

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

平成 29 年 5 月 23 日受付

山 岸 博

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 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り、大きく、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。今年度は主として以下の課題が実地された。本稿では、このうち第 7 の課題について研究成果を報告する。また当研究センターが主催した国際シンポジウムおよびセンターのスタッフの業績について報告する。

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. イネ科およびアブラナ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. ダイコンにおける雄性不稔遺伝子と稔性回復遺伝子の対応
8. 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

1. ダイコンにおける雄性不稔遺伝子と稔性回復遺伝子の対応

1-1 研究の背景

我国では古くからダイコンが食生活上極めて重要な位置を占めている。また長いダイコンの栽培の歴史の中で、多様な形態的特徴を持つ品種が各地で育成されてきた。このダイコン品種の多様性は世界に例を見ない。しかしながら我国における栽培ダイコンの多様性については、

その起源が十分に明らかになっていない。その一方で、我国には広く野生ダイコンのハマダイコンが分布している。このハマダイコンと栽培ダイコンの遺伝的關係については、古くから論争があるものの、現在まで両者の關係についての明確な論拠が示されていない。そこで、我国の栽培ダイコンの多様性に与える野生ダイコン、とりわけ我国に自生するハマダイコンの遺伝的影響を知るために、ミトコンドリアの雄性不稔遺伝子 (*orf138*) と、これに対する核の稔性回復遺伝子 (*Rf* 遺伝子) を指標として、これらの遺伝子が近年の栽培ダイコンにどのように分布しているかを明らかにしようとした。

従来 *orf138* は、我国の栽培ダイコンにはほとんど見出されず、大部分の品種が正常型細胞質を有していた。また我国の栽培品種には *orf138* に対する *Rf* 遺伝子も存在しなかった。これに対して、ハマダイコンにおいては約半数の個体が *orf138* を持つと共に、大部分の個体に *Rf* 遺伝子 (*orf687* または *Rft*) が存在することが明らかになっている。このように *orf138* と *Rf* 遺伝子の分布は、ハマダイコンと栽培ダイコンの間で著しく対照的であった。近年ダイコンをはじめとするアブラナ科作物では、*orf138* を利用した細胞質雄性不稔による F₁ 育種が急速に発展している。このため、本研究では我国の栽培ダイコンにおける *orf138* ならびに *orf687*、*Rft* の分布を調査することによって、本来ハマダイコンが持っていたこれらの遺伝子が栽培ダイコンの品種にどのような影響を与えているかを明らかにすることを目的とした。

ハマダイコンにおいては、雄性不稔遺伝子 *orf138* に関して塩基配列変異が観察されており、8 タイプの *orf138* が存在することが知られている。その一方で、*Rf* 遺伝子にも *orf687* と *Rft* が存在することが明らかになっている。これらのことは *orf138* と *Rf* 遺伝子との間に多様な対応関係があることを示唆している。このため、栽培ダイコンを用いて、*orf138* と *Rf* 遺伝子の対応について、実際に花粉稔性の表現型を調査することによって明らかにすることも目的とした。

1-2 材料および方法

我国で流通しているダイコンの品種 31 品種を供試した。これらの品種について 1 品種あたり 4～10 個体を用いて *orf138* および *Rf* 遺伝子の有無を調査した。各個体の葉から DNA を単離し、PCR によって *orf138* をミトコンドリアに持つか否かを識別した。同様に *Rf* 遺伝子に関しても、PCR によって *orf687* および *Rft* の有無を調査した。その上で *orf687* については PCR 産物の制限酵素処理によって、稔性回復機能を有する *orf687* かどうかを判定した。さらに上記の調査個体のうち *orf138* を持つ個体については、PCR 産物の塩基配列を決定することによって、現在までに明らかにされている *orf138* の 9 タイプのうち、どのタイプに当たるかを決定した。

orf138 を持つことと、そのタイプが明らかになった個体について、実際に開花させて *Rf* 遺伝子の有無と花粉稔性との対応を調査した。PCR および制限酵素処理の結果からは *Rf* 遺伝子

を持つと考えられるものの、花粉稔性の調査によって雄性不稔の表現型を示した個体について、*orf138* の発現とそれに対する *Rf* 遺伝子の影響を詳細に解析した。

1-3 実験結果および考察

供試品種について雄性不稔遺伝子の *orf138* の有無を調査したところ、半数以上の品種が *orf138* を持っていることが判明した（表1）。このことは、近年のダイコンの育種において、オグラ型の細胞質雄性不稔による雑種強勢育種が急速に普及していることを示す。*orf138* を持つ品種は、A 型と H 型の 2 つのタイプに分類されたが、このうち A 型は、我国のハマダイコンにおける頻度は必ずしも高くないことが明らかになっている。このため、ハマダイコンに存在する *orf138* の 8 タイプのうち、特定の *orf138* が栽培ダイコンに導入され利用されていることが明らかになった。一方、H 型の *orf138* は、我国のハマダイコンおよび栽培ダイコンにおいては分布が知られていなかったタイプである。また供試品種の中に、A 型と H 型の個体が混在する品種が観察された。この H 型は台湾のダイコンで認められた *orf138* であり、このタイプの遺伝子を持つ我国の栽培ダイコンの育種経過については、さらに詳しく調査する必要がある。

orf138 に対する *Rf* 遺伝子は、調査したうちの半数の品種に存在した（表1）。ダイコンは主として根部を利用する作物であり、細胞質雄性不稔を利用した雑種強勢育種においては、 F_1 品種の正常な花粉稔性は、必要とされない形質である。それにもかかわらず、半数の品種が *Rf* 遺伝子を持つことは、我国のダイコンの育種上興味深い現象である。*Rf* 遺伝子の有無に関しては、個々の品種が *orf138* を持つか、正常型細胞質を持つかという細胞質の分化との対応関係は観察されなかった。さらに *Rf* 遺伝子のうちでは、*orf687* よりも *Rft* を持つ品種が多く認められた。このことは、ハマダイコンにおける *orf687* と *Rft* の分布頻度と共通しており、栽培ダイコンにおける *Rf* 遺伝子の由来に興味を持たれる。さらに品種内に *orf687* と *Rft* を共に持つ個体が含まれる品種が複数存在し、これらの品種の育種素材についても詳しく調査する必要があると考えられた。

以上のように、従来正常型細胞質の品種が大部分であった我国の栽培ダイコンにおいては、ハマダイコンに分布する *orf138* を持つ品種の普及が急速に進んでいることが見出された。そ

表1 我国のダイコン品種における雄性不稔細胞質と稔性回復遺伝子の対応

| 細胞質 | 稔性回復遺伝子 | | | 計 |
|---------------------|---------------|------------|--------------|-----------------|
| | <i>orf687</i> | <i>Rft</i> | <i>Rf</i> なし | |
| <i>orf138</i> (A 型) | 1 | 7 | 7 | 14 ^a |
| <i>orf138</i> (H 型) | 1 | 2 | 2 | 5 |
| 正常型 | 3 | 3 | 8 | 13 ^a |

^a *orf687* と *Rft* を共に有する品種がそれぞれ 1 品種存在した

の一方で、この *orf138* の分布と *Rf* 遺伝子の分布との間には明確な対応関係は観察されなかった。このため、本来ハマダイコンに由来するこれらの遺伝子が、ダイコンの育種過程においてどのように導入されたかについては、今後詳細に調査する必要がある。

次に *orf138* を持つ品種について、実際の花粉稔性を調査した。その結果、*Rf* 遺伝子を持たないと判定された品種はすべて雄性不稔性を示したものの、*Rf* 遺伝子を持つと考えられた品種においても、正常な花粉稔性を有する品種は少数で、雄性不稔の表現型を示す品種が大半を占めた（表2）。このことは、*orf138* と *Rf* 遺伝子の間の複雑な対応関係を示唆した。*Rf* 遺伝子のうち *Rft* は *orf138* の mRNA をプロセシングすることによって、この遺伝子の発現を抑制し、花粉稔性を回復することが知られている。そこで、*Rft* を持ちながら雄性不稔性を示した品種について、*orf138* の mRNA を調査したところ、いずれもプロセシングを受けているにもかかわらず、ORF138 タンパクが存在していた。このため、栽培ダイコンの中には、*Rft* による *orf138* mRNA のプロセシングの有無によって表現型が決定されるという、今までに解明された両遺伝子の対応関係では説明できない対応を持つ品種が存在することが新たに明らかになった。

さらに、DNA の塩基配列の解析からは、稔性回復機能を有する *orf687* を持つと考えられるにもかかわらず雄性不稔を示す品種が発見された。*orf687* は *orf138* の翻訳を阻害することによって、ORF138 タンパク質の生産を抑制することが明らかになっている。しかしながら、この品種では *orf138* の mRNA はプロセシングを受けておらず、また ORF138 タンパク質の蓄積も確認されて *Rf* 遺伝子が機能していないことが明らかになった。そこで、この遺伝子が持つ翻訳阻害機能を決定するとされる塩基置換以外の領域についても塩基配列を決定した。その結果、この品種の *orf687* は稔性回復機能を持つとして同定された *orf687* の塩基配列と同一であった。このため *orf138* と *orf687* を共に持ちながら、雄性不稔の表現型を示した品種における雄性不稔性の原因については、さらに別の視点から調査する必要がある。

以上のように、本研究によって、*Rft* または *orf687* を有しながら、雄性不稔の表現型を示す栽培品種が存在することが新しく発見された。このため、現在までに明らかにされている *orf138* とこれに対する *Rf* 遺伝子の働きだけでは説明できない未知の対応が、我国の栽培ダイコンに存在することが示唆された。今後さらに詳細に *orf138* と *Rf* 遺伝子の機能について、

表2 *orf138* を持つダイコンにおける *Rf* 遺伝子の有無と花粉稔性との関係

| <i>Rf</i> 遺伝子 | 花粉稔性 | | |
|---------------|------|----|----------------------|
| | 可稔 | 不稔 | 可稔 / 不稔 ^a |
| あり | 2 | 6 | 2 |
| なし | 0 | 8 | 0 |
| 計 | 2 | 14 | 2 |

^a 品種内に可稔の個体と不稔の個体が存在した

調査する必要がある。

なお、この研究は科学研究費助成事業基盤研究（C）（課題番号 26450011）として実地された。この課題の研究代表者は山岸 博、研究分担者は寺地 徹である。

2. 国際シンポジウム “Frontiers in plant mitochondrial genome research”

2-1 主催；京都産業大学植物ゲノム科学研究センター

2-2 日時；2016 年 7 月 7 日

2-3 場所；京都産業大学図書館ホール

2-4 プログラム

1. Extensive structural variation among radish mitochondrial genomes revealed by complete sequencing of mitochondrial DNA
(T. Terachi, Kyoto Sangyo University, JAPAN)
2. Evolution of post-translational mechanism suppressing cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.)
(T. Kubo, Hokkaido University, JAPAN)
3. Genetic analysis of fertility restorer locus on chromosome 10 derived from a wild rice
(T. Kazama, Tohoku University, JAPAN)
4. Genes and mechanisms for mitochondrial shape, number and distribution in *Arabidopsis thaliana*
(S. Arimura, University Tokyo, JAPAN)
5. Group II introns and complexities of splicing in plant mitochondria
(L. Bonen, University Ottawa, CANADA)
6. Organelle DNA degradation in leaf senescence: a possible role of organelle DNA as nutrient reservoir?
(W. Sakamoto, Okayama University, JAPAN)

3. センタースタッフの研究業績

3-1 論文および著書

- ① Yamagishi, H. In: Nishio, T. and Kitashiba, H. (eds) The Radish Genome. Springer (In press), Speciation and diversification of radish. 2017
- ② Yamagishi, H. and Terachi, T. In: Nishio, T. and Kitashiba, H. (eds) The Radish Genome. Springer (In press), Cytoplasmic male sterility and mitochondrial genome variations in

radish. 2017

- ③ Hisano, H., Tsujimura, M., Yoshida, H., Terachi, T. and Sato, K. (2016) Mitochondrial genome sequences from wild and cultivated barley (*Hordeum vulgare*). BMC Genomics 17(1): 824. doi: 10.1186/s12864-016-3159-3
- ④ Hatono, S., Nishimura, K., Murakami, Y., Tsujimura, M. and Yamagishi, H. Complete mitochondrial genome sequences of *Brassica rapa* (Chinese cabbage and mizuna), and intraspecific differentiation of cytoplasm in *B. rapa* and *Brassica juncea*. Breeding Science 67 (In press). 2017

3-2 学会発表等

- ① 軸屋 恵、寺地 徹、山岸 博「*Sinapis* 属植物におけるミトコンドリアの *orf108* の分布」日本育種学会第 131 回講演会 平成 29 年 3 月 30 日 名古屋大学（愛知県・名古屋市）
- ② 太田星史、牧田真之、辻村真衣、寺地 徹、森 直樹「qPCR 法を用いたコムギのミトコンドリアゲノムにおける分子内組換えの定量的解析」日本育種学会第 131 回講演会 平成 29 年 3 月 30 日 名古屋大学（愛知県・名古屋市）
- ③ 植村香織、児島和志、寺地 徹「葉緑体内で自律複製する新たな形質転換ベクターの開発」日本育種学会第 131 回講演会 平成 29 年 3 月 30 日 名古屋大学（愛知県・名古屋市）
- ④ 辻村真衣、中村由衣、寺地 徹「コムギにおける効率の良い遺伝子組換え体の作出に向けた新しい培養系の開発」日本育種学会第 131 回講演会 平成 29 年 3 月 30 日 名古屋大学（愛知県・名古屋市）
- ⑤ 辻村真衣、執行正義、寺地 徹「雄性不稔タマネギのミトコンドリアゲノムの解析」京都産業大学総合生命科学部シンポジウム 平成 29 年 3 月 3 日京都産業大学（京都府・京都市）
- ⑥ 岩橋直人、辻村真衣、村田 稔、寺地 徹「ライコムギ細胞質を持つ細胞質置換コムギのミトコンドリアゲノムの塩基配列の決定」日本育種学会第 130 回講演会 平成 28 年 9 月 25 日 鳥取大学（鳥取県・鳥取市）
- ⑦ 鳩野紗希、辻村真衣、山岸 博「ハクサイとミズナのミトコンドリアゲノムの全塩基配列」日本育種学会第 130 回講演会 平成 28 年 9 月 25 日 鳥取大学（鳥取県・鳥取市）
- ⑧ 辻村真衣、出雲谷遥、執行正義、上ノ山香織、坂本智昭、木村成介、寺地 徹「雄性不稔タマネギのミトコンドリア転写産物の解析」日本育種学会第 130 回講演会 平成 28 年 9 月 25 日 鳥取大学（鳥取県・鳥取市）
- ⑨ 植村香織、林 未来、寺地 徹「葉緑体の遺伝子組換えタバコ作出の過程で得られた斑入り系統の解析 IV. ミニサークルを利用した新規葉緑体形質転換ベクターの構築」日本育種学会第 130 回講演会 平成 28 年 9 月 25 日 鳥取大学（鳥取県・鳥取市）

- ⑩ 阿部こころ、井上理恵子、植村香織、寺地 徹「ダイズの鉄貯蔵タンパク ferritin を葉緑体ゲノムに導入した形質転換レタスの特徴づけ」日本育種学会第 130 回講演会 平成 28 年 9 月 25 日 鳥取大学（鳥取県・鳥取市）
- ⑪ 軸屋 恵、寺地 徹、山岸 博「ダイコンの稔性回復遺伝子の変異がオグラ型雄性不稔の発現に与える影響」日本育種学会第 130 回講演会 平成 28 年 9 月 25 日 鳥取大学（鳥取県・鳥取市）
- ⑫ 山岸 博、崎山史歩、金山純子、軸屋 恵「タカナと CMS キャベツの体細胞雑種作出」日本育種学会第 130 回講演会 平成 28 年 9 月 25 日 鳥取大学（鳥取県・鳥取市）
- ⑬ 前田貴文、田中花歩、柴田菜々恵、山岸 博「*Brassica rapa* における種皮型関連遺伝子の同定に向けた連鎖解析」日本育種学会第 130 回講演会 平成 28 年 9 月 25 日 鳥取大学（鳥取県・鳥取市）
- ⑭ 寺地 徹、岸本岳之、木下滉平、児島和志、中山侑加、軸屋 恵、山岸 博「大腸菌を用いたダイコンのミトコンドリア CMS 遺伝子の進化実験」日本育種学会第 129 回講演会 平成 28 年 3 月 22 日 横浜市立大学（神奈川県・横浜市）
- ⑮ 辻村真衣、森 直樹、寺地 徹「スペルタコムギが持つ VIIb 型ミトコンドリアゲノムの解析」日本育種学会第 129 回講演会 平成 28 年 3 月 22 日 横浜市立大学（神奈川県・横浜市）
- ⑯ 出雲谷遥、辻村真衣、執行正義、寺地 徹「タマネギ (*Allium cepa*) のミトコンドリアゲノムの解析—N 型ゲノム—」日本育種学会第 129 回講演会 平成 28 年 3 月 22 日 横浜市立大学（神奈川県・横浜市）
- ⑰ 植村香織、辻村真衣、永島伊都子、寺地 徹「*Brachypodium distachyon* のミトコンドリアゲノムの解説」日本育種学会第 129 回講演会 平成 28 年 3 月 22 日 横浜市立大学（神奈川県・横浜市）
- ⑱ 山岸 博、鳩野紗希、西村香里、山下陽子、辻村真衣「*Brassica rapa* および *Brassica juncea* におけるミトコンドリアゲノムの SNP」日本育種学会第 129 回講演会 平成 28 年 3 月 22 日 横浜市立大学（神奈川県・横浜市）
- ⑲ Gyawali, Y., T. Saito, H. Fukuoka, H. Yamagishi 「Detailed genetic analysis of fertility restorer genes in eggplant」日本育種学会第 129 回講演会 平成 28 年 3 月 22 日 横浜市立大学（神奈川県・横浜市）
- ⑳ N. Nakamura, Y. Tsujimoto, Y. Takahashi, Y. Nakayama, M. Konishi, A. Kurosaka: Generation of mutant zebrafish that lack multiple vertebrate-specific polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. Society for Glycobiology Meeting, New Orleans (USA), 2016.11.20
- ㉑ A. Kurosaka, N. Nakamura, Y. Tsujimoto, Y. Takahashi, Y. Nakayama, M. Konishi:

Identification and expression analysis of zebrafish polypeptide α -N-acetylgalactosaminyl-transferase genes during embryonic development. Society for Glycobiology Meeting, New Orleans (USA), 2016.11.20

- ②② A. Kurosaka: Developmental roles of polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferases in model organisms. Texas A&M University, Department of Biochemistry and Biophysics Special Seminar (invited), College Station (USA), 2016.11.16
- ②③ 中村直介、中山喜明、黒坂 光「脊椎動物特有な GalNAc-T サブファミリーの機能欠失体作製」平成 28 年度新学術「神経糖鎖生物学」最終班会議 平成 29 年 3 月 3 日（愛知県・名古屋市）
- ②④ 中村直介、辻本優季、高橋由衣、川合多美子、中山喜明、小西守周、黒坂 光「ゼブラフィッシュを用いた脊椎動物特異的ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素の機能解析」第 89 回日本生化学会大会 平成 28 年 9 月 25 日-27 日 仙台国際センター（宮城県・仙台市）
- ②⑤ 中村直介、辻本優季、高橋由衣、川合多美子、中山喜明、小西守周、黒坂 光「脊椎生物特異的なポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素を欠失したゼブラフィッシュ変異体の作製」第 35 回日本糖質学会年会 平成 28 年 9 月 2 日 高知市文化プラザかるぽーと（高知県・高知市）

Development of new biotechnologies by utilizing the information on nuclear and organelle genomes

Hiroshi YAMAGISHI

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. In this fiscal year, mainly the following eight researches were conducted.

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 and Brassicacea species.
5. Mitochondrial genome analysis of normal and CMS onions.
6. Isolation of a fertility restorer gene from eggplants.
7. Correspondence of mitochondrial male sterile gene and fertility restoration genes in radish.
8. Studies on a new gene-manipulation technology by genome editing.

This report describes the details of the seventh research theme. This report also introduces the international symposium entitled “Frontiers in plant mitochondrial genome research” that was held in July, 2016, and the publications of the staffs of the center.

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