

## ポストゲノム時代の植物進化研究

オーガナイザー

豊倉 浩一

神戸大学理学系研究科

市橋 泰範

理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Koichi Toyokura<sup>1,2</sup> and Yasunori Ichihashi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science, Kobe University, Rokkodai 1-1, Kobe, 657-8501, Japan

<sup>2</sup>Graduate School of Science, Osaka University, Machikaneyamacho 1-1, Toyonaka,  
560-0043, Japan

<sup>3</sup>RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Yokohama, Kanagawa, 230-0045 Japan

植物の進化における多くの知見は、多種多様な植物を分類することに端を発し、その分類群に時間軸を加えた系統学から生じてきた。形態などの特徴的な形質から系統関係を類推する古典的な手法に加え、分子系統学としてDNAの塩基配列情報をもとにより詳細かつ正確に系統関係を類推することができるようになってきた。そのような系統学の進展によって、例えば被子植物は現時点で350,000種が認識されており、主要被子植物(Mesangiospermae)はジュラ紀中後期に多様化したことが明らかになっている(Zeng et al. 2014)。このように多様化した植物種が示す多種多様な形態は、ジュラ紀の昆虫だけでなく我々植物学者を含む多くの人々を魅了するのに十分であると言えるだろう。加えて分子生物学的技術が進展することにより、遺伝子レベルでの解析が進化研究に適用され、個々の博物学的な研究から系統間を通して一般的な議論ができるようになったことは特筆すべきことである。またシロイヌナズナやイネをはじめとするモデル植物ではゲノム解読が完了し(The Arabidopsis Initiative. 2000; Yu et al. 2002; Goff et al. 2002)，逆遺伝学的な手法を応用することで、順遺伝学的手法では明らかにできなかったような遺伝子の機能(例えば機能重複など)にも迫ることができるようになってきた。近年では、次世代シークエンサー等の新技術により多くの植物種のゲノム解読が可能となり、単細胞藻類 *Chlamydomonas* (Merchant et al. 2007) から、車軸藻植物 *Klebsormidium* (Hori et al. 2014)、コケ植物 *Physcomitrella* (Rensing et al. 2008)、シダ植物 *Selaginella* (Banks et al. 2011)、裸子植物オウシュウトウヒ (Nystedt et al. 2013)、基部被子植物 *Amborella* (Amborella Genome Project. 2013) などのゲノム配列が明らかにされており、進

K. Toyokura & Y. Ichihashi -1

化系統関係上重要な植物の理解がさらに進んできている。しかし、このような目覚ましい技術進歩によりゲノムを解読しても、植物形態・生理応答の多様性の理解はなかなかつながらないのが現状である。むしろゲノムレベルの解析の垣根が低くなつた分、それぞれの研究者にはよりオリジナルな視点が要求される時代となっている。そのようなポストゲノム時代の植物進化研究は今後どう進めていくべきだろうか？現在、私たちはゲノム情報を中心として様々解析手法を手に入れており、その知見・技術を使って、前人未踏の分野である植物進化の真理を理解できる時代が、まさに今である。

そこで本総説シリーズでは、順遺伝学・遺伝子配列解析・トランスクリプトーム解析など様々な解析手法を駆使したポストゲノム時代の進化研究をそれぞれの研究分野の背景とともに紹介する。まず、アブラナ科の根の形態進化を対象に順遺伝学的手法を使った研究を論じ、非モデル植物から順遺伝学的に重要な遺伝子へ迫る内容である。次に、水生植物カワゴケソウ科の多様化についてゲノムワイドに遺伝子配列を比較した研究を論じ、ATGC の配列から進化スケールで何が起きたか明らかにしていく内容となっている。さらに、トマト近縁種の葉の形態進化を対象にトランスクリプトーム解析を使った研究を論じ、トランスクリプトーム解析とその下流解析であるネットワーク解析の有効性について議論している。ぜひ今回紹介する話題から植物進化研究の広がりを感じ、そして次の波を想像することを楽しんでいただきたい。

現在はまだ多くの研究において、それぞれの研究対象とする植物種で研究が完結しているため、私たちの植物進化における知識は博物学的要素が強い雑多な集合と言わざるを得ない。しかし近い将来、ゲノムという共通言語をもとに、種や系統群を越えた次世代型の植物進化研究が始まり、植物進化ひいては生物進化の一般性の理解が期待できるではないかと思っている。今回の総説が、その小さな第一歩として、植物進化に興味がある皆さんのが今後研究展開へ少しでも参考になることを願っている。

本総説は、日本植物学会第 79 回大会（2015 年 9 月）で開催されたシンポジウムの講演内容を再構成したものである。シンポジウムの開催にあたってお世話になりました大会実行委員の先生方、レビュー執筆の機会を与えてくださった電子出版物編集委員の先生方にこの場を借りて厚くお礼申し上げたい。

## 引用文献

- Amborella* Genome Project. 2013. The *Amborella* genome and the evolution of flowering plants. *Science* 342: 1467.
- Banks, J.A. Nishiyama, T. Hasebe, M. Bowman, J.L. Grubbskov, M. dePamphilis, C. Albert, V.A. Aono, N. Aoyama, T. Ambrose, B.A. Ashton, N.W. Axtell, M.J. Barker, E. Barker, M.S. Bennetzen, J.L. Bonawitz, N.D. Chapple, C. Cheng, C. Correa, L.G.G. Dacre, M. DeBarry, J. Dreyer, I. Elias, M. Engstrom, E.M. Estelle, M. Feng, L. Finet, C. Floyd, S.K. Frommer, W.B. Fujita, T. Gramzow, L.

- Gutensohn, M. Harholt, J. Hattori, M. Heyl, A. Hirai, T. Hiwatashi, Y. Ishikawa, M. Iwata, M. Karol, K.G. Koehler, B. Kolukisaoglu, U. Kubo, M. Kurata, T. Lalonde, S. Li, K. Li, Y. Litt, A. Lyons, E. Manning, G. Maruyama, T. Michael, T.P. Mikami, K. Miyazaki, S. Morinaga, S.i. Murata, T. Mueller - Roeber, B. Nelson, D.R. Obara, M. Oguri, Y. Olmstead, R.G. Onodera, N. Petersen, B.L. Pils, B. Prigge, M. Rensing, S.A. Riaño-Pachón, D.M. Roberts, A.W. Sato, Y. Scheller, H.V. Schulz, B. Schulz, C. Shakirov, E.V. Shibagaki, N. Shinohara, N. Shippen, D.E. Sørensen, I. Sotooka, R. Sugimoto, N. Sugita, M. Sumikawa, N. Tanurdzic, M. Theissen, G. Ulvskov, P. Wakazuki, S. Weng, J.K. Willats, W.W.G.T. Wipf, D. Wolf, P.G. Yang, L. Zimmer, A.D. Zhu, Q. Mitros, T. Hellsten, U. Loqué, D. Otellar, R. Salamov, A. Schmutz, J. Shapiro, H. Lindquist, E. Lucas, S. Rokhsar, D., & Grigoriev, I.V. 2011. The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332: 960-963.
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.-H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W.-I., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T.C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R.M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalma, T., Oliphant, A., & Briggs, S. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296: 92-100.
- Hori, K., Maruyama, F., Fujisawa, T., Togashi, T., Yamamoto, N., Seo, M., Sato, S., Yamada, T., Mori, H., Tajima, N., Moriyama, T., Ikeuchi, M., Watanabe, M., Wada, H., Kobayashi, K., Saito, M., Masuda, T., Sasaki-Sekimoto, Y., Mashiguchi, K., Awai, K., Shimojima, M., Masuda, S., Iwai, M., Nobusawa, T., Narise, T., Kondo, S., Saito, H., Sato, R., Murakawa, M., Ihara, Y., Oshima-Yamada, Y., Ohtaka, K., Satoh, M., Sonobe, K., Ishii, M., Ohtani, R., Kanamori-Sato, M., Honoki, R., Miyazaki, D., Mochizuki, H., Umetsu, J., Higashi, K., Shibata, D., Kamiya, Y., Sato, N., Nakamura, Y., Tabata, S., Ida, S., Kurokawa, K., & Ohta, H. 2014. *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature commun.* 5.
- The Arabidopsis Initiative 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- 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. Lucas, S.M. Grimwood, J. Schmutz, J. Cardol, P. Cerutti, H. Chanfreau, G. Chen, C.-L. Cognat, V. Croft, M.T. Dent, R. Dutcher, S. Fernández, E. Fukuzawa, H. González-Ballester, D. González-Halphen, D. Hallmann, A. Hanikenne, M. Hippler, M. Inwood, W. Jabbari, K. Kalanon,

M. Kuras, R. Lefebvre, P.A. Lemaire, S.D. Lobanov, A.V. Lohr, M. Manuell, A. Meier, I. Mets, L. Mittag, M. Mittelmeier, T. Moroney, J.V. Moseley, J. Napoli, C. Nedelcu, A.M. Niyogi, K. Novoselov, S.V. Paulsen, I.T. Pazour, G. Purton, S. Ral, J.-P. Riaño-Pachón, D.M. Riekhof, W. Rymarquis, L. Schröda, M. Stern, D. Umen, J. Willows, R. Wilson, N. Zimmer, S.L. Allmer, J. Balk, J. Bisova, K. Chen, C.-J. Elias, M. Gendler, K. Hauser, C. Lamb, M.R. Ledford, H. Long, J.C. Minagawa, J. Page, M.D. Pan, J. Pootakham, W. Roje, S. Rose, A. Stahlberg, E. Terauchi, A.M. Yang, P. Ball, S. Bowler, C. Dieckmann, C.L. Gladyshev, V.N. Green, P. Jorgensen, R. Mayfield, S. Mueller-Roeber, B. Rajamani, S. Sayre, R.T. Brokstein, P. Dubchak, I. Goodstein, D. Hornick, L. Huang, Y.W. Jhaveri, J. Luo, Y. Martínez, D. Ngau, W.C.A. Otillar, B. Poliakov, A. Porter, A. Szajkowski, L. Werner, G. Zhou, K. Grigoriev, I.V. Rokhsar, D.S., & Grossman, A.R. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245-250.

Nystedt, B., Street, N.R., Wetterbom, A., Zuccolo, A., Lin, Y.-C., Scofield, D.G., Vezzi, F., Delhomme, N., Giacomello, S., Alexeyenko, A., Vicedomini, R., Sahlin, K., Sherwood, E., Elfstrand, M., Gramzow, L., Holmberg, K., Hallman, J., Keech, O., Klasson, L., Koriabine, M., Kucukoglu, M., Kaller, M., Luthman, J., Lysholm, F., Niittyla, T., Olson, A., Rilakovic, N., Ritland, C., Rossello, J.A., Sena, J., Svensson, T., Talavera-Lopez, C., Theiszen, G., Tuominen, H., Vanneste, K., Wu, Z.-Q., Zhang, B., Zerbe, P., Arvestad, L., Bhalerao, R., Bohlmann, J., Bousquet, J., Garcia Gil, R., Hvidsten, T.R., de Jong, P., MacKay, J., Morgante, M., Ritland, K., Sundberg, B., Lee Thompson, S., Van de Peer, Y., Andersson, B., Nilsson, O., Ingvarsson, P.K., Lundeberg, J., & Jansson, S. 2013. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* 497: 579-584.

Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G.K.-S., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, C., Tong, W., Cong, L., Geng, J., Han, Y., Li, L., Li, W., Hu, G., Huang, X., Li, W., Li, J., Liu, Z., Li, L., Liu, J., Qi, Q., Liu, J., Li, L., Li, T., Wang, X., Lu, H., Wu, T., Zhu, M., Ni, P., Han, H., Dong, W., Ren, X., Feng, X., Cui, P., Li, X., Wang, H., Xu, X., Zhai, W., Xu, Z., Zhang, J., He, S., Zhang, J., Xu, J., Zhang, K., Zheng, X., Dong, J., Zeng, W., Tao, L., Ye, J., Tan, J., Ren, X., Chen, X., He, J., Liu, D., Tian, W., Tian, C., Xia, H., Bao, Q., Li, G., Gao, H., Cao, T., Wang, J., Zhao, W., Li, P., Chen, W., Wang, X., Zhang, Y., Hu, J., Wang, J., Liu, S., Yang, J., Zhang, G., Xiong, Y., Li, Z., Mao, L., Zhou, C., Zhu, Z., Chen, R., Hao, B., Zheng, W., Chen, S., Guo, W., Li, G., Liu, S., Tao, M., Wang, J., Zhu, L., Yuan, L., & Yang, H. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296: 79-92.

Zeng, L., Zhang, Q., Sun, R., Kong, H., Zhang, N., & Ma, H. 2014. Resolution of deep angiosperm phylogeny using conserved nuclear genes and estimates of early divergence times. *Nat. Commun.*

5: 4956

## 植物の進化発生研究における順遺伝学的解析

豊倉 浩一<sup>1,2</sup>, 深城 英弘<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>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<sup>1,2</sup> and Hidehiro Fukaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science, Kobe University, Rokkodai 1-1, Kobe, 657-8501, Japan

<sup>2</sup>Graduate 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、次世代シークエ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が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は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 *perpetual 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ない。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、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*, *PINI*, *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 *RCO1* 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 *RCO1* 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 *RCO1* の相同遺伝子の系統解析から、*RCO1* 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 *RCO1* 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 *RLI2* 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出し、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事を示していた (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 (tgrl)* 変異体は、サイトカイ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イ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 *hhdl* 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に分子機構で形成されている事が示唆された。また、*hhdl*, *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事が示された (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。自殖が優先的にお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おこる事も多い。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, エチルメタンスルホン酸(ethyl methanesulfonate, EMS), メチルメタンスルホン酸(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, シロイスナズナに対して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ス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活性化させて、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出するのが理想的である。

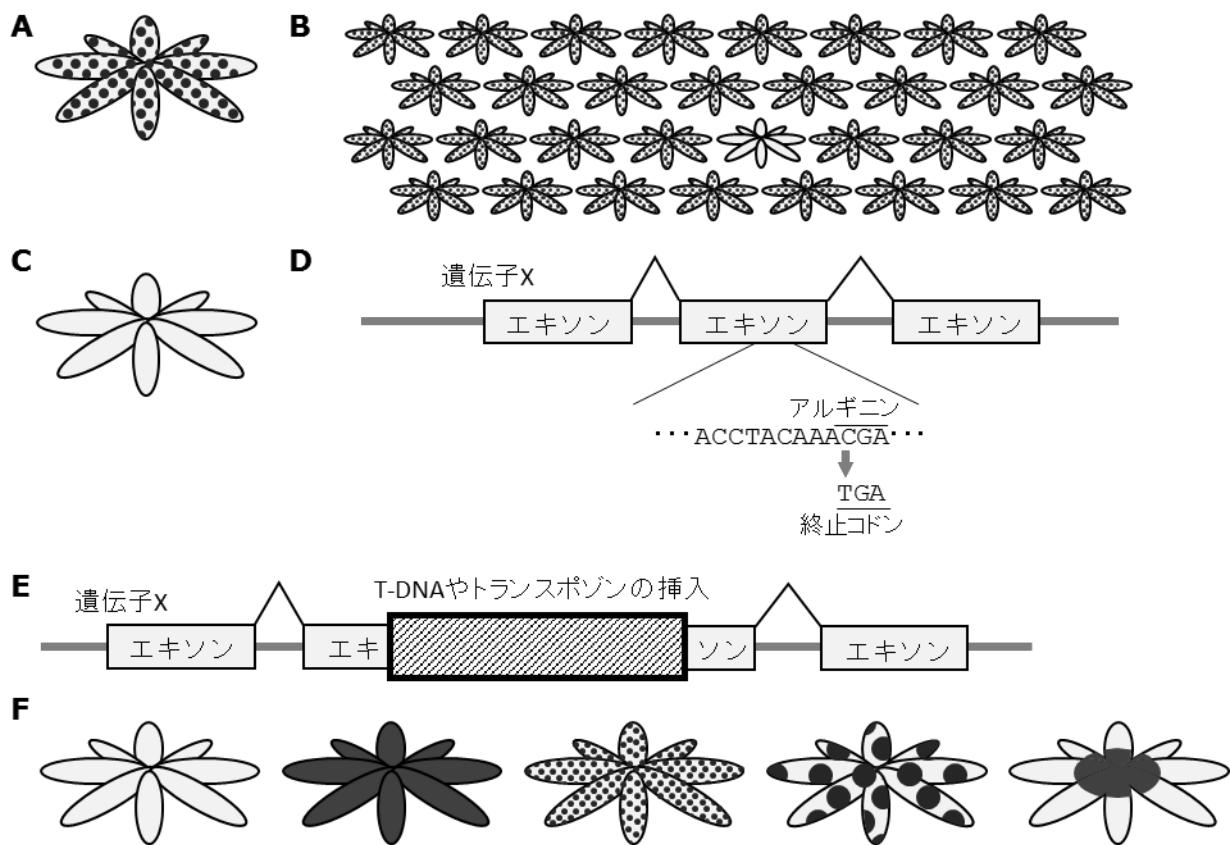


図 1. 順遺伝学の例

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じにする。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によりロゼット葉の模様の進化を分子遺伝学的に明らかにできる。

### 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得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得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査し、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、次世代シークエンサーによりゲノムシークエンスが比較的安価・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、次世代シークエンサーに

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、次世代シークエンサーの1リードあたりの解読可能な配列長も長くなっています、野生型のゲノムシークエ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クエ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つたような新しい発見へ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., Kougoumoutzi, 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.
- Kougoumoutzi, E., Cartolano, M., Canales, C., Dupré, M., Bramsiepe, J., Vlad, D., Rast, M., Dello Iorio, 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 Iorio, 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 Iorio, 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-Blanca, 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.

## 水生被子植物カワゴケソウ科の多様化とその要因

片山なつ

日本学術振興会特別研究員 (PD)

日本女子大学 理学部 物質生物科学科 学術研究員

〒112-8681 東京都文京区目白台 2-8-1

## Diversification of aquatic angiosperms Podostemaceae

Natsu Katayama

Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science

Department of Chemical and Biological Sciences, Japan Women's University

Mejirodai 2-8-1, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8681, Japan

### 1. はじめに

陸上植物の種数は現在約 30 万種とも見積もられており (IUCN 2016), このことはその数だけ種多様性が存在することを意味する。これは、植物が様々な環境へ進出し、その時に、その場その場で、絶滅と適応を繰り返してきた結果である。海へ、山へ、川へ、あるいは我々が見分けることのできない微細な環境の違いに、またあるいは突然の環境変化に適応し、様々な生活形を獲得し、子孫を残してきたのである。分類学や生態学、発生学、細胞学など、扱う時間的空間的スケールは様々であるが、どのような分野においても、生物学を学ぶ限り、生物の発展と分化の歴史における現在という断面を扱っていることに他ならない。そのような研究を通して、我々は生物の実体や生き様をどれだけ理解することができるのだろうか。

上述の内容は、師加藤雅啓先生や岩槻邦男先生の著書「陸上植物の種」(東京大学出版会)から学んだことである。生物の実体や多様性を理解するには、様々な分野の進歩と発展、そしてそれらの情報の統合が不可欠である。

### 2. 水生被子植物カワゴケソウ科

水生の被子植物は約 2800 種が知られている (Cook 1996, 田中 2012)。被子植物を約 27 万種と見積もると、水生植物の占める割合は種数にして 1% にすぎない。一方で水生植物は 78 科 396 属で知られ、様々な分類群に出現する。Cook (1996) によると、被子植物における水生化 (水中への進出) は、少なくとも 50 回、おそらくは 100 回以上独立に起きたと推定されている。なかでも最も種数が多いのはホシクサ科で 6 属約 1000 種、次い

N. Katayama-1

でカヤツリグサ科やイネ科、トウエンソウ科、アヤメ科でそれぞれ 300 種前後が知られているが、これらの大部分は湿生の抽水植物である (Cook 1996)。通常の状態において水中で生育する水生植物のなかでは、カワゴケソウ科が約 300 種と最大で、科内の全ての種が水中環境で生育する。

カワゴケソウ科植物は水生植物の中でも特に変わった生活史をもつ。熱帯や亜熱帯を中心とした温暖な地域に分布し、東アジアや北アメリカの温帯までその分布を広げており、河川の急流域の岩の上にのみ生育することができる。また、雨季と乾季には河川の水位の増減がみられ、この季節的な水位の変動に適応した生活史をもつ。雨季の間には、植物体は完全に水没し、シュートを形成する栄養成長をおこなうが (図 1 A)，その後、乾季になり水位が下がると花芽が形成され始め、植物体が空気中に露出すると開花・結実し、やがて枯死する (図 1 B)。このような環境で、他の科の植物が同所的に生育している姿は見たことがない。このことは、カワゴケソウ科の生育環境が、ほとんどの被子植物にとって生育や適応の難しい環境であることを如実に示している。唯一、熱帯アフリカとマダガスカルに分布するハイドロスタキス科は極めてよく似た環境に生育しているらしい (Van Steenis 1981)。しかし、ハイドロスタキス科には 1 属約 20 種が知られるのみで、現時点ではまだ多様化を遂げてはいない。

カワゴケソウ科は特殊な環境に生態的に適応しただけでなく、劇的な形態進化も遂げている (図 1 C)。通常、被子植物では、シュート系の茎頂分裂組織と根系の根端分裂組織が無限成長をおこない、鉛直方向のボディプランが形成される。それに対し、カワゴケソウ科植物は急流域の岩上に生育するため、鉛直方向の成長が物理的に妨げられる。多くの種で、発芽直後の実生の段階で幼根を失っており、胚軸から生じた不定根が岩上を這い、不定的にシュートを形成しながら成長を続ける。またシュートには、シュート頂に明確な茎頂分裂組織が見られず、葉の基部から葉が形成され、葉が積み重なったようなシュート形成が起きている。頂端分裂組織による鉛直方向の成長を止め、水平方向へボディプランの基軸を変更し、急流中の岩上という特殊な環境へ進出したのだ。

### 3. カワゴケソウ科の形態学

カワゴケソウ科は古くから植物学者の興味を掻き立ててきた。初期の分類学的記載や生態学的記述は 1800 年代から 90 年代初頭にかけて E. Warming や J. C. Willis, C. Cusset などによって行われ、それに続く形態学的研究は 1900 年代前半からアメリカ、ヨーロッパ、インドなど世界中で多くの論文が出版され続けている。日本では、1928 年に今村駿一郎博士が初の日本産カワゴケソウ科植物を報告し (Imamura 1928)，その発見は牧野富太郎

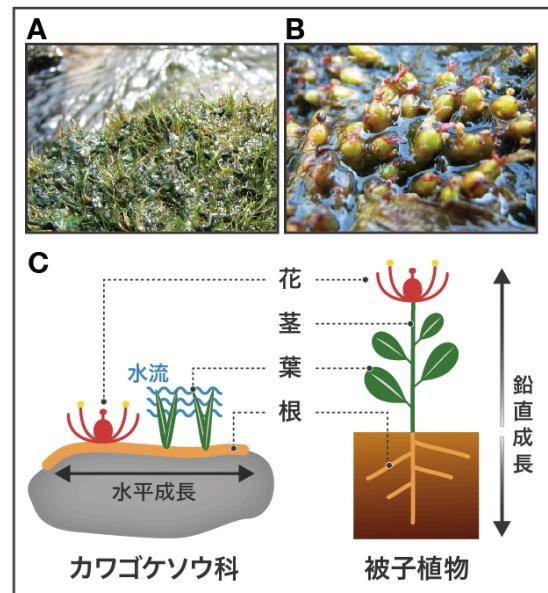


図 1. カワゴケソウ科植物

- A. 栄養期のカワゴロモ：岩を覆う根の上に糸状の葉の束が散在する。
- B. 生殖期のカワゴロモ：根の上に丸い粒のように花が見える。
- C. カワゴケソウ科と一般的な被子植物のボディプランの比較。

博士が「彼ノやっこそうニ次デノ近來ノ大収穫デアル（牧野 1928）」と賞するほどであったようだ。その後、日本産カワゴケソウ科の発見と記載が続き、現在までに 2 属 6 種に整理された (Kato 2008)。海外に遅れをとっていた形態学的研究も、1990 年頃から加藤雅啓博士と今市涼子博士により精密な解析が行われ、現在は世界をリードするに至っている。

カワゴケソウ科の系統と起源については、その被子植物の常識から逸脱した形態ゆえ長らく議論が続いた。L. A. Diels の改訂による 1936 年版のエンゲラ一体系 (Diels 1936) では独立したカワゴケソウ目とされたり、あるいは双子葉類と単子葉類と並ぶ第 3 の亜綱として扱われる (Cusset and Cusset 1988) ことさえあった。分子系統解析より、真正双子葉類バラ亜綱キントラノオ目に含まれ、オトギリソウ科の姉妹群となることが明らかとなっている (Savolinen et al. 2000, Gustafsson et al. 2002, Wurdack and Davis 2009)。このことは、カワゴケソウ科の特殊な形態が、他の被子植物に見られる一般的な体制から劇的な進化を遂げて生じたことを示す。カワゴケソウ科植物は、環境適応の結果、基軸を水平方向へと変更しており (Suzuki et al. 2002, Mohan Ram and Sehgal 1997, 加藤 2013)，この基軸の変更は、他の植物で見られる匍匐枝などのシートが倒れただけで根端やシート頂の頂端成長を維持しているものとは体制が異なっている。カワゴケソウ科の多くの種では、幼根を失い、茎頂分裂組織の無限成長を止め、根本からボディプランを変更しているのだ (Suzuki et al. 2002, Kita and Kato 2005, Koi et al. 2005, Imaichi et al. 2005, Katayama et al. 2010, 2011, 2013 など)。

カワゴケソウ科は祖先的なトリスティカ亜科 (6 属 18 種) とウェッデリナ亜科 (1 属 1 種)、派生的なカワゴケソウ亜科 (53 属 294 種) の 3 亜科にわけられる (Cook and Rutishauser 2007, 加藤 2013)。トリスティカ亜科やウェッデリナ亜科では、ある程度、鉛直軸のボディプランを維持している一方、カワゴケソウ亜科では完全に鉛直軸のボディプランを失っており、水平ボディプランの確立が、カワゴケソウ亜科の多様化の基盤となったと考えられる。そして基軸の変更に関して重要な役割を果たしたと考えられるが、①胚発生過程の変更による水平ボディプランの確立と、②茎頂分裂組織をもたないシート形成機構の確立である。

### ① 胚発生過程の変更による水平ボディプランの確立

双子葉類の実生は、二枚の子葉と胚軸、幼根から成り、子葉の間に茎頂分裂組織が、幼根の先端に根端分裂組織が存在し、このボディプランは受精卵から始まる胚発生の間に確立される。カワゴケソウ科のトリスティカ亜科の実生には、茎頂分裂組織と根端分裂組織がどちらも存在し、発芽後の植物体の発生に関与するが、それに対してカワゴケソウ亜科の実生では子葉の間に明確な茎頂分裂組織が存在せず、本葉が数枚形成されると成長が止まる。また、幼根や根端分裂組織は完全に失われている。両分裂組織の発生過程の変更を探るべく、トリスティカ亜科 *Terniopsis brevis* とカワゴケソウ亜科 *Zeylanidium lichenoides* の胚発生を比較した (図 2, Katayama et al. 2011)。*T. brevis* では胚上部に茎頂分裂組織の形成中心とその上の原表皮から L1 層のような構造が始原し、胚基部には根端分裂組織の静止中心が始原し、シロイヌナズナとよく似た発生で両分裂組織が形成された (図 2A)。それに対し、カワゴケソウ亜科の *Z. lichenoides* では、形成中心は始原するものの、その上の原表皮から L1 層が生じず、子葉基部にドーム状構造の茎頂分裂組織が形成されないことがわかった (図 2B)。また、茎頂分裂組織の維持に機能する *SHOOT MERISTEMLESS*

(STM) 遺伝子が形成中心の始原時から胚の頂端領域で発現し、この領域が発芽後の葉形成にも関与することもわかっている (Katayama et al. 2013)。胚基部においては、静止中心が始原せず、根端分裂組織や幼根は形成されなかった (図 2B)。これらの結果から、胚発生において茎頂分裂組織と根端分裂組織の形成と維持に重要な細胞群や組織の始原に変更が起き、カワゴケソウ亜科の鉛直軸のボディプランの喪失が起きたのではないかと考えら

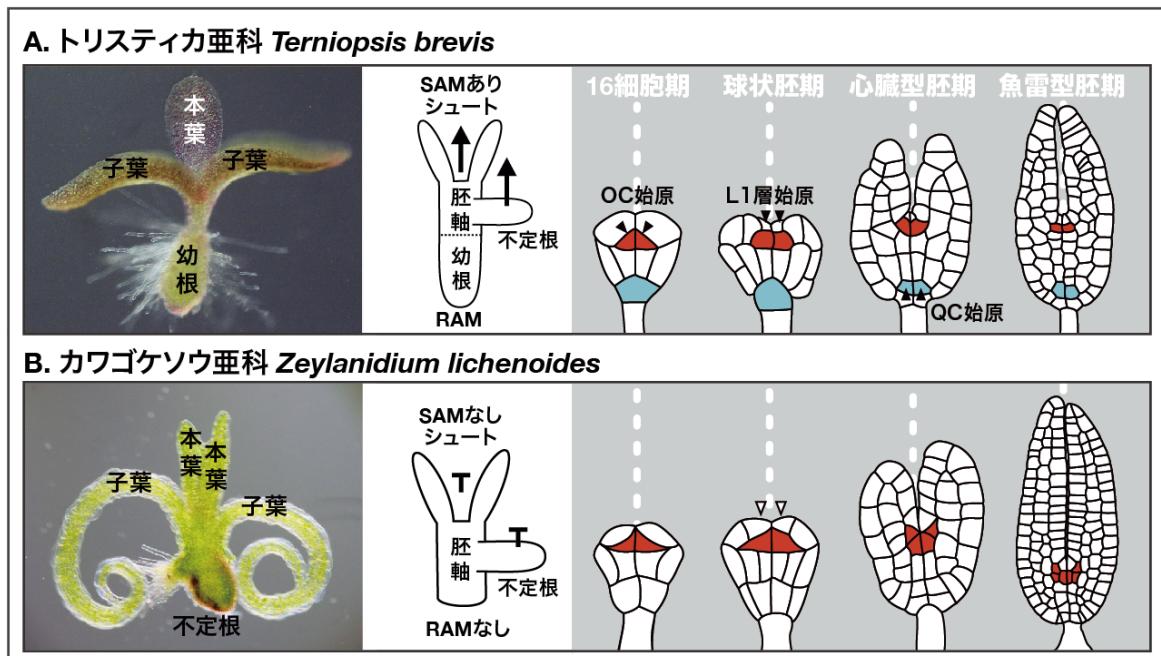


図 2. 実生のボディプランと胚発生の比較 (Katayama et al. 2011 より改変後転載)

- A. *Terniopsis brevis* の実生 (左) とその模式図 (中央)。胚発生 (右) において胚頂端部に形成中心 (OC: 赤色) と L1 層が、基部領域に静止中心 (QC: 水色) が始原する。
- B. *Zeylanidium lichenoides* の実生 (左) とその模式図 (中央)。胚発生 (右) において胚頂端領域で OC は始原するが L1 層が始原せずドーム状の茎頂分裂組織が形成されない。また、基部領域で原根層が初期に分裂してしまうため、QC が始原しない。

れる。

## ② 茎頂分裂組織をもたないショット形成機構の確立

被子植物のショットでは、頂端の茎頂分裂組織が葉を形成しながら無限成長を続ける。カワゴケソウ科の祖先的分類群であるトリスティカ亜科やウェッデリナ亜科のショット頂には茎頂分裂組織が観察され、その側方から鱗片状の葉が形成されるという、ほかの被子植物と共に通のショット形成が維持されている。それに対し、カワゴケソウ亜科は葉と葉が積み重なったようなショットを形成し、そのショット頂の葉原基の間に明確な茎頂分裂組織はみられない。新たな葉は既にある葉の基部から生じ、それが繰り返されることでショットが形成される。Katayama et al. (2010) によるショット形成関連遺伝子を用いた発現解析により、カワゴケソウ亜科の葉一枚一枚が茎頂分裂組織として生じ、その後、分裂組織全体が葉へ分化することが明ら

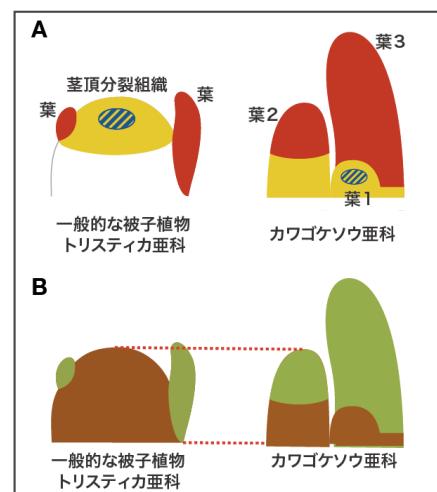


図 3. 遺伝子発現と器官の相同意性

- A. シュート頂における遺伝子発現比較  
(青: WUS, 黄: STM, 赤: ARP)
- B. 遺伝子発現様式に基づく器官の相同意性  
Katayama et al. 2010 より改変後転載 Copyright American Society of Plant Biologists: www.plantcell.org

かとなった（図3A）。このことは、カワゴケソウ亜科の一枚の葉と考えられてきた器官が一本のシートと相同であることを示唆する（図3B）。従って、カワゴケソウ亜科では、シートは始原後すぐに葉へと分化し、その基部から新たなシートが生じるというシート形成が繰り返し起きていると考えられる。

このシート形成様式は、祖先的分類群でみられるシートの分枝様式と非常によく似ている（図4）。トリスティカ亜科では6属中5属で共通してシートの基部から腋外芽として新たなシートが生じ、それが繰り返されるという仮軸分枝が起こることがわかっている（Fujinami and Imaichi 2009, Fujinami et al. 2013, Fujinami and Imaichi 2015）。また、ウェッデリナ亜科の *Weddellina squamulosa* のシートでも同様の仮軸分枝が起きていると考えられている（Koi and Kato 2007）。したがって、シートの基部から新たなシートが生じるというシート形成様式は科内3亜科で共通しており、「カワゴケソウ亜科の特異なシート形成が祖先的分類群の仮軸分枝するシートの先端が葉へと転換することで進化した」というシナリオが考えられる。しかし、実際に祖先的分類群のシート1本とカワゴケソウ亜科のシート（=葉）が相同であるか否かは不明であり、今後、カワゴケソウ亜科のシートが腋芽として生じることを調べる必要がある。

#### 4. 多様化の原動力となる要因

カワゴケソウ科313種のうち、カワゴケソウ亜科には294種が含まれ、科全体の90%以上の種数を占める。つまり、カワゴケソウ亜科において、急流という現在の生育環境下での多様化が成し遂げられたと考えられる。前項で述べた「胚発生過程の変更による水平ボディプラン」や「茎頂分裂組織をもたないシート形成」もカワゴケソウ亜科の共有派生形質であり、特異な環境下での多様化と繁栄に一役買ったであろう。しかし、いくら有利な形質で共有していたとしても、それは亜科内の多様化の基盤にはなりえても、引き起こした原動力とは考え難い。

カワゴケソウ亜科には47属294種が含まれ、比較的種数の多い5属（*Apinagia* 属、*Ledermannella* 属、*Marathrum* 属、*Rhynchoscleria* 属、カワゴロモ属）を除き、残りの42属は10種以下の小属である。このことは、同属にすべき共有派生形質が見られないほどに近縁種間においても形態的差異が大きいことを意味しており本科の多様性の高さがうかがわれる。Willis (1914) はそれまでの生態学的、形態学的調査から、河川などの生育環境の差異は、種間の形態的差異を生み出すほど顕著なものではなく、また、同様の環境に生育する他科の植物がみられないことから、選択圧や競争のない状況でこれほどの多様化が起きたと結論づけた。加藤（2013）も「多くの種類と形態の多様性が、生育条件による淘汰と他生物との交渉によって生じたものとは考え難く、主に植物体に内在する因子によって起こったものと考える他はない（今村 1977）」を引用し、「カワゴケソウ科の形態進化は自然淘汰によってではなく、中立的な変異が起こった結果である」と述べ「中立的な形態進化」に票を投じている。近年、各々の生物群がもつ特有の性質がその後の進化を大

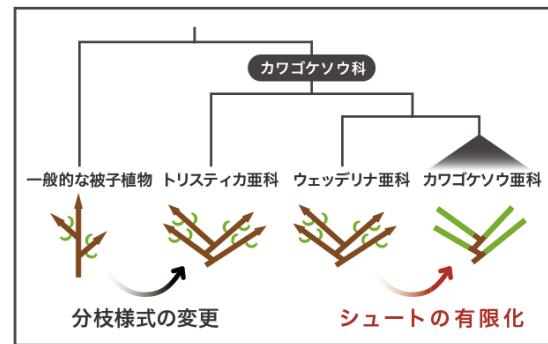


図4. カワゴケソウ科のシート形成の進化

Katayama et al. 2010 より改変後転載 Copyright American Society of Plant Biologists: www.plantcell.org

きく左右するという研究が多く報告されており、祖先多型 (Brawand et al. 2014), 遺伝子重複率 (Lynch and Conery 2000), 分布パターン (Ikeda et al. 2012), 突然変異率 (Barraclough and Savolainen 2001, Lanfear et al. 2010) などが自然選択と共に種の分化や形態的多様化を推し進める内的要因として挙げられている。

## 5. カワゴケソウ科の多様化を引き起こした内的要因

カワゴケソウ科における多様化を引き起こした分類群特有の要因として、第一に分布パターンが挙げられる。本科植物は早瀬や滝などの急流域の岩の上という非常に限定的な環境にのみ生育可能であり、1河川内においても不連続なパッチ状の分布を示す。さらに、河川と河川の間には山や平地など非生育環境が存在し、強い隔離要因となっていると考えられる。集団間に強い地理的隔離が働き、長期間にわたり遺伝的交流が妨げられると、各集団間での変異が蓄積し、その結果、集団ごとの遺伝的分化が進みやすく、ひいては種分化が引き起こされる (Ikeda et al. 2012)。日本に分布するカワゴケソウ *Cladopus doianus* とカワゴロモ *Hydrobryum japonicum* の葉緑体遺伝子間領域を用いた集団遺伝学的解析から、河川間で顕著な集団分化が検出された(図5, Katayama et al. 2016)。さらに、隣り合う4水系にのみ分布するカワゴロモでは距離による隔離の効果が検出されたが、広範囲に点在する6水系に分布域をもつカワゴケソウの集団では距離による隔離の効果が検出されなかつた。安定した遺伝的交流が可能な範囲においては隔離の程度は地理的距離と相関するが (Wright 1943), 分布がある程度の距離に達すると、安定的な遺伝的交流が失われ、集団内における浮動や突然変異によりランダムな遺伝的変異の蓄積が起き、距離による隔離の効果が薄れると考えられるため (Hutchinson and Templeton 1999), 今回、遠く離れた河川に分布するカワゴケソウで距離による隔離が検出されなくなったことから、河川間で安定的な交流が妨げられ、集団分化が進んでいることが考えられる。カワゴケソウ科では、科内の全ての種が河川急流域という環境にしか生育しないことを考えると、生育環境とそれに付随する分布パターンが多様化に貢献した可能性が高い。現在、ゲノムワイドな SNPs を取得できる RAD-seq 解析を行っており、集団間の遺伝的交流の程度や方向性を明らかにしていく予定である。

第二の要因として、カワゴケソウ科では分子進化速度が他の植物に比べて上昇している

N. Katayama-6

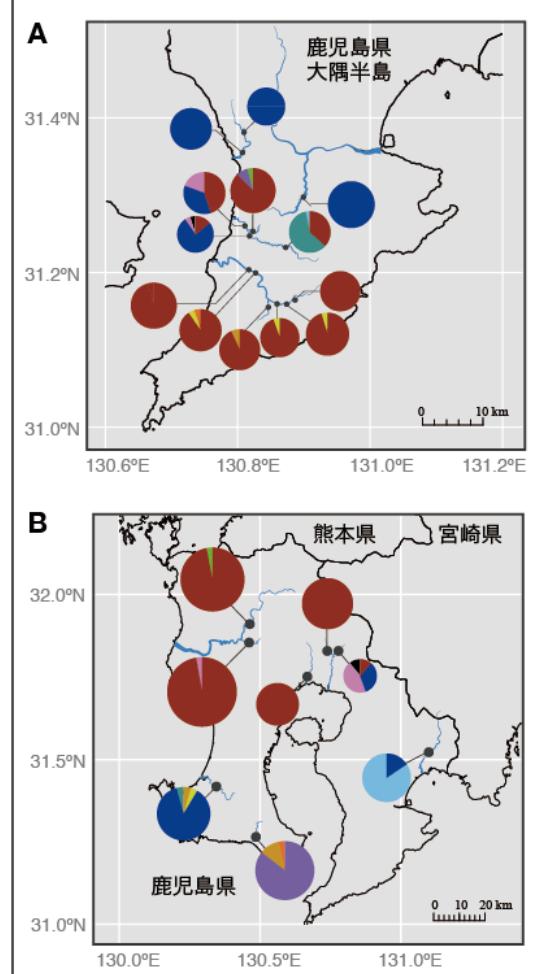


図5. 日本におけるカワゴケソウ科2種 (A: カワゴロモ, B: カワゴケソウ) の集団遺伝構造。円グラフは葉緑体遺伝子間領域に基づく各集団のハプロタイプ頻度。Katayama, N., Kato, M. & Imaichi, R. Habitat specificity enhances genetic differentiation in two species of aquatic Podostemaceae in Japan. *Am. J. Bot.* 103: 317–324 (Botanical Society of America) .より改変後転載。

可能性が挙げられる。これまでの *rbcL* 遺伝子を用いた系統解析 (Les et al., 1997, Ueda et al., 1997) や Wurdack and Davis (2009) による核, 葉緑体, ミトコンドリアの 13 座位を用いた解析において, カワゴケソウ科の枝が長くなることが報告されている。分子系統樹の枝が長いことは, サイトあたりの塩基置換率が高いことを意味しており, 分子進化速度が早くなっている可能性が考えられる。さらに, 分子系統樹の枝長は分類群の種数と相関することが報告されている (Barraclough and Savolainen 2001, Lanfear et al. 2010)。Barraclough and Savolainen (2001) は, 被子植物において姉妹群となる科のペアを用い, 種数の違いと非同義置換数を比較し, 種数の多い科において枝が長くなる傾向があることを示した。非同義置換はアミノ酸変異を伴わないと選択圧を受けず, また集団サイズの影響も受けないとされる。従って, 中立な塩基置換速度の上昇は, 分類群の多様化に貢献すると考えられる。現在, カワゴケソウ亜科における分子進化速度の上昇を検証中である。大規模遺伝子配列情報が公開されているダイズとカワゴケソウ科が属するキントラノオ目 4 種(アマ, トウゴマ, ポプラ, キャッサバ), そしてカワゴケソウ科 *Z. lichenoides* の RNA-seq データを用いた予備的解析により, 578 遺伝子の連結配列 (425,007 塩基) を用いて最尤系統樹を描いた結果, *Z. lichenoides* の枝が顕著に長くなることがわかっている。このことは, カワゴケソウ科で塩基置換率が上昇し, それが科内の多様化を推し進めた一因となっている可能性を示唆している。今後, 科内の祖先的分類群とカワゴケソウ亜科の複数種を用いて比較解析を行うことで, カワゴケソウ亜科の多様化に分子進化速度の上昇が貢献した可能性について検証していきたい。

## 6. おわりに

常に技術は発展し, その流れの中で科学も変貌を遂げてきた。これまで見えなかつたものが見えるようになり, これまで扱うことのできなかつた大規模データも処理できるようになっている。細胞学のようなミクロな解析から生態学のようなマクロな解析にいたるまで, 生物学におけるあらゆる分野で生物と多様性について大量の情報がより細かい精度で蓄積されつつある。これらの蓄積された情報を統合し, 生物が歴史の中でどのように生き抜いてきたのか—生物によってその実体は様々である—を一つ一つ理解し, それらをさらに高次の段階で統合していくことが生物多様性の理解に必要である。発展を続ける技術を使って, 果たして生物の実体の理解という根本的課題にどれだけアプローチできるのか, 常に考えていく必要がある。

## 7. 謝辞

私がこれまでカワゴケソウ科の研究を遂行するにあたり, 数々のご指導を頂いた, 国立科学博物館の加藤雅啓名誉研究員, 金沢大学の山田敏弘准教授, 日本女子大学の今市涼子教授, また, 調査や実験, 解析などでお世話になった大阪市立大学の厚井聰博士, 金沢大学の西山智明博士に心よりお礼申し上げます。

## 8. 引用文献

- Barraclough, T.G. & Savolainen., V. 2001. Evolutionary rates and species diversity in flowering plants. *Evolution* 55: 677–683.
- Brawand, D., Wagner, C.E., Li, Y.I., Malinsky, M. Keller, I., Fan, S., Simakov, O. et al. 2014. The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. *Nature* 513: 375–381.

- Cook, C.D.K. 1996. Aquatic plant book, 2nd ed. SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands.
- Cook, C.D.K. & Rutishauser, R. 2007. Podostemaceae. In Kubitzki, K. [ed.], The Families and Genera of Vascular Plants, 304–344. Springer, Berlin, Germany.
- Cusset G. & Cusset C. 1988. Etude sur les Podostemales. 10. Structures florales et végétatives des Tristichaceae. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat. Paris. B Adansonia* 10:179–218
- Diels, L.A. 1936. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien. 11th ed. Gebrüder Bornträger, Berlin, Germany.
- Fujinami, R., Ghogue, J. P. & Imaichi, R. 2013. Developmental morphology of the controversial ramulus organ of *Tristicha trifaria* (subfamily Tristichoideae, Podostemaceae): Implications for evolution of a unique body plan in Podostemaceae. *Int. J. Plant Sci.* 174: 609–618.
- Fujinami, R. & Imaichi, R. 2009. Developmental anatomy of *Terniopsis malayana* (Podostemaceae, subfamily Tristichoideae), with implications for body plan evolution. *J. Plant Res.* 122: 551–558.
- Fujinami, R. & Imaichi, R. 2015. Developmental morphology of flattened shoots in *Dalzellia ubonensis* and *Indodalzellia gracilis* with implications for the evolution of diversified shoot morphologies in the subfamily Tristichoideae (Podostemaceae). *Am. J. Bot.* 102: 848–859.
- Gustafsson, M.H.G., Bittrich, W. & Stevens, P.F. 2002. Phylogeny of Clusiaceae based on *rbcL* sequences. *Int. J. Plant Sci.* 163: 1045–1054.
- Hutchison, D.W. & Templeton, A.R. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53: 1898–1914.
- Ikeda, H., Nishikawa, M. & Sota, T. 2012. Loss of flight promotes beetle diversification. *Nature Commun.* 3: 648.
- Imaichi, R., Hiyama, Y. & Kato, M. 2005. Leaf development in absence of shoot apical meistem in *Zeylanidium subulatum* (Podostemaceae). *Ann. Bot.* 96: 51–58.
- Imamura, S. 1928. Über *Cladopus japonicus* n. sp., eine Podostemaceen in Japan. *Bot. Mag., Tokyo* 42: 379–387.
- 今村駿一郎. 1977. カワゴケソウ科の植物—その保護の必要—. 植物と自然 11: 9–13.
- IUCN 2016. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-3. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 14 December 2016.
- 岩槻邦男 1979. 陸上植物の種. 東京大学出版. 東京.
- Kato, M. 2008. A taxonomic study of Podostemaceae of Japan. *Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo* 34: 63–73.
- 加藤雅啓 2013. 原色植物分類図鑑 世界のカワゴケソウ. 北隆館. 東京.
- Katayama, N., Koi, S. & Kato, M. 2010. Expression of *SHOOT MERISTEMLESS*, *WUSCHEL*, and *ASYMMETRIC LEAVES1* homologs in the shoots of Podostemaceae: implications for the evolution of novel shoot organogenesis. *Plant Cell* 22: 2131–2140.
- Katayama, N., Kato, M., Nishiuchi, T. & Yamada, T. 2011. Comparative anatomy of embryogenesis in three species of Podostemaceae and evolution of the loss of embryonic shoot and root meristems. *Evol. Dev.* 13: 333–342.
- Katayama, N., Kato, M. & Yamada, T. 2013. Origin and development of the cryptic shoot meristem in *Zeylanidium lichenoides* (Podostemaceae). *Am. J. Bot.* 100: 635–646.

- Katayama, N., Kato, M. & Imaichi, R. 2016. Habitat specificity enhances genetic differentiation in two species of aquatic Podostemaceae in Japan. *Am. J. Bot.* 103: 317–324.
- Kita, Y. & Kato, M. 2001. Infrafamilial phylogeny of the aquatic angiosperm Podostemaceae inferred from the nucleotide sequence of the *matK* gene. *Plant Biol.* 3: 156–163.
- Kita, Y. & Kato, M. 2005. Seedling developmental anatomy of an undescribed *Malaccotristicha* species (Podostemaceae, subfamily Tristichoideae) with implications for body plan evolution. *Plant Syst. Evol.* 254: 221–232.
- Koi, S., Ikeda, H., Rutishauser, R. & Kato, M. 2015. Historical biogeography of river-weeds (Podostemaceae). *Aquat. Bot.* 127:62–69
- Koi, S., Imaichi R. & Kato M. 2005. Endogenous leaf initiation in the apical-meristemless shoot of *Cladopus queenslandicus* (Podostemaceae) and implications for evolution of shoot morphology. *Int. J. Plant Sci.* 166: 199–206.
- Koi, S. & Kato, M. 2007. Developmental morphology of shoot in *Weddellina squamulosa* (Podostemaceae) and implications for shoot evolution in the Podostemaceae. *Ann. Bot.* 99: 1121–1130.
- Lanfear, R., Ho, S.Y.W., Love, D. & Bromham, L. 2010. Mutation rate is linked to diversification in birds. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 107: 20423–20428.
- Les, D. H., Philbrick, C. T. & Novelo, R. 1997. The phylogenetic position of river-weeds (Podostemaceae): Insights from *rbcL* sequence data. *Aquat. Bot.* 57: 5–27.
- Lynch, M. & Conery, J.S. 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290, 1151–1155.
- 牧野富太郎 1928. 我日本ニ於テ學會ニ興味ヲ與ヘシ植物發見ノ略史. 植物研究雑誌 (5): 37–49.
- Mohan Ram, H. & Sehgal, A. 1997. In vitro studies on developmental morphology of Indian Podostemaceae. *Aquatic Bot.* 57: 97–132.
- Suzuki, K., Kita, Y. & Kato, M. 2002. Comparative developmental anatomy of seedlings in nine species of Podostemaceae (subfamily Podostemoideae). *Ann. Bot.* 89: 755–765.
- Savolainen V., Fay M.F., Albach, D.C., Backlund, A., van der Bank, M., Cameron, K.M., Johnson, S.A., et al. 2000. Phylogeny of the eudicots: a nearly complete familial analysis based on *rbcL* gene sequences. *Kew Bull.* 55: 257–309.
- 田中法生 2012. 異端の植物「水草」を科学する. ベレ出版. 東京.
- Ueda, K., Hanyunda, T., Nakano, A., Shiuchi, T., Seo, A., Okubo, H. & Hotta, M. 1997. Origin of Podostemaceae, a marvelous aquatic flowering plant family. *Plant Species Biol.* 110: 87–92.
- van Steenis C.G.G.J. 1981. Rheophytes of the world. Sijthoff & Noordhoff, Alphen aan den Rijn.
- Willis, J.C. 1914. On the Lack of Adaptation in the Tristichaceae and Podostemaceae. *Proc. Royal Soc. London. B:* 532–550.
- Wright, S. 1943. Isolation by Distance. *Genetics* 28: 114–138.
- Wurdack K.J. & Davis C.C. 2009. Malpighiales phylogenetics: gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *Am. J. Bot.* 90: 1151–1570.

## 葉の進化発生学的研究について考える

市橋 泰範

理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Yasunori Ichihashi

Evolutionary developmental studies of leaf shape

Key words: *Evo-Devo, Gene expression, Leaf, Network analysis*

RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Yokohama, Kanagawa, 230-0045 Japan

### 1. はじめに

どうして生物の形はこんなにも多様なのか？生物の形態進化は、進化生物学者ダーウィンの時代から生物学分野における重大な課題の一つである。近年、全生物で共通するDNA分子を通して生物の形態進化を理解する進化発生学が注目を浴びている。この分野は、発生を制御する分子メカニズムを種間で比較解析することで、どのように多様な形態が進化してきたのか分子レベルで明らかにすることを目的とする。現在までに、動植物を問わず幅広い生物種で進化発生学的研究が行われており、多くのケースで新規遺伝子の獲得よりも遺伝子発現の変化が形態進化に大きく貢献していることが明らかにされてきた（Blein et al. 2008, Kimura et al. 2008, Rebeiz et al. 2009, Loehlin and Werren 2012）。そのため、発生を司る遺伝子制御ネットワークのつなぎ換えが形態進化を引き起こす駆動力であると提案されている（Peter and Davidson 2011）。

進化の過程において被子植物は、環境の変化に適応するために葉の形を多様化させてきた。たとえばテンジクアオイ属 (*Pelargonium*) においては、同属内という近縁種間でも単葉から複葉まで多様性に富んだ葉の形態を観察することができる（Nicotra et al. 2011）。また渓流沿い植物は細い葉を発生させて環境に適応しており、イヌガラシ属の *Rorippa aquatica* は同一個体でも環境に応じて葉の形を変化させる（Fassett 1940, van Steenis 1981）。このように葉が示す形態の多様性は、植物の形態進化を支える制御メカニズムを理解する上で良い研究対象となるため、現在までにさかんに研究してきた。そこで本総説では、葉の進化発生学的研究を概観することで、植物の形態進化において論じる。分子レベルでの比較形態学的なアプローチから始まり、複数のモデル植物を対象とした分子遺伝学的研究を俯瞰して、著者らが行った次世代シーケンス技術を活用した進化発生学的研究を紹介する。このように葉の進化発生学という一研究分野の歴史を振り返ることで、植物の進化を理解しようとする研究の今後の方向性について議論したい。

## 2. 葉の発生学

植物のボティプランは、ファイトマーと呼ばれる基本単位の繰り返し構造で形作られており、ファイトマーは葉、茎、その間の腋芽で構成されている。その中でも葉が最も形態的に多様化しており、花器官も葉から派生したものであることを考えると、葉の発生を研究することは、自然界でみられる植物の形態の多様性の理解につながる (Tsukaya 2002)。

他の多くの生物現象における研究と同様に、葉の発生に関連する研究もモデル植物の変異体から多くの遺伝学的な知見が得られた (図 1)。クラス I *KNOTTED-LIKE HOMEOBOX* (以降は *KNOX* と略す) 遺伝子は茎頂分裂組織 (SAM) の無限成長性を維持しており、*BLADE-ON-PETIOLE (BOP)* 遺伝子とそれによって直接制御される *ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2)* 及びその相互作用因子 *ASI* は *KNOX* 遺伝子を抑制することにより、SAM からの一群の細胞を葉の細胞として運命付ける (Semiarti et al. 2001, Byrne et al. 2002, Iwakawa et al. 2002, Ha et al. 2003, Lin et al. 2003, Xu et al. 2003, Ha et al. 2004, Hepworth et al. 2005, Norberg et al. 2005, Zgurski et al. 2005, Fu et al. 2007, Ha et al. 2007, Iwakawa et al. 2007, Ueno et al. 2007, Guo et al. 2008, Ha et al. 2010, Jun et al. 2010, Ichihashi et al. 2011)。加えて、この *BOP* および *ASI* 遺伝子は葉の三次元全ての軸、すなわち先端-基部軸、中央-側方軸、向背軸の形成にも関与している (Semiarti et al. 2001, Ha et al. 2003, Lin et al. 2003, Xu et al. 2003, Fu et al. 2007, Ha et al. 2007, Ikezaki et al. 2010, Ichihashi et al. 2011, Kojima et al. 2011, Ishibashi et al. 2012, Chen et al. 2013)。向背軸の形成に関しては、他にも多くの因子が明らかにされており、向軸形成に関与する遺伝子と背軸形成に関与する遺伝子とが競合して制御し合うことで葉の平面成長が維持されている (Fukushima and Hasebe 2014)。葉が示す有限成長性は、microRNA *JAW* により制御されているクラス II *TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF (TCP)* 遺伝子が葉の成熟スケジュールの進行を抑制することで制御されている (Nath et al. 2003, Palatnik et al. 2003, Efroni et al. 2008)。この *TCP* 遺伝子の下流において、microRNA164 が *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* 遺伝子の発現場所を微調整することにより、葉の周縁部の形も制御されている (Nikovics et al. 2006, Koyama et al. 2007, Kawamura et al. 2010, Koyama et al. 2010)。加えて *CUC* と *KNOX* は相互に発現を上昇させる正のフィードバックループにより形態形成を引き起こすと考えられている (Takada et al. 2001, Blein et al. 2008, Kawamura et al. 2010)。このように、これらの制御因子が葉の発生を精密にコントロールし、進化の過程でこれらの因子の制御が変化すると、葉の形態はダイナミックに変化すると考えられる。

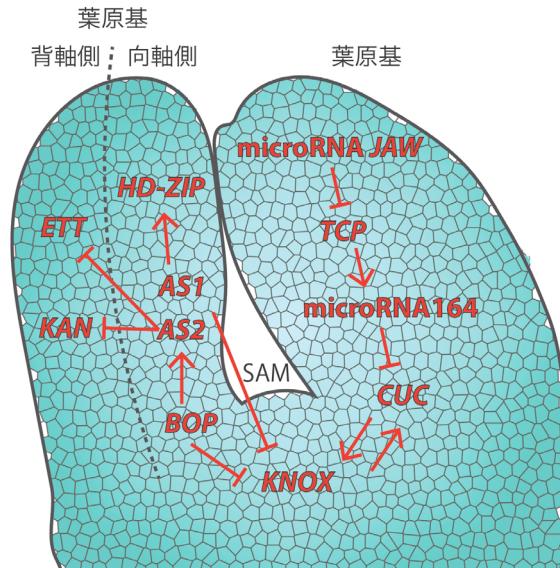


図 1 葉の発生に関与する主要な遺伝子

### 3. 葉の進化発生学的研究のさきがけ

上記したような多様な葉の形を示す変異体の研究により、自然界で観察できる葉の多様性を遺伝子レベルで理解する突破口が開けた。その中でも、葉の形態を劇的に変化させる *KNOX* 遺伝子がまず着目された。様々な葉の形を示す植物群について葉原基における *KNOX* 遺伝子の発現が比較され、*KNOX* 遺伝子発現と葉原基の形態に相関していることが明らかになった (Bharathan et al. 2002)。一方で、複雑な葉原基であっても最終的に単葉を発達させる種もあるため (Bharathan et al. 2002)，葉の最終形態だけでなく葉の初期発生における遺伝子発現を踏まえなければ、眞の相同性が明らかにならない (図 2)。これを機に、比較形態学的なアプローチに遺伝子発現を比較するという新機軸を加えた進化発生学的研究がさかんに行われ、形態進化における相同性を深く理解できるようになった。

**単葉と複葉** – 植物の葉は単葉と複葉に大別され、単葉と複葉における器官の相同性は長い間議論されてきた。すなわち複葉全体が単葉と相同なのか、複葉を構成する個々の小葉が単葉と相同なのか、形態のみの比較からだけでは明らかでなかった (Champagne and Sinha 2004)。トマトの複葉を用いた一連の発生学的解析から、単葉形成に重要な *KNOX* 遺伝子の制御、植物ホルモンのオーキシン、*CUC* 遺伝子などの転写因子の制御が複葉の小葉形成にも重要であることがわかった (Ori et al. 2007, Berger et al. 2009, David-Schwartz et al. 2009, Koenig et al. 2009)。これらの知見をもとに複葉と単葉の相同性について考えると、上記の 2 つの仮説は相反するものではなく、*KNOX* や *CUC* などの制御因子は植物の形態パターンの骨格となる「枝分かれのパターン形成」を祖先種において制御しており、進化の過程においてこの制御系が葉の発生プログラムに再利用されたため、単葉から複葉が進化したと考えられる (Koenig and Sinha 2010)。

**両面葉と单面葉** – 葉は通常、表側と裏側の性質をもつ平たい形になる「両面葉」であるが、アヤメやネギといった一部の植物は、裏側の性質しか持たない「单面葉」をつくる。イグサ属 (*Juncus*) を用いた比較遺伝子発現解析により、单面葉では葉の裏側の性質を決める *AUXIN RESPONSE FACTOR3/ETTIN* 遺伝子が葉原基全体で働くことで、裏側の性質しか持たない

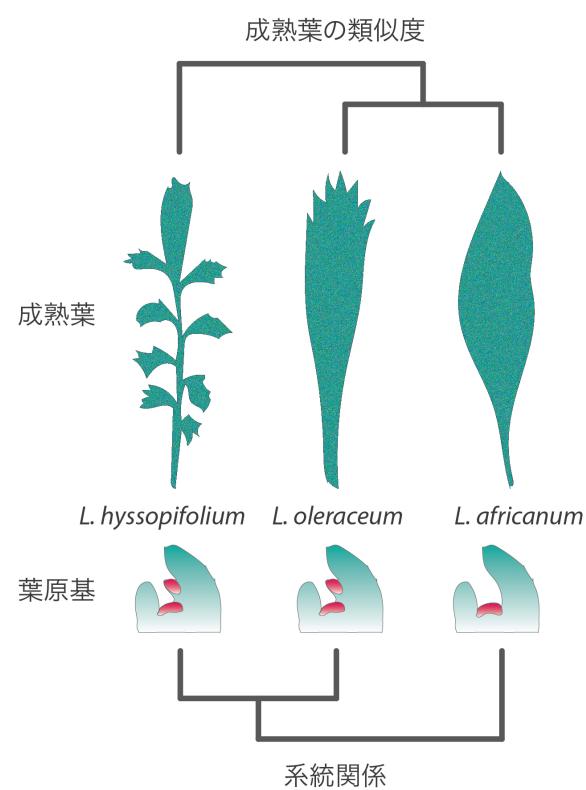


図 2 成熟葉と葉原基の違い

葉の初期発生と遺伝子発現を調べることで眞の相同性を理解できる。*KNOX* の遺伝子発現部位を赤で示す。

くなることが明らかになった (Yamaguchi et al. 2010)。一方で单面葉でも平たい形の葉をつくる種（茎頂に対して葉が展開する方向が両面葉と 90 度違う）が存在しており、*DROOPING LEAF* 遺伝子の発現変化が向背軸方向に沿った細胞増殖を促進することで平たい構造をつくる。このことから、葉の平たさという形態は両面葉と单面葉で相同ではなく、全く異なるメカニズムでつくられることがわかった (Yamaguchi et al. 2010)。

**葉と仮葉枝** – 仮葉枝とは発生する位置から枝に相当するが、葉のような形態を示す器官である。アスパラガス属 (*Asparagus*) の仮葉枝形成における詳細な遺伝子発現解析により、仮葉枝では枝で機能する *KNOX* 遺伝子と、葉で機能する *ASI* 遺伝子の両方が発現していることが明らかになった (Nakayama et al. 2012)。加えて、仮葉枝で見られた *ASI* の遺伝子発現パターンは、葉で観察されるパターンと非常によく似ていることから、仮葉枝は枝に葉の性質が付加されて生じた器官であることが明らかとなった (Nakayama et al. 2012)。

上記で示したように、初期発生と遺伝子発現を詳細に調べることで器官の相同性とその分子メカニズムの一端が明らかになる。一方で、形態進化に相關した発現を示す遺伝子が実際に形態進化に貢献したか、すなわち原因なのか結果なのかを発現解析のみからでは結論付けることはできない。そのため形態進化の背景にあるメカニズムを遺伝子レベルで理解するためには、形質転換などを用いた遺伝子の操作実験による実証が必要になる。

#### 4. 遺伝子の機能解析による葉の形態進化の実証研究

そこでモデル植物と近縁で、葉の形態が多様な植物種へと研究対象が広がり、遺伝子操作による分子遺伝学的解析が行われるようになった。特にモデル植物シロイヌナズナと近縁で複葉を持つミチタネツケバナや、研究リソースが充実したトマトと近縁種を対象にした研究が先行して多くの知見をもたらした (図 3)。前述した *KNOX* 遺伝子およびそれを制御する *ASI* 遺伝子の制御メカニズムがミチタネツケバナとシロイヌナズナの間で比較解析された。

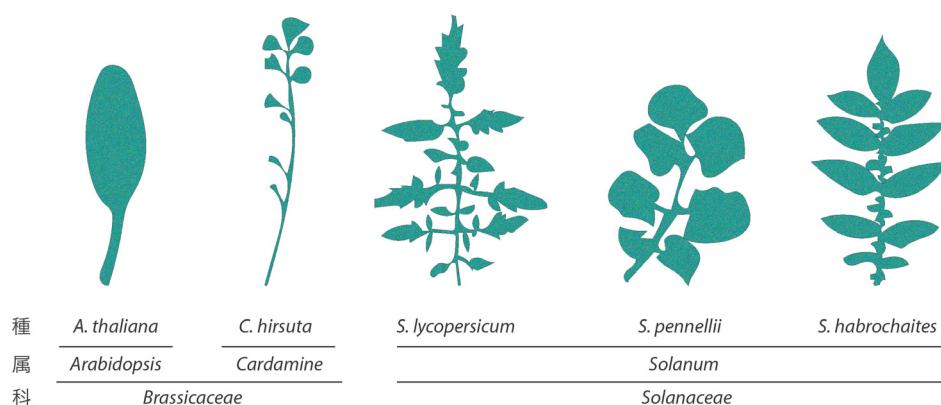


図 3 モデル植物とその近縁種の成熟葉

シロイヌナズナ (*A. thaliana*) と近縁なミチタネツケバナ (*C. hirsuta*)、トマト (*S. lycopersicum*) と近縁な *S. pennellii* と *S. habrochaites* は多様な葉の形を示す。

その結果, *ASI* 遺伝子の機能は保存されているものの *KNOX* 遺伝子の上流にある制御配列の違いにより *ASI-KNOX* 制御系が 2 種間で異なり葉の形態の違いが生じていることが明らかになった (Hay and Tsiantis 2006)。加えてシロイヌナズナ属内でみられる葉の形態の多様性の一部も *KNOX* 遺伝子の上流にある制御の変化で説明できることがわかった (Piazza et al. 2010)。

一方で遺伝子の発現制御系の違いだけでなく、タンパク質レベルでの制御系の違いが種間の葉の違いを生み出すケースがトマトと近縁種 *Solanum galapagense*との解析で明らかになった。KNOX タンパク質は BEL-LIKE HOMEO DOMAIN タンパク質と複合体を形成して機能するが、ホメオドメインを持たない KNOX タンパク質 PETROSELINUM (PTS) / KANTM はその複合体形成を阻害する (Kimura et al. 2008, Magnani and Hake 2008)。*S. galapagense* では PTS の発現が過剰となる遺伝的変異を持ち、そのため KNOX と BELL 複合体形成が阻害され下流の制御が変化することで、葉の形態が複雑化したことが明らかになった (Kimura et al. 2008)。

また *CUC* 遺伝子は様々な植物種における葉の形態において保存された機能を持つことが形質転換実験で明らかされており、遺伝子操作実験によりモデル植物で明らかにされていた葉の形態の制御因子について進化的スケールでの機能が明らかになった (Blein et al. 2008)。加えて、近縁種の順遺伝学的アプローチにより、モデル植物では欠失した遺伝子が形態進化へ関与していることも示された (Sicard et al. 2014, Vlad et al. 2014)。

以上のように、葉の形態進化に貢献した遺伝子さらには種間の形態的相違を説明する遺伝的変異が明らかになった。この知見は、遺伝子制御ネットワークのつなぎ換えもしくは部分的な改変が形態進化を引き起こすという仮説を支持した。しかしながら、個々の遺伝子の機能解析からだけでは、発生を司る遺伝子制御ネットワークがシステムとしてどのように変化して形態進化を引き起こしたのか議論できない。

## 5. トランスクリプトームからみた葉の形態進化の全体像

それでは一体、どのような遺伝子制御ネットワークの変化が自然界で観察されるような多様な形の葉を進化させるのだろうか? この問題解決において、近年の次世代シーケンサーを使ったトランスクリプトーム (RNA-seq) が有効である (Ichihashi and Sinha 2014, Ichihashi et al. 2015)。トランスクリプトーム解析によりゲノムワイドで遺伝子発現データを得ることで、発生現象などの複雑な生物学的な現象を理解することができ、特に次世代シーケンシング技術によりゲノムが解読されていない非モデル生物においてもトランスクリプトーム解析を適用できることは大きなブレイクスルーである (Wang et al. 2009)。加えて、数学の一分野であるグラフ理論をトランスクリプトーム解析に導入することにより、個々の遺伝子の関係をシステムレベルで理解する、すなわち遺伝子制御ネットワークを推定することができるようになった (Marbach et al. 2012)。

そこで著者らは RNA-seq を用いて、トマトと近縁種 (*S. pennellii* と *S. habrochaites*) 間の葉

の発生について進化発生学的解析を行い、多様な葉の形を進化させた遺伝子制御ネットワーク上の変化を明らかにした (Ichihashi et al. 2014)。これらの植物種における葉の発生ステージ別の RNA-seq データを用いた共発現ネットワーク解析により、トマト種における葉の発生の遺伝子制御ネットワークの予測を試みた。バイオインフォマティックス解析に加えて生化学実験を行った結果、ネットワークの周縁部分に葉の形の複雑性を制御する PTS 遺伝子を含む遺伝子モジュールがあり、このモジュール内で BOP と LSH のタンパク質複合体が PTS の発現を直接制御し、PTS が競合する KNOX タンパク質（トマトでは LeT6）の量によって、葉の細胞増殖関連因子を含むネットワーク上の多くの遺伝子発現が制御されていることがわかった (Kimura et al. 2008, Ichihashi et al. 2014)。続いてトマト種間で葉の発生の遺伝子制御ネットワークがどのように変化しているのか明らかにするために、ブートストラップ法を用いてネットワーク統計量を解析することで葉の発生制御ネットワークを種間で比較した。加えて交雑個体を用いて両親種のアレルを区別した遺伝子発現解析を行うことにより、発現の制御様式を調べた。以上より、BOP の発現を制御する *cis* 因子上の変異が BOP-LSH-PTS の遺伝子モジュールの発現を変化させたため、種間で葉の発生の遺伝子制御ネットワークで大規模な発現の変化が起きていることが示唆された (Ichihashi et al. 2014)。

トマトはすでにゲノムが解読され、その近縁種においても分子遺伝学的解析が可能である (Ranjan et al. 2012, Ichihashi and Sinha 2014)。そこで実際に BOP-LSH-PTS の遺伝子モジュールの発現変化が形態進化を引き起こしたか検証するため、上流因子の BOP と LSH 遺伝子の発現を操作した形質転換体を解析すると、それらの遺伝子の発現量によって、トマトとその近縁種における多様な葉の形質の一部が再現された (Ichihashi et al. 2014)。この結果は BOP-LSH-PTS の遺伝子モジュールが引き起こすネットワークの大規模なつなぎ替えが葉の形の多様性を生み出したことを示し、今までの進化発生学で提唱されている、「遺伝子制御ネットワークにおける大規模なつなぎ替えが形態進化を引き起こす」という仮説を実験データで支持した (Peter and Davidson 2011)。また理論ネットワーク生物学的知見から、遺伝子制御ネットワークの周縁に位置する遺伝子群の変異の方がネットワークのハブ遺伝子群の変異よ

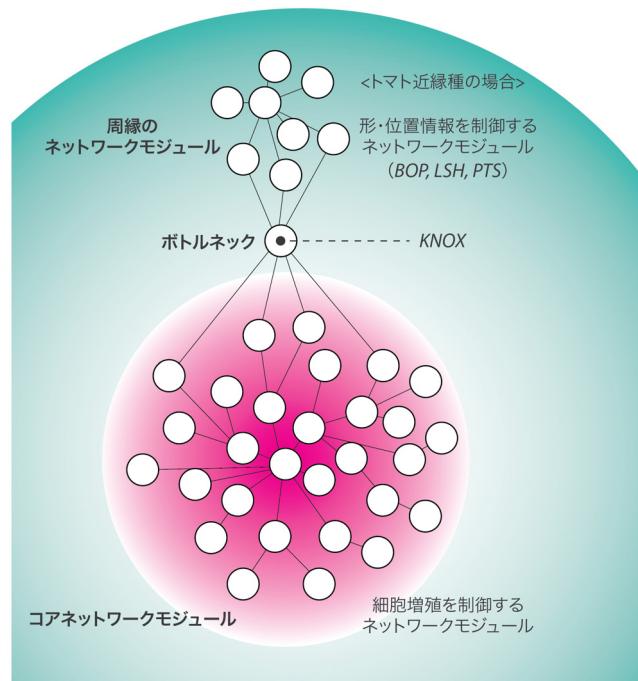


図 4 ネットワークからみた形態進化のモデル

それぞれの遺伝子は、遺伝子制御ネットワーク上の位置によって形態進化への寄与が違うと考えられる。

りも進化的な寄与が大きいとされていたが (Vidal et al. 2011), 今回の研究により初めてその予測が実験的に支持された。前述したように, 幅広い植物種において *KNOX* 遺伝子の制御における変異が形態進化に繰り返し関与することは (Bharathan et al. 2002, Hay and Tsiantis 2010, Katayama et al. 2010, Piazza et al. 2010, Nakayama et al. 2012, Nakayama et al. 2014, Sicard et al. 2014, Vlad et al. 2014), *KNOX* 遺伝子が形や位置情報を制御するネットワークモジュールと細胞増殖に関与するネットワークモジュールを橋渡するボトルネック上にあるためかもしれない (図 4)。今後このようなトランスクリプトーム解析を駆使した進化発生学的研究が他の植物での形態進化に応用されることになれば, このアイデアの一般性が検証されていくだろう。

## 6. おわりに

今後, 植物の進化発生学分野では, シーケンス技術や遺伝子操作技術などの進歩のため, より詳細でスケールが大きな研究が主流になることは想像に難くない。たとえば, 大規模な RNA-seq を可能とする技術により (Kumar et al. 2012, Townsley et al. 2015), ネットワークの動的変化を追うことが容易となる。加えて, ネットワークの構造を比較するバイオインフォマティックスにより (Ideker and Krogan 2012, Fukushima 2013), 個々の遺伝子レベルでなく「遺伝子と遺伝子の相互作用レベル」で形態進化を解き明かすことができる。さらに解析から得られた結果に基づいて, CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術を使って人工的に遺伝子間の相互作用を操作することにより (Kumar and Jain 2015), 遺伝子制御ネットワーク上の個々の相互作用の変化がどのように形態進化に結びつくのか明らかになる。

また技術進歩だけでなく, 研究対象もさらに広がるだろう。たとえば, 前述した单面葉や仮葉枝のように, 特定の種もしくはグループに特異的な新規形質の進化現象に対して, より深い理解が得られると予想される。特に食虫植物の捕虫葉や寄生植物の吸器などユニークな形態進化について遺伝子および遺伝子制御ネットワークレベルで理解できれば, そのような植物が真に特別な遺伝的背景を持っているのか, もしくはすでに保持している遺伝子セットを使い回すことで新規形質を進化させうるのか明らかになる。さらに個々の植物系統における進化だけでなく, 系統を超えたレベルでの大進化や収斂進化への進化発生学的アプローチも今後期待される。

最後にこのような進化発生学的研究から得られた知見は, 基礎科学分野にとどまらず, 農作物などの改良に貢献することができるかもしれない。たとえば, 進化の過程で選択される遺伝的変異は, 単に特定の形質のみが環境に適応したとは考えづらく, 他の形質における制御系とバランスのとれた遺伝子制御ネットワークモジュールが自然界で選択される可能性が十分に考えられる。そこで, 育種において農業利用上価値ある遺伝的形質のみに着目するのではなく, 進化的背景を踏まえた, システムとしてより頑強な植物形態デザインを目指すべきであろう。その目的達成に進化発生学的研究から得られる知見が貢献できると期待される。

## 7. 謝辞

本稿で紹介した著者らの研究の一部は、理化学研究所・基礎科学特別研究員制度および科学研究補助金・若手研究B(15K18589)の支援を得て遂行した。また本研究を進めるにあたり、数々のサポートを頂いた、カリフォルニア大学デービス校・Prof. Neelima Sinha, Prof. Julin Maloof, Dr. José Antonio Aguilar-Martínez, Dr. Moran Farhi, Dr. Ravi Kumar, Dr. Lee Millon, Dr. Jie Peng, ドナルドダンフォース研究所・Dr. Daniel Chitwoodに、この場を借りてお礼申し上げます。

## 8. 引用文献

- Berger, Y., Harpaz-Saad, S., Brand, A., Melnik, H., Sirding, N., Alvarez, J. P., Zinder, M., Samach, A., Eshed, Y., and Ori, N. 2009. The NAC-domain transcription factor GOBLET specifies leaflet boundaries in compound tomato leaves. *Development* 136: 823-832.
- Bharathan, G., Goliber, T. E., Moore, C., Kessler, S., Pham, T., and Sinha, N. R. 2002. Homologies in leaf form inferred from KNOXI gene expression during development. *Science* 296: 1858-1860.
- Blein, T., Pulido, A., Viallette-Guiraud, A., Nikovics, K., Morin, H., Hay, A., Johansen, I. E., Tsiantis, M., and Laufs, P. 2008. A conserved molecular framework for compound leaf development. *Science* 322: 1835-1839.
- Byrne, M. E., Simorowski, J., and Martienssen, R. A. 2002. ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in Arabidopsis. *Development* 129: 1957-1965.
- Champagne, C., and Sinha, N. 2004. Compound leaves: equal to the sum of their parts? *Development* 131: 4401-4412.
- Chen, X., Wang, H., Li, J., Huang, H., and Xu, L. 2013. Quantitative control of ASYMMETRIC LEAVES2 expression is critical for leaf axial patterning in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 64: 4895-4905.
- David-Schwartz, R., Koenig, D., and Sinha, N. R. 2009. LYRATE is a key regulator of leaflet initiation and lamina outgrowth in tomato. *Plant Cell* 21: 3093-3104.
- Efroni, I., Blum, E., Goldshmidt, A., and Eshed, Y. 2008. A protracted and dynamic maturation schedule underlies Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* 20: 2293-2306.
- Fassett, N. C. 1940. A Manual of Aquatic Plants, University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, USA.
- Fu, Y., Xu, L., Xu, B., Yang, L., Ling, Q., Wang, H., and Huang, H. 2007. Genetic interactions between leaf polarity-controlling genes and ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 in Arabidopsis leaf patterning. *Plant Cell Physiol.* 48: 724-735.
- Fukushima, A. 2013. DiffCorr: an R package to analyze and visualize differential correlations in

- biological networks. *Gene* 518: 209-214.
- Fukushima, K., and Hasebe, M. 2014. Adaxial-abaxial polarity: the developmental basis of leaf shape diversity. *Genesis* 52: 1-18.
- Guo, M., Thomas, J., Collins, G., and Timmermans, M. C. 2008. Direct repression of KNOX loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 complex of Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 48-58.
- Ha, C. M., Jun, J. H., and Fletcher, J. C. 2010. Control of Arabidopsis leaf morphogenesis through regulation of the YABBY and KNOX families of transcription factors. *Genetics* 186: 197-206.
- Ha, C. M., Jun, J. H., Nam, H. G., and Fletcher, J. C. 2004. BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45: 1361-1370.
- Ha, C. M., Jun, J. H., Nam, H. G., and Fletcher, J. C. 2007. BLADE-ON-PETIOLE 1 and 2 control *Arabidopsis* lateral organ fate through regulation of LOB domain and adaxial-abaxial polarity genes. *Plant Cell* 19: 1809-1825.
- Ha, C. M., Kim, G. T., Kim, B. C., Jun, J. H., Soh, M. S., Ueno, Y., Machida, Y., Tsukaya, H., and Nam, H. G. 2003. The BLADE-ON-PETIOLE 1 gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in *Arabidopsis*. *Development* 130: 161-172.
- Hay, A., and 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.
- Hay, A., and Tsiantis, M. 2010. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development* 137: 3153-3165.
- Hepworth, S. R., Zhang, Y., McKim, S., Li, X., and Haughn, G. W. 2005. BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 1434-1448.
- Ichihashi, Y., Aguilar-Martinez, J. A., Farhi, M., Chitwood, D. H., Kumar, R., Millon, L. V., Peng, J., Maloof, J. N., and Sinha, N. R. 2014. Evolutionary developmental transcriptomics reveals a gene network module regulating interspecific diversity in plant leaf shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E2616-2621.
- Ichihashi, Y., Kawade, K., Usami, T., Horiguchi, G., Takahashi, T., and Tsukaya, H. 2011. Key proliferative activity in the junction between the leaf blade and leaf petiole of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 157: 1151-1162.
- Ichihashi, Y., Mutuku, J. M., Yoshida, S., and Shirasu, K. 2015. Transcriptomics exposes the uniqueness of parasitic plants. *Brief. Funct. Genomics* 14: 275-282.
- Ichihashi, Y., and Sinha, N. R. 2014. From genome to phenotype and back in tomato. *Curr. Opin. Plant Biol.* 18: 9-15.
- Ideker, T., and Krogan, N. J. 2012. Differential network biology. *Mol. Syst. Biol.* 8: 565.

- Ikezaki, M., Kojima, M., Sakakibara, H., Kojima, S., Ueno, Y., Machida, C., and Machida, Y. 2010. Genetic networks regulated by ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) and AS2 in leaf development in *Arabidopsis thaliana*: KNOX genes control five morphological events. *Plant J.* 61: 70-82.
- Ishibashi, N., Kanamaru, K., Ueno, Y., Kojima, S., Kobayashi, T., Machida, C., and Machida, Y. 2012. ASYMMETRIC-LEAVES2 and an ortholog of eukaryotic NudC domain proteins repress expression of AUXIN-RESPONSE-FACTOR and class 1 KNOX homeobox genes for development of flat symmetric leaves in *Arabidopsis*. *Biol. Open.* 1: 197-207.
- Iwakawa, H., Iwasaki, M., Kojima, S., Ueno, Y., Soma, T., Tanaka, H., Semiarti, E., Machida, Y., and Machida, C. 2007. Expression of the ASYMMETRIC LEAVES2 gene in the adaxial domain of *Arabidopsis* leaves represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves. *Plant J.* 51: 173-184.
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C., and Machida, Y. 2002. The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant Cell Physiol.* 43: 467-478.
- Jun, J. H., Ha, C. M., and Fletcher, J. C. 2010. BLADE-ON-PETIOLE1 coordinates organ determinacy and axial polarity in *arabidopsis* by directly activating ASYMMETRIC LEAVES2. *Plant Cell* 22: 62-76.
- Katayama, N., Koi, S., and Kato, M. 2010. Expression of SHOOT MERISTEMLESS, WUSCHEL, and ASYMMETRIC LEAVES1 homologs in the shoots of Podostemaceae: implications for the evolution of novel shoot organogenesis. *Plant Cell* 22: 2131-2140.
- Kawamura, E., Horiguchi, G., and Tsukaya, H. 2010. Mechanisms of leaf tooth formation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 62: 429-441.
- Kimura, S., Koenig, D., Kang, J., Yoong, F. Y., and Sinha, N. 2008. Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel KNOX gene. *Curr. Biol.* 18: 672-677.
- Koenig, D., Bayer, E., Kang, J., Kuhlemeier, C., and Sinha, N. 2009. Auxin patterns *Solanum lycopersicum* leaf morphogenesis. *Development* 136: 2997-3006.
- Koenig, D., and Sinha, N. 2010. Evolution of leaf shape: A pattern emerges. *Curr. Top. Dev. Biol.* 91: 169-183.
- Kojima, S., Iwasaki, M., Takahashi, H., Imai, T., Matsumura, Y., Fleury, D., Van Lijsebettens, M., Machida, Y., and Machida, C. 2011. Asymmetric leaves2 and Elongator, a histone acetyltransferase complex, mediate the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52: 1259-1273.

- Koyama, T., Furutani, M., Tasaka, M., and Ohme-Takagi, M. 2007. TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 473-484.
- Koyama, T., Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., and Ohme-Takagi, M. 2010. TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in Arabidopsis. *Plant Cell* 22: 3574-3588.
- Kumar, R., Ichihashi, Y., Kimura, S., Chitwood, D. H., Headland, L. R., Peng, J., Maloof, J. N., and Sinha, N. R. 2012. A High-Throughput Method for Illumina RNA-Seq Library Preparation. *Front. Plant Sci.* 3: 202.
- Kumar, V., and Jain, M. 2015. The CRISPR-Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. *J. Exp. Bot.* 66: 47-57.
- Lin, W. C., Shuai, B., and Springer, P. S. 2003. The Arabidopsis LATERAL ORGAN BOUNDARIES-domain gene ASYMMETRIC LEAVES2 functions in the repression of KNOX gene expression and in adaxial-abaxial patterning. *Plant Cell* 15: 2241-2252.
- Loehlin, D. W., and Werren, J. H. 2012. Evolution of shape by multiple regulatory changes to a growth gene. *Science* 335: 943-947.
- Magnani, E., and Hake, S. 2008. KNOX lost the OX: the Arabidopsis KNATM gene defines a novel class of KNOX transcriptional regulators missing the homeodomain. *Plant Cell* 20: 875-887.
- Marbach, D., Costello, J. C., Kuffner, R., Vega, N. M., Prill, R. J., Camacho, D. M., Allison, K. R., Consortium, D., Kellis, M., Collins, J. J., and Stolovitzky, G. 2012. Wisdom of crowds for robust gene network inference. *Nat. Methods* 9: 796-804.
- Nakayama, H., Nakayama, N., Seiki, S., Kojima, M., Sakakibara, H., Sinha, N., and Kimura, S. 2014. Regulation of the KNOX-GA Gene Module Induces Heterophyllic Alteration in North American Lake Cress. *Plant Cell* 26: 4733-4748.
- Nakayama, H., Yamaguchi, T., and Tsukaya, H. 2012. Acquisition and diversification of cladodes: leaf-like organs in the genus Asparagus. *Plant Cell* 24: 929-940.
- Nath, U., Crawford, B. C., Carpenter, R., and Coen, E. 2003. Genetic control of surface curvature. *Science* 299: 1404-1407.
- Nicotra, A., Leigh, A., Boyce, K. C., Jones, C. S., Niklas, K. J., Royer, D. L., and Tsukaya, H. 2011. The evolution and functional significance of leaf shape in the angiosperms. *Funct. Plant Biol.* 38: 535-552.
- Nikovics, K., Blein, T., Peaucelle, A., Ishida, T., Morin, H., Aida, M., and Laufs, P. 2006. The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in Arabidopsis. *Plant Cell* 18: 2929-2945.
- Norberg, M., Holmlund, M., and Nilsson, O. 2005. The BLADE ON PETIOLE genes act redundantly

- to control the growth and development of lateral organs. *Development* 132: 2203-2213.
- Ori, N., Cohen, A. R., Etzioni, A., Brand, A., Yanai, O., Shleizer, S., Menda, N., Amsellem, Z., Efroni, I., Pekker, I., Alvarez, J. P., Blum, E., Zamir, D., and Eshed, Y. 2007. Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nat. Genet.* 39: 787-791.
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., and Weigel, D. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425: 257-263.
- Peter, I. S., and Davidson, E. H. 2011. Evolution of gene regulatory networks controlling body plan development. *Cell* 144: 970-985.
- Piazza, P., Bailey, C. D., Cartolano, M., Krieger, J., Cao, J., Ossowski, S., Schneeberger, K., He, F., de Meaux, J., Hall, N., Macleod, N., Filatov, D., Hay, A., and Tsiantis, M. 2010. Arabidopsis thaliana leaf form evolved via loss of KNOX expression in leaves in association with a selective sweep. *Curr. Biol.* 20: 2223-2228.
- Ranjan, A., Ichihashi, Y., and Sinha, N. R. 2012. The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. *Genome Biol.* 13: 167.
- Rebeiz, M., Pool, J. E., Kassner, V. A., Aquadro, C. F., and Carroll, S. B. 2009. Stepwise modification of a modular enhancer underlies adaptation in a *Drosophila* population. *Science* 326: 1663-1667.
- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C., and Machida, Y. 2001. The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* 128: 1771-1783.
- Sicard, A., Thamm, A., Marona, C., Lee, Y. W., Wahl, V., Stinchcombe, J. R., Wright, S. I., Kappel, C., and Lenhard, M. 2014. Repeated evolutionary changes of leaf morphology caused by mutations to a homeobox gene. *Curr. Biol.* 24: 1880-1886.
- Takada, S., Hibara, K., Ishida, T., and Tasaka, M. 2001. The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128: 1127-1135.
- Townsley, B. T., Covington, M. F., Ichihashi, Y., Zumstein, K., and Sinha, N. R. 2015. BrAD-seq: Breath Adapter Directional sequencing: a streamlined, ultra-simple and fast library preparation protocol for strand specific mRNA library construction. *Front. Plant Sci.* 6: 366.
- Tsukaya, H. 2002. Leaf development. *Arabidopsis Book* 1: e0072.
- Ueno, Y., Ishikawa, T., Watanabe, K., Terakura, S., Iwakawa, H., Okada, K., Machida, C., and Machida, Y. 2007. Histone deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES2 are involved in the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 445-457.
- van Steenis, C. G. G. J. 1981. Rheophytes of the world : an account of the flood-resistant flowering

- plants and ferns and the theory of autonomous evolution, Rockville, Maryland, USA.
- Vidal, M., Cusick, M. E., and Barabasi, A. L. 2011. Interactome networks and human disease. *Cell* 144: 986-998.
- 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., and Tsiantis, M. 2014. Leaf shape evolution through duplication, regulatory diversification, and loss of a homeobox gene. *Science* 343: 780-783.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10: 57-63.
- Xu, L., Xu, Y., Dong, A., Sun, Y., Pi, L., Xu, Y., and Huang, H. 2003. Novel *as1* and *as2* defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 and ERECTA functions in specifying leaf adaxial identity. *Development* 130: 4097-4107.
- Yamaguchi, T., Yano, S., and Tsukaya, H. 2010. Genetic framework for flattened leaf blade formation in unifacial leaves of *Juncus prismatocarpus*. *Plant Cell* 22: 2141-2155.
- Zgurski, J. M., Sharma, R., Bolokoski, D. A., and Schultz, E. A. 2005. Asymmetric auxin response precedes asymmetric growth and differentiation of asymmetric leaf1 and asymmetric leaf2 *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 17: 77-91.