

維管束植物の茎頂とホメオボックス遺伝子

長谷部光泰¹、佐野亮介²

¹基礎生物学研究所 (〒444 岡崎市明大寺町)

²千葉大学理学部 (〒263 千葉市稲毛区弥生町)

Mitsuyasu Hasebe¹ and Ryosuke Sano²

¹National Institute for Basic Biology, Myodaiji-cho, Okazaki, 444 Japan

²Faculty of Science, Chiba University, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba, 260 Japan

要旨

KNOX 遺伝子群は、ホメオボックスを持ち、植物の器官分化に関わると考えられている。mRNA、タンパク質の発現様式、突然変異体の解析から、シュート分化、複葉形成に関係しているらしいことがわかってきた。しかし、機能にあいまいな点もあり、これは、遺伝子重複によって生じたいくつかの遺伝子が redundancy を持ち、進化しつつある状態を反映している可能性が高い。KNOX 遺伝子の最近の研究を総説する。

Abstract

Genes of the KNOX gene family have the homeo domain and have been revealed to be related to the organogenesis in plants. Based on the results of mRNA and protein *in situ* hybridization and mutant analyses, the genes closely related to the maize *knotted-1* gene were reported to be involved in the shoot differentiation and the compound leaf formation. Redundancy of the genes in the family are observed and it may show the evolutionary dynamics of the gene family. Recent studies on the KNOX genes are reviewed.

key words: KNOX, homeobox, shoot apical meristem, leaf primordium, knotted

はじめに

植物のシュートは茎頂分裂組織 (shoot apical meristem) から形成される。シダ植物の茎頂分裂組織は、ヒカゲノカズラ類を除き、はっきりと識別できる一つの頂端細胞を持っている。しかし、種子植物では、はっきりとした単一の頂端細胞は認識できず、多数の細胞群によって茎頂分裂組織が構成されている。また、コケ植物は一般にはっきりと識別できる一つの頂端細胞を配偶体の分裂組織に持っていることから、シダ植物のような茎頂がより原始的であろうと推定される。種子植物の系統では、どのような遺伝子の変化が起こることによって、このような形態的变化 (進化) が引き起こされたのであろうか。また、種子植物での複雑な茎頂の進化は、種子植物進化においてどのような意味があったのであろうか。

一方、はっきりと識別できる一つの頂端細胞を持つ茎頂を形成する時期と、多数の細胞によって構成される茎頂分裂組織を形成する時期を合わせ持つ植物も知られている。シダ類のミズワラビでは、胞子から発芽した直後の原糸体は、はっきりとした一つの頂端細胞を持ち、その形態は、胞子体の茎頂分裂組織の頂端細胞と良く似ている。しかし、原糸体が2次元成長を開始し、ハート型の前葉体が形成されるころには、外見上

区別できないいくつかの細胞からなる茎頂分裂組織を持つようになる。このような形態形成の時間的な制御はどのような機構によって行われ、どのような意味があるのだろうか。

これらの問題にアプローチするためには、モデル植物の茎頂分裂組織を形成している遺伝子群を解析することが先決となる。茎頂分裂組織特異的に発現している遺伝子がこれまでいくつか単離され解析されている (Medford, 1992)。その中で、最も解析が進んでいるのが KNOX 遺伝子群である。本総説では、KNOX 遺伝子と形態との関係について整理する。

KNOX 遺伝子群とそのホモログ

トウモロコシの *Knotted-1* (*Kn1*) 遺伝子の gain of function の優性突然変異体は、葉に形態異常をきたし、葉身の側脈上に異所的に葉舌が形成され、瘤ができる。この遺伝子がトランスポゾンタギングによって単離され、動物で形態形成に重要な働きを持っているホメオドメインを持つ遺伝子であることがわかった (Vollbrecht et al., 1991)。Kn-1 遺伝子のホメオドメインは DNA 結合能、核移行シグナル能を持ち (Meisel and Lam, 1996)、形態形成における制御遺伝子として機能しているのではないかと推定されている。その後いくつかの植物群から、類似の遺伝子が単離され、総称して KNOX 遺伝子群と呼ばれている。形態形成における制御遺伝子は、植物では、他に MADS 遺伝子群や LEAFY 遺伝子群などが知られており、形態進化において重要な役割を果たしたのではないかと考えられている。Kn-1 遺伝子が単離された当初は、葉に形態変異を引き起こす変異体であることから、葉で発現し、その形態形成に関係する遺伝子であろうと推測されていた。しかし、mRNA、タンパク質の発現様式の解析 (Smith et al., 1992; Jackson et al., 1994) は、予想を覆すものだった。

Kn-1 遺伝子の mRNA は、栄養および花序茎頂分裂組織周辺で検出され、葉原基ができる部分では、発現が抑制されていた。そして、葉では、少なくとも形態形成初期においては、全く発現が見られなかった。また、タンパク質も、ほぼ同じ組織の核で検出されており、茎頂分裂組織周辺で転写調節の働きをしていると考えられている。mRNA とタンパク質の発現様式が異なる部分もあった。mRNA は茎頂分裂組織の内体のみで発現し、外衣では発現していなかったが、タンパク質は、外衣、内体の両方で検出された。このことは、KN1 タンパク質自体が細胞間におけるシグナルとして働いていることを示唆しているのかもしれない (Jackson et al., 1994)。Kn-1 変異体において、Kn-1 遺伝子は葉身の維管束のみで異所的に発現しているが、葉肉、表皮細胞に変異を起こして瘤を形成することとも関係しているかもしれない。実際に、KN1 タンパク質は、原形質連絡を通して自分自身、一定の大きさ以下の他のタンパク質、そして特定の mRNA を移動させる能力があることが示されている (Lucas et al., 1995)。KN1 のこの能力は、植物の器官分化が細胞系譜よりは位置情報によって支配されており、そのためには、細胞間の情報伝達が必須であることと深く関わっている可能性がある。

茎頂分裂組織で強い発現が見られたが、その機能はいったいなんなのだろうか。過剰発現実験がそのことに対する示唆を与えてくれている (Sinha et al., 1993)。Kn-1 遺伝子をタバコで過剰発現させると、葉が縮み、3 裂する。また、strong 突然変異体では、主脈向軸側からシュートが分化し、その後花序となり、花を咲かせる。葉は、有限成長器官であり、そこに異所的に無限成長器官であるシュートが分化することから、Kn-1 遺伝子は、有限成長と無限成長を制御しているのでは、ないかと考察された。また、動物のホメオボックス遺伝子機能からの類推として、Kn-1 遺伝子は、細胞がどの器官になるかの決定にかかわっているのではないかと考えられているが、動物と植物の共通祖先種は単細胞生物であり、両系統は独立に多細胞化をとげた生物群であるから、安易に多細胞動物での研究に植物ホメオボックス遺伝子機能をなぞらえるのは

注意が必要である。いずれにしろ、*Kn-1* 遺伝子の発現が茎頂分裂組織で強く見られ、葉原基が形成されるときには抑制されることも考えあわせると、*Kn-1* 遺伝子が、シュートの分化に関わっていることは確かそうである。シロイヌナズナでの *Kn-1* 遺伝子のホモログである *KNAT1* 遺伝子の発現様式、過剰発現実験結果もほぼ同様であった (Lincoln et al., 1994)。

一方、過剰発現形質転換体に見られた、葉が縮み、しばしば裂片を形成するという性質は、*Kn-1* 遺伝子の別の機能を現しているのかもしれない。タバコは元来単葉を持つが、複葉を持つトマトで *Kn-1* 遺伝子を過剰発現させると、複葉化が著しく促進され、1枚の葉に数百以上の小葉が形成されるようになることがわかった (Hareven et al., 1996)。このことから、*Kn-1* 遺伝子は、複葉形成にも関与している可能性がある。では、タバコの葉はどうして裂片ができるだけで、トマトのように著しい複葉化をしなかったのであろうか。トマトにも、タバコのように単葉を付ける優性の *Lanceolate* 突然変異体がある。この変異体で、*Kn-1* 遺伝子を過剰発現させると、タバコで観察されたように裂片ができ縮れた葉の表現型を示すようになる。このことから、トマトとタバコでみられた *Kn-1* 遺伝子の過剰発現にたいする表現型の違いは、*Kn-1* 遺伝子の下流にある *Lanceolate* 遺伝子の違いによって引き起こされている可能性が高い。また、トマトには、複葉形成に関する突然変異体がいくつか報告されているが、*Petroselinum*, *potato-leaf* 突然変異体では、これらの表現型と独立に *Kn-1* 遺伝子を過剰発現させた影響が出ることから、複葉形成には *Kn-1* 遺伝子系だけではなく、いくつかの遺伝子系が関与していることが示唆される。このことは、被子植物の葉型の多様性を分子レベルで解明するうえで、興味を持たれる。さらに、異常に複葉化した *Kn-1* 遺伝子過剰発現トマトでは、複葉形成時にシダ植物やソテツ類でみられるような、ワラビ巻きができることも特筆に値する。

以上の結果から、*Kn-1* 遺伝子と他の植物でのホモログは、シュート分化と複葉形成に関与していることが示唆された。しかし、遺伝子機能をはっきりと解析するには、loss of function 突然変異体あるいは遺伝子破壊した形質転換体の観察が必須である。シロイヌナズナで子葉は形成するが、茎頂が形成されないために、本葉をつけたシュートが形成されない *Shoot meristem less (stm)* 突然変異体の遺伝子が単離され、*Kn-1* 遺伝子に類似した配列を持っていることから (Long et al., 1996)、*Kn-1* 遺伝子群の loss of function 突然変異体であることがわかった。*STM* 遺伝子は、突然変異体から予想される通り、野生型においては、若い胚の茎頂分裂組織、栄養茎頂分裂組織、花序茎頂分裂組織の頂端周辺で発現していた。そして、栄養茎頂分裂組織の葉原基、花序茎頂分裂組織の花原基が形成される部分では、発現が抑制されていることがわかった。これらの結果から、初期に *Kn-1* 遺伝子群の研究で予想されていたように、*KNOX* 遺伝子群は、確かにシュート分化に関与していることがわかる。

しかし、いくつか腑に落ちない現象もある。トウモロコシでは、栄養茎頂とともに、花序茎頂でも *Kn-1* 遺伝子が発現しているが、シロイヌナズナの *Kn-1* ホモログである *KNAT1* は栄養茎頂のみで発現し、花序茎頂では発現しないこと (Lincoln et al., 1994)、先述したトマトのホモログ (*Tkn1*) は、茎頂だけでなく、葉原基でも発現していること (Hareven et al., 1996)、など疑問点が多い。さらに、トウモロコシ *Kn-1* 遺伝子自体についても、どうして *Kn-1* 変異体の葉に異所的に葉舌ができるのか、不明である。同じイネ科のイネにおける *Kn-1* ホモログである *OSH1* をタバコで過剰発現させると、*Kn-1* の過剰発現時と同じように葉脈からシュートが分化するが、イネ自身で過剰発現させると、葉に異所的な葉舌が形成される (Matsuoka et al., 1995)。異所的な葉舌形成については、(1) タバコと異なり、トウモロコシやイネでは、*Kn-1* 遺伝子は葉舌形成能を持っている、(2) 葉舌は、葉形態形成における基底状態 ground state であって、*Kn-1* 遺伝子とそのホモログは、形態形成の進行を阻害し、無分化な状態を維持する機能を持つため、葉への分化が滞り、葉舌が分化した、(3) *Kn-1* 遺伝子は形態の異時性に関わる遺伝子で、葉身形成期にある部分に異所的

に作用して、葉舌形成期にスイッチさせたといった仮説がたてられているが (Hake, 1992; Freeling et al., 1992; Sinha et al., 1993; Smith and Hake, 1994; Schneeberger et al., 1995)、どの仮説も実証されていない。イネ科の葉舌は、双子葉植物の托葉と相同であると考えられており、*OSH1* プロモーターとレポーター遺伝子を融合してシロイヌナズナに形質転換すると、托葉でのみ発現が見られる (Matsuoka et al., 1993)。このことは、(1) の仮説を支持しているかもしれない。しかし、大きな問題点は、トウモロコシの葉舌形成時に *Kn-1* 遺伝子が発現していないことである。このような、機能のあいまいさにたいして、遺伝子系統樹が興味深い示唆を与えてくれる。

核遺伝子は、通常遺伝子族を形成しており、族内遺伝子の関係が、homologous なのかあるいは、authologous なのかを調べるには遺伝子系統樹を作ることが必須となる。図 1 にこれまで報告された植物の *Kn-1* 関連遺伝子の遺伝子系統樹を示す。この図からわかるように、シロイヌナズナは、シダ類、被子植物の分岐と双子葉類、単子葉類の分岐の間に遺伝子重複した *KNAT1* と *STM*、シダ類、被子植物の分岐したよりも前に *KNAT1* と *STM* の祖先遺伝子と遺伝子重複した *ATK1*、そして、より古くに分枝し、機能が良くわかっていない *KNOT3*, *KNAT4*, *KNAT5* の合計 6 つの遺伝子を持つことがわかる。そして、*Kn-1* 遺伝子のシロイヌナズナでのホモログは *KNAT1* であり、トウモロコシの *STM* ホモログは、まだ見つかっていないことになる (図 1)。これまで、loss of function 突然変異が知られているのは *STM* 遺伝子だけである。極端に考えると、*STM* 遺伝子とそのホモログ (シロイヌナズナとダイズ以外では見つかっていないが) だけがシュート分化に関係していて、他の遺伝子は、シュート分化の役割を *STM* 遺伝子にまかせ、他の機能を担いつつ進化しているという可能性もある。つまり、*Kn-1* 遺伝子の機能にあいまいな点が多いことの要因は、どうも遺伝子重複によって生じたいくつかの遺伝子が redundant な関係にあり、遺伝子の機能的制約が緩み、遺伝子がさまざまな進化的実験をしていることにあるのかもしれない。

ここで、redundancy (総説として、Pickett and Meeks-Wagner, 1995) について少し触れておこう。元来、何らかの機能を持っていた遺伝子が遺伝子重複により 2 つになると、どちらかの遺伝子が元来の機能を保持すれば、致命的なダメージを生体に与えることなく他方の遺伝子は、変化することができる。つまり、機能的制約から解放され、進化することが可能となる。遺伝子重複直後は、両方の遺伝子は同じ機能を持っているだろうが、突然変異の蓄積により機能分化してくることが期待される。そして、ついには、全く異なった機能を持つに到るかもしれない。その両極端の間において 2 つの遺伝子は redundant な関係を持つことになる。一方、遺伝子重複とは関係なく、本来全く起源の異なる遺伝子が同じ現象に関わることにより、redundant な関係になることもあるであろう。これは、進化における収斂現象であり、遺伝子重複後の遺伝子の進化過程とともに、形態進化を遺伝子レベルで解明するうえで重要な現象であるとともに、形態の多様性を導き出している要因の一つである可能性が高い。

終わりに

以上、シュートの形成に関与している可能性が高い KNOX 遺伝子群の最近の研究結果をまとめた。しかし、KNOX 遺伝子群がどのようにシュート形成に関与しているかについては、全く研究が進んでいない状況である。従って、今後、(1) ゲノム内に存在する KNOX 関連遺伝子を全てクローニングし、mRNA、タンパク質の発現様式を解明する、(2) 遺伝子破壊により、各遺伝子機能を推定する、(3) KNOX 遺伝子群の上流、下流遺伝子群の解析と制御機構の解明が必要となるであろう。また、KNOX 遺伝子群以外にも茎頂分裂組織の形態形成に関与していることが知られている遺伝子が単離されており (Souer et al., 1996; Clark et al., 1993; Bancroft et al., 1993)、それらの機能解析、KNOX 遺伝子との関係にも興味を持たれる。

そして、はじめに述べたような形態進化にアプローチするためには、現在用いられているシロイヌナズナ、イネ以外にも、より多様なモデル植物を開拓する必要がある。シダ植物でモデル植物としてもっとも有望なのはリチャードミズワラビ (*Ceratopteris richardii*) である (Chasen, 1992)。シダ植物は一般に多年草であるが、リチャードミズワラビは1世代が約3カ月であり、温度条件さえととのえれば(約30度)年中栽培可能である。また、前葉体を用いた交雑実験は容易である (Eberle *et al.*, 1995; その他の情報は <http://www.bio.utk.edu/botany/cfern/manualtw.html> 参照)。コケ植物では、ニセツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) がモデル系としてほぼ確立されている。交配実験、形質転換が可能である (詳しくは <http://www.unil.ch/lpc/docs/mosswelcome.html> 参照) とともに、近年、植物としては例外的に容易に遺伝子破壊が可能であることが報告され (Kammerer and Cove, 1996)、新しいモデルとして期待されている。

引用文献

- Bancroft, M.J., Jones, J.D.G. and Dean, C. 1993. Heterologous transposon tagging of the DRL1 locus in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5: 631-638.
- Chasen, R. 1992. *Ceratopteris*: a model plant for the 90s. *The Plant Cell* 4: 113-115.
- Clark, S.E., Running, M.P. and Meyerowitz, E.M. 1993. CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119: 397-418.
- Eberle J., J. Nemacheck, C.-K. Wen, M. Hasebe, J.A. Banks 1995. *Ceratopteris*: a model system for studying sex-determining mechanisms in plants. *International Journal of Plant Sciences*. 156: 359-366.
- Freeling, M., Bertrand-Garcia, R and Sinha, N. 1992. Maize mutants and variants altering developmental time and their heterochronic interactions. *BioEssays* 14: 227-236.
- Hake, S. 1992. Unraveling the knots in plant development. *Trend Genet.* 8: 109-114.
- Hareven, D., Gutfinger, T., Parnis, A., Eshed, Y., Lifschitz, E. 1996. The making of a compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato. *Cell* 84: 735-744.
- Jackson, D., Veit, B. and Hake, S. 1994. Expression of maize *KNOTTED-1* related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* 120: 405-413.
- Kammerer, W. and Cove D.J. 1996. Genetic analysis of the effects of re-transformation of transgenic lines of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen. Genet.* 250: 380-382.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K. and Hake, S. 1994. A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* 6: 1859-1876.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I. and Barton, M.K. 1996. A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379: 66-69.
- Lucas, W.J., Bouché-Pillon, S., Jackson, D.P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B., Hake, S., 1995. Selective trafficking of *KNOTTED1* homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* 270: 1980-1983.
- Matsuoka, M., Ichikawa, H., Saito, A., Tada, Y., Fujimura, T. and Kano-Murakami, Y. 1993. Expression of a rice homeobox gene causes altered morphology of transgenic plants. *Plant Cell* 5: 1039-1048.
- Matsuoka, M., Tamaoki, M., Tada, Y., Fujimura, T., Tagiri, A., Yamamoto, N. and Kano-Murakami, Y. 1995. Expression of rice *OSH1* gene is located in developing vascular strands and its ectopic expression in transgenic rice causes altered morphology of leaf. *Plant Cell Report* 14: 555-559.
- Medford, J.I. 1992. Vegetative apical meristems. *Plant Cell* 4: 1029-1039.
- Meisel, L. and Lam, E. 1996. The conserved ELK-homeodomain of *KNOTTED-1* contains two regions that signal nuclear localization. *Plant Mol. Biol.* 30: 1-14.
- Pickett, F.B. and Meeks-Wagner, D.Ry. 1995. Seeing double: appreciating genetic redundancy. *Plant Cell* 7: 1347-1356.

- Schneeberger, R.G., Becraft, P.W., Hake, S. and Freeling, M. 1995. Ectopic expression of the *knox* homeo box gene *rough sheath1* alters cell fate in the maize leafy. *Genes Dev.* 9: 2292-2304.
- Sinha, N.R., Williams, R.E., Hake, S. 1993. Overexpression of the maize homeo box gene, *KNOTTED-1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes. Dev.* 7: 787-795.
- Smith, L.G., Greene, B., Veit, B., Hake, S. 1992. A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1*, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Development* 116: 21-30.
- Smith, L.G. and Hake, S. 1994. Molecular genetic approaches to leaf development: *Knotted* and beyond. *Can. J. Bot.* 72: 617-625.
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J. and Koes, R. 1996. The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85: 159-170.
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha N. and Hake, S. 1991. The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* 350: 241-243.

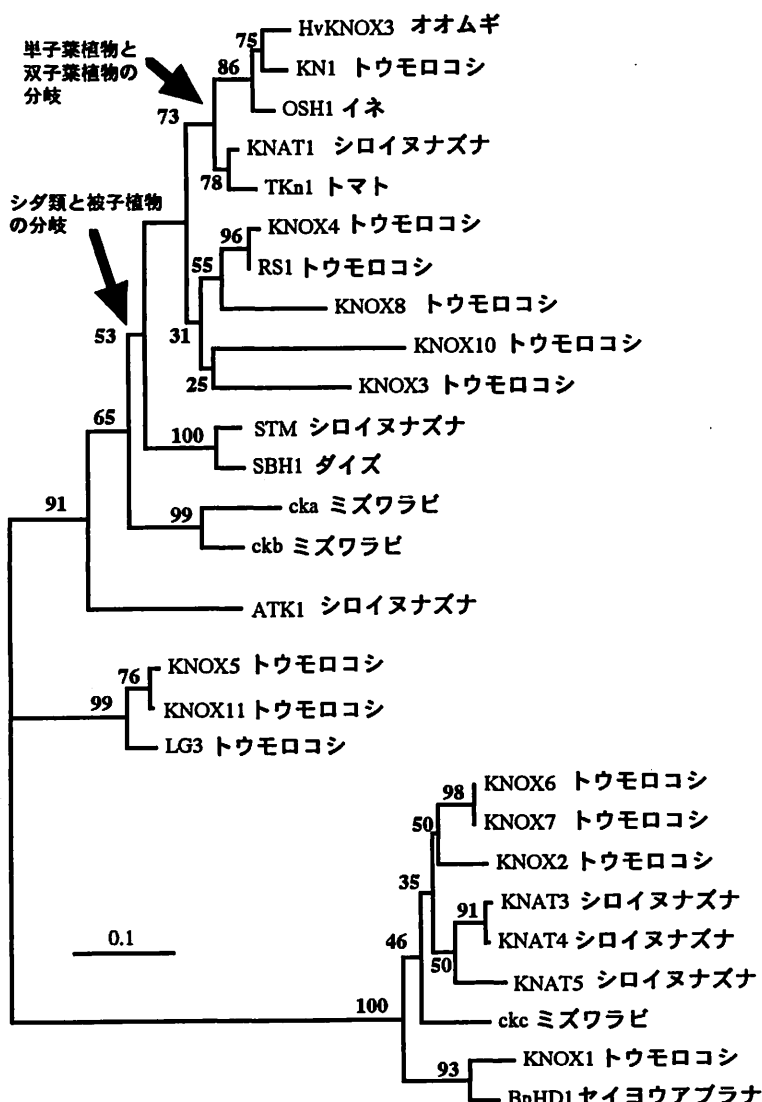


図1 KNOX 遺伝子群の遺伝子系統樹。ホメオドメイン周辺の90アミノ酸配列を用い、PROTDIST、NEIGHBORプログラムを用いて構築した。枝の数字は、100回当たりのブートストラップ確率を示す。本系統樹は無根であるが、植物ホメオボックス全体を含んだ系統樹を参考に根を付けてある。