

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24380182

研究課題名(和文) 発熱植物の呼吸代謝および温度センシング機構に関する研究

研究課題名(英文) Respiration control and temperature-sensing in thermogenic plants.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：恒温性を有する発熱植物であるザゼンソウを用い、その呼吸代謝並びに温度センシングメカニズムを明らかにするための解析を行った。その結果、ザゼンソウの発熱器官である肉穂花序由来のミトコンドリアが特異的な温度依存性呼吸を示すことが明らかになると共に、熱力学的な解析が温度依存的な呼吸に適用できることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*), was used to uncover the mechanism of respiration control and temperature-sensing mechanisms during homeothermic heat-production. Our data showed that mitochondria from thermogenic spadices possess a specific temperature-dependent respiration, and that thermodynamic analyses could be a useful tool to determine the overall activation energy of respiration control under different temperatures.

研究分野：境界農学

キーワード：呼吸制御 発熱植物 ザゼンソウ

1. 研究開始当初の背景

ザゼンソウをはじめとする発熱植物は、呼吸活性の増大により特定の器官の温度を積極的に上昇させることができる。我が国に自生するザゼンソウの肉穂花序は、氷点下を含む外気温の変動にも関わらず、発熱によりその体温を 23 内外に維持することが明らかにされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ザゼンソウの温度制御システムに関わる分子群について、ミトコンドリアにおける呼吸経路に着目した研究を行う。これまでの研究により、ザゼンソウは予想以上に高感度の温度制御システムを有していることが判明しており、本研究の成果は、植物の発熱制御システムの解明、及び、植物由来の温度センシング機構の同定につながる事が期待される。

3. 研究の方法

1. 研究の方法

(1) 研究調査地

野生のザゼンソウは秋田県大森町、及び、岩手県北上市藤根に自生している植物体を主に用いた。

(2) ミトコンドリア精製

発熱性肉穂花序の小花から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は、そのインタクトネスを測定した上で呼吸解析に用いた。

(3) 呼吸測定

精製したミトコンドリアの呼吸活性は、クラーク型酸素電極を用い、その酸素消費量から決定した。呼吸測定は、NADH、リンゴ酸、コハク酸を基質として、種々の温度(15、23、30、37)において行った。また、チトクローム c 呼吸経路(COX 経路)とシアン耐性呼吸経路(AOX 経路)の温度に依存した活性についてもそれぞれの経路の特異的な阻害剤を用いて行った。

(4) Thermal clamping 法による呼吸測定

群生地における肉穂花序温度の固定は、thermal clamping 法により行った。同法により肉穂花序が所定の温度に到達し、平衡が保たれるまで一定の時間をおいた後に、肉穂花序の呼吸を計測・記録した。

(5) Modified Arrhenius model による解析

Thermal clamping 法により得られたデータについては、modified Arrhenius model により熱力学的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア呼吸

植物のミトコンドリアは、ロテノン感受性の NADH 脱水酵素に加え、ロテノン非感受性

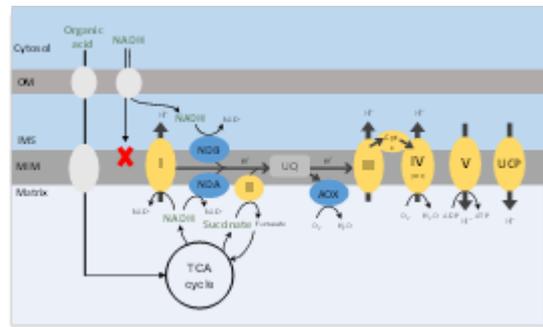


図1. ミトコンドリア呼吸鎖の概略

の NADH 脱水酵素を有している。これらは、NDA および NDB と呼ばれ、それぞれミトコンドリア内膜のマトリックス側および膜間腔側を向いて存在している(図1)。さらに、植物の発熱性組織のミトコンドリアにおいては、シアン耐性呼吸酵素(AOX)と呼ばれる呼吸酵素が存在する(図1)。NDA および NDB は触媒反応により酸化型ユビキノン還元型のコヒキノールに変換し、呼吸鎖に還元力を供給するが、ミトコンドリアのプロトン濃度勾配の形成には影響を与えない。また、AOX は、還元型ユビキノール由来の電子を用い、酸素を還元して水を生成する反応を触媒するが、同酵素もプロトン濃度勾配の形成には影響を与えない。このように、NDA と NDB、及び、AOX はそれぞれの反応が熱消散的であり、植物の熱産生に貢献する因子群である。従来の研究により、ザゼンソウの発熱性小花由来のミトコンドリアにおいては、AOX と NDA 転写産物が高レベルで発現していることが判明している。

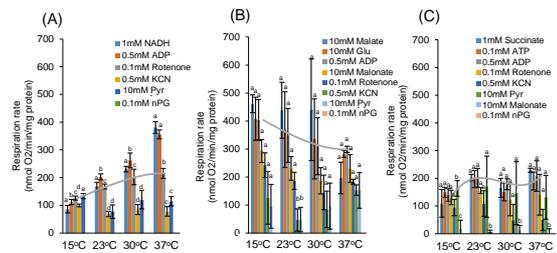


図2. ミトコンドリア呼吸の温度依存性  
インタクトなミトコンドリアを用い、(A)NADH、(B)リンゴ酸、及び、(C)コハク酸を基質とした呼吸を行った。異なる英字は有意差があることを示す。

図2に示すように、得られたミトコンドリア呼吸はそれぞれの用いる基質および温度によりその活性が異なっていた。細胞のミトコンドリア呼吸においては、基質となる代謝物は複数存在し、その細胞内濃度も今回の実験とは異なっていることが予想されるが、本解析はあくまでもミトコンドリア呼吸反応に関わる各要素・経路の温度応答を見ようとしたものである。

次に、これらのデータを用い、state3 呼吸についてまとめた結果が図3である。NADHを基質とした呼吸は、温度の上昇と共に増大している。また、コハク酸を基質とした呼吸は温度変化に対して大きな変動を示さない。

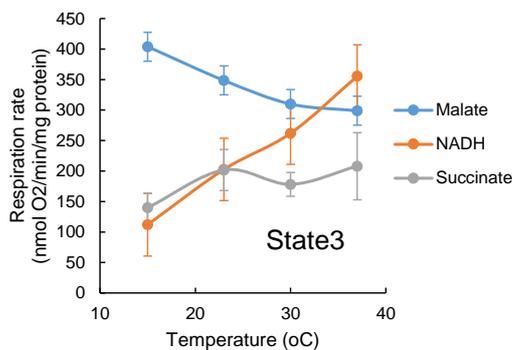


図3. NADH、リンゴ酸、及び、コハク酸を用いた State3 呼吸の温度依存性

一方、リンゴ酸を基質とした呼吸は温度が低い方がその呼吸活性が高い傾向があることが判明した。リンゴ酸を呼吸基質として用いた場合、ミトコンドリアのマトリクスに取り込まれたリンゴ酸は、リンゴ酸脱水素酵素により代謝され、NADHを生成する。生じたNADHは複合体IあるいはNDAを介して電子伝達系に電子が供給される。今回の実験においては、呼吸測定に用いた緩衝液にロテノンを追加しているため、ここで得られた結果はNDAを介した呼吸であると考えられる。先述したNADHを加えた際に観察された呼吸は、インタクトなミトコンドリアを用いていることから、NDBを介した呼吸である。これらの結果は、NDAを介した呼吸が今回用いた温度範囲において低温側でより活性が高いことを示している。

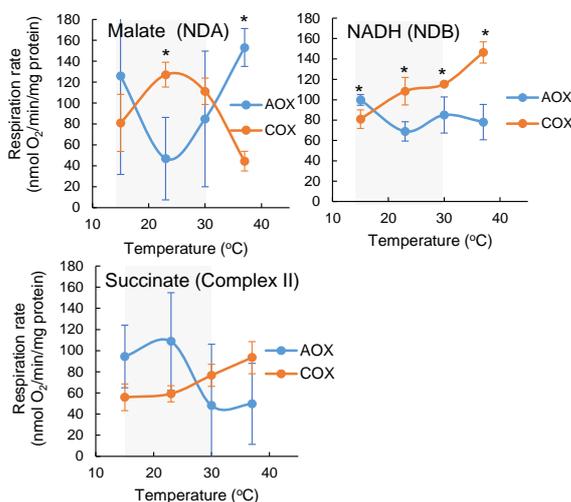


図4. AOX および COX 経路の温度依存性

それぞれの呼吸活性を AOX および COX 経路のキャパシティとして示した結果が図4である。リンゴ酸を基質とした NDA を介する呼吸

においては、COX 経路の最大呼吸速度は 23 で観察され、同経路の呼吸速度は、23 よりも高い温度あるいは低い温度において低下することが判明した。一方、リンゴ酸を基質とした NDA を介する AOX 呼吸は、23 で最も低く、15 と 37 で高い値を示すことが明らかとなった。また、NADH を基質とした NDB を介する COX 呼吸活性は温度上昇とともに増大したが、AOX 呼吸は温度による大幅な変化は観察されなかった。コハク酸を基質とした COX 呼吸活性は温度とともに増大する傾向があったが、AOX 呼吸は 15 および 23 の値が 30 および 37 よりも高い傾向にあった。

呼吸速度と温度との関係を示す指標として  $Q_{10}$  値がある。 $Q_{10}$  値は 10 の温度差に対する反応速度の比率を示すものであり、通常、温度が 10 上昇した場合の  $Q_{10}$  値は 2 であることが知られている。これは温度が 10 上昇するとその化学反応速度は 2 倍になることを意味している。ザゼンソウの発熱性肉穂花序小花から抽出したミトコンドリアを用いた呼吸測定データに基づき  $Q_{10}$  値をまとめたものが表1である。

表1 ザゼンソウ由来ミトコンドリア呼吸の  $Q_{10}$  値

Substrate (main enzyme which oxidized substrates)	$Q_{10}$ (15-30°C)			
	State3 (-inhibitor)	State3 (+ inhibitor)	AOX capacity	COX capacity
Malate (NDA)	0.84	0.71	0.77	1.24
NADH (NDB)	1.76	1.37	0.90	1.27
Succinate (Complex II)	1.17	0.95	0.64	1.23

表1においては、リンゴ酸を基質とした NDA を介した呼吸と NADH を基質とした NDB を介した呼吸、及び、コハク酸を基質とした複合体 II を介した呼吸について State3、及び、AOX と COX のキャパシティとして表示している。ここで、+inhibitor は、ロテノンおよび malonate を添加した際の呼吸を示している。得られた結果は、NDA を介した呼吸が最も小さい  $Q_{10}$  値を持つことを示し、NDA を介した呼吸の温度特異性の重要性を示唆している。

## (2) インタクトな肉穂花序における呼吸

群生地で発熱している肉穂花序においては、肉穂花序温度が 15 から 30 において温度制御がなされ、肉穂花序の呼吸活性は 15 で最大となる。特に、ザゼンソウ肉穂花序における 15 という温度は switching temperature と定義付けられ、本植物に固有の特異温度である。上述したミトコンドリアを用いた呼吸解析においては、NDA を介した呼吸反応が温度変化と逆相関を示す呼吸であることが示されたが、これらの精製したミトコンドリアを用いた実験結果はあくまでも人工的な測定条件において得られたものであり、インタクトな肉穂花序における温度応答をより鳥瞰的に解析することが必要であると考えられた。

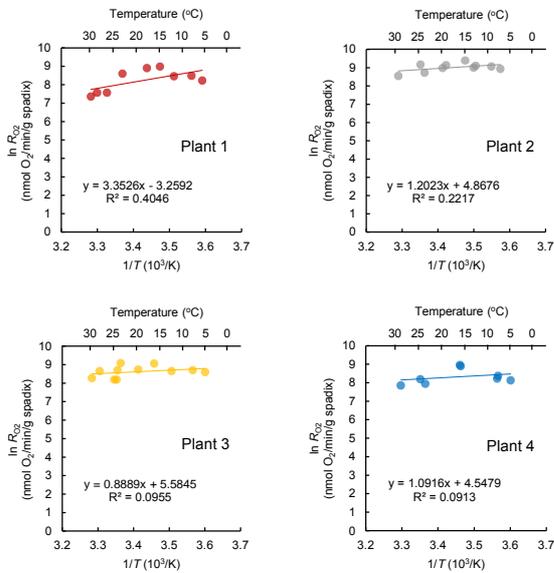


図 5. Arrhenius model を用いた肉穂花序呼吸データの解析

一般的に、温度と化学反応の関係については Arrhenius model に基づく熱力学的解析手法が用いられる。そこで、野外で発熱している独立した 4 個体の肉穂花序で行われている呼吸に関わる化学反応を Arrhenius model により解析することとした。その結果を図 5 に示す。得られたデータは 4 個の植物体 (Plant 1~3) いずれにおいても呼吸速度と温度との相関係数が低いことを示している。そこで、今度は近年提示されている Modified Arrhenius model をザゼンソウから得られたデータに適用できないかという観点から解析を行った。その結果が図 6 に示されている。

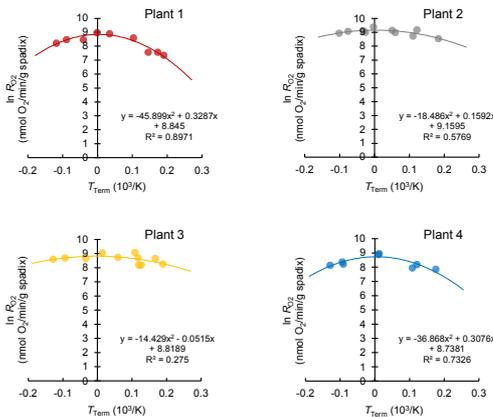


図 6. Modified Arrhenius model を用いた肉穂花序データの解析

Modified Arrhenius model を用いた解析は図 5 で用いた 4 個の植物体から得られたデータと同一であるが、その相関係数は Arrhenius model よりはより高い値が得られ、ザゼンソウ肉穂花序の呼吸速度から Modified Arrhenius model により熱力学的な解析が可能であることを示唆された。

Modified Arrhenius model に基づき、肉穂花序における呼吸反応に関わる全活性化エネルギー ( $E_o$ : overall activation energy) を算出した。得られた  $E_o$  と温度との関係を示すグラフを図 7 に示す。ここで示されている 4 個の植物体由来のデータは、図 5 及び図 6 で解析に使われたものと同一である。

解析の結果、肉穂花序温度が 15 より低い場合は、 $E_o$  は正の値を示すものの、ザゼンソウの switching temperature である 15 においては、いずれの肉穂花序もその活性化エネルギーがゼロとなり、さらに 15 よりも肉穂花序温度が高くなった場合には、 $E_o$  は負の値を示すことが明らかとなった。

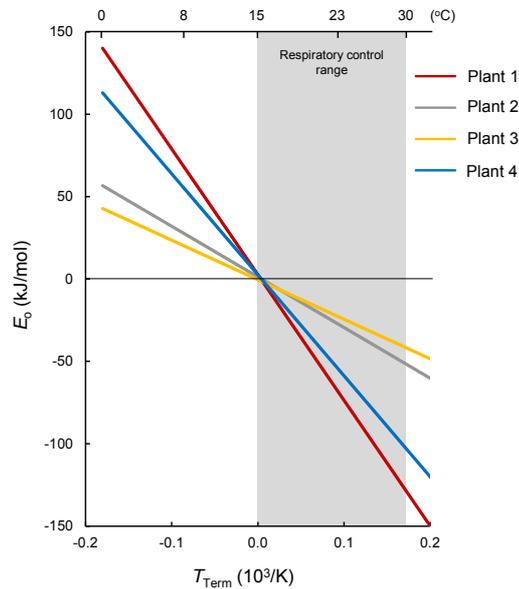


図 7. Modified Arrhenius model を用いた活性化エネルギーと温度との関係性

Modified Arrhenius model を用いた結果は、ザゼンソウ肉穂花序の呼吸反応に関わる活性化エネルギーを算出し解析できることを示す重要な知見である。

### (3) まとめ

本課題において、ザゼンソウ肉穂花序由来のミトコンドリアは用いる基質や温度条件等により、様々な呼吸応答を示すことが判明した。今回用いた実験系は人工的にデザインされたもので、発熱細胞本来の条件とは必ずしも一致していないと考えられるが、ザゼンソウから調製したミトコンドリアが呼吸環境により柔軟な活性を示すことが明らかとなった。また、本来の発熱細胞におけるミトコンドリア呼吸の状態を推定できる手法として、Modified Arrhenius model の有用性が明らかとなったことは本研究課題の大きな成果である。

特に、異なる植物個体において、15 という特定の温度において活性化エネルギーがゼロとなり、15 から 30 という本植物の生

理的な温度調節範囲において負の活性化エネルギーを示すことは、本植物の呼吸代謝並びに温度センシングメカニズムを熱力学の観点から解析できることを示しており、重要な知見である。

負の活性化エネルギーが生じるメカニズムはザゼンソウの恒温性の本質を説明できる可能性があり、本課題においてデータや解析手法が蓄積されているミトコンドリア呼吸と合わせて、今後さらなる研究を展開していきたいと考えている。

#### 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3件)

Seymour, R.S., Ito, K., Umekawa, Y., Matthews, P.D. and Pirintsos, S.A. (2015) The oxygen supply to thermogenic flowers. **Plant Cell and Environment** 38: 827-837. (査読有)

Onda, Y., Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Seymour, R. S., Umekawa, Y., Pirintsos, S. A., Shinozaki, K. and Ito, K. (2015) Transcriptome analysis of thermogenic *Arum concinatum* reveals the molecular components of floral scent production. **Scientific Reports** 5: 8753. (査読有)

伊藤菊一 (2014) ミトコンドリアにおけるシアン耐性呼吸酵素(AOX)の構造と機能. **光合成研究** 24: 10-17. (査読有)

##### [学会発表](計6件)

Md. Abu Sayed, 梅川 結, 伊藤菊一. Metabolism of phosphoenolpyruvate in thermogenic spadix of skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. 第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会 BMB2015. 2015.12.2.神戸ポートアイランド(兵庫県)

梅川 結, 伊藤菊一. ザゼンソウにおける温度変化と逆相関を示す呼吸調節メカニズム. 第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会 BMB2015. 2015.12.3.神戸ポートアイランド(兵庫県)(若手優秀発表賞)

梅川 結, 伊藤菊一. 植物ザゼンソウの恒温性メカニズムにおける負の活性化エネルギー. 平成27年度日本農芸化学会東北支部第150回大会. 2015.10.3.東北大学大学院農学研究科(宮城県)

梅川 結, Md. Abu Sayed, 清藤駿成, 伊藤菊一. ザゼンソウ発熱組織から調製したミトコンドリアにおけるNADH呼吸の温度応答性に関する解析. 2014.10.18.第87回日本生化学会. 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都

府)

Umekawa, Y., Seito, T., Md. Abu Sayed, and Ito, K. Rotenone-insensitive internal alternative NADPH dehydrogenase-dependent respiration in the mitochondria from skunk cabbage: temperature responses of COX- and AOX-mediated respiration pathways. 18th European Bioenergetics Conference, 2014.7.14. University of Lisbon (Portugal)

伊藤菊一. ミトコンドリアにおけるシアン耐性呼吸酵素(AOX)の構造と機能. 日本植物学会第77回大会. 2013.9.13. 北海道大学高等教育推進機構(北海道)(招待講演)

#### 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