

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660001

研究課題名(和文) イネミトコンドリア人工染色体の開発

研究課題名(英文) An approach toward developing mitochondrial artificial chromosome in rice

研究代表者

鳥山 欽哉 (TORIYAMA, Kinya)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20183882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：未報告のイネミトコンドリアの形質転換技術を開発することを目指した。イネのBT型やLD型細胞質雄性不稔系統のミトコンドリアにはメインゲノムの他に、プラスミド様環状DNA(B1プラスミド)が存在し、安定的に保持されている。本研究では、このB1プラスミドをミトコンドリア人工染色体としてイネミトコンドリア形質転換に利用する計画とした。クローニングしたB1プラスミドに独自のGFP発現カセットを組み込み、大腸菌のミニサークルベクターテクノロジーを利用して環状プラスミドにするためのベクターを構築し、人工染色体として機能するかを実験する材料準備を整えた。

研究成果の概要(英文)：To establish transformation system of rice mitochondria, we aimed to develop a mitochondrial artificial chromosome. We employed a utilization of plasmid-like circle DNA, B1 plasmid, which is stably present in mitochondria of BT-type and LD-type cytoplasmic male sterile rice. We carried out cloning of LD-type B1 plasmid and inserted our originally designed GFP expression cassette. Finally we constructed a putative mitochondrial artificial chromosome containing GFP cassette using an E. coli-based mini-circle vector technology to test whether it work as an artificial chromosome in rice mitochondria.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：育種学 遺伝学 遺伝子 バイオテクノロジー 植物

## 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 リボソー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。

我々は、これまで、イネ細胞質雄性不稔 (CMS) 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。イネ LD 型 CMS のミトコンドリアにはメインゲノムの他に、プラスミド様環状 DNA (B1 プラスミド; DDBJ accession no. AB523795; 2135 bp) が存在する (Fuji, Kazama, Yamada, Toriyama 2010, BMC Genomics)。この DNA 分子は、複製開始点を持つことが予想され、自己増殖しミトコンドリア内で安定的に保持されると考えられている。

市販されている大腸菌のミニサークルベクターテクノロジーを利用すると、バクテリアの複製開始点等を含むプラスミド部分を取り除いて、目的遺伝子のみの環状プラスミドを作成できることに気づいた。このため、B1 プラスミドとミニサークルベクターテクノロジーを組み合わせるとミトコンドリア人工染色体を作成できるのではないかとこの着想に至った。

作成したミトコンドリア人工染色体を LD 型イネ細胞のミトコンドリアにパーティクルガンを用いて導入する予定であるが、通常ミトコンドリアは小さすぎるので、分裂関連遺伝子の発現を抑制して巨大化したミトコンドリアを持つ組換えイネを作成して利用すれば、実験が遂行可能であろうと考えた。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアの形質転換系は報告されていないので、ミトコンドリアの形質転換技術を開発することに挑戦する。イネ BT 型や LD 型細胞質雄性不稔系統のミトコンドリアにはメインゲノムの他に、プラスミド様環状 DNA (B1 プラスミド; 2135 bp) が存在し、安定に保持されている。このため B1 プラスミドは複製開始点を含み、自己増殖すると考えられる。本研究では、この B1 プラスミドをミトコンドリア人工染色体 (Mitochondrial Artificial Chromosome; 略称 MAC) として利用することを目的とする。B1 プラスミドにミトコンドリアゲノムにコードされる遺伝子のプロモーターに連結した GFP 発現カセットを組み込み、大腸菌のミニサークルベクターテクノロジーを利用して環状プラスミドとして LD 型細胞に導入し、MAC として機能するか調査する。

## 3. 研究の方法

### (1) ミニサークルベクター-MAC の作成

B1 プラスミド (DDBJ accession no. AB523795; 申請者が 2010 年に登録) は *EcoRI* サイトを 1 カ所持つ環状 DNA であり、LD 型ミトコンドリアに存在する。B1 プラスミドを持つ稔性回復系統 (LDR) より、B1 プラスミドをクローニングする。ミニサークルベクター-pMC.BESPX-MCS2 (System Bioscience 社) の *EcoRI* サイトに挿入する。GFP 発現融合カセット (両端に *SalI* サイトを付加して合成済み) をミニサークルベクターの *SalI* サイトに挿入する。ミニサークルベクター生産システム (System Bioscience 社) を用いてミニサークルベクター (= MAC) を作成する。

### (2) 巨大ミトコンドリアを持つイネの作出

ミトコンドリアの分裂を阻害して巨大化させるため、ミトコンドリア分裂因子ダイナミンのドミナントネガティブ変異型 *OsDRP3A (K63A)* (東京大学 有村慎一准教授より譲渡; Fujimoto, Arimura et al. 2004. A rice dynamin-like protein, OsDRP3A is involved in mitochondrial fission. *Breeding Science* 54: 367-372) を LD 型 CMS 細胞質を持つ稔性回復系統 (LDR) に遺伝子導入する。

### (3) パーティクルガン法で MAC を巨大ミトコンドリアに導入

巨大ミトコンドリアをもつ LDR の培養細胞に、パーティクルガン法を用いて MAC を導入する。通常用いられる直径 1  $\mu\text{m}$  の金粒子を用いても、巨大ミトコンドリアならば遺伝子導入が充分可能であると考えた。

## 4. 研究成果

### (1) ミニサークルベクター-MAC の作成

イネのミトコンドリアに存在するプラスミド様環状 DNA は、4 種類報告されており、BT 型細胞質雄性不稔系統から見つかったことから、B1, B2, B3, B4 と名付けられている。我々は、LD 型細胞質雄性不稔系統と CW 型細胞質雄性不稔系統のミトコンドリアゲノムの全塩基配列を次世代シーケンサーで決定した (Fuji, Kazama, Yamada, Toriyama 2010)。その際、B1 プラスミド (2,135 bp) のコピー数は LD 型 CMS で特に多く、メインゲノムの 4 倍であることがわかった。そこで、LD 型細胞質雄性不稔系統に存在する B1 プラスミドのクローニングを行うこととした。LD 型細胞質雄性不稔系統のミトコンドリア DNA を単離してアガロースゲル電気泳動すると、メインゲノムの他に B1 プラスミドが検出される (図 1)。このバンドを抽出して *EcoRI* で切断してクローニングした。LD 型の B1 プラスミドの塩基配列を BT 型の B1 プラスミドと比較すると 2 塩基の SNP が存在した。*EcoRI* 切断部位から数えて 1~1649 塩基と 1935~2135 塩基までは第 1 染色体に 99% 相同の配列が、1650~1815 塩基と 1896~1948 塩基

は第染色体に 96% 相同な配列が存在した。

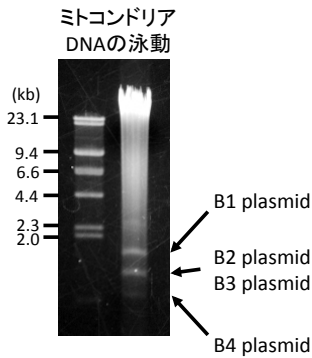


図 1 ミトコンドリア DNA の泳動で確認できるプラスミド様 DNA 分子

1815~1896 塩基の配列はユニークな配列であった。LD 型の B1 プラスミドの *Eco*RI 切断断片をミニサークル作成用ベクター pMC. BESPX-MCS2 (System Bioscience 社) の *Eco*RI サイトに挿入した。

独自にデザインした GFP 発現カセットはイネのミトコンドリアで GFP を高発現させることを狙って、我々がイネミトコンドリアのゲノムアレイ (OsMes (Oryza sativa Mitochondria expression server) <http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/cgi-bin/gbrowse/OsMes/>) によって独自に明らかにした発現が高い遺伝子 *rrn26* のプロモーター領域に、バクテリアと葉緑体のコドンに最適化された *sGFP* を連結し、さらに転写終結シグナルとして *nad6* の 3' 領域を結合した GFP 発現カセットである。*sGFP* の上流にはバクテリアで翻訳レベルをあげるとされている gene 10 リーダー配列、SD 配列、および、融合タンパク質発現に用いられる *pET3a* を連結するという工夫がしてある。両端に *Sal*I サイトを付加して合成した。この *Sal*I 断片を B1 プラスミド挿入済みのミニサークル作成用ベクター pMC. BESPX-MCS2 の *Sal*I サイトに挿入した。大腸菌のミニサークルベクターテクノロジーを利用してミニサークルベクター (図 2) にするためのベクターが完成した。

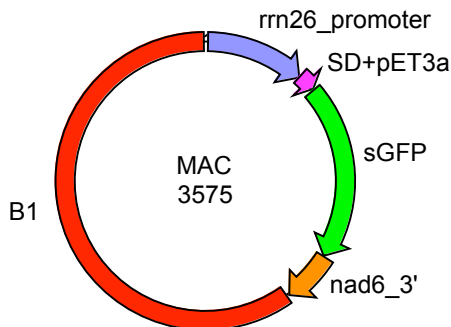


図 2 ミニサークルベクター MAC の模式図

(2) 巨大ミトコンドリアを持つイネの作出

作成した MAC をイネ細胞のミトコンドリアにパーティクルガンを用いて導入する予定であるが、通常のミトコンドリアは小さすぎるので、分裂関連遺伝子の発現を抑制して巨大化したミトコンドリアを持つ組換えイネを作成して利用することとした。シロイヌナズナにおいてミトコンドリア分裂因子ダイナミン *DRP3A* のドミナントネガティブ変異型を導入すると、ミトコンドリアの分裂が阻害されて大きく (細長く) なることが報告されている (Fujimoto et al. 2004)。ミトコンドリア移行シグナル配列を付加した GFP と *OsDRP3A (K63A)* を合わせ持つコンストラクト (図 3) を、アグロバクテリウム法を用いてイネ品種「台中 65 号 (T65)」種子由来カルスに導入し、ハイグロマイシンで形質転換カルスを選抜した。



図 3 導入した遺伝子の模式図

独立に 10 系統の形質転換カルスを得た。細かい培養細胞を得るために AA 液体培地で培養し、ミトコンドリアを観察したところ、形質転換系統 *OsDRP3A (K63A) +mtGFP/T65* の #6 と野生型の T65 ( $\gamma$ -ATPase-GFP を導入し、GFP によりミトコンドリアを可視化したポジティブコントロール T65WT) を比較すると、#6 では多くの細胞でミトコンドリアが大きな粒状または長いひも状になっていた (図 4)。一部の細胞でミトコンドリアの長さを測定したところ、通常の細胞では  $0.73 \mu\text{m}$  であるのに対し、形質転換細胞では  $1.75 \mu\text{m}$  であり、2.4 倍となった。2 系統について再分化植物から種子が得られた。巨大ミトコンドリアを持つイネが作成できることがわかったので、GFP を含まない *OsDRP3A (K63A)* を LD 型雄性不稔細胞質を持つ稔性回復系統 LDR に遺伝子導入し形質転換体を得た。

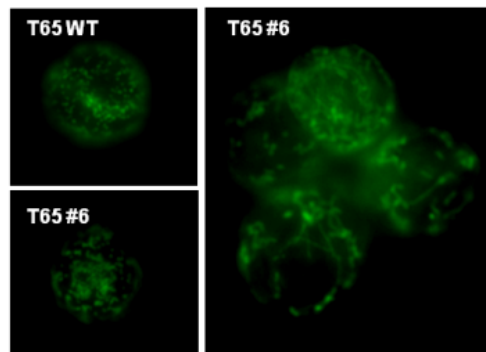


図 4 大きな粒状または長いひも状のミトコンドリアを持つイネのサスペンションセル

実験(1)で作成した環状プラスミド MAC を実験(2)で作成した形質転換イネにパーティクルガンを用いて導入する計画であったが、そこまで達成できなかった。本研究期間内に、人工染色体として機能するかを実験する材料準備が整った。

### (3)今後の展望

GFP のトランジェント発現を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、Mito-tracker で可視化したミトコンドリアで GFP の発現が観察できれば人工染色体開発実験の第 1 ステップ成功となるだろう。第 2 ステップとして MAC の安定性、および、増殖性について観察することにより、B1 プラスミドに含まれる複製開始点が同定できることが期待される。さらに、選抜マーカーの種類を検討して、最適の選抜マーカーを見つけ出すことができれば、ミトコンドリア人工染色体が完成できると展望している。

## 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)

[学会発表] (計 7 件)

### (1) 風間智彦・鳥山欽哉

ミトコンドリアゲノムタイプと核遺伝子の組み合わせによって決まるイネの花粉発達  
国立遺伝学研究所オルガネラゲノム研究会

2014 年 11 月 7 日

国立遺伝学研究所 (静岡県三島市)  
(招待)

### (2) 風間智彦・鳥山欽哉

ミトコンドリアに起因する植物の不妊を回避する核因子の探索

第 3 回マトリョーシカ型生物学研究会

2014 年 7 月 11 日～7 月 13 日

神戸大学六甲台キャンパス (兵庫県神戸市)

### (3) 梅津優香・風間智彦・有村慎一・鳥山欽哉

ドミナントネガティブ変異型 *OsDRP3A* を利用したミトコンドリア巨大化イネの作出に関する研究

イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2014  
2014 年 7 月 11 日～7 月 12 日

東京大学農学部 (東京都文京区)

### (4) 風間智彦・鳥山欽哉

植物のメス化：ミトコンドリアが花粉を殺す？

第二回 YoungMito2014

2014 年 5 月 22 日～5 月 23 日

大阪府箕面市

### (5) 風間智彦・鳥山欽哉

ミトコンドリア RNA の制御が花粉の運命を決定する

第 3 回植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム、「RNA から植物を考える - 植物をささえる RNA 機能 -」

2013 年 11 月 22～23 日

北海道大学 (北海道札幌市)

### (6) Toriyama, K., Igarashi, K., Okazaki, M., Motomura, K., Kazama, T.

Comparative study on cytoplasmic male sterility-associated genes, *orf79*, *orf113*, *orf352*, derived from *Oryza rufipogon*.

7th International Rice Genetics Symposium  
November 5-8, 2013

Manila (Philippines)

### (7) Kazama, T., Toriyama, K.

Comparison of fertility restoration system in two types of cytoplasmic male sterility in rice.

8<sup>th</sup> International Conference for Plant Mitochondrial Biology

May12-16, 2013

Rosario (Argentina)

[その他] (計 14 件)

アウトリーチ活動

### (1) 鳥山欽哉

花粉の不思議と環境適応植物工学

大学出前授業、山形県立西高等学校 1 年生

2015 年 2 月 7 日

山形県立西高等学校 (山形県山形市)

### (2) 鳥山欽哉・伊藤幸博

研究室紹介

宮城県加美農業高等学校、韓国水原農生命科学高等学校交流視察研修

2014 年 9 月 4 日

東北大学農学部 (宮城県仙台市)

### (3) 鳥山欽哉

よくわかる遺伝子組換え植物

東北大学農学部オープンキャンパス

2014 年 7 月 30 日、31 日

東北大学農学部 (宮城県仙台市)

### (4) 鳥山欽哉

花粉の不思議と環境適応植物工学、SSH 生物 I 特別授業、宮城県仙台第一高等学校 2 年生

2013 年 9 月 9 日

宮城県仙台第一高等学校 (宮城県仙台市)

### (5) 鳥山欽哉

エンジョイ DNA～よくわかる遺伝子組換え植物～

平成 25 年度東北大学総合技術部職員研修「生物・生命科学職群」講演

2013年9月3日  
東北大学農学部（宮城県仙台市）

(6) 風間智彦  
研究室紹介  
福島県立磐城高等学校 SSH 総合の時間  
2013年4月24日  
東北大学農学部（宮城県仙台市）

報道関連情報

(7) 鳥山欽哉  
二重らせん、見えますか？  
東北大生協 TCC vol 284, 9~10  
2014年10月1日

(8) 鳥山欽哉  
花粉の不思議 (6 完) 寒さに強い花粉夢の途中  
河北新報、科学の泉  
2013年8月30日

(9) 鳥山欽哉  
花粉の不思議 (5) 精細胞から植物体再生  
河北新報、科学の泉  
2013年8月31日

(10) 鳥山欽哉  
花粉の不思議 (4) コピー作れぬハイブリッド  
河北新報、科学の泉  
2013年8月30日

(11) 鳥山欽哉  
花粉の不思議 (3) 運命決めるミトコンドリア  
河北新報、科学の泉  
2013年8月29日

(12) 鳥山欽哉  
花粉の不思議 (2) アレルゲンの実体を解明  
河北新報、科学の泉  
2013年8月28日

(13) 鳥山欽哉  
花粉の不思議 (1) 細胞壁分解助けるタンパク質  
河北新報、科学の泉  
2013年8月27日

ホームページ等

(14) 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>

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  
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