

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601
研究種目：基盤研究(A)
研究期間：2012～2014
課題番号：24248001
研究課題名(和文)人工制限酵素を用いたミトコンドリアゲノムの改変

研究課題名(英文) Mitochondrial genome editing by TALEN

研究代表者

堤 伸浩 (TSUTSUMI, NOBUHIRO)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：00202185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物のミトコンドリアゲノムは、雑種強勢を用いたハイブリッドF1品種育成に多用される細胞質雄性不稔の原因等、重要形質遺伝子を含んでいる。しかしながら、現在もこのゲノムの改変は不可能な技術である。本研究は、人工制限酵素を用いて、これにミトコンドリア局在化シグナルを付加することで、ミトコンドリアゲノム上任意配列の破壊改変を試みた。複数のターゲット配列それぞれに対応する二つ一組のTALENについて植物で同時に発現させるための複雑なベクターを効率的・迅速に構築するシステムを完成させ、TALEN導入シロイヌナズナを多数系統作出・解析することで、ミトコンドリアゲノム改変の為の有効な方法の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Although plant mitochondria genome encodes scientifically and/or agriculturally important genes, the detailed analyses are quite limited because the transformation technique of plant mitochondrial genome is still unavailable. This project tried to change the sequence of the targeted genes of Arabidopsis mitochondrial genome by using TALEN, an artificial restriction enzyme. Because each gene-targeting needs a pair of TALEN proteins with mitochondrial localizing signals, many kinds of simultaneously dual expression vectors were made. This laborious step was drastically improved by our developing method with multisite gateway system. T1 plants introduced with these TALEN expression vectors were made and some of their mitochondrial target genes were checked, but at this time point, mutation has not yet been detected.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：TALEN ミトコンドリアゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

植物ミトコンドリアは生育に必須の細胞内小器官であり、細胞呼吸によるエネルギー生産をはじめ、アミノ酸・核酸・脂質の代謝、光呼吸等を通して植物の生活環の全ステージにおいて重要な貢献をしている。研究開始当初、10種を超える植物種のミトコンドリアゲノムが公開されているが、このゲノム上には呼吸系に必須と思われる遺伝子群とそれらの遺伝子発現のための遺伝子がコードされている。しかし、これらのアノテーションはいずれも細菌遺伝子との相同性検索などから予測されたものに過ぎない。また機能未知の植物種固有のORFも多数存在しており、植物を材料としてきちんとその機能解析がされたミトコンドリアゲノム遺伝子配列はほとんどない。このような基礎的な知見が不足している背景には、その形質転換技術などの基盤技術が欠如していることが大きい。またミトコンドリアゲノムの改変による作物育種のポテンシャルの大きさを考えると、この技術開発は早急に進めなければならない。

他方で葉緑体ゲノムに関しては、1990年からタバコにおいてパーティクルガン法を用いて外来遺伝子の導入・ジーンターゲットングが成功しており、葉緑体ゲノム上の遺伝子の機能解析を始め、ゲノム維持機構や伝達機構の解明や、葉緑体ゲノムから核ゲノムへの遺伝子転移の機構解析などの基盤研究が飛躍的に進んだ。その結果、光合成機能の増強や物質生産などへの応用が期待されている。また、オルガネラゲノムは母性遺伝することから遺伝子組換え配列の花粉飛散による環境への拡散リスクが小さいなどのメリットもあり、重要な形質改変ターゲットとして研究が進展している。

葉緑体では可能であるのに、植物ミトコンドリアでは形質転換ができない。その理由は、①ミトコンドリアの物理的な小ささ（パーティクルガン法に用いる金粒子とほぼ同じ大きさ）、②適切な選抜マーカーの欠如、③細胞あたりのコピー数の多さ（細胞あたり数百コピー）、という三つが主に考えられる。このうち、①については申請者等の過去の研究から、ミトコンドリア分裂突然変異体や原因遺伝子の形質転換体（核ゲノム）を用いることで巨大ミトコンドリアを持つ植物の作製に成功した。しかし、これらの細胞を標的としても、ミトコンドリアゲノムの形質転換には至っていない。

本研究では、②と③を同時に解決するための方法として、まず、核ゲノムにミトコンドリア局在シグナルを付加した人工制限酵素遺伝子を導入することで、ミトコンドリアゲノム上の標的とする遺伝子を破壊した株を作製する。これはミトコンドリアゲノムへの直接的な外来遺伝子の導入ではないが、ミトコンドリアゲノム上の遺伝子に変異を持つ突然変異体を母本として、正常配列を持つ

DNAをパーティクルボンバードメント法によって相補することができれば、正常配列がポジティブセレクションマーカーとなると考えられる。この人工制限酵素を用いた方法によるミトコンドリアゲノムの破壊が成功すれば、ミトコンドリアゲノム上の遺伝子を逆遺伝学的に解析することが可能となり、ミトコンドリアゲノム機能解析の基礎を構築する上で意義深い。

2. 研究の目的

ミトコンドリアは植物生育に必須の細胞小器官であり、呼吸によるATP生産をはじめ、アミノ酸・核酸・脂質の代謝、光呼吸等、植物の生活環の全ステージを通して重要な機能を担っている。また多くの作物のF1品種の種子親に利用されている細胞質雄性不稔性は、ミトコンドリアゲノム上の変異が原因となっていることが知られている。このように、植物ミトコンドリアゲノムは育種の潜在的な重要ターゲットであるにも関わらず、人為的に改変することが不可能であるとされてきた。本研究では、近年発展著しい任意の塩基配列を認識して切断する人工制限酵素にミトコンドリア局在シグナルを付加したものを核ゲノムに形質転換することで、その植物のミトコンドリアゲノム上の任意の配列を切断し、ミトコンドリアゲノムに変異を持つ植物を作製することを第一の目的とする。また、この技術を利用して、ミトコンドリアゲノム上に存在する多数の未知遺伝子の逆遺伝学的な機能解析、ミトコンドリアのゲノム配列多型マーカーによる個体内と世代間のミトコンドリア遺伝情報の維持機構の解析をおこなう。

3. 研究の方法

本申請研究では、近年実用レベルになってきた任意の塩基配列を認識し切断が可能な人工制限酵素であるTALENを用いて、ミトコンドリアゲノム上の標的配列を切断破壊し、その植物体の解析を行う。人工制限酵素にはエストロゲン誘導型ベクターを用い、またミトコンドリア局在化シグナルと核外排出シグナルをつけ、これを核ゲノムに形質転換する。ミトコンドリアゲノムは一つの細胞内に数百コピー存在するため、通常は全てのDNAの完全破壊が難しいと思われるが、この方法では、制限酵素が正常配列を持つミトコンドリアゲノムを切り続けるため、最終的には正常配列がなくなり、変異の入ったコピーだけが存在する状態になる可能性が高い。ターゲット配列としては、呼吸阻害薬剤アンチマイシンAのターゲットである呼吸電子伝達経路のタンパク質apocytochrome bの遺伝子配列を用いる。また、ミトコンドリア上の呼吸鎖

関連遺伝子は、破壊することで致死になる可能性が高いと考えられるが、高等植物では、呼吸鎖電子伝達経路に複数のバイパス経路が知られており、バイパスを持つ酵素複合体であれば、破壊による致死性が回避されると考えられる。具体的には、Complex I である NADH dehydrogenase、Complex IV の COX2 の二つは、それぞれ NDex (or NDin) , AOX と呼ばれるバイパス経路が存在しているため、これらもミトコンドリアゲノム上の破壊ターゲット遺伝子とする。

任意塩基配列を切断する人工制限酵素は、2010 年に開発された transcription activator-like effector nucleases (TALEN) を用いる。これは ZFN と同様ではあるが、アミノ酸配列に変異を入れることで設計した認識配列に結合可能な DNA 結合ドメインに FokI 切断ドメインを結合したものである。TALEN は 1 塩基ごとに結合可能なドメイン設計ができるため、本来の意味で任意の配列を認識可能な人工制限酵素といえる。実験開始当初ではすでにゼブラフィッシュで TALEN を利用して核ゲノムの標的遺伝子破壊が成功していた (Sander ら, Nat. Biotech., 2011)。

ミトコンドリアゲノムは 1 個の細胞内に多数のコピーがある。したがって、標的遺伝子の全コピーを同時に人為的に改変することは困難であると考えられてきた。ところが、本課題で提案する人工制限酵素を利用する方法では、核に導入した遺伝子が発現する限り、常に標的遺伝子を切断し続けるので、コピー数の多いミトコンドリア遺伝子の改変に有効である。

4. 研究成果

シロイヌナズナ、イネにおけるミトコンドリアゲノム上の遺伝子破壊ターゲットについて、それぞれ複数の人工制限酵素を作製し、植物用形質転換ベクターを作製した。これらについては既に植物核ゲノムに導入した形質転換植物が T2 ラインまで進んだ種子が得られており、今後ミトコンドリアゲノム上に変異が導入されているか否か引き続き検討する予定である。また、ここまでで作った二つ一組の人工制限酵素 ORF が同時に発現しミトコンドリアへ局在する植物形質転換ベクターについて、その機能（遺伝子の同時発現とミトコンドリアへの局在）を確認検証した。上記ベクターの ORF の部分に GFP や RFP の遺伝子配列を導入した同様のベクターを作製し、パーティクルガン法を用いて植物緑葉へ形質転換導入し、その遺伝子発現と局在を蛍光顕微鏡観察によって検証を行った。その結果、これらのベクターでは、二つの ORF は、（遺伝子発現したものについてはきちんとミトコンドリアへ局在していることは確認できたが、）二つの遺伝子が同時に発現しない場合があることや、発現量に大きな差があ

る場合があることが確認された。そのため、植物形質転換用のベクターを改変し、別の種類の薬剤誘導型プロモーターや恒常的な発現用のプロモーターの使用や、発現量を増やしサイレンシングを抑制するようなターミネーター配列を導入したベクターを作り直した。これらの改変ベクターでは、二つ一組の人工制限酵素が同時に恒常的に強く発現し、またミトコンドリアへ局在することが確認された。また、新たなベクターに関してリクローニングを行い、出来たものからシロイヌナズナへ形質転換を行っている。

当初予定通り、ミトコンドリアゲノム上の複数の遺伝子破壊ターゲットに対応するそれぞれ複数の人工制限酵素配列について、植物内で誘導発現もしくは恒常的に発現するベクターが作製済み、またこれらを用いた核ゲノム形質転換植物も順調に作出出来つつある。上述したとおり、これらの中には二つの人工制限酵素ペアのうち片方の発現が著しく弱かったり発現しなかったりしたものもあったが、そのベクターについて、プロモーター配列やターミネーター配列の改変によって、大幅に発現を改良することができた。これら改変型のベクターを用いて順次人工制限酵素ペアの植物発現プラスミド作りをすすめている。さらに、このように複雑困難なベクター作製方法についても改良を行い、簡便に効率よく作成することが出来る Multisite Gateway System を利用したベクター構築システムを開発した。

ここまでの過程で作製してきた人工制限酵素ベクターについて、これを導入した形質転換植物を多数作成し、実際にミトコンドリアゲノムの改変が起こっているかどうかを検証した。基本的にはミトコンドリアゲノム上の遺伝子をターゲットとしているが、表現型（生育虚弱性）はあまり現れないような破壊対象を選んでいる。そのため、各形質転換植物の後代複数の植物体それぞれについて Cel-1 assay を中心に、また一部はシークエンス解析によって遺伝子型を確認した。一つずつの植物について DNA 解析を行うのでは時間と資金がかかりすぎる為、5 個体ずつ等にまとめて DNA 抽出と検定を行って、該当するミトコンドリアゲノム破壊株を選抜した。

現在までのところ、主に T1 植物による解析では、ミトコンドリアゲノム上の望んだ位置に突然変異は検出されていない。しかしながら、制限酵素の発現は後代も進むため、T2 以降の解析によって、後述するように変異が検出される可能性は残されている。

ミトコンドリアゲノムは、細胞あたり数百コピーあるといわれている超多倍数体状態となっている。このため、この中のいくつかのコピーが破壊されただけでは変異が固定されず、遺伝子破壊の初期はヘテロプラスミーと呼ばれる正常型と異常型のゲノムが混在した形で植物が存在すると思われる。人工制限酵素はかなり多く発現するようにベク

ターを改良してきており、またその活性がある限り対象遺伝子が切断され続けるため、異常型遺伝子が結果として優勢になると考えている。また、形質転換当代を用いるのでは無く、後代を用いることで、ある程度分離が起こり、異常型としてホモプラスミー化された個体を得ることが可能であると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- 1) Arabidopsis dynamin-related proteins, DRP2A and DRP2B, function coordinately in post-Golgi trafficking. Huang J, Fujimoto M, Fujiwara M, Fukao Y, Arimura S, Tsutsumi N. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jan 2;456(1):238-44. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.065. Epub 2014 Nov 22.
- 2) Dynamin-related proteins in plant post-Golgi traffic. Fujimoto M, Tsutsumi N. *Front Plant Sci.* 2014 Sep 4;5:408. doi: 10.3389/fpls.2014.00408. eCollection 2014. Review.
- 3) RCN1/OsABCG5, an ATP-binding cassette (ABC) transporter, is required for hypodermal suberization of roots in rice (*Oryza sativa*). Shiono K, Ando M, Nishiuchi S, Takahashi H, Watanabe K, Nakamura M, Matsuo Y, Yasuno N, Yamanouchi U, Fujimoto M, Takanashi H, Ranathunge K, Franke RB, Shitan N, Nishizawa NK, Takamure I, Yano M, Tsutsumi N. Schreiber L, Yazaki K, Nakazono M, Kato K. *Plant J.* 2014 Oct;80(1):40-51. doi:0.1111/tpj.12614. Epub 2014 Aug 13.
- 4) Microarray analysis of laser-microdissected tissues indicates the biosynthesis of suberin in the outer part of roots during formation of a barrier to radial oxygen loss in rice (*Oryza sativa*). Shiono K, Yamauchi T, Yamazaki S, Mohanty B, Malik AI, Nagamura Y, Nishizawa NK, Tsutsumi N. Colmer TD, Nakazono M. *J Exp Bot.* 2014 Sep;65(17):4795-806. doi: 10.1093/jxb/eru235. Epub 2014 Jun 9.
- 5) Rice alcohol dehydrogenase 1 promotes survival and has a major impact on carbohydrate metabolism in the embryo and endosperm when seeds are germinated in partially oxygenated water. Takahashi H, Greenway H, Matsumura H, Tsutsumi N., Nakazono M. *Ann Bot.* 2014 Apr;113(5):851-9. doi: 10.1093/aob/mct305. Epub 2014 Jan 14.
- 6) Strigolactone and cytokinin act antagonistically in regulating rice mesocotyl elongation in darkness. Hu Z, Yamauchi T, Yang J, Jikumaru Y, Tsuchida-Mayama T, Ichikawa H, Takamure I, Nagamura Y, Tsutsumi N., Yamaguchi S, Kyojuka J, Nakazono M. *Plant Cell Physiol.* 2014 Jan;55(1):30-41. doi:10.1093/pcp/pct150. Epub 2013 Oct 21.
- 7) Distribution of cellulosic wall in the anthers of Arabidopsis during microsporogenesis. Matsuo Y, Arimura S, Tsutsumi N. *Plant Cell Rep.* 2013 Nov;32(11):1743-50. doi:10.1007/s00299-013-1487-1. Epub 2013 Jul 28.
- 8) Characterization of a novel chromodomain-containing gene from the silkworm, *Bombyx mori*. Shoji K, Kiuchi T, Hara K, Kawamoto M, Kawaoka S, Arimura S, Tsutsumi N. Sugano S, Suzuki Y, Shimada T, Katsuma S. *Gene.* 2013 Sep 25;527(2):649-54. doi:10.1016/j.gene.2013.06.071. Epub 2013 Jul 11.
- 9) Transcriptome analysis of developing ovules in rice isolated by laser microdissection. Kubo T, Fujita M, Takahashi H, Nakazono M, Tsutsumi N. Kurata N. *Plant Cell Physiol.* 2013 May;54(5):750-65. doi:10.1093/pcp/pct029. Epub 2013 Feb 14.
- 10) A newly discovered function of peroxisomes: involvement in biotin biosynthesis. Maruyama J, Yamaoka S, Matsuo I, Tsutsumi N. Kitamoto K. *Plant Signal Behav.* 2012 Dec;7(12):1589-93. doi: 10.4161/psb.22405. Epub 2012 Oct 16.
- 11) Arabidopsis sphingolipid fatty acid 2-hydroxylases (AtFAH1 and AtFAH2) are functionally differentiated in fatty acid 2-hydroxylation and stress responses. Nagano M, Takahara K, Fujimoto M, Tsutsumi N. Uchimiya H, Kawai-Yamada M. *Plant Physiol.* 2012 Jul;159(3):1138-48. doi:10.1104/pp.112.199547. Epub 2012 May 25.
- 12) Phosphorylation and ubiquitination of dynamin-related proteins (AtDRP3A/3B) synergically regulate mitochondrial

proliferation during mitosis. Wang F, Liu P, Zhang Q, Zhu J, Chen T, Arimura S, Tsutsumi N, Lin J. Plant J. 2012 Oct;72(1):43-56. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05052.x. Epub 2012 Jul 26.

〔学会発表〕（計 6 件）

- 1) A lipid metabolism required for the constant mitochondrial shape in *Arabidopsis thaliana*. Kenta Katayama, Tomoki Kiyose, Masaaki Demura, Yozo Okazaki, Kazuki Saito, Hajime Wada, Nobuhiro Tsutsumi and Shin-ichi Arimura, 日本植物生理学会シンポジウム、2015年3月18日東京農業大学
- 2) ゼニゴケを用いたミトコンドリア 分裂因子の解析, 長岡渚, 栗栖里奈, 片山健太, 石崎公庸, 河内孝之, 堤伸浩, 有村慎一, 日本植物生理学会、東京農業大学、2015年3月17日
- 3) Some candidate genes for mitochondrial fission in *Marchantia polymorpha*. N. Nagaoka, R. Kurisu, K. Katayama, K. Ishizaki, T. Kohchi, N. Tsutsumi, S. Arimura, MARCHANTIA WORKSHOP 神戸大学 2014年12月8日
- 4) A novel type of mitochondrial fission induced by cold treatment depends on DRP3 without ELM1 in *Arabidopsis thaliana*. Shin-ichi Arimura, Kenta Katayama and Nobuhiro Tsutsumi, ICAR2014, Vancouver Canada July 2014
- 5) *Arabidopsis* Dynamin-related proteins, DRP2A and DRP2B, function coordinately in post-Golgi trafficking. Jiahe Huang, Masaru Fujimoto, Masayuki Fujiwara, Yoichiro Fukao, Shin-ichi Arimura, Nobuhiro Tsutsumi, ICAR2014, Vancouver Canada July 2014
- 6) Distribution of cellulosic wall in the anthers of *Arabidopsis* during microsporogenesis Yuichi Matsuo, Shin-ichi Arimura, Nobuhiro Tsutsumi, ICAR2014, Vancouver Canada July 2014

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者
堤伸浩 (Nobuhiro TSUTSUMI) 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：00202185

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし