

3.24 KAZUYOSHI KITAZAKI, YUTA NOMOTO, AKIHIRO AOSHIMA, TETSUO MIKAMI, TOMOHIKO KUBO

Hokkaido University, N-9 W-9, Kita-Ku, Sapporo, Hokkaido, Japan - 060-8589

Original language: English

A MITOCHONDRIAL GENE INVOLVED IN CYTOCHROME C MATURATION (CCMC) IS EXPRESSED AS A PRECURSOR WITH A LONG NH₂-TERMINAL EXTENSION IN SUGAR BEET

ABSTRACT

Extensive genome rearrangement is one of the major mechanisms of angiosperm mitochondrial evolution. As a consequence of this process, fragmented genes and chimeric ORFs have been created as by-products. For example, sugar beet *ccmC*, which plays an important role in cytochrome c maturation, harbors a unique extended NH₂ terminal region of 277 amino acid residues (N-extension) instead of a conserved translational initiation codon. We analyzed the mechanism to yield a functional polypeptide from sugar beet *ccmC*.

Expression analysis by Northern blotting with a *ccmC*-homologous region derived probe showed two major transcripts of 2.2 and 1.1kb in length. The 5'-termini of two major RNA species was determined by primer extension analysis, which revealed that the larger transcript covered the entire N-extension. Nucleotide sequencing of the cDNA revealed that two C-to-U RNA editing events occurred in the N-extension and 29 in the *ccmC*-homologous region. All the editing events do not disrupt the ORF but improve the homology of the putative translation product to the other plant *ccmC*. Western blotting analysis using anti-CCMC antiserum showed the 29.5 kDa signal band, which is shared by sugar beet and radish. Therefore, it is likely that 29.5 kDa polypeptide is mature CCMC protein. Two additional larger signal bands 34.2, and 56.1 kDa were detected on the blot of sugar beet. The largest signal band is also detected by anti-N-extension antiserum. One of the possibilities to yield the 29.5 kDa protein is that the 56.1 kDa protein is proteolytically processed into smaller protein.

UN GÈNE MITOCHONDRIEN ASSOCIÉ DANS LA MATURATION DU CYTOCHROME C (CCMC) EST EXPRIMÉ COMME UN PRÉCURSEUR AVEC UNE LONGUE EXTENSION TERMINALE NH₂ CHEZ LA BETTERAVE À SUCRE

RÉSUMÉ

Le profond réarrangement du génome est un des mécanismes majeurs de l'évolution mitochondriale des angiospermes. En conséquence de cette évolution, des gènes fragmentés et des ORF chimériques ont été créés en tant que sous-produits. Par exemple, la betterave sucrière *ccmC*, qui joue un rôle important dans la maturation c des cytochromes, arbore une unique région terminale allongée unique NH₂ de 277 résidus d'acides aminés (extension-N)

au lieu d'une initiation translationnelle conservée des codons. Nous avons analysé les mécanismes pour produire un polypeptide fonctionnel de betteraves sucrières ccmC.

L'analyse expressionnelle de gel septentrional avec des régions homologues ccmC à l'aide de sondes a montré deux transcriptions majeures de 2.2 et 1.1kb en longueur. Le terminus de 5' de deux espèces d'ARN a été déterminé par une analyse étendue, qui a révélé que la plus grande transcription couvrait entièrement l'extension N. La séquence nucléotidique de l'ADNc a révélé que deux modifications d'ARN de C à U ont eu lieu dans l'extension Net 29 dans la région ccmC-homologues. Ces modifications ne perturbent pas l'ORF améliorent l'homologie du produit de la traduction putative vers l'autre plante ccmC. L'analyse du transfert de protéines utilisant le sérum anti-CCMC ont montré une bande de signal de 29.5 kDa, partagée par la betterave sucrière et le radis. De plus, il est probable que le polypeptide 29.5 kDa est une protéine CCMC mature. Deux bandes de signal supplémentaires, plus larges, de 34.2, et 56.1 kDa ont été détectés sur le gel de la betterave sucrière. Le signal le plus large est également détecté par l'anti-sérum anti extension N antiserum. Une des possibilités pour produire une protéine de 29.5 kDa est que la protéine 56.1 kDa est protéolytiquement découpée en de plus petits protéines.

EIN MITOCHONDRIALES GEN DER CYTOCHROM C REIFUNG (CCMC) WIRD IN ZUCKERRÜBEN ALS VORSTUFE MIT EINER LANGEN TERMINALEN NH₂-EXTENSION EXPRIMIERT

KURZFASSUNG

Extensive Genom-Reorganisation ist einer der Hauptmechanismen der mitochondrialen Evolution von Bedecktsamern. Als Folge dieses Prozesses wurden fragmentierte Gene und chimerische OLR (ORF) als Nebenprodukte erzeugt. Beispielsweise enthält Zuckerrüben ccmC, welches eine wichtige Rolle bei der cytochromen c Reifung spielt, einen einzigartigen NH₂ Abschlussbereich von 277 Aminosäureresten anstatt eines konservierten translatoren Startcodons (N Extension). Wir analysierten den Mechanismus um ein funktionales Polypeptid aus Zuckerrüben ccmC zu gewinnen. Genexpressionsanalyse durch Northern Blotting mit einer Probe aus einem ccmC homologen Bereich zeigte zwei Haupttranskripte von 2.2 und 1.1 kb Länge. Das 5'-Ende zweier Haupt RNA Sorten wurde durch Primer Extension Analyse bestimmt, welche den Aufschluss gab, dass das längere Transkript die gesamte N Extension abdeckte. Nukleotide Sequenzierung der cDNA gab zu erkennen, dass sich zwei C to R RNA Editierungsvorgänge in der N Extension und 29 im ccmC homologen Bereich ereigneten. Alle Editierungsvorgänge trennen nicht die ORF sondern verbessern die Homologie des putativen Translationprodukts mit der ccmC der anderen Pflanze. Western blotting Analyse unter Verwendung von anti-CCMC Antiserum zeigte ein 29.5 kDa Signalbande, welches sowohl die Zuckerrübe als auch der Rettich besitzen. Daher ist es wahrscheinlich dass das 29.5 kDa Polypeptid matures CCMC Protein ist. Es wurden zwei zusätzliche Signalbanden von 34.2 und 56.1 kDa beim Blotting von Zuckerrüben entdeckt. Die größte Signalbande wurde auch vom anti N Extension Antiserum aufgespürt. Eine Möglichkeit das 29.5 kDa Protein zu gewinnen ist die proteolytische Verarbeitung des 56.1 kDa Proteins in ein kleineres Protein.