

# 山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

所属機関 名古屋大学

職名・氏名 特任助教・一瀬 瑞穂

## 1. 研究テーマ

デザイン可能な RNA 結合タンパク質を用いたオルガネラ RNA 操作ツールの開発

## 2. 研究の背景・目的

ミトコンドリアと葉緑体は、呼吸や光合成をはじめ生命維持に必須な物質を生産するオルガネラであり、細胞核とは別に独自のゲノム DNA および遺伝子発現系を有している。オルガネラ遺伝子の機能を調節することは、生物の機能増強が期待される。しかし、オルガネラ遺伝子を改変するための有効な手段は未だ開発されていない。そこで本研究では、デザイン可能な RNA 結合タンパク質を利用したオルガネラに適用可能な RNA 機能調節ツールの開発を目指した。

## 3. 実験の方法

RNA 機能を調節するためのツールとして、任意の RNA 配列を認識するカスタム RNA 結合タンパク質 (RBP) に、作用ドメインを搭載した「RNA 調節酵素」を創製する。

そのために、以下の課題に取り組む。

### 1. カスタム RBP のデザイン

RNA 結合モジュールを用いて、目的の RNA 配列を特異的に認識するカスタム RBP をデザインする。

### 2. カスタム RBP に作用ドメインを搭載した RNA 調節酵素の創製

1 でデザインした RBP に、RNase ドメインを連結した「RNA 制限酵素」および、RNA 編集ドメインを連結した「RNA 編集酵素」を創製した。

### 3. RNA 調節酵素の作用検証

各 RNA 調節酵素と標的配列を含む RNA を共発現させ、標的 RNA への影響を確認する。

## 4. 実験結果

### <RNA 制限酵素>

1. 葉緑体 RNA-A の配列を認識するようにデザインした RBP に RNA 切断ドメインを搭載した (RNA 制限酵素)。
2. RNA 制限酵素と標的配列を含む RNA-A を大腸菌内で共発現させた結果、標的 RNA の切断が確認された。
3. 葉緑体移行シグナルを付加した RNA 制限酵素を、植物体内で発現させた形質転換体を作成した。その結果、標的遺伝子 A の切断は確認されなかった。

### <RNA 編集酵素> (エディットフォース株式会社との共同研究)

1. RNA-B を認識するようにデザインした RBP に、ドメイン X およびドメイン Y をそれぞれ搭載した (RNA 編集酵素 X および Y)。
2. 各 RNA 編集酵素と RNA-B を大腸菌内で共発現させた結果、RNA 編集酵素 X が特定の RNA 塩基シチジン (C) を 90%以上の効率でウリジン (U) に (C-to-U 編集)、RNA 編集酵素 Y がウリジンを 20~30%の効率でシチジンに置換 (U-to-C 編集) することを確認した。

## 5. 今後の展望

### <RNA 制限酵素>

本研究でデザインした RNA 制限酵素は、大腸菌内において標的 RNA への切断活性が観察されたが、植物体内では切断は見られなかった。実際に、RNA 制限酵素が葉緑体に局在しているかどうかを、GFP を融合して観察する予定である。また、他の候補 RNase ドメインを連結して、効果を検証する。

### <RNA 編集酵素>

大腸菌内において 2 種の RNA 編集酵素から、それぞれ C-to-U または U-to-C への編集活性が検出された。C-to-U 編集が高活性を示した一方、U-to-C 編集活性は低かったため、今後はドメイン Y の改良を行う。

## 6. 研究成果の発信方法

本研究で開発した RNA 編集酵素を用いて特定の RNA 塩基を置換する方法は特許出願中である。また、本研究で得られた成果は国内外の学会での成果発表および論文投稿を行う予定である。