

9228 海産植物の耐塩機構の解明と「耐塩性」遺伝子組みかえの基礎的研究

助成研究者:新田 毅(東京農工大学 一般教育部)

共同研究者:福原敏行, 森山裕光, 古賀隆一(東京農工大学)

:王京兆(中国科学院), 野村港二(筑波大学)

:朴俊泳(朝鮮大学), 新井正善(東京農工大学)

研究目的

海草は、陸上植物が海に里帰りしたもので、海藻とは異なる海水耐性機構を獲得していると考えられる。作物の耐塩性の改良を目指すなら、遺伝的に距離を隔てた海藻よりは、同じ高等植物である海草を研究対象とする方がより有効であろう。しかし、現状では、海草がどうやって海に戻ることができたのか、皆目わかっていない。本研究の目的は、海草の耐塩性に重大な働きを持つ ATPase 遺伝子の発現機構解明を通じて、『塩に強い作物』の分子育種に新たな道をきり拓くことである。

研究方法

ATPase 酵素活性の酢酸鉛沈澱による検出は Hall らの方法(1980)に従った。ATPase 遺伝子のクローニングについては、逆転写酵素により cDNA を合成したのち、PCR 反応を行った。プライマーは高等植物の H^+ -ATPase および動物の Na^+/K^+ -ATPase の配列を用い、増幅した DNA 断片は pUC18 プラスミドの Sma I サイトに組み込み、大腸菌 JM109 株に導入した。塩基配列は Dideoxy 法により決定した。サザンおよびノーザン ハイブリダイゼーションのプローブは、上記組み替えプラスミドを制限酵素で処理した DNA 断片を鋳型として、作成した。

研究結果

海藻、陸上植物、海草の3者で塩環境への細胞の抵抗メカニズムが異なることを明らかにした。アマモの成葉表皮の細胞膜は、陸上植物と異なり、低濃度のウアバインで阻害される ATPase 活性を示したが、葉ざやに覆われ、海水から隔てられた葉基部の分裂組織では、活性は検出出来ない。分裂を終えた表皮細胞は、成長して Transfer Cell 化し、細胞膜に激しい凹凸が固定され、ATPase 活性を持つようになり、海水への抵抗性を獲得する。一方、海藻の細胞膜には、ほとんど ATPase 活性はなく、一部の液胞膜または小胞膜にモザイク状に分布し、塩分を積極的に蓄積した後、そのエキソサイトーシスによって、細胞外に排出していると思なされる。

cDNA クローニングによる塩基配列分析とハイブリダイゼーション実験結果からは、アマモ葉表皮細胞の Na^+ 排出に働く ATPase は、ウアバインに感受性ではあるが、動物の Na^+/K^+ -ATPase の系譜とは異なり、高等植物の H^+ -ATPase にごく近いものと推定される。この遺伝子の分裂組織での発現は抑制されている。

9228 海産植物の耐塩機構の解明と「耐塩性」遺伝子組みかえの基礎的研究

助成研究者:新田 毅(東京農工大学 一般教育部)

共同研究者:福原敏行, 森山裕光, 古賀隆一(東京農工大学)

:王京兆(中国科学院), 野村港二(筑波大学)

:朴俊泳(朝鮮大学), 新井正善(東京農工大学)

1. 研究目的

高濃度含塩土壌の広がり、日本でこそ目立たないが、深刻な地球規模の現象となっている。今や、耐塩性作物品種の育成は急務である。耐塩性は植物にとっても重要な遺伝形質のひとつであり、系統進化の中で、この機作がどのように変わり、それを支える遺伝子がどのように変わったかを明らかにすることは、植物の進化——過去、現在、未来——を理解する上で欠かすことはできない。

このように、植物の耐塩性研究は、基礎、応用の両面から重要視され、活発に進められている。当然ながら、研究対象は主として作物となっている。近縁の種間、品種間でも耐性にはかなりの相違があって、その改良は有望視されていた。その理由は、液胞に塩を溜め込める種類と溜め込めない種類があるからで、つまり、液胞膜でイオン透過性を担う ATPase が作用するかどうか、もっとさかのほれば、『液胞膜』 ATPase 遺伝子が発現できるかどうかによる。このように膜 ATPase が植物細胞の耐塩性に重大な意義をもつことは十分予想されるところで、ATPase は耐塩性遺伝子組み替えのターゲット第一候補に擬せられる。植物の ATPase には、細胞小器官、細胞膜、液胞膜に別々に局在する起源を異にする3種が見いだされており、それぞれに同類のものが存在する。高等動物では、細胞膜にあるウアバイン感受性の Na^+/K^+ -ATPase が高塩濃度環境に抵抗する仕組みとなる。植物では、ウアバイン感受性の酵素の存在は報告されていない。 Na^+ などの塩分の透過に関与する ATPase については未解明である。

しかし、これまでの多大な努力にもかかわらず、交配や変異株の選抜が有効ではなく、耐塩性新品種の報告がなかなか聞かれなかったのは何故だろうか。植物が上陸し、耐塩性を必要としなくなってから、すでに久しい。そのための遺伝子も大幅に変化し、現存の高等植物はそう簡単にはつよい耐塩性を再獲得できない所まで、進化してしまったのであろう。その証拠に、自然界でも耐性種はそうそうは生まれていない。そうだとすれば、交配や突然変異株の選択によって有効な耐塩品種を得ようというのは無駄な試みでしかない。このようなやり方では、海水で成育する稲

などはとうてい得られるものではない。したがって、耐塩性品種を獲得するためには、遠まわりのようだが、海産植物の耐性機構を十分に明らかにし、植物の耐性にかかわる遺伝子の変異と実態を系統的に捉えて行く基礎からの研究が必要と思う。

海産植物は分類学上二つに大別出来る。『魚のゆりかご』として知られるアマモの仲間は、いったん耐塩性を失った陸上植物が再び海に里帰りしたもので、アサクサノリやワカメなどの海藻とは進化上大きな隔りがあるため、両者を区別して、海草 (Seagrass) と呼ばれる。従って、海草は、海藻とは違った海水への耐性機構を獲得していると考えてよい。海草はその広い分布にもかかわらず、ヒルムシロ、トチカガミの 2 科だけに属し、世界中でも 100 にたりない少数種である。この事実も、陸上植物の耐塩性再獲得は遺伝的にかなり難しいことを示唆しているが、高等植物の耐塩性の改良を目指すなら、遺伝的に距離を隔てた海藻よりは同じ高等植物である海草の方が有効と考えるのが合理的である。しかし、このように海草は極めて興味ある研究材料であるにもかかわらず、この海草がなぜ海に戻ることができたのか説明を試みた研究はこれまでまったくない。

我々は、これまで知られていなかったアマモ細胞の数々の特性と同時に、耐塩性に直接関係すると目されるウアバイン感受性の『細胞膜』ATPase をアマモで検出することができた。これまでの結果として、海藻から陸上植物、陸上植物から海草へという植物の系統進化の中での耐塩性機構の様相がどうやら体系的に描けるようになった。目下、この遺伝子の解析を進めているところだが、この遺伝子の細胞発現機構の解明を通じて『塩に強い作物』の分子育種に新たなルートを拓くのが本研究の目的である。

最近、各地のアマモ群落が減って『藻場』としての機能が失われてきている。これが近海魚が姿を消して来た原因のひとつと言われる。我々もアマモを研究材料にしてきたので、東京湾などでアマモの植生の変遷をつぶさに見てきた。ここでのアマモの細胞レベルでの環境適応能力の研究が、アマモ群落植生の保護を通じ、『人間と海の共生』に道をひらくことを心から期待したい。

2. 研究方法

2.1 細胞生物学的研究

アマモの他、ミナトハネモ、アナアオサ そのほかの海藻は、千葉県富津で採集し、人工海水（アクアマリン、八州薬品）または自然海水中で明所、20℃ に置いた。試料は採集後 1 週間以内に用いた。

ATPase 酵素活性の検出は Hall らの方法 (1980) に従った。試料は 50 mM カ

コジル酸緩衝液中で、2.5 % (v/v) グルタルアルデヒドまたは 1 % (v/v)ホルムアルデヒドにより 4°C で固定し、同緩衝液で1時間、次いでトリス マレイン酸緩衝液 (pH 7.0) で 30 分洗浄した。一部の処理試料は、酵素活性の検出に先立ち、0.1 mM バナジン酸、50 mM 硝酸カリ、または 0.01 mM ウアバインで室温 2 時間の処理を行った。試料を 50 mM クエン酸ソーダ緩衝液 (pH 7.2) に 30 分浸けて、次いで、2 mM ATP, 2 mM Mg(NO₃)₂, 3.6 mM Pb(NO₃)₂ を含む 50 mM トリス マレイン酸 (pH 7.2) で、30°C 45 分インキュベートした。その後、緩衝液に 30 分浸け、アセトンまたはエタノール シリーズで脱水、スパール混合樹脂に包埋し、切片を作った。一部は ATPase 検出処理後 1 % (w/v) 酢酸ウランで染色した。電子顕微鏡は JEOL 100C (日本電子) を用いた。

2.2 分子生物学的研究

2.2.1. ATPase 遺伝子のクローニング

アマモ成熟葉より CTAB 法で DNA、グアニジンチオシアネート法で RNA をそれぞれ精製し、RNA については M-MLV 逆転写酵素 (GIGCO BRL) により cDNA を合成したのち、PCR 反応に用いた。PCR 反応のプライマーは高等植物の H⁺-ATPase のアミノ酸配列の間で保存性の高い配列 SALTGES, CSDKTGT を基に 5'-GAICAGTCTGCTCTCTIACIGG-3' (P1), 5'-GTCCCIGTITGTCACTICA-3' (P2), および動物の Na⁺/K⁺-ATPase の間で保存性の高い配列 LVMKGAPE, TGDGVNDS を基に 5'-CTIGTIATGAA(A/G)GGIGGICCIGA-3' (P3), 5'-GA(A/G)TC(A/G)TTIACICCC(A/G)TCICCCIGT-3' (P4) を用いた。PCR 反応は GeneAmp PCR Reagent Kit (Takara), ザイモリアクターII (Att o)を用い、94°C 30秒、50°C 25秒、72°C 1.5分の反応を 35 回繰り返して行った。

PCR 反応により増幅した DNA 断片は、CL-4B クロマトグラフィーにより精製した後、pUC18 プラスミドの Sma I サイトに組み込み、大腸菌 JM109 株に導入した。得られた組み替え大腸菌クローンより、アルカリ SDS 法を用い組み替えプラスミドを精製し、制限酵素 Eco RI および Hind III で処理、アガロースゲル電気泳動で外来 DNA 断片を含むことを確認した。塩基配列は Sequenase Ver. 2 Kit (USB) を用い、Dideoxy 法により決定した。

2.2.2. ハイブリダイゼーション実験

サザンおよびノーザン ハイブリダイゼーションには Zeta-Probe メンブラン (Bio-Rad) を用い、マニュアルに従って行った。プローブは、上記の組み替えプラスミドを制限酵素で処理、アガロースゲル電気泳動で分画した ATPase 遺伝子をコードする DNA 断片を鋳型として Random Primer Labelling Kit (Takara) と α -³²P-CTP (Amersham) を用いて作成した。ハイブリダイゼーション シグナルの強度はデンシトメーター (アドバンテック) を用いて測定した。

3. 研究結果

3.1 電子顕微鏡による ATPase の組織化学的研究

3.1.1. 海藻の ATPase の細胞内分布

海藻の ATPase の細胞内分布を酢酸鉛沈澱法を用いて検討した。海藻の膜酵素については、知見がない。カサノリとオオシコロについて、単離細胞膜画分に生化学的方法で酵素活性が検出されているに過ぎないが、この場合も、ATPase のウアバイン感受性は調べられていない。我々は、緑藻、褐藻、紅藻にわたって広く検討したが、いずれの細胞膜にも、酵素活性は検出できなかった (Fig. 1A, B)。しかし、細胞質中の一部の小胞膜や液胞膜に、多くはモザイク状に活性が見られた。この活性は、人工海水の塩濃度を増すと、増加した。したがって、海藻は、陸上植物と同様、高濃度の塩分を液胞あるいは小胞（ベジクル）内に蓄積していると考えられる。これらの小胞は細胞膜まで移動し、エキソサイトーシスによって、含まれた塩分を細胞外に排出している、と考えられる。事実、これらの小胞は、しばしば互いに密着融合しており、膜ではモザイク状の活性分布を示すことが多い (Fig. 1B)。

3.1.2. 海草の ATPase の細胞内分布

一方、アマモ、コアマモの成葉表皮の細胞膜には陸上植物では見られない強い酵素活性が検出された (Fig. 1C)。この組織の細胞膜は、特に葉の内側に面してはげしい凹凸を示すが、ATPase の活性の出現は明らかにこの現象と平行関係がある。幾層もの葉ざやに堅く覆われ、周囲の海水からは隔てられた葉基部分の分裂組織細胞は滑らかな細胞膜を持ち、ATPase 活性はほとんど検出できない (Fig. 1D)。しかし、分裂を終えた細胞は、成長して葉ざやから出るに伴い、細胞膜は凸凹になり、かつ、強い ATPase 活性を示すようになり、海水にたいして耐性を獲得する。

次に、この細胞膜酵素の活性について阻害効果を調べた。バナジン酸ナトリウムは極少量 (10^{-2} mM) で鉛沈澱の生成を阻害した (Fig. 2A)。しかし、液胞膜の ATPase 作用の阻害をする KNO_3 は影響しない (Fig. 2B)。われわれは、このアマモの細胞膜 ATPase 活性の大部分がウアバイン（動物に特有な Na^+/K^+ -ATPase の特異的阻害剤）によって失われることを見いだした (Fig. 2C)。従来、植物で検出されている細胞膜 ATPase はウアバインによる阻害がない。従って、アマモにみられるこの ATPase 活性は、動物で見られる Na^+/K^+ -ATPase 同様、塩の汲み出しに関係している可能性が高い。

一方、アマモの葉肉組織細胞では液胞膜にかなり強い ATPase 活性を示す。これらの細胞では、細胞膜の酵素活性は強くない。従って、海草は動物のように単純に表皮細胞から塩を排出しているのではなく、葉を構成する組織により ATPase 活性の細胞内分布に方向性を持ち、海水への耐性を葉全体で高次元に構築していると

思われる。おそらく、葉の内部中央にある大きな中空部が塩分の蓄積にかかわっているのだろう。古代の藻塩はアマモが材料である。表皮細胞では、葉内部側に細胞膜の凹凸がずっと多く見られが、表皮細胞では塩分を葉の外へ排泄するだけでなく、細胞壁を通じて、葉の内部の中空部に積極的に塩分を送り込んでいるものと推定される。

3. 2. アマモ ATPase 遺伝子組み替えの基礎実験

3. 2. 1. アマモ ATPase の遺伝子塩基配列およびアミノ酸配列

アマモ成熟葉より調製した DNA (または精製した RNA から合成した cDNA) を鋳型として P1 と P2 および P3 と P4 をプライマーにして PCR 反応を行い、増幅した DNA 断片を pUC18 にクローニングし、得られたクローンの塩基配列を決定した。Fig. 3 には P1 と P2 をプライマーとして PCR 反応を行い得られたクローン pZMA7 の塩基配列とその塩基配列から予想されるアミノ酸配列を示した。これらの配列と相同性のある配列をデータベース (塩基配列は GenBank, アミノ酸配列は NBRF-PDB) より検索すると、DNA, アミノ酸いずれのレベルでも pZMA7, pZMA208 クローンともに高等植物の細胞膜 H^+ -ATPase ともっとも相同性が高かった。

Fig. 4 には、イネ細胞膜 H^+ -ATPase のアミノ酸配列と pZMA7, pZMA208 クローンのアミノ酸配列を比較したものを示した。pZMA7 の領域でのそれらの配列はアミノ酸レベルで 82.5%, 核酸レベルで 68.7%, pZMA208 の領域では、それぞれ 86.3%, 71.6% の相同性を示した。

これらの結果から、アマモの細胞膜 H^+ -ATPase 遺伝子が部分的にクローニングされたと考えられる。一方、P3 と P4 をプローブとしたときは、クローンが得られなかった。アマモの ATPase は通常的高等植物の細胞膜 ATPase と違ってウアバインに感受性ではあるが、同じように感受性をもつ動物の Na^+/K^+ -ATPase とは異なっていて、むしろ高等植物の H^+ -ATPase にごく近いものと推定される。動物と植物の系統上の隔たりからすれば、この推論は妥当であろう。

3. 2. 2. アマモ細胞膜 H^+ -ATPase 遺伝子の発現

上記の pZMA7 のクローンをプローブに用い、アマモ DNA とのサザン ハイブリダイゼーションを行った結果、pZMA7 を含む ATPase 遺伝子はアマモ ゲノムにおいて1コピー存在すること、および pZMA7 と同一ではないが相同性が高いと予想される配列が数コピー存在することが判明した (Fig. 5A)。

一方、アマモ成熟葉および未成熟葉から、それぞれ全 RNA を精製し、pZMA7 をプローブに用いたノーザン ハイブリダイゼーションを行った。その結果、(1) rRNA との比較より、発現しているアマモ ATPase の mRNA は約 3.4 Kbp であり、既報のアラビドプシス、タバコなどの細胞膜 H^+ -ATPase の mRNA とほぼ同じサイ

ズであること、(2) ハイブリアイゼーション シグナルの強度の比較から、耐塩性を獲得した成熟葉では、耐塩性を獲得していない未成熟葉に比べ、細胞膜 ATPase の mRNA が約 10 倍存在することが示された (Fig. 5B)。この実験結果はアマモ細胞における耐塩性獲得に細胞膜 ATPase が関与している可能性を示唆している。

4. 考察

4.1. アマモ ATPase 遺伝子の特異性

動物細胞で Na^+ の排出に作用している ウアバイン感受性の ATPase の植物での存在は、これまで報告されていない。原生動物や菌類でもやはり見いだされないため、この酵素は多細胞動物の進化とともに出現したものと受け止められている。したがって、アマモで検出された酵素は、動物に存在する Na^+/K^+ -ATPase とは異なる系譜に属するものから出ていると考えられる。アマモの細胞膜 ATPase の大部分がウアバイン感受性であるということは、それらが動物の ATPase と類似の酵素作用をもつと推定される。この酵素が動物では塩の細胞排出の主役になっていることを考えれば、植物界に広く分布する H^+ -ATPase からこのような作用をもった ATPase が生み出されたことが、海草をつくり出すことに力があつたのであろう。この遺伝子を明らかにし、組み替えに利用することが、これからの課題になる。

4.2. アマモにおける Transfer Cell 分化

アマモの表皮細胞の外観は、陸上植物ではじめて進化した “transfer cell” に極めて類似する。この細胞は、通常は光合成産物などを維管束系に能動輸送すると目される細胞で、維管束周辺に位置し、細胞壁に極端な陥入突出があつて、細胞膜に激しい凹凸ができるのが特徴である。分泌腺細胞も同様の構造をとっている。それらの細胞膜は強い ATPase 活性を示すことが知られているが、細胞のプレパレーション技術ができていないので、植物生理学上の重要性にもかかわらず、今の所、研究は進んでいない。我々は、アマモ葉から単離したプロトプラストが丸くならず、四角なままでいるという奇妙な性質を見だし、アマモの細胞膜が、“rigid”であることを示した。おそらく、この性質は高等植物の Transfer Cell に共通するものであろう。つよい細胞膜 ATPase の活性表現は Transfer Cell 細胞膜の凹凸による反応面積の拡大化によって支えられているに違いない。この細胞の利用が、ATPase の進化とともに海草の海への復帰をもたらしたのではあるまいか。

このように、アマモでは全表皮細胞が Transfer Cell に分化し、細胞膜の H^+ -ATPase から進化したウアバイン感受性の特異的な ATPase の作用により、塩の排

出を行っていると考えられる。しかし、その証明は、現在行っているアマモの ATPase 遺伝子のクローニングと解析を待たなければならない。

4.3. 植物の耐塩能力の進化

植物の耐塩性を担う遺伝子の中でもっとも重要なのは、 Na^+ の膜透過に作用している ATPase であることに異議はない。しかし、海藻、陸上植物、海草の細胞内のこの酵素の分布を調べた結果、本質的な違いがあることが明らかになった。

海藻では主として細胞質の小胞または小液胞に ATPase 活性が存在して、細胞膜にはほとんど活性はない。つまり、海藻は、細胞内に入って来た高濃度の塩分をこれらの小胞に積極的に送り込み、エキソサイトーシスと厚い細胞壁アポプラスチック経路によって細胞外へ排泄し、海水の塩分にたいして抵抗していると推察される。

海藻が上陸すると、このような耐性機構は必要としなくなる。陸上植物の液胞は植物体を大きくすることに用いられ、多くの植物では塩を積極的に蓄積しエキソサイトーシスする能力はなくなつたろう。ただし、大きくなった液胞に塩を溜め込む ATPase 能力には比較的容易に差が出るため、遺伝的に近縁の品種間でさえも耐塩性に違いが見られるのだろう。もちろん、海水のような高濃度の塩には、これだけのメカニズムでは抵抗できないだろう。

海草は、海藻がもっていたエキソサイトーシスを利用した耐性メカニズムを失った陸上植物に由来する。海草の ATPase は、表皮組織細胞では、ほとんど細胞膜に局在する。これらの細胞は、高等植物で細胞の物質運搬にかかわる Transfer Cell と同じ構造をとっていると見なされる。つまり、高等植物である海草は、高等植物になって進化した Transfer Cell を利用して、海水への新たな抵抗メカニズムを獲得したと考えられる。

塩生植物には海草型と海藻型とがみつかる。これまでに報告された知見では、単子葉塩生植物の塩腺細胞では Transfer Cell 構造をとり、その生理作用を利用して、塩水を細胞外に出しているようである。一方、双子葉の塩腺細胞は、いずれも大きな液胞を持ち、かなり高濃度の塩分をここに蓄積することが出来る。ただし、海藻のようにエキソサイトーシスで細胞外に捨てることはできない。マングローブも一般にこのタイプであるが、過剰の塩分を蓄積してしまうと、葉全体を落して、塩の害から逃れる。また、ある種の植物では高濃度の塩分を土壌に与えると、根毛周辺に Transfer Cell が誘導されることが報告されている。このような諸現象から考えると、高等植物にとって Transfer Cell は活発な物質輸送を行うためには必須の細胞分化で、海草の出現には ATPase の進化とともに重要な条件であったと思われる。今後、この細胞を誘導する遺伝子系の研究が必要である。

5. 今後の課題

前項で述べたように、研究費助成を受けたこの1年間の研究の進展により、今後の研究方針に確実な見通しを持つことができた。心から感謝したい。実際の成果が得られるのは、これからであり、具体的には次の実験を行う。

細胞生物学的研究としては、ウアバイン感受性の細胞膜 ATPase が海草だけに存在するものかどうか、鉛沈澱法による電子顕微鏡観察、プローブによる *in situ* ハイブリダイゼーション法により広く植物界を検索する。ATPase 活性が Transfer Cell 細胞膜に集中する機作を明らかにするため、植物組織からの Transfer Cell とその細胞膜の調製法を確立、細胞膜のはげしい凹凸の固定化という現象がこの細胞だけに起こる理由を物質レベルで明らかにし、耐塩性細胞が生ずる遺伝子条件を追求、細胞組織培養による Transfer Cell の人工誘導を試みる。Transfer Cell は細胞分裂能力を失っているものと目されるので、この点注意が必要となろう。

一方、分子生物学的研究によって、アマモに特異的なウアバイン感受性の ATPase も高等植物共通の H^+ -ATPase に類似していることが確かめられた。従って、これからはプローブを H^+ -ATPase にして、アマモがもつ総ての遺伝子を拾いあげ、その塩基配列を検討し、海草に特有な細胞膜 ATPase を明らかにすることが必要である。そのため、次の実験を行う。アマモの mRNA から cDNA を調製、クローニングし、組織化学的方法で検出したウアバイン感受性の ATPase について、調節機構を含めた遺伝子構造や分子進化的位置付けを塩基配列分析や種々のハイブリダイゼーション実験などにより明らかにする。この遺伝子を発現ベクターに導入し、植物培養細胞への遺伝子導入実験を試みる。

6. 発表文献

- 1) Seawater-resistant, non-spherical protoplasts from seagrass leaves. Arai, M., Pak, J.Y., Nomura, K. and Nitta, T. *Physiol. Plant.* 83, 551-559 (1991).
- 2) アマモの耐塩性細胞と細胞膜 ATPase について. 朴俊泳、新田毅. 日本植物学会年会 (1992).
- 3) Discrete subcellular localization of ATPase for resisting high salinity in two evolutionarily distinct classes of marine plants. Pak, J.Y., Fukuhara, T., Ohwaki, Y. and Nitta, T. XV International Botanical Congress (1993).

Fig. 1. Distribution of ATPase activity in algal (A and B) and seagrass (C and D) epidermal cells. Post-staining by uranyl acetate was omitted except for d. Cell membranes are shown by arrows and lead precipitates by arrow heads. Bars = 1 μ m. A, Bryopsis sp. A variety of vesicle type is identified by lead precipitation in algal cytoplasm. B, Porphyra tenera. Closely-contacted vacuoles are observable. C, Mature-leaf cells of Zostera marina. High ATPase activity was detected along the highly invaginated cell membranes. D, Immature-leaf epidermal cells before release of leaves from sheaths. ATPase activity was not detected along the smooth cell membranes. Post-stained.

Fig. 2. Inhibition of ATPase activity in cell membranes of Z. marina leaves. Arrows show cell membranes and arrow heads do lead precipitates. Bars = 1 μ m. A, Inhibitory effect of 10^{-1} mM sodium vanadate on ATPase activity in mature-leaf cells. B, Non-inhibitory effect of 50 mM KNO_3 on the enzymatic activity in young-leaf cells. The activity remained along cell membranes. C, Inhibitory effect of 10^{-3} mM ouabain on the ATPase activity in mature-leaf cells. The result allowed identification of most precipitates (Fig. 1C) as products of ATPases.

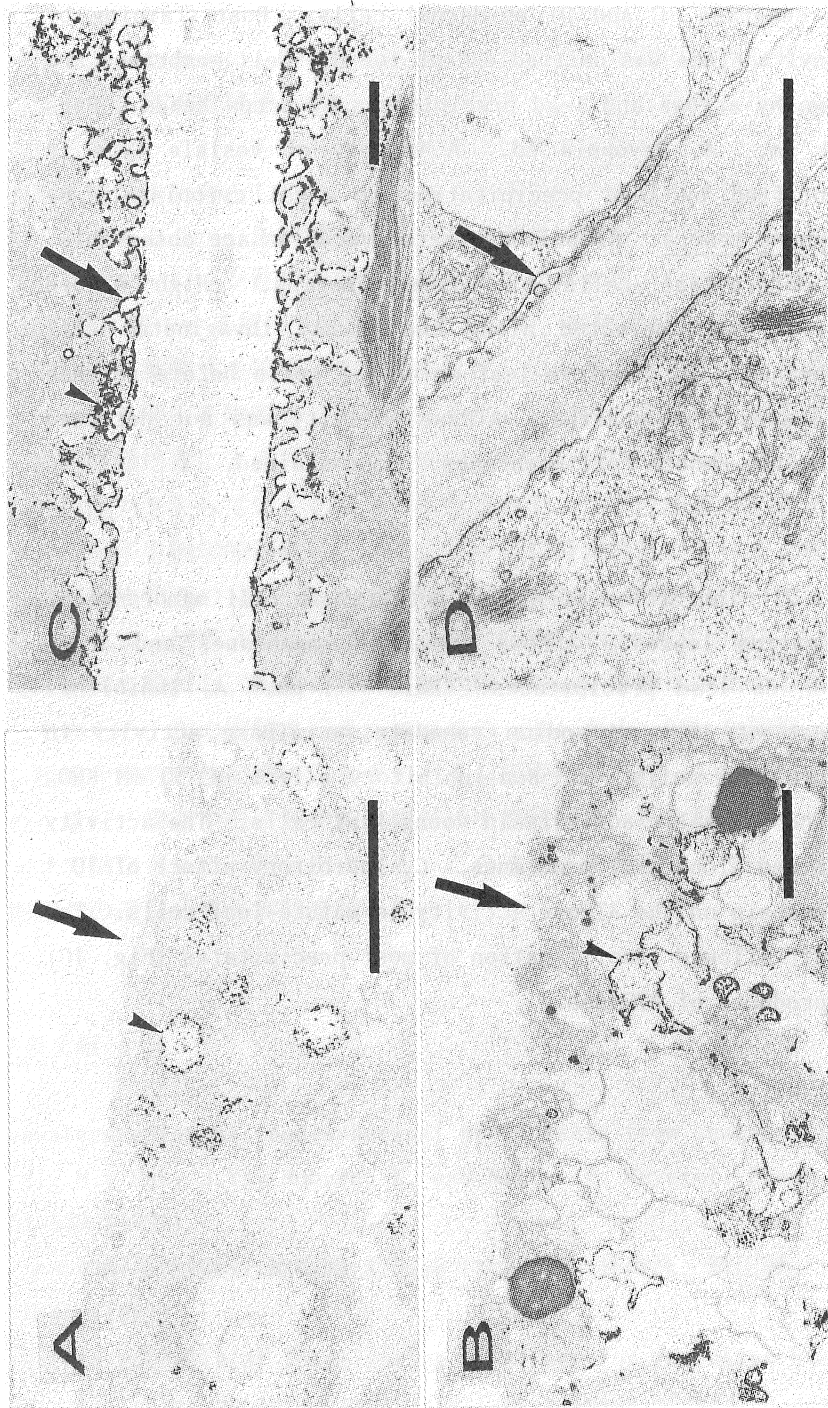


Fig. 1 Distribution of ATPase activity in algal (A and B) and seagrass (C and D) epidermal cells.

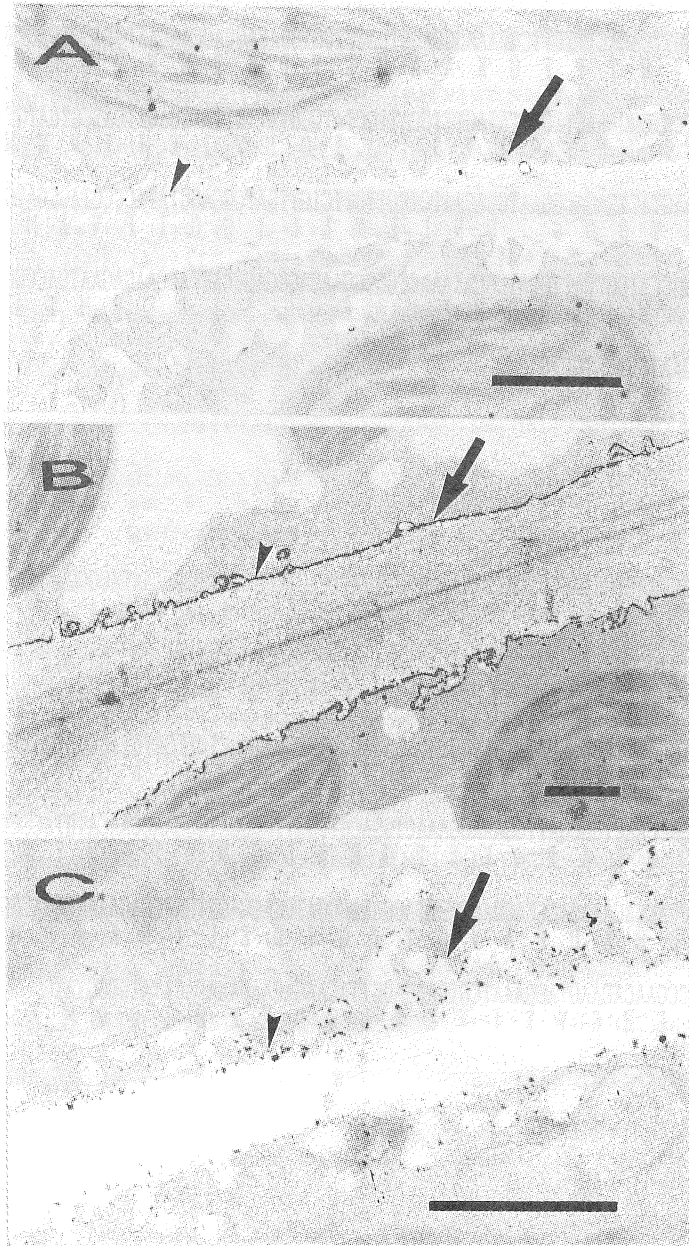


Fig. 2 Inhibition of ATPase activity in cell membranes of *Z. marina* leaves.

pZMA7

1 TGAGTCACTTCCGGTGACCCGTAATCCCGGATCTGAGGTTTTCTCCGGATCAACCTGCAACAAGGAGAAATCGATGCTG
E S L P V T R N P G S E V F S G S T C K Q G E I D A V
81 TGGTCATTGCAACTGGAGTTCACACTTTCTTCGAAAAGGCAGCTCATCTCGTGACAGCACCAACAATGTGGGTCACTTC
V I A T G V H T F F G K A A H L V D S T N N V G H F
161 CAGAAAATCCTTACAGCCATCGGAAACTTCTGTATAGTTTCATTGCTATCGGTATTGTTATCGAGATCATCGTATGCTG
Q K V L T A I G N F C I V S I A I G I V I E I I V M W
241 GCCTATTACAGAGACGTAAGTACAGAGACGGAATCGACAATCTCCTTGTCTGTGATCGGAGGTATACCCGTAGCCATGC
P I Q R R K Y R D G I D N L L V L L I G G I P V A M P
321 CCGCTGTTCTTCCGTGGCCATGGCCATTGGATCGCATAAACTGGCGAACAGGGAGCCATCACCAAGAGAATGACCGCC
A V L S V A M A I G S H K L A E Q G A I T K R M T A
401 ATCGAAGAGTTGGCTGGAATGGACGTGCTG
I E E L A G M D V L

pZMA208

1 GCAGATCATGACTCTGTGCAACTGCAAGCCTGACATGAAAGCCAAGATTCCTCCGTCATCGACAAATACCGGAAACGTTG
Q I M T L C N C K P D M K A K I H S V I D K Y A E R G
81 GACTTCGATCTTTGGGTGTCGGGCAACAGGAGGTCCCGGAGAAGAACAAGGAGAGTCCGGGAGGACCGTGGCAGTTGTA
L R S L G V G Q Q E V P E K N K E S P G G P W Q F V
161 GGTGTGTTGCTCTTTTCGATCCACCGAGACATGACAGTGCAGAGACGATTCCGAGAGCTCTTGATCTAGGAGTGAATGT
G V L P L F D P P R H D S A E T I R R A L D L G V N V
241 GAAGATGATTACCGGAGACCAACTGGCGATTGGAAGGAAAAGTGGACGTCGGTTGGGGATGGGAACCAACATGTACCCTT
K M I T G D Q L A I G K E T G R R L G M G T N M Y P S
321 CATCATATTGCTCGGCGACCACAAAGACCCAGCAGTGGGTACGATAGGGATCGACGAGTTGATCGAGAAAGCCGATGGA
S S L L G D H K D P A V G T I G I D E L I E K A D G
401 TTCGCCGAGTGTTCCTCCGAACACAAGTACGAAATCGTGAAGAGGTTACAAGACAAGAAACACATATGCCGATG
F A G V F P E H K Y E I V K R L Q D K K H I C G M

Fig. 3. Partial nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of the *Zostera marina* ATPase gene.

Rice H⁺-ATPase

1' MAEDKGGDLAVLKESVDLENIPIEEVFQNLKCCRQGLTSEEAQLRLQLFGPNKLEEKEES

61' KFLKFLGFMWNPLSWVMEAAAIMAIALANGGGKPPDWQDFVGIITLLLINSTISFIEENN

121' AGNAAAALMARLAPKAKVLRNGSWTEEEAAILVPGDIISIKLGDIIIPADARLLEGDPLKI

181' DQSALTGESLPATKPGDGVYSGSTVKQGEIEAVVIATGVHTFFGKAAHLVDSTNQVGHF
 ****.*..*.*.**** *****.*****.*****.*****.*****
 pZMA7 ESLPVTRNPGSEVPSGSTCKQGEIDAVVIATGVHTFFGKAAHLVDSTNNVGHF

241' QKVLTAIGNFCICSIAVGMFVEIIVMYPHQHRPYRPGIDNLLVLLIGGIPIAMPTVLSVT
 ***** **.*.***** **.* ** *****.***.*****.

54" QKVLTAIGNFCIVSIAIGIVIEIIVMWPIQRRKYRDGIDNLLVLLIGGIPVAMPVLSVA

301' MAIGSHRLSQQGAI TKRMTAIEEMAGMDVLCSDKTGTLTNLKLTVDKNLIEIFERGVTQD
 *****.*.*****.*****

114" MAIGSHKLAEQGAI TKRMTAIEELAGMDVL

361' QVILMAARASRTENQDAIDTALVGMLADPKEARAGIQEVHFLPFNPTDKRTALTYIDSDG

421' KMYRVSKGAPEQIINLAHNKTIERRVHAVIDKFAERGLRSLAVAYQEVDPGRKESPGGP
 .*.*.*.** *****.*.*****.*****
 pZMA208 QIMTLCNCKPDMKAKIHSVIDKYAERGLRSLGVGQEVPEKNKESPGGP

481' WRFVALLPLFDPPRHDSAETIRRALNLGVNVKMITGDQLAIGKETGRRLGMGTNMPSSA
 ..*.*****.*****.*****.*****.*****.

50" WQFVGVLPPLFDPPRHDSAETIRRALDLGVNVKMITGDQLAIGKETGRRLGMGTNMPSSS

541' LLGQNKDESVAALPVDDLIEKADGFAGVFPPEHKYIEVKRLQARKHICGMTGDGVNDPPAL
 ..*.*.*****.*****.*****.*****.

110" LLGDHKDPAVGTIGIDELIEKADGFAGVFPPEHKYIEVKRLQDKKHICGM

601' KKADIGIAVADATDAARSASDIVLTEPGLSVIISAVLTSRAIFQRMKNYTIYAVSITIRI

661' VFGFMLLALIWEFDFPPFMVLI IAILNDGTIMTISKDLVKPSPLPDSWKLAEIFTTGVVL

721' GGYLAMMTVISSGLHTRPTFSLGSFTSKALRRQLQDDYQKLASAVYLQVSTISQALIFVT

781' RSRWSFIERPGFLLVFAFFVAQLIATLIAVYANWAFTSIKIGIGWGAGIVWLYNLVIFYF

841' PLDIKFLIRYALSGKAWDLVIEQRIAFTRKKDFGKEERELKWAHAHRTLHGLQPPDAKP

901' FPEKTGYSELNQMAEEAKRRAE IARLRELHTLKGHVESVVKLGLDIDITHQSYTV

Fig. 4. Amino acid homology between the rice (*Oryza sativa* L.) plasma membrane H⁺-ATPase (upper lines) and the *Z. marina* ATPase (lower lines). Identical and similar amino acid residues are indicated by * and ., respectively.

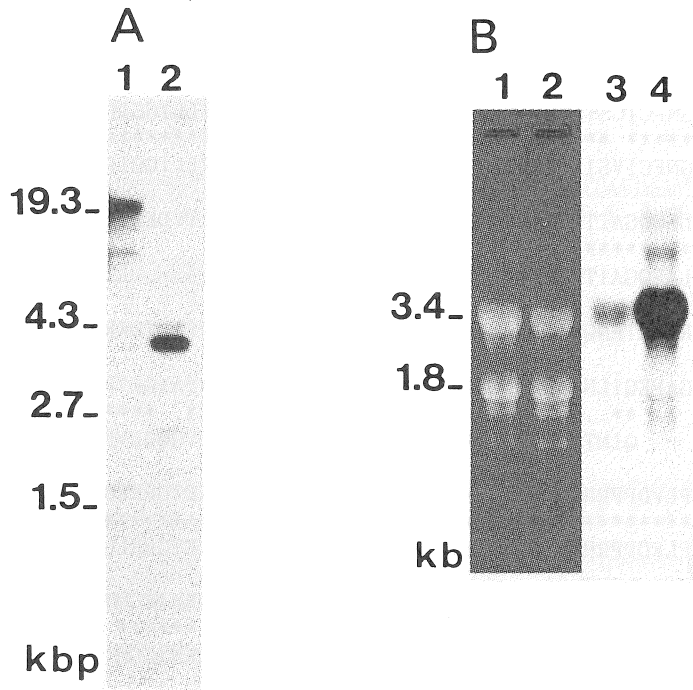


Fig. 5. Southern (A) and Northern (B) blot analyses of the *Z. marina* ATPase gene. The hybridization probe was a 430-bp fragment prepared from pZMA7 (Fig. 1). A, about 2 μ g of genomic DNA was digested with either *Bam*HI (lane 1) or *Hind*III (lane 2). B, 20 μ g of total RNA isolated from in-mature leaves (lanes 1 and 3) or mature leaves (lanes 2 and 4). Lanes 1 and 2: ethidium bromide staining. Lanes 3 and 4: hybridization.

Salinity Tolerance Mechanisms in Marine Plants and Genetic Engineering of the Salinity-Tolerance Genes

Takeshi Nitta¹, Toshiyuki Fukuhara¹, Hiromitsu Moriyama¹, Ryuichi Koga¹, Masayoshi Arai¹, Jun-Yong Pak², Koji Nomura³, Jinghzaο Wang⁴

¹Laboratory of Biology, Tokyo University of Agriculture & Technology, Fuchu, Tokyo 183

²Department of Biology, Korea University, Kodaira, Tokyo 182

³Department of Agriculture, Tsukuba University, Tsukuba 305

⁴Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101

Salt-transport systems involving ATPases located in cellular membranes are of the utmost importance for the molecular description of the salinity tolerance of plants. High ATPase activity was detected by cytochemical procedures of lead precipitation on the copiously invaginated cell membranes of mature leaf epidermal cells from Zostera marina, whereas immature leaf cells which were sensitive to salinity did not detect such high activity. The enzymatic reaction was markedly reduced by 10^{-2} mM ouabain, suggesting characteristic presence of potential Na⁺-pumps that play a central role in the tolerance of seagrasses to salinity. Cloning of cDNAs for seagrass ATPases is now in progress.

On the other hand, such high enzymatic activity was not found on cell membranes of marine macro-algae but on the membranes of some cytoplasmic vesicles or micro-vacuoles. Thus it appears that marine plant cells currently exploit two main methods by which they excrete excess salts for resisting the high salinity of seawater.