

# 論文内容の要旨

## 論文題目

Studies on Copper Tolerance and Cell Differentiation in *Scopelophila cataractae*

(ホンモンジゴケにおける銅耐性と細胞分化に関する研究)

氏名 野村俊尚

### 序論

ホンモンジゴケ (*Scopelophila cataractae*) は、寺院の銅葺き屋根の下や銅鉦山の周辺など銅濃度の高い環境下に生育し、体内に銅を蓄積する興味深いコケ植物である。注目すべき特徴として、他の重金属蓄積植物に比べても突出して高い銅蓄積能 (1-3%) が挙げられる。また、ホンモンジゴケは、ほぼ例外なく高濃度の銅存在下で生育している。このような銅が高濃度に存在する環境をホンモンジゴケがどのような機構を用いて探しているのかは未だ知られていない。これまでのホンモンジゴケに関する研究では、生育地点の記載および銅の蓄積部位や含有量を明らかにする目的のための野外から採取した植物試料の分析化学的解析が主であった。しかし、野外から試料を採取するアプローチでは、安定した性質の試料が持続的に得られないことなどから、生理学・分子生物学的手法による解析は困難であり、そのためにホンモンジゴケの生理機能については未だほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、ホンモンジゴケ原糸体の継代培養株を新たに作出し、これを用いてホンモンジゴケの銅に対する耐性および応答性を解析することで、このコケの持つ独特な生理機能や生態を明らかにすることを目指した。特に「ホンモンジゴケは好銅性なのか?」「どのような仕組みで自然界に点在する高濃度の銅存在環境を探し、移動して、定住しているのか?」という問いはこのコケの生存戦略を知る上で重要であり、これらの問いに答えることが本研究の主要な目的である。

### 結果と考察

#### **1. ホンモンジゴケ原糸体細胞における重金属耐性および蓄積特性に関する解析**

##### **1-1 ホンモンジゴケ原糸体継代培養株の確立**

0.5 %次亜塩素酸溶液で滅菌処理したホンモンジゴケの茎葉体（茨城県の寺院の銅屋根下に生育）を、BCDAT 培地で培養後、再生した原系体を液体あるいは寒天培地上で継代培養し（23 °C, 16/8 h 明/暗周期）、実験材料として用いた。

### 1-2 ホンモンジゴケ原系体培養株を用いた銅耐性能の解析

蘚類のモデル植物であるヒメツリガネゴケ原系体細胞を高濃度の銅（1-5 mM CuSO<sub>4</sub>）に暴露すると数時間で、液胞の形態変化やミトコンドリアの断片化が引き起こされるが、ホンモンジゴケにおいては、それらの形態に大きな影響は生じないことが確認された（図 1A）。一方で、1 mM 過酸化水素処理では両者ともに液胞とミトコンドリアの形態変化が誘導された（図 1A）。これらの結果から、ホンモンジゴケは高濃度の銅に暴露されても、酸化ストレスを生じさせない機構を有する可能性が示唆された。さらに、銅無添加区と比較して、銅添加区で 2 週間培養したコロニーで成長量（コロニーの直径）が上回ることから、ホンモンジゴケは好銅性を持つことが示唆された（図 1B, C）。加えて、ヒメツリガネゴケと比較して、ホンモンジゴケは亜鉛、ニッケル、コバルト、銀といった銅以外の重金属に対しても耐性能を有することが明らかになった。

### 1-3 銅耐性への細胞壁の関与

ホンモンジゴケは細胞壁に銅を高蓄積するため、細胞壁が銅のブロッカーとして機能している可能性が示唆されていた。これを検証するために、原系体細胞から細胞壁を除去したプロトプラストを調整し、銅耐性能の検定を行った。その結果、プロトプラストにおいても高い銅耐性能が確認されたことから（図 1D）、銅耐性能は重金属を排出する細胞膜局在の輸送体など、細胞壁以外の細胞機能によって生じる可能性が示唆された。

### 1-4 ホンモンジゴケ原系体細胞における重金属蓄積の特異性の解析

Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Pb（全て硫酸イオン化合物）を各々 20 μM ずつ添加した液体培地でホンモンジゴケ原系体を一週間培養後、ICP-MS によりそれぞれの含有量を測定した。その結果、ホンモンジゴケ原系体細胞は、他の添加金属と比較して銅と鉛を取り込んで蓄積しやすいことが明らかになった（図 2）。

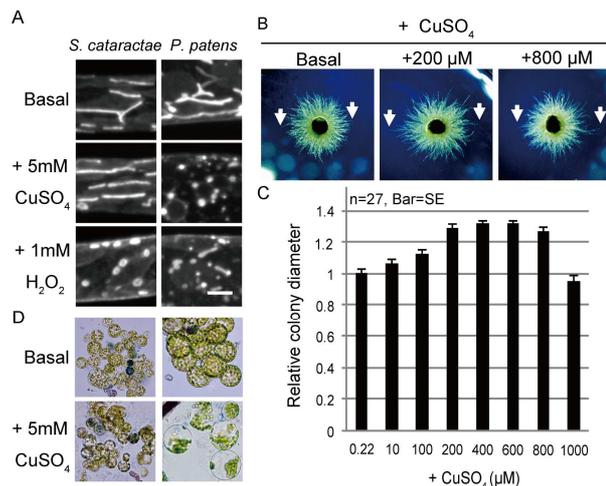
## 2. 銅によるホンモンジゴケの細胞分化制御機構の解析

### 2-1 原系体における無性芽形成への銅添加の影響

日本やアメリカ、ヨーロッパにおいて、高濃度の銅存在環境下に分布するホンモンジゴケは、孢子体ではなく無性芽を形成することで無性的に分布を拡大させることが知られている。そこで、この無性芽形成機構にホンモンジゴケ独自の分布拡大様式の機構解明の鍵があるので

はないかと考え、ホンモンジゴケ原系体における無性芽形成（図 3A）への銅添加

図 1



ガネゴケにおけるミトコンドリアの形態変化. bar=5 μm. B, C. ホンモンジゴケ原系体コロニー成長への銅添加の影響. 矢印: 原系体コロニーの端. D. 銅暴露 (24 時間) したホンモンジゴケとヒメツリガネゴケのプロトプラスト.

図 2

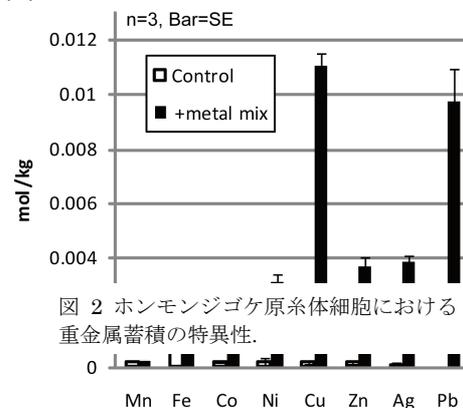


図 2 ホンモンジゴケ原系体細胞における重金属蓄積の特異性.

図 3

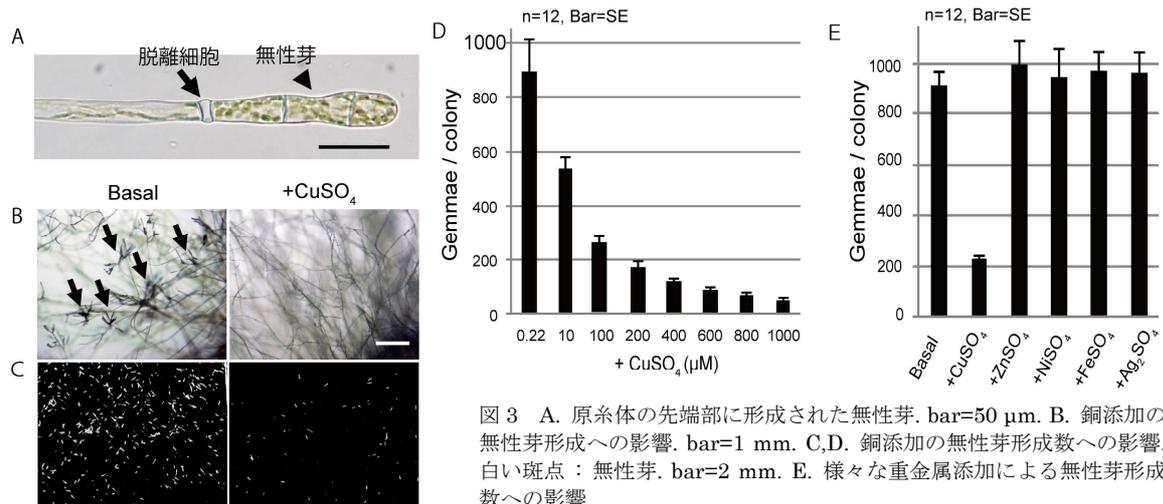


図 3 A. 原糸体の先端部に形成された無性芽. bar=50 μm. B. 銅添加の無性芽形成への影響. bar=1 mm. C,D. 銅添加の無性芽形成数への影響. 白い斑点：無性芽. bar=2 mm. E. 様々な重金属添加による無性芽形成数への影響.

の影響を調べた。その結果、添加した銅濃度依存的に無性芽形成が抑制されることが示された (図 3B-D)。銅添加による無性芽形成抑制効果は金属キレーター EDTA の共添加で打ち消されたため、銅イオンが無性芽形成を直接的に抑制しているものと考えられる。これらの結果から、銅濃度が低い環境、つまりホンモンジゴケにとって種間競争が厳しく生存に不利な環境では定住せず、蘚類の生育ステージ初期である原糸体の段階で無性芽を大量に形成して、積極的に次の新しい場所へ移動するというモデルが考えられた (図 5)。また、この無性芽形成の抑制効果は、亜鉛、ニッケル、コバルト、鉄、銀といった銅以外の重金属添加では引き起こされなかった (図 3E)。この結果は、ホンモンジゴケが重金属の中でも銅に特異的なセンシング機構を備える可能性を示唆するとともに、ホンモンジゴケが自然界で高濃度の銅環境下に偏在的に分布することの説明になりうると考えられる。

## 2-2 カウロネマ細胞分化への銅添加の影響

蘚類の原糸体において通常発達段階では、発芽したクロネマ細胞からカウロネマ細胞が分化する。その後、カウロネマ細胞から芽分化が生じ、これが成長することで茎葉体が形成される。このカウロネマ細胞分化への銅添加の影響を解析したところ、銅添加はカ

図 4

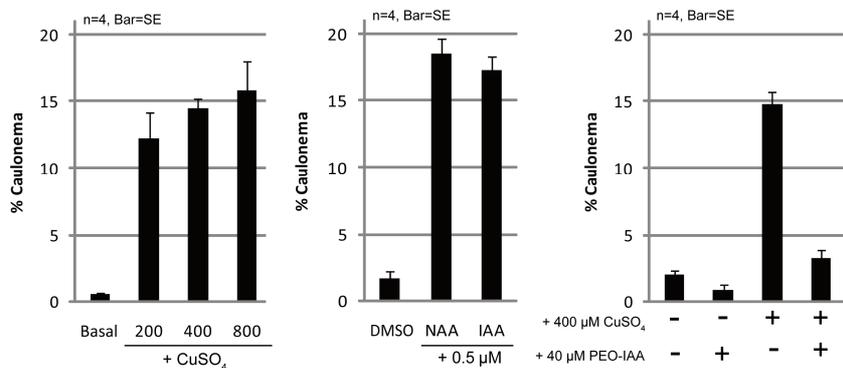


図 4 A. 銅添加によるカウロネマ細胞分化への影響. B. オーキシン添加によるカウロネマ細胞分化への影響. C. オーキシン作用阻害剤 PEO-IAA 添加の銅依存的カウロネマ細胞分化への影響.

ウロネマ細胞への分化を促進することが新たに明らかになった (図 4A)。

## 2-3 銅依存的な細胞分化の制御機構へのオーキシシグナル系の関与

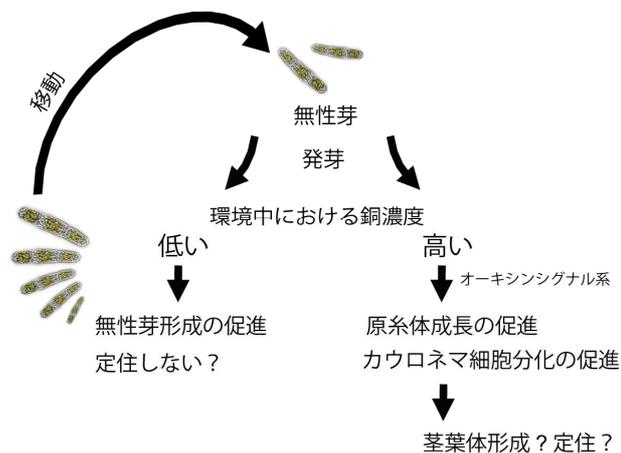
銅による細胞分化の制御機構を明らかにするため、一般的に蘚類のカウロネマ分化に対し促進作用を有するオーキシン添加の影響を解析した。その結果、オーキシン添加 (IAA あるいは NAA 0.5 μM) は、銅添加時と同様に無性芽形成の抑制とカウロネマ細胞分化の促進を引き起こした (図 4B)。さらに、銅添加によるカウロネマ分化促進は、オーキシン受容体 (TIR1/AFBs) を特異的にブロックするオーキシン作用阻害剤 PEO-IAA により抑制されることを確認した (図 4C)。これらの結果から、銅依存的な細胞分化の制御機構にはオーキシシグナル系が関与する可能性

が示唆された。

## まとめ

本研究では、ホンモンジゴケ原糸体培養株を用い、これまでにほとんど明らかにされていなかったホンモンジゴケの重金属耐性と蓄積および銅に対する応答性の解析を行った。まず、ホンモンジゴケ原糸体細胞が、銅とその他の重金属に対して耐性能を持つこと、銅添加は原糸体の成長促進を促すことを明らかにした。さらに銅耐性能はプロトプラストにおいてもみられたことから、主な銅蓄積の場である細胞壁以外の細胞機能が耐性能に関与する可能性が示唆された。また、重金属蓄積能を解析した結果、ホンモンジゴケは、銅と鉛を特異的に蓄積しやすいことが見いだされた。さらに、ホンモンジゴケは、環境中の銅濃度に応じて、オーキシニンシグナル系を介した細胞分化の切り替え機構を有していることが新たに明らかになった。特に、銅濃度が低い環境で、原糸体成長が抑制される代わりに、無性芽形成が促進されるという結果は、なぜ自然界においてホンモンジゴケのコロニーが低濃度の銅存在環境下に見いだせないのかという疑問に対する回答になると考えられる。また、この細胞分化制御は、銅以外の重金属添加ではみられないことから、ホンモンジゴケが銅特異的なセンシング機構を有している可能性をも示唆する。これは、ホンモンジゴケが他の重金属ではなく、銅の存在する環境下でのみコロニーを形成することの説明になると考えられる。このような特定の重金属の存在による細胞分化の調節機構は、重金属高蓄積植物であるホンモンジゴケが、生存戦略のために進化の段階で独自に獲得してきたものであると推測され、重金属高蓄積植物の生態や進化を考える上で興味深い。現在は、本研究で明らかになったホンモンジゴケの銅に関する生理現象の分子機構解明に取り組んでいる。

図 5



の高濃度銅環境への分布拡大様式。