

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

PPR 蛋白質ファミリーの解析と RNA 調節酵素への応用

### 2. 氏名

中村 崇裕

### 3. 研究のねらい

植物オルガネラ(葉緑体、ミトコンドリア)ゲノムにコードされる遺伝子の発現は、核にコードされる遺伝子によって、主に RNA の段階で制御されている。このような制御のために、植物が 500 個もの新規の蛋白質ファミリー、PPR(pentatricopeptide repeat)蛋白質、を進化の過程で独自に獲得してきたことがゲノム配列情報より明らかになった(シロイヌナズナ全蛋白質遺伝子の 1/50)。

500 個の PPR 蛋白質はそれぞれが別の配列をもつオルガネラ RNA に結合し、切断、編集、スプライシング、もしくは翻訳、などの様々な RNA プロセッシングに関わることが明らかになってきた。殆どの PPR 蛋白質は 35 アミノ酸から成る PPR モチーフの約 10 個の繰り返しで構成されており、性質の異なる PPR モチーフの組み合わせによって、配列特異的な RNA アダプターとして働くと考えられている。しかし、ゲノム配列情報の計算科学的な手法で見いだされたモチーフであるため、その配列と機能の相関関係は全く不明である。

そこで本研究では、この植物特異的な蛋白質の分子機能を明らかにすると共に、その機能の根幹をなす各 PPR モチーフの RNA 結合特性の解明、および PPR モチーフを人工的に組み上げることで、任意の RNA 配列に結合し、切断する RNA 調節酵素を開発するための基盤技術の確立を目指した。

### 4. 研究成果

#### A. PPR 蛋白質の分子機能

##### i) 配列特異的な RNA 切断酵素として働く PPR 蛋白質

約 15%の PPR 蛋白質には、PPR モチーフの連続のほかに、C 末端に約 100 アミノ酸の機能未知の保存モチーフが見いだせる。このモチーフは、アスパラギン酸(D)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)が C 末端に保存されているため、DYW モチーフと呼ばれている。DYW モチーフは、RNA 編集(RNA での塩基の置換)との進化的な相関関係が見いだされたため、RNA 編集の触媒酵素だと推測されていた。

この DYW モチーフの酵素化学的な解析を行ったところ、実際には新規の RNA 切断酵素ドメインであることを明らかにした(論文 2)。また、12 個の PPR モチーフ、1 個の DYW モチーフで構成される PPR 蛋白質、CRR2、の解析を行い、PPR 部分で RNA の認識、DYW 部分で切断を行う配列特異的な RNA 切断酵素であることを試験管内で再現することができた。

##### ii) RNA 編集に関わる PPR 蛋白質の進化

植物オルガネラでは、RNA 上で C が U に変換される RNA 編集が多く見いだせる(葉緑体 30 個、ミトコンドリア 500 個)。この複数の RNA 編集を経ることでオルガネラ遺伝子の情報は正しく発現する。また、RNA レベルでの遺伝情報の補完という現象であることから、その意義、分子機構に関する研究が活発に行われている。

植物では、オルガネラ RNA 編集の部位指定に PPR 蛋白質で働くことが明らかになってきたが、編集を触媒する酵素は未だ発見されていない。近年、いくつかの PPR 蛋白質が持つ DYW モチーフが、編集酵素実体であるとの仮説が提唱されたが、研究成果 i)で示したとおり、いくつかの DYW モチーフは RNA 切断酵素として働くことを既に見いだしていた。

今回、新たに RNA 編集に必要な蛋白質として PPR 蛋白質(CRR22、28)を遺伝学的に同定したが、この PPR 蛋白質は RNA 切断に働く DYW モチーフを有していた。そのため、一部の DYW モチ

一フが当初の仮説通り、RNA 編集酵素である可能性が考えられた。しかし、解析を行ったところ、今回同定した CRR22、CRR28 の DYW モチーフは既に RNA 切断活性を失っていること、*in vivo* での RNA 編集における機能に DYW モチーフは必要ないことが明らかになった。また、CRR22、CRR28 の DYW モチーフは、RNA 切断に働く CRR2 の DYW モチーフの機能を相補できないことが明らかになった(論文 1)。

このことから、最初は RNA 切断に働いていた DYW をもつ PPR 蛋白質が、RNA 編集に流用されるようになり、機能的に必要でなくなった DYW モチーフは変異により酵素的な活性が失われていること、さらに DYW 部分が消失することで、アダプター部分の PPR モチーフのみで構成される PPR 蛋白質が RNA 編集に働くように進化してきたことが示唆された。

### iii) 細胞質雄性不稔の稔性回復因子として働く PPR 蛋白質

細胞質雄性不稔(CMS)とは、細胞質(主にミトコンドリア)遺伝子の変異に起因する現象であり、ヒトでは無精子症に相当する。CMS は、雑種強勢を利用した F1 採種を効率よく行うための農業上の重要形質であり、多くの作物の育種に利用されている。ある種の親株の核に存在する稔性回復因子(Rf)によって、異常ミトコンドリア遺伝子による CMS の効果は打ち消され、稔性が回復する。この CMS・Rf 相互作用のメカニズムの解明は、有用農作物の作出手段としてだけでなく、核と細胞質の相互作用のモデルとして世界中で研究対象となっている。

近年、いくつかの植物で稔性回復遺伝子が同定され、多くの場合、PPR 蛋白質をコードしていることが明らかになった。代表的な CMS の研究材料である BT 型 CMS イネの稔性回復因子である Rf1 は、不稔原遺伝子であるミトコンドリア *atp6-orf79* RNA からの *orf79* の発現を抑えることで、稔性を回復する。この Rf1 の分子機能を解析したところ、Rf1 は *atp6-orf79* RNA に結合し、その切断を誘導することで、*orf79* RNA とリボソームとの結合阻害、切断された *orf79* RNA の分解促進、の2段階で ORF79 蓄積を妨げていることを明らかにした(論文 3)。

## B PPR 蛋白質の RNA 結合能の解析と利用

ほとんどの PPR 蛋白質は平均 11 個の PPR モチーフが連続した単純な構造を持つが、それぞれが異なる基質 RNA に結合する。この配列特異的な RNA 結合能は、蛋白質を構成する PPR モチーフそれぞれの性質、および組み合わせに依存すると考えられている。過去の研究で、PPR 蛋白質と RNA との結合を実験的に検出するためには 2 個の PPR モチーフが必要であることがわかってきた。

そこで、2 個の PPR モチーフから成る一連の部分長蛋白質を、HCF152 を含めた合計 3 種類の PPR 蛋白質より調製し(約 20 個)、それぞれの蛋白質の RNA への結合親和性、各塩基(A、C、G、U)への認識特異性を解析することで、RNA との結合親和性が強い PPR モチーフ、配列認識特異性が強い PPR モチーフを同定した。次に、統計処理および蛋白質の構造モデリングを行い、RNA との結合表面を予測し、結合表面に現れる全てのアミノ酸に変異を導入した。

その結果、5 箇所のアミノ酸において、機能欠失型の変異体を得ることができた。さらに変異導入を行い、上記 5 箇所のうち、3 箇所において、機能獲得型の変異体を得ることができた。よってこの 3 箇所のアミノ酸に依存して、PPR モチーフの RNA 結合能が成立していることを明らかにした(論文・特許出願、準備中)。

また、いくつかの塩基に特異的に結合する PPR モチーフを同定した。その結果、同じウリジン(U)に結合するモチーフでも、RNA との結合に働くと考えられる 3 箇所のアミノ酸は非常に多岐であることが明らかになった。

## 5. 自己評価

### A. PPR 蛋白質の分子機能について

2000 年に初めて同定された植物特有の成分である PPR 蛋白質について、本研究でいくつかの機能解析を行ったことで、その分子機能の概要をつかむことができたと考えている。PPR 蛋白質の解析は主に遺伝学的手法で行われることが多く、その蛋白質科学的な特徴を解析した報告例は非常に少ない。本研究期間中に報告した事例は、PPR 蛋白質の分子機能、植物における役割を理解する上で、重要な知見を提供していると考えている。

## B. PPR 蛋白質の RNA 結合能の解析と利用

PPR モチーフの RNA 結合能に関しては全く知見がなかった。本研究で RNA 結合に能動的に働くいくつかのアミノ酸を同定することができた。これは、PPR モチーフが RNA 結合ドメインとして機能するための条件を明らかにしたものであり、非常に重要な知見だと考えている。PPR モチーフとよく似た TPR モチーフ(34 アミノ酸; 蛋白質-蛋白質相互作用に働く)との機能的差異、進化を考察する上でも重要な知見である。しかし、PPR 蛋白質と RNA との結合の原子レベルでの理解、目標に掲げた任意の配列に結合・切断する人工タンパク質の開発には、本研究期間中には到達できなかった。以後も、同研究開発を継続したいと考えている。

## 6. 研究総括の見解

植物のオルガネラゲノムにコードされる遺伝子の発現は、核にコードされる遺伝子によって、主に RNA の段階で制御されている。このような制御のために、植物は多くの PPR タンパク質ファミリー(35 アミノ酸からなる PPR モチーフの約 10 個の繰り返しで構成)を持つ。PPR タンパク質それぞれは別の配列を持つオルガネラ RNA に結合し、切断、編集、スプライシング、翻訳などの RNA プロセッシングに関わる。そこで、PPR モチーフの配列と RNA 認識の関係を明らかにし、任意の RNA 配列に結合し、切断する RNA 調節酵素を開発することを目的としてきた。PPR と RNA の相互作用は非常に複雑であり、最終的な PPR 配列と RNA の相互作用の規則は不明であるが、本研究で、RNA 結合に能動的に働くいくつかのアミノ酸を同定することに成功したことは評価できる。さらに、本研究により、一部の PPR タンパク質中の DYW モチーフは RNA 切断酵素であることを証明し、また雄性不稔を稔性へと回復させる PPR タンパク質はミトコンドリア不稔原遺伝子からの RNA を切断していることなども明らかにし、PPR タンパク質の機能に関する理解を深める貢献をした。

## 7. 主な論文等

### A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

#### ①論文

1. Kenji Okuda, Anne-Laure Chateigner-Boutin, Takahiro Nakamura, Etienne Delannoy, Mamoru Sugita, Fumiyoshi Myouga, Reiko Motohashi, Kazuo Shinozaki, Ian Small, Toshiharu Shikanai  
Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell* 21, 146-156 (2009)
2. Takahiro Nakamura, Mamoru Sugita  
A conserved DYW domain of the pentatricopeptide repeat protein possesses a novel endo-ribonuclease activity. *FEBS Lett.* 582, 4163-4168 (2008)
3. Tomohiko Kazama, Takahiro Nakamura, Masao Watanabe, Mamoru Sugita, Kinya Toriyama  
Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice. *Plant J.* 55, 619-628 (2008)

#### ②特許

研究期間累積件数: 2 件

発明者: 中村崇裕、小林啓子

発明の名称: PPR モチーフを利用した RNA 結合蛋白質の改変方法

出願人: 九州大学

出願日: 2010 年 3 月 11 日

出願番号: 特願 2010-55155

発明者: 中村崇裕、杉田護

発明の名称: RNA 切断活性を有するタンパク質及びその利用  
出願人: 名古屋大学  
出願日: 2006年12月5日  
出願番号: 特願 2006-328869

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Takahiro Nakamura, Kumiko Naito, Naoto Yokota, Chieko Sugita, Mamoru Sugita  
Cyanobacterial non-coding RNA, Yfr1, is required for growth under multiple stress conditions.  
*Plant Cell Physiol.* 48, 1309-1318 (2007)