

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02927

研究課題名（和文）植物ミトコンドリアゲノムへの外来遺伝子導入技術開発と異種CMS移植の検討

研究課題名（英文）Introduction of genes including CMS into plant mitochondria

研究代表者

有村 慎一（Shin-ichi, Arimura）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：00396938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：代表者らが開発した植物ミトコンドリアゲノムを標的としたゲノム編集技術 mitoTALEN法を応用し、その標的切断部位に新規外来遺伝子を挿入する試みを行った。パーティクルガン法による導入は成功していないが、試みの途上で得た知見から、標的部位、挿入遺伝子配列の改良を重ねており、また新たな遺伝子導入方法の利用共同研究につながり現在も発展的に継続している。この間、mitoTALEN法（DNA二本鎖切断による標的遺伝子破壊）を改変することで、標的一文字置換技術について検討を行い、葉緑体、並びにミトコンドリアでそれぞれその安定的完全置換に成功し、これをそれぞれ論文発表を行った。

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、農業生産F1品種の生産に半世紀以上使われる細胞質雄性不稔性の原因遺伝子がコードされているが、この基礎的完全理解、並びに異種移植応用は未だ達成されていない。この原因は、ゲノム改変が難しく、外来遺伝子導入が不可能であるからである。今回、外来遺伝子挿入は達成できていないが、近年急速に進展したゲノム編集技術を改良することで、標的配列の破壊、ゲノム構造の攪乱、並びに新たに標的一文字置換ができるようになった。後者はNature Plants誌に掲載されるとともに新聞や国内外のウェブサイトに掲載され、大きな反響を受け、この技術を用いた国内外の共同研究開始につながった

研究成果の概要（英文）：The mitoTALEN, a genome editing technology targeting the plant mitochondrial genome developed by the project leaders, was applied to introduce foreign genes into the targeted site. Although they have not succeeded in introducing the gene using the particle bombardment method, they have continued to improve the target site and inserted gene sequence based on the knowledge they obtained during the course of their attempts, which led to collaborative research using a new gene introduction method, which is still ongoing. In the meantime, we have investigated the target single base substitution technique by modifying the mitoTALEN method (targeted gene disruption by DNA double-strand breaks), and succeeded in stable complete nucleotide substitutions in chloroplasts and mitochondria, respectively, which were published in the respective papers.

研究分野：育種遺伝科学

キーワード：植物ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

植物ミトコンドリアゲノムの形質転換や遺伝子導入技術は、「単離植物ミトコンドリアを用いた *in vitro* の研究 (Farre & Araya 2002 等)」や、「細胞融合による異種ミトコンドリア融合による両ゲノム間の組換えの研究 (Sanchez-Puerta 2015 等)」、「核ゲノムコードのミトコンドリアゲノム維持修復遺伝子群の改変によるミトコンドリアゲノムランダム変異創出 (Gualberto & Newton 2017 総説)」や「核コードの RNA editing 構成因子の破壊や新規導入によるミトコンドリアゲノム “代理変異体 (Surrogate mutants)” を用いた遺伝子解析 (Colas des Francs-Small 2014, 2018)」、「キメラリボザイムを用いた植物ミトコンドリアゲノム上遺伝子の発現抑制の研究 (Val 2011, Sultan 2016)」などがあるが、現在も植物ミトコンドリアゲノムの直接的な遺伝子改変・形質転換技術は未達のままであった (Larossa & Remacle 2013 総説, Gualberto & Newton 2017 総説等)。

また、研究対象材料としている植物ミトコンドリアゲノム上の細胞質雄性不稔の原因遺伝子群に関する研究では、これまで日本が有力グループ国の一つとして数多くの業績を出してきた。本申請のイネとセイヨウナタネやコセナダイコンの CMS 原因遺伝子同定や解析、その稔性回復遺伝子同定は東北大学の鳥山欽哉氏・風間智彦氏と研究分担者である肥塚信也氏らが世界に先駆けて同定した遺伝子群 (文献 10-13) である。これらを用いることは、研究材料・解析技術・情報交換の上でも先端研究をリードし維持できる可能性を高めると考えた。

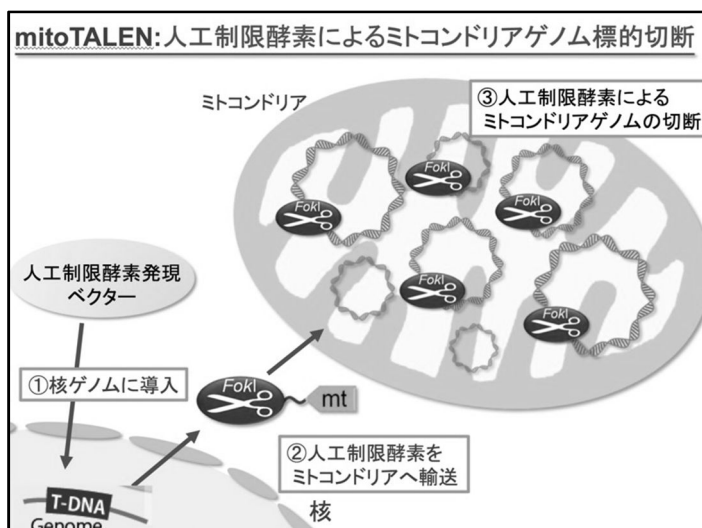
2. 研究の目的

植物ミトコンドリアゲノム上には細胞質雄性不稔 (CMS) 遺伝子が存在し、F1 ハイブリッド育種と F1 種子生産現場の両方で多用されている。研究開始時までに約 20 種類の CMS 原因候補遺伝子の配列が報告されているが、これらは (近縁種以外では) 互いに相同性を持たず、また雄性不稔惹起の詳しい分子機構もいまだ多くが不明である。本申請研究では、我々が開発した植物ミトコンドリアゲノム編集技術 mitoTALEN 法をもちいて、現在不可能な「標的配列への外来遺伝子導入/安定遺伝可能な形質転換」技術開発を行う。また、「異種の CMS 遺伝子を移植し、雄性不稔現象の移植可能性を検討」し、CMS 分子機構解明と応用展開の基盤構築を目指した。

3. 研究の方法

本研究の目的は、「植物ミトコンドリアゲノムへの遺伝子導入技術の確立」と、これを用いた「CMS 原因遺伝子の移植」の二つであった。

植物ミトコンドリアゲノムへの遺伝子導入技術の確立: 我々は最近、イネとナタネを材料にして、人工制限酵素 TALEN にミトコンドリア局在シグナルを付加させた mitoTALEN 法 (右下図) を用いて標的遺伝子破壊に成功した (特許出願中, 投稿論文審査中)。二つ一組の TALEN 分子はそれぞれが切断標的の前後配列を認識し、その間で二重鎖切断を引き起こす。核ゲノムでは二重鎖切断は通常 NHEJ (Non-homologous end joining) によって修復され、結果として 10bp 程度の短い欠失や挿入が起こることが多いが、植物ミトコンドリアゲノムの場合、切断の両末端配列同士は結合せず、組換えを介して互いに別々の遠方の相同配列とつながることが分かった。これにより現れた改変ゲノムは、標的配列付近の大規模欠失 (数百 bp ~ 数 Kb) と大規模構造変化が起こっていたが、安定して (ホモプラスミー化して) 子孫に維持遺伝されていた。これは恐らく細胞内に 50 コピー以上ある全ての分子が切断され、代わりに低頻度で現れた (生育に必要な遺伝子をひとつながりでもつ) 修復後の構造変化ゲノムが特異的に増幅されてホモプラスミー化し維持されたことによると思われる。mitoTALEN の切断活性の高さとゲノムの相同組換え活性の高さが伺える。本申請は「mitoTALEN 法による DNA 切断の際に、切断両端や周辺配列と同じ配列



修復後の構造変化ゲノムが特異的に増幅されてホモプラスミー化し維持されたことによると思われる。mitoTALEN の切断活性の高さとゲノムの相同組換え活性の高さが伺える。本申請は「mitoTALEN 法による DNA 切断の際に、切断両端や周辺配列と同じ配列

をその両端にもつ外来 DNA を共存(次ページ図)させ、植物ミトコンドリアゲノムで元来頻繁に見られる相同組換え活性を用いて、「ゲノムの大規模編成を引き起こさず」に「組換え遺伝子挿入」を起こさせるという試みである。外来 DNA のミトコンドリア内への導入については、最近、理化学研究所の沼田圭司氏らのグループが、細胞透過性ペプチドを用いて植物ミトコンドリア内に外来 DNA 断片を一過的に導入する技術 (Peptide-DNA 混合法) を報告しており (Chuah 2015), さらに実際に一部で組換わった DNA 分子の検出も報告している (Yoshizumi 2018)。ただしこの方法では、組み入れた DNA は、細胞内に存在する大多数の非組み換えゲノムとの混在状態 (ヘテロプラスミー) を打破できておらず、後代に組換えゲノムを優先的に維持させるに至っていない。この「組換えゲノム」と「非組換えゲノム」の細胞内ヘテロプラスミー性の打破は、mitoTALEN を同時発現させて非組換えゲノムを切断除去することで可能と考えられる。最近ほ乳類でも mitoTALEN 法が試みられ、細胞内に同時に存在する正常型と病態型のゲノムのヘテロプラスミー状態から、病態型ゲノムだけを切断除去して正常型ゲノムだけのホモプラスミー状態へシフトさせることに成功したことが報告され、不治の病であったミトコンドリア病の治療法として大きな期待が寄せられている (Reddy 2015, Bacman 2018, Gammage 2018)。植物の mitoTALEN 技術は我々の他にまだ報告がなく、ベクター構築と検出系は独自の工夫と技術が必要なため独自性を維持できる可能性が高い。このゲノム編集技術と Peptide-DNA 混合法などの本邦が先行する技術を組み合わせることは独自性と創造性の両面において強みと言える。

CMS 原因遺伝子の移植: 本申請研究では上記遺伝子導入技術を用いて、イネ BT 型 CMS 関連遺伝子 *orf79* を、セイヨウナタネ SW18 の CMS 関連遺伝子 *orf125* 領域等に挿入置換させ、「異種の CMS 原因遺伝子は交換/移植が可能か？」を検討する。これは、CMS の分子機構や発生過程を探る研究の一端であると共に、育種現場で実際に使用されている少数の CMS 遺伝子の多様性拡張可能性を検証することにつながる。CMS を標的にした理由として、その農業的重要性の他に、形質転換実験の初導入配列として有利な特徴 (その改変が植物体初期生育に悪影響を及ぼさないことや、挿入遺伝子としてとても短い (237bp) 等、右下囲い) を多く備えていることも重要な点として挙げられる。我々は、mitoTALEN 法によって、既にイネとセイヨウナタネの CMS 関連遺伝子 (*orf79*, *orf125*) の標的破壊実験に成功し、各々の雄性不稔が回復することも見出している。これらの実験の過程において母本/材料/検出系が揃ったことも強みである。このように科学的/農学的重要性と実現可能性の両面から CMS 遺伝子を移植対象とする本申請研究を計画した。

4. 研究成果

2019年度は既に開発した上記 mitoTALEN 技術をつかった稲と菜種を用いた細胞質雄性不稔原因遺伝子の同定の内容を論文 Nature Plants 誌に掲載させることができた。日本並びに海外のウェブサイトやマスコミに掲載してもらうこともでき、多数の共同研究の開始につながった。2020年はコロナ禍で思うように進めることができなかったが、mitoTALEN 技術をシロイヌナズナへの適用に成功させ、これを効率的に進める方法を Plant Journal 誌に掲載させることができ、雑誌の research highlight にも紹介していただいた。この二つの発表で招待講演複数を行うこともできた。2020年に、米国ハーバード大学から類似技術であり、革命的な技術、哺乳類のミトコンドリア DNA の標的一文字置換技術が公開された。そのため、これを急いで植物に適用することも行なったところ、非常にうまく生き、世界初の葉緑体ゲノムの標的一文字置換に成功し、Nature Plants 誌に掲載された。この技術をミトコンドリアにも転用させることに成功し、2022年5月に PNAS 誌に掲載された。このように、期間内に遺伝子導入そのものには結び付かなかったが、紆余曲折をもって当初期待以上の研究結果と成果を上げることができた。また、そのおかげもあり、外来遺伝子導入の共同研究が開始され進展している。今後の大きな展開が見込めており、その種を見つけられた点も成果としておおきいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Arimura Shin-ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of mitoTALENs-Directed Double-Strand Breaks on Plant Mitochondrial Genomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 153 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12020153	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 Arimura Shin ichi, Ayabe Hiroki, Sugaya Hajime, Okuno Miki, Tamura Yoshiko, Tsuruta Yu, Watari Yuta, Yanase Shungo, Yamauchi Takaki, Itoh Takehiko, Toyoda Atsushi, Takanashi Hideki, Tsutsumi Nobuhiro	4. 巻 104
2. 論文標題 Targeted gene disruption of ATP synthases 6 1 and 6 2 in the mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana by mitoTALENs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1459 ~ 1471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15041	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 Ayabe Hiroki, Kawai Narumi, Shibamura Mitsuhiro, Fukao Yoichiro, Fujimoto Masaru, Tsutsumi Nobuhiro, Arimura Shin-ichi	4. 巻 40
2. 論文標題 FMT, a protein that affects mitochondrial distribution, interacts with translation-related proteins in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 327 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00299-020-02634-9	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 Kubo Tomohiko, Arakawa Takumi, Kitazaki Kazuyoshi, Kazama Tomohiko, Takenaka Mizuki, Sakamoto Wataru, Ishihara Naotada, Nakamura Takahiro, Niikura Satoshi, Arimura Shin-ichi, Handa Hirokazu, Koizuka Nobuya	4. 巻 22
2. 論文標題 Recent advances and perspectives in plant mitochondrial biology for plant breeding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Research	6. 最初と最後の頁 87 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbr.22.W05	査読の有無 無
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 風間智彦、有村慎一	4. 巻 78
2. 論文標題 TALENを用いた植物ミトコンドリアゲノム改変	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 400-401
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 無
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 Ayabe Hiroki, Kawai Narumi, Shibamura Mitsuhiro, Fukao Yoichiro, Fujimoto Masaru, Tsutsumi Nobuhiro, Arimura Shin-ichi	4. 巻 40
2. 論文標題 FMT, a protein that affects mitochondrial distribution, interacts with translation-related proteins in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 327 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00299-020-02634-9	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 Arimura Shin ichi, Ayabe Hiroki, Sugaya Hajime, Okuno Miki, Tamura Yoshiko, Tsuruta Yu, Watari Yuta, Yanase Shungo, Yamauchi Takaki, Itoh Takehiko, Toyoda Atsushi, Takanashi Hideki, Tsutsumi Nobuhiro	4. 巻 104
2. 論文標題 Targeted gene disruption of ATP synthases 6 1 and 6 2 in the mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana by mitoTALENs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1459 ~ 1471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15041	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 Arimura Shin-ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of mitoTALENs-Directed Double-Strand Breaks on Plant Mitochondrial Genomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 153 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12020153	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 風間智彦、有村慎一	4. 巻 78
2. 論文標題 TALENを用いた植物ミトコンドリアゲノム改変	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 400-401
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 無
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 Nakazato Issei, Okuno Miki, Yamamoto Hiroshi, Tamura Yoshiko, Itoh Takehiko, Shikanai Toshiharu, Takanashi Hideki, Tsutsumi Nobuhiro, Arimura Shin-ichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Targeted base editing in the plastid genome of Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 906 ~ 913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-021-00954-6	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6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 有村慎一
2. 発表標題 植物ミトコンドリアのゲノム編集
3. 学会等名 植物生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有村慎一
2. 発表標題 mi toTALEN法による標的遺伝子破壊から垣間見えた植物ミトコンドリアゲノムの修復維持機構と特徴
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有村慎一
2. 発表標題 mitoTALEN法による標的遺伝子破壊から垣間見えた植物ミトコンドリアゲノムの修復維持機構と特徴
3. 学会等名 分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiko Kazama, Nobuya Koizuka and Shin-ichi Arimura,
2. 発表標題 TALEN-based Mitochondrial Genome editing in plants
3. 学会等名 Plant and Animal Genomics XXVIII 2020 San Diego USA. 12th Jan.（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shin-ichi Arimura
2. 発表標題 Targeted disruption of mitochondrial genes associated with cytoplasmic male sterility in rice and rapeseed
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia meeting: Mitochondria, 12th Nov 2019, Suzhou China,（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有村慎一
2. 発表標題 植物ミトコンドリアのゲノム編集
3. 学会等名 日本植物生理学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 執筆者:96名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化	

1. 著者名 執筆者:96名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化/ 第7章12節、ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化	

〔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	肥塚 信也 (Koizuka Nobuya) (30433866)	玉川大学・農学部・教授 (32639)	

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
---------	---------