

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658002

研究課題名（和文）ミトコンドリア宅配型アグロバクテリウムの開発とミトコンドリア形質転換系の確立

研究課題名（英文）An approach toward establishing *Agrobacterium*-mediated transformation system of mitochondria

研究代表者

鳥山 欽哉 (TORIYAMA KINYA)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20183882

研究成果の概要（和文）：

植物のミトコンドリアの形質転換系を確立するために、ミトコンドリアに外来遺伝子を宅配できるようにアグロバクテリウム菌の改変を目指した。アグロバクテリウム菌は、核移行シグナルを持つ VirD2 と VirE2 が T-DNA に結合し、T-DNA を核に移行させる。本研究では、T-DNA をミトコンドリアに輸送させるために、この VirD2 から核移行シグナルを除去し、代わりにミトコンドリア移行シグナル配列を付加した改変アグロバクテリウム菌を作成した。

研究成果の概要（英文）：

To establish transformation system of plant mitochondria, we aimed to produce genetically modified *Agrobacterium* so that it delivered T-DNA into mitochondria. To deliver T-DNA into mitochondria, we removed the nuclear localization signal sequence from VirD2, which usually played a role to deliver T-DNA into nucleus, and added a mitochondrial targeting signal sequence. Finally we produced *Agrobacterium* carrying modified *VirD2* with mitochondrial targeting signal sequence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：育種学・遺伝学・遺伝子・バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

タバコなどの植物では、葉緑体の形質転換が可能であり、緑葉細胞にパーティクルガンを用いて外来遺伝子を導入する系が確立されている。葉緑体ゲノムには相同組換えで外来遺伝子が導入されるため、導入したい遺伝子の両端には葉緑体のゲノムを配置した形質転換用ベクターを構築する。選抜マーカーとして、スペクチノマイシン（70S リボソ-

ム翻訳阻害の作用がある）に耐性を付与する *aadA* (aminoglycoside-adenyltransferase) 遺伝子が用いられる。一方、ミトコンドリアの形質転換系は報告されていない。葉緑体の形質転換で用いられる直径 1  $\mu\text{m}$  の金粒子ではミトコンドリアに対して大きすぎ、またこれ以下ではパーティクルガンでの導入は不可と言われている。

私たちは、イネ細胞質雄性不稔性に見られ

る核とミトコンドリアのゲノム障壁に関する研究を行ってきた。雄性不稔の原因候補のミトコンドリア遺伝子を同定したが、これを証明するためには、ミトコンドリア形質転換系の確立が必要となった。

そこで、アグロバクテリウムを用いて、T-DNA をミトコンドリアに移行させるアイデアを思いついた。通常、植物に移入される1本鎖 T-DNA の 5' 末端と周りにはそれぞれ VirD2 と VirE2 タンパク質が結合し T-complex と呼ばれる複合体を形成している。VirD2 および VirE2 タンパク質は核移行シグナルを持ち、その働きにより受容体と結合して複合体が核に移行し、最終的に T-DNA が染色体に組み込まれる。この VirD2 タンパク質にミトコンドリア移行シグナルを連結すれば、タンパク質と T-DNA の複合体がミトコンドリアに移送され、T-DNA がミトコンドリアゲノムに組み込まれると期待される。このように改変した VirD2 を組換えたアグロバクテリウム菌を作出してミトコンドリア相同組換え用の T-DNA を導入することを着想した。

## 2. 研究の目的

アグロバクテリウムの T-DNA が植物細胞の核に輸送される時は、T-DNA に VirD2 と VirE2 が結合して T-complex を形成する。この VirD2 にミトコンドリア移行シグナル配列を付加した改変アグロバクテリウムを作成し、T-DNA をミトコンドリアに輸送（宅配）させることを目指す。ミトコンドリアで発現誘導するプロモーターに GFP を連結し、ミトコンドリアゲノム配列で挟み込んだ T-DNA を構築し、相同組換えを利用したミトコンドリアの形質転換系の確立を目指すことを目的とする（図1）。

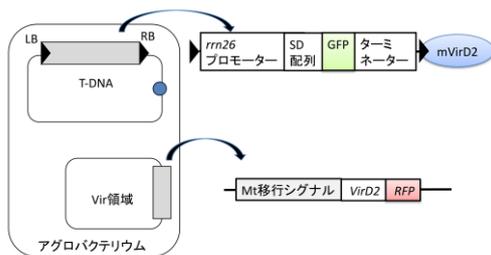


図1 本研究で目指した研究の模式図  
Mt移行シグナルを付加したmVirD2の働きでT-complexをミトコンドリアに輸送させる

## 3. 研究の方法

(1)ミトコンドリア宅配型アグロバクテリウムの作成：

ミトコンドリア移行シグナル(シロイヌナズナ gamma subunit of mitochondrial F1-ATPase) + 核移行シグナルを除去した VirD2 + RFP を連結した合成 DNA を作成し、*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 に導入した。相同組換えにより VirD2 の N 末端にミト

コンドリア移行シグナル、C 末端に RFP が連結されたアグロバクテリウムを PCR 解析により選抜した（図1）。

(2) ミトコンドリア発現用ベクターの構築：  
ミトコンドリア 26S ribosomal RNA 遺伝子 (*rrn26*) のプロモーターに GFP および、ターミナーを連結したミトコンドリア発現用ベクターを作成した（図1）。

## 4. 研究成果

(1)ミトコンドリア宅配型アグロバクテリウムの作成：

相同組換えにより、VirD2 の N 末端にミトコンドリア移行シグナル、C 末端に RFP が連結された改変アグロバクテリウムを作成した。得られたアグロバクテリウムには、非同組換えにより導入遺伝子が少なくとももう1コピー存在すると考えられた。

(2) ミトコンドリア発現用ベクターの構築：  
イネミトコンドリア 26S ribosomal RNA 遺伝子 (*rrn26*) のプロモーター (400bp) + SD 配列を付加した GFP + *nad6* 3' (200bp) を連結した合成 DNA を作成した。この遺伝子はミトコンドリアに導入された場合に発現し、核に導入された場合には発現しないと考えられる。

(3)今後の展望

今後は、(1)で作成した改変アグロバクテリウムを用いて、(2)で作成したミトコンドリア発現用ベクターをタバコの葉あるいはイネのカルスなどに感染させ、トランジェントな GFP 発現を蛍光顕微鏡を用いて観察する実験が必要である。ミトコンドリアで GFP の発現が観察できれば本研究の目標が達成されたことになるかと期待される。この研究の成功の暁には、ミトコンドリアで機能する選抜マーカー遺伝子を開発し、次世代に安定して遺伝するミトコンドリア形質転換体作成法の開発につなげたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

(1) Toda T, Toriyama K (2013)

Re-sequencing of mitochondrial genes in a standard rice cultivar Nipponbare.

RICE 6 (2): 1-3

doi:10.1186/1939-8433-6-2

(査読有り)

[学会発表] (計6件)

(1) Toriyama K, Kazama T

Genome barriers between mitochondria and

nuclei exemplified by cytoplasmic male sterility/fertility restoration in rice.  
10th International Congress on Plant Molecular Biology,  
2012年10月21 - 26日,  
Jeju, Korea  
(招待)

(2) 鳥山欽哉  
イネにおけるミトコンドリア遺伝性の花粉発育不全とそれをレスキューする核遺伝子  
日本遺伝学会第84回大会  
2012年9月24日から26日  
福岡市 九州大学医学部  
(招待)

(3) 鳥山欽哉・風間智彦  
コメ産業の国際化を狙った新規ハイブリッドライス育種基盤の開発、  
日本育種学会2012年秋季大会、  
2012年9月14日から15日、  
京都市 京都産業大学  
(招待)

(4) Toriyama K, Kazama T  
Fertility restoration in three types of cytoplasmic male sterility in rice.  
XXII International Congress on Sexual Plant Reproduction (Plant Reproduction for Food),  
2012年2月13-17日,  
Melbourne, Australia  
(招待)

(5) Toriyama K  
New resources for hybrid rice breeding.  
XVIII International Botanical Congress,  
2011年7月24-30日,  
Melbourne, Australia  
(招待)

(6) Toriyama K, Kazama T  
Molecular analysis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice.  
1st Congress of Cereal Biotechnology and Breeding.  
2011年5月24-27日,  
Szeged, Hungary  
(キーノートスピーカー)

[その他]  
○アウトリーチ活動 (8件)

(1) 伊藤幸博  
東北・北海道地区SSH指定校発表会 指導助言講師 (宮城県仙台第三高等学校)

2013年1月26日～27日

(2) 伊藤幸博  
植物の多様な生存戦略～東北に植物のチカラを～  
日本植物生理学会高校生シンポジウム組織委員副委員長 (東北大学)  
2012年8月6日

(3) 鳥山欽哉  
エンジョイ DNA～よくわかる遺伝子組換え植物～  
市民講座 東北大学サイエンスカフェ第82回 (仙台メディアテーク)  
2012年7月27日

(4) 伊藤幸博  
DNAと遺伝子組換え植物  
次世代型科学者の卵養成講座 (東北大学)  
2012年7月14日

(5) 鳥山欽哉  
エンジョイ DNA～遺伝子組換え植物と植物の環境適応  
福島県立磐城高等学校模擬講義 (東北大学)  
2012年4月20日

(6) 伊藤幸博  
エンジョイ DNA～遺伝子組換え植物と植物の環境適応  
福島県立磐城高等学校模擬講義 (東北大学)  
2012年4月20日

(7) 伊藤幸博  
DNAと遺伝子組換え植物  
第11回東北大学出前授業 (仙台市立東二番丁小学校)  
2011年11月22日

(8) 鳥山欽哉  
エンジョイ DNA～遺伝子組換え植物と植物の環境適応  
第4回科学者の卵養成講座 (東北大学)  
2011年9月3日

○新聞報道 (1件)

(1) 鳥山欽哉  
東北大学サイエンスカフェから 細菌を利用して植物を改良  
河北新報  
2012年8月8日

○ホームページ等 (2件)

(1) 伊藤幸博・鳥山欽哉

インターネット上での研究成果の継続的な発信「環境適応生物工学研究室 お知らせと更新情報」

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bioadp/PukiWiki/index.php?FrontPage>

(2) 鳥山欽哉

エンジョイ DNA～よくわかる遺伝子組み換え植物～,

東北大学サイエンスカフェ動画チャンネル

<http://www.youtube.com/watch?v=u6gU81x0VAQ&feature=youtu.be>

公開日 2012年10月4日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥山 欽哉 (TORIYAMA KINYA)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20183882

(2) 連携研究者

伊藤 幸博 (ITO YUKIHIRO)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：70280576

風間 智彦 (KAZAMA TOMOHIKO)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30431464