

Cloning and functional characterization of key enzymes in octadecanoid pathway of *Physcomitrella patens*

(ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* 中のオクタデカノイド経路主要
酵素のクローニングと機能特性)

学位論文内容の要旨

Jasmonic acid (JA), which is a well-known plant hormone involved in defense signaling and developmental regulation processes in plants. It is a ubiquitously occurring lipid-derived octadecanoid identified first in *Jasminum grandiflorum* oil. JA is biosynthesized by octadecanoid pathway started with free polyunsaturated fatty acids mainly α -linolenic acid. It is then oxygenated into 13-hydroperoxy octadecatrienoic acid (13-HPOT) by 13-lipoxygenase (13-LOX) and the 13-HPOT is converted into unstable allene oxide (12,13-EOT) by allene oxide synthase (AOS) followed by the conversion into (9*S*,13*S*)-12-oxo-phytodienoic acid (12-OPDA) by allene oxide cyclase. 12-OPDA is reduced into 3-oxo-2-(2'-(*Z*)-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic acid (OPC-8:0) by 12-oxo-phytodienoic acid reductase 3 (OPR3). After the three steps of β -oxidation, OPC-8:0 is converted into (+)-7-*iso*-JA, which is simultaneously converted into more stable (-)-JA. The overall JA signaling pathway in vascular plants has already been well elaborated. However, a little information is available about the JA biosynthesis and its functions in bryophytes which consist with liverworts, hornworts and mosses. The moss *Physcomitrella patens* became the first model bryophyte since recent completion of its genome sequencing. In contrast to flowering plants, *P. patens* is consisting with substantial amount of C-20 fatty acids and utilized predominantly for its oxylipins biosynthesis. Because of these interesting features of its oxylipin profile and key evolutionary position between green algae and flowering plants, the present study was started with the objective of tracing the putative octadecanoid pathway of *P. patens*.

Two putative AOS sequences were identified in *P. patens* genome and heterologously overexpressed in *E. coli*. Only one PpAOS recombinant protein was purified in soluble form and analyzed the activity by reacting with 13-HOPT. The products were analyzed

by GC-MS and the presence of α -ketol and racemic 12-OPDA were confirmed. The optimal pH for PpAOS1 activity was determined to be pH 6.0. PpAOS was reacted with 13-HPOT and 9-HPOT to determine the substrate specificity. Similar to the flowering plant 13-AOSs, PpAOS showed substrate specificity to 13-HPOT over 9-HPOT. Enzyme kinetic analysis of PpAOS1 was performed with 13-HPOT and 9-HPOT as substrates. PpAOS exhibited higher V_{max} value for 13(S)-HPOT over 9(S)-HPOT, indicating that PpAOS is specific for 13(S)-HPOT. Six putative OPR genes were identified in *P. patens* genome and designated to be *PpOPR1*, *PpOPR2*, *PpOPR3*, *PpOPR4*, *PpOPR5* and *PpOPR6*. Amino acid alignment analysis indicated that PpOPR3 was the only possible candidate involved in JA biosynthesis. PpOPR1, which represent sub.group I, and PpOPR3, which represents sub.group II, were successfully overexpressed in *E. coli*. For the functional characterization, recombinant proteins were reacted separately with 13-HPOT in the presence of recombinant PpAOS1 and 1mM NADPH. The products were analyzed by GC-MS. PpOPR1 preferentially reduced (-)-*cis*-OPDA into (-)-*cis*-OPC-8:0. Interestingly, PpOPR3 also showed substrate specificity to (-)-*cis*-OPDA over (+)-*cis*-OPDA, which is not a precursor of JA. At higher concentrations, both proteins tend to reduce both (+)- and (-)-*cis*-OPDA into corresponding OPC-8:0 isomers. Moreover, semi-quantitative RT-PCR analysis exhibited that only *PpOPR3* up-regulated by dehydration stress.

These results suggest that *P. patens* can not metabolize (+)-*cis*-OPDA further, resulting no JA or its conjugates and this leads to suggest that JA signaling pathway might have evolved after the divergence of bryophytes and other land plants from their common ancestor. In *P. patens*, (+)-*cis*-OPDA itself or its derivatives might function as signaling molecules instead of jasmonate. But the conflicting reports on presence and absence of JA in *P. patens* have been reported. Moreover, JA in *P. patens* was detected in the present study as well. It is too early to rule out the presence of JA and its signaling pathway in *P. patens* since all the homologs of JA biosynthetic and signaling pathways are available in *P. patens*. Moreover, at higher concentration, PpOPR1 and PpOPR3 reduce (+)-*cis*-OPDA into (+)-*cis*-OPC-8:0, which is the precursor of JA. Due to this ambiguity, further studies are needed to check whether *P. patens* produce JA at very special environmental conditions or specific growth stages.

学位論文審査の要旨

主査	特任教授	鍋田憲助
副査	教授	橋床泰之
副査	准教授	松浦英幸
副査	助教	高橋公咲

学位論文題名

Cloning and functional characterization of key enzymes in octadecanoid pathway of *Physcomitrella patens*

(ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* 中のオクタデカノイド経路主要
酵素のクローニングと機能特性)

本論文は、図 29, 表 1, 引用文献 102 を含み、3部からなる総ページ 94 の英文論文である。別に参考論文 2 編が添えられている。

ジャスモン酸 (JA) は顕花植物においては防御信号の伝達、あるいは成長や発達調節に働く植物ホルモンである。JA は顕花植物においては、 α -リノレン酸を出発物質とし、オクタデカノイド経路を経て生合成される。 α -リノレン酸はリポキシゲナーゼ (LOX) により 13-(S)-hydroperoxyoctadecatrienoic acid (13-HPOT) に酸化される。更に、13-HPOT はアレンオキシド合成酵素 (AOS)、アレンオキシド環化酵素 (AOC) 及び 12-オキソフィトジエン酸還元酵素 (OPR) の連続した酵素の作用により allene oxide (12, 13-ECOT)、(9S, 13S)-12-oxo-phytodienoic acid (12-OPDA) を経て、3-oxo-2-(2'-(Z)-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic acid (OPC-8:0) に転換される。OPC-8:0 は更に三回の β -酸化を経て活性型 JA である (+)-7-iso-JA に生合成される。本研究は高等植物でシグナル伝達機構として重要な役割を果たしている JA 生合成系の蘚苔類における存在を証明し、陸上植物における JA 合成の系統発生研究に手がかりを得ることを目的に研究を行った。

本研究に用いられたヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) は全塩基配列が決定されており、その遺伝子解析により、塩基配列上に AOS、AOC 並びに OPR がコードされていることが推定された。これら酵素遺伝子をクローニングし、過剰発現した組換え酵素の反応選択性を解明することにより *P. patens* での JA 生合成系の存在を明らかにした。

1. PpAOS のクローニングと機能解析

ヒメツリガネゴケのゲノム上に二個の AOS 配列の存在が推測された。二種の AOS 遺伝子をクローニングし、*E. coli* 中で過剰発現させた。そのうち一種 (PpAOS1) を可溶性の組換え PpAOS タンパクとして精製し、13-HOPT と反応させた。反応生成物を GC-MS 分析した結果、 α -ketol と共にラセミ体 12-OPDA を同定し、AOS 活性を確認した。なお、本酵素 (至適 pH、6.0) の 13-HPOT 及び 9-HPOT との反応速度を比較した結果、13-HPOT ($V_{max} 21.4 \pm 3.8 \mu\text{mols}^{-1}\text{mg}^{-1}$) の反応速度が 9-HPOT ($V_{max} 0.83 \pm 0.05 \mu\text{mols}^{-1}\text{mg}^{-1}$) よりずっと高いことが証明された。この基質選択性は顕花植物の JA 生合成に介在する AOS の選択性と一致する。

2. PPOPR のクローニングと機能解析

ゲノム上に 6 個の OPR 遺伝子 (*PpOPR1*, *PpOPR2*, *PpOPR3*, *PpOPR4*, *PpOPR5* 及び *PpOPR6*) の存在を推定した。アミノ酸をアライメント解析した結果、*PpOPR3* のみが JA 生合成に関わる II 型酵素と推定された。この II 型 OPR は (+)-及び (-)-*cis*-OPDA をともに相当する OPC-8:0 に還元することから、JA 合成の中間体である (+)-*cis*-OPC-8:0 の合成に関与すると考えられた。一方、I 型 OPR は (-)-*cis*-OPDA を選択的に還元することから JA 生合成に関わらない。6 種の OPR のうち *PpOPR1* (I 型還元酵素) 及び *PpOPR3* をクローニングし、*E. coli* 中で過剰発現させた。組換え PpOPR を PpAOS1 と 1mM NADH の共存下で基質 13-HPOT と反応させ結果、精製した *PpOPR1* では (-)-*cis*-OPC-8:0 の選択的な生成を確認した。*PpOPR3* は、*PpOPR1* に比較して (+)-*cis*-OPC-8:0 を著量生成するが、(-)-体の生成が優勢であった。精製が不十分なため、*E. coli* 由来の還元酵素活性による (-)-*cis*-OPC 生成の影響を取り除くことができず、反応選択性からの II 型の確認に至らなかった。なお、*PpOPR3* は乾燥ストレスで著量増加した。

以上組換え PpAOS1 の基質選択性、*PpOPR3* による (+)-*cis*-OPC-8:0 生成の確認、並びに本学生が第四著者として研究に携わった組換え PpAOC による 12, 13-EOT からの (+)-*cis*-OPDA の選択的生成等の酵素反応を繋ぎ合わせると、顕花植物と同一の JA 生成系が蘚苔類に存在する可能性は極めて高い。今後、蘚苔類における JA の生理的機能を解析することにより、JA 経路の植物界における進化の過程が明らかにされるものと期待される。

よって審査員一同は、Sarathchandra Senarath Bandara が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。