

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14626

研究課題名(和文)稔性回復遺伝子ホモログの人工進化による特異的RNA結合タンパク質の合成

研究課題名(英文) Synthesis of a specific RNA-binding protein via the artificial evolution of Rf-PPR homologs

研究代表者

藤井 壮太 (Fujii, Sota)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：90716713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：任意のRNAに結合するタンパク質を生み出す事ができるだろうか？近年，ゲノム編集技術が急速に発展している中で，標的RNAの発現を制御する技術の確立への期待は大きい．本研究では，このようなタンパク質を合成する系を，植物が持つRf-PPRタンパク質のモジュール性と多様性に着目して確立することを目指した．まず，大腸菌内でRNAへのタンパク質結合を可視化するレポーター系を確立した．一方，Rf-PPRのホモログについて機能解析を行い，ミトコンドリアのRNA代謝に関わることを論文として報告した．本研究により，Rf-PPRタンパク質の自在制御へ近づいたと考えている．

研究成果の概要(英文)：In the age of genome-editing, technologies that enable engineering of RNA expression is demanded. In this project, I aimed to establish such system by using the Rf-PPR protein, an RNA-binding protein with great diversity and ubiquitously present in angiosperm species. First of all, I established a system that visualizes the binding of a protein to an RNA sequence in *E. coli*. I have also performed functional characterization of an Rf-PPR homolog. The RFL2 was shown to be involved in the cleavage of the RNA transcript of the mitochondrially-encoded orf291.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：稔性回復遺伝子 人工進化 RNA編集

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

任意の RNA に結合するタンパク質を生み出す事ができるだろうか? 近年, ゲノム編集技術が急速に発展している中で 標的 RNA の発現を制御する技術の確立への期待は大きい. その一方で, 生体内における RNA が受ける転写後修飾を自在にコントロールできる程柔軟な実験系は存在しない.

近年, 「ゲノム編集」はバクテリアからヒト細胞を含むあらゆる生物の遺伝子操作に求められており, 今後もゲノム編集を可能にする技術が分子生物学を牽引してゆくことは想像に難くない. また, 今後の作物改良にゲノム編集技術が大きな役割を果たす事も容易に予想できる. その一方で, 生体内における RNA が受ける転写後修飾, すなわちスプライシング, 塩基置換, 分解, 二次構造の変化, 翻訳, メチル化・脱メチル化などをコントロールできるような「トランスクリプト編集」実験系は存在しない. このような技術の開発は分子生物学の新たな可能性を引き出すのみならず, 医学や農学にとっても重要なツールとなる. 応募者はこれまでの研究において,

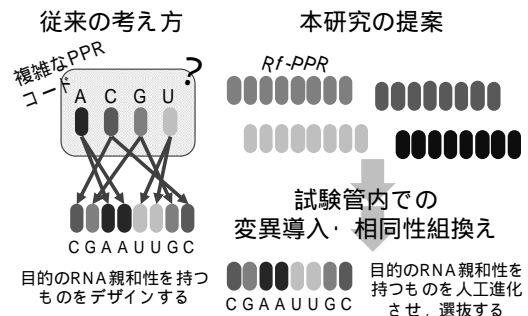
Pentatricopeptide Repeat (PPR) と呼ばれるタンパク質の機能メカニズムの解明を目指してきた. PPR は 35 個のアミノ酸の繰り返し構造であり, 繰り返し単位それぞれがひとつの RNA 塩基を認識し, 一対一で結合する. 例えば, PPR 配列が 20 回繰り返された場合, その 700 (35x20) アミノ酸長のタンパク質は 20 塩基の特定の RNA 配列を高い親和性で認識して結合する. このため, PPR の RNA 認識特異性を制御することで, トランスクリプト編集が可能になると期待されている.

2. 研究の目的

2012 年, 応募者を含むグループの研究によって PPR が RNA に結合する法則性 (PPR コード) の一部が世界で初めて公開された (Barkan, Rojas, Fujii et al. *PLoS Genet* 8: e1002910-, 2012). その後, PPR の RNA 改変への応用は他のグループによっても試行が進んでいる. にもかかわらず, 応募者が関わったわずかな例 (Barkan, Rojas, Fujii et al. 2012; Fujii et al. *Plant Cell* 23: 3079-, 2013) 以外では, これまでに PPR の機能改変に成功した例は報告されていない. これは, PPR が結合する RNA との一対一の対応関係が未だ特定されていない事が原因である. 例えば PPR の 35 個のアミノ酸のうち, 14 番目のアミノ酸が RNA への結合強度を決定している一方で, 1, 3 と 6 番目の組み合わせが縮退的に結合する RNA 塩基を決定している (Barkan, Rojas, Fujii et al. 2012; Fujii et al. 2013). 多くの研究グループはこの複雑な PPR コードを解読し, 対応する PPR モジュールを数珠つなぎに連結する事で, 特異的 RNA に結合するタ

ンパク質をデザインする, という困難なフォワードエンジニアリングを目指している.

応募者は PPR の中でも CMS の稔性回復遺伝子 Rf がコードする PPR の進化原理や機能について研究を行ってきた (Fujii et al. *PNAS* 108: 1723-, 2011). CMS は顕花植物に一般的に見られるミトコンドリア遺伝性花粉不稔現象である. 一方核コードの Rf-PPR 遺伝子は CMS 原因遺伝子の発現を抑制するために速く進化する. この Rf-PPR 遺伝子群が持つ遺伝的な性質を利用する事で, 任意の RNA に結合する PPR を進化させられる (下図) と考え本申請に至った.



3. 研究の方法

1) エラー誘発 PCR による Rf-PPR 遺伝子への変異導入 (図 1)

シロイヌナズナの Rf-PPR パラログは 26 遺伝子が見つかり, 互いに高い相同性を示す. これらの遺伝子の cDNA の多くはこれまでの研究で既にクローニングしてある. これらの cDNA を鋳型とし, 変異を起こし易い PCR 条件を検討することで, 一遺伝子あたり 5~10 アミノ酸の変異が導入された Rf-PPR のライブラリー構築を目標とする (図 1 上部).

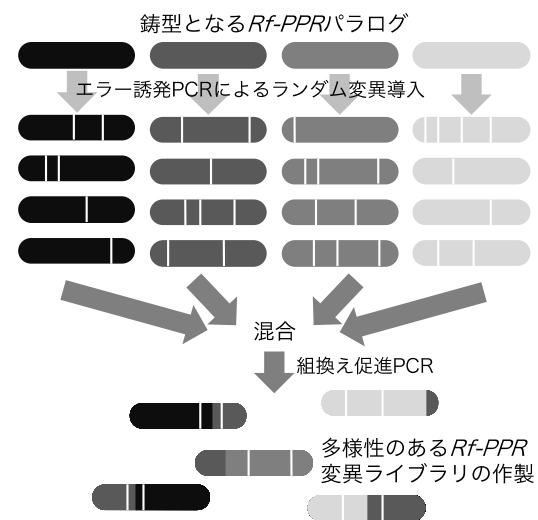


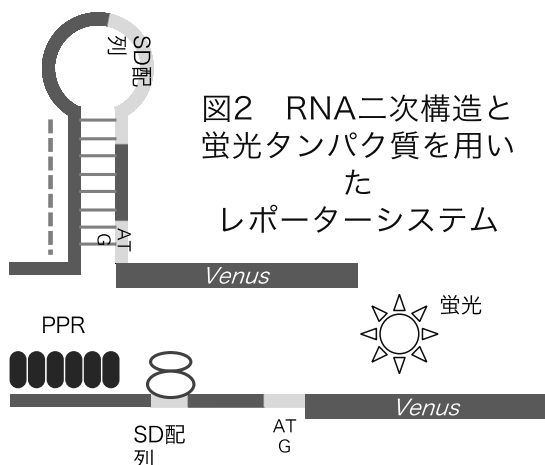
図 1 Rf-PPR を用いた多様な RNA 認識結合活性を持つ遺伝子プールの作製

その一方で Random priming 法などの実験方法を検討し, Rf-PPR 間の相同性組換えを促し RNA 認識特異性の多様性を増幅させる (図 1 下部). 本実験ではライブラリーのスケールを評価することが肝要である. 最

初にパイロット実験の規模でクローニング後の配列解析で変異導入効率や組換え効率を算出し、エラー誘発 PCR と組換え促進 PCR の条件や順番等を最適化する。

2) 特異的な RNA への結合能力を獲得した人工タンパク質の選抜

変異ライブラリーの中から、任意の RNA への結合活性を持つものをスクリーニングできるシステムを構築する。既にこのような実験系を構築できる可能性を、モデル PPR タンパク質である PPR10 を用いて示してきた。PPR10 は葉緑体の atpH と呼ばれる遺伝子の 5' 非翻訳領域に結合することが知られている (Prikrýl et al. 2009)。この領域は通常 RNA 二次構造を形成するが、PPR10 が結合することで二次構造の形成が阻害され、Shine-Dalgarno (SD) 配列が露出し、リボソームが翻訳を開始できるようになると期待した (図 2)。



3) 人工進化させたタンパク質の機能評価

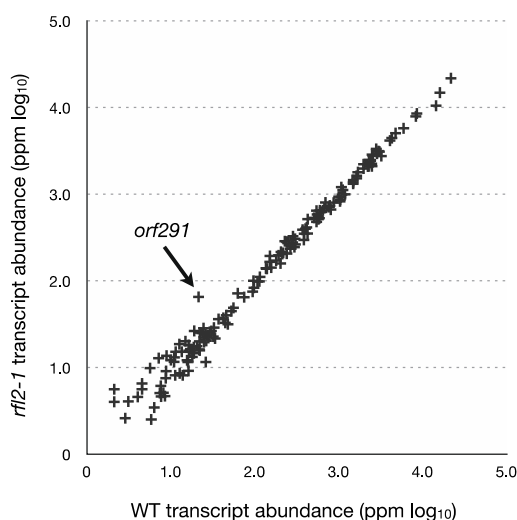
上述した蛍光による一次スクリーニングの問題点として、RNA 結合活性が高いものではなく、大腸菌内での可溶性が増加したものも選抜されてきてしまう可能性がある。組換えタンパク質を精製し、RNA ゲルシフトアッセイや Biacore で標的 RNA への結合活性を評価する。この二次スクリーニングによって、真に高い RNA 結合活性を持つように進化させた Rf-PPR を選抜する。

二次スクリーニング後、シロイヌナズナの ppr10 変異体や rf12 変異体に人工進化させた PPR タンパク質を導入し、表現型を相補できるか試行する。ppr10 への T-DNA 挿入系統は胚致死であるため、遺伝子導入によって表現型を相補できるかは簡単に試験できる。rf12 はミトコンドリアの orf291 遺伝子の発現が抑制できなくなる変異体であり、RT-PCR によって定量性良く表現型を評価できる。

4. 研究成果

まず、大腸菌内で RNA へのタンパク質結合を可視化するレポーター系を確立した。そしてエラー誘発 PCR によって Rf-PPR に人為的に変異を導入する実験系の確立を目指した。Random Priming 法を用いて相同性組み換えを誘発し、RNA 認識特異性が拡大された PPR ライブラリーの構築を試みたが、良好な PCR 断片を得ることは難しかった。一方、アブラナ科植物のゲノム DNA から多様な Rf-PPR フラグメントを次世代シーケンサーによって一度に大量に同定することを試みた。しかし、配列のヘテロ性が少ないためかシーケンス解析がうまくいかず、良好なデータは得られなかった。

図 3



一方、個々の Rf-PPR タンパク質の機能解析が進捗し、RFL2 タンパク質がミトコンドリアの orf291 遺伝子の RNA を切断する機能を持つことを明らかにした (図は Fujii et al. *Plant J* 2016 より抜粋)。まず、トランスクリプトーム解析によって rf12 変異体では orf291 遺伝子に由来する RNA が多く蓄積していることを明らかにした (図 3)。ノーザンブロット解析を行ったところ、rf12 変異体では orf291 遺伝子の RNA が前駆体のままで蓄積していた (図 4)。

In vitro での RNA 結合アッセイを行ったところ、RFL2 タンパク質は orf291 RNA の切断サイトの近辺に直接的に結合していた (図 5)。

次にアブラナ科植物のコレクションを用いて調査したところ、RFL2 が結合するサイトは特に多様性が高いことが明らかとなった (図 6)。

以上の解析から RFL の RNA 認識特異性と進化原理についての知見が得られた。

図 4

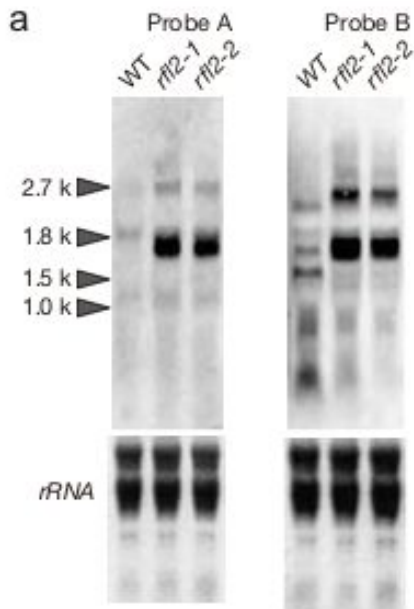


図 5

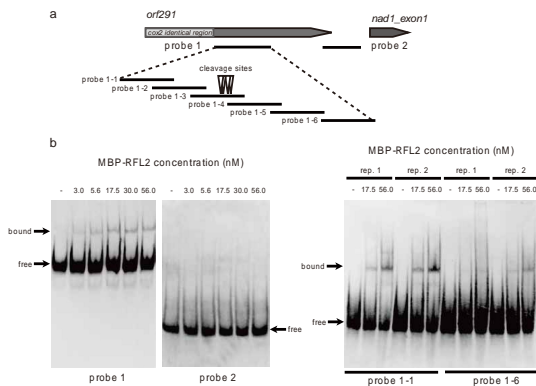
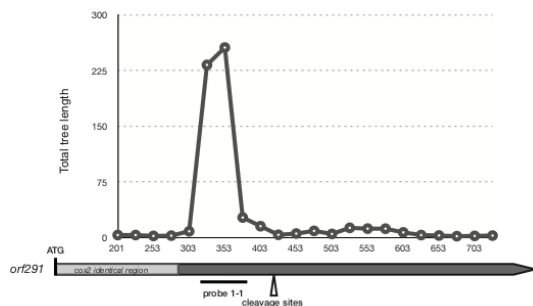


図 6



さらに、RFL3 タンパク質についても機能解析を行った。RFL3 は最近の遺伝子重複によって RFL2 と分岐した遺伝子である。rfl3 変異体はミトコンドリアの nad7 遺伝子の 2 番目のイントロンのスプライシングが効率良く行えなくなっており、生育に支障を来

していた。従って nad7 遺伝子の前駆体配列に結合するのではないかと期待された。

植物のミトコンドリアゲノムは大きな多様性を持つことが知られている。しかし、その多様化メカニズムや、進化的意義は未知である。本研究では Rf-PPR タンパク質の機能や多様性を明らかにすることができた。RFL2 と RFL3 は最近の遺伝子重複によって誕生したにも関わらず、それぞれが異なる機能を担っていた。Rf-PPR タンパク質はミトコンドリアの特定の配列へ結合する上、その標的配列はアブラナ科植物の orf291 相同配列の中でも特に多様性が高い部分であることが明らかとなった。Rf-PPR がなぜ多様性が高い配列を認識するのかは不明であるが、Rf-PPR の RNA 認識アミノ酸残基が正の選択を受けているという以前の観察 (Fujii et al 2011) と適合している。

本研究の成果により、Rf-PPR の自在制御へ近づいたと考えている。

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1件)

Fujii S, Suzuki T, Giegé P, Higashiyama T, Koizuka N, Shikanai T. The Restorer-of-fertility-like 2 pentatricopeptide repeat protein and RNase P are required for the processing of mitochondrial orf291 RNA in Arabidopsis. Plant Journal, 2016, 86, 504-513.

[学会発表 (計0件)

[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

藤井 壮太 (FUJII, Sota)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
助教
研究者番号：90716713

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

()