

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660292

研究課題名(和文)植物オルガネラのRNA編集の分子機構解明に向けた編集酵素の探索と同定

研究課題名(英文)Identification of novel editing factors towards elucidation of molecular mechanism of RNA editing

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)：植物のミトコンドリアと葉緑体で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」が頻繁に起こるが、その分子メカニズムは不明である。本研究ではモデル植物であるヒメツリガネゴケを用いて新規のRNA編集因子を3種同定した。さらに同定したRNA編集因子の機能ドメイン領域を解析した結果、RNA編集因子のC末端に存在するシチジンデアミナーゼ活性部位類似アミノ酸残基を含む39アミノ酸領域がRNA編集部位の認識に関与することを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In plant mitochondria and plastids, C-to-U RNA editing frequently occurs in many transcripts. However, the molecular mechanism of RNA editing remains to be elucidated. In this study, three novel RNA editing factors were identified in the moss *Physcomitrella patens*. In addition, a C-terminal 39 amino acid region of identified RNA editing factors was clarified to be required for editing site-specific recognition.

研究分野：植物オルガネラ遺伝子発現制御

キーワード：RNA編集 ミトコンドリア 葉緑体 ヒメツリガネゴケ シチジンデアミナーゼ RNAi PPRタンパク質

1. 研究開始当初の背景

植物のミトコンドリアと葉緑体で 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」が頻繁に起こることが知られている。C から U への RNA 編集反応は、配列認識因子による編集部位の認識と編集酵素による編集部位 C の脱アミノ化による U への変換の 2 段階で起こると考えられている。しかし RNA 編集の主役である編集酵素は未だ発見されておらず、どのようにして脱アミノ化されるかも不明である。

2. 研究の目的

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、植物オルガネラの新規 RNA 編集因子の探索・同定と、RNA 編集酵素活性の検証を行い、RNA 編集の分子メカニズムの解明を目指す。

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 S14 遺伝子 (*rps14*) は開始コドンをもたないが、転写後、mRNA の ACG コドンが AUG コドンに変換されて開始コドンが形成されることが知られている。そこで、葉緑体形質転換法を用いて、ヒメツリガネゴケの葉緑体 *rps14* mRNA の RNA 編集を行わない株 (ATG 株) を作製し、これを利用して新規 RNA 編集関連因子をスクリーニングする。

(2) ヒメツリガネゴケの RNA 編集因子と予想される PPR-DYW タンパク質遺伝子を破壊した KO 株 ($\Delta 65-1$) と遺伝子発現レベルを抑制した KD 株 ($\Delta 98KD$)、RNAi により遺伝子発現レベルを抑制した 45RNAi 株をそれぞれ作製し、それぞれの変異株の RNA 編集の有無と効率を調べた。

(3) 植物オルガネラの RNA 編集反応は C の脱アミノ化により U へ変換されることから、RNA

編集酵素はシチジンデアミナーゼ活性を持つことが予想される。ヒメツリガネゴケの PPR タンパク質の DYW ドメイン中にシチジンデアミナーゼ活性中心の保存アミノ酸残基 (HxE...CxxCH) が存在する。このことから、RNA 編集に働く PPR-DYW タンパク質が標的部位の配列認識と RNA 編集酵素活性を併せ持つ可能性が考えられる。そこで、RNA 編集が欠損した PPR 遺伝子破壊株 (当研究室で取得) に PPR 遺伝子全長と DYW ドメインなどを削った遺伝子領域をそれぞれ導入して相補株を作製し、得られた相補株で RNA 編集が回復するかどうかを調べた。さらに、シチジンデアミナーゼ活性部位のアミノ酸残基やその他のアミノ酸残基に変異を導入した遺伝子を RNA 編集欠損株に導入し、RNA 編集の有無および効率を調べた。

4. 研究成果

(1) ヒメツリガネゴケ葉緑体の *rps14* 遺伝子の 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) を選抜するためスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*aadA*) が共転写されるような遺伝子導入を試みたが、期待されるホモプラズミックな葉緑体形質転換株を得ることができなかった。葉緑体形質転換株作製用コンストラクト構築のデザインを再検討する必要がある。

(2) 逆遺伝学により、2 種類の PPR-DYW タンパク質、PpPPR_65 と PpPPR_98 がミトコンドリアの RNA 編集因子であることを明らかにした。PpPPR_65 は *ccmFc*-C103 部位と *ccmFc*-C122 部位の編集に働き、PpPPR_98 は *atp9*-C92 部位の編集に特異的に働く。*atp9*-C92 は *atp9* 遺伝子の第 3 エキソン (8 ヌクレオチド長) 内のイントロンとエキソンの境界から 5 塩基目に位置する。そこで、組換え PpPPR_98 タンパク質がスプライスされた *atp9* mRNA の *atp9*-C92 上流を認識する

のか、あるいはスプライスされていない *atp9* pre-mRNA を認識するのかを、組換え PpPPR_98 タンパク質と 2 種類の RNA プローブを用いた RNA 結合実験 (REMSA) を行い検討した。その結果、組換え PpPPR_98 タンパク質はスプライスされた *atp9* mRNA に強く結合することを明らかにした (図 1)。

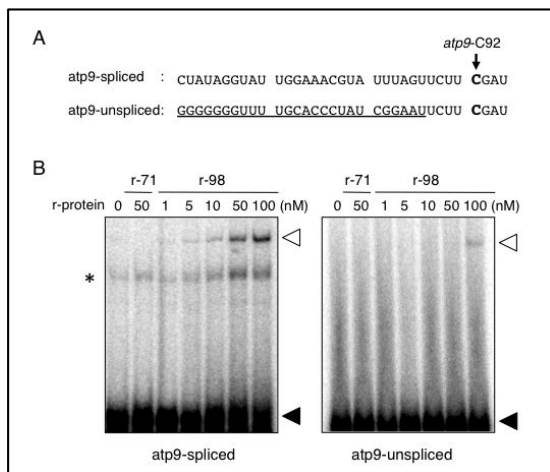


図 1. 組換え PpPPR_98 タンパク質 (r-98) がスプライスされた *atp9* mRNA (*atp9*-spliced) に強く結合した。対照として用いた組換え PpPPR_71 タンパク質 (r-71) は RNA プローブに結合しなかった。

この結果は、スプライシング後に生じた RNA 編集のシス制御領域に PpPPR_98 タンパク質が特異的に結合することが、*atp9*-C92 の編集に必要であることを示唆している。これらの成果を 2013 年に Plant Cell Physiology 誌に論文発表した。

(3) PpPPR_45 遺伝子のノックアウト (KO) 株を取得するため、これまでに様々なコンストラクトを作製してコケ植物に導入したが KO 株を得ることができなかった。そこで本研究では、遺伝子発現抑制 (KD) 株の取得を試みたところ、期待通り PpPPR_45 遺伝子 KD 株 45RNAi を得ることに成功した。45RNAi 株を解析した結果、PpPPR_45 が葉緑体の *rps14* mRNA の編集に関与する因子であることを明らかにした。今後、RNA 編集の効率と S14 タンパク質の蓄積レベルおよび葉緑体のタンパク質合成能の関連性を明らかにする上で取得した 45RNAi 株は有益な解析

ツールとなる。これらの成果を 2014 年に FEBS Letters 誌に論文発表した。

(4) 本研究により、ヒメツリガネゴケの 10 種の PPR-DYW タンパク質のうち 9 種が全 12 カ所の編集部位それぞれを特異的に認識する RNA 編集因子であることが明らかになった (表 1)。シロイヌナズナでは葉緑体とミトコンドリアを合わせると全部で 500 カ所以上の RNA 編集部位が存在し、現在までに約 70 カ所の部位に作用する 25 種の PPR 編集因子が同定されている。一植物種の葉緑体とミトコンドリアの全 RNA 編集部位に作用する全セットの PPR-DYW 編集因子が明らかになったのは、本研究のヒメツリガネゴケが最初である。このことは、PPR-DYW タンパク質が RNA 編集部位認識の中心的な編集因子であることを強く示唆している。

表 1. ヒメツリガネゴケの全 12 カ所の RNA 編集部位とそれぞれの部位に働く PPR-DYW 編集因子の対応関係

RNA 編集因子	編集部位	
PpPPR_45	<i>rps14</i> -C2	葉緑体
PpPPR_56	<i>nad3</i> -C230 <i>nad4</i> -C272	ミトコンドリア
PpPPR_65	<i>ccmFc</i> -C103 <i>ccmFc</i> -C122	ミトコンドリア
PpPPR_71	<i>ccmFc</i> -C122	ミトコンドリア
PpPPR_77	<i>cox2</i> -C370 <i>cox3</i> -C733	ミトコンドリア
PpPPR_78	<i>rps14</i> -C138 <i>cox1</i> -C755	ミトコンドリア
PpPPR_79	<i>nad5</i> -C598	ミトコンドリア
PpPPR_91	<i>nad5</i> -C730	ミトコンドリア
PpPPR_98	<i>atp9</i> -C92	ミトコンドリア

太字は本研究で明らかにした RNA 編集因子

(5) ヒメツリガネゴケの RNA 編集因子の C 末端に保存されている 95 アミノ酸の DYW ドメインの RNA 編集における役割を明らかにするために、ミトコンドリアの RNA 編集が欠損した PpPPR 遺伝子破壊株を用いた相補実験を行

い、RNA 編集には DYW ドメインが必須であることを明らかにした。さらに、DYW ドメインに存在するシチジンデアミナーゼ活性部位の類似アミノ酸残基 HxE(x)nCxXC にアミノ酸変異を導入すると RNA 編集機能が喪失することを明らかにした。また、DYW ドメインのほぼ中央部の 39 アミノ酸領域が RNA 編集部位の認識に寄与していることも明らかにした。相補株を用いた実験結果から、DYW ドメインが RNA 編集酵素としてのシチジンデアミナーゼ活性を有していることが強く示唆された。今後は、生化学によりシチジンデアミナーゼ活性を検証する必要がある。これらの成果は近日中に論文発表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

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.2014.09.031

Ichinose, M., Sugita, C., Yagi, Y., Nakamura, T., Sugita, M. 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).

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).

DOI:10.4161/rna.24772

〔学会発表〕(計 8 件)

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、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

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、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、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渓流ホテル、2014年8月27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、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

Mizuho Ichinose, Chieko Sugita, Korechika Tanaka, Yasuhiro Kawaguchi, Seiya Goto, Akimi Takahashi and Mamoru Sugita: Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins in *Physcomitrella patens*, CREST symposium, Regulation of photosynthesis and chloroplast function, Kyoto University, 2013.12.12

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 *ccmFc* 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、日本植物学会第 77 回大会、北海道大学、2013年9月13日

Mamoru Sugita, Mizuho Ichinose, Chieko Sugita, Korechika Tanaka, Yasuhiro Kawaguchi, and Seiya Goto, Functional analysis of the pentatricopeptide repeat protein family in *Physcomitrella patens*, 16th International Conference MOSS 2013, Masaryk Center, Prague, Czech Republic, June 17, 2013

〔図書〕(計 1 件)

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.

doi:10.1007/978-1-62703-995-6_29.

ISBN-10: 1627039945

ISBN-13: 978-1627039949

〔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/~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

(3) 連携研究者

青木 摂之 (AOKI, Setsuyuki)

名古屋大学・大学院情報学研究科・准教授

研究者番号：30283469

(2) 研究協力者

一瀬 瑞穂 (ICHINOSE, Mizuho)

杉田 千恵子 (SUGITA, Chieko)

内田 雅人 (UCHIDA, Masato)

中村 崇裕 (NAKAMURA, Takahiro)