

2021年度「理学部公募型アドバンス演習・実験・実習」 成果報告書

研究課題名：アルストロメリアの花の模様の発現機構

報告者（申請者名）：原 萌果

報告日：2022年2月18日

1. 研究過程の概要

花には、昆虫や人の目を惹きつけるため、赤色、黄色、白色などいろいろな色がある。赤色の花にはアントシアニン、黄色の花にはカロチノイドなどと、含まれている色素は異なっている。これらの色素の生合成に関しては様々な植物で調べられている。一方、パンジーのように花卉の中央と外側で色が異なるものや、ユリのように斑点状の模様を持つものもある。このような模様を作り出す仕組みはよく調べられていないが、アントシアニン生合成系を調節する遺伝子が関与していると考えられる。



図1：アルストロメリアの花

本研究では、アルストロメリアを用いて花の色や模様ができる仕組みについて調べることを目的とする。アルストロメリアは、長野県が生産量全国一を誇る花である。黄色、紫色、白色などの様々な色があり、さらに、花卉に斑点模様があるのが特徴である(図1)。この斑点の部分にはアントシアニンが含まれており、地色のアントシアニンとは異なるアントシアニンが蓄積していることが分かっている。しかし、アントシアニン生合成に関わる遺伝子はまだ調べられていない。アントシアニン生合成系遺伝子が同定できれば、花の模様を作るのに必要な調節遺伝子を調べることができるようになる。本研究によって花卉に斑点模様ができる仕組みを調べるための基礎的なデータを得ることができると考えられる。

花の模様ができる仕組みを調べるために以下の三点について調べた。

- 1) アルストロメリアのアントシアニン生合成系遺伝子の塩基配列
- 2) いつどこでどのように色素が蓄積してくるか
- 3) 花にはどのような色素が含まれているか

1) アルストロメリアでは、アントシアニン生合成に関わる遺伝子の多くはまだ調べられていない。そこで、すでにアントシアニン生合成に関わる遺伝子が調べられている他の植物のアントシアニン生合成系遺伝子の情報を用いてアルストロメリアの生合成系遺伝子をPCRで増幅し、塩基配列の一部を決定することを試みた。

2) 色素が蕾から開花までのどのステージで蓄積してくるかを調べるために、蕾の大きさと色素の有無を観察した。さらに、斑点部分の色素が花卉のどの細胞に蓄積しているかについて

は、切片を作製して顕微鏡で観察した。

3) 花の地色部分と斑点部分から色素を抽出し、薄層クロマトグラフィーを用いて色素を分離した。

2. 研究成果の要点

アルストロメリアでアントシアニン生合成系遺伝子のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ、カルコンシンターゼ、ジヒドロフラボノールリダクターゼの塩基配列を決定するため、他の植物の塩基配列の情報を用いてプライマーを作成し、PCR で増幅を試みたが、うまく増幅できなかった。

縦の長さが 2.5 cm 以上の蕾では、花卉に斑点がみられた。3.2 cm 以上の蕾では、地色の紫色がみられた。また、顕微鏡での観察結果から、斑点部分では、表皮細胞に色素が蓄積していることがわかった。さらに、色素が蓄積している細胞は周囲の他の細胞とは異なる形をしていた。

薄層クロマトグラフィーでは、うまく分離しなかったが、斑点部分と地色部分ではわずかに違いがあったため、異なる色素が含まれていると考えられる。

3. 成果の自己評価、残された課題や反省点など

アルストロメリアのアントシアニン生合成系遺伝子の増幅と塩基配列の決定を試みたが、目的の DNA が得られず、塩基配列の決定ができなかった。今後は、アントシアニン生合成系遺伝子を同定し、発現についても調べていきたい。

2021年度「理学部公募型アドバンス演習・実験・実習」 成果報告書

研究課題名：アリによる種子散布が、身近な春咲き植物の種子発芽率に及ぼす影響

報告者（申請者名）：中林 楓

報告日：2022年2月18日

1. 研究過程の概要

動物による種子散布には、哺乳類や鳥類、無脊椎動物などの様々な分類群の動物が関わっているとされるが、その中でもアリという昆虫に種子を運んでもらうように特化したアリ散布（myrmecochory）というものがある。アリ散布植物はエライオソームというアリの餌となる栄養物質を種子に付けることでアリをおびき寄せ、種子を運んでもらっている。なぜ植物の中にアリ散布に特殊化したものがあるのか？私は、この謎を解明する一つの観点として、アリによる種子散布が植物種子の生存、定着に良い影響を与えているのではないかと考えた。

本研究では、近所でよく見かけるような身近なアリ散布植物の種子を用いて、アリの種子散布実験と種子の発芽実験を行った。その結果、アリ散布の過程が種子の発芽、生存にプラスの影響を及ぼしていることがクサノオウについて明らかになった。一方、ヒメオドリコソウ、ムラサキケマン、アケビ、ホトケノザについては、プラスの影響が認められなかった。

2. 研究成果の要点

2-1 研究の目的

植物の中には、自らの種子をアリによって運ばせ、分布を拡大させるといった戦略をとるものがあり、それらはアリ散布植物とよばれている。一般的に、このような植物の種子には、エライオソームとよばれる脂肪酸や糖などを含んだ付属体が付いていることが多く、この付属体は、アリを誘引し、種子を親元から離れた場所に運搬するように仕向けているとされている。このようにエライオソームには分布域の拡大という面で植物側にメリットを与えているが、種子散布後の発芽率や実生の生存率など、種子の生存に関しては不明な点が多い。そのため、本研究では春に咲く身近な草本5種の種子を用いて、エライオソームの除去（アリによる除去、または人為的な除去）の有無による種子の発芽率を調べた。その結果からアリ散布の新たな側面を考えることが本研究の目的である。

2-2 研究の方法

● 研究対象

| | | |
|------|----------|----------------------------|
| 植物種： | ヒメオドリコソウ | <i>Lamium purpureum</i> |
| | ホトケノザ | <i>Lamium amplexicaule</i> |
| | クサノオウ | <i>Chelidonium majus</i> |
| | ムラサキケマン | <i>Corydalis incisa</i> |
| | アケビ | <i>Akebia quinata</i> |

アリ種： アメイロアリ *Nylanderia flavipes*

● 研究方法

- ① 2021年5月～8月に、発芽実験に用いる植物種子の採集を行った。その際、種子の運搬とエライオソームの除去を野外で行っているアリ種を特定した。そのうちの1種であるアメイロアリについて、1コロニーを持ち帰り、プラケースで飼育した。採集した種子は冷蔵庫（約4℃）で保管した。
- ② 2021年9月19日～10月25日に4回の種子放置実験をおこなった。プラケースで飼育していたアメイロアリのコロニー（女王アリ：有，繭：有，働き蟻：50～100個体）に、保管していた5種の種子（ヒメオドリコソウとアケビは10個、その他の3種は20個ずつ）を入れ、3日間（72時間）放置し、各種の種子がアリによって運搬された割合を観察した。
- ③ 72時間放置後、アリによって運搬され、エライオソームを除去された種子をアリのコロニー内から回収した。種子の大きさに対するエライオソームの相対的な大きさがアリの誘引に関わっているかを調べるため、種子の長径×短径とエライオソーム部分の長径×短径の比率を計算した。
- ④ ①で保管していた種子のエライオソームをデザインナイフを用いて人為的に除去した。
- ⑤ 5種の種子について、採取したままの種子（①、図2、コントロール）、アリによってエライオソームを除去された種子（③、図2）、人為的にエライオソームを除去した種子（④）を育種用ポットに一粒ずつ蒔き、その後育種用ポットを3日に一度観察し、植物種ごとに発芽した個体数を数え、発芽率を計算した。

2-3 結果

● 2-3-1 アメイロアリコロニーにおける植物種別の種子運搬割合



図1 飼育中のアリコロニーに植物種子を入れた様子



図2 ヒメオドリコソウの種子
左下：エライオソーム有り
右上：エライオソーム除去（アリ）

各植物種の72時間以内のアリによる種子の運搬割合は、ヒメオドリコソウの種子が0.9で最も高く、アケビが0.26で最も低かった（図3）

各植物種の種子における、相対的なエライオソームの大きさ（エライオソーム部分の長径×短径 / 種子の長径×短径）の平均値は、ヒメオドリコソウ：0.25，ホトケノザ：0.09，クサノオウ：0.16，ムラサキケマン：0.08，アケビ：0.08であった（図4）。アリがヒメオドリコソウの種子をよく運ぶ

のは、種子に対してエライオソームの部分が相対的に大きいことが関係している可能性がある。

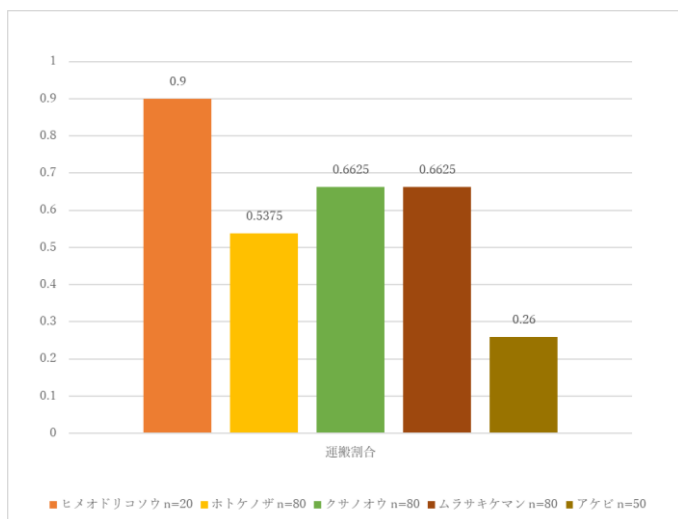


図3 各植物種のアリによる種子運搬割合

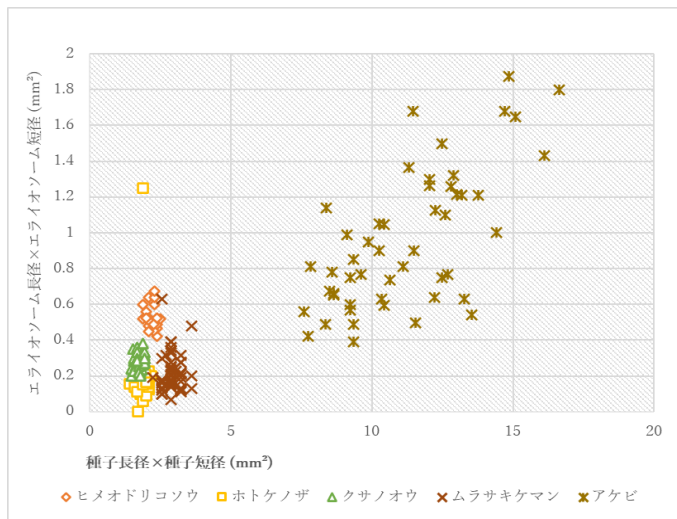


図4 種子の大きさに対するエライオソームの大きさ

● 2-3-2 アリによるエライオソーム除去が発芽率に及ぼす影響

発芽率を比較した結果、ヒメオドリコソウ、ムラサキケマン、アケビの3種は、どの処理を行った種子も発芽しなかったため、発芽率は0であった。ホトケノザとクサノオウ (図5) に関しては発芽が認められたため、発芽率を計算した。

表1 ホトケノザとクサノオウの発芽状況

| ホトケノザ | タネを蒔いた日 | 蒔いた数 | 発芽した数 | 発芽までの日数 | 発芽割合 |
|------------------|---------|------|-------|---------|---------|
| アリ操作 9/19~9/22 | 10月8日 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| アリ操作 9/24~9/27 | 10月8日 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| アリ操作 10/5~10/8 | 10月15日 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| アリ操作 10/22~10/25 | 11月16日 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 処理なし | 10月18日 | 50 | 5 | 10 | 0.1 |
| 人為的処理あり | 11月16日 | 54 | 13 | 21~33 | 0.24074 |

| クサノオウ | タネを蒔いた日 | 蒔いた数 | 発芽した数 | 発芽までの日数 | 発芽割合 |
|------------------|---------|------|-------|---------|---------|
| アリ操作 9/19~9/22 | 10月8日 | 13 | 2 | 20 | 0.15385 |
| アリ操作 9/24~9/27 | 10月8日 | 12 | 3 | 20 | 0.25 |
| アリ操作 10/5~10/8 | 10月15日 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| アリ操作 10/22~10/25 | 11月16日 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 処理なし | 10月18日 | 50 | 0 | 0 | 0 |
| 人為的処理あり | 11月16日 | 51 | 0 | 0 | 0 |

各条件での発芽率まとめ

ホトケノザ：コントロール 10.0% アリの操作有り 0.0% 人為的処理 24.1%

クサノオウ：コントロール 0.0% アリの操作有り 12.5% 人為的処理 0.0%

ホトケノザでは、人為的にエライオソームを外した種子の発芽率が一番高く、クサノオウでは、逆にアリによってエライオソームを除去された種子で発芽率が一番高かった。

さらに、ホトケノザとクサノオウのそれぞれについて、発芽の有無と種子の処理（コントロール、アリによる除去、人為的な除去）の関連についてカイ二乗検定を実施したところ、どちらも有意差がみられた（ホトケノザ： $p = 0.005$ 、クサノオウ： $p = 0.001$ ）。残差分析の結果、ホトケノザでは、アリによる除去区（ $p < 0.05$ ）で有意に発芽率が低く、人為的な除去区（ $p < 0.01$ ）で有意に発芽率が高いことが示され、クサノオウでは、アリによる除去（ $p < 0.001$ ）で有意に発芽率が高いことが示された。

また、アリのコロニー内では、ヒメオドリコソウ、ホトケノザ、クサノオウの 3 種の発芽が確認され（図6）、未回収種子の数のうち発芽した種子の率は、クサノオウ 58.3 %、ホトケノザとヒメオドリコソウ（芽生えでは 2 種の判別不能）は合わせて 73.7 %であった。



図5 クサノオウの発芽状況



図6 アリコロニー内での発芽状況

回収できなかったヒメオドリコソウ、ホトケノザ、クサノオウ 3 種の種子が発芽している。

2-4 考察

アリによる種子の操作が春咲きのエライオソーム植物の種子の発芽率を高めるかどうかは、クサノオウについては言えそうだが、ホトケノザについては予想とは逆の結果となった。種子の形態的には、クサノオウはエライオソームの部分と種子本体の部分が分かれているが、ホトケノザは種子本体にエライオソームが被さるように密着しているため、人為的にエライオソームを外す際に、本体に傷を付けてしまった可能性がある。そのため種子の吸水性が高くなり、温度の低い（0~5℃）12月中旬頃でも発芽することができたのではないかと考えられる。また、ホトケノザがアリの操作によって発芽が抑制されるとは考えにくく、実際、コロニー内に持ち去られた種子からは少なくとも 8 つは発芽している。一つも発芽しなかったのは、おそらく回収後の保存状態が良くなかったか、サンプル数が少なかったか、など要因はいくつか考えられるが、特定はできない。クサノオウについては、予想と同じ結果であったため、今後はサンプル数を増やし、確実性のあるデータにする必要があるだろう。

3. 研究成果発表

中林 楓, 2022.01.31, アリ散布が、アリ散布種子の生存、発芽に及ぼす効果, 信州大学理学部・進化生態学セミナー (市野研主催)

4. 発表会等で得られたコメントや意見

- ・採集した種子を低温で保存するのはなぜか。種子の発芽率には、低温処理を施した影響が出てしまう可能性があり、純粹にアリのエライオソーム除去による影響を認めることができないのではないか。
- ・植物の種数を絞って、もっと集中的に実験を行った方がよいのではないか。
- ・条件の良いアリコロニーを実験期間内に、野外で複数集めるのは困難であるため、実験に供試するコロニーの購入を検討してみてはどうか。

5. 成果の自己評価, 残された課題や反省点など

今回の研究では、アリを飼育したり、種子のエライオソームを除去したりするなどの地道な作業があり、さらに、その作業が何のためになるのかを考えて実験系を組むことが難しかった。そのため、気まぐれで実験を進めていたこともあり、条件設定やデータのまとめ方（何を数値的なデータで取る必要があるのか）に少々不満が残った。今後の課題としては、アリによる種子の処理によって、種子の生存率がどのようになるか（種子が真菌類に感染する割合等を調べる）、また、時間経過による発芽率の変化など記録し、何か関連があるかを研究したい。また、発表会でいただいたコメントのように今回のような実験では、生きている生物を用いるため、実験の準備段階で、アリの飼育や種子の保存法などを確立する必要があるようだ。

2021年度「理学部公募型アドバンス演習・実験・実習」 成果報告書

研究課題名：玄武岩中の青色晶洞鉱物について

報告者（申請者名）：木尾颯月

報告日：2022年2月18日

1. 研究概要

玄武岩中の晶洞に青色の鉱物が見つかったが、同産地の晶洞鉱物の先行研究論文等において青色を呈する鉱物についての記載や報告は見つけれなかった。本研究では、青色晶洞鉱物の同定を行うために、実体顕微鏡および偏光顕微鏡を用いて記載を行い、電界放出形電子プローブマイクロアナライザを用いて鉱物組成の定性分析を行った。

2. 研究目的

本研究では、青色晶洞鉱物の同定を目的として以下の2つを行った。

- 1) 青色晶洞鉱物の産状や化学的性質評価
- 2) 本鉱物の組成分析による構成元素の解明

3. 結果

3.1 蛍光性について

青色鉱物部分に長・短波長の紫外線を照射したところ、どちらの波長でも蛍光はしなかった。

3.2 薬品への耐性について

純水、エタノール、塩酸中に10分間入れたところ、本鉱物はどの薬品に対しても反応を示さなかった。ガラス板の上で各薬品につけた際、晶洞部分全体に見えていた淡青色が消え、光沢を持つ30 μ m~40 μ m程度の濃青色鉱物が確認された。

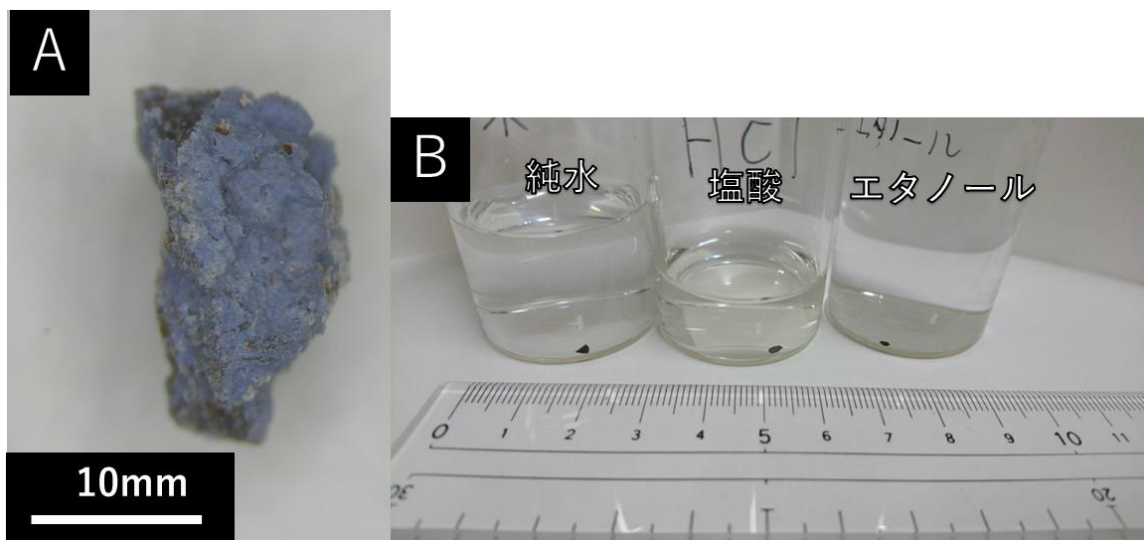


図1. (A)実験観察に用いた小岩片の1つ、(B)各種薬品に入れた岩片

3.3 青色鉱物の記載

晶洞部分を含む玄武岩岩片について実体顕微鏡で表面観察を行った（図 2A、B）。

実体顕微鏡観察を行った結果、青色鉱物が晶洞に限らず岩石表面の小孔に存在している（図 2C）。晶洞部分に産出した青色鉱物は最大で $200\ \mu\text{m}$ 程の大きさである。また、青色鉱物は偏光顕微鏡のオープンニコルでの観察結果より不透明鉱物であることが分かった。

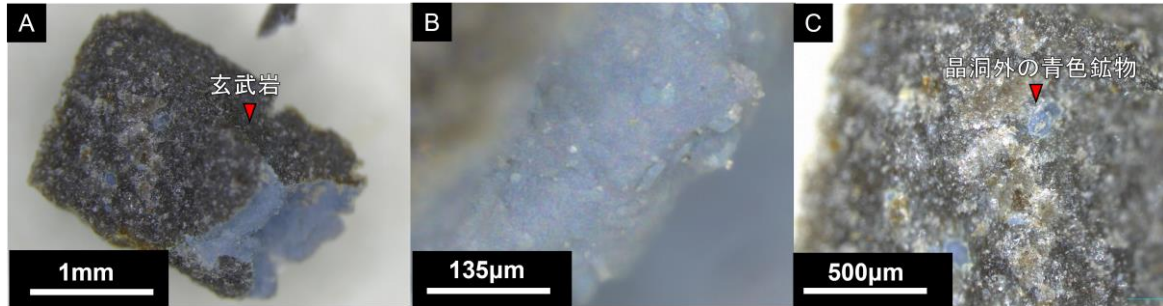


図 2. (A)実験観察に用いた小岩片の 1 つ、(B)各種薬品に入れた岩片

4.4 電界放出形電子プローブマイクロアナライザによる青色鉱物の電子像観察及び組成分析

青色鉱物部分の電子像観察の結果、微細な鉱物の集合体であることが分かった。また、定性分析の結果、Al, Si, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni が検出された（図 3）。

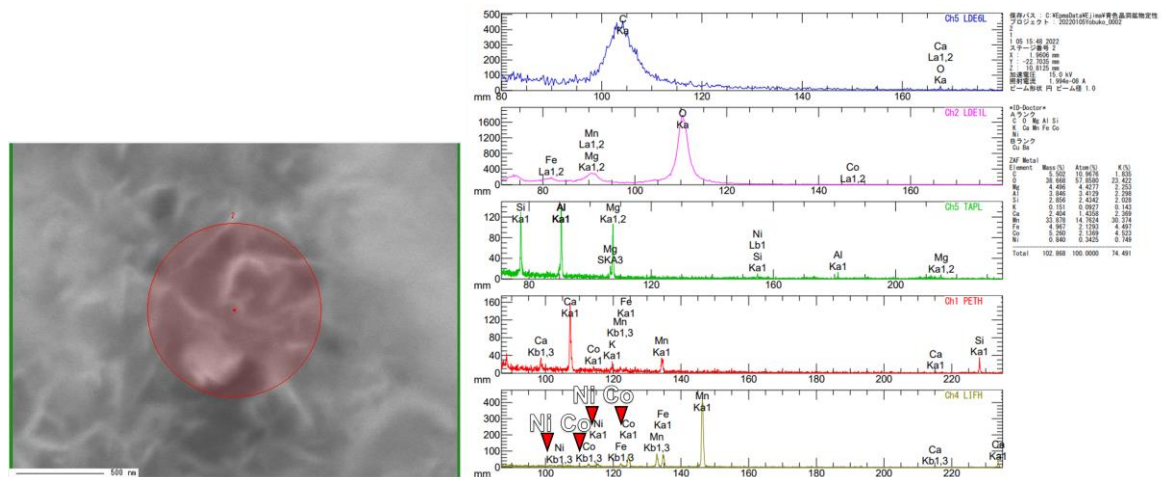


図 3. 定性分析点 (左) と得られた特性 X 線スペクトル図 (右)。Co や Ni 等の希少元素が検出されていることがわかる。

4. 研究成果の要点

玄武岩中の晶洞に産出した青色鉱物は、 $30\ \mu\text{m} \sim 40\ \mu\text{m}$ 程度の粒子であった。また青色鉱物は玄武岩中の小孔に産し、電子顕微鏡下においては微細な繊維状の物質の集合体であった。加えて、青色鉱物は Co および Ni のレアメタルを含む鉱物であることが分かった。

5. 研究成果発表

本年度は新型コロナウイルス感染拡大防止のため、研究成果発表会は中止となった。そのため本研究は発表会にてコメントや意見等は受けられなかった。2月下旬に行うアドバンスゼミ

において、研究成果報告を予定している。

6. 成果の自己評価、残された課題や反省点など

本研究では青色鉱物の記載を主に行ったが、なぜコバルトやニッケルなどのレアメタルが玄武岩中の晶洞中に濃集しているのかについては触れることが出来なかった。また今回は1サンプルのみの観察を行ったので、他の晶洞に産出した見た目の異なる青色鉱物も観察と組成分析を行い、同一の鉱物であるかを調べる必要がある。加えて、青色鉱物が微細であるため、鉱物名決定のためにはより詳細な観察が必要となる。今後は、電界放出形電子プローブマイクロアナライザおよびEDS搭載の透過型電子顕微鏡を用いた局所での組成分析、X線粉末構造解析や透過型電子顕微鏡による構造評価を行い、より詳しく青色鉱物について調べ、今後青色鉱物の成因についても研究を行いたい。

7. 参考文献

堀秀道, 楽しい鉱物図鑑, 株式会社 草思社, (1993), 52-53 118