

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22405

研究課題名（和文）葉緑体からミトコンドリアへの細胞内遺伝子移行の検証

研究課題名（英文）Analysis of intracellular gene transfer from chloroplasts to mitochondria

研究代表者

小田原 真樹（Odahara, Masaki）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：40460034

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子の移行を検出することを目的とした。遺伝子移行を検出することはできなかったが、これは遺伝子移行が頻繁ではない可能性を示唆している。一方で、遺伝子移行を検出するための系を改良し、遺伝子移行が熱ストレスによって亢進されている可能性を見出すことができた。今後はこれらの系をもとに改良し、より大規模な実験を行うことにより、葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行を検出できると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムの流動性や多様性を引き起こす葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行の検出は初の試みであった。多くの課題が見つかったものの、遺伝子移行を検出する系を確立し、また遺伝子移行機構に関するヒントを得ることができたことは、この分野における大きな一歩であったと考えられる。今後、本研究をもとに、生物の多様性をもたらす遺伝子移行やゲノム流動性、植物における物質生産を可能にするミトコンドリア形質転換の研究へと発展することを期待する。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to detect gene transfer from chloroplasts to mitochondria in plants. Unfortunately, the gene transfer was not detectable in this study, suggesting the gene transfer may be an infrequent event. On the other hand, we improved the system to detect the gene transfer, and we showed that the gene transfer can be induced by heat stress. I believe that gene transfer from chloroplasts to mitochondria would be detectable by the improved system with larger scale in the future.

研究分野：植物バイオテクノロジー

キーワード：遺伝子移行 葉緑体 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

植物のミトコンドリアは呼吸によるエネルギーの供給のみならず脂質やアミノ酸の供給においても重要な役割を果たすオルガネラであり、独自のゲノム DNA を持つ。植物ミトコンドリア DNA は動物ミトコンドリア DNA とは異なり、約 15 kb の線状から 3000 kb の環状と非常に多様な構造をとる。特に被子植物のミトコンドリア DNA は構造が複雑かつ多様であり、頻繁に挿入されている核や葉緑体ゲノム由来の配列が構造的多様性の一因となっている。葉緑体由来の配列は、頻繁に獲得と喪失を繰り返していること、また葉緑体由来配列の場合ミトコンドリアゲノム中の 10% 程度となる例もあること、が報告されており (Sloan and Wu, 2014)、これは比較的最近においても葉緑体からミトコンドリアへ遺伝子が移行していることを示唆する。同様の細胞内遺伝子移行は葉緑体と核間あるいはミトコンドリアと核間でも観察されており、葉緑体あるいはミトコンドリアからの核への遺伝子移行は現在でも起きている現象であることが報告されている (Huang et al., 2003; Thorsness et al., 1990)。しかしながら葉緑体からミトコンドリアへの細胞内遺伝子移行が現在でも起きている現象が、そしてどの程度の頻度で起きているかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

植物に内在すると考えられる葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行機構に着目し、葉緑体 DNA に導入した遺伝子のミトコンドリア DNA への移行を解析することにより、葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行の証明を行うことを目的とする。これは同時にミトコンドリアの形質転換を行うことを意味し、未だ確立されていない多細胞植物におけるミトコンドリア形質転換法を確立することも本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行 (ミトコンドリア DNA へのランダムな転移)

ミトコンドリアにおける選抜マーカーとしての使用可能であることが提唱されている sulfadiazine 耐性葉酸合成系遺伝子 *sul1* (Tabatabaei et al., 2019) をミトコンドリアプロモーター (*Pcox2*) 下で発現する *sul1* カセットを葉緑体 DNA に挿入したタバコ (*Nicotiana tabacum*) の形質転換体を取得した。この葉緑体形質転換体の葉を用いて sulfadiazine を含むミトコンドリア選抜条件下でシュート再生させることにより、*sul1* カセットがミトコンドリアゲノムへ移行したミトコンドリア形質転換体の取得を試みた。

(2) 葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行 (ミトコンドリア DNA の特定の座位への転移)

(1) の方法で取得された sulfadiazine 耐性の植物体の *sul1* カセットの転移先の決定が困難であったため、葉緑体 DNA に挿入する *sul1* カセットの両端に約 1 kb のミトコンドリア DNA 相同配列を付加した。植物のミトコンドリアでは相同組換えが活発であり、この相同配列を介してミトコンドリアゲノム上の特定の座位 (標的領域) に *sul1* カセットが転移させることが可能と考えられる。ミトコンドリア DNA 標的領域は、相同組換えが活発であると予想される 18 kb の反復配列上の遺伝子間領域に *sul1* カセットを挿入する形 (MHR1)、転写が活発である *nad9* 遺伝子 (Grimes et al., 2014) のコード領域を *sul1* コード領域で置き換える形 (MHR2) にて設計した。上記 MHR1 と MHR2 の葉緑体形質転換体を作製し、葉を用いて sulfadiazine を含むミトコンドリア選抜条件下でシュート再生させることにより、*sul1* 遺伝子がミトコンドリアゲノムの標的領域へ移行したミトコンドリア形質転換体の取得を試みた。

4. 研究成果

(1) 葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行 (ミトコンドリアゲノムへのランダムな転移)

sul1 カセットを葉緑体 DNA に挿入したタバコ葉緑体形質転換体を作出し、その葉を用いて sulfadiazine 存在下でシュート再生させることにより、sulfadiazine 耐性の植物体を複数取得した。*sul1* マーカー部位をプローブとしたサザンブロット解析を行った結果、これらの sulfadiazine 耐性植物体においては、葉緑体 DNA に挿入した *sul1* 以外に由来するバンドを検出することができた (図 1)。これは *sul1* がゲノム上で転移したことを示唆する。*sul1* がミトコンドリアゲノム上に転移したと仮定し、転移した *sul1* のマッピングを行った。マッピングは、ミトコンドリア DNA 上に 5 kb 間隔で一方向に配置したプライマーと、*sul1* 上に外向きに配置したプライマーを用いた PCR によって行った (図 2)。PCR の結果、sulfadiazine 耐性植物体特異的なバンドは観察されたものの、いずれも転移した *sul1* に由来するものではなかった。転移した *sul1* はミトコンドリア DNA 上にランダムに挿入かつヘテロプラスミックな

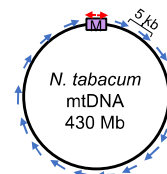


図2. PCR法による転移した *sul1* のマッピング
ミトコンドリアゲノム上にランダムに挿入されると予想される *sul1* マーカー (M) 上に外向きに配置したプライマー (赤) と 5 kb ごとに一方向に配置されたプライマー (青) で PCR を行う。sulfadiazine 耐性植物体特異的に増幅された DNA を解析することにより、*sul1* マーカーの挿入位置を決定する。

葉緑体ゲノム上に *sul1* カセットを組み込んだ植物体 (PTIS original) と、PTIS を用いて得られた sulfadiazine 耐性植物体の全ゲノム DNA を KpnI で処理し、*sul1* プローブで検出を行った。*は *sul1* の転移を示唆するバンド。

状態で存在していると考えられ、上記のような PCR 法で *sul1* の転移先を決定するのは困難であると判断した。

(2) 葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行 (ミトコンドリアゲノムの特定の座位への転移)

両端にミトコンドリア DNA 相同配列を付加した *sul1* カセットを葉緑体ゲノムに挿入した葉緑体形質転換体を作成した (MHR1, MHR2)。葉緑体から核への遺伝子移行が熱処理 (45 °C、6 時間) によって促進されることが報告されていることから (Wang et al., 2012) 作成した植物体において葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行が同様に熱処理によって促進されているか、*sul1* の発現量により検証した。定量 RT-PCR 法による解析を行った結果、熱処理を施した植物体においては *sul1* 発現量が増加しているケースが見られ、熱処理によって葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行が促進されている可能性が示唆された。この熱処理した植物体の葉を用いて sulfadiazine 選抜条件下で個体再生を行った。選抜の結果、MHR1 と MHR2 いずれに関しても sulfadiazine 耐性の植物体を複数取得した。これら植物体のミトコンドリア DNA 標的領域を PCR により解析したが、*sul1* 遺伝子の転移は観察されなかった。低い割合のヘテロプラスミックとして *sul1* 遺伝子が転移している可能性があるため、現在標的領域をディープシーケンシングにより解析している。

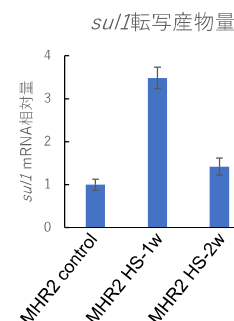


図3. 熱処理による *sul1* 発現量の変化
播種後1週間 (1w) あるいは2週間 (2w) に熱処理 (45°C、6 時間) を行った MHR2 株と未処理の MHR2 株 (control) の播種後3週間における *sul1* 転写産物量を定量 RT-PCR 法により解析した。cox2 遺伝子を内部標準として補正を行った。n=3

本研究は、現在進行形で起きている現象が、そしてどの程度の頻度で起きている現象であるか未知である葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行を検出すると同時に、未だ確立されていない多細胞植物におけるミトコンドリア形質転換を行うというチャレンジなテーマであった。当初の遺伝子移行検出系における課題は見つかったものの、改良した検出系においてはその課題は解決されたと考えられる。研究期間内にミトコンドリアゲノムへの遺伝子移行を検出することは達成できなかったが、引き続き新たな系において取得された形質転換体を詳細に解析していきたい。一方、熱処理により葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行が促進されている可能性が示されたことは興味深く、その殆どが未知である葉緑体からミトコンドリアへの遺伝子移行機構を明らかにする上で重要な結果である。今後、本研究で構築した系は、より大規模なスクリーニングやより強力な選抜系を組み合わせることにより、今後葉緑体からミトコンドリアへ移行した遺伝子の検出において有効であると期待される。

< 引用文献 >

- Sloan DB, Wu Z. *Genome Biol Evol.* 2014 Nov 21;6(12):3210-21.
Huang CY, Ayliffe MA, Timmis JN. *Nature.* 2003 Mar 6;422(6927):72-6.
Thorsness PE and Fox TD. *Nature.* 1990 Jul 26;346(6282):376-9.
Tabatabaei I, Dal Bosco C, Bednarska M, Ruf S, Meurer J, Bock R. *Plant Biotechnol J.* 2019 Mar;17(3):638-649.
Grimes BT, Sisay AK, Carroll HD, Cahoon AB. *BMC Genomics.* 2014 Jan 17;15:31.
Dong Wang, Andrew H Lloyd, Jeremy N Timmis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 14;109(7):2444-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Odahara Masaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Factors Affecting Organelle Genome Stability in Physcomitrella patens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants9020145	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 Kobayashi Yusuke, Odahara Masaki, Sekine Yasuhiko, Hamaji Takashi, Fujiwara Sumire, Nishimura Yoshiki, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 184
2. 論文標題 Holliday Junction Resolvase MOC1 Maintains Plastid and Mitochondrial Genome Integrity in Algae and Bryophytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1870 ~ 1883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.20.00763	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 Odahara Masaki, Nakamura Kensuke, Sekine Yasuhiko, Oshima Taku	4. 巻 4
2. 論文標題 Ultra-deep sequencing reveals dramatic alteration of organellar genomes in Physcomitrella patens due to biased asymmetric recombination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02141-x	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小田原真樹、伊丹順、堀井陽子、根岸由紀、渡邊健太、沼田圭司
2. 発表標題 機能性ペプチドによるイネ、タバコ、ケナフの葉緑体形質転換
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 小田原真樹、伊丹順、堀井陽子、根岸由紀、渡邊健太、沼田圭司
2. 発表標題 機能性ペプチドによるイネ、タバコ、ケナフの葉緑体形質転換
3. 学会等名 第84回 日本植物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小田原真樹、中村建介、関根靖彦、大島拓
2. 発表標題 相同組換え欠損によって生じたオルガネラゲノム全体にわたる変異と大規模な構造変化
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会 ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小田原真樹、堀井陽子、伊丹順、根岸由紀、沼田圭司
2. 発表標題 融合ペプチドを用いたタバコ、イネ、ケナフの色素体形質転換系の開発
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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