

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 7 月 23 日現在

機関番号：24302
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22370002
 研究課題名（和文） C-to-U 型 RNA 編集による植物オルガネラゲノムの機能維持機構の起源と進化
 研究課題名（英文） Evolution of the function maintenance system of plant organelle genome by C-to-U RNA editing
 研究代表者
 小保方 潤一（OBOKATA JUNICHI）
 京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：50185667

研究成果の概要（和文）：植物オルガネラの C-to-U 型 RNA 編集を司る触媒因子の実体は、20 年以上にわたり謎のままである。本研究では、シロイヌナズナの *psbE* 遺伝子をモデルに、この RNA 編集装置の単離精製と構造・機能の解析を試みた。その結果、編集触媒因子の同定には至らなかったが、活性を保持した因子を生化学的に濃縮精製することに世界で初めて成功し、その機能には RNase 感受性の成分が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Catalytic molecules of the plant organellar RNA editing has long been unidentified. We attempted to isolate and characterize those molecules, using the *psbE* gene of *Arabidopsis thaliana* as a model. As a result, we succeeded in concentrating the catalytic activity from the chloroplast lysates by biochemical means, and found that RNase-sensitive component(s) should be involved in the catalytic reaction. Based on this we propose a tentative model of the C-to-U editing machinery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：植物オルガネラゲノム、葉緑体RNA編集、PPR タンパク質、RNA 分解酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) 陸上植物の葉緑体やミトコンドリアのゲノムでは、DNA 鎖上の特定の C が転写後に RNA 鎖上で U に変換される現象があり、C-to-U RNA 編集とよばれている。この RNA 編集によって、ゲノム DNA 上の塩基配列が mRNA 上で修正され、「多くの植物で保存されている正しいタンパク質コード配列」が生成される。

(2) この RNA 編集は、様々な状況証拠から、植物が陸上に進出した初期に、オルガネラゲノムに好ましくない塩基変異が大量に生じ、それによる障害を回避するために核ゲノムが新たに作り出した、ゲノムの機能維持メカニズムの一つであると考えられている。

(3)しかし、この特殊な塩基修復機構が、何を起源として、どのようにして出現したのかは全く分かっていない。この謎を解くためには、C-to-U 変換の触媒因子の分子実体を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、葉緑体 RNA 編集の C-to-U 触媒反応を司る分子装置の実体を解明することである。そのため、以下の(2)~(5)の項目の研究をおこなう。

(2) シロイヌナズナの葉緑体遺伝子 *psbE* の RNA 編集部位をモデル材料にして、この部位に作用する RNA 編集因子を生化学的な方法で濃縮精製する。

(3) 濃縮精製画分に含まれるタンパク質成分を質量分析などの手法で分析し、RNA 編集因子の候補タンパク質を選抜する。

(4) 得られた候補タンパク質を生化学や遺伝学の手法によって詳しく解析し、最終的に、RNA 編集因子タンパク質を同定する。

(5) 得られた知見を基に、RNA 編集触媒因子の機能や進化を考察する。

3. 研究の方法

(1) RNA 編集活性の検出と定量

シロイヌナズナの葉緑体 *psbE* 遺伝子では、C-to-U RNA 編集によって、転写物上の GAUCC 配列が GAUUC 配列に変化する。GAUUC を逆転写してできる GATTC は制限酵素 HinfI の認識配列である。そこでこの性質を利用し、RNA 編集の基質となる *psbE* RNA を RT-PCR によって特異的に増幅した後、その分子集団の中で HinfI によって切断できる分子の割合を調べ、その値から、*in vivo* や *in vitro* の各種実験系における *psbE* 部位の RNA 編集活性を定量した。

(2) RNA アフィニティー法による葉緑体抽出液からの RNA 編集因子の濃縮精製

シロイヌナズナの若葉から RNA 編集活性をもった葉緑体抽出液を調製し、そのなかに含まれる「*psbE* 転写物に作用する RNA 編集因子」を、磁気ビーズに固定した RNA 鎖を用いたアフィニティー法によって精製した。この精製には、以下の様な工夫をほどこした。

筆者らの経験から、① 野生型の *psbE* 配列をもつ RNA をアフィニティー基質に用いても、活性のある編集因子を回収できない（一度基質 RNA に結合した編集因子は、*in vitro* で反応を触媒した後、不活化するか乖離する可能性が高い）、② RNA 編集部位の-10 領域に塩基変異を導入すると、そもそも RNA 編集因

子がこの RNA 鎖に結合出来なくなる、③ 編集部位の-1 の部位に塩基変異を導入すると、結合した編集因子は C-to-U 反応を効率よく進められなくなる、という3つの性質が分かっていた。そこで、下記の図の様に、-10 変異型、野生型、-1 変異型の3種類の RNA 鎖を用いたアフィニティー精製によってそれぞれに結合するタンパク質群を回収し、それらの差分から、RNA 編集因子とその触媒成分を、それぞれ同定しようと試みた。

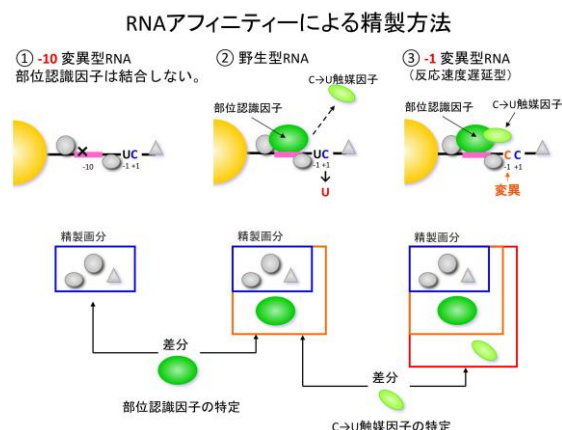


図 1. 3 種類の RNA 配列を用いたアフィニティーによる *psbE* RNA 編集因子の差次的解析

(3) LC-MS/MS 分析

RNA アフィニティー精製によって回収されたタンパク質成分は、SDSPAGE によって 20kDa から 250kDa の領域を切り出した後、トリプシン消化によって断片化し、次いで、C18 逆相カラムと LCQ Advantage quadrupole ion trap mass spectrometer (Finnning) を用いて LC-MS/MS 分析を行った。得られたデータは Mascot program (Matrix Science) によってシロイヌナズナのタンパク質データベースと照合した。

(4) 候補タンパク質の機能解析

RNA アフィニティー精製と LC-MS/MS 分析の結果から予想された RNA 編集因子の候補タンパク質については、①シロイヌナズナのストックセンターからとりよせた遺伝子破壊系統の植物を用いた遺伝学的な機能解析と、②それぞれのタンパク質の部分アミノ酸配列（合成オリゴペプチド）に対して作成したウサギ抗体を用いた、*in vitro* での機能阻害実験を行い、それらが実際に *psbE* の RNA 編集反応に関わっているかどうかを検討した。

(5) *psbE* RNA 編集部位に結合する PPR タンパク質の生物情報学的アプローチによる予測

psbE RNA 編集部位近傍のシス配列に結合する PPR タンパク質 (pentatricopeptide repeat protein) については、これまでに分

かっている PPR タンパク質群とその結合配列から得られた規則性を用いて、Yagi らの方法 (RNA Biology 10:9, 1-7, 2013) によって予測した。

(6) *in vitro* RNA 編集反応、UV クロスリンク実験、その他の生化学的実験手法

葉緑体抽出液を用いた *in vitro* RNA 編集実験や UV クロスリンク、その他の一般的な生化学的実験は、筆者らがこれまで行ってきた方法 (Miyamoto et al., PNAS 101:48-52, 2004, Kobayashi et al., Nucleic Acids Res 36:311-318, 2008) に従った。

4. 研究成果

(1) RNA アフィニティー法による RNA 編集活性画分の濃縮と部分精製

生鮮重量 4.2kg のシロイヌナズナの若葉から、*in vitro* で *psbE* RNA の編集活性を示す葉緑体抽出液を 63ml 回収した。ついでこの葉緑体抽出液を三等分し、図 1 に示した 3 種類の RNA 鎖を用いて、それぞれアフィニティー精製を行った。その結果を図 2 に示したが、予想どおり、-1 変異型 RNA をアフィニティー基質に用いたときにだけ、RNA 編集活性を回収できた。これは、生化学的手法で RNA 編集活性を濃縮精製することに成功した世界で初めての例である。

この実験では、4.2kg のシロイヌナズナから、180 分間に *in vitro* で 0.5fmol の基質 RNA を編集できる活性が濃縮・回収された。

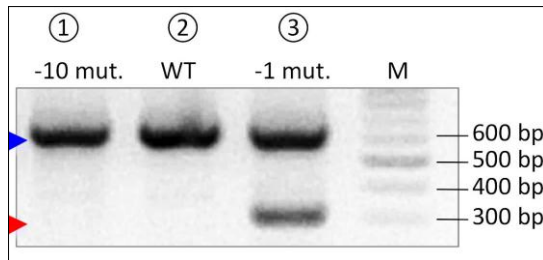


図 2. 3 種類の RNA 鎖を用いたアフィニティー精製画分が示す *psbE* RNA 編集活性。活性測定に用いた 600 塩基の RNA 基質に C-to-U RNA 編集が生じると、ゲル電気泳動像の上で、300 塩基対のバンドが出現する。

(2) LC-MS/MS 法によるタンパク質成分の分析

図 2 に示したそれぞれのアフィニティー精製画分を LC-MS/MS 分析にかけたところ、145 種類のタンパク質の部分断片が検出された。それらのうち、図 1 に示した予想に従って、③の画分でのみ検出されるか、③の画分での

検出量が①や②の画分よりも大きいタンパク質を検索したところ、いずれも RNA 代謝に関係のある 3 種類のタンパク質が見いだされた。それらは、シロイヌナズナの核ゲノム上の遺伝子、At1g02150、At1g48410、At1g70070 にそれぞれコードされていることが分かった。

次に、上記の 3 遺伝子がコードしているタンパク質の部分ペプチド配列に対して、ウサギでそれぞれ抗体を作成し、それを用いて、*in vitro* RNA 編集系での機能阻害実験を行った。しかし、いずれのタンパク質に対する抗体でも、*psbE* の RNA 編集反応に対する特異的阻害効果はみられなかった。

さらに、シロイヌナズナのストックセンターから At1g02150、At1g48410、At1g70070 の破壊系統植物をそれぞれ入手し、それらの植物体中での *psbE* の RNA 編集を調べたが、いずれの植物体中でも RNA 編集は正常に生じていた。

以上の結果は、LC-MS/MS 解析によって RNA 編集因子の候補と予想された 3 種のタンパク質は、いずれも RNA 編集に必要なタンパク質では無いことを示している。

(3) 精製実験のどこに問題があったのか？

上記の (2) までの解析で、ほぼ 2 年近くの研究期間を費やしたが、上述のように、最終的に選んだ 3 種の候補タンパク質の中には RNA 編集反応に対する必須タンパク質は含まれていなかった。しかし、編集活性自体の濃縮精製と回収には成功しているため、解析した画分に、RNA 編集因子が全く含まれていなかったとは考えられない。では、なぜ、LC-MS/MS 分析で編集因子/触媒因子が見つからなかったのか？ 様々な可能性が考えられるが、筆者らが特に留意したのは次の諸点である。

- ① RNA 編集因子の量が非常に少なかったため、LC-MS/MS でも充分には検出できなかった。
- ② 活性画分に濃縮された編集因子が、SDSPAGE や LC-MS/MS の過程で異常な挙動をとり、うまく検出されなかった。
- ③ RNA 編集触媒因子の主成分は、タンパク質以外の成分である。

これらの可能性を念頭において RNA 編集触媒因子の分析をさらに進めることにしたが、より確実に研究を進めるため、上述の生化学的精製の他に、新たに生物情報学的なアプローチを研究に取り入れることにした。

(4) 生物情報学的アプローチによる *psbE* RNA 編集部位認識タンパク質の予測と遺伝学的手法による同定

Yagi らの生物情報学的方法に従って、*psbE* RNA 部位の周辺配列を認識する可能性の高い PPR タンパク質を検索したところ、At3g14330 が候補としてあげられた。そこで、At3g14330 の遺伝子破壊系統植物 (T-DNA tag 挿入系統) を入手し、植物体中での *psbE* の RNA 編集を調べたところ、RNA 編集は生じていなかった。この結果から、DYW 型 PPR タンパク質 At3g14330 が、*psbE* の RNA 編集部位の上流近傍に特異的に結合する部位認識タンパク質であると推論した。

(5) *psbE* 部位に作用する RNA 編集因子は RNase に対する感受性を示す

上述の(1)~(2)で行った RNA 編集因子の濃縮精製の過程で、RNA 編集因子の活性は RNase によって損なわれることが示唆された。そこで、*in vitro* 系を用いて、RNA 編集反応と RNase の関係を詳細に解析したところ、次の様な知見が新たに明らかになった。

- ① 葉緑体抽出液中の RNA 編集活性は RNaseA による処理で完全に失活する。
- ② この失活は RNaseA が直接編集因子に作用して生じたものであり、RNaseA 処理によって生じた阻害物質による間接的効果や、編集基質となる *psbE* の RNA 配列が分解されたことによって生じたものではない。

以上の知見は、*psbE* 部位に作用する RNA 編集因子には、タンパク質成分の他に RNA 成分が必須因子として含まれていることを強く示唆する。

(6) RNaseA 処理は、部位認識因子の特異的結合には影響を与えず、C-to-U 触媒反応を失活させる。

RNaseA 処理によって RNA 編集因子が失活することが分かったが、その原因が、編集因子が基質 RNA に結合出来なくなることなのか、C-to-U 触媒反応が阻害された為なのかを調べるために、RNA 編集の基質となる *psbE* RNA 配列の-10 の位置と+1 の位置をそれぞれ ³²P で標識し、それらに対する RNA 編集因子タンパク質の結合を UV クロスリンク法によって解析した。その結果、分子量約 55kDa の部位認識因子 (DYW 型 PPR タンパク質 At3g14330) の-10 部位への結合は RNase 処理の影響を受けなかったが、+1 部位への結合・接触は、著しく阻害されることが分かった。

さらに、分子量 29kDa, 31kDa, 36kDa の RNA 結合タンパク質の+1 部位への接触・結合も、RNaseA 処理によって著しく阻害されることが分かった。

(7) 研究のまとめ：葉緑体 RNA 編集装置の構造モデルと今後の研究への展望

本研究で得られた知見をまとめると、葉緑体の C-to-U RNA 編集装置について、図 3 のようなモデルを考えることができる。

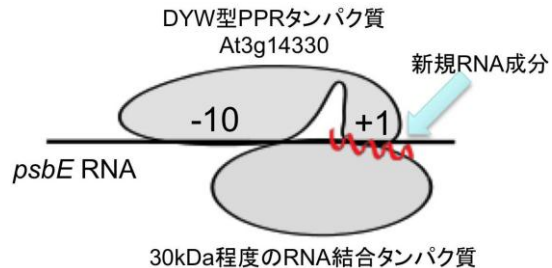


図 3 シロイヌナズナの *psbE* RNA に作用する C-to-U RNA 編集装置の模式図

- ① 葉緑体の C-to-U 型 RNA 編集装置の機能には未同定の RNA 成分が関わっている。
- ② この RNA 成分は、DYW 型 PPR タンパク質が +1 編集部位に安定に接触するために必要であり、この RNA 成分が失われると、上記のタンパク質の+1 部位への接触が不安定になるほか、RNA 編集触媒反応は生じなくなる。
- ③ 上記の RNA 成分は、30kDa 程度の葉緑体タンパク質が+1 近傍へリクルートされプロセスにも関わっている。
- ④ 今後は、*psbE* の部位認識因子として同定された DYW 型 PPR タンパク質 At3g14330 と上述した新規 RNA 成分を新たな手がかりとする事により、これまで以上に確実に C-to-U RNA 編集装置の単離精製や機能解析を進めることが出来ると考えられる。

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)

- ① Yagi, Y., Tachikawa, M., Noguchi, H., Satoh, S., Obokata, J and Nakamura, T. Pentatricopeptide repeat proteins involved in plant organellar RNA editing. RNA Biology (査読有り) 10: 1-7 (2013)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 立川誠、長谷川綾香、高林厚史、種村尚典、溝田香織、諏佐瑞穂、野村明子、若杉達也、小保方潤一
葉緑体の C-to-U RNA 編集活性は RNase に

よって失活する。
第 15 回日本 RNA 学会年会 2013 年 7 月 23-25
日 (松山)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

www2.kpu.ac.jp/life_environ/plant_genome_bio/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小保方 潤一 (OBOKATA JUNICHI)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50185667

(2) 研究分担者

椎名 隆 (SHIINA TAKASHI)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10206039

杉山 康雄 (SUGIYAMA YASUO)

名古屋大学・遺伝子実験施設・准教授

研究者番号：70154507