

## 研究報告書

### 「植物ミトコンドリアゲノム人為改変技術と雄性不稔植物の作出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 有村 慎一

#### 1. 研究のねらい

植物ミトコンドリアゲノムは未だ安定な形質転換技術が確立していない。本研究では、人工制限酵素をミトコンドリアへ導入することで、高等植物ミトコンドリアゲノムの遺伝子破壊に挑戦した。人工制限酵素は、狙った数十 bp の塩基配列を認識して切断することができる合成酵素であり、近年技術進歩が著しい。これまで菌類、ほ乳類、植物などさまざまな生物で人工制限酵素を利用した“核ゲノムの標的遺伝子の切断破壊(ジーンターゲティング)”が試みられ、その有効性が実証されてきた。本研究ではこの人工制限酵素の一つ、TALEN にミトコンドリア局在シグナルを融合させ植物細胞内で発現させることで、ミトコンドリアゲノムのジーンターゲティングに挑戦する。これまでのミトコンドリアゲノム自然変異などの知見を参考にして複数のターゲット遺伝子の破壊を行い、それらの分子生物学的解析を行う。その過程で致死性・生育遅延・発生変異と共に新規細胞質雄性不稔などの表現型を示す遺伝子破壊システムの出現が期待され、それらの知見と技術は農学育種分野において下記のような応用利用が考えられる。

遠縁の植物を交配してできたその F1 世代は両親を大幅に凌ぐ生長を示すことがある。この雑種強勢現象の利用は作物や植物バイオマス増産、CO<sub>2</sub> 吸収向上に有効な技術である。大量に品質の安定した F1 種子を採取する技術の一つとして、細胞質雄性不稔植物体が利用されてきた。興味深いことに、これまで調べられたほとんどすべてにおいて、ミトコンドリアゲノム上の遺伝子発現の不具合が雄性不稔の直接の原因であることが報告されている。しかし、このようなミトコンドリアゲノム変異が、なぜ発生や生育に対しては悪影響をおこさず、雄性器官には特異的に不具合をひき起こすのかなど、基礎的な疑問も未だに解明されていない。本研究によってミトコンドリアゲノムを改変して細胞質雄性不稔を引き起こす技術を確立することができれば、現存する多くの優良作物、優良品種について極短期間で細胞質雄性不稔システムの作出が可能となり、F1 品種育種の現場の大幅な効率化につながる。植物ミトコンドリアゲノムの改変技術の確立は、植物ミトコンドリア機能の基礎理解とその機能強化のための基盤技術であり、これは二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化に大きく貢献すると考えている。

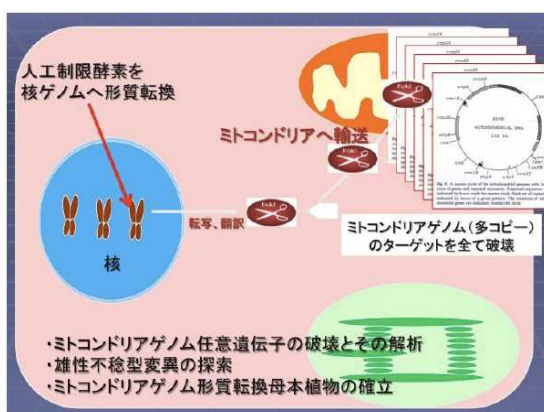
#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

人工制限酵素 TALEN をもちいた高等植物ミトコンドリアゲノムの任意遺伝子破壊に挑戦した。TALEN は狙った塩基配列を認識する二つ一組のタンパク質であり、これらについて①ミトコンドリア局在配列をもち②植物内で安定して高発現するベクターを、③ターゲットの数だけそれぞれ作る必要がある為、Multisite Gateway System を流用した高効率ベクター構築システ

ムを作製した。TALEN は 105 塩基毎の繰り返しが 15-20 回あり、また二つの TALEN 遺伝子をタンデムにつなげるなど、ベクター構築は極めて難しく、またプラスミドの不安定性、植物内での遺伝子発現の不安定性等の困難があったが、最終的に、高効率で簡便・確実な植物ミトコンドリア TALEN 遺伝子破壊発現ベクター作りに成功した。このベクターシステムをもちいて、イネ・シロイヌナズナを材料に、3 種類のターゲット遺伝子の破壊ベクターを作製し植物に導入したところ、現在、一遺伝子の二カ所の破壊に成功し、独立の遺伝子破壊植物体 20 系統を得た。現時点ではこの植物ミトコンドリアのジーンターゲットングは世界初の成功例である。植物ミトコンドリアゲノムは多種類の DNA 分子で構成されており、それぞれの中にリピート配列をもち、組換えが絶えず起こるとされているが、これまでゲノム改変ができないため、詳細理解が進んでいなかった。今回の遺伝子破壊とその後の解析によって、その正常ゲノムの維持様式や修復過程、真の物理的構造についての手がかりを得ることができた。また、ミトコンドリアゲノムは一細胞内に数百コピーが存在するため、一部のコピーに遺伝子破壊が起こっても、正常遺伝子との混在（ヘテロプラスミー）が問題になると考えていたが、意外なことに、前述 20 系統のほとんどが遺伝子破壊型へほぼ純化（ホモプラスミー化）していることが確認された。この結果は、この技術の有効性を示すとともに、新たな謎であり、また今後の多様な遺伝子破壊への展開に際する注意点を示唆している。まだ成功例が少ないため、遺伝子毎、領域毎、形質転換手法や植物種の違いなど検討すべき事項が多数考えられ、今後多数のターゲットに対して破壊と解析を行っていきたいと考えているが、当初設定した最大の目的である遺伝子ターゲットングに成功することができた。

## (2) 詳細



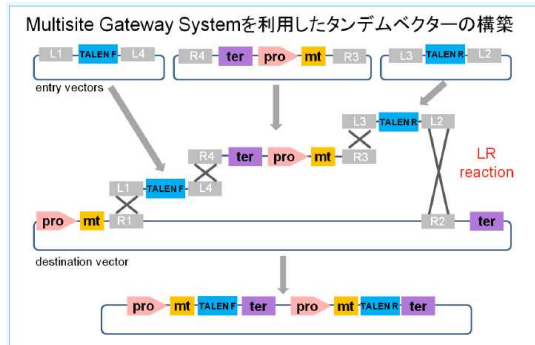
左図はプロジェクトの概要であり、植物細胞の中に、核(左,青)・ミトコンドリア(右上,オレンジ)・葉緑体(右下,緑)が書かれている。人工制限酵素遺伝子発現ベクターを一端核ゲノムへ導入し、そのタンパク質を発現させると、これに融合させたミトコンドリア局在シグナルによって、人工制限酵素がミトコンドリアへ局在する。人工制限酵素は対象配列が多コピーであっても切り続ける為、いずれ変異が蓄積するというストラ

ラテジーである。

### 1. 「ミトコンドリア TALEN 遺伝子破壊ベクター構築システムの開発」

第一段階として、このミトコンドリア局在配列付きの二つの TALEN を同時に高発現するための、植物核ゲノムへの形質転換発現ベクター作りが必要であった。TALEN は、二つ一組で働く DNase のため、設計した酵素それぞれに、ミトコンドリア局在シグナルと薬剤誘導性プロモ-

タ配列を付加する必要がある。複雑なベクター構築が複数必要となるが、Multisite Gateway System を応用し、簡便・迅速に設計するシステムを作製した。このシステムによって、TALEN-ORFを設計作製時に、それぞれを multisite エントリーベクター(図2 上部)に構築することで、TALEN-ORF 完成後すぐに(2~3日)で二つ一組を一つの植物形質転換用 Ti-plasmid タンデム誘導ベクター上に移行することが出来る。コントロール実験として、GFP と RFP を TALEN-ORF に見立てて multisite エントリーベクターを作成、タンデムベクターを構築し、この GFP と RFP が一過的に発現し、またミトコンドリア内に局在することを確認した。初期には、タンデムの後者遺伝子(RFP)の発現が比較的弱いことが明らかになったが、さきがけ領域内



のアドバイスに従い、ターミネーターの種類を変えたところ、両遺伝子が高発現、安定するようになった。このシステムをもちいて、これまで合計 20 種類以上の TALEN タンデムベクター構築を行った。

当初 TALEN-ORF の部分は Invitrogen や Wako 社に外注していたが、1TALEN ペア毎に 50 万円を超える金額が必要であった。

た。そこで、広島大学の山本卓研究室で開発された Platinum Gate 法をベースとして、TALEN-ORF 部分を含んだエントリーベクター作製の自作システムも立ち上げた。これにより、ミトコンドリアゲノムの任意の配列を破壊するための TALEN 発現ベクターを効率よく一から自作できるシステムが完成し、実験の低価格化と迅速化を達成した。

## 2. 「ミトコンドリアゲノム遺伝子破壊」

これまで、イネとシロイヌナズナを対象に、合計三つの遺伝子をターゲットとして選択して、上記ベクターを複数種類作製した。これらの遺伝子は、いずれも変異による破壊がおこっても致死とならないことが先行研究により予想されている遺伝子である。当初、切断対象領域を PCR して、CEL1 assay を中心とした微量欠失や点変異検出を行っていたが、500 系統を超える独立の遺伝子導入系統でも変異が検出されなかった。しかしながら、ある遺伝子の切断を行った 20 系統の植物体において、対象遺伝子の PCR 増幅が全く起こらないという奇妙な現象が見られた。詳しく調べたところ、遺伝子切断を行った領域の前後数百 bp~数 Kbp に渡って、ゲノムが大きく消失していることが明らかになった。この消失領域の中にはそのほかの必須遺伝子は存在していなかった。消失領域の末端について調べたところ、ミトコンドリアゲノム内

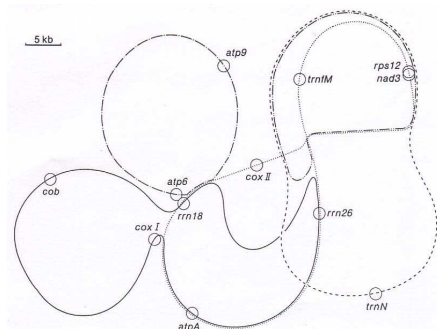


Fig. 4. A genetic map of the rice mitochondrial genome. Each type of line indicates a set of basic circles. Overlapping regions are regions repeated among circles. Iwahashi M et al. (1992) Theor Appl Genet 84:275-279

に多数存在するリピート配列を介して、ゲノム上の別の領域と組換えを起こし、新たなゲノム構造変を引き起こしていることが明らかとなった。もとも植物ミトコンドリアゲノムは、多数の分子種の混在あり、その中に相同配列をもっており、頻繁な組換えが起こることが報告されている。左図は、イネのミトコンドリアゲノムのマップ概略図で、それぞれのマチパータイト DNA の中で相同な配列は重なるよう

書かれている。今後解明しなければならない謎はまだ多いが、この TALEN によるミトコンドリア遺伝子破壊の成果は、(真核生物初では無くなってしまったが、)植物初のミトコンドリアゲノム編集の成功である。また、遺伝子切断後のゲノム修復過程について、核ゲノムの場合では NHEJ(Non-Homologous End Joining)と呼ばれる緊急修復が主であるのに対して、植物ミトコンドリアゲノムでは、NHEJがほぼ起こらず、homologous recombinationによる修復維持に向かうことを初めて見いだした。さらに、一つの細胞の中に数百コピー存在するといわれる植物ミトコンドリアゲノムについて、当初ヘテロプラスミーと呼ばれる、正常配列と異常配列の混在状態を保つと予想したにもかかわらず、組換え変化した変異型ゲノム構造で安定した状態(ホモプラスミー)に変化できることを見いだした。技術的な成功と知に、意外な基礎的知見を見いだすことができた。

### 3. 「選択的アプローチ: CRISPR/Cas9 とパーティクルガン法」

TALEN によるミトコンドリア遺伝子破壊の挑戦とともに、選択的な手段として、CRISPR/Cas9 をもちいた遺伝子破壊、ならびにパーティクルガン法をもちいた一過的な遺伝子導入にも挑戦した。CRISPR/Cas9 は、一タンパク質— RNA の二因子をもちいた人工制限酵素であり、ターゲット遺伝子あたりのベクター設計がごく簡単で、切断活性～破壊効率も高いため核遺伝子の改変に多用されている。Cas9 タンパク質にミトコンドリア局在シグナルをつけたベクターを構築したが、現在の所、まだ変異の検出に至っていない。植物ミトコンドリアが巨大化したミトコンドリア分裂突然変異体をもちいてパーティクルガン法による遺伝子導入を行った。GFP 等をマーカー遺伝子として、大きく分けて四種類の発現ベクターを構築しトライしたが、これまで GFP 等の発現を検出するに至っていない。

### 3. 今後の展開

植物ミトコンドリアゲノムは、巨大で複雑な構造を持っており、維持伝達機構や発現機構についてもよくわかっていない。植物生育上必須の遺伝子や、未解明の遺伝子を含んでいるにも関わらず、形質転換技術がないことがネックとなって研究が行き詰まっている。本研究の成果「人工制限酵素によるミトコンドリアゲノム遺伝子破壊」によって、遺伝子やその発現調節領域、構造領域、複製領域、組換え領域など様々な部位の解析に道をひらくと思われる。今回一端をつかんだ修復機構とゲノムの維持機構、ヘテロプラスミーの解析など、植物ミトコンドリアゲノムの基本理解において、これまで行き詰まっていた解析・研究が一気に進展する可能性がある。また、産業上最も利用され注目を浴びている細胞質雄性不稔の原因遺伝子について、これを用いた解析は必須であると思われる。これまで 10 を越える作物でその原因遺伝子候補が報告されているが、それぞれについて、最終的な同定を行う上で強力なツールとして利用されると思われる。また、この遺伝子の破壊によって、細胞質雄性不稔性の打破ができれば、この TALEN 遺伝子を人工稔性回復遺伝子として使用する応用も考えられ、一部の一代雑種育種への応用が考えられる。

また、もともと細胞質雄性不稔遺伝子は、進化上、自然に低頻度で起こるミトコンドリアゲノムの組換えで偶然出来たキメラ遺伝子だと考えられており、これが発現し悪さをすることで雄性不稔性が起こったとされている。今後、TALEN を用いたミトコンドリアゲノム上の様々な領域を切

断することによって、新たな組換えを起こすことで、新たな細胞質雄性不稔遺伝子を人為的に構築することも可能かもしれない。現在作物に利用されている雄性不稔細胞質は、種類が少なく、病害や環境変異に極めて脆弱である可能性があり、この方法で雄性不稔遺伝子を作ることができれば、優良品種を短期間で雌化して一代雑種 F1 種子生産に使うことが出来る可能性がある。また、TALEN ベクターは核ゲノムに導入されるが、その結果引き起こされる改変型ミトコンドリアゲノムは母性遺伝するため、null segregant を簡単に得ることができ、遺伝子組換え生物拡散の問題を回避できる。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

この申請研究プロジェクトの目的は、これまで不可能であった「ミトコンドリアゲノム人為改変技術」にトライするという極めてハイリスクな研究テーマであったが、これを達成することができた。タイトル後半の「雄性不稔植物の作出」までは残念ながらトライすることが出来なかったが、前者が最大のネックであるため、達成度としては高いと考えている。研究の進め方としては、「遺伝子発現ベクターを作製し、形質転換植物を作製し、変異と表現型を解析する」だけのシンプルな検討手法であるため、検証自体は当初順調に推移すると考えていたが、第一段階のベクター作りが予想外に困難で、改良に時間がかかった(約二年間経過)。また、500 系統以上を探索して変異がなかったことから、この方法に見切りをつけ、別の手段を考えはじめていたが、磯貝領域長から、「新しい方法に挑戦するのもいいけど、当初方法がなぜ悪かったかわかるまでやったほうがいいですよ」とのアドバイスをいただき、解析を工夫しつつ続けたところ幸運にも変異(ではなく予想外の大規模な欠失・消失)を検出することができたが、この検出は偶然的な要素が多分にあった。また、検出方法の変更において DNA 自動泳動装置の緊急導入、ならびに予想外のゲノム大規模改変を検出するための次世代シーケンス外注費用などの、追加支援を申請したところ受諾していただき、スムーズに緊急対応することができた。当初想定では、核ゲノムと同様の変異が起こるとばかり考えていたが、植物ミトコンドリアゲノムに特異的な相同組換えと大規模ゲノム再編が起こることを見いだすことができた。最終的にゲノム編集成功個体が現れたのが、最終年度の 8 月中旬であり、(また秘匿事項の関係で、)これまで外部発表・公開はこれからとなる。植物ミトコンドリアゲノム研究において、強力な独自の手法、それも最初の段階と検出にも工夫が必要であり外部からの新規参入ハードルが高いと思われるので、まずは国内の細胞質雄性不稔研究者を中心に新旧の共同研究者と共に、出来ることを一斉に行い、世界初の最新成果をしばらく出し続けられるように努力したい。今後の植物基礎研究、農学育種の解析・開発ツールの一つとして有効なものが出来たことは大きな成果だと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

##### (研究総括)

本研究で有村氏は、これまでに未開発であったミトコンドリアの遺伝子編集技術を確立し、その一つの実証として、細胞質雄性不稔植物を作出することを目的とした。有村氏はこの研究の

過程でのいろいろな試行錯誤を経て、最終的に、TALEN の手法でミトコンドリアのゲノム編集に成功した。本研究をきっかけとして、ミトコンドリアのゲノム編集による遺伝子改変植物が次々と生み出されてくることが期待される。有村氏の想定した雄性不稔植物もそうした過程で生み出されてくるであろう。これが作物などで実現すれば、高生産性のハイブリッド作物の作出などにも応用することが可能となるであろう。この大きな成果をさらに発展させるために、いろいろな形質についても検討を進めることが必要である。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

\*2016/2/10 現在ほか一報投稿中。ゲノム編集の成功そのものの論文は執筆中。

1. Yamashita A, Fujimoto M, Katayama K, Yamaoka S, Tsutsumi N and Arimura S (2016) Formation of Mitochondrial Outer Membrane Derived Protrusions and Vesicles in Arabidopsis thaliana. PLoS ONE 11(1): e0146717. doi:10.1371/journal.pone.0146717.
2. Huang J, Fujimoto M, Fujiwara M, Fukao Y, Arimura S, Tsutsumi N., Arabidopsis dynamin-related proteins, DRP2A and DRP2B, function coordinately in post-Golgi trafficking. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Jan 2;456(1):238-44. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.065. Epub 2014 Nov 22.
3. Matsuo Y, Arimura S, Tsutsumi N., Distribution of cellulosic wall in the anthers of Arabidopsis during microsporogenesis. Plant Cell Rep. 2013 Nov;32(11):1743-50. doi: 10.1007/s00299-013-1487-1. Epub 2013 Jul 28.
4. Shoji K, Kiuchi T, Hara K, Kawamoto M, Kawaoka S, Arimura S, Tsutsumi N, Sugano S, Suzuki Y, Shimada T, Katsuma S., Characterization of a novel chromodomain-containing gene from the silkworm, Bombyx mori. Gene. 2013 Sep 25;527(2):649-54. doi: 10.1016/j.gene.2013.06.071. Epub 2013 Jul 11.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主な招待講演

1. Mitochondrial Dynamics in Plants, Shin-ichi Arimura, The 4th International symposium on Dynamics of Mitochondria (Dynamito 2013) Okinawa, Japan 10/28-11/1 2013
2. 「植物ミトコンドリアダイナミクスを支える遺伝子群」、有村慎一、国立遺伝学研究所研究集会「オルガネラゲノムに支配される生命現象」2014 年 11 月 7 日

3. Acyl remodeling affecting the mitochondrial morphology in *Arabidopsis thaliana*. 有村慎二、植物生理学会年会シンポジウム 2015 年 3 月 16 日
4. Dynamic Aspects of plant mitochondria and their genome 有村慎一 植物生理学会シンポジウム 2016 年 3 月 18 日

#### 受賞

2013 年 3 月、日本植物生理学会奨励賞受賞

#### 著作物

Mitochondria and peroxisome division Shin-ichi Arimura and Nobuhiro Tsutsumi, A Chapter in the book entitled “*Molecular cell biology of the growth and differentiation of plant*” in press. (2016)

Shin-ichi Arimura, Mitochondrial fission and fusion in an onion epidermal cell (2014) Atlas of Plant Cell Structure, 2014 Springer: pp38-39

本研究で開発されたミトコンドリアゲノム編集技術を中心にして、本年度は科研費申請を行う。今後様々な共同研究をおこないつつ、来年度以降その他の公募研究事業へ応募していく予定である。