

博士論文

Pohlia flexuosa 原糸体における
培養特性の解析と建物緑化資材への応用

長岡技術科学大学大学院 工学研究科

博士後期課程 生物統合工学専攻

大塩 愛子

Pohlia flexuosa 原糸体における培養特性の解析と建物緑化資材への応用

目次

第一部 *Pohlia flexuosa* 原糸体の培養特性の解析

第一章 諸言

- 1-1. コケ植物 1
- 1-2. コケ植物を用いた研究 3
- 1-3. 本研究の目的 3
- 1-4. 本論文の構成 4

第二章 ケヘチマゴケ原糸体の生長特性

- 2-1. 諸言 8
- 2-2. 本章で共通する材料と方法 12
- 2-3. *in vitro* 培養下での原糸体生長観察法の確立 16
- 2-4. 原糸体上への芽の分化誘導 15
- 2-5. 原糸体の生長に対する糖の影響 18

第三章 総合考察

- 3-1. 培養ケヘチマゴケ原糸体の実験材料としての利点 37
- 3-2. ケヘチマゴケ原糸体に形成される芽の特徴 37
- 3-3. ケヘチマゴケ原糸体の生長に見られた糖の影響 38

第二部 *Pohlia flexuosa* 原糸体の建物緑化資材への応用

第一章 諸言

- 1-1. ヒートアイランド現象 39
- 1-2. 緑化 39
- 1-3. 建築物緑化 40

第二章 資材用コケ原糸体の調製

- 2-1. 緒言 45
- 2-2. 目的 45
- 2-3. 実験方法 46
- 2-4. 結果 46
- 2-5. 考察 47

第三章 緑化シートの成形

- 3-1. コケ原糸体の基盤への展開 53
- 3-2. 基盤展開後のコケ原糸体からの茎葉体の誘導 55

第四章 総合考察	7 1
参考文献	7 2
謝辞	7 8

第一部 *Pohlia flexuosa* 原糸体の培養特性の解析

第一章 諸言

1-1. コケ植物

コケ植物は分類学的にコケ(蘚苔)植物門に属し、スギゴケ (*Polytrichum juniperinum*) やハイゴケ (*Hypnum plumaeforme*) に代表される蘚綱、ゼニゴケに代表される苔綱、胞子体がツノのような形状をしたツノゴケ綱の 3 群に分けられる。現在日本で知られている蘚苔類はおよそ 1700 種であるが、これは全世界で報告されている種数のおよそ 10 分の 1 に相当するといわれている。蘚綱、苔綱、ツノゴケ綱はしばしば蘚類、苔類、ツノゴケ類と呼ばれる (Table 1-1)。ここでは、蘚類に焦点を当て記載していく。

1-1-1. 蘚類の生活環

蘚類の生活環を Fig. 1-1 に示す。コケ植物の本体は、卵や精子などの配偶子を形成する配偶体であり、シダ植物における前葉体と同じく単相 (n) である。配偶体上に造卵器と造精器が作られ、それぞれにおいて卵細胞と 2 本鞭毛性の精子が形成される。精子と卵細胞の受精により、複相 ($2n$) の胚を生じる。胚は配偶体に寄生した状態で生長し、胞子体となる。胞子体は、苔類では短命なのに対し、蘚類やツノゴケ類では光合成を行い、比較的長命である。胞子体は胞子嚢を形成するが、コケ植物の胞子嚢は蒴と呼ばれる。蒴の中で減数分裂が起こり、胞子が作られる。胞子が発芽すると原糸体を形成する。原糸体は糸状、葉状または塊状で、一般に蘚類のものは苔類やツノゴケ類のものよりもよく発達し、分枝を繰り返して生長する。この原糸体上の 1 ヶ所~数ヶ所に芽ができ、茎葉体が形成され、生長することで我々が普段目にするコケ植物の形状となる。この原糸体は通常すぐに消失する。しかしその一方で、原糸体がよく発達し、長期間残存し、代わりに本体がほとんど発達しないハミズゴケ (*Pogonatum spinulosum*) やウチワチョウジゴケ (*Buxbaumia aphylla*)、ヒカリゴケ (*Schistostega pennata*) のような種も存在する。

配偶体には仮根と呼ばれる構造があり、水分吸収や基質に茎葉体をつなぎとめる役割を果たしている。水分吸収は仮根からだけでなく、植物全体から吸収する。植物体の表面にはクチクラ層が存在するが、維管束植物に比べると発達は弱く、吸水・乾燥しやすい。また、コケ植物は細胞中で液胞があまり発達せず、乾燥すると葉などが縮んで休眠状態になり、水を得ると急速に休眠から回復する性質がある。

1-1-2. コケ原糸体の特徴

原糸体は胞子の発芽により生じる配偶体の始まりで、常に湿潤な地上や樹皮などの上に密着して生活する。原糸体の形や発生の仕方はコケの種類によって異なっているが、蘚類と苔類の原糸体の様子は様々な点で根本的な違いがある。

蘚類では、胞子が発芽すると 1-2 本の発芽管を出す。発芽管の細胞は頂端分裂と分枝分裂を繰り返し、ミズゴケ類やヨツバゴケ類のように葉状になる例外はあるが、糸状のフィラメントからなる原糸体を形成する。原糸体は何度も分裂を繰り返して広がり、クモの巣状の原糸体コロニーとなる (Fig. 1-2A)。この原糸体は生長に伴って盛んに分枝を行い、クロロネマ (chloronema)、カウロネマ (caulonema)、仮根 (rhizoid) へと分化を遂げる。クロロネマは不規則な分枝を行い、クロロネマを構成する細胞には多くの葉緑体が含まれているため、光合成による独立栄養で生長が可能である (Fig. 1-2B)。さらにクロロネマは細胞間の隔壁を伸長方向に対して垂直に形成し、細胞長は短く、無色の細胞壁を持つ。もう一方のカウロネマを構成する細胞は、少数の小さく紡錘形の葉緑体が均一に配置され、伸長方向に対して斜めに隔壁を持つ (Fig. 1-2C)。さらにカウロネマの細胞長は長く、茶色がかった細胞壁であるといった特徴を持つ。カウロネマ細胞上にはところどころに分枝分裂後に頂端細胞がふくらんで、これが分裂を繰り返して芽 (Fig. 1-2D) となり、茎葉体が発生する。一つの原糸体上には多くの場合に数個～多数の茎葉体ができる。実験室内で原糸体を培養した場合、クロロネマ細胞は水平方向と同様に垂直方向にも生長するが、カウロネマ細胞は水平方向にのみ生長することが知られている (Reski, 1998; Glime, 2007)。

原糸体はある程度の長さが保たれていれば切断しても生存が可能であり，増殖を繰り返すことができる．したがって一塊の原糸体を多数に切断，培養することで大量の原糸体を得ることが可能であり，増殖速度も大きいため茎葉体よりも実験材料に適していると考えられる．

1-2. コケ植物を用いた研究

蘚類の生活環で述べたように，コケ植物は孢子が発芽するとまず原糸体が形成される．この原糸体上に生じた芽から茎葉体（配偶体）が分化する．原糸体は構造が比較的単純であり，形態的特徴に関する観察が容易である．このような特徴から，ヒョウタンゴケ *Funaria hygrometrica* Hedw. やヤノウエノアカゴケ *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. あるいはヒメツリガネゴケ *Pyscomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. の原糸体は器官分化のモデル系として利用されている (Bose *et al.*, 2004; Rensing *et al.*, 2008; Panigrahi *et al.*, 2009)．さらにヒョウタンゴケ原糸体は鉛や金などを蓄積 (独立行政法人理化学研究所 2011)，孢子体や茎葉体にも鉛や亜鉛が蓄積することが分かっており (Basile *et al.*, 2001)，バイオレメディエーションなど工業的な利用に向けての研究もおこなわれている．近年，耳にすることが多くなった屋上緑化にもコケ植物が利用されることもあり，そこで用いられるエゾスナゴケ *Racomitrium japonicum* Dozy et Molk. と細菌を用いた促成栽培法なども研究されている (Tani *et al.*, 2012)．このように，コケ植物を用いた研究は多岐にわたっている．

1-3. 本研究の目的

コケ植物は植物進化の過程において，陸上植物の中で最も原始的であると想定されている．その結果として他の陸上植物と共通する遺伝制御システムを共有原始形質として保持していると考えられている (Mishler & Oliver, 2009)．コケ植物は構造の単純さと植物体サイズが小さいことから，研究室での維持や実験・観察が容易等の利点を持ち，モデル植

物としての利点を持つことを示している。実際にコケ植物は近年、分子遺伝学のモデル植物として確立されており、ヒメツリガネゴケやヒョウタンゴケで研究が進められている (Bose *et al.*, 2004; Rensing *et al.*, 2008; Panigrahi *et al.*, 2009)。しかし、これまで用いられてきたこれらヒメツリガネゴケやヒョウタンゴケ、あるいはヤノウエノアカゴケには原糸体の形態観察や生長量の計測が困難であるといった共通の欠点があった。

そこで本研究では、蘚類であるケヘチマゴケ *Pohlia flexuosa* Hedw.原糸体がこれら欠点を克服する種であることを明らかにし、原糸体の実験系を確立すること、さらにその手法を用いてケヘチマゴケ原糸体の培養特性を調べることを目的とした。

1-4. 本論文の構成

本論文は、次の二部で構成する。

第一部・・・ モデル生物として利用されているヒメツリガネゴケと屋上緑化用植物として用いられているエゾスナゴケ原糸体と比較し、ケヘチマゴケ原糸体の形態的特徴を明らかにし、その特徴を生かして5細胞に切断した原糸体を用いた生長量計測の実験方法を提案する。さらにその方法を用いてケヘチマゴケ原糸体の培養特性を調べる。結果より得られた情報を基に、ケヘチマゴケ原糸体はこれまでに研究に用いられているコケ原糸体と異なり、形態観察にも適していることなどからコケ植物を用いた実験のモデル植物として利用できることを考察する。

第二部・・・ 建物緑化資材へのコケ原糸体の利用を目指し、ケヘチマゴケ原糸体の大量培養法を確立し、得られた原糸体を用いたコケシート作成法の検討を行った。加えて、原糸体を展開したシートからの茎葉体誘導条件の検討も各種植物ホルモンを用いて行った。大量培養時の細胞状態、シート基盤への原糸体展開条件の決定、さらに原糸体のシート基盤展開後の茎葉体誘導条件について考察する。

Table 1-1 Characteristics of the three major taxa in bryophyte (出典；コケの手帳)

	蘚類	苔類	ツノゴケ類
原糸体	糸状	塊状	塊状
植物体	茎葉体	茎葉体、葉状体	葉状体
仮根	多細胞	単細胞	単細胞
葉	深く切れ込まない	多様 (深く切れ込む種類が多い)	ない
中肋	ある*	ない	ない
油体	ない	ある	ない
蘚帽	ある	ない	ない
蒴柄	丈夫	軟弱	ない
蒴の気孔	ある*	ない	ある
蒴齒	ある	ない	ない
弾糸	ない	ある	ある**

(*例外が多い。 **ツノゴケ類と苔類の弾糸は形態と機能はかなり異なる)

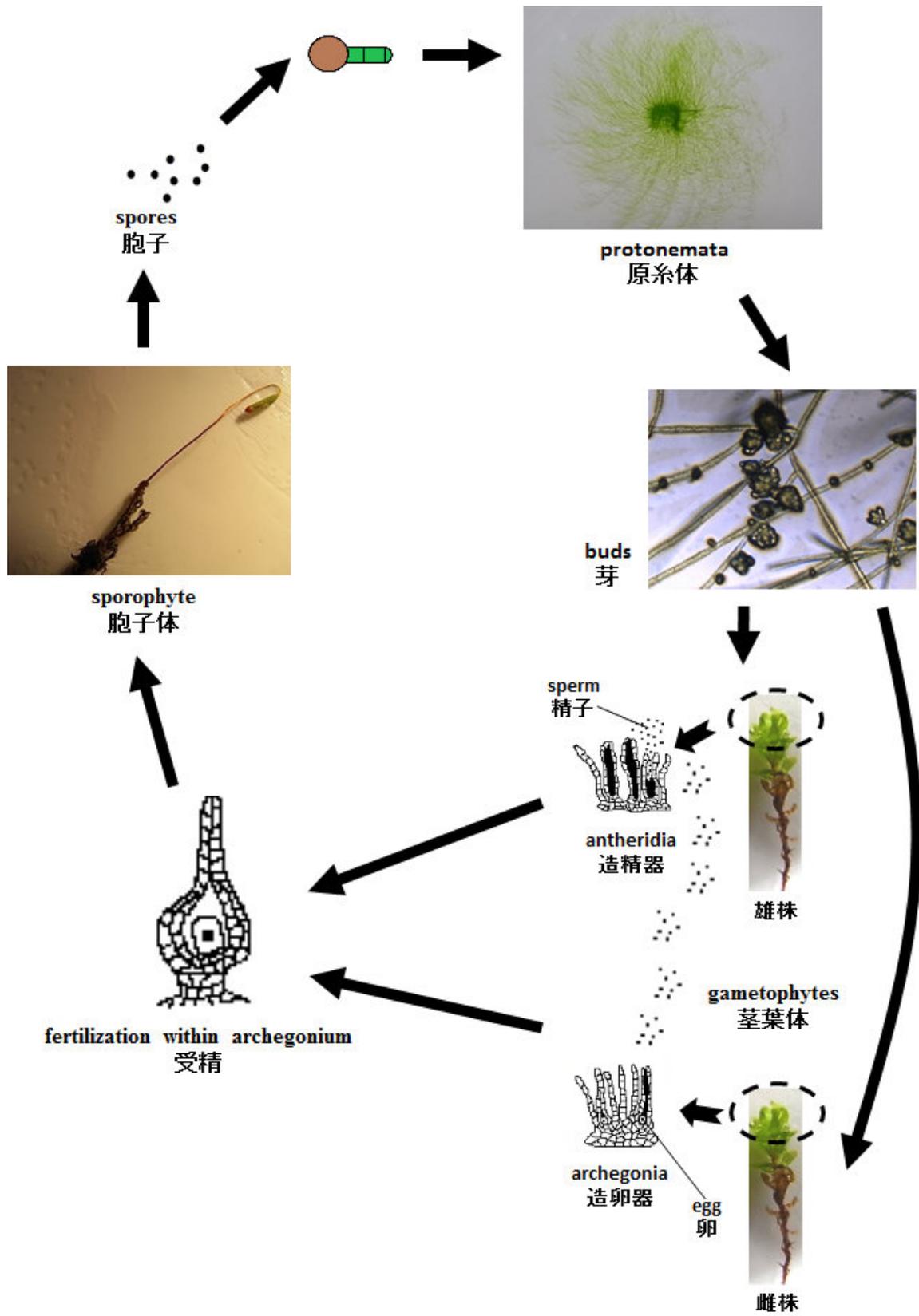


Fig. 1-1 Life cycle of mosses

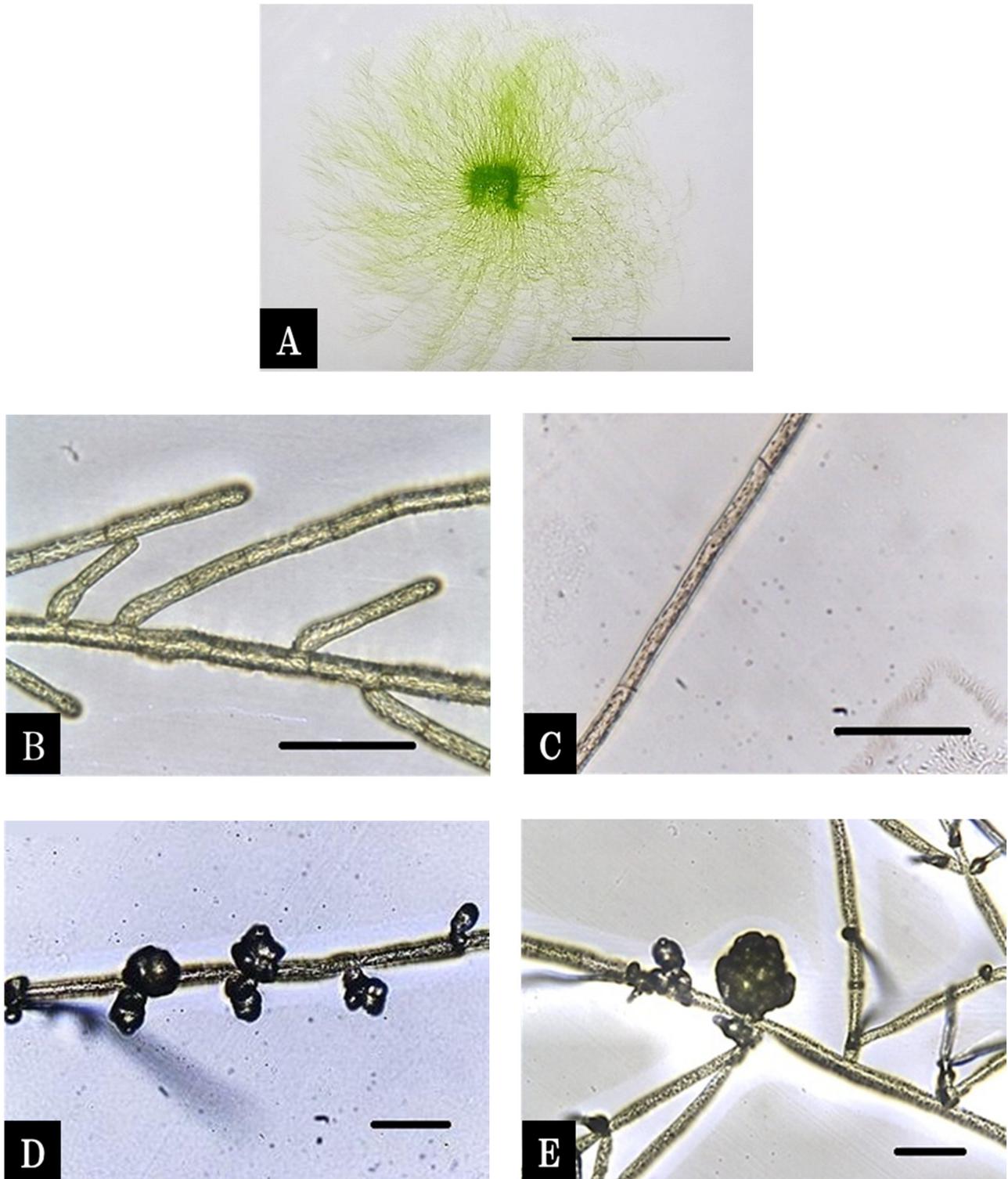


Fig. 1-2 Protonema cells of *Pohlia flexuosa*

A: Protonema colony (Bar=1cm), B: Chloronema cells,

C: Caulonema cells, D&E: Buds (Bar=100 μ m).

第二章 ケヘチマゴケ原糸体の生長特性

2-1. 諸言

2-1-1. コケ原糸体の芽分化

コケ植物は2008年にヒメツリガネゴケにおけるゲノムの概要配列が発表され、分子遺伝学のモデル植物として、植物進化に大きな情報を与えている (Rensing *et al.*, 2008). 他にも蘚類では、ヒョウタンゴケやヤノウエノアカゴケ、エゾスナゴケなどでも研究が行われている。コケ原糸体は、一次元的に頂端分裂によって生長し、分枝分裂によって蜘蛛の巣状の二次元的な生長に変わる。そこから分化した芽は三次元的に生長する。すなわち細胞分裂様式が変化し、植物体の体制が作り替えられるという非常に興味深い現象である (Schumaker & Dietrich, 1998).

多くの蘚類では、原糸体培養時には、クロロネマ細胞は水平方向と同様に垂直方向にも生長するが、カウロネマ細胞は水平方向のみの生長である (Reski, 1998; Glime, 2007). カウロネマ細胞上に分化した芽は生長して茎葉体を形成する。すなわち、頂端細胞による単純な伸長生長から三つの分裂面をもった頂端細胞による生長へと細胞分裂様式が変化し、その結果として細胞の立体的な集合体へと植物体の体制が変貌を遂げるわけであり、非常に興味深い現象である (Schumaker & Dietrich, 1997; Reski, 1998; Schumaker & Dietrich, 1998). この段階では、細胞骨格にも変化が現れる；原糸体を構成する細胞が分裂する際には見られなかった先前期微小管束が、芽を分化させる段階では構成される (Doonan *et al.*, 1987). そしてこの配偶体形成における一次元生長から三次元生長への変化が、原糸体では比較的簡単に観察できるという面でもコケ植物の原糸体は大変興味深い研究対象である。

Gorton & Eakin (1957), Spiess (1973) らの一連の研究によって、サイトカイニンがコケの原糸体上で茎葉体を形成するための芽分化を促進する物質であるということが立証された。また、置換基をもつアデニン系サイトカイニンだけでなく、少なくともいくつかのフェニルウレアサイトカイニンでも芽の分化誘導ができることも分かっており

(Christianson & Hornbuckle, 1999), 芽の誘導位置に規則性があることも報告されている (Nebel & Naylor, 1968; Yoshida & Yamamoto, 1982). さらにサイトカイニン処理を行わない条件下で生じた芽と, サイトカイニン処理によって人為的に誘導された芽では, その生じる原糸体上の位置に違いは認められず, 前者と後者ともに芽分化位置に規則性が見られた (Yoshida & Yamamoto, 1985). しかし, この規則的な誘導が報告されているのはヒョウタンゴケやアゼゴケ *Physcomitrium sphaericum* (Ludw.) Brid.などのごく一部の分類群の蘚類についてのみであり, 報告されている規則性が全ての蘚類に当てはまるかは不明である. さらに, 原糸体上に形成される茎葉体へと生長する芽が分化する位置は種によって異なるが, この形態形成の制御に関与するメカニズム自体は異なる種で共通すると推測されている (Reski, 1998).

Brandes & Kende (1968) は, ヒョウタンゴケ原糸体における芽の分化がカウロネマ細胞に限られるということを示している. しかし, 同じ蘚類のイワマセンボンゴケ *Scopelophila lingulata* (Spruce) Spruce では, カウロネマ細胞だけでなくクロロネマ細胞でも芽分化が確認されている (Noguchi & Furuta, 1956). さらに, ヒメツリガネゴケでは低濃度のサイトカイニンによって芽を誘導した時はクロロネマ細胞にのみ芽が発生するが, 高濃度のサイトカイニンで芽を誘導した場合にはカウロネマ細胞にのみ芽が発生することが確認されている (Decker *et al.*, 2006). ところが, 外因性の高濃度のサイトカイニンによって発生した芽は途中で生長が止まり, 茎葉体への分化は見られないことが報告されている (Iwasa, 1965). ヒョウタンゴケのクロロネマ細胞とカウロネマ細胞の両方を用いて, それぞれに放射性物質によるラベルを施したサイトカイニン (カイネチン) を摂取させた実験によれば, クロロネマ細胞とカウロネマ細胞の両者間でのカイネチン摂取に差異は観察されず, また摂取のメカニズムにも違いが見られなかった (Erichsen *et al.*, 1978). このように芽分化には様々な規則性が存在し, 実際に芽を分化する能力がある原糸体は, サイトカイニンの存在により芽の分化に関わる遺伝子が発現して新しい分化を起こす. しかし, これらのメカニズムの詳細はまだわかっていない.

2-1-2. コケ原糸体と糖

植物の代謝においてスクロース (sucrose) やグルコース (glucose), フルクトース (fructose) といった糖は必須要素として知られている (Hassid & Putman, 1950). その栄養効果によって植物における多くの発達過程や生理的課程, 代謝過程を少なくとも部分的に制御している (Gibson, 2004; Rolland *et al.*, 2006). 植物組織培養の培地を調整する際には, 一般的にスクロースなどの糖が 1–5% (w/v) 程度加えられている. その理由は, 組織培養中の組織や外植片は光合成能力が低く, 光独立栄養的生長が困難なため, 従属栄養的生長のための炭素源として糖を必要とするからである (Donnelly & Vidaver, 1984). 培地に添加する炭素源として有効な糖は, スクロースやグルコースなどであることが報告されている (Murashige, 1974; Gmborg & Shyluk, 1981).

コケ植物の形態形成に及ぼす糖の影響については, これまでわずかしか研究例がない. Sabovljevic *et al.* (2005) は, ギンゴケ *Bryum argenteum* Hedw. とナミガタタチゴケ *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. の 2 種の茎葉体ならびに原糸体を用いて, 異なる糖 (スクロース, グルコース, フルクトース) が生長に及ぼす影響を報告している. 彼らの研究によれば, ギンゴケではいずれの糖でも原糸体, 茎葉体ともに生長が観察されたが, ナミガタタチゴケでは糖を添加した場合は原糸体, 茎葉体のいずれにおいても培地に糖を加えない場合よりも生長が抑制された. つまりコケ植物の種によって糖の存在への反応には差が見られるということである. また, 糖による生長の促進が観察されたギンゴケでは, 培地に添加した糖の種類によって生長差が観察されている.

この章では, 今回実験試料としたケヘチマゴケ原糸体の生長特性を明らかにすることを目的とし, 最初に正確な原糸体の形態観察と生長量の計測ができるよう実験手法を確立した. 次に芽の分化が制御可能かどうかを明らかにするため, サイトカイニン処理を行い, 芽を誘導するための処理時間と処理時間による芽の分化数の違いを調査した. さらにケヘチマゴケ原糸体にも芽の分化する位置に規則性が見られるか原糸体コロニーでの観察を行

った。また、これまでの報告で種によって糖への反応が異なることが明らかになっている。そのため、ケヘチマゴケ原糸体を培養する際に糖を添加し、原糸体生長に対する糖の影響を確かめた。

2・2. 本章で共通する材料と方法

2・2・1. 材料

実験材料となるケヘチマゴケの原糸体は、1994年に長岡技術科学大学構内のグラウンドに生育する野生集団より採取した胞子体から次の手順で得たものである。採取した蒴を蒴帽を残したまま蒴柄を5 mm程度つけた状態で蒴の部分を単離した。これを Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monooleate を加えた70%エタノールで蒴を3分間滅菌、その後さらに70%エタノールで2分間殺菌を行い、滅菌水で洗浄した。蒴滅菌を行った蒴はクリーンベンチ内で風乾後、蒴帽を取って Table 2-1 に示す改変 Knop 培地 (pH 5.8, 0.8% agar) 上に胞子を蒔き、25°C、14時間日長 (光量子束密度 = 95 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の明条件で培養した。胞子発芽し、生長した原糸体を無菌状態で維持して継代培養されてきたものを本研究では使用した。

2・2・2. 基本培地条件

基本培地として pH 5.8、寒天濃度 0.8% の改変 Knop 培地を 121°C、1.4 atm.、20分間オートクレーブ滅菌し、使用した。また、培養には直径 6 cm の滅菌シャーレを使用し、1シャーレあたり約 4 ml の培地を分注し、培地が固まってから用いた。

2・2・3. 基本培養条件

原糸体は 25°C、14時間日長 (光量子束密度 = 95 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の条件下で改変 Knop 培地上に置床し、培養している。ある程度生長した原糸体を滅菌済みピンセットを用いて原糸体の先端部分を少量ずつ切断し、新たに複数枚の培地に置床して継代培養及び維持を行

った。このような継代培養や顕微鏡観察，及び以降に述べるメスによる原糸体の切断などの処理を容易にするため，原糸体が培地中に侵入するのを防ぎ，培地面に沿って生長させる必要がある。そのため，固体改変 **Knop** 培地上に透析膜（三光純薬（株）、size: 27/32）を約 **3 cm** 角に切ったものを敷き，その上で原糸体の培養を行った。なお，この透析膜はグリセリンと硫化物除去のために以降に示す手順で前処理を行ってから使用した。

2-2-4. ケヘチマゴケ原糸体の前培養

実験には可能な限り新しい原糸体細胞を使用できるよう，原糸体の先端部分を用いた。以下の操作は全て無菌条件下で行った。まず，固体改変 **Knop** 培地で維持していたケヘチマゴケ原糸体から適量の原糸体を切断し，新しい固体改変 **Knop** 培地表面に敷いた透析膜上に置床した。これを 25°C ，14 時間日長（光量子束密度 = $95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）で 1 週間培養した。培養後，同じく無菌条件下で顕微鏡を用いて替刃メス（フェザー安全剃刀株式会社：フェザー替刃メス ステンレス No. 11）で先端から約 10 細胞の長さで切断し（以後，「前切り」と略称する），その断片以外の原糸体を透析膜上から滅菌済みピンセットを用いて除去した。この前切り作業は，サンプル断片の細胞齢を可能な限り均一にし，クロロネマ細胞にそろえるために行う。

切断された原糸体断片が乗った透析膜は，その後さらに新しい固体改変 **Knop** 培地上へ移し，10 日間培養したものを実験に使用した。この培養手順を「前培養」と略称する。

2-3. *in vitro* 培養下での原糸体生長観察法の確立

2-3-1. 目的

これまで主に実験に用いられてきた前述のヒメツリガネゴケ，ヒョウタンゴケ，ヤノウエノアカゴケ，エゾスナゴケの原糸体には，共通する欠点としてコロニー形成時に原糸体フィラメントが密集することが挙げられる。これにより，個々の原糸体の状態を観察しづらく，生長量を正確に計測することも困難であった。ここでは，これら欠点を克服する

ことができる新たな原糸体培養系をケヘチマゴケ原糸体を用いて確立することを目的とする。

2-3-2. 実験方法

2-3-2-1. 原糸体生長の測定

2-2-4.で示した手順でケヘチマゴケ原糸体を前培養した後、原糸体の生長を観察するために以下の処理を行った。前培養後の原糸体から、頂端細胞を含む5細胞が無傷で残るように無菌条件下でメスを用いてクロロネマ細胞を切断し、5細胞以外の原糸体はピンセットを用いて除去した (Fig. 2-1)。5細胞の原糸体断片が乗った透析膜を滅菌済みピンセットを用いて新たな固体改変 **Knop** 培地に移し培養し、8日間にわたり24時間ごとにメインフィラメント (Fig. 2-2a) の細胞数、そして一次側枝 (Fig. 2-2b)、二次側枝 (Fig. 2-2c)、三次側枝 (Fig. 2-2d) について新たに生じたそれぞれの数を測定した。この測定はそれぞれ70サンプルについて行った。

2-3-2-2. 原糸体コロニーの比較

ヒメツリガネゴケなど、主に研究に利用されている種の欠点であるコロニー形成時の原糸体フィラメントの状態を観察するため、前培養を行ったケヘチマゴケ原糸体を切断せずに新たな固体改変 **Knop** 培地へ透析膜ごと移動し、約1ヶ月培養した。コロニー比較のため、ヒメツリガネゴケとエゾスナゴケについても同様の操作でサンプルを作成した。

2-3-3. 結果

2-3-3-1. ケヘチマゴケ原糸体の生長

測定結果を Fig. 2-3 に示す。メインフィラメント細胞数は、5細胞切断を行ってから培養5日目まではほぼ一定に増加した。6日目以降も細胞数の増加は見られたが、その程度は減少した (Fig. 2-3a)。一次側枝数もほぼ一定の増加を示した (Fig. 2-3b)。二次側枝数

は、培養 3 日目までは発生が見られなかったが、4 日目には発生し、それ以降は一定の増加を示した (Fig. 2-3c). 三次側枝数は、培養 5 日目から発生が始まり、6 日目以降は急速に増加した (Fig. 2-3d). メインフィラメント細胞数と一次側枝数は同様の増加を示したが、ともに三次側枝の発生が始まった 5 日目付近からは増加の程度が減少した. 原糸体フィラメントの頂端細胞からそれぞれの側枝を生じた細胞までの細胞数は平均して約 5-6 細胞であった.

2-3-3-2. 原糸体コロニーの形状

培養したケヘチマゴケおよびヒメツリガネゴケ、エゾスナゴケの原糸体コロニーの形状を Fig. 2-4 に示す. ヒメツリガネゴケとエゾスナゴケの原糸体は、培地上を放射状に広がるだけではなく、培地に対して垂直方向にも生長した. そのため、この 2 種は半球状の塊を形成する傾向がある. これに対してケヘチマゴケ原糸体は、放射状に一平面上での生長が著しく、分枝が少なく、フィラメントが密集しない傾向が見られた. また、原糸体コロニーの周縁部のフィラメントは、ヒメツリガネゴケ、エゾスナゴケともに短い側枝を多数発生させたが、ケヘチマゴケでは側枝が少なかった.

2-3-4. 考察

最初に置床した原糸体断片から伸長した細胞にはクロロネマ細胞とカウロネマ細胞の両方が存在しており、そこから実験に使用するクロロネマ細胞のみを確実に切り出すのは困難である. 短いフィラメントに切断した時、最初に伸長する細胞はクロロネマであり、カウロネマ細胞はそのさらに後に発生する.

そのため、本実験では実験に用いる原糸体フィラメントの初期条件を合わせるため、新たな固体改変 Knop 培地に継代し、1 週間培養した原糸体の主にクロロネマ細胞から成る原糸体フィラメントを前切りとして頂端細胞から約 10 細胞に切断、それ以外の部分を除去した. この前切り操作により、実験使用時の細胞が全てクロロネマ細胞になる. さらにこ

れら断片の頂端細胞は最も若い細胞であり、本質的にコケ原糸体はこの頂端細胞の頂端分裂によって生長する。これらの準備操作をすることで、実験時のコケ原糸体の初期条件をコントロールすることができた。

コケ原糸体のクロロネマ細胞は多くの葉緑体を持ち、独立栄養で生長が可能である (Reski 1998)。本研究により、ケヘチマゴケ原糸体ではクロロネマ細胞を 5 細胞に切断しても独立して生長することが可能であることが実証された。さらに、原糸体形成の特徴として、ヒメツリガネゴケやエゾスナゴケと比較してケヘチマゴケは原糸体が主に放射状に生長し、また密集の程度が弱いことから、原糸体フィラメントを構成する一つ一つの細胞を容易に認識することが可能であった。原糸体生長においてもメインフィラメントの増殖を見ると 8 日間で 5 細胞から約 35 細胞に増加しており、1 日に約 3-4 細胞増えていることが分かった。このように原糸体生長が早いため、安定した試料の確保も比較的短期間で行えることが明らかになった。また、顕微鏡観察を行う際にも細胞間の隔壁が明瞭に観察できるため、本研究で開発した細胞の増加数を計測することで生長量を測定することも可能であることが分かった。

2-4. 原糸体上への芽の分化誘導

2-4-1. 目的

植物ホルモンの一種であるサイトカイニンがコケの原糸体上に茎葉体を形成するための芽分化を促進する物質であることが立証されている。さらに、コケ植物原糸体の培養系では、サイトカイニンを加えなくとも培養開始から 1 ヶ月以内には芽が分化することが報告されている (Brandes & Kende, 1968; Nebel & Naylor, 1968; Yoshida & Yamamoto, 1982)。ケヘチマゴケ原糸体においても同様の芽の分化が観察されるのか、また芽の分化誘導に必要なサイトカイニン処理時間を明らかにすることを目的とし、サイトカイニンによる芽の分化誘導を行った。

2-4-2. 実験方法

芽分化の誘導は植物ホルモンの一種であるサイトカイニンを用いた。本研究では、サイトカイニンとして 6-benzylaminopurine (BAP) を使用した。ケヘチマゴケ原糸体上の芽分化については、BAP の濃度 1 ppm まで阻害効果が見られないことが報告されており、実験に用いる濃度を 1 ppm に設定した。

基本培地である固体改変 Knop 培地に 1 ppm の濃度の BAP を添加して作成した固体培地に、前培養した原糸体コロニーを透析膜に乗せた状態のまま移動させることで芽の誘導処理とし、培養した。培養時間は 12, 24, 36, 48, 60, 72 時間の 6 段階とし、それぞれについて 40 サンプルを培養した。その後、透析膜上に残留している BAP を除去するために各々の BAP 処理時間の後、原糸体を透析膜に乗せたまま BAP-free の固体改変 Knop 培地に移した (洗浄処理)。洗浄処理に際しては、30 分静置した後、再度新たな 1 BAP-free 培地へ移し、これを 3 回繰り返した。これをサイトカイニン処理 12 時間後から、各々 12 時間おきに行い、全サンプル BAP 処理開始から 72 時間後に一斉に顕微鏡下で観察し、芽分化数を計測した。すなわち、この実験で最も長い BAP 処理時間は 72 時間となる。72 時間処理のサンプルについては、BAP-free 培地に移動せずに芽分化数を計測している。一連の操作を Fig. 2-5 に示す。なお、本実験では芽の分化数が 250 個を超えた場合、それ以上の計測が困難であったため、計測を 250 個で打ち切っている。これらの実験との比較として、BAP-free 培地に前培養した原糸体を移動させて培養したものも観察を行った。

2-4-3. 結果

外生サイトカイニンによって誘導された芽は、1 シャーレ上に生じた原糸体コロニーの周縁部から一定の距離の範囲内に位置していた (Fig. 2-6)。

原糸体コロニーをそれぞれの BAP 処理時間で培養した時、Fig. 2-7 に示すように 24 時間以上の処理で直径 20 μm 以上の芽が生じた。12 時間処理では 40 サンプル全てで芽の分化は観察できなかった。24 時間処理では、40 サンプル中 24 サンプルについて芽の分化が

確認でき、芽の分化が見られたサンプルでは1シャーレにつき平均2個の芽が観察できた。36時間処理では、40サンプル中34サンプルで芽の分化が確認でき、芽の分化が見られたサンプルでは1シャーレにつき平均33個の芽が分化していた。48時間とそれ以上の処理時間では、40サンプル全てで芽の分化が観察できた。さらに1シャーレにつき、48時間処理では平均239個、60時間処理では平均244個、72時間の処理では平均250個以上の芽が分化しており、BAPの48時間以上の処理では増加の程度が緩やかになった。

このようにケヘチマゴケ原糸体上に分化した芽は、BAPを添加していない固体改変Knop培地上でさらに12ヶ月以上培養・維持を行っても、芽の肥大化あるいは小さな葉が1-2枚生じる段階にまで達するのみで、茎葉体へ生長することはなかった (Fig. 2-8)。

2-4-4. 考察

コケ植物における多くの種では、胞子の発芽直後の早い生長段階において原糸体フィラメントはクロロネマ細胞として生長する。その後カウロネマ細胞が分化し、将来茎葉体へと分化するための芽は主にこのカウロネマ細胞上に生じる (Crum, 2001)。しかし、ヒメツリガネゴケを用いた実験では、高濃度のサイトカイニンを追加すると芽はカウロネマ細胞上に形成されるが、低濃度のサイトカイニンを追加した場合はクロロネマ細胞にのみ芽が誘導されることが分かっている (Decker *et al.*, 2006)。一方、BAP濃度0.02-1 ppmでケヘチマゴケ上の芽の分化を報告しているが、いずれの濃度においても外生サイトカイニンによって誘導された芽はカウロネマ細胞にではなく、全てクロロネマ細胞上に形成された。このことから、外生サイトカイニンの追加によってクロロネマ細胞上に芽の形成が見られるのは濃度依存ではないことが示唆される。

外生サイトカイニンによって生じた芽は生長途中で止まり、その後の茎葉体へと生長しない傾向が見られることが報告されている (Reski, 1998)。本研究に使用したケヘチマゴケ原糸体でも、サイトカイニンを追加すると芽の分化は誘導されたが、その後茎葉体への生長は観察されなかった。このことから、茎葉体形成にはサイトカイニン以外の要因も必

要であることが示唆される。

形態形成の制御に関与するメカニズム自体は異なる種間で共通すると推測されている (Reski, 1998) が、芽が分化する位置は種によって異なる。無処理のケヘチマゴケ原糸体は長期間の培養下でも芽を分化しなかったが、Fig. 2-6 に示すように、十分に生長したケヘチマゴケ原糸体コロニーを BAP 処理すると、最初に原糸体を置床した位置を中心として、一定の範囲内の同心円状に芽の形成が確認された。Yoshida & Yamamoto (1982) によるアゼゴケ *Physcomitrium sphaericum* (Ludw.) Brid. 原糸体フィラメントを使った実験では、芽が形成された細胞は原糸体フィラメントの頂端細胞から数えて 8.87 ± 3.08 個目の細胞であり、芽が分化するのは頂端細胞から一定の範囲内であることが示されている。本実験では、頂端細胞から芽が形成した細胞までの細胞数を計測していないが、ケヘチマゴケでも“芽が形成される範囲”が存在することが分かった。このことから、アゼゴケと同様にフィラメント上の全ての細胞が芽への分化能を有するのではなく、芽の分化能をもつ細胞が生じることが示唆される。

以上のことから、培養したケヘチマゴケ原糸体はサイトカイニン処理を施さない場合は茎葉体の芽を分化させないが、BAP 処理を 24–72 時間行うことで芽の分化を誘導できること、さらに芽の生じる位置には規則性をもつことが明らかとなり、芽分化の実験材料として有益な性質を備えていることがわかった。

2-5. 原糸体生長に対する糖の影響

2-5-1. 目的

これまでに報告されているわずかな研究例から、種が異なると糖が生長に及ぼす影響が異なるということが分かっている。さらに、糖による生長の促進が見られた種においても、培養培地に添加する糖の種類によって生長差が観察されている。本研究では、初期条件をそろえたケヘチマゴケ原糸体を用いて、培地に添加した糖の種類による原糸体の生長量への影響を調べることを目的とした。

2-5-2. 実験方法

材料となるケヘチマゴケ原糸体（クロロネマ細胞）は 2-2-4.で示した手順において、ここでは原糸体を前切り処理した後、原糸体断片が乗った透析膜を新たな固体改変 Knop 培地に移して 3 日間培養を行った。その後、頂端細胞から数えて 5 細胞だけを無傷で切り離して以降の実験で用いた。

本研究で用いた糖は 3 種類である。2 種類は植物組織培養の際に炭素源として添加されるグルコースとスクロースであり、もう 1 種類は植物細胞では代謝されないことが知られているマンニトールである。これらをそれぞれ 1% (w/v)の濃度で添加した培地を用意し、これに 5 細胞からなる原糸体断片が乗った透析膜を置いてサンプルとした。糖を添加した培地上で生長した原糸体と生長量の比較をするために、同様に原糸体断片が乗った透析膜を糖無添加の固体基本 Knop 培地（以後、sugar-free）に置き、比較のためのコントロールとした。このように調製したサンプルは、それぞれ 14 時間日長の明条件（光源一方向インキュベーター；日本医科機器製作所，TG-180-5L：光量子束密度= $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）と暗条件（培養シャーレをアルミホイルで覆って遮光）で 25°C培養した。24 時間ごとに 8 日間、原糸体の生長を計測した。計測は、メインフィラメント細胞数、一次側枝数、二次側枝数、三次側枝数について行った。各培地条件について、それぞれ明条件 60 サンプル、暗条件 60 サンプルずつ（各々 10 サンプルずつ 6 反復）計測し、平均値と標準誤差を求めた。さらに、明条件と暗条件下における原糸体細胞について顕微鏡を用いて観察を行った。

2-5-3. 結果

各条件において、原糸体フィラメント細胞増加数、一次側枝数、二次側枝数、三次側枝数を 24 時間ごとに計測した結果を Fig. 2-9 – Fig. 2-12 に示す。各 Fig.共に a が明条件で得られた結果、b が暗条件で得られた結果である。Fig. 2-9 のメインフィラメント細胞増加数は、最初に準備した 5 細胞も含まれる。

明条件での培養では、メインフィラメント細胞増加数(Fig. 2-9a)、一次側枝数(Fig. 2-10a)

ではスクロース，糖無添加，マンニトールのいずれについてもほぼ同じ数値となった．二次側枝数 (Fig. 2-11a) と三次側枝数 (Fig. 2-12a) では，植物細胞では炭素源として利用できないにもかかわらず，マンニトールを添加した培地が最も大きな数値を示した．グルコース添加培地では，全ての観察期間を通じて原糸体生長量はいずれの計測値においても糖無添加よりも低くなった．

暗条件での培養では，グルコース及びスクロース添加培地でのみ生長が観察された．生長はグルコース添加培地よりもスクロース添加培地の方がやや良い結果であった．しかし，明条件と比較した場合，メインフィラメント細胞数を除いてその数値はいずれも低く，特に二次側枝数 (Fig. 2-11b)，三次側枝数 (Fig. 2-12b) で著しい減少が見られた．一番大きな生長が見られたスクロースにおいても，明条件と比較するとメインフィラメント細胞増加数は約 80%，一次側枝増加数は約 10%に留まり，二次側枝の増加に関してはほとんど見られなかった．一方，マンニトール添加培地と糖無添加培地では，メインフィラメント細胞増加数において，全ての観察期間を通して 1 細胞増えたサンプルが見られたが (Fig. 2-9b)，他の観察項目については全ての観察期間を通して原糸体の生長は全く確認できなかった (2-10b, 2-11b, 2-12b)．

本実験では，明条件と暗条件で培養し，生長によって生じた原糸体細胞の形状にも著しい違いが観察された．暗条件下で生長した原糸体細胞はそのほとんどが葉緑体をほとんど含まない細長い細胞であったが，隔壁は伸長方向に対して垂直であった (Fig. 2-13)．

2-5-4. 考察

コケ原糸体のクロロネマ細胞には多数の葉緑体が存在し，カウロネマの多い断片ではまずクロロネマが生長する．そのため原糸体自体が光合成を行うことで，実験環境下で原糸体を栽培する際も培地に炭素源が含まれていなくても生長が可能となる (Reski, 1998)．また，本研究では2-3.で確立した5細胞にそろえた原糸体断片を材料として用いたことで，より定量的に原糸体の生長量を計測することが可能となった．

明条件下では、メインフィラメント細胞増加数において、スクロース、マンニトール、**sugar-free** で明瞭な差はなかった。しかし一次、二次、三次側枝増加数ではそれぞれの糖を添加した培地で得られた値に差が見られた。このことから、3種の培地では分枝頻度にはばらつきがあると考えられる。さらにこの分枝頻度にはマンニトール添加>スクロース添加>**sugar-free** という傾向が見られるが、これがケヘチマゴケ原系体の生理的特性なのかさらに検討する必要がある。

暗条件下では、代謝可能なスクロース添加培地とグルコース添加培地でのみ、わずかではあるが生長が観察された。対照的にマンニトール添加培地と **sugar-free** 培地では全く生長が見られなかった。このことは、ケヘチマゴケ原系体においてグルコースとスクロースは糖として確かに生長に利用されていることを示しており、さらに他の植物と同様にマンニトールは炭素源として利用されないことが確認された。また、メインフィラメント細胞増加数に比べると側枝の発生は、明条件下での分枝よりも著しく減少する。これは、原系体の伸長生長にはスクロースとグルコースが炭素源として有効であるが、分枝を補うには不十分であることを示す。

Table 2-1 Composition of modified Knop medium

	Composition	Concentration (mg/l)
Knop I major salt	KCl	120
	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	1000
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	250
	KH ₂ PO ₄	250
Nitch's trace element	MnSO ₄ · 4H ₂ O	3
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.018
Other	Fe citrate	10
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025

Pre-treatment of dialysis membrane (removal of sulfide and glycerin)

- ① Dialysis membrane is cut into 3 cm length.
- ② Washed 3–4 hours with running tap water.
- ③ After the cylindrical dialysis membrane washing, divide into two sheets of 3 cm².
- ④ Washing for one minute in the aqueous sodium sulfate solution of 0.3%(w/v), 80°C.
- ⑤ Washing for two minutes in the distilled water of 60°C.
- ⑥ Washing for one minute in the aqueous sodium sulfate solution of 0.2%(w/v), 80°C.
- ⑦ Washing for two minutes in the distilled water of 60°C.
- ⑧ Dips in distilled water and carries out autoclave sterilization for 20 minutes by 121°C 1.4 atm..

(If stored for a long time after sterilization, it must sterilization again prior to use.)

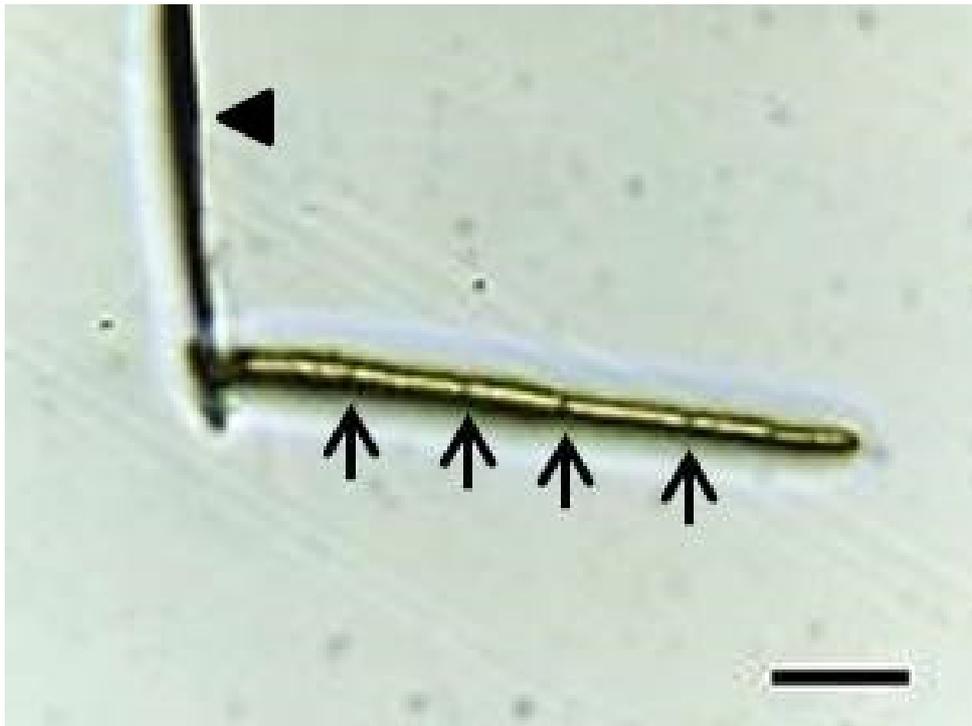


Fig. 2-1. Method to obtain five cells cutting protonema (chloronema) of *Pohlia flexuosa*.

Arrows; septum, arrow heads; cutting line. Bar=100 μ m.

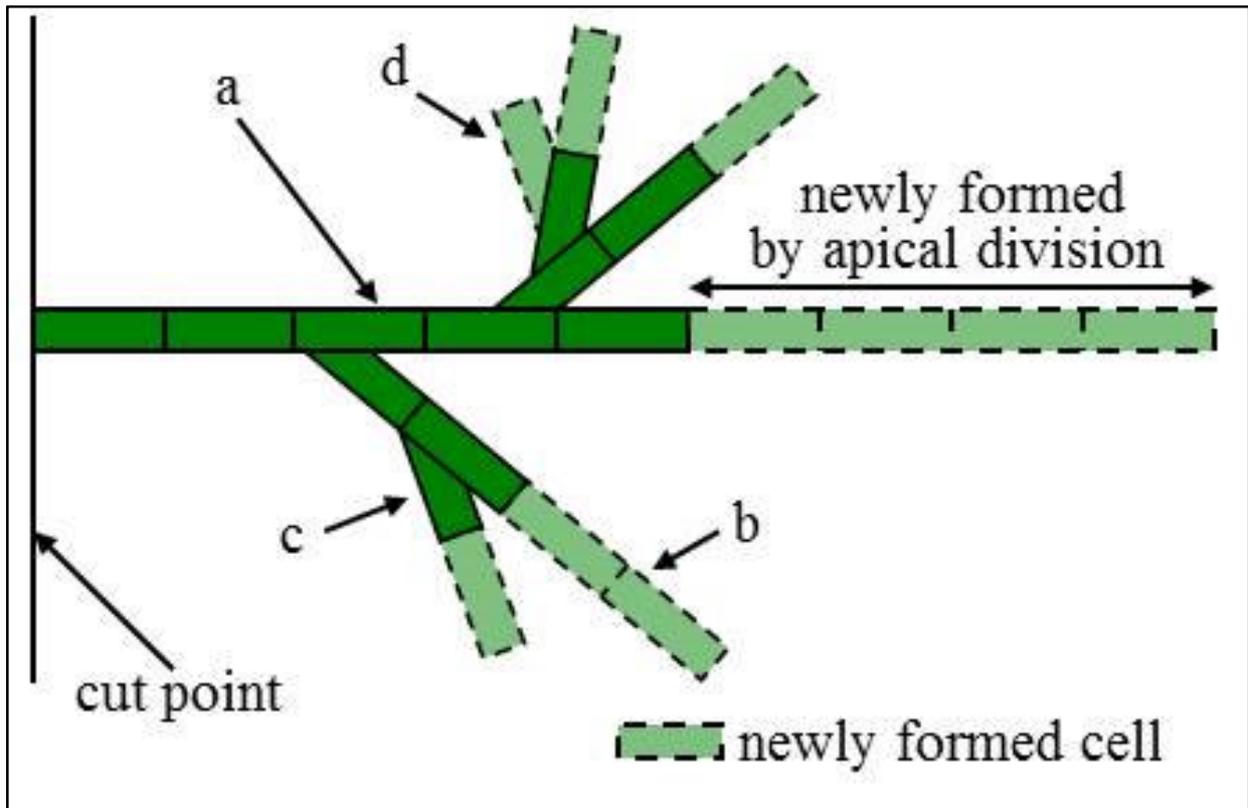


Fig. 2-2. Schematic diagram of growing five cells protonema of *Pohlia flexuosa*.

a: main filament, b; primary side branch, c; secondary side branch,
 d; tertiary side branch.

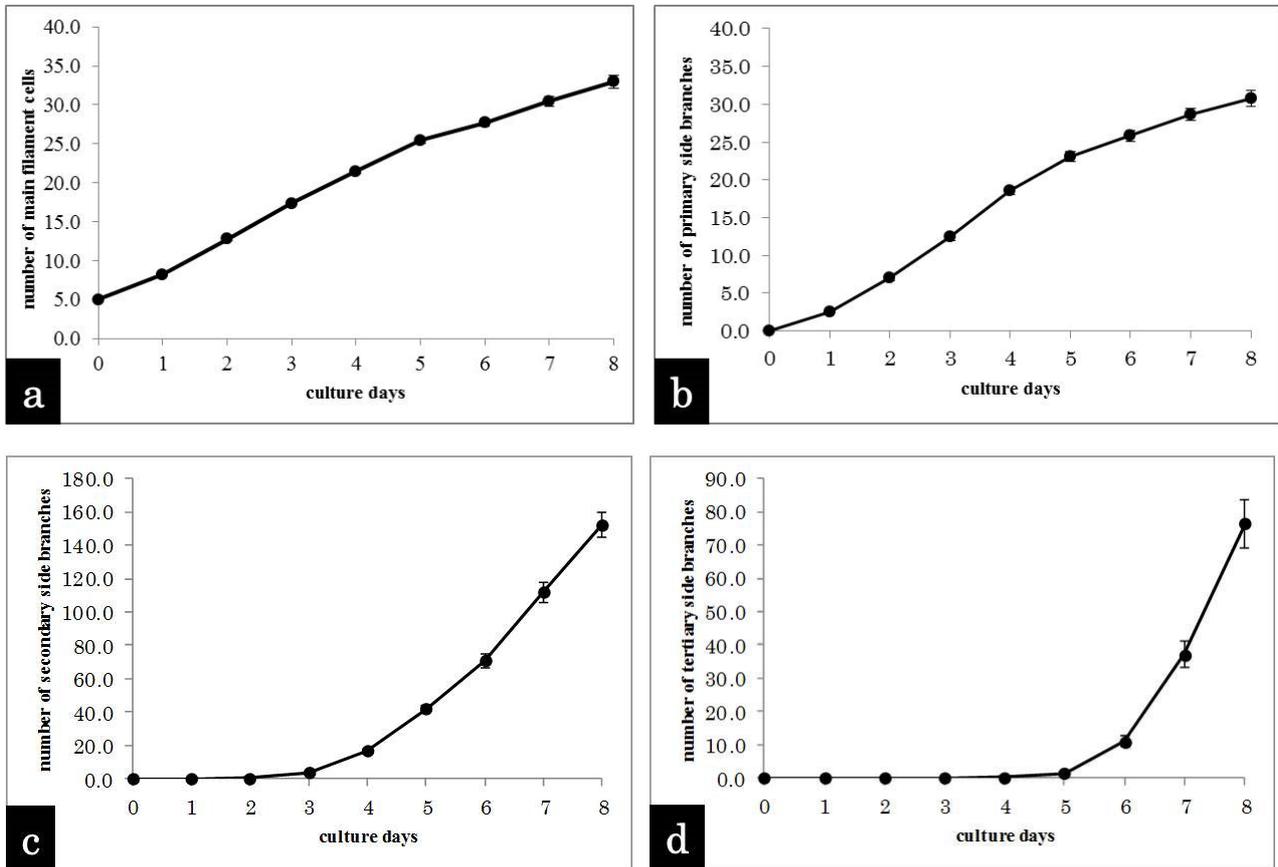


Fig. 2-3. Growth curves of five cutting protonema cells on *Pohlia flexuosa*.

a; number of main filament cells, b; number of primary side branches,
 c; number of secondary side branches, d; number of tertiary side branches.

Abscissa: mean number of each item. Ordinate: culture days.

N=70; error bars represent \pm SEM.

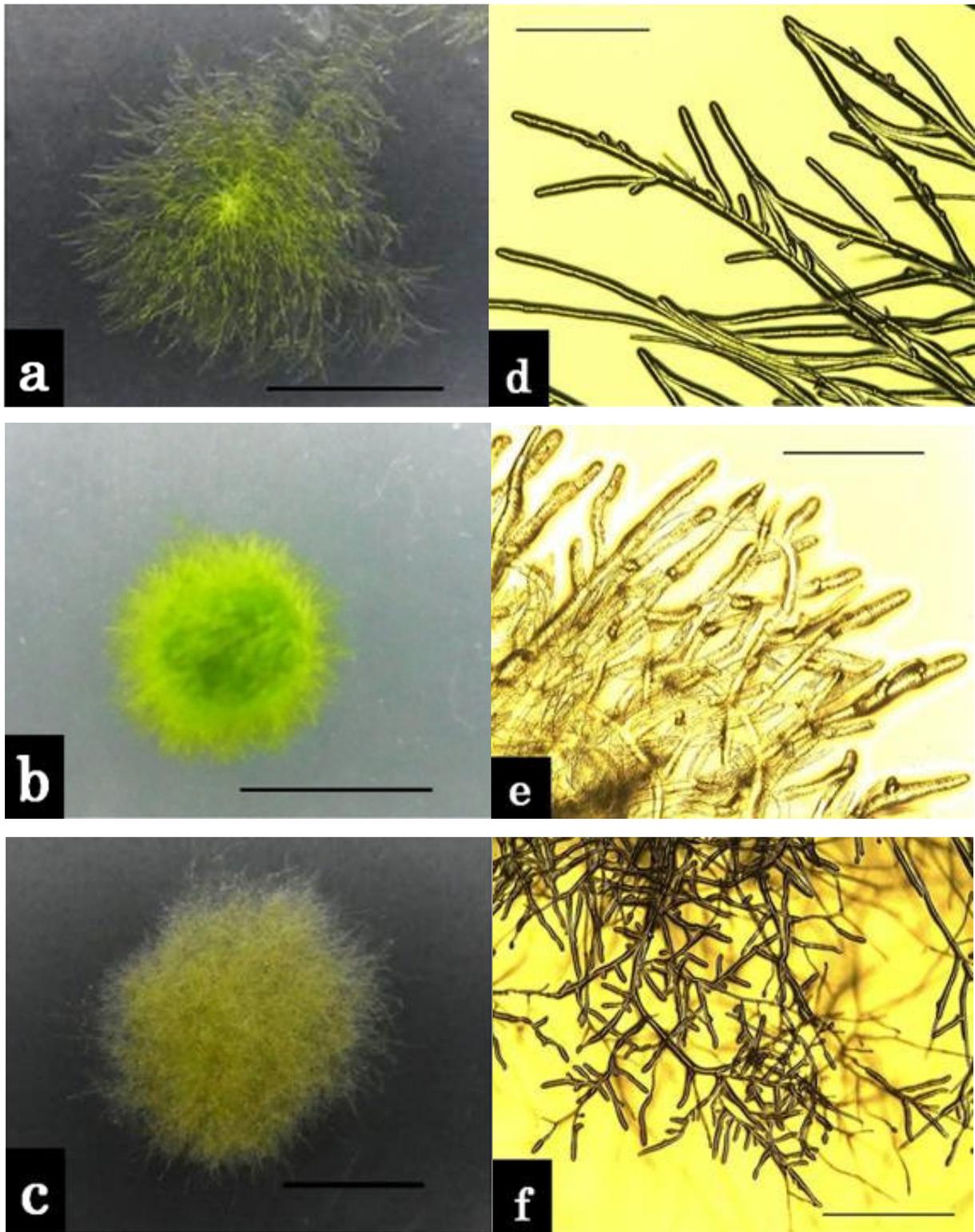


Fig. 2-4. Comparison of three species moss protonema.

a, d; *Pohlia flexuosa*, b, e; *Physcomitrella patens*, c, f; *Racomitrium japonicum*,
a– c; overview of protonemal colony, bar=5 mm, d–f; periphery of protonema
colony, bar=500 μ m.

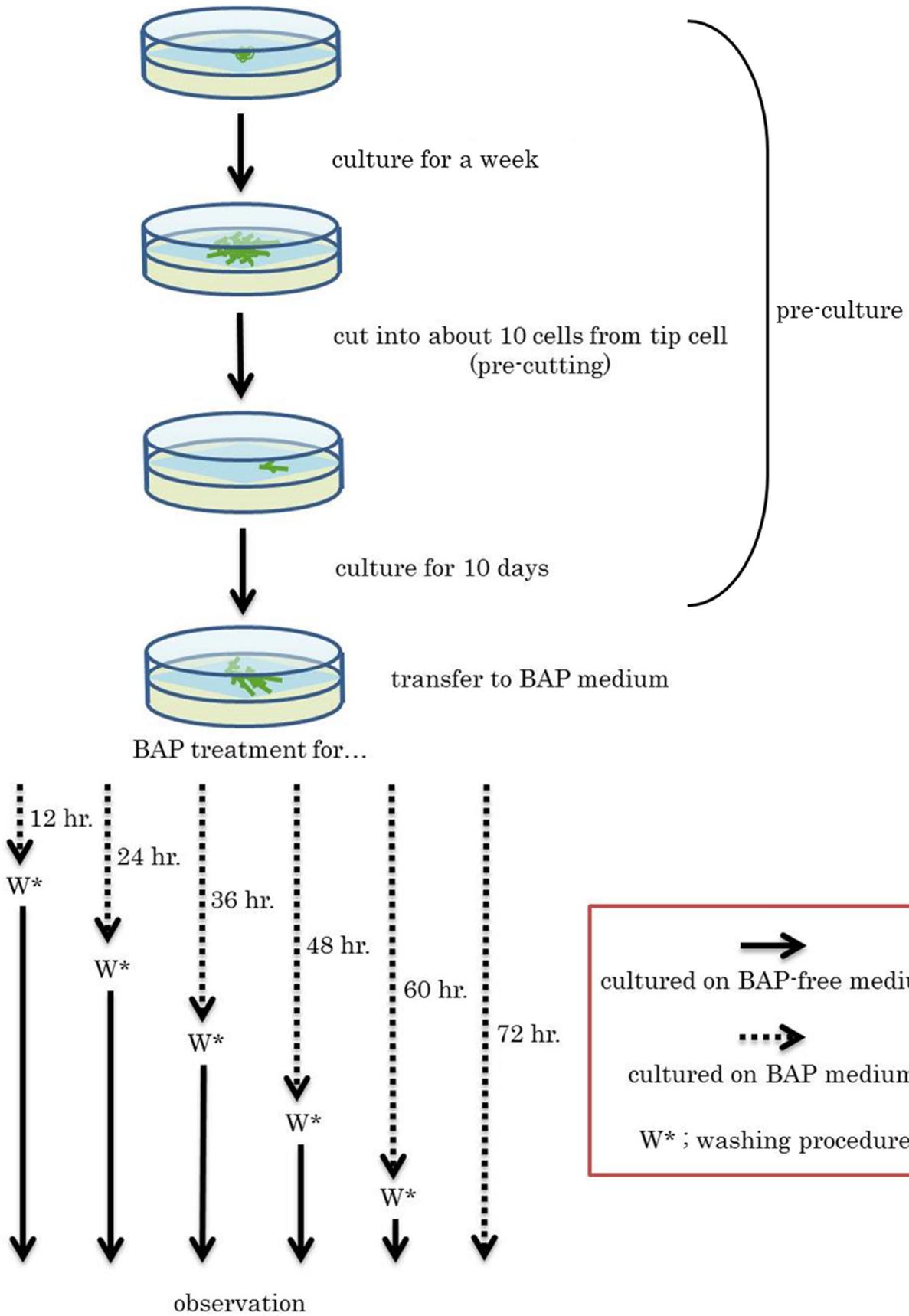


Fig. 2-5. Outline of experiment 2-4-2

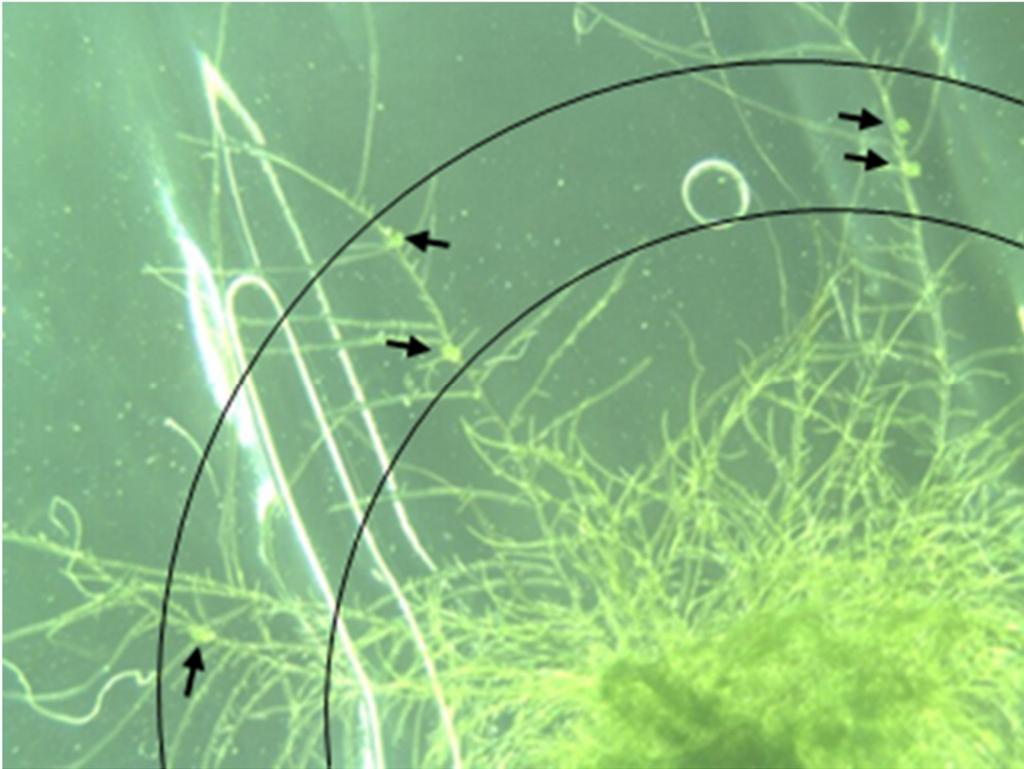


Fig. 2-6. Bud formation of the protonema colony induced by BAP treatment.

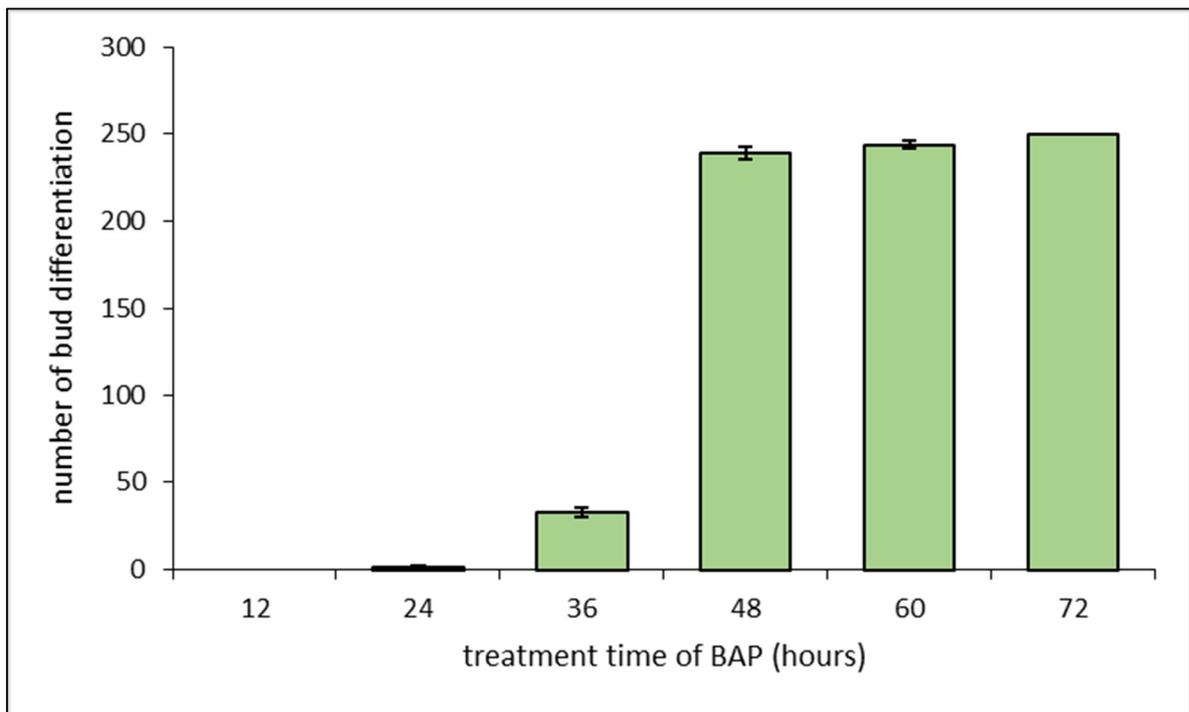


Fig. 2-7. Number of bud differentiation of protonema colonies about each BAP treatment time. N = 40; bars represent \pm SE.



Fig. 2-8. Gametophore buds of *Pohlia flexuosa* after induced by external BAP.

These buds continued to hypertrophy without leaves (a).

Or bud growing was stopped after 1 - 2 of leaves grew (b).

Scale bar = 50 μ m.

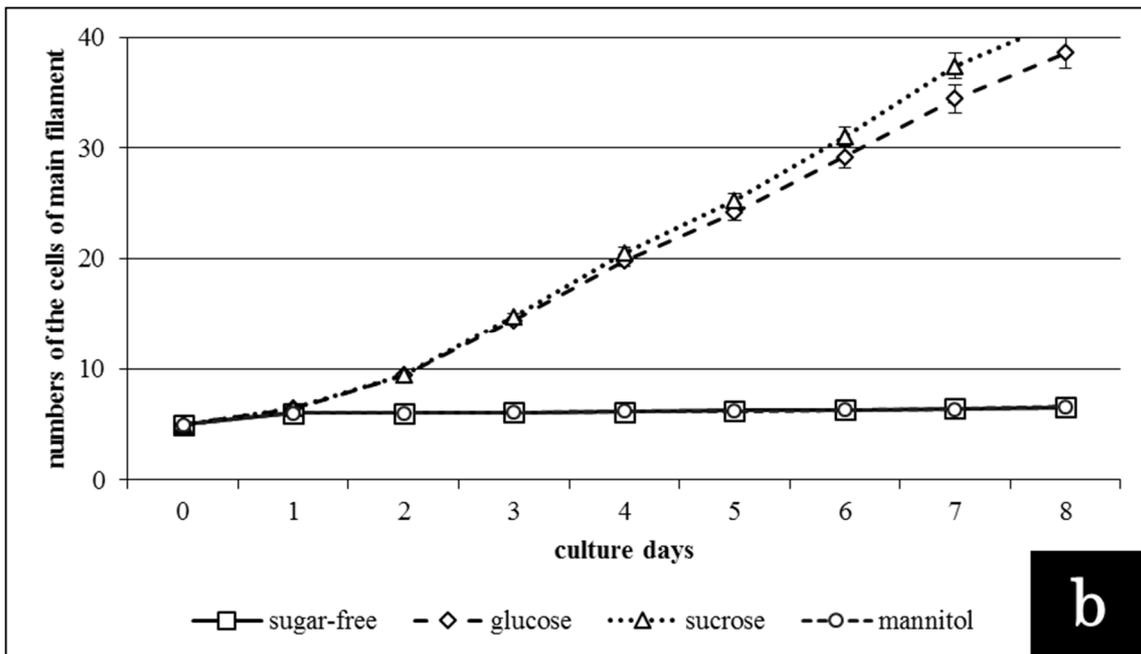
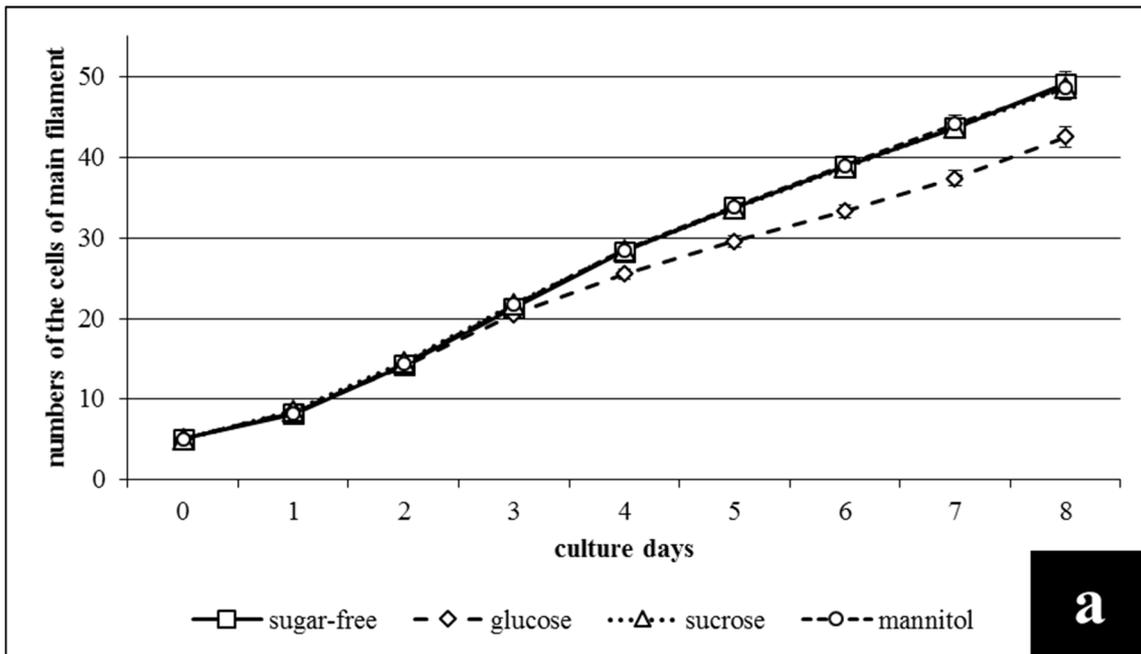


Fig. 2-9. Increased numbers of main filament cells.

a; light conditions, b; dark conditions.

N = 60; error bars represent \pm SE.

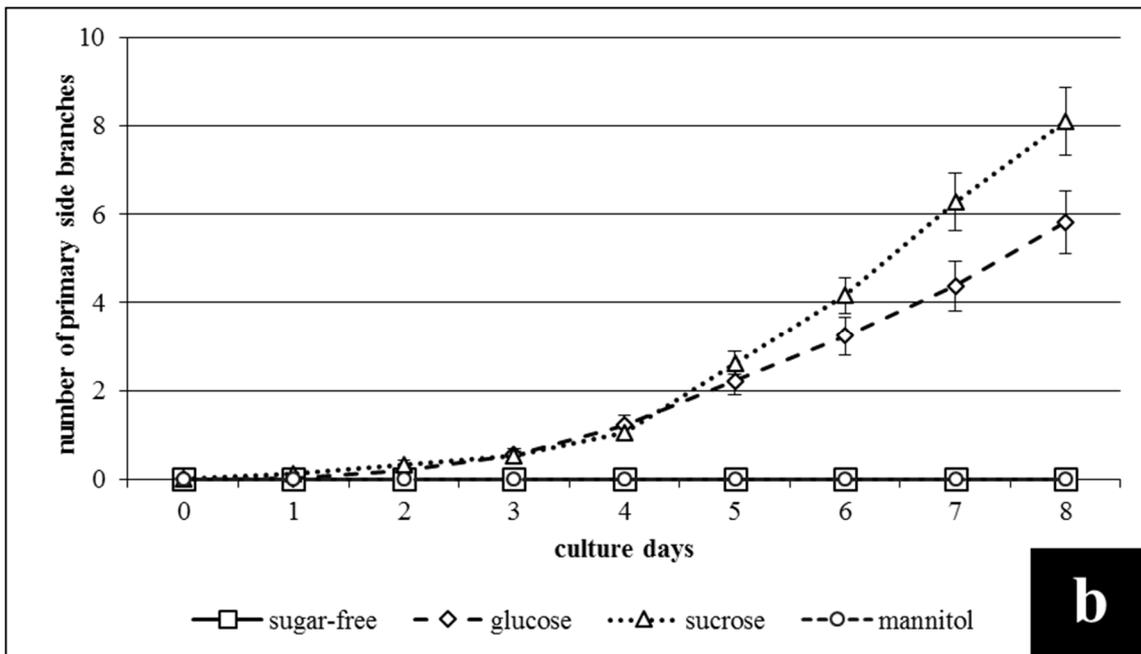
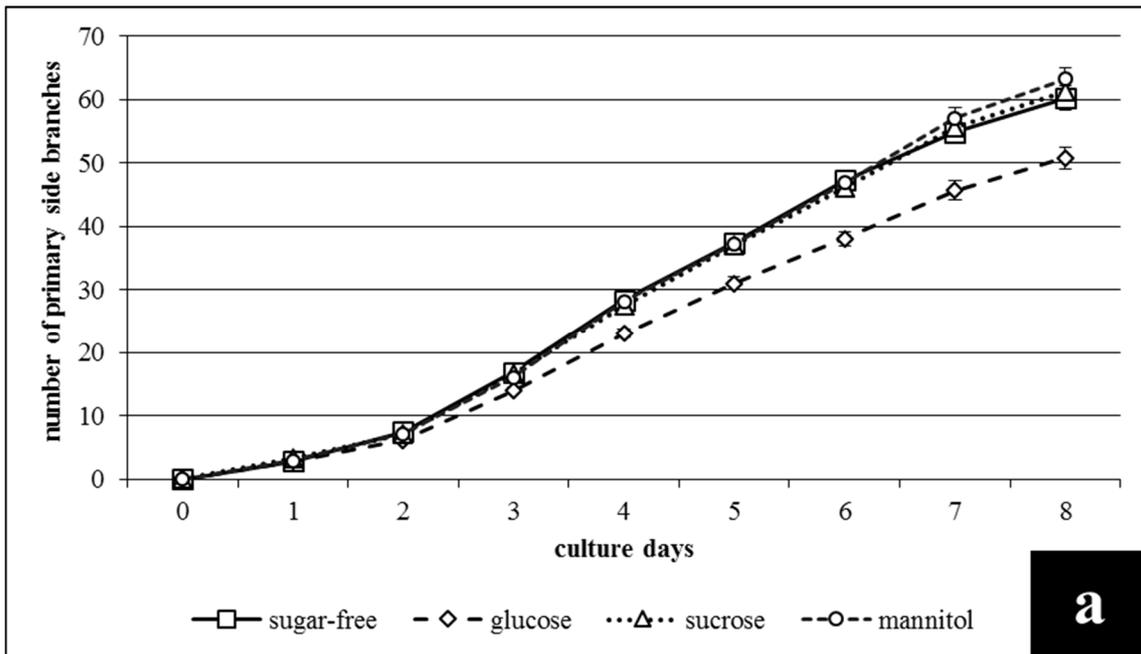


Fig. 2-10. Number of primary side branches.

a; light conditions, b; dark conditions.

N = 60; error bars represent \pm SE.

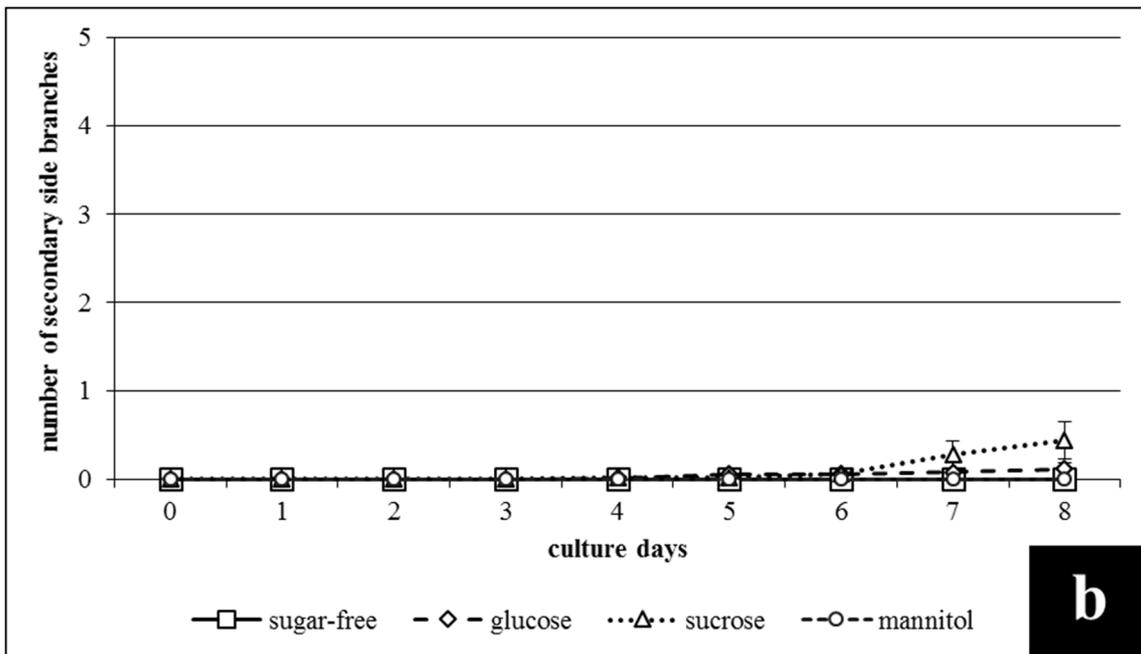
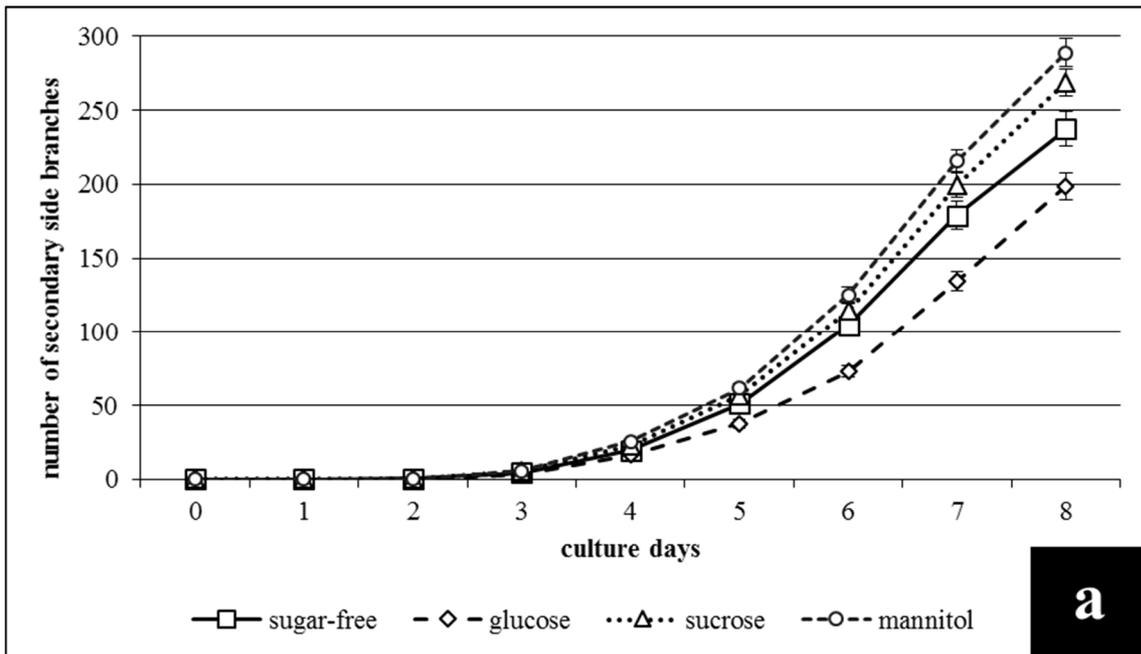


Fig. 2-11. Number of secondary side branches.

a; light conditions, b; dark conditions.

N = 60; error bars represent \pm SE.

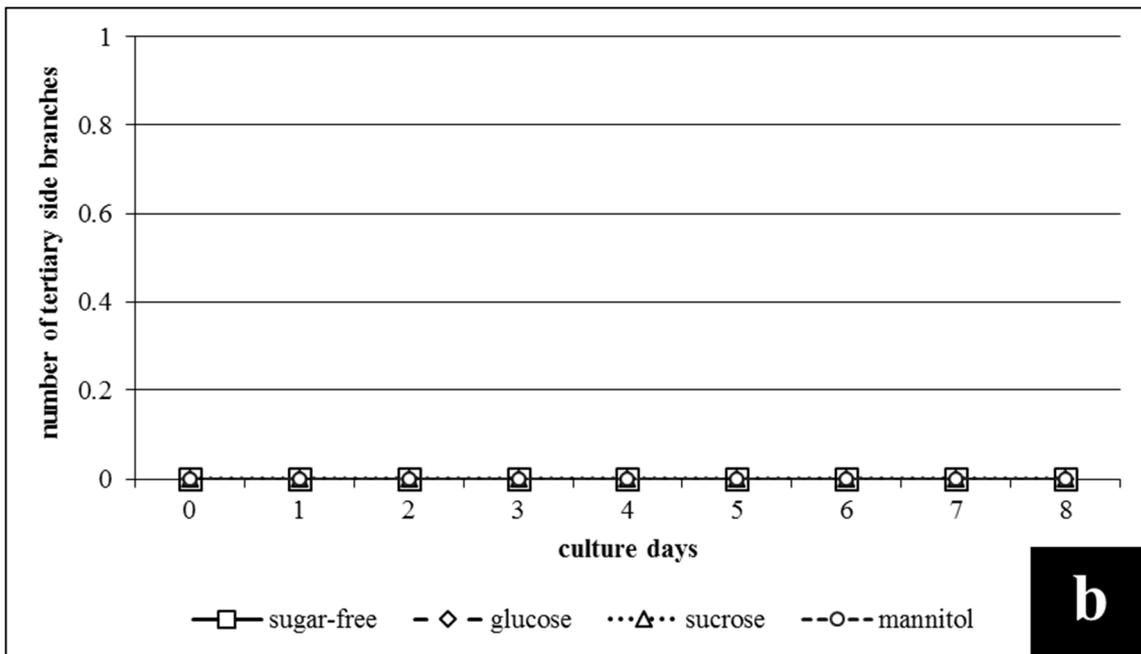
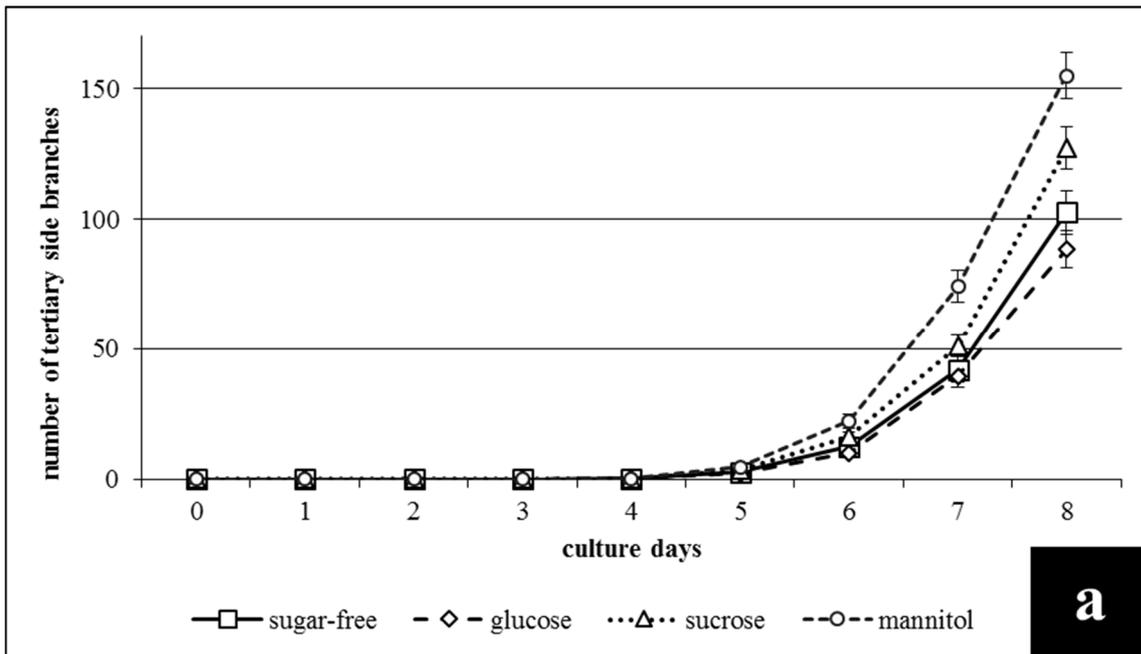


Fig. 2-12. Number of tertiary side branches.

a; light conditions, b; dark conditions.

N = 60; error bars represent \pm SE.



Fig. 2-13. Growing protonema filament under the dark condition.

Arrowheads indicate three cell walls. Scale bar = 50 μm .

第三章 総合考察

3-1. ケヘチマゴケ原糸体培養系の実験材料としての利点

本研究で開発したケヘチマゴケ原糸体の培養系には、次のような利点があると考えられる。

(1) 原糸体フィラメントの生長が速く、実験試料の安定した確保が容易である。(2) 原糸体が平面的に生長する傾向が強く、側枝の分裂が比較的少ないため 1 本 1 本の原糸体フィラメントを識別できるだけでなく、構成する細胞の葉緑体や隔壁も容易に観察することができる。(3) 顕微解剖的な原糸体断片の切断が容易に実行でき、原糸体断片を用いて生長量を正確に計測することができる。(4) 芽の分化を外生サイトカニンによってコントロールすることが可能である。

3-2. ケヘチマゴケ原糸体上に形成される芽の特徴

ケヘチマゴケ原糸体は外生サイトカニンを与えなかった場合、培養 1 ヶ月以内での芽分化は観察されなかった。しかし本実験より、ケヘチマゴケ原糸体培養では BAP のような外生サイトカニンを与えると誘導期間 3 日以内という短期間で容易に芽の分化を誘導できることが明らかとなった。これは内生サイトカニンの影響を考慮することなく外生サイトカニンによって望むタイミングでの芽分化の誘導・制御ができることを意味する。さらにこれは他の種では外生サイトカニンを与えなくても芽の分化が起こるといった報告 (Brandes & Kende, 1968; Nebel & Naylor, 1968; Yoshida & Yamamoto, 1982) とは異なる。これは今後、芽分化のメカニズムを解明するための実験材料として有用なケヘチマゴケ原糸体の特徴だと考えられる。

外生サイトカニンによってケヘチマゴケ原糸体上に誘導された芽は、いずれもクロロネマ細胞に形成した。さらにその芽は途中段階で生長を停止した。これは Reski (1998) でも報告されており、詳細は分かっていない。今後、クロロネマ細胞上での芽分化および茎葉体への生長については、他の要因も含めてさらなる検討が必要である。

3-3. ケヘチマゴケ原糸体生長に見られた糖の影響

ケヘチマゴケ原糸体を糖（グルコース、スクロース、マンニトール）を添加した培地と **sugar-free** の培地で培養し比較した結果、糖として代謝されるグルコースとスクロースでは、メインフィラメント細胞数では明瞭な差が見られなかったが、側枝増加数に及ぼす影響に明瞭な違いがあることが実証された。その一方で、スクロース添加培地、**sugar-free** 培地、そして糖として代謝されないマンニトール添加培地において、メインフィラメント細胞増加数と一次側枝数ではいずれの培地においてもほぼ同様の結果が得られた。これは、メインフィラメント細胞増加数では、培養開始時のクロロネマ 5 細胞による光合成で十分に生長を賄うことが可能であり、さらに一次側枝数の増加については一次側枝が発生する際の細胞量による光合成で十分生長が賄え、この 2 つの生長には外的要因を必要としないことを示す。

明条件下では、マンニトール添加培地や **sugar-free** 培地でもスクロース添加培地と同様に全ての観察項目において生長が観察できることから、明条件下ではケヘチマゴケ原糸体は培地中の炭素源を必要としないことが示唆される。

暗条件下では、マンニトール添加培地と **sugar-free** 培地は生長が見られなかったことから、ケヘチマゴケ原糸体でもマンニトールは炭素源として利用されないということが明確となった。また、スクロースとグルコースは炭素源として伸長生長に有効であることが明らかとなったが、分枝を行うには不十分であることが示された。

明条件において、グルコースを添加した培地は **sugar-free** 培地よりも低い生長量を示した。Sabovljevic *et al.* (2005) は、ナミガタタチゴケにおいてグルコースによる生長への負の効果を報告している。彼らは原糸体の生長を原糸体コロニーの直径で計測しており、今回の結果（増加した細胞数ならびに側枝数）と直接比較することはできない。しかし、ケヘチマゴケでも同様な結果が得られたことは大変興味深い。ケヘチマゴケ原糸体の生長において何故グルコースが生長を抑制するのか、今後さらなる検討が必要である。

第二部 *Pohlia flexuosa* 原糸体の建物緑化資材への応用

第一章 緒言

1-1. ヒートアイランド現象

ヒートアイランド現象とは、都市の中心部の気温が郊外と比べて島状に高くなる現象を言う。この現象は年間を通して生じているが、特に夏の気温上昇が都市生活の快適性を低下させるとして問題になっている。ヒートアイランド現象は夏期だけの問題ではない。都市と郊外や農村地の気温差は一日のうちでは夜間に大きく、一年を通してでは冬に大きくなることが分かっている。このヒートアイランド現象の緩和対策として、人工排熱量の削減、地表面被覆の改善、都市形態などの改善が求められる。

1-2. 緑化

都市の気温上昇を緩和する主な非人工的要因としては、水面や緑被地が考えられており、都市緑化の重要性が叫ばれている。ここでいう緑被地とは、森林や田畑などのように植物が地表を覆っている場所を総称したものである。これと似た言葉である緑地は、通常緑被地に加えてグラウンドや水面などの植物の生えていない場所も含んだ意味で用いられることが多い。

都市気温上昇とその都市の緑被率との関係を調べた結果、その両者にはほぼ反比例的な関係が認められている (Nonomura *et. al.*, 2009)。すなわち、緑地が多い都市ほど気温の上昇が抑えられていることが示されている。緑地の気温上昇緩和作用の程度は、日射量や風速、緑地に植栽されている植物の種類によっても異なるが、植栽密度が高いほど気温上昇への緩和効果が大きいこと、緑地の面積が大きいほどその緩和効果がより広範囲へおよぶことも知られている (Dhakal & Hanaki, 2002; Wong & Yu, 2005)。この効果は、植物の蒸発散作用によって草木が大気から気化熱を奪うために生じる。しかし、都市部において大きな面積を割き、失った自然を再生するのは難しい。そこで現在注目されているのが

緑化である。緑化の主な方法は、建築物緑化、地表面緑化である。これを推進するため、日本では各自治体で公的助成金補助制度も設けられ、各方面から関心が集まっている。

1-3. 建築物緑化

現在、建築物緑化には木本から草本まで様々な種の植物が用いられている。屋上緑化にはクロマツやネムノキなどの高木・中木、ローズマリーやナツグミなどの低木、セダム類やラベンダーなどの多年草、シバ、コケが用いられている。木本類および多年草などは主に屋上庭園やビオトープ、シバやコケはマットなどに成形して施工に用いられる。また、壁面緑化にはフジやセイヨウキヅタなどのツル植物が用いられる。

1-3-1. 屋上緑化

Fig. 1-1 に主に用いられる緑化構造を示す。屋上緑化には大きく分けて「身近な環境を改善する効果」と「都市全体の環境の改善に寄与する効果」がある。建物1棟を緑化するだけでも身近な環境を改善する効果が得られるが、街に屋上緑化が増えることで、全体として街全体の環境の改善に寄与する効果が得られる。以下に、屋上緑化によって得られる主な環境の改善効果を挙げる。

1) ヒートアイランド軽減効果

都市は面積の30%以上を緑で覆うと気温は4°C下がると言われている (Lazzarin *et al.*, 2005)。植物は、蒸発散効果により大気温度を冷却する。このように緑地は日中その表面から盛んに水分を蒸発させる。水の蒸発熱は $2.3 \times 10^3 \text{ kJ/kg}$ である。つまり、1gの水が蒸発することでその場から2.3Jの熱を奪うことになる。さらに、屋上緑化を行うことで屋上表面への蓄熱を緩和する効果も期待される。これらが屋上緑化によるヒートアイランド軽減効果の主な要因となる (Onmura *et al.*, 2001)。

2) 断熱効果

屋上緑化は、一種の“外断熱材”と考えることができる。無機的な断熱材は、熱抵抗値と断熱材の厚さで性能が決まる。しかし建築物緑化の場合は、それでは性能評価ができない。緑化した場合、植物と排水層と含水層である植生マットにより、植物と植栽基盤の蒸散による冷却効果が得られるため、室内の温度上昇が避けられ、遮熱、断熱効果が得られる (Onmura *et al.*, 2001; Kumar & Kaushik, 2005)。表面温度は外気温との差がほとんどなくなり、室内温度の上昇も緩和される。また、建物内の暖かな空気を外へ逃げにくくする保温効果も得られる (Lazzarin *et al.*, 2005)。その結果、緑化を行った場所の真下の部屋ではクーラーや暖房の消費電力は20%–30%節約され、省エネルギー効果が得られる。

3) 建物の保護効果

屋上緑化には“緑の保護層”として紫外線や酸性雨などによる防水層や壁面の劣化軽減効果がある。さらに土壌層を設けることにより、土の下での温度変化が少なくなる。緑化したコンクリート面の1日当たりの温度変化がほとんど無いのに対し、非緑化面の1日当たりのコンクリート面の温度変化は大きくなる (Niachou *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2003)。これにより、緑化していないコンクリート面は毎日伸縮を繰り返し、コンクリート面へのクラックの発生や防水層の損傷などが発生することから、屋上緑化を行うことで昼夜の温度差による熱膨張収縮から建物を保護することが可能となる。

4) 雨水の貯留効果および流出遅延効果

都市型水害の原因として、排水施設に流れ込む水の量が一気に増加すること、短時間に集中することの2点が挙げられる。緑化がない場合、降雨の100%が短時間のうちに流出するが、緑化した場合は植物と土壌によって雨水の70–100%を一時的に保持し、徐々に排水層から流れ出る (Villarreal & Bengtsson, 2005; Mentens *et al.*, 2006)。これにより、水害が緩和されると考えられる。一方で、乾燥時には保持した水分の蒸散により湿度を与

える機能もあるとされている。

以上のような効果が得られる一方で、施工の際に注意しなければならない事柄がいくつかあるのも事実である。主な注意点は次に挙げるものである。1) 建物が植物や構造物の重さに耐えうる構造であること（荷重）。2) 水漏れを起こさないよう防水層が万全であること（防水）。3) 余剰水が速やかに排出されること（排水）。4) 防水層の隙間への根の侵入やコンクリート亀裂への侵入を防ぐこと（防根）。5) 降水がない場合に備え水栓や灌水装置を設けること（給水）。

大変メリットの多い屋上緑化であるが、防水や土壌の軽量化、薄層化、適切な防水工法、灌水方式や灌水の自動化、コスト削減、倒木や土壌飛散の防止などのデメリットの軽減対策が急務である。

1・3・2. 屋上緑化とコケ植物

現在すでにコケ植物は緑化用植物として利用されており、様々な方法で施工されている。材料として最もよく用いられているコケの種はエゾスナゴケである。これは日当たりのよい土上に生育していることから、乾燥に強いとされている。方法は様々で、樹脂加工シートに挟み込みシートを形成するもの、定着剤を混ぜた保水材と共にコケを直接吹き付けるもの、化学合成品は使用せず伝統の土壁技法を生かして土や粘土、藁層でボード状に成形するものなどである。しかしこれらは全て材料のコケを“茎葉体”で準備しており、圃場で栽培されている。エゾスナゴケ茎葉体の生長速度は極めて緩やかであり、屋上の過酷な環境に耐えうるだけの大きさに生長するには2-3年を要するため Park & Murase (2011) によってエゾスナゴケ茎葉体の植物工場による生産技術が開発された。これにより年間を通じてコケの生育に最適な環境が保たれ、省スペースで安定したコケの生産が行えるようになった。さらに、自然環境下での圃場栽培と比べて生育期間4-6ヶ月という短期間での生産が実現した。

この章では、さらに短期間でのコケ緑化資材の作成を目指し、茎葉体よりも生長が速いとされる原糸体を建物緑化資材へ応用することを目的とする。初めに、緑化資材の準備として第一部で明らかにしたケヘチマゴケ原糸体の培養特性を生かした大量増殖法の確立を行う。続いて、得られたコケ原糸体をコケシートとして成形する方法、またシートへ成形した後の茎葉体分化を誘導するための条件検討を行う。

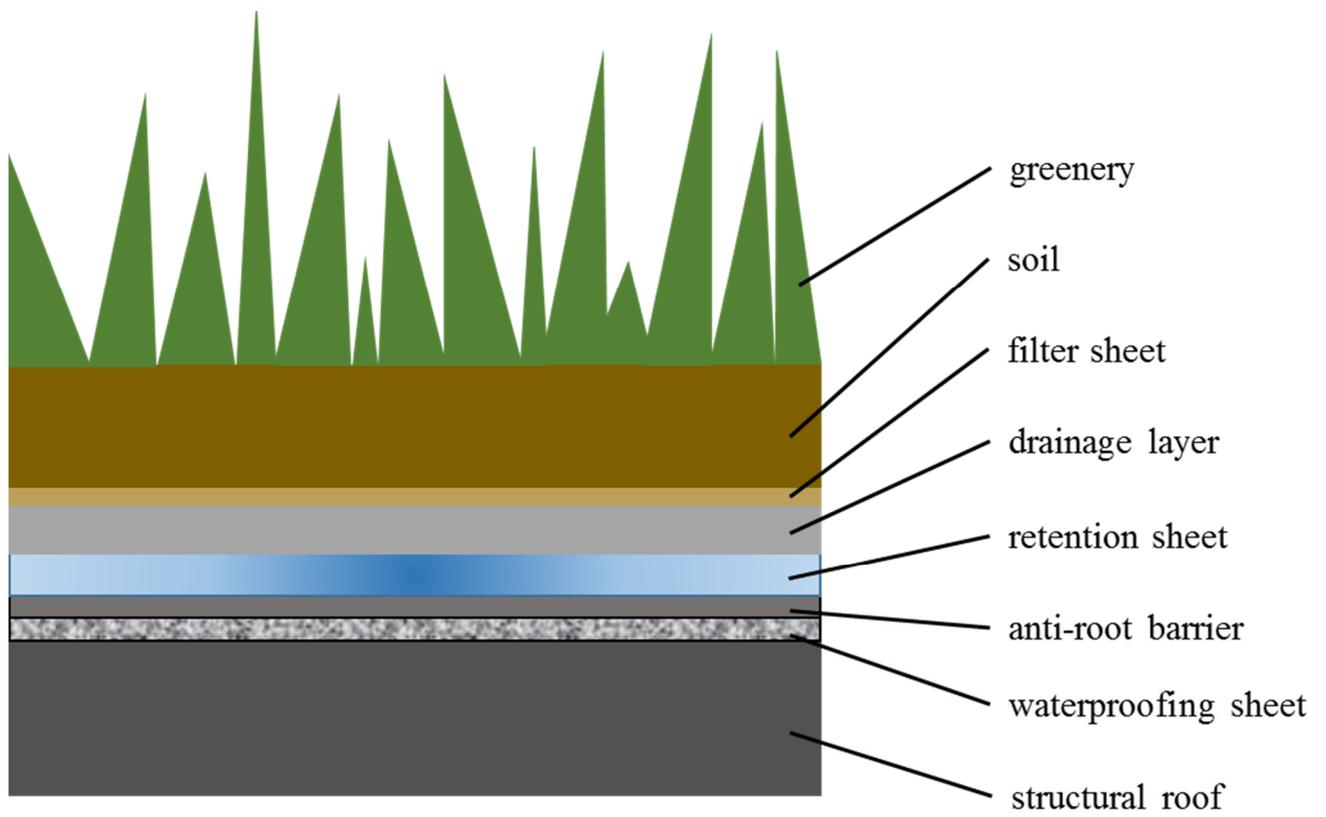


Fig. 1-1. The different layers of a standard green roof

第二章 資材用コケ原糸体の準備

2-1. 緒言

これまで人間は生活を豊かにするために、微生物の働きや酵素の作用を上手く利用してきた。身近にある酒や醤油，味噌などがその例に挙げられる。時代が進むにつれ人口が増加し，都市社会も発展していくなかで，それに伴ってこれらの生産は個人規模から大量生産へと移行した。この大量生産を可能にした要因の一つに新たな素材の導入があり，それと同時に規模を拡大するための新たな技術が進歩した。現在も大量増殖技術の発展は続いている。

現在主に工業的に利用されている植物組織の形態は，カルスあるいは毛状根である (Sudharsan *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005)。カルスの物質生産性はカルスの大きさに関連することが多く，適切な大きさのカルス塊を維持しつつ，酵素や栄養分を十分に供給できるバイオリアクターが必要である (Grima *et al.*, 2003)。毛状根については，カルスとは異なるバイオリアクターを開発しなければならない。主に用いられる培養法にはタンクでの液体通気培養が挙げられる (Luning & Pang, 2003; Pang & Luning, 2006)。大量増殖技術は，それぞれの培養試料に最適な培養条件や培地組成などを決定するために膨大な時間と費用がかかる。しかし一度その方法が確立されると非常に有用なものになる。また，一度確立されたものでもその都度改良を加えることで，近縁種への適用が可能になる場合もある。加えて培養時間の短縮や低コスト化，収量の増大につながる。

2-2. 目的

現在、緑化用資材として用いられているコケは全て茎葉体を大量増殖させたものである。その方法は，圃場栽培や植物工場内のタンクを用いるなど様々であるが，茎葉体では資材として利用が可能な大きさに生長するまでに膨大な時間を必要とする。第一部では，原糸体細胞は 5 細胞以上を保持しておけば原糸体を切断しても増殖が可能であることを示した。さらに Hohe & Reski (2002) によって，バイオリアクターを用いたヒメツリガネゴケ原

糸体の培養法が報告されている。本研究では生長が茎葉体よりも速い原糸体の状態を用いて、ケヘチマゴケ原糸体の大量培養法を確立することを目的とする。

2-3. 実験方法

第一部で糖を培養培地に添加することで側枝の発生頻度に差が見られることが明らかとなった。この結果が大量培養系へ応用できるか確認するため、以下の実験を行った。

第一部で示したケヘチマゴケ原糸体の前培養を行った後、1週間おきに新たな固体改変 **Knop** 培地へ原糸体を透析膜に乗せたまま移動させ、1ヶ月培養を続けた原糸体コロニーを試料とした。

寒天を添加せずに調整した液体改変 **Knop** 培地を 1 L 三角フラスコに 800 ml 分注し、滅菌した。液体培地が十分に冷えてから、前培養後 1ヶ月間、固体改変 **Knop** 培地上で培養を行った原糸体を滅菌済みピンセットで細かく切断しながらコロニー2個分を摂取した。その後、Fig. 2-1 に示す液体通気培養装置にセットし、通気量 3.4 L/min., 14時間日長、室温（約 25℃）で2週間培養した。さらに、糖（スクロース）を添加したものと比較するため、同様の実験を 1% (w/v) のスクロースを添加した培地でも行った。2週間の培養後、得られた原糸体は乾燥重量を計測し、収量の比較を行った。

さらにスクロース添加培地、**sugar-free** 培地それぞれで得られた原糸体を顕微鏡で観察し、メインフィラメント細胞数と一次側枝数を計測した。それぞれの培地条件で 100本の原糸体、計 200本について計測を行った。

2-4. 結果

2-4-1. 液体通気培養によって得られた原糸体収量の比較

3反復の結果を Table 2-1 に示す。実験を行った回によりばらつきが見られるが、いずれもスクロースを添加した条件の方が **sugar-free** 培地の約 2倍量の収量が得られた。

2-4-2. 液体通気培養で得られた原糸体の顕微鏡観察

液体通気培養で得られた原糸体フィラメントはいずれも短く断片化されていた。この短く断片化された原糸体を“短糸状原糸体”と定義する。本実験で得られた短糸状原糸体のメインフィラメント細胞数、および一次側枝数をヒストグラムにまとめ、Fig. 2-2 および 2-3 に示す。液体通気培養によって得られる原糸体にはどちらの培地条件においても二次側枝以降の側枝は全く確認されなかった。メインフィラメントの長さには、大きな差は見られなかったが、スクロース添加培地で培養された短糸状原糸体には側枝を形成しているものが多く観察できた。Sugar-free では一次側枝の形成が平均 0-1 本であったのに対して、スクロース添加培地では、平均 3-4 本であった。短糸状原糸体の形態は、側枝発生の有無以外の原糸体細胞の形状に大きな差はなかった (Fig. 2-4)。

2-5. 考察

スクロースを添加した場合、液体通気培養では sugar-free と比べて乾燥重量で約 2 倍の収量が得られることが明らかとなった。また、スクロース添加培地で得られた短糸状原糸体には一次側枝が平均 3-4 本形成していることから、sugar-free で得られる原糸体よりも頂端細胞を多く保持していることが示される。これを材料として緑化資材を調整することで、頂端細胞が多い分、緑化基盤への展開が速くなるのではないかと推測される。さらに、スクロースを添加した場合でも生長する原糸体の形態に異常が見られないことも確認でき、培地にスクロースを添加することでケヘチマゴケ原糸体の大量培養に成功し、得られた原糸体を緑化資材の材料として使用することが観察上可能であることが確認できた。

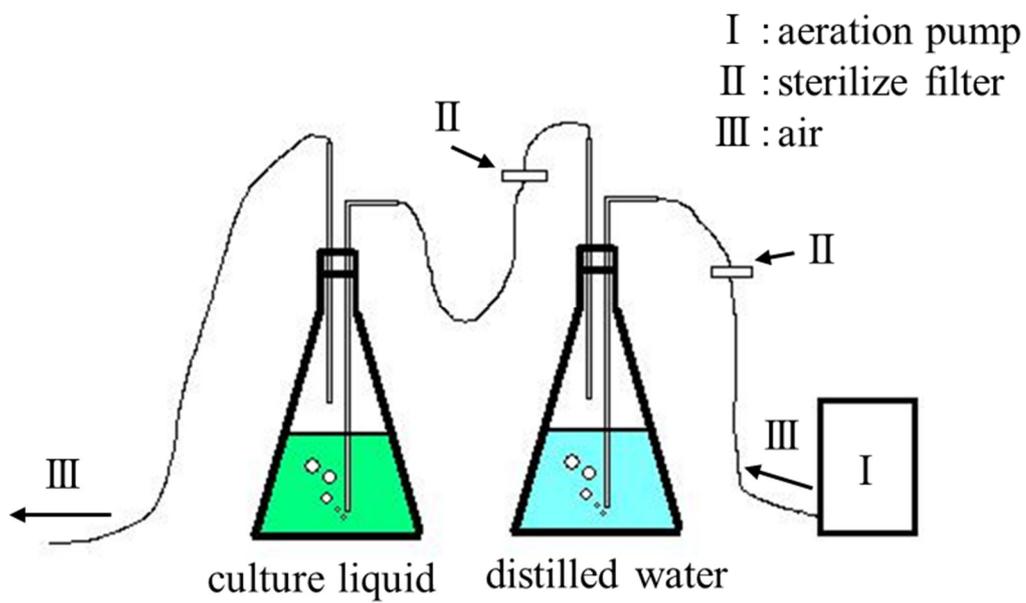
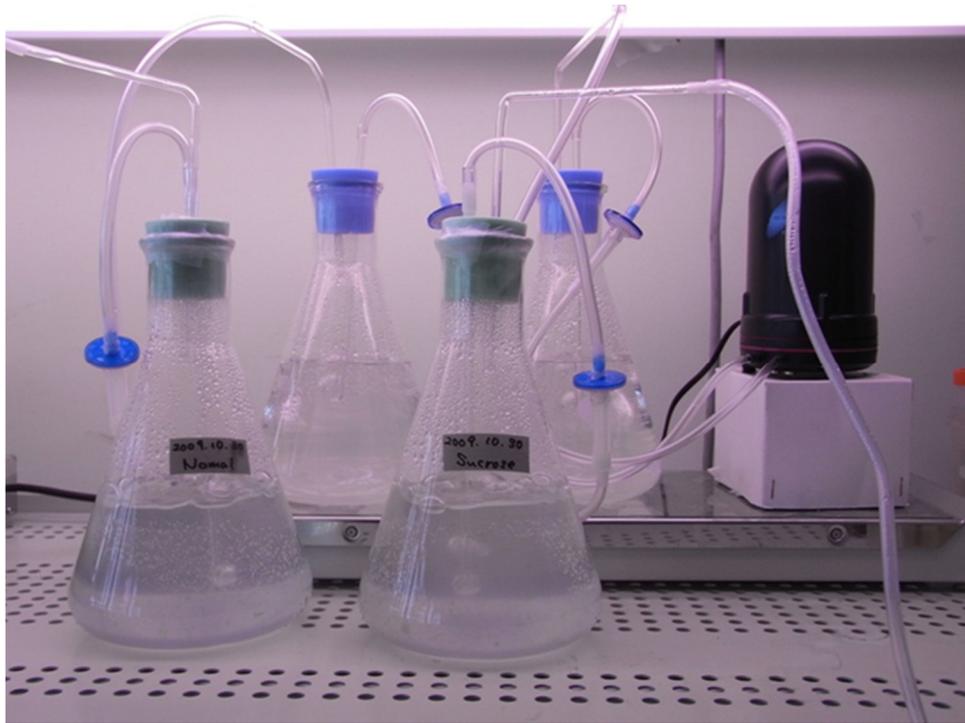


Fig. 2-1. An experimental equipment of liquid aerobic culture
 Upper: photo of assembled device, down: schematic of systems.

Table 2-1. Dry weight of the protonema obtained by liquid aerobic culture

aeration rate	culture days	sugar-free medium	1%-sucrose medium
3.4 L / min.	2 weeks	0.314 g	0.970 g
		0.398 g	0.674 g
		0.486 g	0.942 g

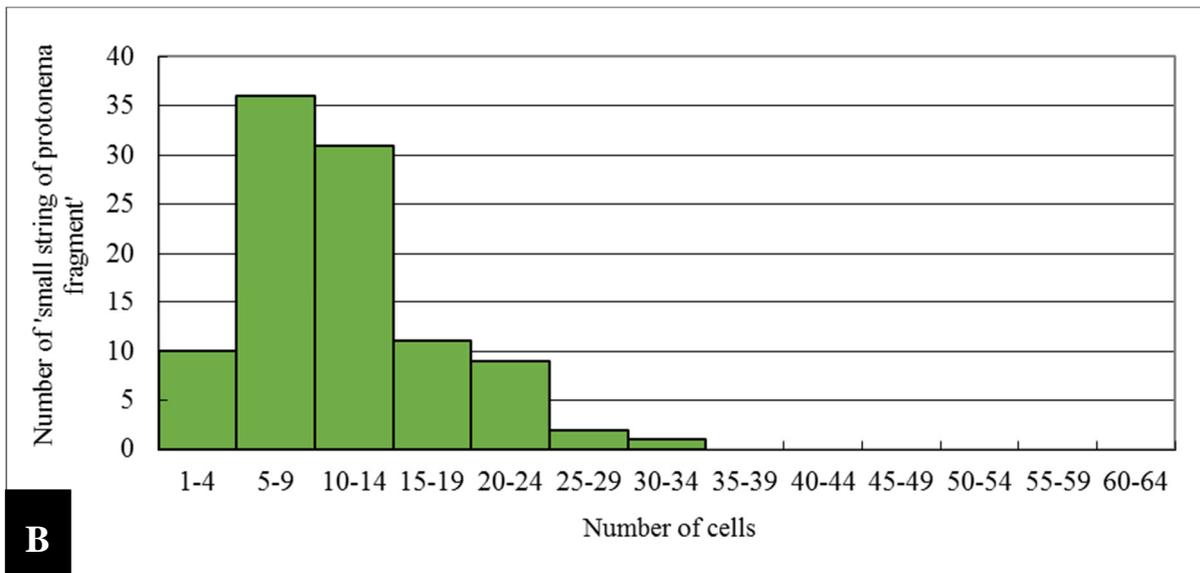
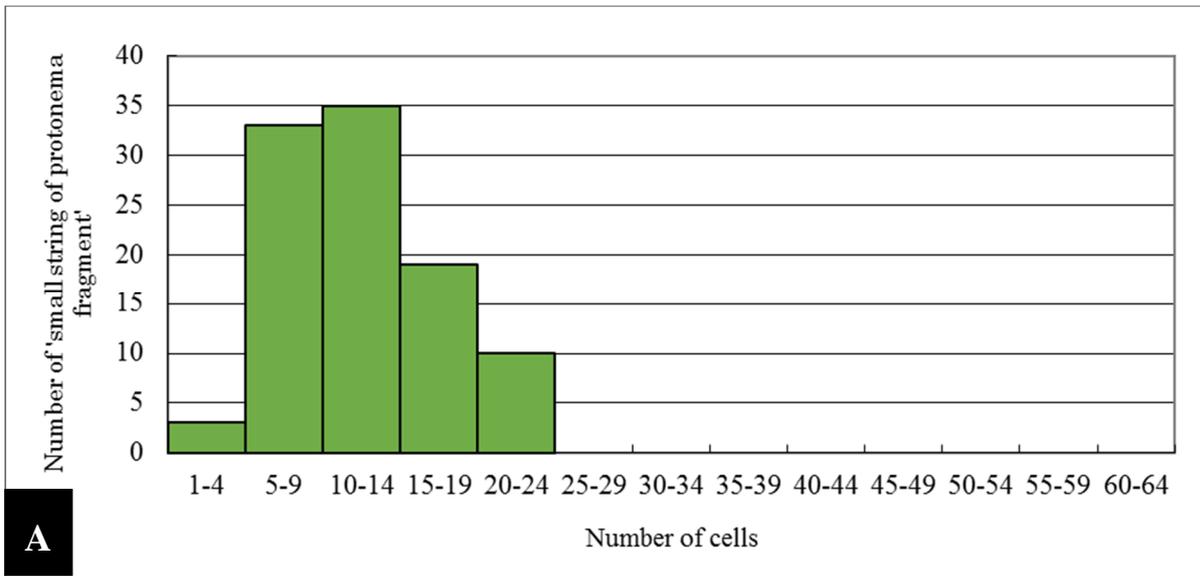


Fig. 2-2. Number of main filament cells per 'small string of protonema fragment'

A: sugar-free medium, B: 1%-sucrose medium.

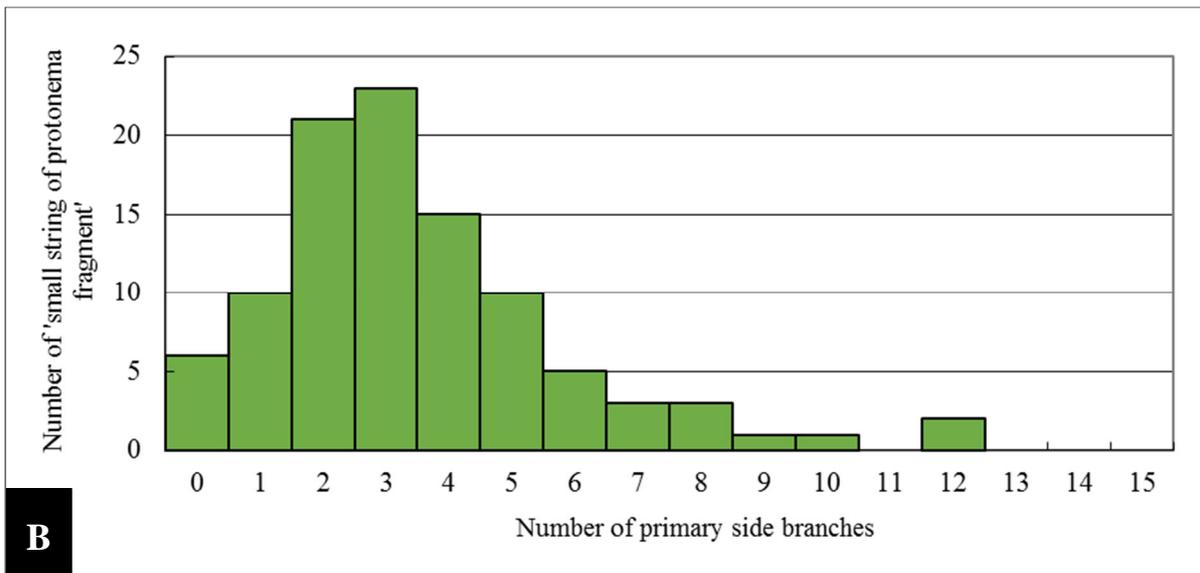
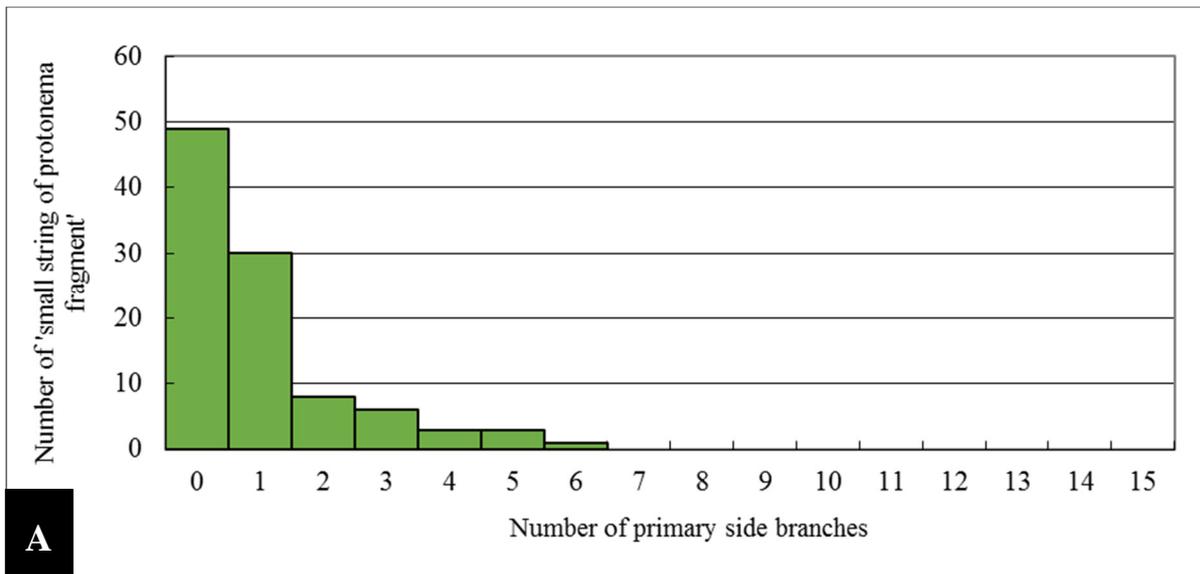


Fig. 2-2. Number of primary side branches per 'small string of protonema fragment'
 A: sugar-free medium, B: 1%-sucrose medium.



Fig. 2-4. Pictures of cultured protonema in liquid aerobic culture

A–B: cultured in the sugar-free medium,

C–D: cultured in the 1%-sucrose medium

Bars = 100 μ m.

第三章 コケシートの成形

3-1. コケ原糸体基盤への展開

3-1-1. 緒言

これまでにコケ原糸体の大量培養に成功した。しかし，屋上緑化を行うためには得られた原糸体を緑化資材として加工する必要がある。緑化現場で使用する際，運搬および施工に適していると考えられる形状はシート状であると考えられる。これまでに，シート基盤素材として不織布が最適であることを明らかにし，シート基盤への原糸体の展開にも成功している。

ここでは，大量培養にて得られたケヘチマゴケ原糸体を用いたコケシートの成形法の検討を行う。

3-1-2. 目的

これまでに成功したシート基盤への原糸体の展開では，シート基盤への短糸状原糸体の展開は見られたが，その密度が低いという結果が得られた。これを改善するため，短糸状原糸体をシート基盤に展開する際の培地にスクロースを添加し，**sugar-free** 培地との比較を行うことを目的とする。

3-1-3. 材料

材料は第二部 第二章で得られた短糸状原糸体を使用し，短糸状原糸体の初期接種量を均一にするため，**packed cell volume** 法で原糸体量を量った。方法は次の通りである。あらかじめ滅菌しておいたピペットで同様に滅菌済みの目盛り付の蓋付き試験管に液体通気培養で得られた短糸状原糸体を培地を含めて **10 ml** 取り，回転数 **1000 rpm** で 5 分間遠心分離をかけ，短糸状原糸体量を計測した。その後，上澄みを取り除いて沈殿した短糸状原糸体に，**0.1 ml** 短糸状原糸体/**2 ml** 培地となるように，調整・滅菌済みの液体改変 **Knop** 培地を加えて調整した。

さらに、基盤としてのシート素材は不織布製のクッキングペーパー（ライオン株式会社、リードクッキングペーパー）を用いた。

3-1-4. 実験方法

実験手順の概略図を Fig. 3-1 に示す。6×6 cm²の大きさに切断したクッキングペーパーを筒状に丸めたものを管ビン（長さ 10 cm，内径 22 cm）にセットし，液体改変 Knop 培地を 6 ml 加えて蓋をし，オートクレーブで 121℃，20 分間滅菌した。そこに 3-1-3 で定量済みの短糸状原糸体を含む液体培地を 2 ml 摂取し，回転培養器 (BIOSPIN MBS-1, Fig. 3-2) にセットし，回転速度 5 rpm，角度 15° で回転させて培養を行った。これを同様に，あらかじめ管ビンに加えておく培地を 1%-スクロース添加改変 Knop 培地に変更したものも行い，短糸状原糸体のシート基盤への展開に差が生じるのか観察を行った。比較するために，培養開始から 8，10，14，1 ヶ月にそれぞれ管ビンからシートを取り出し，目視によるマス目計算によって原糸体の被覆率を求めた。各々の培養日数につき 10 シートずつ，計 80 シートの検討を行った。また，培養温度は室温（約 25℃）で行ったが，外気温による室温の変化をコントロールすることはできなかった。

3-1-5. 結果

培養開始から 8 日，10 日，14 日，1 ヶ月後の原糸体被覆率を Table 2-2 に示し，1 ヶ月間回転培養を行ったシートの様子を Fig. 3-3 に示す。シートを覆っている原糸体が確認しやすくするため色調を変更した。シート基盤への原糸体被覆率は，培養 8-14 日ではスクロースを添加した培地で回転培養を行っていたものが **sugar-free** 培地での培養よりも約 10% 広がった。さらに培養 1 ヶ月後になると，Fig. 3-3 のようにスクロース添加培地で培養した方が原糸体密度が非常に高くなっており，被覆率は **sugar-free** 培地と比べると約 30% 広がった。

3-1-6. 考察

この実験によって、シート基盤への原糸体展開の際にはスクロースを添加した方が、添加していないものと比べて短時間でシートに展開することが示された。これは、第一部で得られたスクロースを添加した培地ではケヘチマゴケ原糸体は分枝を促されるという結果からも考えられる。

3-2. 基盤展開後のコケ原糸体からの茎葉体誘導

3-2-1. 緒言

ケヘチマゴケ原糸体は、通常の培養条件下では1ヶ月を過ぎても自発的な芽の分化を起さないことが分かっている。それにもかかわらず、外生サイトカイニンであるBAPを培地に添加すると72時間の処理で全てのサンプルにおいて1個の原糸体コロニーから250個以上の芽が得られる。しかし、Iwasa (1965) によって外生サイトカイニンで誘導した芽はその後生長を止め、茎葉体への分化が見られないことが報告されており、同様の現象が本研究においてケヘチマゴケ原糸体でも観察された。

植物にはその生長を調節するための物質として植物ホルモンが存在する。これら植物ホルモンは、その生長や分化、環境応答を担う重要な役割を果たしている。コケ植物にも植物ホルモンは存在する。以下に主要な5つの植物ホルモンと、これまでに報告されている蘚類における挙動を示す。

アブシジン酸（以下ABA）は、蘚類、苔類両方で合成されることが知られている（Christianson, 2000）が、その合成経路は未だ明らかになっていない。ABAはストレス応答や生長生理に働く。コケ植物特有の作用として、乾燥耐性の獲得のための重要なホルモンであることが分かっている。ヒョウタンゴケでは、乾燥処理を施すと内生ABA量が増加し、原糸体が乾燥耐性を示した。また、ヒメツリガネゴケやヒョウタンゴケをABA存在下で培養すると、乾燥耐性を示すbrood cellと呼ばれる特殊細胞が分化する。また、被子植物と同様にABAを介した凍結耐性も報告されている（Bhyan *et al.*, 2012）。

エチレンもまた、蘚類、苔類の両方で内生エチレンの存在が報告されている。しかしその合成経路は確定していない。蘚類でのエチレンの生理作用は、被子植物と同様に老化促進作用が示唆されている。

オーキシンに関しては、蘚類、苔類ともに内生オーキシンとしてインドール酢酸 (IAA) が同定されている。他のホルモンとは異なり、合成経路の報告が見られる。オーキシンは、蘚類と苔類の両方で仮根の分化の誘導、また蘚類においてはサイトカイニンとともに芽の分化を促進することが知られている。

サイトカイニンは5つのホルモンの中で最も報告が多い。多くの蘚類では、サイトカイニンは芽の分化を誘導するホルモンである (Brandes & Kende, 1968; Christianson, 1998)。その他、原糸体の細胞分裂を促進、茎葉体における頂芽優勢の制御にもサイトカイニンとオーキシンがかかわっていることが報告されている。

ジベレリンに関しては、蘚類、苔類ともに内生ジベレリンの存在も合成系に生理作用も明白になっていない。しかし、蘚類の種類によっては外生ジベレリンの投与によって孢子の発芽を促進または阻害した。また原糸体の伸長、芽の形成、造精器の形成を促進したと報告されている。

このように、コケ植物における植物ホルモンの作用は未だ明確にはされておらず、ある種で見られた同様の応答が他の種でも見られるという保証はない。

3-2-2. 目的

緑化用シート基盤に展開できたケヘチマゴケ原糸体から、茎葉体を生長させなければならぬ。しかしケヘチマゴケ原糸体は放置しておくとも1ヶ月以上芽を形成しない。また、外生サイトカイニンによって得た芽は、生長が止まってしまう。それを打開するため、植物ホルモンを添加し茎葉体の誘導条件を検討することを目的とする。さらに、独立行政法人理化学研究所 植物科学研究センター 生産機能研究グループ 生産制御研究チーム研究員の井藤賀操先生から、芽を乾燥に曝すことで茎葉体分化が起こりやすくなるという情報

を得たため、これについても検討を行う。

3-2-3. 材料

第二部，第二章でスクロース添加培地による液体通気培養法で得られた短糸状原糸体を緑化シートの材料とする。さらに，添加する短糸状原糸体の量はあらかじめ **packed cell volume** で **0.1 ml** 短糸状原糸体／**1 ml** 液体培地に調整して用いた。検討に用いた植物ホルモンは，オーキシシン (**indole-3-acetic acid; IAA**)，サイトカイニン (**6-benzylamino-purine; BAP**)，アブシジン酸 (**abscisic acid; ABA**)，ジベレリン酸 (**gibberellic acid; GA₃**) の 4 種を全て濃度 **1 ppm** で用いた。

3-2-4. 実験方法

3-2-4-1. 基盤展開時後のホルモン処理による茎葉体誘導条件の検討

緑化シート基盤へのケヘチマゴケ原糸体の展開は第二部，第二章の 3-1 節で示した通りである。ここでは，あらかじめ管ビンに分注しておく培地は **1%** スクロース添加の液体改変 **Knop** 培地とした。短糸状原糸体を含む液体培地を **2 ml** 摂取した管ビンを **Fig. 3-4** と詳細は **Fig. 3-5** に示す順番に従ってホルモンの処理を行った。各ホルモンの処理期間は **Fig. 3-4** のとおりである。

スクロース添加培地で **6** 日間培養した後，無菌条件下で液体培地をホルモン添加培地と置換した。この時，次の培地へのスクロースもしくはホルモンの持ち越しを可能な限り防ぐため，次の 3 つの操作を行った。1)管ビン内の培地を捨てる。2)新たに調製・滅菌しておいた液体改変 **Knop** 培地を **8 ml** 加えて蓋をし，**30** 分間回転培養を行う。この操作を **3** 反復行う。3)最後に管ビン内の培地を捨て，次の条件の新たなホルモン添加培地を **8 ml** 加えて回転培養を始める。

本研究では，新たなホルモン添加培地に置換してから，次のホルモン添加培地に置換するまでの培養期間を **3** 日間とした。最後のホルモン添加培地への置換から **3** 日後，基本培

地である液体改変 Knop 培地 8 ml に置換し，6 日間回転培養を続けた．6 日間の回転培養を終えると，原糸体が展開したシート基盤を，20 ml の 0.8%寒天培地を分注した直径 9 cm，深さ 15 mm のシャーレに移動させ，インキュベーター内で 25℃，14 時間日長で培養，観察を行った．また，比較のためコントロールとして BAP 処理の後，液体改変 Knop 培地に置換したものも行った．これは他の条件が培地を交換する際，基本培地である改変 Knop 培地で培地交換を行った．各条件につき管ビン 2 本ずつ行った．

3-2-4-2. 植物ホルモン処理後の茎葉体形成誘導の検討

3-2-4-1 項で植物ホルモン処理を終え，20 ml の 0.8%寒天培地を分注した直径 9 cm，深さ 15 mm のシャーレに移動した原糸体展開シート基盤から茎葉体をより多く，より速く誘導するための検討を行った．方法は，シャーレに封をする材料をパラフィルムとサージカルテープに分けて観察を行った．3-2-4-1 項で同じ条件でシート作成したものが 2 本ずつあるため，1 方はパラフィルムでシャーレの封をした（シャーレ内の湿度が保たれたままである）が，もう一方はサージカルテープでシャーレの封をした（乾燥状態に曝されることになる）．その他の培養条件は同じである．

それぞれのホルモン添加条件および封をするテープの効果を比較するため，シャーレに移して培養してから 1 ヶ月後，原糸体展開シートを Fig. 3-6 に示すように一辺が 1 cm の正方形に 36 分割した．灰色に着色した箇所のシート片を 12 片分観察し，1 片あたりに形成している芽と茎葉体の数を計測した．球状の細胞塊を示すものを芽，葉を形成してシートから垂直方向に生長しているものを茎葉体とした．ここで Fig. 3-6 のように中 2 列を選抜した理由は，管ビン培養時に上部と下部となる部分には原糸体の展開斑が多いため，いずれの管ビンにおいても均一に展開しているのが中 2 列だったからである．

3-2-4. 結果

Fig. 3-5 に示した全 14 通りのホルモン処理を行い，その後パラフィルムとサージカルテ

ープでの封に分けてシャーレ上で培養していた原糸体展開シートの断片 (1 cm^2) あたりの芽と茎葉体の発生数を Fig. 3-7 に示す. 示したグラフには, 発生した芽の数に茎葉体の数も含まれている. 1 cm^2 の断片に切断する前の原糸体展開シートの比較を Fig. 3-8 に示す. サージカルテープで封をした方が基盤シートを覆う原糸体の密度が非常に高かった.

パラフィルムでシャーレの封をしたものでは芽の分化は多数観察できたが, 茎葉体の形成はほとんど見られなかった. これに対してサージカルテープでシャーレの封をしたものでは, 茎葉体形成が数多く観察できた. これは, ホルモン処理を行わなかったコントロールでも同様に観察でき, パラフィルムでは 1 cm^2 あたり約 1 個–2 個しか茎葉体を発生しなかったが, サージカルテープでは約 10 個の茎葉体が観察された. 発生した茎葉体を Fig. 3-9 に示す.

本実験で行った全 14 通りのホルモン処理で, 明確な差が見られなかった. 同条件のホルモン処理でも, パラフィルムとサージカルテープで芽の形成数にも大きな違いが見られた.

3-2-5. 考察

パラフィルムでシャーレに封をする場合と, サージカルテープでシャーレに封をした場合とでは, 茎葉体形成数に明白な差が生じた. BAP 処理しか行っていないコントロールでもサージカルテープで封をしたとき, 茎葉体の発生が見られた. しかしその数を他の条件と比較すると差は明らかだったことから, BAP 処理だけではなくその後も他の植物ホルモンを組み合わせて処理を行うことで茎葉体の発生数が増加することが分かった.

サージカルテープで封をしていた原糸体シートの原糸体密度が非常に高くなった. しかし管ビンからシャーレに移した直後はパラフィルムで封をしたシートと差は見られなかった. そのことから, 原糸体は乾燥状態に曝されると何らかの原因で生長が促進され, さらに芽が乾燥に曝された場合茎葉体が形成しやすくなることが確認できたが, そのメカニズムは何も分からないため更なる研究が必要である.

ホルモン処理条件の決定のためには反復実験を行い, さらには封の仕方を統一して同条

件のホルモン処理で得られる 1 cm^2 あたりの芽または茎葉体の数にばらつきがあるのか確かめる必要がある。

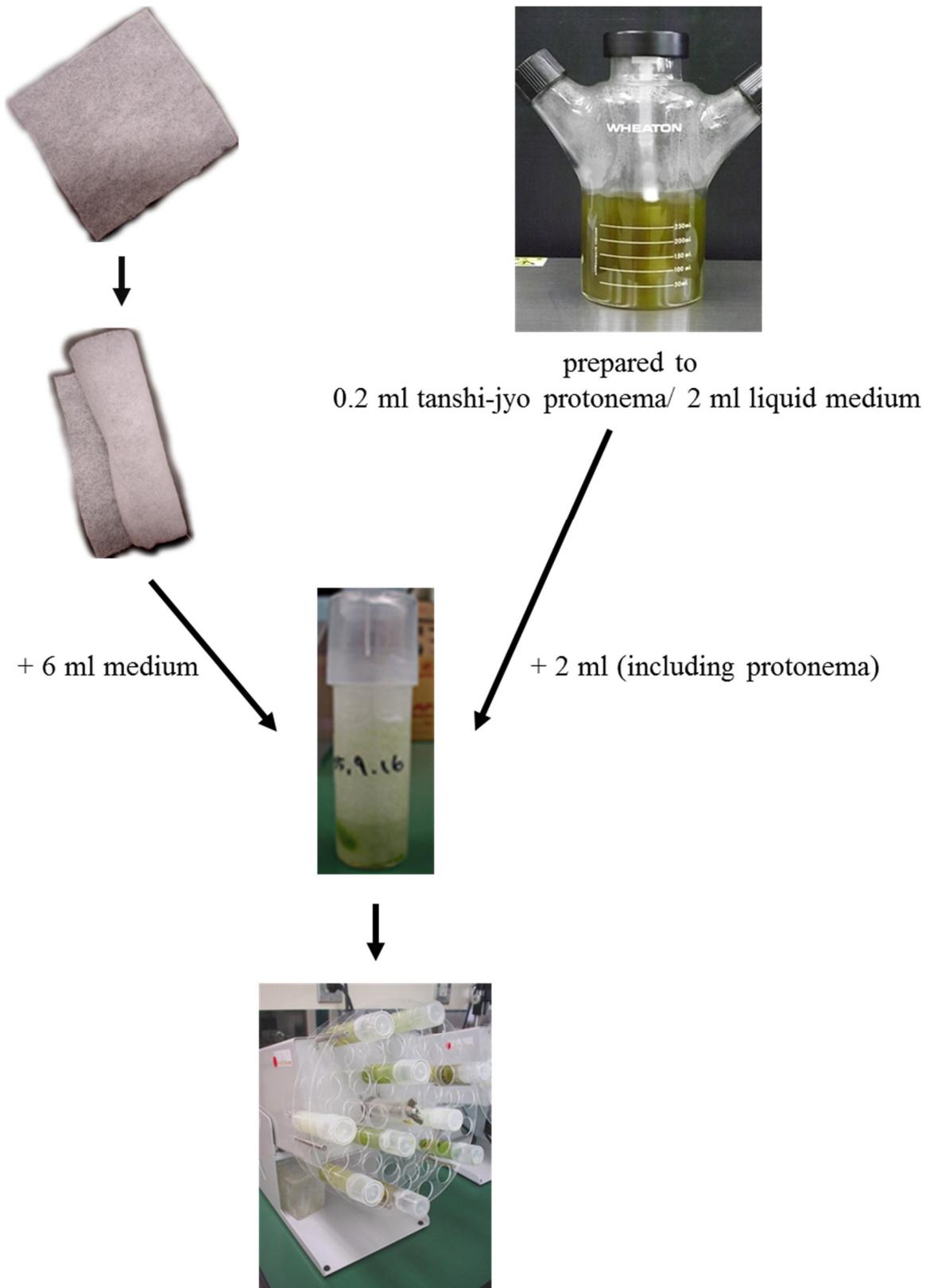


Fig. 3-1. Production steps of moss sheet

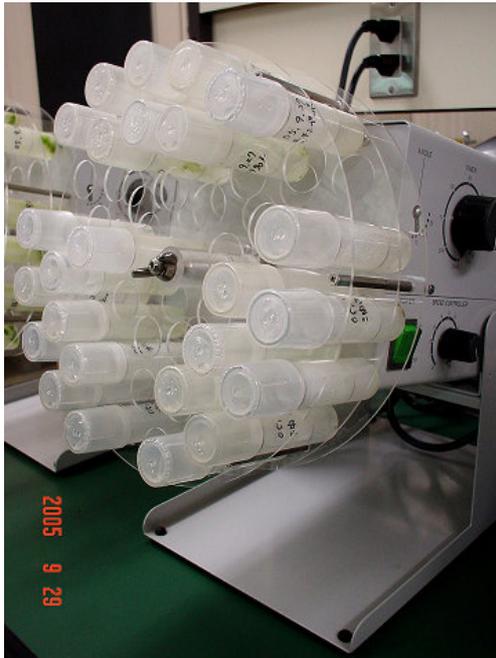
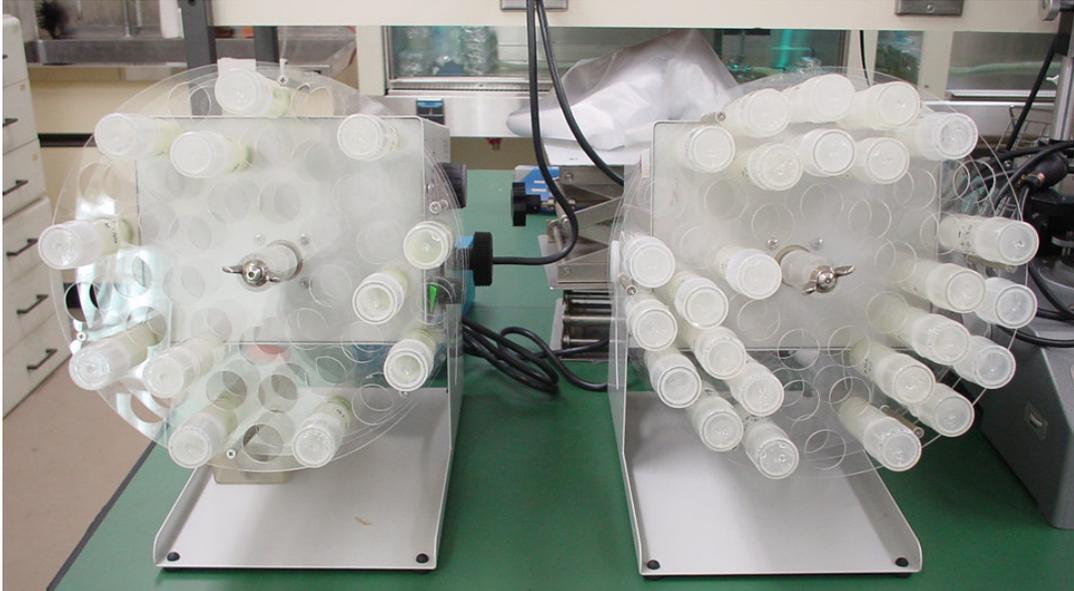


Fig. 3-2. BIOSPIN MBS-1

Table 2-2. Average of protonema covered ratio

culture days	protonema covered ratio	
	sugar-free medium	add 1%-sucrose medium
8 days	20.8%	31.1%
10 days	26.0%	35.5%
14 days	35.3%	45.8%
1 month	66.2%	94.1%

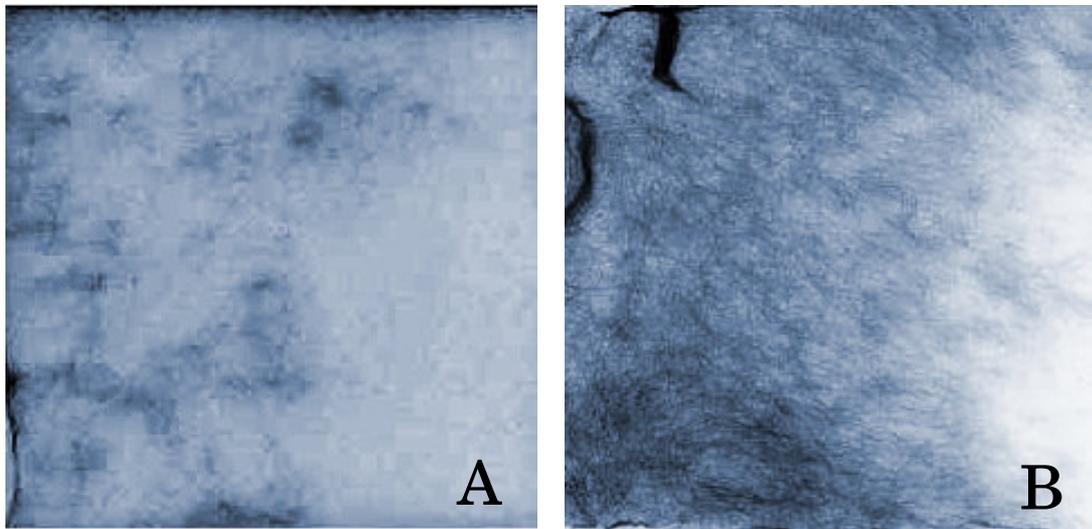


Fig. 3-3. Protonema growth on sheets one month after inoculation.
A: sugar-free medium, B: medium supplemented with 1% sucrose

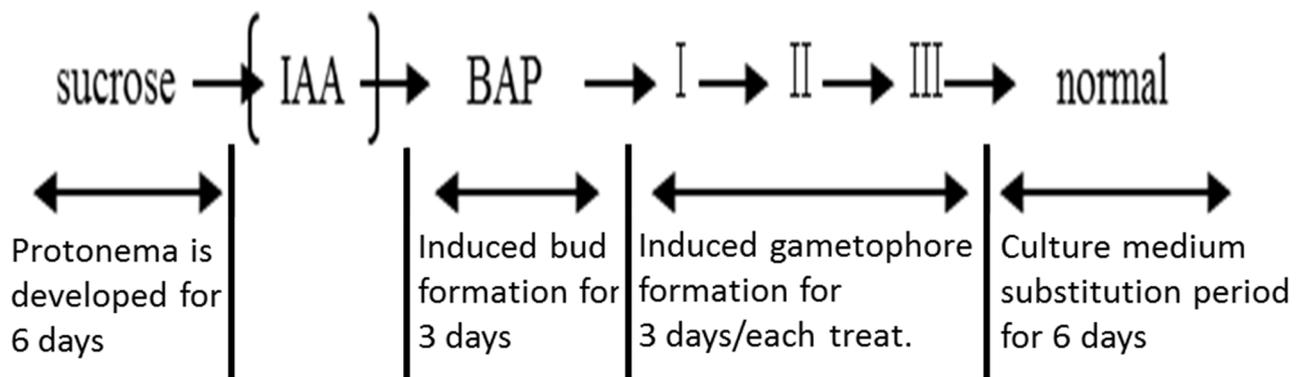


Fig. 3-4. Processing order of plant hormones (outline)

I , II , III is plant hormone, respectively.

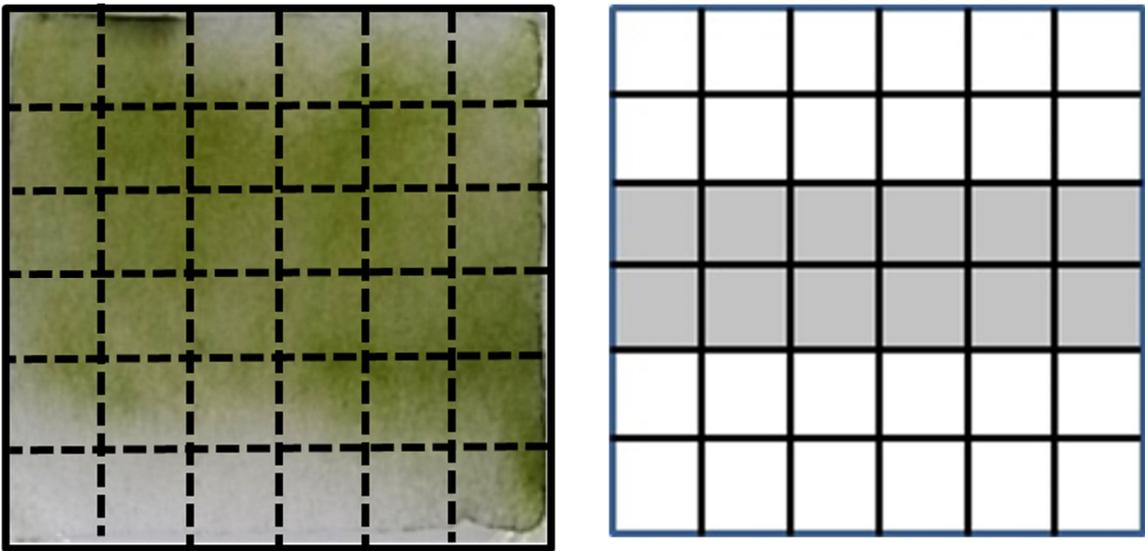


Fig. 3-6. Method of cutting a protonema sheet

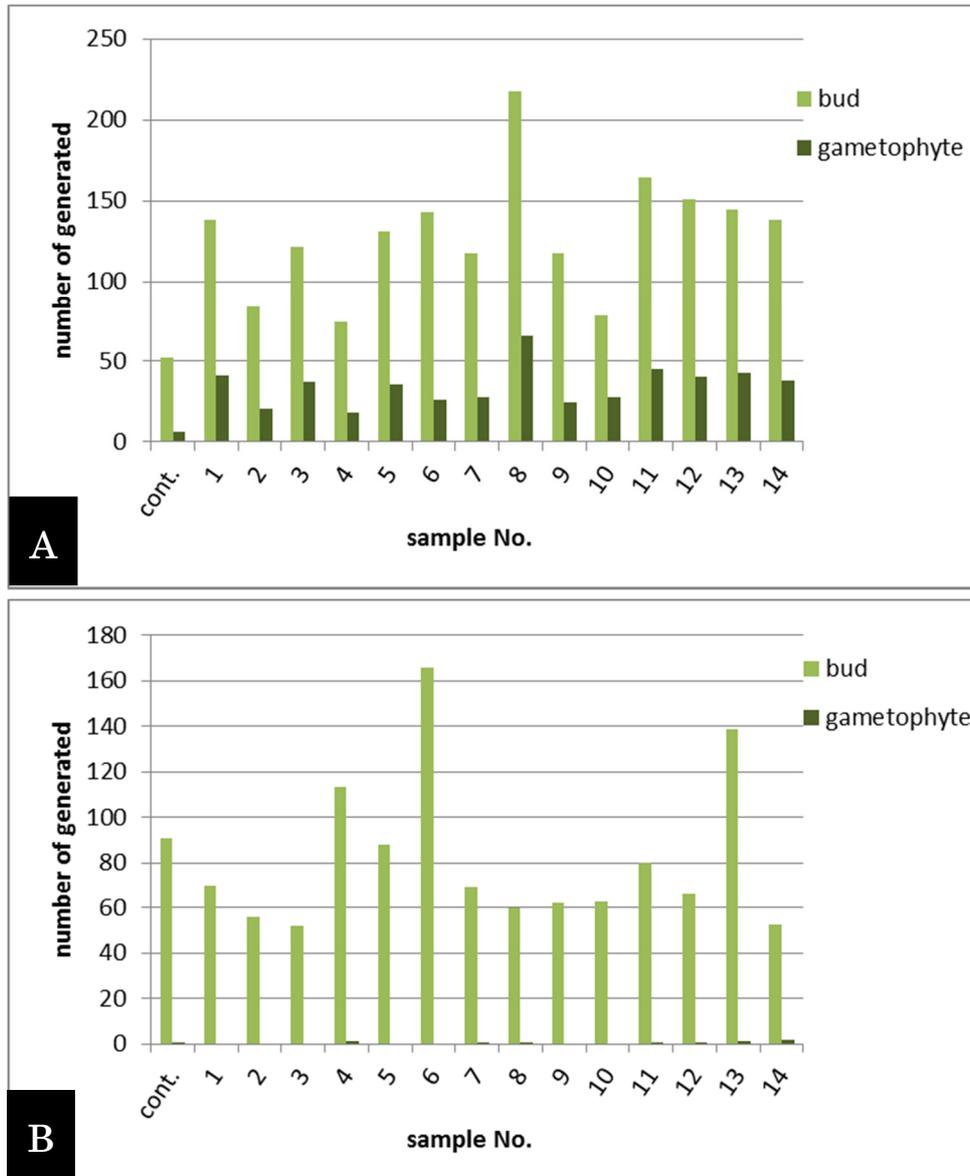


Fig. 3-7. Mean number of buds and gametophyte per 1 cm² protonema sheet. Each sample No. is indicate biotynthetic pathway of plant hormones in Fig. 3-5.

A: sealed with surgical tape, B: sealed with parafilm.

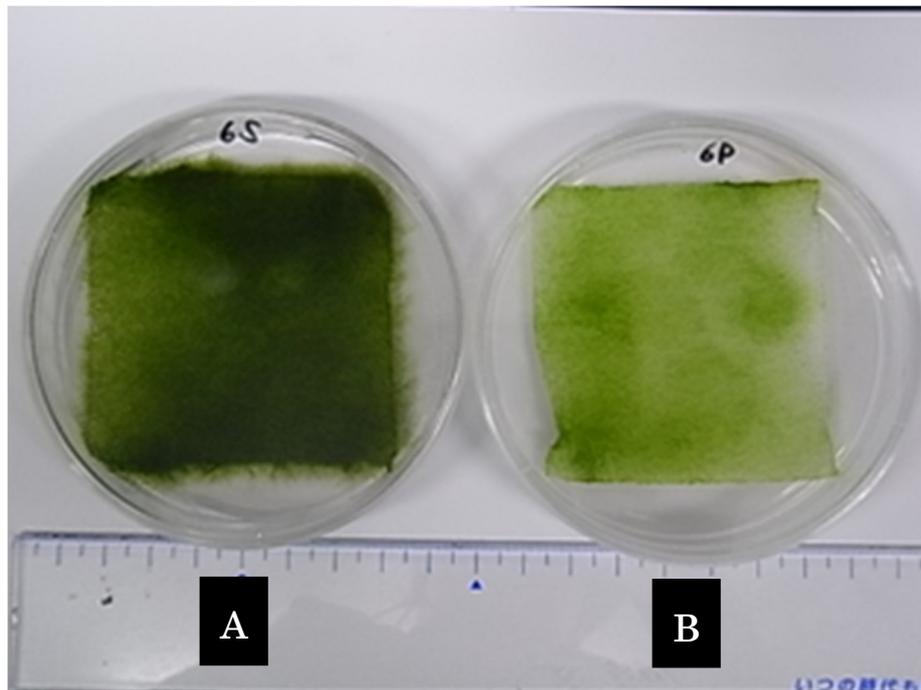


Fig. 3-8. Result of prepare the moss protonema sheets.

A: sealed with surgical tape, B: sealed with parafilm

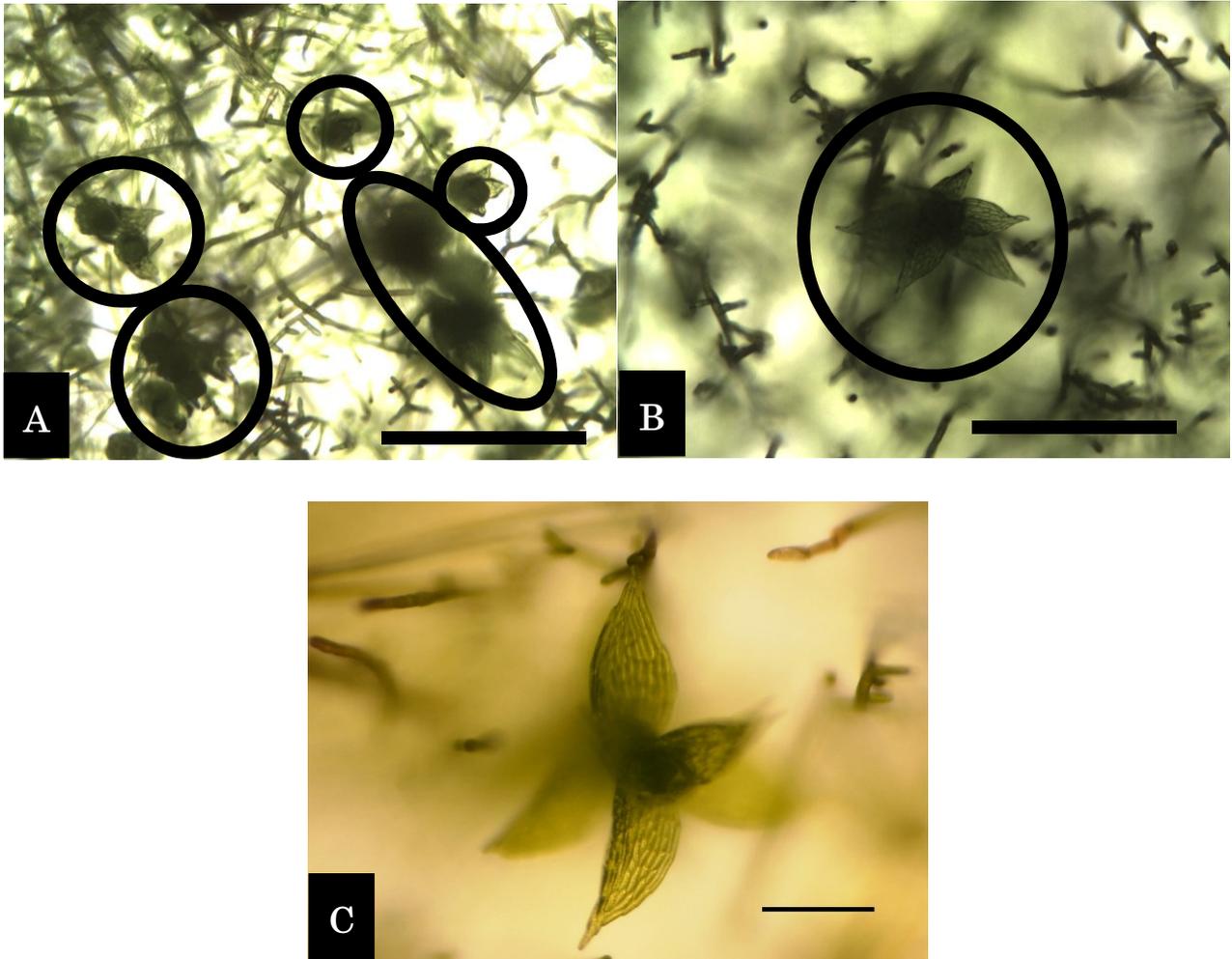


Fig. 3-9. Pictures of gametophore on the moss sheet

A & B: scale bar = 600 μm , C: scale bar = 200 μm .

第四章 総合考察

第一部において、マンニトール添加培地、スクロース添加培地、**sugar-free** 培地の3種の培地では分枝頻度にばらつきがあると考えられた。コケ原糸体を液体通気培養にて大量培養した時、**sugar-free** 培地と比べて収量に明らかな違いが見られた。これはスクロースを添加したことで、得られた原糸体断片の分枝数が多かったということに関係があるのか、また何故スクロース添加培地で液体通気培養した原糸体は側枝が多いのか、さらに調べる必要がある。

今回の結果では、シート作成時におけるホルモン処理の各条件に明白な差は見られなかった。そのため、茎葉体誘導条件を決定することができなかった。しかし、同じホルモン処理条件で培養していても芽から生長しなかった茎葉体が、原糸体を乾燥状態に曝すことで芽から茎葉体への生長が増加した。これにより、乾燥処理が芽から茎葉体への生長には影響していることが示されたが、その理由は分かっていない。そのためコケ原糸体の乾燥に対する影響をさらに調べる必要がある。また、サージカルテープで封をした場合、通常培地表面に沿って水平方向にしか生長しない原糸体が培地に対して垂直方向にも生長をし、原糸体密度がさらに高くなった。このことから、コケ原糸体の生長に“乾燥ストレス”が与える影響というのがとても大きいということがうかがえる。

緒言でも述べたが、コケ植物における植物ホルモンの生理作用、合成経路などはまだ分かっていないところが多い。また、報告があるものに対しても全ての種に当てはまるかどうか分からない状態である。本研究では、すでに報告されている生理作用を参考にホルモンの処理の順序を考えたが、それぞれの植物ホルモンがどのような影響を及ぼすのか、一度ケヘチマゴケ原糸体で確認しておく必要がある。

コケ緑化シートの完成には大きく近づいた。原糸体シートの成形だけであれば2週間前後で可能となった。しかしその一方で、コケの生理作用などについて多くの疑問が残されている。この疑問を解くことで、さらなるコケ緑化シートの短期間生産が可能になると考える。

参考文献

- 秋山弘之 編/著, 畦浩二 著, 福田恵 著, 西村直樹 著, 本郷順子 著, 南佳典 著, 伊村智 著, 上野健 著, 山口富美夫 著 (2002)コケの手帳 (のぎへんのほん) . 件成社
- Basile, A., A. E. Cogoni, P. Bassi, E. Fabrizi, S. Sorbo, S. Giordano, R. Castaldo Cobianchi (2001). Accumulation of Pb and Zn in gametophytes and sporophytes of the moss *Funaria hygrometrica* (Funariales). *Ann. Bot.* 87: 537–543.
- Bhyan, S. B., A. Minami, Y. Kaneko, S. Suzuki, K. Arakawa, Y. Sakata, D. Takezawa (2012). Cold acclimation in the moss *Physcomitrella patens* involves abscisic acid-dependent signaling. *J. Plant Physiol.* 169: 137–145.
- Bose, G., P. Schwille & T. Lamparter (2004). The mobility of phytochrome within protonemal tip cells of the moss *Ceratodon purpureus*, monitored by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 87(3): 2013–2021.
- Brandes, H. & H. Kende (1968). Studies on cytokinin-controlled bud formation in moss protonemata. *Plant Physiol.* 43: 827-837.
- Christianson, M. L. (1998). The quantitative response to cytokinin in the moss *Funaria hygrometrica* does not reflect differential sensitivity of initial target cells. *American J. Bot.* 85(1): 144–148.
- Christianson, M. L. (2000). ABA prevents the second cytokinin-mediated event during the induction of shoot buds in the moss *Funaria hygrometrica*. *American J. Bot.* 87(10): 1540–1545.
- Christianson, M. L. & J. S. Hornbuckle (1999). Phenylurea cytokinins assayed for induction of shoot buds in the moss *Funaria hygrometrica*. *Amer. J. Bot.* 86(11): 1645-1648.
- Crum, H (2001). Structural diversity of bryophytes. The university of Michigan herbarium ann arbor.

- Decker, E. L., W. Frank, E. Sarnighausen & R. Reski (2006). Moss systems biology en route: Phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biol.* 8: 1-9.
- 独立行政法人 理化学研究所 (2011). コケ植物でグリーンイノベーションを実現する. *RIKEN NEWS.* 355: 12-14.
- Dhakal, S & K. Hanaki (2002). Improvement of urban thermal environment by managing heat discharge sources and surface modification in Tokyo. *Energy and Buildings.* 34: 13-23.
- Doonan, J. H., D. J. Cove, F. M. K. Corke and C. W. Lloyd (1987). Pre-prophase band of microtubules, absent from tip-growing moss filaments, arises in leafy shoots during transition to intercalary growth. *Cytoskeleton* 7(2):138-153.
- Donnelly, D. J. & W. E. Vidaver (1984). Pigment content and gas exchange of red raspberry in vitro and ex vitro. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 177-181.
- Erichsen, U., B. Knoop & M. Bopp (1978). Uptake, transport and metabolism of cytokinin in moss protonema. *Plant Cell Physiol.* 19(5): 839-850.
- 船瀬俊介 著 (2003). 「屋上緑化」完全ガイド. 築地書館.
- Gibson, S. I. (2004). Sugar and phytochrome response pathways: navigating a signaling network. *J. Exp. Bot.* 55: 253-264.
- Glime, J. M (2007). Chapter 5-3 Ecophysiology of development: protonema. *Bryophyte Ecology vol. 1 Physiological Ecology.* Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. Accessed on April 2013.
- Gorton, B. S. & R. E. Eakin (1957). Development of the gametophyte in the moss, *Tortella caespitosa*. *Bot. Gaz.* 119: 31-38.
- Gmborg, O. L. & J. P. Shyluk (1981). Nutrition, Media, and Characteristics of Plant Cell and Tissue Cultures. In T. A. Thorpe (ed.), *Plant Tissue Culture; Methods and*

Application in Agriculture: 21–44. Academic Press, London.

- Graham, L. E. 著, 渡邊信, 堀輝三 共訳 (1996). 陸上植物の起源 緑藻から緑色植物へ. 株式会社 内田老鶴圃
- Grima, E. M., E. -H. Belarbi, F. G. A. Fernandez, A. R. Medina, Y. Chisti (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*. 20: 491–515.
- Hassid, W. Z. & E. W. Putman (1950). Transformation of sugars in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 1: 109–124.
- Hohe, A. & R. Reski (2002). Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. *Plant Sci*. 163: 69–74.
- 井上浩 著 (1962). コケ類 研究と採集・培養. 加島書店
- 井上浩 解説・写真 (1986). フィールド図鑑 コケ. 東海大学出版会
- Iwasa, K. (1965). Chemical control of morphogenesis in moss protonema. *Plant Cell Physiol*. 6: 421-429.
- 岩月善之助 編 (2001). 日本の野生植物 <コケ>. 平凡社
- 小柴共一, 神谷勇治, 勝見允行 編, 植物ホルモンの分子細胞生物学 成長・分化・環境応答の制御機構, 講談社サイエンティフィク.
- Kumar, R. & S. C. Kaushik (2005). Performance evaluation of green roof and shading for thermal protection of buildings. *Building and Environment*. 40: 1505–1511.
- Lazzarin, R. M., F. Castellotti, F. Busato (2005). Experimental measurements and numerical modelling of a green roof. *Energy and Buildings*. 37: 1260–1267.
- Luning, K. & S. Pang (2003). Mass cultivation of seaweeds: current aspects and approaches. *J. Appl. Phycol*. 15: 115–119.
- Mentens, J., D. Raes, M. Hermy (2006). Green roofs as a tool for solving the

rainwater runoff problem in the urbanized 21st century?. *Landscape and urban Planning*. 77 (3): 217–226.

- Mishler B. D. & M. J. Oliver (2009). Chapter 1 Putting *Physcomitrella patens* on the tree of life: The evolution and ecology of mosses. *Annual Plant Reviews*. 36: 1-15.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 25: 135–166.
- Nebel, B. J. & A. W. Naylor (1968). Initiation and development of shoot-buds from protonemata in the moss *Physcomitrium turbinatum*. *Amer. J. Bot.* 55(1): 33-37.
- Niachou, A., K. Papakonstantinou, M. Santamouris, A. Tsangrassoulis, G. Mihalakakou (2001). Analysis of the green roof thermal properties and investigation of its energy performance. *Energy and Buildings*. 33: 719–729.
- Noguchi, A. & H. Furuta (1956). Germination of spores and regeneration of leaves of *Merceya ligulata* and *M. gedeana*. *J. Hattori Bot. Lab.* 17: 32-44.
- Nonomura, A., M. Kitahara, T. Masuda (2009). Impact of land use and cover changes on the ambient temperature in a middle scale city, Takamatsu, in Southwest Japan. *J. Environ. Manag.* 90 (11): 3297–3304.
- Onmura, S., M. Matsumoto, S. Hokoi (2001). Study on evaporative cooling effect of roof lawn gardens. *Energy and Buildings*. 33: 653–666.
- Pang, S. J. & K. Luning (2006). Tank cultivation of the red alga *Palmaria palmate*: Year-round induction of tetrasporangia, tetraspore release in darkness and mass cultivation of vegetative thalli. *Aquaculture*. 252: 20–30.
- Panigrahi, K. C., M. Panigrahy, M. Vervliet-Scheebaum, D. Lang, R. Reski, M. M. Johri (2009). Auxin-binding proteins without KDEL sequence in the moss *Funaria hygrometrica*. *Plant Cell Rep.* 28(11): 1747–1758.
- Park, S. Y., J. K. Ahn, W. Y. Lee, H. N. Murthy, K. Y. Paek (2005). Mass production of

Eleutherococcus koreanum plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. *Plant Sci.* 168: 1221–1225.

- Park, J. E. & H. Murase (2011). Optimal environmental condition for moss production in plant factory system. Preprints of the 18th IFAC world congress. 18 (1): 621–626.
- Rensing, S. A., D. Lang, A. D. Zimmer, A. Terr, A. Salamov, H. Shapiro, T. Nishiyama, P. F. Perroud, E. A. Lindquist, Y. Kamisugi, T. Tanahashi, K. Sakakibara, T. Fujita, K. Oishi, T. Shin-I, Y. Kuroki, A. Toyoda, Y. Suzuki, S. Hashimoto, K. Yamaguchi, S. Sugano, Y. Kohara, A. Fujiyama, A. Anterola, S. Aoki, N. Ashton, W. B. Barbazuk, E. Barker, J. L. Bennetzen, R. Blankenship, S. H. Cho, S. K. Dutcher, M. Estelle, J. A. Fawcett, H. Gundlach, K. Hanada, A. Heyl, K. A. Hicks, J. Hughes, M. Lohr, K. Mayer, A. Melkozernov, T. Murata, D. R. Nelson, B. Pils, M. Prigge, B. Reiss, T. Renner, S. Rombauts, P. J. Rushton, A. Sanderfoot, G. Schween, S. H. Shiu, K. Stueber, F. L. Theodoulou, H. Tu, Y. V. Peer, P. J. Verrier, E. Waters, A. Wood, L. Yang, D. Cove, A. C. Cuming, M. Hasebe, S. Lucas, B. D. Mishler, R. Reski, I. V. Grigoriev, R. S. Quatrano, J. L. Boore (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64–69.
- Reski, R. (1998). Development, genetics and molecular biology of mosses. *Bot. Acta* 111: 1-15
- Rolland, F., E. Baena-Gonzalez & J. Sheen (2006). Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57: 675–709.
- Sabovljevic, A., M. Sabovljevic, D. Grubisic & R. Konjevic (2005). The effect of sugars on development of two moss species (*Bryum Argenteum* and *Atrichum undulatum*) during *in vitro* culture. *Belg. J. Bot.* 138 (1): 79–84.

- 斎藤一雄 著 (1979). 緑化土木 環境系の形成技術として. 森北出版株式会社
- Schumaker, K. S. & M. A. Dietrich (1997). Programmed changes in form during moss development. *The Plant Cell* vol. 9: 1099-1107.
- Schumaker, K. S. & M. A. Dietrich (1998). Hormone-induced signaling during moss development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 501-523.
- Spiess, L. D. (1976). Developmental effects of zeatin, ribosyl-zeatin, and *Agrobacterium tumefaciens* B₆ on certain mosses. *Plant Physiol.* 58(1): 107-109.
- Sudharsan, C., M. AboEl-Nil, J. Hussain (2003). Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants. *J. Arid Environ.* 54: 133-147.
- Tani, A., Y. Takai, I. Suzukawa, M. Akita, H. Murase, K. Kimbara (2012). Practical application of methanol-mediated mutualistic symbiosis between *Methylobacterium* species and a roof greening moss, *Racomitrium japonicum*. *PLoS One.* 7(3): e33800.
- Villarreal, E. L. & L. Bengtsson (2005). Response of a *Sedum* green-roof to individual rain events. *Ecological Engineering.* 25: 1-7.
- Wong, N. H., D. K. W. Cheong, H. Yan, J. Soh, C. L. Ong, A. Sia (2003). The effects of rooftop garden on energy consumption of a commercial building in Singapore. *Energy and Buildings.* 35: 353-364.
- Wong, N. H. & C. Yu (2005). Study of green areas and urban heat island in a tropical city. *Habitat International.* 29 (3): 547-558.
- Yoshida, K. & K. Yamamoto (1982). The position of bud differentiation on protonema of the moss, *Physcomitrium sphaericum*. *Plant Cell Physiol.* 23(5): 737-743.
- Yoshida, K. & K. Yamamoto (1985). The effect of ageing on bud differentiation in the moss, *Physcomitrium sphaericum*. *Plant Cell Physiol.* 26(8): 1549-1555.
- 財団法人 都市緑化技術開発機構 特殊緑化共同研究会 編 (2003). 知っておきたい 屋上緑化の Q & A. 鹿島出版会

謝辞

本研究は、長岡技術科学大学大学院 工学研究科 博士後期課程 生物統合工学専攻 高原研究室において行われた。

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました高原美規准教授に感謝の意を表します。

さらに、論文の原稿執筆にあたり終始適切なお助言を賜り、また丁寧に指導して下さいました秋山弘之博士（兵庫県立大学／兵庫県人と自然の博物館）に深く感謝いたします。また、論文投稿に際したくさんのアドバイスをいただきました日本蘚苔類学会 編集幹事 有川智己博士にもこの場をお借りし、厚くお礼申し上げます。

大学生活の大半を過ごした応用植物工学研究室の先輩、同輩、後輩の皆さんとは楽しい時間の共有と共に、辛いときには様々な面で助け合い、長岡での生活に欠かすことのできない存在でした。特に、同じ博士後期課程の学生として研究から息抜きまで長い時間を過ごし、支えてくれた田中啓介さんと榎真一さんには心から感謝いたします。

長い学生生活をいつも応援し支えてくれており、うまくいかずに機嫌が悪くてもいつも見守ってくれた父、母、妹、そして弟に心から感謝し、今後の活躍に期待してもらえたら幸いです。

最後になりましたが、主査を引き受けていただきました古川清教授には大変ご迷惑をおかけしましたが、最後まで本当にありがとうございました。また、学位審査をしていただきます先生方に、厚くお礼申し上げます。