

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291059

研究課題名(和文) 植物オルガネラ遺伝子の発現を統御する核コードPPRタンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the nuclear-encoded pentatricopeptide repeat proteins involved in regulation of plant organellar gene expression

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアと葉緑体は、植物の生長にとって重要な働きをするオルガネラである。植物オルガネラは独自の遺伝子発現系を持ち、その遺伝子発現は転写後のRNAレベルで強く制御されている。しかし、その制御に関わる因子の多くは未解明である。本研究では、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、tRNAの5'末端形成、RNA編集、RNAスプライシングに働く新規のRNA結合タンパク質を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plant mitochondria and chloroplasts are the important organelles that are essential for plant growth. Both organelles possess their own gene expression system and their gene expression is tightly regulated at the post transcriptional level. However, protein factors involved in post transcriptional regulation are unknown. In this study, we identified novel pentatricopeptide repeat RNA-binding proteins required for tRNA 5'-end processing, RNA editing, and RNA splicing, using a model plant, the moss *Physcomitrella patens*.

研究分野：植物分子生理学

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

## 1. 研究開始当初の背景

(1)植物のミトコンドリアと葉緑体の遺伝子発現制御に、核ゲノムコードのPPRタンパク質が働いている。PPRタンパク質は、初期陸上植物であるコケ植物におよそ100個、維管束植物に数100個存在し、植物オルガネラ機能の発現と植物の生長、分化、生殖に重要な役割を担っている。

(2)研究代表者らは、植物の進化的観点からコケ植物に注目してオルガネラ遺伝子の機能解析を行ってきた。これまでに、ヒメツリガネゴケのPPRタンパク質のひとつが葉緑体mRNAの部位特異的切断に関与し、その変異株は葉緑体機能を著しく損なうことを明らかにした。また、PPR遺伝子のノックアウト変異株を多数作製し、ミトコンドリアのRNA編集やmRNAスプライシングに働く新規のPPRタンパク質を明らかにした。しかし、機能解明されたPPRタンパク質はごく僅かである。

(3)ヒメツリガネゴケ 107 個の PPR タンパク質のうち、シロイヌナズナと共通するものは半分にも満たない (Sugita et al. RNA Biol. 2013)。PPR タンパク質の拡大と多様性の獲得が陸上植物の巧妙な生存戦略の原動力となったのではないかと推測されることから、ヒメツリガネゴケの PPR タンパク質の機能を解明することは重要な研究課題である。

## 2. 研究の目的

PPRタンパク質が遺伝子特異的に1対1の関係で、RNA制御に関わっていることから、PPRタンパク質の標的RNA分子を同定し、その機能解明を目指す。研究項目は以下の3点である。

- (1)PPRタンパク質の細胞内局在(葉緑体、ミトコンドリア、その他)を明らかにする。
- (2)PPRタンパク質の標的RNAを同定する。RNA編集、スプライシング、部位特異的切断など、どのステップに作用しているのかを明らかにする。
- (3)PPR タンパク質に存在する保存アミノ酸配列モチーフの機能部位を明らかにする。

## 3. 研究の方法

ヒメツリガネゴケは相同組換え能が高いため、PPR遺伝子を自在に破壊、改変することが可能である。そこで本研究では、逆遺伝学手法を駆使して解析を行う。

- (1)PPR遺伝子にタグGFP配列を導入したノックイン株またはノックイン株を作製し、蛍光顕微鏡を用いて細胞内のGFP蛍光を観察する。
- (2)PPR遺伝子破壊株またはRNAiによる遺伝子発現抑制株を作製する。
- (3)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。
- (4)PPRタンパク質の保存アミノ酸配列モチーフ(DYWドメインなど)にアミノ酸変異を導入する。変異タンパク質を大腸菌で発現させ、試験管内でアッセイする。

## 4. 研究成果

(1)本研究で得られた結果を合わせると、107種のヒメツリガネゴケ PPR タンパク質のうち、これまでに 40 種余りの細胞内局在を実験により決定した。細胞内局在予測プログラム(TargetP, Predotar など)による結果を合算すると、51 種は葉緑体、47 種はミトコンドリア、2 種は葉緑体とミトコンドリアの両方、3 種は葉緑体かミトコンドリア、1 種は核、3 種は不明となった。シロイヌナズナの450種の PPR タンパク質のうち、65%(292種)はミトコンドリアに、34%(154種)は葉緑体に局在することが報告されている(Colcomber et al. RNA Biol. 2013)。コケ植物と種子植物のオルガネラでは PPR タンパク質の依存度が大きく異なることを示す興味深い結果である。

(2)本研究期間の3年間で、40種の PPR 遺伝子破壊株と3種の遺伝子発現抑制株を取得した。このうち、PpPPR4, 45, 63, 65, 67, 98, 104の分子機能を解明した。

(3)機能解明された PPR タンパク質の詳細は以下の通りである。

### tRNAの5'末端形成に関与する PPR タンパク質の同定

RNase Pはpre-tRNAの5'リーダー配列を切断する酵素で、細菌、アーキア、真核細胞核のRNase Pは触媒活性をもつRNA成分と1~数個のタンパク質成分から構成されている。これに対して、ヒトと植物のミトコンドリアおよび葉緑体のRNase Pはタンパク質成分みの酵素で、proteinaceous RNase P (PRORP)と呼ばれている。本研究で、ヒメツリガネゴケの PPR タンパク質である PpPPR63, 67, 104 が RNase P 活性をもつ PRORP であることを見出した(図1)。本成果を論文発表した(Sugita et al. PLoS ONE 2014)。

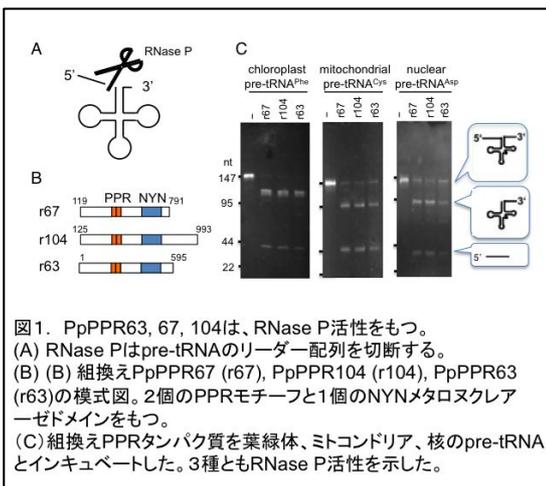


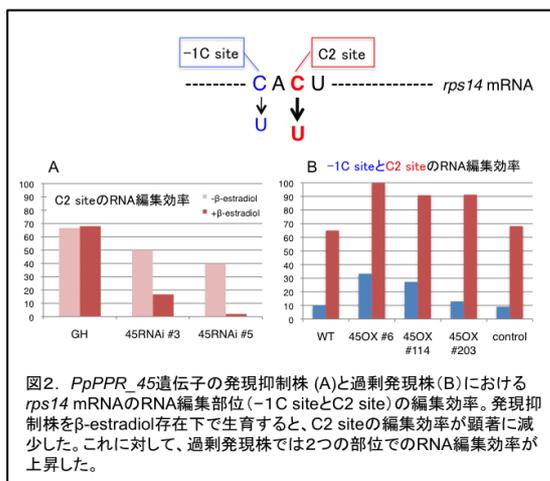
図1. PpPPR63, 67, 104は、RNase P活性をもつ。(A) RNase Pはpre-tRNAのリーダー配列を切断する。(B) (B) 組換えPpPPR67 (r67), PpPPR104 (r104), PpPPR63 (r63)の模式図。2個のPPRモチーフと1個のNYNメタロヌクレアーゼドメインをもつ。(C) 組換えPPRタンパク質を葉緑体、ミトコンドリア、核のpre-tRNAとインキュベートした。3種ともRNase P活性を示した。

PpPPR63は核に局在し、PpPPR67と104は葉緑体とミトコンドリアの両方に局在する。PpPPR63遺伝子をノックアウトしたコケ植物は、予想に反して、生育可能で、細胞質tRNAの蓄積レベルも野生株のものと同大差がなか

った。もしかすると、コケ植物の核内には PRORP 以外に RNase P 活性を持つ酵素が存在する可能性が考えられる。今後の研究課題である。緑藻クラミドモナスとコケ植物ゼニゴケは PRORP を一つしか持たない。核・葉緑体・ミトコンドリアのどこに局在するか、今度明らかにする必要がある。

#### RNA 編集に關与する PPR タンパク質の同定

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」が、葉緑体とミトコンドリアで起ることが知られている。葉緑体の RNA 編集部位は、種子植物で 30~40 カ所存在するのに対して、コケ植物のヒメツリガネゴケの葉緑体では 2 カ所 (*rps14*-C2 部位とその 2 ヌクレオチド上流の -1C 部位) しか存在しない。編集効率は *rps14*-C2 部位で 70%、-1C 部位では 10% 以下である。これまでの研究で、葉緑体の RNA 編集因子の候補として、PpPPR45 が有力であることが予想されていた。そこで、PpPPR45 遺伝子の発現抑制株と過剰発現株を解析した結果、PpPPR45 が予想通り 2 カ所の RNA 編集に關わっていることを明らかにした (図 2)。本成果を論文発表した (Ichinose et al. FEBS Lett. 2014)。

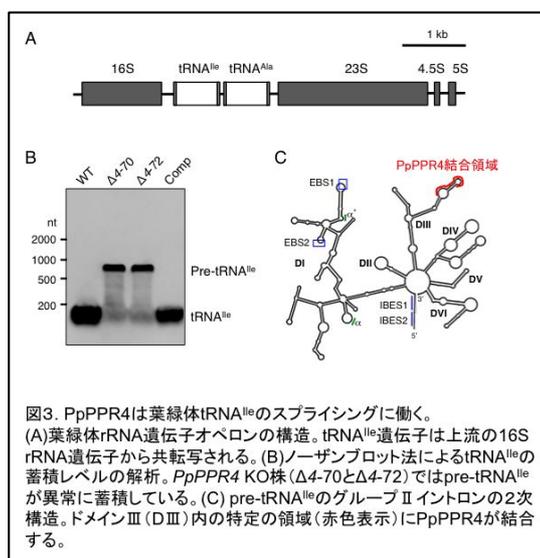


PpPPR65 がミトコンドリアの *ccmF*c-C103 に、PpPPR98 がミトコンドリアの *atp9*-C92 の RNA 編集部位に働くことを明らかにした (Ichinose et al. Plant Cell Physiol. 2013)。本成果を含め、ヒメツリガネゴケの全 RNA 編集部位 (ミトコンドリア 11 カ所と葉緑体 2 カ所) の認識に働く全 9 種の PPR-DYW タンパク質を同定した。1 植物種の全 RNA 編集部位に働く全 PPR タンパク質セットを明らかにしたのは本研究が初めてで、植物オルガネラの RNA 編集の分子メカニズムの解明に大きく貢献した。

#### 葉緑体 tRNA スプライシング因子の同定

PPR タンパク質の大半をしめる P タイプ PPR タンパク質の分子機能が明らかになったのは 1 割にも満たない。そこで本研究では、ヒメツリガネゴケの P クラス PpPPR4 の機能解析を行った。PpPPR4 遺伝子破壊 (KO) 株は

コケ原系体の生長が遅く、光合成能が低く、葉緑体タンパク質の蓄積レベルも大きく減少していた。そこで次に、葉緑体遺伝子の発現レベルを調べたところ、葉緑体 rRNA 遺伝子オペロンから転写される tRNA<sup>Ile</sup>-GAU の蓄積レベルが KO 株では顕著に低下し、逆にイントロンを含む pre-tRNA<sup>Ile</sup> が蓄積していた (図 3A, B)。これに対して、その他の tRNA と rRNA の蓄積レベルおよび RNA プロセシングパターンに異常は検出されなかった。このように、pre-tRNA<sup>Ile</sup> のスプライシング異常が観察されたので、組換え PpPPR4 と tRNA<sup>Ile</sup> イントロンとの結合実験を行った。その結果、組換え PpPPR4 がイントロンのドメイン領域に結合することを明らかにした (図 3C)。以上の結果から、PpPPR4 は tRNA<sup>Ile</sup>-GAU イントロンに特異的なスプライシング因子であると結論し、これを PTSF1 (plastid tRNA splicing factor 1) と命名した。



以上の観察結果を考察すると、PPR4-KO 株では葉緑体 tRNA<sup>Ile</sup>-GAU の蓄積レベルの低下、葉緑体のタンパク質合成レベルの低下、光合成活性の低下によって、著しい生育遅延が生じたと考えられる。このことは、葉緑体の生理・生化学の維持管理に tRNA が重要な律速因子となっていることを示唆している。この現象は高等植物を用いた研究でも報告例がなく、P タイプ PPR タンパク質の新機能の発見である。本成果を論文発表した (Goto et al. Plant J. 2016)。

(4) ヒメツリガネゴケの RNA 編集因子が PPR-DYW タンパク質であることが本研究で判明したので、RNA 編集における DYW 保存アミノ酸配列モチーフの機能解析を行った。その結果、DYW ドメインの C 末端の 3 アミノ酸と HxE(x)nCxXC を含む中央部の 23~61 番目のアミノ酸領域が、RNA 編集部位の認識に關与していることを明らかにした。これは RNA 編集の分子メカニズムを解明する上で重要な発見である (論文作成中)。

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8件)

Goto, S., Kawaguchi, Y., Sugita, C., Ichinose, M., Sugita, M.

P-class pentatricopeptide repeat protein PTSF1 is required for splicing of the plastid pre-tRNA<sup>le</sup> in *Physcomitrella patens*.

**Plant J.** in press (2016). 査読有

DOI:10.1111/tjp.13184

Suzuki, S., Hirakawa, Y., Kofuji, R., Sugita, M., Ishida, K.

Plastid genome sequences of *Gymnochlora stellata*, *Lotharella vacuolata*, and *Partenskyella glossopodia* reveal remarkable structural conservation among chlorarachniophyte species. **J. Plant Res.** in press (2016). 査読有

DOI:10.1007/s10265-016-0804-5

Ryo, T., Matsuo, T., Yamashino, T., Ichinose, M., Sugita, M., Aoki, S.

Diversity of plant circadian clocks: insights from studies of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Physcomitrella patens*.

**Plant Signaling & Behavior** 11 (1), e1116661 (2016). 査読有

DOI:10.1080/15592324.2015.1116661

Ichinose, M., Uchida, M., Sugita, M.

Identification of a pentatricopeptide repeat RNA editing factor in *Physcomitrella patens* chloroplasts.

**FEBS Letters** 588 (21), 4060–4064 (2014). DOI:10.1016/j.febslet.2014.09.03 査読有

Corrigendum: **FEBS Letters** 589 (10), 1171 (2015). 査読無

DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.03.020

Sugita, C., Komura, Y., Tanaka, K., Kometani, K., Satoh, H., Sugita, M.

Molecular characterization of three PRORP proteins in the moss *Physcomitrella patens*: nuclear PRORP protein is not essential for moss viability. **PLoS ONE** 9 (10), e108962 (2016). 査読有

DOI:10.1371/journal.pone.0108962

Miyagishima, S., Kabeya, Y., Sugita, C., Sugita, M., Fujiwara, T.

DipM is required for peptidoglycan hydrolysis during chloroplast division. **BMC Plant Biology** 14, 57 (15 pages) (2014). 査読有 DOI:10.1186/1471-2229-14-57

Ichinose, M., Sugita, C., Yagi, Y., Nakamura, T., Sugita, M. (2013) Two DYW subclass PPR proteins are involved in RNA editing of *ccmFc* and *atp9* transcripts in the moss *Physcomitrella patens*: First complete set of PPR editing factors in plant mitochondria.

**Plant & Cell Physiology** 54 (11), 1907-1916

(2013). 査読有

DOI:10.1093/pcp/pct132

Sugita, M., Ichinose, M., Ide, M., Sugita, C. Architecture of the PPR gene family in the moss *Physcomitrella patens*. **RNA Biology** 10 (9), 1439-1445 (2013). 査読有

DOI:10.4161/rna.24772

[学会発表](計20件)

松田拓也、一瀬瑞穂、杉田護 (PF-112) 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

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

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 (PF-110)、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 (3pF08)、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

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

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* (Poster 23), 9<sup>th</sup> International Conference of Plant Mitochondrial Biology, Wroclaw, Poland May 17-22, 2015.

後藤誠也、一瀬瑞穂、加藤歩美、杉田千恵子、杉田護：ヒメツリガネゴケの P-type PPR タンパク質の機能解析 (2)(1S17)、第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス、2015年3月16日

杉田千恵子、西浜竜一、河内孝之、杉田護：ゼニゴケのタンパク質性 RNase P の解析 (1S16)、第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス、2015年3月16日

一瀬瑞穂、杉田護：植物オルガネラ RNA 編集における DYW ドメインの機能解析 (2pB03)、第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス、2015年3月17日

一瀬瑞穂、杉田護：植物オルガネラ RNA 編集における DYW ドメインの機能解析 (2pB03)、第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス、2015年3月17日

一瀬瑞穂、杉田護：RNA編集におけるPPRタンパク質のDYWドメインの役割。第4回植物RNA研究者ネットワークシンポジウム、京都大学理学部セミナーハウス、2015年1月19日

川口康弘、一瀬瑞穂、中島健策、杉田千恵子、杉田護：ヒメツリガネゴケのミトコンドリアのRNAスプライシングに働く新規のPLS-type PPRタンパク質の同定 (P-197)。日本植物学会第78回大会、明治大学生田キャンパス、2014年9月13日

一瀬瑞穂、杉田護：オルガネラRNA編集におけるDYWドメインの役割 (2aG08)。日本植物学会第78回大会、明治大学生田キャンパス、2014年9月13日

一瀬瑞穂、杉田護：ヒメツリガネゴケの遺伝子ターゲティングによるPPR遺伝子ファミリーの機能解析 (P7)。日本蘚苔類学会第43回大会 (青森大会)、青森県十和田市大字奥瀬字栃久保231星野リゾート奥入瀬溪流ホテル、2014年8月27日

川口康弘、一瀬瑞穂、杉田千恵子、杉田護：ヒメツリガネゴケのP-type PPRタンパク質の機能解析 (PL108)、第55回日本植物生理学会年会、富山大学五福キャンパス、2014年3月20日

田中惟睦、杉田千恵子、香村吉洋、杉田護：ヒメツリガネゴケの2つのオルガネラ局在タンパク質性RNase Pの解析 (PL107)、第55回日本植物生理学会年会、富山大学五福キャンパス、2014年3月20日

一瀬瑞穂、内田雅人、杉田護：ヒメツリガネゴケの葉緑体RNA 編集因子の同定 (2pD10)、第55回日本植物生理学会年会、富山大学五福キャンパス、2014年3月19日

杉田千恵子、田中惟睦、米谷一樹、香村吉洋、杉田護：ヒメツリガネゴケの3種類のタンパク質性RNase Pの解析 (2pD09)、第55回日本植物生理学会年会、富山大学五福キャンパス、2014年3月19日

一瀬瑞穂、杉田千恵子、八木祐介、中村崇裕、杉田護：ヒメツリガネゴケのミトコンドリア *ccmF*c mRNAの近接した2カ所のRNA編集部位に働くDYWサブクラスPPRタンパク質 (1pF13P) 日本植物学会第77回大会、北海道大学、2013年9月13日

後藤誠也、一瀬瑞穂、杉田千恵子、杉田護：葉緑体局在PPRタンパク質がヒメツリガネゴケの原系体細胞の分化に關与する (1pF03) 日本植物学会第77回大会、北海道大学、2013年9月13日

〔図書〕(計3件)

杉田護：6章 真核光合成生物のゲノム科学 (125-138頁)、*「光合成生物の進化と生*

命科学」(三村徹郎、川井浩史編)、培風館、2014年7月発行、総ページ数192。

Sugita, M. (2014) Part V. Plastid Transformation in Bryophyte. Chapter 29, Plastid transformation of *Physcomitrella patens*. In: **Chloroplast Biotechnology: Methods and Protocols** (Pal Maliga ed.), pp.427-437. *Methods in Molecular Biology* 1132, Springer Protocols. Humana Press. ISSN 1064-3745 ISSN 1940-6029 (electronic) ISBN 978-1-62703-994-9 ISBN 978-1-62703-995-6 (eBook) DOI: 10.1007/978-1-62703-995-6

Kanamaru, K., Sugita, M. Chapter 10. Dynamic features of plastid genome and its transcriptional control in plastid development. (eds. Basanti Biswal, Karin Krupinska, Udaya C. Biswal), **The Advances in Photosynthesis and Respiration series 36 on "Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence"**. 2013. Pp.189-213. DOI:10.1007/978-94-007-5724-0\_10 Print ISBN:978-94-007-5723-3 Online ISBN:978-94-007-5724-0 pp.685

〔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>

## 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

### (3) 連携研究者

中村 崇裕 (NAKAMURA, Takahiro)  
九州大学・農学研究院・准教授  
研究者番号：10464398

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：60755718

### (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：30402457