

令和元年6月5日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19256

研究課題名(和文)ミトコンドリア移行TALENを用いた植物ミトコンドリアゲノム改変法の開発

研究課題名(英文) Attempts of plant mitochondrial genome modification via mitochondria-targeting TALENs

研究代表者

風間 智彦 (Kazama, Tomohiko)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：30431464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

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の改変・編集法の確率を目指し、配列特異的ヌクレアーゼ(mitoTALEN)によって二本鎖切断を導入することで(1)二本鎖切断導入箇所への外来遺伝子のノックインと(2)ゲノム再編成による新規orfの作出を目標として研究を行った。(1)に関しては、外来遺伝子のミトコンドリアへのデリバリーがうまくいっていないことが原因で、外来遺伝子の導入された個体は得られていない。一方、(2)では、ターゲットとしたorf314が消失したが、新規orfは作出されていないことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ミトコンドリアのゲノム上には、呼吸に関与する因子のみでなく、農業上重要な形質である細胞質雄性不稔性の原因遺伝子もコードしている。さらに、機能不明のorfも多く存在していることが知られているが、機能不明のorfについての解析も進んでいないのが現状である。そこで、人工制限酵素TALENにミトコンドリア移行シグナルを付加したmitoTALENを用いて切断箇所へのGFP遺伝子の挿入を試みた。成功すれば、世界で初めてのミトコンドリア遺伝子導入技術として学術的な意義がある。一方、雄性不稔の原因遺伝子を導入する事が可能となれば、多収育種の基盤を提供することが可能となるため、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop a method of a mitochondrial genome modification. (1) We tried to develop a method for an insertion of a transgene, gfp gene, via homologous recombination. Because we have found that a double strand break caused by mitochondria-targeted TALEN (mitoTALEN) is repaired by homologous recombination. To replace an orf79 in BT-type CMS mitochondrial genome, we constructed atp6-gfp donor vector. This vector contains 2-kb upstream and downstream sequence of orf79 and the orf79 sequence is replaced with gfp gene. To deliver atp6-gfp vector to mitochondria, we used particle bombardment. However, we could not obtain gfp-inserted plants. This indicates that the particle bombardment is not effective for a gene delivery to mitochondria. (2) We tried to modify an orf314, previously termed orf288, using mitoTALEN. Although we obtained orf314-lost transgenic Taichung 65, we could not obtain orf314-modified plants.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物ミトコンドリア ゲノム改変

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

植物の細胞にも動物の細胞と同様にミトコンドリアが存在し、呼吸による ATP 合成や代謝の場として機能していることが知られている。また、どちらのミトコンドリアも独自のゲノムを保有しているが、動物のミトコンドリアゲノムは 17 kb 環状であることがわかっているが、植物ミトコンドリアゲノムのサイズも 200 kb から 11.3 Mb と植物種によって異なることがわかってきた。一方、その構造は歴史的な経緯よりマスターサークルと呼ばれる環状で記述されることが多いが、詳細についてはいまだに不明で、環状ではないミトコンドリアゲノムを持つ植物についても報告されている。

これまで、核や葉緑体に存在するゲノムへの外来遺伝子の導入については、アグロバクテリウムやパーティクルガンを用いた方法が確立され、様々な研究に利用されてきた。しかし、植物ミトコンドリアゲノムへの遺伝子導入に関しては、いまだに安定的な遺伝子導入個体を得るまでには至っていない。これは外来遺伝子が導入されたゲノムを選抜するための適切な薬剤（選抜マーカー）が見つかっていないことと、ミトコンドリアへ DNA をデリバリーする技術が確立されていないことが主な原因である。

植物には、核とミトコンドリアの組み合わせを変更すると、花粉の形成がうまくいかず自殖ができなくなる、不稔となる細胞質雄性不稔性（Cytoplasmic male sterility: CMS）という性質がある。CMS を引き起こす原因遺伝子はミトコンドリアに存在すると考えられているが、ミトコンドリアゲノムへの遺伝子導入ができないため、CMS 原因遺伝子の証明は不可能であった。一方、BT 型 CMS イネの原因遺伝子と考えられてきたミトコンドリアの *orf79* をミトコンドリア移行シグナル付き TALEN によってノックアウトすると、稔性が回復することを明らかにした（Kazama et al. 投稿中）。さらに、mitoTALEN によって特定の箇所に導入された二本鎖切断（double strand break: DSB）は、周辺の相同配列を利用した相同組換えによって修復されることを明らかとした。ここでわかった、DSB が相同組換えで修復される性質を利用すると、*orf79* と *gfp* を置換されたイネが得られるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

植物ミトコンドリアゲノムに導入された二本鎖切断（DSB）が、相同組換えによって修復されることより、DSB 周辺の配列を持つ外来 DNA 断片をミトコンドリアへデリバリーすることができれば、任意の部位へ目的の外来 DNA 断片をノックインすることを目的とした。さらに、CMS イネのミトコンドリアゲノム配列解析の結果、それぞれの CMS ミトコンドリアに特異的に存在すると考えられる CMS 原因候補遺伝子は、日本晴ミトコンドリアに存在する *orf288* の一部配列を含んでいることがわかってきた。以上のことより、mitoTALEN を用いて、特定の箇所に外来 DNA を挿入することと、*orf288* をターゲットとする mitoTALEN によって *orf288* へ DSB を挿入することで、*orf288* 配列を含む新規 CMS 原因遺伝子の創出を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *gfp* 遺伝子のミトコンドリアゲノムへの導入

BT 型 CMS イネ（BTA）の核へ、CMS 原因遺伝子である *orf79* をターゲットとする mitoTAL2 もしくは mitoTAL3 をアグロバクテリウム法で導入する。選抜培地で選抜をする際に、*orf79* の上流および下流 2 kb を持ち、*orf79* を *gfp* と置換した *atp6-gfp* ベクターをパーティクルガンで培地上のカルスへ導入した。パーティクルガンで導入を行なったのちは、通常のアグロバクテリウム法と同様に再分化培地へ移植し、再分化個体を得た。得られた再分化個体の葉より DNA を抽出し、*orf79* および *gfp* の存在を、PCR によって調査した。

(2) *orf314* をターゲットとする mitoTALEN の導入

日本晴ミトコンドリアゲノムに存在すると報告された *orf288* は、様々な CMS イネの原因候補遺伝子に相同性を示すことが分かっている。一方、中国のグループが日本晴 *orf288* の配列に一部間違があることを報告している。そこで、材料として用いるジャポニカイネの台中 65 号 (T65) の *orf288* 周辺について配列を決定した。さらに、*orf288* をターゲットとする mitoTALEN を T65 へアグロバクテリウム法で導入することで、*orf288* の配列を持った新規 *orf* が生じて、不稔性を示すようにならないかを調査した。

4. 研究成果

(1) *gfp* 遺伝子のミトコンドリアゲノムへの導入

TAL2 および TAL3 遺伝子をアグロバクテリウム法で BTA のカルスに導入し、選抜途中に *atp6-gfp* ベクター (図 1) をパーティクルガンによって導入した。これらの操作を行ったカル

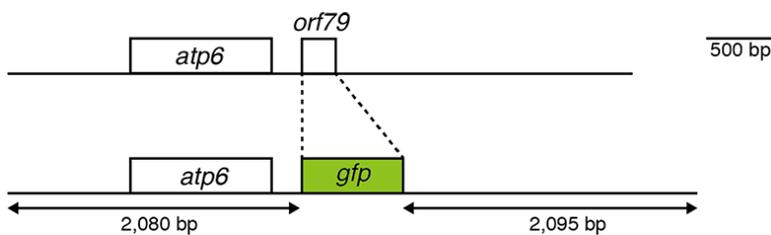


図 1 *gfp* 挿入のためのドナーベクターとして用いた *atp6-gfp* を模式的に示した。

スより再分化個体を TAL2 より 48 個体, TAL3 より 10 個体得ることができた。得られた細分化個体について、*orf79* の有無について PCR で調査した。この結果, TAL2 を導入した 48 個体中 20 個体

において、*orf79* が消失していることが明らかとなった。一方、TAL3 を導入した 10 個体については *orf79* の消失は見られなかった。TAL2 を導入し、*orf79* が消失した個体では、TAL2 による二本鎖切断によって、*orf79* を含む領域が消失したことが考えられた。また、*gfp* が *orf79* と置換されたかを PCR によって調査したところ、どの個体においてもシグナルを得ることができなかった。このことは、*orf79* が *gfp* によって置換されていないことを示している。これは、相同組換えのドナーとなるべき *atp6-gfp* ベクターが、パーティクルガンで打ち込むだけではミトコンドリアにうまくデリバリーされていないためと考えられた。

(2) *orf314* をターゲットとする mitoTALEN の導入

*orf288* の周辺を PCR によって増幅し、配列を決定したところ、別のグループが報告している通りの変異が T65 の *orf288* においても存在した。このため、タンパク質をコードする領域が長くなるので名称を *orf288* から *orf314* へと変更することとした (図 2)。

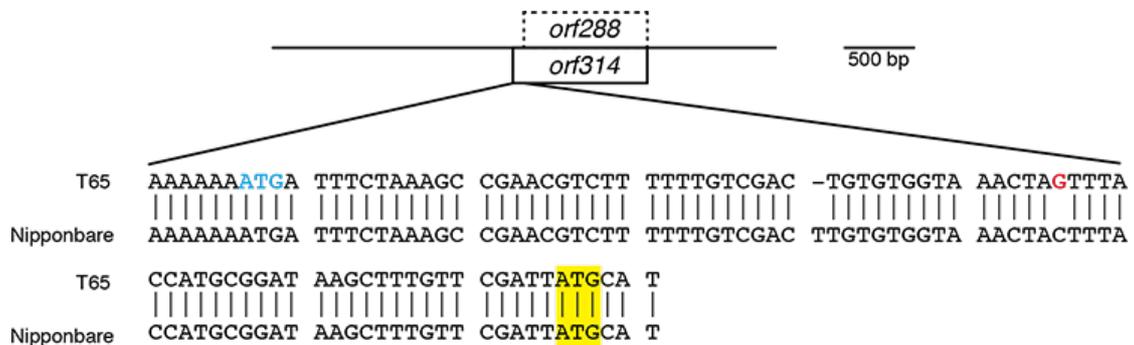


図 2 登録されている *orf288* の上流配列と台中 65 号 (T65) における配列の差

T65 において T の欠失と G への置換が見られた。

T65 では青字で示した ATG から 314 アミノ酸をコードする *orf314* が予測される。

黄色で示した ATG は *orf288* の ATG を示す。

6 種類の mitoTALEN をアグロバクテリウム法で 400 粒の T65 に由来するカルスに導入した. 表 1

表 1 *orf314* 編集のために導入した mitoTALEN の配列と, 再分化個体の有無  
cTAL は compact TALEN を示し, TAL は 2 分子 TALEN を示す

再分化個体		ターゲット配列 (5' to 3')
cTAL16	○	TACTTACGGAATCTCAAAGA
cTAL17	×	TATTAATAGGTTCGTTATCA
cTAL18	×	AATTTGAATCCTTCCGCCCA
TAL16	×	[L]GCAAATCTAACGAAGTGC [R]TACTTACGGAATCTCAAAGA
TAL17	×	[L]CTTCAGCGGTTTTGAGTGGA [R]TATTAATAGGTTCGTTATCA
TAL18	×	[L]AATTTGAATCCTTCCGCCCA [R]AGATCCTCCGCTTGAATCCG

に得られた個体をコンストラクト  
ごとにまとめたものを示した. 表に  
示したとおり, cTAL16 を導入したカル  
スのみから再分化個体が得られ  
た. 得られた個体のうち 8 個体につ  
いて, *orf314* が存在するかどうかを  
PCR でチェックしたところ, 1 個体  
でのみ *orf314* の存在が確認できな  
かった. サザンブロット分析でも調  
査を行ったが, やはりこの個体では  
シグナルを得ることができ無かつ  
た. 以上のことより, この個体では,

*orf314* が消失したと考えられる. 一方, *orf314* が消失した個体においても後代が得られている  
ことより, *orf314* 自体は存在しても存在しなくても, イネの生殖形質に影響を与えないことが  
分かった.

以上のことより, 植物ミトコンドリアへの遺伝子導入を行うには, ミトコンドリアへ導入した  
い DNA 断片を効率よく大量にデリバリーすることが重要なことが再確認された.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

### 1. Tomohiko KAZAMA

Mitochondrial genome modification using mitochondria-targeted TALENs  
WUR-TU Plant Science 2018・2018 年

### 2. 風間智彦, 亘悠太, 堤伸浩, 鳥山欽哉

BT 型細胞質雄性不稔性イネにおけるミトコンドリア遺伝子 *orf79* の破壊  
日本育種学会 第 135 回講演会・2019 年

### 3. 池田健一郎, 有村慎一, 鳥山欽哉, 風間智彦

ミトコンドリア移行 TALEN を用いた植物ミトコンドリアゲノム改変の試み  
第 13 回 東北育種研究集会・2018 年

### 4. 阿部瑞希, 風間智彦, 鳥山欽哉

イネ培養細胞を用いたミトコンドリア形質転換開発の試み  
日本育種学会 第 133 回講演会・2018 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

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

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8 桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：鳥山 欽哉  
ローマ字氏名：TORIYAMA, kinya

研究協力者氏名：伊藤 方子  
ローマ字氏名：ITO, masako

研究協力者氏名：池田 健一郎  
ローマ字氏名：IKEDA, kenichiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。