

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28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29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？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。本研究では遺伝育種学によって見出された、細胞質雄性不稔性(Cytoplasmic male sterility: CMS)における稔性回復遺伝子(Fertility restorer: Rf)が持つ性質に着目し、この課題の克服を目指す。RfはCMS原因タンパク質の発現を抑制する事が知られており、PPRと呼ばれるRNA結合タンパク質をコードする。本研究ではRf-PPR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。

昨年度までの研究で、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断片が得られなかった。そこで、今年度は発想を転換し、より広いRf-PPRの鋳型シーケンスを用意し、混合することで、ヘテロ性の高いライブラリーの構築を目指すこととした。約80種のアブラナ科植物のゲノムDNAを抽出し、縮退プライマーによってRf-PPRの増幅を行った。これらを混合することで、より多様性の高いライブラリーが構築されることが期待されたため、現在シーケンス解析を行っている。また、特異的なRNA配列への結合能力を獲得したPPRをスクリーニングする系はすでに確立した。

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)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

昨年度までの研究では、エラー誘発PCRの実験系が確立できず、やや遅れていた。今年度は自然変異を用いることでRf-PPRライブラリの多様性をカバーすることができたと考えられた。また、Rf-PPRの進化メカニズムの研究を行い、RFL2タンパク質がorf291遺伝子のRNAを切断する機能を持つことを明らかにし、論文として公表した。これは本研究課題では当初予定していなかった成果であり、人工的にRf-PPRの進化を可能にする上で重要なステップになったと考えている。従って、本研究を包括的に鑑みて、概ね順調に進展していると判断した。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

今後は高速シーケンサーを用いてRf-PPRライブラリーの多様性評価を行う。現在、PacBioシーケンサーを用いて、得られたライブラリーのシーケンス解析を行っている。また、この解析にあたり、Rf-PPRの配列の由来となる個々の種に特有のバーコード配列をPCR断片に付加している。バーコード配列によって配列をソートし、アセンブリーを行うことで、Rf-PPRがどの種に由来するのか明らかにしていく。当初予定していなかったが、本解析によって、Rf-PPRの進化メカニズムの解明にも迫ることが期待できる。また、得られたRf-PPRライブラリーをスクリーニングシステムに導入するべく、調整を行っている。今後、蛍光を指標にコロニーの選抜を行い、任意のRNA配列に結合するようなRf-PPRの合成を目指す。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

現在得られたRf-PPRライブラリーのシーケンス解析を行っている途中であるが、その結果次第では追試を行う必要がある。その場合のシーケンス解析に関わる費用を残す必要があったため。また、スクリーニング実験を計画しており、そのための費用をまだ執行していないため。

(使用計画)

今年度はシーケンスの結果を解析し、その結果次第では追試を行う。そのための消耗品あるいは委託経費に割り当てる予定である。そして、Rf-PPRのスクリーニングを行うが、その際に生じる消耗品にも割り当てる。最後に、論文投稿料が計上されている。

(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 28 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				
Fujii S, Suzuki T, Giege; 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.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Plant Journal	有	86	2016	504-513	該当する	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1111/tpj.13185						
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

--