

博士論文（要約）

異質倍数体の環境ストレス応答に関する遺伝子発現解析

東京大学大学院農学生命科学研究科

応用生命工学専攻生物情報工学研究室

平成 26 年度 博士課程 進学

氏名 孫 建強

指導教員名 清水 謙多郎

謝辞

本論文をまとめるにあたり、ご指導、ご鞭撻を頂いた清水謙多郎教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）、中村周吾准教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）、瀬々潤先生（産業技術総合研究所人工知能センター）、および門田幸二特任准教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）に心より感謝を申し上げます。

筆者は学部学生のと時から、清水先生および中村先生に研究のご指導、ご鞭撻を頂きました。また、研究を進めるために、快適な環境を整備して頂いたことに心より感謝を申し上げます。筆者は、博士課程1年目にRNA-Seqデータを正規化する手法の開発および評価を中心に取り込んだ。このとき、門田先生にご指導を頂きました。また、博士課程2年目および3年目は、植物のトランスクリプトを定量したRNA-Seqデータの解析を行った。このとき、瀬々先生にご指導を頂きました。また、植物データの解析にあたり、清水健太郎教授（チューリッヒ大学進化生物環境学研究所）ならび清水（稲継）理恵教授（チューリッヒ大学進化生物環境学研究所）に多くの助言を頂き、この場を借りて感謝を申し上げます。

最後に、これまで自分の思う道を進むことに対し、温かく見守りそして辛抱強く支援して下さった家族に対して深い感謝の意を表して謝辞と致します。

第1章 序論.....	1
第1節 RNA-Seq と遺伝子発現量解析	2
第1項 RNA-Seq	2
第2項 遺伝子発現量	2
第3項 RNA-Seq を利用した発現変動遺伝子の検出.....	4
第4項 RNA-Seq の農学への応用	4
第2節 異質倍数体と種の多様性	7
第1項 異質倍数体	7
第2項 ホメオログ	7
第3項 <i>Cardamine</i> 属	9
第3節 研究内容と研究目的.....	11
第4節 本研究の位置付け.....	12
第2章 遺伝子発現量の定量	14
第1節 方法	14
第1項 実験材料および実験デザイン	14
第2項 ゲノムアセンブリー.....	15
第3項 マッピング	15
第4項 遺伝子発現量の計算.....	20
第5項 発現遺伝子の定義.....	26
第6項 遺伝子オントロジーエンリッチメント解析.....	26
第2節 結果.....	28
第1項 遺伝子発現	28
第2項 RNA-Seq ライブラリーの相関.....	28
第3章 冠水ストレスに応答する発現変動遺伝子.....	31
第1節 方法	31
第1項 発現変動遺伝子の検出.....	31
第2項 遺伝子オントロジーエンリッチメント解析.....	32
第2節 結果.....	33
第1項 発現変動遺伝子	33
第2項 発現変動遺伝子の遺伝子オントロジーエンリッチメント解析	34
第3項 低酸素ストレス応答遺伝子の発現量の変化.....	55
第4項 plantlet の形成.....	58
第4章 異質倍数体のホメオログ発現比率	61
第1節 方法	61
第2節 結果.....	62

第5章 総合討論	66
第1節 異質倍数化と種の多様性	66
第1項 トランスクリプトームショックの影響	66
第2項 異質倍数体の cis 調節と trans 調節.....	67
第3項 異質倍数体と種の多様性	67
第2節 解析手法に対する考察	68
第1項 ホメオログの RNA-Seq データの定量法	68
第2項 多群間比較を行うための GO エンリッチメント解析手法.....	68
第3節 結論.....	69
引用文献.....	70
付録.....	79
付録1	80

第1章 序論

植物は移動できないため、外部環境の変化に適応する形質や能力を、進化の過程で獲得してきた。外部環境は、光、気体成分、気温、湿度など様々な要素を含む。そのため、外部環境の変化は、これら複数の要素が同時に変化することを意味する。植物を冠水させた場合を例に示す。酸素と二酸化炭素などの気体成分は水に対する溶存度が低い。そのため、冠水された植物の細胞は、好気呼吸や光合成を続けることができなくなり、低酸素ストレスにさらされるようになる。このとき、細胞は好気呼吸から嫌気呼吸に切り替えて ATP を生産する¹⁻⁵。また、冠水された植物はエチレンを細胞外に放出できず、細胞内にエチレンが蓄積するようになる⁶⁻⁸。エチレン濃度の上昇が引き金となって、伸長成長に関連する多くの遺伝子の発現が促進される。このように、植物を冠水させた場合だけでも、植物細胞は低酸素ストレス応答やエチレン応答など多岐にわたる応答を行っている。

細胞がストレスに応答するメカニズムを解明するには、細胞内で発現している遺伝子間の複雑な相互作用を理解する必要がある。細胞内における遺伝子間の相互作用を調べるために、高速かつ高精度で大量の遺伝子の発現量を一度に測定する技術が欠かせない。

細胞内で発現している遺伝子を一度に測定するには、マイクロアレイまたは高速シーケンサー (high-throughput sequencer; HTS) が用いられる。マイクロアレイは、遺伝子の転写物をマイクロアレイのチップ上に固定させることによって、転写物を定量している。そのため、マイクロアレイのチップ上にはプローブとよばれる転写物と相補的に結合できる短い塩基配列が配置されている。この特徴から、マイクロアレイによる発現量の定量は、塩基配列既知の遺伝子に対して有効であると言われている。これに対して、HTS を利用した RNA シーケンシング技術 (RNA-Seq) は、遺伝子の転写物の塩基配列を直接読み取ることで、転写物の定量を行っている^{9,10}。HTS はプローブを必要としないため、新規の転写物をはじめとして、細胞内の全転写物を一度に定量できる。そのため、ゲノムが解読されていない生物の遺伝子の発現量も定量できる。この観点から、遺伝子発現の網羅的解析は一般的に RNA-Seq がよく利用されている。

第1節 RNA-Seq と遺伝子発現量解析

第1項 RNA-Seq

RNA-Seq は細胞内転写物を定量する技術の一つである^{9,10}。細胞内の mRNA などの転写物を短い塩基配列に切断してから HTS で読みとること（シーケンシング）で定量が行われる。シーケンシングの方法には、シングルエンド法とペアエンド法の2通りある（図 1-1）。シングルエンド法は、短い塩基配列の片側から1塩基ずつシーケンシングする方法である。シーケンシングされた塩基配列をリードと呼ぶ。これに対して、ペアエンド法は、短い塩基配列の両側からシーケンシングする方法である。ペアエンド法の場合、1つの短い塩基配列を両端からシーケンシングしているため、2つのリードが得られる。この2つリードを区別する際に、片方を forward リードと呼び、もう片方を reversed リードと呼ぶ。

リードは転写物の塩基配列の一部であるため、DNA の転写領域と相補的に結合する部分を持つ。リードを DNA 配列と照合し、DNA 上にある相補的に結合できる部分を探すことをマッピングという（図 1-2）。HTS は細胞内で発現している全転写物に対して、切断およびシーケンシングを並列的に処理しているため、シーケンシング直後では、個々のリードがどの転写物に由来するのかわからない。そこで、個々のリードを DNA 上にマッピングすることで、そのリードが DNA 上のどの転写領域に由来するのかを決定できる。ペアエンド法により読み取られた2つのリードは、同一遺伝子の転写領域上にマッピングされる。2つのリードとその間の塩基配列を合わせてフラグメントという。また、シーケンシングエラーなどにより、ペアとなる2つのリードがそれぞれ異なる遺伝子の転写領域にマッピングされたり、片方がマッピングされないこともある。このようなリードは、解析前に取り除くのが一般的である。

第2項 遺伝子発現量

各転写領域にマッピングされたリードを、転写領域ごとに集計したリード数をリードカウントデータとよぶ。一般に、転写物の発現量が高くなれば、その転写物のリードカウントも大きな値をとる。これに加え、転写物が長いほど、シーケンシングされるリード数が多くなり、その転写物のリードカウントが大きな値をとる。したがって、転写物のリードカウントは、そのままでは、転写物の発現量を表していない。リードカウントから転写物の発現量を推定するには、転写物の長さがリードカウントの大小に与える影響を取り除く必要がある。

転写物の長さがリードカウントデータの大小に与える影響を取り除く方法の1つとして、リードカウントデータから RPKM (reads per kilobase of transcript per million mapped reads)を計算する方法がある¹¹。この方法では、RNA-Seq でシーケンシングされた全リード数を100万に揃えたのち、すべての転写物の長さが1,000 bp と仮定したときに、マッピングできたリード数を計算している。すなわち、転写物 i の長さを L_i とし、転写物 i の転写領域にマッピングされたリード数を Y_i とし

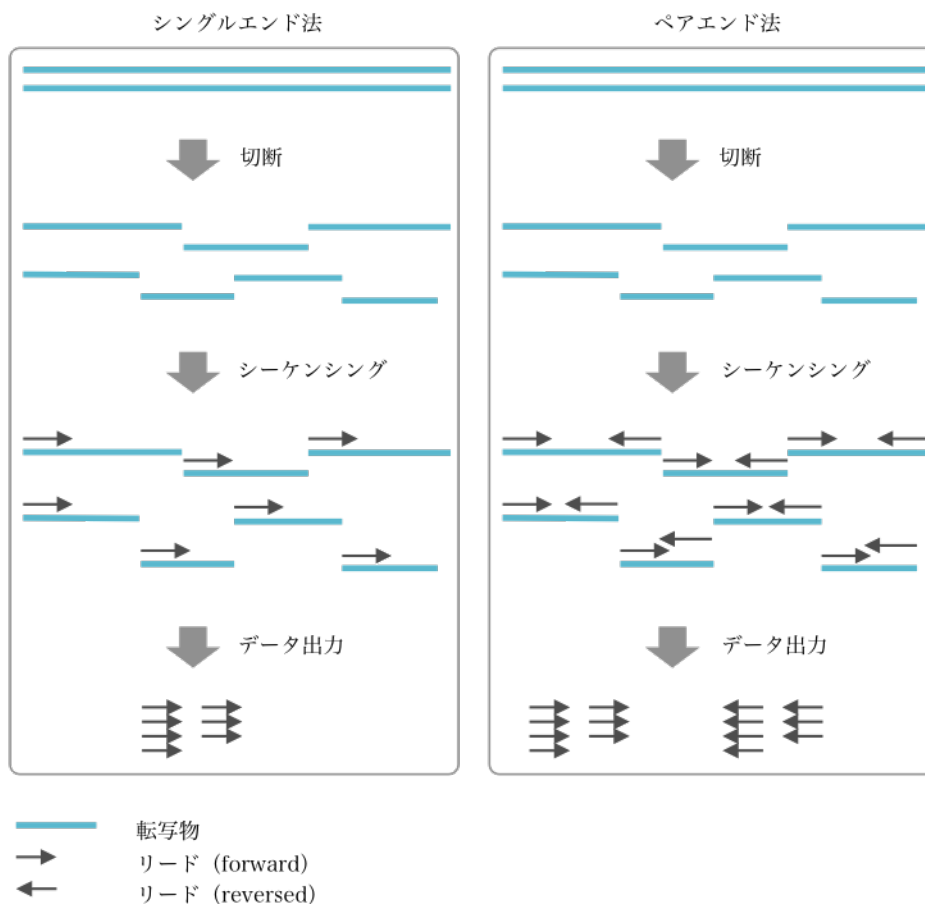


図 1-1

転写物 (mRNA) は切断されてから高速シーケンサーで読み取られる (シーケンシング)。転写物の断片配列を片側のみからシーケンシングする方法をシングルエンド法という。これに対して、転写物の断片配列を両側からシーケンシングする方法をペアエンド法という。ペアエンド法によってシーケンシングされた2つのリードは、それぞれ forward リードと reversed リードという。

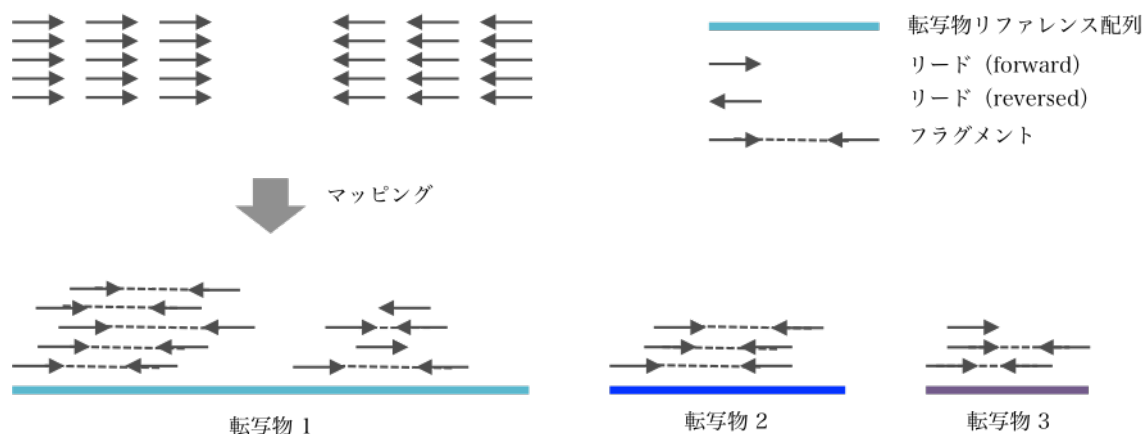


図 1-2

RNA-Seq によりシーケンシングされたリードは、リファレンス配列にマッピングすることで、そのリードがどの転写物に由来するのかが決定できる。また、個々の転写物にマッピングされたリードの数を集計することで、転写物の発現量を予測できる。

たとき、転写物 i の RPKM は

$$10^9 \frac{Y_i}{\sum_k Y_k \cdot L_i}$$

によって計算される。ただし、 k は i を含む全転写物とする。

ペアエンドリードの場合は、ペアとなる 2 つのリードが同じ転写領域にマッピングされ、フラグメントが作られる。この場合、リードを利用して RPKM を計算する代わりに、フラグメントを利用して FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) を計算するのが一般的である¹²。ここで計算される RPKM あるいは FPKM は、転写物の発現量とみなすことができる。

第3項 RNA-Seq を利用した発現変動遺伝子の検出

植物がストレスに応答するときに、転写物の発現量に変化する。ストレスを与えたサンプル（処理群）と与えていないサンプル（対照群）における転写物の発現量を比較し、発現量に変化する転写物を検出すれば、ストレスに応答する転写物の候補を決めることができる。

RNA-Seq を利用することで、処理群と対照群のサンプル中の全転写物の発現量を測定できる。測定できたすべての転写物の発現量を比べることによって、2 つの比較群において発現量の異なる転写物を一括して検出できる（図 1-3）。複数の RNA-Seq 実験から得られる転写物の発現量データに対して、転写物の発現量の比較を行い、発現量の異なる転写物を検出するソフトウェアは、edgeR¹³、DESeq2¹⁴ などをはじめ、数多くリリースされている¹⁵⁻¹⁷。

第4項 RNA-Seq の農学への応用

RNA-Seq は、これまでマイクロアレイで対応できなかった遺伝子発現の網羅的な解析を可能にした。新規遺伝子の発見やノンコーディング RNA の定量は、もはや目新しいものではない¹⁸⁻²⁰。近年では、農学の分野において、雑交種の発現解析への応用が行われるようになった²¹⁻²³。

雑交種は農作物によく見られる。例えば、小麦、綿花、コーヒーなどがあげられる^{24,25}。これらは、生産量の増加、あるいは干ばつや塩害などのストレス耐性を強くするために、古くから人の手により近縁種同士の雑交を繰り返し、作成されと考えられる。雑交種の遺伝子発現に対する網羅的な解析は、雑交種の形質や適応能を理解する上で欠かせない。すなわち、雑交種は親種に比べて、どのようなメカニズムで生産量が増加したか、あるいはどのようなメカニズムでストレス耐性が強くなったのかを遺伝子レベルで解明し、今後、農学分野において雑交による品種改良を効率的に行うために役立つと期待できる。

雑交種は、近縁にある 2 種を雑交することで作成する。近縁にある 2 種のゲノムの塩基配列は、配列相似性が高い。そのため、雑交種は相似性の高い 2 種類のゲノムセットを同時に持つ。例えば、種 A と種 R が近縁種同士とする。種 A と種 R が雑交することにより誕生した雑交種は、種 A に由来するゲノムと種 R に由来するゲノムを同時に持つ。雑交種で発現する遺伝子に対して、種 A 由来のゲ

ノムから発現する分と種 R 由来のゲノムから発現する分を区別して定量するために、マイクロアレイでは 2 種類のプローブを必要とする。このとき、遺伝子の塩基配列の相同性が高い場合、プローブの配列が同一なものになり、区別できなくなる。これに対して、RNA-Seq を用いた実験ではプローブを必要としないために、この問題を回避できる (図 1-4)。各親種のゲノムの配列は、相同性が高いものの、転写領域に種特異的な一塩基多型 (SNPs; single nucleotide polymorphisms) が多く含まれている²⁶⁻²⁸。このようなゲノムから転写された転写物にも、種特異的な変異が含まれる。そのため、RNA-Seq でシーケンシングされたリードにも、それらの変異が反映されている。このことから、リード上にあるこれらの変異を調べれば、それぞれのリードが種 A 由来のゲノムあるいは種 R 由来のゲノムのどれから転写されているのかを決定できる。

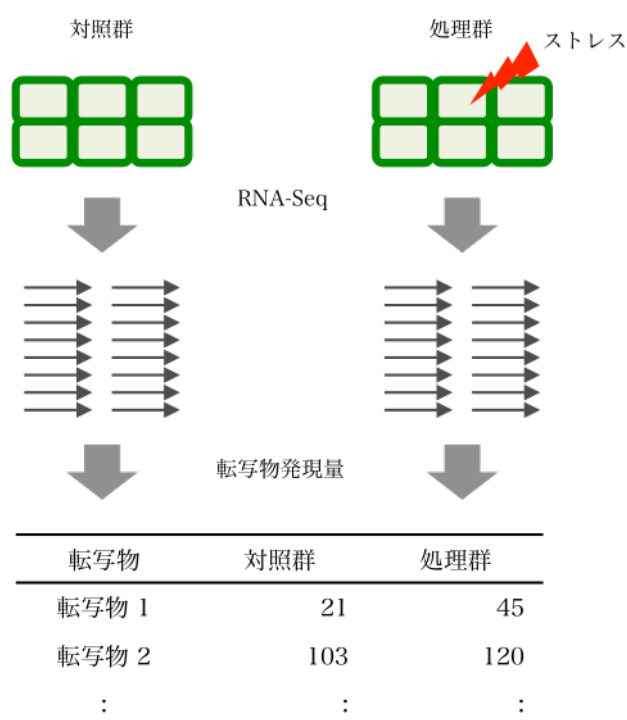


図 1-3

対照群およびストレスを与えた処理群の細胞に対して、RNA-Seq により遺伝子の発現量を定量し、両者の遺伝子の発現量を比較することにより、ストレスにより発現量が増加した転写物を同定することができる。

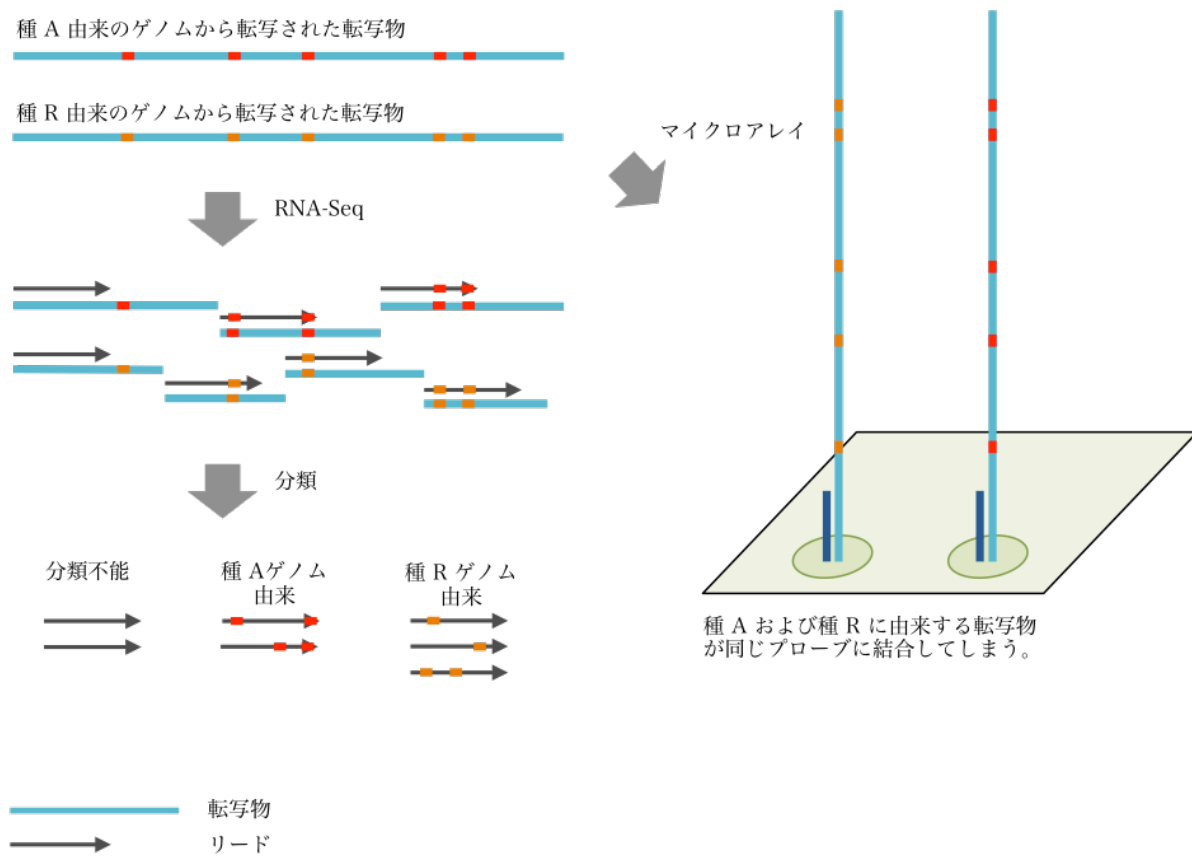


図 1-4

雑交種のゲノムに存在する相同性が非常に高い塩基配列を持つ遺伝子の発現量を、ゲノム種類ごとに定量するとき、マイクロアレイを用いると、短いプローブが共通しているために、異なるゲノムに由来する転写物が同じプローブに結合してしまう場合がある。これに対して、RNA-Seq では、シーケンシングされたリード上にある塩基の変異などを利用して、リードがどのゲノムに由来するのかを判定している。

第2節 異質倍数体と種の多様性

第1項 異質倍数体

農作物のように人工的に雑交することによって作られた雑交種のほかに、自然界にも多くの雑交種が存在する。これらの雑交種は、自然界で起こる倍数化とよばれる現象によって誕生したものである。倍数化は、生物のゲノムのセット数が通常よりも多くなる現象のことをいう。動物、菌類や植物などに普遍的に見られる。とりわけ植物でよく見られ、ほぼすべての被子植物が進化の過程において1回以上の倍数化を経験していると言われている²⁹⁻³¹。

倍数化は同種間の交雑あるいは近縁種（異種）間の交雑で起こる³²⁻³⁴（図 1-5）。同種間交雑により同じ種に由来するゲノムが1つの核に取り込まれることにより起こる倍数化は、同質倍数化と呼ばれている。これに対して、異種間交雑により異なる種のゲノムが1つの核に取り込まれることにより起こる倍数化は、異質倍数化と呼ばれている。

倍数化は植物の種の多様性や種分化に大きな影響を与えていると考えられる。例えば、同質倍数化により誕生した種は、同じ種に由来するゲノムのセット数よりも多く含む。そのため、多くの遺伝子重複が生じる。重複した遺伝子の片方に致命的な変異が入ったとしても、もう片方で正常に代謝を行うことができるため、植物は生存し続けることができる。このように遺伝子重複により、遺伝子に変異が入りやすくなり、最終的には新規遺伝子の獲得につながるのではないかと考えられている^{27,35}。また、異質倍数化により誕生した種は、異なる2近縁種由来のゲノムを同時に持つ。そのため、遺伝子重複のほかに、どちらかの親のみに由来する遺伝子をも持つようになる。したがって、異質倍数体は両親のニッチだけでなく、その中間のニッチにも適応できる考えられている³⁶⁻³⁸。

第2項 ホメオログ

同じ祖先種に由来する遺伝子が、異種間で保存されている場合、その遺伝子同士をオーソログ（ortholog）関係にあるという。このような2種のゲノムが異質倍数化により誕生した異質倍数体に取り込まれると、オーソログ関係にある遺伝子が同じ核内に存在するようになる。このとき、同じ核に取り込まれたオーソログ関係にある遺伝子をホメオログ（homeolog）という（図 1-6）。

異質倍数体の複数ゲノム上にあるホメオログを区別して行う発現解析は、昔から少なからず行われてきた。昔は数個のみのホメオログに対してcDNA-SSCP解析などにより発現解析が行われていた^{39,40}。現在ではRNA-Seqを利用した発現解析が行われるようになった^{21,22,38,41-44}。

先行研究によって、異質倍数体において2親種に由来するホメオログが同じ頻度で使われていないことが報告された^{38,39,45,46}。この現象はホメオログ発現バイアス（homeolog expression bias）として知られている。異質倍数体として知られている綿花についての先行研究を例に述べる。綿花 *G. hirsutum* はAゲノムとDゲノムを2セットずつ持つ異質倍数体として知られている。先行研究がcDNA-SSCPを用いて *adhA* の発現量を解析したところ、葉組織ではDゲノムからの発現量とAゲノ



図 1-5

同質倍数化は、同じ種に由来するゲノムが1つの核内に取り込まれる倍数化のことである。これに対して、異質倍数化は、異なる2つの近縁種のゲノムが1つの核内に取り込まれる倍数化のことである。

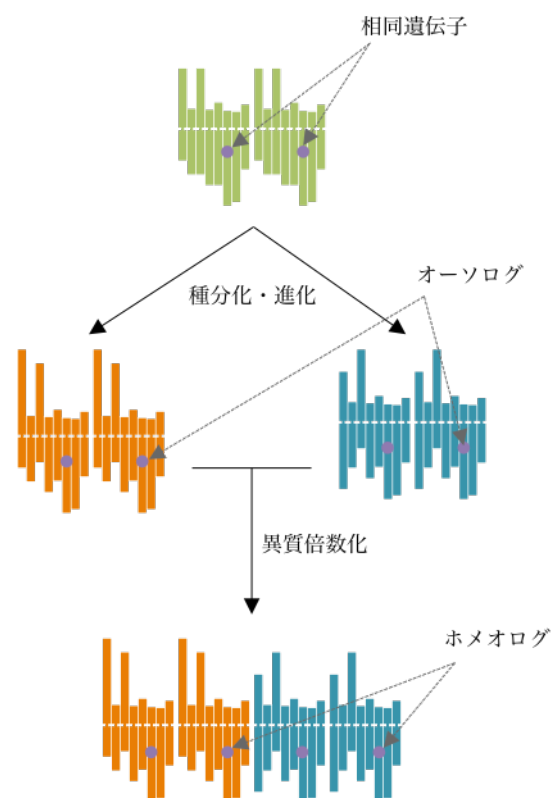


図 1-6

祖先種のゲノム上にある遺伝子が、種分化により誕生した種に保存される。新種で保存された遺伝子同士の関係をオーソログという。また、進化の過程において、これらの種のゲノムが倍数化などにより再び1つの核に取り込まれたとき、これら遺伝子同士の関係をホメオログという。

ムからの発現量の比は D:A = 65:35 となっていた。これに対して、花卉では D:A = 100:0、子葉では D:A = 34:66 などのように異なっていたことを報告した³⁹。その他に、ホメオログ発現バイアスは生育温度によって異なったり⁴⁵、概日リズムに伴って変化したり⁴⁶することが確認されている。ここで注意したいのは、ホメオログ発現バイアスを持つ遺伝子として報告された遺伝子の数は多くないことである。また、近年、RNA-Seq を利用したゲノムワイドな解析においては、多くのホメオログが等しい頻度で利用されていることがわかりつつある^{38,41,43}。

第3項 Cardamine 属

タネツケバナ (*Cardamine*) 属の植物は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の近縁種として知られる。タネツケバナ属の植物は、高緯度の地域に生息し、土壌湿度に応じて多様な種が存在する³⁶。例えば、スイスアルプスにある Urnerboden 村では *C. amara* ($2n = 2x = 16$, AA)、*C. rivularis* ($2n = 2x = 16$, RR) や *C. insueta* ($2n = 3x = 24$, RRA) をはじめとする多くのタネツケバナ属の植物が確認できる (図 1-7)^{37,47-49}。*C. amara* は、水中あるいは水辺で生息し、冠水された環境に置かれても生存できる^{36,50}。これに対して、*C. rivularis* は、牧草地のようにやや乾燥した場所で生息し、冠水した環境に置かれると生存できなくなる^{36,50}。このように、*C. amara* と *C. rivularis* の水に対する適応性は、明確に異なっている。また、水辺からやや乾燥した場所までの広い範囲において、異質倍数体である *C. insueta* が生息していることが確認できる。*C. insueta* は、およそ 150 年前に、*C. amara* と *C. rivularis* の自然交雑によって誕生したと考えられる^{37,47,48}。

C. amara、*C. rivularis* および *C. insueta* は、生殖様式も異なっている⁵⁰。*C. amara* は種子繁殖およびランナーによるクローン繁殖が可能であり、両方の生殖様式で繁殖している。水中などにおいて、クローン繁殖により形成された *C. amara* の群集がよくみられる (図 1-7B)。また、*C. rivularis* は種子繁殖および plantlet (栄養分体) によるクローン繁殖が可能である。しかし、*C. rivularis* は *C. amara* と異って種子繁殖が主であり、クローン繁殖がほとんど行われぬ。異質倍数体の *C. insueta* は 3 倍体であるために、花を咲かせることはできるが、発芽可能な種子を形成する確率は大きくない。また、*C. insueta* は *C. amara* のようにランナー、また *C. rivularis* のように plantlet の両方を形成できるが、ほとんどの場合、plantlet による繁殖を行っている。

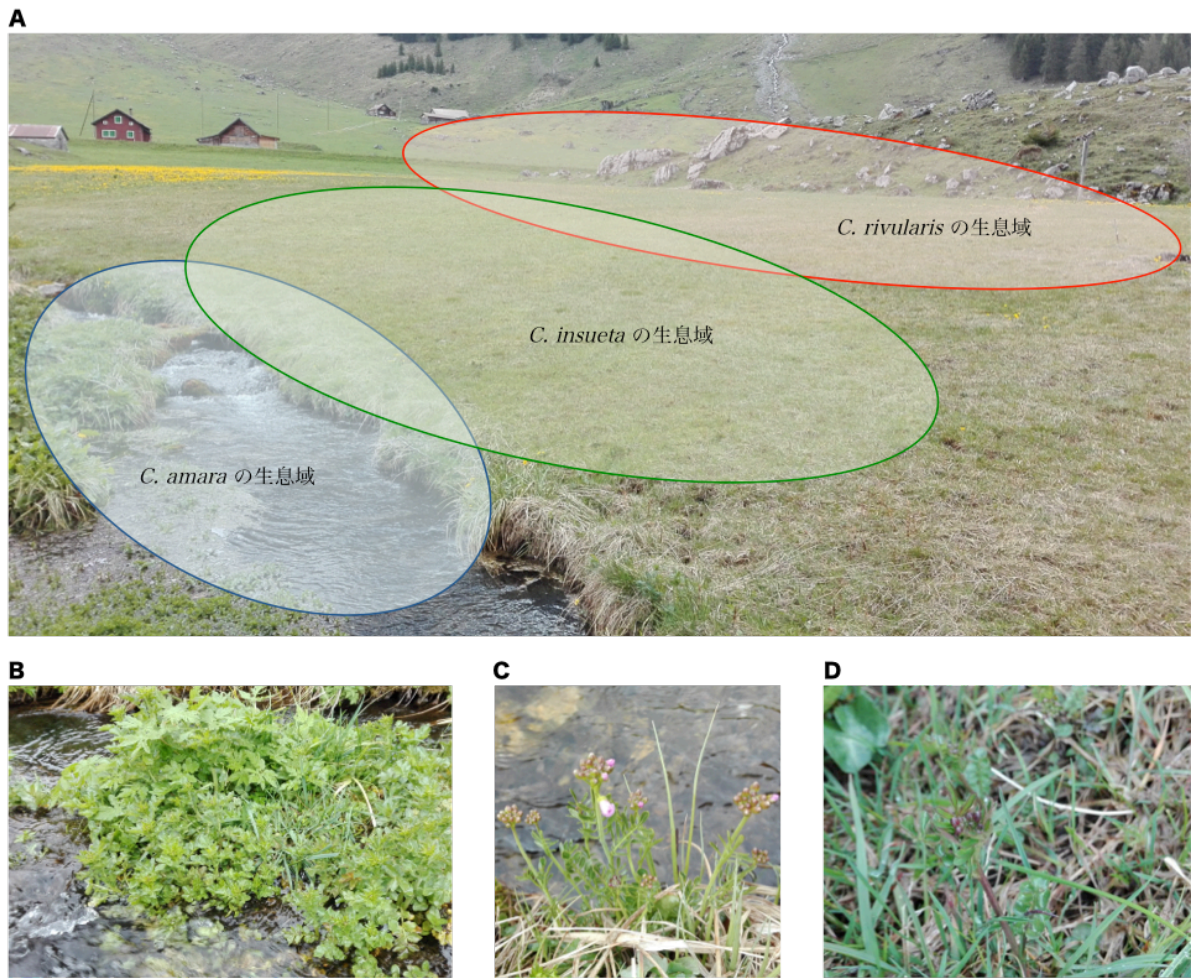


図 1-7

A Urnerboden はスイス中央にあるアルプス山脈に囲まれた谷地である。春先になると両側の山々から雪解け水が流れ落ち、山の麓に小川が流れるようになる。気温が上昇すると、雪解けが加速し、小川が氾濫する。そのため、小川の近くにある場所は水に浸されるようになる。しかし、両側の山から遠く離れた谷地の中央では雪溶け水に浸されず、牧草地となっている。**B** 小川の中で生息している *C. amara*。**C** 小川沿いに生息している *C. insueta*。**D** やや乾燥した場所で生息している *C. rivularis*。

第3節 研究内容と研究目的

異質倍数体は核内に複数の親種に由来するゲノムを同時に持つため、環境ストレスに対する応答は多様であると考えられる。*C. insueta* を例に示すと、ストレスを受けた *C. insueta* は、Aゲノム上のホメオログを *C. amara* と同じように発現量を変化させ、Rゲノム上のホメオログを *C. rivularis* と同じように発現量を変化させてストレスに応答する場合が考えられる。また、例えば *C. insueta* のAゲノム上とRゲノム上のホメオログ同士が相互作用し、*C. insueta* は両方のホメオログを *C. amara* と *C. rivularis* のいずれとも異なるように発現量を変化させてストレスに応答する場合も考えられる。こうした異質倍数体のストレス応答様式を明らかにすることは、異質倍数体の遺伝子発現およびその調節機構を解明する糸口になると考えられる。

そこで本研究では、異質倍数体のストレス応答様式が、その親種のストレス応答様式と比較してどのように異なっているのかを調べることを目的とした。農作物の多くは、品種改良が重ねられた結果、形質が安定化し、明確な形質が確認できない可能性がある。さらに、ゲノムサイズが非常に大きく、解析が困難な面がある。そこで、本研究では約150年前に誕生した新種で、かつゲノムサイズが小さい異質倍数体 *C. insueta* を利用することにした。*C. insueta* の親種である *C. amara* と *C. rivularis* は水に対する形質が明確に異なっている^{36,50}。そこで、この3種の植物の冠水ストレスに対する応答様式を観測すれば、異質倍数体と親種のストレス応答様式の違いを明らかにすることができる考えた。

本研究では、*C. amara*、*C. rivularis* および *C. insueta* の葉組織を水中に浸し、冠水後0時間、2時間、4時間、8時間、12時間、24時間、48時間、72時間および96時間の時点における葉細胞内の転写物を定量したRNA-Seqデータの解析を行った。具体的には、(1) RNA-Seqのデータから遺伝子発現量を計算し、(2) 冠水後に発現量が有意に変化した発現変動遺伝子の種間差を調べ、また、(3) *C. insueta* のホメオログの発現比率の冠水後の変化を調べた。これらの結果を基に、異質倍数体のストレス応答様式が、その親種のストレス応答様式と比較してどのように異なっているのかについて考察を行った。

第4節 本研究の位置付け

異質倍数体のホメオログの発現量に着目した研究はこれまでもいくつか行われている^{21,22,38-44}。

先行研究について幾つかをここで紹介する。

1. *A. kamchatica* の亜鉛蓄積性

A. kamchatica ($4x = 32$, HHAA)は、*A. halleri* ($2x = 16$, HH)と *A. lyrata* ($2x = 16$, AA)が自然交雑することによって誕生した種である。*A. halleri* は亜鉛を個体内に高濃度で蓄積できる形質 (hyperaccumulation) を持つのに対して、*A. lyrata* は hyperaccumulation の性質を持たない。高亜鉛濃度の環境において *A. kamchatica* のホメオログの発現が通常の環境に比べてどのように異なっているのかを調べるために、Paape らは RNA-Seq 実験を行い、高亜鉛濃度の環境で植栽された *A. kamchatica* のホメオログの発現を観測した⁴⁴。その結果、Paape らは、*A. kamchatica* の金属輸送に関わるホメオログは、A ゲノムに比べ、H ゲノムから発現している割合が大きいと報告した⁴⁴。

2. *Brassica juncea* のホメオログ発現

異質倍数体 *B. juncea* ($4x = 36$, AABB)は *B. rapa* ($2x = 20$, AA)と *B. nigra* ($2x = 16$, BB)の雑交種である。Jinghua らは *B. juncea* のゲノムを解読し、A ゲノムから発現するホメオログと B ゲノムから発現するホメオログの発現量の比率を求めたところ、観測した全ホメオログのうち 8.0%が主に A ゲノムから優先的に発現し、8.2%のホメオログが主に B ゲノムから優先的に発現し、残りの 83.8%のホメオログは A ゲノムと B ゲノムからほぼ等頻度で発現していることを明らかにした⁵¹。また、この比率は、高温ストレスや乾燥ストレスにさらされた時に大きく変化することはなかった。

3. *Capsella bursa-pastoris* のホメオログ発現

C. bursa-pastoris ($4x$, GG00)は *C. grandiflora* ($2x$, GG)と *C. orientalis* ($2x$, 00)の雑交種である。Gavin らは、*C. bursa-pastoris* の G ゲノムから発現するホメオログと O ゲノムから発現するホメオログの発現量の比率を調べたところ、全観測ホメオログのうち 3%のホメオログが G ゲノムまたは O ゲノムから優先的に発現していると報告した⁴³。

4. 概日リズムに応答する *CAAI* ホメオログの発現

Zhongfu らは、*A. thaliana* ($2x = 16$, TT)と *A. arenosa* ($2x = 16$, AA)を人工的に倍数化させて作成した異質倍数体を利用して、異質倍数体の細胞内における *CAAI* (circadian clock associated 1)ホメオログの発現量を観測した。その結果、*CAAI* は、暗期では T ゲノムと A ゲノムから同じ頻度で発現しているのに対して、明期では A ゲノムから優先的に発現しているのがわかった。

以上で見たように、これらの先行研究には、少数のホメオログに着目したものや異なる 2 状態間のホメオログに着目したものがあるが、本研究のように、時系列的に調べた研究はこれまで行われていない。

本研究で明らかにする異質倍数体のストレス応答様式およびそれと親種のストレス応答様式の違いは、今後の異質倍数体の研究に新しい可能性を提示できると期待される。また、今後、こうした研究が多く行われることによって、異質倍数体と親種の遺伝子発現およびその調節機構のモデル化が可能になり、品種改良を目的とした効率的な雑交種の作成に役立つと考えられる。ストレス耐性が強く、生産高の多い作物の作成に応用できれば、安定的な食糧供給が期待される。

第2章 遺伝子発現量の定量

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第3章 冠水ストレスに応答する発現変動遺伝子

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第4章 異質倍数体のホメオログ発現比率

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第5章 総合討論

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

引用文献

1. Baroja-Fernández, E. *et al.* Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* Arabidopsis mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 321–326 (2012).
2. Licausi, F. *et al.* HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **62**, 302–315 (2010).
3. Santaniello, A., Loreti, E., Gonzali, S., Novi, G. & Perata, P. A reassessment of the role of sucrose synthase in the hypoxic sucrose-ethanol transition in Arabidopsis. *Plant, Cell Environ.* **37**, 2294–2302 (2014).
4. Banti, V. *et al.* Low oxygen response mechanisms in green organisms. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 4734–61 (2013).
5. Mithran, M., Paparelli, E., Novi, G., Perata, P. & Loreti, E. Analysis of the role of the pyruvate decarboxylase gene family in Arabidopsis thaliana under low-oxygen conditions. *Plant Biol.* **16**, 28–34 (2014).
6. Voeselek, L. a C. J., Colmer, T. D., Pierik, R., Millenaar, F. F. & Peeters, a. J. M. How plants cope with complete submergence. *New Phytol.* **170**, 213–226 (2006).
7. Voeselek, L. A. C. J. & Bailey-Serres, J. Flood adaptive traits and processes: An overview. *New Phytol.* **206**, 57–73 (2015).
8. Lee, S. C. *et al.* Molecular characterization of the submergence response of the Arabidopsis thaliana ecotype Columbia. *New Phytol.* **190**, 457–471 (2011).
9. Gallego Romero, I., Pai, A. A., Tung, J. & Gilad, Y. RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. *BMC Biol.* **12**, 42 (2014).
10. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 57–63 (2009).
11. Wagner, G. P., Kin, K. & Lynch, V. J. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory Biosci.* **131**, 281–285 (2012).
12. Trapnell, C. *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **28**, 511–515 (2010).

13. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2009).
14. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
15. Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**, R106 (2010).
16. Hardcastle, T. J. & Kelly, K. A. baySeq: empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data. *BMC Bioinformatics* **11**, 422 (2010).
17. Sun, J., Nishiyama, T., Shimizu, K. & Kadota, K. TCC: An R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics* **14**, (2013).
18. Roberts, A., Pimentel, H., Trapnell, C. & Pachter, L. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-seq. *Bioinformatics* **27**, 2325–2329 (2011).
19. Weikard, R., Hadlich, F. & Kuehn, C. Identification of novel transcripts and noncoding RNAs in bovine skin by deep next generation sequencing. *BMC Genomics* **14**, 789 (2013).
20. Albalat, R., Baquero, M. & Minguillón, C. Identification and characterisation of the developmental expression pattern of *tbx5b*, a novel *tbx5* gene in zebrafish. *Gene Expr. Patterns* **10**, 24–30 (2010).
21. Matos, I., Machado, M. P., Scharl, M. & Coelho, M. M. Gene Expression Dosage Regulation in an Allopolyploid Fish. *PLoS One* **10**, e0116309 (2015).
22. Wang, X. *et al.* Transcriptome asymmetry in synthetic and natural allotetraploid wheats, revealed by RNA-sequencing. *New Phytol.* **209**, 1264–1277 (2016).
23. Zhang, H. *et al.* Transcriptome shock invokes disruption of parental expression-conserved genes in tetraploid wheat. *Sci. Rep.* **6**, 26363 (2016).
24. Chen, Z. J. Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 377–406 (2007).
25. Renny-Byfield, S. & Wendel, J. F. Doubling down on genomes: Polyploidy and crop plants. *Am. J. Bot.* **101**, 1711–1725 (2014).
26. Foster, J. T. *et al.* Genotyping of *Brucella* species using clade specific SNPs. *BMC Microbiol.* **12**, 110 (2012).
27. Rutter, M. T., Cross, K. V. & Van Woert, P. A. Birth, death and subfunctionalization in the Arabidopsis genome. *Trends Plant Sci.* **17**, 204–212 (2012).
28. Meirmans, P. G., Lamothe, M., Périnet, P. & Isabel, N. Species-specific single nucleotide polymorphism markers for detecting hybridization and introgression in poplar

- is one of a selection of papers published in the Special Issue on Poplar Research in Canada. *Can. J. Bot.* **85**, 1082–1091 (2007).
29. Leitch, I. J. & Bennett, M. D. Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci.* **2**, 470–476 (1997).
 30. Masterson, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* **264**, 421–4 (1994).
 31. Wendel, J. F. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.* **42**, 225–49 (2000).
 32. Adams, K. L. Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants. *J. Hered.* **98**, 136–41 (2007).
 33. Yoo, M.-J., Szadkowski, E. & Wendel, J. F. Homoeolog expression bias and expression level dominance in allopolyploid cotton. *Heredity (Edinb.)*. **110**, 171–180 (2013).
 34. Abbott, R. *et al.* Hybridization and speciation. *J. Evol. Biol.* **26**, 229–246 (2013).
 35. Otto, S. P. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* **131**, 452–62 (2007).
 36. Shimizu-Inatsugi, R. *et al.* Plant adaptive radiation mediated by polyploid plasticity in transcriptomes. *Mol. Ecol.* (2016). doi:10.1111/mec.13738
 37. Mandáková, T. *et al.* The more the merrier: Recent hybridization and polyploidy in Cardamine. *Plant Cell Online* **25**, 3280–3295 (2013).
 38. Akama, S., Shimizu-Inatsugi, R., Shimizu, K. K. & Sese, J. Genome-wide quantification of homeolog expression ratio revealed nonstochastic gene regulation in synthetic allopolyploid Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* **42**, 1–15 (2014).
 39. Adams, K. L., Cronn, R., Percifield, R. & Wendel, J. F. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4649–54 (2003).
 40. Cronn, R. C. & Adams, K. L. Quantitative analysis of transcript accumulation from genes duplicated by polyploidy using cDNA-SSCP. *Biotechniques* **34**, 726–34 (2003).
 41. Shi, X. *et al.* Cis- and trans-regulatory divergence between progenitor species determines gene-expression novelty in Arabidopsis allopolyploids. *Nat. Commun.* **3**, 950–959 (2012).
 42. Yang, C. *et al.* Evolution of physiological responses to salt stress in hexaploid wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 11882–7 (2014).
 43. Douglas, G. *et al.* Hybrid origins and the earliest stages of diploidization in the highly successful recent polyploid *Capsella bursa-pastoris*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 2806–2811 (2015).
 44. Paape, T. *et al.* Conserved but Attenuated Parental Gene Expression in Allopolyploids: Constitutive Zinc Hyperaccumulation in the Allotetraploid Arabidopsis kamchatica. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 2781–2800 (2016).

45. Combes, M. C., Cenci, A., Baraille, H., Bertrand, B. & Lashermes, P. Homeologous gene expression in response to growing temperature in a recent allopolyploid (*Coffea arabica* L.). *J. Hered.* **103**, 36–46 (2012).
46. Ni, Z. *et al.* Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* **457**, 327–31 (2009).
47. Zozomova-Lihova, J. *et al.* Multiple hybridization events in Cardamine (Brassicaceae) during the last 150 years: revisiting a textbook example of neoallopolyploidy. *Ann. Bot.* **113**, 817–830 (2014).
48. Urbanska, K. M., Hurka, H., Landolt, E., Neuffer, B. & Mummenhoff, K. Hybridization and evolution in Cardamine (Brassicaceae) at Urnerboden, central Switzerland: Biosystematic and molecular evidence. *Pl Syst Evol* **204**, 233–256 (1997).
49. Zimmerli, S. The influence of management upon development and structure of Cardamine populations at Urnerboden. *Stift. Rübel* **87**, 141 (1986).
50. Urbanska, K. Reproductive Strategies in some Perennial Angiosperms. *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft Zürich* 269–284 (1981).
51. Yang, J., Liu, D., Wang, X., Ji, C. & Cheng, F. The genome sequence of allopolyploid *Brassica juncea* and analysis of differential homoeolog gene expression influencing selection. *Nat. Genet.* **48**, (2016).
52. Gan, X. *et al.* The Cardamine *hirsuta* genome offers insight into the evolution of morphological diversity. *Nat. plants* **2**, 16167 (2016).
53. Mandáková, T., Marhold, K. & Lysak, M. A. The widespread crucifer species Cardamine *flexuosa* is an allotetraploid with a conserved subgenomic structure. *New Phytol.* **201**, 982–92 (2014).
54. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
55. Li, H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* **27**, 2987–2993 (2011).
56. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
57. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
58. Schmieder, R. & Edwards, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* **27**, 863–864 (2011).

59. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930 (2014).
60. Consortium, T. G. O. Gene ontology: Tool for the identification of biology. *Nat. Genet.* **25**, 25–29 (2000).
61. Huntley, R. P., Sawford, T., Martin, M. J. & O'Donovan, C. Understanding how and why the Gene Ontology and its annotations evolve: the GO within UniProt. *Gigascience* **3**, 4 (2014).
62. Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y. & He, Q.-Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* **16**, 284–7 (2012).
63. Yu, G. *et al.* GOSemSim: An R package for measuring semantic similarity among GO terms and gene products. *Bioinformatics* **26**, 976–978 (2010).
64. Robinson, M. D. & Smyth, G. K. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics* **9**, 321–332 (2008).
65. Anne E. Hall, Findell, J. L., Schaller, G. E., Sisler, E. C. & Bleecker, A. B. Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **123**, 1449–1458 (2000).
66. Liu, Q. & Wen, C.-K. Arabidopsis ETR1 and ERS1 differentially repress the ethylene response in combination with other ethylene receptor genes. *Plant Physiol.* **158**, 1193–207 (2012).
67. Ndamukong, I. *et al.* SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant J.* **50**, 128–139 (2007).
68. Farinas, B. & Mas, P. Histone acetylation and the circadian clock: a role for the MYB transcription factor RVE8/LCL5. *Plant Signal. Behav.* **6**, 541–543 (2011).
69. Chae, K. *et al.* A multifaceted study of stigma/style cysteine-rich adhesin (SCA)-like Arabidopsis lipid transfer proteins (LTPs) suggests diversified roles for these LTPs in plant growth and reproduction. *J. Exp. Bot.* **61**, 4277–4290 (2010).
70. Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in Arabidopsis thaliana. *MGG Mol. Gen. Genet.* **238**, 17–25 (1993).
71. Himuro, Y. *et al.* Arabidopsis galactinol synthase AtGols2 improves drought tolerance in the monocot model Brachypodium distachyon. *J. Plant Physiol.* **171**, 1127–1131 (2014).
72. Honna, P. T. *et al.* Molecular, physiological, and agronomical characterization, in greenhouse and in field conditions, of soybean plants genetically modified with AtGols2 gene for drought tolerance. *Mol. Breed.* **36**, 157 (2016).

73. Muraoka, R., Okuda, K., Kobayashi, Y. & Shikanai, T. A Eukaryotic Factor Required for Accumulation of the Chloroplast NAD(P)H Dehydrogenase Complex in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **142**, 1683–1689 (2006).
74. Long, T. A., Okegawa, Y., Shikanai, T., Schmidt, G. W. & Covert, S. F. Conserved role of PROTON GRADIENT REGULATION 5 in the regulation of PSI cyclic electron transport. *Planta* **228**, 907–918 (2008).
75. Wu, H.-Y., Liu, M.-S., Lin, T.-P. & Cheng, Y.-S. Structural and Functional Assays of AtTLP18.3 Identify Its Novel Acid Phosphatase Activity in Thylakoid Lumen. *Plant Physiol.* **157**, 1015–1025 (2011).
76. Liu, F. *et al.* Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **137**, 1115–1129 (2005).
77. Hinz, M. *et al.* Arabidopsis RAP2.2: An Ethylene Response Transcription Factor That Is Important for Hypoxia Survival. *Plant Physiol.* **153**, 757–772 (2010).
78. Kosmacz, M. *et al.* The stability and nuclear localization of the transcription factor RAP2.12 are dynamically regulated by oxygen concentration. *Plant, Cell Environ.* **38**, 1094–1103 (2015).
79. Licausi, F. *et al.* Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* **479**, 419–422 (2011).
80. Weits, D. A. *et al.* Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nat. Commun.* **5**, 3425 (2014).
81. Sasidharan, R. & Mustroph, A. Plant oxygen sensing is mediated by the N-end rule pathway: a milestone in plant anaerobiosis. *Plant Cell* **23**, 4173–83 (2011).
82. Okamoto, J. K., Caster, B., Villarreal, R., Van Montagu, M. & Jofuku, K. D. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7076–81 (1997).
83. Guglielminetti, L., Perata, P. & Alpi, A. Effect of Anoxia on Carbohydrate Metabolism in Rice Seedlings. *Plant Physiol.* **108**, 735–741 (1995).
84. Hay, A. & Tsiantis, M. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development* **137**, 3153–3165 (2010).
85. Garcês, H. M. P. *et al.* Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoë*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15578–15583 (2007).
86. Garcês, H. & Sinha, N. The ‘Mother of Thousands’ (*Kalanchoë daigremontiana*): A plant model for asexual reproduction and CAM studies. *Cold Spring Harb. Protoc.* **4**, 1–10 (2009).

87. Canales, C., Barkoulas, M., Galinha, C. & Tsiantis, M. Weeds of change: *Cardamine hirsuta* as a new model system for studying dissected leaf development. *J. Plant Res.* **123**, 25–33 (2010).
88. Barkoulas, M., Hay, A., Kougioumoutzi, E. & Tsiantis, M. A developmental framework for dissected leaf formation in the *Arabidopsis* relative *Cardamine hirsuta*. *Nat. Genet.* **40**, 1136–41 (2008).
89. Scofield, S., Dewitte, W. & Murray, J. A. H. The KNOX gene SHOOT MERISTEMLESS is required for the development of reproductive meristematic tissues in *Arabidopsis*. *Plant J.* **50**, 767–781 (2007).
90. Chai, M. *et al.* A class II KNOX gene, KNOX4, controls seed physical dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 6997–7002 (2016).
91. Lewis, D. R., Negi, S., Sukumar, P. & Muday, G. K. Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development* **138**, 3485–3495 (2011).
92. Kyndt, T. *et al.* Redirection of auxin flow in *Arabidopsis thaliana* roots after infection by root-knot nematodes. *J. Exp. Bot.* **67**, 4559–70 (2016).
93. Mravec, J. *et al.* Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* **459**, 1136–1140 (2009).
94. Bender, R. L. *et al.* PIN6 is required for nectary auxin response and short stamen development. *Plant J.* **74**, 893–904 (2013).
95. Jeon, Y. *et al.* The nucleolar GTPase nucleostemin-like 1 plays a role in plant growth and senescence by modulating ribosome biogenesis. *J. Exp. Bot.* **66**, 6297–6310 (2015).
96. Wang, X., Xie, B., Zhu, M., Zhang, Z. & Hong, Z. Nucleostemin-like 1 is required for embryogenesis and leaf development in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **78**, 31–44 (2012).
97. Leasure, C. D. *et al.* ROOT UV-B SENSITIVE2 acts with ROOT UV-B SENSITIVE1 in a root ultraviolet B-sensing pathway. *Plant Physiol.* **150**, 1902–15 (2009).
98. Mustroph, A., Sonnewald, U. & Biemelt, S. Characterisation of the ATP-dependent phosphofructokinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **581**, 2401–2410 (2007).
99. Nelissen, H. DRL1, a Homolog of the Yeast TOT4/KTI12 Protein, Has a Function in Meristem Activity and Organ Growth in Plants. *Plant Cell Online* **15**, 639–654 (2003).
100. Hartigan, J. A. & Wong, M. A. Algorithm AS 136: A K-Means Clustering Algorithm. *Appl. Stat.* **28**, 100 (1979).

101. Shimizu-Inatsugi, R. *et al.* The allopolyploid *Arabidopsis kamchatica* originated from multiple individuals of *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis halleri*. *Mol. Ecol.* **18**, 4024–4048 (2009).
102. Tsuchimatsu, T., Kaiser, P., Yew, C. L., Bachelier, J. B. & Shimizu, K. K. Recent loss of self-incompatibility by degradation of the male component in allotetraploid *Arabidopsis kamchatica*. *PLoS Genet.* **8**, 16–19 (2012).
103. McClintock, B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* **226**, 792–801 (1984).
104. Wu, Y. *et al.* Transcriptome shock in an interspecific F1 triploid hybrid of *Oryza* revealed by RNA sequencing. *J. Integr. Plant Biol.* **58**, 150–164 (2016).
105. Buggs, R. J. A. *et al.* Transcriptomic shock generates evolutionary novelty in a newly formed, natural allopolyploid plant. *Curr. Biol.* **21**, 551–556 (2011).
106. Comai, L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol. Biol.* **43**, 387–99 (2000).
107. Slotkin, R. K. Plant epigenetics: from genotype to phenotype and back again. *Genome Biol.* **17**, 57 (2016).
108. Liu, B. & Wendel, J. F. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Mol. Phylogenet. Evol.* **29**, 365–379 (2003).
109. Paun, O. *et al.* Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid orchids (*Dactylorhiza*: *Orchidaceae*). *Mol. Biol. Evol.* **27**, 2465–73 (2010).
110. Lee, H. S. & Chen, Z. J. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6753–6758 (2001).
111. Madlung, A. *et al.* Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physiol.* **129**, 733–746 (2002).
112. Mittelsten Scheid, O., Afsar, K. & Paszkowski, J. Formation of stable epialleles and their paramutation-like interaction in tetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* **34**, 450–454 (2003).
113. Farh, K. K.-H. *et al.* The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* **310**, 1817–21 (2005).
114. Barbash, D. A., Siino, D. F., Tarone, A. M. & Roote, J. A rapidly evolving MYB-related protein causes species isolation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 5302–5307 (2003).
115. Lynch, M. & Conery, J. S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290**, 1151–5 (2000).

116. Wang, J., Tian, L., Lee, H. S. & Chen, Z. J. Nonadditive regulation of FRI and FLC loci mediates flowering-time variation in Arabidopsis allopolyploids. *Genetics* **173**, 965–974 (2006).
117. Swanson-Wagner, R. a *et al.* All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F1 hybrid and its inbred parents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6805–6810 (2006).
118. He, P., Friebe, B. R., Gill, B. S. & Zhou, J. M. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Mol. Biol.* **52**, 401–414 (2003).
119. Combes, M. C. *et al.* Regulatory divergence between parental alleles determines gene expression patterns in hybrids. *Genome Biol. Evol.* **7**, 1110–1121 (2015).
120. Lemmon, Z. H., Bukowski, R., Sun, Q. & Doebley, J. F. The role of cis regulatory evolution in maize domestication. *PLoS Genet.* **10**, e1004745 (2014).
121. Suvorov, A. *et al.* Intra-specific regulatory variation in *Drosophila pseudoobscura*. *PLoS One* **8**, e83547 (2013).
122. Glover, N. M., Redestig, H. & Dessimoz, C. Homoeologs: What Are They and How Do We Infer Them? *Trends Plant Sci.* **21**, 609–21 (2016).

付録

付録 1

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。