

古い酒を新しい革袋に～preexisting gene regulatory network の転用による

陸上植物のボディプラン革新

オーガナイザー

石崎公庸

神戸大学大学院理学研究科生物学専攻
〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1

榊原恵子

金沢大学学際科学実験センター
〒920-0934 金沢市宝町13-1

約40億年前に地球上に生命が誕生して以来、生物はずっと水の中で暮らしてきました。水中の光合成生物の気の遠くなるほど長い年月にわたる活動の結果、大気中に酸素が増えていくと紫外線の作用によりオゾン層が形成され、生物にとって有害な紫外線が吸収されるようになり、陸上に生命が生き延びられる環境が整ってきた頃、最初に陸上に進出したのは植物でした。植物の陸上進出は今から約4億7千万年前までに起こり (Wellman et al. 2003)，それまで岩石に覆われた荒れ地であった地上は徐々に緑の植物に覆われ、大気中のCO₂濃度の更なる低下をはじめとして地球環境に大きな影響を与えたと考えられています (Lenton 2001; Mora et al. 1996; Taylor et al. 2012)。そして植物に遅れること数千万年、約4億年前までには昆虫が陸上に進出し、3億6千万年前までは我々の祖先である両生類も陸上進出を果たしたのです。地球の歴史上、最大の転換点の一つである植物の陸上進出、そして陸上植物の進化はどのようにして起こったのでしょうか？

約4億7千万年前に陸上進出を果たした植物の共通祖先は、現生の車軸藻植物門の中でもシャジクモ藻綱 (Charophyceae) やコレオケーテ藻綱 (Chlorococcales), アオミドロやミカヅキモを含むホシミドロ藻綱 (Zygnematophyceae) に近縁の淡水性の多細胞緑色藻類だったと考えられています (図1; Lewis and McCourt 2004)。緑色藻類の中でもこれらのグループは、ロゼッタ構造をとるセルロース合成酵素複合体を獲得したことで効率よくセルロースを合成し、細胞質分裂における隔膜形成体 (フラグモプラス : phragmoplasts) の形成、原形質連絡 (プラズモデスマータ : plasmodesmata) の形成など、複数の陸上植物と共通する形質 (共有派生形質 : synapomorphy) をもっています (坂山 2010; Graham 1993)。

また近年の分子系統解析や化石レベルの証拠から、現生の陸上植物の中で最も基部で分岐したのがコケ植物だと考えられています。コケ植物 (bryophytes) には、タイ類 (liverworts), 蘚類 (mosses), ツノゴケ類 (hornworts) の3つのグループがありますが、それらは初期に分岐したため、相互の系統関係には諸説あり、現在でも議論の決着はついていません (Qiu et al. 2006; Wickett et al. 2014)。そして陸上進出を果たして僅か数千万年も経たない4億3千万年前までは、植物は維管束や気

孔を獲得し、過酷な陸上環境へ適応していきました。現生の維管束植物の最も基部に位置するものはイヌカタヒバなどを含む小葉類 (lycophytes) です。維管束植物は更なる進化を遂げ、種子や花を獲得し、陸上環境での繁栄を謳歌しています (図 1)。

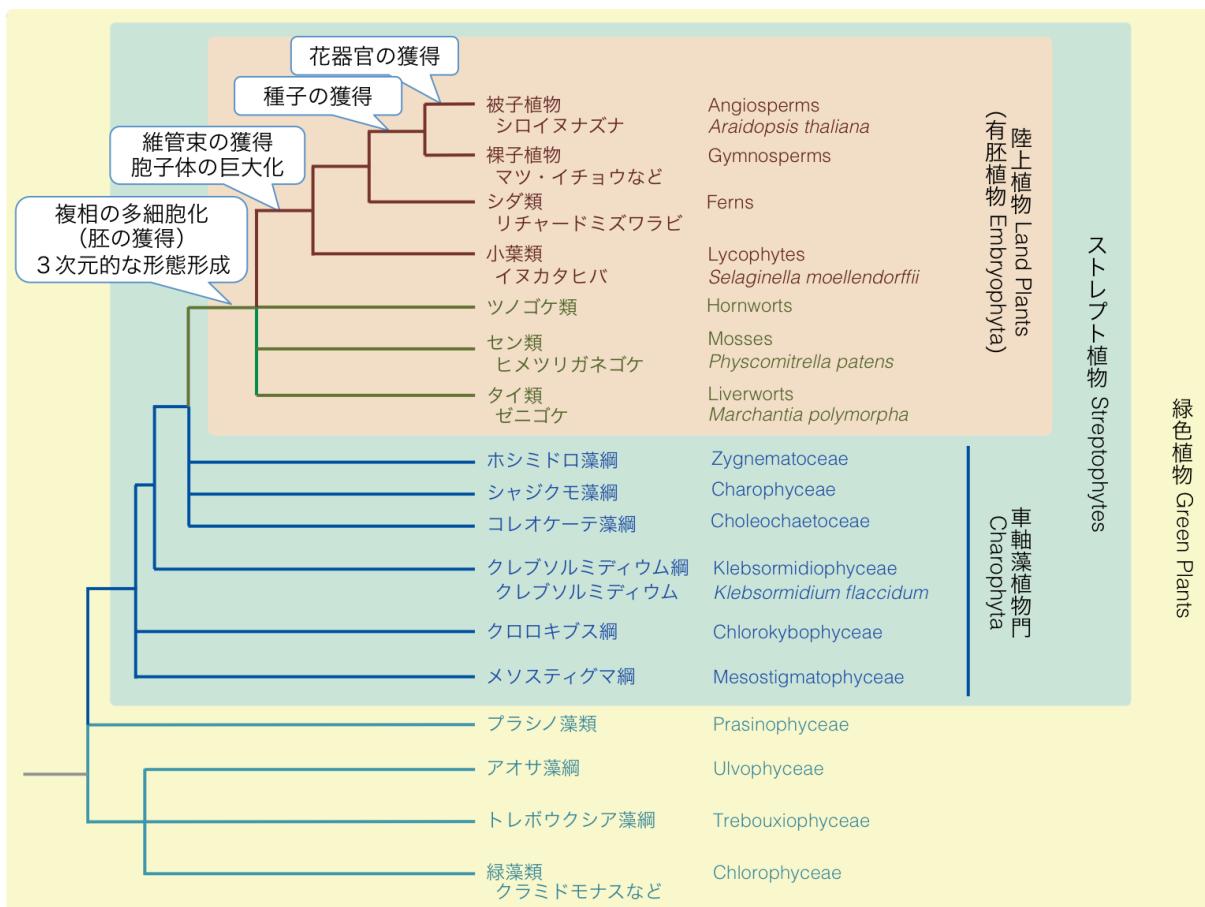


図 1 現生の緑色植物の進化

陸上植物の起源と進化を理解するには、緑藻とコケ植物、小葉類以降の維管束植物の形態やボディプランの比較研究が肝要です。まず、緑色藻類と陸上植物における生活環を比較してみます。シャジクモ藻綱を含む緑色藻類は、生活史のほとんどを配偶体 (n 世代) で過ごし、複相 ($2n$ 世代) は単細胞の接合子 (zygote) あるいは受精卵 (fertilized egg) のみです。接合子は体細胞分裂することなく減数分裂を行ない、 n 世代へと移行します。一方、コケ植物と維管束植物を含む陸上植物は、全て配偶体 (n 世代) に加えて多細胞の胞子体 ($2n$ 世代) を形成します。雌雄の配偶子 (精子と卵) が受精して形成される受精卵が、直ちに減数分裂することなく、体細胞分裂を繰り返すことで多細胞体を形成することが、緑色藻類とは異なる、陸上植物に共通する形質なのです。若い胞子体は胚と呼ばれ、胚発生を行なうことが陸上植物の共通の特徴であるため、陸上植物は有胚植物 (Embryophytes) とも呼ばれます。配偶体と胞子体の 2 つの多細胞体が生活環の中に交互に現れること世代交代と呼び、これも陸上植物の特徴です。またコケ植物以降の配偶体や胞子体が有する頂端細胞は、3 つ以上の細胞分裂面を持つ三次元的な形態形成を行う点も、緑色藻類との大きな違いです。一方、陸上植物の中でも、コケ植物と維管束植物では、その体制

は大きく異なります。コケ植物は、生活史の大半を配偶体 (n 世代) として過ごし、胞子体 ($2n$ 世代) は配偶体に依存していますが、維管束植物は胞子体 ($2n$) が優占であり、配偶体は相対的に小さくなっています（図2）。

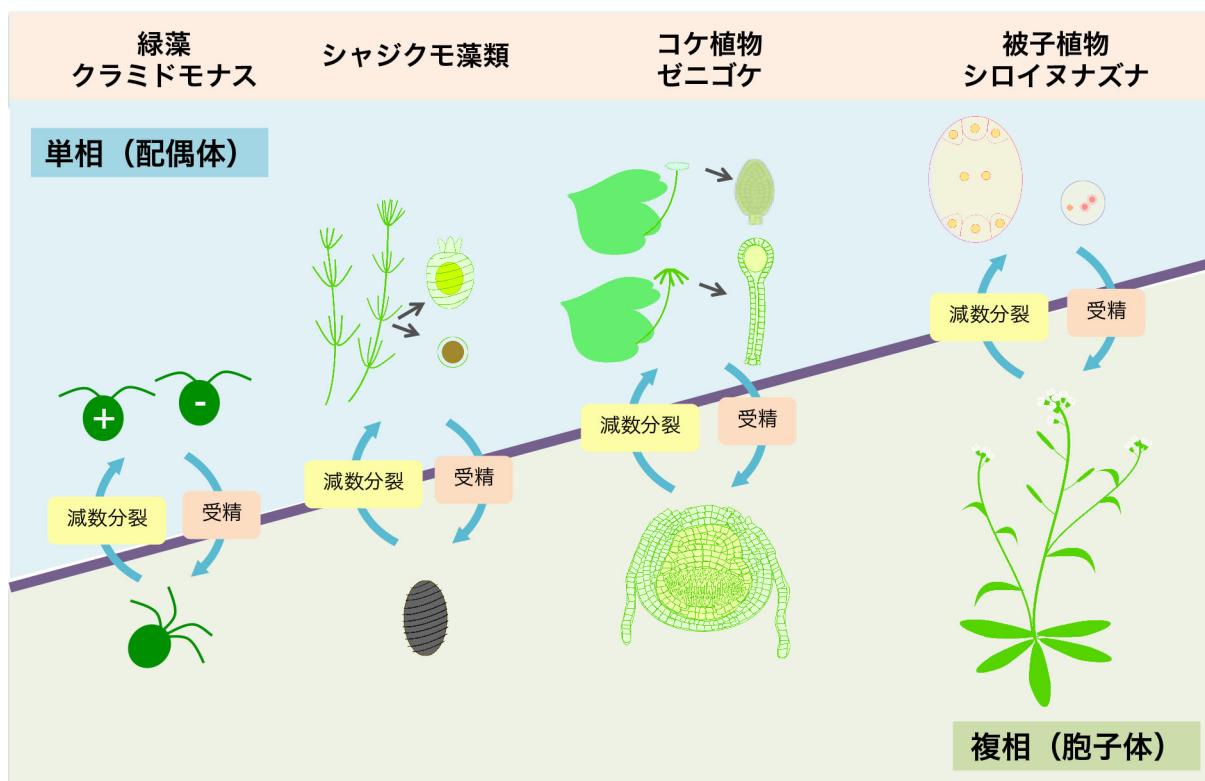


図2 緑色植物の系統と生活環の模式図

小葉類やシダ植物の配偶体は、胞子体に比べ相対的に小さいながらも独立して生活しますが、被子植物では配偶体は数細胞にまで縮退し、胞子体に依存しています。また維管束植物の胞子体ではコケ植物には見られない多くの新規形質（維管束、種子、花器官、リグニンを含む二次細胞壁）が獲得されています。このためコケ植物と維管束植物の異なる世代に形成される類似した器官を比較する研究は行われてきたものの（Graham et al. 2000; Ligrone et al. 2012），形態学的，組織学的類似性を指摘するに留まっています。

動物では、陸上植物に見られるような核相の交代を伴う世代交代はなく、通常、複相世代 ($2n$) にのみ多細胞の体を作り、単相には単細胞の精子や卵細胞を作る、複相型生活環をもちます。古くに分岐した異なる系統の間（例えば約5億年前に出現した脊椎動物の中の魚類・両生類・哺乳類の間、脊椎動物と無脊椎動物の間でも）においても生活史は基本的に共通であり、複相世代に構築される多細胞体には、系統的な近縁性に応じて胚発生過程の類似性や器官の形態的相同性が認められます。そして異なる系統間における器官の相同性や胚発生パターンの類似性の比較研究から、ドイツのヘッケルが『個体発生は系統発生を繰り返す』と表現した「ある動物の個体発生過程は、その動物が進化してきた過程の形態的変化（系統発生）を繰り返すように進行する」という「反復説」に代表されるような発生と進化（系統発生）を結びつける考え方方が古くからあ

りました。このような比較発生学に基づく進化の議論は、20世紀後半における分子遺伝学や実験発生学の成果を取り入れながら、進化発生学（エボデボ）研究分野として発展し、形態的相同性や胚発生パターンの類似性とそれらを生み出す進化的メカニズムは、より深いレベルで理解されつつあります。近年では、約10億年前に分岐した海綿動物のような単純な体制をもつ動物のゲノムにさえも、より複雑な動物で形態形成に関与するホメオボックス遺伝子を始めとする制御遺伝子やその原型ともいえる遺伝子が多く存在することが明らかになっています（Carroll et al. 2003; Fortunato et al. 2014）。複雑かつ多様なボディプランの進化は、（主に）新たな機能をもつ新たな遺伝子の獲得によるものではなく、既に獲得されていた共通の遺伝子セットのアミノ酸置換を引き起こす変異（Ronshaugen et al. 2002）や、使い方（いつ、どこで働くか）の変化によるものだと考えられるようになりました（Carroll 2008; De Robertis 2008; Shubin et al. 2009）。例えば多くの動物門で共通して眼の発生に用いられている *Pax6* 遺伝子（Halder et al. 1995a; 1995b）に見られるように、発生プロセスを制御する共通の遺伝子セット（ツールキット）を中心とした遺伝子制御ネットワークは、節足動物や脊索動物など5億年以上前に分岐した高次の系統間でも、多くの場合、共通していることが明らかとなっています。過去20年にわたる動物の発生進化学研究の成果により、多様な動物の系統における発生プロセスの変更は、ツールキット遺伝子発現の時空間的変化や、時には、別の局面での転用・再利用（コ・オプション）によってもたらされると考えられるようになってきました。

1990年台からシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を始めとする被子植物モデル植物種における形態形成の仕組みについて分子レベルの理解が飛躍的に向上しました。続いて、シロイヌナズナで同定された形態形成遺伝子の起源を探るために、被子植物以外の陸上植物を材料とした相同遺伝子探索が行なわれるようになりました。例えば、被子植物の生殖器官である花の発生において、花芽形成のマスター制御因子 LEAFY/FLORICAULA 遺伝子や、花器官の形成を担う MADS ボックス遺伝子について、コケやシダ植物にもその相同遺伝子が存在することが明らかとなり、その発現様式や機能の保存性についての解析が進められています（Tanahashi et al. 2005; 荒木 2012; Hasebe et al. 1998; 長谷部 2002）。さらに2000年台に入り、シロイヌナズナを始めとする被子植物だけでなく、小葉類、コケ植物、緑藻など様々な植物種のゲノムが解読されると、体制や生活様式が大きく異なる陸上植物の系統間で、発生制御関連の遺伝子の多くが保存されていることが明らかになってきました（Floyd and Bowman 2007; Rensing et al. 2008; Banks et al. 2011）。2000年台中頃になり、コケ植物の中でいち早く遺伝子機能解析の実験系が確立された蘚類ヒメツリガネゴケ（Shaefer and Zryd 2001）を材料として、被子植物の胞子体で発生制御に関わる様々な遺伝子の相同遺伝子について機能解析が進められ、被子植物とコケ植物での遺伝子機能の共通性や違いが議論できるようになりました。特に、近年では、コケ植物では配偶体で機能する遺伝子が、被子植物では胞子体での機能を獲得したコ・オプション（転用・再利用）の例が報告され始めています。例えば、シロイヌナズナの胞子体における根の表皮細胞から分化する根毛の形成を制御するクラス VIII basic-helix-loop-helix 転写因子のヒメツリガネゴケにおけるオーソログ遺伝子（オーソログとパラログについては、本総説集、榎原・古水の解説を参照）が、配偶体の表皮細胞から分化する仮根の形成を制御していることが報告されました（Menand et al. 2007）。そして被子植物胞子体の根毛細胞を形成するクラス VIII basic-helix-loop-helix 転写因子を中心とした遺伝子制御

ネットワークとコケ植物配偶体の仮根のような糸状の細胞を形成する遺伝子制御ネットワークが、ほぼ共通していることも示されています (Tam et al. 2015)。このことは、配偶体を本体とする陸上植物の共通祖先で機能していた遺伝子制御ネットワークが、被子植物胞子体の細胞分化制御にコ・オプションされた一例と考えられます。現在のところ、緑藻やコケ植物における遺伝子セットの存在様式や機能についての知見はまだまだ不足しており、植物におけるボディプラン進化の全容解明は始まったばかりです。近年、次世代シーケンサー利用の拡がりにより緑色植物の様々な系統のゲノム解読が進んでいます。また、タイ類ゼニゴケなど新しいモデル種における研究基盤の構築 (Ishizaki et al. 2016) も見逃せません。シダや裸子植物においても形質転換系が確立され (Plackett et al. 2014; Tang and Newton 2003)，遺伝子機能解析の道が拓かれました。今まさに植物の発生進化研究は新たな局面に入ったといえます。

本総説集は、日本植物学会第 78 回大会（2014 年 9 月）で開催されたシンポジウム「古い酒を新しい革袋に～*preexisting gene regulatory network* の転用による陸上植物のボディプラン革新」の内容をもとに総説として取りまとめたものです。このシンポジウムは、近年、植物の発生進化を理解する上で重要な日本発の研究が相次いで報告された動向を踏まえ、ようやく端緒についていた植物の発生進化学、特に「遺伝子制御ネットワークの獲得とそのコ・オプションによる植物進化モデル」を議論することを意図して企画しました。講演者には、オーガナイザー 2 人に加え、植物ゲノム研究の第一人者である西山智明博士、シャジクモ藻類のゲノム解読で世界初の成果を挙げた堀孝一博士、ゼニゴケのモデル植物化の立役者であり陸上植物における環境応答の仕組みと進化を研究している河内孝之教授、陸上植物で獲得された細胞分化を制御する遺伝子制御ネットワークについて大きな発見をされた大谷美沙都博士といった気鋭の研究者を選びました。

本総説集の内容ですが、堀孝一博士と太田啓之博士の総説では、2014 年に初めてベールを脱いだ車軸藻植物門の一種クレブソルミディウム全ゲノム解読の成果について解説されています。榎原恵子博士の総説では、植物の進化における複相の複雑化について、河内孝之博士、大谷美沙都博士の総説では、コケ植物の実験系を用いた研究から見えてきた陸上植物に共通する遺伝子制御ネットワークとその世代を超えたコ・オプションによる進化を支持する具体的な研究例が解説されています。

今後、新たな植物種でのゲノム情報の更なる蓄積や、様々な生物種間での遺伝子機能の比較研究が進み、植物の発生進化研究がますます加速することが期待されます。これらの総説を通じて、植物における発生進化学の新たな潮流を感じていただければ、オーガナイザー一同、これ以上嬉しいことはありません。

謝辞

本稿の作成にあたっては、緑色藻類の分類体系の扱い方について、坂山英俊博士（神戸大学大学院理学研究科）から多くのコメントをいただきました。また図の作成にご協力いただいた大学院生の高見英幸さん（神戸大学大学院理学研究科）と本稿に有益なコメントをいただいた古水千尋博士（Max Planck Institute for Plant Breeding Research）に感謝いたします。

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* 3: 134-158.
- Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Grbskov, 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., 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., 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., Wipf, D., Wolf, P.G., Yang, L., Zimmer, A.D., Zhu, Q., Mitros, T., Hellsten, U., Loqué, D., Otillar, 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.
- Carroll, S.B., Grenier, J.K., & Weatherbee, S.D. (訳, 上野直人・野地澄晴) 2003. DNA から解き明かされる形づくりの進化の不思議. 羊土社. 東京.
- Carroll, S.B. 2008. Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: A genetic theory of morphological evolution. *Cell* 134: 25-36.
- De Robertis, E.M. 2008. Evo-devo: Variations on ancestral themes. *Cell* 132:185-195.
- Floyd, S.K., & Bowman, J.L. 2007. The ancestral developmental tool kit of land plants. *Int. J. Plant Sci.* 168: 1-35.
- Fortunato, S.A.V., Adamski, M., Ramos, O.M., Leininger, S., Liu, J., Ferrier, D.E.K., & Adamska, M. 2014. Calcisponges have a parahox gene and dynamic expression of dispersed NK homeobox genes. *Nature* 514: 620-623.
- Graham, L.E. 1993. Origin of land plants. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Graham, L.E., Cook, M.E., & Busse, J.S. 2000. The origin of plants: Body plan changes contributing to a major evolutionary radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4535-4540.
- Halder, G., Callaerts, P., & Gehring, W.J. 1995a. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267: 1788-1792.
- Halder, G., Callaerts, P., & Gehring, W.J. 1995b. New perspectives on eye evolution. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 5: 602-609.
- Hasebe, M., Wen, C.K., Kato, M., & Banks, J.A. 1998. Characterization of MADS homeotic genes in the fern *Ceratopteris richardii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6222-6227.
- 長谷部光泰・小藤累美子・田辺陽一・伊藤元己 2002. MADS ボックス遺伝子と植物の生殖器官の進化. 蛋白質 核酸 酵素 46: 1358-1366.

- Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K.T., & Kohchi, T. 2016. Molecular genetic tools and techniques for *Marchantia polymorpha* research. *Plant Cell Physiol.* 57: 257-261.
- Lenton, T.M. 2001. The role of land plants, phosphorus weathering and fire in the rise and regulation of atmospheric oxygen. *Glob. Chang. Biol.* 7: 613-629.
- Lewis, L.A., & McCourt, R.M. 2004. Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.* 91: 1535-1556.
- Ligrone, R., Duckett, J.G., & Renzaglia, K.S. 2012. Major transitions in the evolution of early land plants: a bryological perspective. *Ann. Bot.* 109: 851-871.
- 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.
- Mora, C.I., Driese, S.G., & Colarusso, L.A. 1996. Middle to late paleozoic atmospheric CO₂ levels from soil carbonate and organic matter. *Science* 271: 1105-1107
- Plackett, A.R.G., Huang, L., Sanders, H., & Langdale, J.A. 2014. High-efficiency stable transformation of the model fern species *Ceratopteris richardii* via microparticle bombardment. *Plant Physiol.* 165: 3-14.
- Qiu, Y.L., Li, L., Wang, B., Chen, Z., Knoop, V., Groth-Malonek, M., Dombrovska, 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., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Ashton, N., Barbazuk, W.B., Barker, E., Bennetzen, J.L., Blankenship, R., Cho, S.H., Dutcher, S.K., Estelle, M., Fawcett, J.A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K.A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D.R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P.J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S.H., Stueber, K., Theodoulou, F.L., Tu, H., Van de Peer, Y., Verrier, P.J., Waters, E., Wood, A., Yang, L., Cove, D., Cuming, A.C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B.D., Reski, R., Grigoriev, I.V., Quatrano, R.S., & Boore, J.L. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69.
- Ronshaugen, M., McGinnis, N., & McGinnis, W. 2002. Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan. *Nature* 415: 914-917.
- 坂山英俊 2010. 植物の上陸作戦=シャジクモの辿った道. *BSJ-Review* 1: 30-35.
- Shaefer, D., & Zryd, J.P. 2001. The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant Physiol.* 127: 1430-1438.
- Shubin, N., Tabin, C., & Carroll, S. 2009. Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature* 457: 818-823.
- Tanahashi, T., Sumikawa, N., Kato, M., & Hasebe, M. 2005. Diversification of gene function: homologs of the floral regulator FLO/LFY control the first zygotic cell division in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 132: 1727-1736.

- Tam, T.H.Y., Catarino, B., & Dolan, L. 2015. Conserved regulatory mechanism controls the development of cells with rooting functions in land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: E3959-E3968.
- Tang, W., & Newton, R.J. 2003. Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. *Plant Cell Rep.* 22: 1-15.
- Taylor, L.L., Banwart, S.A., Valdes, P.J., Leake, J.R., & Beerling, D.J. 2012. Evaluating the effects of terrestrial ecosystems, climate and carbon dioxide on weathering over geological time: A global-scale process-based approach. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 367: 565-582.
- Wellman, C.H., Osterloff, P.L., & Mohiuddin, U. 2003. Fragments of the earliest land plants. *Nature* 425: 282-285.
- Wickett, N.J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Baker, M.S., Bureigh, J.G., Gitzendanner, M.A., Ruhfel, B.R., Wafula, E., Der, J.P., Graham, S.W., Mathews, S., Melkonian, M., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Miles, N.W., Rothfels, C.J., Pokorny, L., Shaw, A.J., DeGironimo, L., Stevenson, D.W., Surek, B., Villarrel, J.C., Roure, B., Philippe, H., dePamphilis, C.W., Chen, T., Deyholos, M.K., Boucom, R.S., Kutchan, T.M., Augustin, M.M., Wang, J., Zhang, Y., Tian, Z., Yan, Z., Wu, X., Sun, X., Wong, G.K.S., & Leebens-Mack, J. 2014. Phylogenomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E4859-E4868.

車軸藻クレブソルミディウムのゲノムから見た植物の陸上化

堀孝一¹, 太田啓之^{1,2}

¹ 東京工業大学・大学院生命理工学研究科

現在の所属：東京工業大学・生命理工学院

〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259 B-65

² 東京工業大学・地球生命研究所

〒152-8550 東京都目黒区大岡山 2-12-1-IE-1

Koichi Hori¹ & Hiroyuki Ohta^{1,2}

Klebsormidium flaccidum genome reveals genome evolution for plant terrestrial adaptation

Key words: charophyte, klebsormidium, genome analysis, land colonization

¹Tokyo Institute of Technology, Department of Biological Sciences.

Present address : Tokyo Institute of Technology, School of Life Science and Technology

² Tokyo Institute of Technology, Earth-Life Science Institute.

地球における生命の歴史において、生命の陸上進出は多様な種を生み出し、現在の生物多様性の礎となっている。最初の生命の陸上進出の過程はいまだ不明な点が多く、植物よりはるか先にバクテリアの陸上進出があったと考えられている(Battistuzzi & Hedges 2009)。しかしながら、動物をはじめとした複雑な陸上生物を発達させ、今日の地球環境を形成するに至った直接の原動力として、光合成によって二酸化炭素を固定し有機物を合成できる植物の陸上進出は大きな役割を果たした事は確かである。本総説では植物の陸上化を解明するにあたって重要な位置づけにある車軸藻植物門のうち、クレブソルミディウム(*Klebsormidium flaccidum*)のゲノム解読と他生物との比較の結果を紹介する。

1. 植物の陸上化について

植物の陸上進出がいつ起きたのかは定かではなく、分子系統解析から有胚植物(陸上植物)の出現の推定年代も諸説あるのが現状である。しかしながら、分子系統解析と胞子の化石より約4億7千万年前にはすでに現生の陸上植物の共通祖先は誕生していたと考えられている(Rubinstein et al. 2010, Clarke et al. 2011, Magallón et al. 2013, Edwards & Kenrick 2015)。

陸上は、乾燥はもちろん強い紫外線、大きな温度変化、重力、栄養の欠乏など様々なストレスが存在する過酷な環境であり、植物が陸上進出するにあたって、これらのストレスに適応する必要があったと思われる。植物の陸上化はこのような当時の陸上環境に大きく影響を受ける一方、酸素濃度の増大(Parnell & Foster 2012)、二酸化炭素固定、風化作用や堆積(Scott & Glasspool 2006)など地球環境の形成に大きく寄与し、相互に深く影響を及ぼしあったと考えられる。

K. Hori & H. Ohta¹

2. 陸上植物の起源

陸上植物は緑色藻類の一群から分岐し、現在の多様な陸上植物へと発展してきたが、どのような植物が陸上に進出し、どうやって陸上環境に適応し発展を遂げていったのだろうか。その解明には陸上植物に近い藻類の特性を明らかにし、他の藻類や陸上植物と比較することが重要なアプローチの一つとして期待される。

多様な藻類が存在する中で細胞分裂の特徴や系統解析から車軸藻植物門(Charophyta)に属する藻類が陸上植物に最も近いと考えられている(Lewis & McCourt 2004, Leliaert et al., 2012)。(車軸藻植物は多系統群であり、分類上の表記はまだ統一されてはないが、本稿ではLewis & McCourt 2004の分類に基づき車軸藻植物の分類を表記した。) 車軸藻植物門はクロロキブス藻綱、クレブソルミディウム藻綱、コレオケーテ藻綱、接合藻綱、シャジク藻綱の5つの綱が含まれる(図1)。このなかで後者の3つは特に陸上植物に近いとされ、そのうちどの綱が陸上植物の姉妹群であるかは長らく議論が続いてきた。近年、転写産物情報の蓄積とともに、より精度の高い解析が行われ、現在は接合藻綱が陸上植物の姉妹群とする説が有力となっている(Timme et al. 2012, Wickett et al. 2014)。実際、31種類の保存された配列に基づいた図1の解析結果もそれを支持している。

我々は陸上化にいたる過程のより初期に、どのような遺伝子を獲得したのかという観点で植物の陸上進出について研究を進める事を考え、これらの車軸藻植物のうち比較的初期に分岐し、多細胞性であるがシンプルな体制を持つクレブソルミディウムのゲノム解読を進めた。

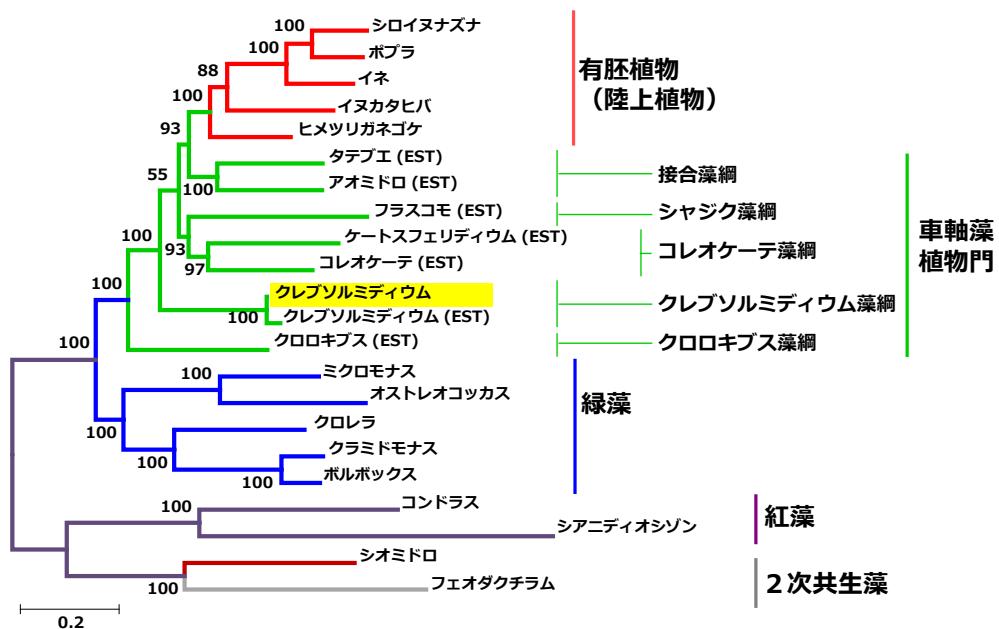


図1 31種類の保存されたタンパク質による系統樹

21生物種に共通して保存された核コードのタンパク質配列（一部EST配列から推定）を基に作成した最尤系統樹(Hori et al. 2014. Fig. 2を改変)

3. クレブソルミディウムとは

クレブソルミディウムは糸状性の多細胞の藻類であり、遊走子による無性生殖は報告されているが、細胞分化や有性生殖は報告されていない(図2a)。生息環境は淡水および陸上の湿潤な環境であり、世界中に分布する。藻類ではあるが、ある程度陸上環境に適応した気生藻類であり、乾燥(Morison & Sheath 1985, Elster et al. 2008, Karsten & Holzinger 2012)や凍結

(Elster et al. 2008, Nagao et al. 2008)などストレスの強い環境でもある程度耐え、環境が良くなると再び増殖する事ができる。非常に身近な藻類でもあり、直遮光の当たらないコンクリート壁や路面などで水抜きパイプの脇など湿気の多い所にしばしば群集を形成している（図 2 b, c）。どのような機構により、陸上環境へ適応しているのか明らかではないが、陸上環境への適応を明らかにしていくうえで非常に興味深い。ただし、クレブソルミディウムと陸上植物が分岐してから、クレブソルミディウムも独自の進化を遂げており、クレブソルミディウムと陸上植物に共通している形質が、真に共通派生形質であるのか注意を払う必要がある。

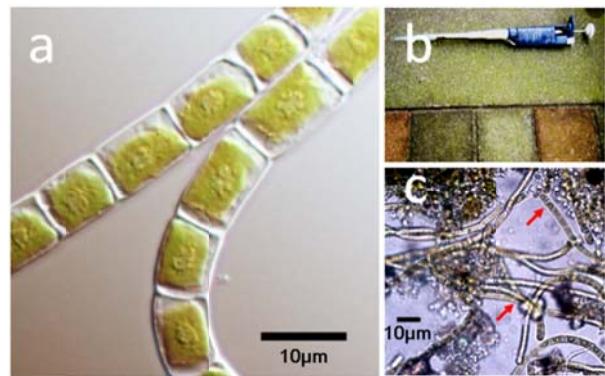


図 2 クレブソルミディウムの顕微鏡写真

- a. *K. flaccidum* NIES-2285 株（固体培地にて生育）
- b. クレブソルミディウムと思われる藻類が生育していたコンクリート路面
- c. (b)から採取した藻類の顕微鏡写真

4. 車軸藻植物門 *Klebsormidium flaccidum*（クレブソルミディウム）のゲノム解読

我々は国立環境研究所微生物系保存施設より分譲を受けることができる *Klebsormidium flaccidum* NIES-2285 株（以下本稿では *K. flaccidum* NIES-2285 株をクレブソルミディウムと表記した。）を用いてドラフトゲノム配列の解読を行った。ゲノム解読には 454 GS FLX Titanium と Illumina GAIIx の超並列シーケンサーを用いて約 6.1 Gb のゲノム配列と、約 578 Mb の転写産物配列を取得した。これらの配列をアセンブルした結果約 104 Mbp (1812 scaffolds, ピークカバー率:40 倍) の核ゲノム配列と葉緑体ゲノム（約 181 kbp）、ミトコンドリアゲノム（約 106 kbp）、転写産物（17,422 座位、約 21 Mb）を再構築する事ができた。クレブソルミディウムの核ゲノムサイズは核の蛍光染色像から約 117 Mbp 程度と推定され、フォスマニドライブラーの端読みの結果 20%強程度の反復配列領域があると推定されたことから、配列決定が困難な反復配列領域などを除いてゲノムのほぼ全域の解読が完了した。ついで転写産物情報や配列解析などからタンパク質をコードする核ゲノムの 16,063 遺伝子、葉緑体の 117 遺伝子、ミトコンドリアの 35 遺伝子を予測し、既知の機能が明らかな遺伝子との類似性などから、これら 16,215 遺伝子の機能予測を行った(Hori et al. 2014, http://www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp/~algae_genome_project/klebsormidium/)。

5. クレブソルミディウムと他生物種の遺伝子比較解析

ゲノム解析の次の段階として、クレブソルミディウムの遺伝子を 5 種の陸上植物および 9 種の藻類と比較した。これらの生物の全タンパク質配列をクラスタリングし、比較生物種内において、藻類のみに存在するタンパク質か陸上植物のみに存在するタンパク質か分類を行った結果、クレブソルミディウムの 1,238 タンパク質（約 8 %）は陸上植物に特異的である事が明らかとなった（図 3）。また各生物種内の類似遺伝子を遺伝子ファミリーとしてまとめると、陸上植物は藻類より多くの遺伝子を保持しているが、主に遺伝子重複により遺伝子数が増加していることが、総遺伝子数と遺伝子ファミリー数をプロットする事ではっきりと見

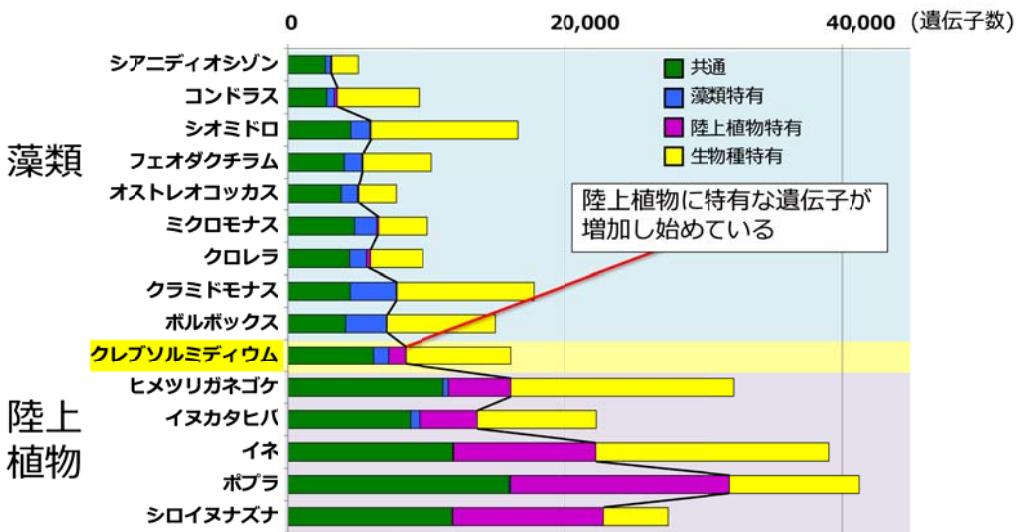


図 3 15 生物種間での遺伝子比較

15 生物種の全タンパク質配列をクラスタリングし、クラスター内の他生物種のタンパク質が、藻類と陸上植物のどちらに特有であるかを基にして分類を行った。(Hori et al. 2014. Fig. 3a を改変)

て取れる(図4)。クレブソルミディウムは他の藻類と遺伝子数あたりの遺伝子ファミリー数はあまり変わらなかったことから、遺伝子重複は植物が組織分化を獲得し、陸上の複雑な環境に応答していく過程で有効に働いたのではないかと考えられる。しかしながら基部陸上植物であるゼニゴケは遺伝子の重複が少ないとの報告もあり(大和・河内, 2012), 遺伝子重複の推移と植物の陸上化の関与を明らかにするためにはより多くの車軸藻植物と基部陸上植物の比較解析がキーポイントとなっていくであろう。

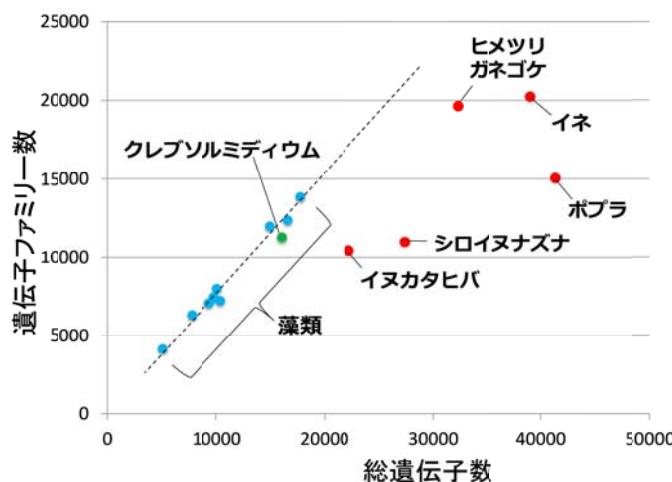


図 4 15 生物種の総遺伝子数と遺伝子ファミリー数のプロット

各生物種内の類似遺伝子を遺伝子ファミリーとしてまとめ、総遺伝子と遺伝子ファミリー数でプロットした。藻類は図3と同じ種を使用している。点線は藻類のプロットの近似曲線である。

また我々は遺伝子ファミリーのほか、タンパク質を構成するパートと考えられるタンパク質ドメインの構成についても比較解析を行った。各生物種のドメインの種類数や、その組み合わせパターンと総遺伝子数をプロットした結果、ドメインの種類数は陸上植物すでに頭打ちになっているが、その組み合わせパターンは被子植物さらに増加していることが明らかとなった(図5)。また解析した5種の陸上植物に共通するドメインや、その組み合わせパターンを藻類がどれだけ獲得しているかを調べた結果、クレブソルミディウムでは陸上植物に共通する90.7%のドメインと84.3%のドメインの組み合わせパターンを獲得しており、他の藻類より2~3割程度高いことが分かった(図6)。これらのこととはクレブソルミディウムが陸上植物に共通のタンパク質の機能を作るうえで多くの基本的なパートをすでに獲得して

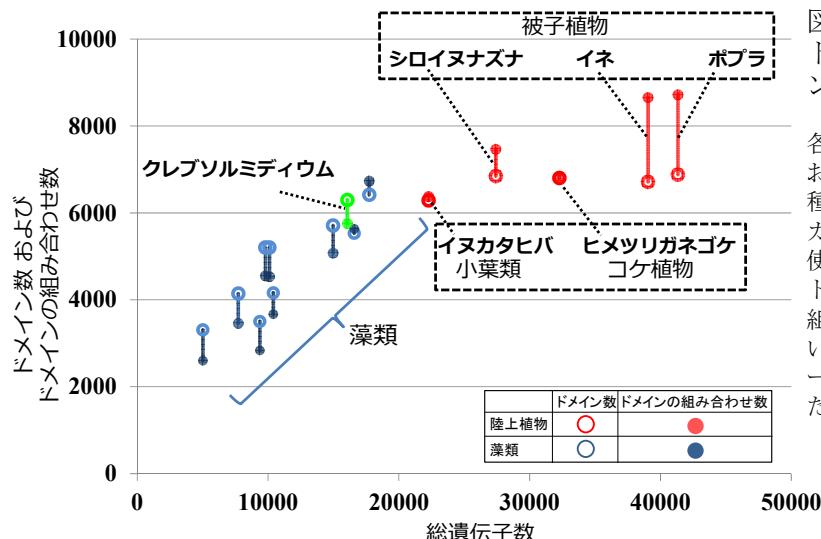


図 5 15 生物種の総遺伝子数とドメインの種類数およびドメインの組み合わせ数のプロット

各生物種内の全タンパク質の pfamA および pfamB を検索し、ドメインの種類数および組み合わせパターンをカウントした。藻類は図 3 と同じ種を使用している。多くの藻類において、ドメインの種類数よりもドメインの組み合わせパターンが少なくなっているのは、ドメインの組み合わせパターンが少なく決まった組合せが多いためである。

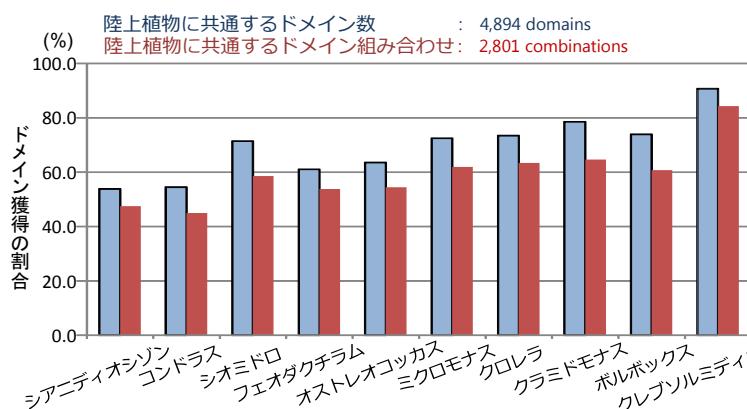


図 6 陸上植物に共通するドメインおよびドメインの組み合わせの獲得率

ヒメツリガネゴケ、イヌカタヒバ、イネ、ポプラ、シロイヌナズナに共通する pfam ドメイン (4,894 ドメイン) および、ドメインの組み合わせパターン (2,801 パターン) のうちそれぞれの藻類で獲得している割合。

いることを意味する。クレブソルミディウムは車軸藻植物の中で早いうちに分岐し、非常にシンプルな体制であるにもかかわらず、陸上植物特有の様々なシステムを、原始的な形であったとしても予想以上に獲得しているかもしれない。

以上の結果をまとめると、植物が陸上に適応していく過程で遺伝子の多様性の獲得は、次の 3 段階のステップに分けられると考えられる（図 7）。

- 陸上植物の共通祖先である緑藻からクレブソルミディウムが分岐するまでの間は遺伝子数の増加が遺伝子の種類の増加をもたらしたと考えられる。
- コケ、シダ植物のように陸上環境により適応し、組織分化が形成されるには、同遺伝子族の中でバリエーションを増加させ、細かな機能調節や発現調節を可能にしたと考えられる。
- 種子植物のような高度な陸上環境への適応と組織分化を可能にするには既存のパートの新しい組み合わせを生み出し、新しい機能の遺伝子を生み出したことが重要だったと考えられる。

このような過程の中でクレブソルミディウムの祖先は、陸上植物が多細胞体の構築や陸上環境に適応するために発達させていった遺伝子、あるいはそのパートの多くをすでに獲得していた事が推定された。

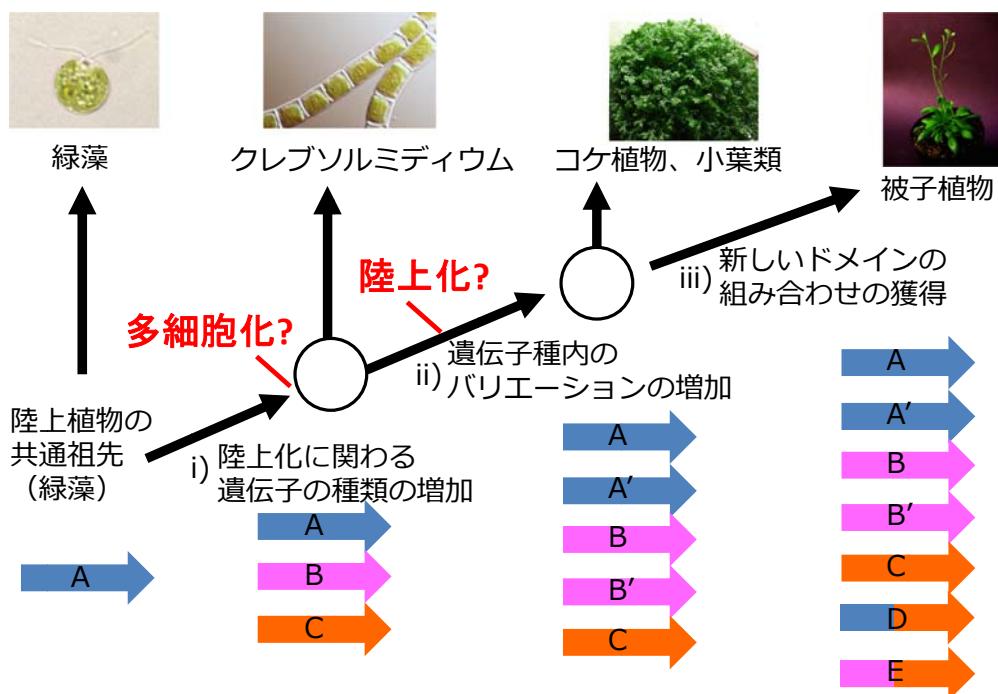


図 7 植物の陸上化の過程と遺伝子多様性の獲得

6. クレブソルミディウムにおける植物ホルモン関連因子

クレブソルミディウムの遺伝子と藻類、陸上植物の遺伝子を比較した結果、情報伝達、環境応答、細胞壁合成、植物ホルモン関連因子などに関わる因子に、陸上植物で大幅に増加しているものや、陸上植物特異的なものが多い傾向が明らかとなった(Hori et al. 2014)。

中でも植物ホルモン情報伝達は陸上植物の環境応答において重要な役割を担っている。そこでクレブソルミディウムにおいて植物ホルモンの合成系遺伝子を探査した結果、主要な植物ホルモン合成系が存在していることが推定された。またクレブソルミディウムの植物ホルモンの測定を行った結果、オーキシン、アブシジン酸、サイトカイニン、ジャスモン酸、サリチル酸と多数の植物ホルモンがクレブソルミディウムに存在することが明らかとなった。さらに植物ホルモンのシグナル情報伝達系の関連因子の詳細な解析を行った結果、いくつかの受容体、輸送系や情報伝達系が存在しており、クレブソルミディウムにおいても何らかの植物ホルモン応答が存在していることが示唆された（図8）。

その一方で TIR1（オーキシン受容体）、COI1（ジャスモン酸受容体）などのユビキチン依存性タンパク質分解を介した情報伝達経路の多くが存在しておらず、ABA受容体のPYR/PYL/RCAR も存在していないことが明らかとなった。これらの受容体は、現在の植物ホルモン情報伝達において主要な経路を担っていると考えられており、植物ホルモン間のクロストークを生み出す経路としても知られている。クレブソルミディウムの植物ホルモン伝達経路は陸上植物の主要な情報伝達経路を獲得する前段階にあると考えられ、陸上植物の主要な経路とは異なる原始的な植物ホルモン伝達経路である可能性が考えられる。次の課題は、クレブソルミディウムの植物ホルモンの作用や伝達経路を明らかにし、植物が陸上に進出する過程で、植物ホルモンの起源や役割をどのように発達させてきたか解明していくことである。

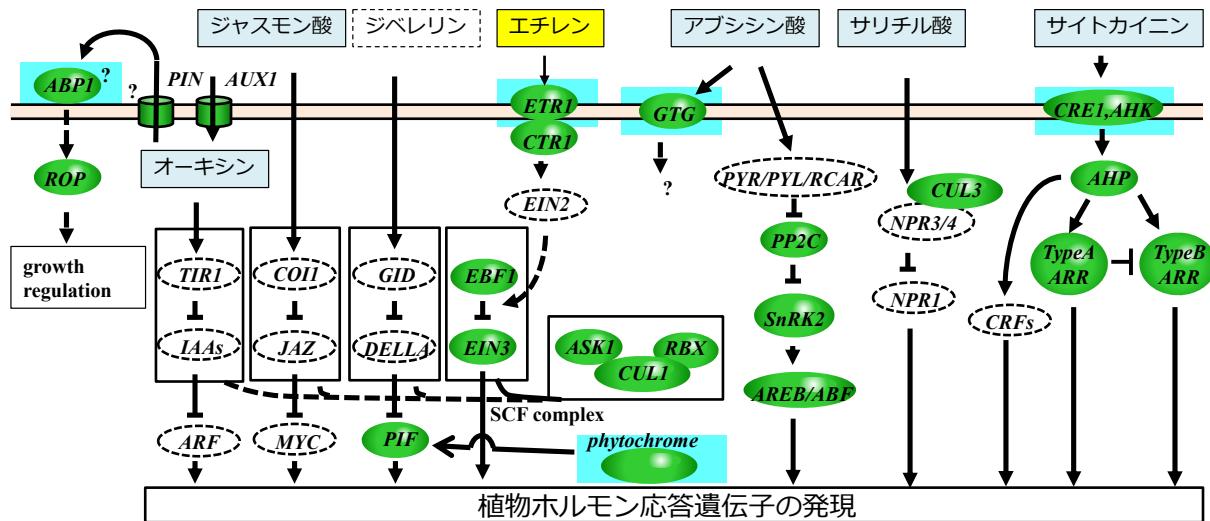


図8 クレブソルミディウムに検出された植物ホルモンと類似遺伝子が見出された情報伝達因子

植物ホルモンのうち検出されたものは水色のボックスで示した。エチレンは未測定である。陸上植物で明らかとなっている情報伝達因子のうち、クレブソルミディウムで類似遺伝子が存在していたものを緑で示した。点線は類似遺伝子が見つかっていない。

7. クレブソルミディウムにおける転写因子

植物ホルモンの他に、転写因子も環境応答に関わる非常に重要な因子である。Plant Transcription Factor Database v3.0 (Jin et al. 2013)の分類法に基づいて58種類の転写因子の同定を行った結果、クレブソルミディウムから266遺伝子の転写因子が同定された（図9）。他の藻類と比べると若干多いものの、陸上植物と比較すると圧倒的に少ない。全遺伝子に占める割合も約1.5%と他の藻類と同程度であり、陸上植物の全遺伝子に占める転写因子の割合より少ないものであった。しかしながらその種類を比較すると、他の藻類より格段にバリエーションが増えていることがわかる（図10a）。またクレブソルミディウムと陸上植物の共通祖

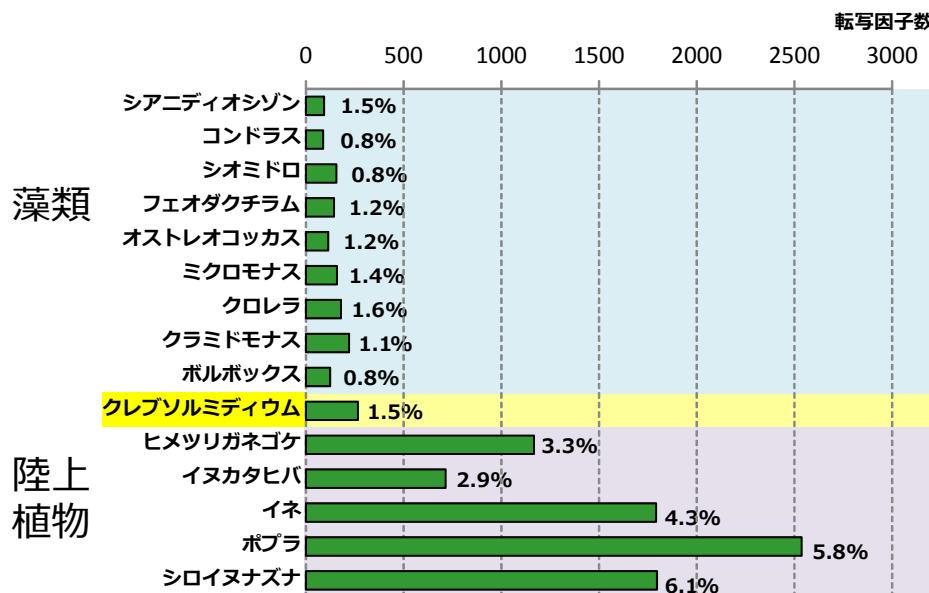


図9 15生物種において検出された転写因子数
図内の数値は全遺伝子に占める転写因子の割合を示す。

先が分岐した後にも転写因子の種類の増加がみられ、植物の陸上化の前後で転写因子の種類、数が増加し、多様な遺伝子制御を身に着けたことが伺える。さらに転写因子に限ったドメインの組み合わせ数をプロットした結果、被子植物ではドメインの組み合わせパターンを増加させており、転写因子の多様化は項目5で述べた遺伝子の多様性の獲得過程の典型的な例と考えられた(図10b)。このような転写因子の種類増加や、組み合わせパターンの増加は、急激に遺伝子ネットワークを指數的に複雑化させた事は間違いないであろう。このことは、陸上に進出した植物が、様々なストレス環境に柔軟に適応し、様々な組織を分化させ、多様な細胞の状態を実現できるようになった大きな要因と考えられる。以上の結果から、陸上植物との車軸藻植物の共通祖先のなかで、比較的早くに分岐したクレブソルミディウムがシンプルな体制を持つにもかかわらず、陸上植物の礎となる基本的な遺伝子制御ネットワークを獲得しており、陸上環境に適応していく過程で遺伝子重複とドメインの組み合わせ方を利用して、既存の遺伝子制御ネットワークを転用して発達させていったという陸上進出のための戦略が見えてくる。今後植物ホルモンの発達と同様、クレブソルミディウムの転写因子が何に応答し、何を制御しているのか明らかにすることが重要となってくると思われる。

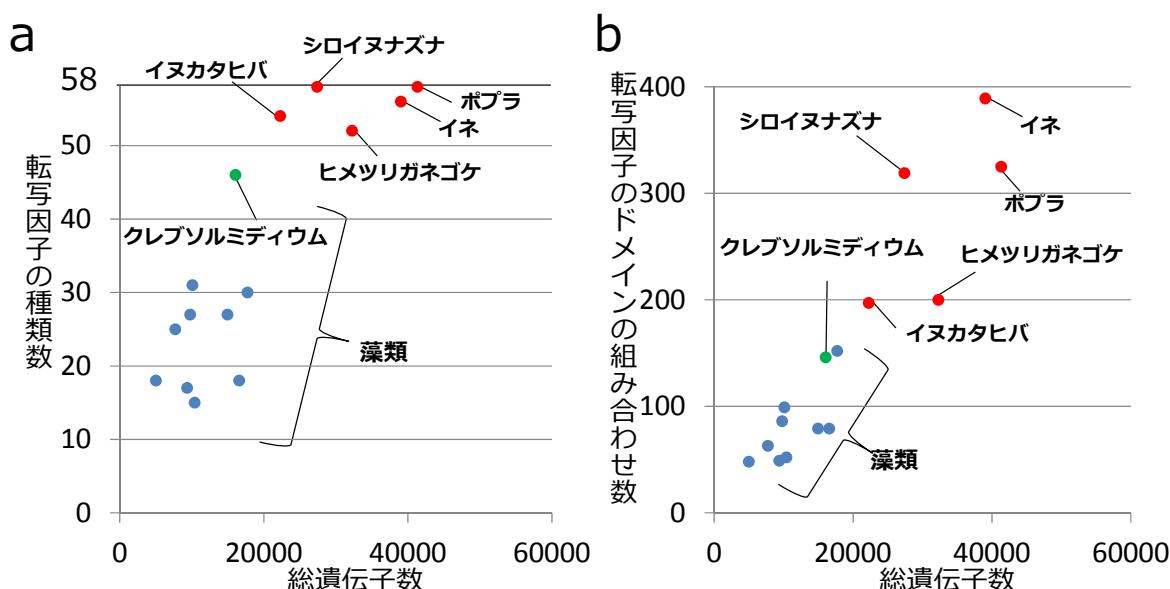


図10 15生物種の転写因子の種類数、ドメインの組み合わせ数と総遺伝子数の関係

- a. 各生物種内の転写因子の種類数と総遺伝子数のプロット
- b. 各生物種内の転写因子におけるドメインの組み合わせ数と総遺伝子数のプロット

8. 今後の展望

クレブソルミディウムのゲノム解読により、植物の陸上進出前の段階ですでに陸上化を可能とするような因子が出現していることが分かってきた。クレブソルミディウム以外にも車軸藻植物のゲノム解読が進んでおり、今後陸上進出の過程で起きたゲノムの変化をより詳細に調べができるようになっていくだろう。今後さらに植物の陸上化を明らかにしていくためには、これらの因子が陸上化前の車軸藻植物にどのような影響を与えたのか解明することが次の段階であると思われる。車軸藻植物は淡水と陸上との間に生息しているものが多く、部分的ながらこれらの因子が半陸上状態の生育に有利であり、徐々により厳しい陸上環

境に生育を広げていくにあたって、機能の多様化や強化を成し遂げた事が考えられる。また他の可能性として、前適応として共通祖先では異なる機能を担っており、陸上化にあたって予想外に有利に働いた因子がある可能性も考えられる。個々の具体的な因子の進化過程を明らかにするためには、実験的にその機能を実証することが必要であり、遺伝子操作系を確立し、培養法、実験系もより扱いやすくしていくことが必須である。このことは植物の陸上化の解明のみならず藻類研究の発展にも大きく貢献するであろう。車軸藻植物門では接合藻綱のヒメミカヅキモ、タテブエが、それぞれパーティクルポンバードメント法、アグロバクテリウム法によって形質転換に成功しており(Abe et al. 2011, Sørensen et al. 2014), 我々もクレブソルミディウムで急ぎ形質転換系の確立を進めている。今後クレブソルミディウムを初めとして様々な車軸藻植物がモデル藻類として確立し、植物の陸上化を含め、生物進化のありかたが垣間見えることを期待している。

謝辞

本研究は日本学術振興会、平成21年度～平成25年度グローバルCOEプログラム「地球から地球たちへ」の一環として推進され、平成23年度から現在まで科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業(CREST)「植物栄養細胞をモデルとした藻類脂質生産系の戦略的構築」の一環として加速的に推進されている。また一部は平成24年度からの文部科学省WPIプログラム、地球生命研究所に引き継がれている。なお *Klebsormidium flaccidum* NIES-2285は国立環境研究所、微生物系統保存施設より分譲頂いた。また本研究はクレブソルミディウム解析チーム(http://www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp/~algae_genome_project/klebsormidium/kf_team.htm)による共同研究であり、全員の多大な貢献があつての研究となった。ここに記して深く感謝の意を表したい。

引用文献

- Abe, J., Hori, S., Tsuchikane, Y., Kitao, N., Kato, M. & Sekimoto, H. 2011. Stable nuclear transformation of the *Closterium peracerosum–strigosum–littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* 52: 1676-1685.
- Battistuzzi, F.U. & Hedges, S.B. 2009. A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. *Mol Biol Evol.* 26:335-343
- Clarke, J.T., Warnock, R.C.M. & Donoghue, P.C.J. 2011. Establishing a time-scale for plant evolution. *New Phytol.* 192: 266-301
- Edwards, D. & Kenrick, P. 2015. The early evolution of land plants, from fossils to genomics: a commentary on Lang (1937) 'On the plant-remains from the Downtonian of England and Wales'. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370: 20140343.
- Elster, J., Degma, P., Kováčik, L., Valentová, L., Šramková, K., & Pereira, A. B. 2008. Freezing and desiccation injury resistance in the filamentous green alga *Klebsormidium* from the Antarctic, Arctic and Slovakia. *Biologia* 63: 843–851.
- 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., Shimojima1, M., Masuda, S., Iwai1, 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, 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. *Nat. Commun.* 5: 3978.
- Jin, J., Zhang, H., Kong, L., Gao, G. & Luo, J. 2013. PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucl. Acids Res.*, 42(D1):D1182-D1187.
- Karsten, U. & Holzinger, A. 2012. Light, temperature, and desiccation effects on photosynthetic activity, and drought-induced ultrastructural changes in the green alga *Klebsormidium dissectum* (Streptophyta) from a high alpine soil crust. *Microb. Ecol.* 63: 51–63.
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. 2012. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31: 1-46.
- Lewis, L. A., & McCourt, R. M. 2004. Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.* 91: 1535-1556.
- Magallón S, Hilu KW & Quandt D. 2013. Land plant evolutionary timeline: gene effects are secondary to fossil constraints in relaxed clock estimation of age and substitution rates. *Am J Bot.* 100: 556-573
- Morison, M. O. & Sheath, R. G. 1985. Response to desiccation stress by *Klebsormidium rivulare* (Ulotrichales, Chlorophyta) from a Rhode Island stream. *Phycologia* 24: 129–145.
- Nagao, M., Matsui, K. & Uemura, M. 2008. *Klebsormidium flaccidum*, a charophycean green alga, exhibits cold acclimation that is closely associated with compatible solute accumulation and ultrastructural changes. *Plant Cell Environ.* 31: 872–885.
- Parnell, J. & Foster, S. 2012. Ordovician ash geochemistry and the establishment of land plants. *Geochem. Trans.* 13, 7.
- Rubinstein C.V., Gerrienne, P., de la Puente, G.S., Astini, R.A. & Steemans, P. 2010. Early Middle Ordovician evidence for land plants in Argentina (eastern Gondwana). *New Phytol.* 188: 365-369
- Scott, A. C. & Glasspool, I. J. 2006. The diversification of Paleozoic fire systems and fluctuations in atmospheric oxygen concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 10861-10865.
- Sørensen, I., Fei, Z., Andreas, A., Willats, W. G., Domozych, D. S. & Rose, J. K. 2014. Stable transformation and reverse genetic analysis of *Penium margaritaceum*: a platform for studies of charophyte green algae, the immediate ancestors of land plants. *Plant J.* 77: 339-351.
- Timme, R. E., Bachvaroff, T. R. & Delwiche, C. F. 2012. Broad phylogenomic sampling and the sister lineage of land plants. *PLoS ONE* 7, e29696.
- Wickett, N.J., Mirarab S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M., Burleigh, J.G., Gitzendanner, M.A., Ruhfel, B.R., Wafula, E., Der, J.P., Graham, S.W., Mathews, S., Melkonian, M., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Miles, N.W., Rothfels, C.J., Pokorny, L.,

Shaw, A.J., DeGironimo, L., Stevenson, D.W., Surek, B., Villarreal, J.C., Roure, B., Philippe, H., dePamphilis, C.W., Chen, T., Deyholos, M.K., Baucom, R.S., Kutchan, T.M., Augustin, M.M., Wang, J., Zhang, Y., Tian, Z., Yan, Z., Wu, X., Sun, X., Ka-Shu Wong, G. & Leebens-Mack J. 2014. Phylogenomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, E4859-E4868.

大和勝幸, 河内孝之 2012. 見えてきたゼニゴケゲノム 植物科学最前線 3:71.

TALE型ホメオボックス遺伝子族の進化による陸上植物複相の複雑化

榎原恵子^{1*}・古水千尋²

¹ 金沢大学学際科学実験センター 〒920-0934 金沢市宝町13-1

(* 現所属: 立教大学理学部 〒171-8501 東京都豊島区西池袋3-34-1)

² Max Planck Institute for Plant Breeding Research

Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Cologne Germany

The evolution of TALE homeobox transcription factors contributes to the increase in the complexity of the diploid body plan in land plants

Key words: Alternation of generations; Evolution of sporophytes; Gene duplication; KNOX; BELL

Keiko Sakakibara^{1*}, Chihiro Furumizu²,

¹ Advanced Science Research Center, Kanazawa University, Kanazawa 920-0934, Japan

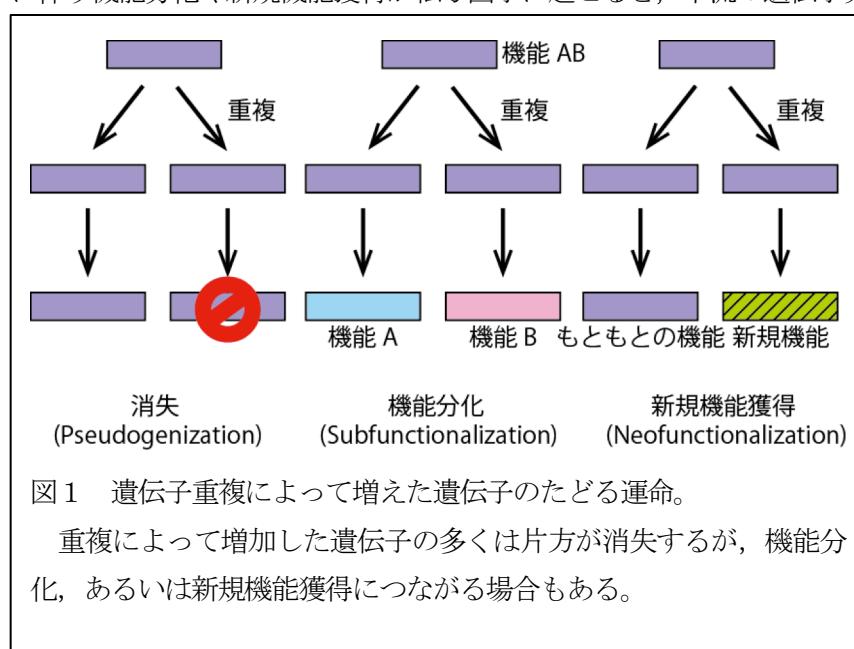
(*Current address: Rikkyo University, 3-34-1 Nishi-Ikebukuro, Toshima-ku, 171-8501, Tokyo Japan)

² Max Planck Institute for Plant Breeding Research

Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Cologne, Germany

1. 遺伝子重複は進化の原動力

遺伝子重複は新規遺伝子獲得の原動力であると考えられてきた (Ohno 1970)。重複によって増えた遺伝子の多くは偽遺伝子化 (Pseudogenization)によって消失するが、重複に由来する2つの遺伝子がオリジナルの遺伝子が担っていた機能を役割分担するようになる機能分化 (Subfunctionalization)や、重複により増えた遺伝子の片方がもともと担っていた機能を維持する一方で、もう片方の遺伝子が新しい機能を獲得する新規機能獲得 (Neofunctionalization)が起こることが知られている (図1)。遺伝子重複に伴う機能分化や新規機能獲得が転写因子に起こると、下流の遺伝子発現が大きく変化する結果、そ

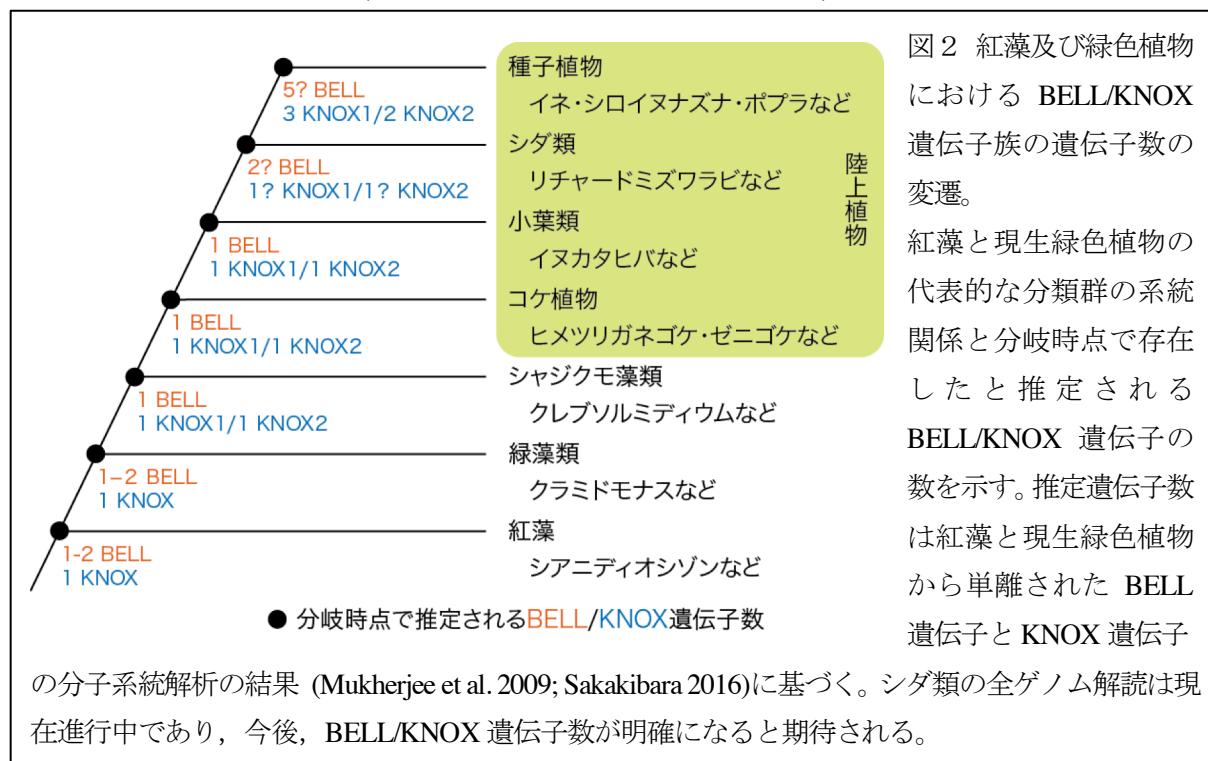


の生物に新しい形質の獲得をもたらす原動力となりうる。陸上植物においても、遺伝子重複後の機能分化や新規機能獲得が既存の遺伝子制御ネットワークをより複雑にし、その進化に貢献したと考えられている (Rensing 2014)。また、同じ種内で重複により生じた相同遺伝子はパラログと呼ばれ、種分化によって生じたオーソログとは区別される。

陸上植物は淡水性緑色藻類のシャジクモ藻類の仲間から約4億8000万年以上前に分岐したと考えられている(Lewis and McCourt 2004; Wellman et al. 2003; Wickett et al. 2014)。シャジクモ藻類シャジクモと陸上植物の生活環を比較してみると、シャジクモは核相が単相の世代に多細胞の配偶体を作るが、複相の世代は単細胞の接合子のみである。一方で、陸上植物は複相の世代も多細胞の孢子体を形成する。陸上植物の進化の初期に他の系統から分岐したと考えられるコケ植物では生活環の大半は単相の配偶体で、孢子体は小さく、配偶体上に依存的に形成される。これに対し、被子植物では複相の孢子体が生活の主となり、配偶体は数細胞にまで退化している(Graham et al. 2000)（本総説集中の石崎と榎原の図2を参照）。このことから、陸上植物の進化の過程で複相の植物体の多細胞化と巨大化が起きたと考えられる。本総説では陸上植物の複相世代の進化に貢献したと考えられる2つのホメオボックス型転写因子、KNOX遺伝子族とBELL遺伝子族の遺伝子重複とその後の遺伝子進化について紹介する。

2. 緑色植物のTALE型ホメオボックス遺伝子にみられる遺伝子重複：KNOX遺伝子とBELL遺伝子

ホメオボックス型転写因子は真核生物が共通に持つ起源の古い転写因子の一つであり、真核生物の共通祖先において、DNA結合能を示すホメオドメインの第1ヘリックスと第2ヘリックスの間に3アミノ酸残基の挿入を含むTALE型ホメオボックス遺伝子と3アミノ酸残基の挿入がない非TALE型ホメオボックス型遺伝子に分かれていたと考えられている(Derelle et al. 2007)。植物ではTALE型転写因子はKNOX遺伝子族とBELL遺伝子族に分かれており、いずれも緑色植物と単細胞紅藻シアニティオシゾン *Cyanidioschyzon merolae* で広く保存されている(図2; Mukherjee et al. 2009; Sakakibara 2016)。緑藻類と異なり、陸上植物の系統ではKNOX遺伝子族は遺伝子重複によりKNOXクラス1遺伝子亜族(KNOX1)とKNOXクラス2遺伝子亜族(KNOX2)に分岐している(図2; Mukherjee et al. 2009)。コケ植物と維管束植物の共通祖先ではKNOX1遺伝子亜族とKNOX2遺伝子亜族の遺伝子数はそれぞれ1個ずつであったと推定されるが、その後に起こった遺伝子重複の結果、種子植物ではさらに遺伝子数が

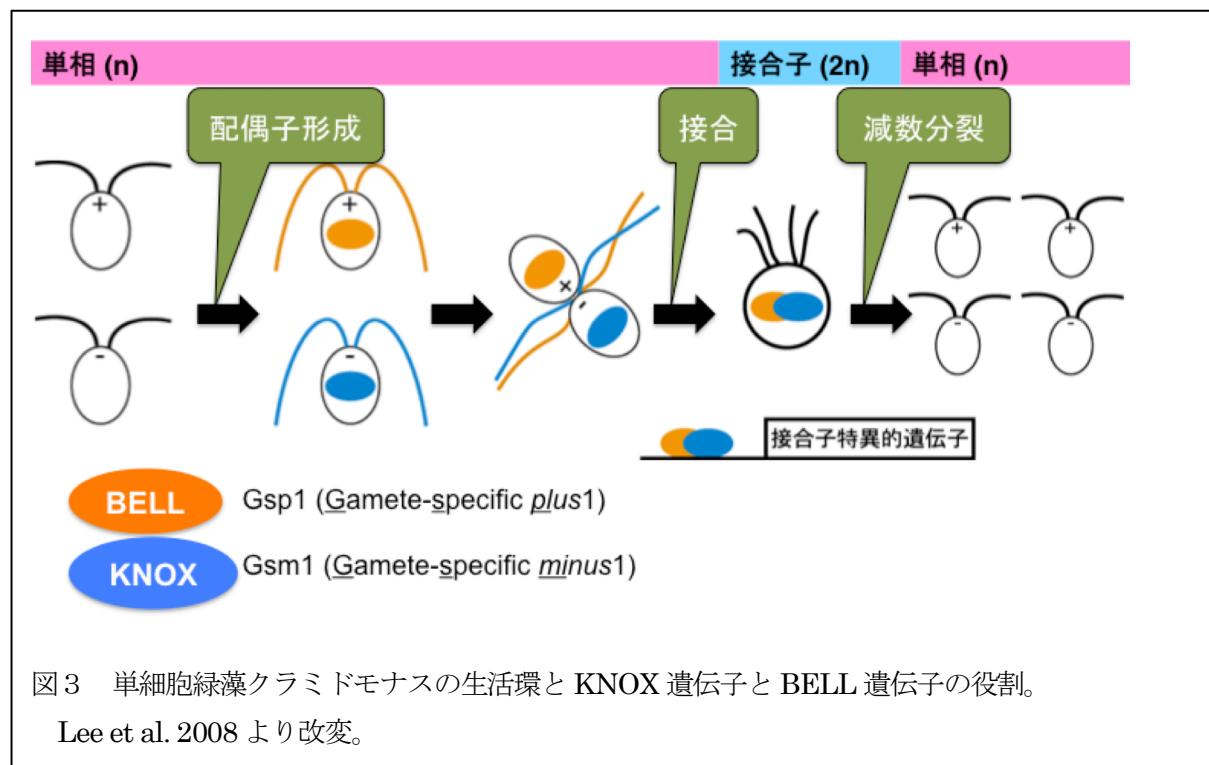


増加している。KNOX遺伝子と同様に、陸上植物のBELL遺伝子についても遺伝子重複により遺伝子数が増加する傾向が認められる。一方、藻類のBELL遺伝子では、紅藻シアニディオシゾン、及び緑藻類は遺伝子重複によって生じた2個のBELL遺伝子を持つが、シャジクモ藻類クレブソルミディウム *Klebsormidium flaccidum*では1個存在する。分岐年代の古さから、藻類のBELL遺伝子と陸上植物のBELL遺伝子の系統関係は未だ明らかではなく、さらなる解析が待たれる。

BELL遺伝子とKNOX遺伝子の祖先的な機能を考察する上で重要な、緑藻類のTALE型ホメオボックス遺伝子に関する研究を次の項で紹介する。

3. 緑色植物の複相発生を制御する TALE 型ホメオボックス遺伝子

単細胞緑藻類クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* はプラスとマイナスの2つの交配型を持ち、栄養欠乏条件下では单相の栄養細胞が配偶子へと分化する。その際に、プラス型配偶子は BELL 様タンパク質をコードする *GSP1* (*Gamete-specific plus1*) 遺伝子を、マイナス型配偶子は KNOX タンパク質をコードする *GSM1* (*Gamete-specific minus1*) 遺伝子を発現する。これらのタンパク質はそれぞれの配偶子においては細胞質に局在する。KNOX タンパク質は転写因子として働くが、自身は核移行シグナルを持たず、接合後、BELL タンパク質とヘテロダイマーを形成することで核へと移行し、接合子（複相）特異的な遺伝子発現を調節することで複相世代の分化を制御していることが示された (Lee et al. 2008; Zhao et al. 2001)。これらの実験や緑色植物における TALE 遺伝子の配列解析の結果に基づいて、Lee ら (2008) は KNOX 遺伝子と BELL 遺伝子の進化が陸上植物の複相世代の多細胞化に重要であったという仮説を提唱している。次の項では陸上植物の生活環における TALE 型ホメオボックス遺伝子の役割を考察する上で重要な知見をもたらした、ヒメツリガネゴケの KNOX 遺伝子族と BELL 遺伝子族に関する研究を紹介する (Horst et al. 2016; Sakakibara et al. 2013)。



4. KNOX2 遺伝子と BELL 遺伝子は陸上植物の世代交代を制御する

基部陸上植物における KNOX2 遺伝子亜族と BELL 遺伝子族の機能についてはコケ植物セン類のヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* を用いた解析が進んでいる。ヒメツリガネゴケゲノム中には2個の KNOX2 遺伝子がコードされており(図2), いずれも複相の胞子体で発現し, その二重機能欠損変異体は胞子体の胚発生が初期の段階で停止する。この胚を単離培養すると, 核相は複相のまま胞子体から配偶体様組織を分化したことから, KNOX2 遺伝子が複相において配偶体の発生プログラムを抑制することで世代交代を制御していることが示された(Sakakibara et al. 2013)。

一方, ヒメツリガネゴケは4個のBELL遺伝子を持つが, そのうちの一つであるPpBELL1遺伝子を配偶体において過剰発現させると, 核相は単相のまま胞子体様組織が誘導された(Horst et al. 2016)。この結果から, ヒメツリガネゴケのBELL遺伝子が胞子体の発生プログラムを制御することにより, 世代の切換えに関与することが示された。また, BiFC解析と呼ばれる手法でタバコの表皮細胞を用いてタンパク質間の相互作用を解析した結果, PpBELL1タンパク質と蛍光タンパク質断片との融合タンパク質がヒメツリガネゴケのKNOX1またはKNOX2タンパク質と蛍光タンパク質断片との融合タンパク質のいずれとも相互作用可能であることが示されている。以上の結果は, ヒメツリガネゴケでもPpBELL1タンパク質がヒメツリガネゴケKNOXタンパク質のいずれかと物理的に相互作用して世代交代を制御している可能性を示唆する(Horst et al. 2016)。これらの研究によって, KNOX遺伝子とBELL遺伝子による単相と複相の切換えの分子機構が緑藻クラミドモナスと陸上植物ヒメツリガネゴケ間である程度保存されていることが示された。

5. KNOX1 遺伝子は胞子体の分裂組織形成維持遺伝子

植物で最初に単離されたホメオボックス遺伝子はトウモロコシ *Zea Mays* から単離された KNOX1 遺伝子亜族に属する遺伝子である *Knotted-1* であり(Vollbrecht et al. 1991), KNOX1 遺伝子亜族については被子植物を用いた研究が多数, 報告されている(Hay and Tsiantis 2010)。トウモロコシの *Knotted-1* 遺伝子の報告に続いてシロイスナズナ *Arabidopsis thaliana* の茎頂分裂組織が欠失する変異体 *shoot meristemless (stm)* の原因遺伝子として *STM* 遺伝子が単離され, KNOX1 タンパク質をコードしていることが明らかになった(Barton and Poethig 1993; Long et al. 1996)。また, シロイスナズナの他の KNOX1 パラログの機能欠損変異体である *knat1/brevipedicellus (bp)* は花茎の伸長が妨げられる表現型を示し, 細胞壁合成遺伝子, 特にリグニン合成経路の遺伝子発現が上昇していることから, *KNAT1/BP* 遺伝子は細胞の未分化状態を適切に維持し, 花茎の細胞分化と伸長がおこる前にリグニンの沈着してしまうのを抑制していると考えられている(Mele et al. 2003)。一方, *KNAT1/BP* 遺伝子をシロイスナズナで過剰発現させると葉に異所的に分裂組織が形成される(Chuck et al. 1996)。これらの事実から, 被子植物 KNOX1 遺伝子は胞子体の茎頂分裂組織の形成維持と細胞分化の抑制に機能していると考えられている(Hay and Tsiantis 2010)。

基部陸上植物であるコケ植物ヒメツリガネゴケの持つ3個の KNOX1 遺伝子は胞子体の頂端細胞と分裂組織で機能する。ヒメツリガネゴケの胞子体の分裂組織は胚発生の初期に形成されるが, 後に分裂組織が消失し, 1個の胞子のうを分化して胞子体の発生を終了する。ヒメツリガネゴケの KNOX1 遺伝子はいずれもこの胞子体に一時的に作られる分裂組織で発現する。ヒメツリガネゴケ KNOX1 遺

伝子三重機能欠損変異体においては胞子体の分裂組織が適切に維持されないため、結果としていびつな胞子体を形成する。このことから、KNOX1 遺伝子はヒメツリガネゴケにおいても被子植物の KNOX1 オーソログと同様に分裂組織を維持する機能を担っていると考えられる(Sakakibara et al. 2008)。

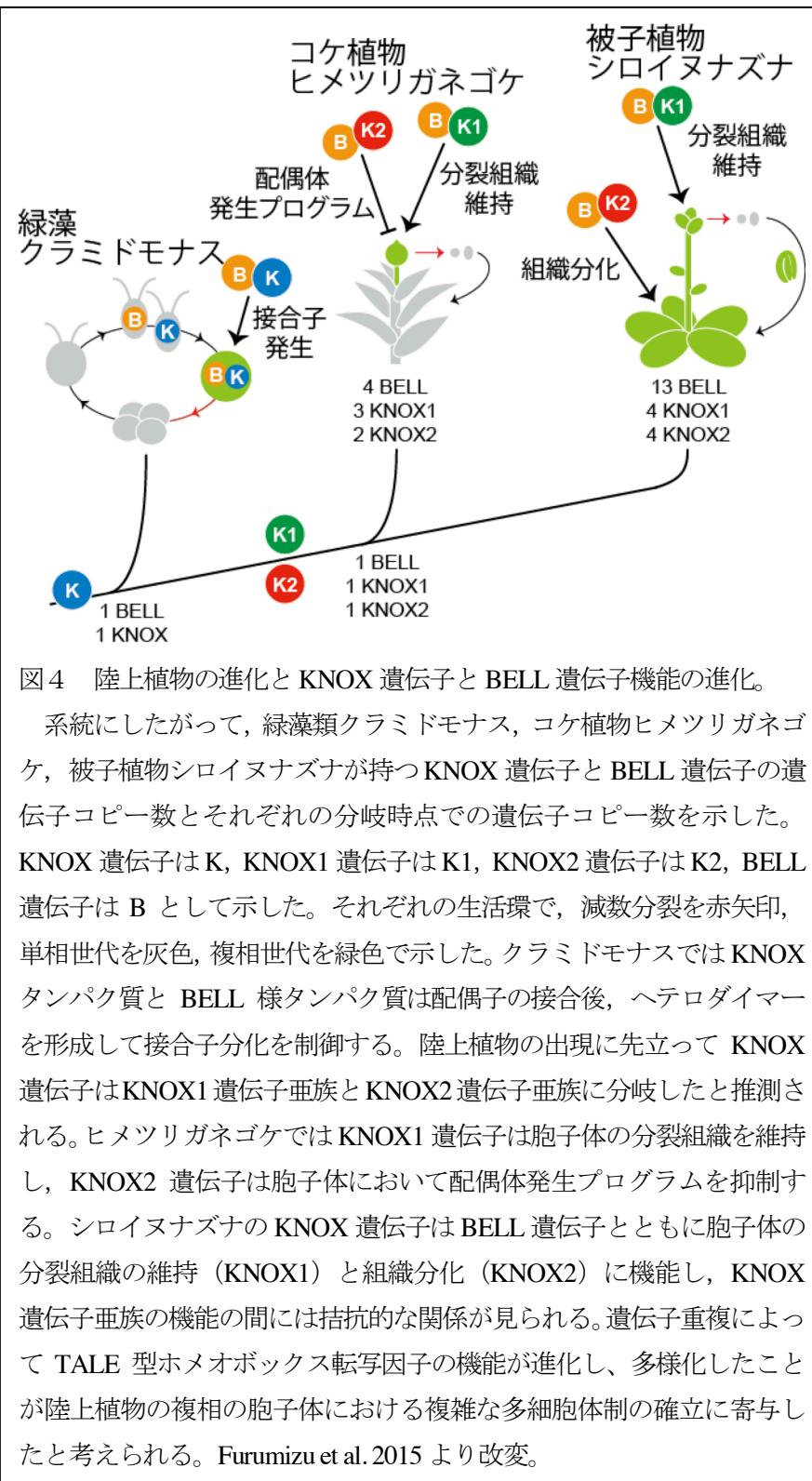
シロイヌナズナのような単葉を形成する被子植物では KNOX1 遺伝子は茎頂分裂組織で発現し、葉原基形成に先立って予定葉領域で発現が消失する。それに対して、トマト *Solanum lycopersicum* やシロイヌナズナの近縁種のミチタネツケバナ *Cardamine hirsuta* など複葉を形成する植物では KNOX1 遺伝子の発現が葉原基の小葉原基で再び活性化することで複葉の発生が制御されていることが知られている(Blein et al. 2008; Hay and Tsiantis 2010)。また、複葉を形成する植物で KNOX1 遺伝子を過剰発現させた場合は複葉の複雑さが亢進される(Hareven et al. 1996)。これらの研究は KNOX1 遺伝子の発現様式の変化が被子植物の葉の進化と多様化に貢献したことを示唆している。このように被子植物の胞子体の茎頂では KNOX1 遺伝子の発現は時空間的に精緻に制御されており、茎頂分裂組織で長期間維持される一方、発生初期の葉原基では抑制されるという複雑な発現様式を示すが、ヒメツリガネゴケの KNOX1 遺伝子の発現は胞子体の胚発生の初期の分裂組織に限定されている。被子植物の葉原基での KNOX1 遺伝子の発現抑制に関与する転写因子として MYB ドメインを含む ARP (ASYMMETRIC LEAVES1/ROUGH SHEATH2/PHANTASTICA)タンパク質、LOB (LATERAL ORGAN BOUNDARIES)ドメインを含む AS2 (ASYMMETRIC LEAVES2)タンパク質の複合体や YAB (YABBY) タンパク質などが報告されている(Byrne et al. 2000; Hake et al. 2004; Kumaran et al. 2002)。これらの調節因子の一部 (AS1, AS2 や YAB) のオーソログはヒメツリガネゴケゲノムには存在せず(Rensing et al. 2008; Sakakibara et al. 2008)，陸上植物の進化の過程で、被子植物を含む系統で KNOX1 遺伝子の発現調節に関わる新たなトランス因子が獲得されたと推測される。加えて発現調節に関わるシス領域が進化した結果、KNOX1 遺伝子の発現制御ネットワークが複雑になったことで、茎頂での発現が維持されるようになり、被子植物の系統での胞子体の複雑化につながったと考えられる(榎原恵子 2013)。

6. 被子植物における KNOX2 遺伝子の機能

Knotted-1 遺伝子の単離を端緒として、そのオーソログが陸上植物の様々な分類群から単離された。系統解析の結果、陸上植物 KNOX 遺伝子はそれぞれ单系統の KNOX1 遺伝子亜族と KNOX2 遺伝子亜族に分かれることが早くから示されていた(Kerstetter et al. 1994)。両者の間には、遺伝子の発現パターンや過剰発現体の表現型に大きな違いがある。すなわち、シダ類や被子植物の KNOX1 遺伝子は胞子体の分裂組織で主に発現する一方で、KNOX2 遺伝子は胞子体の分化中の様々な組織で発現する(Bharathan et al. 1999; Reiser et al. 2000; Sano et al. 2005; Serikawa et al. 1997a)。また、シロイヌナズナの KNOX2 遺伝子の一つである *KNAT3* を過剰発現する株は顕著な表現型を示さないが(Serikawa et al. 1997a; Serikawa et al. 1997b)，これは分裂組織の異所的な形成などの顕著な表現型を示す KNOX1 遺伝子の機能獲得型変異体や KNOX1 過剰発現植物体とは対照的である。さらに興味深い現象として、シロイヌナズナの他の KNOX2 遺伝子の機能欠損型変異体である *knat7* 変異体において二次壁合成能の減少が報告されており(Zhong et al. 2008)，KNOX1 遺伝子亜族に属するシロイヌナズナの *KNAT1/BP* の変異体 *bp* でリグニン沈着が促進されるのと対極的である(Mele et al. 2003)。これらの知見から、KNOX2 遺伝子は KNOX1 遺伝子とは異なり、胞子体の分化組織で主に機能することが推測されていたが、こ

の仮説を裏付ける最近の研究成果を次に紹介する。

シロイヌナズナ KNOX2 遺伝子パラログの残りの3個の単独変異体はいずれも野生型とほぼ同様の表現型を示すが、*knat3 knat4 knat5* 三重変異体はシロイヌナズナ KNOX1 遺伝子を過剰発現させた時のように葉が切れ込む表現型を示す(Furumizu et al. 2015; Serikawa et al. 1997a; Truernit et al. 2006)。また、*KNAT3*をBELL遺伝子とともに茎頂分裂組織で異所的に発現すると、KNOX1 遺伝子の機能欠損変異体である *stm* 変異体と類似の表現型を示す。KNOX1 転写因子と転写抑制ドメインの融合タンパク質を植物体で発現させると、KNOX1 の欠損型変異体と類似の表現型を示すことから、KNOX1 タンパク質は主にアクティベータ型転写因子として機能すると推測される(Markel et al. 2002; Shani et al. 2009)。一方、シロイヌナズナの *KNAT7* 遺伝子がコードする KNOX2 タンパク質はリプレッサー型転写因子として働くことが示唆されている(Li et al. 2011; Li et al. 2012)。KNOX2 転写因子のターゲットの同定などの今後の解析が必要であるが、以上の事実から、シロイヌナズナの KNOX1 遺伝子と KNOX2 遺伝子は地上部のボディプランを制御する共通のターゲット遺伝子の発現を拮抗的



に制御する可能性が示唆された(図4; Furumizu et al. 2015)。

先に複葉を形成する植物において KNOX1 遺伝子が複葉の複雑さを亢進することを言及したが、ミチタネツケバナにおける複葉形成には KNOX1 遺伝子が必要であり、KNOX1 遺伝子の過剰発現は複葉を構成する小葉の枚数を増加させる(Hay and Tsiantis 2006)。一方、ミチタネツケバナで KNOX2 遺伝子を過剰発現すると複葉の複雑さが減少することから、シロイヌナズナの地上部の形態形成と同様に、ミチタネツケバナの複葉形成においても KNOX2 遺伝子は KNOX1 遺伝子と反対の役割を果たすことが示唆された(Furumizu et al. 2015)。これらの知見から、被子植物に至る系統で KNOX1 遺伝子亜族と KNOX2 遺伝子亜族の機能が大きく分化したと推測される。KNOX1 遺伝子と KNOX2 遺伝子の発現領域に重なりがないこと、また転写因子として機能の違いが推測されることから、遺伝子の発現を調節するシス領域と遺伝子の産物であるタンパク質がともに変化することで機能分化に至ったと考えられる。

また、被子植物での KNOX 遺伝子族の転写因子の機能の変化を如実に示す例として、シロイヌナズナやトマトで同定された、ホメオドメインを欠く KNOX 様タンパク質 KNATM や PTS/TKD1 が挙げられる。これらの DNA 結合能を持たない KNOX 様タンパク質は通常の KNOX 転写因子の機能を競合的に阻害し、KNOX 転写因子によるターゲット遺伝子の発現制御の抑制因子として働くと示唆されている(Kimura et al. 2008; Magnani and Hake 2008)。

7. KNOX 遺伝子と BELL 遺伝子の重複は被子植物の胞子体地上体制の複雑化に貢献した

シロイヌナズナゲノムには13個のBELL 遺伝子が含まれる。機能欠損変異体の遺伝学的な解析により、STM 遺伝子などのKNOX1 遺伝子は PENNYWISE や POUND-FOOLISH などの BELL 遺伝子とともに機能することが示されている(Byrne et al. 2003; Rutjens et al. 2009; Smith and Hake 2003)。一方、機能欠損変異体の表現型の類似や過剰発現植物体の解析から KNOX2 遺伝子は BELL1, SAWTOOTH1 (SAWI), SAW2 などの BELL 遺伝子とともに機能する可能性が示唆されており、シロイヌナズナの BELL 遺伝子には機能の分化があることが推測される(Furumizu et al. 2015)。これらの研究から、BELL 遺伝子族内での遺伝子重複とその後の機能分化も KNOX 遺伝子との相互作用の組み合わせの多様化に寄与したと考えられる。KNOX 遺伝子と BELL 遺伝子の組み合わせの多様化がより高度な転写調節ネットワークの構築を可能にし、その結果、被子植物の地上部の複雑なボディプランの進化にも貢献したのではないかと考えられる。

8. おわりに

2014年に公開されたシャジクモ藻類クレブソルミディウムのゲノム情報を含めた系統解析により、KNOX 遺伝子族は陸上植物の多様化に先立って、KNOX1 と KNOX2 の遺伝子亜族に分かれていたことが明らかとなった(図2; Hori et al. 2014; Sakakibara 2016)。シャジクモ藻類では世代交代は報告されておらず、おそらく、陸上植物の系統での KNOX1 と KNOX2 の遺伝子亜族で新規機能獲得がおきたことにより、胞子体の複雑な多細胞体制の確立に機能するようになったと考えられる。シャジクモ藻類においてこれらの KNOX1 遺伝子、KNOX2 遺伝子がそれぞれどのような機能を担っているかは興

味深いところだ。近年、シャジクモ藻類ホシミドロ目のヒメミカヅキモ *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex とタテブエ *Penium margaritaceum*において形質転換系の確立が相次いで報告されており(Abe et al. 2011; Sørensen et al. 2014), 今後、シャジクモ藻類でのKNOX1/KNOX2 遺伝子亜族やBELL 遺伝子の機能解析が待たれる。

また、紅藻からも KNOX 遺伝子と BELL 遺伝子がそれぞれみつかっており(Matsuzaki et al. 2004; Mukherjee et al. 2009), KNOX-BELL 経路の進化を考える上でこれらの機能解析もたいへん興味深い。KNOX 遺伝子族と BELL 遺伝子族の起源をさかのぼってみると、これらの遺伝子族は紅藻と緑色植物の共通祖先での遺伝子重複によって生じたと推測され、起源の古い遺伝子重複とその後の進化が植物のボディプランや陸上植物の生活史の進化に大きな影響を与えたと考えられる。

本稿では発生遺伝学的な研究が充実している緑藻類とコケ植物、そして被子植物の研究を中心に紹介してきたが、他の分類群における遺伝子機能の解析に向けた実験系の整備も近年、飛躍的に進んでいる。シダ植物においては現在公開されている小葉類のイヌカタヒバ *Selaginella moellendorffii* ゲノムだけでなく、薄のうシダであるリチャードミズワラビなどのゲノム解析も進められており(Sessa et al. 2014), リチャードミズワラビなどで遺伝子導入が可能なことが報告された (Muthukumar et al. 2013; Plackett et al. 2014)。今後、シダ植物でのそれぞれの遺伝子族内での遺伝子数が明らかとなり、これらの遺伝子の機能解析が進められることで、維管束植物でのKNOX遺伝子族とBELL遺伝子族の遺伝子重複と機能分化を段階的に調べることが可能となるだろう。また、現存のコケ植物のモデル、タイ類のゼニゴケ、セン類のヒメツリガネゴケに加え、第三のコケ植物であるツノゴケのモデル化も始まっている(Szövényi et al. 2015)。今後、これらの分類群におけるBELL/KNOX遺伝子の機能や陸上植物で新規に獲得したと考えられる機能ドメインの解析が進むと、KNOX遺伝子族及びBELL遺伝子族の遺伝子重複とそれに続く新規機能獲得がどのように陸上植物の形態進化や生活史の進化をもたらしたのかの全貌が明らかとなるだろう。

謝辞

オーストラリア Monash 大学の John L. Bowman 博士に日頃からの有益な discussion を感謝します。

引用文献

- Abe, J., Hori, S., Tsuchikane, Y., Kitao, N., Kato, M., & Sekimoto, H. 2011. Stable nuclear transformation of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* 52: 1676-1685.
- Barton, M.K., & Poethig, R.S. 1993. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wildtype and in the *shoot meristemless* mutant. *Development* 119: 823-831.
- Bharathan, G., Janssen, B.-J., Kellogg, E.A., & Sinha, N. 1999. Phylogenetic relationships and evolution of the KNOTTED class of plant homeodomain proteins. *Mol. Biol. Evol.* 16: 553-563.
- Blein, T., Pulido, A., Vialette-Guiraud, A., Nikovics, K., Morin, H., Hay, A., Johansen, I.E., Tsiantis, M., & Laufs, P. 2008. A conserved molecular framework for compound leaf development. *Science* 322: 1835-1839.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., & Martienssen, R.A. 2000. *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* 408: 967-971.

- Byrne, M.E., Groover, A.T., Fontana, J.R., & Martienssen, R.A. 2003. Phyllotactic pattern and stem cell fate are determined by the *Arabidopsis* homeobox gene *BELLINGER*. *Development* 130: 3941–3950.
- Chuck, G., Lincoln, C., & Hake, S. 1996. *KNAT1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 1277-1289.
- Derelle, R., Lopez, P., Le Guyader, H., & Manuel, M. 2007. Homeodomain proteins belong to the ancestral molecular toolkit of eukaryotes. *Evol. Dev.* 9: 212-219.
- Furumizu, C., Alvarez, J.P., Sakakibara, K., & Bowman, J.L. 2015. Antagonistic roles for KNOX1 and KNOX2 genes in patterning the land plant body plan following an ancient gene duplication. *PloS Genet.* 11: e1004980.
- Graham, L.E., Cook, M.E., & Busse, J.S. 2000. The origin of plants: body plan changes contributing to a major evolutionary radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4535-4540.
- Hake, S., Smith, H.M.S., Holtan, H., Magnani, E., Mele, G., & Ramirez, J. 2004. The role of KNOX genes in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 125-151.
- 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.
- 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.
- Hay, A., & Tsiantis, M. 2010. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development* 137: 3153-3165.
- 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, 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. *Nat. Commun.* 5: 3978.
- Horst, N.A., Katz, A., Pereman, I., Decker, E.L., Ohad, N., & Reski, R. 2016. A single homeobox gene triggers phase transition, embryogenesis and asexual reproduction. *Nat. Plants* 2: 15209.
- Kerstetter, R., Vollbrecht, E., Lowe, B., Veit, B., Yamaguchi, J., & Hake, S. 1994. Sequence analysis and expression patterns divide the maize *knotted1*-like homeobox genes into two classes. *Plant Cell* 6: 1877-1887.
- Kimura, S., Koenig, D., Kang, J., Yoong, F.Y., & Sinha, N. 2008. Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel KNOX gene. *Curr. Biol.* 18: 672-677.
- Kumaran, M.K., Bowman, J.L., & Sundaresan, V. 2002. YABBY polarity genes mediate the repression of KNOX homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2761-2770.
- Lee, J.-H., Lin, H., Joo, S., & Goodenough, U. 2008. Early sexual origins of homeoprotein heterodimerization and evolution of the plant KNOX/BELL family. *Cell* 133: 829-840.

- Lewis, L.A., & McCourt, R.M. 2004. Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.* 91: 1535-1556.
- Li, E., Wang, S., Liu, Y., Chen, J.-G., & Douglas, C.J. 2011. OVATE FAMILY PROTEIN4 (OFP4) interaction with KNAT7 regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 67: 328-341.
- Li, E., Bhargava, A., Qiang, W., Friedmann, M.C., Forneris, N., Savidge, R.A., Johnson, L.A., Mansfield, S.D., Ellis, B.E., & Douglas, C.J. 2012. The Class II *KNOX* gene *KNAT7* negatively regulates secondary wall formation in *Arabidopsis* and is functionally conserved in *Populus*. *New Phytol.* 194: 102-115.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., & Barton, M.K. 1996. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 163: 66-69.
- Magnani, E., & 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.
- Markel, H., Chandler, J., & Werr, W. 2002. Translational fusions with the *engrailed* repressor domain efficiently convert plant transcription factors into dominant-negative functions. *Nucleic Acids Res.* 30: 4709-4719.
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-i, T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, S., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, Y., Nishimura, Y., Nakao, S., Kobayashi, T., Momoyama, Y., Higashiyama, T., Minoda, A., Sano, M., Nomoto, H., Oishi, K., Hayashi, H., Ohta, F., Nishizaka, S., Haga, S., Miura, S., Morishita, T., Kabeya, Y., Terasawa, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Asakawa, S., Takano, H., Ohta, N., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y., & Kuroiwa, T. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428: 653-657.
- Mele, G., Ori, N., Sato, Y., & Hake, S. 2003. The *knotted1*-like homeobox gene *BREVIPEDICELLUS* regulates cell differentiation by modulating metabolic pathways. *Genes Dev.* 17: 2088-2093.
- Mukherjee, K., Brocchieri, L., & Bürglin, T.R. 2009. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Mol. Biol. Evol.* 26: 2775-2794.
- Muthukumar, B., Joyce, B.L., Elless, M.P., & Stewart Jr., C.N. 2013. Stable Transformation of Ferns Using Spores as Targets: *Pteris vittata* and *Ceratopteris thalictroides*. *Plant Physiol.* 163: 648-658.
- Ohno, S. 1970. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag. New York.
- Plackett, A.R.G., Huang, L., Sanders, H.L., & Langdale, J.A. 2014. High-efficiency stable transformation of the model fern species *Ceratopteris richardii* via microparticle bombardment. *Plant Physiol.* 165: 3-14.
- Reiser, L., Sanchez-Baracaldo, P., & Hake, S. 2000. Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of knox homeobox genes. *Plant Mol. Biol.* 42: 151-166.
- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Ashton, N.W., Barbazuk, W.B., Barker, E., Bennetzen, J.L., Blankenship, R., Cho, S.H., Dutcher, S.K., Estelle, M., Fawcett, J.A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K.A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D.R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P.J., Sanderfoot, A., Schwein, G., Shiu, S.-H., Stueber, K., Theodoulou, F.L., Tu, H., Van de Peer, Y., Verrier, P.J., Waters, E., Wood, A., Yang, L., Cove, D.J., Cuming, A.C., Hasebe, M., Lucas, S., K. Sakakibara and C. Furumizu- 10

- Mishler, B.D., Reski, R., Grigoriev, I.V., Quatrano, R.S., & Boore, J.L. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69.
- Rensing, S.A. 2014. Gene duplication as a driver of plant morphogenetic evolution. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17: 43-48.
- Rutjens, B., Bao, D., Van Eck-Stouten, E., Brand, M., Smeekens, S., & Proveniers, M. 2009. Shoot apical meristem function in *Arabidopsis* requires the combined activities of three BEL1-like homeodomain proteins. *Plant J.* 58: 641-654.
- 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.
- Sakakibara, K., Ando, S., Yip, H.K., Tamada, Y., Hiwatashi, Y., Murata, T., Deguchi, H., Hasebe, M., & Bowman, J.L. 2013. KNOX2 transcription factors regulate the haploid to diploid morphological transition in land plants. *Science* 339: 1067-1070.
- 榊原恵子 2013. コケ植物のエボデボから見えてきた胞子体の複雑化。あんな形、こんなできかた—エボデボ研究最前線 [植物篇] . 生物の科学遺伝 1: 39-44.
- Sakakibara, K. 2016. Technological innovations give rise to a new era of plant evolutionary developmental biology. In: Rensing, S.A. (ed.) Genomes and evolution of charophytes, bryophytes, club mosses and ferns. Elsevier Limited, Oxford. pp. 3-35.
- 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.
- Serikawa, K.A., Martinez-Laborda, A., Kim, H.S., & Zambryski, P.C. 1997a. Localization of expression of *KNAT3*, a class 2 knotted1-like gene. *Plant J.* 11: 853-861.
- Serikawa, K.A., & Zambryski, P.C. 1997b. Domain exchanges between KNAT3 and KNAT1 suggest specificity of the kn1-like homeodomains requires sequences outside of the third helix and N-terminal arm of the homeodomain. *Plant J.* 11: 863-869.
- Sessa, E.B., Banks, J.A., Barker, M.S., Der, J.P., Duffy, A.M., Graham, S.W., Hasebe, M., Langdale, J., Li, F.-W., Merchant, D.B., Pryer, K.M., Rothfels, C.J., Roux, S.J., Salmi, M.L., Sigel, E.M., Soltis, D.E., Soltis, P.S., & Stevenson, D.W., Wolf, P.G. 2014. Between two fern genomes. *Gigascience* 3: 15.
- Shani, E., Burko, Y., Ben-Yaakov, L., Berger, Y., Amsellem, Z., Goldshmidt, A., Sharon, E., & Ori, N. 2009. Stage-specific regulation of *Solanum lycopersicum* leaf maturation by class 1 KNOTTED1-LIKEHOMEBOX proteins. *Plant Cell* 21: 3078-3092.
- Smith, H.M.S., & Hake, S. 2003. The interaction of two homeobox genes, *BREVIPEDICELLUS* and *PENNYWISE*, regulates internode patterning in the *Arabidopsis* inflorescence. *Plant Cell* 15: 1717-1727.
- Sørensen, I., Fei, Z., Andreas, A., Willats, W.G.T., Domozych, D.S., & Rose, J.K.C. 2014. Stable transformation and reverse genetic analysis of *Penium margaritaceum*: a platform for studies of charophyte green algae, the immediate ancestors of land plants. *Plant J.* 77: 339-351.
- Szövényi, P., Frangedakis, E., Ricca, M., Quandt, D., Wicke, S., & Langdale, J.A. 2015. Establishment of K. Sakakibara and C. Furumizu- 11

- Anthoceros agrestis as a model species for studying the biology of hornworts. *BMC Plant Biol.* 15: 98.
- Truernit, E., Siemering, K.R., Hodge, S., Grbic, V., & Haseloff, J. 2006. A map of KNAT gene expression in the *Arabidopsis* root. *Plant Mol. Biol.* 60: 1-20.
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N., & Hake, S. 1991. The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* 350: 241-243.
- Wellman, C.H., Osterloff, P.L., & Mohiuddin, U. 2003. Fragments of the earliest land plants. *Nature* 425: 282-285.
- Wickett, N.J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M.S., Burleigh, J.G., Gitzendanner, M.A., Ruhfel, B.R., Wafula, E., Der, J.P., Graham, S.W., Mathews, S., Melkonian, M., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Miles, N.W., Rothfels, C.J., Pokorny, L., Shaw, A.J., DeGironimo, L., Stevenson, D.W., Surek, B., Villarreal, J.C., Roure, B., Philippe, H., DePamphilis, C.W., Chen, T., Deyholos, M.K., Baucom, R.S., Kutchan, T.M., Augustin, M.M., Wang, J., Zhang, Y., Tian, Z., Yan, Z., Wu, X., Sun, X., Wong, G.K.-S., & Leebens-Mack, J. 2014. Phylogenomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111: E4859-E4868.
- Zhao, H., Lu, M., Singh, R., Snell, & W.J. 2001. Ectopic expression of a *Chlamydomonas* mt+-specific homeodomain protein in mt- gametes initiates zygote development without gamete fusion. *Genes Dev.* 15: 2767-2777.
- Zhong, R.Q., Lee, C.H., Zhou, J., L., McCarthy, R.L., & Ye, Z.H. 2008. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 2763-2782.

植物における日長による成長相転換制御のメカニズムとその進化

山岡尚平・河内孝之

京都大学 大学院生命科学研究科 遺伝子特性学分野

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

Evolutionary insights into the molecular mechanism of day-length-dependent transition to reproductive growth in plants

Keywords: day length, evolution, growth-phase transition, land plants, *Marchantia polymorpha*, reproductive growth

Shohei Yamaoka and Takayuki Kohchi

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

Kyoto, 606-8502, Japan

1. はじめに

植物は、約4億7千万年前に陸上に進出した(Edwards and Kenrick 2015, Rubinstein et al. 2010, Steemans et al., 2009, Wellman et al. 2003)。陸上では、光、温度、乾燥・湿潤が絶えず変化する。固着型の生活を営む陸上植物は、こうした環境の変動を適切に感知し、自身の生存と生殖を最適化するためのメカニズムを進化させてきた。なかでも、栄養成長から生殖成長への転換(成長相転換)をいつ行うかということは、植物の繁殖戦略にとってきわめて重要である。現生の陸上植物の多くは、主に日長を感じることで成長相転換のタイミングを決めている。日長の変化は、さまざまな環境の変化のうちで最も確実に予測することができ、それにより来たる季節を知ることができるからである。このメカニズムは、植物の進化のなかでいつ獲得され、その原形とはどのようなものだったのだろうか。本総説では、陸上植物の基部系統の一種である苔類ゼニゴケに、日長による成長相転換のメカニズムの原形が存在することについて解説する。

2. 日長による花芽形成制御のメカニズム

被子植物の成長相転換は、花芽の形成として観察される。日長による花芽形成制御のメカニズムは、長日植物であるシロイヌナズナを使った分子遺伝学研究によって大きく理解が進んだ。シロイヌナズナでは、花芽形成のタイミングに異常が生じるとロゼット葉の数が異なってくる。これを指標に、長日の下で遅咲きとなる変異株が単離され、花芽形成を促進する役割を持つ遺伝子が明らかにされた。その主なものは、*FT*, *CONSTANS (CO)*, *FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX1 (FKF1)*, *GIGANTEA (GI)*である。

被子植物では、約80年前に、葉で日長を感じ、「フロリゲン(花芽形成ホルモン)」によってそのシグナルが伝達され、茎頂での花芽形成が開始されるという仮説が提唱された(Chailakhyan 1936,

S. Yamaoka & T. Kohchi-1

Garner and Allard 1920, Knott 1934)。ようやく最近になって、この「フロリゲン」の実体が FT タンパク質であることが明らかにされた。長日になると、転写因子 CO が活性化し FT 遺伝子の発現を促進する (Kobayashi et al. 1999, Kardailsky et al. 1999, Suárez-López et al. 2001)。葉の維管束の師部伴細胞でつくられた低分子量の FT タンパク質は、師管を通じて茎頂分裂組織へ運ばれる (Corbesier et al. 2007, Jaeger and Wigge 2007, Tamaki et al. 2007)。そこで FT は転写因子 FD などと転写複合体を形成し、転写因子 APETALA1 などの遺伝子を発現させることで花芽分裂組織の形成を開始させる (Abe et al. 2005, Wigge et al. 2005, Taoka et al. 2011)。したがって、花芽形成の開始は CO と FT の活性によって決まるといえる。

では、日長の変化はどのようにして CO と FT を活性化するのだろうか。最近の研究から、CO と FT の活性化は転写・翻訳後の段階で多重の調節を受けており、その調節には FKF1 と GI が中心的な役割を果たしていることが明らかになってきた。CO の転写は概日リズムを示し、長日の下では夕方に転写産物の蓄積量がピークを迎えるが、この調節に関わる分子が FKF1 と GI である (Suárez-López et al. 2001, Imaizumi et al. 2003)。FKF1 は、F-box とよばれる E3 ユビキチンリガーゼ複合体の形成に関わるドメインをもち、標的タンパク質をプロテアソームによる分解に導くタンパク質の一種である (Nelson et al. 2000, Imaizumi et al. 2003)。また N 末端側に LOV (Light, Oxygen, and Voltage sensing) とよばれるドメインをもち、発色団としてフラビン・モノスクレオチドを非共有結合しており、青色光に対する感受性を示す (Nelson et al. 2000, Imaizumi et al. 2003)。さらに C 末端側には kelch リピートとよばれるドメインをもち、この部分を介して転写抑制因子 CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1) と相互作用し、その安定性を制御している (Imaizumi et al. 2005)。CDF1 は CO 遺伝子のプロモーターに結合することでその発現を抑制する働きをもつ (Imaizumi et al. 2005)。CDF1 はシロイヌナズナに少なくとも 3 つのホモログが存在し、これらも CO の発現調節に関わっている (Fornara et al. 2009)。一方、GI は陸上植物でのみ見られる分子量約 130 kDa のタンパク質である (Fowler et al. 1999, Park et al. 1999)。FKF1 と GI は青色光の下で安定なタンパク質複合体を形成し、CDF タンパク質を分解することで CO の転写を活性化する働きをもつ (Sawa et al. 2007, Fornara et al. 2009)。FKF1 と GI の遺伝子発現は概日時計に制御されており (Fowler et al. 1999, Park et al. 1999, Nelson et al. 2000)，長日下では FKF1 と GI の遺伝子発現のピークが夕方に一致する。さらにこのとき青色光により FKF1-GI 複合体がより安定化される。こうしたことが協調的に効くことで、夕方に FKF1-GI 複合体による CDF の分解が最も効率的に行われ、CO の転写活性化が起こると考えられている (Sawa et al. 2007)。さらに FKF1 は翻訳後調節にも関わっており、CO タンパク質と直接相互作用し、CO を安定化させることができるとされている (Song et al. 2012)。FT の転写自体も FKF1 と GI による調節を受けている。FT 遺伝子のプロモーターには CO と同様に CDF タンパク質が結合し、FKF1-GI 複合体による調節を受ける (Song et al. 2012)。また、GI は別の複数の転写抑制因子と相互作用することで FT の転写抑制に関わっていることも明らかにされている (Sawa and Kay 2011)。

3. 花芽形成と概日時計の制御に関わる FKF1/ZTL/LKP2 遺伝子ファミリー

シロイヌナズナには ZEITLUPE (ZTL), LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) という 2 つの FKF1 相同遺伝子が存在し、これらは遺伝子ファミリーを形成している (図 1)。ZTL と LKP2 の機能は FKF1 と異なり、主に概日時計の制御に関わっている。ZTL は、夜間において概日リズムの中心振動子である TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1) と PSEUDO RESPONSE REGULATOR 5 (PRR5) との間で LOV

ドメインを介して相互作用し、これらをプロテアソームによる分解に導く (Más et al. 2003, Yasuhara et al. 2004, Kiba et al. 2007, Fujiwara et al. 2008, Baudry et al. 2010)。一方、日中においては、ZTL は FKF1 と同様に LOV ドメインを介して GI と結合し、青色光の下で安定なタンパク質複合体を形成する。GI の蓄積は概日リズムを示すため、ZTL-GI 複合体の形成は午後にあたる時間にピークを迎える (Kim et al. 2007)。このとき拮抗的に TOC1 と PRR5 との結合が阻害されるため、これらのタンパク質は安定化し、概日リズムがより明瞭に刻まれると考えられている (Fujiwara et al. 2008)。LKP2 は ZTL と比べてシロイヌナズナ植物体での発現量が極めて低いため、その変異だけでは概日リズムに異常が見られない (Schultz et al. 2001, Baudry et al. 2010)。しかし、過剰発現させると概日リズムが不整となり、ZTL プロモーター制御下で発現させると *ztl* 変異を相補できることから、LKP2 は ZTL とほぼ同様の分子機能をもつと考えられている (Schultz et al. 2001, Baudry et al. 2010)。

FKF1 もまた、概日時計の制御に関与している。*fjf1* 変異だけでは概日リズムに影響が見られないが、*ztl fjf1* 二重変異株では *ztl* 変異株と比べて夜間での TOC1 と PRR5 の分解がより強く阻害され、概日リズムはより長周期化する (Baudry et al. 2010)。しかし、*FKF1* を ZTL プロモーター制御下で発現させても *ztl* 変異による概日リズム異常を相補できないことから、概日時計の制御における FKF1 の作用機序は ZTL・LKP2 と異なると考えられている (Baudry et al. 2010)。

一方で、ZTL と LKP2 は花芽形成にも関わっている。*ztl* 変異株は短日条件下で弱い早咲きの表現型を示し、*lkp2* との二重変異でより早咲きとなり、*CO* の発現は上昇する (Somers et al. 2004, Takase et al. 2011)。しかし、*fjf1 ztl lkp2* 三重変異株ではこの表現型が抑制され、*CO* の発現も抑制される (Fornara et al. 2009, Takase et al. 2011)。また、ZTL と LKP2 をそれぞれ過剰発現させると、*CO* の発現が抑制され、形質転換株は長日条件下で遅咲きとなる (Schultz et al. 2001, Somers et al. 2004)。この現象の説明のひとつとして、FKF1 と ZTL・LKP2 の細胞内局在の違いが挙げられる。FKF1 は核で機能するのに対し、ZTL と LKP2 は主に細胞質に局在する (Kim et al. 2007, Sawa et al. 2007, Takase et al. 2011, Kim et al. 2013)。LOV ドメインを含む ZTL タンパク質の N 末端側は GI との結合能をもつが、この部分だけを過剰発現させると、GI の核局在が阻害され、形質転換株が遅咲きとなる (Kim et al. 2013)。このことから、FKF1 と ZTL・LKP2 は GI を「共有」しており、これらが正常に機能するためには、核と細胞質での GI の分子数のバランスが重要であると考えられる。ZTL の N 末端部分の過剰発現株では、GI が細胞質でより多く使われてしまうために、核内の GI の分子数が減り、その結果 FKF1 の機能が抑制されて遅咲きになると考えられる (Kim et al. 2013)。FKF1 と ZTL・LKP2 の作用機序については他の仮説も提唱されており、今後の検証が待たれる (Ito et al. 2012, Suetsugu and Wada 2013)。

4. FKF1/ZTL/LKP2 の祖先型タンパク質は苔類ゼニゴケの成長相転換に関わる

FKF1/ZTL/LKP2 と GI は、ともに陸上植物進化の初期から存在していたと考えられる。シダ植物のうち最も古い分類群に属する小葉類イヌカタヒバ *Selaginella moellendorffii* では、FKF1/ZTL/LKP2 と GI の相同遺伝子がそれぞれ 1 つずつ存在する (Holm et al. 2010, Banks et al. 2011)。しかしコケ植物のうち、蘚類ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* では、LOV ドメインだけをもつタンパク質と、F-box

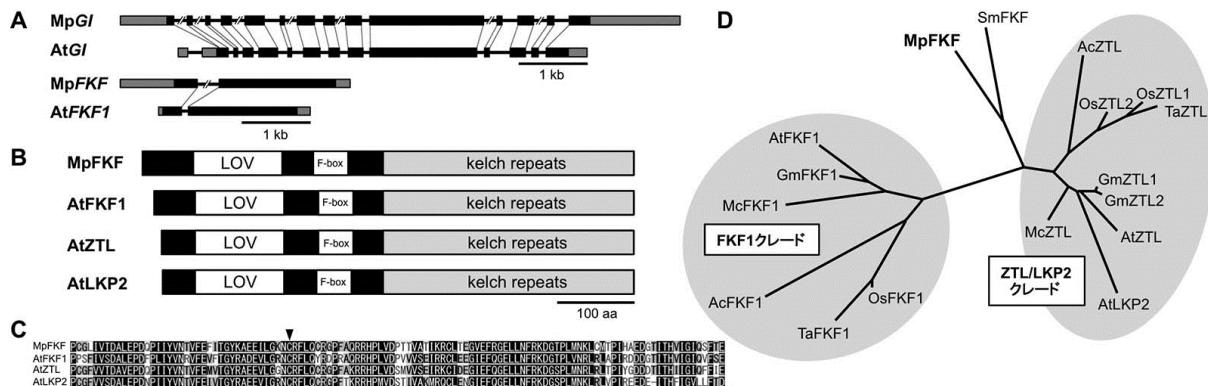


図 1. FKF1/ZTL/LKP2 の遺伝子・タンパク質の構造と系統樹

A, ゼニゴケおよびシロイヌナズナの *GI* および *FKF1* ホモログの遺伝子構造。黒のボックスはエキソン、灰色のボックスは非翻訳領域を示す。図は Kubota et al. (2014)より改変。B, ゼニゴケおよびシロイヌナズナの FKF1/ZTL/LKP2 タンパク質の構造。LOV, LOV ドメイン, kelch repeats, kelch リピート。C, FKF1/ZTL/LKP2 タンパク質の LOV ドメインのアミノ酸配列。矢尻は発色団の非共有結合に必要なシステイン残基を示す。D, FKF1/ZTL/LKP2 タンパク質の系統樹。Mp : ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*), Sm : イヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*), Ac : タマネギ (*Allium cepa*), Os : イネ (*Oryza sativa*), Ta : コムギ (*Triticum aestivum*), Gm : ダイズ (*Glycine max*), At : シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*), Mc : アイスプラント (ハマミズナ科 *Mesembryanthemum crystallinum*)。図は Kubota et al. (2014)より改変。

と kelch リピートを含む部分配列をもつタンパク質の遺伝子は存在するが、*FKF1/ZTL/LKP2* の相同遺伝子は存在しない。また *GI* の相同遺伝子は見つかっていない (Holm et al. 2010)。さらに、水生の単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* と *Ostreococcus tauri* では *FKF1/ZTL/LKP2*・*GI* の相同遺伝子はいずれも見つかっていない (Mittag et al. 2005, Matsuo et al. 2008, Corellou et al. 2009)。このことから、従来は *FKF1/ZTL/LKP2*・*GI* による成長相転換のメカニズムは維管束植物の誕生以降に獲得されたものと考えられていた。

苔類ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* は陸上植物進化の最も基部で分岐したコケ植物の一種である (Qiu et al. 2006, Chang and Graham 2011, Wickett et al. 2014)。最近ゼニゴケは分子遺伝学の基盤が整備され、制御系遺伝子の進化と多様性、あるいは植物の陸上化をもたらしたメカニズムを研究する上で優れたモデル植物として注目されている (Ishizaki et al. 2016, Berger et al. 2016, Bowman et al. 2007)。ゼニゴケは長日植物であり、葉状体の先端部に傘状の生殖器托を形成することで成長相転換を行う (Benson-Evans 1961, Benson-Evans 1964)。この相転換には遠赤色光に富む光質が必要である (Chiyyoda et al. 2008, 河内・石崎 2012)。筆者らのグループは、ゼニゴケのゲノムに *FKF1/ZTL/LKP2* と *GI* の相同遺伝子がそれぞれ 1 個ずつ存在することを見出し、これらをそれぞれ MpFKF と MpGI と名付けた (Kubota et al. 2014)。シロイヌナズナの *FKF1* と *GI* の遺伝子とその構造を比較すると、イントロンの插入位置がよく一致しており、これらは進化的に保存されていると考えられた (図 1A)。MpFKF は、他の FKF1/ZTL/LKP2 タンパク質と同様、LOV ドメイン・F-box・kelch リピートをもっていた (図 1B)。また LOV ドメインでは発色団の非共有結合に必要なシステイン残基が保存されていた (図 1C)。系統解析によると、MpFKF はイヌカタヒバの相同遺伝子(SmFKF)と最も近縁であり、被子植物の FKF1, ZTL/LKP2 のクレードからは独立していた (図 1D)。このことから、FKF1/ZTL/LKP2 タンパク質は、MpFKF をはじめとするコケ・シダ植物のものを祖先とし、植物の進化が進むにつれ、遺伝子重複の後、

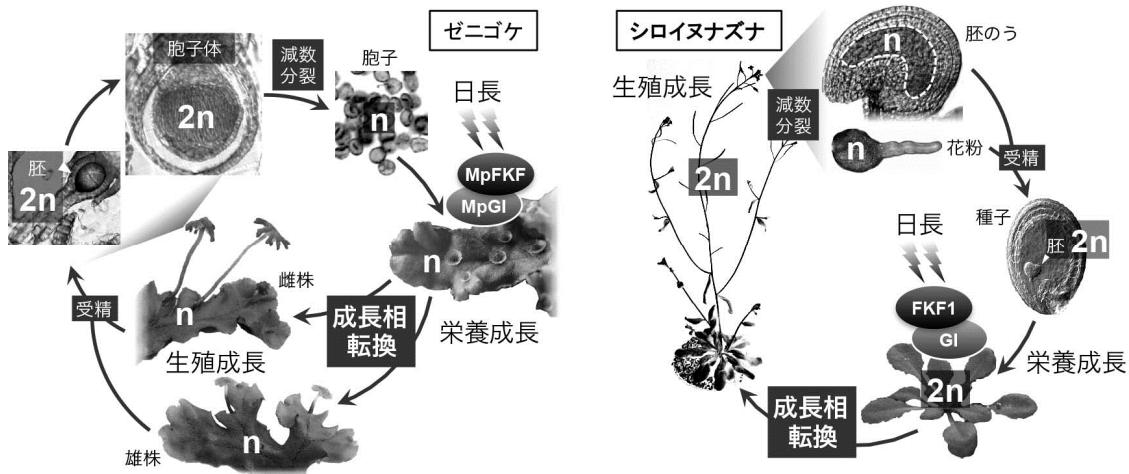


図2. ゼニゴケとシロイヌナズナの生活環と FKF1-GI複合体の作用点

nは半数体世代を、2nは2倍体世代を示す。

FKF1 と ZTL/LKP2 に代表される 2 種類の分子に機能的に分化していったと考えられる (Kubota et al. 2014)。

ゼニゴケは、遠赤色光に富む光の下において、長日条件では生殖器托を形成して成長相転換するが、短日条件では葉状体のまま成長し続ける。MpFKF と MpGI の遺伝子ノックアウト株は、どちらも長日条件下で生殖器托の形成がみられなかった。またそれぞれの過剰発現株では、短日条件下でも、長日条件下とほとんど同じ時期に生殖器托を形成した。さらに、MpFKF と MpGI を同時に過剰発現させた株では、単独の過剰発現株とほとんど同じ時期に生殖器托を形成した。また MpFKF と MpGI のタンパク質は、少なくとも長日条件の中期では相互作用しうることも明らかになった (Kubota et al. 2014)。これらのことから、MpFKF と MpGI はゼニゴケの成長相転換に必要な分子であり、複合体を形成して促進的に働くと考えられる。系統解析とあわせて考えると、この MpFKF-MpGI 複合体による制御が、陸上植物の成長相転換のメカニズムの原形であると考えられる (Kubota et al. 2014)。MpFKF-MpGI 複合体が下流の成長相転換の実行因子を直接制御しているのか、あるいはシロイヌナズナ ZTL-GI 複合体のように概日時計の制御を介して成長相転換に関わっているのか、今後の研究の進展が期待される。

MpFKF と MpGI の生理機能についての知見は、植物の生活環の進化を考える上でも示唆に富んでいる。図2に示すように、ゼニゴケの生活環の大部分は、半数体(n)の配偶体世代が占める。生殖器托の中で受精により胚が生じ、それが発達して胞子体となるが、この間の組織だけが2倍体(2n)の世代であり、そのサイズ・存続の期間ともに小さい。この配偶体世代—胞子体世代の関係は、陸上植物の進化が進むにつれ徐々に逆転する。シロイヌナズナなどの被子植物では、生活環の大半は胞子体世代が占める。配偶体世代は、花器官の中で形成される花粉と胚のうという小さな組織のみであり、それは受精とともに終わってしまう。FKF1/ZTL/LKP2 と GI による成長相転換が行われる時期は、ゼニゴケでは配偶体世代であり、被子植物では胞子体世代である (図2)。このことは、進化の過程で、本来は配偶体世代で機能していた成長相転換のメカニズムが、胞子体世代での制御に転用されたことを示している (Kubota et al. 2014)。

ゼニゴケでは、どのような分子が MpFKF-MpGI の下流で働き、成長相転換を実行するのだろうか。筆者らのグループによるゲノム・トランスクriプトーム解析から、ゼニゴケには少なくとも CDF の相同遺伝子が存在することが明らかにされている。この遺伝子は、ノックアウトにより生殖器托の形成が促進されることから、成長相転換に関わることが示されている（永山ら 日本植物学会第 78 回大会 2014, 河内・山岡ら 未発表）。また筆者らはこれまでに、遠赤色光を含まない光の下で、日長に関わらず生殖器托を常に形成することのできる変異株を単離している (Yamaoka et al. 2004)。この変異株の原因遺伝子を同定することで、ゼニゴケの成長相転換の実行因子が明らかになり、植物の成長相転換のメカニズムがどのように進化してきたか、その全容の解明につながることが期待される。

謝辞

本稿で述べた筆者らの研究について、京都大学大学院生命科学研究科の久保田茜（現・ワシントン大学）・永山啓太郎両氏と、文部科学省・科学研究費補助金の助成に謝意を表する。

引用文献

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., & Araki, T. 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309: 1052-1056.
- Banks, J.A., et al. 2011. The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332: 960-963.
- Baudry, A., Ito, S., Song, Y.H., Strait, A.A., Kiba, T., Lu, S., Henriques, R., Pruneda-Paz, J.L., Chua, N.H., Tobin, E.M., Kay, S.A., & Imaizumi, T. 2010. F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control *Arabidopsis* clock progression. *Plant Cell* 22: 606-622.
- Benson-Evans, K. 1961. Environmental factors and bryophytes. *Nature* 191: 255–260.
- Benson-Evans, K. 1964. Physiology of the reproduction of bryophytes. *Bryologist* 67: 431–445.
- Berger, F., Bowman, J.L., & Kohchi, T. 2016. *Marchantia*. *Curr. Biol.* 26: R186-R187.
- Bowman, J.L., Floyd, S.K., & Sakakibara, K. 2007. Green genes-comparative genomics of the green branch of life. *Cell* 129: 229-234.
- Chailakhyan, M.K. 1936. New facts in support of the hormonal theory of plant development. *C. R. (Dokl.) Acad. Sci. USSR*, 13: 79–83.
- Chang, Y. & Graham, S.W. 2011. Inferring the higher-order phylogeny of mosses (Bryophyta) and relatives using a large, multigene plastid data set. *Am. J. Bot.* 98: 839–849.
- Chiyyoda, 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.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., & Coupland, G. 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316: 1030-1033.

S. Yamaoka & T. Kohchi-6

- Corellou, F., Schwartz, C., Motta, J.P., Djouani-Tahri el, B., Sanchez, F., & Bouget, F.Y. 2009. Clocks in the green lineage: comparative functional analysis of the circadian architecture of the picoeukaryote *Ostreococcus*. *Plant Cell* 21: 3436-3449.
- Edwards, D., & Kenrick, P. 2015. The early evolution of land plants, from fossils to genomics: a commentary on Lang (1937) 'On the plant-remains from the Downtonian of England and Wales'. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370: 20140343.
- Fornara, F., Panigrahi, K.C., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Rühl, M., Jarillo, J.A., & Coupland, G. 2009. Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce *CONSTANS* expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Dev. Cell* 17: 75-86.
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G., & Putterill, J. 1999. *GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J.* 18: 4679-4688.
- Fujiwara, S., Wang, L., Han, L., Suh, S.-S., Salomé, P.A., McClung, C.R., & Somers, D.E. 2008. Post-translational regulation of the *Arabidopsis* circadian clock through selective proteolysis and phosphorylation of pseudo-response regulator proteins. *J. Biol. Chem.* 283: 23073-23083.
- Garner, W.W. & Allard, H.A. 1920. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J. Agric. Res.* 18: 553-606.
- Holm, K., Kallman, T., Gyllenstrand, N., Hedman, H., & Lagercrantz, U. 2010. Does the core circadian clock in the moss *Physcomitrella patens* (Bryophyta) comprise a single loop? *BMC Plant Biol.* 10: 109.
- Imaizumi, T., Tran, H.G., Swartz, T.E., Briggs, W.R., & Kay, S.A. 2003. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 426: 302-306.
- Imaizumi, T., Schultz, T.F., Harmon, F.G., Ho, L.A., & Kay, S.A. 2005. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Science* 309: 293-297.
- Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K.T., & Kohchi, T. 2016. Molecular genetic tools and techniques for *Marchantia polymorpha* research. *Plant Cell Physiol.* 57: 262-270.
- Ito, S., Song, Y.H., & Imaizumi, T. 2012. LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 5: 573-582.
- Jaeger, K.E., & Wigge, P.A. 2007. FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 17: 1050-1054.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., & Weigel, D. 1999. Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science* 286: 1962-1965.
- Kiba, T., Henriques, R., Sakakibara, H., & Chua, N.H. 2007. Targeted degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCF^{ZTL} complex regulates clock function and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 2516-2530.
- Kim, J., Geng, R., Gallenstein, R.A., & Somers, D.E. 2013. The F-box protein ZEITLUPE controls stability and nucleocytoplasmic partitioning of GIGANTEA. *Development* 140: 4060-4069.
- Kim, W.Y., Fujiwara, S., Suh, S.-S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Nam, H.G., & Somers, D.E. 2007. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* 449: 356-360.
- Knott, J.E. 1934. Effect of a localized photoperiod on spinach. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 31: 152-154.

- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., & Araki, T. 1999. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286: 1960-1962.
- 河内孝之・石崎公庸 2012. 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. *BSJ-Review* 3: 58-70.
- Kubota, A., Kita, S., Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K.T., & Kohchi, T. 2014. Co-option of a photoperiodic growth-phase transition system during land plant evolution. *Nat. Commun.* 5: 3668.
- Más, P., Kim, W.Y., Somers, D.E., & Kay, S.A. 2003. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 426: 567-570.
- Matsuo, T., Okamoto, K., Onai, K., Niwa, Y., Shimogawara, K., & Ishiura, M. 2008. A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system. *Genes Dev.* 22: 918-930.
- Mittag, M., Kiaulehn, S., & Johnson, C.H. 2005. The circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. What is it for? What is it similar to? *Plant Physiol.* 137: 399-409.
- Nelson, D.C., Lasswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A., & Bartel, B. 2000. *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 101: 331-340.
- Park, D.H., Somers, D.E., Kim, Y.S., Choy, Y.H., Lim, H.K., Soh, M.S., Kim, H.J., Kay, S.A., & Nam, H.G. 1999. Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis GIGANTEA* gene. *Science* 285: 1579-1582.
- Qiu, Y.-L., et al. 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 15511-15516.
- Rubinstein, C.V., Gerrienne, P., de la Puente, G.S., Astini, R.A., & Steemans, P. 2010. Early middle Ordovician evidence for land plants in Argentina (eastern Gondwana). *New Phytol.* 188: 365-369.
- Sawa, M., & Kay, S.A. 2011. GIGANTEA directly activates *Flowering Locus T* in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 11698-11703.
- Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A., & Imaizumi, T. 2007. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* 318: 261-265.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M., & Kay, S.A. 2001. A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2659-2670.
- Somers, D.E., Kim, W.Y., & Geng, R. 2004. The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. *Plant Cell* 16: 769-782.
- Song, Y.H., Smith, R.W., To, B.J., Millar, A.J., & Imaizumi, T. 2012. FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. *Science* 336: 1045-1049.
- Steemans, P., Hérissé, A.L., Melvin, J., Miller, M.A., Paris, F., Verniers, J., & Wellman, C.H. 2009. Origin and radiation of the earliest vascular land plants. *Science* 324: 353.
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., & Coupland, G. 2001. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410: 1116-1120.
- Suetsugu, N., & Wada, M. 2013. Evolution of three LOV blue light receptor families in green plants and photosynthetic stramenopiles: phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and aureochrome. *Plant Cell Physiol.* 54: 8-23.
- Takase, T., Nishiyama, Y., Tanihigashi, H., Ogura, Y., Miyazaki, Y., Yamada, Y., & Kiyosue, T. 2011. *LOVKELCH*

- PROTEIN2* and *ZEITLUPE* repress *Arabidopsis* photoperiodic flowering under non-inductive conditions, dependent on *FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX1*. *Plant J.* 67: 608-621.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H.L., Yokoi, S., & Shimamoto, K. 2007. Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* 316: 1033-1036.
- Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T., Yamaguchi, M., Nakashima, C., Purwestri, Y.A., Tamaki, S., Ogaki, Y., Shimada, C., Nakagawa, A., Kojima, C., & Shimamoto, K. 2011. 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* 476: 332-335.
- Wellman C.H., Osterloff P.L., & Mohiuddin U. 2003. Fragments of the earliest land plants. *Nature* 425: 282–285.
- Wickett, N.J. et al. 2014. Phylogenomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E4859-E4868.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U., & Weigel, D. 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309: 1056-1059.
- Yamaoka, S., Takenaka, M., Hanajiri, T., Shimizu-Ueda, Y., Nishida, H., Yamato, K.T., Fukuzawa, H., & Ohyama K. 2004. A mutant with constitutive sexual organ development in *Marchantia polymorpha* L. *Sex. Plant Reprod.* 16: 253-257.
- Yasuhara, M., Mitsui, S., Hirano, H., Takanabe, R., Tokioka, Y., Ihara, N., Komatsu, A., Seki, M., Shinozaki, K., & Kiyoue, T. 2004. Identification of ASK and clock-associated proteins as molecular partners of LKP2 (LOV kelch protein 2) in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 55: 2015-2027.

NAC 転写因子 VNS ファミリーが語る 陸上植物の通水細胞進化の物語

大谷美沙都^{1,2}・出村拓^{1,2}

¹奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

²理研 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

Misato Ohtani^{1,2} & Taku Demura^{1,2}

Evolution of water-conducting cells in land plant;

lessons from VNS family gene encoding NAC transcription factor

Keywords: land plant evolution, NAC transcription factor, VND, VNS, water-conducting cell

¹Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology,

Ikoma, Nara, 630-0192 Japan

²RIKEN Center for Sustainable Resource Science,

Yokohama, Kanagawa, 230-0045 Japan

NAC 転写因子は植物特異的な転写因子群であり、発生や細胞分化、ストレス応答など幅広い植物生理過程に関与していることが知られている。本稿では、通水細胞 (water-conducting cell) 分化のマスタースイッチと考えられている NAC 転写因子 VNS ファミリーの最新の知見をもとに、陸上植物のボディプラン進化の過程で植物特異的な転写因子とその転写制御スキームがどういった役割を果たしてきたのかについて考察したい。

1. はじめに：通水細胞とは

地球史上、植物が陸上環境への進出と適応を成し遂げたことは、現在の地上生態圏につながる重要な第一歩であったと考えられている。それまで水中で暮らしていた植物が陸上化するにあたって、問題となった環境要素はさまざま考えられるが、中でも生存に必須な水の確保が大きな課題となつたことは想像に難くない。限られた水資源への適応の結果として、陸上植物は水を体内輸送することに特化した細胞、通水細胞を生み出すに至った。

現在の陸上植物がもつ、おもな通水細胞を図 1 に挙げた。通水細胞に共通の特徴は、いずれも死細胞であることである。これは、死細胞の方が生細胞よりも水の通道性が高いことから考えると納得のいく適応進化であろう (Sperry 2003)。現存の通水細胞の中でもっとも進化した形と言えるのが、被子植物がもつ道管細胞である。道管細胞は筒状の形状をした細胞で、上下の細胞とつながつて管状組織を形成する (図 1 a)。道管細胞分化の過程では、上下の細胞とのつなぎ目に穿孔 (せんこう) と呼ばれる完全に細胞壁が分解された大きな孔が空き、水を効率的に輸送できるようになっている。これに対して、裸子植物やシダ植物が主要な通水細胞としているのが仮道管と呼ばれる細胞である (図 1 b)。仮道管は紡錘形の細胞であり、細胞同士が連結することではなく隣の細胞と接す

る面に壁孔（へきこう）と呼ばれる穴を多数形成し、この壁孔を通して水を輸送する。一般的に仮道管細胞は道管細胞よりも著しく長い（化石種では長さが 3 cm に達する仮道管細胞も見つかっている；Cichan & Taylor 1992）が、細胞径は道管細胞のそれと比べて小さい。これは、仮道管の場合には水輸送機能ユニットが細胞単位であるため、細胞長が長い方が通水効率が上がるという水理的な理由によると考えられている（Tyree & Zimmermann 2002）。対して道管の場合には、道管細胞同士が連結した管状組織が通水機能ユニットとして働くため、径の大きな細胞をたくさん連結させて長く太い管を作ることでより通水効率を上昇させるという適応進化が起こったものと想像されており、その結果、道管細胞径の最大としては 0.5 mm、道管細胞がつながってできる一本の道管の長さは樹種によっては 10 m 以上に達するケースも報告されている（Tyree & Zimmermann 2002）。

以上に加えて、一部のコケ植物も通水細胞をもつことが知られている（図 1c）。コケの通水細胞は長軸方向にやや長い形態をしていることが多い、1) 原形質連絡が由来となった孔が存在する有孔タイプと、2) 孔は形成されない無孔タイプ、が知られている。苔類と蘚類ナンジャモンジャゴケ綱の一部の種がもつのはおもに 1) であり、蘚類マゴケ綱の一部は 2) を発達させている。とくによく発達している場合にはコケ植物の通水細胞（組織）はハイドロイドと呼ばれることがある、狭義に 2) の無孔タイプに限ってハイドロイドと呼ぶ場合もある（Ligrone et al. 2000, 2012）。成熟したハイドロイド細胞のサイズは、種によって大きく異なっており（200~1,500 μm 長、10~25 μm 径）、個体サイズや体制の種特性と関連が深いことが知られている（Ligrone et al. 2000）。

最後に、通水細胞の特徴をまとめた上で、細胞壁修飾の問題を取り上げておきたい。維管束植物がもつ道管・仮道管細胞の特徴として、厚い二次細胞壁（二次壁）を蓄積する点が挙げられる。二次壁は一次壁（細胞分裂のときに生み出される細胞壁で、全ての植物細胞がもっている）と細胞膜の間に二次的に形成される堅い構造体であり、セルロース、主にキシランなどのヘミセルロース、そしてリグニンといったバイオポリマーが、一次壁とは異なった強固な高次構造をとって蓄積している。二次壁は細胞に強い機械的強度や耐水性を付与することができ、これが、仮道管・道管細胞におけるより高い通水機能の一因であると考えられている。対して、コケ植物の通水細胞の細胞壁は種によって大きく異なっており、周辺の体細胞よりも薄い細胞壁をもつ場合もあれば、明瞭な肥厚を示す場合もある（Ligrone et al. 2000）。ただし肥厚細胞壁が起こる場合にも、例えスギゴケの

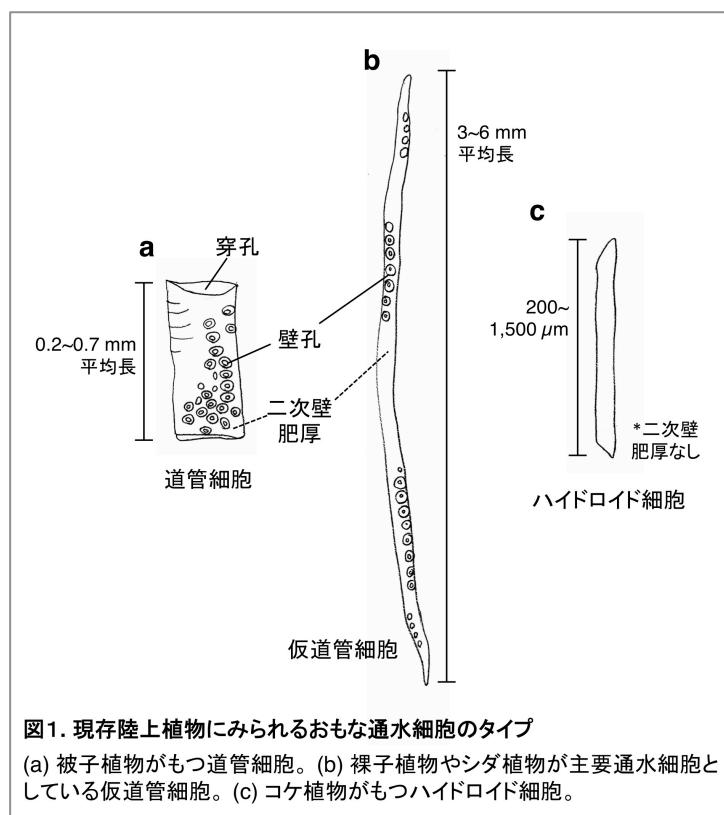


図1. 現存陸上植物にみられるおもな通水細胞のタイプ

(a) 被子植物がもつ道管細胞。(b) 裸子植物やシダ植物が主要通水細胞としている仮道管細胞。(c) コケ植物がもつハイドロイド細胞。

ハイドロイドの場合には、二次的に肥厚するわけではないので、二次壁とは呼べないことも報告されている (Ligrone et al. 2002)。さらに孔のでき方にも大きな違いがあり、道管細胞では壁孔は原形質連絡とは直接関連性がなく、二次壁の沈着が阻害されることで形成される。一方で、コケ植物の有孔通水細胞の孔は原形質連絡をその由来としている (Ligrone et al. 2000; Tyree & Zimmermann 2002)。コケ植物の通水細胞の場合には、種によるバリエーションが幅広いため一概には言えないが、少なくとも細胞壁修飾については維管束植物の通水細胞との相違点も多いようである。

このように、現行陸上植物の通水細胞であるハイドロイド、仮道管細胞、道管細胞は、いずれも通水という共通機能をもつものの、細胞学的、発生学的にはさまざまな共通点や相違点が存在する。これらが果たして進化的にどのように生まれてきたのか、これらの関係性が相同的なのか、相似的なのか、については、これまで多くの議論があり、いまだに決着がついていない問題ではあるが、最近、筆者達の一連の研究から、こうした進化的側面に関する示唆をもたらす解析結果が得られてきた。本稿では、以降、筆者達の研究成果を中心に通水細胞分化の分子制御機構の知見を紹介しつつ、通水細胞の進化について考察する。

2. 通水細胞分化のマスタースイッチ：VNS ファミリー

通水細胞分化に関する分子機構の研究は、主に道管細胞をターゲットとして行われてきた。分子生物学的研究の端緒を開いたのは、ヒヤクニチソウ葉肉細胞からの植物ホルモン添加による直接的な道管細胞への分化転換誘導系であり、この系によって多くの道管細胞分化関連遺伝子の同定や機能解析が行われた (Fukuda & Komamine 1980; Demura et al. 2002 など。詳細は Fukuda 1996 や Turner et al. 2007 の総説とその中に引かれている文献を参照)。また、シロイヌナズナやポプラといったモデル植物の飛躍的な実験環境整備に伴って、道管細胞分化や二次壁形成と連動した大規模トランスクリプトームデータが蓄積し、遺伝子情報の拡充が行われた (例えば Sterkey et al. 2004; Turner & Somerville 1997 など。詳細は Nakano et al. 2015 などの総説やその中に引かれている文献を参考のこと)。

こうした中、2005 年、シロイヌナズナ培養細胞を材料とした道管細胞分化誘導系を用いたトランスクリプトーム解析によって、7 つの遺伝子から構成される NAC 転写因子ファミリー、*VND* (VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN) 遺伝子ファミリーが同定された (Kubo et al. 2005; 図 2 a)。詳細な *VND* 遺伝子機能解析の結果、*VND* ファミリー内でもとくに *VND6* と *VND7* が、それぞれ、網目状の二次壁をもつ後生木部道管とらせん状の二次壁をもつ原生

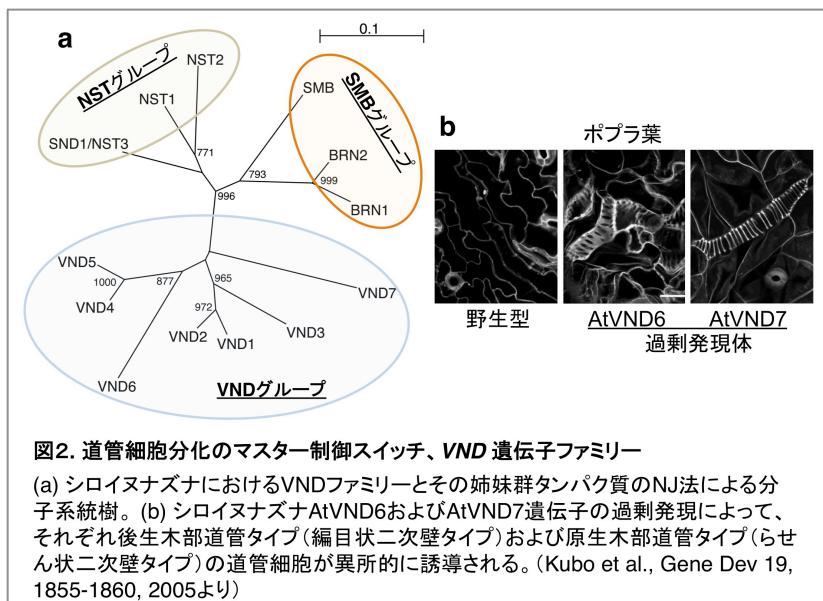
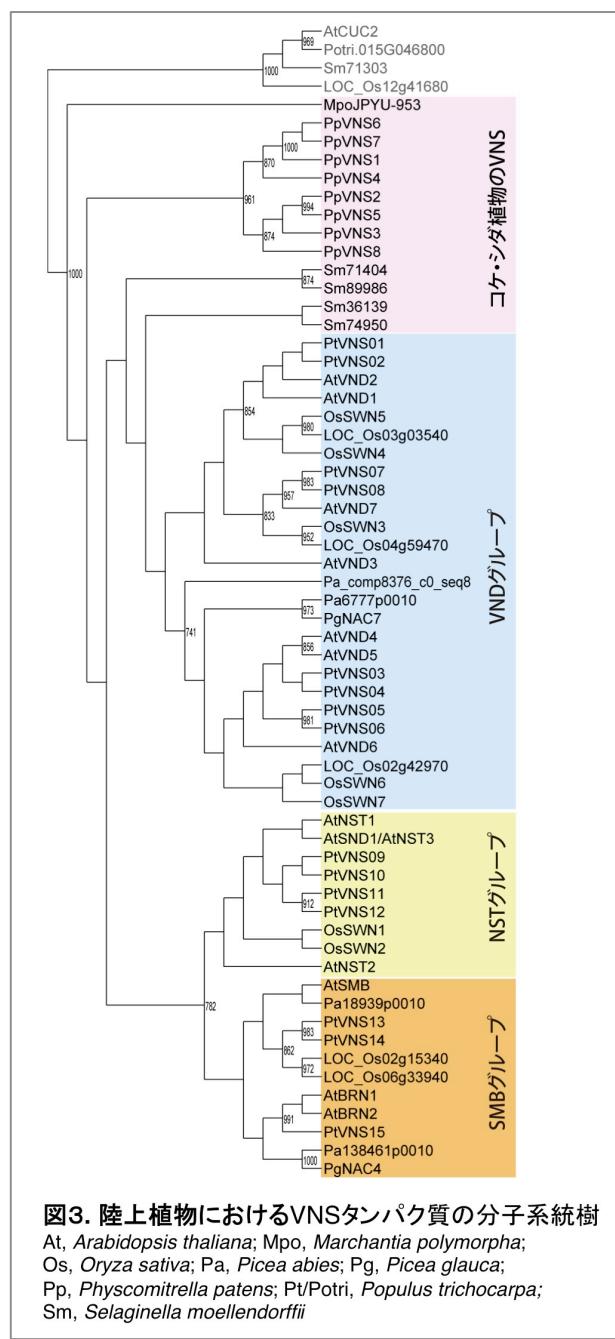


図2. 道管細胞分化のマスター制御スイッチ、*VND* 遺伝子ファミリー

(a) シロイヌナズナにおける*VND*ファミリーとその姉妹群タンパク質のNJ法による分子系統樹。(b) シロイヌナズナAtVND6およびAtVND7遺伝子の過剰発現によって、それぞれ後生木部道管タイプ(網目状二次壁タイプ)および原生木部道管タイプ(らせん状二次壁タイプ)の道管細胞が異所的に誘導される。(Kubo et al., Gene Dev 19, 1855-1860, 2005より)

木部道管の分化を制御するマスタースイッチ（鍵遺伝子）として働いていることが明らかとなった（Kubo et al. 2005; Yamaguchi et al. 2008; 図 2 b）。VND ファミリーの同定の報告から少し遅れて、道管細胞と同様に形成層分裂組織から作られる木質細胞（リグニンを含む二次細胞壁を発達させる細胞を木質細胞と呼ぶ）である木部纖維細胞の分化制御のマスタースイッチとして、VND ファミリーの姉妹遺伝子群に属する NST1 (NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1) および NST3/SND1 (SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN1) が同定された（Zhong et al. 2006; Mitsuda et al. 2007; 図 2 a）。木部を構成する道管細胞と纖維細胞は地上バイオマスの大部分を構成する木質バイオマスの主要供給源であることから、VND および NST/SND ファミリーがこれらの細胞の分化スイッチとして同定されたことは、基礎的にも応用的にも重要な発見であった。

シロイヌナズナでは、VND および NST/SND ファミリーの姉妹遺伝子として、さらに 3 つの NAC 転写因子が存在している。興味深いことに、これら SMB (SOMBRERO), BRN1 (BEARSKIN1) および BRN2 は、シロイヌナズナの根冠細胞の分化・成熟を制御していることが示された（Willemsen et al. 2008; Bennett et al. 2010; 図 2 a）。さらに SMB, BRN1 および BRN2 遺伝子の過剰発現は、VND や NST/SND ファミリーの遺伝子を過剰発現した場合と同様に、道管細胞様の二次壁沈着の異所的誘導を引き起こすことも分かった（Bennett et al. 2010）。以上の結果は、VND, NST/SND, SMB グループからなる NAC 転写因子サブグループは共通して、道管（様）細胞の分化を誘導する潜在的な能力を有していることを示している。すなわち、植物進化の早い段階でこのサブグループの共通祖先となる NAC タンパク質が道管細胞分化制御能力を獲得しており、その後、進化が進むに従って VND, NST/SND, SMB 各グループの機能分化が起きたと想像できる。こうした分子機能の共通性から、著者たちは、このサブグループを VNS (VND, NST/SND, SMB-related protein) ファミリーと呼ぶことを提唱している（Ohtani et al. 2011; Xu et al. 2014; Nakano et al. 2015）。図 3 には、ゲノム



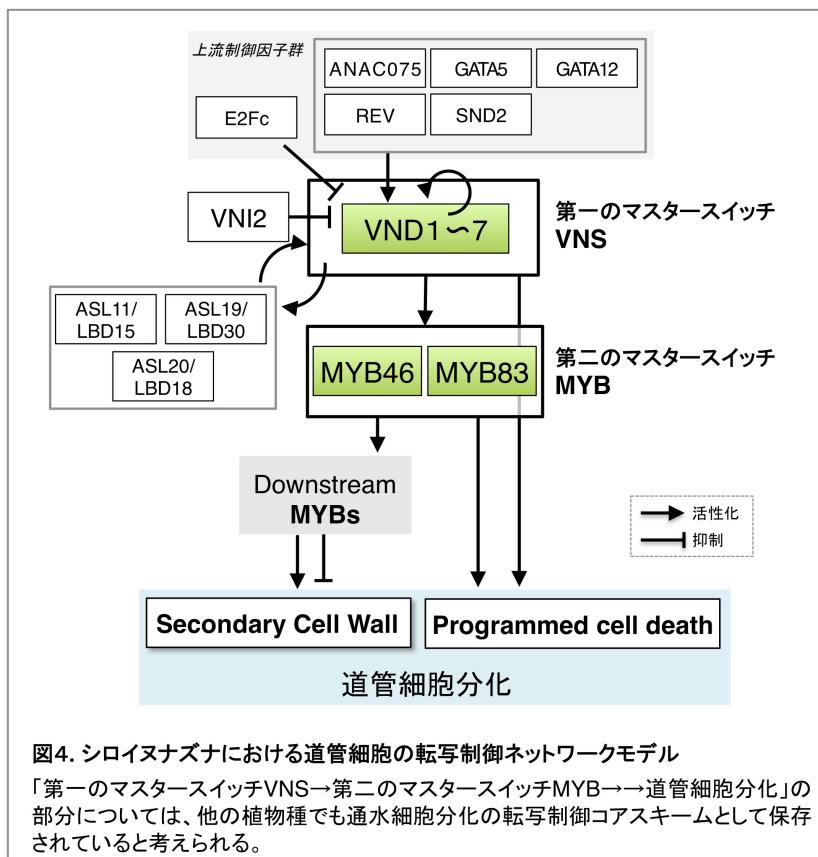
解読が行われた主な植物種における VNS タンパク質の分子系統樹を示した（Nakano et al. 2015）。

VNS タンパク質は陸上植物に広く保存されており、コケ・シダ植物の VNS タンパク質との関係性などから考えて、植物進化上最初に出現した VNS タンパク質は、VND タイプに近い配列を持っていたことが推測される。また、現在までにゲノム配列が解読されている裸子植物には、NST/SND グループに属する VNS が存在していない（Nakano et al. 2015）。被子植物特異的に NST/SND タイプの VNS 遺伝子が進化したのか、あるいは裸子植物系統で NST/SND タイプの VNS 遺伝子が欠落したのか、今後の詳細解析が必要であるが、以上の事実は仮道管と道管細胞の違いを考える上でも興味深い点である。

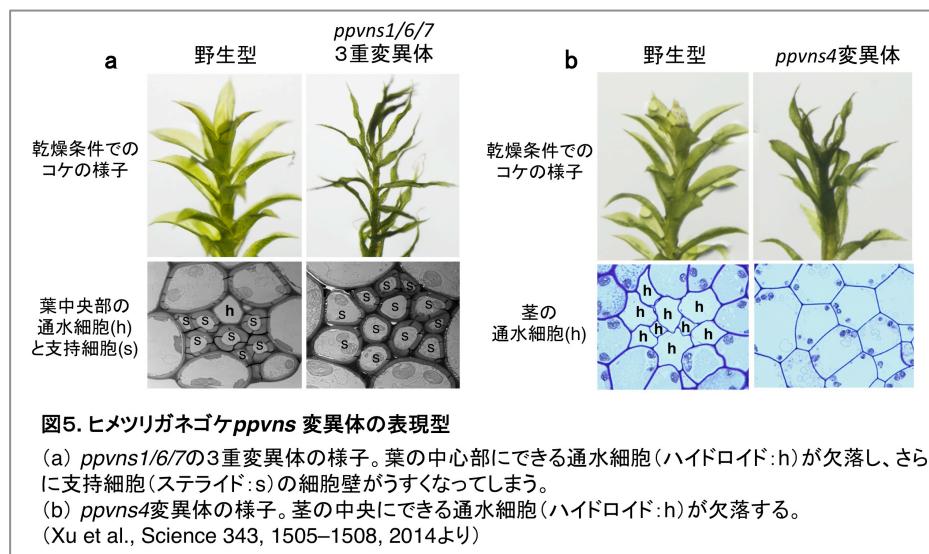
2010 年前後には、複数の研究グループによって VND6 および VND7, SND1/NST3 のダイレクトターゲット遺伝子群が明らかにされた（Ohashi-Ito et al. 2010; Zhong et al. 2010; Yamaguchi et al. 2011）。これらの研究によって、VNS タンパク質によって二次壁形成や細胞死に関わる遺伝子が直接的に正の発現制御を受けていると同時に、MYB を中心に多くの転写因子が VNS の下流で機能していることが示された。現在考えられている、シロイヌナズナにおける道管細胞の転写制御ネットワークモデルを図 4 に示した。シロイヌナズナ、ポプラ、ユーカリ、イネ、ブラキポデイウム、タルウマゴヤシ、トウモロコシなどモデル被子植物の VNS 遺伝子の機能解析から、これらの植物ではおおまかに「第一のマスタースイッチ VNS→第二のマスタースイッチ MYB→道管細胞分化」の流れが保存されていることが分かっており、少なくとも被子植物においては、この部分を通水細胞分化の転写制御コアスキームと見なすことができそうである。さらにシロイヌナズナ研究から、VNS の上流・下流とともに多くの転写因子が存在し、これら転写因子が転写レベル・タンパク質レベルで複雑に相互作用しながら、適切な細胞分化の制御に機能していることが分かりつつある（Yamaguchi & Demura 2010; Nakano et al. 2015; Taylor-Teeple et al. 2015）。通水細胞は死細胞であり、細胞分化がある程度進んでしまうと細胞運命を変えることは出来ない。このため、分化のマスタースイッチ VNS の活性を制御するために複雑かつ精緻な分子メカニズムが発達しているのかもしれない。

3. ヒメツリガネゴケ VNS 機能解析から分かったこと

さて、図 3 の分子系統樹が示すとおり、VNS ファミリー遺伝子は原始的な陸上植物とされるコケ



植物ゲノムにも存在している。そこで著者らは、VNS 機能に関する進化的な知見を得るために、モデルコケ植物であるヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を材料とした解析を行ってきた。ヒメツリガネゴケゲノムには 8 つの VNS 遺伝子 (*PpVNS1*~*PpVNS8*) が存在しており、分子系統樹解析からは、これらはコケ植物系統内で独立して放散したことが示されている (Xu et al. 2014; 図 3)。発現解析の結果、*PpVNS* 遺伝子は葉の中肋や茎の中心領域など、通水細胞であるハイドロイドが存在する部分で発現していることが明らかとなった。このうち、葉の中肋で強く発現する *PpVNS1*、*PpVNS6*、*PpVNS7* に関する三重変異体 *ppvns1* *ppvns6* *ppvns7* を作製したところ、この変異体では通水細胞であるハイドロイドの形成が不全になること、またそのためにハイドロイドを通じた水の輸送が起こらなくなることが分かった (図 5 a)。さらに、茎で発現する *PpVNS4* の変異体では、茎のハイドロイドが欠失し、茎内部の通水機能がほぼ完全に失われていた (図 5 b)。これらの変異体を乾燥条件 (相対湿度 75%) に置くと、野生型に比べて早い段階で萎れてしまう (図 5)。これらのことから、*PpVNS* がコケの通水細胞形成に必須の遺伝子であること、さらに言えばハイドロイドがヒメツリガネゴケの体内通水において重要であることが、初めて実験的に明らかになった (Xu et al. 2014)。



以上の知見は、コケ植物と維管束植物の最近共通祖先植物の段階で、既に VNS が通水細胞分化の制御因子としての機能を有していたことを示唆している。興味深いことに、*PpVNS* 遺伝子をヒメツリガネゴケ内で過剰発現すると、全身的なプログラム細胞死が誘導される (Xu et al. 2014)。つまり、コケ植物 VNS 遺伝子の第一義的な分子機能はプログラム細胞死誘導能であると解釈することができよう。現在の陸上植物がもつ通水細胞は基本的には全て死細胞であることを合わせて考えても、VNS ファミリー遺伝子進化の端緒は、高い通水機能のためにプログラム細胞死を細胞分化プログラムに組み込む点にあったのかもしれない。また、さらに興味深い点として、上述の *ppvns* 変異体では、葉の中肋に存在するステライド細胞（細胞壁が肥厚し、器官支持に機能すると考えられているコケの支持細胞）の細胞壁肥厚が減少する (*ppvns1* *ppvns6* *ppvns7*; 図 5 a)、あるいは、胞子体フット領域に作られる転送細胞（細胞壁が内側に突出することで細胞表面積を増大させ、細胞間の物質転送を行うと考えられている細胞）の分化が異常になる (*ppvns4*) ことも示された (Xu et al. 2014)。ステライド細胞もトランスファー細胞も細胞壁の大きな修飾が起こる細胞であることから、*PpVNS* にはプログラム細胞死誘導能に加えて細胞壁修飾制御能力があると考えられる。ヒメツリガネゴケの場合にはハイドロイドは厚壁化しないが、コケ植物でも種によっては厚い壁をもったハイドロイド細胞が作られる (Ligrone et al. 2000)。このことを考えると、原始型陸上植物のかなり早い段階、少なくともコケ植物と維管束植

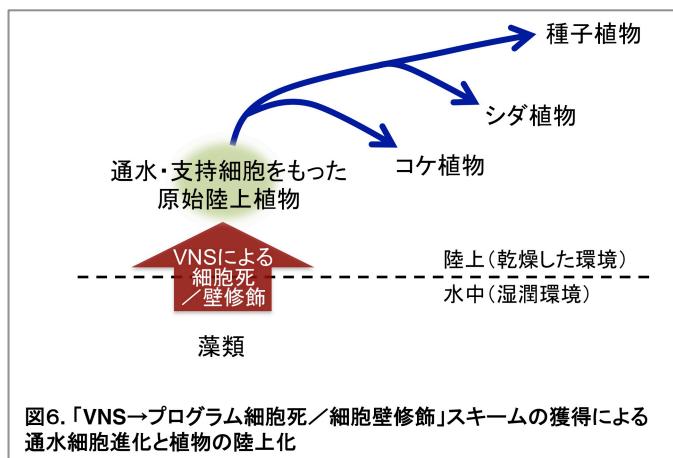
ると、全身的なプログラム細胞死が誘導される (Xu et al. 2014)。つまり、コケ植物 VNS 遺伝子の第一義的な分子機能はプログラム細胞死誘導能であると解釈することができよう。現在の陸上植物がもつ通水細胞は基本的には全て死細胞であることを合わせて考えても、VNS ファミリー遺伝子進化の端緒は、高い通水機能のためにプログラム細胞死を細胞分化プログラムに組み込む点にあったのかもしれない。また、さらに興味深い点として、上述の *ppvns* 変異体では、葉の中肋に存在するステライド細胞（細胞壁が肥厚し、器官支持に機能すると考えられているコケの支持細胞）の細胞壁肥厚が減少する (*ppvns1* *ppvns6* *ppvns7*; 図 5 a)、あるいは、胞子体フット領域に作られる転送細胞（細胞壁が内側に突出することで細胞表面積を増大させ、細胞間の物質転送を行うと考えられている細胞）の分化が異常になる (*ppvns4*) ことも示された (Xu et al. 2014)。ステライド細胞もトランスファー細胞も細胞壁の大きな修飾が起こる細胞であることから、*PpVNS* にはプログラム細胞死誘導能に加えて細胞壁修飾制御能力があると考えられる。ヒメツリガネゴケの場合にはハイドロイドは厚壁化しないが、コケ植物でも種によっては厚い壁をもったハイドロイド細胞が作られる (Ligrone et al. 2000)。このことを考えると、原始型陸上植物のかなり早い段階、少なくともコケ植物と維管束植

物の最近共通祖先植物の段階では、VNS ファミリー遺伝子はプログラム細胞死誘導能力に加えて細胞壁修飾制御活性を保有していた可能性が高い。通水細胞には高い陰圧がかかるため、より通水機能を高めるためにはこうした圧力に抵抗性のある特殊化細胞壁を作り出す必要があるという意味では、プログラム細胞死誘導と細胞壁修飾制御がともに VNS というマスタースイッチの下流で制御される仕組みが進化してきたのは納得できる事実であろう。以上のヒメツリガネゴケ *PpVNS* の解析から、VNS による通水細胞分化が現行の陸上植物のおそらく全てに共通するメカニズムであることが明らかとなった (Xu et al. 2014)。これは、これまで進化的な関係性が不明であったコケ植物のハイドロイドと、維管束植物の道管細胞が、とともに同じファミリー遺伝子の働きによって作られていることを端的に示す重要な知見となった。

4. 通水細胞進化における VNS を基点とする転写制御スキームの発展

PpVNS 遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現させると異所的道管細胞分化が引き起こされる (Xu et al. 2014) ことからも明らかのように、VNS 自身の基本的な転写因子機能は陸上植物のかなり早い段階で確立されており、以降、VNS は進化過程で連続と通水細胞分化に関連した役割を担ってきたことが想像される。前々項で紹介した通り、被子植物では、道管細胞分化のコア転写制御スキームとして、「第一のマスタースイッチ VNS→第二のマスタースイッチ MYB→道管細胞分化」の流れが見出されてきた (Yamaguchi & Demura 2010; 出村・大谷 2015; Nakano et al. 2015)。興味深いことに、ヒメツリガネゴケ *PpVNS7* 誘導的過剰発現時のトランスクリプトーム解析の結果、シロイヌナズナ VNS の下流遺伝子のホモログと考えられる遺伝子の多くが、ヒメツリガネゴケでも *PpVNS* の下流に存在していることが示された (Xu et al. 2014)。*PpVNS* 下流で保存されていたシロイヌナズナ道管細胞分化関連遺伝子のホモログ遺伝子としては、第二のマスタースイッチと考えられている MYB 転写因子のホモログ、プログラム細胞死に関わるシスティンプロテアーゼ遺伝子 XCP1 のホモログ、および細胞壁主要構成成分であるセルロース合成酵素遺伝子である CesA のホモログ、フェノールプロパノイド合成経路酵素遺伝子群などが含まれている。すなわち、VNS 自体の分子機能のみならず、VNS→MYB といった枠組を始め、道管細胞分化で見られる VNS による転写制御スキームの大まかな雛形が、コケ植物と維管束植物の最近共通祖先の時点で既に確立されていたと考えられる。

以上の結果は、通水細胞進化という観点から見ても非常に示唆的であった。というもの、例えばコケ植物細胞壁には維管束植物二次壁に多く含まれるフェノール性ポリマーであるリグニンは含まれていない(種によってはリグニン経路の中間物質にあたるフェルラ酸を作ることや、フェノール性物質が壁に蓄積していることは分かっている; Ligrone et al. 2008)。にもかかわらず、*PpVNS7* をヒメツリガネゴケで過剰発現させると、リグニン生合成につながるフェニルプロパノイド経路の酵素遺伝子群の発現



を誘導することが分かったからである。このことから、コケ植物の段階ではリグニンモノマー合成に至る全代謝経路は獲得されていなかったが、その後、VNS 遺伝子の制御下反応であるという枠組はそのままに（あるいは後ほど独立して獲得される形で）リグニン生合成機構が進化し、シダ植物進化の段階では細胞壁のリグニン化が通水細胞分化プログラムの新たな素過程として組み込まれた、という過程を想定することができる。つまり、現在の維管束植物に見られる複雑な通水細胞分化過程は、コケ植物と維管束植物の最近共通祖先にあたる原始型陸上植物が獲得していた「VNS→プログラム細胞死／細胞壁修飾」というスキームをベースに、VNS 下流の分子イベントが多様化・複雑化することで成立してきたと考えられよう（図 6）。ヒメツリガネゴケは残念ながら胞子体にハイドロイドを分化させないが、胞子体で発現する *PpVNS4* がフット領域の転送細胞分化に関与していることは先に述べた（Xu et al. 2014）。コケ植物も種によっては胞子体のフットの中心域にハイドロイドを分化させるので、原則的にはコケ植物では配偶体世代・胞子体世代問わず、「VNS→細胞死／細胞壁修飾」という共通のスキームが使われていると見なすことができる。現在の植物進化学的な見方では、コケ植物の祖先が分岐した後に現れたシダ植物と種子植物の最近共通祖先において、胞子体の永続的な細胞増殖能力が獲得され、胞子体の大型化・多機能化が加速したと推測されている（Ligrone et al. 2012）。こうした変化が余剰物質生産を可能にし、リグニンなどの新たな二次代謝経路の進化の呼び水となることは想像に難くない。リグニン化した二次壁は通水細胞の圧力強度を飛躍的に上昇させ、長距離の水輸送を可能にし、古代の木生シダの繁栄へと繋がったと考えられている（Sperry 2003）。こう考えると、現生の陸上植物の通水細胞のバリエーションは全て、最初の陸上植物が獲得した VNS 機能を土台としつつ、長い進化の過程で下流分子イベントが発展・多様化することで生み出されてきたものである、と整理することができる。

5. おわりに：いつ、どこから、どうやって？

以上、本稿では通水細胞分化のマスター制御転写因子 VNS の分子機能という視点から、陸上植物の通水細胞の進化について考えてきた。これまでの実験生物学的研究から得られた分子的知見によって、現存陸上植物が共通した通水細胞分化の分子基盤スキームをもっていることが分かつてきただけでなく、一方で、通水細胞進化の全貌を明らかにするには、まだ多くの鍵情報が足りていないのも事実である。

例えば、本稿ではコケ植物の中でも蘚類であるヒメツリガネゴケの結果を中心に議論を展開したが、蘚類より進化上早期に維管束植物の系統から分岐したと考えられている苔類ゼニゴケのゲノムにも、VNS 遺伝子が存在していることが分かつていている（Xu et al. 2014; Nakano et al. 2015; 図 3）。ゼニゴケにおける VNS 分子機能の解明は、VNS による細胞分化の仕組みの変遷をさらに遡って論じる上で重要な課題である。また、木生シダ繁栄をもたらしたのはリグニンを含んだ仮道管の進化であったが、先述のように仮道管はコケ植物のハイドロイドとは異なる特徴を多くもっている（図 1）。仮道管分化はいかにして可能になったのか、さらにいえば、どういった VNS 機能の強化・修飾が仮道管を生み出す原動力となったのか、また、その際に胞子体世代が優勢となったことがどういった影響を与えたのか、など、仮道管分化の分子機構については分かつてない点が多い。これらについては、現存のシダ植物や裸子植物の仮道管分化の分子機構を明らかにしていくことで、議論の手掛かりを得る必要があるだろう。また、もっと大きな問い合わせとして、VNS が属する植物特異的な転写

因子群、NAC ファミリー遺伝子がいったいどのように進化してきたのか、その中からどのように VNS 遺伝子が現れてきたのか、という問題もある。近年の次世代シーケンス技術の進展はさまざまな生物種のゲノム情報取得を可能にしているが、こうした比較ゲノム学的なアプローチが、VNS ファミリー進化についての新たな知見をもたらす可能性は高い。

いつ、どこから、どうやって、VNS 遺伝子が生まれ、さまざまな通水細胞を作りだし、陸上植物の繁栄とひいては陸上生物圏の発展につながっていったのか。さらにこうした通水細胞の進化が、植物のボディプランの進化とどのように関連してきたのか。上記に挙げたようなさまざまな研究の進展によって、こうした植物通水細胞進化の道のりの謎がさらに解き明かされることを期待したい。

引用文献

- Bennett, T., van den Toorn, A., Sanchez-Perez, G.F., Campiho, A., Willemse, V., et al. 2010. SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 640–654.
- Cichan, M.A. & Taylor, T.N. 1982. Vascular cambium development in *Sphenophyllum*: A Carboniferous arthropophyte. *IAWA Bull* 3: 155–160.
- Fukuda H. 1996. Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 299–325.
- Fukuda H. & Komamine A. 1980. Establishment of an experimental system for the tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* 65: 57–60.
- 出村拓・大谷美沙都 2015. セミナー室/植物細胞壁の情報処理システム. 植物細胞壁：細胞壁形成の設計図～転写制御機構～. 化学と生物 (53): 313–318.
- Demura, T., Tashiro, G., Horiguchi, G., Kishimoto, N., Kubo, M., et al. 2002. Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15794–15799.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., et al. 2005. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* 19: 1855–1860.
- Ligrone, R., Carafa, A., Duckett, J.G., Renzaglia, K.S. & Ruel K. 2008. Immunocytochemical detection of lignin-related epitopes in cell walls in bryophytes and the charalean alga *Nitella*. *Plant Syst. Evol.* 270: 257–272.
- Ligrone, R., Duckett, J.G. & Renzaglia, K.S. 2000. Conducting tissues and phyletic relationships of bryophytes. *Philos. Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355: 795–813.
- Ligrone, R., Duckett, J.G. & Renzaglia, K.S. 2012. Major transitions in the evolution of early land plants: a bryological perspective. *Ann. Bot.* 109: 851–871.
- Ligrone, R., Vaughn, K.C., Renzaglia, K.S., Knox, J.P. & Duckett, J.G. 2002. Diversity in the distribution of polysaccharide and glycoprotein epitopes in the cell walls of bryophytes: new evidence for the multiple evolution of water-conducting cells. *New Phytologist* 156: 491–508.
- Mitsuda, N., Iwase, A., Yamamoto, H., Yoshida, M., Seki, M., et al. 2007 NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 270–280.
- Nakano, Y., Yamaguchi, M., Endo, H., Rejab, N.A. & Ohtani, M. 2015. NAC-MYB-based transcriptional

- regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Front. Plant Sci.* 6: 288.
- Ohashi-Ito, K., Oda, Y. & Fukuda, H. 2010. *Arabidopsis* VASCULAR- RELATED NAC-DOMAIN6 directly regulates the genes that govern programmed cell death and secondary wall formation during xylem differentiation. *Plant Cell* 22: 3461–3473.
- Ohtani, M., Nishikubo, N., Xu, B., Yamaguchi, M., Mitsuda, N., et al. 2011. A NAC domain protein family contributing to the regulation of wood formation in poplar. *Plant J.* 67: 499–512.
- Sperry, J.S. (2003) Evolution of water transport and xylem structure. *Int. J. Plant Sci.* 164: S115-S127.
- Sterky, F., Bhalerao, R.R., Unneberg, P., Segerman, B., Nilsson, P., et al. 2004. A *Populus* EST resources for plant functional genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13951–13956.
- Taylor-Teeple, M., Lin, L., de Lucas, M., Turco, G., Toal, T. W., et al. 2015. An *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* 517: 571–575.
- Turner, S., Gallois, P. & Brown, D. 2007. Tracheary Element Differentiation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 407–433.
- Turner, S.R. & Somerville, C.R. 1997. Collapsed xylem phenotype of *Arabidopsis* identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. *Plant Cell* 9: 689–701.
- Tyree, M.T. & Zimmermann, M.H. 2002. Xylem Structure and the Ascent of Sap. Second ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Willemse, V., Bauch, M., Bennett, T., Campiho, A., Wolkenfelt, H., et al. 2008. The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in *Arabidopsis* root stem cells. *Dev. Cell* 15: 923–922.
- Xu, B., Ohtani, M., Yamaguchi, M., Toyooka, K., Wakazaki, M., et al. 2014. Contribution of NAC transcription factors of plant adaptation to land. *Science* 343: 1505–1508.
- Yamaguchi, M. & Demura, T. 2010. Transcriptional regulation of secondary wall formation controlled by NAC domain proteins. *Plant Biotechnol.* 27: 237–242.
- Yamaguchi, M., Kubo, M., Fukuda, H. & Demura, T. 2008. VASCULAR- RELATED NAC-DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in *Arabidopsis* roots and shoots. *Plant J.* 55: 652–664.
- Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Ohtani, M., Ohme-Takagi, M. & Demura, T. 2011. VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 7 directly regulates the expression of broad range of genes for xylem vessel formation. *Plant J.* 66: 579–590.
- Zhong, R., Demura, T. & Ye, Z. H. 2006. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 3158–3170.
- Zhong, R., Lee, C. & Ye, Z. H. 2010. Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 3: 1087–1103.