エゾスナゴケ (*Racomitrium japonicum*) 原系体の低温長期保存法

秋田 求¹・関 大輔¹・村瀬治比古²

¹ 近畿大学生物理工学部 649–6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

² 大阪府立大学大学院工学研究科 599–8531 大阪府堺市中区学園町 1–1

In Vitro Cryopreservation of Moss Protonema (*Racomitrium japonicum*)

Motomu AKITA¹, Daisuke SEKI¹ and Haruhiko MURASE²

¹School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

²Department of Mechanical Engineering, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Nakaku, Sakai, Osaka, 599-8531, Japan

Abstract

This study investigated the conditions for cryopreservation of the moss protonema (*Racomitrium japonicum*). An aseptic culture of *R. japonicum* was established from a single spore obtained from surface-sterilized sporangia. The cultured protonema showed extremely high tolerance to freezing. Even when directly transferred to -80°C without cryoprotectants, the cells remained viable one year later, and began growing shortly after direct transfer to fresh Knop medium maintained at room temperature. The growth and coloration of newly generated protonemata was affected by medium composition before and during long-term preservation. The suggested optimal medium for cryopreservation is Knop medium supplemented with sucrose (10 g L^{-1}) and trace elements (B, Mn, Zn, I, Mo, Cu and Co), with or without benzyladenine.

Keywords: culture, long-term preservation, moss, *Racomitrium japonicum*, Sunagoke

緒 言

いわゆるスナゴケ (エゾスナゴケ, *Racomitrium japonicum*) は、近年、屋上緑化用植物として利用されている藓類である。このコケは強い日射のある乾燥気味の斜面に大きな群落を形成しているのがしばしば観察される。このような生態が示すとおり、エゾスナゴケは乾燥に対して高い耐性を有している。したがって、ビル屋上のような強い日射をうけ水分供給も制限されるような条件におかれても、降雨等のみに

依存して生存することができる。そのため、屋上等の緑化にエゾスナゴケを利用する試みが活発になされてきた。このコケを利用し成形されたマットはいくつかのタイプに分けられるが、施工により敷設場所の温度が有意に低下したという事例も紹介されている (<http://www.nhk.or.jp/ohayou/marugoto/2012/09/0924.html>, 2013 年 11 月 1 日参照)。このことから、このコケを緑化材として用いることは、都市のヒートアイランド現象の緩和に一定の効果があると期待されている。

コケを用いる緑化事業をさらに効果的に進めるためには、エゾスナゴケ優良株の育成が重要になると予想される。そのためには、在来株の収集や評価およびそれらの性格付けを行うことに最初に取り組まなければならないと考えられる。さらに、種々の方法による変異株の誘導と、その結果生じる多数の変異株の評価も行われなければならない。これらを可能に

2013 年 11 月 6 日受付

2013 年 11 月 26 日受理

Corresponding author: Motomu Akita

(akita@waka.kindai.ac.jp)

するためには株を安定して長期間保存する基本的方法が明らかでなければならない。コケの変異株誘導とその保存に関してはヒメツリガネゴケ (*Physomitrella patens*) を用いた研究例が知られている^{1,2)} が、エゾスナゴケに関するものは見当たらない。

従来、植物細胞の長期保存法としては適切な保護剤で前処理し、プログラムフリーザーを用いて凍結保存する方法が一般的とされる (たとえば、大澤と江面³⁾)。低温により活性を著しく低下させた状態に細胞をおくことによって、保存中の変異も防止できる。種々の凍結保存法が開発され適応できる植物種も増え、保存効率も著しく向上してきた。エゾスナゴケの場合にもそれらの技術を適用できるものと考えられるが、それに先立って、このコケそのものが有する耐凍性を評価し、より簡便な長期保存条件を明らかにする必要があると考えた。そこで、本研究では、まずエゾスナゴケ無菌培養系を冷凍した際の影響を観察することにした。その結果、エゾスナゴケの原糸体 (protonema) は無処理のまま凍結させても長期間保存できることを見出したので報告する。

材料および方法

植物材料

材料としてエゾスナゴケ (*R. japonicum*) の無菌培養系を用いた。無菌培養系は、開裂前の胞子嚢を表面殺菌し、無糖の寒天培地上に静置して原糸体を生じさせたのちその1つの胞子由来の原糸体を分離した。無菌性は糖 (スクロースまたはグルコース) を含む数種類の培地上においてバクテリアが見出せないことによって確認した。このようにして得られた培養物は下記条件で培養するかぎりすべて原糸体であり、茎葉体の形成は観察されなかった。

培 地

基本培地として Knop 培地 (KH_2PO_4 250 mg L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250 mg L⁻¹, KCl 250 mg L⁻¹, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1000 mg L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mg L⁻¹) を用いた。継代培養には Knop 培地にスクロースを 10 g L⁻¹ 添加し pH 5.8 に調製後寒天 8 g L⁻¹ により固化した培地を用いた。

コロニーとして継代培養する場合は 300 ml のフラスコに上記培地を 100 ml 入れて用いた。原糸体をマット状に生育させる場合は同組成の固形培地をシャーレ (直径 9 cm) に約 20 ml 分注して用いた。

長期保存試験用の培地として上記 Knop 培地のほかに、

サイトカニンとしてベンジルアデニン (以下 BA) を 10 μM 加えたもの、微量金属類として $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot 6.20 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3 mg L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.60 mg L⁻¹, KI 0.83 mg L⁻¹, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg L⁻¹, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg L⁻¹ を混合したもの (以下 D 成分)、および BA と D 成分をともに加えたものを用いた。各々にスクロースを 0, 10, 100 g L⁻¹ 添加し、pH 5.8 として、寒天 8 g L⁻¹ によって固化した。培地は、オートクレーブ滅菌後、20 ml ずつプラスチックシャーレ (径 9 cm) に分注して用いた。

各々のシャーレの培地には、使用前にシャーレと同じ大きさの切ったセロハン (レンゴー, 300 番) を上に敷いた。このセロハンは、5 mM EDTA (pH 8.0) 溶液中でオートクレーブ処理し、純水で 5 回洗浄後、ろ紙に挟んで再度オートクレーブ殺菌して用いた。

培養条件

継代培養は培養温度 24℃、連続明条件 (蛍光灯下、約 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PFD) の培養室内で行った。コロニーの継代時は、ピンセットで径 5 mm から 10 mm にちぎったコロニーを上記培地に 8 ~ 10 個移植した。原糸体をマット状に生育させる場合は、ホモジナイザー (セルマスター CM-100, アズワン) を用いて材料を破碎した。破碎は、典型的にはコロニー 3 個と滅菌水 10 ml を 50 ml カップに入れ 10000 rpm で 3 分間行なった。得られた破碎液は先端を切ったマイクロビペットを用いてセロファンを敷いた上記固形培地上に移植した。

長期保存試験では前述の種々の培地 (シャーレ) で 2 週間前培養した。この前培養ではマット状に生育させたコケを約 5 mm 径のコロニーになるようにちぎり取り、各種培地に移植して培養した。この場合も培養温度等は上記と同じとした。

長期保存試験

前記の条件で 2 週間前培養したコロニーを各々の前培養と同じ組成の固形培地 1 ml を入れた 2 ml のマイクロチューブに対して 1 個入れフタをした。さらにフタはパラフィルムを用いて封じた。それらを 24℃暗条件、4℃暗条件、-80℃暗条件の各々に直ちに移動して保存した。保存後、-80℃で維持したものはチューブのまま室温で解凍したのち取り出し、他はそのまま取り出して、継代培養と同じ培地を入れたシャーレに移植し、継代培養と同じ条件で培養して生育を観察した。

結果および考察

予備実験として原系体を常法どおり培養し、それを凍結または通風乾燥してから、直ちに同組成の新鮮な培地に移植しても死滅することはないことを確かめた（結果示さず）。すなわち、エゾスナゴケはこれらのストレスに対してきわめて高い耐性を有していた。

そこで、保存前および保存中に用いる培地中のスクロース

濃度、サイトカイニン（BA），および微量金属類添加効果を調べた。なお、サイトカイニン類に蘚類が応答すること、その応答が維管束植物と類似することは報告されている⁴⁻⁶⁾。

前培養の2週間に、各条件における原系体の状態に見かけ上は明らかな差はなかった。そのコロニーを2 mlのマイクロチューブに移し、各条件で保存した。

各温度で3, 6, 12か月間保存し、直ちに常温に戻して新しい培地に移植したところ、保存前および保存中の培養条件によらず、保存期間の長い場合ほど初期生育が遅くなる傾向

Fig. 1 Influence of storage temperature and medium composition on the recovery and growth of *in vitro* *R. japonicum* protonema.

R. japonicum protonemata were preserved for one year at 24 °C, 4 °C and - 80 °C, then directly transplanted to and cultured on Knop medium for 1 month. Each Petri dish was inoculated with seven colonies from cultures preserved at 24 °C (first row), 4 °C (second row) and - 80 °C (third row). The diameter of each dish was 9 cm.

が見られた。しかし、良好に生育を開始する複数の条件が見られた。Fig. 1に12か月保存後に1か月間培養したコロニーの状況を示した。これらは、各シャーレの上段から、24℃、4℃、-80℃で各々保存した7個のコロニーを各々横一列に並べて移植し培養したものである。Knop培地またはBAのみを添加したKnop培地では培養中に褐変しやすかった。

24℃で保存したものでは培地間の差が大きく、特にスクロース 100 g L⁻¹のKnop培地やBAを単独に添加したKnop培地を用いた場合は、ほとんどが枯死した。一方、D成分を単独あるいはBAとともに含む培地で前培養した場合は培養中も緑色を保った。なかでもスクロース 10 g L⁻¹の場合に生育が比較的良好と考えられた。他の培地では安定性に劣り、数個以上のコロニーで生育が認められないか著しく生育が遅かった。なお、原糸体が絡まりあってひも状になったものが、特にBAを単独に添加したスクロース 10 g L⁻¹の培地で見られた。この状態の細胞は6か月以上保存すると観察された。しかし、それらから茎葉体が分化することはなかった。

これに対して4℃または-80℃で保存した場合は、褐変化したものや生育が遅いものは見られても、全ての培地で何らかの成長が見られた。特にD成分単独、あるいはD成分とBAを共に加えた培地を用いた場合は、スクロース濃度によらず褐変化しないで原糸体の新たな生育が認められた。Fig. 1において、特にスクロース 10 g L⁻¹を含む培地を使用した場合に黒色に写っているコロニーがあるが、これらではコロニー上に新しい原糸体が良く生育していた。スクロースを含まない培地を用いた場合、保存後の生育は他より劣った。最も安定して生育が認められる培地は、スクロース濃度を10 g L⁻¹とし、D成分単独かBAを共に加えたKnop培地と判断された。

以上の結果から、エゾスナゴケは特別な前処理を行うことなく、直接に-80℃の低温条件に移すのみで長期保存できることがわかった。なお、スクロースを10 g L⁻¹としD成分を加えたKnop培地で前培養したのち、-80℃と24℃を1日毎に5回繰り返した場合も、原糸体が死滅することはなかった（結果示さず）。ただし、これらの処理後にどれだけの細胞が活性を維持していたかは不明である。培養物の全体が緑色を呈していたことから、死滅していない細胞の割合は高いと予想されるが、今後、その割合を定量化することが求められる。

これらの結果は、優良株選抜および育種研究において重要な情報とすることができる。なお、変異を極力抑制するという観点からは、-80℃条件のように生物学的活性を著しく低下させた条件で長期保存することがより望ましいと考えられる。

本研究では、容器内に培養物を封じた。これにより酸素供給が制限されるが、このことが保存性を高めている可能性があると考えられる。例えば、Repunteら⁷⁾は不定根培養物をカプセル化して細胞への酸素供給を制限することにより、培養

物を長期保存することが可能と報告している。

凍結による植物細胞の傷害の原因は、凍結脱水ストレスと氷晶成長による機械ストレスによるところが大きいとされる^{8,9)}。エゾスナゴケの培養細胞が急激に低温に移されたときに、どのようにして傷害を回避しているのかは興味深い問題である。エゾスナゴケ細胞に氷晶の発達を抑制する物質が豊富に含まれている可能性や、コロニー内に水分含量がすでに低いなど状態の異なる細胞群が常に混在していて、それらが融解後に活動した可能性が考えられる。後者の場合、凍結により損傷した細胞も存在するはずであるが、実際、凍結融解を繰り返した材料からの物質の漏出を電気伝導度の変化によって調べたところ、その上昇が認められている（結果示さず）。したがって、少なくとも強く損傷を受ける細胞も培養物に混在していると考えられる。

本研究において、スナゴケの原糸体培養物が凍結ストレスに対し高い耐性を示すことがわかった。このことは、エゾスナゴケが、植物の耐凍性の仕組みを解明し、あるいは、耐性を向上させようとする試みに対して有用な情報を提供する材料となる可能性をも示唆している。

摘 要

エゾスナゴケ原糸体の無菌培養物を長期間簡易に維持する方法について検討した。エゾスナゴケの原糸体は、胞子嚢を表面殺菌することによって得た。原糸体培養物は、急激な凍結にも耐えた。また、前処理無しで-80℃に移しても、そのまま少なくとも1年間保存することが可能であり、再度培養を行うと生育を開始した。この結果から、エゾスナゴケの培養株を簡易に保存できることがわかった。

謝 辞

本研究は、近畿経済産業局による地域新生コンソーシアム研究開発事業「屋上・壁面緑化用多機能性バイオ苔のLED活用高効率生産技術」の一環として行われた。

引用文献

- 1) Schulte J, Reski R. High throughput cryopreservation of 140,000 *Physcomitrella patens* mutants. Plant Biol. 6: 119-127. 2004.
- 2) Schween G, Egner T, Fritzowsky D, Granado J, Guitton MC, Hartmann N, Hohe A, Holtorf H, Lang D, Lucht JM, Reinhard C, Rensing SA, Schlink K, Schulte J, Reski R. Large-scale analysis of 73, 329

- Physcomitrella* plants transformed with different gene disruption libraries: Production parameters and mutant Phenotypes. *Plant Biol.* 7: 228–237. 2005.
- 3) 大澤勝次, 江面 浩. 植物保存技術. 大澤勝次, 江面浩著, 植物バイオテックの基礎知識. 農文協, 東京. 119–134. 2005.
 - 4) Von Schwartzenberg K, Núñez MF, Blaschke H, Dobrev PI, Novák O, Motyka V, Strnad M. Cytokinins in the bryophyte *Physcomitrella patens*: analyses of activity, distribution, and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. *Plant Physiol.* 145: 786–800. 2007.
 - 5) Decker EL, Frank W, Sarnighausen E, Reski R. Moss systems biology en route: Phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biol.* 8: 397–406. 2006.
 - 6) Cove D, Bezanilla M, Harries P, Quatrano R. Mosses as model systems for the study of metabolism and development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 497–520. 2006.
 - 7) Repunte VP, Taya M, Tone S. Conservation of root regeneration potential of cell aggregates from horseradish hairy roots used as artificial seeds. *J. Chem. Engineer. Jap.* 29: 874–880. 1996.
 - 8) Atici O, Nalbantoglu B. Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochem.* 64: 1187–1196. 2003.
 - 9) Hoshino T, Odaira M, Yoshida M, Tsuda S. Physiological and biochemical significance of antifreeze substances in plants. *J. Plant Res.* 112: 255–261. 1999.