

アサガオの切り出した蔓の 巻き付きにおけるジベレリン とエチレン阻害剤の効果

農研機構中日本農業研究センター
野菜畑作研究領域
夜船 友咲

はじめに

アサガオといえば、日本人にとっては大変身近な植物であり、小学校では夏休みの宿題にアサガオの観察日記をつけることも多い。そんな日本の夏の風物詩ともいえるアサガオだが、元々は薬用として奈良時代に中国から渡来した。その後、動く遺伝子（トランスポゾン）により形質に様々な変異が生まれ、江戸時代には観賞用としてアサガオの栽培ブームが起り、多様な品種・変異体が現在まで保存されている。このような多様性は、園芸上のみならず、研究材料としても非常に有用で、2016年にはアサガオの全ゲノム配列が解読された（Hoshino et al. 2016）。園芸植物としてブームが起った関係上、保存されているアサガオの変異は、花卉や葉、茎の色・形に関するものが多いが、そもそもアサガオには細長い茎（＝蔓）で周りのものに巻き付き成長するという、蔓植物としての特徴も持っている。

光合成でエネルギーを得ている高等植物にとって、光を遮られないよう、周りの植物より高い位置で葉を展開することは重要である。この競争に対して、蔓植物は自身を支えられる太い茎を発達させる代わりに、細長い茎で巻き付くことで、周囲の植物よりも高い場所へ到達し、光を獲得する戦略をとっている。つまり、巻き付きは蔓植物にとって生存する上で重要な形態形成反応である。“植物の巻き付き”

は、進化論で有名なチャールズ・ダーウィンも注目した古典的なテーマである（Darwin 1865）。植物は一般に、茎の先端を回しながら伸長する“回旋運動”を行いながら生長している（Darwin and Darwin 1880）。蔓植物では、この回旋運動で周囲の状況を探り、支柱などに接触すると、蔓で巻き付きながら伸長する。巻き付きの誘導には、支えとなる物との接触による刺激が関与すると考えられているが、接触してから巻き付き反応が起こるまでの詳しい仕組みについては解明されていない。

植物が接触のような機械的刺激により、自らの形態を変化させる現象は“接触形態形成”と定義されている（Jaffe 1981; Jaffe and Forbes 1993）。そして、植物の接触形態形成の初期過程には、植物ホルモンのエチレンが重要な役割を果たしていると考えられている（Jaffe and Forbes 1993）。著者は、以前所属していた研究グループで、アサガオの蔓の巻き付き仕組みと植物ホルモンの関連性について調べていた。本稿では、植物体から切り出した蔓で巻き付き反応を再現する実験系の開発と、その実験系を使って、ジベレリンとエチレンが巻き付きにどのように関係するのかについて調べた結果を報告する。なお、本稿は Yofune et al. (2024) の内容を一部抜粋、改変して再編集したものである。

切り出した蔓を用いた実験系

蔓の巻き付き仕組みにおける植物ホルモンの役割を調べるにあたって、植物ホルモン阻害剤などの薬剤を外因処理することは有効な手段の一つである。しかし、蔓植物は茎が長く伸長し、植物体が比較的大型になるものもあるため、植物体を用いる実験は限られたスペースの実験室内では難しいこともある。これらの問題に対して、植物体から切り出した蔓を用いる実験系は有用であると考えられる。この実験系の開発にあたって、まず切り出した蔓における巻き付き反応の再現を試みた。

アサガオの品種ムラサキ（*Ipomoea nil* cv. Violet）について、子葉の付け根から茎頂までの長さが20～35 cm以上になった植物体から、茎頂より下18 cmの箇所まで茎を切断し、蔓を切り出した。2% スクロースを含む10 mM Na-リン酸緩衝液（pH 6.2）の入った15 mL 遠沈管に、切り出した蔓と支柱代わりの竹串を立て、さらに少量の綿を遠沈管の上端に軽く詰めて蔓と竹串を固定した。この状態で、27°C、連続光下で処理を行った。なお、切り出した蔓からは、1 cm以上の長さの葉を葉柄の付け根で切って取り除いてある。処理開始から24時間後に、蔓が伸長した長さと茎頂が回旋して支柱に巻き付いた角度を計測することで、巻き付きの程度を定量化した。巻き付いた角度は、遠沈管の上端における蔓の位置を基準とし、支柱を中心と

して茎頂が回り込んだ位置までの角度を分度器で測定した(図-1A “ α 度”)。

アサガオの蔓の巻き付きとジベレリンの関係性

アサガオのムラサキから切り出した蔓を、2% スクロースを含む 10 mM Na-リン酸緩衝液 (pH 6.2) で処理したところ、24 時間後に伸長した長さおよび支柱に巻き付いた角度がともに小さく、支柱への巻き付きをほとんど示さなかった。植物の茎の伸長に与える植物ホルモンの一つとして、ジベレリンが挙げられる。ジベレリン合成能を部分的に欠くアサガオの矮性品種のキダチは、茎が太く節間も短いという形態を示し、蔓が細長く伸長しないため巻き付きを示さない(図-2 “Control”)。このキダチは外からジベレリンを与えることで蔓が伸長して表現型が回復し (Barendse and Lang 1972; King et al. 1994; Simmons and Coulter 1979), それに伴い支柱への巻き付きを示すようになることから(図-2 “+ GA₃”), アサガオの蔓の伸長にはジベレリンが必要であることが分かっている。これらのことから、植物体から切り出した蔓を用いた実験系において、ジベレリンの外因処理が巻き付き反応を誘導するのに必要なのではないかと考えた。

そこで、2% スクロースを含む 10 mM Na-リン酸緩衝液 (pH 6.2) に様々な濃度のジベレリン酸 (GA₃) を添加したところ、濃度が高くなるのに伴っ

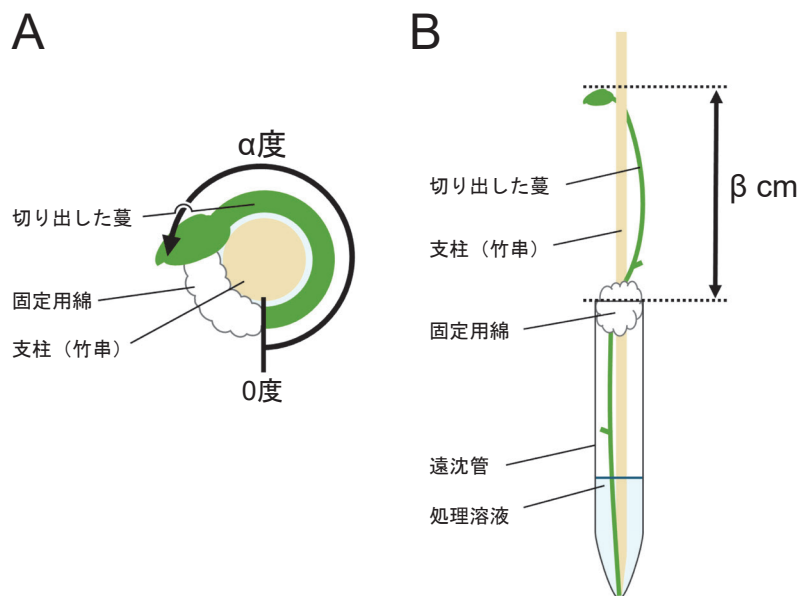


図-1 処理後の切り出した蔓における巻き付いた角度の測定の模式図 (Yofune et al. 2024 を一部改変)

24 時間処理を行った後、切り出した蔓の長さおよび巻き付いた角度を測定した。(A) 切り出した蔓を上から見た図。(B) 切り出した蔓を横から見た図。巻き付いた角度 (α 度) は、切り出した蔓を上から見た時に遠沈管の上端における蔓の位置を基準とし、支柱を中心として茎頂が回り込んだ位置までの角度を測定した。巻き付きの強さは、巻き付いた角度 (α 度) を遠沈管の上端から茎の先端までの蔓の長さ (β cm) で割ることで蔓の長さ 1 cm あたりの巻き付いた角度 (α 度/ β cm) として算出した。

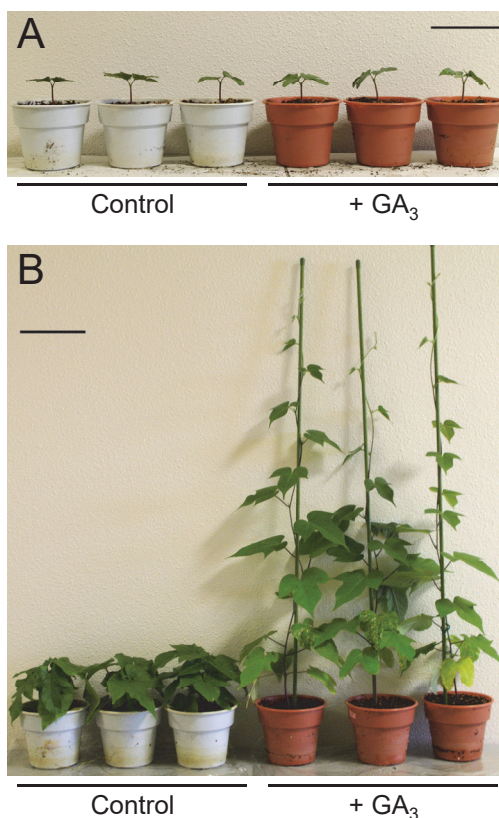


図-2 水 (Control) あるいは GA₃ 溶液 (+ GA₃) を処理したアサガオの矮性品種キダチの植物体 (Yofune et al. 2024 を一部改変)

播種から 1 週間後、2 週間後、4 週間後に、植物体 1 個体あたり 200 mL の水あるいは 140 μ M GA₃ 溶液をそれぞれ与えて栽培した。それぞれ播種から 1 週間後 (A) と 5 週間後の植物体 (B)。スケールバー: 10 cm。

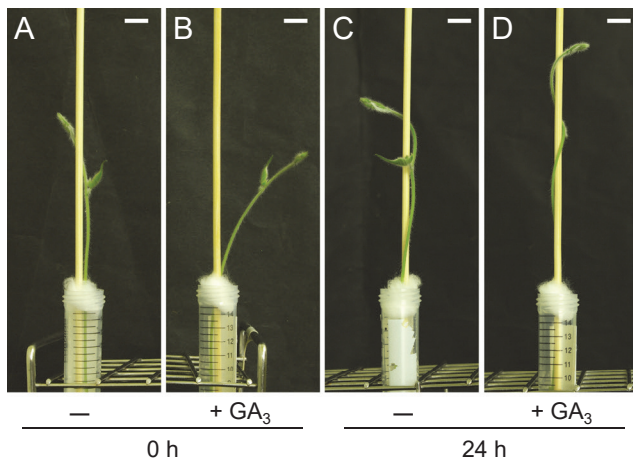


図-3 GA_3 を含まない処理溶液 (—) または $100 \mu\text{M}$ GA_3 を添加した処理溶液 (+ GA_3) で処理した切り出したアサガオのムラサキの蔓 (Yofune et al. 2024 を一部改変)
処理開始直後 (A, B) および 24 時間後 (C, D)。 GA_3 を含まない溶液での処理 (A, C) および $100 \mu\text{M}$ GA_3 を添加した溶液での処理 (B, D)。スケールバー：1 cm。

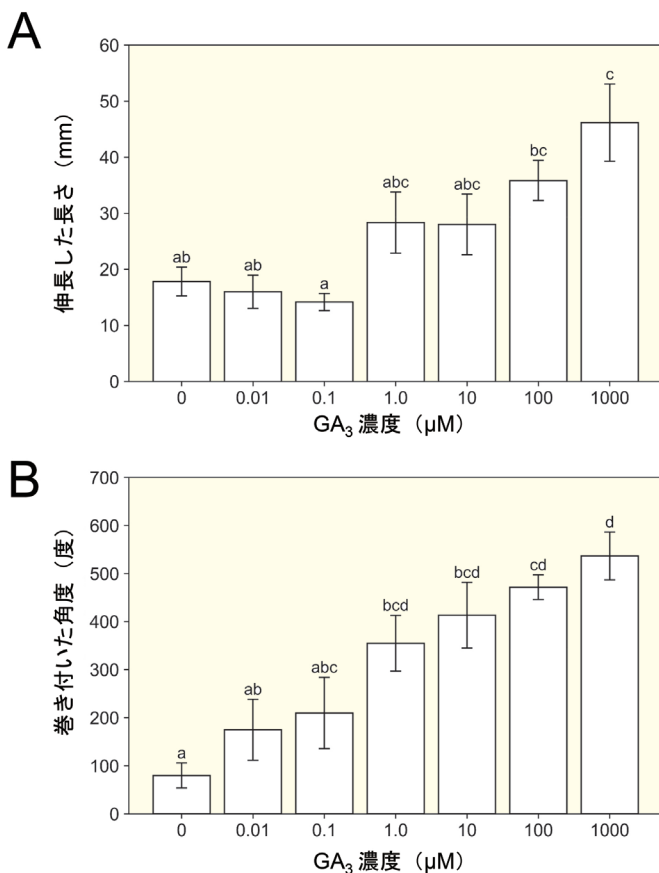


図-4 アサガオのムラサキにおける切り出した蔓の伸長と巻き付きに対するジベレリンの効果 (Yofune et al. 2024 を一部改変)

処理開始から 24 時間後における切り出したアサガオの蔓が伸長した長さ (A)、茎頂が回旋して支柱に巻き付いた角度 (B) をそれぞれ示している。データはそれぞれ 6 個体での平均値を示しており、誤差バーは標準誤差を示している。同じアルファベットのついたデータ間には有意差がない ($P < 0.05$; Tukey's HSD test)。

て、蔓の伸長した長さ、巻き付いた角度はともに大きくなる傾向がみられ(図-3, 図-4), $1 \mu\text{M}$ 以上の濃度の GA_3 の添加により巻き付きが有意 ($P < 0.05$; Tukey's HSD test) に見られた。これらの結果から、アサガオの蔓の巻き付きには蔓の伸長が必要であり、その蔓の伸長にはジベレリンが必要であることが示された。アサガオのムラサキにおいて、活性型ジベレリンの前駆物質が子葉から茎へ輸送され、そこで活性型ジベレリンへと変換されて利用されることが報告されている (Yang et al. 1995; Yang et al. 1996)。本実験系において、アサガオのムラサキの植物体から切り出した蔓に GA_3 を与えなかった場合には、蔓の伸長は小さく、支柱への巻き付きをほとんど示さなかったが(図-3, 図-4), これは他の器官(子葉, 胚軸あるいは根など)からの活性型ジベレリンあるいはその前駆物質の供給が断たれ、切り出した蔓に含まれるジベレリン量が伸長や巻き付きを引き起こすためには不十分であったためと考えられる。

アサガオの蔓の巻き付きとエチレンの関係性

続いて、蔓の巻き付きとエチレンとの関連性を調べるために、切り出した蔓にエチレンの作用阻害剤である 1-メチルシクロプロペン (1-MCP) を処理する実験を行った。なお、切り出した蔓で巻き付き反応を再現するために、2% スクロースと $100 \mu\text{M}$

表-1 アサガオのムラサキにおける切り出した蔓の伸長及び巻き付きに対する 1-MCP の 24 時間処理の効果 (Yofune et al. 2024 を一部改変)

処理方法	伸長した長さ (mm) ¹⁾	巻き付いた角度 (度) ²⁾	巻き付きのピッチ (度/cm) ³⁾	サンプル数
Control	47 ± 3 a	565 ± 31 a	52.1 ± 2.9 a	n = 12
+ 1-MCP (1.0 ppm)	46 ± 3 a	415 ± 36 b	38.3 ± 3.1 b	n = 12

1) 18 cm の長さに切り出したアサガオの蔓が処理開始から 24 時間後に伸長した長さ。

2) 遠沈管の上端における蔓の位置を基準とし、支柱を中心として茎頂が回り込んだ位置までの角度。

3) 巻き付きの強さとして、巻き付いた角度を遠沈管の上端から茎の先端までの蔓の長さで割って算出した。

数値は平均値 ± 標準誤差を示しており、各項目において同じアルファベットのついた数値間には有意差がない ($P < 0.05$; Student's *t*-test)。

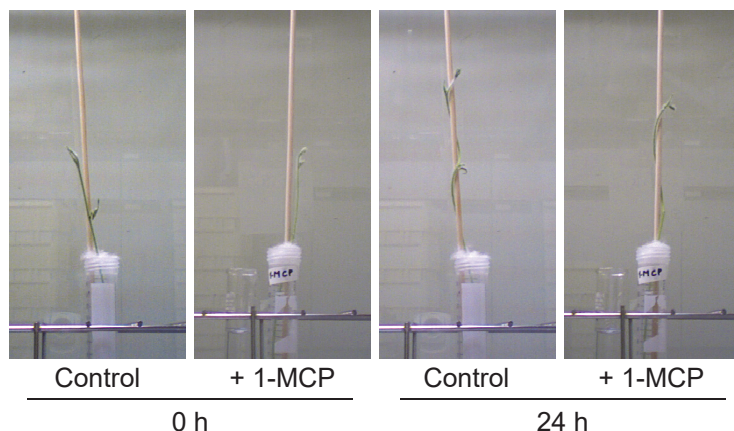


図-5 基本溶液 (Control) または基本溶液 + 1.0 ppm 1-MCP 燻蒸 (+ 1-MCP) で処理した切り出したアサガオのムラサキの蔓 (Yofune et al. 2024 を一部改変)

処理開始直後 (A, B) および 24 時間後 (C, D)。基本溶液処理 (A, C) および基本溶液 + 1-MCP 処理 (B, D)。スケールバー: 1 cm。

GA_3 を含む 10 mM Na-リン酸緩衝液 (pH 6.2) を基本溶液として用いた。1-MCP は気体であるため、密閉されたガラス水槽内で切り出した蔓を基本溶液で処理している間、1-MCP を 1.0 ppm の濃度で発生させ、27°C、連続光下において燻蒸処理を行った。処理開始から 24 時間後に、蔓が伸長した長さと茎頂が回旋して支柱に巻き付いた角度を計測した。

結果として、蔓の伸長した長さについては、基本溶液処理 (Control) と基本溶液 + 1-MCP 処理 (+ 1-MCP) との間に有意な差はみられなかった (表-1, 図-5)。ところが、巻き付いた角度については、基本溶液処理と比較して、基本溶液 + 1-MCP 処理で巻き付きが有意 ($P < 0.01$; Student's *t*-test) に抑制された (表-1, 図-5)。さらに、巻き付きのピッチとして、遠沈管の上端から茎の先端までの蔓の長さ 1 cm あたりの巻き付いた角度 (図-1 “ α 度/

β cm”) を計算すると、基本溶液処理と比較して、基本溶液 + 1-MCP 処理で巻き付きが有意 ($P < 0.01$; Student's *t*-test) にゆるくなっていた (表-1)。また、処理中の切り出した蔓の様子をタイムラプスカメラで撮影したところ、基本溶液 + 1-MCP 処理をした蔓は回旋運動を行いながら支柱に数回接触していたが、接触から支柱につかまって巻き付き始めるのにかかる時間が基本溶液処理のものより長くなる様子が見られた (図-6)。

蔓の巻き付き反応は支えとなるものとの接触刺激が引き金となると考えられており、“接触形態形成”の1つとみなすことができる。一般に、植物の接触形態形成の初期過程にはエチレンが重要な役割を果たしていると考えられているが (Jaffe and Forbes 1993), アサガオの蔓の巻き付き反応とエチレンとの関連性については明らかにされていなかった。1-MCP はエチレン受

容体に結合することで不可逆的にエチレン受容体の働きを阻害し、受容体のターンオーバーまでその効果を持続させる強力なエチレン作用阻害剤である (Blankenship and Dole 2003; Sisler and Serek 1997)。1-MCP を処理した蔓は、巻き付きが緩くなり (表-1), また回旋運動によって支柱と接触しても巻き付きを始めるのに時間がかかる様子が見られた (図-6)。これらのことから、エチレンはアサガオの蔓において、支柱に対する接触の感知あるいは支柱に沿って巻き付く際の蔓の形態変化に関わっている可能性がある。

アサガオの蔓の巻き付きの大まかな方向性を決めているのは回旋運動である。アサガオおよびシロイヌナズナの重力感知関連変異体で回旋運動が起きなくなることや (Hatakedo et al. 2003; Kitazawa et al. 2005), オーキシン輸送阻害剤によりアサガオの回旋運動が強く阻害されることから (Hatakedo et al. 2003), 回旋運動には、重力感知とそれに関連したオーキシンの局在化が重要であることが判っている (Hatakedo et al. 2003; Kitazawa et al. 2005)。これに対して、本研究でエチレン阻害剤処理を施したアサガオの蔓では回旋運動が認められたことから (図-6), エチレンはアサガオの回旋運動には関わっていないと思われる。巻き付き反応におけるエチレンの役割は、おそらく接触により感知した支柱に応答して形態変化を促し、しっかりとつかまることであると思われるが (表-1, 図-5, 図-6), そのメカニズムに

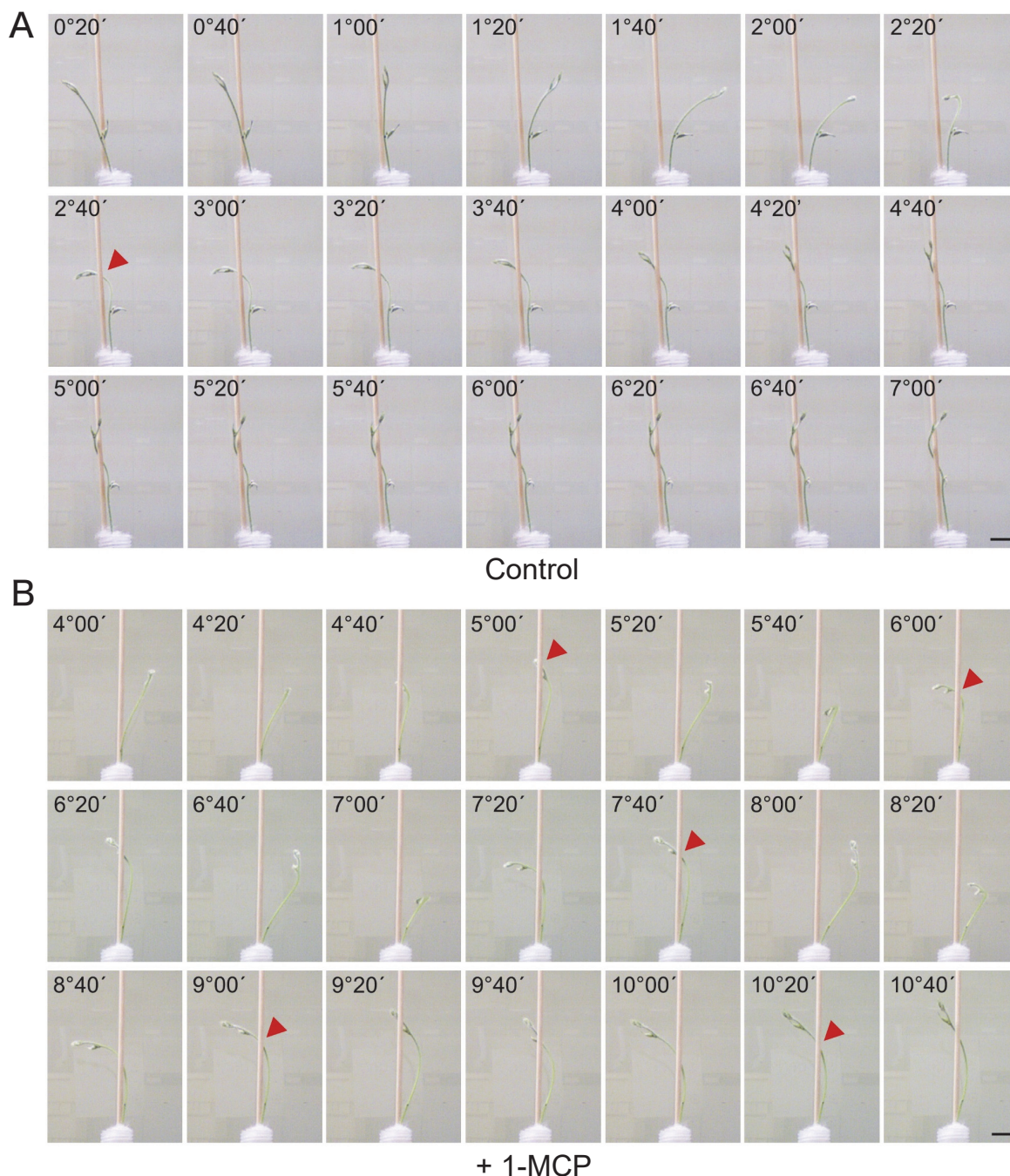


図-6 アサガオのムラサキの切り出した蔓を基本溶液 (A) または基本溶液 + 1.0 ppm 1-MCP 燻蒸 (B) で処理した時の蔓の動きのタイムラプス解析 (Yofune et al. 2024 を一部改変)

切り出した蔓の回旋運動および巻き付きの様子をそれぞれ 20 分間隔で横から連続撮影した。各画像の左上に処理開始からの経過時間を示す。赤い矢尻 (▼) は蔓と支柱との接触が起こり始めた箇所を示す。スケールバー：1 cm。

についてはさらに調査が必要である。

おわりに

本稿では触れなかったが、本稿のもととなった論文 (Yofune et al. 2024) では、エチレンの生合成経路における

鍵酵素である ACS について、アサガオの蔓の巻き付きに関連して発現量が変化する ACS ホモログがあったことも報告している。アサガオでは、形質転換体を作製する方法だけでなく、ゲノム編集技術を用いた変異体の作製例も報告されている (Kikuchi et al. 2005;

Ono et al. 2000; Shibuya et al. 2018; Shimizu et al. 2003; Watanabe et al. 2017; Watanabe et al. 2018)。今後、アサガオの蔓の巻き付きにおけるエチレンの働きについて解明するために、蔓の巻き付きに関連して発現量が変化する ACS 遺伝子について、形質転換体

を用いた発現の局在の詳細な解析や、ゲノム編集技術を用いた機能解析が有効であると考えられる。また、巻き付きの仕組みを解明するためにはエチレンの役割に加えて、巻き付きに対して大まかな方向性を与える回旋運動に関与しているオーキシンの役割についても今後調べる必要があると考えられる。現在、オーキシン応答性プロモーター GUS を導入した形質転換アサガオの作製に成功しており、それを利用した解析も進めている。

謝辞

本研究で使用したアサガオの種子は、文部科学省の「ナショナル・バイオリソース・プロジェクト (NBRP)」の支援を受けて、九州大学から提供された。

参考文献

- Barendse, G. W. M. and Lang, A. 1972. Comparison of endogenous gibberellins and of the fate of applied radioactive gibberellin A1 in a normal and a dwarf strain of Japanese morning glory. *Plant Physiol.* 49, 836–841.
- Blankenship, S. M. and Dole, J. M. 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 1–25.
- Darwin, C. 1865. On the movements and habits of climbing plants. *J. Linn. Soc. London, Bot.* 9, 1–118.
- Darwin, C. and Darwin, F. 1880. The power of movement in plants. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hatakeda, Y. et al. 2003. Gravitropic response plays an important role in the nutational movements of the shoots of *Pharbitis nil* and *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 118, 464–73.
- Hoshino, A. et al. 2016. Genome sequence and analysis of the Japanese morning glory *Ipomoea nil*. *Nat. Commun.* 7.
- Jaffe, M. J. 1981. Thigmomorphogenesis and thigmonasty. p. 394–395. In: McGraw-Hill yearbook of science and technology. McGraw-Hill, New York.
- Jaffe, M. J. and Forbes, S. 1993. Thigmomorphogenesis: the effect of mechanical perturbation on plants. *Plant Growth Regul.* 12, 313–324.
- Kikuchi, R. et al. 2005. Efficient transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* with a ternary plasmid in *Pharbitis nil*. *Plant Biotechnol.* 22, 295–302.
- King, R. W. et al. 1994. Genes for dwarfing and photoperiod flowering response in *Pharbitis nil* Choisy. *J. Plant Res.* 107, 215–259.
- Kitazawa, D. et al. 2005. Shoot circumnutation and winding movements require gravisensing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18742–18747.
- Ono, M. et al. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Pharbitis nil*. *Plant Biotechnol.* 17, 211–216.
- Shibuya, K. et al. 2018. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *EPHEMERAL* locus that regulates petal senescence in Japanese morning glory. *Plant Physiol. Biochem.* 131, 53–57.
- Shimizu, K. et al. 2003. Plant regeneration from suspension cultures in Japanese morning glory (*Ipomoea nil* (L.) Roth.). *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 72, 409–414.
- Simmons, H. A. and Coulter, M. W. 1979. Responses of normal and dwarf *Pharbitis nil* to an extended dark period and gibberellic acid. *Plant Cell Physiol.* 20, 1671–1673.
- Sisler, E. C. and Serek, M. 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiol. Plant.* 100, 577–582.
- Watanabe, K. et al. 2017. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *dihydroflavonol-4-reductase-B* (*DFR-B*) locus in the Japanese morning glory *Ipomoea* (*Pharbitis*) *nil*. *Sci. Rep.* 7.
- Watanabe, K. et al. 2018. Alteration of flower colour in *Ipomoea nil* through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *carotenoid cleavage dioxygenase 4*. *Transgenic Res.* 27, 25–38.
- Yang, Y. Y. et al. 1995. Metabolism and translocation of gibberellins in seedlings of *Pharbitis nil*. (I) Effect of photoperiod on stem elongation and endogenous gibberellins in cotyledons and their phloem exudates. *Plant Cell Physiol.* 36, 221–227.
- Yang, Y. Y. et al. 1996. Metabolism and translocation of gibberellins in the seedlings of *Pharbitis nil* (II). Photoperiodic effects on metabolism and translocation of gibberellins applied to cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 37, 69–75.
- Yofune, T. et al. 2024. The Effect of Gibberellin and an Ethylene Inhibitor on Twining of Vine Cuttings in Japanese Morning Glory (*Ipomoea nil* (L.) Roth.). *Hort J.* 93, 176–184.