

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間：2020年度～2024年度
課題番号：20H05680
研究課題名：植物ミトコンドリアゲノム育種の基盤創出

研究代表者氏名（ローマ字）：堤 伸浩（TSUTSUMI Nobuhiro）
所属研究機関・部局・職：東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：00202185

研究の概要：

植物ミトコンドリア (mt) ゲノムはエネルギー生産や重要農業形質遺伝子等をコードし、基礎科学的にも農業生産的にも重要な研究と改変の対象であるが、これまでゲノム改変技術が不在であった。本研究では我々が近年開発した世界初の植物 mt ゲノム編集技術を用いて遺伝基礎性質の解明、農業形質遺伝子の同定、改変集団による育種への潜在能力検証を通じ、世界初 mt ゲノム育種基盤の開拓を目指す。

研究分野：遺伝育種科学

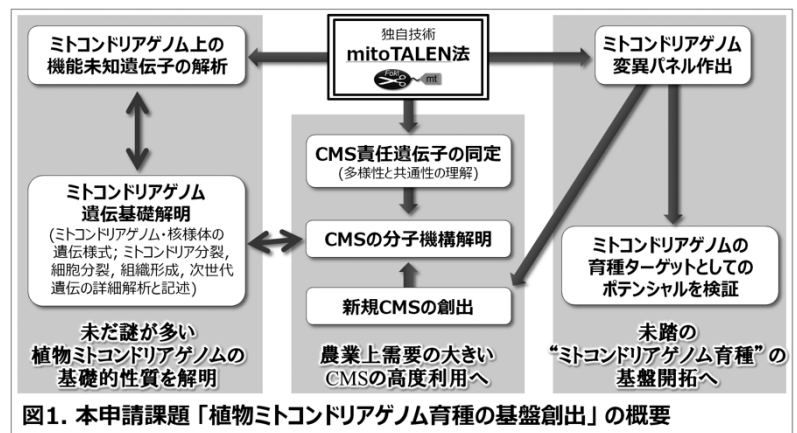
キーワード：ミトコンドリア、細胞質雄性不稔、ハイブリッド育種、ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

植物細胞内には核に加えて色素体（葉緑体）と mt にもゲノムが存在するが、農作物の栽培化と近代育種において改良に使用されてきた遺伝情報は専ら核ゲノムの遺伝子群であった。mt ゲノムはエネルギー生産に必須の遺伝子や現代農業で重用されるハイブリッド F₁ 品種生産に欠かせない細胞質雄性不稔 (Cytoplasmic Male Sterility: CMS) の原因遺伝子等をコードしており、基礎科学的にも農業生産的にも重要な研究と改変の対象であるにもかかわらず、これまで遺伝子組換え等の改変技術が不在であったため、手つかずの最後のゲノムとしてとり残されていた。

2. 研究の目的

我々は最近ゲノム編集技術の一つ TALEN を用いて植物 mt ゲノムの特異的な改変（標的遺伝子破壊とゲノム攪乱）に世界で初めて成功（**mitoTALEN 法**）し、大きなブレイクスルーを果たした。他の追随を許さないこの技術的優位を足がかりに、未解明でかつ独自の謎を多くもつ植物 mt ゲノム遺伝の基礎的性質を明らかにし、また mt ゲノム改変集団（変異パネル）を通じて育種応用の潜在性検証と重要農業形質に関する遺伝子の同定を行い、世界に先駆けて新規 CMS の創出を含む mt ゲノム育種の基盤を開拓することが本研究の狙いである（**図1**）。また、本研究では①育種ポテンシャルの検証、②遺伝基盤の解明、③CMS の分子機構解明と新規創出、の三つを主たる問いとして研究を行う。



3. 研究の方法

【代表者：堤伸浩、分担者：有村慎一、高梨秀樹（東大）】全グループで使用する mitoTALEN ベクターの設計・構築を行う。対象植物や遺伝子に合わせた組織特異的発現や薬剤誘導性プロモーターに置換したベクター等を適宜構築し施行する。シロイヌナズナを用いた変異集団パネル作製と遺伝型と表現型解析（堤・有村）、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的解析（堤・有村）、mt と核様体のライブイメージング解析（有村・高梨）、ソルガム CMS 系統のミトコンドリアゲノム解析・原因遺伝子同定・メカニズム解析（堤・高梨）を行う。

【分担者：風間智彦（九大）】既に研究代表者らとの先行共同研究により、イネ BT 型 CMS 系統を用いて原因遺伝子 *orf79* の破壊と稔性回復に成功した。本申請ではこの成功材料を用いて mt ゲノム攪乱の展開検証や改良（①の一部と③）を行う。また、別の CMS 系統である WA 型（ハイブリッドライス生産の CMS の 90%以上で実用）と CW 型（今後の有望系統）について、各 CMS 原因候補 *ORF352*、

ORF307 を標的とした遺伝子破壊と分子生物学的解析を行う。

【分担者: 寺地徹 (京産大)】③についてナスを材料に実験を行う。ナスは雑種強勢による収量増加が著しく、これまでは除雄と人工交配による F₁ 採種がなされてきたが、最近ようやく CMS 利用が始まった。その中で有望系統である花粉非形成型 CMS ナスとその野生型について、mt ゲノム配列と構造を決定し、遺伝子発現比較解析を通して CMS 原因候補を選抜する。この候補遺伝子を標的とする mitoTALEN を共同設計して導入・破壊し、逆遺伝学的に原因遺伝子の同定および証明を試みる。

4. これまでの成果

中核技術である mitoTALEN ゲノム編集技術の改良により、**世界初の葉緑体ゲノム標的一文字置換を達成**した成果が Nature Plants 誌に掲載され、各国マスコミや website で報道された。植物 **mt ゲノムにおいても同様の技術開発に成功**し、現在論文審査中である。中核ゲノム編集技術が改良され、解析の選択肢が増えたことで、上記①-③の問いの解析が、精度と幅と深みを増して進めることができている。上記ゲノム編集技術について共同研究依頼が国内外から多数あり受諾実行しており、一部は既に論文公開と特許出願を行なった。多様な作物や異型 CMS について他ではできない直接改変を通じた解析を進めることができおり、当初計画を超えて研究の進展とデータ解明が進んでいる。

5. 今後の計画

引き続き、世界を先行することができている技術 (mitoTALEN と TALECD) の改良と、これらを用いたオルガネラゲノム編集によって、未解明の mt ゲノム (と葉緑体ゲノム) の多様な側面 (未同定表現型-遺伝型解析、CMS 遺伝子とその解明、転写翻訳システム、環境制御、RNA editing 等) について共同研究を含めて効率的に推進させ、mt ゲノム育種の基盤を開拓する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Takatsuka A, Kazama T, Arimura SI, *Toriyama K (2022) TALEN-mediated depletion of the mitochondrial gene *orf312* proves that it is a Tadukan-type cytoplasmic male sterility-causative gene in rice. *Plant J*, doi: 10.1111/tbj.15715. (査読有)

Kuwabara K, Arimura SI, Shirasawa K, *Ariizumi T. (2022) *orf137* triggers cytoplasmic male sterility in tomato. *Plant Physiol*, doi: 10.1093/plphys/kiac082. (査読有)

Kang BH, Anderson CT, Arimura SI, 他 15 名 (2022) A glossary of plant cell structures: Current insights and future questions. *Plant Cell*, 34: 10-52. (総説, 査読有)

Arimura SI (2021) MitoTALENs: A Method for Targeted Gene Disruption in Plant Mitochondrial Genomes. *Methods Mol Biol*, 2363: 335-340. (プロトコル, 査読有)

Nakazato I, Okuno M, Yamamoto H, Tamura Y, Itoh T, Shikanai T, Takanashi H, Tsutsumi N, *Arimura SI (2021) Targeted base editing in the plastid genome of *Arabidopsis thaliana*. *Nat Plants*, 7: 906-913. (査読有)

Omukai S, Arimura SI, Toriyama K, *Kazama T (2021) Disruption of mitochondrial *open reading frame 352* partially restores pollen development in cytoplasmic male sterile rice. *Plant Physiol*, 187: 236-246. (査読有)

*Masutani B, Arimura SI, Morishita S (2021) Investigating the mitochondrial genomic landscape of *Arabidopsis thaliana* by long-read sequencing. *PLoS Comput Biol*, 17: e1008597. (査読有)

Ayabe H, Kawai N, Shibamura M, Fukao Y, Fujimoto M, Tsutsumi N, *Arimura SI (2021) FMT, a protein that affects mitochondrial distribution, interacts with translation-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*, 40: 327-337. (査読有)

*Arimura SI, Ayabe H, Sugaya H, Okuno M, Tamura Y, Tsuruta Y, Watari Y, Yanase S, Yamauchi T, Itoh T, Toyoda A, Takanashi H, Tsutsumi N (2020) Targeted gene disruption of *ATP synthases 6-1* and *6-2* in the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* by mitoTALENs. *Plant J*, 104:1459-1471. (査読有)

受賞: 一般社団法人 日本植物バイオテクノロジー学会 2021 年度技術賞

風間智彦, 肥塚信也, 鳥山欽哉, 堤伸浩, 有村慎一

「植物ミトコンドリアゲノム編集技術の開発と細胞質雄性不稔原因遺伝子の同定」

その他: 新聞報道 7 件、WebNews など 11 件、知的財産権 2 件、招待講演 10 件、学会発表 31 件

7. ホームページ等

東京大学大学院農学生命科学研究科植物分子遺伝学研究室

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/pmg/>