

公 益 財 団 法 人

下中記念財団

The Shimonaka Memorial Foundation

下中科学研究助成金取得者研究発表

研究発表一覧は下記からご覧いただけます。

<https://www.shimonaka.or.jp/3s-grant-contest/>

アクアポリン遺伝子から探るデンジソウの水上葉形成メカニズム

ノートルダム清心学園 清心女子高等学校

田中 福人

1. はじめに — デンジソウについて —

デンジソウ（学名：*Marsilea quadrifolia* L 英名：Water clover）は夏緑性の水生シダ植物であり、水田や沼などの流れのない水域で生育する。和名を漢字で記すと「田字草」となるが、これはクローバーのような小葉4枚が開いたときに「田」の字のように見えることからこの名前がつけられている（図1）。ホームセンターでは、アクアリウムの水草として市販されており、睡蓮鉢等で作られるビオトープに植栽されるなど、観賞用としても人気がある植物種である。



図1. デンジソウ（於：岡山自然保護センター）

野外での分布範囲はヨーロッパ・インド北部から東アジアで、国内では北海道・本州・四国・九州と奄美大島の低地に生育する。かつては、暖かい地域を中心に普通に見られ、水田の雑草とされていたが、農薬・除草剤の使用による水質の汚染、水田の

耕作方法の変化、さらには水田の減少などで個体数が激減し、環境省レッドリストでは、絶滅の危険が増大している種として『絶滅危惧Ⅱ類』に選定されている。そのため、自然保護センターや植物園等を除いて、野外で見かけることはほとんどなくなってしまった。

2. 研究目的

デンジソウの4枚の小葉は、その生育環境の特性から、葉柄を空中に伸張させて展開する「地上葉」と、水面上で展開する「浮き葉」の存在が知られている（図2，3）。特に浮き葉は、周りの水位が高くなって個体が完全に沈んだ環境でよく見られる。小葉と茎をつなぐ部分を葉柄とよぶが（デンジソウの茎は地面を這って伸びており、匍匐茎とよばれる。通常、茎のように見える部分は葉柄である）、地上葉の葉柄の長さは通常、10～15cm程度であるのに対し、浮き葉は水面上に葉を展開するため、水位が高くなるほど葉柄が伸長し、25cmを超えることもある。浮き葉をつくる理由として、小葉の組織が水によってふやけたり、光合成が阻害されるのを防ぐためであると考えられている。浮き葉を形成する際は、水面上に葉を浮かべるために前述の「葉柄」が非常に良く伸びるが、その詳しいしくみを報告した先行研究は見当たらない。そこで本研究では、浮き葉形成の際に葉柄が伸びるメカニズムを明らかにすることを目的とした。



図2 地上葉



図3 浮き葉

現行の高等学校「生物」の教科書では、旧教科書と比べ、遺伝子やタンパク質の働き等を扱った分子生物学の内容が増えている。しかし、それらを高校の教育現場で体験的に理解する実験教材については、コスト、実験設備、指導者の力量等、様々なハードルをクリアする必要があると、開発が遅れている。本校の教育課程では、理科の教科内に「課題研究」の時間が設定されており、この時間では、各々の生徒が興味を持ったテーマについて研究活動を行う。そこで、本研究を遂行するにあたり、高校生を対象とした分子生物学実験の実践例を示し

たいと考え、実験はこの「課題研究」の時間内に、生徒に指導する形で進めた。

3. 研究仮説

通常、成長した植物細胞では、液胞がよく発達していることが知られている(図4)。液胞の中身の大半は水分であるため、細胞が成長し、葉柄が伸びるときには、細胞内の液胞に水がさかんに入ると考えられる。そこで、デンジソウは葉柄をより長く伸ばすために、細胞への吸水性を高めるしくみがあるのではないかと考えた。そして本研究では、そのしくみとして、特に、細胞内外の水の通り道であるアクアポリンが関係していると仮説を立てた(図5)。アクアポリンは細胞膜上あるいは液胞膜上に存在していて、水分子を通す孔をもっている。また、アクアポリンの成分はタンパク質であり、遺伝子の働きによってつくられることが知られている。つまり、アクアポリン遺伝子の働きが活発になり、細胞内にアクアポリンが多くつくられたならば、細胞内へ水が入りやすくなり、細胞の成長及び、葉柄の伸長が急速に進むと考えられる。

また、遺伝子が働く際には、DNAに含まれる遺伝情報から mRNA がつくられ(=転写)、その後、mRNA をもとにタンパク質が合成される(=翻訳)。アクアポリン遺伝子の働きが活発になることを示すために、この「転写量」と「翻訳量」に注目した。浮き葉が発生する環境条件(個体が完全に水につかった状態)と、地上葉が発生する環境条件(個体が水につかっていない状態)の株から葉柄の組織サンプルを各々採取し、アクアポリン遺伝子の「転写量」及び「翻訳量」を比較することで、前述の仮説の検証を行った。

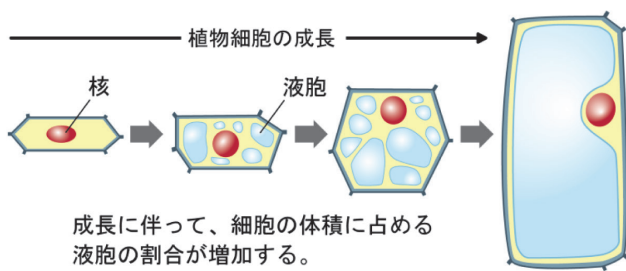


図4 植物細胞の成長

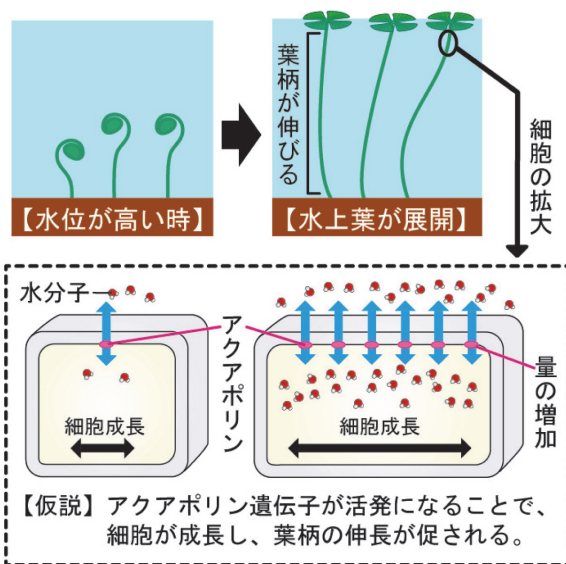


図5 研究仮説

4. 実験方法

4-1 アクアポリン遺伝子の「転写量」の比較

デンジソウの小葉は最初、ゼンマイのような形態をとっており、4枚の小葉も重なっているが(図6)、その後、小葉が開き、「田」の字のように見えてくる。一度葉が開いてしまうと、葉柄の伸長が見られなくなるため、実験では主に、展開前の小葉を使用した。実験方法はRT-PCR法を採用し、その概略は図7に示すが、実験は下記のa～dの順序で行った。

a. RNAの抽出

実験室内の窓際で生育させているデンジ



図6 デンジソウ小葉の初期形態

ソウ株から、葉柄を含む小葉を0.1g採取し、組織内でつくられている全RNAを抽出した。抽出試薬はRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社)を用い、付属のマニュアルに沿って抽出を行った。実験後、RNAがきちんと抽出されているかについては、分光光度計で確認した。

b. cDNAの作製

aで抽出したRNAに逆転写反応(RNAに含まれる塩基配列の情報をもとにDNAを合成すること。この時に合成されたDNAを特にcDNAとよぶ)を起こさせ、cDNAを作製した。逆転写反応のための試薬はReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(東洋紡社)を用い、実験は付属のマニュアルに沿って行った。

c. PCR

bで得られたcDNAは微量であるため、PCR法により増幅し、量を増やした。PCR法では、DNAのある一部分だけを選択的に増幅させることができるので、cDNA内のアク

a. RNA の抽出



b. cDNA の作製

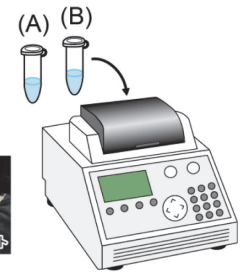


試薬を用いて逆転写反応を行い、RNA から cDNA を作製する。



c. PCR

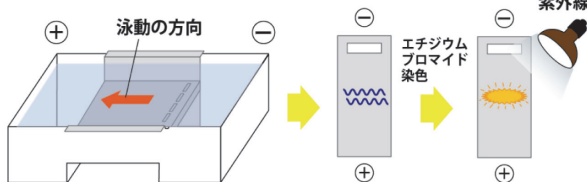
PCR により、cDNA を増幅させる。



【PCR 条件】 ※一部のサンプルについて記載

液胞膜上に存在するアクアポリン	
● PCR サイクル条件 (MgTIPg1)	
3 ステップ	
● PCR プライマー情報 (MgTIPg1)	
forward Primer	5'-CCCTCCTCAAGGGTATCCTTTAC-3'
reverse Primer	5'-CAAAGGATCTTGCAGGGTTCATG-3'
Predenature	94°C, 2min.
Denature	94°C, 30sec.
Annealing	60°C, 30sec.
Extension	68°C, 1min./kb
35 cycles	
細胞膜上に存在するアクアポリン	
● PCR サイクル条件 (MgPIPg1)	
3 ステップ	
● PCR プライマー情報 (MgPIPg1)	
forward Primer	5'-GACCTTTGGTCTCTCTCCTTCG-3'
reverse Primer	5'-GGTCATCCCATGTTTCTTG-3'
Predenature	94°C, 2min.
Denature	94°C, 30sec.
Annealing	57°C, 30sec.
Extension	68°C, 1min./kb
35 cycles	

d. 電気泳動 (アガロースゲル電気泳動)



電流を流すことで、PCR サンプル (増幅した DNA) がゲル内を泳動する。その泳動速度によって、DNA 断片の大体の長さが推定できる。

図7 アクアポリン遺伝子の「転写量」の比較

実験の流れ

アポリン遺伝子の部分を増幅した。過去、未知であったデンジソウのアクアポリン遺伝子を同定したので、その遺伝情報から PCR 法に必要なプライマーを設計した (プライマーの合成はユーロフィンジェノミクス社に依頼した)。プライマー以外に必要な試薬は Quick Taq® HS DyeMix (東洋紡社) を用いた。

d. 電気泳動 (アガロースゲル電気泳動)

c で得られた PCR サンプルを電気泳動にかけ、アクアポリン遺伝子の転写量を確認した。電気泳動を行うことで、PCR サンプル内に含まれる DNA 断片を長さに応じて分離することが出来る。電気泳動装置は Mupid®-2plus (タカラバイオ社) を用いた。支持体 (ゲル) の作製のため、アガロース

粉末を $1 \times \text{TAE}$ バッファーに 2% の割合になるよう溶かし、電子レンジで加熱して完全に溶解させた。溶解後、付属のトレイに流し込み、常温で冷やして固めた。

泳動層には $1 \times \text{TAE}$ バッファーを注ぎ、各ウェルに PCR サンプルを添加後、100V の電圧で 40 分間泳動した。また、PCR サンプルと共に、100bp ~ 1000bp の範囲の DNA ラダー (様々な長さの DNA 断片が予め含まれている) も合わせて泳動した。

泳動後、ゲルを泳動層から取り出し、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ のエチジウムブロマイド溶液で染色した。その後、ゲルを水道水で洗浄し、紫外線トランスイルミネーターを用いてバンドの有無を確認した。

以上の実験から得られた電気泳動写真を

用いて、水につかったデンジソウ株から得られたサンプルと、つかっていない株から得られたサンプルとでアクアポリン遺伝子を示すバンドの濃度から、転写量を比較した。

4-2 アクアポリン遺伝子の「翻訳量」の比較

4-1 と同様、水につかったデンジソウ株と、つかっていない株からタンパク質を抽出し、その中に含まれるアクアポリンの量を比較した。実験方法はウエスタンブロット法を採用し、その概略は図8に示すが、実験は下記の e～g の順序で行った。

e. タンパク質の抽出

葉柄を含む植物サンプルを各 0.2g ずつとり、液体窒素で凍らせた後に破碎した。その後、植物サンプルの3倍量のサンプルバッファー (0.3M Sucrose、50mM Tris、8mM EDTA、4mM DTT) を加えてすりつぶし、10,000g、4℃で10分間遠心分離を行った。その後、タンパク質が含まれている上澄み部分を新しいチューブに移し、上澄み液と等量の可溶化バッファー (60% Sucrose、10% LDS、純水を 1:1:2 の割合で混ぜて DTT を加えたもの) を加え、沸騰した湯の中で1分間ボイルした。その後、氷上で急冷した。

f. 電気泳動 (SDS-PAGE)

e で得られたデンジソウのタンパク質溶液には、様々な種類のタンパク質溶液が含まれている。今回、特に必要としているタンパク質はアクアポリンであるため、電気泳動を行い、タンパク質を分離した。4-1 d の時と同様、電気泳動を行えば、タンパク質をその大きさに応じて分離することが出来る。先行研究から、アクアポリンの大体の大きさは分かっているため、この方法でアクアポリンを分離することが可能である。実験では、縦型電気泳動装置 (AE-6530、

ATTO 社)、既成ゲル (e・PAGEL、ATTO 社) を使用した。泳動層に泳動バッファー (AE-1410 EzRun、ATTO 社) を注ぎ、各ウェルに e で得られた全タンパク質及び分子量ラダーマーカートを添加後、250V・20mA で60分間泳動を行った。電気泳動後、スパンチュラを使ってゲルをトレイから外し、以降の実験で使用した。

g. ウエスタンブロット

セミドライブロッティング装置 (サンブラテック社) を用いて、ゲルに含まれるタンパク質を PVDF (ポリフッ化ビニリデン) メンブレン上に写した。その後、メンブレンをボンソー S 染色液 (アプロサイエンス社) で染色し、タンパク質がきちんと写し取られているかどうかを確認した。確認後、染色液を捨て、蒸留水及び 0.1M NaOH を用いてメンブレンを洗浄した。

洗浄したメンブレンをブロッキングバッファー (TAKARA 社) 中で1時間振とうし、メンブレン上のアクアポリン以外のタンパク質との反応を抑制させる、ブロッキング処理を行った。その後、ブロッキングバッファーを除き、Tween-PBS でメンブレンを洗浄してから、アクアポリンと一次抗体を反応させた。この際用いた一次抗体は、デンジソウのアクアポリンのアミノ酸配列をもとに、ユーロフィンジエノミクス社に作製を依頼したもので、ウサギの体内で合成させたものである。その後、再び Tween-PBS でメンブレンを洗浄し、デンジソウのアクアポリンに付着した一次抗体と、二次抗体 (ヤギ抗ウサギ IgG-AP、バイオラッド社) とを反応させた。更に、BCIP-NBT 溶液キット (ナカライテスク社) を用いて、メンブレン上の二次抗体をアルカリフォスファターゼ (AP) 反応により染色し、デンジソウのアクアポリンを検出した。

e. タンパク質の抽出



f. 電気泳動 (SDS-PAGE)



g. ウェスタンブロット

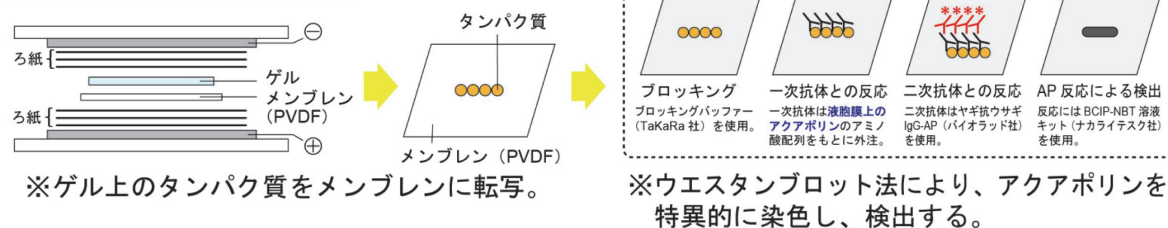


図8 アクアポリン遺伝子の「翻訳量」の比較

実験の流れ

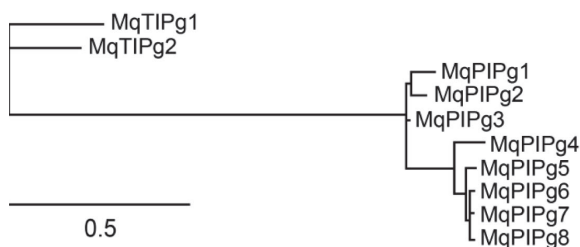
5. 結果

5-1 アクアポリン遺伝子の「転写量」の比較

過去の研究で同定したデンジソウのアクアポリン遺伝子は10種類であった (図9)。PCR 実験の際に用いたプライマーは、それら10種のアクアポリン遺伝子に対応したものを8種類作製して用いた。それらのアクアポリン遺伝子について、転写量を比較す

るために行った電気泳動写真を図10に示す。

電気泳動の結果、単一のバンドが確認できたが、PCR の際に用いたプライマー配列や想定される PCR 産物の長さから考えると、得られたバンドはデンジソウのアクアポリン遺伝子由来のものである可能性が高い。さらに、どのアクアポリン遺伝子においても、水に浸した株から得られたサンプルの方がバンドが濃くなっていることが確認できた。



※MqTIP ～は細胞内の液胞膜上に存在すると考えられるアクアポリン、
MqPIP ～は細胞膜上に存在すると考えられるアクアポリンを合成する遺伝子である。
含まれるアミノ酸の違いにより、複数のアクアポリンが存在していると考えている。

図9 過去の研究で同定したデンジソウア
キアポリン遺伝子のアミノ酸配列をも
とに作成した分子系統樹

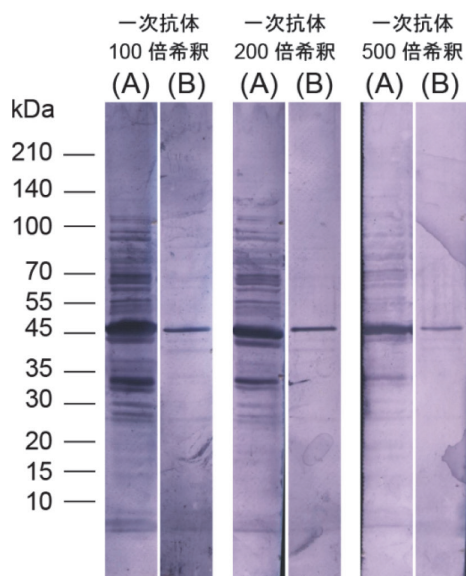


図11 アクアポリン遺伝子の翻訳量
の違い

液胞膜上に存在する
アクアポリン

細胞膜上に存在するアクアポリン

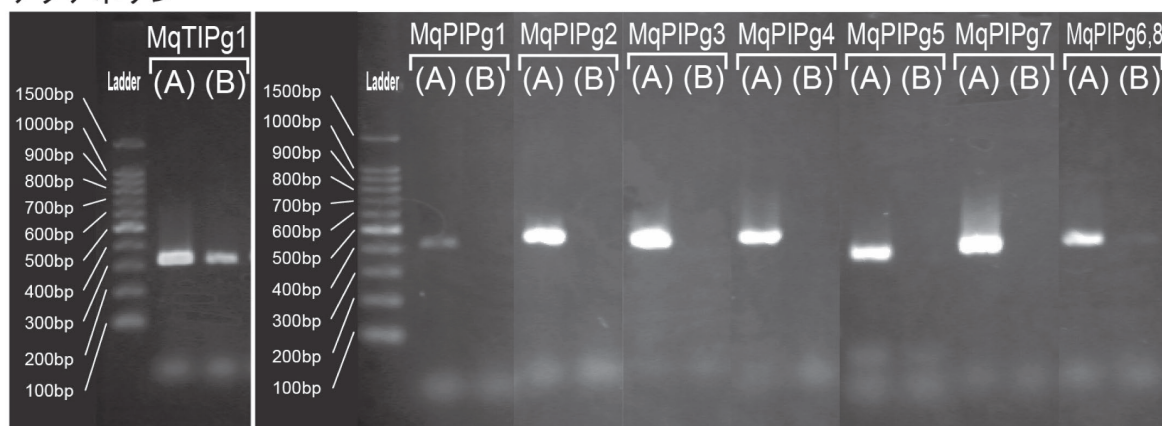


図10 アクアポリン遺伝子の転写量の違い

(A: 水につかった株 B: 水につかっていない株)

5-2 アクアポリン遺伝子の「翻訳量」の比較

本研究では、液胞膜上に存在するアクアポリン (図9) の MqTIPg1) について一次抗体を作製し、アクアポリンの検出を行った。ウエスタンブロットの結果を図11に示す。水につかった株、つかっていない株の

両サンプルにおいておいて、バンドが確認できた。双方に共通しているバンドは大きさが 45kDa 程度のあたりに見られた。先行研究によると、被子植物の液胞膜上に存在するアクアポリンの分子量は約 20 ～ 25kDa との報告されている。そこから考えると、今回得られたバンドはアクアポリンの 2 量

体の可能性が高い。そして、特に水に浸した株の方では、複数の濃いバンドが確認できた。

4. 考察

デンジソウを材料とした RT-PCR やウエスタンブロットについては先行研究がないため、本研究ではまず、実験方法の確立が求められた。実験を繰り返し行った結果、一応の結果が得られたため、実験方法の確立は概ね達成できたと考えられる。図10を見ると、水につかった株の方が濃いバンドを示していたため、デンジソウは周りの水位が高くなると、アクアポリン遺伝子の転写量を増加させていると考えられる。また、図11より、ウエスタンブロットにより翻訳量を比較した結果においても、水につかった株の方が濃いバンドが確認できたので、アクアポリン遺伝子の転写量だけでなく、翻訳量も増加していると考えられる。図11において、水につかったサンプルで複数のバンドが見られたため、水につけることで、単一のアクアポリンだけではなく、複数のアクアポリンの発現が促された可能性がある。ただし、アクアポリン以外の非特異的なタンパク質が検出されている可能性もある。これをはっきりさせるためには、まずは、抗体濃度の検討や、染色及び洗浄時間の変更等、実験方法についての改善を今後進めていきたい。

DNA — (転写) → RNA — (翻訳) → タンパク質という遺伝子発現の流れ(=セントラルドグマ)の各段階において、違いがはっきりと確認できたため、水につかることでアクアポリン遺伝子の働きが活発になることは間違いない。また、この研究に至るまでに、塩化水銀を用いてアクアポリンの働きを阻害させた場合、葉柄の伸長が抑制されることは確認できている。これは、ア

クアポリンが働かないと、細胞の吸水ができず、細胞の成長が抑制されたからだと考えられる。この結果からも、アクアポリンと葉柄伸長との関連性は高いことが示唆される。以上の結果をまとめると、デンジソウの葉柄伸長のメカニズムについては、「水生シダ植物であるデンジソウは水に浸された際、アクアポリン遺伝子の働きを活発にし、アクアポリンを多量に合成する。その結果、細胞内への吸水性が高まり、葉柄の伸長が促進される」と考えることが出来る。

デンジソウはため池や圃場など、水位の変化が比較的激しい場所で生育するため、このようなメカニズムで葉柄を伸ばして浮き葉を形成することは、個体の生存率を高めることにつながっていると考えられる。浮き稲を用いて行われた先行研究では、田植え後の梅雨時、苗が早く空中に葉を出すために、アクアポリン遺伝子の働きを活発にしていることが報告されているが、本研究のような水性シダ植物を用いた研究については研究例がなく、本研究が初の報告となる。

アクアポリンは、1992年にアメリカ人研究者のピーター・アグレ氏(2003年にノーベル賞受賞)によって発見された。水と生命をつなぐ役割をもっているとされ、様々な生物を対象に現在も研究が進められている。高等学校「生物」の教科書内の「細胞と分子」の項においては、細胞膜内外で物質を輸送する“チャネル”の具体例としても紹介されており、一般的にも広く認知されるようになってきた。本研究が示す結果は、アクアポリンの役割についての新たな知見であり、これを教科指導に役立てることで生徒の生命現象に対する深い理解を促すことにつながると考えている。

また、実験は「課題研究」の時間内に高校生に指導する形で進めていったが、各実

験手順の意味を説明し、考えさせながら進めていくことで、生徒の科学的知識及び理解が深まっていくことが実感できた。このような体験を通して得られた深い知識は、大学進学後も有効であると考えられる。実験難度が高く、長時間に渡る実験も含まれているため、通常の「生物」の時間内に一般生徒を対象に本研究のような分子生物学実験を進めていくことは難しいかもしれないが、特に興味関心の高い生徒を対象に「総合的な学習の時間」等を利用して丁寧に指導をすることで、高校段階でも本格的な分子生物学実験を導入することは可能である。なお、本研究を通して得られた様々な情報（アクアポリン遺伝子について、実験方法等）は今後の教科指導においても役立てていきたい。

末筆ながら、本研究に研究助成をして下さった公益財団法人下中記念財団に紙上を借りて、厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- (1) 白岩卓巳「絶滅危惧植物 水生シダは生きる」(自費出版) 2000年
- (2) アーネスト M. ギルフォード・エイドリアンズ S. フォスター. 中澤幸(訳)「維管束植物の形態と進化」(文一総合出版) 2002年
- (3) Yukari M., Shoji S., Hidehiro H., Junko S., Mari M. 2011. Vacuolar Proton Pumps and Aquaporins Involved in Rapid Internode Elongation of Deepwater Rice. Biosci. Biotechnol. Biochem., 75 (1), 114-122, 2011
- (4) 石川淳子, 林秀洋, 松尾直樹, 実山豊「ダイズの細胞膜型及び液胞膜型アクアポリン遺伝子の器官別発現特性」(日本作物学会記事) 82, 334-335, 2013年
- (5) 大藤道衛(編集)「電気泳動なるほど Q&A —そこが知りたい!」(羊土社) 2011年
- (6) 田村隆明「基礎から学ぶ遺伝子工学」(羊土社) 2012年
- (7) 岡田雅人・宮崎香(編集)「タンパク質実験ノート〈上〉タンパク質をとり出そう(抽出・精製・発現編)」(羊土社) 2011年
- (8) 岡田雅人, 三木裕明・宮崎香(編集)「タンパク質実験ノート(下) タンパク質をしらべよう」(羊土社) 2011年



田中 福人先生
(たなか ふくと)

<略歴>

1982年4月17日生まれ

2005年3月 岡山大学理学部生物学科卒業

2007年3月 岡山大学大学院教育学研究科
修了

2007年3月～ノートルダム清心学園 清心女
子高等学校勤務
現在に至る

<研究歴>

主に植物を研究材料とし、生物リズムについて自身が研究するとともに、生徒への指導も行ってきた。過去に扱った主な生物材料は、本研究対象でもある水生シダ植物のデンジソウであり、就眠運動などの生物リズムの調査や、孢子繁殖等の生態調査並びに繁殖率を向上させるための環境条件の検討、個体増殖につなげるための組織培養法の確立について研究を行ってきた。それらの研究成果は外部の研究発表会等で積極的に発信し、水生シダ植物の保全について社会に訴えてきた。また、この課題研究における教育実践例は、平成26年度（第46回）東レ理科教育賞において本賞を受賞した。

最近では、子囊菌類の栽培を教育に活かす試みを新たに始めており、生徒に課題研究として取り組ませ、より良い栽培手法の検討など、試行錯誤させることで科学的知識・技能の習得と科学的思考力の育成を促している。

第49回日本原生生物学会シンポジウム（2016）にて、「原生生物学の進展と理科教育への可能性」というテーマで勤務校の科学教育の実践例を報告した。

岡山県総合教育センター高等学校理科研修講座（2016）にて、生物活動記録装置の作製実習を指導した。

<勤務校>

ノートルダム清心学園 清心女子高等学校
〒701-0195 岡山県倉敷市二子1200

電話 086-462-1661