

植物の恒温性に関わる温度応答性呼吸調節メカニズムに関する研究

Studies on the temperature-dependent respiratory control in plants

岩手大学大学院 連合農学研究科

寒冷圏生命システム学専攻

熱・生命システム学連合講座

梅川 結

## 目次

第1章 序論	3
第2章 呼吸の温度応答性の解析に関する理論体系の構築	35
第3章 修正アレニウスモデルを用いた植物組織由来呼吸の温度応答の解析	52
第1節 ザゼンソウの発熱器官由来呼吸の温度応答の解析	53
第2節 発熱植物および非発熱植物由来呼吸の温度応答の解析	69
第4章 ザゼンソウ由来単離ミトコンドリアを用いた前駆平衡に基づく呼吸反応の修正アレニウスモデルを用いた解析	88
第5章 総合考察	113
謝辞	141

## 第 1 章

### 序論

生命活動は、酵素が触媒する種々の化学反応により行われるが、アレニウス (Svante August Arrhenius), およびヴァントホッフ (Jacobus Henricus van 't Hoff) が 19 世紀末に明らかにしたように、化学反応速度は温度に大きく影響を受ける (Arrhenius, 1889; van 't Hoff, 1898). 従って、温度は生物のエネルギー産生を含む種々の生体反応に影響するため、生物の体の大きさの決定等にも温度は関与しており (Aschoff, 1981; Angilletta *et al.*, 2004; Ghosh *et al.*, 2013), 温度影響が大きい場合においては、生物は死に至る (Bigelow & Esty, 1920; Bigelow, 1921; Luyet & Gehenio, 1940).

一般に、真核生物は、環境温度変動に対し、遺伝子型を変えることなく、代謝反応の順化を通じた生理的な適応を行う能力を有している (Graham & Patterson, 1982; Shikata *et al.*, 1995; Hughes & Dunn, 1996). そのうち動物は、自らに適した温度環境を意識的に選択する行動性体温調節 (Chaffee & Roberts, 1971; Hutchison & Maness, 1979) や、外気温変動に対する自律性体温調節 (Chaffee & Roberts, 1971; Aschoff, 1981) を含む、様々な生存戦略を通じ、温度影響を回避している.

自律性体温調節とは、一般に恒温性とも呼ばれる、哺乳類や鳥類に特有の性質である。これらの動物は、生体内で産生される代謝熱により、外気温と独立した体温を示すことができる (Chaffee & Roberts, 1971). このような恒温性は、フィードバック制御に基づく、脳と神経系を介した複雑なメカニズムにより達成される (図 1). 即ち、外気温変動を含む温度刺激は、体表の上皮細胞や脳の視床下部など様々な場所に局在する、TRP (Transient receptor potential) チャネルと呼ばれる温度受容体を介して認識される (Julius & Basbaum, 2001; McKemy *et al.*, 2002; Clapham, 2003; Venkatachalam & Montell, 2007). 温度情報は体温調節中枢である脳の視索前野の神経細胞に伝達された後、種固有の体温 (例えば、ヒト (*Homo sapiens*) は約 37 °C である) のセットポイントとの差異に応じて、熱産生、または熱産生の抑制、熱放散のうち適切な体温調節方法と、その反応出力の程度が選択され、実行される (Morrison *et al.*, 2008; Nakamura & Morrison, 2010; Morrison & Nakamura, 2011). そのうち、

体温がセットポイントよりも低い場合においては、その差異が小さい場合、交感神経を介し、主に褐色脂肪組織で行われる非ふるえ熱産生が行われる (Nakamura & Morrison, 2011). 一方、差異が大きい場合は、非ふるえ熱産生に加え、運動神経を介し筋肉で行われるふるえ熱産生の経路も活性化されることで、熱産生の出力を上昇し、体温を上昇することができる (Nakamura & Morrison, 2011).

一方、ある種の種子植物は、その花器官において、ハチドリに匹敵するほどの代謝熱を産生することが知られている (Wagner *et al.*, 2008; Seymour, 2010). このような植物の発熱現象は、1778年に、フランスの博物学者ラマルク (Jean-Baptiste de Lamarck) によって世界で初めて報告された (Meeuse, 1975). それ以降、アフリカや北米、アジアを含む世界各地において、多様な花の構造を示す15の科に属する30種以上の植物の発熱現象が報告されてきた (Ito *et al.*, 2013; deBruyn *et al.*, 2015). 被子植物においては、単一の花が花器官を構成する、バンレイシ科、ウマノスズクサ科、ヒドノラ科、シキミ科、モクレン科、ハス科、スイレン科、ラフレシア科、マツブサ科、ビャクダン科の10種の科において、発熱現象が報告されており (Seymour & Schultze-Motel, 1997; Seymour, 2001; Seymour *et al.*, 2009c; Seymour, 2010; deBruyn *et al.*, 2015), 多数の小花から花序が構成される植物については、サトイモ科、ヤシ科、パナマソウ科の3科で報告がある (Seymour & Schultze-Motel, 1997; Seymour, 2010). 裸子植物においては、雄性および雌性の球果を有するソテツ科、ザミア科に属する植物に関して、発熱現象が報告されている (Tang & Price, 1987; Terry *et al.*, 2004; Seymour, 2010).

このような発熱植物は、その熱産生様式から、一過性の発熱、もしくは前述の哺乳類・鳥類で観察されるものと類似の、恒温性の2つに大別される (Kakizaki *et al.*, 2012). 一過性の発熱とは、夕方から夜にかけての数時間程度の間、急速な呼吸活性の増大により熱産生を示す発熱現象であり、複数のアラム属 (*Arum*) の植物においては、外気温が15-20°Cにおいても、約30°Cの外気温と独立した発熱器官温度を示すことが知られている (James &

Beevers, 1950; Buggeln & Meeuse, 1971; Meeuse, 1975; Seymour *et al.*, 2009a; Seymour *et al.*, 2009c). 一方で、サトイモ科のフィロデンドロン属 (*Philodendron*) (Nagy *et al.*, 1972), ザゼンソウ属 (*Symplocarpus*) (Knutson, 1974), およびドラクンクルス属 (*Dracunculus*) (Seymour & Schultze-Motel, 1999) そしてハス科のハス属 (*Nelumbo*) (Seymour & Schultze-Motel, 1996; Seymour, 1998) の恒温性を示す植物群においては、数日間、発熱器官の温度をほぼ一定に維持することができる。

植物で行われる熱産生の生理的意義は、一過性の発熱植物において、熱産生時の香り成分の揮発、および温かい温度環境の提供を通じた、訪花昆虫による受粉の効率化の説が唱えられている (Meeuse & Raskin, 1988). また、発熱植物の中で唯一、周囲に花粉媒介者の少ない寒冷環境下で発熱するザゼンソウ (*Symplocarpus renifolius*) においては、体温調節により維持される発熱器官温度が、その植物の花粉管伸長の程度と密接に関連することが明らかとなっている (Seymour *et al.*, 2009b). 従って、当該植物において、恒温性は重要な生存戦略の一つであることが示唆されている。

筆者はこれまで、植物の発熱現象、ならびに恒温性メカニズムの一端を明らかにするために、恒温性を示すザゼンソウ、およびドラゴンリリー (*Dracunculus vulgaris*), または一過性の発熱を示す植物であるアラムコンシネータム (*Arum concinatum*) を含む種々の発熱植物を用いた研究を行ってきた (Ito *et al.*, 2013; Onda *et al.*, 2015; Seymour *et al.*, 2015; Sayed *et al.*, 2016). 当該テーマについては、呼吸生理学、生化学および分子生物学的手法、さらに数理モデルを用いた、様々な着眼点からの先行研究が行われている。本章では、これまで得られている植物の発熱現象や、恒温性メカニズム、およびそれらに関連する知見について、ザゼンソウに関するものを中心にまとめた。

サトイモ科の多年生植物であるザゼンソウ (英名: *skunk cabbage*) は、東アジアから北米にかけての広い範囲に生息しており、北米に自生するものは *S. foetidus*, 東アジアに自生するものは *S. renifolius* と、遺伝的に異なる種として分類される (Wen *et al.*, 1996). これらの

異なる地域に生息するザゼンソウは、共に熱産生を行う種である。日本においては、ザゼンソウ属に関して世界で最多の3種が生息しており、ザゼンソウの他に、熱産生を行うナベクラザゼンソウ (*S. nabekuraensis*)、さらに熱産生を行わないヒメザゼンソウ (*S. nipponicus*) が自生している (大塚ら, 2011)。これまで、ヒメザゼンソウは  $2n = 30$  の2倍体であるのに対し、ザゼンソウ、およびナベクラザゼンソウが  $2n = 60$  の4倍体であること (岩坪 & 大塚, 2005)、ならびに系統樹解析より、ヒメザゼンソウ、およびザゼンソウが約2千万年前に分岐し、その後 *S. foetidus* および *S. renifolius* に分岐したことが明らかになっており (Nie *et al.*, 2006)、従って、ザゼンソウの祖先はヒメザゼンソウ型の染色体が2倍体の植物種であること、さらに染色体倍加の過程で、ザゼンソウは熱産生機構を獲得したことが示唆されている。

ザゼンソウは、数年もの栄養成長期を経た後 (Ito-Inaba *et al.*, 2016)、早春の開花期に肉穂花序と呼ばれる花器官特異的な熱産生を行う (図 2a ; Kamata *et al.*, 2009 を引用 & Ito *et al.*, 2003)。サーモグラフィー、および後述する発熱組織特異的に発現する遺伝子の解析から、肉穂花序のうち、外気に接する外側の Florets と呼ばれる、雄蕊、雌蕊、花被から構成される小花の集合体が主な発熱組織であり、内側の維管束を含む Pith と呼ばれる組織は、ほとんど熱産生能力を持たないことが明らかとなっている (図 2b ; Onda *et al.*, 2008 を引用 & Sayed *et al.*, 2016)。このような熱産生が行われる一週間程度のうち、恒温性は受粉が行われる雌期のみで観察される。その場合は、氷点下を含む外気温変動の中でも、肉穂花序温度をほぼ一定に維持できることが示されている (図 3 ; Onda *et al.*, 2008 を引用 & Seymour & Blaylock, 1999; Seymour, 2001; Ito *et al.*, 2003; Seymour, 2004)。この時、肉穂花序の温度は、熱損失量の大きさから肉穂花序重量にも影響は受けるものの (Seymour, 2001)、約  $23^{\circ}\text{C}$  に調節されることが判明している (Seymour *et al.*, 2009b)。興味深いことに、前述したように、維持される体温はザゼンソウの花粉管伸長が最大となる温度であること (Seymour *et al.*, 2009b)、また、肉穂花序の上方から花粉が出始める両性期から肉穂花序温度および体温調

節能力が低下し始め、雄期になると発熱はほぼ観察されなくなること(図 3; Onda *et al.*, 2008)から、恒温性は生殖活動と密接に関連することが示唆されている。

このような恒温性メカニズムの理解のため、ザゼンソウの体温および外気温との関係に着目した、種々の解析が行われてきた (Knutson, 1974; Seymour & Blaylock, 1999; Seymour, 2001; Ito *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2004; Seymour, 2004). その結果、ザゼンソウは外気温ではなく、発熱器官である肉穂花序組織自体の温度変化を感知して、体温調節を行っていることが明らかとなった (Ito *et al.*, 2004). その体温調節の過程においては、 $\pm 0.9^{\circ}\text{C}$  の肉穂花序温度変動を閾値とする、約 60 分を周期とする体温振動が観察されることが判明した (図 4 & 5; 共に Ito *et al.*, 2004 を引用). さらに、ザゼンソウの肉穂花序温度と外気温の時系列データに関する決定論的非線形モデルを用いた解析から (図 6), このような体温振動により表現されるザゼンソウの恒温性メカニズムは、短期予測可能かつ長期予測不可能なカオス性を示すことが明らかとなり、かつそれは 2.63 次元の方程式として数学的に記述可能であることが明らかとなった (Ito & Ito, 2005). その知見を基に、二次元に近似した数式としてザゼンソウの体温調節アルゴリズムを明らかにしたのが、Takahashi らによる工学的モデルの研究である (図 6 & Takahashi *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2009). これらの研究により、ザゼンソウの恒温性メカニズムを数学的に理解し、その表現型を計測装置に応用することが可能となった。

上述したような数理モデルを用いた解析が、ザゼンソウの恒温性メカニズムの概要を明らかにした一方、本植物の恒温性に関わる分子基盤に関する研究が、生化学的および分子生物学的な手法を用いて進められてきた。ザゼンソウの恒温性を世界で初めて報告した Knutson は、その体温調節が外気温変動に応じた呼吸速度調節により達成されることを明らかにした (図 7; Knutson, 1974 を一部改変して引用). そのような外気温と酸素消費速度の逆相関は、その後 Seymour ら (Seymour & Schultze-Motel, 1999; Seymour, 2004), および伊藤 (図 8; 伊藤, 2012 を引用) によって二酸化炭素産生量との間にも見出されている。さらに、

呼吸商が 1.0 であることから、恒温性においては、炭水化物を呼吸基質とする、外気温変動に即時に応答した呼吸調節が密接に関連することが明らかとなっている。

前述したように、ザゼンソウは肉穂花序自体の温度変動を感知することから、人為的に肉穂花序の温度を制御した場合の、肉穂花序由来の呼吸速度が測定された (図 9; Seymour *et al.*, 2010 を一部改変して引用)。その結果、興味深いことにザゼンソウの呼吸速度は、15°C を頂点としたΛ型の応答を示すことが明らかとなった。即ち、ザゼンソウの恒温性が観察される、呼吸調節範囲と呼ばれる 15°C から 30°C の肉穂花序温度域においては、肉穂花序温度が低下すると呼吸速度が増大し、逆に温度が上昇すると呼吸速度が減少することが明らかとなった (Seymour *et al.*, 2010)。その恒温性は、Seymour らが定義した、Switching temperature という最大呼吸速度を示す 15°C よりも肉穂花序温度が低下すると失われる。以上のような温度応答性呼吸調節メカニズムに基づいて、Switching temperature 以下の体温低下を避けながら、ザゼンソウはほぼ一定の値に体温を維持できることが示唆されている。ここで、呼吸基質となる、夏期に光合成により蓄えた根からの炭水化物の供給を解析した結果、発熱期に特異的な根からの Sucrose を含む分泌液の供給が密接に関連する一方、外気温を変動させても、その分泌量は変化しないことが明らかとなっている (Ito *et al.*, 2003; Onda & Ito, 2005)。また、解糖系から TCA 回路にかけての呼吸代謝、およびミトコンドリアにおける酸素消費および二酸化炭素産生の過程が、肉穂花序の温度変化を受けて制御されることが予想されており、恒温性を示すドラゴンリリーにおいては、一次代謝に関わる多数の代謝産物が有意な温度変動を示すことが明らかとなっている (Ito *et al.*, 2013)。従って、細胞レベルで行われる植物の恒温性メカニズムを明らかにするために、このような呼吸調節に関与する因子の同定を目的とした研究が進められてきた。

一般に、呼吸反応は、炭水化物と酸素から水と二酸化炭素を産生する異化反応 (発熱反応) であり、1 mol のグルコースのギブス自由エネルギーは、2881 kJ に相当することが明らかとなっている (Calow, 1981)。従って、呼吸反応における 1 mol のグルコースの酸化によ

り取り出されるエネルギーのうち、1254 kJ が、主にミトコンドリアにおける酸化リン酸化と共役した 38 mol の ATP 産生により保存される一方、残りの 1627 kJ のエネルギーは、その過程で熱として散逸される。このような酸化リン酸化には、ミトコンドリア内膜における電子伝達系の 5 つの酵素、即ち、NADH:ユビキノンをオキシドレダクターゼ (複合体 I)、コハク酸:ユビキノンをオキシドレダクターゼ (複合体 II)、ユビキノール:シトクロム *c* オキシドレダクターゼ (複合体 III)、シトクロム *c* オキシダーゼ (複合体 IV: COX)、および ATP 合成酵素 (複合体 V) が関与しており、それらの機能は真核生物においてよく保存されている (Hatefi, 1985; Millar *et al.*, 2011)。それらの結晶構造解析から、これら呼吸鎖酵素群の電子伝達における反応経路の詳細が明らかになりつつある (Abrahams *et al.*, 1994; Tsukihara *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1997; Iwata *et al.*, 1998; Stock *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2005; Baradaran *et al.*, 2013; Zickermann *et al.*, 2015)。複合体 I および複合体 II は、それぞれ NADH およびコハク酸の酸化によりユビキノンプールへ電子を供給し、複合体 III から IV への電子伝達が行われる。その過程で生じるプロトン駆動力 (膜電位およびプロトン濃度勾配に起因するエネルギー) を用いて、ATP が合成される。電子伝達が行われる呼吸経路によっては、プロトンの膜輸送を行わず (例えば、複合体 I は NADH 分子の酸化によりプロトン 4 分子を膜輸送する一方、複合体 II は膜輸送に関与しない) プロトン駆動力形成に関与しないことから、ATP の理論的な合成効率も呼吸経路によって変化する (Nicholls & Ferguson, 2013)。そのため、植物の恒温性呼吸調節においては、ATP 合成と共役しない呼吸経路を選択していることが、熱産生効率の点から考えられる。

このような ATP 合成と共役せず、エネルギー消散的に機能する酵素は、植物や菌類のミトコンドリア呼吸鎖において、いくつか存在することが知られている (Millar *et al.*, 2011; Schertl & Braun, 2014)。まず、複合体 I および II と同様に呼吸基質の酸化に関わるものに、ロテノン非感受性 NAD(P)H 脱水素酵素が知られており、それらはいずれも複合体 I の阻害剤であるロテノンに対して非感受性を示す (Kerscher, 2000; Melo *et al.*, 2004; Rasmusson *et al.*,

2004). それらは, ミトコンドリア内膜の両側に表在する膜タンパク質であり, ミトコンドリアマトリクス側に局在する, マトリクスから供給される NAD(P)H を酸化する酵素は NDA, または NADPH 酸化に関わるものを NDC と呼ぶ場合もある (Escobar *et al.*, 2004; Fernie *et al.*, 2004; Rasmusson *et al.*, 2004; Schertl & Braun, 2014). 一方, 膜間腔側に局在し, 細胞質から供給される NAD(P)H を酸化する酵素は NDB と呼ばれる (Fernie *et al.*, 2004; Rasmusson *et al.*, 2004; Schertl & Braun, 2014). NDA および NDC については, NADH および NADPH に関する基質の選択性に関する詳細な報告はないことに加えて,  $\text{Ca}^{2+}$ により活性制御を受けるといふ報告がありながらも,  $\text{Ca}^{2+}$ 結合性の EF-hand モチーフを持たないことから, その詳細な分子基盤は明らかではない (Møller & Rasmusson, 1998; Møller, 2001; Rasmusson *et al.*, 2004; Wallström *et al.*, 2014b). 対照的に, NDB に関しては, EF-hand モチーフに依存した  $\text{Ca}^{2+}$ による活性化機構を有しており (Rasmusson *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2003; Rasmusson *et al.*, 2008; Wallström *et al.*, 2014a), 特に NADPH 酸化に関わる NDB は  $\text{Ca}^{2+}$ 依存的な活性を示すものが知られる一方, NADH を基質とするものは EF-hand モチーフの有無に基づいた  $\text{Ca}^{2+}$ による活性制御を受ける (Michalecka *et al.*, 2004; Geisler *et al.*, 2007). さらに, これらの酵素は, NADH および NADPH をそれぞれ選択的に酸化することが近年判明しており (Hao & Rasmusson, 2016), 活性部位のピリミジンヌクレオチド結合領域において, 非酸性の QS motif モチーフを有する場合は NADPH が基質となり, また酸性の EA motif を有する場合は NADH を基質とする. 他にも, 解糖系から供給されるグリセロール-3 リン酸をジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) に変換するグリセルアルデヒド-3 リン酸脱水素酵素や, プロリンを酸化するプロリン脱水素酵素を含む, いくつかの酵素が, ミトコンドリア内膜に局在し, ユビキノンプールに直接電子を供給しうることが示唆されている (Schertl & Braun, 2014). これらを介した呼吸経路は, 呼吸基質の酸化の際にプロトンの膜輸送に関与しないため, ATP 合成効率を低下させる.

さらに、プロトン駆動力形成を妨げる酵素としては、シアン耐性呼吸酵素 (Alternative oxidase: AOX), および脱共役タンパク質 (Uncoupling protein: UCP) が挙げられる (Rousset *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2013). AOX はミトコンドリアの内膜のマトリクス側に表在する, 電子伝達系の末端に相当する酵素である (Rhoads & McIntosh, 1991; Moore *et al.*, 2013). AOX はユビキノンプールにあるユビキノールを介して電子を受け取り, 酸素を水に還元する反応を触媒するため, COX を介した酸素消費をバイパスする. 従って, AOX を介した酸素消費は ATP の合成効率を低下させることから, エネルギーの熱散逸に貢献することで熱産生に関わることが古くから示唆されてきた (James & Beevers, 1950; Meeuse, 1975). ここで, AOX は, 生体内において, 非共有結合性のホモ 2 量体として存在しており, 2 種類の翻訳語修飾による活性制御を受ける (Umbach & Siedow, 1993; Umbach *et al.*, 1994). 第一に, チオレドキシンを介した, AOX の酸化還元状態の制御である (Yoshida *et al.*, 2013). AOX は Cys I および Cys II という 2 つのよく保存されたシステイン残基を有しており (Umbach *et al.*, 2002; Umbach *et al.*, 2006), そのうち N 末端側の Cys I がタンパク質間のシステインジスルフィド結合形成に関与し, Cys I を介して酸化型の二量体 (不活性型) を形成する. それらは, ミトコンドリアマトリクス内で生成される NADPH 量に応じて, チオレドキシンを介し, 還元型の単量体 (活性型) に変換されることが示唆されている (Vanlerberghe *et al.*, 1995; Vanlerberghe & McIntosh, 1997; Yoshida *et al.*, 2013). 第二に,  $\alpha$ -ケト酸および Cys I を介したアロステリックな活性制御である. 還元型の AOX は, ピルビン酸と Cys I のシステイン残基の間でチオヘミアセタール結合を形成することで, 活性化されることが示唆されている (Umbach *et al.*, 1994; Onda *et al.*, 2007). このピルビン酸応答性は植物種によって異なり, E/DNV モチーフを有する AOX はピルビン酸応答型, QXX (QDT, QNT, QDC) モチーフを有するものはピルビン酸非応答型と考えられている (Ito *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2013). さらに, 膜間腔側からマトリクス側にプロトンを輸送する UCP は, 形成されたプロトン駆動力を解消する性質を有しており, 動物の非ふるえ熱産生に関与することが古くから知ら

れている (Rousset *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004). 一般に, 植物や菌類において, これらの因子は温度影響を含む, 種々の環境ストレスや活性酸素により誘導されることが知られており, ユビキノンプールの過還元状態などの要因に基づく活性酸素生成を回避する機能を有すると考えられている (Møller, 2001; Sweetlove *et al.*, 2002; Considine *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2003; Clifton *et al.*, 2005; Arnholdt-Schmitt *et al.*, 2006).

発熱植物においては, これら酵素のエネルギー散逸的な性質から, これらの因子が熱産生へ関与することが示唆されてきた. 特に, 脂質を呼吸基質とするフィロデンドロン・セローム (*Philodendron selloum*) を除いた, ザゼンソウを含む種々の発熱植物においては, 発熱器官特異的な AOX 遺伝子およびタンパク質の高発現が明らかとなっている (Ito & Seymour, 2005; Onda *et al.*, 2007; Onda *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2011). さらに, ザゼンソウにおいては, これまでピルビン酸応答性の ENV モチーフを有する 1 種類の SrAOX 遺伝子が同定されており, その AOX 呼吸がピルビン酸に応答することから, ピルビン酸の供給量の調節が恒温性メカニズムに関連する可能性が挙げられてきた (Onda *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2011). さらに, 恒温性を示すザゼンソウと, 一過性の発熱を示すアラムマキュレータムにおいては, ミトコンドリアのプロテオーム解析により呼吸鎖を構成する因子の構成が異なったことから, 恒温性メカニズムに特徴的な呼吸経路の存在が示唆されている (Kakizaki *et al.*, 2012).

このような恒温性に関わるとされる呼吸調節因子に関しては, 基礎的な知見は得られているものの, それらの酵素の温度特性については, ほとんどが不明のままである. 本研究においては, 植物の恒温性メカニズムを明らかにするためのアプローチとして, 呼吸反応と温度の関係性に着目し, 温度によって制御される熱力学的平衡が恒温性に与える影響を明らかにすることを試みた. 第 2 章においては, 化学反応速度の温度応答性解析について古くから蓄積してきた知見を基に, 呼吸の温度応答性の解析に関する理論体系の構築を行った. 次に第 3 章において, 呼吸反応の温度応答データから, 化学反応速度に密接に関連

する活性化エネルギーを抽出することが可能な修正アレニウスモデルを用いて、ザゼンソウにおける組織レベルの呼吸の温度応答データを用いた解析を行った。さらに、それらについて、恒温性を示す植物と、示さない非発熱植物種についても同様の解析を行い、それらの差異について比較解析を行った。さらに、第4章では、第3章で得られた知見を基に、ザゼンソウ由来単離ミトコンドリアレベルの呼吸の温度応答データを用いた解析を行った。最後に、第5章においては、本研究で明らかになった化学平衡に基づく植物の恒温性に関わる呼吸調節モデルについて、従来の数理的および工学的に得られたザゼンソウのモデルと比較考察を行うと共に、得られた呼吸調節モデルについての詳細な考察を行った。

#### 引用文献

Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R. and Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**: 621-628.

Angilletta, M. J., Steury, T. D. and Sears, M. W. (2004) Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. *Integr. Comp. Biol.* **44**: 498-509.

Arnholdt-Schmitt, B., Costa, J. H. and de Melo, D. F. (2006) AOX – a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends Plant Sci.* **11**: 281-287.

Arrhenius, S. (1889) Über die reaktionsgeschwindigkeit bei der inversion von rohrzucker durch säuren. *Z. Phys. Chem.* **4**: 226-248.

Aschoff, J. (1981) Thermal conductance in mammals and birds: Its dependence on body size and circadian phase. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* **69**: 611-619.

Baradaran, R., Berrisford, J. M., Minhas, G. S. and Sazanov, L. A. (2013) Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* **494**: 443-448.

- Bigelow, W. D. (1921) The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. Infect. Dis.* **29**: 528-536.
- Bigelow, W. D. and Esty, J. R. (1920) The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. *J. Infect. Dis.* **27**: 602-617.
- Buggeln, R. G. and Meeuse, B. J. D. (1971) Hormonal control of the respiratory climacteric in *Sauromatum guttatum* (Araceae). *Can. J. Bot.* **49**: 1373-1377.
- Calow, P. (1981) Respiration. Invertebrate biology: a functional approach. *Boston, MA, Springer US*: 63-91.
- Chaffee, R. and Roberts, J. (1971) Temperature acclimation in birds and mammals. *Annu. Rev. Physiol.* **33**: 155-202.
- Clapham, D. E. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**: 517-524.
- Clifton, R., Lister, R., Parker, K., Sappl, P., Elhafez, D., Millar, A. H., Day, D. and Whelan, J. (2005) Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **58**: 193-212.
- Considine, M. J., Goodman, M., Echtay, K. S., Laloi, M., Whelan, J., Brand, M. D. and Sweetlove, L. J. (2003) Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 22298-22302.
- Graham, D. and Patterson, B. D. (1982) Responses of plants to low, nonfreezing temperatures: proteins, metabolism, and acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**: 347-372.
- deBruyn, R. A. J., Paetkau, M., Ross, K. A., Godfrey, D. V. and Friedman, C. R. (2015) Thermogenesis-triggered seed dispersal in dwarf mistletoe. *Nat. Commun* **6**: 6262.
- Escobar, M. A., Franklin, K. A., Svensson, A. S., Salter, M. G., Whitlam, G. C. and Rasmusson, A. G. (2004) Light regulation of the *Arabidopsis* respiratory chain. Multiple discrete photoreceptor responses contribute to induction of type II NAD(P)H dehydrogenase genes. *Plant Physiol.* **136**: 2710-2721.

Fernie, A. R., Carrari, F. and Sweetlove, L. J. (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 254-261.

Geisler, D. A., Broselid, C., Hederstedt, L. and Rasmusson, A. G. (2007) Ca<sup>2+</sup>-binding and Ca<sup>2+</sup>-independent respiratory NADH and NADPH dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **282**: 28455-28464.

Ghosh, S. M., Testa, N. D. and Shingleton, A. W. (2013) Temperature-size rule is mediated by thermal plasticity of critical size in *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **280**.

Hao, M. S. and Rasmusson, A. G. (2016) The evolution of substrate specificity-associated residues and Ca<sup>2+</sup>-binding motifs in EF-hand-containing type II NAD(P)H dehydrogenases. *Physiol. Plant.* **157**: 338-351.

Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 1015-1069.

Hughes, M. A. and Dunn, M. A. (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J. Exp. Bot.* **47**: 291-305.

Hutchison, V. H. and Maness, J. D. (1979) The role of behavior in temperature acclimation and tolerance in ectotherms. *Am. Zool.* **19**: 367-384.

Ito-Inaba, Y., Masuko-Suzuki, H., Maekawa, H., Watanabe, M. and Inaba, T. (2016) Characterization of two *PEBP* genes, *SrFT* and *SrMFT*, in thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). *Sci. Rep.* **6**: 29440.

Ito, K., Ito, T., Onda, Y. and Uemura, M. (2004) Temperature-triggered periodical thermogenic oscillations in skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Plant Cell Physiol.* **45**: 257-264.

Ito, K., Ogata, T., Kakizaki, Y., Elliott, C., Albury, M. S. and Moore, A. L. (2011) Identification of a gene for pyruvate-insensitive mitochondrial alternative oxidase expressed in the thermogenic appendices in *Arum maculatum*. *Plant Physiol.* **157**: 1721-1732.

- Ito, K., Onda, Y., Sato, T., Abe, Y. and Uemura, M. (2003) Structural requirements for the perception of ambient temperature signals in homeothermic heat production of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Plant Cell Environ.* **26**: 783-788.
- Ito, K. and Seymour, R. S. (2005) Expression of uncoupling protein and alternative oxidase depends on lipid or carbohydrate substrates in thermogenic plants. *Biol. Lett.* **1**: 427-430.
- Ito, K., Takahashi, H., Umekawa, Y., Imamura, T., Kawasaki, S., Ogata, T., Kakizaki, Y. and Seymour, R. (2013) Metabolite profiling reveals tissue- and temperature-specific metabolomic responses in thermoregulatory male florets of *Dracunculus vulgaris* (Araceae). *Metabolomics* **9**: 919-930.
- Ito, T. and Ito, K. (2005) Nonlinear dynamics of homeothermic temperature control in skunk cabbage, *Symplocarpus foetidus*. *Phys. Rev. E, Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **72**: 051909.
- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S. and Jap, B. K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *Science* **281**: 64-71.
- James, W. O. and Beevers, H. (1950) The respiration of *Arum* spadix. A rapid respiration, resistant to cyanide. *New Phytol.* **49**: 353-374.
- Julius, D. and Basbaum, A. I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**: 203-210.
- Kakizaki, Y., Moore, A. L. and Ito, K. (2012). Different molecular bases underlie the mitochondrial respiratory activity in the homoeothermic spadices of *Symplocarpus renifolius* and the transiently thermogenic appendices of *Arum maculatum*. *Biochem. J.* **445**: 237-246.
- Kamata, T., Matsukawa, K., Kakizaki, Y. and Ito, K. (2009) In vivo redox state of the ubiquinone pool in the spadices of the thermogenic skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. *J. Plant Res.* **122**: 645-649.
- Kerscher, S. J. (2000) Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**: 274-283.

- Knutson, R. M. (1974) Heat production and temperature regulation in eastern skunk cabbage. *Science* **186**: 746-747.
- Luyet, B. J. and Gehenio, P. M. (1940) The mechanism of injury and death by low temperature. A review. *Biodynamica* **3**: 33-99.
- Møller, I. M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 561-591.
- Møller, I. M. and Rasmusson, A. G. (1998) The role of NADP in the mitochondrial matrix. *Trends Plant Sci.* **3**: 21-27.
- McKemy, D. D., Neuhausser, W. M. and Julius, D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**: 52-58.
- Meeuse, B. J. D. (1975) Thermogenic respiration in aroids. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **26**: 117-126.
- Meeuse, B. J. D. and Raskin, I. (1988) Sexual reproduction in the arum lily family, with emphasis on thermogenicity. *Sex. Plant Reprod.* **1**: 3-15.
- Melo, A. M., Bandejas, T. M. and Teixeira, M. (2004) New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 603-616.
- Michalecka, A. M., Agius, S. C., Møller, I. M. and Rasmusson, A. G. (2004) Identification of a mitochondrial external NADPH dehydrogenase by overexpression in transgenic *Nicotiana sylvestris*. *Plant J.* **37**: 415-425.
- Millar, A. H., Whelan, J., Soole, K. L. and Day, D. A. (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 79-104.
- Moore, A. L., Shiba, T., Young, L., Harada, S., Kita, K. and Ito, K. (2013) Unraveling the heater: New insights into the structure of the alternative oxidase. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 637-663.
- Moore, C. S., Cook-Johnson, R. J., Rudhe, C., Whelan, J., Day, D. A., Wiskich, J. T. and Soole, K. L. (2003) Identification of AtNDI1, an internal non-phosphorylating NAD(P)H dehydrogenase in *Arabidopsis* mitochondria. *Plant Physiol.* **133**: 1968-1978.

- Morrison, S. F. and Nakamura, K. (2011) Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci. (Landmark Ed.)* **16**: 74-104.
- Morrison, S. F., Nakamura, K. and Madden, C. J. (2008) Central control of thermogenesis in mammals. *Exp. Physiol.* **93**: 773-797.
- Nagy, K. A., Odell, D. K. and Seymour, R. S. (1972) Temperature regulation by the Inflorescence of *Philodendron*. *Science* **178**: 1195-1197.
- Nakamura, K. and Morrison, S. F. (2010) A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 8848-8853.
- Nakamura, K. and Morrison, S. F. (2011) Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. *J Physiol.* **589**: 3641-3658.
- Nicholls, D. G. and Ferguson, S. J. (2013) The Chemiosmotic Proton Circuit in Isolated Organelles: Theory and Practice. Bioenergetics (Fourth Edition). *Boston, Academic Press*: 53-87.
- Nie, Z.-L., Sun, H., Li, H. and Wen, J. (2006) Intercontinental biogeography of subfamily Orontioideae (*Symplocarpus*, *Lysichiton*, and *Orontium*) of Araceae in eastern Asia and North America. *Mol. Phylogenet. Evol.* **40**: 155-165.
- Onda, Y. and Ito, K. (2005) Changes in the composition of xylem sap during development of the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 1156-1161.
- Onda, Y., Kato, Y., Abe, Y., Ito, T., Ito-Inaba, Y., Morohashi, M., Ito, Y., Ichikawa, M., Matsukawa, K., Otsuka, M., Koiwa, H. and Ito, K. (2007) Pyruvate-sensitive AOX exists as a non-covalently associated dimer in the homeothermic spadix of the skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. *FEBS Lett.* **581**: 5852-5858.
- Onda, Y., Kato, Y., Abe, Y., Ito, T., Morohashi, M., Ito, Y., Ichikawa, M., Matsukawa, K., Kakizaki, Y., Koiwa, H. and Ito, K. (2008) Functional coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage. *Plant Physiol.* **146**: 636-645.

- 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. *Sci. Rep.* **5**: 8753.
- Rasmusson, A. G., Geisler, D. A. and Møller, I. M. (2008) The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion* **8**: 47-60.
- Rasmusson, A. G., Soole, K. L. and Elthon, T. E. (2004) Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 23-39.
- Rasmusson, A. G., Svensson, A. S., Knoop, V., Grohmann, L. and Brennicke, A. (1999) Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J.* **20**: 79-87.
- Rhoads, D. M. and McIntosh, L. (1991) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 2122-2126.
- Rousset, S., Alves-Guerra, M. C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A. M., Bouillaud, F. and Ricquier, D. (2004) The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* **53**: 130-135.
- Sayed, M. A., Umekawa, Y. and Ito, K. (2016) Metabolic interplay between cytosolic phosphoenolpyruvate carboxylase and mitochondrial alternative oxidase in thermogenic skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. *Plant Signal. Behav.* **11**: e1247138
- Schertl, P. and Braun, H. P. (2014) Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. *Front Plant Sci.* **5**: 163
- Seymour, R. S., Lindshau, G. and Ito, K. (2010) Thermal clamping of temperature-regulating flowers reveals the precision and limits of the biochemical regulatory mechanism. *Planta* **231**: 1291-1300.
- Seymour, R. S. (2001) Biophysics and physiology of temperature regulation in thermogenic flowers. *Biosci. Rep.* **21**: 223-236.

- Seymour, R. S. (2004) Dynamics and precision of thermoregulatory responses of eastern skunk cabbage *Symplocarpus foetidus*. *Plant Cell Environ.* **27**: 1014-1022.
- Seymour, R. S. (2010) Scaling of heat production by thermogenic flowers: limits to floral size and maximum rate of respiration. *Plant Cell Environ.* **33**: 1474-1485.
- Seymour, R. S. and Blaylock, A. J. (1999) Switching off the heater: influence of ambient temperature on thermoregulation by eastern skunk cabbage *Symplocarpus foetidus*. *J. Exp. Bot.* **50**: 1525-1532.
- Seymour, R. S., Gibernau, M. and Pirintsos, S. A. (2009a) Thermogenesis of three species of *Arum* from Crete. *Plant Cell Environ.* **32**: 1467-1476.
- Seymour, R. S., Ito, K., Umekawa, Y., Matthews, P. D. and Pirintsos, S. A. (2015) The oxygen supply to thermogenic flowers. *Plant Cell Environ.* **38**: 827-837.
- Seymour, R. S., Ito, Y., Onda, Y. and Ito, K. (2009b) Effects of floral thermogenesis on pollen function in Asian skunk cabbage *Symplocarpus renifolius*. *Biol. Lett.* **5**: 568-570.
- Seymour, R. S., Maass, E. and Bolin, J. F. (2009c) Floral thermogenesis of three species of *Hydnora* (Hydnoraceae) in Africa. *Ann. Bot.* **104**: 823-832.
- Seymour, R. S. and Schultze-Motel, P. (1996) Thermoregulating lotus flowers. *Nature* **383**: 305.
- Seymour, R. S. and Schultze-Motel, P. (1997) Heat-producing flowers. *Endeavour* **21**: 125-129.
- Seymour, R. S. and Schultze-Motel, P. (1999) Respiration, temperature regulation and energetics of thermogenic inflorescences of the dragon lily *Dracunculus vulgaris* (Araceae). *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **266**: 1975-1975.
- Seymour, R. S., Schultze-Motel, P. (1998) Physiological temperature regulation by flowers of the sacred lotus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **353**: 935-943.
- Shikata, T., Iwanaga, S. and Shimeno, S. (1995) Metabolic response of acclimation temperature in carp. *Fish. Sci.* **61**: 512-516.

- Smith, A. M. O., Ratcliffe, R. G. and Sweetlove, L. J. (2004) Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. *J. Biol. Chem.* **279**: 51944-51952.
- Stock, D., Leslie, A. G. W. and Walker, J. E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**: 1700-1705.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M. and Rao, Z. (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* **121**: 1043-1057.
- Sweetlove, L. J., Heazlewood, J. L., Herald, V., Holtzapffel, R., Day, D. A., Leaver, C. J. and Millar, A. H. (2002) The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *Plant J.* **32**: 891-904.
- Takahashi, K., Ito, T., Chiba, S., Ito, K. and Osada, H. (2009) Modeling of thermoregulation in the skunk cabbage in relation to meteorological factors. *Agric. For. Meteorol.* **149**: 1032-1036.
- Takahashi, K., Ito, T., Endo, T., Chiba, S., Ito, K. and Osada, H. (2008) Algorithm for temperature control in the skunk cabbage, *Symplocarpus Foetidus*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **22**: 959-963.
- Takahashi, K., Ito, T., Onda, Y., Endo, T., Chiba, S., Ito, K. and Osada, H. (2007) Modeling of the thermoregulation system in the skunk cabbage: *Symplocarpus foetidus*. *Phys. Rev. E, Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **76**: 031918.
- Tang, W. S. and Price, L. D. (1987) Metabolic aspects of thermogenesis in male cones of five cycad species. *Bot. Gaz.* **148**: 165-174.
- Terry, I., Moore, C. J., Walter, G. H., Forster, P. I., Roemer, R. B., Donaldson, J. D. and Machin, P. J. (2004) Association of cone thermogenesis and volatiles with pollinator specificity in *Macrozamia* cycads. *Plant Syst. Evol.* **243**: 233-247.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**: 1136-1144.
- Umbach, A. L., González-Meler, M. A., Sweet, C. R. and Siedow, J. N. (2002) Activation of the plant mitochondrial alternative oxidase: insights from site-directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1554**: 118-128.

Umbach, A. L., Ng, V. S. and Siedow, J. N. (2006) Regulation of plant alternative oxidase activity: a tale of two cysteines. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**: 135-142.

Umbach, A. L. and Siedow, J. N. (1993) Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol.* **103**: 845-854.

Umbach, A. L., Wiskich, J. T. and Siedow, J. N. (1994) Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. *FEBS Lett.* **348**: 181-184.

van 't Hoff, J. H. (1898) Lectures on theoretical and physical chemistry. Part 1. Chemical dynamics. *Edward Arnold, London*, .

Vanlerberghe, G. C., Day, D. A., Wiskich, J. T., Vanlerberghe, A. E. and McIntosh, L. (1995) Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria (Dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation). *Plant Physiol.* **109**: 353-361.

Vanlerberghe, G. C. and McIntosh, L. (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 703-734.

Venkatachalam, K. and Montell, C. (2007) TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 387-417.

Wagner, A. M., Krab, K., Wagner, M. J. and Moore, A. L. (2008) Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: the role of the alternative oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**: 993-1000.

Wallström, S. V., Florez-Sarasa, I., Araújo, W. L., Aidemark, M., Fernández-Fernández, M., Fernie, A. R., Ribas-Carbó, M. and Rasmusson, A. G. (2014a) Suppression of the external mitochondrial NADPH dehydrogenase, NDB1, in *Arabidopsis thaliana* affects central metabolism and vegetative growth. *Mol. Plant* **7**: 356-368.

Wallström, S. V., Florez-Sarasa, I., Araújo, W. L., Escobar, M. A., Geisler, D. A., Aidemark, M., Lager, I., Fernie, A. R., Ribas-Carbó, M. and Rasmusson, A. G. (2014b) Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H Dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and

metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport. *Plant Cell Physiol.* **55**: 881-896.

Wen, J., Jansen, R. K. and Kilgore, K. (1996) Evolution of the Eastern Asian and Eastern North American disjunct genus *Symplocarpus* (Araceae): insights from chloroplast DNA restriction site data. *Biochem. Syst. Ecol.* **24**: 735-747.

Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia, J.-Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L. and Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**: 60-66.

Yoshida, K., Noguchi, K., Motohashi, K. and Hisabori, T. (2013) Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria. *Plant Cell Physiol.* **54**: 875-892.

Zickermann, V., Wirth, C., Nasiri, H., Siegmund, K., Schwalbe, H., Hunte, C. and Brandt, U. (2015) Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. *Science* **347**: 44-49.

伊藤 菊一 (2012) ザゼンソウの発熱現象と呼吸制御. *生化学* **84**: 853-857.

岩坪 美兼, 大塚 孝一 (2005) 日本産ザゼンソウ属の染色体数. *植物地理・分類研究* **53**: 203-205.

大塚 孝一, 浜田 崇, 植田 邦彦 (2011) 日本産ザゼンソウ属植物の発熱現象. *植物研究雑誌* **86**: 224-229.

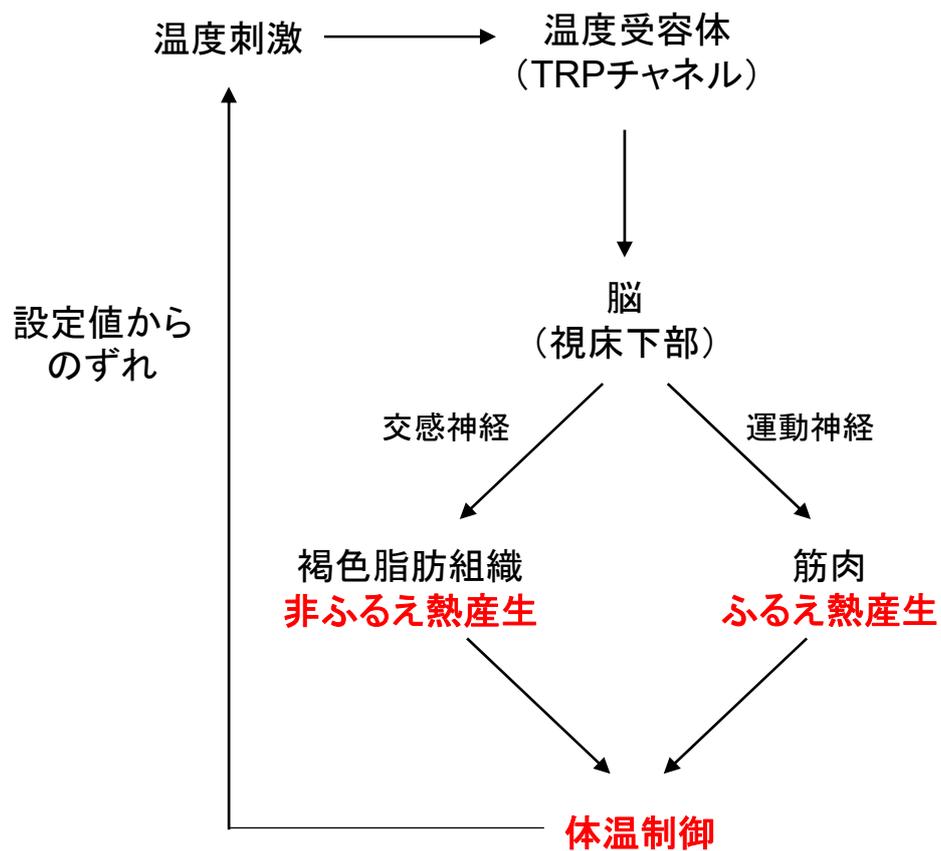
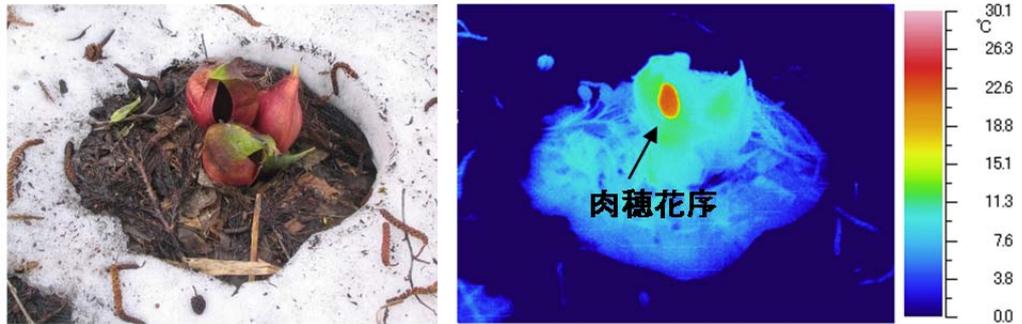


図 1. 動物における自律性体温調節の概要.

自律性体温調節においては、温度刺激の知覚に基づく脳と神経系を介した体温の調節が行われる。

**a**



**b**

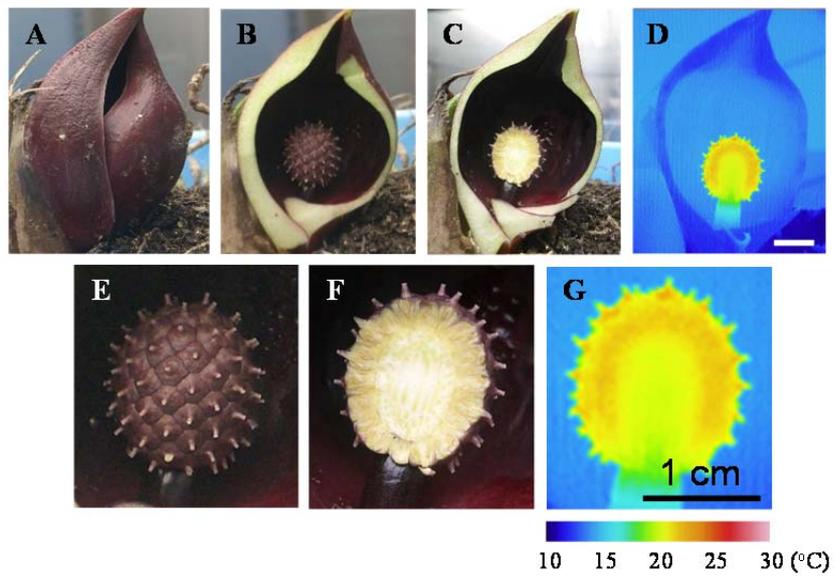


図 2. ザゼンソウの肉穂花序における熱産生.

**a.** 群落地で自生するザゼンソウのサーモグラフィー解析 (Kamata *et al.*, 2009 より引用). 肉穂花序特異的な発熱が観察される. **b.** ザゼンソウ由来肉穂花序のサーモグラフィー解析 (Onda *et al.*, 2008 より引用). A, インタクトなザゼンソウ. B, 仏炎苞を切断した場合の雌期ザゼンソウの断面図. C, 肉穂花序の切断面. D, C で示された肉穂花序断面のサーモグラフィー解析. E-G, 画像 B-D の拡大図.

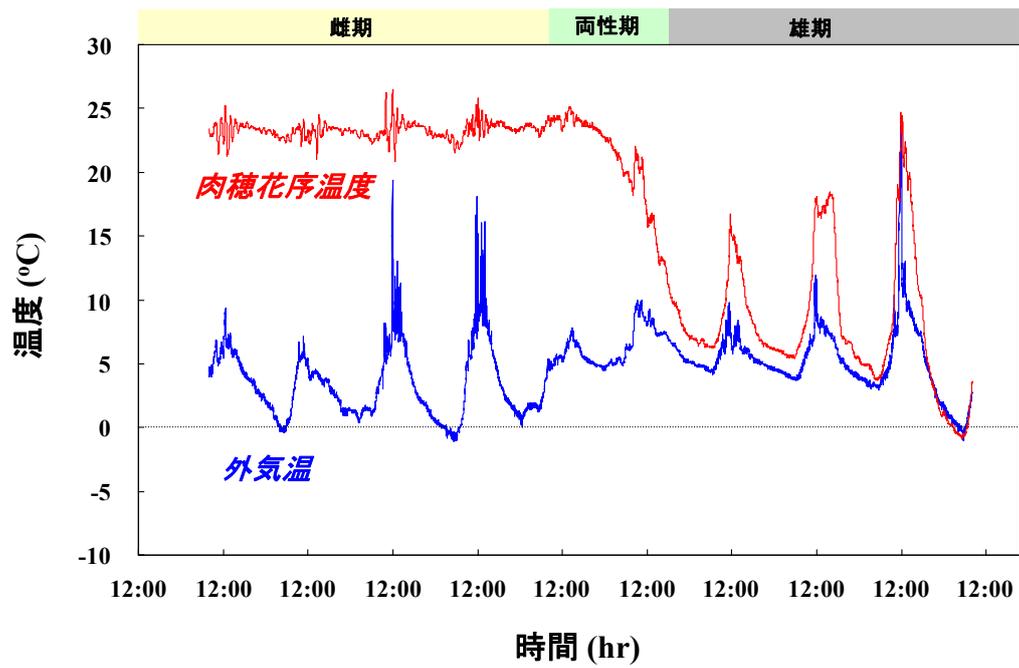


図 3. ザゼンソウの雌期特異的な恒温性.

Onda *et al.*, 2008 を一部改変し，引用した．ザゼンソウの雌期，両性期，雄期にかけての肉穂花序温度および外気温の変動を示している．

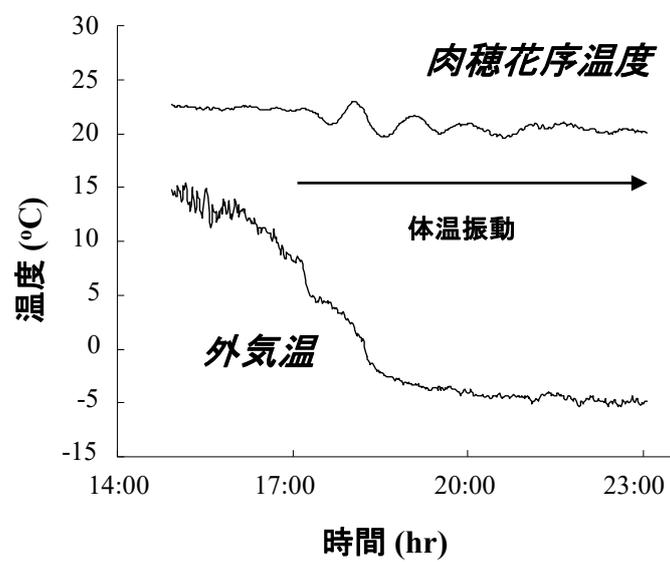


図 4. ザゼンソウの恒温性に関わる体温振動.

Ito *et al.*, 2004 を一部改変して引用した. 雌期のザゼンソウにおいては, 外気温変動により体温振動が生じる.

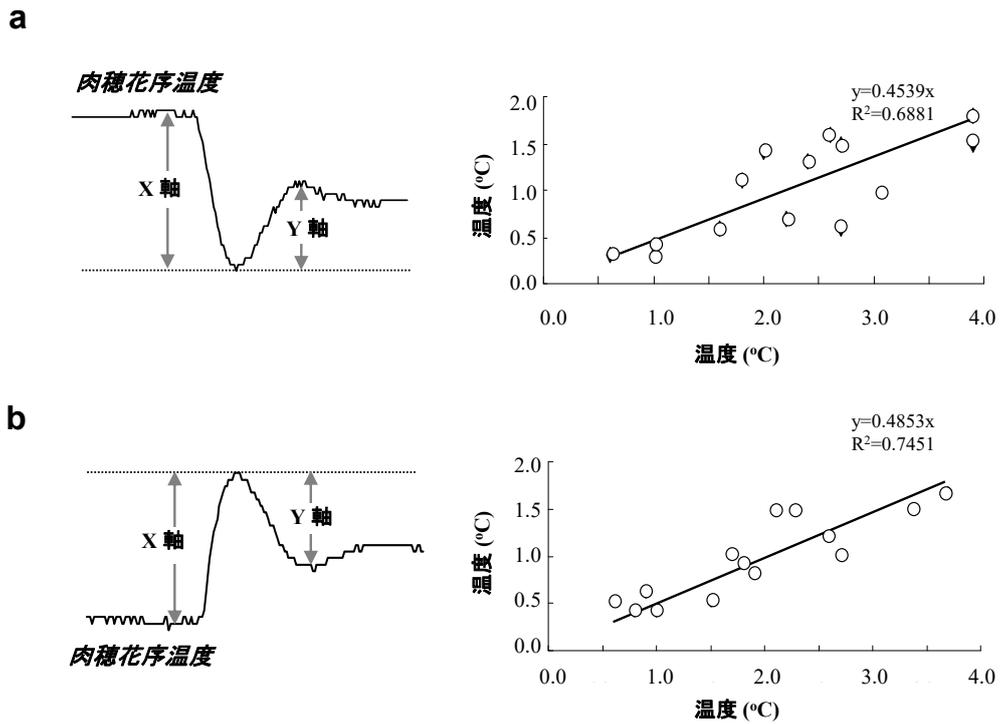


図 5. 外気温変動に応じた定量的かつ定期的な体温振動.

Ito *et al.*, 2004 を一部改変して引用した. 外気温変動に対する, 肉穂花序温度が減少 (a), または増大 (b) した場合の, 体温振動の定量的解析. 外気温変動に応じた肉穂花序温度の変化量 (X 軸) および, 体温調節後の体温レベル (Y 軸).

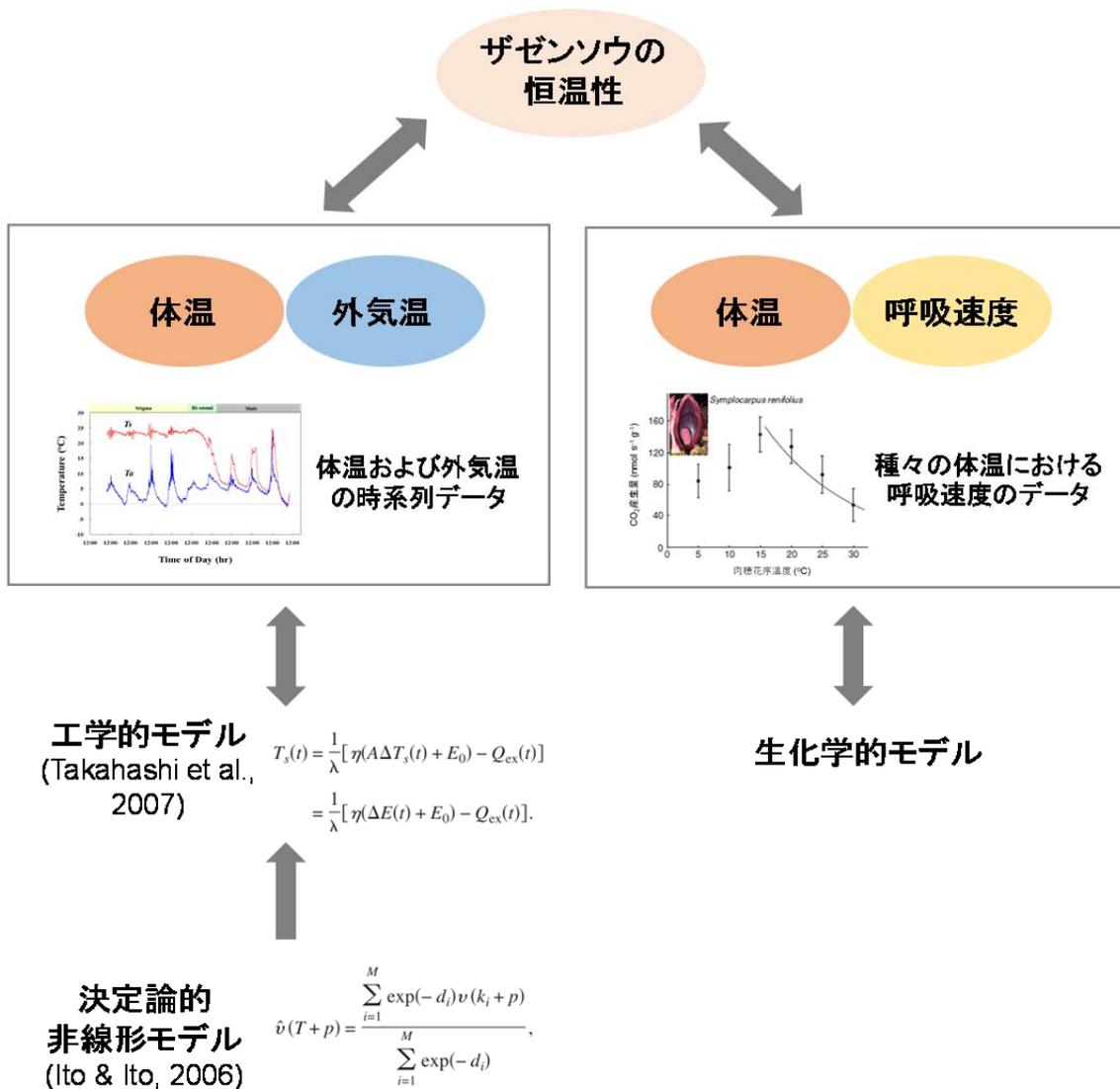


図 6. ザゼンソウの恒温性モデルに関する先行研究の概要.

体温（肉穂花序温度）と外気温の時系列データに関する決定論的非線形モデル，および工学的モデルを用いた解析から，ザゼンソウの体温調節は2次の方程式で表現できることが明らかとなっている．一方，体温と呼吸速度に着目した生理的かつ生化学的解析からは，体温調節メカニズムの分子基盤は不明であった．

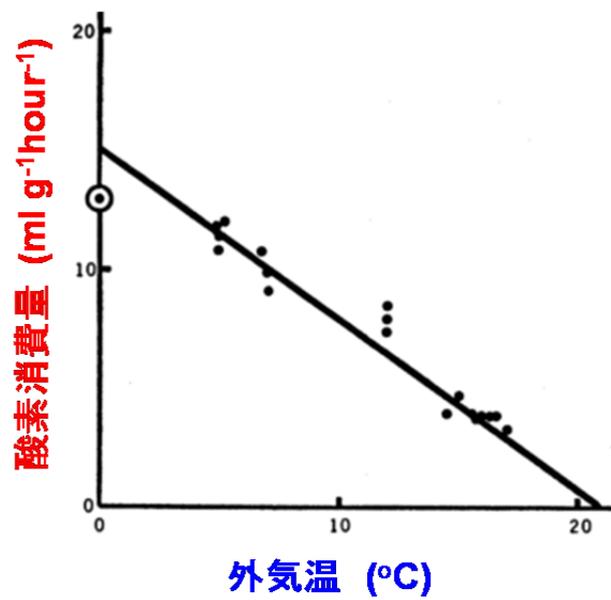


図 7. ザゼンソウの外気温変動に応じた酸素消費量の制御.

Knutson, 1974 を一部改変して引用した. ザゼンソウの恒温性には, 外気温と呼吸速度の逆相関が観察される.

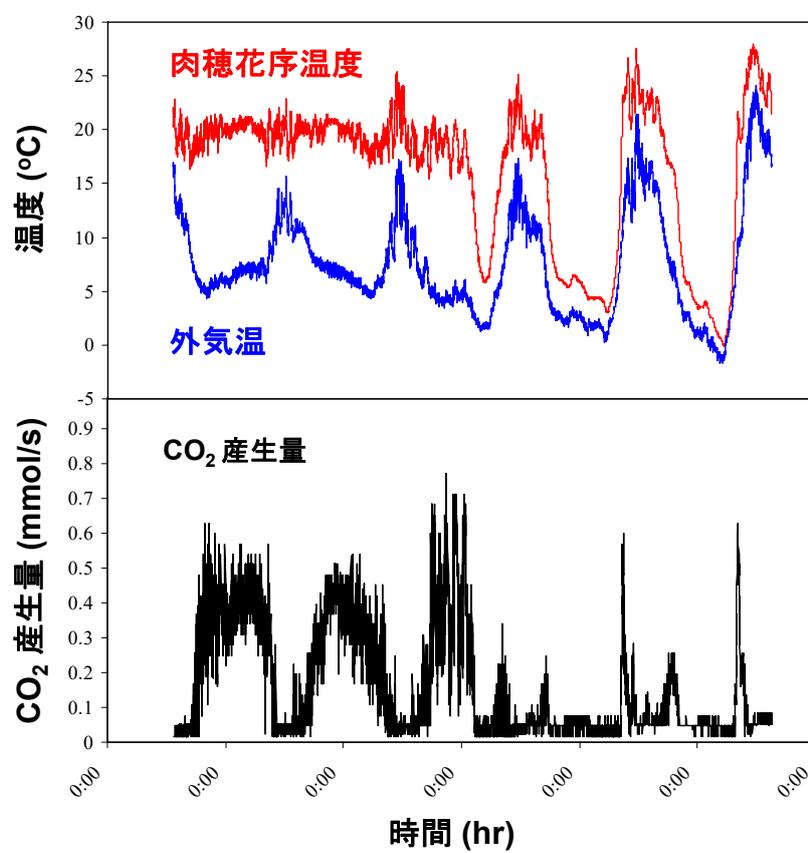


図 8. ザゼンソウの外気温変動に応じた二酸化炭素産生量の制御.

伊藤, 2012 を一部改変して引用した. 外気温変動と二酸化炭素産生量の逆相関が観察される.

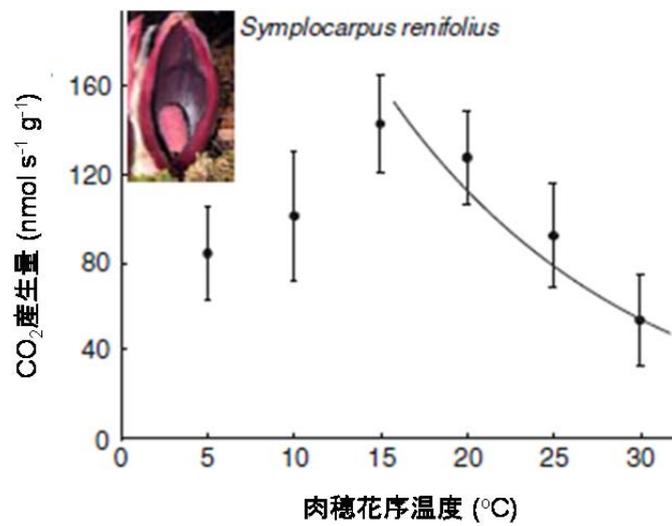


図 9. ザゼンソウの肉穂花序温度と逆相関を示す，呼吸調節メカニズム。

Seymour *et al.*, 2010 を一部改変して引用した. 恒温性が観察される 15 °C から 30°C の呼吸調節範囲においては，肉穂花序温度と呼吸速度の逆相関が存在する.

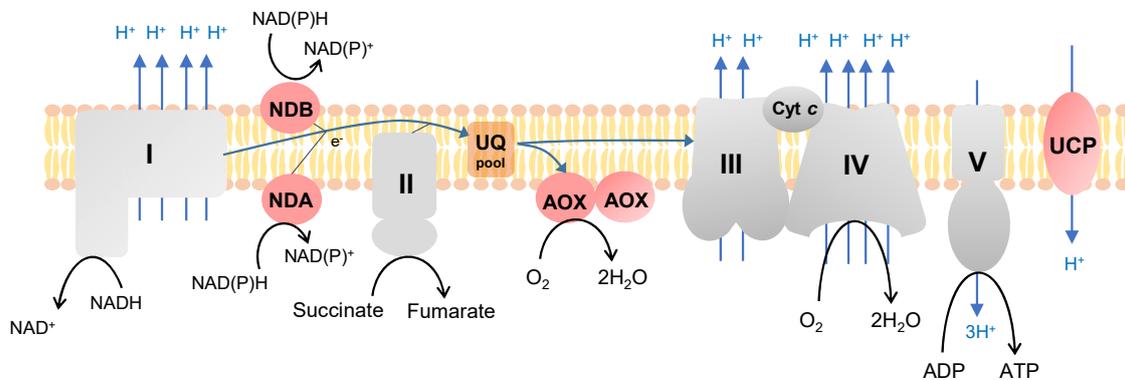


図 10. 植物のミトコンドリアにおける呼吸鎖の模式図.

生物において広く保存される複合体 I-V は、灰色で示した。そのうち、植物の呼吸鎖において観察される酵素群を赤で示した。NDA:マトリクス側局在性ロテノン非感受性脱水素酵素, NDB:膜間腔側局在性ロテノン非感受性脱水素酵素, AOX: シアン耐性呼吸酵素, UCP: 脱共役タンパク質。

## 第2章

### 呼吸の温度応答性の解析に関する理論体系の構築

## 要旨

呼吸反応は、生物のエネルギー代謝獲得において重要な代謝の一つである。気候変動の影響を大きく受ける植物においては、植物の生産性を左右するとともに、近年問題提起される地球温暖化への影響を考える上で重要であることから、呼吸の温度応答の予測モデルが研究されてきた。呼吸反応の温度応答を示すモデルは、 $Q_{10}$ モデル、アレニウスモデル、理論的な裏づけを持たない非線形モデルの3つに大別される。本章では、理論的に導出された $Q_{10}$ モデル、およびアレニウスモデルの理論背景、ならびにその差異について解説するとともに、これまでの研究を体系的にまとめた。

## 背景

近年、生命システムを表現する概念として、オミックススペースが提案された (Toyoda & Wada, 2004)。オミックススペースとは、ゲノムを最下層とし、転写産物の発現を表すトランスクリプトーム、タンパク質の発現を表すプロテオーム、代謝産物を表すメタボローム、生物の表現型を表すフェノームの主に5つの階層から構成される。そのうち、温度は、オミックススペースにおけるゲノム以外の全ての階層に対して影響を与える重要な因子である。即ち、転写産物の発現量、酵素の温度依存性、化学反応速度、およびリン酸化を含むシグナル伝達に関わる経路などの多くの生体反応は温度による外乱を受け、その結果、表現型が変化する。生物は、そのような外乱に反応し (短期的応答)、その応答を基に、数週間かけて生理的機能を順化させる (長期的応答) ことで、温度を含む環境変動に適応する仕組みを有している (Atkin & Tjoelker, 2003)。

生物の成長やホメオスタシスにとって非常に重要であると考えられるものが、エネルギー産生、および生体内への炭素骨格供給に関わる呼吸反応である (Atkin *et al.*, 2005)。植物

においては、光合成により一日に得られた炭素 (C) の 2/3 は、呼吸反応により大気中に放出されることが知られている (Atkin *et al.*, 1996; Loveys *et al.*, 2002; Atkin *et al.*, 2007). 陸上植物全体の見積もりでは、呼吸反応による C の放出量は年間 60 Pg (ペタグラム:  $10^{15}$  g) に及び (Canadell *et al.*, 2007), 生態系の炭素循環に大きく影響しうる. ここで、植物の呼吸活性は温度の影響を強く受けることから (Amthor, 2000; Atkin & Tjoelker, 2003), 化石燃料の燃焼を介した CO<sub>2</sub> 量増大による地球温暖化が生態系に与える影響を理解するために (Cox *et al.*, 2000; Fung *et al.*, 2005; King *et al.*, 2006), 今日まで、個体または生態系レベルにおける植物由来の呼吸の温度応答に関する研究は発展してきた.

その中で、呼吸速度の短期的な温度応答を予測する、種々のモデルが考案されている. それらのモデルは、ヴァントホッフおよびアレニウスによる、単一の化学反応の速度と温度間の関係を示す理論から派生した Q<sub>10</sub> モデルおよびアレニウスモデル (Atkin *et al.*, 2005; Kruse *et al.*, 2011), および理論的裏づけがない、モデルのフィッティングに基づく非線形モデル (Ise *et al.*, 2008; Ise & Moorcroft, 2010), またそれらを組み合わせた修正モデル (O'Sullivan *et al.*, 2013; Heskell *et al.*, 2016) に分類される. 本章においては、化学反応に関する理論的背景を持つ Q<sub>10</sub> モデルおよびアレニウスモデルについて概説する.

#### (1) Q<sub>10</sub> モデル

ヴァントホッフは、多様な化学反応が同様の温度依存性を持つことから、反応速度の増加率が化学反応の種類によってもほとんど変化しないことを明らかにした (van 't Hoff, 1898). それによる温度と化学反応速度の関係式は以下のように表せる (Lloyd & Taylor, 1994)

$$\log_{10} k = a + bT \quad \text{数式 1}$$

$a, b$ : 定数,  $k$ : 速度定数,  $T$ : 温度.

ここで、Lloyd & Taylor は、化学反応の反応速度式に基づき、以下に示すような土壌由来の呼吸速度の温度応答性を示す式を提案した.

$$R = k_R M \quad \text{数式 2}$$

$k_R$ : 生態系においてある一定の値を示す温度依存的な速度定数,  $R$ : 呼吸速度 ( $\mu\text{mol C m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $M$ : 呼吸反応の基質となる単位面積あたりの C 量 ( $\mu\text{mol C m}^{-2}$ ).

$k = k_R$  であることから, 数式 1 は以下のように表すことができる.

$$\log_{10} k = a + bT$$

$$\frac{\ln k}{\ln 10} = a + bT$$

$$\ln k = a \ln 10 + bT \ln 10$$

$$k = e^{a \ln 10 + bT \ln 10}$$

従って,

$$R = k_R M$$

$$= k M$$

$$= e^{a \ln 10 + bT \ln 10} \times M$$

$$= M e^{a \ln 10} \times e^{bT \ln 10}$$

$$R = A e^{BT} \quad \text{数式 3}$$

ここでは  $A = M e^{a \ln 10}$ , および  $B = b \ln 10$  という定数で呼吸速度  $R$  を表した.

数式 3 は, 呼吸速度が温度上昇により指数関数的に増大することを示唆している. このときの  $B$  の値が,  $10^\circ\text{C}$  の温度上昇による呼吸活性の増加率を意味する, 一般に古典的な  $Q_{10}$  モデルとして表される指標である. 即ち,

$$B = \frac{\ln Q_{10}}{10}$$

$$Q_{10} = e^{10B} \quad \text{数式 4}$$

従って, 理論的には, 単一の  $Q_{10}$  の値から, 測定温度範囲外においても, 化学反応の温度応答性の推定が可能である. さらに, 以下のように, 2 点の温度における呼吸速度から  $Q_{10}$  を算出し, 呼吸の温度応答を予測する修正モデルが求められた (Atkin & Tjoelker, 2003).

$$Q_{10} = \left( \frac{R}{R_{REF}} \right)^{\left[ \frac{10}{T-T_{REF}} \right]} \quad \text{数式 5}$$

$T_{REF}$  : 基準となる温度,  $R_{REF}$  : 基準温度における呼吸速度.

この方法は、10°C 以外の温度間隔における  $Q_{10}$  の計算を可能にする。さらにこの数式を対数変換すると、以下の式が導かれる (Atkin *et al.*, 2005).

$$R = R_{REF} \times Q_{10}^{\left[ \frac{T-T_{REF}}{10} \right]} \quad \text{数式 6}$$

以上のような数式により算出される  $Q_{10}$  は、異なる生息環境に属する同一の植物種由来の呼吸の温度依存性を明らかにし、それらの間の差異を容易に示すための指標として、用いられてきた (Tjoelker *et al.*, 2008; Ow *et al.*, 2010). しかしながら、ヴァントホッフの提示する  $Q_{10}$  の概念は、あらゆる化学反応の温度依存性は一定であることを示しているにも関わらず、植物由来の化学反応である呼吸においては、 $Q_{10}$  の算出に用いられる温度域によって  $Q_{10}$  の値が異なることが判明している (Tjoelker *et al.*, 2001; Atkin & Tjoelker, 2003; Atkin *et al.*, 2005). 例えば、10°C の温度変動に関する植物における呼吸の  $Q_{10}$  は、計算に用いられる温度が低いほど  $Q_{10}$  の値が大きく、逆に温度が高いほど小さい値を示すことが判明しており、その傾向は植物種、および熱帯や北極地域を含むその生息域の差異に影響を受けないことが示唆されていた (Tjoelker *et al.*, 2001). 従って、古典的な  $Q_{10}$  モデルは、生理的な温度域の呼吸反応の温度依存性を示すには不適當であると、現在においては考えられている。そのために、実験的に求めた値から  $Q_{10}$  の温度依存性を補正した、 $Q_{10}$  モデルの修正式が算出され、種々の呼吸反応の解析に適用されている (Atkin *et al.*, 2005; O'Sullivan *et al.*, 2013; Heskell *et al.*, 2016)

## (2) アレニウスモデル

アレニウスは、ヴァントホッフと同様に、しかし全く独立して、種々の温度における速度定数の実験値から温度と反応速度との関係式を見出した (図 1 & Arrhenius, 1889). その反応速度の大きさを決定する因子として、アレニウスは活性化エネルギーという概念を提

唱した (図 1a)。活性化エネルギー $E_a$ は、化学反応において、反応速度を決定するパラメータの一つであり、反応分子のエネルギー状態を活性化し、高いエネルギーを持つ遷移状態にするため必要なエネルギーの障壁に相当する。即ち、活性化エネルギー以上のエネルギーを有する分子のみが、その障壁を越えて反応を進めることができる。アレニウスモデルは、以下の数式として表わされる。

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{rT}} \quad \text{数式 7}$$

$k$ : 速度定数,  $A$ : 頻度因子,  $E_a$ : 活性化エネルギー ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $r$ : 気体定数 ( $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T$ : 温度 (K)

ここで、数式 7 を対数変換した数式は、以下のように表すことができる。

$$\begin{aligned} \ln k &= \ln A \cdot e^{-\frac{E_a}{rT}} \\ &= \ln A + \ln e^{-\frac{E_a}{rT}} \\ \ln k &= \ln A - \frac{E_a}{rT} \quad \text{数式 8} \end{aligned}$$

数式 8 より、アレニウスモデルは理論的に以下のことを示している：(1) ある単一の化学反応の速度は温度上昇により増大する、(2) その化学反応の温度応答性は活性化エネルギー (直線の傾き) によって決定される、(3) 活性化エネルギーは温度により一定である (図 1b)。即ち、アレニウスモデルは、温度によって変化するのは活性化エネルギー以上のエネルギーを有する分子の割合であることを示唆している。そのことは、アレニウスモデルで示される  $e^{-\frac{E_a}{rT}}$  の項が、ボルツマン分布より表現されるあるエネルギー以上の分子数の項 (Karzas & Latter, 1961) と一致することからも理解できる。従って、温度が上昇すると、反応障壁を乗り越えるためのエネルギーを持つ分子の割合が大きくなることから反応速度が大きくなり、逆に温度が低下すると反応速度が小さくなる。さらに、ヘスの法則より、化学反応前後におけるエンタルピーの変化量は反応の経路によって変わらないが、活性化エ

エネルギーの大きさは反応の経路によって異なる。触媒は、活性化エネルギーの障壁を下げることによって、化学反応の速度を上昇させることができる (図 1c)。

ここで、反応速度と速度定数を近似して、任意の温度  $T$  および  $T_{REF}$  の時の呼吸速度をそれぞれ  $R$ ,  $R_{REF}$  とおくと (図 2a), 数式 8 より,

$$R = Ae^{-\frac{E_o}{rT}} \quad \text{数式 9}$$

$$R_{REF} = Ae^{-\frac{E_o}{rT_{REF}}} \quad \text{数式 10}$$

それぞれの頻度因子  $A$  は等しいので, 数式 9 および 10 より,

$$\begin{aligned} \frac{R}{e^{-\frac{E_o}{rT}}} &= \frac{R_{REF}}{e^{-\frac{E_o}{rT_{REF}}}} \\ R &= R_{REF} \times \frac{e^{-\frac{E_o}{rT}}}{e^{-\frac{E_o}{rT_{REF}}}} \\ &= R_{REF} \times e^{-\frac{E_o}{rT} + \frac{E_o}{rT_{REF}}} \\ &= R_{REF} \times e^{-\frac{E_o}{rT} + \frac{E_o}{rT_{REF}}} \\ &= R_{REF} \times e^{\frac{E_o}{r} \left( \frac{1}{T_{REF}} - \frac{1}{T} \right)} \\ R &= R_{REF} \times e^{\frac{E_o(T-T_{REF})}{rT \times T_{REF}}} \quad \text{数式 11} \end{aligned}$$

$E_o$ : 呼吸反応全体の活性化エネルギー ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

ここで  $T_{Term} = \frac{T-T_{REF}}{T \times T_{REF}}$  ( $\text{K}^{-1}$ ) (Kruse & Adams, 2008; Kruse *et al.*, 2011) とすると, 数式 11は

以下のように表せる.

$$R = R_{REF} \times e^{\frac{E_o}{r} T_{Term}}$$

従って,

$$\ln R = \ln R_{REF} + \frac{E_o}{r} \cdot T_{Term} \quad \text{数式 12}$$

基底温度  $T_{REF}$  (K),  $T_{REF}$  における呼吸速度  $R_{REF}$  を定数とすると, 数式 12 は, 古典的アレニウスモデルの理論に基づいて, 任意の温度  $T$  (K) における呼吸速度  $R$  の関係式, 即ち  $T_{Term}$  および  $\ln R$  の一次関数として捉えることができる (図 2b). 従って, 数式 12 の微分方程式より, 呼吸反応全体の活性化エネルギー  $E_o$  ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) は以下のように算出される.

$$(\ln R)' = \frac{E_o}{r}$$

$$E_o = (\ln R)' \times r$$

なお, 数式 12 で表した呼吸と温度の関係式は,  $E_o$  が温度変化によらず一定であり, 呼吸反応の温度応答は  $E_o$  を有する分子の割合の温度応答に依存するという, 古典的なアレニウスモデルの考え方に従っている (図 2b & 3a). しかしながら, 実際の呼吸反応に関する解析においては,  $Q_{10}$  モデルにおいて問題になったことと同様に, 呼吸反応の増加率が温度によって変動する (Tjoelker *et al.*, 2001; Atkin & Tjoelker, 2003). 従って, 生物的反応である呼吸反応においては, 古典的アレニウスモデルとは異なり, グラフの傾きを表す活性化エネルギーが温度に対して動的に変動することが示唆された (図 3b). Kruse らは実際の呼吸の温度応答をより反映した数式を作成するために, アレニウスモデルを二次的に修正したモデルを作成した (Kruse & Adams, 2008; Kruse *et al.*, 2008; Kruse *et al.*, 2011). 即ち,  $E_o$  の動的な変動を表すために, 数式 12 の  $T_{Term}$  の係数を以下のように変換した.

$$\ln R = \ln R_{REF} + \left( \frac{E_o(T_{REF})}{r} + \delta(T_{REF}) \times T_{Term} \right) \times T_{Term} \quad \text{数式 13}$$

$E_o(T_{REF})$ : 基底温度における呼吸反応全体の活性化エネルギー ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $\delta(T_{REF})$ : 温度依存的な活性化エネルギーの変化率 ( $10^3 \cdot \text{K}^2$ ),  $T_{Term} = \frac{T - T_{REF}}{T \times T_{REF}}$  ( $\text{K}^{-1}$ ),  $T_{REF}$ : 基底温度 (K),  $R_{REF}$ :  $T_{REF}$  における呼吸速度.

従って,  $\delta(T_{REF}) \times T_{Term}$  の部分が,  $\frac{E_o(T_{REF})}{r}$  で示された基底温度の活性化エネルギーからの温度変化による増減を表す部分である. さらに数式 13 より,

$$\ln R = \ln R_{REF} + \frac{E_o(T_{REF})}{r} \times T_{Term} + \delta(T_{REF}) \times T_{Term}^2 \quad \text{数式 14}$$

以上のように、温度  $T$  における呼吸速度  $R$  は、 $\ln R$  と  $T_{Term}$  の二次関数として表すことができる (図 2c)。さらに数式 14 の微分方程式より、

$$(\ln R)' = \frac{E_o(T_{REF})}{r} + 2\delta(T_{REF}) \times T_{Term}$$

アレニウスモデルより  $E_o = (\ln R)' \times r$  であるから、呼吸反応全体の活性化エネルギーの温度変化は、以下の一次式として表すことができる。

$$E_o = E_o(T_{REF}) + 2r\delta(T_{REF}) \times T_{Term} \quad \text{数式 15}$$

以上により、Kruise らは動的な活性化エネルギーの変動に基づく、呼吸活性の温度応答を二次関数として表す修正アレニウスモデルを提示した。修正アレニウスモデルは、活性化エネルギーというパラメータから生理的反応への知見を得ることができる点で有用である。また近年、231 種の様々な地域に生息する植物に対して行った回帰直線分析からも、一般に植物の呼吸応答は温度との二次関数として表わされることが示唆されていることから

(Heskel *et al.*, 2016)、修正アレニウスモデルもまた、様々な植物体の呼吸応答に対し応用できると考えられる。

## 考察

古典的なアレニウスモデルの概念は、活性化エネルギーは温度により一定であり、反応速度の温度応答に影響するのは、活性化エネルギー以上のエネルギーを有する分子の割合の変化であることを意味する (図 3a)。一方、Kruise らが提唱した修正アレニウスモデルは、呼吸反応に関わる活性化エネルギーが温度に対して動的に変動することを示唆している

(図 3b)。ここで、本研究において着目する、生体内で行われる呼吸反応においては、前述したように、 $Q_{10}$  モデルのような温度上昇による反応速度の指数関数的増大はみられず、

温度上昇により反応速度の増加率が減少することが判明している。このような活性化エネルギーの動的変動に寄与する因子については、長期的な順化などの温度影響を除くと、以下の要因が考えられる。即ち、(1) 触媒となる酵素の温度依存性、(2) 複合的な反応による酸素消費の基質供給量の差異、である。

生体内で行われる種々の化学反応においては、酵素が触媒として関与する。このような酵素は、エンタルピー的に安定な構造をとる温度において活性を有することが知られている (Oliveberg *et al.*, 1995; Somero, 1995)。従って、このような温度変化に対する連続的な酵素活性変化に由来した酵素活性の温度依存性が、生体内で行われる化学反応において影響すると考えられる。また、一部の酵素はアロステリックな活性制御を受ける (Laskowski *et al.*, 2009)。この場合、温度変化を受け、エフェクター分子による酵素活性の増加率が変化する事例が存在する (Ito *et al.*, 2013)。それ以外にも、生体内においては、エフェクター分子の量的変動に基づいて酵素がアロステリック制御を受けることで、酵素反応の温度依存性を変化させることが考えられる。特に呼吸反応においては、呼吸基質の酸化還元や、酸素消費に関わる細胞内の複数の酵素が関連しているので、複数の酵素の温度依存性がこのような活性化エネルギーの動的変動に影響することが示唆される。

さらに、反応速度の決定に関わる反応速度論に基づくと、一般に反応速度  $v$  は速度定数と濃度  $S$  の比例式として、以下のように表すことができる。

$$v = k[S] \quad \text{数式 16}$$

反応速度論に基づいて考えると、速度定数は、触媒の影響を含む定数として表すことができるので、数式 16 において、活性化エネルギーは  $k$  に相当すると考えられる。従って、反応速度を速度定数として近似している修正アレニウスモデルでは、基質濃度が反応速度に対し影響することが自明である。複合的な化学反応によって生じる酸素消費または二酸化炭素濃度をモニターする呼吸反応においては、複合的な化学反応によって生じたこれら

の基質量が温度変動に基づき変化した結果、反応速度が変動し、動的な活性化エネルギー変動が観察される可能性があることを理解し、考察することが必要となる。

次章以降の解析においては、生体内で行われる化学反応と関連付けた考察が可能となる修正アレニウスモデルを用いて、植物の恒温性に関わる温度応答性呼吸調節の熱力学的、および反応速度的理解をすることを試みた。

#### 引用文献

Amthor, J. S. (2000) The McCree–de Wit–Penning de Vries–Thornley respiration paradigms: 30 years later. *Ann. Bot.* **86**: 1-20.

Arrhenius, S. (1889) Über die reaktionsgeschwindigkeit bei der inversion von rohrzucker durch säuren. *Z. Phys. Chem.* **4**: 226-248.

Atkin, O. K., Botman, B. and Lambers, H. (1996) The causes of inherently slow growth in alpine plants: An analysis based on the underlying carbon economies of alpine and lowland *Poa* species. *Funct. Ecol.* **10**: 698-707.

Atkin, O. K., Bruhn, D. and Tjoelker, M. G. (2005). Response of plant respiration to changes in temperature: Mechanisms and consequences of variations in  $Q_{10}$  values and acclimation. Plant respiration: from cell to ecosystem. H. Lambers and M. Ribas-Carbo. *Dordrecht, Springer Netherlands*: 95-135.

Atkin, O. K., Scheurwater, I. and Pons, T. L. (2007) Respiration as a percentage of daily photosynthesis in whole plants is homeostatic at moderate, but not high, growth temperatures. *New Phytol.* **174**: 367-380.

Atkin, O. K. and Tjoelker, M. G. (2003) Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends Plant Sci.* **8**: 343-351.

Canadell, J. G., Le Quere, C., Raupach, M. R., Field, C. B., Buitenhuis, E. T., Ciais, P., Conway, T. J., Gillett, N. P., Houghton, R. A. and Marland, G. (2007) Contributions to accelerating atmospheric CO<sub>2</sub> growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 18866-18870.

Cox, P. M., Betts, R. A., Jones, C. D., Spall, S. A. and Totterdell, I. J. (2000) Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature* **408**: 184-187.

Fung, I. Y., Doney, S. C., Lindsay, K. and John, J. (2005) Evolution of carbon sinks in a changing climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 11201-11206.

Heskel, M. A., O'Sullivan, O. S., Reich, P. B., Tjoelker, M. G., Weerasinghe, L. K., Penillard, A., Egerton, J. J. G., Creek, D., Bloomfield, K. J., Xiang, J., Sinca, F., Stangl, Z. R., Martinez-de la Torre, A., Griffin, K. L., Huntingford, C., Hurry, V., Meir, P., Turnbull, M. H. and Atkin, O. K. (2016) Convergence in the temperature response of leaf respiration across biomes and plant functional types. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: 3832-3837.

Ise, T., Dunn, A. L., Wofsy, S. C. and Moorcroft, P. R. (2008) High sensitivity of peat decomposition to climate change through water-table feedback. *Nature Geosci.* **1**: 763-766.

Ise, T. and Moorcroft, P. R. (2010) Simulating boreal forest dynamics from perspectives of ecophysiology, resource availability, and climate change. *Ecol. Res.* **25**: 501-511.

Ito, K., Takahashi, H., Umekawa, Y., Imamura, T., Kawasaki, S., Ogata, T., Kakizaki, Y. and Seymour, R. S. (2013) Metabolite profiling reveals tissue- and temperature-specific metabolomic responses in thermoregulatory male florets of *Dracunculus vulgaris* (Araceae). *Metabolomics* **9**: 919-930.

Karzas, W. and Latter, R. (1961) Electron radiative transitions in a coulomb field. *Astrophys. J.* **6**: 167.

King, A. W., Gunderson, C. A., Post, W. M., Weston, D. J. and Wullschleger, S. D. (2006) Plant respiration in a warmer world. *Science* **312**: 536-537.

- Kruse, J. and Adams, M. A. (2008) Three parameters comprehensively describe the temperature response of respiratory oxygen reduction. *Plant Cell Environ.* **31**: 954-967.
- Kruse, J., Hopmans, P. and Adams, M. A. (2008) Temperature responses are a window to the physiology of dark respiration: Differences between CO<sub>2</sub> release and O<sub>2</sub> reduction shed light on energy conservation. *Plant Cell Environ.* **31**: 901-914.
- Kruse, J., Rennenberg, H. and Adams, M. A. (2011) Steps towards a mechanistic understanding of respiratory temperature responses. *New Phytol.* **189**: 659-677.
- Laskowski, R. A., Gerick, F. and Thornton, J. M. (2009) The structural basis of allosteric regulation in proteins. *FEBS Lett.* **583**: 1692-1698.
- Lloyd, J. and Taylor, J. A. (1994) On the temperature dependence of soil respiration. *Funct. Ecol.* **8**: 315-323.
- Loveys, B. R., Scheurwater, I., Pons, T. L., Fitter, A. H. and Atkin, O. K. (2002) Growth temperature influences the underlying components of relative growth rate: an investigation using inherently fast- and slow-growing plant species. *Plant Cell Environ.* **25**: 975-988.
- O'Sullivan, O. S., Weerasinghe, K. W., Evans, J. R., Egerton, J. J., Tjoelker, M. G. and Atkin, O. K. (2013) High-resolution temperature responses of leaf respiration in snow gum (*Eucalyptus pauciflora*) reveal high-temperature limits to respiratory function. *Plant Cell Environ.* **36**: 1268-1284.
- Oliveberg, M., Tan, Y. J. and Fersht, A. R. (1995) Negative activation enthalpies in the kinetics of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 8926-8929.
- Ow, L. F., Whitehead, D., Walcroft, A. S. and Turnbull, M. H. (2010) Seasonal variation in foliar carbon exchange in *Pinus radiata* and *Populus deltoides*: respiration acclimates fully to changes in temperature but photosynthesis does not. *Glob. Chang. Biol.* **16**: 288-302.
- Somero, G. N. (1995) Proteins and temperature. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 43-68.
- Tjoelker, M. G., Oleksyn, J. and Reich, P. B. (2001) Modelling respiration of vegetation: evidence for a general temperature-dependent Q<sub>10</sub>. *Glob. Chang. Biol.* **7**: 223-230.

Tjoelker, M. G., Oleksyn, J., Reich, P. B. and Żytkowiak, R. (2008) Coupling of respiration, nitrogen, and sugars underlies convergent temperature acclimation in *Pinus banksiana* across wide-ranging sites and populations. *Glob. Chang. Biol.* **14**: 782-797.

Toyoda, T. and Wada, A. (2004) Omic space: coordinate-based integration and analysis of genomic phenomic interactions. *Bioinformatics* **20**: 1759-1765.

van 't Hoff, J. H. (1898) Lectures on theoretical and physical chemistry. Part 1. Chemical dynamics. *Edward Arnold, London*.

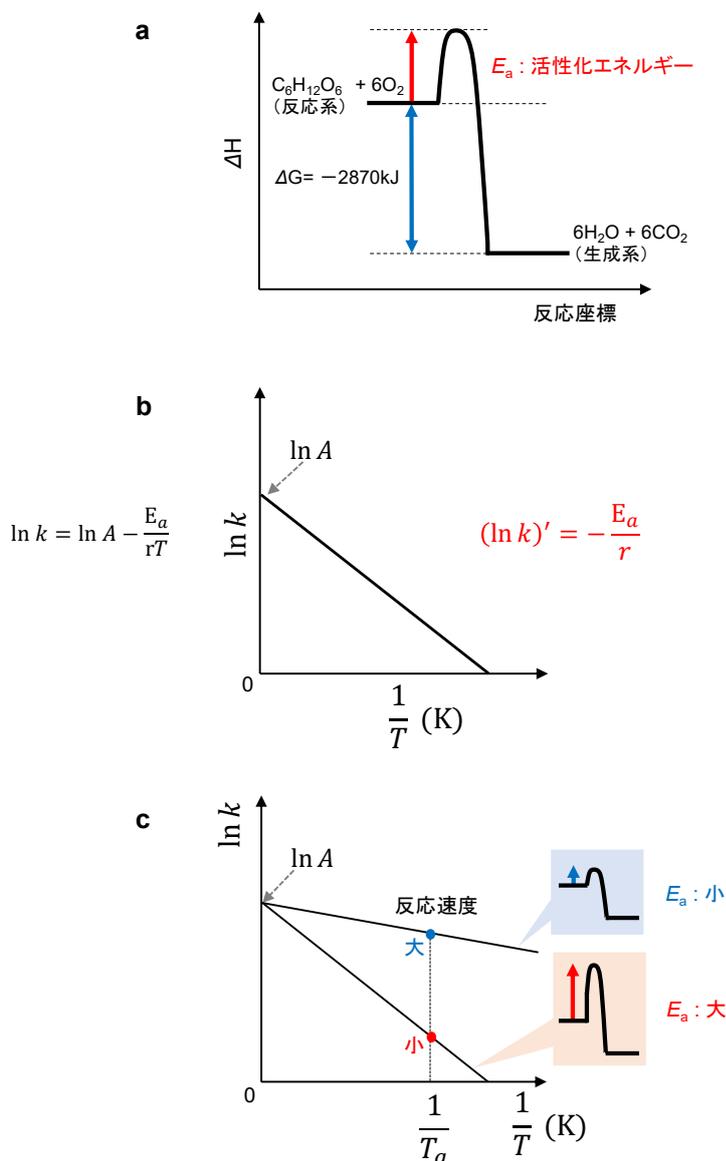


図 1. 古典的アレニウスモデルの概要と、活性化エネルギー。

**a.** 呼吸反応を例とした活性化エネルギーの概要。炭水化物を酸化する過程で酸素を消費し、二酸化炭素を生成する呼吸反応は、発熱反応であり、このようなエネルギー状態として図示できる。このとき、反応物のエネルギー状態を活性化し、高いエネルギーを持つ遷移状態にするため必要なエネルギーの障壁が、活性化エネルギー $E_a$ である。反応障壁を乗り越えた分子のみが、化学反応を進行して生成物を産生できる。 $\Delta G$ : 反応のギブス自由エネルギー。

**b.** 古典的アレニウスモデルの概要。ある速度定数 $k$ の対数値は、温度の逆数との線形関係として表すことができる。その際、反応の活性化エネルギーは直線の傾きに相当する。

**c.** 活性化エネルギーの大きさの差異による、反応速度および温度間の関係性の違い。

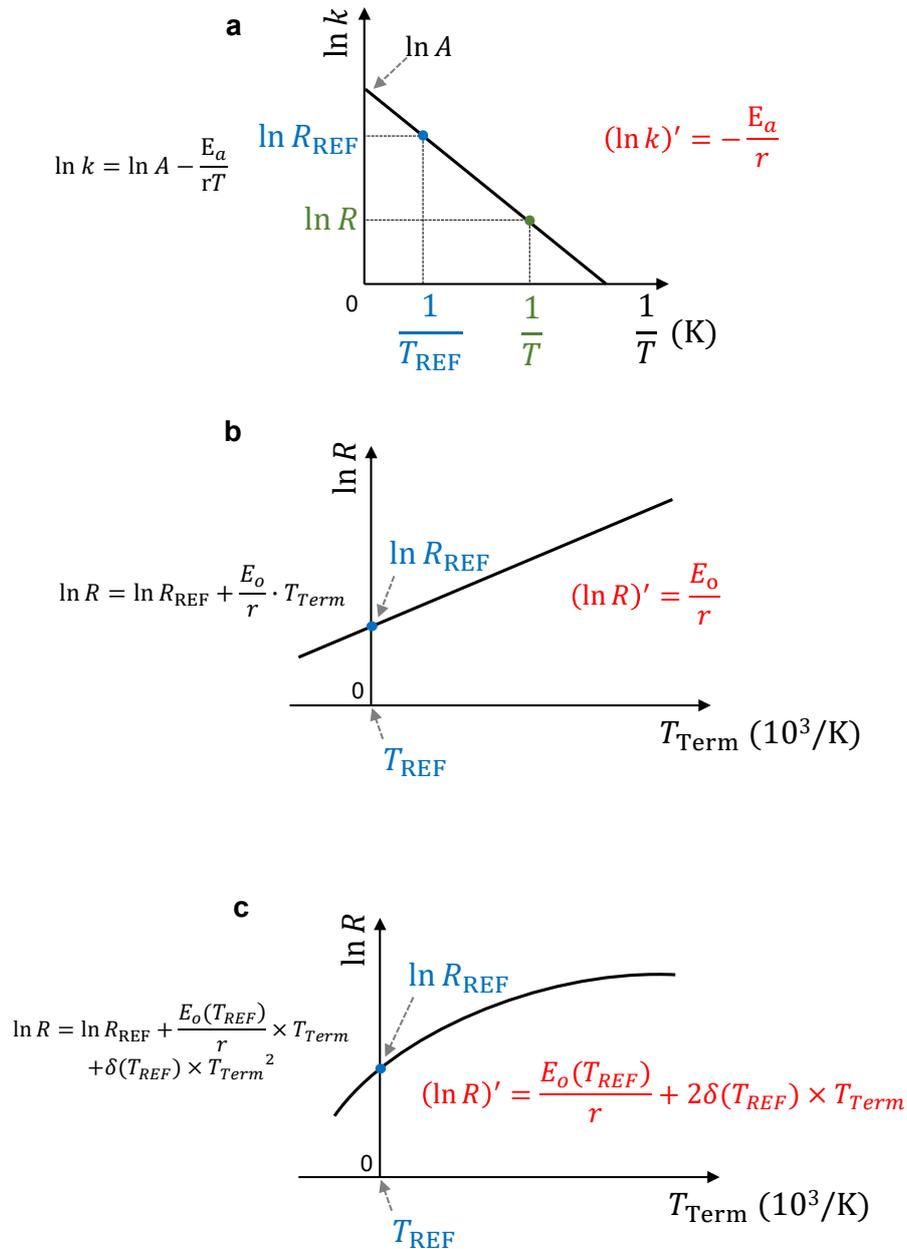


図 2. 修正アレニウスモデルの概要.

a. 古典的アレニウスモデルに基づいて表される, ある温度  $T$  および  $T_{REF}$  における呼吸速度  $R$  および  $R_{REF}$ . b. 古典的アレニウスモデルに基づいて算出した, 呼吸速度と温度との関係式. ある呼吸速度  $R$  の対数値は, 温度指標  $T_{Term}$  との線形関係として表すことができる. その際, 呼吸反応の活性化エネルギーは直線の傾きから算出できる. c. 呼吸反応に関する修正アレニウスモデルの概要. 呼吸速度  $R$  の対数と指標  $T_{Term}$  を, 二次関数の関係で表した. この場合, アレニウスモデルの理論に基づく活性化エネルギーは, 温度によって変動する一次関数として表すことができる.

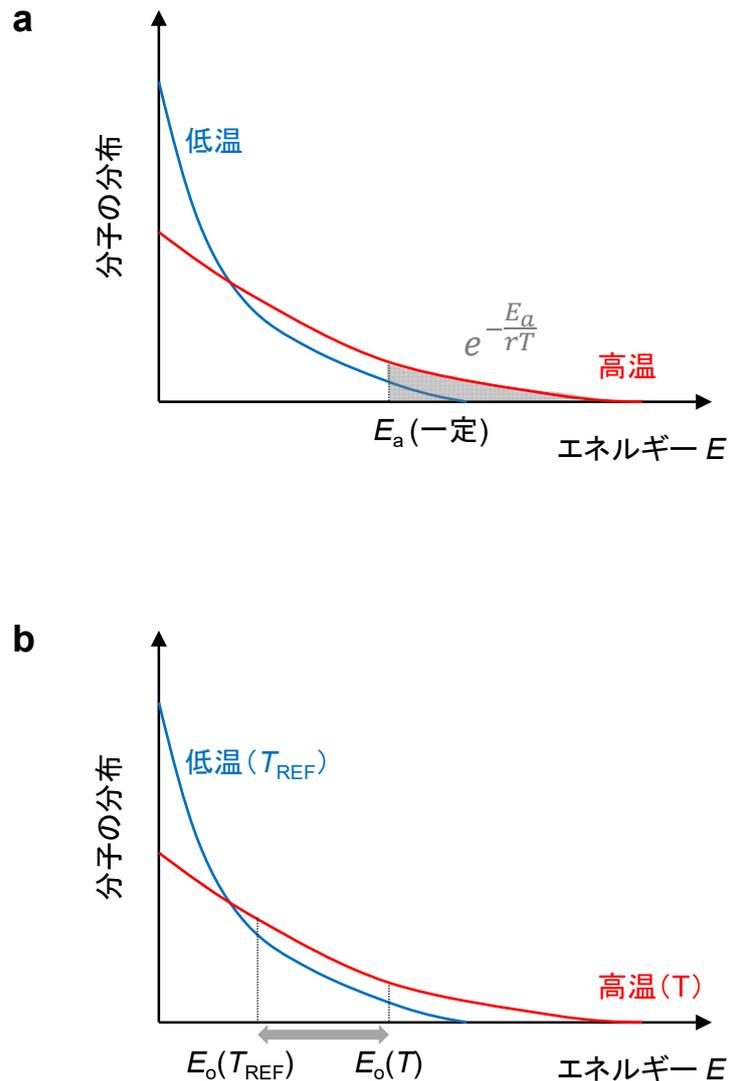


図 3. 古典的なアレニウスモデルおよび修正アレニウスモデルの差異.

a. 古典的アレニウスモデルに基づいて表されるあるエネルギー  $E$  を持った分子の分布図. 古典的アレニウスモデルにおいては, 反応により活性化エネルギー  $E_a$  は一定であり, 高エネルギー分子の割合が温度上昇により増加することで, 反応速度は増大する. ボルツマン分布より,  $E_a$  を有する分子の温度の割合は,  $e^{-\frac{E_a}{rT}}$  として表すことができる. b. 修正アレニウスモデルに基づいて表されるあるエネルギー  $E$  を持った分子の分布図. 修正アレニウスモデルにおいては, 古典的アレニウスモデルと同様に, 温度により高エネルギー分子を有する割合が変化するのに加えて,  $E_a$  自体も変動する.

## 第3章

### 修正アレニウスモデルを用いた 植物組織由来呼吸の温度応答の解析

## 第1節 ザゼンソウの発熱器官由来呼吸の温度応答の解析

### 要旨

一般にいくつかの動物で観察される恒温性は、脳と神経系を介した複雑な体温調節により達成される。一方種子植物のいくつかの科は、その花において、動物とは全く異なる方法で生理的な体温調節を示す。そのような植物の一つであるザゼンソウは、発熱器官である肉穂花序の温度と逆相関を示す呼吸調節により、外気温と独立した体温を維持している。本研究で行った修正アレニウスモデルを用いた解析により、呼吸調節が行われる温度域において、肉穂花序で行われる呼吸反応に関わる活性化エネルギーは、負の値を示すことが明らかとなった。従って、ザゼンソウの呼吸調節は、発熱反応および吸熱反応から構成される、前駆平衡反応と呼ばれる特殊な化学平衡が関与することが示唆された。その場合においては、ザゼンソウの呼吸基質である炭水化物の酸化還元による、呼吸鎖末端酵素への電子の供給が、前駆平衡に密接に関連する可能性が提示された。

### 背景

生物の環境温度変化への適応手段の一つである生理的な体温調節は、主に鳥類および哺乳類によって行われる (Chaffee & Roberts, 1971)。それらの動物は環境温度が低下すると、脳の視床下部で認識された温度情報に基づき、生体内のふるえ、ならびに非ふるえ熱産生を調節することで、体温をほぼ一定の温度に維持できる (Morrison & Nakamura, 2011)。このような恒温性は、動物のみならず、熱産生を行ういくつかの植物の花に相当する器官においても観察されることが知られている (Nagy *et al.*, 1972; Knutson, 1974; Seymour &

Schultze-Motel, 1996; Seymour, 1998; Seymour & Schultze-Motel, 1999). しかしながら、これらの植物の恒温性は、鳥類や哺乳類と異なり、ある程度の環境温度による熱損失の影響を受ける (Seymour, 2001). 例えば、ハス (*Nelumbo nucifera*) は 10°C の環境温度低下により、発熱器官である花托の中心温度が 0.9°C 低下する (Seymour, 1998). また、ザゼンソウの発熱器官である肉穂花序の温度は、野外におけるその体温の平均値は 23°C であるにも関わらず、外気温が 5°C の時には熱損失と熱産生の速度が釣り合った結果、17.6°C で平衡温度が形成され、また外気温が 30°C の時は 27.6°C となる (Seymour *et al.*, 2010). この時、これら植物の発熱器官においては、発熱器官温度が低下すれば呼吸速度が上昇し、逆に温度が上昇すると呼吸速度を減少させる、発熱器官の温度と呼吸速度が逆相関する共通のメカニズムが存在する. その際、ザゼンソウにおいては肉穂花序温度が 15°C の場合に最大呼吸速度を示すが、15°C よりも肉穂花序温度が低下すると、あたかも恒温性の ON/OFF を制御するスイッチを切ったかのように、その体温調節能力は失われてしまう. Seymour らは、ザゼンソウにおける 15°C に相当する温度を *Switching temperature* と命名するとともに、恒温性が観察される、発熱器官の温度と呼吸速度が逆相関する温度域を呼吸調節範囲とした (Seymour *et al.*, 2010). このような呼吸調節は可逆的に行われるため、温度上昇による呼吸活性の減少は、単なるタンパク質変性による酵素失活が原因でないことは明らかである. しかしながら、発熱植物の温度と逆相関する呼吸調節メカニズムの生化学的基盤は不明であった. そこで本研究においては、ザゼンソウの恒温性が、肉穂花序温度の変動に基づく呼吸反応の活性化エネルギー変化により、肉穂花序の熱力学的平衡が変化することで獲得されると仮定した. そして、ザゼンソウ肉穂花序における呼吸反応の温度応答に対し、アレニウスモデル (Arrhenius, 1889)、ならびに修正アレニウスモデル (Kruse & Adams, 2008; Kruse *et al.*, 2011) を適用し、活性化エネルギーの算出を行った.

## 実験材料と方法

### 植物材料

種々の温度における肉穂花序組織由来の呼吸測定のために、2008年の3月上旬から下旬にかけて、日本の岩手県北上市、藤根の群落地で自生する発熱中のザゼンソウ肉穂花序4個体を解析に用いた。

### 組織由来呼吸の活性測定

呼吸速度の測定は、Thermal clamping 法により行った (Seymour *et al.*, 2010)。その概要と模式図を図 1a および図 1b に示した。具体的な手順としては、仏炎苞を取り除いたザゼンソウの肉穂花序に対して、ペルチェ素子を挿入し、肉穂花序温度を人為的に制御した。さらに肉穂花序の周囲の土壌をプラスチック等で覆った後、その上から CT cabinet と呼ばれる自作の機械を被せ、その中の二酸化炭素量を CO<sub>2</sub> analyzer ならびにデータロガーを介してモニターすることで、肉穂花序由来の呼吸を経時的に測定・記録を行った。野外において行われる本実験系では、根から供給される炭水化物を呼吸基質として熱産生を行うザゼンソウにおいて、インタクトな条件下での肉穂花序由来の呼吸活性を測定することが可能となる。

呼吸活性の解析には、前述の方法を用いて既に得られている肉穂花序由来の呼吸データを引用した (Seymour *et al.*, 2010)。ここで、ザゼンソウにおいては呼吸商が 1.0 であり (Seymour & Blaylock, 1999)、得られた CO<sub>2</sub> 産生量 (nmol CO<sub>2</sub>/min/g spadix) は酸素消費量と等しいことから、本研究においては得られた呼吸データは酸素消費量として取り扱った。

### アレニウスモデルおよび修正アレニウスモデルを用いた呼吸活性の解析

第2章にて理論的背景を含めて前述した古典的アレニウスモデル (Arrhenius, 1889), および修正アレニウスモデル (Kruse & Adams, 2008; Kruse *et al.*, 2011) は, 呼吸反応に関する活性化エネルギーの解析に用いた. 以下に示す修正アレニウスモデルを, 種々の平衡状態の温度における呼吸データに対する曲線回帰分析に用いた.

$$\ln R = \ln R_{REF} + \frac{E_o(T_{REF})}{r} \times T_{Term} + \delta(T_{REF}) \times T_{Term}^2$$

$T_{Term}$  は, ある温度  $T$  および任意に定める基準温度  $T_{REF}$  を用いて表した温度指標であり, 以下のように表すことができる.

$$T_{Term} = \frac{T - T_{REF}}{T \times T_{REF}}$$

即ち, 修正アレニウスモデルは, ある温度  $T$  における呼吸速度の対数  $\ln R$  と, 温度指標  $T_{Term}$  の二次関数である. 曲線回帰分析の結果より, いくつかの呼吸パラメータ, 即ち基準温度における呼吸速度  $\ln R_{REF}$ , 呼吸反応全体の活性化エネルギー  $E_o(T_{REF})$ , ならびに  $E_o$  の温度感受性を示す  $\delta(T_{REF})$  ( $E_o$  と温度との関係を示す一次関数の傾きに相当する) は求められる.

さらに,  $E_o$  は, 第2章に示したように, 以下のように表すことができる.

$$E_o = E_o(T_{REF}) + 2r\delta(T_{REF}) \times T_{Term}$$

本数式は, 種々の温度における呼吸反応全体の活性化エネルギーの算出に用いた.

## 結果

ザゼンソウにおいて呼吸反応全体の活性化エネルギーの温度応答を明らかにするために, 種々の温度における肉穂花序組織由来の呼吸データに対して, アレニウスおよび修正アレニウスモデルを適用した. まず, 図1に示す方法で, ザゼンソウ4個体それぞれについて, 人為的な2時間の温度固定により肉穂花序温度を平衡状態にした際の呼吸速度を実験的に

求めた。温度固定を繰り返し、最終的に得られた種々の温度における呼吸速度に対して古典的アレニウスモデルによる回帰分析を行った結果、測定した全ての個体の肉穂花序由来呼吸の温度応答は直線に回帰しない傾向が示された（図 2）。次に、呼吸速度の対数および温度の二次関数である修正アレニウスモデルを用いて同様の解析を行った結果、4 個体全てにおいて古典的アレニウスモデルよりも高い相関係数  $R^2$  が得られ、曲線によく回帰することが明らかとなった（図 3 & 4）。従って、2 種類のアレニウスモデルを用いて行った解析の結果から、ザゼンソウの肉穂花序における呼吸反応の活性化エネルギーは、動的な温度応答を示すことが判明した。本結果に基づき、以降の活性化エネルギーの解析には、ザゼンソウ組織由来の呼吸の温度応答をよく反映している修正アレニウスモデルを用いた。

以上の修正アレニウスモデルを用いた曲線回帰分析により、それぞれの個体の呼吸パラメータ ( $\ln R_{REF}$  (基準温度  $T_{REF}$  が  $15^\circ\text{C}$  における呼吸速度),  $E_0$  (全体の活性化エネルギー), および  $\delta$  (温度感受性)) を算出した（表 1）。次に、得られたこれらの呼吸パラメータを用いて、筆者は各個体における呼吸反応全体の活性化エネルギー  $E_0$  の動的な温度応答を算出した（図 5）。その結果、解析した全ての肉穂花序において  $E_0$  は温度上昇により減少し、さらにザゼンソウの **Switching temperature** である  $15^\circ\text{C}$  付近で明らかに収束した。詳細な解析のために、修正アレニウスモデルにおいて最大呼吸速度を意味する  $E_0 = 0$  となる温度を算出した結果、これらの個体の  $E_0$  は  $15.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$  という精度で、最大呼吸速度を示す温度において収束することが判明した（表 1）。また、興味深いことに、更なる温度上昇により、 $15^\circ\text{C}$  から  $30^\circ\text{C}$  の呼吸調節温度域における  $E_0$  は、測定した全ての個体で負の値を示すことが明らかになった。

## 考察

修正アレニウスモデルを用いると、化学反応全体の活性化エネルギー $E_0$ の温度応答を算出することができる。本研究においては、ザゼンソウの呼吸反応に関わる $E_0$ が、恒温性に重要である呼吸調節範囲において負の値を示すことが明らかとなった(図5)。このように、温度上昇が化学反応速度の減少を引き起こす、即ち活性化エネルギーが負になる現象については、化学分野におけるいくつかの報告がある。例えば、アニオン重合伝播(Shimomura *et al.*, 1967)や多成分反応の一つであるマンニッヒ反応(第一級または第二級アミン、ケトン、およびアルデヒドによる $\beta$ -アミノケトン生成の反応)のうち、トリプトファン骨格を有した二官能性のチオ尿素が触媒する、不斉マンニッヒ反応(Han *et al.*, 2013)が知られている。それとは対照的に、生物システムにおける化学反応については、負の活性化エネルギーに関する報告例はなく、特に、修正アレニウスモデルを用いた解析は、発熱植物以外の種々の植物由来の呼吸反応に対して行われているが、結果として得られた呼吸反応の $E_0$ は全て正の値のみを示している(Kruse & Adams, 2008; Kruse *et al.*, 2008; Kruse *et al.*, 2012; Noguchi *et al.*, 2015)。

ここで重要なことは、このような負の活性化エネルギーの生成する現象については、化学分野において既に理論的な解釈が成されており、前駆平衡反応と呼ばれる複合的な化学反応が関係することが明らかとなっていることである(Maharaj & Winnik, 1981)。即ち、発熱反応および吸熱反応から構成される速い可逆的な反応が不安定な中間体を形成し、その後の律速段階となる中間体を基質とした不可逆的な反応が、中間体の量に基づいて全体の反応速度を決定する(図6)。例えば、 $A + B \rightleftharpoons Y^* \rightarrow C$ として表される前駆平衡反応においては、3つの活性化エネルギーが関与している(図6)。そのうち2つは前駆平衡反応における可逆的な反応のステップであり、 $E_a$ は発熱反応、 $E_a'$ は吸熱反応の活性化エネルギーを示す。残りの一つである $E_a''$ は、不可逆的な反応のステップにおける発熱反応を示す。これらの活性化エネルギーの相対的な大きさに基づき、全体の活性化エネルギー $E_0$ の値が決定される。この場合における $E_0$ を表す数式を以下に示す。

$$E_o = E_a + E_a'' - E_a' \quad \text{数式 17}$$

即ち、 $E_a + E_a'' > E_a'$  の場合においては、 $E_o$  は正の値を示すとともに、温度上昇により  $E_o$  の値が減少すると、化学反応速度は増大する。さらに、 $E_a + E_a'' = E_a'$  ( $E_o = 0$ ) となる温度において最大の反応速度を示す。しかしながら、 $E_a + E_a'' < E_a'$  の場合においては、 $E_o$  は負の値を示し、温度上昇により  $E_o$  の値がさらに減少していくと、化学反応速度は減少する。従って、 $E_o$  が負の値を示す場合においては、温度上昇により可逆的反応ステップを構成する発熱および吸熱反応の実際の化学反応速度が温度上昇により増大した結果、生成される電子の量が減少することにより、呼吸速度が温度上昇により減少することを意味すると考えられる。

以上より、ザゼンソウの肉穂花序において負の活性化エネルギーが観察されるということとは、肉穂花序における呼吸調節が、前駆平衡反応により成立することを示唆している。従って本研究においては、炭水化物 ( $RH_2$ ) を呼吸基質とするザゼンソウにおいて、呼吸反応を前駆平衡反応として表すモデルを作成した (図 7)。即ち、細胞内の各種デヒドロゲナーゼによる可逆的な反応 (速度定数  $k_1, k_1'$ ) と、ミトコンドリア呼吸鎖末端のオキシダーゼ AOX および COX ( $k_2$ ) による不可逆的な化学反応により構成される、前駆平衡反応という生化学的に説明可能な反応を介して、ザゼンソウの恒温性における負の活性化エネルギーが産生される可能性を示した。本モデルにおいては、発熱反応および吸熱反応に関わる個別の活性化エネルギーは、いずれも温度上昇により低下する (図 7)。従って、個別の速度定数  $k_1, k_1', k_2$  の値はいずれも温度上昇により大きくなるため、温度上昇によりそれぞれの化学反応速度は増大すると考えられる。しかしながら、前述したように  $E_o = 0$  となる温度以降は、温度上昇により吸熱反応の影響が大きくなるために、活性化エネルギーは負になり、結果として温度上昇により酸素消費速度は低下すると考えられる。

ここで、測定した全ての個体における  $E_o$  は、最大呼吸速度である  $E_o = 0$  で収束する興味深い特徴を示した (図 5)。それは即ち、 $E_o = 0$  を示す熱力学的に  $E_a + E_a'' = E_a'$  となる温度

は、全ての個体で一定であることを示唆している。一方各個体の  $E_0$  の温度応答は、最大呼吸速度を示す温度以外においては個体差が生じることが明らかになった (図 5)。この差異は、直線の傾きに相当する温度感受性  $\delta$  として表現されるが (表 1)、Plant 1 および Plant 4、ならびに Plant 2 および Plant 3 において温度変化に対し比較的類似した傾きを示した (図 5)。また、呼吸活性と温度の関係性を示す図 4 より、Plant 1 および Plant 4 の方が Plant 2 および Plant 3 よりも測定した温度域において全体的に高い活性を示すことが判明した。このような特徴は、肉穂花序重量と全く相関しないことが示唆されている (表 1)。

以上まとめると、本研究においては、修正アレニウスモデルを用いてザゼンソウの呼吸反応に関する活性化エネルギーの温度応答を明らかにした。その結果、恒温性が行われる呼吸調節範囲において、負の活性化エネルギーが産生されたことから、ザゼンソウ肉穂花序で行われる呼吸調節には前駆平衡反応が密接に関与する可能性が示唆された。即ち、炭水化物を呼吸基質とするザゼンソウにおいては、細胞内における炭水化物の酸化還元反応と、それにより生じた電子を用いた AOX および COX を介した酸素消費反応が、全体として前駆平衡を形成している可能性がある。

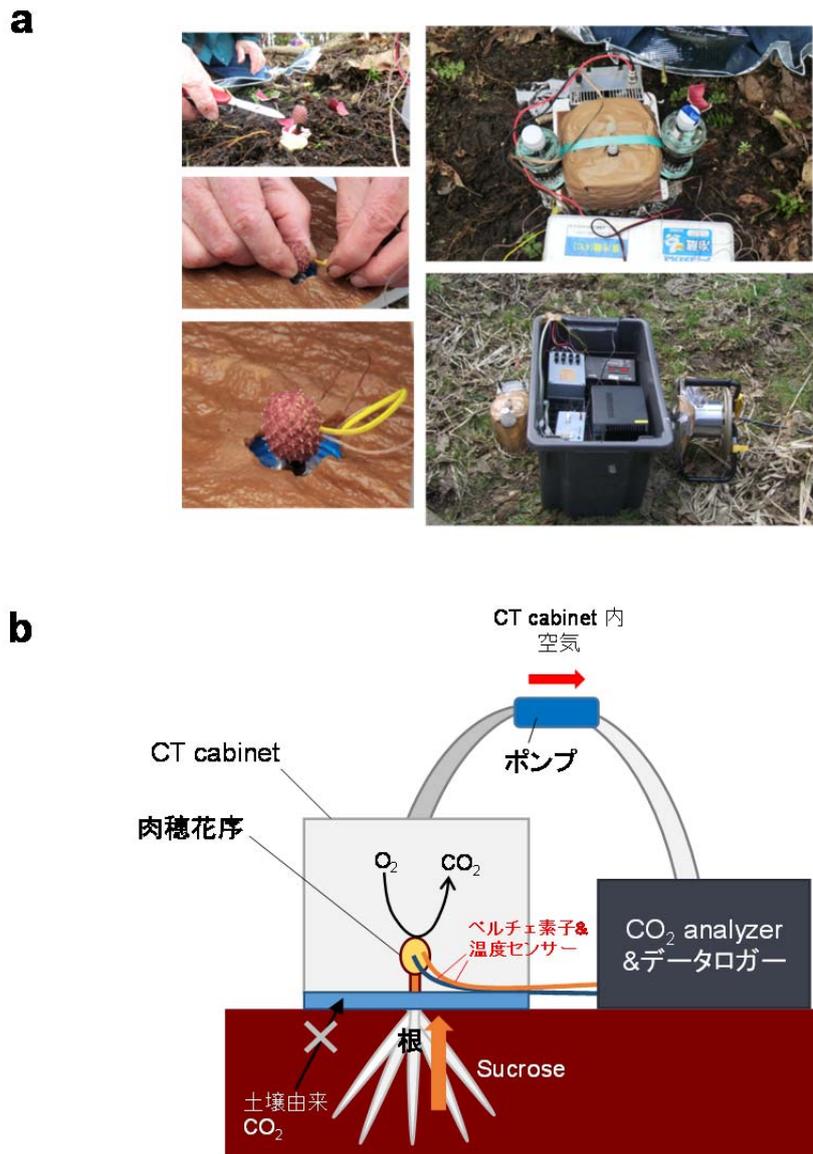


図 1. Thermal clamping 法を用いた肉穂花序由来呼吸測定の概要.

**a.** ザゼンソウ群落地における肉穂花序由来呼吸測定の様子. 対象となるザゼンソウについては、仏炎苞を切り出した後、その周りの土壌をプラスチック製のカバーで覆っている. 肉穂花序には、ペルチェ素子および温度センサーを挿入したのち、上から CT cabinet を被せる. CT cabinet に接続した CO<sub>2</sub> analyzer により肉穂花序由来の CO<sub>2</sub> 産生量はモニターされ、データロガーに記録される. **b.** Thermal clamping 法を用いた肉穂花序由来呼吸測定の様式図. ザゼンソウの呼吸基質であるスクロースは根から供給されるが、群落地で行う本実験系では根からの基質供給を阻害しないため、インタクトな条件での呼吸測定が可能となる.

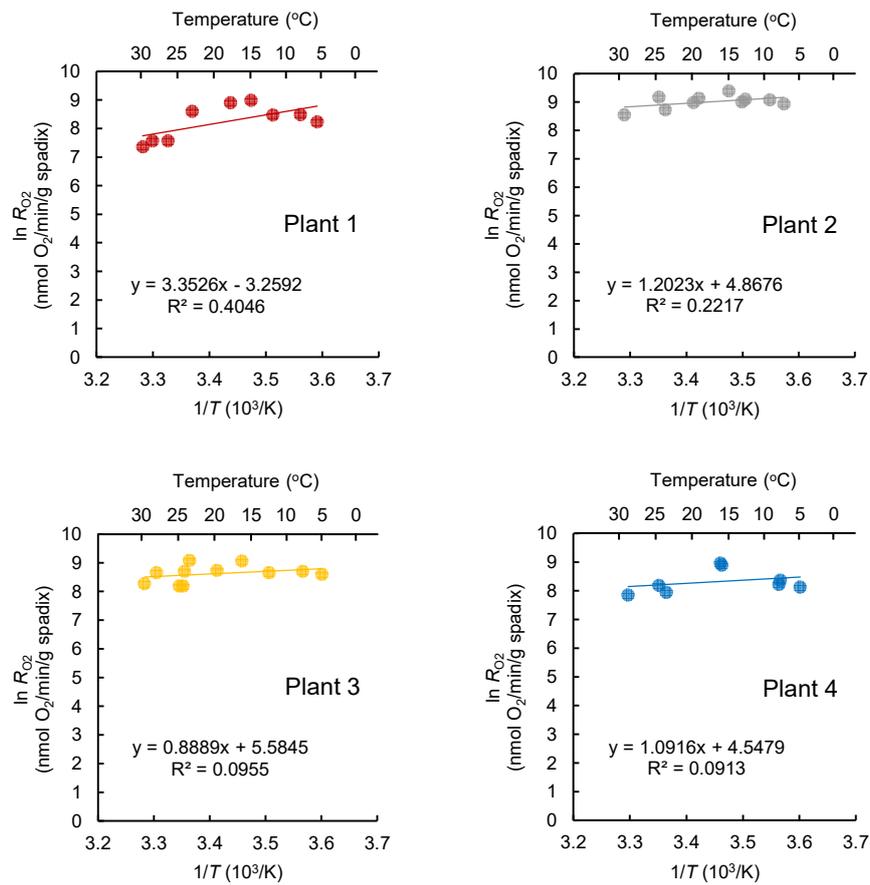


図 2. 古典的アレニウスモデルを用いた個別の肉穂花序由来呼吸の直線回帰分析.  
呼吸データは Seymour *et al.* (2010) を用いた.

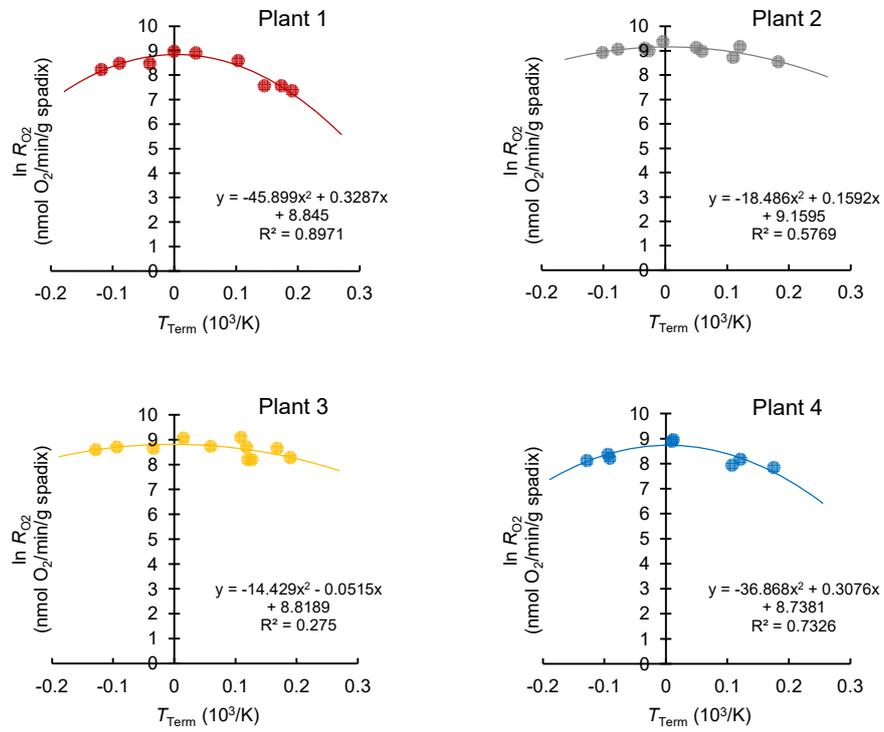


図 3. 修正アレニウスモデルを用いた個別の肉穂花序由来呼吸の直線回帰分析.  
呼吸データは Seymour *et al.* (2010) を用いた.

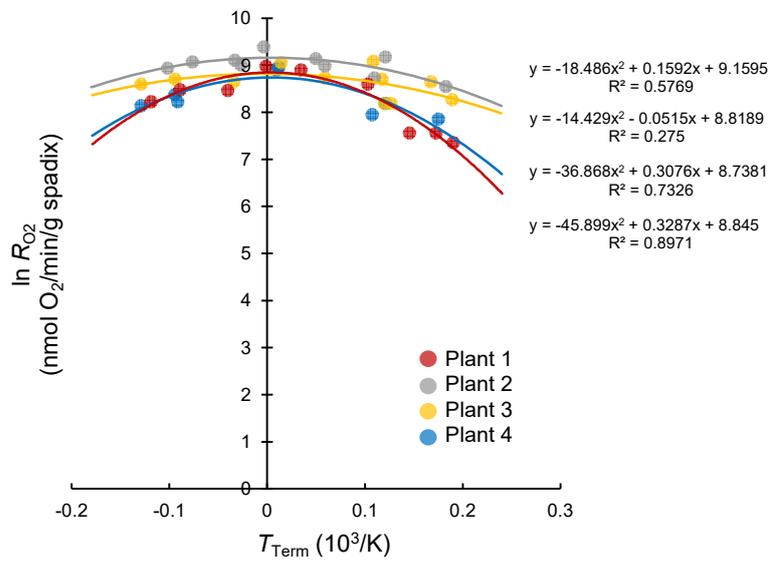


図 4. 修正アレニウスモデルを用いた個別の肉穂花序由来呼吸の直線回帰分析.

図 3 における個別の肉穂花序由来の呼吸データは、統一して示された。

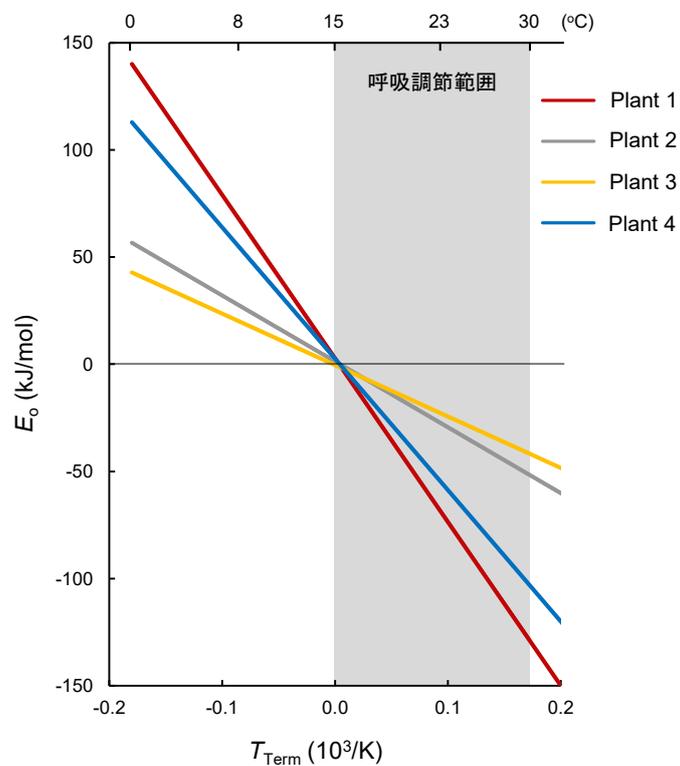


図 5. ザゼンソウの肉穂花序由来呼吸に対する温度の影響.

発熱中の個別の肉穂花序における呼吸の  $E_o$  と温度の関係が示された. 解析は, 基準温度 ( $T_{REF}$ ) を 15°C として行われた.

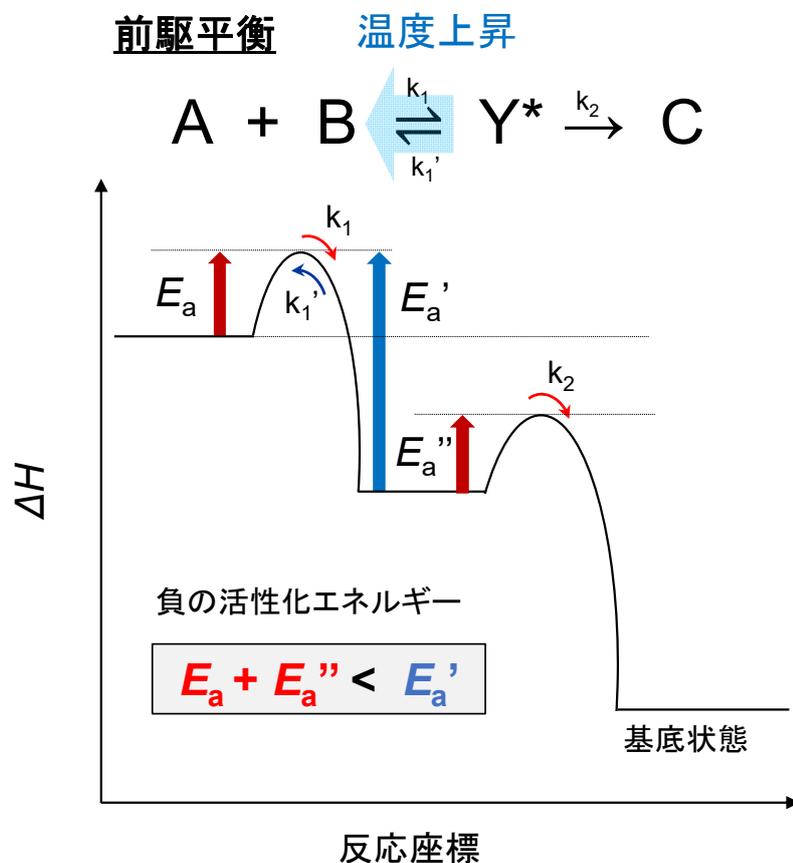


図 6. 前駆平衡反応の概要

前駆平衡とは、先行する可逆的な反応（速度定数  $k_1$ 、および  $k_1'$ ）と、その後続く不可逆的な反応（ $k_2$ ）から構成される化学反応である。前駆平衡においては、 $k_1, k_1' \gg k_2$  より化学平衡が先に形成されるため、生成した中間体  $Y^*$  の濃度に基づき  $C$  は産生される。即ち、 $k_2$  の反応が前駆平衡反応の律速段階となる。このような前駆平衡反応には、 $k_1$ 、および  $k_2$  で表される発熱反応の活性化エネルギー  $E_a$ 、および  $E_a''$ 、ならびに  $k_1'$  で表される吸熱反応の活性化エネルギー  $E_a'$  の、合計 3 つの活性化エネルギーが関与している。負の活性化エネルギーは、発熱反応に関わる活性化エネルギーの和より吸熱反応に関わる活性化エネルギーが大きい場合に生じる。その場合は温度上昇により化学平衡が左にシフトすることで、 $C$  の産生速度は減少する。

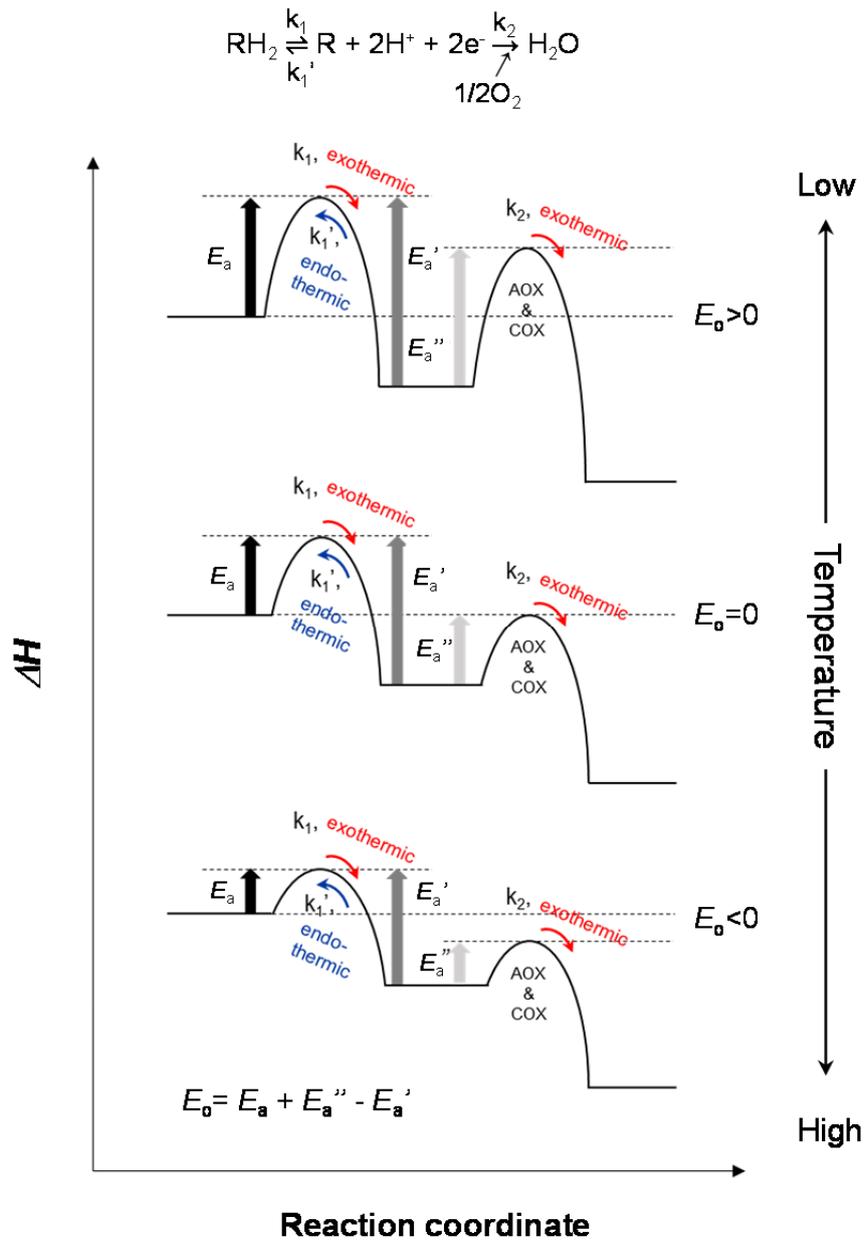


図 7. ザゼンソウの肉穂花序における前駆平衡反応モデル

この前駆平衡モデルは、先行する平衡反応（速度定数  $k_1$  および  $k_1'$ ）とその後のミトコンドリア呼吸鎖末端オキシダーゼ AOX および COX を介した酸素消費ステップ（ $k_2$ ）から構成される。個々の化学反応に関する活性化エネルギーは、 $k_1$  ( $\text{RH}_2 \rightarrow \text{R} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ ) および  $k_2$  ( $1/2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ ) が関わる発熱反応においてそれぞれ  $E_a$  および  $E_a''$ 、 $k_1'$  ( $\text{R} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{RH}_2$ ) が関わる吸熱反応において  $E_a'$  として表すことができる。

表 1. 修正アレニウスモデルに基づく肉穂花序由来呼吸の呼吸パラメータ.

	$\ln R_{\text{REF}}$ (15°C, 288K) (nmol O <sub>2</sub> /min/g spadix)	$E_o$ (15°C, 288K) (kJ/mol)	$\delta$ (15°C, 288K) (10 <sup>3</sup> K <sup>2</sup> )	$E_o=0$ となる 温度 (°C)	肉穂花序 重量(g)
Plant 1	8.84	2.73	-45.90	15.3	3.35
Plant 2	9.16	1.32	-18.49	15.4	1.81
Plant 3	8.82	-0.43	-14.43	14.9	3.21
Plant 4	8.74	2.56	-36.87	15.4	4.34
Mean ± SD	8.89±0.18	1.55±1.46	-28.92±14.95	15.2±0.20	3.18±1.04

$T_{\text{REF}}$  を 15°C とした場合の,  $\ln R_{\text{REF}}$  (基準温度における呼吸速度),  $E_o$  (全体の活性化エネルギー), および  $\delta$  (温度感受性) はそれぞれ修正アレニウスモデルから算出された.  $E_o=0$  となる温度 および肉穂花序重量を同様に示す.

## 第2節 発熱植物および非発熱植物由来呼吸の温度応答の解析

### 要旨

本章第1節におけるザゼンソウの肉穂花序由来の呼吸解析から、本植物の恒温性に関わる呼吸調節メカニズムが、負の活性化エネルギーに支配される化学平衡に基づいて行われることが示唆された。ザゼンソウで観察された負の活性化エネルギーの普遍性を検討するため、本節では、ザゼンソウ以外の恒温性を有する発熱植物および非発熱植物を対象に、呼吸代謝に関わる活性化エネルギーの数理計算に基づく制御メカニズムの解析を行った。その結果、恒温性を示す発熱植物において特異的に負の活性化エネルギーが観察された。従って、植物の恒温性メカニズムにおいては、前駆平衡と呼ばれる特異的な化学平衡に基づく呼吸調節が、基本原理として関与している可能性が示された。

### 背景

ある種の種子植物は開花期特異的な呼吸速度の増大により、その花器官において熱産生が行われる。そのような発熱植物のうちいくつかは、外気温変動を感知して呼吸速度を調節することで、恒温性を示すことが知られてきた。ここで、本章第1節により、恒温性を示す発熱植物の一つであるザゼンソウにおいては、前駆平衡と呼ばれる、発熱反応と吸熱反応からなる特殊な化学平衡が、本植物の呼吸調節に密接に関連することが示唆された。このような前駆平衡は、呼吸基質である炭水化物の酸化還元反応として表すことが可能である。そのため、前駆平衡を構成する呼吸代謝に関わる因子群は、基本的には生物間で保

存されている。従って、ザゼンソウ以外の植物種においても、ザゼンソウと同様の呼吸調節メカニズムが機能している可能性がある。

ザゼンソウ以外に恒温性を示す植物種としてハス (*N. nucifera*)、ドラゴンリリー (*D. vulgaris*) が挙げられる (Seymour & Schultze-Motel, 1996; Seymour, 1998; Seymour & Schultze-Motel, 1999)。これらの植物は、初夏に開花し、その際それぞれ花托、および雄性肉穂花序と呼ばれる花に相当する器官が数日間発熱する (図 1)。図 1 に示すように、日光が遮られ、外気温が低下する夜においても、発熱器官温度はほぼ一定の値に維持されていることがわかる。このような恒温性を示すハス、およびドラゴンリリーにおいては、ザゼンソウと同様の温度応答性呼吸調節メカニズムの存在が明らかとなっている (Seymour *et al.*, 2010)。即ち、発熱器官温度が低下すると呼吸速度を増大させ、逆に温度上昇により呼吸速度を減少させることで、発熱器官温度と逆相関する呼吸調節に基づいて体温をほぼ一定に調節できる (図 2)。これら植物は、寒冷環境にて約 1 週間程度発熱するザゼンソウを含めて、それぞれ最大呼吸速度を示す **Switching temperature** や、恒温性が観察される呼吸調節範囲が異なるが、その要因としては、開花時期および生育環境温度、熱産生量 (単位重量あたりの呼吸速度) が異なることに起因する維持される体温、発熱期間の長さ、また発熱器官の構造的な差異などを含めた複雑な形質が影響すると考えられる。しかしながら、異なる発熱の特徴を有するにも関わらず、いずれの植物も温度に応じた呼吸調節メカニズムを有していることは、このような恒温性が同様のメカニズムに主導された形質である可能性がある。

従って、本研究においては、ザゼンソウにおいて明らかとなった温度応答性呼吸調節メカニズムが、他の恒温性を示す発熱植物種においても適用されるかを明らかにするため、ハスおよびドラゴンリリー由来の呼吸データに対して修正アレニウスモデルを用いた解析を行った。さらに、対照区として恒温性を示さない非発熱植物についても同様の解析を行い、その結果と比較することで、恒温性に関わる呼吸調節メカニズムについて考察した。

## 実験材料と方法

### 植物材料

2008年の1月から2月にかけて、オーストラリア、アデレードの植物園の池に自生していた発熱中のハスが、呼吸解析に用いられた (Seymour *et al.*, 2010)。ハスの発熱器官である花托は、花弁と雄蕊に囲まれており、複数の子房が中に含まれる構造を有している。また、2008年の5月8日から5月21日にかけて、ギリシャのクレタ島の北海岸に位置するパノルモにおいて自生するドラゴンリリーが、同様に解析に用いられた。ドラゴンリリーの花序は、発熱器官である雄性肉穂花序、ならびに熱産生が観察されない雌性肉穂花序および Appendix (付属体) から構成され、高さ 20–80 cm にも成る大きな構造を示す。

### 組織由来呼吸の活性測定

呼吸速度の測定は、第3章1節で述べた、Thermal clamping 法という Seymour らが開発した方法で行った (Seymour *et al.*, 2010)。ドラゴンリリーおよびハスにおいては、その構造や生育環境の特徴から、第1章に述べたザゼンソウに適用された方法を一部改変し、呼吸活性測定が行われた。ハスの花は水上に位置することから、CT cabinet は池の底に挿した杭に吊り下げ、設置された。花托に取りつけたペルチェ素子、および花の上から被せた CT cabinet 内の空気を通すチューブは、岸に設置した CO<sub>2</sub> analyzer およびデータロガーを含む機器類に接続された。ハスにおいては、温度変化に対する応答が数時間かかることから (Seymour, 1998)、花托温度は少なくとも4時間の間隔で固定させた。

ドラゴンリリーについては、全花序は CT cabinet に収めることが不可能であったことから、恒温性を示す雄性肉穂花序のみで観察した。薄い水の層に肉穂花序を切つてすぐに置くと、数時間発熱が観察されることから、水を入れた小さな容器内に肉穂花序を入れた後、CT cabinet 内に設置し、主に熱産生が観察され始める約 13:00 から 03:00 の間に約2時間間隔で雄性肉穂花序の温度を固定した。

以上の方法で既に得られているハスおよびドラゴンリリー由来の呼吸データを本研究では引用し、呼吸活性の温度応答性解析に用いた (Seymour *et al.*, 2010).

修正アレニウスモデルを用いた呼吸活性の解析

第2章および第3章にて前述した修正アレニウスモデルを、同様に本解析に用いた。

Q<sub>10</sub> モデルを用いた呼吸速度の解析

Q<sub>10</sub> モデルは、10°C の温度上昇に応じた化学反応の変化の割合を表す指標である。Q<sub>10</sub> と呼吸速度  $R$  は、第2章で示したように、以下の数式として表すことができる (Tjoelker *et al.*, 2008; Ow *et al.*, 2010)。

$$R = R_{\text{REF}} \times Q_{10}^{\left[\frac{T-T_{\text{REF}}}{10}\right]} \quad \text{数式 6}$$

$T$ : 温度 (K または °C),  $T_{\text{REF}}$ : 基準となる温度 (K または °C),  $R_{\text{REF}}$ : 基準温度における呼吸速度。

本研究においては、エンドウ、およびコムギ由来の呼吸反応に関する、種々の温度域における Q<sub>10</sub> データ (Tjoelker *et al.*, 2001) から、本数式を用いて呼吸速度  $R$  を算出した。その際、0°C における呼吸速度  $\ln R$  を 1 とした。

結果

恒温性を有する発熱植物であるハス、およびドラゴンリリーにおいても、ザゼンソウにおいて示された呼吸調節メカニズムが適用できるかを明らかにするため、種々の温度におけるそれぞれの発熱器官由来の呼吸データに対して、修正アレニウスモデルを適用した解析を行った。まず、ハス7個体それぞれの呼吸データに対し修正アレニウスモデルを適用した結果、種々の呼吸パラメータが得られた (表1)。パラメータ算出には、基準温度  $T_{\text{REF}}$

はハスの Switching temperature である 30 °C に設定した。従って、得られた 7 個体のハスの  $\ln R_{\text{REF}}$  (基準温度  $T_{\text{REF}}$  における呼吸速度) は  $7.54 \pm 0.21$  (nmol O<sub>2</sub>/ min/ g receptacle), 30 °C における  $E_0$  は  $-26.12 \pm 35.40$  (kJ/mol),  $\delta$  (温度感受性) は  $-153.99 \pm 105.35$  (10<sup>3</sup> K<sup>2</sup>) であった。特に  $\delta$  は負の値を示すことから、いずれの個体においても温度上昇により呼吸反応の活性化エネルギー  $E_0$  は減少し、最大呼吸速度を示す  $E_0 = 0$  となる温度  $28.5 \pm 1.8$  °C 以降で負の値を示すことが示唆された。

さらに、ドラゴンリリー 5 個体それぞれの呼吸データに対しても修正アレニウスモデルを適用した結果、同様に呼吸パラメータが得られた (表 2)。基準温度  $T_{\text{REF}}$  はドラゴンリリーの Switching temperature である 20 °C に設定した。得られた 5 個体のドラゴンリリーの  $\ln R_{\text{REF}}$  (基準温度  $T_{\text{REF}}$  における呼吸速度) は  $8.15 \pm 0.26$  (nmol O<sub>2</sub>/ min/ g receptacle), 20 °C における  $E_0$  は  $-40.25 \pm 10.04$  (kJ/mol),  $\delta$  (温度感受性) は  $-30.99 \pm 7.90$  (10<sup>3</sup> K<sup>2</sup>) であった。また、最大呼吸速度を示す  $E_0 = 0$  となる温度は、 $26.9 \pm 0.8$  °C であることが判明した。ハスと同様に  $\delta$  は負の値を示すことから、いずれの個体においても温度上昇により呼吸反応の活性化エネルギー  $E_0$  は減少し、最大呼吸速度を示す  $E_0 = 0$  となる温度  $28.5 \pm 1.83$  °C 以降で負の値を示すことが示唆された。

次に、非発熱植物であるエンドウおよびコムギ由来の呼吸に関しても、同様に温度と呼吸速度の関係を修正アレニウスモデルにより解析した。解析には、Tjoelker らが多様な植生の植物種に対して解析した  $Q_{10}$  データを引用し、恒温性発熱植物と同様に温帯に生息するエンドウ、およびコムギの  $Q_{10}$  値を解析に用いた (Tjoelker *et al.*, 2001)。 $Q_{10}$  とは、温度が 10 °C 上昇した際の化学反応速度の増加率を表す指標である。従来呼吸速度と温度間の関係性を表す数式として  $Q_{10}$  モデルは用いられてきたが、モデルの数学的な性質から、 $Q_{10}$  値は解析に用いる温度域において変動することが示されていた (Tjoelker *et al.*, 2001; Atkin & Tjoelker, 2003; David *et al.*, 2003)。即ち、呼吸反応においては温度の上昇により  $Q_{10}$  値の減少が見られ、即ちそれは、温度上昇による呼吸活性の増加率は、温度上昇により減少し、呼吸活性

は温度との二次関数的に推移することを意味している。ここで、Tjoelker らの解析の結果、エンドウおよびコムギの  $Q_{10}$  においても、温度上昇により  $Q_{10}$  値は同様に減少することが判明した (図 3)。従って、図に示されるこれらの各温度域における種々の  $Q_{10}$  データから、 $Q_{10}$  モデルを用いて、相対的な呼吸速度を算出した (表 3)。得られたそれぞれの植物体の種々の温度における呼吸データを用いて、修正アレニウスモデルによる解析を行い、種々の呼吸パラメータを算出した (表 4)。まず、基準温度  $T_{REF}$  を  $15^{\circ}\text{C}$  に設定した結果、得られたエンドウおよびコムギの  $15^{\circ}\text{C}$  における  $E_0$  は、それぞれ  $57.38$  (kJ/mol)、および  $49.93$  (kJ/mol) であった。また  $\delta$  (温度感受性) は、それぞれ  $-7.60$  ( $10^3 \text{ K}^2$ )、 $-9.99$  ( $10^3 \text{ K}^2$ ) であった。また、最大呼吸速度を示す  $E_0=0$  となる温度は、それぞれ  $58.3^{\circ}\text{C}$ 、 $42.2^{\circ}\text{C}$  であることが判明した。エンドウおよびコムギにおいても  $\delta$  は負の値を示すことから、いずれの個体においても温度上昇により呼吸反応の活性化エネルギー  $E_0$  は減少することが判明した。しかしながら、最大呼吸速度を示す  $E_0=0$  となる温度はそれぞれ  $58.3^{\circ}\text{C}$ 、 $42.2^{\circ}\text{C}$  であることから、温帯域に生息する両植物においては、負の活性化エネルギーを示さないと考えられる。

## 考察

本研究により、ザゼンソウ以外の種々の植物における呼吸の温度応答が明らかとなった。まず、恒温性を示す発熱植物であるハス、およびドラゴンリリー、ならびに非発熱植物種であるコムギ、エンドウにおいては、いずれの個体も  $\delta$  は負の値を示すことが明らかとなった (表 5)。ここで、解析した全ての植物種は、ザゼンソウと同様に温度上昇により呼吸反応の活性化エネルギー  $E_0$  も減少することが示唆された。

今回解析した種々の植物種以外にも、非発熱植物における呼吸反応に対して、修正アレニウスモデルを適用した事例が存在する。例えば、木本植物であるユーカリ (*Eucalyptus*) に属する 12 の植物種 (Kruse *et al.*, 2012)、マツ (*Pinus*) (Kruse & Adams, 2008)、または草

本植物であるキュウリ (*Cucumis sativus*), タバコ (*Nicotiana tabacum*), イネ (*Oryza sativa*), トマト (*Solanum lycopersicum*), ポテト (*Solanum tuberosum*), ソラマメ (*Vicia faba*) を含む 11 種の作物種 (Noguchi *et al.*, 2015) を用いた研究においては, 同一または近縁種における植物において, 生育温度や生育ステージ, 施肥量の差異による, それらの種々の修正アレニウスモデルに基づく呼吸パラメータ (ある温度における呼吸反応の活性化エネルギー  $E_0$  や, 呼吸速度, または温度感受性  $\delta$  など) の差異に関する比較がなされている. これら様々なサンプル群を用いた解析の結果, ほぼ全ての植物サンプルで,  $\delta$  が負の値を示した (Kruse & Adams, 2008; Kruse *et al.*, 2012; Noguchi *et al.*, 2015). このような結果は, 植物の呼吸反応には, 動的な活性化エネルギーの変動が関与すること, ならびに呼吸反応の活性化エネルギーが温度上昇により減少する現象は, 植物において普遍的であることを示唆している. これまで, このような動的な活性化エネルギーの変動は, 生物学的触媒である酵素の温度依存性に起因すると考えられており, 特に酵素の変性による失活が影響すると考えられてきた.

ここで, 温度感受性  $\delta$  の値が負であることは植物種間で共通する一方, 得られた恒温性発熱植物種であるザゼンソウ, ハス, ドラゴンリリーと非発熱植物種との差異は, 負の活性化エネルギー産生の有無にあることが判明した (表 5). 即ち, 恒温性を示す植物は, 生理的に取りうる環境温度域内において,  $E_0 = 0$  となる最大呼吸速度を示す温度を有するとともに, その温度以降は温度上昇により呼吸速度が減少する. 本研究において, 同様に修正アレニウスモデルをエンドウおよびコムギの呼吸温度応答に適用した場合や, 前述したその他非発熱植物種においても, それらの生育環境温度域において負の活性化エネルギーが生じることはないことが判明した (表 5 & Kruse & Adams, 2008; Kruse *et al.*, 2012; Noguchi *et al.*, 2015). 先行研究で示されているように, 恒温性をもつ植物のこのような呼吸と温度の逆相関は可逆的であり, 酵素の失活ではない. 従って, 今回ハスおよびドラゴンリリーで示された負の活性化エネルギーは, これらの植物における, ザゼンソウと同様の前駆平衡

に基づく呼吸調節メカニズムの存在を示唆するものである。以上より、植物の前駆平衡に基づく呼吸調節メカニズムは、恒温性を示す植物に特異的であると考えられる。

今回得られたハス、およびドラゴンリリーに関する種々の呼吸パラメータに関して興味深い点は、 $E_0=0$ となる温度の個体間における誤差の小ささである（表 1 & 2）。ハスにおいては  $28.5 \pm 1.8^\circ\text{C}$  ( $n=7$ )、ドラゴンリリーにおいては  $26.9 \pm 0.8^\circ\text{C}$  ( $n=5$ ) という精度で一致している。従って、両植物においてもザゼンソウと同様に、 $E_0=0$ となる温度において  $E_0$ が収束する可能性がある。また、両植物においては、温度感受性  $\delta$ に個体差が観察された。その場合に、 $\delta$  値の個体差および値の大きさが、ドラゴンリリーと比較してハスで大きく、またハス特異的に  $\delta$ と花托重量が負の相関（花托重量が大きくなると、 $\delta$ の値が小さくなり、従って温度変化による  $E_0$ の変動量が大きくなる）を有する傾向がみられた（表 1 & 2）。これらに関連する要因として、ハスの発熱器官である花托の重量が、ドラゴンリリーの雄性肉穂花序よりも約 6 倍程度大きく、発熱器官温度を  $1^\circ\text{C}$  上昇させるための熱容量が大きい点が考えられる。即ち、ハスにおいては、熱容量が大きく体温の維持に有利であるが、体温変動が生じた場合は、高い温度感受性により、発熱器官温度の変動に対し迅速に対応し、体温調節を行っている可能性がある。

また、これまで報告されている発熱植物の最大呼吸速度を示す **Switching temperature** は、ハスにおいて  $30^\circ\text{C}$ 、ドラゴンリリーにおいて  $20^\circ\text{C}$  である（図 2 & Seymour *et al.*, 2010）。この Seymour らが定義した **Switching temperature** は、 $5^\circ\text{C}$  刻みの呼吸速度の測定点の平均値が最大の値を示す温度として得られているが、本解析の結果、ハスでは約  $29^\circ\text{C}$ 、ドラゴンリリーでは約  $27^\circ\text{C}$  が **Switching temperature** である可能性が新たに示された（表 1 & 2）。以上のことから、ハスおよびドラゴンリリーにおいては、このような最大呼吸速度を示す温度と、発熱器官温度のセットポイントが類似の値を示す特徴がある（図 1, 表 1 & 2）。即ち、ハスは約 2-3 日程度の恒温性を示し、その際、花托温度は  $30-36^\circ\text{C}$  に維持される（Seymour & Schultze-Motel, 1996; Seymour & Schultze-Motel, 1999）。ドラゴンリリーにおい

ては、約1日程度の恒温性を示し、図1bより25–30°Cに維持されることがわかる。それに対して、ザゼンソウは、最大呼吸速度を示す15°Cと、維持される23°Cの肉穂花序温度に差異がある (Seymour *et al.*, 2010)。このような植物間の呼吸調節温度域の差異は、寒冷環境で発熱するザゼンソウと、初夏に発熱するハス、およびドラゴンリリーとの、恒温性に関わる実際に用いられる呼吸代謝経路の詳細な違いが影響していると考えられる。即ち、植物の恒温性呼吸調節メカニズムには、前駆平衡が生化学基盤として重要な役割を果たすことが示唆されるけれども、前駆平衡を構成する具体的な酵素（化学）反応や、その温度特性に関しては、植物間で異なることを示唆している。また、ハスおよびドラゴンリリーにおいては、恒温性に関わる呼吸調節範囲が狭いことから、その発熱の生理的意義は、ザゼンソウのような生殖反応に温度が密接に関連したものでなく (Seymour *et al.*, 2009)、訪花昆虫による受粉効率を高めるものであると考えられる。

以上本研究により、ハス、ドラゴンリリーという恒温性を示す発熱植物においても、ザゼンソウと同様の、前駆平衡と呼ばれる特異的な化学平衡に基づく呼吸調節が行われている可能性が示された。また、このような前駆平衡に基づく呼吸調節は、恒温性を示す植物において特異的なメカニズムであることが示唆された。

## 引用文献

Atkin, O. K. and Tjoelker, M. G. (2003) Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends Plant Sci.* **8**: 343-351.

- Chaffee, R. and Roberts, J. (1971) Temperature acclimation in birds and mammals. *Annu. Rev. Physiol.* **33**: 155-202.
- David, J. S. M., Susan, A. K. and David, A. (2003) Using  $Q_{10}$ : Can growth rates increase linearly with temperature? *Aquat. Microb. Ecol.* **32**: 307-313.
- Kruse, J. and Adams, M. A. (2008) Three parameters comprehensively describe the temperature response of respiratory oxygen reduction. *Plant Cell Environ.* **31**: 954-967.
- Kruse, J., Turnbull, T. L. and Adams, M. A. (2012) Disentangling respiratory acclimation and adaptation to growth temperature by *eucalyptus*. *New Phytol.* **195**: 149-163.
- Noguchi, K., Yamori, W., Hikosaka, K. and Terashima, I. (2015) Homeostasis of the temperature sensitivity of respiration over a range of growth temperatures indicated by a modified Arrhenius model. *New Phytol.* **207**: 34-42.
- Ow, L. F., Whitehead, D., Walcroft, A. S. and Turnbull, M. H. (2010) Seasonal variation in foliar carbon exchange in *Pinus radiata* and *Populus deltoides*: respiration acclimates fully to changes in temperature but photosynthesis does not. *Glob. Chang. Biol.* **16**: 288-302.
- Seymour, R. S., Lindshau, G. and Ito, K. (2010) Thermal clamping of temperature-regulating flowers reveals the precision and limits of the biochemical regulatory mechanism. *Planta* **231**: 1291-1300.
- Seymour, R. S., Ito, Y., Onda, Y. and Ito, K. (2009) Effects of floral thermogenesis on pollen function in Asian skunk cabbage *Symplocarpus renifolius*. *Biol. Lett.* **5**: 568-570.
- Seymour, R. S. and Schultze-Motel, P. (1996) Thermoregulating lotus flowers. *Nature* **383**: 305.
- Seymour, R. S. and Schultze-Motel, P. (1999) Respiration, temperature regulation and energetics of thermogenic inflorescences of the dragon lily *Dracunculus vulgaris* (Araceae). *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **266**: 1975-1975.
- Seymour, R. S., Schultze-Motel, P. (1998) Physiological temperature regulation by flowers of the sacred lotus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **353**: 935-943.

Tjoelker, M. G., Oleksyn, J. and Reich, P. B. (2001) Modelling respiration of vegetation: evidence for a general temperature-dependent  $Q_{10}$ . *Glob. Chang. Biol.* **7**: 223-230.

Tjoelker, M. G., Oleksyn, J., Reich, P. B. and Żytkowiak, R. (2008) Coupling of respiration, nitrogen, and sugars underlies convergent temperature acclimation in *Pinus banksiana* across wide-ranging sites and populations. *Glob. Chang. Biol.* **14**: 782-797.

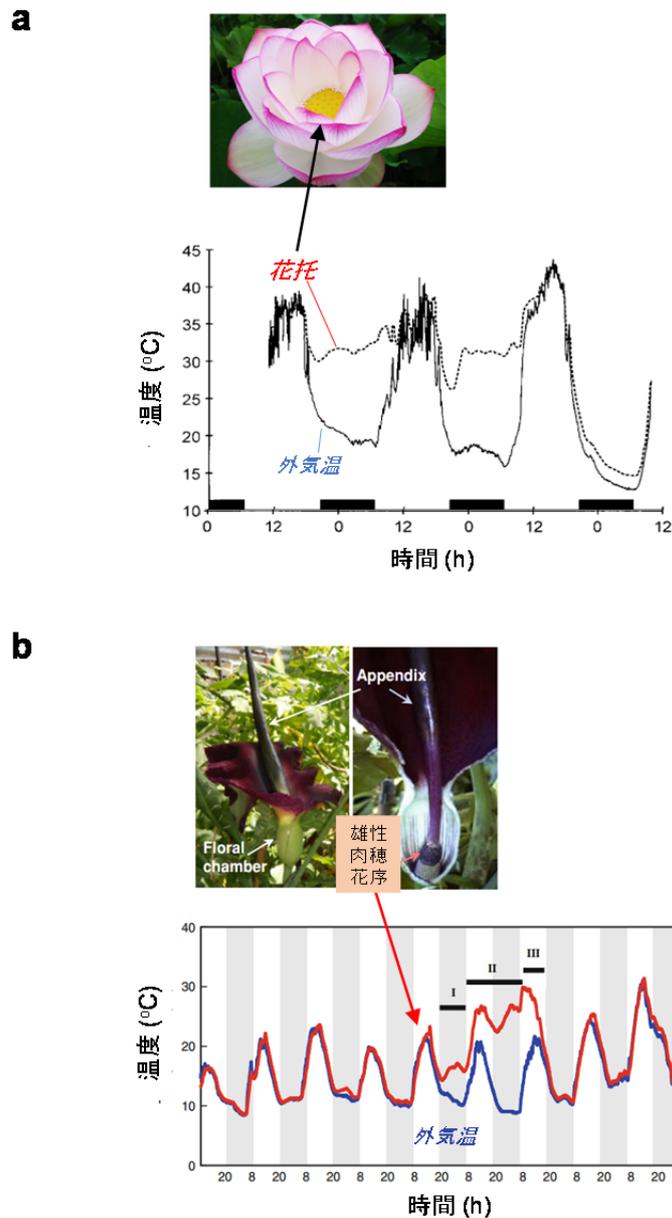


図 1. ハスおよびドラゴンリリーにおける恒温性.

**a.** ハスの熱産生. 花托において, 開花後数日間の熱産生が観察される. その温度は 30–36 °C に維持される. 温度の時系列データは, Seymour & Schultze-Motel (1998) から図を一部改変して引用した. **b.** ドラゴンリリーの熱産生. 雄性肉穂花序と呼ばれる器官において, 数日間の熱産生が観察される. 図中の発熱ステージ II (約 24 時間) の段階において, 恒温性が観察される. ドラゴンリリーの写真および温度の時系列データは, Ito *et al.* (2013) から図を一部改変して引用した.

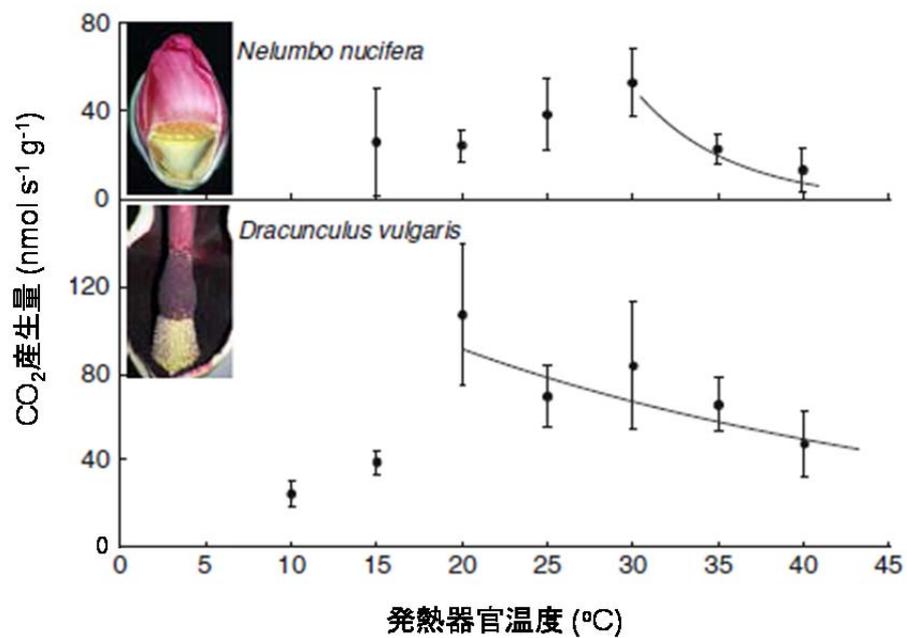


図 2. ハスおよびドラゴンリリーの恒温性に関わる呼吸調節メカニズム。

Seymour *et al.* (2010) より図を一部改変して引用した。ハスおよびドラゴンリリーにおいては、それぞれ 30°C, 20°C を Switching temperature とした、発熱器官温度と逆相関を示す呼吸調節により体温調節が行われる。

表 1. 修正アレニウスモデルに基づくハスの花托由来呼吸パラメータ.

	$\ln R_{\text{REF}}$ (30°C, 303K) (nmol O <sub>2</sub> /min/g receptacle)	$E_0$ (30°C, 303K) (kJ/mol)	$\delta$ (30°C, 303K) (10 <sup>3</sup> K <sup>2</sup> )	$E_0=0$ となる 温度 (°C)	花托 重量(g)
Plant 1	7.24	-76.62	-177.77	27.6	30.01
Plant 2	7.79	-0.09	-367.56	30.0	25.68
Plant 3	7.36	-7.16	-134.75	29.7	26.50
Plant 4	7.42	18.27	-176.62	30.6	19.90
Plant 5	7.51	-48.41	-69.65	26.2	12.57
Plant 6	7.63	-8.64	-65.96	29.3	11.67
Plant 7	7.79	-60.16	-85.64	26.2	15.04
Mean ± SD	7.54±0.21	-26.12±35.40	-153.99±105.35	28.5±1.83	20.20±7.34

$T_{\text{REF}}$  を 30 °C とした場合の,  $\ln R_{\text{REF}}$  (基準温度における呼吸速度),  $E_0$  (全体の活性化エネルギー), および  $\delta$  (温度感受性).  $E_0=0$  となる温度, および花托重量を同様に示した.

表 2. 修正アレニウスモデルに基づくドラゴンリリーの雄性肉穂花序由来呼吸パラメータ.

	$\ln R_{\text{REF}} (20^{\circ}\text{C}, 283\text{K})$ (nmol O <sub>2</sub> /min/g spadix)	$E_0 (20^{\circ}\text{C}, 283\text{K})$ (kJ/mol)	$\delta (20^{\circ}\text{C}, 283\text{K})$ (10 <sup>3</sup> K <sup>2</sup> )	$E_0=0$ となる 温度 (°C)	雄性肉穂花序 重量(g)
Plant 1	7.78	27.80	-25.44	25.8	1.97
Plant 2	8.47	39.32	-27.23	27.8	2.86
Plant 3	8.03	35.51	-24.15	27.6	4.36
Plant 4	8.14	54.82	-42.80	26.5	4.36
Plant 5	8.32	43.79	-35.34	26.8	3.12
Mean ± SD	8.15±0.26	40.25±10.04	-30.99±7.90	26.9±0.8	3.33±1.03

$T_{\text{REF}}$  を 20 °C とした場合の,  $\ln R_{\text{REF}}$  (基準温度における呼吸速度),  $E_0$  (全体の活性化エネルギー), および  $\delta$  (温度感受性).  $E_0=0$  となる温度 および雄性肉穂花序重量を同様に示した.

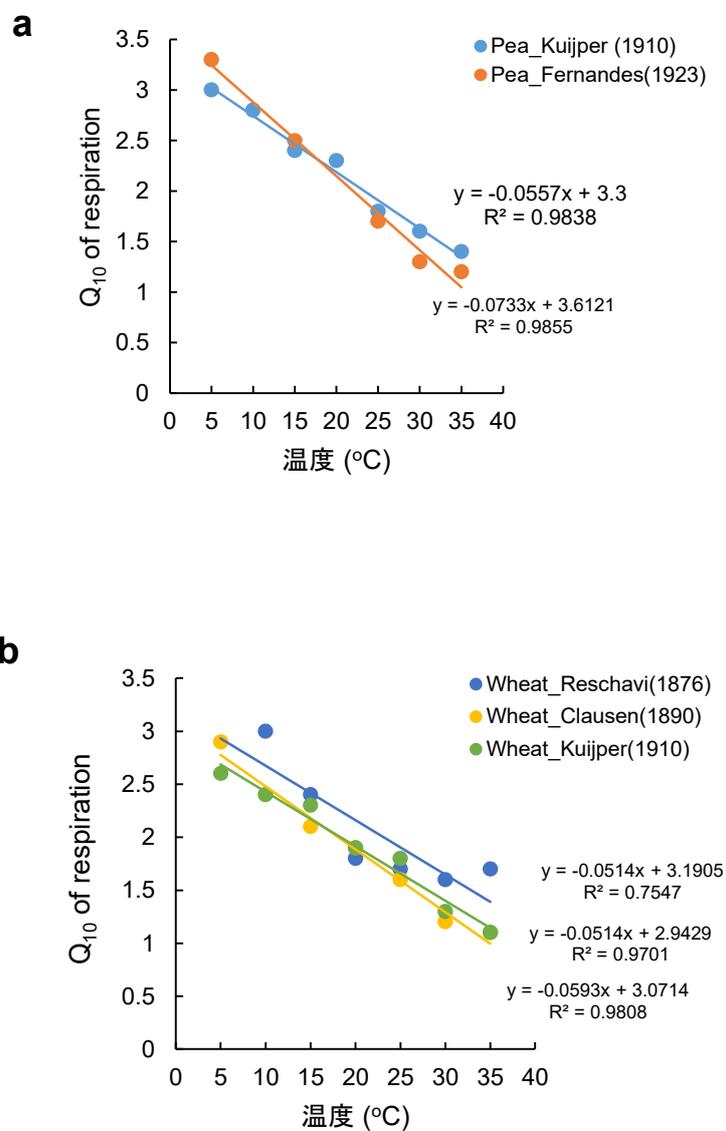


図 3. エンドウおよびコムギ由来の呼吸の温度依存性を示す  $Q_{10}$  値

a. エンドウにおける呼吸反応の  $Q_{10}$  値. Kuijper, 1910 および Fernandes, 1923 による呼吸データを基に, Tjoelker *et al.* (2001) において算出された  $Q_{10}$  を引用し, その温度との関係性を示した. b. コムギにおける呼吸反応の  $Q_{10}$  値. Reschavi, 1876, Clausen, 1890 および Kuijper, 1910 による呼吸データを基に, Tjoelker *et al.* (2001)において算出された  $Q_{10}$  を用いて, 温度との関係性を示した.

表 3. エンドウおよびコムギ由来  $Q_{10}$  から算出した種の温度域における呼吸活性

		$T-T_{ref}$ (0-10°C)	$T-T_{ref}$ (10-20°C)	$T-T_{ref}$ (20-30°C)	$T-T_{ref}$ (30-40°C)
エンドウ	$Q_{10}$	3.0	2.4	1.8	1.4
	$\ln R$	2.10	2.97	3.56	3.90
コムギ	$Q_{10}$	2.9	2.1	1.6	1.1
	$\ln R$	2.06	2.81	3.28	3.37

図 3 に示したエンドウ (Kuijper, 1910), およびコムギ (Clausen, 1890) における呼吸反応の  $Q_{10}$  を基に, 温度  $T$  および基準温度  $T_{REF}$  間の中間温度における呼吸速度  $R$  を,  $Q_{10}$  と  $\ln R$  の関係式 (Tjoelker *et al.*, 2008; Ow *et al.*, 2010) により算出した. この時, 0°C における呼吸速度  $\ln R$  を 1 とした. 従って, 0°C から 10°C の温度域における  $Q_{10}$  が 3.0 の場合, その中間温度 5°C における呼吸速度は 2.10 となる.

表 4. 修正アレニウスモデルに基づくエンドウおよびコムギの組織由来呼吸パラメータ.

	$E_0$ (15°C, 278K) (kJ/mol)	$\delta$ (20°C, 278K) ( $10^3 \text{ K}^2$ )	$E_0=0$ となる 温度 (°C)
エンドウ	57.38	-7.60	58.3
コムギ	49.93	-9.99	42.2

$T_{\text{REF}}$  を 15 °C とした場合の  $E_0$  (全体の活性化エネルギー), および  $\delta$  (温度感受性).  $E_0=0$  となる温度を同様に示した.

表 5. 恒温性発熱植物および非発熱植物における組織由来呼吸の呼吸調節メカニズムの差異

		温度感受性 $\delta$	負の活性化エネルギーの有無	前駆平衡
恒温性 発熱植物	ザゼンソウ	負	○	成立
	ハス	負	○	成立
	ドラゴンリリー	負	○	成立
非発熱植物	エンドウ	負	×	不成立
	コムギ	負	×	不成立

表 1 および 2, 4 において得られた種々の植物における呼吸反応に関わる  $E_0$  の温度応答性解析のサマリー.

## 第4章

ザゼンソウ由来単離ミトコンドリアを用いた前駆平衡に基づく

呼吸反応の修正アレニウスモデルを用いた解析

## 要旨

第3章より、恒温性の発熱植物においては、前駆平衡と呼ばれる、負の活性化エネルギーに支配される化学平衡が成立すること、また、非発熱植物においては、負の活性化エネルギー産生が観察されないことが明らかとなった。従って、前駆平衡は、発熱植物の恒温性メカニズムに密接に関与する可能性が示された。さらなる解析のため、本章においては、ザゼンソウの肉穂花序から単離したミトコンドリアを用いて、前駆平衡が成立する呼吸反応、ならびに成立しない呼吸反応を *in vitro* で再構築し、その際の呼吸反応に関する活性化エネルギーの温度応答を算出した。その結果、前駆平衡が成立する呼吸反応特異的に、負の活性化エネルギーが産生された。従って、前駆平衡の成立が負の活性化エネルギー産生に密接に関与することが明らかになるとともに、ミトコンドリア局在型のイソクエン酸デヒドロゲナーゼを介した NADPH 産生、即ち吸熱反応が、前駆平衡の形成に重要な役割を示すことが判明した。また、恒温性の獲得には、AOX を介した酸素消費反応が密接に関与することが明らかとなった。以上より、ルシャトリエの原理に基づいた温度変化による化学平衡のシフトが、ザゼンソウの恒温性獲得に重要であると考えられた。

## 背景

植物の恒温性においては、温度と呼吸速度の逆相関を示すメカニズムが重要であることがこれまで複数の研究から示唆されてきたものの、そのような逆相関を生み出す分子メカニズムの詳細は不明であった。その中で、第3章にて行った解析により、ザゼンソウ肉穂花序においては、細胞レベルにおいて、負の活性化エネルギーの産生に基づく前駆平衡による呼吸調節が行われる可能性が示唆された。即ち、炭水化物を呼吸基質として、細胞内の各種デヒドロゲナーゼによる可逆的反応を介してある定常状態の電子の濃度が先に決定

され、さらにその濃度に基づき、ミトコンドリア呼吸鎖末端のオキシダーゼである AOX および COX からなる不可逆的反応が律速段階となり、全体の呼吸反応速度が決定される（第 3 章第 1 節 図 7）。従って、ザゼンソウの恒温性が観察される呼吸調節範囲においては、先の可逆的反応のうち吸熱反応の影響が高まることで、化学平衡が温度上昇により反応物側（炭水化物）にシフトすると考えられる。その結果、温度上昇に基づく電子濃度の減少により酸素消費速度は減少し、温度上昇による呼吸速度の逆相関が達成される可能性が高い。さらに、ザゼンソウ以外の恒温性を示すハス、およびドラゴンリリーの発熱器官由来の呼吸反応においても、ザゼンソウと同様に、恒温性が観察される温度域において、負の活性化エネルギーが産生されることが明らかとなった。

本章では、このような前駆平衡反応が、温度上昇による負の活性化エネルギー産生に関連するかを明らかにするため、本研究においては、単離ミトコンドリアを用いた、ミトコンドリアマトリクス内で供給される呼吸基質 NADPH の酸化還元と、AOX および COX を介した酸素消費反応から構成される前駆平衡の再構成を行い、修正アレニウスモデルを用いた解析を行った。さらに、AOX および COX 特異的な阻害剤を用いた *in vitro* における呼吸解析により、それぞれを介した酸素消費経路の温度応答性を明らかにすることを試みた。

## 実験材料と方法

### 植物材料

発熱中のザゼンソウ肉穂花序は 2014 年の 3 月下旬から 4 月中旬、および 2014 年 5 月 26 日に、それぞれ日本の岩手県北上市金ヶ崎、および岩手県和賀郡西和賀町の群落地で採取された。採取した肉穂花序は、ミトコンドリア精製まで 4°C かつ氷上において 6-18 時間保存された。

## 修正アレニウスモデルを用いた呼吸活性の解析

修正アレニウスモデルを用いた解析は、第3章第1節に示したものと同様の方法で行われた。

## ミトコンドリア精製および呼吸活性測定

実験に用いた単離ミトコンドリアの単離方法の概要を、図1に示した。まず採取した肉穂花序から、温度感受性の高い組織である Florets を手で速やかに取り外し、ミトコンドリアの単離精製に用いた。ミトコンドリア精製は以前我々が報告した方法に基づいて行われたが (Ito *et al.*, 2011), 今回は Florets 組織を破砕する際のバッファーにプロテアーゼ阻害剤 (cOmplete ULTRA tablets (Roche Diagnostics), または  $10 \mu\text{M}$  E-64 (Roche Diagnostics) および  $0.5 \text{ mM}$  4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (Roche Diagnostics)) を添加した。

精製直後の Fresh な単離ミトコンドリア由来の酸素消費速度は、クラーク型酸素電極 (Oxytherm electrode control unit, Hansatech Instruments Ltd.) を用いて測定した (Onda *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2013)。種々の温度 ( $8^{\circ}\text{C}$ ,  $15^{\circ}\text{C}$ ,  $23^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ) におけるクエン酸を呼吸基質とした際のミトコンドリア呼吸は、 $10 \text{ mM}$  クエン酸 (Wako Pure Chemical Industries),  $0.5 \text{ mM}$  ADP (Sigma-Aldrich),  $10 \text{ mM}$  マロン酸 (Wako Pure Chemical Industries),  $0.1 \text{ mM}$  ロテノン (ICN Biomedicals) を含む呼吸測定バッファー (Onda *et al.*, 2007) を用いて測定された。また、NADH を呼吸基質とした際のミトコンドリア呼吸は、 $15^{\circ}\text{C}$ ,  $23^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  において、 $1 \text{ mM}$  NADH (Oriental Yeast),  $0.5 \text{ mM}$  ADP,  $0.1 \text{ mM}$  ロテノンを含む呼吸測定バッファー中で測定された。AOX capacity は、 $0.5 \text{ mM}$  シアン化カリウム (KCN (Wako Pure Chemical Industries)) 非感受性および  $0.1 \text{ mM}$  *n*-propyl gallate (*n*-PG (Wako Pure Chemical Industries)) 感受性の酸素消費活性として測定された。さらに、ピルビン酸による AOX 活性化は、AOX capacity に対し  $10 \text{ mM}$  ピルビン酸を添加することで測定された。一方、COX capacity は、

0.5 mM シアン化カリウム (KCN) 感受性および 0.1 mM *n*-propyl gallate (*n*-PG) 非感受性の酸素消費活性として測定された。単離ミトコンドリアのタンパク質濃度は BCA 法 (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) を用いて測定された (Kakizaki *et al.*, 2012)。さらに、呼吸測定に使用した以外の単離ミトコンドリアは、精製後すぐ分注して  $-30^{\circ}\text{C}$  で一晩保存した後、 $-80^{\circ}\text{C}$  において長期間保存され、後述する酵素活性測定に用いられた。

#### 呼吸活性測定

ミトコンドリアに局在するアコニターゼ、ならびに  $\text{NAD}^+$ 型、および  $\text{NADP}^+$ 型イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (ICDH) の酵素活性は、それぞれ Aconitase Assay Kit (Abcam) および Isocitrate Dehydrogenase Assay Kit (Abcam) を用いて測定された。測定温度は、 $15^{\circ}\text{C}$ 、 $23^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$  が用いられた。

#### 統計解析

得られたデータについては、Microsoft Excel Software (2013 for Windows) により等分散の検定、ならびにスチューデントの *t* 検定を行った。その結果得られた *P* 値が有意水準 0.05 よりも小さい場合は、統計的に有意であると解釈した。

#### 結果

本章第1節で提示した前駆平衡に基づく呼吸調節モデルが、*in vitro*においても機能を示すかを明らかにするため、図 1の方法でザゼンソウ肉穂花序から単離したミトコンドリアを用いて、 $8^{\circ}\text{C}$ から $37^{\circ}\text{C}$ の温度範囲における4つの異なる温度において呼吸解析を行った (図 2b)。さらに、得られた $E_0$ の温度変動に関する結果と、インタクトな肉穂花序を用いて得られた結果とを比較した (図 2a & 2c)。この時、クエン酸は恒温性を有する発熱植物である

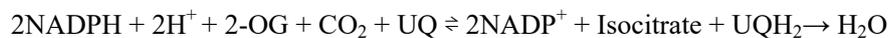
ドラゴンリリー (*D. vulgaris*) の発熱器官において、最も豊富に含まれる有機酸の一つであることから (Ito *et al.*, 2013), 本研究では、クエン酸を基質とした呼吸経路に着目した。クエン酸代謝に関与するアコニターゼ、およびイソクエン酸ヒドロゲナーゼ (ICDH) に関して、ザゼンソウ由来単離ミトコンドリアを用いた酵素の温度応答性解析を行った結果、クエン酸を基質にアコニターゼを介して産生されるイソクエン酸を代謝する主要な酵素が、 $\text{NADP}^+$ -ICDHであること、さらに、両者は温度上昇により活性増大を示すことが判明した。

(図 3a & 3b). 従って、単離ミトコンドリアにおいては、クエン酸を基質とした場合、ICDH およびマトリクス側に局在するロテノン非感受性NADPH脱水素酵素 (NDA) を介した前駆平衡を再構成できることが示唆された (図 3a). さらに、前駆平衡反応の再構成実験の対照区として、膜間腔側局在ロテノン非感受性NADH脱水素酵素 (NDB) を介した呼吸反応を測定し、前駆平衡が観察される場合との呼吸の温度応答性に関する比較を行った (図 2b). その理由として、単離ミトコンドリアを用いる実験系においては、内膜の外側に $\text{NAD}^+$ をNADHに変換する脱水素酵素は存在しないため、*in vitro*における前駆平衡反応は成立しないことが挙げられる (図 3a). 最終的に、得られた肉穂花序由来、および単離ミトコンドリア由来の呼吸反応は、それぞれ2次の曲線である修正アレニウスモデルによく回帰することが判明した (図 2a & 2b). さらに、曲線回帰分析により得られた呼吸パラメータを用いて、呼吸反応の全体の活性化エネルギー $E_0$ の温度応答性を求めた結果、いずれの呼吸反応においても $E_0$ は温度上昇により減少したが、NADHを基質とするNDBを介した酸素消費反応は負の活性化エネルギーを示さないことが明らかとなった (図 2c). 対照的に、NADPHを基質とするNDA/ICDHを介した酸素消費は負の活性化エネルギーを示し、 $22.3^\circ\text{C}$ において $E_0$ はゼロを示した (図 2c). インタクトな肉穂花序由来の呼吸では $15.2^\circ\text{C}$ において $E_0$ がゼロとなることが明らかであり、従って、単離ミトコンドリアおよび肉穂花序間で $E_0$ がゼロとなる温度に差異がみられた (図 2c).

次に、Switching temperatureの決定に対する、AOXまたはCOXを介した呼吸経路の関与を明らかにするための解析を行った。そのため、単離ミトコンドリアを用いて、*in vitro*における前駆平衡が成立するNADPH-NDA/ICDHを介した酸素消費を、AOXまたはCOX特異的阻害剤存在下で測定した（KCN存在下：AOX経路の酸素消費の測定；*n*-propyl gallate：COX経路の酸素消費の測定）（図 4a）。その結果、AOXおよびCOX経路を介した酸素消費活性は共に修正アレニウスモデルによく回帰した（図 4a）。さらに、前述と同様の方法で $E_0$ の温度応答性を求めた結果、 $E_0$ がゼロとなる温度が、AOXおよびCOX経路の酸素消費においてそれぞれ16.1 °C、または24.9 °Cであることを示した（図 4b）。これらの結果は、AOXを介した呼吸経路がSwitching temperatureに対して大きく影響することを示唆している。ここで、 $E_0$ の温度応答性の傾きであり、温度感受性に関わる $\delta$ に関してさらなる解析を行った結果、AOXおよびCOX経路を介した呼吸反応における $\delta$ は、統計的に有意な差はないことが判明した（図 5）。

最後に、AOXを介したミトコンドリア呼吸の温度感受性 $\delta$ に対し、ピルビン酸が与える影響を調べた。なぜならば、ピルビン酸はAOXの正のアロステリック制御因子として機能することが判明しているからである（Onda *et al.*, 2007）。本解析において、前駆平衡を形成するNAPDH-NDA/ICDH、または前駆平衡を形成しないNADH-NDBを介したAOX経路の酸素消費反応の $\delta$ は、それぞれ負および正の値を示した（図 6）。そのような異なる温度感受性は、両呼吸経路が同様にユビキノールを基質としたAOXを介した酸素消費を共有している一方で、NAPDH-NDA/ICDH、およびNADH-NDBを介した呼吸基質の酸化還元様式の差異が $\delta$ に影響することを示唆している。さらに重要なことに、両方の呼吸経路でピルビン酸の有無は $\delta$ の値に統計的に有意な影響を示さないことが判明した（図 5）。

本研究においては、*in vitro* で前駆平衡を成立させたミトコンドリア呼吸 (NADPH-NDA/ICDH) と前駆平衡が成立しないミトコンドリア呼吸 (NADH-NDB) に関して、呼吸解析を行った。その結果、前駆平衡が成立する場合においてのみ、負の活性化エネルギーが産生された。従って、これらの結果を基に、NADPH-NDA/ICDH および呼吸鎖末端酵素 AOX および COX を介した、単離ミトコンドリアにおける前駆平衡モデルを示した (図 7)。本モデルにおいて、前駆平衡を表す化学反応式は、以下のように表すことができる。



即ち、ICDH を介してミトコンドリアマトリクス内で産生される NADPH (速度定数  $k_1'$ ) は、NADPH の酸化反応に関わる NDA ( $k_1$ )、および呼吸鎖末端の酵素 AOX および COX ( $k_2$ ) によるユビキノールの酸化による酸素消費反応とともに前駆平衡反応を形成する (図 7)。ここで、 $\text{NADP}^+$ -ICDH の酵素活性は温度の上昇により増大することから ( $Q_{10} = 2.0$ ; 図 3b)、このような NADPH を産生する吸熱反応が温度上昇により促進された結果、発熱反応および吸熱反応からなる化学平衡がシフトし、 $[\text{NADPH}]/[\text{NADP}^+]$ 比が増大すると考えられる (図 7)。その際、 $[\text{NADPH}]/[\text{NADP}^+]$ 比が大きくなることは、 $[\text{ユビキノン (UQ)}]/[\text{ユビキノール (UQH}_2)]$ 比が同様に大きくなることを意味する。従って、温度上昇により、ユビキノールプール内のユビキノールの割合が減少した結果、呼吸鎖末端のオキシダーゼを介した酸素消費速度は結果的に減少すると考えられる (図 7)。これらの結果は、ある化学平衡が温度変化を受けた際、その温度変化を妨げる方向に平衡がシフトして、新たな平衡を作り出すシステムが存在することを示唆している。このような現象は、ルシャトリエの原理と呼ばれる化学反応の法則に従っているように見える。ルシャトリエの原理は、熱力学的に可逆的な反応においてのみ成立することから、今回の呼吸解析により得られた結果は、ザゼンソウの発熱器官由来の単離ミトコンドリアを用いて、発熱反応および吸熱反応から成る前駆平衡反応が *in vitro* で再構成されたことを示している。

また、図7で示したこのモデルは、呼吸鎖末端のオキシダーゼを介した化学反応における  $E_a''$  の温度変化が、 $E_0$  がゼロとなる温度を決定することを予測している。即ち、本章の数式 17 を展開すると、AOXまたはCOX経路を介した呼吸経路の活性化エネルギー  $E_a''$  は、以下の数式として表すことができる。

$$E_a'' = E_0 - E_a + E_a' \quad \text{数式 18}$$

ここで、数式 18 における  $-E_a + E_a'$  は、どの温度条件においても一定である。なぜなら、 $E_a$  および  $E_a'$  が関わる化学反応は、前駆平衡の可逆的反応ステップにおける、同じ活性化エネルギーを共有しているからである（図 7）。従って、 $E_0$  の温度変化は  $E_a''$  の温度変化を反映するものとして考察することが可能である。

以上の概念に基づいて、前駆平衡が成立する *in vitro* における呼吸反応において、ユビキノールを酸化する呼吸経路の差異、即ち AOX および COX 経路が、呼吸反応の温度感受性、および肉穂花序由来呼吸の **Switching temperature** に与える影響を調べた。その結果、興味深いことに、AOX 経路を介した場合の  $E_0 = 0$  となる温度（16.1 °C）は、肉穂花序由来呼吸の当該温度（15.2 °C）と類似の値を示す一方、COX 経路を介した場合の  $E_0 = 0$  となる温度とは大きく異なる（24.9 °C）ことが判明した（図 2c & 4b）。これらの結果は、AOX を介した呼吸経路が、肉穂花序由来の呼吸における **Switching temperature** に対して大きく影響することを示唆している。ここで、このような  $E_0 = 0$  となる温度の差異は、 $E_0$  の温度感受性を表す指標  $\delta$  により生じる。即ち、温度感受性が高い程、 $E_0$  と温度の一次関数の傾きに相当する  $\delta$  は大きくなり、逆に温度感受性が小さい程、 $\delta$  は小さくなる。このような  $E_0$  の動的応答に関わる  $\delta$  に関してさらなる解析を行った結果、AOX および COX 経路を介した呼吸反応における  $\delta$  は、統計的に有意な差はないことが判明した（図 5）。ここで得られた結果は、AOX 呼吸の生データにおける大きな差異が影響することを示唆している。しかしながら、このような統計的に有意でない  $\delta$  に基づいて、ザゼンソウの肉穂花序温度の平均値である 23 °C においては、AOX 経路の  $E_0$  の値は COX 経路より有意に低いことが明らかと

なっている (図 4b) . なぜある特定の温度において有意な  $E_0$  の差異が生じるのか, 詳細は不明であるが, この温度における  $E_0$  の値が低いことに基づく AOX を介した呼吸経路の優位性が, 体温調節に何らかの影響を与えている可能性がある.

さらに, AOX の活性調節因子であるピルビン酸は, AOX 反応の温度感受性  $\delta$  に有意な影響を及ぼさないことが判明した (図 6) . 先行研究において, 恒温性の発熱植物種と一過性の発熱植物種では, AOX におけるピルビン酸応答性のモチーフに差異があることが判明しており, 恒温性の発熱植物ではピルビン酸によるアロステリックな制御が恒温性の制御要因として考えられてきた (Onda *et al.*, 2007) . しかしながら, 本研究における結果より, ピルビン酸による AOX の活性状態が,  $E_0$  の温度感受性である  $\delta$  を制御している可能性は低いと考えられる. 従って, 本章の解析において示した, 熱力学的に可逆的な前駆平衡反応における化学平衡の温度に依存したシフトが, 従来考察されたようなピルビン酸による AOX の活性制御より, ザゼンソウの恒温性における温度感知および応答機構において重要な役割を担う可能性がある. また, 同様に AOX 経路単独を介した酸素消費反応であるにも関わらず, 前駆平衡反応が成立する場合 (NADPH-NDA/ICDH) としない場合 (NADH-NDB) で  $\delta$  がそれぞれ負, または正の値を示すことが明らかとなった (図 6) . そのような逆の温度感受性は, 呼吸経路を構成する因子の主要な差異 (前駆平衡の形成の有無) を示唆している. 以上のことは, 恒温性には, 前述した, Switching temperature の決定に影響する AOX 経路の呼吸だけでなく, 前駆平衡の存在が, 負の活性化エネルギーに支配される恒温性に重要であることを裏付ける結果だと考えられる.

結論として, ザゼンソウの肉穂花序は, 温度変化による負の活性化エネルギーの入力を基に複数の化学反応を駆動し, 出力として体温調節を行う, 言わばある種のケミカルリアクターとして捉えることができると考えられる. 全体の活性化エネルギー  $E_0$  は前駆平衡反応に関与する個別の活性化エネルギーの相対的な大きさから単純に求めることができるので, 本研究において提案するこのような呼吸調節モデルは, 発熱組織由来の呼吸と温度間の関

係が異なる曲線の形，また温度範囲で表される，ザゼンソウ以外の恒温性を有する発熱植物においても適用するのに十分なほどロバスト性を有すると考えられる．さらに，他の生物種の細胞における生化学的な化学平衡に対しても，ルシャトリエの原理に従って温度はその化学平衡のシフトに影響を与える．従って，化学平衡で表される呼吸調節モデルは，このような恒温性を示す発熱植物種だけでなく，哺乳類における非ふるえ熱産生や，Hyperthermia（異常高熱）を示すような他の生物学的現象に関しても，熱的なホメオスタシスを維持するために，同様のメカニズムが少なくとも部分的に用いられている可能性がある．

#### 引用文献

Arrhenius, S. (1889) Über die reaktionsgeschwindigkeit bei der inversion von rohrzucker durch säuren. *Z. Phys. Chem.* **4**: 226-248.

Chaffee, R. and Roberts, J. (1971) Temperature acclimation in birds and mammals. *Annu. Rev. Physiol.* **33**: 155-202.

Han, X., Lee, R., Chen, T., Luo, J., Lu, Y. and Huang, K. W. (2013) Kinetic evidence of an apparent negative activation enthalpy in an organocatalytic process. *Sci. Rep.* **3**: 2557.

Ito, K., Ogata, T., Kakizaki, Y., Elliott, C., Albury, M. S. and Moore, A. L. (2011) Identification of a gene for pyruvate-insensitive mitochondrial alternative oxidase expressed in the thermogenic appendices in *Arum maculatum*. *Plant Physiol.* **157**: 1721-1732.

Ito, K., Takahashi, H., Umekawa, Y., Imamura, T., Kawasaki, S., Ogata, T., Kakizaki, Y. and Seymour, R. (2013) Metabolite profiling reveals tissue- and temperature-specific metabolomic responses in thermoregulatory male florets of *Dracunculus vulgaris* (Araceae). *Metabolomics* **9**: 919-930.

- Kakizaki, Y., Moore, Anthony L. and Ito, K. (2012). Different molecular bases underlie the mitochondrial respiratory activity in the homoeothermic spadices of *Symplocarpus renifolius* and the transiently thermogenic appendices of *Arum maculatum*. *Biochem. J.* **445**: 237-246.
- Knutson, R. M. (1974) Heat production and temperature regulation in eastern skunk cabbage. *Science* **186**: 746-747.
- Kruse, J. and Adams, M. A. (2008) Three parameters comprehensively describe the temperature response of respiratory oxygen reduction. *Plant Cell Environ.* **31**: 954-967.
- Kruse, J., Hopmans, P. and Adams, M. A. (2008) Temperature responses are a window to the physiology of dark respiration: Differences between CO<sub>2</sub> release and O<sub>2</sub> reduction shed light on energy conservation. *Plant Cell Environ.* **31**: 901-914.
- Kruse, J., Rennenberg, H. and Adams, M. A. (2011) Steps towards a mechanistic understanding of respiratory temperature responses. *New Phytol.* **189**: 659-677.
- Kruse, J., Turnbull, T. L. and Adams, M. A. (2012) Disentangling respiratory acclimation and adaptation to growth temperature by *eucalyptus*. *New Phytol.* **195**: 149-163.
- Maharaj, U. and Winnik, M. A. (1981) Quenching of aromatic ketone phosphorescence by simple alkenes: an Arrhenius study. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 2328-2333.
- Morrison, S. F. and Nakamura, K. (2011) Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci. (Landmark Ed)* **16**: 74-104.
- Nagy, K. A., Odell, D. K. and Seymour, R. S. (1972) Temperature Regulation by the Inflorescence of *Philodendron*. *Science* **178**: 1195-1197.
- Noguchi, K., Yamori, W., Hikosaka, K. and Terashima, I. (2015) Homeostasis of the temperature sensitivity of respiration over a range of growth temperatures indicated by a modified Arrhenius model. *New Phytol.* **207**: 34-42.
- Onda, Y., Kato, Y., Abe, Y., Ito, T., Ito-Inaba, Y., Morohashi, M., Ito, Y., Ichikawa, M., Matsukawa, K., Otsuka, M., Koiwa, H. and Ito, K. (2007) Pyruvate-sensitive aox exists as a non-covalently

associated dimer in the homeothermic spadix of the skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. *FEBS Lett.* **581**: 5852-5858.

Seymour, R. S., Lindshau, G. and Ito, K. (2010) Thermal clamping of temperature-regulating flowers reveals the precision and limits of the biochemical regulatory mechanism. *Planta* **231**: 1291-1300.

Seymour, R. S. (2001) Biophysics and physiology of temperature regulation in thermogenic flowers. *Biosci. Rep.* **21**: 223-236.

Seymour, R. S. and Blaylock, A. J. (1999) Switching off the heater: influence of ambient temperature on thermoregulation by eastern skunk cabbage *Symplocarpus foetidus*. *J. Exp. Bot.* **50**: 1525-1532.

Seymour, R. S. and Schultze-Motel, P. (1996) Thermoregulating lotus flowers. *Nature* **383**: 305.

Seymour, R. S. and Schultze-Motel, P. (1999) Respiration, temperature regulation and energetics of thermogenic inflorescences of the dragon lily *Dracunculus vulgaris* (Araceae). *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **266**: 1975-1975.

Seymour, R. S., Schultze-Motel, P. (1998) Physiological temperature regulation by flowers of the sacred lotus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **353**: 935-943.

Shimomura, T., Tolle, K., Smid, J. and Szwarc, M. (1967) Energy and entropy of activation of propagation by the free polystyryl anions and their ion pairs. The phenomenon of "negative" activation energy. *J. Am. Chem. Soc.* **89**: 796-803.

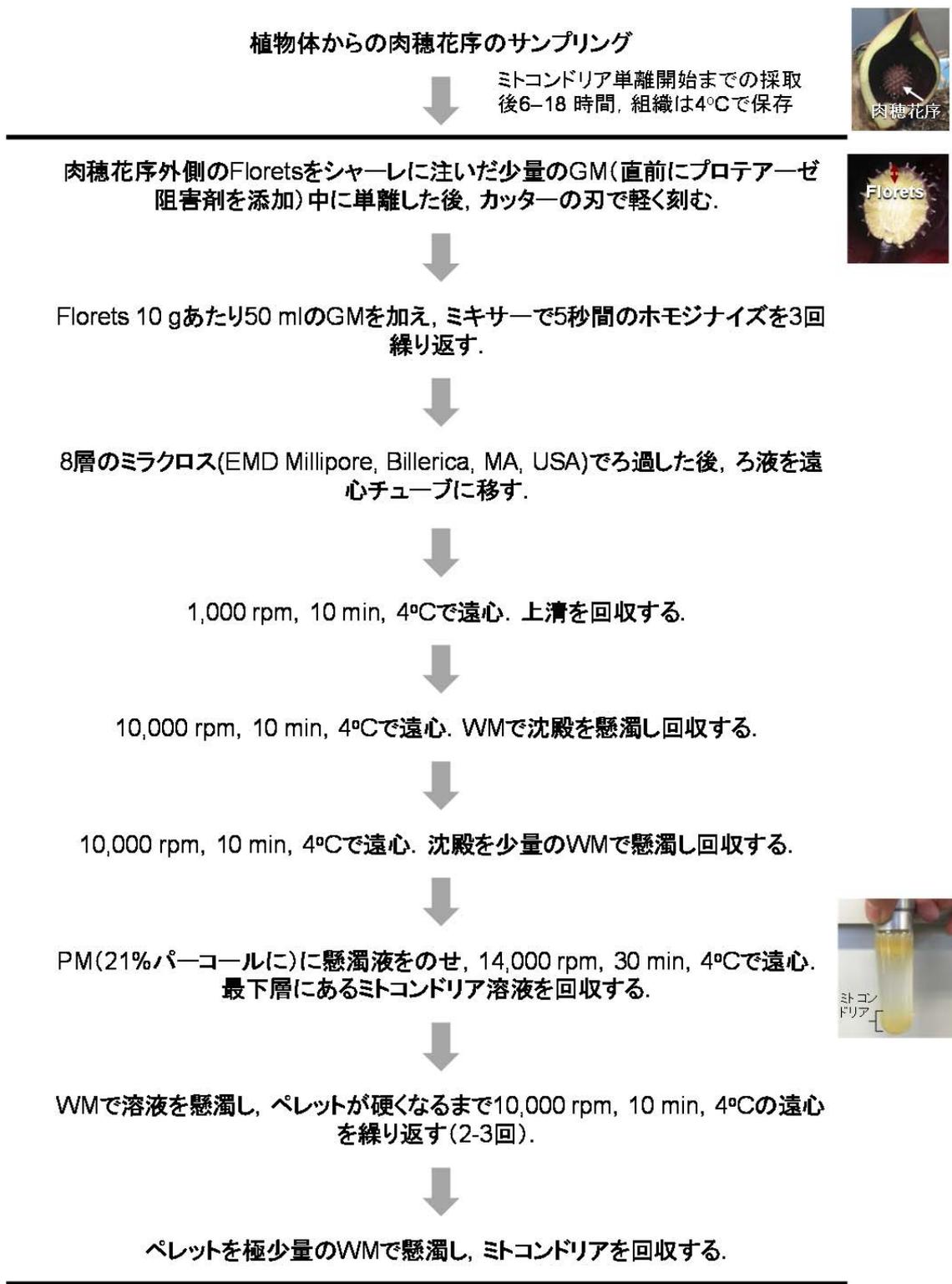


図 1. ザゼンソウ肉穂花序由来ミトコンドリアの単離精製ステップの概要.  
図の説明文は次のページに示す.

**図 1. ザゼンソウ肉穂花序由来ミトコンドリアの単離精製ステップの概要.**

Ito *et al.*, 2011 により既に報告されている方法を, 材料と方法の項目で述べたように一部改変したものを記した.

GM: Grinding medium; 0.3 M mannitol (Wako Pure Chemical Industries) , 20 mM MOPS (Sigma-Aldrich) (pH 7.5) , 2 mM EDTA (Dojindo Laboratories) , 2 mM pyruvate (Wako Pure Chemical Industries) , 7 mM cysteine (Sigma-Aldrich) , および 0.2% (w/v) BSA (fatty acid free) (Wako Pure Chemical Industries); WM: Wash medium; 0.3 M mannitol, 20 mM MOPS (pH 7.5), 2 mM EDTA, 2 mM pyruvate, および 0.2% (w/v) BSA (fatty acid free) ; PM: Percoll medium; 21% (v/v) Percoll<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich) , 0.3 M Sucrose (Wako Pure Chemical Industries) , 5 mM MOPS, 0.1% (w/v) BSA (fatty acid free) , および 2 mM Pyruvate.

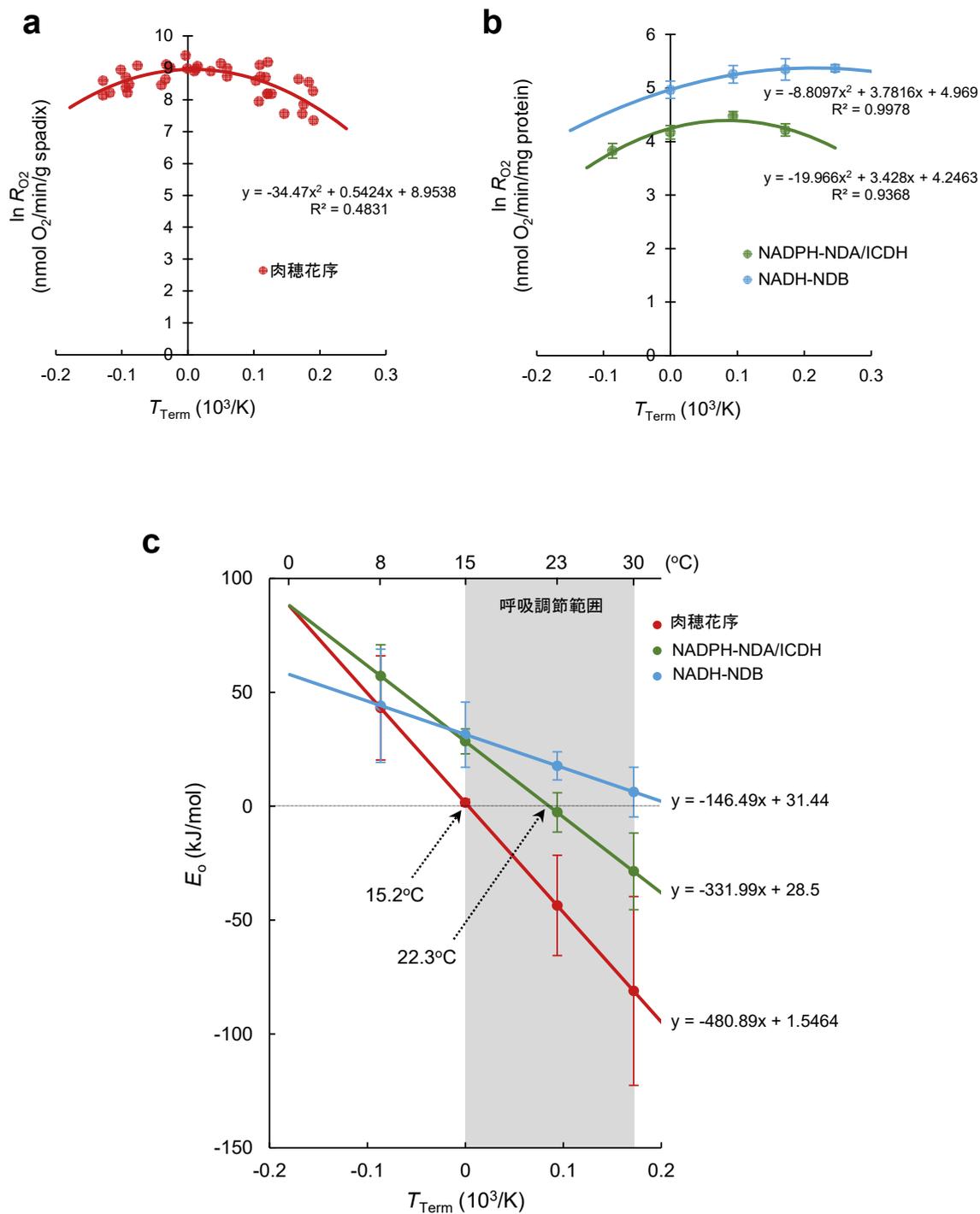


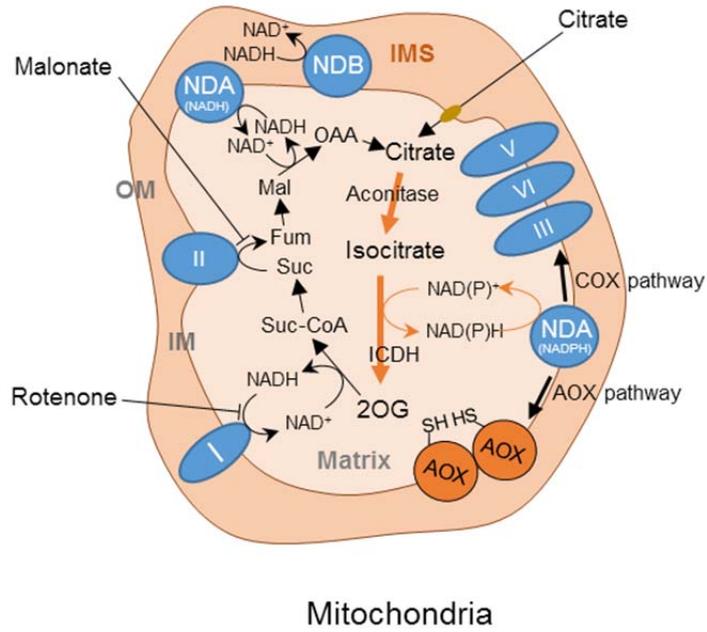
図 2. ザゼンソウの肉穂花序およびミトコンドリア由来呼吸に関する  $E_0$  の温度応答性の比較解析.

図の説明文は、次のページに記す.

**図 2. ザゼンソウの肉穂花序およびミトコンドリア由来呼吸に関する  $E_0$  の温度応答性の比較解析.**

**a.** 修正アレニウスモデルを用いた, インタクトな肉穂花序由来の呼吸速度の曲線回帰分析. 呼吸データは Seymour *et al.*, 2010 を引用した. **b.** 修正アレニウスモデルを用いた, 単離ミトコンドリア由来の呼吸速度の曲線回帰分析.  $\text{NADP}^+$ -ICDH および NDA (NADPH-NDA/ICDH; ●), ならびに  $\text{NAD}^+$ -NDB (NADH-NDB; ●) を介したミトコンドリア呼吸が解析に用いられた. NADPH-NDA/ICDH を介した呼吸反応は, 8 °C, 15 °C, 23 °C, 30 °C, NADH-NDB を介した呼吸速度は, 15 °C, 23 °C, 30 °C, 37 °C において測定した ( $n = 6$ ). **c.** 肉穂花序およびミトコンドリア由来呼吸の  $E_0$  の温度応答解析. 肉穂花序における  $E_0$  の温度変化(●), および単離ミトコンドリアにおける  $E_0$  の温度変化(NADPH-NDA/ICDH; ●, および NADH-NDB; ●) を示した ( $n = 6$ ).  $E_0$  がゼロとなる温度は, 肉穂花序由来の呼吸, および NADPH-NDA/ICDH を介したミトコンドリア呼吸において, それぞれ 15.2 °C, または 22.3 °C である.

**a**



**b**

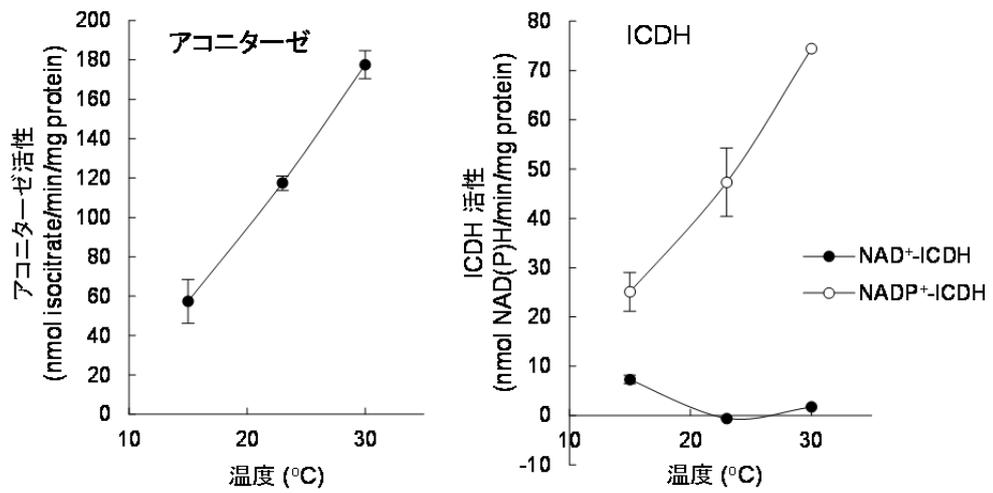
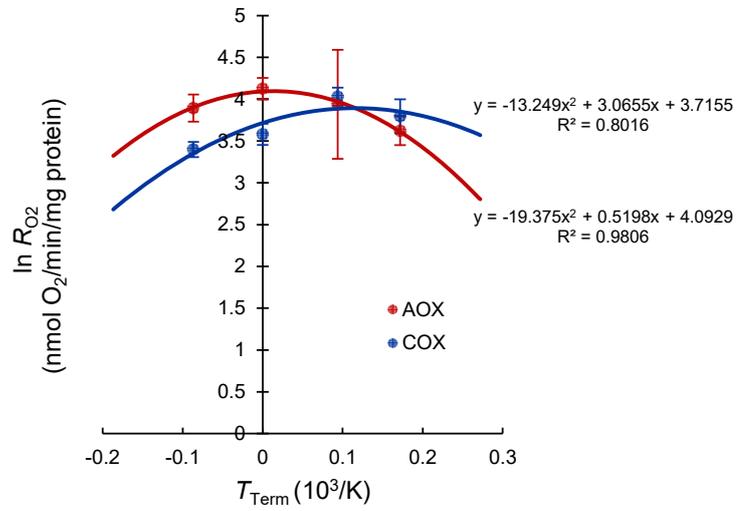


図 3. クエン酸を基質としたミトコンドリア呼吸への温度影響。  
図の説明文は、次のページに記す。

**図 3. クエン酸を基質としたミトコンドリア呼吸への温度影響.**

- a.** ミトコンドリアにおける呼吸代謝. クエン酸 (Citrate) は, ミトコンドリアマトリクス (Matrix) に局在するアコニターゼ (Aconitase) および ICDH を介して, イソクエン酸 (Isocitrate) から 2OG へ変換される. ロテノン (Rotenone) およびマロン酸 (Malonate) 存在下において, 産生される NAD(P)H は, 内膜マトリクス側に局在するロテノン非感受性 NAD(P)H 脱水素酵素 NDA を介して NAD(P)<sup>+</sup>に酸化される. 一方, 外部から加えた NADH は, 内膜膜間腔側に局在するロテノン非感受性 NAD(P)H 脱水素酵素 NDB を介して NAD<sup>+</sup>に酸化される. I-V: 複合体 I-V, ICDH; イソクエン酸デヒドロゲナーゼ, 2OG: 2-オキソグルタル酸, Suc-CoA: スクシニル CoA, Suc: コハク酸, Fum: フマル酸, Mal: リンゴ酸, OAA: オキサロ酢酸, OM: ミトコンドリア外膜, IM: ミトコンドリア内膜, IMS: 膜間腔.
- b.** アコニターゼおよび ICDH の酵素活性の温度応答解析 (n = 3). ミトコンドリアにおいては, NAD<sup>+</sup>型 (●), および NADP<sup>+</sup>型 (○) の 2 種類の ICDH が局在する.

**a**



**b**

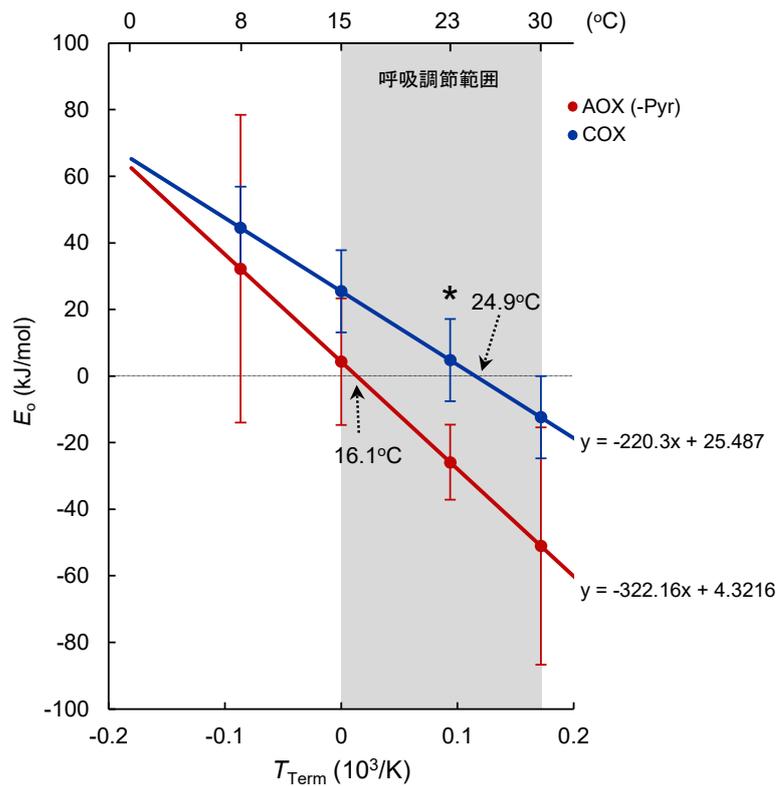


図 4. AOXまたはCOXを介したミトコンドリア呼吸に関する $E_0$ の温度応答性の比較解析.

図の説明文は、次のページに記す.

図 4. AOX または COX 経路を介したミトコンドリア呼吸に関する  $E_0$  の温度応答性の比較解析.

a. AOX (●) または COX (●) 経路を介したミトコンドリア呼吸の修正アレニウスモデルを用いた曲線回帰分析 ( $n = 3$ ). 前駆平衡が成立する NADPH-NDA/ICDH を介した酸素消費を解析に用いた. b. AOX (●) または COX (●) 呼吸経路における  $E_0$  の温度応答性解析 ( $n = 3$ , \*:  $P < 0.05$ ). NADPH-NDA/ICDH を介した酸素消費を解析に用いた.

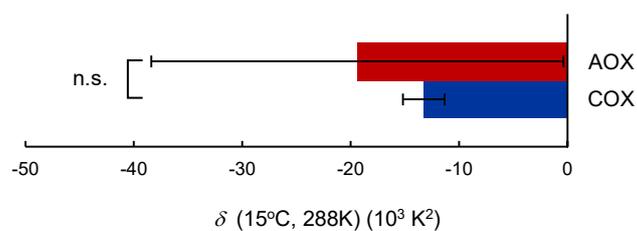


図 5. AOX および COX 経路を介したミトコンドリア呼吸における  $E_0$  の温度感受性  $\delta$  の比較.

NADPH-NDA/ICDH を介した AOX および COX 経路それぞれの酸素消費 (AOX- / COX-capacity) に関して,  $\delta$  値を算出した ( $n=3$ ). n.s.: 有意差なし.

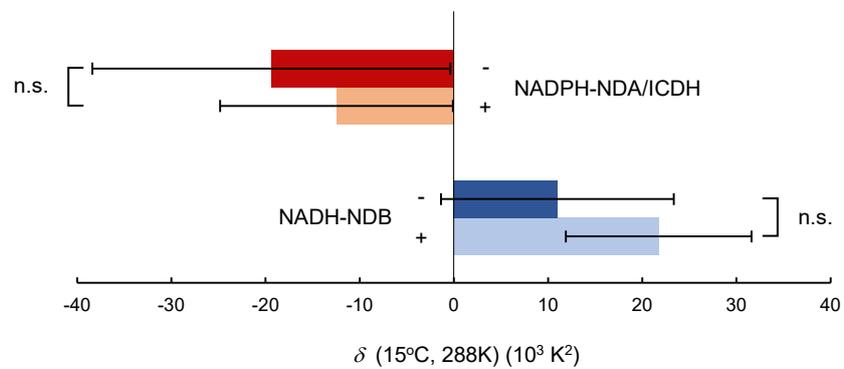


図 6.  $E_0$  の温度感受性  $\delta$  に対するピルビン酸の影響.

ピルビン酸非存在下 (-), または存在下 (+) における NADPH-NDA/ICDH, または NADH-NDB を介した AOX 経路の酸素消費 (AOX capacity) に関して,  $\delta$  値を算出した ( $n = 3$ ). n.s.: 有意差なし.



表 1. AOX および COX を介したミトコンドリア呼吸における呼吸パラメータ.

	$\ln R_{\text{REF}}$ (15°C, 288K) (nmol O <sub>2</sub> /min/mg protein)	$E_o$ (15°C, 288K) (kJ/mol)	$\delta$ (15°C, 288K) (10 <sup>3</sup> K <sup>2</sup> )
AOX	4.09±0.35	4.32±19.01	-19.38±19.00
COX	3.72±0.10	25.49±7.38	-13.24±1.92

NDA を介した呼吸反応における AOX および COX capacity を解析に用いた. 全ての呼吸測定は, ピルビン酸非存在下で行われた.  $T_{\text{REF}}$  が 15°C における  $\ln R_{\text{REF}}$ ,  $E_o$ , および  $\delta$  はそれぞれ修正アレニウスモデルを用いて算出した. これらのデータは全て means ± SD として表した (n = 3).

## 第5章

### 総合考察

## 論文の概要

本論文において、筆者は植物の恒温性に関わる温度応答性呼吸調節メカニズムに関する生化学的基盤を明らかにすることを試みた。まず、植物の恒温性メカニズムについて、これまで得られている生化学的かつ数理科学的知見を整理した（第1章）。そのうち、植物の恒温性は肉穂花序温度と逆相関を示す呼吸調節により得られることから、本研究では、呼吸反応速度と温度の関係に着目し、それらの関係を表す複数の理論を体系化した（第2章）。そのうち、本研究においては、化学反応速度に影響する因子である活性化エネルギーを実験的に求めることを可能にするアレニウスモデル、およびその修正モデルを用いて、ザゼンソウを含む恒温性発熱植物、および非発熱植物において、組織レベルで行われる呼吸反応に関する活性化エネルギーの解析を行った（第3章）。その結果、ザゼンソウや、それ以外の発熱植物（ハスおよびドラゴンリリー）において、それぞれの植物に特有の呼吸調節範囲で、負の活性化エネルギーが産生されることが明らかとなった。さらに、負の活性化エネルギーの産生は、恒温性を示す発熱植物に特異的であることが判明した。これらの結果は、恒温性発熱植物の呼吸調節が、前駆平衡反応に基づいて行われることを示唆するものであった。即ち、発熱反応および吸熱反応からなる化学平衡が、肉穂花序の温度変動を受けてシフトすることで、ミトコンドリア呼吸鎖末端呼吸酵素への電子の供給量（ユビキノール濃度）が変化し、酸素消費量が可逆的に変動すると考えられた。さらなる解析のため、ザゼンソウの発熱器官から単離したミトコンドリアを用いて、前駆平衡が成立する、もしくは成立しない呼吸反応を *in vitro* で再構築し、同様に活性化エネルギーの解析を行った（第4章）。その結果、前駆平衡が成立する場合特異的に、負の活性化エネルギーが産生された。従って、ザゼンソウにおける、前駆平衡の呼吸調節への関与が明らかとなった。さらに、前駆平衡の成立には、吸熱反応に関わるイソクエン酸デヒドロゲナーゼが密接に関連することが判明した。

一般に、生物の恒温性は、鳥類や哺乳類を含む動物において観察される (Chaffee & Roberts, 1971). そのような体温調節は、脳や皮膚表面の TRP チャンネルが認識した温度情報が、脳の体温調節中枢に伝達されることで行われる (Caterina, 2007; Morrison *et al.*, 2008; Morrison & Nakamura, 2011). 即ち、寒冷環境においては、褐色脂肪細胞における UCP1 を介した代謝性の非震え熱産生、代替的活性化マクロファージによる白色脂肪細胞における脂肪分解の促進、および骨格筋における震え熱産生を通じて熱産生を増大する (Nakamura & Morrison, 2011; Nguyen *et al.*, 2011). 一方、暑熱環境においては熱産生の抑制および熱放散を増加させることで体温調節を行う (Nakamura & Morrison, 2010). このように、動物における体温調節は様々な神経回路を介して、質的に異なる体温調節方法が統合されることで行われる、非常に複雑なメカニズムを有する. 本研究においては、ザゼンソウに代表される植物の恒温性メカニズムを明らかにすることを目的とした. 植物は動物と全く異なる器官をもつため、植物の恒温性メカニズムにおいては、脳や神経系を介さない、細胞レベルでの体温調節が行われると予想されてきた.

ザゼンソウの恒温性を世界で初めて報告した Knutson は、その論文において、外気温と呼吸速度の逆相関が恒温性メカニズムに関わることを既に示していた (Knutson, 1974). このようなメカニズムの詳細を明らかにするために、ザゼンソウの呼吸速度と外気温、および肉穂花序温度との関係性、または肉穂花序温度と外気温との関係性に着目した種々の研究が行われてきた (Seymour & Blaylock, 1999; Seymour, 2001; Ito *et al.*, 2003; Seymour, 2004). その結果、重要なことに、ザゼンソウの恒温性は発熱器官である肉穂花序自体の温度変動を認識することで行われること (Ito *et al.*, 2004), さらに肉穂花序温度が 15 °C 以上の温度域においては、発熱器官温度および呼吸速度が逆相関を示す呼吸調節メカニズムが存在することが明らかとなっている (Seymour *et al.*, 2010). さらに、ザゼンソウの恒温性は、肉穂花序温度が 15 °C よりも温度が低下することで失われることから (Seymour *et al.*, 2010), ザゼンソウは相対的な温度変化ではなく、肉穂花序の温度変化を認識することで、呼吸調節

が行われることが予想された。これまで呼吸調節メカニズムの分子基盤の詳細は不明であったが、本研究において、ザゼンソウにおける呼吸調節メカニズムが、前駆平衡と呼ばれる、発熱反応と吸熱反応の化学平衡に基づく呼吸調節により行われることが明らかとなった。即ち、ザゼンソウは炭水化物を呼吸基質とすることから (Seymour & Blaylock, 1999)、細胞内の各種脱水素酵素による炭水化物の酸化還元反応 (可逆反応) と、それにより生じる電子 (ユビキノール) を用いた、ミトコンドリア呼吸鎖末端呼吸酵素 AOX および COX による酸素消費反応 (不可逆反応) が全体として前駆平衡を構成すると考えられる。その場合、肉穂花序温度の変動により、化学反応系の温度が変化することで、ルシャトリエの法則に基づいて系の変化を妨げる方向に化学平衡がシフトし、その結果、呼吸速度が変化する。以上をまとめると、ザゼンソウにおける体温調節の概要は図 1 として示すことができる。即ち、ザゼンソウの肉穂花序温度 (体温) は、外気温変動の影響による熱損失と、肉穂花序における熱産生の熱収支から決定される。この時、ザゼンソウは肉穂花序温度を常にモニタリングすることで、呼吸調節を基にした熱産生量制御を行う。その際、温度を感知して呼吸調節を行う因子が、前駆平衡を構成する化学平衡であると考えられる。このような化学反応は細胞レベルで成立することから、ザゼンソウで示された恒温性メカニズムは、植物のみならず、動物においても機能している可能性がある。

ここで、ザゼンソウの恒温性には、外気温変動に応じた肉穂花序温度の周期的な振動が関与することが明らかにされている (図 2 & Ito *et al.*, 2004)。即ち、外気温変動により肉穂花序温度の変化が生じると、その温度変化はほぼ 1 時間という周期性を持った体温変動として現れる。外気温を人為的に低下させた実験系では、その振幅はその振動周期における外気温の変化速度に比例していることがわかる (Ito *et al.*, 2004; Seymour, 2004)。このような体温の振動現象は、恒温性を示すハスにおいても観察されることから (Seymour, 1998; Seymour *et al.*, 1998)、恒温性を示す植物に広く保存されたメカニズムであることが示唆されてきた。このような生命現象で観察される振動現象は、様々な生物種において観察される。

即ち、動物のストレス応答に関与する転写因子 NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) の核内局在 (Hoffmann *et al.*, 2002) や, ERK (extracellular signal-regulated kinase) 活性 (Kholodenko, 2000; Shankaran *et al.*, 2009) が関与するシグナル伝達系, サーカディアンリズム (Shearman *et al.*, 2000; Reppert & Weaver, 2002), 植物のカルシウムシグナリング (Evans *et al.*, 2001) などを含む, ネガティブフィードバック制御が関与する様々な生命現象において, 振動現象が現れるという報告がある. ザゼンソウの体温の振動現象が生じる分子メカニズム, および恒温性に対する生理的意義は不明であった. しかしながら, 今回ザゼンソウの体温調節が前駆平衡に基づく呼吸調節メカニズムに基づいて行われることが明らかとなったことから, 本植物の体温振動には, 温度に応じた呼吸に関する化学平衡のシフトが影響している可能性がある. 即ち, ザゼンソウの体温調節は, 肉穂花序温度の温度が低下すると, 発熱反応および吸熱反応からなる化学平衡が発熱反応の方向にシフトするため, その過程で熱産生量が増加する (図 2). その後, 熱産生量と熱損失量が釣り合う状態を経て, 次は発熱反応に傾いた平衡を妨げるように, 吸熱反応側に平衡がシフトする. このように, ルシャトリエの原理に基づいた化学平衡のシフトにより, 振動現象は説明できると考えられる. 化学分野においては, 化学平衡が関与する化学振動反応として, Belousov-Zhabotinsky 反応 (BZ 反応) がよく知られている (Belousov, 1958). この反応においては, セリウム (Ce) の酸化還元反応が触媒の酸化還元と共役して起こることで, セリウムの酸化還元状態の経時的変化が振動として現れる. 即ち,  $Ce^{3+}$  の  $Ce^{4+}$  への酸化反応は臭化物イオン ( $Br^-$ ) の濃度依存的に起こり, この反応により  $Br^-$  は  $Br_2$  に変換される. 生成された  $Br_2$  濃度が大きくなると, 今度は  $Ce^{4+}$  から  $Ce^{3+}$  への還元反応が進む. この繰り返しが振動を生み出すが, このような化学平衡のシフトは, 温度変化が化学平衡のシフトに影響するザゼンソウの前駆平衡反応と類似の理論的背景を有すると考えられる. 一方, なぜ肉穂花序重量や, 体温に関わらずほぼ 1 時間という振動周期が決まっているのかは, 前駆平衡反応のみからは説明がつかないが, 呼吸反応に関与する前駆平衡を構成する何らかの因子が関係していると考えられる.

さらに、ザゼンソウの体温調節メカニズムは、決定論的非線形モデルを用いた解析より、2次元に近似した数式として表されることが明らかとなっている (Ito & Ito, 2005). それを基に、恒温性を表す工学的モデルが提案されている (図 3a & Takahashi *et al.*, 2007). 当該モデルでは、肉穂花序温度の変化の感知に基づき **Generator** で生成された生化学的エネルギーが、**Heater** において熱として変換される. その後、熱損失などを考慮して求められる肉穂花序温度の情報がまたフィードバックされることで、体温調節が行われる (図 3a). このうち、呼吸反応に関する前駆平衡反応による恒温性モデルに相当するのが、**Generator** および **Heater** を介した制御系であると考えられることから、工学的モデルに本研究で得られた呼吸調節モデルの概念を導入した模式図を提示することができる (図 3b). この修正工学的モデルでは、**Generator** および **Heater** をつなぐ矢印が可逆的である点に、オリジナルの工学的モデルと差異がある. 即ち、**Generator** と **Heater** 間においては、生化学的エネルギーである炭水化物を共有しており、その酸化還元により生じた電子が **Heater** の基質となることで熱産生が行われる. 炭水化物の酸化還元に関わる化学平衡が、体温に応じたフィードバック制御を受けることで、体温調節が行われると考えられる. **Heater** には、ミトコンドリア呼吸鎖末端で電子を受け取り、酸素消費が行われる際、熱散逸的に機能する AOX が相当すると考えられる. このような可逆反応を含むことは、工学的モデルの意味合いを全く変えているが、新たに実験的に求められたこのような化学平衡の概念を導入することで、実際の恒温性メカニズムをより反映した新たな工学的モデルに関する数式を導出できると考えられる.

本研究は、ザゼンソウ以外の恒温性発熱植物であるハス、およびドラゴンリリー、ならびに非発熱植物種であるエンドウ、およびコムギにおける呼吸反応に関しても修正アレニウスモデルを用いた解析を行い、ザゼンソウで明らかとなった前駆平衡に基づく呼吸調節メカニズムの適用範囲を求めた. 結果として、恒温性を示す植物特異的に負の活性化エネルギーが観察され、非発熱植物においては、負の活性化エネルギーを示さないことが判明した. また、先行研究において修正アレニウスモデルを用いた合計 24 種の非発熱植物にお

ける呼吸反応の解析の結果も、本研究で示された負の活性化エネルギー産生が提示された例はない (Kruse & Adams, 2008; Kruse *et al.*, 2012; Noguchi *et al.*, 2015)。

ここで、前駆平衡に基づく呼吸調節メカニズムは、炭水化物の酸化還元とミトコンドリア呼吸鎖末端のオキシダーゼによる酸素消費反応からなる、シンプルな化学反応式として表すことができる (図 4)。従って、それらの前駆平衡を構成する個別の発熱および吸熱反応は、解糖系から TCA 回路、および電子伝達系が広く保存された代謝経路であることから、一般に恒温性以外の植物においても存在する普遍的な化学反応である。しかしながら、なぜ負の活性化エネルギー産生の差異が生まれるのであろうか。それに対する一つの答えは、恒温性発熱植物における、吸熱反応の存在であると考えられる。まず、全体の活性化エネルギーは、第 3 章にでも示したように以下のように表すことができる。

$$E_o = E_a + E_a'' - E_a' \quad \text{数式 17}$$

数式 17 より、 $E_a + E_a'' < E_a'$  となることで  $E_o$  が負の値を示すには、吸熱反応である  $E_a'$  が存在する必要がある。逆に、 $E_a'$  の影響が小さい場合には、常に  $E_a + E_a'' > E_a'$  となり、 $E_o$  は温度が上昇しても正の値を示すと考えられる。即ち、吸熱反応に関わる  $E_a'$  に関わる反応が、表現形としてみている複数の化学反応の中で、割合として小さく、無視して考えられる条件においては、たとえ温度上昇により個別の反応の活性化エネルギーが減少しても、全体の活性化エネルギーは負になることはない。従って、植物の温度応答性呼吸調節モデルにおいて、炭水化物の還元反応を意味する速度定数  $k_1'$  が関わる吸熱反応が、前駆平衡の形成に重要であることが、本研究から示唆された (図 4)。また、非発熱植物においては、吸熱反応の影響が小さいために  $k_1'$  を無視して考えられることから、非発熱植物の呼吸調節は、炭水化物の酸化と、それにより生じる電子を用いた酸素消費反応に関わる一方向性の化学反応として呼吸調節モデルを表現できると考えられる。

非発熱植物において、炭水化物の還元に対応する吸熱反応が成立しないのは、根からのスクロース (炭水化物) の供給によって呼吸を行う発熱植物と、光合成の影響がない、暗

条件で呼吸測定が行われる植物との差異が影響する可能性がある。一般に植物は、日中の明期に光化学反応を介して NADPH および ATP を産生し、次にそれらのエネルギーを用いてカルビン回路を介した炭酸固定を行い、炭水化物を生成する (Lambers *et al.*, 2008)。カルビン回路の反応はそれに関わる Rubisco の活性などが光により制御されるので (Zhang & Portis, 1999)、暗期では炭酸固定活性が低いことが知られている。従って、暗条件では、呼吸反応、即ち炭水化物の酸化を中心とした化学反応が行われ、その際炭水化物の還元 (吸熱反応) の影響は小さいと考えられる。非発熱植物においては、光合成および呼吸反応が同時に行われる条件下では、前駆平衡に基づいて、温度上昇により呼吸を介した酸素消費は減少する可能性がある。光合成の観点から考えると、恒温性発熱植物の発熱器官はいずれも花で葉緑体を持たないため、光合成を介した炭水化物の還元反応は成立しないと考えられる。一方で、熱産生が起こるのに十分な量のスクロースの供給や、または恒温性植物においては糖新生に相当する化学反応が呼吸反応と同時に成立することなどが、個体レベルでの呼吸反応の成立に関与する可能性が考えられ、これらに関与する代謝経路の包括的な理解が今後必要である。

このように、吸熱反応の存在が前駆平衡に重要であると考えられるが、一過性の発熱植物種においてはどうか。例えば、アラムマキュレータム (*Arum maculatum*) の発熱器官である付属体においては、 $\delta$ -Stage と呼ばれる生育ステージにおいて、夕方から夜にかけての数時間、急激な熱産生が観察される (James & Beevers, 1950; Meeuse, 1975; Ito *et al.*, 2011)。一過性の発熱において、 $\delta$ -Stage における呼吸速度の増大が観察されることから (James & Beevers, 1950)、呼吸速度と発熱器官温度には正の相関があることが知られてきた。また、同様に付属体が一過性の発熱を示す植物であり、アラムマキュレータムの近縁種であるアラムコンシネータム (*Arum concinatum*) (Linz *et al.*, 2010) においても、呼吸速度と付属体の温度の経時的モニタリングにより、両者に正の相関があることが判明している (Seymour *et al.*, 2009)。このように、一過性の発熱植物においては、恒温性の植物のような、温度上

昇により呼吸活性が減少する，呼吸調節メカニズムを持たないことが示されている．従って，そのような一過性の発熱現象においては，呼吸反応において負の活性化エネルギーは生じないため，非発熱植物と同様に，前駆平衡反応を示さないことが示唆される（図 4）．従って，一過性発熱植物における熱産生には，非発熱植物と同様に，吸熱反応の影響は小さいと考えられる．これまで，このような恒温性および一過性発熱植物の熱産生様式の差異に関連する分子基盤について，ミトコンドリア呼吸鎖，およびマトリクスのそれぞれに特異的な酵素群（Kakizaki *et al.*, 2012）や，または AOX のピルビン酸応答性の差異（Ito *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2013）から，考察が進められてきた．ここで，アラムマキュレータムの付属体から単離したミトコンドリアに関しては，前駆平衡を示さない NDB および複合体 II 由来のミトコンドリア呼吸の温度応答性が示されているが，AOX および COX 経路に関わらず，温度上昇による呼吸活性減少は示さないことが明らかとなっている（Cook and Cammack, 1985）．また，NDA のタンパク質レベルでの発現が低いことは，アラムマキュレータムにおいては明らかになっているものの（Kakizaki *et al.*, 2012），前駆平衡を形成する呼吸反応の関与は，一過性の発熱を示す植物において不明である．今後は，このような観点から，単離ミトコンドリア呼吸の温度応答性に関する情報を集約していくことが，恒温性に関わる分子基盤の理解に重要だと考えられる．

ここで，これらの熱産生様式の顕著な違いに，ユビキノンプールの還元レベルの違いが挙げられる．即ち，恒温性のザゼンソウにおいては，発熱期および発熱後においても，同様に還元型ユビキノンの割合が 40-60%である（Kamata *et al.*, 2009）．その一方で，一過性のアラムマキュレータムにおいては，未発熱および発熱後における還元型ユビキノンの割合が 40-60%であるのに対し，発熱期では 80-90%と，過還元状態となっている（Wagner *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 2008）．アラムマキュレータム，およびアラムコンシネータムは，発熱期における単位重量あたりの呼吸速度が発熱植物の中でも最大クラスであることが判明している（Seymour, 2010）．従って，一過性の発熱植物では，その熱産生時において，炭水化物

酸化の非常に大きなフラックスを介し、酸化型ユビキノンが全て還元型になるほどの還元力（電子）をユビキノンプールに投入し、呼吸速度を増大していると考えられる。それに対して、ザゼンソウにおいては、本研究で示した前駆平衡反応に基づいて炭水化物の酸化還元が行われることで、ユビキノンプールに供給される電子量を精密に制御し、呼吸調節を行っていると考えられる。

本研究で示した植物の恒温性に関わる呼吸の前駆平衡反応は、化学反応速度論を用いて、以下のような呼吸速度を表す反応速度式として表すことができる（図 5a）。

$$v = \frac{k_1}{k_1'} \cdot k_2 \cdot \frac{[RH_2]}{[R]} \cdot [O_2]^{\frac{1}{2}}$$

ここで、ザゼンソウにおいて、酸素の供給は呼吸調節における律速段階にならないことが示唆されているので（Seymour *et al.*, 2015）、酸素濃度の項は定数として無視できる。従って、当該式は、呼吸速度が発熱反応に関わる速度定数  $k_1$  および  $k_2$ 、ならびに炭水化物  $[RH_2]$  の濃度に依存して増大することを意味している。さらに、呼吸速度が吸熱反応に関わる  $k_1'$ 、および還元レベルの低い炭水化物  $[R]$  の濃度に依存して減少することを意味する。また、この反応式は以下のように平衡定数  $K$  を用いて表すこともできる。

$$v = K \cdot \frac{[RH_2]}{[R]} \cdot [O_2]^{\frac{1}{2}}$$

これらのパラメータを反応速度に関与する因子として考えると、反応速度と平衡定数  $K$ 、および反応速度と炭水化物の酸化型、還元型の濃度比  $\frac{[RH_2]}{[R]}$  の間の関係式について、それ以外のパラメータを定数と近似することで、比例関係として表すことができる（図 5b）。即ち、 $K$  および  $\frac{[RH_2]}{[R]}$  の値が増加すると、呼吸反応速度も増加するので、呼吸速度の温度応答は、 $K$  および  $\frac{[RH_2]}{[R]}$  と一致すると考えられる。ここで、本研究において、呼吸速度の対数値と、肉穂花序温度は二次関数として表せることが修正アレニウスモデルの解析より判明したことから（第 3 章）、温度と  $\ln K$  および  $\ln \frac{[RH_2]}{[R]}$  も同様に二次曲線として数学的に理解することが

できる (図 5c). このような方法により, 各パラメータが呼吸調節モデルに与える影響の考察が可能となる. 従って, 図 5c より, 温度上昇により  $\ln K$  および  $\ln \frac{[RH_2]}{[R]}$  が増大し, 最大呼吸速度を示す極大値を取る温度で,  $\ln K$  および  $\ln \frac{[RH_2]}{[R]}$  は最大の値を示す. その温度よりも温度が上昇すると,  $\ln K$  および  $\ln \frac{[RH_2]}{[R]}$  は減少する. このような  $\ln K$  および  $\ln \frac{[RH_2]}{[R]}$  の減少がみられるのが, 恒温性を示す呼吸調節範囲に相当する. 全ての速度定数が温度上昇により増大する場合において, そのような温度域では, 吸熱反応に関わる速度定数  $k_1'$  の値の温度上昇による増加率が, 発熱反応に関わる速度定数  $k_1$  および  $k_2$  よりも大きく,  $k_1'$  の影響が大きい場合, ならびに,  $[R]$  が  $[RH_2]$  より増大する場合 (即ち  $[RH_2]$  が減少する場合) において, 呼吸活性が減少することが考えられる. また, 酵素の温度特性により, 発熱反応に関わる速度定数  $k_1$  および  $k_2$  が減少する場合にも, 温度上昇により呼吸活性が減少する. ここで, 本研究においては, 二次関数が極大値を取る温度, 即ち最大呼吸速度を示す温度は, ザゼンソウにおいては  $15^\circ\text{C}$  であり, それは個体間で等しいことが明らかとなった (第 3 章). 従って,  $K$  と  $\frac{[RH_2]}{[R]}$  のパラメータのうち, 植物の個体差に影響しないのは, 前駆平衡を形成する酵素活性の温度応答性が関与する, 平衡定数  $K$  である. 従って, **Switching temperature** の決定には, 前駆平衡に関わる酵素の温度特性が関与すると考えられる.

このような平衡定数  $K$  を構成する因子群は, 非常に多岐にわたり, かつそれらはピラミッドのように影響力の違いをもつと考えられる (図 6). 影響の大きい因子としては, 呼吸調節モデルの速度定数  $k_1$  および  $k_1'$  に相当する, 呼吸基質の酸化還元に関与する酵素, ならびに酸素消費に関わる AOX および COX が挙げられる. このような前駆平衡に直接的に関わる AOX や TCA 回路における種々の酵素については, チオレドキシンを含む酸化還元酵素を介して活性制御を受けることが知られている (Moore *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2013; Nunes-Nesi *et al.*, 2013; Yoshida & Hisabori, 2014; Daloso *et al.*, 2015). これらの酵素が活性を有する酸化還元状態にあることが重要だとすれば, 炭水化物の酸化還元に関与しなく

とも、それを維持するための還元力を供給する酵素や、前駆平衡に関わる酵素のチオレドキシンを例とした酸化還元酵素は、前駆平衡反応において重要だと考えられる。ここで、単離ミトコンドリアを用いた解析より、ザゼンソウにおいては、イソクエン酸と  $\text{NADP}^+$  から、2-OG と  $\text{NADPH}$  を産生する ICDH が  $k'$  に相当する、吸熱反応に関わる反応の一つであることが明らかとなった。ICDH は  $\text{NAD}^+$  型と  $\text{NADP}^+$  型に分類されるが、 $\text{NAD}^+$  型はミトコンドリアのみに局在しており、TCA 回路のフラックスの増大や電子伝達系への還元力供給の役割を有する (Igamberdiev *et al.*, 2003; Leterrier *et al.*, 2016)。一方で、 $\text{NADP}^+$ -ICDH は、植物においては細胞質、ミトコンドリア、葉緑体、ペルオキシソームにおける局在が明らかになっている (Leterrier *et al.*, 2016)。その多様な局在は、チオレドキシンの還元のための基質を供給することで (Noctor *et al.*, 2012)、各オルガネラの酸化還元レベルのホメオスタシスに関連するためだと考えられる。一般に、植物の ICDH は  $\text{NAD}^+$  型の方が高い活性を有するが (Igamberdiev *et al.*, 2003)、ザゼンソウにおいては、 $\text{NADP}^+$ -ICDH が  $\text{NAD}^+$ -ICDH よりも高い活性を有していた。炭水化物の酸化反応のフラックスが大きいことが考えられるザゼンソウにおいては、生体内のレドックスバランスを還元状態に維持することで、ミトコンドリア内の前述した酵素群の活性を維持する必要がある。従って、ザゼンソウにおいて、吸熱反応に関わる還元力の供給が重要であることを示唆している。細胞増殖の過程で生じるミトコンドリア由来 ROS の除去のため、大きな還元力が必要となるガン細胞においては、細胞質に局在する IDH1、ミトコンドリアに局在する IDH2 の 2 種類の  $\text{NADP}^+$ -ICDH の両方が機能し、IDH1 はペントースリン酸回路から供給される  $\text{NADPH}$  を用いてグルタミン由来の 2-OG を isocitrate に還元し、IDH2 はその isocitrate を用いてミトコンドリアにおいて  $\text{NADPH}$  を産生する (Jiang *et al.*, 2016)。このように、還元力の持続的な供給には、このような細胞質およびミトコンドリアの間の  $\text{NADPH}$  の化学平衡が関与することが示唆されている。従って、呼吸反応における前駆平衡には、生体内レドックスレベルの維持に関わる酸化還元反応が重要であると考えられる。

また、炭水化物の酸化還元レベルの比  $\frac{[RH_2]}{[R]}$  に影響するような、温度変化を受けてすぐにこれらの濃度差を形成するような因子は、化学平衡を動かす大きな要因となる。例えば、恒温性を示すドラゴンリリーに関して行ったメタボローム解析からは、一次代謝に関わる代謝産物以外にも多くのアミノ酸や、または AMP が有意かつ著しい増減を示すことが判明している (Ito *et al.*, 2013)。AMP は解糖系のフィードバック制御に関与するほか (Rolland *et al.*, 2006)、近年、哺乳類の AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の植物におけるホモログが、同様に細胞内のエネルギー要求性の感知を通じたタンパク質合成の制御に関与することが示唆されている (Nukarinen *et al.*, 2016)。従って、このような温度変動による代謝産物量の変動に関係する酵素や、代謝産物のエネルギーレベルを大きく変化させる代謝反応を担う酵素などが、化学平衡の濃度勾配の形成を通じた前駆平衡の制御に重要であると考えられる。

このような植物の個別の代謝産物量は、特に野生植物であるドラゴンリリーを用いた場合、大きくばらつく傾向があることが判明している (Ito *et al.*, 2013)。従って、前駆平衡における炭水化物の酸化還元レベルの比  $\frac{[RH_2]}{[R]}$  は、個体差が大きい可能性がある。ここで、本研究において、組織由来の呼吸反応の活性化エネルギー  $E_0$  の解析にて差異が生じたのは、温度に対する  $E_0$  の傾きを示す、温度感受性  $\delta$  である (第 3 章)。従って、個別の植物体における基質量を反映する  $\frac{[RH_2]}{[R]}$  が、温度感受性に影響するパラメータであることが示唆される。

複数の化学反応に関わる呼吸反応において、最大活性を示す温度 Switching temperature が、同一の植物種間で一致することは、興味深い現象である。その生理的な意義は、恒温性の ON/OFF となる温度を植物における必須の仕組みとして保存する点にあると考えられるが、このような温度依存性を決定する具体的な分子基盤については不明である。それを明らかにするには、単離ミトコンドリアを用いた、*in vitro* における前駆平衡の再構成を用いた実験系で、その関与が想定される個別の化学反応の速度定数を決定し、前述の反応速度式を

基に解析することが必要と考えられる。少なくとも、本研究においては、先の呼吸基質の酸化還元に関わる  $k_1$  および  $k_1'$  が等しいが、酸素消費反応に関わる  $k_2$  (AOX および COX) が異なる前駆平衡の *in vitro* における再構成系で、最大呼吸速度を示す温度が異なることが示されている (第 3 章)。このことは、前駆平衡反応においては、速度定数  $k_2$  が関わる酸素消費反応は、基質 (電子) 濃度に完全に依存しているわけではないことを示唆している。電子の移動速度などはマーカス理論を基に、通常の化学反応速度とは異なる挙動を示すことも知られている (Marcus & Sutin, 1985) ことから、物理化学分野における詳細な考察も興味深いと考えられる。

また、子孫を残す生存戦略の一つとして関連づけられている、約 23 °C というザゼンソウの体温セットポイントが、どのようなメカニズムにより決定されるのかも、同様に重要な問いである。恒温性メカニズムに関する理解が進む哺乳類においては、皮膚表面のセンサーで感知する環境温度や、深部体温の温度センサーの閾値が異なることから、体温のセットポイントは単一でないことが示唆されている (Kanosue *et al.*, 2010)。従って、体温調節中枢で統合される温度情報に基づき、ふるえ熱産生、非ふるえ熱産生などの適切な体温調節方法が選択され、実行された結果、ある一定の体温を維持できると考えられる。このような体温のセットポイントの決定に関与する因子の一つとして、これまでナルディライジン (N-arginine dibasic convertase: NRDC) が同定されており、この因子を欠損させたマウスにおいては、室温で野生型より体温が 1.5 °C 低下することが明らかになっている (Hiraoka *et al.*, 2014)。また、そのマウスは寒冷環境では体温が維持できなくなることから、NRDC は中枢性体温セットポイントの制御に加えて、UCP1 の転写制御を通じた非ふるえ熱産生に関与することが明らかとなるとともに、皮膚血管による熱放散にも関与することが示唆されている。NRDC はこのように恒温性メカニズムの様々な部分に関与しているが、室温でも 1.5 °C 低いセットポイントで体温自体は維持されることから、他の因子の存在も示唆される。

ザゼンソウにおいては、体温調節中枢と熱産生因子に相当するのが呼吸に関わる前駆平衡反応である。即ち、温度変化の感知は、前駆平衡を構成する、発熱反応と吸熱反応に関わる酵素群によって行われ、それに応じて化学平衡がシフトすることで、呼吸調節（体温調節）が行われると考えられる。この時、発熱期における呼吸基質スクロースの供給に応じて、基底の呼吸活性というものが存在し、それにより産生される熱量と、平均的な外気温による熱損失の結果が約 23°C という表現型としてみられる可能性が考えられる。その時、外気温変動が起きた場合は、ルシャトリエの法則に基づき、反応系の変化を妨げる方向に化学平衡のシフトを約 1 時間周期で繰り返していく、このようなネガティブフィードバック制御が繰り返されることで、23°C に維持されることが考えられる。

以上本研究より、恒温性を示す植物の温度応答性呼吸調節メカニズムには、発熱反応および吸熱反応から構成される前駆平衡反応が密接に関与することが明らかとなった。これまで、恒温性発熱植物の熱産生に関与する、AOX および UCP, NDA, NDB を含む種々の酵素や部分的な代謝経路が明らかになってきたが、いずれも非発熱植物におけるそれらの過剰発現体が熱を産生することはないため、それらは熱産生の必要条件であり、十分条件ではないことが考えられる。従って、植物の恒温性には、呼吸基質の供給ならびにその酸化還元に基づく酸素消費に向けた還元力の供給が重要である、という本研究で得られた新たな視点は、植物の呼吸調節メカニズムの理解を拡大させるものであり、生物の化学平衡に基づく温度感知・応答機構という、新たな研究フィールドを切り拓くと考えられる。今後は、本モデルの分子基盤に関するさらなる実証に基づく検討が行われることにより、植物の恒温性を含む生物のホメオスタシスがより深く理解されるものと考えられる。

## 引用文献

- Belousov, B. P. (1958) Periodically acting reaction and its mechanism. *Collection of Abstracts on Radiation Medicine*: 145–147.
- Chaffee, R. and Roberts, J. (1971) Temperature acclimation in birds and mammals. *Annu. Rev. Physiol.* **33**: 155-202.
- Caterina, M. J. (2007) Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**: 64-76.
- Cook, N. D. and Cammack, R. (1985) Effects of Temperature on Electron Transport in *Arum maculatum* Mitochondria. *Plant Physiol.* **79**: 332-335.
- Daloso, D. M., Müller, K., Obata, T., Florian, A., Tohge, T., Bottcher, A., Riondet, C., Bariat, L., Carrari, F., Nunes-Nesi, A., Buchanan, B. B., Reichheld, J.-P., Araújo, W. L. and Fernie, A. R. (2015) Thioredoxin, a master regulator of the tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 1392-1400.
- Evans, N. H., McAinsh, M. R. and Hetherington, A. M. (2001) Calcium oscillations in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 415-420.
- Hiraoka, Y., Matsuoka, T., Ohno, M., Nakamura, K., Saijo, S., Matsumura, S., Nishi, K., Sakamoto, J., Chen, P.-M., Inoue, K., Fushiki, T., Kita, T., Kimura, T. and Nishi, E. (2014) Critical roles of nardilysin in the maintenance of body temperature homeostasis. *Nat. Comm.* **5**: 3224.
- Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L. and Baltimore, D. (2002) The I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B signaling module: Temporal control and selective gene activation. *Science* **298**: 1241-1245.
- Igamberdiev, A. U. and Gardstrom, P. (2003) Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **1606**: 117-125.
- Ito, K., Ito, T., Onda, Y. and Uemura, M. (2004) Temperature-triggered periodical thermogenic oscillations in skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Plant Cell Physiol.* **45**: 257-264.

- Ito, K., Ogata, T., Kakizaki, Y., Elliott, C., Albury, M. S. and Moore, A. L. (2011) Identification of a gene for pyruvate-insensitive mitochondrial alternative oxidase expressed in the thermogenic appendices in *Arum maculatum*. *Plant Physiol.* **157**: 1721-1732.
- Ito, K., Onda, Y., Sato, T., Abe, Y. and Uemura, M. (2003) Structural requirements for the perception of ambient temperature signals in homeothermic heat production of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Plant Cell Environ.* **26**: 783-788.
- Ito, K., Takahashi, H., Umekawa, Y., Imamura, T., Kawasaki, S., Ogata, T., Kakizaki, Y. and Seymour, R. (2013) Metabolite profiling reveals tissue- and temperature-specific metabolomic responses in thermoregulatory male florets of *Dracunculus vulgaris* (Araceae). *Metabolomics* **9**: 919-930.
- Ito, T. and Ito, K. (2005) Nonlinear dynamics of homeothermic temperature control in skunk cabbage, *Symplocarpus foetidus*. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **72**: 051909.
- James, W. O. and Beevers, H. (1950) The respiration of *Arum* spadix. A rapid respiration, resistant to cyanide. *New Phytol.* **49**: 353-374.
- Jiang, L., Shestov, A. A., Swain, P., Yang, C., Parker, S. J., Wang, Q. A., Terada, L. S., Adams, N. D., McCabe, M. T., Pietrak, B., Schmidt, S., Metallo, C. M., Dranka, B. P., Schwartz, B. and DeBerardinis, R. J. (2016) Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature* **532**: 255-258.
- Kakizaki, Y., Moore, Anthony L. and Ito, K. (2012). Different molecular bases underlie the mitochondrial respiratory activity in the homeothermic spadices of *Symplocarpus renifolius* and the transiently thermogenic appendices of *Arum maculatum*. *Biochem. J.* **445**: 237-246.
- Kamata, T., Matsukawa, K., Kakizaki, Y. and Ito, K. (2009) In vivo redox state of the ubiquinone pool in the spadices of the thermogenic skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. *J. Plant Res.* **122**: 645-649.
- Kanosue, K., Crawshaw, L. I., Nagashima, K. and Yoda, T. (2010) Concepts to utilize in describing thermoregulation and neurophysiological evidence for how the system works. *Eur. J. Appl. Physiol.* **109**: 5-11.

Kholodenko, B. N. (2000) Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1583-1588.

Knutson, R. M. (1974) Heat production and temperature regulation in eastern skunk cabbage. *Science* **186**: 746-747.

Kruse, J. and Adams, M. A. (2008) Three parameters comprehensively describe the temperature response of respiratory oxygen reduction. *Plant Cell Environ.* **31**: 954-967.

Kruse, J., Turnbull, T. L. and Adams, M. A. (2012) Disentangling respiratory acclimation and adaptation to growth temperature by *eucalyptus*. *New Phytol.* **195**: 149-163.

Lambers, H., Chapin, F. S. and Pons, T. L. (2008). Photosynthesis. Plant physiological ecology. *New York, NY, Springer New York*: 11-99.

Leterrier, M., Barroso, J. B., Valderrama, R., Begara-Morales, J. C., Sanchez-Calvo, B., Chaki, M., Luque, F., Vinegla, B., Palma, J. M. and Corpas, F. J. (2016) Peroxisomal NADP-isocitrate dehydrogenase is required for Arabidopsis stomatal movement. *Protoplasma* **253**: 403-415.

Linz, J., Stökl, J., Urru, I., Krügel, T., Stensmyr, M. C. and Hansson, B. S. (2010) Molecular phylogeny of the genus *Arum* (Araceae) inferred from multi-locus sequence data and AFLPs. *Taxon* **59**: 405-415.

Marcus, R. A. and Sutin, N. (1985) Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim. Biophys. Acta* **811**: 265-322.

Meeuse, B. J. D. (1975) Thermogenic respiration in aroids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**: 117-126.

Moore, A. L., Shiba, T., Young, L., Harada, S., Kita, K. and Ito, K. (2013) Unraveling the heater: New insights into the structure of the alternative oxidase. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 637-663.

Morrison, S. F. and Nakamura, K. (2011) Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci (Landmark Ed)* **16**: 74-104.

- Morrison, S. F., Nakamura K. and Madden C. J. (2008) Central control of thermogenesis in mammals. *Exp. Physiol.* **93**: 773-797.
- Nakamura, K. and Morrison S. F. (2011) Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. *J. Physiol.* **589**: 3641-3658.
- Nguyen, K. D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y. P. S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R. M. and Chawla, A. (2011) Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* **480**: 104-108.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G. and Foyer, C. H. (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* **35**: 454-484.
- Noguchi, K., Yamori, W., Hikosaka, K. and Terashima, I. (2015) Homeostasis of the temperature sensitivity of respiration over a range of growth temperatures indicated by a modified Arrhenius model. *New Phytol.* **207**: 34-42.
- Nukarinen, E., Nägele, T., Pedrotti, L., Wurzinger, B., Mair, A., Landgraf, R., Börnke, F., Hanson, J., Teige, M., Baena-Gonzalez, E., Dröge-Laser, W. and Weckwerth, W. (2016) Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Sci. Rep.* **6**: 31697.
- Nunes-Nesi, A., Araujo, W. L., Obata, T. and Fernie, A. R. (2013) Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**: 335-343.
- Reppert, S. M. and Weaver, D. R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**: 935-941.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 675-709.
- Seymour, R. S., Lindshau, G. and Ito, K. (2010) Thermal clamping of temperature-regulating flowers reveals the precision and limits of the biochemical regulatory mechanism. *Planta* **231**: 1291-1300.

Seymour, R. S. (2001) Biophysics and physiology of temperature regulation in thermogenic flowers. *Biosci. Rep.* **21**: 223-236.

Seymour, R. S. (2004) Dynamics and precision of thermoregulatory responses of eastern skunk cabbage *Symplocarpus foetidus*. *Plant Cell Environ.* **27**: 1014-1022.

Seymour, R. S. (2010) Scaling of heat production by thermogenic flowers: limits to floral size and maximum rate of respiration. *Plant Cell Environ.* **33**: 1474-1485.

Seymour, R. S. and Blaylock, A. J. (1999) Switching off the heater: influence of ambient temperature on thermoregulation by eastern skunk cabbage *Symplocarpus foetidus*. *J. Exp. Bot.* **50**: 1525-1532.

Seymour, R. S., Gibernau, M. and Pirintsos, S. A. (2009) Thermogenesis of three species of *Arum* from Crete. *Plant Cell Environ.* **32**: 1467-1476.

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

Seymour, R. S., Schultze-Motel, P. and Lamprecht, I. (1998) Heat production by sacred lotus flowers depends on ambient temperature, not light cycle. *J. Exp. Bot.* **49**: 1213-1217.

Seymour, R. S., Schultze-Motel, P. (1998) Physiological temperature regulation by flowers of the sacred lotus. *Philos. Trans..Royal Soci. B: Biol. Sci.* **353**: 935-943.

Shankaran, H., Ippolito, D. L., Chrisler, W. B., Resat, H., Bollinger, N., Opresko, L. K. and Wiley, H. S. (2009) Rapid and sustained nuclear–cytoplasmic ERK oscillations induced by epidermal growth factor. *Mol. Syst. Biol.* **5**: 332.

Shearman, L. P., Sriram, S., Weaver, D. R., Maywood, E. S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C. C., van der, G. T. J., Horst, Hastings, M. H. and Reppert, S. M. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**: 1013-1019.

Takahashi, K., Ito, T., Onda, Y., Endo, T., Chiba, S., Ito, K. and Osada, H. (2007) Modeling of the thermoregulation system in the skunk cabbage: *Symplocarpus foetidus*. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **76**: 031918.

Wagner, A. M., Krab, K., Wagner, M. J. and Moore, A. L. (2008) Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: the role of the alternative oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**: 993-1000.

Wagner, A. M., Wagner, M. J. and Moore, A. L. (1998) In vivo ubiquinone reduction levels during thermogenesis in Araceae. *Plant Physiol.* **117**: 1501-1506.

Yoshida, K. and Hisabori, T. (2014) Mitochondrial isocitrate dehydrogenase is inactivated upon oxidation and reactivated by thioredoxin-dependent reduction in *Arabidopsis*. *Front. Environ. Sci.* **2**: 38

Yoshida, K., Noguchi K., Motohashi, K. and Hisabori, T. (2013) Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria. *Plant Cell Physiol.* **54**: 875-892.

Zhang, N. and Portis, A. R. (1999) Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 9438-9443.

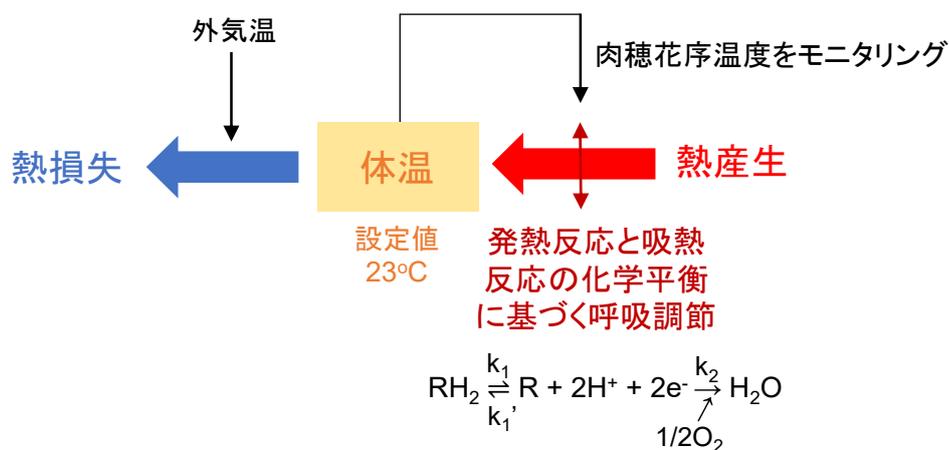


図 1. ザゼンソウにおける熱収支および体温調節の概要.

ザゼンソウの体温は、外気温が影響する肉穂花序からの熱損失、および肉穂花序における熱産生の熱収支により決定される。時間経過を経てもザゼンソウの体温は一定に保たれる場合、その熱収支の釣り合いから、ザゼンソウの体温は定常状態になっていると考えられる。ザゼンソウは、体温（肉穂花序温度）に応じて熱産生量を制御することで、体温を約 23 °C に自律的に調節している。その恒温性メカニズムは呼吸調節により達成されることが明らかであったが (Knutson 1974; Seymour & Blaylock 1999; Seymour 2004, Seymour *et al.*, 2010), 本研究においては、その呼吸調節が発熱反応と吸熱反応の化学平衡に基づいて行われることを明らかにした。このとき、肉穂花序における温度センサー兼呼吸調節因子としての役割を果たすのが、呼吸反応の前駆平衡反応における化学平衡に相当すると考えられる。

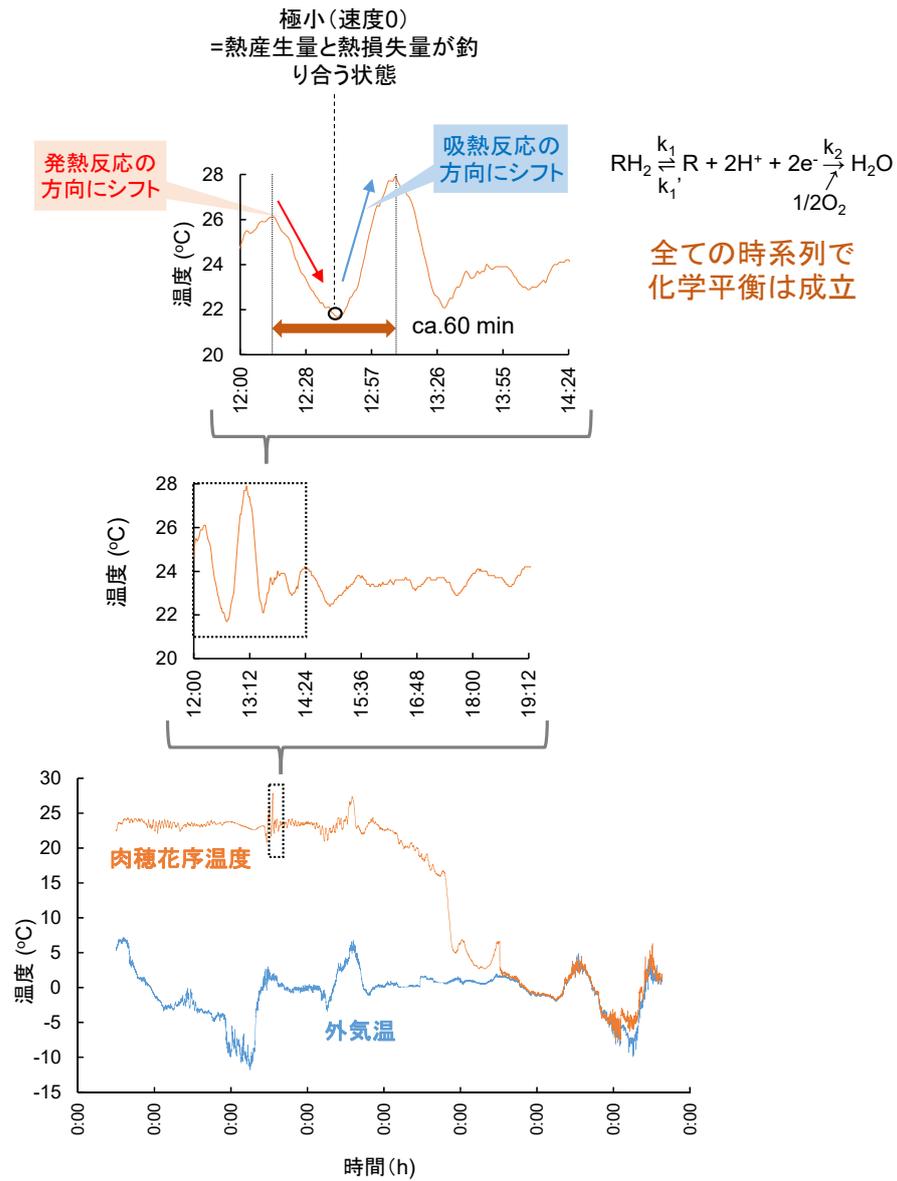


図 2. ザゼンソウの体温調節に関わる体温振動。

ザゼンソウの肉穂花序温度と外気温の時系列データ。ここでは、外気温上昇による熱損失量の低下が引き起こした体温上昇に対し、体温調節がなされる例を示している。体温調節には、一時間の周期的な体温振動が伴う。肉穂花序温度が低下すると、呼吸反応に関する前駆平衡が発熱反応の方向にシフトする。その熱産生量と熱損失量が釣り合う体温を経て、今度は体温セットポイントとのずれを是正するように、化学平衡は吸熱反応側にシフトする。外乱となる外気温変動の影響が小さくなると、呼吸調節反応も定常状態となる（発熱反応、吸熱反応が平衡に保たれる）ので、体温振動は小さくなる。前提として、呼吸反応による熱産生が肉穂花序温度を変化させるには、タイムラグが伴う。

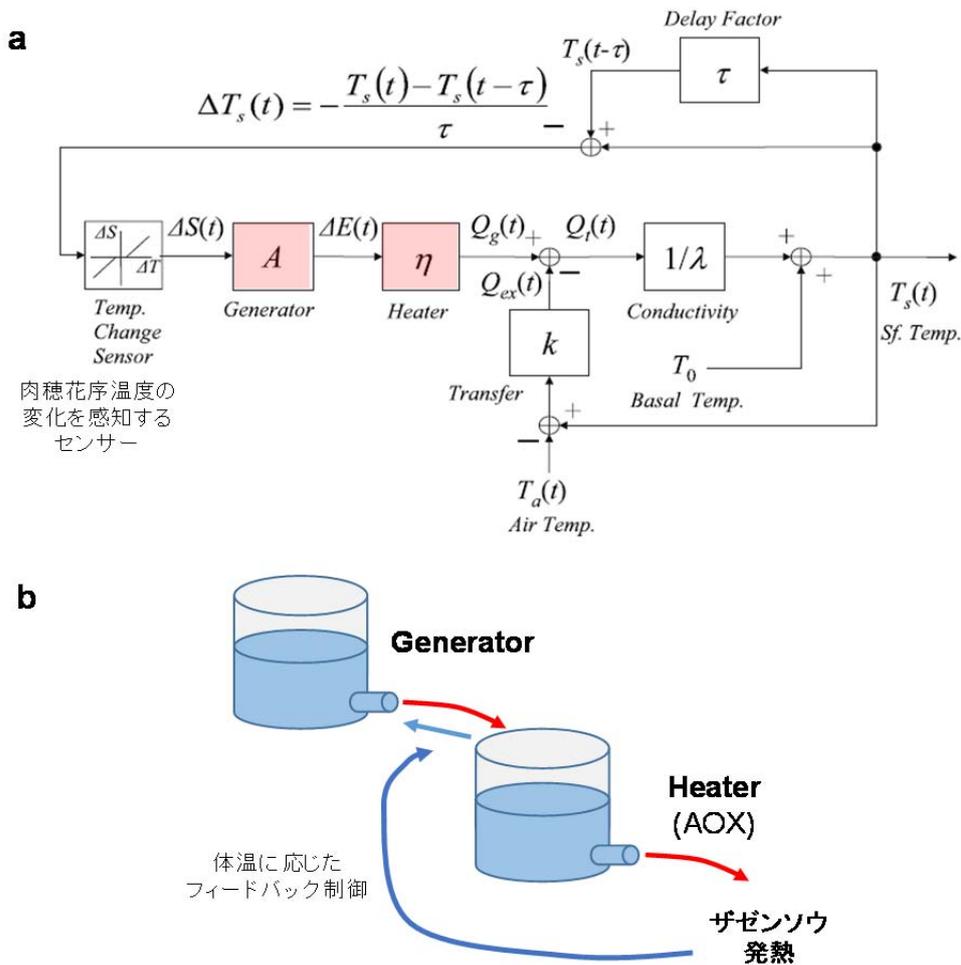


図 3. ザゼンソウ恒温性を表す工学的モデル。

**a.** ザゼンソウの肉穂花序で行われる体温調節の工学的モデル。Takahashi et al., 2007 における図を一部改変して引用した。肉穂花序温度の変化を感知し、その情報を生化学的なエネルギーの生成に関する Generator に伝える。その後エネルギーは Heater を通して熱産生が行われる。外気温による熱損失量と合わせて、最終的な熱量は、熱伝達率に応じて最終的にある時点  $t$  における肉穂花序温度となる。 $\Delta T_s$ : ある時点  $t$  における肉穂花序温度変化,  $\tau$ : 遅延時間,  $T_s(t-\tau)$ :  $\tau$  時間前の肉穂花序温度,  $\Delta S$ :  $T_s$  によるネガティブフィードバックシグナル,  $\Delta E$ : 生化学的エネルギー,  $Q_g$ : 熱産生量,  $\eta$ :  $\Delta E$  および  $Q_g$  のエネルギー変換効率,  $Q_{ex}$ : 外気温と肉穂花序間で起こる対流,  $k$ : 熱伝達率,  $Q_i$ : 全体の熱量,  $\lambda$ : 熱伝達率,  $T_0$ : 基底温度,  $T_a$ : 外気温。 **b.** ザゼンソウ恒温性の工学的モデルの模式図。Generator の中には、炭水化物に相当する化学エネルギーが入っていると考えられる。炭水化物の酸化還元により生じた電子は Heater の基質となり、電子量に応じて熱産生が行われる。本モデルでは、得られた電子を用いて熱散逸的に酸素消費を行う AOX が、Heater に相当すると考えられる。

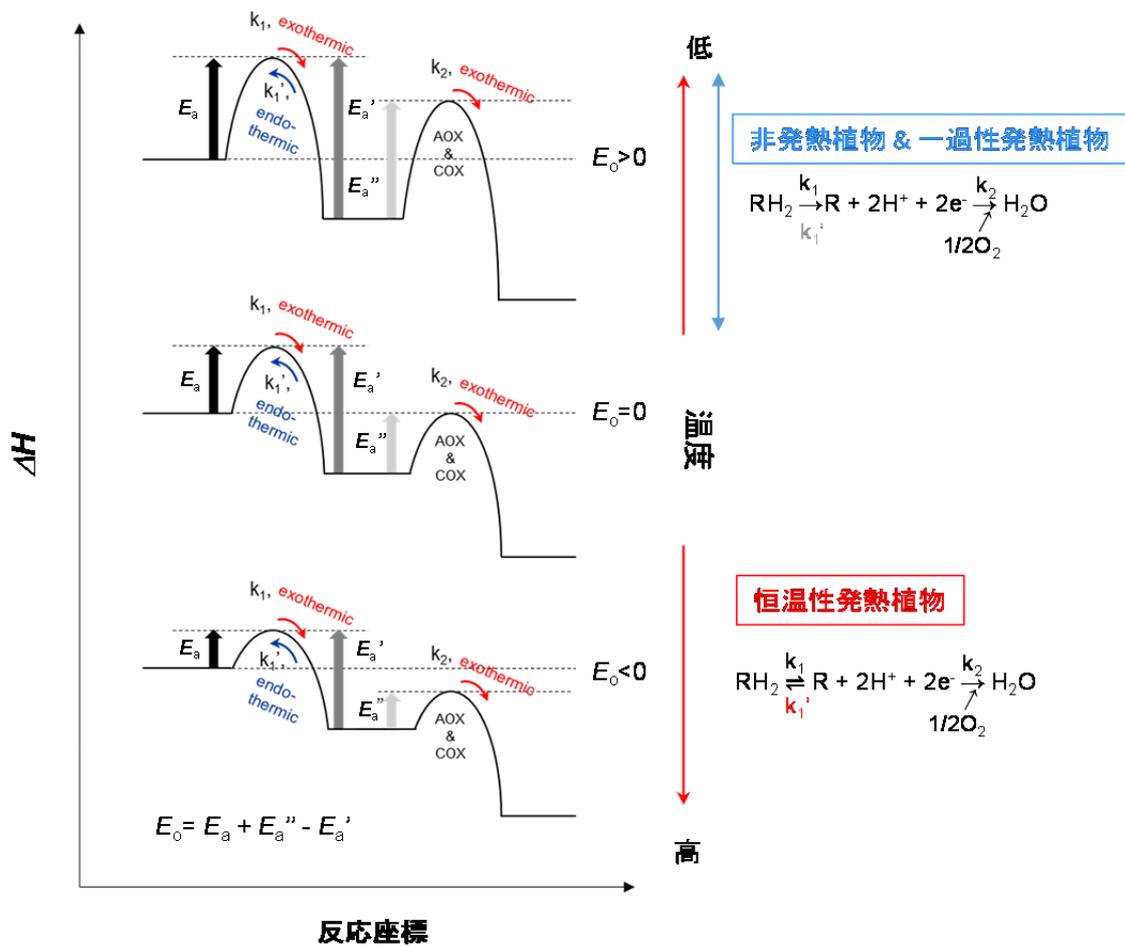
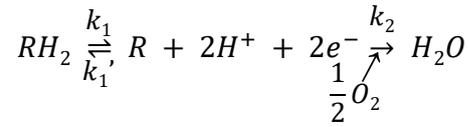


図 4. 前駆平衡に基づく生物の温度応答性呼吸調節モデル.

このモデルは、先行する平衡反応（速度定数  $k_1$  および  $k_1'$ ）、およびその後のミトコンドリア呼吸鎖末端オキシダーゼ（AOX & COX）を介した酸素消費反応（ $k_2$ ）より構成される。モデルにおいて示されるそれぞれの化学反応の活性化エネルギーは以下のように示すことができる：まず、速度定数  $k_1$  ( $\text{RH}_2 \rightarrow \text{R} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ ) および  $k_2$  ( $1/2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ ) が関わる発熱反応の活性化エネルギーは、それぞれ  $E_a$  および  $E_a''$  として表される。また、 $k_1'$  ( $\text{R} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{RH}_2$ ) による吸熱反応の活性化エネルギーは、 $E_a'$  として表される。恒温性発熱植物では、呼吸反応全体の活性化エネルギーは負になる。即ち、温度上昇により  $k_1'$  の影響が大きくなり、化学平衡が左にシフトすることで、温度上昇により呼吸速度は減少する。非発熱植物や、一過性の発熱植物においては、吸熱反応の影響が小さいため、呼吸反応においては発熱反応が主に行われることから、負の活性化エネルギーが生じることはない。

**a**



$RH_2 \rightleftharpoons R + 2H^+ + 2e^-$  より,

$$\frac{k_1}{k_1'} = \frac{[R][H^+]^2[e^-]^2}{[RH_2]}$$

$$[H^+]^2[e^-]^2 = \frac{k_1}{k_1'} \cdot \frac{[RH_2]}{[R]}$$

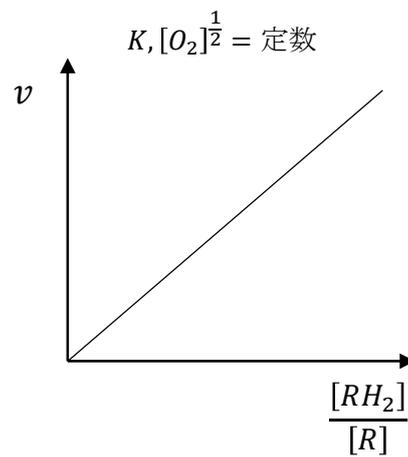
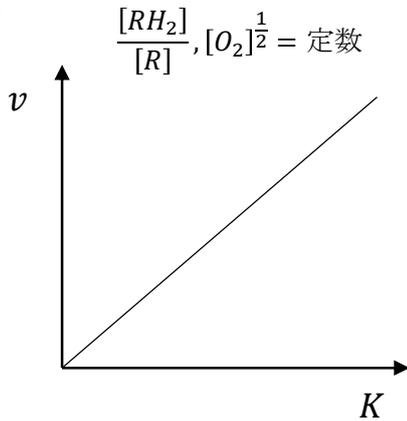
したがって、酸素消費速度  $v$  は,

$$v = k_2[H^+]^2[e^-]^2[O_2]^{\frac{1}{2}}$$

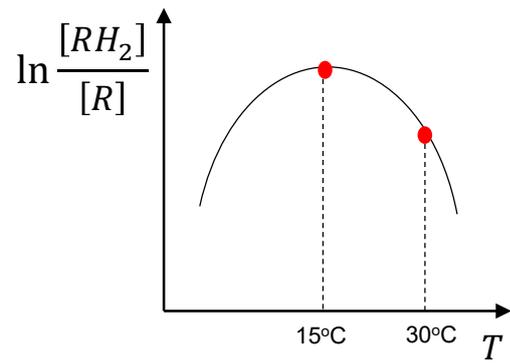
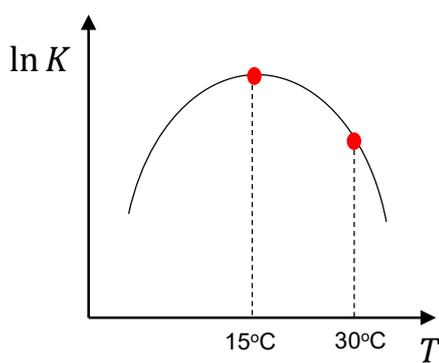
$$= \frac{k_1}{k_1'} \cdot k_2 \cdot \frac{[RH_2]}{[R]} \cdot [O_2]^{\frac{1}{2}}$$

$$\therefore v = K \cdot \frac{[RH_2]}{[R]} \cdot [O_2]^{\frac{1}{2}}$$

**b**



**c**



$K (= \frac{k_1 \cdot k_2}{k_1'})$  は植物体によって変わらない

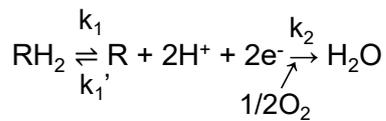
$\frac{[RH_2]}{[R]}$  は植物体によって異なる

図 5. 植物における呼吸の前駆平衡モデルに関する反応速度論的説明.

図の説明文は、次のページに記す.

**図 5. 植物における呼吸の前駆平衡モデルに関する反応速度論的説明.**

**a.** 植物の呼吸反応モデルから導出した, 呼吸速度を示す反応速度式. **b. a** の反応速度式における速度と平衡定数 $K$ , ならびに速度と炭水化物の酸化還元レベルの濃度比 $\frac{[RH_2]}{[R]}$ の関係式. 酸素濃度項 ( $[O_2]$ ) について, 酸素供給量は呼吸反応の律速にはならないことが判明しているので (Seymour *et al.*, 2015), それを定数とした.  $K$ および $\frac{[RH_2]}{[R]}$ いずれも, 反応速度との比例関係として表すことができる. **c.** 温度と平衡定数 $K$ , および炭水化物の酸化還元レベルの濃度比 $\frac{[RH_2]}{[R]}$ との関係式. 温度と呼吸速度の対数値は二次関数として表すことができるので, 温度とこれらのパラメータも同様に二次関数として関係付けることが可能である. 二次関数の極大値 (最大呼吸速度) が  $15^\circ\text{C}$  であることはザゼンソウの植物体において不変である一方,  $\frac{[RH_2]}{[R]}$ は個体差が生じうる. 従って, 本数式より, 少なくとも, ザゼンソウの **Switching temperature** の決定には  $K$  が関与すると考えられる.



$$v = \frac{k_1}{k_1'} \cdot k_2 \cdot \frac{[RH_2]}{[R]} \cdot [O_2]^{\frac{1}{2}}$$

$$= K \cdot \frac{[RH_2]}{[R]} \cdot [O_2]^{\frac{1}{2}}$$

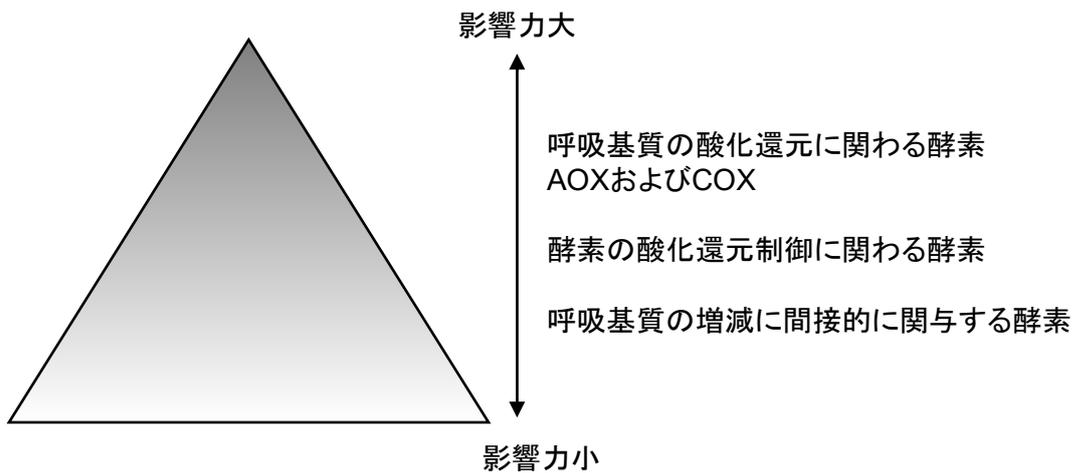


図 6. 平衡定数  $K$  を構成すると推定される因子群.

呼吸反応の前駆平衡モデルにおいては、平衡定数  $K$  が温度応答性に重要である可能性が示唆された。  $K$  に関与するものには、呼吸基質の酸化還元に関わる酵素や AOX および COX に関する酵素など影響力が大きいものから、これらの酵素の酸化還元に関与する酵素、または呼吸基質の増減に間接的に関与する酵素などが関連すると考えられる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり，主指導教員として直接ご指導頂いた伊藤菊一教授に深く感謝します。研究室に所属して以来，根気強く，かつ熱意を持って指導を頂き，迷ったときはその道筋を示すとともに，いつも温かく励まして頂きました。その研究哲学を身近で学び，また様々な経験をさせて頂いたことは，私の人生のうえで大きな糧になりました。

いつもの確な助言およびご指導を頂いた岩手生物工学研究センターの高橋秀行博士，山形大学の三橋渉教授に深く御礼申し上げます。

発熱植物の呼吸データの提供に加え，共同研究の機会を与えて頂くとともに，いつも示唆に富む助言を頂いた，アデレード大学の Roger Seymour 教授に深く感謝いたします。

植物組織のサンプリングにご協力を頂いた，瀬川強氏に深く感謝いたします。

生化学的解析を数理的解析に結び付けて行うにあたり，様々なご指導，ご助言を頂いた岩手大学の鳥巢諒名誉教授，川崎秀二准教授，長田洋教授に感謝致します。

また，博士課程の同期である Md. Abu Sayed 氏をはじめ，実験協力や，議論を通じて研究の発展に多くの協力を頂いた，研究室に在籍されていた方々に心から感謝致します。

最後に，本研究は，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に所属する方々をはじめ，多くの方々のご指導や助言，ご協力により行われました。博士課程にお

ける研究生生活において，沢山の得がたい経験をさせて頂くことができ，それを支えて頂いた皆様に心から感謝致します。