

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：14602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23657048

研究課題名(和文)左右相称花の姿勢を制御する「重力捻性」への形態学的アプローチ

研究課題名(英文)Morphological study on "geostrophism" controlling the orientation of zygomorphic flowers

研究代表者

坂口 修一(SAKAGUCHI, Shuichi)

奈良女子大学・自然科学系・准教授

研究者番号：20221997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：左右相称花は、通常、花の相称軸が鉛直方向を向くように咲き、相称軸の向きを人為的に変えると元に戻すように花の向きが回転することが知られている。この現象は、花が重力方向を感知して花柄を捻ることによりおこると想定されるが、その詳細はほとんど明らかにされてこなかった。本課題では、コチョウランの花を実験材料としてその運動を定量的に解析し、この現象が重力屈性とは異なる「重力捻性」と呼ばれるべき別個の現象であることを明らかにするとともに、そのメカニズム解明に向けて花柄表皮の微小管配向の測定と微小管破壊剤投与の効果調べた。その結果、花の回転は確かに花柄の捻れによりおこり、微小管は関与しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The symmetric axis of a zygomorphic flower usually orientates to the direction of gravity, and upon artificial changing of the orientation, the flower rotates so as to recover its original orientation. This rotation of flower is supposed to occur by twisting of the pedicel following sensing of changed direction of gravity, that is, by such a process called "geostrophism". However, little is known about the details of this phenomenon until now. In this study, we chose an orchid *Phalaenopsis* as an experimental material, measured and analyzed its movement by time-laps video and by marking on the surface of pedicels. In addition, we observed microtubules in the epidermis of the pedicels, and examined the effect of microtubule-destroying reagent, oryzalin, on the movement. The results showed that rotation of flower is certainly due to twisting (geostrophism), not bending (geotropism), of the pedicel, and suggested presence of a novel twisting mechanism that is independent of microtubules.

研究分野：Plant morphology and Cell biology

キーワード：捻れ成長 エンバー 重力応答 左右相称花 微小管 コチョウラン 重力屈性 resupination プレッシャーチ

1. 研究開始当初の背景

(1) ラン科やマメ科、シソ科の花など左右相称性の花の大部分は、横向きに花が咲き、花の左右相称軸は鉛直方向を向いている。たとえば、ランの花は唇弁を下にして、マメ科の花は旗弁を上にして花が咲く。このような左右相称花の方向性は、昆虫による花粉媒介に適應した形質と考えられている (Endress, 2001; Ushimaru *et al.*, 2009)。ラン科植物などでは、つぼみの中で花の上下方向が逆転しており、開花の際、二次的に花が回転して正しい向きになるという現象が古くから知られている。このときクリノスタットで重力を打ち消すと花の回転運動は起きなくなる (Ziegenspeck, 1936)。また、いくつかの左右相称花において、花の相称軸を重力方向から人為的にずらすと、花柄が捻れて花が回転し、本来の向きに戻ることが観察されている (Hill, 1939)。これらの報告から、左右相称花が重力の方向を検知して花柄の捻れ運動を誘発し、花の向きを調節していることが強く示唆される。しかし、花の回転運動に対する研究はその後途絶え、Nyman *et al.* (1984, 1985)が若干の知見を報告している以外、目立った研究は今日までなされてこなかった。

(2) 近年、器官が捻れるという表現型をひき起こす突然変異がシロイヌナズナにおいて相次いで発見され (Rutherford & Masson, 1996; Furutani *et al.*, 2000; Hashimoto, 2002) 原因遺伝子がチューブリンや微小管結合タンパク質をコードしていることが明らかにされた。これらの変異体では、表層微小管が細胞の軸に対し傾いて配向するために、細胞の成長方向が斜めになり、器官にらせん状の捻れを生じると考えられている (Ishida *et al.*, 2007)。したがって、上述の花の回転運動に関しても、重力刺激が微小管の方向に傾きを生じさせ、その結果花柄を捻れさすという可能性が考えられた。

(3) 本課題代表者は、コチョウランの培養変異の研究をおこなってきたが、実験材料の栽培場所を移動する際、花の向きを変化させたところ、花の向きが鉛直方向に戻るよう花が回転することに気づいた。以後、市販のデジタルカメラを使いタイムラプス撮影をしてコチョウランの花の運動を観察し、予備的な結果を蓄積しつつあった。

2. 研究の目的

(1) 植物が光、重力、接触、水分勾配など外界からの刺激に応じて成長方向を調整する能力として、種々の屈性や傾性が知られている (重力屈性、光屈性、接触傾性など)。屈性や傾性は、運動方向が刺激の方向に依存する/しないの違いはあるものの、出力反応として器官の屈曲をひき起こす点で共通している。一方、左右相称花は、花の対称軸が鉛直

方向を向くように咲いており、花の向きが重力に応答して調節されるが、その応答反応は、花柄の捻れという、屈曲とは全く異なる反応を示す。本研究では、左右相称花が重力方向に依存して花を回転させる現象の解析を通して、その基本的特性を明らかにし、重力による器官の捻れが重力屈性と本質的に異なる現象であることを立証し、新しいタイプの重力応答反応として「重力捻性」の概念を確立することを目的とした (図1)。

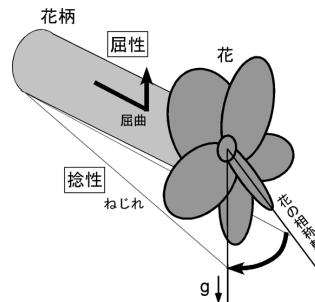


図1. 重力屈性と重力捻性 (概念図)

屈性は、軸状器官の上下面での成長差により軸が屈曲して起こる。一方、捻性は、角度が調節されるべき器官 (ここでは花) の向きの鉛直方向からのずれが、これを支える軸状器官 (こ

こは花茎) の軸のねじれをひき起こす。

(2) 具体的には、コチョウランを主な実験材料として、以下の諸点の明確化に主眼をおき研究を実施することとした。

花の回転は花柄の「捻れ」によるものであり、「屈曲」によるものではないこと。

重力刺激の方向に依存して花が回転すること。

花の回転は物理的な変形でなく、能動的・生物学的な作用によること。

反応機構に重力屈性と異なる特徴が見いだされること (表層微小管の配列の傾斜変化等)。

本現象が複数種の左右相称花で確認されること。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

コチョウラン *Phalaenopsis alliance* は予備的観察から花の回転がよくおこること、花のサイズが大きく種々の実験操作を施しやすく、結果の観察もしやすいことから、本課題における主な実験材料に採用した。予備観察で個体により重力への反応性に大きな差が見られたことから品種や生理的条件を揃えることが再現性の良いデータを得るために必須であり、研究の成否を握る鍵と考えられた。このため品種を決め、幼苗の頃から研究室内の人工環境下で栽培し、開花させた株を実験に使用するのが理想的と考えられたが、栽培に相当の年数を要し、広い栽培スペースが必要となるため断念した。種々検討した結果、一定品種の生育の揃った個体を年間を通じて供給できる特定の生産農家 (有限会社森田洋蘭園、埼玉県川越市) から開花間近の株をそのつど購入し、研究室で短期間 (数日~数週間) 栽培後、実験に供することとし

た。具体的にはとくに断らない限りミディ品種のスーパーメードと大輪品種のハッピーストリームを用いた。研究室での栽培は、20~25 に空調した北側実験室の窓際に蛍光灯付きの栽培棚を置き、自然光と人工照明(明暗周期 12L12D)を併用しておこなった。水は1週間に1度程度与え、さらに月1回程度栄養塩水溶液(1000倍希釈の HYPONEX 5-10-5; 村上物産)を与えた。ニワフジ *Indigofera decora* とミヤコグサ *Lotus japonicus* は、奈良女子大学構内(奈良県奈良市)に植栽されているものを観察した。

(2) 花の回転の誘導

5円玉を糸で吊し鉛直方向の標準とし、この線と花の頂萼片(真上の花びら)と唇弁(真下の色の濃い小型の花びら)を結んだ線(=花の相称軸)との間の角度を分度器で測定しながら鉢を倒す(あるいは花茎をしながら固定する)などの操作で花の向きを所定の角度に変化させ、花に重力刺激を与えた。なお花の向きを変える際、花の開花平面は不変のまま、その面内で花の相称軸の向きだけが変わるように花の方向を正常な状態から変化させた。

(3) タイムラプス動画の撮影

間欠撮影機能のあるデジタルカメラ(PENTAX Optio W10 または Nikon COOLPIX 995)を三脚に取り付け、20分おきに間欠撮影を7日間にわたりおこない Windows PC に画像ファイルを読み込み Movie Generator (スターメディアソフト、<http://www.starmediasoft.com/index.html/>)で12000倍速の動画に変換した。撮影は恒明条件下でおこなった。

(4) 花柄の捻れの観察

花柄の長さ方向に沿って製図用インクで点を一列に打っておき、反応後、この点列がらせん状に捻れることを確認するとともに、点の位置を反応前後の写真から計測し、花柄の部位ごとの捻れのピッチを算出した。また、同時に縦方向への花柄の伸長率も算出した。

(5) 花の重心の決定

花柄への付着部で切り離した花の適当な位置に糸を取り付けてぶら下げ、花の正面から写真をとった。糸を取り付ける場所を変えて同様の写真を3枚以上撮影し、花が重なるように写真を合成し糸の延長線が交わる場所を求め、すべての線が1点に重なることを確認し、これを重心とした。

(6) 単離(花-花柄)実験系の開発

花柄の切り口から各種薬剤(微小管破壊剤など)を吸い上げさせ花柄の捻れ運動への影響を調べるためには、花柄を花茎(花の集団がついている中央の茎)の部分から切り離しても花柄の捻れが再現するよう培養条件を整える必要がある。そのため以下の手順をとつ

た。花茎の皮の部分を少し残した状態で花柄を花茎からカミソリで切り離し、この残した花茎の皮の上から医療用粘着テープ(ウオノメ保護パッド, 大創産業)を貼り付け、プラスチックシャーレ(35mm)に花柄を固定した。これに固まる直前まで冷やした0.7% Agar を加え、蒸発を防ぐため花柄以外をパラフィルムで覆った。プラスチックシャーレの裏に両面テープを貼り付け、垂直な壁面に貼り付けた。この時、つぼみの相称軸が鉛直方向からずれるようにして花に重力刺激を与えた。

(7) プレッシャーチェンバーによる薬剤加圧急速浸透法の開発

切り離した(花-花柄)に花柄の切り口から薬剤を浸透させても何日も時間がかかると阻害剤を含まない対照実験でも重力にตอบสนอง能力が失われてしまう。そこで水ポテンシャル測定用装置であるプレッシャーチェン

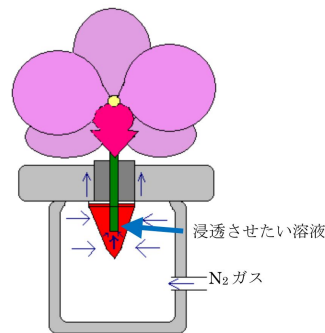


図2. 薬剤加圧急速浸透装置の概略

バーにより切り口側を加圧し薬剤を急速に花柄内に浸透させることで、微小管破壊剤の浸透を数日から数分に短縮することができた(図2)。

4. 研究成果

(1) 重力反応の定量的解析

特定の品種の良質なコショウランの株を特定の生産農家から入手し、短期間のうちに実験に供することにした結果、実験の再現性が向上し、相称軸を重力方向からずらすと、これを戻す方向にすぐ花柄が捻れはじめ、ずれが0度に達すると行き過ぎることなく運動が停止することが観察された。花の回転運動が誘導されるずれの閾値は5度以下であり、元に戻る際、行き過ぎないことから、花の角度が常に監視されており実際の閾値は5度よりもさらに小さいと考えられた。

(2) 花の重心測定

花の重心はちょうど花柄の花への接続部位にあり、花の向きをどのように回転させても重力のアンバランスに起因する回転力はほとんど生

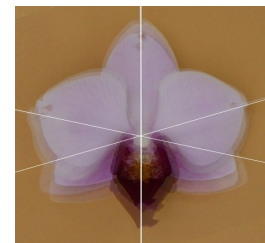


図3. 三直線の交点が重心。ずい柱に落ち、この裏側に花柄が付着する。

じないことがわかった(図3)。(1)と併せ、花柄の捻れは物理的な変形ではなく、重力方向のずれを検知しておこる生物学的反応であること

が示された。

(3) 花柄へのインク点列のマーキング解析
花の回転後インクの点列がらせん状に捻れていたことより花は確かに屈曲ではなく捻れにより回転していることが確かめられた。また捻れは花柄の全長に渡っておきているが、とくに縦方向への伸長が盛んな部分で大きい傾向があり、捻れが花柄の伸長に伴って起こることが示唆された。

(4) 花柄表皮の表層微小管の観察
花柄の捻れがシロイヌナズナの捻れ変異体のように器官表面の表層微小管の捻れ方向に依存した傾斜によって起こるか確かめるために抗チューブリン抗体を用いた蛍光抗体法で観察したが微小管の明白な傾斜傾向は見られなかった。

(5) 微小管破壊剤オリザリンの花柄の捻れに対する効果

微小管が捻れと関係が無ければ微小管を破壊しても捻れは起こるはずなので、花柄の細胞の微小管を破壊して捻れに対する影響を見る実験を考えた。しかしながら花柄の表面からオリザリンを与えても効果は全く見られずクチクラ層を通過できないことが考えられた。そこで花を花柄の下で切って花柄の切り口からオリザリンを与えることを計画した。しかし、オリザリンが花まで浸透するのに何日もかかりその間に花柄は捻れる能力を失うことが判明した。そこで、プレッシャーチェンバーによる加圧急速浸透法を試みた。その結果、50 μ M オリザリン水溶液に切り口を浸け2 atm で5分間加圧すると3の(6)に記載した単離実験系で花が回転することが確認できた。さらに実験終了後花柄を固定して観察すると微小管が破壊されていることが確かめられた。この結果より、コチョウランの重力刺激に伴う花柄の捻れには、シロイヌナズナの捻れ変異体で提唱されているような器官表皮の表層微小管が関与するメカニズムはあてはまらず、微小管を必要としない何らかの新奇のメカニズムが存在することが示唆された。

(6) コチョウラン以外の植物

花の相称軸の向きを人為的に変更することによる花柄の捻れによる花の回転は、マメ科のミヤコグサとフジでも観察された。

(7) 2. 研究の目的の(2)の①～⑤の達成状況とまとめ

点列によるマーキングにより花柄の捻れによる反応であることが証明された。

・ さまざまな向き、角度で重力刺激を与えた結果、5°程度という微妙な傾きでもコチョウランは正しい方向に花柄を捻ることが判明した。一方で花の重心は花柄の付着部にあり、花の相称軸の向きの変化は重量の

アンバランスを生じないので、物理的に回転しているのではなく、また花柄への応力を検知している訳でもなく、重力加速度のベクトル自体を感じて成長方向を修正していることが示唆される。このような変化はきわめて生物学的なものである。

反応の様態が屈曲か捻れかという以外に両者を区別する必然性のある特徴は見つかっていない。オーキシンの関与や分布、屈性関連遺伝子の関与などモデル植物であれば容易に確かめられるであろうことをどのように扱っていくか今後の課題である。内皮細胞や花柄の各組織の細胞の観察も必要である。

2種のマメ科植物について簡単な観察をおこなったのみである。重力捻性が一般的な現象であるか多様な植物を調べることはより使いやすい実験材料の発見につながるので、重要である。

<引用文献>

Endress PK (2001) Evolution of floral symmetry. *Cur Op Pl Biol* 4:86-91

Ushimaru A, Dohzono I, Takami Y, Hyodo F (2009) Flower orientation enhances pollen transfer in bilaterally symmetrical flowers. *Oecologia* 160:667-674

Ziegenspeck H (1936) *Orchidaceae*. In: Kirchner O et al. (Eds.), *Lebensgeschichte der Bl ü tenpflanzen Mitteleuropas*, vol. 1. Eugen Ulmer, Stuttgart. no. 4.

Hill W (1939) Resupination studies of flowers and leaves. *Ann Bot* 3:871-887

Nyman LP, Soediono N, Arditti J (1984) Opening and resupination in buds and flowers of *Dendrobium* (Orchidaceae) hybrids. *Bot Gaz* 145:215-221

Nyman LP, Soediono N, Arditti J (1985) Resupination in flowers of two *Dendrobium* (Orchidaceae) hybrids: Effects of nodal position and removal of floral segments. *Bot Gaz* 146:181-187

Rutherford R, Masson PH (1996) *Arabidopsis thaliana* sku mutant seedlings show exaggerated surface-dependent alteration in root growth vector. *Plant Physiol* 111: 987-998

Furutani I, Watanabe Y, Prieto R, Masukawa M, Suzuki K, Naoi K, Thitamadee S, Shikanai T, Hashimoto T (2000) The *SPIRAL* genes are required for directional control of cell elongation in

Arabidopsis thaliana. Development 127:
4443-4453

Hashimoto T (2002) Molecular genetic
analysis of left-right handedness in plants.
Phil Trans Roy Soc Biol Sci 357: 799-808.

Ishida T, Thitamadee S, Hashimoto T
(2007) Twisted growth and organization of
cortical microtubules. J Plant Res 120:
61-70.

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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

福田有希, 坂口修一 コチョウラン花柄の
ねじれ運動と微小管との関係について 日本
植物形態学会第 23 回大会 東京 2011/9/16
(P-7)

福田有希, 坂口修一 コチョウラン花柄の
ねじれ運動機構解明にむけた阻害剤処理実
験系の検討 日本植物学会第 76 回大会 姫路
市 2012/9/16 (P-032)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂口 修一 (SAKAGUCHI, Shuichi)

奈良女子大学・自然科学系・准教授
研究者番号: 20221997