

平成21年 5月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19580378
研究課題名（和文） コケ原糸体培養の適用による都市環境への三次自然の導入
研究課題名（英文） Application of moss protonema culture to introduce tertiary nature on urban environment
研究代表者 高原 美規（TAKAHARA YOSHINORI） 長岡技術科学大学・工学部・准教授 研究者番号：20236422

研究成果の概要：コケ原糸体液体培養の効率化と、芽分化誘導の斉一化を課題とし、培養形態、培養条件の検討を行った。液体懸濁培養時の通気あるいはスクロース添加により、約20倍の懸濁細胞量が得られること、また半個体培地上での培養時にスクロース添加により、原糸体の分岐分裂が促進され、密度の高いマット状の成長となった。BAPによる芽分化誘導では、原糸体の辺縁部のみに見られた芽分化が、原糸体全体で一様に得られるようになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境技術，植物，植物組織培養，都市環境，二酸化炭素排出削減

## 1. 研究開始当初の背景

コケ植物（蘚類）は、胞子の発芽後、細胞が直鎖に並び、分岐しながら成長することで樹形状の構造を取り、この時期を原糸体と呼ぶ。原糸体には以下の特徴がある。

- ・ 光合成により独立生活できる個体である
- ・ 省スペースで培養できる
- ・ 頂端分裂と分岐分裂により樹形状に成長する→成長解析が容易
- ・ 細胞全てが外界に接している  
→外界の影響を受けやすい
- ・ CO<sub>2</sub>同化速度が高く成長が早い
- ・ 芽分化誘導法が確立している

→大量培養可能

こうしたコケ原糸体の特徴を踏まえ、平成17、18年度の2年間、科学研究費補助金基盤研究（C）「コケ原糸体培養のミクロとマクロにおける環境保全への適用」の交付を受け、ミクロの応用として、環境汚染物質バイオアッセイ系の開発、マクロの応用として、建物緑化用植栽材料の大量調製法の開発についての研究を進めて来た。

ミクロの応用の課題については、ケヘチマゴケ、オオサナダゴケモドキ、ハリヒノキゴケの3種のコケの無菌原糸体培養を確立し、日本において植物毒性が問題となる重金属、

銅とカドミウムの原糸体成長に対する影響を調査することにより、以下のことが明らかにできた。i)  $Cu^{2+}$ は0.5ppm程度から、 $Cd^{2+}$ では2ppm程度から生育抑制が見られる。ii) 頂端分裂と分岐分裂では、生育抑制の程度が異なり、成長パターンの変化が見られる。iii) 原糸体成長速度と重金属による成長阻害の両方に、種間差が確認できた。

マクロの応用に関しては、液体培養においてスピナーフラスコのように大きな攪拌球を用いて、培地中に強い乱流を作り、剪断応力を働かせることで、比較的短い断片の形で原糸体のサスペンション培養ができること、また、こうして得られた原糸体サスペンションを、不織布のシートとともにローテーターで回転培養することで、1週間程度の短期間で全面に原糸体が展開した原糸体シートを養成できることを明らかにできた。しかし、植物ホルモンであるBAPの添加で原糸体シートから茎葉体を誘導できるのだが、均質な誘導ができず、また発生する茎葉体の芽の数も少ないため、コケ茎葉体の揃ったコケシートの作成には至らなかった。また、原糸体での培養の難易度に種間差が見られ、オオズギゴケでは、わずかな原糸体成長の後すぐにBAP処理無しで茎葉体分化を生じ、原糸体状態での増殖が困難であった。

そこで、本研究課題では先行研究のマクロの応用の進展に注力し、コケ原糸体培養の環境科学への応用として、都市をコケ植物で被覆することで都市に3次自然を導入し、ヒートアイランド現象を緩和し、また都市のCO<sub>2</sub>収支を改善することで、京都議定書の達成に資することを最終目標とし、その要素技術の開発を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、原糸体シートからの均質な茎葉体分化誘導法の確立、茎葉体分化の生理学的特徴の解明、原糸体培養時のCO<sub>2</sub>吸収特性の調査の3点を当初目的とした。また、様々な種類のコケの無菌培養系の確立、および、上記3点の種間差の調査も平行して進め、多様な種の無菌原糸体培養の確立(50種程度)と好適種のスクリーニングを目標とした。また、建築物緑化のための建築資材への適応の検討を行うこととした。

具体的には、原糸体シート作成のための原糸体懸濁培養の効率化、原糸体生育密度の向上、原糸体からの均一な茎葉体芽分化の誘導、分化した芽からの茎葉体発生の誘導を目標とした。

また、茎葉体分化の生理学的特徴の解明のために、BAPを受容するtarget cellと芽を分化するresponse cellの間の関係を調査した。

## 3. 研究の方法

植物材料としては、原糸体培養時に自発的な茎葉体芽分化が起こらず、長期にわたって原糸体として培養を維持でき、また、外部から植物ホルモン(サイトカイニン)のBAPを与えることで容易に芽分化を誘導できるケヘチマゴケ(*Pohlia flexuosa*)の原糸体を主に用いた。

培地にはKnop培地を用い、液体懸濁培養および寒天で培地を固化した半固体培養を行った。液体培養では、培地中で大きな攪拌球が回転するスピナーフラスコを用いて培養を行い、一部の実験では、三角フラスコを用いて通気培養を行った。半固体培養では、原糸体が培地中に侵入するのを防ぎ、平面的に成長させ、また継代培養を容易にするため、培地上に半透膜を敷き、半透膜上で原糸体を成長させた。成長解析を行う場合には、半透膜上で成長している原糸体の先端5細胞のみを切断して残りの細胞を取り除き、細胞分裂を行う先端細胞を一つだけ含む原糸体断片から、成長を追跡観察した。

### (1) 糖添加培地での原糸体の成長

スピナーフラスコを用いた液体懸濁培養において、培地にスクロース1%を添加し、糖無添加の場合と1ヶ月間の短糸状原糸体の増殖量を比較した。また通気培養での増殖量も合わせて計測した。

また、半固体培地において、培地にスクロースまたはグルコース1%を添加し、5細胞切断を行った原糸体断片からの成長を比較した。

### (2) BAP処理による茎葉体芽分化の解析

半固体培地上で、原糸体を継代後5日間培養したのち、BAP 2 ppmを含む培地に透析膜ごと移動することで茎葉体芽分化処理を行った。BAP処理を12, 24, 36, 48, 60, 72時間行い、BAP処理開始後72時間の時点で芽分化の有無を観察した。また、各条件でBAP処理終了時に、BAP処理開始時点での先端から5細胞の位置で原糸体を切断して、切断しなかった場合と芽分化発生率を比較した。

### (3) 糖添加培地で成長させた原糸体に対する複数ホルモン処理

1%スクロース添加培地上で成長させた原糸体をBAP(サイトカイニン)で処理し芽分化誘導を行った後に、GA3(ジベレリン)あるいはABA(アブシジン酸)添加培地に継代し、分化後の芽の成長を観察した。

### (4) 新たなコケ原糸体培養の確立

野外より採取した、十数種のコケ植物の配偶体を十分に流水洗浄したのち、有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌し、その後滅菌水で2回洗浄したのち、無菌環境下で細断し半透膜

を置いた半固体培地上で原糸体を発生させることで、無菌原糸体培養の確立を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 糖添加培地での原糸体の成長

スピナーフラスコを用いた液体懸濁培養での糖添加なし、スクロース1%添加、および三角フラスコでの通気培養の3条件で、原糸体培養を行った場合の1ヶ月後の原糸体成長量を、以下の表に示す。

表 液体培地での原糸体成長量

	糖添加無し	スクロース添加	通気培養
細胞量	0.023g	0.694g	0.548g

原糸体は培養時においても、葉緑体を失わず、明条件下であれば炭素源なしでも独立栄養的に培養を維持することができる。しかし、糖添加により成長量が約20倍に増加したことから、葉緑体が維持されるコケ原糸体培養においても、外部から炭素源を供給することにより、成長量を増加させられることが分かった。そこで、より詳細に糖添加による原糸体成長の変化を解析するために、先端5細胞のみに切断した断片からの成長を観察し、先端細胞の分裂速度、一次側枝、二次側枝、三次側枝の数を経時的に観察した。結果を以下の図1 a-dに示す。

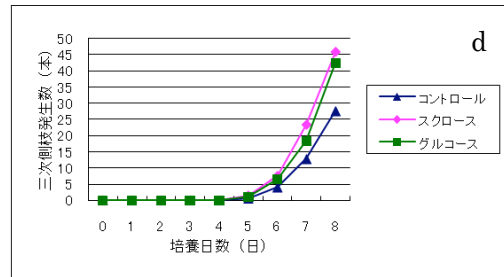
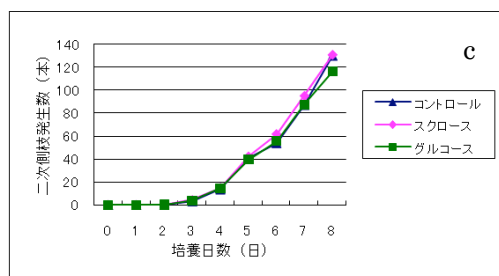
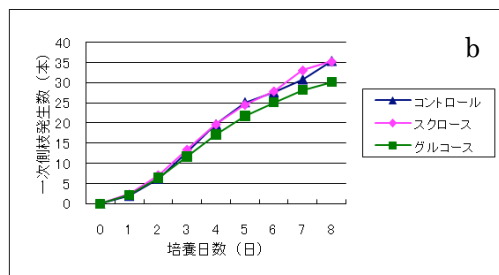
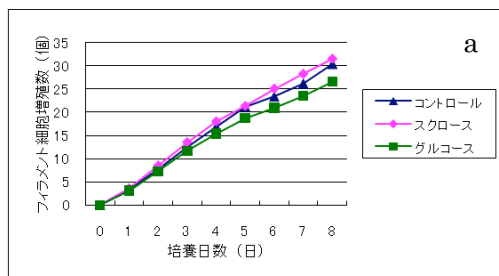


図1 糖添加の原糸体成長に対する影響

- a フィラメント細胞増殖数
- b 一次側枝発生数
- c 二次側枝発生数
- d 三次側枝発生数

原糸体は先端の細胞が分裂することで伸長していくが、先端の一細胞のみを切り出した場合、成長することはできないことから、後方の細胞の光合成産物が転流されることで分裂に必要な炭素源が供給されていると考えられる。そして、原糸体がある程度長くなり、より先端に近い細胞だけで先端細胞の成長が支えられるようになると、後方の細胞が分枝分裂を行うことで新しい先端細胞を生じ側枝を生じる。こうした細胞分裂に必要な炭素源を外部から供給することでより増殖速度を高めることができると考えられたが、フィラメント細胞数、一次側枝、二次側枝の数は、糖添加と糖無添加で顕著な差は見られなかった。細胞分裂の速度は、炭素源の供給以外の要因で制限されており、その分裂速度を保つのに十分な炭素源は自らの光合成のみで十分であることが示唆される。しかし、三次側枝発生数では、糖添加によりその発生数が有意に増加しており、より短い間隔で側枝の発生が可能となっていることが示された。液体培地での成長量と合わせて、培地への糖添加により、原糸体成長を促進することができることが明らかとなった。

##### (2) BAP 処理による茎葉体芽分化の解析

原糸体培養を BAP 処理することで、茎葉体芽分化を誘導することができる。その際、すべての細胞から芽分化が生じるのではなく、一部の細胞のみが芽分化を生じることができ、その芽分化を生じる細胞は **response cell** と呼ばれる。また、BAP の受容も特定の細胞によって行われるとされており、その細胞は **target cell** と呼ばれる。これら、**target cell** と **response cell** の関係及びその間のシグナル伝達を調べるために、12 時間単位での BAP パルス処理とその後の切断処理を行い、芽分化がはっきりと確認できる 72

時間後に観察を行った。  
 以前の予備的実験により、**response cell** は BAP 処理を行った時点での先端細胞から 5 細胞までの領域にあることが分かっているため、BAP 処理後 BAP を受容した **target cell** からのシグナル伝達を遮断する目的で、パルス処理終了時に BAP 処理開始時の先端 5 細胞のところで切断を行った。結果を図 2 に示す。

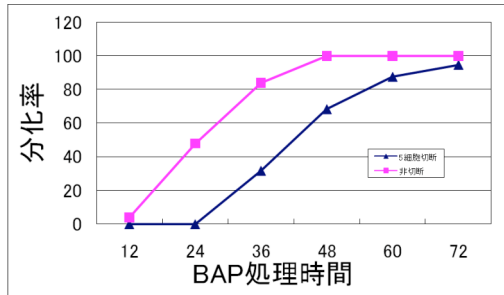


図 2 BAP パルス処理と切断の芽分化に対する影響

BAP パルス処理終了時に **response cell** の手前で原糸体を切断することにより、切断をしなかった場合と比べて、分化率が下がるが、それがほぼ BAP 処理時間 12 時間分に相当することが分かる。このことから、**target cell** はこの切断部位よりも先端細胞から遠い位置にあり、その間のシグナル伝達が細胞切断により遮断されることから、細胞内を移動するシグナルであることが分かる。また、切断により分化率が、ほぼ BAP 処理時間 12 時間分低下することから、**target cell** から **response cell** までのシグナル伝達には、約 12 時間かかることも示された。

(3) 糖添加培地で成長させた原糸体に対する複数ホルモン処理

これまで、原糸体を BAP で処理することで芽分化を誘導できるが、誘導された芽を茎葉体へと発達させることができなかった。これは、原糸体が十分に成長する前に、外生的な刺激により強制的に芽分化を誘導したために、その後の成長を支えるだけの炭素源を原糸体の光合成産物だけでは供給できないのではないかと考えられた。

(1)の実験により、培地に炭素源を添加することにより原糸体の成長を促進できることが明らかとなったので、分化後の芽の成長も促進できるのではないかと考え、糖添加培地で培養した原糸体に対して BAP 処理を行い誘導後の芽が茎葉体へと発達するかどうかを観察した。また、原糸体からの芽分化過程は、高等植物における胚発生過程と相同であると

考えられるので、胚からの成長を促進するジベレリンまたは胚の成熟を促すアブジン酸を BAP 処理の後に与え、芽からの茎葉体発達に効果があるか確かめた。糖処理培地上で BAP 処理により分化した芽を図 3 に示す。

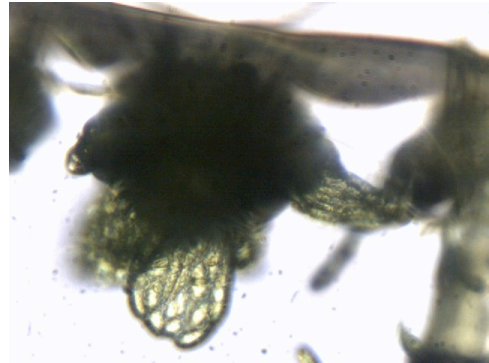


図 3 糖添加培地上で BAP によって誘導された芽分化

糖添加培地で十分に成長させた原糸体を、BAP 処理することで、分化した芽から数枚の小葉が成長するのが確認できた。しかし、数枚小葉が発達した時点でやはり成長が停止し、十分な茎葉体へと成長させることはできなかった。

BAP 処理後にジベレリンまたはアブジン酸での処理を追加する実験を行ったが、芽分化および分化後の芽の成長を促進する作用は認められなかった(データ未掲載)。

(4) 新たなコケ原糸体培養の確立

野外から採取したコケ茎葉体は、植物体が小さいため、土壌からの距離が小さく、多くの細菌で汚染されており、また表皮のクチクラ層があまり発達しないため、滅菌が困難で、目標の 50 種程度の無菌培養体の確立は達成できなかった。

無菌原糸体培養を確立できたのは、オオスギゴケ (*Polytrichum formosum*)、コウライタマゴケ (*Bartramia ithyphylla*)、ホンモンジゴケ (*Scopelophila cataractae*)、コバノスナゴケ (*Racomitrium barbuloide*)、ハリヒノキゴケ (*Rhizogonium spiniforme*)、オオサナダゴケモドキ (*Plagiothecium euryphyllum*)、ナガサキホウオウゴケ (*Fissidens grandifrons*)、トサカホウオウゴケ (*Fissidens dubius*)、トヤマシノブゴケ (*Thuidium kanedae*) であり、ケヘチマゴケと合わせて 11 種となった。

これら 11 種の中では、ケヘチマゴケが原糸体成長速度が最も速く、また自発的な芽分化がなく、長期にわたって原糸体状

態で維持できるため、最も有用な種だと言える。一方でオオスギゴケやコウライタマゴケは BAP 処理なしで自発的に茎葉体の芽分化を生じるので、芽分化とその後の成長の試験には、これらの種も試験していく必要があると考えられる。

本研究課題では、コケ原糸体培養からコケ茎葉体のシートを作り、それを建物緑化の緑化資材として適用することが最終目標であった。

これまでに、スピナーフラスコを用いて乱流による強い剪断応力がかかる懸濁培養を行うことで、短糸状原糸体として均質な培養物が得られることが分かっており、本研究課題によりさらに培地に糖添加することで、同じ培地量で原糸体の細胞量を 20 倍まで増やせることが明らかとなった。これは、実用化を考える上で重要な知見であるといえる。

また、懸濁培養した短糸状原糸体の懸濁液を不織布とともに回転培養器で培地とともにゆっくり回転させながら培養することで、原糸体シートが得られる。この原糸体シートに BAP 処理を行い、芽分化を誘導しその芽が茎葉体へと発達すれば、そのまま建築物緑化に適用可能な茎葉体シートが得られると考えられるが、現時点では芽分化後の成長が停止するため、建築物緑化の試験が行えないでいる。

本研究課題の成果により、target cell と response cell の間のシグナル伝達について、細胞内を輸送される 12 時間程度で移動するシグナルが想定できることを明らかにできた。原糸体からの芽分化についてより詳細な解析を行うための重要な進展が得られたと考えている。

BAP 処理により分化した芽の成長は、糖を添加した培地を用いることで、小葉数枚を展開するところまで成長させることができるようになった。高等植物の胚発生では、胚および種子が自らホルモンセンターとなることで、短期間にホルモン組成や生理状態を大きく変化させながら胚が成長していく。胚発生過程と相同であると考えられるコケ原糸体からの芽形成と茎葉体の発達においても、その成長初期には短いステージごとに必要な生理条件が異なることが予想できる。本研究課題により、分化した芽からのごく初期の成長は誘導できたので、さらに成長を続けさせる条件を模索することで、コケ茎葉体シートを実現し、建築物緑化によってヒートアイランド現象を緩和し、さらには都市内部で二酸化炭素固定を行うことで、二酸化炭素の都市からの排出量を削減できると考えられる。

## 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)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Aiko Oshio, Yoshinori Takahara, Application of moss protonema cultures for building greening materials., Proceedings of the 8th International Symposium on Global Renaissance by Green Energy Revolution. 査読無, 2008, B-96.
2. 大塩愛子, 高原美規. コケ原糸体の大量培養による建物緑化の基礎研究. 第 13 回高専シンポジウム in 久留米予稿集. 査読無, 2008, P-51
3. 大塩愛子, 高原美規. コケ原糸体の大量培養による建物緑化資材の開発. 日本ヒートアイランド学会第 2 回全国大会予稿集. 査読無, 2007, A-32

[学会発表] (計 1 件)

1. 大塩愛子, 高原美規. 培地への糖添加に対する原糸体成長の変化. 蘚苔類学会第 37 回大会, 2008.8.30, 秋田県秋田市秋田大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高原 美規 (TAKAHARA YOSHINORI)  
長岡技術科学大学・工学部・准教授  
研究者番号: 20236422

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

大塩 愛子 (OSHIO AIKO)  
長岡技術科学大学・大学院工学研究科博士  
課程・生物統合工学専攻