

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380196

研究課題名（和文） ザゼンソウの発熱現象における新規UCP分子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of a novel UCP molecule in heat-production in skunk cabbage.

研究代表者

伊藤 菊一 (ITO KIKUKATSU)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：50232434

研究成果の概要：わが国の寒冷地に自生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発熱によりその花器の体温をほぼ一定に維持することができる発熱植物である。本研究においては、ザゼンソウの発熱現象にミトコンドリアにおける脱共役蛋白質(UCP)がシアン耐性呼吸酵素(AOX)とともに機能していることを明らかにすることができた。本研究の成果は、ザゼンソウのみならずハス等の他の発熱植物の熱産生メカニズムの理解にも大きく貢献するものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2007年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：発熱植物、呼吸、ミトコンドリア、脱共役活性、シアン耐性経路

1. 研究開始当初の背景

一般に、植物の体温は外気温の変化とともに変動するものと考えられているが、驚くべきことに、ある種の植物には、自ら発熱し、その体温を積極的に調節できるものが存在する。例えば、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氷点下を含む外気温の変動にも関わらず、その発熱器官である肉穂花序の温度を 20℃内外に維持できるサトイモ科の発熱植物である。このような寒冷環境に自生し、恒温維持能力を有する植物は、地球上においてザゼンソウ以外に報告例がない。従来、我が国におけるザゼンソウは、単なる山野草としての位置付けであり、例えば国内で発刊されている各種植物図鑑等を見ても、本植物の発熱に関わる記述はほとんどない。しかしながら、ザゼンソウの有するユニークな特徴、すなわち、哺乳動物に匹敵する程の高い発熱能力 (Ito *et al.*, 2003)、±0.03℃/min の微小温度変化を認識できる極めて鋭敏な温度モニタリングシステム (Ito *et al.*, 2004)、さらに、非線形ダイナミクスに基づく温度制御アルゴリズムの存在 (Ito & Ito, 2005)、等々を鑑みると、本植物は「発熱モデル植物」として十分なポテンシャルを有しており、我が国が世界に先

駆けて重点的に取り組むべき重要な研究対象の一つである。

2. 研究の目的

本研究においては、ザゼンソウの発熱現象を調査するとともに、従来ザゼンソウにおいて機能が予想されていた脱共役蛋白質(UCP)の発熱器官における機能活性を明らかにすることを目的とした。その際、古くから植物の発熱に関連していることが示唆されているシアン耐性呼吸酵素(AOX)のザゼンソウ発熱器官等における機能についても明らかにすることとした。また、種々の環境温度におけるザゼンソウの発熱組織におけるUCPとAOXの蛋白質レベルの発現の変動についても調査を行い、本植物の恒温性と両蛋白質の機能に関する考察を行った。

3. 研究の方法

野外に自生しているザゼンソウについてその肉穂花序の体温を気温とともに連続的に測定し、その恒温性に関する情報を得た。さらに、発熱している肉穂花序の小花から無傷ミトコンドリアを調製し、その呼吸活性を測定し、UCPおよびAOXの活性を解析した。なお、UCPの機能活性については本研究においてミトコンドリアの膜電位と酸素消費量を同時に測定できる新たなモニタリング方法を確立した。また、ウエスタン解析においては、UCPについてはそのC末に特異的なペプチド抗体を、また、AOXについては植物間で保存性の高いアミノ酸残基に対するモノクローナル抗体を用いた。なお、実験に用いたザゼンソウは、岩手県西和賀町、秋田県大森町、および、岩手大学構内に自生している植物体を主に用いた。

4. 研究成果

(1) ザゼンソウの発熱現象

ザゼンソウの開花時期は早春3月~4月にかけて観察される。図1は、群落地に自生するザゼンソウの肉穂花序温度の時系列データを気温変動とともに示したものである。図1より、氷点下を含む外気温度(T_a)が大きく変動する寒冷環境下にもかかわらず、雌期(stigma)とよばれる発達ステージのザゼンソウ肉穂花序温度(T_s)は、20°C程度に一定に保たれていることが明らかである。

このような恒温性は、肉穂花序の發育ステージが進んだ両生期において消失し、さらにステージが進み、肉穂花序の表面に噴出した花粉が観察されるオス期(male)においては、発熱が終了し、肉穂花序温度は外気温の変化に依存するようになる。これまでに発熱植物としてザゼンソウ以外にハスやヒトデカズラが報告されているが、氷点下を含む寒冷環境において積極的に発熱し、その体温を維持

できる植物はザゼンソウのみである。

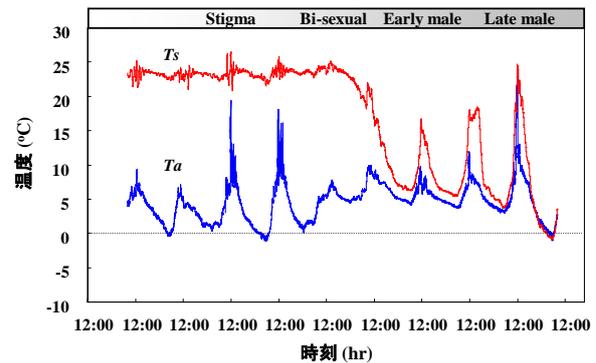


図1 群落地におけるザゼンソウ肉穂花序温度(赤)と外気温(青)の変動(Onda *et al.* 2008を改変)。

(2) ザゼンソウ肉穂花序におけるUCP機能活性の測定

ミトコンドリアにおける脱共役活性は、哺乳動物の非ふるえ熱産生を担当する褐色脂肪細胞(BAT)が有する高い呼吸活性において必須の役割を果たしている。BAT脱共役活性は脱共役タンパク質(Uncoupling protein1; UCP1)と呼ばれるミトコンドリア内膜に存在する6回膜貫通型のタンパク質により触媒され、その機能は、呼吸基質の酸化によって生じたプロトン勾配をATP合成を介さずに解消することによって、プロトン勾配が有する自由エネルギーを熱として放逸すると考えられる。実際に、UCP1の発現をノックアウトしたマウスでは、体温低下が起きることが明らかとなっているが、植物のUCPの熱産生への関与やその生理的役割については現在のところ十分な理解は得られていない。特に、ザゼンソウの発熱組織(小花)由来のミトコンドリアにおけるUCP活性を測定することは、当該組織における熱産生メカニズムを理解するために重要なステップであった。哺乳動物のUCP1による脱共役活性は、単離ミトコンドリアに対する外因性の遊離脂肪酸の添加によって活性化されることから、発熱中のザゼンソウから調製したミトコンドリアを用いて、リノレン酸(LA)による脱共役活性の増大が起きるかどうかを検討した。その結果、図2Aに示すように、LAは濃度依存的に酸素消費速度の増大を伴う膜電位の低下を誘導することが判明した。さらに、図2Bに示すように、シアン耐性呼吸酵素(AOX)の阻害剤であるKCNを3~25 μM の間で変化させた場合(5 μM LA存在下)、ミトコンドリア内膜のプロトン透過速度が大きく亢進させることが明らかとなった。これらの結果は、発熱中のザゼンソウ肉穂花序小花由来のミトコンドリアにおいては、これまで

報告されていなかった UCP 活性が存在していることを示唆している。

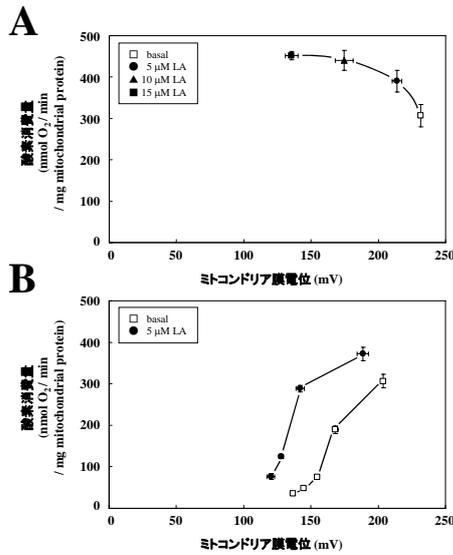


図 2 ザゼンソウ発熱中の肉穂花序（小花）より調製したミトコンドリアを用いた UCP 機能活性 (Onda *et al.* 2008 を改変)．A は LA 濃度を変化させた際の活性を、B は 5μM LA 存在下、KCN 濃度を変化させた際の活性。

それでは、このような UCP 活性を与える分子はどのようなものであろうか？この疑問に答えるため、ザゼンソウ肉穂花序で発現している UCP 遺伝子の翻訳産物の C 末端に特異的なペプチド抗体 (UCP-cab) を用いたウエスタン解析を行った。その結果、図 3 に示すように、小花由来のミトコンドリアにおいては 29kDa のバンドが検出されることが判明した。

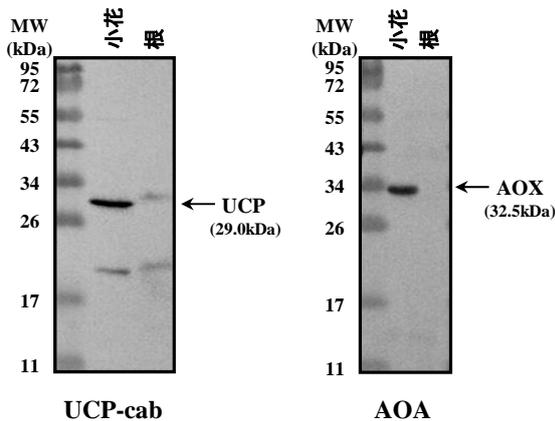


図 3 ザゼンソウ発熱中肉穂花序（小花）および根から調製したミトコンドリアにおける UCP および AOX の発現。

一方、図 3 において、根由来のミトコンドリアにおいては当該位置にシグナルは検出されない。また、AOX に対するモノクローナル抗体 (AOA) を用いたウエスタン解析を行うと、小花由来ミトコンドリアにおいて従来から知られている 32.5kDa の位置に明確なシグナルが検出された。これらの結果は、ザゼンソウの発熱組織においては、SDS-PAGE において 29kDa のバンドを与える蛋白質が UCP 活性を担っていることを示唆している。なお、この蛋白質は非発熱器官である根においては発現していない点にも注意が必要である。さらに、図 3 の結果は、発熱中の肉穂花序小花由来のミトコンドリアにおいては、UCP と AOX が機能的に共発現していることも示唆している。そこで次に、小花由来のミトコンドリアを用いて UCP と AOX の活性を同時に測定することとした。その結果、図 4 に示すように、UCP と AOX の活性はリノレン酸濃度が低い場合においてのみ両因子が機能しうることが判明した。従来、ザゼンソウの肉穂花序における発熱は、炭水化物を基質として行われることが判明しており、この点は、哺乳動物の褐色脂肪組織における脂質を基質とする UCP1 が介在する熱産生とは様相を異にする部分である。従って、肉穂花序において、哺乳動物と同様にリノレン酸等の遊離脂肪酸が豊富に存在し、UCP 活性を賦活化していることは考えにくく、AOX と UCP が協調的に機能するためには、低濃度の遊離脂肪酸の存在下でも UCP が十分な機能を獲得できるメカニズムが必要であることが推定される。また、図 4 において、ザゼンソウの AOX 活性はピルビン酸により賦活化されることが明らかであるが、このピルビン酸による効果は、リノレン酸により大きく阻害されることはなかった。従って、AOX のピルビン酸による活性化とリノレン酸による阻害メカニズムは同一ではない可能性が考えられる。

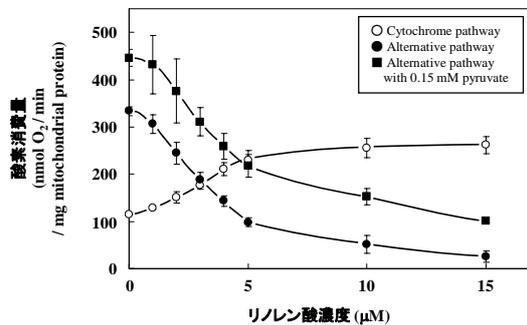


図 4 ザゼンソウ発熱中肉穂花序（小花）より調製したミトコンドリアを用いた UCP および AOX の機能解析 (Onda *et al.* 2008 を改変)。

(3) ザゼンソウ肉穂花序におけるUCPとAOXの発現と恒温性との関連

図1に示したように、ザゼンソウの雌期における肉穂花序温度は外気温の変動にも関わらず、ほぼ一定の値を維持することができる。このような恒温性の維持においては、ミトコンドリアの呼吸に関わるUCPやAOXといった因子の活性が大きく変動していることが容易に予想される。そこで、ザゼンソウが生育している環境温度を人為的に変化させることにより、その呼吸活性が大きく異なる肉穂花序を用い、そのUCPとAOXの蛋白質レベルにおける発現量の変動を検討することとした。寒冷環境において発熱しているザゼンソウ肉穂花序においては、積極的な冷却機能は保有しないことから(蒸散作用は存在する)、外気温が上昇することにより、その体温を一定に保つために、発熱レベルが大きく低下することが予想される。もし、発熱の制御(呼吸調節)がミトコンドリアにおけるUCPやAOXの蛋白質レベルの発現により制御されているとしたら、発熱レベルの異なる肉穂花序由来のミトコンドリアを用いたウエスタン解析により両蛋白質の発現量に明確な差異が観察されるはずである。実験は、人工気象室に移したザゼンソウ(Group A: 8個体、Group B: 11個体)についてGroup Aについては、その気温を10.3°C→23.1°Cに上昇させた後に肉穂花序(小花)からミトコンドリアを調製した。一方、Group Bについては、気温を8.3°C→24.9°Cに上昇させた際の肉穂花序からミトコンドリアを調製した。この際における肉穂花序における発熱レベルは、Group Aにおいては、およそ65%に低下し、Group Bにおいては、およそ60%に低下していると見積もられた。図5は、両グループから調製したミトコンドリアを用いたウエスタン解析の結果である。

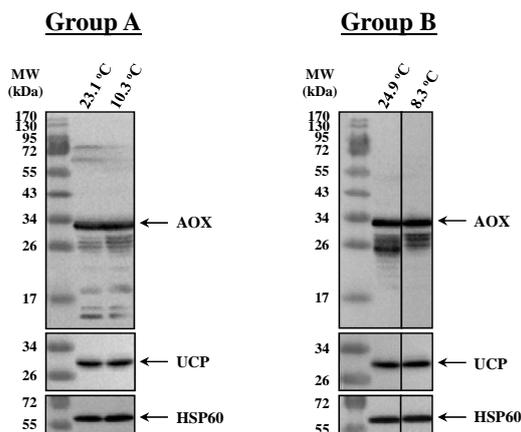


図5 発熱レベルの異なる肉穂花序(小花)から調製したミトコンドリアを用いたウエスタン解析(Onda *et al.* 2008を改変)。

図5からも明らかのように、異なる発熱レベルの発熱組織由来のミトコンドリアにおいても、UCPおよびAOXの発現量に大きな差異は観察されなかった。これら結果は、ザゼンソウの恒温性維持においては、ミトコンドリアにおけるUCPおよびAOXの蛋白質レベルでの発現変動は大きく関与していないことを示唆するものである。上述したように、UCPはリノレイン酸などの遊離脂肪酸によりその活性が賦活化される可能性が高いが、炭水化物を基質とするザゼンソウの発熱においては、細胞内における遊離脂肪酸の濃度は少なくとも哺乳動物における褐色脂肪細胞に比べると著しく小さいことが予想され、UCPの遊離脂肪酸による翻訳後活性制御が重要な機能を果たしているとは考えにくい。一方、ビルビン酸により活性化されるAOXについては、ビルビン酸が解糖経路の最終産物であることを考慮すると、環境温度の変動に伴いそのミトコンドリアにおける濃度が異なる可能性も十分に考えられる。この問題は本植物の恒温性維持メカニズムとも密接に関連することから、今後さらなる解析が必要な部分である。

(4) まとめと展望

本研究によりザゼンソウ発熱中の肉穂花序(小花)由来のミトコンドリアにおいては、UCPがAOXと機能的に共発現していることが明らかとなった。これは、AOX遺伝子をそのゲノム上に持たない哺乳動物におけるUCP1を主体とした熱産生とは大きく異なる点であり、本研究で得られた重要な知見である。ミトコンドリアにおける呼吸鎖は、通常は、チトクローム経路を介した酸素消費が行われているが、ザゼンソウ発熱組織においては、図6のようなAOX経路とUCP活性が介在することにより熱産生が行われている可能性が高い。

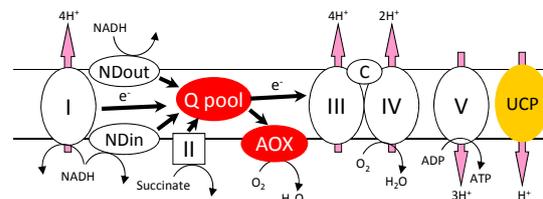


図6 ザゼンソウ発熱細胞における想定される呼吸経路。

これまでザゼンソウ以外にも恒温性を有する植物としてハスが報告されているが、その呼吸経路に関する詳細な解析は行われていない。また、国外に自生する*Arum*属植物にも数多くの発熱種が報告されており、その熱産生メカニズムがザゼンソウで見出されたものと同様であるかどうかは非常に興味を持たれるところである。また、非発熱植物

においても、例えばウイルス感染における熱産生の可能性など非常に興味深い現象があり、発熱植物のみならず、多くの農作物を含む非発熱植物における熱産生現象も今後の大きな研究のターゲットになろう。本研究においては、植物の発熱現象を全て説明できうるような統一的モデルの提示までには至らなかったが、UCPやAOXといったミトコンドリア因子のさらなる解析や解糖系に関わる酵素群の温度応答等など関連する研究がさらに進展することを期待したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Kamata, T., Matsukawa, K., Kakizaki, Y. and Ito, K. *In vivo* redox state of the ubiquinone pool in the spadices of the thermogenic skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. Journal of Plant Research, 2009, in press. 査読有
- ② Nicole, G., Onda, Y., Kakizaki, Y., Ito, K., Watling, J. and Sharon, R. Two Cys or not two Cys, that is the question? Alternative oxidase in the thermogenic *Nelumbo nucifera*. Plant Physiology, 2009, in press. 査読有
- ③ Matsukawa, K., Kamata, T. and Ito, K. Functional expression of plant alternative oxidase decreases antimycin A-induced reactive oxygen species production in human cells. FEBS Letters 583: 148-152, 2009. 査読有
- ④ Igarashi, A., Yamagata, K., Sugai, T., Takahashi, Y., Sugawara, E., Tamura, A., Yaegashi, H., Yamagishi, N., Takahashi, T., Isogai, H. and Yoshikawa, N. *Apple latent spherical virus* vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes. Virology 386: 407-416, 2009. 査読有
- ⑤ Onda, Y. Kato, Y. Abe, Y. Ito, T. Morohashi, M. Ito, Y. Ichikawa, M. Matsukawa, K. Kakizaki, Y. Koiwa, H. and Ito, K. Functional coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage. Plant Physiology 146: 636-645, 2008. 査読有
- ⑥ Onda, Y., Kato, Y., Abe, Y., Ito, T., Ito-Inaba, Y., Morohashi, M., Ito, Y., Ichikawa, M., Matsukawa, K., Otsuka, M. Koiwa, H. and K. Ito. Pyruvate-sensitive AOX exists as a non-covalently associated dimer in the homeothermic spadix of the skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. FEBS Letters 581: 5852-5825, 2007. 査読有
- ⑦ 恩田義彦, 伊藤菊一 発熱する植物たち —サーモカメラが捉えた発熱現象—, バイオサイエンスとインダストリー 11: 8-9, 2007. 査読無
- ⑧ Yaegashi, H., Isogai, M., Tajima, H., Sano, T. and Yoshikawa, N. The combinations of the two amino acids (Ala40 and Phe75 or Ser40 and Tyr75) in the coat protein of apple chlorotic leaf spot virus are crucial for infectivity. Journal of General Virology 89: 2611-2618, 2007. 査読有
- ⑨ Takahashi, T., Sugawara, T., Yamatsuta, T., Isogai, M., Natsuaki, T. and Yoshikawa, N. Analysis of spatial distribution of two virus populations differently labeled with cyan and yellow fluorescent proteins in co-infected plants. Phytopathology 97: 1200-1206, 2007. 査読有
- ⑩ Le Gall, O., Sanfacon, H., Ikegami, M., Iwanami, T., Jones, T., Karasev, A., Lehto, K., Wellink, J., Wetzell, T. and Yoshikawa, N. *Cheravirus* and *Sadwavirus*: two unassigned genera of plant positive-sense single-stranded RNA viruses formerly considered atypical members of the genus *Nepovirus* (family *Comoviridae*). Archives of Virology 152: 1767-1774, 2007. 査読有

- ⑪ Yaegashi, H., Yamatsuta, T., Takahashi, T., Li, C., Isogai, M., Kobori, T., Ohki, S. and Yoshikawa, N. Characterization of virus-induced gene silencing in tobacco plants infected with Apple latent spherical virus. Archives of Virology 152: 1839-1849, 2007. 査読有
- ⑫ Isogai, M., Yaegashi, H. and Yoshikawa, N. The multifunctional roles of Apple chlorotic leaf spot virus 50KP movement protein. Plant viruses 1: 135-141, 2007. 査読有
- ⑬ Ito, K., Matsukawa, K. and Kato, Y. Functional analysis of skunk cabbage SfUCPB, a unique uncoupling protein lacking the fifth transmembrane domain, in yeast cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 349: 383-390, 2006. 査読有
- ⑭ 伊藤孝徳, 伊東靖子, 伊藤菊一 ザゼンソウの発熱制御システム. 化学と生物 44: 225-232, 2006. 査読無

[学会発表] (計4件)

- ① 松川和重, 伊藤菊一 ガラクトース培地で培養した哺乳動物細胞におけるアンチマイシンAによって生じる活性酸素は、シアン耐性呼吸酵素の機能的発現により軽減できる. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008), 神戸. (2008.12.10)
- ② Matsukawa, K., Kamata, T. and Ito, K. Mitochondrial cyanide-resistant respiratory pathway alleviates generation of reactive oxygen species by complex III inhibitor, antimycin A, in human cells. First International AOX Symposium, Evora, Portugal. (2008.10.22)
- ③ Onda, Y. and Ito, K. The co-expression of the mitochondrial *SFAOX* and *SfUCPb* genes underlies the mechanism of homeothermic regulation in thermogenic florets of the skunk

cabbage, *Symplocarpus foetidus*. 8th International Plant Cold Hardiness Seminar, Saskatoon, Canada (2007.8.5)

- ④ 伊藤菊一 寒冷環境におけるザゼンソウの発熱制御システム, 平成19年度日本生物工学会北日本支部仙台シンポジウム「生物のユニークな環境適応戦略 -その分子機構と応用ポテンシャル-」, 仙台. (2007.7.19)

[図書] (計1件)

- ① 伊藤菊一 (分担執筆) 花はなぜ咲くの? 植物まるかじり叢書, 化学同人 2008.

[その他] アウトリーチ活動

- ① 伊藤菊一 第2回ザゼンソウシンポジウム 演題: ザゼンソウの発熱現象 -基礎から応用まで- 2009年2月28日, 今津
- ② 伊藤菊一 第1回ザゼンソウシンポジウム 演題: 発熱植物ザゼンソウの不思議 2008年2月28日, 今津

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 菊一 (ITO KIKUKATSU)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号: 50232434

(2) 研究分担者

吉川 信幸 (YOSHIKAWA NOBUYUKI)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号: 40191556