

令和元年6月6日現在

機関番号：17102
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16H05067
研究課題名(和文) DNA結合型PPRタンパク質の体系的な解析

研究課題名(英文) Study on DNA binding PPR protein

研究代表者

中村 崇裕 (Nakamura, Takahiro)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：10464398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、DNA結合型PPR (dPPR) の分子機能解析を体系的に行いその大まかな全体像を把握することを目的として、約10種のdPPRの解析を行った。それらの細胞内局在を検証したところ、その多くは葉緑体、ミトコンドリアに局在した。いくつかのdPPR分子が特徴的なDNA配列に結合することが明らかとなった。当該dPPR遺伝子を欠損したシロイヌナズナを入手し、その生理学的な表現型を解析したところ、オルガネラ機能の低下、胚発生致死、などの重篤な異常が一部の変異株で観察された。配列比較解析を行い、DNA/RNA結合に関わる機能アミノ酸を解析したところ、進化と機能分岐に関わるアミノ酸の違いを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのPPRタンパク質がRNA結合に働くのに対して、一部のPPRタンパク質がDNA結合に働くことを見出しており、本研究は当該知見に立脚して、植物にのみ豊富に存在するPPRタンパク質遺伝子に関する理解を深めるものである。本研究の知見は、PPRタンパク質のDNAまたはRNA結合を支える分子基盤、PPRタンパク質機能多様化の理解、ひいてはオルガネラゲノム構造・発現の新知見を与えるものである。さらに本知見は、ゲノム編集技術開発のための基礎的基盤としても有用である。

研究成果の概要(英文)：This study has been conducted to understand the principle of the molecular function of DNA binding PPR protein (dPPRP), in contrast to the major class of PPR protein contains RNA binding capacity (RNA binding PPR protein; rPPRP). Dozens of dPPRP gene were selected in this study. The sub cellular localization was found to be in mitochondria or chloroplast as similar to rPPRP. The dPPRP exhibited sequence specific DNA binding activity as expected. The physiological phenotypes were severe in several dPPRP deficient Arabidopsis. The sequence analysis using public database identified several significant amino acids that cloud involved in the evolution of dPPRP genes and/or functional divergence between dPPRP and rPPRP.

研究分野：植物分子生物学・ゲノム工学

キーワード：PPR オルガネラ 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光合成、呼吸、多様な代謝物の産生などの場である葉緑体とミトコンドリアは、独自のゲノムとその遺伝子発現機構をもつ共生オルガネラである。近年の研究で、植物における核によるオルガネラ遺伝子発現の制御において、植物のみで大きなファミリーを形成する pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質が重要な働きを担うことが明らかになってきた。

PPR タンパク質は 35 アミノ酸からなる PPR モチーフ複数個の連続で構成され、その多くは、植物オルガネラ遺伝子発現の RNA 段階の制御に配列特異的な RNA 結合タンパク質として働く。申請者らは PPR-RNA 認識機構を解明し、PPR タンパク質を利用した所望の RNA 配列に結合するタンパク質分子設計の開発基盤を構築した。さらに申請者らは、一部の PPR タンパク質が DNA 結合因子であることを発見し、RNA 結合型 PPR (rPPR) とのアミノ酸構成の比較から、DNA 結合型 PPR (dPPR) と rPPR は、ほぼ同様のメカニズムで DNA と結合することを見出し、所望の DNA 配列に結合するタンパク質分子設計の開発基盤を構築した。これらの開発基盤に立脚し、国産のゲノム編集技術 (dPPR による DNA 操作) および世界初のトランスクリプトーム編集技術 (rPPR による RNA 操作) の産業化を推し進めているところである。

過去の論文や申請者らの予備的な実験から、植物に含まれる約 500 個の PPR 遺伝子のうち、90% が RNA 結合型 (rPPR; RNA-binding PPR)、10% が DNA 結合型 (dPPR; DNA-binding PPR) と算定している。すでに 50 種以上の RNA 結合型 PPR タンパク質遺伝子が解析されているが、PPR の DNA 結合能を生化学的に解析している報告はコムギ p63 の一報のみであり (Ikeda & Gray, MCB, 1998)、またその他 4 種の PPR 遺伝子が変異体を用いた遺伝学的な解析によって DNA 代謝に関わることが示唆されているのみである。以上のように、希少種である dPPR の植物における生物学的重要性、および分子機能についての知見は極めて乏しい。それにも関わらず、dPPR の産業利用のみが先行している危うい現状にあり、dPPR の基礎生物科学的知見を拡充する必要がある。

2. 研究の目的

dPPR 複数個の分子機能解析を体系的に行い、dPPR 機能の大まかな全体像を把握することで、ゲノム編集技術開発のための基礎知的基盤の形成、オルガネラゲノム構造・発現の新知見、PPR タンパク質機能多様化の理解、を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、DNA 結合型 PPR (dPPR) の植物での働き、DNA 結合タンパク質としての基本性質を体系に解析することで、その大まかな全体像をつかむことを目的とした。シロイヌナズナから 21 種の dPPR 分子種を選定し、これらを解析対象として、(1) 当該遺伝子産物の細胞内局在、結合 DNA 結合配列の同定、(2) 当該遺伝子欠損株の生理的・分子的表現型の解析 (特にオルガネラゲノム構造または発現における働き) をおこなった。また、dPPR のタンパク質化学的な性質を明らかにするために、(3) DNA 結合型 PPR と RNA 結合型 PPR のアミノ酸の差異の解析、をおこなったとともに、(4) DNA 結合型 PPR の進化に関する解析を行った。

4. 研究成果

本研究は、DNA 結合型 PPR (dPPR) の分子機能解析を体系的に行いその大まかな全体像を把握することを目的とした。

実施項目 1: 候補 dPPR 分子の細胞内局在、結合 DNA 配列の同定

- a. dPPR-GFP 融合タンパク質による細胞内局在の解析: 解析対象である 21 種の dPPR 分子を GFP と融合し、タバコ(*N. benthamiana*)およびシロイヌナズナ培養細胞(T87)に導入することで、その局在を解析した。
- b. dPPR 分子の結合 DNA 配列の同定: dPPR-GFP 融合遺伝子を導入したナズナ T87 培養細胞を用いて、GFP をタグとした抗 GFP 抗体による ChIP アッセイ (Chromatin immunoprecipitation)により、dPPR が結合する DNA 断片を同定した。

実施項目 2: 候補 dPPR 遺伝子の変異体の生理的・分子的表現型の解析

候補因子 21 種のうち、ABRC に登録されている 23 種のシロイヌナズナ変異体(15 種の遺伝子)を入手し、ホモ化系統の単離を進めた。その結果、7 系統のホモ化ラインを得ることが出来た。ホモ化ラインが得られなかった遺伝子欠損株については、当該遺伝子が生存に必須であることが予想された。

- a. 生理的表現型(Physiological phenotype)の解析:得られた 7 種の dPPR 欠損株について、形態学的解析に加えて、呼吸活性、光合成活性に着目し、生理学的表現型の解析を行った。その結果、一部の変異株で野生型とは異なる生理的表現型、具体的には葉の形態形成異常、生育不全、クロロフィル含有量の低下、などが観察できた。候補 dPPR タンパク質の細胞内局在の結果と合わせて、解析対象である dPPR の分子機能について考察した。
- b. 分子的表現型(Molecular phenotype)の解析:遺伝子欠損株で特徴的な表現型を示す dPPR について、結合配列の詳細な解析を行い、それぞれが異なる DNA 配列に結合する結果を得た。また、各変異株におけるゲノムコピー数、転写される RNA の profiling 等を行った

実施項目 3: DNA 結合型 PPR の進化に関する解析 これまでに解析を進めてきた PPR 遺伝子について、公共データベースを利用して十数種類の植物ゲノムにおける当該 PPR 遺伝子の配列比較解析を行い、全体の保存性を指標にアミノ酸配列の違いを量的に解析することに加えて、結合塩基特異性、DNA 結合親和性、RNA 結合親和性等に関わる機能アミノ酸の違いを質的に解析した。進化と機能分岐に関わるアミノ酸の違いを見いだせたため、当該 PPR 遺伝子にコードされる組換え蛋白質を調製し、実験的な検証を行った。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. Kobayashi T, Yagi Y, Nakamura T*
Comprehensive Prediction of Target RNA Editing Sites for PLS-Class PPR Proteins in *Arabidopsis thaliana*.
Plant Cell Physiol. 60, 862-874 (2019) : 査読あり
2. Kawabe Y, Komatsu S, Komatsu S, Murakami M, Ito A, Sakuma T, Nakamura T, Yamamoto T, Kamihira M*
Targeted knock-in of an scFv-Fc antibody gene into the hprt locus of Chinese hamster ovary cells using CRISPR/Cas9 and CRIS-PITCh systems.
J. Biosci. Bioeng. 125, 599-605 (2018) : 査読あり
3. Kobayashi T, Yagi Y, Nakamura T*
Development of Genome Engineering Tools from Plant-Specific PPR Proteins Using Animal Cultured Cells.
Methods Mol Biol. 1469, 147-155 (2016) : 査読あり

4. Kazama T, Itabashi E, Fujii S, Nakamura T, Toriyama K*
Mitochondrial ORF79 levels determine pollen abortion in cytoplasmic male sterile rice.
Plant J. 85, 707-16 (2016) : 査読あり

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 中村崇裕
国産ゲノム・RNA 編集技術の医療での展開
革新的医薬・核酸医薬の開発、2018.1.20、"国内学会招待"
2. 中村崇裕
PPR タンパク質を用いた DNA/RNA 操作技術の開発
"植物科学シンポジウム 2016 植物科学とイノベーション"、2016.12.7、"国内学会招待"
3. 中村崇裕
PPR タンパク質を用いた DNA/RNA 操作技術の開発 第 9 回 DNA 鑑定学会
2016.11.11、"国内学会招待"
4. 中村崇裕
PPR タンパク質を用いた DNA/RNA 操作技術の開発
日本植物学会 第 80 回大会理事会主催シンポジウム、2016.9.18、"国内学会招待"

〔図書〕(計 2 件)

1. Tamura T, Nakamura T*
Applied RNA biosci. (Edited by Masuda S. & Izawa, S.; Springer), 151-160 (2018)
2. 田村泰造、中村崇裕*
新規ゲノム編集
ゲノム編集とその医療応用 (真下・金田編; 化学同人), 203-214 (2018)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/plantmb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。