

平成21年5月21日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16085206

研究課題名（和文） 葉緑体の環境適応戦略

研究課題名（英文） Environmental acclimation of chloroplasts

研究代表者

鹿内 利治 (SHIKANAI TOSHIHARU)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70273852

研究成果の概要：植物の RNA 編集は RNA 上で特定の C を U に書き換える反応で、プラスチドとミトコンドリアで頻繁に見られる。本研究では、プラスチドの RNA 編集において PPR タンパク質が標的決定因子として機能することを明らかにした。さらに PPR タンパク質のドメイン構造の解析から、プラスチドでの RNA 編集装置の二成分（PPR タンパク質と編集酵素）モデルを提唱した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	12,900,000	0	12,900,000
平成17年度	12,900,000	0	12,900,000
平成18年度	12,900,000	0	12,900,000
平成19年度	12,900,000	0	12,900,000
平成20年度	12,900,000	0	12,900,000
総計	64,500,000	0	64,500,000

研究分野：植物生理学、植物分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学／植物分子生物・生理学

キーワード：

(1)葉緑体 (2)RNA 編集 (3)環境適応 (4)PPR タンパク質 (5)光合成 (6)プラスチド (7)シロイヌナズナ (8)遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

RNA 編集は、ゲノムの情報を RNA 上で書き換えるものであり、高等植物ではプラスチドとミトコンドリアにおいて頻繁に起こり、多数の C が U に変換される。特定の C の認識には、標的サイト周辺の 30 塩基程度が必要で、シス配列と呼ばれる。シス配列には高い保存性はなく、500 近いある RNA 編集サイトを何らかのトランス因子が独立に認識すると考えられてきた。トランス因子の実体解明と C から U への変換を行う編集酵素の解明が重要な課題であった。

## 2. 研究の目的

我々は、特定領域研究の開始直後に、シロイヌナズナの特定の RNA 編集を欠く変異株 *crr4* を単離、解析したことを報告した（発表論文①）。*crr4* は、PPR タンパク質をコードする遺伝子に異常を持ち、トランス因子の実体が PPR タンパク質であることが強く示唆された。プラスチド遺伝子発現制御は、葉緑体の環境応答の重要な過程であり、特定領域研究では、RNA 編集に焦点を絞ることにした。研究の最終的な目標は、RNA 編集装置の解明であるが、それに向けて以下の目標を順次達

成してきた。(1) PPR タンパク質がトランス因子の実体であることの証明。(2) RNA 編集に機能する PPR タンパク質の各ドメインの機能解明。(3) RNA 編集効率を制御する因子の解明。(4) DYW ドメインの機能解明。それぞれの項目に分けて、方法および成果についてまとめる。

### 3. 研究の方法

(1) CRR4 はプラスチド *ndhD* の開始コドンを作る RNA 編集に必須である。CRR4 を大腸菌で発現させ、精製後、標的サイトを含む RNA を用いて、ゲルシフトアッセイを行った。

(2) RNA 編集に関わる 2 つの PPR タンパク質 CRR4 と CRR21 を用いて、ドメインの欠損や交換を行い、その機能を *in vitro* と *in vivo* で評価した。

(3) *ndhD* の開始コドンの RNA 編集効率の異なるタバコ属 2 種から CRR4 オルソログを単離し、シロイヌナズナの *crr4* に導入し、RNA 編集効率を評価した。

(4) CRR2、CRR22、CRR28 の 3 つの DYW ドメインを有する PPR タンパク質間で、ドメイン欠損、ドメイン交換を行った。

### 4. 研究成果

(1) 大腸菌で発現させた CRR4 は *ndhD* の翻訳開始コドン周辺の 30 塩基以下の配列を特異的に認識し、結合することを示した。遺伝学のデータ (発表論文①) とあわせて、PPR タンパク質がプラスチドの RNA 編集におけるトランス因子であることを結論した (発表論文⑨)。このことは、現在ではプラスチドだけでなく、ミトコンドリアでも受け入れられている。

(2) CRR4 は *ndhD* の開始コドンを作る RNA 編集に関わるが、CRR21 は同じ RNA のアミノ酸置換を引き起こす RNA 編集に関わる。両者はともに E クラスに属する PPR タンパク質で、PPR モチーフに加えて C 末に E ドメインを持つ。ドメイン欠損、ドメイン交換実験から、RNA 配列認識、結合には N 末の PPR モチーフ領域で充分であるが、E モチーフは *in vivo* での RNA 編集に必須であり、CRR4 と CRR21 の間で交換可能で、RNA 編集に共通した機能に関わることが明らかになった。RNA 編集装置は、PPR タンパク質と C から U への変換を触媒する RNA 編集酵素 (未同定) から成る二成分モデルを提唱した (図 1)。

QuickTime<sup>®</sup> C2  
TIFF (LZW) 圧縮  
© 2000 Apple Computer, Inc. All rights reserved.  
00000000-0000-0000-0000-000000000000

図 1 RNA 編集装置の二成分モデル

(4) *ndhD* の開始コドンは野生株でも半分程度しか RNA 編集を受けない。また *Nicotiana tomentosiformis* では、このサイトは編集を受けないと報告されていた。しかしながら、*N. tomentosiformis* においてもこのサイトの RNA 編集を確認し、その活性は *N. sylvestris* より低いことを示した。またこの RNA 編集効率の違いは、CRR4 オルソログの配列の違いに起因することを明らかにした (発表論文⑩)。

(4) E モチーフのさらに C 末側に DYW モチーフを有する CRR22 と CRR28 を発見した。両者は、プラスチドにおいて複数のサイトの RNA 編集に関わる。DYW モチーフは、RNA 編集酵素の実体ではないかと注目されているが、我々は、特定領域研究開始前に、DYW モチーフを有する CRR2 が RNA 編集ではなく遺伝子間の RNA 切断に関わることを報告している (Hashimoto *et al.*, Plant J. 36, 541-9, 2003)。この研究では、CRR2 の DYW モチーフは *in vitro* で RNase 活性を有し、*in vivo* での CRR2 の機能に必須であることを明らかにした。一方、CRR22 と CRR28 の DYW モチーフは、*in vivo* での機能に不要であった。さらに CRR2 と CRR22 あるいは CRR28 の間で、DYW モチーフの交換はできないが、CRR22 と CRR28 の間の DYW モチーフの交換は、その機能に影響を与えなかった。以上の結果から、RNA 編集と RNA 切断に関わる PPR タンパク質で、DYW モチーフの機能が異なることが明らかになった (発表論文⑬)。

### 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 23 件) すべて査読有り

- ① Kotera E, Tasaka M, Shikanai T A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433, 326-30 (2005)
- ② Hojo M, Tasaka M, Shikanai T Physiological requirements of the nonmevalonate pathway for photo-acclimation in Arabidopsis. *Plant Biotech* 22, 39-45(2005)
- ③ Abdel-Ghany SE, Müller-Moulé P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* 17, 1233-51 (2005)
- ④ Okegawa Y, Tsuyama M, Kobayashi Y, Shikanai T The *pgl1* mutation in the Rieske subunit of the cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex does not affect PGR5-dependent cyclic electron transport around photosystem I. *J Biol Chem* 280, 28332-6 (2005)
- ⑤ Munshi MK, Kobayashi Y, Shikanai T Identification of a novel protein CRR7 required for the stabilization of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in *Arabidopsis*. *Plant J* 44, 1036-44 (2005)

- ⑥ Munekage Y, Shikanai T Cyclic electron transport through photosystem I. *Plant Biotech* 22, 361-9 (2005)
- ⑦ Shikanai T RNA editing in plant organelles: machinery, physiological function and evolution. *Cell Mol Life Sci* 63, 698-708 (2006)
- ⑧ Munshi MK, Kobayashi Y, Shikanai T CRR6 is a novel factor required for accumulation of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in Arabidopsis. *Plant Physiol* 141, 737-44 (2006)
- ⑨ Okuda K, Nakamura T, Sugita M, Shimizu T, Shikanai T A pentatricopeptide repeat protein is a site-recognition factor in chloroplast RNA editing. *J Biol Chem* 281, 37661-7 (2006)
- ⑩ Muraoka R, Okuda K, Kobayashi Y, Shikanai T A eukaryotic factor required for accumulation of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in Arabidopsis. *Plant Physiol* 142, 1683-9 (2006)
- ⑪ Shikanai T Cyclic electron transport around photosystem I; genetic approaches. *Annu Rev Plant Biol* 58, 199-217 (2007)
- ⑫ Okuda K, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Shikanai T Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 8178-83 (2007)
- ⑬ Shikanai T The NAD(P)H dehydrogenase complex in photosynthetic organisms: Subunit composition and physiological function. *Func Plant Sci Biotech* 1, 129-37 (2007)
- ⑭ Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M Regulation of copper homeostasis by microRNA in Arabidopsis. *J Biol Chem* 282, 16369-78 (2007)
- ⑮ Shimizu H, Shikanai T Dihydrodipicolinate reductase-like protein, CRR1, is essential for chloroplast NAD(P)H dehydrogenase in Arabidopsis. *Plant J*. 52, 539-47 (2007)
- ⑯ Okegawa Y, Long TA, Iwano M, Takayama S, Kobayashi Y, Covert SF, Shikanai T Balanced PGR5 level is required for chloroplast development and optimum operation of cyclic electron transport around photosystem I. *Plant Cell Physiol* 48, 1462-71 (2007)
- ⑰ Yamasaki H, Pilon M, Shikanai T How do plants respond to copper deficiency? *Plant Signaling & Behavior* 3-4, 231-2 (2008)
- ⑱ Okegawa Y, Kagawa Y, Kobayashi Y, Shikanai T Characterization of factors affecting the activity of photosystem I cyclic electron transport in chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 49, 825-34 (2008)
- ⑲ Shimizu H, Peng L, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Shikanai T CRR23/NdhL is a subunit of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 49, 835-42 (2008)
- ⑳ Okuda K, Habata Y, Kobayashi Y, Shikanai T Amino acid sequence variations in *Nicotiana* CRR4 orthologs determine the species-specific efficiency of RNA editing in plastids. *Nucleic Acids Res* 36, 6155-64 (2008)
- ㉑ Peng L, Shimizu H, Shikanai T The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in Arabidopsis. *J Biol Chem* 283, 34873-9 (2008)
- ㉒ Okuda K, Chateigner-Boutin A-L, Nakamura T, Delannoy E, Sugita M, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Small I, Shikanai T Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell* 21, 147-56 (2009)
- ㉓ Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T SPL7 is a central regulator for copper homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 347-61 (2009)
- [学会発表] (計16件)
- ① 小寺栄見, 田坂昌生, 鹿内利治 シロイヌナズナ核遺伝子 *CRR4* は葉緑体遺伝子 *ndhD* の RNA 編集に関わる 第46回植物生理学会年会 新潟 (2005)
- ② Shikanai T Function of PPR proteins in the maturation of chloroplast RNA. ICPMB 2005, Obernai, France (2005)
- ③ 奥田賢治, 清水敏之, 鹿内利治 シロイヌナズナ PPR タンパク質 *CRR4* による葉緑体 RNA 編集機構の解明 第47回日本植物生理学会年会, 筑波 (2006)
- ④ Shikanai T Machinery of RNA editing in the chloroplast. The 53<sup>rd</sup> NIBB Conference, Okazaki (2006)
- ⑤ Shikanai T Machinery of RNA editing includes a PPR protein in plastids. Japanese-Finnish Seminar, Nara (2006)
- ⑥ 奥田賢治, 明賀史純, 本橋令子, 篠崎一雄, 鹿内利治 葉緑体 RNA 編集に関わる PPR タンパク質は機能的に保存されたドメイン構造を持つ 第48回日本植物生理学会年会, 松山 (2007)
- ⑦ 北村后希, 奥田賢治, 小林善親, 鹿内利治 葉緑体 RNA 編集が異常なシロイヌナズナ *cr4* のサプレッサー変異株の解析 第48回日本植物生理学会年会, 松山 (2007)
- ⑧ Okuda K, Shikanai T Function of PPR proteins as a *trans*-factor in chloroplast RNA editing. ICPMB 2007, Nara (2007)
- ⑨ Okuda K, Shikanai T PPR proteins function as a *trans*-factor in chloroplast RNA editing.

International Congress of Photosynthesis, Glasgow, UK (2007)

- ⑩ Shikanai T Mechanism of RNA editing in plastids. The Plant & Animal Genome XVI Conference, San Diego, USA (2008)
- ⑪ Shikanai T Machinery of RNA editing contains PPR proteins in plastids. Plant winter Conference, POSTEC, Korea (2008)
- ⑫ 鹿内利治 葉緑体 RNA 編集を行う装置 第 49 回日本植物生理学会年会, 札幌 (2008)
- ⑬ 奥田賢治, 羽畑優哉, 小林善親, 鹿内利治 タバコ祖先種における RNA 編集システムの比較解析 第 49 回日本植物生理学会年会, 札幌 (2008)
- ⑭ Shikanai T Mechanism of RNA editing in plastids. Gordon Research Conference, Mitochondria & Chloroplasts, Bidderford, USA (2008)
- ⑮ Shikanai T Mechanism of RNA editing in plastids. Japan-Swiss Workshop, Nara (2008)
- ⑯ 奥田賢治, Chateigner-Boutin A-L, 中村崇裕, Delannoy E, 杉田護, 明賀史純, 本橋令子, 篠崎一雄, Small I, 鹿内利治 葉緑体における PPR タンパク質の多様化した機能 第 50 回日本植物生理学会年会, 名古屋 (2009)

[図書] (計 5 件)

- ① Shikanai T, Obokata J Machinery of RNA editing in plant organelles. In "RNA and DNA editing: Molecular mechanisms and their integration into biological system." pp99-119 (2008)
- ② 鹿内利治, 小寺栄見, 田坂昌生 高等植物の葉緑体における RNA editing のメカニズム 実験医学 23, 1213-5 (2005)
- ③ 鹿内利治 RNA 編集 ゲノム進化の痕跡? 蛋白質核酸酵素 50, 1858-9 (2005)
- ④ 鹿内利治 植物の光環境適応戦略 生物と化学 44, 121-7 (2006)
- ⑤ 鹿内利治 なぜ植物は RNA 編集をやめないのか 蛋白質核酸酵素 51, 229-36 (2006)

[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  
なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿内 利治 (SHIKANAI TOSHIHARU)  
京都大学・理学研究科・教授  
研究者番号 : 70273852

(2) 研究分担者

小林 善親 (KOBAYASHI YOSHICHIKA)  
九州大学・農学研究院・教授  
研究者番号 : 90087594

(3) 研究分担者 (05-08 年度)

津山 孝人 (TSUYAMA MICHIUTO)  
九州大学・農学研究院・助教  
研究者番号 : 10380552