

種子植物の生殖器官における発熱分子機構とミトコンドリア特性に関する研究



宮崎大学農学部 稲葉靖子

はじめに

種子植物の花（花序や球果を含む）による発熱には、訪花昆虫の誘引や昆虫との相利共生等、原始種子植物の生殖機構に絡む主要な役割がある。一般的に、花の温度を外気温に対して0.5℃以上上昇させる能力を持つ植物のことを「発熱植物」と呼び、発熱能力の高い植物では、花の温度が外気温に対して20℃以上も上昇する。これまでに報告された発熱植物の中で、約半数は裸子植物のソテツ（ソテツ科とザミア科から成る）が占め、残りを占める被子植物の大部分はサトイモ科植物である。本講演では、発熱植物の中で、我が国にも自生するソテツ (*Cycas revoluta*) とサトイモ科植物ザゼンソウ (*Symplocarpus renifolius*) を用いて行った一連の研究について紹介する。

1. 裸子植物ソテツの発熱に関する研究

1-1. ソテツ (*C. revoluta*) の発熱諸特性

日本に自生する *Cycas revoluta* という学名を持つソテツは、ソテツ科に属し、九州南部から沖縄諸島にかけて広く分布する。発熱植物の中でソテツは約半数を占めるが、植物の発熱研究はこれまで被子植物が中心であった。

ソテツが発熱植物であることを最初に報告したのは、アメリカの植物学者ウィリアム・タングであり、彼は、約40種のソテツの花（正確には、球果）の温度を測定して、ザミア科に含まれる複数のソテツで、花の温度が外気温に対して10℃以上も上昇していることを発見した¹⁾。彼はこの論文の中で *C. revoluta* を含むソテツ科植物の発熱性についても検討したが、ザミア科に比べてソテツ科植物の発熱能力は微弱であると結論付けている。特に *C. revoluta* は、外気温に対して花の温度の上昇がわずか1.6℃であったため、その後、十分な検証はなされなかった。

しかしながら、我々の調査では、本植物の雄花は、花の体温を外気温に対して最大で11.5℃、雌花は8.3℃も上昇させる能力を持ち、両者とも花の体温は10日以上に渡り外気温より高く保たれていた。また、日射量の影響が排除できる夜間等であれば、赤外線サーモグラフィにより雄花の発熱を熱画像として明瞭に捉えられることも確認できた。ソテツの花の熱画像撮影は、*C. revoluta* に限らず、全てのソテツの中で初めての例であり、我々の撮影したソテツ花の熱画像は、雑誌の表紙にも採用された²⁾。さらに、野外のソテツから採取した雄花と雌花を、22℃の明条件に設定した人工気象器内に静置して体温の変動を計測したところ、雄花の体温は、雌花に比べて、常に高い温度で変動したが、雄花・雌花ともに、自発的な発熱による体温の振動が観測された。一連の実験から、*C. revoluta* の花は、雄花・雌花ともに、発熱植物の中で中程度の発熱能力を持ち、*C. revoluta* 雄花の発熱能力は、雌花に比べて高いことが明らか

かとなった²⁾。

1-2. *C. revoluta* 雄花の発熱分子機構

植物の発熱分子機構研究は、1980年代後半から1990年代初頭にかけて、サトイモ科発熱植物ブードゥー・リリーからシアン耐性呼吸酵素 (AOX) が単離されたことに端を発する。AOXは、ミトコンドリア膜上で余剰エネルギー解消に役割を持つこと、被子植物に含まれる複数の発熱植物において、発現や活性が発熱組織で高いことなどから、植物の発熱に重要な役割を持つタンパク質と考えられてきた。しかしながら、ソテツのような発熱性を備える裸子植物において、AOXと発熱との関連性に関して十分な調査は行われていなかった。

上記を踏まえ、我々は、*C. revoluta* の雄花を用いて、ソテツの発熱分子機構研究を進めることにした。まず、雄花を構成する2つの主要な組織である小胞子葉（発熱組織）と小胞子のう（非発熱組織）から生化学的にミトコンドリアを単離して、両組織間でAOXを介したミトコンドリア呼吸の程度に違いがあるかを検討した。その結果、小胞子葉と小胞子のうのミトコンドリアはともに、呼吸基質としてコハク酸を用いた際に酸素消費を開始して、小胞子葉ミトコンドリアでは、小胞子のうミトコンドリアに比べて、AOX経路の働きが活発であることがわかった。また、イムノブロットングによる解析で、AOXタンパク質は、小胞子葉ミトコンドリアでは検出されたが、小胞子のうミトコンドリアでは検出されなかった。さらに、雄花で発現する2つのAOX遺伝子 (*CrAOX1* および *CrAOX2*) の単離・同定を行い、qPCR解析により、小胞子葉における *CrAOX1* 遺伝子の発現は、*CrAOX2* 遺伝子の発現に比べ、100倍も高いことがわかった。以上の結果から、小胞子葉ミトコンドリアにおける *CrAOX1* を介した呼吸経路が、ソテツ雄花の発熱に役割を持つことが示唆された²⁾。

1-3. *C. revoluta* 雄花ミトコンドリアの形態的特性

動物の発熱組織では、ミトコンドリアの細胞内密度や大きさ

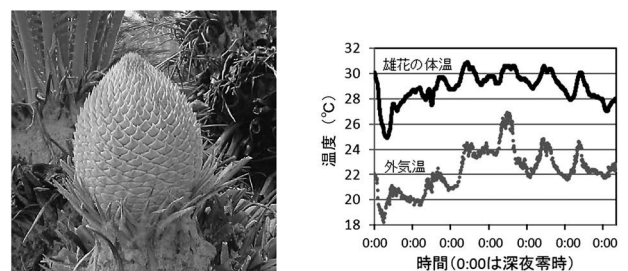


図 ソテツ (*Cycas revoluta*) 雄花 (左) とその発熱 (右) 右のグラフは、2017年6月22日から28日にかけて宮崎市内で測定したソテツ雄花の体温と外気温の変化を示す。

などの形態的特徴が発熱能力に影響していることが知られている。一方、植物の発熱組織では、後述するザゼンソウ等の一部の例を除いて、ミトコンドリアの形態と組織の発熱性とは、明瞭な関係性が見いだされていなかった。そこで我々は、*C. revoluta* 雄花の小孢子葉（発熱組織）と小孢子のう（非発熱組織）の細胞内構造を透過型電子顕微鏡（TEM）により詳細に観察して、両者のミトコンドリア形態に違いがあるかを検討した²⁾。その結果、小孢子葉では、円形でマトリックス密度が一律のミトコンドリアが多数観察されたのに対し、小孢子のうでは、特定の形態を持つミトコンドリア集団は観察されなかった。また、小孢子葉では、断面積が $2\mu\text{m}^2$ 以上の大きさを持つ巨大なミトコンドリアが、表皮において全体の1割程度観察されたが、類似のミトコンドリアは、小孢子のうでは観察されなかった。

2. 被子植物ザゼンソウの発熱に関する研究

サトイモ科植物ザゼンソウ (*S. renifolius*) は、花序における安定した発熱を長期に渡り持続できるため、植物の発熱を研究する上では優れた研究材料である。ザゼンソウの発熱を最初に報告したのは、アメリカの植物学者ロジャー・ヌットソンであり、彼は本植物の発熱は低温により誘導され、呼吸を活発化して体温を上昇させることを見出している³⁾。

我々がザゼンソウ研究に着手した当時、AOXとは異なる機構で余剰エネルギー解消に役割を持つ脱共役蛋白質（UCP）が、本植物の熱生産に寄与すると考えられていた。そこでまず、当時報告されていた2つのUCPアイソフォーム（SrUCPA/B）の解析を進め、発熱組織で主に発現しているのはSrUCPAであることを見出した⁴⁾。また、ザゼンソウ花序におけるミトコンドリアの形態的特徴を、花卉、めしべ、おしべの各組織において精査したところ、特に花卉では、発熱終了期に比べ、発熱期において、多くのミトコンドリアを含んでいた⁵⁾。さらに、熱生産能力を持たない近縁種ミズバショウとの比較により、花序におけるAOXの働きはザゼンソウの方がより活発であることを明らかとした⁶⁾。トランスクリプトーム解析では、発熱期の花で呼吸やミトコンドリア機能に関わる遺伝子の発現が高く、発熱を終えると、これらの遺伝子に代わりストレス応答や液胞代謝に関わる遺伝子の発現が上昇することを見出した^{7,8)}。以上の結果から、ザゼンソウの熱生産には、AOXの働きに加えて、ミトコンドリアの量的効果や呼吸代謝に絡む遺伝子の発現が重要であることが示唆された。

おわりに

上記の研究により、裸子植物でも被子植物でも、生殖器官における熱生産にはAOXを介した呼吸経路が主要な役割を持つことを明らかとし、当該器官に含まれるミトコンドリアの特徴的形態の一端を解明することにも成功した。しかし一方で、AOXと植物の発熱との因果関係については今なお不明な点も多く、AOX以外の分子が、植物の発熱に直接的に関与する可能性は十分に考えられる。現在、ソテツとザゼンソウの双方において*de novo* RNA-seqの解析を進めており、興味深い分子が多数見いだされている。並行して、最近我々は、発熱植物から取り出した遺伝子をモデル植物に導入して、機能解析を行い得ることを示した⁹⁾。さらに、当該遺伝子を酵母や発熱植物から単離

した細胞に導入して、機能解析を行う実験系も確立しつつある。今後は、これらの研究を粘り強く続け、得られた候補分子の中から、発熱誘導に関わる真の遺伝子を同定することが我々の研究目標の一つであり、日々、精進していきたいと考えている。

(引用文献)

- 1) Tang, W., Heat production in cycad cones. *Bot Gaz*, Vol. 148, pp. 165-174, (1987).
- 2) Ito-Inaba, Y., *et al.*, Alternative oxidase capacity of mitochondria in microsporophylls may function in cycad thermogenesis. *Plant Physiol.*, Vol. 180, pp. 743-756, (2019).
- 3) Knutson, R.M., Heat production and temperature regulation in eastern skunk cabbage. *Science*, Vol. 186, pp. 746-747, (1974)
- 4) Ito-Inaba, Y., *et al.* Characterization of the plant uncoupling protein, SrUCPA, expressed in spadix mitochondria of the thermogenic skunk cabbage. *J. Exp. Bot.*, Vol. 59, pp. 995-1005, (2008).
- 5) Ito-Inaba, Y., *et al.* Developmental changes and organelle biogenesis in the reproductive organs of thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). *J. Exp. Bot.*, Vol. 60, pp. 3909-3922, (2009).
- 6) Ito-Inaba, Y., *et al.* What is critical for plant thermogenesis? Differences in mitochondrial activity and protein expression between thermogenic and non-thermogenic skunk cabbages. *Planta*, Vol. 231, pp. 121-130, (2009).
- 7) Ito-Inaba, Y., *et al.* 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.*, Vol. 35, pp. 554-566, (2012).
- 8) Ito-Inaba, Y., *et al.* Isolation and gene expression analysis of a papain-type cysteine protease in thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 76, pp. 1990-1992, (2012).
- 9) Ito-Inaba, Y., *et al.* Characterization of two PEBP genes, SrFT and SrMFT, in thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). *Sci. Rep.*, 6, article number: 29440, (2016).

謝辞 学生時代、オリジナリティーを大切に、粘り強く研究を続ける醍醐味を教えて下さった神尾好是先生（東北大学名誉教授）、そして、私の頭脳を鍛え、研究者としての基礎、素養を学ばせて頂いた徳田元先生（東京大学名誉教授）、松山伸一先生（立教大学教授）に厚く御礼申し上げます。博士研究員時代、研究活動の遂行に惜しみないご支援を賜りました上村松生先生（岩手大学教授）、鈴木幸一先生（岩手大学名誉教授）、渡辺正夫先生（東北大学教授）に深く感謝申し上げます。また、宮崎大学での研究室立ち上げに際し、多くのご指導ご助言を頂きました國武久登先生（宮崎大学教授）、榎原陽一先生（宮崎大学教授）、鉄村琢哉先生（宮崎大学教授）、加藤丈司先生（宮崎大学教授）に深く御礼申し上げます。さらに、共同研究で大変お世話になっている豊岡公徳先生（理化学研究所上級技師）、林哲也先生（九州大学教授）、小椋義俊先生（九州大学准教授）に感謝申し上げます。

なお、本研究は、博士研究員時代から現在の所属先で行った研究をまとめたものです。研究の遂行にご協力頂きました多くの共同研究者の皆様、学生の皆さん、そして、研究時間の捻出に協力してくれた家族に感謝致します。最後に、本賞へのご推薦を賜りました水光正仁先生（宮崎大学理事・副学長）に厚く御礼申し上げます。