

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05638

研究課題名(和文) ミトコンドリアゲノム形質転換植物体の作出に向けた革新的遺伝子導入技術の開発

研究課題名(英文) Development of efficient gene transfer techniques for plant mitochondrial genome transformation

研究代表者

木村 光宏 (Kimura, Mitsuhiro)

九州大学・農学研究院・特任准教授

研究者番号：00372342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物ミトコンドリアゲノム形質転換は細胞質雄性不稔の付加や有用物質の大量生産など様々な活用法が期待されるが、従来の植物形質転換法では報告例がない。申請者の研究室では融合ペプチドを用いて、ミトコンドリアへの一過的遺伝子導入に成功している。しかし、ミトコンドリアゲノム形質転換植物体は未だ作出できておらず、その原因の一つはミトコンドリアへの低い遺伝子導入効率にあると考えている。本研究では、ペプチド法によるミトコンドリアへの遺伝子導入効率を向上させる化合物の選抜を約20,000種類の化合物を用いて行った。結果、遺伝子導入効率は個体差が大きく、有効な化合物を同定することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉緑体ゲノム形質転換は、葉緑体ゲノムが多コピー存在するため、外来タンパク質を大量に発現させられることや、母性遺伝のため、花粉飛散による外来遺伝子の拡散が起こりにくいことなど、核ゲノム形質転換にはない利点がある。ミトコンドリアゲノム形質転換にも同様の利点があると考えられるが、未だ、安定的な形質転換技術は確立されていない。本研究によりミトコンドリアへの遺伝子導入効率が向上することができれば、オルガネラ形質転換のさらなる応用可能性が高まることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Plant mitochondrial genome transformation may be utilized for the introduction of cytoplasmic male sterility and the production of useful proteins and metabolites. However, the mitochondrial genome transformation has not been reported by conventional transformation methods. We developed a peptide-mediated gene transfer system to plant mitochondria, but transmitochondrial plants have not yet been produced. The major reason has suggested that the system is insufficient for gene transfer efficiency to plant mitochondria. In this study, we screened for chemicals that improve the efficiency of gene transfer to mitochondria. As a result, no chemical was identified because the gene transfer efficiency to mitochondria varies widely among individuals.

研究分野：園芸科学

キーワード：ミトコンドリアゲノム 化合物ライブラリー 遺伝子導入 CAPT法 LUC活性

1. 研究開始当初の背景

(1) 作物の品種改良には形質転換技術が応用されており、海外では既に商業栽培されている。形質転換作物の利用は農産物の生産性向上に有効であるため、食料問題や環境問題の解決において重要な技術である。また、交配育種では付加できない他の生物種に特異的な形質を持つ作物の開発も可能である。これまでに報告されている核ゲノムを対象とした形質転換技術だけでなく、近年、オルガネラゲノムを対象とした形質転換技術についても報告が増えている。核ゲノムに比べ、オルガネラゲノムを対象とした形質転換植物体は、(a)植物細胞当たりのオルガネラゲノムは核ゲノムよりも多いため、植物体あたりの外来遺伝子の発現量が高くなること、(b)細胞質では有害なタンパク質でも蓄積可能であること(c)相同組換えによる遺伝子導入が可能のため、外来遺伝子の位置効果が無いこと、(d)ポリシストロン性 mRNA のため、複数の外来遺伝子を同時に発現させられること、(e)オルガネラの母性遺伝により、外来遺伝子が環境にエスケープする可能性が低いことなど、多くの利点が挙げられる。これらのことから、オルガネラ形質転換は外来タンパク質や有用物質の大量合成に有用であると考えられており、これまでに葉緑体ゲノム形質転換植物体の作出が多くの植物種で報告されている [1]。しかし、パーティクルボンバード法やポリエチレングリコール法など葉緑体ゲノム形質転換に用いられてきた従来法では、ミトコンドリアゲノムにおける安定的形質転換植物体の作出のみならず、ミトコンドリアへの一過的遺伝子導入すら報告されていなかった。

(2) 申請者の研究室ではミトコンドリア移行ペプチドと DNA 結合ペプチドを融合したペプチドを開発しており、ペプチド-DNA 複合体を用いたミトコンドリアへの一過的遺伝子導入に成功している [2, 3]。しかし、この方法を用いたミトコンドリアゲノムにおける安定的な形質転換については未だ成功していない。形質転換植物体を安定的に作出するためには人工ペプチドの改良や選抜マーカー遺伝子を開発するだけでなく、ミトコンドリアへの遺伝子導入効率の向上が重要であると考えている。以前の報告で、アグロバクテリウム LBA4404 系統によるタバコ核への遺伝子導入効率は約 90%、形質転換効率は約 20%であるのに対し [4]、申請者が行ったペプチド法によるタバコミトコンドリアへの遺伝子導入効率は PCR を用いた高感度の検出法で 10%以下であった (Kimura et al., in preparation)。ミトコンドリアへの遺伝子導入効率が低い原因には、(1) ペプチド-DNA 複合体が細胞壁や細胞膜を通過しにくいこと、細胞内への取込み効率が低いこと、(2) ペプチド-DNA 複合体がミトコンドリアの脂質二重膜を通過しにくいこと、ミトコンドリアへの取込み効率が低いこと、さらに、(3) 外来遺伝子のミトコンドリアゲノムへの相同組換え効率が低いことなどが考えられる。これらの原因を回避し、遺伝子導入効率を向上させるための技術革新がミトコンドリアゲノム形質転換植物体を安定的かつ効率的に作出するためには必須であると考えた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ペプチド法によるミトコンドリアへの遺伝子導入効率を向上させる化合物を化合物ライブラリーから同定し、効率的なミトコンドリア遺伝子導入法を開発することを研究の目的とした。申請者は近年、形質転換が難しいマメ科のモデル植物、ミヤコグサ MG-20 系統を用いて、アグロバクテリウムによる遺伝子導入効率を向上させる化合物の探索を約 3,600 種類の生物活性を持つ化合物から構成される LATCA 化合物ライブラリー (<http://cutlerlab.blogspot.jp/2008/05/latca.html>) を用いて行った。その結果、アグロバクテリウムによる遺伝子導入を活性化することが報告されているフェノール化合物、アセトシリゴン [5] よりも、遺伝子導入効率をさらに向上させるニトリル系除草剤、クロロキシニルを同定した [6]。この化合物はミヤコグサの他、イネやアズキの遺伝子導入、複数のアグロバクテリウム系統を用いた遺伝子導入にも効果を示したことから、多くの植物種の遺伝子導入に応用可能であると期待している。

(2) 本研究は現在、唯一のミトコンドリア遺伝子導入法であるペプチド法の技術革新に申請者の研究経験が活かされることを期待して取り組む研究である。本研究の成果は、植物細胞内の全てのオルガネラゲノムを自由に改変する技術に繋がるため、農業分野や医療分野においても革命的な進展が見込まれる。

3. 研究の方法

(1) 植物材料には *Brassica campestris* (cv. 京都伏見寒咲花菜、タキイ種苗、京都)、ペプチドにはミトコンドリア移行ペプチドおよび DNA 結合ペプチドを持つ cytcocx-(KH)。[2]、DNA にはミトコンドリアでのみ機能する rrn18 プロモーター [7] の下流に NanoLuc マーカー遺伝子

(Promega Co. USA) を融合したプラスミド DNA を作成して用いた。また、化合物ライブラリーには東京大学創薬機構および、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所がそれぞれ保有する約 10,000 種類の化合物からなる化合物ライブラリーを独立に用いた。

(2) 播種後 7 日目の *B. campestris* 子葉断片をそれぞれ 1mM の化合物およびペプチド-DNA 複合体を添加した滅菌水に入れ、申請者らが開発した Centrifugation-Assisted Peptide-mediated gene Transfer (CAPT) 法 [8] により化合物およびペプチド-DNA 複合体を同時に細胞内に浸潤させて、30、連続明条件下で静置培養した。一晚培養後、各試料から抽出した粗タンパク質から LUC 活性を測定し、ミトコンドリアへの遺伝子導入効率が向上する化合物の選抜を試みた。

4. 研究成果

(1) 人工ペプチドを用いたミトコンドリアへの遺伝子導入効率を向上させる化合物の選抜

それぞれの化合物ライブラリーを用いて遺伝子導入効率を解析した結果、1 次選抜では東大化合物ライブラリーから 18 種類 (T1~18)、名大化合物ライブラリーから 15 種類 (N1~15) の化合物の添加によりコントロールに比べて、高い遺伝子導入効率を示した。これらの化合物について個別に購入し、追試験を行った。しかし、選抜した全ての化合物で有意な結果を得ることはできなかった (図 1)。また、東大化合物ライブラリーから選抜された 1 化合物は市販されていないため、再現性を確認することができなかった。

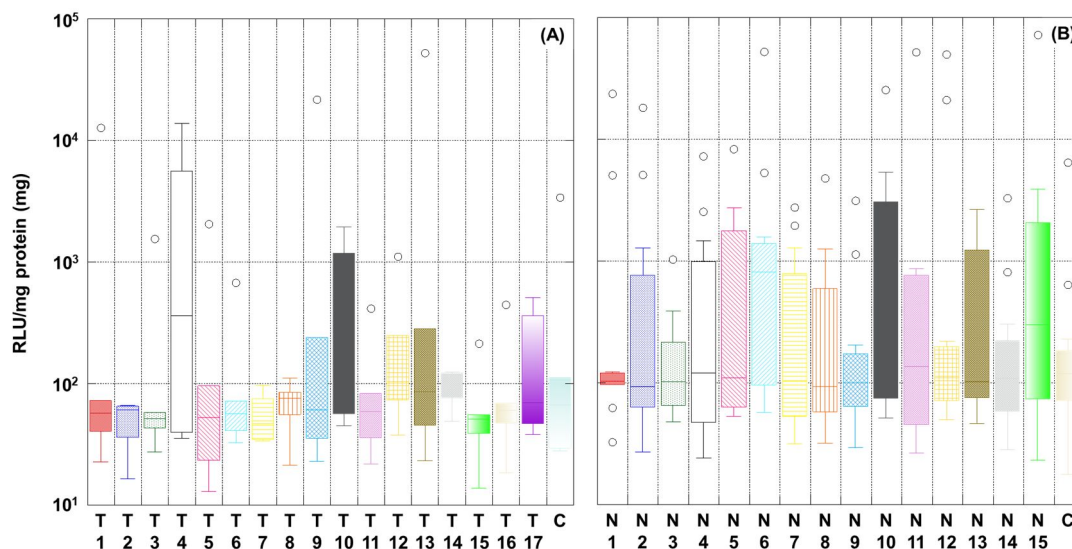


図 1 人工ペプチドを用いたミトコンドリアへの遺伝子導入効率を向上させる化合物の選抜 (A) 東大化合物ライブラリー (T1~T17) (B) 名大化合物ライブラリー (N1~N15) から選抜した化合物を処理し、遺伝子導入を行った *B. campestris* の LUC 活性。C: DMSO 処理し、遺伝子導入を行った *B. campestris* の LUC 活性

(2) まとめ

CAPT 法によるミトコンドリアへの遺伝子導入効率には個体差が大きく、人工ペプチドを用いたミトコンドリアへの遺伝子導入効率を向上させる化合物を選抜するには至らなかった。その要因の一つとして、本研究で用いた人工ペプチドはミトコンドリア移行ペプチドと DNA 結合ペプチドを融合しているが、細胞膜透過性を有するペプチドは融合されていないため、ペプチド-DNA 複合体が細胞膜を透過する効率が安定していないことが考えられる。申請者らのグループが開発した Particle Bombardment-assisted Peptide-mediated gene Transfer (PBPT) 法は、パーティクルボンバード法により安定的にペプチド-DNA 複合体を細胞内に送達することができるため [9]、PBPT 法と化合物を組み合わせた効率的なミトコンドリアへの遺伝子導入法を今後、試みたい。

<引用文献>

1. Adem et al., Recent achievements obtained by chloroplast transformation, Plant methods. 13, 30, 2017
2. Chuah et al., Gene introduction into the mitochondria of *Arabidopsis thaliana*

- via peptide-based carriers, *Scientific Reports*. 5, 7751, 2015
3. Yoshizumi et al., Selective Gene Delivery for Integrating Exogenous DNA into Plastid and Mitochondrial Genomes Using Peptide-DNA Complexes, *Biomacromolecules*. 19, 1582-1591, 2018
 4. Bakhsh et al., Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L., *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 26, 259-264, 2017
 5. Stachel et al., Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*, *Nature*. 318, 624-629, 1985
 6. Kimura et al., A Novel Phenolic Compound, Chloroxynil, Improves *Agrobacterium*-Mediated Transient Transformation in *Lotus japonicus*, *PLOS ONE*. 10, e0131626, 2015
 7. Hameed et al., Comparison of mitochondrial gene expression and polysome loading in different tobacco tissues, *Plant Methods*. 13, 112, 2017
 8. Kimura et al., A centrifugation-assisted peptide-mediated gene transfer method for high-throughput analyses, *Plant Biotechnology*. 36, 49-52, 2019
 9. Kimura et al., Particle bombardment-assisted peptide-mediated gene transfer for highly efficient transient assay, *BMC Research Notes*. 16, 46, 2023

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kimura Mitsuhiro, Yoshizumi Takeshi, Numata Keiji	4. 巻 36
2. 論文標題 A centrifugation-assisted peptide-mediated gene transfer method for high-throughput analyses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 49 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.18.1115a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Mitsuhiro, Endo Akira, Nagira Yozo, Yoshizumi Takeshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Particle bombardment-assisted peptide-mediated gene transfer for highly efficient transient assay	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-023-06320-3	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木村光宏、吉積毅
2. 発表標題 ペプチド法による植物ミトコンドリアへの遺伝子導入効率を向上させる技術開発
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村光宏、吉積毅、沼田圭司
2. 発表標題 ペプチド-DNA複合体を用いた葉緑体ゲノム組換えタバコの作出
3. 学会等名 園芸学会平成31年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村光宏、吉積毅、沼田圭司
2. 発表標題 遠心による植物細胞へのペプチド-DNA複合体導入
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsuhiro Kimura, Takeshi Yoshizumi, Keiji Numata
2. 発表標題 A Centrifugation-Assisted Peptide-mediated plant Transformation (CAPT) method for various high-throughput analyses: its protocol and efficiency.
3. 学会等名 International Association for Plant Biotechnology Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 植物の改変方法及び植物のゲノム編集方法、並びに植物の作製方法	発明者 遠藤亮、柳楽洋三、濱田晴康、三木隆二、吉積毅、木村光	権利者 遠藤亮、柳楽洋三、濱田晴康、三木隆二
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-031698	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 核酸を植物細胞のゲノムへ導入する方法	発明者 吉積毅、木村光宏、中村史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021 - 013616	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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