

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

|   |
|---|
| 機関番号：13901  |
| 研究種目：挑戦的萌芽研究  |
| 研究期間：2011～2012  |
| 課題番号：23657003   |
| 研究課題名（和文）<br>RNA編集酵素遺伝子を単離・同定するための新規スクリーニング法の開発   |
| 研究課題名（英文）<br>Development of a new screening method to isolate the genes encoding RNA editing enzyme |
| 研究代表者<br>杉田 護 (SUGITA MAMORU)<br>名古屋大学・遺伝子実験施設・教授<br>研究者番号：70154474                                 |

研究成果の概要（和文）：葉緑体とミトコンドリアでmRNAの特定のシチジン（C）がウリジン（U）に変換される「RNA編集」という現象が発見されて20有余年となるが、RNA編集酵素の実体は未だ不明である。この未解決の問題に終止符を打つべく、モデル植物として優れた特性をもつヒメツリガネゴケを用いて研究を行った。その結果、RNA編集に働く植物固有のRNA編集因子を発見した。

研究成果の概要（英文）：In chloroplasts and mitochondria, RNA editing frequently occurs in many transcripts of most terrestrial plants. RNA editing is an enigmatic phenomenon in which specific cytidines (C) in the transcripts are changed to uridines (U). Since C-to-U RNA editing was discovered in plant organelles 20 years ago, the RNA editing enzyme or factors remain to be identified. In this study, we have identified several novel RNA editing factors using a model plant, *Physcomitrella patens*.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

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：RNA編集、葉緑体、ミトコンドリア、ヒメツリガネゴケ、逆遺伝学、ペントトリコペプチドリピータンパク質、PPRタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体とミトコンドリアでmRNAの特定のシチジン（C）がウリジン（U）に変換される「RNA編集」という現象が発見されてから20有余年になるが、このRNA編集反応は植物の生育に必要な現象であるにもかかわらず、RNA編集酵素の実体は未だ不明であり、その解明が遺伝・ゲノム動態を理解する上で重要な研究課題となっていた。

## 2. 研究の目的

植物特有のオルガネラである葉緑体とミトコンドリアのRNA編集酵素の探索と同定を目

指して研究を行った。ヒメツリガネゴケを用いた逆遺伝学的手法により、RNA編集酵素の有力な候補因子であるペントトリコペプチドリピータンパク質の機能を明らかにすることも目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)ヒメツリガネゴケの葉緑体ゲノムに存在するリボソームタンパク遺伝子 *rps14* のACGコドンをDNAレベルでATGに置換した改変 *rps14* 遺伝子をもつ葉緑体形質転換株（ATG株）を作製する。ATG株選抜のためにスペクトノマイシン耐性遺伝子 *aadA* を共転写されるように導入

した。*aadA*遺伝子の開始コドン周辺を*rps14*のRNA編集部位に置換した。コントロール株としてACG株も作製した。遺伝子導入はパーティクルボンバードメント法で行った。

#### (2) 遺伝子ノックアウト株の作製

標的遺伝子内に薬剤耐性選択マーカーを挿入または置換する方法でノックアウト株を作製した。遺伝子導入はパーティクルボンバードメント法で行った。

#### (3) RNAiによる遺伝子発現抑制株の作製

生育に必要な遺伝子にはノックアウト手法は適さない。そこで本研究では、RNAi法による遺伝子発現抑制株（ノックダウン株）の作製を試みた。標的遺伝子コード領域または非翻訳領域の200 bpをターゲット配列として、これをプラスミドベクターにセンス方向とアンチセンス方向にRFP配列近傍に挿入したコンストラクトを作製した。これをバックグラウンド株であるヒストンH2B-mRFP発現株に導入してRNAi株を得た。

(4) 葉緑体形質転換株、遺伝子ノックアウト株、遺伝子発現抑制株から全RNAを調製し、cDNA合成、RT-PCRによりcDNA断片を増幅して、その塩基配列を決定した。野生株と変異株におけるRNA編集の有無を観察・定量した。

### 4. 研究成果

(1) ヒメツリガネゴケの葉緑体ではリボソームタンパク遺伝子*rps14*が転写された後で、mRNAのACGコドンがC-U RNA編集によりAUGコドンに変換される。このRNA編集の生物学的意義を検証するため、*rps14*遺伝子のACGコドンをATGに置換した改変*rps14*遺伝子をもつ葉緑体形質転換株を作製した。この株を用いて、現在多数のRNA編集欠損変異体ストックの構築を試みている。今後はこのストックをリソースとして活用することにより、RNA編集関連因子を迅速に同定することが可能となる。

(2) 葉緑体ゲノムで1カ所だけRNA編集が起こるが、このRNA編集部位（+2C部位）に作用する因子として葉緑体局在型のペントトリコペチドリピート（PPR）タンパク質PpPPR45が有力な候補因子であることをPPRタンパク質のアミノ酸配列情報解析により推定した。そこで、RNAi法によりPpPPR45遺伝子の発現を抑制した変異株を多数作製し、葉緑体におけるRNA編集の影響を調べた。その結果、PpPPR45が*rps14*の+2C部位のRNA編集に関与する可能性が高いことを見いだした（論文準備中）。現在、PpPPR45タンパク質がRNA編集酵素活を有するかを生化学的に検証する解析を進めている。

(3) ミトコンドリアで作用するRNA編集因子の候補遺伝子をノックアウトした変異株を逆遺伝学手法で作製し、RNA編集との関連性を調べた。その結果、2種のPPRタンパク質（PpPPR78とPpPPR79）がミトコンドリアmRNAの3カ所のRNA編集部位に特異的に作用することを明らかにした（Uchida et al. *FEBS Lett.* 2011年、図1）。

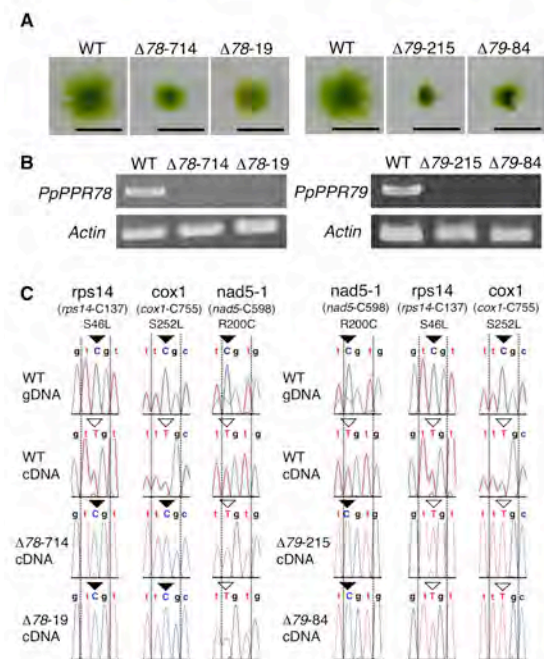


図1. 遺伝子破壊株の表現型の観察。

(A) コケの原系体コロニーの大きさの比較。(B) ノックアウトされた遺伝子は発現していない。(C) PpPPR78遺伝子をノックアウトすると*rps14*部位と*cox1*部位のRNA編集が起こらない。PpPPR79遺伝子をノックアウトすると*nad5-1*部位のRNA編集が起こらない。

ミトコンドリアのRNA編集に関与する新規のPPRタンパク質を同定したことは大きな成果である。

(4) ミトコンドリア局在型PPRタンパク質をコードするPpPPR43遺伝子を破壊すると、ミトコンドリアのRNA編集は正常に起るが、*cox1* pre-mRNAの第3イントロンのスプライシングが起こらないことを見いだした（図2）。PpPPR43タンパク質のC末端に存在するEドメインとDYWドメインを除去してもスプライシング反応が正常に起こることを観察した。このことはEドメインとDYWドメインはスプライシング反応に関与していないことを示している。PPRタンパク質がRNA編集だけでなく、RNAスプライシングにも関与する可能性を初めて示した重要な成果である。Ichinose et al. *The Plant J.* 2013.

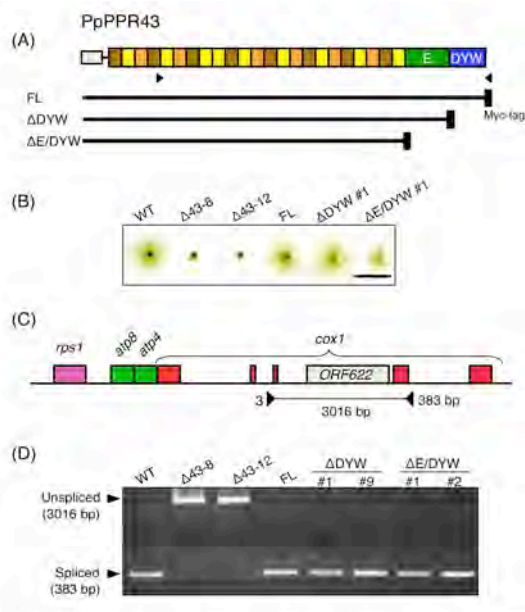


図2. *PpPPR43*遺伝子の破壊株と相補株の表現型とスプライシング。(A) *PpPPR43*タンパク質のモチーフ構造と相補実験用のコンストラクト。(B)野生株(WT)、遺伝子破壊株( $\Delta 43-8$ と $\Delta 43-12$ )、遺伝子相補株(FL、 $\Delta DYW\#1$ 、 $\Delta E/DYW\#1$ )の原系体コロニーの大きさ。スケールバーは10 mm。(C)4つのイントロンをもつ *cox1* 遺伝子の構造。第3イントロンのスプライシング検出用プライマーセットの位置と増幅DNA断片の長さ。(D)野生株、遺伝子破壊株、遺伝子相補株におけるスプライシングの有無。

(5) PPRタンパク質と標的RNA配列の結合に関する分子認識メカニズムを明らかにした。PPRタンパク質は10数個の連続したPPRモチーフで構成され、配列特異的にRNAを認識するアダプターとして機能することが示唆されている。しかし、個々のPPRモチーフがどのようにしてRNAと結合するのかその仕組みは不明であった。本研究では、PPRタンパク質のひとつであるHCF152タンパク質の部分長組み換えタンパク質を用いて、その標的RNA分子との結合親和性を生化学的に解析した。その結果、PPRモチーフ中にRNA塩基認識およびRNA結合親和性のそれぞれに働くアミノ酸部位を見いだした。PPRモチーフの2つの $\alpha$ ヘリックス(AとB)のうち、 $\alpha$ ヘリックスAの1番目と4番目のアミノ酸残基およびPPRモチーフの34番目のアミノ酸残基がRNAの塩基を認識し、8番目と12番目の塩基性アミノ酸がRNAのリン酸に結合することを示す実験結果を得た(Kobayashi et al. *Nucleic Acids Res.* 2013)。今後はこの結合モデルを実証する研究をさらに進めていく予定である。

## 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6件)

① Sugita, C., Kato, Y., Yoshioka, Y., Tsurumi, N., Iida, Y., Machida, Y., Sugita, M. *CRUMPLED LEAF (CRL)* homologs of *Physcomitrella patens* are involved in the complete separation of dividing plastids. *Plant and Cell Physiology* 53 (6), 1124-1133 (2012). DOI: 10.1093/pcp/pcs058. 査読あり

② Ichinose, M., Tasaki, E., Sugita, C. Sugita, M. A PPR-DYW protein is required for splicing of a group II intron of *cox1* pre-mRNA in *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* 70 (2), 271-278 (2012). 査読あり

DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04869.x

③ Kobayashi, K., Kawabata, M., Hisano, K., Kazama, T., Matsuoka, K., Sugita, M., Nakamura, T. Identification and characterization of the RNA binding surface of the pentatricopeptide repeat protein. *Nucleic Acids Res.* 40 (6), 2712-2723 (2012). DOI: 10.1093/nar/gkr1084. 査読あり

④ Uchida, M., Ohtani, S., Ichinose, M., Sugita, C. Sugita, M. The PPR-DYW proteins are required for RNA editing of *rps14*, *cox1* and *nad5* transcripts in *Physcomitrella patens* mitochondria. *FEBS Letters* 585 (14), 2367-2371 (2012). 査読あり

DOI: 10.1016/j.febslet.2011.06.009

⑤ Banks, J. A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J. L., ... Sugita, M., ... Grigoriev, I. V. (103 authors) The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332, 960-963 (2011).

DOI: 10.1126/science.1203810. 査読あり

⑥ Itoh, K., Izumi, A., Mori, T., Dohmae, N., Yui, R., Maeda-Sano, K., Shirai, Y., Kanaoka, M. M., Kuroiwa, T., Higashiyama, T., Sugita, M., Murakami-Murofushi, K., Kawano, S. and Sasaki, N. DNA packaging proteins Glom and Glom2 coordinately organize the mitochondrial nucleoid of *Physarum polycephalum*. *Mitochondrion* 11

(4), 575-586 (2011).

DOI: 10.1016/j.mito.2011.03.002. 査読あり

[学会発表] (計 13 件)

- ① 一瀬瑞穂, 片山博文, 杉田護: ヒメツリガネゴケの新規 PLS-type PPR タンパク質の同定と機能解析、第 54 回日本植物生理学学会年会、2013 年 3 月 23 日、岡山大学津島キャンパス
- ② 一瀬瑞穂、杉田護: ヒメツリガネゴケのミトコンドリア RNA 編集因子の同定 (3P-0740)、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 13 日。
- ③ Mizuho Ichinose, Chieko Sugita, Mamoru Sugita: The complete set of PPR-DYW proteins addressing all eleven editing sites in *Physcomitrella patens* mitochondrial transcripts (Poster and selected oral presentations). Frontiers in Plant RNA Research 2012, October 16–17, 2012, Sapporo, Hokkaido.
- ④ Mamoru Sugita, Mizuho Ichinose, Shotaro Ohtani, Masato Uchida: The moss PPR-DYW proteins are required for RNA editing and RNA splicing of mitochondrial transcripts. Oral presented on Oct. 16, International Conference for Plant Mitochondrial Biology, May 14-19, 2011, Hohenroda, Germany.
- ⑤ 一瀬瑞穂, 杉田護: ヒメツリガネゴケを用いた RNA 編集因子の同定。日本蘚苔類学会第 41 回北海道大会、斜里町公民館ゆめホール知床、2012 年 9 月 8 日、日本蘚苔類学会優秀発表賞 (ポスター発表部門) 受賞
- ⑥ 内田雅人, 大谷祥太郎, 一瀬瑞穂, 杉田千恵子, 杉田護: ミトコンドリアの RNA 編集に働く PPR-DYW タンパク質の同定 (1pD14)、日本植物学会第 75 回大会、東京大学駒場キャンパス、2011 年 9 月 17 日

[図書] (計 1 件)

- ① Kanamaru, K. and Sugita, M. Chapter 10. Dynamic features of plastid genome and its transcriptional control in plastid development. Basanti Biswal, Karin Krupinska and Udaya C. Biswal, **The Advances in Photosynthesis and Respiration 36 “Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence”**. March 31, pp. 685, 2013. Springer-Verlag, ISBN 978-94-007-5723-3

[その他]

ホームページ等

杉田研究室ホームページ、論文リスト

[http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~](http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~sugita-g/ronbun.html)

[sugita-g/ronbun.html](http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~sugita-g/ronbun.html)

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、論文紹介

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/paper/index.html>

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: 70154474

(2) 研究分担者なし

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

青木撰之 (AOKI SETSUYUKI)

名古屋大学・大学院情報科学研究科・准教授

研究者番号: 30283469

|