

Form 3

Date (日付)

15/11/2009

(Date/Month/Year:日/月/年)

**Activity Report -Science Dialogue Program-**

(サイエンス・ダイアログ事業 実施報告書)

Fellow's name (参加外国人研究者氏名): Mohammad Basyuni (ID No. P 08104)Participating school (参加機関(受入学校名)): Ikeda High School, KagoshimaDate (実施日時): 9/11/2009 (Date/Month/Year:日/月/年) Time: from 10:40 to 12:20Lecture title (講演題目): (in English) Characterization of Terpenoid Biosynthesis of Mangrove Tree Species and its Correlation to Salt Tolerance(in Japanese) マングローブにおけるテルペノイド生合成と耐塩性の関わり

Lecture summary (English) (講演概要):

Mangroves plants are distributed in the inter-tidal zone of tropical or sub-tropical area and prosperous sources of triterpenoids alcohols mostly derived from oleanane, lupane, and ursane type of terpenoids. Despite the ubiquitous distribution of terpenoids in mangrove trees, their physiological functions are not well understood. The present study thus sheds the light on the biosynthesis of terpenoid with the special emphasis on its relevance to salt tolerance.

First of all, nonsaponifiable lipid composition (NSL) of Okinawan mangroves were analyzed to characterize their terpenoid profile. Triterpenoids and phytosterols comprised the major proportion of NSL. The terpenoids and phytosterols mainly consisted of 11 and 6 compounds, respectively. The major components were lupeol,  $\beta$ -amyrin and taraxerol for terpenoids, and were  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol for phytosterols. Terpenoid compositions of the root are not always similar to that of leaf, suggesting that terpenoids in the root are produced by biosynthesis in situ, not a translocation of the synthate from the leaf. Terpenoids existed in greater proportion in the outer parts of the root, suggesting the protective roles of terpenoids in mangrove.

The diversity in the NSL composition has been noted with mangrove species for both leaves and roots, implying the occurrence of divergent enzyme systems for biosynthesis. Despite diversity in the carbon skeleton, all triterpenes and phytosterols are biosynthesized from a common precursor substrate 2,3-oxidosqualene via oxidosqualene cyclases (OSCs). To get more insight into the physiological significance of terpenoid, gene cloning of terpenoids synthase was attempted. Five oxidosqualene cyclase (OSC) cDNAs were cloned from young root of *Kandelia candel* and the leaves of *Bruguiera gymnorrhiza* and *Rhizophora stylosa* by a homology-based PCR method. The ORFs of full-length clones termed *KcMS*, *BgbAS*, *BgLUS*, *RsM1* and *RsM2* were ligated into yeast expression plasmid pYES2 under the control of the *GAL1* promoter. Expression of *BgbAS* and *BgLUS* in GIL77 resulted in the production of  $\beta$ -amyrin and lupeol. This showed that the gene encoded  $\beta$ -amyrin and lupeol synthase, respectively. Furthermore, *RsM1* produced germanicol,  $\beta$ -amyrin, and lupeol in the ratio of 63:33:4, whereas *RsM2* produced taraxerol,  $\beta$ -amyrin, and lupeol in the proportions 70:17:13. The *KcMS* transformant accumulated a mixture of lupeol,  $\beta$ -amyrin and  $\alpha$ -amyrin in 2:1:1 ratio. These results indicated that these were multifunctional triterpene synthases. Phylogenetic analysis and sequence comparisons revealed that *BgbAS* and *RsM1* showed high similarities to  $\beta$ -amyrin synthases, and were located in the branch of  $\beta$ -amyrin synthase. *BgLUS* and *KcMS* formed a new branch for lupeol synthase that was closely related to the  $\beta$ -amyrin synthase cluster, while *RsM2* was found in the first branch of the multifunctional triterpene synthase

evolved from lupeol to  $\beta$ -amyrin synthase.

Furthermore, cDNAs expected to encode the OSCs for phytosterol biosynthesis were cloned from roots of *K. candel* and leaves of *R. stylosa*: *KcCAS* and *RsCAS*. Functional expression of these genes found that both *KcCAS* and *RsCAS* encoded cycloartenol synthase. Finally, correlation between mRNA expression of these genes and salt concentration was examined. mRNA level of *KcMS* was increased with salt concentration in both roots and leaves of *K. candel*. Similarly, salt stress increased the mRNA levels of *BgLUS* and *BgbAS* in the root of *B. gymnorrhiza*. In contrast to these observations, the mRNA level of *KcCAS* was not modulated by salt stress in the roots, and decreased in the leaves. These results therefore suggest that the terpenoid but not phytosterols are playing important role to cope with the salt stress in mangrove root. The concentration and proportion of terpenoids increased with salinity in the seedling of *K. candel* and *B. gymnorrhiza*, providing additional evidence for the protective role of terpenoids against salt stress.

#### Lecture summary (Japanese)

マングローブは熱帯・亜熱帯の汽水域に生育する耐塩性の強い植物であり、種々の炭素骨格のテルペノイドを含有していることが知られている。しかしながら、これらのテルペノイドの生理学的役割については不明な点が多い。そこで、本研究はマングローブにおけるテルペノイドの生合成と耐塩性との関わりについて追究し、テルペノイドの生理学的役割の解明に寄与することを試みた。

まず、沖縄に自生するマングローブのテルペノイド組成を明らかにするため、7種のマングローブの葉と根から調整した不ケン化物のテルペノイド組成を分析した。不ケン化物は主にテルペノイドと植物ステロールによって占められていた。テルペノイドと植物ステロールはそれぞれ11種と6種の成分より成り、テルペノイドではルペオール、 $\beta$ -アミリン、タラキセロール、植物ステロールでは $\beta$ -シトステロール及びスチグマステロールが主要な成分であった。根のテルペノイド組成は必ずしも葉に類似しておらず、根のテルペノイドは葉からの輸送ではなくその場で合成されているものと考えられた。さらに、根においては内側より外側でテルペノイド濃度が高く、何らかの保護機能を有していることが示唆された。

次いで、メヒルギ、オヒルギ、ヤエヤマヒルギから5つのテルペノイド合成遺伝子をクローニングし、それぞれ *KcMS*、*BgbAS*、*BgLUS*、*RsM1*、*RsM2* と名付けた。これらの遺伝子を酵母変異株 (GIL 77) に導入して、遺伝子の機能発現解析を行った。その結果、*BgbAS* と *BgLUS* はそれぞれ  $\beta$ -アミリンとルペオール合成酵素であることが、*RsM1* はジャーマニコール、*RsM2* はタラキセロール、*KcMS* はルペオールをそれぞれ主に産生する多機能型テルペン合成酵素であることが明らかになった。これらの遺伝子の分子進化系統解析において、*BgbAS* と *RsM1* は  $\beta$ -アミリン合成酵素と高い相同性を示し、系統樹上  $\beta$ -アミリン合成酵素のグループに配置された。一方、*BgLUS* と *KcMS* は  $\beta$ -アミリン合成酵素に近い新しいルペオール合成酵素に分類され、*RsM2* はルペオール合成酵素から  $\beta$ -アミリン合成酵素に進化する最初の段階の多機能型酵素のグループに配置された。

続いて、植物ステロールの合成酵素をコードしていると期待される遺伝子をメヒルギとヤエヤマヒルギからクローニングし、*KcCAS* と *RsCAS* と命名した。これらの遺伝子は、機能発現解析により両者ともシクロアルテノール合成酵素であることが明らかになった。

最後に、これらの遺伝子の発現と塩濃度との相関について検討した。メヒルギのテルペノイド合成遺伝子 *KcMS* の mRNA レベルは塩濃度上昇に伴い増加した。同様にオヒルギの *BgLUS* と *BgbAS* の mRNA レベルも塩負荷により上昇した。しかしながら、植物ステロール合成遺伝子 *KcCAS* の mRNA レベルは塩濃度の影響を受けず、テルペノイドが耐塩性形質に寄与していることが示唆された。さらにオヒルギとメヒルギ苗木のテルペノイドの絶対濃度は塩分負荷により上昇し、耐塩性におけるテルペノイドの関与を支持しているものと考えられた。

Language used (使用言語): English

Lecture format (講演形式):

○Lecture time (講演時間) 80 min (分), including Q&A, the remaining 20 min has been used by host researcher to present general issues on the importance of mangrove ecosystems. Before starting lecture, I requested the students not to be hesitated to raise their hands if they had any inquiries regarding with presentation topic. During my presentation, the students interrupted my talk and I explained again on the issue what they did not understand.

○Lecture style (examples: used projector, conducted experiments)

(講演方法 (例: プロジェクター使用による講演、プレ実験など))

Used projector

○Interpreter (example: assistance by host or colleague, provided Japanese explanation by yourself)

(通訳 (例: 受入研究者によるサポート、外国人研究者本人による日本語説明))

assistance by host

Name and title of assistant (協力者 職・氏名) (example: host or colleague)

Prof Shigeyuki Baba (host)

○Other note worthy information (その他特筆すべき事項):

Impressions and opinions of assistant (協力者から本事業に対する意見・感想等がございましたら、お願いいたします。):