

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658094

研究課題名（和文）ケミカルプローブを用いた植物発熱装置の分子同定

研究課題名（英文）Characterization of thermogenic organelles in plants using chemical probes

研究代表者

稲葉 丈人（INABA TAKEHITO）

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：00400185

研究成果の概要（和文）：

本研究では、植物の発熱装置の同定とその機能構築を、網羅的な遺伝子発現解析法やケミカルプローブを用いて明らかにすることを目的とした。寒冷地に生息する発熱植物「ザゼンソウ」を用いて解析した結果、ザゼンソウの発熱時期にはミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子や呼吸機能に関わる遺伝子が高発現していることが判明した。さらに、発熱が終了する時期には液胞に局在するプロテアーゼが高発現することも明らかになった。以上の結果から、植物発熱装置の実体として、呼吸やミトコンドリア機能に関わる遺伝子群や老化・ストレス応答に関与する遺伝子群の関与が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This project aimed at uncovering the machineries (organelles) involved in thermogenesis in plants. To this end, we examined the gene expression landscape of skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*) during thermogenic and post-thermogenic stages. In-depth analysis suggested that cellular respiration and mitochondrial functions are significantly enhanced during the thermogenic stage. In contrast, genes involved in stress responses and protein degradation were significantly up-regulated during post-thermogenic stages. These data suggest that mitochondria may play key roles in plant thermogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：発熱植物、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

体温を一定に保つ「恒温性」は哺乳動物や鳥類、そして一部の高等植物にみられる特徴である。動物ではミトコンドリアの脱共役タンパク質 UCP、植物ではシアン耐性呼吸酵素 AOX が電子伝達鎖上の余剰エネルギーを解消して、その過程で熱を出すと考えられている。しかしながら、UCP や AOX による発熱分子モデルはピーター・ミッチェルの化学浸

透圧説をベースとした理論モデルであり、実験的な証明には至っていない。そこで本研究では、ケミカルバイオロジーやオミクス解析などのアプローチを用いて、植物における発熱分子機構の理解を目指すこととした。

2. 研究の目的

本研究では寒冷地に生息する発熱植物「ザ

ゼンソウ」をモデルとして用いた。ザゼンソウは花が密集した「肉穂花序」と呼ばれる器官を持ち、肉穂花序の雌期から雄期への移行に伴い発熱状態が変化する。雌期では盛んに発熱して体温を一定に保つが、雄期になると発熱能力が低下して、体温は外気温とともに変化する。

本研究ではまず、網羅的な遺伝子発現解析法を用いてザゼンソウの発熱期および非発熱期に特異的に発現している遺伝子を同定することを目的とした。

次に、発現解析により同定した遺伝子の産物を明らかにするため、高速 DNA シーケンサーを用いてザゼンソウの大規模 EST 解析を行った。

最後に、遺伝子発現解析で同定した主要な遺伝子産物の構造及び機能を明らかにするため、高発現していた遺伝子の cDNA をクローニングし、*in situ hybridization* 法を用いてそれらの発現場所を調べた。

3. 研究の方法

(1) Super-SAGE 法を用いた遺伝子発現の解析
岩手県西和賀町に生息するザゼンソウの肉穂花序を未熟期、雌期、両性期、雄期に分けてサンプリングし、RNA を精製した。精製したサンプルを用いて Super-SAGE タグを調製した。調製したサンプルは高速 DNA シーケンサーを用いて解析した。

(2) ザゼンソウの大規模 EST 解析
ザゼンソウの発熱部位で発現する遺伝子の大規模な EST 解析を行うため、まず、RNeasy plant kit を用いて肉穂花序から total RNA を精製した。これを高速 DNA シーケンス解析のサンプルとして供した。

(3) 発熱消失期に高発現するシステインプロテアーゼの同定
まず、Super-SAGE で得られたタグ情報をもとに EST データ中から候補遺伝子を探索した。候補遺伝子を同定したのち、プライマーを設計してシステインプロテアーゼ遺伝子の ORF 全長をクローニングした。さらに、その部分配列を用いてセンスおよびアンチセンスプローブを作成した。これらのプローブと固定したザゼンソウ肉穂花序切片を用いて *in situ hybridization* 解析を行った。

4. 研究成果

(1) Super-SAGE 法を用いた遺伝子発現の解析
まず、発熱植物ザゼンソウを用いて、トランスクリプトーム解析により発熱時期特異

的に発現している遺伝子を探索した (図 1)。

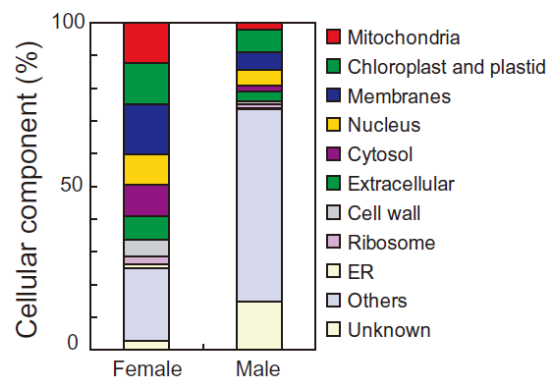


図 1.雌期および雄期の肉穂花序で高発現している遺伝子の予想局在場所

その結果、以下のことが明らかになった。

1. ミトコンドリアに局在するタンパク質は雌期で高発現しているが雄期になると発現が低下する
2. 発熱が終了したザゼンソウの肉穂花序では分類から外れる遺伝子が高発現しており、これらの多くは液胞に局在するタンパク質をコードしている

また、ザゼンソウの発熱は花が密集している「肉穂花序」で観察されることが知られているため、非発熱植物のシロイヌナズナの花序における遺伝子発現プロファイルとザゼンソウのものとを比較した。その結果、シロイヌナズナの花序ではミトコンドリアタンパク質をコードしている遺伝子は高発現しておらず、ザゼンソウの花序における遺伝子発現パターンとは大きな違いが見られた。以上の結果から、発熱時期特異的に発現している遺伝子群には特徴があり、これらの遺伝子産物が発熱装置の実体を構成している可能性が示唆された。さらに、ザゼンソウの発熱を制御する仕組みとして、図 2 に示すようなモデルが浮かび上がってきた。

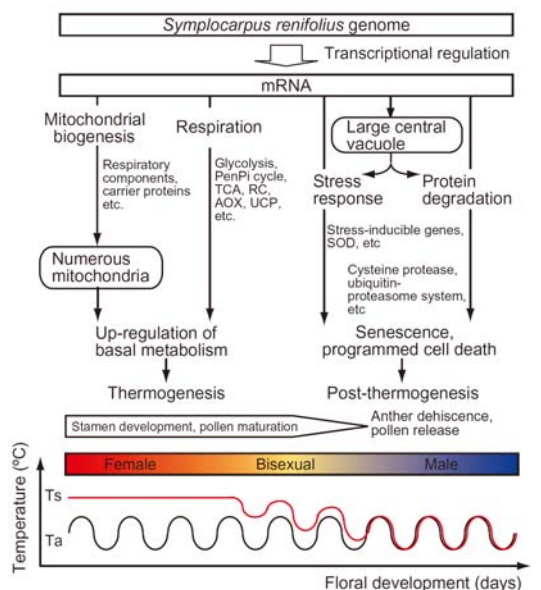


図 2. 遺伝子発現解析から明らかになったザゼンソウにおける発達ステージと発熱の関係

(2) ザゼンソウの大規模 EST 解析

(1) では以前に行ったザゼンソウ肉穂花序の EST 解析により得られたデータを使用した。アノテーションができた遺伝子は数百程度であった。発熱装置の実体を明らかにするためにはさらに多くの遺伝子の同定が必要であると考え、ザゼンソウの発熱組織から得られた RNA を用いて大規模な EST 解析を行った。得られたデータを解析した結果、発熱部位で発現する遺伝子の構造を以前の 10 倍以上の規模で明らかにすることができた。これらの遺伝子の中には転写因子やシグナル伝達にかかわる因子など、発現量が少ないものも含まれていた。したがって、今後の研究により、発熱装置を構成するタンパク質の発現調節機構を解析することも可能になった。

(3) 発熱消失期に高発現するシステインプロテアーゼの同定

雌期および雄期で発現している遺伝子を機能ごとに分類すると興味深いことが判明した。すなわち、電子伝達等に関与するタンパク質は雌期から雄期にかけて発現が減る一方、ストレス応答タンパク質は雌期から雄期かけて発現が上昇する (図 3)。雄期に高発現するタンパク質は発熱装置の分解・消失に関係すると考えられるので、その実体解明を試みた。

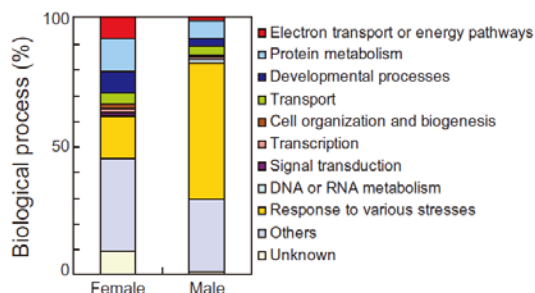


図 3. 雄期および雌期の肉穂花序で発現する遺伝子の機能分類

まず、Super-SAGE 解析で得られたタグを用いて(2)で解析した EST データから候補遺伝子を探索したところ、候補遺伝子のほぼ全長が同定できた。そこで、プライマーを設計して、システインプロテアーゼ遺伝子 (SrCPA) の ORF 全長をクローニングした。当該遺伝子の部分配列を用いて *in situ* hybridization 解析を行ったところ、SrCPA 遺伝子は発熱の終了する時期に高発現していることが明らかになった。

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 4 件)

(1) Ito-Inaba Y., Masuko H., Watanabe M., Inaba T. Isolation and gene expression analysis of a papain-type cysteine protease in thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*).

Biosci. Biotechnol. Biochem., 76

(10):1990-1992, 2012.

(2) Ito-Inaba Y., Hida Y., Matsumura H., Masuko H., Yazu F., Terauchi R., Watanabe M., Inaba T. The gene expression landscape of thermogenic skunk cabbage suggests critical roles for mitochondrial and vacuolar metabolic pathways in the regulation of thermogenesis.

Plant Cell Environ., 35 (3):554-566, 2012.

(3) Kakizaki T., Yazu F., Nakayama K., Ito-Inaba Y., Inaba T. Plastid signalling under multiple conditions is accompanied by a common defect in RNA editing in plastids.

J. Exp. Bot., 63 (1):251-260, 2012.

(4) Inaba, T., Yazu, F., Ito-Inaba, Y., Kakizaki, T. and Nakayama, K. Retrograde signaling pathway from plastid to nucleus.

Int. Rev. Cell Mol. Biol., 290, 167-204

〔学会発表〕(計 2件)

•稲葉靖子, 飛田耶馬人, 松村英生, 増子潤美, 矢津英美子, 寺内良平, 渡辺正夫, **稲葉丈人**
遺伝子発現プロファイルから見えてきたザゼンソウの熱産生におけるミトコンドリアおよび液胞の役割 第53回日本植物生理学会年会, 2012年3月16日, 京都

•稲葉靖子, 飛田耶馬人, 矢津英美子, 松村英生, 寺内良平, **稲葉丈人** 発熱植物ザゼンソウの遺伝子発現及び遺伝子機能の解析 平成23年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会, 2011年9月17日, 宮崎

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲葉 丈人 (INABA TAKEHITO)
宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号: 00400185

(2)研究分担者

井上 謙吾 (INOUE KENGO)
宮崎大学・IR 推進機構・助教
研究者番号: 70581304

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

稲葉 靖子 (INABA YASUKO)
宮崎大学・テニュアトラック推進機構・助教