

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14756

研究課題名(和文)植物ミトコンドリアノックダウンシステムの開発

研究課題名(英文)The development of knock-down system in plant mitochondria

研究代表者

八木 祐介 (Yagi, Yusuke)

九州大学・農学研究院・学術共同研究者

研究者番号：60612421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年様々なゲノム改変ツールがある一方で、ミトコンドリア遺伝子の改変手法がない。本研究では、配列特異的なRNA結合蛋白質であるPPR蛋白質PPRとRNaseを融合した人工ヌクレアーゼを開発し、ミトコンドリアノックダウンシステムを構築した。動物培養細胞でのミトコンドリアノックダウンに成功し、今後、植物細胞へこの技術を適用し、様々なノックダウンライブラリーすることで、植物ミトコンドリアの新しい機能の解明につながると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは、生命が活動する上で必要なエネルギーを供給するために重要な細胞内の場所です。その機能を維持するためにミトコンドリア内には遺伝情報つまりゲノムが存在しています。特に植物細胞のミトコンドリアは、ヒトなど動物と比較して複雑なゲノム構造を有しており、まだまだ未解明な部分が多く、本研究により新しい仕組みが明らかになる可能性があります。また、植物のミトコンドリアの理解を深め、本研究を応用することでミトコンドリアを対象とした新しい育種方法の確立ができると考えています。これは、収量増強や病気によい作物の作出が期待されます。

研究成果の概要(英文)：Although there are various functional analysis tools that target to genome and transcriptome, such as genome editing and knock-down techniques, recent years, there is no way to alter the mitochondrial gene expression. In this study, we developed knock-down system in mitochondria using an artificial ribonuclease that composed of PPR protein, which capable to design the sequence specificity, and RNase. We succeeded in mitochondrial knockdown in animal cultured cells. By applying this technique to plant cells, we believe that various mitochondria knockdown libraries can elucidate new functions of plant mitochondria.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA

1. 研究開始当初の背景

これまでの分子生物学的、遺伝学的研究などから、植物細胞のミトコンドリアは、様々な代謝制御、植物ホルモン応答、稔性制御といった生殖機能など多くの細胞制御に関与していることが示唆されている。一方で、ミトコンドリア内の遺伝子機能や分子メカニズムは多くが分かっていない。特に、植物ミトコンドリア遺伝子を改変する手法がないため、未だにミトコンドリア遺伝子機能の詳細な解析が行われていない。一般的な遺伝子機能解析は、核遺伝子のノックアウト、ノックダウンといった手法を介したフェノタイプ、及び関連遺伝子の発現変動を解析されるが、ミトコンドリア内ではサイレンシング経路が存在しないため相補鎖核酸を用いたノックダウン手法を利用することができない。またゲノムへのターゲッティングもできないためノックアウトが出来ない。そのため、ミトコンドリア遺伝子機能の研究が全く行っていないのが現状である。

植物ミトコンドリアゲノムは動物と比べ非常に大きく、さらに機能未知 ORF が数多く存在している。これらの機能未知 ORF は、稔性制御に関与していることが知られているが、文字通り機能は分かっていない。植物ミトコンドリア遺伝子の発現は、RNA レベルで多様な調節を受けている。例えば、シトシン塩基がウラシル塩基に変換される RNA 編集イベントは 500 箇所もある。この RNA 編集イベントは、編集箇所特異的に因子が用意されている。それが、RNA 結合タンパク質である PPR 蛋白質である。PPR 蛋白質は、35 アミノ酸からなる PPR モチーフの繰り返しによって構成されており、各モチーフが 1 対 1 で塩基を認識する (Yagi et al., PLOS One, 2013)。認識される塩基は 3 箇所のアミノ酸の組み合わせで決定されることをインフォマティクスと生化学解析から明らかにした。(PPR code)。この発見により、どの PPR 蛋白質がどの箇所の RNA を制御しているのか予測することが可能になった。そこで、各ミトコンドリア遺伝子を制御している PPR の同定、もしくは、人工的に PPR を作成し、RNA 切断ドメインと融合することで、各ミトコンドリア遺伝子特異的に作用する人工 RNase が作成できると考えた。この PPR-RNase を植物に導入することで、様々なミトコンドリアノックダウン株を作成できると考え着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、いまだ有効な手段がない、ミトコンドリア遺伝子ノックダウンツールを開発することを目的とした。植物自身が持つ PPR もしくは、人工的に作成した PPR と Endoribonuclease を融合した配列特異的 RNase を作成し、ミトコンドリアノックダウンシステムを構築する。

3. 研究の方法

① 標的配列特異性を持つ PPR タンパク質の作製

PPR モチーフのアミノ酸配列 (Code 情報) から、標的配列の予測が可能となり各ミトコンドリアの遺伝子に対応するシロイヌナズナ PPR タンパク質について同定を進めた。しかしながら、code 情報が不足していたため多くの場合ではっきりとした標的 RNA を同定することが出来なかった。また、天然 PPR の配列特異性を検証するため大腸菌で組み換えタンパク質を発現、精製し RNA との結合解析を進めていたがほとんどの場合、可溶性タンパク質にならず解析が困難であった。唯一、葉緑体 PPR (CRR4) が、標的配列も同定され、タンパク質精製が可能であったためモデル PPR としてこれを選んだ。

上記のような問題があったため、人工的に PPR を作成しそれを用いる方法も検討した。Coquille らが、24000 種類の PPR モチーフからコンセンサス配列を同定し、Code 部分のアミノ酸を標的配列に対応するようにしたモチーフを連結して標的的特異的な PPR の作成に成功していた。そこで、異なる方法でコンセンサス配列を収集しそれを用いて PPR を作成した。さらに、それらの配列結合特異性を解析した。標的配列は、下記のレポーター遺伝子ノックダウンのため Luciferase 遺伝子内の配列及びミトコンドリア遺伝子 ND5 とした。

② RNase domain との連結

本研究とは別の開発でバクテリア RNase、や植物オルガネラで PPR と共に機能している RNase、といったヌクレアーゼドメイン RNase domain を利用していたためそれらを用いることにした。PPR と Nuclease domain を連結する Linker について検証するため 19 種類の様々な Linker 配列を用意し検証した。

③ ノックダウンの検証

まずは、レポーター遺伝子を用いて PPR-Nuclease によるノックダウンの検証を行った。植物細胞や個体での検証は時間がかかるため研究室内で構築していた動物培養細胞 (HEK293T) を用いた系を利用した。1 つのプラスミド内にレポーターとして Nano-luc, Internal control として Firefly luciferase が発現するように設計し構築した。

④ ミトコンドリア遺伝子ノックダウン検証

本研究実施期間で、植物細胞への適用まで進むことが出来なかった。そこで動物培養細胞のミトコンドリアを用いて機能検証を行った。

4. 研究成果

① 標的配列特異性を持つ PPR タンパク質の作製

Coquille ら (Nature Commun. 2014) の手法では 7 つの PPR モチーフを連結し配列特異的な PPR タンパク質の作製に成功しているがいくつか問題点があった。1 つは、PPR モチーフがリピートであるため遺伝子作製が困難であること。そのため 7 リピート以上の PPR タンパク質が作製できていない。またそれらの結合力 K_d が $10^{-7}M$ と高く、結合が弱い。また天然 PPR モチーフの相同性は低く多様なアミノ酸組み合わせで構成されている。一方でコンセンサス配列にすることで可溶性が増し大量のタンパク質を調製することができるため Coquille らは結晶構造解析をすることにも成功している。そこで、Coquille らとは別の PPR 配列を準備しより構築しやすく、かつ結合力の高い PPR タンパク質の作製方法の確立に取り組んだ。図 1 にその結果の一部を示した。3 種類の PPR モチーフと Coquille らのモチーフを選択し 15 モチーフ、18 モチーフの PPR タンパク質遺伝子を遺伝子合成により作製した。Coquille らのモチーフについても遺伝子合成により作製が可能であった。それらの PPR 遺伝子の N 末に Luciferase, C 末に His タグを付加し大腸菌を利用してタンパク質発現精製した。結果、天然型 PPR と比較して 1000 倍程度精製量が向上した。一方で、Coquille らのモチーフは精製タンパク質がラダーになり、分解されている傾向が見られた。精製タンパク質の結合特異性を解析するため、ELISA に似た系を構築した。Streptavidin がコーティングされたホワイトプレートを準備し、そこへ 5' -Biotin 化した合成 RNA プロブを加え、結合させ、Luciferase 融合 PPR タンパク質を加え Wash 後、プレートリーダーによる発光計測により結合している PPR 量を測定した。結果、Coquille ら (v1) と比較して標的特異性が高く、安定して PPR タンパク質が発現するモチーフ配列の同定に成功した。以降 v4 のモチーフを用いて PPR を構築した。

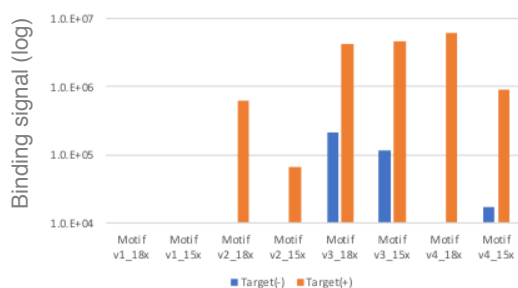


図1. モチーフ配列の違いによるPPR/RNA 結合性能比較

これらのモチーフを使い、次の解析のための PPR を設計、構築した。レポーターアッセイのための Nluc, ミトコンドリア遺伝子のノックダウンのために human ND5 を標的 mRNA と設定し、その配列中からユニークな 12~18 塩基を選択した。図 2 に結果を示す。すべて

の PPR で標的配列特異的な結合が認められた。

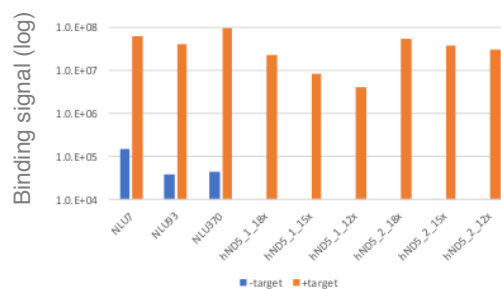


図2. 標的特異的PPRの作製、評価結果

② レポーターを用いたノックダウン検証
 研究室内の他プロジェクトにおいて、天然型 CRR4 と各種 RNase ドメインを融合した人工 RNase を用いて検証を進めていた。レポーターの 5' UTR, 3' UTR, ORF 内として Start codon 直後または STOP codon 直前に CRR4 標的配列を挿入したレポータープラスミドを作製し、CRR4-RNase 発現プラスミドと共発現させレポーター活性を比較した。結果、2 種類の RNase を融合したコンストラクトで、最大 20%程度のノックダウン効率があり、標的位置は ORF 内に設定したものがより効果的であることが分かっていた。一方でノックダウン効率が低かった。原因として、1. PPR の結合性能, 2. 適切な PPR と RNase の連結でないことが挙げられた。本研究では 2 について検証を行った。Linker 配列は、フレキシブル型 (GS linker など)、リジット型 (Helix 構造をとるなど) に分けられる。様々な長さ、構造のものを 19 種類考案し、CRR4 と RNase の間に挿入したもので比較検討を行った。結果、フレキシブル型で短い長さのものが最もノックダウン効果が高かったが顕著な性能向上は認められなかった (図 3)。

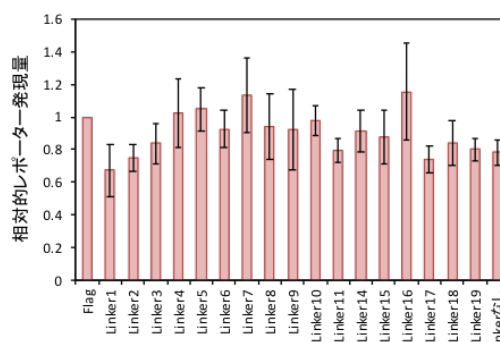


図3. 様々な長さ、性質(可動性、蛋白質構造別)のものを用意し、PPRとNucleaseの間に融合したコンストラクトによるノックダウン効率

そこで、結合性能の異なる PPR が作製できたのでそれらを用いて検証を行った (図 4, NLU7, 93, 370, RD11-2, RD14 は異なる RNase domain)。最も結合力の強い NLU370 において、約 50%程度のノックダウン効果が認められた。位置効果といった原因も排除できないが、こ

の結果から高結合の PPR を用いることで、よりノックダウン効率の高い分子を同定することができる結論づけた。

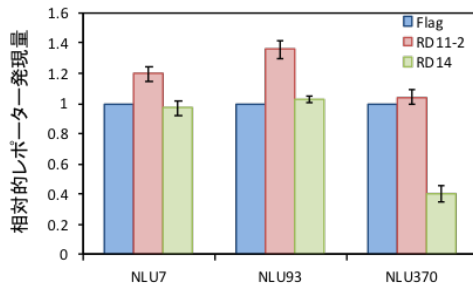


図4. NLUC標的PPRによるノックダウン効率

③ミトコンドリアノックダウンシステムの開発

実際にミトコンドリアのRNAに標的し分解されるかどうかの検証を行った。まずはスループットの高い動物培養細胞系 (HEK293T) を用いて実験を行った。標的は、human ND5 遺伝子を選択し、標的配列を2箇所選定した。それらを標的する PPR の N 末側にミトコンドリア輸送シグナル配列と局在確認用に GFP を付加し、C 末側に RNase を付加した。CMV プロモーター下で発現するプラスミドを構築し HEK293T 細胞へ一過的に transfection した。GFP 蛍光の観察により、PPR-RNase がミトコンドリアへ局在していることが確認できた(図5)。

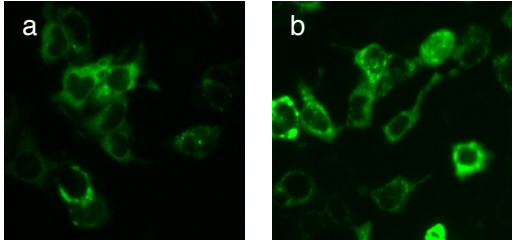


図5. GFP-PPRのGFP局在。a, hND5-1, b, hND5-2

一方で、Transfection 後の細胞の生存率が悪く、constitutive な発現条件での解析が難しいことがわかった。そこで、発現 Promoter を、Inducible promoter にし、Stable 株を作製した。Dox 誘導後、TotalRNA を精製し、random primer を用いて逆転写した後にリアルタイム PCR により hND5 mRNA 量を定量した。結果、70~80%程度ではあるが、ノックダウン効果が認められた(図6)。

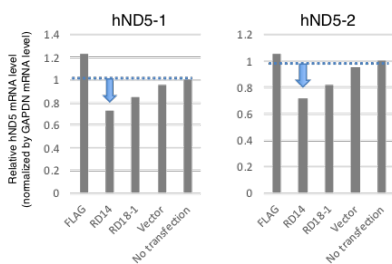


図6. ミトコンドリアmRNAノックダウン効率の測定

以上の結果から、PPR-RNase を用いてミトコ

ンドリア RNA のノックダウンが可能であることが示唆された。一方で本研究ではミトコンドリアノックダウンによる他遺伝子発現への影響などを調べる事が出来なかった。今後この技術を植物細胞へ転用することで、植物ミトコンドリアノックダウンライブラリーを作成し、様々な生理現象の解析に役立てると期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 八木祐介、中村崇裕「PPR 蛋白質を利用した RNA 操作技術の開発」、日本分子生物学会, 2017 年
- ② 八木祐介、中村崇裕「PPR 蛋白質を利用した RNA 操作技術の開発」、日本 RNA 学会, 2017 年
- ③ 八木祐介、中村崇裕「PPR 蛋白質を利用した RNA 操作ツールの開発」、日本分子生物学会 (招待講演), 2016 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木祐介 (Yagi Yusuke)
九州大学・農学研究院・
学術共同研究者
研究者番号：60612421

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号:

(4)研究協力者
なし ()

研究者番号: