HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Jasmonates in the model lycophyte Selaginella moellendorffii : biosynthesis, metabolism, and functions [an abstract of entire text]
Author(s)	PRATIWI, PUTRI
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12876号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67758
Type	doctoral thesis
File Information	Putri_Pratiwi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文題名

Jasmonates in the model lycophyte *Selaginella moellendorffii*: biosynthesis, metabolism, and functions

（イヌカタヒバにおけるジャスモン酸類の同定および機能解析）

北海道大学大学院農学院　Putri Pratiwi

1.　序論

植物ホルモンの 1 種であるジャスモン酸（JA）は、植物のストレス応答、老化促進および形態形成等に関与している。JA 生合成経路（図 1）および JA シグナル伝達経路が解明され、その主要なシグナル分子は JA とイソロイシンの縮合体（JA-Ile）であることが判明した。これらの研究成果は、主に種子植物を用いた研究から明らかにされた。[1] その一方で、最初の陸上植物であるコケ植物は、JA を生産せず JA 中間体の 1 種である 12-オキソファイトジエン酸（OPDA）がシグナル分子として機能している。[2,3] しかし、植物進化の過程において JA がシグナル分子として生合成されるようになった時期は不明であった。本研究は、植物の進化においてコケ植物と種子植物の中間に位置する小葉類のモデル植物であるイヌカタヒバ（*Selaginella moellendorffii*）[4]の JA 類の内生量の分析、生合成および生物活性を調べ、植物が JA の生合成および JA シグナル伝達経路を獲得した時期を明らかにすることを目的として行った。[5]

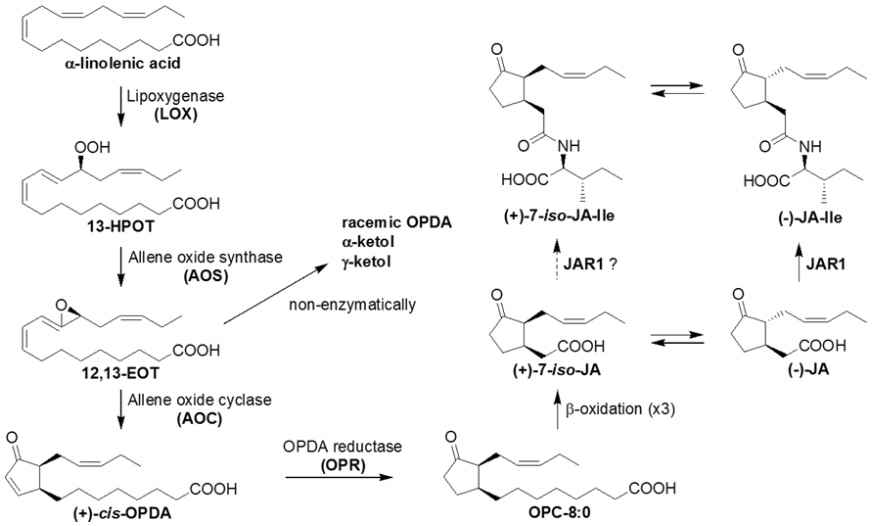


図 1．JA および JA-Ile の生合成経路.

2. イヌカタヒバにおける OPDA、JA および JA-Ile の分析

2-1.　目的

イヌカタヒバが OPDA、JA および JA-Ile を生産するのか否かを確認することを目的とし

た。

2-2. 方法

イヌカタヒバを 80%メタノールで抽出し減圧濃縮した。得られた抽出液は固相抽出した後、ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer （UPLC-MS/MS）で分析した。[5)]

2-3. 結果

UPLC-MS/MS 分析の結果、イヌカヒバにおいても JA および JA-Ile が検出され、植物が小葉類に進化することで両化合物が生合成されるようになったことが推測された。また、種子植物と同様にイヌカタヒバにおいても傷害ストレスが OPDA、JA および JA-Ile の内生量を増加させていた。

3. JA 生合成酵素の解析

3-1. 目的

リポキシゲナーゼ（LOX）、アレンオキシドシンターゼ（AOS）、アレンオキシドシクラーゼ（AOC）および OPDA レダクターゼ（OPR）は、重要な JA 生合成酵素である．これらの酵素活性は，種子植物において詳細に調べられている。[1)] イヌカタヒバにおいても種子植物と同様の生合成経路により JA が生産されているのか明らかにすることを目的とし、これらの酵素活性を調べた。

3-2. アレンオキシドシンターゼ（AOS）

3-2-1. 目的

イヌカタヒバのアレンオキシドシンターゼの組換えタンパク質を作製し、その酵素活性の確認を目的とした。

3-2-2. 方法

シロイヌナズナの *AtAOS* 遺伝子を用いてイヌカタヒバゲノム中の *AOS* 相同性遺伝子をデータベースで検索した（Phytzome 12; https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/port）。その結果、3 種の *AOS* 遺伝子（*SmAOS1*、*SmAOS2* および *SmAOS3*）が見出された。その中の一種 *SmAOS2* の配列をもとにプライマーを設計し、定法に従って PCR を行った。得られた PCR 産物を組換えタンパク質作成用のベクターに挿入し、大腸菌に形質転換させた。本大腸菌を培養し、得られた菌体を抽出バッファーに懸濁し、超音波破砕することでタンパク質抽出液が得られた。本タンパク質抽出液をアフィニティークロマトグラフィーで精製することで組換え

SmAOS2 タンパク質が得られた。SmAOS2 酵素反応液 を 25℃で 1 時間反応させ、反応生成物をキラル gas chromatography mass sepctrometer（GC-MS）により分析した。[5)]

3-2-3. 結果

ゲノムデータベース解析の結果、イヌカタヒバゲノム中には3種の*AOS*遺伝子（*SmAOS1*、*SmAOS2* および *SmAOS3*）がコードされていることが判明した。それらをクローニングし、大腸菌を用いて組換えタンパク質の作製を試みた。その結果、SmAOS2 のみが組換えタンパク質として作製することに成功した。

AOS は、13-HPOT を 12,13-epoxyoctadecatrienoic acid（12,13-EOT）に変換する（図１）。12,13-EOT は非常に不安定であり、生成後すぐに非酵素的にα-ketol、γ-ketol および(±)-*cis*-OPDA に変換される。本研究では、SmAOS2 反応により得られる 12,13-EOT が(±)-*cis*-OPDA へ変換した後、アルカリ処理で *trans*-体とし、さらにメチル化した。得られたメチルエステルをキラル GC-MS で分析した結果、(±)-*trans*-OPDA のメチルエステルに由来する二つのピークが確認されたため、SmAOS2 は AOS 活性を有することが示された。

3-3. アレンオキシクラーゼ（AOC）

3-3-1. 目的

イヌカタヒバのアレンオキシドシクラーゼの組換えタンパク質を作製し、その酵素活性の確認を目的とした。

3-3-2. 方法

シロイヌナズナの *AtAOC1* 遺伝子を用いてイヌカタヒバゲノム中の *AOC* 相同性遺伝子をデータベース検索した（Phytzome 12; https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/port）。その結果、*SmAOC* 遺伝子が見出された。*SmAOC* 遺伝子をもとにプライマーを設計し定法に従って PCR を行った。得られた PCR 産物を組換えタンパク質作成用のベクターに挿入し、大腸菌に形質転換させた。本大腸菌を培養し、得られた菌体を抽出バッファーに懸濁し、超音波破砕することでタンパク質抽出液が得られた。本タンパク質抽出液をアフィニティークロマトグラフィーで精製することで組換え SmAOC タンパク質が得られた。SmAOC 酵素反応液を 25℃で 1 時間反応させた。得られた反応生成物は、キラル GC-MS により分析した。[5)]

3-3-3. 結果

ゲノムデータベース解析の結果、イヌカタヒバゲノム中に *AOC* 相同性遺伝子である *SmAOC* がコードされていることが判明した。本遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いた組換えタンパク質の作製に成功した。

AOC は、12,13-EOT を (+)-*cis*-OPDA へと変換する。しかし、12,13-EOT は非常に不安定

であり、12,13-EOT そのものを基質として反応液に添加することは出来ない。[1] そこで SmAOC 反応液中に 13-HPOT とヒメツリガネゴケ由来の PpAOS2 を添加することで、反応液中で基質である 12,13-EOT を産生させることとした。反応終了後、生成物はアルカリ処理により *trans*-体とし、さらにメチル化した後にキラル GC-MS で分析した。その結果、(+)-*trans*-OPDA のメチルエステルに由来するピークが確認された。その純度は 95%以上であった。この結果から、SmAOC は立体選択的に(+)-*cis*-OPDA を生産することが明らかとなり、AOC 活性を有することが示された。[5]

3-4. OPDA レダクターゼ（OPR）

3-4-1. 目的

イヌカタヒバの OPDA レダクターゼの組換えタンパク質を作製し、その酵素活性の確認を目的とした。

3-4-2. 方法

シロイヌナズナの *AtOPR3* 遺伝子を用いてイヌカタヒバゲノム中の *OPR3* 相同性遺伝子をデータベース検索した（Phytzome 12; https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/port）。その結果、*OPR3* 相同性遺伝子として *SmOPR5* 遺伝子が見出された。*SmOPR5* 遺伝子をもとにプライマーを設計し定法に従って PCR を行った。得られた PCR 産物を組換えタンパク質作成用のベクターに挿入し、大腸菌に形質転換させた。本大腸菌を培養し、得られた菌体を抽出バッファーに懸濁し、超音波破砕することでタンパク質抽出液が得られた。本タンパク質抽出液をアフィニティークロマトグラフィーで精製することで組換え SmOPR5 タンパク質が得られた。SmOPR5 反応液を 25℃で 1 時間反応させた。得られた反応生成物は、キラル GC-MS により分析した。[5]

3-4-3. 結果

OPR には、非天然型の (-)-*cis*-OPDA を (-)-*cis*-OPC-8:0 へと還元するⅠ型 OPR と、(±)-*cis*-OPDA を(±)-*cis*-OPC-8:0 へと還元するⅡ型 OPR がある。JA 生合成にはⅡ型 OPR が関与している。ゲノムデータベース解析の結果、イヌカタヒバゲノム中にⅡ型 OPR である *AtOPR3* と相同性の高い *SmOPR5* がコードされていることが判明した。本遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いた組換えタンパク質の作製に成功した。

SmOPR5 反応の生成物をアルカリ処理することで *trans*-体とし、さらにメチル化した後にキラル GC-MS で分析した。その結果、(±)-*trans*-OPC-8:0 のメチルエステルに由来するピークが確認された。本結果から、SmOPR5 は(±)-*cis*-OPDA を(±)-*cis*-OPC-8:0 へと還元するⅡ型 OPR があることが判明し、JA 生合成に関与することが明らかとなった。

4. JA-Ile シンターゼ（JAR1）の解析

4-1. 目的

JA シグナル伝達経路の主なシグナル分子は JA-Ile である。種子植物においては、JAR1 により JA と Ile が縮合され JA-Ile となる。[1] イヌカタヒバにも JAR1 が存在し、JA-Ile シンターゼとして機能しているのか明らかにすることを目的とした。

4-2. 方法

シロイヌナズナの *AtJAR1* 遺伝子を用いてイヌカタヒバゲノム中の *JAR1* 相同性遺伝子をデータベース検索した（Phytzome 12; https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/port）。その結果、*SmJAR1* が見出された。その中の一種 *SmJAR1* の配列をもとにプライマーを設計し、定法に従って PCR を行った。得られた PCR 産物を組換えタンパク質作成用のベクターに挿入し、大腸菌に形質転換させた。

本大腸菌を培養し、培養 5 時間後に JA（終濃度 1 mM）および IPTG（終濃度 0.2 mM）を添加した。添加後さらに 3 時間培養し、培養液を酢酸エチルで抽出し濃縮した。本抽出物を UPLC-MS/MS で分析した。[5]

4-3. 結果

ゲノムデータベース解析の結果、イヌカタヒバゲノム中には *SmJAR1* 遺伝子がコードされていることが判明した。本遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いた組換えタンパク質の作製を試みたが発現量が少なく精製が困難であった。そこで、SmJAR1 を発現した大腸菌に JA を添加し、培養液中で JA-Ile への変換を試みた。本培養液の酢酸抽出物を UPLC-MS/MS で分析した結果、JA-Ile のピークが確認された。従って、SmJAR1 は JA-Ile を生産することが明らかとなり、JAR1 活性を有していることが判明した。

5. 傷害ストレスおよび JA 処理による *SmAOC*、*SmOPR5* および *SmJAR1* 遺伝子の発現解析

5-1. 目的

種子植物においては、傷害ストレスおよび JA 処理により JA および JA-Ile 生合成遺伝子の発現が上昇する。[1] イヌカタヒバにおいても種子植物と同様に JA および JA-Ile 生合成遺伝子の発現が上昇するのか確認することを目的とした。

5-2. 方法

イヌカタヒバを傷害処理および JA 処理（100 μM）した後、10 分、20 分、30 分、60 分および 180 分後に植物体を回収した。定法により RNA を抽出し cDNA を得た後、qRT-PCR により *SmAOC*、*SmOPR5* および *SmJAR1* 遺伝子の発現量を解析した。[5]

5-3. 結果

傷害処理により *SmAOC* および *SmOPR5* は一過的に発現が上昇していた。その一方で、*SmJAR1* は傷害処理後 3 時間が経過した後に発現が上昇していた。また、JA 処理においても *SmAOC* および *SmOPR5* は一過的に発現していた。しかし、これらの遺伝子発現とは異なり *SmJAR1* は JA 処理により発現が抑制されていた。従って、イヌカタヒバにおいても種子植物と同様に傷害ストレスにより *SmAOC*、*SmOPR5* および *SmJAR1* の発現が誘導されることが明らかとなった。また、JA 処理による *SmAOC* および *SmOPR5* の発現誘導が確認されたため、JA 生合成の正のフィードバック制御機構の存在が明らかとなった。

6. OPDA、JA および JA-Ile のイヌカタヒバの生育に対する影響

6-1. 目的

OPDA、JA および JA-Ile の主要な生理作用の一つとして種子植物の生育阻害活性が挙げられる。[1] その一方でコケ植物においては、OPDA が生育阻害活性を示すものの、JA は生育阻害活性を示さない。[2,3] そこで、OPDA、JA および JA-Ile がイヌカタヒバの生育に対して与える影響を明らかにすることを目的とした。

6-2. 方法

イヌカタヒバの bulbil を Jiffy-7（サカタのタネ）に播き、2 日一度 25 μM、50 mM および 100 μM に調整した OPDA、JA および JA-Ile をスプレーした。その後、30 日後の地上部の長さを測定した。

6-3. 結果

種子植物と同様に OPDA、JA および JA-Ile はいずれもイヌカタヒバの生育を阻害した。

7. 考察

UPLC-MS/MS を用いてイヌカタヒバ中の OPDA、JA および JA-Ile の内生量を測定した。その結果、イヌカタヒバはいずれの化合物も生産し、傷害ストレスによりそれらの化合物の内生量が増加することが明らかとなった。コケ植物のモデル植物であるゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*）およびヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）は、JA および JA-Ile を生産しないことから、[2,3] 植物は、小葉類に進化することで JA および JA-Ile を生産するようになったことが推測された。

JA および JA-Ile の生合成には AOS、AOC、OPR および JAR1 の各酵素が深く関与している。イヌカタヒバにおいても、これらの 4 種の酵素が JA および JA-Ile の生合成に関与していることが判明した。本結果は、イヌカタヒバが OPDA、JA および JA-Ile を生産するという結果と良い一致を示した。従って、植物が進化の過程で小葉類になることにより、JA お

よび JA-Ile 生合成経路を獲得したことが推測された。

種子植物において、JA および JA-Ile は生育を阻害する。OPDA、JA および JA-Ile のイヌカタヒバの生育に与える影響を調べた。その結果、いずれの化合物も種子植物と同様にイヌカタヒバの生育を阻害した。また、*SmAOC* および *SmOPR5* の発現も JA 処理および傷害処理により誘導された。これらの結果から、JA および JA-Ile はイヌカタヒバにおいてもシグナル分子として機能していることが推定された。

JA は JA-Ile に変換され、COI1-JAZ シグナル伝達経路を介して多様な生理作用を示す。イヌカタヒバゲノム中にも COI1 タンパク質および JAZ タンパク質をコードする遺伝子が存在する。従って、イヌカタヒバにおいても COI1-JAZ シグナル伝達経路が機能し、JA シグナルが伝達されていることが予想された。

本研究により、JA および JA-Ile の生合成および JA シグナル伝達経路は、最初の維管束植物である小葉類において出現したことが推測された。従って、植物進化の過程で維管束の形成と JA の生合成およびシグナル伝達経路の獲得が関連している可能性が強く示唆された。

8. 参考論文

1) Wasternack, C., Hause, B. (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. *Ann Bot.* 111:1021-1058.

2) Yamamoto, Y., Ohshika, J., Takahashi, T., Ishizaki, K., Kohchi, T., Matusuura, H., et al. (2015) Functional analysis of allene oxide cyclase, MpAOC, in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry* 116: 48-56.

3) Ponce de León, I., Schmelz, E.A., Gaggero, C., Castro, A., Álvarez, A., Montesano, M. (2012) *Physcomitrella patens* activates reinforcement of the cell wall, programmed cell death and accumulation of evolutionary conserved defence signals, such as salicylic acid and 12-oxo-phytodienoic acid, but not jasmonic acid, upon *Botrytis cinerea* infection. *Mol Plant. Pathol.* 13: 960-974.

4) Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Gribskov, M., de Pamphilis, C. et al. (2011) The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332:960-963.

5) Pratiwi, P., Tanaka, G., Takahashi, T., Xie, X., Yoneyama, K., Matsuura, H., Takahashi, K. (2017) Identification of jasmonic acid and jasmonoyl-isoleucine and the

characterization of AOS, AOC, OPR and JAR1 in the model lycophyte *Selaginella moellendorffii*. *Plant Cell Physiol.* 58: 789–801.