

「古くて新しいモデル植物ゼニゴケ  
～陸上植物の多様性・普遍性の分子基盤を探る～」

オーガナイザー

上田貴志

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

〒113-0033 文京区本郷7-3-1

澤進一郎

熊本大学大学院自然科学研究科理学専攻

〒860-8555 熊本市黒髪2-39-1

荒木 崇

京大学生命科学研究科統合生命科学専攻

〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町

本総説集は、日本植物学会第74回大会（2010年9月）で開催されたシンポジウム「古くて新しいモデル植物ゼニゴケ～陸上植物の多様性・普遍性の分子基盤を探る～」の内容をもとに総説として取りまとめたものです。

ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) は古くから植物学の教育と研究に用いられ、葉緑体ゲノム・ミトコンドリアゲノム・Y染色体の塩基配列決定などをおして、植物のゲノム科学の重要な牽引役でもありました。最近数年間においては、苔類を代表する日本発のモデル植物として、国内外の研究者を惹き付けてきており、本シンポジウムに先立つ2010年の3月には、京都で第一回の国際ワークショップが盛況のうちに開催されております。本シンポジウムは、そうした動向を踏まえ、古くて新しいモデル植物としてのゼニゴケを広く会員に知ってもらう目的で、モデル植物としてのゼニゴケの特色と、ゼニゴケの利点を活かしておこなわれている多様な研究の一端を紹介したいという意図のもとに企画いたしました。講演者には、オーガナイザー3名のほかに、ゼニゴケのモデル植物化と普及の立役者である河内孝之教授、河内教授とともにゲノム関連の研究推進に関わってきた大和勝幸博士、コケ植物の細胞分裂に関して優れた研究をおこなっている嶋村正樹博士、ストレス応答に関する研究で実績を挙げている竹澤大輔博士、といった中堅～若手の研究者を選びました。

本シンポジウム以降のことについても付記しておきますと、翌年（2011年7月）にメルボルンで開催された国際植物学会議（International Botanical Congress 2011）では、ゼニゴケ関係の2つのシンポジウムがおこなわれ、活発な議論がなされました。今年の秋（2012年11月）に

T. Ueda, S. Sawa & T. Araki - 1

は、第2回の国際ワークショップが、熊本で開催されることになっております。このように、国内にとどまらず、国際的な研究コミュニティーが着実に広がりつつあります。

本総説集の内容ですが、河内教授と石崎公庸博士の総説と大和博士と河内教授の総説の2つからは、モデル植物としての利点や整備状況、将来性を容易に知ることができ、新たにゼニゴケを用いてみたいという読者には、手ごろかつ大きな助けとなると思います。嶋村博士の総説は、分類学上の位置づけはもちろん、形態と構造に関しても、現時点で入手可能なゼニゴケ関連の文献の中でも、最も充実した内容のものとなっており、ゼニゴケを用いた研究を進める上で、基本的文献として、長く有用性を保つものと期待しております。ほかの4つの総説は、ゼニゴケを用いて展開されている実際の具体的な研究の紹介であり、シンポジウム後の進展などが加味された新しい内容のものとなっています。多様な研究の一端ではありますが、ご覧いただくと幸いです。これらを通して、ゼニゴケの魅力を感じ取っていただき、会員の中にゼニゴケを研究材料に加える方がますます増えてくだされば、オーガナイザー一同、これ以上嬉しいことはありません。

## 古くて新しいモデル植物としてのタイ類ゼニゴケの特徴

河内孝之・石崎公庸

京都大学大学院生命科学研究科

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

Liverwort, *Marchantia polymorpha* L., as a reviving model for plant biologyKey words: basal land plant, genomics, land plant evolution, *Marchantia polymorpha*, molecular genetics

Takayuki Kohchi and Kimitsune Ishizaki

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

Kyoto 606-8502, Japan

ゼニゴケは、19世紀後半に既に発生過程が詳細に観察され、植物学研究のモデル植物であった。中学校や高等学校の生物教育でも被子植物との生活史の対比を中心に引き上げられてきた。核相が半数体である配偶体世代が生活史において優位的であることは分子遺伝学研究の材料として大きな利点となる。近年、ゲノム情報や形質転換技術といった実験基盤が急速に整備された。進化発生生物学分野 (Evo Devo) や生態進化学分野 (Evo Eco) の扱いやすい実験材料としても注目されている。本総説では、現代のモデル植物としてのゼニゴケの魅力を中心に解説し、その分子遺伝学研究の展望を述べる。

## 1. ゼニゴケの特徴

分類上の位置づけ・生活史・発生過程・環境応答・遺伝子構成といったゼニゴケが本来もつ性質は、モデル植物として独自性の高い優れた特徴を与える。まず、ゼニゴケの基本的な特徴について解説する。ゼニゴケの栽培法や取り扱いについては、大和ら (2008) を参照されたい。

## 1-1. 基部陸上植物としての位置づけ

ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) は、日常生活でごく普通に目にするコケ植物のひとつで、タイ類ゼニゴケ科に属する。タイ類は、ゲノム解析や実験系が整備されたヒメツリガネゴケを含むセン類やツノゴケ類とともにコケ植物として1つにまとめられることもあるが、タイ類、セン類、ツノゴケ類は4億年以上前に分岐している。陸上植物の基部の系統はさまざまな議論の余地はあるものの、核遺伝子や葉緑体遺伝子の配列や構造の分子系統解析といった異なる手法を組み合わせた総合的な分子系統解析から、タイ類はコケ植物のなかでも最も古く分岐し、陸上植物 (正確には有胚植物) の基部に位置することが示されている (Qiu et al. 2006)。ゼニゴケの分類上の位置づけの詳細については、嶋村 (2012) を参照されたい。この進化的な位置づけは、ゼニゴケの重要な魅力のひとつである。進化には遺伝子の獲得、喪失、機能変換を伴うが、基本的に遺伝子は祖先から受け継いだものであり、

T. Kohchi &amp; K. Ishizaki-1

タイ類を実験材料とした分子遺伝学的な解析は、陸上植物成立の理解の鍵となると期待される。尚、現生のゼニゴケは、被子植物の祖先に当たる訳ではないことには注意が必要である。

## 1-2. 半数体世代が優占的な生活史

ゼニゴケは、配偶体世代が優占的な生活史をもつ (図 1)。通常、我々が目にするゼニゴケは配偶体世代である。ゼニゴケの発生過程については、Kny (1890) が様々な植物の図譜のうちの 1 章をゼニゴケにあてて出版した。これらの精緻なイラストは、現在 WEB サイトでも目にする事ができる (<http://www.geheugenvannederland.nl/> から *Marchantia* で検索)。ここでは、モデル植物として注目すべき生活史の側面のみを取り上げる。ゼニゴケの形態学的な解説は嶋村 (2012) や荒木 (2012) を参照されたい。

ゼニゴケの配偶体世代の核相は単相 ( $n$ ) である。1 細胞の胞子が吸水によって活動を開始し、細胞分裂を経て多細胞体制となる。1 細胞からの発生過程を観察できるのは、コケ植物の魅力である。栄養生長相で葉状体として増殖した後、生殖成長相では生殖細胞をつくる造卵器や造精器を発達させる。受精して接合体を形成するまでの間の核相はすべて単相である。シダ植物以降では、孢子体世代 ( $2n$ ) が生活史に優占的であるのとは対照的である。配偶体世代においてさまざまな組織が分化し、それぞれが環境応答を示すため、多くの研究で配偶体世代を対象にすることができる。配偶体世代が優占的なコケ植物と孢子体世代が優占的な陸上植物の制御機構の比較は、核相と生命現象の関係といった点で普遍性と多様性を知る上で非常に興味深い研究対象となる。言い換えると、コケ植物と維管束植物を比較することによって、孢子体世代の制御機構が配偶体世代で成立した制御機構を転用したのだろうかといった問いかけに答が得られる (Nishiyama et al. 2003, Sano et al. 2005, Sakakibara et al., 2008 など)。

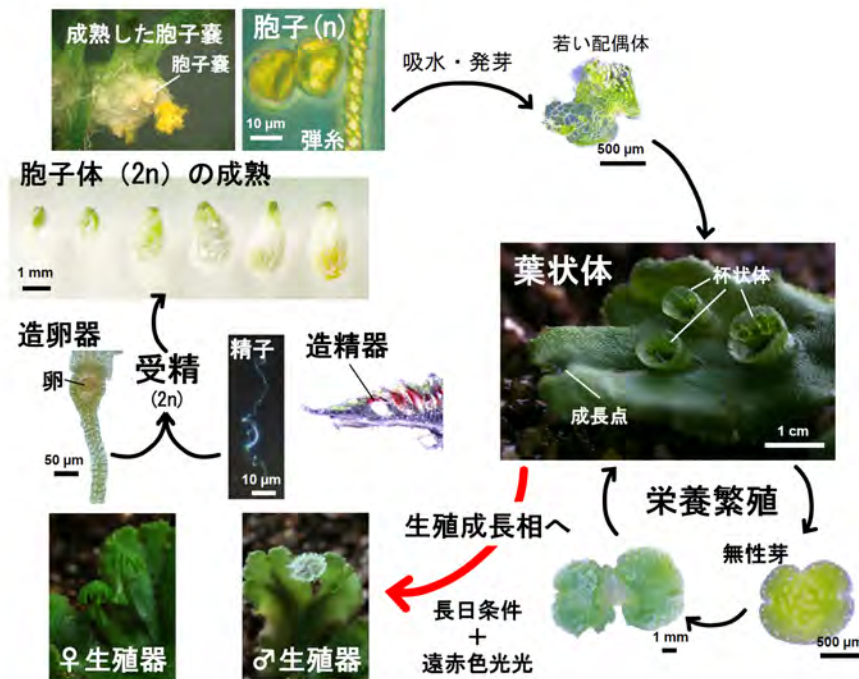


図 1. ゼニゴケの生活史

実験生物学の実質的な点でも、酵母などの例を挙げるまでもなく、突然変異体を扱う分子遺伝学研究において、半数体を対象とする意義は大きい。半数体世代では、劣性変異であっても変異表現型が当代で観察できるという利点がある。

### 1-3. 交配が容易

ゼニゴケは8本の常染色体に加えて、メスはX染色体、オスはY染色体をもつ雌雄異株植物である(大和2012)。配偶体世代では、孢子あるいは無性芽(後述)から発生する葉状体の茎頂先端に存在するノッチが二叉分岐を繰り返し、平面的な成長によって地面を覆う。ゼニゴケでは、葉状体として盛んに成長する段階を栄養成長相と呼ぶ。栄養成長相にあるゼニゴケは、環境変化が引き金となり生殖成長相へ移行する。ゼニゴケは日長が長くなると相転換が起こる長日植物である(Wann 1925)。日長に加えて、低温も相転換を促進することも報告されている(Lloyd & Steinmetz 1937)。当時の実験は野外のガラス室や白熱電球を光源として植物が栽培されていた。しなしながら、我々が実験室でゼニゴケを栽培すると長日条件や低温条件にしても成長相転換が観察されなかった。その後、蛍光灯を光源にしていることが当時の実験との大きな違いであり、遠赤色光を補光することで相転換が促進されることがわかった。これによって、実験室環境で世代を回すことが可能となった(Chiyoda et al. 2008)。生殖成長相に移行すると、雄株では造精器、雌株では造卵器が形成される。造精器から放出された精子が造卵器内の卵細胞に泳ぎ着くと、受精が起こり、孢子体が形成される。

ゼニゴケの交配はいたって簡単である。雄株に形成される生殖器官である雄器床の上部に水を垂らすと精細胞が塊となって排出され、そこから精子が運動を始める。精子形成や有性生殖については荒木(2012)と嶋村(2012)を参照されたい。懸濁した精子を、成熟した卵細胞をもつ一見未発達な雌器床(雌株に形成される生殖器官)に垂らすことで人工交配が可能である。これによって、受精、胚発生といった孢子体世代の発生に至り、最終的には減数分裂で孢子が形成される。このように、孢子を出発点とする実験や胚発生過程を対象とする実験が日常的に行えるようになった(図2)。実験室内での孢子の調製が可能になったことは、一見些細なことではあるが、微生物による汚染が少ない孢子を実験材料として準備するためには重要な点である。



図2. ゼニゴケの交配

T. Kohchi & K. Ishizaki-3

受精後、接合子は孢子体として増殖し（胚発生）、減数分裂は孢子形成の直前に起きる。この段階で染色体の組換え・交差が起こるので、1個の受精卵に由来する孢子嚢から独立した後代が得られることとなる。1回の交配で複数の孢子嚢が形成されるとともに、ひとつの孢子嚢には30万もの孢子が形成される。ひとつの雌器床に多数の造卵器が形成され、ひとつの植物体には多数の雌器床が形成されることを考慮すると、ゼニゴケの繁殖力は驚異的である。このため、膨大な次世代が得られることになり、ゼニゴケの遺伝解析は容易である。

さまざまな変異体や形質転換系統の精子や卵は、実験において重要なリソースとなる。現在は、実験材料として孢子や無性芽（後述）を保存しているが、今後はほ乳類では日常的に行われる卵や精子の保存法の確立もゼニゴケにおいて期待される。

モデル植物の世代時間は短いことが望ましい。孢子（Spore）から出発すると、はじめに細胞分裂を盛んに行い、頂端基軸や背腹性を確立し、多細胞としての基本的な体制を確立する。この時期は Sporelings と呼ばれ、葉状体を形成するまでに2-3週間を要する。これに対して、葉状体上の杯状体に発生する無性芽を出発点とすると、時間の短縮が可能である。無性芽（Gemma）から葉状体への発生段階は Gemmalings と呼ばれる。Gemmalings の段階は、孢子を出発材料にする Sporelings に比べて、比較的短期間で（約1週間）、葉状体を形成する（詳細は嶋村 2012 を参照）。葉状体を遠赤色光照射処理した場合には速やかに生殖成長が誘導されることから、ゼニゴケ葉状体には幼若期は存在しないようである（Kubota et al. 2012）。但し、孢子と無性芽のどちらを出発点として場合にも葉状体への発生段階は必要で、葉状体を形成せずに生殖器を出すことはない。葉状体に遠赤色光を照射し、生殖成長を誘導した場合、約1ヶ月で交配可能な雄器托と雌器托が出現する。交配による受精から孢子の成熟に約1ヶ月を要する。つまり、最短の世代時間は約3ヶ月と計算でき、実験生物としては比較的短い世代時間をもつと言える。

最短のケースを例に世代時間を述べたが、ゼニゴケでは厳密な世代時間を定義することはできない。葉状体は環境に応答して生殖成長へ移行するが、基本的には葉状体のまま無限成長することが可能である。相転換により葉状体の頂端は葉状体を生み出す無限成長から生殖器を作り出す有限成長に切り替わるものの、葉状体全体が枯死することはなく、新たな分裂組織が形成される。シロイヌナズナやイネなどでは最終的に個体が枯れてしまうのに対して、ゼニゴケでは特定の世代を恒久的に維持することができることも材料としての利点である。葉状体の継代培養や無性芽の低温保存によって、最初に突然変異体として分離した株や遺伝子導入を行った当代の維持が可能である。

#### 1-4. 高い再生能力～切断面再生と無性芽

一般的に、コケ植物の組織の再生能力は高い。切断した葉状体断片からは再生が容易に観察される。ゼニゴケ葉状体切断面からの発生が発生プログラムのリセットを介した再生であるか、葉状体に存在する未分化な細胞に由来する再生であるかは不明である。葉状体を切断した場合、茎頂ノッチを有する断片は、そのまま成長を継続し、切断面からの再生は観察されない。一方、ノッチを除去された基部側の葉状体断片は切断面から再生し、葉状体を発生する。この場合、中肋組織の部分から再生される傾向があり、中肋に存在する細胞の特殊性が予想される。しかし、中肋を含まない断片も再生可能であり、再生には中肋の存在は必須ではない。このような高い再生能力を利用して、切断で誘導した

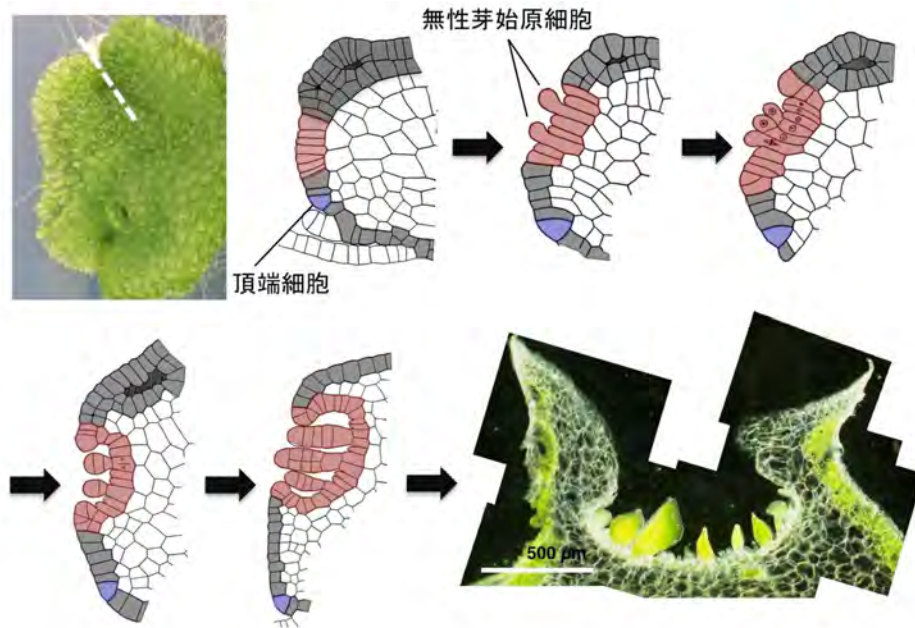


図3. ゼニゴケの無性芽発生 イラストは Barnes & Land (1908)を改変

細胞分裂を観察するといった実験が可能である。

多くのコケ植物同様に、ゼニゴケは無性芽というユニークな増殖形態をもつ。ゼニゴケの無性芽は、名前の通りカップ構造をした杯状体の底部に、有性生殖を経ることなしに形成される（嶋村 2012）。杯状体の発生過程を図3に示す。無性芽は底部の細胞を起源として、細胞伸長、並層分裂による基部の柄細胞と先端側細胞への分裂、先端側細胞が一連の細胞分裂を繰り返す、多細胞化することで形成される。ここで特に注目したいことは、個々の無性芽は母体の葉状体と同じ遺伝子型をもつこと、なかでも1細胞に由来するクローンであるということである。

無性芽は吸水させなければ休眠する性質があるので、発生段階の揃った均一な材料を調製するのに利用可能である。無性芽は効率的な増殖形態であるとともに、一種の休眠状態にあるためストレスに対する抵抗性も高い。徐々に乾燥した無性芽や、寒天培地上に保存した無性芽は少なくとも数年間の保存が可能である。

ゼニゴケの再性能の高さは、形質転換実験（後述）にも生かされている。一般的に植物の形質転換では、細胞をカルスとして増殖しDNAを導入し、ホルモンの調節によって再分化させるという培養技術が必要とされる。これに対して、ゼニゴケは特殊な植物ホルモン処理をすることなく、薬剤耐性を獲得した細胞から植物体を容易に再生させることができる。

### 1-5. ゲノムと遺伝子構成

ゼニゴケは、タイ類の基本的な染色体数  $n=8+$  性染色体をもつ。比較的単純な体制を反映して、遺伝子の冗長性が種子植物に比べて低いという特徴がある。その傾向は、転写調節因子やタンパク質リン酸化酵素といった制御系因子で顕著である。遺伝的な冗長性は突然変異体を扱う分子遺伝学的な解析では障害となることが多いが、ゼニゴケはその可能性が低く扱いやすい生物種と言える。詳しくは、大和（2012）を参照されたい。

## 2. 標準系統

ゼニゴケの分類学的研究は18世紀なかばに起源をもつが、種内分類群も存在し、初期には記載名にもさまざまな混乱が見られた(嶋村 2012)。国内でも19世紀後半から20世紀にかけて池野らによるゼニゴケの精子形成といった研究例があるが(荒木 2012)が、当時は標準系統という発想はあまりなかったようである。1943年にBurgeffは、「Genetische Studien an Marchantia (ゼニゴケ属の遺伝学研究)」という成書を出版し(Burgeff 1943)、発生過程や形態学的観察や突然変異体などを多数収録した。遺伝解析の結果も収録されており、約70年前にゼニゴケの研究が盛んに行われていたことがわかる。興味深い表現型を示す突然変異体の記述も多いが、残念ながら実験材料として現在入手することは困難である。

1970年代、熊本大学においてゼニゴケ培養細胞が樹立された(Ono 1976)。この細胞は、光独立栄養条件の培養が可能であることや増殖が極めて盛んであることから、葉緑体ゲノムやミトコンドリアゲノムの解析に利用された(Ohyama et al. 1986, Oda et al. 1992)。しかし、培養細胞のゲノムには培養による染色体レベルでの変化があることや、現在の標準系統から決定したものと比較するとオルガネラゲノムにも著しい多型が存在することが明らかになっている(大和, 石崎, 河内 未発表データ)。今後、このゼニゴケ培養細胞を実験に利用する場合には上記の点に注意が必要である。

分子遺伝学研究では実験材料に標準系統を定めることによって、無用な混乱を避けることが重視されてきた。現在、研究用の標準株として京都市宝ヶ池地区で採集した系統、Takaragaike-1(雄株)とTakaragaike-2(雌株)が利用されている(Okada et al. 2000)。これらの系統は、*Marchantia polymorpha* ssp. *ruderalis* (かつての狭義の *Marchantia polymorpha*) に属する。Takaragaike-1 株およびTakaragaike-2 株由来のPACクローンを用いてゲノムライブラリーが構築され(Okada et al. 2000)、性染色体の構造解析が行われた(Okada et al. 2001, Ishizaki et al. 2002, Yamato et al. 2007)。現在、これらの系統は、ゲノムプロジェクトをはじめ、さまざまな研究で野生型標準株として採用されている。コケ植物の場合、配偶体世代で採取するため、採取した段階で既に純系であると言えるが、Takaragaike-1 およびTakaragaike-2の間には、性染色体の違いだけでなく常染色体にも塩基多型が存在した。そこで、2006年から戻し交配を進め、Takaragaike-1 由来の常染色体とTakaragaike-2の雌性染色体をもつ雌株を得た。米国エネルギー省 Joint Genome Institute におけるコミュニティプログラムに採択されたゲノム解読には戻し交配系統が用いられている(<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/99191.html>, 大和 2012)。

また、遺伝地図作成や遺伝子マッピングのための対照系統として、京都大学の構内からKitashirakawa株を採集した。Takaragaike-1 株との間の多型を利用して、8本の常染色体を表す8つの連鎖群からなる遺伝地図を作成した。現在、ゲノム物理地図と遺伝地図の統合を進めている。マッピングにおいても、半数体の利点がある。交配後得られるF1胞子に由来する植物体は、すぐにRecombinant Inbred系統のようなマッピング集団として利用可能である。配偶体世代ではヘテロ接合性も存在しないため、遺伝的なマッピングは極めて容易である。

## 3. 遺伝子導入技術

### 3-1. アグロバクテリアを介する核ゲノムの形質転換

植物の形質転換法のなかでも、アグロバクテリアによる形質転換は効率的かつ簡便である。当初は





図4. アグロバクテリウムを介するゼニゴケ形質転換

アグロバクテリアを用いたゼニゴケの形質転換は困難であった。実験室において比較的微生物混入の少ない胞子の採集が可能となったことがきっかけとなり、形質転換が容易になった。胞子から培養したゼニゴケ Sporelings は盛んに分裂しており、アグロバクテリアによる形質転換に適した材料である (Ishizaki et al. 2008)。液体培地のなかで胞子を発芽させ、5日目の Sporelings を準備する。ここにアグロバクテリアを加え、2日間の共存培養によって感染させる。本来、ゼニゴケはアグロバクテリアの感染宿主ではないが、アセトシリシリンゴンの添加によって効率的な感染が可能となる。共存培養後、洗浄によってアグロバクテリアを除去し、選抜用の薬剤を含む選抜培地上でゼニゴケを培養する。この極めて単純で容易な操作によって、多数の形質転換体を得られる (図4)。我々の研究室では1胞子囊から1,000近い数の形質転換体を得ている。取り扱う胞子数を増やせば、スケールアップも可能である。形質転換実験法の詳細な解説は石崎・河内 (2008) を参照されたい。

ゼニゴケの Sporelings を用いた形質転換が効率的であることや、半数体世代を対象としていることを活かして、T-DNA を変異原および変異のタグとして利用することが可能となった。ゼニゴケのゲノムサイズ、平均的遺伝子サイズおよびT-DNA の挿入数をもとに試算したところ、全くバイアスなくT-DNA が挿入される場合、約70,000の独立した形質転換体ですべての遺伝子が一度は破壊されることが予想された。また、90%の期待値で全遺伝子を網羅するには、約20万系統の形質転換個体を扱うことになる計算された。これまでに、形態的な変異体を複数分離し、そのなかのモデルケースとして気室をまったく形成しない変異体を選び、その原因遺伝子をT-DNA をタグとして同定した (増田晃秀, 水谷未耶, 石崎公庸 未発表データ)。また、ゼニゴケが高濃度のオーキシシンで枯死することを利用して、オーキシシン低感受性変異体のスクリーニングを行った。生き残るものを選抜する強制的なスクリーニング方法であれば、ひとりの研究者でも比較的容易に網羅的なT-DNA 変異体スクリーニングが可能である。計算上20万形質転換体を作成し、高濃度オーキシシン含有培地で生存する変異体を10数系統取得した。TAIL-PCR を行ったところ、転写活性化タイプのオーキシシン応答転写因子 (ARF+) 遺伝子が独立に破壊された2株に加えて、興味深い遺伝子にタグが入った様々な系統が得られた (武田真由子, 石崎公庸ら 未発表データ)。

Sporelings を材料とする形質転換は効率的であるが、特定の遺伝的背景をもつ系統にさらに形質転換するには、胞子を準備するための時間を要するといった課題があった。タバコ形質転換が切断した葉

を利用するようにゼニゴケ葉状体を切断してだけでは、効率的なアグロバクテリア形質転換は起きなかった。光応答の研究から葉状体の切断面における再生過程では、光依存的に細胞分裂を誘導できることがわかった。この段階の細胞は分裂が活発であることに注目し、再生中の葉状体を対象にアグロバクテリアの感染を行った。切断処理後、明条件で数日培養して分裂の活発な細胞を含む葉状体を材料にすることで安定して形質転換体を得られた。胞子を使った方法と比較すると、独立した形質転換システムを多数作成するには不向きであるものの、数十の形質転換体を得られればよいような多くの実験に利用できる実用的な方法である(久保田茜, 石崎公庸, 未発表)。現時点で、最初に利用したハイグロマイシンを含めて4つの選抜マーカーがゼニゴケ形質転換に利用可能である(上田実, 石崎公庸, Sandy Floyd ら 未発表)。過剰発現株の作成や相補性検定を行う場合、あるいは特定の突然変異体や形質転換体に遺伝子を導入する場合の方法として有用である。

アグロバクテリアを介したゼニゴケの形質転換当代の個体においては、細胞がキメラ状態で存在することもあるようである。通常の植物形質転換では、交配によって種子を得て、形質転換当代の T1 から T2, T3 と世代を回して、解析に適したホモ接合体系統を確立する。ゼニゴケでは、半数体であることと無性芽が1細胞に由来するクローンであるため、T1 個体から無性芽を分離して(原則的にひとつの T1 から1系統だけ分離する)、純系を確立できる。これは、無性芽 (gemma) の第一世代ということで、G1 と呼んでいる(便宜上、世代と呼ぶが減数分裂は経ていないことに注目)。G1 世代は系統として維持するとともに、ひとつの G1 個体から得られる G2 世代を均一な材料として実験に供している(図5)。無性芽を介する増殖は迅速であるため、短期間に遺伝的な状態を維持したままで解析可能な状態となる。ゼニゴケは、比較的容易に純系としての形質転換体を得ることできるユニークな実験系であると言える。

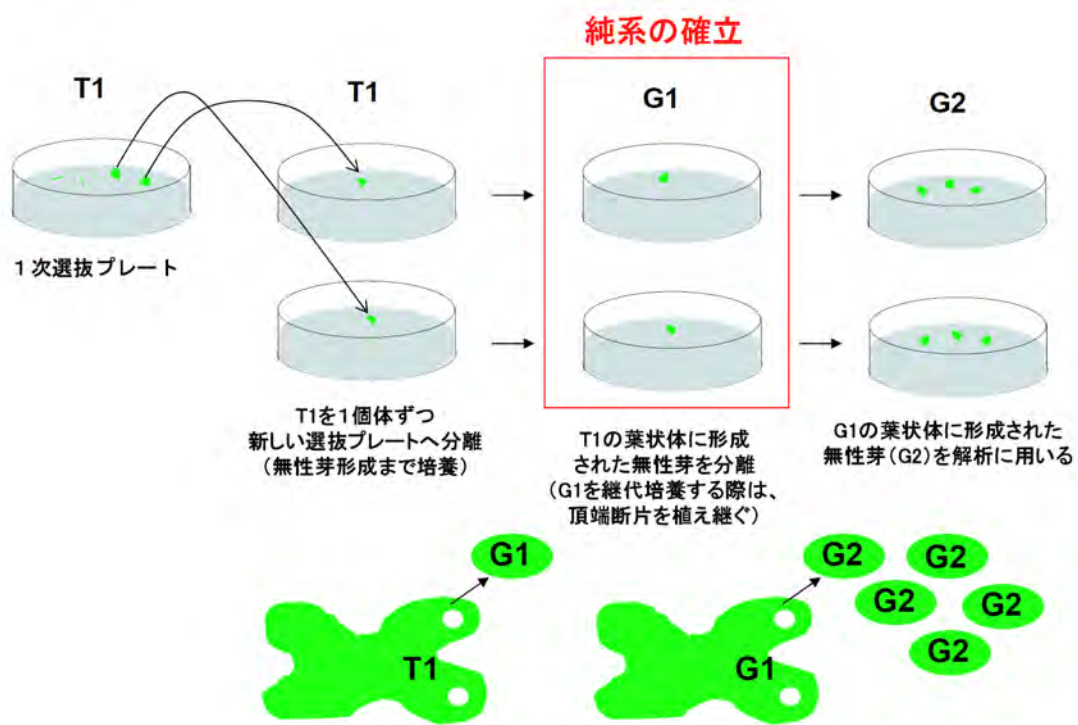


図5. 無性芽による純系の確立

### 3-2. 相同組換えによる遺伝子破壊

逆遺伝学的な遺伝子機能解析には、相同組換えを利用した遺伝子ターゲティングが強力な手段となる。ヒメツリガネゴケは、高い頻度で相同組換えを起こすことが知られているが、ゼニゴケには当てはまらないようである。これがセン類とタイ類の違いと一般化できるかは不明である。飯田らはイネを材料に効率的な遺伝子破壊システムの選抜方法を開発した (Terada et al. 2007)。これは、薬剤耐性の選抜マーカー遺伝子を2つの相同性部分で挟み、さらに外側に負の選択マーカー (この場合は、1細胞毒である DTA 遺伝子) を配置した T-DNA コンストラクトを用いることにより、通常の T-DNA のランダムな挿入による形質転換を排除するというものである。比較ゲノム解析に相同性組換えは必須のツールと考えられたので、この手法をゼニゴケに応用した。2011年の半ばに、最初の成功例が出てから、この手法によって現在までに約 20 遺伝子が破壊されている (石崎ら 未発表)。PCR 法を用いて目的の形質転換体を同定する必要があるが、得られた薬剤耐性株の約 2% が正しく遺伝子破壊されたものである。手法的には改善の余地はあるものの、200 個体ほどの候補株より DNA を抽出して PCR を行えば、ほぼ確実に遺伝子破壊株を同定できるようになった。

### 3-3. 葉緑体ゲノムへの形質転換

植物細胞には核の他に、葉緑体とミトコンドリアにゲノムが存在する。葉緑体ゲノムは、植物細胞の光合成機能に重要な遺伝子を中心に 120 あまりの遺伝子がコードされる。光合成においては、核ゲノムと葉緑体ゲノムの協調的な発現が重要である。一般的に、葉緑体 DNA での遺伝子破壊は、相同組換えを利用している。クラミドモナス葉緑体で変異を相補するといった選抜方法で報告された (Boynton et al. 1984)。現在では、タバコ、ヒメツリガネゴケなどにおいて、スペクチノマイシン耐性遺伝子といった選抜マーカー遺伝子を挟む形の相同領域を与えたコンストラクトをパーティクルガン法などの物理的な手法で細胞内の葉緑体に導入して選抜する方法が確立している。モデル植物シロイヌナズナでは葉緑体形質転換は確立していない。同様の手法をゼニゴケ培養細胞および植物体で応用したところ、形質転換体を比較的容易に得ることに成功した (Chiyoda et al. 2007, Chiyoda et al. 2008, 千代田・河内 2008)。実際に、この方法を用いて葉緑体遺伝子の機能解析が行われている (Ueda et al. 2012)。葉緑体 DNA は多コピーであるため、すべてのコピーを破壊 DNA に置き換えたホモプラストミックな系統作成に時間を要するのが一般的である。しかしゼニゴケでは、Sporelings を対象として単離した形質転換体が最初からホモプラズミックである場合もあった (Chiyoda et al. 2008)。分離当初はヘテロな状態であっても無性芽の培養を経ることでホモプラストミックなラインを迅速に分離することが可能である (鹿内ら 私信)。

## 4. 突然変異体の分離

シロイヌナズナでは多数の突然変異体が分離され、様々な生命現象の理解に大きく貢献した。突然変異体の分離は、生命現象の理解に重要な方法である。ヒメツリガネゴケの EST 解析から、陸上植物は成立当初からさまざまな種類の遺伝子を保持していることが示されている (Nishiyama et al. 2003)。これは近年のヒメツリガネゴケやイヌカタヒバといった基部植物のゲノム解析からも支持されている (Rensing et al. 2008, Banks et al. 2011)。ゼニゴケも被子植物がもつ器官をもたないものの、遺伝子レベルでは基本的な遺伝子セットを保持していることが示されている (大和勝幸 2012)。また、ゼニゴケ

は進化の過程で染色体レベルでの倍化を経験したことがないと予想され、制御因子における遺伝的な冗長性がヒメツリガネゴケと比べても低いことが示されている。この傾向は特に制御系遺伝子で顕著である。つまり、ゼニゴケは古典的な突然変異体の分離に加えて、ゲノム解析からも分子遺伝学に適した材料であることが示唆されている。

シロイヌナズナでは遺伝子の冗長性のため単一変異体の表現型が明瞭でない事例も多数報告されている。例えば、光形態形成における負の転写因子である PIF ファミリーは複数の遺伝子が冗長的に作用する (Leivar et al. 2008)。これに対して、ゼニゴケの PIF 様遺伝子は単一コピーであり、遺伝子を破壊すると正常な光形態形成が起こらない (井上佳祐ら 未発表)。この例が示すように、基本的な生命現象の分子機構の理解にゼニゴケの突然変異体が役立つ可能性がある。

前述の Burgeff の成書 (1943)には、当時既にゼニゴケ属の突然変異体が分離されて解析されていることが報告されている。興味深い形態を示すものや遺伝的背景のものも多い。これらは貴重な変異体であるが、現在では入手不能であることと野外から分離されたため遺伝的背景が不明であるのが残念なところである。

現在、条件的には改善の余地はあるが、ゼニゴケの胞子をガンマ線や EMS などの変異原によって処理して変異体を単離することが可能である (石崎公庸ら 未発表)。ゼニゴケを用いる最大の利点は、前述の遺伝的な冗長性が低いことに加えて、通常扱う配偶体世代が半数体であり、優性や劣性といった区別なく突然変異体が当代で分離できることである。これまでに、オーキシンの感受性が低下した変異体や青色光屈性が低下した変異体の分離に成功している。光屈性の変異体のなかには、青色光受容体 phot に変異をもつものが含まれていた (小松愛乃ら 未発表)。形質転換の項で述べたように、アグロバクテリアを介する形質転換で挿入される T-DNA を変異タグとして変異体を分離することも可能となっている。今後は、多数の変異体を収集して、実験に自由に供する体制を作ることが重要である。

## 5. 展望

ゼニゴケには遺伝学研究の長い歴史があるが、現代的な分子遺伝学研究は始まったばかりである。ゼニゴケが真に優れたモデル生物となるには、いくつかの課題がある。

材料としての扱いは、それぞれの生物種に固有の問題がある。ゼニゴケは雌雄異株であるため、変異表現型観察をする際には性差・個体差に注意が必要である。また、ゼニゴケ組織はシロイヌナズナに比べて硬く、さまざまな化合物を蓄積しているため、ゼニゴケから生体分子を単離して解析するためには工夫が必要である。

また、細胞生物学的な観察は成果があがりつつあるが (恵良・上田 2012)、細胞の観察も非常に見やすい細胞から多層構造のため見づらい細胞まで存在する。見える細胞を増やすため、観察方法には工夫が必要である。栽培法にも改良の余地がある。実験室環境では、プレート培養による無菌的な栽培が可能となっているが、湿度の高さが原因か、稔性をもたない。稔性のある個体を得て交配するためには、オープンな環境での栽培が必要である。水やりを必要としないプレート培養に比べて、オープンな栽培はやや手間がかかり、研究場所をセットアップするうえで、ハエや藍藻との戦いや胞子の飛散といったトラブルもある。交配後は容器にいれて胞子の飛散を防いでいるが、無菌的な環境で生活史が完結する方法の開発が望まれる。

ゼニゴケの発生に関する古典的な記述は充実しているが、発生の指標となるマーカー遺伝子は不足しており、細胞や分子について着目した発生系譜の理解が不足している。今後の進化発生学的な研究に大いに期待したい (澤ら 2012, 荒木 2012)。また、突然変異体の種類もまだ少なく、これから充実させる必要がある。リソースの共有に関しても、ストックセンターとしての拠点はなく、研究者による突然変異体の収集と共有が課題となっている。

何よりも、ゼニゴケを現代の植物科学研究の実験材料とした研究は始まったばかりである。これからは研究の知見を蓄積し、情報を共有することが大切である。現在、さまざまな生命現象やプロテオミクス、イメージングといった新技術を専門とする研究者もゼニゴケに興味をもつようになってきている。ゲノム情報はもとより総合的にゼニゴケ研究を支援する統合的なデータベースの開発は必須である。

植物科学研究の最先端を行くシロイヌナズナと比較しながら、陸上植物進化に思いを巡らせて、ゼニゴケを材料にさまざまな研究を比較的労力をかけずに進めることは、非常に楽しいものである。また、次世代シーケンサーに代表される解析技術の進歩によって、多様性の視点からさまざまなゼニゴケ accession や近縁のコケ植物を材料にして研究することが可能となってきた。モデル植物が広がりを見せるなかで、ゼニゴケのデータを有効に利用して効率的に解析することも期待される。陸上植物の普遍性と多様性を実験的に解析できる実験系として、ゼニゴケの可能性を信じている。

## 謝辞

本研究は、文部科学省および学術振興会の科学研究費補助金をもとに進めた。ゲノムの解析は米国エネルギー省 Joint Genome Institute, オーストラリア Monash 大学 John Bowman 博士, 遺伝学研究所を中心とした新学術領域研究ゲノム支援グループ, 近畿大学大和勝幸博士らとの共同研究である。相同性組換えによる遺伝子破壊は、静岡県立大学飯田滋博士や定塚(久富)恵世博士との共同研究である。広島大学の嶋村正樹博士, 京都大学の荒木崇博士には研究全般に様々なアドバイスをいただいている。また、本文のなかで言及したメンバーに限らず、研究室に所属するスタッフや大学院生はそれぞれの研究を進めながらゼニゴケの研究基盤の確立に貢献している。ここですべての共同研究者の名前を上げるスペースはないが、共同研究を通じて多数のゼニゴケコミュニティの研究者に支援を受けている。記して感謝したい。

## 引用文献

- 荒木崇 2012. 植物固有の転写因子 LEAFY とゼニゴケの有性生殖. *BSJ Review*.
- Banks, J. A., Nishiyama, T., Hasebe, M. et al. 2011. The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332: 960-963.
- Barnes, C. R., & Land, W. J. G. 1908. The origin of the cupule of *Marchantia*. *Bot. Gazette* 46: 401-409.
- Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., Randolph-Anderson, B. L., Robertson, D., Klein, T. M., Shark, K. B., & Sanford, J. C. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538.
- Burgeff, H. 1943. *Genetische Studien an Marchantia*. Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- Chiyoda, S., Linley, P. J., Yamato, K. T., Fukuzawa, H., Yokota, A., & Kohchi, T. 2007. Simple and efficient plastid transformation system for the liverwort *Marchantia polymorpha* L. suspension-culture cells. *Transgenic Res.*

16: 41-49.

- Chiyoda, S., Ishizaki, K., Kataoka, H., Yamato, K. T., & Kohchi, T. 2008. Direct transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. by particle bombardment using immature thalli developing from spores. *Plant Cell Rep.* 27: 1467-1473.
- 千代田将大・河内孝之 2008. 光合成研究法, 5-3b ゼニゴケの培養細胞と植物体のプラスチド形質転換法. *低温科学* 67: 601-606.
- Ishizaki, K., Shimizu-Ueda, Y., Okada, S., Yamamoto, M., Fujisawa, M., Yamato, K.T., Fukuzawa, H., & Ohyama, K. 2002. Multicopy genes uniquely amplified in the Y chromosome-specific repeats of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Nucl. Acids Res.* 30: 4675-4681.
- Ishizaki, K., Chiyoda, S., Yamato, K. T., & Kohchi, T. 2008. Agrobacterium-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant Cell Physiol.* 49: 1084-1091.
- 石崎公庸・河内孝之 2008. 光合成研究法, 5-3a アグロバクテリウムによるゼニゴケ核ゲノム形質転換法. *低温科学* 67: 597-600.
- 恵良厚子・上田貴志 2012. ゼニゴケ細胞生物学 *BSJ Review* 3: 114-121.
- Kny, L. 1890. Bau und Entwicklung von *Marchantia polymorpha* L. In *Botanische Wandtafeln mit Erläuterndem Text* pp. 364-401. Verlag von Wiegandt, Hempel & Parey, Berlin.
- Kubata, A., Ishizaki, K., Hosaka, M., & Kohchi, T. 2012. Efficient Agrobacterium-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press.
- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Huq, E., & Quail, P.H. 2008. Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature photomorphogenesis during early seedling development in darkness. *Current Biol.* 18: 1815-1823.
- Lloyd, C.E., & Steinmetz, F.H. 1937. Temperature as a factor influencing the sexual response of *Marchantia*. *Americ. J. Bot.* 24: 423-425.
- Nishiyama, T., Fujita, T., Shin-I, T., Seki, M., Nishide, H., Uchiyama, I., Kamiya, A., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., Kohara, Y., & Hasebe M. 2003. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 8007-8012.
- Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Takemura, M., Nozato, N., Akashi, K., Kanegae, T., Ogura, Y., Kohchi, T., & Ohyama, K. Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. A primitive form of plant mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 223: 1-7.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H., & Ozeki, H. 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574.
- Okada, S., Fujisawa, M., Sone, T., Nakayama, S., Nishiyama, R., Takenaka, M., Yamaoka, S., Sakaida, M., Kono, K., Takahama, M., Yamato, K.T., Fukuzawa, H., Brennicke, A., & Ohyama, K. 2000. Construction of male and female PAC genomic libraries suitable for identification of Y-chromosome-specific clones from the liverwort, *Marchantia polymorpha*, *Plant J.* 24: 421-428.

- Okada, S., Sone, T., Fujisawa, M., Nakayama, S., Takenaka, M., Ishizaki, K., Kono, K., Shimizu-Ueda, Y., Hanajiri, T., Yamato, K.T., Fukuzawa, H., Brennicke, A., & Ohyama, K. 2001. The Y chromosome in the liverwort *Marchantia polymorpha* has accumulated unique repeat sequences harboring a male-specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9454-9459.
- Ono, K. 1976. Cytological observations of calluses and restored thalluses in *Marchantia polymorpha*. *Jpn. J. Genet.* 51: 11-18.
- Qui, Y.L., Li, L., Wang, B., Chen, Z., Knoop, V., Groth-Malonek, M., Dombrowska, O., Lee, J., Kent, L., Rest, J., Estabrook, G.F., Hendry, T.A., Taylor, D.W., Testa, C.M., Ambros, M., Crandall-Stotler, B., Duff, R.J., Stech, M., Frey, W., Quandt, D., & Davis, C.C. 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 15511-15516.
- Rensing, S. A., Lang, D., Zimmer, A. D. et al. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69.
- Sakakibara, K., Nishiyama, T., Deguchi, H., & Hasebe, M. 2008. Class 1 KNOX genes are not involved in shoot development in the moss *Physcomitrella patens* but do function in sporophyte development. *Evol. Dev.* 10: 555-566.
- Sano, R., Juárez, C.M., Hass, B., Sakakibara, K., Ito, M., Banks, J.A., & Hasebe, M. 2005. KNOX homeobox genes potentially have similar function in both diploid unicellular and multicellular meristems, but not in haploid meristems. *Evol. Dev.* 7: 69-78.
- 澤進一郎・本田紘章・田畑亮 2012. *MpCLE1* 遺伝子の機能解析. *BSJ Review* 3: 129-133.
- 嶋村正樹 2012. ゼニゴケの分類学と形態学. *BSJ Review* 3: 84-113.
- Terada, R., Johzuka-Hisatomi, Y., Saitoh, M., Asao, H. & Iida, S. 2007. Gene targeting by homologous recombination as a biotechnological tool for rice functional genomics. *Plant Physiol.* 144: 846-856.
- Ueda, M., Kuniyoshi, T., Yamamoto, H., Sugimoto K., Ishizaki, K., Kohchi, T., Nishimura, Y., & Shikanai, T. 2012. Composition and physiological function of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Marchantia polymorpha*. *Plant J.* 72: 683-693.
- Wann, F.B. 1925. Some of the factors involved in the sexual reproduction of *Marchantia polymorpha*. *Americ. J. Bot.* 12: 307-318.
- Yamato, K. T., Ishizaki, K., Fujisawa, M., Okada, S., Nakayama, S., Fujishita, M., Bando, H., Yodoya, K., Hayashi, K., Bando, T., Hasumi, A., Nishio, T., Sakata, R., Yamamoto, M., Yamaki, A., Kajikawa, M., Yamano, T., Nishide, T., Choi, S. H., Shimizu-Ueda, Y., Hanajiri, T., Sakaida, M., Kono, K., Takenaka, M., Yamaoka, S., Kuriyama, C., Kohzu, Y., Nishida, H., Brennicke, A., Shin-i, T., Kohara, Y., Kohchi, T., Fukuzawa, H. & Ohyama, K. 2007. Gene organization of the liverwort Y chromosome reveals distinct sex chromosome evolution in a haploid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104: 6472-6477.
- 大和勝幸・石崎公庸・河内孝之 2008. 光合成研究法, 1-4 ゼニゴケの培養法. *低温科学* 67: 23-30.
- 大和勝幸・河内孝之 2012. ゼニゴケゲノム. *BSJ Review* 3: 71-83.

## 見えてきたゼニゴケゲノム

大和勝幸<sup>1</sup>・河内孝之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>近畿大学生物理工学部

〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

<sup>2</sup>京都大学大学院生命科学研究科

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

The “sneak” preview of the *Marchantia polymorpha* genome

Key words: bryophyte, genetic redundancy, liverwort

Katsuyuki T. Yamato<sup>1</sup>, Takayuki Kohchi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnological Science

Kinokawa 649-6493, Japan

<sup>2</sup>Graduate School of Biostudies, Kyoto University

Kyoto 606-8502, Japan

新しいモデル植物として期待されている基部陸上植物ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) のゲノム解読が進んでいる。これまでシロイヌナズナやイネなどの被子植物をはじめとする様々な植物種のゲノムが解読・比較され、陸上植物ゲノムのなりたちが明らかになってきた。しかし、植物の陸上進出を考える上で重要な位置にある基部陸上植物のゲノム情報は、今のところヒメツリガネゴケのものに限られている。本総説では、ゼニゴケゲノムの「スニーク・プレビュー」を行い、陸上植物ゲノムのなりたちを考察するための新たな材料を提供したい。

### 1. ゼニゴケにおける「ゲノム」研究

植物で初めてその全ゲノムが決定されたのはシロイヌナズナである (The Arabidopsis Genome Initiative 2000)。その後、イネ (International Rice Genome Sequencing Project 2005) などの作物のゲノムが順次明らかにされ、さらにはヒメツリガネゴケ (Rensing et al. 2008) といったモデル植物のゲノムについても解読されてきた。本稿執筆時点で 30 以上の陸上植物種のゲノム情報が公開されている (<http://www.phytozome.net/>, <http://www.plantgdb.org/>など) ことを考えると、ゼニゴケのゲノム研究は後塵を拝した感が否めない。しかし、オルガネラゲノムを含む広い意味でゲノムを捉えた場合、植物におけるゲノム研究においてゼニゴケはむしろ先陣を切っていたと見こともできる。

1986 年、ゼニゴケ (Ohyama et al. 1986) とタバコ (Shinozaki et al. 1986) の葉緑体ゲノムの全塩基配列が相次いで解読された。それぞれのサイズは約 120 kb と約 160 kb であり、当時既に明らか



になっていたヒトのミトコンドリアゲノムの約 16 kb (Anderson et al. 1981) や入フェージゲノムの約 50 kb (Sanger et al. 1982) と比較しても格段に大きい。葉緑体ゲノム初の解読は、葉緑体をもつ個々の遺伝子ではなく、遺伝情報の全体像に注目した点でいわゆるゲノム研究と同じ視点に立っていたと言える。

1992 年、植物としては初めてゼニゴケでミトコンドリアゲノムの全塩基配列が明らかになり (Oda et al. 1992), ゼニゴケは葉緑体およびミトコンドリア両方のゲノムが解読された初の生物種となった。このように、ゼニゴケでは植物細胞に存在する 3 種のゲノムのうち 2 種が最初に解読されており、ゼニゴケを用いたオルガネラゲノム研究は植物ゲノム研究の「はしり」と位置付けることができる。

2007 年、ゼニゴケがもつ染色体の中では最も小さい Y 染色体 (約 10 Mb) のゲノムが明らかになった (Yamato et al. 2007, 大和勝幸 2009)。これは植物性染色体としては初めて、半数体生物の性染色体としても初めて、Y 染色体としてもヒト (Skaletsky et al. 2003) およびチンパンジー (Kuroki et al. 2006) に次ぐ 3 番目であった。

2008 年、ゼニゴケの「残されたゲノム」(常染色体および X 染色体) の解読が始まった。これは米エネルギー省 Joint Genome Institute (JGI), 豪 Monash 大学の John Bowman ら, 京都大学の河内孝之らをコアとする国際共同研究である (<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/99191.html>)。現在では、遺伝学研究所の中村保一らも加わり、ゲノム情報基盤の整備に向けて動きが加速している。

本総説では、ゼニゴケのモデル植物としての実験基盤がほぼ確立されていることを踏まえ (河内孝之・石崎公庸 2012), モデル植物としてのゼニゴケゲノムの特徴をゲノムプロジェクトの進捗状況やゲノムリソースとともに紹介する。

## 2. パイロット・クローンから見たゼニゴケゲノム

JGI では、対象ゲノムの基本情報を得るため、大規模シーケンシングを開始する前にパイロットスケールでシーケンシングを行っている。ゼニゴケの場合、雄株の P1 由来人工染色体 (PAC) ライブラリ (Okada et al. 2000) より選んだ 30 クローンについて塩基配列を決定し、ゼニゴケゲノムを評価した。これらのパイロット・クローンはいずれも常染色体に由来し、20 クローンは PAC ライブラリから任意に選ばれて JGI で解析された。残りの 10 クローンについては国内の研究者が各々の興味に基づいて選び、それぞれ分担で解析された。

パイロット・シーケンシングの結果を表 1 に示す。今回解析した PAC クローンのインサートサイズの合計は約 3.3 Mb であり、これは約 280 Mb と見積もられているゲノムサイズ (Okada et al. 2000) の約 1% に相当する。ゼニゴケゲノム DNA の GC 含量は 40% 前後であり、少なくとも今回解析した PAC クローン間では大きなばらつきはなかった。また、シーケンシングやアセンブリングの障害となる大小の反復配列もほとんど見られなかった。レトロトランスポゾンを中心とする転移因子も 1 クローンを除いて少なく、100 kb に 1 個程度の頻度であった。以上の結果より、ゼニゴケゲノムの解読に特段の困難はないと判断された。実際、筆者らも各クローンのショットガン・データをアセンブルしてみたが、多数の転移因子を含む 1 クローンを除いては良好な結果が得られている。

表1 パイロット・シーケンシングのまとめ

| Clone         | Length (kb) | GC%  | Estimated number of genes | Gene density (per 10 kb) | TE* density (per 10 kb) | tRNA gene              |
|---------------|-------------|------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| pMM24-53F7    | 133         | 41.0 | 13                        | 1.0                      | 2                       |                        |
| pMM23-591A3   | 48          | 42.9 | 3                         | 0.6                      | 0                       |                        |
| pMM23-245C5   | 96          | 41.2 | 6                         | 0.6                      | 0                       |                        |
| pMM23-619A2   | 129         | 42.6 | 7                         | 0.5                      | 1                       | H(GTG)                 |
| pMM23-432E3   | 66          | 44.9 | 6                         | 0.9                      | 0                       |                        |
| pMM23-90H5    | 118         | 44.1 | 9                         | 0.8                      | 1                       |                        |
| pMM23-136B7   | 110         | 41.0 | 4                         | 0.4                      | 3                       |                        |
| pMM23-679E2   | 117         | 41.7 | 6                         | 0.5                      | 3                       |                        |
| pMM24-60A8    | 87          | 38.9 | 4                         | 0.5                      | 3                       |                        |
| pMM23-293A4   | 170         | 39.4 | 12                        | 0.7                      | 3                       |                        |
| pMM23-040-G3  | 97          | 41.3 | 12                        | 1.2                      | 0                       |                        |
| pMM23-065-F6  | 86          | 44.3 | 7                         | 0.8                      | 1                       | C(GCA)                 |
| pMM23-108-D2  | 118         | 41.9 | 10                        | 0.8                      | 1                       |                        |
| pMM23-163-G12 | 117         | 42.6 | 8                         | 0.7                      | 2                       |                        |
| pMM23-241-G5  | 54          | 47.1 | 3                         | 0.6                      | 1                       |                        |
| pMM23-298-A3  | 104         | 42.3 | 5                         | 0.5                      | 2                       |                        |
| pMM23-322-A9  | 77          | 38.4 | 6                         | 0.8                      | 1                       |                        |
| pMM23-493-F4  | 140         | 40.6 | 11                        | 0.8                      | 1                       | D(GTC)                 |
| pMM23-493-H3  | 131         | 41.7 | 12                        | 0.9                      | 2                       |                        |
| pMM23-493-H9  | 97          | 42.6 | 8                         | 0.8                      | 1                       |                        |
| pMM23-494-B9  | 120         | 39.0 | 8                         | 0.7                      | 1                       |                        |
| pMM23-494-D2  | 85          | 43.0 | 8                         | 0.9                      | 1                       | V(CAC), D(GTC), M(CAT) |
| pMM23-494-F10 | 106         | 41.8 | 9                         | 0.8                      | 1                       |                        |
| pMM23-494-F11 | 147         | 43.0 | 7                         | 0.5                      | 2                       |                        |
| pMM23-495-F10 | 119         | 43.6 | 9                         | 0.8                      | 0                       |                        |
| pMM23-498-C1  | 129         | 43.8 | 8                         | 0.6                      | 0                       |                        |
| pMM23-498-D12 | 116         | 41.7 | 14                        | 1.2                      | 0                       |                        |
| pMM23-498-F2  | 111         | 51.7 | 0                         | 0.0                      | many                    |                        |
| pMM23-539-E1  | 119         | 40.5 | 13                        | 1.1                      | 2                       |                        |
| pMM24-013-G6  | 111         | 42.6 | 7                         | 0.6                      | 1                       |                        |
|               | 3,260       | 42.4 | 235                       | 0.7                      | 0.1                     |                        |

\* transposable element

次に、データベースに登録されているアミノ酸配列に対する類似性検索およびゼニゴケ EST(表2)のマッピングを行い、タンパク質コード領域を推測した。多数の転移因子を含む1クローン以外では複数のタンパク質遺伝子が見いだされ、その密度は10 kb 当たり約0.7であった。これはシロイヌナズナの10 kb 当たり2.3 (TAIR10に基づく)より低い。パイロット・クローンの1つである pMM23-619A2 の遺伝子地図を図1に示すが、遺伝子の分布がやや「まばら」であることがわかる。ゼニゴケの総遺伝子数は明らかではないが、EST データからは18,000~20,000であると推測される。これは、パイロット・クローンのデータから推測される遺伝子密度約0.7/10 kb (=20,000 個/280 Mb) とよく一致する。

表2 EST リソース

| ライブラリ              | シーケンス法  | 系統                           | 性別  | 組織           | 数         |
|--------------------|---------|------------------------------|-----|--------------|-----------|
| rlwa               | dideoxy | Tak-1                        | ♂   | 葉状体          | 17,592    |
| rlwb, M01          | dideoxy | Tak-1                        | ♂   | 雄器托 (成熟)     | 16,130    |
| F01                | dideoxy | 野生群落                         | ♀   | 雌器托 (初期)     | 671       |
| lwc <sup>1)</sup>  | dideoxy | Tak-1                        | ♂   | 葉状体          | 66,892    |
| lwd <sup>1)</sup>  | dideoxy | F <sub>1</sub> (Tak-2/Tak-1) | ♂/♀ | 幼葉状体         | 66,750    |
| lwe <sup>1)</sup>  | dideoxy | Tak-1                        | ♂   | 葉状体 (暗所)     | 65,741    |
| lwf <sup>1)</sup>  | dideoxy | BC4 <sup>3)</sup>            | ♀   | 葉状体 (遠赤色光補光) | 66,140    |
| CGGW <sup>2)</sup> | pyro    | 野生群落                         | ♂/♀ | 雄器托+雌器托      | 1,243,241 |
| CGGX <sup>2)</sup> | pyro    | 野生群落                         | ♀   | 胞子体+雌器托      | 976,634   |
| Anth               | pyro    | Tak-1                        | ♂   | 雄器托          | 690,003   |

1) 完全長 c DNA クローンの両末端を決定

2) JGIによる

3) Tak-2株にTak-1株を4回戻し交配

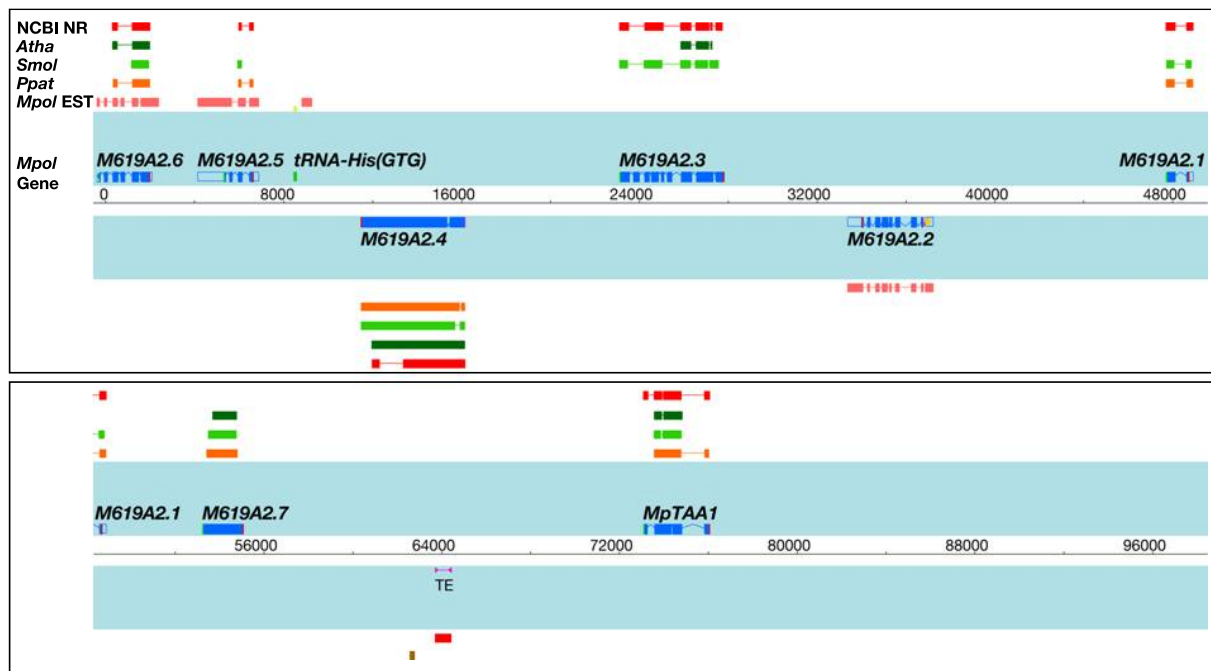


図1 パイロット・シーケンシングに用いられた pMM23-619A2 の概要

数字を付した横線は pMM23-619A2 の配列を示し、上下の水色の領域にあるボックスは推定エクソンを、推定エクソンのうち塗りつぶした部分はコード領域を示す。白色の領域にあるボックスは以下の配列に対する類似領域を示す: NCBI NR, NCBI non-redundant protein sequences; Atha, Smol および Ppat, シロイヌナズナ, イヌカタヒバおよびヒメツリガネゴケの遺伝子モデル; Mpol EST, ゼニゴケ EST。

パイロット・クローンのうち、4 クローンで合計 6 個の tRNA 遺伝子が見いだされた。ゼニゴケ核ゲノムに存在する tRNA 遺伝子の詳細については今後の解析が待たれる。また、遺伝子発現調節に関わる miRNA などの低分子 RNA についても、陸上植物で保存されているものが一部見いだされているが (Floyd and Bowman 2004) , 全容は明らかではない。なお、ゼニゴケの rRNA 遺伝子は、他の真核生物同様クラスターを形成しており、常染色体に 9 箇所、X 染色体に 1 箇所存在することが示されている (Fujisawa et al. 2003, Sone et al. 1999) 。

### 3. 遺伝地図

JGI によって提供されるゲノムデータの整理化や、変異体の遺伝子マッピングを行うため、標準系統 Takaragaike-1 株および Kitashirakawa-2 株 (河内孝之・石崎公庸 2012) に見られる多型を利用して遺伝地図を作成した (図 2)。この時、上記の 30 個のパイロット・クローンを含む PAC クローンより作成した多型マーカー 31 個、そしてゼニゴケ EST および遺伝子の配列より作成した dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequences) および SSR (simple sequence repeats) マーカー 78 個を用いた (友金寛和ら, 未発表データ)。合計 109 個のマーカーは、ゼニゴケの常染色体数と同じである 8 個の連鎖群に収束し、それらの全長は約 900 cM となった。

遺伝地図の精度を上げるため、現在 JGI にて Takaragaike-1 株および Kitashirakawa-2 株を交配して得られた F<sub>1</sub> 集団の大規模シーケンシングが進行中である。さらに、国立遺伝学研究所において、対照系統である Kitashirakawa-2 株の次世代シーケンサによるデータが取得され、後述する JGI のゲノムデータとの比較が進められている。

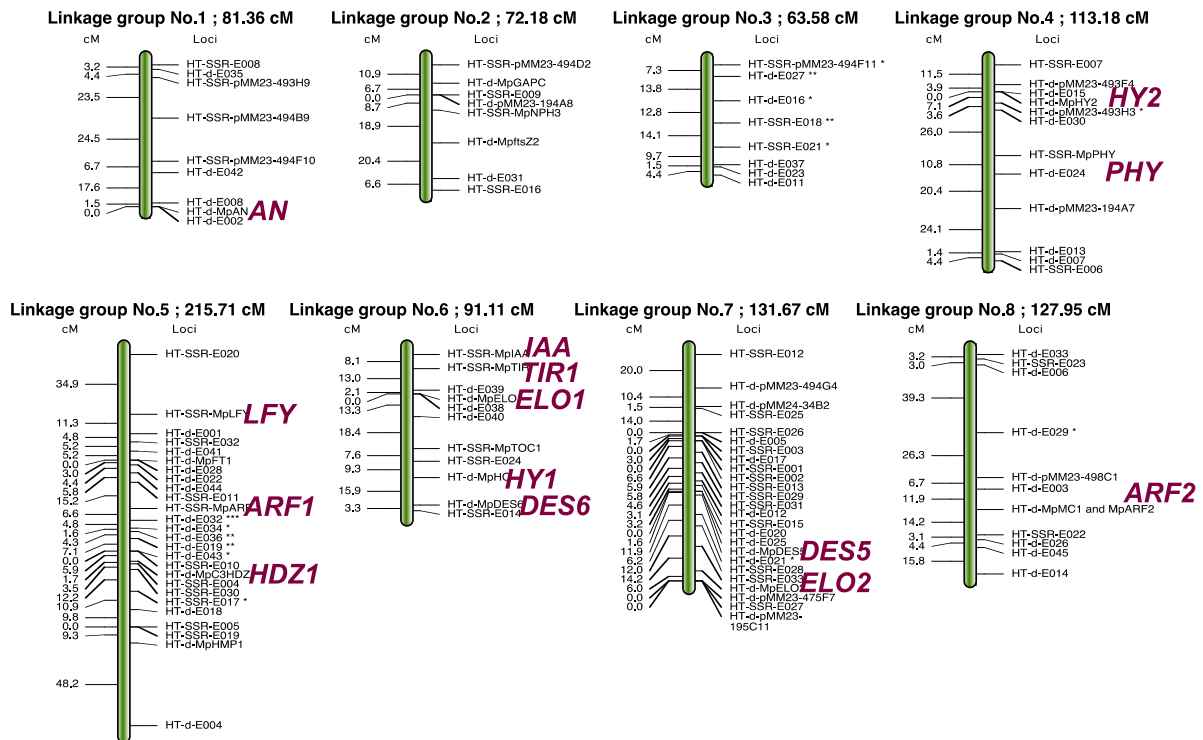


図 2 ゼニゴケの遺伝地図

標準系統 Takaragaike-1 株および Kitashirakawa-2 株に見られる多型を利用した遺伝地図。マーカーが作成されている一部の遺伝子についても地図中に示した。

#### 4. ドラフトゲノム

JGIによる大規模シーケンシングは、主に2種類のアプローチで実施されている。すなわち、サンガー法による Fosmid クローンの末端配列決定、そして次世代シーケンサ Roche GS-FLX による全ゲノムショットガンである。これまでに約 27x のゲノムカバレッジを達成し、2011年12月には暫定アセンブリ ver. 0.6 がコミュニティ内限定でリリースされている。アセンブリ ver. 0.6 におけるコンティグ数は約 8,400 で、その長さの合計は約 200 Mb、すなわちゲノムの約 70% がコンティグによってカバーされていることになる。また、遺伝地図作成に用いられた 109 個のマーカー、およびこれまでに単離している X 染色体連鎖マーカー 9 個の全てもマップすることができた。さらに、JGI で取得した EST の約 90% もマップできたことから、今回得られたアセンブリはゲノムの大半をカバーしていると期待することができる。

完全長 cDNA を暫定アセンブリにマッピングした予備的な解析により、ゼニゴケのタンパク質遺伝子の一般的な構造が見えてきた (表 3)。まず、エキソン-イントロン構造を見ると、遺伝子当たりのエキソン数はシロイヌナズナよりゼニゴケの方が少ない。これに関連して、ゼニゴケのエキソンはシロイヌナズナのものよりやや長い傾向を示している。しかし、筆者らがこれまで扱ってきた遺伝子を見る限り、ゼニゴケの遺伝子におけるイントロン挿入部位は、他の陸上植物遺伝子でも保存されているのが普通である。詳細は不明であるが、ゼニゴケではイントロンをもたない遺伝子の割合が多い可能性もある。一方で、イントロンおよび 5'/3' 非翻訳領域 (UTR) の長さはシロイヌナズナのものより顕著に大きく、その結果ゼニゴケの遺伝子の全長はシロイヌナズナのものより大きくなる傾向にある。これは、ゼニゴケゲノムにおける遺伝子密度がシロイヌナズナゲノムよりも低いことの一因となっている。

一般に、真核生物 mRNA の 5' 側から見て最初の AUG が開始コドンとなり、そこから翻訳が開始される。しかし、ゼニゴケの遺伝子では、他生物種オーソログとの比較から開始コドンであることが強く示唆される ATG の上流に、しばしば複数の ATG が見られる (図 3)。このような UTR-ATG には本来の読み枠にあるものもないものも含まれていることから、ゼニゴケの翻訳装置は正しい開始コドンを選ぶための何らかのしくみをもつと考えられる。現時点では、正しい開始コドン周辺の共通構造を含め、そのしくみは不明である。このことから、ゼニゴケの遺伝子の開始コドンを設定したり、5'UTR を含めた形で他生物種に導入する際には注意が必要である。

表 3 ゼニゴケおよびシロイヌナズナの遺伝子構造の比較

|                 | ゼニゴケ <sup>1)</sup> | シロイヌナズナ <sup>2)</sup> |
|-----------------|--------------------|-----------------------|
| エキソン数/遺伝子       | 4.7                | 5.9                   |
| 平均エキソン長 (bp)    | 351                | 296                   |
| 平均イントロン長 (bp)   | 432                | 165                   |
| 平均5'非翻訳領域長 (bp) | 379                | 152                   |
| 平均3'非翻訳領域長 (bp) | 470                | 237                   |

1) 6,406本の完全長cDNA配列をJGIドラフトゲノムにマップして推定。

2) TAIR10に基づく。

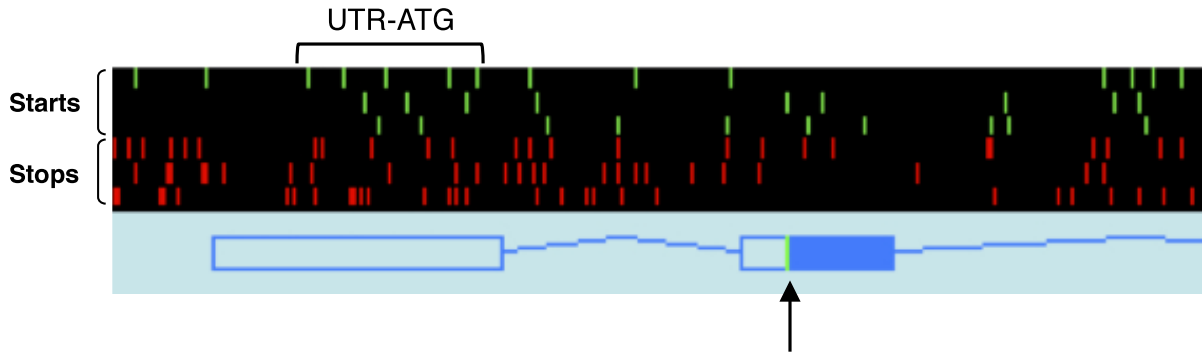


図3 ある遺伝子の5' 構造

この遺伝子の第2エクソンに、他生物種のオーソログとの類似性から推定される開始コドンが存在する（矢印）。しかし、推定開始コドンの上流には10個のATGが存在する。

## 5. 冗長性の低い遺伝子構成

これまでに得られたゼニゴケ EST およびゲノム情報から見てきたことの中で、モデル植物としておそらく最も重要かつ魅力的なものは、遺伝子重複の少なさである。遺伝子重複は生物のもつ遺伝子レパートリーを拡大し、より複雑で多様なしくみを生物に実装させてきた。しかしその反面、配列および機能が類似した複数の遺伝子の存在は、それらの機能解析の大きな障害となる。例えば、植物の主要な光受容体であるフィトクロムは、シロイヌナズナには5分子種存在するが、それぞれ互いに一部異なる機能を分担しつつも、重複的な機能も認められる（図4）。従って、重複する機能については単一変異体では観察しにくく、それを知るためには多重変異体を作成しなくてはならない (Strasser et al. 2010)。しかも、フィトクロムと相互作用するタンパク質の遺伝子の多くが遺伝子ファミリーを形成しているため (Leivar and Quail 2011)、フィトクロムを介したシグナル伝達系は複雑に並列化しており、その解析が困難となっている。このような遺伝子重複は、被子植物の他の遺伝子についても一般的に見られる。

一方、ヒメツリガネゴケは、植物で唯一高効率な相同組換えが可能な実験系であり (Schaefer 2001)、そのゲノムも明らかにされていることから (Rensing et al. 2008)、モデル植物として広く用いられている。しかし、セン類の系統あるいはヒメツリガネゴケでの遺伝子重複がある (Rensing et al. 2007)。例えばフィトクロム遺伝子は被子植物のものとは異なる遺伝子ファミリーを形成し、冗長性が高くなっている（図4）。また、被子植物では単一遺伝子である *LFY* も、ヒメツリガネゴケには2コピー存在する (荒木崇 2012)。そのため、遺伝子機能解析に関しては、基部陸上植物であるヒメツリガネゴケにおいてもシロイヌナズナと同様の問題を抱えていると言える。

これに対し、ゼニゴケに存在するフィトクロムは、被子植物フィトクロム・ファミリーが分岐する以前に分岐したと見られる1分子種のみである（図4）。さらに、フィトクロムを介したシグナル伝達で中心的な役割を果たすと考えられている *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR* (PIF) は、ゼニゴケでは1分子種しか見つかっておらず、遺伝子破壊すると光応答が異常となる (井上佳祐ら、未発表データ)。被子植物やヒメツリガネゴケではシグナル伝達や形態形成に関わる遺伝子の多くが遺伝子ファミリーを形成しているが、ゼニゴケゲノムにはその多くが単一遺伝

子として存在しているらしい (表4に一部を示す)。さらに、分裂組織の維持や形態形成に重要な役割を果たす *CLE* 遺伝子は、被子植物では32遺伝子からなる遺伝子ファミリーを形成しているが、ゼニゴケにはそれぞれの系統の基部で分岐したオーソログが1遺伝子ずつ見つまっている (澤進一郎 2012)。同様の傾向が、他の制御系遺伝子について報告されている (Sasaki et al. 2007)。これは、単純な体制をもつゼニゴケが陸上植物に共通に見られるしくみを備えつつも、そのしくみを支える遺伝子構成が極めて単純、基本的である可能性を示す。つまり、ゼニゴケをモデルとすることで、被子植物に見られる制御系の機能的重複もしくは並列化による複雑さを回避しつつ、陸上植物に共通する基本的なしくみを解明できる可能性がある。相同組換えによる遺伝子破壊が可能になった現在 (河内孝之・石崎公庸 2012)、遺伝的冗長性の低さは、ゼニゴケのモデル植物としての大きな強みである。

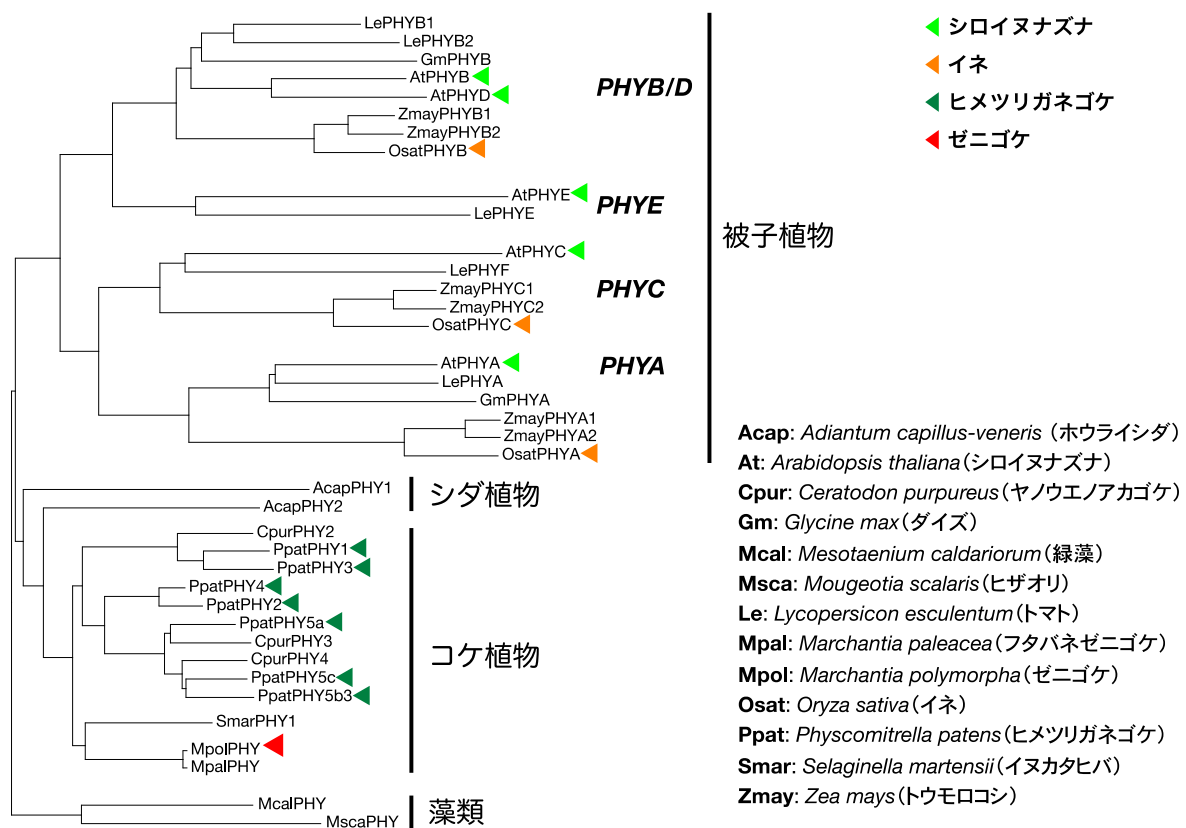


図4 フィトクロム遺伝子の分子系統樹

## 6. 性染色体

ゼニゴケは雌雄異株植物であり、常染色体8本に加え、性染色体として雌株ではX染色体 ( $n = 8 + X$ ), 雄株ではY染色体 ( $n = 8 + Y$ ) をもつ。Y染色体の塩基配列とX染色体の部分配列の比較から、ゼニゴケY染色体も、ヒトやチンパンジーのY染色体と同様に常染色体から分化したと考えられる (Yamato et al. 2007)。Y染色体の遺伝子密度は0.1/10 kb程度であり、常染色体の推定値0.7と比べて明らかに低い。これは、X染色体との組換えが抑制されたことで一部の遺伝子が欠失し、さらにレトロトランスポゾンや反復配列が蓄積したためと考えられる。なお、半数体

表4 ゼニゴケおよび他植物における遺伝子ファミリーの比較

| 遺伝子            | シロイヌナズナ | イヌカタヒバ | ヒメツリガネゴケ | ゼニゴケ |
|----------------|---------|--------|----------|------|
| <i>WOX</i>     | 16      | 6      | 3        | 1    |
| <i>CLE</i>     | 28      | 6      | 4        | 2    |
| <i>KANADI</i>  | 4       | 3      | 3        | 1    |
| <i>PIN</i>     | 8       | 5      | 4        | 4    |
| <i>AUX/LAX</i> | 4       | 2      | 4        | 1    |
| <i>ARF</i>     | 23      | 7      | 14       | 3    |
| <i>AUX/IAA</i> | 29      | 3      | 2        | 1    |
| <i>TIR</i>     | 6       | 2      | 4        | 1    |
| <i>TPL</i>     | 5       | 3      | 2        | 1    |
| <i>YUCCA</i>   | 11      | 3      | 6        | 4    |
| <i>TAA</i>     | 3       | 1      | 4        | 1    |

(Monash大学のBowman博士らとの共同研究)

においてはX染色体も組換えを起こさないので、Y染色体と同様の傾向（遺伝子の欠失、およびトランスポゾンや反復配列の蓄積）を示すと予測される。

ゼニゴケX染色体の配列情報を得るため、これまでに単離したX染色体連鎖マーカーを用いて、JGIアセンブリ ver. 0.6 より合計 3.9 Mb の配列を抽出した。Y染色体に見いだされた64個の遺伝子のうち、少なくとも20個のホモログがX染色体配列に見いだされた（図5）。これは、ゼニゴケX染色体とY染色体が同じ染色体に由来することを改めて支持している。しかし、それぞれの遺伝子の染色体上での位置関係はほとんど保存されておらず、X染色体とY染色体が分岐して以来、両者は染色体レベルの再編を繰り返してきたと推測される。また、ゼニゴケY染色体には、ヒト (Egydio de Carvalho et al. 2002)、マウス (Lorenzetti et al. 2004) および緑藻クラミドモナス (Ikeda et al. 2007) で鞭毛形成に必要とされる遺伝子や、植物および一部の動物で保存されている雄側受精関連遺伝子 (Hirai et al. 2008, Mori et al. 2006) のホモログなどが存在するが、これらの「雄遺伝子」の痕跡は今の所雌ゲノムに見つかっていない。今後、X染色体の配列が明らかにされれば、Y染色体および常染色体との比較を通して、性決定遺伝子や半数体生物における性染色体の成立過程が明らかになってくるものと期待される。

## 7. 今後の展望

ゼニゴケのゲノムデータは出そろいつつあり、それを利用できる形にして提供するのが急務である。JGIでのアセンブルが終了すれば、速やかにアノテーションを行い、同時にこれまでに蓄積したトランスクリプトームデータや対照系統であるKitashirakawa-2株由来のデータの統合も目指す。JGIでの標準的なデータ公開用ポータルに加え、遺伝学研究所の中村保一博士らと共により使い勝手のよい日本発データベースの構築を計画している。なお、ゲノムデータおよびトランスクリプトームデータの多くは現在未公開であるが、類似性検索のリクエストには個別に対応しているので、興味がある読者は連絡されたい。



現在までに多くの植物種についてそのゲノムが明らかにされてきた。しかし、利用できる情報量が格段に増えたことで、陸上植物に見られる様々な現象を分子や遺伝子に結びつけるプロセスは容易になったのだろうか。ゲノムの多様性や複雑さの方が前面に出てきたために、実は陸上植物ゲノムのなりたちが見えにくくなり、遺伝子レベルでのしくみも見えにくくなってしまっているのではないだろうか。様々なゲノムが出そろってきた今こそ、ゼニゴケゲノムがこの状況を打破するきっかけを与えてくれると著者らは信じている。

### 謝辞

本稿で取り上げたゲノムプロジェクトは、JGI, Monash 大学の John Bowman 博士および Sandra Floyd 博士との国際共同研究である。国内の研究については、文部科学省および学術振興会の科学研究補助金の助成を受けている。パイロット・クローンの解析は、名古屋大学の青木撰之博士、京都大学の荒木崇博士、東京大学の上田貴志博士との共同研究である。完全長 cDNA の解析は、京都大学の福澤秀哉博士およびゲノム特定支援班との共同研究である。データ解析では、遺伝学研究所の長崎英樹博士および中村保一博士より多大なる支援を頂いた。遺伝地図は、京都大学の友金寛和氏によるものである。最後に、本プロジェクトに関わってきた石崎公庸博士を始めとする筆者らの研究室（京都大学および近畿大学）のメンバーに深謝したい。

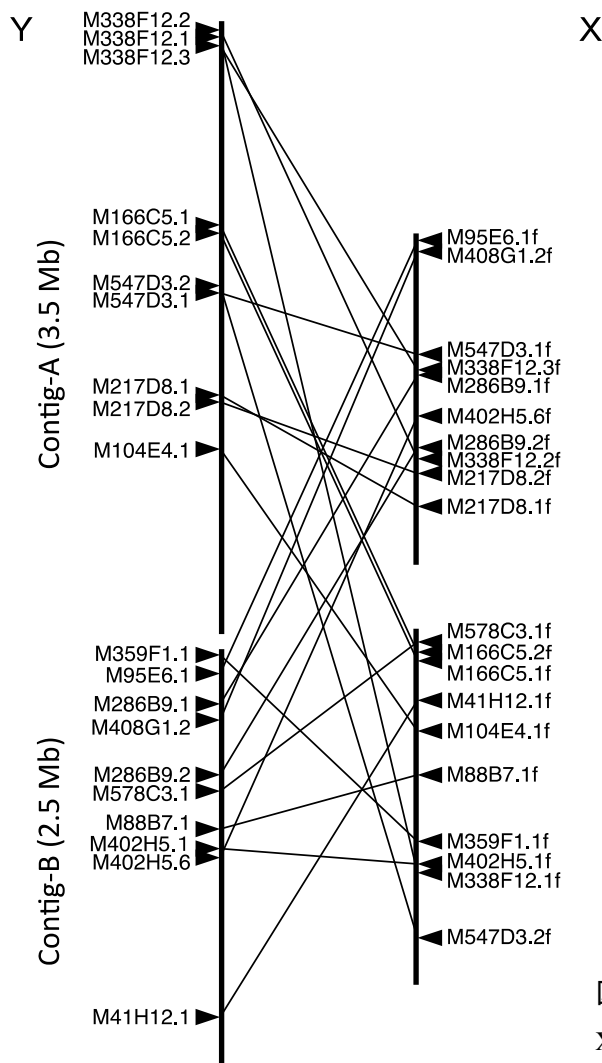


図5 X染色体とY染色体の相同遺伝子の分布  
X染色体とY染色体の対応する遺伝子を直線で結んだ。

## 引用文献

- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., & Young, I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- Egydio de Carvalho, C., Tanaka, H., Iguchi, N., Ventela, S., Nojima, H., & Nishimune, Y. 2002. Molecular cloning and characterization of a complementary DNA encoding sperm tail protein SHIPPO 1. *Biol. Reprod.* 66: 785-795.
- Floyd, S.K., & Bowman, J.L. 2004. Gene regulation: Ancient microRNA target sequences in plants. *Nature* 428: 485-486.
- Fujisawa, M., Nakayama, S., Nishio, T., Fujishita, M., Hayashi, K., Ishizaki, K., Kajikawa, M., Yamato, K.T., Fukuzawa, H., & Ohyama, K. 2003. Evolution of ribosomal DNA unit on the X chromosome independent of autosomal units in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Chromosome Res.* 11: 695-703.
- Hirai, M., Arai, M., Mori, T., Miyagishima, S.Y., Kawai, S., Kita, K., Kuroiwa, T., Terenius, O., & Matsuoka, H. 2008. Male fertility of malaria parasites is determined by GCS1, a plant-type reproduction factor. *Curr. Biol.* 18: 607-613.
- Ikeda, K., Ikeda, T., Morikawa, K., & Kamiya, R. 2007. Axonemal localization of Chlamydomonas PACRG, a homologue of the human Parkin-coregulated gene product. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 64: 814-821.
- International Rice Genome Sequencing Project 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436: 793-800.
- Kuroki, Y., Toyoda, A., Noguchi, H., Taylor, T.D., Itoh, T., Kim, D.S., Kim, D.W., Choi, S.H., Kim, I.C., Choi, H.H., Kim, Y.S., Satta, Y., Saitou, N., Yamada, T., Morishita, S., Hattori, M., Sakaki, Y., Park, H.S., & Fujiyama, A. 2006. Comparative analysis of chimpanzee and human Y chromosomes unveils complex evolutionary pathway. *Nat. Genet.* 38: 158-167.
- Leivar, P., & Quail, P.H. 2011. PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in Plant Science* 16: 19-28.
- Lorenzetti, D., Bishop, C.E., Justice, & M.J. 2004. Deletion of the Parkin coregulated gene causes male sterility in the *quaking*<sup>viable</sup> mouse mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8402-8407.
- Mori, T., Kuroiwa, H., Higashiyama, T., & Kuroiwa, T. 2006. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nature Cell Biol.* 8: 64-71.
- Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Takemura, M., Nozato, N., Akashi, K., Kanegae, T., Ogura, Y., Kohchi, T., et al. 1992. Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. A primitive form of plant mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 223: 1-7.
- Ohayama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, K., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H., & Ozeki, H. 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort, *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574.
- Okada, S., Fujisawa, M., Sone, T., Nakayama, S., Nishiyama, R., Takenaka, M., Yamaoka, S., Sakaida, M.,

- Kono, K., Takahama, M., Yamato, K.T., Fukuzawa, H., Brennicke, A., & Ohyama, K. 2000. Construction of male and female PAC genomic libraries suitable for identification of Y-chromosome-specific clones from the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant J.* 24: 421-428.
- Rensing, S.A., Ick, J., Fawcett, J.A., Lang, D., Zimmer, A., De Peer, Y.V., & Reski, R. 2007. An ancient genome duplication contributed to the abundance of metabolic genes in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Evol. Biol.* 7:
- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Ashton, N., Barbazuk, W.B., Barker, E., Bennetzen, J.L., Blankenship, R., Cho, S.H., Dutcher, S.K., Estelle, M., Fawcett, J.A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K.A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D.R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P.J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S.H., Stueber, K., Theodoulou, F.L., Tu, H., Van de Peer, Y., Verrier, P.J., Waters, E., Wood, A., Yang, L.X., Cove, D., Cuming, A.C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B.D., Reski, R., Grigoriev, I.V., Quatrano, R.S., & Boore, J.L. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F., & Peterse, G.B. 1982. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\lambda$  DNA. *J. Mol. Biol.* 162: 729-773.
- Sasaki, G., Katoh, K., Hirose, N., Suga, H., Kuma, K., Miyata, T., & Su, Z.H. 2007. Multiple receptor-like kinase cDNAs from liverwort *Marchantia polymorpha* and two charophycean green algae, *Closterium ehrenbergii* and *Nitella axillaris*: Extensive gene duplications and gene shufflings in the early evolution of streptophytes. *Gene* 401: 135-144.
- Schaefer, D.G. 2001. Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 143-150.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchishinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., & Sugiura, M. 1986. The Complete Nucleotide-Sequence of the Tobacco Chloroplast Genome - Its Gene Organization and Expression. *EMBO J.* 5: 2043-2049.
- Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P.J., Cordum, H.S., Hillier, L., Brown, L.G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S.F., Latrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., Maupin, R., McPherson, J., Miner, T., Nash, W., Nguyen, C., Ozersky, P., Pepin, K., Rock, S., Rohlfling, T., Scott, K., Schultz, B., Strong, C., Tin-Wollam, A., Yang, S.P., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Rozen, S., & Page, D.C. 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423: 825-837.
- Sone, T., Fujisawa, M., Takenaka, M., Nakagawa, S., Yamaoka, S., Sakaida, M., Nishiyama, R., Yamato, K.T., Ohmido, N., Fukui, K., Fukuzawa, H., & Ohyama, K. 1999. Bryophyte 5S rDNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. *Plant Mol. Biol.* 41: 679-685.

- Strasser, B., Sanchez-Lamas, M., Yanovsky, M.J., Casal, J.J., & Cerdan, P.D. 2010. Arabidopsis thaliana life without phytochromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107: 4776-4781.
- The Arabidopsis Genome Initiative 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408: 796-815.
- Yamato, K.T., Ishizaki, K., Fujisawa, M., Okada, S., Nakayama, S., Fujishita, M., Bando, H., Yodoya, K., Hayashi, K., Bando, T., Hasumi, A., Nishio, T., Sakata, R., Yamamoto, M., Yamaki, A., Kajikawa, M., Yamano, T., Nishide, T., Choi, S.H., Shimizu-Ueda, Y., Hanajiri, T., Sakaida, M., Kono, K., Takenaka, M., Yamaoka, S., Kuriyama, C., Kohzu, Y., Nishida, H., Brennicke, A., Shin-i, T., Kohara, Y., Kohchi, T., Fukuzawa, H., & Ohya, K. 2007. Gene organization of the liverwort Y chromosome reveals distinct sex chromosome evolution in a haploid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 6472-6477.
- 河内孝之・石崎公庸 2012. 古くて新しいモデル植物としての苔類ゼニゴケの特徴. *BSJ Review* 3: 58-70.
- 荒木崇 2012. 植物固有の転写因子 LEAFY とゼニゴケの有性生殖. *BSJ Review* 3: 134-158.
- 大和勝幸 2009. 極小 Y 染色体—コケの性染色体に印された♂♀の設計図. *遺伝* 63: 36-41.
- 澤進一郎・本田紘章・田畑亮 2012. *MpCLE1* 遺伝子の機能解析. *BSJ Review* 3: 129-133.

## ゼニゴケの分類学と形態学

嶋村正樹

広島大学大学院理学研究科生物科学専攻

〒739-8526 東広島市鏡山 1-3-1

An introduction to the taxonomy and morphology of *Marchantia polymorpha*Key words: bryophytes; *Marchantia polymorpha*; morphology; taxonomy

Masaki Shimamura

Department of Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University

Kagamiyama 1-3-1, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan

## 1. はじめに

ゼニゴケは、北半球を中心に世界中に分布し、人間の住環境周辺で最も普通にみられるコケ植物の1つである。コケ植物に現代的な分類学が適用される以前から、様々な本草誌等に登場しており、植物学の古典的な教科書では、タイ類の代表例としてほぼ例外なく取り扱われている。ヨーロッパや米国で古くから植物学の教育用として広く用いられた Leopold Kny による一連の植物図譜 (1874~1911) の中で、詳細なゼニゴケの図版が出版されたことも (Kny1890)、ゼニゴケがタイ類の代表例として扱われてきた理由ではないかと指摘されている (Stotler 1994)。19 世紀においては、もっとも研究の進んでいた植物の1つであり、モデル植物の元祖とも呼べる存在である。これまでの長い研究の歴史で蓄積した膨大な知見は、ゲノム情報や分子遺伝学の手法を用いた研究を進める上でも大きな資産となると考えられる(河内・石崎 2012)。本稿では、ゼニゴケに関する研究の中でも最も古い歴史をもつ分類学と形態学、その周辺分野に関する知見をまとめ、今後の研究の展望を示した。

## 2. ゼニゴケの分類学的位置と進化学的起原

コケ植物は維管束をもたない配偶体が、主要な生活世代である点で特徴づけられ、タイ類 (Marchantiophyta)、セン類 (Bryophyta)、ツノゴケ類 (Anthocerotophyta) の3群に分類されている。これら3群の配偶体は長い進化の歴史でそれぞれに多様化を遂げているため、配偶体の形態で3群を分ける形質を特徴づけるのは難しいが、胞子体の形態が決定的に違っている。セン類とツノゴケ類の胞子体が気孔を備えているのに対し、タイ類はもっていない。また、タイ類の胞子体は、配偶体由来の保護器官に完全に覆われた状態で成長し、減数分裂が終了した後に胞子体の柄が伸長し、はじめて外部に露出する。セン類の胞子体は、頂端部に配偶体由来の組織の一部 (蘇帽) を被った状態で成長し、柄が伸びて胞子体が外部に露出した後に胞子嚢が発達し、減数分裂がおこる。ツノゴケ類の胞子体は、基部に分裂組織をもち、上方に向けて新たな胞子体組織を継続的に形成し続ける。タイ類とセン類では胞子体内部の組織分化が同調的におこり、胞子形成 (減数

分裂)も胞子体内部で同時に完了するが、ツノゴケ類では、胞子体の組織分化は基部から上方に向けて逐次におこり、胞子も新たなものが逐次形成される。

タイ類、セン類、ツノゴケ類の系統関係については様々な議論があるが、最近の分子系統学的解析の多くは、ゼニゴケが含まれるタイ類が最も初期に分岐したことを支持している (Qiu et al. 2006, 2007)。最新の分類体系 (Crandall-Stotler et al. 2009) では、タイ類は、大きくコマチゴケ綱 (Haplomitriopsida)、ゼニゴケ綱 (Marchantiopsida)、ツボミゴケ綱 (Jungermanniopsida) の3群に大別されている。コマチゴケ綱 (約20種) は、最も初期に分岐したと考えられている、直立あるいは匍匐する茎葉体の外形をもつ分類群である。造卵器や造精器を保護するための特別な葉の器官をもたない、仮根をもたないなど、コケ植物としても例外的な特徴があり、タイ類の中でも原始的な形態を留めていると考えられている。ツボミゴケ綱はタイ類の大半の種を含む分類群で、その形態も多様であり、直立する茎葉性、生育基物に沿って匍匐する茎葉性、茎と葉の分化が不明瞭で内部組織の分化も単純な単純葉状性 (simple thalloid) と様々である。ゼニゴケを含むゼニゴケ綱 (約400種) は、扁平な葉状体の外形をもつグループである。ゼニゴケ綱では、外界と通じる小さな穴 (気室孔) を備えた細胞間隙 (気室) をもつ複雑葉状性 (complex thalloid) とよばれる体制が典型的である。

ゼニゴケ綱はコマチゴケ綱に次いで分岐した、陸上植物の中でも最も長い歴史をもつ分類群の1つと考えられている (図1)。ゼニゴケ綱の起原の古さを示す証拠として、オルドビス紀の地層からみつかると考えられる化石が現生のゼニゴケ綱のものと似ていることが指摘されている (Wellman et al. 2003, Graham et al. 2004)。ただし、はっきりとゼニゴケ綱と分かる植物体の化石は中生代以降の地層からしかみつかっていない (Walton 1925)。現生種の分布パターンや分子系統解析の結果は、ゼニゴケ綱の祖先が古生代のペルム紀 (Permian) と中生代の三畳紀 (Triassic) の境目 (P-T境界; 約2億5千万年前) の地球規模の生物大量絶滅を生き延び、その後、温暖化、乾燥化した環境に適応して、適応放散したことを示唆している (Wheeler 2000)。

ゼニゴケ綱は、ウスバゼニゴケ亜綱とゼニゴケ亜綱に大別される (He-Nygren et al. 2006)。ウスバゼニゴケ亜綱は、ウスバゼニゴケ目のみからなり、ウスバゼニゴケ (*Blasia pusilla*) とシャクシゴケ (*Cavicularia densa*) の2種を含む。葉状体の縁には葉のようにも見える細かい切れ込みがあり、内部に藍藻類を共生する空隙をもつ分類群で、雌器床や雄器床をもたない。胞子体はゼニゴケ亜綱と比べて大型で、葉状体の先端に1~2個ずつ付き、柄は数cmに伸びる。胞子嚢の外壁 (蒴壁) が2細胞以上の厚みをもつ、胞子母細胞が減数分裂に先立って4つにくびれるなど、ツボミゴケ亜綱の胞子体と共通する特徴をもつ (Duckett & Renzaglia 1993, Shimamura et al. 2005, 嶋村ら 2006)。ウスバゼニゴケ亜綱は、ゼニゴケ綱の中でも最も初期に分岐し、ゼニゴケ綱のなかで原始的な形態的特徴を備えた分類群と考えられている (Forrest et al. 2006, Shimamura et al. 2012)。一方、ゼニゴケを含むゼニゴケ亜綱 (約400種) は、ダンゴゴケ目 (Sphaerocarpaceae)、ホジソンゴケ目 (Neohodgsoniales)、ミカヅキゼニゴケ目 (Lunulariales)、ゼニゴケ目 (Marchantiales) からなり、大半の種はゼニゴケ目に含まれる (Long 2006)。ゼニゴケ目の主要な分類群の系統関係を図2に示す。ゼニゴケ目ゼニゴケ科 (Marchantiaceae) は、ゼニゴケ目の中で、最も初期に分岐した分類群と考えられている。ゼニゴケ目は、気室孔と気室を分化する多層構造の葉状体をもつこと、葉状体の腹面に腹鱗片と仮根を分化し、仮根には肥厚による模様があるもの (有紋仮根) とないもの

(平滑仮根)の両方が分化する, 器状の無性芽器の中に多細胞性の無性芽をつくること, 生殖器官や孢子体を付けるための特別な生殖枝である雄器托, 雌器托を分化するなどの派生形質で特徴づけられる。これらの構造はゼニゴケを含むゼニゴケ科 (Marchantiaceae) では一般的だが, その他の科ではこれらの形質の一部, あるいは大部分は退化し, 消失していることも多い (Boisselier-Dubayle et al. 2002, 図3)。また, ゼニゴケ目の孢子体は, 他のタイ類と比べ微小で構造が単純で, 蒴壁が1細胞厚, 柄は短いか欠失する。ゼニゴケ科では, 多数の小さな孢子体が雌器托の上部(雌器床)から懸垂して発生し, カリプトラ, 偽花被, 苞膜という配偶体由来の器官で3重に保護されながら成長する。ゼニゴケ科は, ブチェジゼニゴケ属 (Bucegia), アカゼニゴケ属 (Preissia), ゼニゴケ属 (Marchantia)からなる。ゼニゴケ属(Marchantia)は約40種が知られ, 日本国内には, *M. polymorpha* ssp. *ruderalis* (ゼニゴケ), *M. polymorpha* ssp. *polymorpha* (ヤチゼニゴケ), *Marchantia paleacea* ssp. *paleacea* (ツヤゼニゴケ), *Marchantia paleacea* ssp. *diptera* (フタバネゼニゴケ), *Marchantia emarginata* ssp. *tosana* (トサゼニゴケ), *Marchantia pinnata* (ヒトデゼニゴケ) が分布する。(Bishler 1989, 1998, 片桐・古木 2012)。

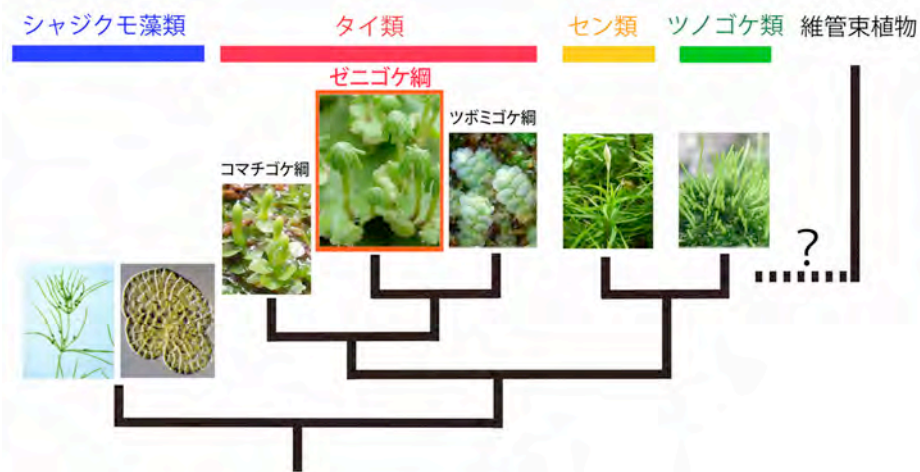


図1. 陸上植物におけるタイ類ゼニゴケ綱の系統的位罫。タイ類は現生の陸上植物の中で, もっとも初期に分岐したと考えられている。維管束植物とコケ植物の系統関係については明確な結論が出ていないが, 最近の分枝系統学的研究の多くはツノゴケ類と維管束植物が姉妹群となることを示している。

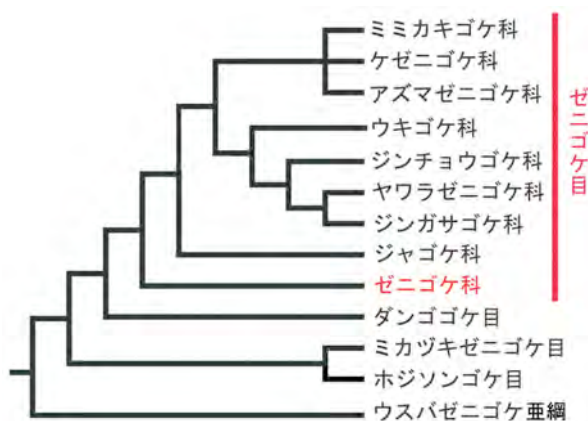


図2.ゼニゴケ綱の主要分類群の系統関係。ゼニゴケを含むゼニゴケ科は, ゼニゴケ綱の種の大半を占めるゼニゴケ目の中で最も初期に分岐したと考えられる。Shimamura et al. (2012)をもとに作図。



図3.ゼニゴケ綱の主要分類群の特徴。a. ウ斯巴ゼニゴケ目ウ斯巴ゼニゴケ科, シャクシゴケ (*Cavicularia densa*) の無性芽器をつけた葉状体。ウ斯巴ゼニゴケ科は, 気室をもたないが葉状体の内部に藍藻類を共生させる腔所がある。葉状体のふちが細かく切れ込む。雄器床と雌器床がなく, 造精器は葉状体に散在し, 胞子体は葉状体の先端に付く。b. ミカヅキゼニゴケ目ミカヅキゼニゴケ科, ミカヅキゼニゴケ (*Lunularia cruciata*) の雌器托。ミカヅキゼニゴケ科は1層の気室をもつ。雄器床は無柄。雌器床に偽花被がない。胞子体の柄がよく発達する。三日月型の無性芽器をもつ。c. ダンゴゴケ目ダンゴゴケ科, キビノダンゴゴケ (*Sphaerocarpos donnelli*)。ダンゴゴケ科は気室をもたない。細い葉状体の縁が葉のように切れ込み, 茎葉体に近い外形をもつ。フラスコ型の雄包膜と偽花被を密生する。d. ゼニゴケ目ゼニゴケ科, アカゼニゴケ (*Preissia quadrata*) の雌器托 (広島大学・片桐知之氏撮影)。ゼニゴケ科は1層の気室をもつ。雄器托, 雌器托をもつ。雌器床は偽花被と苞膜をもつ。e. ゼニゴケ目ジャゴケ科, ジャゴケ (*Conocephalum conicum*) の雄器床。ジャゴケ科は1層の気室をもつ。雄器床は無柄。雌器托柄は胞子散布の際に急激に伸長する。偽花被がない。無性芽器がない。f. ゼニゴケ目ジンガサゴケ科, ジンガサゴケ (*Reboulia hemisphaerica* ssp. *orientalis*) の雌器托と雄器床。ジンガサゴケ科は気室が1~3層に発達する。気室に同化系がない。二叉分枝だけでなく, 植物体の腹面からの介在的な分枝も行。無性芽器がない。g. ゼニゴケ目ジンチョウゴケ科, ヤツガタケジンチョウゴケ (*Sauteria yatsuensis*)の雌器托 (片桐知之氏撮影)。ジンチョウゴケ科の気室は2~3層。気室に同化系がない。雌器托は葉状体の途中につく。雄器托はないか, 無柄。気室孔の開口部が星形。無性芽器がない。h. ゼニゴケ目ウキゴケ科, ウキゴケ (*Riccia fluitans*)。ウキゴケ科は気室が2~3層に発達する。雄器床と雌器床がなく, 造卵器と造精器は葉状体内部に沈生。胞子体に柄がない。水中に浮遊して生育する種もある。i. ゼニゴケ目ケゼニゴケ科, ケゼニゴケ (*Dumortiera hirsuta*) の雄器托。ケゼニゴケ科は気室や腹鱗片が痕跡的。雄器托, 雌器托をもつが雄器托柄は非常に短い。無性芽器がない。



### 3. ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) の分類学的研究の歴史

ゼニゴケの分類学的研究は、*Marchantia polymorpha* L.が1753年にLinnaeusによって記載されたことに遡る (Linnaeus 1753)。*M. polymorpha* L. (広義のゼニゴケ) には生育地や生育環境によって、形態に多様性があることが、Linnaeus自身やその後の研究で認められており、数多くの種内分類群 (亜種や変種) が記載されてきた。Burgeff (1943)はそれらを*M. polymorpha* (狭義)、*M. aquatica*、*M. alpestris*の3つの独立した種として整理した。その後、Burgeff (1943)のみとめた3分類群は、多くの研究者に*M. polymorpha*の種内分類群として受け入れられ (Schuster 1992)、現在は3つの亜種のみを認めるのが一般的となっている (Bischler & Boisselier-Dubayle 1991, Perold 1999, Paton 1999)。分類学的定義が曖昧であった、*M. polymorpha* L. (Linnaeus 1753)に関しては、Bischler & Boisselier-Dubayle (1991)により、原記載で引用されている図版 (Dillenius 1741-1742)がレクトタイプとして指定された。その形態的特徴は、従来、*M. aquatica*とされていた植物に一致する。

現在認められている3つの亜種のうち*M. polymorpha* ssp. *polymorpha* (従来、*M. aquatica*とされていたもの) は、葉状体中央部に気室が分化せず、腹面側組織の色が透けて見えるために中央部の黒い線が連続的で明瞭である。さらに腹鱗片の付属物が全縁であること、生殖器官や無性芽器をほとんどつけないことなどで特徴づけられる。主に山地の水辺に分布し、人為的な環境には生育しない。本亜種は日本にも分布し (北川 1987)、ヤチゼニゴケとよばれている。図4に広島大学植物標本庫所蔵の1952年に群馬県尾瀬ヶ原で採集された標本を示す。*M. polymorpha* ssp.

*montivagans* (従来、*M. alpestris*とされていたもの) は、葉状体の幅が2 cmに達することもある大型の植物で、葉状体の中央部の黒い線がみられない。ヨーロッパでは、山地を中心にミネラル分の豊富な環境に生育し (海岸近くの塩性湿地での採集記録もある)、人為的な環境には生育しない。本亜種はこれまでの所、日本では分布が確認されていない。*M. polymorpha* ssp. *ruderalis* (従来、狭義の*M. polymorpha*とされていたもの) は、葉状体の中央部の黒い線 (気室が発達しない部分) が不連続で、腹鱗片の付属物に鋸歯があること、無性芽器や有性生殖器官を旺盛につけるなどの特徴がある。人為的な環境を中心に北半球全域に広く分布し、南半球にも都市部を中心に移入がみられる。日本でも人家の周辺で普通に生育し、“ゼニゴケ”の和名で呼ばれ、多くの研究室で研究材料として用いられているのはこの亜種である。

Burgeff (1943) の交雑実験は上述の3亜種の遺伝的関係を考える上で、興味深い結果を示している。それによるとヤチゼニゴケと*M. alpestris* (現在、ssp. *montivagans*とされているもの)の間では、ほとんど交雑が起こらないが、ごく希に生じた雑種にゼニゴケに似た形態をもつものがある。一方で、ゼニゴケは、ヤチゼニゴケと*M. alpestris*それぞれとの間で容易に交雑する。それゆえ、彼はゼニゴケが、ヤチゼニゴケと*M. alpestris*の雑種に起原すると考えた。Schuster (1983, 1992)もその考えを支持し、ゼニゴケの生育が人為的環境に限られることからゼニゴケは、先史時代に生じた雑種に起原する、非常に新しい種と考えた。その後行われたアロザイム・DNA多型の解析を通じて、三つの亜種が遺伝的にも区別できることは明らかになったが、ゼニゴケが他の2亜種の雑種に起源するという証拠は得られていない (Boisselier-Dubayle & Bischler 1989, Boisselier-Dubayle et al. 1995)。染色体数はいずれの亜種も9本 (n=9, 雌雄の性染色体を含む) であることが分かっている (Bischler 1986)。

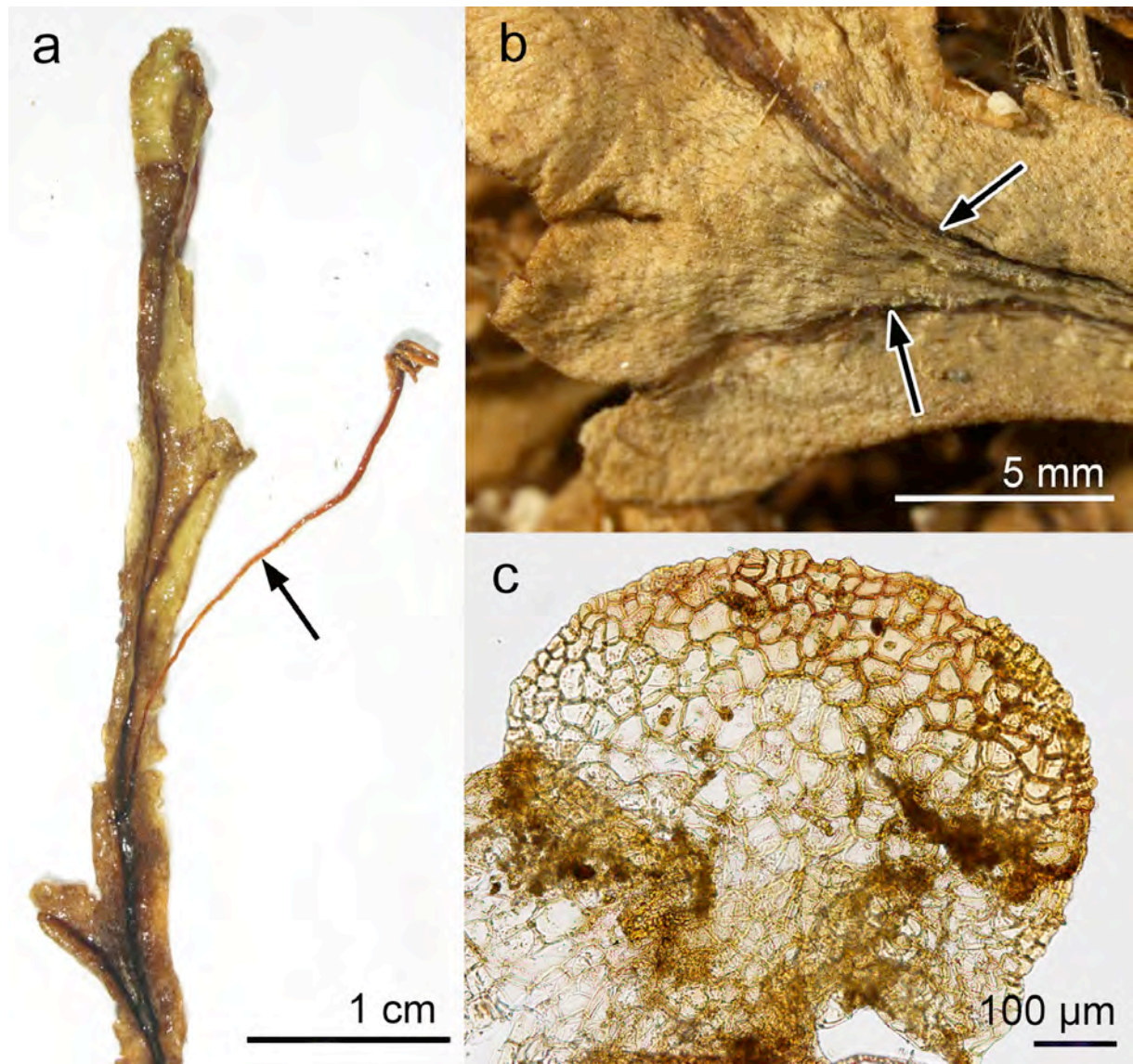


図4. ヤチゼニゴケ (*M. polymorpha* ssp. *polymorpha*)の標本。a. 葉状体(雌株)の外形。葉状体は細長く、幅は4~8 mm、分枝の角度がゼニゴケと比べ鋭角。成熟した雌器托(矢印)は葉状体の基部近くに位置する。雌器床は小さいが、柄は3~3.5 cmと長く伸びる。この標本は無性芽器をつけていない。b. 葉状体中央部付近。中央部に気室が全く分化せず、中央部の黒い線が連続的で明瞭(矢印)。c. 腹鱗片の付属物。鋸歯がなく、小さな細胞で縁取られ、全縁。(図15cのゼニゴケの腹鱗片の付属物と比較せよ)。Specim. exam. Japan. Pref. Gunma: Ozegahara, 1400 m alt. H. Ando 9143 (HIRO).

#### 4. ゼニゴケの生活史

ゼニゴケの生活史の概略を図5に示す。ゼニゴケは他の植物と同じく、核相の変化を伴う世代交代を行う。他のコケ植物と同様、生活の主体となる植物体(葉状体)は単相の配偶体である。植物体は雌雄異株で、雄株には造精器をつける雄器托、雌株には造卵器をつける雌器托が形成される。多くのタイ類では、生殖器官が年間の限られた時期のみ形成されるが、ゼニゴケは例外的で、野外においても冬期を除いて、長期間にわたり次々と雄器托と雌器托が形成される。野外の個体群では春先に雄器托が雌器托に先立って成長する傾向がある。雄株の造精器で作られた精子が雌株の造卵器に到達し、内部で受精が行われると、受精卵は発生を始め、複相の孢子体が形成

される。胞子体は雌株の雌器床の下部に懸垂して成長する。胞子体の内部では減数分裂がおり、単相の胞子が形成される。胞子体から放出された胞子が発芽し、原糸体と呼ばれる体制を経て植物体が形成される。有性生殖を介した胞子形成だけでなく、植物体の無性芽器の内部に形成される無性芽によっても旺盛な無性生殖を行う。以下、生活史の各段階で見られる形態について、より詳しく解説する。

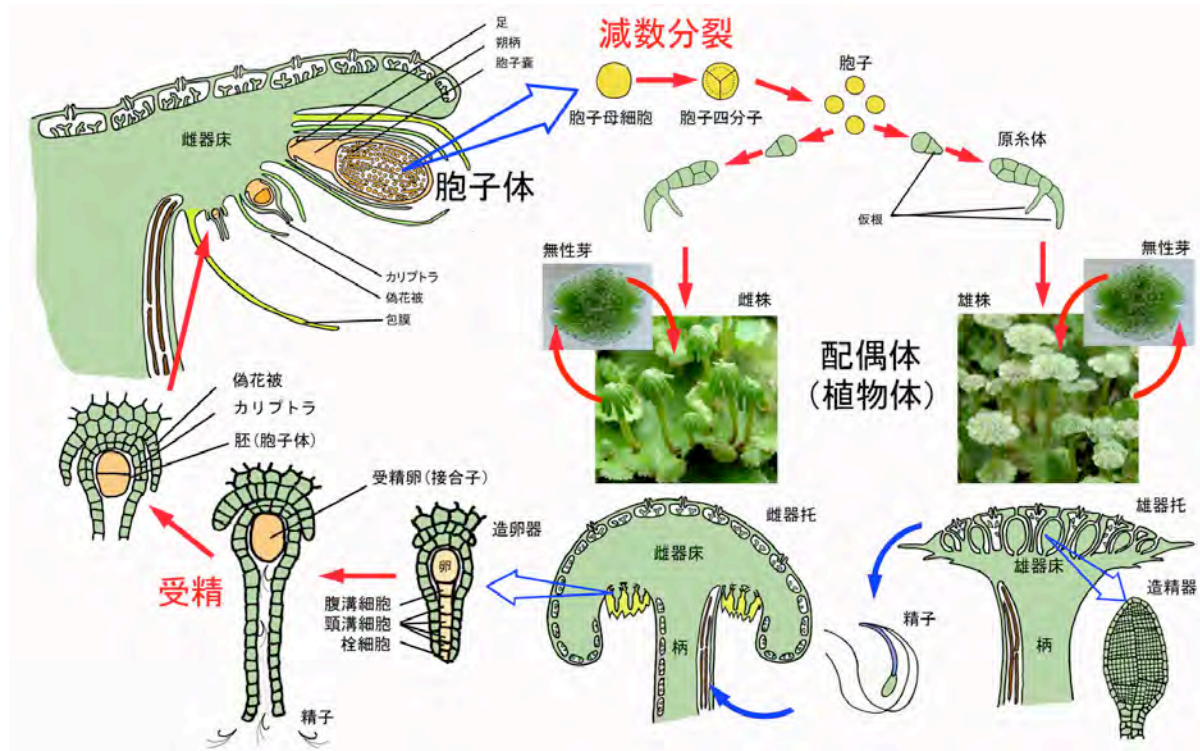


図5. ゼニゴケの生活環。

## 5. 胞子と胞子発芽

ゼニゴケの胞子は 10–15  $\mu\text{m}$  程度の球形で、胞子体から放出されたあと、適当な環境条件が整えば休眠することなく、ただちに発芽する。発芽は光依存的で、胞子が光合成を行うことが重要であることが分かっている (Inoue 1960, Nakazato et al. 1999)。胞子は発芽の際に、大小2つの細胞を生じる不等分裂を行う (図 6a)。このうち小さい細胞からは最初の仮根 (平滑仮根) が伸長し、大きい細胞は数度分裂することで、数細胞が一系列に連なり、末端に仮根をもつ原糸体となる (Inoue 1960) (図 6b)。その後不規則な細胞分裂を行い、塊状の外形を経て (図 6c)、ある程度の大きさになると、2方向に交互に規則正しい細胞分裂を繰り返す頂端細胞が出現し、原糸体上に葉状体様の平たい部分ができる (Leitgeb 1880) (図 6d)。さらに原糸体の細胞が数十細胞に増加し、背腹面方向にも分裂を行う楔形の頂端細胞が形成されると、葉状体の湾入部 (ノッチ) が形成され、厚みをもった葉状の植物体の形成が開始する (O'Hanlon 1926) (図 6e)。

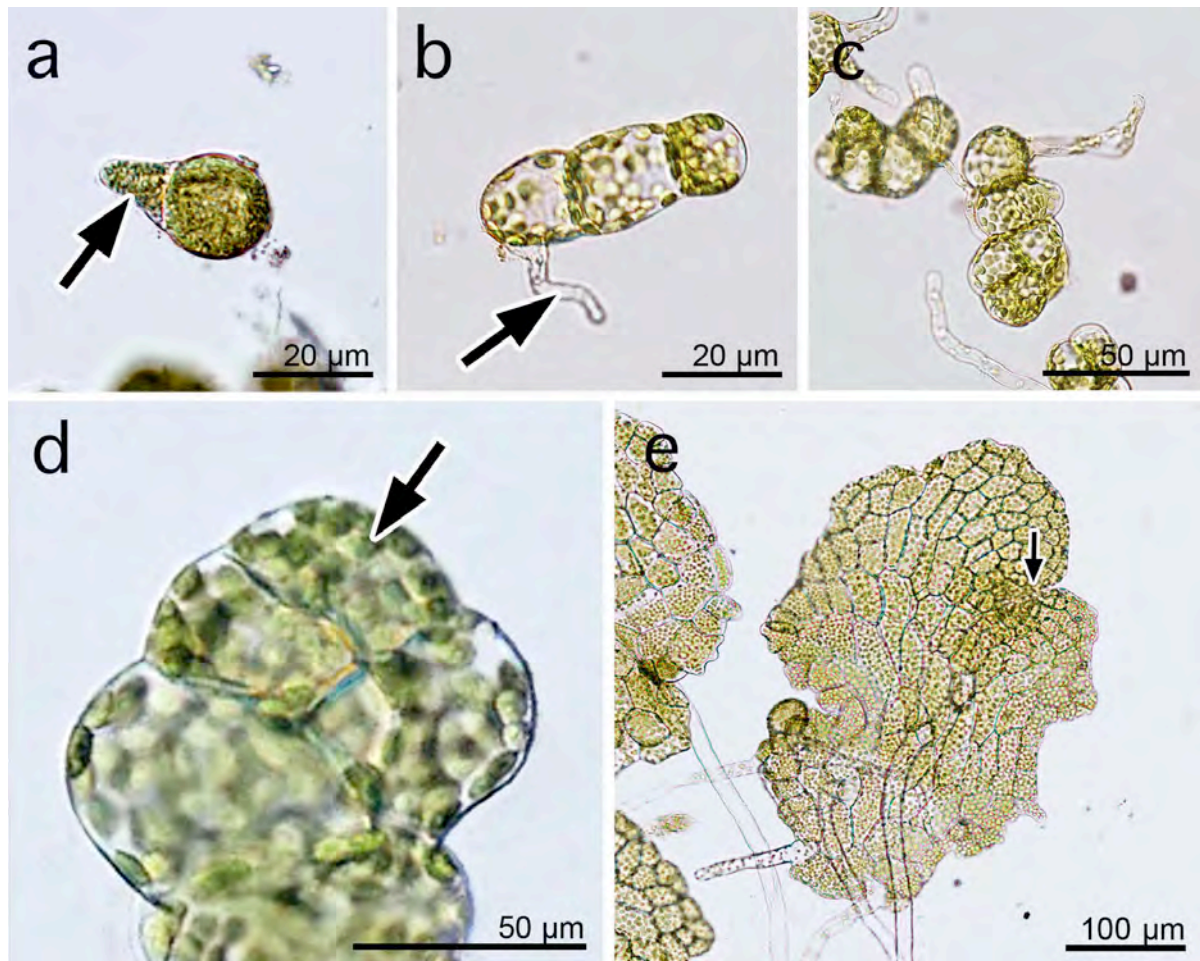


図 6. ゼニゴケの原糸体。a. 胞子の最初の細胞分裂で生じた小さい細胞から仮根が伸長する (矢印)。b. 平滑仮根 (矢印) を末端にもつ、数細胞が連なった原糸体。c. 初期の原糸体は特定の細胞分裂パターンをもたず、様々な塊状の外形をもつ。d. 原糸体上に生じた頂端細胞 (矢印)。e. 頂端細胞が生じると、そこが湾入部 (ノッチ) となって (矢印)、平面的な葉状体の形成が始まる。

## 6. 植物体 (葉状体)

成熟したゼニゴケの植物体 (葉状体) は幅 8 mm から 15 mm 程度、中央部の厚みは 0.3 mm から 0.6 mm 程度で、二叉状に分枝を繰り返して成長する。ゼニゴケ目の葉状体の断面は複雑に分化した層状構造となっており、組織分化の単純なツボミゴケ綱の葉状性タイ類の体制が単純葉状体 (simple thalloid) とよばれるのに対し、複雑葉状体 (complex thalloid) とよばれる (図 7)。葉状体の頂端部は心臓型に湾入しており、その付近が細胞分裂の盛んな成長点となっている。成長点を構成する細胞群の中央には、1つの頂端細胞 (apical cell) がみとめられる。頂端細胞は周辺の細胞に比べて大型で、細胞質に富んでおり、並層分裂によって生じた細胞によって対称に取り囲まれていることで、他の細胞と区別できる。頂端細胞の周辺では活発な細胞分裂が起こっている一方で、頂端細胞自体の分裂頻度は低く、細胞を切り出す方向を厳密に制御することで、植物体の形態形成に重要な役割を担っている。コケ植物では頂端細胞から切り出された1つの細胞 (セグメント) に由来する細胞群をメロファイトとよび、植物体を構成する組織が規則的に分化する。コケ植物の植物体はメロファイトが積み重なった構造であり、メロファイトは植物体の組織分化

の基本単位となっているといえる。頂端細胞の形、頂端細胞の細胞分裂方向の制御、メロファイト中での細胞分裂パターンの規則性は、各分類群の基本的な形態形成を支配している。ゼニゴケの頂端細胞は4つの細胞分裂面をもつ楔形である(図8)。頂端細胞の自由面(外界に接する面)は植物の腹面側に傾いて配置しており、腹面側から発達する粘液毛と腹鱗片によって保護されている。頂端細胞から植物体の背面側に切り出されたセグメントに由来する背面メロファイト、腹面側に切り出されたセグメントに由来する腹面メロファイトは、葉状体の中央部を構成する組織(表皮と髄質)となる。頂端細胞の側方に切り出されたセグメントに由来する側方メロファイトからは、葉状体を構成する全ての組織が分化する(図9, 10)。メロファイト中で4回の細胞分裂がおこり、側方メロファイトが5細胞となった時点で、背面表皮組織(表皮・気室)、背面髄質組織、翼部(葉状体の縁)、腹面表皮組織(表皮・腹鱗片・仮根など)、腹面髄質組織へと分化する細胞が決定する(Crandall-Stotler 1981)。ゼニゴケの場合、側方メロファイトの初期の分裂パターンは、頂端細胞と全く同じであり、二次頂端細胞(secondary apical cell)ともよべる振る舞いをするため、頂端細胞と側方メロファイトの識別を組織切片像から判断するのは難しい。ゼニゴケは単一の頂端細胞をもたないと解釈した過去の研究例も多くある。しかし連続切片を作製し、頂端細胞直下の腹面メロファイトが腹鱗片の原基を形成しないことを指標にすれば頂端細胞を同定できる。

葉状体の背面側は、全体がクチクラで覆われた表皮が発達している。その直下には、気室(air chamber)が分化する。個々の気室は6角形の小室を形成しているため、葉状体を背面から眺めると6角形の模様がみえる。気室は中央に位置する気室孔(air pore)によって外界と通じている。気室孔は4列の細胞に環状に取り囲まれた細胞間隙であり、縦断面では樽型に配置した細胞群が観察される(図11)。一般的にはゼニゴケ気室孔は、維管束植物の気孔のような開閉運動はしないと記述されている。しかしゼニゴケ類のいくつかの種類では気室孔を囲む樽型に配置した細胞のうち、最も底部の細胞が、膨圧の変化により変形し、気室孔の通気性を調整していると考えられる例が観察されている(Walker & Pennington 1939)。気室の内部には葉緑体を多く含む細胞(同化糸; assimilatory filament)が分化し、光合成を担っている(図11)。気室孔と細胞間隙を備えた気室は、気孔を備えた維管束植物の葉肉組織と同様に、光合成組織を乾燥から守りつつ、拡散しやすい気相の二酸化炭素を植物体内に導くことに役立っている(Meyer et al. 2008)。気室孔の開閉運動がないか、不完全なものであるとすれば、維管束植物の気孔と比べて蒸散による水の損失が大きいと予測される。しかし、この蒸散作用が、地面に接した葉状体下面からの水の吸収を導いているのかもしれない。ゼニゴケ類の気室の発生起源に関しては、背面の最外層の細胞列と2番目の細胞列の間に生じた細胞間隙に起源する説(内生起源; Hofmeister 1851 など)と背面最外層の細胞同士の細胞間隙に起源する説(外生起源; Leitgeb 1880 など)の2つがあったが、フタバネゼニゴケを用いた Apostolakis & Galatis (1982) の詳細な組織学的研究は、気室が明らかに外生起源であることを示している。ゼニゴケにおいても、植物体の頂端付近の組織切片を観察し、気室の拡大過程を追うと、最外層の表皮細胞同士に隙間が生じ、それが拡大して気室となっている様子が観察できる(図12a-c)。

気室の下部の葉状体の髄質(柔組織; parenchymatous tissue)は貯蔵組織となっている。細胞は他の組織に比べ大きく、細胞間隙が発達せず、葉緑体は他の組織よりも小さく、澱粉粒が発達してい

る。貯蔵組織の細胞壁には細胞の長軸方向に直交する方向に透明な肥厚がみられる(図 13)。内部に大きな油体 (oil body) を含む細胞 (油体細胞; idioblast, oil cell) は、葉状体の各組織で所々に分化する。単膜系オルガネラである油体は、イソプレノイド化合物の合成、蓄積の場となっている (Suire et al. 2000)。

葉状体の腹面側 (地面に接する側) には、腹鱗片 (ventral scale) と仮根 (rhizoid) が分化する(図 13)。仮根は葉状体腹面の表皮細胞が分裂を伴わず伸長して生じたもので、1細胞からなる。仮根には、斑点状、線状の内生肥厚による紋様をもつ有紋仮根 (pegged rhizoid または tuberculate rhizoid) と、微小な斑点状の肥厚しかもたない平滑仮根 (smooth rhizoid) の2つのタイプがある。両者は異なる機能を担っており、発生場所や伸長方向も異なっている (Kammerling 1897, Schiffner 1909, 北川 1977)。有紋仮根は太さ 10-20  $\mu\text{m}$  程度のものが多く、腹面全体から生じて、葉状体の中央部を目指すように腹面に沿って伸びている(図 14a, b)。有紋仮根は、肥厚を形成する過程で細胞質を失い死細胞となるが、束化することで、それぞれの間に働く毛細管現象を利用し、葉状体腹面全体に水を供給する「外部通導」の機能を担っている (McConaha 1941)。一方、平滑仮根は、有紋仮根より太く (20-40  $\mu\text{m}$ )、主に中央の2列の腹鱗片やその周辺から生じ、細胞質に富んでいる。ただし細胞壁が薄いため、葉状体の古い部分ではつぶれた形状となっていることも多い。平滑仮根は、下方に伸長し、葉状体を基物に固定し、基物から水分や養分を導入する経路ともなっている (図 14c)。ゼニゴケ類の多くの種で菌根を形成する菌類が基物にのびる平滑仮根を通じて、植物体内に侵入することが分かっている。前述した広義ゼニゴケの3亜種のうち、*M. polymorpha* ssp. *montivagans* の植物体には、他のゼニゴケ類と同様、共生菌がみられるが、ゼニゴケとヤチゼニゴケにはみられない (Ligrone et al. 2007)。窒素分の多い場所に好んで生育する分類群では菌類との共生が必要ないか、菌類との共生に関する機能を失ってしまったのかもしれない。ゼニゴケの植物体表面には、メチロバクテリウムが生息しており、植物の生長を促進しているという報告もある (Kutschera et al. 2007)。

腹鱗片は、腹面全体を覆うように発達する1細胞厚の鱗片状の組織で、その形や配列は、ゼニゴケ類の各分類群で特徴があり、種を同定する際の1つの目安となる。ゼニゴケでは葉状体の中央を挟んで3列ずつ、計6列に配置し (図 15a, b)、中央の2列には他の4列にはない突起状の付属物がある (図 15c)。この付属物は、もともと葉状体の頂端付近で成長点を腹面側から背面側に覆うように発達して保護している。付属物は、葉状体が成長し腹鱗片の付着位置が成長点から離れるに従い、腹面側に引き込まれて腹鱗片の前方周縁部の突起として残る (図 15d)。中央の2列の腹鱗片は葉状体の中央部に沿って長く下垂する部分を持ち、平滑仮根を両側から束ねる鞘状の構造を形成しており、効率の良い水分輸送の通路となっている (McConaha 1941, 北川 1977) (図 14b)。日本産ゼニゴケ属の他の種類では腹鱗片は4列に並び、ゼニゴケのように葉状体の縁から大きく外にはみ出すことはないため、野外で種を判別するための指標になる (図 15d)。

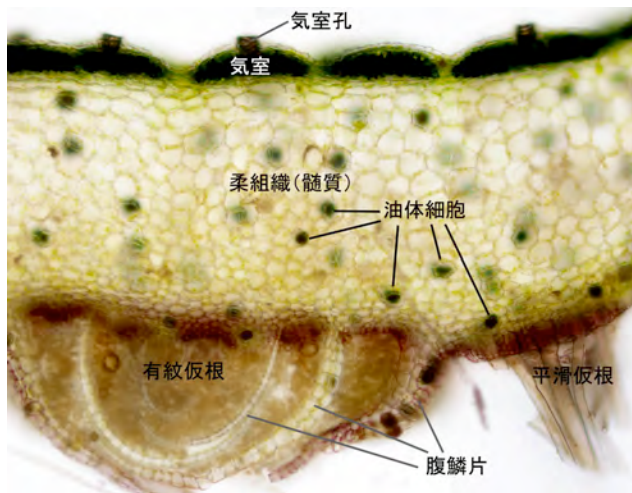


図 7. ゼニゴケ葉状体の横断面の構造。背面側の表皮組織には気室孔で外界に通じた気室が分化し、その下に分厚い柔組織(髄質)が分化する。腹面表皮から腹鱗片と仮根が分化する。有紋仮根が腹鱗片に沿うように葉状体の腹面全体に分布する。平滑仮根は基物に向かって伸びている。葉状体の所々に油体細胞が分化する。

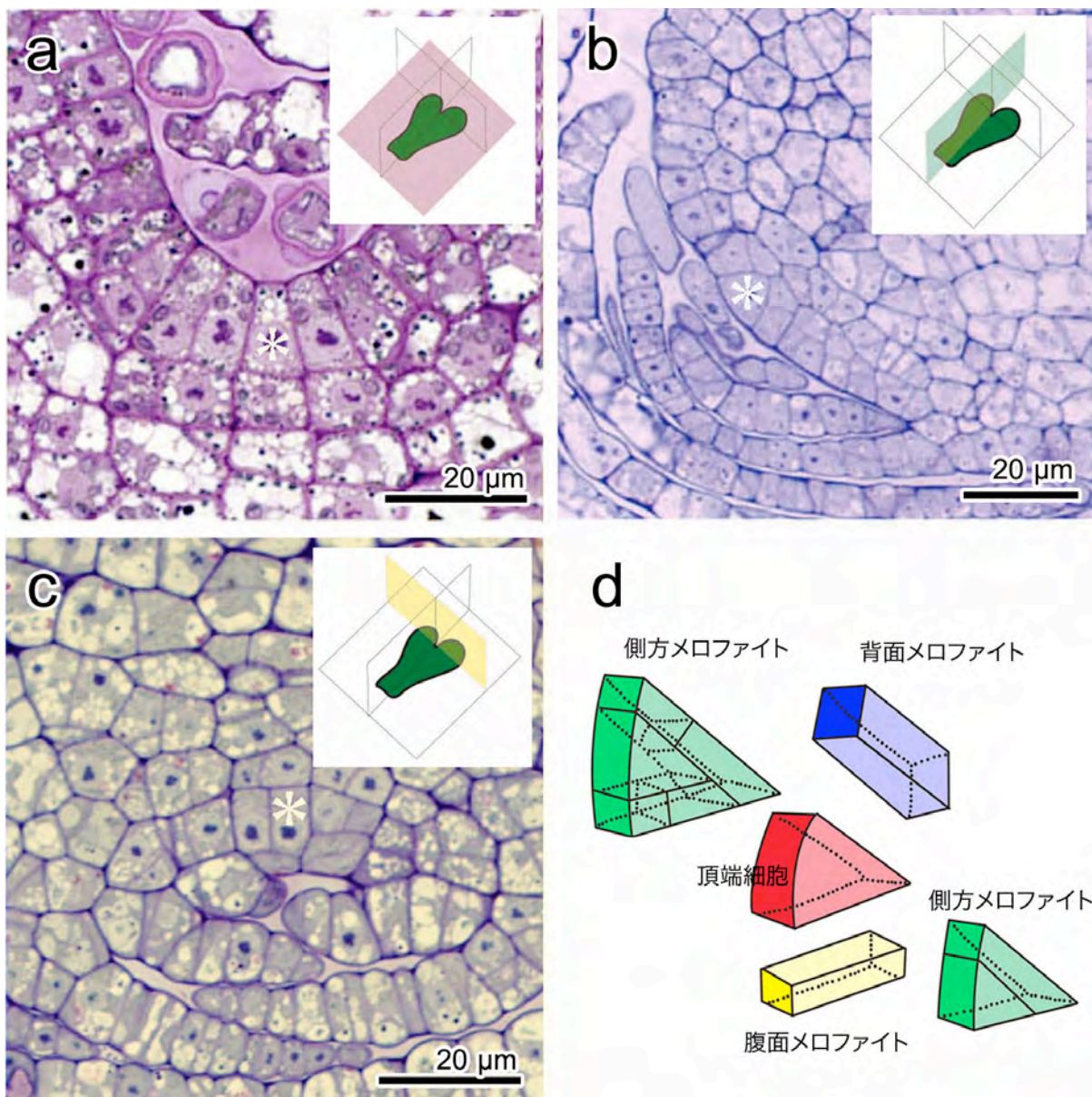


図 8. 頂端細胞(星印)を含む組織切片。a. 葉状体の背腹面に平行な切片。b. 背腹面に垂直かつ成長軸に平行な切片。c. 背腹面に垂直かつ成長軸を横断する切片。d. 頂端細胞と周辺のマロファイトの分裂パターンをの模式図。

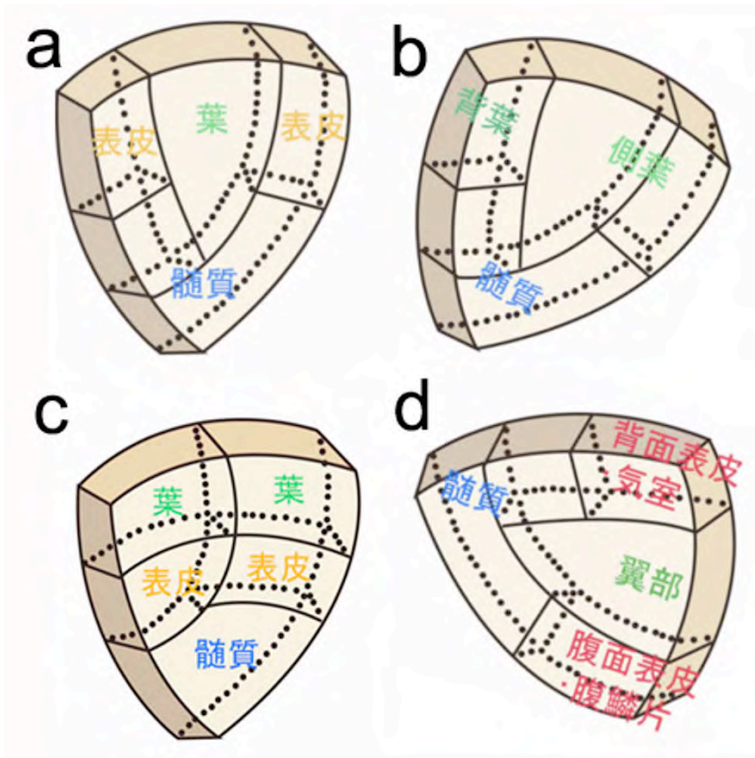


図 9. タイ類の分類群ごとのメロファイトの分裂パターンと、組織の発生活源となる細胞の違い。a. コマチゴケ綱コマチゴケ (茎葉性)。1つのメロファイトから1枚の葉が形成される。b. コマチゴケ綱ヒメトロイブゴケ (匍匐する茎葉性)。1つのメロファイトから大きな側葉と小さな背葉が形成される。c. ツボミゴケ亜綱ツボミゴケ目 (茎葉性)。1つのメロファイトから2つに切れ込んだ、あるいは2つに折り畳まれた1枚の葉が形成される。d. ゼニゴケ亜綱 (葉状性)。コマチゴケ綱と同じ分裂パターンを示すが、コマチゴケで葉を形成する細胞が、葉状体の縁 (翼部) となる。

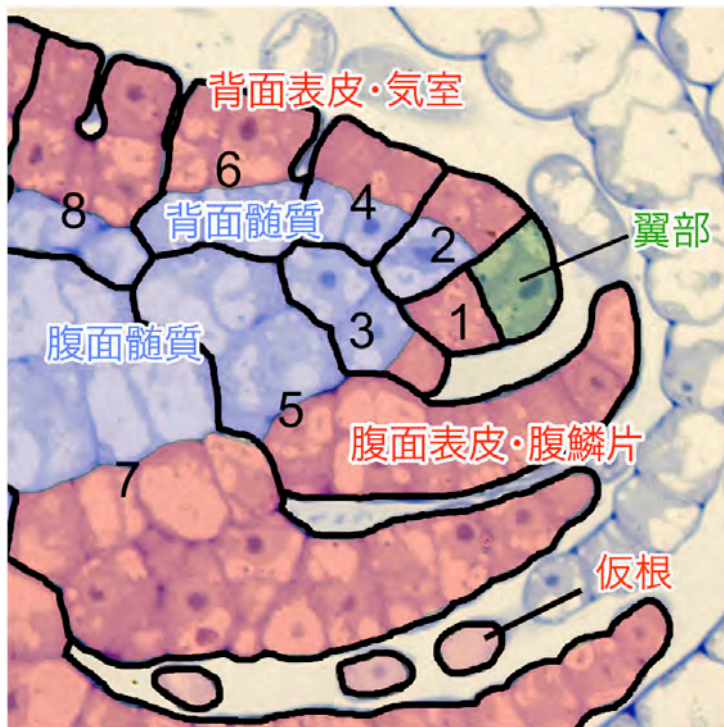


図 10. ゼニゴケ側方メロファイトの縦断切片。翼部の扇形の細胞から切り出された細胞の組織分化過程を色分けして示す。1~8の細胞群はそれぞれ、翼部の扇形の細胞から切り出された1細胞に由来する。



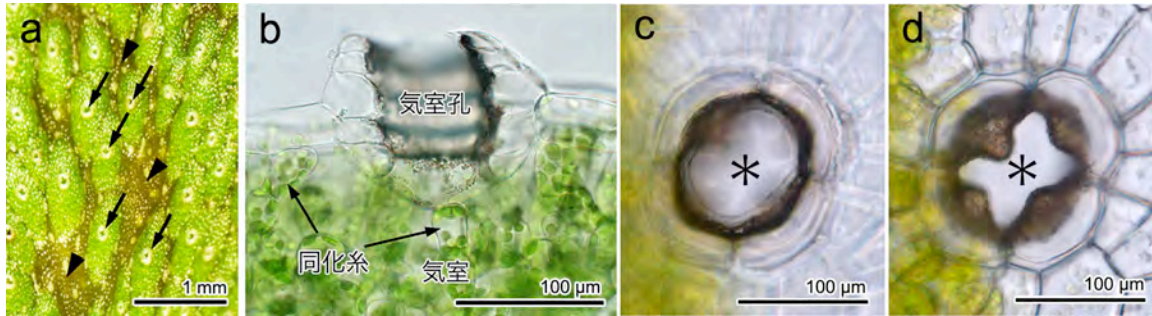


図 11. ゼニゴケの気室と気室孔。a. 葉状体背面からみた気室孔。5～6角形の個々の気室の中央部に気室孔が開く（矢印）。葉状体中央部には気室が分化しない領域（矢頭）が不連続に分布する。b. 気室孔の断面。気室孔をとりまく樽型に配置した細胞は、気室孔に面する側が肥厚する。気室内には葉緑体に富んだ同化糸がある。表皮層には葉緑体が分化しない。c. 背面側から見た気室孔の最上部。観察のために同化糸を除去した。気室孔（星印）は円形の開口部をもつ。d. 気室孔の底部。肥厚した4つの細胞がせり出し十字形に開口している。

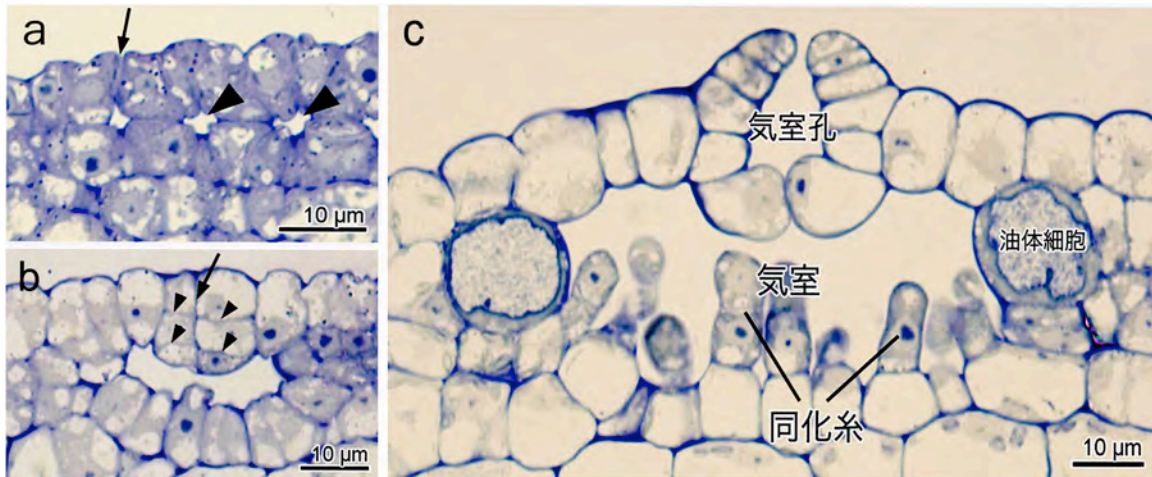


図 12. 気室の形成過程。a. 若い表皮組織の断面。気室孔の起源となる表皮細胞間に生じるすき間（矢印）と拡大しつつある気室（矢頭）。b. 発達中の気室。最初にすき間が生じた位置（矢印）で上下方向に細胞分裂がおこることで、気室孔周辺の樽型の細胞配置がえられる（矢頭）。c. 同化糸を備えた気室。

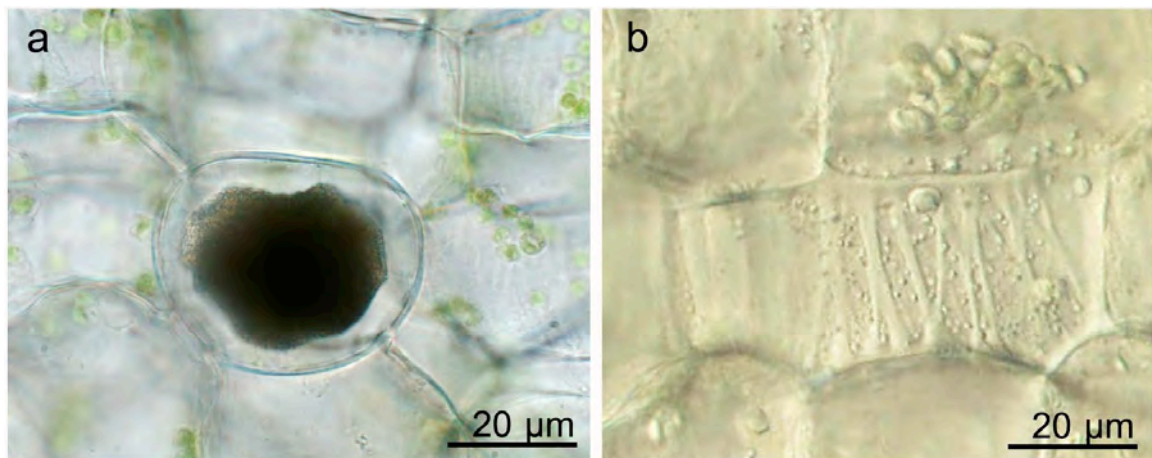


図 13. 柔組織（髄質）の細胞。a. 柔組織の葉緑体は同化糸のものに比べて小さく、デンプン粒が発達している。中央の細胞は油体細胞。b. 柔組織の細胞には透明な帯状の肥厚がある。

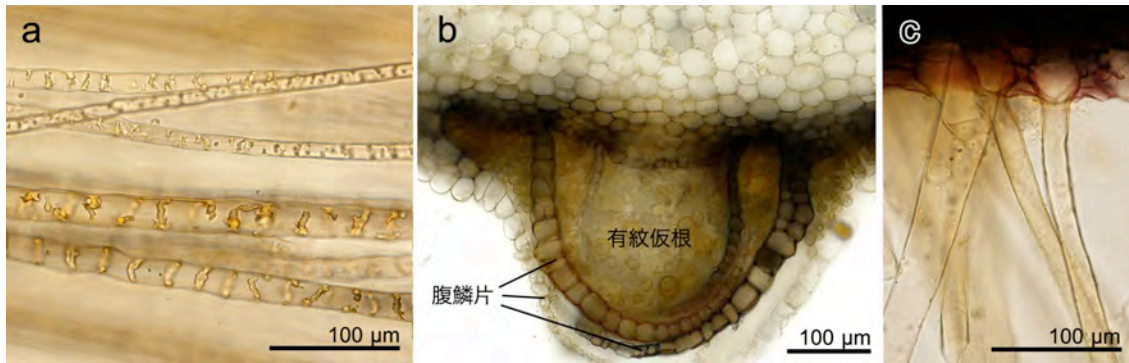


図 14. 有紋仮根と平滑仮根。a. 葉状体の腹面に沿って伸びる有紋仮根。斑点状、環状の肥厚をもつ。b. 葉状体腹面中央の有紋仮根の束。両側から腹鱗片に覆われている。c. 基物に向かって伸びる平滑仮根。

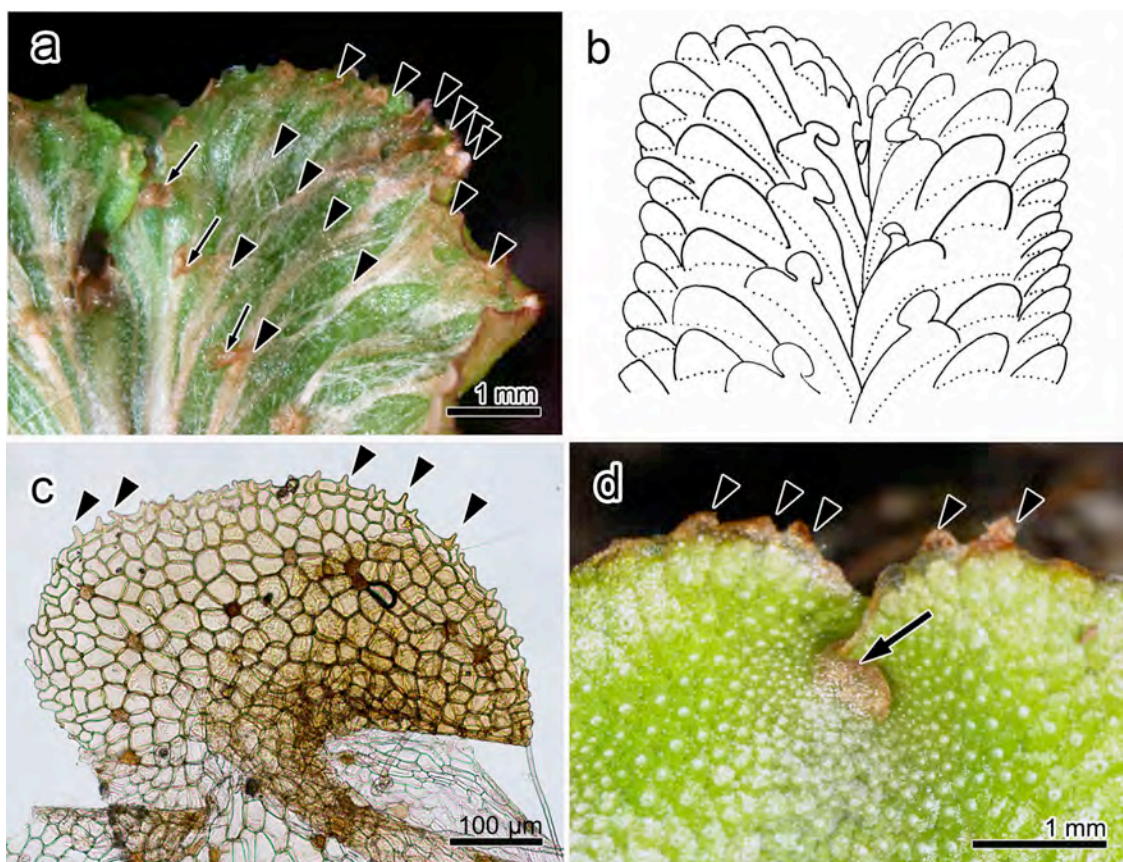


図 15. 腹鱗片の形態。a. 葉状体の腹面。腹鱗片（矢頭）が腹面全体を覆うように分布する。内側の腹鱗片には他の腹鱗片にはない付属物（矢印）がある。b. 腹鱗片の分布の模式図。両側に 3 列ずつ、合計 6 列に配列する。c. 最内列の腹鱗片の付属物。周縁に鋸歯がある（矢頭）。d. 背面から見た葉状体頂端部。頂端細胞があるノッチの部分は腹面側からせり出した腹鱗片で保護されている（矢印）。最外列の腹鱗片は葉状体の縁からはみ出している（矢頭）。

## 7. 無性芽器と無性芽

葉状体の背面中央に部に沿って、無性芽器（杯状体; gemma cup）が形成される（図 15a）。無性芽器の縁に切れ込みがあり、外側に乳頭状の突起があることは、トサゼニゴケなど平滑な無性芽

器をもつ近縁種との識別点の1つになる(図16a, b)。無性芽器の内部では、底部の細胞を起源として、無性芽が立ち上がる形で次々と形成される(図16c)。無性芽は単細胞の柄と2つの湾入部をもち、中央部に厚みのある、円形の平たい形状をしている(図16d)。無性芽が成長する過程で、湾入部を保護する粘液毛が作られる。油体細胞や仮根の原基となる細胞も分化するが、無性芽器の内部に留まっているうちは気室や腹鱗片は分化せず、形態的に背腹性を持たない。細胞分裂は周縁部全体で同調的におこるため、無性芽は葉状体のような方向性のある伸長成長をせず、円形の外形を保ったまま成長する。次々と作られ成長する無性芽は、互いに押し合うことで柄の部分が分離し、無性芽器の内部に蓄積する。蓄積した無性芽は、無性芽器の縁が斜め上方に広がった構造(splash cup)になっているため、無性芽器内に落ちた雨粒によって、はねとばされて周辺に飛び散る。無性芽が無性芽器から120 cmの距離にまで跳んだという記録もある(Equihua 1987)。無性芽が地面に落ちると、地面に接する側に仮根が分化し、湾入部の頂端細胞が活動を始め、背腹性のある組織分化が始まる。

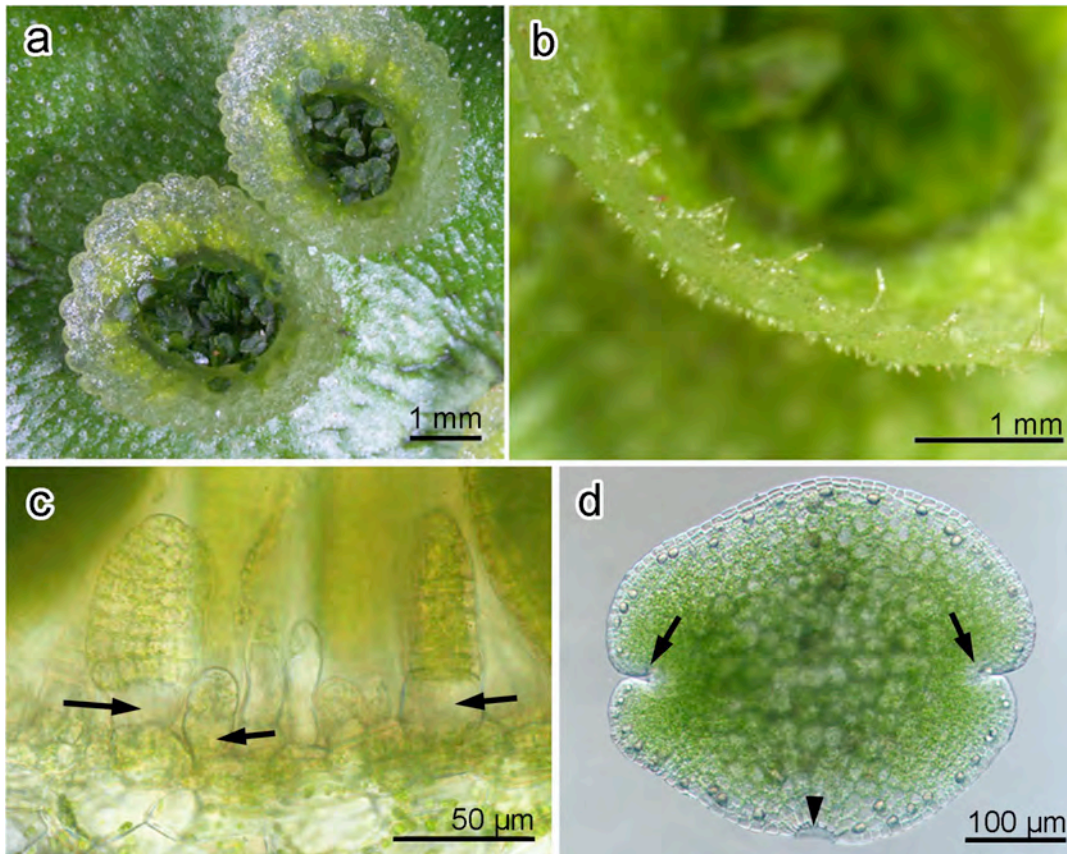


図 16. 無性芽器と無性芽。a. 無性芽器。b. 無性芽器の縁。縁とその外側に突起が生じる。c. 無性芽器の底部の形成途上の無性芽。無性芽は単細胞性の柄(矢印)をもつ。d. 柄から分離した無性芽。柄が分離した痕(矢頭)と2つのノッチ(矢印)。

## 8. 雄器托と雌器托

雄株と雌株はそれぞれ、雄器托(antheridiophore)、雌器托(archegoniophore)とよばれる、傘状の生殖枝を分化する(図17, 18)。雄器托の上部の円盤状の構造である雄器床(antheridial receptacle)には造精器(antheridium)が分化する。雄器床は葉状体によく似た構造を持っており、ゆるやかに

8裂するものが多い(図17a, c)。雄器床が成長する過程で、翼部から背面側に気室や造精器、腹面側に腹鱗片と仮根が分化する(図17b)。雄器托の柄の断面を観察すると、葉状体腹面から連続する有紋仮根の束を2列備えていることが分かる(図17c)。成熟した雄器床は、幅の広い翼部をもつため、雄器床の上部に水をためやすい構造となっている(図17b, d)。雌器托上部の傘状の雌器床(archegonial receptacle)は、深く8-10裂し、指状突起(digitate ray)とよばれる構造をもつ(図17a)。個々の指状突起の間には、頂端細胞があり、雌器床の成長過程で造卵器(archegonium)が次々と形成される。指状突起の発達が未熟な若い雌器托では、造卵器の頸部が雌器床の上方や側方に向いているが、その後、雌器床は組織全体が内曲しながら成長するため、造卵器は見かけ上、懸垂した位置に形成されるようになる(図18b)。雌器托の柄の断面を観察すると、雄器托と同様、葉状体腹面から連続する有紋仮根の束を2列備えている(図18c)。雌器托の柄では、気室や腹鱗片も分化する。雄器托、雌器托の柄は形態的には細長く徒長した葉状体と解釈できる。また、雄器床、雌器床も上部に気室が分化し、下部には鱗片様の構造が分化するなど、基本的な構造は葉状体と同じである。雌器床の指状突起の断面を観察すると、葉状体が内曲し、筒状になったものであることがわかる(図18d)。

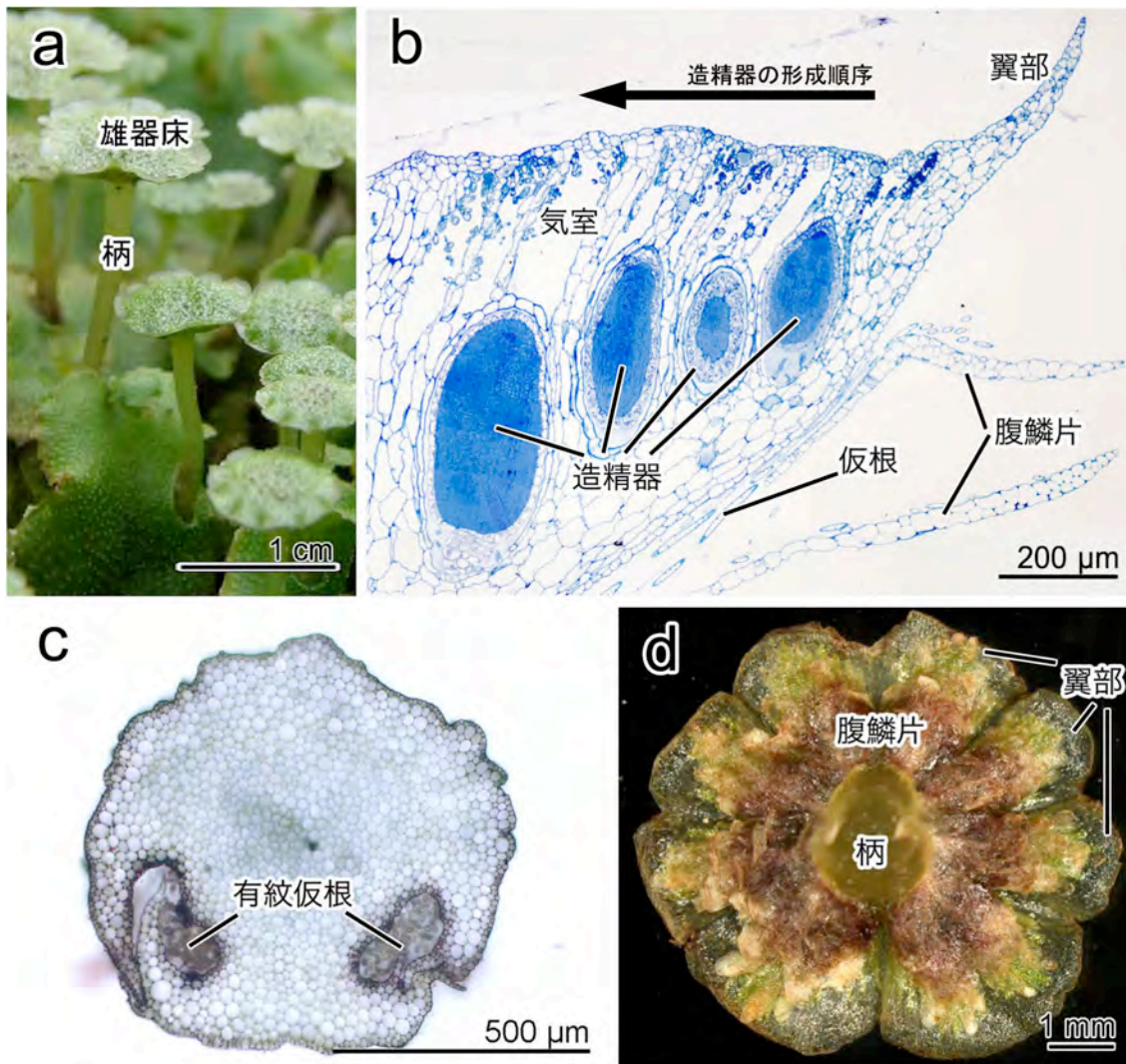


図17. 雄器床の構造。a. 雄器托外形。b. 雄器床の縦断面。c. 柄の横断面。d. 雄器床の腹面。翼部を除き、大部分が腹鱗片で覆われる。

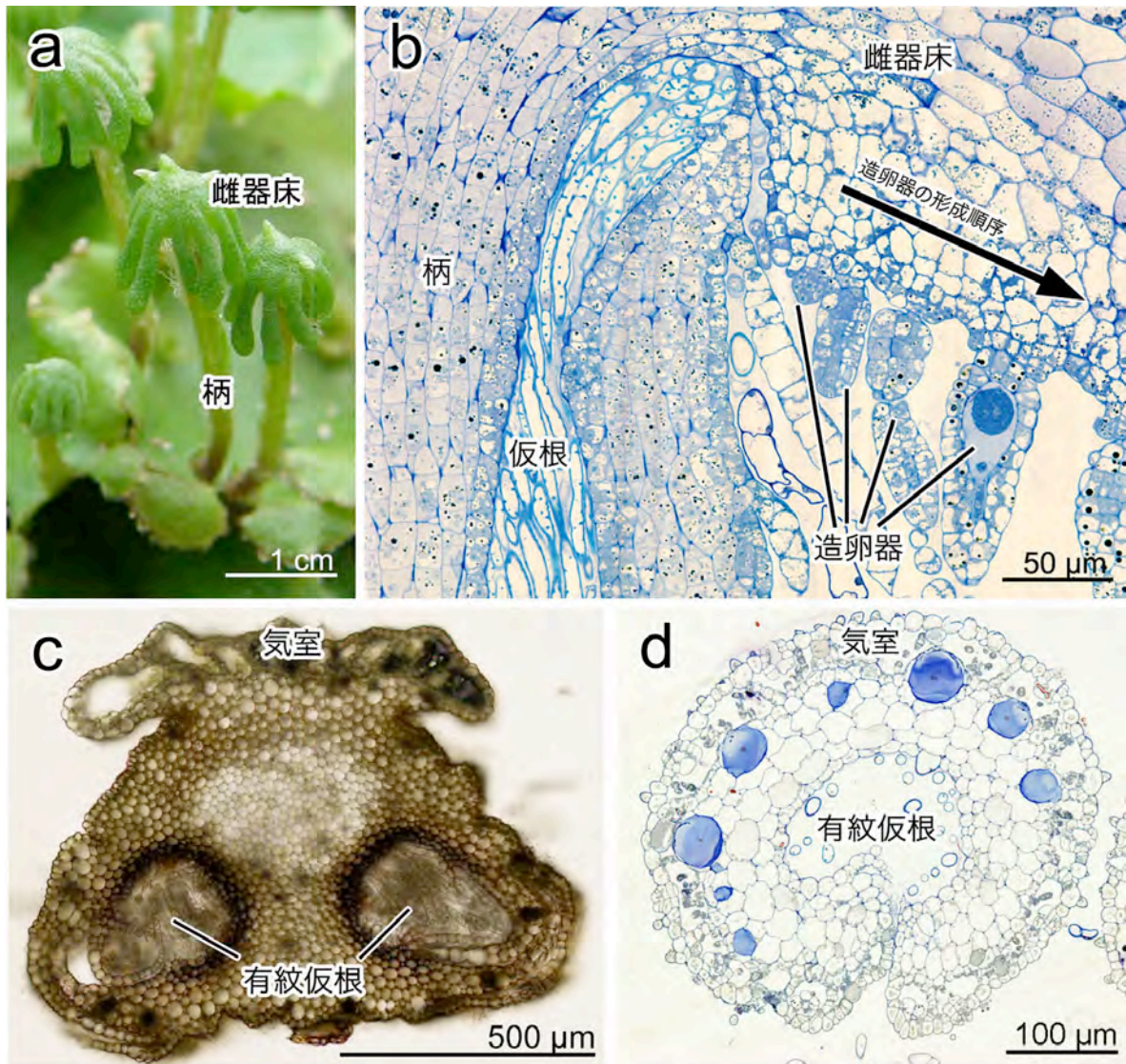


図 18. 雌器托の構造。a. 雌器托外形。b. 雌器托の縦断面（下部の柄の近く）。c. 柄の横断面。d. 指状突起の横断面。

## 9. 造精器と造卵器

造精器は雄器床の翼部の楔形の細胞から切り出された表皮の1細胞に起原する。造精器が成長する過程で、それを取り囲むように、気室によく似た、フラスコ状の腔所（造精器腔）が形成される（図 19a）。造精器腔の上部や周辺にある造精器を含まない気室とは異なり、造精器腔の内部には、同化糸が分化せず、単細胞性の粘液毛のみが少数生じる（図 19b）。造精器腔の上部は、小さい孔で外部と通じている。造精器は短い柄をもち、1細胞厚のジャケット細胞の内部は精原組織（spermatogenous tissue, androgonial tissue）である。精原組織は将来精子となる精原細胞（spermatogenous cell）のみからなる。精原細胞は細胞の伸長成長をほとんどせず、分裂方向が直交する細胞分裂を繰り返すため、精原組織は多数の小さな方形の細胞からなる（図 19c）。造精器内で行われる最後の細胞分裂である、精細胞（sperm cell）を形成する精母細胞（sperm mother cell）の分裂のみ、既存の細胞壁に対し細胞壁が斜め方向に挿入されるため、精細胞は三角形の外形をもつ（図 19d）。

タイ類の植物体の体細胞分裂では中心体のような球状の微小管形成中心（極形成体; polar

organizer) から微小管形成がおこるが、その内部には中心小体がない (Brown & Lemmon 1990, Shimamura et al. 2004)。しかし、精母細胞の分裂では、1 対の中心小体 (centriole) をもった中心体 (centrosome) が出現し、紡錘体の微小管形成中心となる (Carothers & Kreitner 1968)。中心小体は、精細胞が精子へ変態する過程で鞭毛の基部装置 (基底小体; basal body) へと変化する (Moser & Kreitner 1970)。精細胞が精子へと変態する過程で、細胞質の縮小、核の変形、精子特有の微小管構造 (鞭毛, スプライン, 基底小体) の形成がおこる (図 20a-d)。完成した精子は、凝集した核が大部分を占める長い胴体部をもち、核に沿うようにスプラインとよばれる微小管の束がある。頭部の細胞質にはミトコンドリアがあり、多層構造体に接する鞭毛基部装置から後方に向けて 2 本の鞭毛が平行に伸びている。尾部と鞭毛の先にも細胞質の固まりがあり、尾部の細胞質には葉緑体とミトコンドリアがある (図 20e, f)。コケ植物の精子のミトコンドリアや色素体が受精の際に卵細胞に持ち込まれることが観察されている (Yuasa 1952)。しかし、ツノゴケ類とタイ類の精細胞が精子へと変態する過程で細胞質オルガネラに由来する DNA 蛍光染色の輝点が消失すること (Izumi & Ono 1999, Shimamura et al. 1999)、様々な種の遺伝的な解析でも葉緑体とミトコンドリアが片親遺伝することが示されており (Pacak & Szweykowska-Kulińska 2003, McDaniel et al. 2007, Jankowiak-Siuda et al. 2008)、他の多くの陸上植物と同様に、コケ植物でも細胞質オルガネラが母性遺伝するための機構が存在すると考えられる。コケ植物の鞭毛の断面は、多くの真核生物に共通の 9+2 構造の微小管群 (鞭毛軸糸) からなるが、鞭毛軸糸にダイニン外腕をもたないのが特徴である。ゼニゴケを含め、コケ植物の完成した精子、あるいは変態途中の精細胞における構造の形態学的研究には透過型電子顕微鏡を用いた多くの研究例があり、スプラインを構成する微小管の数や、基底小体の配置など、分類群ごとに特徴的な形質が見いだされている (Carothers & Duckett 1980, Renzaglia & Garbary 2001)。

造卵器も、雌器床の翼部の表皮細胞に起源するが、雌器床は、平面的に成長する雄器床と違って、著しく内曲して成長するため、ある程度成長した雌器床では、新たな造卵器は雌器床の下部で形成される。造卵器は 1 細胞に起源し、組織の内外を分ける細胞分裂によって最初に内部に生じた細胞が、卵原細胞となる (図 21a)。卵原細胞は造卵器が成長するに従い分裂し、将来造卵器の開口部となる栓細胞 (cover cell)、4 個以上の頸溝細胞 (neck canal cell)、卵細胞に接する腹溝細胞 (ventral canal cell)、卵細胞 (egg) を形成する (図 21b)。栓細胞と頸溝細胞が、造卵器の成熟過程で崩壊することで、精子が卵細胞へ到達するための通路が開く (図 21c, d)。腹溝細胞は小さくなるが、受精時まで残存することがある。ゼニゴケ綱では頸部を構成する頸細胞が 6 列に並び (横断面で頸溝細胞の周りを 6 個の細胞が取り巻く)、その内部が、受精の際に精子が卵へと到達する通路となる (図 21d)。ツボミゴケ綱では頸細胞が 5 列に並ぶのが典型である。完成した造卵器はフラスコ形で、膨らんだ腹部 (venter) と長い頸部 (neck) をもち、腹部の内部には 1 個の卵細胞がある。造卵器の基部は浅い円筒状の組織に取り囲まれている (図 21e)。この円筒状の組織は受精がおこると、造卵器を包み込む袋状の組織に発達し、偽花被 (pseudoperianth) とよばれる。

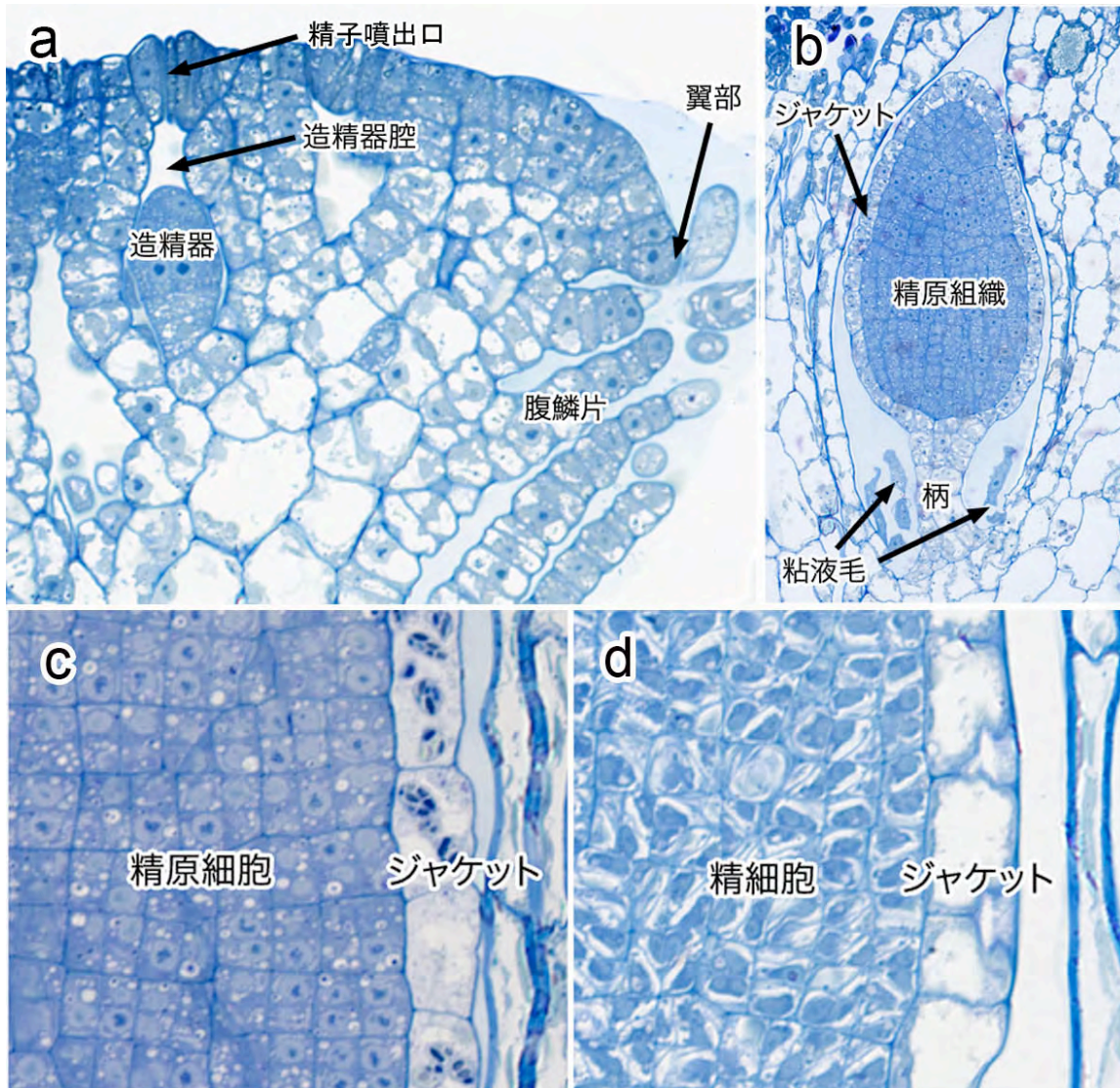


図 19. 造精器の構造。a. 若い雄器托の翼部の縦断面。b. 造精器の縦断面。c. 精原組織断面。方形の小さい細胞で占められる。d. 精原組織断面（精子変態期）。精細胞は三角形の外形を示す。

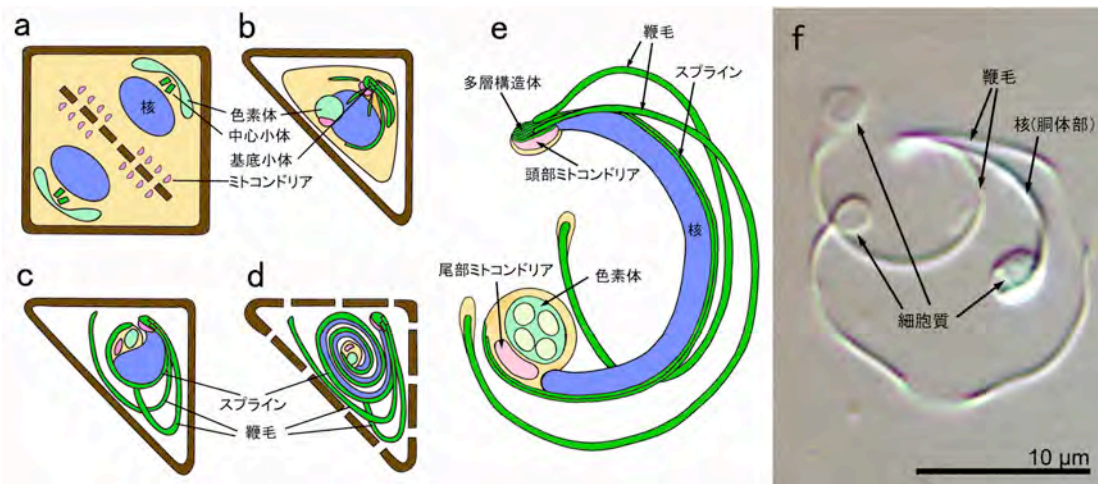


図 20. 精子の構造と形成過程。a. 精母細胞の斜め方向の細胞分裂。b. 鞭毛，スプライン微小管の形成。c. 細胞質の退化と核の凝集。d. スプラインに沿った核の伸長。e. 精子の模式図。f. 微分干渉顕微鏡で観察したゼニゴケ精子。a-e. Carothers & Kreitner (1968), Shimamura et al. (1999)を参考に作図。

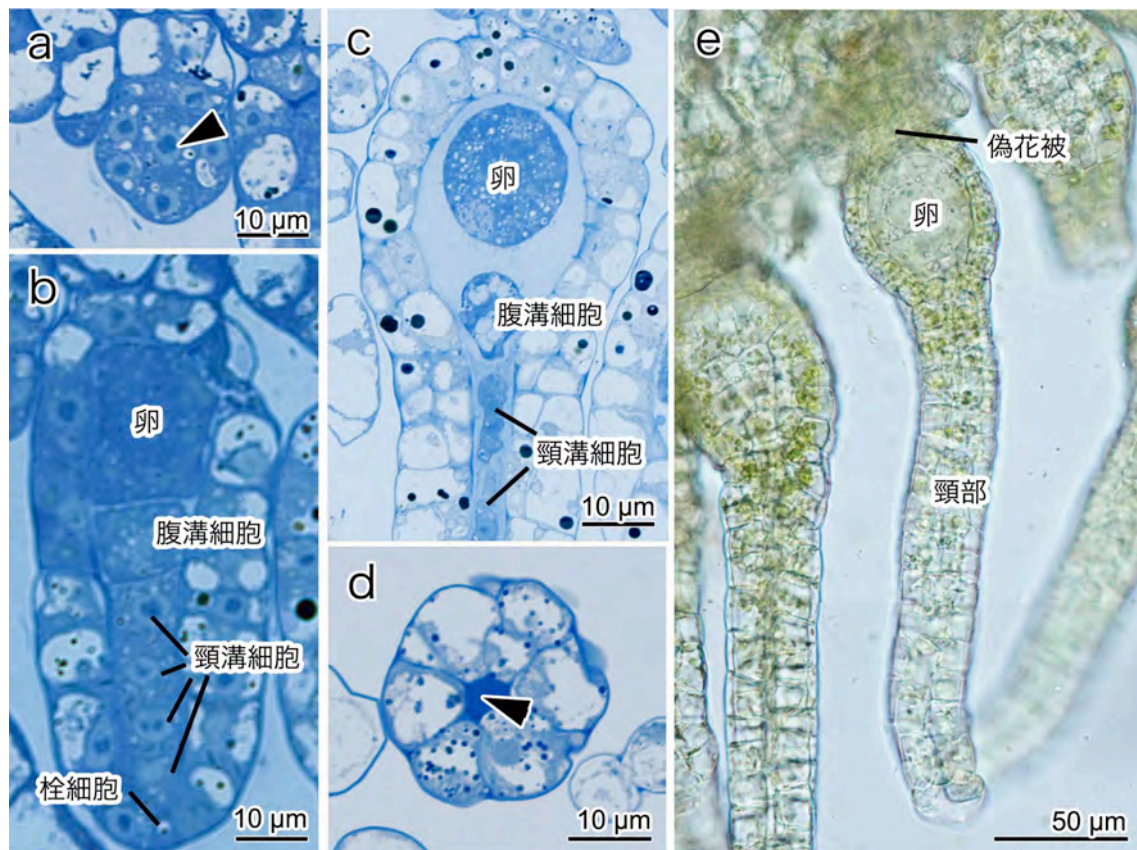


図 21. 造卵器の形成過程。a. 若い造卵器と内部の卵原細胞 (矢頭) の縦断面。b. 造卵器 (卵細胞形成直後) の縦断面。c. 造卵器腹部の縦断面 (腹溝細胞と頸溝細胞の退化)。d. 造卵器頸部の横断面。頸口 (矢頭) は 6 細胞列で囲まれる。e. 完成した造卵器。

## 10. 受精

雄器床に水が触れて雄器床の各組織の細胞が膨張すると、その圧力で造精器が崩壊し、造精器腔の上部の孔を通じて精子が雄器床上にたまった水中へ噴出する (図 22a, b)。この孔の縦断面はアーチ型で、出口が狭くなっており、樽型の縦断面を示す通常の気室孔とは、形状が異なっている (図 22c)。ゼニゴケ目には雄器床に柄がない種も多いが、それらは、雄器床の造精器腔の孔から、空気中に精子を 20 cm 近くの高さまで霧状に噴出し、風による精子の散布を行う (Shimamura et al. 2008)。今のところ、このような空気中への能動的な精子噴出はゼニゴケでは知られていない。ゼニゴケは一般的には雄器床の上に溜まった、精子を含む液滴が雨水によってはねとばされ、周辺に飛び散ることで精子が散布していると考えられている。Duckett & Pressel (2009) がメチレンブルーで着色した液滴を雄器托の上に滴下した実験によると、雄器床の上で跳ねた液滴は最大 30 cm の距離に飛び散った。一方で雄器托から吸収されたメチレンブルー溶液が、1 時間以内に、約 10 cm の大きさのコロニーの腹面側全体に、有紋仮根の束に沿って広がることも分かった。また、雌株を着色した液滴に浸したところ、30~60 分で雌器托の上部にまで着色した液が到達した。これらの結果は、葉状体の腹面や雌器托、雄器托に存在する有紋仮根の束が、植物体全体に水分を行き渡らせるだけでなく、受精においても精子の移動経路として機能している可能性を示してい



る。雄株の近くで生育する雌株の雌器床では、さまざまな発生段階の孢子体がみられ、柄に近い側に新たに作られた造卵器では、受精したばかりのものもみられる。造卵器は雌器托柄が発達して雌器床が持ち上げられたあとも継続的に形成され、受精は雌器床が地上から立ち上がった状態でも継続的におきていることが示唆される (Parihar 1956)。筆者も実際に雌器床の断面を観察してみたところ、雌器托の柄の仮根束は雌器床で枝分かれし、個々の指状突起内部の仮根束と一続きになっていることが分かった。したがって個々の指状突起の基部の間に位置する造卵器群は、両側を仮根束に取り囲まれている (図 23)。精子は雌株の葉状体の縁にさえ到達すれば、造卵器のごく近傍まで、仮根束の毛細管現象により受動的に運ばれるのではないだろうか。精子が造卵器からの何らかの誘因物質に誘われて泳ぐ必要があるとすれば、1 mm 以下のごく短い距離かもしれない。

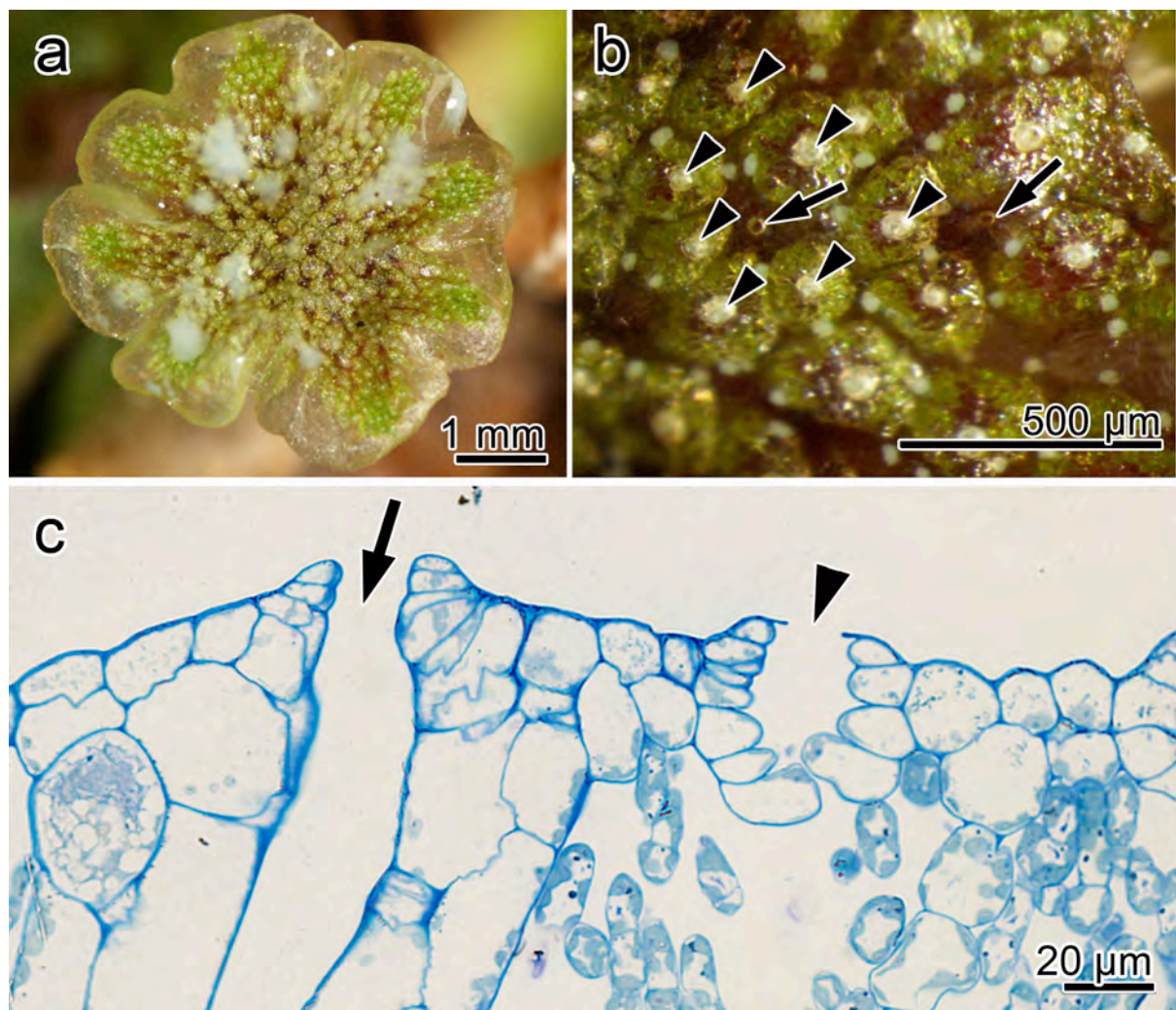


図 22. 精子の放出。a. 雄器床の上の水中に噴出した精子(白濁している部分)。b. 造精器腔の上部の精子噴出口 (矢印) と周辺の気室孔 (矢頭)。造精器腔には同化糸が発達しないため、上部からみると気室に囲まれた黒っぽい領域としてみとめられる。c. 精子の噴出口 (矢印) と気室の縦断面 (矢頭)。噴出口の断面はアーチ型で、樽型の開口部をもつ気室とは形状が異なる。

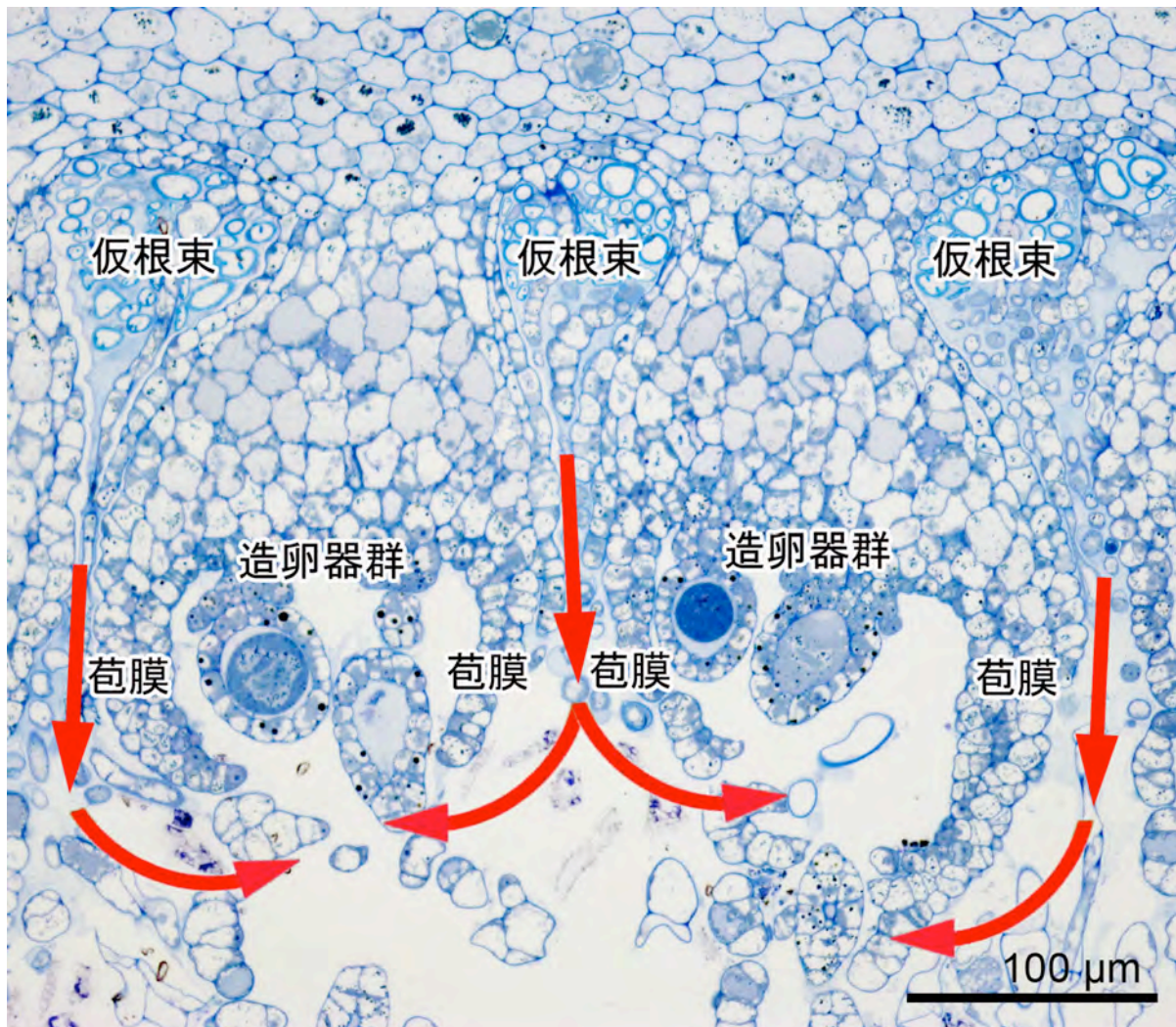


図 23. 雌器床の指状突起基部の横断面。雌器托の内部には葉状体腹面から一続きになった有紋仮根の束が入り込んでいる。造卵器群は指状突起へと続く有紋仮根の束に取り囲まれていることが分かる。精子が仮根束を經由して移動する場合、推定される受精の経路を矢印で示す。

### 1.1. 孢子体

受精した卵は、造卵器の内部で細胞分裂を開始する。まず、上下方向に分裂し、上下2つの細胞が形成される。続いてそれに直交するような向きで分裂がおこる (図 24a)。頸部に近い側の細胞群で、並層分裂がおこり、外界に接しない内側の細胞が生じたときに (図 24b)、外側をアンフィテシウム (amphithecium)、内側をエンドテシウム (endothecium) とよび、タイ類ではアンフィテシウムから蒴壁のみが生じ、エンドテシウムからは胞原組織 (孢子と弾糸) のみが生じる。ツノゴケ類の大部分や、セン類の一部ではエンドテシウムから、蒴の中心部の軸中 (コルメラ; columella) とよばれる支持組織のみが分化し、胞原組織はアンフィテシウムに起源する。

前述したように、受精がおこった造卵器の基部からは個々の造卵器を包み込むように、偽花被 (pseudoperianth)が発達する。さらにその外側から、苞膜 (雌苞膜; female involucre) で保護される。苞膜は、個々の指状突起の基部の間に位置する造卵器群を取り囲むように発達する (Parihar 1956)。造卵器の腹部は、孢子体の成長に同調して成長し、孢子体を直接包むカリプトラ (calyptra) とな

る。つまり、孢子体は内側から順に、カリプトラ、偽花被、苞膜により3重に保護されて成長する(図 24c, d, 26a)。カリプトラと偽花被は、受精がおこらない限り発達しない。茎と葉の分化が明瞭な茎葉性タイ類では、造卵器を保護するための葉の組織を苞葉 (bract) とよび、その内部にある、周囲の葉が癒合して孢子体を包み込んだようにみえる袋状の保護組織を花被 (perianth)とよんでいる。ゼニゴケのように、見かけ上「葉」がない葉状性タイ類では、同様の組織が茎葉性タイ類とは異なる異なる名称でよばれるが、苞葉と苞膜、花被と偽花被は、それぞれ相同な組織と考えられる。

コケ植物では通常、孢子体は上方に向かって成長するが、ゼニゴケ目の多くの種では造卵器が雌器床の下部に下向きについているせいで、孢子体は懸垂し、下方に向かって成長する。孢子体は他のタイ類と同様、足、柄、蒴 (孢子囊) の3つの部分からできている (図 24d)。足 (foot) は、配偶体との連結部分で、配偶体から孢子体への栄養輸送を担っている。足と配偶体組織が接する部位を胎座 (placenta) とよび、胎座では、配偶体、孢子体双方の側の細胞が複雑な肥厚を形成する。この肥厚は配偶体-孢子体間の物質輸送と関連があると考えられている。柄は足と蒴を接続する部分で、孢子散布の際に伸長成長することで、蒴を保護器官の外に押し出す。蒴は、1細胞厚の蒴壁とその内部の胞原組織 (sporogenous tissue) からなる。胞原組織には、弾糸母細胞 (elater mother cell, elaterocyte) と胞原細胞 (sporogenous cell) が対になって分化する。ゼニゴケでは弾糸母細胞はほとんど細胞分裂を行わず、伸長生長のみを行い、弾糸細胞 (elater cell) となる (ジャゴケ科などでは弾糸母細胞も分裂して増加する)。胞原細胞は4回から5回の細胞分裂を行い、1つの弾糸細胞に対し16-32個に増加し、減数分裂を行う孢子母細胞 (spore mother cell, sporocyte) となる (図 24e)。ゼニゴケ目では、ゼニゴケを含めて減数分裂時のオルガネラの配分や細胞分裂装置の形態がよく調べられている (Brown et al. 2007, 2010, Shimamura et al. 2012)。ゼニゴケでは孢子母細胞はただ1つの色素体 (葉緑体) をもち (図 25a)、核の分裂に先立って4つに分裂し、将来の孢子となる細胞質領域に移動する。核の分裂は葉緑体の配分によってあらかじめ決定された細胞極性に従って進行することが分かっている (図 25b)。タイ類では蒴の中心部に弾糸束とよばれる、孢子を分化せず弾糸が束状に分化する領域が存在することがあるが、ゼニゴケの蒴の内部は孢子と弾糸が一樣に分布し、弾糸束は認められない (図 26a)。孢子は1つの孢子体あたり300,000個以上、1つの雌器床から7,000,000個以上産生されるとの推定がある (O'Hanlon 1926)。1つの雌器托は春から秋にかけて最大100個程度の孢子体を継続的に形成するという報告 (Duckett & Pressel 2009) もあるので、実際の1つの雌器托あたりの孢子の産生量はもっと多いかもしれない。減数分裂終了後、蒴壁は環状の肥厚を形成し、最終的に細胞質を失う (図 26b)。弾糸細胞は左巻きの螺旋状の肥厚を形成し、最終的には細胞質を失い、死細胞である弾糸 (elater) となる (図 26c)。孢子体は、造卵器に由来するカリプトラに包まれた状態で成長するが、孢子を散布する際には、柄が伸長し、蒴はカリプトラを破り、さらにカリプトラを覆う偽花被と苞膜をこじ開けて、空中に露出する (図 26d)。その後、蒴壁が孢子体の先端部から不規則に破れ、弾糸が乾湿運動することで孢子が空中に放出される。

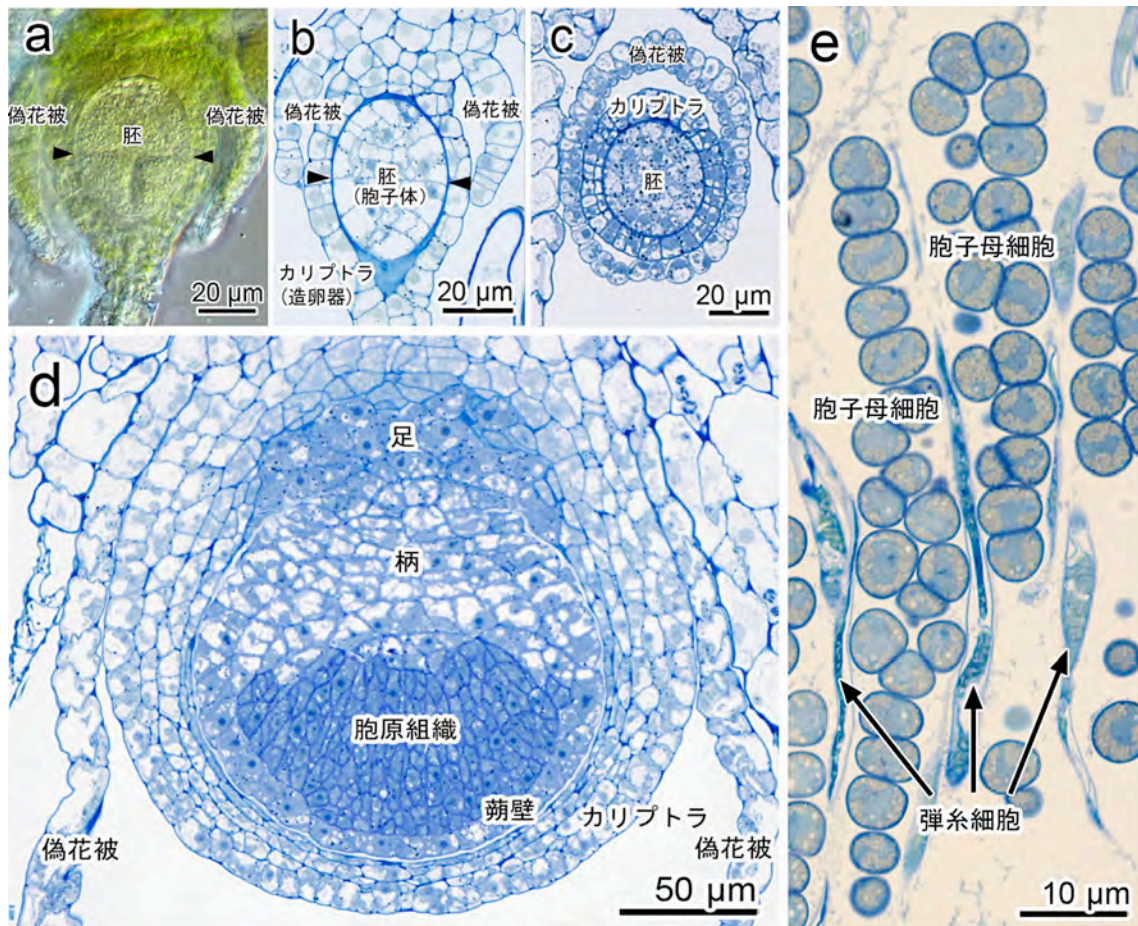


図 24. 胞子体の発生過程。a. 胚（4細胞期）の透過像。受精卵の最初の分裂面（矢頭）に対し、直交する細胞板が形成される。b. エンドテシウムが生じた胚。受精卵の最初の分裂面（矢頭）より頸部に近い側から蒴が分化する。c. 胚の横断面。胚は、造卵器の腹部に由来するカリプトラ、造卵器の基部から発達する偽花被に取り囲まれて成長する。d. 足、柄、胞子嚢（蒴壁と胞原組織）の3つの領域が分化した胞子体の縦断面。e. 減数分裂直前の胞原組織の縦断面。弾糸細胞と胞子母細胞群が交互に配置する。

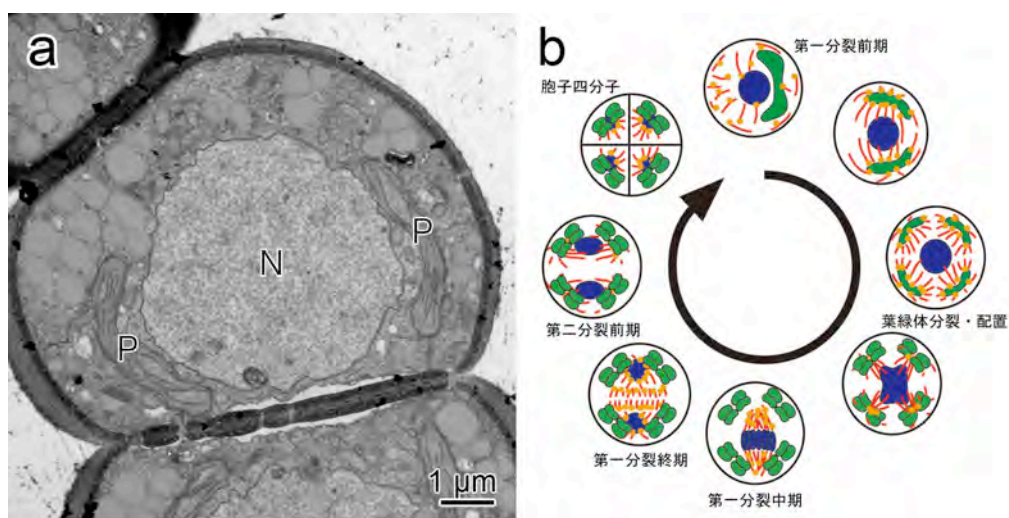


図 25. 減数分裂。a. 胞子母細胞の透過型電子顕微鏡による観察。P: 色素体, N: 核。b. 減数分裂時の色素体（緑）と核（青）の挙動。核の分裂に先立ち色素体が分裂する。色素体の表面にはγ-チューブリン（黄色）が存在し、減数分裂期の微小管（赤）の形成の足場となる。

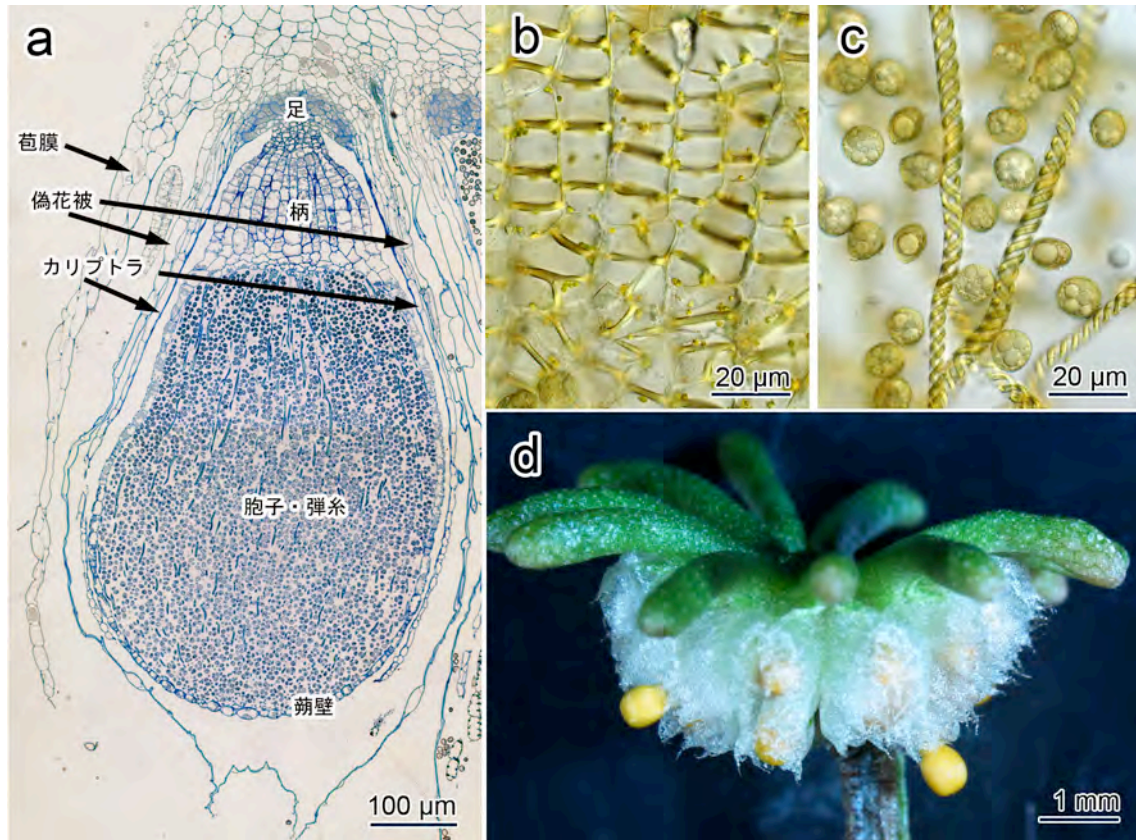


図 26. 完成した孢子体の形態。a. 減数分裂が終了した孢子体の縦断面。b. 蒴壁の環状肥厚。c. 孢子と弾糸。弾糸は 2 重螺旋の肥厚を形成する。螺旋の向きは全て左巻き。d. 柄が伸長し、苞膜の外に露出了した蒴。

## 1 2. ゼニゴケの分類学的・形態学的研究の今後の展望と課題

本稿で紹介した *M. polymorpha* (広義のゼニゴケ) の分類学的研究は主にヨーロッパに分布する植物を元に行われてきた経緯があり、アジア地域の植物については、詳細な分類学研究、遺伝的解析はなされていない。日本では、北川 (1987) が群馬県尾瀬ヶ原で採集された標本をもとに、ヤチゼニゴケ (*M. polymorpha* var. *aquatica* として同定、現在の *ssp. polymorpha* に相当) を報告したこと以外に、広義のゼニゴケの種内分類群に関する研究例がない。ゼニゴケは分類学者や採集家にとって、あまりにも身近な“駄もの”でしかないと注意が払われてこなかったという点は否めない。さらに日本には、染色体上の核小体形成部位 (nucleolar organizer) の位置がヨーロッパ産の各亜種とは異なる個体群があることが報告されており (Bischler 1986)、ゲノム構造の違いがあることが示唆されている。

*M. polymorpha* *ssp. montivagans* に関しては、ヨーロッパ以外でも、アフリカ (Perold 1999)、北米 (Schuster 1992)、ロシア (Konstantinova & Bakalin 2009)、韓国 (Choi et al. 2010)、など高緯度あるいは高標高の地域を中心に世界各地から生育が報告されており、日本国内でも新たな調査や標本の再検討が望まれる。3つの亜種間のそれぞれの中間的な形態の植物が存在することは、分類学的な解釈が研究者によって異なる原因ともなってきた。例えば湿潤な環境で生育しているゼニゴケはヤチゼニゴケに似た形態を示すことがある (北川 1987, Schuster 1992)。今後の解析で3つの亜種やその中間型の植物の遺伝的実体、形態の可塑性の幅が明らかになることを期待したい。

ゼニゴケの外部形態に関しては200年以上にわたる研究の歴史の中で、詳細に観察・記述されてきた。ただし、気室、腹鱗片、有紋仮根、雌器托、雄器托といったゼニゴケ亜綱に特有の組織の進化的起源、他のコケ植物の組織との相同性については、これまで議論が不足していた。現在、陸上植物におけるタイ類の系統的位置やコケ植物各分類群の内部の系統関係がしだいに明らかになり、形態の進化に関わる議論を系統関係に基づいて行える環境が整ってきた。ゼニゴケをモデル植物とした研究の進展で、陸上植物に普遍的な現象の理解が深まることのみならず、コケ植物特有の進化発生学的研究の基礎も確立できるのではないだろうか。これまでもつぱら、分類群や種を認識するための形態形質としてのみ注目されていたコケ植物の外部形態の多様性について、具体的な組織の相同性を遺伝子発現レベルで検証し、進化発生学的観点で研究を進めることができるかもしれない。

## 引用文献

- Apostolakos, P., & Galatis, B. 1982. Studies on the development of the air pores and air chambers of *Marchantia paleacea*. *Protoplasma* 128: 120-135.
- Bischler, H. 1986. *Marchantia polymorpha* L. s. lat. karyotype analysis. *J. Hattori Bot. Lab.* 60: 105-117.
- Bischler, H. 1989. *Marchantia* L. The Asiatic and Oceanic taxa. *Bryophytorum Bibliotheca* 38: 1-317.
- Bischler, H. 1998. Systematics and evolution of the genera of the Marchantiales. *Bryophytorum Bibliotheca* 51: 1-201.
- Bischler-Causse, H., & Boisselier-Dubayle, M. C. 1991. Lectotypification of *Marchantia polymorpha* L. *J. Bryol.* 16: 361-365.
- Boisselier-Dubayle, M. C., & Bischler, H. 1989. Electrophoretic studies in *Marchantia polymorpha* L. *J. Hattori Bot. Lab.* 67: 297-312.
- Boisselier-Dubayle, M. C., Jubier, M. F., Lejeune, B., & Bischler, H. 1995. Genetic variability in the three subspecies of *Marchantia polymorpha* (Hepaticae): isozymes, RFLP and RAPD markers. *Taxon* 44: 363-376.
- Boisselier-Dubayle, M. C., Lambourdiere, J., & Bischler, H. 2002. Molecular phylogenies support multiple morphological reductions in the liverwort subclass Marchantiidae (Bryophyta). *Mol. Phylogenet. Evol.* 24: 66-77.
- Brown, R. C., & Lemmon, B. E. 1990. Polar organizers mark division axis prior to preprophase band formation in mitosis of the hepatic *Reboulia hemisphaerica* (Bryophyta). *Protoplasma* 156: 74-81
- Brown R. C., Lemmon B. E., & Shimamura, M. 2007. Transformations of the pleiomorphic plant MTOC during sporogenesis in the hepatic *Marchantia polymorpha*. *J. Integr. Plant Biol.* 49: 1244-1252.
- Brown, R. C., Lemmon, B. E., & Shimamura, M. 2010. Diversity in meiotic spindle origin and determination of cytokinetic planes in sporogenesis of complex thalloid liverworts (Marchantiopsida). *J. Plant Res.* 123: 589-605
- Burgeff, H. 1943. Genetische Studien an *Marchantia*. Gustav Fischer, Jena, Germany.
- Carothers, Z. B., & Duckett, J. G. 1980. The bryophyte spermatozoid: a source of new phylogenetic information. *Bull. Torrey Bot. Club* 107: 281-297.
- Carothers, Z. B., & Kreitner, L. 1968. Studies of spermatogenesis in the Hepaticae. II. Blepharoplast

- Structure in the spermatid of *Marchantia*. *J. Cell Biol.* 36: 603-616.
- Choi, S. S., Bakalin V. A., & Sun, B. Y. 2010. Unrecorded liverwort species from Mt. Deogyu, Korea. *Kor. J. Plant Tax.* 40: 218-225.
- Crandall-Stotler, B. 1981. Morphology/anatomy of hepatics and anthocerotes. In: Schultze-Motel W. (ed.) *Advances in Bryology I*. pp. 315-398. J. Cramer, Vaduz.
- Crandall-Stotler, B., & Stotler, R. E. & Long, D. G. 2009. Phylogeny and Classification of the Marchantiophyta. *Edinb. J. Bot.* 66: 155-198.
- Dillenius, J. J. 1741-1742. *Historia muscorum*. Theatro Sheldoniano, Oxford, UK.
- Duckett, J. G., & Pressel, S. 2009. Extraordinary features of the reproductive biology of *Marchantia* at Thursley NNR. *Field Bryol.* 97: 2-11.
- Duckett, J. G., & Renzaglia, K. S. 1993. The reproductive biology of the liverwort *Blasia pusilla* L. *J. Bryol.* 17: 541-552.
- Equihua, C. 1987. Splash-cup dispersal of gemmae in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Cryptogamie Bryologie-Lichénologie* 8: 199-217.
- Forrest, L. L., Davis, E. C., Long, D. G., Crandall-Stotler, B. J., Clark, A., & Hollingsworth, M. L. 2006. Unraveling the evolutionary history of the liverworts (Marchantiophyta) – Multiple taxa, genomes, and analyses. *Bryologist* 109: 303-334.
- Graham, L. E., Wilcox, L. W., Cook, M. E., & Gensel, P. G. 2004. Resistant tissues of modern marchantioid liverworts resemble enigmatic Early Paleozoic microfossils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 11025-11029.
- He-Nygrén, X., Juslén, A., Ahonen, I., Glenny, D., & Piippo, S. 2006. Illuminating the evolutionary history of liverworts (Marchantiophyta)—towards a natural classification. *Cladistics* 22: 1-31.
- Hofmeister, W. 1851. *Vergleichende Untersuchungen der Keimung, Entfaltung und Fruchtbildung höherer Kryptogamen und der Samenbildung der Gymnospermen*. Leipzig.
- Inoue, H. 1960. Studies in spore germination and the earlier stages of gametophyte development in the Marchantiales. *J. Hattori Bot. Lab.* 23:148-191.
- Izumi, Y., & Ono, K. 1999. Changes in plastid DNA content during the life cycle of the hornwort *Anthoceros punctatus* L. *Cytologia* 64: 37-44
- Jankowiak-Siuda, K., Pacak, A., Odrzykoski, I., Wyatt, R. & Szweykowska-Kulińska, Z. 2008. Organellar inheritance in the allopolyploid mosses species *Plagiomnium medium* and *Plagiomnium curvatulum*. *Taxon* 57: 145-152.
- 片桐知之・古木達郎 2012. 日本産タイ類ツノゴケ類チェックリスト. 蘚苔類研究 10: 193-210.
- 北川尚文 1987. ゼニゴケの一変種日本に産す. 日本蘚苔類学会会報 4: 116-117.
- 北川尚文 1977. ゼニゴケの腹鱗片と仮根. 日本蘚苔類学会会報 2: 34-36.
- Kammerling, Z. 1897. Zur Biologie und Physiologie der Marchantiaceen. *Flora* 84: 1-68.
- Kny, L. 1890. Bau und Entwicklung von *Marchantia polymorpha* L. *Botanische Wandtafeln* 8: 364-401. Paul Parey, Berlin.
- 河内孝之・石崎公庸 2012. 古くて新しいモデル植物としての苔類ゼニゴケの特徴. *BSJ Review* 3:

58-70.

- Konstantinova, N. A., & Bakali, V. A. 2009. Checklist of liverworts (Marchantiophyta) of Russia. *Arctoa* 18: 1-64.
- Kutschera, U., Thomas, J., & Hornschuh, M. 2007. Cluster formation in liverwort-associated methylobacteria and its implications. *Naturwissenschaften* 94: 687-692.
- Leitgeb, H., 1880. Die Athemöffnung der Marchantiaceen. Sitz-Ber. d. Kaiserl. Akademie d. Wiss. 81: 40-54.
- Linnaeus, C. 1753 *Species plantarum*. Ed. 1. Salvius, Stockholm.
- Ligrone, R., Carafa, A., Lumini, E., Bianciotto, V., Bonfante, P., & Duckett, J. G. 2007. Glomeromycotean associations in liverworts: a molecular, cellular, and taxonomic analysis. *Amer. J. Bot.* 94: 1756-1777.
- Long, D. G. 2006. New higher taxa of complex thalloid liverworts (Marchantiophyta –Marchantiopsida). *Edinb. J. Bot.* 63: 257-262.
- McConaha, M. 1941. Ventral structures effecting capillarity in the Marchantiales. *Amer. J. Bot.* 28: 301-306.
- McDaniel, S. F., Willis, J. H., & Shaw, A. J. 2007. A linkage map reveals a complex basis for segregation distortion in an interpopulation cross in the moss *Ceratodon purpureus*. *Genetics* 176: 2489-2500.
- Meyer, M., Seibt, U. & Griffiths, H. 2008. To concentrate or ventilate? Carbon acquisition, isotope discrimination and physiological ecology of early land plant life forms. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 2767-2778
- Moser, J. W., & Kreitner, G. L. 1970. Centrosome structure in *Anthoceros laevis* and *Marchantia polymorpha*. *J Cell Biol.* 44: 454-458.
- Nakazato, T., Kadota, A., & Wada, M. 1999. Photoinduction of spore germination in *Marchantia polymorpha* L. is mediated by photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 40: 1014-1020.
- O'Hanlon, M. E. 1926. Germination of the spores and early stages in the development of the gametophyte of *Marchantia polymorpha*. *Bot. Gaz.* 82: 215-222.
- Pacak, A. & Szweykowska-Kulińska, Z. 2003. Organellar inheritance in liverworts: an example of *Pellia borealis*. *J Mol Evol.* 56:11-7.
- Parihar, N. S. 1956. An Introduction to Embryophyta. Volume I. Bryophyta, Central Book Depot. Allahabad, India.
- Paton, J. A. 1999. The Liverwort Flora of the British Isles. Harley Books, Colchester. UK.
- Perold, S. M. 1999. Flora of Southern Africa. Hepatophyta. Part 1: Marchantiopsida. In: O.A.Leistner (ed.), Flora of southern Africa:1-252. Botanical Research Institute, Pretoria.
- Qiu, Y.-L., Li, L., Wang, B., Chen, Z., Knoop, V., Groth-Malonek, M., Dombrovska, O., Lee, J., Kent, L., Rest, J., Estabrook, G. F., Hendry, T. A., Taylor, D. W., Testa, C. M., Ambros, M., Crandall-Stotler, B., Duff, R. J., Stech, M., Frey, W., Quandt, D., & Davis C. C. 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 15511-15516.
- Qiu, Y.-L., Li, L., Wang, B., Chen, Z., Dombrovska, O., Lee, J., Kent, L., Li, R., Jobson, R. W., Hendry, T. A., Taylor, D. W., Testa, C. M., & Ambros, M. 2007. A nonflowering land plant phylogeny inferred



- from nucleotide sequences of seven chloroplast, mitochondrial, and nuclear genes. *Int. J. Plant Sci.* 168: 691-708.
- Renzaglia, K.S., & Garbary, D. J. 2001. Motile gametes of land plants: diversity, development, and evolution. *Crit Rev Plant Sci.* 20:107-213
- Schiffner, V. 1909 Studien über die Rhizoiden der Marchantiales. *Ann. Jard. Bot. Buitenz. 2 ser., Suppl.* 3: 473-492.
- Schuster, R. 1983. Phytogeography of the Bryophyta. In *New manual of bryology. Edited by R.M. Schuster.* Hattori Bot. Lab., Nichinan, Japan.
- Schuster, R. M. 1992. The Hepaticae and Anthocerotae of North America, Vol. 6. Field Museum of Natural History. Chicago.
- Shimamura, M., Fukushima, H., Yamaguchi, T., & Deguchi, H. 1999. Behavior of plastid and plastid DNA during spermiogenesis in *Dumortiera hirsuta*. *Bryol. Res.* 7: 201-204.
- Shimamura, M., Brown, R. C., Lemmon, B. E., Akashi, T., Mizuno, K., Nishihara, N. Tomizawa K. I., Yoshimoto, K., Deguchi, H., Hosoya, H., Horio, T., & Mineyuki, Y. 2004.  $\gamma$ -Tubulin in basal land plants: characterization, localization, and implication in the evolution of acentriolar microtubule organizing centers. *Plant Cell* 16: 45-59.
- Shimamura, M., Furuki, T., & Deguchi, H. 2005. Sporophyte anatomy of *Cavicularia densa* Steph. (Blasiaceae). *Bryologist.* 108: 420-426.
- 嶋村正樹・古木達郎・出口博則 2006. ウスバゼニゴケの孢子体における形態学的研究. *Hikobia* 14: 399-402.
- Shimamura, M., Yamaguchi, T., & Deguchi, H. 2008. Airborne sperm of *Conocephalum conicum* (Conocephalaceae). *J. Plant Res.* 121: 69-71.
- Shimamura, M., Itouga, M., & Tsubota, H. 2012. Evolution of apolar sporocytes in marchantialeen liverworts: implications from molecular phylogeny. *J. Plant Res.* 125: 197-206.
- Stotler, R. 1994. [Review of the book *Marchantia L. The European and African Taxa. Bryophytrum Bibliotheca* 45 by Bishler, H.] *Bryologist* 97: 351-352.
- Suire, C., Bouvier, F., Backhaus, R. A., Bégu, D., Bonneau, M., & Camara, B. 2000. Cellular localization of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Marchantia polymorpha*. uncovering a new role of oil bodies. *Plant Physiol.* 124: 971-978.
- Völker, H. 1972. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Cytokinese an jungen Brutkörpern von *Marchantia polymorpha* L. *Protoplasma*, 75: 139-153.
- Walker, R., & Pennington, W. 1939. The movements of the air pores of *Preissia quadrata* (Scop.). *New Phytologist* 38: 62-68.
- Walton, J. 1925. Carboniferous bryophytes. I. Hepaticae. *Ann. Bot.* 39: 563-72.
- Wellman, C. H., Osterff, P. L., & Mohiuddin, U. 2003. Fragments of the earliest land plants, *Nature* 425: 282-285.
- Wheeler, J. A. 2000. Molecular phylogenetic reconstructions of the marchantioid liverwort radiation. *Bryologist* 103: 314-333.

Yuasa, A. 1952. Studies in the cytology of Pteridophyta XXX. The behavior of the plastid during the process of fertilization. *Sci. Pap. Coll. Gen. Edu. Univ. Tokyo* 2: 73-79.

## ゼニゴケ細胞生物学

恵良厚子・上田貴志

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

〒113-0033 文京区本郷 7-3-1

Cell biology in liverwort

Key words: Cytoskeleton, Membrane traffic, Organelle, Rab5, VAMP727

Atsuko Era &amp; Takashi Ueda

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo

7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

## 1. 膜交通システム

真核生物の細胞内には様々なオルガネラが存在し、それぞれに固有のタンパク質が局在している。オルガネラが正常な機能を維持したり、その機能を細胞の内部環境や外部環境・刺激に応答して変化させたりするためには、タンパク質が各オルガネラや他の目的地へと正確に輸送される必要がある。単膜系オルガネラ（小胞体、ゴルジ体、トランスゴルジネットワーク、エンドソーム、液胞、細胞膜、etc.）

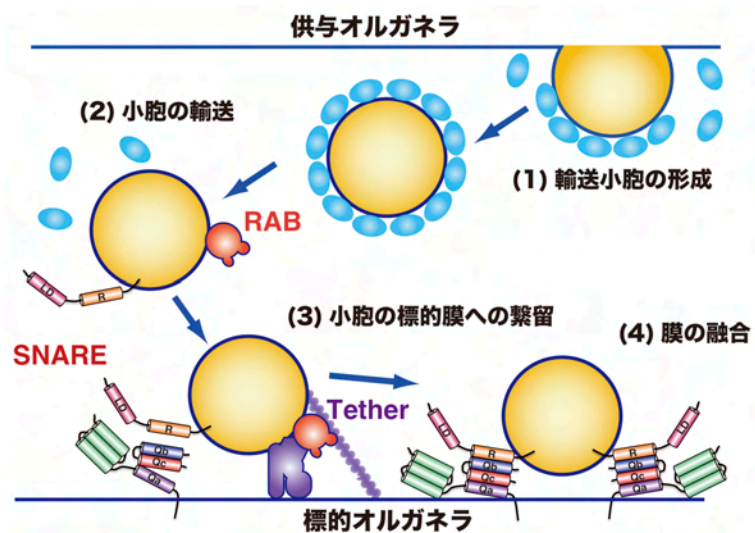


図1 膜交通の分子機構。

間において、その正確な輸送を担っているのが“膜交通”システムである。膜交通は、輸送小胞の出芽、輸送小胞の標的膜への繫留と、それに続く融合のステップが繰り返し起こることにより成り立っており、出芽のステップでは被覆複合体、繫留・融合のステップでは Rab GTPase と SNARE タンパク質という、進化的に保存された分子が活躍する（図1）。異なる膜交通経路では異なる被覆複合体, Rab GTPase, SNARE タンパク質のセットがはたらいっている。また、これらの分子は固有のオルガネラに局在することから、オルガネラのアイデンティティーを決定付けている分子であるとも言える。

かつて原核生物から真核生物が誕生し、現存の真核生物へと進化する過程で、細胞内の膜構造はその複雑さを増してきた。オルガネラの種類が増え、同時に輸送経路も多様化したはずである。膜交通経路網の全てで、被覆複合体, Rab GTPase, SNARE の三点セットが機能していることから、膜交通の多様化には、これら三点セットをコードしている遺伝子の重複と、それに続く変異の蓄積による機

能の多様化が必要であったことが示唆される。つまり、被覆複合体, Rab GTPase, SNARE の多様化は、膜交通経路の多様化とリンクしているのである (図 2) (Dacks & Field 2007)。

## 2. RAB5 グループの機能の多様化

Rab GTPase は、輸送小胞を標的膜に繫留するステップを調節する分子スイッチである。その中の Rab5 グループは、一部の例外を除き真核生物に広く保存されており、エンドソームにおいて機能している。動物においては、Rab5 が様々なエンドソーム機能の調節を行っていることが知られている (Grosshans et al. 2006)。シロイヌナズナには、*RHA1*, *ARA7*, *ARA6* という3つの Rab5 ホモログがある。*RHA1* と *ARA7* は、動物の Rab5 とよく似た構造を持つ、真核生物に保存されたタイプの RAB5 (保存型 Rab5) である。一方 *ARA6* は、保存型 Rab5 とは逆にアミノ末端側に脂質修飾を受けるなど、非常に特徴的な構造を持っている。このタイプの RAB5 は陸上植物に広く保存されているが、動物や菌類を含む他の真核生物の系統には存在しないことから、*ARA6* グループは植物が進化の過程で独自に獲得した植物特異的な RAB5 であると考えられる (マラリア原虫を含むアピコンプレクサの一部には、*ARA6* とある程度の特徴を共有する RAB5 が存在するが、その由来は不明である)。さて、この *ARA6* は、一体どのような膜交通経路を制御しているのだろうか。シロイヌナズナにおいてその細胞内局在を観察してみると、保存型 RAB5 も *ARA6* も、多胞化したエンドソーム (multivesicular endosome: MVE) に局在していた。だが、両者の局在は完全には一致せず、一部重複しつつ異なるエンドソーム集団に局在していることが示された (このことから、エンドソームにも様々な種類があることが分かる) (Ueda et al. 2001)。この局在の違いから、保存型 RAB5 と *ARA6* が、異なる機能を有していることが示唆されていた。そして近年、保存型 RAB5 はエンドソームから液胞膜への、*ARA6* はエンドソームから細胞膜への輸送系路ではたらいっていることが、ついに明らかとなった (Ebine et al. 2011)。では、この *ARA6* が局在しているエンドソームによって、細胞膜または細胞外へどのような物質が運ばれているのである

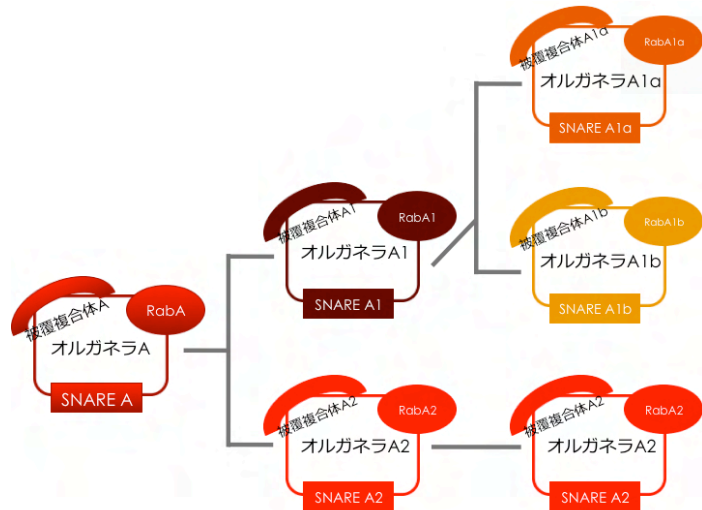


図2 膜交通制御因子の遺伝子重複と膜交通経路の複雑化。  
(Dacks & Field 2007 より改変)

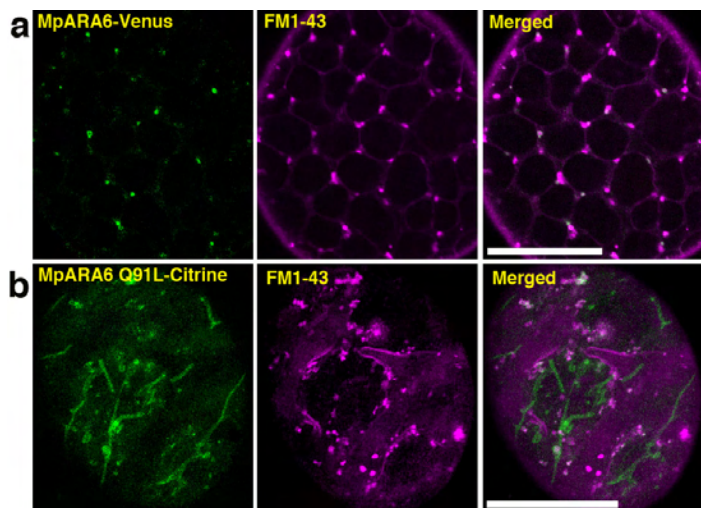


図3 (a) MpARA6 の細胞内局在。FM1-43 によりラベルされたエンドソームに局在している。(b) 恒常活性型 MpARA6 の局在。FM1-43 によりラベルされた液胞膜とは異なる奇妙な膜区画 (erasome) に局在している。恒常活性型 Rab は、自身の制御する膜交通経路の最終到達点に蓄積すると考えられている。Bars = 20  $\mu$ m

とある程度の特徴を共有する RAB5 が存在するが、その由来は不明である)。さて、この *ARA6* は、一体どのような膜交通経路を制御しているのだろうか。シロイヌナズナにおいてその細胞内局在を観察してみると、保存型 RAB5 も *ARA6* も、多胞化したエンドソーム (multivesicular endosome: MVE) に局在していた。だが、両者の局在は完全には一致せず、一部重複しつつ異なるエンドソーム集団に局在していることが示された (このことから、エンドソームにも様々な種類があることが分かる) (Ueda et al. 2001)。この局在の違いから、保存型 RAB5 と *ARA6* が、異なる機能を有していることが示唆されていた。そして近年、保存型 RAB5 はエンドソームから液胞膜への、*ARA6* はエンドソームから細胞膜への輸送系路ではたらいっていることが、ついに明らかとなった (Ebine et al. 2011)。では、この *ARA6* が局在しているエンドソームによって、細胞膜または細胞外へどのような物質が運ばれているのである

うか。それは未だ ARA6 がいかなる高次機能の発現に関わるのかという問題とともに未解明であるが、ARA6 経路が少なくともいくつかのストレスに対する耐性に関わるという知見が得られつつある。

さて、前述の通り、この ARA6 タイプの RAB5 は、陸上植物に広く保存されている。陸上植物の基部に位置するゼニゴケも、このタイプの RAB5 を持っている (MpARA6)。では、MpARA6 もシロイヌナズナの ARA6 と同様エンドソームから細胞膜への輸送を制御しているのであろうか。MpARA6 の細胞内局在を調べたところ、やはりエンドソームに局在が認められた (図 3a)。では、MpARA6 はこのエンドソームとどのオルガネラの間での輸送を制御しているのであろうか？ 現在までに得られている結果は、MpARA6 が液胞膜とも細胞膜とも異なる奇妙な膜区画 (erasome) への輸送に関わっていることを示唆している (図 3b)。この結果は、ゼニゴケにおいて植物特異的 RAB5 がシロイヌナズナとは異なる機能を有していることを示している。ゼニゴケは進化の過程で独自の膜交通経路を発達させ、世界中の日陰で繁栄する植物となったのかもしれない。

### 3. 種子植物が持つ SNARE, VAMP727 の本当の起源は？

Rab GTPase のはたらきにより輸送小胞が標的膜に繫留された後、輸送小胞に局在する R-SNARE と標的膜に局在する Q-SNARE とが複合体を形成し、膜融合が起こる。この SNARE の中でも、植物固有のものがある。VAMP7 は R-SNARE の一種で、植物の VAMP7 は VAMP71 と VAMP72 の 2 グループから成り立っている。さらに種子植物には、VAMP72 のサブグループである VAMP727 が存在している。VAMP727 にはアミノ末端側の longin ドメインと呼ばれる領域に特徴的な酸性挿入配列を持っており、類似の R-SNARE は裸子植物以降に現れた植物に高度に保存されている。しかしながら、VAMP727 様の分子の存在は、ヒメツリガネゴケやイヌカタヒバでは確認されていない。このことから、この酸性配列の挿入は、陸上植物の進化の過程において、シダ植物が分岐した後に種子植物の共通祖先で起こったものと思われていた。しかし、ゼニゴケの EST 解析により、酸性挿入配列を有する MpVAMP727 がゼニゴケに存在することが明らかとなった。このことから、VAMP72 への酸性配列の挿入は、コケ植物の分岐以前に起こったこと、ヒメツリガネゴケやシダは二次的に VAMP727 型 VAMP72 を失ったことが示唆される。では MpVAMP727 と VAMP727 は似たような輸送経路で機能しているのか、それは今後の研究課題である。

### 4. ゼニゴケのアクチン繊維

植物細胞において、オルガネラの動きを制御しているのは主にアクチン繊維であるといわれている。また、細胞の形態形成、細胞分裂、先端成長など、アクチン繊維の関わる現象は多岐に渡り、アクチンの挙動が細胞の生命活動に与える影響は非常に大きい (Hasezawa & Kumagai 2002, Hussey et al. 2006, Tijs Ketelaar 2001)。我々は、Lifeact (Riedl et al. 2008) というプローブを用いて、ゼニゴケのアクチン繊維のライブイメージングを試みた (Era et al. 2009)。その結果、アクチン繊維束がその太さに応じて速度を変えつつ滑り運動している様子が観察された (図 4)。運動速度は、細いアクチン繊維ほど大きかった。同様のアクチン繊維の太さによる安定化は、*in vitro* 系やシロイヌナズナの胚軸細胞においても報告されている (Michelot et al. 2007, Staiger et al. 2009)。植物細胞において、アクチン繊維はミオシンに依存した波打ち運動をすることが報告されており、ゼニゴケでもこの波打ち運動が観察された。

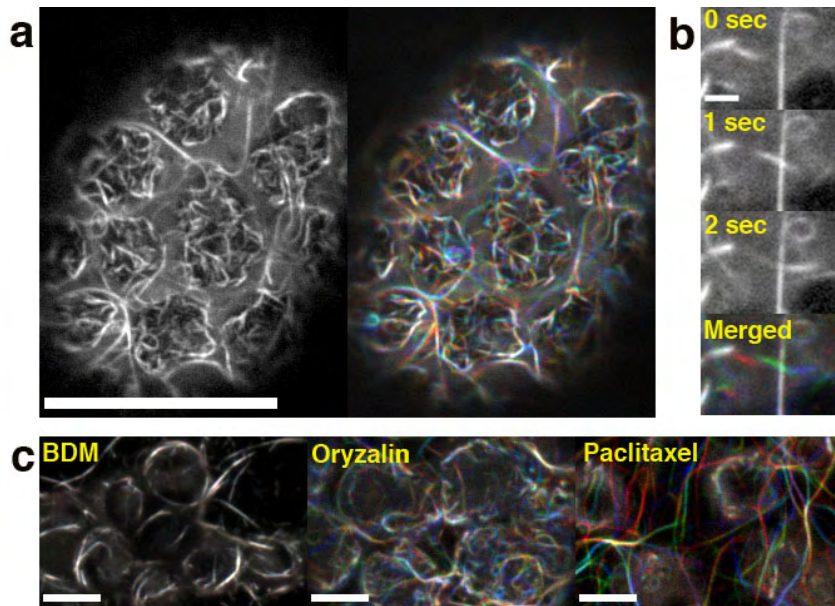


図4 (a)Lifeact-Venusにより可視化されたゼニゴケのアクチン繊維。右図は3秒おきに撮影した画像をそれぞれ赤、緑、青で表示し重ね合わせたもの。Bar = 20  $\mu\text{m}$ 。(b) アクチン繊維の滑り運動。Bar = 2  $\mu\text{m}$ 。(c) ミオシンATPase 阻害剤 (BDM), 微小管重合阻害剤 (Oryzalin), 微小管安定化剤 (Paclitaxel) 処理後, 図a右図と同様に表示。Bar = 5  $\mu\text{m}$

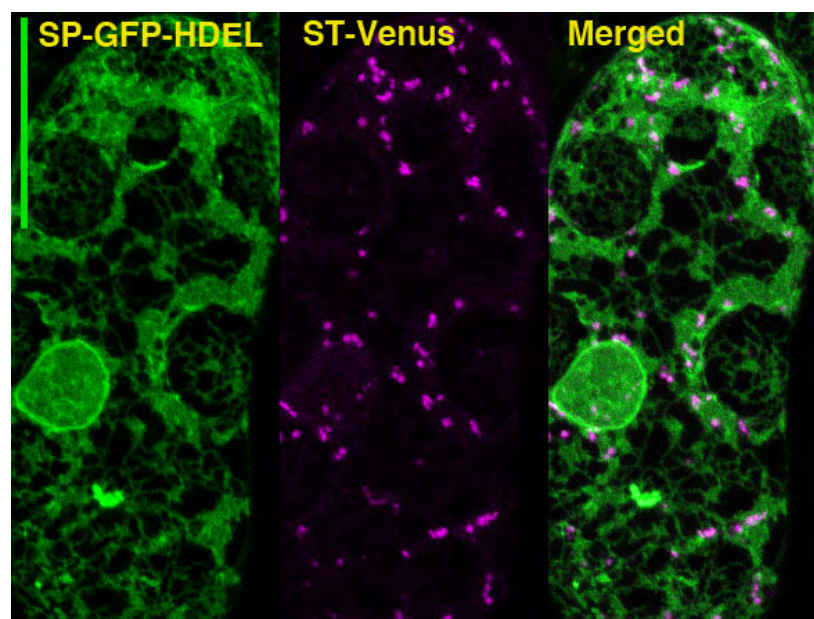
波打ち運動と同様, 滑り運動もまたミオシンに依存していること, また, 微小管を破壊, または安定化させても, 滑り運動が止まることはなく, むしろ運動速度が増すことも明らかとなった (Era et al. in press)。このゼニゴケユニークなアクチン繊維の挙動は, ゼニゴケが独自に発達させた細胞内活動制御システムなのかもしれない。

## 5. フォトギャラリー ～ゼニゴケオルガネラ～

我々は現在, 各種オルガネラマーカを用い, ゼニゴケの様々なオルガネラを可視化することを試みている。なお観察は, 植継後5日目の長径約5 mmの葉状体全体をスライドグラスに乗せ, その表皮細胞を対象としている。その結果のいくつかを以下に紹介させて頂こう。

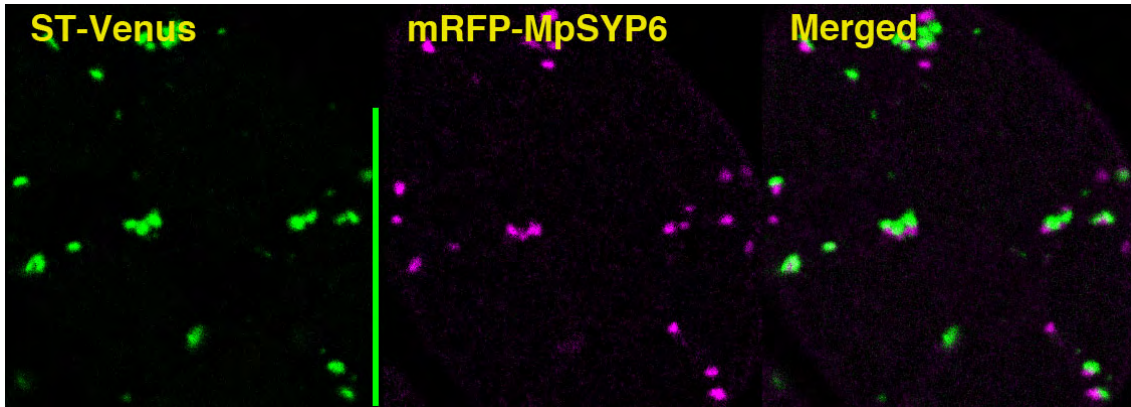
### 5-1. 小胞体とゴルジ体

小胞体の可視化には, 蛍光タンパク質にシグナルペプチドと小胞体局在シグナルを付与したもの (SP-GFP-HDEL) を用いた。小胞体は, 他の動植物同様にシート状構造と網目状構造で構成されている。また, 核膜らしき構造も観察された。小胞体全体が流れるように動いており, 絶えずその模様は変化していた。ゴルジ体を sialyl transferase (ST) を用いて可視化したところ, ドット状の構造が小胞体近傍に観察された。Bar = 20  $\mu\text{m}$

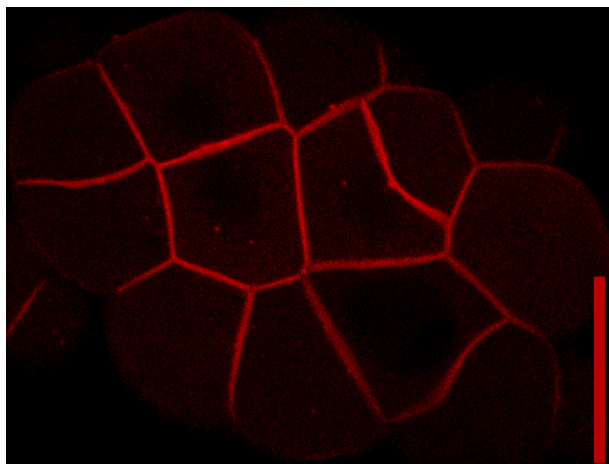


### 5-2. ゴルジ体とトランスゴルジネットワーク (TGN)

TGNの可視化には、シロイヌナズナにおいてTGNに局在することが知られているQ-SNARE, SYP61の配列をもとにゼニゴケのESTを検索し、得られたMpSYP6に蛍光タンパク質を融合させたものを用いた。STにより可視化されたゴルジ体と、TGNであると期待されるMpSYP6コンパートメントは、隣接しつつ相互作用するような動きを見せた。Bar = 20  $\mu\text{m}$



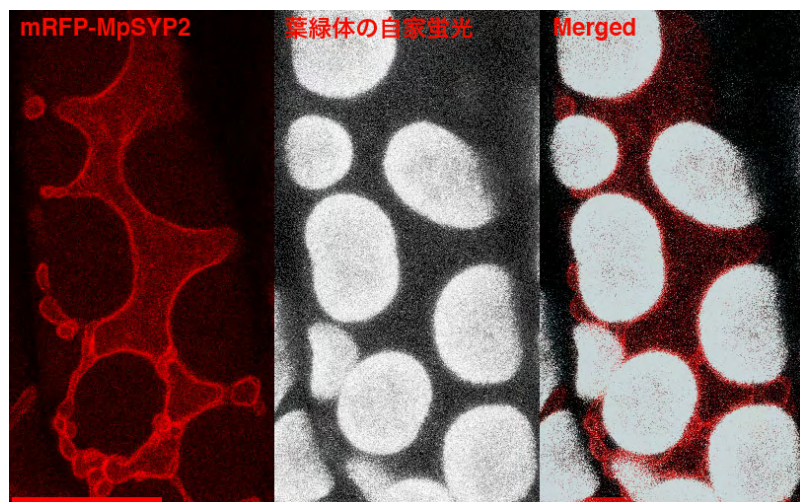
### 5-3. 細胞膜



シロイヌナズナにおいて細胞膜に局在することが知られている, Q-SNARE, SYP11, SYP12, SYP13の配列をもとにゼニゴケのESTを検索し、得られたMpSYP1に蛍光タンパク質を融合させ、ゼニゴケの細胞膜を可視化した。Bar = 20  $\mu\text{m}$

### 5-4. 液胞膜

シロイヌナズナにおいて液胞膜に局在することが知られているQ-SNARE, SYP2の配列をもとに、ゼニゴケのESTを検索し、得られたMpSYP2に蛍光タンパク質を融合させ、ゼニゴケの液胞膜を可視化した。ゼニゴケの液胞は葉緑体のごく近傍まで細胞いっぱい広がっている。液



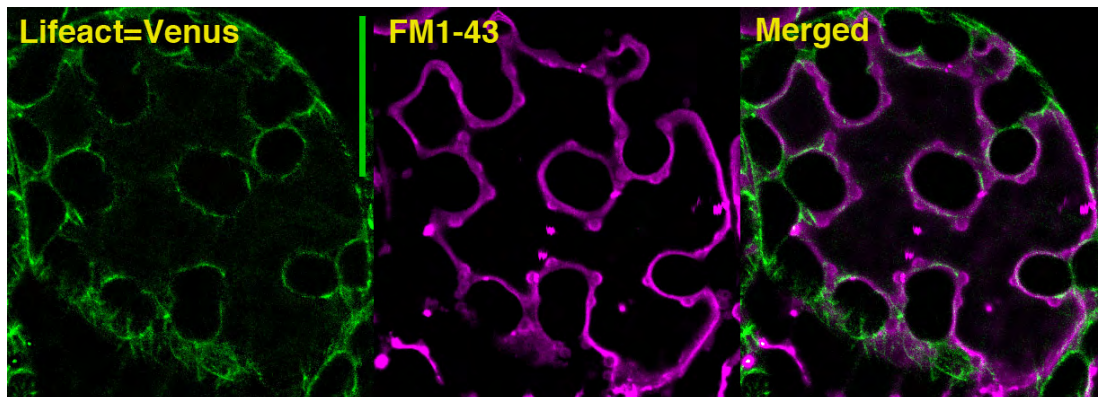
A. Era & T. Ueda-5

胞を貫く原形質糸は観察されない。また、細胞表層付近の液胞膜は非常に複雑な形状を有している。

Bar = 20  $\mu$ m

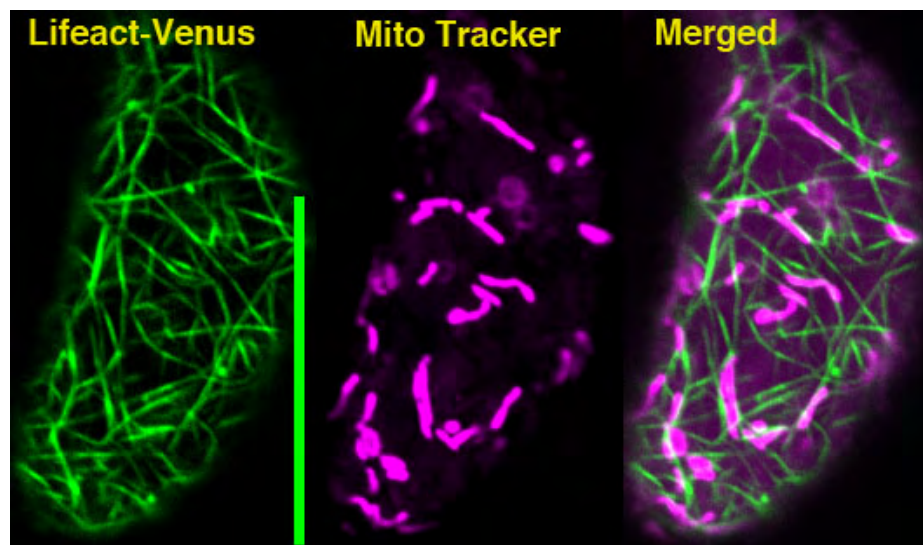
### 5-5. アクチン繊維と液胞膜

先の Lifact によりアクチン繊維が可視化された細胞において、FM1-43 というエンドサイトーシスの追跡試薬による液胞膜を染色した。液胞膜、細胞膜、葉緑体の間の狭い空間にアクチン繊維が張り巡らされている様子が分かる。Bar = 20  $\mu$ m



### 5-6. アクチン繊維とミトコンドリア

先の Lifact によりアクチン繊維が可視化された細胞に対して、Mito Tracker によるミトコンドリアの染色を行った。アクチン繊維に沿った配向を示すミトコンドリアが多数観察された。Bar = 20  $\mu$ m



## 6. 雑感 -ゼニゴケ細胞生物学の今後-

園芸家達からの嫌われ者、ゼニゴケ。我々の研究室においても、シロイヌナズナの鉢にいつの間にかゼニゴケが生えている…なんてこともある。邪魔だ邪魔だを取り除く際に、間違ってもシロイヌナズナの方を抜いてしまうような輩は流石にいない。形態があまりにも異なっているからだ。生物の形態とはつまり、生物の基本単位である細胞が積み重なって目に見えている形である。故に細胞が同じでも積み重なり方が異なれば、形態も異なってくる訳である。しかし実際には形態の異なる別種の生物では、その細胞の様子までも異なっているものだ。個体をつくる細胞をさらに形造る遺伝子情報が異



なるのだから、それは当然なのだが。原核細胞と真核細胞の違いや、動物細胞と植物細胞の違い、あるいは共通点は誰もが知るところだろう。ではゼニゴケとシロイヌナズナの細胞の違いは？4億年以上前に存在した共通祖先から、両者にはどのような多様性が生まれていったのだろうか。そしてその多様性は何に起因し、どのような個体レベルの多様性へと繋がっていくのか。また、藻類とゼニゴケの細胞との違いは？ゼニゴケ細胞のどういった特徴が植物の陸上化に有利にはたらいたのか。ゼニゴケという進化的に興味深い生物を用いた細胞生物学の究極目標とは、つまるところそういう問題を解き明かすことであると思っている。

細胞生物学の基本は細胞を観ることである。我々はゼニゴケ細胞のオルガネラや細胞骨格を蛍光タンパク質により可視化して観察を行っている。ゼニゴケも植物であるから、当然ながら植物細胞の持つべきオルガネラを全て備えている。小胞体やゴルジ体、TGNなどのオルガネラは、シロイヌナズナのそれらと概ね同様の形態をとっているようである。今現在までの我々の観察により判明したゼニゴケ細胞の最大の特徴は、細胞いっぱい広がった液胞膜により狭められた空間を、非常にユニークな動きで駆け回るアクチン繊維だろう。こういった特徴は未だ記述の範囲を脱していないが、このアクチン繊維の動きの役割を今後は知りたいものである。

先に述べたように、オルガネラのアイデンティティーは膜交通に関わる分子で決まる。ゆえに生物の遺伝子を調べ、或る一群の生物だけが持つ膜交通制御分子を見つけたとしたら、その生物群に特徴的な膜交通経路やオルガネラ機能があるだろうと予測できる訳である。我々は陸上植物に広く保存されているARA6型RAB5の機能をシロイヌナズナとゼニゴケで調べ、陸上植物特異的な膜交通経路を発見できるのではないかと考えた。しかし、どうもゼニゴケのARA6型RAB5はシロイヌナズナARA6とは異なる経路ではたらいっているようである。これも広く保存されているRABなので、何か陸上植物共通の重要な役割を担っているかと思っていたものだから、これは驚きである。ARA6型RAB5の機能が植物の各系統でどの程度多様化しているのかは未だ不明であり、非常に興味深い問題である。

同様の考え方から、種子植物にしか存在しないと思われていたVAMP727は、種子植物特異的な膜交通経路ではたらいっているだろうと推測されていた。この「種子植物にしか存在しない」という前提は、「ヒメツリガネゴケやイヌカタヒバは持っていない」という情報に基づくもので、今回我々がゼニゴケのESTを調べた結果、ゼニゴケにはVAMP727様分子が存在することが判明し、この前提は覆った。ヒメツリガネゴケに無いからといって、コケ植物に無いと言ってはならないということを思い知った。さて、シロイヌナズナにおいてVAMP727は、液胞前区画というオルガネラと液胞や細胞膜との融合時にはたらき、種子形成やストレス耐性に関与していることが明らかとなっている(Ebine et al. 2011, Ebine et al. 2008)。ゼニゴケのVAMP727はシロイヌナズナのVAMP727と異なる機能を持っているのだろうか。ゼニゴケは種子をつけないので、当然高次機能発現における役割は異なってくるだろうが、細胞生物学的レベルではどうだろうか。現在研究中である。

現在我々が取り組んでいるゼニゴケ細胞生物学は、どれもまだまだ研究途中にある。それでも膜交通経路や細胞骨格動態の多様性が続々と明らかとなってきた。これらゼニゴケ細胞で見られる特徴がゼニゴケの形態や生態にどのように寄与しているのかを突き止められれば、陸上植物の生存戦略はどのように多様化していったのかといった疑問解決への大きなヒントとなるだろう。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、お世話になりました京都大学の河内孝之先生、石崎公庸先生、近畿大学の大和勝幸先生にこの場を借りて感謝申し上げます。

## 引用文献

- Dacks, J.B., & Field, M. C. 2007. Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system: origin, tempo and mode. *J Cell Sci.* 120: 2977-2985.
- Ebine, K., Fujimoto, M., Okatani, Y., Nishiyama, T., Goh, T., Ito, E., Dainobu, T., Nishitani, A., Uemura, T., Sato, M.H., Thordal-Christensen, H., Tsutsumi, N., Nakano, A., & Ueda, T. 2011. A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat Cell Biol.* 13: 853-859.
- Ebine, K., Okatani, Y., Uemura, T., Goh, T., Shoda, K., Niihama, M., Morita, M. T., Spitzer, C., Otegui, M. S., Nakano, A., & Ueda, T. 2008. A SNARE complex unique to seed plants is required for protein storage vacuole biogenesis and seed development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 20: 3006-3021.
- Era, A., Kutsuna, N., Higaki, T., Hasezawa, S., Nakano, A., & Ueda, T. 2012. Microtubule stability affects the unique motility of F-actin in *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.* in press.
- Era, A., Tominaga, M., Ebine, K., Awai, C., Saito, C., Ishizaki, K., Yamato, K. T., Kohchi, T., Nakano, A., & Ueda, T. 2009. Application of Lifeact reveals F-actin dynamics in *Arabidopsis thaliana* and the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* 50: 1041-1048.
- Grosshans, B. L., Ortiz, D., & Novick, P. 2006. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 11821-11827.
- Hasezawa, S., & Kumagai, F. 2002. Dynamic changes and the role of the cytoskeleton during the cell cycle in higher plant cells. *Int Rev Cytol.* 214: 161-191.
- Hussey, P. J., Ketelaar, T., & Deeks, M. J. 2006. Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu Rev Plant Biol.* 57: 109-125.
- Michelot, A., Berro, J., Guerin, C., Boujemaa-Paterski, R., Staiger, C. J., Martiel, J. L., & Blanchoin, L. 2007. Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr Biol.* 17: 825-833.
- Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., Sixt, M., & Wedlich-Soldner, R. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods.* 5: 605-607.
- Staiger, C. J., Sheahan, M. B., Khurana, P., Wang, X., McCurdy, D. W. & Blanchoin, L. 2009. Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array. *J Cell Biol.* 184: 269-280.
- Tijs Ketelaar, A. M. C. E. 2001. The cytoskeleton in plant cell growth: lessons from root hairs. *New Phytologist.* 152: 409-418.
- Ueda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., & Nakano, A. 2001. Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 20: 4730-4741.

## 苔類のストレス応答と休眠におけるアブシシン酸の役割

竹澤 大輔

埼玉大学大学院理工学研究科・環境科学研究センター

〒338-8570 さいたま市桜区下大久保 2 5 5

The role of abscisic acid in stress response and dormancy of liverworts

Key words: abscisic acid; desiccation stress; protein phosphatase 2C.

Daisuke Takezawa

Graduate School of Science and Engineering; Institute for Environmental Science and

Technology, Saitama University

Sakura-ku, Saitama, 338-8570, Japan

### 1. はじめに

アブシシン酸 (ABA) はセスキテルペン化合物で、植物ではよく知られる植物ホルモンの一つである。種子植物においては、ABA が関与するいくつかの特徴的な現象があり、種子の休眠や水ストレスに応答した気孔閉鎖への関与などがその例である。近年、トウモロコシやシロイヌナズナの変異株解析から、ABA 生合成経路や、受容と情報伝達に関わる分子メカニズムの解明が進んでいる (Cutler et al. 2010)。ABA は植物に特有の化合物ではなく、藍藻や緑藻類、菌類、アピコンプレクサ、後生動物にも検出され、さまざまな生理作用を持つことが示唆されている (Hartung 2010)。しかし、これらの生物が同じ ABA 生合成経路や受容機構を持っているかどうかは不明である。いっぽう、コケ、シダを含むさまざまな陸上植物 (Embryophyta) のグループにおいて、ABA が乾燥や浸透圧ストレス応答において果たす役割が明らかとなっており、ABA 応答に関わる陸上植物共通のメカニズムの存在が示唆される。近年、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) やゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) の分子解析と遺伝子破壊技術の開発が進むにつれ、陸上植物に保存される ABA 応答に関わる遺伝子群と、植物の適応進化におけるそれらの役割が明らかになることが期待されている (Takezawa et al. 2011)。

### 2. 植物の陸上適応における ABA の役割

さまざまな陸上植物において ABA が関わる生理的プロセスは多岐にわたるが、その中には種子の成熟、休眠、気孔閉鎖、花芽形成阻害など、高等植物に特徴的なプロセスと、細胞の分裂・伸長阻害や低温・乾燥耐性促進などコケ植物を含めた陸上植物に共通のプロセスが存在する。蘚類や苔類などのコケ植物は、生命活動に必須な水の利用に関して、維管束植物とは異なるメカニズムにより環境に適応している。水が比較的少ない環境下において、維管束植物は根から吸収した水を気孔からの蒸散を制御することにより水の損失を防ぐ。それと比べて、表皮系を持たないコケ植物の栄養組織は、水の損失を防ぐことができないかわりに、細胞レベルでの高い脱水耐性を持ち、乾燥状態においても細胞の傷害を回避する機構を持つと考えられる。コケ植物のこのよ

D. Takezawa-1

うな性質は祖先的植物の陸上での適応に重要な形質であったと考えられ (Oliver et al. 2005), 陸上植物の進化過程で最も初期に分岐したグループであるコケ植物が高い乾燥耐性を持つという事実がそのことを支持している (図1)。

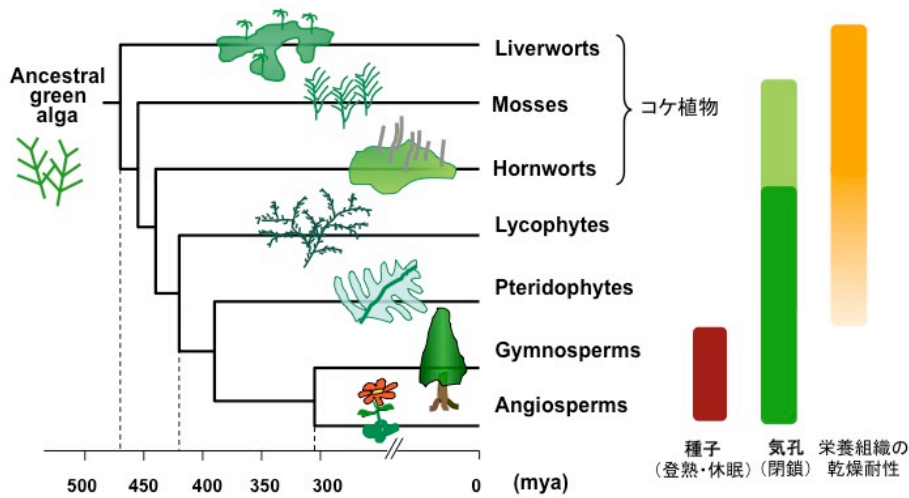


図1. 陸上植物の進化とABAが関わる生理学的過程

筆者はコケ植物の乾燥・乾燥耐性における ABA の役割を明らかにすることにより, 植物の陸上適応に必須であった ABA 応答の原型的機構を解明し, その後の進化過程で多様化した維管束植物の ABA 応答機構についても理解を深めたいと考えている。そこで, モデル植物としての分子解析基盤が整備されつつあるヒメツリガネゴケやゼニゴケを用い, ABA により引き起こされる耐性の変化と, ABA 応答の分子機構に関して解析を行なっている。

### 3. コケ植物の ABA 応答

コケ植物の ABA は, 主にモノクローナル抗体を用いた手法により蘚類, 苔類およびツノゴケ類の異なる種から検出されている (Hartung et al. 1987, Werner et al. 1991)。胞子体に気孔を持つ蘚類とツノゴケ類では, ABA が気孔の閉鎖を促進することがヒョウタンゴケ (*Funaria hygrometrica*) やナガサキツノゴケ (*Anthoceros punctatus*) において報告されている (Garner and Paolillo 1973, Hartung et al. 1987)。また, 蘚類については, 原系体に ABA が与える生理作用について, 比較的多くの研究報告がある (図2)。蘚類の原系体細胞を ABA 処理すると, その成長が抑制され, 無性生殖形態である brood cell が誘導される。また, ABA は原系体から茎葉体への分化を阻害することも報告されている (Valadon and Mummery 1971, Menon and Lal 1974, Goode et al. 1993, Chopra and Kapur 1989)。ヒョウタンゴケでは, ABA 処理が原系体細胞の乾燥耐性を誘導することが明らかとなっており, 乾燥ストレスが内生 ABA 量を増加させる (Werner et al. 1991)。同じヒョウタンゴケ科に属するヒメツリガネゴケにおいても, 上記のような ABA 処理による形態変化や乾燥・凍結ストレス耐性の増大が報告されている (Goode et al. 1993, Minami et al. 2003)。全ゲノムが解読されたヒメツリガネゴケでは, さらに ABA 応答遺伝子の発現プロファイル解析や, 応答に関わるシグナル因子の機能解析が行なわれている (Cuming et al. 2007, Komatsu et al. 2009,

Chater et al. 2011)。

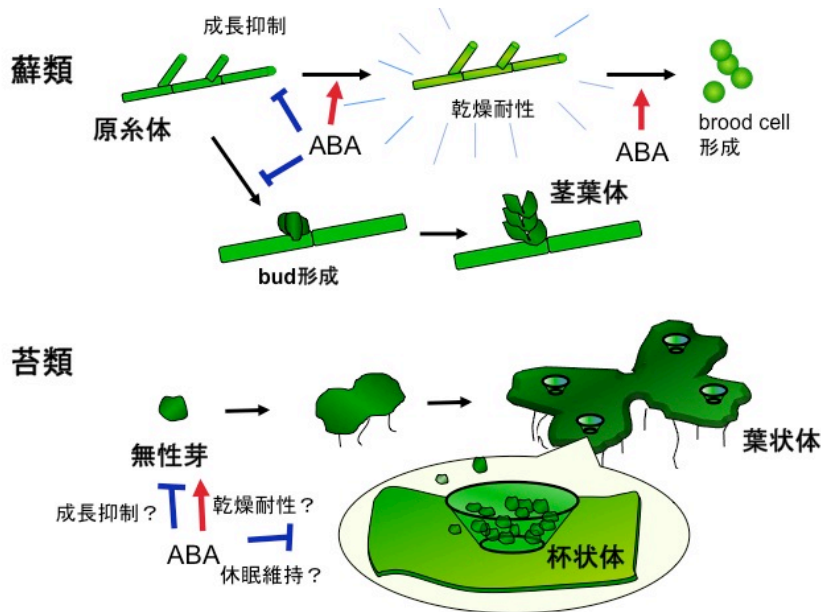


図2. 蘚類と苔類の配偶体におけるABAの役割

これに対し、苔類では、ABA によって引き起される生理応答に関して得られている知見は少ない。しかし、Hellwege および Hartung らの先駆的な研究により、ゼニゴケ目 (Marchantiales) に属する好乾燥性苔類 *Exormothea holstii* と水生の苔類ウキゴケ (*Riccia fluitans*) において、内生 ABA 蓄積と乾燥耐性の関連が明らかにされている (Hellwege et al. 1994, 1996)。また、ウキゴケにおいては、ABA 処理特異的に誘導される LEA 様タンパク質についても報告されている (Hellwege et al. 1996)。ゼニゴケ目以外でも、フタマタゴケ目に属するヤハズゴケ (*Pallavicinia lyellii*) に対し、ABA は乾燥耐性を誘導することが報告されている (Pence et al. 2005)。一方で、ゼニゴケに対しては、ABA は乾燥耐性を誘導しないとの結果も得られている (Pence et al. 2005)。Pryce (1972) は、苔類において ABA が出される例が少ないことから、苔類において ABA の役割は限定的であり、ルヌラリン酸 (LNA) (図3) のような苔類に広く分布する化合物が ABA 様の働きをしている可能性を指摘した (Pryce 1972)。LNA はミカヅキゼニゴケ (*Lunularia cruciata*) の休眠誘導と関連して蓄積する物質として単離され、ゼニゴケ無性芽やレタスの胚軸成長、クレソ種子の発芽を抑制することが報告されているほか、緑藻クロレラの耐凍性を増大させるという報告もある (Valio and Schwabe 1970)。しかし、LNA が ABA と同様の作用機構により植物に作用しているかどうかについては不明である。

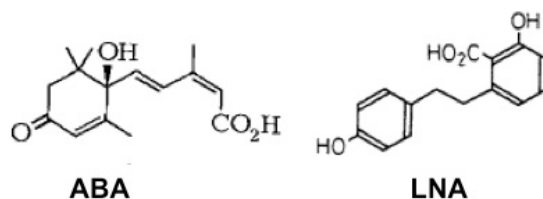


図3. アブシジン酸(ABA)とルヌラリン酸(LNA)

### 3. ゼニゴケを用いた ABA 応答の進化生物学的研究

筆者らは、苔類 ABA 応答の分子機構を明らかにするため、ゼニゴケを ABA 応答研究のモデル系として確立することを目指し実験を進めてきた。無菌培養条件において ABA の影響を調べたところ、ABA はゼニゴケ無性芽の成長を抑制し、凍結や乾燥に対する耐性の増大を促進することが明らかとなった (Tougane et al. 2010, Akter et al. 2011)。また、ゼニゴケ培養細胞において ABA はコムギ種子の ABA 誘導性遺伝子 *Em* のプロモーター制御下にある *GUS* 遺伝子 (*Em-GUS*) を濃度依存的に活性化した。このことから、筆者らはゼニゴケにも高等植物と共通の ABA 応答に必要な細胞内因子が存在すると考え、京都大学の河内、石崎、近畿大学の和らの協力を得てゼニゴケ ABA 応答関連遺伝子の探索を試みた。

筆者らは、ゼニゴケ EST 配列情報からシロイヌナズナ *ABSCISIC ACID INSENSITIVE1 (ABI1)* のホモログを見だし、*MpABI1* と名付けた。シロイヌナズナ *ABI1* はプロテインホスファターゼ 2C (PP2C) をコードし、特異的な Gly が Asp に変化した *abi-1* 変異は ABA 非感受性表現型を示すことが知られている。シロイヌナズナには *ABI1* を含む 9 遺伝子が「グループ A」PP2C をコードし、これら PP2C は ABA シグナル伝達の負の制御因子であると考えられている。最近、グループ A PP2C が細胞内 ABA 受容体 PYR/PYL/RCAR と直接相互作用し、プロテインキナーゼ SnRK2 の脱リン酸化を介して ABA シグナルを負に制御していることが明らかとなった (Park et al. 2009)。

ゼニゴケ *MpABI1* はシロイヌナズナのグループ A PP2C と C 末端の触媒ドメインにおいて相同性を持ち (図 4)、系統解析からもグループ A に属すると考えられた。いっぽう、N 末端のドメインはシロイヌナズナ PP2C との相同性はなかったが、核移行シグナルを持っており、GFP 融合タンパク質による局在解析実験からも *MpABI1* の核局在に寄与することが示された。

ゼニゴケ細胞の一過的発現アッセイでは、*MpABI1* の過剰発現が ABA 応答的な *Em-GUS* 遺伝子の発現を強く抑制した。また、*MpABI1* 遺伝子を過剰発現するヒメツリガネゴケ形質転換体を作成したところ、その原系体細胞は顕著な ABA 非感受性を示した。すなわち、野生株において ABA により獲得される凍結耐性や高浸透圧耐性が *MpABI1* 過剰発現株では観察されず、ABA 誘導的な LEA タンパク質の蓄積もほとんど見られないことが明らかとなった (Tougane et al. 2010)。

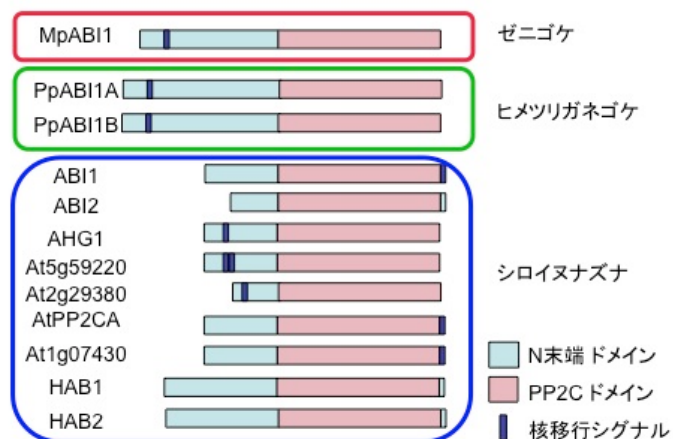


図4. ゼニゴケ、ヒメツリガネゴケおよびシロイヌナズナのグループA PP2Cのポリペプチド構造の比較

D. Takezawa-4

また, *MpABII* 過剰発現株は ABA 応答だけでなく低温馴化能にも欠損があることが明らかとなり, ABA 情報伝達経路が植物の低温応答に関与していることが示唆された (Bhyan et al. 2012)。これらの結果から, 苔類にも PP2C を介した ABA 応答制御機構が存在し, ABA 応答に関わる基本的な分子メカニズムが陸上植物間で共通である可能性が示された。

## 5. 今後の展望

これまでの研究で, 気孔も種子も持たない苔類が保存された ABA 応答の分子機構を持ち, ABA が脱水や乾燥などのストレス耐性において機能する陸上植物に普遍的な化合物であることが示唆された。苔類の ABA 応答に関わる転写因子や耐性関連遺伝子の発現制御機構についての詳細は未だ不明であり, 前述の一過的発現系や, Ishizaki (2008)らによる形質転換法により, 研究のさらなる発展が期待される。苔類における ABA の生理作用, 特に, 成長や生殖, 休眠における役割については未だ不明な点が多い。今後, ゼニゴケの ABA 非感受性株や ABA 合成欠損株を解析することができれば, ABA の生理学的意義を明らかにするとともに, ABA 応答の原型的機構の概要を明らかにできると考えている。

## 6. 謝辞

本研究は, 文部科学省科学研究費補助金・基盤研究(C)および新学術領域研究「植物環境突破力」の助成により進められた。ゼニゴケの培養および遺伝子解析については京都大学の河内孝之博士と石崎公庸博士, 近畿大学の和勝幸博士による全面的なサポートを得た。一過的発現系による PP2C の機能解析は東京農業大学の坂田洋一博士, 小松憲治博士の貢献により初めて可能になった。ここに深く感謝する。

## 引用文献

- Akter, K., Tougane, K., Kaneko, M., & Takezawa, D. 2011. Effect of sugar and abscisic acid on freezing and desiccation tolerance in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Cryobiol. Cryotechnol.* 57: 83-86.
- Bhyan, S. B., Minami, A., Kaneko, Y., Suzuki, S., Arakawa, K., Sakata, Y., & Takezawa, D. 2012. Cold acclimation in the moss *Physcomitrella patens* involves abscisic acid-dependent signaling. *J. Plant Physiol.* 169: 137-145.
- Chater, C., Kamisugi, Y., Movahedi, M., Fleming, A., Cuming, A. C., Gray, J. E., & Beerling, D. J. 2011. Regulatory mechanism controlling stomatal behavior conserved across 400 million years of land plant evolution. *Curr. Biol.* 21: 1025-1029.
- Chopra, R. N., & Kapur, A. 1989. Effect of abscisic acid and kinetin on protonemal differentiation in *Timmiella anomala*. *Plant Sci.* 61: 203-206.
- Cuming, A. C., Cho, S. H., Kamisugi, Y., Graham, H., & Quatrano, R. S. 2007. Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*. *New Phytol.* 176: 275-287.
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. 2010. Abscisic acid: emergence of a

- core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 651–79.
- Garner, L. B., & Paolillo, D. J. 1973. On the functioning of the stomates in *Funaria*. *Bryologist* 76: 423-427.
- Goode, J. A., Stead, A. D., & Duckett, J. G. 1993. Redifferentiation of moss protonemata: an experimental and immunofluorescence study of brood cell formation. *Can. J. Bot.* 71: 1510-1519.
- Hartung, W., Weiler, E. W., & Volk, O. H. 1987. Immunochemical evidence that abscisic acid is produced by several species of Anthocerotae and Marchantiales. *Bryologist* 90: 393-400.
- Hartung, W. 2010. The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen. *Funct. Plant Biol.* 37: 806-812.
- Hellwege, E. M., Dietz, K. J., Volk, O. H., & Hartung, W. 1994. Abscisic acid and the induction of desiccation tolerance in the extremely xerophilic liverwort *Exormotheca holstii*. *Planta* 194: 525–531.
- Hellwege, E. M., Dietz, K. J., & Hartung, W. 1996. Abscisic acid causes changes in gene expression involved in the induction of the landform of the liverwort *Riccia fluitans* L. *Planta* 198: 423-432
- Ishizaki, K., Chiyoda, S., Yamato, K. T., & Kohchi, T. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant Cell Physiol.* 49: 1084-1091.
- Komatsu, K., Nishikawa, Y., Ohtsuka, T., Taji, T., Quatrano, R. S., Tanaka, S., & Sakata, Y. 2009. Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type 2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between Arabidopsis and the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol. Biol.* 70: 327-340.
- Menon, M. K. C., & Lal, M. 1974. Morphogenetic role of kinetin and abscisic acid in the moss *Physcomitrium*. *Planta* 115: 319-328.
- Minami, A., Nagao, M., Arakawa, K., Fujikawa, S., & Takezawa, D. 2003. Abscisic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *J. Plant Physiol.* 160: 475-483.
- Oliver, M. J., Velten, J., & Mishler, B. D. 2005. Desiccation tolerance in bryophytes: a reflection of the primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats? *Integr. Comp. Biol.* 45: 788–799.
- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. F., Alfred, S. E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N. J., Desveaux, D., Rodriguez, P. L., McCourt, P., Zhu, J. K., Schroeder, J. I., Volkman, B. F., & Cutler, S. R. 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068-1071.
- Pence, V. C., Dunford, S. S., & Redella, S. 2005. Differential effects of abscisic acid on desiccation tolerance and carbohydrates in three species of liverworts. *J. Plant Physiol.* 162: 1331-1337.
- Pryce, R. J. 1972. The occurrence of lunularic acid and abscisic acid in plants. *Phytochemistry* 11: 1759-1761.
- Takezawa, D., Komatsu, K., & Sakata, Y. 2011. ABA in bryophytes: how a universal growth regulator in life became a plant hormone? *J. Plant Res.* 124:437-453.
- Tougane, K., Komatsu, K., Bhyan, S. B., Sakata, Y., Ishizaki, K., Yamato, K. T., Kohchi, T., & Takezawa,



- D. 2010. Evolutionarily conserved regulatory mechanisms of abscisic acid signaling in land plants: characterization of ABSCISIC ACID INSENSITIVE1-like type 2C protein phosphatase in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiol.* 152: 1529-1543.
- Valadon, L. R. G., & Mummery, R. S. 1971. Quantitative relationship between various growth substances and bud production in *Funaria hygrometrica*. A bioassay for abscisic acid. *Physiol. Plant.* 24: 232-234.
- Valio, I. F. M., & Schwabe, W. W. 1970. Growth and dormancy in *Lunularia cruciate* (L.) Dum. VII. The isolation and bioassay of lunularic acid. *J. Exp. Bot.* 21: 138-150.
- Werner, O., Espin, R. O. S., Bopp, R. M., & Atzorn, R. 1991. Abscisic acid-induced drought tolerance in *Funaria hygrometrica* Hedw. *Planta* 186: 99-103.

ゼニゴケ *MpCLE* 遺伝子の解析

澤進一郎 本田紘章 田畑亮  
 熊本大学大学院自然科学研究科理学専攻  
 〒860-8555 熊本市黒髪 2-39-1

An analysis of *MpCLE* genes in *Marchantia polymorpha*

Key words: CLE, Hormone, Peptide, Development, *Marchantia polymorpha*

Shinichiro Sawa, Hiroaki Honda, Ryo Tabata  
 Kumamoto University  
 Kurokami 2-39-1, Kumamoto, 860-8555, Japan

## 1. はじめに

植物の発生を制御し、様々な局面における植物生理を調節すると考えられている CLE (CLAVATA3/Embryo-Surrounding-Region)ペプチドホルモンは、シロイヌナズナを中心に、盛んに研究がなされている。なかでも、その CLE ファミリーである CLAVATA3 (CLV3)や tracheary element differentiation inhibitory factor (TDIF; CLE41/CLE44)は、茎頂分裂組織の活性や維管束細胞の分化を制御することが明らかとなってきた(Betsuyaku et al. 2011a; Miwa et al. 2009a)。

典型的な *CLE* 遺伝子がコードするタンパク質は 100 アミノ酸程度であり、その N 末には細胞外に放出されるためのシグナルペプチドがコードされている。また、C 末にコードされる *CLE* ドメインのうち、12-13 アミノ酸が切り出され、糖鎖修飾を受けた後、成熟したペプチドホルモンとして細胞外で、細胞非自律的に機能すると考えられている(Ohyama et al. 2010)。

これまでに調べられた様々な植物で、多くの *CLE* 遺伝子が見つかったが (Oelkers et al. 2008)、ヒメツリガネゴケに典型的な *CLE* 遺伝子が存在するため、少なくとも進化的にコケ植物以降の植物は *CLE* ペプチドホルモンを利用していると考えられている。この *CLE* 遺伝子はクラミドモナスにも存在するとされているが (Oelkers et al. 2008)、その *CLE* ドメインはさほど保存されていないため、*CLE* ペプチドホルモンとして機能するか否かはさらなる研究が必要と思われる。現在のところ、そのクラミドモナスを除き、ヒメツリガネゴケよりも下等な植物における *CLE* 遺伝子の知見はない。

シロイヌナズナゲノム上には、*CLE* 遺伝子が 32 個存在し、イネには 47 個(Sawa et al. 2008)、シダ植物小葉類であるイヌカタヒバにも 15 個の *CLE* 遺伝子が存在する(Miwa et al. 2009b)。このように、植物ゲノム上には多くの *CLE* 遺伝子が存在することから、植物における *CLE* 遺伝子の機能の重要性が伺われるだけでなく、多様な機能を持つことも推測される。そこで、我々は、この *CLE* 遺伝子の分子進化、機能進化、シグナル伝達系の解明を目指して研究を行っている。

## 2. 何故, “ゼニCLE” か?

CLEの機能やシグナル伝達系の研究において, 現在, 分子遺伝学的解析の実験材料として確立されたシロイヌナズナが主に使われており, 筆者らもやはりシロイヌナズナを用いてきた。しかし, 多くの研究者がCLEシグナル伝達系の解析を行っているにもかかわらず, そのシグナル伝達因子の多くは未解明であり, 受容体は単離されたものの(Kinoshita et al. 2010), その下流因子はほとんど明らかになっていない。さらに, シロイヌナズナには32ものCLE遺伝子があるにもかかわらず, 研究が進んでいるのはCLV3とTDIFのみである。CLE遺伝子を過剰発現した場合, 多くのCLE遺伝子の形質転換体が類似した表現型を示し, また, 多くのCLE遺伝子は機能的冗長性が高いと考えられ, 機能欠失型でも表現型を示さないことから, どのような機能を持っているか予想することは困難である。

シロイヌナズナにおけるCLEに関する研究がこのような状況であるため, CLE遺伝子の機能解明や, シグナル伝達系の解明には, ブレークスルーが必要であった。ゼニゴケは, 最も下等な陸上植物として注目を浴びている実験材料である(河内さんの稿参照)。我々は, そのゼニゴケの遺伝子重複性の低さと, 遺伝子破壊が可能である点に注目した。シロイヌナズナでは, T-DNA挿入ラインが整備され, 多くの遺伝子破壊株がストックセンターから容易に分与して貰うことが可能である。しかし, CLE遺伝子の多くはイントロンももたず, 100アミノ酸程度のタンパク質しかコードしないため, 遺伝子領域が大変短く, 多くのCLE遺伝子にはT-DNA挿入ラインが存在しない。このことから, 機能欠損変異体を利用した遺伝学的解析が困難であった。ゼニゴケでは遺伝子破壊が可能であるため, この点もクリアできることから, CLE遺伝子解析には大変有効であると考えられる。そこで, 我々は, ゼニゴケのCLE遺伝子, “ゼニCLE”の単離, 解析を行った。

## 3. *MpCLE1*と*MpCLE2*の同定

ゼニゴケゲノム上には, 2個のCLE遺伝子が見つかり, それぞれ*MpCLE1*, *MpCLE2*と名付けた(図1)。これらは, 典型的なCLE遺伝子で, それらの翻訳産物は, 適切なプロセッシングを受け, シグナルペプチドにより細胞外に放出され, C末のCLEドメインが細胞外でペプチドとして機能することが予想された。

*MpCLE1*はTDIFグループに属し, *MpCLE2*は, CLV3が属する大きなグループの祖先的なタイプであることが示唆された。TDIFは, 道管分化を抑制し, 前形成層細胞の分裂を活性化させる機能を持つことが知られている(Ito et al. 2006)。また, CLV3は茎頂分

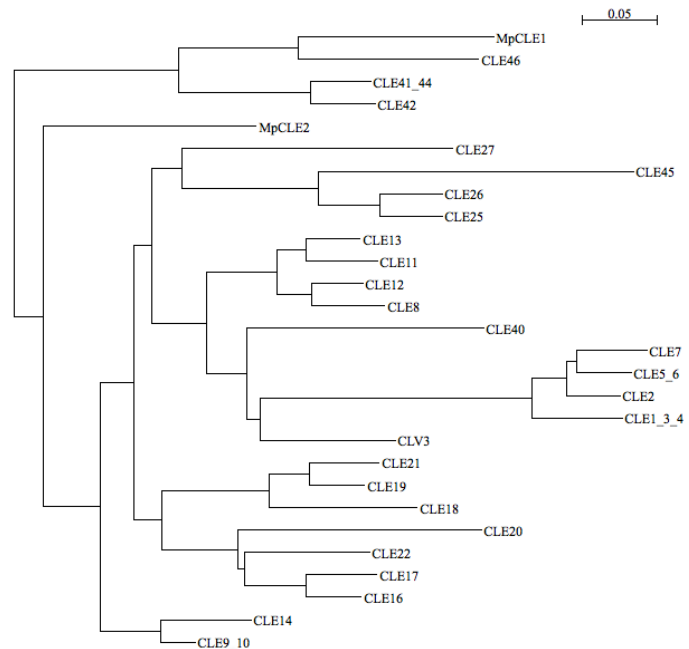


図1 シロイヌナズナとゼニゴケのCLE系統樹

裂組織の幹細胞の細胞分裂活性を抑制し、側方器官の分化を促進する機能を持つと考えられている。どちらも、細胞分裂の活性を制御することで、植物の分化に携わっているため、ゼニゴケでも同様の機能を持つ可能性が考えられた。

そこで我々は、*MpCLE1*遺伝子の過剰発現株を作成し、その表現型観察を行う事で、*MpCLE1*がどのような機能を持つか解析することにした。*MpCLE1*の過剰発現により、*MpCLE2*の経路を活性化させ、*MpCLE2*の効果を観察してしまうことも危惧されるが、ゼニゴケには2つの*MpCLE*遺伝子しか存在しないので、今後の遺伝学的解析でそれら2つの*CLE*遺伝子の機能を分離して検討することも可能であると考えている。そこで、まずは、過剰発現株を作成し、どのような形態的特徴に注目すればよいかを検討した上で、遺伝子重複性の低いゼニゴケを用いて、今後詳細な解析を行いたいと考えている。

#### 4. *MpWOX1* の同定

シロイヌナズナでは、*CLV3*は、ホメオボックス転写因子の*WUSCHEL* (*WUS*)遺伝子の発現を抑制することが知られている。シグナル伝達経路がゼニゴケから高等植物まで保存されているか否か検証するために、ゼニゴケゲノム、及び、EST配列を用いて、*WUS*のホモログを探索し、一つの候補を得た(図2)。*MpWOX1*遺伝子は、321アミノ酸からなるタンパク質をコードすると考えられ、シロイヌナズナの*wuschel-related homeobox13*(*WOX13*)と最も高い相同性を示した。*WOX13*と相同性を示す遺伝子は、緑藻からも見つかり、*WOX13*ファミリーは最も原始的な*WOX*と考えられている(Nardmann et al. 2009)。このことから、ゼニゴケに一つしかない*WOX*が、*WOX13*と相同性を示すのはリーズナブルである。

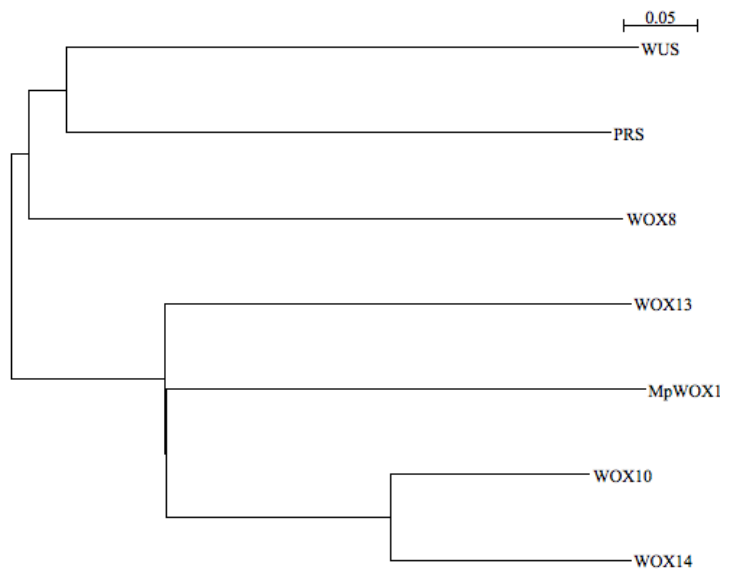


図2 シロイヌナズナとゼニゴケの*WOX*系統樹

#### 5. ゼニゴケとシロイヌナズナの *CLE* と *WOX* の機能とシグナル伝達経路の保存性

これまでに、*MpCLE1*の過剰発現株と発現抑制株、及び*MpWOX1*の過剰発現株を作成し、その表現型を観察した。その結果、*MpCLE1*の過剰発現株は表皮細胞の細胞分裂抑制と、それに伴う表皮細胞の欠損が観察され、発現抑制株は表皮細胞の細胞分裂過剰とそれに伴う気室、及び気室孔の形態異常が観察されている(田畑ら未発表)。また、表皮細胞周辺と、その分化過程において、*MpCLE1*の遺伝子発現が*in situ hybridization test*により確認された(Zachgoら未発表)。一方、現在のところ、*MpWOX1*は表皮細胞での発現が観察されておらず(Zachgoら未発表)、*MpWOX1*が気室分化に関わるという結果は未だ得られていない。

これまでの結果より、我々は、*MpCLE1*は、表皮細胞や気室分化の分化抑制を担うことで、適切なゼニゴケの発生を制御すると考えているが、その局面において、*MpWOX1*は*MpCLE1*の下流で機能しないと考えている。このことは、高等植物でみられるようなCLEとWOXを介したシグナル伝達経路が植物の進化に伴って再構築されたことを示唆している。

現在、高等植物には多くのCLE遺伝子が存在し、受容体複合体も複雑化し、多様な生理機能を持つことが示唆されているが(Betsuyaku et al. 2011b)、ペプチドホルモンとしての構造はあまり変化させないながらも、受容体より下流のシグナル伝達経路を複雑化することで、多数のペプチドホルモンによる情報を適切に伝達することが可能となるように進化したとも考えられる。この複雑なシグナル伝達経路のために、これまで、シロイヌナズナを材料としただけでは受容体より下流の因子が同定できなかつたのではないかと思われる。

今後、*MpCLE1*だけでなく、*MpCLE2*も用いた、より詳細な分子遺伝学的解析を行う事で、CLEシグナル伝達系の、特に、今まで手つかずであった受容体下流の一端を明らかにすることができ、未だ明らかになっていない高等植物におけるシグナル伝達経路研究の道標となると考えている。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、お世話になった、京都大学の河内孝之先生、石崎公庸先生、近畿大学の大和勝幸先生、Monash大学のJohn, Bowman先生、平川有宇樹先生、Osnaburueck大学のSabine Zachgo先生にこの場を借りて感謝申し上げます。

## 引用文献

- Betsuyaku, S., Sawa, S., & Yamada, M. 2011a. The function of the CLE peptide in plant development and symbiosis. *The Arabidopsis Book*. 9: e0149
- Betsuyaku, S., Takahashi, F., Kinoshita, A., Miwa, H., Shinozaki, K., Fukuda, H., & Sawa, S. 2011b. Mitogen-Activated Protein Kinase regulated by the CLAVATA receptors contributes to the shoot apical meristem homeostasis. *Plant Cell Physiol*. 52: 14-29.
- Ito, Y., Nakanomyo, I., Motose, H., Iwamoto, K., Sawa, S., Dohmae, N., & Fukuda, H. 2006. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell. *Science* 313: 842-845.
- Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H., & Sawa, S. 2010. RPK2/TOAD2 is an essential receptor-like kinase transmitting the CLV3 signalling in Arabidopsis. *Development* 137: 3911-3920.
- Miwa, H., Kinoshita, A., Fukuda, H., & Sawa S. 2009a. Plant meristems: CLV3/ESR-related signaling in the shoot apical meristem and the root apical meristem. *J. Plant Res.* 122: 31-39.
- Miwa, H., Tamaki, T., Fukuda, H., & Sawa, S. 2009b. Evolution of CLE signaling. *Plant Signaling & Behavior* 4: 477-481.

- Nardmann, J., Reisewitz, P., & Werr, W. 2009. Discrete Shoot and Root Stem Cell-Promoting *WUS/WOX5* Functions Are an Evolutionary Innovation of Angiosperms. *Mol Biol Evol.* 26: 1745-1755.
- Oelkers, K., Goffard, N., Weiller, G., F., Gresshoff, P., M., Mathesius, U., & Frickey, Y. 2008. Bioinformatic analysis of the CLE signaling peptide family. *BMC Plant Biology* 8:1. doi:10.1186/1471-2229-8-1
- Ohyama, K., Shinohara, H., Ohnishi, M. O., & Matsubayashi, Y. 2009. A Glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chem. Biol.* 5: 578-580.
- Sawa, S., Kinoshita, A., Betsuyaku, S., & Fukuda, H. 2008. A large family of genes that share homology with CLE domain in *Arabidopsis* and rice. *Plant Signaling & Behavior* 3: 1-3.

## 植物固有の転写因子 LEAFY とゼニゴケの有性生殖

荒木 崇

京都大学生命科学研究科統合生命科学専攻  
〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町Plant-specific transcription factor LEAFY and its possible role in gametophyte development in  
*Marchantia polymorpha*Key words: gametophyte, LEAFY, *Marchantia polymorpha*

Takashi Araki

Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University  
Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

## 1. はじめに

ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) は、陸上植物 (有胚植物 [Embryophyta]) の現生の系統の中では、最も初期に分岐したと考えられる苔類を代表するモデル植物である (本総説集中の、河内と石崎、大和と河内、嶋村の各総説を参照)。筆者の研究室では、生活環の進化に対する関心から、2007 年からゼニゴケを用いた研究を進めてきた。その中で、われわれは、(1) 被子植物においてその役割がよく研究されており、その祖先的機能に興味を持たれる、(2) 陸上植物の進化過程で遺伝子重複がほとんど起こっておらず、オルソログ関係が明確に確定できる、という2つの観点から、植物固有の転写因子 LEAFY (LFY) に着目し、最初の解析対象のひとつとしている。

本総説では、まず LFY について概説し、ついで、ゼニゴケにおいて LFY が関わる可能性が高いとわれわれが考えている、有性生殖における雄側の役割について、ゼニゴケが植物学の対象として研究されるようになってから現在に至るまでの知見をまとめ、今後の研究の方向性を紹介するとともに、読者の参考に供したい。

## 2. 植物固有の転写因子 LEAFY

LEAFY/FLORICAULA (LFY/FLO) (以下、簡便のため、LFY と略す) は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) とキンギョソウ (*Antirrhinum majus*) において、花序分裂組織の側方に発生する分裂組織が、花芽分裂組織としての属性を獲得する過程で、重要な役割を果たす転写因子として同定された。約 350~430 アミノ酸残基から成り、N 末側に 76 アミノ酸残基の N ドメイン、C 末に 160 アミノ酸残基の C ドメインという、ともによく保存されたドメインを持つ (図 1)。主としてシロイヌナズナにおける研究から、LFY は花芽形成におけるマスター制御因子であることが明らかになっている (総説として Moyroud *et al.* 2010, Siriwardana and Lamb 2012a)。転写因子としての LFY の機能については、DNA 結合ドメインである C ドメイン (後述の 2-2. を参照) の立体構造が決定され、DNA との相互作用や二

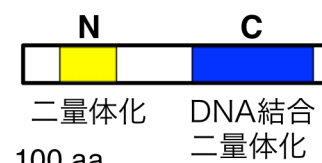


図 1. LFY 蛋白質の構造

量体化に必要なアミノ酸残基が特定されている (Hamès *et al.* 2008)。また、この結果に基づいて、LFY の DNA への結合の生物物理学モデルが構築され、ゲノム上の LFY 結合サイトの正確な予測がなされている (Moyroud *et al.* 2011)。理解が遅れていた N ドメインに関しても、最近になって、二量体形成における重要性が報告された (Siriwardana and Lamb 2012b)。さらに、花序と芽生えにおける制御標的遺伝子の網羅的な探索がおこなわれ、花芽形成関連の遺伝子でこれまでに制御標的遺伝子として同定されていたものを含めて、多数の遺伝子が同定された (Winter *et al.* 2011, Siriwardana and Lamb 2012a)。芽生えにおける制御標的遺伝子の同定からは、これまで予想されていなかった生理学・発生的過程における LFY の潜在的役割が浮かび上がり、興味ある今後の研究課題を提供することになった。未だに少数ではあるが、重要な co-factor もいくつか同定されている (Siriwardana and Lamb 2012a)。

LFY の機能の理解は、このように、もっぱらシロイヌナズナの研究により進んできたが、花芽形成におけるマスター制御因子という位置づけから来る関心から、種子植物を中心に数多くのオルソログが同定されている (2012 年 6 月 1 日の時点で、被子植物から約 2200、裸子植物から約 110、シダ植物から 53、小葉類から 76、コケ植物から約 660 (ただし、大半がミズゴケ属 (*Sphagnum*) の種からのごく短いもの) の配列が登録されている)。こうした探索から、LFY 遺伝子は、コケ植物を含む陸上植物に広く存在し、裸子植物と一部の系統に見られる倍数体化や染色体領域の小規模な倍加に起因する遺伝子重複を除けば、概ね単一コピー遺伝子として存在することが明らかになった。これは、陸上植物の進化の過程で、陸上植物に固有のものも含めて、多くの転写因子遺伝子が、遺伝子重複により大きなファミリーを形成するようになってきたこととは対照的である (Riechmann *et al.* 2000, Moyroud *et al.* 2009)。LFY 遺伝子がなぜ遺伝子ファミリーを形成するに至らなかったかについては謎であるとされる。また、進化上の起源についても、DNA 結合ドメイン (C ドメイン) の構造と DNA への結合様式が、いくつかのヘリックス-ターン-ヘリックス蛋白質 (例えば、Te3A トランスポゼース) のそれと似ている (Hamès *et al.* 2008) ことから、トランスポゾン起源の可能性が示唆されているが、いずれの場合にも配列相同性の度合いは非常に低く、推測の域を出ない (Moyroud *et al.* 2009)。すでに、ゲノム解読が完了している 2 種の緑藻類、クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) とボルボックス (*Volvox carteri*) にはオルソログが存在しないことから、陸上植物 (有胚植物) に固有の転写因子である可能性が高いが、緑藻類の中でもシャジクモ類 (坂山 2010) やコレオケーテ類、接合藻類といった陸上植物の姉妹群とされるもの (どれが姉妹群であるかは確定していないようである。これらの緑藻類に関する参考書としては、Smith 1955a, Graham 1996 [1993], 井上 2007 を参照) にはオルソログが存在する可能性があり、研究が待たれる。

裸子植物が持つ 2 つの LFY 相同遺伝子、LFY オルソログと *NEEDLY* (*NLY*)、については、球果類 (針葉樹類) の孢子嚢穂における発現パターンの解析が複数種でなされており、これに基づいて、M. Frohlich により被子植物の花の起源に関する興味深い仮説が提唱された (後述の 2-1-2. を参照)。種子植物以外の陸上植物では、蘚類のヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) の 2 つの LFY 遺伝子 (*PpLFY1*, *PpLFY2*) に関する研究が際立って優れた研究であり、最近になって相次いで刊行された 2 冊のコケ植物の教科書の中でも、紙面を割いて紹介されている (Cuming 2009, Vanderpoorten and Goffinet 2009)。遺伝子発現パターンの詳細な解析と、遺伝子破壊株を用いた機能解析がなされ (Tanahashi *et al.* 2005. 後述の 2-1-4. を参照)、転写因子とそれが制御する発生過程の進化という観点から興味深い考察もなされている (Maizel *et al.* 2005)。



## 2-1. 陸上植物の各系統群における LFY

### 2-1-1. 被子植物

被子植物におけるLFYについては, Moyroud *et al.* (2009) による最近の総説が全体を概観するのに役立つ (本文中の引用文献の文献リストからの漏れは気になるが)。シロイヌナズナとキンギョソウ以外の被子植物では, トマト (*Solanum esculentum* [慣用名としては, *Lycopersicon esculentum*]), *FALSIFLORA* [FA], ペチュニア (*Petunia × hybrida*, *ABERRANT LEAF AND FLOWER* [ALF]), タバコ (*Nicotiana tabacum*, *Nicotiana FLO/LFY* [NFL]), エンドウ (*Pisum sativum*, *UNIFOLIATA* [UNI]), ミヤコグサ (*Lotus japonicus*, *LjLFY*), タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*, *SINGLE LEAFLET1* [SGL1]), イネ (*Oryza japonica*, *RICE FLO/LFY* [RFL]), トウモロコシ (*Zea mays*, *ZEA FLO/LFY 1,2* [ZFL1,2]) などで, LFY オルソログの機能欠損変異体あるいは発現抑制体, 過剰発現体が得られ, 機能解析がおこなわれている (学名の後の名称は遺伝子名 [略称])。これらの植物種の解析から言えることは, ほとんどの場合, LFY は花の正常な発生に必要であるが, シロイヌナズナやキンギョソウで明らかになっているような花芽形成のマスター制御因子としての役割を必ずしも果たしているとは限らないことである。例えば, トマトやトウモロコシでは, シロイヌナズナの場合に近い役割を担っているとみることができ, ABC 遺伝子のうち, A クラス遺伝子の発現制御に関わることを示す明確な根拠は得られていない。また, シロイヌナズナの *lfy* 変異体が極めて軽微な花成遅延しか示さないのに対し, これらの種の機能欠損変異体 (トマトの *fa* と *leafy inflorescence (lfi)*, トウモロコシの *zfl1 zfl2* 二重変異体) は明瞭な花成遅延を示すなどの差異がみられる。一方, ペチュニアの場合には, 花の発生過程に必要ではあるものの, 花成以前から茎頂分裂組織で強い発現を示す *ALF* は, 花芽形態形成のための制限要因とはなっていない。そのため, *ALF* 遺伝子の過剰発現はこれといった表現型の変化をひきおこさない。興味深いことに, マメ科の3種の場合には, 花の形態形成に加え, 葉の形態形成にも重要な役割を果たしており, 機能欠損変異体ではいずれも複葉が単葉化する。程度は弱いものの, 同様の表現型はトマトの場合にも見られる。これは, LFY が無限成長性 (indeterminacy) の維持において重要な役割をもつことを示唆するものと解釈されている。同様にして, イネの *RFL* 遺伝子の発現抑制体では, 花成遅延とともに花序の分枝の極端な減少が観察されることから, *RFL* 遺伝子は花序分裂組織の無限成長性の維持に関わると考えられる。興味深いことに, *RFL* 発現抑制体では, 形成された花は正常な形態と稔性を持っており, *RLF* 遺伝子は花芽形態形成の主要な制御因子ではないとされる。

以上に述べたように, 被子植物におけるLFYの役割は, 機能解析がなされた限られた数の種をみても, 決して一様ではなく, 安易な図式化は適当ではない。花の起源と進化に対する関心から, 基部被子植物 (basal angiosperm) を含む多くの種でLFY 遺伝子の発現パターンが解析されているが, ここではふれないことにする。

### 2-1-2. 裸子植物

裸子植物では, ウェルウィッチア (*Welwitschia mirabilis*), グネツム属 (*Gnetum*), ソテツ類の1種 (*Zamia furfuracea*), イチョウ (*Ginkgo biloba*) などの系統 (Frohlich and Parker 2000, Shindo *et al.* 1999 など) や, 球果類 (針葉樹類) の数種 (Mouradov *et al.* 1998, Mellerowicz *et al.* 1998, Vázquez-Lobo *et al.* 2007) から遺伝子クローニングがなされてきた。その結果, グネツム属を除く裸子植物のゲノムには, 上述のように, 遺伝子重複により, LFY クレードの遺伝子と *NLY* クレードの遺伝子が1コピーずつ存在することが明らかになった。被子植物とグネツム属では, *NLY* クレードの遺伝子が失われたと考えられている

(Frohlich and Parker 2000, Frohlich 2003, p. 7の図2を参照)。

ラディアータマツ (*Pinus radiata*) で、最初に2つの遺伝子、*NEEDLY (NLY)* と *Pinus radiata FLO/LFY-like (PrFLL)* が単離され、雌性球果 (大孢子嚢穂) と雄性球果 (小孢子嚢穂) におけるそれぞれの発現パターンが解析された (Mouradov *et al.* 1998, Mellerowicz *et al.* 1998)。その結果、*NLY* 遺伝子が主に雌性球果内の胚珠を生じる種鱗で発現する (ただし、Mouradov *et al.* (1998) には、雄性球果の小孢子葉の花粉母細胞でも発現することも明記されている) のに対し、*PrFLL* 遺伝子は未熟な雄性球果では発現が見られたが、発生途上の雌性球果ではほとんど発現が見られなかった (RNA プロット解析)。M. Frohlich は、これらの結果から、*NLY* 遺伝子は雌性球果で、*PrFLL* 遺伝子は雄性球果でそれぞれ発現する、という大胆な一般化を引き出し、*NLY* クレードの遺伝子が被子植物に至る系統では失われていることと合わせて、被子植物の花が花粉をつける雄性生殖器官 (小孢子嚢穂) に由来するとする、“Mostly Male theory” を提唱した (Frohlich and Parker 2000, Frohlich 2003, 和文による解説としては伊藤 (2012) のものがわかりやすい)。しかし、「*NLY* クレードの遺伝子は雌性生殖器官、*LFY* クレードの遺伝子は雄性生殖器官」という図式は、上述のラディアータマツでも截然とは当てはまっておらず、その後解析された球果類を含む他の裸子植物の例 (Shindo *et al.* 2001, Vázquez-Lobo *et al.* 2007など) からも支持されないなど、“Mostly Male theory” に対しては批判的な見方が強い (Vázquez-Lobo *et al.* 2007, Siriwardana and Lamb 2012a)。被子植物の花の起源に関する異なる仮説としては、MADSボックス遺伝子の研究者である G. Theissen らによるものがある (Melzer *et al.* 2010)。

### 2-1-3. モニロファイト類 (シダ植物) と小葉類

シダ植物では、薄囊シダ類のリチャードミズワラビ (*Ceartopteris richardii*) から2遺伝子が、真囊シダ類のリウビンタイ (*Angiopteris lygodifolia*) から3遺伝子がクローニングされているほか、マツバラ (*Psilotum nudum*)、スギナ (*Equisetum arvense*) からそれぞれ1遺伝子が得られている (Himi *et al.* 2001)。このうち、リチャードミズワラビの遺伝子 (*CrLFY1*, *CrLFY2*) については、RNA プロットによる発現解析がなされている。両遺伝子とも孢子体世代においては、栄養シュートおよび生殖シュートの茎頂と蕨巻き状態の孢子葉で発現しており、特に生殖シュートの茎頂において強い発現が観察された。一方、配偶体世代 (前葉体) では、発現は認められるものの、造精器および造卵器が形成される時期を含めて、その発現レベルは低いものであるとみなされている (Himi *et al.* 2001)。

小葉類では、ヒメミズニラ (*Isoetes asiatica*) から部分配列が報告されている (Himi *et al.* 2001) ほか、ゲノム解読が終了したイヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*) においても単一コピーの存在が確認できる。Siriwardana and Lamb (2012a) では、配列アライメントの中に *SelLFY* として取り上げられている。小葉類ではまったく発現が調べられておらず、解析が待たれる。

### 2-1-4. 蘚類とツノゴケ類

コケ植物は、苔類、蘚類、ツノゴケ類の3群 (門 phylum) に分けられる (Vanderpoorten and Goffinet 2009, 嶋村 2012 を参照)。まず、ツノゴケ類 (約150種, Renzaglia *et al.* 2009) からは今のところ *LFY* オルソログの報告はないが、存在することは疑いないので、報告が待たれるところである。

蘚類からは、ヒョウタンゴケ目のヒメツリガネゴケから2つの遺伝子 (*PpLFY1*, *PpLFY2*) が、スギゴケ目のタチゴケ属の1種 (*Atrichum angustatum*) から2つの遺伝子の全長に近い部分断片 (*AtranFlo1*, *AtranFlo2*) が、それぞれクローニングされている (Tanahashi *et al.* 2005, Frohlich and Estabrook 2000)。ヒョウタンゴケ目のヒョウタンゴケ (*Funaria hygrometrica*) では、トランスクリプトーム解析により配偶

体と孢子体の遺伝子発現のプロファイルの比較がおこなわれているが (Szövényi *et al.* 2011), 残念ながら, *LFY* オルソログはデータベースに登録されていない。ミズゴケ属 (*Sphagnum*) からは, Cドメイン内の約30アミノ酸残基に対応する部分配列が大量にデータベースに登録されているが, 全長ないしはそれに近い長さの配列の報告はない。蘚類 (約13,000種) の中で, ミズゴケ属は, 蘚類の進化の初期に分岐したミズゴケ綱に, スギゴケ目とヒョウタンゴケ目は, さらに後に分岐したとスギゴケ綱とマゴケ綱に, それぞれ含まれる (Goffinet *et al.* 2009, p.7の図2を参照)。後述する (2-2.を参照) ように, 苔類を含めた他の系統と比べて, 蘚類では *LFY* 遺伝子が特殊化していることが予想されるが, その検証には, 広範なサンプリングが必要である。

上述のように, ヒメツリガネゴケにおいては, 2つの遺伝子 (*PpLFY1*, *PpLFY2*) のGUSレポーターを用いた発現パターン解析がなされ, 遺伝子破壊により機能が明らかにされている (Tanahashi *et al.* 2005)。両遺伝子ともに, 配偶体と孢子体の両方で発現している。このうち配偶体では, シュート頂で発現が見られるほか, 造卵器における発現が観察されたが, 造精器においては, どちらの遺伝子の発現もみとめられなかった。一方, 孢子体の発生過程では, はじめ孢子体全体でみとめられた発現が, 孢子嚢, 蒴柄 (seta), 足 (foot) の分化後は, 孢子嚢と足に限定された。*PpLFY1 PpLFY2* 二重破壊株においては, 配偶体には異常は観察されなかったが, 孢子体の発生が1細胞期より先には進行しないことが明らかになった。このことは, 両遺伝子が受精卵の第一分裂に必須であることを意味すると解釈されている。二重破壊株の卵に野生型の精子を受精させた場合には, 正常な孢子体の発生が見られ, 正常な発芽能と分離比を示す孢子が形成されたことから, 配偶体における卵形成そのものには異常はない。受精卵が直ちに減数分裂せず, 体細胞分裂を繰り返すことで, 胚発生を経て孢子体形成をおこなうことは, 陸上植物 (有胚植物) を特徴づける重要な形質である (Bower 1930, Smith 1955b)。この観点から, 二重破壊株の表現型は極めて興味深い。ヒメツリガネゴケのこの研究は, 被子植物以外の植物における唯一の機能解析の例であり, *LFY* の祖先的な機能の探索に対して示唆とともに, 大きな課題を与えるものとなっている。

#### 2-1-5. ゼニゴケを含む苔類

苔類は, 約400属約5,000種を擁し, 3つの綱 (コマチゴケ綱, ゼニゴケ綱, ツボミゴケ綱) に大別される (Crandall-Stotler *et al.* 2009, 嶋村 2012 を参照。種数に関しては, 7,500種という最近の見積もりがある [Konrad *et al.* 2010])。 *LFY* オルソログの報告があるのは, ゼニゴケ綱のゼニゴケ (Frohlich and Estabrook 2000) とウキゴケ (*Riccia fluitans*) (Maizel *et al.* 2005) の2種のみである (いずれも部分配列)。後者からは, allelic variants とされる2種類の配列 (Cドメインの一部) が登録されている。蘚類以上に, 知見が不足していると言える。

こうした状況を踏まえて, 筆者らは, ゼニゴケから全長cDNAとプロモータを含む約20 kbpのゲノム領域をクローン化した。シロイヌナズナと比較した場合, イントロンが長く, 特に第一イントロンは 6 kbp 近い長さであった (辻井由香ほか, 日本植物学会第72回大会, 2008年)。ゼニゴケに加え, 美和秀胤博士 (現・ヘルシンキ大学) に材料に関する協力を仰ぎ, ジャゴケ (*Conocephalum conicum*) とヒメジャゴケ (*C. japonicum*) からも, Cドメインに当たる部分配列を得ている (辻井由香ほか, 未発表)。

後述する筆者らの解析 (2-3.を参照) を除けば, これまでのところ, 発現や機能に関する解析はない。蘚類との比較の興味深い問題については, 次項で論じる。

## 2-2. Cドメイン (DNA結合ドメイン) の構造と蘚類における特殊化?

2. の冒頭で述べたように、Cドメインは約160アミノ酸残基からなるDNA結合ドメインであり、立体構造が決定されている (Hamès *et al.* 2008)。2個の $\beta$ シートおよび短いループで連結された7個の $\alpha$ ヘリックスからなるコンパクトな折り畳み構造で、DNAのパリンドローム配列の半分と結合する (したがって、二量体でDNAに結合する)。7個のうち、ヘリックス $\alpha_2$  と $\alpha_3$  がヘリックス-ターン-ヘリックス構造を取り、 $\alpha_3$  がDNAの主溝内に位置して、DNAとの相互作用の大半を担っている。

Maizel *et al.* (2005) は、シロイヌナズナのLFYプロモータの制御下でヒメツリガネゴケの *PpLFY1* あるいは *PpLFY2* を発現させた場合に、*lfy* 変異体における表現型の相補と下流遺伝子の発現誘導が全く見られないことに着目し、さまざまな種間でアミノ酸配列の比較をおこなった。その結果、ヒメツリガネゴケのLFYでは、Cドメイン内の2か所のアミノ酸残基が他の植物種のLFYと異なることを見いだした。コンセンサス配列上では394番目と427番目 (Hamès *et al.* (2008) では、312番目と345番目に当たる) の残基が、他の種ではそれぞれ、ヒスチジン (H) とアルギニン (R) であるのに対し、ヒメツリガネゴケでは、アスパラギン酸 (D) とシステイン (C) となっていた。同様の置換 (以下では、DC型と記す。また、他の植物種のLFYをHR型と記す) がタチゴケ属の1種の2つのLFYでも見られることから、蘚類に特有の置換であると推論している。改変 *PpLFY1* 遺伝子と形質転換体を用いた解析から、2つの置換のうち、H $\rightarrow$ D の置換が結合配列の変化をもたらし、*lfy* 変異体の相補能を欠く原因であることが示されている。Hamès *et al.* (2008) は、H312がヘリックス $\alpha_3$ の一部を成し、 $\alpha_3$ のN末に当たるP308のちょうど1ヘリックス上に位置すること、その一つ前のK307が -2 および +2 の位置のグアニン (G) と直接相互作用することから、ヒメツリガネゴケにおける H $\rightarrow$ Dおよび R $\rightarrow$ C ( $\alpha_3$ の上に重なる $\alpha_5$ 内に位置する) の置換は、ヘリックス $\alpha_3$ の配向に影響を与える可能性があるとしている。

Maizel *et al.* (2005) の研究の時点で部分配列が知られていた2種の苔類、ゼニゴケとウキゴケのLFYは、いずれもHR型であった。上述 (2-1-5. を参照) のように、われわれは、ゼニゴケのLFY (以下、*MpLFY*とする) の全長配列とともに、ジャゴケ、ヒメジャゴケのCドメインの配列を得ているが、どの種においても単一コピーと考えられ、いずれもHR型である。したがって、これまでのところ苔類ゼニゴケ綱の4種はすべてHR型である。なお、ミズゴケ属の部分配列がデータベースに大量に登録されている (2-1-4. を参照) が、いずれも問題の箇所よりも数残基N末側の部分であり、蘚類の基部近くで分岐したこの興味深いグループがHR型、DC型のいずれのLFYを持つかについては今のところ不明である。

興味深いことに、Cドメイン内の2か所の置換に加え、ヒメツリガネゴケとタチゴケでは、NドメインとCドメインの間の領域が72~76アミノ酸残基と短い (他の種では約100アミノ酸のものが多い。ただし苔類ではゼニゴケしか情報がない)。さらに、ヒメツリガネゴケの2つの遺伝子のエキソン・イントロン構造 (Tanahashi *et al.* 2005) は、シロイヌナズナやイヌカタヒバ (accession: EFJ20684.1)、ゼニゴケ (辻井由香ほか、日本植物学会第72回大会、2008年) とは異なり、NドメインよりN末側をコードする領域に、他の種には見られない長いイントロンを持つ。タチゴケ属の1種の2つの遺伝子 (*AtranFlo1*, *AtranFlo2*) の配列 (accession: AB286054.1, AB286055.1) をヒメツリガネゴケと比較すると、この種においても、このイントロンの存在が予想される。これらから、苔類を含む他の系統と比べて、蘚類ではLFYの特殊化が起きていると考えられる (図2の点線枠内)。この特殊化が蘚類の進化のどの段階で起きたかを推定するためには、蘚類の基部に位置するミズゴケ属やナンジャモンジャゴケ属 (*Takakia*)、

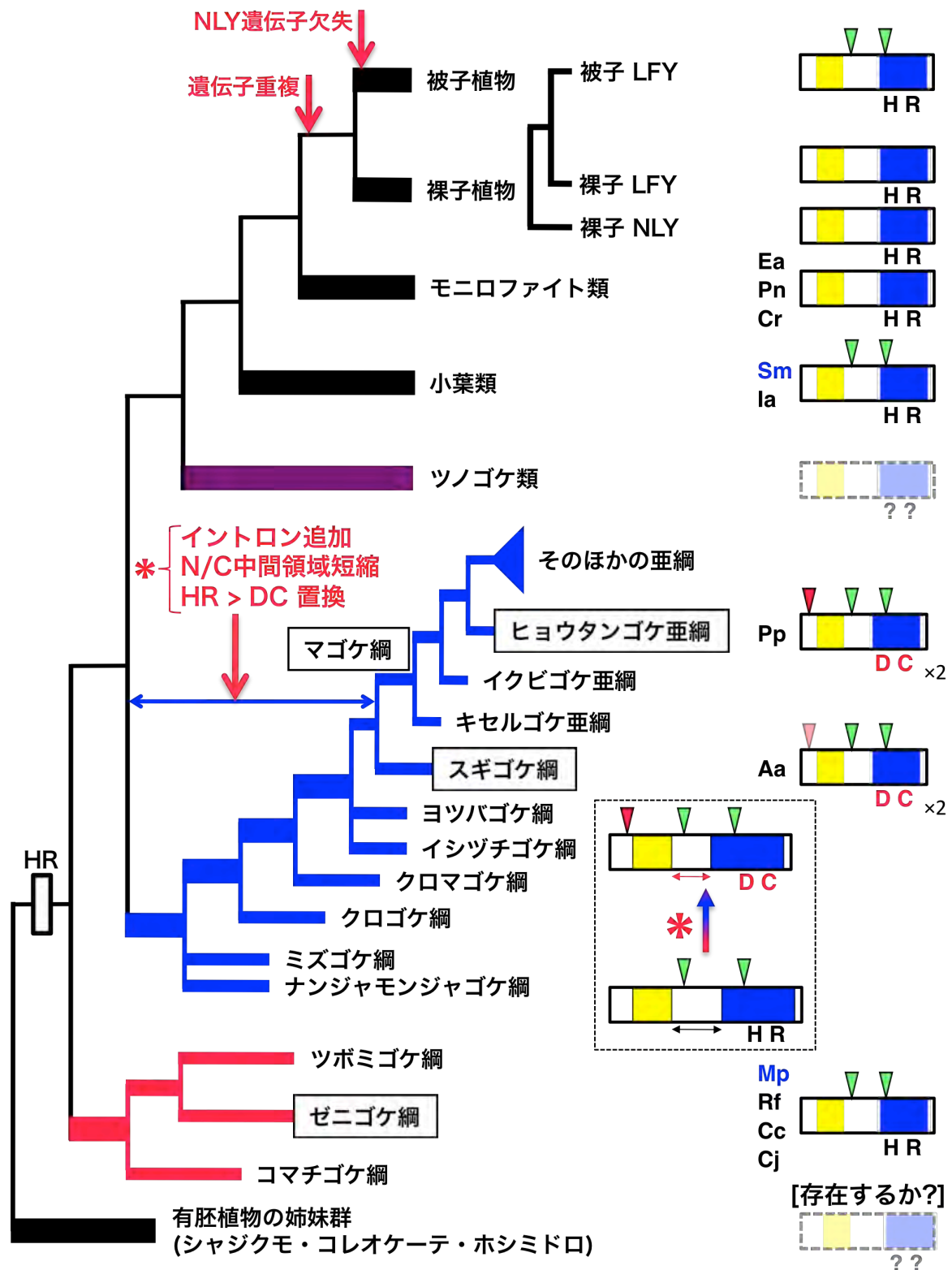


図2. 陸上植物の進化過程で起きたと推定されるLFYの変化

苔類 (赤) と蘚類 (青) については主要な系統を示した。下向きの三角形はイントロン (赤三角形は蘚類の2種にのみ存在する) の挿入位置を示す。2文字のアルファベットは、LFY が単離されている代表的な種 (青字は遺伝子構造がわかっているもの) を示す: ゼニゴケ (Mp), ウキゴケ (Rf), ジャゴケ (Cc), ヒメジャゴケ (Cj), タチゴケの1種 (Aa), ヒメツリガネゴケ (Pp), イヌカタヒバ (Sm)。ヒメミズニラ (Ia), スギナ (Ea), マツバラ (Pn), リチャードミズワラビ (Cr)。破線枠内は、蘚類で起きたと考えられる変化。

苔類のゼニゴケ綱以外の系統（コマチゴケ綱やツボミゴケ綱）からの $LFY$ の単離が待たれる。

### 2-3. 生活環との関連から見た発現パターン

以上で、各系統の $LFY$ について概説したが、最後に、発現パターンに関する知見を、生活環との関連でまとめておくことにしたい。

まず、被子植物では、 $LFY$  遺伝子の発現は孢子体 (2n) 世代に限定されるようである。シロイヌナズナでは、精細胞 (Borges *et al.* 2008) と胚嚢の卵細胞, 助細胞, 中央細胞 (Wuest *et al.* 2010) でトランスクリプトーム解析がなされているが、いずれにおいても  $LFY$  遺伝子の発現はみとめられなかった。したがって、配偶体では発現しないと考えられる。

裸子植物においては、これまでになされた発現解析は孢子体のみに限られている。ラディアータマツの  $NLY$  遺伝子の例では、花粉母細胞 (2n) で発現することが報告されているが、それ以降のステージにおける観察はなされていない (Mouradov *et al.* 1998)。このほか、トウヒ属 (*Picea*) の例 (Carlsbecker *et al.* 2004) や、“Mostly Male theory” の批判的な検証を念頭に発現解析がなされたトウヒ属やマキ属 (*Podocarpus*)、イチイ属 (*Taxus*) の  $LFY$  遺伝子と  $NLY$  遺伝子の場合においても、胚珠や小孢子嚢における発現は確認されているが、孢子や配偶体における発現は調べられていない (Vázquez-Lobo *et al.* 2007)。グネツム属の場合も同様である (Shindo *et al.* 2001)。

種子植物とは異なり、シダ植物における唯一の解析例であるリチャードミズワラビでは、孢子体に加えて、配偶体においても弱い発現が検出されている。しかし、造精器, 造卵器で発現するのかという点を含めて、詳細な空間的な発現パターンは不明である (Himi *et al.* 2001)。小葉類も含めた発現解析が待たれる。Himi *et al.* (2001) は、この発現様態がMADSボックス遺伝子のものとは異なることから、MIKC<sup>C</sup>型のMADSボックス遺伝子の $LFY$ による制御は、シダ植物においてはまだ確立していなかったと考察している。やはりコケ植物における唯一の解析例であるヒメツリガネゴケでは、上述 (2-1-4. を参照) のように、孢子体に加え、配偶体においてもシュート頂や造卵器における特異的な発現が観察されている。興味深いことに、 $PpLFY1$ ,  $PpLFY2$  とともに、造精器においては発現がみとめられなかった。(Tanahashi *et al.* 2005)。

以上から、コケ植物においては配偶体, 孢子体の両方で発現していたものが、シダ植物では孢子体 (シュート頂) における発現が優勢となり、種子植物では孢子体 (シュート頂) のみに発現が限定されるようになり、生殖成長に関わるようになった、というシナリオが考えられる。配偶体における組織特異的な発現が見られるヒメツリガネゴケにおいても、その機能的な重要性がすでに孢子体に限られているように見えることはたいへん興味深い。

これらのことを念頭において、われわれは、ゼニゴケの配偶体および孢子体における $MpLFY$  遺伝子の発現パターンの解析を、RT-PCR, *in situ* RNA hybridization,  $MpLFYpro(5.3):GUS$  形質転換体などにより進めてきた (酒井友希・宮下結衣ほか, 日本植物学会第74回大会, 2010年, 日本植物学会第75回大会, 2011年)。その結果、ヒメツリガネゴケと同様に、配偶体と孢子体の両方で発現することが明らかになった。しかし、配偶体における発現の様態はヒメツリガネゴケの場合とはいくつかの重要な点で異なることもわかった。その一つが、雄性生殖器官の発生過程における発現である (酒井友希・宮下結衣ほか, 日本植物学会第75回大会, 2011年)。この発現が実際に機能的な意味を持つ可能性が高いことは、発現抑制体の表現型などからも支持されている (酒井友希・宮下結衣ほか, 日本植物学会第75回大会, 2011年)。この点も、 $PpLFY1$   $PpLFY2$  二重破壊株の配偶体が異常を示さないこととは対照的である。

### 3. ゼニゴケにおける雄性生殖器分化と有性生殖過程

コケ植物は、2本の鞭毛を持つ精子 (spermatozoid) と卵とによって有性生殖をおこなう。これらの配偶子が形成される生殖器官は多細胞性であり、それぞれ、造精子器 (antheridium), 造卵器 (archegonium) と呼ばれ、ジャケット (jacket) という1層の細胞層が配偶子細胞を包み、配偶子嚢をなす。生殖器官が多細胞性であることは、緑藻類にはない、コケ植物を含む陸上植物の特徴である (Bower 1930, Smith 1955b, 和文では、北川 1989 に平易な解説がある)。ジャケットは配偶子を乾燥から守る意義を持ち、陸上環境への適応であるとされている。これに加えて、造精子器 (雄性配偶子嚢) の場合には、後述するように、ゼニゴケを含む一部の苔類では、精細胞塊を外部に排出する際にも積極的な役割を果たすことが知られている (Bergdolt 1926, 後述の3-5. を参照)。

コケ植物の有性生殖過程については、北川 (1990b) に、生殖器官の形成、雌雄性、受精など全般にわたる解説があり、ゼニゴケの生活環の解説 (北川 1990a) の中にも、有性生殖過程の記述が含まれる。コケ植物の精子・受精については、大和 (2012) の総説の中にこれまでの研究が簡潔にまとめられている。また、本総説集の中でも、嶋村 (2012) がゼニゴケの有性生殖に関して、多数の図をまじえて詳細に解説している。のみならず、独自の見解も述べられており、今後の研究のための課題を提供する優れた内容のものとなっている。上述のように、ゼニゴケの *MpLFY* 遺伝子が、有性生殖過程、特に雄が関与する過程に関わる可能性があることから、ここでは、ゼニゴケにおける雄性生殖器の分化と精子形成、受精について、大和 (2012) および嶋村 (2012) との重複を避けつつ、これまでの研究の歴史やその過程で得られた知見、未解決の問題を中心に記述することにした。なお、以下では、古い研究を引用する際に、コケ植物の名称については、和名 (原著者が用いた学名 [= 現行の学名]) のように表記する。

#### 3-1. 雄性生殖器

ゼニゴケの生殖器官については、嶋村 (2012) が多くの写真を用いて解説している。また、北川 (1990a) やコケ植物などの教科書類にも図解がなされている (Campbell 1928, Goebel 1930, Smith 1955b, Parihar 1962)。そのため、ここでの記述は簡潔にすませることとする。

雄株は、雄器托 (antheridiophore) と呼ばれる生殖枝を分化する。雄器托の柄の上部には、雄器床 ([antheridial] receptacle) と呼ばれる円盤状の構造が形成される (図3 A)。ゼニゴケ属は、有柄の雄器

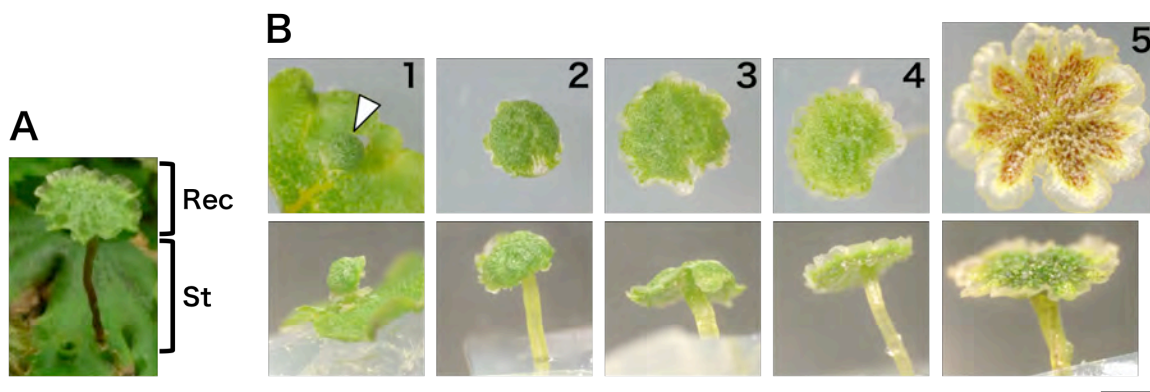


図3. 雄器托・雄器床の形態と成長過程

A: 雄器托の構造。柄 (St) と雄器床 (Rec) から成る。B: 雄器托と雄器床の成長過程。上段は上面から、下段は側面からみたもの。便宜上、5つのステージに分けている。ステージ1の雄器托は白い矢尻の先にある。ステージ4で、それまで凸面だった雄器床の上面が平らになり、縁が上反することで、浅い皿状になる。ステージ5は成熟段階。Bのスケール・バーは、0.5 mm。写真とステージ分けは、宮下結衣と酒井友希による。

托を発達させる点で、ゼニゴケ目の中でも特異な存在とされる (Smith 1955b)。雄器床の上面は、雄器托の分化初期にはドーム状をしているが、成熟すると、縁が上向きに持ち上がり、浅い凹面の皿状となる (図 3 B)。雄器床の上部には造精器腔 (Goebel 1930 では, Antheridiengrube) と呼ばれるフラスコ状の窩洞があり、その中に造精器が収まっている。造精器は、柄とジャケット (一細胞層) に包まれた精原組織 (spermatogenous tissue) から成る (p. 12 の図 4 B を参照)。造精器腔は、細い通路を経て、雄器床の上面に開口しており、後述する (3-5. を参照) 精細胞の放出の際には、この通路を通して精細胞塊の排出がおこる。

以上の雄性生殖器官の発生過程における *MpLFY* の役割を明らかにすることが、当面の重要な課題である (2-3. および 3-3. を参照)。

### 3-2. 有性生殖過程の研究史

ゼニゴケを含めて、コケ植物の有性生殖過程に関しては、蘚苔類学あるいはコケ植物の生物学に関する最近の教科書・成書ではほとんど紙面が割かれていない (Schofield 1985, Vanderpoorten and Goffinet 2009, Goffinet and Shaw 2009)。また、後に見るように、研究に当たって参考とすべき論文も古いものが多い。そこで、具体的な記述の前に、まず、研究史を概説することにする。注意すべきは、ゼニゴケを含むコケ植物の有性生殖に関わる初期の研究がなされつつあった 19 世紀前半は、有性生殖を巡る大論争の時代であり、有性生殖の位置づけ自体が大きく揺らいでいたことである (Farley 1982)。Matthias Jacob Schleiden と Theodor Schwann による細胞説が生殖や発生に対する見方を大きく変革しつつある一方で、精子が生殖において果たす役割についてさえ、まだ共通の理解の確立にはほど遠かった。植物に限ってみても、被子植物以外の植物 (その当時のいわゆる隠花植物 Cryptogamia) は有性生殖をおこなわないという見方が支配的であり、その主唱者はほかならぬ Schleiden であった (彼は、被子植物の受精に関しては、花粉管から胚が形成されるという説を提唱していた) (Farley 1982)。以下、研究者の人名と経歴、植物学史あるいは有性生殖の研究史における位置づけの確認は、主に Sachs (1906 [1875]) および Farley (1982) にもとづく。

Bower (1930) によると、ゼニゴケの形態と発生過程の記載は、フランスにおける顕微鏡レベルの植物形態学の始祖であり、植物の発生過程 (その当時, history of development と呼ばれていた) に着目した研究の先駆的な存在である Charles François Brisseau de Mirbel が 1835 年に発表した 2 つの連報論文 (Mirbel 1835a, Mirbel 1835b) に始まる。このうち Mirbel (1835b) は、造精器に着目した研究であり、フラスコ状の造精器腔の中に収まって存在する造精器などの見事な彩色図を伴っている。Mirbel は、造精器とその下の柄の部分に合わせて、被子植物の雄蕊に当たるものとして, étamine (stamen) と呼び、造精器を anthere (anther), その中の精原細胞を pollen とした。この論文では、被子植物としてカボチャ (*Cucurbita pepo*) を選び、葯の形態をゼニゴケと比較している。Mirbel は、雄器床に対して弱い圧力を加えると、造精器が収まっているポケットの開口部から粘性の液体が出てくるといふ Casimir Christoph Schmidel (1747) (筆者は未見) の観察を引用し、自身でも同様の「粘性の液体 (liquere visqueuse)」を観察したと報告している。さらに、この液体は低倍率のルーペでは乳白色に見えるが、約 600 倍の顕微鏡下では、多数の顆粒や「花粉粒 (grains entiers de pollen)」(精原細胞を指すと考えられる) が透明な液体中に浸かっているのが認められたことを報告している。しかし、精子の発見には至らなかったようである。図版 VII, 第 55 図 から判断すると、精子完成前の精原細胞を含む造精器を観察に用いたためと推測される。ゼニゴケの精子は、このすぐ後に、ほかの苔類の精子とともに、Franz Unger (1837)



(筆者は未見)によって発見され、2本の鞭毛を持つことも観察された。Unger はこれが正常な状態であるとは考えなかったようである (Hofmeister 1862 [1851] による)。

Wilhelm Hofmeister は, Schleiden の著書から独学で新しい植物学を学び, 被子植物の受精と胚発生の研究や, いわゆる隠花植物の植物体と生殖器官の発生に関する広範な記載的研究をおこなった。細胞説に立脚した Hofmeister は, 苔類・蘚類から被子植物に至る陸上植物の植物体間, 生殖器官間の本質的な対応関係を見抜くことで, 植物の生活環を配偶体と孢子体の世代交代 (Generationswechsel) として捉える全く新しい見方を提唱した。それまでの論争で遠のいた感があった (Schleiden もその一因である) 植物における有性生殖と無性生殖の本質的な理解は, Hofmeister によって, はじめて成し遂げられたといえる (Goebel 1926 [1924], Farley 1982)。

さて, Hofmeister は, その重要な著書である『高等隠花植物の比較研究』(Hofmeister 1862 [1851]) の中で, 葉状体苔類についても1つの章全体を当てている。彼が研究したのは, ゼニゴケのほかに, ジャゴケ (*Fegatella conica* [= *Conocephalum conicum*]), ジンガサゴケ (*Rebouillia hemisphaerica*), ミカヅキゼニゴケ (*Lunularia vulgaris* [= *Lunularia cruciata*]), ハマグリゼニゴケ (*Targionia hypophylla*) の4種であった。ゼニゴケについては, 彼自身の観察の記載とともに, 前出の Mirbel をはじめとする先行研究の批判的紹介もおこなっている。雌性生殖器官の発生と胚発生に比べると, 雄性生殖器官の発生に割かれた紙面は限られているが, 造精器が, 葉状体が変形してできた構造 (雄器床) の上面に, フラスコ状の腔 (造精器腔) の中に収まって存在することや, 雄器托・雄器床の形成初期や始原細胞からの造精器の形成過程などを図示・記述している。後述する精細胞塊の放出過程についても簡単な記述を残している。

余談であるが, Hofmeister の『高等隠花植物の比較研究』(1851年刊。本人によって大幅に増補改訂された英訳が1862年に刊行された) は, 19世紀の植物学における最も重要で革新的な著作の一つとされる (Sachs 1906 [1875], Goebel 1926 [1924], Farley 1982)。その内容は徹底して, 観察事実の詳細な記載と先行研究の批判的評価である。わずかに最後の章 (英訳では第16章) に短い全体の総括・一般化があり, 2つの異なる世代 (配偶体世代と孢子体世代) の間の世代交代という概念が, かなり切りつめたかたちで提示されている。その中には, 裸子植物に精子が存在する可能性についての言及も見いだせる。平瀬作五郎とともに裸子植物の精子を発見した池野成一郎は, *Annals of Botany* 誌からイチョウとソテツの精子発見についての抄録を求められた際に, この予言のことを記している (Ikeno and Hirase 1897)。正規の大学教育を受けなかった Hofmeister は 19世紀のドイツのアカデミズムにあっては, 極めて異色の経歴の持ち主である。その業績と伝記は, 門下の Karl von Goebel と二女の Constanze によってまとめられている (Goebel 1926 [1924]) (その英訳版の翻訳と編纂は, 世代交代を植物の陸上への進出と適応という観点から捉え直した Frederick Orpen Bower 夫妻による)。Constanze が引用している旅先から妻に宛てた手紙を見ると, 自宅で栽培しているゼニゴケを乾いた状態に保つようにという指示や, ツボミゴケ (*Jungermannia*) を 20 本も見つけたというような, 苔類の採集や観察についての記述も散見される。

さて, 生殖器官の発生に関しては, Hofmeister に続いて, 後に植物学の教科書の代名詞となる Eduard Strasburger (1870) が記載的な研究をおこない, 皿状を成す雄器床の形状 (図3) の機能的な意義 (3-6. を参照) についても論じている。ゼニゴケの形態・発生の図説として知られる Kny (1890) は, 以上のような成果に基づいて作成された, 大学の教室における教育用の壁掛図 (Wandtafel) の別冊解説書

である。精子の形態 (第 86 図版 13 図) のように、今日目からすると不正確な図もあるが、雄器床の外形と縦断面 (第 85 図版) や造精器の発生過程 (第 86 図版)、雌器床の縦断面や造卵器 (第 87 図版) などの優れた図解を含んでいる。植物器官学の創始者といえる Goebel の教科書 (Goebel 1930) にも、ゼニゴケの生殖器官の発生過程や機能に関する自身の研究にもとづく図や他の研究者による図が多数掲載されている。

以上は、19 世紀以降における研究史の概略であるが、造精器・造卵器の発生過程と、受精卵からの孢子体の発生と孢子形成の過程に関して、今日でも有用な研究としては、Durand (1908) によるものがある。Durand は、これまでの研究の流れを受けて、始原細胞からの造精器の発生過程を詳細に記述・図示している。一方、精子形成過程に関しては、池野成一郎による研究 (Ikeno 1903) があり、Durand (1908) やコケ植物の教科書 (Campbell 1928, Parihar 1962) に引用されている。

### 3-3. 造精器の発生過程

Durand (1908) の記述をもとに、造精器の発生過程は以下のようにまとめることができる (図 4)。まず、若い雄器床の翼部の表皮細胞から 1 個の造精器始原細胞 (antheridium initial cell, AIC) が生じる。造精器始原細胞 (AIC) は、頂部側の造精器本体母細胞 (antheridium proper mother cell, APMC) と基部側の柄母細胞 (stalk mother cell, StMC) とに分裂する。造精器本体母細胞 (APMC) は、横分裂と縦分裂により、4 個の造精器細胞 (antheridial cell, AC) が数段重なった造精器の原基を形成する。造精器細胞 (AC) はやがて並層分裂をおこない、内側の精原細胞 (spermatogenous cell, SC) と外側の壁細胞 (wall cell, WC) を生じる。精原細胞 (SC) と壁細胞 (WC) は、分裂を繰り返す、それぞれ、精原組織とジャケットを形成することになる。精原細胞は、精母細胞 (spermatid mother cell, SMC) として、斜め方向

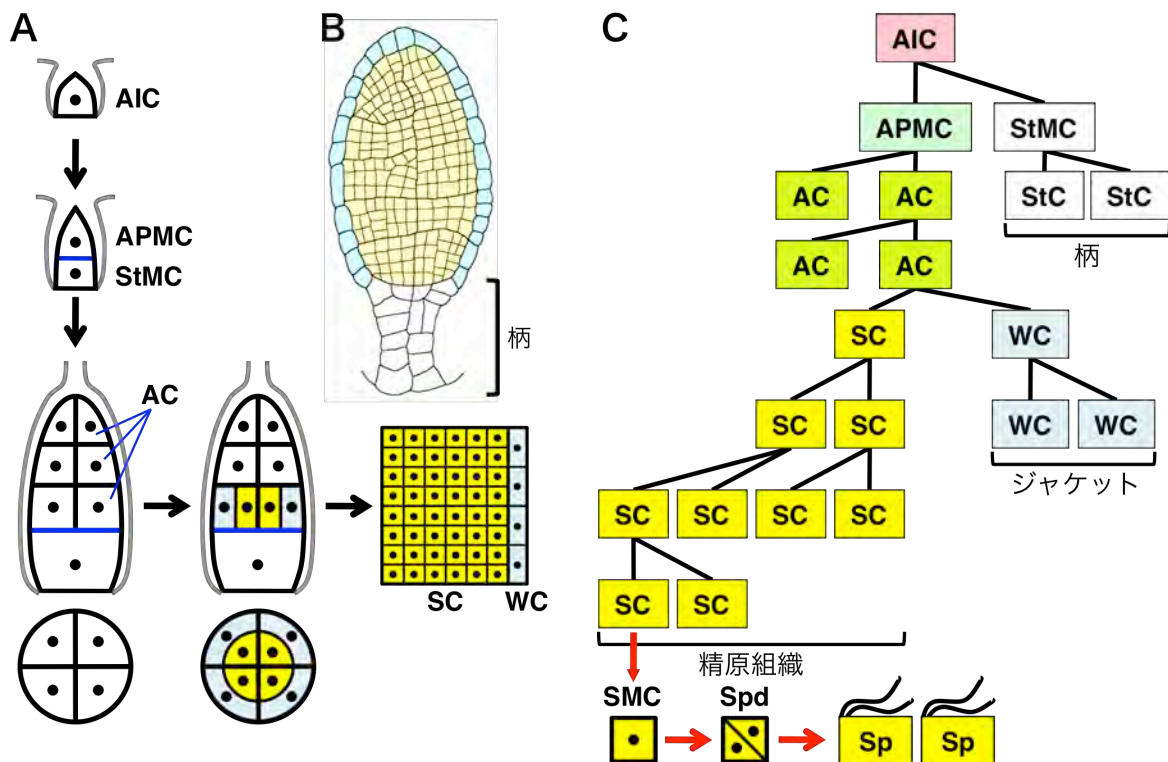


図 4. 造精器の形態と発生過程

A: 造精器の発生過程。B: 精子形態形成前の造精器。柄およびジャケット (水色) と精原組織 (黄色) からなる配偶子嚢を示す。C: 造精器の発生過程における細胞系譜。増殖分裂の回数は正しく示していない。詳細は本文を参照。

の最終分裂をおこなう。2つの娘細胞（精細胞 [spermatid, Spd]）は精子（spermatozoid, Sp）へと変態（形態形成）する（spermiogenesis）。造精器が形成される過程で、周囲の細胞の分裂により、造精器が収まる腔（造精器腔）が形作られる。

### 3-4. 精子形成

植物の精子全般に関しては、湯浅 (1969) や Renzaglia and Garbary (2001) にまとめられており、特に後者は必読の総説である。また、陸上植物の系統関係を探るという関心から、Garbary *et al.* (1993) は、造精器の発生から精子形成・精子成熟までの諸過程の90の形質について、コレオケーテ類やジャジクモ類から裸子植物（イチョウとソテツ類）に至る系統の代表的な種（ゼニゴケも含む）でそれまでに得られていた知見をまとめている。その後の研究成果を取り入れ、Renzaglia and Garbary (2001) は、これを72の形質に整理し直した。同じ関心から、Renzaglia *et al.* (2000) は、配偶体と孢子体に関する広範な形質を解析しており、その中で精子の形成過程や形態についても多数の図（精子の形態の模式図を含む）を示している。被子植物や裸子植物の鞭毛を持たない精細胞との間の、細胞骨格や核形態における類似性については、Southworth and Cresti (1997) が、雄性配偶子全般については、Duckett and Racey (1975) が、それぞれ参考になる。

ゼニゴケの精子形成に関しては、前出の Ikeno (1903) 以降、比較的最近では、鞭毛と鞭毛関連の構造体の形成や核の変化などに関する電子顕微鏡を用いた微細形態学的研究が多数なされている（Carothers 1975, Carothers and Kreitner 1967, Carothers and Kreitner 1968, Carothers and Kreitner 1976, Kreitner 1977a, Kreitner 1977b, Moser and Kreitner 1970 など）。嶋村 (2012) には、そうした知見の要点が解説されている。その一方で、鞭毛形成をはじめとする精子の形態形成や機能に関連した遺伝子発現の研究は、ゼニゴケにとどまらずこれまでまったくなされていない。シロイヌナズナやイネをはじめとする多くのモデル植物を擁する被子植物が、鞭毛を持たず、鞭毛関連の遺伝子を失っていること（Merchant *et al.* 2007, Carvalho-Santos *et al.* 2011）が、この研究上の空白の大きな原因と考えられる。陸上植物における普遍原理の探求とは異なる、ゼニゴケを用いた独自の研究の可能性がここに広がっていると言えよう。

ゼニゴケを含む陸上植物の精子の鞭毛は、多くの真核生物に共通の“9+2”構造の鞭毛軸糸を持つが、ダイニン外腕を欠いている（Hyams and Campbell 1985, Carvalho-Santos *et al.* 2011）。これは、コケ植物やシダ植物の精子が後退遊泳能を持たないことの原因と考えられる（大和 2012 による）。鞭毛の構成蛋白質とその遺伝子に関しては、緑藻クラミドモナスを中心に研究が進められており、多くの知見が蓄積している（Merchant *et al.* 2007, Witman 2008, Inaba 2011）。その結果、鞭毛には600種を超える蛋白質が存在することが明らかになっている（Witman 2008）。筆者らは、クラミドモナスの情報をもとに、多くの方々の助言を得つつ、ゼニゴケの EST およびゲノム情報（京都大学生命科学研究科・河内孝之教授、石崎公庸博士の助力による）から、ダイニン外腕以外の鞭毛軸糸（ダイニン内腕、ラディアル・スポーク、中心対装置）の構成蛋白質遺伝子や、基底小体、中心体、鞭毛内輸送系などの構成蛋白質遺伝子を抽出する作業を進めており、これまでに、得られたものの一部について、造精器特異的な発現を確認している（酒井友希ほか、未発表）。こうしたアプローチとは別に、性染色体（Y染色体）に座乗する遺伝子（Yamato *et al.* 2009）の中から精子や造精器の形成と機能に関わる可能性がある遺伝子が抽出されている（Yamato *et al.* 2009, 近畿大学・大和勝幸博士、私信）。その中には、マウス（*Mus musculus*）の *Parkin co-regulated gene (PACRG)* のオルソログのような興味深いものが含まれている

(Yamato *et al.* 2009, Supporting Information の Table 5)。マウスの *PACRG* 遺伝子は精巣内では精原組織でのみ発現しており、この遺伝子を含む染色体領域を欠失した変異体 (*quaker<sup>viable</sup>*) では、重篤な精子欠損・不稔が見られ、*PACRG* 遺伝子の再導入によりこれが回復することが示されている (Lorenzetti *et al.* 2004, Yanagimachi *et al.* 2004)。クラミドモナスでは、*PACRG* 蛋白質は、鞭毛軸糸全長にわたって存在し、外側のダブルレット微小管のA管とB管の間に局在することが観察されている (Ikeda *et al.* 2007)。

以上の鞭毛関連蛋白質のほかにも、精子には、さまざまな代謝系の酵素や、走化性や雌雄間の認識に関わる蛋白質など、その形成と機能に重要な役割をもつ蛋白質が多数存在する (毛利と星 2006)。ゼニゴケの場合も同様であり、鞭毛関連蛋白質のほかにも、精子特異的な塩基性核蛋白質 (Reynolds and Wolfe 1978)、造精器から精細胞塊を排出するための機構 (3-5. を参照) に関わる蛋白質 (細胞壁成分の代謝酵素など)、排出された精細胞を四散させる機構 (3-6. を参照) に関わる代謝産物の合成に関わる酵素、精子の運動を開始させる機構に関わる蛋白質、運動を可能にする代謝に関わる酵素、走化性に関わる蛋白質、雌雄間の認識に関わる蛋白質、といったものの存在が予想される。これらの蛋白質の遺伝子は、造精器・精子の分化過程の特定の段階で発現する必要があると考えられる。これまでの微細形態学的な研究に加えて、こうした、遺伝子・蛋白質とその発現制御機構に関する研究が進められることにより、ゼニゴケは精子形成・精子機能を研究するための優れたモデル生物となる可能性を秘めている (大和勝幸博士, 日本植物生理学会 2012 年年会)。

### 3-5. 精細胞塊の排出

コケ植物の受精には水が必要であり、造精器から造卵器に至る経路が水のつながりによって結びつかなければならないことは広く知られている。受精にあたって造精器から精子が泳ぎ出すと書かれることが多いが、ミズゴケを除いて、実際に放出されるのは、精細胞 (ごく薄い細胞壁に包まれた精子) の塊である (北川 1990b)。3. の冒頭に述べたように、蘚苔類学あるいはコケ植物の生物学に関する最近の教科書にはこの過程に関する記述がまったくなく、古い教科書類 (Goebel 1905 [1898], Campbell 1928, Goebel 1930, Smith 1955, Parihar 1962, Watson 1971) に遡ることで、ようやく記述が見つかる。これらの教科書が引用している研究はいずれも、1930 年頃までのものであり、ごく最近のジャゴケの研究例 (Shimamura *et al.* 2008) を別にすれば、近年の研究はほとんどないようである。現在ではほとんど注目されることのない過程と思われるので、以下に研究の歴史も含めて、少し詳しく紹介する。

苔類における造精器からの精細胞塊の放出過程は、サイハイゴケ属の1種 (*Astellia californica*) とジャゴケで、「爆発的な噴出」(forcible discharge, explosive discharge) が報告されたこと (Peirce 1902, Cavers 1903) を契機に、関心が持たれるようになったようである。ジャゴケの例を報告した Cavers は翌年、ジャゴケの精細胞塊の噴出は 50 年近く以前にすでに Thuret (1856) により報告されていたことを論文の追記として公表している (Cavers 1904)。これは、フランスの E. Bornet からの私信によるもので、Bornet によると Thuret (1856) はそれまでもほとんど引用されることがなかったという。実際、Gustav Thuret の観察は、王立シュルブール自然科学協会誌第4巻の中の“Analyse des travaux de la Société”という項目の中に埋没するように紹介されており、目次にも載っていない。これでは見つけ出すのも難しい。Cavers にこの報告の存在を知らせた Bornet はというと、問題の項目のすぐ前と後の頁に、それぞれ藻類と地衣類の論文を載せていて、疑問は氷解する。ちなみに、裕福なアマチュア植物学者であった Thuret は、もともとは法律家であり、コンスタンチノーブルにおけるフランス外交団の一員であったこともあるという。しかし、植物学に専念するために本業を辞め、どこの大学にも所属することなく、

アマチュア植物学者として研究を続け、藻類の生殖などについて優れた業績を残した。ヒバマタ (*Fucus*) やシヤジクモ (*Chara*) において精子を発見したのは、Thuret である (Farley 1982)。

ところで、後述の Bergdolt (1928) は、1747 年に、Schmidel が苔類の造精器が雄性生殖器官であることを発見した際に、すでに造精器の内容物の放出を観察していると述べ、さらに、Thuret (1851) のヤツガタケウロコゼニゴケ (*Fossombronina pusilla*) の造精器の開口に関する観察と Moore (1874) (未見) のミカヅキゼニゴケにおける噴出 (記述から判断するとジャゴケの場合と似ている) の観察例を引用している。これらから判断すると、Thuret (1856) 以前の観察・報告がいくつか存在するようである。

さて、ゼニゴケの精細胞塊放出に関しては、嶋村 (2012) が写真を含めて解説している。前出の Mirbel (1835b) は、Johannes Hedwig が蘚類と苔類のミズゼニゴケ (*Jungermannia epiphylla* [= *Pellia epiphylla*]) で「花粉の爆発 (l'explosion du pollen)」を報告していることに触れ、Hedwig や彼に先行する Schmidel [1747] も、ゼニゴケでは同様の現象を見ることがなかったこと、さらに Mirbel 自身も 2 年におよぶ観察期間の中で、ゼニゴケでそのような現象を見る幸運には恵まれなかったことを記述している。同じく前に紹介した Hofmeister (1862 [1851]) は、造精器が成熟すると、頂端部の細胞が離ればなれになり、内部の精細胞が造精器腔の狭い開口部を通して外に押し出され、雄器床の上面にかなりの大きさに液滴となって現れることを観察している。これらの観察や嶋村 (2012) の記述にあるように、ゼニゴケの場合には、ジャゴケとは異なり、「爆発的な噴出」ではない。このことは、筆者の研究室における両種の観察でも確かめている。しかし、Cavers (1904) は、ジャゴケと似た「爆発的な噴出 (explosive discharge)」は、ゼニゴケのほか、ジंगाサゴケやアカゼニゴケ属の 1 種 (*Preissia commutata*) においても観察することができ、ゼニゴケ目における一般的な現象である可能性があるとしている (Smith 1955 [p.52] にも引用されている)。これからすると、精細胞の放出の様態に関しては、ゼニゴケの地域集団間で何らかの分化が生じているのかもしれない。

苔類において、造精器のジャケット頂部が開口し、中から精細胞が放出ないしは噴出される機構に関しては、Goebel (1898) の研究が先駆のようである (Bergdolt 1926 による)。Goebel (1898) は、蘚類とともに、ウロコゼニゴケ属の 1 種 (*Fossombronina dumortieri* [= *Fossombronina foveolata*]) とヤハズゴケ (*Blyttia lyellii* [= *Pallavicinia lyellii*]) について記述している。また、Goebel (1905 [1898]) には、ゼニゴケ科を含む苔類についての知見がまとめられている。これに続いて、ジャゴケにおける噴出機構については、Cavers (1904) が記述しており (残念ながら図はない)、ゼニゴケとその同属種については、Bergdolt (1926) がゼニゴケで、Andersen (1931) が *Marchantia domingensis* でそれぞれの観察を図とともに報告している。このうち、Bergdolt (1926) の図は、Goebel (1930) の教科書に再録されている。

機構は上記の 3 種で概ね共通している。Bergdolt (1926) は、造精器内の精細胞の放出に関わるものとして、(1) 精細胞を包むジャケット (Bergdolt 1926 では、造精器壁 Antheridienwand とされる) の細胞の作用、(2) 造精器腔壁 (同じく Kammerwand) の細胞の作用、(3) 造精器 (内の細胞) そのものが持つ膨潤性の物質の作用、3 つ (の組み合わせ) を挙げている。ジャゴケでは、造精器腔の壁細胞の膨潤の寄与も少なくないようであるが、ゼニゴケの場合には、造精器のジャケット細胞の膨潤による寄与が大きく、造精器腔の壁細胞は放出には関わらないとされる。Bergdolt (1926) は、造精器の成熟過程で、ジャケット細胞が拡大すること、またその拡大は細胞質の拡大によるのではなく、細胞外に粘液質が蓄積されることによると記述している。吸水に伴い、この粘液質が膨潤することにより、ジャケット細胞が造精器の内側に向かって膨らみ、中にある精細胞が排出される (図 5)。Andersen (1931) によ

る *M. domingensis* における観察も同様であり、放出前のジャケット細胞の細胞壁には多量の mucilage が含まれること、また、放出には、(1) ジャケット細胞の吸水に伴う内側に向かう膨潤、(2) 精細胞の細胞壁の膨潤、(3) 造精器腔の壁にあたる、色素（アントシアニン）を蓄積した細胞が及ぼす圧（これによりジャケット細胞の膨潤が造精器の内側方向に向かう）、(4) 造精器腔底部にある粘液毛 (paraphysis; 嶋村 2012 に図示されている) の膨潤による造精器の直立姿勢の維持、などが関わるが、最も重要なのは (1) であることが観察されている。Andersen (1931) はまた、造精器の細胞の組織化学的な解析も試みているが、ここには詳述しない。これについては、現在の新しい手法・技術による解析が必要なことは論をまたない。

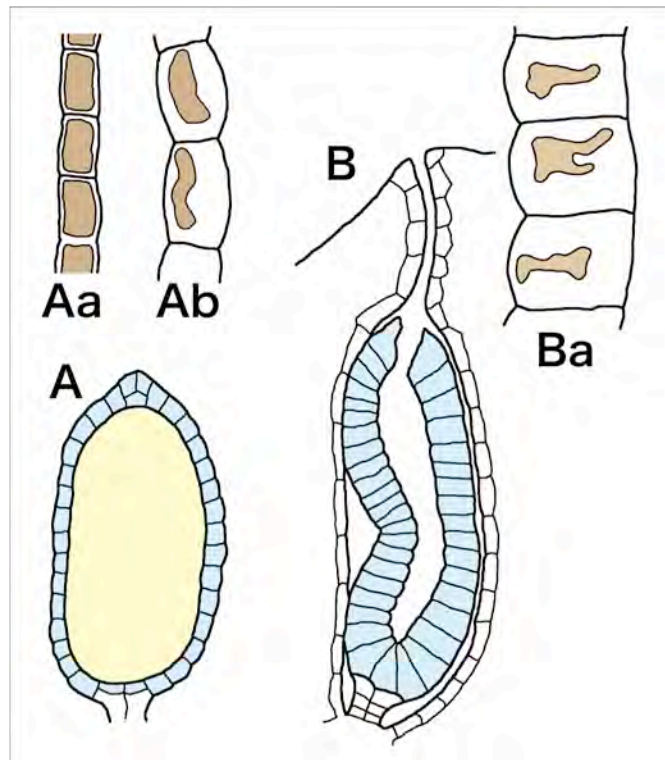


図5. 造精器の成熟過程と精細胞塊放出過程におけるジャケット細胞の形態変化

A: 成熟した造精器。B: 精子細胞塊放出後の造精器。頂部の細胞は崩壊している。水色で塗った部分がジャケット細胞。黄色の部分は精細胞を含む部分（細部は省略）。Aa: 未成熟な造精器のジャケット細胞。Ab: 成熟した造精器のジャケット細胞。Ba: 精子細胞塊放出後の造精器のジャケット細胞。薄い茶色で塗った部分は細胞質。Bergdolt (1926) をもとに作図。

造精器から精細胞が放出される際には、造精器腔の開口部の下に位置するジャケットの頂部の細胞が崩壊する（図5 Bを参照）。蘚類の場合には、頂部に位置する1個もしくは明瞭に区別される少数の細胞がこれに関わるが、蘚類でもミズゴケや苔類の場合には、そのような特別の細胞はないとされている (Goebel 1905 [1898], Goebel 1930)。この点についても、プロモーター・トラップやエンハンサー・トラップシステムなどを用いて、ジャケット内の位置に応じた細胞の分化が存在するかどうかを検討してみる必要がある。

造精器からの精細胞塊の放出機構に関して、残る問題は、一連の過程の引き金となる水がどのようにして造精器腔の内部に入るかという点である。Goebel (1905 [1898]) は、造精器腔の狭い開口部を通して水が外から内部に入る機構は不明であるとしつつも、造精器腔底部の粘液毛が分泌し、開口部に蓄積して内部を乾燥から保護している mucilage が吸水の役割も果たすのだろうと推測している。30年後の同じ本の第3版においても、造精器腔の開口部は、少なくとも造精器が成熟する過程の間は、気室孔と同様に狭いため、水の侵入を許さないだろうとし、以前と同様の推論を展開している (Goebel 1930)。このように、吸水の機構に関しても不明の点が残っており、研究の余地があると言えそうである。なお、われわれの観察では、水に应答した雄器床の変化には、局所的な細胞の細胞壁膨潤に留まらない、器官全体にわたる形態変化に伴う「器官運動」があるようにも思われる (酒井友希, 未発表)。これについても、今後、検討してみる必要があると考えている。

### 3-6. 排出された精細胞の四散と精子の散布・受精

上に見た過程により、雄器床上面の造精器腔開口から排出された精細胞塊は、個々の細胞に分離・四散して水面に広がり、精子が中から出てくる。この分離・四散の過程は、精細胞塊に含まれる少量の脂肪が表面張力を減少させることによるとする説があるようである（北川 1990b による）。実際に、Muggoch and Walton (1942) は、排出された精細胞塊をスライドグラス上におくと、崩壊して、精細胞が水面に浮かび、数分のうちに精子が精細胞から脱出すること、ナイルブルー硫酸塩染色やスーダゲン III 染色によって、精細胞塊には脂肪が存在すると考えられることを報告している。精細胞からどのようにして精子が脱出するのかについては不明である。精細胞の細胞壁は薄いとされており（北川 1990b）、精細胞内における精子の形態形成・成熟の過程で、細胞壁の変化が起き、脱出を可能にしていることが想像される。

成熟した雄器床の上部は皿状の凹面を成しており、水を得て精細胞塊が排出された後は、精細胞ないしはそこから脱出した精子を含む水を湛えた浅いカクテルグラスという様相を呈する。このような状態のところには雨滴のような水滴が落ちると、精子を含む水滴が周りに弾き飛ばされ、離れた場所に精子が散布されることになる（Strasburger 1870, Goebel 1905 [1898]）。無性芽の散布の場合にも知られるスプラッシュ・カップ (splash cup) と呼ばれるしくみである（Watson 1971, 北川 1990a）。これは、必ずしも水という媒質の連続性を必要としない伝搬方法である。スプラッシュ・カップ方式による精子の散布を可能にするために、精細胞塊が適切に崩壊し、精細胞が四散して水面に広がることは特に重要である。そのため、精細胞の分化過程で合成され、細胞外に分泌される脂肪酸などの疎水性化合物の解析は、精子の脱出を可能にする精細胞壁の変化の解析とともに、今後の重要な研究課題のひとつとして興味深い。

さて、このようにして周囲に散布された精子のあるものは、雌株の造卵器の開口部にたどり着く。これを可能にするための雌器托・雌器床 (archegoniophore, [archegonial] receptacle) の形態上の特徴についてはここでは述べない（Goebel 1930, 嶋村 2012 を参照）。実際に、精子がどのようにして造卵器の開口部にたどり着くのかについては、まだよくわかっていないようである。嶋村 (2012) は、有紋仮根が、雌株における精子の移動あるいは輸送の経路として機能する可能性を示唆している。これは、今後検証すべきたいへん魅力的な仮説である。GUS や蛍光蛋白質をレポーターとして発現する精子を用いた解析などが待たれる。

造卵器の形態や発生についてはここでは述べないが（Durand 1908 に詳細な記載がある。嶋村 2012 も参照）、造卵器の開口部近くに辿り着いた精子は、造卵器頸部を通過して卵細胞に至る。頸部内部には頸溝細胞 (ventral canal cell) が、その奥の卵細胞の上には腹溝細胞 (ventral canal cell) があるが、卵細胞の成熟の時点では崩壊して細胞内容物を頸部の通路外に放出している。これが精子の誘引に関わっている可能性が考えられる（大和 2012 による）。精細胞分化・精子形成過程では、そのような誘引シグナルに対する応答系の蛋白質の遺伝子が発現するはずである。その同定は極めて重要な課題の一つである。卵細胞に至るまでの長い頸部は、また、精子間競争の場でもあるとされる（北川 1990b による）。しかし、注意しておきたいのは、異なる個体由来する精子の場合は別として、同一の配偶体個体とそのクローン（半数体である）に由来する精子間には、遺伝的な差はない（すべて遺伝的に同一である）ことである。ゼニゴケのような種において、精子間競争が現実的にどの程度おこるのかは、まだ検証の余地がありそうである。

### 3-7. 有性生殖を実現することの難しさ

コケ植物における精子の散布は、比較的近距离に限られており (Vanderpoorten and Goffinet 2009, Goffinet and Shaw 2009, 北川 1990b, 嶋村 2012 も参照), 有性生殖の実現には困難を伴うことが多いと考えられる。苔類では、約2/3の種が雌雄異株である (Vanderpoorten and Goffinet 2009) が、このことは、個体間を隔てて、雄個体から雌個体へと精子を送り届ける必要を意味し、有性生殖の困難をさらに増す要因となっている。加えて、新しい生育場所に進出する際には、必ずしも両性の個体が揃うとは限らない。実際に、野外のゼニゴケの群落を見ると、片方の性のみから成る場合も多く、雌株のみの場合には、有性生殖ができず孢子囊の成熟が見られない (図6)。帰化植物であるミカヅキゼニゴケの場合には、日本ではほとんどの地域で雄株しか存在せず、有性生殖をおこなうことはできないといわれる。こうした有性生殖の実現の難しさに対する対処として、ゼニゴケやミカヅキゼニゴケを含む多くの種が、無性芽 (gemma, 嶋村 2012 を参照) などによる栄養繁殖という方法を発達させている。



図6. 野外におけるゼニゴケの群落

**A:** 成熟した孢子をもつ雌株。写真の上半部分で黄色に見えるのが孢子。矢尻はすでに枯れている雄株の雄器床を示す。写真の下半部分には、まだ若い雄株と雄器床が見える。**B:** Aの近くに見られた、受精できなかった雌株のみの群落。孢子囊は未発達で、柄は伸びず、指状突起は下向きのまま雌器床は枯れつつある。2012年6月10日、京都大学農学部北白川試験地にて (荒木 崇・撮影)。

このような困難の中で、チャンスがある場合には、遺伝的な多様性をもたらす有性生殖を成就するという観点から、精子の散布に至るまでの過程 (3-5. および3-6.) は、やはり大きな重要性を持つものであると言える。受精過程に関しては、生物学的により興味深い、精子の走化性や運動性に注目が集まるが、精子に備わったそのような能力は、造卵器の近傍にあってはじめてその威力を発揮することに留意する必要がある。したがって、精子の散布から雌性生殖器到達までの過程は、もう少し注目されるべきであると筆者は考える。

## 4. 今後の研究の展望

以上に、植物固有の転写因子LFYと、ゼニゴケにおいてLFYが関わる可能性がある有性生殖過程の雄側の部分について概説した。現在あるいはこれからの研究課題については、個別の箇所で言及した。



LFY に関しては、被子植物の限られた種 (2-1-1.) と蘚類のヒメツリガネゴケ (2-1-4.) を除いて、発生過程における役割を明らかにする研究はほとんどなされていない。裸子植物を含め、発現パターンと被子植物の知見にもとづいて、先入観をもって役割が推測されているに過ぎない (例えば, *Mostly Male theory* [2-1-2.]). ゼニゴケを用いた研究は、この空白を埋める意味で、意義のあるものとなろう。LFY は、ほかの多くの転写因子 (植物固有のものも含む) とは異なり、陸上植物の進化の過程で、遺伝子重複による遺伝子数の増加をほとんどおこさなかった。例外的に、裸子植物では、長期間にわたって、機能的に分化したと考えられる2つのパラログ (*NLY* と *LFY*) が維持されてきた。しかし、被子植物に至る系統では、*NLY* が失われたと考えられている (2-1-2.)。一方、コケ植物に目を転ずると、現在までの、極めて限られた知見からも、ヒメツリガネゴケやタチゴケのような蘚類の *LFY* 遺伝子は特殊化していることが推察される (2-2.)。蘚類、苔類と、まったく情報がないツノゴケ類を加えたコケ植物の *LFY* 遺伝子を広範に比較することで、蘚類における *LFY* 遺伝子・*LFY* 蛋白質の特殊化の実態が明らかになろう。その際に、ヒメツリガネゴケですでに明らかにされている発現パターンと機能 (2-1-4. と 2-3.) とゼニゴケのそれ (2-3.) を対比して考察する必要があるだろう。さらに、蘚類 (13,000 種) と苔類 (5,000 種) という多様性を考えると、ヒメツリガネゴケとゼニゴケで明らかになったことの一般性を、それぞれ、蘚類と苔類で検証する必要も出てくるだろう。LFY は緑藻類のクラミドモナスやボルボックスには存在しないが、陸上植物の姉妹群とされるシャジクモ類・コレオケーテ類・ホシミドロ類で LFY を探索し、発現パターンや機能を明らかにすることは、陸上植物の誕生と進化を理解する上で、重要な意味を持つかもしれない。

生殖器官や配偶子の形成過程やその機能を含む有性生殖全体に関しては、ヒメツリガネゴケを含めて、被子植物以外の陸上植物では、総合的な研究がなされていない。コケ植物、小葉類、シダ植物 (モノロファイト類) は、雄性配偶子として、鞭毛を有し運動性を備えた精子を持つという被子植物にはない特徴を共有する。現生の裸子植物の一部 (イチョウヤソテツ類) においても、花粉管内で鞭毛を持つ精子を形成される。また、ペルム紀 (3~2.5 億年前) に南半球にあったゴンドワナ大陸に広く分布していたグロッソプテリス類は、被子植物の祖先と考えられるが、その1種 (*Glossopteris homevalensis*) の化石からは、花粉管内で形成途中の精子と放出過程と考えられる精子が発見されている (Nishida *et al.* 2003)。花粉管 (雄性配偶体) によって精細胞を雌性配偶体 (胚嚢) の卵細胞へと輸送する機構を高度に発達・洗練させてきた被子植物では、精子の形成をやめ、鞭毛を形成するための蛋白質 (クラミドモナスでは600種以上といわれる) の遺伝子はゲノムから失われている (3-4.)。この点を考えると、ゼニゴケを用いた精子形成の研究は、被子植物を用いてはおこなうことのできない、独自の研究の機会を与えてくれるものと期待できる。これはまた、植物を超えて、動物との共通原理を探る研究ともなろう。鞭毛・繊毛の形成や機能を研究するためのモデル生物 (Thomas *et al.* 2010, Carvalho-Santos *et al.* 2011, Vincensini *et al.* 2011) に、新たな一員としてゼニゴケが加えられる可能性も期待できよう。有性生殖過程については、精子形成以外の部分でも、研究の大きな空白地が広がっており、代謝、シグナル伝達、細胞分化、細胞機能などから、器官の形態とその機能的な意義、集団生物学に至るさまざまな研究課題を提供する (3-4. ~ 3-6.)。総合的な研究プログラムとして、恰好のテーマであろう。実際に、非常に多数の事象が実現され、それらがうまく噛み合って、はじめて有性生殖は成就される。植物が最初に陸上に進出した際には、限られた水をうまく利用しつつ、いかにして、水中にあった祖先と同じように有性生殖を成功させるかは、文字通り、将来の繁栄を賭けた重要な課題で

あつたはずである。植物の陸上進出とその後の繁栄は、地球上の生態系を大きく変えることになった。したがって、緑藻内の、陸上植物の姉妹群と考えられる系統との比較も含めて、ゼニゴケを用いて有性生殖過程の全貌を明らかにすることは、地球上の生命の歴史の理解という観点からも意義のある挑戦と言える。

## 5. おわりに

ゼニゴケを用いた研究には、陸上植物における普遍原理の探求（研究が進んでいる被子植物が念頭におかれていることは否めない）という方向とともに、被子植物では研究できない現象の探求や、苔類あるいはコケ植物をよりよく理解するための研究といった、独自の方向性が期待できる。このうち、後者については、コケ植物（苔類・蘚類・ツノゴケ類）が、種多様性の面でも生息環境の多様性の面からも、被子植物に次いで繁栄しているグループであることを考えれば、あながち瑣末な関心とばかりは言い切れないであろう。眼を凝らしてみれば、研究の未開地はあちこちに広がっている。ゼニゴケを用いることで、われわれは、あたかも、初めて進出した陸地に限りない可能性を見いだした最初の陸上植物の祖先のような気持ちをもって研究することができると筆者は確信している。

## 6. 謝辞

本稿に取り上げた筆者の研究室におけるゼニゴケ *MpLFY* の研究は、文部科学省の科学研究費補助金（基盤研究B・挑戦的萌芽研究）による助成のもと、歴代の学生諸君（辻井由香さん、宇山和樹君、宮下結衣さん）と博士研究員の酒井友希博士によって進めてきたものである。この研究の遂行にあたっては、本文中でお名前に言及した、河内孝之教授と石崎公庸博士（京都大学）、大和勝幸博士（近畿大学）（以上、研究開始時からの共同研究者）、美和秀胤博士（現・ヘルシンキ大学）のほか、西浜竜一博士（京都大学）、山野隆志博士（京都大学）の助力を仰いでいる。また、嶋村正樹博士（広島大学）からは多くのご教示とご支援をいただいている。記して感謝の意を表したい。本稿の作成にあたっては、初稿の段階で、蘚類の分類体系の扱い方、コケ植物の古い学名と現行の学名の対応などをはじめとして、嶋村正樹博士から多くのコメントをいただいた。これによって、いくつかのミスを未然に防ぐことができた。第2章は、山口礼子博士からの数多くの建設的なコメントにより、いくつかの重要な点を改善することができた。また、大和勝幸博士からは、コケ植物・シダ植物の受精に関する総説原稿を見せていただき、最終稿の参考にすることができた。これらの方々に特に感謝したい。

## 引用文献

- Andersen, E. N. 1931. Discharge of sperms in *Marchantia domingensis*. *Bot. Gaz.* 92: 66-84.
- Bergdolt, E. 1926. Die Antheridientleerung der Marchantiaceen. In: *Untersuchungen über Marchantiaceen. Botanische Abhandlungen* 10: 24-37.
- Borges, F., Gomes G., Gardner, R., Moreno, N., McCormick, S., Feijó, J.A., & Becker, J. D. 2008. Comparative transcriptomics of *Arabidopsis* sperm cells. *Plant Physiol.* 148:1168-81.
- Bower, F. O. 1930. *Primitive Land Plants also Known as the Archaeogoniatae*. Macmillan, London, pp. 26-41, 483-496, 497-518.
- Campbell, D. H. 1928. *The Structure and Development of Mosses and Ferns*. 3<sup>rd</sup> ed. Macmillan, London, pp. 8-71.

- Carlsbecker, A., Tandré, K., Johanson, U., Englund, M., & Engström, P. 2004. The MADS-box gene *DALI* is a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant J.* 40: 546-557.
- Carothers, Z. B. 1975. Comparative studies on spermatogenesis in bryophytes. In: Duckett JG and Racey PA (ed.) *The Biology of the Male Gamete. Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 7 Suppl. No. 1. Academic Press, pp. 71-84, pl. 1-6.
- Carothers, Z. B. & Kreitner, G. L. 1967. Studies of spermatogenesis in the Hepaticae. I. Ultrastructure of the vierergruppe in *Marchantia*. *J. Cell Biol.* 33: 43-51.
- Carothers, Z. B. & Kreitner, G. L. 1968. Studies of spermatogenesis in the Hepaticae. II. Blepharoplast structure in the spermatid of *Marchantia*. *J. Cell Biol.* 36: 603-616.
- Carvalho-Santos, Z., Azimzadeh, J., Pereira-Leal, J. B., & Bettencourt-Dias, M. 2011. Evolution: Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *J. Cell Biol.* 194:165-175. [erratum: *J. Cell Biol.* 195: 341.]
- Cavers, F. I. 1903. Explosive discharge of antherozoids in *Fegatella conica*. *Ann. Bot.* 17: 270-274.
- Cavers, F. I. 1904. On the structure and biology of *Fegatella conica*. *Ann. Bot.* 18: 87-120, pl. 7-8.
- Crandall-Stotler, B., Stotler, R. E., & Long, D. G. 2009. Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: Goffinet, B. & Shaw, A.J. (ed.) *Bryophyte Biology 2<sup>nd</sup> ed.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-54.
- Cuming, A. C. 2009. Mosses as model organisms for developmental, cellular and molecular biology. In: Goffinet, B. & Shaw, A.J. (ed.) *Bryophyte Biology 2<sup>nd</sup> ed.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 199-236.
- Duckett, J. G., & Racey, P. A. (ed.) 1975. *The Biology of the Male Gamete. Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 7 Suppl. No.1. Academic Press, pp. 1-202.
- Durand, E. J. 1908. The development of the sexual organs and sporogonium of *Marchantia polymorpha*. *Bull. Torrey Bot. Club* 35: 321-335, pl. 21-25.
- Farley, J. 1982. *Gametes & Spores Ideas about Sexual Reproduction, 1750-1914*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Frohlich, M. W. 2003. An evolutionary scenario for the origin of flowers. *Nat. Rev. Genet.* 4: 559-566.
- Frohlich, M. W., & Estabrook, G. F. 2000. Wilkinson support calculated with exact probabilities: an example using *Floricaula/LEAFY* amino acid sequences that compares three hypotheses involving gene gain/loss in seed plants. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1914-1925.
- Frohlich, M. W., & Parker, D. S. 2000. The mostly male theory of flower evolutionary origins: from genes to fossils. *Syst. Bot.* 25: 155-171.
- Garbary, D.J., Renzaglia, K. S., & Duckett, J.G. 1993. The phylogeny of land plants: a cladistic analysis based on male gametogenesis. *Pl. Syst. Evol.* 188: 237-269.
- Goebel, K. 1898. Über den Öffnungsmechanismus der Moos-Antheridien. *Ann. Jard. Bot. Buitenzorg* Suppl. 2: 65-72.
- Goebel, K. 1905. *Organography of Plants, Part II, Special Organography*. Clarendon Press, Oxford. [translation of German ed. (1898). by I.B. Balfour], pp. 9-14, 85-87.
- Goebel, K. 1926. *Wilhelm Hofmeister, The Work and Life of a Nineteenth Century Botanist*. The Ray Society, London. [translation of German ed. (1924). by H.M. Bower & F.O. Bower]
- Goebel, K. 1930. *Organographie der Pflanzen, Band 2, Bryophyten - Pteridophyten. 3. Aufl.*, Gustav Fischer, Jena,

- pp. 648-656, 822-828.
- Goffinet, B., Buck, W. R., & Shaw, A. J. 2009. Morphology, anatomy, and classification of the Bryophyta. In: Goffinet, B., & Shaw, A. J. (ed.) *Bryophyte Biology 2<sup>nd</sup> ed.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 55-138.
- Goffinet, B., & Shaw, A. J. (ed.) *Bryophyte Biology 2<sup>nd</sup> ed.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Graham, L. E. (渡邊 信, 堀 輝三 訳) 1996 [1993]. 陸上植物の起源, 内田老鶴圃, 東京.
- Hamès, C., Ptchelkine, D., Grimm, C., Thevenon, E., Moyroud, E., Gérard, F., Martiel, J. L., Benlloch, R., Parcy, F., & Müller, C. W. 2008. Structural basis for LEAFY floral switch function and similarity with helix-turn-helix proteins. *EMBO J.* 27: 2628-2637.
- Himi, S., Sano, R., Nishiyama, T., Tanahashi, T., Kato, M., Ueda, K., & Hasebe, M. 2001. Evolution of MADS-box gene induction by FLO/LFY genes. *J. Mol. Evol.* 53: 387-393.
- Hofmeister, W. 1862. *On the Germination, Development, and Fructification of the Higher Cryptogamia and on the Fructification of the Coniferae.* The Ray Society, London. [translation of German ed. (1851) by F. Currey], pp. 102-128, 434-442, pl. XV.
- Hyams, J. S. & Campbell, C. J. 1985. Widespread absence of outer dynein arms in the spermatozooids of lower plants. *Cell Biol. Int. Rep.* 9: 841-848.
- Ikeda, K., Ikeda, T., Morikawa, K., & Kamiya, R. 2007. Axonemal localization of Chlamydomonas PACRG, a homologue of the human *Parkin-coregulated* gene product. *Cell Motil. Cytoskeleton* 64: 814-821.
- Ikeno, S. 1903. Die Spermatogenese von *Marchantia polymorpha*. *Beih. Bot. Centralb.* 15: 65-88.
- Ikeno, S. & Hirase, S. 1897. Spermatozooids in gymnosperms. *Ann. Bot.* 11, 344-345.
- Inaba, K. 2011. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol. Hum. Reprod.* 17: 524-538.
- 井上 勲 2007. 藻類 30 億年の自然史 第 2 版, 東海大学出版会, 秦野.
- 伊藤元巳 2012. 植物の系統と進化. 裳華房, 東京.
- 北川尚史 1989. コケの生物学 1. プランタ 1: 36-42.
- 北川尚史 1990a. コケの生物学 8. プランタ 8: 27-33.
- 北川尚史 1990b. コケの生物学 9. プランタ 9: 37-45.
- Kny, L. 1890. Bau und Entwicklung von *Marchantia polymorpha*. Sonderabdruck a. d. Text d. VIII Abtheilung d. "Botanische Wandtafeln". pp. 364-401. Paul Parey, Berlin.
- 河内孝之・石崎公庸 2012. 古くて新しいモデル植物としての苔類ゼニゴケの特徴. *BSJ Review* 3: 58-70.
- Konrat, M. V., Söderström, L., Renner, M. A. M., Hagborg, A., Bricoe, L., & Engel, J. J. 2010. Early Land Plants Today (ELPT): How many liverwort species are there? *Phytotaxa* 9: 22-40.
- Kreitner, G. L. 1977a. Influence of the multilayered structure on the morphogenesis of *Marchantia* spermatids. *Amer. J. Bot.* 64: 57-64.
- Kreitner, G. L. 1977b. Transformation of the nucleus in *Marchantia* spermatids: morphogenesis. *Amer. J. Bot.* 64: 464-475.
- Kreitner, G. L., & Carothers, Z. B. 1976. Studies of spermatogenesis in the Hepaticae. V. Blepharoplast development in *Marchantia polymorpha*. *Amer. J. Bot.* 63: 545-557.

- Lorenzetti, D., Bishop, C. E., & Justice, M. J. 2004. Deletion of the *Parkin coregulated* gene causes male sterility in the *quaking<sup>viable</sup>* mouse mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 8402-8407.
- Maizel, A., Busch, M.A., Tanahashi, T., Perkovic, J., Kato, M., Hasebe, M., & Weigel, D. 2005. The floral regulator LEAFY evolves by substitutions in the DNA binding domain. *Science* 308: 260-263.
- Mellerowicz, E. J., Horgan, K., Walden, A., Coker, A., & Walter, C. 1998. *PRFLL* - a *Pinus radiata* homologue of *FLORICAULA* and *LEAFY* is expressed in buds containing vegetative shoot and undifferentiated male cone primordia. *Planta* 206: 619-629.
- Melzer, R., Wang, Y. Q., & Theissen, G. 2010. The naked and the dead: the ABCs of gymnosperm reproduction and the origin of the angiosperm flower. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21: 118-128.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L. H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H. *et al.* 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245-250.
- Mirbel, C.F.B. de 1835a. Recherches anatomiques et physiologiques sur le *Marchantia polymorpha*, pour servir à l'histoire du tissu cellulaire, de l'épiderme et des stomates. *Mém. l'Acad. Sci. l'Inst. France* 13: 337-373, pl.1-6.
- Mirbel, C.F.B. de 1835b. Complément des observations sur le *Marchantia polymorpha*, de recherches sur les métamorphoses des utricules, et sur l'origine, développements et la structure de l'anthere et du pollen des végétaux phanérogames. *Mém. l'Acad. Sci. l'Inst. France* 13: 375-436, pl. 6-10.
- 毛利秀雄・星元紀 (監修) 2006. 新編 精子学. 東京大学出版会, 東京.
- Moser, J. W. & Kreitner, G. L. 1970. Centrosome structure in *Anthoceros laevis* and *Marchantia polymorpha*. *J. Cell Biol.* 44: 454-8.
- Mouradov, A., Glassick, T., Hamdorf, B., Murphy, L., Fowler, B., Marla, S., & Teasdale, R. D. 1998. *NEEDLY*, a *Pinus radiata* ortholog of *FLORICAULA/LEAFY* genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6537-6542. [correction: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 5336.]
- Moyroud, E., Tichtinsky, G., & Parcy, F. 2009. The LEAFY floral regulators in angiosperms: conserved proteins with diverse roles. *J. Plant Biol.* 52: 177-185.
- Moyroud, E., Kusters, E., Monniaux, M., Koes, R., & Parcy F 2010. LEAFY blossoms. *Trends Plant Sci.* 15: 346-352.
- Moyroud, E., Minguet, E. G., Ott, F., Yant, L., Posé, D., Monniaux, M., Blanchet, S., Bastien, O., Thévenon, E., Weigel, D., Schmid, M., & Parcy, F. 2011. Prediction of regulatory interactions from genome sequences using a biophysical model for the Arabidopsis LEAFY transcription factor. *Plant Cell* 23: 1293-1306.
- Mugoch, H. & Walton, J. 1942. On the dehiscence of the antheridium and the part played by surface tension in the dispersal of spermatocytes in Bryophyta. *Proc. R. Soc. Lond. B* 132: 448-461.
- Nishida, H., Pigg, K. B., & Rigby, J. F. 2003. Swimming sperm in an extinct Gondwanan plant. *Nature* 422: 396-397.
- Parihar, N. S. 1962. *An Introduction to Embryophyta*. Vol. 1 *Bryophyta 5<sup>th</sup> ed.*, Central Book Depot, Allahabad, pp. 40-67.

- Peirce, G. J. I. 1902. Forcible discharge of the antherozoids in *Astellia californica*. *Bull. Torrey Bot. Club* 29: 374-382.
- Renzaglia, K. S., Duff, R. J. T., Nickrent, D. L., & Garbary, D. J. 2000. Vegetative and reproductive innovations of early land plants: implications for a unified phylogeny. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 355: 769-793.
- Renzaglia, K. S. & Garbary, D. J. 2001. Motile gametes of land plants: diversity, development, and evolution. *Crit. Rev. Plant Sci.* 20: 107-213.
- Renzaglia, K. S., Villarreal, J. C., & Duff, R. J. 2009. New insight into morphology, anatomy, and systematics of hornworts. In: Goffinet, B. & Shaw, A. J. (ed.) *Bryophyte Biology 2<sup>nd</sup> ed.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 139-171.
- Reynolds, W. F. & Wolfe, S. L. 1978. Changes in basic proteins during sperm maturation in a plant, *Marchantia polymorpha*. *Exp. Cell Res.* 116: 269-273.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandehari, D., Sherman, B. K., & Yu, G. 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Sachs, J. 1906. *History of Botany (1530-1860)*. Clarendon Press, Oxford. [translation of German ed. (1875) by H.E.F. Gamsey and revised by I.B. Balfour]
- 坂山英俊 2010. 植物の上陸作戦 = シヤジクモの辿った道. *BSJ Review* 1: 30-35.
- Schofield, W. B. 1985. *Introduction to Bryology*. Macmillan, New York, pp. 212-235.
- Shindo, S., Sakakibara, K., Sano, R., Ueda, K., & Hasebe, M. 1999. Characterization of a *FLORICAULA/LEAFY* homologue of *Gnetum parvifolium* and its implications for the evolution of reproductive organs in seed plants. *Int. J. Plant Sci.* 162: 1199-1209
- 嶋村正樹 2012. ゼニゴケの分類学と形態学. *BSJ Review* 3: 84-112.
- Shimamura, M., Yamaguchi, T., & Deguchi, H. 2008. Airbourne sperm of *Conocephalum conicum* (Conocephalaceae). *J. Plant Res.* 121: 69-71.
- Siriwardana, N. S., & Lamb, R. S. 2012a. The poetry of reproduction: the role of LEAFY in *Arabidopsis thaliana* flower formation. *Int. J. Dev. Biol.* 56: 207-221.
- Siriwardana, N. S., & Lamb, R. S. 2012b. A conserved domain in the N-terminus is important for LEAFY dimerization and function in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 71: 736-749.
- Smith, G. M. 1955a. *Cryptogamic Botany* Vol. I *Algae and Fungi*, 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill, New York.
- Smith, G. M. 1955b. *Cryptogamic Botany* Vol. II *Bryophytes and Pteridophytes*, 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill, New York, pp.14-86.
- Southworth, D., & Cresti, M. 1997. Comparison of flagellated and nonflagellated sperm in plants. *Amer. J. Bot.* 84: 1301-1311.
- Strasburger, E. 1870. Die Geschlechtsorgane und die Befruchtung bei *Marchantia polymorpha*. *Pringsh. Jahrb. f. wiss. Bot.* 7, 409-422, pl. 26-27.
- Szövényi, P., Rensing, S. A., Lang, D., Wray, G. A., & Shaw, A. J. 2011. Generation-biased gene expression in a bryophyte model system. *Mol. Biol. Evol.* 28: 803-812.

- Tanahashi, T., Sumikawa, N., Kato, M., & Hasebe, M. 2005. Diversification of gene function: homologs of the floral regulator FLO/LFY control the first zygotic cell division in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 132: 1727-1736.
- Thomas, J., Morlé, L., Soulavie, F., Laurençon, A., Sagnol, S., & Durand, B. 2010. Transcriptional control of genes involved in ciliogenesis: a first step in making cilia. *Biol. Cell* 102: 499-513.
- Thuret, G. 1851. Recherche sur les zoospores des algues et les anthéridies des cryptogmes. *Ann. Sci. nat.* 3<sup>me</sup> sér. 16: 5-39, pl.1-15.
- Thuret, G. 1856. Sur les anthéridies du *Fegatella conica*, Corda. *Mem. Soc. Imp. Sci. nat. Cherbourg* 4: 216-218.
- Vanderpoorten, A. & Goffinet, B. 2009. *Introduction to Bryophytes*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vázquez-Lobo, A., Carlsbecker, A., Vergara-Silva, F., Alvarez-Buylla, E. R., Piñero, D., & Engström, P. 2007. Characterization of the expression patterns of *LEAFY/FLORICAULA* and *NEEDLY* orthologs in female and male cones of the conifer genera *Picea*, *Podocarpus*, and *Taxus*: implications for current evo-devo hypotheses for gymnosperms. *Evol. Dev.* 9: 446-459.
- Vincensini, L., Blisnik, T., & Bastin, P. 2011. 1001 model organisms to study cilia and flagella. *Biol. Cell* 103: 109-130.
- Watson, E. V. 1971. *The Structure and Life of Bryophytes*. 3<sup>rd</sup> ed. Hutchinson University Library, London.
- Winter, C. M., Austin, R.S., Blanvillain-Baufumé, S., Reback, M. A., Monniaux, M., Wu, M.F., Sang, Y., Yamaguchi, A., Yamaguchi, N., Parker, J. E., Parcy, F., Jensen, S.T., Li, H., & Wagner, D. 2011. LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, cis motifs, and a link to biotic stimulus response. *Dev. Cell* 20: 430-443.
- Witman, G. B. (ed.) 2008. *Chlamydomonas Sourcebook 2<sup>nd</sup> ed.* Vol. 3 *Cell Motility and Behavior*. Academic Press, New York.
- Wuest, S. E., Vijverberg, K., Schmidt, A., Weiss, M., Gheyselinck, J., Lohr, M., Wellmer, F., Rahnenführer, J., von Mering, C., & Grossniklaus, U. 2010. Arabidopsis female gametophyte gene expression map reveals similarities between plant and animal gametes. *Curr. Biol.* 20: 506-512.
- 大和勝幸・河内孝之 2012. 見えてきたゼニゴケゲノム. *BSJ Review* 3: 71-83.
- 大和勝幸 2012a. コケ・シダ植物の受精. 澤田 均 (編) 生物の受精 - 単細胞生物から植物・動物まで. 化学同人, 京都. 第5章 (刊行準備中)
- Yamato, K. T., Ishizaki, K., Fujisawa, M., Okada, S., Nakayama, S., Fujishita, M., Bando, H., Yodoya, K., Hayashi, K., Bando, T., Hasumi, A., Nishio, T., Sakata, R., Yamamoto, M., Yamaki, A., Kajikawa, M., Yamano, T., Nishide, T., Choi, S. H., Shimizu-Ueda, Y., Hanajiri, T., Sakaida, M., Kono, K., Takenaka, M., Yamaoka, S., Kuriyama, C., Kohzu, Y., Nishida, H., Brennicke, A., Shin-i, T., Kohara, Y., Kohchi, T., Fukuzawam H., & Ohyama, K. 2007. Gene organization of the liverwort Y chromosome reveals distinct sex chromosome evolution in a haploid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 6472-6477.
- Yanagimachi, R., Wakayama, T., Kishikawa, H., Fimia, G.M., Monaco, L., & Sassone-Corsi, P. 2004. Production of fertile offspring from genetically infertile male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 1691- 1695.
- 湯浅 明 1969. 植物の精子. 東京大学出版会, 東京.