

干瓢粉末添加培地におけるホンモンジゴケの生育への影響

大岡 久子^{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 物質生物系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1)

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

Effects of Moss Culture Media Supplemented with Gourd Powder on Moss Protonemal Growth in *Scopelophila cataractae*

Hisako Ooka^{1*}, 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 Materials Science and Bioengineering
(1603-1 Kamitomioka, Nagaoka, Niigata 940-2188, JAPAN)

*ooka@gunma-ct.ac.jp

(Received September 16, 2022; Accepted October 21, 2022)

Scopelophila cataractae, known as “copper moss,” can grow in areas contaminated with high concentrations of copper where other plants cannot grow. Because it grows more slowly than other plants, its high copper tolerance and ability to accumulate copper are effective survival strategies. These characteristics are also expected to be applied to phytoremediation, which is an environmental regeneration technology. However, in order to study *S. cataractae* in detail and use it for phytoremediation, it is necessary to culture moss on a large scale, and it is essential to search for media additives that improve the moss growth. Therefore, we focused on Kampyo (dried gourd shavings), which promotes the initial growth of *Pohlia flexuosa* and *Racomitrium japonicum*. The growth effect on *S. cataractae* by adding Kampyo powder to the medium was evaluated. Results indicated that the addition of Kampyo powder to the medium improved the growth of the protonemata of *S. cataractae*.

Key Words : *Scopelophila cataractae* / copper moss / dried gourd

1. 緒言

ホンモンジゴケ (*Scopelophila cataractae*) は、築年数が経過した緑青を生じた銅屋根や銅像などから雨水がしたり落ちるような場所で生育が確認されることが多

く、日本では、東京池上本門寺の銅屋根の下で最初に発見されたことからこの和名で呼ばれている[1]。ホンモンジゴケが生育する場所では、基本的にホンモンジゴケのみが生育している。それは他の植物が生育できないくらい高濃度の銅存在下でも生育できることを示している。

実際に、人工的に環境を制御できる培養下において、コケのモデル植物となっているヒメツリガネゴケでは 15 ppm の銅添加培地で枯死するのに対して、ホンモンジゴケでは 300 ppm の銅添加培地でも生育することが示されている[2]。また、ホンモンジゴケは銅を体内に蓄積することも知られており、各地の野外から採取されたホンモンジゴケの茎葉体に含まれる銅の量は、10,000 ppm を超えるものが多く、さらに 38,600 ppm もの銅を含有しているものまで報告されている（乾燥重量当たりの量）[1]。このようにホンモンジゴケの高い銅耐性および銅蓄積能力は、環境汚染のバイオ指標や植物を用いた環境浄化技術であるファイトレメディエーションとしての利用が可能であると考えられる。コケ植物が常緑樹の葉よりも重金属による大気汚染のバイオ指標として優れているという報告[3]やコケの原系体を用いた金属回収技術（バイオフィルトレーション）の研究は進められている[4]。これらの技術へ貢献するためにも、いくつかの報告や推測はあるものの、その詳細は明らかにされていないホンモンジゴケの銅耐性や銅蓄積に関する研究は進められるべきである。

ホンモンジゴケは日本各地で確認されているが、胞子体を形成することは稀であり、その報告はほとんどない[5]。主に無性芽で増殖することが知られており、成長は遅く、培養下ではなかなか茎葉体を形成しない。また銅濃度によって生殖様式を変えることや、培地成分の違いによって銅に対する感受性が異なる報告もある[2][6]。今後、ホンモンジゴケの詳細な研究をするにあたって、またファイトレメディエーションへの応用に向けても、大量培養方法の確立が必須である。そこで、ホンモンジゴケの生育を良好にする培地添加物の探索が必要であると考えた。

干瓢（かんぴょう）の国内生産は年々減少し、コロナ禍における外食産業の需要低迷の影響を受け、2021年の生産量は200tに満たないほどであった[7]。国内生産量のほぼ100%を占める栃木県では、寿司だけではなく干瓢の新たな使い方が生まれることを期待して、レシピコンテストを開催するなどのPRを行っている[7]。また、干瓢の乾燥剤としての可能性や肥料化への研究もなされており、エゾスナゴケとケヘチマゴケにおいて、培地に

干瓢粉末を添加することで原系体の成長に有意な影響を示すことが報告されている[8][9]。

本研究では、大量培養方法の確立が求められている生育の遅いホンモンジゴケを用いて、干瓢粉末添加培地における生育への影響を調査することを目的とした。また、ホンモンジゴケは銅ゴケとしても知られているため、銅の添加の有無に対する生育への影響についても調査した。

2. 実験方法

植物体材料として、当研究室において採取、同定、培養維持されているホンモンジゴケを用いた。培地には、水耕栽培の培養液として最初に考案されシンプルな無機塩培地である Knop 培地 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250 mg/L, KH_2PO_4 250 mg/L, KNO_3 250 mg/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1000 mg/L) [10] , またはコケのモデル植物であるヒメツリガネゴケの原系体培養に用いられる BCDAT 培地 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250 mg/L, KH_2PO_4 250 mg/L, KNO_3 1010 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.055 mg/L, H_3BO_3 0.614 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.055 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.055 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.389 mg/L, KI 0.028 mg/L, Ammonium Tartrate 920.5 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 147 mg/L) [11]を用いて、それぞれに干瓢粉末とゲル化剤としてگرانガム（富士フィルム和光純薬（株）、植物組織培養用）1%を加え、pHを5.0に調整した固体培地を用いた。干瓢粉末は、ひも状の干瓢乾物市販品（20-30%水分含有）を40℃で4日間乾燥後、1分間ミル破碎して粉末状にしたものをそれぞれの培地に0.0, 0.1, 0.2% (w/v)で添加した。銅の影響を調査するため、それぞれの培地において銅濃度を0, 500 μM ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を500 μM (124.85 mg/L) : 銅耐性を持たないヒメツリガネゴケの生育限界の2倍量[2])に調整した。また原系体が培地内に進入することを防ぐため、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。培養は人工気象器（NK システム, LH-220N）内で、14時間日長、25℃で行い、各培地条件ごとに3シャーレ、3反復（9シャーレ）行った。

生育の評価のため、重量とクロロフィル濃度を測定した。重量は、培養6週間後のホンモンジゴケの原系体の重さ（シャーレから取り出した直後の湿重量）を精密天秤で測定した。クロロフィル濃度の測定のため、6週間培養後のホンモンジゴケの原系体を透析膜上から回収し、乳鉢・乳

棒を用いてアセトン抽出を行った[12]. 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、クロロフィル濃度 (Chl *a* + *b* [$\mu\text{g/mL}$]) とした[13].

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

3. 結果および考察

3.1 ホンモンジゴケの外観

培養開始時と培養 6 週間後の外観の様子を図 1 に示す。ホンモンジゴケの原糸体は放射状に伸長し、干瓢粉末添加濃度の増加に従い良好な生育がみられた。また、Knop 培地では原糸体が薄く広がるのに対して、BCDAT 培地では原糸体が寄り集まり密に生育する様子が見られた。さらに、銅添加なし ($0 \mu\text{M}$) と銅添加あり ($500 \mu\text{M}$) では、銅添

加ありの方が原糸体の生育がよく、干瓢粉末添加濃度が高いほどその差が顕著にみられた。

培養開始後、2 週間から 4 週間が経過すると、BCDAT 培地に銅を添加した培地で液状化する現象がみられた。特に干瓢粉末添加濃度が 0.2% の液状化が顕著であり、培養日数が経過するにつれて液状化が進む様子が見られた。改変型 Knop 培地で寒天を用いた場合においても干瓢粉末添加濃度が 0.3% を超えると寒天培地が固まらない現象がみられている[9]。これは干瓢粉末が寒天のゲル化を物理的に阻害していると考えられている。本実験においても、干瓢粉末添加濃度が高い方が液状化の現象が顕著にみられたのはそのためであると考えられるが、Knop 培地においては液状化現象がみられなかったことから、それだけの理由ではないことが分かる。また BCDAT 培地においても、銅を添加していない培地では液状化がみられなかった。

本研究において、ゲル化剤として用いているゲランガムは、2 個のグルコース、1 個のグルクロン酸、1 個のラムノ

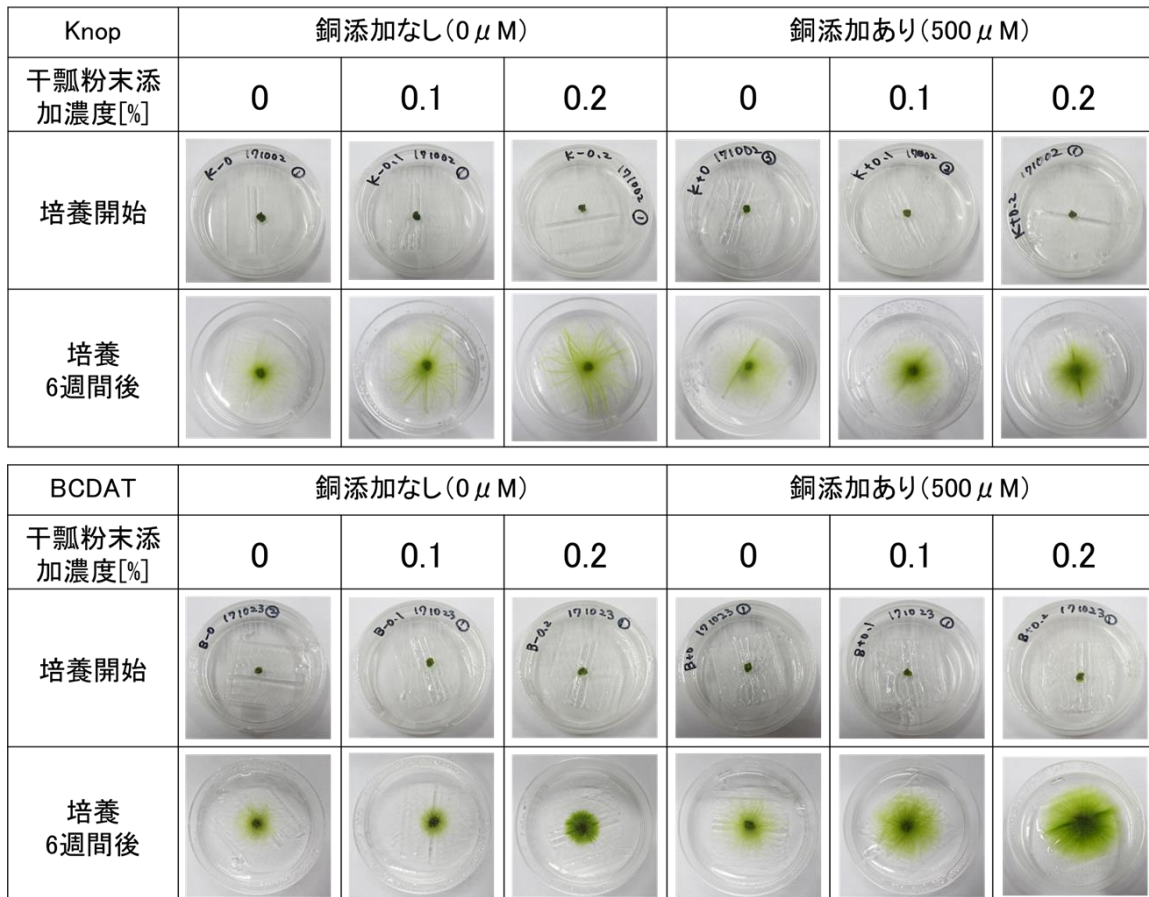
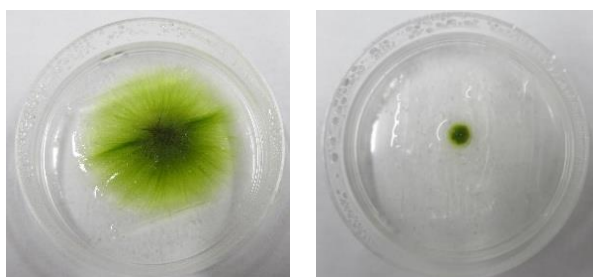


図 1 Knop 培地と BCDAT 培地におけるホンモンジゴケの外観

ースの4糖が構成単位の多糖であり、カルシウム、カリウム、マグネシウムなどのイオンの存在下でゲル化するとされている[14]。Knop 培地にも BCDAT 培地にもこれらのイオンが含まれるためゲル化すると考えられる。銅も2価のイオンとなる。液状化する培地では、この銅イオンがゲル化に関与し、培養中にホンモンジゴケの原系体が銅を吸収するために液状化したのではないかと考えた。Knop 培地の銅添加ありでは液状化せず、BCDAT 培地の銅添加ありで液状化したのは、BCDAT 培地に含まれる Ammonium Tartrate がゲランガム中のグルクロン酸と同様にカルボキシ基を持つことが影響していると考えられる。また、Knop 培地と BCDAT 培地では、カルシウム塩の種類と濃度が異なる。カルシウムイオンはゲル化に関与するが、BCDAT 培地に含まれる量は Knop 培地の約7分の1量である。また BCDAT 培地に含まれる塩化物イオンが液状化に関与している可能性も考えられる。

液状化したもののうち、特に完全に水没してしまった場合は、原系体の生育が悪くなった。静置培養のため、十分な酸素や二酸化炭素の供給や排出が阻害されたことが生育不良の原因として考えられる。水没していない原系体の部分がよく成長している様子もみられた。図1に示した BCDAT 培地の銅添加ありの写真は、透析膜を介して水没を免れた原系体の様子である。水没した原系体の様子と比較するために図2-Aに再掲する。図2-Bは水没した様子であり、原系体がほとんど伸びていない様子が分かる。これ以降のデータにおいて、BCDAT 培地の銅添加ありの結果の誤差が大きくなっているのは液状化の影響を受けているためである。



A: 水没を免れた原系体の様子 B: 水没した原系体の様子

図2 BCDAT 培地（銅濃度 500 μM, 干瓢粉末添加濃度 0.2%）におけるホンモンジゴケの外観

3.2 重量による生育測定

培養6週間後のホンモンジゴケ原系体の重量について、各条件の平均値を図3~6に示した。それぞれの図のバーは標準誤差を示し、t検定の結果(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)を示した。銅を添加していない Knop 培地では、干瓢粉末を添加することで原系体の重量は大きくなることが分かった。銅を添加した培地でも同様の傾向はみられた

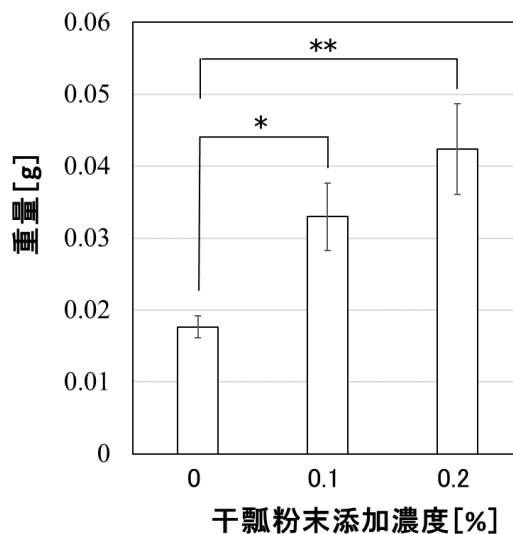


図3 Knop 培地（銅濃度 0 μM）における原系体の重量

ものの有意差はみられなかった。BCDAT 培地においても

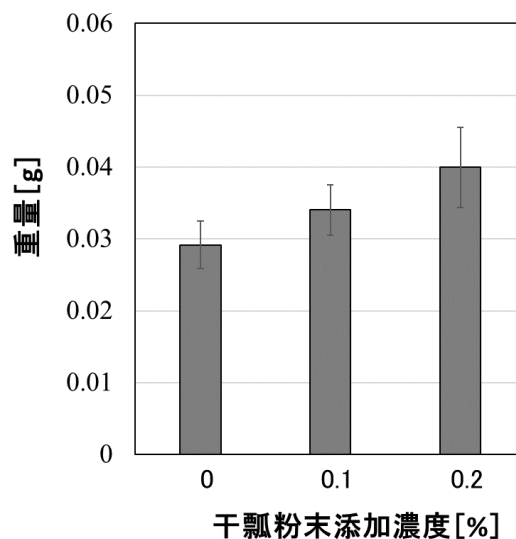


図4 Knop 培地（銅濃度 500 μM）における原系体の重量

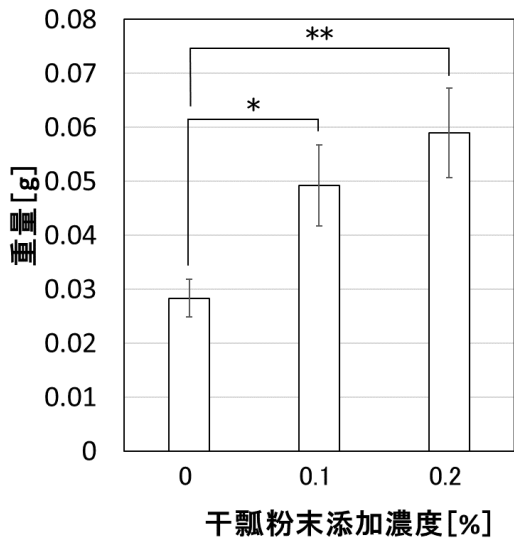


図5 BCDAT 培地（銅濃度 0 μM）における原糸体の重量

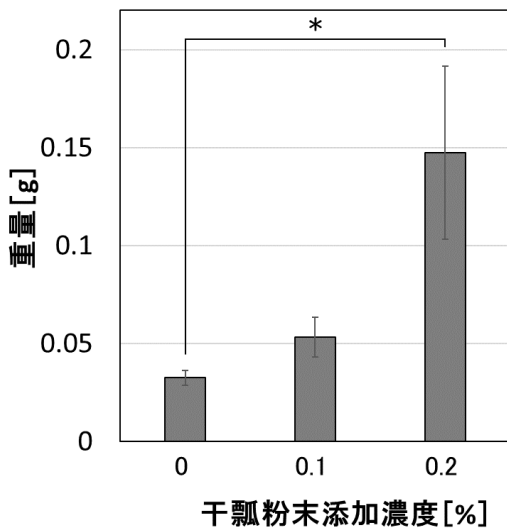


図6 BCDAT 培地（銅濃度 500 μM）における原糸体の重量

銅を添加していない場合では、干瓢粉末の添加によって原糸体の重量が大きくなることが分かった。銅を添加していない Knop 培地と BCDAT 培地の結果を比較すると、BCDAT 培地の方がいずれの干瓢粉末添加濃度でも重量が大きくなっていった。

これらの結果は、外観の様子と一致していたが、コケの原糸体は細く、細胞内に含まれる水分の他に原糸体の周囲に付着した水分も大きく影響すると考えられる。特に BCDAT 培地に銅を添加した培地においては、液状化によ

る水没した原糸体は周りに付着する水分も多くなったと考えられる。

3.3 クロロフィル濃度による生育測定

湿重量の測定では、周りに付着する水分の影響も大きいという問題があるが、乾燥重量での評価は、原糸体の量が少なく微量となるため測定が困難である。このような植物体の生育測定には、クロロフィル濃度の測定が有効である[2]。各培地で6週間培養後、原糸体のクロロフィル濃度を測定した結果を図7~10に示した。

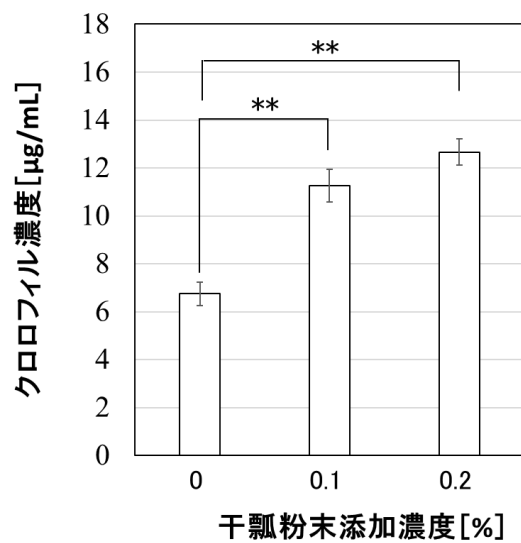


図7 Knop 培地（銅濃度 0 μM）におけるクロロフィル濃度

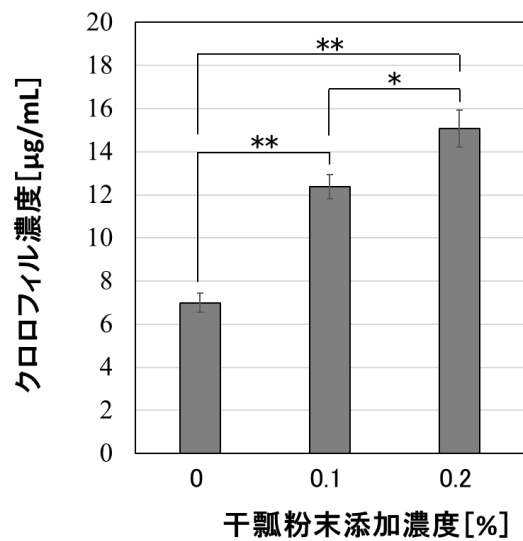


図8 Knop 培地（銅濃度 500 μM）におけるクロロフィル濃度

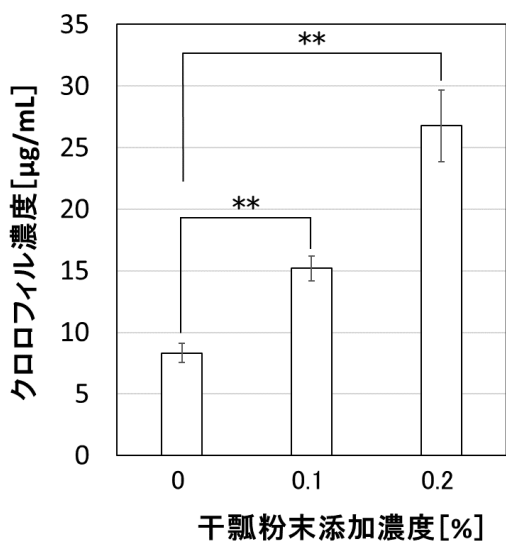


図9 BCDAT 培地（銅濃度 0 µM）におけるクロロフィル濃度

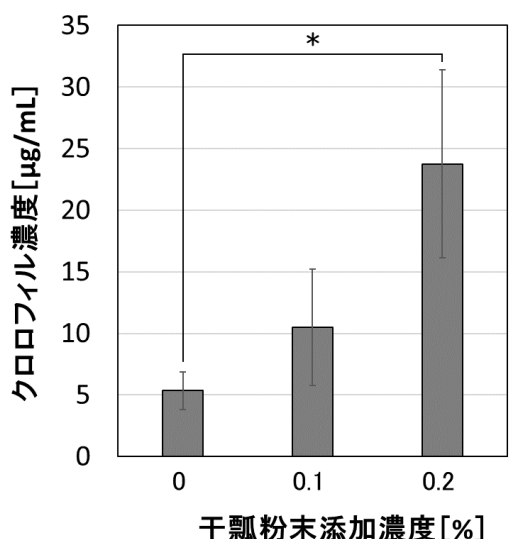


図10 BCDAT 培地（銅濃度 500 µM）におけるクロロフィル濃度

Knop 培地においては、銅の有無に関わらず、干瓢粉末を添加することによってクロロフィル濃度が高くなることが分かった。BCDAT 培地においても干瓢粉末の添加によってクロロフィル濃度が高くなった。これらの結果から、干瓢粉末を添加することによって、コケの原糸体の生育は良くなることが明らかにされた。これまでの研究[9]では、ケヘチマゴケとエズスナゴケにおいて干瓢粉末による生育への有意性が示されていたが、本研究において、それら

よりも生育の遅いホンモンジゴケにおいても原糸体伸長の有意性が示された。さらに、これまでの研究では、莖葉体からの原糸体の伸長、つまり初期成長促進効果について画像解析によって評価していたが、クロロフィル濃度による評価によって、二次元画像からは分からない原糸体の重なりについても評価することができた。

干瓢（乾）100g あたりには、水分 19.8 g, タンパク質 6.3 g, 脂質 0.2 g, 炭水化物 68.1 g, 灰分 5.0 g が含まれる。炭水化物の約半分は単糖当量であり、残り半分は食物繊維である[15]。灰分には植物の生育に欠かせないカリウムやその他にも必須微量元素などが含まれている。干瓢に含まれる遊離糖やミネラルなどの成分がホンモンジゴケの生育に良好な影響を与えたと考えられる。固体培地では一部液状化がみられたことから、今後、ホンモンジゴケにおいて液体培地での大量培養方法の検討を行うことで、さらに干瓢粉末を利用しやすくなることが期待できる。

4. まとめ

本研究では、干瓢粉末がホンモンジゴケの原糸体の生育にどのような影響を与えるかについて調査した。その結果、銅の有無にかかわらず、干瓢粉末を添加した培地で原糸体の生育が良好になることが明らかにされた。通常のコケよりも生育の遅いホンモンジゴケでも良好な生育がみられたことから、他の植物においても生育に良好な影響を与えることが期待できる。以上のことから、干瓢粉末のコケの大量培養への利用や肥料化としての有効性は十分にあると考えられる。

引用文献

- [1] 佐竹研一：『銅ゴケの不思議』, pp.13-22, 株式会社イセブ, 2013
- [2] 大岡久子, 北隅悠磨, 田中孝国, 高原美規：培地条件の違いによるホンモンジゴケの生育特性, 技術・教育研究論文誌, Vol. 25, No.2, pp.29-35, 2018
- [3] Yanbin Jiang, Miao Fan, Ronggui Hu, Jinsong Zhao and Yupeng Wu : Mosses Are Better than Leaves of Vascular Plants in Monitoring Atmospheric Heavy Metal Pollution in Urban Areas, International Journal of Environmental

- Research and Public Health, 15, 1105, 2018.
- [4] 野村俊尚, 井藤賀操, 榑原均: 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] 鵜沢美穂子, 佐竹研一: 秩父山地で再発見されたホンモンジゴケの胞子体及び生殖器官の形成について, 蘚苔類研究, 10(1), pp.10-12, 2010.
- [6] Toshihisa Nomura, Seiichiro Hasegawa: Regulation of gemma formation in the copper moss *Scopelophila cataractae* by environmental copper concentrations, Journal of Plant Research, 124, 5, pp.631-638, 2011.
- [7] 「かんぴょう かつて年間 5000t の栃木産, 今は... 細る国内唯一の産地」: 食品新聞, 2021 年 12 月 17 日トップニュース, (閲覧日: 2022 年 9 月 12 日).
<https://shokuhin.net/50326/2021/12/17/topnews/>
- [8] 田中孝国, 江口智之, 川越大輔, 高屋朋彰: かんぴょうを材料とした乾燥剤の作製と評価, 技術・教育研究論文誌, Vol. 20, No.1, pp.39-44, 2013.
- [9] 田中孝国, 大貫知哉, 小林康浩, 大岡久子, 高原美規: 干瓢粉末が及ぼすコケ原糸体への影響, 技術・教育研究論文誌, Vol. 24, No.1, pp.5-9, 2017.
- [10] 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.
- [11] 青木摂之, 杉田護: ヒメツリガネゴケ, 低温科学, Vol.67, pp.31-33, 2009.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 「多糖類とはジェランガム」: 住友ファーマフード&ケミカルのホームページ, (閲覧日: 2022 年 9 月 12 日).
https://www.tatourui.com/about/type/04_gellan.html
- [15] 「日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂)」: 文部科学省ホームページ, (閲覧日: 2022 年 9 月 12 日).
https://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/mext_01110.html