

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07762

研究課題名(和文) 裸子植物ソテツの体温振動を支える光依存的発熱分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the light-dependent exothermic molecular mechanism that supports body temperature oscillations in cycad

研究代表者

稲葉 靖子 (Ito-Inaba, Yasuko)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：80400191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：発熱植物の中で裸子植物は約半数を占め、植物の発熱にはポリネーターの誘引や昆虫との相利共生等、種子植物の生殖機構に絡む主要な役割がある。本研究では、日本に自生する裸子植物ソテツ(*Cycas revoluta*)の発熱諸性質およびミトコンドリア機能/形態的特徴について詳細な検討を行った。その結果、*C. revoluta*は雄花、雌花ともに発熱能力を有しており、雄花による発熱をサーモグラフィーカメラで撮影することに世界で初めて成功した。また、ミトコンドリアの特徴的形態と呼吸鎖バイパス経路の働きがソテツの発熱に関与することを見出した。本研究により、ソテツの花が発熱するしくみの一端を解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ソテツ(*Cycas revoluta*)は、種子植物の中でも特に原始的な性質を持つことが知られており、九州南部や沖縄諸島を含む亜熱帯地域に広く安定的に分布する。これまで植物の発熱分子機構研究はサトイモ科などの被子植物を中心に展開されたが、本研究により、十分な発熱能力を有する*C. revoluta*は、発熱の基本的メカニズムを理解する上で今後重要な植物材料となり得ることを示した。将来的に、これらの植物を用いて花の発熱を支えるしくみを明らかとすれば、寒冷環境下における植物の成長遅延回避や、花における匂い成分の合成・飛散を助ける技術の開発につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cone thermogenesis is a widespread phenomenon in cycads. The most commonly proposed role for plant thermogenesis is to promote the emission of volatiles that may serve to attract pollinators. In this study, we investigated thermogenic properties and mitochondrial function/morphology in thermogenic cycad species, *Cycas revoluta*. Both male and female cones generated heat, but heat producing ability of male cones is more significant than that of female. Thermal image of the male cone was successfully taken by an infrared thermal camera, and this image was adopted on the cover by *Plant Physiology* (June 2019). Ultrastructural and biochemical analyses revealed that the existence of a population of mitochondria with a distinct morphology and with a high capacity of alternative respiratory pathway in thermogenic tissues, microsporophylls. These results suggest that distinctive mitochondrial morphology and AOX-mediated respiration in microsporophylls might play a role in cycad thermogenesis.

研究分野：植物生化学

キーワード：発熱植物 ソテツ シアン耐性呼吸酵素 ミトコンドリア 光シグナル伝達 体温振動

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物による発熱現象は、原始的な種子植物を中心として約 80 種類の植物で報告があり、裸子植物から被子植物まで分布がある。発熱の生理的意義は、ポリネーターの誘引、昆虫との相利共生、低温ストレスの回避等、原始種子植物の生殖機構に絡む重要な役割がある。植物の発熱には、花の成長と密接に関わる普遍的な機構が存在すると考えられており、種を問わず、開花と同時期に発熱を開始して、花粉の放出と同時期に発熱を終了する(1)。発熱植物の数は、被子植物より裸子植物の方が多いが、これまでの研究は、発熱植物の中でも最も発熱能力の高いグループに含まれるサトイモ科やハス科等の被子植物が中心であった。これらの植物を用いた一連の研究により、被子植物では、ミトコンドリアの余剰エネルギー解消に役割を持つシアン耐性呼吸酵素 AOX が、呼吸鎖との連携により呼吸を活発化して、代謝的熱産生を誘導することが明らかとされていた(2-5)。加えて、被子植物の中で、ブードゥーリリーでは植物ホルモンであるサリチル酸が発熱を誘導すること(6,7)、ザゼンソウでは発熱組織がミトコンドリアを豊富に含むこと(8)等の知見も蓄積されていた。一方で、裸子植物の発熱機構に関する報告は限られており、分子レベルでの知見は全くなかった。

裸子植物ソテツ(*Cycas revoluta*)は、日本の固有種であり、九州南部と沖縄諸島に自生地を持つ(9)。以前の報告から、*C. revoluta* の発熱能力は微弱であり、発熱植物の中でも最も発熱能力が低いグループに属するとされてきた(10)。しかしながら、研究開始当初、我々は、*C. revoluta* が発熱植物の中でも中程度の発熱能力を持つとともに、光に依存して体温を変化させる興味深い性質を持つことを明らかとしていた。裸子植物で観られる体温振動現象に関しては、それまで概日リズムによるもの(10)、自発的機構によるもの(11,12)等の報告があったが、光に依存したものは報告がなかった。これに加えて、我々は当時、*C. revoluta* 雄株の花では、花を構成する2つの主要組織(小孢子葉および小孢子のう)の内、小孢子葉で AOX 経路が活発に働くことを明らかとして、当該組織が発熱に主要な役割を持つことを示唆していた。したがって、*C. revoluta* は、吸収した光シグナルを速やかに発熱装置に伝えて体温を変化させる仕組みを備えており、AOX 等の発熱関連タンパク質が、光シグナル伝達機構といかに相互作用して発熱が誘導されているかには興味を持たれていたが、その多くは不明のままであった。

### 2. 研究の目的

1 で述べた経緯を踏まえ、本研究では、ソテツ(*C. revoluta*)の体温振動を促す光諸特性および発熱制御機構の詳細を生理生化学および形態学的に検討するとともに、光の受容から代謝的熱産生に至る一連の経路の細胞自律性および分子ネットワークの解析により、当該植物における光依存型発熱制御機構の分子レベルでの解明を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究ではまず、花(特に、雄花)の各組織に含まれるミトコンドリアの生理生化学的諸性質と電子顕微鏡 TEM を用いた形態観察により、*C. revoluta* の発熱制御機構における当該ミトコンドリアとシアン耐性呼吸酵素(AOX)の役割等を調べた(項目1)。併行して、光受容→光シグナル伝達→発熱制御に関わる分子ネットワークを明らかにするため、*de novo* RNA-seq により、雄花および雌花の発熱組織で発現変動する遺伝子群を抽出して、当該遺伝子の中から、光受容後に発現が変動する遺伝子候補の探索を行った(項目2)。具体的な方法を、以下に示す。

#### (1) 花の発熱制御に関わるミトコンドリア諸性質の生理生化学および形態学的な検討

被子植物の発熱は、発熱組織に含まれる豊富なミトコンドリアと活発な AOX 活性により支えられているが、裸子植物の発熱を支える分子機構は全く不明である。そこで本研究では、*C. revoluta* の花の発熱制御に関わるミトコンドリアの諸性質を生理生化学および形態学のアプローチにより解析するとともに、本植物の光依存的発熱制御機構における AOX を含む余剰エネルギー解消系タンパク質の役割や光シグナルがミトコンドリアを中心とする呼吸代謝に与える影響を調査する。

#### (2) 光受容・シグナル伝達と発熱制御機構をつなぐ新規分子ネットワークの解明

光の受容から代謝的熱産生に至る一連の機構を支える分子ネットワークを構築するために、*C. revoluta* の光に応答した体温変化過程で、経時的に主要組織のサンプリングを行い、各サンプルから RNA 抽出を行った。*de novo* RNA-seq により抽出された雄花および雌花の発熱組織で発現変動する遺伝子群の中から、光や発熱への関与が考えられる遺伝子を選び出し、当該遺伝子の発現を real-time PCR で詳細に解析した。

### 4. 研究成果

3 で述べた研究の中で、項目1の研究成果については、世界的な植物科学雑誌である *Plant Physiology* 誌(2019年6月号)に論文を掲載することができた。これを受け、新聞9社(朝日新聞、日本経済新聞、科学新聞など)およびテレビ2社で研究成果が報道され、さらに、雑誌「化学8月号(化学同人発行)」、「科学8月号(岩波書店発行)」、「ミルシル(国立科学博物館発行)」でも紹介された。項目1および2に関する具体的な研究成果を、以下に示す。

(1) 花の発熱制御に関わるミトコンドリア諸性質の生理生化学および形態学的な検討

我々はまず、ソテツ (*C. revoluta*) 球果の発熱諸性質に関して詳細な検討を行い、雄花の発熱を世界で初めてサーモグラフィーで捉えることに成功した (図 1)。また、外気温に対して、雄花は最大で 11.5°C、雌花は最大で 8.3°C も体温が上昇することを見出した。続いて、雄球果の 2 つの主要な組織である小孢子葉 (発熱組織) と小孢子のう (非発熱組織) の細胞内構造を解析した結果、発熱組織 (小孢子葉) では、特徴的な形態を持つミトコンドリア集団の存在が明らかとなった。我々は、これらの細胞で、内部に一樣なマトリクス密度を持ち、断面積が 2  $\mu\text{m}^2$  以上の大きさを持つ巨大なミトコンドリアが、ミトコンドリア全体の 1 割を占めることを観察した (図 2)。また、断面積が 2  $\mu\text{m}^2$  未満の多くのミトコンドリアにおいても、巨大なミトコンドリアと類似したマトリクス構造を持つことがわかった。さらに、裸子植物による熱生産と AOX 活性とに関係性があるかを調査するために、小孢子葉 (発熱組織) と小孢子のう (非発熱組織) の AOX キャパシティを比較した。その結果、小孢子葉 (発熱組織) におけるシアン耐性呼吸酵素 (AOX) のキャパシティと発現量は、小孢子のう (非発熱組織) のそれよりも著しく高かった。最後に、同ソテツの雄花で発現する AOX 遺伝子としては、少なくとも 2 つのアイソフォーム (*CrAOX1* および *CrAOX2*) が存在することが明らかとなったため、ソテツの熱生産にはどちらの AOX が寄与するかを調査した。その結果、発熱組織 (小孢子葉) における *CrAOX1* 遺伝子の発現レベルは、*CrAOX2* 遺伝子の発現レベルに比べて、100 倍も高いことが明らかとなり、ソテツの熱生産には *CrAOX1* が主要な役割を担うことが示唆された (図 3)。以上の結果から、発熱組織 (小孢子葉) におけるミトコンドリアの特徴的な形態と *CrAOX1* を介したシアン耐性呼吸が、ソテツ球果の発熱に役割を持つことが明らかとなった。

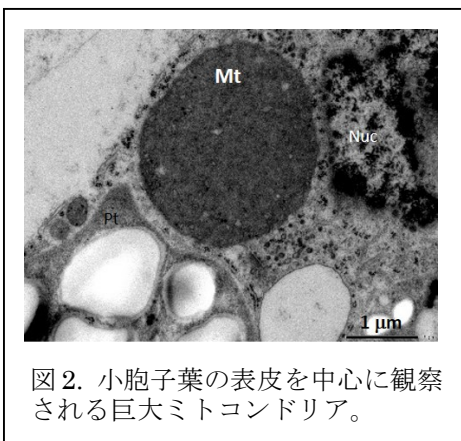
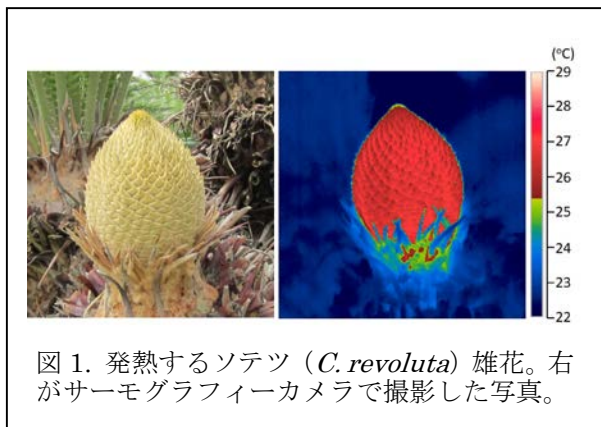


図 1. 発熱するソテツ (*C. revoluta*) 雄花。右がサーモグラフィーカメラで撮影した写真。

なお、上記一連の研究成果は、連携研究者である豊岡公德上級研究員 (理化学研究所・環境資源科学研究センター) および同じく連携研究者である小椋善俊准教授 (九州大学・医学研究科) と共同で行ったものである。

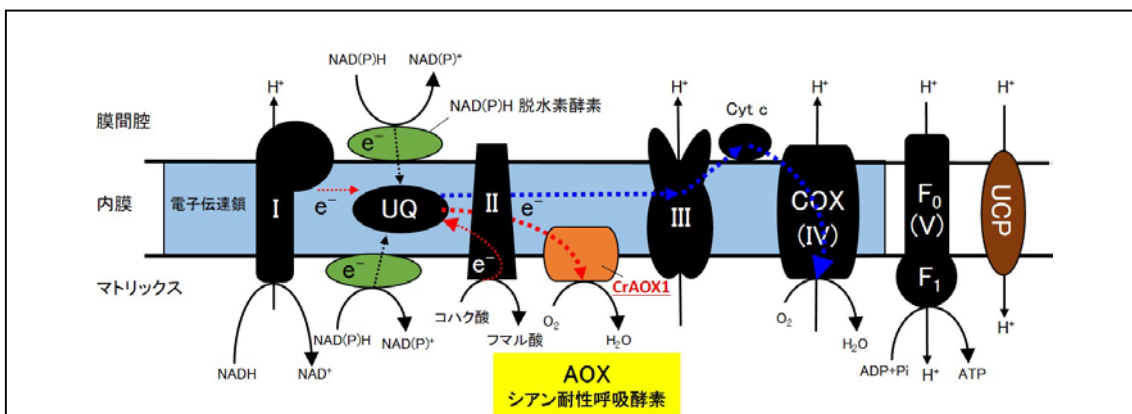


図 3. *C. revoluta* 雄花の小孢子葉ミトコンドリアでは、*CrAOX1* を介したシアン耐性呼吸が活発である。シアン耐性呼吸経路 (赤色太点線矢印)、シトクロム経路 (青色太点線矢印)。I から V は、電子伝達と ATP 合成に関わる複合体タンパク質を示す。

(2) 光受容・シグナル伝達と発熱制御機構をつなぐ新規分子ネットワークの解明

まず、野外で生息するソテツ雄花および雌花の球果を採取して、温度/光の条件を適切に設定した人工気象器内に静置後、翌日から主要組織のサンプリングを行った。*de novo* RNA-seq により、雄花と雌花の発熱組織で発現変動する遺伝子の中から光/発熱への関与が考えられた複数遺

伝子を選び出し、当該遺伝子の発現を **real-time PCR** で調査した。しかしながら、調査した遺伝子の中で、光依存的に発現変動する遺伝子を見い出すことはできなかった。これについては、今後の課題として検討を進めていきたいと考えている。

#### 引用文献

- (1) Meeuse and Raskin, *Sex Plant Reprod*, 1988.
- (2) Ito-Inaba et al., *Planta*, 2009b.
- (3) Miller et al., *New Phytol*, 2011.
- (4) Seymour, *Plant Cell Environ*, 2010.
- (5) Watling et al., *Plant Physiol*, 2006.
- (6) Raskin et al., *Science*, 1987.
- (7) Raskin et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989.
- (8) Ito-Inaba et al., *J Exp Bot*, 2009a.
- (9) 安慶貴子, ソテツをみなおす(奄美・沖縄の蘇鉄文化誌), 2015.
- (10) Tang, *Botanical gazette*, 1987.
- (11) Skubatz et al., *J Exp Bot*, 1993.
- (12) Roemer et al., *Plant Cell Environ*, 2008.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yasuko Ito-Inaba, Mayuko Sato, Mitsuhiro P. Sato, Yuya Kurayama, Haruna Yamamoto, Mizuki Ohata, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Kiminori Toyooka, Takehito Inaba | 4. 巻<br>180           |
| 2. 論文標題<br>Alternative oxidase capacity of mitochondria in microsporophylls may function in cycad thermogenesis.  | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Plant Physiology  | 6. 最初と最後の頁<br>743-756 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br><a href="https://doi.org/10.1104/pp.19.00150">https://doi.org/10.1104/pp.19.00150</a>   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Susumu Uehara, Ayane Sei, Misaki Sada, Yasuko Ito-Inaba & Takehito Inaba   | 4. 巻<br>10                    |
| 2. 論文標題<br>Installation of authentic BicA and SbtA proteins to the chloroplast envelope membrane is achieved by the proteolytic cleavage of chimeric proteins in Arabidopsis | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>Article No.2353 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br><a href="https://doi.org/10.1038/s41598-020-59190-1">https://doi.org/10.1038/s41598-020-59190-1</a>  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>稲葉靖子                                |
| 2. 発表標題<br>発熱植物の生体エネルギー論：シアン耐性呼吸からミトコンドリアの構造まで |
| 3. 学会等名<br>第57回日本生物物理学会年会（招待講演）（国際学会）          |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>稲葉靖子  |
| 2. 発表標題<br>亜熱帯地域に自生する裸子植物ソテツ ( <i>Cycas revoluta</i> ) の発熱諸特性と発熱分子機構 |
| 3. 学会等名<br>第11回トランスポーター研究会九州部会（招待講演）                                 |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大坪雅、佐藤光彦、前川春彦、小椋義俊、林哲也、稲葉丈人、稲葉靖子     |
| 2. 発表標題<br>ザゼンソウ花序の発熱期に発現が誘導される糖輸送体SWEETsの同定と解析 |
| 3. 学会等名<br>第61回日本植物生理学会年会                       |
| 4. 発表年<br>2020年                                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>稲葉靖子、大島瑞希、山本知奈、稲葉丈人   |
| 2. 発表標題<br>ソテツ ( <i>Cycas revoluta</i> ) 雄花の発熱におけるミトコンドリア形態とシアン耐性呼吸経路の役割 |
| 3. 学会等名<br>第61回日本植物生理学会年会  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大坪雅、前川春彦、稲葉丈人、稲葉靖子                |
| 2. 発表標題<br>発熱期ザゼンソウの花序で発現が誘導される糖輸送体の局在と機能の解析 |
| 3. 学会等名<br>第11回トランスポーター研究会九州部会               |
| 4. 発表年<br>2019年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堀之内冬紅、湯淺日菜子、稲葉靖子、森仁志、稲葉丈人   |
| 2. 発表標題<br>iTRAQ法を用いた転写因子GLK1相互作用因子の探索 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2020年度大会            |
| 4. 発表年<br>2020年                        |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>木下寛子, 西田文香, 川尻果林, 稲葉靖子, 稲葉丈人        |
| 2. 発表標題<br>シロイヌナズナCONSTANS-LIKE遺伝子が葉緑体発達に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2020年度大会                    |
| 4. 発表年<br>2020年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>上原晋, 清絢音, 佐田美咲, 稲葉靖子, 稲葉丈人     |
| 2. 発表標題<br>葉緑体内包膜への重炭酸イオン輸送体の導入と形質転換植物の解析 |
| 3. 学会等名<br>第11回トランスポーター研究会九州部会            |
| 4. 発表年<br>2019年                           |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>佐田美咲, 上原晋, 稲葉靖子, 稲葉丈人               |
| 2. 発表標題<br>重炭酸イオン輸送体BicA及びSbtAを共発現するシロイヌナズナの作出 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2019年度西日本・中四国支部合同大会         |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>伊東恵, 堀之内冬紅, 稲葉靖子, 稲葉丈人             |
| 2. 発表標題<br>転写因子Golden2-like1(GLK1)のDNA結合配列の探索 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2019年度西日本・中四国支部合同大会        |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>上原晋, 稲葉靖子, 稲葉丈人                        |
| 2. 発表標題<br>重炭酸イオン輸送体を導入したシロイヌナズナにおける葉緑体関連タンパク質の変動 |
| 3. 学会等名<br>第60回日本植物生理学会年会                         |
| 4. 発表年<br>2019年                                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堀之内冬紅, 湯淺日菜子, 稲葉靖子, 稲葉丈人      |
| 2. 発表標題<br>相補株を用いたシロイヌナズナGLK1タンパク質複合体の探索 |
| 3. 学会等名<br>第60回日本植物生理学会年会                |
| 4. 発表年<br>2019年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>深町翠, 岡杏里砂, 梶浦正典, 姫野将平, 稲葉丈人, 鉄村琢哉, 稲葉靖子 |
| 2. 発表標題<br>低温がスイートピー切り花の花持ち効果に与える影響の検証             |
| 3. 学会等名<br>園芸学会平成30年度秋季大会                          |
| 4. 発表年<br>2018年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>三原良太, 稲葉靖子, 稲葉丈人                 |
| 2. 発表標題<br>シロイヌナズナの低温応答を阻害する化合物が遺伝子発現に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2018年度西日本支部大会            |
| 4. 発表年<br>2018年                             |



|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堀之内冬紅, 湯淺日菜子, 稲葉靖子, 稲葉丈人          |
| 2. 発表標題<br>抗体を用いたシロイヌナズナGLK1タンパク質複合体の精製条件の検討 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2018年度西日本支部大会             |
| 4. 発表年<br>2018年                              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>牛山真里, 三原良太, 稲葉靖子, 稲葉丈人             |
| 2. 発表標題<br>シロイヌナズナのtop1a変異体のスクリーニングとその低温応答の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2018年度西日本支部大会              |
| 4. 発表年<br>2018年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>稲葉丈人, 廣澤嘉洸, 多田朱里, 松浦恭和, 森泉, 小椋義俊, 林哲也, 上原晋, 稲葉靖子 |
| 2. 発表標題<br>プラスチドシグナルと植物ホルモンの相互作用による葉緑体発達の制御                 |
| 3. 学会等名<br>蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム                         |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yasuko Ito-Inaba, Yoko Katayama, Yuya Kurayama, Koichiro Mizoguchi, Haruhiko Maekawa, Takehito Inaba          |
| 2. 発表標題<br>Possible roles of cyanide resistant respiration in cone thermogenesis in the gymnosperm <i>Cycas revoluta</i> |
| 3. 学会等名<br>10th International Conference for Plant Mitochondrial Biology 2017 (国際学会)                                     |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>倉山侑也、山本知奈、片山陽子、稲葉靖子                             |
| 2. 発表標題<br>ソテツ (Cycas revoluta) 雄花の発熱におけるシアン耐性呼吸酵素の役割と分子同定 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2018年度大会                                 |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>稲葉靖子  |
| 2. 発表標題<br>Floral thermogenesis in primitive seed plants |
| 3. 学会等名<br>Gender Summit 10 Satellite Conference (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                                | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 連携研究者 | 豊岡 公德<br><br>(Toyooka Kiminori)<br><br>(10360596) | 国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員<br><br><br>(82401) |    |
| 連携研究者 | 小椋 善俊<br><br>(Ogura Yoshitosi)<br><br>(40363585)  | 九州大学・医学研究院・准教授<br><br><br>(17102)                    |    |
| 連携研究者 | 稲葉 丈人<br><br>(Inaba Takehito)<br><br>(00400185)   | 宮崎大学・農学部・准教授<br><br><br>(17601)                      |    |