

学位論文要旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

学位論文題目 (Dissertation Title)	シロイヌナズナにおける傷害応答性みどりの香りバースト機構に関する研究
氏名(Name)	望月 智史
<p>植物は食害や病原菌感染などにより傷害を受けると、傷害部位及び傷害を受けていない離れた部位で傷害を認識し、適切に応答することで劣悪な生育環境を克服し適応度を高めている。傷害後に直ちに生成されるみどりの香り(GLVs)やジャスモン酸(JA)といったオキシリピン類は植食者や病原体に対する防御応答を担う。オキシリピン生合成経路では、リノレン酸やモノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)のアシル基がリボキシゲナーゼ(LOX)によって酸化を受け、続くヒドロペルオキシドリアーゼ(HPL)によって開裂を受けることで GLVs が、アレンオキシドシンターゼ(AOS)及びアレンオキシドシクラーゼ(AOC)による反応を受けると JA 前駆体の 12-オキソフィトジエン酸(OPDA)が生成される。古くから GLVs や JA の生合成経路やその生理活性はよく調べられてきたが、これらの生合成メカニズムについては未だ不明な点が多い。例えば、シロイヌナズナにおいて、GLVs/JA 生成の鍵酵素である LOX は傷害を受けていない健全葉でも大量に発現して葉緑体ストロマに局在し、基質であるチラコイド膜脂質と隣接している。さらに、HPL 及び AOS は葉緑体包膜に発現しているため、GLVs/JA を恒常的に生産するポテンシャルをもつ。しかし実際は GLVs/JA は無傷な植物では蓄積されておらず、傷害を受けてから即座に新規に合成される(バーストされる)。GLVs 及び OPDA バーストは数秒から数分で起こる反応であり、遺伝子発現を調節する時間的余裕はないうえ、傷害部位は細胞組織が破壊されているため新たなタンパク質合成に必要なマシナリーが維持されているとは考え難い。つまり、LOX には遺伝子レベルでの制御による酵素タンパク質の発現調節以外の活性制御システムが存在すると考えられるが、植物 LOX でこれら制御システムについての報告はほとんどない。そこで本論文では「無傷植物では LOX を不活性型で存在させておき、傷害刺激を認識すると LOX を活性化させ、過酸化脂質を生成して代謝カスケードが亢進される」と仮説をたて、特に LOX 活性化機構の解明に取り組んだ。</p> <p>植物は LOX アイソザイムを複数有しており、それぞれのアイソザイムに特有の役割があることが分かっている。例えばトマト LOXC やタバコ LOX2 は GLVs 生成に、トマト LOXD やタバコ LOX3 は JA 生成に寄与している。シロイヌナズナにおいて JA 生成には主に LOX2 が関与していることが報告されているが、GLVs 生成に関与する LOX は明らかでなかった。野生型として主に用いられるエコタイプ(Col-0)が HPL 活性をもたないためである。そこで、HPL 活性をもつエコタイプ(Ws-1)でシロイヌナズナに6つある LOX のノックアウト変異体をそれぞれ作成し、その代謝物を GC-MS で分析した。これにより、シロイヌナズナでは LOX2 が GLVs 生成に必須であることを実証し、さらに一部の炭素数5の揮発性化合物生成にも LOX2 が関与することを証明した。</p> <p>シロイヌナズナでは LOX2 が GLVs 及び JA 生成に関与することが分かったので LOX2 が活性化を受けていると仮定し検証を行った。ロイコトリエン生成に関与する動物 LOX 活性化機構のアナロジーから、活性化因子として Ca²⁺が候補として挙げられた。そこで、Ca²⁺選択的なキレート剤である BAPTA を用いてシロイヌナズナ葉を破碎したところ、GLVs 生成量が抑制され、さらに LOX2 の酵素反応物である</p>	

(和文 2,000 字程度 / 英文 800 語程度)

(about 800 words)

モノガラクトシルジアシルグリセロール-ヒドロペルオキシド (MGDG-OOH) も BAPTA によって生成量が同程度抑制された。この際、シロイヌナズナ LOX2 生成物として初めて MGDG-OOH を 3 種同定定量し、MGDG-OOH が直接 GLVs バーストに寄与することを初めて証明した。また、Ca²⁺添加実験で生理学的な Ca²⁺濃度(数 μM)で GLVs 生成活性が回復することを確認し、HPL 及び AOS/AOC 活性は BAPTA により阻害されなかった。シロイヌナズナでは LOX2 が Ca²⁺依存的に活性化され、この活性化によってオキシリピンバーストが引き起こされることを実証した。Ca²⁺を活性化因子とする動物 LOX との立体構造モデル重ね合わせ実験から、シロイヌナズナ LOX2 にも Ca²⁺結合に関与しうるアミノ酸残基の候補を確認でき、この活性化には LOX 立体構造の変化が寄与していることが示唆された。シロイヌナズナ以外の植物種で Ca²⁺の影響を調べたところ、シロイヌナズナで用いた濃度の BAPTA では GLVs や OPDA バーストの抑制は見られなかった。陸上植物普遍的な GLV バーストは Ca²⁺による LOX 活性化だけでなく、複数のシステムで制御されている可能性が考えられた。

学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

学位論文題目 (Dissertation Title)	Study on the mechanisms governing green leaf volatile-burst caused by tissue-disruption in <i>Arabidopsis thaliana</i> .
氏 名 (Name)	MOCHIZUKI Satoshi

Oxylipins, such as green leaf volatiles (GLVs) and jasmonic acid (JA), were lipid-derived secondary metabolites that are synthesized through the lipoxygenase (LOX) pathway. Oxylipins play a defensive role against herbivore damage, pathogen infection, and so on. LOXs are key enzymes that catalyze an oxygenation of linolenic acid or acyl groups of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), abundant in thylakoid membrane, to form their hydroperoxides. Subsequent cleavage by hydroperoxide lyase (HPL) yields GLVs, or epoxidation/cyclization by allene oxide synthase (AOS)/allene oxide cyclase (AOC) forms 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) as a precursor of JA. Biosynthetic pathway and physiological function of oxylipins have been extensively studied so far, but the mechanisms of formation are largely unknown. For example, substantial amount of *Arabidopsis* LOX2 localizes in chloroplast stroma in intact cell concomitantly with its substrate in thylakoid membrane. Since HPL and AOS localize on chloroplast envelope, plant should have a potential to form GLVs and OPDA continuously. However, plants hardly form oxylipins before suffering stresses. Cell/tissue disruption intimately associated with herbivore damage causes rapid formation of oxylipins (termed as "burst") in nature. Oxylipin-burst is evident within a few seconds–minutes after damage. Subcellular compartment is largely disrupted at the place of damage, and there should be no time to initiate expression of the genes for oxylipin formation. Accordingly, it is suggested that LOX undergoes a system to regulate its enzyme activity at the protein level. In this study, I posed a hypothesis that plant LOXs stays at their inactivated forms in intact tissues to suppress formation of oxylipins and are activated after damage to promptly initiate oxylipin-burst.

In Chapter 1, I identified a specific LOX isoform involved in GLV-burst of *Arabidopsis* leaves. Plants generally have several LOX isozymes and each of them seems to have specific roles, e.g., GLVs formation, JA formation. So far, a LOX involved in GLVs and/or JA formation has been identified in tobacco, tomato, potato, and maize. In *Arabidopsis*, it is already reported that LOX2 is involved in local formation of JA after tissue disruption. However, the LOX involved in GLVs formation has not been studied largely because the ecotype, Col-0, widely used by plant biologists has a natural mutation in *HPL*. I prepared a complete set of knockout mutant of each *LOX* gene in *Ws-1*, which has intact *HPL* gene and therefore can form GLVs. Volatiles formed after freeze-thaw treatment of leaves was analyzed with GC-MS. Accordingly, I identified LOX2 as an essential LOX to form GLVs and five carbon volatiles in *Arabidopsis*.

In Chapter 2, I studied the mechanism to control LOX2 activity. At first, I prepared a recombinant protein with *E. coli* expression system. I found that the activity of recombinant LOX2 is quite unstable that hindered further characterization. Next, I evaluated *ex vivo* LOX2 activity. LC-MS/MS analysis on the extract prepared from disrupted leaves of Col-0 revealed formation of MGDG-hydroperoxides (MGDG-OOHs) as products of LOX2. With considering an analogy with the mechanism to regulate LOX activity in animal tissues, Ca^{2+} was a candidate that regulates activity of *Arabidopsis* LOX2. Addition of a Ca^{2+} chelating reagent, BAPTA, suppressed formation of MGDG-OOHs. Formation of GLVs in *Ws-1* was also suppressed in the presence of BAPTA, and

様式7号(第12条,第31条関係)

(様式7号)(Format No.7) 英語版

the amount of GLVs suppressed was mostly same with amount of MGDG-OOHs found in Col-0, which indicated that MGDG-OOHs were largely converted into GLVs. This is the first report that MGDG-OOHs formed by LOX2 is directly involved in GLV-burst in Arabidopsis. GLVs formation was recovered with supplementation of free Ca^{2+} in a dose dependent manner in the presence of BAPTA. BAPTA showed little effect on HPL activity. These results suggest that LOX2 is activated by Ca^{2+} to facilitate GLV-burst in Arabidopsis. A modeling study on Arabidopsis LOX2 based on the structure of coral LOX that is regulated by Ca^{2+} led identification of amino acid residues, which may bind Ca^{2+} , in Arabidopsis LOX2. I examined the effect of Ca^{2+} on the other plant species, such as tobacco, tomato, clover, soybean, rice, and maize. Unexpectedly, addition of BAPTA hardly suppressed GLV-burst with these plants.

(様式 9 号)

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	望 月 智 史
審 査 委 員	主 査： 松 井 健 二
	副 査： 宮 田 浩 文
	副 査： 内 海 俊 彦
	副 査： 真 野 純 一
	副 査： 肥 塚 崇 男
論 文 題 目	Study on the mechanisms governing green leaf volatile-burst caused by tissue-disruption in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナにおける傷害応答性みどりの香りバースト機構に関する研究)
<p>【論文審査の結果及び最終試験の結果】</p> <p>本論文では植物のみどりの香り生成制御機構に関する研究成果が示されており、その中で植物細胞が破碎されるとストロマにカルシウムイオンが流入し、ストロマ局在型のリポキシゲナーゼ 2 が構造変化を伴って活性化され、チラコイド膜へ移行してガラクト糖脂質の酸化を促進すること、この酸化が引き金となってみどりの香りがバースト的に生成放散されることを明らかにしている。この知見は長らく不明であった植物葉組織傷害に伴うみどりの香りバーストの分子機構を明らかにしたもので画期的な新知見であり、高く評価できる。</p> <p>また、平成 31 年 1 月 24 日に審査委員同席のもと、論文の最終試験を公開で実施した。最終試験の口頭発表では学位論文の骨格となる新知見を丁寧に論理立てて説明し、得られた結論の合理性を担保するに十分な発表内容であった。</p> <p>以上の精査より望月智史氏は山口大学大学院創成科学研究科の学位 (博士) を付与するに相応しいと判断した。</p> <p style="text-align: right;">(生命科学)</p>	