

〈第59回 静岡県学生科学賞 県科学教育振興委員会賞〉

4. 花と葉の表面構造の違いについて partIV

静岡県立磐田南高等学校

生物部・植物班 澤 康一・鈴木 萌絵・山本 珠永

1. 動機・目的

平成23年度に磐田南高校理数科1年生は、学校設定科目『磐南スーパーサイエンスI』の一環として、走査型電子顕微鏡を用いて8種類の被子植物の花弁と葉の表面構造の比較観察を行った。その結果、7種の花弁の表面には、葉には無い特異的な突起が観察され、キキョウのみ花弁表面も葉の表面も平坦であった(磐南 SS I 活動報告書作成委員会 2011)。

花弁表皮細胞の円錐状または乳頭状突起については、それが花弁に特異的な形質であり、*MIXTA* 遺伝子ファミリーが関与していることが知られている (Brockington *et al.*2012)。その突起の役割としては、花弁からの光の反射を複雑化することにより、昆虫の誘引に効果的であるとの報告がある (Kay *et al.*1981, Glover & Martin 1998)。

そこで平成25年度から26年度にかけて、理数科の課題研究のテーマ及び生物部の研究テーマの一つとして、「花弁表皮に突起を持たないキキョウは花粉媒介者を誘引できるのか、花弁の何が昆虫誘引の要因となっているのか。」「花弁表面に突起を持たない遺伝的な要因は何か。」という疑問を解決するために調査・研究を行った。その結果、キキョウの訪花昆虫を確認でき、要因として突起以外の視覚刺激を検討した。また、キキョウの蕾から1種の *MIXTA* 様遺伝子 (*PgMIXTA-like* と命名) の完全長配列の単離に成功した (平野 他 2014)。

平成27年度には、無根系統樹を作成して他の *MIXTA* 遺伝子ファミリーと比較した。すると最も近縁なのが *MgMYBML8* 遺伝子であることがわかった。この遺伝子はミムラス (*Mimulus guttatus*) の葉において、普段はトリコーム形成を抑制しているが、葉が昆虫による食害を受けると、その発現量が低下し葉にトリコームが生じる (Scoville *et al.*2011)。

ゆえに今年度の遺伝子実験として、この取り出した *PgMIXTA-like* 遺伝子について、近縁な *MgMYBML8* 遺伝子との関係の解析を進めた。一方で、昨年度私たちが立てた「青い花仮説」の検証を深めるため、約200種類の植物の花弁表皮の光学顕微鏡観察を行った。

2. 材料と方法

材料

(1) *PgMIXTA-like* 遺伝子発現量解析

・キキョウ科 キキョウ (*Platycodon grandiflorus*) 品種名は『五月雨』

食害された株と無傷の株とで発現量比較を行うため、防虫ネットを掛けた株と掛けていない株を屋外で栽培した。栽培場所は、校舎3階の直射日光が当たる青空廊下である。

ガの幼虫による食害を確認してから、サンプルを採取した。採取した部位は、各株の蕾、萼片、葉 (展開葉及び幼葉) 等である。

(2) 顕花植物の花弁表皮細胞の観察

・顕花植物 69科 176属 204種

方法

(1) 無根系統樹の作成と *PgMIXTA*-like 遺伝子発現量解析

前年に私たちが完全長塩基配列を単離した *PgMIXTA*-like 遺伝子について、BLASTX プログラムを用いて相同遺伝子の検索を行った。11 種の *MIXTA* 関連遺伝子を抽出し、これらの遺伝子について Clustalw プログラムおよび TREEVIEW プログラムを利用し、無根系統樹を作成した。RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen 社)を用いて各サンプルから全 mRNA を抽出した。次に PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa 社)を用いて cDNA を合成した。

前年の研究において設計・作成した発現定量用プライマーを利用し、発現量解析をリアルタイム PCR 法により行った。PCR 反応は、TaKaRa 社の SYBR Premix Ex Taq II を用い、Roche 社製の Light Cycler 480 で行った。

(2) 顕花植物の花弁表皮細胞の観察

材料の花の写真を屋外または屋内で撮影し、その後、手動により生の花弁切片の垂直断片を作製してプレパラートをつくり、光学顕微鏡で観察し突起の有無やその形状の特徴を記録した。マイクロメーターを用いて突起の高さなどを測定し、また各種ごとに光学顕微鏡写真を撮影した。突起の有無の判別は、突起の高さが $10\mu\text{m}$ より低い場合「無し」とした。

3. 結果

(1-1) 無根系統樹

作成した無根系統樹を図に示した。

この系統樹において *PgMIXTA*-like に最も近いのが、*MgMYBML8* 遺伝子であった。他の遺伝子が花弁の表皮の突起形成に関与している中で、このミムラスの遺伝子は、葉におけるトリコーム形成の制御という点で異なるものだった。

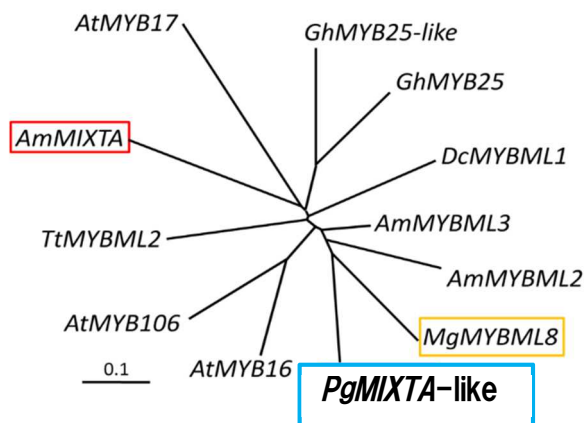


図 *PgMIXTA*-like の分子系統樹上の位置づけ

表 1 リアルタイム PCR 測定結果

サンプル内容	略称	Targets	References	① Mean Cp	② Mean Cp	①-② ΔCp
食害あり蕾花卉	B1	Mixta	Actin	20.56172	19.04474	1.5169812
食害なし蕾花卉	B0	Mixta	Actin	20.76114	19.90972	0.8514156
食害あり蕾萼片	C1	Mixta	Actin	22.13486	19.38876	2.7460999
食害なし蕾萼片	C0	Mixta	Actin	22.10986	19.89665	2.2132047
食害受けた株の無傷の葉	L1	Mixta	Actin	22.98316	20.64845	2.3347078
食害受けていない株の葉	L0	Mixta	Actin	24.14265	20.99335	3.1493014
食害受けた株の幼葉	YL1	Mixta	Actin	20.27481	19.9634	0.3114087
食害受けていない株の幼葉	YL0	Mixta	Actin	21.9505	20.58162	1.3688759
食害あり花		Mixta	Actin	24.58097	20.50043	4.0805426
食害された葉		Mixta	Actin	23.38613	21.07271	2.3134222

※内部標準として、キキョウのアクチン遺伝子 (遺伝子コード JF781303.1) を用いた。

(1-2) *PgMIXTA*-like 遺伝子発現量解析

表1に、リアルタイムPCRの結果を示した。

表1の結果をもとに、食害なしの株の各部分の ΔC_p を基準として、食害ありの株の同じ部分との $\Delta\Delta C_p$ を算出し、発現量の差を求めた。その結果、葉においては展開葉でも幼葉においても、食害を受けた株では*PgMIXTA*-likeの発現量が受けていない株のほぼ半分であることがわかった。しかし蕾においては花卉でも萼片でも、食害を受けた葉の方が約1.5倍となっていた(表2)。

さらに、食害あり、なしのそれぞれの株において、蕾と葉の*PgMIXTA*-likeの発現量を比較した。すると、食害を受けた株の葉と萼片を除き、いずれも葉の方が多く、特に食害なしの株では、蕾の花卉より展開葉の方が約5倍発現していることがわかった(表3)。

$\Delta\Delta C_p$ 基準は食害なし	$\Delta\Delta C_p=n$	2^n
B1-B0	0.665565603	1.58619
C1-C0	0.532895265	1.44683
L1-L0	-0.81459361	0.568569
YL1-YL0	-1.05746721	0.480475

表2 食害を受けた株と受けていない株の比較

$\Delta\Delta C_p$ 葉—蕾(基準)	$\Delta\Delta C_p=n$	2^n
L1-B1	0.817726521	1.762626
L0-B0	2.297885735	4.917366
L1-C1	-0.41139218	0.751897
L0-C0	0.936096693	1.913345

表3 葉と蕾の比較

(2) 顕花植物の花弁表皮細胞の観察

今回調べた植物のリストと花弁表皮の突起の有無及び突起の長さを、花色のグループ別にまとめたものである。植物種は、それぞれの時期に咲いている花を選んだ。学校の敷地内で咲いていた野生種も含むが、花卉園芸店やスーパーマーケットの花売り場で購入したものもある。科名は、マバリー(2008)の分類体系に従った(大場 2009)。

表4は、各花色グループの無突起率(花弁表皮に突起を持っていなかった種の比率)を示している。黄色グループがやや高いものの大きな差はなく、青・紫のグループは、仮説が正しければ他に比べ高いはずであるが、むしろその逆で最も低かった。

	赤・桃	黄・橙・緑	青・紫	白
突起を持たない種の数(51種中)	11	14	9	11
無突起率(%)	21.6	27.4	17.6	21.6

表4 各花色グループの無突起率

4. 考察

(1) *PgMIXTA*-like の機能について

前回の実験で取り出すことに成功した *PgMIXTA*-like に最も近縁な *MgMYBML8* は、花ではなく葉のトリコーム形成に関わるものだった。Scoville *et al.* (2011)によれば、この遺伝子は、カリフォルニア州に固有のハエドクソウ科ミゾホオズキ属の一種 *Mimulus guttatus* から単離されたもので、葉のトリコーム形成を抑制する働きを持つ。その発現量は、昆虫に食害されていないときに多く、食害を受け始めると低下する。この反応の意味は、トリコームという長い突起が葉に形成されると昆虫が食べにくくなるため、普段はその形成を抑え、食べられるとその抑制を解除するのだと解釈されている。トリコームは突起の一種であるため、キキョウが

突起を持たない理由は、蕾から単離された *PgMIXTA-like* が同様の働きを持つため、突起形成が抑えられているのではないかと予想された。

そこで、防虫ネットを掛けた株と掛けない株を屋外で育て、蕾だけでなく葉においても *PgMIXTA-like* の発現量がどのようになっているかを調べた。結果はほぼ予想どおりで、表2に示したように、葉においては展開葉でも幼葉においても、食害を受けた株の *PgMIXTA-like* の発現量は、受けていない株のほぼ半分だった。しかし蕾においては花卉でも萼片でも、食害を受けた葉の方が約1.5倍となっていた。このことについては、食害を受けた株では生き残りのため、花により多くの昆虫を呼び寄せようと、邪魔なトリコームの形成は一層抑えるようになるといった説明は可能かもしれない。

また表3に示したように、この *PgMIXTA-like* は、葉の方が蕾の花卉より多く発現しており、食害なしの株では、蕾の花卉より展開葉の方が約5倍、食害ありの株でも約2倍発現していることがわかった。

そこで、実際に食害を受けたキキョウの葉にトリコームが形成されているのか調べるため、光学顕微鏡で切片を観察したが、確認することはできなかった。

(2) 青い花仮説の再検証

私たちは平成25年度から26年度にかけての研究において、キキョウがその花色により十分に昆虫を引きつけることができるのであれば、エネルギーを必要とする突起形成をしないのではないかと考え、これを「青い花仮説」と名付けた。そして、青～紫色の花10種を集めこの仮説の検証を行った。結果は、青い花の中にも明瞭な突起を持つものがあったため、仮説は否定されたと考えた。花が大きいこと、花の形が複雑でなくどんな昆虫でも蜜腺を探しやすいこと、蜜量が多いことなどがキキョウの魅力であると推測した。

しかしながら、生物の多様性を考えるとたった10種で結論を出すのは尚早と考え直し、今回は青色～紫色の花だけでなく、赤色～桃色、橙色～黄色～緑色、白色の花を新たなグループとして括って、それぞれのグループの51種の花の花弁表皮の突起の有無を調査した。4グループの中で、青色～紫色の花々に突起を持たないものが有意に多ければ、仮説は正しいと言えるかと予想した。

結論としては、表4に示したように、青色～紫色の花のグループが特に無突起率が高いということはなく、再び仮説は否定されたことになる。

今回約200種の植物の花を観察していて幾つか気づいたことがある。

第一は、花弁表皮の突起にさまざまなタイプがあるということである。ハナイバナよく発達した突起を持っている。この高いドーム型に対し、ソメイヨシノやゲンゲなどは低いドーム型といえる形状の花弁表皮の凹凸も見られた。

第二は、系統的に近縁なグループで、特に無突起率が高い傾向があるということである。キキョウ科は今回7属9種を調べたが、その内5種が突起を持っていなかった。この他にもアカバナ科のマツヨイグサ属4種を調べたが、全て突起が無かった。属レベルの分岐が起きるときに、花弁表皮の突起を支配する遺伝子にも変異が起きている可能性が示唆される。

第三に、やはり多くの顕花植物は花弁表皮に何らかの形の突起を持っているということに改めて認識した。花弁の発生は葉に由来するものの、形態的にも機能的にも両者には違いがあり、花弁表皮の突起は花弁を特徴づけるものの一つとされる (Whitney *et al.* 2011)。私たちの出した結果もこれを支持するものとなった。

5. 今後の課題

これまでの遺伝子実験では、キキョウの蕾花卉から、MYB 転写因子の一種である *MIXTA* 関連遺伝子を1個単離した。しかしながら、植物では MYB 転写因子は大きな遺伝子ファミリーを形成していることがよく知られている(浦尾 他 1995)。したがって、キキョウの蕾花卉では、花卉表皮の突起の制御に関する他の遺伝子も発現していることが予想される。

そこで、次の実験は、RNA-シーケンスを計画している。キキョウの蕾の細胞内の全ての mRNA を解析できるので、その中には様々な MYB 転写因子が含まれるはずである。*MIXTA* 関連遺伝子を網羅的に把握することにより、突起形成の制御について総合的に分析していくことができると考えている。

生態学的な研究については、青い花仮説が否定されたため、新たな仮説を設定する必要がある。現在考えているのは、花の大きさについて検証するため花の大きさが異なる品種を探すこと、また花卉を段階的に周辺から切り取り、花の中心にある蜜腺の周りの花卉面積を変え、昆虫の誘引率に差が出るかどうかを見ることを考えている。

謝辞

静岡大学大学院農学領域応用生物化学コース植物機能生理学研究室の一家崇志先生、大学院生の田中靖乃さん、鴨志田瑞穂さんに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. Pigment distribution, light reflection and cell structure in petals. Botanical Journal of Linnean Society. vol. 83. P. 57-84.
- B.J.Glover and C.Martin, 1998. The role of petal cell shape and pigmentation in pollination success in *Antirrhinum majus*. Heredity 80:778-784.
- S.F.Brockington, R.A-Fernandez, J.B.Landis, K.Alcorn, R.H.Walker, M.M.Thomas, L.C.Hileman and B.J.Glover. 2012. Evolutionary Analysis of the MIXTA Gene Family Highlights Potential Targets for the Study of Cellular Differentiation. Published by Oxford University.
- Scoville AG, Barnett LL, Bodbyl-Roels S, Kelly JK, Hileman LC. 2011. Differential regulation of a MYB transcription factor is correlated with transgenerational epigenetic inheritance of trichome density in *Mymulus guttatus*. New Phytol. 191:251-263.
- 浦尾 剛, 岩崎 俊介, 篠崎 和子, 篠崎 一雄, 1995. 植物の MYB 転写因子の多様な機能. 化学と生物 Vol.33, No.1. • 大場秀章 2009 植物分類表 アボック社
- B.J.Glover, M.Prez-Rodriguez and C.Martin. 1998. Development of several epidermal cell types can be specified by the same MYB-related plant transcription factor. Development 125, 3497-3508.
- M.Ohara & S.Higashi, 1994. Effects of inflorescence size on visits from pollinators and seed set of *Corydalis ambigua* (Papaveraceae). Oecologia. June 1994, Volume 98, Issue 1, pp 25-30
- Heather.M.Whitney, K.M.Veronica Bennett, Matthew Dorling, Lucy Sandbach, David Prince, Lars Chittka and Beverly J.Glover. 2012.Why do so many petals have conical epidermal cells? Annals of Botany 108:609-616.
- www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator •
- ClustalW(URL:clustalw.ddbj.nig.ac.jp)