

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02172

研究課題名（和文）人工稔性回復因子をモデルとした植物ミトコンドリア遺伝子の人為的制御の試み

研究課題名（英文）Attempts to regulate mitochondrial gene expression in rice.

研究代表者

風間 智彦（Kazama, Tomohiko）

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：30431464

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において我々は、ミトコンドリア移行シグナル付きTALENでWA型やRT102型CMSイネのCMS原因遺伝子候補orf352のノックアウトを行なった。この結果、orf352がノックアウトされてもこれらの系統は、自殖による種子稔性は見られなかった。一方、それらの系統の花粉の形状を調査したところ、CMS系統とは異なり、花粉への澱粉の蓄積が見られた。これにより、WA型やRT102型CMSイネではorf352だけでなく、その他にも不稔を引き起こす遺伝子が存在することを世界に先駆けて明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で研究の対象としたWA型CMSイネは、中国において世界で初めて実用化され、栽培されているハイブリッドライスの90%以上がこの細胞質を利用していることが知られている。このCMSイネのCMS原因遺伝子については、中国のグループによってorf352のみによってCMSが引き起こされると報告されていたが、今回、我々の研究成果より、orf352以外の因子もWA型CMSに関与することが世界で初めて明らかにされ、学術的な意義は大きい。また、orf352がCMSを引き起こすことを直接的に証明できたことより、CMS細胞質の判定にorf352の存在の有無を指標とすることが可能となるため、農学的にも価値が高い。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we have performed a knockout of orf352, a candidate of CMS-causative gene for WA-type and RT102-type CMS rice, using a TALEN with a mitochondria-targeting signal. As a result, we have obtained some transformants whose orf352 are disrupted. These plants, however, did not show seed fertility. Sequence analysis around the target site of mitoTALEN in orf352 and pollen phenotype observation have revealed that disruption of orf352 partially restores pollen development. These results suggest that multiple genes in the mitochondrial genome may be involved in the induction of male sterility in rice.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：CMS mitoTALEN ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核ゲノムとミトコンドリアゲノム間の不和合により、雄性生殖器官の発達異常が生じ、機能的な雄性生殖細胞が分化しない形質を細胞質雄性不稔性(Cytoplasmic Male Sterility, CMS)と呼んでいる。この形質を示す植物では花粉が機能しないため、自殖による採種が不可能となる。このため、この形質は自然界において自殖性植物にとっては、不利な形質と考えられている。しかし、労力のかかる機械的な除雄を行わなくても自殖が避けられることより、生育が旺盛な F1 ハイブリッド品種の採取現場においては、非常に重宝される形質であり、農業上重要である。

これまでの古典遺伝学的な解析より、CMS 植物のミトコンドリアゲノムには、CMS を引き起こす CMS 関連遺伝子が存在し、CMS 細胞質を持つにもかかわらず機能的な雄性生殖器官を発達させる植物の核には、CMS 関連遺伝子の発現を抑制する稔性回復遺伝子が存在することが分かっていた。一方、ミトコンドリアゲノムに存在する CMS 関連遺伝子については、直接的な変異導入技術や、ミトコンドリアゲノムへの遺伝子導入技術が存在しなかったことより、本当に CMS 原因遺伝子として機能しているのかは明らかとされてこなかった。

我々は本研究を開始する前に、ゲノム編集技術の一つである TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) にミトコンドリア移行シグナルを付加した mitoTALEN を用いて、植物ミトコンドリアゲノム編集が可能であることを世界に先駆けて示した。我々は BT 型 CMS イネの CMS 原因遺伝子と考えられていた *orf79* をターゲットとする mitoTALEN を BT 型 CMS イネに遺伝子導入した。これにより、*orf79* が破壊された個体を得られ、これらの個体においては種子稔性が回復したことより、*orf79* が BT 型 CMS イネにおいて CMS を引き起こす原因遺伝子であることを証明するとともに、mitoTALEN を用いることでミトコンドリアゲノムに存在する遺伝子の機能証明が可能だということが示された。

イネにおいては、さまざまな種類の CMS 細胞質が知られており、CMS を引き起こすと考えられる原因遺伝子はそれぞれの細胞質で異なっていると考えられている。しかしながら、研究開始時点で CMS 原因遺伝子として明らかとなっているのは、BT 型 CMS イネ *orf79* のみであった。

2. 研究の目的

本研究では、mitoTALEN を用いて様々な CMS イネの原因遺伝子を明らかにするとともに、次世代育種技術の一つである人工 PPR 遺伝子を用いて、原因遺伝子の人為的制御が可能かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア移行 TALEN (mitoTALEN) を用いた真の CMS 原因遺伝子の同定

本項目では、mitoTALEN で CMS 原因遺伝子を明らかにする目的で、中国で実用化されハイブリッドライスの細胞質親として 90%以上のシェアを誇る WA 型 CMS イネとその派生型と考えられる RT102 型 CMS イネおよび、東北大学オリジナルで育成された CW 型 CMS イネを材料として用いた。それぞれの CMS イネは、ミトコンドリアに存在する *WA352*(WA 型)、*orf352*(RT102 型)と *orf307*(CW 型)が CMS 原因遺伝子候補として報告されている。

そこで、それぞれの CMS 原因遺伝子内の配列を認識する mitoTALEN を設計し、CMS イネにアグロバクテリウム法によって遺伝子導入を行なった。得られた遺伝子導入個体のうち、ターゲット

とした CMS 原因遺伝子が破壊された個体を選び、自殖による種子稔性が回復するかどうかを調査することで、ターゲットとした遺伝子が CMS 原因遺伝子かどうかを明らかとする。

(2)カスタム PPR による転写後制御を介した CMS 原因遺伝子の機能抑制

(1)で明らかにした CMS 原因遺伝子の発現をカスタム PPR によって転写後制御することで、人工稔性回復遺伝子の作出が可能となるかを明らかとする。まずは、mitoTALEN によって BT 型 CMS イネの CMS 原因遺伝子であることが明らかとなった *orf79* をターゲットとするカスタム PPR タンパク質をコードする PPR 遺伝子を BT 型 CMS イネに遺伝子導入し、種子稔性が回復するかどうかを調査する。うまくいくようであれば、(1)で明らかになった CMS 原因遺伝子に対するカスタム PPR を設計し、CMS 原因遺伝子の発現を人為的に制御できるかどうかを調査する。

4. 研究成果

(1)ミトコンドリア移行 TALEN (mitoTALEN) を用いた真の CMS 原因遺伝子の同定

WA 型・RT102 型について

CMS 原因遺伝子の最有力候補である *WA352* と *orf352* をターゲットとする 2 種類の mitoTALEN (TAL12 および TAL13) をそれぞれの CMS イネにアグロバクテリウム法によって遺伝子導入を行った。得られた遺伝子導入個体の中で、ターゲットとした *WA352* および *orf352* が破壊された植物を選び、種子稔性を調査した。この結果、*WA352* および *orf352* が破壊されている個体においても、種子稔性が確認できないことが分かった (表 1)。

表1 課題(1)のまとめ

CMS系統	CMS原因遺伝子候補	導入したmitoTALEN	ターゲット遺伝子破壊個体	ターゲット遺伝子破壊個体の表現型
WA型	<i>WA352</i>	TAL12, TAL13	有り	不稔 (花粉発達は一部回復)
RT102型	<i>orf352</i>	同上	有り	不稔 (花粉発達は一部回復)
CW型	<i>orf307</i>	TAL10, TAL11	有り	稔性回復

RT102 型 CMS イネは、WA 型 CMS イネと同様に成熟花粉にデンプンの蓄積が見られず、花粉がつぶれた形であることが知られている (図 1)。一方、*orf352* 型が破壊された RT102 型 CMS イネの一部個体では、花粉の形状が元の CMS イネ (RT102 型 CMS イネ) と異なり、デンプンを蓄積し柱頭上で花粉管の発芽も行われることが分かった (図 1)。同様の表現型は、*WA352* を破壊した WA 型 CMS イネにおいても観察された。

以上のことより、WA 型および RT102 型 CMS イネの *WA352* および *orf352* は CMS 原因遺伝子の一部であることが示唆された。さらに、これらの CMS イネでは *WA352* や *orf352* 以外の CMS 原因遺伝子が存在する可能性が示唆された。なお、RT102 型 CMS に関する成果は、国際ジャーナルである Plant Physiology に掲載されるとともに、News and Views において “A TALEN for reviving old questions about cytoplasmic male sterility (Plant Physiol, vol 187, 14-16)” として取り上げられた。

CW 型について

CW 型 CMS の原因遺伝子として *orf307* が候補に挙げられてきたが、稔性回復系統においても

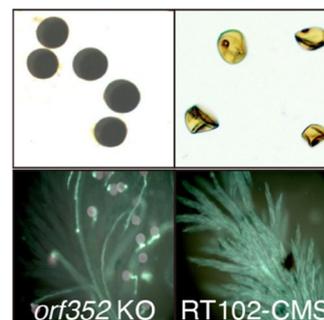


図1 花粉の形状および柱頭上での花粉管発芽の調査

CMS 系統と *orf307* の発現パターンが同一であるため、本当に CMS 原因遺伝子かどうかは不明であった。そこで、*orf307* をターゲットとする mitoTALEN (TAL10 および TAL11) を CW 型 CMS 系統へアグロバクテリウム法で遺伝子導入した。この結果、*orf307* が破壊された個体が得られた。これらの個体について、mitoTALEN のターゲットとなった *orf307* 周辺の配列を調査したところ、BT 型や RT102 型と同様に、mitoTALEN によって導入された二本鎖切断の多くは、ゲノム中の別の領域に存在する相同配列を介した組換えによって修復されていることと、この過程で、相同配列に挟まれた領域が欠失することにより、ターゲット遺伝子の破壊が起こることが分かった (図 2)。

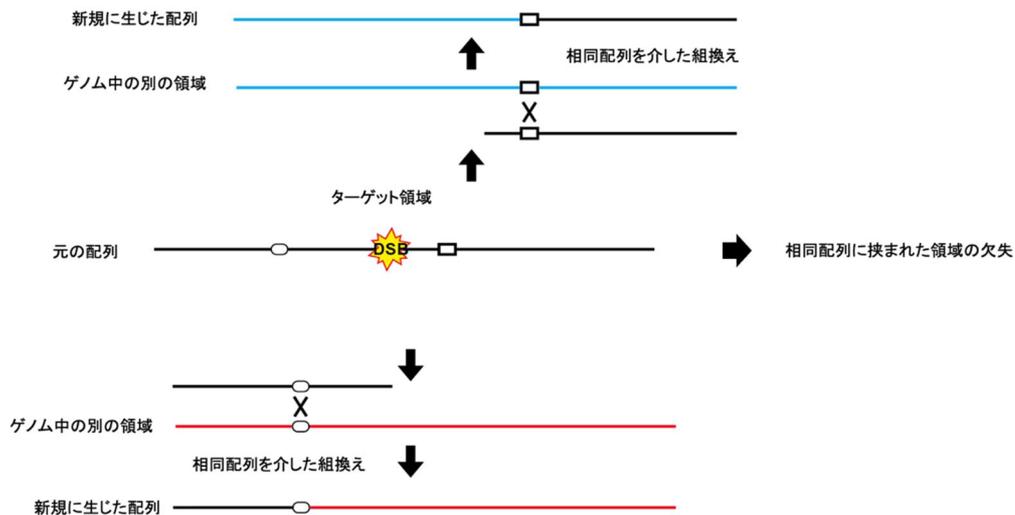


図2 mitoTALENによって導入される二本鎖切断(DSB)の修復モデル

また、*orf307* が破壊された系統について自殖種子がつくかどうかを調査したところ、種子稔性の回復が観察された。このことより、CW 型 CMS イネの CMS 原因遺伝子は、*orf307* であることが明らかとなった。

(2) カスタム PPR による転写後制御を介した CMS 原因遺伝子の機能抑制

カスタム PPR タンパク質によるミトコンドリア遺伝子的人為的制御を目的として、mitoTALEN 法によって BT 型 CMS イネの CMS 原因遺伝子であることが明らかとなった *orf79* の RNA に結合する PPR タンパク質 5 種類を設計した。これらの PPR タンパク質については、リコンビナントタンパク質とターゲット RNA の結合実験を行うことで、*in vitro* において結合することが確かめられている。これらの PPR タンパク質をコードする遺伝子を BT 型 CMS イネへアグロバクテリウム法で遺伝子導入した。得られた遺伝子導入個体について、種子稔性を調査したところ不稔のままであった。これらのことより、*in vitro* で結合活性の高いカスタム PPR タンパク質だとしても、*in vivo* で機能を発揮するためにはさらなる工夫が必要であることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiho Omukai, Shin-ich Arimura, Kinya Toriyama, Tomohiko Kazama	4. 巻 187
2. 論文標題 Disruption of mitochondrial open reading frame 352 partially restores pollen development in cytoplasmic male sterile rice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 236-246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiab236	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11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大向詩穂・鳥山 欽哉・有村 慎一・風間 智彦
2. 発表標題 ミトコンドリア移行TALENを用いたCMS原因遺伝子候補 orf352 のノックアウト
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 風間智彦・肥塚信也・有村慎一
2. 発表標題 細胞質雄性不稔性植物をモデルとしたミトコンドリアゲノム編集
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大向詩穂・鳥山 欽哉・有村 慎一・風間 智彦
2. 発表標題 ミトコンドリア移行TALENによるRT102型CMSイネミトコンドリアゲノムの構造変化と表現型の調査
3. 学会等名 第14回東北育種研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 風間智彦、鳥山欽哉、有村慎一
2. 発表標題 TALENを用いたイネミトコンドリアゲノムの改変
3. 学会等名 九州育種談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 風間智彦
2. 発表標題 TALENを用いた植物ミトコンドリアゲノムの改変
3. 学会等名 植物バイオ研究会 第19回会合（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 風間智彦
2. 発表標題 細胞質雄性不稔植物を用いたミトコンドリアゲノム編集
3. 学会等名 プロジェクト横断型公開シンポジウム「植物のゲノム編集基盤技術開発の現状と展望」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大向詩穂・有村慎一・鳥山欽哉・風間智彦
2. 発表標題 ミトコンドリア移行TALENを用いたCMS原因遺伝子候補orf352のノックアウト
3. 学会等名 第13回 東北育種研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木下諄美・有村慎一・鳥山欽哉・風間智彦
2. 発表標題 ミトコンドリア移行TALENを用いたCW型細胞質雄性不稔性イネの雄性不稔性原因遺伝子の破壊
3. 学会等名 第13回 東北育種研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木実穂・有村慎一・鳥山欽哉・風間智彦
2. 発表標題 稔性回復遺伝子Rf1はW1112型細胞質雄性不稔性イネの稔性を回復させるか？
3. 学会等名 第13回 東北育種研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 風間智彦・亘悠太・堤伸浩・鳥山欽哉・有村慎一
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本育種学会 第135回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiko KAZAMA
2. 発表標題 Mitochondrial genome modification using mitochondria-targeted TALENs
3. 学会等名 WUR-TU Plant Science Workshop 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	鳥山 欽哉 (Toriyama Kinya) (20183882)	東北大学・農学研究科・教授 (11301)	
研究協力者	有村 慎一 (Arimura Shin-ichi) (00396938)	東京大学・農学生命科学研究科・准教授 (12601)	
研究協力者	中村 崇裕 (Nakamura Takahiro) (10464398)	九州大学・農学研究院・教授 (17102)	

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
---------	---------