

食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

研究課題	出穂遅延と雄性不稔を示す核細胞質置換パンコムギの原因遺伝子の機能解明
研究種別	<input checked="" type="checkbox"/> 共同 <input type="checkbox"/> 個人
研究組織	竹中 祥太郎（農学部・講師）研究代表者 辻村 真衣（農学部・ラボラトリー専門助手） 中田 聖月（農学部・ラボラトリー専門助手） 寺地 徹（京都産業大学生命科学部・教授）
研究期間	<input type="checkbox"/> 1年研究 <input checked="" type="checkbox"/> 2年研究
キーワード	(1) コムギ (2) ミトコンドリア (3) 雄性不稔 (4) 出穂遅延 (5) ゲノム編集 (6) 組織培養

1. 2022年度の研究計画（簡潔にまとめて記入してください。）

<p>2022年度は以下の3点について実験を進めた。</p> <ol style="list-style-type: none"> orf181の特徴づけ 不稔系統および可稔系統における <i>orf181</i> の発現差解析を行った。また大腸菌を使ったタンパク質の発現実験を行い、ORF181 タンパク質の性質調査を行った。 遺伝子導入実験 前年度の研究結果から、ミトコンドリアゲノムにある <i>orf181</i> という遺伝子が T²型細胞質における雄性不稔遺伝子であることを推定した。そこでこの遺伝子のノックアウト系統の作出を試みる。ノックアウト方法はミトコンドリアゲノム編集技術の一つである mitoTALECD 法で実施する。mitoTALECD は、ミトコンドリアゲノムの塩基配列に C→T の塩基置換を起こしてコドン編集する。具体的には翻訳フレーム内に終止コドンを作成して翻訳産物を改変できる。コムギで形質転換が容易とされる品種「Fielder」を材料に用い、アグロバクテリウム法で mitoTALECD 遺伝子の導入実験を行った。 不稔を示すコムギ-エギロプス核細胞質置換系統の稔性調査 コムギの核細胞質置換系統には、本研究の材料である T²型細胞質以外にも、雄性不稔を示す系統が多数存在する。龍谷大学で系統維持されているこれら系統について、稔性の再調査を行った。 日本在来コムギを使った組織培養に適した系統の選抜 現在コムギにおいて培養系に用いられる再分化率が高い品種は「アカダルマ」および「Fielder」である。特にアグロバクテリウム法に使われる品種は後者に限られる。培養に用いる品種の選択肢を増やすこと、また現在使用される品種より形質転換効率が高い品種を探すため、牧圃場で栽培されている日本在来コムギを使って、ダルマ系の再分化培養を行い、効率を比較した。
--

2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

< 概略 >

本研究は、コムギの近縁野生種 *Aegilops mutica* の細胞質を持ち実験系統「Chinese Spring」(以下 CS と略す) の核を持つ核細胞質置換系統において、出穂遅延を示す C13 (T 型細胞質を持つ) と、雄性不稔を示す C14 (T² 型細胞質を持つ) という 2 種類の、表現型の原因遺伝子を特定し、機能解明することが目的であった。というのも、これまでの先行研究から、*mutica* 細胞質のミトコンドリアゲノムには CS のミトコンドリアにはない *orf260* という遺伝子が存在し、転写されていることが明らかとなっており、恐らくこの遺伝子が原因である、と考えられていた。*orf260* は、*Triticum timopheevii* 細胞質に由来する雄性不稔原因遺伝子と推定されていた *orf256* のホモログである。ところが、2021 年に Melonek らによって、「*timopheevii* 細胞質の雄性不稔原因遺伝子は、*orf256* ではなく *orf279* である」と報告された。この内容は我々の研究においても前提を覆すものであったため、2021 年は研究計画を再検討し、実験を進めた。2022 年は新たに見つかった遺伝子を対象にして実験を進めた。

① 雄性不稔原因遺伝子の調査

前述の通り *timopheevii* 細胞質で見つかった新規の雄性不稔遺伝子 *orf279* が、我々の材料である C13 および C14 に存在するか調査した。両者のミトコンドリアゲノムは既に決定しており (GenBank: AP013051.1, AP013052.1)、*orf279* の有無を BLAST 検索した。その結果、*orf181* という *orf279* のホモログと思われる未知の遺伝子を発見した。この配列は C14 ミトコンドリアゲノムの *atp9* 遺伝子の直後に位置し、*orf279* の N 末端側 294bp が欠けていて、相同領域は 88% の相同性を示した (図 1)。また可稔である CS、C13 には存在せず、雄性不稔の C14 にのみ存在した。

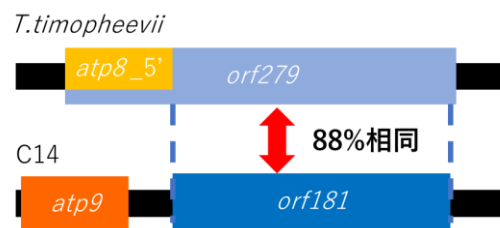


図1 *orf279* と *orf181*

orf181 は、雄性不稔遺伝子の特徴である膜貫通領域を一か所持つことがわかった (図 3)。また *atp9* の直後にあることから、*atp9* と共転写を起こしている可能性がある。以上から雄性不稔遺伝子として機能している可能性は高いと考えた。

② *orf181* の特徴づけ

まず *orf181* が転写されているか調査した。CS と C14、そして C14 と同じ細胞質を持ちさらに稔性回復遺伝子を持つ回復系統 R112 の 3 種から、出穂前の幼穂を取り出し、葯をサンプリングした。DAPI 染色による花粉発達過程を観察して (後述)、花粉のステージが 1 核期および 2 核期の葯から RNA を抽出し、RT-PCR を行った (図 2)。その結果、ミトコンドリアゲノム上に *orf181* を持たない CS および R112 では増幅が見られなかった。一方 C14 および R112 では 1 核期および 2 核期ともに *orf181* の増幅が見られ、また C14 の 2 核期でより強い増幅が見られた。また、C14 のミトコンドリアゲノム上で *orf181* の直前にある *atp9* から *orf181* にかけて PCR した結果、C14、R112 とともに増幅が見られた。このことから、*orf181* は *atp9* と共転写していることがわかった。

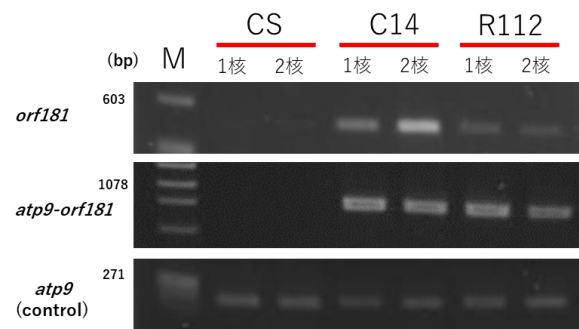


図2 *orf181* の RT-PCR

稔性回復遺伝子は、雄性不稔遺伝子の転写産物を切断あるいは翻訳阻害を行って発現を抑制することが知られている。R112 が持つ稔性回復遺伝子の作用機序は不明であるが、*atp9- orf181* 領域が C14 と変わらず増幅することから、この領域間での切断はないと考えられる。一方で *orf181* 単体での PCR 増幅には差が見られるこの転写産物量を低下させる

ことによって稔性回復に寄与している可能性がある。

雄性不稔遺伝子は、大腸菌で発現させると細胞毒性を示し、増殖に悪影響を及ぼすことが知られている(Nakai et al., 1995)。またその細胞毒性は膜貫通ドメインに起因するのではないかと考えられている。そこで *orf181* タンパク質の膜貫通ドメイン予測プロット結果を参考に、大腸菌での発現実験を行った。すなわち、C14 の totalDNA を鋳型に PCR を行い、*orf181* 全長の PCR 産物を得て、発現ベクター pMAL-c6T にクローニングした (ORF181ful)。更にこのベクターを鋳型に InversePCR を行い、N 末端側から 7 アミノ酸欠失($\Delta 7$)および 44 アミノ酸欠失($\Delta 44$)した *orf181* を持つベクターを作成した(図 3)。これら大腸菌 DH5 α 株に導入し、IPTG 誘導 +/- プレートで培養した(図 4)。ベクターのみを導入した株では IPTG 誘導 +/- に関わらず大腸菌の増殖が見られるが、ORF181ful、 $\Delta 7$ 、 $\Delta 44$ 系統では全く増殖しない、あるいは増殖の悪化が見られた。一方で膜貫通ドメインを削った $\Delta 44$ を作成したが、大腸菌の増殖に明瞭な回復傾向は見られなかった。

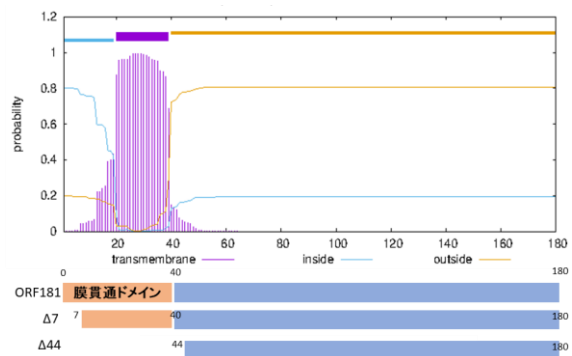


図3 ORF181の膜貫通ドメインプロットと発現ベクターへのクローニング遺伝子

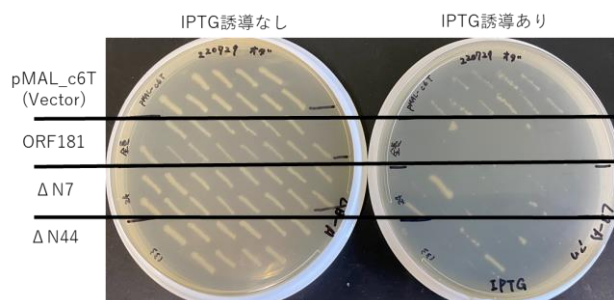


図4 大腸菌タンパク発現実験

③ ミトコンドリアゲノム編集遺伝子の導入実験

本研究の核となる実験は、ミトコンドリアゲノム編集である。植物ミトコンドリアの DNA 改変は困難であったが、2019 年にナタネとイネで初めて成功が発表され(Kazama et al., 2019)、その後もトマト(Kuwabara et al., 2022)とイネ(Omukai et al., 2021, Takatsuka et al., 2022)で、成功が報告されている。我々はこの技術をコムギに応用すべく、実験を進めている。

ミトコンドリアゲノム編集は、核ゲノムに編集遺伝子を導入し、その遺伝子が発現し、ミトコンドリアに移行してターゲット DNA 配列にアクセスしてゲノム編集が達成される。これを達成するために、まずは核ゲノムに遺伝子を導入しなければならない。遺伝子導入はアグロバクテリウム法で行うが、コムギの場合アグロ法が可能な品種は「Fielder」に限られる。そこで、a)連続戻し交雑により C13 および C14 の核ゲノムを Fielder に置換して実験系統を作出する、b)遺伝子導入を行った Fielder を C13、C14 に交配する、という 2 通りの方法で実験を進めることとした。a)は、温室での通常栽培と簡易人工気象室を使い、C13 は 3 世代、C14 は 2 世代 Fielder の戻し交雑を行った。これらの交雑系統は計算上、C13 が 87.5%、C14 が 75%の割合で Fielder の核ゲノムに置換されている。今後も交雑を続け、最終的に 95%以上(交雑 5 世代以上)の核置換系統を作出したい。

2021 年~22 年にかけては、b)の方法である Fielder への遺伝子導入を実施した。材料である Fielder の栽培は、温室と人工気象室を用いて年 2 回実施した。外殖片である開花後 14 日目の未熟胚にアグロバクテリウムによる遺伝子導入を行い、選抜培地で培養を行った(図 5)。

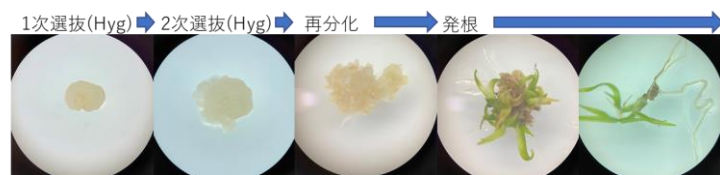


図5 遺伝子導入コムギの再分化過程

組換え実験に用いるプラスミド DNA は、東京大学 有村慎一准教授に作成を依頼した。ミトコンドリア DNA のターゲット箇所を切断する mitoTALEN ベクターに加え、2020 年に開発されたシチジンデアミナーゼを用いて C→T の塩基置換を行う mitoTALECD も用意した。ターゲット領域には、*orf260* と *orf181* のコード領域中でそれぞれ 2 か所を選定したため、mitoTALEN および mitoTALECD を 2 種ずつ、合計 8 種のベクターを用意した。

2021 年度はコムギ培養系とアグロバクテリウム感染実験の立ち上げを行い、再分化シュートを得ることはできたが発根には至らなかった。2022 年度は図 5 に示すような再分化個体を 12 個体得ることができた。これらの葉から簡易的に DNA を抽出し、TALECD 遺伝子および選抜試薬であるハイグロマイシン耐性遺伝子の PCR を行ったところ、図 6 の赤矢印で示した #3、#5、#8 で TALECD 遺伝子の増幅が見られた。しかしハイグロマイシン耐性遺伝子では増幅が見られなかった。またこれらの系統は選抜試薬入り培地で培養を継続すると枯死した。以上から、導入遺伝子の一部のみを持つと考えられる。

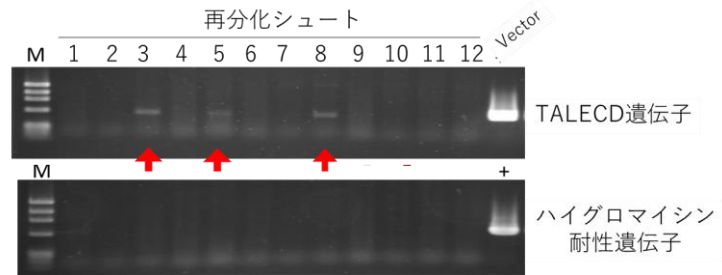


図6 再分化シュートにおけるPCRチェック

④ 不稔を示すコムギ-エギロプス核細胞質置換系統の稔性調査

パンコムギの核を持ち、コムギ-エギロプス属植物の細胞質を持つ細胞質置換系統には、雄性不稔を示す系統が多数存在する(Tsunewaki 2009)。龍谷大学ではこれらのうち複数の系統が維持されており、2022 年度は CS 核の核細胞質置換系統の栽培を行った。

雄性不稔は雄ずいの不調による不稔ということはよく知られているが、雄ずいの発達過程でいつ異常が発生するのかはよくわかっていない。そこでまずは花粉発達過程の経時観察を行った。図 7 はその一例で、核親である CS と *umbellulate* 細胞質を持つ C03 系統(部分可稔)である。四分子期、初期一核期までは差がほとんど見られないものの、それ以降は C03 において二核期に示したような発育不全な花粉が見られた。しかし発育不全の花粉は CS にも存在しており、C030 との間に大差は見られなかった。ところが成熟花粉では明らかに C03 で花粉量が少なかった。今回の実験では定性的な結果しか見ていないが、各過程における正常花粉量など定量的な分析が必要と思われる。

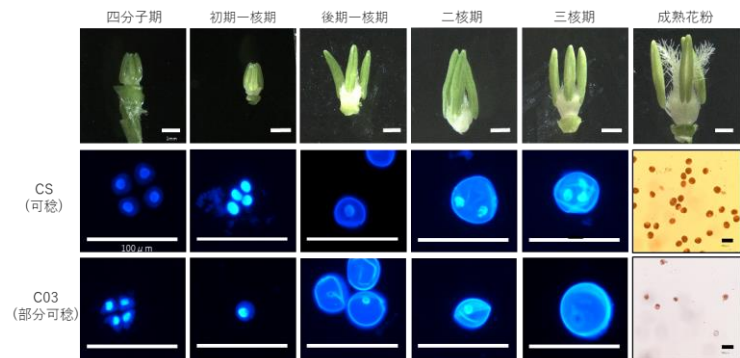


図7 コムギの花粉発達過程

また、細胞質置換系統 28 種を用いて、前述の推定雄性不稔遺伝子である *orf181* の有無を PCR で調査した。増幅産物の *orf181* コード領域についてはシーケンシングを行い、それらの塩基配列を比較した。その結果、C14 の細胞質である *mutica*(T²型)に加えて、*helderichii*(Mh)、*comosa*(M)、*ovata*(Mo)、*columnaris*(U')、*umbellulate*(U) の細胞質を持つ系統で *orf181* が存在し、複数のアレルが存在することがわかった(図 8)。

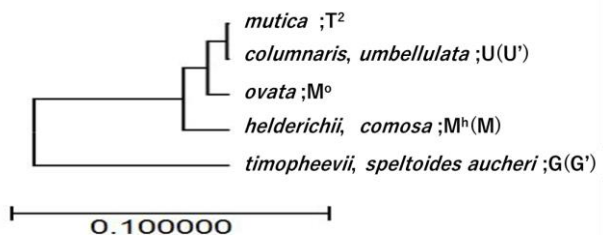


図8 コムギ核細胞質置換系統に見られる *orf181* のアレル

またこれらの稔性を調査したところ、M、Mh、T²はこれまでのデータと一致し、完全不稔を示した(表 1)。一方、U'、U の稔性はそれぞれ 8.2%、34.9%であった。このことは、CS の核ゲノムが細胞質によっては稔性回復力を示すことを意味する。もし *orf181* が雄性不稔遺伝子として機能している場合、アレルによってその回復力に差が生じている可能性が示唆される。

表1 細胞質置換系統の稔性調査

Plasmon Type	<i>umbellulata</i>	<i>columnaris</i>	<i>comosa</i>	<i>helderichii</i>	<i>mutica</i>	<i>timopheevii</i>	<i>araraticum</i>
	U	U'	M	M ^h	T ²	G	G
code	C03	C30	C05	C06	C14	C25	C24
稔実率	8.2%	34.9%	0.0%	0.0%	0.0%	2.2%	0.0%

⑤ 日本のダルマ系統における脱分化・再分化調査

現在コムギでアグロバクテリウム法に用いられる品種は「Fielder」にほぼ限られている。Fielder の系譜を確認すると、日本の農林 10 号が含まれる。農林 10 号は半矮性を持ち、パンコムギの緑の革命において利用されたものであり、農林 10 号の半矮性遺伝子は日本のダルマ系統に由来する。このことから、Fielder が持つ形質転換しやすい形質もダルマ系統に由来する可能性がある。そこで牧圃場で栽培されている日本在来系統から、ダルマ系統 7 種と「農林 10 号」を使い、培養実験を行って再分化率を調査した(図 9)。

ダルマ系統の中で培養実験に使われた実績があるのは「赤達磨」であるが、予想外なことに「達磨ミニ」のカルス化率の方が高く、また再分化率は「白達磨」が高い値を示した。このことは形質転換実験に使う品種になりうる可能性を示す。次年度はアグロバクテリウムの感染実験を行い、新たな実験系統になりうるか検証する。

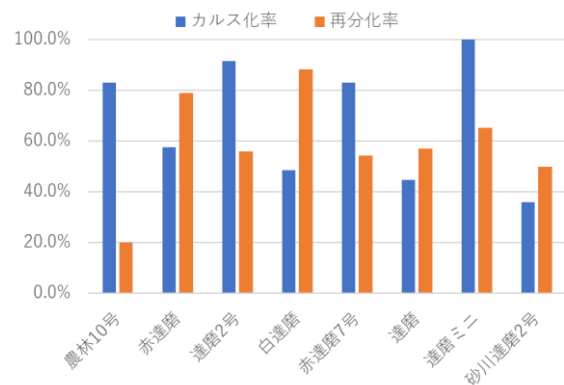


図9 ダルマ系統7種のカルス化および再分化率

3. 研究成果の社会的還元について

本研究プロジェクトの研究成果について（１）社会的な意義や影響（２）社会にどのように発信したのか、を平易にご説明ください。

（１）社会的な意義や影響

本研究は開始直後に研究テーマに関連する重要な論文が発表された。そのおかげで新たな雄性不稔遺伝子 **orf181** を発見することができ、ミスリードせず研究計画を見直すことができた。というのも、これまで原因遺伝子と考えられていた **orf256** および **orf260** は、不稔・可稔に関わらずほぼ全ての細胞質置換系統に存在している。そのため本当にこの遺伝子が原因であるのか疑問が持たれてきた。一方 **orf181** は、多数存在するコムギ核細胞質置換系統の雄性不稔系統の中で、一部の系統のみが保有している。このことから、コムギの雄性不稔原因遺伝子について新たな着眼点で解析できるようになった。

更に **orf181** を持たず雄性不稔を示す系統も存在しており、新たな研究シーズが得られた。現在、これらの不稔系統の解析にも着手するために、NBRP コムギの種子譲渡サービスを利用して不稔系統と稔性回復系統を揃えて栽培している。コムギ-エギロプス全種を網羅した核細胞質置換系統は日本の研究者によって作出された。これらを容易に利用できることは、同じ日本国内で研究しているメリットであるし、貴重な材料を活用することは意義あることと考える。

また細胞質雄性不稔は、ミトコンドリアゲノム編集技術を使う良いモデルとなっている。今回設計したゲノム編集遺伝子は、**orf181** アレル全てに共通に働くよう設計されている。実験計画ではゲノム編集遺伝子を持つ個体と不稔系統を交雑し、後代で雄性不稔遺伝子がノックアウトされたか調査する。つまり、1種類のゲノム編集遺伝子を持つ個体が作出できれば、**orf181** を持つ系統全てに共通で使える。このようなモデルは雄性不稔遺伝子のアレルが判明しているコムギならではと言える。

さらに、本研究で実施した交配実験で、**C13** の出穂遅延性が **Fielder** との交配系統では出現しなくなることがわかった。つまり **Fielder** は出穂遅延回復遺伝子を持つことが明らかとなった。これまで **C13** の出穂遅延回復遺伝子の報告例はなく、新たな発見となる。こちらも研究シーズとして今後発展させていきたい。

（２）社会にどのように発信したか

研究成果は日本育種学会で発表した。2021年は秋季大会で1題、2022年は春季大会で1題、秋季大会で2題の発表を行った。

4. 収支報告

(非公開)

5. 研究発表等(研究代表者及び研究分担者)

<学会発表>

① 第140回 日本育種学会 2021年9月23日～25日 オンライン開催 口頭発表
ミトコンドリアの *orf181* は *Aegilops mutica* 細胞質を持つパンコムギ系統の雄性不稔原因遺伝子か？

庄司 穂弘¹, 辻村 真衣², 竹中 祥太郎², 寺地 徹³ (1. 京産大・院生命科学研究科, 2. 龍谷大学・植物生命, 3. 京産大・生命科学)

② 第141回 日本育種学会 2022年3月20日～21日 オンライン開催 口頭発表
パンコムギ細胞質置換系統で見られる雄性不稔原因遺伝子の分類とミトコンドリアゲノム編集を用いたノックアウトライン作出の取り組み

辻村真衣¹, 庄司穂弘², 中田聖月¹, 有村慎一³, 竹中祥太郎¹, 寺地徹⁵

(1. 龍谷大・農学部, 2. 京産大・院生命科学, 3. 東京大・農学生命科学研究科, 4. 京産大・生命科学部)

③ 第142回 日本育種学会 2022年9月23日～25日 帯広畜産大学 ポスター発表
Chinese Spring を核に持つコムギ-エギロプス属の細胞質置換系統で見られる雄性不稔性の調査 1. Plasmon Type U, M, T², C, G について

辻村真衣¹ 竹中祥太郎¹ 中田聖月¹ 森直樹² 寺地徹³

(1. 龍谷大・農学部, 2. 神戸大院農学, 3. 京産大・生命科学部)

④ 第142回 日本育種学会 2022年9月23日～25日 帯広畜産大学 ポスター発表
雄性不稔を示す細胞質置換コムギが持つミトコンドリア遺伝子 *orf181* の特徴づけ

庄司 穂弘¹, 小田 奈央子², 辻村 真衣³, 寺地 徹²

(1. 京産大・院生命科学研究科, 2. 京産大・生命科学, 3. 龍谷大学・植物生命)