

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14917

研究課題名(和文) RNA結合タンパク質を介してオルガネラRNA機能を調節する新たな実験系の開発

研究課題名(英文) Development of an RNA binding protein-based tool for manipulating organelle RNA function

研究代表者

杉田 護 (SUGITA, Mamoru)

名古屋大学・遺伝子実験施設・教授

研究者番号：70154474

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)：配列特異的に結合するRNA結合性PPRタンパク質を利用した「RNA機能を調節する新しい実験系」開発のための基礎研究を行った。本研究により、葉緑体イソロイシンtRNAのスプライシングに關与する新規のPPRタンパク質を同定し、そのRNA結合領域を初めて明らかにした。さらに、特定のRNA配列を認識するカスタムPPRタンパク質をデザインし、これにRNaseドメインを付加した配列特異的RNA切断酵素を創製した。本研究成果はPPRタンパク質を利用した「RNA機能を調節する新しい実験系」の開発に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：A new tool for manipulating organelle RNA functions urgently needs to be developed. Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are sequence-specific RNA-binding proteins and consist of a tandem array of multiple PPR motifs. Each of PPR motifs aligns to one nucleotide in the RNA target. The amino acid side chains at two specific positions in each motif confer nucleotide specificity in a predictable and programmable manner. Thus, PPR proteins provide an extremely promising opportunity to create custom RNA-binding PPR proteins with tailored specificity. In this study, we created custom PPR proteins to understand PPR-RNA recognition modes and to manipulate target RNA molecules.

研究分野：植物オルガネラ遺伝子発現制御

キーワード：RNA結合タンパク質 PPRタンパク質 RNAスプライシング RNA編集 RNA分解 ヒメツリガネゴケ 葉緑体 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

近年、TALEN や CRISPR/Cas9 による「ゲノム編集」と small RNA による「RNA 干渉」を介した遺伝子発現抑制が有力な実験手法として盛んに使われている。しかし、これらの手法は葉緑体やミトコンドリアには適用できない。そこで、オルガネラにも適用可能な新しい実験手法の開発が急務の課題となっている。

葉緑体とミトコンドリアの遺伝子発現は転写後の RNA レベルで多様な制御を受けているが、この制御に核コードのペントリコペプチドリピート (PPR) タンパク質が中核的因子として関与していることが明らかにされた。さらに PPR タンパク質が標的 RNA 配列を認識する「PPR コード」が 2012 年に Barkan らによって初めて報告された (PLoS Genet. 8, e1002910)。PPR タンパク質は P モチーフのみ、または P, L, S の 3 種類のみで構成されている。このうち、P モチーフと S モチーフの 5 番目と 35 番目のアミノ酸の組み合わせで RNA の 1 塩基を認識するが、L モチーフは塩基認識に寄与しないと考えられていた。しかし、P, L, S モチーフそれぞれの認識塩基については例外も多く、いまだ RNA 結合認識機構は十分に解明されているとは言えない。そこで、PPR タンパク質が有している高度の RNA 配列認識の真の原理を探るとともに、PPR タンパク質を利用した「RNA 機能を調節する新しい実験系」の開発につながる挑戦的萌芽研究に着手することにした。

2. 研究の目的

(1) 新規の PPR タンパク質が作用する標的 RNA 分子を特定し、その結合部位を明らかにする。

(2) 特定の RNA 配列を認識するカスタム PPR タンパク質をデザインし、標的 RNA 編集部位における「RNA 編集」への影響を評価する。

(3) カスタム PPR タンパク質に RNA 分解活性を付加した「新規の配列特異的 RNA 切断酵素」を創製する。この作用を葉緑体またはミトコンドリアの中で検証する。

最終目標として、葉緑体とミトコンドリアの遺伝子発現を RNA レベルで調節する新しい実験技術を開発する基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) ヒメツリガネゴケの新規 PPR タンパク質 PpPPR4 をコードする核遺伝子に薬剤耐性マーカー遺伝子を挿入した遺伝子破壊変異株を作製し、変異株の遺伝子発現解析を行い、PPR タンパク質の標的 RNA 分子を同定する。標的 RNA の結合部位を PPR コードに基づいて予測した。予測結合配列をもつ合成 RNA 分子をプローブに用いて、組換え PpPPR4 タンパク質との結合を electrophoresis mobility assay (EMSA) 法で調べた。

(2) 2 カ所の C 部位 (*nad3*-C230 と *nad4*-C272) の RNA 編集が欠損した PpPPR56 変異株に PpPPR56 のそれぞれのモチーフの 5 番目と 35 番目のアミノ酸残基を置換した多数の変異 PpPPR56 をそれぞれ発現させた形質転換ヒメツリガネゴケ株を作製した。それぞれの株から全 RNA を抽出し cDNA を合成した。RNA 編集部位を挟むプライマーセットを用いて cDNA から増幅した DNA 断片をダイレクトシーケンスし、RNA 編集の有無を調べた。

(3) 特定の葉緑体 mRNA を認識するカスタム PPR タンパク質をデザインした。このタンパク質の C 末端に RNase 活性をもつドメインを付加したキメラ PPR タンパク質を大腸菌の中で発現・精製した。RNA 分解活性を試験管内で測定した。

4. 研究成果

(1) 新規 PPR タンパク質の RNA 結合部位

ヒメツリガネゴケの P クラス PpPPR4 の機能解析を行い、PpPPR4 が葉緑体 pre-tRNA^{le} のスプライシングに作用することを明らかにした (Goto et al. Plant J. 2016)。PpPPR4 の PPR モチーフから予想される結合配列 (GUxRxxUR) を検索したところ、pre-tRNA^{le} のイントロン内に 5 カ所の結合候補配列を見いだした。それぞれの配列を含む RNA 領域 (RNA1~RNA5) をプローブに用いて、組換え PpPPR4 との EMSA 法による *in vitro* 結合実験を行った。その結果、組換え PpPPR4 がイントロンのドメイン Ⅲ領域に結合することを明らかにした (図 1)。

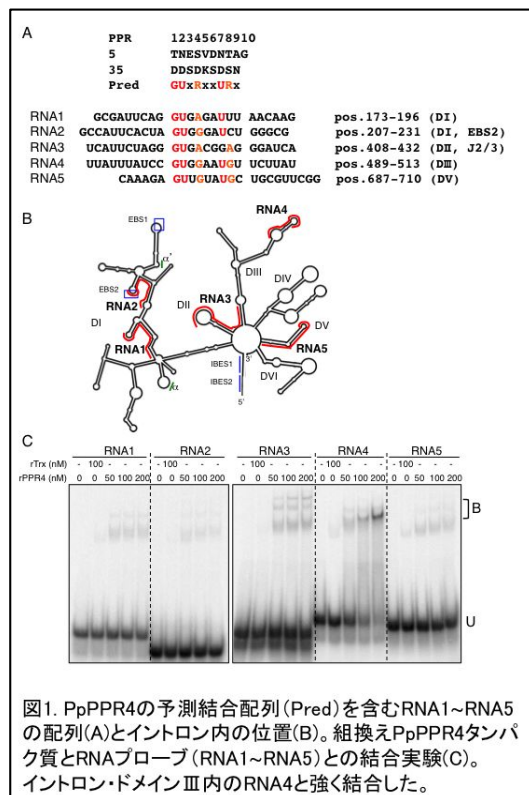


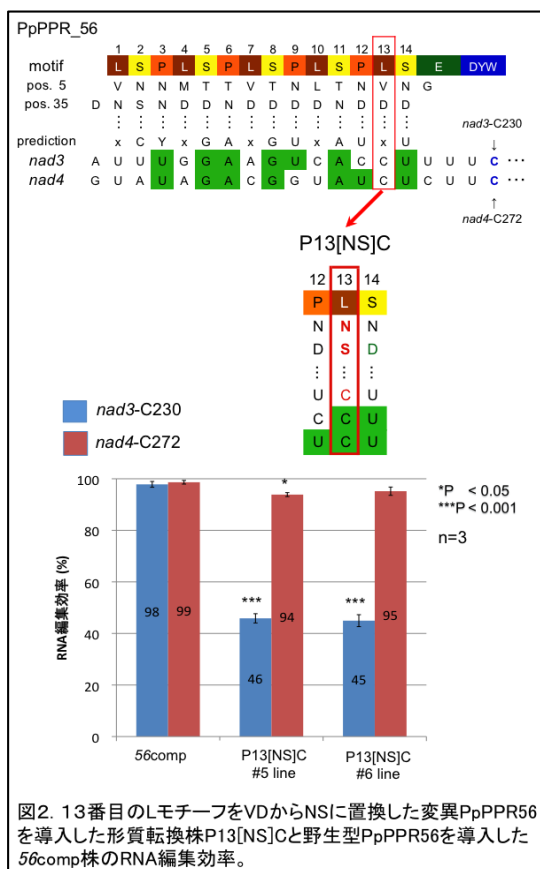
図1. PpPPR4の予測結合配列 (Pred)を含むRNA1~RNA5の配列(A)とイントロン内の位置(B)。組換えPpPPR4タンパク質とRNAプローブ (RNA1~RNA5)との結合実験(C)。イントロン・ドメインⅢ内のRNA4と強く結合した。

この結果は、PpPPR4 が GUxGxxUG を特異

的に認識することを示しており、Barkan らによって提唱された PPR コードと一致していた。

(2) LモチーフはRNA編集効率に寄与する

ヒメツリガネゴケのRNA編集タンパク質 PpPPR56 は14個のPPRモチーフが(LSP)₄LSの順に並んでいる。本研究で、PpPPR56のそれぞれのモチーフの5番目と35番目のアミノ酸残基を置換した多数の変異 PpPPR56 を PpPPR56 変異株に導入し発現させ、2カ所の編集部位 (*nad3*-C230 と *nad4*-C272) のRNA編集効率を比較定量した。その結果、14個のモチーフのうちC末端側に位置する13番目のLモチーフに変異を導入すると、*nad4*-C272 部位の編集効率が野生株レベルに回復したが、*nad3*-C230 部位のRNA編集効率が45%程度にしか回復しなかった(図2)。10番目のLモチーフに変異を導入した場合も同様の結果となった。このことは、LモチーフもRNA編集に寄与していることを強く示唆している。この他に、PとSモチーフについても同様の実験を行った(論文作成中)。これらの結果は、Lモチーフの重要性を示した画期的な成果である。



(3)新規の配列特異的RNA切断酵素の創製

葉緑体の *psbA* RNA または *ycf66* RNA を認識するようにデザインしたカスタム PPR タンパク質を作製した(図3)。さらに、そのC末端にN4BP1, YacP-like Nuclease (NYN)ドメインを融合させたカスタム PPR-NYN タンパク質を作製し、そのRNA分解活性を測定し

た。その結果、試験管内でPPR-NYNタンパク質がRNAを効率よく分解することが観察された。現在、カスタムPPR-NYNをコードする遺伝子を核ゲノムに導入した形質転換ヒメツリガネゴケ植物の作出を行っている。

本研究で得られた成果を基盤として、今後も「RNA機能を調節する新しい実験系」の開発を続ける予定である。

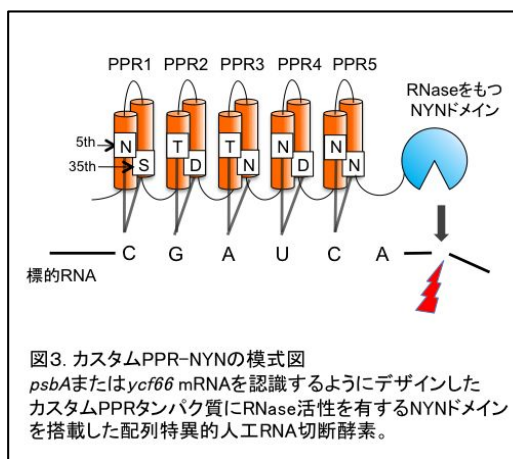


図3. カスタムPPR-NYNの模式図
*psbA*または*ycf66* mRNAを認識するようにデザインしたカスタムPPRタンパク質にRNase活性を有するNYNドメインを搭載した配列特異的人工RNA切断酵素。

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5件)

Ichinose, M. and Sugita, M., RNA editing and its molecular mechanism in plant organelles. **Genes** 8 (1), 5, (2017). 査読有
doi:10.3390/genes8010005

Hayashi, R., Sugita, C. and Sugita, M., The 5' untranslated region of the *rbp1* mRNA is required for translation of its mRNA under low temperatures in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. **Archives of Microbiology** 199 (1), 37-44 (2017). 査読有

Sugita, M., Uchiyama, H., Ichinose, M., RRM and PPR proteins network as a global regulator for plastid RNA metabolism. **Endocytobiosis and Cell Research**, 27 (3), 41-44 (2016). Research Interests. 査読有
DOI: 10.1007/s00203-016-1270-0

Sugita, M., Uchiyama, H., Ichinose, M., P-class pentatricopeptide repeat protein PTSF1 is required for splicing of the plastid pre-tRNA^{Leu} in *Physcomitrella patens*. **Plant Journal** 86 (6), 493-503 (2016). 査読有
DOI: 10.1111/tpj.13184

Ichinose, M., Uchida, X. and Sugita, M., Corrigendum to "Identification of a pentatricopeptide repeat RNA editing factor in *Physcomitrella patens* chloroplasts" [FEBS Lett. 588 (2014) 4060-4064], **FEBS Letters** 589 (10), 1171 (2015). 査読無
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.03.020

〔学会発表〕(計 10 件)

Seiya Goto, Chieko Sugita, Mizuho Ichinose, Mamoru Sugita, Functional analysis of P-class pentatricopeptide repeat proteins in *Physcomitrella patens*. MOSS 2016, the annual conference of the international moss research community is being hosted September 2nd – September 5th 2016, The University of Leeds.

Hirofumi Uchiyama, Mizuho Ichinose, Mamoru Sugita, On the expansion of the plastid RRM protein family in the Viridiplantae., The 13th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, September 10 to 14, 2016, Kyoto.

Tetsuo Ebihara, Chieko Sugita, Mamoru Sugita: ヒメツリガネゴケ葉緑体の P-type PPR タンパク質の機能解析, Functional analysis of P-type pentatricopeptide repeat (PPR) proteins in the *Physcomitrella patens* chloroplasts, 第 58 回日本植物生理学会年会、鹿児島大学、2017 年 3 月 16 日.

松田拓也、一瀬瑞穂、杉田 護: ヒメツリガネゴケ PPR 編集因子の RNA 認識モデル Model for the RNA recognition by PPR editing factors in the moss *Physcomitrella patens*. 第 58 回日本植物生理学会年会、鹿児島大学、2017 年 3 月 16 日.

Nakajima, K., Kawaguchi, Y., Ichinose, M., Sugita, C., Sugita, M. A PLS-type PPR protein is involved in RNA splicing of *nad5* pre-mRNA in the moss *Physcomitrella patens*, 9th International Conference of Plant Mitochondrial Biology, Wroclaw, Poland May 17-22, 2015.

内山博道、一瀬瑞穂、杉田千恵子、杉田 護、ヒメツリガネゴケの RRM を持つ葉緑体 RNA 結合タンパク質の機能解析 (P-118)、日本植物学会第 79 回大会、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター、2015 年 9 月 8 日.

後藤誠也、一瀬瑞穂、杉田千恵子、杉田 護、ヒメツリガネゴケの葉緑体 tRNA のスプライシングに關与する新規 PPR タンパク質の同定、日本植物学会第 79 回大会、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター、2015 年 9 月 8 日.

杉田千恵子、松尾拓哉、西浜竜一、河内孝之、杉田 護、クラミドモナスとゼニゴケのタンパク質性 RNase P の解析、第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学上田キャンパス、2016 年 3 月 18 日～20 日.

後藤誠也、一瀬瑞穂、杉田千恵子、杉田 護、ヒメツリガネゴケ葉緑体の pre-tRNA のスプライシングに關与する PPR タンパク質 (PF-111) 第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学上田キャンパス、2016 年 3 月 18 日～20 日.

松田拓也、一瀬瑞穂、杉田 護、ヒメツリガネゴケ PPR タンパク質の RNA 塩基認識の解析、第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学上田キャンパス、2016 年 3 月 18 日～20 日.

〔その他〕

杉田研究室ホームページ：

<http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~sugita-g/>
名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻
ホームページ：

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/index.php>
Endocytobiosis and Cell Research, 27 (3), 41-44
(2016):

http://zs.thulb.uni-jena.de/receive/jportal_jparticle_00452115

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 護 (SUGITA, Mamoru)
名古屋大学・遺伝子実験施設・教授
研究者番号：7 0 1 5 4 4 7 4

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

一瀬 瑞穂 (ICHINOSE, Mizuho)
名古屋大学・トランスフォーマティブ生命
分子研究所・特任助教
研究者番号：6 0 7 5 5 7 1 8

(4) 研究協力者

杉田 千恵子 (SUGITA, Chieko)
名古屋大学・遺伝子実験施設・研究員
研究者番号：3 0 4 0 2 4 5 7