

Title	Phosphorylation dependent regulation of the Arabidopsis thaliana 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
Author(s)	Robertlee, Jekson
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69536
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name: Jekson ROBERTLEE

Title

Phosphorylation dependent regulation of the *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (シロイヌナズナにおける3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductaseのリン酸化依存的調節機構)

Plant produce diverse structures isoprenoids as primary and specialized metabolites. The common precursors for cytosolic isoprenoids biosynthesis such as sesquiterpenoids, triterpenoids, polyisoprenoids, and sterols, are mainly produced via the mevalonate pathway. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase (HMGR) catalyzes the reaction of HMG-CoA to mevalonic acid as the first committed step of the mevalonate pathway. In plant, HMGR is encoded by multiple genes which are differentially regulated by developmental and environmental stimuli. In *Arabidopsis thaliana*, a model plant, HMGR is encoded by two genes producing three different isoforms (AtHMGR1L, AtHMGR1S, and AtHMGR2). It has been reported that the *hmg1hmg2* double mutant is appeared to be lethal, the *hmg1* mutant shows dwarf and sterility phenotypes, while the *hmg2* mutant shows normal phenotype. Although very high mRNA levels were obtained by overexpression of the *HMG1* gene in *A. thaliana*, only a modest increase of HMGR activity was detected. Moreover, alteration of downstream products accumulation of the mevalonate pathway affects HMGR activity without changing the protein level, suggesting the importance of post-translational regulation of plant HMGR activity.

The post translational regulation of HMGR has been elucidated in mammals. Mammalian HMGR can be phosphorylated at a C-terminal conserved serine residue by the AMP-activated protein kinase (AMPK) and AMPK kinase (AMPKK) cascade that leads to the direct inactivation of HMGR. Interestingly, the serine residue is conserved in many higher plants HMGR suggesting that plant HMGR might have similar phosphorylation dependent regulation. Further, the AMPK ortholog kinases have been identified in plants, named as AKIN10, that can phosphorylate the short-target peptide that was used to measure AMPK specific activity. It has also been reported that in the presence of geminivirus rep-interacting kinases1 (GRIK1), AKIN10 has approximately 6-times higher activity to the short-target peptide, suggesting GRIK1 as the ortholog of the mammalian AMPKK. Instead of the presence of the AMPK and AMPKK orthologs in plants, however, the connection between AKIN10 and GRIK1 kinases to plant HMGR activity has not been experimentally verified. More importantly, HMGR phosphorylation at the conserved serine residue has never been detected. Thus, is HMGR truly phosphorylated at the C-terminal conserved serine *in planta*? Therefore, I started this study to elucidate the phosphorylation dependent regulation of the *A. thaliana* HMGR, which would aid new ideas for the improvement of economically important plants isoprenoids productions.

Enhancing the mevalonate pathway by removing the HMGR inactivating phosphorylation site to avoid its inactivation would be a promising strategy to increase the production of economically important isoprenoids in plants. In my study, I confirmed that plant HMGR is inactivated by plant kinase cascade system via phosphorylation at the conserved serine (corresponds to S577 in AtHMGR1S) *in vitro*. Unexpectedly, the kinase cascade also phosphorylated AtHMGR1S at sites other than S577 *in vitro*. The analysis of AtHMGR1S-FLAG fusion protein in *Arabidopsis* indicated that it is truly phosphorylated at S577 *in planta* under normal growth condition. Moreover, phosphorylation at sites other than S577 were also detected *in planta*, suggesting the presence of a novel regulatory mechanism of plant HMGR. Based on the information from the *A. thaliana* protein phosphorylation site database, I found that phosphomimic substitution at any of seven novel potential phosphorylation sites strongly reduced the activity of both *A. thaliana* and *Hevea brasiliensis* HMGR1 *in vitro*, suggesting the presence of HMGR inactivating phosphorylation at sites other than S577. Additionally, amino acid substitution at two other sites increased approximately 1.3-times relative to AtHMGR1 activity *in vitro*. The results described in this study would aid the improvement of valuable isoprenoids productions by avoiding HMGR inactivation through phosphorylation *in planta*.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (ROBERTLEE Jekson)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教 授	村中 俊哉
	副 査	教 授	藤山 和仁
	副 査	教 授	渡邊 肇
	副 査	教 授	福崎 英一郎
	副 査	教 授	紀ノ岡 正博
	副 査	教 授	大政 健史
	副 査	教 授	仁平 卓也
	副 査	教 授	永井 健治

論文審査の結果の要旨

植物は、炭素数 5 を基本骨格とする多種多様のイソプレノイド（テルペノイド）を生成する。なかでも、多様な生理活性を有する化合物群から成る炭素数 15 のセスキテルペノイド、炭素数 30 のトリテルペノイドは、植物の細胞質における酢酸—メバロン酸経路にて生合成される。3・ヒドロキシ・3・メチルグルタリル CoA レダクターゼ(以下、HMGR と記す)は、酢酸—メバロン酸経路における鍵酵素であり、転写レベルでの遺伝子発現調節機構については知見があるものの、翻訳後の制御機構については不明な点が多い。同経路の生物工学的改変のためには、翻訳後の制御機構を研究することが重要である。

このような背景に基づき学位申請者は、植物における HMGR における翻訳後制御、特にリン酸化依存的調節機構を明らかにするために、モデル植物であるシロイヌナズナを研究材料とした生化学および分子遺伝学的解析を行っている。植物の HMGR は C 末に保存されているセリン残基がリン酸化されることにより不活性化されることが試験管内の実験等により明らかになっていたが、リン酸化制御のカスケードがどのようになっているか不明であった。学位申請者は、シロイヌナズナの HMGR キナーゼとして AKIN10 を、また、AKIN10 のキナーゼとして GRIK1 について着目し、それぞれの酵素タンパク質ならびに、シロイヌナズナ HMGR の C 末リン酸化部位欠損酵素(S577)を大腸菌で発現させてリン酸化実験を行っている。その結果、GRIK1-AKIN10-HMGR というリン酸化カスケードが成り立つことを示すとともに、S577 においてもリン酸化されたタンパク質が残存していることを示しており、S577 以外にもリン酸化されるアミノ酸が HMGR に存在することを示唆している。学位申請者はさらに、シロイヌナズナの HMGR 遺伝子欠損変異体を用いて、HMGR あるいは、S577 を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナの植物体におけるリン酸化ならびに HMGR の活性状態について研究している。それにより、シロイヌナズナ植物において、フォスファターゼ処理により脱リン酸化された HMGR が蓄積するとともに HMGR 活性が上昇することを見出している。さらに、S577 を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナにおいてもリン酸化された HMGR が蓄積し、野生型とは異なる HMGR 活性を示したことから、植物体においても S577 以外のリン酸化部位が酵素機能に関わることを示している。

学位申請者はまた、シロイヌナズナ HMGR における S577 以外のリン酸化アミノ酸を検索するために、植物における HMGR の配列比較を行い、リン酸化される可能性のあるアミノ酸残基を抽出している。さらに、これらの抽出したアミノ酸残基をそれぞれ、リン酸化および脱リン酸化模倣アミノ酸に置換し、大腸菌での組換え酵素を用いた生化学実験を行っている。それにより、S577 以外にもリン酸化・脱リン酸化されるアミノ酸残基が数箇所存在することを見出している。さらに、SA577 以外の 2 箇所のリン酸化されるアミノ酸残基を置換することにより野生型よりも 1.3 倍活性が上昇することを見出している。

以上のように、本論文は、植物のイソプレノイド生合成における鍵酵素である 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA レダクターゼにおける翻訳後のリン酸化依存的調節機構をモデル植物シロイヌナズナにおいて明らかにし、あらたなリン酸化調節残基も見出している。さらに酢酸—メバロン経路の制御による生物工学的応用の可能性についても述べている。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。