



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒメツリガネゴケ
Author(s)	青木, 摂之; 杉田, 護
Description	1章 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養 5
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 31-33
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39087
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-006.pdf



5. ヒメツリガネゴケ

青木 摂之¹⁾, 杉田 護²⁾

ヒメツリガネゴケは高効率な遺伝子ターゲティングの適用が可能なので、逆遺伝学のモデル植物として活用されている。このコケの入手と培養法について簡単にまとめる。

Physcomitrella patens

Setsuyuki Aoki, Mamoru Sugita

The moss *Physcomitrella patens* is an excellent model plant in the reverse genetics because high efficiency-gene targeting is applicable to this moss. Here we describe briefly how to obtain, grow and maintain the wild type and transformed strains of this moss.

5.1 ヒメツリガネゴケの由来と入手先について

国内外の多くのラボで実験植物として用いられているヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* の野生型株は、もともと Whitehouse 博士によりイギリスの Huntingdonshire, Gransden Wood で採取された株の子孫であり、1 個の胞子に由来するものである¹⁾。そのうちの 1 系統が Andrew Cuming 博士 (Leeds 大学) から基礎生物学研究所の長谷部光泰教授に贈られ、それが国内各地の研究者に広まった。その後、ゲノム解析にあたり、David Cove 博士が維持していた同由来の株から 1 個の胞子由来の株が再単離され、Gransden2004 と名付けられ、The U.S. Department of Energy Joint Genome Institute (JGI) での配列解析に用いられた。基礎生物学研究所など JGI 以外の研究室で作出された EST などは Gransden2004 以外のラインを用いているので、SNPs を含んでいる可能性がある。また、フランス由来の Villersexel K3 ライン (エコタイプではない) が遺伝的地図作成に用いられている²⁾。Gransden2004 ラインは造卵器造精子誘導の同調率が従来の系統に比べて悪く、胞子体形成率が低い (長谷部光泰教授; 私信による)。現在では、基礎生物学研究所、熊本大学、埼玉大学、東京大学、東京農業大学、名古屋大学、北海道大学など多くの機関のラボでヒメツリガネゴケを用いた研究が行われている。これから新たにヒメツリガネゴケを用いて研究を始めようという方は、該当する最寄りのラボに連絡してみるとよい。

1) 名古屋大学大学院情報科学研究科

2) 名古屋大学遺伝子実験施設

5.2 ヒメツリガネゴケの培養について

ヒメツリガネゴケの培養については、その他の実験方法とともに、長谷部教授のグループにより整備された綿密なプロトコルが WEB 上で公開されている³⁾。国内のおそらくほとんどのラボで、このプロトコルを各々のラボの諸事情に合わせて改変し、培養を行っていると思われる。ここではそのうちの一例として、青木研の例を簡単に紹介する。培地の名称などは長谷部研のプロトコルに準じた。

ヒメツリガネゴケの生活環は研究室の条件で 2~3 ヶ月で完結する。まず胞子が発芽し、先端成長と時折の分岐により平面的な原糸体 (プロトネマ) 組織が生じる。この原糸体に芽が生じ、葉と茎そして仮根を持つ立体的な茎葉体に分化する。次に茎葉体の先端に造精子器と造卵器ができ、受精が起こり、胞子嚢を持つ胞子体が生じる。各発生段階が実験・観察に用いられるが、細胞を多く得るためには、再生・分裂能力の高い原糸体がよく用いられる^{4,5)}。

コケ細胞は通常 25°C・連続明条件で培養する。照明の光強度は、白色蛍光灯 (TOSHIBA, FL20SS-W/18 など) にアルミホイルを巻くなどして約 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に調整している。

5.2.1 各種の培地

いったん安定な形質転換体を確立した後は、抗生物質なしで形質転換株を培養し続けても特に問題はない。ただし抗生物質入りの培地の上で培養すれば、耐性のない菌類や野生株の混入を防げるというメリットはある。培地は培養する細胞/組織の種類により異なり、原糸体は BCDAT 寒天培地あるいは BCDATG 寒天培地、茎葉体

は BCD 寒天培地，胞子は胞子発芽用寒天培地を用い培養する．それぞれの培地は主に濃縮したストック液を適量ずつ混ぜてつくる．ストック液は 4℃で保存する．表 1 にストック液の組成を示す．

[各培地の調整方法]

1. BCDAT 寒天培地：10 ml ずつのストック B，ストック C，ストック D，1 ml の Alternative TES，10 ml の Ammonium Tartrate ストック液（最終濃度：5 mM），20 ml の CaCl_2 ストック液（1 mM），8 g の寒天（0.8% [w/v]；SIGMA の A 9799 を用いている）に総量 1000 ml になるよう純水を加え，オートクレーブする（121℃，20 分間）．溶けた寒天培地をクリーンベンチ内でプラスチックシャーレに分注し，培地が固まったらシャーレの蓋を半分ほど開けて，クリーンベンチ内で送風しながら 20 分間ほど乾燥させる．室温で大きめのプラスチックのタッパ内で気密保存する．
2. BCDATG 寒天培地：BCDAT 培地と同じ量の各ストック液と寒天に 5 g のグルコース（最終濃度：5 g/l）を加える．これに総量 1000 ml になるよう純水を加える．この後は BCDAT 寒天培地と同様である．
3. BCD 寒天培地：10 ml ずつのストック B，ストック C，ストック D と，1 ml の Alternative TES，20 ml の CaCl_2 ストック液（1 mM），8 g の寒天に総量 1000 ml になるよう純水を加え，オートクレーブする（121℃，20 分間）．この後は BCDAT 寒天培地と同様である．

4. 胞子発芽用寒天培地：10 ml ずつのストック B，ストック C，ストック D と 1 ml の Alternative TES，10 ml の Ammonium Tartrate ストック液（最終濃度：5 mM），1.5 g の粉末 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，8 g の寒天に総量 1000 ml になるよう純水を加え，オートクレーブする（121℃，20 分間）．この後は BCDAT 寒天培地と同様である．

5.2.2 原糸体・茎葉体の植え継ぎ

原糸体は再生・分裂能力に優れるため，これを植え継ぎコケ細胞を大量に増やすことができる．以下の操作はクリーンベンチ内で無菌的に行い，器具等はあらかじめオートクレーブ滅菌しておく．BCDAT 寒天培地あるいは BCDATG 寒天培地にシャーレのサイズに丸く切った透明セロハン（松屋，MO-430）をピンセットを用いて敷く．試験管に 20 ml ほど滅菌水を入れ，そこにシャーレ 2，3 枚分の原糸体をピンセットで集めて入れる．この原糸体をホモジナイザー（NS-310E，マイクロテック・ニチオン）で約 10 秒間破碎する．破碎用シャフトは NS-4 あるいは NS-7 を用い，シャフト回転速度は 4～5 に設定する．セロハンを敷いた 6～10 枚の寒天培地に，破碎した細胞を 3 ml ずつ駒込ピペットで分注して，シャーレの蓋を閉めた後に菌の混入を防ぐためにサージカルテープを巻き，インキュベーターに移して培養する．通常の維持培養や形質転換用に細胞を増やすための培養においては，シャーレを数枚積み重ねても問題はない．これを 4 日から 1 週間に一度行う．なおグルコースの入った BCDATG 培地の方がコケの生育は良いが，枯れるのも早い．原糸体を培養してしばらく経つと芽ができ，そこから茎葉体が生じる．適当な大きさに育ったらピン

表 1：ストック溶液の調製法

ストック液	調製方法
ストック B 液（×100）	25 g の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ （最終濃度：0.1 mM）を総量 1000 ml になるよう純水に溶かす．
ストック C 液（×100）	25 g の KH_2PO_4 （最終濃度：1.84 mM）を KOH 水溶液（4 M）で pH 6.5 になるよう調整し，総量 1000 ml になるよう純水に溶かす．
ストック D 液（×100）	101 g の KNO_3 （最終濃度：1 M）と 1.25 g の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ （4.5 mM）を総量 1000 ml になるよう純水に溶かす．酸化して液が茶色く着色したら新しいものを調製して用いる．
Alternative TES ストック液（×1000）	55 mg の $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ （最終濃度：0.22 mM），614 mg の H_3BO_3 （10 mM），55 mg の $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ （0.23 mM），25 mg の $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （0.1 mM），55 mg の $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ （0.19 mM），389 mg の $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ （2 mM），28 mg の KI（0.17 mM）を総量 1000 ml になるよう純水に溶かす．
Ammonium Tartrate ストック液（×100）	92.05 g の Ammonium Tartrate（最終濃度：500 mM）を総量 1000 ml になるよう純水に溶かす．
CaCl_2 ストック液（×50）	7.35 g の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （最終濃度：50 mM）を総量 1000 ml になるよう純水に溶かし，オートクレーブで滅菌する（121℃，20 分間）．

セットでBCD寒天培地に移し、培養する。適量に増えたらピンセットで数本分ずつ採取し、新たなBCD寒天培地に植え継ぐ。

5.2.3 胞子の採取

上記の方法で原糸体を連続して10回以上植え継いでも生育などに問題は見られないが、長期にわたり栄養生殖を続けると突然変異が次第に蓄積する恐れがある。そこで時折胞子を発芽させ、「フレッシュ」な原糸体から新たに植え継ぎを開始させる。例えば形質転換には5、6回以上植え継いだものは使用しないようにする。

胞子を採取するためには、有性生殖を誘導し、胞子体を生じさせる必要がある。ヒメツリガネゴケの造精器と造卵器の発達は温度と日長に影響されることが知られる⁹⁾。よく葉の茂った茎葉体を15°C、短日条件(8時間明16時間暗)で3週間ほど培養すると造精器と造卵器が茎葉体の先端に形成される。滅菌水を茎葉体全体が浸かるようシャーレに入れ、すぐに捨てる。これにより、精子がコケ組織の表面に残った水を介して造精器から造卵器まで泳ぎつき、受精が起こる。その後、約一カ月で直径2mmほどの胞子嚢を持つ胞子体が生じる。茎葉体を水に浸す必要があるため、深型のシャーレが扱いやすい。またBCD寒天培地の代わりに、ジフィーセブン(ピートモスからなる園芸用の培養土ポット; サカタのタネ)を培地として用いると、多数の胞子体をより安定に得ることができる。この場合は、ジフィーセブンを適当な容器(例えばIWAKIのプラントボックス[41-012-002])内に置き、水を適量加えてオートクレーブ滅菌し、茎葉体をジフィーセブン上に植えつけ培養を行う。こうしてできた胞子嚢をピンセットで採取し、数個ずつマイクロチューブに小分けして入れる。数時間マイクロチューブの蓋を開け放して乾燥させたのち、蓋を閉じ、4°Cで保存する。少なくとも1年間は保存できることを確認している。

5.2.4 胞子蒔き

胞子嚢を保存していたマイクロチューブに900 μ lの滅菌水と100 μ lの次亜塩素酸を入れてよく混ぜ、5分間ほど放置する。この後、ピペットマンで上清を取り除き、1000 μ lの滅菌水を入れよく混ぜて胞子嚢を洗浄し、胞子

が沈殿した後に滅菌水を捨てる。この滅菌水による洗浄を3、4回繰り返す。最後に1000 μ lの滅菌水を加え、ペッスル(Treff, ペレットミキサー)や滅菌した爪楊枝ですりつぶして胞子嚢を壊し、胞子が拡散した液をピペットマンで200 μ lずつ胞子発芽用寒天培地に滴下する。寒天培地にピペットマンでさらに1000 μ lの滅菌水を加え、培地上に胞子を広げた後、25°C、連続明条件で培養する。2〜3週間で最初の植え継ぎができる量の原糸体が得られる。

5.2.5 株の保存

胞子(胞子嚢)の状態が長期保存できるので、株の保存は胞子の状態で行うのが良い。ただし原糸体の状態でも、寒天培地が乾燥しないようにシャーレをパラフィルムで二重に巻き、4°C、微弱光下で少なくとも数カ月は保存できる。時間が経ち、一見寒天培地とともに干からびてしまったように見えても、ペラペラになった寒天培地ごと新しい寒天培地の上に置くと、再び生育を開始する場合がある。

5.3 謝辞

株の由来などについて情報を頂いた長谷部光泰教授(基礎生物学研究所)に感謝します。

参考文献

- 1) N. W. Ashton, & D. J. Cove, *Mol. Gen. Genet.* **154** (1977) P.87.
- 2) Y. Kamisugi, M. von Stackelberg, D. Lang, M. Care, R. Reski, S. A. Rensing, & A. C. Cuming, *Plant J.* **56** (2008) P.855.
- 3) Y. Hiwatashi, T. Fujita, Y. Sato, T. Tanahashi, T. Nishiyama, K. Sakakibara, R. Kofuji, N. Aono, N. Sumikawa, T. Murata, & M. Hasebe, (2008) <http://www.nibb.ac.jp/evodevo/PHYSCOmanual/00Eindex.htm>
- 4) 日渡祐二, 西山智明, 長谷部光泰, 蘚苔類研究 **7** (2000) P.276.
- 5) D. J. Cove, & C. D. Knight, *Plant Cell* **5** (1993) P. 1483.
- 6) A. Hohe, S. A. Rensing, M. Mildner, D. Lang, & R. Reski, *Plant Biol.* **4** (2002) P.595.