

植物の進化発生研究における順遺伝学的解析

豊倉 浩一^{1,2}, 深城 英弘¹

¹神戸大学大学院理学研究科

〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1

²大阪大学大学院理学研究科

〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

Forward Genetics for Plant Evolutionary and Developmental Research

Koichi Toyokura^{1,2} and Hidehiro Fukaki¹

¹Graduate School of Science, Kobe University, Rokkodai 1-1, Kobe, 657-8501, Japan

²Graduate School of Science, Osaka University, Machikaneyamacho 1-1, Toyonaka, 560-0043, Japan

Key words: *forward genetics, non-model plant*

1. はじめに

近年、次世代シーケンサーと呼ばれる一度に大量の DNA の配列を調べる方法・装置が広く利用されるようになってきた。それに伴い多様な形態を示す植物のゲノム配列の解読も進んでおり、形態進化がどのようなゲノム配列の変化により生じてきたかを具体的に調べる体制が整ってきた。しかしながら、配列をただ眺めているだけでは、大量の配列の中から形態変化に関わるごく一部のゲノム配列の変化を同定するのは困難である。シロイヌナズナをはじめとするモデル植物において様々な形態形成に関わる遺伝子とその働きの理解が進み、それらの知見に基づいた植物の形態形成の進化・多様性の分子遺伝学的研究が行われてきた。これらの研究の多くはモデル植物で知られている遺伝子の相同遺伝子に注目しその発現や機能を調べる逆遺伝学的研究であった。近年では、逆遺伝学的研究に加えて、注目する形質に関わる遺伝子を非モデル植物から順遺伝学的に同定し、解析する研究も増えてきた。本総説では、進化発生を順遺伝学的に研究する意義と、その具体的な手法を紹介したい。

2. 進化発生研究における順遺伝学的手法の意義

ゲノム配列の変化と形態変化を結びつけるという事は、「どの遺伝子」の「どの配列変化」が形態変化の直接的な原因であるかを明らかにする、という事である。順遺伝学は、この中から「どの遺伝子」が形態変化の原因であるかを知るための強力な手法である。

はじめに、順遺伝学について簡単に説明したい。順遺伝学 (forward genetics) とは人為的、あるいは、自然に生じた突然変異により引き起こされた形質の原因となる遺伝子を特定する研究である。一般的には、放射線や薬剤などにより変異誘導した集団の中から注目する形質を持つ個体を選抜し、その原因遺伝子を同定し、その遺伝子と形質との関係について解析を行う。順遺伝学と対になる研究として、逆遺伝学 (reverse genetics) がある。逆遺伝学は、注目する遺伝子の機能や発現を選択的に欠失する事で生じる形質を解析し、その遺伝子の機能を明らかにする研究である。順遺伝学と逆遺伝学はともに

特定の遺伝子と形質との関係を明らかにする研究であるが、研究の初発において形質に注目するのか、遺伝子に注目するのかという点で異なっている。

植物の研究に限らず、従来の進化発生研究では逆遺伝学的手法が多く取られてきた。分子遺伝学的解析の進んでいるモデル生物において、特定の形質（特定の器官、組織の発生など）を制御する様々な遺伝子が単離されてきた。その上で、モデル生物と比較して異なる形態の器官・組織をもつ生物において、その遺伝子の相同遺伝子の発現部位の解析や、RNA 干渉 (RNAi) や人工マイクロ RNA 等を用いた遺伝子発現抑制による器官・組織の発生異常を検証する事により、生物間で異なる形態の器官・組織と遺伝子の機能との関係性が調べられてきた。このような逆遺伝学による進化発生研究により、モデル生物で解明された多くの形態進化に関わる遺伝子が明らかにされてきた。しかしながら、モデル生物が持たない形質の進化の研究のように、注目する形質に関わる遺伝子がモデル生物を用いた研究から明らかにされていない場合も多いため、逆遺伝学による進化発生研究には限界があると考えられる。これに対して、順遺伝学ではまず形質に注目した後に原因遺伝子を同定する事から、原理的にはどのような形質であってもその形質に関わる遺伝子を同定する事が可能となる。このように、順遺伝学の利点として、分子遺伝学的な知見が乏しい形質の進化研究において、モデル植物だけを用いた研究では見出す事ができないような遺伝子を同定できる事が挙げられる。

また、順遺伝学による進化発生研究は、完全に機能を欠損した変異体を得られる点でも有用である。順遺伝学で得られる変異体は機能欠損変異体である事が多く、ある植物種 A から得られた機能欠損変異体に対して別の植物種 B の相同遺伝子を導入する事で植物種 A の形質から植物種 B の形質に転換させる事ができれば、その遺伝子が「形態進化を引き起こした遺伝子」であるかを明らかにする事ができる (Nikolov and Tsiantis 2016)。一方で、逆遺伝学的解析で広く用いられている RNA 干渉 (RNAi) や人工マイクロ RNA 等による遺伝子発現抑制では、標的とする内生の遺伝子発現を完全に抑制する事が難しい事に加え、相同遺伝子の発現も抑制してしまう。そのためこれらの遺伝子発現抑制の方法では、順遺伝学で得られた変異体の場合のような解析を行う事が難しい。ただし、植物種によっては相同組換えを利用した遺伝子欠損技術が発達しているだけでなく、近年、CRISPR-Cas 法や TALEN, ZFN といった直接的に標的とした遺伝子を変化させるゲノム編集技術の開発等により、逆遺伝学的に機能が欠損した変異体を得る事が可能になってきている。これらの技術がより安定的に行えるようになると逆遺伝学による進化発生研究においても「形態進化を引き起こした遺伝子」であるかどうかの検証が容易に行えるようになるだろう。

似た手法として、QTL (Quantitative Trait Locus) 解析や GWAS (Genome-Wide Association Studies) 解析といった手法がある。これらの手法は、基本的に同一種内における形質の進化に関わる遺伝子座を同定する手法である。本稿では、これらの解析では解析が難しいような種間の形態進化等に関わる遺伝子を同定する事ができる順遺伝学的解析に絞って、研究例と具体的な研究の進め方を紹介したい。

3. 順遺伝学的手法の研究例

順遺伝学的手法を用いて様々な植物の形態進化を分子遺伝学的に明らかにされてきた幾つかの例を紹介したい。

Coupland らのグループは、多年生植物である *Arabis alpina* を用いて、EMS を変異原として多年生でなく一年生の変異体の単離解析を行い、一年生植物のシロイヌナズナと比較する事で多年生と一年生

を制御する分子機構を研究している。*A. alpina* は、栄養成長期に越冬し、春になると花成し生殖成長を行い、数週間の生殖成長の後に、再び栄養成長期に戻り、翌年の春まで栄養成長を続けるという年周期を示す。*A. alpina* において、生殖成長の後に栄養成長期に戻らずに、生殖成長を続けてるという一年生植物になってしまった *perperual flowering 1* (*pep1*), *pep2* 変異体の単離・解析が行われた。*pep1* 変異体の原因遺伝子 *PEP1* は、シロイヌナズナにおいて花成を抑制する事が知られている *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) 遺伝子の相同遺伝子であった (Wang et al. 2009)。*FLC* 遺伝子は、シロイヌナズナにおいて越冬などの長期の低温によって発現抑制され、その結果、花成が誘導される事が知られている。*A. alpina* の *PEP1* 遺伝子は、シロイヌナズナと同様に長期の低温によって発現抑制されるのに加えて、その後、通常の温度で生育を続けると *PEP1* の発現が回復し、それにより数週間の生殖成長の後に栄養成長期に戻る事が示された (Wang et al. 2009)。一方、*pep2* 変異体の原因遺伝子 *PEP2* は、シロイヌナズナで齢依存的な花成制御、および、花器官形成に関わる *APETALA 2* (*AP2*) の相同遺伝子であり、*A. alpina* においてもシロイヌナズナと同様に若い頂芽や側芽が生殖成長期に移行するのを抑制する事が示された (Bergonzi et al. 2013)。一年生のシロイヌナズナでは、越冬して一度 *FLC* 遺伝子の発現が減少すると、頂芽や側芽が例依存的に *AP2* 遺伝子の発現が減少して次々に生殖成長に移行するため、再び栄養成長に戻る事が無い。それに対して、多年生の *A. alpina* では越冬後に *PEP1* 遺伝子の発現が減少して、ある齢以上の頂芽や側芽が生殖成長に移行するものの、再び *PEP1* 遺伝子の発現が上昇するため、*PEP2* 遺伝子を発現する若い側芽が生殖成長に移行せず、でそのまま栄養成長を継続する。こうした研究から、*A. alpina* は個体として栄養成長と生殖成長を繰り返す事が可能である事が示された。

Tsiantis らのグループは、複葉を形成するアブラナ科のミチタネツケバナ *C. hirsuta* を用いて、EMS を変異原として複葉形成に異常を示す変異体の単離解析を行い、単葉を形成するシロイヌナズナと比較する事で複葉形成の進化機構の研究を行っている。彼らのグループはこれまでに複葉が単純化する変異体として、*chpin1* (Barkoulas et al. 2008), *chstm*, *chbp*, *chcuc2* (Rast-Somssich et al. 2015), *sil3* (Kougioumoutzi et al. 2013), *rco* (Vlad et al. 2014)、複葉が複雑化する変異体として、*chas1* (Hey & Tsiantis 2006), *par* (Rast-Somssich et al. 2015) を単離している。これら変異体の原因遺伝子のうち、*ChPIN1*, *ChSTM*, *ChBP*, *ChCUC2*, *ChASI*, *PAR* は、それぞれシロイヌナズナにおいて葉の鋸歯や小葉形成に関わる *ASI*, *PIN1*, *STM*, *BP*, *CUC2*, *ASI*, *MIR164A* 遺伝子の相同遺伝子であった。この事から、ミチタネツケバナの複葉とシロイヌナズナの鋸歯は共通する分子機構によって形成されている事が遺伝学的に示された。また、ミチタネツケバナとシロイヌナズナの相同遺伝子の多重変異体の表現型の比較から制御ネットワークの違いが複葉と鋸歯の違いを生み出している事が示された (Rast-Somssich et al. 2015)。*rco1* 変異体の原因遺伝子 *RCOI* はシロイヌナズナゲノム中に機能的な相同遺伝子がなく、また、ミチタネツケバナの *RCOI* 遺伝子をシロイヌナズナに形質転換する事で葉の形態の複雑さが上昇する (Vlad et al. 2014)。アブラナ科における *RCOI* の相同遺伝子の系統解析から、*RCOI* 遺伝子はアブラナ科が誕生した初期に生まれ、その後、シロイヌナズナにおいて *RCOI* 相同遺伝子が失われた事が明らかとなった。さらに、*sil3* 変異体の原因遺伝子はリボソーム合成に関わる *RLL2* の相同遺伝子であった事から、リボソーム合成が複葉形成に関わる事を示唆した (Kougioumoutzi et al. 2013)。

Dolan らのグループはゼニゴケ *Marchantia polymorpha* を用いて、種子植物が持たない仮根形成の制御機構について研究を行っている。(Proust et al. 2016)。彼らは T-DNA 挿入による変異体を作成し、仮根を形成しない変異体を単離・解析したところ、bHLH 型の転写因子をコードする *MpRSL* 遺伝子に T-

DNA が挿入していた。彼らのグループは以前 *MpRSL* のシロイヌナズナ相同遺伝子 *RHD6* が根毛形成を制御する事と、ヒメツリガネゴケ相同遺伝子 *PpRSL* が仮根の発達に重要であることを示していた (Menand et al. 2007)。ゼニゴケ *MpRSL* の変異体は、仮根形成不全に加えて、無性芽も形成しない。これらの結果から、種子植物の胞子体が持つ根毛とコケ植物の配偶体がもつ仮根と無性芽は、同じ転写因子による制御機構から進化してきた事が示された。

著者らのグループは、根の放射パターンの進化に興味を持って研究を行っており、特に皮層の層数が種間で異なる事に注目して研究を行っている。シロイヌナズナとミチタネツケバナ *Cardamine hirsuta* は同じアブラナ科の植物でありながら、それぞれの根の皮層の層数は1層、2層と異なっている。一般的に、維管束植物の根の皮層と内皮は共通の皮層内皮始原細胞に由来しており、すべての皮層内皮始原細胞が複数回植物種ごとに決まった回数だけ並層分裂する事で、秩序だった同心円上の細胞の並びが生み出されている (Wiliums 1947, 豊倉ら, 未発表)。ミチタネツケバナを EMS により変異原処理して得られた、皮層の層数が2層から1層に減少する変異体を用いた解析を行っている (豊倉ら, 未発表)。得られた変異体のうち、皮層と内皮を合わせた細胞層を **ground tissue** と呼ぶ事から名付けた1層ずつの皮層と内皮を形成する *two ground tissue layer 1 (tgr1)* 変異体は、サイトカニンの受容体に変異を持つ事を明らかにした。現在、詳細な解析を進めているところであるが、細胞ごとのサイトカニン応答性が種ごとに進化した事でそれぞれの種が独自の根の放射パターンを持つ様になったと考えている。

これら紹介した研究のように、順遺伝学的研究によって明らかになる変異体の原因遺伝子は、モデル植物においてすでに十分に機能が解析されている遺伝子の相同遺伝子である場合や、モデル植物が機能的相同遺伝子を持たないため全く解析されていない遺伝子である場合など様々なケースがある。すでに、相同遺伝子の機能の理解が進んでいる場合は、コードするタンパク質の機能や、その遺伝子の発現制御機構が進化しているか否かを調べる事で、注目する形質の進化を分子レベルで明らかにする事ができるであろう。一方で、相同遺伝子がモデル植物に存在しない場合には、植物の系統の中で、その遺伝子がいつ生まれ、あるいは、消えたのかを明らかにし、注目する形質と比較する事で分子と形質の進化の関係性を明らかにする事ができるであろう。

このような、変異体の原因遺伝子の同定を必要としない順遺伝学的解析の例として、吉田らのグループによる寄生植物であるコシオガマ *Phtheirospermum japonicum* を用いた研究を紹介したい。多くの寄生植物の吸器は吸器毛と呼ばれる構造を持つが、その意義についてはこれまで議論があった。彼らはコシオガマにおいて EMS による変異原処理で吸器毛形成に異常を示す *hhd1* 変異体と *hhd2* 変異体を単離した (Cui et al. 2016)。これらの変異体の原因遺伝子座は異なるにもかかわらず、どちらの変異体も根毛形成にも異常を示す事から、吸器毛は根毛形成と共通の分子機構で形成されている事が示唆された。また、*hhd1*, *hhd2* 変異体は、宿主としてイネと一緒に培養した時に、形成する吸器数が野生型よりも減少する事から、吸器毛は吸器形成に重要であることを示された (Cui et al. 2016)。この研究のように、同じ表現型を示す複数遺伝子座の変異体を得る事ができれば、原因遺伝子を同定する事なくモデル植物が持たない形質の機能や分子機構について明らかにする事も可能である。

3. 順遺伝学的手法の概略

順遺伝学の研究は大きく分けて、1) 純系, もしくは, 近交系の確立 (図 1A), 2) 変異体の作出, 3) スクリーニング (図 1B), 4) 原因遺伝子の同定 (図 1D、E), という 4 段階で構成されている。以下に, それぞれについて, 具体的な例を交えて説明したい。

3-1. 純系, もしくは, 近交系の確立

純系とは全ての遺伝子についてホモな系統 (岩波 生物学辞典 第4版) の事であり, 近交系とは近親交配をくり返す事によって, 大多数の遺伝子座でホモ接合体になっている系統 (岩波 生物学辞典 第4版) の事である。純系・近交系の子孫は遺伝的に均質であるため, 少数の遺伝子の突然変異による効果や環境変化による効果を緻密に解析する事が可能となる。

自家和合性を示す植物の場合は, 他個体からの花粉と交配しないように自家受粉による世代交代をくり返し行う事によって純系を確立できる。一般的に, こうした自殖を 8 回以上行った系統を純系として扱う事が多い。自殖が優先的に起こる植物の場合は元々ホモ接合体となっている遺伝子座が多いと考えられるため, 8 世代よりも短い世代数で表現型の固定が起こる事も多い。また, 薬培養や花粉培養により半数体植物を得たのち, コルヒチン処理や自然におこる核倍加により迅速に純系を得る事も可能である。

自家不和合性を示す植物の場合は, 人為的に蓄受粉や老化受粉により自家不和合性を回避して自殖をくり返す事で, 純系を作出する事が可能である。しかしながら, 自家不和合性を示す植物は有害変異をヘテロで保有するため, 自殖をくり返すと近交弱勢により生育不全を示し純系の確立が困難となる場合もある。この場合は, 異なる個体間の交配を行い, 得られた兄弟個体同士の交配を繰り返す事により, 効率的に有害変異を排除しつつ大多数の遺伝子座をホモ接合体にする事ができる (近交系)。

3-2. 変異体の作出

無作為に遺伝子の破壊を行う方法 (random mutagenesis) としては, X 線, ガンマ線, 速中性子線, 重イオンビームなどの放射線照射, エチルメタンサルホン酸 (ethyl methanesulfonate, EMS), メチルメタンサルホン酸 (methyl methanesulfonate, MMS), エチルニトロソ尿素 (ethylnitrosourea, ENU) やメチルニトロソ尿素 (methylnitrosourea, MNU) などのアルキル化薬剤処理, 形質転換による外来遺伝子の挿入がある。

ガンマ線, 速中性子線, 重イオンビームはゲノムの大きな欠失を引き起こす事ができるため変異体が効率よく得られる。しかしながら, 染色体の転座や逆位などを伴う事も多くその後の遺伝解析が難しい場合も多い。

アルキル化薬剤処理は主に, グアニンの 6 位の O のアルキル化により G:C 対から A:T 対への変異を引き起こすと考えられている。ただし, グアニンや他の塩基のアルキル化に伴う DNA 修復時のエラーなどによる数塩基の挿入・欠失, G:C 対から A:T 対以外の変異も生じうる。筆者の経験から, シロイヌナズナに対して 0.3% EMS を一晩処理した場合, 数百遺伝子のコード領域にアミノ酸置換を伴う塩基置換が生じる (図 1B)。放射線照射, および, 薬剤処理は種子, 個体, 花粉等に対して行う。

外来遺伝子の導入としては, 薬剤耐性遺伝子を含む DNA をアグロバクテリウム法やパーティクルボンバートメント法により植物に形質転換し, 薬剤耐性を指標に組み換え個体を選抜する。アグロバクテリウム法の場合はシロイヌナズナの場合平均して 1 から 2 遺伝子座に T-DNA が挿入される。遺

伝子組換え生物として扱う必要がある点が難点であるが、全ゲノム配列が明らかでない場合でも原因遺伝子の同定に至る事ができる（後述）。また、内在性・外来性のトランスポゾンを変性化させて、遺伝子破壊を行う方法もある。

このように、それぞれの変異体の作出方法には一長一短があり、複数の方法で変異体を作成するのが理想的である。

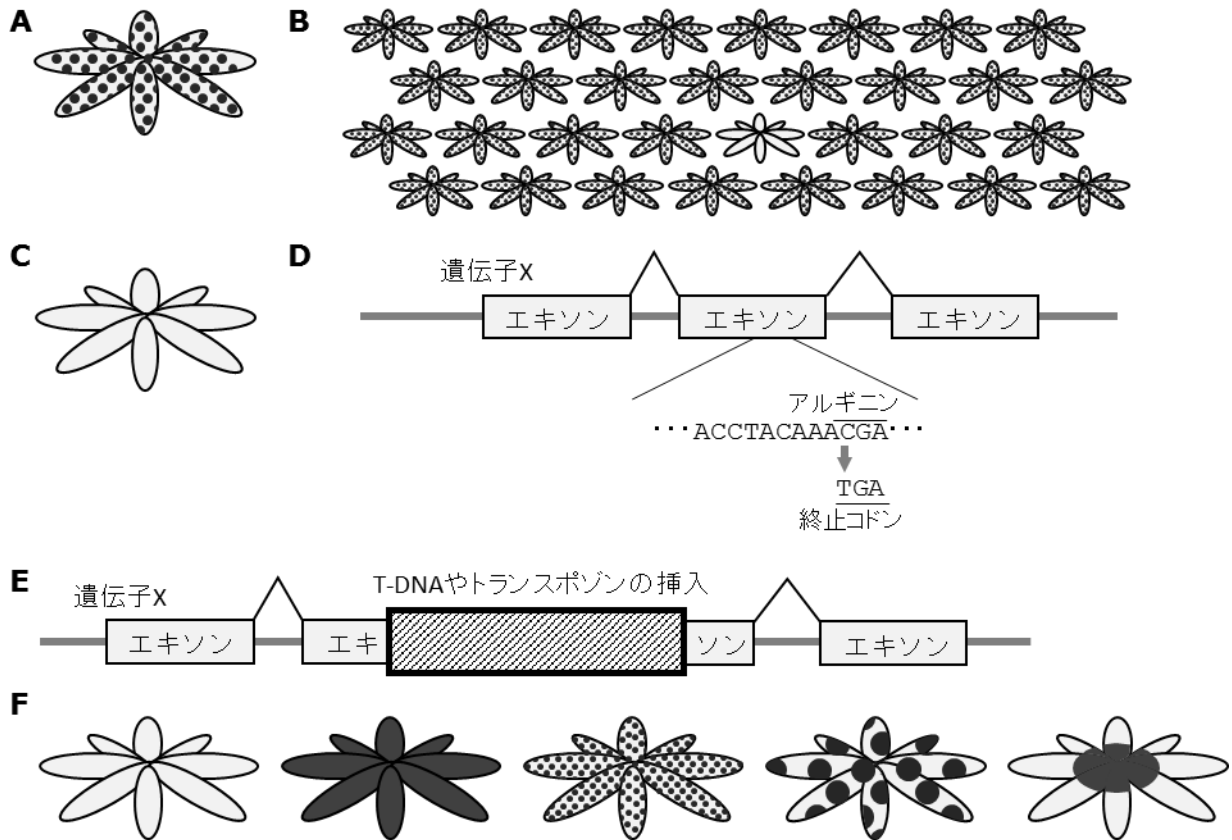


図1. 順遺伝学の例

A) ロゼット葉に水玉模様をもつ植物種がどのように進化したかを知るために順遺伝学的に解析する。遺伝解析を容易にするために、数世代自殖させ遺伝背景を均一にしておくことが望ましい。B) 親株Aに変異原処理を施し、水玉模様を持たない個体（突然変異体、3段目左から5個体目）を単離する。C) 突然変異体を親株Aに複数回戻し交配して原因遺伝子以外の遺伝背景を親株と同一にする。D) 薬剤による変異の場合は、1塩基が別の塩基に置換している場合が多く、例えば、遺伝子Xのうちのアルギニンをコードする塩基配列（CGA）が終止コドン（TGA）に変異することにより、異常な遺伝子産物が作られていると予想される。E) 外来遺伝子の挿入の例。遺伝子Xの途中に外来遺伝子が挿入することで異常な遺伝子産物が作られると予想される。F) 多様な模様を持つ近縁種において、遺伝子Xの機能や発現制御を調べることでロゼット葉の模様の進化を分子遺伝学的に明らかにすることができる。

3-3. スクリーニング

スクリーニングでは、無作為な遺伝子に変異を導入した集団から注目する形質が親株と異なる個体・系統を選び出す（図1B）。例えば、ある器官や組織の形態形成に関わる遺伝子を探索する目的であれば、その器官や組織に異常を示す変異体を選び出す事になる。変異原処理により得られる変異体の多くは遺伝子の機能欠損を引き起こす変異により形態異常を示す。また、変異原処理した世代（M1個

体)においては対となる相同染色体のゲノムの片方だけに変異が引き起こされる事から、スクリーニングは一般的に、変異原処理した世代の次の世代 (M2 個体: 変異をホモに持つ個体が生じると考えられる) で行う。

スクリーニングにおいて注意すべき重要な点は、その器官や組織の形態形成に異常を示す変異体として、具体的にどのような表現型がありうるのかを事前に考えておき、そのような表現型が確かめられるような栽培・観察方法でスクリーニングする事である。そのためには、変異原処理をする前の親系統を用いて、スクリーニングのための栽培・観察方法の条件検討を行うとよい。例えば、ある植物において特定の器官の数が温度によって多少する場合、一定の温度で栽培しなければその器官の数の変異体を単離する事は難しいだろう。ただし、親株においても注目する形質が低い一定の確率で異常を示すような場合もあり、そのような形質をスクリーニングする時は変異体候補の次世代個体 (M3 個体) を用いて二次スクリーニングを行う必要がある。

形態形成に異常を示す変異体の場合は、生育不全などにより M3 個体が得られない可能性も十分に考慮しておく必要がある。このような変異が劣性変異や半優性変異の場合、1つの M1 個体に由来する M2 世代の種子をそれぞれ別々のバッチに分けて保存しておく。こうする事で、M3 個体が出現する同じバッチの別の M2 個体から、目的の変異をヘテロで持つ個体が見られると期待される。ヘテロ個体は次の世代で目的の表現型を示す変異体が見られるかどうかで判断できる。このような変異体はヘテロ世代で維持をしていく必要がある。

得られた変異体は原因となる遺伝子の変異だけでなく、別の無関係な遺伝子にも変異を持っていると考えられる。そこで、表現型の詳細な解析のためには親系統と連続的に複数回交配を行う必要がある。理論上は1回の親系統との交配により表現型と無関係な変異の半分を除く事ができる。10回親系統との交配を行えば原因遺伝子と連鎖している変異以外は0.1%程度にまで減らす事ができるが、シロイヌナズナの研究の場合、親系統との交配を2, 3回だけ行ったものを表現型解析に用いている場合も多い。

3-4. 原因遺伝子の同定

原因遺伝子の同定法は、変異原の種類によって大きく2つある。1つは、T-DNA やトランスポゾン の挿入による変異の場合 (図1E) で、TAIL-PCR 法やインバース PCR 法を用いて挿入配列に隣接するゲノム配列を同定する事によりどの遺伝子が破壊されているのかを調べる方法である。利点として、ゲノム配列が明らかとなっていない種であっても、外来遺伝子の挿入領域周辺のゲノム配列だけを解析する事で原因となる遺伝子を迅速に同定する事ができる。

一方、EMS 等の薬剤処理による変異導入の場合、ゲノム上の多型マーカーの中から表現型と連鎖する多型マーカーを探索し、その近傍のゲノム領域の配列を野生型と変異体との間で比較する事で原因遺伝子の同定を行う必要がある。ゲノム上の多型マーカーとしては、変異体の親株系統とは異なる系統との間にみられるゲノム配列の多型を PCR や制限酵素処理によって見分けるマーカーを用いる事が一般的である。しかしながら、この方法には、対象とする生物の全ゲノム配列の解読や、組換えを利用した遺伝地図の整備が必要であり、どのような植物の場合でもすぐに可能というわけではない。近年、次世代シーケンサーによりゲノムシーケンスが比較的安価・容易に行う事ができるようになってきた。全ゲノムの配列を完全に決定するのはまだ難しい点が多いが、次世代シーケンサーに

より得られた断片的なゲノム配列を野生型と変異体との間で比較する事によって塩基置換などの突然変異を同定する事が可能である (Nordstrom et al. 2013)。また、最近では年々、次世代シーケンサーの1リードあたりの解読可能な配列長も長くなっており、野生型のゲノムシーケンスのデータから簡単なゲノムアセンブリを行い、それに対して変異体のゲノムシーケンスのデータをマッピングして変異を同定する事もできる。今やこれらの解析は一般的なデスクトップコンピューターを用いて数日で完了する。これらの技術革新により EMS 等の薬剤処理による変異導入であっても迅速に原因遺伝子の同定を行う事ができるようになってきたと言える。

どのような方法で変異を同定した場合であっても、その変異が注目する表現型をもたらしているか否かを調べる事が必要となる。変異体と親株とを交配して得られた F2 世代において表現型と変異の遺伝的連鎖を調べる事で、それを明らかにできる。例えば、変異を持つものにもかかわらず表現型を示さない個体が出た場合は、その変異は注目する表現型の原因遺伝子ではないと考える。また、原因遺伝子の同定に取り掛かる前に変異体を親株と複数回交配する事で連鎖しない変異を取り除き、注目する表現型と連鎖する変異だけにするのも有効である。さらに、類似の表現型を示す劣勢変異体が複数系統得られた場合、それらを相互に交配して得られる次世代個体 (F1 個体) の表現型解析も重要である。もしも、F1 個体が両親の変異体と同じ表現型を示す場合、同一の遺伝子の変異によりその表現型を示していると考えられる。これらの変異体が同一の遺伝子に異なる変異を持っていれば、注目する表現型の原因遺伝子としてより確からしさが示される。一方、原因遺伝子を同定する別の方法としては、形質転換可能な植物の場合、原因遺伝子の候補遺伝子を含む野生型ゲノムを変異体に形質転換する方法がある。表現型が野生型に戻れば、注目する表現型の原因遺伝子である事を確かめることができる。原因遺伝子の候補が複数ある場合は、それぞれの遺伝子を含む野生型ゲノムを導入する事で、どれが原因遺伝子であるかを確定する事ができる。

ここまで、順遺伝学的手法の概略として4つの段階を紹介した。この手法によって明らかになるのは、注目する形質を(何らかの形で)制御する遺伝子である。そのような遺伝子が、どのような性質を持つタンパク質をコードしているか、どこで発現しているか、種間で保存されているか、といった疑問について、生化学、分子遺伝学、系統学などの手法と組み合わせて研究を進めていく事で、形態進化の理解がさらに進むと考えている。

4. おわりに

およそ30年前に、シロイヌナズナをモデル植物とした遺伝学研究が本格的に始まり、これまで根、茎、葉、花、など多くの種子植物に共通した器官の形態形成の仕組みが分子レベルで明らかにされてきた。その後、この知見を元にした逆遺伝学的研究によって、自然界に存在する多様な植物の形態形成機構の理解が進んできた。そして最近では、逆遺伝学的研究に加えて順遺伝学的研究を行う事で、モデル植物では得られない新しい知見が次々と明らかにされ始めてきた。形態形成に限らず、植物が示す様々な生理応答も植物種によって多様に進化している。今後、多様な植物の発生や生理応答の進化を分子レベルで明らかにしていく研究が、順遺伝学的手法を取り入れる事でモデル植物の研究からは想像もできなかったような新しい発見へとつながっていく事を期待している。

謝辞

本稿で述べた著者らの研究について、神戸大学大学院理学研究科の岡本佳枝、瀬良史織両氏による支援と文部科学省・科学研究費補助金の助成に感謝いたします。大阪大学大学院理学研究科の飯田浩行氏の有意義なコメントに感謝いたします。

引用文献

- Barkoulas, M., Hay, A., Kougioumoutzi, E., & Tsiantis, M. 2008. A developmental framework for dissected leaf formation in the *Arabidopsis* relative *Cardamine hirsuta*. *Nat. Genet.* 40: 1136-1141.
- Bergonzi, S., Albani, M.C., van Themaat, E.V.L., Nordström, K.J., Wang, R., Schneeberger, K., Moerland P.D., & Coupland, G. 2013. Mechanisms of age-dependent response to winter temperature in perennial flowering of *Arabis alpina*. *Science* 340: 1094-1097.
- Cui, S., Wakatake, T., Hashimoto, K., Saucet, S., Toyooka, K., Yoshida, S., & Shirasu, K. 2016. Haustorial hairs are specialized root hairs that support parasitism in the facultative parasitic plant, *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Physiol.* 170:1492-1503.
- Hay, A. & Tsiantis, M. 2006. The genetic basis for differences in leaf form between *Arabidopsis thaliana* and its wild relative *Cardamine hirsuta*. *Nat. Genet.* 38: 942-947.
- Kougioumoutzi, E., Cartolano, M., Canales, C., Dupré, M., Bramsiepe, J., Vlad, D., Rast, M., Dello Ioio, R., Tattersall, A., Schnittger, A., Hay, A., & Tsiantis, M. 2013. *SIMPLE LEAF3* encodes a ribosome - associated protein required for leaflet development in *Cardamine hirsuta*. *Plant J.* 73: 533-545.
- Menand, B., Yi, K., Jouannic, S., Hoffmann, L., Ryan, E., Linstead, P., Schaefer, D.G., & Dolan, L. 2007. An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science* 316: 1477-1480.
- Nikolov, L.A. & Tsiantis, M. 2015. Interspecies Gene Transfer as a Method for Understanding the Genetic Basis for Evolutionary Change: Progress, Pitfalls, and Prospects. *Front. Plant Sci.* 6: 01135
- Nordström, K.J., Albani, M. C., James, G. V., Gutjahr, C., Hartwig, B., Turck, F., Paszkowski, U., Coupland, G., & Schneeberger, K. 2013. Mutation identification by direct comparison of whole-genome sequencing data from mutant and wild-type individuals using k-mers. *Nat. Biotechnol.* 31: 325-330.
- Proust, H., Honkanen, S., Jones, V.A., Morieri, G., Prescott, H., Kelly, S., Ishizaki, K., Kohchi, T., & Dolan, L. 2016. *RSL* class I genes controlled the development of epidermal structures in the common ancestor of land plants. *Curr. Biol.* 26: 93-99.
- Rast-Somssich, M. I., Broholm, S., Jenkins, H., Canales, C., Vlad, D., Kwantes, M., Bilsborough, G., Dello Ioio, R., Ewing, R.M., Laufs, P., Huijser, P., Ohno, C., Heisler, M.G., Hay, A., & Tsiantis, M. 2015. Alternate wiring of a *KNOX1* genetic network underlies differences in leaf development of *A. thaliana* and *C. hirsuta*. *Genes. Dev.* 29: 2391-2404.
- Vlad, D., Kierzkowski, D., Rast, M. I., Vuolo, F., Dello Ioio, R., Galinha, C., Gan, X., Hajheidari, M., Hay, A., Smith, R.S., Huijser, P., Bailey, C.D., & Tsiantis, M. 2014. Leaf shape evolution through duplication, regulatory diversification, and loss of a homeobox gene. *Science* 343: 780-783.
- Wang, R., Farrona, S., Vincent, C., Joecker, A., Schoof, H., Turck, F., Alonso-Blance, C., Coupland, G., & Albani, M. C. 2009. *PEP1* regulates perennial flowering in *Arabis alpina*. *Nature* 459: 423-427.

Williams, B.C. 1947. The structure of the meristematic root tip and origin of the primary tissues in the roots of vascular plants. *Am. J. Bot.* 34: 455-462.