

令和 7 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2024

課題番号：19KK0391

研究課題名（和文）mitoTALEN法を用いた植物ミトコンドリアゲノム修復と細胞質雄性不稔の解析

研究課題名（英文）Plant mitochondrial genome repair and cytoplasmic male sterility using the mitoTALEN method.

研究代表者

有村 慎一（ARIMURA, Shin-ichi）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：00396938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

渡航期間： 1ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物ミトコンドリアゲノムに対して高精度に操作を加える新規技術「mitoTALEN法」を応用し、細胞質雄性不稔（CMS）の原因となる未知のミトコンドリア遺伝子orf117Shaを特異的に破壊することで機能を明確に解明しました。ゲノム切断後のミトコンドリアDNAの再構成・修復機構を次世代シーケンスにより網羅的に解析し、植物に特有の多様な修復機構を初めて明らかにしました。さらに、TALENやデアミナーゼを応用した一塩基置換技術を確立し、ゲノムの精密編集にも成功しました。CMSの可逆的制御や植物の新たな表現型変化が可能となり、分子育種や種子生産技術への応用が現実的な段階に入りつつあります。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物ミトコンドリアゲノムの標的編集および一文字塩基編集技術を世界で初めて確立し、細胞質雄性不稔の原因遺伝子の機能解明と制御を可能にしました。また、植物ミトコンドリアDNAに特徴的なゲノムの維持修復機構の一端を明らかにしました。これにより、ミトコンドリア遺伝子の機能解析が飛躍的に進むとともに、CMSを用いたF1種子生産の効率化や、外来遺伝子を使わない形質改変技術として、持続可能な農業と社会的受容性に資する新たな分子育種法の基盤が築かれました。

研究成果の概要（英文）：We developed and applied a novel mitochondrial genome editing technology, "mitoTALEN," to elucidate the function of orf117Sha, a causative gene of cytoplasmic male sterility (CMS) in plants. Targeted disruption of this mitochondrial ORF successfully restored fertility, confirming its role in pollen abortion. Additionally, comprehensive analysis of the mitochondrial genome after editing revealed diverse DNA repair mechanisms unique to plant mitochondria. We also established base-editing technologies for precise nucleotide substitutions in mitochondrial and plastid genomes. These achievements not only deepen our understanding of organellar genome function and repair but also offer new tools for reversible CMS control and innovative plant breeding strategies. The outcomes have led to extensive international collaborations and contributed to the formation of a global research hub on plant organelle biology.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：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は、呼吸による ATP 生成や代謝経路の制御のみならず、発達や生殖など多くの生命活動に深く関与する重要な細胞小器官である。その一方で、植物ミトコンドリアゲノムは極めて大きく複雑であり、核ゲノムとは異なる進化的経緯を辿っている。特に、細胞質雄性不稔 (CMS) と呼ばれる表現型は、ミトコンドリアゲノムに由来する ORF (open reading frame) 遺伝子群が原因であり、これは F_1 種子生産において人為的に利用されている重要な形質である。CMS は、花粉の発達を阻害することで雄性を不稔化し、効率的な一代雑種作出を可能にするが、その分子機構には未解明な点が多く、原因遺伝子の機能解析やその制御は技術的に困難であった。その主因として、植物ミトコンドリアゲノムに対する改変技術の未発達が挙げられる。従来、核ゲノムや葉緑体ゲノムにおいては CRISPR や TALEN、ZFN などを用いた精密な遺伝子改変が可能となってきたが、ミトコンドリアゲノムは外来 DNA の導入や標的編集が著しく困難であり、その解析には限界があった。また、ミトコンドリアゲノムはリコンビネーションや重複、再編成を頻繁に繰り返す構造的可塑性を持ち、単一の構造モデルで解析することが難しいことも、機能解析を阻む要因であった。こうした背景のもと、本研究では、哺乳動物で開発されつつあったミトコンドリア標的の編集酵素を植物へ応用する新たな技術基盤の構築に着目した。特に、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) を植物ミトコンドリアに輸送することで、特定の ORF 遺伝子を選択的に切断し、その機能を消失させることができれば、CMS の原因遺伝子を分子レベルで検証し、その制御すら可能となると期待された。さらに、近年注目を集める一文字塩基編集 (base editing) 技術をミトコンドリアに応用することで、より精密かつ可逆的な機能改変も実現できる可能性があった。本研究は、こうした新技術の開発と応用を通じて、植物ミトコンドリアゲノムの構造・機能の謎に迫り、CMS という重要形質の制御と作物育種への応用基盤を構築することを目指して始動したものである。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、植物ミトコンドリアゲノムにおける特定の遺伝子配列を、高精度かつ選択的に切断・改変する技術基盤を確立することである。特に、CMS (細胞質雄性不稔) の原因とされる ORF 遺伝子を標的とし、その機能を失わせることで、CMS 表現型が可逆的に制御可能であることを実証し、CMS の分子機構を明らかにすることを目的とした。また、単に遺伝子を破壊するのみならず、編集後のミトコンドリア DNA がどのように再構成・修復されるかを追跡し、植物ミトコンドリア特有の DNA 修復機構を明らかにすることも、本研究の重要な目的の一つである。第二に、TALEN のような切断酵素に加えて、デアミナーゼなどを利用した一文字塩基編集 (base editing) 技術を植物ミトコンドリアや葉緑体に適用し、ゲノム構造に大きな変化を与えずに機能改変を行う技術の確立を目指した。この技術が確立されれば、より微細な機能改変や表現型制御が可能となり、研究応用だけでなく実際の育種や品種開発においても画期的な応用が期待できる。第三に、これらの技術開発と応用を通じて、複数の植物種 (*Arabidopsis thaliana*, イネ, ジャガイモなど) において CMS 機構やエネルギー代謝、ストレス応答などに関与するオルガネラ遺伝子の機能解析を行い、植物の形質制御の新たな知見を得ることを目指した。さらに、CMS の可逆的制御による F_1 種子生産の効率化や、環境にやさしい雑種育種法の開発といった、実用面での応用可能性の評価も行った。第四

に、フランス(ストラスブール大学、INRAe)、オーストラリア(ARC CoE in Plant Energy Biology)、ドイツなどの海外研究機関との国際共同研究を推進し、技術の共有とデータ解析の分担を通じて研究の高度化と国際発信力の向上を図るとともに、国際的な研究拠点の形成を視野に入れた人的・技術的ネットワークの構築を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、まず植物ミトコンドリアに標的に移行する TALEN(mitoTALEN)を設計・構築し、CMS の原因と考えられる ORF 遺伝子に対する選択的切断を試みた。TALEN 配列は植物ミトコンドリアのトランジットペプチドを融合させることでミトコンドリア内に局在させ、アグロバクテリウム法や PEG 法を用いてモデル植物に導入した。導入後、選抜された個体については PCR および次世代シーケンサーを用いたゲノム解析により、切断・再構成の有無を検証した。CMS の原因とされた orf117Sha をターゲットにした実験では、ゲノム上の当該 ORF が失活した個体において花粉の形成が正常に回復し、CMS 表現型が解除されることを確認した。これにより、同 ORF が CMS の直接的な原因であることが機能的に実証された。加えて、ミトコンドリア DNA 切断後に生じる再構成過程を網羅的に追跡するため、切断部位周辺のリコンビネーション頻度や再配列パターンを可視化・定量化し、植物ミトコンドリアにおける新規の修復様式が存在を突き止めた。さらに、TALEN にデアミナーゼを融合させた一文字編集ベクター(mitoBaseEditor)を設計し、C-to-T や A-to-G 変換を植物ミトコンドリアおよび葉緑体で実施した。この技術により、構造的な大規模改変を伴わずに精密な機能改変が可能となり、CMS だけでなく、酵素活性や耐性遺伝子の微調整などにも応用の可能性が広がった。これらの実験系は、フランスの INRAe ペルサイユ、ストラスブール大学、ドイツの細胞生理学研究チーム、オーストラリアの植物エネルギー研究センターなどと分担体制で実施され、特にバイオイメージング、ATP 測定、RNA 編集との相互作用解析などにおいては、各国の専門技術とリソースを活用した。共同研究の進捗は年次ごとの訪問・オンライン会議により確認され、必要に応じて試料・データを交換しながら進められた。

4. 研究成果

5 年間の研究を通じて、植物ミトコンドリアゲノムにおけるゲノム編集と塩基編集の両技術を世界で初めて確立・実証することに成功した。とくに、シロイヌナズナ Sha 細胞質雄性不稔株において、mitoTALEN 法を用いて orf117Sha を破壊し、花粉形成が回復することを示した研究成果は、Journal of Experimental Botany 誌(2024)に掲載され、大きな注目を集めた。また、ゲノム切断後のミトコンドリア DNA の再構成過程についても、多様な新規構造が生じることを次世代シーケンスにより網羅的に明らかにし、従来考えられていた単一パターンでは説明できない複雑な修復様式が存在することを示した。一文字塩基編集技術においては、Arabidopsis とジャガイモで成功を収め、Nature Plants, PNAS, Plant Biotechnology Journal など複数の一流国際誌に成果が掲載された。これにより、植物ミトコンドリアや葉緑体でも核ゲノムと同様に精密な遺伝子編集が可能であることが示され、CMS に限らず多様な機能遺伝子の改変が実現可能となった。また、本研究を通じて、フランス、オーストラリア、ドイツ、韓国、イタリアなど 8 カ国以上の研究者と 20 を超える共同研究を展開し、2024 年には JST

国際拠点形成事業として「植物オルガネラ研究国際拠点 (<https://plant-organelle.jp>)」を設立するに至った。これにより、日本発の技術を国際標準として確立し、研究・教育の両面で次世代人材の国際育成にも貢献している。CMSの可逆的制御技術は、外来遺伝子を用いないため遺伝子組換え規制を回避でき、実用化へのハードルも低い。持続可能な農業、品種改良の革新、種子企業への技術移転など、多方面での波及効果が期待される。これら一連の成果は、植物科学のみならず、ゲノム工学全体における新たな展開を切り開くものとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Dehaene Noémie, Boussardon Clement, Andrey Philippe, Charif Delphine, Brandt Dennis, Giloupe Taillefer Clément, Nietzel Thomas, Ricou Anthony, Simon Matthieu, Tran Joseph, Vezon Daniel, Camilleri Christine, Arimura Shin-ichi, Schwarzlinder Markus, Budar Françoise	4. 巻 なし
2. 論文標題 The mitochondrial <i>orf117Sha</i> gene desynchronizes pollen development and causes pollen abortion in the <i>Arabidopsis Sha CMS</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.01.17.575984	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 該当する
1. 著者名 Nicolia Alessandro, Scotti Nunzia, D'Agostino Nunzio, Festa Giovanna, Sannino Lorenza, Aufiero Gaetano, Arimura Shin-ichi, Cardi Teodoro	4. 巻 20
2. 論文標題 Mitochondrial DNA editing in potato through mitoTALEN and mitoTALECD: molecular characterization and stability of editing events	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Methods	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13007-023-01124-9	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 該当する
1. 著者名 Zhou Chang, Okuno Miki, Nakazato Issei, Tsutsumi Nobuhiro, Arimura Shin-ichi	4. 巻 194
2. 論文標題 Targeted A-to-G base editing in the organellar genomes of <i>Arabidopsis</i> with monomeric programmable deaminases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 2278 ~ 2287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiad678	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 該当する
1. 著者名 Zhou Jiawei, Nie Liyun, Zhang Shuo, Mao Hailiang, Arimura Shin-ichi, Jin Shuangxia, Wu Zhiqiang	4. 巻 1
2. 論文標題 Mitochondrial genome editing of <i>WA352</i> via <i>mitoTALENs</i> restore fertility in cytoplasmic male sterile rice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pbi.14315	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 該当する

1. 著者名 Kuwabara Kosuke, Arimura Shin-ichi, Shirasawa Kenta, Ariizumi Tohru	4. 巻 189
2. 論文標題 <i>orf137</i> triggers cytoplasmic male sterility in tomato	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 465 ~ 468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiac082	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 Nakazato Issei, Okuno Miki, Zhou Chang, Itoh Takehiko, Tsutsumi Nobuhiro, Takenaka Mizuki, Arimura Shin-ichi	4. 巻 119
2. 論文標題 Targeted base editing in the mitochondrial genome of <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2121177119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2121177119	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 Takatsuka Ayumu, Kazama Tomohiko, Arimura Shin ichi, Toriyama Kinya	4. 巻 110
2. 論文標題 <scp>TALEN</scp> mediated depletion of the mitochondrial gene <i>orf312</i> proves that it is a Tadukan type cytoplasmic male sterility causative gene in rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 994 ~ 1004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15715	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 Kazama Tomohiko, Arimura Shin-ichi	4. 巻 2615
2. 論文標題 A Method for Precisely Identifying Modifications to Plant Mitochondrial Genomes by mitoTALENs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 365 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2922-2_25	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 Cable Jennifer, Ronald Pamela C., Voytas Daniel, Zhang Feng, Levy Avraham A., Takatsuka Ayumu, Arimura Shin-ichi, 14名, Bagchi Ramyani	4. 巻 1506
2. 論文標題 Plant genome engineering from lab to field? a Keystone Symposia report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of the New York Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 35 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nyas.14675	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 該当する

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 -

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 Masutani Bansho, Arimura Shin-ichi, Morishita Shinichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Investigating the mitochondrial genomic landscape of Arabidopsis thaliana by long-read sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Computational Biology	6. 最初と最後の頁 e1008597-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pcbi.1008597	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 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	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 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2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0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尾維持機構と特徴
3. 学会等名 分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 植物ゲノムの編集方法	発明者 有村慎一、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/002162	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	グアルベルト ジョセ (Gualberto Jose)	ストラスブール大学・Institute of plant molecular biology・Research director	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ブダー フランソワ (Budar Francois)	インラ・Institut Jean-Pierre Bourgin・Professor	

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			
フランス	INRA Versille			
フランス	University of Strasberg			