

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21300

研究課題名（和文）普通の栽培品種の核ゲノム編集により細胞質雄性不稔系統を生み出す技術開発

研究課題名（英文）Approach toward creating a cytoplasmic male sterility line from a normal cultivar by genome-editing of nuclear genes

研究代表者

鳥山 欽哉（Toriyama, Kinya）

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：20183882

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）：一代雑種品種の育種に細胞質雄性不稔性（CMS；ミトコンドリアゲノムと核ゲノムの相性が悪く花粉が死滅する現象）が使われている。本研究では、普通の栽培イネ品種もミトコンドリアゲノムにCMSを発現できる潜在遺伝子orf288を隠し持っており、核ゲノムに制御遺伝子（Rf）を合わせ持っているために顕在化しないが、この制御遺伝子が欠損するとCMSが顕在化することを明らかにし、核ゲノム編集によりCMS系統を生み出せる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一代雑種品種は、F1が両親に比べ旺盛な生育を示す性質を利用したもので、市販されているほとんどの野菜、トウモロコシ、ソルガムなどは一代雑種品種であり、その育種に細胞質雄性不稔性（CMS；ミトコンドリアゲノムと核ゲノムの相性が悪く花粉が死滅する現象）が使われている。CMS系統は近縁野生種に栽培種を連続戻し交雑することで育種されてきた。しかし、利用できる近縁野生種が限られており、既存の品種を利用できる新システムの開発が種苗業界から求められている。本研究では標準的な普通の栽培品種から、価値の高いCMS系統を生み出す新システムを開発できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Cytoplasmic male sterility (CMS; the phenomenon of pollen death due to incompatibility between the mitochondrial and nuclear genomes) is used in the breeding of F1 hybrid varieties. In this study, we found that cultivated rice varieties also have a cryptic CMS-causing gene, orf288, in the mitochondrial genome, although it is not manifested due to a nuclear Rf gene that suppress the expression of orf288. We demonstrated that CMS is manifested, when the Rf gene has a deletion. This study demonstrated the possibility of generating CMS lines by nuclear genome editing.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：育種学 遺伝学 遺伝子 ゲノム 植物 イネ

1. 研究開始当初の背景

一代雑種品種は、F1 が両親に比べ旺盛な生育を示す性質を利用したもので、市販されているほとんどの野菜、トウモロコシ、ソルガムなどは一代雑種品種であり、その育種に細胞質雄性不稔性 (Cytoplasmic Male Sterility; CMS; ミトコンドリアゲノムと核ゲノムの相性が悪く花粉が死滅する現象) が使われている。細胞質雄性不稔性 (CMS) は、近縁野生種や遠縁亜種のミトコンドリアに存在する CMS 原因遺伝子が発現することによって引き起こされる。近縁野生種や遠縁亜種は、核内に稔性回復遺伝子を保持し、ミトコンドリアに存在する CMS 原因遺伝子の発現を抑制しているため雄性不稔性を示さない。一方、稔性回復遺伝子を持たない栽培種の核と置換すると、稔性回復遺伝子が失われるため、CMS 原因遺伝子が発現して細胞質雄性不稔性となると考えられる。

例えば、海南島野生イネに由来する WA 型 CMS 系統は、ミトコンドリアゲノムに CMS 原因遺伝子 WA352 が存在し、WA352 タンパク質が減数分裂期の葯に蓄積することで雄性不稔性を引き起こす (Luo et al 2013)。WA352 はイネ品種「日本晴」のミトコンドリアゲノムに存在する機能未知の遺伝子、*orf284*, *orf224*, *orf288* のキメラ構造をなしている。WA352 タンパク質は ORF288 相同配列がミトコンドリアの電子伝達系のシトクローム C 酸化酵素複合体のサブユニット COX11 に結合して活性酸素を発生されるため雄性不稔性となることが知られている (Tang et al. 2017)。*orf288* 遺伝子は 314 個のアミノ酸をコードしている。日本晴の葯において、*orf288* mRNA は検出できないが、酵母で ORF288 タンパク質を発現させると、WA352 タンパク質と同様に COX11 に結合することが報告されている (Tang et al. 2017)。一方、稔性回復遺伝子として *Rf4* 遺伝子がクローニングされている。*Rf4* は配列特異的 RNA 結合タンパク質である pentatricopeptide repeat (PPR) protein をコードしている (Kazama and Toriyama 2014; Tang et al. 2014)。*Rf4* が存在すると、WA352 RNA が分解され、WA 型 CMS 系統の雄性不稔性は回避される。

日本型の栽培イネ品種「台中 65 号 (T65)」を母親として、アフリカイネ *Oryza glaberrima* (WK18 系統) を連続戻し交雑すると、CMS 系統が得られることが報告されている (金岡ら 2018)。CMS 系統ではミトコンドリアは T65/核は *O. glaberrima* となっている。このことは、栽培イネ品種 T65 がミトコンドリアゲノムに CMS 原因遺伝子を隠し持っていることを示唆している。一方、稔性回復系統については、ミトコンドリアは T65/核は *O. glaberrima* だが、第 10 染色体に T65 由来の断片が 1.5 Mb 残っており、ここに CMS 遺伝子の発現を制御できる稔性回復遺伝子が少なくとも 2 個連鎖して座乗していると報告されている (金岡ら 2018)。

ミトコンドリアゲノムのドナーとしてこれまでは近縁野生種などが利用され、CMS 系統は近縁野生種に栽培種を連続戻し交雑することで育種されてきた。しかし、利用できる近縁野生種が限られており、既存の品種を利用できる新システムの開発が種苗業界から求められている。これまでの報告を総合して考察し、「普通の栽培イネ品種もミトコンドリアゲノムに細胞質雄性不稔性を発現できる潜在遺伝子を隠し持っており、核ゲノムに制御遺伝子 (=稔性回復遺伝子) を合わせ持っているために顕在化しない」という仮説を立てた。よって、台中 65 号の核ゲノムの制御遺伝子 (=稔性回復遺伝子) を破壊すれば、CMS が顕在化できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では標準的な「普通の栽培品種」から、価値の高い「CMS 系統」を生み出す新システムを、ゲノム編集を駆使して開発することを目的とした。そのために、まず、ミトコンドリアが T65/核が *O. glaberrima* の CMS 系統 (TGA)、ミトコンドリアが T65/核が *O. glaberrima* であるが、一部 T65 号由来の稔性回復遺伝子を保持する稔性回復系統 (TGR)、および、維持系統の *O. glaberrima* について詳細に解析し、CMS 原因遺伝子候補と稔性回復遺伝子候補を明らかにすることをそれぞれ第 1 と第 2 の目的とした。次に、稔性回復遺伝子候補をゲノム編集技術でノックアウトすることにより、CMS 系統を作出することを第 3 の目的とした。

3. 研究の方法

(1) T65 由来の CMS 原因遺伝子の解析

次世代シーケンサー PacBio を利用し、T65 のミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定し、ミトコンドリアゲノムに座乗する遺伝子を調査した。既知の CMS 原因遺伝子と類似した遺伝子が存在するかを調査した。次に候補遺伝子について、減数分裂期の葯における発現を調査するために、減数分裂期に相当する葉耳間長が -1 から 1 cm の時期に、葯を含む穎花を 0.1 g (約 50 個) サンプルングしてノーザンブロット解析を行った。TGA における候補遺伝子のノックアウトを行うために、ミトコンドリアのゲノム編集技術である mitoTALEN ベクターをアグロバクテリウム法で導入する実験を行った。

(2) T65 由来の稔性回復遺伝子の解析

TG-CMS の稔性回復遺伝子を同定するにあたり、まずは稔性回復遺伝子の遺伝様式を調査した。

稔性回復遺伝子をヘテロで持つ個体(F1)を自家受粉させることで得られた後代(F2)119 個体について、稔性回復遺伝子 *Rf1* に連鎖した SSR マーカー (KNJ8-indel 759; Yonemaru *et al.* 2015) を用いて分離比を調査した。また、T65 の全ゲノム配列を PacBio を用いて決定した。

稔性回復遺伝子の有無でミトコンドリア遺伝子 *orf288* RNA の量が変化したので、稔性回復遺伝子は *Rf4* と同様な *Rf*-like PPR 遺伝子であると予測した。マッピング領域に存在する PPR 遺伝子について、*Rf*-like であるかを Melock *et al.* (2016) の報告に基づいて調査した。遺伝子発現をイネ遺伝子発現データベース RiceXPro (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>) を用いて調査した。ミトコンドリア移行シグナル配列の有無を細胞内局在予測プログラム Wolf PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) , TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) , Predotar (<https://urgi.versailles.inra.fr/Tools/Predotar>) を用いて調査した。PPR モチーフの個数を PPR モチーフを予測できるプログラム TPRpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/tpred>) を用いて調査した。

(3) 稔性回復遺伝子候補のノックアウト実験

候補とした PPR 遺伝子を CRISPR-Cas9 でノックアウトするための gRNA を設計し、Cas9, gRNA 一体型バイナリーベクター pZH_OsU6gRNA_MMCas9 (Mikami *et al.* 2015) に挿入した。アグロバクテリウム法で T65 への遺伝子導入を行った。

4. 研究成果

(1) T65 由来の CMS 原因遺伝子の解析

細胞質が T65/核が *O. glaberrima* の CMS 系統 (TGA) で観察された花粉の形態は、既知のイネ CMS では WA 型 CMS に類似していた (図 1)。そのため CMS 原因遺伝子も類似していると考えた。WA 型 CMS 系統は、ミトコンドリアゲノムには CMS 原因遺伝子 WA352 が存在し、WA352 タンパク質が減数分裂期の薬に蓄積することで雄性不稔性を引き起こす (Luo *et al.* 2013)。WA352 はイネ品種「日本晴」のミトコンドリアゲノムに存在する機能未知の遺伝子、*orf284*, *orf224*, *orf288* のキメラ構造をなしている。

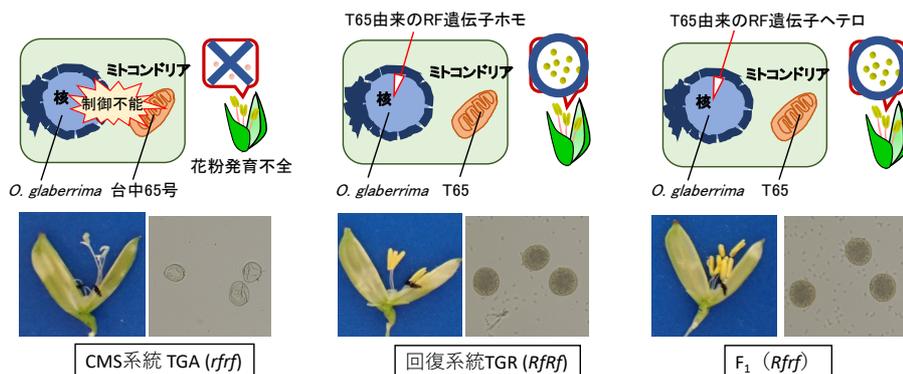


図1 台中65号(T65)のミトコンドリアを持つ *O. glaberrima* の CMS 系統と回復系統 模式図、および、薬と花粉の形態

T65 のミトコンドリアに上記の遺伝子があるかを調査するために、T65 のミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定して DDBJ に登録した (登録番号: LC697740; Ichida *et al.* 2023; 図 2)。T65 のミトコンドリアゲノムは 465,453 bp の直鎖状にアセンブリーされた。座乗している遺伝子は日本晴と同じであり、*orf284*, *orf224*, *orf288* の 3 遺伝子も別々の形で存在しており、塩基配列も日本晴と完全に一致した。

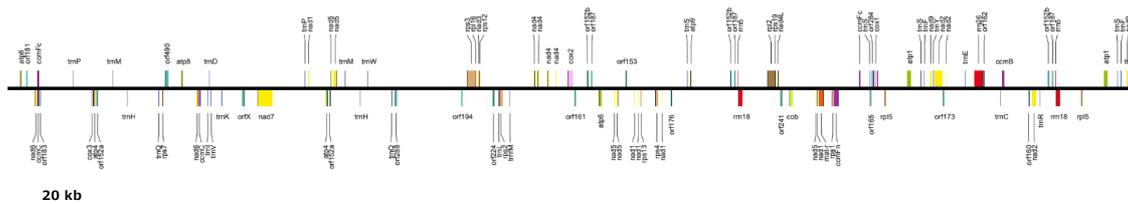


図2 T65のミトコンドリアゲノムの遺伝子

減数分裂期薬を含む穎花をサンプリングしてノーザンブロット解析を行った (図 3)。*orf284*, *orf224* については、TGA と TGC の間でシグナルの差異がなかった。一方、*orf288* について、TGA でもシグナルが検出されたことから、TGA においても *orf288* が発現していることが示された。また TGC では発現は見られず、*orf288* の mRNA の蓄積パターンが RF の有無で異なっていること

が明らかになった。これにより *orf288* が TGA の CMS 原因遺伝子である可能性が考えられた。

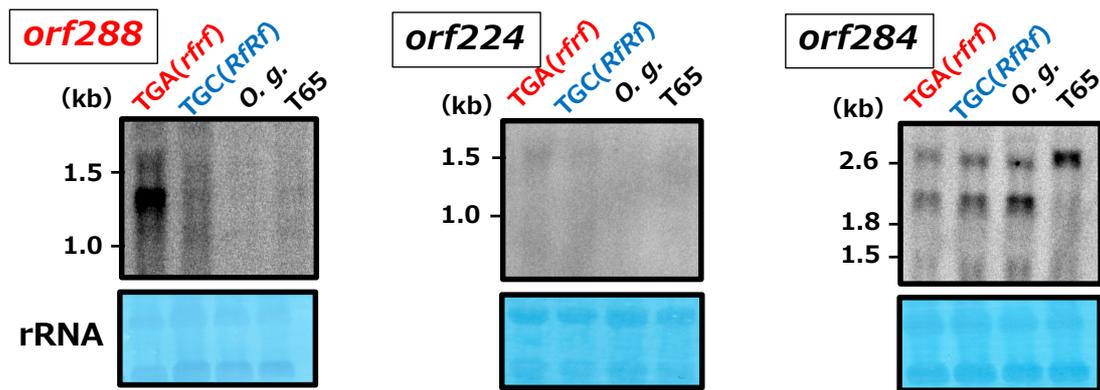


図3 減数分裂期の葯を含む穎花カラ抽出したRNAを用いたノーザンブロット解析
O.g. は *O. glaberrima*

<CMS 原因遺伝子候補ノックアウトの試み>

TGA の原因遺伝子が *orf288* であることを確かめるため、*orf288* をターゲットとした mitoTALEN TAL17 の一種 TAL17 (DDBJ accession no. LC662754; Takatsuka et al 2022) を TGA に遺伝子導入する実験を行った。TGA の *orf288* をノックアウトし、その個体の稔性が回復していれば、*orf288* が CMS 原因遺伝子を証明できる。 *O. glaberrima* の形質転換法は確立されていないため、未熟胚からカルスを誘導するなど複数の方法により形質転換を試みた。TGA から誘導したカルス約 500 個を用いて形質転換を試みたが、再分化個体は得られなかった。共存培養を終え抗生物質入り培地に移すと、数日で著しいカルスの褐変が見られた。この結果より、従来のジャポニカイネ同様の方法によるアグロバクテリウム法は、 *O. glaberrima* には適用できないことが明らかになった。

そのため令和 4 年度からは、台中 65 号にミトコンドリアゲノム編集ツール mitoTALEN を導入して *orf288* をノックアウトした個体を作成し、 *O. glaberrima* を連続戻し交雑することで、*orf288* の作用を特定することとした。BC1 世代でも雑種不稔が見られるため、まだ *orf288* が花粉発育に与える影響を評価できていないが、今後数回戻し交雑した後代を得てから稔性を調査し、稔性回復する個体が出現したら *orf288* が CMS 原因遺伝子であることを証明できる予定である。

(2) T65 由来の稔性回復遺伝子の解析

稔性回復遺伝子をヘテロで持つ個体 (F₁) を自家受粉させることで得られた後代 (F₂) 119 個体の分離を観察すると、T65 型が 30 個体、ヘテロ型が 60 個体、WK18 型が 29 個体となり、カイ 2 乗検定の結果より $RfRf : Rfrf : rfrf = 1 : 2 : 1$ の分離比と有意差がないことが明らかとなった。これは孢子体型で機能する稔性回復遺伝子で見られる典型的な分離比であったため、TG-CMS の稔性回復遺伝子は孢子体型で機能するということが明らかになった。これは、同じ花粉の表現型を示す WA-CMS の稔性回復様式とも同じであった。

日本晴のマッピング領域に存在する 12 個の PPR 遺伝子の配列は、PacBio 解析で構築された T65 ゲノムのコンティグにも同様に存在していた。塩基配列も Os10g0495200 の 1 塩基を除いて完全一致していた。この 1 塩基についてもアミノ酸配列の変化を伴わない同義置換であったため、12 遺伝子が T65 でも候補になりうると考えて調査を進行した。Rf-like であること、葯での発現していること、ミトコンドリア局在が予測されること、PPR モチーフを 10 個以上 (ミトコンドリアゲノムサイズから推定した認識特異性を示すために最低必要な PPR モチーフ数) 持つと考えられる遺伝子は 4 個存在した。このうちの 1 つは、既報の BT-CMS の稔性回復遺伝子 *Rf1b* にアミノ酸置換が生じた非機能型遺伝子であった。さらに、BT-CMS の原因遺伝子は *orf79* であり、TG-CMS の原因遺伝子候補である *orf288* や WA-CMS の原因遺伝子である *WA352* とは配列が大きく異なる遺伝子である。稔性回復機構も大きく異なるため、この遺伝子が TG-CMS の稔性回復遺伝子であるとは考えにくく、この遺伝子も候補から除くこととした。その結果 3 遺伝子を有力候補として考えた。

(3) 稔性回復遺伝子候補のノックアウト実験

CRISPR/Cas9 における gRNA 構築サイトである CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) および RAP-DB の BLAST 検索を用いて、遺伝子内の他の領域を破壊しない (オフターゲット効果のない) ターゲット配列を選定した。また、3 個の候補遺伝子を同時に破壊できるようなターゲット配列を決定した。それぞれ単独で、あるいは複数同時にノックアウトできるように連結した gRNA 発現カセットを pZH_OsU6gRNA_MMCas9 に導入し、バイナリーベクターを完成させた。アグロバクテリウム法で T65 のカルスに遺伝子導入を開始した。現在、再分化植物が得られ始めてい

る。次世代において、ノックアウト変異がホモ型となり T-DNA が抜け落ちたヌルセグリガントの稔性を調査し、雄性不稔性を示せば、稔性回復遺伝子をゲノム編集技術でノックアウトすることにより CMS 系統を作出できることを実証できるが、研究期間終了までに実証には至らなかった。

<引用文献>

- Ichida et al (2023) The mitochondrial and plastid genomes of *Oryza sativa* L. cv. Taichung 65. *Plant Biotechnol* 40:109-112
- 金岡ら(2018) アジアイネとアフリカイネの交雑後代で見出された細胞質雄性不稔性とその稔性回復に関わる新規相互作用の遺伝解析 *育種学研究*20(別1): 121
- Kazama and Toriyama (2014) A fertility restorer gene, Rf4, widely used for hybrid rice breeding encodes a pentatricopeptide repeat protein. *Rice* 7:28
- Luo et al (2013) A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. *Nat Genet* 45: 573-577
- Melonek et al (2016) Evolutionary plasticity of restorer-of-fertility-like proteins in rice. *Sci Rep* 6: 35152
- Mikami et al(2015) Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol Biol* 88: 561-572
- Takatsuka et al (2022) TALEN-mediated depletion of the mitochondrial gene *orf312* proves that it is a Tadukan-type cytoplasmic male sterility-causative gene in rice. *Plant J* 110: 994-1004
- Tang et al (2014) The rice restorer *Rf4* for wild-abortive cytoplasmic male sterility encodes a mitochondrial-localized PPR protein that functions in reduction of WA352 transcripts. *Mol Plant* 7: 1497-1500
- Tang et al (2017) Multi-step formation, evolution, and functionalization of new cytoplasmic male sterility genes in the plant mitochondrial genomes. *Exp Cell Res* 27: 130-146
- Yonemaru et al (2015) Genome-wide indel markers shared by diverse Asian rice cultivars compared to Japanese rice cultivar 'Koshihikari'. *Breed Sci* 65, 249-56

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toriyama Kinya	4. 巻 38
2. 論文標題 Molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 285 ~ 295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.0607a	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 Takatsuka Ayumu, Kazama Tomohiko, Arimura Shin-ichi, Toriyama Kinya	4. 巻 110
2. 論文標題 TALEN mediated depletion of the mitochondrial gene orf312 proves that it is a Tadukan type cytoplasmic male sterility causative gene in rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 994 ~ 1004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15715	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 Ichida Hiroyuki, Kazama Tomohiko, Arimura Shin-ichi, Toriyama Kinya	4. 巻 40
2. 論文標題 The mitochondrial and plastid genomes of <i>Oryza sativa</i> L. cv. Taichung 65	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.22.1213a	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8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥山欽哉
2. 発表標題 私もできる植物ゲノム編集 CRISPR-Cas9 と TALEN を用いた遺伝子破壊の研究例
3. 学会等名 園芸学会東北支部令和3年度大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥山欽哉
2. 発表標題 イネの細胞質雄性不稔性と稔性回復の分子基盤
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 風間智彦・肥塚信也・鳥山欽哉・堤伸浩・有村慎一
2. 発表標題 植物ミトコンドリアゲノム編集技術の開発と細胞質雄性不稔原因遺伝子の同定
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田信哉，市田裕之，阿部知子，有村慎一，風間智彦，陳孫祿，金岡義高，貴島祐治，鳥山欽哉
2. 発表標題 台中65号の細胞質を持つ <i>Oryza glaberrima</i> のCMS関連遺伝子の解析
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田信哉，風間智彦，鳥山欽哉
2. 発表標題 台中65号の細胞質を持つ <i>Oryza glaberrima</i> のCMS原因遺伝子はorf288か
3. 学会等名 2021年度国立遺伝学研究所・イネ属近縁野生種研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田信哉, 市田裕之, 阿部知子, 有村慎一, 風間智彦, 陳孫祿, 金岡義高, 貴島祐治, 鳥山欽哉
2. 発表標題 台中65号の細胞質およびアフリカイネの核を持つTG-CMSの原因遺伝子解析とその稔性回復様式の調査
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会(堺)大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田信哉, 市田裕之, 阿部知子, 有村慎一, 風間智彦, 陳孫祿, 金岡義高, 貴島祐治, 鳥山欽哉
2. 発表標題 細胞質雄性不稔性Oryza glaberrimaの解析から明らかとなった日本型イネのミトコンドリアに存在するorf288遺伝子の発現制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田信哉, 五十嵐圭介, 岩井裕子, 鳥山欽哉
2. 発表標題 細胞質を日本晴に置換したOryza glaberrimaにおけるミトコンドリア遺伝子orf288の発現解析
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊藤幸博、鳥山欽哉	4. 発行年 2021年
2. 出版社 東北大学出版会	5. 総ページ数 142
3. 書名 植物バイオテクノロジーの基礎知識	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞質雄性不稔系統と維持系統の作出方法	発明者 鳥山欽哉・五十嵐圭介・岩井裕子・武田信哉・高塚歩・風間	権利者 東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-036941	出願年 2023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
---------	---------