

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07400

研究課題名(和文) 葉緑体生合成を制御するRNAスプライシング機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of chloroplast intron splicing

研究代表者

朝倉 由香里 (Yukari, Asakura)

大阪大学・蛋白質研究所・特任研究員

研究者番号：70609677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物の葉緑体ゲノムには、約20個のグループIIおよび1個のグループIイントロンが存在する。それらのスプライシングには、核コードのRNA結合蛋白質の介在が必要である。本研究では、RNA結合ドメインをもつCFM1のターゲットとなるイントロンを同定することを目的とした。RNA免疫沈降と葉緑体全ゲノムマイクロアレイを組み合わせた方法であるRIP-chip法を行った結果、8個のグループIIイントロンが免疫共沈降した。これらのイントロンにおいてイネcfm1-1変異株のスプライシング活性の有無を確認したところ、6個のグループIIイントロンのスプライシング活性が親株に比較して有意に低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で機能を明らかにしたCFM1は、葉緑体に局在する複数個のCRMドメインを保持する蛋白群のうち6個目のスプライシング因子であり、それぞれの蛋白質でターゲットイントロンとパートナー蛋白質の組み合わせが異なっていた。CRMドメイン蛋白質群は、葉緑体やミトコンドリアの遺伝子発現を制御するために、既存のCRMドメインを2個～4個とタンデムに繋げることにより、細胞内共生以降に植物が独自に発達させたシステムであると考えられる。本研究の知見は、植物の葉緑体におけるスプライシング機構の全体像の解明や、細胞核による葉緑体の遺伝子発現制御機構の解明に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Chloroplast genomes in higher plants encode ~ 20 group II and 1 group I introns. The CRM domain (The chloroplast RNA splicing and ribosome maturation) is an RNA binding domain that is required for splicing of group II and group I introns in higher plant chloroplasts. This domain is derived from a prokaryotic 50S pre-ribosome binding protein, YhbY. It comprises 14 or 16 orthologous groups in rice and Arabidopsis, respectively. To explore the functional repertoire of CRM domain proteins, we studied CFM1 (for CRM Family Member 1) which harbors 3 CRM domains in rice and maize. RNA co-immunoprecipitation assay showed that CFM1 in maize associates with several group II introns in chloroplasts. A rice cfm1-1 mutant possesses a point mutation conditions white or white-variegated seedling. The cfm1-1 mutant impaired in the splicing of several group II introns in chloroplasts.

研究分野：植物分子生物学、生化学

キーワード：葉緑体 スプライシング イントロン RNA結合蛋白質 RNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高等植物の葉緑体ゲノムには、約 20 個のグループ II および 1 個のグループ I イントロンが存在する。その中には、tRNA、リボゾーム蛋白質、光化学系のタンパク質複合体、プロテアーゼなど、葉緑体の生合成や光合成機能に重要な働きを担う遺伝子が含まれている。高等植物の葉緑体のイントロンは自己スプライシング能を持たず、RNA スプライシングには「スプライシング因子」と呼ばれる RNA 結合蛋白質の介入を必要とする。これまでに植物の葉緑体において、15 個の核コードのスプライシング因子が明らかになっている。

CRM ドメイン(Chloroplast RNA Splicing and Ribosome Maturation)は約 10 kDa の RNA 結合ドメインであり、原核生物の 50S リボゾーム前駆体の成熟に関わる YhbY を祖先にもつ。植物の CRM ドメイン蛋白質は、双子葉のシロイヌナズナには 16 個、単子葉のイネには 14 個存在する。これらはすべて葉緑体あるいはミトコンドリアに局在すると予測され、4 つのサブファミリーに分類される(図 1、Barkan et al., RNA, 2007)。我々はこれまでに、5 つの CRM ドメイン蛋白質ファミリー(CRS1、CAF1、CAF2、CFM2 および CFM3)が葉緑体のグループ II および I イントロンのスプライシング因子であることを明らかにしてきた(図 1、図 2)。

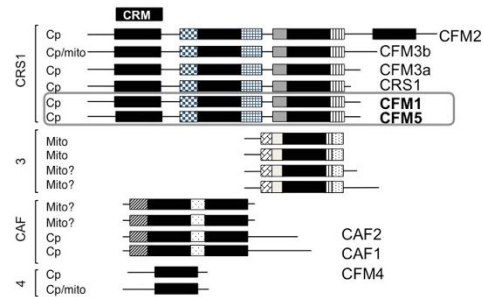


図1 イネ・シロイヌナズナにおけるCRMドメインファミリー

Barkan et al., RNA 2007より改変

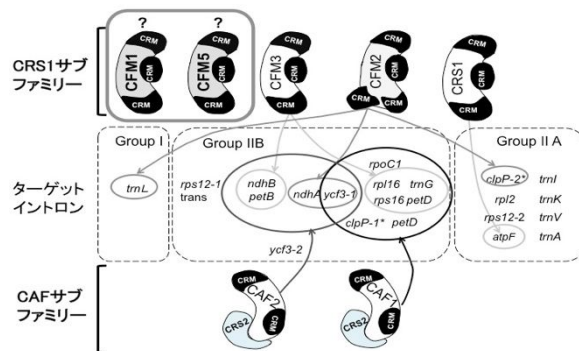


図2 葉緑体遺伝子のスプライシングに必要とされるCRMドメイン蛋白質

Asakura et al., 2012より改変

2. 研究の目的

当該研究の CFM1 (CRM Family Member 1) および CFM5 は 3 個の CRM ドメインをタンデムに持つ機能未知のタンパク質であり、葉緑体に局在すると予測される(図 1、2)。両蛋白質は、上述の CRS1、CFM2、CFM3 と同じ CRS1 サブファミリーに属することから、葉緑体のスプライシング因子であると推察される。しかし、これまでに、CFM1 のトウモロコシおよびシロイヌナズナの欠損株が胚性致死となるため、CFM1 の機能解析は遅れていた(未発表データ)。そこで我々は、斑入りの形質を示すイネ点突然変異株 *cfm1-1* を入手した(未発表データ)。これらの変異株の形質により、CFM1 が葉緑体の生合成過程に重要な役割を担っていると考えられる。本研究では、変異株と特異的抗体を用いて、CFM1 のターゲットとなるイントロンを同定し、さらに、葉緑体のスプライシングマシナリーである RNA 蛋白質複合体を単離・同定することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(1) **RIP-chip** (RNA immunoprecipitation and chip hybridization) assay と (2) **変異株** を用いた *in vivo* のスプライシングアッセイを組み合わせることにより、RNA 結合蛋白質のターゲット RNA の探索をハイスループットに行った。

(1) RIP-chip 法を用いた CFM1 のターゲットイントロンのスクリーニング

RNA 免疫沈降と葉緑体全ゲノムマイクロアレイを組み合わせた方法で RNA 結合蛋白質のターゲット RNA を効率よく探索する方法である (Schmitz-Linneweber et al., Plant Cell, 2005、図 3)。この方法では、免疫沈降可能な良質な抗体が必要となる。我々は抗 CFM1 抗体を作出していたが、クルードの抗体では免疫沈降が行えなかつたため、抗体精製を試みた。まず、リコンビナント CFM1 抗原を大腸菌で発現・精製し、CFM1 抗原カラムを作成後、2 個の抗トウモロコシ CFM1 抗体を精製した。

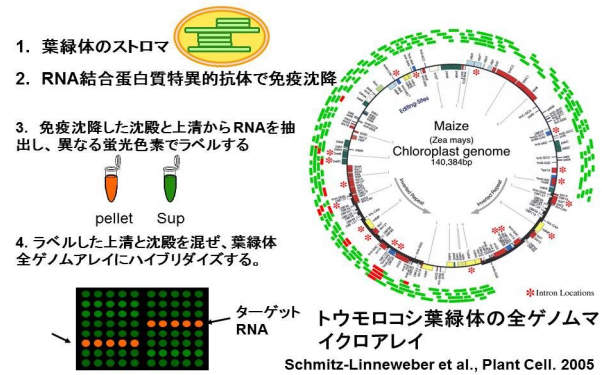


図3 RIP-chip (RNA immunoprecipitation and chip hybridization) assay の概略図

次に、トウモロコシの緑葉から調整した葉緑体の可溶性画分であるストロマと、精製した抗 CFM1 抗体を用いて免疫沈降実験を行った。CFM1 と免疫共沈降した沈殿と上清から RNA を抽出し、異なる蛍光色素で標識後、混合し、トウモロコシ葉緑体全ゲノムマイクロアレイにハイブリダイズした。次に、葉緑体ゲノム上で、上清と比較して、沈殿の蛍光シグナルの強度が高い DNA 領域を探索することにより、CFM1 のターゲットイントロンをスクリーニングした (図 3)。

次に、トウモロコシの緑葉から調整した葉緑体の可溶性画分であるストロマと、精製した抗 CFM1 抗体を用いて免疫沈降実験を行った。CFM1 と免疫共沈降した沈殿と上清から RNA を抽出し、異なる蛍光色素で標識後、混合し、トウモロコシ葉緑体全ゲノムマイクロアレイにハイブリダイズした。次に、葉緑体ゲノム上で、上清と比較して、沈殿の蛍光シグナルの強度が高い DNA 領域を探索することにより、CFM1 のターゲットイントロンをスクリーニングした (図 3)。

(2) 変異株を用いた *in vivo* スプライシングアッセイ

(1)の RIP-chip 法でスクリーニングしたイントロンが CFM1 のターゲットであるか否かを、下記の方法で判定した。イネ点突然変異株 *cfm1-1* と親株から RNA を抽出後、ノーザンブロット法および poisoned-primer extension 法 (プライマーエクステンション法の応用で、前駆体 RNA と成熟体 RNA を簡易に検出する方法; Schmitz-Linneweber et al., Plant Cell, 2006; Asakura and Barkan, Plant Physiol., 2006)を用いて、*cfm1-1* 変異株における葉緑体イントロンのスプライシング活性の有無を検出した。

(3) CFM1 と相互作用する蛋白質の探索

CFM1 が複合体を形成しているのか、単量体として存在しているのかを明らかにするために、二次元 Blue-Native PAGE/SDS-PAGE 法やシヨ糖密度勾配法を用いてトウモロコシ葉緑体の蛋白質複合体を分離後、抗 CFM1 抗体を用いてウエスタン解析を行った。次に、CFM1 蛋白質のパートナー蛋白質を探索するため、トウモロコシ緑葉から調整したストロマを用いて抗 CFM1 抗体で免疫沈降実験を行い、既知の葉緑体のグループ II イントロンのスプライシング因子の抗体でウエスタン解析を行った。

4. 研究成果

(1) CFM1の細胞内局在の解析

CFM1 の細胞内局在を明らかにするために、トウモロコシから緑葉、葉緑体、葉緑体の可溶性画分であるストロマ、膜画分であるチラコイド膜、葉緑体内の核様体のヌクレオイドを調整後、蛋白質を抽出し、抗 CFM1 抗体を用いてウエスタン解析を行った。その結果、トウモロコシ CFM1 は葉緑体に局在し、葉緑体の可溶性画分であるストロマと核様体であるヌクレオイドに共局在していた。

(2) RIP-chip法を用いたCFM1のターゲットイントロンの探索

CFM1 のターゲットイントロンを探索するために、トウモロコシ緑葉から調整したストロマと精製抗 CFM1 抗体を用いて RIP-chip 法を行った。その結果、葉緑体ゲノム中の 8 個のグループ II イントロンが CFM1 と免疫共沈降した。

(3) イネ *cfm1-1* 変異株を用いたグループ II イントロンの *in vivo* スプライシングアッセイ

(2)の RIP-chip 法で CFM1 と免疫共沈降した葉緑体のグループ II イントロンが CFM1 のターゲットイントロンであるか否かを確認するため、イネ点突然変異株 *cfm1-1* と親株から抽出した RNA を用いて poisoned-primer extension 法およびノーザンブロッティング法を行い、*cfm1-1* 変異株のスプライシング活性の有無を確認した。その結果、8 個のグループ II イントロンのうち 6 個のイントロンのスプライシング活性が、*cfm1-1* 変異株において親株と比較して有意に低下していた。これらのことから、CFM1 はスプライシング因子であり、そのターゲットイントロンは、葉緑体ゲノムの 6 個のグループ II イントロンであることを明らかにした。

(4) CFM1と相互作用する蛋白質の探索

CFM1 が複合体で存在しているのか否かを解析するために、二次元 Blue-Native PAGE/SDS-PAGE 法やショ糖密度勾配法を用いてトウモロコシ葉緑体の蛋白質複合体を分離後、抗 CFM1 抗体を用いてウエスタン解析を行ったところ、CFM1 は葉緑体内で高分子量の蛋白質複合体を形成していた。

次に、CFM1 蛋白質のパートナー蛋白質を探索するため、トウモロコシ緑葉から調整した葉緑体のストロマを用いて、抗 CFM1 抗体で免疫沈降実験を行い、既知のグループ II イントロンのスプライシング因子の抗体を用いて検出を行った。その結果、複数個の既知のグループ II イントロンのスプライシング因子が CFM1 と免疫共沈降した。このことから CFM1 は、これらの既知のスプライシング因子と RNA-蛋白質複合体を形成していることが明らかになった。

<引用文献>

- (1) Asakura Y and Barkan A. Arabidopsis orthologs of maize chloroplast splicing factors promote splicing of orthologous and species-specific group II introns. *Plant Physiol.* 2006. 142; 1656-1663.
- (2) Barkan A, Klipcan L, Ostersetzer O, Kawamura T, Asakura Y, Watkins KP. The CRM domain: an RNA binding module derived from an ancient ribosome-associated protein. *RNA.* 2007. 13; 55-64.
- (3) Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Barkan A. RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell.* 2005.17;2791-2804.
- (4) Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier RE, Williams-Voelker PM, Kroeger TS, Vichas A, Barkan A. A pentatricopeptide repeat protein facilitates the trans-splicing of the maize chloroplast rps12 pre-mRNA. *Plant Cell.* 2006. 18; 2650-2663.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Kikuchi S, Asakura Y, Imai M, Nakahira Y, Kotani Y, Hashiguchi Y, Nakai Y, Takafuji K, Bédard J, Hirabayashi-Ishioka Y, Mori H, Shiina T, Nakai M. A Ycf2-FtsHi Heteromeric AAA-ATPase Complex Is Required for Chloroplast Protein Import. *Plant Cell.* 2018 30:2677-2703 (査読あり).

[学会発表](計2件)

Asakura Y, Williams-Carrier R., Barkan A., Nakai M. Pet9, a nuclear-encoded protein containing a rhodanese domain requires for the biogenesis of cytochrome *b₆f* complex in maize. 第 60 回植物生理学会年会、名古屋大学(愛知県・名古屋市) 2019 年 3 月 14 日

Asakura Y., Williams-Carrier R., Barkan A., Nakai M. Pet9, a rhodanese-like domain protein, involved in the biogenesis of the cytochrome *b₆f* complex in maize. International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis. 8th Nov., 2018. Kurashiki, Okayama, Japan.

6 . 研究組織
該当なし