

· 特邀综述 ·

PPR蛋白参与细胞器RNA C→U编辑机制研究进展

于晓琳, 李西雅, 夏冰玉洁, 李昊, 谭保才, 王勇*

山东大学生命科学学院, 植物发育与环境适应生物学教育部重点实验室, 青岛 266237

摘要 植物体中线粒体和叶绿体是半自主细胞器, 具有自己的基因组。RNA编辑对于细胞器基因的正确表达至关重要, 最常见的RNA编辑是C→U。RNA C→U编辑需要多种编辑因子参与, 其中PPR蛋白中的PPR基序阵列特异性地靶向编辑位点, PPR-DYW蛋白DYW结构域是催化C→U编辑的脱氨酶。该文综述了PPR蛋白参与RNA C→U编辑机制的最新研究进展, 并讨论了人工合成PPR编辑因子的潜在应用价值。

关键词 PPR蛋白, RNA C→U编辑, 线粒体, 叶绿体

于晓琳, 李西雅, 夏冰玉洁, 李昊, 谭保才, 王勇 (2024). PPR蛋白参与细胞器RNA C→U编辑机制研究进展. 植物学报 59, 903–911.

植物的线粒体和叶绿体不仅分别是呼吸作用和光合作用的场所, 还是多种物质代谢的场所, 因此其对植物生长各阶段都至关重要。植物的线粒体和叶绿体分别由 α -棒状杆菌和蓝细菌内共生演化而来。在演化过程中, 线粒体和叶绿体中大部分基因已经转移到细胞核, 只有少部分基因仍位于这2个细胞器的基因组中, 因此线粒体和叶绿体为半自主细胞器。线粒体和叶绿体基因组中的基因编码线粒体和叶绿体关键功能蛋白, 线粒体基因主要编码氧化磷酸化呼吸途径中复合亚基蛋白、核糖体亚基蛋白、核糖体RNA以及一些tRNA; 叶绿体基因编码光合作用复合亚基蛋白、转录起始因子、RNA聚合酶亚基、核糖体亚基蛋白、核糖体RNA以及tRNA。线粒体和叶绿体基因转录后加工和翻译过程复杂, 包括RNA编辑、内含子剪接、5'和3'末端的成熟、RNA稳定以及蛋白翻译。这些过程需要多种不同核基因编码蛋白的参与, 如参与RNA编辑的PPR (Pentatricopeptide Repeat)蛋白、MORF (Multiple Organelle RNA editing factor)蛋白、ORRM (Organelle RNA Recognition Motif-containing)蛋白以及OZ1 (Sandoval et al., 2019; Small et al., 2020), 参与内含子剪接的PPR蛋白、CRM结构域蛋白、PORR蛋白、RNA解旋酶、mTERF以及成熟

酶(Maturase) (Brown et al., 2014)。

RNA C→U编辑是线粒体和叶绿体基因表达的关键过程, RNA编辑通常恢复进化保守的氨基酸、产生起始或终止密码子、调控内含子剪接和促进tRNA成熟等(Kadowaki et al., 1995; Fey et al., 2002; Xu et al., 2020; Wang et al., 2021)。RNA编辑缺陷会严重损害植物的生长发育, 导致植物呈现矮小、黄化或者白化等表型(马艳莉等, 2011; Bentolila et al., 2012; Liu et al., 2021); 抑制种子发育, 导致种子呈现小籽粒(small kernel)、籽粒发育缺陷(defective kernel)、空果皮(empty pericarp)以及胚缺失(embryo defective)等表型(Liu et al., 2013; Li et al., 2014; Yang et al., 2022b) (附表1)。RNA编辑广泛存在于植物线粒体和叶绿体中, 高等植物线粒体中一般有300–600个编辑位点, 而叶绿体中有20–30个编辑位点(Notsu et al., 2002; Mower and Palmer, 2006; 邓李坤等, 2012; Bentolila et al., 2013; Wang et al., 2019; Liu et al., 2021)。编辑位点的数量根据物种不同存在显著差异, 低等植物小立碗藓(*Physcomitrella patens*)线粒体中有11个编辑位点(Rüdinger et al., 2009), 叶绿体基因组中仅有1个编辑位点(Miyata and Sugita, 2004); 而在睡莲属植物线粒体和叶绿体基因组中分

收稿日期: 2024-06-01; 接受日期: 2024-08-20

基金项目: 国家自然科学基金(No.32101640)

* 通讯作者。E-mail: wangy07@sdu.edu.cn

别有865和98个RNA C→U编辑位点(He et al., 2021)。此外,地钱纲是苔藓植物中起源古老的一个分支,是复杂复叶状苔类植物,长期以来被认为是陆生植物中唯一缺乏RNA编辑的类群,但是最新研究发现以洞穴为主要生境的地钱纲植物光苔(*Cyathodium cavernarum*)的线粒体和叶绿体中分别有172和129个RNA C→U编辑位点(Shen et al., 2024)。

截至目前,在低等植物小立碗藓中只发现PPR-DYW一种RNA编辑因子,且体外酶活实验表明,PpPPR65和PpPPR56能有效催化 $ccmF_C$ -103和 $nad4$ -272以及 $nad3$ -230位点的编辑(Oldenkott et al., 2019; Hayes and Santibanez, 2020)。因此,小立碗藓中RNA编辑可能仅由PPR-DYW蛋白完成。而高等植物中RNA编辑由RNA编辑复合体(editosomes)完成,包含多种RNA编辑因子,如PPR蛋白、MORF蛋白、ORRM蛋白、OZ1和ISE2(Sandoval et al., 2019; Small et al., 2020)。PPR蛋白是其中非常关键的一种,其PPR基序决定了编辑位点的特异性以及PPR-DYW蛋白DYW结构域催化C→U的脱氨反应。

1 PPR蛋白的分类和结构

PPR蛋白是一个大的蛋白家族,广泛分布在植物中。水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和小立碗藓基因组中分别有477、521、450和103个PPR蛋白(O'toole et al., 2008; Wei and Han, 2016)。PPR蛋白由2–27个含大约35个低保守氨基酸残基的PPR基序串联重复组成(Small and Peeters, 2000)。根据组成PPR基序的不同,PPR蛋白分为P类和PLS类。P类PPR蛋白完全由35个氨基酸残基组成的P基序串联重复而成,一些P类PPR蛋白的C端具有特殊的结构域,如CC (Coiled-coil)、WQQ repeats和SMR (Small MutS related)。PLS类PPR蛋白由3种PPR基序串联重复而成,包括P基序(35个氨基酸残基)、L基序(35–36个氨基酸残基)以及S基序(31–32个氨基酸残基)。Cheng等(2016)根据组成PPR基序氨基酸的保守性将P、L和S基序分别细分为P1和P2基序、L1和L2基序以及S1、S2和SS基序。PLS类PPR蛋白的3个亚型蛋白PPR-E、PPR-E+和PPR-DYW在其C端分别具有E、E+和DYW结构域(Lurin et al., 2004; Cheng et al., 2016)。PPR蛋白特

异地识别和结合单链RNA,即每个PPR基序第一位和最后一位氨基酸组合后共同识别1个碱基,进而特异地识别和结合RNA序列(Barkan et al., 2012; Yin et al., 2013)。

2 PPR-DYW蛋白参与RNA编辑的机制

PPR蛋白是植物RNA编辑过程的核心组分。截至目前,已报道了多个PPR蛋白参与RNA C→U编辑,其中绝大部分是PLS类PPR蛋白,包括PPR-DYW、PPR-E和PPR-E+蛋白(附表1)。PPR-DYW蛋白的PPR基序特异地识别和结合编辑位点上游序列,其DYW结构域催化编辑位点的脱氨反应。通常PPR-DYW蛋白识别的RNA序列位于编辑位点上游-4的位置(Barkan and Small, 2014),进而确保DYW结构域准确地催化编辑位点进行脱氨反应。多项研究表明,PPR-DYW蛋白的PPR基序特异地识别和结合编辑位点上游的序列(Okuda et al., 2006)。RNA C→U编辑是胞嘧啶脱氨形成尿嘧啶的过程(Blanc et al., 1995; Yu and Schuster, 1995)。据报道,催化该过程的脱氨酶都具有CDAs-like的锌离子结合保守氨基酸(HxE(x)nCxXC),位于PPR-DYW蛋白C端的DYW结构域具有这些保守的氨基酸。然而,DYW结构域是否具有脱氨酶活性尚未得到实验证实。Oldenkott等(2019)在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中异源表达小立碗藓PPR-DYW蛋白PpPPR65和PpPPR56,并分别同时表达这2个蛋白负责编辑的位点 $ccmF_C$ -103和 $nad4$ -272以及 $nad3$ -230,发现当2个蛋白在细菌中表达时,对应的位点被有效编辑,而表达去掉DYW结构域或者突变DYW结构域上关键氨基酸的PpPPR65和PpPPR56蛋白均导致对应编辑位点完全缺失或者编辑效率严重降低,特别是当锌离子结合的保守氨基酸突变时,RNA编辑完全缺失。因此,该研究证实位于PPR-DYW蛋白C端的DYW结构域是催化RNA C→U编辑的脱氨酶。随后,Hayes和Santibanez (2020)在体外证实了DYW催化RNA C→U编辑的脱氨酶活性。经体外纯化PpPPR65蛋白,然后与 $ccmF_C$ RNA孵育,发现 $ccmF_C$ -103可被有效编辑。进一步研究表明,PpPPR65蛋白单体呈现高催化活力,而多聚体导致催化活力降低,并且DYW的催化活力依赖锌离子和ATP。Takenaka等(2021)解析了拟南芥PPR-DYW蛋

白OTP86的DYW结构域晶体结构,发现DYW与细菌脱氨酶EcCD具有类似的蛋白结构,但是也存在不同。相似之处是脱氨酶的核心区域由5个 β -折叠和2个 α -螺旋组成,其中前2个 β -折叠位于PG-box结构域。DYW与EcCD不同之处在于DYW的 β 2-折叠和 β 5-折叠之间插入了2个 β -折叠(β 3, β 4)和1个 α -螺旋(α 1),该插入被称为Gating domain; 另一个显著不同是DYW脱氨酶具有沉默和激活2种状态。不与底物结合时, DYW脱氨酶表现沉默状态; 当与底物结合时, Gating domain中的2个 β -折叠和1个 α -螺旋发生构象改变,使酶的活性中心呈现高效催化活性的构象,进而催化RNA C→U的脱氨反应。此外, DYW脱氨酶的活性与2个锌离子有关,一个位于脱氨酶活性中心,另一个与C端3个高度保守的氨基酸残基DYW中的Y结合,研究表明这些氨基酸突变严重抑制DYW脱氨酶活性(Boussardon et al., 2014; Hayes and Santibanez, 2020; Takenaka et al., 2021)。DYW1是拟南芥中结构特殊的DYW蛋白,该蛋白不具有PPR结构域,仅由N端信号肽和缺少部分N端氨基酸的DYW结构域组成。Toma-Fukai等(2023)解析了该蛋白的晶体结构,与OTP86的DYW结构域不同的是, DYW1中的1个 α -螺旋取代了OTP86的DYW结构域Gating domain中的2个 β -折叠。

通常结构典型的PPR-DYW蛋白只负责少数几个位点的编辑。例如,玉米中PPR2263只负责*nad5*-1550和*cob*-908位点的编辑(Sosso et al., 2012); 拟南芥中MEF7负责*ccb*206-28、*cob*-325、*nad2*-1433和*nad4L*-41位点的编辑(Zehrmann et al., 2012)。然而在玉米中一些结构典型的PPR-DYW蛋白,除参与识别位点的编辑外,其功能缺失还导致其它多个位点的编辑缺陷。玉米中EMP5是定位于线粒体的PPR-DYW蛋白,EMP5基因突变除导致*rpl16*-458位点的编辑完全缺失外,还造成其它9个位点的编辑效率显著降低(Liu et al., 2013)。EMP21也是一个结构典型的PPR-DYW蛋白,预测该蛋白可识别和结合*nad7*-77、*atp1*-1291和*atp8*-437位点上游的RNA序列,EMP21功能缺失导致3个位点的编辑完全缺失。此外,EMP21突变导致其它78个位点的编辑缺失或效率严重降低(Wang et al., 2019)。emp5-4是Emp5基因的一个弱突变体,该突变导致Emp5-4编码一个缺失DYW结构域的结构类似于PPR-E+的蛋白,该突变体*rpl16*-458

位点的编辑效率下降但并非完全缺失,而emp21突变体中该位点的编辑效率也显著降低。遗传分析显示,emp5-4/emp21-1双突变体中该位点的编辑效率相比单突变体显著降低,且这2个蛋白都与MORF8互作,暗示EMP5-4可能间接招募EMP21,进而EMP21的DYW结构域部分催化*rpl16*-458位点的编辑(Wang et al., 2019)。除这2个蛋白外,PPR27、ZmPPR26和DEK48功能缺失也导致多个位点的编辑缺失或者效率显著降低(Liu et al., 2020, 2021; Yang et al., 2022a)。

高等植物除具有典型的PPR-DYW蛋白外,还具有少数几个非典型的PPR-DYW蛋白,这类蛋白只具有少数几个不太保守的PPR基序和C端的DYW结构域,不具有典型的E1和E2结构。这类蛋白在拟南芥中有5个,分别是DYW2、DYW3、DYW4、MEF8和MEF8S,由于未发现DYW3的EST (expressed sequence tag),推测该基因是一个假基因(Yang et al., 2022b); 玉米中有3个,分别是PCW1、ZmDYW2A和ZmDYW2B; 水稻中只有2个,即OsDYW2和OsPCW1 (Wang et al., 2023)。其中,拟南芥中的DYW2、MEF8和MEF8S及玉米中的PCW1、ZmDYW2A和ZmDYW2B功能已被解析。这些基因突变均导致线粒体和叶绿体中大量位点的编辑缺陷,最终导致胚胎致死。DYW2、MEF8/8S、PCW1和ZmDYW2A/2B分别参与392、151、102和108个位点的编辑(Diaz et al., 2017; Guillaumot et al., 2017; Yang et al., 2022b; Wang et al., 2023, 2024)。

3 PPR-E/E+蛋白参与RNA编辑的机制

高等植物中超过一半的PLS类蛋白是PPR-E和PPR-E+蛋白。拟南芥中有200个PLS类PPR蛋白,其中包含47个PPR-E和60个PPR-E+蛋白(Lurin et al., 2004); 玉米中有238个PLS类PPR蛋白,包含76个PPR-E和49个PPR-E+蛋白(Wei and Han, 2016)。几乎所有已报道的PPR-E/E+蛋白都参与RNA C→U编辑。与PPR-DYW蛋白类似,PPR-E/E+蛋白的PPR基序特异地识别和结合编辑位点上游的序列,进而准确识别编辑位点。然而,PPR-E/E+蛋白不具有C端的DYW脱氨酶,需要招募其它脱氨酶完成RNA编辑。CRR4是一个特殊的PPR-E+蛋白,由11个PPR基序、E结构域和部分E+结构域组成,可特异地识别拟南芥

叶绿体 $ndhD-1$ 位点,功能缺失导致该位点的编辑完全缺失(Kotera et al., 2005; Okuda et al., 2006)。拟南芥 $dyw1$ 突变体该位点的编辑完全缺失,研究发现CRR4与DYW1互作,且CRR4-DYW1的融合蛋白可以回补 $crr4-3/dyw1-1$ 双突变体中 $ndhD-1$ 的RNA编辑(Boussardon et al., 2012)。这说明PPR-E+蛋白可以招募反式DYW脱氨酶,进而完成RNA编辑。2017年,2个独立的课题组分别以线粒体定位的PPR-E+蛋白SLO2和叶绿体定位的PPR-E+蛋白CLB19为诱饵蛋白进行IP-MS实验,富集到非典型PPR-DYW蛋白DYW2和结构特殊的P型PPR蛋白NUWA,一系列的遗传和分子生物学实验表明,PPR-E+蛋白SLO2以及CLB19在NUWA的辅助下招募DYW2,进而进行RNA编辑(Andrés-Colás et al., 2017; Guillaumot et al., 2017)。最新研究表明,玉米中ZmDYW2A/2B是PPR-E+蛋白招募的脱氨酶,ZmNUWA辅助PPR-E+蛋白对ZmDYW2A/2B的招募(Wang et al., 2024)。与DYW2蛋白不同的是,玉米中PPR-E+蛋白招募ZmDYW2A/2B可能主要通过ZmNUWA辅助,而拟南芥中PPR-E+蛋白招募脱氨酶除需要NUWA以外,可能还需要其它P类PPR蛋白(Wang et al., 2024)。氨基酸序列比对分析发现,DYW2和ZmDYW2A/2B的DYW结构域不具有完整的脱氨酶结构,这2个蛋白丢失了PG-box (DYW脱氨酶中的 $\beta 1$ -和 $\beta 2$ -折叠)以及Gating domain的N端(Takenaka et al., 2021)。通过分析5 107个PPR-E+蛋白的E+结构域,发现E+结构域具有PG-box以及Gating domain的N端(Wang et al., 2023)。因此,DYW2和ZmDYW2A/2B的DYW结构域中丢失的PG-box和Gating domain的N端被PPR-E+蛋白中E+结构域弥补。PCW1和MEF8/8S具有完整的DYW结构域,遗传和分子生物学证据证实PCW1和MEF8/8S分别是玉米和拟南芥中PPR-E蛋白招募的脱氨酶(Yang et al., 2022b; Wang et al., 2023)。

4 P类PPR蛋白参与RNA编辑的机制

P类PPR蛋白是PPR蛋白中一个大的亚类,主要参与内含子剪接、前体RNA的成熟和翻译起始等。该类蛋白只有少数几个参与RNA C $\rightarrow$ U的编辑,分别是拟南芥中的NUWA、GRP23和PPME及玉米中的bCCP1

和ZmNUWA。其中NUWA、GRP23、bCCP1和ZmNUWA除具有PPR基序以外还具有其它特殊结构域。NUWA、ZmNUWA和bCCP1均由N端bZIP (basic region/nuclear localization signal leucine zipper motif)结构域、中间的PPR基序和C端CC (Coiled-coil)结构域组成(Andrés-Colás et al., 2017; Guillaumot et al., 2017; Wang et al., 2023, 2024)。GRP23包含N端bZIP结构域、中间的PPR基序、截短的CC结构域以及C端WQQ结构域(Ding et al., 2006)。这4个结构特殊的P类PPR蛋白都参与植物细胞器中大量位点的RNA编辑。拟南芥NUWA和GRP23分别调节226和358个位点的编辑;玉米bCCP1和ZmNUWA分别参与66和107个位点的编辑。NUWA、GRP23、bCCP1和ZmNUWA参与RNA编辑并非通过识别和结合RNA,而是通过辅助和促进PPR-E或PPR-E+招募非典型PPR-DYW蛋白参与RNA编辑(Andrés-Colás et al., 2017; Guillaumot et al., 2017; Yang et al., 2022b; Wang et al., 2023, 2024)。Zang等(2024)发现,玉米中ZmGRP23可以辅助PPR-E蛋白DEK56对PCW1的招募。

5 PPR蛋白参与RNA编辑的工作模型

我们根据文献总结出PPR蛋白参与RNA编辑的几种工作模型。(1) 线粒体和叶绿体中PPR-DYW蛋白特异地识别编辑位点上游的序列,C端DYW催化RNA C $\rightarrow$ U编辑,该过程可能需要其它编辑因子参与,如MORF蛋白(图1A)。研究显示,MORF蛋白可促进PPR蛋白对底物的结合(Yan et al., 2017)。(2) PPR-E+蛋白结合到编辑位点上游的RNA,在P型PPR蛋白(NUWA和ZmNUWA)和MORF蛋白的辅助下招募非典型PPR-DYW蛋白(DYW2和ZmDYW2A/2B),完成特定位点的RNA编辑(图1B)。在叶绿体中可能还需要ORRM1以及OZ1的辅助(Wang et al., 2024)。(3) PPR-E蛋白结合到编辑位点上游的RNA,在P型PPR蛋白(bCCP1、ZmGRP23和GRP23)和MORF蛋白的辅助下招募非典型PPR-DYW蛋白(PCW1或MEF8/8S),完成特定位点的RNA编辑(图1C)。

6 PPR编辑因子在植物生长发育中的功能

PPR编辑因子突变严重抑制植物的生长发育,使植

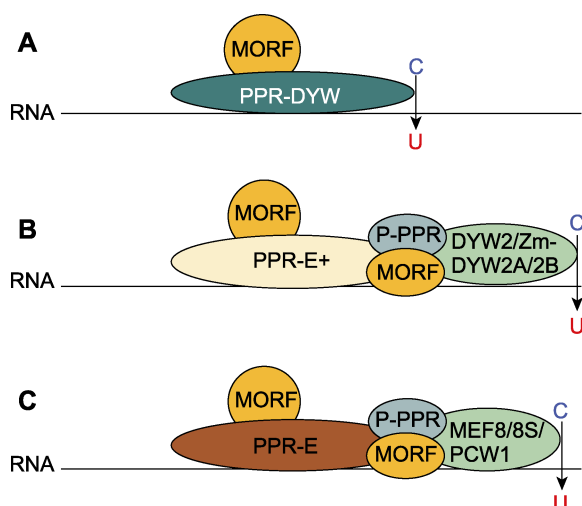


图1 PPR蛋白参与RNA C→U编辑的工作模型
(A) PPR-DYW; (B) PPR-E+; (C) PPR-E

Figure 1 Models of PPR proteins involved in RNA C→U editing
(A) PPR-DYW; (B) PPR-E+; (C) PPR-E

物呈现矮小、白化或黄化等表型;抑制胚发生和胚乳发育,导致小籽粒、籽粒发育缺陷、空果皮和胚缺失等;抑制花粉发育,造成雄性不育;导致逆境响应改变(附表1)。定位于线粒体的PPR编辑因子功能缺失抑制线粒体中氧化磷酸化呼吸途径中复合物的组装和活性或蛋白质翻译,破坏线粒体的结构和功能,抑制植物生长发育和种子发育,导致育性降低或不育(附表1)。定位于叶绿体的PPR编辑因子功能缺失常破坏叶绿体光合作用复合物的组装和活性及抑制蛋白质翻译等,导致植物生长发育迟缓、胚致死,呈现白化或黄化等表型(附表1)。玉米中叶绿体定位的PPR-DYW蛋白qKW9功能缺失,导致叶绿体 $ndhB-246$ 位点的编辑缺失,引起光合效率降低,突变体呈现玉米穗变小,产量降低(Huang et al., 2020)。然而,多项研究显示,拟南芥PPR编辑因子功能缺失突变体在正常条件下与野生型一致,未表现出任何生长发育缺陷(附表1)。其中一些可能在正常条件下不具有生长发育表型的突变体,在胁迫条件下表现出对某种胁迫敏感或抗性增强的表型。例如,AHG11功能缺失在正常条件下与野生型一致,但是 $ahg11$ 突变体表现出对盐、脱落酸以及茉莉酸等胁迫敏感的表型(Murayama et al., 2012)。 $slg1$ 突变体生长发育较野生型略迟缓,但表现出抗旱性显著增强(Yuan and Liu, 2012)。因此,

这些正常条件下对植物生长发育无影响或影响较小的突变体为筛选抗性植物提供了可能的候选材料。

7 人工合成PPR编辑因子的潜在应用价值

PPR蛋白具有特异识别和结合RNA及催化RNA编辑的特性。人工合成PPR蛋白可在不改变基因DNA序列的情况下,改变RNA的遗传信息(McDowell et al., 2022)。因此,人工合成PPR可作为工具对RNA中特定位点进行编辑,进而定向改造编码的蛋白。目前,科学家已进行了一些尝试并取得了较好的效果。Royan等(2021)人工合成PPR蛋白可在体外、大肠杆菌以及拟南芥叶绿体中对其识别的位点进行有效编辑;Bernath-Levin等(2022)人工合成S型PPR蛋白,在大肠杆菌中表达后可对特定位点进行RNA C→U编辑;Lesch等(2022)在人类细胞系中表达小立碗藓PPR-DYW蛋白PpPPR56和PpPPR65,发现PPR蛋白可有效地对RNA进行C→U编辑,当特异地改变PPR基序中2个关键碱基识别氨基酸时,可以改变PPR蛋白识别和编辑的位点,这说明PPR-DYW蛋白同样可在异源细胞核和细胞质中进行RNA编辑(Lesch et al., 2022)。因此,通过定向改造自然的PPR或人工合成PPR可在不改变DNA序列的情况下,对突变的基因进行修正或对一些RNA位点进行准确编辑。人工合成PPR可用于对胞质雄性不育基因进行修正,并利用诱导性启动子对该PPR的表达进行调控,进而准确地对胞质雄性不育进行人为控制。人类多种疾病由线粒体基因突变导致,可利用人工合成PPR对突变基因进行修正,进而治疗疾病。然而,PPR基序识别RNA特异性不高,过量表达容易脱靶,因此提高人工合成PPR蛋白的RNA识别和结合特异性是目前亟待解决的关键问题。

8 研究展望

目前,虽然对PPR蛋白参与RNA编辑进行了较多研究,但是仍有一些问题需要进一步回答。(1) 高等植物细胞器中RNA编辑由编辑复合体完成,除PPR蛋白外,还需要多种因子参与,如MORF、ORRM、OZ1和ISE2(Sun et al., 2016; Sandoval et al., 2019)。这

些编辑因子如何协同参与RNA编辑尚不清楚。(2) 研究表明, PPR-E蛋白识别编辑位点后招募非典型PPR-DYW蛋白PCW1和MEF8/8S; PPR-E+蛋白招募非典型PPR-DYW蛋白AtDYW2和ZmDYW2A\2B进行RNA编辑(Andrés-Colás et al., 2017; Guillaumot et al., 2017; Yang et al., 2022b; Wang et al., 2023, 2024)。然而PPR-E/E+蛋白负责编辑的一些位点(如PCW1、MEF8/8S、AtDYW2和ZmDYW2A\2B)都不负责编辑或者只负责其中一部分(Andrés-Colás et al., 2017; Guillaumot et al., 2017; Yang et al., 2022a; Wang et al., 2023, 2024)。这暗示PPR-E/E+蛋白除招募非典型PPR-DYW蛋白作为脱氨酶以外, 还可能招募其它脱氨酶。典型的PPR-DYW蛋白是可能的候选脱氨酶, 但还需要进一步验证。

作者贡献声明

于晓琳, 李西雅: 查阅文献和撰写文章主要内容; 夏冰玉洁: 查阅文献和撰写PPR编辑因子突变体表型部分; 李昊: 参与PPR结构和展望部分的撰写; 谭保才: 文章框架设计和规划; 王勇: 文章整体框架设计和规划、文章修改以及质量控制。

参考文献

- Andrés-Colás N, Zhu Q, Takenaka M, De Rybel B, Weijers D, Van Der Straeten D (2017). Multiple PPR protein interactions are involved in the RNA editing system in *Arabidopsis* mitochondria and plastids. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, 8883–8888.
- Barkan A, Rojas M, Fujii S, Yap A, Chong YS, Bond CS, Small I (2012). A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins. *PLoS Genet* **8**, e1002910.
- Barkan A, Small I (2014). Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol* **65**, 415–442.
- Bentolila S, Heller WP, Sun T, Babina AM, Friso G, van Wijk KJ, Hanson MR (2012). RIP1, a member of an *Arabidopsis* protein family, interacts with the protein RARE1 and broadly affects RNA editing. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, E1453–E1461.
- Bentolila S, Oh J, Hanson MR, Bukowski R (2013). Comprehensive high-resolution analysis of the role of an *Arabidopsis* gene family in RNA editing. *PLoS Genet* **9**, e1003584.
- Bernath-Levin K, Schmidberger J, Honkanen S, Gutmann B, Sun YK, Pullakhandam A, des Francs-Small CC, Bond CS, Small I (2022). Cofactor-independent RNA editing by a synthetic S-type PPR protein. *Synth Biol* **7**, ysab034.
- Blanc V, Litvak S, Araya A (1995). RNA editing in wheat mitochondria proceeds by a deamination mechanism. *FEBS Lett* **373**, 56–60.
- Boussardon C, Avon A, Kindgren P, Bond CS, Challenor M, Lurin C, Small I (2014). The cytidine deaminase signature HxE(x)_nCxxC of DYW1 binds zinc and is necessary for RNA editing of *ndhD-1*. *New Phytol* **203**, 1090–1095.
- Boussardon C, Salone V, Avon A, Berthome R, Hammani K, Okuda K, Shikanai T, Small I, Lurin C (2012). Two interacting proteins are necessary for the editing of the *NdhD-1* site in *Arabidopsis* plastids. *Plant Cell* **24**, 3684–3694.
- Brown GG, des Francs-Small CC, Ostersetzer-Biran O (2014). Group II intron splicing factors in plant mitochondria. *Front Plant Sci* **5**, 35.
- Cheng SF, Gutmann B, Zhong X, Ye YT, Fisher MF, Bai FQ, Castleden I, Song Y, Song B, Huang JY, Liu X, Xu X, Lim BL, Bond CS, Yiu SM, Small I (2016). Redefining the structural motifs that determine RNA binding and RNA editing by pentatricopeptide repeat proteins in land plants. *Plant J* **85**, 532–547.
- Deng LK, Li Y, Yu JN (2012). RNA editing sites in chloroplast protein-coding genes in leaf white mutant of *Triticum aestivum*. *Chin Bull Bot* **47**, 581–593. (in Chinese)
- 邓李坤, 李妍, 俞嘉宁 (2012). 小麦叶绿体蛋白质编码基因RNA编辑位点的测定及与返白现象的关系. 植物学报 **47**, 581–593.
- Diaz MF, Bentolila S, Hayes ML, Hanson MR, Mulligan RM (2017). A protein with an unusually short PPR domain, MEF8, affects editing at over 60 *Arabidopsis* mitochondrial C targets of RNA editing. *Plant J* **92**, 638–649.
- Ding YH, Liu NY, Tang ZS, Liu J, Yang WC (2006). *Arabidopsis* GLUTAMINE-RICH PROTEIN23 is essential for early embryogenesis and encodes a novel nuclear PPR motif protein that interacts with RNA polymerase II subunit III. *Plant Cell* **18**, 815–830.
- Fey J, Weil JH, Tomita K, Cosset A, Dietrich A, Small I, Maréchal-Drouard L (2002). Role of editing in plant mitochondrial transfer RNAs. *Gene* **286**, 21–24.
- Guillaumot D, Lopez-Obando M, Baudry K, Avon A, Rigai G, de Longevialle AF, Broche B, Takenaka M, Berthomé R, De Jaeger G, Delannoy E, Lurin C (2017).

- Two interacting PPR proteins are major *Arabidopsis* editing factors in plastid and mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, 8877–8882.
- Hayes ML, Santibanez PI** (2020). A plant pentatricopeptide repeat protein with a DYW-deaminase domain is sufficient for catalyzing C-to-U RNA editing *in vitro*. *J Biol Chem* **295**, 3497–3505.
- He ZS, Zhu AD, Yang JB, Fan WS, Li DZ** (2021). Organelle genomes and transcriptomes of *Nymphaea* reveal the interplay between intron splicing and RNA editing. *Int J Mol Sci* **22**, 9842.
- Huang J, Lu G, Liu L, Raihan MS, Xu JT, Jian LM, Zhao LX, Tran TM, Zhang QH, Liu J, Li WQ, Wei CX, Braun DM, Li Q, Fernie AR, Jackson D, Yan JB** (2020). The kernel size-related quantitative trait locus *qKW9* encodes a pentatricopeptide repeat protein that affects photosynthesis and grain filling. *Plant Physiol* **183**, 1696–1709.
- Kadowaki KI, Ozawa K, Kazama S, Kubo N, Akihama T** (1995). Creation of an initiation codon by RNA editing in the *coxI* transcript from tomato mitochondria. *Curr Genet* **28**, 415–422.
- Kotera E, Tasaka M, Shikanai T** (2005). A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* **433**, 326–330.
- Lesch E, Schilling MT, Brenner S, Yang YY, Gruss OJ, Knoop V, Schallenberg-Rüdinger M** (2022). Plant mitochondrial RNA editing factors can perform targeted C-to-U editing of nuclear transcripts in human cells. *Nucleic Acids Res* **50**, 9966–9983.
- Li XJ, Zhang YF, Hou MM, Sun F, Shen Y, Xiu ZH, Wang XM, Chen ZL, Sun SSM, Small I, Tan BC** (2014). *Small kernel 1* encodes a pentatricopeptide repeat protein required for mitochondrial *nad7* transcript editing and seed development in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). *Plant J* **79**, 797–809.
- Liu R, Cao SK, Sayyed A, Yang HH, Zhao J, Wang XM, Jia RX, Sun F, Tan BC** (2020). The DYW-subgroup pentatricopeptide repeat protein PPR27 interacts with ZmMORF1 to facilitate mitochondrial RNA editing and seed development in maize. *J Exp Bot* **71**, 5495–5505.
- Liu XY, Jiang RC, Wang Y, Tang JJ, Sun F, Yang YZ, Tan BC** (2021). ZmPPR26, a DYW-type pentatricopeptide repeat protein, is required for C-to-U RNA editing at *AtpA*-1148 in maize chloroplasts. *J Exp Bot* **72**, 4809–4821.
- Liu YJ, Xiu ZH, Meeley R, Tan BC** (2013). *Empty pericarp5* encodes a pentatricopeptide repeat protein that is required for mitochondrial RNA editing and seed development in maize. *Plant Cell* **25**, 868–883.
- Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruy  re C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconnat L, Small I** (2004). Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**, 2089–2103.
- Ma YL, Chen HY, Wang JG, Yu JN** (2011). Analysis of editing sites for chloroplast *ndhF* in *Ginkgo biloba* and the editing efficiency at C290 in response to different stresses. *Chin Bull Bot* **46**, 1–10. (in Chinese)
- 马艳莉, 陈海燕, 王继刚, 俞嘉宁 (2011). 银杏叶绿体 *ndhF* RNA编辑现象分析及C290位编辑对胁迫处理的响应. 植物学报 **46**, 1–10.
- McDowell R, Small I, Bond CS** (2022). Synthetic PPR proteins as tools for sequence-specific targeting of RNA. *Methods* **208**, 19–26.
- Miyata Y, Sugita M** (2004). Tissue- and stage-specific RNA editing of *rps14* transcripts in moss (*Physcomitrella patens*) chloroplasts. *J Plant Physiol* **161**, 113–115.
- Mower JP, Palmer JD** (2006). Patterns of partial RNA editing in mitochondrial genes of *Beta vulgaris*. *Mol Genet Genomics* **276**, 285–293.
- 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.
- Notsu Y, Masood S, Nishikawa T, Kubo N, Akiduki G, Nakazono M, Hirai A, Kadowaki K** (2002). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol Genet Genomics* **268**, 434–445.
- Okuda K, Nakamura T, Sugita M, Shimizu T, Shikanai T** (2006). A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. *J Biol Chem* **281**, 37661–37667.
- Oldenkott B, Yang YY, Lesch E, Knoop V, Schallenberg-Rüdinger M** (2019). Plant-type pentatricopeptide repeat proteins with a DYW domain drive C-to-U RNA editing in *Escherichia coli*. *Commun Biol* **2**, 85.
- O’toole N, Hattori M, Andres C, Iida K, Lurin C, Schmitz-Linneweber C, Sugita M, Small I** (2008). On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol Biol Evol* **25**, 1120–1128.
- Royan S, Gutmann B, des Francs-Small CC, Honkanen**

- S, Schmidberger J, Soet A, Sun YK, Sanglard LVP, Bond CS, Small I** (2021). A synthetic RNA editing factor edits its target site in chloroplasts and bacteria. *Commun Biol* **4**, 545.
- Rüdinger M, Funk HT, Rensing SA, Maier UG, Knoop V** (2009). RNA editing: only eleven sites are present in the *Physcomitrella patens* mitochondrial transcriptome and a universal nomenclature proposal. *Mol Genet Genomics* **281**, 473–481.
- Sandoval R, Boyd RD, Kiszter AN, Mirzakhanyan Y, Santibañez P, Gershon PD, Hayes ML** (2019). Stable native RIP9 complexes associate with C-to-U RNA editing activity, PPRs, RIPs, OZ1, ORRM1 and ISE2. *Plant J* **99**, 1116–1126.
- Shen C, Xu H, Huang WZ, Zhao Q, Zhu RL** (2024). Is RNA editing truly absent in the complex thalloid liverworts (Marchantiopsida)? Evidence of extensive RNA editing from *Cyathodium cavernarum*. *New Phytol* **242**, 2817–2831.
- Small ID, Peeters N** (2000). The PPR motif—a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* **25**, 45–47.
- Small ID, Schallenberg-Rüdinger M, Takenaka M, Mireau H, Ostersetzer-Biran O** (2020). Plant organellar RNA editing: what 30 years of research has revealed. *Plant J* **101**, 1040–1056.
- Sosso D, Mbelo S, Vernoud V, Gendrot G, Dedieu A, Chambrier P, Dauzat M, Heurtevin L, Guyon V, Takenaka M, Rogowsky PM** (2012). PPR2263, a DYW-subgroup pentatricopeptide repeat protein, is required for mitochondrial *nad5* and *cob* transcript editing, mitochondrion biogenesis, and maize growth. *Plant Cell* **24**, 676–691.
- Sun T, Bentolila S, Hanson MR** (2016). The unexpected diversity of plant organelle RNA editosomes. *Trends Plant Sci* **21**, 962–973.
- Takenaka M, Takenaka S, Barthel T, Frink B, Haag S, Verbitskiy D, Oldenkott B, Schallenberg-Rüdinger M, Feiler CG, Weiss MS, Palm GJ, Weber G** (2021). DYW domain structures imply an unusual regulation principle in plant organellar RNA editing catalysis. *Nat Catal* **4**, 510–522.
- Toma-Fukai S, Sawada Y, Maeda A, Shimizu H, Shikanai T, Takenaka M, Shimizu T** (2023). Structural insight into the activation of an *Arabidopsis* organellar C-to-U RNA editing enzyme by active site complementation. *Plant Cell* **35**, 1888–1900.
- Wang Y, Huang ZQ, Tian KD, Li H, Xu CH, Xia BYJ, Tan BC** (2024). Multiple factors interact in editing of PPR-E+-targeted sites in maize mitochondria and plastids. *Plant Commun* **5**, 100836.
- Wang Y, Li H, Huang ZQ, Ma B, Yang YZ, Xiu ZH, Wang L, Tan BC** (2023). Maize PPR-E proteins mediate RNA C-to-U editing in mitochondria by recruiting the transdeaminase PCW1. *Plant Cell* **35**, 529–551.
- Wang Y, Liu XY, Huang ZQ, Li YY, Yang YZ, Sayyed A, Sun F, Gu ZQ, Wang XM, Tan BC** (2021). PPR-DYW protein EMP17 is required for mitochondrial RNA editing, complex III biogenesis, and seed development in maize. *Front Plant Sci* **12**, 693272.
- Wang Y, Liu XY, Yang YZ, Huang J, Sun F, Lin JS, Gu ZQ, Sayyed A, Xu CH, Tan BC** (2019). *Empty Pericarp21* encodes a novel PPR-DYW protein that is required for mitochondrial RNA editing at multiple sites, complexes I and V biogenesis, and seed development in maize. *PLoS Genet* **15**, e1008305.
- Wei KF, Han P** (2016). Pentatricopeptide repeat proteins in maize. *Mol Breeding* **36**, 170.
- Xu CH, Song S, Yang YZ, Lu F, Zhang MD, Sun F, Jia RX, Song RL, Tan BC** (2020). DEK46 performs C-to-U editing of a specific site in mitochondrial *nad7* introns that is critical for intron splicing and seed development in maize. *Plant J* **103**, 1767–1782.
- Yan JJ, Zhang QX, Guan ZY, Wang Q, Li L, Ruan FY, Lin RC, Zou TT, Yin P** (2017). MORF9 increases the RNA-binding activity of PLS-type pentatricopeptide repeat protein in plastid RNA editing. *Nat Plants* **3**, 17037.
- Yang DL, Cao SK, Yang HH, Liu R, Sun F, Wang L, Wang MD, Tan BC** (2022a). DEK48 is required for RNA editing at multiple mitochondrial sites and seed development in maize. *Int J Mol Sci* **23**, 3064.
- Yang YZ, Liu XY, Tang JJ, Wang Y, Xu CH, Tan BC** (2022b). GRP23 plays a core role in E-type editosomes via interacting with MORFs and atypical PPR-DYWs in *Arabidopsis* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **119**, e2210978119.
- Yin P, Li QX, Yan CY, Liu Y, Liu JJ, Yu F, Wang Z, Long JF, He JH, Wang HW, Wang JW, Zhu JK, Shi YG, Yan NE** (2013). Structural basis for the modular recognition of single-stranded RNA by PPR proteins. *Nature* **504**, 168–171.
- Yu W, Schuster W** (1995). Evidence for a site-specific cytidine deamination reaction involved in C to U RNA editing of plant mitochondria. *J Biol Chem* **270**, 18227–18233.
- Yuan H, Liu D** (2012). Functional disruption of the pentatricopeptide protein SLG1 affects mitochondrial RNA edi-

ting, plant development, and responses to abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant J* **70**, 432–444.

Zang J, Zhang TF, Zhang ZG, Liu J, Chen HB (2024). DEFECTIVE KERNEL 56 functions in mitochondrial RNA editing and maize seed development. *Plant Physiol* **194**,

1593–1610.

Zehrmann A, van der Merwe J, Verbitskiy D, Härtel B, Brennicke A, Takenaka M (2012). The DYW-class PPR protein MEF7 is required for RNA editing at four sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *RNA Biol* **9**, 155–161.

Research Advance of PPR Proteins Involved in the Mechanism of Organelle RNA C→U Editing

Xiaolin Yu, Xiya Li, Bingyujie Xia, Hao Li, Baocai Tan, Yong Wang*

Key Laboratory of Plant Development and Environmental Adaptation Biology, Ministry of Education, School of Life Sciences, Shandong University, Qingdao 266237, China

Abstract Mitochondria and chloroplasts are semi-autonomous organelles harboring their own genomes. RNA editing is essential for the correct expression of organelle genes. The mostly identified RNA editing is cytidine (C)-to-uridine (U). Multiple editing factors have been reported to be involved in RNA C→U editing. The PPR-motifs array in PPR proteins specifically target editing sites, and the DYW domains in PPR-DYW proteins catalyze the deaminase in the C→U editing. This paper aims to review the recent advance of PPR proteins involved in RNA C→U editing, and to discuss the potential application value of synthetic PPR editing factors.

Key words PPR proteins, RNA C→U editing, mitochondria, chloroplasts

Yu XL, Li XY, Xia BYJ, Li H, Tan BC, Wang Y (2024). Research advance of PPR proteins involved in the mechanism of organelle RNA C→U editing. *Chin Bull Bot* **59**, 903–911.

* Author for correspondence. E-mail: wangy07@sdu.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)

附表 1 高等植物中参与 RNA C→U 编辑的 PPR 基因突变体表型

Appendix table 1 The mutant phenotype of PPR genes involved in the RNA C→U editing in higher plants

<https://www.chinbullbotany.com/fileup/1674-3466/PDF/24-085-1.pdf>

通讯作者/团队简介

王勇, 博士, 副研究员, 硕士生导师。其研究团队主要从事玉米种子发育关键基因克隆、功能解析和RNA加工机制研究, 系统解析了多个基因的功能, 并明确了这些基因参与细胞器RNA加工以及玉米种子发育的分子机制。相关成果以第一作者身份发表在*Plant Cell*、*Plant Commun*、*PLoS Genet*、*Plant J*和*Front Plant Sci*等学术期刊; 以合作者身份在*Nat Commun*、*Proc Natl Acad Sci USA*、*New Phytol*、*Plant Physiol*、*J Integr Plant Biol*和*J Exp Bot*等国际主流学术期刊发表论文10余篇。主持国家自然科学基金等项目多项。