

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14623

研究課題名(和文) 巨大化させたミトコンドリアを利用したイネミトコンドリアゲノム編集システムの開発

研究課題名(英文) An approach toward developing mitochondrial genome-editing system in rice cells containing enlarged mitochondria

研究代表者

鳥山 欽哉 (TORIYAMA, Kinya)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：20183882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネのミトコンドリアは遺伝子操作を行うには小さすぎると考え、分裂因子の作用を阻害して巨大化したミトコンドリアを持つ組換えイネを得た。この培養細胞のミトコンドリアに、パーティクルガン法で遺伝子導入を試みたが、導入遺伝子の発現は確認できなかった。イネのミトコンドリアゲノムの編集を行うためのベクターの開発を行うため、特定のイネのミトコンドリアに安定して存在するプラスミド様環状DNAとミトコンドリアで発現誘導することが報告されているGFP発現カセットを連結したミニサークルDNAを作成した。ミトコンドリアゲノム編集実験を行うためツールを整えることができた。

研究成果の概要(英文)：To establish genome-editing system in rice mitochondria, we developed a rice cell suspension lines with enlarged mitochondria mediated by dominant-negative dynamin-like transgene. We introduced a GFP gene using particle gun. We did not, however, detect introduced GFP expression in the mitochondria. We constructed a mini-circle DNA containing a GFP expression cassette and plasmid-like B1 DNA, which was stably present in mitochondria of certain cultivars. The resulting vector can be used as a basic tool for genome-editing experiments in rice mitochondria.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：育種学 遺伝学 遺伝子 バイオテクノロジー 植物

### 1. 研究開始当初の背景

タバコなどの植物では葉緑体の形質転換が可能であり、緑葉細胞にパーティクルガンを用いて外来遺伝子を導入する系が確立されているが、ミトコンドリアの形質転換系は報告されていない。イネ細胞のミトコンドリアにパーティクルガンを用いて遺伝子導入する場合、通常のミトコンドリアは直径1 μmと小さすぎるので、巨大化したミトコンドリアを持つ組換えイネを作成して利用すれば、遺伝子導入とその後の観察が容易になるであろうと考えた。我々は、イネのミトコンドリア分裂因子であるダイナミン様タンパク質遺伝子のドミナントネガティブ変異 *OsDRP3A (K63A)* を導入し、ミトコンドリアの分裂を阻害して、巨大化したミトコンドリアを持つ形質転換培養細胞系統、および、再分化植物体を得た (イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2014)。

理化学研究所の沼田圭司らは、細胞膜透過配列およびポリカチオン配列を有する融合ペプチドと DNA の複合体を用いた遺伝子導入法を報告した (PCT/JP2013/056062)。彼らはこの技術を用いてミトコンドリアへの DNA 導入にも成功している (植物細胞分子生物学会 2014 年盛岡大会)。

イネ BT 型や LD 型細胞質雄性不稔系統のミトコンドリアにはメインゲノムの他に、プラスミド様環状 DNA (B1 DNA; 2,135 bp) が存在し、安定に保持されている。複製開始点を含み、自己増殖すると考えられる。我々は、このプラスミド様 B1 DNA をミトコンドリア人工染色体 (Mitochondrial Artificial Chromosome; 愛称 MAC) として利用することを考案し、B1 DNA にミトコンドリア用 GFP 発現カセットを組み込み、大腸菌のミニサークルベクターテクノロジーを利用して環状 DNA にすることのできるペアレンタルプラスミドを構築した。

ミニサークルは非ウイルス性の DNA であり、ΦC31 インテグレースを介した分子内組換えにより、元となるペアレンタルプラスミド DNA から作製される。通常のプラスミド DNA と異なり、バクテリア由来の複製開始点や抗生物質耐性遺伝子を有さない。また、メチル化やサイレンシングなどの影響を受けないため、ミニサークルからの発現は、通常のプラスミドを用いた場合よりも高効率かつ長期間 (最大 14 日間) 持続することが知られている。

ペプチドを利用した遺伝子導入法と、我々が開発した巨大化ミトコンドリアを持つイネ、および、B1 DNA を組み込んだミニサークルを組み合わせることで、イネにおいてミトコンドリアのゲノム編集システムが開発できるという着想に至った。

### 2. 研究の目的

イネのミトコンドリア分裂因子であるダイナミン様タンパク質遺伝子のドミナントネガティブ変異 *OsDRP3A (K63A)* を導入し、巨大化し

たミトコンドリアを持つ組換えイネを材料として、パーティクルガン法や細胞膜透過配列およびポリカチオン配列を有する融合ペプチドを利用した遺伝子導入法などを用いてミトコンドリアゲノム編集システムを開発することを目指した。その際、イネミトコンドリアが保持するプラスミド様環状 DNA を独自に改変したベクターやミトコンドリア宅配型配列を用いる等の工夫を行い、プラスミド様環状 DNA 改変ベクターがミトコンドリア人工染色体として利用できるかについて検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

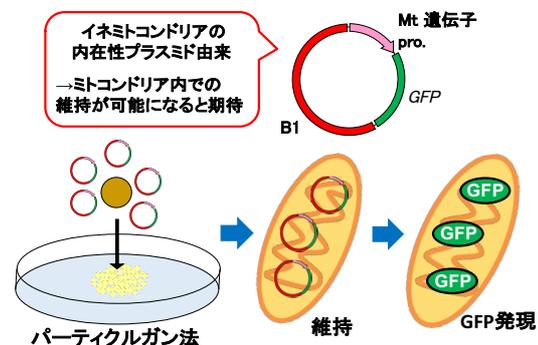
#### (1) ミニサークルの作成

LD 型ミトコンドリアに存在するプラスミド様 B1 DNA (DDBJ accession no. AB523795) を利用した。Eco RI サイトを 1 カ所持つ環状 DNA である。B1 DNA を持つ稔性回復系統 (LDR) より、B1 DNA をクローニングし、ミニサークルベクター pMC. BESPX-MCS2 (System Bioscience 社) の Eco RI サイトに挿入した。GFP 発現融合カセットをミニサークルベクターの Sal I サイトに挿入し、ミニサークルペアレンタルプラスミドを作成した。ミニサークル DNA 生産キット (MC-Easy™ Minicircle DNA Production Kit; System Bioscience) を用いてミニサークルを作成した。

#### (2) イネ培養細胞への遺伝子導入

イネ培養細胞は、LDR のカルスを材料とし、AA 液体培地を用いて 28℃、108 rpm で振盪培養した。直径 7 cm のろ紙を敷いた吸引ロート (ピフネルロート ケニス株式会社) の中にカルスを AA 液体培地ごと移し、吸引ろ過器 (ケニス株式会社) にかけて培地を除き、ろ紙ごと直径 9cm のシャーレに移し、パーティクルガン (Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System) を用いて遺伝子導入を行った。

#### パーティクルガン法による遺伝子導入の作業仮説



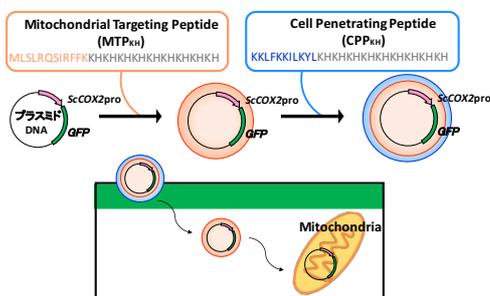
対照実験として、ミトコンドリア移行シグナル配列を付加した GFP または RFP を CaMV 35S プロモーターに連結したプラスミドを用いた。また、ミトコンドリアの観察がしやすいタマネギとツユクサの表皮細胞への遺伝子導入も行った。蛍光観察には、蛍光顕微鏡は

Axioplan2 (Carl Zeiss Microscopy) を使用した。

2015年に、細胞膜透過性ペプチド、および、ミトコンドリア移行ペプチドを用いた遺伝子導入により、シロイヌナズナのミトコンドリアにおける GFP の発現が報告された (Chuah J. A., Yoshizumi T., Kodama Y., and Numata K. (2015) Gene introduction into the mitochondria of *Arabidopsis thaliana* via peptide-based carriers. *Sci. Rep.* 5: 7751.)。細胞膜透過配列およびポリカチオン配列を有する融合ペプチドと DNA の複合体を用いた遺伝子導入法は、この論文と特許出願 PCT/JP2013/056062 に記載の方法に従った。

### 植物におけるミトコンドリアへの遺伝子導入の報告例

細胞膜透過性ペプチドを用いた遺伝子導入の結果、シロイヌナズナのミトコンドリアにおける GFP の発現が報告された (Numata et al. 2015)。



### (3) B1 DNA の安定性の調査

実験を開始した当初は、B1 DNA の保持に関わる遺伝子が核に存在する可能性も考えたため、B1 DNA を保持しないイネ品種台中 65 号 (T65) と、B1 DNA を保持する Tadukan (WRC20) や IR 64 との F<sub>2</sub> では、B1 DNA を保持する個体と保持しない個体に分離すると予想した。そこで、WRC20×T65 F<sub>2</sub> および IR 64×T65 F<sub>2</sub> を材料として、PCR 法により、B1 DNA の次世代への遺伝について調査した。

イネの BT 型細胞質雄性不稔系統である BTA のミトコンドリアには、メインゲノムの他に 4 種類のプラスミド様環状 DNA (B1, B2, B3, B4) が報告されている。これらがミトコンドリア内で安定に維持されており、自律的に複製されると考えられる。これを検証するため、WRC20、および、WRC20×T65 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> について、4 種類のプラスミド様環状 DNA の存在を調査した。

## 4. 研究成果

### (1) パーティクルガン法を用いた遺伝子導入

イネのミトコンドリアで発現させることを狙って、イネミトコンドリアで発現量が多い 26S リボソーム RNA 遺伝子のプロモーターと GFP を連結したコンストラクト (rrn26 pro:GFP) を作成した。細胞質雄性不稔性イネミトコンドリア内在性のプラスミド様環状分子 (B1 DNA) と GFP 発現カセットを連結したミニサークル DNA を作成した。

ミニサークルの導入実験を行うにあたり、

ミトコンドリア局在のポジティブコントロールとして F1-ATPase  $\gamma$ -サブユニット移行シグナルと RFP との融合タンパク質を発現するコンストラクト mtRFP (Arimura and Tsutsumi 2002. プロモーターは CaMV 35S) を用いた。さらに、ミニサークルに使用した GFP 発現カセットと同じ配列を含む pPrn-GFP プラスミドも使用し、ミニサークルとの比較を試みた。植物材料としては、タマネギ、ツクサ、イネを用いた。ツクサは、若い葉の裏側を上向きにして水を染み込ませたろ紙の入ったシャーレに並べた。イネは 50 mg/L の Hyg を含む AA 液体培地で振とう培養した *OsDRP3A (K63A)/LDR* 系統の #1 のカルスを材料とした。

ツクサに mtRFP とミニサークルを導入したところ、RFP と GFP の両シグナルが観察された (図 1、表 1)。RFP と GFP のシグナルが重なり合ったことから、GFP がミトコンドリアで発現していると思われた。しかし、RFP の発現が強いため GFP のフィルターでシグナルが観察される、いわゆる「映り込み」の現象である可能性も考えられた。イネでは、GFP のシグナルは見られず、ポジティブコントロールである mtRFP のシグナルも見られなかった (表 1)。

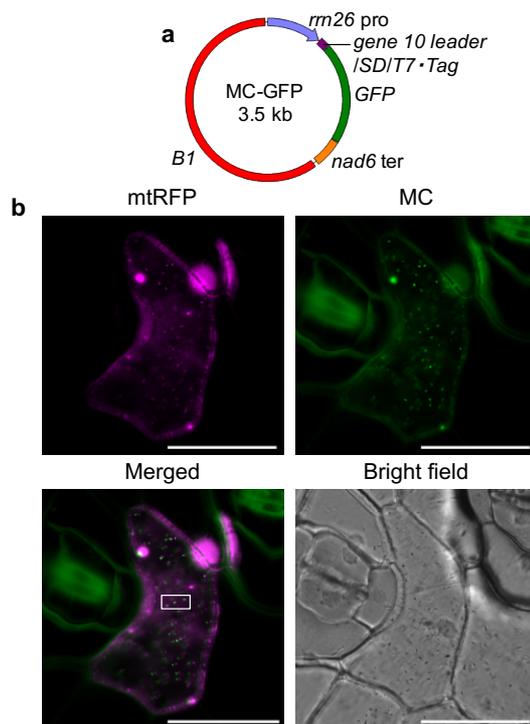


図 1 ミニサークルおよびミニサークルを導入したツクサの観察

a: 本研究で作成し利用したミニサークルのコンストラクト。

b: ミニサークル (MC) の GFP シグナルはミトコンドリアのコントロールである mtRFP のシグナルと一致していた。bars = 50  $\mu$ m.

表1 パーティクルガン法によるミニサークル導入実験

実験番号	材料	1日後の観察 2日後の観察 3日後の観察						備考	
		RFP	GFP	RFP	GFP	RFP	GFP		
①	タマネギ	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	ND ND - - - -	
②	ツツクガ	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	ND ND - - + ND ND	RFPとGFPのシグナルが重なった。
③	ツツクガ	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	ND ND - - + ND ND	再現性が得られたが、GFPの蛍光が弱かった。
④	ツツクガ	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	ND ND - - + ND ND	2種類のプラスミドを導入したツツクガで、34種の細胞でRFPが見え、そのうちの細胞でGFPも見えた。
		m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	ND ND - - - -	
⑤	タマネギ	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	ND ND - - + ND ND	タマネギでは、RFPのみが見られた細胞が1個、RFPとGFPが見られた細胞が4個あった。ツツクガでは、RFPのみが見られた細胞が1個、RFPとGFPが見られた細胞が4個あった。
		m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	ND ND - - - -	
⑥	タマネギ	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	ND ND - - + ND ND	タマネギでは、RFPのみが見られた細胞が1個、RFPとGFPが見られた細胞が4個あった。ツツクガでは、RFPのみが見られた細胞が1個、RFPとGFPが見られた細胞が4個あった。
		m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	ND ND - - - -	
⑦	ツツクガ	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	ND ND - - + ND ND	⑤で導入したRFPと同じプラスミドを用いた。今回はRFPが見られた。⑤でRFPが見られなかったのは、プラスミドに問題があったわけではない。
⑧	ツツクガ	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	ND ND - - + ND ND	合計で2種類のプラスミド(10株)を導入した。
⑨	イネ (LDR)	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	ND ND - - - -	プロトプラストにしてから観察した。
⑩	イネ (KSA #1)	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	35s-mRFP	ND ND - - - -	プロトプラストにしてから観察した。
		m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	m28-GFP	ND ND - - - -	

m28-GFPがミニサークル、m28-GFPが一般的にプラスミドのm28-GFP発現カセットを示す。  
イネ (LDR) はWT/LDRのイネを示す。イネ (KSA #1) は、OxDR3A/K63A/LDR系統のイネを示す。  
\*は蛍光が見られた。-は蛍光が見られなかった。NDは観察しなかった項目。

導入した GFP 発現カセットにさらなる改善が必要である可能性も考えられたため、ミトコンドリアで発現誘導することが報告された酵母の COX2 プロモーターを用いた GFP 発現カセット (Chuah et al 2015) を含むベクターを再構築した。このプラスミドをタマネギ表皮に導入したところミトコンドリアと考えられる細胞内顆粒で GFP の発現が観察できた。イネのサスペンションセルに遺伝子導入を試みたが、イネカルスは強い自家蛍光を発生し、導入した GFP の蛍光を確認するのは困難であった。

酵母の COX2 プロモーターを用いた GFP 発現ベクターをイネミトコンドリア内在性のプラスミド様 B1 DNA と連結したミニサークル DNA を作成した (図 2)。しかし、イネ細胞への導入実験までは至らなかった。

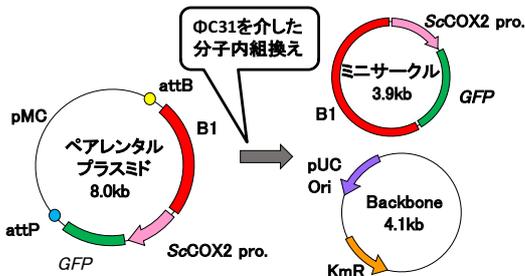


図2 ミニサークルの作成  
酵母の COX2 プロモーターと GFP、および、イネミトコンドリア内在性のプラスミド様 B1 DNA を連結したミニサークル

(2) 細胞膜透過性ペプチドを用いた遺伝子導入

発芽後 7 日のシロイヌナズナ芽生えを植物材料として用い、膜透過性ペプチド CPP<sub>RH</sub> と 35S-GUS または 35S-NLS-GFP のプラスミドの混合溶液にシロイヌナズナの芽生えを浸した。シリンジに蓋を開けたままの 1.5 ml チューブを入れ、シリンジの先をパラフィルムで密封し、目盛りが 2 倍になるように引き抜いて減圧処理 (0.5 bar) を 1 分間施した。また、目盛りが 2 分の 1 になるように押し加

圧処理 (2 bar) を 1 分間処理した。減圧と加圧を両方行うもの、減圧のみを行なうもの、加圧のみを行うものに分けて比較した。GUS アッセイおよび蛍光顕微鏡による観察の結果、いずれのコンストラクトにおいても導入遺伝子の発現を観察することはできなかった。

(3) B1 DNA の安定性の調査

PCR により B1, B2, B3, B4 の存在を調査した結果、IR 64 では、ポジティブコントロールである BTA と同様、B1~B4 DNA をすべて保持していることが分かった (図 3)。また、WRC20 および WRC20×T65 BC<sub>8</sub>F<sub>1</sub> においては、B1, B2, B4 DNA を保持しているが、B3 DNA を保持していないことが分かった。このことから、4 種類のプラスミド様環状 DNA は、必ずしもセットで存在するわけではないということが明らかになった。さらに、WRC20×T65 BC<sub>8</sub>F<sub>1</sub> の結果が WRC20 と同様であったことから、プラスミド環状 DNA を保持しない T65 の核ゲノム背景でも、プラスミド様環状 DNA を安定に維持されることが検証できた。プラスミド様環状 DNA の存在は核による制御を受けず、ミトコンドリアにのみ依存すると考えられた。

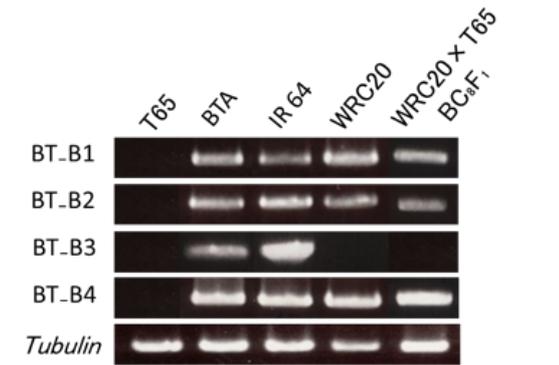


図3 PCR によるプラスミド様環状 DNA の調査

(4) 今後の展望

当初の計画では、図 2 で作成したミニサークル DNA、ミトコンドリア移行ペプチド (MTP<sub>RH</sub>)、および、細胞膜透過性ペプチド (CPP<sub>RH</sub>) の複合体を、巨大化したミトコンドリアを持つ形質転換培養細胞系統へ導入する実験を行う予定であったが、それには至らなかった。この実験を行うとともに、イネの培養細胞における自家蛍光を排除した GFP の観察が可能となれば、ミトコンドリアにおいて導入した GFP が検出できると期待できる。

B1 DNA が戻し交雑を行って核を置換しても安定に保持されることを明らかにしたことから、B1 DNA を含むミニサークルをミトコンドリアに導入することができれば、自己複製し、ミトコンドリア人工染色体として機能し、ミトコンドリアゲノム編集システムを開発できると期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 4 件)

### (1) Toriyama, K.

Arms race between mitochondria and nuclei exemplified by cytoplasmic male sterility in rice.

Lorentz center workshop “Innate immunity of Crop, Livestock and Fishes -Dawn of Agricultural Immunology- “

September 19-23, 2016

Leiden (Netherlands)

(招待)

### (2) Kazama, T.

Genetic analysis of fertility restorer locus on chromosome 10 derived from a wild rice. K.S.U. International symposium 'Frontiers in plant mitochondrial genome research'

July 7, 2016

京都産業大学 (京都府京都市)

(招待)

### (3) 梅津優香・伊藤幸博・鳥山欽哉

ミトコンドリア形質転換のためのミトコンドリア宅配型アグロバクテリウム開発へのアプローチ

第10回東北育種研究集会

2015年11月14日

東北大学大学院農学研究科 (宮城県仙台市)

### (4) Kazama, T., Igarashi, K., Okazaki., M., Toriyama, K.

Mitochondrial genotype determines fate of pollen development in cytoplasmic male sterile rice.

9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology

May 17-22, 2015

Wroclaw (Poland)

(招待)

[その他] (計 8 件)

## 受賞

### (1) 風間智彦

細胞質雄性不稔イネの稔性回復メカニズムの分子遺伝学的解析

日本育種学会奨励賞

2017年3月29日

名古屋大学 (愛知県名古屋市)

## アウトリーチ活動

### (2) 鳥山欽哉

遺伝子組み換え作物のリスクとベネフィット  
みやぎ県民大学 大学開放講座

2016年8月26日

東北大学農学部 (宮城県仙台市)

### (3) 風間智彦・鳥山欽哉

東北大学農学部オープンキャンパスにおける研究紹介

2016年7月27日・28日

東北大学農学部 (宮城県仙台市)

### (4) 風間智彦・伊藤幸博

研究室紹介

福島県立磐城高等学校 SSH 総合の時間

2016年4月21日

東北大学農学部 (宮城県仙台市)

### (5) 風間智彦

植物ミトコンドリアが引き起こす花粉不稔とその利用

東京大学公開セミナー

2015年10月30日

東京大学 (東京都文京区)

### (6) 風間智彦・鳥山欽哉

東北大学農学部オープンキャンパスにおける研究紹介と模擬講義

2015年7月29日・30日

東北大学農学部 (宮城県仙台市)

### (7) 風間智彦・伊藤幸博

研究室紹介

福島県立磐城高等学校 SSH 総合の時間

2015年4月23日

東北大学農学部 (宮城県仙台市)

ホームページ等

### (8) 伊藤幸博・風間智彦・鳥山欽哉

インターネット上での研究成果の継続的な発信「環境適応生物工学研究室 お知らせと更新情報」

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鳥山 欽哉 (TORIYAMA, KINYA)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20183882

### (2) 連携研究者

風間 智彦 (KAZAMA, TOMOHIKO)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30431464