

## 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 28 年 5 月 20 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では、「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」と題する 5 カ年計画のプロジェクトを実施している。このプロジェクトに含まれる実験課題は多岐にわたるが、大きくは、1) 葉緑体の遺伝子組換え、2) ミトコンドリアゲノムの構造解析、3) その他、の 3 つに分けられる。また、それぞれのカテゴリーの中で、基盤的な研究、さらには萌芽的な研究がなされている。本稿では、今年度の実施した、以下の 7 つの課題について報告する。

1. 有用遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えレタスならびにトマトの作出
2. パンコムギにおける葉緑体形質転換系の開発
3. 斑入りを示す組換えタバコの葉緑体ゲノムの構造変異
4. イネ科植物のミトコンドリアゲノムの解読
5. タマネギのミトコンドリアゲノムの解読
6. ナスの稔性回復遺伝子の単離
7. 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：葉緑体形質転換、ミトコンドリアゲノム、ゲノム解読、稔性回復遺伝子、ゲノム編集

以下に平成 27 年度の研究の詳細について報告する。

### 1. 有用遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えレタスならびにトマトの作出

昨年の所報にも記されているように、「葉緑体の遺伝子組換え」は、平成 20 年度～平成 24 年度の私立大学戦略的研究基盤形成事業で集中的に実施されてきた課題である。その後の研究

を経て、当センターの前身である植物オルガネラゲノム研究センターでは、モデル植物であるタバコやベンサミアナタバコの葉緑体ゲノムへ、任意の遺伝子をほぼ確実に導入する実験技術を開発することに成功した。そこで当センターでは、この実験技術をレタス、トマト、パニコムギなどの作物に適用し、有用な植物を作出することをめざしている。

葉緑体の組換え体には、導入遺伝子の強発現が期待される、花粉による遺伝子拡散の懸念がない、一度に多数の遺伝子を導入できるなど、通常の核の組換え体に比べて、いくつもの利点があることは良く知られている。当センターで実験の対象としているレタスは、葉物野菜の代表的なもののひとつであり、生育が比較的早く、葉の収量も多い。また水耕栽培のシステムも確立されていることから、葉緑体の組換え技術を適用するのに適した作物であると考えられる。昨年度、レタスの葉緑体の組換え実験を行うにあたり、注目したのがグルタチオン (GSH) である。GSH は、グルタミン酸、システインおよびグリシンからなるトリペプチドで、生活習慣病の予防や肝機能の向上などに効果があるとの報告がある。人の体内の GSH は加齢と共に減少するとされ、アメリカではグルタチオン療法やサプリメントなど、GSH を補う方法が開発されている。一般に GSH の合成には  $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素 (*gsh1*) とグルタチオン合成酵素 (*gs*) の 2 種類の酵素が関与する。我々は以前、この 2 種類の酵素をコードする 2 つの遺伝子をそれぞれダイコンから単離し、タバコの葉緑体ゲノムへ導入して強発現させることに成功した。その結果、GSH の前駆体を合成する *gsh1* が GSH 合成経路の律速であるという結果を得た。そこで本研究では、レタスを材料に、ダイコンの *gsh1* 遺伝子を葉緑体ゲノムへ導入して強発現させ、GSH を多く含むレタスを作成することを試みた。このレタスは GSH を工業的に精製する際のプラットフォームとして利用できる可能性があり、また究極的には、このレタスを食用とすることで、より手軽に GSH を摂取できるようになることが期待される。今回、導入に用いた *gsh1* は、ダイコンの葉から RT-PCR によって得られたもので、全長 cDNA 配列からトランジットペプチド (TP) をコードする部分を除いたものを導入コンストラクトの作成に使用した。葉緑体内で働く *psbA* プロモーターと *rps16* ターミネーター (いずれもタバコ由来) を *gsh1* のコード領域に連結し、レタス用の葉緑体形質転換ベクターにクローニングした。なお、このベクターは、マーカー遺伝子として *aadA* を持つので、組換え体を抗生物質 (スペクチノマイシン) で選抜することが可能である。無菌的に 4 週間生育させたレタス (品種: キングクラウン) の葉の主脈と葉縁部を切断し、前培養培地を入れたシャーレの中央に、葉の裏面が培地に接するように置いて遮光状態で 1 日間、24℃ でインキュベートした。1 シャーレにつき 1 ショットずつ、導入コンストラクトを撃ち込んだ。その後再び、葉を遮光状態で 2 日間、24℃ でインキュベートした。インキュベート後、葉を 3mm 角に切断して、選抜培地 (前培養培地にスペクチノマイシンを入れたもの) を入れたシャーレに置床し、組換え体の候補を選抜した。その後 2 週間ごとに葉片を新しい培地に植え換え、組換え体の選抜を継続した。計 65 回のパーティクルボンバードメントを行った結果、約 2 ヶ月後に 2 つの

カルス（A と B）が得られた。しかし、カルス A は生育不良で、シュートは得られなかった。もう一つのカルス B からは、図 1 のようなシュートが、計 8 つ得られた。しかしながら、得られたシュートのうち 2 つはガラス化、1 つは馴化の段階で枯れたので、最終的にはカルス B から 5 つの組換え体を鉢あげした。組換え体を馴化後、閉鎖系温室で育て、表現型を観察したところ、野生型と比べ大きな差は見られなかった（図 2）。

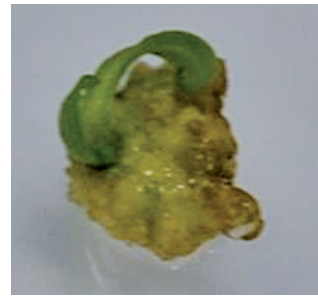


図 1 組換えレタスのシュート

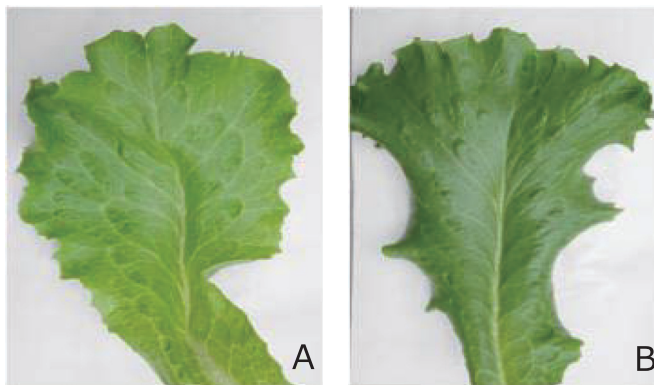


図 2 野生型 (A) および組換え体 (B) レタスの表現型

組換え体の特徴付けを行うため、まず組換え体から全 DNA を調製し、PCR を用いて導入遺伝子の検出を行った。図 3A の PCR ではレタスの葉緑体ゲノムに特異的に結合するプライマーと *aadA* 内に特異的に結合するプライマーのペアを用いた。また、図 3B の PCR ではレタスの葉緑体ゲノムに特異的に結合するプライマーと *gshI* 遺伝子に特異的に結合するプライマーのペアを用いた。図 3A、B で示した PCR では、いずれの場合も予測される約 2.3kb の大きさのバンドが増幅し、目的遺伝子が葉緑体ゲノムの標的部位に正しく導入されていることが示唆された。

続いて各個体の葉から全 DNA を調製し、2 $\mu$ g を制限酵素 *SacII* で消化した後、消化物を電気泳動で分離し、ナイロン膜に転写してサザン解析を行った。*gshI* プロローブを用いたサザン解析（図 4A）では、野生型にはハイブリダイゼーションのシグナルが見られない一方、組換え体のすべてにシグナルが観察された。葉緑体プロローブを用いたサザン解析（図 4B）では、野生型には約 1.5kbp の大きさのシグナルが検出されたのに対し、組換え体には約 2kbp と約 3kbp の 2 本のシグナルが検出された。これらの結果から、組換え体の葉緑体ゲノムの標的部位に目的遺伝子（*gshI*）が導入されていること、組換え体はホモプラスミックな状態であることがわかった。

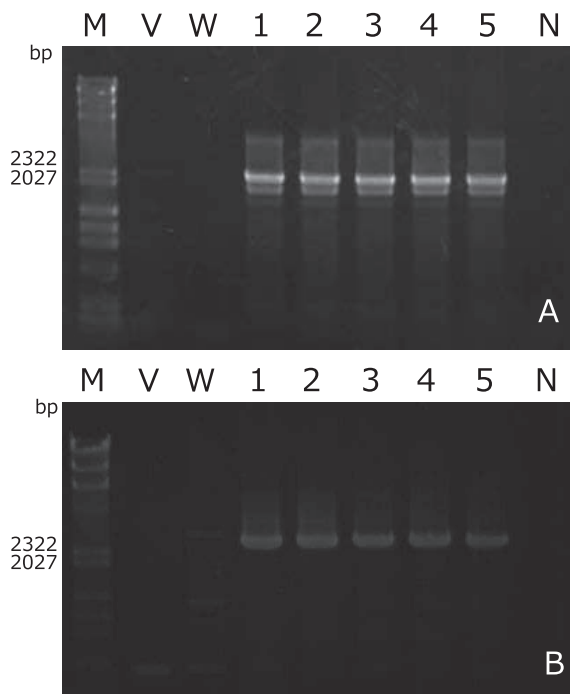


図3 PCR産物の電気泳動

M: 分子サイズマーカー、V: ベクター DNA、W: 野生型、1~5: 組換え体、N: dH<sub>2</sub>O

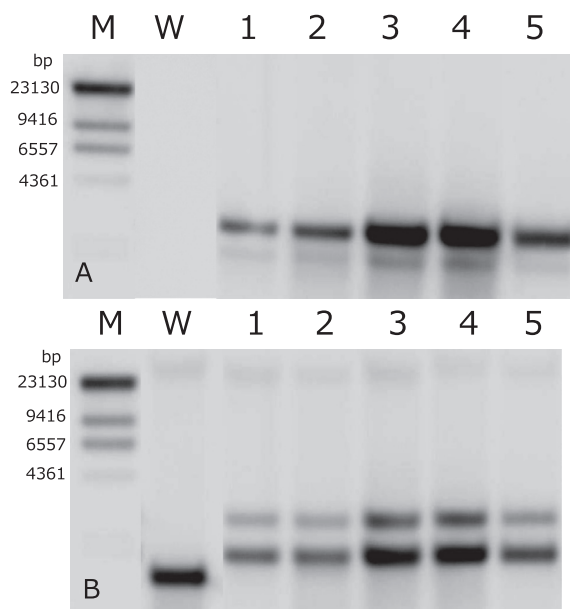


図4 サザン解析

M: 分子サイズマーカー、W: 野生型、1~5: 組換え体

さらに各個体の葉から全 RNA を調製し、その 2 $\mu$ g を電気泳動後にナイロン膜に転写して、*gsh1* プロブで転写物の検出を行った。その結果、野生型にはシグナルが見られないのに対し、組換え体にはシグナルが観察されたことから、導入した *gsh1* 遺伝子が RNA に転写されていることがわかった (図 5)。同仁化学研究所の Total Glutathione Quantification Kit を使用し、pseudo-endpoint 法によりグルタチオン量を測定した。その結果、野生型と *gsh1* 導入個体間に大きな差は見られなかった (データ未掲載)。*gsh1* 遺伝子導入領域の塩基配列を決定するため、組換え体由来する PCR 産物のダイレクトシーケンシングを行った。その結果、*gsh1* 遺伝子と開始コドンの間に 2 塩基 (AT) の挿入があり、今回作成した組換え体は、フレームシフト変異を持つことが明らかとなった (図 6)。

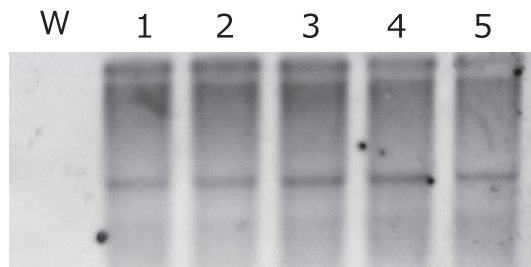


図 5 ノーザン解析

M：分子サイズマーカー、W：野生型、1～5：組換え体

	10					20					30					40					50					60																
	D	R	S		K	R	G		H	Q	L	I		V	A	A		S	P	P		T	E	E	A																	
M	I	G	A		R	E	G		I	S	*		L	L	R	R		V	L	P		Q	R	R																		
ATGATAGGAG CAAGAGAGGG CATCAGTTGA TTGTTGCGGC GAGTCCTCCC ACAGAGGAGG																																										
	70							80							90							100							110							120						
	V	V	A		T	E	P		L	T	R	E		D	L	I		A	Y	L		A	S	G	C																	
	L	W	S	P		L	S	R		L	R	E		R	T	S	L		L	I	S		P	L	V																	
CTGTGGTTCG CACTGAGCCG CTTACGAGAG AGGACCTCAT TGCTTATCTC GCCTCTGGTT																																										
	130							140							150							160							170							180						
	K	P	K		D	K	W		R	I	G	T		E	H	E		K	F	G		F	E	V	N																	
	A	N	L	R		T	N	G		G	L	V		Q	S	M	R		S	L	V		L	R	L																	
GCAAACCTAA GGACAAATGG AGGATTGGTA CAGAGCATGA GAAGTTTGGT TTTGAGGTTA																																										
	190							200							210							220							230							240						

図 6 組換え体へ挿入された *gsh1* 遺伝子の塩基配列

フレームシフト変異をもたらす 2 塩基の挿入を枠で囲んだ

以上の結果をまとめると、今回、計 65 回のパーティクルボンバードメントの結果、1 系統 5 個体のレタスの組換え体を作成することに成功した。PCR とサザン解析の結果から、*gsh1* 遺伝子が組換え体の標的部位に導入されていることが証明され、ノーザン解析の結果から、導入遺伝子が転写されていることが確認された。しかしこの組換え体は、*gsh1* 遺伝子の開始コドン直後にフレームシフト変異を持ち、これが原因で GSH タンパク質を発現していないこと

がわかった。現在、このフレームシフト変異を修正した新しい形質転換ベクターを用いて、再度レタスの組換え体を作成している。

トマトは、モデル植物であるタバコと同じナス科の植物であり、すでに米国や独国の研究室では、いくつかの興味深い組換え体が得られている。これらの組換え体では、葉の葉緑体における発現の約 50% 程度ではあるものの、果実中の色素体においても、導入遺伝子由来のタンパク質が高発現していたと報告されている。我々は実験系統マイクロトムの子葉を用いた植物の再分化系のプロトコルを、筑波大学形質転換植物デザイン研究拠点から当センターへ移植し、この子葉を遺伝子導入の際の外植片として使用している。

いくつかの先行研究を受け、甘味タンパク質であるソーマチンをコードする *thaumatin* 遺伝子をトマト葉緑体ゲノムに導入し、それを強発現させることで、甘味性の強いトマトを作成する事が可能ではないかと考えた。ソーマチンは西アフリカ原産の植物の果実 (*Thaumatococcus daniellii*) から抽出される 207 個のアミノ酸残基からなるタンパク質で、ショ糖に比べてモル比で 10 万倍の甘味を示すとの報告がある。また、一本鎖のポリペプチドからできた非常に単純な構造のタンパク質であり、糖などによる修飾も受けず熱や酸性環境に安定であるとの報告がある。このことから、葉緑体で発現させたソーマチンは機能を持つと予測した。昨年度はその手始めに、*thaumatin* 遺伝子をモデル植物のタバコの葉緑体ゲノムに導入する実験を行い、*thaumatin* 遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換え体を初めて得ることに成功した。すなわち、合計 30 ショットで 14 個のシュートが得られ、そこから 10 個の再分化個体を得られた。再分化個体に対して *thaumatin* 遺伝子配列に特異的なプライマーを用いて PCR を行った結果、2 個体で増幅産物が認められた。この 2 個体のうち 1 個体は 4 つに株分けして、また 1 個体は株分けせずに、それぞれ鉢上げして、最終的に 5 個体の組換え体 (T<sub>0</sub>) を開花結実させた。サザンおよびノーザン解析の結果、株分け個体の 2 個体と、株分けしなかった 1 個体の合計 3 個体で、遺伝子の導入・転写が認められた (データ未掲載)。しかしながら、SDS-PAGE およびウェスタン解析の結果、ソーマチンタンパク質の発現は認められなかった (データ未掲載)。予期に反し、なぜタンパク質レベルの発現が見られなかったのか、原因は今のところ不明であり、その解明は今後の課題となっている。

またトマトについては、マイクロトムの子葉を外植片として、パーティクルボンバードメントを行った。計 72 ショットで 8 個のシュートが得られたものの、このシュートを再分化させて得た個体から DNA を調製し、*thaumatin* 遺伝子配列に特異的なプライマーを用いて PCR を行った結果、いずれの個体にも遺伝子の導入は認められなかった。言うまでもなくトマトにおける葉緑体の組換え体の作出は当センターの大きな課題のひとつであり、今後も研究を継続する (担当: 植村香織、大森健人、阿部こころ)。

## 2. 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植物を作出するための大前提は、プラスミド DNA を撃ち込むのに用いる植物の外植片が、個体にまで再分化できるかどうかである。前述のタバコやレタスでは成葉、トマトでは子葉を、それぞれ外植片として用いると、再分化個体を得ることができるが、コムギでは再分化能力を持つ組織は限定されており、未熟胚あるいはそれに由来するカルスのみである。しかも未熟胚は、特定の品種（アカダルマおよび Bob White）の受粉後 2 週間±1 日のものが要求され、それ以外のものではカルス化の効率が著しく悪い。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。当センターでは、設備の制約から、年 1 回しかコムギの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 26 年度に続き昨年度も、鳥取大学の乾燥地研究センターと「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」という課題名の共同研究を実施した。この共同研究では、先方の人工気象器を用い、8 月に播種、12 月に未熟胚の単離を行うことができるので、年 2 回の材料調製が可能となる。

コムギでは、これまで葉緑体の組換え体は全く得られていない。この実験の難しさの原因は、DNA を撃ち込む未熟胚由来の黄白色のカルスでは、葉緑体が未発達の状態で留まっていることにあるのではないかと考察した。そこで本研究ではまず、より葉緑体形質転換に適していると思われる、再分化能力のある緑色カルスを生じるコムギの系統を作出することをめざした。そのため、葉緑体の発達を促す転写因子である GLK (golden2 like) に着目し、コムギ GLK 遺伝子をパーティクルガン法によりコムギの核ゲノムへ導入して過剰発現させ、緑色カルスを形成する系統を得ようとした。

高い再分化能を持つカルスを得るため、未熟胚単離に用いるコムギを、乾燥地研究センターのグロースチャンパー内で、光量と温度を厳密に管理して育てた。単離した未熟胚を 2, 4-D (2mg/L) を含む LS 培地に置床して 25℃ で培養し、得られたカルスを遺伝子導入の外植片に用いた。遺伝子導入後、選抜培地上で育った 206 個の再分化個体から DNA を調製し、PCR によって導入遺伝子の有無を調査した。その結果、2 個体に GLK および選抜マーカー遺伝子 (*hpt*: ハイグロマイシン耐性遺伝子) が、また 3 個体に *hpt* のみが、それぞれ導入されていることがわかった (データ未掲載)。遺伝子が導入されていた個体はいずれも、未熟胚単離から遺伝子導入までの培養日数が 10 日間~15 日間のものに限られており、遺伝子導入のためにはカルスの培養日数が重要であることが示唆された。本実験で得られた個体は、現在も培養を継続中である。馴化後改めて DNA および RNA を調製し、導入遺伝子のコピー数、転写の有無などを調べる予定である (担当: 塚谷真衣、中村由依)。

### 3. 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、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。葉緑体の活性酸素の消去に関わる酵素（APX）の遺伝子を、タバコの葉緑体ゲノムに導入したところ、得られた組換え体3系統のうち、2系統で斑入りが観察された（図7 apx B、apx C）。これまでの研究で、この斑入り系統には、組換え型の葉緑体ゲノムの二次的な組換えで生じた、小さな環状DNA分子（ミニサークル）が大量に存在することが示されている。最近、斑入り系統を高温（30℃）で栽培すると、斑が消失するとともに、ミニサークルが減少することを見出した。この発見を手がかりに、温度ストレスと斑の形成、およびミニサークルの複製の関係を探ることを本研究の目的とする。

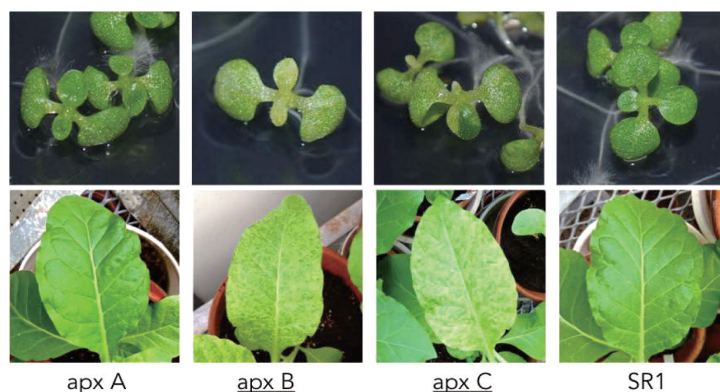


図7 組換えタバコの表現型

斑入り系統および野生型（SR1）の全DNA（あるいは葉緑体DNA）を抽出した。斑入り系統の葉緑体ゲノムに占めるミニサークルの割合を調べるため、抽出した全DNAを鋳型に、SYBR Greenを用いたRealtime PCR、Digital PCR、およびTaqMan probeを用いたRealtime PCRによって各DNA分子を定量した。また、斑入りの表現型を示す葉の細胞内でどのような現象が起きているのかを明らかにするため、電子顕微鏡を用いて葉緑体の形態観察を行った。ミニサークルと、ミニサークルが抜け落ちたあとの環状分子（ラージサークル）のコピー数の比を推定するため、図8の①と②で示した領域を、SYBR Greenを用いたRealtime PCR、Digital PCR、およびTaqMan probeを用いたRealtime PCRによって増幅・定量した。いずれの方法でも、斑入り系統であるapx B、Cにおいて、ミニサークル上に存在する①の領域が大幅に増加していることが示された（図9）。一方、今回の実験では、定量PCRの実験方法による違いも観察された。例えば、葉緑体ゲノムは環状なので、野生型タバコSR1における①および②で示した領域の存在比は理論上「1」となる。しかし、SYBR Greenを用いたRealtime PCRでは2.2倍、Digital PCRでは108倍もの差として検出された（図9A、B）。なお、TaqMan



probe を用いた Realtime PCR では、①と②で示した領域の差が0.96 倍となり、理論比に最も近い値となった（図9C）。これらの実験から、組換え体のミニサークルの割合を定量PCRでもとめられることがわかった。このことは組換え体の温度ストレスへの応答を正確にモニターする実験に道を開くものである。しかしながら、Digital PCR のプロトコルについては、さらなる改善が必要であると判断された。

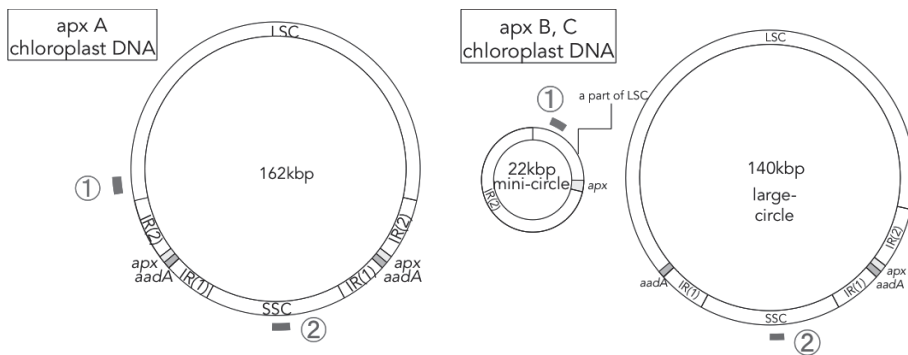


図8 組換えタバコの葉緑体ゲノムの構造

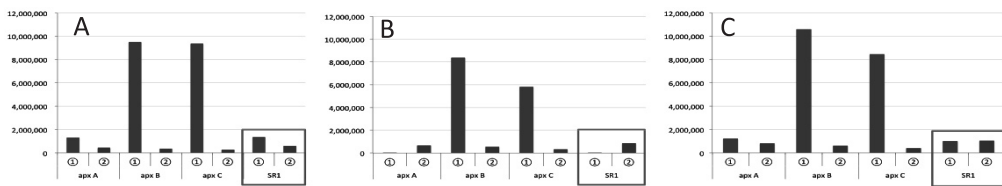


図9 異なる葉緑体 DNA 分子種の定量

左：Realtime PCR（SYBR-G）、中：Digital PCR、右：Realtime PCR（TaqMan）

電子顕微鏡を用いて各系統の葉緑体を観察したところ、斑入り系統では、葉緑体の形態に異常が認められ（丸みを帯びる）、グラナが崩壊しかかっているなど、その内部構造にも変化があった（図10）。このことから、組換え体ではチラコイド膜など葉緑体の膜に何らかの変化が生じていることが示唆される。今後、葉緑体の膜の形成・維持に関連する遺伝子を解析し、斑形成の分子的な機構を明らかにしたい（担当：植村香織）。

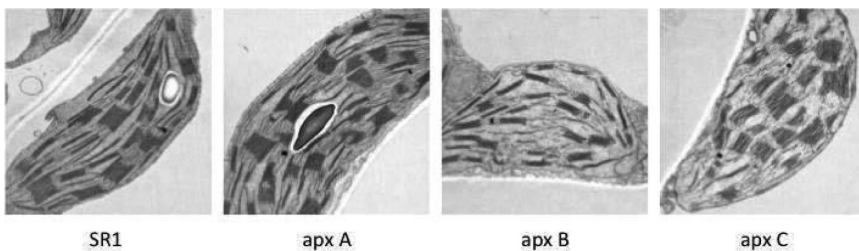


図10 葉緑体の透過電子顕微鏡像

#### 4. イネ科植物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が持つミトコンドリアゲノムの解読を実施するものである。これまで当センターで実施してきたダイコンとその近縁種 (アブラナ科) のミトコンドリアゲノムの研究に加え、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を目的としている。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的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、さらにはミトコンドリアゲノム上に多数見つかる新規 ORF の機能解析も視野に入れている。

昨年度は、既に概要配列データを取得してある *Aegilops caudata* および *Ae. searsii* (いずれも細胞質置換コムギを使用)、*Triticum monococcum*、*T. spelta* のフィニッシング (コンティグを繋ぐ DNA 断片を PCR 増幅し、サンガー法で塩基配列を確認する作業) を実施し、遺伝子のアノテーションなど、それぞれのゲノム配列を精査した。また、コムギと同じイネ科の作物であるライムギ、さらにイネ科のゲノム研究のモデル植物とされる *Brachypodium distachyon* の 2 種のミトコンドリアゲノムについても解読が進行中である。実験により決定した、各植物のミトコンドリアゲノムのサイズ、GC 含量 (%) を表 1 に掲げた (担当: 塚谷真衣、永島伊都子、植村香織)。

表 1 昨年度のミトコンドリアゲノム解読実験に用いた系統

Name	Nuclei	Cytoplasm	Mt Genome size (bp)	GC contents (%)
J02	<i>Triticum compactum</i>	<i>Aegilops caudata</i> polyathera KU6-1	441,673	44.20
C18	<i>T. aestivum</i>	<i>Ae. searsii</i>	MC1; 386,813	44.29
			MC2; 71,807	44.22
DV92	<i>T. monococcum</i>	<i>T. monococcum</i>	403,346	44.47
K52	<i>T. spelta</i>	<i>T. spelta</i>	459,361	44.37
Rye (Midget sample)	<i>Secale cereale</i>	<i>T. aestivum</i>	MC1; 368,259	44.16
			MC2; 365,538	44.07
<i>Brachypodium distachyon</i>	<i>B. distachyon</i>	<i>B. distachyon</i>	531,388	44.12

## 5. 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、古くから世界中で栽培されている作物で、現在は細胞質雄性不稔 (CMS) を利用した F<sub>1</sub> 品種が主流となっている。しかしタマネギでは、そのミトコンドリアゲノムは未だ完全に解読されておらず、構造やコードされている遺伝子の全体像も明らかになっていない。そこで本研究は、タマネギの雄性不稔細胞質 (CMS型) と正常細胞質 (Normal型) のミトコンドリアゲノムを解読し、両者を比較して CMS の原因遺伝子を特定することを目的とした。

当センターでは既に CMS を示す品種、“もみじ3号” のミトコンドリアゲノムを解読しており、それが約 173kbp と約 143kbp の2つのサークル分子から構成されていることを示した。本年度は、Normal 型のミトコンドリアゲノムの解読の結果を述べる。

次世代シーケンシングの結果、平均 586bp の長さのリードが 104,101 本得られた。コンティグの総数は 91 個あり、そのうちリードに十分な厚みのある 49 個のコンティグを選び、これらが mtDNA を構成する配列であると考え、その並びを精査して1つの推定マスターサークルを作成した (図 11)。隣接コンティグ間の DNA 断片を PCR 増幅し、ダイレクトシーケンスで塩基配列を確認した結果、隣接コンティグ間にギャップを含むものが多かったものの、ほぼすべてのコンティグの連続性が確認された。図 11 の実線は隣接コンティグの連続性が確認された領域を、点線は PCR で増幅が見られなかった領域を、▲は隣接コンティグ間にギャップが認められた箇所を示している。実線領域の大きさは 343,656bp だった。

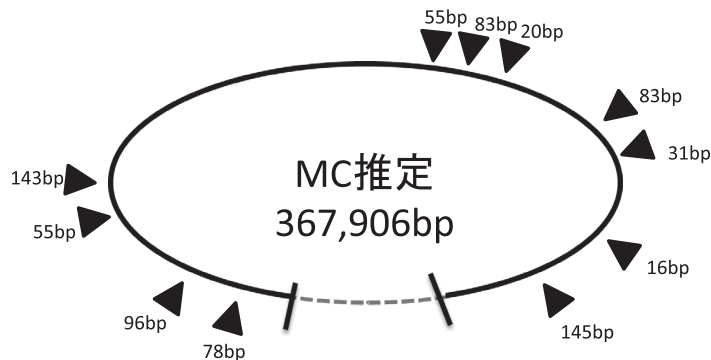


図 11 タマネギの Normal 型ミトコンドリアゲノムの構造 (仮想マスターサークル分子)

次世代シーケンシングから得られた情報をもとに、“もみじ3号” と Normal 型タマネギの遺伝子比較を行った。その結果、ほとんどの遺伝子で“もみじ3号” と Normal 型の塩基配列は完全に同一であった。しかし、*atp1*、*atp6*、*ccmFC\_exon2*、*ccmFN*、*cox1*、*cox3*、*nad1*、*nad4*、*nad5*、*nad6* の各遺伝子では、両者の間に変異が観察された。とりわけ Normal 型の *cox3* と *nad6* には 5 塩基の欠失が見られた。この欠失により Normal 型の両遺伝子にフレーム

シフト変異が生じている可能性がある。しかし、*cox3* と *nad6* はミトコンドリアに必須な遺伝子なので、機能が損なわれているとは考えにくい。次世代シーケンシングのデータに何らかのエラーがある可能性も含め、今後、両遺伝子の配列をサンガー法によるダイレクトシーケンシングで確認する必要がある。

ところで、タマネギの CMS 原因遺伝子の候補として *orf725* があげられる。これは、*cox1* の 3' 側に *orf4501* (アサツキの CMS 特異的遺伝子) が連結したキメラ遺伝子で、“もみじ3号”では単一コピー *cox1* の全長を覆うように存在する (図 12)。一方、Normal 型には *orf725* が存在せず、*cox1* は一般的な構造をとる。しかしながら、もし *orf725* 内の *cox1* 配列が RNA エディティングを受け、Normal 型の *cox1* の終止コドンに相当する位置に新たに終止コドンが作られると、“もみじ3号”と Normal 型の *cox1* の違いが打ち消され、*orf725* が CMS の原因遺伝子である可能性に疑念が生じる。そこで今回、“もみじ3号”と Normal 型から調製した RNA を鋳型に RT-PCR を行い、cDNA のシーケンシングにより、*orf725* と *cox1* の転写産物の RNA エディティングのパターンを調べた。その結果、図 13 に示すように“もみじ3号”には 5ヶ所の C-U エディティングサイトが存在し、そのうち 4ヶ所は Normal 型と共通であることがわかった。また、“もみじ3号”では RNA エディティングによって、Normal 型の *cox1* の終止コドンに対応する位置に、新たに終止コドンは生じていないものの、*orf725* のゲノム配列から予測される終止コドンより 9 アミノ酸手前に終止コドンが出来ていた。このこ

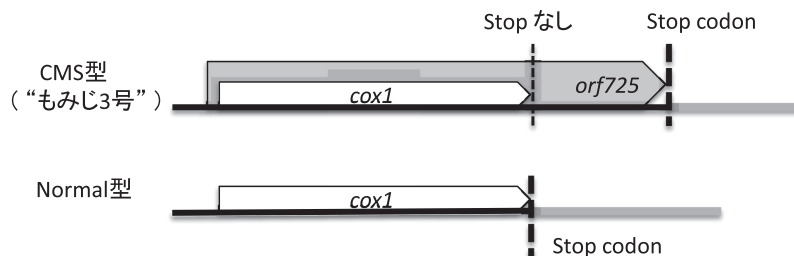


図 12 *orf725* 遺伝子と *cox1* 遺伝子の構造

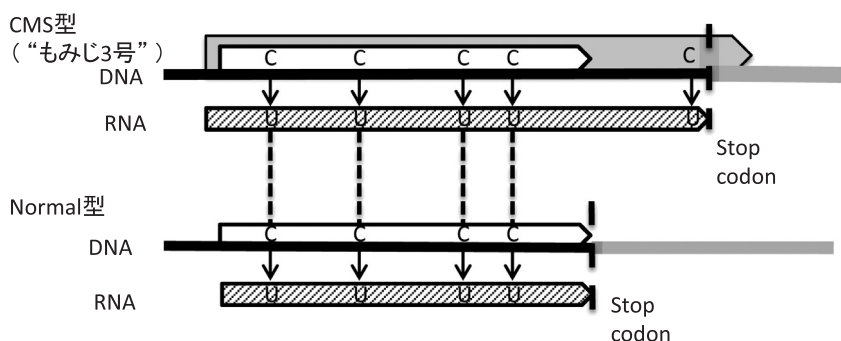


図 13 *orf725* 遺伝子と *cox1* 遺伝子の RNA エディティング

とは“もみじ3号”の *cox1* のC末端がNormal型のものと比べて著しく伸長している可能性を示しており、この違いがCMSの原因となりうるか、今後の研究が待たれるところである。

以上の結果をまとめると、本研究では、Normal型のマスターサークルの全長のうち343,656 bpを決定した。これは推定されるサイズの98.9%であった。PCRによる増幅が見られなかった領域はコンティグの再配置を検討する必要がある。また、Normal型と“もみじ3号”の遺伝子を比較した結果、一部の遺伝子で変異が見られた。しかし、特に *cox3* と *nad6* に関してはシーケンシングエラーの可能性も排除できないため、今後ダイレクトシーケンシングによって配列を確認する必要がある。CMS原因候補遺伝子の *orf725* はRNAエディティングを受けていたものの、*orf725* に含まれる *cox1* には、Normal型のものと同じ位置に終止コдонは形成されておらず、*orf725* の3'末端直前まで翻訳されている可能性が示唆された。今後はウエスタン解析などでタンパク質レベルの解析を行う必要がある（担当：塚谷真衣、出雲谷遙）。

## 6. 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<sub>1</sub>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<sub>1</sub>品種である。しかしながら、ナスのF<sub>1</sub>育種は、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<sub>1</sub>採種には至っていない。ナスのF<sub>1</sub>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、野菜茶業研究所などとの共同研究の成果に基づき、ナスの稔性回復遺伝子（*Rf* 遺伝子）を単離すること、ならびにこの遺伝子と強く連鎖した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に、多数のSSR連鎖マーカーを適用し、花粉稔性との連鎖関係を調べることで、染色体上の *Rf* 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ニニーを活用した *Rf* 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などからなる、一連の実験を進め、最終的には *Rf* 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と期待されている。

これまでの研究において、*Rf* 遺伝子が座乗すると推定された染色体上の約580kbpの領域の中に、合計38個のDNAマーカーを開発した。その一方で、F<sub>2</sub>集団約1,400個体について、個体ごとに花粉稔性を観察し、得られたDNAマーカーの遺伝子型と花粉稔性の表現型との対応を調査した。その結果、想定した領域について、不稔個体特異的なDNAマーカーを持つにもかかわらず、正常な花粉稔性を示す組換え個体が複数発見された。さらに花粉は可稔である

ものの、葯の発達が必ずしも十分でない個体が観察された。これらのことから、この領域には、2つの *Rf* 遺伝子 (*Rf1*、*Rf2* とする) が密接に連鎖して座乗していると考えられた。これら2つの *Rf* 遺伝子は、いずれも単独で花粉稔性を回復するが、一方の遺伝子 (*Rf1*) は高い稔性回復力を有するのに対して、もう一方の *Rf* 遺伝子 (*Rf2*) は、表現型上の葯の発達を完全に回復する作用力を持たない遺伝子であると推定された。これらの遺伝子を含む2つの領域のそれぞれにおいて、高密度に開発した DNA マーカーを利用して F<sub>2</sub> 集団を観察することによって、2つの *Rf* 遺伝子のうち *Rf1* を含む領域は 50kbp 以下に、もう一方の *Rf2* を持つ領域は 200kbp 以下に絞られた。

F<sub>2</sub> 集団のうち、*Rf* 遺伝子とその両側の DNA マーカーをホモに持つと考えられる1個体を用いて、フォスミドライブラリーを構築した。このライブラリーを用いて、2つの *Rf* 遺伝子のうち、より効果が大きいと考えられる1つの遺伝子 (*Rf1*) の周辺の塩基配列を決定することにより、*Rf* 候補遺伝子を絞り込もうとした。そのために、この領域および周辺を含む範囲に 35 対の PCR プライマーを設計した。プライマー間の距離は平均約 6kbp であり、これらのプライマーによる DNA の増幅の有無によって、約 200kbp の領域をカバーする約 20 個程度のコロニーを選抜した。今後、これらのフォスミドクローンの塩基配列を決定・精査して、*Rf1* 遺伝子の実体を解明する予定である (担当：山岸博、Yadav Gyawali)。

## 7. ゲノム編集による新しい遺伝子改変技術の検討

標的遺伝子の機能解析には、塩基の欠失による遺伝子破壊や遺伝子ノックインなどの遺伝子改変を行いその影響を調べることが有効である。近年は TALEN や CRISPR/Cas などの細胞種や生物種を問わない、極めて効率の良いゲノム編集方法が開発され注目されている。本年は、生物の初期発生や細胞の分化に関わる分子の機能の解明を目的として、主に CRISPR/Cas システムを用いて、モデル生物や培養細胞の変異体作製を試みた。

近年開発された 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、従来の方法に比べて簡便でありかつ効率のよいゲノム編集法である。CRISPR/Cas は真正細菌や古細菌の獲得免疫機構を応用したものであり、目的遺伝子中の標的塩基配列に相補的な RNA 配列と、Cas ヌクレアーゼの動員に必要な RNA 配列を連結させた single guide RNA (sgRNA) を合成する。細胞の中に、この sgRNA とヌクレアーゼ Cas9 をコードする RNA あるいは Cas9galnt タンパク質を同時に導入すると、sgRNA 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 ヌクレアーゼ、あるいは導入酵素タンパク質を標的部位に誘導し、標的遺伝子に 2 本鎖切断を引き起こす。このようにして 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、モデル生物の初期発生に関わる標的遺伝子に対して、設計した sgRNA および Cas9 mRNA あるいは Cas9 タンパク質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。いくつかの遺伝子については、変異体の作製に成功した。今後の表現型の変化を観察し、遺伝子の機能解析を行う。また、同じ組織において重複して発現する関連遺伝子については、必要に応じて複数遺伝子欠損体の作製を視野に入れて研究を進める (担当：黒坂光)。

## 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 has been conducting a five-year research project entitled “Development of new biotechnologies by utilizing the information on nuclear and organelle genomes and their application to plant breeding”. The project can be categorized into three groups; 1) chloroplast transformation, 2) mitochondrial genomics, and 3) others. Both basic and exploratory studies are conducted in each group. This report describes the seven topics in the study performed in this fiscal year;

1. Production of transplastomic lettuce and tomato containing useful genes.
2. Development of chloroplast transformation system for wheat.
3. Characterization of transplastomic tobacco having variegated leaves.
4. Mitochondrial genome analysis of Pooideae species.
5. Mitochondrial genome analysis of normal and CMS onions.
6. Isolation of a fertility restorer gene from eggplants.
7. Studies on a new gene-manipulation technology by genome editing.

**Keywords :** Chloroplast transformation, Mitochondrial genome, Genomics,  
Fertility restoration gene, Genome editing