

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07867

研究課題名（和文）ヒノキ栄養組織由来シングルセルからの効率的なクローン増殖技術の開発

研究課題名（英文）Development of Efficient Clone Propagation Technology from Single Cell Derived from Hinoki Cypress Tissue

研究代表者

細井 佳久（HOSOI, YOSHIHISA）

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：50353842

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：ヒノキ、サワラの未熟な種子胚を培養し、不定胚形成能力を持つ増殖細胞塊を誘導した。得られた細胞塊を不定胚成熟用培地に移して不定胚を大量に形成させた後、発芽用培地に移すことで植物体を得ることができた。さらにサワラについて、培養中に細胞塊から遊離する単一の細胞を培養することにより、再分化植物が得られた。ヒノキ、サワラ、ヒノキアスナロ、アスナロの葉条切片を培養し、切片上に芽の原基を多数形成させ、多芽体を誘導した。多芽を伸長させ、発根培地へ移すことで植物体を形成させることができた。アスナロについて、多芽体切片を細断し、液体培地で振盪培養することで単一の細胞を多数遊離させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒノキ、サワラの種子胚から不定胚を形成させ、均質な植物体を大量に形成させることができるようになった。サワラについては1つずつ分けて単独培養した細胞（シングルセル）から植物体を再生させることに成功した。これにより、遺伝子改変処理を行った細胞を個別に培養して植物体を得ることが可能となり、多種の改変細胞が混じり合うことのない植物体を短期間で得ることができるようになる（従来は植物体作成後に様々な選抜過程を経ることが必要）。ヒノキ、サワラ、ヒノキアスナロ、アスナロについて栄養組織である葉条切片から植物体再生させることが可能となり、親木のクローンを大量に生み出せるようになった。

研究成果の概要（英文）：Immature embryos of HNOKI and SAWARA cypress were cultured to induce a proliferative cell mass capable of forming somatic embryos. Plants regenerated by transferring the cell mass to a medium for embryo maturation to form a large amount of somatic embryos, and then transferring to a medium for germination. Furthermore, for Sawara, Regenerated plants were obtained by culturing a single cell released from the cell mass during culturing. Leaf sections of Hinoki, Sawara, Hinokiasunaro, and Asunaro were cultured, and a large number of bud primordia were formed on the sections. Plants could be formed by elongating the multi-buds and transferring them to the rooting medium. For Asunaro, a large number of single cells could be released by cutting bud primordia and culturing with shaking in a liquid medium.

研究分野：樹木の組織、細胞培養

キーワード：不定胚 多芽体 細胞培養 ヒノキ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

林木において、生物工学的手法を用いた育種については、他の野菜や果樹などに比べ進展が遅れている。ゲノム編集などの遺伝子改変を行う場合、その基盤となる培養系の開発が遅れていることが大きな原因となっている。日本では主要な針葉樹であるヒノキ科の樹種について、安定した植物体再生系を開発することは急務である。

2. 研究の目的

ヒノキを中心として、種子胚由来の増殖細胞から均質で大量の植物体を再生させる培養系を開発し、遺伝子改変した個体などの目的個体を速やかに大量に生産可能とする。1つの細胞から植物体を再生させる培養系を開発し、多数の異なる遺伝子改変処理細胞が混在する(キメラ化)ことを避けて、単一の改変細胞由来の個体を得られるようにする。親木の遺伝子構成と異なる種子胚由来個体ではなく、栄養組織である葉条から植物体を再生できるようにし、各種目的により選抜した親木そのもののクローン増殖を可能とする。

3. 研究の方法

(1) ヒノキ、サワラの種子胚を無菌培養し、得られた分裂細胞から不定胚を誘導する。不定胚を発芽させて植物体を再生させる。

(2) サワラの不定胚形成能力を持つ分裂細胞塊から遊離する単一の細胞を、顕微鏡下、マイクロマニピュレーターで1細胞ずつ培養プレートに移植して個別に培養する。培養により不定胚形成させた後、植物体を再分化させる。

(3) ヒノキ、サワラ、ヒノキアスナロ、アスナロの葉条切片を培養し、多芽体を誘導する。多芽を伸長させてシュート化させ、発根培地に移し発根させて植物体を分化させる。

4. 研究成果

(1) ヒノキ、サワラについて6月中旬から7月初旬にかけて採取した未熟な種子を暗黒下、90mmシャーレを用いて固形培地上で培養し、不定胚形成能力を持つ増殖細胞塊(不定胚形成細胞)を誘導した(表-1)。細胞塊は、不定胚を形成するための緻密な細胞の集団と、それに続くサスペンサー細胞で構成されていた(図-1)。サワラのサスペンサー細胞はヒノキに比べ短い傾向にあった。そのため、(2)の単一細胞の培養にはマニピュレーターで扱いやすいサワラの伸長途上にあるサスペンサー細胞を用いることとした。不定胚形成細胞塊を不定胚形成細胞誘導用の培地と同一組成の培地で増殖させ、増殖細胞塊を暗黒下、不定胚成熟用培地(表-2)に移植すると1カ月から2カ月で不定胚が形成された。成熟化培養には90mmシャーレを用い、暗黒下で行った。不定胚の成熟には、ショ糖に代えてマルトースの添加、10%から15%のポリエチレングリコール(PEG 4,000)の添加、10から20mMのグルタミンの添加が効果的であった。不定胚を、ショ糖濃度を1%、植物生長調節物質を含まないMS固形培地へ移植すると発芽して個体形成した(図-2)。培養には90mmシャーレを用い、16時間3,000lx蛍光灯照明下で行った。

(2) サワラの不定胚形成細胞塊から培養中に遊離してくる単一の細胞を、顕微鏡下、マイクロマニピュレーターでピックアップし、96穴培養プレートに、「1細胞/穴」になるように滴下して液体培地で培養した(図-3)。培地は(1)で用いた不定胚形成細胞塊を増殖する際と同一の培地組成とした。培養は暗黒下で行った。培養開始、約10日後に不定胚形成細胞塊を再分化させ始めた(図-4)。その後、(1)と同一組成の成熟用と発芽用培地で培養することで、単一細胞から植物体を再分化させることができた(図-5)。これらのことから、不定胚形成細胞は、単一細胞(シングルセル)の状態でも不定胚への再分化能力を失わず、個体の再分化が可能であることが証明できた。今回は細胞のピックアップ作業の時間的効率を優先し、ヒノキではなくサワラの単一細胞を用いて実験を進めたが、(1)の実験結果からヒノキの単一細胞についても再分化能力を有していると判断できるため、サワラと同様の培養を行えば、単一細胞から再分化個体が得られるものと推察できる。

(3) 6月にヒノキ、サワラ、ヒノキアスナロ、アスナロの枝葉を採取し、葉条切片を切り出して培養した。培地は、硝酸アンモニウム濃度を1/2としたMS() LP() DCR() EM() 基本培地に植物生長調節物質として2,4-D 0.6 μ M、BAPを6 μ M添加した固形培地を用い、16時間3,000lx蛍光灯照明下で培養した。培養開始、約1カ月後に鱗片状の葉片と葉片の境目に芽の原基が形成され始めた。同一組成の培地で継代培養すると、4カ月ほどで、多芽で覆われた多芽体が形成された(図-6)。4樹種のうちでヒノキが多芽体の形成率が高く、DCR培地の場合87%であった(表-3)。得られた多芽体は、ショ糖を1%添加し、植物生長調節物質を含まない1/2MS固形培地に移植して培養した。3カ月後、約1.5cmに伸長したシュートを切り取り、IBAを6 μ M添加した1/2MS固形培地に移植すると、発根して個体を再分化させることができた(図-7)。シュート伸長、発根については16時間3,000lx蛍光灯照明下で培養した。ヒノキ、ヒノキアス

ナロについては発根個体を人工気象機内で順化し、鉢出しした(図-8)。サワラはショ糖を含む発根用培地で培養するとカルス化し、発根しなかったが、ショ糖を含まない培地で培養することで発根して個体再生した。これらの結果から、種子胚組織ではなく栄養組織である葉条切片を用いた実験により、4樹種については親木と同じ遺伝子組成を持つ植物個体を大量にクローン増殖できることがわかった。当初の計画では、ヒノキ科のうちヒノキ属のヒノキ、サワラについてのみ実験を行う予定であったが、鱗片葉を持つアスナロ属のヒノキアスナロ、アスナロについても同様に実験を試みたところ、植物体再分化が可能であることがわかった。ヒノキ科の中でもスギ属は鱗片葉を持たないが、コノテガシワ属やビャクシン属、クロベ属など、ヒノキ属同様に鱗片葉を持つグループは多い。このため、他の多くのヒノキ科樹木についても、多芽体経由による植物体再分化系開発の道を開くことができた。

(4)アスナロについて、多芽体を細断し、液体培地で振盪培養すると、2週間ほどで細胞の遊離が見られるようになり、いずれ分裂したが、1カ月後までは、ほぼ単一の細胞の割合が多くを占めた(図-9)。将来この単一の細胞から多芽体を再分化させ、植物体を再生させる培養系を開発すれば、精英樹や病虫害抵抗性個体などの選抜された親木の単一細胞に遺伝子改変を施し、キメラ化させることなく目的とする個体の作出、クローン増殖が可能となる。

<引用文献>

Murashige, T. et al., *Physiol. Plant.*, 15:473-497, 1962
 Aitkin-Cristie, J. et al., *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol.1, Academic Press Inc., pp.82-95, 1984
 Lloyd, G. and McCown, B., *Plant Propag. Soc.*, 30:421-427, 1980
 Maruyama, E., Tanaka, T. et al., *Plant Biotechnology*, 17(4):281-296, 2000

表 - 1 不定胚形成細胞の誘導・増殖用培地

Compound	Amounts [mg / L]	Compound	Amounts [mg / L]
KNO ₃	500	Thiamine-HCl	2.5
MgSO ₄ · H ₂ O	250	Nicotinic acid	2.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	37.5	Pyridoxine-HCl	0.25
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	30	myo-Inositol	500
NaNO ₃	30	Glycine	2.5
KH ₂ PO ₄	35	Glutamine	1,500
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	80		
KCl	40	2,4-D	3 [μM]
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10	BAP	1 [μM]
H ₃ BO ₃	20		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	12.5	Sucrose	30,000
KI	0.5	Gellan Gum	3,000
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.2		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.1		
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.1		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	15		pH 5.8
Na ₂ · EDTA	20		

表 - 2 不定胚成熟用培地

Compound	Amounts [mg / L]	Compound	Amounts [mg / L]
KNO ₃	500	Glycine	5
MgSO ₄ · H ₂ O	250	Glutamine	3,000
CaCl ₂ · 2H ₂ O	37.5	Asparagine	2,000
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	30	Arginine	1,000
NaNO ₃	30	Citrulline	79
KH ₂ PO ₄	35	Ornithine	76
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	80	Lysine	55
KCl	710	Alanine	40
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10	Proline	35
H ₃ BO ₃	20		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	12.5	Maltose	60,000
KI	0.5		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.2	ABA	100 [μM]
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.1		
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.1	PEG (4,000)	150,000
FeSO ₄ · 7H ₂ O	15		
Na ₂ · EDTA	20	Charcoal, Activated	2,000
		Gellan Gum	3,000
Thiamine-HCl	5		
Nicotinic acid	5		
Pyridoxine-HCl	0.5		pH 5.8
myo-Inositol	1,000		

表 - 3 葉条切片の培養：個体による多芽体形成率の違い

樹種	個体No.	MS(1/2NH ₄ NO ₃)	LP	DCR	EM
ヒノキ	1	44/55(80)	27/43(63)	68/78(87)	
	2	31/40(78)	30/38(79)	33/42(79)	
	3	3/37 (8)	10/40(25)	6/29 (21)	
サワラ	1	8/16 (50)	29/48(60)	30/52(58)	
	2	1/15 (7)	18/32(56)	37/59(63)	
ヒノキアスナロ			10/41(24)	8/39 (21)	12/46(26)
アスナロ			11/47(23)		

* 数値は(多芽体形成切片 / 置床全切片) 括弧内は形成効率[%]

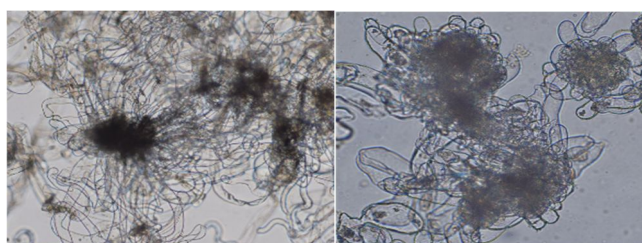


図 - 1 誘導された不定胚形成細胞 ヒノキ(左)サワラ(右)



図 - 2 再生個体(ヒノキ)

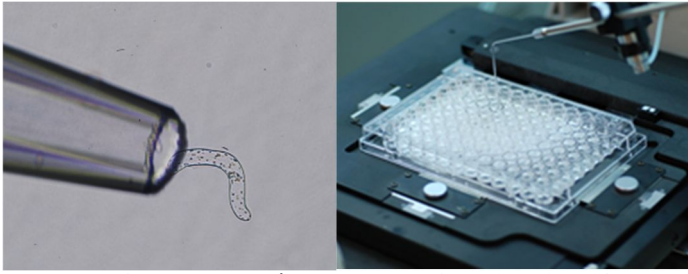


図 - 3 顕微鏡下マイクロマニピュレーターによる単一細胞の移植、培養

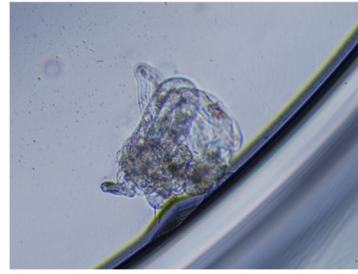


図 - 4 単一細胞から再分化した不定胚形成細胞塊

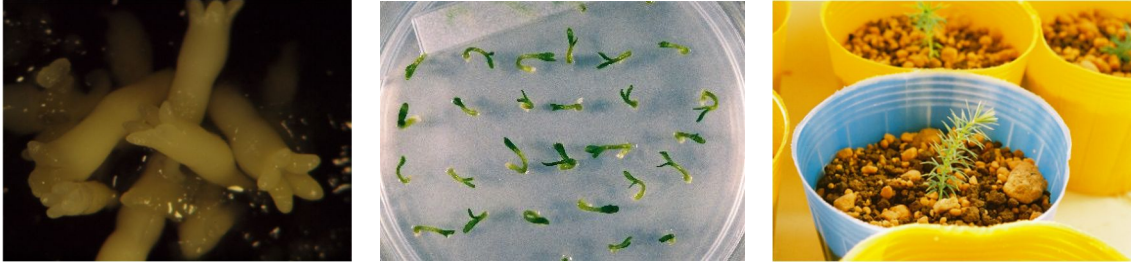


図 - 5 不定胚形成細胞塊から形成された不定胚、不定胚が発芽して得られたサワラ植物体

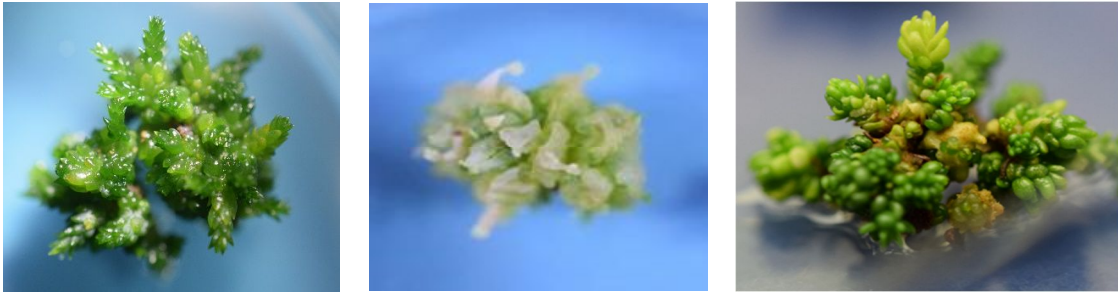


図 - 6 誘導された多芽体 ヒノキ(左) サワラ(中) ヒノキアスナロ(右)



図 - 7 伸長させたシュートを切り出して発根させ得られた個体 ヒノキ(左)ヒノキアスナロ(中)アスナロ(右)



図 - 8 栽培中の親木のクローン個体 ヒノキ(左)ヒノキアスナロ(右) 図 - 9 アスナロの遊離細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 細井 佳久、丸山 毅	4. 巻 70
2. 論文標題 ヒノキ亜科3種の葉条切片からの形態形成とサワラ単一細胞の誘導と培養の試み	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 関東森林研究	6. 最初と最後の頁 57,60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 細井 佳久、丸山 毅	4. 巻 69
2. 論文標題 ヒノキ葉条からの多芽体・植物体再分化とサワラ葉条からの多芽体誘導	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 関東森林研究	6. 最初と最後の頁 7,10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 丸山 毅、細井 佳久
2. 発表標題 Propagation of Japanese cypresses via organogenesis and somatic embryogenesis. (器官形成や不定胚形成による日本サイプレスの繁殖)
3. 学会等名 Scientific Program of International Conference Bioprocesses
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山 毅、細井 佳久
2. 発表標題 In vitro propagation of Japanese cypresses through adventitious-bud multiplication from adult leaf-segment and somatic embryo explants. (成木葉条切片と不定胚外植体からの不定芽増殖による日本サイプレスのインビトロ・プロパゲーション)
3. 学会等名 Book of Abstracts of International Conference BioVeg
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細井 佳久、丸山 毅
2. 発表標題 国産針葉樹組織からの器官分化と増殖細胞の誘導・単一細胞からの植物体再分化
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山 毅、細井 佳久
2. 発表標題 Micropropagation of Hinoki cypress (<i>Chamaecyparis obtusa</i>) via organogenesis and somatic embryogenesis. (器官形成や不定胚形成によるヒノキのマイクロインジェクション)
3. 学会等名 Abstracts of International Conference on Plant, Cellular & Molecular Biology, Italy, Plant
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細井 佳久、丸山 毅
2. 発表標題 ヒノキ科植物の組織・細胞培養による植物体再分化
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細井 佳久、丸山 毅
2. 発表標題 ヒノキ亜科3種の葉条切片からの形態形成とサワラ単一細胞の誘導と培養の試み
3. 学会等名 関東森林学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山 毅、細井 佳久
2. 発表標題 Micropropagation of Japanese cypresses by adventitious-bud multiplication(不定芽増殖によるヒノキ属のマイクロプロパゲーション)
3. 学会等名 国際植物バイオテクノロジー会議 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山 毅、細井 佳久
2. 発表標題 Progress in somatic embryogenesis of Japanese conifers(日本産針葉樹の不定胚形成における進歩)
3. 学会等名 IUFRO会議 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細井 佳久、丸山 毅
2. 発表標題 国産針葉樹の葉切片からの器官分化と細胞培養の試み
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細井佳久、丸山毅
2. 発表標題 ヒノキ科3種の培養による形態形成
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細井佳久、丸山毅
2. 発表標題 ヒノキ、サワラ葉条からの多芽体誘導と植物体再分化
3. 学会等名 関東森林学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 細井佳久
2. 発表標題 ヒバ葉条からの多芽体形成と増殖細胞の誘導・プロトプラストの単離
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	丸山 毅 (Maruyama Tsuyoshi) (20353865)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------