

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：52301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：21780302

研究課題名(和文) ホンモンジゴケの銅耐性機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the copper-tolerance mechanism in *Scopelophila cataractae*

研究代表者

正木 久子(大岡久子)(Ooka-Masaki, Hisako)

群馬工業高等専門学校・その他部局等・講師

研究者番号：00390526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ホンモンジゴケは、高濃度の銅存在下で生育が可能であり、体内に銅を蓄積することが知られている。本研究において、いくつかの指標を用いてホンモンジゴケの銅に対する生育測定を行った結果、培地の種類によって銅耐性が向上することが明らかにされた。

銅耐性に関与する遺伝子の解析においては、銅添加培地での処理時間と銅濃度の違いによって発現量に差を生じる遺伝子を見つけた。今後再現性の確認と機能解析を進めていく方針である。

研究成果の概要(英文)：Scopelophila cataractae has the ability to grow under the environment containing high concentrations of copper and to accumulate copper in its bodies.

Their growth characteristics involved in response to copper were investigated using several indicators. These results showed that its copper-tolerance is enhanced with medium types.

An expression analysis for genes related to copper-tolerance and stress-responses were performed. It was found that expression levels of several genes are changed by copper treatments. In the future, I will confirm the reproducible results and progress the functional analysis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学

キーワード：無菌培養 ホンモンジゴケ 銅耐性

## 1. 研究開始当初の背景

近年、化学系工場の跡地や不法投棄などによって土壌が著しく汚染され、土地の再開発や農業などに支障を来している。現在、このような土壌汚染の浄化は重機を用いた掘削工法が主流であるが、技術的・経済的な問題点も多く残る。そこで植物を利用して環境を浄化するファイトレメディエーションの技術的開発が望まれている。

ファイトレメディエーションは、現在いくつかの植物種で実用化が試みられているが、適用汚染金属や植物の栽培条件などに制限があり、多種多様な環境汚染問題に適用していくためには、まだまだ未熟な技術である。それに対応すべく、重金属耐性に関する遺伝的研究もゲノムが解読されているシロイヌナズナやイネなどを中心に研究が進められているが、それらの植物に備わっていない耐性については研究が進展しないなどの問題点が挙げられる。

コケ植物においては、ヒメツリガネゴケのゲノム解析が進められ、今後さらに遺伝子解析が加速化して進展することが期待されるが、シロイヌナズナやイネと異なり、コケ植物では先行する遺伝子情報が少ない。しかし、コケ植物は多種多様な環境下で生育しており、他の植物よりも多くのストレス耐性遺伝子を保有していることが考えられる。さらに形態による分類が詳細に行われ、原始的な構造(原系体)から高次構造(茎葉体)を取ることからも、植物のストレス耐性や形態形成を研究する上でも注目されるべき存在である。

ホンモンジゴケ (*Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth.) は、重金属の1つである銅が高濃度で存在する汚染地域において生息が認められており、体内に 10,000ppm を越す銅イオンを蓄積することが知られているコケ植物である。ホンモンジゴケの生体内における銅濃縮率が約 10,000 という報告もあり、ハイパーアキュムレーターとしての能力や形態的特徴などについても注目されている。この特殊な機能の解明は将来のファイトレメディエーションに大きく貢献するものであると考えられる。これまでにホンモンジゴケにおいて銅イオンの蓄積に関するいくつかの報告があるが、これに關与する遺伝的解析は行われていない。また実験材料として扱うために必要な無菌培養系も確立されていない。コケ植物の中には、重金属を多量に含むことができるハイパーアキュムレーターとして挙げられている種類がホンモンジゴケ以外にも存在する。このことから、ホンモンジゴケの研究の成果は他の重金属に対して蓄積能を持つコケ植物(さらにはコケ以外の植物)においても応用できる可能性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、将来のファイトレメディエー

ションへの応用を見据えて、強い重金属耐性を持つホンモンジゴケに注目し、その銅耐性のメカニズムを解明する。

ホンモンジゴケの銅の蓄積は、原系体から茎葉体で確認され、特に茎葉体の細胞壁に局在していることが報告されている。通常の植物では重金属によって生育阻害が確認されるが、ホンモンジゴケでは重金属存在下において原系体から茎葉体への分化が観察されている。しかし、これまで材料として用いてきたホンモンジゴケは自然界から採取したものが多く、生育を制御した際の銅の感受性に関する詳細な実験は行われていない。そこで本研究では、無菌体のホンモンジゴケを用いることにより生育条件を制御し、様々な条件下における銅の感受性について明らかにすることを目的とする。これにより、高濃度の重金属存在下における細胞分裂や原系体から茎葉体分化に関しても重要な知見が得られると考えられる。

また上記の実験で得られた無菌的なホンモンジゴケの原系体を、銅耐性に關与する遺伝子の解析に用いる。これまでに他の植物で報告されている銅耐性に關与する遺伝子やその他のストレス応答に關与する遺伝子情報と、コケ植物でゲノムが解読されているヒメツリガネゴケの遺伝子情報をもとにプライマーを設計し、ホンモンジゴケにおいて発現解析を行う。ここから銅濃度の違いなどの条件によって発現量の異なる遺伝子をスクリーニングすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 実験材料及びホンモンジゴケの培養条件の検討

ホンモンジゴケは、野外から採取し、外觀及びパラフィン包埋切片による横断面の顕微鏡観察によって同定したものをを用いた。ホンモンジゴケの茎葉体を流水洗浄後、70%エタノール、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 1%) で殺菌し、滅菌水ですすいだものを Knop 培地(1%ゲランガム、銅濃度 3ppm, pH4) に置床し無菌体を得た。これ以降の実験はこの無菌体を用いて行った。コケのモデル植物であるヒメツリガネゴケは、他の研究機関から分与されたもの(無菌的に培養維持されていたもの)を用いた。

培地の種類として、Knop 培地、MS 培地(1/2 倍、1/10 倍)、BCDAT 培地、BCDATG 培地を用いた。Knop 液体培地と MS 液体培地(どちらの培地も銅濃度 3ppm, pH4) を用いて振盪培養を行った。この時、スクロースを 0%、0.5%、1%、2%の濃度で添加した培地を用いて生育への影響を観察した。Knop 培地、BCDAT 培地、BCDATG 培地(いずれの培地も銅濃度 0ppm) を用いてホンモンジゴケとヒメツリガネゴケの生育の違いについて調査を行った。BCDATG 培地と 6-ベンジルアミノプリン(以下 BAP)を用いて、ホンモンジゴケの芽分化誘導条件の検討

を行った。BAP の濃度は、0, 0.5, 1, 2ppm で検討を行い、それぞれ明条件と暗条件で培養を行った。ホンモンジゴケにおいて培地の銅濃度とプロトプラスト形成効率について調査した。形質転換体作出法は遺伝子解析のために必要なツールである。コケ植物の形質転換法では、ヒメツリガネゴケにおいてプロトプラストを用いた形質転換法が確立されている。この方法を用いて、銅濃度 0, 3, 30, 100ppm の BCDATG 培地で培養されているホンモンジゴケの原系体からプロトプラストの調製を行った。

(2) ホンモンジゴケとヒメツリガネゴケにおける銅濃度の違いによる生育への影響

BCDATG 培地に 0, 1.5, 3, 15, 30, 60, 125, 300ppm の銅をそれぞれ添加した培地を用いて、ホンモンジゴケとヒメツリガネゴケにおける生育の差を観察した。

(3) ホンモンジゴケにおける Knop 培地と BCDATG 培地を用いた銅に対する生育特性の評価

BCDATG 培地と Knop 培地に 0, 1.5, 3, 15, 30, 60, 125, 300ppm の銅をそれぞれ添加した培地を用いて、ホンモンジゴケの生育測定を行った。生育測定には伸長面積（原系体は放射状に生育することから伸長直径を測定して算出したもの）と、クロロフィル濃度（Porra らの式を用いてクロロフィル  $a + b$  の濃度を求めたもの）を用いた。

(4) 銅耐性に関する遺伝子の発現解析

ホンモンジゴケと同様に細胞壁に銅イオンを蓄積することが知られているアルプスグンバイナズナにおいて銅輸送に関与するとして同定された膜タンパク質の情報をもとにプライマーを設計した。また、シロイヌナズナの銅シャペロン抗酸化タンパク質（ATX1）は、銅欠乏と過剰な銅に対して耐性を高めることが報告されている。本研究のホンモンジゴケの銅濃度に対する生育特性の実験結果においても、ホンモンジゴケは銅が存在しないもしくは高濃度で存在する培地でも生育が可能であることが示されている。そこで、ATX1 の配列情報をもとにプライマーの設計を行った。

無菌的に培養維持されているホンモンジゴケの原系体を銅濃度 0, 30ppm の Knop 培地に継代し、24 時間後にサンプリングを行った。サンプリングした原系体から totalRNA の抽出、逆転写反応により cDNA を合成し、設計したプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動による遺伝子の発現解析を行った。

(5) ホンモンジゴケにおける NAC ファミリー遺伝子の解析

ストレス応答や形態形成に関与することが知られている植物特異的転写因子である NAC ファミリー遺伝子に注目した。ホンモ

ンジゴケにおいて NAC ファミリー遺伝子は単離されていないため、ヒメツリガネゴケを含むいくつかの植物のアミノ酸配列を PlantGDB から収集し、InterProScan-5-RC6 で PF02365 にヒットしたものを NAC ファミリーとして、系統解析を行った。系統解析の結果をもとに、相同性の高い部分からプライマーを設計した。無菌的に培養維持されているホンモンジゴケの原系体を銅濃度（以下、処理銅濃度）の異なる Knop 液体培地に浸漬し、一定時間（以下、処理時間）後にサンプリングを行った。totalRNA の抽出、RT-PCR を行い、電気泳動による遺伝子の発現解析を行った。電気泳動結果の定量化には ImageJ を用いた。内部標準としてアクチンを用いた。

#### 4. 研究成果

(1) ホンモンジゴケの培養条件の検討

(1) - Knop 液体培地と MS 液体培地を用いた振盪培養の結果、Knop 培地の方がホンモンジゴケの生育が良好であることが分かった。また液体培地に継代する培養物の大きさが小さいと培地に関わらず枯死することが観察された。大量培養などにおいては、液体培養は有効な方法であると考えられるが、継代時の培養物の状態や酸素供給などの培養条件の検討はさらに行われるべきである。

固体培地における初代培養及び継代培養においては、炭素源を加えていない Knop 培地（1%ゲランガム、銅濃度 3ppm、pH4）を用いていたが、植物培養において炭素源として一般的に用いられるスクロース（0.5%、1%、2%）を添加した培地を用いて生育への影響を観察した。この結果、スクロース 2%添加のホンモンジゴケはどちらの培地においても培養 5 日後に白色化し枯死した様子がみられた。スクロース 1%添加においても白色化がみられた。スクロース 0%と 0.5%添加では緑色を維持しながら増殖する様子がみられたが、0.5%添加の原系体では褐色化する様子がみられた。どちらの培地においてもスクロースを添加していない培地の原系体の方が濃緑色を示し増殖も良好であった。

(1) - 本研究の一部において、銅濃度を変えた Knop 培地においてホンモンジゴケの原系体の培養を行った結果、銅濃度 0ppm においても原系体の生育がみられた。自然界から採取したホンモンジゴケの茎葉体を用いた先行研究において、ホンモンジゴケは銅がないと生育できない好銅性であると報告されてきたが、本研究においては銅を含まない培地でも良好な伸長がみられた。より良好な培養条件を検討すべく、これまで本研究で用いてきた Knop 培地に加えて、ヒメツリガネゴケの培養に用いられている BCDATG 培地と BCDATG 培地において、生育の比較を行った。ホンモンジゴケの培養後の様子を図 1 に示した。BCDATG 培地に継代したホンモンジゴケは培養 1 週間後から原系体の伸長がみられ、BCDATG 培地と Knop 培地においては

培養 2 週間後から原系体の伸長がみられた。ヒメツリガネゴケにおいても同様の傾向がみられ、原系体の伸長がみられる時期は BCDATG 培地で培養した場合が一番早いことが分かった。さらに、Knop 培地で生育させたホンモンジゴケの原系体は放射状に薄く広がるのに対して、BCDATG 培地においては原系体が寄り集まって増殖する様子が見られた。より多くの細胞を早く得るためには、BCDATG 培地が適していることが分かった。

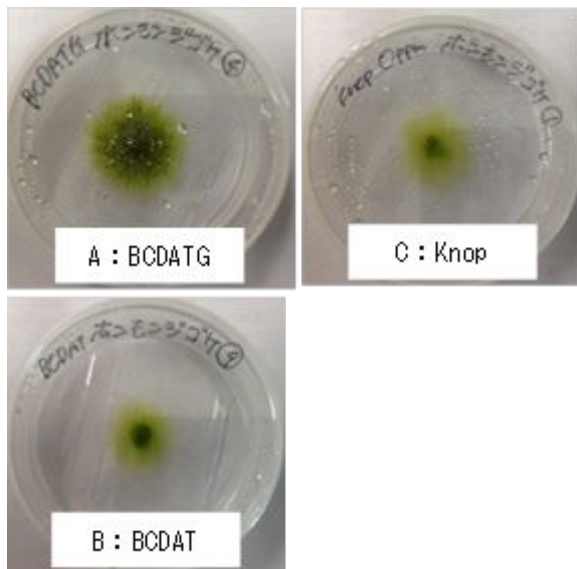


図 1 ホンモンジゴケにおける培地の種類による生育への影響

(1) - 培養しているホンモンジゴケの原系体から芽分化を誘導する条件を BAP 濃度と光条件において検討した。その結果、暗条件においては、BAP 濃度 1, 2ppm の培地で培養 3 日後から芽分化が確認され、培養 5 日後には BAP 濃度 0.5ppm の培地においても芽分化が確認された。明条件においては、BAP 濃度 1, 2ppm の培地で培養 5 日後に、BAP 濃度 0.5ppm の培地においては培養 7 日後に芽分化が確認された。今後さらに培地の種類や環境条件を検討することによって茎葉体を形成する培養条件の確立を目指す。

(1) - 各銅濃度で培養したホンモンジゴケの原系体からプロトプラストの調製を行い、血球計算版を用いてそれぞれのプロトプラスト濃度を求めた。この結果、銅濃度が高くなるにつれて、原系体量に対するプロトプラスト形成効率は低くなっていることが分かった。ホンモンジゴケは吸収した銅を細胞壁内のペクチンと結合させて蓄積していると報告されている。ペクチンは細胞壁内で細胞接着の役割を果たしていることから、銅がホンモンジゴケに吸収され細胞壁のペクチンと結合することにより細胞接着の役割を弱めるだけでなく、細胞全体が分解されやすくなっている可能性が示唆された。また本研究の別の実験では、生育させている培地の銅

濃度が高くなるにつれてホンモンジゴケの体内の銅濃度も上昇することを確認している。

(2) ホンモンジゴケとヒメツリガネゴケにおける銅濃度の違いによる生育への影響

(1) - の結果から、ホンモンジゴケとヒメツリガネゴケが BCDATG 培地において良好な生育が可能であることが分かったことから、BCDATG 培地を用いて銅濃度の違いによる生育への影響について調査した。銅濃度 3ppm, 15ppm, 300ppm で 6 週間培養した結果を図 2 に示した。ヒメツリガネゴケでは、培地の銅濃度が 0, 1.5, 3ppm の場合に生育がみられたが銅濃度が高くなるにつれて褐色化部分が多くなることが分かった。さらに 15ppm 以上の培地では一切生育せずに枯死の様子がみられた(図 2E, F)。一方ホンモンジゴケにおいては、銅濃度 300ppm においても原系体の伸長がみられた。

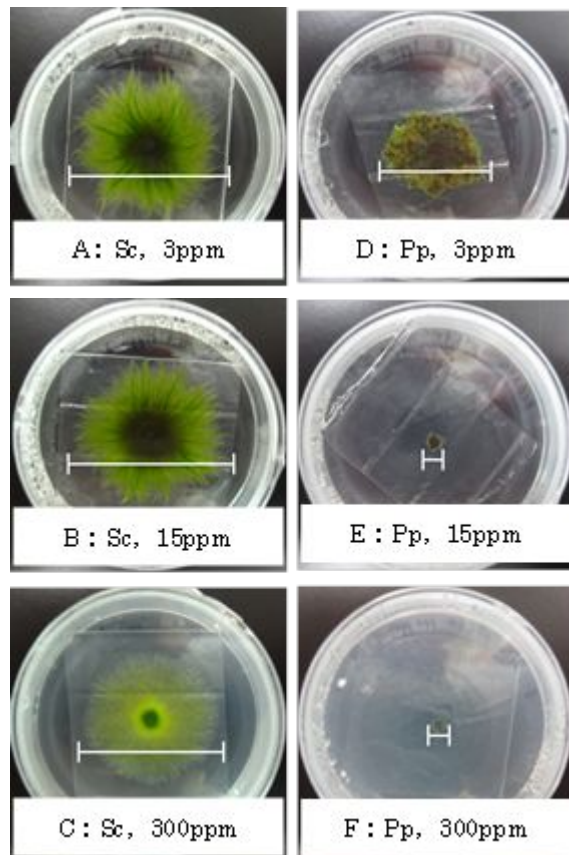


図 2 ホンモンジゴケとヒメツリガネゴケにおける培地の銅濃度に対する生育への影響

Sc はホンモンジゴケを Pp はヒメツリガネゴケを示し、図中のバーは放射状に生育した原系体の最大直径を示している。

(3) ホンモンジゴケにおける Knop 培地と BCDATG 培地を用いた銅に対する生育特性の評価

培養しているホンモンジゴケの面積を測



定し、継代直後(0日目)と培養45日目の伸長面積比を求めた。各銅濃度に対するそれぞれの培地におけるホンモンジゴケの原系体の伸長面積比を図3に示した。この結果から全ての銅濃度で伸長が確認できたが、培地間及び銅濃度間に有意差はみられなかった。しかし、(1) - の結果から BCDATG 培地と Knop 培地でのホンモンジゴケの原系体の生育が異なることが観察されており(図1), 再実験においても同様の結果が得られている。(1) - の実験でみられた緑色の濃さが異なること、上方向への生育、原系体が寄り集まって生長していることは、これまでの伸長面積の指標だけでは評価できない。そこで、細胞に含まれる緑色の光合成色素であるクロロフィル濃度の測定を行った。Knop 培地における各銅濃度に対するクロロフィル濃度を図4に示した。また BCDATG 培地における結果を図5に示した。それぞれの培地で、銅濃度 0ppm を基準として *t* 検定を行った。この結果、銅を添加した Knop 培地におけるクロロフィル濃度は、銅を添加していない場合(銅濃度 0ppm)との間に有意差が確認された(図4)。また BCDATG では、銅濃度 300ppm におけるクロロフィル濃度との間にも有意差が確認された(図5)。これらの結果から、伸長面積比のみでは確認できなかった生育の差をクロロフィル濃度という指標を用いることによって確認することができた。

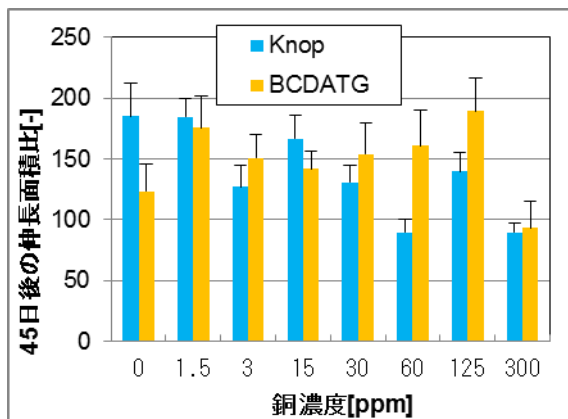


図3 培地の銅濃度の違いによる伸長面積比

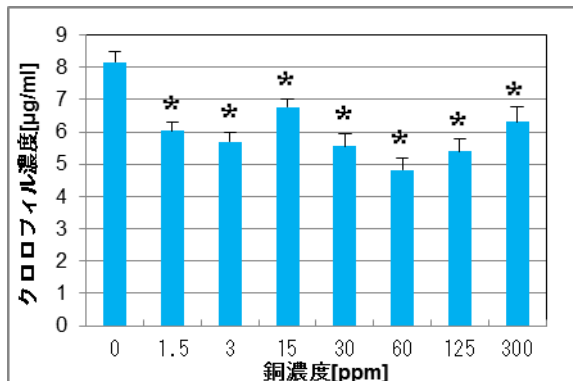


図4 Knop 培地における銅濃度の違いによるクロロフィル濃度 (\* =  $p < 0.05$ )

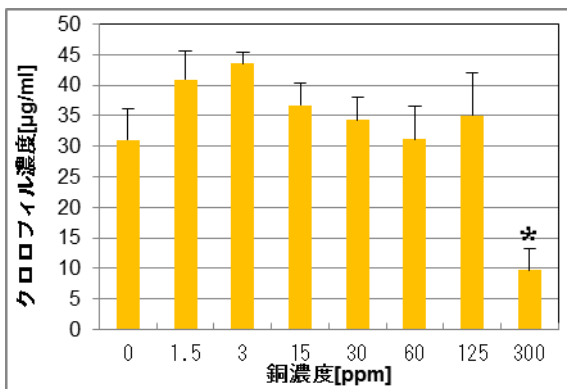


図5 BCDATG 培地における銅濃度の違いによるクロロフィル濃度 (\* =  $p < 0.05$ )

図4に示した Knop 培地における結果では、銅濃度 0ppm におけるクロロフィル濃度と他の銅添加培地でのクロロフィル濃度との間に有意差があったことから、銅の存在によって生育が阻害されていることが考えられた。また Knop 培地を用いて銅濃度を变化させた別の実験においても、銅を添加した培地よりも銅を添加していない培地の方が原系体の伸長面積が大きくなる傾向を確認しており、Knop 培地においては銅が原系体の生育を阻害していると考えられる。

BCDATG 培地において、銅濃度 300ppm の外観の様子(図2C)を確認すると、それよりも低濃度でみられた BCDATG 培地での特徴がみられず、Knop 培地で培養した外観と似て薄く広がっていることが分かった。クロロフィル濃度の測定においても銅濃度 300ppm において非常に低い値であった。クロロフィル濃度の測定において、BCDATG 培地では銅濃度 0ppm と 1.5~125ppm の間に有意差が確認できず、高濃度の銅存在下でも銅が添加されていない培地での生育と同様の生育が確認できた。以上のことから BCDATG 培地に含まれている特定の成分がホンモンジゴケの銅が関与した生長因子を活性化している可能性が示唆された。

#### (4) 銅耐性に関与する遺伝子の発現解析

アルプスゲンバイナズナの金属イオン輸送に関わる膜タンパク質と類似した配列を、ヒメツリガネゴケから2つ選抜し、アライメント解析によって相同性の高い部分をプライマーに用いて RT-PCR を行ったが、バンドは検出されなかった。

シロイヌナズナの ATX と類似した配列を持つヒメツリガネゴケの ATX をもとに設計したプライマーにおいては、複数のバンドがみられた。処理銅濃度 0ppm と 30ppm でバンドの多型がみられたが、ミスアニーリングの可能性も高いため、今後、再現性の確認と配列決定による確認を行う方針である。

#### (5) ホンモンジゴケにおける NAC ファミリ

## 一遺伝子の解析

NAC ファミリー遺伝子は、形態形成に關与する既知遺伝子とストレス応答に關与する既知遺伝子がそれぞれ系統樹のある領域に集まることが知られている。本研究の系統解析の結果、ヒメツリガネゴケの NAC ファミリー遺伝子においても、これらの既知遺伝子と同じサブグループに系統分類されることが分かった。これらの情報と相同性をもとに、プライマーを設計し、NAC ファミリー遺伝子の発現解析に用いた。

処理銅濃度を 0, 3, 30, 100ppm, 処理時間を 24 時間でサンプリングを行い、4 種類のプライマーを用いて実験を行った結果、NAC ファミリー遺伝子と思われるバンドは得られたが、発現の差は見られなかった。

処理銅濃度を 300ppm で、処理時間を 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 時間で経時的にサンプリング、発現解析を行った結果、あるプライマーにおいて、9 時間後までは発現が強くなり 12 時間後に発現が弱くなる発現挙動が見られた。この NAC ファミリー遺伝子は急激な銅濃度の変化に対して応答している可能性がある。

処理銅濃度を 0, 3, 30ppm, 処理時間を 1, 7 日で発現解析を行った結果、いくつかのプライマーにおいて発現量の差がみられた。ストレス応答に關与する既知遺伝子が存在する系統分類に属する配列の相同性から設計したプライマーを用いた発現解析結果を図 6 に示した。どの処理銅濃度においても発現量は 1 日後よりも 7 日後の方が強くなっていることが分かった。さらに 7 日後においては、処理銅濃度が高くなるにつれて発現量も高くなっていることが明らかにされた。今後、再現性の確認及び配列決定などの解析を進めていく予定である。

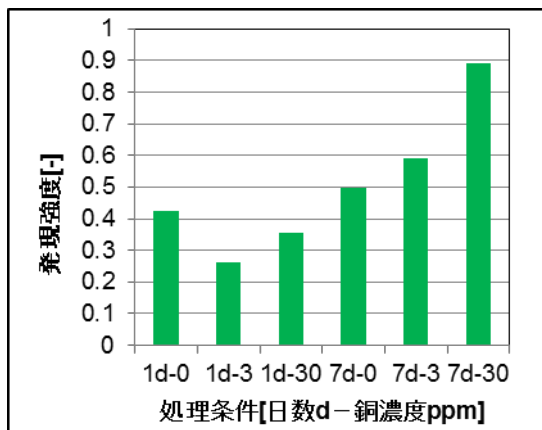


図 6 予測ストレス応答性 NAC ファミリー遺伝子の発現強度

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 8 件)

(1)廣瀬優作, 檜佐武, 赤岩祐佳子, 鶴田功輔,

大岡久子「銅濃度の違いがホンモンジゴケの生育に及ぼす影響」第 16 回高専シンポジウム, 2011 年 1 月 22 日

(2)檜佐武, 廣瀬優作, 笹沼いづみ, 大岡久子「ホンモンジゴケの銅耐性に關与するタンパク質の解析」第 16 回高専シンポジウム, 2011 年 1 月 22 日

(3)塚本結芽, 大岡久子「コケ植物における NAC ファミリー遺伝子の解析」第 17 回高専シンポジウム, 2012 年 1 月 28 日

(4)武田理佐, 大和田恭子, 大岡久子「銅濃度の変化によるホンモンジゴケの遺伝子発現解析」日本高専学会第 18 回年会講演会, 2012 年 8 月 25 日

(5)佐藤克俊, 大岡久子, 高原美規「*Physcomitrella patens*における NAC ファミリー遺伝子の機能解析」第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 5 日

(6)角田覚, 大岡久子「ホンモンジゴケにおける茎葉体誘導法の確立」第 19 回高専シンポジウム, 2014 年 1 月 25 日

(7)佐藤克俊, 大岡久子「*Physcomitrella patens*における NAC ファミリー遺伝子の機能解析」第 19 回高専シンポジウム, 2014 年 1 月 25 日

(8)北隅悠磨, 大岡久子「ホンモンジゴケの銅濃度変化に対する生長測定」第 19 回高専シンポジウム, 2014 年 1 月 25 日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大岡久子(群馬工業高等専門学校 物質工学科)

研究者番号: 00390526

### (2)研究協力者

佐藤克俊(群馬工業高等専門学校 環境工学専攻)

北隅悠磨(群馬工業高等専門学校 物質工学科)

塚本結芽(群馬工業高等専門学校 物質工学科)

岡田拓也(群馬工業高等専門学校 物質工学科)

角田覚(群馬工業高等専門学校 物質工学科)

武田理佐(群馬工業高等専門学校 物質工学科 2012 年度卒業生)

廣瀬優作(小山工業高等専門学校 物質工学科 2009 年度卒業生)

檜佐武(小山工業高等専門学校 物質工学科 2009 年度卒業生)