

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19202

研究課題名（和文）植物ミトコンドリアゲノム編集技術による雄性不稔細胞質の創出

研究課題名（英文）Creation of male sterile cytoplasm by 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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：植物ミトコンドリアにあるゲノムはこれまで安定した改変が不可能であったが、申請者らはゲノム編集技術mitoTALEN法を用いた世界初の安定改変に成功している。この技術を用いて標的配列切断とゲノム構造改変を通じて多様なゲノム編集植物集団を作ること、育種上重要な細胞質雄性不稔性質を付与する実験をおこなった。明確な細胞質雄性不稔個体は取れなかったが、モデル植物での効率の良い植物ミトコンドリアゲノム編集技術の確立が高い評価を受けており、国際論文掲載、学会技術賞受賞、国際共同研究の進展につながった。

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ゲノムには、植物ゲノム全体のうち1%以下しか情報をコードしていないが、生育に必須の細胞呼吸や、農業上多用されているF1育種に必要な細胞質雄性不稔の原因遺伝子などがコードされており、その人為改変は待望されてきた。申請者らはこれを安定改変/ゲノム編集する方法を世界に先駆けて成功させており、現在学術的に注目を集めている。元タイネとナタネで成功させていた方法だが、植物モデルのシロイヌナズナで、高効率に成功させる技術を開発展開させたところから、今後さらに未解明事項の多い植物ミトコンドリアやエネルギー生産/農業生産向上に直結する細胞質雄性不稔性の理解と改変応用につながる研究を加速させる。

研究成果の概要（英文）：Stable modification of genomes in plant mitochondria has been almost impossible till recently, but the applicants have succeeded in the world's first stable modification using the mitoTALEN genome editing technology. Using this technology, I have created a population of genome-edited Arabidopsis plants through targeted sequence double-strand breaks and structural modification of the genome to confer cytoplasmic male sterility, which is important for F1 breeding. Although no clear-cut cytoplasmic male sterility was obtained, the establishment of an efficient plant mitochondrial genome editing technique in model plants has been highly evaluated, leading to the publication of an international journal scientific papers, a technical award at an academic conference, and lead to start some international collaborative researches.

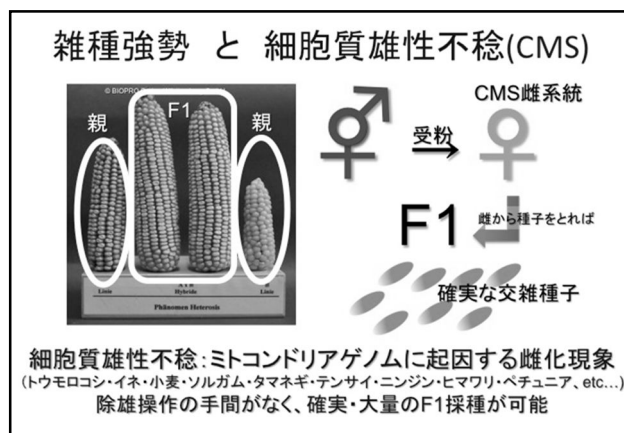
研究分野：遺伝育種科学

キーワード：ミトコンドリア 細胞質雄性不稔

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞質雄性不稔 (CMS; Cytoplasmic male sterility) とは、雌雄同株である植物が雌化する現象であり、またその原因遺伝子はミトコンドリアゲノム上にコードされている。CMS は、現在多くの農産物で利用される雑種強勢品種 (F<sub>1</sub> 品種) 作製現場において広く利用されている (右図)。CMS をもつ植物 (雌株) に実った種子は、自殖があり得ないため (除雄操作などの) 手間をかけず、商業ベースに載せられる高品質、高純度の F<sub>1</sub> 種子を大量に用意することができる。しかしながら、実用化されている CMS の原因遺伝子配列をもつミトコンドリアゲノムの種類は極めて少ないため、環境変化や病虫害に対する遺伝的な脆弱性が指摘されており、新規創出が待望されていた。



### 2. 研究の目的

これまで実用化されてきた CMS は、野生種や既に CMS 性が示されている近縁種を母親として交配 (または細胞融合) 後、連続戻し交雑による核-細胞質置換を行うことで、優良品種の核ゲノム・細胞質は CMS 型という組み合わせを作製することで達成されてきた (右図)。この従来法は、数年~10 年単位の時間がかかる上に、不必要な遺伝子が、核・葉緑体・ミトコンドリアゲノム上に残存混在するため、時間的にも遺伝学的にも改良の余地がある。本申請研究により、ミトコンドリアゲノム上に直接 CMS 原因遺伝子を生じる方法が確立できれば、優良品種の核や葉緑体ゲノムを乱すことなく、極めて短時間で CMS 系統を多数作製させる方法開発につながる。すなわち、CMS-F<sub>1</sub> 育種を大幅に効率化させるとともに遺伝的多様性・作物生産の安定性に貢献することが可能となる。

CMS はミトコンドリアゲノム上の遺伝子による性制御という基礎科学的にも興味深い現象である。また、CMS は多くの園芸作物・穀物で利用されているにも関わらず、実はどうして CMS キメラ遺伝子群の発現が雄性不稔性を引き起こすのか、そのメカニズムは未だによくわかっていない。これは、ひとえに CMS 原因遺伝子候補が存在するとされるミトコンドリアゲノムの改変技術がなかったことによる。我々は開発した mitoTALEN 法を用いて、現在、既存の CMS について逆遺伝学的な解析を行っている。一方で、本申請研究では、これとは異なるアプローチ「新たに CMS 原因遺伝子と CMS 性を創出する」ことによって、多様な CMS 系統を生み出すことで、CMS を深く比較解析し、一般原理を探求するための母本作りも目的としている。

自然の植物の中には、Gynodioecy と呼ばれる「雌雄同株と雌の個体が共存する」集団がみられ、植物の性分化過程の一形態として Charles Darwin もこの現象に注目していた。Gynodioecy の雌株の多くは CMS によるものと考えられている。ミトコンドリアゲノム上の CMS 遺伝子は宿主個体を雌化することで、自身の配列を母性遺伝により 100% 引き継がせることができるため、利己的な遺伝子でもある。140 種類もの植物で CMS 性が知られ、報告されている 20 種類ほどの CMS 関連遺伝子はお互いに相同性がないことから、進化上、割と高頻度に独立に生じた現象であると考えられる。本申請の研究目的の一つは、自然現象として見つかる CMS の創出を研究室レベルで再現し、利己的遺伝子の創出過程を追うことでもある。

### 3. 研究の方法

先述したように、本研究では TALEN 人工制限酵素をミトコンドリアへ局在させる mitoTALEN 法を用いる。ちなみに、CRISPR/CAS9 法を用いたミトコンドリアゲノム編集は、申請者らも現在開発に挑戦しているが未だ成功しておらず、他生物でも成功例がない。これは、CRISPR/CAS9 が gRNA とタンパク質という性質の異なる二分子をミトコンドリアへ同時局在させる必要があり、特に RNA のミトコンドリア輸送技術が確立されていないことが大きい。TALEN はベクター

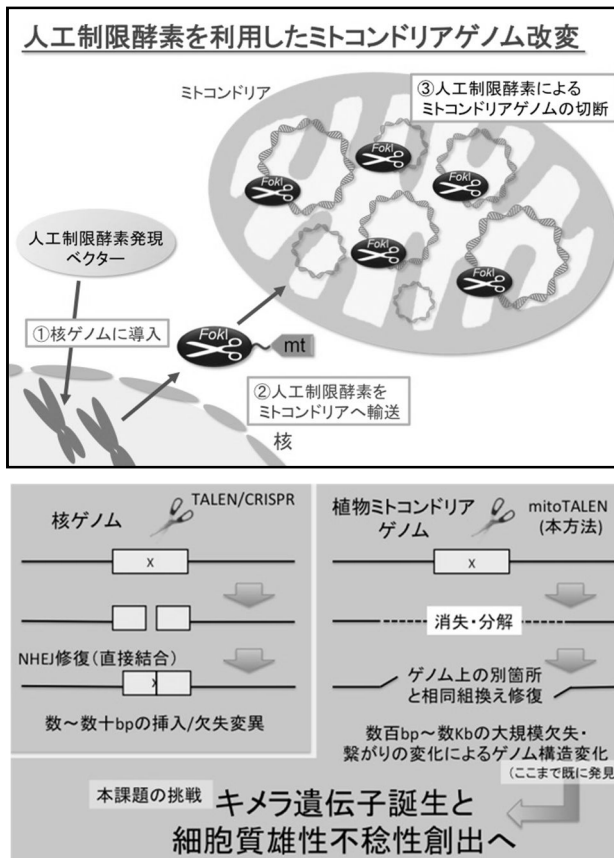
構築が困難だが、我々は既に簡便に構築する技術と方法を確立しており、本申請研究では基本的に mitoTALEN 法で研究を進める予定である。mitoTALEN 法で植物ミトコンドリアゲノム遺伝子破壊を行った結果、核で主に観察される NHEJ (Non-Homologous End Joining) 修復による配列変化 (数 bp の欠失・挿入) は見出されず、数百 bp~数 Kbp の消失が見いだされた。さらに、消失領域の周辺は相同配列を介してゲノム上の全く別の部分につながっていた。この修復により (植物生育に異常は現れていないにも関わらず) ミトコンドリアゲノム全体の構造が大きく変化し、それぞれ数カ所できメラ配列が生じた個体を複数個体得ることができている。そこで本申請では、この mitoTALEN によるゲノム改変を繰り返すことで、多様なキメラ配列創出を促し、CMS 型キメラ遺伝子創出を促し、新規細胞質雄性不稔系統を選抜し確立する。

標的遺伝子としてはシロイヌナズナの *ATP6* 遺伝子を用いる。*ATP6* は必須遺伝子であるが、columbia 系統ではゲノム中に二コピー存在し、その両者とも転写が確認されているため、キメラ遺伝子が新規形成された際に致死性の回避とともにキメラ遺伝子の転写発現が期待される。また、実際に報告されている CMS キメラ遺伝子内部に *ATP6* 断片を持つ例が複数報告されることから有望な標的候補であるといえる。

mitoTALEN 法では発現ベクターを一旦核ゲノムに導入する必要があるが、これは分離後代で除去することができる。実際に核ゲノムには mitoTALEN ベクターを持たずミトコンドリアゲノムには変異をもつ Null segregant 個体の確立にも成功している。この Null Segregant 確立はプロダクトベースの非 GMO として将来的な実用化の上で重要な性質である。

#### 4. 研究成果

私たちが開発した世界初の植物のミトコンドリアゲノム標的遺伝子破壊技術, mitoTALEN 法を用いて、ナタネとシロイヌナズナを用いて植物ミトコンドリアゲノムの攪乱と新規雄性不稔個体の創出を試みた。ナタネについては先行研究で用いた標的配列破壊 mitoTALEN 発現ベクターを用いて既に複数の形質転換植物体を得ており、そのミトコンドリアゲノム配列の変化を PCR や次世代シーケンズを用いて解析した。その結果、ミトコンドリアゲノムは標的配列部分の欠失を中心に、ゲノム構造の大きな変化がみられた。これによって、新たなキメラ遺伝子創出を期待し、一部そのような特徴をもつ配列の同定に至ったが、残念ながら新たな CMS 性を引き起こす訳ではなかった。シロイヌナズナについては、mitoTALEN 導入によるミトコンドリアゲノム改変は初めてであり、その開発に挑戦した。mitoTALEN の設計標的配列によっては、その破壊による致死性が考えられるため、標的遺伝子を二種類、標的部位を計 4 種類設計し、検討した。また、mitoTALEN の発現の場所や量が影響する可能性を考え、プロモーター配列を三種類、mitoTALEN の種類 (二分子型と一分子型) の組合せ、総 24 種類のコンストラクトを作製し、これを順次シロイヌナズナの核ゲノムに形質転換した。その結果、2 つの遺伝子のうち、1 つについては欠失型の配列を採ることに成功したため、まずはモデル植物シロイヌナズナでも初のミトコンドリアゲノム編集/標的遺伝子破壊を行うことに成功することができた。そのほか、活性の高いプロモーター種類の選抜と mitoTALEN の二分子型がよいことなどが明らかとなった。このシロイヌナズナについての成果は Plant Journal 誌に掲載され、Research Highlight に選ばれるなど高い評価を受け、国際共同研究の開始にもつながった。シロイヌナズナでの高効率ミトコンドリアゲノム編集システムを用いて、200 系統程度の新規ゲノム編集システムを作成し、これの表現型スクリーニングを続けた。現在まで明確な遺伝型郵政不稔系統はなかったが、期間内に世界をリードする植物 mitoTALEN 技術をさらに改良進展することができた。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Arimura Shin-ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of mitoTALENs-Directed Double-Strand Breaks on Plant Mitochondrial Genomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 153 ~ 153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes12020153	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 -
1. 著者名 Arimura Shin ichi, Ayabe Hiroki, Sugaya Hajime, Okuno Miki, Tamura Yoshiko, Tsuruta Yu, Watari Yuta, Yanase Shungo, Yamauchi Takaki, Itoh Takehiko, Toyoda Atsushi, Takanashi Hideki, Tsutsumi Nobuhiro	4. 巻 104
2. 論文標題 Targeted gene disruption of ATP synthases 6 1 and 6 2 in the mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana by mitoTALENs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1459 ~ 1471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15041	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 Ayabe Hiroki, Kawai Narumi, Shibamura Mitsuhiro, Fukao Yoichiro, Fujimoto Masaru, Tsutsumi Nobuhiro, Arimura Shin-ichi	4. 巻 40
2. 論文標題 FMT, a protein that affects mitochondrial distribution, interacts with translation-related proteins in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 327 ~ 337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00299-020-02634-9	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 Kubo Tomohiko, Arakawa Takumi, Kitazaki Kazuyoshi, Kazama Tomohiko, Takenaka Mizuki, Sakamoto Wataru, Ishihara Naotada, Nakamura Takahiro, Niikura Satoshi, Arimura Shin-ichi, Handa Hirokazu, Koizuka Nobuya	4. 巻 22
2. 論文標題 Recent advances and perspectives in plant mitochondrial biology for plant breeding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Research	6. 最初と最後の頁 87 ~ 94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbr.22.W05	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 -

1. 著者名 風間智彦、有村慎一	4. 巻 78
2. 論文標題 TALENを用いた植物ミトコンドリアゲノム改変	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリ	6. 最初と最後の頁 400-401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Tomohiko Kazama 1*, Miki Okuno2, Yuta Watari3, Shungo Yanase3, Chie Koizuka4, Yu Tsuruta3, Hajime Sugaya3, Atsushi Toyoda 5, Takehiko Itoh2, Nobuhiro Tsutsumi3, Kinya Toriyama1, Nobuya Koizuka 4* and Shin-ichi Arimura 3,6*	4. 巻 5
2. 論文標題 Curing cytoplasmic male sterility via TALEN- mediated mitochondrial genome editing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 722-730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-019-0459-z	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 Arimura Shin-ichi, Yanase Shungo, Tsutsumi Nobuhiro, Koizuka Nobuya	4. 巻 93
2. 論文標題 The mitochondrial genome of an asymmetrically cell-fused rapeseed, <i>Brassica napus</i> , containing a radish-derived cytoplasmic male sterility-associated gene	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 143 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.18-00005	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 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 有村慎一
2. 発表標題 植物ミトコンドリアのゲノム編集
3. 学会等名 植物生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有村慎一
2. 発表標題 mitoTALEN法による標的遺伝子破壊から垣間見えた植物ミトコンドリアゲノムの修復維持機構と特徴
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有村慎一
2. 発表標題 TARGETED DISRUPTION OF MITOCHONDRIAL GENES ASSOCIATED WITH CYTOPLASMIC MALE STERILITY IN RICE AND RAPESEED
3. 学会等名 ICPMB2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有村慎一
2. 発表標題 Trials of targeted gene disruption of the plant mitochondrial genomes by mitoTALEN.
3. 学会等名 Gordon research conference plant biotechnology（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者:96名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化	

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

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