

	モハンマド・アブ・サイード
氏 名	Md. Abu SAYED
本籍（国籍）	バングラデシュ
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第連研 692 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 寒冷圏生命システム学
学位論文題目	The metabolism of phosphoenolpyruvate in thermogenic spadices of skunk cabbage, <i>Symplocarpus renifolius</i> (ザゼンソウの発熱性肉穂花序におけるホスホエノールピルビン酸の代謝)
学位審査委員	主査 岩手大学教授 伊藤 菊一 副査 斎藤 靖史 (岩手 准教授), 葛西 身延 (弘前 教授), 三橋 渉 (山形 教授), 高橋 秀行 (岩手 客員教員)

論文の内容の要旨

Glycolysis is a central pathway of carbohydrate metabolism among living organisms from bacteria to plants and humans. In the glycolytic pathway, phosphoenolpyruvate (PEP) is an important intermediate, as it occupies the highest position on the thermodynamic scale of known phosphorylated metabolites. In animal cells, PEP is predominantly catalyzed by pyruvate kinase (PK) with the concomitant phosphorylation of ADP to ATP. However, in addition to PK, PEP carboxylase (PEPC) and PEP phosphatase (PEPase) play roles in the catabolism of PEP and overall regulation of mitochondrial respiration in plant cells. In contrast, PEP carboxykinase is an enzyme involved in gluconeogenesis.

Although thermogenesis is uncommon in plants, the glycolytic pathway is important in thermogenic plants such as skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*), which utilize carbohydrates as a major respiratory substrate for their metabolic heat-production. In the case of *S. renifolius*, organ-specific thermogenesis occurs in the inflorescence known as the spadix, and maintains a temperature of approximately 23°C during flowering, even when ambient temperatures drop below freezing. Because the mitochondrial cyanide-insensitive alternative oxidase (AOX) allows for a dramatic decrease in free energy between ubiquinol and oxygen, *SrAOX* identified in *S. renifolius* is likely to play a role in thermogenesis in this plant. Electron paramagnetic resonance studies have

been shown that the AOX active site comprises a binuclear iron center, and Fourier transform infrared analysis has further indicated that the AOX belongs to the class of membrane-bound di-iron carboxylate proteins. Thus far, it has been documented that sustained thermogenesis in spadices is associated with the import of carbohydrates including sucrose, glucose, and fructose from roots. Although these results suggest that glycolysis and subsequent AOX-mediated mitochondrial respiration plays a crucial role in organ-specific thermogenesis in *S. renifolius*, the mechanisms of carbohydrate metabolism in this plant remain poorly understood. The purpose of my study was to investigate glycolytic carbon flow at the PEP branch-point in thermogenic spadices of *S. renifolius*.

First, I isolated entire cDNAs for *SrPK*, *SrPEP*tase, *SrPEPC*, and *SrPEPCK* genes, and determined their nucleotide sequences. Subsequently, I examined their tissue-specific expression patterns of these genes together with *SrAOX* by quantitative real-time PCR using RNAs from the spathe, leaf, floret, and pith tissues collected from thermogenic *S. renifolius* plants. Expression levels of the *SrPEPC* and *SrAOX* transcripts were significantly higher in florets than those in the spathe, leaf, and pith tissues. In contrast, the expression levels of *SrAOX*, *SrPEPC*, *SrPK*, *SrPEP*tase, and *SrPEPCK* were nearly undetectable in the non-thermogenic tissues including spathe and leaf tissues.

To examine gene expression in more detail, I focused on three tissues, the petal, stamen, and pistil, each of which comprises the florets of the spadix. *SrPEPC* transcripts were again co-expressed with *SrAOX* transcripts in petals and pistils, whereas *SrPK*, *SrPEP*tase, and *SrPEPCK* transcripts were expressed at low levels in all tissues examined. I also determined the PK, PEPtase, PEPC, and PEPCK activities in cytosolic fractions from thermogenic florets. These analyses showed that the specific activity of PEPC was significantly higher than that of PK, PEPtase, and PEPCK. Phylogenetic analysis of PEPC amino acid sequences from 15 plants, 3 algae, and 4 bacteria clearly characterized *SrPEPC* as a C3-plant-type PEPC. Moreover, amino acid sequences of *SrPEPC* and the homolog *NnPEPC* from the thermogenic plant species *Nelumbo nucifera* were closely related on the phylogenetic tree. Multiple sequence alignments of the deduced PEPC amino acid sequence with other protein sequences from C3- and C4-plant PEPCs showed that *SrPEPC* possesses conserved alanine and arginine residues, characteristic of C3-plant-type PEPCs. Moreover, a serine residue with a potential phosphorylation site was highly conserved across C3- and C4-types of plant PEPCs, including that from *S. renifolius*.

To clarify whether purified mitochondria from thermogenic florets oxidize pyruvate as

a substrate for respiration, I used the same experimental conditions as previously reported for pyruvate-mediated respiration in the mitochondria from thermogenic appendices of *Arum maculatum*. In these experiments, I used the cinnamate derivative UK5099 to inhibit mitochondrial pyruvate transport and determined the effects on respiratory rates. My analyses showed that pyruvate does not act as a substrate for mitochondrial respiration and that UK5099 does not affect respiration. However, subsequent addition of NADH led to significantly increased respiration rates both in absence and in presence of cyanide, indicating cyanide-insensitive mitochondrial AOX activities. To confirm that purified mitochondria from thermogenic florets do not utilize externally added pyruvate as a substrate for respiration, I performed experiments in presence of the pyruvate dehydrogenase complex cofactors NAD⁺ and thiamine pyrophosphate. These experiments indicated that pyruvate was not used as a respiratory substrate, although addition of exogenous malate led to increased respiration rates regardless of whether cyanide was present, with the highest respiration rate observed at pH 7.2. These results suggest that PEP is predominantly catabolized by PEPC in thermogenic tissues of *S. renifolius*. Although extremely high enzymatic activities of PEPC have been reported in other thermogenic plants including *A. maculatum*, this is the first study to show tissue-specific co-expression of *PEPC* and *AOX* in quantitative gene expression analyses of thermogenic plants.

Because AOX-mediated energy-dissipative respiration pathway contributes significantly to cellular thermogenesis in plants, co-expression of *SrAOX* and *SrPEPC* detected in the present study may be critical for metabolic cross-talk between the cytosol and AOX-expressing mitochondria in thermogenic cells. In thermogenic cells, PEP was primarily catabolized by PEPC to produce oxaloacetic acid, which is used directly as a mitochondrial respiration substrate or is converted to malate by malate dehydrogenase for use as a respiratory substrate. In either case, such PEPC-mediated metabolism may contribute significantly to continuous carbon flow in furnishing C4-dicarboxylic acids that maintains increased respiration for thermogenesis in *S. renifolius*. More importantly, because PEPC catalyzes the addition of HCO₃⁻ to PEP, excess CO₂ that is liberated with increased mitochondrial respiration in thermogenic cells may be catabolized by complex I-integrated mitochondrial γ -carbonic anhydrases to form HCO₃⁻, which is subsequently converted to oxaloacetic acid by PEPC. Therefore, it appears that thermogenic *S. renifolius* developed specialized metabolisms for recycling excess CO₂ during evolution. Accordingly, integration of PEPC-mediated CO₂ assimilation and AOX-mediated mitochondrial respiration probably act as substantial carbon resources in thermogenic plants. Moreover, PEPC may play a role in metabolic

heat-production in furnishing organic acids to AOX-expressing mitochondria in other thermogenic plants. Because pyruvate has been identified as an allosteric activator of *S. renifolius* AOX, AOX activities in this plant may be post-translationally regulated by intra-mitochondrially produced pyruvate via malic enzyme that uses malate from the PEPC-mediated metabolic pathway.

In conclusion, PEPC has been shown to be abundantly co-expressed with AOX in thermogenic spadices of *S. renifolius*. These results further suggest that PEP metabolism in glycolysis, primarily catabolized by PEPC, plays a critical role in thermogenesis in *S. renifolius*.

(和訳)

解糖系は細菌から植物およびヒトを含む生物の炭水化物代謝において中心的な代謝経路である。また、熱力学的に最もエネルギーの高いリン酸結合を有するホスホエノールピルビン酸 (PEP) は解糖経路において重要な中間体である。PEP は、動物細胞においては、ピルビン酸キナーゼ (PK) により異化されるとともに、ADP から ATP が産生される。一方、植物細胞においては、PEP は PK のみならず、PEP カルボキシラーゼ (PEPC) および PEP フォスファターゼ (PEPase) により代謝され、これらの反応はミトコンドリア呼吸の調節において重要である。一方、PEP カルボキシキナーゼ (PEPCK) は糖新生に関与する酵素である。

植物における熱産生は限られた植物種においてのみ観察される現象であり、ザゼンソウ (*Symplocarpus renifolius*) のような、熱産生の代謝基質として炭水化物を用いることが知られている発熱植物においては、解糖経路が重要な役割を担っている。ザゼンソウにおいては、肉穂花序と呼称される花器において器官特異的な熱産生が観察され、当該器官の温度は外気温が氷点下まで低下してもほぼ 23°C に維持される。ミトコンドリアに局在するシアン耐性呼吸酵素 (AOX) は還元型ユビキノンと酸素分子間の自由エネルギーを熱として散逸させる反応を触媒することから、ザゼンソウ由来の *SrAOX* は本植物における熱産生において重要な機能を有していると考えられている。AOX はその触媒部位に二核鉄を有する di-iron カルボキシラーゼに属するタンパク質であることが EPR および FTIR 分析により明らかとなっている。これらの知見は解糖経路とそれに引き続くミトコンドリアにおける AOX を介した呼吸反応が器官特異的なザゼンソウの熱産生に重要であることを示唆しているが、本植物における糖代謝の詳細はこれまで不明のままであった。本研究においては、ザゼンソウにおける熱産生に関与する代謝を明らかにするため、解糖経路の分岐点である PEP を介した炭素代謝に着目した解析を行った。

はじめに *SrPK*、*SrPEPase*、*SrPEPC*、および、*SrPEPCK* の全長 cDNA をクローン化し、それぞれの塩基配列を決定した。さらに、発熱期のザゼンソウの仏炎苞、葉、小花、および、肉穂花序の髄から調製した RNA を用い、それぞれの遺伝子および *SrAOX* の転写

産物の発現量をリアルタイム PCR により定量した。その結果、*SrPEPC* と *SrAOX* の小花における転写産物量は、仏炎苞、葉、肉穂花序の髄における発現量と比べ、有意に高いことが判明した。一方、仏炎苞および葉を含む非発熱組織における *SrAOX*、*SrPEPC*、*SrPK*、*SrPEPase* および *SrPEPCK* の転写産物量は極めて低かった。

さらに、肉穂花序の小花を構成している雄蕊、雌蕊、および、花被におけるこれらの転写産物の発現に関するより詳細な解析を行った結果、*SrPEPC* の発現は雌蕊と花被において *SrAOX* と共発現していることが明らかとなった。一方、*SrPK*、*SrPEPase* および *SrPEPCK* の発現は、雄蕊、雌蕊、および花被において低いレベルであった。また、発熱性肉穂花序から調製した細胞質画分を用いて PK、PEPase、PEPC および PEPCK の酵素活性を測定した結果、PEPC が有意に高い値を示すことが判明した。

15 種類の植物、3 種の藻類、および、4 種の細菌由来の PEPC を用いた系統樹解析の結果、ザゼンソウ *SrPEPC* は C3 型 PEPC に特徴的なアラニンおよびアルギニン残基が保存されていることが判明した。また、ザゼンソウ *SrPEPC* は発熱植物であるハス由来の *NnPEPC* と比較的高い相同性を示すことが明らかとなった。さらに、C3 型および C4 型植物 PEPC とのアミノ酸配列の比較を行った結果、ザゼンソウにおいて発現している *SrPEPC* は C3 型 PEPC に見られるリン酸化を受けるセリン残基を有していることが判明した。

また、ザゼンソウの発熱性肉穂花序の小花から調製したミトコンドリアがピルビン酸を基質とする呼吸を行うか否かを明らかにするため、既にピルビン酸を呼吸基質にすることが判明している *Arum maculatum* の発熱性付属体由来のミトコンドリアを用いた呼吸解析系を用いた実験を行った。本解析においては、ミトコンドリアにおけるピルビン酸輸送体の特異的な阻害剤である UK5099 を用いた測定も行った。その結果、ザゼンソウ由来のミトコンドリアはピルビン酸を基質とした呼吸が観察されないこと、さらに、UK5099 はザゼンソウ由来ミトコンドリアの呼吸に影響を与えないことが明らかとなった。一方、これらのミトコンドリアはシアン存在下において、NADH を基質とする顕著な呼吸が観察された。この結果は、ザゼンソウの発熱性肉穂花序の小花から調製したミトコンドリアはシアン非感受性の AOX 活性を有していることを示している。さらに、ピルビン酸を基質とする呼吸は、ミトコンドリアにピルビン酸脱水素酵素複合体の補因子である NAD⁺ やチアミンピロリン酸を添加する条件においても観察されないことが判明した。一方で、リンゴ酸を基質とする明確なミトコンドリア呼吸が観察されることから、ザゼンソウの発熱性肉穂花序の小花においては、ミトコンドリア呼吸の基質としてピルビン酸が機能していないことが明らかとなった。なお、これまで *A. maculatum* を含む発熱植物の熱産生器官における高い PEPC 活性が示されていたが、植物の発熱組織における PEPC と AOX の共発現を定量的に明らかにした研究は今回がはじめてである。

AOX を介する呼吸は植物の熱産生に密接に関与すると考えられているが、本研究において見出された *SrAOX* と *SrPEPC* との共発現は植物の発熱細胞において細胞質とミトコン

ドリアにおける代謝クロストークの存在を示唆している。すなわち、植物の発熱細胞において、PEPはPEPCにより代謝され、オキサロ酢酸が生じるが、オキサロ酢酸はそのままミトコンドリアにおいて呼吸基質として用いられるか、あるいは、リンゴ酸脱水素酵素によりリンゴ酸に代謝され、ミトコンドリア呼吸基質として使われるものと考えられる。このようなPEPCを介した代謝は、C4有機酸をミトコンドリアに供給することにより、ザゼンソウの熱産生における呼吸反応の増大に大きく貢献していることを示している。より重要な点は、ミトコンドリアの呼吸反応で生じたCO₂は呼吸鎖複合体Iを構成する炭酸脱水酵素によりHCO₃⁻に変換されると考えられるが、PEPCはその触媒反応において生じたHCO₃⁻由来の炭素をオキサロ酢酸に取り込んでいると考えられる。さらに、本研究で明らかとなったPEPCとAOXの非光合成組織における共発現は、ザゼンソウにおいては、ミトコンドリア呼吸で発生したCO₂を再利用できる代謝経路を進化の過程において獲得した可能性を示している。このようなAOXを発現しているミトコンドリアに対するPEPCを介した有機酸の供給は、ザゼンソウのみならず、他の発熱植物においても機能していると考えられる。さらに、ザゼンソウ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が、このピルビン酸はマリックエンザイムによりPEPCを介して合成されたリンゴ酸を代謝基質として、ミトコンドリア内において産生されることが示唆された。以上のように、本研究においては、ザゼンソウの発熱性肉穂花序においてPEPCがAOXと高いレベルで共発現していることを見出した。これらの結果はPEPCを介した解糖経路におけるPEPの代謝がザゼンソウの熱産生において重要な機能を担っていることを示している。

論文審査の結果の要旨

植物における発熱は呼吸反応の亢進による代謝熱の産生によるものである。呼吸基質として炭水化物を用いることが知られているザゼンソウにおいては、その熱産生において、解糖経路が重要な役割を担っている。本研究においては、ザゼンソウを対象に、解糖経路の分岐点であるホスホエノールピルビン酸（PEP）を介した炭素代謝に着目した一連の実験と解析を行った。

ザゼンソウの発熱組織である小花におけるPEPカルボキシラーゼ（*SrPEPC*）の転写産物量は、仏炎苞、葉、肉穂花序の髄といった非発熱組織における発現量と比べ、有意に高いことが判明した。一方、小花および非発熱組織におけるピルビン酸キナーゼ（*SrPK*）、PEPフォスファターゼ（*SrPEPase*）、PEPカルボキシキナーゼ（*SrPEPCK*）の転写産物量は極めて低かった。さらに、肉穂花序の小花を構成している雄蕊、雌蕊、および、花被におけるこれらの転写産物の発現に関するより詳細な解析を行った結果、*SrPEPC*の発現は雌蕊と花被においてシアン耐性呼吸酵素（*SrAOX*）と共発現していることが明らかとな

った。*SrAOX* は熱産生に関わることが指摘されているキノール酸化酵素である。一方、*SrPK*、*SrPEPase* および *SrPEPCK* の発現は、雄蕊、雌蕊、および花被において低いレベルであった。また、発熱性肉穂花序の小花から調製した細胞質画分を用い、*PK*、*PEPase*、*PEPC*、および、*PEPCK* の酵素活性を測定した結果、*PEPC* が有意に高い値を示すことが判明した。

15 種類の植物、3 種の藻類、および、4 種の細菌由来の *PEPC* を用いた系統樹解析の結果、ザゼンソウ *SrPEPC* は C3 型植物 *PEPC* に属することが判明した。さらに、C3 型および C4 型植物 *PEPC* とのアミノ酸配列の比較を行った結果、ザゼンソウ由来 *SrPEPC* は C3 型 *PEPC* において見られるリン酸化を受けるセリン残基を有していることが明らかとなった。また、ザゼンソウの発熱性肉穂花序の小花から調製したミトコンドリアはピルビン酸を基質とする呼吸活性が非常に低いことが判明した。これらの結果は、ザゼンソウの熱産生において C3 型 *PEPC* を介した代謝が重要であることを示している。

ザゼンソウの発熱細胞においては、呼吸反応の亢進により CO_2 が産生されるが、その一部はミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の一部を構成する炭酸脱水素酵素により HCO_3^- に変換された後、*PEPC* によりオキサロ酢酸に取り込まれ、ミトコンドリアの呼吸基質として用いられているものと考えられた。以上のように、ザゼンソウにおいては、非光合成器官である肉穂花序において呼吸の亢進により発生した CO_2 を再利用できる代謝経路が発達していることが明らかとなった。

本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

【主論文】

1. M.A. Sayed, Y. Umekawa and K. Ito (2016).
Metabolic interplay between cytosolic phosphoenolpyruvate
carboxylase and mitochondrial alternative oxidase in thermogenic
skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*.
Plant Signaling & Behavior **11** (11): e1247138.