

2. 花と葉の表面構造の違いについて partⅢ

静岡県立磐田南高等学校 理数科、生物部植物班

平野 靖也・栗田 直紀・澤 康一・鈴木 萌絵・山本 珠永

1. 動機・目的

平成 23 年度に走査型電子顕微鏡を用い、植物の花弁と葉の表面構造の観察を行った。花は葉より複雑な表面構造をもつと予想した。その結果、調べた 8 種の植物の内キキョウ以外では花弁と葉の表面構造が明確に違っており、花弁の表面には葉には見られない突起が並んでいることが分かった(図 1 (A) (B))。それに対し、キキョウでは、花弁の表面は比較的平坦であった(図 2 (A) (B))。

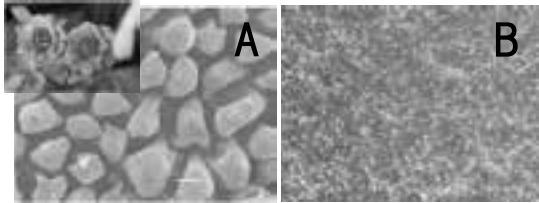


図 1. バラ(*Rosa* sp.): 花弁(A)と葉(B)

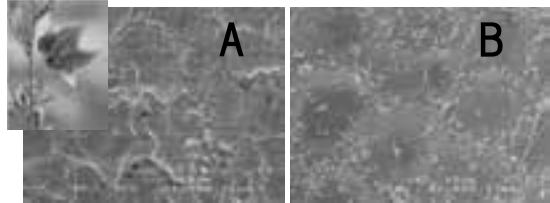


図 2. キキョウ(*Platycodon grandiflorus*): 花弁 (A)と葉(B)

被子植物の多くの花の花弁表面には、円錐状または乳頭状の突起があり(Kay *et al*, 1981), それが花弁を同定するマーカーになっている(Whitney *et al*, 2011). また、その突起の役割についての研究論文も多い。キンギョソウには MYB (myeloblastosis) 転写因子に分類され、花弁表面に突起を形成させるはたらきを持つ転写因子が複数存在する(Brockington *et al*, 2012)。私たちが注目したのは、*MIXTA* とよばれる遺伝子の突然変異体を用いた研究で、花弁表面のベルベットのような質感を失い、くすんだ花色になった突然変異体においては、正常個体に比べて、花粉媒介者である昆虫類の訪花率が低い(Glover & Martin, 1998)という研究結果である。この研究結果に基づき考察すると、花弁表面に突起を持っていないキキョウについて、「それで昆虫を誘引できるのか。また、何故突起を持っていないのか」という疑問が生じる。本研究ではこれらの疑問を解決するため、次の三つの目的を持ち、調査・研究を行った。

- (Ⅰ) 花弁の表面に突起を持たないキキョウが、花粉媒介者となる昆虫を誘引できるのか確かめる。
- (Ⅱ) 呼べるとしたら、突起の無いキキョウの何が昆虫を引きつけるのか調べる。
- (Ⅲ) キキョウが花弁表面に突起を持たないメカニズムを、遺伝子レベルで解析する。

2. 目的(Ⅰ)のための調査

(1) 方法

野外でキキョウの訪花昆虫調査を行った。ただし環境省レッドデータの絶滅危惧Ⅱ類に分類されていて野生での観察は困難だったため、周智郡森町の香勝寺の庭園で調査を行った。香勝寺には「桔梗寺」という別名があり、その庭園には 12 品種のキキョウが約 4 万株栽培されている。また、庭園は自然豊かな里山に囲まれている。そこで、香勝寺はキキョウの訪花昆虫を探すのに最適であると考えた。採集は行わず、種の同定は撮影した写真により行った。

(2) 結果

図 3 に示したように、合計で 9 科 10 属 11 種の昆虫のキキョウへの訪花を確認できた。

観察中に多くキキョウを訪花していたのは、クマバチ、ハラナガツチバチである。また、クマバチとハラナガツチバチは、キキョウの花が庭園内で全体的に少なくなった頃には桃色や白色のキキョウも訪れていたが、花盛りの時期には、紫色のキキョウばかりを訪れていた。

一方、ミツバチやコアオハナムグリは、白色のキキョウに多かった。

また、環境省のレッドデータリストに「情報不足」と分類されているナミルリモンハナバチを観察できたことは、注目に値する。静岡県のレッドデータに記載は無いが、都道府県別のレッドデータリストでは、5 つの府県でその名が挙げられている。

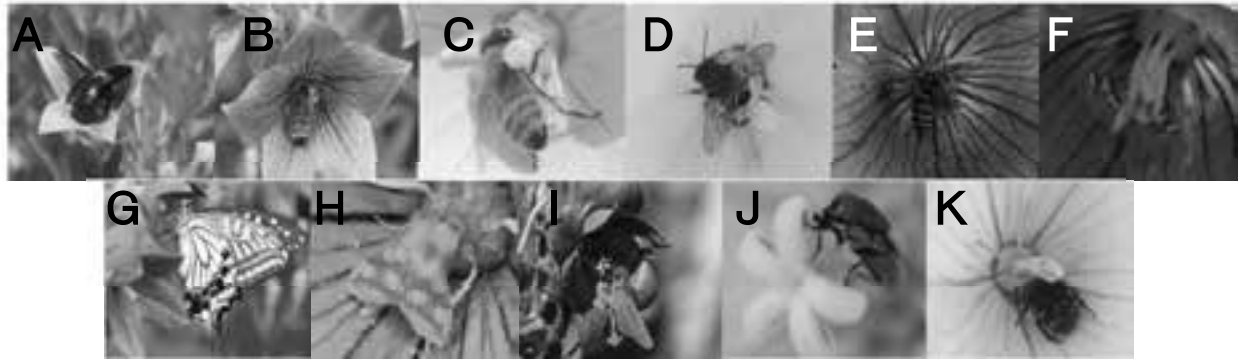


図3. 香勝寺で観察されたキキョウの訪花昆虫（9科10属11種）
 (A)クマバチ (*Xylocopa appendiculata circumvolans*) (B)ハラナガツチバチ (*Campsomeris schultzei*) (C)セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*)
 (D)ニホンミツバチ (*Apis cerana japonica*) (E)ナミルリモンハナバチ (*Thyreus decorus*) (F)ハイマダラノメイガ (*Hellula undalis*)
 (G)ナミアゲハ (*Papilio xuthus*) (H)ベニフキノメイガ (*Pyrausta panopealis*) (I)イチモンジセセリ (*Parnara guttata*)
 (J)ツマグロキンバエ (*Stomorphina obsoleta*) (K)コアオハナムグリ (*Gametis jucunda*)

(3) 考察

「花卉の表面に突起を持たないキキョウは、花粉媒介者となる昆虫を誘引できないのではない」という私たちの予想は覆された。写真の記録を取ることができたのは11種類だが、視認のみ行った他種も数種類あった。つまりキキョウの花は人工的な環境下とはいえ、多くの昆虫を引きつけていたのである。キキョウは雄性先熟という、葯が花粉を出しているときに雌しべの柱頭は閉じていて未熟状態である特徴を持っている(田中, 2001)。このことから類推すれば、一つの花の中で花粉が昆虫の体に付着しても自家受粉は起こらない。キキョウが私たちの予想どおり花粉を媒介する昆虫を誘引できなかったとしたら、栄養生殖のみでしか子孫を残せなかったはずである。しかしながら、本校でも2013年から校舎3階の屋外通路においてキキョウを鉢植えで栽培しているが、2013年の秋には果実ができ稔性のある種子が得られた。2014年には、そのキキョウの花の周りで、クマバチが何かを探るように飛んでいるのを目撃した。このことは、訪花昆虫（おそらくクマバチ）によって受粉が起こったことを示唆する。

香勝寺での観察で、蜂、蝶や蛾、甲虫類といったさまざまな昆虫がキキョウを訪れることがわかった。キキョウの花は大きなカップ状のつくりをしており、マメ科の花のように、花の「開け方」を学習している昆虫でなければ蜜や花粉を得られないタイプの花の形ではない。しかし、どのような昆虫でもキキョウにとって有効な花粉媒介者かを検討すると、必ずしもそうではない。クマバチのような体の大きな昆虫ならば、キキョウの大きく突き出た雌しべにつかまり柱頭に接触し、授粉を行えると考えられる。

一方、イチモンジセセリはキキョウの花の縁の方に留まり、そこから口吻を伸ばして蜜を吸っていた。おそらく雌しべの柱頭に花粉を付けることはないと思われる。ただし、吸蜜の様子を観察していると、なかなか花卉上に静止することができず、脚を滑らせていた。これはキキョウの花弁に「足掛かり」となる突起が無いからではないか、と私たちは考えている。すなわち蜜だけを吸う昆虫が訪花しづらくすることが、キキョウが花卉の表面に突起を持たない生態学的な理由だと言えるのかもしれない。

3. 目的(Ⅱ)のための研究

花卉の表面に突起を持たないキキョウの花が昆虫を誘引できるとわかったため、目的(Ⅱ)である昆虫を引きつける要因の検証に移った。以下のとおり[その1][その2]の2つに分けて行った。

[その1] 青い花仮説の検証

花卉表面の突起の有無は光の反射の仕方に作用し、視覚情報に影響を与える。そこで、同じ視覚情報である色、特にキキョウの花の青紫色が昆虫を引きつける要因ではないかと考えた。花卉表皮の細胞が特殊な形となり、クチクラ層にも複雑な溝などの模様が形成されるため、形成に多くのエネルギーを必要とするはずである。つまり、突起の有無以外の要因である色で十分に昆虫を引きつけることができれば、エネルギーの消費を抑えるために突起は形成されなくなるのではないかと考え、次の仮説を設定した。

仮説：キキョウと同じく、青～紫色の花は花卉表面に突起を持たない。（青い花仮説）

(1) 材料と方法

青～紫色の花を持つ、表1に示した10種の被子植物の花弁の切片断面を光学顕微鏡で観察した。

表1 光学顕微鏡で観察した被子植物 10 種

キキョウ科	キキョウ, オトメギキョウ, イワシャジン, イソトマ, ロベリア
シソ科	ローズマリー, ジャーマンダーセージ
リンドウ科	リンドウ園芸種
ツユクサ科	ツユクサ
キンポウゲ科	デルフィニウム

(2) 結果

観察した 10 種のうち, 明瞭な突起を持っていなかったのはキキョウ科のキキョウ, オトメギキョウ, イワシャジンの 3 種のみであり, 他の 7 種の花弁の表皮には全て突起が確認された。

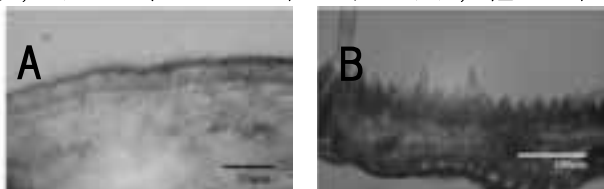


図4. 青～紫色の花 2 種の花弁断面の光学顕微鏡像

(A)キキョウ(*Platycodon grandiflorus*)

(B)ロベリア(*Lobelia erinus*)

(3) 考察

青～紫色の花でも花弁表面に突起を持っているものがあつた。よつて, 仮説は否定された。しかしながら, 前述のように, 昆虫の種類によつては, 突起の有無にかかわらず, 紫色の花弁に誘引されると考えられる。

[その2] 紫外線反射の観察

紫外線の反射の度合いについても観察を行った。ヒトには見えないが昆虫には見える紫外線を利用して, キキョウが昆虫にアピールしているのかもしれないと考えたからである。

(1) 材料と方法

マクロレンズ(TAMRON AF 90 mm 1:2.8 MACRO)を装着した一眼レフカメラ(Nikon D80)に, 紫外線透過フィルター(FUJI FILTER OPTICAL)と赤外線遮断フィルター(IRカットフィルター1 セラテックジャパン)を取り付けて, キキョウの紫外線写真を撮影した。また, キキョウ科で青紫色の花弁を持ち, かつ突起も持つことがわかつた, イソトマとロベリアについても撮影を行った。

(2) 結果



図5. キキョウ・イソトマ・ロベリアの可視光写真(上)と紫外線写真(下)

(A): キキョウ(花)

(B): キキョウ(葉)

(C): イソトマ(*Isotoma axillaris*) (花)

(D): ロベリア(花)

図5下段において, 白く写っているのが紫外線を反射している部分である。キキョウの花弁は中心部の蜜標となる部分を除き, 花弁全体で紫外線をよく反射している(図A下)ことがわかつた。一方, 葉はほとんど紫外線を反射していない(図B下)。

また, イソトマとロベリアの2種の花弁も紫外線をよく反射していることがわかつた。

(3) 考察

キキョウが昆虫を引きつける要因の一つとして考えられるのが, 昆虫には視認できる紫外線をよく反射するという性質である。キキョウの花が花全体で紫外線を反射することは, 突起が無いという欠点を補えるアピール点になるかと思われた。

ところがさらに観察を進めると, イソトマやロベリアといった, 突起を持つ紫色の花もまた, 紫外線をよく反射することがわかつた。この2種は庭に植えておくとよく種子ができ, 翌年こぼれ種が発芽してくる。おそらく昆虫が頻繁に訪れるからだろう。実際に, 私たちもイソトマへのオオスカシバの訪花を目撃している。

キキョウの昆虫へのアピールに関する考察は, 再び振り出しに戻ってしまった感があるが, さらに考えると, キキョウの花の大きさの重要性が浮上する。

Ohara & Higashi(1994)によれば、エゾエンゴサク (*Corydalis ambigua*) の開花中の群落で観察した結果、より大きな花序を持つ個体は小さなものより、エゾオオマルハナバチ (*Bombus hypocrita sapporensis*) によって訪花される頻度が高かった。このように、花の大きさや花序の大きさが昆虫の訪花頻度に影響を与えるという報告はいろいろある。キキョウの種小名である「*grandiflorus*」は「大きな花」という意味である。キキョウが他の植物に比べ、特に大きな花を持つことは、昆虫を誘引する要因の一つだと思われる。

さらには、動物に花粉が媒介される植物の一つ一つは、さまざまな戦略を組み合わせ、総合力で動物を引きつけていると考えられる。今後は、ヒトの嗅覚では感じられないキキョウの香りや、昆虫に提供できる蜜の量の測定と他種との比較も行っていきたい。

4. 目的(Ⅲ)のための研究

(1) 序論

Glover らは、キンギョソウの花弁の表面に円錐状突起を形成させる遺伝子 *MIXTA* をタバコの葉に導入し、葉の表面に本来は無かった突起を形成させた (Glover *et al*, 1998)。このことを参考にすれば、キキョウでは花弁の表面に突起が見られないことから、*MIXTA* 遺伝子か、それに類似したはたらきの遺伝子が発現していないと考えられる。これらのことを踏まえ、次の仮説を設定した。

仮説：花弁表面に突起を持たないキキョウなどの植物は、*MIXTA* 様遺伝子に異常を持つ。

以下に、平成25年度に行った実験を①、平成26年度に行った実験を②として各項目を記す。

(2) 材料と方法

- ① 花弁表面の突起や *MIXTA* 遺伝子の存在が確認されているキンギョソウと、花弁表面に突起を持たないオトメギキョウを使用し、それぞれから *MIXTA* 様遺伝子を取り出せるかどうかを調べた。この実験でオトメギキョウを使用したのは、キキョウが開花時期では無かった上、オトメギキョウは蕾の数が多く、サンプルの採集に適していたためである。

まず、National Center for Biotechnology Information と ClustalW を使用し、*MIXTA* 遺伝子(キンギョソウ由来)と類似のはたらきを持つ、*MIXTA* 様遺伝子 10 種(キンギョソウ、カラマツソウ、シロイヌナズナ等に由来)について、アミノ酸配列の類似部分を調べた。それをもとに、約 420bp の *MIXTA* 様遺伝子断片を増幅させるための縮重プライマーを設計した。

次に、突起形成中と考えられるサンプルの蕾から cDNA を合成した。この全 cDNA を先述の縮重プライマーにより PCR 法で増幅し、アガロース電気泳動したところ、キンギョソウとオトメギキョウの双方から、約 420bp の遺伝子断片が得られた。なお、約 380bp の断片の増幅も確認されたが、これは片方のプライマーのみでも増幅が確認できたため、二つのプライマーにより特異的に増幅される *MIXTA* 様遺伝子断片ではないと判断した。*MIXTA* 様遺伝子のものと思われた約 420bp の遺伝子断片を T-ベクターを用いてサブクローニングし、シーケンシングを行い(ファスマック㈱に委託)、増幅された遺伝子の配列を特定した。

- ② キキョウの開花時期に合わせ、キキョウとキンギョソウの蕾を材料とし、それぞれから *MIXTA* 様遺伝子を取り出せるかを調べた。キキョウでは長さ(がくの付け根から花弁の先端まで)が短いものから A、Ps、Pb と名付け cDNA を作成した。この cDNA と①で用いた縮重プライマーにより PCR 法で遺伝子断片を増幅し、アガロースゲル電気泳動により分離したところ、Ps、Pb の両サンプルで約 420bp のバンド、A のサンプルで約 580bp のバンドが確認できた。それぞれをゲルから切り出して遺伝子を抽出し、T-ベクターを用いてサブクローニングして、インサートチェックを行ったところ、Pb と A からのみ、目的遺伝子の増幅が確認された。それぞれについて、目的遺伝子が組み込まれた大腸菌を液体培養して遺伝子の再増幅を行い、シーケンシングを行い(ファスマック㈱に委託)、増幅された遺伝子断片の塩基配列を特定した。次に、SMARTer RACE cDNA Amplification kit を用いて完全長 cDNA を作成した。そして、その配列に基づいてプライマーを設計し、RACE-PCR、Nested-PCR によって、キキョウの *MIXTA* 様遺伝子の未知配列部分の増幅を行った。

(3) 結果

- ① シークエンス解析の結果、キンギョソウから得られた断片は *MIXTA* 遺伝子の一部であることが分かった。しかし、オトメギキョウから得られたものは *MIXTA* 様遺伝子ではなく、真核細胞に普遍的に存在するポリユビキチン遺伝子の一部であった。

② 図6 キキョウの *MIXTA* 様遺伝子のアミノ酸配列

```
MGRSPCCDKVGLKKGPWTPPEEDQKLLAYIDEHGHGSRALPSKAGLQRCGKSCRLRWNTNLRPDIKRGKFSQHEEQTIQLHALLGNRWSAIA  
T HLPKRTDNEIKNYWNTHLKKRLAKMGIDPVSHKPKNDTLLSSDGQSKSTANLSHMAQWESARLEAEARLVKQSKQRSSSLQTLGSAELS  
QLVK PVVPLVVPPRCLDILKAWTGGWGGSGFGEQESPSSTLSTTGIGESSTNFI EFGVNSSGSCEDGMVGDEVGEWEKSFGSTTTRLPEYK  
DGRGGN SIPFNSSGGMSSMENGWTTAESITSDNSNEHVAENFLESFTLLNNNITSTGGDRSGGLAEGGSDIGGGRGCGNSCYDDNYKNY  
WNSI
```

キキョウから、*MIXTA* 様遺伝子の単離に成功し、2つの結果が得られた。図6にその内の1を示した。両者の比較を行うと、一文字のみ塩基配列が異なっており、それぞれアデニン、シトシンとなっていた。結果として、アミノ酸残基が1個異なっており、それぞれアスパラギン酸(図6中の枠内)、アラニンとなっていた。この違いは、ともにシークエンスエラーである可能性がある。

(4) 考察

- ① キンギョソウからは *MIXTA* 遺伝子の取り出しに成功したため、プライマー設計には問題がなかったと言える。オトメギキョウから *MIXTA* 遺伝子が取り出されなかった理由として、
- オトメギキョウは *MIXTA* 様遺伝子を持たない。
 - MIXTA* 様遺伝子を持つが、今回はポリユビキチン遺伝子が主に増幅された。
 - MIXTA* 様遺伝子を持つが、採取した蕾の発達段階では発現中ではなかった。
 - 今回の縮重プライマーではオトメギキョウの *MIXTA* 様遺伝子に対応できなかった。
 - 実験過程において何らかのミスがあった。

以上のことが考えられる。i) は我々の仮説に一致する。

- ② キキョウの蕾から取り出された全 mRNA の中に、*MIXTA* 様遺伝子の転写産物を見出した。シークエンス解析から、それが指定する転写因子のアミノ酸残基数は 391 であり、キンギョソウ由来の *MIXTA* 遺伝子産物と比較した結果、70 大きいことがわかった。また、アミノ酸配列を比較すると、前半部は *MIXTA* 遺伝子の指定するタンパク質とよく似ているが、後半部では違いが大きいことがわかった。このことは、MYB 転写因子の DNA 結合ドメインにおいて両者の類似性は高いが、転写活性化ドメインでは違いが大きいことを示唆する。植物の MYB 転写因子の遺伝子ファミリーは大きく、DNA 結合ドメインの保存性は高いが、転写活性化ドメインは様々であり、その領域の違いによって遺伝子の機能の多様性が生じることが指摘されている(浦尾 他, 1995)。したがって、今回私たちが発見したこのキキョウの *MIXTA* 様遺伝子は、花卉表面に突起をつくらせる作用を持っていない可能性がある。

5. 今後の課題

キキョウの花が昆虫を引きつける要因をさらに探求する。また、発現量解析するため、葉などの他の部位とリアルタイム PCR 法を用いて比較を行い、この転写因子の機能について解析を行う。

謝辞

静岡大学大学院農学研究科の一家崇志先生、大学院生の田中靖乃さん、鴨志田瑞穂さん、公益財団法人山崎自然科学教育振興会様、また、香勝寺の皆様にも厚くお礼を申し上げます。

参考文献

- ・ Q.O.N.Kay, H.S.Daoud and C.H.Stirton. 1981. P. 57-84.
- ・ S.F.Brockington, *et al.* 2012.
- ・ M.Ohara & S.Higashi, 1994. pp 25-30
- ・ 磐南 SS I 活動報告書作成委員会. 第 28 回(平成 23 年度)山崎賞受賞論文.
- ・ 栗田直紀・平野靖也. 2014.
- ・ B.J.Glover and C.Martin, 1998. 3497-3508.
- ・ B.J.Glover., *et al.* 2012. 108:609-616.
- ・ 浦尾 剛, 岩崎 俊介, 篠崎 和子, 篠崎 一雄, 1995.
- ・ 田中肇. (2001).
- ・ 佐々木正己. (1999).
- ・ www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator
- ・ clustalw.ddbj.nig.ac.jp ClustalW | DDBJ
- ・ www.jpnrdb.com/search.php?mode=map&q=07180404287 日本のレッドデータ検索システム
- copyright©2007 NPO 法人 野生生物調査協会, NPO 法人 Envision 環境保全事務所