

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570033

研究課題名(和文)

ヒメツリガネゴケを用いた葉緑体の遺伝子発現における転写後制御因子の研究

研究課題名(英文) Posttranscriptional regulation of plastid gene expression in *Physcomitrella patens*.

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

研究成果の概要(和文)：植物の葉緑体には独自のゲノム DNA があり、この中に 100 種ほどの遺伝子が存在する。葉緑体の機能と遺伝子の発現には核ゲノムにある多数の遺伝子群の協調的な働きが必要である。本研究では葉緑体の転写後制御に働く核コードの制御因子の同定を行った。その結果、葉緑体遺伝子のスプライシング、RNA 切断と RNA 編集のそれぞれに働く植物に固有のペンタトリコペプチドリピート (PPR) タンパク質を新たに同定した。

研究成果の概要(英文)：Chloroplasts possess their own DNA and approximately 100 genes. Chloroplast function and gene expression are cooperatively controlled by the chloroplast and nuclear genomes. Posttranscriptional regulation is an important step in the control of chloroplast gene expression. In this study, we identified novel nuclear-encoded pentatricopeptide repeat proteins involved in RNA splicing, RNA cleavage, and RNA splicing in chloroplasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：植物オルガネラ分子生物学

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：葉緑体、ミトコンドリア、転写後制御、RNA 編集、PPR タンパク質、ヒメツリガネゴケ、遺伝子破壊株

## 1. 研究開始当初の背景

植物オルガネラの転写後制御の重要な成分として、pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質ファミリーが注目されていたが、その具体的な機能についてはほとんど未解明であった。そこで本研究では、植物特有のオルガネラである葉緑体で働く PPR タンパク質の機能を解明して、PPR タンパク質ファミリーを介した葉緑体の転写後制御の分子機構を明らかにすることを目指した。こ

の研究を推進するための材料として、シロイヌナズナでなく、遺伝子ターゲティングが可能なヒメツリガネゴケを主に用いることにした。

## 2. 研究の目的

オルガネラの転写後制御の重要な成分として、pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質ファミリーが知られているが、機能が解明された PPR タンパク質の種類はほ

んの一部にすぎない。そこで本研究では、植物特有のオルガネラである葉緑体で働く PPR タンパク質を同定しその機能解明を目指す。これにより、PPR タンパク質を介した葉緑体の転写後制御の分子機構の一端を明らかにする。本研究では主にヒメツリガネゴケを用いて以下の研究を行う。

- (1) 葉緑体で働く PPR タンパク質の標的 RNA 分子を同定する。
- (2) 結合特異性を決定する標的分子内のシス領域を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) PPR タンパク質の細胞内局在部位の決定

PPR タンパク質の N 末端側 100 アミノ酸をコードする遺伝子断片 (300 bp) を増幅し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) コード領域の上流に連結したコンストラクトを構築する。これをヒメツリガネゴケの原糸体細胞プロトプラストに導入し、一過的な GFP 蛍光の発現を顕微鏡観察し、葉緑体局在かどうかを判定する。

#### (2) 葉緑体 PPR タンパク質をコードする核遺伝子破壊株の作製

① PPR 遺伝子破壊株を効率的に得るため、当研究室で汎用している 35S プロモーター/*nptII*/CaMV ターミネーター (pMBL6 由来) からなる薬剤耐性選択マーカー遺伝子カセットを、葉緑体 PPR タンパク質遺伝子の 3 kb 断片内に挿入し破壊株作製用コンストラクトを構築する。

② コンストラクトをヒメツリガネゴケの原糸体細胞に導入し、薬剤 (ジェネテシムまたはハイグロマイシン) 耐性変異株を取得する。原糸体コロニー PCR 法およびゲノムサザン解析を行い、遺伝子破壊株であることを確認する。

#### (3) 変異株を用いた標的 RNA 分子の同定

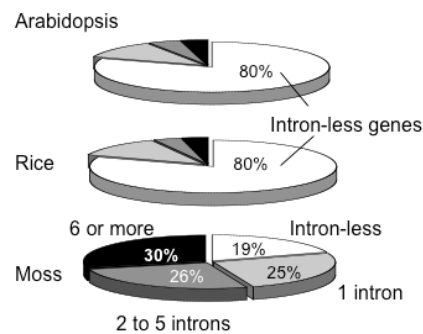
① 遺伝子破壊株の外部形態 (原糸体コロニーの生長速度、葉緑体の形状と数)、光合成能と光化学系電子伝達能 (PAM クロロフィル蛍光測定) などを観察・定量する。このような表現型の観察は、標的 RNA 分子を推定する上で重要な手がかりとなる。

② 遺伝子破壊株から全 RNA を抽出して、葉緑体 DNA マイクロアレイ解析、およびハイスループットな RT-PCR 検出法で、ターゲット領域を迅速に特定する。最終的に、ノザ

ン解析を行い葉緑体転写物の蓄積レベルおよび蓄積パターンを詳細に調べ、PPR 蛋白質の標的となる葉緑体 RNA 成分を特定する。

### 4. 研究成果

(1) ヒメツリガネゴケ、シロイヌナズナ、イネの全 PPR 遺伝子の構造と進化に関する研究を行った。シロイヌナズナ、イネ、ヒメツリガネゴケのゲノム中に見いだされるすべての PPR 遺伝子を抽出し、その遺伝子構造を詳細に比較検討した。その結果、シロイヌナズナとイネの PPR 遺伝子の大半は「intron less」であるのに対して、ヒメツリガネゴケの PPR 遺伝子は「intron rich」と特徴付けられた (下図)。

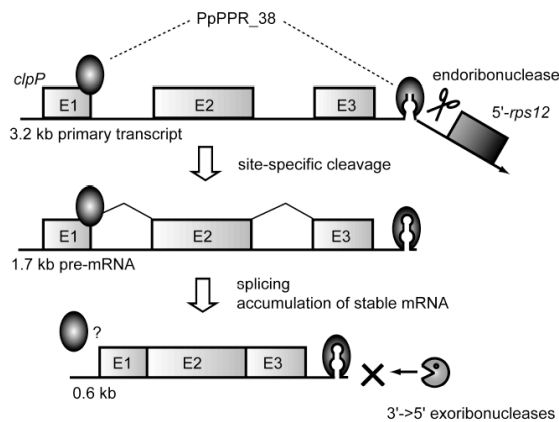


intron poor 遺伝子のイントロン挿入位置が遺伝子の 5' 側に偏っていたことや、3 種の植物種すべての PPR 遺伝子を系統解析した結果から、顕花植物においては 1 回または 2 回の大規模なレトロトランスポジションによって、PPR 遺伝子ファミリーが拡大したことが推察された。また、植物の PPR タンパク質はそのモチーフ構造の特徴から、いくつかのサブファミリーに分類されるが、初期の陸上植物であるヒメツリガネゴケには、「E サブファミリー」がまったく存在しないこと、および「DYW サブファミリー」が少ない (僅か 10 種) ことが判明した。このような特徴から、DYW サブファミリーがオルガネラの RNA 編集と関係があるのではないかと議論される契機となった。これらの成果を *Molecular Biology and Evolution* (2008) に発表した。

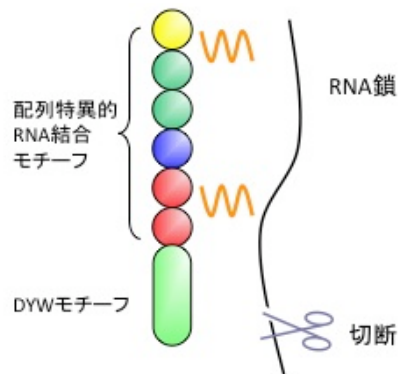
さらに、初期維管束植物であるイヌカタヒバに 800 種以上の PPR 遺伝子が存在することを発見した (*Science* に発表)。

(2) 葉緑体 Clp のサブユニットをコードする *clpP* pre-mRNA の成熟過程における PPR

タンパク質 PpPPR\_38 の役割を詳細に明らかにするため、組換え PpPPR\_38 タンパク質と様々な RNA 断片を用いた RNA 結合実験を行い、PpPPR\_38 タンパク質が RNA 配列特異的な RNA 結合タンパク質であることを明らかにした。PpPPR\_38 は pre-mRNA の *clpP*-5'-*rps12* の intergenic region に強く結合することを明らかにした。次に、2本鎖 RNA 部分を特異的に切断する RNA 分解酵素を用いた RNA 切断実験や葉緑体抽出液中での標的 RNA 分子の安定性に関する実験を行った。その結果、下図に示した PpPPR\_38 タンパク質の機能に関するモデルを提案した。



(3) 新規のエンドリボヌクレアーゼ活性を有する PPR タンパク質を発見した (*FEBS Lett.* 2008)。植物に普遍的に存在するペンタトリコペプチドリピート (PPR) タンパク質は、植物オルガネラの機能発現、器官の発生や分化など幅広い植物生理現象に関わる重要なタンパク質である。PPR タンパク質は RNA 結合能をもつ PPR モチーフ以外に、様々な機能未知の保存配列モチーフをもつことが知られている。本研究で、PPR タンパク質の C 末端に存在する DYW モチーフが新規のエンド型 RNA 分解活性を有することを初めて明らかにした。DYW エンドリボヌクレアーゼは RNA 分子をアデノシン残基の位置で特異的に切断する全く新しいタイプの RNA 分解酵素である。生体内では PPR モチーフと DYW モチーフの組み合わせにより、ヌクレオチド配列特異的に RNA 切断に働いていると予想される。PPR モチーフと DYW モチーフを組み合わせることにより、新機能性を付加した人工酵素を創製することが可能である (下図)。

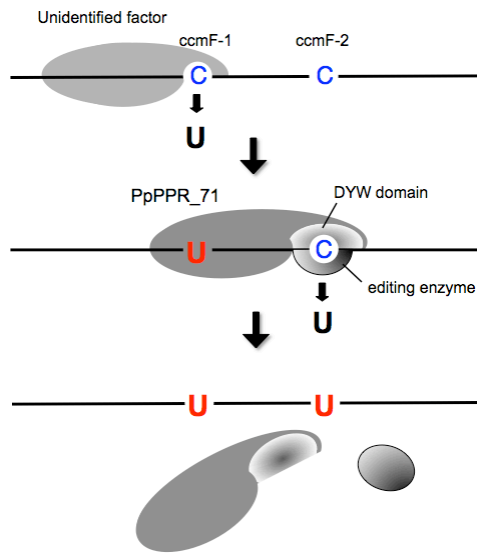


(4) RNA 編集に関与する新規の葉緑体 PPR タンパク質 CRR21 と CRR28 を発見した (Okuda et al. *Plant Cell* 2009)。どちらも DYW ドメインをもつ PPR タンパク質 (PPR-DYW タンパク質) であり、この発見により、PPR-DYW タンパク質が葉緑体の RNA 編集のトランス因子として普遍的であることが

(5) 葉緑体の PPR-DYW タンパク質がトランス因子として働くが、ミトコンドリアの RNA 編集にも PPR-DYW タンパク質が関与しているかは不明であった。そこで、PPR-DYW タンパク質であるミトコンドリア局在型 PpPPR\_56, PpPPR\_71, PpPPR\_77, PpPPR\_78, PpPPR\_79, PpPPR\_91 をコードする遺伝子を相同組み換えによりノックアウトした変異株を作製し、その RNA 編集について解析した。その結果、これらの PPR-DYW タンパク質すべてがミトコンドリアの RNA 編集のトランス因子として機能していることを明らかにした。このうち、PpPPR\_56, PpPPR\_77, PpPPR\_78 が 2 カ所の RNA 編集部位のトランス因子であった。2 カ所の RNA 編集部位に共通のシス配列を検索した。塩基配列の同一性は 50%前後にすぎないことが判明した。

(6) *ccmF*-2 部位の RNA 編集のみに働くミトコンドリア局在型 PpPPR\_71 を用いて、RNA 編集部位との結合認識について解析した。合成 RNA と組換え PpPPR\_71 を用いた RNA ゲルシフト解析を行ったところ、PpPPR\_71 が編集部位周辺に結合すること、およびその結合の強さは *ccmFc* mRNA の編集状態によって異なることを明らかにした。これらの結果に基

づいて、PpPPR\_71 タンパク質による *ccmFc* mRNA の RNA 編集メカニズムのモデルを提唱した。



(7) ミトコンドリア局在型 PpPPR\_43 をコードする遺伝子を相同組み換えにより遺伝子破壊株を作製した。PpPPR\_43 遺伝子破壊株ではミトコンドリアの RNA 編集が正常に起っていたので、RNA 編集以外の転写後プロセスについて解析した。その結果、*coxI* 遺伝子の第3イントロンのスプライシングがほとんど起こっていないことを見いだした。PPR-DYW タンパク質が RNA 編集だけでなく、RNA スプライシングにも関与する可能性を初めて示した重要な成果である。

#### 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 13 件)

①Banks, J. A., Nishiyama, T., Hasebe, M., ... Sugita, M., 他 99 名、79 番目, The compact Selaginella genome identifies changes in gene content associated with the evolution of vascular plants. **Science** 332 (6032), 960-963 (2011) (DOI: 10.1126/Science.1203810)

②Itoh, K., Izumi, A., Mori, T., Dohmae, N., Yui, R., Maeda-Sano, K., Shirai, Y., Kanaoka, M. M., Kuroiwa, T., Higashiyama, T., Sugita, M., Murakami-Murofushi, K., Kawano, S. and Sasaki,

N.: DNA packaging proteins Glom and Glom2 coordinately organize the mitochondrial nucleoid of *Physarum polycephalum*. **Mitochondrion** (2011) in press. Doi: 10.1016/j.mito.2011.03.002

③Ohtani, S., Ichinose, M., Tasaki, E., Aoki, Y., Komura, Y., and Sugita, M.: Targeted gene disruption identifies three PPR-DYW proteins involved in RNA editing for five editing sites of the moss mitochondrial transcripts. **Plant and Cell Physiology** 52 (11), 1942-1949 (2010).

④ Tasaki, E. and Sugita, M.: The moss *Physcomitrella patens*, a model plant for the study of RNA editing in plant organelles. **Plant Signaling & Behavior** 5 (6), 727-729 (2010).

⑤Tasaki, E., Hattori, M. and Sugita, M. : The moss pentatricopeptide repeat protein with a DYW domain is responsible for RNA editing of mitochondrial *ccmFc* transcript. **The Plant Journal** 62 (4), 560-570 (2010).

⑥ Hattori, M. and Sugita, M.: A moss pentatricopeptide repeat protein binds to the 3'-end of plastid *clpP* pre-mRNA and assists with the mRNA maturation. **FEBS Journal** 276 (20), 5860-5869 (2009).

⑦Ito, H., Mutsuda, M., Murayama, Y., Tomita, J., Hosokawa, N., Terauchi, K., Sugita, C., Sugita, M., Kondo, T. and Iwasaki, H.: Cyanobacterial daily life with Kai-based circadian and diurnal genome-wide transcriptional control in *Synechococcus elongatus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106 (33), 14168-14173 (2009).

⑧Okuda, K. Chateigner-Boutin, A.L., Nakamura, T., Delannoy, E., Sugita, M., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., Small, I. and Shikanai, T.: Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in *Arabidopsis* chloroplasts. **The Plant Cell** 21,

146-156 (2009).

⑨Nakamura, T. and Sugita, M. : A conserved DYW domain of the pentatricopeptide repeat protein possesses a novel endoribonuclease activity. **FEBS Letters** 582 (30), 4163-4168 (2008).

⑩Yura, K., Miyata, Y., Arikawa, T., Higuchi, M. and Sugita, M. : Characteristics and prediction of RNA editing sites in the transcripts of a moss *Takakia lepidozioides* chloroplast. **DNA Research** 15 (5), 309-321 (2008).

⑪Kazama, T., Nakamura, T., Watanabe, M., Sugita, M. and Toriyama, K.: Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice. **The Plant Journal** 55, 619-628 (2008).

⑫O'Toole, N., Hattori, M., Andres, C., Iida, K., Claire Lurin, C., Schmitz-Linneweber, C., Sugita, M., and Small, I.: On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. **Molecular Biology and Evolution** 25 (6), 1120-1128 (2008).

⑬Miyata, Y., Sugita, C., Maruyama, K., and Sugita, M.: RNA editing in the anticodon of tRNA<sup>Leu</sup> (CAA) occurs before group I intron splicing in plastids of a moss *Takakia lepidozioides* S. Hatt. & Inoue. **Plant Biology** 10, 250-255 (2008).

[学会発表] (計 24 件)

① Mamoru Sugita :Shotaro Ohtani, Mizuho Ichinose, Masato Uchida and Chieko Sugita: *Physcomitrella patens*, a model plant for studying the molecular basis of site-specific RNA editing (T30). Oral presented on July 24. MOSS2010, the annual international conference for experimental moss research, 21-24 July 2010, in Sapporo and its vicinity, Lake Shikotsu Resort, Hokkaido, Japan.

②一瀬瑞穂、田崎瑛示、杉田 護、DYW ドメインを持つ PPR タンパク質はミトコンド

リア mRNA の蓄積レベルを制御する (2pG03)、日本植物学会第 7 4 回大会、中部大学春日井キャンパス、2010 年 9 月 10 日

③杉田護、田崎瑛示、香村吉洋、青木良晃、井手瑞樹、服部満 : RNA 結合性 pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質ファミリーの網羅的解析 (4P-301)、第 3 2 回日本分子生物学会、横浜、2009 年 12 月 12 日。

④田崎瑛示、香村吉洋、青木良晃、大谷祥太郎、永島はるか、杉田 護 : ヒメツリガネゴケの PPR タンパク質は質は部位特異的な RNA 編集や RNA の蓄積レベルの制御に働く (3pH02)、第 5 1 回日本植物生理学会年会、熊本大学、2010 年 3 月 20 日。

⑤宮田有希、杉田 護 : 陸上植物の葉緑体 RNA 編集の進化、日本植物学会第 7 2 回大会 (高知)、高知大学、2008 年 9 月 25 日

⑥服部 満、杉田 護、小澤岳昌 : Helical repeat protein の RNA 配列特異性と生体プローブへの応用 (1P-0881)、第 3 1 回日本分子生物学会・第 8 1 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 1 2 月 9 日 (火)、神戸ポートアイランド

[図書] (計 4 件)

① Sugita, M. and Aoki, S. Chapter 8. Chloroplasts. In **The Moss *Physcomitrella patens***, Celia Knight, Pierre Francois-Perroud and David Cove, eds., Blackwell Publishing. **Annual Plant Reviews** 36, 182-210 (2009).

②杉田 護、田崎英示、香村吉洋、5 章 形質転換、4. ヒメツリガネゴケ、低温科学 67 巻、607-613、北海道大学低温科学研究所 2009 年 3 月発行

[その他]  
ホームページ等

<http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~sugita-g/>  
<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/index2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 護 (教授)

研究者番号 : 70154474

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし