

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292219

研究課題名(和文) PPRコードを利用した細胞質雄性不稔の稔性回復因子の同定と創成

研究課題名(英文) Identification and design of PPR-based Rf protein

研究代表者

中村 崇裕 (Nakamura, Takahiro)

九州大学・(連合)農学研究科(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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：様々なアミノ酸多型を持つRf候補遺伝子の機能検定を生化学、計算科学的手法で行い、Rf遺伝子の機能性を司るアミノ酸群を詳細に明らかにした。さらに、オクラ型細胞質ダイコンのRf蛋白質が、ミトコンドリアCMS遺伝子であるorf125転写物の翻訳開始コドン直下に結合し、2次構造形成を促進することでorf125遺伝子を翻訳の段階で抑制することを明らかにした。CMS遺伝子の発現を不活化するカスタムPPR蛋白質の構築を行った。いくつかの人工PPRタンパク質と予想したRNA配列との特異的な結合を得ることができた。BT型細胞質不稔イネのCMS遺伝子の発現を阻害する分子ツールの開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Biochemical and in silico analysis was applied to Rf-like PPR proteins those contain various amino acid polymorphism, to identify amino acids that connecting the functionality of Rf proteins. Further, a Rf protein recognizes RNA sequence and the subsequent structural change results in suppression of CMS gene expression of orf125 gene in ogura-CMS radish. Custom PPR protein was designed for CMS gene suppression. The custom, artificial PPR protein displayed expected RNA sequence recognition. This custom PPR technology was applied to develop a molecular tool for suppressing a CMS gene for a CMS rice.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：PPR ゲノム編集 CMS

1. 研究開始当初の背景

雑種強勢とは、C.ダーウィンの時代から知られる現象で、雑種1代目に異なる両親の優性形質が現れ、両親のいずれよりも体質が強健で発育が良くなる性質である(図1)。代表的な育種技術の一つであり、この性質を用いることで植物個体あたりの収穫量の増大(20~50%の収量増加)、耐病性、耐環境性などの有用形質が付与される。雑種強勢個体の効率よい作出には、異なる♀系統と♂系統の交配を容易にする系統、すなわち自殖しない系統の作出が重要である。そのひとつ、花粉が出来なくなる細胞質雄性不稔(CMS; Cytoplasmic Male Sterility)は、細胞質のゲノム、特にミトコンドリアゲノムの変異による異常遺伝子(CMS遺伝子)の発現により、雄性配偶子(花粉)が正常に機能しなくなる形質である。この形質は、しばしば核に存在する稔性回復遺伝子(Rf遺伝子; Restorer of fertility)によって打ち消され、雄性配偶子が正常に形成されることが知られている。このCMS-Rfシステムは、不稔および可稔の制御が可能なること、細胞質の母性遺伝を利用できることから、非常に重要な農業形質として知られており、イネ、ナタネなどの農業生産性を飛躍的に増加させることが分かっている。

しかし、CMS系統の作出は古典的な育種法に頼っており、いくつかの農作物の代表的な品種にしか適応されていない。CMS遺伝子とRf遺伝子の機能性判定が生理的な表現型(花粉形成の可否)に依存していることが原因で、近年発達した分子生物学を利用した分子表現型、すなわちCMS遺伝子およびRf遺伝子の配列の機能性、がほとんど明らかでないためである。いくつかの代表的な雄性不稔ミトコンドリアでは組換えによって生じたキメラ遺伝子が存在し、これが雄性不稔の原因となると考えられている。これまでに見つかっているCMS遺伝子の特徴として、疎水性領域に富む、ATP合成酵素遺伝子と共転写する、呼吸鎖複合体構成蛋白質の遺伝子の一部とキメラになっている、などの特徴を持つことが多い。

一方、最近いくつかの植物種で、CMS遺伝子の発現を抑制するRf遺伝子が同定されてきた。多くの場合、それぞれのCMS遺伝子に遺伝子特異的に作用する因子であるpentatricopeptide repeat (PPR)モチーフを持つ蛋白質がRfとして働くことが明らかになってきた。PPR蛋白質は、配列特異的なRNA結合蛋白質であり、CMS遺伝子を含むRNAと配列特異的に作用し、その発現をRNAの段階で不活化する。

申請者はこれまでの研究で、PPR蛋白質のRNA結合の分子基盤および配列特異的なRNA認識機構を司るPPRコードを明らかにした。PPRコードを用いることで、計算科学的にPPR蛋白質と基質RNAの結合が部分的に予測可能になった。さらに、任意のRNA

を標的にしたカスタムPPR蛋白質構築の基礎技術基盤が確立した。そこで、本研究では、(1) Rfとして働く天然型PPR蛋白質の予測と同定、および(2) PPR蛋白質の改変によるカスタムRfの創出を本研究の目的とした。

2. 研究の目的

細胞質雄性不稔性(CMS)は雑種強勢を利用した育種法に用いられる。CMSではミトコンドリアゲノム中の異常遺伝子(CMS遺伝子)の発現によって、雄性配偶子(花粉)の形成が損なわれる。しかし、核コードの稔性回復因子(Rf遺伝子)によって稔性が回復する。Rf遺伝子の多くはPPR蛋白質をコードし、CMS遺伝子の発現を抑制する。申請者はPPR蛋白質の配列特異的なRNA認識機構を司るPPRコードを最近明らかにした。この成果によって、Rfとして働くPPR蛋白質の結合RNA配列予測、意図する配列に結合するカスタムPPR蛋白質の構築が可能になった。そこで本研究では、(1) Rfとして働くPPR蛋白質の同定、(2) カスタムRfの創成、を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

申請者らのPPRコードの発見により、Rfとして働くPPR蛋白質のアミノ酸配列からの機能予測(結合RNA配列予測)、およびアミノ酸改変によるカスタムPPR蛋白質の構築が可能になった。そこで、(1) Rfとして働く天然型PPR蛋白質の予測と同定を行う。具体的には、(1a) 様々なアミノ酸多型を持つRf様遺伝子の機能検定、(1b) 未同定Rf遺伝子の同定、(1c) 潜在的Rf遺伝子の探索、を行う。そして(2) PPR蛋白質の改変によるカスタムRfの創成、を行う。計算科学、遺伝学、および生化学的手法を用いて研究を行い、CMS-Rfシステム高度利用化の先鞭をつける。

4. 研究成果

(1) Rfとして働く天然型PPR蛋白質の予測と同定

(a) 様々なアミノ酸多型を持つRf様遺伝子の機能検定 オグラ型細胞質ダイコンを材料に様々なアミノ酸多型を持つRf候補遺伝子の機能検定を行った。オグラ型細胞質のRfとして働くorf687遺伝子では、数箇所のアミノ酸多型でその機能性(稔性回復における優性もしくは劣性)が変化する。種苗会社と共同し、様々なダイコン品種、数十種、を材料に供した。計算科学による予測を行い、CMS遺伝子との結合を計算科学的に予測した。次に、様々なダイコン品種、数十種、の実際の遺伝子機能の判定を行い、予測との比較を行った。

また、申請者らはオグラ型細胞質ダイコン(CMS遺伝子orf125; Rf遺伝子orf687)では、16個のPPRモチーフを持つRf蛋白質が、ミトコンドリアCMS遺伝子であるorf125転写物の翻訳開始コドン直下に結合

し、2次構造形成を促進することで **orf125** 遺伝子を翻訳の段階で抑制することを生化学的手法で明らかにした(論文準備中)。アミノ酸多型を有するいくつかの **Rf** 候補遺伝子の組換え蛋白質を調製し、その生物活性を生化学的に検証した(蛋白質存在下での RNA 構造マッピングなど)。計算科学と実験的な検証をフィードバックさせることで、**Rf** 遺伝子の機能性を司るアミノ酸群を詳細に明らかにし、予測プログラムの精度を向上させた。

(b) 未同定 **Rf** 遺伝子の同定 **Rf** 遺伝子が未同定の **CMS** 系統について、潜在的な **Rf-PPR** 遺伝子を推測し、遺伝学的な解析と合わせて、**Rf** 遺伝子的高速同定法を確立することを目的とした。最初の材料として、イネの **CMS** を用いて、該当する核ゲノム領域中の **PPR** 遺伝子を抽出し、潜在的な **CMS** 遺伝子と配列特異的に結合する **PPR** 遺伝子を予測した。現在、マップベーススクローニングによって、予測の結果を検証する。同時に、**CMS** 遺伝子に作用する候補 **PPR** 遺伝子を順次 **CMS** イネに導入し、予測の結果を検証について実験的な検証を行った。遺伝学的に優性の **Rf** 遺伝子として働くことが明らかになった **PPR** 遺伝子について、ミトコンドリア **orf352** 遺伝子 mRNA との結合を生化学的に検証した。具体的には、当該 **PPR** の組換えタンパク質をコムギ胚芽無細胞系により調製し、ゲルシフト法、アルファスクリーン法などの生化学的手法で、**CMS** 遺伝子 mRNA との結合を検証した。

(c) 潜在的 **Rf** 遺伝子の探索 現存のミトコンドリアゲノム中にも、潜在的な **CMS** 遺伝子が存在し、核コードの種特異的な **PPR** 蛋白質によってその発現が抑制されていると予測している(図4)。これまでに同定された **CMS** 遺伝子の特徴(疎水性領域に富む、ATP 合成酵素遺伝子と共転写する、呼吸鎖複合体構成蛋白質の遺伝子の一部とキメラになっている、など)を指標に潜在的な **CMS** 遺伝子を推定する。潜在的な **CMS** 遺伝子に作用する **PPR** 蛋白質を計算的に予測する。当該 **PPR** 蛋白質遺伝子欠損株(イネ、またはシロイヌナズナ)を入手し、実験的な証明を行う。[H25年度は、潜在的な **CMS** 遺伝子に作用する候補 **PPR** 蛋白質遺伝子の計算的な予測、当該遺伝子の欠損株の入手を行う。H26年度以降は計画に沿って実験を行う]

(2) **PPR** 蛋白質の改変によるカスタム **Rf** の創出

PPR コードを用いて、**CMS** 遺伝子の発現を不活化するカスタム **PPR** 蛋白質の構築を行った。最初の実験材料として、いまだ **Rf** 遺伝子が同定されていない細胞質イネの **CMS** 原因遺伝子に特異的に結合し、不活化するカスタム **PPR** 蛋白質を構築した。すでに A、C、

G、U 各塩基に結合する **PPR** コードの収集は完了している(特許出願準備中)。まず、迅速な評価が可能な酵母モデル系(RNA・蛋白質の相互作用を検証する **three-hybrid** 法)を用いて、カスタム **PPR** 蛋白質の RNA 結合特性の解析を試みたが、酵母実験系で再現性のある結果が得られなかった。異なるアッセイ系の確立が必要と考えられた。そこで、構築したカスタム **PPR** タンパク質の機能性を動物培養細胞で検証する実験系を確立した。また、新たな生化学的な実験系として、**alpha screen** 法によってタンパク質と RNA との結合を解析する実験系を確立した。これら実験系を基に、いくつかの人工 **PPR** タンパク質を構築、検証したところ、予想した RNA 配列との特異的な結合を得ることができた。

BT 型細胞質不稔イネの **CMS** 遺伝子である **orf79** に特異的に作用し、編集(C→U への変換)することで、タンパク質コード領域に新たな翻訳終止コドンを形成し、**CMS** 遺伝子の発現を阻害する分子ツールの開発を行った。動物培養細胞で当該分子ツールの検証を行った。具体的には複数個の **PPR** モチーフを人工的に連結することで、目的とするカスタム **PPR** 分子を設計し、全遺伝子合成により目的 DNA 断片を得た。設計した **PPR** 分子の配列特異的な RNA 結合能を動物培養細胞で検証した。目的とする性質が検証できた **PPR** 分子に RNA 編集を補助するエフェクタードメインを連結し、解析に用いた。

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9件)

Yagi, Y., Tachikawa, M., Noguchi, H., Satoh, S., Obokata, J. & Nakamura, T.

Pentatricopeptide repeat proteins involved in plant organellar RNA editing.

RNA Biol. **10**, 1419-1425, doi: 10.4161/rna.24908 (2013).

Ichinose, M., Sugita, C., Yagi, Y., Nakamura, T. & Sugita, M.

Two DYW subclass PPR proteins are involved in RNA editing of *ccmFc* and *atp9* transcripts in the moss *Piscomitrella patens*: First complete set of PPR editing factors in plant mitochondria.

Plant Cell Physiol. **54**, 1907-1916, doi: 10.1093/pcp/pct132 (2013).

Kazama, T., Yagi, Y., Toriyama, K. & Nakamura, T.

Heterogeneity of the 5'-end in plant mRNA may be involved in mitochondrial translation.

Front. Plant Sci. **4**, 517, doi:

10.3389/fpls.2013.00517 (2013).

Yagi, Y., Nakamura, T. & Small, I.
The potential for manipulating RNA with pentatricopeptide repeat proteins.
Plant J. **78**, 772-782, doi: 10.1111/tpj.12377 (2014).

Okuda, K., Shoki, H., Arai, M., Shikanai, T., Small, I. & Nakamura T.
Quantitative analysis of motifs contributing to the interaction between PLS-subfamily members and their target RNA sequences in plastid RNA editing.
Plant J. **80**, 870-82, doi: 10.1111/tpj.12687 (2014).

Imai, T., Nakamura, T., Maeda, T., Nakayama, K., Gao, X., Nakashima, T., Kakuta, Y. & Kimura, M.
Pentatricopeptide repeat motifs in the processing enzyme PRORP1 in *Arabidopsis thaliana* play a crucial role in recognition of nucleotide bases at T ϕ C loop in precursor tRNAs.
Biochem. Biophys Res. Commun. **450**, 1541-1546, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.030 (2014).

Kazama T, Itabashi E, Fujii S, Nakamura T, Toriyama K.
Mitochondrial ORF79 levels determine pollen abortion in cytoplasmic male sterile rice.
Plant J. 85(6):707-16. doi: 10.1111/tpj.13135. (2016).

Yagi, Y., Shirakawa, M. & Nakamura, T.
Challenges of EditForce Inc., to go beyond genome editing.
Nature **528**, sponsors feature, (2015).

Sakuma, T., Takenaga, M., Kawabe, Y., Nakamura, T., Kamihira, M. & Yamamoto, T.
Homologous recombination-independent large gene cassette knock-in in CHO cells using TALEN and MMEJ-directed donor plasmids.
Int. J. Mol. Sci. **16**, 23849-23866, doi: 10.3390/ijms161023849 (2015).

〔学会発表〕 (計 22 件 ; 招待講演のみ)

招待講演 : 2015 年 (国際学会 2 件、国内学会 5 件)、2014 年 (国際学会 1 件、国内学会 9 件)、2013 年 (国際学会 1 件、国内学会 4 件)

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : PPR モチーフを利用した DNA 結合性蛋白質およびその利用
発明者 : 中村崇裕、八木祐介、大川恭行、山本卓、佐久間哲史
権利者 : 国立大学法人九州大学・広島大学
種類 : PCT 出願
番号 : PCT/JP2014/061329
出願年月日 : 2014 年 4 月 22 日
国内外の別 : PCT 出願

○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 :
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/plantmb/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし