

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22405001

研究課題名（和文）海外に自生する発熱植物の体温時系列データの収集と決定論的非線形予測

研究課題名（英文）Analyses of heat-production in thermogenic plants growing overseas.

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（和文）：国外に自生する発熱植物（*Arum maculatum* および *Dracunculus vulgaris*）を対象に、それぞれの温度データを収集し、決定論的非線形予測手法を用いた解析を行うと共に、呼吸調節に関する分析を行った。その結果、両植物の発熱現象にはカオスの振る舞いは見られなかったが、それぞれの熱制御に関連すると考えられる特異的な代謝産物の変動やミトコンドリア構成蛋白質に関する新知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：In the present study, two thermogenic plants, *Arum maculatum* and *Dracunculus vulgaris*, grown in England and Australia, respectively, were investigated. Our analyses suggest that both *A. maculatum* and *D. vulgaris* utilize non-chaotic regulation in their heat-production, and that components for mitochondrial respiration including alternative oxidase and specific metabolomic changes play a role in organ-specific thermogenesis in these plants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2012 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総計	6,800,000	2,040,000	8,840,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生体生命情報学

キーワード：呼吸制御

1. 研究開始当初の背景

一般に植物には積極的な発熱能力はなく、その体温は外気温の変動とともに変化すると考えられている。しかしながら、ある種の植物には、積極的に発熱し、その体温を維持できるものが存在する。例えば、我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拘わらずその発熱器官（肉穂花序）の体温を 20℃内外に維持することができる発熱植物である(Ito et al., *Plant Cell & Environ.* 26: 783-788, 2003)。このような発熱植物の存在は、今からおよそ 200 年程度も前に、フランスの博物学者であるラマルクにより記述されていたが(Lamarck, *Flore Fr.*

3: 151, 1815)、その体温制御に関わるダイナミクス研究は本研究申請者により明らかになったザゼンソウのカオス制御 (Ito & Ito, *Physical Review E* 72: 051909, 2005) 以外には例がない。また、発熱植物における熱制御はミトコンドリアにおける呼吸が重要な働きをしていることが明らかとなっているが、海外に自生する発熱植物の呼吸代謝に関わる知見は未だ十分とは言えない。

2. 研究の目的

このような背景において、本研究においては、海外に自生する発熱植物における温度制御ダイナミクスを明らかにするため、当該自

生地における植物の体温時系列データの収集を含む調査を行う。また、呼吸代謝に関わるミトコンドリア因子や代謝産物の解析を通じて、植物の熱産生の普遍性あるいは多様性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 研究調査地

オーストラリア・アデレード市郊外に生育する *Dracunculus vulgaris*、および、イギリス南部に自生する *Arum maculatum* を対象に、それぞれ、アデレード大学およびサセックス大学の許可を得て、フィールド調査を行った。

(2) 発熱現象の測定と決定論的非線形予測

それぞれの植物の群生地において、発熱器官に温度センサを挿入し、1分ごとに体温を測定し、記録媒体にデータを蓄積した。また、外気温の変動も同様に測定した。A. *maculatum* においては、赤外線サーモグラフィにより、発熱の様子をより詳細に解析した。得られた時系列データについては、決定論的非線形予測による数理解析を行った。

(3) 呼吸測定

調査フィールドにおいて、発熱器官を採取し、アデレード大学およびサセックス大学の実験室にてパーコール密度勾配法によりミトコンドリアを精製した。得られたミトコンドリアについては、NADH 等を基質とした呼吸活性を測定した。その際、シアン化合物に耐性を有する呼吸経路 (AOX 経路) についても解析を行った。

(4) ミトコンドリア蛋白質および代謝産物の解析

調製したミトコンドリアを SDS-PAGE で分離後、AOX 蛋白質を切り出し、トリプシン消化の後、nano LC-MS/MS による解析を行った。また、*D. vulgaris* については、male spadix を 20°C あるいは 35°C に人為的に固定し (1 時間)、当該サンプルから抽出した代謝産物をメタボローム解析に供した。

4. 研究成果

(1) *D. vulgaris*

サトイモ科植物の一種である *D. vulgaris* は付属体 (appendix) と呼ばれる棒状の器官とその下部に存在する floral chamber と呼称される覆いの中に、male spadix が存在する (図 1A)。この male spadix が熱産生器官である。さらに、male spadix の断面を見ると、本器官は、表面に近い florets と維管束に富む pith に分けられる (図 1B)。male spadix のより下方に female spadix が存在するが (図 1A)、本器官には発熱能力はない。

群落地における male spadix と外気温の変

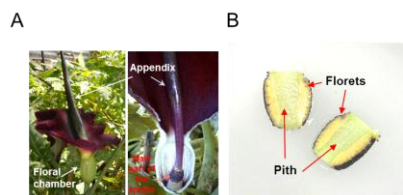


図1 *Dracunculus vulgaris*の外観(A)とmale spadix断面図(B)

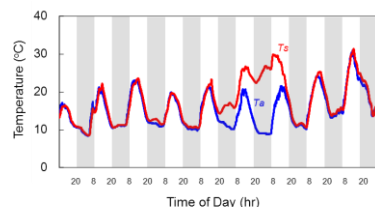


図2 *Dracunculus vulgaris*のmale spadix温度(Ts)と外気温(Ta)

動を測定した結果、male spadix においては、その体温が明確に外気温よりも上昇する時間帯が存在することが判明した (図 2)。Male spadix の温度は 30°C 以上にまで上昇し、その後、体温は急速に低下し、外気温とほぼ同程度になった。Male spadix 温度については、外気温が低下する際に、当該温度が上昇しており、これはザゼンソウに見られる恒温性の特徴が一部本植物においても保存されていることを示唆している。

そこで、male spadix の温度データを用いて、決定論的非線形予測を行った。本手法は、当該データのカオス性を明らかにすることができる方法で、解析の結果得られたグラフは縦軸が予測精度 (1.0 は 100% 予測が可能であることを示す)、横軸は予測ステップをしめす (図 3)。本解析により得られた結果は、右下がりのグラフになったが、これは、カオス性の存在を示唆するものであったが、同様のグラフは非整数ブラウン運動においても観察されることから、当該データを用いたより詳細な解析を行った。

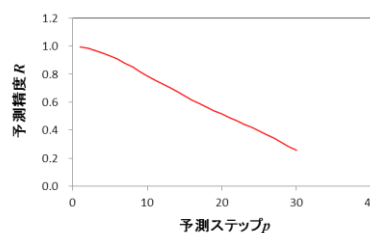


図3 *Dracunculus vulgaris*のmale spadix 温度データを用いた決定論的非線形予測

その結果、本植物から得られたデータは、非整数ブラウン運動の特徴を有していることが判明した (図 4)。これらの結果は、ザゼンソウと *D. vulgaris* の温度制御アルゴリズムが同一ではないことを示唆している。

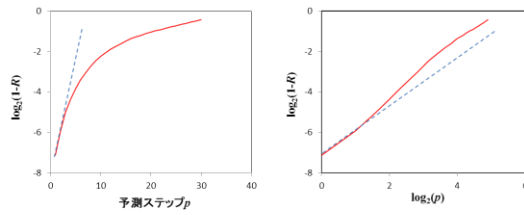


図4 *Dracunculus vulgaris*のmale spadix温度データを用いた非整数ブラウン運動に関する解析

(2) *A. maculatum*

本植物もサトイモ科に属する発熱植物である。先述した *D. vulgaris*と同様、付属体およびfloral chamberの中に、male spadixとfemale spadixが存在し、開花は複数のステージに分けることができる(図5および図6)。

付属体における温度変化を連続的に記録した結果を見ると、付属体の発熱は、 δ 期において最大となり、その温度は30℃以上にまで達することが明らかである(図6)。本植物においては、*D. vulgaris*で見られたような弱い恒温性は観察されず、付属体における発熱はあくまでも一過的なものであった。また、floral chamber内の温度は付属体の発熱が起こる前に一度上昇し、その後、 δ 期の後半に再び温度の上昇が認められる(図6)。このfloral chamber内の温度上昇は、赤外線サーモグラフィーの結果からも明らかのように、male spadixの発熱によるものである(図6)。



図5 *Arum maculatum*の外観およびinflorescenceの発達過程

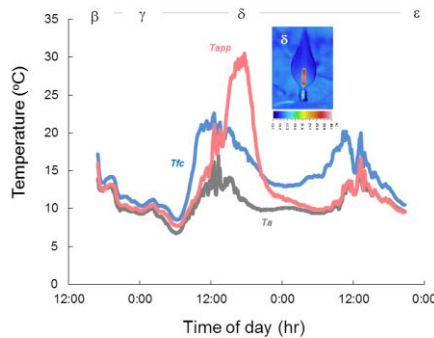


図6 *Arum maculatum*のappendix温度(T_{app})、floral chamber温度(T_{fc})、および、外気温(T_a)

次に、最も発熱能力の高い付属体の温度データを用い、最適化された条件において、決定論的非線形予測手法を用いた解析を行った。決定論的非線形予測においては、結果のグラフが右肩下がりになった場合、解析に用いたデータがカオスの特徴を持っている可能性が生じてくるが、*A. maculatum*のappendixの温度データの解析からは明確なカオス性が認められないことが判明した(図7)。

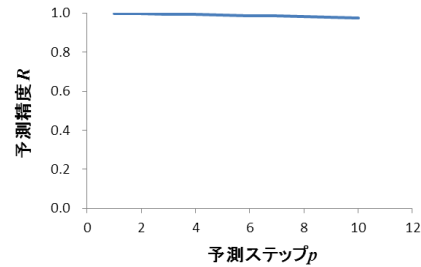


図7 *Arum maculatum*のappendix温度データを用いた決定論的非線形予測

決定論的非線形予測手法は当該データに関わる制御ダイナミクスの同定にも有効な方法であるが、今回解析を行った *D. vulgaris*と *A. maculatum*の発熱現象を支配するダイナミクスが異なることを示唆している。また、*D. vulgaris*と *A. maculatum*、および、ザゼンソウはいずれもサトイモ科の発熱植物であるが、今回の結果は、それぞれの発熱制御メカニズムは種間で差異がある可能性も示唆している。

そこで、次に、*D. vulgaris*と *A. maculatum*の発熱制御メカニズムに関わると予想される代謝産物の変動とミトコンドリアの呼吸酵素に着目した解析を行うこととした。

(3) 代謝産物の変動およびミトコンドリア呼吸因子に関する解析

上述したように、*D. vulgaris*は弱い恒温性を有することから、当該発熱器官においては、気温変化と逆相関を示す発熱メカニズムが存在するはずである。そこで、*D. vulgaris*から採取したmale spadixの温度を人為的に20℃(呼吸活性高い)あるいは35℃(呼吸活性低い)に固定し、当該組織における代謝産物の変動を測定した。その結果、TCAサイクルおよび解糖系を含むいくつかの代謝経路が温度変化によって影響を受けることが判明した(図8)。これらの温度により変動する代謝産物の中には、ミトコンドリアの呼吸基質となるコハク酸が含まれていた。

*A. maculatum*においては、付属体において一過的な発熱が観察されたが、従来、植物の熱産生において重要であるとされるシアン耐性呼吸酵素(AOX)の本植物における詳細は不明のまま残されていた。そこで、本研究において精製したミトコンドリアに含まれ

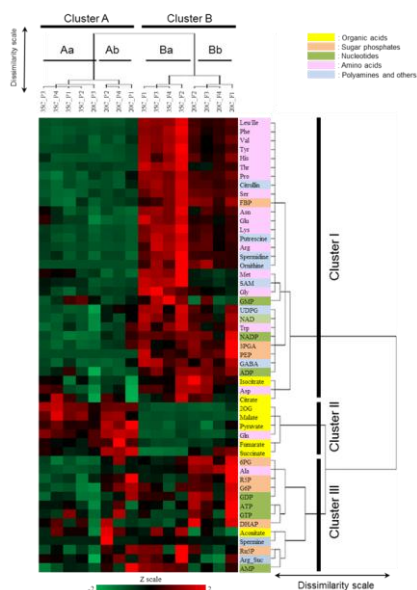


図8 *Dracunculus vulgaris*の発熱器官における代謝産物の変動している AOX のペプチド構造を解析した結果、我々が本植物から同定した AmAOX1e と同一性を持つ配列が得られることが判明した (図 9)。また、分裂酵母を用いた解析により、AmAOX1e はビルビン酸等の代謝産物による翻訳後活性調節を受けないタイプの AOX であることが判明した。

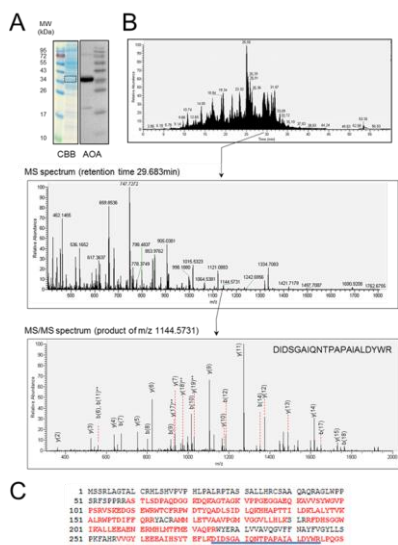


図9 *Arum maculatum*のappendix由来ミトコンドリアにおけるシアン耐性呼吸酵素の解析 (A)ミトコンドリアタンパク質をSDS-PAGEで分離し、(B) nanoLC-MS/MSで解析した結果、(C)シアン耐性呼吸酵素アミノ酸に相当するペプチド配列 (赤色)が得られた。

(4) おわりに

本課題においては、海外に自生するサトイモ科発熱植物 (*D. vulgaris* と *A. maculatum*) を対象に一連の解析を行い、それぞれの植物の制御ダイナミクスが同一ではない可能性を提示するに至った。また、本申請者が既に報告しているサトイモ科植物であるザゼン

ソウの発熱特性と比較しても、*D. vulgaris* と *A. maculatum* の発熱現象は互いに異なるものである。従って、所謂発熱植物の温度制御ダイナミクスは単一のアルゴリズムで説明できるようなものではなく、それぞれの発熱植物に固有の制御メカニズムを考慮する必要があると考えられる。今後は、個別の発熱植物のメタボローム解析や AOX を含む熱産生に関わる個々の分子の詳細な解析を通じ、地球上に自生する発熱植物の熱制御メカニズムをより鳥瞰的に捉えるような研究が必要であろう。

なお、本研究を推進するにあたっては、オーストラリア・アデレード大学の Roger Seymour 教授、イギリス・サセックス大学の Anthony Moore 教授にお世話になった。また、数理的解析においては、伊藤孝徳博士に協力頂いた。また、オーストラリア・アデレード郊外に自生する *D. vulgaris* のフィールド調査においては、Mick Brew 氏に協力を頂いた。さらに、代謝産物の測定においては、岩手生工研の高橋秀行博士にお世話になった。この場を借りて深謝申し上げたい。また、紙面の都合上、本報告書に記載できなかったデータも多数あるが、それらは以降に示す原著論文を参照して頂けると幸いである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Ito, K., Takahashi, H., Umekawa, Y., Imamura, T., Kawasaki, S., Ogata, T., Kakizaki, Y. and Seymour, R.S. (2013). Metabolite profiling reveals tissue- and temperature-specific metabolomic responses in thermoregulatory male florets of *Dracunculus vulgaris* (Araceae).

Metabolomics, in press. DOI: 10.1007/s11306-013-0509-x (査読有)

② Kakizaki, Y., Moore, A.L. and Ito, K. (2012). Different molecular bases underlie the mitochondrial respiratory activity in the homeothermic spadices of *Symplocarpus renifolius* and transiently-thermogenic appendices of *Arum maculatum*. **Biochem. J.** 445: 237-246. (査読有)

③ Ito, K., Ogata, T., Kakizaki, Y., Elliott, C., Albury, M.S. and Moore, A.L. (2011). Identification of a gene for pyruvate-insensitive mitochondrial alternative oxidase expressed in the thermogenic appendices in *Arum maculatum*. **Plant Physiol.** 157: 1721-1732. (査読有)

〔学会発表〕（計6件）

①柿崎裕介, Moore, A.L., 伊藤菊一. 恒温性発熱植物 *Symplocarpus renifolius* と一過性発熱植物 *Arum maculatum* の発熱器官における呼吸鎖因子の発現様式とネイティブ構造に関する解析. 第85回日本生化学会大会. 2012.12.15. 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡（福岡県）

②尾形孝文, Moore A.L., 伊藤菊一. 発熱植物 *Arum maculatum* におけるシアン耐性呼吸酵素(AOX)の発現と分裂酵母を用いた機能解析. 第34回日本分子生物学会年会. 2011.12.15. パシフィコ横浜（神奈川県）

③柿崎裕介, Moore, A.L., 伊藤菊一. 恒温性発熱植物 *Symplocarpus renifolius* と一過性発熱植物 *Arum maculatum* におけるミトコンドリア呼吸鎖因子の発現様式に関する比較解析. 第84回日本生化学会大会. 2011.9.24. 国立京都国際会館（京都府）

④梅川 結, 高橋秀行, 今村智宏, Seymour, R. S., 伊藤菊一. *Dracunculus vulgaris* の発熱現象における代謝変動. 第34回日本分子生物学会年会. 2011.12.14. パシフィコ横浜（神奈川県）

⑤Ito, K., Ogata, T., Kakizaki, Y., Elliott, C., Albury, M.S., Moore, A.L. Molecular and systems elucidation of thermoregulation in plants. 18th International Botanical Congress. 2011.7.28. Melbourne Convention Centre (Australia) (Invited talk)

⑥尾形孝文, Moore, A.L. 伊藤菊一 発熱植物 *Arum maculatum* におけるシアン耐性呼吸酵素 (AOX) および脱共役タンパク質 (UCP) 転写産物の同定と発現に関する研究. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会. 2010.12.9. 神戸ポートアイランド（兵庫県）

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