

培地条件の違いによるホンモンジゴケの生育特性

大岡 久子^{1*}・北隅 悠磨¹・田中 孝国²・高原 美規³

¹群馬工業高等専門学校 物質工学科 (〒371-8530 群馬県前橋市鳥羽町 580 番地)

²小山工業高等専門学校 物質工学科 (〒323-0806 栃木県小山市中久喜 771 番地)

³長岡技術科学大学 生物系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1)

*ooka@chem.gunma-ct.ac.jp

Characterization of growth of *Scopelophila cataractae* in different medium conditions

Hisako Ooka^{1*}, Yuma Kitazumi¹, Takakuni Tanaka² and Yoshinori Takahara³

¹National Institute of Technology, Gunma College
(580 Toribamachi, Maebashi, Gunma 371-8530, JAPAN)

²National Institute of Technology, Oyama College
(771 Nakakuki, Oyama, Tochigi 323-0806, JAPAN)

³Nagaoka University of Technology, Department of Bioengineering
(1603-1 Kamitomioka, Nagaoka, Niigata 940-2188, JAPAN)

(Received June 28, 2018; Accepted July 30, 2018)

In this paper, we report growth characteristic of *Scopelophila cataractae*, which is known as copper moss. First, we examine how to obtain axenic plants because that will enable us to control various conditions surrounding plants by artificial means. Next, we investigate the influence on growth of *S. cataractae* by the kind of medium, the changing pH, and the concentration of copper in a medium using two measurements: a ratio of the protonemal area and the chlorophyll concentration. The results revealed that the growth behavior's dependence on the concentration of copper differed by the kind of medium in *S. cataractae*. With further research in the future, these results can contribute to an elucidation of the mechanisms of copper tolerance in *S. cataractae*.

Key Words : *Scopelophila cataractae* / copper moss / plant tissue culture / chlorophyll concentration

1. 緒言

近年、酸性雨や地球温暖化を始めとして、大気汚染、土壌汚染、水質汚染など地球規模での環境悪化が深刻な問題となっている。酸性雨は、河川や土壌の酸性化だけでなく、重金属汚染や樹木の立ち枯れにも大きな影響を与えている。環境省は各種環境汚染に対する基準や対策法を整備し、調査を行っている。土壌汚染に係る環境基準としては、重金属や有機化合物などの物質ごとに基準が定められている[1]。この基準を超える場合には浄化を行う必要があるが、この浄化技術として、ファイトレメディエーションが注目されている。ファイトレメディエーションとは、植物

を用いた環境浄化技術を指す。植物を用いることにより、環境負荷が小さい、低コストなどの多くの利点が得られる浄化法である。一方で、海外での研究では高いカドミウム濃縮率が報告されているインドカラシナを日本で適用したところ、その約 20 分の 1~200 分の 1 程度の濃縮率しか示さなかった例も報告されており、生育環境の違いが浄化能に大きく影響を与えていると考えられる。そのため、日本の土壌汚染地域で栽培が可能な植物の選定が課題の 1 つとなっている[2]。また植物種によって、集積可能な物質や適用範囲が異なってくるため、ファイトレメディエーションを適用するためには、適切な植物の選抜やその植物の生育特性の詳細について、多くの知見が必要となる。

神社や寺院などの緑青で覆われた銅製建造物の下は銅濃度が高い銅汚染地帯となる。それは、長年をかけて、雨水（酸性雨）が銅建造物の銅を溶かし、銅を含む雨水が落ちて、土壌の銅濃度を高めることによる。ホンモンジゴケは、このような銅汚染地帯でも生育することが可能な銅耐性植物であり、体内に 10,000 $\mu\text{g/g}$ （乾燥重量当たり）を超える銅を蓄積することが報告されている[3]。さらに土壌汚染の指標植物としての検討、水質浄化技術への応用、銅を含むいくつかの重金属浄化技術への検討などがなされている[3][4]。

ホンモンジゴケは、銅汚染地域に必ず生育が認められるわけではない。銅建造物の下で発見することが多いが、銅建造物が出来てから 20~30 年経過後に生育がみられるようになるという報告もある[5]。胞子体をほとんどつけず、無性芽によって増殖しており、生育分布や増殖方法についても興味深い植物である [5][6]。ホンモンジゴケの生体内において、銅は主に細胞壁に蓄積することによって無毒化されているのではないかと推測されている[7][8]。またいくつかの研究において、銅と結合している生体物質は数種類報告されており、セルロースやペクチンが銅と結合していると考えられている[3][8]。さらに、ゲノム編集技術を用いた変異体の作出方法についての報告もあり、分子生物学的な解析も進められつつある[9]。このようにいくつかの知見があるものの、ホンモンジゴケの銅耐性機構や銅蓄積能の詳細は未だ明らかにされていない。銅耐性機構の解明の第一段階として、生育環境を人工的に制御することが可能である無菌培養系を用いた生長特性の評価が必要だと考えられる。

そこで、本研究ではホンモンジゴケの培地条件に対する生育特性を評価した。初めに、生育特性を評価するために野外から採取したホンモンジゴケの殺菌条件の検討を行った。さらに得られた無菌体を用いて、培地の種類、pH、銅濃度を变化させた培地で培養を行い、原系体の伸長面積比と、栄養生長に必須である光合成に関与するクロロフィル濃度によって生育特性を評価した。

2. 植物体材料および実験方法

2.1 植物体材料

ホンモンジゴケ（学名：*Scopelophila cataractae*）は銅イオンが存在する場所で群落を形成することが知られている。本研究では、福島県福島市杉妻町の福島県庁に隣接する板倉神社の緑青を生じた銅屋根を通った雨水が排水される石垣壁面の群落（図 1）から採取した。群落は暗緑色

で厚みを持ち弾力のあるコロニーを作るホンモンジゴケの群落の特徴を示していた。葉の形は舌状で広い鋭頭であり上部でわずかに微鈍鋸歯がみられ、基部から少しねじれていた。中肋は 1 本あり、細胞の形は方形から六角形の形をしていた。パラフィン包埋切片の顕微鏡観察により、中肋にガイドセルと呼ばれる大きな 2 つの細胞を観察することができた（図 2）。以上の特徴は、全てホンモンジゴケの特徴と一致しており、採取したコケをホンモンジゴケと同一し実験に用いた[10][11]。



図 1 ホンモンジゴケの群落



図 2 ホンモンジゴケの小葉の横断面
（パラフィン包埋切片）（Bar=50 μm ）

コケ植物の無菌培養系の確立は、胞子体滅菌により得る方法が知られている。しかし、ホンモンジゴケの多くは胞子体を滅多につけることがなく、国内におけるホンモンジゴケの胞子体が確認された報告は数例のみである[11]。そのため、胞子体滅菌による胞子からの無菌培養の開始ではなく、茎葉体からの無菌培養方法の確立が必要である。一方で、コケ植物の茎葉体の葉は小葉であり、多くの部分で細胞層が一層であり、強い殺菌法では細胞が死滅してしまう。そこで予備実験により殺菌条件を検討し[12][13]、70 %エタノール溶液への浸漬時間 80 秒、有効塩素濃度 1 %の次亜塩素酸ナトリウム水溶液への浸漬時間 30 秒、

その後滅菌水で十分に濯ぎ、無菌的に培地へ置床し、置床した茎葉体から二次的に生じた原系体を取得することで、無菌的な原系体培養細胞を得た。

比較対象として、重金属耐性を持たずコケ植物で最初にゲノムが解読されモデル植物とされているヒメツリガネゴケ（学名：*Physcomitrella patens*）を用いた。ヒメツリガネゴケは、長岡技術科学大学応用植物工学研究室から分与された無菌植物体を、無菌的に培養維持したものをを用いた。

培養培地には、BCDATG 培地 (MgSO₄・7H₂O 250 mg/L, KH₂PO₄ 250 mg/L, KNO₃ 1010 mg/L, FeSO₄・7H₂O 12.5 mg/L, CuSO₄・5H₂O 0.055 mg/L, H₃BO₃ 0.614 mg/L, CoCl₂・6H₂O 0.055 mg/L, Na₂MoO₄・2H₂O 0.025 mg/L, ZnSO₄・7H₂O 0.055 mg/L, MnCl₂・4H₂O 0.389 mg/L, KI 0.028 mg/L, Ammonium Tartrate 920.5 mg/L, CaCl₂・2H₂O 147 mg/L, グルコース 5 g/L) [14], または Knop 培地 (MgSO₄・7H₂O 250 mg/L, KH₂PO₄ 250 mg/L, KNO₃ 250 mg/L, Ca(NO₃)₂・4H₂O 1000 mg/L) [15]にそれぞれゲランガム 1 %を加えた固体培地を用いた。また原系体が培地内に入ること防ぐため、培地上に透析膜(セルロースチューブ UC27-32-100 を洗浄後シート状に切ってオートクレーブにより滅菌したもの)を敷き、透析膜上に原系体を置床し培養を行った。

2.2 生長特性の評価

伸長面積比およびクロロフィル濃度を測定することによって生長特性を評価した。

人工気象器内の光は培養物全体に当たるため、培養しているコケの原系体は同心円状に広がる。また培地上には透析膜を敷いているため培地内には入り込まず、水平方向に伸長する。予備実験において、良好な生育がみられた培地条件で培養 45 日後に培地上に敷いた透析膜全体に原系体が広がることが分かったため、培養期間を 45 日間とした。円状に広がった原系体の直径を測定し、面積を求めた。伸長面積比は次の式により求めた。

伸長面積比 = (45 日後の原系体の面積) / (継代直後の原系体の面積)

次にクロロフィルの抽出のため、培養 45 日後のホンモンジゴケの原系体を透析膜上から全て回収し、アセトン抽出[16]を行った。分光光度計(日本分光, V-560)で 750.0 nm, 663.6 nm, 646.6 nm の各波長における吸光度を測定し、クロロフィル *a* と *b* の濃度を次の式により求めた[17]。

$$\text{Chl}a + b [\mu\text{g/mL}] = 17.76 (A_{646.6} - A_{750.0}) + 7.34 (A_{663.6} - A_{750.0})$$

2.3 培地の違いによる銅濃度の影響

無菌的に培養維持されたホンモンジゴケの原系体を等量になるように切り分け、BCDATG 培地と Knop 培地にそれぞれゲランガム 1 %を加えた固体培地(培地上に透析膜を敷いたもの)に継代した。銅濃度は、0, 1.5, 3, 15, 30, 60, 125, 300 mg/L になるように硫酸銅水溶液を添加し、BCDATG 培地は pH 6.6, Knop 培地は pH 4.0 に調整した。pH 調整には、KOH と HCl を用いた。生育の比較のため、ヒメツリガネゴケをホンモンジゴケと同じ条件の BCDATG 培地に継代した。

コケ植物の培養は人工気象器(NK システム, LH-220N)内で、12 時間日長、25 °C で 45 日間行い、伸長面積比およびクロロフィル濃度の測定を行った。

2.4 生長特性の評価培地の pH がホンモンジゴケの生育に及ぼす影響

野外でホンモンジゴケが生育している環境は、酸性であることが多い。ホンモンジゴケの群落に銅屋根から滴る雨水の pH は 4.7 や 4.9 であるという報告がある[7]。そこで、Knop 培地(1 %ゲランガム)を pH 4.0, pH 6.6 に調整し、pH の違いが生育に及ぼす影響を調査した。pH 調整には、KOH と HCl を用いた。各培地の銅濃度は、0, 1.5, 3, 15, 30 mg/L に調製し、45 日間培養後(人工気象器内 12 時間日長、25 °C)、伸長面積比およびクロロフィル濃度の測定を行った。

3. 結果および考察

3.1 培地の違いによる銅濃度の影響

無菌原系体培養細胞を用いて、ホンモンジゴケの最適培養条件の検討を行った。各培地、各銅濃度で 45 日間の培養後の外観の様子を図 3 に示した。

ホンモンジゴケは全ての銅濃度で原系体の伸長がみられた。ホンモンジゴケは銅を含む環境で生育していることが知られているが、銅を含まない培地でも原系体の伸長が確認された。

一方、ヒメツリガネゴケは、15 mg/L 以上の銅濃度では伸長がみられず枯死している様子が見られ、1.5, 3 mg/L の銅濃度においても全体的に褐変化している様子が見られた。ホンモンジゴケにおいて、2 種類の培地で培養した原系体の外観を比較すると、Knop 培地では全体的に薄く原系体が広がるのに対して、BCDATG 培地(銅濃度 0~125 mg/L)では全体的に緑色が濃く、特に中心部で一層濃

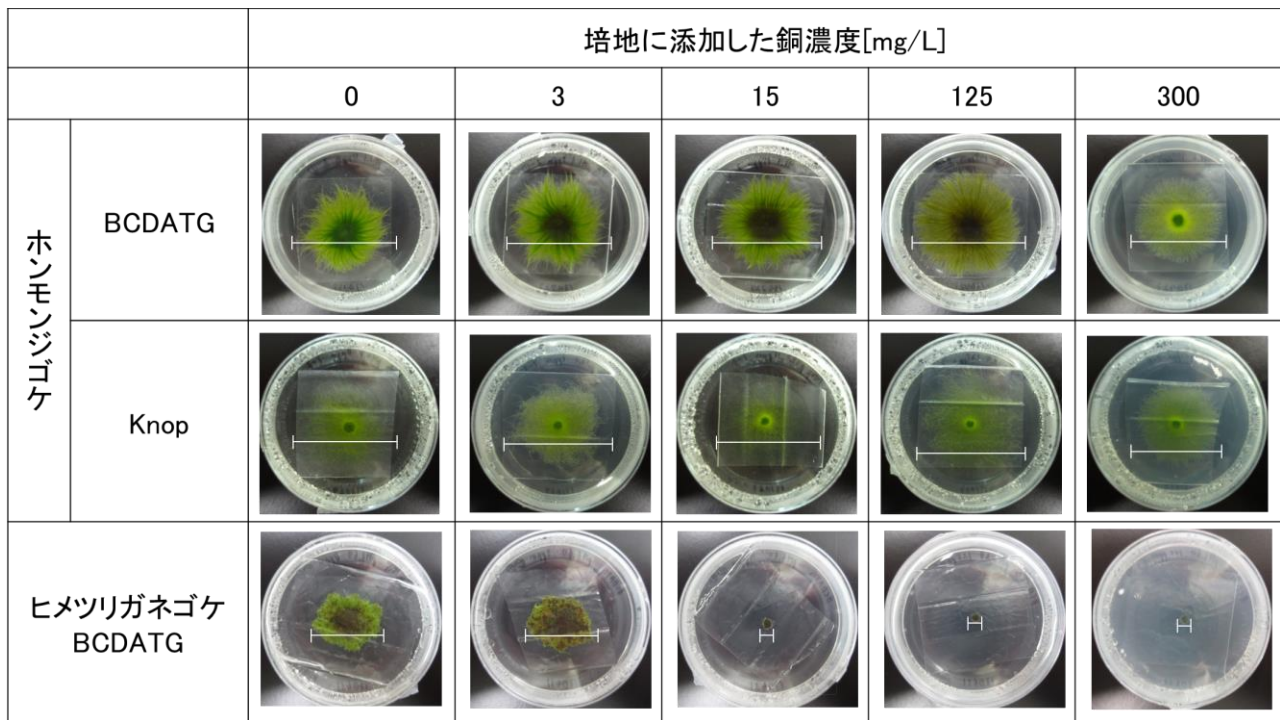


図3 培地の種類の違いによる原糸体の生育

い緑色をしていた。顕微鏡で各原糸体の様子を観察した結果、Knop 培地での原糸体よりも BCDATG 培地での原糸体の方が、細胞密度が高く密な生長をしている様子がみられた(図4)。さらに BCDATG 培地においては無性芽が確認された。

図3の各写真に、同心円状に伸長した原糸体の直径を白い線で示した。この直径から原糸体の伸長面積比を求め、図5、6に示した。いくつかの培地条件において、伸長面積比に差がみられたが、培地の種類や銅濃度による傾向はみられなかった。

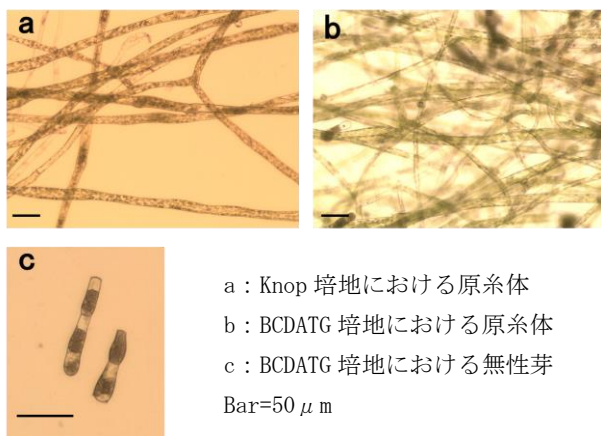


図4 ホンモンジゴケ培養45日後の顕微鏡写真

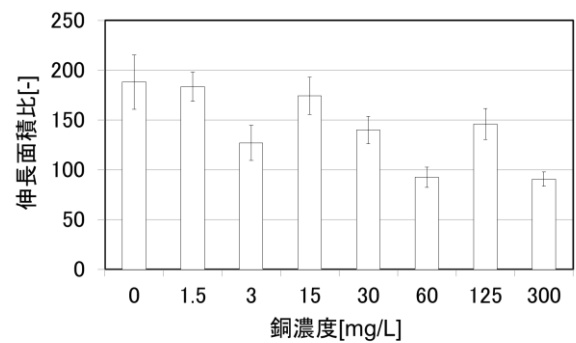


図5 Knop 培地におけるホンモンジゴケ培養45日後の伸長面積比 (Bar=標準誤差)

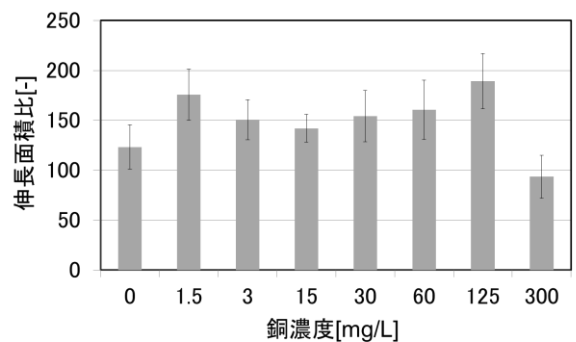


図6 BCDATG 培地におけるホンモンジゴケ培養45日後の伸長面積比 (Bar=標準誤差)

クロロフィル濃度測定による生育特性の評価の結果を **図 7, 8** に示した。Knop 培地と BCDATG 培地のそれぞれで、銅含有培地での測定値と、銅濃度 0 mg/L での測定値について *t* 検定を行った。

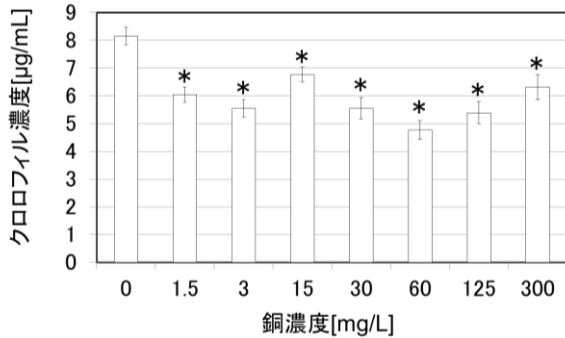


図 7 Knop 培地におけるホンモンジゴケのクロロフィル濃度 (Bar=標準誤差, * = $p < 0.05$)

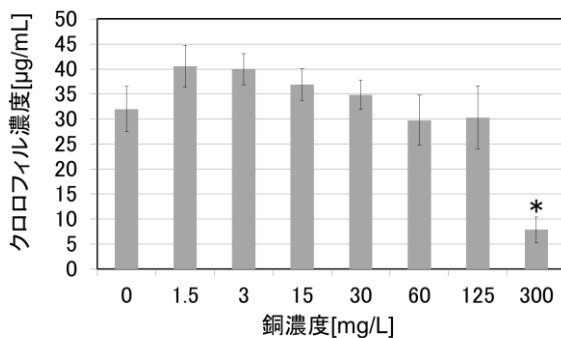


図 8 BCDATG 培地におけるホンモンジゴケのクロロフィル濃度 (Bar=標準誤差, * = $p < 0.05$)

Knop 培地では、銅濃度 0 mg/L でのクロロフィル濃度が最も高く、全ての銅含有培地で銅を含まない培地よりクロロフィル濃度が低く、有意水準 5 % で有意な差が示された。BCDATG 培地においては、銅濃度 0~125 mg/L の範囲では有意な差がみられず、銅濃度 300 mg/L でのみ、銅濃度 0 mg/L との比較において、有意水準 5 % で有意に低い値となった。

伸長面積比の比較では、培地の種類および銅濃度の影響による有意な差が得られなかったが、クロロフィルの濃度では、培地の種類により銅濃度に対する感受性の違いが観察された。クロロフィルは、原糸体の葉緑体に含まれており、伸長面積比では評価できない原糸体細胞の細胞量の指標として利用可能であることが示唆された。コケ植物の原糸体は培地上で糸状に生長をするため、乾燥重量・湿重量が非常に小さく、重量変化による生長測定が通常の天秤で

はできないが、クロロフィル濃度の測定は簡便で有効な手段であると考えられる。

また、BCDATG では、1.5~125 mg/L の範囲で銅を培地に添加してもクロロフィル濃度の有意な低下はみられなかったが、Knop 培地では 1.5 mg/L の濃度から有意な低下がみられたことから、BCDATG 培地中の Knop 培地には含まれないいずれかの成分が、この範囲での銅耐性を高める作用があることが示唆される。一方で、銅添加なしの状態では、Knop 培地よりも BCDATG 培地で培養した原糸体の方が高いクロロフィル濃度を示したことから、BCDATG 培地の培地成分は銅耐性そのものではなく、クロロフィル量を増やす効果があり、そのため銅添加培地でのクロロフィル濃度の減少が抑えられたということも考えられる。今後、詳細に検討していく必要がある。

3.2 培地の pH がホンモンジゴケの生育に及ぼす影響

ホンモンジゴケが生育している場所は、銅濃度が高いだけでなく、銅建造物から銅イオンを溶かしこんだ雨水のため酸性条件となっている [7]。先の実験において、銅を含まない培地においても良好な生育が確認された。そこで、培地の pH を pH 4.0 または pH 6.6 に調整した培地で培養し、異なる pH でのホンモンジゴケの生育特性を評価した。各 pH の培地での培養 45 日後の伸長面積比を **図 9** に、クロロフィル濃度については **図 10** に示した。各銅濃度ごとに pH 4.0 と pH 6.6 の測定値について *t* 検定を行った。 **図 9, 10** の * で示した検定は、有意水準 5 % で有意差が認められたものである。

伸長面積比では、いずれの銅濃度においても pH 6.6 よりも pH 4.0 の培地の方が大きな伸長がみられ、銅濃度 1.5, 15, 30 mg/L の条件では有意水準 5 % で有意差が認められた。さらに、 **図 10** の結果から、クロロフィル濃度では、

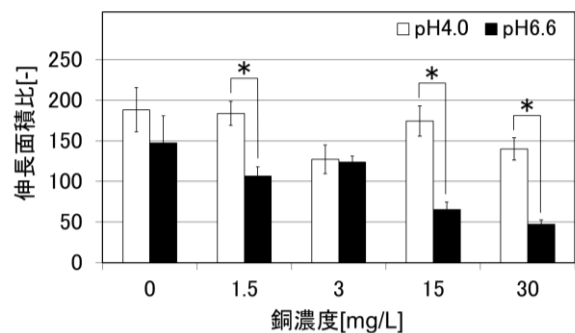


図 9 培地の pH の違いによる伸長面積比 (Bar=標準誤差, * = $p < 0.05$)

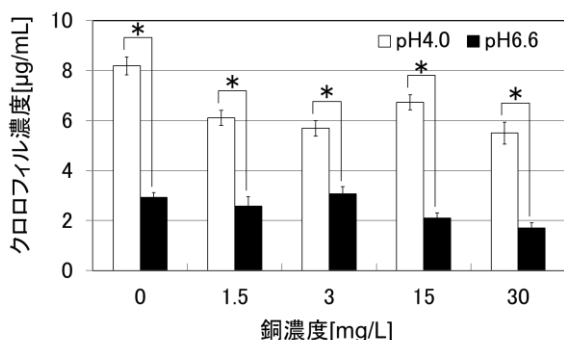


図 10 培地の pH の違いによるクロロフィル濃度 (Bar=標準誤差, * = $p < 0.05$)

全ての銅濃度において pH 4.0 の条件で pH 6.6 の条件より有意水準 5 % で有意に高い結果が得られた。以上の結果より、ホンモンジゴケの生育は、pH 6.6 の中性付近では pH 4.0 の酸性条件と比較して阻害されることが分かった。通常の植物は中性付近で良好な生育を示すものが多いが、ホンモンジゴケは酸性域で良好な生育を可能とすることで、他の植物との競合のない生育環境を選ぶ生存戦略をとっていると考えられる。

4. まとめ

ホンモンジゴケは、生息地の状況から、銅イオンの存在する酸性域を好むと考えられてきたが[7]、今回の実験により、無菌の原糸体培養細胞を管理された条件下で培養することによって、より詳細な生育特性を知ることができた。また、コケ植物の原糸体のような、生長による重量や体積の増加が小さく十分な測定が困難な植物材料の生体重の指標として、クロロフィル濃度測定が有用であることを示すことができた。

ホンモンジゴケは、培地の成分の違いにより、銅に対する感受性が異なることが示されたことから、BCDATG 培地に含まれる成分が銅耐性を高める作用を持つことが示唆された。さらに、中性付近よりも酸性条件下で生育が良好であることが示された。今後これらの基礎的な知見が、ホンモンジゴケの銅耐性機構の解明に貢献できると考えられる。

謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 21780302 の助成を受けたものであり、ここに謝意を表します。またホンモンジゴケの同定についてご指導いただきました独立行政法人理化学研究所環境資源科学研究センターの井藤賀操氏に心よ

り感謝申し上げます。

引用文献

- [1] 土壤環境基準 (環境省ホームページ) <http://www.env.go.jp/kijun/dt1.html>
- [2] 吉田光敦毅, 秋吉美穂, 藤原靖: ファイトレメディエーションの現状と課題, 大成建設技術センター報, 第 38 号, pp.06-1-06-4, 2005.
- [3] 井藤賀操, 加藤由佳梨, 山口勇, 小野芳朗, 榊原均: コケ植物を用いたファイトレメディエーション, 1-ホンモンジゴケの Cu 蓄積特性と燃焼飛灰由来の Pb 浄化の試み, *Hikobia*, 14, pp.263-271, 2005.
- [4] 野村俊尚, 井藤賀操, 榊原均: 植物の生物機能を用いた金属回収技術 コケ植物を用いた金属回収技術の開発と展望, *化学と生物*, Vol.52, No.2, pp.121-126, 2014.
- [5] 山岡正尾: ホンモンジゴケのこと, *富山の生物*, 32, pp.39-41, 1993.
- [6] 山岡正尾: 富山県のホンモンジゴケ生育地-III, 及び本酒の日本海側における分布北限の訂正について, *富山の生物*, 35, pp.29-30, 1996.
- [7] Tatsuro Oda and Takaharu Honjo: Characterization of Copper, Lead and Zinc in Metal Tolerant Mosses, *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv., *Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth and *Pohlia bulbifera* (Warnst.) Warnst. in Heavy Metals Pollution Areas, *J. Phytogeogr. & Taxon.*, 43, pp.91-102, 1995.
- [8] 保倉明子, 吉井雄一, 中井泉, 阿部知子, 井藤賀操, 榊原均: 金属蓄積植物ホンモンジゴケにおける銅と鉛の蓄積機構の解明, 東京電機大学総合研究所年報 2009, No.29, pp.179-182, 2010.
- [9] Toshihisa Nomura, Tetsuya Sakurai, Yuriko Osakabe and Hitoshi Sakakibara: Efficient and Heritable Targeted Mutagenesis in Mosses Using the CRISPR / Cas9 System, *Plant & Cell Physiology*, 57(12), pp. 2600-2610, 2016.
- [10] 岩月善之助編者: 『日本の野生植物 コケ』, p.90, 平凡社, 2009.
- [11] 井上浩: 『フィールド図鑑コケ』, p.8, 東海大学出版会, 2002.
- [12] 鶴田功輔, 大岡久子: ホンモンジゴケの銅浄化作用の解明, 第 12 回高専シンポジウム講演要旨集, p.16, 2007.
- [13] 赤岩祐佳子, 福井梨紗, 鶴田功輔, 大岡久子: ホンモンジゴケの殺菌条件の検討と銅耐性評価, 第 14 回高専シンポジウム講演要旨集, p.75, 2009.

- [14] 青木撰之, 杉田護: ヒメツリガネゴケ, 低温科学, Vol.67, pp.31-33, 2009.
- [15] 大澤勝次, 江面浩:『植物バイオテクの基礎知識』, p.66, 農山漁村文化協会, 2005.
- [16] 田中亮一: 色素の分析 クロロフィルおよびクロロフィル代謝経路中間体の抽出・定量法, 低温科学, Vol.67, pp.315-325, 2009.
- [17] R.J.Porra, W.A. Thompson and P.E.Kriedemann : Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 975, pp.384-394, 1989.