

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22681028

研究課題名(和文)植物オルガネラ遺伝情報を維持・制御するPPR蛋白質のRNA認識コードの網羅的解析

研究課題名(英文) Systematic analysis on RNA recognition mechanism of PPR protein for plant organelle gene expression

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) 19,400,000円、(間接経費) 5,820,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の遂行により、PPRモチーフのRNA結合様式をほぼ解明することができた。すなわち、PPR蛋白質を構成する連続した、複数のPPRモチーフが一対一の対応関係でRNAと結合し、かつモチーフ中の3アミノ酸(1、4、ii番)の組み合わせが暗号となって(PPRコード)、結合塩基が決定する。この知見により、植物にのみ非常に多く含まれるPPR蛋白質のミトコンドリア、葉緑体遺伝情報の管理について著しい進歩が期待出来る。また、上記のPPR蛋白質の性質は、蛋白質工学的な利用に最適であり、現在、PPR蛋白質を利用したカスタムRNA結合蛋白質の構築にも着手している。

研究成果の概要(英文)：Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are eukaryotic RNA-binding proteins that are commonly found in plants. Organelle transcript processing and stability are mediated by PPR proteins in a gene-specific manner through recognition by tandem arrays of degenerate 35-amino-acid repeating units, the PPR motifs. Here, we showed the principle underlying RNA recognition for PPR proteins involved in RNA editing. Amino acid variation at 3 particular positions within the motif determined recognition of a specific RNA in a programmable manner, with a 1-motif to 1-nucleotide correspondence. Data from the decoded nucleotide frequencies for these 3 amino acids were used to assign accurate interacting sites to several PPR proteins for RNA editing and to predict the target sites for an uncharacterized PPR proteins. In another view, PPR proteins appear to provide an extremely promising opportunity to create custom RNA binding proteins with tailored specificity.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：オルガネラゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

植物オルガネラであるミトコンドリアと葉緑体は独自のゲノムを持ち、その遺伝情報の発現は、主に核コードの遺伝子によって、主に RNA の段階で制御されている。

このような制御を行うために、高等植物は 500 個もの新しい蛋白質、PPR 蛋白質を進化の過程で獲得してきた。PPR 蛋白質はそれぞれが異なるオルガネラ RNA 分子に作用し、切断、スプライシング、編集、安定性、翻訳など全ての RNA 代謝に関わる。ほとんどの PPR 蛋白質は 35 アミノ酸からなる PPR モチーフの約 10 個の繰り返しのみで構成されている。

PPR 蛋白質機能の主幹をなす配列特異的な RNA との結合は、PPR 蛋白質を構成する複数個の PPR モチーフの種類、並び方に依存すると考えられている。研究代表者は、これまでにいくつかの PPR 蛋白質の解析を行い、PPR モチーフと結合塩基が 1:1 の対応であること、PPR モチーフを構成する 35 アミノ酸のうち、4 つのアミノ酸が RNA との結合に主要な役割を担うことを明らかにした。そこで、この 4 つのアミノ酸に着目し、その RNA 結合特性をカタログ化することで、内在 PPR 蛋白質 (約 10 個の PPR モチーフ) の標的 RNA 分子の予測、PPR 蛋白質による植物のオルガネラ遺伝情報維持機構の全貌を明らかにする端緒が開けるとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

高等植物でのみ大きなファミリーを形成する PPR 蛋白質 (約 500 個) は、ミトコンドリア、葉緑体のゲノム情報を RNA レベルで配列特異的に維持、制御している。この配列特異的な RNA 結合能は、PPR 蛋白質を構成する約 10 個の PPR モチーフに依存する。シロイヌナズナの全 PPR モチーフ約 5,000 個を分類し、それぞれの RNA 結合特性をカタログ化することで、内在 PPR 蛋白質の標的 RNA の予測を行い、PPR 蛋白質による植物のオルガネラ遺伝情報維持機構を考察する。

## 3. 研究の方法

PPR モチーフの RNA 結合能を司るアミノ酸についての法則性を見いだすために、シロイヌナズナ核ゲノムに含まれる PPR モチーフ配列 (約 5,000 個) を抽出し、RNA 結合アミノ酸を指標に分類する。生化学、遺伝学的、情報科学的な解析により、PPR モチーフの RNA 結合特性を解明する。得られた結果より、PPR モチーフの RNA 結合予測プログラムを構築する。機能未知 PPR 蛋白質と結合する RNA を予測し、その結合を実験的に検証する。全ての PPR 蛋白質に対して、標的 RNA の予測を行い、PPR 蛋白質によるオルガネラ遺伝情報維持・制御機構について考察する。

## 4. 研究成果

既に予備的な知見を得ていた PPR モチーフ中の RNA 結合に関わるアミノ酸群の詳細な解析を行った。様々な天然型および変異導入 PPR モチーフを用いて解析を行った結果、塩基認識、親和性にそれぞれ寄与するアミノ酸群を同定した。当該アミノ酸について、約 5000 個の PPR モチーフを用いて統計解析を行い、当該アミノ酸群の連続性、および協調的な働きについて知見を得た。また、異種植物間での相同遺伝子のアミノ酸多型を解析することで、同義の働きをするアミノ酸群について知見を得ることが出来たため、PPR モチーフの RNA 認識コードについてある程度単純化した分類分けを行った。平行して、生化学的な解析手法として、SELEX 法を用いて、シロイヌナズナ HCF152 蛋白質の結合 RNA 配列を解析したところ、過去に部分欠失 RNA を用いて同定した結合 RNA 領域 20b 中の約 10b とほぼ一致する RNA 配列を得ることが出来た。これまでの解析から、RNA 結合に関わる PPR モチーフ中のアミノ酸、5 個、を同定し、その法則性の一部を明らかにすることができた (論文 6-8、特許 4-5)。また、PPR 蛋白質の RNA 結合特性解析手法として、試験的に Phage Display 法の導入を試みた。いくつかの PPR モチーフをライブラリーに組み込んで実験したところ、ligand に用いる RNA に応じて特定のアミノ酸を持つ PPR モチーフが選択的に濃縮されることがわかった。天然型 PPR モチーフ 500 種、または上記の PPR コードを担うアミノ酸群にアミノ酸置換を施した合成 PPR モチーフ、ふたつのライブラリーを構築した。特定の RNA 配列に結合する PPR モチーフの選抜を行った。しかし、その他の方向性の解析より、必要な情報を得ることができたため (後述)、本法による解析を途中で中止した。

RNA 編集に関わる既知の PPR 蛋白質と標的 RNA 配列、約 30 種、の組み合わせを材料に、計算科学および統計学的手法で、PPR モチーフの RNA 認識コード、PPR コード、を明らかにした。その結果、PPR モチーフの RNA 結合能は、PPR モチーフを構成する 35 アミノ酸の中でも、ほんの数個所のアミノ酸で決定することがわかった。さらに、当該アミノ酸の種類および組み合わせに含まれる結合 RNA 塩基の情報を用いることで、生体内の標的 RNA 分子が予測できることが明らかになった (論文 5, 7)、特許 2, 3)。

上記に記した PPR コードの正確性を試験管内、および生体内で検証・利用する実験系の確立に着手した。同時に、PPR 蛋白質の結合 RNA 配列予測プログラムの試用版を構築した。このプログラムを用いて、シロイヌナズナに含ま

れる機能未知PPR蛋白質いくつかの標的予測を行った。該当遺伝子を欠損したシロイヌナズナを入手し、予測の正確性を検証した(文3, 4)。

さらに、明らかにしたPPRモチーフのRNA認識コード、PPRコード、の試験管内での動作検証を行った。PPRコードに準じて、タンパク質にアミノ酸置換を導入したところ、そのRNA結合選択性において、予測通りの結果を得ることができた(論文準備中)。

また、PPRコードを利用して、いくつかの未解析PPR蛋白質の標的RNA予測を行い、当該遺伝子欠損株(シロイヌナズナ)を解析した。その結果、予測通りの結果を得ることができた。以上の解析から、本研究で得られたPPRコードの正確性を実証した。

結合配列予測プログラムの構築と検証を行っている間に、RNA塩基識別に働く3つのアミノ酸(1番、4番、-2番)の効力が他の箇所のアミノ酸の影響を受けるという新たな知見を得たため、検証実験を行った。得られた結果を基に、予測プログラムを改良し、一般公開する予定である。

本研究の遂行により、PPRモチーフのRNA結合様式をほぼ解明することができた。すなわち、PPR蛋白質を構成する、連続した、複数のPPRモチーフが一对一の対応関係でRNAと結合し、かつモチーフ中の3アミノ酸(1、4、ii番)の組み合わせが暗号となって(PPRコード)、結合塩基が決定する。この知見により、植物にのみ非常に多く含まれるPPR蛋白質によるミトコンドリア、葉緑体遺伝情報の管理について著しい進歩が期待出来る。また、上記のPPR蛋白質の性質は、蛋白質工学的な利用に最適であり、現在、PPR蛋白質を利用したカスタムRNA結合蛋白質の構築にも着手している。

#### 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9件)「全て査読あり」

1. Yagi, Y., Nakamura, T., \*Small, I. (in press) The potential for manipulating RNA with pentatricopeptide repeat proteins. **Plant J.** doi: 10.1111/tpj.12377.
2. 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.
3. 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.

4. Yagi, Y., Tachikawa, M., Noguchi, H., Satoh, S., Obokata, J., \*Nakamura, T. (in press). Pentatricopeptide repeat proteins involved in plant organellar RNA. **RNA Biol.** doi: 10.4161/rna.24908.
  5. Yagi, Y., Hayashi, S., Kobayashi, K., Hirayama, T., \*Nakamura, T. (2013). Elucidation of the RNA recognition code for pentatricopeptide repeat proteins involved in organelle RNA editing in plants. **PLoS ONE** 8, e57286.
  6. Kobayashi, K., Kawabata, M., Hisano, K., Kazama, T., Matsuoka, K., Sugita, M., \*Nakamura, T. (2012). Identification and characterization of the RNA binding surface of the pentatricopeptide repeat protein. **Nucleic Acids Res.** 40, 2712-2723.
  7. Murayama, M., Hayashi, S., Nishimura, N., Ishide, M., Kobayashi, K., Yagi, Y., Asami, T., Nakamura, T., Shinozaki, K., \*Hirayama, T. (2012) Isolation of Arabidopsis *ahg11*, a weak ABA hypersensitive mutant defective in *nad4* RNA editing. **J. Exp. Bot.**, 63, 5301-5310.
  8. \*Nakamura, T., Yagi, Y., Kobayashi, K. (2012) Mechanistic Insight into Pentatricopeptide repeat proteins as sequence-specific RNA-binding proteins for organellar RNAs in plants. **Plant Cell Physiol.** 53, 1171-1179.
  9. Kusumi, K., Sakata, C., Nakamura, T., Kawasaki, S., Yoshimura, A., \*Iba, K. (2011) A plastid protein NUS1 is essential for build-up of the genetic system for early chloroplast development under cold stress conditions. **Plant J.** 68,1039-1050.
- [学会発表] (計 11 件 ; 招待講演のみ)
1. 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)。
  2. 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)
  3. 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)
  4. 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
  5. Nakamura T : Molecular basis for the RNA recognition of the pentatricopeptide

repeat (PPR) protein. The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions-Asia Study “RNA Biofunctions and Viruses”, Jan 2013 (Fukuoka).

6. Nakamura T, Yagi Y, Kobayashi K: Molecular basis for the RNA recognition of the pentatricopeptide repeat protein. *Frontiers in Plant RNA research* 2012, Oct 2012 (Sapporo, Japan).
7. 中村崇裕: 「植物ミトコンドリア遺伝子発現の分子基盤解明と育種への応用」、日本育種学会、第122回講演会、ワークショップ、2012年9月(京都).
8. 中村崇裕: 「植物で大きなファミリーを形成する PPR タンパク質の配列特異的な RNA 認識メカニズムとその利用」、東京理科大学 総合研究機構、RNA 科学総合研究センター 公開シンポジウム「RNA 科学の現状と将来」、2012年6月(千葉).
9. 中村崇裕: 「任意の RNA 配列に結合、切断する タンパク質の設計方法」、JST 主催・九州大学 新技術説明会、2012年1月(東京).
10. 中村崇裕、小林啓子、「植物オルガネラ遺伝子発現を司る PPR タンパク質スーパーファミリー」、シンポジウム「RNA から植物を考える～植物 RNA 研究の最前線～」、2010年8月(札幌).
11. 中村崇裕: 「オルガネラ遺伝子発現を支える PPR タンパク質、その分子基盤」、第12回オルガネラワークショップ、2010年3月(熊本).

[産業財産権]

○出願状況(計5件)

1

名称: PPR モチーフを利用した DNA 結合性蛋白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

2

名称: PPR モチーフを利用した RNA 結合性蛋白質の設計方法及びその利用  
発明者: 中村崇裕、八木祐介、小林啓子  
権利者: 九州大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2012/077274  
出願年月日: 2012年10月22日  
国内外の別: 海外

3

名称: PPR モチーフを利用した RNA 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、小林啓子  
権利者: 九州大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-231346  
出願年月日: 2011年10月21日  
国内外の別: 国内

4

名称: PPR モチーフを利用した RNA 結合性タンパク質の改変方法  
発明者: 中村崇裕、小林啓子  
権利者: 九州大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2011/055803  
出願年月日: 2011年8月12日  
国内外の別: 海外

5

名称: pentatricopeptide repeat モチーフを利用した新規 RNA 結合タンパク質創成およびその RNA 結合特性の改変技術  
発明者: 中村崇裕、小林啓子  
権利者: 九州大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-55155  
出願年月日: 2010年3月11日  
国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: RNA 分解酵素活性を有する タンパク質及びその利用  
発明者: 杉田護、中村崇裕  
権利者: 名古屋大学  
種類: 特許  
番号: 2006-328869  
取得年月日: 2013年1月8日  
国内外の別: 国内

[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