

ホンモンジゴケ (*Scopelophila cataractae*) が銅イオン下で生息するメカニズム

湯原 颯汰

大阪府立大手前高等学校

要旨

ホンモンジゴケ (*Scopelophila cataractae*) は銅ゴケの一種として知られている。このゴケを若山神社 (大阪府島本町) 本殿の銅葺き屋根の下で採取し、光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡を用いて形態的特徴を観察した。また、走査電子顕微鏡に装着されたEDXにより元素分布を調べた。その結果、ホンモンジゴケは特異的にS、Fe、Cuを保持していることが明らかになった。ホンモンジゴケに脱ベクチン処理を行うと、Fe、Cuのシグナルはほとんど見られなくなった。また各種元素のマッピングを行うと、Cは細胞壁の存在する所に分布するが、Cuは細胞壁のみならず、細胞内と思われる所にも存在した。Cuイオンは細胞壁中のベクチンによって保持されているとともに、細胞内にも存在して何らかの重要な役割を果たしているものと思われた。

重要語句: EDX, ホンモンジゴケ, 銅イオン

序論

ホンモンジゴケは、1910年に池上本門寺で発見されたことから、その寺社の名前にちなんで命名された。神社仏閣の銅葺き屋根の下では銅イオン濃度が高く、植物の生育には不向きな環境だが、ホンモンジゴケはこのような環境で生育する。このようなゴケを銅ゴケと呼ぶ。本研究では、ホンモンジゴケがどのようなメカニズムにより銅イオン濃度の高い場所で生育できるのかを明らかにするため、光学顕微鏡 (LM) や電界放射形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) で形態観察、ならびにエネルギー分散型X線分析装置 (EDX) で元素分布を調べた。

試料と方法

試料の採取

2017年6月18日に大阪府三島郡島本町の若山神社境内でホンモンジゴケ (*Scopelophila cataractae*) を採取した。その後京都大学に持ち帰り、剃刀で茎と葉に分けてそれ

ぞれ3%グルタルアルデヒド・1/15Mリン酸緩衝液を用いて固定した。比較のために、京都大学フィールド科学教育研究センター北白川試験地に生育するタチゴケ (*Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv.) を採取し、同様に固定した。

LM用試料の作製と観察

3%グルタルアルデヒドで固定し、リン酸緩衝液で洗浄された試料をエタノールシリーズで脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。

包埋試料より、ガラスナイフを用いて1 μm の厚さの切片を作製し、免疫標識に用いた。

抗体を用いた細胞壁多糖類の免疫標識

作製された切片に対し、多糖類に対する4種類の抗体、BGM C6 (グルコマンナンを認識)、LM11 (キシランを認識)、JIM5 (メチルエステル化されたホモガラクトツロナンやエステル化されていないホモガラクトツロナンを認識)、JIM7 (メチルエステル化されたホモガラクトツロナンを認識) を用い、4°Cで2日間反応させた。洗浄後に、Alexa Fluor 488 標識された二次抗体で35°C、2時間反応させた。その後、蛍光顕微鏡で観察をした。



図1. 若山神社本殿銅葺き屋根の軒下に生育していたホンモンジゴケ

SEM及びEDX用試料の作製と観察

3%グルタルアルデヒドで固定され、リン酸緩衝液で洗浄された試料を、エタノールシリーズで脱水した。その後、*t*-ブタノールで置換し、液体窒素で凍結させた。凍結試料は、凍結乾燥機を用いて乾燥させた後、導電テープと導電ペーストを用いてFE-SEM用試料台(スタブ)に載せた。その後イオンパタリング装置(HITACHI E-1045)を用いて、白金をコーティングし、EDX装置(Genesis XM2)が装着されたFE-SEM(HITACHI S-4800)を用いて微細構造を観察するとともに、試料中の元素分布を調べた。

脱ペクチン及び脱ヘミセルロース処理

3%グルタルアルデヒドで固定されリン酸緩衝液で洗浄された試料を、脱ペクチン処理として80°Cに保った0.25%シュウ酸アンモニウム水溶液に6時間浸した。脱ペクチン処理した試料の一部をさらに室温で24%水酸化カリウム水溶液に1日浸して、ヘミセルロースを抽出した。これらの試料は、凍結乾燥後にスタブに載せ、白金をコーティングしてFE-SEMで観察するとともに、EDXで元素分布を調べた。



図2. ホンモンジゴケの葉のLM像

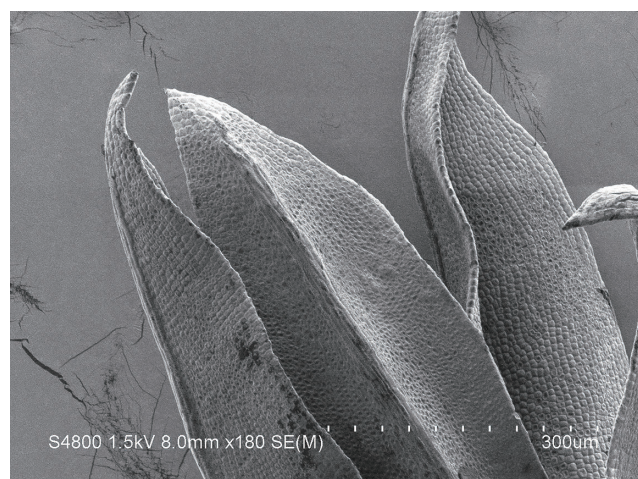


図3. ホンモンジゴケの葉のFE-SEM像

結果

ホンモンジゴケの外観、葉の構造

図1は、銅葺き屋根を持つ若山神社本殿の軒下に生育していたホンモンジゴケである。このゴケはビロード状の外観を示し、ルーペで観察した所、仮根、茎、葉の3つの部分からなっていることが確認できた。

図2は、葉のLM写真である。葉では、直径20 μm程度の葉肉細胞が寄せ集まり、1層構造になっていることが確認できた。図3にFE-SEMで撮影した葉を示している。LM観察と同様に、葉は1層の葉肉細胞で構成されていた。

ホンモンジゴケ細胞壁の免疫標識

図4にBGM C6で免疫標識されたホンモンジゴケの茎と葉の断面の写真を示す。茎、葉の細胞壁は、いずれもBGM C6で標識された。一方、LM11, JIM5, JIM7では標識が認められなかった。

EDXでの元素解析

EDXを用いてホンモンジゴケ中に含まれる元素分析を行った結果、C, O, Na, Al, P, S, Si, K, Ca, Fe, Cu, Ptが検出された(図5)。一方、タチゴケでは、C, O, Al, P, K, Ca, Ptが検出された(図6)。

図7に、各元素の分布を調べた部位のFE-SEM像と、各元素のマッピング結果を示す。EDX分析ではFE-SEMの加速電圧を25 kVにするため、左上の部位は電子線照射に伴う細胞壁の破壊が生じていた。Cの分布は細胞壁の存在する部位に相当しており、電子線によって破壊された細胞壁部分にはCのシグナルが認められない。一方、Cuは試料全域からシグナルが確認でき、細胞壁が破壊された部分では細胞壁部分に比べやや強いシグナルが認められた。Sは試料表面全域からシグナルが観察され、Fe

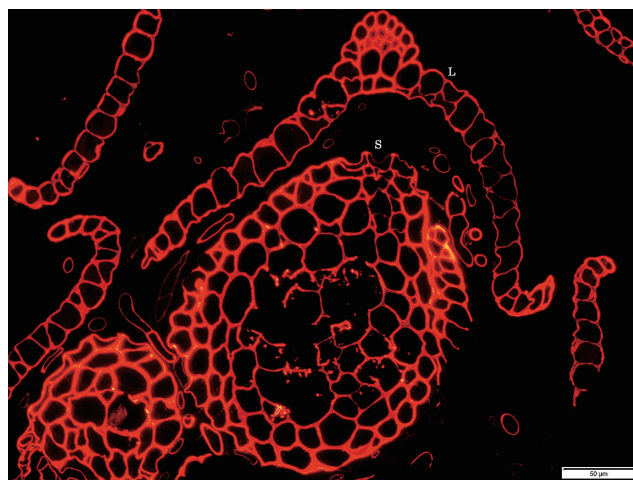


図4. ホンモンジゴケの茎と葉がBGM C6で標識された蛍光顕微鏡像。標識はグルコマンナンの局在を示す。L:葉, S:茎

は所々で線状に強いシグナルが観察された。

脱ペクチン処理の影響

図8に、脱ペクチン処理されたホンモンジゴケの元素分析を行った結果を示す。脱ペクチン処理により、K, Fe, Cuがほとんど消失していた。

考察

ホンモンジゴケは、他の藓類と同様に、葉は葉肉細胞が集合して1層構造になっていることを確認した。免疫標識の結果は、細胞壁にはグルコマンナンが含まれ、LM11で標識されるキシランは存在しないことを示している。また、JIM5やJIM7では標識が現れないことから、メチルエステル化されたホモガラクトロナン、エステル化されていないホモガラクトロナンは存在せず、高等植物とは異なる化学構造を持ったペクチンの存在を示唆している。

EDXによるホンモンジゴケ、タチゴケの元素分析の結果は、両者にC, O, Al, P, K, Ca, Ptが検出された。C, Oは細胞壁を構成する元素、Alは試料台、Ptはコーティング金属に由来すると考えられる。Na, K, Pは、本研

究に用いた緩衝液に含まれており、試料中に残存していたものと考えられる。またSiは土壌由来の可能性が高い。従って、ホンモンジゴケに含まれる特有な元素はS, Fe, Cuである。

Cのマッピング結果と走査電子顕微鏡像の比較により、Cのシグナルが細胞壁由来であることが認められる。一方、Cuのシグナルは細胞壁とともに細胞壁が破壊されている部分にも現れ、後者のシグナルがやや強く検出された。この結果は、Cuが細胞壁中に保持されているとともに、細胞質中にも存在していることを示唆している。ホンモンジゴケ原糸体を用いた培養実験⁽¹⁾では、0.2 mMのCuSO₄を含む培地で育てると、ホンモンジゴケに取り込まれたCuのうち、43%が細胞壁に取り込まれていることが示されている。本研究の結果は、これを支持する結果と考えられる。ホンモンジゴケを脱ペクチン処理しEDXで元素分析を行うと、CuやFeのシグナルがほとんど検出されなかったことから、CuやFeはペクチンによって細胞壁中に保持されている可能性がある。しかしながら、ホンモンジゴケの細胞壁はJIM5やJIM7で標識されなかったことから、ホンモンジゴケのペクチンは高等植物のそれとは異なる化学構造であることを示唆する。

ホンモンジゴケ原糸体における銅添加の影響を調べた

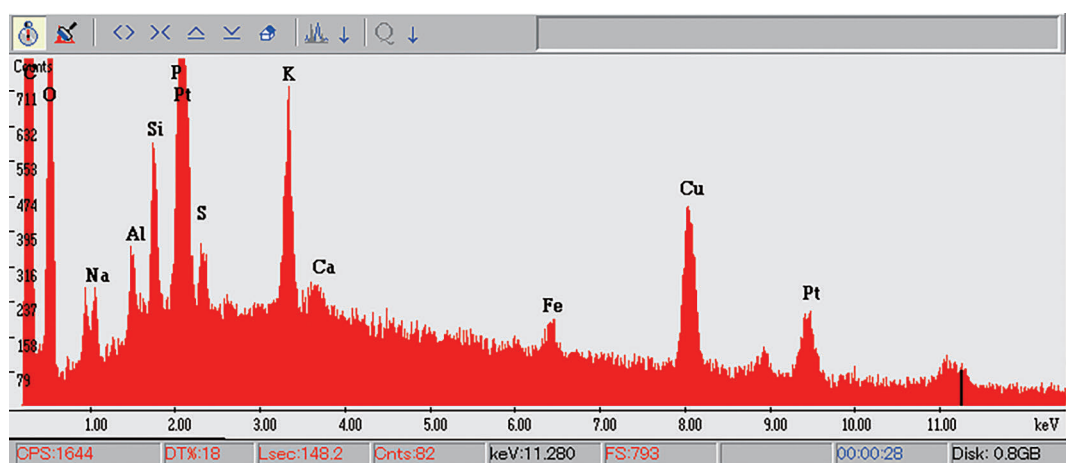


図5. ホンモンジゴケの葉のEDX分析

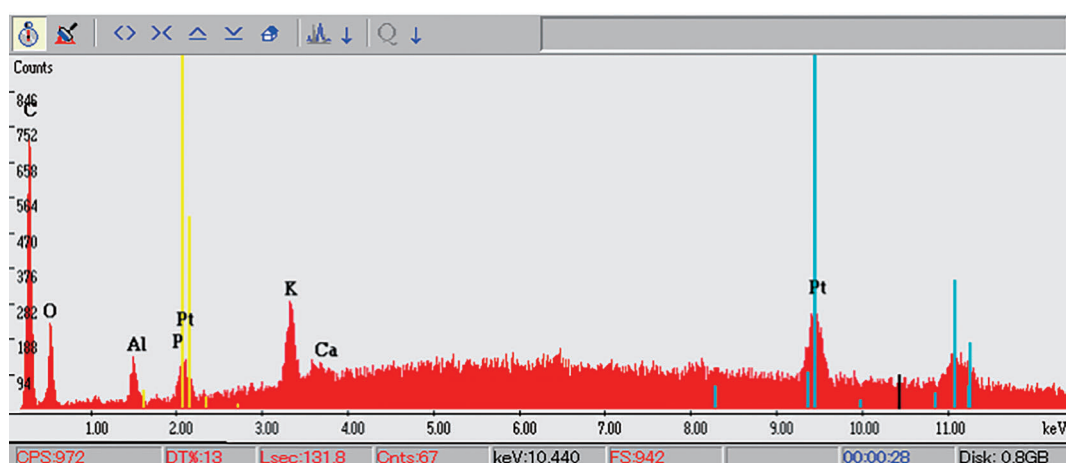


図6. タチゴケの葉のEDX分析

研究⁽²⁾では、銅無添加条件では無性芽形成が促進され、銅添加条件では原糸体の成長が促進され、無性芽形成が抑制された。このことは、Cuが細胞内でオーキシンのシグナリングを仲介し、細胞分化に影響を与えていることを示すものと報告されている。本研究ではホンモンジゴケの細胞内にもCuのシグナルが観察されており、何らか

の機能を果たしているものと推察される。

Feは局所的に線状に強いシグナルが認められ、このことからFeは細胞壁の特定部位に保持されている可能性がある。Sは試料全域から検出されているが、その存在理由は不明である。

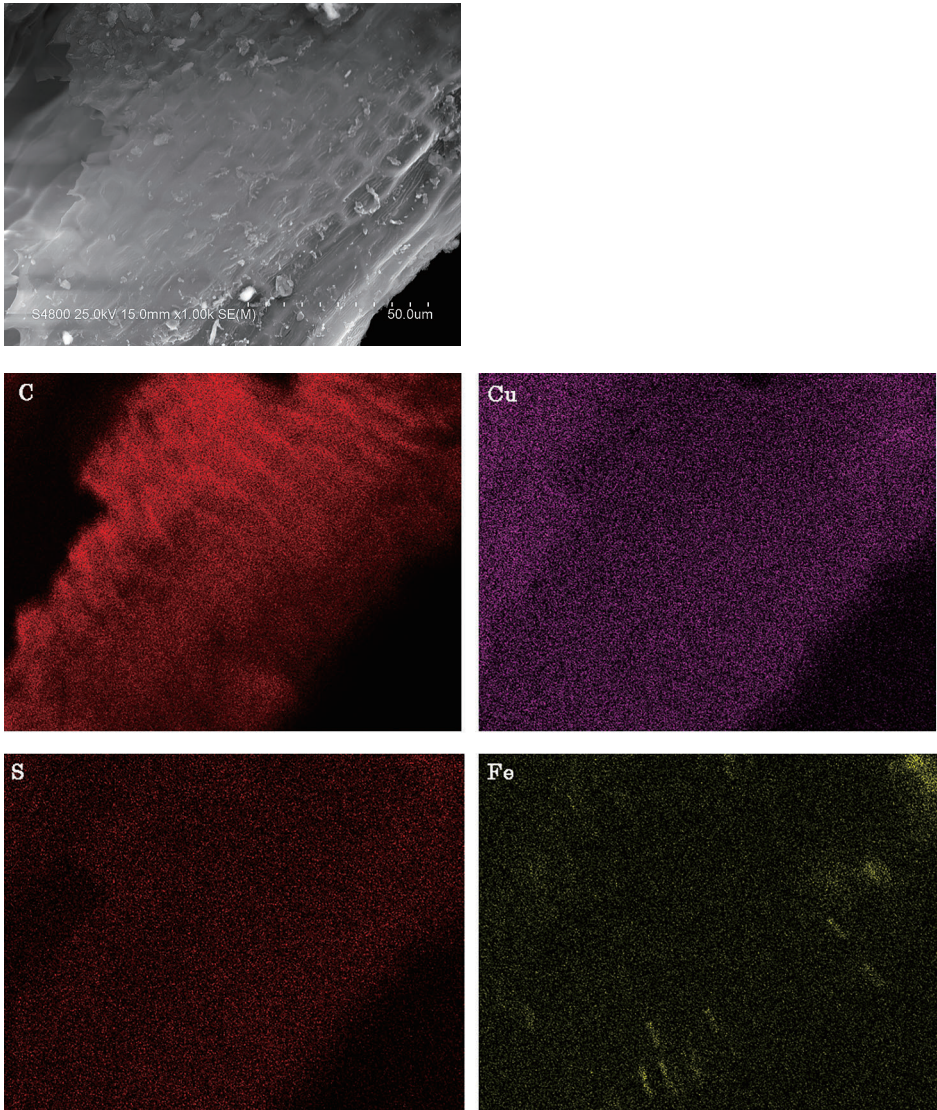


図7. ホンモンジゴケの葉のFE-SEM像とEDXによる元素のマッピング

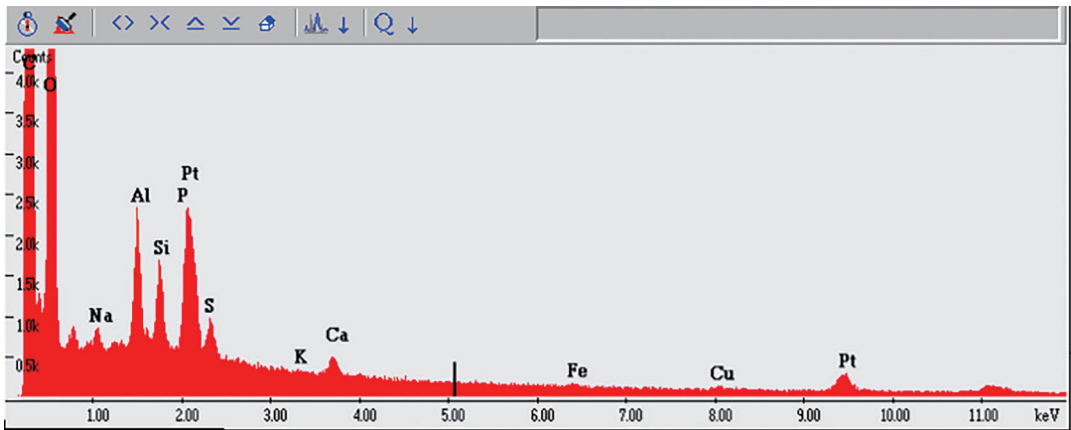


図8. 脱ペクチン処理されたホンモンジゴケの葉のEDX分析

謝辞

本研究を進めるにあたり，樹木細胞学分野の高部圭司教授，院生の皆さんにご指導いただきました。ありがとうございました。

また本研究は科学技術振興機構（JST）のグローバルサイエンスキャンパスに採択された京都大学実施「科学体系と創造性がクロスする知的卓越人材育成プログラム略称ELCAS（エルキャス）」の支援を受けている。

参考文献

- 1) Konno, H., Nakashima, S. & Katoh, K. Metal-tolerant moss *Scopelophila cataractae* accumulate copper in the cell wall pectin of the protonema. J Plant Physiol 167, 358-364 (2010).
- 2) Nomura, T. et al. Copper mediates auxin signaling to control cell differentiation in the copper moss *Scopelophila cataractae*. J Experimental Bot 66, 1205-1213 (2015)

Survival mechanism of Honmonji moss (*Scopelophila cataractae*) in the presence of Cu ion

YUHARA SOTA

Osaka Prefectural Otemae Senior High School

Abstract

Honmonji moss (*Scopelophila cataractae*) is one of the so-called copper mosses. The moss growing under the roof made of copper sheets at Wakayama Shrine (Shimamoto-cho, Osaka, Japan) was collected and observed under an optical microscope and a scanning electron microscope equipped with an energy dispersive X-ray spectrometer (EDX). EDX analysis indicated that Honmonji moss specifically contained Cu, Fe, and S. Extraction of pectin caused the disappearance of Cu and Fe signals, suggesting that pectin is important in keeping Cu and Fe ions within the cell wall. Mapping of elements suggested that Cu was localized both in the cell wall and in the cell, though C was distributed only in the cell wall. Some of Cu ions are retained by pectin in the cell wall, and the other Cu ions may play an important role in the cell.

Key words: energy dispersive X-ray spectrometer (EDX), Honmonji moss, Cu ion