

令和 2 年 2 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14827

研究課題名(和文)CRISPR/Cas9を用いた植物ミトコンドリアゲノム編集技術の確立

研究課題名(英文)Trials of CRISPR/Cas9 for plant mitochondrial genome editing

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)・准教授

研究者番号：00396938

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):植物ミトコンドリアゲノムは安定的な形質転換が不可能である。ゲノム編集技術TALENを用いて、最近、ミトコンドリアゲノムの任意箇所の切断、修復、ゲノム構造変化の誘起が報告された。本研究では、よりベクター作製が簡便でDNA切断効率の高いCRISPR/Cas9法をミトコンドリアゲノム編集に適用させることに挑戦した。ミトコンドリア内のDNAを標的切断するために、Cas9タンパク質にミトコンドリアマトリクス局在シグナル配列を付加した。残念ながらこの方法ではミトコンドリアゲノム上の標的DNAの切断/変異導入/DNA消失などは認められなかったが、植物ミトコンドリアゲノム編集法の改良法の展開につながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内には核のほかに、葉緑体とミトコンドリアの中にもゲノムが存在します。このうち植物ミトコンドリアのゲノムだけが改変が不可能でしたが、最近我々のグループによって世界で初めてゲノム編集技術TALENを応用した方法で成功しました。ミトコンドリアゲノムの改変は、基礎生物学的にも農業応用上も重要な対象です。今回の試みでは、植物ミトコンドリアゲノム編集技術を、TALENを用いた方法から、より作製方法が容易なCRISPR/Cas9法を応用して挑戦しました。この方法でのゲノム改変は残念ながら達成できませんでしたが、植物ミトコンドリアゲノム改変法の改良を進めるための手助けとなる知見が多数得られました。

研究成果の概要(英文):Plant mitochondrial genome is the last untouchable target for transformation in the genomes. TALENs (Transcription activator-like effector nuclease) with mitochondrial localization signals were recently reported to cut and elimination of mitochondrial DNA targets in mammalian cells. Here, I tried the similar way with CRISPR/Cas9 for plant mitochondrial genome. Unfortunately, no mitochondrial transformants have been detected in this trial. The CRISPR guide RNA localization might have been mainly problematic for its co-localization to mitochondria with mito-Cas9 protein.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：ゲノム編集 ミトコンドリアゲノム 植物ミトコンドリア

### 1. 研究開始当初の背景

核ゲノムと異なり、オルガネラゲノムはその多コピー性(一細胞内に数十コピーから数千コピー存在する)などから、ゲノムの改変・形質転換をおこなうことが難しい。その中でも、植物のミトコンドリアゲノムは未だ形質転換が不可能な最後のゲノムの一つである。植物ミトコンドリアゲノムは動物のものとは比べ 10-100 倍大きく、遺伝子の並び方もバラエティーに富んでおり、頻繁な組換えが起こることで多様なゲノム分子種が混在するマルチパーティット構造をもつことが知られている。植物ミトコンドリアゲノムには、呼吸系の遺伝子とその発現に必要な、生存に必須の遺伝子とともに、雄性配偶子・花粉の形成を不可能にすることで雌雄両性性の株を雌化させる、細胞質雄性不稔性の原因遺伝子などをコードしている。後者は農業分野でハイブリッド育種の現場で多用されている。つまり、植物ミトコンドリアゲノム上には科学的な基礎的興味と農業生産上の実用性の両面から重要遺伝子がコードされているといえ、その改変方法の確立と改良は重要な未達の課題である。

### 2. 研究の目的

最近核ゲノムの遺伝子改変にゲノム編集技術が多用され、爆発的に普及してきている。この方法は、任意配列を特異的に認識して切断するエンドヌクレアーゼを用いて、標的配列を切断し、生物側がもつ修復機構のエラーによって変化を期待するのが一番簡単な改変変化を引き起こす方法である(任意遺伝子破壊)。これまで形質転換や改変が不可能であった植物ミトコンドリアゲノムに対して、同様にこのようなゲノム編集の方法が適用可能ではないかと考え、本プロジェクトでは、後述する CRISPR/Cas9 法を用いてこれに挑戦した。

核のゲノム編集では、複数種存在する任意配列特異的なエンドヌクレアーゼの中でも、CRISPR/Cas9 法が最も良く使われている。この方法は、DNA を切断するタンパク質因子と DNA の塩基配列を認識する guide RNA (gRNA) の二因子からなる。これはその他の二つの方法 (TALEN 法、ZFN 法) がタンパク質のみから構成されているのとは比べ、一見複雑な印象を受けるが、それぞれの切断認識配列に合わせた酵素を設計するにあたり、CRISPR/Cas9 法のほうが、gRNA の短い配列を任意配列に合わせて調整するだけで住むため、圧倒的にベクター構築が簡便であり、研究者に支持されよく使われている。

### 3. 研究の方法

ミトコンドリアゲノムは、細胞内ミトコンドリアの中に存在するため、その任意配列切断酵素をミトコンドリア内へ特異的に輸送させる必要がある。そのため、この任意配列切断酵素にミトコンドリア輸送配列

を付加した。これには、シロイヌナズナ ATPase delta prime subunit pre-sequence 配列を用いた。エンドヌクレアーゼをミトコンドリア内に局在させるこの方法であれば、細胞内に多コピー存在するミトコンドリア DNA も、全て破壊することが可能であると考えられる。

Cas9 タンパク質にこの pre-sequence 配列をつなげた ORF 発現ベクターを構築し、guide RNA と共発現する Ti-plasmid を、一旦イネの核ゲノムへアグロバクテリウム法を用いて形質転換した。上記発現ベクター内の Cas9 タンパク質の代わりに GFP-ORF をクローニングして形質転換を行い、共焦点レーザー顕微鏡によって観察することで、その発現とミトコンドリアへの局在を確認した。核ゲノムにこれら Ti-Plasmid 中の T-DNA 領域が形質転換された植物体を複数確立して、それらのミトコンドリアゲノムの変化を PCR 法を用いて確認した。

### 4. 研究成果

ヒトやほ乳類、動物のミトコンドリアゲノムも安定的な形質転換は現在までできていない。最近、TALEN 法を用いて、ミトコンドリア DNA の任意配列を切断して消失させることに成功した報告が連続してでてきている(mitoTALEN 法)。TALEN はタンパク質性の任意配列認識エンドヌクレアーゼであるが、これに前述同様にミトコンドリア局在配列を付加させてミトコンドリア内に局在させることで、標的配列を切断させるという方法である。この mitoTALEN 法を用いて、私と共同研究者たちは植物のミトコンドリアゲノム内の遺伝子の破壊に成功した。破壊された配列は、数百 bp に及んで欠失がおこっており、これは数~数十 bp の欠失もしくは挿入が起こる核ゲノムの遺伝子破壊とは大きくことなっていた。本研究では、これをポジティブコントロールとして、mitoTALEN 法でうまくいったものと同じ植物、同じ破壊標的について、CRISPR/Cas9 を用いた方法で実験を行った。しかしながら、残念なことにその遺伝子破壊や遺伝子配列変化を確認することはできなかった。

CRISPR/Cas9 法は、タンパク質因子だけでその任意配列切断が可能である TALEN 法などと異なり、タンパク質因子 Cas9 の他に guide RNA が必要である。今回の実験では、タンパク質因子 Cas9 のミトコンドリアへの局在はおそらく成功したと考えられるが、同時に細胞質で発現させた guide RNA がミトコンドリア内に入らなかった可能性がある。ミトコンドリアは外膜内膜に囲まれており、その物質輸送には各種のトランスポーターを用いており、guide RNA の局在は難しい可能性が考えられた。しかしながら、他方では、植物のミトコンドリアは普段細胞質から数種類の tRNA などの小分子 RNA を取り込んでいることが知られている。これらは特異的な

トランスポーターによって輸送されている可能性も指摘されているが、ミトコンドリアへ局在するタンパク質と複合体をつくることで共輸送されている可能性も指摘されている。後者を考慮すると、Cas9 にミトコンドリア局在シグナルを付加することで、Cas9 と複合体を形成した guide RNA も同時に取り込まれる可能性が考えられ、これを期待して実験を行った。

CRISPR/Cas9 を用いた方法で、ほ乳類培養細胞のミトコンドリア DNA の切断に成功した報告が一例存在するが、不明瞭な結果であり、mitoTALEN 法を成功させたチームからは、再現性がなかったことが報告されている。この中でも、guide RNA のミトコンドリアへの取り込みが起こっていないことが主因ではないか主張されており、ミトコンドリアゲノム編集には核ゲノムのように CRISPR 化はなされないのではないかという主張がされている。植物ミトコンドリアゲノムを用いた当該研究の結果からも、代表者も同様の意見である。

CRISPR/Cas9 法を用いて、mitoTALEN で成功した植物・標的配列を用いて同じ所を切った方法は上手くいかなかった。しかしながら、mitoTALEN 法を改良し、大きく進展させることができた。mitoTALEN 法は、一箇所の標的切断部位の前後二箇所を認識する二分子のタンパク質 nickase の共発現ベクターを構築する必要がある。これを、一分子のタンパク質エンドヌクレアーゼに変換させる compact TALEN 法を流用し、植物ミトコンドリアゲノム編集に適用した。この方法を構築したところ、mitoTALEN 法のベクター構築にくらべ、その労力が大幅に削減できた。mitoTALEN の DNA 認識ドメインの構築は歩留まりが悪いため、二つ一組を揃えるのには時間がかかったが、一個だけでよくなれば、その労力と時間は 1/2 よりも実際はかなり短く済むことがわかった。この mitoTALEN-compact 法を用いることで、前述した植物ミトコンドリアゲノム上の遺伝子を認識・切断させ、塩基配列変化を引き起こすことに成功した。この方法は現在論文執筆中である。mitoTALEN-compact 法は、mitoTALEN 法に比べ、成功率(核ゲノム形質転換体あたりのミトコンドリアゲノム変化個体率)が低いことが多いのがまだ難点であるが、そのエンドヌクレアーゼドメインの置換等によって、現在さらに改良を加えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Shibata S., Arimura S., Ishikawa T. and Awai K. (2018) Alterations of membrane lipid content correlated with chloroplasts and mitochondria development in *Euglena gracilis*. *Front. Plant Sci.* | doi: 10.3389/fpls.2018.00370 2018 年

2. Shimano S, Hibara KI, Furuya T, Arimura S, Tsukaya H, Itoh JI. Conserved functional control, but distinct regulation, of cell proliferation in rice and Arabidopsis leaves revealed by comparative analysis of GRF-INTERACTING FACTOR 1 orthologs. *Development*. 2018 Apr 5;145(7). pii: dev159624. doi: 10.1242/dev.159624.

3. Arimura\* S, Kurisu R, Sugaya H., Kadoya N. and Tsutsumi N. (2017) Cold Treatment Induces Transient Mitochondrial Fragmentation in *Arabidopsis thaliana* in a Way that Requires DRP3A but not ELM1 or an ELM1-Like Homologue, ELM2 *Int. J. Mol. Sci.* 18(10), 2161; doi:10.3390/ijms18102161

4. Nagaoka N, Yamashita A, Kurisu R, Watari Y, Ishizuna F, Tsutsumi N, Ishizaki K, Kohchi T, Arimura\* S (2017) DRP3 and ELM1 are required for mitochondrial fission in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Scientific Reports*, 2017 Jul 4;7(1):4600. doi: 10.1038/s41598-017-04886-0.

5. Yamashita A, Fujimoto M, Katayama K, Tsutsumi N and Arimura S (2016) Mitochondrial outer membrane forms bridge between two mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal & Behav.*, 2016 3;11(5):e1167301. doi: 10.1080/15592324.2016.1167301.

6. Yamashita A, Fujimoto M, Katayama K, Yamaoka S, Tsutsumi N and Arimura S (2016) Formation of Mitochondrial Outer Membrane Derived Protrusions and Vesicles in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 11(1): e0146717. doi:10.1371/journal.pone.0146717.

〔学会発表〕(おもなもの 計 2 件)

1. Dynamics of mitochondria and their nucleoids in *Arabidopsis* and *Marchantia*. Shin-ichi Arimura TJPB2017, Join meeting of JSP and Taiwan society for plant biology, Session invited speaker. 2<sup>nd</sup> Nov. 2017 at Taiwan

2. Mitochondrial distribution and morphology in *Arabidopsis thaliana*. Akihiro Yamashita, Masaru Fujimoto and Shin-ichi Arimura 分子生物学会シンポジウム 3SP9 Inter and Intra mitochondrial biology. 2<sup>nd</sup> Dec. 2016

〔図書〕(計 3件)

Shin-ichi Arimura\* (2018) Fission and fusion of plant mitochondria, and genomes maintenance. Plant Physiol. 176(1):152-161., doi: 10.1104/pp.17.01025.

Tomohiko Kazama, Asuka Nishimura, Shin-ichi Arimura (2018) Chapter 4. Rice organelle genomics, approaches to genetic engineering and breeding. Takuji Sasaki & Motoyuki Ashikari edit. Rice Genomics, Genetics and Breeding. Springer Nature.

有村慎一 高梨秀樹 植物ミトコンドリアゲノムの不思議とその変化の試み 2017年, 植物の生長調節 52(1): 25-30

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 植物ミトコンドリアゲノムの編集方法  
発明者: 有村慎一、風間智彦、片山健太、日高朋美、鳥山欽哉、堤伸浩  
権利者: 国立大学法人東京大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2017- 24923  
出願年月日: 2017年2月11日  
国内外の別: 国内、及び米国

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)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)・准教授

研究者番号: 00396938

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
なし ( )

研究者番号:

(4)研究協力者  
なし ( )