

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21657064

研究課題名（和文）オジギソウはなぜ動くのか：適応進化的意義の探求

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of leaf movement in *Mimosa pudica*

研究代表者

長谷部 光泰 (MITSUYASU HASEBE)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授

研究者番号：40237996

研究成果の概要（和文）：オジギソウの運動の適応的意味を解明するため、運動に異常の生じた突然変異体の作出を試み、約 5000 変異体の選抜を行ったが単離には成功しなかった。一方、逆遺伝学的方法によって運動に異常を起こす突然変異体を得るため、オジギソウ形質転換体の作出を試み成功した。今後、本研究によって確立した形質転換技術を用いてオジギソウの運動の分子機構を明らかにするとともに運動に関わる遺伝子を逆遺伝学的方法で機能喪失させることにより運動欠損変異体を作成し、運動の適応的意義についての研究を行うことが可能となった。

研究成果の概要（英文）：To understand the adaptive significance of the seismonastic movement in response to external stimuli in the sensitive plant *Mimosa pudica*, we tried to isolate mutants with EMS and fast neutron. Even after screening of 5000 M2 seeds, we could not obtain mutants with defect in the movement. On the other hand, we established a method for transformation to aim reverse-genetic approach to isolate movement mutants. This new technique will be useful for future study on the molecular mechanisms and evolution of the seismonastic movement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：オジギソウ・就眠運動・お辞儀運動・進化・複合適応形質

1. 研究開始当初の背景

ダーウィンが 1880 年に「The Power of Movement in Plants」という著作をまとめたように、植物の動きは多くの進化学者の興味を集めてきた。植物はアサガオの蔓が巻き付くように、成長過程で自律的に運動する。また、重力や光などの外部刺激に応答した運動もする。これらの所謂「遅い運動」は広く植

物全般に見られる運動である。また、夜になると葉を閉じる就眠運動も遅い運動であり、多くの種類で観察できる。一方、食虫植物の捕虫葉やオジギソウの本葉の運動は、「速い運動」として知られ、特定の植物だけに進化した形質である。

我々はこれまで複合形質の進化に興味を持って発生進化の研究を行う過程で、現生種

の突然変異体が大進化研究に有用であると考え、本研究を着想した。本研究では突然変異体を用いた新しいアプローチを用いることにより、植物運動進化における以下の2つの問題点の解明を目的とする。

一つは、オジギソウ *Mimosa pudica* における速い運動の起源と進化である。オジギソウは二回羽状複葉の葉を持ち、小葉、羽片、葉身の基部に瘤状の葉枕と呼ばれる組織を形成する。オジギソウの速い運動機構は20世紀の多くの研究によって概要が明らかになってきた (Shibaoka 1969. Ann. Rev. Plant Phys. 20: 165)。葉に刺激が加わると、活動電位が発生し、維管束を經由して、葉枕へと伝わる。伝わった活動電位は葉枕背軸側 (葉の裏側) の細胞から細胞外へのカリウムと塩素イオンの移動を促し、それに伴い大量の水が放出される。放出された水は、向軸側 (葉の表側) の細胞へと移動する。この結果、背軸側の細胞は縮小し、向軸側の細胞が拡大し、葉枕が下向きに動く。一体、このような複雑かつ複合的な形質はどのように進化してきたのだろうか。一つの可能性は、オジギソウの属するマメ科に広く見られる就眠運動からの進化である。夜になるとオジギソウの葉はしなだれ、刺激を与えてお辞儀運動をしたときのような状態になる。しかし、オジギソウの就眠運動は葉の傾斜角度がお辞儀運動の場合と異なることがわかっており両者は別な生理学的な反応ではないかと考えられており (Shibaoka 1969 *ibid.*)。進化過程は不明である。

もう一つの問題は、就眠運動とお辞儀運動の適応的意義である。就眠運動について、ダーウィンは、夜間における温度保持のための運動であると解釈したが (Darwin and Darwin 1880 *ibid.*)。その後、一部の植物を除いて、就眠運動をしてもしなくてもほとんど葉温に影響が無いことがわかってきた (Schwintzer 1971 Plant Phys. 48: 203)。次に提唱された仮説は、植物の日長を感受して開花期などを制御する光周性を正確に保つためだという仮説である (Bünning and Moser 1969 PNAS 62: 1018)。彼らは、葉を閉じることによって夜間における月明かりによる影響を軽減できることを示した。しかし、オジギソウは赤道直下でも開花する中日植物である。従って、就眠運動の適応的意義は不明である。さらに、お辞儀運動については、食害昆虫からの回避、雨水を取り除き光合成効率を上げる、などの仮説が提唱されているが、どれも実証的な研究はなされていない (Simons 1992 The Action Plant. Blackwell)。

2. 研究の目的

本研究では、オジギソウのお辞儀運動の起

源と進化を調べるために、オジギソウの就眠運動とお辞儀運動に影響を与えるような突然変異体を作成する。そして、個々の突然変異体において、就眠運動だけあるいはお辞儀運動だけに影響が現れるか、あるいは、両者ともに影響が現れるような場合があるのかを調べることにより、両運動の遺伝的な連関を探索し、両運動が進化的に関連しているかどうかを推定する。さらに、就眠運動あるいはお辞儀運動に異常の生じたオジギソウを野外で野生型とともに栽培し、突然変異体の適応度 (生産種子数) が野生型と比べてどのように異なるか、低い場合には、どのような原因によるものかを推定し、就眠運動とお辞儀運動の適応的意義を考察する。

3. 研究の方法

(1) 突然変異体の作出

オジギソウのゲノムサイズは 588 Mb、染色体数は $2n = 52$ である (Bennett et al. 1998 Ann. Bot. 82 [Sup.A]: 121)。EMS によってどのくらいの突然変異体を得られるかはゲノム構成によって異なるため理論的に何個体をスクリーニングしたらよいかを決めることは難しい。オジギソウの約2倍のゲノムサイズを持つトマトでは、50%程度の致死率で突然変異を誘発すると、約1万突然変異ラインから約400の形態異常を持つ変異体が単離できることが報告されている

(Watanabe et al. 2007 Plant Biotech. 24: 33)。そこで、まずオジギソウにおいて50%程度の致死率となる EMS 濃度、反応時間、温度を特定する。このような条件下で、1万種子の突然変異剤処理を行う。4月に処理を行い、温室で培養し、シュートに袋掛けを行い自家受粉させ、9月に採種する。突然変異剤処理による変異のほとんどは劣性突然変異であることが知られているので、突然変異第一代 (M1) は突然変異が表現型として現れない。そこで、10月に温室内で、M1 種子を1個体あたり12個播種する。本葉が2枚展開した時点で、振動を与えて、お辞儀反応に異常が見られる個体を選抜するとともに、夜間観察により、就眠運動に異常が見られる個体も選抜する。就眠運動はデジタルカメラ (現有) を用いて夜間自動継時撮影を行い解析する。

(2) 形質転換系の確立

本研究期間中には突然変異体の責任遺伝子の単離は計画しないが、将来的に、就眠運動とお辞儀運動の起源と進化を知る上では、それぞれの運動を制御する遺伝子を単離し、それらの遺伝子ホモログが、運動をしない植物でどのような機能を持っているかを比較解析することが必要である。EMS 処理では点突然変異が誘発されるため、遺伝的地図の確

立されていないオジギソウでは EMS 処理から得られた突然変異体の責任遺伝子を単離することは困難である。そこで、植物で一般的に行われているアグロバクテリアの T-DNA をゲノムに挿入して突然変異を引き起こす T-DNA タギング法によって突然変異を収集する必要がある。そこで、本研究では、T-DNA タギング法の前提となる、オジギソウ形質転換系の確立を目指す。具体的には同じマメ科のモデル植物であるミヤコグサで用いられている方法を用い (Stiller et al. 1997 J. Exp. Bot. 48: 1357) 子葉からカルスを誘導し、アグロバクテリアを感染する方法を行う。現在、低頻度であるが、アグロバクテリアの感染に成功し、カルスからの個体再生も可能である。しかし、アグロバクテリアの感染した細胞をカルス化し、感染細胞を再分化させることには成功していない。ホルモン濃度、アグロバクテリアの濃度、ストレイン、感染時間などの条件を検討し、本研究期間内に形質転換法を確立する。

4. 研究成果

(1) 突然変異体の作出

オジギソウの突然変異体作出のため、EMS 濃度、イオンビーム強度を検討した。少量スケールでは 0.5% EMS を用いることによって約 50% の発芽率低下が見られたが、大量スケールでは約 70% の致死率であった。これは、EMS がモル比で効くためと推定され、より高濃度での処理が必要であることがわかった。2009 年度は約 70% 致死率の種子を播種し、約 1200 個体に袋かけをして開花した 300 個体から種子を採取した。さらに 2010 年度に理化学研究所仁科加速器研究センターにおいて種子 2000 粒を用いて、イオンビーム照射によって突然変異体を作出した。前年度採取した種と併せて M2 ライン種子約 5000 粒を播種し観察したが運動異常を示す変異体は得られなかった。再度同じ条件で約 2000 種子に EMS 処理、播種、袋かけをし、採種したが、これらからも運動異常を示す変異体を得ることができなかった。

相当量の突然変異体を解析したものの運動異常変異体は得られなかったことは、オジギソウが倍数体であることに起因しているのかもしれない。そこで、方針を転換し、形質転換系を確立し、逆遺伝学的方法によってオジギソウ突然変異体を作る方針に転換した。

(2) 形質転換系の確立

アグロバクテリウムを用いた植物の形質転換体の作出は、大きく分けて「アグロバクテリウムによる植物細胞ゲノムへの T-DNA 挿入 (アグロバクテリウムの感染)」と「形質

転換細胞からの植物体の完全再生」の 2 つの過程から成る。オジギソウを含むマメ科の植物は、他の植物と比べて後者の「植物体の再生」が困難であることが多く、この問題の克服が研究目的達成の鍵になると考えられた。そこで本研究では、まずオジギソウの芽生えを子葉・子葉ノード・胚軸・根に分割して培養し、シュート再生能を示す部位の探索を行った。シュート再生は培地中に添加する植物ホルモン量にも影響を受けるため、培地中のサイトカイニン (BAP) およびオーキシン (NAA) 濃度の最適化を行った。また、再生に成功したシュートから根を誘導するプロセスにおいても、誘導培地の組成、オーキシン添加の有無、および使用する基質に関する条件検討を行った。

アグロバクテリウム感染に関しては、まず T-DNA 導入用ベクター (バイナリーベクター) の構築を行った。感染効率の比較および形質転換体の樹立を容易にするために、レポーター遺伝子としてイントロン-sGFP を構築し、これを T-DNA 上に組み込んだ。イントロン-sGFP 遺伝子は内部にイントロン配列を持ち、アグロバクテリウム細胞内では蛍光タンパク質を産生しないため、アグロバクテリウム感染の起こった植物細胞のみを蛍光標識できる利点を持つ。また、本研究では通常のバイナリーベクターである pIG121-Hm の改変体 (pIF121-Hm) に加え、スーパーバイナリーベクターである pSB111 をベースにしたベクター (pSB111-GFP) を作製し、感染実験に用いた。スーパーバイナリーベクターはベクター骨格上にアグロバクテリウム感染を亢進する遺伝子群を持ち、通常のバイナリーベクターよりも高い感染効率を示すことが報告されており (日本たばこ産業株式会社植物イノベーションセンターより分与いただいた) このため、形質転換体の作出の成功例がないオジギソウにおいて、スーパーバイナリーベクターの使用は困難を克服するための鍵になると期待された。

アグロバクテリウムの感染条件の検討に関しては、まず共培養培地に添加する物質の検討を行った。アグロバクテリウムの感染は、フェノール性の小分子、単糖および弱酸性の pH (5.2~5.8) によって活性化されることが知られている。そこで、アセトシリゴン、D-グルコースおよび MES バッファーを共培養培地に単体あるいは組み合わせで添加し、感染効率に与える影響を調べた。さらに、共培養培地の至適 pH 値の検討を行うとともに、共培養期間中における培地 pH の変化をモニターし、バッファー添加が与える影響を詳しく解析した。また、バイナリーベクター pIF121-Hm とスーパーバイナリーベクター pSB111-GFP の感染効率の比較、および共培養培地の種類 (液体あるいは個体) の比較を行

った。最後に、共培養前に行う外殖片の傷付けおよびアグロバクテリウム浸透のための前処理として、超音波処理、減圧処理および界面活性剤 Silwet-L77 による処理を単体あるいは組み合わせて適用し、感染効率に与える影響を調べた。

樹立に成功した形質転換オジギソウに関しては、ゲノム DNA を用いたサザンブロット解析によって T-DNA の挿入パターンを調べるとともに、おじぎ運動を行う能力が保持されているかどうかの確認を行った。

まず、オジギソウの芽生えを子葉・子葉ノード・胚軸・根に分割して培養し、シュート再生能を示す部位の探索を行った。その結果、子葉ノードを含む外殖片において、非常に高いシュート再生能 (97%) が認められた。また、葉柄を含む子葉外殖片においてもシュート再生が確認された (16%)。次に、シュート誘導培地に添加するサイトカイニン (BAP) およびオーキシン (NAA) の濃度の検討を行った。その結果、子葉ノード外殖片からのシュート再生は、0.5 $\mu\text{g/ml}$ の BAP 存在下で最も亢進することを見出した。当該条件下におけるシュート再生の効率は、4 週間の培養で外殖片あたり平均 5.2 本だった。一方、子葉外殖片を用いて同様の検討を行った結果、より長い 6 週間の培養を行ったにも関わらず、シュート再生率は最大で平均 2.1 本に留まった。以上の結果から、本研究では子葉ノード外殖片をアグロバクテリウム感染のターゲットとして選定し、以降の実験に用いることとした。

子葉ノード部位へのアグロバクテリウム感染に関しては、予備実験の結果、感染効率が非常に低いことが判明した。そこで、本研究ではアグロバクテリウム感染の包括的な条件検討を行った。まず、共培養培地へのアセトシリゴン、D-グルコースおよび MES バッファアの添加の効果を調べた。その結果、子葉ノード細胞へのアグロバクテリウム感染には、多くの系で必要とされるアセトシリゴンに加え、MES バッファアの添加が必須であると判明した。次に、アセトシリゴンおよび MES バッファアの存在下で、バイナリーベクター pIF121-Hm とスーパーバイナリーベクター pSB111-GFP の感染効率を比較した。その結果、pSB111-GFP の使用により、子葉ノード部位への感染効率が劇的に上昇することを見出した。また、液体と固体の共培養培地を比較した結果、液体培地を用いたほうがより高い感染効率を示すことが明らかになった。さらに、共培養培地の至適 pH 値を検討した結果、pH 6.1 において感染効率が最大になることを見出した。本研究では、バッファア添加が共培養培地の pH に与える影響を明らかにするために、共培養培地の pH 値の経時変化をモニターした。その結果、バッ

ファア添加なしの状態では、共培養培地の pH 値は培養開始直後から急激に低下を始め、3 時間以内に pH 5.0 以下になることが判明した。この急激な pH 値の低下はアグロバクテリウムによって引き起こされること、および共培養培地へのバッファアの添加により緩和されることが明らかになった。最後に、外殖片の傷付けおよびアグロバクテリウム浸透のための前処理として、超音波処理、減圧処理および界面活性剤 Silwet-L77 による処理を行い、感染効率に与える影響を調べた。その結果、0.03% の Silwet-L77 による前処理が、子葉ノード部位への感染効率を約 2 倍に上昇させることを見出した。以上の結果から、オジギソウ子葉ノード細胞へのアグロバクテリウム感染には、高効率を示すスーパーバイナリーベクターの使用と、バッファア添加による共培養培地の pH 安定化の 2 つの要素が必要であることが明らかになった。

再生シュートからの根の誘導に関しては、1/2 MS 培地 (スクロース・ビタミン添加)、1/2 MS 培地 (スクロース・ビタミンなし)、水の 3 種類の誘導培地、基質としてゲランガムとパーミキュライトの 2 つを用いて、発根におよぼす影響を比較した。その結果、水とパーミキュライトの組み合わせにおいて、再生シュートは最も効率よく発根することが確認された (81%)。発根効率のさらなる改善のため、各種オーキシン (NAA、IAA、IBA) を水・パーミキュライト発根系に添加し効果を検討したが、効率の改善は認められなかった。

以上の最適化条件を用いて、アグロバクテリウム感染から形質転換植物 (T_0 世代) の樹立までの効率を調べた。160 個の子葉ノード外殖片を出発材料として用い、計 8 か月間の薬剤選抜・培養を行った結果、101 個の外殖片が GFP 陽性カルスを形成し、さらに 48 個のカルスからシュート再生が確認された。そのうちの 23 個は、根の誘導に用いるのに十分な段階 (本葉 2 枚以上) までシュートを伸長し、さらに 19 個に由来するシュートでは発根に成功し、 T_0 世代の形質転換植物として定着させることができた。以上の結果から、本研究で確立したオジギソウ形質転換手法では、用いた子葉ノード外殖片の 11.9% (19/160) から形質転換植物を作出できることが明らかになった。また、これら形質転換植物のうち、4 系統 (2.5%) に関しては 4 か月間の薬剤選抜・培養で樹立できており、このような早期に樹立される集団の存在は、迅速な形質転換体の作出を可能にすると考えられる。形質転換植物における GFP 蛍光は、アグロバクテリウムを用いて形質転換を行った T_0 世代のみでなく、 T_1 世代および T_2 世代でも観察され、導入した外来遺伝子が次世代以降にも安定して継承されることを確認で

きた。

樹立された T₀ 世代の形質転換体 13 個体からゲノム DNA を抽出し、sGFP 配列をプローブとしたサザンブロット解析を行った結果、9 個体においては 1 か所の、残りの 4 個体においては 2 か所の T-DNA 挿入が起こっていることが確認された。アグロバクテリウム法と並び、植物の形質転換に用いられるパーティクルボンバードメント法においては、一般に多数の DNA コピーが複雑な形で挿入され、以降の解析における障害となることが多い。この点において、本手法を用いて得られるシンプルな DNA 挿入パターンは、他の形質転換手法に対する利点の 1 つと考えられる。

最後に、オジギソウ形質転換体がおじぎ運動の能力を保持しているかどうかを調べた。その結果、用いたすべての形質転換体(T₀ 世代、34 個体)において、通常個体と遜色のないおじぎ運動と就眠運動が確認された。これらの結果は、本研究で用いたアグロバクテリウム感染および植物体再生のプロセスが、運動のメカニズムを損なわないことを意味しており、本手法がおじぎ運動の分子解析のための有用なツールになることを示している。

本研究の成果は、世界に先駆けてオジギソウの形質転換を可能にし、また今後の本格的実験に耐えうる高い形質転換効率(11.9%)を達成することに成功した。オジギソウの運動メカニズムの分子的研究においては、これまで、逆遺伝学的手法の欠如が最大のボトルネックとなっていた。本研究の成果は、当該分野に技術的ブレークスルーをもたらし、今後の研究を大きく推進するものと考えられる。また、本研究では形質転換の困難なオジギソウに対し、極めてシステムチックな条件検討を行い、アグロバクテリウムの感染効率を大きく改善する複数の要因を見出した。特に、共培養培地へのバッファー添加による pH 安定化の重要性に関しては、これまでの形質転換方法において強調された例が非常に少なく、バッファーを使用するプロトコールは依然として少数派であると思われる。例として、広範な植物種の形質転換方法を取り扱った成書 *Agrobacterium Protocols [Methods Mol. Biol. 343 (2006)]* において、バッファーを用いているのは全体の約 1/4 の手法に限られている。こうした点で、形質転換が困難なオジギソウにおけるバッファー添加の有効性を示した本研究の成果は、形質転換が困難とされる他の植物種の研究に対しても、技術的な革新をもたらす可能性がある。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 1 件)

1 藤井 知美:「オジギソウ *Milosa pudica* のアグロバクテリウムによる形質転換系の確立」第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 20 日、熊本大学(熊本県)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/evodevo>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長谷部 光泰 (MITSUYASU HASEBE)
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授
研究者番号: 4 0 2 3 7 9 9 6

(2)研究分担者

日渡 祐二 (YUJI HIWATASHI)
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・助教
研究者番号: 1 0 3 7 3 1 9 3

(3)連携研究者

なし