

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14435

研究課題名（和文）PPRネットワークから理解する植物ミトコンドリアのRNA制御メカニズム

研究課題名（英文）Understanding the mechanism of post-transcriptional regulation in plant mitochondria

研究代表者

一瀬 瑞穂 (Ichinose, Mizuho)

九州大学・農学研究院・学術研究員

研究者番号：60755718

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：植物細胞内のミトコンドリアは生命エネルギーを生産する重要なオルガネラである。ミトコンドリアは独自の遺伝子発現系を有しており、この遺伝子発現は主に転写後のRNAレベルで多様な制御を受けるが、その制御メカニズムは不明な点が多い。本研究では、ミトコンドリアRNAのスプライシングや安定化などオルガネラRNA制御に機能する新規因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアの正常な機能発現は植物の生育に必須であるにも関わらず、その遺伝子発現機構は未だ不明な点が多い。ミトコンドリア遺伝子発現に働く因子を明らかにすることは、ミトコンドリアの複雑な遺伝子発現システムの理解につながるため、学術的意義は大きい。また、ミトコンドリアの遺伝子発現システムが解明されれば、ミトコンドリア機能増強による有用作物の作出が期待される。

研究成果の概要（英文）：Plant mitochondria is an important organelle for plant growth and development. Mitochondria has own gene expression system and this is tightly regulated at post-transcriptional level. However, the mechanism of post-transcriptional regulation is still unknown. In this study, we identified new factors involved in organelle RNA regulation such as splicing and RNA stability.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物 オルガネラ ミトコンドリア 葉緑体 PPRタンパク質 RNA制御 遺伝子発現 転写後制御

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物細胞内のミトコンドリアは生命エネルギーを生産する重要なオルガネラである。ミトコンドリアは独自の遺伝子発現系を有しており、この遺伝子発現は主に転写後の RNA レベルで多様な制御を受けるのが特徴である。この RNA 制御に核コードの Pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質が中核的な役割を担っていることがわかってきた。PPR タンパク質は陸上植物に非常に多く保存されている RNA 結合タンパク質で、そのほとんどがミトコンドリアまたは葉緑体で働く。PPR タンパク質は 35 アミノ酸から成る PPR モチーフを繰り返してもち、1 モチーフが 1 塩基を認識して結合する配列特異的な RNA 結合タンパク質である。このことから、PPR 因子は遺伝子特異的な RNA 制御に機能することが予想されるが、分子機能が明らかになった PPR はごく僅かであり、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

植物ミトコンドリアの RNA 制御メカニズムを解明するために、進化的観点からコケ植物に着目して PPR タンパク質の分子機能を明らかにすることを目指す。ミトコンドリアは植物が陸上化した後に多様な RNA 制御を受けるようになり、PPR ファミリーの巨大化との起源が一致する。基部陸上植物であるヒメツリガネゴケは約 100 個の PPR を持つが、これは種子植物の 4 分の 1 以下である。ヒメツリガネゴケのミトコンドリアに局在する PPR を網羅的に解析することで、植物ミトコンドリアの RNA 制御メカニズムを理解する。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア局在型 PPR 変異株の作製

(2) ミトコンドリア遺伝子発現レベルの解析

PPR は RNA の部位特異的切断、スプライシング、安定化、RNA 編集など様々な RNA 制御に関与することが予想される。野生株と比較して発現パターンの異なる RNA を探索し、標的 RNA 分子を同定する。

(3) 結合 RNA 領域の特定

大腸菌で発現・精製した組換え PPR タンパク質とラベルした RNA プローブを用いたゲルシフトアッセイにより、PPR の結合 RNA 領域を決定する。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアの RNA スプライシングに関与する PPR タンパク質の同定

- PPR31 が電子伝達系の複合体 I サブユニットをコードする *nad5* 遺伝子の第 3 インtron および複合体 V サブユニットをコードする *atp9* 遺伝子の第 1 インtron のスプライシング因子であることを明らかにした(図 1A)。2 つの遺伝子は exon-intron junction 付近に類似の配列を持っており、PPR31 はこれらの配列に特異的に結合した。

- 複合体 IV サブユニット *cox1* 遺伝子の第 3 インtron のスプライシング因子として PPR9 を同定した(図 1B)。申請者らは以前、同じインtron のスプライシング因子として PPR43 を同定している。1 ヶ所のスプライシングに 2 種類の PPR が協調的に働いていることが示唆された。

本成果を論文発表した (Ichinose, Ishimaru et al. PCP 2020)。

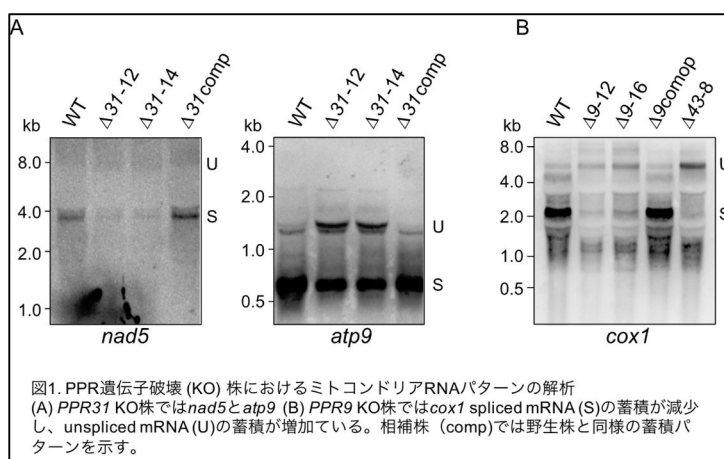


図1. PPR遺伝子破壊 (KO) 株におけるミトコンドリアRNAパターン解析
(A) PPR31 KO株では *nad5* と *atp9* (B) PPR9 KO株では *cox1* spliced mRNA (S) の蓄積が減少し、unspliced mRNA (U) の蓄積が増加している。相補株 (comp) では野生株と同様の蓄積パターンを示す。

(2) ミトコンドリア mRNA の安定化に関与する PPR タンパク質の同定

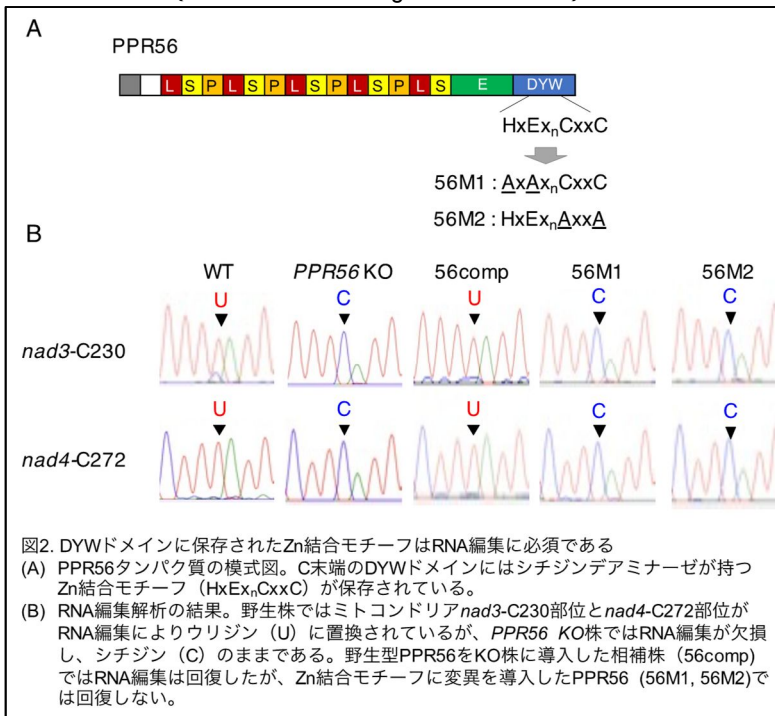
著しい生育遅延を示した *PPR11* 遺伝子破壊株では、成熟 *nad7* mRNA が蓄積していないことを明らかにした。PPR11 は一部のコケ植物に特有であり、この PPR を持たないコケ植物のミトコンドリアゲノムには、*nad7* 遺伝子が存在しないまたは偽遺伝子化していることが判明した。PPR11 は *nad7* mRNA の末端に結合し、エンドヌクレアーゼからの分解を防ぐことで安定化に寄与していると考えられる (論文作成中)。

(3) 葉緑体の RNA 制御に関する PPR タンパク質の同定

- 葉緑体局在型 PPR21 が光化学系 II サブユニットをコードする *psbI* 遺伝子を含む *psbI-ycf12* dicistronic mRNA の安定化に関与することを明らかにした。PPR21 は *psbI* の 5' -UTR 領域に特異的に結合した (ebihara et al. 2019 Plant J.)
- 葉緑体局在型 PPR64 が *psaA-psaB-rps14* 遺伝子クラスターの発現および 23S-4.5S rRNA 前駆体のプロセシングに関与することが明らかとなった

(4) RNA 編集における DYW ドメインの役割

申請者らは以前、ヒメツリガネゴケのミトコンドリア C-to-U RNA 編集に、DYW ドメインを持つ PPR タンパク質が関与することを明らかにしている。本研究では、RNA 編集における DYW ドメインの役割を明らかにすることを目指した。DYW ドメインが RNA 編集反応を触媒するシチジンデアミナーゼである可能性が高いこと (図 2) 、そして編集部位の認識に寄与していることを明らかにした。また、DYW ドメインの 37-42 番目のアミノ酸が編集部位の認識には関与していることを明らかにした (Ichinose and Sugita 2018 PCP)。



(5) PPR 様 L モチーフはスペーサーとして機能する

PPR タンパク質は PPR モチーフが RNA 塩基と 1:1 で結合することで RNA と配列特異的に結合する。PPR モチーフには 35 アミノ酸から成る一般的な P モチーフに加え、PPR 様の S (short) モチーフと L (long) モチーフがある。S モチーフは P モチーフ同様に RNA 認識することが知られているが、L モチーフについてはわかっていなかった。本研究では、L モチーフは RNA 認識への寄与が少なく、スペーサーとして機能していることが示唆された (Matsuda et al. 2020 PLoS One)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuda Takuya, Sugita Mamoru, Ichinose Mizuho	4. 巻 15
2. 論文標題 The L motifs of two moss pentatricopeptide repeat proteins are involved in RNA editing but predominantly not in RNA recognition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0232366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ichinose Mizuho, Ishimaru Airi, Sugita Chieko, Nakajima Kensaku, Kawaguchi Yasuhiro, Sugita Mamoru	4. 巻 61
2. 論文標題 Two Novel PLS-Class Pentatricopeptide Repeat Proteins Are Involved in the Group II Intron Splicing of Mitochondrial Transcripts in the Moss <i>Physcomitrella patens</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1687 ~ 1698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcaa070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ichinose Mizuho, Sugita Mamoru	4. 巻 59
2. 論文標題 The DYW Domains of Pentatricopeptide Repeat RNA Editing Factors Contribute to Discriminate Target and Non-Target Editing Sites	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1652 ~ 1659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcy086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ebihara Tetsuo, Matsuda Takuya, Sugita Chieko, Ichinose Mizuho, Yamamoto Hiroshi, Shikanai Toshiharu, Sugita Mamoru	4. 巻 97
2. 論文標題 The P class pentatricopeptide repeat protein Pp_PPR _{psbI} _21 is needed for accumulation of the mRNA in <i>Physcomitrella chloroplasts</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1120 ~ 1131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.14187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Ayumu, Sugita Chieko, Ichinose Mizuho, Sugita Mamoru	4. 巻 -
2. 論文標題 Moss PPR-SMR protein PpPPR_64 influences the expression of a psaA-psaB-rps14 gene cluster and processing of the 23S?4.5S rRNA precursor in chloroplasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-020-01090-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichinose Mizuho, Sugita Mamoru	4. 巻 2181
2. 論文標題 Substitutional RNA Editing in Plant Organelles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0787-9_1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ichinose, M., Sugita, C., Ishimaru, A., Ito, A. Ebihara, T. and Sugita, M.
2. 発表標題 PPR proteins as post-transcriptional regulators in plant organelles
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 一瀬瑞穂、杉田 護
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケのミトコンドリアP-class PPRタンパク質の機能解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤綾花、杉田千恵子、一瀬瑞穂、加藤義宣、山本 宏、鹿内利治、杉田 護
2. 発表標題 葉緑体ndh遺伝子の転写後制御に関わるPPRタンパク質
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海老原哲男、松田拓也、杉田千恵子、一瀬瑞穂、山本 宏、鹿内利治、杉田 護
2. 発表標題 Pクラス・ペントトリコペプチドタンパク質は葉緑体psbI-ycf12 mRNAの蓄積に必要である
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	杉田 護 (Sugita Mamoru) (70154474)	名古屋大学・情報学研究科・招へい教員 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------