

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14743

研究課題名(和文)植物組織における新規透明化技術の開発

研究課題名(英文)Development of clearing method for plant tissues

研究代表者

坂本 勇貴 (Sakamoto, Yuki)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：00735483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光タンパク質の蛍光をほぼ完全に維持しながら植物組織を迅速かつ完全に透明化する透明化技術“iTOMEI”を開発した。本手法は組織の固定、色素の脱色、蛍光の再活性化、屈折率の均一化の4つのステップから構成され、最短で26時間で完了する。本手法はシロイヌナズナやイネ、ゼニゴケなどの植物組織に加え動物組織にも適用可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発された透明化技術iTOMEIは簡便かつ迅速に植物組織を透明化できることから、植物を用いた基礎研究のみならず応用的な研究にも広く用いられると考えられる。特に非破壊的に透明化が可能であることから、農作物における害虫や寄生虫、病原菌の発見や感染箇所の同定、作物の品種間の細胞形態、組織の内部構造の観察、比較をもとにより良い品種改良への足がかりにつながる。

研究成果の概要(英文)：I developed a novel clearing method “iTOMEI” which rapidly and completely clears plant tissue maintaining fluorescence of fluorescent proteins. iTOMEI is composed of 4 steps : fixation, decolorization, reactivation of fluorescent protein, and unification of reflective index. This method can use for not only plant tissues such as Arabidopsis thaliana, Oryza sativa, and Marchantia polymorpha but also animal tissue.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：透明化 顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、動物組織に対する多数の透明化手法が開発されていた。この手法をそのまま植物組織に用いても透明化効率が悪く、透明化の完了までに1週間以上の長時間処理が必要であった。本研究に先駆けて、申請者の研究グループでは透明化が1日で完了する透明化手法“TOMEI-I”および“TOMEI-II”を開発していた(Hasegawa et al., 2016)。

2. 研究の目的

蛍光タンパク質の蛍光を失わずに観察するためには TOMEI-II を用いる必要があるが、TOMEI-II は迅速に透明化が完了する代わりに、植物の葉緑体内に含まれるクロロフィルを完全に除くことができないという欠点があった。そこで本研究では TOMEI-II と遜色ないほど迅速で、完全にクロロフィルを除きつつ、これまで以上に蛍光タンパク質の蛍光を保持できる透明化手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

透明化手法を固定、脱色、蛍光タンパク質の再活性化、屈折率の均一化の4つのステップに分けて開発を進めた。

- (1) 固定
一般的に組織固定に用いられるグルタルアルデヒドとホルムアルデヒドの濃度、組み合わせ、および固定液のバッファー組成を検討した。
- (2) 脱色
数十種類の界面活性剤および有機溶媒をスクリーニングし、脱色効率が高く蛍光タンパク質を失活させない試薬を選抜した。
- (3) 蛍光タンパク質の再活性化
一度失活し蛍光を失った蛍光タンパク質を高 pH のバッファーでインキュベートすることで、蛍光を回復させることができる。この処理条件の検討を行った。
- (4) 屈折率の均一化
顕微鏡で観察する際には、高い屈折率の透明な液体に試料を浸し、試料とカバーガラスやマウント用のオイルの屈折率を均一化することで、光の屈折を抑制し試料深部からのシグナルを減衰させずに検出できる。このステップで用いる溶液の選定を行った。
- (5) 透明化の検証
完成した透明化手法 iTOMEI がどのような植物、蛍光タンパク質に適用できるかを検証した。

4. 研究成果

- (1) 固定
一般的に植物組織の固定に用いられるバッファーの中で pH7.0 でバッファー効果がある HEPES, PBS, MOPS, Tris-HCL, PIPES を検証した。これらのバッファー中にホルムアルデヒドを2%になるように溶解し、固定液を作成した。これらの固定液を用いて GFP 単体を発現するシロイヌナズナの芽生えを固定し、固定前後の GFP の蛍光輝度を蛍光実体顕微鏡を用いて検出した。その結果 PBS をベースに作成した固定液を用いることで、固定後も蛍光輝度が高く保たれることが明らかとなった。次に、グルタルアルデヒドとホルムアルデヒドの組み合わせ、及びそれぞれの濃度の検証を同様の手法で行ったところ、低濃度のホルムアルデヒドのみで固定する方法が GFP 蛍光を最も明るく維持できることが明らかとなった。また、低濃度のホルムアルデヒドであっても細胞構造が固定されていることを確認している。
- (2) 脱色
脱色に用いる試薬をスクリーニングするために、GFP 単体を発現するシロイヌナズナの芽生えを固定し、候補試薬で24時間処理した後、溶液中に溶出したクロロフィル量を分光光度計を用いて測定した。この結果、従来の透明化に用いられている TritonX-100 や Sodium Deoxycholate よりもクロロフィルを高効率に溶出できる界面活性剤 X を発見した。さらに、最適な濃度と数種類の界面活性剤の組み合わせを検証し、20%界面活性剤 X で処理することでクロロフィルの溶出効率は最大となることが明らかとなった。また、界面活性剤 X が蛍光タンパク質の蛍光にも影響を与えないことも確認した。
- (3) 蛍光タンパク質の再活性化
これまでの研究で pH10.7 および pH11.3 の溶液で処理することで失活した GFP を再活性化できることが報告されていた(Hanqing Xiong et al., 2014)。そこで、GFP 単体を発現するシロイヌナズナの芽生えを固定し、pH8 から pH12 まで1刻みで調製した溶液中で静置した。その結果、pH8 で十分な再活性化効果があることが明らかになった。さらに、脱色用の溶液を pH8 で調製して脱色処理することで脱色と同時に十分な再活性化効果が得られることも明らかとなった。
- (4) 屈折率の均一化
屈折率の均一化にはこれまで動物組織の透明化で報告されていたイオヘキソールを用いた。イオヘキソールは蛍光タンパク質に影響を与えないことが示されており、かつ非常に高い屈折率を持つ。GFP 単体を発現するシロイヌナズナの芽生えを固定、脱色し、イオヘキソール

をベースとした溶液で処理することで、植物においても蛍光タンパク質に影響を与えないこと、屈折率を均一にできることを確認した。

(5) 透明化の検証

最終的に固定から観察まで最短で 26 時間で透明化が完了する iTOMEI を完成させた。本手法を用いてシロイヌナズナ、イネ、ゼニゴケを透明化できることを示した。蛍光タンパク質は GFP, YFP, mOrange, tdTomato, tagRFP を失活することなく観察できた。また、驚くべきことに、マウスの脳を iTOMEI で透明化することで非常に高度に透明化できることも示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakamoto Yuki	4. 巻 未定
2. 論文標題 Nuclear lamina CRWN proteins regulate chromatin organization, gene expression, and nuclear body formation in plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-020-01184-1	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 Luo Lilan, Ando Sayuri, Sakamoto Yuki, Suzuki Takanori, Takahashi Hiro, Ishibashi Nanako, Kojima Shoko, Kurihara Daisuke, Higashiyama Tetsuya, Yamamoto Kotaro T., Matsunaga Sachihoro, Machida Chiyoko, Sasabe Michiko, Machida Yasunori	4. 巻 101
2. 論文標題 The formation of perinucleolar bodies is important for normal leaf development and requires the zinc finger DNA binding motif in Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1118 ~ 1134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kurita Kazuki, Sakamoto Yuki, Naruse Sota, Matsunaga Tomoko M., Arata Hideyuki, Higashiyama Tetsuya, Habu Yoshiki, Utsumi Yoshinori, Utsumi Chikako, Tanaka Maho, Takahashi Satoshi, Kim Jong-Myong, Seki Motoaki, Sakamoto Takuya, Matsunaga Sachihoro	4. 巻 132
2. 論文標題 Intracellular localization of histone deacetylase HDA6 in plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 629 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-019-01124-8	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 Nurani Alif Meem, Ozawa Yasuko, Furuya Tomoyuki, Sakamoto Yuki, Ebine Kazuo, Matsunaga Sachihoro, Ueda Takashi, Fukuda Hiroo, Kondo Yuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Deep Imaging Analysis in VISUAL Reveals the Role of YABBY Genes in Vascular Stem Cell Fate Determination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 255 ~ 264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa002	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 Hirai Risaku, Higaki Takumi, Takenaka Yuto, Sakamoto Yuki, Hasegawa Junko, Matsunaga Sachihiko, Demura Taku, Ohtani Misato	4. 巻 9
2. 論文標題 The Progression of Xylem Vessel Cell Differentiation is Dependent on the Activity Level of VND7 in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 39 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants9010039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計27件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 坂本卓也、坂本勇貴、御子侑香、伊藤ななみ、松永幸大
2. 発表標題 シロイヌナズナの新規染色体構造構築制御因子の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本卓也、坂本勇貴、御子侑香、伊藤ななみ、松永幸大
2. 発表標題 シロイヌナズナの新規染色体構造構築制御因子の探索
3. 学会等名 日本植物形態学会第31回総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊水音、坂本勇貴、坂本卓也、松永幸大
2. 発表標題 植物における新奇核膜内膜局在タンパク質の同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 御子侑香、坂本卓也、伊藤ななみ、坂本勇貴、松永幸大
2. 発表標題 シロイヌナズナの間期セントロメア配置制御に核膜孔複合体が関与する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本勇貴、石本安奈、酒井友希、佐藤萌子、辻寛之、西浜竜一、河内孝之、松永幸大
2. 発表標題 iTOMEIの開発と応用
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤萌子、坂本勇貴、松永幸大、辻寛之
2. 発表標題 イネ茎頂メリステムにおける植物ホルモンシグナル伝達のイメージング
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Sakamoto, Mayuko Sato, Takamasa Suzuki, Kiminori Toyooka, Shingo Takagi, Sachihiko Matsunaga
2. 発表標題 Nuclear lamina protein CRWN regulates gene positioning of a copper transport family gene locus
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Sakamoto, Yuki Sakamoto, Yuka Oka, Takamasa Suzuki, Stefan Grob, Ueli Grossniklaus, Sachihito Matsunaga
2. 発表標題 Exploring biological meanings of the correct centromere distribution in plants
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 June-Sik Kim, Yuki Sakamoto, Fuminori Takahashi, Mikiko Kojima, Kaoru Urano, Hitoshi Sakakibara, Sachihito Matsunaga, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki
2. 発表標題 ER stress-responsive transcription factors bZIP17 and bZIP28 regulate root elongation
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Alif Meem Nurani, Yuki Kondo, Yuki Sakamoto, Kazuo Ebine, Sachihito Matsunaga, Takashi Ueda, Hiroo Fukuda
2. 発表標題 Spatial regulation involved in bi-directional differentiation of vascular cells in Arabidopsis
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Natsuki Hasegawa, Keisuke Tanaka, Hirokazu Takahashi, Tomoaki Nishiyama, Yuki Sakamoto, Dario Copeti, Hisato Kobayashi, Mikio Nakazono, Kentaro K. Shimizu, Sachihito Matsunaga, Hiroyuki Tsuji
2. 発表標題 Florigen in cactus
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayuri Ando, Takumi Ogawa, Shuichiro Goto, Shoko Kojima, Yuki Sakamoto, Sachihiro Matsunaga, Yasunori Machida, Chiyoko Machida
2. 発表標題 Roles of nucleolar proteins for nuclear localization of zinc-finger-like protein ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2) in leaf development of Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yui Fujiwara, Takuya Sakamoto, Yuki Sakamoto, Nobutoshi Yamaguchi, Toshiro Ito, Sachihiro Matsunaga
2. 発表標題 Analysis of relationship between maintenance of heat stress memory and chromosome higher order structure
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Sakamoto, Yuki Sakamoto, Yuka Oko, Stefan Grob, Ueli Grossniklaus, Sachihiro Matsunaga
2. 発表標題 Maintenance of chromatin stability brought by two-step regulation of centromere distribution
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Sakamoto, Mayuko Sato, Kiminori Toyooka, Shingo Takagi, Sachihiro Matsunaga
2. 発表標題 Plant nuclear lamina regulates gene expression under stress condition
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊水音、坂本勇貴、桑田啓子、松永幸大
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける新奇核膜内膜タンパク質の同定
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 御子侑香、坂本卓也、坂本勇貴、松永幸大
2. 発表標題 核膜関連タンパク質によるセントロメア配置制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤沙友里、小川拓海、小島晶子、坂本勇貴、松永幸大、町田泰則、町田千代子
2. 発表標題 シロイヌナズナの葉の発生分化に関わるzinc-finger-likeタンパク質AS2の細胞内局在の解析
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊水音、坂本勇貴、松永幸大
2. 発表標題 植物における新奇核膜内膜タンパク質の同定と解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 御子侑香、坂本卓也、坂本勇貴、松永幸大
2. 発表標題 核膜関連因子による間期セントロメア配置決定機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤沙友里、小川拓海、神谷翔子、山川美里、小島晶子、坂本勇貴、松永幸大、町田泰則、町田千代子
2. 発表標題 シロイヌナズナの葉の発生分化に関わるZinc-finger-likeタンパク質AS2の核小体局在性の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本勇貴、高木慎吾、松永幸大
2. 発表標題 植物核ラミナの構造と機能の解析
3. 学会等名 日本植物形態学会第30回総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 御子侑香、坂本卓也、坂本勇貴、松永幸大
2. 発表標題 核膜関連タンパク質によるセントロメア配置決定機構の解析
3. 学会等名 日本植物形態学会第30回総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊水音、坂本勇貴、松永幸大
2. 発表標題 植物における新奇核膜内膜タンパク質の同定
3. 学会等名 日本植物形態学会第30回総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤ななみ、御子侑香、坂本勇貴、坂本卓也、松永幸大
2. 発表標題 シロイヌナズナのセントロメア配置制御機構における核膜孔複合体の網羅的解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧野晃司、工藤大彰、高橋知愛、坂本勇貴、石田咲子、松田頼子、西浜竜一、河内孝之、十川太輔、大和勝幸、高木慎吾
2. 発表標題 ゼニゴケにおける植物核ラミナタンパク質 CRWN の機能解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 June-Sik Kim、坂本勇貴、高橋史憲、小嶋美紀子、浦野薫、榊原均、松永幸大、篠崎和子、篠崎 一雄
2. 発表標題 小胞体ストレス応答の欠如による根の伸長阻害を回復するサプレッサー変異の機能解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 生体試料の透明化方法及び生体試料脱色剤	発明者 坂本勇貴、松永幸大	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-150513	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----