

DNA 情報を活用したシダ植物の配偶体フロアの調査

～日本でも、まだまだ新産種は見つかる～

村上 哲明, 酒井 絵理佳, 米岡 克啓

東京都立大学 牧野標本館

〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1

Inventories of fern independent gametophytes in Japan using DNA barcoding based on nucleotide sequences of *rbcL* gene

Noriaki Murakami, Erika Sakai, Katsuhiko Yoneoka

Makino Herbarium, Tokyo Metropolitan University,

1-1 Minami-Osawa, Hachioji, Tokyo, 192-0397, Japan

Keywords: ferns, Hymenophyllaceae, independent gametophytes, Pteridaceae, vittarioids

DOI: 10.24480/bsj-review.12c3.00211

1. はじめに

日本は、シダ植物を含む陸上植物の多様性が極めて高いにもかかわらず、その植物相（どのような種が生育しているか）が世界的に見ても最もよく調査されている地域である。例えばシダ植物については、日本国内で 37 科 724 種が認められている（海老原 2016, 2017）。さらに日本シダの会の非職業研究者の全面的な協力の下、その一つ一つの種について 2 万 5 千分の地図の範囲ごとに分布しているか（標本記録があるか）どうかの詳細に調査され、その情報が分布図集として既に出版されている（倉田 & 中池 1979-1997）。このような精度で個々の種の国内の地理的分布まで調査されている国は欧米にもないだろう。つまり、日本はシダ植物の新産種はもとより、新産種（世界の他地域では知られていたが、日本国内に分布していることは知られていなかった種のこと）を発見することさえもとても困難な地域だと言える。

ところが、そのような日本国内でも、新しい研究技術と独自の研究アイデアがあれば、少なくとも新産種ならまだまだ見つかることを、我々のシダ植物の独立配偶体の研究を例に挙げて紹介したい。これは、もし日本に国立自然史博物館が設立されて、国内に加えて、生物多様性が地球上で最も高いにもかかわらず、その解明が低い東南アジアでも日本人研究者が同様の技術と独自のアイデアで生物多様性の研究を行えば、新産種はもとより多数の新産種を効率よく見つけることができるであろうことを意味する。

ここで私たちが強調しておきたいのは、これは日本人研究者が東南アジアの国々から収奪をするという話ではないということである。生物多様性を迅速に解明することは、野生生物を適切に保全することに直結し、日本が東南アジアの国々に「環境保全」という平和的な貢

献ができることに繋がるからである。人類がまだ知らない野生生物は適切に保全しようがない。少し前の日本人もそうだったように、東南アジアの多くの人々が現在は野生生物の保全よりも、開発で得られる経済的利益の方を重視しているかもしれない。しかし、そう遠くない将来には自分たちのまわりにある生物多様性の重要性、さらにそれを守っていくことこそが自分たちが快適に生きていくための環境の保全にも直結することに必ず気がつくはずである。今から日本がこれらの国々の生物多様性の保全に力を貸しておけば、将来にわたって長く日本が感謝されることになり、東南アジア諸国と日本との友好関係を安定的に維持することにも貢献すると我々は考える。

近年、人類の無秩序な開発によって急速に失われつつある東・東南アジア地域の生物多様性の実態を科学的に明らかにして、地球環境の保全に貢献することは、我々が新設を目指している国立沖縄自然史博物館が掲げる最も重要なミッションの1つである。私たちの研究グループが国内で実施しているシダ植物の独立配偶体に関する最近の調査研究とその成果を知っていただくことで、国立沖縄自然史博物館が果たしうる壮大なミッションの重要性を多くの方々に理解していただくことの一助になれば幸いである。

2. シダ植物の孢子体と配偶体

シダ植物には孢子体と配偶体の二つの世代が存在し、それら交互に現れる（世代交代する）（図1）。普通、シダ植物と認識されているのは複相（ $2n$ ）の孢子体である。根・茎・葉の三つの器官に分化し、維管束が発達して時に（木生シダのヘゴ類などでは）高さが10 m近くになるほど大型にもなり、複雑な形態をしている。孢子体は成熟すると、その名前の通り葉の裏面や縁などに孢子嚢を形成し、その中で減数分裂を経て単相（ n ）の孢子ができる。この孢子が発芽して形成されるのが配偶体である。シダ植物の配偶体は、通常長さ幅共に0.5 cm程度、せいぜい1 cmほどの大きさで、細胞層も1～数層と薄い。形態も単純であり、多くの種の配偶体はハート型をしている。一方、コケシノブ科やイノモトソウ科シシラン類など、リボン状の配偶体をもつ群も一部存在するが、個々の配偶体が小型で単純な形をしている点では変わらない。

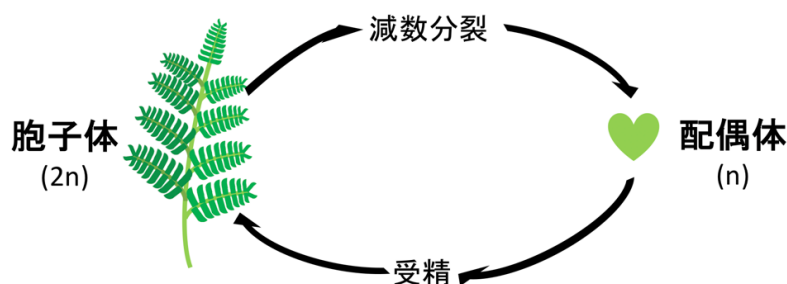


図1 シダ植物の生活環

シダ植物の配偶体は微小なので植物学者でさえも野外で認識することは稀であり、さらに形態が単純で種の識別形質に乏しいので、仮に認識できたとしても、どの種のものかまでは

分からなかった。なので、シダ植物の配偶体の地理的分布は日本国内でも全くと言って良いくらいに分かっていない。本稿の冒頭で、日本国内に生育するシダ植物については個々の種の地理的分布まで含めて詳細に説明されていると述べたが、これはあくまでも孢子体についてである。もし、配偶体のみで生育しているシダ植物があれば、日本でも少なくとも新産種となるはずである。

我々の研究グループでは、DNA の情報を用いて配偶体の種同定を行い、日本国内の配偶体の地理的分布を詳しく調べることを着想した。現在では DNA の塩基配列情報を用いてシダ植物の種を同定することが既に可能になっている。特に国内では、孢子体が認識されているほぼ全ての日本産シダ植物種について、葉緑体 DNA 上にある *rbcL* 遺伝子（光合成における炭酸固定の最初のステップを触媒するリブローズビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ大サブユニットの遺伝子）の塩基配列が決定されて、DNA データベースに登録されている（Ebihara 2011）。この遺伝子は、少なくとも生殖的隔離のある種間では、最も近縁な種間でも 3-5 塩基／1,200 塩基以上は異なり（Yatabe et al. 2009）、この 1 遺伝子の塩基配列を調べただけで 2 倍体有性生殖種であれば（雑種由来の倍数体種の場合は、複数種間で同じ配列を共有している場合がある）種の同定、すなわち DNA バーコーディングが可能である。さらに、この方法を使えば、小型で形態形質に乏しい配偶体でも、それがどの種ものものか容易に同定ができる。そのような方法を用いて、日本国内におけるシダ植物の配偶体の分布を詳細に明らかにし、さらに配偶体のみで生育しているシダ植物の日本新産種（次の項で詳しく述べる独立配偶体）を探索することを我々は目指したのである。

3. 独立配偶体とは

シダ植物において、配偶体世代だけで生育しているものは独立配偶体（independent gametophyte）と呼ばれる。シダ植物の配偶体は、通常、その上に造卵器と造精器を形成し、卵細胞と精子の間で受精が起こって有性的に次世代の孢子体を生じる。

ところが、特に配偶体ガリボン状の形態をしているシダ植物などでは、配偶体の辺縁などに多数の無性芽を形成し、この無性芽を通じて無性生殖（栄養繁殖）のみで配偶体の野外集団を数十年～数千年もの長期間に渡って維持続けられるものが存在する。そのような配偶体が独立配偶体である。最初に野外で独立配偶体を発見したのはアメリカ・アイオワ州立大学の Farrar 博士で、コケシノブ科とシシラン類（イノモトソウ科）の独立配偶体を北米のアパラチア山脈で見出した（Farrar 1967）。その後、北米の他の場所はもとより、ヨーロッパ、日本、台湾、韓国（済州島）からもシダ植物の独立配偶体が報告されている（Ramsey et al. 1990; Ebihara et al. 2013, 2019; Kuo et al. 2017; Park et al. 2020）。

当初、Farrar 博士は地球上に孢子体が全く存在せず、まさに配偶体のみで生育しているものだけを独立配偶体と呼んでいた。最近、Kuo et al. (2017) は独立配偶体の定義を拡張して、孢子体が存在していても、配偶体集団が長期にわたって栄養繁殖で維持され続けているものは全て独立配偶体と呼ぶことを提唱している。我々も Kuo 博士らの定義に従って、シダ植物の「独立配偶体」という用語を使うことにする。

4. 日本産独立配偶体の探索と我々の独自のアイデア

我々の研究目的は、まずは日本国内で未報告の独立配偶体を見出すことである。日本国内でこれまでに見つかった独立配偶体としては、Ebihara et al. (2013) によって、カラクサシダ (*Pleurosoriopsis makinoi*) のものが東京都の奥多摩と埼玉県秩父から、オオコケシノブ (*Hymenophyllum badium*) とヒメサジラン (*Loxogramme graminoides*) のものが秩父から、キクモバホラゴケ (*Callistopteris apiifolia*) のものが沖縄県の西表島から報告されていた。さらに、Kuo et al. (2017) によってオオバシシラン (*Haplopteris yakushimensis*)、あるいはその近縁種の独立配偶体も鹿児島県の屋久島と奄美大島から報告されていた。逆に言うと、これらのみであった。これ以外にも、まだ多くの未報告の独立配偶体が日本国内にも生育していると我々は考えた。

そこで本研究では、研究材料であるシダ植物のリボン状配偶体を奥多摩（東京都）、奥秩父の山塊（東京都、埼玉県、長野県、山梨県にまたがる）、さらには小笠原諸島（東京都）で多数採集した。我々がリボン状の配偶体を探す際には、それが集まって 1 cm～数 cm の大きさの配偶体マット（図 2）を形成しているものを探索・採集することにした。少なくとも数十年以上の長期間にわたって栄養繁殖をしながら生育し続けていれば、多くの配偶体が集まったマットになっていることが期待できる。もし、日本国内に胞子体が存在しない独立配偶体があれば、それはきっと配偶体マットを形成しているはずであると我々は考えたのである。



図 2 シダ植物の配偶体マット

(A) 配偶体マット、(B) 左側の写真の中央部を拡大したもの。配偶体の周辺に多く形成されている無性芽を赤丸で囲った。

逆に配偶体マットならば、個々の配偶体とは異なって、肉眼でも十分に見える大きさなので、探索するのも楽である。従来の研究でも、例えば海老原博士らは配偶体の群落に特に着目していた。しかし、逆に斜面一面や岩一面に広がった配偶体の大群落に着目して研究をしていたため、そのような独立配偶体の大群落は数が限られており、当然、ごく少数のサンプルに基づく研究となっていた。1～数 cm の配偶体マットに着目して、野外で非常に多くのサンプルを採集して独立配偶体を研究した例はないので、これに着目したのは我々の研究グループの独創的なアイデアである。シダ植物の配偶体研究では、野外で独立配偶体サンプルを発見・採集するステップが律速段階なので、その効率を高める工夫はとても重要である。

5. 奥多摩で見出された4種の独立配偶体

図3 奥多摩（東京都）で見出されたシダ植物4種の独立配偶体の *rbcL* 分子系統樹（酒井ら、未発表データ）

残りの2つがヒメサジランとカラクサシダで、どちらも胞子体の記録は東京都からもあるも



の、非常に珍しい種である。これらは、レッドデータブック東京 2013（本土版）（東京都環境局 2013）にも掲載されている絶滅危惧種である。なお、カラクサシダの独立配偶体については、Ebihara et al. (2013) によって奥多摩から既に報告されていたし、オオコケシノブとヒメサジランの独立配偶体も東京都の奥多摩に隣接する埼玉県の秩父から報告されていた。しかし、本研究においてこれら 4 種とも、その独立配偶体は奥多摩内の複数の谷から見出された（図 4）。さらに、それぞれの谷においても、数十 m 離れて複数か所に分布していることが多かった。これら 4 種の独立配偶体が奥多摩において、このように普通に見られ、決して稀少な存在ではないことを明らかにしたのは、本研究が初めてである。

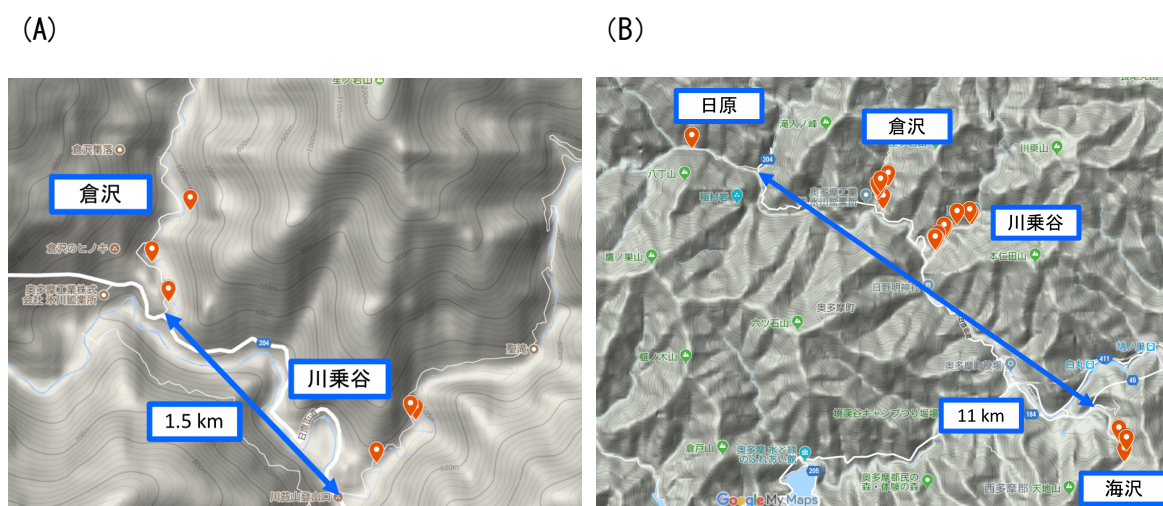


図 4 奥多摩における (A) ミカワコケシノブ, (B) ヒメサジランの独立配偶体の分布
(酒井ら, 未発表データ)

ミカワコケシノブとヒメサジランの独立配偶体を採集した地点を赤点で示す。いずれの種でも、無性芽では移動することが困難であると考えられる 1.5~11 km 離れた複数の谷で独立配偶体は見られた。

6. 奥秩父山塊で発見された幻のシダ, イトシシランの独立配偶体

奥秩父山塊は、北は両神山（埼玉県）、南は大菩薩嶺（山梨県）、東の端は雲取山（東京都）、西の端は野辺山（長野県）にまたがる大きな山塊である。その 1 つである雲取山の山頂付近の岩場でシダ植物の独立配偶体マット採取することができた。その *rbcL* 遺伝子の塩基配列を決定して、DNA データベース上の配列と比較したところ、台湾産のイトシシラン (*Haplopteris mediosora*) と完全に一致した。イトシシランは台湾の阿里山から記載されたシダ植物の種で、ヒマラヤ〜チベットの高地と、台湾、フィリピンの高山に広く分布している種である。日本では、1968 年に芹沢俊介博士が奥秩父の梓白岩〜十文字峠でその胞子体を採集した記録（伊藤 1969）しかなく、「幻のシダ」と言われていた。また、この時の採集標本には胞子囊群がついておらず（胞子囊群の形状は、イトシシランと同定する上で重要な識別形質である）、誤同定の可能性も指摘されていた。

今回、独立配偶体としてではあるが、確かに奥秩父の山塊にイトシシランが生育しているこ

とが確認された。また、芹沢博士がその孢子体を発見した梓白岩、さらには両神山でも、我々はイトシシランの配偶体を発見した（図 5）。配偶体が見いだされた雲取山、梓白岩、両神山の付近を詳しく調査したが、イトシシランの孢子体は見出せなかった（シシラン類の孢子体が見られなかった）。このように奥秩父山塊の遠く離れた 3 つの山頂付近からイトシシランの独立配偶体が見いだされたことから、この種の配偶体は秩父山塊に広く分布しているのではないかと我々は考えている。



図 5 奥秩父山塊（雲取山と梓白岩）で見出されたイトシシラン（イノモトソウ科）の生育環境（左）と独立配偶体の形態（右）（米岡ら，未発表データ）

雲取山と梓白岩は約 20 km 離れている。いずれの場所でも、尾根付近の岩の割れ目に独立配偶体が生育していた。

7. 小笠原諸島で見出された日本未記録種の独立配偶体

小笠原諸島は東京都心から約 1,000 km 南にあり、本州などの大きな陸地と一度も陸続きにならなかったことがない海洋島で、亜熱帯域に位置する。この小笠原諸島でも、我々はイノモトソウ科シシラン類の *Antrophyum plantagineum*（仮和名：ナンヨウタキシミシダ）の独立配偶体を見出した（図 6）。この種の孢子体は、主に太平洋諸島～東南アジアに広く分布しているが、日本国内では未報告の種（新産種）である。この種と同じタキシミシダ属に属する種は、日本国内ではタキシミシダ（*A. obovatum*）とシマタキシミシダ（*A. formosanum*）の 2 種しか知られていない（海老原 2016）。今回確認された独立配偶体は、これらのいずれの種とも *rbcL* の塩基配列が大きく（40/1,200 塩基以上）異なっていたので、これら 2 種のいずれでもないことは明白である。一方で、この種の独立配偶体は、父島、母島、さらには北硫黄島でも見出され、少なくとも父島と母島ではやはり普通に生育していることも明らかになった。これまでシダ植物の独立配偶体は、北米やヨーロッパ、日本でも奥多摩や奥秩父などの比較的冷涼な地域で見つかることが多かった。

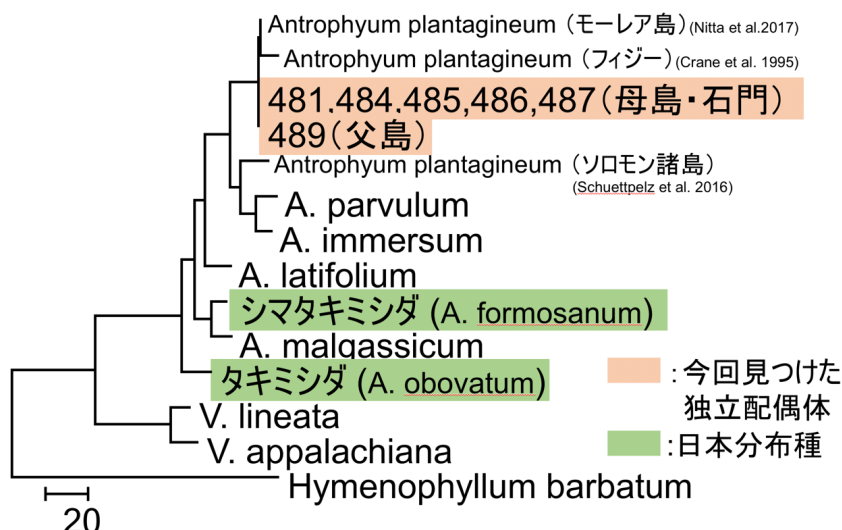


図6 小笠原諸島（東京都）で採集された独立配偶体サンプル（番号がふされたもの）から得られた *rbcL* 遺伝子の塩基配列を含む分子系統樹（酒井ら，未発表データ）

小笠原諸島の父島と母島で採集した独立配偶体サンプル（数字）の *rbcL* 遺伝子の塩基配列は、タキミシダとシマタキミシダの配列とは大きく異なる一方、太平洋諸島産のナンヨウタキミシダ（仮和名）*Antrophyum plantagineum* の配列と一致した。

最初にシダ植物も独立配偶体を発見した Farrar 博士は、約 200 万年前から数十万年おきに現れる、現在よりも 5-8℃ も平均気温が低かった氷河期（氷期）に、それまで生育していた胞子体が生育できなくなって絶滅し、低温耐性が胞子体よりも高い配偶体のみが生き残って独立配偶体が出現するというシナリオを提唱していた（Farrar 1967）。亜熱帯域の、しかも低地（海拔 400 m 以下）でシダ植物の独立配偶体が普通に生育していたことは興味深い。氷河期とは無関係にシダ植物の独立配偶体が形成されうること示しているからである。

8. まとめと今後の展望

胞子体については、個々の種の詳しい地理的分布まで明らかにされている日本産シダ植物であるが、独立配偶体が高頻度で含まれていると考えられる配偶体マツトを採集して、*rbcL* 遺伝子の塩基配列情報を用いて分子種同定を行ったところ、ミカワコケシノブやイトシシランなどの希少種のみならず、日本で未記録の種であるナンヨウタキミシダ (*A. plantagineum*) まで見出すことができた。ちょっとした研究のアイデアと最新の DNA 解析技術を組み合わせれば、シダ植物相（どのような種が国内の何処に生育しているか）が詳しく解明されている日本でさえも、シダ植物の新産種を発見できるということである。さらに、小笠原諸島の亜熱帯域低地でもシダ植物の独立配偶体が普通に見られたので、同様の調査・研究を生物多様性が日本よりもはるかに高く、その解明度が低い東南アジア地域などで展開すれば、新産種を見つけるに止まらず、地球上にその胞子体が存在しない新種のシダ植物の独立配偶体なども発見できるのではないかと期待が膨らむ。

国立沖縄自然史博物館は、沖縄や日本国内の生物多様性を解明する為の調査研究を行うだけ

ではなく、その立地（日本の最南西端に位置して、東南アジアへの窓口となるのに最適の場所にある）を生かして、生物多様性の解明が遅れている東・東南アジア諸国における自然史の調査・研究を先導し、地球環境の保全を推進することを通じて、これらアジアの近隣諸国にも貢献することを目指している。我々日本人の植物学者が最新の研究技術と独創的なアイデアをもってアジア諸国で調査・研究をすることは、日本がこの地域で平和的貢献をすることにつながり、日本の国益にもつながると我々は確信している。これが、我々が国立沖縄自然史博物館の新設を目指して活動を続けている理由である。最後に、是非このことを強調しておきたい。

謝辞

ここで紹介した日本国内のシダ植物の独立配偶体研究を実施するに当たっては、科研費・基盤研究（B）（代表者 村上哲明； 課題番号 19H03288）と東京都立大学 学長裁量枠プロジェクト研究（代表者 村上哲明）の研究費助成を受けている。また、本研究は、共同研究者の海老原 淳博士（国立科学博物館・植物研究部）、篠原 渉博士（香川大学・教育学部）、常木 静河博士（愛知教育大学）、山本 薫博士（横須賀市立人文自然博物館）、堀 清鷹博士（高知県立牧野植物園）の協力を得て実施したものである。さらに、様々な協力や有用な助言を頂いている東京都立大学・牧野標本館の皆様にも、お礼を申し上げたい。

引用文献

- 伊藤洋 1969. 台湾・ヒマラヤに次いで奥秩父が第3の産地となったイトシシラン. 秩父自然科学博物館研究報告 (15): 65-66.
- Ebihara, A. (2011) *RbcL* phylogeny of Japanese pteridophyte flora and implications on infrafamilial systematics. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B* 37: 63-74.
- Ebihara A, Yamaoka, A., Mizukami, N., Sakoda, A., Nitta, J.H., & Imaichi R. (2013) A survey of the fern gametophyte flora of Japan: Frequent independent occurrences of noncordiform gametophytes. *Am. J. Bot.* 100: 735-43.
- 海老原淳 2016, 2017. 日本産シダ植物標準図鑑 I, II. 学研. 東京.
- Ebihara, A., Nitta, J. H., Matsumoto, Y., Fukazawa, Y., Kurihara, M., Yokote, H., Sakuma, K., Azajanum O., Hirayama, Y., & Imaichi, R. (2019) Growth dynamics of independent gametophytes of *Pleurosoriopsis makinoi* (Polypodiaceae). *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B* 45: 77-86.
- Farrar, D. R. (1967) Gametophytes of four tropical fern genera reproducing independently of their sporophytes in the southern appalachians. *Science* 155: 1266-1267.
- Hasebe, M., Omori, T., Nakazawa, M., Sano, T., Kato, M., & Iwatsuki, K. (1994) *RbcL* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 5730-5734.
- Kuo, L.-Y., Chen, C.-W., Shinohara, W., Ebihara, A., Kudoh, H., Sato, H., Huang, Y.-M., Chiou, W.-L. (2017) Not only in the temperate zone: Independent gametophytes of two vittarioid ferns (Pteridaceae, Polypodiales) in East Asian subtropics. *J. Plant Res.* 130: 255-262.

- 倉田悟・中池敏之 1979-1997. 日本のシダ植物図鑑 分布・生態・分類 全8巻. 東京大学出版会. 東京.
- Park, S.-H., Kim, S.-S., & Kim, H.-T. (2020) *Ecol. Evol.* 10: 7826-7838.
- Rumsey, F., Sheffield, E., & Farrar, D. (1990) British filmy-fern gametophytes. *Pteridologist* 2: 40–42.
- 東京都環境局 2013. レッドデータブック東京2013. <https://tokyo-rdb.metro.tokyo.lg.jp/index.php>
- Yatabe, Y., Shinohara, W., Matsumoto, S., & Murakami, N. (2009) Patterns of hybrid formation among cryptic species of bird-nest fern, *Asplenium nidus* complex (Aspleniaceae), in West Malesia. *Bot. J. Linn. Soc.* 160: 42-63.