

## 古くて新しいモデル植物としてのタイ類ゼニゴケの特徴

河内孝之・石崎公庸

京都大学大学院生命科学研究科

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

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

Takayuki Kohchi and Kimitsune Ishizaki

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

Kyoto 606-8502, Japan

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

## 1. ゼニゴケの特徴

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

## 1-1. 基部陸上植物としての位置づけ

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

T. Kohchi &amp; K. Ishizaki-1

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

## 1-2. 半数体世代が優占的な生活史

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

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



図1. ゼニゴケの生活史

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

### 1-3. 交配が容易

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

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

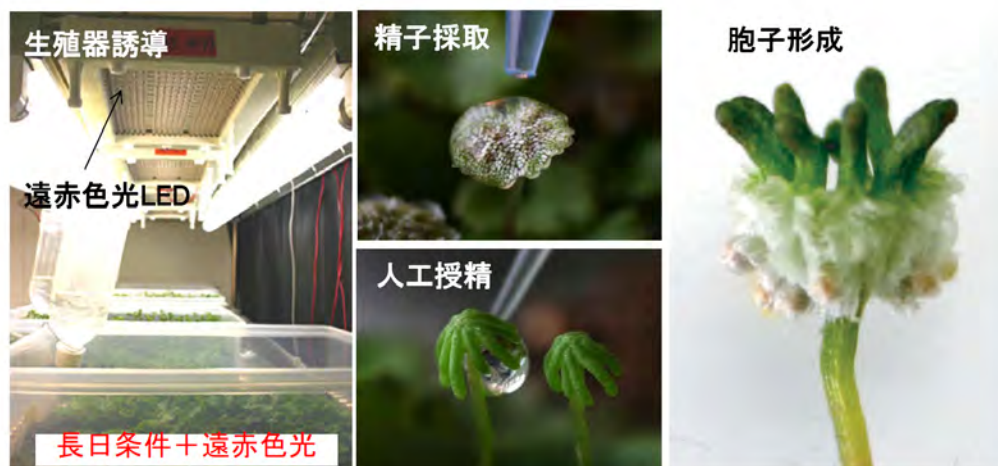


図2. ゼニゴケの交配

T. Kohchi & K. Ishizaki-3

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

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

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

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

#### 1-4. 高い再生能力～切断面再生と無性芽

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



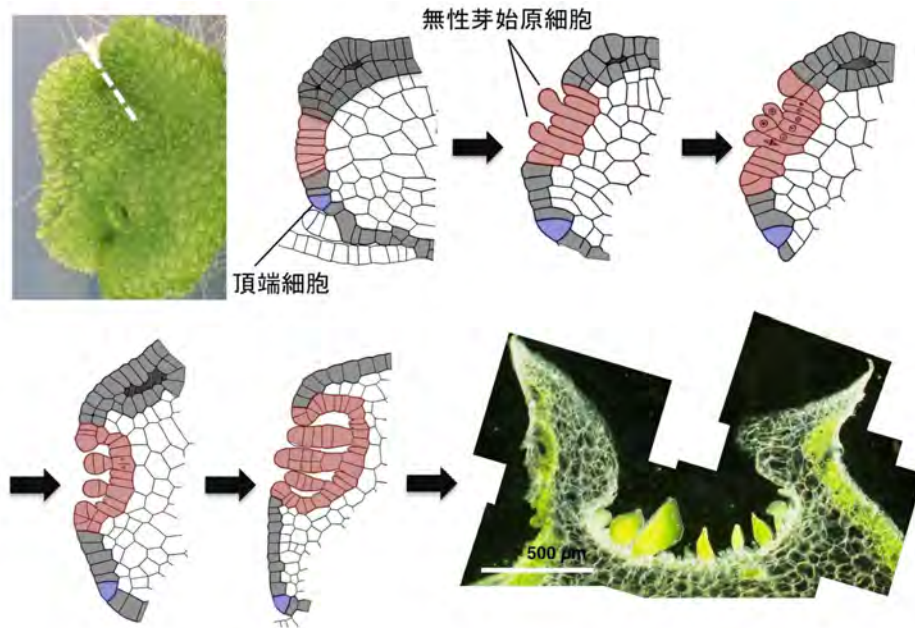


図3. ゼニゴケの無性芽発生 イラストは Barnes & Land (1908)を改変

細胞分裂を観察するといった実験が可能である。

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

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

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

### 1-5. ゲノムと遺伝子構成

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

## 2. 標準系統

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

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

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

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

## 3. 遺伝子導入技術

### 3-1. アグロバクテリアを介する核ゲノムの形質転換

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



図4. アグロバクテリウムを介するゼニゴケ形質転換

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

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

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

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

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

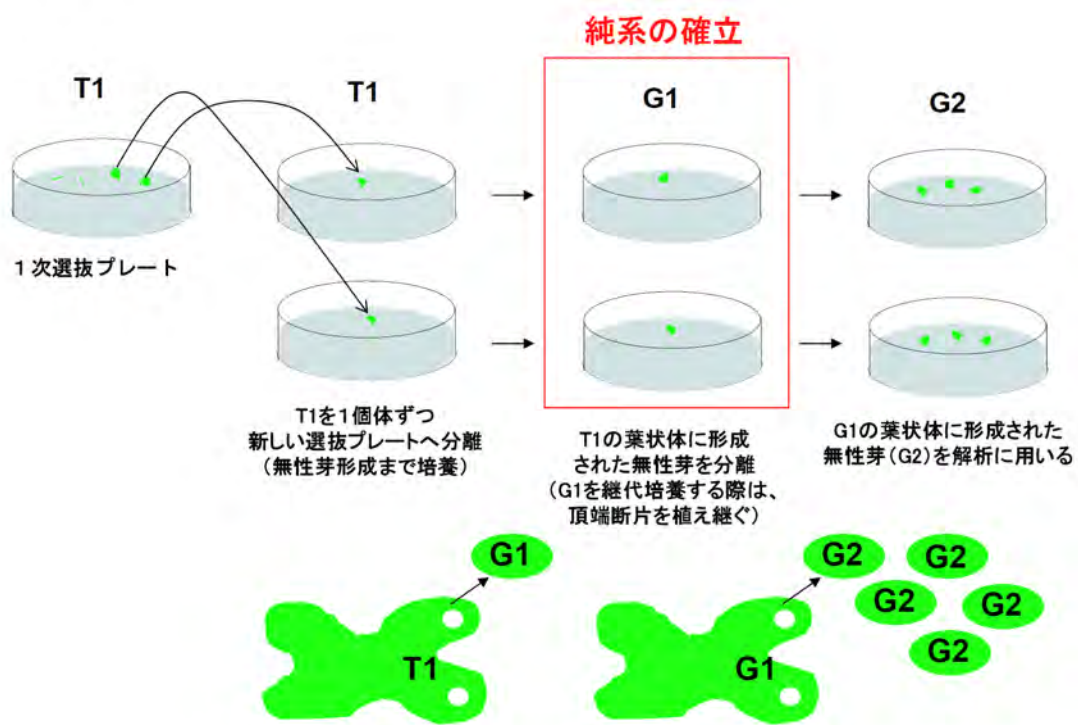


図5. 無性芽による純系の確立



### 3-2. 相同組換えによる遺伝子破壊

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

### 3-3. 葉緑体ゲノムへの形質転換

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

## 4. 突然変異体の分離

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

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

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

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

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

## 5. 展望

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

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

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

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

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

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

## 謝辞

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

## 引用文献

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

16: 41-49.

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



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