



## タマネギの体細胞分裂にリズムはあるか 細胞と遺伝子からのアプローチ

本研究発表は、平成25(2013)年度日本農芸化学会大会(開催地・仙台)での「ジュニア農芸化学会」において、“銀賞”に選ばれた。発表者らは、植物の体細胞分裂が光や概日リズムによって調節されるかについて、タマネギの根を題材として詳細に観察し、これを細胞生物学と分子遺伝子学レベルで明らかにしようとしている。得られた研究成果は、関連研究者にとっても示唆に富むものであり、高く評価された。



### 本研究の背景、実験方法および結果

**【目的】**「タマネギの体細胞分裂の観察は、分裂が盛んな午前9時～10時ごろが良い」という定説があるが、この理由を明らかにした研究成果は少ない。そこで、私たちはこの定説が正しいのかを検証するために、タマネギの根の体細胞分裂のリズムを探る研究を行った。また、そのリズムが何によって制御されているのかを明らかにすることにも取り組んだ。

### 【方法】

#### 1. タマネギの発芽と体細胞分裂の観察

シャーレにろ紙を3枚重ねて敷き、蒸留水を6 mL入れ、1枚のシャーレ当たりタマネギの種子(ベビーオニオン, (株)サカタのタネ)を40粒播種し、温度22℃の恒温器内で発芽させた。この際、恒暗条件と明暗条件(12時間明期・12時間暗期)の2条件で保温した。播種後5日目から、根を数時間ごとに採取し、40%酢酸で固定した。これを4%塩酸で60℃処理した後、種子と根を切り離し、根に酢酸オルセインを1滴滴下して5分放置した。プレパラートは押しつぶし法を用いて作製し、顕微鏡下で、細胞分裂間期・前期・中期・後期・終期の細胞数を計測した。

#### 2. クロロフィルの定量

発根させた種子を90%アセトン(5  $\mu$ L)とともにすりつぶした後、1.5 mLのアセトンを用いて抽出した。5,000 rpmで2分間遠心分離した上清を適宜希釈後、660 nm, 650 nm, 640 nmの波長の吸収を測定しクロロフィルa量を定量した。

#### 3. サイクリンB遺伝子の単離と発現

NCBIのデータからタマネギがシロイヌナズナのcyclin B遺伝子と相同性の高い遺伝子をもっていないかを調べ、一つの遺伝子を候補として選び出した。この遺伝子の塩基配列からプライマーを設計し、タマネギの全DNAを用いたPCRを行い、電気泳動上で単一のDNA断片を得た。この遺伝子のDNA配列を決定した。既知の遺伝子のDNA配列との比較にはMEGAを用いた。根の試料から調製したcDNAを鋳型としてPCRを用いてcyclin B遺伝子の転写産物を検出した。発現量はアクチンのそれとの相対値として定量した。

### 【結果と考察】

#### 1. 光条件の違いによる体細胞分裂のリズムの変化

恒暗条件と明暗条件(12時間明期・12時間暗期)の2条件下でタマネギの種子を発芽させた。播種後5日目の根を24時間にわたり経時的に採取し、固定・染色後、顕微鏡で体細胞分裂の様子を観察した。その結果、恒暗条件で発芽させた場合には16～20時ごろに分裂期の細胞数のピークが現れたが、明暗条件ではこのピークは見られなかった(図1A)。このことから、体細胞分裂には内生リズムが存在し、光がそのリズムに影響を与えることがわかった。これはネギを用いたときも同様であった。明暗条件下で生育させたタマネギの根のクロロフィル量が、播種後3日目から上昇していたことから(図

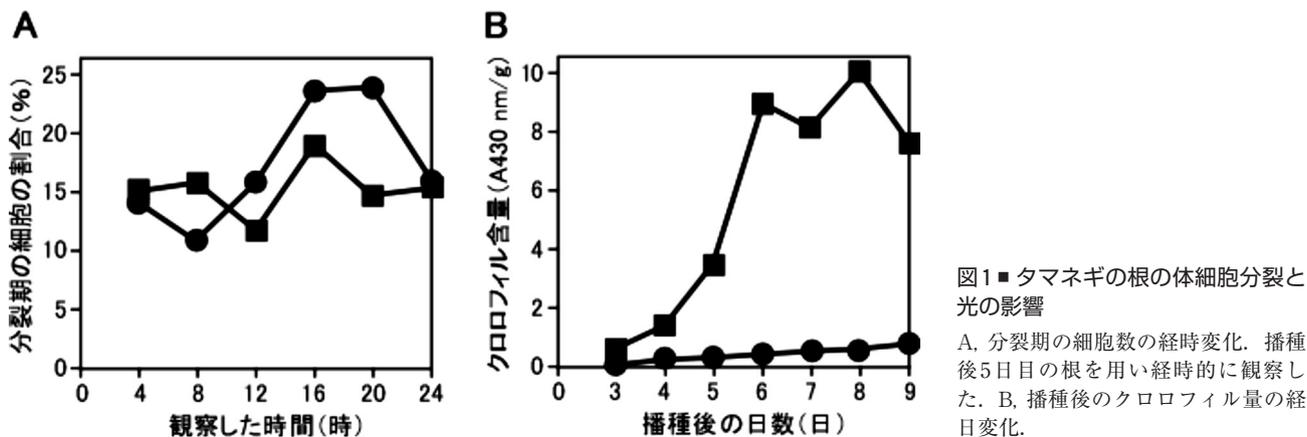


図1 ■ タマネギの根の体細胞分裂と光の影響  
 A, 分裂期の細胞数の経時変化. 播種後5日目の根を用い経時的に観察した. B, 播種後のクロロフィル量の経日変化.

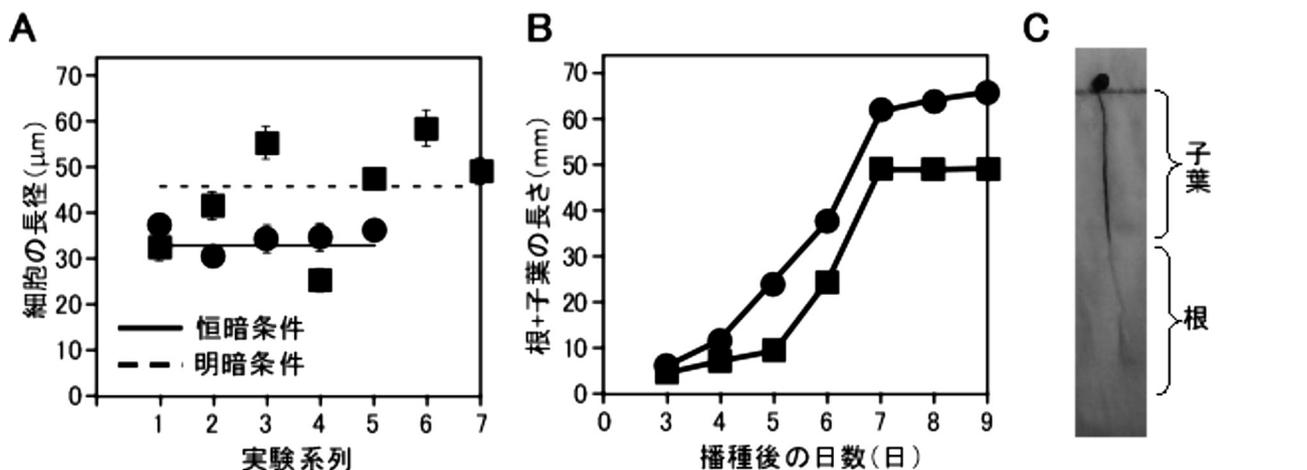


図2 ■ タマネギの根の伸長と体細胞分裂  
 A, 根の伸長領域の細胞長径. 播種後5日目の根を用い経時的に観察した. ●, 恒暗条件; ■, 明暗条件. 実線と点線は, それぞれ恒暗条件と明暗条件の測定値の平均を表す. B, 播種後の根と子葉の長さ. ●, 恒暗条件; ■, 明暗条件. C, タマネギの種子の発芽の様子.

1B), この植物体が実際に光応答可能であることも確認できた.

## 2. 体細胞分裂と細胞伸長

顕微鏡観察により, タマネギの根の表皮細胞では根端から5 mm以内の細胞伸長が活発であることが確認できたので, この領域の細胞の長径をレプリカ法を用いて測定した. その結果, 明暗条件では恒暗条件に比べ細胞長径が長いことがわかった (図2A). 一方, 明暗条件では恒暗条件に比べ根の伸長が遅かった (図2B, C). 以上の結果から, 明暗条件では, 光によって細胞の伸長ではなく体細胞分裂の頻度が低下することによって根の伸長が抑制されると考えられた.

## 3. Cyclin B遺伝子の発現と体細胞分裂

高等植物の体細胞分裂において, cyclin Bは分裂期への移行に参与する. NCBIデータベースから, シロイヌナズナのcyclin B遺伝子と相同性の高いタマネギ由来遺伝子を選抜し, このDNA配列をもとに設計したプライ

マーを用いてPCRを行った. 得られたゲノムDNA断片のDNA配列 (DDBJアクセション番号AB819891) は, 推定イントロン部位を除いてタマネギESTクローン; EST665443と完全に一致した. この遺伝子の発現量の経時変化を調べたところ, 明暗条件よりも恒暗条件で高いことが示されたことから (図3), タマネギの根は, 光に反応してcyclin Bの発現量を低下させ, 体細胞分裂の速度を低下させると考えられた. また, cyclin Bの発現量の極大の午前6時ごろよりも体細胞分裂のリズムの極大 (図1) がやや遅れていた. このことから, cyclin Bの発現量を指標とすることによってタマネギの体細胞分裂のリズムを判別できると考えられた.

本研究では, 分裂期の細胞数に加えてcyclin Bの発現量を観察することによって, 昔から言われている「細胞分裂が盛んな時間帯がある」という定説を検証することができた. また, 根の体細胞分裂が光によって遺伝子発現レベルで抑制され, それにより根の伸長も阻害される

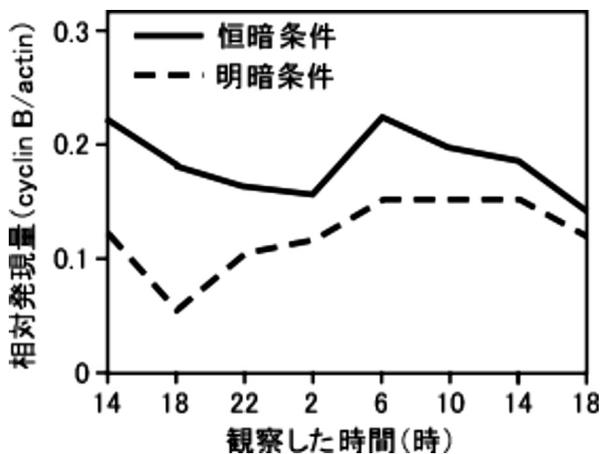


図3 ■ タマネギの根における cyclin B 遺伝子の発現  
 アクチン遺伝子の発現量との相対値として表した。実線，恒暗条件；点線，明暗条件。

可能性が示された。葉とは異なり，根は本来，暗い場所にあるものである。おそらく，この仕組みによって，光が根の体細胞分裂のリズムを乱しているのではないかと考えている。

### 本研究の意義と展望

タマネギを用いた体細胞分裂の観察は，教科書で最も

有名な生物学実験の一つといってもよいだろう。しかし、「ではなぜ午前中に観察するのがよいか」と改めて聞かれると明確な答えは得られていないのではないだろうか。本研究は，この素朴な疑問を解き明かそうという試みであり，この着眼はとてもユニークである。顕微鏡観察と統計処理，クロロフィルの定量，遺伝子クローニングなどハイレベルの機器や技術を導入した研究は素晴らしいものであるが，それにもまして，昼夜に及ぶサンプリング作業などをはじめ，高校生たちが熱心に根気よく研究を進めようとした様子がうかがえる力作である。また，データのばらつきが大きくなりがちな体細胞分裂の観察実験をなんとかして定量化しようと，総計で2万個を超える細胞の顕微鏡観察を行うだけでなく，生徒自身が試行錯誤と模索を繰り返し，cyclin Bの発現量を指標にする新たな研究方法の着想に至ったと聞いている。ユニークな着眼と地道な実験で研究を展開するという農芸化学の大切さを高校生たちに教えられたジュニア農芸化学会であった。

(文責「化学と生物」編集委員)