

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究機関：2009~2011

課題番号：21580123

研究課題名（和文）コケ植物におけるジャスモン酸の生合成及び生理機能の解明

研究課題名（英文）The study of biosynthesis and functions of jasmonic acid in *Physcomitrella patens*.

研究代表者

高橋 公咲 (TAKAHASHI KOSAKU)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：30374622

研究成果の概要（和文）：

ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) におけるオクタデカノイド経路中（ジャスモン酸生合成）の各種酵素の活性を調べた。その結果、いずれの酵素も高等植物と同様の酵素活性が示された。ヒメツリガネゴケの生育においては、ジャスモン酸 (JA) がほとんど影響を与えなかったのに対して、その生合成中間体である 12-オキソファイトジエン酸 (OPDA) は生育を阻害した。オクタデカノイド経路に関わる酵素遺伝子の変異株を作製したが、それらの表現型は野生株と大きな差異は無かった。本研究の結果から、ヒメツリガネゴケでは JA ではなく OPDA が活性化化合物として機能していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The properties of the recombinant enzymes of the octadecanoid pathway in *Physcomitrella patens* were shown to have high similarity to those in higher plants. 12-oxophytodienoic acid, but not jasmonic acid, inhibited the growth of *P. patens*. The genes encoding enzymes of the octadecanoid pathway were attempted to be disrupted or overexpressed in *P. patens*. Any mutant of *P. patens* did not show distinguishable morphological change, respectively. This study suggests that OPDA is an important substance in *P. patens*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、生物生産化学・生物有機化学

キーワード：植物成長調節物質

1. 研究開始当初の背景

コケ植物は、植物進化の過程で維管束植物と藻類の中間に位置しており、植物の様々な生理機能の進化的変遷を解明するうえで重

要な植物である（図1）。本研究の開始前にモデル植物であるヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) のゲノム解析が終了し、高等植物の植物ホルモンであるジャス

モン酸の生合成酵素遺伝子の存在が予想された。オーキシシン、サイトカイニンおよびアブシジン酸はヒメツリガネゴケにおいても植物ホルモン様活性が確認されていたが、ジャスモン酸 (JA) 及びその類縁体のヒメツリガネゴケにおける生理作用に関する報告はほとんど無かった。

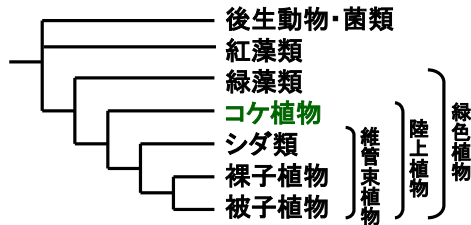


図 1. 植物の系統分類

2. 研究の目的

(1) ヒメツリガネゴケにおいてもオクタデカノイド経路 (ジャスモン酸生合成) が機能しているのかどうか明らかにする (図 2)。

(2) ジャスモン酸及びその類縁体がヒメツリガネゴケにおいてどのような作用を有しているのか確認する。

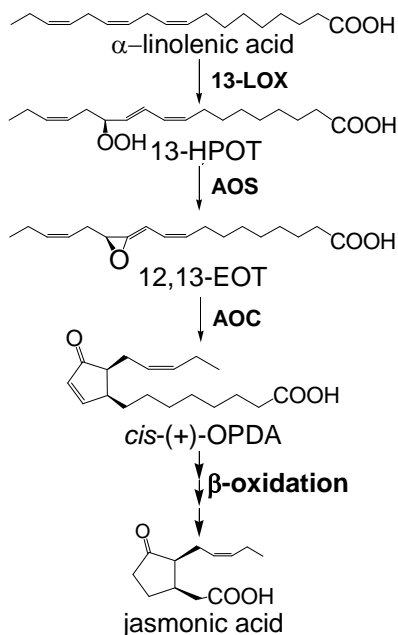


図 2. ジャスモン酸生合成経路

3. 研究の方法

(1) ヒメツリガネゴケのオクタデカノイド経路に関与するアレンオキシドシンターゼ (AOS) をコードする遺伝子 (*PpAOS1* 及び *PpAOS2*) をクローニングし、その組換えタンパク質を大腸菌で発現させ酵素学的諸性質を明らかにした。*PpAOS1* 及び *PpAOS2* の GFP

融合タンパク質を発現させて細胞内局在性を調べた。*PpAOS1* 及び *PpAOS2* 遺伝子破壊株を作製し、その表現型を調べた。

(2) ヒメツリガネゴケのアレンオキシドシンターゼ (AOC) をコードする遺伝子をクローニングし、その組換えタンパク質を用いて各 AOC 酵素反応の立体選択性を調べた。

(3) 12-オキソファイトジエン酸還元酵素 (OPR) をコードする遺伝子の中から、*PpOPR1*、*PpOPR3* 及び *PpOPR6* をクローニングし、これらの組換えタンパク質を作製し、その基質特異性を調べた。

(4) 高等植物では、JA 及び 12-オキソファイトジエン酸 (OPDA) 処理により生育が阻害されることが知られている。そこで、ヒメツリガネゴケに JA 及び OPDA を処理し、それらがヒメツリガネゴケの生育に与える影響を調べた。

(5) 高等植物では、傷害等の環境ストレスによりオクタデカノイド経路の酵素遺伝子発現が上昇することが知られている。そこで、傷害がヒメツリガネゴケの OPDA 量及び *PpAOS1* 遺伝子発現に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) ヒメツリガネゴケのアレンオキシドシンターゼ (AOS) の機能解析

ヒメツリガネゴケの 2 種の AOS 遺伝子 (*PpAOS1* 及び *PpAOS2*) をクローニングした。大腸菌を用いて *PpAOS1* の組換えタンパク質を作製し、その酵素学的性質を調べた。その結果、本酵素の至適 pH は pH6.0 であり、高等植物の AOS の至適 pH (7.0~8.0) とは異なることが明らかとなった。また、*PpAOS1* は 9-ヒドロペルオキシオクタデカトリエン酸 (9-HPOT) ではなく 13-ヒドロペルオキシオクタデカトリエン酸 (13-HPOT) を選択的に基質とし、AOC 反応の基質である 12,13-EOT を生成することが示された。*PpAOS1* と *PpAOS2* の C-末端側に GFP を融合させたタンパク質をヒメツリガネゴケで発現させ、その細胞内局在性を調べた。その結果、いずれも葉緑体に局在していることが明らかとなった。また、*PpAOS1* 欠損株及び *PpAOS2* 欠損株を作製し、内生 OPDA 量を測定した。いずれの欠損株も内生 OPDA 量が減少していたが、*PpAOS1* 欠損株の方が著しく OPDA 内生量が少なかった。従って、ヒメツリガネゴケでは *PpAOS1* が主に機能していることが判明した。*PpAOS1* 欠損株、*PpAOS2* 欠損株及び *PpAOS1* と *PpAOS2* の二重欠損株を作製し、その表現型を観察したが、いずれの欠損株も野生株と比較して大きな差異は見られなかった。これらの結果から、

ヒメツリガネゴケにおいても AOS タンパク質は葉緑体内においてオクタデカノイド経路内の酵素の一種として機能することが明らかにされた。

(2) ヒメツリガネゴケのアレンオキシドシクララーゼ (AOC) の機能解析

ヒメツリガネゴケの 3 種の AOC 遺伝子 (*PpAOC1*, *PpAOC2* 及び *PpAOC3*) をクローニングした。大腸菌を用いて、それぞれの組換えタンパク質を作製し、それらの酵素反応の立体選択性をキラル GC-MS で調べた。OPDA は二つの不斉炭素を有しているが、*PpAOC1*、*PpAOC2* 及び *PpAOC3* はいずれも天然型と同じ立体化学を有する OPDA を生成することが判明した。また、*PpAOC3* は *PpAOC1* 及び *PpAOC2* よりも遺伝子発現量が低かった。*PpAOC3* の GFP 融合タンパク質をヒメツリガネゴケで発現させたところ、本タンパク質は葉緑体内で発現していることが示された。*PpAOC1* 及び *PpAOC2* は葉緑体内で発現しているという報告もある。これらの結果を考慮すると、いずれも葉緑体に局在し、高等植物の AOC と同様の酵素活性を有することが明らかとなった。

(3) ヒメツリガネゴケの OPDA 還元酵素 (OPR) の機能解析

ヒメツリガネゴケには 7 種の OPR 遺伝子 (*PpOPR1*~*PpOPR7*) が存在した。それらの遺伝子配列から予想されたタンパク質のアミノ酸配列から、*PpOPR3* 及び *PpOPR6* が天然型の OPDA を還元できることが予想された。そこで、これらの遺伝子のクローニングを行った。その他の OPR 遺伝子の中では、遺伝子発現量が高かった *PpOPR1* のクローニングを行った。*PpOPR6* は、大腸菌では組換えタンパク質が得られなかったが無細胞タンパク質発現系を用いたところ、組換えタンパク質が得られた。本タンパク質は、天然型及び非天然型いずれの OPDA も対応する OPC-8:0 に還元した。従って、*PpOPR6* は II 型 OPR 活性を有する事が明らかとなった。*PpOPR1* は大腸菌により組換えタンパク質が得られた。本酵素は、非天然型の OPDA のみを還元することができ、アミノ酸配列から推定された I 型 OPR としての活性が示された。その一方で、*PpOPR3* は大腸菌及び無細胞タンパク質発現系いずれを用いても組換えタンパク質が得られなかった。II 型 OPR としての酵素活性が明らかとなった *PpOPR6* 過剰発現株を作製した。その結果、本過剰発現株の内生 OPDA 量は野生株に比べて減少しており、*in vivo* において *PpOPR6* が機能していることが示された。しかし、*PpOPR6* 過剰発現株の表現型は、野生株と大きな違いは認められなかった。

(4) JA 及び OPDA がヒメツリガネゴケの生育与える影響

JA または OPDA を添加した寒天培地でヒメツリガネゴケを生育させた。その結果、OPDA ($1\mu\text{M}$ 及び $10\mu\text{M}$) は有意にヒメツリガネゴケの生育を阻害した。また、プロトネマ細胞の伸長も著しく阻害していた。その一方で、OPDA 処理は茎葉体への分化を促すことも明らかとなった。しかし、JA は $10\mu\text{M}$ においても生育にほとんど影響を与えなかった。従って、ヒメツリガネゴケにおいては JA ではなく OPDA が活性物質として機能していることが示唆された。

(5) 内生 OPDA の変化及び OPDA が遺伝子発現に与える影響

超音波処理によりヒメツリガネゴケに傷害を与え内生 OPDA 量の測定を行った。その結果、傷害処理一時間後に内生 OPDA 濃度が著しく上昇し、その後、時間の経過とともに OPDA 濃度が減少した。内生 OPDA 濃度と同様に、傷害処理により *PpAOS1* 遺伝子発現が一過的に誘導されていた。また、OPDA 処理により *PpAOS1* 遺伝子発現の誘導も認められたことから、OPDA による正のフィードバック機構の存在が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Bandara P. K. G. S. S., Kosaku Takahashi, Michio Sato, Hideyuki Matsuura, Kensuke Nabeta, Cloning and functional analysis of an allene oxide synthase in *Physcomitrella patens.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 73, 2009, 2356-2359, DOI:10.1271/bbb.90457.

② Takahiro Hashimoto, Kosaku Takahashi, Michio Sato, Bandara P. K. G. S. S., Kensuke Nabeta, Cloning and characterization of an allene oxide cyclase, *PpAOC3*, in *Physcomitrella patens.*, *Plant Growth Regul.* 査読有, 65, 2011, 239-245, DOI:10.1007/s10725-011-9592-z.

[学会発表] (計 6 件)

① Bandara P. K. G. S. S., Kosaku Takahashi, Michio Sato, Hideyuki Matsuura, Kensuke Nabeta, Identification of jasmonic acid, cloning and functional analysis of an allene oxide synthase in *Physcomitrella patens.*, 平成 21 年度第一回合同同学術講演会、平成 21 年 7 月 25 日、札幌市。

② 高橋公咲、Bandara P. K. G. S. S.、佐藤道大、

松浦英幸、鍋田憲助、ヒメツリガネゴケにおけるジャスモン酸の同定およびアレンオキシドシクターゼの機能解析、植物化学調節学会第44回大会、平成21年10月30日、仙台市。

③橋本貴裕、高橋公咲、Bandara P. K. G. S. S.、鍋田憲助、ヒメツリガネゴケにおけるアレンオキシドシクターゼのクローニング及び機能解析、日本農芸化学会2010年度大会、平成22年3月30日、東京都。

④Bandara P. K. G. S. S., Takahiro Hashimoto, Kosaku Takahashi, Michio Sato, Hideyuki Matsuura, Kensuke Nabeta, Cloning and functional analysis of the key enzymes involved in jasmonic biosynthesis in *Physcomitrella patens.*, The 13th annual moss international conference, July 22, 2010, Chitose, Hokkaido

⑤阿部達也、高橋公咲、Bandara P. K. G. S. S.、鍋田憲助、ヒメツリガネゴケにおける12-オキソファイトジエン酸の機能解析、平成23年度日本農芸化学会北海道支部学術講演会、平成23年11月5日、札幌市。

⑥高橋知寛、高橋公咲、阿部達也、Bandara P. K. G. S. S.、松浦英幸、鍋田憲助、ヒメツリガネゴケの12-オキソファイトジエン酸還元酵素の機能解析、日本農芸化学会2012年度大会、平成24年3月24日、京都市。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/rfoa/abs/abs3-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 公咲 (TAKAHASHI KOSAKU)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：30374622

(2) 研究分担者

松浦 英幸 (MATSUURA HIDEYUKI)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：20344492

(3) 連携研究者

鍋田 憲助 (NABETA KENSUKE)

北海道大学・大学院農学研究院・特任教授

研究者番号：70093911