

· 专题论坛 ·

HD-Zip III转录因子家族与植物细胞分化

朱莹莹, 于亮亮, 汪杏芬, 李来庚*

中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所, 国家植物分子遗传学重点实验室和合成生物学重点实验室, 上海 200032

摘要 细胞分化是生物生长发育的重要过程, 受到一系列信号的精确调控。植物特有的转录因子HD-Zip III在细胞分化中发挥了重要作用。该文对HD-Zip III基因类型和结构特点进行了简要介绍, 重点论述了HD-Zip III在胚胎形态发生、顶端分生组织形成、叶极性建立和维管组织分化等发育过程中的作用, 系统总结了HD-Zip III基因在不同层次受到的调控, 探讨了该家族基因与陆生维管植物进化的关系。

关键词 细胞分化, HD-Zip III, 植物发育, 转录因子

朱莹莹, 于亮亮, 汪杏芬, 李来庚 (2013). HD-Zip III转录因子家族与植物细胞分化. 植物学报 48, 199–209.

植物的生长发育过程伴随着细胞的不断分裂和分化。细胞分裂后形成的子细胞向着某一方向进行特异分化, 产生一类性质相同或相似的细胞族群, 形成具有特定功能的组织和器官。研究表明, 细胞分化过程受到一系列程序化信号的精确调控。

植物中存在一类转录因子: 亮氨酸拉链蛋白(homeodomain-leucine zipper protein, HD-Zip), 该类蛋白属于同源异型域(homeodomain, HD)转录因子超家族(Schena and Davis, 1992; Elhiti and Stasolla, 2009)。根据结构域保守性、基因结构以及生理学功能, HD-Zip家族又可以分为HD-Zip I、HD-Zip II、HD-Zip III和HD-Zip IV四个亚家族(Ariel et al., 2007)。HD-Zip I主要响应外界信号, 如温度和渗透压等非生物胁迫, 进而调控植物生长使植物适应环境; HD-Zip II通过感应光信号使植物具有避阴生长反应; HD-Zip IV主要调控植物表皮细胞的分化; 而HD-Zip III对植物多种细胞分化过程都起到重要调控作用, 如胚胎形态发生、分生组织形成、侧生器官发生、侧生器官极性建立和维管系统发育等(Prigge et al., 2005)。本文将对HD-Zip III亚家族基因的类型、结构、功能和调控等研究现状进行系统介绍。

1 HD-Zip III基因类型

从低等的苔藓植物, 到蕨类植物和裸子植物, 再到更

为进化的被子植物都存在HD-Zip III基因(Floyd et al., 2006; Prigge and Clark, 2006)。随着越来越多物种全基因组测序工作的完成, 人们发现HD-Zip III在每个物种中的成员数目不尽相同。在不具有维管系统的球莴藓(*Physcomitrella patens*)中, 存在5个HD-Zip III基因(Sakakibara et al., 2001)。在裸子植物白云杉(*Picea glauca*)和火炬松(*Pinus taeda*)中分别克隆到4个和5个HD-Zip III基因(Côté et al., 2010)。双子叶草本植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) HD-Zip III家族共有5个成员, 分别是REVOLUTA/IFL1(REV)、PHAVOLUTA/AtHB9(PHV)、PHABULOSA/AtHB14(PHB)、AtHB15/CORONA(CNA)和AtHB8, 它们的蛋白同源性在60%–85%之间。单子叶植物水稻(*Oryza sativa*)中也存在5个HD-Zip III基因, 为OsHB1–5(Itoh et al., 2008)。木本植物毛果杨(*Populus trichocarpa*)HD-Zip III基因家族成员有8个, 为PtHB1–8(Ko et al., 2006)。根据HD-Zip III的序列同源性可以将其分为3组: 原始HB族群(Paleo-HB)、裸子HB族群(Gymno-HB)和被子HB族群(Angio-HB)(图1)。其中, 低等植物HD-Zip III基因组成了原始HB族群; 裸子植物HD-Zip III基因组成裸子HB族群, 部分裸子植物HD-Zip III与原始HB族群重叠; 全部被子植物HD-Zip III组成被子HB族群。在被子HB族群中, 又可细分为3个亚组, 这3个亚组具有不同的表达模

收稿日期: 2012-04-09; 接受日期: 2012-10-09

基金项目: 国家杰出青年基金(No.30725025)和国家自然科学基金(No.30972329)

* 通讯作者。E-mail: lgli@sibs.ac.cn

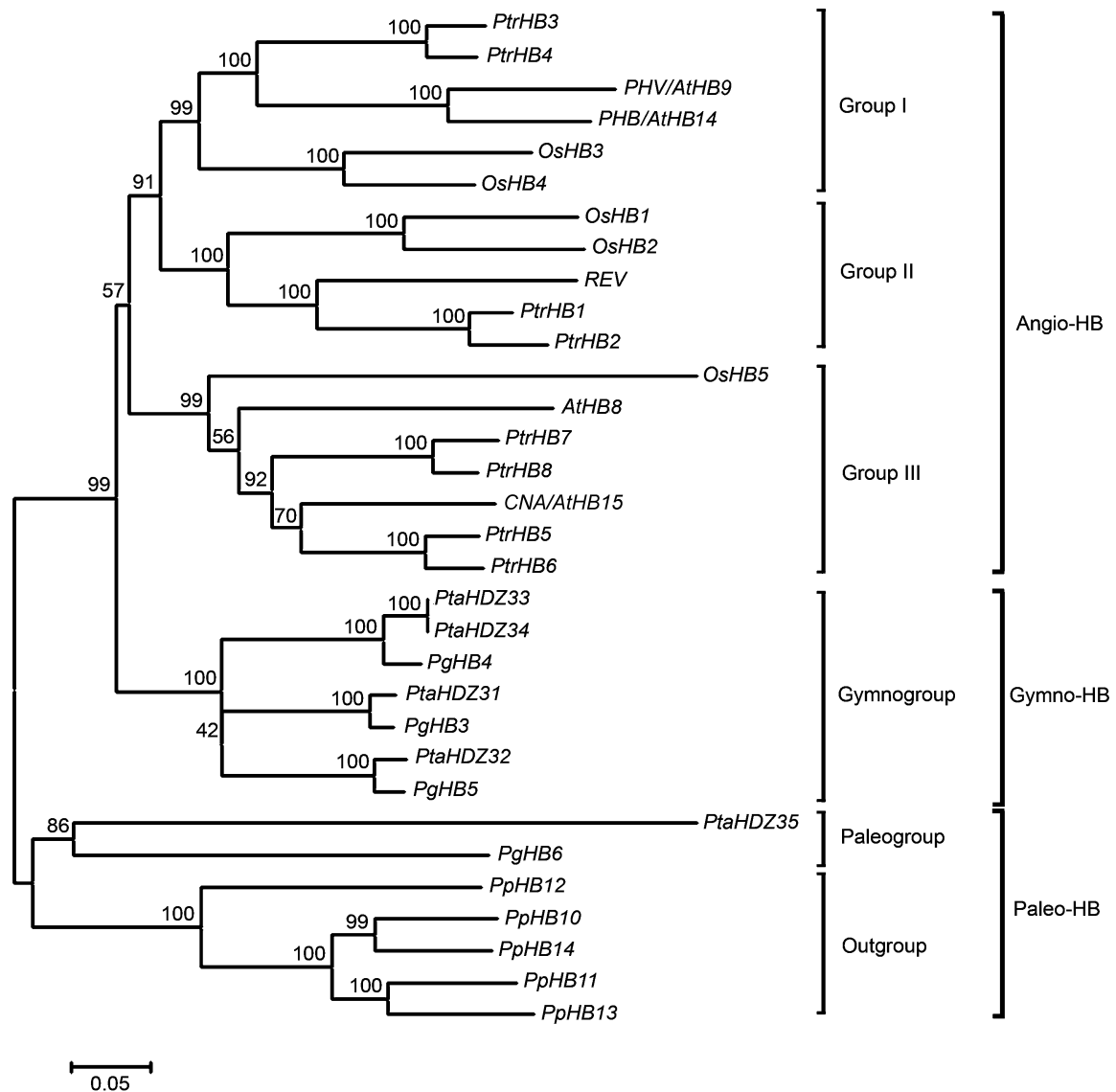


图1 HD-Zip III基因之间的同源关系

Pp: 球蕨; Pg: 白云杉; Pta: 火炬松; Ptr: 毛果杨; At: 拟南芥; Os: 水稻

Figure 1 Phylogenetic relationship among HD-Zip III genes

Pp: *Physcomitrella patens*; Pg: *Picea glauca*; Pta: *Pinus taeda*; Ptr: *Populus trichocarpa*; At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*

The access number of gene sequence in NCBI: PpHB10 (DQ657200); PpHB11 (DQ657201); PpHB12 (DQ657202); PpHB13 (DQ657203); PpHB14 (DQ657204); PgHB3 (HQ391914); PgHB4 (HQ391915); PgHB5 (HQ391916); PgHB6 (HQ391917); PtaHDZ31 (DQ657210); PtaHDZ32 (DQ657211); PtaHDZ33 (DQ657212); PtaHDZ34 (DQ657213); PtaHDZ35 (DQ657214); PtrHB1 (AY919616); PtrHB2 (AY919617); PtrHB3 (AY919618); PtrHB4 (AY919619); PtrHB5 (AY919620); PtrHB6 (AY919621); PtrHB7 (AY919622); PtrHB8 (AY919623); REV (NM_125462); PHV/AtHB9 (NM_102785); PHB/AtHB14 (NM_129025); CNA/AtHB15 (NM_001084233); AtHB8 (NM_119441); OsHB1 (NM_001055242); OsHB2 (NM_001071408); OsHB3 (NM_001073792); OsHB4 (NM_001057280); OsHB5 (AB374207)

式和功能。目前对于被子植物HD-Zip III的研究比较深入。下文将着重介绍被子植物HB族群中各个成员的

结构特点和功能，解析HD-Zip III基因在植物生长发育过程中的作用。

2 HD-Zip III蛋白结构

HD-Zip III蛋白包含4个结构域,从N端到C端依次是同源异型结构域(Homeodomain, HD)、亮氨酸拉链结构域(leucine-zipper domain, Zip)、START结构域(steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer)和MEKHLA结构域(图2)。HD结构域由高度保守的60或61个氨基酸残基组成,能够结合特异的DNA序列,调控靶基因表达。Zip结构域形成同源或异源二聚体并行行使功能。START结构域被预测为脂质/类固醇结合受体,它在进化中高度保守(Ponting and Aravind, 1999; Schrick et al., 2004)。有关在动物中含有START结构域蛋白报道较多,不少脂质配体已被鉴定。在植物中,只有PYR (PYRABACTIN RESISTANCE)蛋白的START结构域可以与脱落酸(ABA)结合,起到ABA受体的作用(Park et al., 2009)。另外,HD-Zip III亚家族蛋白的羧基末端都含有一段MEKHLA序列,这一序列以6个高度保守的氨基酸命名,分别为氨基酸Met、Glu、Lys、His、Leu和Ala。MEKHLA结构域与PAS(Per-ARNT-Sim)结构域具有较高的相似性(Mukherjee and Burglin, 2006)。PAS结构域在生物界普遍存在,其功能可能与外界信号接收与传递有关(Möglich et al., 2009; McIntosh et al., 2010)。有报道显示,HD-Zip III蛋白的MEKHLA结构域通过结合信号分子,改变HD-Zip

III蛋白构象,从而解除其它信号对HD-Zip III形成二聚体的抑制,起到调控HD-Zip III转录激活作用(Magnani and Barton, 2011)。但这一细胞信号尚待进一步鉴定。

3 HD-Zip III基因功能

由于结构高度保守,HD-Zip III转录因子在功能上表现出普遍的冗余性。拟南芥5个成员的缺失突变体只有*rev*出现表型变化。Prigge等(2005)通过构建多重突变体发现,HD-Zip III家族成员在拟南芥发育过程中扮演着重叠、拮抗或者完全相反的作用。同时,对HD-Zip III显性突变体的研究表明,HD-Zip III基因家族在植物胚胎及胚后形态发生(顶端分生组织及侧生分生组织的形成)、侧生器官极性建立和维管组织细胞分化等方面扮演着重要角色(图3)。

3.1 调控胚胎形态发生

胚胎形态发生是从受精卵发育成多细胞个体的过程。在被子植物中,随着胚胎形态的建成,植株轴向(如近远轴、顶基轴等)随之建立,主要组织雏形(如顶端分生组织、维管组织)逐步形成,为进一步发育成植物个体提供基础。

在拟南芥胚胎发育过程中,REV、PHB、PHV和CNA首先在球形胚的顶端中部表达。到了心形胚阶

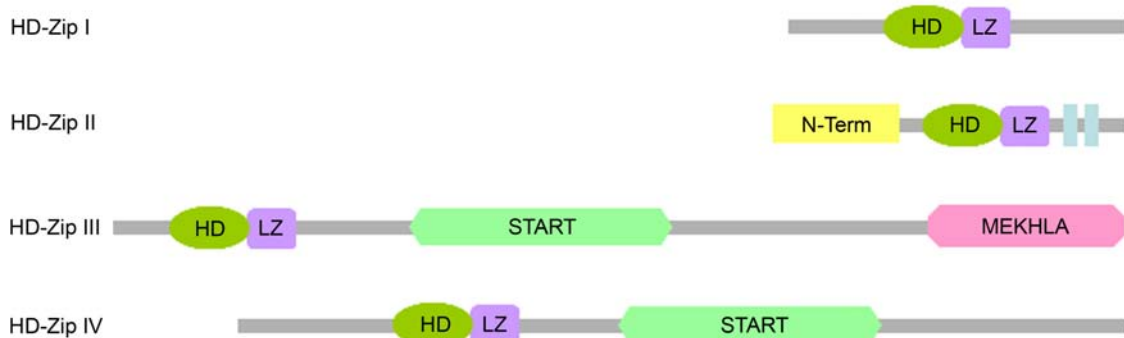


图2 HD-Zip家族蛋白结构

HD: 同源异型框; LZ: 异亮氨酸拉链域; N-Term: N末端一致序列; START: 脂质/类固醇结合受体; MEKHLA: 较保守的MEKHLA序列

Figure 2 Schematic representation of the distinctive features exhibited by each HD-Zip subfamily

HD: Homeodomain; LZ: Leucine-zipper; N-Term: N-terminus consensus; START: Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain; MEKHLA: Named after the highly conserved amino acids Met, Glu, Lys, His, Leu, Ala

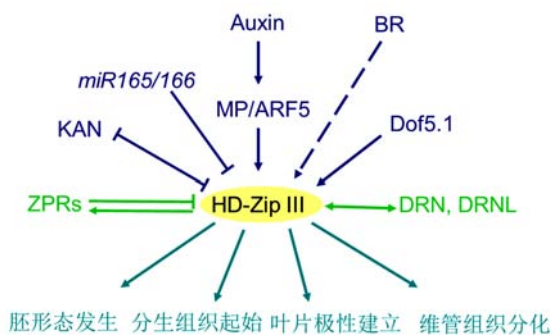


图3 HD-Zip III的功能及调控网络

Figure 3 Summary of HD-Zip III functions and its regulation network

段, *REV*、*PHB*和*PHV*在子叶的近轴侧及原维管束的中心部位表达(McConnell et al., 2001; Emery et al., 2003); *CNA*的表达则不具有明显的区域性(Ilegems et al., 2010)。 *AtHB8*在胚胎发育到心形胚时, 在维管组织中强烈表达(Baima et al., 1995)。 *HD-Zip III*在胚胎发育阶段的表达模式呈叠加性和互补性, 暗示这些基因存在一定程度的冗余, 同时各具特点。水稻同源基因具有与拟南芥相似的表达模式: *OsHB1-4*在胚胎的顶端及子叶的起始部位表达, 而与*AtHB8*同源的*OsHB5*在胚胎维管束形成后表达(Itoh et al., 2005, 2008), 暗示*AtHB8/OsHB5*可能与维管组织分化关系更紧密。

在拟南芥中, *REV*、*PHB*、*PHV*和*CNA*在胚胎发育各时期均有表达, 但各个基因的单一缺失突变体都未显示胚胎发育缺陷的表型。Prigge等(2005)发现拟南芥*rev phb*双重缺失突变体胚胎顶端被一辐射对称结构所取代, 幼苗缺失顶端分生组织, 原本的2片子叶被一呈辐射对称式棒状结构所取代。此外, *rev phb phv*和*rev phb cna*三突变体进一步增强了*rev phb*的胚胎发育缺陷表型。遗传学分析表明, *REV*、*PHB*、*PHV*和*CNA*在胚胎发生过程中协同调控顶端分生组织和顶端两侧对称。

Smith和Long (2010)将*REV*、*PHB*和*CNA*异位过量表达在根的起始区, 发现根被第2个茎组织所取代, 进一步证明了*HD-Zip III*在胚胎发育时期对顶部组织形成的决定作用。

3.2 调控顶端分生组织形成

植物生长主要依赖于顶端分生组织细胞的分裂与分化。顶端分生组织包括茎顶端分生组织(shoot apical meristem, SAM)和根顶端分生组织(root apical meristem, RAM), 茎顶端分生组织可分化为叶原基(leaf primordia)和花原基(flower primordia)。在拟南芥和水稻中, 除*AtHB8*和*OsHB5*, 其它的*HD-Zip III*基因都在顶端分生组织、叶原基、花原基和侧根原基处表达(Williams et al., 2005)。在拟南芥中, *rev*突变体叶腋缺失分生组织, 分枝显著减少, 花结构发育不全且不育, 表明*REV*在茎顶端分生组织的形成过程中起着重要作用(Talbert et al., 1995; Otsuga et al., 2001)。 *phb*和*phv*都能进一步强化*rev*单突变的表型, 说明三者顶端分生组织形成中起协同作用。*cna*、*athb8*与*rev*形成三重突变时, 出现了比*rev*单突变更多的侧枝和可育的花, 说明*CNA*和*AtHB8*与*REV*在茎顶端分生组织形成过程中可能相互拮抗(Prigge et al., 2005)。在根顶端分生组织发育过程中, *phb phv rev*三重缺失突变体产生较少的侧根, 而显性突变体*rev-10d*则产生更多的侧根, 说明*REV*、*PHB*和*PHV*同时促进根顶端分生组织的形成, 在根的发育过程中起协同作用(Hawker and Bowman, 2004)。

3.3 调控叶片极性建立

被子植物叶片呈背腹性分化的平坦结构, 其叶肉细胞在背面(近轴面)为排列紧密的栅栏组织, 在腹面(远轴面)为松散的海绵组织。在叶脉维管束中, 负责水分和无机盐运输的木质部靠近叶片背面一侧; 负责有机物运输的韧皮部则靠近腹面一侧。背腹性在叶原基的确立需要一系列位置信息的产生和感应机制。

*HD-Zip III*基因在叶原基的近轴一侧强烈表达, 表明它们在叶片起始时对叶片近远轴极性建立发挥着作用。拟南芥*REV*的显性突变体*rev-10d/avb1*和*PHB*显性突变体*phb-1d*在叶的形态上具有非常显著的表型特征: 叶子出现不同程度的近轴面化, 产生了喇叭状叶、棒状叶和更为严重的针状叶; 切片观察显示这些叶片的维管结构呈木质部包围韧皮部的近轴面化模式(McConnell and Barton, 1998; Emery et al., 2003; Zhong and Ye, 2004)。以上研究结果进一步证实了这类基因对叶片极性建立至关重要。*CNA*的

显性突变体 *icu4-1* 在极性上的缺陷不如 *PHB* 和 *REV* 的显性突变体明显, 只是叶片出现了上卷, 叶片维管结构未见明显变化 (Ochando et al., 2006)。同时拟南芥 *REV* 缺失突变体 *rev-1* 叶片变大并下卷, 解剖观察结果显示叶肉细胞和维管束细胞明显增多, 且近轴面的细胞数量和体积增多增大的现象更为显著 (Talbert et al., 1995)。双重缺失突变体 *rev phv* 出现喇叭状叶, 且远轴面的特性出现在叶片的近轴面。三重缺失突变体 *rev phb/+phv* 的叶片几乎全部呈喇叭状并且远轴面化加剧 (Prigge et al., 2005)。上述显性突变体与缺失突变体表型呈现相反的现象充分说明 *HD-Zip III* 基因对叶片的极性建立起到调控作用。到目前为止, 人们还未能明晰地解释 *HD-Zip III* 基因如何影响叶片极性的建立。

3.4 调控维管组织细胞分化

维管组织是陆生植物主要特征结构, 提供植物向上生长的机械支撑, 同时运输水分、营养物质及一些信号分子。维管束由3种有序排列的组织组成: 木质部、原形成层 (procambium) / 形成层和韧皮部。

在拟南芥、水稻和毛果杨中, *HD-Zip III* 基因在根、茎和叶的维管束中均强烈表达。精细定位发现拟南芥中的5个 *HD-Zip III* 基因在原形成层细胞和木质部细胞中特异表达 (Zhong and Ye, 1999; Kang and Dengler, 2002)。显性突变体 *rev-10d/avb1* 和 *phb-1d* 整个植株维管组织发生了剧烈变化, 出现木质部包围韧皮部且维管束数目显著增多的现象 (McConnell et al., 2001; Zhong and Ye, 2004)。*REV* 缺失突变体茎秆维管束出现异常: 在 *Col* (Columbia) 生态型背景下 *ifl1* 的束间纤维细胞缺失, 植株倒伏 (Zhong and Ye, 1999); 在 *Ler* (Landsberg erecta) 生态型背景下 *rev-1* 茎秆皮层、木质部和韧皮部细胞增多, 形成层细胞区域扩大 (Talbert et al., 1995)。而 *CNA* 显性突变体 *icu4-1* 出现木质部、形成层和韧皮部细胞增多的现象 (Ochando et al., 2006)。这表明 *CNA* 在维管组织发育过程中的作用与 *REV* 相反。Baima 等 (2001) 在拟南芥中过量表达 *AtHB8*, 只出现木质部细胞增多的现象, 暗示 *AtHB8* 可能在功能上有别于其它几个成员, 专一调控木质部的发育。双重缺失突变体 *rev phb* 和 *rev phv* 均加剧了 *rev* 维管发育缺陷表型, 而 *rev cna athb8* 三重突变体部分抑制了 *rev* 维管发育缺陷表型 (Prigge

et al., 2005)。这些研究表明, *REV*、*PHB* 和 *PHV* 与 *CNA* 和 *AtHB8* 在拟南芥茎维管组织发育中的功能可能是相互拮抗的。拟南芥根中, 5个 *HD-Zip III* 基因在除韧皮部细胞以外的维管束各类细胞中均有表达, 包括原形成层细胞、木质部前体细胞 (xylem precursor cells)、原生木质部细胞 (protoxylem cells) 和后生木质部细胞 (metaxylem cells)。*athb8 phb* 和各种三重缺失突变体的后生木质部细胞被异位产生的原生木质部细胞所取代。四重缺失突变体几乎无后生木质部细胞产生, 而五基因同时缺失则完全无木质部产生。这一结果表明 *HD-Zip III* 基因决定木质部产生, 同时不同表达量决定形成不同类型的木质部细胞 (Carlsbecker et al., 2010)。

木本植物的维管系统发育有别于草本植物。木本植物在初生维管系统基础上, 维管形成层 (vascular cambium) 保持长久的干细胞活性, 持续地向外分化形成次生韧皮部组织, 向内分化形成次生木质部组织。我们研究发现, *PtHB7* 在杨树次生木质部的分化调控中起重要作用。另有研究表明, 杨树中分别与 *REV* 和 *CNA* 同源的 *PtHB2* 和 *PtHB6* 影响杨树初生和次生木质部的发育。*PtHB2* 过量表达植株产生异位的形成层和木质部细胞, 可能调控形成层的起始。过量表达 *PtHB6* 抑制次生木质部和韧皮部纤维细胞的木质化, 表明其对次生维管组织发育起负调控作用 (Du et al., 2011; Robischon et al., 2011)。

4 HD-Zip III 与其它信号因子的相互作用

作为一类重要的转录因子, *HD-Zip III* 在各个层次受到精确调控 (图3), 同时 *HD-Zip III* 准确地启动或者抑制下游因子的表达, 从而使其作用得到完好发挥。

4.1 转录水平的调控

4.1.1 HD-Zip III 与 KAN 之间的调控

KANADI (*KAN*) 是2001年被发现的一类 GPR 转录因子。在拟南芥中其 mRNA 在器官的远轴面的一侧特异地积累, 通过对其缺失突变体 *kan* 的分析发现 *KAN* 对远轴面的建成起促进作用 (Kerstetter et al., 2001)。*KAN* 组织定位及缺失表型都与 *HD-Zip III* 相反, 暗示这两类因子间存在拮抗作用。*REV* 显性突变体 *rev-10d* 的发现初步揭示了这两类因子间的关系。在

*rev-10d*中由于*REV*的过量表达出现了木质部包围韧皮部的维管束,而*KAN*三基因缺失突变体*kan1 kan2 kan3*出现了同样的表型(Emery et al., 2003; Hawker and Bowman, 2004)。这一现象充分说明了*KAN*家族与*HD-Zip III*家族在维管束的发育过程中作用相反。到目前为止,人们尚不清楚这两类因子相互影响的机制。因为*KAN*的组织定位与*HD-Zip III*的mRNA定位是不完全重合的,所以它们之间可能不存在直接的相互作用(Izhaki and Bowman, 2007)。有报道显示某些转录因子在形成蛋白质后可以在细胞间移动(Yadav et al., 2011)。*KAN*和*HD-Zip III*蛋白是否也具有移动性,从而可以直接在转录水平调控彼此的表达呢?这还需要进一步研究解析。

4.1.2 生长素对*HD-Zip III*基因的调控

早在1995年,人们就发现拟南芥*HD-Zip III*的一个成员*AtHB8*转录受到生长素的诱导(Baima, 1995)。研究表明,在*REV*缺失突变体*ifl1*中生长素的极性运输能力急剧下降(Zhong and Ye, 2001)。同时,在水稻中外源施加生长素导致*HD-Zip III*家族基因的表达在空间上发生扩展(Itoh et al., 2008)。这些结果都暗示了*HD-Zip III*在转录水平上与生长素关系密切。在*HD-Zip III*缺失突变体中,生长素转运蛋白PIN1的定位发生异常。*phb phv rev*三突变体发育至心形胚时,PIN1的定位从正常的两侧表达模式变成了辐射对称模式,生长素的分布极性发生变化,形成单一生长素富集区域,结果产生单个辐射对称的子叶(Izhaki and Bowman, 2007)。Donner(2009)通过观察*athb8*叶脉系统阐明了*HD-Zip III*与生长素的确切关系。他们发现生长素响应因子MONOPTEROS(MP)可以结合*AtHB8*启动子中生长素响应元件直接调控*AtHB8*表达。这种直接调控关系是否普遍适用于*HD-Zip III*家族其它成员和其它组织器官的发育过程,*HD-Zip III*与生长素的运输又有怎样的关系,还需要更多的研究阐明。

4.1.3 Dof转录因子对*HD-Zip III*的调控

最近,研究人员经筛选发现一个与*HD-Zip III*基因过量表达叶片上卷相似表型的突变体。这一突变体是由Dof转录因子家族*Dof5.1*过量表达引起的。在这一基因过量表达的植株中,*REV*和*CNA*发生了表达上调。

进一步的研究发现在*REV*的启动子上存在Dof家族的结合元件,从而推测*Dof5.1*可能结合*REV*的启动子元件发挥作用。这一推测得到了体外和体内实验验证。但是在*CNA*的启动子中并没有发现相同或相似的结合元件。*Dof5.1*调控*HD-Zip III*基因的机制还有待进一步研究(Kim et al., 2010)。

4.1.4 microRNA对*HD-Zip III*表达的调控

microRNA165/166对*HD-Zip III*的调控作用研究得最为清楚。拟南芥基因组含有2个miR165前体和7个miR166前体,与拟南芥*HD-Zip III*转录本的一段保守区有近乎完美的互补性(Floyd and Bowman, 2004)。miR165/166的发现很好地解释了为什么几乎所有*HD-Zip III*基因显性突变体的突变位点都是在这段序列中。改变*REV*和*PHB* mRNA但不改变相应蛋白序列的转基因拟南芥,获得了与显性突变体同样的表型,证明*HD-Zip III* mRNA受到microRNA调控(Emery et al., 2003)。同时在烟草中筛选分离到一个*NsPHAV*(拟南芥*PHV*同源基因)的显性突变体*phv1*,该单碱基突变发生在microRNA结合位点,但并未导致编码氨基酸序列的变化。*phv1*引起叶片极性、维管束模式及多种分生组织发育的变化,表明microRNA通过调控*HD-Zip III*基因影响植物发育。杂交杨*PtaHB1*与次生生长期密切相关,其表达水平随着杨树发育阶段和季节变化而不同,且与miR166水平呈负相关,表明在多年生植物中,microRNA通过负调控*PtaHB1*来影响生长发育进程(Ko et al., 2006)。microRNA负调控*HD-Zip III*的机理很好地解释了为什么过表达*HD-Zip III*家族基因没有表型的变化。但例外的是过表达*AtHB8*诱导产生更多的木质部(Baima et al., 2001),这种过表达的表型可能反映了microRNA与目的转录本间存在剂量依赖型作用模式。这一推测在2010年得到了进一步证实:拟南芥根中高剂量的*HD-Zip III*形成后生木质部(metaxylem),而低剂量时形成原生木质部(protoxylem)。这要求*HD-Zip III*在中柱鞘维持低剂量的状态,而在中心具有高浓度状态的分布梯度。这一分布梯度的形成直接依赖于miR165/166的调控。miR165/166可以从皮层向中柱移动,从而不同程度地切割*HD-Zip III*的mRNA使其形成浓度梯度(Carlsbecker et al., 2010)。

4.2 DNA水平的调控

Bao等(2004)发现microRNA作用于*PHB*转录本不仅能导致其降解,同时能引起相应*PHB*模板DNA甲基化。高度甲基化常常伴随染色质的转录活性降低。miR165/166介导的降解作用使得*HD-Zip III*转录本快速失活,而其后发生的甲基化能够使*HD-Zip III*基因保持在受抑制状态。研究表明,microRNA能够在转录过程中和转录后两个水平上调控*HD-Zip III*基因的表达。

4.3 蛋白水平的调控

Wenkel等(2007)首先鉴定出一种包含亮氨酸拉链的蛋白小家族(LITTLE ZIPPER proteins, ZPR),与*HD-Zip III*中的Zip结构域相似。实验证实ZPR蛋白在体外与REV相互作用,同时过量表达ZPRs出现与*HD-Zip III*功能缺失相一致的表型。说明ZPRs与*HD-Zip III*蛋白形成非功能型的异源二聚体,通过竞争抑制*HD-Zip III*与目的DNA结合的方式调控*HD-Zip III*通路。Kim等(2008)通过观察ZPRs缺失突变体茎顶端分生组织发育状况,证明*HD-Zip III*能正向调控ZPRs的表达,说明*HD-Zip III*与ZPRs形成反馈环调控植物的发育。

DORNRÖSCHEN(DRN)和DRN-LIKE(DRNL)蛋白被证明与*HD-Zip III*相互作用,协同调控胚胎的发育。DRN和DRNL都属于包含AP2结构域的蛋白家族。在*drn*和*drnl*的缺失突变体中都发现了胚胎发育异常现象,常常出现针状子叶或子叶缺失的表型。且*drn phv*双突变体增加了*drn*单突变体缺失表型的比例。同时,酵母双杂交、免疫共沉淀和双分子荧光互补实验都证明DRN和PHV之间存在相互作用,这种相互作用同样适用于*HD-Zip III*的其它成员(Chandler et al., 2007)。

4.4 HD-Zip III的下游因子

*HD-Zip III*作为一类转录因子,必定能够直接调控其它因子。在体外实验中发现PHV对回文序列GTAAT(G/C)ATTAC具有高亲和力,表明其调控基因结合位点可能包含这段序列(Sessa et al., 1998)。Magnani和Barton(2011)在*ZPR3*的启动子上发现了上述回文序列,并且在烟草表皮细胞中观察到REV与*ZPR3*启动子具有相互作用。Brandt等(2012)利用ChIP-seq

(chromatin immunoprecipitation)在拟南芥的全基因组范围内搜索确定REV的结合DNA序列(ATG/CAT),发现REV通过直接调控生长素合成途径的2个关键酶TAA1 (TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF-ARABIDOPSIS1)和YUCCA5发挥作用。

5 HD-Zip III与陆生植物的进化

*HD-Zip III*转录因子家族在低等植物(苔藓)以及高等植物(拟南芥、水稻、杨树等)中普遍存在(Aso et al., 1999)。球蒴藓*PpHB10*与拟南芥5个家族成员的同源性都在50%以上(Sakakibara et al., 2001),而其功能涉及植物生长发育和形态建成的诸多重要方面,预示着*HD-Zip III*转录因子家族在陆生植物进化中具有重要作用。从结构上看,*HD-Zip III*基因家族高度保守,均具有4个保守结构域。目前发现的所有*HD-Zip III*转录本均存在与miR165/166互补的序列,说明这一水平的调控在陆生植物中高度保守(Floyd and Bowman, 2004)。如前所述,*HD-Zip III*调控某一功能时往往由多个成员共同参与、协同作用,导致只要缺失其中一个成员就不出现表型变化(*rev*除外),这种功能上的冗余反映了成员间较强的保守性。

植物基因组存在大量的重复基因(duplication gene),拟南芥有近65%的基因以基因家族的形式存在。基因复制是物种进化的主要基因“原材料”,因为冗余的同源基因承受更小的选择压,所以比非冗余基因更容易进化出新功能(Ohno, 1970)。*HD-Zip III*虽然在进化上高度保守,但是它们的功能并不等同。将拟南芥*HD-Zip III*家族的5个基因连接REV的启动子(P_{REV})转化*rev*突变体,结果显示只有 $P_{REV}:REV$ 能够恢复缺失表型,其它4个基因均不能完全恢复(Prigge et al., 2005)。这5个基因功能的分化预示着*HD-Zip III*家族蛋白在进化中功能域的改变。为研究早期*HD-Zip III*的功能,Prigge和Clark(2006)将球蒴藓*PpHB10*基因连接REV的启动子转化*rev*突变体,结果显示*PpHB10*不能恢复*rev*分生组织和叶片发育的缺陷,但能引起茎皮层组织的过度分裂。这一现象从未在*HD-Zip III*功能缺失和显性突变体中出现过,表明*HD-Zip III*在进化过程中功能发生了变化。拟南芥*AtHB8*在胚胎发育时期和幼苗期特异地在维管组织中表达,而其它4个基因的表达几乎伴随着整个植株

发育过程。这说明*AtHB8*可能在进化过程中发生了功能上的特化,专一地促进木质部分化(Baima et al., 2001)。在木质部发育十分旺盛的木本植物毛果杨中,存在2个与*AtHB8*较为同源的基因:*PtHB7*和*PtHB8*,二者同源性高达95%。我们对*PtHB7*作了较为系统的研究,发现它参与调控次生木质部的分化(Zhu et al., 2013)。

6 总结与展望

*HD-Zip III*基因家族在进化上的保守性表明其在植物发育中具有重要作用,这些作用涉及植物生长发育的许多重要方面。*HD-Zip III*各成员的功能存在冗余但并不等同,在植物不同组织、不同发育时期,它们起着协同、拮抗或完全不同的作用。这种复杂的作用方式可能涉及各成员间的互作,需要运用遗传学与分子生物学手段进一步阐明。各基因的时空表达差异暗示它们可能受到多种机制的调控。microRNA在转录中及转录后两个水平上调控是研究最多且最清楚的一种方式,而miR165/166调控*HD-Zip III*家族的保守性又证明了*HD-Zip III*的功能在进化上是保守的。由于存在保守的START结构域,*HD-Zip III*可能受到脂质信号分子的调控,是否存在这一配体有待进一步验证。

研究表明,BR能够诱导原形成层细胞分裂分化产生木质部(Caño-Delgado et al., 2004)。Ohashi-Ito等(2002, 2003)利用百日草(*Zinnia elegans*)悬浮细胞系研究发现,BR能够诱导木质部细胞*HD-Zip III*的表达,因此*HD-Zip III*可能通过响应BR信号转导在维管发育过程中发挥作用。但是并没有研究显示BR信号转导途径中的某个元件直接作用于*HD-Zip III*,这种间接的调控作用尚待研究。*HD-Zip III*作为一类转录因子,必然通过调控下游基因表达来实现功能。到目前为止,只鉴定出少数几类因子受到*HD-Zip III*的直接调控,且尚不能完全阐明*HD-Zip III*的调控机制。因此,有必要进一步分析鉴定*HD-Zip III*调控的下游基因,从而更深入阐明其在植物发育中的功能。

参考文献

Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL (2007). The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci* **12**, 419–426.

Aso K, Kato M, Banks JA, Hasebe M (1999). Characterization of homeodomain-leucine zipper genes in the fern *Ceratopteris richardii* and the evolution of the homeodomain-leucine zipper gene family in vascular plants. *Mol Biol Evol* **16**, 544–552.

Baima S, Nobili F, Sessa G, Lucchetti S, Ruberti I, Morelli G (1995). The expression of the Athb-8 homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**, 4171–4182.

Baima S, Possenti M, Matteucci A, Wisman E, Altamura MM, Ruberti I, Morelli G (2001). The Arabidopsis ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiol* **126**, 643–655.

Bao N, Lye KW, Barton MK (2004). MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev Cell* **7**, 653–662.

Brandt R, Salla-Martret M, Bou-Torrent J, Musielak T, Stahl M, Lanz C, Ott F, Schmid M, Greb T, Schwarz M, Choi SB, Quint M, Palauqui JC, Martínez-García JF, Wenkel S (2012). Genome-wide binding-site analysis of REVOLUTA reveals a link between leaf patterning and light-mediated growth responses. *Plant J* **72**, 31–42.

Caño-Delgado A, Yin YH, Yu C, Vafeados D, Mora-García S, Cheng JC, Nam KH, Li JM, Chory J (2004). BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis. *Development* **131**, 5341–5351.

Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S, Campilho A, Sebastian J, Bowman JL, Helariutta Y, Benfey PN (2010). Cell signaling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* **465**, 316–321.

Chandler JW, Cole M, Flier A, Grewe B, Werr W (2007). The AP2 transcription factors DORNROSCHE and DORNROSCHE-LIKE redundantly control Arabidopsis embryo patterning via interaction with PHAVOLUTA. *Development* **134**, 1653–1662.

Côté CL, Boileau F, Roy V, Ouellet M, Levasseur C, Morency MJ, Cooke JE, Séguin A, MacKay JJ (2010). Gene family structure, expression and functional analysis of *HD-Zip III* genes in angiosperm and gymnosperm forest trees. *BMC Plant Biol* **10**, 273.

Donner TJ, Sherr I, Scarpella E (2009). Regulation of preprocambial cell state acquisition by auxin signaling in

- Arabidopsis leaves. *Development* **136**, 3235–3246.
- Du J, Miura E, Robischon M, Martinez C, Groover A** (2011). The *Populus* Class III HD ZIP transcription factor *POPCORONA* affects cell differentiation during secondary growth of woody stems. *PLoS One* **6**, e17458.
- Elhiti M, Stasolla C** (2009). Structure and function of homodomain-leucine zipper (HD-Zip) proteins. *Plant Signal Behav* **4**, 86–88.
- Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL** (2003). Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol* **13**, 1768–1774.
- Floyd SK, Bowman JL** (2004). Gene regulation: ancient microRNA target sequences in plants. *Nature* **428**, 485–486.
- Floyd SK, Zalewski CS, Bowman JL** (2006). Evolution of class III homeodomain-leucine zipper genes in streptophytes. *Genetics* **173**, 373–388.
- Hawker NP, Bowman JL** (2004). Roles for Class III HD-Zip and KANADI genes in Arabidopsis root development. *Plant Physiol* **135**, 2261–2270.
- Ilegems M, Douet V, Meylan-Bettex M, Uyttewaal M, Brand L, Bowman JL, Stieger PA** (2010). Interplay of auxin, KANADI and Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation. *Development* **137**, 975–984.
- Itoh JI, Hibara KI, Sato Y, Nagato Y** (2008). Developmental role and auxin responsiveness of Class III homeodomain leucine zipper gene family members in rice. *Plant Physiol* **147**, 1960–1975.
- Itoh JI, Nonomura KI, Ikeda K, Yamaki S, Inukai Y, Yamagishi H, Kitano H, Nagato Y** (2005). Rice plant development: from zygote to spikelet. *Plant Cell Physiol* **46**, 23–47.
- Izhaki A, Bowman JL** (2007). KANADI and class III HD-Zip gene families regulate embryo patterning and modulate auxin flow during embryogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 495–508.
- Kang J, Dengler N** (2002). Cell cycling frequency and expression of the homeobox gene *ATHB-8* during leaf vein development in Arabidopsis. *Planta* **216**, 212–219.
- Kerstetter RA, Bollman K, Taylor RA, Bomblies K, Poethig RS** (2001). *KANADI* regulates organ polarity in Arabidopsis. *Nature* **411**, 706–709.
- Kim HS, Kim SJ, Abbasi N, Bressan RA, Yun DJ, Yoo SD, Kwon SY, Choi SB** (2010). The DOF transcription factor Dof5.1 influences leaf axial patterning by promoting *Revoluta* transcription in Arabidopsis. *Plant J* **64**, 524–535.
- Kim YS, Kim SG, Lee M, Lee I, Park HY, Seo PJ, Jung JH, Kwon EJ, Suh SW, Paek KH, Park CM** (2008). HD-ZIP III activity is modulated by competitive inhibitors via a feedback loop in Arabidopsis shoot apical meristem development. *Plant Cell* **20**, 920–933.
- Ko JH, Prassinis C, Han KH** (2006). Developmental and seasonal expression of *PtaHB1*, a *Populus* gene encoding a class III HD-Zip protein, is closely associated with secondary growth and inversely correlated with the level of microRNA (*miR166*). *New Phytol* **169**, 469–478.
- Magnani E, Barton MK** (2011). A per-ARNT-sim-like sensor domain uniquely regulates the activity of the homeodomain leucine zipper transcription factor *REVOLUTA* in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**, 567–582.
- McConnell JR, Barton MK** (1998). Leaf polarity and meristem formation in Arabidopsis. *Development* **125**, 2935–2942.
- McConnell JR, Emery J, Eshed Y, Bao N, Bowman J, Barton MK** (2001). Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature* **411**, 709–713.
- McIntosh BE, Hogenesch JB, Bradfield CA** (2010). Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annu Rev Physiol* **72**, 625–645.
- Möglich A, Ayers RA, Moffat K** (2009). Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* **17**, 1282–1294.
- Mukherjee K, Burglin TR** (2006). MEKHLA, a novel domain with similarity to PAS domains, is fused to plant homeodomain-leucine zipper III proteins. *Plant Physiol* **140**, 1142–1150.
- Ochando I, Jover-Gil S, Ripoll JJ, Candela H, Vera A, Ponce MR, Martinez-Laborda A, Micol JL** (2006). Mutations in the microRNA complementarity site of the *INCURVATA4* gene perturb meristem function and adaxialize lateral organs in Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**, 607–619.
- Ohashi-Ito K, Fukuda H** (2003). HD-Zip III homeobox genes that include a novel member, *ZeHB-13* (*Zinnia*)/*ATHB-15* (Arabidopsis), are involved in procambium and xylem cell differentiation. *Plant Cell Physiol* **44**, 1350–1358.
- Ohashi-Ito K, Demura T, Fukuda H** (2002). Promotion of transcript accumulation of novel *Zinnia* immature xylem-specific HD-Zip III homeobox genes by brassinosteroids. *Plant Cell Physiol* **43**, 1146–1153.
- Ohno S** (1970). Evolution by Gene Duplication. London, New York, Allen & Unwin: Springer-Verlag.

- Otsuga D, DeGuzman B, Prigge MJ, Drews GN, Clark SE** (2001). *REVOLUTA* regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J* **25**, 223–236.
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR** (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**, 1068–1071.
- Ponting CP, Aravind L** (1999). START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signaling proteins. *Trends Biochem Sci* **24**, 130–132.
- Prigge MJ, Clark SE** (2006). Evolution of the class III HD-Zip gene family in land plants. *Evol Dev* **8**, 350–361.
- Prigge MJ, Otsuga D, Alonso JM, Ecker JR, Drews GN, Clark SE** (2005). Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in Arabidopsis development. *Plant Cell* **17**, 61–76.
- Robischon M, Du J, Miura E, Groover A** (2011). The *Populus* class III HD ZIP, *popREVOLUTA*, influences cambium initiation and patterning of woody stems. *Plant Physiol* **155**, 1214–1225.
- Sakakibara K, Nishiyama T, Kato M, Hasebe M** (2001). Isolation of homeodomain-leucine zipper genes from the moss *Physcomitrella patens* and the evolution of homeodomain-leucine zipper genes in land plants. *Mol Biol Evol* **18**, 491–502.
- Schena M, Davis RW** (1992). HD-Zip proteins: members of an Arabidopsis homeodomain protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3894–3898.
- Schrick K, Nguyen D, Karlowski WM, Mayer KF** (2004). START lipid/sterol-binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors. *Genome Biol* **5**, R41.
- Sessa G, Steindler C, Morelli G, Ruberti I** (1998). The Arabidopsis *Athb-8*, *-9* and *-14* genes are members of a small gene family coding for highly related HD-ZIP proteins. *Plant Mol Biol* **38**, 609–622.
- Smith ZR, Long JA** (2010). Control of Arabidopsis apical-basal embryo polarity by antagonistic transcription factors. *Nature* **464**, 423–426.
- Talbert PB, Adler HT, Parks DW, Comai L** (1995). The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**, 2723–2735.
- Wenkel S, Emery J, Hou BH, Evans MMS, Barton MK** (2007). A feedback regulatory module formed by LITTLE ZIPPER and HD-ZIP III genes. *Plant Cell* **19**, 3379–3390.
- Williams L, Grigg SP, Xie MT, Christensen S, Fletcher JC** (2005). Regulation of Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA *miR166g* and its *AtHD-ZIP* target genes. *Development* **132**, 3657–3668.
- Yadav RK, Perales M, Gruel J, Girke T, Jonsson H, Reddy GV** (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes Dev* **25**, 2025–2030.
- Zhong RQ, Ye ZH** (1999). *IFL1*, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in Arabidopsis, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell* **11**, 2139–2152.
- Zhong RQ, Ye ZH** (2001). Alteration of auxin polar transport in the Arabidopsis *ifl1* mutants. *Plant Physiol* **126**, 549–563.
- Zhong RQ, Ye ZH** (2004). *Amphivasal vascular bundle 1*, a gain-of-function mutation of the *IFL1/REV* gene, is associated with alterations in the polarity of leaves, stems and carpels. *Plant Cell Physiol* **45**, 369–385.
- Zhu Y, Song D, Sun J, Wang X, Li L** (2013). *PtHb7*, a class III HD-Zip gene, plays a critical role in regulation of vascular cambium differentiation in *Populus*. *Mol Plant* doi: 10.1093/mp/sss164.

HD-Zip III Transcription Factor and Cell Differentiation in Plants

Yingying Zhu, Liangliang Yu, Xingfen Wang, Laigeng Li*

National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics and Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract Cell differentiation, an essential process for multicellular organism development, is precisely regulated by a series of signals. The plant-specific transcription factor HD-Zip III plays critical roles in the process. Here, we review the *HD-Zip III* gene cluster and structure features and discuss the main functions of *HD-Zip III* genes during embryogenesis, apical meristem formation, leaf polarity and vascular differentiation. We summarize the regulation of *HD-Zip III* genes at different levels and discuss the relationship between *HD-Zip III* function and land plant evolution.

Key words cell differentiation, HD-Zip III, plant development, transcription factor

Zhu YY, Yu LL, Wang XF, Li LG (2013). HD-Zip III transcription factor and cell differentiation in plants. *Chin Bull Bot* **48**, 199–209.

* Author for correspondence. E-mail: lgli@sibs.ac.cn