

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657032

研究課題名(和文) プラスチドRNA編集酵素の生化学的同定

研究課題名(英文) Biochemical identification of RNA editing enzyme in plastids

研究代表者

鹿内 利治 (Toshiharu, Shikanai)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70273852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：PGR3は葉緑体局在の27のPPRモチーフからなるタンパク質で、petLオペロンmRNAの安定化とpetLとndhAの翻訳に関わる。各PPRモチーフの機能を特異的に破壊する変異を導入し、二つの標的RNAに対する機能の影響を調べた。N末側のPPRモチーフは、異なるセットのモチーフを活用することで、二つの標的RNAの認識に寄与しており、一方、C末側のPPRモチーフは翻訳に必須で、RNAの二次構造を変えることで、翻訳装置を呼び込むことが示唆された。このC末の機能は、RNA編集に関わるPPRタンパク質のものと類似し、同様にRNAの二次構造を変えることで編集装置を呼び込むモデルが考えられる。

研究成果の概要(英文)：PGR3 is a PPR protein consisting of 27 PPR motifs and stabilizes the petL operon RNA and also activates the translation of petL and ndhA. To study the function of each PPR motif, a series of mutations which inactivated the specific function of each PPR motif was introduced to PGR3. The N-terminal PPR motifs of PGR3 are required for recognizing two target RNAs by the combination of different set of PPR motifs. In contrast, the C-terminal PPR motifs were essential for activating translation of petL and ndhA. The C-terminal PPR motifs bind RNA to modify its secondary structure, the process which likely recruits the translational machinery. This function of C-terminal domain of PPR proteins is probably conserved in the PPR proteins involved in RNA editing. We hypothesize that the C-terminal domains of such PPR proteins also modify the secondary structure of RNA to recruit the RNA editing enzyme to the target site.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子 生理科学

キーワード：葉緑体 RNA PPRタンパク質 翻訳 光合成

1. 研究開始当初の背景

植物のオルガネラで見られる RNA 編集は、特定のシチジン残基をウリジンに脱アミノ化する過程である。標的のシチジン残基は、PPR タンパク質が標的周辺の RNA 配列を認識することで指定されることが明らかになっている。残された最大の課題は、シチジンをウリジンに脱アミノする酵素の特定である。一部の PPR タンパク質の C 末端に見られる DYW ドメインがこの脱アミノ化酵素の実体ではないかという仮説が提唱され、多くの研究者がこの考えを受け入れている。しかし我々は、多くの RNA 編集に関わる PPR タンパク質において、DYW ドメインが *in vivo* での RNA 編集に必須ではないことを示している。また RNA 切断に関わる CRR2 の DYW モチーフが、*in vitro* でシチジンデアミナーゼ活性ではなく、エンドヌクレアーゼ活性を持つことを報告している。編集酵素の実体は、謎であった。

2. 研究の目的

DYW ドメインがシチジンデアミナーゼ活性を持つことの証明は、組換えタンパク質を用いてその活性を示すことである。しかし、この試みはいずれも成功していない。DYW ドメインが本当に編集酵素なのであるか？我々は、DYW ドメインを欠損した PPR タンパク質が *in vivo* で変異株を相補できるが、さらに内側の E ドメインを欠損すると機能を持たなくなることを報告している。また E ドメインは *in vitro* での標的認識に必須でないことを報告している。我々の仮説は、E ドメインが編集酵素との相互作用に必要であるというものであった。そこで、もっとも直接的に、生化学により葉緑体内で E ドメインと相互作用するタンパク質を精製し、質量分析でそのタンパク質を特定することを提案した。

しかしながら、研究開始前に、計画に関わる二つの重要な情報が得られた。一つは、DYW1 と呼ばれる DYW ドメインのみからなるタンパク質が、*ndhD-1* サイトの RNA 編集に必須であることが明らかになったことである。このサイトは CRR4 と呼ばれる E ドメインを有するが、DYW ドメインモチーフを持たない PPR タンパク質に認識されるが、CRR4 と DYW1 をつないだタンパク質が *crr4 dyw1* 二重変異体を相補する事実が明らかになった (文献 3)。このことは、DYW ドメインの機能を考え直すきっかけとなった。そしてもう一つは、PPR タンパク質が結合領域の RNA の二次構造を変えることで、翻訳装置をリクルートするという仮説の提唱である。翻訳だけではなく、RNA 編集においても、PPR タンパク質が RNA の二次構造を変え、そこに編集装置を呼び込むモデルが現実味を帯びてきた。E ドメインは、この二次構造の変更をもたらす因子 (それは他のタンパク質から供給される DYW ドメインか

もしれない。) と相互作用するものかもしれない。

そこで、E ドメインの相互作用因子の特定を先送りし、PPR タンパク質が RNA の二次構造を変える分子機構の解明にまず着手することにした。材料は、研究室で解析の進んでいた PGR3 を選ぶことにした (文献 6)。

3. 研究の方法

(1) *pgr3-2* と *pgr3-3* の変異を有する組換え PGR3 を作成し、*petL* および *ndhA* mRNA に存在する結合配列を含む RNA プロープに対してゲルシフトアッセイを行った。

(2) PGR3 の 27 の PPR モチーフのうち、各モチーフの 4 番目の残基が T であるものを、それぞれすべて I に置換し、*pgr3-1* に導入した。PGR3 の 3 つの機能の相補を RNA、タンパク質、電子伝達のレベルで解析した。また PPR モチーフを C 末端から削った一連のコンストラクトを作成し、*pgr3-1* に導入して、同様の解析を行った。

4. 研究成果

(1) PGR3 は 27 の PPR モチーフからなり、*petL* オペロン RNA の安定化、*petL* の翻訳、*ndhA* の翻訳の 3 つの機能を有する。3 つの変異アリルを単離しており、*pgr3-1* はすべての機能が、*pgr3-2* は と の機能が、また *pgr3-3* は と の機能が欠損している。そこで、*pgr3-2* と *pgr3-3* の変異を含む組換えタンパク質を合成し、RNA ゲルシフトアッセイを行った。その結果、*pgr3-2* の変異は *ndhA* のシス配列との結合には影響しないが、*petL* との結合を阻害すること、一方、*pgr3-3* の変異は、両者の結合を阻害しないことを明らかにした。この結果は文献 6 の一部として論文発表した。

(2) *pgr3-1* と *pgr3-2* の変異は PPR モチーフの 4 番目の T から I への変異で、この変異は PGR3 全体の構造を乱すことはないが、その PPR の機能を阻害することが示唆された。そこで、CRR3 の 27 のモチーフのうち、4 番目の残基が T であるものに対して、それぞれ I への置換を行った。その結果、N 末側の 16 の PPR モチーフへの変異の導入は、機能 と に対して PPR ごとに異なるインパクトを与えることが明らかになった。このことは、N 末側の 16 の PPR モチーフは、おそらく PPR モチーフの組み合わせを変えることで、異なる標的の認識に関わることが示唆された。また一方で、18 番目以降の C 末側の PPR への変異の導入は、おおむね機能 と を阻害し、C 末側の PPR が、標的認識ではなく、翻訳に関わることが示唆された。

以上の仮説をさらに検証する目的で、N 末側から PPR モチーフの数をそれぞれ 27 (WT)、14 (P14)、16 (P16)、18 (P18)、26 (P26) 持つ PGR3 を *pgr3-1* で発現させた (図 1A)。P16~WT を

導入した植物では *petL* mRNA が安定化し、17番目以降の PPR が少なくとも *petL* mRNA への結合に必須ではないことが明らかになった(図 1B)。一方、*petL* および *ndhA* (NdhL 抗体で検出) の翻訳は、野生型 PGR3 以外は相補せず、18 番目以下(最後の不完全な PPR を含む)の PPR は、*petL* および *ndhA* の翻訳に必須であることが明らかになった(図 1B, C)。

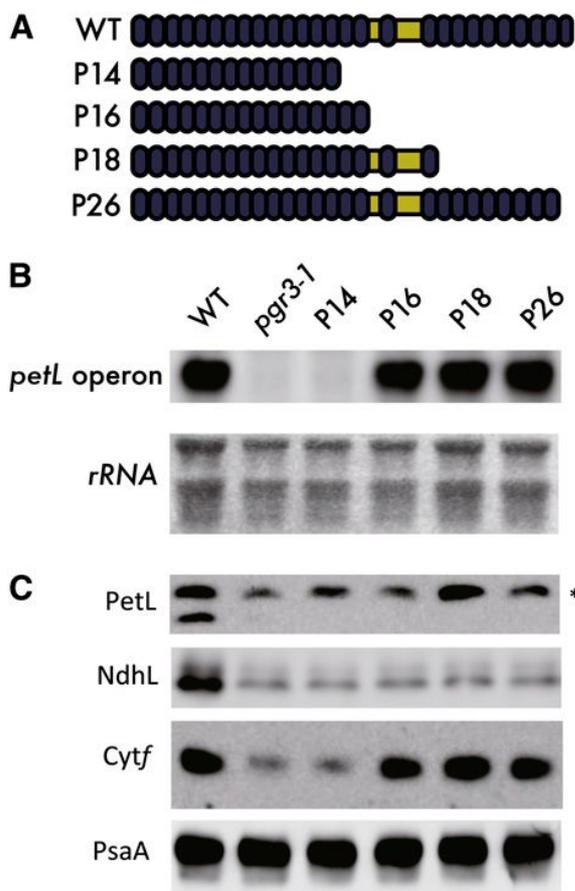


図 1 *petL* オペロン RNA の安定化に必要な領域の決定

- (A) *pgr3-1* に導入した変異型 PGR3
 (B) *petL* mRNA の検出 (RNA ゲルブロット解析)
 (C) PetL, NdhL, Cyt f タンパク質の検出 (ウェスタン解析) *は非特異的シグナル

さらに P16 の組換えタンパク質は *in vitro* で *petL* RNA に結合できるが、P14 は結合できないことを証明した。

また *in silico* 解析と形質転換体を用いた解析から、PPR モチーフの 14 番目の残基は正電荷を持つことが、その PPR の RNA 結合能の発現に必須であることを明らかにした。

以上の成果は、文献 1 に論文として報告した。

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 6 件)

(1) Fujii S., Sato N. and Shikanai T. (2013) Modulation of the RNA-binding activity of individual PPR motifs reveals the functional partitioning of PROTON GRADIENT REGULATION 3. *Plant Cell* 25, 3079-3088. Doi: 10.1105/tpc.113.112193.

(2) Shikanai T. and Fujii S. (2013) Function of PPR proteins in plastid gene expression. *RNA Biology* 10, 31-41. Doi: 10.4161/rna.25207.

(3) Boussardon C., Salone V., Avon A., Berthomé R., Hammani K., Okuda K., Shikanai T., Small I., and Lurin C. (2012) Two interacting proteins are necessary for the editing of the NdhD-1 site in Arabidopsis plastids. *Plant Cell* 24, 3684-3694. Doi: 10.1105/tpc.112.099507.

(4) Okuda K. and Shikanai T. (2012) A pentatricopeptide repeat protein acts as a site-specificity factor at multiple RNA editing sites with unrelated *cis*-acting elements in plastids. *Nucleic Acids Res.* 40, 5052-5064. Doi: 10.1093/nar/gks164.

(5) Hammani K., des Francs-Small I. C.C., Takenaka M., Tanz S.K., Okuda K., Shikanai T., Brennicke A. and Small I. (2011) The pentatricopeptide repeat protein OTP87 is essential for RNA editing of *nad7* and *atp1* transcripts in Arabidopsis mitochondria. *J. Biol. Chem.* 286, 21361-21371. Doi: 10.1074/jbc.M111.230516.

(6) Cai W., Okuda K., Peng L. and Shikanai T. (2011) PROTON GRADIENT REGULATION 3 recognizes multiple targets with limited similarity and mediates translation and RNA stabilization in plastids. *Plant J.* 67, 318-327. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04593.x.

〔学会発表〕(計 2 件)

Fujii S and Shikanai T., "Toward understanding the chloroplast post-transcriptional RNA regulation by the pentatricopeptide repeat proteins." JST-CREST International Symposium, Kyoto, December 12, 2013.

藤井壮太、佐藤望、鹿内利治、巨大 RNA 結合タンパク質ファミリーによる転写制御システム 第 16 回オルガネラワークショップ 富山大学 2014 年 3 月 17 日

〔図書〕(計 2 件)

(1) Shikanai T. (2012) Why do plants edit RNA in plant organelles? C.E. Bullerwell (ed.) *Organelle Genetics*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

(2) Shikanai T. and Okuda K. (2011) In vitro RNA-binding assay for studying trans-factor for RNA editing in chloroplasts. R.P. Jarvis (ed.), *Chloroplast Research in Arabidopsis: Method and Protocols*, volume 1, methods in molecular biology, vol 774. Springer Science+Business Media.
doi: 10.1007/978-1-61779-234-2_13.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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