

RNA編集による暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素の活性制御<sup>§</sup>

名古屋大学 大学院 生命農学研究科

山本 治樹\*

## 1. はじめに

光合成生物は、クロロフィルもしくはバクテリオクロロフィルを用いて光エネルギーを受容し光合成を行う。1990年代以降の分子生物学、生化学的研究により、(バクテリオ)クロロフィルの生合成に関わる酵素群の実態が明らかにされつつある<sup>1,2)</sup>。その中で筆者は生合成後期の律速段階であるプロトクロロフィリド(Pchl<sub>id</sub>)還元反応を触媒する酵素、光依存型 Pchl<sub>id</sub>還元酵素(LPOR)と暗所作動型Pchl<sub>id</sub>還元酵素(DPOR)に焦点を当て研究を行ってきた(図1)。LPORは、単一のポリペプチドからなる酵素であり、NADPH及び光エネルギーを用いてPchl<sub>id</sub>からクロロフィリドへの還元を行う<sup>3)</sup>。一方、DPORは、ChL、ChIN、ChIBと呼ばれる3つのサブユニットから構成され、フェレドキシンなどからの還元力とATPを用いて光非依存的にPchl<sub>id</sub>の還元を行う<sup>4,7)</sup>。DPORは、保持する金属中心(4Fe-4S型鉄硫黄クラスター)が酸素に対し不安定であるため、空気にさらされることで速やかに失活する<sup>6,8)</sup>。これらの2つの酵素は、進化的に起源が異なり、



図1 プロトクロロフィリド還元反応

クロロフィル生合成後期の律速段階であるプロトクロロフィリド還元反応には進化的起源の異なる2つの酵素DPORとLPORが存在する。

LPORが短鎖デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ(SDR)ファミリーに属するのに対し、DPORは窒素固定酵素ニトロゲナーゼと共通の祖先をもつと考えられている。DPORは、その酵素化学的性質だけでなく、最近明らかとなった立体構造においてもニトロゲナーゼと高い類似性を示した<sup>9,10)</sup>。本稿では、RNA編集という転写後修飾によりDPORの活性が制御されているという結果について報告、議論したい。

## 2. DPORの分布

クロロフィル生合成の後期の律速段階であるPchl<sub>id</sub>還元は、バクテリオクロロフィルおよびクロロフィル生合成において共通の反応であり、光合成生物が光合成を行うために必須の酵素反応の1つである。この反応を触媒する酵素として前述のLPORとDPORが報告されており、光合成生物はこれら2つの酵素のうち、片方もしくは両方を有する<sup>11)</sup>(図2)。進化的により早く分岐したと考えられる酸素非発生源光合成を行う光合成細菌は、DPORのみを保持している。それに対し、酸素発生源光合成を行うシアノバクテリア、緑藻、コケ植物、シダ植物、裸子植物などではLPORとDPORが併存する。進化的に最も最近分岐した被子植物はLPORのみをもち、現在のところ明らかにされた被子植物のいずれのゲノムにおいてもDPORをコードする遺伝子は見つかっていない。これらの分布から、生命の黎明期に最初に出現した光合成生物は、DPORのみを用いてPchl<sub>id</sub>の還元を行っていたが、酸素発生源光合成を行うシアノバクテリアの出現に伴い環境中の酸素濃度が上昇し、酸素によってDPORの不活性化が起こるようになったため、酸素に対し安定なLPORがSDRファミリーから進化してきたと考えられる<sup>12)</sup>。

<sup>§</sup> 第2回日本光合成学会シンポジウム 発表賞受賞論文(ポスター発表)

\* 連絡先 E-mail: yamamoto.haruki@h.mbox.nagoya-u.ac.jp

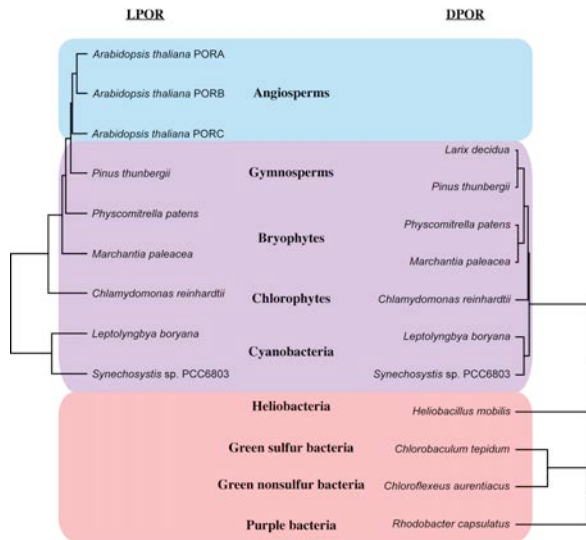


図2 LPORとDPORの分子系統樹および光合成生物における分布

LPOR及びDPORのサブユニットの1つChlL/BchlLのアミノ酸配列を元に作った分子系統樹。光合成細菌(赤)はDPORのみを、被子植物(青)はLPORのみを、シアノバクテリア・緑藻・コケ植物・裸子植物など(紫)は両酵素を保持している。

この仮説は、全ての酸素発生型光合成生物がLPORをもつことから裏付けられる。そして被子植物へと進化する段階で、DPORを喪失し、LPORのみを用いてPchl<sub>id</sub>e還元反応を行うようになったと考えられる。このDPORの喪失の理由は明確ではないが、筆者は以下の考えを博士論文にまとめている。「被子植物は、DPOR喪失によりPchl<sub>id</sub>e還元反応が完全に光依存的となる。これにより光強度や光質の変化に応じてPchl<sub>id</sub>e還元反応の速度が変化することとなり、弱光や暗所においてPchl<sub>id</sub>eの蓄積が引き起こされる。この関係を利用してPchl<sub>id</sub>e蓄積を暗所(もしくは弱光)のシグナルとして捉え、クロロフィルなどの光合成色素合成や光化学系の構造などを外界の光環境に適応させる系を進化させてきたと考えている<sup>13)</sup>。」被子植物においてDPORは失われたものの、裸子植物をはじめとする維管束植物やコケ植物、緑藻、シアノバクテリアにおいてはDPORとLPORが併存しており、シアノバクテリアでは光や酸素環境に応じた機能分化がなされているようである<sup>12,14)</sup>。筆者は、酸素に対し不安定な酵素DPORが、酸素発生型光合成生物においてどのように活性を維持しているか、また生理学的にどのような役割を担っているのかという点に興味を持ち研究を進めてきた<sup>8,15,16)</sup>。

### 3. 葉緑体におけるRNA編集

続いてRNA編集という現象について紹介をする。真核生物では転写されたmRNAに様々な修飾がなされ、成熟mRNAとなる。mRNAの成熟に関するプロセスとしてイントロンを除去するRNAスプライシングや、3'末端にアデニンを付加するポリアダニル化などのRNAプロセッシングがよく知られている。RNA編集は塩基の置換や挿入、欠失を生じるプロセスであり、RNAプロセッシングとは異なるRNA成熟過程として認識されている<sup>17)</sup>。高等植物では、RNA編集はミトコンドリアや葉緑体といった細胞内小器官において観察される<sup>17)</sup>。RNA編集は、mRNAの特定の部位において塩基の挿入や置換が起こるため、遺伝子のコード領域で起こるとコドンの変更を引き起こすことが多い(図3)。また、開始コドンの生成や終止コドンの変更等、翻訳の開始や終結の変更をもたらす例も報告されており<sup>18)</sup>、RNA編集は、正常な長さの蛋白質が発現するために必須の過程となっている。また、コドンの変更によるアミノ酸残基の置換を引き起こすRNA編集は、置換により進化的に保存性の高いアミノ酸残基に変化する例が多い<sup>18,19)</sup>。このように、RNA編集により翻訳の正常化、保存性アミノ酸残基への置換が起こるため、正常

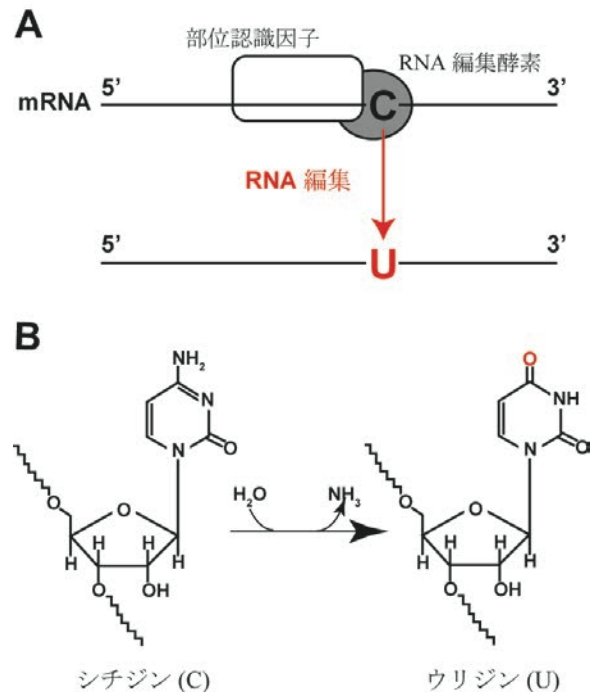


図3 RNA編集による塩基置換

RNA編集では部位認識因子によりmRNAの特定部位が認識され、RNA編集酵素によりその特定部位がCからUに置換される(A)。CからUの置換は、RNA編集酵素によって触媒される脱アミノ反応を介して行われる(B)。

な活性を示す酵素の発現にはRNA編集による塩基置換が必要である。高等植物のRNA編集において塩基置換の種類はCからUが圧倒的に多く、全体の90%以上を占める<sup>18)</sup>。また、置換の対象となるCの5'側に隣接する塩基は、T (約60%)かC (約30%)であり、90%以上の確率でピリミジン塩基である。DNA上で連続するピリミジン塩基は、紫外線照射により高頻度にピリミジン二量体形成する<sup>20)</sup>。特にチミン二量体の形成が最も頻度が高い。このためDNA中の5'-XTTX-3'配列においてチミン二量体形成を防ぐため、DNA上ではT→C置換によって5'-XTCX-3'配列として保存し、C→U置換を行うRNA編集により本来のDNA配列に対応するRNA配列、5'-XUUX-3'にRNAレベルで再置換することによって翻訳に影響が出ないようにする。この過程によって、紫外線によるDNA損傷を最小限に抑えつつ、正常な翻訳産物を生合成できると考える説が有力である<sup>19)</sup>。なかばやむなく導入したDNA上の置換変異をRNAの段階で元に戻しているという考えである。ゲノム上でTからCに置換しても蛋白質の機能に影響が出ないような配列部位では、次第にRNA編集が行われなくなり消失していったと考えられている。そのため、現在報告されているRNA編集部位には、遺伝子のコード領域内で保存性が高く、機能的に重要なアミノ酸残基の置換を伴うものが多い。実際にいくつかの酵素で、RNA編集によるアミノ酸置換が活性に与える影響について報告されている。エンドウの葉緑体DNAにコードされるアセチルCoAカルボキシラーゼβサブユニットAccDでは、RNA編集により267番目のSer (UCG)が保存性の高いLeu (UUG)に置換される。組換え酵素を用いた実験により、この置換が酵素活性に必須であることが示された<sup>21)</sup>。また、ハウレンソウの葉緑体DNAにコードされる光化学系IIのサブユニットの1つPsbFにおいても、RNA編集によりSer (UCU)が保存性の高いPhe (UUU)に置換されることが知られている。この置換が起こらない形質転換体では*in vivo*でクロロフィル含量の低下や高いクロロフィル蛍光を示し、光合成の変異で見られる典型的な表現型を示した<sup>22)</sup>。これらの結果からもRNA編集によるアミノ酸の置換は、酵素活性に重要な影響を与えられ、蛋白質の立体構造におけるアミノ酸置換部位が必ずしも活性部位付近に存在するというわけではない<sup>18)</sup>。むしろ、一般的に疎水性アミノ酸残基で構成されるフォールディングの中心部分や、親水性アミノ酸残基が多

く配置される蛋白質の表層といった一見活性とは無関係な位置にアミノ酸置換部位が存在することが多い。しかし、RNA編集によって引き起こされるアミノ酸置換はアミノ酸残基の性質を変えるもの多く、Ser (UCG)→Leu (UUG)、Ser (UCU)→Phe (UUU) や Arg (CGG)→Trp (UGG) などの置換ではアミノ酸の性質が親水性から疎水性に変わる。また、ヘリックスブレイカーとして知られるProが関わる置換も多く、活性部位周辺に位置しなくとも重要な構造変化を引き起こす可能性が高い。筆者が研究するDPORでも、クロマツなどの裸子植物の葉緑体においてRNA編集によるアミノ酸残基の置換が報告されている<sup>23-25)</sup>。DPORのサブユニット遺伝子*chlB*のコード領域において206番目のPro (CCG)と213番目のArg (CGG)のコードがそれぞれLeu (CUG)とTrp (UGG)に変換される。本稿ではこれらのアミノ酸置換がDPORの活性に与える影響について報告をしたい。

#### 4. DPORにおけるRNA編集

真核光合成生物においてDPORを構成する3つのサブユニットの全ての遺伝子*chlL*、*chlN*、*chlB*は葉緑体DNAにコードされている<sup>11)</sup>。その中で、クロマツ



図4 裸子植物のChlBにおいてRNA編集によりアミノ酸置換が起きる領域のアライメント及びシアノバクテリアChlBへのアミノ酸置換導入

上からクロマツ *Pinus thunbergii*、カラマツ *Larix decidua*、ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens*、ゼニゴケ *Marchantia polymorpha*、緑藻 *Chlorella pyrenoidosa*、シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* のChlBをアライメントした。クロマツおよびカラマツにおいてRNA編集により置換される部位を赤矢印で示す(A)。シアノバクテリア*L. boryana*のChlBにおいて、クロマツのRNA編集前のアミノ酸配列を再現するような2種類のアミノ酸置換を導入した。クロマツのChlBでRNA編集前にArgをコードするコドンCGGとなっているが、シアノバクテリアのChlBにArg置換変異を導入するときにはコドン出現頻度を考慮して、CGCを使用した(シアノバクテリアでの特殊な置換を青で示す)(B)。

(*Pinus thunbergii*)では*chlN*に1箇所、*chlB*に2箇所のRNA編集部位があることが報告されている<sup>24)</sup>。特に、*chlB*における2箇所のRNA編集部位は、カラマツ (*Larix decidua*)やドイツウヒ (*Picea abies*)の*chlB*でも共通していることから、クロマツ以外の針葉樹でも同様のRNA編集が行われていると考えられる<sup>25)</sup>。この2箇所のRNA編集部位では前述のように塩基置換によりコドンが変わり、それぞれの箇所で保存性の高いアミノ酸残基へと置換される(図4A)。このRNA編集とDPORの活性の関係性は針葉樹の芽生えを用いた実験により検証が試みられてきた<sup>23,25)</sup>。針葉樹はDPORを保持するため原理的には暗所におけるクロロフィル合成、すなわち緑化が可能である。しかし、暗所では黄化してしまう種や暗所でのクロロフィル含量が明所に比べきわめて低い種も存在しており、暗所における緑化能の程度は種によって大きく異なる<sup>24,25)</sup>。この緑化能の違いは、DPORの遺伝子*chlB*におけるRNA編集の効率に起因する可能性がある。Demkoらの報告では、暗所で生育させた芽生えから経時的にサンプリングし、クロロフィル含量及びRNA編集された*chlB*のmRNA分子の比率が調べられた。常緑針葉樹であるドイツウヒは、暗所においても一定のクロロフィル含量を維持し、調べられた全期間において*chlB*のmRNAはほぼ完全にRNA編集されていた。一方、落葉針葉樹であるカラマツでは、暗所初期ではRNA編集されたmRNAの比率が高く、クロロフィル含量も維持されているが、暗所後期(14日以降)ではRNA編集されたmRNAの比率の減少に伴ってクロロフィル含量も大きく低下した<sup>25)</sup>。この報告の中でDemkoらは、*chlB*のRNA編集効率と暗所におけるクロロフィル合成能が相関していると主張した。この結果は*chlB*のRNA編集効率の変化がDPORの活性に影響を与えていることを示唆しているが、DPORの活性を直接関係づけることはできなかった。筆者は、楠見淳子博士(九州大学)と共同でカラマツの芽生えにおける*chlB*のRNA編集効率の解析を行った。その結果、暗所における発芽初期においてRNA編集されたmRNAの比率が有意に高く、暗期の継続によりその比率が低下することが確認された。この結果から、カラマツのRNA編集効率の変化はドイツウヒよりもカラマツと類似していることが明らかとなった。

## 5. RNA編集によるアミノ酸置換とDPOR活性の関係

筆者は、これまでの研究でDPOR遺伝子を破壊したシアノバクテリアの変異株で、他の生物由来のDPOR遺伝子を発現させ暗所での緑化能の相補によりDPORの活性の評価する系を確立した<sup>8,13,15)</sup>。このシアノバクテリアを用いたDPOR活性評価系は葉緑体DNAにコードされるDPORにも適用が可能で、ヒメツリガネゴケの葉緑体DNAにコードされるDPORが活性を有することを実証した<sup>15)</sup>。そこで、この系を活用してカラマツの*chlB*におけるRNA編集によるアミノ酸置換とDPOR活性の関係を直接評価しようと考えた。RNA編集により置換される2つのアミノ酸残基は広い生物間で保存されているため、カラマツ以外の生物の持つDPORにおいてもこのアミノ酸置換の効果が検証可能と思われる。まず、すでに活性測定系が確立しているシアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* のDPORを用いてこれらのアミノ酸置換の活性への影響を調べた。RNA編集機構をもたないシアノバクテリアでは、ChlBの該当部位はすでにLeu、Trpであり、カラマツにおけるRNA編集後の残基と一致している(図4B)。これらLeuとTrpをそれぞれProとArgに置換することにより、シアノバクテリアのChlBにおいてカラマツにおけるRNA編集前のアミノ酸配列を再現させるという試みを行った。2箇所の置換部位があるので、それぞれ一方の置換と両方の置換という計3種類の変異ChlBをコードする発現シャトルベクターを構築し、シアノバクテリア *L. boryana*の*chlB*欠損株に導入した(図4B)。*L. boryana*の*chlB*欠損株はDPORの機能を失っているため、暗所においてPchlide還元が起こればクロロフィルが合成できない<sup>26)</sup>。導入した変異ChlBがDPORサブユニットとしての活性を有する場合、暗所におけるクロロフィル合成能が相補される。この *in-vivo* DPOR 相補系では、細胞のクロロフィル含量の定量により簡便に対象遺伝子のDPOR活性を調べることができる<sup>8,15)</sup>。その結果、Leu→Pro変異をもつE1株は、野生型の*chlB*を導入したポジティブコントロール(WT)とほとんど変わらないクロロフィル含量 ( $4.1 \mu\text{g ml}^{-1}$  OD<sub>730</sub><sup>-1</sup>)を示したが、Trp→Arg変異をもつE2株は、WTの1/3程度のクロロフィル含量 ( $1.4 \mu\text{g ml}^{-1}$  OD<sub>730</sub><sup>-1</sup>)を示し、両方の変異をもつE3株は、コントロールベクターを導入したネガティブコントロールとほとんど変わらない僅かなクロロフィル含量しか示さなかった(図5)。また、これら



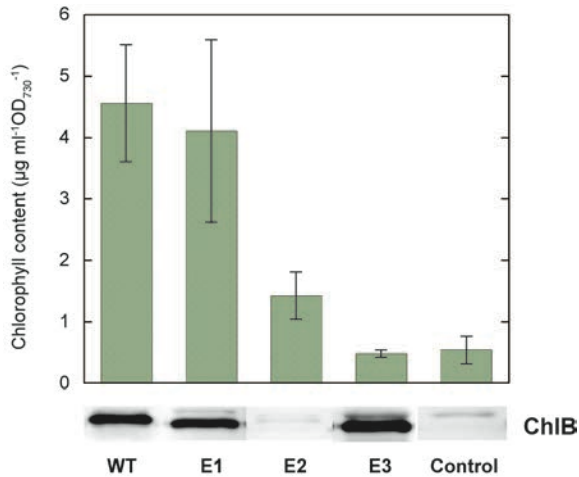


図5 シアノバクテリアを用いた変異DPOR相補実験

各変異*chlB*遺伝子を*L. boryana*の*chlB*変異株に導入し、DPOR活性の相補、すなわち暗所におけるクロロフィル生合成能を評価した。各株を暗所、従属栄養条件で2週間培養し、その細胞から色素を抽出しクロロフィル含量を定量した。また、各細胞抽出液におけるChlBを抗ChlB抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。

の相補株におけるChlBの含量をウェスタンブロッティングで確認した。E2株以外の2株はWTとほぼ同程度のChlB含量を示すことが確認された。これらの結果から、E3株においてはChlBの含量はWTと変わらないにも関わらずDPORとしての機能を示さないことから、2つの変異をもつChlBは質的にDPORの機能を失っていると示唆された。E2株においてウェスタンブロッティングでChlBのシグナルが検出されなかった。これはTrp→Arg変異によりChlBの安定性が低下し細胞内で分解されたためと考えられる。そのためE2におけるクロロフィル含量の低下はChlBの量的な減少によるものと推察される。これらの結果から、ChlBのこれら2つのアミノ酸残基の両方が置換されるとDPORの活性がほとんど失われることが示された。ここまでは、RNA編集によるアミノ酸置換を模倣したシアノバクテリアの変異ChlB蛋白質の活性の評価であった。続いて、実際にクロマツ自身のDPORを用いて実験を行った。クロマツの葉緑体DNAから*chlB*、*chlN*の各遺伝子をクローニングし、シアノバクテリアでのDPOR相補系による活性評価を行った。クロマツ葉緑体DNAから増幅した遺伝子はRNA編集前の配列であるため、RNA編集による塩基置換は部位特異的変異導入により人為的に導入した。この際、*chlN*についても1箇所のRNA編集が報告されていたため、ChlNの284番目のPro (CCU)をSer (UCU)に置換する変異も同時に導入した。これら

の遺伝子を*L. boryana*の*chlB*欠損株に導入し、暗所におけるクロロフィル生合成能を評価した。その結果、RNA編集前の配列をもつクロマツ*chlN-chlB*を導入したBE株は、コントロールベクターを導入したネガティブコントロールと同様の僅かなクロロフィル含量しか示さなかったが、RNA編集後の配列をもつ*chlN-chlB*を導入したAE株では有意なクロロフィル含量の増加が確認された(図6)。この結果から、RNA編集がDPORの活性調節に関与していることが直接的に裏付けられた。

## 6. DPORにおけるRNA編集の生理学的意義

針葉樹における*chlB*のRNA編集の効率の変化、そしてそれに伴うDPORの活性変化の生理学的な意義について議論したい。これまでの結果からRNA編集によるアミノ酸置換がDPORの活性の有無を決定づけていると考えられる。したがって、RNA編集活性が高い時期に生合成されるDPORは活性型であり、これはDemkoらの報告にあるRNA編集の効率と暗所でのクロロフィル生合成能の関係とよく符合する。カラマツの暗所芽生えにおいては発芽初期では*chlB*のRNA編集効率が高かったものの、暗期が長期にわたるとその効率が下がり、それに伴ってクロロフィルの生合成がほぼ停止した。それに対し、ドイツトウヒでは長期の暗所処理においても*chlB*のRNA編集効率が低下せず、DPORによ

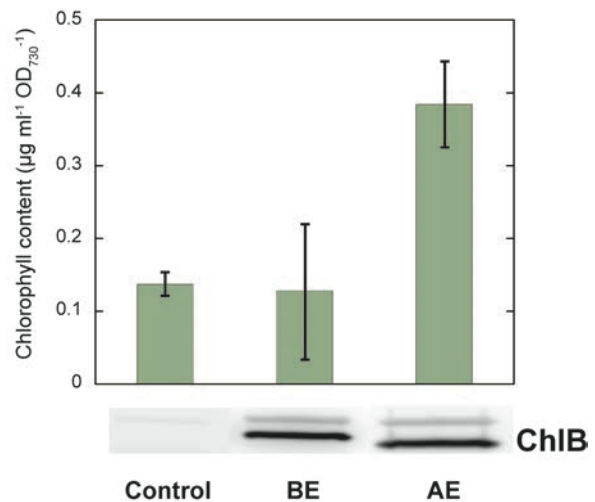


図6 クロマツの*chlN-chlB*を用いたDPOR相補実験

クロマツ葉緑体DNAからクローニングした*chlN-chlB* (Before editing, BE)及び、RNA編集による塩基置換を導入した*chlN-chlB* (After editing, AE)を*L. boryana*の*chlB*変異株に導入し、暗所におけるクロロフィル生合成能を評価した。また抗ChlB抗体を用いたウェスタンブロッティングで各株の抽出液中のChlBの含量を確認した。

るクロロフィルの生合成が安定に継続する<sup>25)</sup>。カラマツは長期の暗期に対し*chlB*のRNA編集効率を下げることでDPORの機能をオフにし、あえてクロロフィル生合成を停止するという戦略を取っているのかもしれない。この戦略はDPORをもたない被子植物のそれと近いものになっている。このようにDPORを保持する針葉樹の間で、暗所におけるクロロフィル生合成能に大きな違いが見られる。この違いは、それぞれの種の光強度と光合成活性の関係性に反映している。カラマツは陽樹で、弱光では光合成活性が低い、強光下では高い光合成活性を示す。それに対し、ドイツトウヒは陰樹で、弱光下での光合成に適している<sup>25)</sup>。一般的に陰樹は弱光の効率的な利用に優れ、日陰でも十分に生育することができる。陰樹は、僅かな光を最大限に利用するため常に効率的な集光系を準備し、一時的な僅かな光でも光合成に利用する。そのため弱光や暗所においても光化学系および集光系を準備するため光の有無に関わらずクロロフィルの生合成を行うように適応してきたと解釈できる。一方で、カラマツの様な陽樹は、光合成の効率がよくない弱光下や光合成のできない暗所では、光合成を行わず、光が十分に強いときのみ光合成活性を最大限まで引き上げる戦略をとる。そのため暗所では、あえてクロロフィルを作らないように適応してきたのかもしれない。暗所におけるクロロフィル生合成の必要性は、弱光や暗所に対する針葉樹の適応戦略に依存していると考えられる。*chlB*のRNA編集効率変化は、DPORの活性制御を通して各々の戦略に合うような集光系の最適化に寄与しているのかもしれない (図7)。なお弱光下におけるクロロフィル生合成では光依存的な酵素LPORの寄与についても解析する必要がある。もともとはDNA損傷を防ぐために導入した塩基置換を相補するためにRNA編集機構が成立したが、進化の過程で、RNA編集による機能的に重要なアミノ酸置換を酵素活性の制御系として利用するようになったと考え、RNA編集の進化は実に興味深い。

## 7. おわりに、そして今後の展開

本稿では、クロロフィル生合成系の酵素DPORが、転写後mRNA成熟プロセスの1つであるRNA編集を紹介してその活性が調節されるという新しい制御機構を紹介した。今後の課題として、光の環境に応じてRNA編集効率を調節している未知の因子を明らかにして、そ

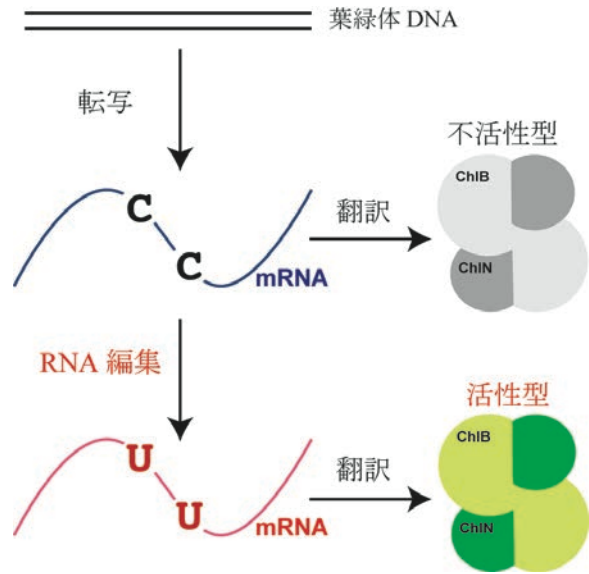


図7 RNA編集によるDPOR活性制御のモデル

クロマツやカラマツのDPORは*chlB*のmRNAのRNA編集効率の変化によりDPORの機能を制御し、暗所におけるクロロフィル生合成をコントロールしている。

の制御メカニズムを解明する必要がある。最近、RNA編集に関わる蛋白質が多数報告され、その特異的なmRNA配列認識機構に注目が集まっている<sup>27-29)</sup>。今回の報告では、DPORに焦点を当て、RNA編集と暗所でのクロロフィル生合成能との関係性を議論したが、RNA編集前のmRNAから生合成される不活性なChlBの機能についても考察する点が多い。まず、RNA編集の有無に関わらず*chlB*のmRNAレベルが保たれることから、不活性型のChlBが発現していると考えられる。この“非編集”ChlBがDPORのサブユニットとは異なる別の機能を担っている可能性も考えられる。実際にトウモロコシのミトコンドリアDNAにコードされるリボソーム蛋白質 S12 (Rps12) ではRNA編集を受けていないmRNAの翻訳が確認されている<sup>30)</sup>。また、ヒトのDNA修復酵素NEIL1では、RNA編集後のmRNAに由来する蛋白質と未編集のmRNAに由来する蛋白質とで認識配列特異性や活性が異なるという報告がある<sup>31)</sup>。遺伝子の転写自体を抑制するのではなく、あえて未編集のmRNAから蛋白質を発現させているとすれば、別の機能を担っていてもなんら不思議はない。RNA編集前のmRNAに由来するChlBについて、その機能解析を行っていきいたい。今後、次世代シーケンサーの普及に伴い、様々な生物で多様なRNA編集が発見されていくに違いない。その中で今回の報告のような環境に回答したRNA編集効率の変化を介し酵素の機能を調節する

例が新たに見つかってくることが期待される。本研究が、それらの先駆けとなれるように精進していきたい。

## 謝辞

裸子植物の芽生えを用いたRNA編集効率の解析は九州大学の楠見淳子博士に行っていただきました。また本研究は名古屋大学の藤田祐一准教授のもとで行われたものです。最後に本研究の紹介の機会を与えていただいた「光合成研究」編集委員の皆様にも深く感謝致します。

Received July 15, 2012, Accepted August 7, 2012,  
Published August 31, 2012

## 参考文献

1. Tanaka, R., and Tanaka, A. (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 321-346.
2. Masuda, T., and Fujita, Y. (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1131-1149.
3. Heyes, D. J., and Hunter, C. N. (2005) Making light work of enzyme catalysis: protochlorophyllide oxidoreductase, *Trends Biochem. Sci.* 30, 642-649.
4. Fujita, Y., and Bauer, C. E. (2000) Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified BchL and BchN-BchB subunits. In vitro confirmation of nitrogenase-like features of a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme, *J. Biol. Chem.* 275, 23583-23588.
5. Nomata, J., Swem, L. R., Bauer, C. E., and Fujita, Y. (2005) Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*, *Biochim. Biophys. Acta* 1708, 229-237.
6. Nomata, J., Kitashima, M., Inoue, K., and Fujita, Y. (2006) Nitrogenase Fe protein-like Fe-S cluster is conserved in L-protein (BchL) of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*, *FEBS Lett.* 580, 6151-6154.
7. Nomata, J., Ogawa, T., Kitashima, M., Inoue, K., and Fujita, Y. (2008) NB-protein (BchN-BchB) of dark-operative protochlorophyllide reductase is the catalytic component containing oxygen-tolerant Fe-S clusters, *FEBS Lett.* 582, 1346-1350.
8. Yamamoto, H., Kurumiya, S., Ohashi, R., and Fujita, Y. (2009) Oxygen sensitivity of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*, *Plant Cell Physiol.* 50, 1663-1673.
9. Sarma, R., Barney, B. M., Hamilton, T. L., Jones, A., Seefeldt, L. C., and Peters, J. W. (2008) Crystal structure of the L Protein of *Rhodobacter sphaeroides* light-independent protochlorophyllide reductase with MgADP bound: a homologue of the nitrogenase Fe protein, *Biochemistry* 47, 13004-13015.
10. Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurisu, G., and Fujita, Y. (2010) X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase, *Nature* 465, 110-114.
11. Fujita, Y., and Bauer, C. E. (2003) The light-independent protochlorophyllide reductase: a nitrogenase-like enzyme catalyzing a key reaction for greening in the dark, in *Chlorophylls and Bilins: Biosynthesis, Synthesis, and Degradation* (Kadish, K., Smith, K.M., and Guilard, R., Eds.) pp 109-156, Academic Press, Amsterdam.
12. Yamazaki, S., Nomata, J., and Fujita, Y. (2006) Differential operation of dual protochlorophyllide reductases for chlorophyll biosynthesis in response to environmental oxygen levels in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*, *Plant Physiol.* 142, 911-922.
13. Yamamoto, H. (2011) Comparative biochemical analysis of protochlorophyllide reductases, PhD. thesis, Nagoya University, Japan.
14. Fujita, Y., Takagi, H., and Hase, T. (1998) Cloning of the gene encoding a protochlorophyllide reductase: the physiological significance of the co-existence of light-dependent and -independent protochlorophyllide reduction systems in the Cyanobacterium *Plectonema boryanum*, *Plant Cell Physiol.* 39, 177-185.
15. Yamamoto, H., Kurumiya, S., Ohashi, R., and Fujita, Y. (2011) Functional evaluation of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase encoded by the chloroplast DNA of *Physcomitrella patens* in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*, *Plant Cell Physiol.* 52, 1983-1993.
16. Yamamoto, H., Nomata, J., and Fujita, Y. (2008) Functional expression of nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus* in *Escherichia coli*, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1238-1242.
17. Knoop, V. (2011) When you can't trust the DNA: RNA editing changes transcript sequences, *Cell Mol. Life Sci.* 68, 567-586.
18. Yura, K., and Go, M. (2008) Correlation between amino acid residues converted by RNA editing and functional residues in protein three-dimensional structures in plant organelles, *BMC Plant Biol.* 8, 79.
19. Tillich, M., Lehwark, P., Morton, B. R., and Maier, U. G. (2006) The evolution of chloroplast RNA editing, *Mol. Biol. Evol.* 23, 1912-1921.
20. Häder, D. P., and Sinha, R. P. (2005) Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact, *Mutat. Res.* 571, 221-233.

21. Sasaki, Y., Kozaki, A., Ohmori, A., Iguchi, H., and Nagano, Y. (2001) Chloroplast RNA editing required for functional acetyl-CoA carboxylase in plants, *J. Biol. Chem.* 276, 3937-3940.
22. Bock, R., Kössel, H., and Maliga, P. (1994) Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype, *EMBO J.* 13, 4623-4628.
23. Karpinska, B., Karpinski, S., and Hällgren, J. (1997) The *chlB* gene encoding a subunit of light-independent protochlorophyllide reductase is edited in chloroplasts of conifers, *Curr. Genet.* 31, 343-347.
24. Kusumi, J., Sato, A., and Tachida, H. (2006) Proceedings of the SMBE Tri-National Young Investigators' Workshop 2005. Relaxation of functional constraint on light-independent protochlorophyllide oxidoreductase in *Thuja*, *Mol. Biol. Evol.* 23, 941-948.
25. Demko, V., Pavlovic, A., Valková, D., Slovák, L., Grimm, B., and Hudák, J. (2009) A novel insight into the regulation of light-independent chlorophyll biosynthesis in *Larix decidua* and *Picea abies* seedlings, *Planta* 230, 165-176.
26. Fujita, Y. (1996) Protochlorophyllide reduction: a key step in the greening of plants, *Plant Cell Physiol.* 37, 411-421.
27. Ohtani, S., Ichinose, M., Tasaki, E., Aoki, Y., Komura, Y., and Sugita, M. (2010) Targeted gene disruption identifies three PPR-DYW proteins involved in RNA editing for five editing sites of the moss mitochondrial transcripts, *Plant Cell Physiol.* 51, 1942-1949.
28. Uchida, M., Ohtani, S., Ichinose, M., Sugita, C., and Sugita, M. (2011) The PPR-DYW proteins are required for RNA editing of *rps14*, *cox1* and *nad5* transcripts in *Physcomitrella patens* mitochondria, *FEBS Lett.* 585, 2367-2371.
29. Fujii, S., and Small, I. (2011) The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes, *New Phytol.* 191, 37-47.
30. Phreaner, C. G., Williams, M. A., and Mulligan, R. M. (1996) Incomplete editing of *rps12* transcripts results in the synthesis of polymorphic polypeptides in plant mitochondria, *Plant Cell* 8, 107-117.
31. Yeo, J., Goodman, R. A., Schirle, N. T., David, S. S., and Beal, P. A. (2010) RNA editing changes the lesion specificity for the DNA repair enzyme NEIL1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 20715-20719.

## RNA Editing Regulates the Activity of Dark-Operative Protochlorophyllide Oxidoreductase

Haruki Yamamoto\*

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University