

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660296

研究課題名(和文) RNA編集を利用した植物ミトコンドリア遺伝子解析手法の確立

研究課題名(英文) Establishment for the method studying mitochondrial gene using RNA editing

研究代表者

中村 崇裕 (Nakamura, Takahiro)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10464398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の機能を解析する新しい実験手法の確立を目的とした。シロイヌナズナを材料に、呼吸鎖複合体Iの構成タンパク質遺伝子のRNA編集に関わるPPRタンパク質を予測し、次に当該PPR遺伝子欠損株を収集することで、呼吸鎖複合体I構成因子の点変異株ライブラリを構築した。構築した点変異株ライブラリの様々な生理活性(ストレス、ホルモン)への応答を解析した。多様なシグナル伝達に対するミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの関与を明らかにすることで、ミトコンドリアゲノムにコードされる遺伝子の新しい実験手法の有用性を評価した。

研究成果の概要(英文)：This study has been performed to establish a novel method studying the protein function encoding in plant mitochondrial genome. To this purpose, the RNA recognition code for PPR protein was applied for the prediction to identify PPR protein genes responsible for mitochondrial RNA editing. The PPR-deficient strains contain the mitochondrial protein whose amino acid was substituted. Thus, the strains could be applied to analyze the mitochondrial responses against various stimuli including abiotic stress and hormones.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ミトコンドリア RNA編集 PPRタンパク質

1. 研究開始当初の背景

植物ミトコンドリアはエネルギー生産の場であるだけでなく、様々な細胞内シグナル伝達の中継地点であることが最近の研究から明らかになりつつある。例えば、植物個体の様々な成長段階、特定の器官での生育異常を始め、雄性不稔、植物ホルモンなどに対する応答異常、に関わることが報告されている。しかし、これらの研究は、他の研究を進めるための遺伝学的解析によって偶発的に解析されており、その理解は乏しい。

呼吸鎖複合体のコア因子はミトコンドリアゲノムにコードされる。その DNA 情報は RNA レベルで編集(多くの場合シチジン(C)→ウラシル(U)への変換)されたのち、機能的なタンパク質となる。それぞれの RNA 編集部位は植物に多く存在する PPR タンパク質によって認識されることが明らかになっている。最近、我々は PPR タンパク質の RNA 認識コード(PPR コード)を発見した(特許出願中 PCT/JP2011/055803; Kobayashi et al., *Nucleic Acid Res.* 2012; ; Yagi et al., *PloSOne* 2013)。PPR コードを用いることで、ミトコンドリアに存在する約 500 箇所の RNA 編集部位それぞれに作用する PPR タンパク質をコンピュータ上で予測することに成功した。すなわち、候補 PPR タンパク質欠損株を収集することで、ミトコンドリアにコードされるタンパク質の 1 アミノ酸欠損株を入手、解析が可能になったことを意味している。

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の機能を解析する新しい実験手法の確立を目的とする。シロイヌナズナを材料に、呼吸鎖複合体 I の構成タンパク質遺伝子の RNA 編集に関わる PPR タンパク質を予測し、次に当該 PPR 遺伝子欠損株を収集することで、呼吸鎖複合体 I 構成因子の点変異株ライブラリを構築する。構築した点変異株ライブラリの様々な生理活性(ストレス、ホルモン)への応答を解析する。多様なシグナル伝達に対するミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の関与を明らかにすることで、ミトコンドリアゲノムにコードされる遺伝子の新しい実験手法の有用性を評価する。

3. 研究の方法

申請者らが最近構築した RNA 編集部位予測プログラムを用いて、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I のうち、特にプロトン輸送に関わるサブユニットをコードする遺伝子(nad2、nad4、nad5)の RNA 編集に関わる約 50 種の候補 PPR タンパク質を推定する。当該 PPR 遺伝子を欠損したシロイヌナズナ T-DNA 挿入株を解析し、RNA 編集の異常を実験的に検証する。得られたシロイヌナズナ変異株を、呼吸鎖複合体 I 構成因子の点変異株として、ミトコンドリアとシグナル伝達機

構との関係を様々な生理的条件下で解析する。

4. 研究成果

呼吸鎖複合体 I のプロトン輸送に関わるサブユニットをコードする遺伝子 nad2、nad4、nad5 において、それぞれ 33、40、32 箇所、計 105 箇所の RNA 編集部位が同定されている。我々の構築した RNA 編集部位予測プログラムを用いて、この RNA 編集部位に作用する潜在的な PPR 分子(核コード)を予測した。具体的には、候補 PPR 分子の RNA 認識コードから推定される結合 RNA 配列をマトリックス化し、標的 RNA 配列に対する適合値(P 値)を基準に候補 PPR を選定することで、呼吸鎖複合体 I 遺伝子 mRNA の RNA 編集に関わる PPR タンパク質を約 30 種選定した。

このうち、適合値(P 値)が特に良好であった 10 種について、候補 PPR 遺伝子を欠損したシロイヌナズナ T-DNA 挿入株を SALK 研究所から取り寄せた。候補変異株を栽培し、T-DNA の挿入位置を確認することで、それぞれの候補 PPR 遺伝子欠損株のホモ化ラインを確立しようとしたところ、4 系統のホモ化ラインが得られず、これら系統に含まれる PPR 遺伝子は必須遺伝子であることが示唆された。6 系統に関しては、ホモ化ラインが得られた。そのうち 1 系統に関しては、生育異常の生理学的表現型を観察した。

ホモ化ラインが得られた 6 系統に関して、RNA の編集異常の解析を行い、それぞれの RNA 編集異常箇所を同定することができた。その結果、4 系統に関しては、予測された RNA 編集部位の異常を同定できたが、2 系統に関しては、予測されない RNA 編集部位の異常であった。また、いくつかの系統においては、複数の RNA 編集箇所、編集の異常が同定された。これら実験から得られた結果は、RNA 編集部位予測プログラムのアルゴリズムに取り入れることで、より精度の高い予測プログラムの構築も進めている。

呼吸鎖複合体 I の構成タンパク質遺伝子 mRNA の RNA 編集の異常が同定できた系統において、通常条件下での呼吸活性を測定したところ、一部の変異体で顕著な差が観察された。現在、非生物学的ストレス条件下での植物個体の解析、ミトコンドリア RNA 蓄積の変動、呼吸活性の変化を検証しているとともに、複合体 I 結晶構造を基に、RNA 編集部位異常によるアミノ酸置換部位の蛋白質構造レベルでの変化をシミュレーションしている。さらに、新たに 10 系統の候補 PPR 遺伝子欠損株の入手、変異体解析に着手し、本解析を拡大している。

以上のように、本研究の遂行により、PPR 遺伝子欠損株を利用したミトコンドリア構成遺伝子の点変異ライブラリの構築とその解析、については、その実験手法は構築できたと考えている。しかし、一部のミトコンドリア PPR タンパク質は複数の RNA 編集に関わっ

ており、その RNA 編集の異常が最終的な生理活性の原因となるのかについて不明瞭な点が残された。責任 PPR 遺伝子に点変異を導入して相補試験をするなど、RNA 編集の異常と表現型を直接つなぐためのさらなる実験が必要と考えられる。

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 6 件)

1. Yagi, Y., Nakamura, T., *Small, I. (2014) The potential for manipulating RNA with pentatricopeptide repeat proteins. **Plant J.** 78, 772-782.
2. Imai, T., Nakamura, T., Maeda, T., Gao, X., Kakuta, Y., Nakashima, T., *Kimura, M. (2014) Pentatricopeptide repeat motifs in the processing enzyme PRORP1 in Arabidopsis thaliana play a crucial role in recognition of nucleotide bases at T psi C loop in precursor tRNAs. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 450, 1541-1546.
3. Okuda, K., Shoki, H., Arai, M., Shikanai, T., Small, I., *Nakamura, T. (2014) Quantitative analysis of motifs contributing to the interaction between PLS-subfamily members and their target RNA sequences in plastid RNA editing. **Plant J.** 80, 870-882.
4. Kazama, T., Yagi, Y., Toriyama, K., *Nakamura, T. (2013) Heterogeneity of the 5'-end in plant mRNA may be involved in mitochondrial translation. **Front. Plant Sci.** 4,517.
5. Ichinose, M., Sugita, C., Yagi, Y., Nakamura, T., *Sugita, M. (2013). Two DYW Subclass PPR Proteins are Involved in RNA Editing of *ccmF*c and *atp9* Transcripts in the Moss *Physcomitrella patens*: First Complete Set of PPR Editing Factors in Plant Mitochondria. **Plant Cell Physiol.** 54, 1907-1916.
6. Yagi, Y., Tachikawa, M., Noguchi, H., Satoh, S., Obokata, J., *Nakamura, T. (2013). Pentatricopeptide repeat proteins involved in plant organellar RNA. **RNA Biol.** 10,1419-1425.

[学会発表] (計 13 件 ; 招待講演のみ)

1. Nakamura, T. PPR motif as a new RNA/DNA binding module for genome editing, JAACT2014 Symposium, 2014 Nov.
2. Nakamura, T. PPR Motifs and Their Engineering, Gordon Research Conference, Reengineering Photosynthetic Organelles, 2015 Jan.
3. 中村 崇裕: PPR タンパク質を用いたゲノム

編集技術開発, 植物ゲノム編集ワークショップ, 2014 11 月.

4. 中村 崇裕: ゲノム編集と植物育種における現状, 九州農業研究発表会, 2014 9 月.
5. 中村 崇裕: ゲノム編集の概念と技術の現状, 平成 26 年度日本水産学会秋季大会 ミニシンポジウム 水産物におけるゲノム編集の現状と展望, 2014 9 月.
6. 中村 崇裕: ゲノム編集と新しい DNA/RNA 結合モジュール、PPR モチーフ, 第 51 回 化学関連支部合同九州大会, 2014 6 月
7. 中村 崇裕: ゲノム編集の新しい DNA/RNA 結合モジュール、PPR モチーフ, ゲノム編集ワークショップ「ゲノム編集の現状と可能性」, 2014 5 月.
8. 中村 崇裕: ゲノム編集と新しい DNA/RNA 結合モジュール、PPR モチーフ, 第 32 回 日本動物工学会 シンポジウム「日本のバイオ医薬品開発を支える先端技術」, 2014 6 月.
9. 中村 崇裕, 八木祐介: PPR motif、オルガネラ研究から RNA/DNA 操作ツールの開発へ, 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 3 月.
10. 八木祐介、佐久間哲史、山本卓、中村崇裕: DNA・RNA 編集の新しい核酸結合モジュール、PPR モチーフ; 第 3 回植物 RNA 研究ネットワーク、2013 年 11 月 (札幌) .
11. 中村崇裕: モノ作りを支える植物細胞内の小さな工場; 農芸化学会主催サイエンスカフェ、2013 年 11 月 (福岡)
12. 中村崇裕: ゲノム編集の現状、および PPR を用いた国産技術開発の取組; 植物バイオテク懇話会、2013 年 7 月 (京都)
13. 中村崇裕: 植物オルガネラの遺伝子発現に働く PPR タンパク質、その RNA 認識基盤; 「植物ミトコンドリア研究の新展開」、岡山大学資源植物科学研究所 共同利用・共同研究拠点ワークショップ、2013 年 1 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: PPR モチーフを利用した DNA 結合性タンパク質の設計方法及びその利用

発明者: 中村崇裕、八木祐介、大川恭行、山本卓、佐久間哲史

権利者: 九州大学・広島大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-89840

出願年月日：2013年4月22日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし