

## 核と細胞質のゲノム情報を活用した新しいバイオ技術の開発と 作物育種への展開

平成 27 年 5 月 25 日受付

寺 地 徹  
植物ゲノム科学研究センター

### 要 旨

植物ゲノム科学研究センターは、将来の作物育種への展開を念頭に、全体として「核と細胞質のゲノム情報を活用した新しいバイオ技術の開発と細胞質ゲノムの構造解析」を行っている。そのため、前身となる植物オルガネラゲノム研究センターから引き継いだ複数の課題、ならびに将来的に重要になると予想される萌芽的な課題について研究を進めている。課題の概要は以下の通りである。

1. 葉緑体の遺伝子組換えによる有用植物の育成
  - 1) タバコの組換えシステムを用いた葉緑体への導入遺伝子の評価
  - 2) 有用遺伝子を持つ組換えレタスならびにトマトの作出
  - 3) パンコムギにおける葉緑体形質転換系の開発
2. 高等植物のミトコンドリアゲノムの解析
  - 1) 栽培・野生ダイコンのミトコンドリアゲノムの変異と進化に関する研究
  - 2) ダイコンに雄性不稔をもたらすアブラナ科野生植物のミトコンドリアゲノムの解読
  - 3) コムギと近縁種のミトコンドリアゲノムの解読
  - 4) タマネギのミトコンドリアゲノムの解読
3. 有用作物における雄性不稔と稔性回復の分子機構
  - 1) ナスの稔性回復遺伝子の単離
4. その他
  - 1) 斑入りを示す組換えタバコの葉緑体ゲノムの構造変異
  - 2) ゲノム編集による新しい遺伝子改変技術の検討

キーワード：葉緑体ゲノム、ミトコンドリアゲノム、葉緑体形質転換体、ゲノム解析、作物

以下に平成 26 年度の研究の詳細について報告する。

## 1. 葉緑体の遺伝子組換えによる有用植物の育成

この課題は、平成 20 年度～平成 24 年度まで文科省に採択されていた私立大学戦略的研究基盤形成事業のもと、当センターの前身にあたる植物オルガネラゲノム研究センターで集中的に実施されてきた課題である。実験の進展にともない、現在はモデル植物のタバコ（およびベンサミアナタバコ）では、任意の遺伝子をほぼ確実に葉緑体ゲノムへ導入することができるようになってきている。また、この実験技術を作物へ応用するため、レタス、トマト、パンコムギを栽培し、それぞれの作物について、遺伝子導入に用いる外植片の無菌培養から再分化個体を得るまでの実験系（再分化系）を確立している。これらの作物で現在までに葉緑体の組換えに成功しているものはレタスのみであるが、トマト、パンコムギについても葉緑体の形質転換実験を継続中である。

### 1) タバコの組換えシステムを用いた葉緑体への導入遺伝子の評価

強光などの非生物的ストレスに耐性を持つ植物を育成するため、葉緑体に発生する有害な活性酸素分子種（ROS）の消去能力を強化する実験を行っている。植物において葉緑体は、ROS を発生する主要な場であるが、一方で葉緑体は、ROS を消去する一連の酵素反応経路（グルタチオン-アスコルビン酸回路）を持つことが知られている。本研究では、タバコを用いて、この回路を構成する酵素を葉緑体で強発現させることを試みた。具体的には、グルタチオンレダクターゼ（GR）、デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ（DHAR）、モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ（MDAR）、およびアスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）の 4 種類の酵素の遺伝子、さらにはこの回路へ基質（過酸化水素）を供給するスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）の遺伝子を対象にした。これらの遺伝子の cDNA を、それぞれタバコの葉から RT-PCR 法によりクローニングし、*psbA* プロモーターおよび *rps16* ターミネーター配列と連結後、定法によりパーティクルボンバードメント法を用いて葉緑体のゲノムへ導入した。また、これらの遺伝子をオペロンとして 2 つ連結したもの（*apx-sod*、*apx-mdar*、*apx-dhar* および *mdar-dhar*）、3 つ連結したもの（*apx-sod-mdar*）、さらには 4 つ連結したもの（*apx-sod-mdar-gr*）を作成し、単独のものと同じように葉緑体ゲノムへ導入した。これらの組換え体の特徴付けを行うため、現在、T<sub>2</sub> 種子を揃えようとしている。カルタヘナ法の規制により、組換え体はすべて閉鎖系温室で育てる必要がある。スペースの制約から、これらの組換えタバコを一斉に育てることはできないので、順番に組換え体の世代更新を進めており、今年度までに上記の遺伝子を持つ組換えタバコの、少なくとも 1 系統については、T<sub>2</sub> 種子を収穫することができた。

### 2) 有用遺伝子を持つ組換えレタスならびにトマトの作出

葉もの野菜の栄養価を高める、果実の品質を向上させる、有用物質を蓄積させるなど、作物

の付加価値を高めることを目標に、葉緑体（色素体）の遺伝子組換えを行っている。今年度はレタスおよびトマトの遺伝子組換え実験を行った。レタスについては、昨年度の本所報で、ダイズフェリチンを葉緑体ゲノムに持つ組換え体の作出に成功したこと、またこの組換え体では、葉の鉄分が約2倍に増加していたことを報告した。このフェリチンレタスは、当センターで初めて得られたレタスの組換え体である。タバコに比べてレタスでは、組換え体を得る効率が悪く（おおよそ十分の一）、まだ任意の組換え体を次々と作出できる状況にはないものの、ダイコンのグルタチオン合成酵素の遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換え体の候補が1個体得られた。トマトについては、平成24年度に「トマトにおける効率的な葉緑体形質転換技術の開発」、また平成25年度に「マイクロトムを用いたトマトの葉緑体形質転換技術の確立」という課題名で、筑波大学の形質転換植物デザイン研究拠点と共同研究を実施し、マイクロトムという生育の早い特殊な実験系統を分譲してもらうとともに、子葉を用いたトマトの再分化系のプロトコルを当センターへ移植することができた。NADH依存性グルタミン酸脱水素酵素遺伝子 (*Gdh1*) (グルタミン酸の含量を増やす) ならびにソーマチン遺伝子 (甘味タンパク質) を持つ、トマト用の形質転換ベクターを構築し、子葉へのパーティクルボンバードメントを行っているが、現在までに組換え体は得られていない。

### 3) パンコムギにおける葉緑体形質転換系の開発

葉緑体の遺伝子組換えを行う場合、実験が成立する大前提として、パーティクルボンバードメント法でプラスミドDNAを撃ちこむ外植片が、個体にまで再分化する能力を有していることが挙げられる。前述のタバコやレタスでは成葉、トマトでは子葉を外植片として用いることができるが、コムギでは再分化能力を持つ組織は限られており、未熟胚とそれに由来するカルスを外植片に用いざるを得ない。しかも未熟胚は、アカダルマやBob Whiteといった特定の品種の、受粉後2週間のものが良いとされる。このようにコムギでは、極めて限定された植物材料を用いて、葉緑体形質転換系の開発を行う必要がある。京都産業大学でコムギを栽培する場合、設備の制約から年一回しか材料を調製できない（12月にビニールハウスへ幼苗を移植、5月に未熟胚の単離を行う）。そこで平成24年度、25年度に続き、平成26年度も「葉緑体形質転換に適した緑色カルスを形成するコムギ実験系統の開発」という課題名で、共同利用・共同研究拠点である鳥取大学の乾燥地研究センターに共同研究を申請し採択された。この共同研究により、先方の人工気象器を用いて8月に播種、12月に未熟胚の単離を行うことができ、年二回の材料調製が可能となった。昨年度は、おおよそ2万個の未熟胚を単離・培養し、これから生じたカルスを外植片としてパーティクルボンバードメントを繰り返しているが、組換え体は得られていない。

その原因のひとつに、未熟胚由来のカルス存在する色素体は、未分化なプロプラスチドであり、直径0.6 μmの金粒子を用いる今のパーティクルボンバードメント法では、プロプラスチ

ドが小さすぎることが考えられた。そこで昨年度から実験の戦略を修正し、まず、コムギで再分化可能な緑色のカルスを得ることに挑戦することにした。イネを用いた先行研究では、葉緑体の発達に必要な核の転写因子である GLK を強発現させることで、実際に未熟胚から緑色のカルスを得ることに成功したとの報告がある。現在、コムギの GLK 遺伝子を持つプラスミドコンストラクトが構築できたところであり、次年度にむけて実験の準備をしている。

## 2. 高等植物のミトコンドリアゲノムの解析

### 1) 栽培・野生ダイコンのミトコンドリアゲノムの変異と進化に関する研究

我々はこれまでに栽培ダイコンの一品種‘打木源助’と、これと同じ核を持ちながら細胞質雄性不稔 (CMS) を示す‘MS 源助’、のダイコンのミトコンドリアゲノムの解読を初めて行った (Tanaka *et al.* 2012, BMC Genomics 13(1): 352)。この研究は、次世代シーケンサー (Rosch 454) を比較的早くに、植物のミトコンドリアゲノムの完全解読に取り入れたものであり、‘打木源助’のいわゆる「正常型」ミトコンドリアゲノムは 244,036 bp の、また‘MS 源助’のオグラ型ミトコンドリアゲノムは 258,426 bp の、それぞれ環状マスターサークルであることを証明することができた。この研究ではまた、両者のミトコンドリアゲノムは 11 のシンテニー領域から構成されていること、両者の違いは短いリピート配列を介したシンテニー領域の再構成の結果であること、CMS の原因遺伝子であるミトコンドリアの *orf138* は、オグラ型に固有の 15 kb の配列に含まれており、進化にともなうゲノムの再構成の過程で偶然生じたものであることなどがわかった。

これまでの研究で、ダイコンのミトコンドリアゲノムには、上記の 2 つのタイプの他に、大きく‘クロダイコン’、‘大阪四十日’、‘青長ダイコン’の 3 つのタイプ (いずれも雄性不稔を引き起こさない) が存在していることが知られており、これらの比較ゲノム解析により、ダイコンの分化や進化について、貴重な情報を得られるものと考えている。そこで先行研究の実験方法を踏襲し、昨年度は、上記のダイコン品種が持つミトコンドリアゲノムの概要配列データを次世代シーケンシングにより得た。現在、サンガー法による塩基配列の最終確認、遺伝子のアノテーションなどゲノム解読のフィニッシング作業を終えたところであり、論文化を進めている。

### 2) ダイコンに雄性不稔をもたらすアブラナ科野生植物のミトコンドリアゲノムの解読

F<sub>1</sub> 品種が主流となっている現在のアブラナ科野菜の育種において、雄性不稔をもたらす細胞質は非常に重宝されている。しかし、T 型細胞質雄性不稔のみに頼った米国のトウモロコシ栽培が、ごま葉枯れ病により深刻な被害を受けた過去の事例などから、農作物の F<sub>1</sub> 育種には、複数の雄性不稔細胞質を利用して遺伝的多様性を確保することが望まれている。

現在ダイコンでは、前述のオグラ型細胞質を利用した F<sub>1</sub> 育種が主流となっており、これに代わる新規の雄性不稔細胞質の開発が望まれている。宇都宮大学では、連続戻し交配によるダイコンへの異種細胞質の導入実験が精力的に進められており、その結果、アブラナ科の野生種のひとつ、*Brassica maurorum* の細胞質を導入したダイコンが雄性不稔を示すことが発見されている。しかしながら、この細胞質の分子的な解析は全く行われていなかった。

そこで、本研究では、*B. maurorum* の CMS の原因遺伝子の同定を目的とし、次世代シーケンサーを用いて、ダイコンに導入された *B. maurorum* のミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定した。実験の途中経過は、昨年度の総合学術研究所所報に報告したが、その後の実験で、*B. maurorum* のミトコンドリアゲノムは全長 237,175 bp の環状 DNA であり、そのゲノム上には 30 種類のタンパク質、18 種類の tRNA 遺伝子、および 3 種類の rRNA 遺伝子が座乗していることがわかった。この研究の特筆すべき点として、*B. maurorum* では、高等植物のミトコンドリアゲノムの特徴のひとつである相同組換えに関与するリピート配列が存在せず、ミトコンドリアゲノムがマスターサークルだけで存在している可能性が示されたことが挙げられる。また、何らかの機能を持つかもしれない未知のオープンリーディングフレーム (*orf*) について、Northern 解析および RT-PCR により発現を調べたところ、*B. maurorum* のミトコンドリアゲノムに特異的な新規 *orf* (*orf117*) が見つかったことも挙げられる。この *orf117* は、*B. juncea* において CMS との関連が予想されている *orf108* 遺伝子に配列が類似しており、*atp1* 遺伝子の上流に位置することも共通していた。このことから、*B. maurorum* では *orf117* が CMS の原因遺伝子である可能性が高いと考えられた。

### 3) コムギと近縁種のミトコンドリアゲノムの解読

本研究は、平成 26 年度に採択された、文科省科研費、基盤研究 (B) 「ゲノム解読を基盤とする高等植物ミトコンドリアゲノムの包括的研究」の一部として、パンコムギとその近縁種のミトコンドリアゲノムの解読を実施するものである。上記 1)、2) に述べたダイコンとその近縁種 (アブラナ科) の研究に加え、パンコムギとその近縁種 (イネ科) という 2 つの異なる分類群を研究対象とすることで、高等植物ミトコンドリアゲノムの構造と機能、ならびに変異と進化に関する包括的な研究を行うことができる。そのため本研究では、次世代シーケンサーを活用して、より多くの植物種のミトコンドリアゲノムの解読を行うとともに、バイオインフォマティクスの手法を積極的に取り入れ、全塩基配列ベースでゲノム構造の比較解析を行う。また、新しい試みとして、分子コーミング法によるミトコンドリア DNA の視覚化を行い、ゲノム構造に関する物理的な情報を得ることに挑戦している。基盤研究では、ミトコンドリアゲノム上に多数見つかる新規 ORF にも着目し、大腸菌とタバコ葉緑体を用いた発現解析を通じて、これら ORF の機能を明らかにすることも予定している。平成 26 年度は *Aegilops searsii*、*Triticum monococcum*、*T. spelta*、およびライムギのイネ科植物 4 種について、

概要配列データを取得した。

#### 4) タマネギのミトコンドリアゲノムの解読

タマネギ (*Allium cepa*) はネギ科ネギ属の作物で、食用ならびに薬用として古くから世界中で栽培されている。タマネギでは現在、 $F_1$  育種が主流であり、 $F_1$  育種には CMS が利用されている。タマネギの CMS は 90 年も前 (1925 年) に発見されているが、生物学的な知見は限られており、CMS に関連するミトコンドリアゲノムの研究も遅れている。そこで、今年度初めて、タマネギのミトコンドリアゲノムの研究を行った。予備実験では、タマネギの鱗茎 (いわゆるタマネギの可食部分) がミトコンドリア単離の良いソースとなること、また単離したミトコンドリアから純度の良い DNA を比較的少量に調製可能なことがわかった。ネギ属植物の専門家である山口大学農学部の実行教授との共同研究により、CMS 型と Normal 型の細胞質を持つタマネギをそれぞれ入手し、実験を進めている。現在、両型のミトコンドリアゲノムの概要配列を取得したところであり、ゲノムの完全解読により、CMS 型と Normal 型を分けている遺伝子は何なのか、Normal 型と系統的にかけ離れた CMS 型のミトコンドリアの由来となっている植物は何なのかなど、学術的な知見を得る予定である。

### 3. 有用作物における雄性不稔と稔性回復の分子機構

#### 1) ナスの稔性回復遺伝子の単離

我国の重要な野菜の 1 つであるナスは、極めて顕著な雑種強勢を示す。このため古くから  $F_1$  育種が行われており、我国の実用的な品種はほぼすべて  $F_1$  品種である。しかしながら、ナスの  $F_1$  育種は今日まで、人工的な除雄と人工授粉によって行われており、効率的で確実な  $F_1$  採種には至っていない。ナスの  $F_1$  育種の効率化のために、現在、CMS-稔性回復系の開発と利用が強く期待されている。本研究は、CMS を利用したナスの  $F_1$  品種に必須である稔性回復遺伝子を単離するとともに、国内外のナスの遺伝資源において利用可能な DNA マーカーを開発することを目的としている。

これまでの研究により、ナス属野生種に由来する雄性不稔の原因遺伝子候補が単離されている。これに対する稔性回復遺伝子を単離することは、CMS-稔性回復系という植物育種にとって極めて重要な現象のメカニズムを明らかにする意義をもつ。また稔性回復遺伝子の DNA マーカーの開発は、この系を利用した効率的な  $F_1$  育種を、民間育種機関を含めて広く普及させることに貢献する。

これまでに、ナスの耐病性台木用品種 '耐病 VF' に由来する細胞質雄性不稔系統が作出される一方、それに対する稔性回復遺伝子 (*Rf* 遺伝子) に近接する DNA マーカーが開発されている。これらのマーカーを用いたトマトゲノムとのマクロシテニー解析から、*Rf* 遺伝子は

ナスの第6連鎖群に座乗することが明らかになっている。一方、野菜茶業研究所によるナスの高密度連鎖地図によって、第6連鎖群上には100個を超えるDNAマーカーが作り出されている。

本研究は、野菜茶業研究所などとの共同研究の成果に基づき、ナスの花粉稔性回復遺伝子を単離すること、ならびに、この遺伝子のDNAマーカーを開発することを目標とする。具体的には、*Rf* 遺伝子に関する大規模な分離集団を用いて多量のSSR連鎖マーカーを適用し、花粉稔性との対応関係を評価することで、稔性回復遺伝子座位を特定する。その上で、ナス（またはトマト）ゲノムにおけるマイクロシntenニーを活用した稔性回復遺伝子領域の絞り込み、染色体歩行、候補遺伝子（群）の機能解析と相補試験を進め、稔性回復遺伝子を同定・単離する。この過程で得られたDNAマーカーは、民間育種機関等が保有するナスの遺伝資源について、*Rf* 遺伝子の有無を広く評価することを可能にする。

昨年度は、*Rf* 遺伝子の分離集団（500～1,000個体）について、連鎖地図上での*Rf* 遺伝子座位を特定すること、ならびにナスBACライブラリーの作製準備を進め、今後の研究の基礎を固めた。現在は、*Rf* 遺伝子座に近接するSSR配列を含んだ、ナス（またはトマト）のゲノム配列情報を取得しており、このSSR周辺に存在する構造遺伝子のイントロン配列などの変異に基づき、新たなSTSマーカーの作製と、分離集団のジェノタイプングによる組換え個体の検出を行っている。最終的には、*Rf* 遺伝子の遺伝子型がホモ (*Rf/Rf*) の個体由来する、ナスBACライブラリーの中から、*Rf* 遺伝子近傍のマーカーを含むクローンをスクリーニングし、選抜されたクローンの末端マーカーを作製し、染色体歩行を行う予定である。

#### 4. その他

##### 1) 斑入りを示す組換えタバコの葉緑体ゲノムの構造変異

この研究は、1. 1) に記した、タバコの葉緑体の遺伝子組換え実験から派生したものである。この研究は、植物の「斑入り」に関するものであるが、観察される現象が極めてユニークで、オルガネラDNAの複製や組換え機構を解明する良いモデルになる可能性があり、植物科学における学術的な意義が大きいと考えられるので、当初から研究計画に組み入れられている。植物における「斑入り」自体は、古くから良く研究されてきたものであり、遺伝的あるいは非遺伝的な原因で生じる。斑入りは核やオルガネラの遺伝子の突然変異によって生じるし、また、部分的な遮光、病原体からの攻撃、栄養不足などを原因とする場合もある。本研究に用いた組換えタバコは、本来、植物のストレス耐性を向上させることを目的に行われていた実験の過程で作出されたものであり、栽培タバコ (*Nicotiana tabacum*, cv. SR1) の葉緑体ゲノムへ、栽培タバコの核ゲノムに存在する *apx* 遺伝子が導入されている。*apx* 系統は、独立に3系統 (*apxA*、*apxB*、*apxC*) 作出されており、このうち2系統 (*apxB*、*apxC*) で斑入りが観察される。最

初に得られた組換え体 (apxC) が斑入りを示したため、当初この斑入りは、導入された *apx* 遺伝子の強発現によるものと思われていた。しかし、後に斑入りを示さない *apxA* 系統が得られたことで、斑入りが生じる原因は導入遺伝子のほかにあると予想された。本研究では、この斑入りの原因を探ることを目的に、組換え体の葉緑体ゲノムの解析を行った。

透過型電子顕微鏡を用いて、SR1 と斑入りを示す組換え体 *apxC* の葉緑体を観察したところ、*apxC* 系統の葉緑体では、野生型に比べ、チラコイドの発達が未熟であった。また SR1、*apxA*、*apxB* および *apxC* の各系統から精製した葉緑体 DNA を制限酵素 *Hind* III によって処理したところ、SR1 と *apxA* では多数の *Hind* III 断片が観察されたが、斑入りを示す *apxB*、*apxC* 系統では切断パターンに違いが見られた。斑入り系統の葉緑体ゲノムの違いを明らかにするため、次世代シーケンシングのデータを用いて、各系統の葉緑体ゲノムの物理地図の作成を行った。斑入りを示さない *apxA* 系統では、予想される葉緑体の IR 領域に遺伝子が導入されており、全体のゲノムサイズが SR1 よりも約 6 kbp 大きい約 162 kbp になっていた。一方、斑入りを示す系統では、導入 *apx* 遺伝子の *rps16* ターミネータと、葉緑体の LSC 領域にもとから存在する *rps16* 遺伝子のターミネータ間で相同組換えを起こし、片方の IR 領域から約 22 kbp の小さな環状 DNA 分子 (以下 Mini-Circle) がループアウトして、残りの約 140 kbp の環状 DNA 分子 (Large-Circle) と共存していることが示唆された。本研究では、この Mini-Circle を Long-PCR によって確認し、ファイバー FISH 法を用いて可視化を試みた。

ところで、この組換え体の斑入りは、京都産業大学のインキュベーターや閉鎖系温室で栽培すると必ず現れるが、共同研究先 (京都府立大学) で栽培すると、条件によって斑入りが出現しない場合があるとの報告があった。そこで 18℃、21℃、24℃、27℃、30℃ の 5 つの異なる温度条件のインキュベーターで、各系統を育成したところ、SR1 と *apxA* 系統では、いずれの温度でも斑入りは観察されなかった。一方、*apxB*、*apxC* 系統では、特に低温で栽培した個体には著しい斑入りが観察され、30℃ では斑入りがほぼ消失した。低温で栽培した個体では Mini-Circle のコピー数が著しく増加することから Mini-Circle と斑入りの関係が示唆される。本研究における発見は、平成 27 年度に採択された、文科省科研費挑戦的萌芽研究の基礎となった。

## 2) ゲノム編集による新しい遺伝子改変技術の検討

ゲノム編集とは、ゲノム中の特定の遺伝子のみ塩基の欠失をもたらしてその遺伝子を破壊する、特定の遺伝子のみ他の遺伝子をノックインするなどの新しい遺伝子改変技術であり、近年は TALEN や CRISPR/Cas などの細胞種や生物種を問わず、極めて効率の良い方法が開発され大きな注目を集めている。ゲノム編集は、植物育種分野においても、変異作出の方法として有望であり、いわゆる NBT (New Breeding Technique) のひとつとしてカルタヘナ法による規制の対象から外れ、結果として、これまでの遺伝子組換え技術に置き換わる可能性



を秘めていることから、当センターでもその研究動向に注意をはらっている。本年度は、細胞の分化や発生に関わる分子の機能を解明するため、モデル生物（メダカ）や培養細胞を対象に、これらの新しいゲノム編集技術を用いて変異体の作製を試みた。

TALEN とは、DNA 結合ドメインと DNA 切断ドメイン（FokI）を融合させた人工 DNA スクレアーゼである。TALEN によるゲノム編集では、ゲノムの標的塩基配列の上流と下流に結合する 1 対の TALEN を設計する。それぞれの TALEN が目的配列に結合すると、TALEN 分子末端のエンドヌクレアーゼ FokI が標的塩基配列近傍で 2 量体を形成して活性化されるために、標的配列に高い特異性で DNA の 2 本鎖切断を引き起こす。

CRISPR/Cas システムは、RNA 誘導型ヌクレアーゼによるゲノム編集法であり、TALEN よりも新しく、より有力な方法である。真正細菌や古細菌の獲得免疫機構を応用する CRISPR/Cas では、目的遺伝子中の標的塩基配列に相補的な RNA 配列と、Cas スクレアーゼの誘導に必要な RNA 配列を連結させた RNA を合成する。細胞の中に、この RNA とヌクレアーゼ Cas9 をコードする RNA を同時に導入すると CRISPR RNA は特異的に標的 DNA に結合するとともに、Cas9 RNA より合成された Cas9 スクレアーゼをその部位に誘導し、標的遺伝子に 2 本鎖切断を引き起こす。

TALEN あるいは CRISPR/Cas により 2 本鎖切断された標的部位は、non-homologous end joining (NHEJ；非相同末端結合) により修復される。NHEJ による DNA 修復は忠実度が低く、DNA 末端の接合部においてしばしば塩基の欠失や挿入が生じる。その結果、標的遺伝子にフレームシフトやアミノ酸置換などの変異が導入され、目的遺伝子が破壊される。

本年度は、標的遺伝子に対して設計した TALEN をコードする RNA、あるいは CRISPR/Cas RNA をモデル生物の初期胚にマイクロインジェクションし、変異体作製を試みた。インジェクション胚からはゲノム DNA を抽出し、HMA (heteroduplex mobility assay) アッセイにより、変異の導入を確認した。今後はかけあわせを重ね、ヘテロ変異体、さらにホモ変異体を作製する予定である。

## Development of new biotechnologies by utilizing the information on nuclear and organelle genomes and their application to plant breeding

Toru TERACHI

### Abstract

Plant Organelle Genomics Research Center conducts a research project entitled “Development of new biotechnologies by utilizing the information on nuclear and organelle genomes and their application to plant breeding” with the goal of developing more efficient plant breeding techniques. The center takes over several studies that had been performed in a previous research center (Plant Organellar Genome RC), and conducts exploratory research related to plant organelle genomes. Research subjects in this fiscal year are as follows:

1. Production of useful plants by chloroplast transformation
  - 1) Evaluation of transgenes in transplastomic tobacco
  - 2) Production of transplastomic lettuce and tomato
  - 3) Development of the chloroplast transformation system for wheat
2. Comprehensive studies on the mitochondrial genome of higher plants
  - 1) Studies on diversity and evolution of mitochondrial genome in wild and cultivated radishes
  - 2) Mitochondrial genome analysis of the CMS radish with the cytoplasm of a wild *Brassica* species
  - 3) Mitochondrial genome analysis of wheat and its related species
  - 4) Mitochondrial genome analysis of onion
3. Studies on the molecular mechanism for the fertility restoration of CMS
  - 1) Isolation of a fertility restorer gene from eggplants
4. Others
  - 1) Structural variations of the chloroplast genome found in variegated transplastomic tobacco
  - 2) Studies on a new gene-manipulation technology by genome editing

**Keywords:** chloroplast genome, mitochondrial genome, transplastomic, genome analysis, CMS