

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05064

研究課題名(和文) 植物の恒温性を支配する負の活性化エネルギーに関する研究

研究課題名(英文) Negative activation energy for homeothermy in thermogenic skunk cabbage

研究代表者

伊藤 菊一 (Kikukatsu, Ito)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：50232434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：恒温性を有する哺乳動物における体温調節は交感神経系を介して行われていることが知られているが、神経系を有さない恒温性を有する植物がいかなる原理に基づいてその体温を制御しているかという問題は未解明のまま残されていた。本研究においては、恒温性を有するザゼンソウの熱産生器官における呼吸調節に関わる活性化エネルギーに着目し、ザゼンソウの恒温性が温度に依存した化学平衡の平衡点の移動により達成されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に植物は積極的な熱産生機構を持たず、その体温は外気温と共に変動するものと考えられているが、興味深いことに、我が国の寒冷地に自生し、早春に花を咲かせるザゼンソウは肉穂花序と呼ばれる花器が特異的に発熱し、その体温を23℃程度に維持できる恒温性を有している。本研究においては、ザゼンソウの体温制御が肉穂花序における代謝反応に関わる化学平衡の平衡点が温度により変動していることを世界ではじめて明らかにすることができた。本研究成果は、生物の表現型が化学平衡の平衡点の変化によって説明できることを意味しており、植物のみならず、哺乳動物の恒温性の理解にも影響を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Homeothermy in animals involves a complex mechanism involving thermal receptors throughout the body and integration in the hypothalamus that controls shivering and nonshivering thermogenesis. The flowers of some ancient families of seed plants show a similar degree of physiological thermoregulation, but by a different mechanism. Here, we show that respiratory control in homeothermic spadices of skunk cabbage is achieved by rate-determining biochemical reactions in which the overall thermodynamic activation energy exhibits a negative value. We propose that a law of chemical equilibrium governs the homeothermic control in thermogenic skunk cabbage.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：発熱植物 呼吸調節 ザゼンソウ 活性化エネルギー 温度 恒温性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般に植物の体温は外気温とともに変動すると考えられているが、驚くべきことに、ある種の植物は、発熱により積極的に自らの体温を上昇させるとともに、当該発熱器官の温度をほぼ一定に維持する能力を持つ。我が国の寒冷地に自生し、早春まだ雪の残る時期に開花・発熱するザゼンソウは、氷点下を含む外気温の変動にも関わらず、肉穂花序(にくすいかじょ)と呼ばれる特種な器官の温度を 23 内外に維持できる発熱植物である (Seymour *et al.*, 2009)。我々は、ザゼンソウの発熱現象に興味を持ち、1998 年に独自に研究を開始し、本植物が持つ様々な発熱特性を明らかにしてきた (Ito & Ito, 2005)。ザゼンソウの肉穂花序において観察される恒温性は、群生地においておよそ 1 週間程度持続するが、開花が終わると熱産生能力が急速に低下し、恒温性も失われてしまう。

一方、哺乳動物における体温調節は、視床下部を介した交感神経系により行われているが、ザゼンソウは神経系を持たないことから、その恒温性に関わるメカニズムは哺乳動物とは異なっている可能性が高い。興味深いことに、分類学的にザゼンソウ(単子葉)とは異なるハス(双子葉)においても恒温性が観察されることから、ザゼンソウやハスを含む一部の高等植物は進化の過程で哺乳動物とは異なる体温制御機構を獲得したものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、恒温性を有する発熱性植物の温度制御メカニズムの原理を明らかにすることであり、特に本研究においては、ザゼンソウの呼吸活性を呼吸に関する全活性化エネルギー (E_o) の観点から解析し、熱力学的にザゼンソウの恒温性を理解することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) Modified Arrhenius model による解析手法

ザゼンソウの呼吸測定データについて、以下の方法により E_o を算出した。具体的には Kruse らが 2011 年に発表した Modified Arrhenius model (Kruse *et al.*, 2011) を基盤とし、呼吸活性 R を以下の 2 次式で近似し、 E_o を算出するために必要なパラメーターを求めた。

$$\ln R = \ln R_{REF} + \frac{E_o(T_{REF})}{r} \times T_{TERM} + \delta(T_{REF}) \times T_{TERM}^2$$

得られたパラメーターを用い、 E_o を以下の式で計算した。ここで、 r は気体定数、 R_{REF} は任意の基準温度における呼吸活性、 T_{TERM} は任意の基準温度に対して定義した温度に関する値である。

$$E_o = E_o(T_{REF}) + 2r\delta(T_{REF}) \times T_{TERM}$$

活性化エネルギーはアレニウスの式により算出されることが多いが、古典的アレニウスモデルは、解析する対象が動的である場合には、適用が困難であり、本研究の対象である種々の温度におけるザゼンソウの呼吸解析等のダイナミック現象においては、Modified Arrhenius model が精度良く当該活性化エネルギーを算出できると考えた。

(2) 単離ミトコンドリアを用いた活性化エネルギー解析

発熱植物の熱産生器官における化学反応が全体として前駆平衡を構成していることが予想された場合、このモデルは、実験的に再構成が可能な系で、負の活性化エネルギーが前駆平衡反応から生じることを示す必要がある。このため、本研究では呼吸に重要なミトコンドリアを用いた NADPH を基質とする呼吸解析を行った。具体的には、単離ミトコンドリアを用いた NADPH を基質とする呼吸反応は、前駆平衡と呼ばれる特殊な化学平衡を形成し、活性化エネルギーが負の値を示す可能性が考えられたからである。すなわち、NADPH はマトリクス内に存在するイソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) により合成されるが、同時に、ミトコンドリア内膜に存在するロテノンに非感受性の internal NADPH dehydrogenase (NDA) により電子が取り出され、末端呼吸酵素 (シアン耐性呼吸酵素 AOX およびチトクローム呼吸酵素 COX) に受け渡され、この一連の反応が前駆平衡を形成すると考えられた。全体の反応は発エルゴン反応でありトータルとして熱産生が行われるが、NADPH を産生する反応は吸熱的であり、負の活性化エネルギーが生じる条件では、化学平衡が吸熱反応の方向に移動し、「温度上昇による呼吸速度の低下」が観察され

るとの想定で実験を実施した。

具体的な実験方法は以下のとおりである。すなわち、群生地に自生するザゼンソウ発熱組織由来のミトコンドリア精製は、これまで汎用しているパーコール密度勾配により実施した。ミトコンドリアの呼吸測定はクラーク型酸素電極を用いて種々の温度条件で行った。NADPH を基質とする呼吸は、ミトコンドリア懸濁液に外部からクエン酸を投与することにより開始させた。クエン酸はアコニターゼによりイソクエン酸に代謝され、その後、イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) により NADPH が産生される。クエン酸は発熱植物の熱産生組織において最も多量に存在する有機酸であり、ミトコンドリアを用いた本解析システムは、発熱細胞内で実際に起こっている反応に極めて近いものである。また、ミトコンドリア内膜外側に存在するロテノン非感受性 external NADH dehydrogenase (NDB) を介した呼吸活性をネガティブコントロールとして同様の手法で解析した。ミトコンドリアを用いた本解析系には NAD^+ を NADH に変換する細胞質画分が含まれていないため、ICDH に相当する反応が起こらず、前駆平衡が成立しない。

4. 研究成果

我々が実施した Modified Arrhenius model による解析によって、ザゼンソウ肉穂花序における呼吸反応に関わる E_o 値の算出に成功した。興味深いことに、得られた E_o 値は温度に対して動的に変動し、本植物の恒温性が観察される呼吸調節範囲においては、負の値を示すことを突き止めた (Umekawa *et al.*, 2016)。生物分野においては、負の活性化エネルギーという概念はあまり馴染みのないものであるが、化学分野においては、負の活性化エネルギーは温度上昇が化学反応速度の低下を引き起こす反応において観察されることが知られており、この現象には前駆平衡と呼ばれる特異な化学平衡が関与していることが報告されている。これらの知見は、負の活性化エネルギーが観察されたザゼンソウ肉穂花序においても、前駆平衡反応に基づいた呼吸調節が行われていることを示唆している。

前駆平衡反応は、反応の速い可逆的の反応と、その後の不可逆的の反応から構成される (図 1A)。すなわち、発熱反応および吸熱反応から構成される可逆的な反応が不安定な中間体を形成し、その後の中間体を基質とした不可逆的な反応が全体の反応速度を決定する。このような前駆平衡反応においては、3つの活性化エネルギーが関与している。すなわち、それぞれ E_a および E_a' で示される可逆的の反応における発熱反応および吸熱反応に関する活性化エネルギーと、 E_a'' で示される不可逆的の反応における発熱反応の活性化エネルギーである (図 1B)。ここで、全体の活性化エネルギーである E_o は、温度により個別に変化する E_a 、 E_a' 、および E_a'' の相対的な大きさによって以下のように決定される。

$$E_o = E_a + E_a'' - E_a'$$

ここに示す前駆平衡反応において、 E_o が正の値を示す場合 ($E_a + E_a'' > E_a'$)、反応系の温度が上昇すると、個別の活性化エネルギーの値が小さくなることで E_o 値も低下し、全体の反応速度は上昇する。やがて温度上昇により E_o 値がゼロになると、反応の障壁となる全体の活性化エネルギーが最小となることから、反応速度が最大となる。一方、反応系の温度がさらに上昇すると、 E_o が負の値を示し ($E_a + E_a'' < E_a'$)、吸熱反応の影響が大きくなり、化学平衡が左に移動し、全体の反応速度は低下する。ザゼンソウ肉穂花序における呼吸は炭水化物を基質としていることから、本植物の熱制御に関わる呼吸反応は脱水素酵素を介した可逆的の反応と、それにより生じる電子を用いたミトコンドリア末端呼吸酵素 (AOX: シアン耐性呼吸酵素、および、COX: チトクローム *c* オキシダーゼ) を介した不可逆的の酸化反応が前駆平衡を構成していると考えられる。

次に、負の活性化エネルギーが生じる実験系を *in vitro* において再構成することを目的に、ザゼンソウ発熱組織から単離したミトコンドリアを用いた呼吸解析を行った。その結果、前駆平衡に基づく呼吸反応を再構成した場合においてのみ、負の活性化エネルギーが特異的に観察されることが判明した。また、*in vitro* における再構成系における前駆平衡の形成には、ミトコンドリアのマトリクス内で NADPH 産生に関わる ICDH による吸熱反応が重要であることが示された。さらに、AOX および COX を介したそれぞれの呼吸経路の温度感受性を解析したところ、肉穂花序のターゲット温度である 23 °C においては、AOX 経路がより高い温度感受性を示すことが判明した。ATP 合成に関与しない AOX を介した酸素消費は熱散逸的に働くことから (Moore *et al.*, 2013)、熱産生への関与が指摘されているが、AOX が触媒する呼吸はザゼンソウの恒温性においても重要な機能を有していることが明らかとなった。

以上のように、ザゼンソウの恒温性においては、発熱反応のみならず吸熱反応を含む化学平衡が重要な役割を担っている。従来の植物の熱制御に関わる研究は、発熱反応と温度との関係の解明に主眼を置くものであったが、今回、ザゼンソウの恒温性メカニズムにおける吸熱反応の重要性が明らかとなったことは、従来にはない新しい視点である。また、温度変化は化学平衡の平衡点のシフトを引き起こすことから、本メカニズムは、植物の熱制御のみならず、より広範囲の生命現象において温度センシングメカニズムとしても機能している可能性が考えられる。

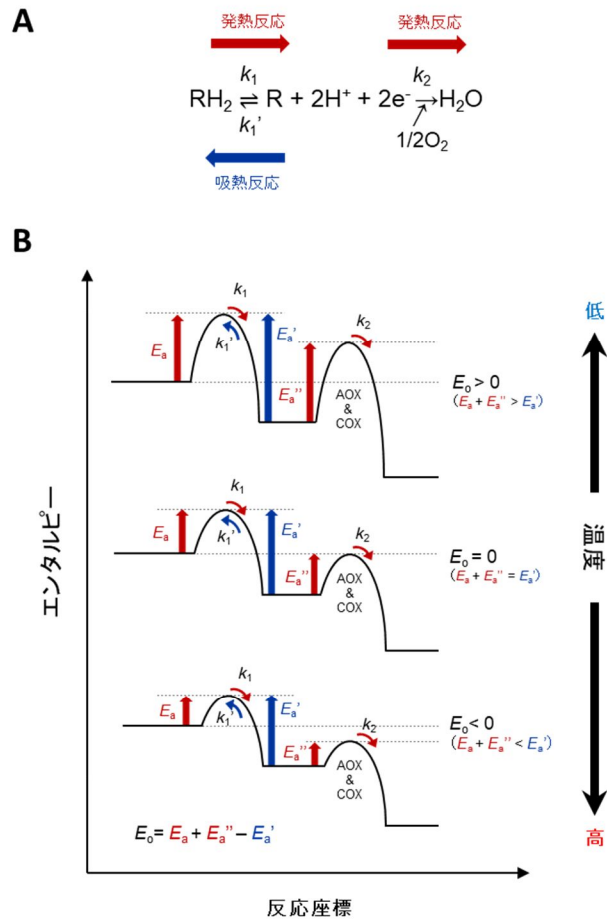


図1 ザゼンソウの恒温性に関わる化学平衡
 (A) 前駆平衡反応. 炭水化物をRH₂と表記している。(B) 全体の活性化エネルギー (E₀) と温度との関係. ザゼンソウの温度調節域 (15~30°C) において, E₀は負の値を示す。

< 引用文献 >

Seymour, R.S., Ito, Y., Onda, Y., Ito, K.: Biol. Lett., 5, 568 (2009)
 Ito, T., Ito, K.: Phys. Rev. E, 72, 051909 (2005)
 Kruse, J. Rennenberg, H., Adams, M. A.: New Phytol., 189, 659 (2011)
 Umekawa, Y., Seymour, R.S., Ito, K.: Sci. Rep., 6, 24830 (2016)
 Moore, A.L., Shiba, T., Young, L. Harada, S., Kita, K., Ito, K.: Annu. Rev. Plant Biol., 64, 637 (2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Umekawa Yui, Ito Kikukatsu	4. 巻 165
2. 論文標題 Thioredoxin o-mediated reduction of mitochondrial alternative oxidase in the thermogenic skunk cabbage <i>Symplocarpus renifolius</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 57～65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Laina Danae, Oikonomou Ioanna, Koutroumpa Konstantina, Bariotakis Michael, Kotzabasis Kiriakos, Ito Kikukatsu, Seymour Roger S., Pirintzos Stergios A.	4. 巻 45
2. 論文標題 Exogenous induction of thermogenesis in <i>Arum concinatum</i> by salicylic acid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Functional Plant Biology	6. 最初と最後の頁 1195～1195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1071/FP17247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 梅川 結, 伊藤 菊一	4. 巻 55
2. 論文標題 ザゼンソウの恒温性を支配する負の活性化エネルギー 化学平衡の移動による体温調節の原理が明らかとなる.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 520-523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.55.520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Umekawa, Y., Seymour, R.S. and Ito, K.	4. 巻 6
2. 論文標題 The biochemical basis for thermoregulation in heat-producing flowers	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep24830	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kikukatsu Ito & Yui Umekawa
2. 発表標題 Negative activation energies in homeothermic control in thermogenic plants.
3. 学会等名 Cell Symposia: Multifaced Mitochondria (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Umekawa & K. Ito
2. 発表標題 Modified Arrhenius model reveals the biochemical basis for thermoregulation of skunk cabbage.
3. 学会等名 The Start of New Genomics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅川 結、伊藤 菊一
2. 発表標題 恒温植物ゲゼンソウの温度応答性呼吸調節メカニズムに関する研究
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅川 結、ロジャー セイモア、伊藤 菊一
2. 発表標題 植物の恒温性メカニズムを支配する負の活性化エネルギーに関する研究
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yui Umekawa, Kikukatsu Ito
2. 発表標題 The homeothermic control based on pre-equilibrium reaction in thermogenic skunk cabbage.
3. 学会等名 Biochemistry 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 梅川 結、伊藤 菊一
2. 発表標題 ザゼンソウの恒温性メカニズムにおけるAOXの酸化還元制御に関する研究
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 伊藤 菊一
2. 発表標題 植物の恒温性メカニズムを解き明かす
3. 学会等名 第24回山形分子生物学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 梅川 結、伊藤 菊一
2. 発表標題 Modified Arrhenius model reveals the biochemical basis for thermoregulation of skunk cabbage
3. 学会等名 The Start of New Genomics (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	梅川 結 (Umekawa Yui)		