

2019年10月31日

遺伝子改変や物質添加なく、細胞塊から 植物クローンがどんどんできる

東京理科大学 理工学部 応用生物科学科
教授 松永 幸大



研究分野は細胞生物学(主に動植物)、動物から植物に至るまで、生物ダイナミクスを網羅する基本メカニズムの解明に取り組んでいます。

太古の昔から、人類は植物リプログラミング現象や 再生現象を利用してきました

剪定



イチョウ

接ぎ木



バラ

挿し木

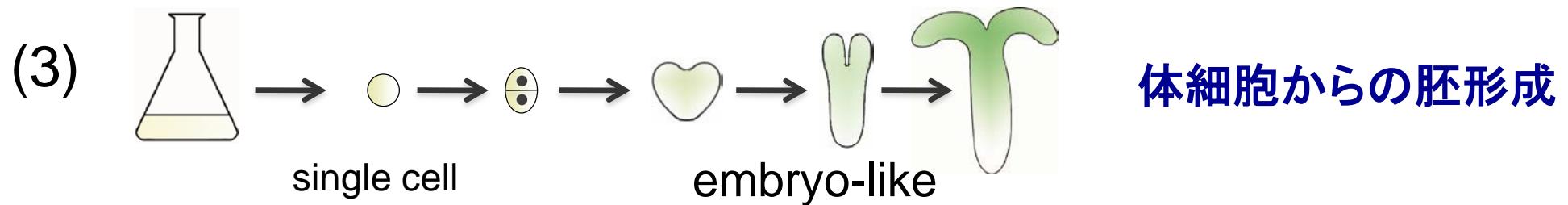
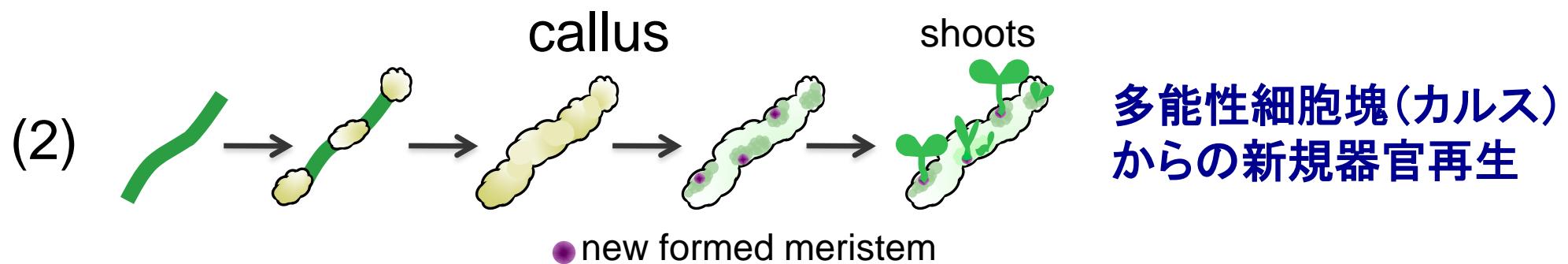
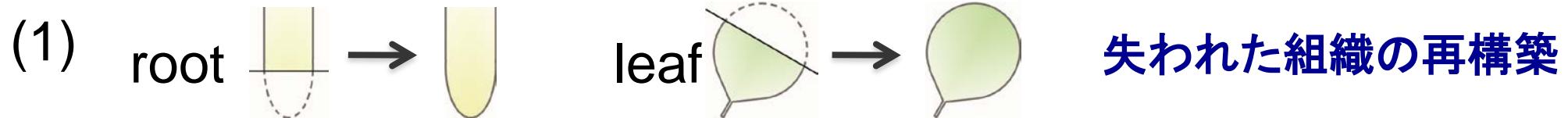


アジサイ

(http://kayoichou-rose.up.n.seesaa.net/kayoichou-rose/image/_DSC7797.png?d=a1)

(<http://ashitaya.info/gardening/cutting/1371>)

驚異の植物再生力



従来技術とその問題点

既に実用化されているものには、遺伝子組換えによる植物の再生促進法や植物ホルモンや化学物質投与による再生促進法等があるが、

- ・遺伝子組換えに対する消費者の不安
- ・化学物質や植物ホルモンのコストがかかる

等の問題があり、広く利用されるまでには至っていない。

新技術の特徴・従来技術との比較

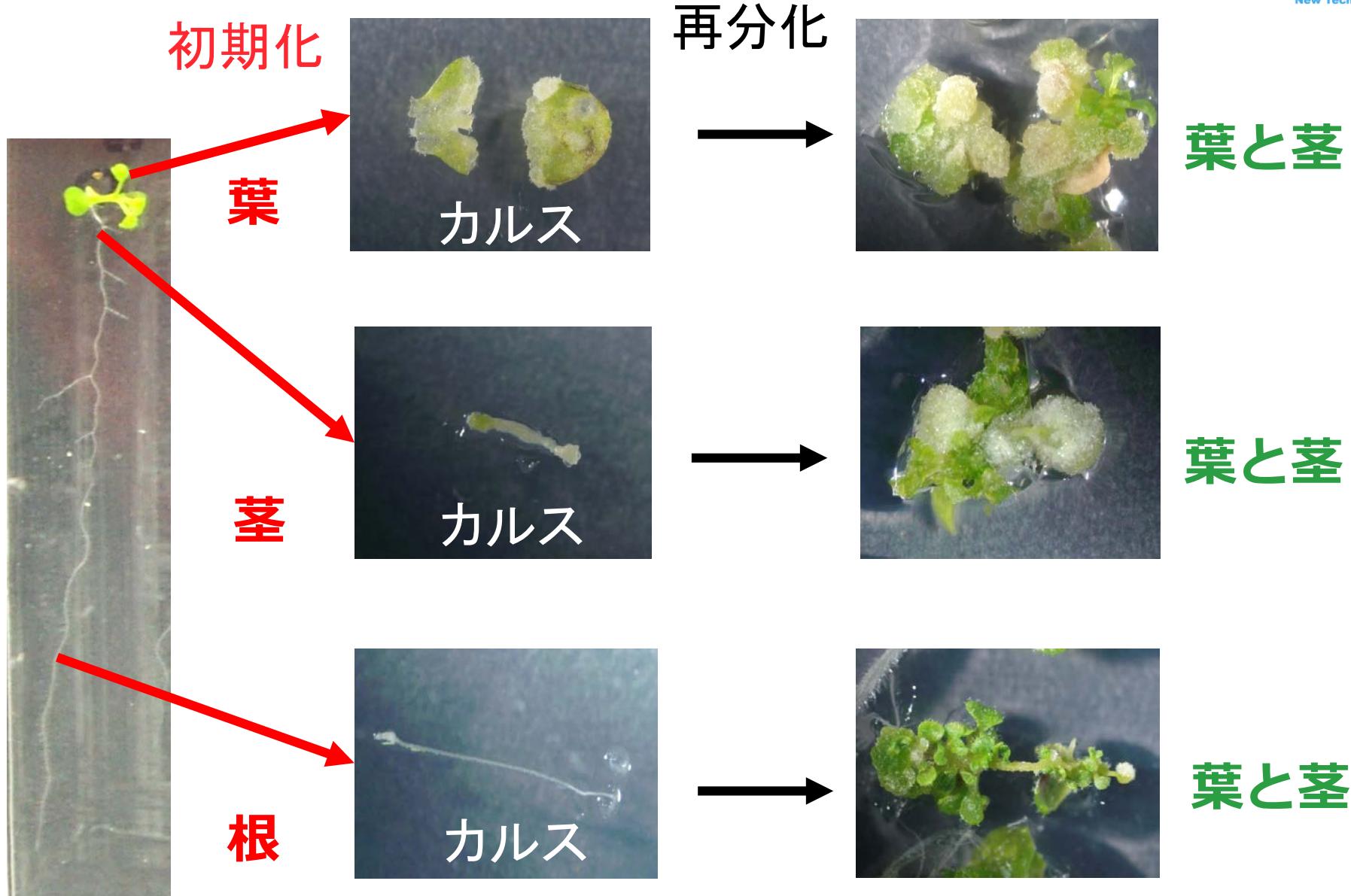
- ある条件で植物の細胞塊に放射線照射すると、芽がどんどん出てくるので、クローン植物を量産できる。
- 物質を添加したり、遺伝子改変が不要であるため、コストも労力もかからない。
- 植物種によって条件が異なるので、企業の独自技術として確立しやすい。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 植物の組織である根、茎、葉、花の一部を組織培養することで、細胞塊・カルスを作り、そこから芽を出させクローン植物を作成できる。
- しかし、従来技術では、芽を出す頻度は植物種で異なることから、植物ホルモンを加えたり、遺伝子組換えをして芽を出す頻度を増やすざるを得なかった。

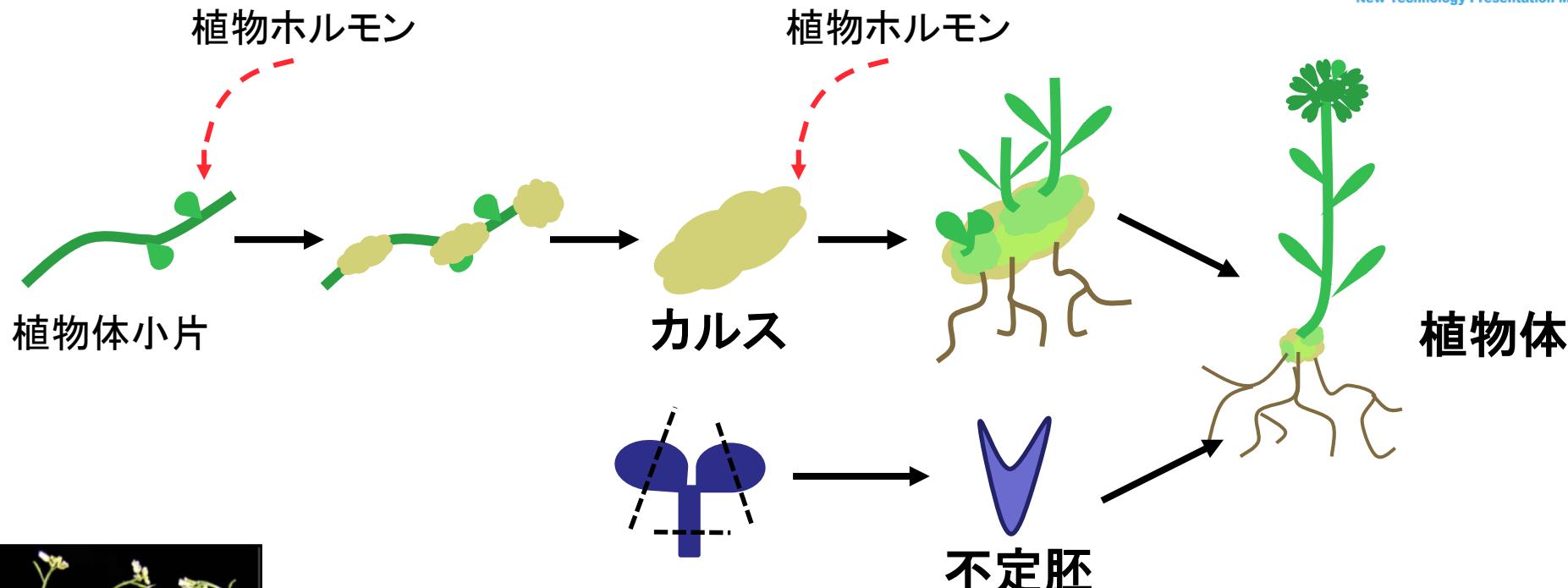
植物のどこからでも葉と茎を再生するシステム 植物を初期化して再分化させる

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!



植物における初期化・再生研究成果は地球に革命を起こす

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!



基礎研究

植物再生メカニズム理解
植物のダイレクト・リプログラミングの理解



応用技術

植物工場化、種子や生殖が不要
品種改良、クローン量産技術
バイオマス増産、食料増産

最近のプレスリリース・新聞報道

◆プレスリリース

植物の驚異的な再生能力の秘密を解明 –「備えあれば憂いなし」、傷を受ける前に再生準備を整える植物再生の新しいメカニズムを発見 –(2019年4月16日)

<https://www.tus.ac.jp/today/2019041701.pdf>

◆新聞ネット記事・テレビ報道

Science Daily (2019年8月1日) Scientists crack the code to improve stress tolerance in plants

<https://www.sciencedaily.com/releases/2019/08/190801104034.htm>

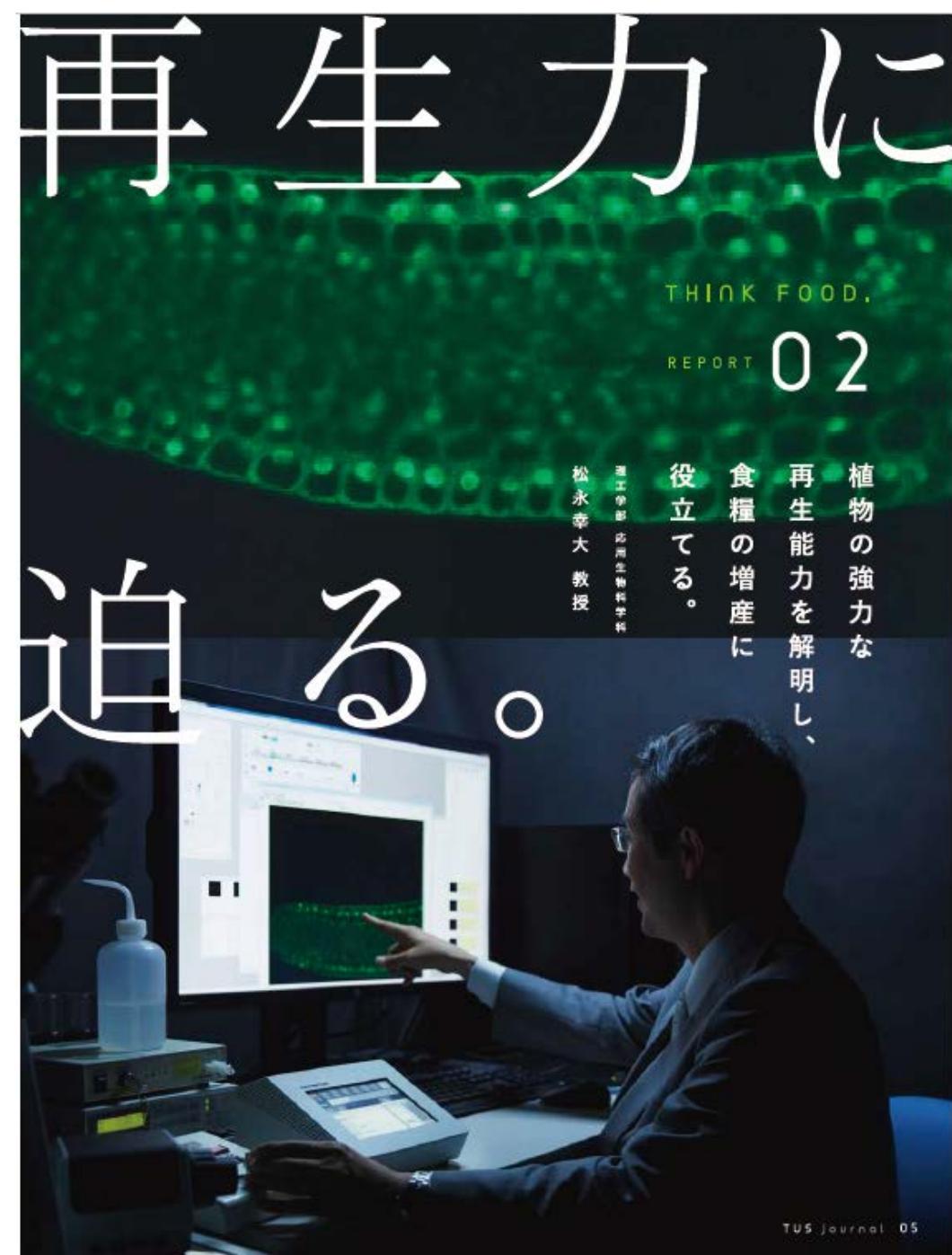
日本経済新聞 (2019年5月12日) 朝刊 30面 草木再生 カギ握る酵素 東京理科大など発見 栽培に応用も

<https://www.nikkei.com/article/DGKKZO44622050Q9A510C1MY1000/>

東京新聞 (2019年4月29日) 朝刊 4面 びっくり！新技術 植物の再生能力 酵素の働きに秘密あり

日経バイオテクONLINE (2019年4月26日) 東京理科大、植物の再生能力を支えるエピジェネ酵素を同定 再生の新機構解明をNature姉妹誌にて発表

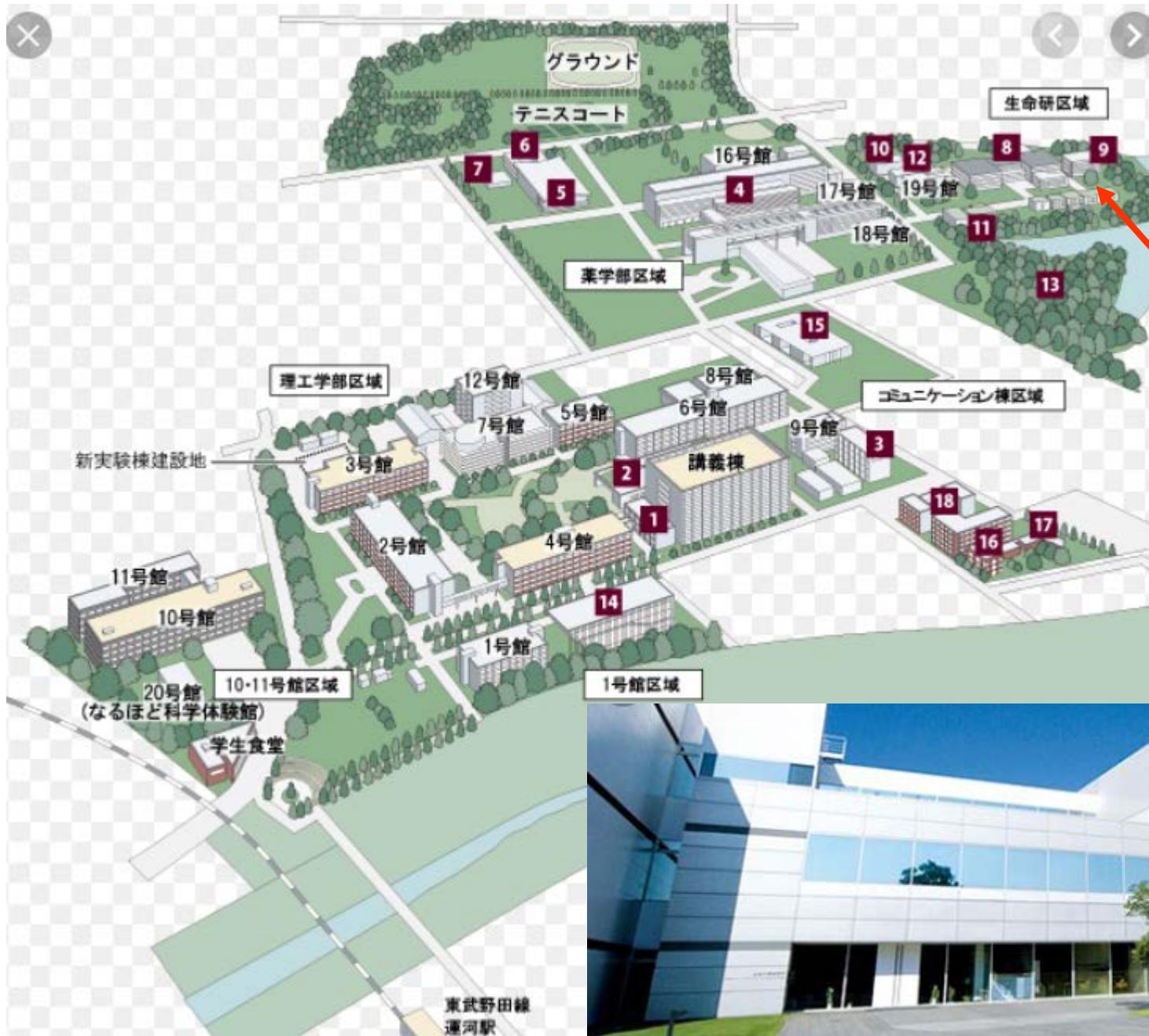
<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/news/p1/19/04/24/05544/>



新技術の特徴

- ・ ジャガイモの芽を出させないように放射線を照射するように、一般的に負のイメージがある放射線照射をある一定の条件で植物の細胞塊に行うと、逆に芽が出ることが促進されたことがわかった。放射線照射するだけで、植物クローン生産を促進できる。

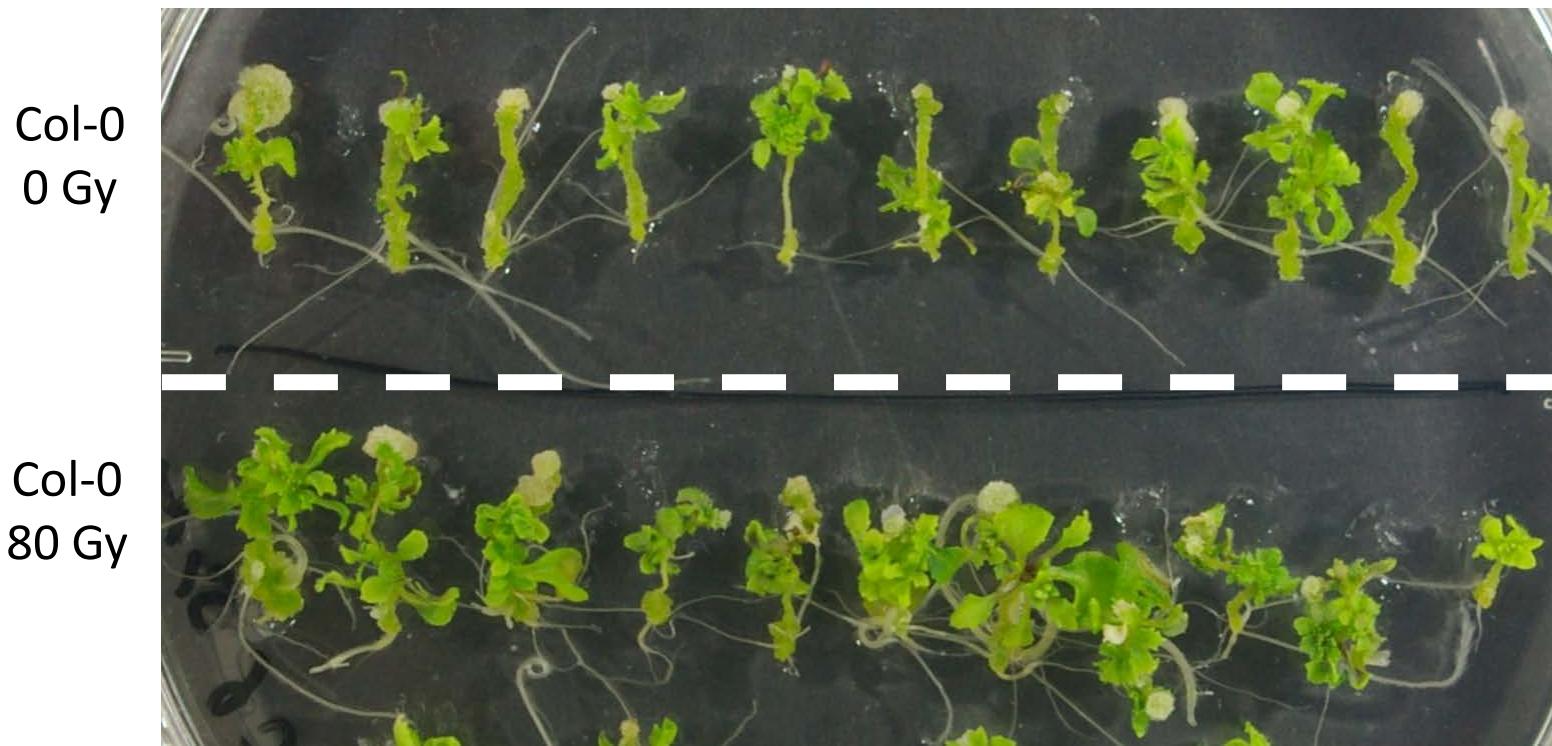
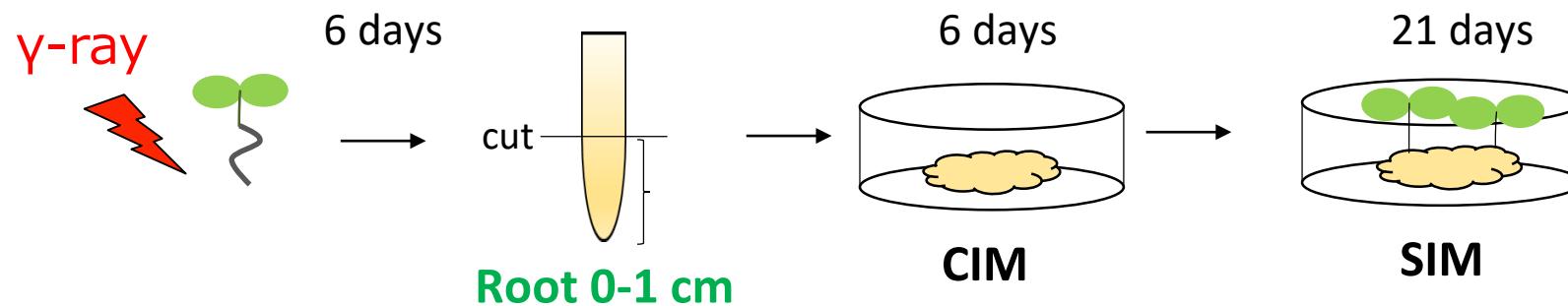
東京理科大学・野田キャンパス



生命医科学研究所
(放射線照射設備あり)



もとの植物体にガンマ線を照射するとシートがよくできる



ガンマ線量80 Gyまでは強い線量の方が再生を促進する

γ -ray



Before irradiation

After irradiation

CIM

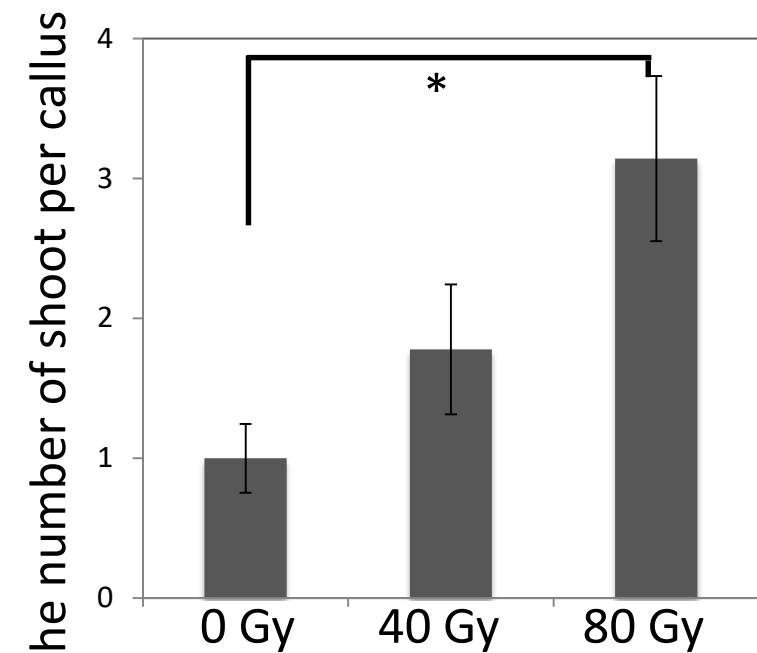
SIM

7 days

6 days

6 days

21 days



(*; Welch's t test, $p < 0.05$)

CIM培地に移す1日前にガンマ線を照射しても効果はない

γ -ray



7 days

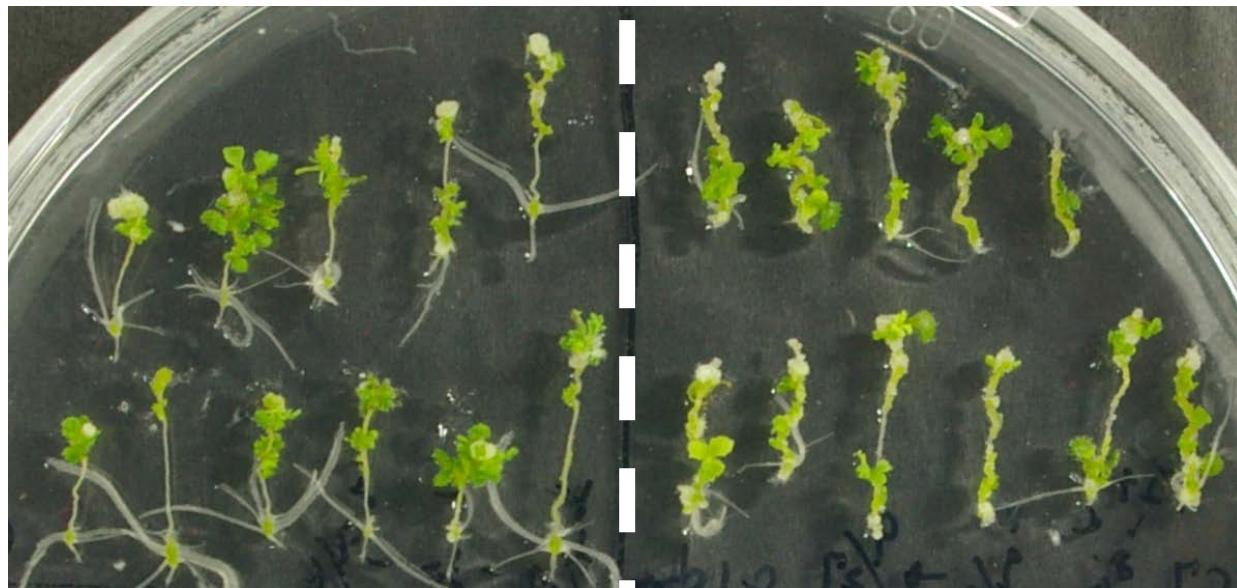
1 day

7 days

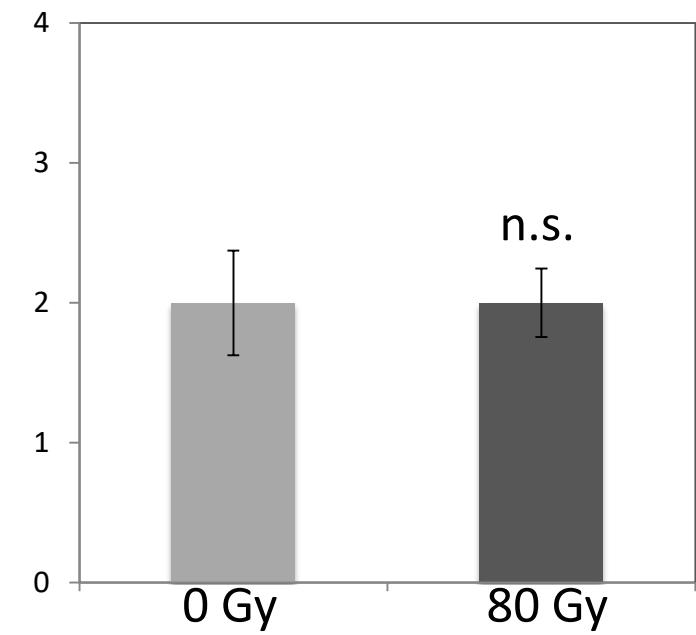
14 days

0 Gy

80 Gy



The number of shoot per callus



(n.s.; Welch's t test, $p > 0.05$)

CIM培地に移す5日前にガンマ線を照射すると、シート再生が促進する

γ -ray

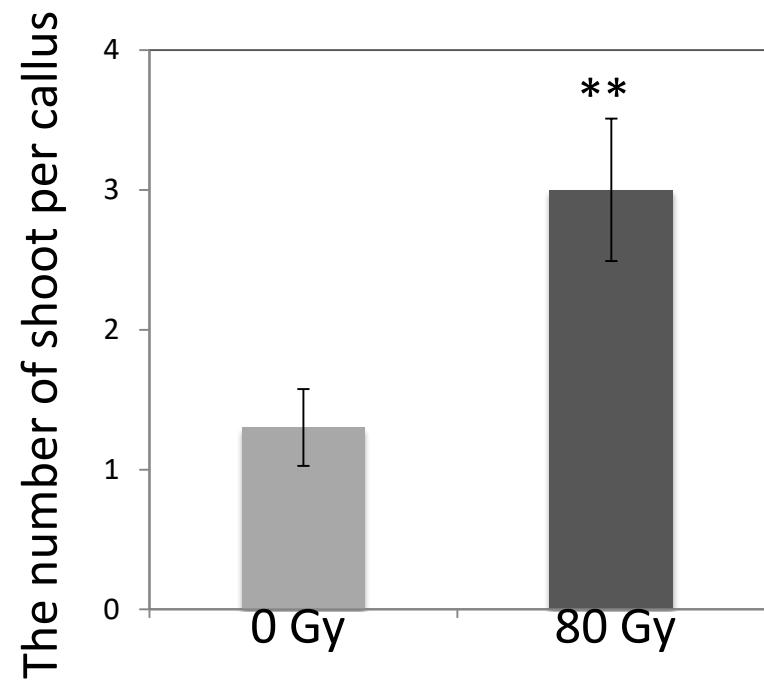
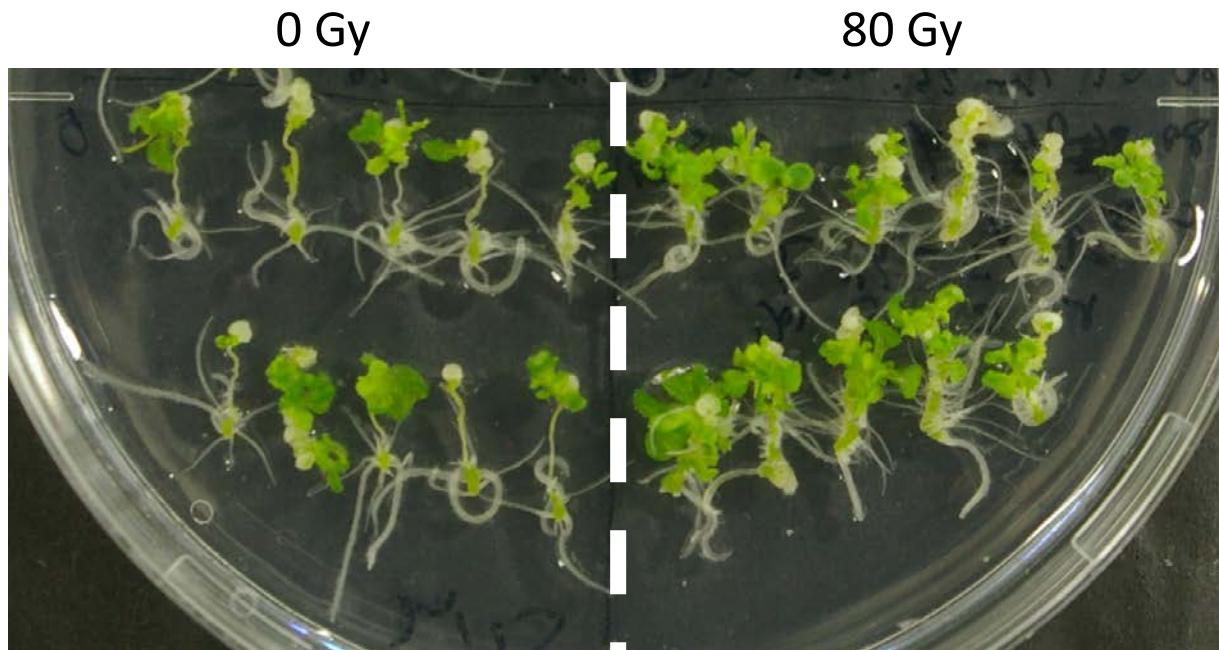


7 days

5 days

7 days

14 days



(**; Welch's t test, $p < 0.01$)

CIM培地に移す8日前にガンマ線を照射すると効果はない

γ -ray



7 days

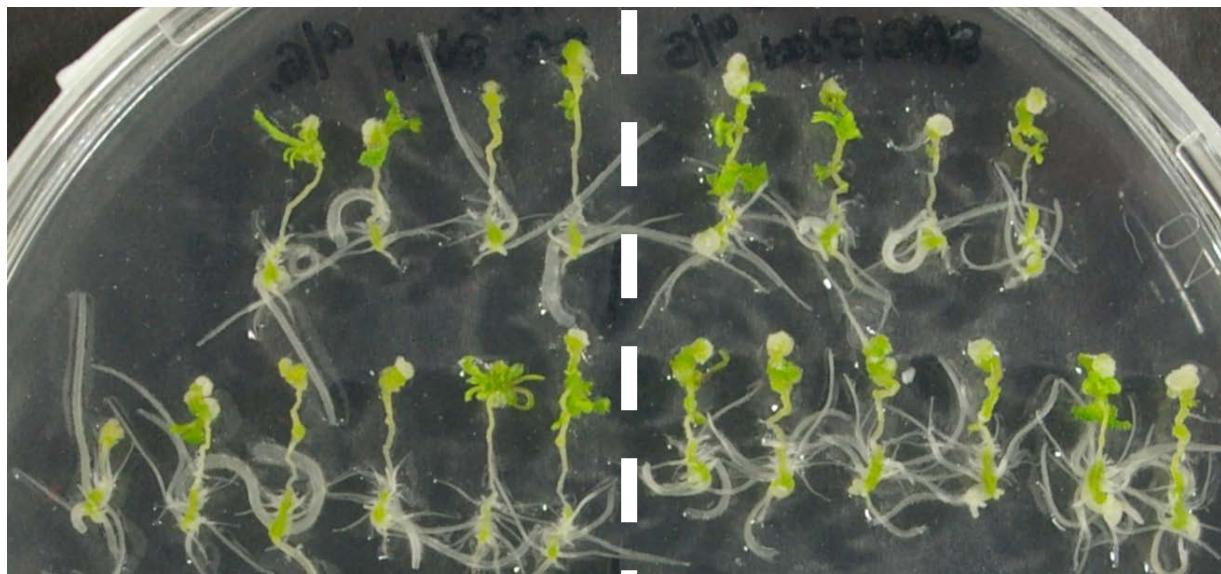
8 days

7 days

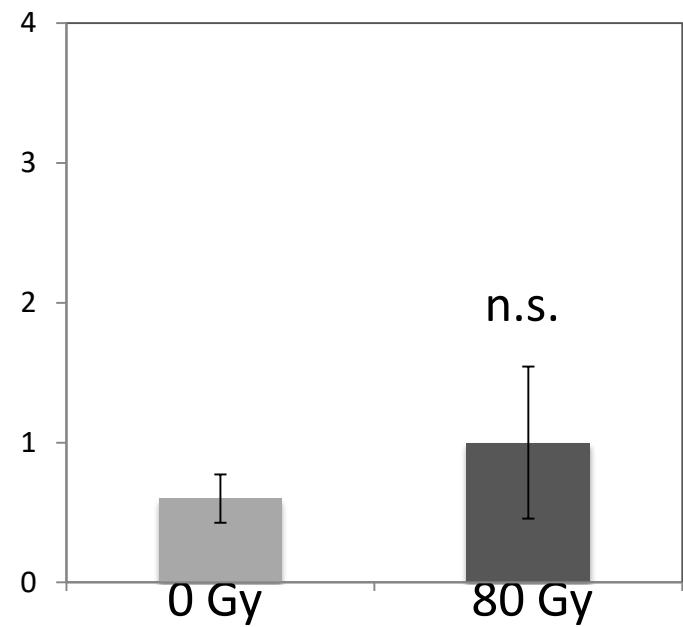
14 days

0 Gy

80 Gy



The number of shoot per callus

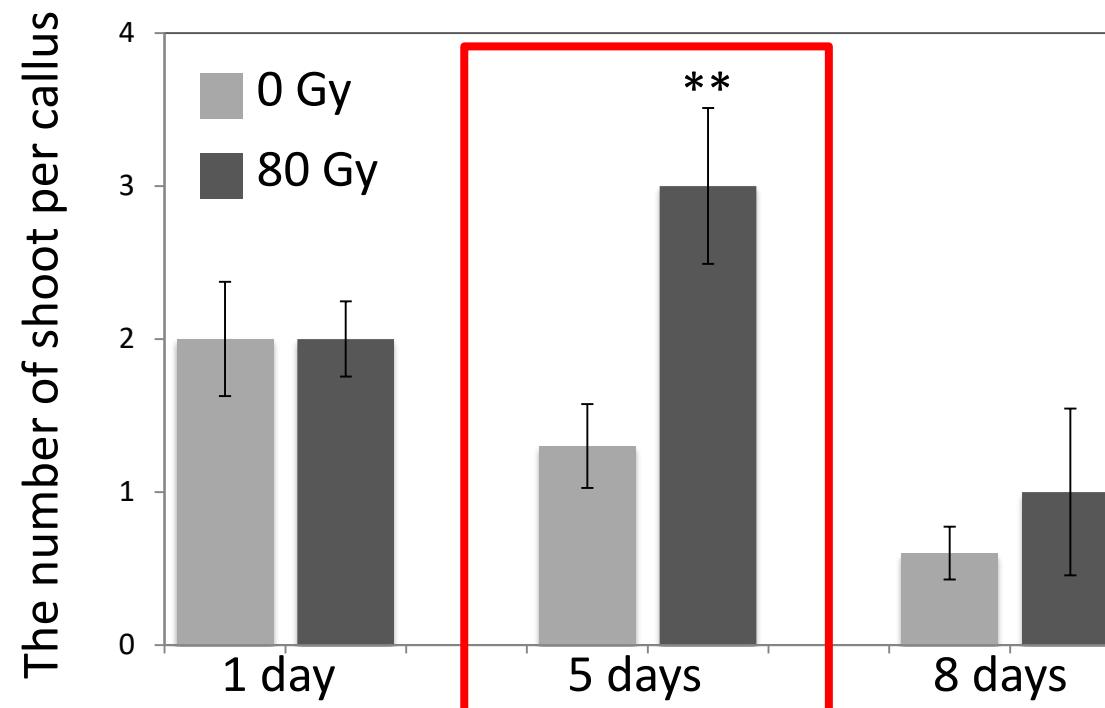


(n.s.; Welch's t test, $p > 0.05$)

カルス誘導培地に移す前の一定の日にガンマ線照射することが重要である

γ-ray

Before irradiation	After irradiation	CIM	SIM
7 days	1 day	7 days	14 days
7 days	5 days	7 days	14 days
7 days	8 days	7 days	14 days



Why did only 5 days incubation enhance shoot regeneration?

想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、作物や園芸品種に適用することで、品質維持や芽生えの促進などのメリットが大きいと考えられる。

(例) 作物や園芸品種のクローン化作成の促進

- 上記以外に、バイオマス増大の効果が得られることも期待される。

(例) 再生しにくかった植物が再生しやすくなる

実用化に向けた課題

- ・ 現在、クローン植物生産が可能なところまで開発済み。
- ・ 今後、多くの実用植物について実験データを取得し、作物や園芸品種に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- ・ 実用化に向けて、新規物質添加と組み合わせることで、植物再生能が向上できるよう技術を確立する必要もあり。

企業への期待

- ・ 植物を活性化させる方法については、放射線照射技術により克服できると考えている。
- ・ 植物の生育への効果を確認したい新規物質や新規技術を持つ企業との共同研究を希望。
- ・ また、有用物質を開発中の企業、植物・農業分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : カルスからの植物器官の形成効率を向上させる方法
- 出願番号 : 特願2019-121921
- 出願人 : 学校法人東京理科大学
- 発明者 : 松永幸大、他1名（計2名）

产学連携の経歴

- 2013年-2019年 JST戦略的創造研究推進事業
(CREST)に採択

「エピゲノム制御ネットワークの理解に基づく環境ストレス
適応力強化および有用バイオマス产生」

- 2014年-現在 東京化成工業と共同研究実施
- 2016年 植物透明化試薬TOMEIを市場投入
- 2018年 好評につき TOMEIの欧米生産を開始

New



植物を短時間で透明化する試薬 TOMEI

植物の内部構造を解剖せずに明瞭な観察が可能

- 特長**
- ・簡便で迅速に、植物の透明化が可能
 - ・共焦点顕微鏡で、より深部まで観察可能

「TOMEI」による植物透明化手法は、東京理科大学の松永らにより開発されました。モデル植物であるイネやシロイヌナズナを、わずか数時間で透明化することが可能です¹⁾。この手法を用いることで、より深部の内部構造をより明瞭に観察できます。



図1. TOMEI-Iにより透明化したイネ(上)とシロイヌナズナ(下)

植物透明化手法「TOMEI-I」は、クロロフィルなどによる自家蛍光が無くなりますが蛍光タンパク質の蛍光を減弱させるため、蛍光色素染色のみでの観察に適しています。

一方、植物透明化手法「TOMEI-II」は「TOMEI-I」よりもマイルドな手法であるため自家蛍光はあまり減りませんが、サンプルの透明度は上昇し蛍光タンパク質の検出に適しています。



図2. TOMEI-IIにより透明化されたシロイヌナズナ

1) J. Hasegawa, Y. Sakamoto, S. Nakagami, M. Aida, S. Sawa, S. Matsunaga, *Plant Cell Physiol.* 2016, 57, 462.

植物を短時間で透明化する試薬 TOMEI

使用例2) 蛍光色素染色のみで解析する方法「TOMEI-I」

透明化方法「TOMEI-I」は、DAPI染色やCalcofluor White染色などの蛍光色素による染色のみで観察を行う場合に適しています。

試薬

固定液(酢酸：エタノール=1:3) ※用時調製することをお勧めします。

PBS

70%エタノール(PBS希釈)

30%エタノール(PBS希釈)

染色液

透明化試薬 TOMEI (TCI製品コード T3530)

(サンプルが根の場合、PBS希釈した20%TOMEI)

操作

固定	1) 十分量の固定液にサンプルを室温(20~25°C程度)で、固定する。 (固定の時間はサンプルの種類や大きさに合わせて検討が必要です。 シロイヌナズナの実生では、1~2時間程度が目安です。)
	2) 固定液を取り除き、70%エタノールを添加し室温で静置5分間する。
	3) 70%エタノールを取り除き、30%エタノールを添加し室温で5分間静置する。
	4) 30%エタノールを取り除き、PBSを添加し室温で5分間静置する。
染色	PBSを取り除き、染色液 ³⁾ を添加、室温で遮光にて静置する。 (二重染色の場合は、以下の洗浄後、再び染色洗浄のステップを繰り返してください。)
	1) 染色液を取り除き、PBSを添加し室温で10分間静置する。 2) PBSを取り除き、PBSを添加し室温で10分間静置する。 3) PBSを取り除き、PBSを添加し室温で10分間静置する。
洗浄	地上部サンプル
	1) PBSを取り除き、TOMEIを添加後、室温で遮光にて20分間静置する。 (透明化の時間はサンプルによって検討が必要です。)
	2) スライドガラス上にサンプルをTOMEIで封入し、観察する。
透明化	地下部サンプル(根)
	1) PBSを取り除き、20%TOMEIを添加後、室温で遮光にて10分間静置する。 2) スライドガラス上にサンプルをTOMEIで封入し、観察する。

³⁾ DAPI染色の場合は5µg/mLで30分、Calcofluor White染色の場合はそれぞれCalcofluor White M3R 1g/L、Evansblue 0.5g/Lで10分が目安ですが、目的などに合わせて調整してください。

製品の詳細はウェブサイトで ▶▶▶ 透明化

東京化成工業株式会社

■本社営業部 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町4-10-2 TCIビル2階
Tel: 03-3668-0489 Fax: 03-3668-0520
E-mail: Sales-JP@TCIchemicals.com

■大阪営業部 〒541-0041 大阪府大阪市中央区北浜1-1-21 第2中井ビル1階
Tel: 06-6228-1155 Fax: 06-6228-1158
E-mail: osaka-s@TCIchemicals.com

□化成品部 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町4-10-1
Tel: 03-5651-5171 Fax: 03-5640-8021
E-mail: finechemicals@TCIchemicals.com

弊社製品取扱店

やむを得ず品目の削除や掲載内容の変更を予告なく行う場合があります。
内容の一部または全部を無断で転載あるいは複製することはご遠慮ください。

お問い合わせ先

東京理科大学

研究戦略・产学連携センター

コーディネーター 森本 裕紀

TEL 03-5228-7431

FAX 03-5228-7442

e-mail ura@admin.tus.ac.jp