葉緑体DNAとシダ植物の系統

長谷部光泰

狭義のシダ類（大葉性のシダ植物）の系統関係を葉緑体DNAを用いた分子系統学的方法で推定した．ホウライシダの葉緑体DNAの逆向き反復配列付近にタバコなど他の陸上植物とは異なった遺伝子配列が確認された．このホウライシダ型の遺伝子配列は他の薄嚢（のう）シダ類にも確認され，薄嚢シダの単系統性を強く示唆した．このことは，胞子形成の薄嚢性という薄嚢シダ類が共有している派生形質によっても支持される．リブロース二リン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（RubisCO）の大サブユニット遺伝子（*rbc*L）の444アミノ酸配列を最尤（ゆう）法によって系統推定に用いた．その結果，これまで一部の系統学者が行なっていたようにシダ類を二つの分類群，すなわち真嚢シダ類と薄嚢シダ類に分けるのは妥当ではなく，真嚢性をもつハナヤスリ科とリュウビンタイ科は偽系統群であることがわかった．また，これまでハナヤスリ科は原裸子植物との関係が形態の観察から強く示唆されていた．しかし，ハナヤスリ科は被子植物とは偽系統群であり，他のシダ類と単系統であると推定され，今回のデータからはそのような仮説を支持しない．

1. 狭義のシダ植物

広い意味でのシダ植物は大きく分けて四つのグループから構成されている．マツバラン類，小葉類，トクサ類，狭義のシダ類（以降単にシダ類と略す）である[1]．本稿では誌面の関係上，シダ類の系統関係に話題を絞ることにする．有名なエングラーの「植物分科概要」の12版の中で，レイマースはシダ類を二つの大きなグループ，すなわち，真嚢シダ類と薄嚢シダ類に分類している．両者は胞子嚢の発生様式が異なっており，前者は胞子嚢がいくつかの始原細胞から由来するのに対し，後者は一つの細胞に由来する．現生の真嚢シダとしてはリュウビンタイ科とハナヤスリ科が知られている．リュウビンタイは熱帯を中心に分布し，1メートル以上にもなる大きな羽状複葉の葉をつける．ハナヤスリの仲間は数十センチメートルほどの小さな植物で，胞子葉が栄養葉の向軸面に生じる立体的な葉構成をしており，他のシダ類とは趣を異にしている．この両グループは形態的に大きく異なっており，真嚢性であることを除けば，ほとんど共通点はない．しかも，真嚢性は原始形質（25ページ参照）であるから分類群をまとめる特徴としてはふさわしくない．よって，多くの研究者はシダ類を三つのグループに分ける．しかし，この三つのグループの系統関係はよくわかっていない．

たとえば，ハナヤスリの仲間は真正中心柱をもつこと，維管束を形成し二次木部ができるなどの点でシダ植物よりはむしろ種子植物に似ていることが形態の詳細な研究からわかってきた[2]．胞子で繁殖し，種子植物と似た形態をもつ化石種として原裸子植物が知られている．ハナヤスリは形態からみる限りは原裸子植物に最も近縁であり，その「生きた化石」ではないかという論文が発表され，多くの研究者の

注目を浴びた．

薄嚢シダ類は薄嚢性という派生形質を共有したグループで，単系統性が強く支持される．しかし，ゼンマイの仲間は胞子嚢形成が真嚢シダと薄嚢シダの中間的であることから，真嚢シダから薄嚢シダへの中間に位置する群ではないかという見解もあった．薄嚢シダは約 30 科，10000 種から構成されているがその系統関係についてはよくわかっていない．この理由としてシダ類は比較できる外部形態が少なく（花が咲かない），いろいろなグループで平行進化が起きているらしく，注目する形質によって推定された系統関係が異なってしまうといったことがあげられる．このような状況で分子系統学的手法の導入が望まれていた．

2. 真嚢シダ類の葉緑体 DNA

陸上植物の葉緑体 DNA は保存性の高いゲノムで，コケから被子植物に至るまでほとんど変わらぬ遺伝子構成をしている．シダ植物の葉緑体 DNA は単離しにくいこともあって研究が遅れていたが，1982 年になって米国のパルマーとスタインによって，ヤマドリゼンマイは標準的な被子植物（タバコやホウレンソウ等）と同じく環状で一対の逆向き反復配列（IR）をもっており，遺伝子配列も同じであることがわかった．

本特集で村上が書いているように，葉緑体 DNA の制限酵素断片長多型（RFLPs）は種間や属間の系統関係の推定に大きな力を発揮する．1980 年代のはじめのころは葉緑体 DNA を単離，精製し，制限酵素処理後染色した電気泳動像を比較する方法がとられていたが，葉緑体 DNA を単離するためには多量の生材料を必要とすることから栽培植物に研究が限られていた．その後いくつかの被子植物で葉緑体 DNA の全体をカバーするようなクローンバンクが作られ，これらのクローンをプローブにすることによって，制限酵素処理した全 DNA からサザンハイブリダイゼーションで葉緑体 DNA の泳動像を検出できるようになった．これにより，通常はわずかな生材料しか入手できない野生植物でも RFLPs による系統関係の解析が可能になった．しかし，RFLPs の技術をシダ類に適用するにはまだ問題点が残されていた．パルマーらが調べたように，葉緑体 DNA の遺伝子配列は被子植物とゼンマイの間で保存されていた．しかし，シダ類は被子植物とは系統がかなり離れているため，塩基配列レベルでの変化，とりわけアミノ酸配列に変化を与えないような同義置換がかなり起こっているようで，タバコなどの被子植物由来のプローブがうまくハイブリダイズしなかったのである．このような状況を解決したのが筆者らのグループであった[3]．筆者らは 1990 年にホウライシダの葉緑体 DNA の制限酵素地図を作成し，ゲノム全体をカバーするようなクローンをとることに成功した．また，このクローンがタバコのクローンに比べシダ類によくハイブリダイズすることを示した．

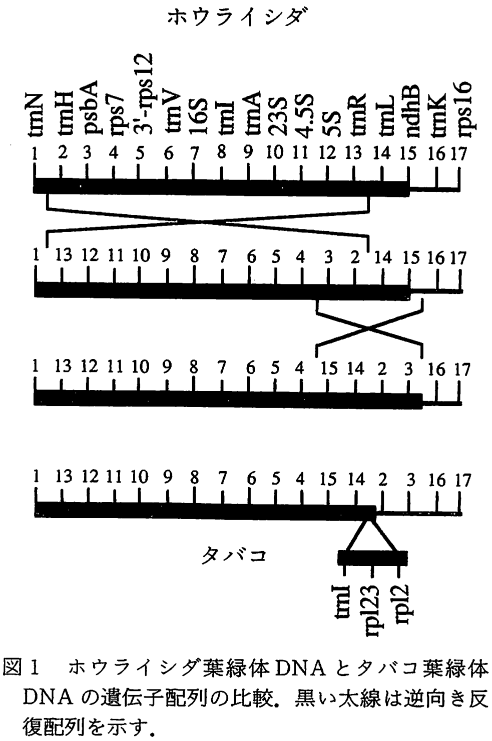

図 1　ホウライシダ葉緑体 DNA とタバコ葉緑体 DNA の遺伝子配列の比較．黒い太線は逆向き反復配列を示す．

さらに，詳細な遺伝子地図を作成してみると，ホウライシダはタバコとIR付近で異なった遺伝子配列をしていることがわかった．両者の違いを図1に示した．維管束植物においてはタバコ型の遺伝子配列が祖先形質であろうと考えられているので，筆者らはホウライシダの系統でIRの短縮と2回の逆位が起こったのではないかと推定した．

3. 薄嚢シダ類の系統

先にも述べたように葉緑体DNAは保存的な分子であるから，その構造変異は系統関係の推定に非常に有効に働く．筆者らは米国のスタイン，コナント，オーストラリアのトムソンらと共同でホウライシダ型の構造変異の薄嚢シダ類における分布を調べてみた．すると，ヘゴ属(ヘゴ科)，ワラビ属(コバノイシカグマ科)，イノデ属(オシダ科)もホウライシダ(ホウライシダ科)と同じ遺伝子配列をしていることがわかった[3]．これら四つの属は形態的に系統がかなり離れていると推定されるものであるから，これらが同じ逆位を共有しているということは薄嚢シダ類全体の単系統性を強く支持していると考えられる．このことは胞子嚢形成の薄嚢性という派生形質の共有とも一致している．さらに重要なことはゼンマイ属(ゼンマイ科)の葉緑体DNAはタバコ型であり，ホウライシダ型ではないということである．このことから，ゼンマイ科は他の薄嚢シダ類の系統から上記の4科が分化する前に分かれたということが推定される．ゼンマイ科のもつ他の薄嚢シダ類とは異なった胞子嚢形成様式もこのことを支持している．

4. *rbc*L遺伝子の最尤系統樹

葉緑体DNAの構造変異からゼンマイ以外の薄嚢シダ類の単系統性がはっきりしたので，筆者らはリブロース二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遺伝子（*rbc*L）の塩基配列を比較することによってシダ類の系統関係を解明しようとした[4]．リュウビンタイについては塩基配列が発表されていたので[5]，筆者らはナツノハナワラビ(ハナヤスリ科)，ヤマドリゼンマイ（ゼンマイ科)，そして薄嚢シダの代表としてホウライシダ（ホウライシダ科）を選んで塩基配列を決定した．陸上植物の*rbc*L遺伝子はGC含量が分類群によって変動することから，DNAの塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したデータを解析に用いた．また系統樹の推定にはいくつかの方法が考案されているが，進化速度の変動の影響を最も受けにくい最尤法を用いた．

最尤法とは，塩基置換の確率モデルに基づいてそれぞれの系統樹が実現される確率（尤度）を求め，最も確率の高くなるような系統樹（最尤系統樹）を求める方法である．最尤法についての詳しい説明は長谷川(1989)[8]を参照していただきたい．最尤法はよい方法ではあるが，コンピュータの計算時間が非常にかかるという欠点がある．現在筆者らが使用しているコンピュータ（VAX 9210 VP）では6種類の系統関係を計算するのが限界である．そこで解析を2段階に分けた．まず，陸上植物を六つのサブグループに分けた．種子植物，ナツノハナワラビ，リュウビンタイ，ヤマドリゼンマイ，ホウライシダ，コケ植物（ゼニゴケ）である．種子植物内の系統関係は別の実験（28ページ参照）で推定された結果を用いた．六つのグループでできる系統樹は全部で105通りになるので，そのすべてのトポロジー（系統類縁関係）について尤度を計算した．尤度は統計的数値であるから分散が存在する．東京大学の岸野と統計数理研究所の長谷川によって考案された尤度の分散を簡易に求める方法を用いた．また，ブーツストラップ法（28ページ参照）で105通りの系統樹がブーツストラップサンプリングをしたときにどのくらいの確率で最尤系統樹になるかを計算してみた．尤度の高い方から順に三つの系統樹を図2にあげてある．最尤系統樹は最もブーツストラップ確率も高か

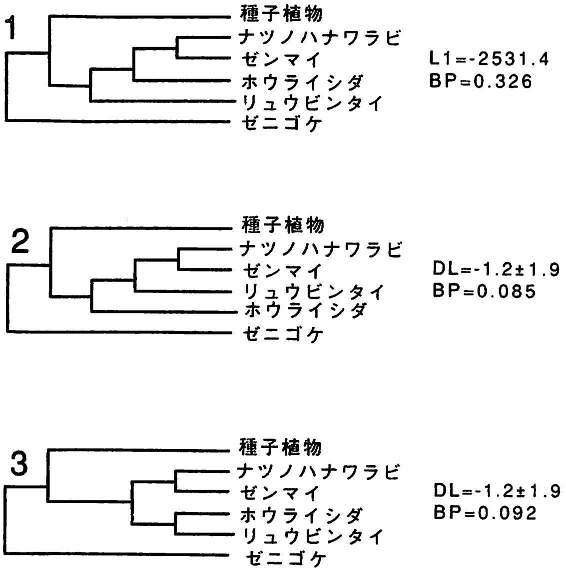

図2　種子植物，ナツノハナワラビ，ゼンマイ，リュウビンタイ，ホウライシダ，ゼニゴケの系統関係．最尤系統樹から順に対数尤度が高いもの三つを示した．L1は系統樹1の対数尤度，BPはブーツストラップ確率，DLは最尤系統樹（系統樹1）と各系統樹の対数尤度の差を示す．

った．最尤系統樹ではシダ類は単系統となったので，つぎのステップとして新たに緑藻類を加えて，種子植物，シダ類（トポロジーは図2の最尤系統樹と同じにした)，コケ，緑藻類の四つのサブグループで解

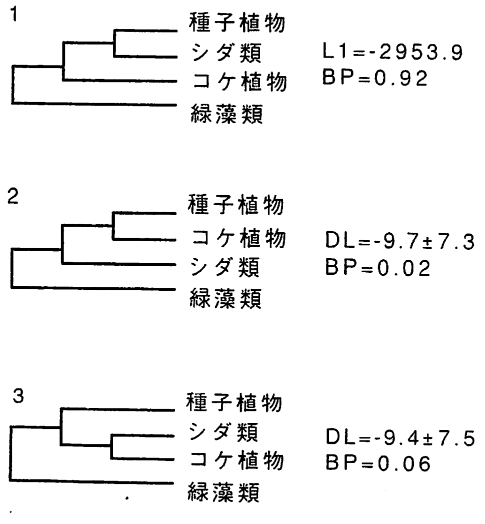

図3　種子植物，シダ類，コケ植物，緑藻類の系統関係．表記の仕方は図2と同じ．

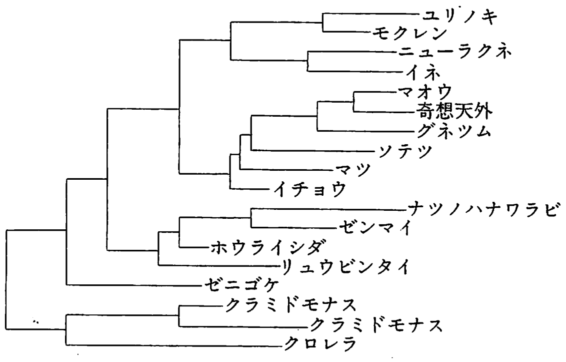

図4　*rbc*L遺伝子の塩基配列から求められた最尤系統樹．枝の長さはアミノ酸の置換数に比例している．

析を行なってみた．四つのグループでできるトポロジーは三つである．図3に結果を示してある．図3の系統樹1はずば抜けてブーツストラップ確率が高かったので，現在のところこの系統樹が最も確率が高く支持されることになる．図4に枝の長さがアミノ酸残基の置換に比例するようにして最尤系統樹を示す．

5. シダ類の系統

図4の結果は明らかにナツノハナワラビがシダ類の仲間であり，種子植物の系列には属さないことを示している．ハナヤスリ科が原裸子植物の生きた化石だとすれば，ナツノハナワラビと種子植物は姉妹群（系統上最も近い分類群を指し，他のどんな分類群とも共有しない祖先種を両分類群が共有する）を形成するはずである．第一段階の105の系統樹の解析で種子植物とナツノハナワラビが姉妹群になる系統樹は七つあるが，それらのブーツストラップ確率の合計はわずかに0.032であるのに対し，ナツノハナワラビとシダ類が姉妹群になる確率は0.944もある．したがって筆者らの結果からはハナヤスリ科はシダ類として分類すべきである．しかし，先に述べたように形態学的にはハナヤスリ科はきわめて原裸子植物に形態が似ている．今後さらに詳細な研究によって，どうして異なる二つの系統で平行的に類似

した形態が進化したのかが解明されることであろう．図4に示した陸上植物の *rbc*L のアミノ酸配列データによる最尤系統樹ではナツノハナワラビはゼンマイと姉妹群となっているが，これら両種を結び付けるような形態学的特徴は皆無である．ゼンマイの胞子嚢形成は薄嚢シダとはやや異なっているとはいえ真嚢シダのものとはまったく異なっている．今後ほかの薄嚢シダからの塩基配列情報が蓄積することによって，この問題に何らかの解答が与えられるかもしれない．

一部の研究者が採用していたような，シダ類を真嚢シダと薄嚢シダの二つのグループに分けるのは系統関係を反映していないことがはっきりした．リュウビンタイとナツノハナワラビが姉妹群となるブーツストラップ確率はゼロである．

6. シダ類とコケ植物の関係

広島大学の堀と名古屋大学の大沢は，1987年に5SリボソームRNAの塩基配列データからシダ植物とコケ植物は姉妹群であり，コケ植物がシダ植物から退行的に進化したのではないかと考察している[6]．また最近，静岡大学の吉永らは葉緑体DNAのいくつかの遺伝子の塩基配列を決定し，堀と大沢の結果を支持できたと議論している[5]．しかし，彼らの議論には問題があり，筆者らのデータとの関連で，この問題を論じたい．分子系統学的手法で系統樹を構築する場合一般における注意点であるが，塩基配列を決めることができるのは現生種のみである（近年，化石からDNAを抽出することが一般的になってきたが今は議論から省く）．したがって筆者らが知りうるのは現生種の間の系統関係である．たとえば図5－1のような系統関係が推定されたとしても，現生のシダ植物とコケ植物の分岐点に存在していた種が，現生のシダ植物に似た種だったのか，現生のコケ植物に似た種だったのか，あるいは両者とは異なった形態をした植物であったのかはわからないのである．堀と大沢は図5－1の系統樹を根拠に「維管束植物（種子植物とシダ植物）が維管束を欠いたコケ様の植物から進化したという説には賛同できず，シダ植物からコケ植物が退行的に進化したという説を支持する」と彼らの論文の中で述べている．しかし，図5－1であろうと2であろうとどちらの説が正しいかは判断できないのである．たとえば，2の系統樹が得られたとしても，コケ植物と維管束植物の分岐点に存在していた種が現生のシダに似た植物であれば，コケ植物は維管束をもった植物から退化したことになる．一方，3のような系統樹が得られたときにはコケ植物が退行進化で生じたという説が有力となる．なぜなら，図中の矢印Aの分岐点がコケ植物であったと仮定するとコケ植物が一度シダ植物に分化した後，矢印Bの位置でもう一度コケ植物に戻るという2段階の進化を考えなければならないが，Aの分岐点がシダ植物ならば，シダからコケへの進化を1回だけ考えればよいから，進化が最節約的に起きるという仮定のもとでは分岐点Aの種がシダであったという説が支持されるのである．

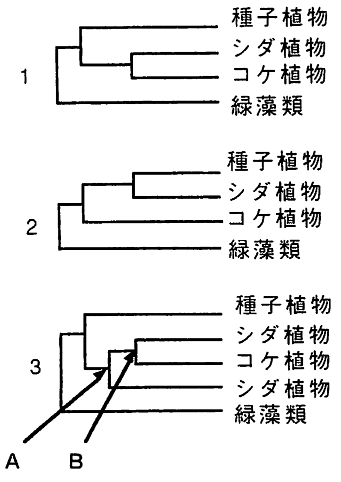

図5　種子植物，シダ植物，コケ植物の系統関係に関する模式図．説明は本文参照．

つぎにコケ植物の退行進化説であるが，この説は20年以上前に唱えられた説であり，その後集積された古生物学の知識からするとすでにあまり意味のない説となってしまっている．最古の陸上植物はライ

ニアを中心とする維管束をもった奇妙な植物群である．維管束をもっているライニア類が下部デボン紀層から発掘されるにもかかわらず，維管束をもたない現生のコケと同じような体制をした植物はライニアよりずっと後になってしか発掘されなかったことなどからこの説が提唱された．しかし，ライニアのある種類は維管束をもたないことや，最古の維管束植物と一般に考えられてきたクックソニアも胞子嚢をつけた軸には維管束が存在しないことがわかり，現在では陸上植物の初期進化の段階では現生のシダとは様相を異にする維管束をもった植物やコケとも違った維管束をもたない植物が混在していたと考えられている[9]．

以上の理由から，コケが先かシダが先かという議論は現生種の塩基配列を比較するうえでは意味がない．問題となるのはシダ植物とコケ植物が姉妹群なのか（図5－1）そうではないのか（図5－2）ということである．5SリボソームRNAのデータは図5－1を支持するが，彼らの系統樹の分岐点の分散を考えに入れると図5－2の可能性を棄却することはできない．一方，筆者らの *rbc*L のデータでは図4に示したように0.92という高いブーツストラップ確率で2の系統樹が支持され，1の確率はわずかに0.06である．しかし，ここで注意が必要なのは筆者らのデータはまだ充分ではないということである．たとえば図3において分散を考えにいれると，必ずしも最尤系統樹が他の系統樹に比べて統計的に有意に尤度が高いとはいえないからである．このことは *rbc*L 遺伝子のアミノ酸配列の長さが情報量として充分ではないということを表わしている．今後さらに多くの遺伝子の塩基配列データを求めることによってこの問題に決着がつくことであろう．最近吉永らは図5－1の系統樹を支持するという論文を発表したが，彼らの系統学的解釈には問題が残っている．彼らはこれまで被子植物には存在しないがゼニゴケには存在する *trn*R という遺伝子が，シダ類のリュウビンタイに存在するという画期的な発見をした．ゼニゴケとリュウビンタイに共通の遺伝子があるので両者は姉妹群であると結論づけているが，この結論には問題がある．25ページで説明してあるように，形質には派生形質と祖先形質が存在し，派生形質を共有しているもの同士は姉妹群と考えられるが，祖先形質を共有しているからといって姉妹群かどうかはわからないのである．したがって緑藻類や裸子植物での *trn*R の有無がわかり，*trn*R の存在が派生形質か，原始形質なのかがわかるまでは系統的解釈はできないのである．しかし，この遺伝子は系統関係を推定するうえで非常に有望な遺伝子であろうと考えられるので今後の研究が期待される．また，彼らはタバコ，イネ，リュウビンタイ，ゼニゴケの4種間でアミノ酸配列がお互いに何%同じかを計算し，リュウビンタイとゼニゴケの値がいちばん大きかったので両者は姉妹群であると結論づけているが，これも問題である．進化速度（年あたりアミノ酸残基あたりの置換数）が系統ごとに異なることを考慮に入れていないからである．この点についてはここで論じる紙幅に欠けるので，分子系統学の教科書[7]を参照していただきたい．実際に吉永らの *rbc*L 遺伝子のデータをそのまま，進化速度の影響を受けにくいといわれている近隣結合法で系統樹を構築してみると図5－2と同じになる．

おわりに

陸上植物の進化を考える場合に，大葉と小葉の進化という興味深い問題がある．シダ植物の中でヒカゲノカズラなどに代表される小葉類の系統関係は陸上植物の進化を探るうえで大きな鍵(かぎ)になると考えられている．スペースの関係でこの問題は今回は取りあげることができなかった．世界各地で着々と塩基配列データがたまりつつあるので，近いうちに現生陸上植物全体の系統が明らかになることであろう．1985年当時は画期的であった5SリボソームRNA

のデータも修正増補や訂正の必要性が指摘されている．同じように，さまざまなデータが蓄積されるうちに今回議論したいくつかの問題点は間違いであったということがわかるかもしれない．今後の研究の進展に期待したい．1993年夏には第15回国際植物科学会議が開かれ，その中で「DNA塩基配列データと陸上植物の系統」というシンポジウムが企画されている．世界中の仲間がどんなデータをもちよるか楽しみである．

文　献

1) 岩槻邦男：日本の野生植物「シダ」．平凡社（1992）．
2) 加藤雅啓：プランタ，8，16-21（1990）．
3) 長谷部光泰：プランタ，**14**，28-33（1991）．
4) Hasebe, M., M. Ito, R. Kofuji, K. Iwatsuki and K. Ueda：投稿中．
5) Yoshinaga, K., Y. Kubota, T. Ishii and K. Wada：Plant. Mol. Biol., **18**, 79-82(1992)．
6) 堀　寛：生物の歴史．pp. 3，25-60，岩波書店（1989）．
7) 根井正利：分子進化遺伝学．培風館（1990）．
8) 長谷川政美：増補 DNAからみた人類の起源と進化．海鳴社（1989）．
9) 北川尚史：コケの生物学4．プランタ，**4**，29-35（1989）．

（はせべ みつやす，東京大学 理学部 附属植物園）

月刊 海洋

～237号は¥1,545(本体¥1,500)，238号～は¥2,000(本体¥1,942)
在庫切れの節は御了承を．

231 内部潮汐……長島秀樹・他
232 局地性湧昇域……高橋正征・他
233 第4・暖水塊(1)……杉本隆成・他
234 第4・暖水塊(2)……川崎康寛・他
235 微小動物プランクトン(1)……谷口旭・他
236 微小動物プランクトン(2)……谷口旭・他
237 海洋生物のジーンバンク……嵯峨直恒・他
238 北太平洋亜寒帯循環……大谷清隆・他
239 インド洋の海洋地質(1)……新妻信明・他
240 インド洋の海洋地質(2)……天野一男・他
241 東北地方の異常気象と海況変動…浅井冨雄・他
242 海底ケーブル利用……笠原順三・他

号外 海洋

1 海洋学－その課題と展望－……¥4,635 吉田耕造・他
2 黒潮－その諸問題－……¥4,120 庄司大太郎・他
3 大気・海洋相互作用と混合層 ¥4,000 花輪公雄・他

月刊 地球

～129号は¥1,545(本体¥1,500)，130号～は¥2,000(本体¥1,942)
在庫切れの節は御了承を．

122 人工衛星アルチメトリィ……瀬川爾朗・他
123 日本海の形成とフォッサマグナ…石橋克彦・他
124 琉球弧の海洋地学……氏家宏・他
125 付加プリズム(1)……平朝彦・他
126 付加プリズム(2)……木村学・他
127 地球(宇宙)物性(1)……池谷元伺・他
128 地球(宇宙)物性(2)……小林正・他
129 海底拡大系(1)……本座栄一・他
130 海底拡大系(2)……玉木賢策・他
131 海底物理探査……上田誠也・他
132 続・群発地震……久保寺章・他
133 日本列島の構造発達(1)……黒田吉益・他
134 日本列島の構造発達(2)……桜井康博・他

号外 地球

1 物理探査法……¥3,090 石井吉徳・他
2 地球中心核……¥3,090 行武毅・他

海洋出版株式会社
〒191 東京都日野市三沢803　振替東京9－2355
TEL 0425－94－2654　FAX 0425－94－2924
図書目録進呈