝子の発現は QC 様領域では確認されなかった。また、トウゲシバ属とミズニラ科に QC 様領域が存在しなかったことから、小葉類の開放型、閉鎖型 RAM は、真葉類とは異なる維持機構をもつ可能性が高いと考えられる。一方、イワヒバ科と大葉類は細胞分裂動態も同じであることから、RAM の維持機構を比較できる可能性が推測される (Fujinami et al. submitted)。

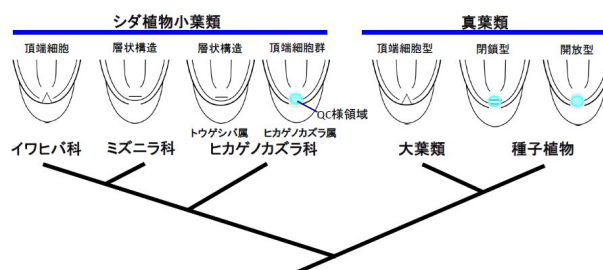


図 1 シダ植物小葉類と真葉類 (シダ植物大葉類と種子植物) の RAM 構造と系統関係 (Fujinami et al. submitted). 静止中心 (QC) と QC 様領域を水色で示す。

(2) ヒカゲノカズラ科の根と茎の分枝様式

開放型 RAM をもつヒカゲノカズラの二分枝の分枝様式を明らかにするために、分枝の発生段階を追って、EdU 法による細胞分裂動態解析を行った。その結果、ヒカゲノカズラ

の根の分枝様式モデルを示すことが可能となった(図2、Fujinami et al. submitted)。

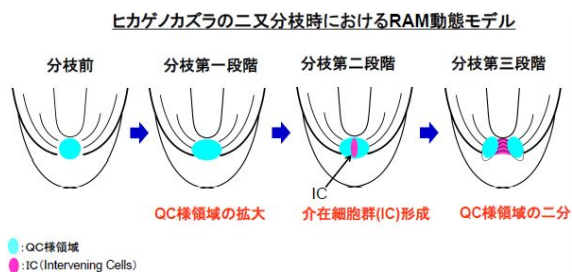


図2 ヒカゲノカズラの根の二又分枝の分枝様式の模式図 (Fujinami et al. submitted).
水色の領域を QC 様領域、赤色の領域を小型細胞群 (IC : Intervening Cells) を示す。

ヒカゲノカズラの根の分枝初期、QC 様領域内の分裂頻度が上昇して細胞数が増加し、QC 様領域が横方向に拡大する。拡大した QC 様領域内の中央部に小型の分裂細胞群 (Intervening Cells: IC) が形成され、QC 様領域内の細胞分裂頻度は低下する。その後、IC の拡大によって QC 様領域が 2 つに分断され、2 つの RAM が形成され、二又分枝する。

ヒカゲノカズラの根は、二又分枝した後に外見上主軸と側軸のような強弱のある三又分枝を形成する。細胞分裂動態解析の結果、分枝時に QC 様領域が拡大し、その領域内 2 か所に IC が生じ、QC 様領域が三分されることが示唆された。したがって、ヒカゲノカズラの根の分枝様式は、QC 様領域が二分、もしくは三分されることによって分枝するということが明らかとなった。

ヒカゲノカズラの茎の分枝は、class 1 *KNOX* と *Histone H4* の各相同遺伝子 (*LcKNOX1*, *LcHistoneH4*) を用いて RNA *in situ* hybridization 法による発現解析を行った。ヒカゲノカズラの SAM は、中央に *LcHistoneH4* 発現のみられない、細胞分裂頻度の低い領域 (OC) が存在した。分枝時、主軸 SAM の側方に新たな OC が生じて側軸 SAM が形成された。この分枝様式は、真葉類でみられる単軸分枝の様式である。したがって、ヒカゲノカズラの茎は、根とは異なる分枝様式をもつことが明らかとなった。

ヒカゲノカズラと同様に、トウゲシバの根と茎の分枝様式を解析した。トウゲシバの根と茎は、外見上、比較的均等に二又分枝する。根は分枝初期、RAM 全体が層状構造を維持しながら水平方向に拡大し、さらに発達が進むと、RAM 中央が凹状にくぼみ、その両端に新たな RAM が形成され、2 つの RAM がそれぞれ根を形成した。したがって、トウゲシバの根の分枝は、層状の RAM 構造は維持されるが領

域を拡大し、その領域が二分されることによって二又分枝することが示唆された。

一方、トウゲシバの茎は分枝時、OC を含めて SAM 全体が分裂して構造が崩れ、2 つの新たな SAM が形成された。したがって、トウゲシバの根と茎の二又分枝は、分枝時の細胞分裂動態が異なると考えられる。

以上の結果から、ヒカゲノカズラとトウゲシバの根の分枝は、RAM 構造が保持されながら RAM が分割されるという点で、同じ動態をもつと考えられる。しかし、茎の分枝は、ヒカゲノカズラが単軸分枝であったことから、ヒカゲノカズラ科の根と茎は異なる分枝様式をもつと示唆される。

本研究成果から、維管束植物の根は小葉類と真葉類のそれぞれのクレードで、平行的に形態進化したと推定される。そして、小葉類の根と茎は異なる分枝様式をもつ可能性が考えられることから、小葉類の時点で根と茎は異なる器官として進化したと推測される。

< 引用文献 >

- von Guttenberg H. 1966. *Histonegese der Pteridophyten*, 2nd ed. Handbch der Pflanzenanatomie, Band 7, Teil 2. Berlin: Genrüder Borntraeger.
- Imaichi R, Kato M. 1989. Developmental anatomy of the shoot apical cell, rhizophore and root of *Selaginella uncinata*. *Botanical Magazine Tokyo* 102: 369-380.
- Kenrick P, Crane PR. 1997. *The origin and early diversification of land plants*. Washington and London: Smithsonian Institution Press.
- Pryer KM, Schuettpelz E, Wolf PG, Schneider H, Smith AR, Cranfill R. 2004. Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. *American Journal of Botany* 91: 1582-1598.
- Yi S, Kato M. 2001. Basal meristem and root development in *Isoetes asiatica* and *Isoetes japonica*. *International Journal of Plant Sciences* 162: 1225-1235.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計9件)

藤浪理恵子、中嶋敦子、今市涼子「シダ植物小葉類ヒカゲノカズラ科の根と茎の分枝様式」日本植物学会第 79 回大会、

2015年9月8日、朱鷺メッセ、新潟市、新潟県

中嶋敦子、藤浪理恵子、今市涼子「シダ植物小葉類ヒカゲノカズラの茎頂の構造と分枝様式」日本植物学会第79回大会、2015年9月8日、朱鷺メッセ、新潟市、新潟県

Rieko Fujinami、Atsuko Nakajima、Ryoko Imaichi「Developmental morphology of dichotomous branching in the roots of lycophytes」International Conference on Lycophytes & Fern Research, Jun, 1, 2015, Washington DC, USA.

藤浪理恵子、高木笙子、今市涼子「シダ植物小葉類と大葉類の頂端細胞型RAM(根頂端分裂組織)の分裂動態比較」日本植物分類学会第14回大会、2015年3月8日、福島大学、福島県

藤浪理恵子、河上愛理、今市涼子「シダ植物小葉類の根頂端分裂組織の構造とEdU解析」日本植物学会第78回大会、2014年9月14日、明治大学、神奈川県

中嶋敦子、藤浪理恵子、今市涼子「シダ植物小葉類ヒカゲノカズラの根の二又分枝と頂端分裂組織動態」日本植物形態学会第26回大会、2014年9月11日、明治大学、神奈川県

Rieko Fujinami、Ryoko Imaichi「Developmental morphology of the dichotomous branching of lycophytes roots」The 6th Asian Fern symposium, Aug, 26, 2014, Bali Botanical Garden, Indonesia.

藤浪理恵子、中嶋敦子、斉木未沙都、今市涼子「シダ植物小葉類ヒカゲノカズラの根の外生分枝と根頂端分裂組織動態」日本植物分類学会第13回大会、2014年3月23日、熊本大学、熊本県

藤浪理恵子、斉木未沙都、堤麻衣子、今市涼子「シダ植物小葉類ヒカゲノカズラの根の二又分枝の発生様式」日本植物学会第77回大会、2013年9月15日、北海道大学、北海道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤浪理恵子 (FUJINAMI Rieko)

日本女子大学・理学部・物質生物科学科・助教

研究者番号：40580725