

秋山 博紀<sup>1</sup>, 戸島 拓郎<sup>1,2</sup>, 上口 裕之<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 理化学研究所脳科学総合研究センター  
 神経成長機構研究チーム,  
<sup>2</sup> 科学技術振興機構さきがけ)

Mechanisms of neuronal growth cone navigation  
 Hiroki Akiyama<sup>1</sup>, Takuro Tojima<sup>1,2</sup>, and Hiroyuki Kamiguchi<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>Laboratory for Neuronal Growth Mechanisms, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan, <sup>2</sup>PRESTO, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan)

## ザゼンソウの発熱現象と呼吸制御

### 1. はじめに

一般に植物の温度は外気温とともに変動すると考えられているが、ある種の植物は自ら積極的に発熱することにより、その体温を外気温よりも有意に上昇させる能力を持っている。このような発熱する植物としては、我が国にも自生するザゼンソウ<sup>1)</sup>やハス<sup>2)</sup>、さらには、国外に自生する *Arum maculatum*<sup>3)</sup>や *Philodendron selloum*<sup>4)</sup>等が知られている。

これらの発熱植物においては、特定の器官や組織の温度が呼吸変動を伴う熱産生により大きく上昇する。しかしながら、その発熱期間や温度制御能力はそれぞれの発熱植物において異なっている。例えば、*A. maculatum* や *P. selloum* は、組織温度が制御されない一過的な発熱を示すが、ザゼンソウやハスにおいては、それぞれの熱産生器官の温度は特定の期間ほぼ一定に維持される。本稿では、これらの発熱植物の中で寒冷環境において発熱し、優れた温度制御能力を有するザゼンソウの発熱現象を紹介するとともに、その温度制御機構について他の発熱植物と比較しながら概説したい。

### 2. 発熱の意義と呼吸制御

植物の発熱現象は訪花昆虫との関連から説明されることが多い。すなわち、植物が発熱する際に放出される臭気成分等により甲虫類等の訪花昆虫が誘引され、例えば、*A. maculatum* においては、発熱器官である肉穂花序と呼ばれ

る花器に現れた花粉を訪花昆虫が別の植物個体に運ぶことにより受粉が行われるというものである<sup>5)</sup>。さらに、*P. selloum* においては、発熱による肉穂花序の温度上昇は訪花昆虫そのものの代謝エネルギーの節約にも寄与することが指摘されている<sup>6)</sup>。しかし、植物の発熱が訪花昆虫の誘引を主な目的とするのであれば、発熱器官の温度は特に一定に調節される必要性はなく、事実、上述した *A. maculatum* や *P. selloum* のように、発熱の意義が訪花昆虫と関連付けられている多くの植物で観察される発熱現象は数時間から数日程度の一過的なものである。

一方、ザゼンソウの発熱器官である肉穂花序の温度は、外気温の変動にも関わらず、雌性期と呼ばれる雌蕊が肉穂花序表面に現れている期間において、当該器官からの CO<sub>2</sub> 放出量の変動を伴いながら 20°C 内外の温度に一定期間(個体により異なるが1週間程度)調節される(図 1A)。その後、肉穂花序で観察される恒温性は、肉穂花序に雌蕊と雄蕊が共存する両性期から消失し始め、肉穂花序全体が花粉に覆われる雄性期においては発熱能力が大幅に低下する。ザゼンソウは自家受粉では受精ができない自家不和合性の特徴を有している。したがって、本植物においては、雄性期の他個体由来する花粉が雌性期の雌蕊と受粉する必要がある。最近、ザゼンソウの肉穂花序における温度制御は、本植物の花粉管の伸長に重要であることが明らかにされた<sup>7)</sup>。すなわち、雄性期由来の肉穂花序から採取した花粉を用い、種々の温度条件において花粉管の発芽や伸長の様子を観察すると、花粉管の伸長に最適な温度は調べた範囲においては 23°C であった(図 1B)。ザゼンソウの開花・発熱は早春まだ雪の残る時期に始まるが、群生地における最低気温は氷点下にまで低下することも珍しくない。したがって、ザゼンソウが寒冷環境において肉穂花序温度を 20°C 内外に維持することができなかったならば、本植物の生殖に大きな支障をきたしていたであろう。このように、ザゼンソウ肉穂花序における発熱の意義は、寒冷環境に自生する本植物の繁殖戦略の一つとして捉えることができそうである。

### 3. ユビキノンの還元レベルの制御

先述したように、発熱する植物においては、一過的な発熱が観察されるものと、恒温性を有するものが存在するが、これらの異なる発熱様式を持つ植物の発熱器官におけるミトコンドリアのユビキノンの酸化還元状態を解析した興味深い結果がある(図 2)。ヨーロッパに自生する *A. maculatum* は、付属体と呼ばれるサトイモ科植物に特有の

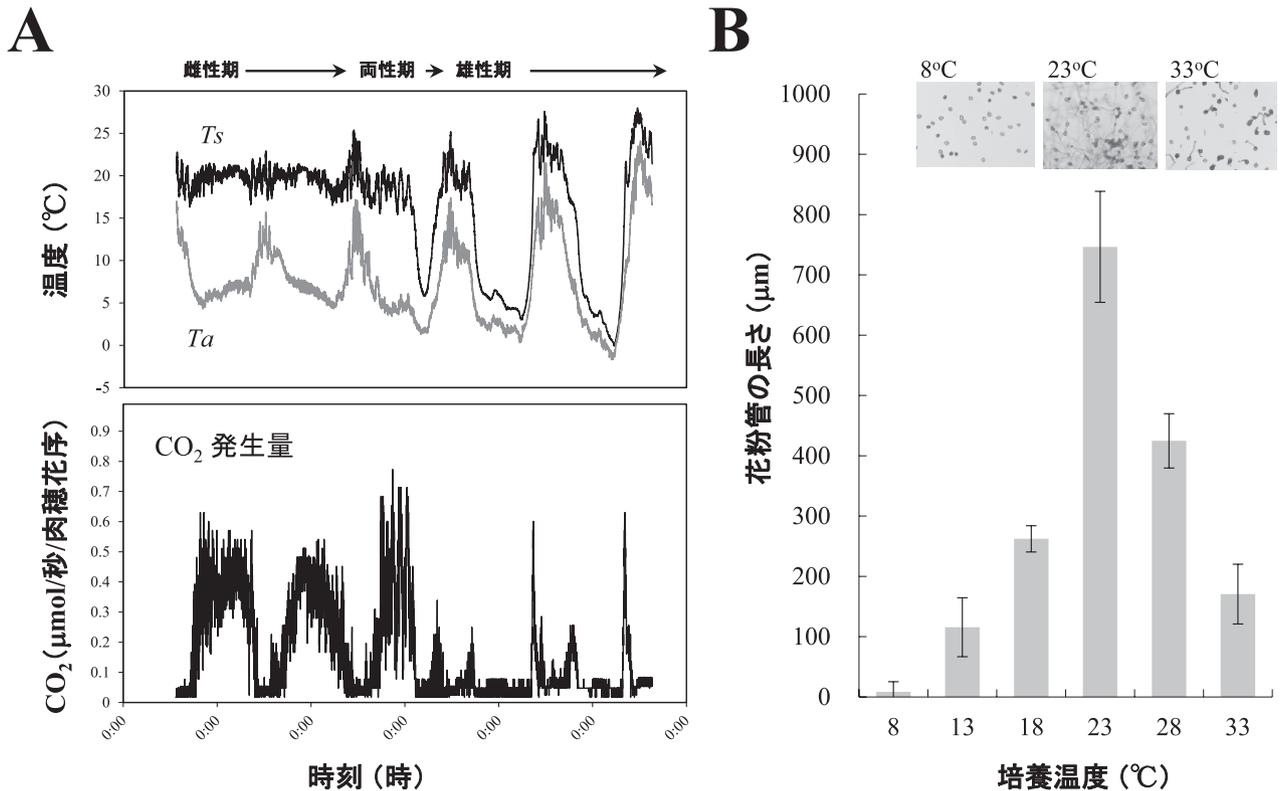


図1 ザゼンソウの発熱現象と花粉管伸長に及ぼす温度の影響

(A) 野外に自生しているザゼンソウの肉穂花序温度 ( $T_s$ ) と気温 ( $T_a$ ) の変化 (上段), および, 肉穂花序から放出される CO<sub>2</sub> 量の変動 (下段). (B) 種々の温度条件における花粉管の伸長. 雄性期肉穂花序由来の花粉を種々の温度において 24 時間培養した後, それぞれの花粉管の長さを測定した. (文献7より引用改変)

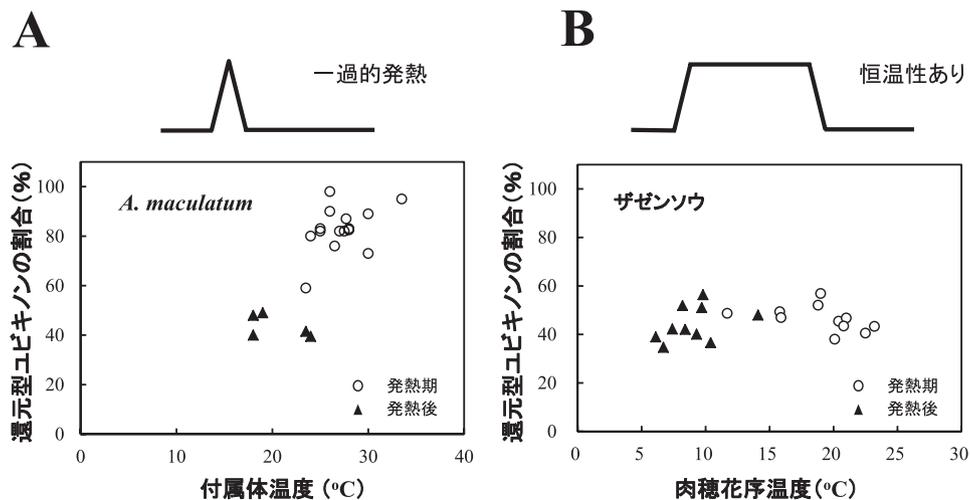


図2 発熱組織におけるユビキノンの還元レベル

(A) 一過的な発熱が見られる *A. maculatum* の付属体における還元型ユビキノンの割合. (B) 恒温性を有するザゼンソウの肉穂花序における還元型ユビキノンの割合. *A. maculatum* においては, 発熱期においてユビキノンは高い還元レベルを示す. (文献8~10より引用改変)

器官が4~6時間程度の一過的な発熱を示す。*A. maculatum* の発熱中および発熱後の付属体におけるユビキノンの酸化還元状態を解析すると、活発に発熱している時期においては、そのほとんどは還元型として存在していることが明らかである(図2A)<sup>8,9)</sup>。一方、ザゼンソウの雌性期の肉穂花序においては、ユビキノンの還元レベルは40~50%程度に制御されている(図2B)<sup>10)</sup>。

#### 4. シアン耐性呼吸酵素

一般に、植物のミトコンドリアは好氣的呼吸阻害剤であるシアン化合物に耐性を持つ呼吸経路を有しており、この酵素はシアン耐性呼吸酵素(alternative oxidase: AOX)と呼ばれている。AOXはミトコンドリア電子伝達系におけるユビキノン由来の電子を用い、酸素を水に還元する呼吸酵素である(図3)。これまで、ザゼンソウや*A. maculatum*、また、ハス等の発熱組織から抽出されたミトコンドリアが非常に高いAOX活性を示すことが明らかになっており、植物の熱産生においてAOXが重要な機能を有していることが推察される。先述したユビキノンの還元レベル

との関連では、NADH脱水素酵素やコハク酸脱水素酵素を介してユビキノンに供給される電子は、結局はチトクローム(Cyt)経路やAOX経路に流れることになるため、ユビキノンの還元レベルは、これらの動的フラックスにより制御されていることが予想される。

植物におけるAOXタンパク質は保存性の高いシステイン残基(Cys I)を介して不活性型(酸化型)と活性型(還元型)間の可逆的な変換が起こることが知られている<sup>11)</sup>。また、活性型(還元型)のAOXタンパク質においては、上述のCys Iに対しピルビン酸に代表される $\alpha$ -ケト酸が作用し、チオヘミアセタール結合を形成することによりAOX活性が賦活化されると考えられている。*A. maculatum* およびザゼンソウの発熱組織由来のミトコンドリアにおいては、それぞれのAOXタンパク質は主に還元型の状態で存在しているが、最近、それぞれのミトコンドリアで主に発現しているAOXタンパク質は、その $\alpha$ -ケト酸に対する応答性が大きく異なっていることが明らかになってきた。ザゼンソウにおけるAOX(SrAOX)に対する $\alpha$ -ケト酸の応答を調べるため、雌性期の肉穂花序から調製したミ

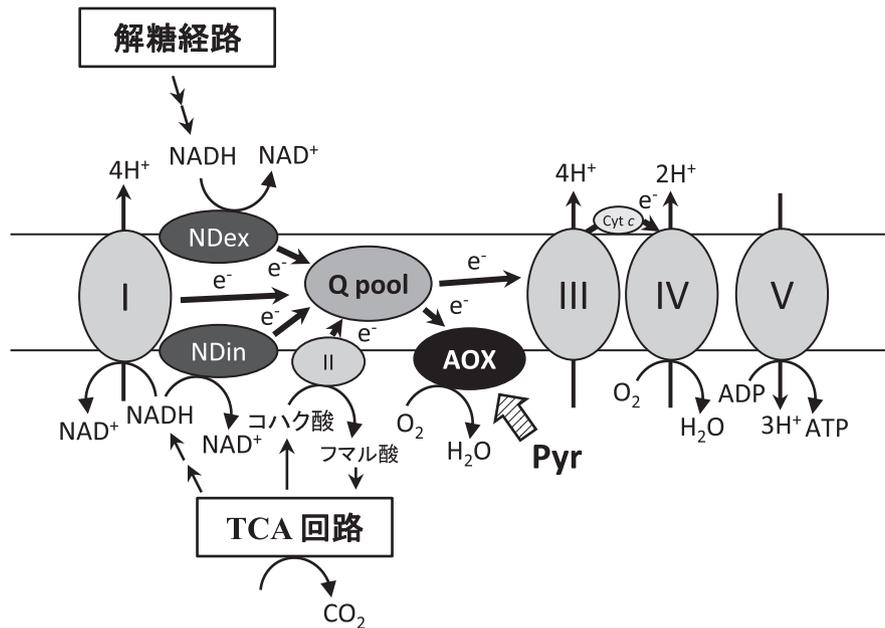


図3 ミトコンドリア電子伝達系とシアン耐性呼吸酵素

炭水化物を主な呼吸基質にするザゼンソウおよび*A. maculatum*においては、解糖経路およびTCA回路により供給される還元力はNADH脱水素酵素(複合体I, NDex(外在性)やNDin(内在性))やコハク酸脱水素酵素(複合体II)によりユビキノン(Q pool)に受け渡される。シアン耐性呼吸酵素(AOX)はユビキノンから電子を受け取り、酸素を受け渡す。AOXはプロトン濃度勾配の形成には寄与しない。ザゼンソウの発熱器官である肉穂花序で発現しているAOXはピルビン酸によりその活性が賦活化される。

トコンドリアを用い、20種類の有機酸のAOX活性に対する効果を検討したところ、ピルビン酸のみがAOX経路を2倍程度に賦活化できることが判明した<sup>12)</sup>。ピルビン酸による直接的なAOX活性の賦活化は反転亜ミトコンドリア膜小胞を用いた解析からも支持され<sup>12)</sup>、ミトコンドリアにおけるAOX経路は代謝産物の一つであるピルビン酸により制御されている可能性が示された。

それでは、一過的な発熱が観察される*A. maculatum*におけるAOX経路はどのように制御されているのであろうか。この点については、最近、*A. maculatum*の発熱器官である付属体におけるAOX遺伝子の発現や機能の解析が行われている<sup>3)</sup>。*A. maculatum*では活発に発熱している付属体においてAmAOX1eと名付けられたタンパク質が発現しているが、当該タンパク質を分裂酵母で発現させ、単離ミトコンドリアを用いた呼吸解析を行うと、AmAOX1eはピルビン酸に非感受性であることが突き止められた<sup>3)</sup>。このように*A. maculatum*とザゼンソウにおいては、それぞれピルビン酸に対する応答が異なるAOX経路が存在することが示唆される。一方、先述したように、ザゼンソウと*A. maculatum*においては、発熱時におけるユビキノンの還元レベルが大きく異なっているが、その理由の一つとして、両植物におけるAOXの活性制御の相違が関係している可能性がある。ザゼンソウと*A. maculatum*はいずれも炭水化物をその呼吸基質にして発熱に関わる一連の代謝を行っており、解糖経路やTCA回路で生じたNADHはミトコンドリアに複数存在するNADH脱水素酵素によりユビキノンの電子が受け渡される。さらに、ユビキノン由来の電子は、AOX経路とCyt経路に流れるが、Cyt経路は通常はATP合成と共役しており、過剰の電子はAOX経路により代謝されることになる。*A. maculatum*の発熱期において、ユビキノンの還元レベルが亢進している状態は、解糖経路やTCA回路からの代謝フラックスが過大となり、ミトコンドリアの電子伝達系が過還元状態となっていることを示唆している。この場合、AOXは還元型分子として高い活性を有して機能していると考えられるが、一連の代謝の結果生じるピルビン酸はAOX経路に影響を与えることはなく、ユビキノンの還元レベルが高い状態が続くのであろう。また、*A. maculatum*の発熱におけるミトコンドリアの過還元状態はおそらくは活性酸素種(ROS)の発生による酸化ストレスを引き起こし、それが付属体における一過的な発熱現象の原因の一つになっているのかもしれない。

一方、ザゼンソウにおいても、発熱時においては、解糖

経路等からの代謝フラックスが高まっていることが予想されるが、発熱器官である肉穂花序で還元型として存在しているSrAOXは、ピルビン酸により活性化され得ることから、上述した*A. maculatum*の場合と比較して、ユビキノン由来の電子をよりAOX経路に逃がすことができるものと考えられる。また、ザゼンソウ由来SrAOXをHeLa細胞において発現させると、当該細胞におけるROSの発生を有意に低下させることができることから<sup>13)</sup>、ザゼンソウにおけるピルビン酸応答性AOX経路の存在が、ROSによる酸化ストレスによる発熱組織の障害を低減させ、*A. maculatum*等と比べてより長い発熱期間の維持に貢献している可能性も考えられる。

AOXに対するピルビン酸を含む $\alpha$ -ケト酸による賦活化の解析は、*A. maculatum*と同様に一過的な発熱現象を示す*Sauromatum guttatum*を用いて行われている<sup>14)</sup>。*S. guttatum*由来のAOX(SgAOX)を分裂酵母において発現させ、当該ミトコンドリアにおける活性を調べると、SgAOXはピルビン酸に対し非感受性であることが明らかになっている。ピルビン酸により賦活化される植物のAOXタンパク質においては、“ENVモチーフ”と呼ばれる領域が関わっていると考えられているが<sup>14)</sup>、この配列はザゼンソウ由来SrAOXにも存在する<sup>12)</sup>。一方、*A. maculatum*由来AmAOX1eおよび*S. guttatum*由来SgAOXにおいては、ENVモチーフはそれぞれQNTおよびQDCに置換されている<sup>3)</sup>。ENVモチーフがいかなる分子機序によりAOXの制御に関与しているのか、興味深いところである。

## 5. おわりに

本稿においては、植物の発熱現象について、その生物学的意義や呼吸制御におけるAOXの機能に焦点を当て、これまでに明らかになっている知見のごく一部を概説した。発熱植物におけるAOXに限っても、例えばザゼンソウと*A. maculatum*の制御機構は異なっており、特に、ザゼンソウにおいてはピルビン酸に関連する代謝にその活性が大きく影響されるようである。このピルビン酸を介する調節システムがザゼンソウの特徴である外気温の変動と逆相関を持つ呼吸制御に関連しているとすれば非常に興味深い。また、本稿ではふれなかったが、ザゼンソウ肉穂花序における温度変動はカオス的な振る舞いを示すことが判明している<sup>15)</sup>。発熱植物を対象とする研究のさらなる進展により、その呼吸制御メカニズムのみならず、このようなカオスを生み出すシステムが解き明かされ、植物の発熱現象に対する包括的な理解がより深まることを期待したい。

- 1) Knutson, R.M. (1974) *Science*, 186, 746-747.
- 2) Seymour, R.S. & Schultze-Motel, P. (1996) *Nature*, 383, 305.
- 3) Ito, K., Ogata, T., Kakizaki, Y., Elliott, C., Albury, M.S., & Moore, A.L. (2011) *Plant Physiol.*, 157, 1721-1732.
- 4) Nagy, K.A., Odell, D.K., & Seymour, R.S. (1972) *Science*, 178, 1195-1197.
- 5) Meeuse, B.J.D. & Raskin, I. (1988) *Sex. Plant Reprod.*, 1, 3-15.
- 6) Seymour, R.S., White, C.R., & Gibernau, M. (2003) *Nature*, 426, 243-244.
- 7) Seymour, R.S., Ito, Y., Onda, Y., & Ito, K. (2009) *Biol. Lett.*, 5, 568-570.
- 8) Wagner, A.M., Wagner, M.J., & Moore, A.L. (1998) *Plant Physiol.*, 117, 1501-1506.
- 9) Wagner, A.M., Krab, K., Wagner, M.J., & Moore, A.L. (2008) *Biochem. Biophys. Acta*, 1777, 993-1000.
- 10) Kamata, T., Matsukawa, K., Kakizaki, Y., & Ito, K. (2009) *J. Plant Res.*, 122, 645-649.
- 11) Vanlerberghe, G.C. & McIntosh, L. (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 703-734.
- 12) Onda, Y., Kato, Y., Abe, Y., Ito, T., Ito-Inaba, Y., Morohashi, M., Ito, Y., Ichikawa, M., Matsukawa, K., Otsuka, M., Koiwa, H., & Ito, K. (2007) *FEBS Lett.*, 581, 5852-5858.
- 13) Matsukawa, K., Kamata, T., & Ito, K. (2009) *FEBS Lett.*, 583, 148-152.
- 14) Crichton, P.G., Affourtit, C., Albury, M.S., Carré, J.E., & Moore, A.L. (2005) *FEBS Lett.*, 579, 331-336.
- 15) Ito, T. & Ito, K. (2005) *Phys. Rev. E*, 72, 051909.

伊藤 菊一

(岩手大学農学部

附属寒冷バイオフィロンティア研究センター)

Heat-production and respiration control in Eastern skunk cabbage

Kikukatsu Ito (Cryobiofrontier Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda, Morioka, Iwate 020-8550, Japan)

## 植物の通気組織形成過程におけるメタロチオネインの組織特異的な発現制御

### 1. はじめに

プログラム細胞死 (programmed cell death, PCD) は、厳密に制御された能動的な細胞死であり、傷害などによって引き起こされる受動的な細胞死である壊死 (necrosis) とは区別される<sup>1)</sup>。植物は、病原菌の侵入した細胞から隣接した細胞への感染を防ぐ過敏反応 (hypersensitive response, HR) などの環境への応答、および雌性配偶体や

種子の胚乳形成などの分化の過程において、利他的 (altruistic) な PCD により生体を維持し、発達させている<sup>1)</sup>。

通気組織 (aerenchyma) は、植物体内に形成される空隙であり、効率的な気体 (酸素, 二酸化炭素など) の循環に重要な役割を果たしている<sup>2)</sup>。イネ科植物の根の通気組織は、皮層細胞 (cortical cell) の選択的な崩壊を伴って形成される (図 1)<sup>2)</sup>。その形成過程においては、クロマチンの凝集, DNA の断片化, 膜に囲まれた小胞の形成など、動物のアポトーシス (apoptosis) と類似の現象がみられることから、PCD の一種として定義されている<sup>2)</sup>。

最近、我々は組織切片から特定の細胞層を切り分ける技術であるレーザーマイクロダイセクション法 (laser microdissection, LM)<sup>3)</sup>を用いて、通気組織形成過程のトウモロコシの根の皮層組織 (cortex) から RNA を抽出し、マイクロアレイ (microarray) による網羅的な遺伝子発現解析を行った<sup>4)</sup>。その結果、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の除去に関わるメタロチオネイン (metallothionein, MT) をコードする遺伝子が、通気組織形成が起こる皮層組織特異的に発現抑制されることを見いだした<sup>4)</sup>。本稿では、通気組織の分類や形態的な特徴、機能的な意義について概説した上で、通気組織形成の分子機構を、MT による ROS の蓄積の制御を中心に紹介する。

### 2. 通気組織の分類、形態および機能

土壌粒子間には、水相と気相の両方が存在する。植物の根は、水相から水を吸収すると同時に、気相に存在する酸素を使って呼吸することで、根の代謝や成長に不可欠なエネルギーを維持している。しかし、排水性の悪い土壌では、降雨により気相が水相に置き換わることで、土壌が湛水状態 (waterlogged condition) になる。湛水状態では、土壌中の酸素拡散速度が 10,000 分の 1 程度に減少するために、酸素濃度が急激に低下し、根は酸欠状態に陥る<sup>5)</sup>。通気組織は、植物の茎葉部から根の分裂や伸長を担う根端部への効率的な酸素供給の経路となり、酸素濃度が低下した湛水状態の土壌への適応に寄与している<sup>2)</sup>。

通気組織は、形成プロセスの違いから、主に離生通気組織 (schizogenous aerenchyma) と破生通気組織 (lysigenous aerenchyma) の二つに分類される<sup>2)</sup>。離生通気組織は、細胞間隙が拡大することによって形成されるが<sup>2)</sup>、主にイネ科植物の根にみられる破生通気組織は、皮層細胞の選択的な細胞死によって形成される (図 1)<sup>2)</sup>。破生通気組織は、土壌に酸素が十分に存在する好気状態 (aerobic condition) においても根の成長に伴って形成される恒常的通気組織