

■原 著■ 2020 年度 神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## アメリカネナシカズラ (*Cuscuta campestris*) 回旋転頭運動の 定量化解析

横山俊哉<sup>1</sup> 水本 侑<sup>1</sup> 浅岡真理子<sup>1</sup> 西谷和彦<sup>1,2</sup>

Quantitative Analysis of the Circumnutation of *Cuscuta campestris*

Toshiya Yokoyama<sup>1</sup>, Yu Mizumoto<sup>1</sup>, Mariko Asaoka<sup>1</sup> and Kazuhiko Nishitani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: nishitani@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Autonomous helical movement of plant organs, originally termed circumnutation by Charles Darwin in the 19th century, is ubiquitously observed in land plants. In *Cuscuta campestris*, a stem parasitic plant whose stems coil around the host stem during parasitization, this movement plays a critical role in searching for a host. Although patterns of circumnutation have been extensively investigated in several species under different environmental conditions, such as variable light and temperature, and after chemical exposure, the mechanisms underpinning this movement remain largely unknown. This is partly due to the lack of suitable methods for acquiring high-resolution spatio-temporal images of plant organs during circumnutation. To address this issue, we designed a time-lapse image acquisition system with two video cameras: one positioned to capture images from above and the other to capture images from the side of the plant. Using this camera system, images of circumnutating *C. campestris* shoots were captured under different light conditions, and the effects of light quality on the winding angle and rotation rate of circumnutation were quantified. The results indicate the utility of this imaging system in evaluating the effects of light quality on circumnutation, and highlight the need for improvements in data resolution for 3D image analysis.

**Keywords:** circumnutation, *Cuscuta campestris*, growth movement, time-lapse video, parasitic plant

### 序論

回旋転頭運動は植物の茎や根などの各組織で見られる内在性成長運動である。被子植物が成長する過程で茎の先端が円を描くように「首を振る」現象が典型的な回旋転頭運動である。回旋転頭運動の研究は19世紀末に Charles Darwin により記載され<sup>1)</sup>て以来、その周期や軌跡の形状、光や温度などの環境要因による影響などが、様々な側面から精力的に研究されてきた<sup>2,3)</sup>。

回旋転頭運動は陸上植物では広くみられ、シロイヌナズナ、エンドウ、ヒマワリ、ネナシカズラ、コムギなど多くの植物で解析されている<sup>4)</sup>。つる性の植物や寄生植物では、回旋転頭運動により、支柱となる植物の探索や、宿主となる植物の探索に有効な

成長運動であると考えられている。一方、つる性でも寄生性でもない大多数の種子植物における回旋転頭運動の生物学的な意味については、現時点では明確ではない。

アメリカネナシカズラ *Cuscuta campestris* Yuncker はヒルガオ科の1年生植物で、他の被子植物の茎や葉に寄生して、宿主より水と栄養素などを吸収して生きる完全寄生植物である。アメリカネナシカズラは発芽すると茎を伸ばしながら回旋転頭運動を行い、宿主となる植物を探索する。茎が物体に接触すると、宿主になりうる植物か否かに関わらず巻き付く。巻きついた後の寄生過程の進行には接触刺激以外に光条件や宿主植物由来の因子が関係していることが分かっている<sup>5)</sup>。

宿主になることができる植物に巻き付いた時には、接触部分に吸器と呼ばれる分裂組織が発生する。吸器の先端に位置する探索糸と呼ばれる細胞は先端成長により急速に伸長し、宿主組織内に侵入し、宿主の維管束組織内に到達すると管状要素に分化し、最終的に宿主とアメリカネナシカズラの道管が接続し、寄生が成立する。

アメリカネナシカズラの寄生過程は、青色光により促進され、回旋転頭運動も光質により影響を受けることが報告されている<sup>6)</sup>。一方、回旋転頭運動そのものの解析法は、シロイヌナズナの子生えを用いた方法が報告されている<sup>2)</sup>。しかし、高い分解能で定量的に解析する実験系は確立されていない。そのため、環境シグナルによる回旋転頭運動の変化を高い精度で定量的に評価した研究はほとんどない。

そこで本研究ではアメリカネナシカズラの寄生過程に至るまでの回旋転頭運動の解析法の確立を目指した。そのために、シロイヌナズナ子生えの回旋転頭運動を解析した先行研究<sup>2)</sup>を参考にして、二台のタイムラプスカメラを用いて、アメリカネナシカズラ茎の回旋転頭運動を二次元的に定量化する実験系を開発した。この方法により、光質（青色光、赤色光、緑色光）を変えることにより、回旋転頭運動に対する光の影響を定量的に解析した。

## 材料と方法

### 実験植物

シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Col-0 の種子を MGRL 培地<sup>7)</sup>を加えたロックウール (Rockwool B.V., Grodan) に蒔き、22°C 連続白色光下 ( $45 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で育成した。アメリカネナシカズラは本研究室で7回の自殖により順化させた種子を用いた。種子発芽を促進するために22°Cの濃硫酸に25分間浸した後、室温で多量の純水で5回濯ぎ、硫酸を除いた。硫酸処理をした種子は、深型シャーレ (滅菌シャーレ深型、IWAKI) 内で、3 mL の純水で湿らせたろ紙 (No.5A 90 mm, 東洋濾紙) 上に蒔き、連続白色光 22°C で育成した。

### 寄生誘導

発芽後5日齢、茎全長が5 cm 以上のアメリカネナシカズラ子生えを選抜し、花茎が10 cm 以上に伸びた4~5週齢のシロイヌナズナの花茎にサージカルテープ (マイクロボア TM サージカルテープ 24, 3 M) で軽く接着させ、青色光下 (波長 444 nm、光量  $7 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )、22°C で48時間静置し、寄生を誘導した。寄生を確認した後、連続白色光下 (光量  $45 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )、22°C に移して育成し、成長した側枝

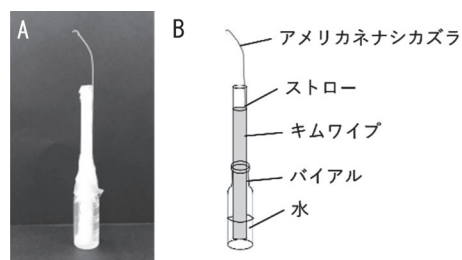


図1. 回旋転頭運動の撮影用バイアル装置. A. バイアル写真. B. バイアル模式図.

を実験に供した。

### 実験装置

水道水を1 mL 含む1.5 mL バイアル (screw top vial, La-Pha-Pack) にプラスチック性ストロー (長さ8 cm、直径6 mm) を差し、水で濡らしたキムワイブ (キムワイブ、日本製紙クレシア) を詰めて、ストローを固定した。アメリカネナシカズラの側枝を茎頂から3 cm 下の部位で切断し、頂端から2 cm の茎が突出するようにストローに固定した。ストロー開口部とストローとバイアルの境界面の隙間はパラフィルムを張り、水の蒸発を防ぐ工夫をして、回旋転頭運動の測定に供した (図1)。

アメリカネナシカズラ茎を固定したバイアルを人工気象器 (LH-80LED-DT、日本医科器械) 内のステージに載せて固定した。人工気象器の天井には、青、赤、緑の三色の異なる波長特性を持つLEDランプの照射を切り替えることができる照明装置を設置し、人工気象器の外部より光の波長と強度を制御した。人工気象器内の側方と真上にそれぞれ1台のカメラ (WG-6, RICOH) を設置し、インターバル撮影モードで、アメリカネナシカズラ茎を5分間隔で24時間に亘りタイムラプス撮影を行った。

### 各光条件下での回旋転頭運動の撮影

単色光条件はそれぞれ青色光 (波長 445 nm、光量  $8.61 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )、赤色光 (波長 660 nm、光量  $8.59 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )、微弱な緑色光 (波長 520 nm、光量  $0.21 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) の3条件に設定した。

光条件を切り替える実験では、それぞれの単色光の強度を変えず、青色光から赤色光、赤色光から青



図2. 回旋転頭運動の傾き角度  $\theta$  .

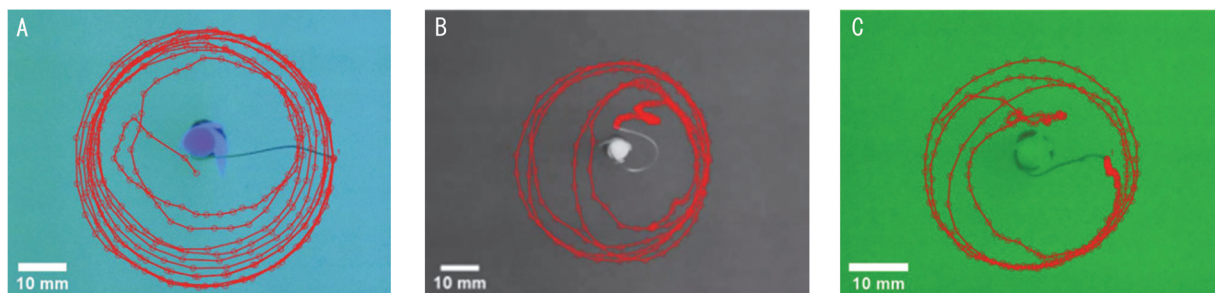


図 3. 各単色光条件下の回旋転頭運動の軌跡. A. 青色光条件. B. 赤色光条件. C. 緑色光条件.

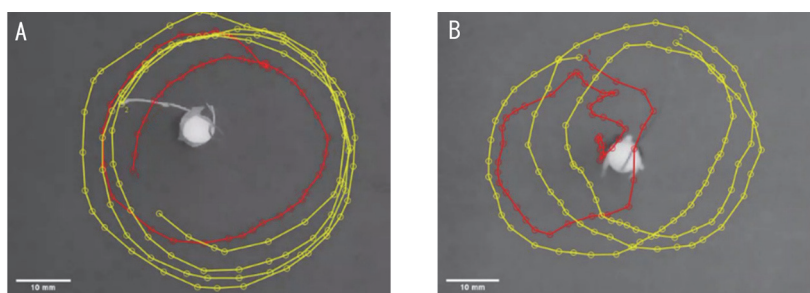


図 4. 光条件の切り替えに伴う回旋転頭運動の軌跡. A. 青色光条件から赤色光条件への切り替えた時の回旋転頭運動の軌跡. B. 赤色光条件から青色光条件への切り替えた時の回旋転頭運動の軌跡. 赤色の折れ線：切り替え前. 黄色の折れ線：切り替え後.

色光に波長のみを切り替え、切り替える前の 4 時間、切り替えた後の 8 時間、合計 12 時間に亘り、5 分間隔でのタイムラプス撮影を行った。

### 画像解析

連続撮影後、画像データを画像処理ソフト ImageJ (NIH) により解析し、側方より撮影した画像スタックデータから回旋転頭の角度の計測が可能な画像を選び、頂端の接線と垂線のなす角  $\theta$  を傾き角度を計測した (図 2)。茎頂の回転角速度は上部より撮影した画像スタックデータを ImageJ で解析し、外部プラグインである MTrackJ (<https://imagescience.org/meijering/software/mtrackj/>) を用いて、アメリカネナシカズラの茎頂の軌跡より回転角速度 rad/s を算出した。

### 統計処理

傾き角度、角速度のデータは表計算ソフト Excel を用いて計算し、平均と標準偏差で示した。単色光条件の各群について一元配置分散分析を行った。光条件を切り替えた時の実験データは、光条件切り替えの前後で対応のない  $t$  検定を行った。すべての統計処理について有意水準を 5% 未満とした。

## 結果

### 単色光条件下の回旋転頭運動

青色光、赤色光、緑色光、いずれの条件でもアメリ

カネナシカズラの 3 cm の茎切片で回旋転頭運動が観測された (図 3)。それぞれの条件下での傾き角度と角速度について計測結果を表 1 上部に示す。各単色条件間の傾き角度、角速度は一元配置分散分析で有意差が認められなかった (傾き角度  $P = 0.37$ 、角速度  $P = 0.20$ )。

### 光条件の切り替えに伴う回旋転頭運動の変化

光条件を切り替える実験では、切り替え後に軌跡のゆがみが観察された (図 4)。傾き角度は、青色光が赤色光に比べ小さくなる傾向が観察されたが (表 1 下部)、有意な差は認められなかった ( $P = 0.14$ )。角速度についても光条件の切り替えによる有意な変

表 1. 回旋転頭運動の傾き角度と角速度. 上部. 単色光条件下での傾き角度と角速度. 下部. 光条件を切り替えた時の傾き角度と角速度

単色光条件		
	傾き角度 deg	角速度 rad/s
青色光	105.36 ± 10.40	6.97 × 10 <sup>-4</sup> ± 1.26 × 10 <sup>-4</sup>
赤色光	104.95 ± 10.95	5.78 × 10 <sup>-4</sup> ± 0.49 × 10 <sup>-4</sup>
緑色光	116.69 ± 10.55	5.14 × 10 <sup>-4</sup> ± 1.34 × 10 <sup>-4</sup>
$N = 3$		
光を切り替えた条件		
	傾き角度 deg	角速度 rad/s
青色光 (前)	105.30 ± 27.13	5.52 × 10 <sup>-4</sup> ± 1.16 × 10 <sup>-4</sup>
赤色光 (後)	120.49 ± 5.97	7.09 × 10 <sup>-4</sup> ± 0.90 × 10 <sup>-4</sup>
赤色光 (前)	111.63 ± 19.13	5.98 × 10 <sup>-4</sup> ± 1.42 × 10 <sup>-4</sup>
青色光 (後)	88.75 ± 13.67	6.02 × 10 <sup>-4</sup> ± 0.14 × 10 <sup>-4</sup>
$N = 3$		

化は認められなかった ( $P=0.97$ )。

## 討論

本研究では開発した実験系により、アメリカネナシカズラの茎の回旋転頭運動を上方、および側方からのタイムラプス撮影を行うことで、明瞭な回旋転頭運動の動画を得られた。回旋転頭運動を評価できる実験系は確立されておらず、新たな実験系として本実験系を提案したい。また、カメラの台数を追加することで、カメラの座標推定、画像計測の技術が適用可能になり、回旋転頭運動の三次元データが得られると期待される。三次元データを利用した回旋転頭運動の詳細な定量化は今後の研究課題である。また、本研究を進めるにあたって、アメリカネナシカズラの側枝の個体差が測定精度に大きく影響していることが明らかとなった。今後この実験系にて回旋転頭運動の解析をする際には芽生えを用いることにより、発生過程での個体差を少なくし、個体間のばらつきについての課題を解消したい。

回旋転頭運動の定量化にあたって、回旋転頭運動の傾き角度と角速度について定量化を行った。単色光条件下での回旋転頭運動の傾き角度と角速度については統計的差異が見られず、青色光では回旋転頭運動が強化されるとする先行研究<sup>8)</sup>とは異なる結果となった。これは先行研究が材料としてアメリカネナシカズラの芽生えを使用していたのに対し、本研究ではアメリカネナシカズラの側枝を使用していたことが原因である可能性が考えられる。もう一つの可能性として、傾き角度と角速度には光条件以外の別の要素が大きく影響している可能性が考えられる。三つ目の可能性として、今回用いた側方と上方からのタイムラプス撮影では捉えられない茎の成長運動が、光に依存して変化していることも考えられる。これら傾き角度、角速度以外の要素についてのより精度の高い定量化は今後三次元データの取得、計測

を行い多角的なデータを取得し、より分解能の高い時空間測定により可能になると考え、現在、分解能の高い時空間測定を進めているところである。

## 謝辞

本研究の一部は、研究課題「重イオンビーム商照射によるネナシカズラ変異体の作出と変異体を用いた寄生機構の解析」に対する2020年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS2002008)、一部はJSPS/MEXT 科研費JP17K19374, JP24114005, JP18H05489の助成を受けて行われた。

## 文献

- 1) Darwin, C (1880) *The power of movement in plants*. John Murray, London, UK.
- 2) Schuster J and Engelmann W (1997) Circumnutations of *Arabidopsis thaliana* seedling. *Biol. Rhythm Res.* **28**: 422-440.
- 3) Millet B and Badot PM (1996) The revolving movement mechanism in *Phaseolus*: New approaches to old questions. In: *Vistas on Biorhythmicity*. Greppin H, Degli Agosti R, Bonzon M, eds, University of Geneva. pp. 77-98.
- 4) Maria Stolarz (2009) Circumnutation as a visible plant action and reaction. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 380-387
- 5) Tada Y, Sugai M and Furuhashi K (1996) Haustoria of *Cuscuta japonica*, a holoparasitic flowering plant, are induced by cooperative effect of far-red light and tactile stimuli. *Plant Cell Physiol.* **37**: 1049-1053.
- 6) Furuhashi T, Furuhashi K and Weckwerth W (2011) The parasitic mechanism of the holostem parasitic plant *Cuscuta*. *J. plant Interact.* **6**: 207-219
- 7) Tsukaya H, Ohshima T, Naito S, Chino M and Komeda Y (1991) Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic arabidopsis. *Plant Physiol.* **97**: 1414-21.
- 8) Lane HC and Kasperbauer MJ (1965) Photomorphogenic responses of dodder seedlings. *Plant Physiol.* **40**: 109-116.