

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06182

研究課題名(和文)次世代育種技術を用いた人工稔性回復因子の開発

研究課題名(英文) Research and development of artificial fertility restorer genes using the new plant breeding techniques.

研究代表者

風間 智彦 (Kazama, Tomohiko)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：30431464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞質雄性不稔性(CMS)イネに対する人工稔性回復因子の開発を行うことを目的とした。特に、次世代育種技術である(1)TALENを用いた方法と(2)カスタムPPRを用いる方法を行った。(1)では、BT型CMSイネのミトコンドリアorf79をターゲットとするmitoTALENを導入する事で、稔性が回復することが明らかとなった。一方、(2)では、orf79に結合するカスタムPPRタンパク質をコードする遺伝子をBT型CMSイネへ導入したが、稔性の回復は見られなかった。以上のことより、カスタムPPRタンパク質を機能させるためには、結合性以外にも考慮すべき問題があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ミトコンドリアゲノムには、呼吸に関与するタンパク質をコードする遺伝子だけでなく、細胞質雄性不稔性の原因遺伝子もコードしている。しかし、植物ミトコンドリアは形質転換ができないため、遺伝子の機能解析は限定的にしか行われてきていない。そこで、人工制限酵素TALENと配列特異的RNA結合タンパク質PPRを用いて、ミトコンドリア遺伝子の発現制御を行うことを目的とした。本研究でミトコンドリア遺伝子の発現制御が可能になれば、基礎科学としてのインパクトも高い。さらに、農業上重要な形質である細胞質雄性不稔性の稔性回復遺伝子を人為的に合成することが可能となり、多種育種の基盤に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop artificial fertility restorer genes using the next plant breeding techniques (NBT), TALEN (transcription activator-like effector nuclease) and PPR (pentatricopeptide repeat protein). First, we introduced mitochondria-targeted TALENs, which are bound to a CMS-associated gene of BT-type CMS rice, orf79. In this case, we obtained orf79-depleted plants. Those plants showed fertility restoration. Interestingly, the knockout of orf79 caused unexpected changes in the mitochondrial genome by homologous recombination via short sequence, possibly as a result of some unusual feature of plant mitochondrial genome. Next, we constructed artificial PPR protein-coding genes and introduced them into BT-type CMS. Those proteins were confirmed to bind to orf79 RNA in vitro, however, we could not obtain fertility-restored transgenic plants. This indicates that not only binding activity but other activities are required to create functional artificial PPR proteins.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物ミトコンドリア 細胞質雄性不稔性 次世代育種技術

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物ミトコンドリアゲノムには、呼吸に関与するタンパク質をコードする遺伝子だけではなく、細胞質雄性不稔性の原因遺伝子や機能不明の *orf* が存在することが知られている。一方、核や葉緑体のゲノムと異なり、植物ミトコンドリアは形質転換ができないため、ミトコンドリアゲノムにコードされる遺伝子の機能解析は限定的であった。近年、動物のミトコンドリア病の治療を目的として、TALEN (transcription activator-like effector nuclease) を用いたミトコンドリアゲノム編集が報告された。このことは、植物においてもミトコンドリアゲノムの改変に TALEN が利用可能であることを示していると考えられた。

また、陸上植物のゲノム解析から明らかにされた配列特異的 RNA 結合タンパク質 (pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質) は、変異体の解析や生化学的解析、計算科学によって、1PPR モチーフで核酸 1 塩基を認識することが明らかにされてきた。このことは、PPR モチーフを組み上げることで、特定の希望の配列に結合して、修飾を行うカスタム PPR タンパク質の合成が可能であることを示唆している。

これまでの研究で、農業上重要な形質の一つである細胞質雄性不稔性は、ミトコンドリアゲノムにコードされる細胞質雄性不稔性原因遺伝子によって引き起こされると考えられている。穀物のように種子を可食部とする作物では、細胞質雄性不稔性を解除する稔性回復遺伝子によって、不稔性を回避し採種可能にすることが重要である。このような稔性回復遺伝子は、核ゲノムにコードされており、その翻訳産物はミトコンドリアにおいて細胞質雄性不稔性原因遺伝子の発現を抑制することで、稔性を回復させていると考えられている。

これらのことより、ミトコンドリアゲノムにコードされる細胞質雄性不稔性の原因遺伝子の発現を抑制する人工稔性回復遺伝子を TALEN とカスタム PPR で構築することで、ミトコンドリア遺伝子発現制御のモデル系を構築でき、稔性回復遺伝子がクローニングされていない作物でも適応可能な人工稔性回復因子の開発につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリアゲノムにコードされる細胞質雄性不稔性 (CMS) 原因遺伝子によって、正常な花粉が分化できなくなり、自殖による種子が採れなくなる CMS イネを材料に用いて、次世代育種技術 (new plant breeding techniques; NBT) を用いた人工稔性回復因子 (人工 RF) の開発を行うことを目的とした。特に、(1)ミトコンドリア移行 TALEN によって CMS 原因遺伝子へ変異を導入することで、稔性の回復を引き起こすことと、(2) 人工 PPR タンパク質をコードする遺伝子を導入することで CMS 原因遺伝子から転写される RNA を切断もしくは分解させることで稔性の回復を引き起こすことの 2 点について研究開発を行う。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア移行 TALEN を用いた方法

BT 型 CMS イネの CMS 原因遺伝子 *orf79* をターゲットとする 2 分子型 TALEN (TAL1, TAL2, TAL3) を発現するコンストラクトを構築した。ターゲットとする配列を表 1 および図 1 に示す。これらのコンストラクトを BT 型 CMS イネにアグロバクテリウム法で遺伝子導入を行った。

表 1 TALEN のターゲット配列

	Target_Left (5' -- 3')	Target_Right (5' -- 3')
TAL1	TTGTGCTATGGCAAATCTG	CCACTACCCGAGGGACTAA
TAL2	TACCCGAGGGACTAACGGT	CTTCGGTGTTCGTTGTAGGA
TAL3	TTGCTAAAGTATCAGGC	CCGGCTTTAATGAAAA

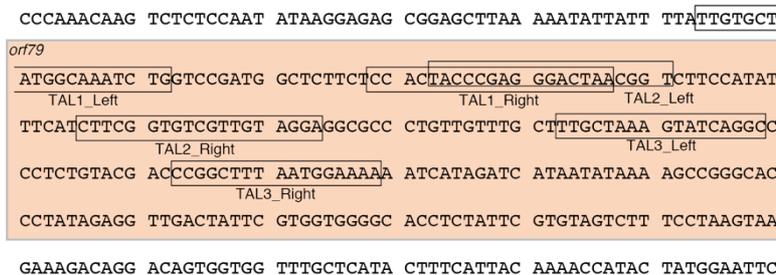


図 1 TALEN ターゲット配列の位置関係を模式的に示した。

得られた遺伝子導入個体について、*orf79* にどのような変異が導入されているかを調査した。さらに、それぞれの個体の種子稔性を調査した。

次に、TAL2 および TAL3 を導入する事で、稔性の回復した個体を花粉親に BT 型 CMS イネとの交配を行い F1 を得た。この F1 個体はミトコンドリアに *orf79* を保有し、核には TAL2 もしくは TAL3 を保有することが期待される。得られた F1 個体を播種し、*de novo* のミトコンドリア編集が起こるか？ (つまり、F1 の稔性が回復するか?) を調査した。

(2) 人工 PPR タンパク質を用いた方法

BT 型 CMS の稔性回復遺伝子としてクローニングされた *Rf1* は、791 アミノ酸からなる PPR タンパク質をコードしていた。さらに、野生イネの *Rf1* 座乗領域のゲノム解析を行った結果、その領域には *Rf1* と相同性が高く 791 アミノ酸からなる PPR タンパク質をコードする PPR 遺伝子が 3 個 (*PPR791a*, *PPR791b*, *PPR791c*) 存在することが明らかとなった。遺伝子導入の結果、*PPR791a* のみが BT 型 CMS イネの稔性を回復させることが明らかとなった。さらに、以前に報告していた RF1 との配列の比較によって、非機能型 PPR791 (*PPR791B* および *PPR791C*) には、共通のアミノ酸置換が 13 箇所存在することが分かっている。

これらの変異を *PPR791A* に導入する事で、稔性回復能を失わせるのに十分なアミノ酸置換を明らかにすることで、RF1 の機能に重要なアミノ酸について調査する。

さらに、*orf79* の特定の配列 5 箇所 (表 2 および図 2) に結合する PPR タンパク質 (ARF) をデザインし、PPR モチーフのみの遺伝子と、RNase を C 末端に結合させたコンストラクトを構築し、BT 型 CMS イネへアグロバクテリウム法で導入した。得られた遺伝子導入個体を P1 温室で育成させ、その種子稔性を調査した。

表 2 ARF ターゲット配列	RF1 結合領域 (予測)
Seq	CATTTC ⁴ CA TGTTCGAATT CGTTTTTCGT TGGAAAAACC AACGCCGACC CCAAAACAAG TCTCTCCAAT ATAAGGAGAG CGGAGCTTAA AAATATTATT ¹ TTATTGTGCT ⁵
ARF1	ATG GCA AAT CTG GTC ² CGA TGG CTC TTC TCC ACT ACC CGA GGG ACT AAC GGT CTT CCA TAT
ARF2	TTC ATC TTC GGT GTC GTT GTA GGA GGC GCC CTG ³ TTG TTT GCT TTG CTA AAG TAT CAG GCC
ARF3	CCT CTG TAC GAC CCG GCT TTA ATG GAA AAA ATC ATA GAT CAT AAT ATA AAA GCC GGG CAC
ARF4	CCT ATA GAG GTT GAC TAT TCG TGG TGG GGC ACC TCT ATT CGT GTA GTC TTT CCT AAG TAA
ARF5	TATTGTGCTATGGCAAAT

図 2 *orf79* 周辺配列と ARF のターゲット領域

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア移行 TALEN を用いた方法

TAL1, TAL2, TAL3 を BT 型 CMS イネへ遺伝子導入した結果、TAL1 導入個体は得ることができなかったが、TAL2 導入個体を 7 個体および TAL3 導入個体を 11 個体得ることができた (表 3)。

表 3 TAL 導入個体	<i>orf79</i> の有無		種子稔性の有無		
TAL2/BTA-1	×	○	TAL3/BTA-1	×	○
TAL2/BTA-2	×	○	TAL3/BTA-2	×	○
TAL2/BTA-3	×	-	TAL3/BTA-3	×	○
TAL2/BTA-4	×	○	TAL3/BTA-4	×	○
TAL2/BTA-5	×	○	TAL3/BTA-5	×	-
TAL2/BTA-6	○	×	TAL3/BTA-6	×	○
TAL2/BTA-7	×	○	TAL3/BTA-7	○	×
			TAL3/BTA-8	×	○
			TAL3/BTA-9	×	○
			TAL3/BTA-10	×	○
			TAL3/BTA-11	×	○

それぞれの個体について、*orf79* を増幅することのできるプライマー対を用いて増幅を行ったところ、TAL2/BTA-6 および TAL3/BTA-7 の 2 個体で *orf79* が増幅できたが、それ以外の個体では *orf79* が増幅できないことが分かった。この結果は、*orf79* を検出するためのサザンブロット分析においても同様であった。つまり、*orf79* をターゲットとする TALEN を導入する事で得られた遺伝子導入個体では、*orf79* が消失していることが明らかとなった。これらの系統の *orf79* 周辺の領域も消失しているのかどうかを調査するために、9 個体についてゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーで得られた配列を、BT 型 CMS イネミトコンドリア配列にプロットしたところ、個体によって消失している配列の大きさが異なることが明らかになった (図 3)。さらに、TAL による二本鎖切断 (DSB) によって生じた末端がどのように修復されたかを調査したところ、比較的短い相同配列を介した組換えによって修復されていることが分かった。

種子稔性を調査したところ、*orf79* を消失した個体では、稔性が回復していることが分かった。以上のことより、CMS 原因遺伝子をターゲットとする TALEN を遺伝子導入することで、CMS 原因遺伝子のノックアウトが可能であることが分かった。次に、*orf79* をターゲットとする TAL の遺伝子導入によって、種子稔性が回復した個体を花粉親として、BT 型 CMS へ交配を行った F1 を得た。この F1 個体は、ミトコンドリアに *orf79* を保有し、核には *orf79* をターゲットとする TALEN 遺伝子を保有する。これらの F1 について、種子稔性を調査したが稔性の回復は見られなかった。また、これらの系統では *orf79* が消失していなかった。以上のことより、

TALEN を用いた人工 RF は、薬剤による選抜圧のもとでは機能させることができるが、*de novo* では機能しないことが分かった。これは、ミトコンドリアゲノムが細胞内でコピー数が多いこと、コンストラクトに利用したプロモーターが 35S であるため、生殖器官での発現が弱かったこと、2 分子 TALEN が機能しなかったことが原因として考えられた。

(2) 人工 PPR タンパク質を用いた方法

機能型 PPR (RF1 および PPR791A) と非機能型 PPR (PPR791B および PPR791C) の配列を比較したところ、非機能型に共通するアミノ酸置換 13 箇所を見いだした。このうち、PPR モチーフの核酸認識に重要な PPR モチーフ内の 1 番目、4 番目、ii 番目のアミノ酸に変異が起きているのは 4 箇所であった。この 4 変異について PPR791A へ導入した。この結果、N162T および N235S の

アミノ酸変異は稔性回復能を失わせるのに十分であることが分かった。どちらの変異も PPR モチーフ内の 4 番目のアミノ酸であることより、これまでの報告通り PPR モチーフの 4 番目のアミノ酸は PPR タンパク質が機能を発揮するために重要であることが明らかになった。

次に、*orf79* 内部および周辺の 5 箇所の配列に結合するような PPR タンパク質を発現するコンストラクト (ARF1~ARF5) を作成し、BT 型 CMS へ遺伝子導入した。それぞれのターゲット配列につき、C 末端に 3 x FLAG がついたものと、RNase ドメインを付加した 2 種類のコンストラクトを準備した。それぞれのコンストラクトの導入で得られた個体について、種子稔性の確認を行ったが、稔性は確認できなかった (表 4)。

以上のことより、ターゲット配列に単に結合する PPR タンパク質を導入するだけでは、ターゲットとする RNA の切断や分解は引き起こせないことが明らかとなった。つまり、RF1 は配列の指定だけをしているのではなく、切断に必要な他の因子を呼び込むような機能を持っている可能性が示唆された。

表 4 ARF 導入個体の種子稔性

	1	2	3	4	5
ARF1_3xFLAG	S	S	S	-	-
ARF1_RD14	S	S	S	S	-
ARF2_3xFLAG	S	S	S	S	-
ARF2_RD14	S	S	S	-	-
ARF3_3xFLAG	-	-	-	-	-
ARF3_RD14	-	-	-	-	-
ARF4_3xFLAG	S	S	S	S	S
ARF4_RD14	S	S	S	S	S
ARF5_3xFLAG	S	S	S	S	S
ARF5_RD14	S	S	S	S	S

S: Sterile, -: No transformant

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. [Kazama, T., Toriyama, K. \(2016\) Whole mitochondrial genome sequencing and re-examination of a cytoplasmic male sterility associated gene in Boro-Taichung-type cytoplasmic male sterile rice. PLoS ONE, vol. 11, e0159379 査読有](#)
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159379>

[学会発表] (計 7 件)

1. 風間智彦、亘悠太、堤伸浩、鳥山欽哉、有村慎一
 BT 型細胞質雄性不稔性イネにおけるミトコンドリア遺伝子 *orf79* の破壊
 日本育種学会 第 135 回講演会・2019 年

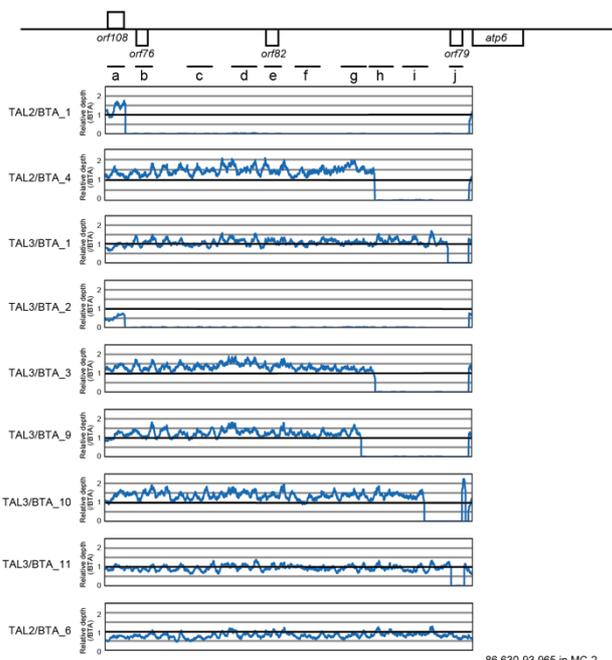


図 3 *orf79* 周辺配列の欠失
 青線が 0 まで沈み込んでいる領域が消失した領域

86,630-93,965 in MC-2

2. Tomohiko Kazama

Mitochondrial genome modification using mitochondria-targeted TALENs.
WUR-TU Plant Science 2018・2018年

3. 佐々木実穂、小松千春、志田怜那、長恵理子、鳥山欽哉、風間智彦
稔性回復遺伝子 Rf1 は W1112 型細胞質雄性不稔性イネの稔性を回復させるか？
第 13 回 東北育種研究集会・2018 年

4. 木下諄美、有村慎一、鳥山欽哉、風間智彦
ミトコンドリア移行 TALEN を用いた CW 型細胞質雄性不稔性イネの雄性不稔性原因遺伝子の破壊
第 13 回 東北育種研究集会・2018 年

5. 大向詩穂、有村慎一、鳥山欽哉、風間智彦
ミトコンドリア移行 TALEN を用いた CMS 原因遺伝子候補 *orf352* のノックアウト
第 13 回 東北育種研究集会・2018 年

6. Kazama, T., Toriyama, K.
Comparative analysis of cytoplasmic male sterility developed form various rice.
XIX International Botanical Congress・2017 年

7. 小方郁弥、鳥山欽哉、風間智彦
野生イネに由来する *Rf1* 相同遺伝子の分子遺伝学的解析
日本育種学会 第 132 回講演会・2017 年

[図書] (計 1 件)

1. Kazama, T., Nishimura, A., Arimura S. (2018) Chapter 4. Rice organelle genomics, approaches to genetic engineering and breeding. Takuji Sasaki & Motoyuki Ashikari edit. Rice Genomics, Genetics and Breeding. pp 53-67. Springer Nature press.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：植物ミトコンドリアゲノムの編集方法
発明者：有村慎一，堤伸浩，片山健太，日高朋美，風間智彦，鳥山欽哉
権利者：国立大学法人 東京大学
種類：特許
番号：特願 2017-24923
出願年：2017 年
国内外の別： 国内および米国

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bioadp/PukiWiki/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鳥山 欽哉

ローマ字氏名：TORIYAMA, kinya

研究協力者氏名：有村 慎一

ローマ字氏名：ARIMURA, shin-ich

研究協力者氏名：中村 崇裕

ローマ字氏名：Nakamura, takahiro

研究協力者氏名：伊藤 方子

ローマ字氏名：ITO, masako

研究協力者氏名：小方 郁弥

ローマ字氏名：OGATA, ikuya

研究協力者氏名：木下 諄美

ローマ字氏名：KINOSHITA, nozomi

研究協力者氏名：佐々木 実穂

ローマ字氏名：SASAKI, miho

研究協力者氏名：大向 詩穂

ローマ字氏名：OOMUKAI, shiho

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。