

形態進化の解明にむけて

長谷部光泰¹, 新道聡美²

佐野亮輔³, 西山智明⁴

(¹基礎生物学研究所, ²金沢大学大学院理学研究科)
(³千葉大学大学院自然科学研究科, ⁴東京大学大学院理学系研究科)

なぜ, 系統分類学者が形態形成機構を 研究するか

この10年ほどの間に, PCR法の普及にともない分子系統学的手法は広く植物系統分類学者に受け入れられてきた。今日では, 分子系統学的手法は, 染色体数を数えるのと同じように系統分類研究上必須の技術となっている。植物系統分類学の分野で最も多くの種について解析が進んでいるのが *rbcL* 遺伝子の塩基配列解析である。この数年間の間に種子植物 (Chase *et al.*, 1993), シダ類 (Hasebe *et al.*, 1995) において詳細な系統解析が行われてきた。しかし, *rbcL* 遺伝子の分子はたかだか1 kb程度の長さであるため情報量が十分でないことと, 機能的制約から見かけ上の進化速度が遅く種子植物の近縁種間の解析には不十分であったことから, 近年では, 進化速度が異なる, *ndhF* (Olmstead & Sweere, 1994), *matK* (Johnson & Soltis, 1994) などの遺伝子の塩基配列を用いた解析が行われている。また, *rbcL* から得られた系統樹を検定する意味あいとして, 核にコードされたりボゾーム RNA 遺伝子の塩基配列から系統解析を行う研究も盛んに行われている (Soltis *et al.*, 1996)。

分子データに基づいた系統樹が広く利用されるようになると, 従来の形態などの情報を用いて推定した系統樹との間に矛盾が生じる場合が現れ, 問題となっている。この問題を解決するには2つのアプローチが考えられる。一つは塩基配列データの量を増やし, 塩基配列データによって得られた系統樹が統計的に強く支持されることを示すことである。ブートストラップ確率が100%であれば, 得られた系統樹はかなり信頼性が高く, 形態データを再検討すべき可能性は高い。しかし, ブートストラップ法についてはいろいろな見解があるので注意が必要である (Felsenstein & Kishino, 1993; Hills & Bull, 1993; Sanderson, 1995)。

もう一つのアプローチは, 形態形質の量を増やすとともに, その進化過程を明らかにすることである。個々の形態形質はいくつかの遺伝子ネットワークによって形成されている。従って, 形態形質を作り上げている遺伝子系を解明できれば, 一つの形態形質がより多くの形質と

して系統推定に利用可能な情報を与えてくれることとなる。また, 形態形質を作り上げている遺伝子ネットワークが明らかになれば, 形態形質が相同で比較可能なものであるかとともに, 形質状態の変化過程を明らかにすることが可能となる。形態系統樹はどの形態形質を用いるか, および進化方向の評価によって大きく異なってくるが, 遺伝子ネットワークを明らかにすることにより, 現在行われている形態形質の評価法を改善することができる。

前者のアプローチは, ほぼ方法論が確立され, データを量産する段階にきている。後者のアプローチはまだ実験手法の検討など未開拓であり, どのような結果がでるか予想がつかない点で若者のロマンをそそる。そこで, 筆者らは後者のアプローチで, 研究をすすめている。形態形成過程を支配する遺伝子を解明することは現代生物学の最も大きな関心事であり, 過去にあった系統関係を推定するとともに, 形態進化の実体を解明できる点でも, 非常に興味深い。

本稿では, 系統分類学者として形態進化の解明にどのようにアプローチできるか, 現在の形態形成に関する研究をどう押し進めれば, 系統分類学上未解決の問題を解く鍵が得られるか, 日頃, 筆者らの研究グループで討議していることを中心にまとめてみたい。

形態形成に関係する遺伝子とは

形態形成はホルモンや細胞成長因子などの働きで開始され, ホメオティック遺伝子などの制御遺伝子群の働きで多くの遺伝子の転写が誘導される。これらの遺伝子産物は, 細胞増殖・分化, 細胞間認識・接着, 細胞壁形成, 酵素産生などに関与し, 形態を構築していく。たとえば, トウモロコシ *Zea mays* の紫の穀粒は図1のように, アブシジン酸と *vp1* 遺伝子の働きにより, 制御遺伝子である *CI* 遺伝子が正に制御され, いくつかの酵素遺伝子が発現することにより黄色の穀粒にアントシアニンが蓄積し, 紫色となる (Hattori *et al.* 1992)。

多細胞生物の形態は多くの遺伝子のネットワークによって形成される。そして, 制御遺伝子はこのネットワークの多くの遺伝子発現を支配しているので, 一つの制御

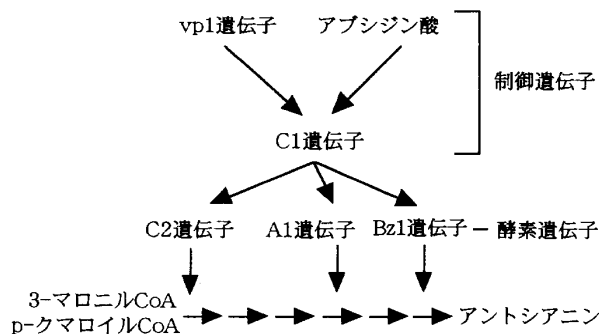


図1. トウモロコシの紫色の穀粒ができあがるためのアントシアニン合成の遺伝子系
矢印は正の制御を示す。

遺伝子に突然変異がおこるだけで、形態が大きく変化する可能性がある。従来、遺伝学的解析から少数の遺伝子によって大きな形態変化が引き起こされることが知られていたが、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* における研究を中心にこれらの遺伝子は遺伝子の発現制御に関係する制御遺伝子であることが解明された。従って、制御遺伝子に突然変異が起これば、短期間に大きな形態進化が引き起こされる可能性がある。メキシコに野生するブタモロコシ (teosinte) *Zea mexicana* からトウモロコシへの栽培化の過程はこの例である。ブタモロコシとトウモロコシは枝ぶり、花序、種子形態などが大きく異なっているが、これらの形態的差異はたった5つの遺伝子座によって支配されていることがQTLマッピング法によって示されている (Dorweiler *et al.* 1993)。

制御遺伝子に起こった変異がどのように集団内に広がり、新しい種を形成していくかという点についての研究も始まっている。形態的に大きな変化を引き起こす制御遺伝子における突然変異は生存に不利なことが多く、自然淘汰により集団からすぐに排除されてしまい、多型が見られない可能性が高い。しかし、ショウジョウバエのホメオティック遺伝子である *Ultrabithorax* (*Ubx*) において、転写産物量についての多型が報告されている (Gibson & Hogness, 1996; Tautz, 1996)。ショウジョウバエでは、*Ubx* の第3胸成虫原基発現が少なくなると、翅を持つ中胸が重複して通常2枚の翅が4枚に変化する。しかし、*Ubx* の発現量の少なくなった突然変異体では、*Ubx* の発現量を増やすような変異が別の遺伝子に起こっており、野生型と同じ量の *Ubx* が発現していることがわかった。将来、交雑、遺伝的浮動などによって大きな形態的变化を引き起こす可能性を秘めていることになる。

植物比較形態形成学の研究法

形態形成の遺伝子制御系を解明するには、交雑実験、

形質転換、遺伝子破壊が必須である。したがって、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana*, イネ *Oryza sativa*, ペチュニア *Petunia hybrida*, キンギョソウ *Antirrhinum majus* といったモデル植物以外での研究はかなり困難である。しかし、形態進化を研究するためには、より広範な植物群における解析が必要となる。動物においては、ショウジョウバエ、センチュウ *Caenorhabditis elegans*, ゼブラフィッシュ *Danio rerio*, マウス *Mus musculus* などという系統的に大きく離れたモデル動物の比較研究によって形態進化に関する驚くべき知見が蓄積している (Kenyon, 1993; Carroll, 1996)。これまで開発されてきたモデル植物は全て被子植物であり、分岐年代はたかだか2億年程度と推定され、12億年もの植物の進化過程における形態進化を解明するには不十分である。従って、植物において形態形成遺伝子を用いて形態進化研究を行うには、少なくとも、裸子植物、シダ植物、コケ植物、藻類からモデル植物系を新たに構築する必要がある。ここでは筆者らが研究している陸上植物について触れる。現生裸子植物は全て木本であり、世代時間が長いために交雑、形質転換実験が困難である。しかし、スギなどは、ジベレリン処理などにより、数年で開花に至るので、今後、技術改良により、研究が進展する可能性がある。シダ植物でモデル植物としてもっとも有望なのはリチャードミズワラビ *Ceratopteris richardii* である (Chasen, 1992)。シダ植物は一般に多年草であるが、リチャードミズワラビは1世代が約3カ月であり、温度条件さえととのえれば (約30度) 年中栽培可能である。また、前葉体を用いた交雑実験は容易である (Eberle *et al.*, 1995; そのほかの情報は <http://www.bio.utk.edu/botany/cfern/manualtw.html> 参照)。しかし、まだ形質転換系が確立されておらず、遺伝子導入の成功例はないので今後の研究が待たれる。また、ゲノムサイズがシロイヌナズナの約100倍という点も大きな短所である。今後、遺伝子導入系、トランスポゾン、アグロバクテリウムなどを用いたタギング系の確立が必須である。コケ植物では、ニセツリガネゴケ *Physcomitrella patens* がモデル系としては確立されている。これは、交配実験と形質転換が可能である (詳しくは <http://www.unil.ch/lpc/docs/mosswelcome.html> 参照)。

このような現状において、陸上植物の形態進化を解明するには2つのアプローチが考えられる。一つは、シロイヌナズナなど被子植物モデル植物系で形態形成に関係していると推定されている遺伝子のホモログを裸子、シダ、コケ植物から単離し、解析することである。この手法は、動物において大きな成果を治めた。たとえば、遺伝学的解析の進んだショウジョウバエで単離されたホメオボックス遺伝子のホモログの機能をマウスなどで解析

することにより、動物形態進化について多大な情報が得られた。ホモログは保存的なアミノ酸配列に対するプライマーを用いた RTPCR 法により、ライブラリーを構築することなく、遺伝子を単離することができる。 *in situ* ハイブリダイゼーション、免疫組織化学的染色により mRNA、蛋白質の局在が特定できるので、ある程度の機能を推定することができる。さらに、形質転換系が確立されれば、アンチセンス RNA を用いて遺伝子機能を阻害し、より直接的に機能解析をすることができる。また、得られた遺伝子を遺伝子系統樹から推定されるシロイヌナズナの相同遺伝子の制御領域につなぎ、その遺伝子機能を欠損したシロイヌナズナに導入する機能回復実験により、遺伝子機能の進化を推定することができる。

裸子、シダ、コケ植物は被子植物とは大きく形態が異なっている。とりわけ、後2者は孢子繁殖し、発達した配偶体を持つなど、被子植物にはない形態形成遺伝子を持っている可能性が高い。従って、被子植物から得られた遺伝子のホモログを探索するだけでなく、被子植物以外の植物においても、形態突然変異体から遺伝子を単離するアプローチが必要となる。現在このアプローチをとれる可能性があるのは、ニセツリガネゴケのみである。トランスポゾン、アグロバクテリウムなどを用いてタギングを行い形態突然変異体を作成し、その遺伝子を単離することが近い将来可能になるであろう。

このように離れた分類群間での形態進化研究の道筋は開けているが、野生種における種内形態変異や適応的に有利な形態形質を規定している遺伝子を単離するといった、モデル植物以外で、表現型の違いからそれを制御している遺伝子を単離することは現状ではかなりの困難をとまう。しかし、モデル植物における形態形成遺伝子の研究がさらに進展することにより、問題となる表現型がどのような遺伝子系に支配されているかのおおまかな予想は可能になるであろうから、そのホモログを解析することにより、原因遺伝子を解明できるようになる可能性はある。

これまで、植物において形態形成に関係する遺伝子の進化に着目した研究を紹介しよう。

花の形態形成

植物の形態形成関連遺伝子で最も研究がすすんでいるのが、花および花器官形成遺伝子である。シロイヌナズナを用いた遺伝学的、分子生物学的解析から、図2に示したような遺伝子系によって花の形態が形成されると予想されている (Weigel & Meyerowitz, 1993 a)。それぞれの遺伝子の機能などについては、ほかの総説を参照していただきたい (後藤, 1994; Ma, 1994; 塚

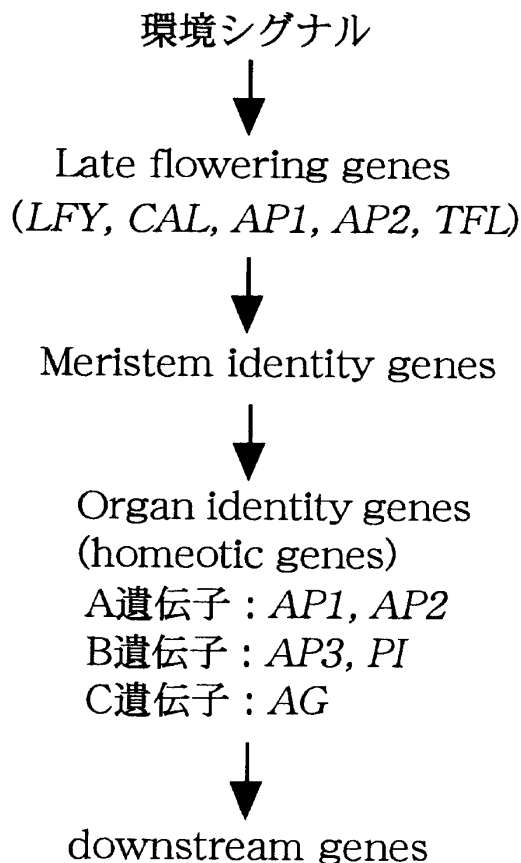


図2. 花と花器官の形成遺伝子群の制御機構

谷, 1994)。光などによる環境シグナルの刺激によって *late flowering genes* の発現が誘導される。これらの遺伝子に突然変異が起こると花形成が遅れることからこのような名前が付いた。 *late flowering genes* は *meristem identity genes* を発現誘導する。 *meristem identity genes* として *LEAFY (LFY)*, *APETALA1 (AP1)*, *CAULIFLOWER (CAL)*, *APETALA2 (AP2)*, *TERMINAL FLOWER (TFL)* の5つの遺伝子がよく研究されており、花序の原基と花の原基の決定に関係している。 *LFY*, *AP1* は *organ identity genes* を正に制御していることが知られている (Weigel & Meyerowitz, 1993 b)。 *organ identity genes* は花のホメオティック突然変異体から単離された遺伝子群で花の各器官 (萼片、花弁、雄蕊、雌蕊) 形成の制御遺伝子である。シロイヌナズナ、キンギョソウを用いた遺伝的解析から、これらの遺伝子機能は ABC モデルと名付けられたモデルによってうまく説明できることがわかった (Coen & Meyerowitz, 1991; Weigel & Meyerowitz, 1994)。このモデルでは、A 遺伝子のみが機能するとガク片、A と B 遺伝子の両方が機能すると花弁、B と C 遺伝子の両方が機能すると雄蕊、C 遺伝子のみが機能すると雌蕊が形成される。このモデルはシロイヌナズナの突然変異体を用いた交配実験を全うまく説明できることから広く受け入れられている。

これまで報告されている *organ identity genes* は全

て MADS 超遺伝子族に属する遺伝子であることが明らかになった。MADS 超遺伝子族は転写調節因子で、動物、菌類、植物に広く存在する遺伝子族であり、MADS ボックスと呼ばれる DNA 結合、2 量体化、タンパク質相互作用に関係する機能を持つ約 56 アミノ酸からなる保存的な配列を持っている (Shore & Sharrocks, 1995; Pellegrini *et al.*, 1995)。植物 MADS 遺伝子族は動物、菌類の MADS 遺伝子族と異なり、K ボックス (keratin coiled-coil domain like box) と呼ばれる約 70 アミノ酸からなる緩やかに類似性のある配列を持つ。K ボックスは両親媒性螺旋構造を形成すると推定されており、タンパク質間相互作用に関与していると考えられている。

organ identity genes の下流には実際に花器官形態を形成する遺伝子群が存在していると考えられているがまだ研究は進んでいない。

MADS 超遺伝子族の進化

MADS 超遺伝子族は先述のように生物界全体に分布する遺伝子であることから、生物全体の形態進化過程を推定するうえで興味深い。動物と植物の系統は単細胞段階で分岐したので、両系統に属する遺伝子族の機能を解析することは、独立に起きた 2 つの多細胞化にともなう形態形成の進化過程を解明することに他ならない。

MADS 超遺伝子族は遺伝子系統樹から SRF 群 Serum Response Factor, MEF2 群 myocyte enhancer factor 2, 植物 MADS 遺伝子群の 3 つに分かれ、それぞれ形態形成に深く関わっている (山口ら, 1994; Hasebe & Banks, 1997)。図 3 の遺伝子系統樹から SRF と MEF2 遺伝子族はそれぞれ動物と菌類の分岐以前に分化していたことがわかる。しかし、植物のみにある K ボックスが植物の系統で独自に生じたのか、祖先遺伝子に存在していた K ボックスが動物、菌類の系統で欠失したのかはわからない。今後、これら 3 分類群の外群となるような生物、とりわけ、プロチスタにおける MADS 超遺伝子族の解析が興味深い。

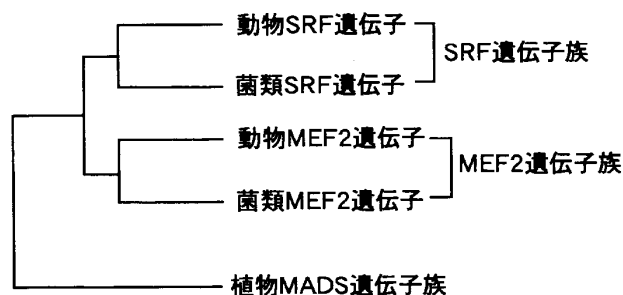


図 3. MADS 超遺伝子族の遺伝子系統樹

植物 MADS 遺伝子の進化と花形態の進化

植物 MADS 遺伝子族の遺伝子系統樹 (図 4) から、この遺伝子族は遺伝子重複によって形成されたと推定される 12 の遺伝子群に分けることができる。各遺伝子群はそれぞれ独自の機能を持つことがわかってきたので、遺伝子重複が植物の花の進化において大きな役割を果たしてきたことが想像できる (Doyle, 1994; 長谷部, 1996; Hasebe & Banks, 1997; Purugganan *et al.*, 1995)。たとえば、AP1 遺伝子群は ABC モデルの A 遺伝子、AP3 と PI 遺伝子群は B 遺伝子、AG 遺伝子群は C 遺伝子に対応している。これら 4 つ以外の遺伝子群についても解析が進行することにより、さらに花器官の形態形成機構が明らかになるであろう。

裸子植物における MADS 遺伝子族の解析と被子植物との比較は、裸子植物から被子植物への花の進化解明の糸口を与える可能性を持つ。裸子植物から被子植物への進化過程における大きな特徴として、花卉の形成があげられる。被子植物の花弁形成には AP3 と PI 遺伝子群が必須であるが、これらの遺伝子群は裸子植物からは得られていない。スクリーニングが十分でないという可能性はあるが、MADS ボックスに特異的な 10 種のプライマーを用いて、コバノグネツム *Gnetum parvifolium* の若い雌花序について約 460 クローンを実行したスクリーニングしたが、これらの遺伝子群に属する遺伝子は全く得られなかった (Shindou, Ueda, Kato & Hasebe, 未発表)。したがって、裸子植物では、AP3 と PI 遺伝子群が花の器官形成に関与していない (花の器官で発現していない) 可能性が高い。AP3 と PI 遺伝子群は被子植物と裸子植物の分化するより前に他の遺伝子群から分岐していた、すなわち、裸子植物と被子植物の共通祖先は AP3 と PI 遺伝子群を持っていたことが遺伝子系統樹からわかる。このことから、種子植物の共通祖先で花以外の形態形成に関与していた、あるいは偽遺伝子化していた遺伝子が、被子植物の進化過程で機能を獲得し、花弁の形成へとつながった可能性がある。今後、裸子植物の栄養器官などのスクリーニングにより、AP3 と PI 遺伝子群に属する遺伝子が発見されれば、花卉の進化についての考察が可能になるであろう。

裸子植物から被子植物への花の器官のもう一つの大きな進化は心皮の形成である。この点について図 4 に示した AGAMOUS, AGL11, DAL2 遺伝子群の遺伝子系統樹は興味深い。DAL2 遺伝子は裸子植物の *Picea abies* からクローニングされた遺伝子で、雄、雌の両花序で発現している。図 4 からわかるように、AGAMOUS と AGL11 遺伝子群は針葉樹類と被子植物が分岐した後で遺伝子重複により形成されることがわかる。この時期は、被子植物が裸子植物から分化した時

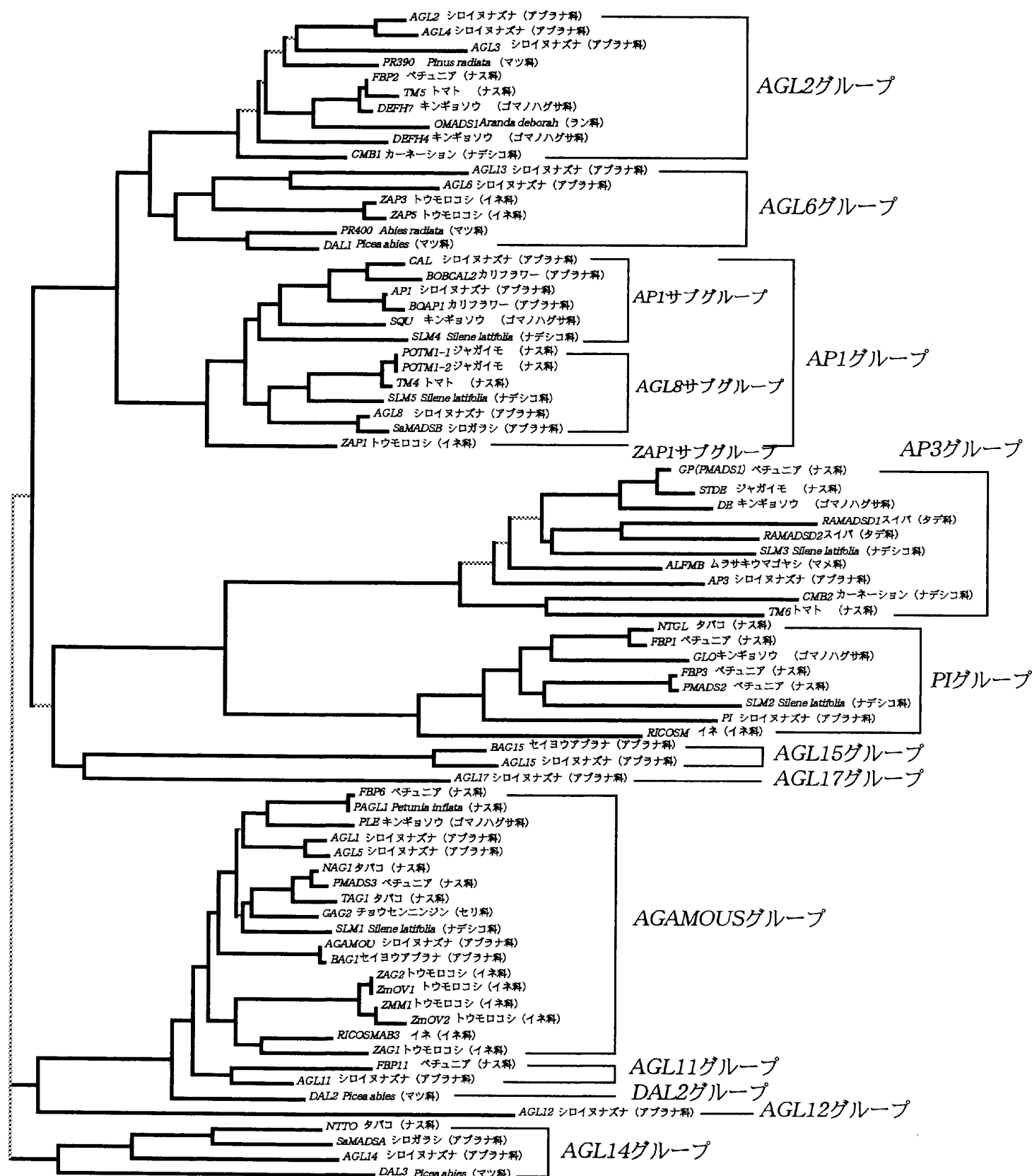


図4. 植物 MADS 遺伝子族の遺伝子系統樹

アミノ酸配列を整列し、PROTDIST プログラムにより距離行列を作り、近隣結合法により系統樹を構築した。灰色の枝はブートストラップ確率が50%以下で信頼性が低いことを示す。この系統樹は無根系統樹である。

期にあたり、*AGAMOUS*と*AGL11*遺伝子群を生じた遺伝子重複が被子植物の進化においてなんらかの役割を果たしたかもしれない。実際、両遺伝子群の機能はこの遺伝子重複が被子植物進化に必須であったことを示唆するものである。*AGL11*遺伝子群にはシロイヌナズナから得られた*AGL11*とペチュニアからの*FBP11*が属する。両遺伝子は胚珠特異的に発現し、*FBP11*を過剰発現させた形質転換ペチュニアは、萼片の向軸側と花卉の背軸側に異所的に胚珠を形成する (Angenent *et al.*, 1995)。このことから、この遺伝子群に属する遺伝子は胚珠形成の開始と位置を制御していると考えられている。一方、ABCモデルのところで述べたようにAG遺伝子群は心皮形成に関与している。この遺伝子群の属するシロイヌナズナの*AGAMOUS*やキンギョソウの*PLENA*遺伝子の発現が見られない突然変異体では、萼片、花卉、花卉という単位が繰り返した花を形成し、心皮は形成されない (Bowman *et al.*, 1991 a)。 *AGAMOUS* 遺伝子は胚珠で発現しているが、*AGAMOUS*の発現が見られないような突然変異体と他の突然変異体との2重、3重変異体は胚珠を付けることから、*AGAMOUS*は胚珠形成に必須の遺伝子ではないと考えられている (Bowman *et al.*, 1991 b)。

これらの結果から以下の2つのシナリオが考えられる。一つは、*AGAMOUS*遺伝子群と*AGL11*遺伝子群の共通祖先はともに心皮と胚珠の形成に正の働きを持っていたが、遺伝子重複後、これらの機能が*AGAMOUS*遺伝子群と*AGL11*遺伝子群の間で分化し、前者は心皮形成、後者は胚珠形成に関わるようになったというシナリオである。もう一つは、共通祖先遺伝子は胚珠形成機能だけを持っており、遺伝子重複後、一方の遺伝子が新たに心皮を形成する機能を獲得したという仮説である。後者のシナリオは、被子植物における心皮の獲得をうまく説明できる。今後裸子植物におけるこれらの遺伝子群の機能解析が進むことにより、心皮の進化の核心に迫れる可能性がある。また、胚珠の形態形成には、MADS遺伝子族以外の*AP2*、*SUPERMAN*、*BELL1*などの遺伝子が関係していることがわかったきたので (Angenent & Colombo, 1996)、今後これらの遺伝子の裸子植物における機能解析も期待される。

花を咲かせない植物の花器官形成遺伝子

MADS遺伝子は花器官形成に深く関わっていることがわかった。では、花を形成せず、胞子で繁殖するシダ植物には植物型のMADS遺伝子族は存在しているのだろうか。最近、9個のMADS関連遺伝子がリチャードミズワラビから単離され、全てMADSボックスと

もにKボックスを持つ植物MADS遺伝子族に属することがわかった (Hasebe & Banks, 未発表)。既知の植物MADS遺伝子とともに遺伝子系統樹を構築してみると、リチャードミズワラビMADS遺伝子 (CMADS) は2つの群に別れ、一方の群は*AGAMOUS*、*AGL11*、*DAL2*遺伝子群と単系統群を形成した。このことから、先述の種子植物の12のMADS遺伝子群のほとんどはシダ植物と種子植物の共通祖先の段階、すなわち、*Psilophyton*型の植物 (Trimerophytophyta) において形成されていたと考えられる。さらに、種子植物が12群のMADS遺伝子を持ち、シダ類のリチャードミズワラビは2群のMADS遺伝子しか持たず、共通しているのは1群だけであるということは (1) 種子植物とシダ類は12以上のMADS遺伝子群を持っていた*Psilophyton*型植物を共通祖先とし、シダ類の系統ではほとんどのMADS遺伝子群が消失した、(2) 種子植物とシダ類は、異なったMADS遺伝子を持つ*Psilophyton*型植物の交雑によって生じたという2つの可能性を示唆している。リチャードミズワラビのMADS遺伝子の異なった2群から選んだ2つの遺伝子は*in situ*ハイブリダイゼーションの結果、ともに胞子嚢始原細胞で強い発現が見られた。このことから、MADS遺伝子のリチャードミズワラビでの機能は胞子嚢形成に関与しているのではないかと推察される。

グネツムと被子植物の関係

グネツム類はグネツム科、ウェルウィチア科、マオウ科の形態的に非常に分化した3科から構成されている。そのため、グネツム類は単系統群ではなく多系統群であろうと考える学者もあり、被子植物はこれら3科から独立に起源した多系統群であるという被子植物多系統説の根拠とされたこともあった。しかし、1980年代後半に入って形態形質の分岐学的解析により、これら3科の単系統性が示唆され (Crane, 1985; Doyle & Donoghue, 1986; Loconte & Stevenson, 1990; Rothwell & Sovenonson, 1994)、*rbcL*遺伝子の塩基配列に基づく分子系統学的研究結果 (Hasebe *et al.*, 1992 a) と併せて今日ではグネツム類の単系統性は広く認識されるに至った。

グネツム類とほかの裸子植物と被子植物との系統関係ははっきりしていない。グネツム類は一枚の珠皮を持つ点で裸子植物的である。しかし、複雑な花序を持つ、導管を持つ、珠心が何層かの外層で覆われているという点などで被子植物的である。形態形質に基づく分岐図では他の現生裸子植物はシダ植物と被子植物の間に位置する側系統群であり、グネツム類は被子植物と単系統群であ

るという仮説を支持する (Crane, 1985; Doyle & Donoghue, 1986; Loconte & Stevenson, 1990; Rothwell & Sovenon, 1994). 一方、葉緑体にコードされている *rbcl* (Hasebe et al., 1992b), 葉緑体の逆位反復領域 Inverted repeat の非翻訳部位 (Goremykin et al., 1996), 核にコードされているリボゾーム遺伝子 (Troitsky et al., 1991; Chaw et al., 1996) の分子系統樹では現生裸子植物は単系統であり、グネツム類は裸子植物と単系統で、被子植物とは単系統にならない。分子データについては、どの研究も現生裸子植物の単系統性を支持するものの、ブーツストラップ確率は高くなく、さらにデータの蓄積が必要である。

系統関係は未解明であるが、グネツム類の花の構造はそれ自体が興味深いものである。グネツムの胚珠は3つの層で覆われているが、これらの層は、被子植物の珠皮、心皮、花弁、萼片と比較できる器官なのであろうか、それとも、異なった器官であり、被子植物の花との類似は収斂によっておこったものなのであろうか。

RTPCR 法によりコバノグネツムの雌の花序から抽出した RNA から、これまで4種の MADS 関連の遺伝子が単離された。この内の一つは、被子植物の胚珠形成に関与していると考えられている AGL6 遺伝子群に属することがわかった (Shindou, Ueda, Kato & Hasebe 未発表)。今後、グネツム類と被子植物での花器官形成遺伝子の機能を比較することにより、両者の花器官の相同性について議論できる知見が得られるかもしれない。

茎葉の進化へのアプローチ

植物は根、茎、葉の3つの主要器官から構成されている。化石記録上最も古い陸上植物である原始マツバラ綱の植物は根と葉が未分化で二分岐する茎だけからできている。したがって、葉や根は、現生植物が陸上に生活するようになった後に進化したのではないかと考えられている。葉の進化を説明する最も有力な仮説は1930年に W.Zimmermann の提唱したテローム説である。この仮説は原始マツバラ様植物の一群の二分岐した茎が無限成長する主軸群と有限成長する側枝群へと分化し、癒合、偏平化することによって葉が形成されたのではないかという説である。すなわち、葉は茎が進化の過程で変形してできたものだという仮説である。

種子植物の葉は、形態学的には茎が変形してできたような形跡はほとんど残していない。しかし、シダ類ではしばしば茎的な特徴を残した葉が観察される。たとえば、ウラボシ *Gleichenia japonica* などでは葉原基の先端の成長点は葉が展開した後も維持され、何回かの休

眠期間を経て数年にわたって数メートルにも達する葉を伸長させる。また、一部のシダでは茎から葉が形成された後も、葉が茎的に二分岐し、腋外芽という独自の器官を発達させる。これらの事実は葉が茎起源だというテローム説を支持しているのかもしれない。完全に分化した種子植物の葉と茎的な様相を残したシダ類の葉の形態形成を支配する遺伝子群を解析し、比較すれば、どのように茎と葉が進化してきたかを解明する糸口がつかめるのではないだろうか。

Knotted1 (*Kn1*) 遺伝子はトウモロコシからクローニングされ、茎頂、維管束で特異的に発現し、動物の形態形成に関連する転写調節因子の一部に存在するホメオドメインを持つことがわかった (Vollbrecht et al., 1991)。Kn1に関連した遺伝子は現在数個が同定され、KNOX と名付けられ、植物の他のホメオドメインを持つ遺伝子群とは塩基配列上区別できることがわかっている。KNOX はアミノ酸配列からクラス1とクラス2の亜群に分類できる (Kerstetter et al., 1994)。クラス1に属する遺伝子群はおもに茎頂の葉の原器以外の部分で発現されること、過剰発現をさせると葉が茎的な性質を帯びることから、茎頂における葉への運命の決定に関わっているのではないかと考えられる。また、クラス2遺伝子群は茎頂以外の部分で発現しており、その機能はわかっていない。最近、トマト *Lycopersicon esculentum* で KNOX 遺伝子を過剰発現させる実験から、KNOX 遺伝子群が複葉形成に関与していることが明らかになっている (Hareven et al., 1996)。また、KNOX 遺伝子を過剰発現させたトマトの若い葉がシダ植物の特徴である「ワラビ巻き」を形成することは、シダ植物ではこれらの遺伝子が被子植物よりも過剰に発現し、茎的な葉を形成しているのではないかという仮説を支持する。

これまで、リチャードミズワラビ生殖茎頂から、3つの KNOX 関連遺伝子がクローニングされ、アミノ酸配列比較から、そのうちの2つはクラス1、残りはクラス2に属することがわかった (Sano, Ito, Banks & Hasebe, 未発表)。これら2つのクラスはシダ類と種子植物の分岐以前に分化していたことになる。現在これらの遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションによる空時的発現様式の解明、リチャードミズワラビの KNOX 関連遺伝子を種子植物 (シロイヌナズナやトウモロコシ) で恒常的に発現させたときの影響、リチャードミズワラビの KNOX 関連遺伝子の上流域をレポーター遺伝子と融合させ、種子植物における器官特異的発現様式を解析し、茎と葉の進化を解明する突破口とすべく研究を進めている。

孢子体と配偶体の関係

動物は、減数分裂により単相世代である卵と精子を形成し、受精により複相世代へと戻る。一方、植物の多くは、減数分裂後、孢子を形成し、単相である配偶体を発達させ、配偶体上に形成した造卵器、造精器で、卵と精子を形成し、受精により複相世代である孢子体へと戻る。単相世代である配偶体の発達は植物特有の現象であり、植物進化を探るうえで重要な問題である。

陸上植物において、コケ植物では、配偶体が茎葉体を作り、孢子体は小さく配偶体に寄生生活をする。シダ植物では、配偶体、孢子体ともに独立生活をするが、孢子体の方が茎葉を発達させる。種子植物では、茎葉を持った孢子体に配偶体が寄生生活する。では、コケ植物の配偶体の茎葉体とシダや種子植物の孢子体が付ける茎と葉は同じ遺伝子によって形成されているのであろうか、それとも全く異質の遺伝子によって制御されているのであろうか。この問題は、孢子体を形成している遺伝子群が、配偶体を形成している遺伝子群と同じものなのか、あるいは全く異なったものなのかという研究へとつながっていく。

先述の茎葉分化に関係していると考えられている KNOX 遺伝子群はこの問題に対するよい研究材料となる。リチャードミズワラビから得られた *CKNOX1* 遺伝子は孢子体、配偶体ともに分裂組織周辺で発現しているらしいことがわかった (Sano, Ito, Banks & Hasebe, 未発表)。

無配生殖と無孢子生殖は、特定の刺激などにより、受精を経ずに配偶体から孢子体が形成されたり、減数分裂を経ずに孢子体から配偶体が形成されたりする現象である。これらの生殖様式も配偶体と孢子体の進化という観点から興味深い。現在、遺伝子を探索する仕事が始まっている (Koltunow *et al.*, 1995)。

終 わ り に

以上、われわれの研究グループが興味を持っている問題を述べた。また、被子植物の花の多様性を解明するために、いくつかの分類群で MADS 遺伝子群を比較解析する研究 (伊藤元己, 千葉大学, 私信) も始まっている。ここでは触れなかったが、このほかにも、胚発生、根、担根体、小葉と大葉、下等植物における頂端細胞と高等植物の內衣、外体を持った茎頂などの進化についても、研究をスタートするだけの下地が出来上がっている。更に将来は、遺伝子導入技術を駆使して、下等植物に高等植物の遺伝子を導入するなど、実験生物学的に進化の解明にアプローチすることが可能となるであろう。われわれは、学問分野の境界にとらわれず、絶えず新し

い技術と知識を用いて植物進化に関する未解決の問題に挑戦することを目指している。形態形成の遺伝子の解析から形態進化にチャレンジする研究は、まさに扉が開かれつつある段階であり、10年前に分子系統学が植物分野に導入されつつあった時期以上の興奮を与えてくれる。一山当ててやろうと思う野心的な学生諸君はご連絡下さい (mhasebe@nibb.ac.jp)。

引 用 文 献

- Angenent, G.C., J. Franken, M. Busscher, A. van Dijken, J.L. van Went, H.J.M. Dons, A.J. van Tunen. 1995. A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. *The Plant Cell* 7 : 1569-1582.
- Angenent, G.C. & L. Colombo. 1996. Molecular control of ovule development. *Trends in Plant Science* 1 : 228-232.
- Bowman, J.L., D.R. Smyth, E.M. Meyerowitz. 1991a. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112 : 1-20.
- Bowman, J.L., G.N. Drews, E.M. Meyerowitz. 1991b. Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. *The Plant Cell* 3 : 749-758.
- Carroll, S.B. 1996. Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* 376 : 479-485.
- Chase, M.W., D.E. Soltis, R.G. Olmstead, D. Morgan, D.H. Les, B.D. Mishler, M.R. Duvall, R.A. Price, H. G. Hills, Y.-L. Qiu, K. A. Kron, J. H. Rettig, E. Conti, J.D. Palmer, J.R. Manhart, K.J. Sytsma, H.J. Michaels, W.J. Kress, K.G. Karol, W.D. Clark, M. Hedréin, B.S. Gaut, R.K. Jansen, K.-J. Kim, C.F. Wimpee, J.F. Smith, G.R. Furnier, S.H. Strauss, Q.-Y. Xiang, G.M. Plunkett, P.S. Soltis, S.M. Swensen, S.E. Williams, P.A. Gadek, C.J. Quinn, L.E. Equiarte, E. Golenberg, G.H. Learn Jr, S.W. Graham, S.C.H. Barrett, S. Dayanandan & V.A. Albert. 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of Missouri Botanical Garden* 80 : 528-580.
- Chasen, R. 1992. *Ceratopteris*: a model plant for

- the 90s. *The Plant Cell* 4 : 113-115.
- Chaw S.-M., A. Zharkikh, H.-M. Sung, T.-C. Lau, W.-H. Li. 1996. Molecular phylogeny of gymnosperms and seed plant evolution: analysis of 18S rRNA sequences. *American Journal of Botany* 83 (supplement) : 211.
- Coen, E. & E.M. Meyerowitz. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353 : 31-37.
- Crane, P.R. 1985. Phylogenetic analysis of seed plants and the origin of angiosperms. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 72 : 716-793.
- Dorweiler, J., A. Stec, J. Kermicle & J. Doebley. 1993. Teosinte glume architecture: a genetic locus controlling a key step in maize evolution. *Science* 262 : 233-235.
- Doyle, J.A. & M.J. Donoghue. 1986. Seed plant phylogeny and the origin of angiosperms: and experimental cladistic approach. *Botanical Review* 52 : 321-431.
- Doyle, J.J. 1994. Evolution of a plant homeotic multigene family: toward connecting molecular systematics and molecular developmental genetics. *Systematic Biology* 43 : 307-328.
- Eberle J., J. Nemacheck, C.-K. Wen, M. Hasebe, J.A. Banks. 1995. *Ceratopteris*: a model system for studying sex-determining mechanisms in plants. *International Journal of Plant Sciences*. 156 : 359-366.
- Felsenstein, J. & H. Kishino. 1993. Is there something wrong with the bootstrap on phylogenies? A reply to Hillis and Buss. *Systematic Biology* 42 : 193-200.
- Gibson, G. & D.S. Hogness. 1996. Effect of polymorphism in the *Drosophila* regulatory gene *Ultrabithorax* on homeotic stability. *Science* 271 : 200-203.
- Goremykin, V., V. Bobrava, J. Pahnke, A. Troitsky, A. Antonov & W. Martin. 1996. Noncoding sequences from the slowly evolving chloroplast inverted repeat in addition to *rbcL* do not support Gnetalean affinities of angiosperms. *Molecular Biology and Evolution* 13 : 383-396.
- 後藤弘爾 1994. 花の形態形成 植物細胞工学シリーズ 1 : 53-61
- Hasebe, M., M. Ito, R. Kofuji, K. Iwatsuki & K. Ueda. 1992a. Phylogenetic relationships in gnetophyta deduced from *rbcL* gene sequences. *Botanical Magazine Tokyo* 105 : 385-391.
- Hasebe, M., R. Kofuji, M. Ito, M. Kato, K. Iwatsuki, K. Ueda. 1992b. Phylogeny of gymnosperms inferred from *rbcL* gene sequences. *Botanical Magazine Tokyo* 105 : 673-679.
- Hasebe, M., P.G. Wolf, K.M. Pryer, K. Ueda, M. Ito, R. Sano, G.J. Gastony, J. Yokoyama, J.R. Manhart, N. Murakami, E.H. Crane, C.H. Haufler & W.D. Hauk. 1995. Fern phylogeny based on *rbcL* nucleotide sequences. *American Fern Journal* 85 : 134-181.
- 長谷部光泰 1996. 形態形成遺伝子と進化 植物細胞工学シリーズ5 印刷中
- Hasebe, M. & J.A. Banks. 1997. Evolution of MADS gene family in plants. *In*: K. Iwatsuki *et al.* (eds.), *Evolution and Diversification in Land Plants*, (in press) Springer-Verlag, Tokyo.
- Hareven, D., T. Gutfinger, A. Parnis, Y. Eshed & E. Lifschitz. 1996. The making of a compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato. *Cell* 84 : 735-744.
- Hattori, T., V. Vasil, L. Rosenkrans, L.C. Hannah, D.R. McCarty & I.K. Vasil. 1992. The viviparous-1 gene and abscisic acid activate the C1 regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes & Development* 6 : 609-618.
- Hillis, D.M. & J.J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42 : 182-192.
- Johnson, L.A. & D.E. Soltis. 1994. *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s.s. *Systematic Botany* 19 : 143-156.
- Kenyon, C. 1993. If birds can fly, why can't we? homeotic genes and evolution. *Cell* 78 : 175-180.
- Kerstetter R., E. Vollbrecht, B. Lowe, B. Veit, J.

- Yamaguchi & S. Hake. 1994. Sequence analysis and expression patterns divide the maize *knotted1*-like homeobox genes into two classes. *The Plant Cell* 6 : 1877-1887.
- Koltunow, A.M., R.A. Bicknell, A.M. Bhaudhury. 1995. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology* 108 : 1345-1352.
- Loconte, H., W. Stevenson. 1990. Cladistics of the Spermatophyta. *Brittonia* 42 : 197-211.
- Ma, H. 1994. The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analyses. *Genes & Development* 8 : 745-756.
- Olmstead, R.G. & J.A. Sweere. 1994. Combining data in phylogenetic systematics: an empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. *Systematic Biology* 43 : 467-481.
- Pellegrini, L., S. Tan, T.J. Richmond. 1995. Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature* 376 : 490-498.
- Purugganan, M.D., S.D. Rounsley, R.J. Schmidt, M.F. Yanofsky. 1995. Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics* 140 : 345-356.
- Rothwell, G.W., R. Serbet. 1994. Lignophyte phylogeny and the evolution of spermatophytes: a numerical cladistic analysis. *Systematic Botany* 19 : 443-482.
- Sanderson, M.J. 1995. Objections to bootstrapping phylogenies: a critique. *Systematic Biology* 44 : 299-320.
- Shore, P. & A.D. Sharrocks. 1995. The MADS-box family of transcription factors. *European Journal of Biochemistry* 229 : 1-13.
- Soltis, D.E., P.S. Soltis, D.L. Nickrent, L.A. Johnson, W.J. Hahn, S.B. Hoot, J.A. Sweere, R.K. Kuzoff, K.A. Kron, M.W. Chase, S.M. Swensen, E.A. Zimmer, S.-M. Chaw, S.-M. Gillespie, W.J. Kress & K.J. Sytsma. 1996. Angiosperm phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, (submitted).
- Tautz, D. 1996. Selector genes, polymorphisms, and Evolution. *Science* 271 : 160-161.
- Troitsky, A.V., Yu.F. Melekhovets, G.M. Rakhimova, V.K. Bobrova, K.M. Valiejo-Roman, A.S. Antonov. 1991. Angiosperm origin and early stages of seed plant evolution deduced from rRNA sequence comparisons. *Journal of Molecular Evolution* 32 : 253-261.
- 塚谷裕一 1994. シュート形態形成の遺伝学的背景 蛋白質核酸酵素 39 : 2580-2590.
- Vollbrecht, E., B. Veit, N. Sinha & S. Hake. 1991. The developmental gene *knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* 350 : 241-243.
- Weigel, D. & E.M. Meyerowitz. 1993a. Genetic hierarchy controlling flower development. *In: M. Bernfield (ed.), Molecular Basis of Morphogenesis*, p.93-107. Wiley-Liss, New York.
- Weigel, D. & E.M. Meyerowitz. 1993. Activation of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Science* 261 : 1723-1726.
- Weigel, D. & E.M. Meyerowitz. 1994. The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78 : 203-209.
- 山口和男・小藤累美子・植田邦彦 1994. 花器官形成調節遺伝子 蛋白質核酸酵素 39 : 2570-2578.

(1996年8月7日受領)