

遺伝学によるプラスチド RNA 編集研究の新展開

1. はじめに

RNA 編集は、ゲノムに書かれている遺伝情報を RNA 上で塩基置換、削除、付加を介して書きかえる、セントラルドグマを逸脱する生物現象である。1986年に原生動物トリパノソーマのキネトプラスチドで発見されて以来、ヒトを含めた多くの真核細胞生物で行われていることが明らかになった。哺乳類の RNA 編集異常は疾患研究との繋がりがから多くの注目を集め、その分子機構の解明が進んでいる。一方、陸上植物オルガネラにおいては、その詳細な分子機構について、他の生物に比べ理解が大きく遅れていた。しかしながら、我々の遺伝学による RNA 編集に関わるタンパク質の発見を機に、現在、植物 RNA 編集研究は数年前には想像できなかったほどの大きな展開を見せようとしている。本稿では、植物におけるプラスチド RNA 編集研究の現状を、特にその分子機構と装置に注目して紹介したい。

2. プラスチドの RNA 編集

プラスチド（色素体）は様々な形態、機能を持つ植物固有のオルガネラであり、よく知られる葉緑体はプラスチドが葉などの光合成組織でとる形態の名称である。葉緑体は植物オルガネラの中でも、光合成の場として最も研究がなされている。プラスチドは進化的には祖先であるシアノバクテリア（ラン色細菌）の始原真核細胞への細胞内共生に由来すると考えられており、独自のゲノムを持つ。プラスチドゲノムには、プラスチドの機能に必要なタンパク質の一部しかコードされておらず、残りの大部分は核ゲノムにコードされている。また、プラスチド遺伝子の発現機構は、シアノバクテリアのものに比べてはるかに複雑になっている。これらは主にプラスチドでの原核細胞型の遺伝子発現様式に、核が転写と転写後（スプライシング、RNA 編集、RNA 末端形成、翻訳など）の過程に新たに真核細胞型の制御を付加したことによる。その中でも極めて特徴的なのが RNA 編集である。高等植物では、1989年にミトコンドリアで発見され^{1,2)}、その2年後にプラスチドでも RNA 編集が行われていることが明らかになった³⁾。現在では、ほとんど全ての陸上植物オルガネラで RNA 編集が非常に大規模に行われていることが知られている（プラスチ

ドで約30箇所、ミトコンドリアでは400箇所以上、reviewed in Shikanai, 2006)⁴⁾。高等植物の RNA 編集は、哺乳類で見られるような C から U への変換が大部分で、稀に逆の変換も見られる (reviewed in Shikanai, 2006)⁴⁾。プラスチド RNA 編集の大きな謎の一つは、ゲノム中に無数に存在する C から特定の C のみを選んで編集する編集サイト認識のメカニズムである。この疑問に答えるのに大きく貢献したのはプラスチドの形質転換技術の確立⁵⁾と葉緑体抽出液を用いた試験管内で RNA 編集を再現する *in vitro* RNA 編集系の開発⁶⁾である。これらの相補的な実験手法により、個々の編集サイトの 5'側約20塩基と3'側約10塩基が、RNA 編集サイトの認識に必要とされることが示された。また、これらの配列は多くの場合、編集サイト間で保存されていないことも明らかになった。この認識に必要な配列は RNA 編集サイトと同じ RNA 分子上にあるので、シス配列と呼ばれる。さらに、*in vitro* RNA 編集系を用いた紫外線架橋実験により、個々のシス配列に個別のタンパク質因子が特異的に結合することが示された⁷⁾。これらの結果から、RNA 編集サイト認識のメカニズムは、個々のシス配列を個別のトランス因子（タンパク質あるいは RNA）が認識するというモデルが提唱された。高等植物に合計500箇所以上存在する編集サイトをほぼ1対1でトランス因子が対応するとすると、いったいどのような遺伝子がトランス因子をコードしているのだろうか？

3. プラスチド RNA 編集におけるトランス因子の発見

プラスチド RNA 編集におけるトランス因子発見のためのブレイクスルーは、光合成電子伝達の遺伝学によりもたらされた。シロイヌナズナ *crr4* (*chlororespiratory reduction* 4) 変異株は、プラスチド *ndhD* 遺伝子の翻訳開始コドンをつくる RNA 編集 (*ndhD*-1 サイト) 能力を特異的に欠損している⁸⁾ (図 1A, B)。このコドンはゲノム上では ACG でコードされているが、RNA 編集により AUG に変換され、翻訳開始コドンとして機能する。プラスチド *ndhD* 遺伝子は、光化学系 I サイクリック電子伝達に関わる葉緑体 NAD(P)H デヒドロゲナーゼ複合体のサブユニットの一つをコードしている⁹⁾。*crr4* 変異株の原因遺伝子は、pentatrico-peptide repeat (PPR) タンパク質をコードしていた⁸⁾ (図 1C)。PPR タンパク質は高等植物において非常に大きなファミリーを形成しており、シロイヌナズナでは450個存在する¹⁰⁾。PPR タンパク質は保存性の低い35アミノ酸からなる PPR モチーフと呼ばれるモチーフをアミノ酸配列中に繰り返し持つタンパク質として定義されてい

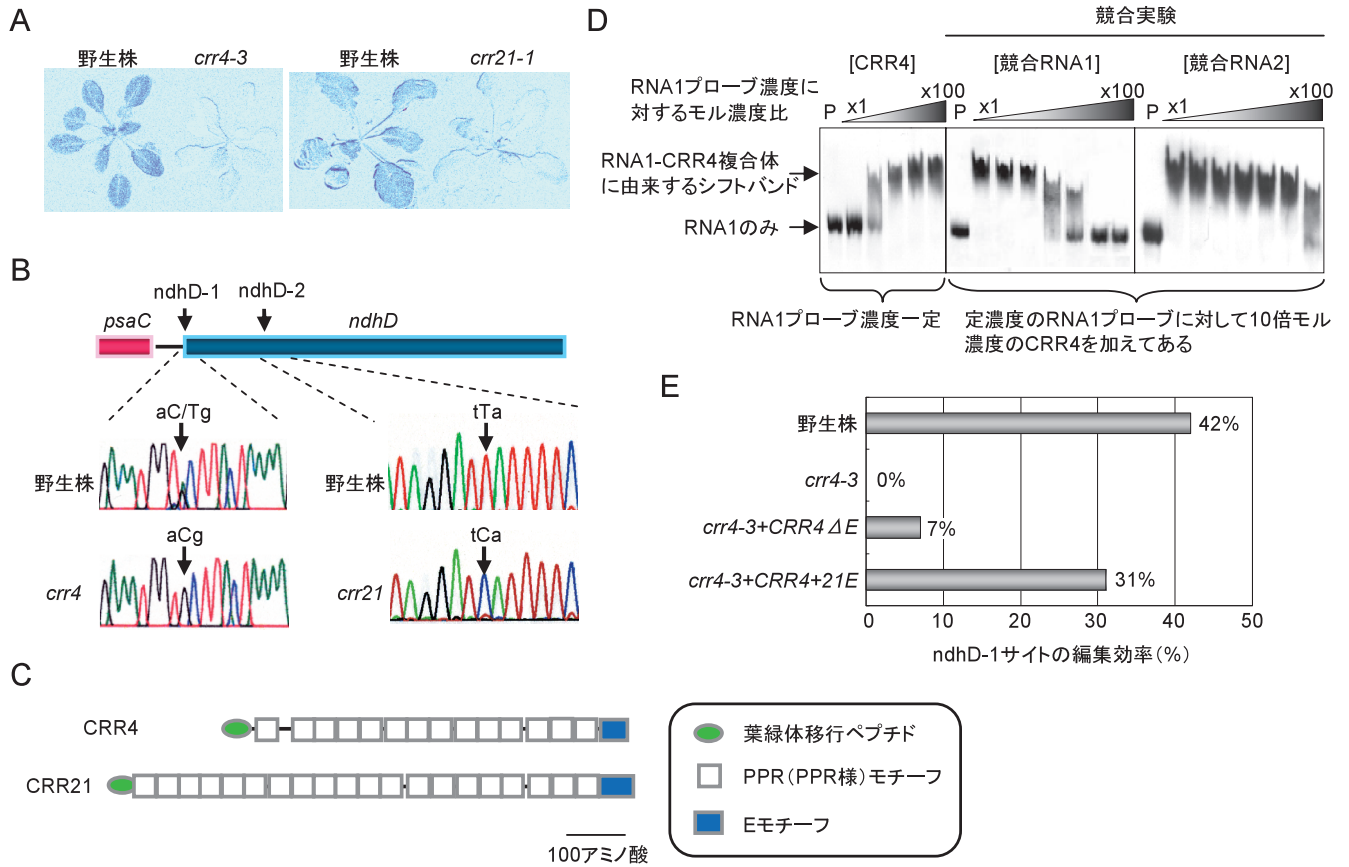


図1 プラスチド RNA 編集に関わる変異株の単離および解析

(A) *crr4* および *crr21* 変異株は *ndhD* 遺伝子の RNA 編集に異常を持つため、NAD(P)H デヒドロゲナーゼ活性を欠く。この活性はクロロフィル蛍光と呼ばれる光化学系 II から発せられる光を、CCD カメラでモニターすることによって可視化できる。

(B) *ndhD* の RT-PCR 産物の塩基配列を決定した。*ndhD-1*, *ndhD-2* は *ndhD* 転写産物の 1 番目および 2 番目の RNA 編集サイトを示す。野生株では *ndhD-1* サイトは約 50% 程度 RNA 編集を受けるため、aC/Tg と C と T が混合した状態になっているが、*crr4* 変異株では C しか検出されない。*ndhD-2* も同様に野生株では RNA 編集を受けて T になっているが、*crr21* 変異株では C のままである。

(C) CRR4 と CRR21 のモチーフ構造

(D) RNA ゲルシフト法を用いて CRR4 と *ndhD-1* サイト周辺 36 塩基の RNA1 プローブとの結合能を調べた。CRR4 のモル濃度上昇に伴いシフトバンドが検出された。結合の配列特異性は、RNA1 に対して 10 倍のモル濃度の CRR4 を加えた条件下で競合 RNA1 および競合 RNA2 (RNA1 配列を含まない配列) を加えることで評価した。レーン上の P はプローブのみを示す。

(E) E モチーフを削った CRR4 (*CRR4 ΔE*) および E モチーフを CRR21 と交換した CRR4 (*CRR4 + 21E*) による *crr4* 変異株の相補実験

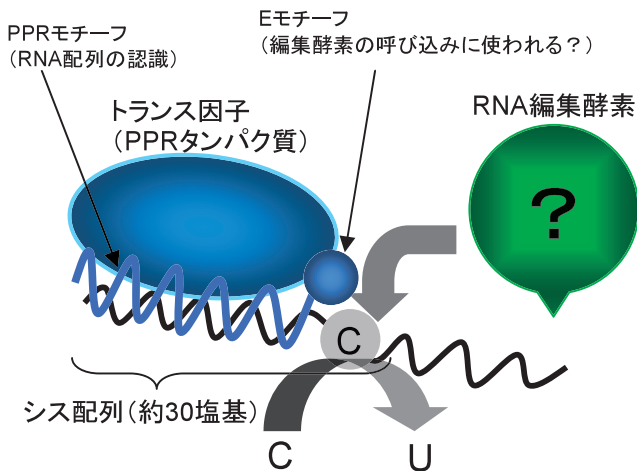


図2 プラスチド RNA 編集機構のワーキングモデル
PPR タンパク質がシス配列に結合することで編集サイトを認識し、そこに未知の編集酵素を呼び込むことで、編集反応が行われる。E モチーフは編集酵素との結合に関わっているかもしれない。

る¹⁰。近年、PPRタンパク質の機能解析は急速に進んでおり、オルガネラ遺伝子発現の転写、RNA成熟化、翻訳とほとんど全ての過程に関与することが明らかになってきている¹⁰。PPRタンパク質の変異がさまざまな遺伝子発現に特異的に影響することから、その役割は標的となるRNAに触媒活性を呼び込むアダプターのような役割をしているのではないかと考えられている。これらの状況証拠から、CRR4の機能は、*ndhD-1*サイトのシス配列を特異的に認識するまさにトランス因子の実体ではないかと考えられた。我々は、RNAゲルシフト法を用いて、大腸菌から作製した組み換えCRR4タンパク質が*ndhD-1*サイトの周辺配列36塩基に特異的に結合することを明らかにした¹¹ (図1D)。遺伝学の結果とあわせて、我々はPPRタンパク質CRR4がプラスチドRNA編集におけるトランス因子の実体であると結論した。

4. プラスチドRNA編集の二成分モデル

プラスチドRNA編集サイトの認識はPPRタンパク質によって行われる。この情報をもとに、さらに我々はRNA編集に関わる第二のPPRタンパク質の変異株*crr21*を発見した(図1A)。*crr21*変異株は、プラスチド*NdhD*の128番目のセリン残基をロイシン残基へと変換するRNA編集を欠損していた¹² (図1B)。

Lurinらはバイオインフォマティクスの手法を用いて、PPRファミリーをPPRモチーフを単純に繰り返すPサブファミリーと、長さの異なるPPR様モチーフを反復して持つPLSサブファミリーに分類した¹⁰。PLSサブファミリーは高等植物にしか存在せず、植物のPPRタンパク質の約半分を占めている¹⁰。PLSサブファミリーはさらにC末端に付加されているモチーフにより、PLS, E, DYWの三つのサブクラスに分類される¹³。これらモチーフの構造に着目すると興味深いことに、CRR4とCRR21のPPRモチーフは長さも異なり配列相同性も示さないが、ともにC末端によく保存されているEモチーフを持つことが明らかになった¹² (図1C)。PPRモチーフが似ていないのは、異なる標的RNA配列を認識するためと考えられる。ではC末端に共通に保存されているEモチーフは何をやっているのだろうか? Eモチーフを欠いているCRR4遺伝子を*crr4*変異体に形質転換したところ、CRR4機能をほとんど回復することができないことがわかった¹² (図1E)。また、Eモチーフを欠くCRR4は標的RNAに対して、全長のCRR4と同様の結合能を示す¹²。さらに、CRR4のEモチーフはCRR21のEモチーフによって機能相補できるこ

とが明らかになった¹² (図1E)。これらの結果から、PPRタンパク質におけるN末側のPPRモチーフがRNA配列を認識し、C末のEモチーフがRNA編集の活性に共通の働きを担っていることが示唆された。Eモチーフ内にはRNA編集反応に直接関わるような触媒モチーフが見出されないことから、未知の編集酵素との相互作用に機能していることが推測される。ここまでの結果に基づいて、プラスチドRNA編集装置は、おそらく編集サイトを認識するPPRタンパク質と、それとは別に編集反応を行う酵素の少なくとも二成分から構成されることが考えられる(図2)。

5. おわりに

プラスチドにおけるRNA編集サイト認識の機構は、PPRタンパク質によるシス配列認識によってある程度の説明が付けられた。分子装置の一端が明らかになった今、植物RNA編集研究者の目はまさに編集装置の本体である編集酵素の実体は何か? に向けられている。さまざまな憶測の中、2007年、Saloneらによって、DYWサブクラスのPPRタンパク質の持つDYWモチーフがその正体ではないかという仮説が発表された¹⁴。DYWモチーフはヒトのRNA編集酵素の活性中心に保存されているコンセンサス配列を含み、RNA編集を行う植物のみでしか見られないというのが彼らの仮説の根拠である。しかしながら、DYWサブクラスのCRR2を欠損する変異株は、RNA編集ではなくプラスチドのポリシストロニックRNAの遺伝子間切断に特異的な異常を示し¹⁵、彼らの仮説に矛盾を与えている。この仮説が正しいかどうかも含めて、PPRタンパク質とおそらく共同して働く未知の編集酵素の実体解明が今後の大きな課題である。

謝辞

本稿で紹介した研究は、当研究室のメンバーの他、学外の多くの研究者との共同研究により行われました。改めて深く御礼申し上げます。また、本研究は文部科学省特定領域研究費(17GS0316)によりサポートされました。

- 1) Gualberto, J.-M., Lamattina, L., Bonnard, G., Weil, J.-H., & Grienenberger, J.-M. (1989) *Nature*, 341, 660-662.
- 2) Covello, P.-S. & Gray, M.-W. (1989) *Nature*, 341, 662-666.
- 3) Hoch, B., Maier, R.-M., Appel, K., Igloi, G.-L., & Kössel, H. (1991) *Nature*, 353, 178-180.
- 4) Shikanai, T. (2006) *Cell Mol. Life Sci.*, 63, 698-708.
- 5) Chaudhuri, S. & Maliga, P. (1996) *EMBO J.*, 15, 5958-5964.

- 6) Hirose, T. & Sugiura, M. (2001) *EMBO J.*, **20**, 1144–1152.
- 7) Miyamoto, T., Obokata, J., & Sugiura, M. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 627–634.
- 8) Kotera, E., Tasaka, M., & Shikanai, T. (2005) *Nature*, **433**, 326–330.
- 9) Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K., Endo, T., Tasaka, M., & Shikanai, T. (2004) *Nature*, **429**, 579–582.
- 10) Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.-L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.-P., Szurek, B., Tacconat, L., & Small, I. (2004) *Plant Cell*, **16**, 2089–2103.
- 11) Okuda, K., Nakamura, T., Sugita, M., Shimizu, T., & Shikanai, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 37661–37667.
- 12) Okuda, K., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., & Shikanai, T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 8178–8183.
- 13) O'Tool, N., Hattori, M., Andres, C., Iida, K., Lurin, C., Schmitz-Lineweber, C., Sugita, M., & Small, I. (2008) *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 1120–1128.
- 14) Salone, V., Rüdinger, M., Polsakiewicz, M., Hoffmann, B., Groth-Malonek, M., Szurek, B., Small, I., Knoop, V., & Lurin, C. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 4132–4138.
- 15) Hashimoto, M., Endo, T., Peltier, G., Tasaka, M., & Shikanai, T. (2003) *Plant J.*, **36**, 541–549.

奥田 賢治, 鹿内 利治

(京都大学大学院理学研究科生物科学専攻植物科学系)

Genetic research of RNA editing in plastids

Kenji Okuda and Toshiharu Shikanai (Department of Botany, Graduate School of Science, Kyoto University, Oiwakecho, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606–8502, Japan)

好塩性酵素：マイナス荷電が決める好塩性

1. はじめに

多くの有用微生物の利用によって人々の日々の暮らしが支えられていることは自明の事実である。通常生物が生きてゆけないいわゆる“極限環境”に生息している微生物は、極端な環境条件でも生きてゆける特殊な能力を持っているわけで、この特殊能力を解明し利用することは重要な研究課題である。

2. 好塩菌と好塩性酵素

筆者らはこのような極限環境微生物の中でも特に“好塩菌”とそのタンパク質に注目して研究を進めている。好塩

菌は塩環境に適応するとともに塩を生育に要求する微生物であり、極端に高い塩濃度（～2.5M以上）を好む高度好塩菌と、最適生育塩濃度は1～2M程度であるが0.2M～飽和濃度と非常に幅広い塩濃度で生育可能な中度好塩菌に分類できる¹⁾。高度好塩菌のほとんどは古細菌（Archaea）に属し、生育環境の高濃度塩に対抗する手段として、細胞内に外界に匹敵する高濃度の塩を蓄積する（salt-in）という通常の生物では見られない方法を用いている。細胞内はいわば「塩漬け」状態であるが、DNAの複製や転写、翻訳、タンパク質の構造形成、代謝等々、すべての生命活動がこのほぼ飽和塩濃度の細胞内で滞りなく行われている。そのため細胞構成成分は高濃度塩環境に適応して強い好塩性を示す。一方、中度好塩菌は細胞内に適合溶質を蓄積するため一般に細胞内塩濃度は生育環境よりは低い（salt-out）と考えられ、細胞内酵素は高度好塩菌ほど強い好塩性を示さないものが多い。また細胞外に分泌される酵素は高濃度塩の環境に適応して強い好塩性を示す。

3. 高度好塩菌由来酵素と中度好塩菌由来酵素の好塩性メカニズム

ひとくちに好塩性酵素といっても上記のようにそれらが働く生理的環境によって塩濃度は異なり、高度好塩菌由来のもの、中度好塩菌由来のもの（さらに中度好塩菌由来のものは細胞内酵素と細胞外酵素）で性質が異なり区別して考える必要がある。高度好塩菌由来の酵素は、一般に最低1M程度の塩がないと失活してしまい、酵素の安定性に高濃度塩環境を“利用”している。従って、好塩性メカニズムを考える際には、タンパク質-タンパク質の相互作用とともにタンパク質-溶液の相互作用、すなわちタンパク質と水分子や塩イオンとの相互作用の考察が必須である。これに比べると、中度好塩菌由来の酵素は、その安定性に塩を要求しないものも多く、細胞質酵素では、高濃度塩で活性が阻害されるものも多いので、溶液との相互作用も通常酵素により近いと考えられる。興味深いのは中度好塩菌の細胞外酵素である。高濃度塩存在下でもよく働く強い好塩性を示し、“通常酵素的性質”も持ち合わせているので、塩がなくても安定（耐低塩性＝安定なコア構造）なものがある。これは、自然界では0.2M～飽和濃度といった極めて幅広い塩濃度環境で働かなくてははいけないことを考えると合理的である。

4. 高度好塩菌タンパク質の好塩性メカニズム

典型的に強い好塩性を示す高度好塩菌酵素の好塩性メカ