

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 27 年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 挑戦的萌芽研究 4. 補助事業期間 平成 27 年度～平成 28 年度

5. 課題番号

1	5	K	1	4	6	2	6
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 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

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
9 0 7 1 6 7 1 3	フジイ ソウタ 藤井 壮太	バイオサイエンス研究科	助教

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

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？本研究では、本研究ではRf-PPRと呼ばれるRNA結合タンパク質をコードする多重遺伝子群に人為的に変異を導入することで、任意のRNAに結合するタンパク質を人工進化させる事を目指す。今年度はエラー誘発PCRによってRf-PPRに人為的に変異を導入する実験系の構築を試みた。まず、Rf-PPRのパラログをdegenerate PCRを用いて4種のアブラナ科植物から増幅した。これらの中には推定40種類のRf-PPRパラログ配列が存在すると思われる。現在これらの断片を鋳型に混合PCRを行い、試験管内でのPCRエラーによって多様なRf-PPRライブラリーが構築できるか検査している。一方、Random priming法によってRf-PPR間の相同性組換えを促しRNA認識特異性の多様性が拡大されたライブラリーの構築を試みたが、現在までに良好なPCR増幅断片は得られていない。

また、特異的なRNAへの結合能力を獲得した人工進化PPRの選抜を目指し、蛍光タンパク質Venusを用いたスクリーニング系の開発を行った。タンパク質翻訳の開始点となるShine-Dalgarno(SD)配列部分がRNA二次構造を取るような配列をデザインし、PPRがその部分に結合した場合SD配列がオープンになり、Venusが翻訳されるというシステムである。モデルPPRタンパク質であるPPR10の結合配列をSD配列と連結して二次構造を取るようデザイン(PPR10-SD隠蔽型ベクター)したところ、実際下流に連結したVenusの発現は見られなくなった。一方、同じ大腸菌株にPPR10を発現させたところ、蛍光が回復した。従って、PPRの結合活性を簡易にスクリーニングできる系が開発されたと考えている。

10. キーワード

- | | | | |
|-------------|----------|-----------|-----|
| (1) 稔性回復遺伝子 | (2) 人工進化 | (3) RNA編集 | (4) |
| (5) | (6) | (7) | (8) |

11. 現在までの進捗状況

(区分)(3) やや遅れている。

(理由)

上述したとおり新規レポーター系の開発は概ね完了できたと考えている。
 その一方で、多様性のあるRf - PPRライブラリーの開発は現在までに成功しておらず、最大の理由はRandom priming法によるPCRフラグメント間の組換え促進系が確立できなかったことにある。この遅れによって任意のRNA配列への結合活性を持つPPRのスクリーニング実験まで到達することができなかった。
 本研究の関連で、Rf - PPRの一種であるRFL2の詳細な機能解析を行ってきた。この解析より、Rf - PPRがRNAの二次構造のリモデリングに関わる可能性が示唆され、研究開始当初は未解明であったPPRの機能を見出すことができた。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

今年度は、引き続きエラー誘発PCRによって多様性のあるRf - PPRライブラリーの開発を目指す。これまでにPCRで増幅した推定40種類のRf - PPR断片を鋳型としてPCRを行い、相同性組換えを誘発する。これらをクローニングし、配列をシークエンスすることで、Rf - PPRライブラリーの多様性を評価する。
 ライブラリーを得られた場合、PPR10-SD隠蔽型ベクターを発現する株に導入し、Venusの蛍光が回復するコロニーをスクリーニングする。コロニーからプラスミドを単離し、中身のRf - PPR配列を確認する。このRf - PPRがPPR10結合配列に対して結合活性を持つかどうかを、in vitroのRNA結合アッセイによって評価する。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

昨年度は人工進化させたRf - PPRをシークエンス解析によってスクリーニングする予定であったが、Random priming法を用いた良好な組換えDNA断片が得られず、スクリーニングまで至らなかったため。

(使用計画)

今年度はこれらの次年度使用額の多くをRf - PPRのシークエンス解析を行うための消耗品費に割り当てる予定である。

(課題番号： 15K14626)

(注) ・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(2 / 4)

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(1)件/うち査読付論文 計(1)件/うち国際共著 計(1)件/うちオープンアクセス 計(0)件

著者名		論文標題				
Megumi Iwano, Kanae Ito, Sota Fujii, Mitsuru Kakita, Hiroko Asano-Shimosato, Motoko Igarashi, Pulla Kaothien-Nakayama, Tetsuyuki Entani, Asaka Kanatani, Masashi Takehisa, Masaki Tanaka, Kunihiko Komatsu, Hiroshi Shiba, Takeharu Nagai, Atsushi Miyawaki, Akira Isogai & Seiji Takayama		Calcium signalling mediates self-incompatibility response in the Brassicaceae				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Nature Plants	有	1	2015	15128	該当する	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
http://dx.doi.org/10.1038/nplants.2015.128						
オープンアクセス						
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難						

(学会発表) 計(0)件/うち招待講演 計(0)件/うち国際学会 計(0)件

発表者名		発表標題	
学会等名	発表年月日	発表場所	

(図書) 計(0)件

著者名		出版社	
書名		発行年	総ページ数

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(課題番号: 15K14626)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(3/4)

(取得) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究: -

17. 備考

--