

# 植物における温度受容体の探索

## Searching for thermoreceptors in plants

(植物生理学会推薦)

代表研究者 京都大学

遠藤 求

Kyoto University

Motomu ENDO

Light and temperature are two major environmental signals for plants. Plants sense these signals through photo- and thermos-receptors and regulates physiological responses. Instead of deeper understanding of photoreceptors and its signaling, thermoreceptor and signal transduction mechanisms are largely unknown. Here, we describe how much temperature differences can be sensed by plant circadian clocks. Plants are grown under various temperature cycles, and measured circadian phase of a clock gene, CCA1. When plants were entrained in 19°C 12hours, 25°C 12hours temperature cycles, circadian phase of CCA1 were similar, suggesting plants can use 6-degree difference as an environmental cue. We then tested, 4, 2, and 1-degree differences and found that only 2-degree differences are enough to entrain circadian clocks. If plants can sense 2-degree differences and modulate their growth in response to their environmental temperature, plants may show “thermotropism”. Using two peltier devices, we produced thermogradient on agar media. We then grow plants on the thermogradiented media and checked root directions. However, plants did not respond to temperature at all. Taken together, plants can sense only 2-degrees differences, but did not show temperature-related physiological response. Further studies will need to elucidate how plants can respond to ambient temperature.

### 研究目的

移動できない植物は環境刺激を鋭敏に察知し、応答することで、生存している。植物が利用する環境刺激は栄養、ストレス、温度、日長、光質など多岐にわたるが、中でも温度と光は最も重要な環境刺激であり、花芽形成や胚軸伸長など多くの生理応答でこうした刺激が利用されている。光の感知にはフィトクロム、クリプトクロム、フォトトロピンといった、光受容体が重要であることが知られており、およそ 100 年の歴史がある。一方で、植物の温度受容体に対する知見は全く存在せず、2000 年前後くらいから、いくつかの変異体では温度応答が異常になっていることが報告されているのみであり、温度受容体についてはほとんど明らかにされていない。動物では、カプサイシンによる灼熱感やミントの冷涼感がきっかけとなり、温度受容体 TRIP チャンネルが発見された経緯を持つ。TRIP チャンネルの相同遺伝子は線虫から昆虫、哺乳類に至るまでかなり保存されて

いる一方で、植物にはそうした遺伝子ファミリーは全く存在せず、全く別の温度受容体を利用していると考えられてきた。

植物の場合、光受容体の欠損変異体の表現型は暗黒条件下での表現系と同一であり、こうしたことを指標に光受容体は明らかにされてきた。しかし、温度は光とは異なり、温度受容体の欠損変異体、すなわち、温度を感じられなくなった植物がどのような挙動を示すのかについては全く予想ができず、分子からも表現型からも温度受容に迫れないという状況が長く続いていた。

申請者は、これまでに植物の概日時計の機能を組織特異的に阻害する研究を通じて、植物の温度依存的な細胞伸長がどの組織で制御されているのかを明らかにしてきた。その結果、植物にとっての常温は、おそらく表皮に存在する未知の温度受容体によって受容されており、そのシグナルが表皮の概日時計へと伝えられることで細胞伸長制御が引き起こされる

ことが示されてきた。こうした結果から、植物にも温度受容体は存在し、概日リズムを指標にすることで温度受容体ならびに温度シグナル伝達経路を明らかにできるのではないかと考えられた。

## 研究経過

申請者は植物における温度受容体および温度シグナル伝達経路に関する知見をえるため、最初に、植物がどの程度の温度差を区別できるのかを解析した。次に、そうした知見を元に温度応答に関わる新たな分子の同定を目指しトランスクリプトーム解析を行った。さらに、

未知の温度応答の可能性として *thermotropism* (屈温性) に着目し、モデル植物においてこうした応答が観察できるかについて条件検討を行った。

### (1) 植物が区別できる温度差の解明

光と温度は概日時計の重要な入力刺激であり、明暗周期や冷温周期に応じた概日位相を持つリズムが形成される。申請者はこの現象を利用することで、植物が感知できる温度差を定量した。まず、コントロールとして、22°C一定かつ連続明条件下で植物を生育し、概日リズムを計測した。こうした条件においてもコントロールしきれていない何らかの影響により、時計遺伝子は概日リズムを示すものの、個々の個体が指し示す時間はバラバラであり、環境情報を利用した時間認識ができていないことを確認した (図1)。次に、22°C一定かつ明暗条件下で植物を生育させると、はっきりとした概日位相の同調が観察され、植物は光を利用して概日時計の位相を調節していることが確認された。さらに、19°C 12時間、25°C 12時間 (平均 22°C) かつ連続明条件でも、植物は正しく概日時計は正しく時間を刻むことを確認し、概日リズム形成には温度と光が重要であることを確認した。

そこで申請者は温度サイクルにおける両者の温度差を 6°C、4°C、2°C、1°C とし、どれくらいの温度差があれば冷温サイクルとして認識されるのかを検証した。6°C差や 4°C差でははっきりとしたリズム同調が見られ、2°C差においても多少のばらつきはあるものの、概日リズムの同調が確認された (図1右)。一方で 1°C差では、こうした概日リズムの同調は見られなかった。以上のことから、植物は概ね 2°C差を認識できることを明らかにした。

そこで申請者は温度サイクルにおける両者の温度差を 6°C、4°C、2°C、1°C とし、どれくらいの温度差があれば冷温サイクルとして認識されるのかを検証した。6°C差や 4°C差でははっきりとしたリズム同調が見られ、2°C差においても多少のばらつきはあるものの、概日リズムの同調が確認された (図1右)。一方で 1°C差では、こうした概日リズムの同調は見られなかった。以上のことから、植物は概ね 2°C差を認識できることを明らかにした。

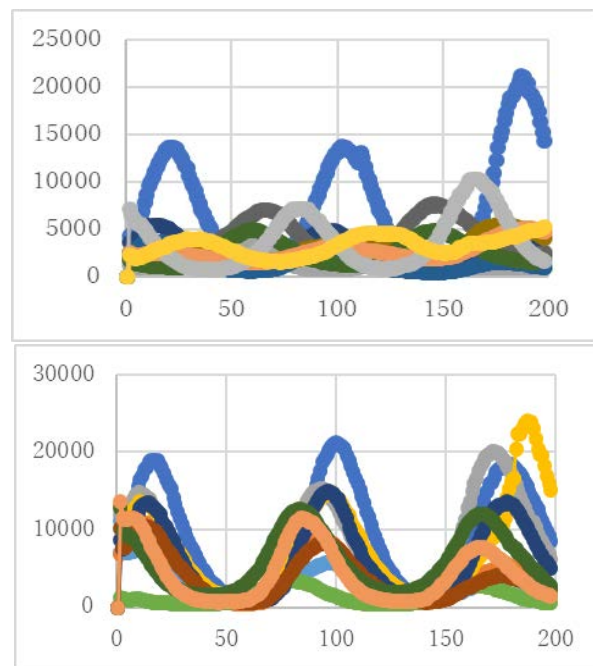


図1 上：連続明かつ温度サイクルなし。この条件では各個体はバラバラな概日位相を示しており、同調されていない。下：連続明かつ2°C差の温度サイクル (22°C 12 時間、20°C 12 時間)。この条件では多少のバラツキはあるものの、ほぼ同期した概日位相を示しており、植物が2°Cの温度差から時間情報を読み取れていることを意味する。

### (2) 異なる環境温度に応じて発現が変化する遺伝子発現の網羅的探索

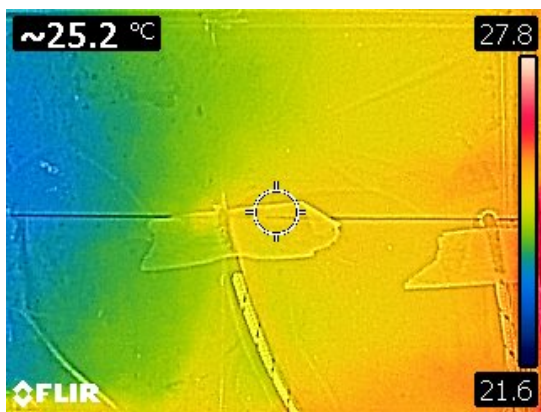
植物が 2°C差を認識できることから、18°C、20°C、22°C、24°C、26°Cと 2°Cずつ環境温度を変化させ、この温度変化に対して線形的に発現量が変化する遺伝子群があれば、それらは温度シグナル伝達に関わっていると考えた。また、申請者のこれまでの研究から温度受容はおそらく表皮で行われていることが明らかとなっていたため、表皮のみを対象としたトランスクリプトーム解析を行うことが適当であると考えた。

そこで、サーモグラフィを用いて葉の表面温度をリアルタイムに計測しつつ、表皮のサンプリングを試みた。現行の方法ではテープを葉に貼り付け、剥がす時に一緒についてきた表皮細胞を単離するものであったが、こうしたテープの貼り付け、人の手による操作、などの影響で温度変化を±2°C以内に抑えることが極めて難しく、このまま仮にデータをとったとしても、果たして温度変化を反映しているの

かが怪しいということが示唆される結果となった。

### (3) 屈温性を指標とした温度応答変異体のスクリーニング系の確立

そこで、申請者は全く別のアプローチによって温度受容体および温度シグナル伝達経路に関わる因子の同定を試みた。センチュウでは、形成された培地上の温度勾配に従って、自身の好ましい温度帯に移動する現象が知られており、このことを利用して温度認識に関わるニューロン群が発見されている。移動できない植物では、このような実験は不可能であるが、1990年の論文にトウモロコシの根における屈温性の報告がなされている。これによれば、トウモロコシの根は自身が好ましい温度の方向に根を伸ばすとされており、現在広く用いられているモデル植物シロイヌナズナにおいてもこうした現象が観察できると期待された。そこで、ペルチエ素子二台の間に銅板をセットし、その上に寒天培地を置くことで、培地上に温度勾配を形成させる方法を確立した。この方法では 4~8°Cほどの温度勾配を形成できる(図2)。



### 温度勾配形成の時間推移

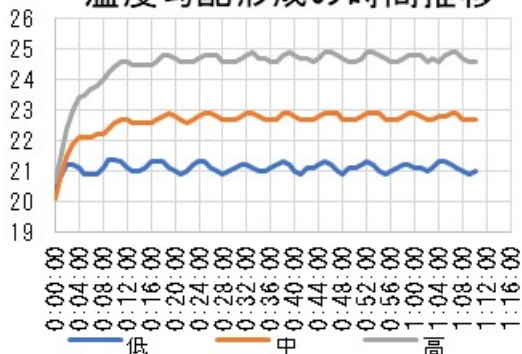


図2 ペルチエ素子を利用して作られた培地上の温度勾配とその温度推移

温度勾配はかなり綺麗に形成されており、約10分で狙った温度になることが分かる。

そこで、温度勾配に対して水平または垂直に根を這わせることで、根の伸長方向で至適温度を明らかにすることができるかと期待された。しかし、実際には根の伸長には重力や光の影響が非常に強く現れ、温度に対して指向性をもった根の成長は観察されなかった(図3)。

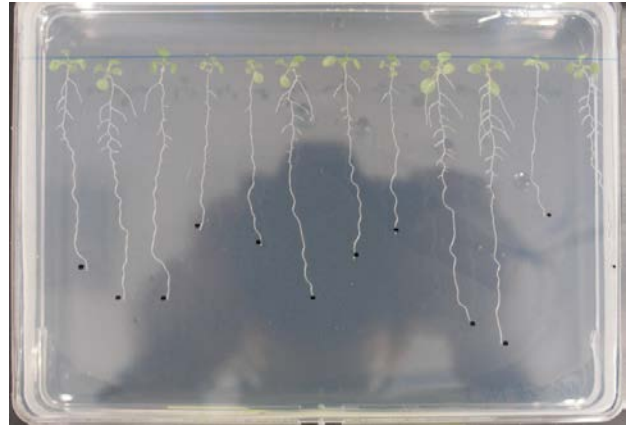


図3 垂直にした培地上で温度勾配を形成し、植物を栽培した結果

重力方向に根が伸長し、水平方向の温度勾配の影響は見られなかった。

現在は、暗所で光の影響を排除しつつ、固い培地上に水平に植物を配置することで重力の影響を極力排除する等の条件検討を行っている。

### 考察

本研究を通じて、植物が2°Cという僅かな温度の違いを鋭敏に感知できることが初めて明らかとなった。一般的な化学反応速度論では、2°Cの温度差で14%程度しか反応速度が変化せず、こうした差で温度応答を説明することは難しい。こうしたことから、間接的にはあるが、植物の温度受容体を介した積極的な温度応答が示唆された。しかし、こうした温度受容体の実体に迫る実験は難しく、RNA-seqによるアプローチも屈温性によるアプローチも課題が残り、さらなる工夫が必要である。

本研究がスタートした直後に光受容体である phyB が温度受容体でもあるという論文が発表され、また、青色光/UV-A の受容体であるフォトトロピンや UV-B の受容体である UVR8 もまた温度受容体であるという報告がなされ、光受容体=温度受容体という流れが主流となりつつある。しかし、申請者の研究から連続明または連続暗条件下でも温度応答は

十分に引き起こされることから、温度応答と光応答は切り離して考えるべきであり、光受容体以外の温度受容体が存在する可能性は極めて高いと考えている。

温度は光以上にコントロールが難しい。サーモグラフィ等を用いた可視化だけでなく、動物の培養細胞等で開発が進んでいる温度センサープローブや、そもそもの実験室環境の安定化（インキュベータの中にインキュベータを設置する等）など包括的な対策を講じることで、温度条件を厳密にコントロールできる方策を考える必要があるだろう。さらに、ゲル培地上での温度勾配形成は非常にうまくいき、センチウで使われているよりもさらに簡便な系が確立できた。こうした利点を活かして、引き続き屈温性については研究を進めたい。光や重力など根の伸長方向に関わる既知の環境刺激の影響を排除するた

めに、暗黒条件かつ植物は水平にして（横倒しにして）栽培する等の工夫が必要だと考えられるが、フォトトロピンなどの光受容体の変異体や重力屈性の変異体背景下で研究を行うなど、より大掛かりな工夫についても併せて検討を行う。さらに、根の伸長以外に温度応答性が知られている胚軸伸長など別の表現型を調べることに加え、シダやコケの原始体の伸長方向などよりシンプルなモデル植物の使用も併せて検討する。

#### **研究の発表**

特になし

#### **誌上発表**

特になし