

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657080

研究課題名(和文) 発熱植物ザゼンソウにおいて見出された脱共役活性の分子基盤に関する研究

研究課題名(英文) Molecular basis of uncoupling proteins in thermogenic 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：一般に植物には強力な発熱能力はないと考えられているが、ザゼンソウを含むある種の植物は積極的に発熱し、発熱器官の温度を外気温よりも有意に上昇できることが知られている。本研究においては、哺乳動物において熱産生因子の一つとして知られている脱共役タンパク質に着目し、ザゼンソウ肉穂花序由来ミトコンドリアにおける発現を他の発熱植物である *Arum maculatum* と比較した。その結果、*A. maculatum* における脱共役タンパク質の発現はザゼンソウと比較して極めて低レベルであること等が判明した。これらの結果は、植物の熱産生現象において脱共役タンパク質は異なる発現および機能性を有する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanisms of thermoregulation in plants, we performed a comparative analysis of mitochondrial proteins using Blue native PAGE combined with nano LC-MS/MS. Mitochondrial fractions were prepared from thermogenic organs of *Symplocarpus renifolius* and *Arum maculatum*, a transiently-thermogenic plant. Our analysis visualized approximately 70 2D gel protein spots regardless of the origin of the mitochondria, and most of these visible spots were subjected to protein identification by mass-spectrometry. Forty-four of these proteins were comparable between the *S. renifolius* mitochondria and *A. maculatum* mitochondria in terms of their positions on the gels. Moreover, mitochondria from *S. renifolius* express higher amounts of uncoupling proteins than those found in *Arum maculatum*. Our data together with genomic analysis of the protein suggest that expression and functionality of uncoupling proteins are differently regulated in thermogenic plants.

研究分野：生物学、生物科学、機能生物科学

キーワード：生体エネルギー変換

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が、驚くべきことに、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、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。発熱植物の熱産生はミトコンドリアにおける呼吸制御が重要な役割を担っていることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

哺乳動物の非ふるえ熱産生は褐色脂肪組織 (BAT) における UCP1 の脱共役機能が担っている。BAT での UCP1 活性は、脂質の分解により生じた遊離脂肪酸により賦活化される。一方、高等植物においても、高度に発熱機能を発達させた植物種が存在しており、上述したとおり、ザゼンソウにおいては、氷点下を含む外気温の変動においても発熱により特定器官の温度を 20 内外に維持する能力を持つことが知られている。ザゼンソウの発熱基質は炭水化物であることが知られており、また、肉穂花序と呼称される発熱器官における遊離脂肪酸の含量も低いことから、ザゼンソウにおける脱共役活性は、脂質代謝産物によりその活性が賦活化される哺乳動物由来の UCP1 とは異なる分子基盤を持つことが予想される。

興味深いことに、発熱植物の中には、ザゼンソウのようにある一定の期間、発熱器官の温度がほぼ一定を示す恒温性を有するものと、熱産生が一過的なものが存在する。恒温性を有する植物は、外気温の変動を認識する温度センサの存在が予想されるが、当該機能を司る因子は未だ見つかっていない。本研究においては、恒温性を有するザゼンソウと一過的な発熱を示す発熱植物である *Arum maculatum* を対比しながらそれぞれの植物における脱共役タンパク質の発現レベルについて比較検討し、植物の熱産生における脱共役タンパク質の位置づけを明らかにしようとした。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア調製

ザゼンソウおよび *A. maculatum* の発熱器官を緩衝液中において破碎し、粗ミトコンドリア画分を得た。その後、パーコール密度勾配遠心法により、ミトコンドリアを分離した後、緩衝溶液に懸濁し、凍結保存した。ミトコンドリアのタンパク質濃度について BCA 法により決定するとともに、適宜、呼吸活性を測定した。

(2) ミトコンドリア可能化条件の検討

ミトコンドリアを適当な濃度のジギトニンで可溶化し、一次元 BN-PAGE を行い、その

後、二次元目の泳動を行い、個別のタンパク質を可視化した。一次元目の泳動は、NativePAGE Novex 4-16% Bis-Tris Gel、および、二次元目の泳動は、NuPAGE Novex 4-12%で行った。

(3) 質量分析

ゲル上で可視化されたタンパク質スポットを切り出し、LTQ Orbitrap XL により解析を行うとともに、得られたデータを MASCOT により解析した。

(4) ゲノム DNA の調製

ザゼンソウ葉を材料に、市販されているキットを用い、ゲノム DNA を調製した。

(5) ゲノム DNA の解析

既に報告されているザゼンソウ由来脱共役タンパク質の遺伝子配列を基に設計したプライマーを用い、ターゲットとするゲノム領域を PCR 増幅し、当該塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) ザゼンソウおよび *A. maculatum* の呼吸鎖複合体

発熱ステージにある器官から調製されたミトコンドリアを用い、一次元の BN-PAGE 解析を行った結果を図 1 に示す。

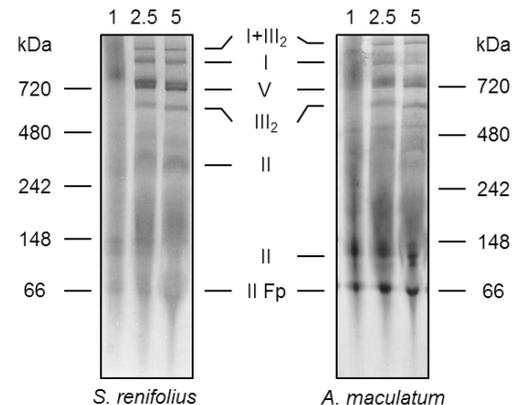


図 1. ザゼンソウ (*S. renifolius*) および *A. maculatum* 由来ミトコンドリアの一次元 BN-PAGE 像. 用いたジギトニンのタンパク質に対する濃度をそれぞれのパネルの上部に示した。ローマ文字はそれぞれの呼吸鎖複合体の位置を示している。分子質量マーカーがパネルの左右に示されている。

可能化剤として用いるジギトニンの濃度はタンパク質 1g あたり、5g が適当であると考えられ、以降の解析にはこの濃度を用いることとした。また、呼吸鎖複合体の位置は、複合体 II を除いて、両植物由来ミトコンドリアで大きな相違がないことが判明した。

(2) 二次元 BN-PAGE によるミトコンドリアタンパク質の分離

最適化されたミトコンドリアタンパク質の可溶化条件を用い、ザゼンソウおよび *A. maculatum* 由来ミトコンドリアタンパク質の分離を行った結果を図2および図3に示す。

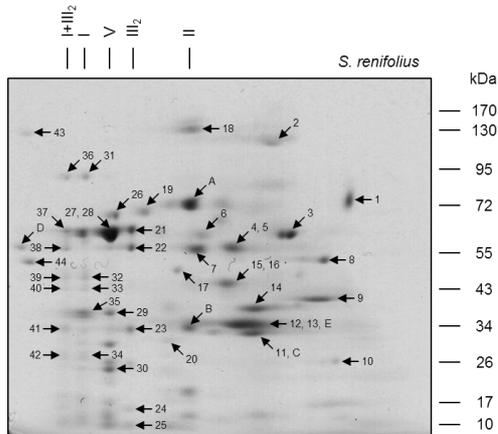


図2. ザゼンソウ (*S. renifolius*) 由来ミトコンドリアの二次元 BN-PAGE 解析像。電気泳動後、タンパク質を Coomassie Brilliant Blue により染色し、各スポットについて番号を付した。

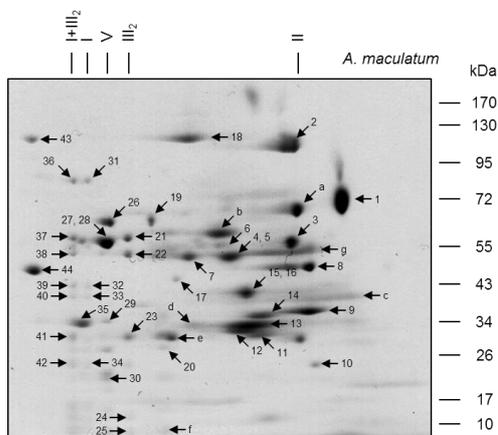


図3. *A. maculatum* 由来ミトコンドリアの二次元 BN-PAGE 解析像。電気泳動後、タンパク質を Coomassie Brilliant Blue により染色し、各スポットについて番号を付した。

ザゼンソウおよび *A. maculatum* のゲル上で観察されたスポットについて、両植物種で共通するものは同一の番号が付されている。また、それぞれの植物種に特異的なスポットについては、大文字のアルファベット (ザゼンソウ) および小文字のアルファベット (*A. maculatum*) で示している。本解析により、それぞれのミトコンドリアにおいて、70 個以上のスポットの同定に成功した。さらに、これらのスポットについて、質量分析による解析を行った結果、本研究において着目してい

る脱共役タンパク質は、ザゼンソウにおいてスポット E としてその存在が同定された。

一方、*A. maculatum* においては、可視化されたいずれのスポットにおいても、脱共役タンパク質に由来するペプチドは同定されなかった。これらの結果は、発熱植物間において、脱共役タンパク質の発現に大きな差異があることを示唆している。

また、ザゼンソウ由来ミトコンドリアを用いた質量分析において、脱共役タンパク質に関する情報が得られた。すなわち、ザゼンソウ由来ミトコンドリアにおいては、「KNDGPLAFYKG」に相当するペプチドと合致するデータが得られることが判明した。一方、「KNDGLLAFYKG」に相当するペプチド断片に関する情報については、我々が行った解析において、得ることができなかった。この配列 («KNDGPLAFYKG») は、ザゼンソウにおいて発現している特定の脱共役タンパク質に由来するペプチド断片である可能性が考えられた。

(3) ザゼンソウ脱共役タンパク質をコードするゲノム領域の解析

上述のとおり、恒温性植物であるザゼンソウ由来のミトコンドリアにおいては、脱共役タンパク質が発現していることが明らかとなったが、一方で、一過的な発熱を示す *A. maculatum* における同タンパク質の発現は検出限界以下であった。さらに、ザゼンソウ由来ミトコンドリアにおける脱共役タンパク質の解析においては、発現している同タンパク質の一部と考えられるペプチド断片 («KNDGPLAFYKG») が同定された。そこで、ザゼンソウゲノム上における脱共役タンパク質をコードしている遺伝子について解析することとした。その結果を図4に示す。

ザゼンソウ葉から調製したゲノム DNA 上には、脱共役タンパク質をコードすると予想される遺伝子が少なくとも2種類存在していた。既報のザゼンソウ脱共役タンパク質の膜貫通ドメイン IV から VI に着目すると、それぞれのドメインをコードするエクソン領域は、膜貫通ドメイン V において ESS (exonic splicing silencer) の存在の有無が認められた。また、エクソン V と VI の間にある、イントロン領域においては、一部の配列の欠失を含む複数の遺伝子配列の相違が観察された。膜貫通ドメイン V に存在する ESE (exonic splicing enhancer) の機能性についても興味のあるところである。なお、図4においては、それぞれの遺伝子を既報に従い、SrUCPa および SrUCPb と記載しているが、先述した «KNDGPLAFYKG» のペプチド断片は、SrUCPb 由来のものと考えられる。これまでの報告によれば、ザゼンソウ肉穂花序由来のミトコンドリアにおいて発現している脱共役タンパク質は、「KNDGLLAFYKG」を含む SrUCPa であるとされている。本研究においては、異なる植物体から異なる年に調製したミトコ

ンドリアを用い、複数回の独立した質量分析解析を行ったが、我々の解析では「KNDGLLAFYKG」に関するペプチド情報は出現しなかった。

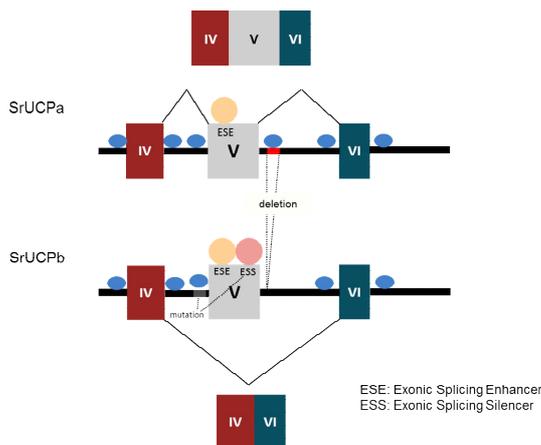


図 4. ザゼンソウのゲノムにおける脱共役タンパク質をコードする遺伝子。青い楕円はスプライシングに関与すると予想される因子群。ESE および ESS サイトと結合因子群についても示している。膜貫通ドメイン IV から VI を含むゲノム領域を模式的に示した。

(4) 今後の展望

複数の発熱植物のミトコンドリアにおける脱共役タンパク質の発現の程度を詳細に解析した事例は本研究がはじめてである。一過的な発熱を示す *A. maculatum* における脱共役タンパク質の翻訳産物としての発現量は本研究で用いた解析手法では、検出限界以下であった。一方、ザゼンソウの発熱器官である肉穂花序における脱共役タンパク質の発現は、二次元 BN-PAGE において明瞭なスポットとして観察されることから、両植物種における同タンパク質の発現・機能は異なっている事が推察される。

哺乳動物の非ふるえ熱産生においては、UCP1 が重要な機能を果たしていることが知られており、本研究を開始する時点においては、植物の熱産生においても、脱共役タンパク質が同様の重要な機能を有していることが推察された。しかしながら、本研究により、脱共役タンパク質の発現・機能は、発熱植物種によって異なっていることが予想される。

恒温性を示す植物として本研究においては、ザゼンソウのみを対象としたが、脱共役タンパク質が植物の恒温性と関連することを示すためには、ザゼンソウ以外の恒温植物を用いた解析を行う必要があると考えられる。

今後は、ザゼンソウと同様に恒温性を示すことが報告されているヒトデカズラやハス

の熱産生器官を対象とした関連する研究が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kakizaki, Y., Moore, A.L. and Ito, K. Different molecular bases underlie the mitochondrial respiratory activity in the homeothermic spadices of *Symplocarpus renifolius* and transiently-thermogenic appendices of *Arum maculatum*. *Biochem. J.* 査読有、445 巻、2012、237-246
DOI: 10.1042/BJ20111978

〔学会発表〕(計 4 件)

梅川 結、Sayed Md Abu、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。第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 15 日、京都国際会議場(京都)

Umekawa, Y., Seito, T., Abu Md, S., 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. EBEC2014 2014 年 7 月 12 日、リスボン大学(リスボン)

梅川 結、高橋秀行、今村智宏、伊藤菊一 *Symplocarpus renifolius* における発熱調節と代謝変動に関する網羅的解析。第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡)

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 年 12 月 15 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
https://www.researchgate.net/profile/Kikukatsu_Ito

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
なし

(3)連携研究者
なし