

9425 マングローブ植物の耐塩性に関する代謝生理学的研究

助成研究者：芦原 坦（お茶の水女子大学 理学部）

共同研究者：福島 裕子（お茶の水女子大学 理学部）

熱帯、亜熱帯の海岸沼沢地に生育する耐塩性のマングローブ植物は、塩類の排除や輸送のために多量のエネルギー(ATP)を必要とし、さらに浸透圧調節物質としていわゆる compatible solutesを生産していると思われる。これらの植物がどのような機構で塩類を排除したり有効に利用しているのかを知ることは、基礎科学のみならず、樹木の改良のような応用分野の基礎としても重要である。そこで、本研究では、沖縄・西表島に生育するマングローブ植物のうち、耐塩性が高くかつ組織培養が可能なヒルギダマシ (*Avicennia marina*) 根と葉を実験材料として用い、炭水化物とヌクレオチドの代謝を調べた。ヒルギダマシの葉の呼吸は、塩濃度の上昇に伴い増加したが、根の呼吸は塩に影響されなかった。[1- 14 C]glucoseと[6- 14 C]glucoseからの 14 CO₂放出量から、根における糖の異化経路としては、解糖系とほかペントースリン酸経路の関与が大きい、葉では、ほとんど解糖系のみが働いていることが示唆された。根と葉に[U- 14 C]sucroseを100 mM、250 mM、500 mMのNaCl存在下で18時間与え、その代謝を調べた結果、放射能は、CO₂、アミノ酸、有機酸、糖、タンパク質にとりこまれていたが、塩濃度により影響を受けたのは、リンゴ酸の合成が、根、葉とも塩濃度の増加に伴い高まったこと、葉におけるCO₂放出が高塩濃度で増加したことであった。この植物に特徴的なことは、葉において未同定の糖の合成が見られることで、全部の糖合成の半分以上を占めていた。根では、この糖の合成は見られなかった。この糖は、compatible solutesとなる可能性もあるため今後の研究が必要である。プリン代謝に関して、[8- 14 C]adenosineと[8- 14 C]guanosineの代謝を調べた。根でも葉でも、ヌクレオチドや核酸への放射能のとりこみが見られ、これらのサルベージ経路が機能していることが示された。葉では、20-40%の放射能がウレイド(アラントインとアラントイン酸)に見られ、5%以下がCO₂にとりこまれており、プリンの異化経路も働いていることが明らかになった。非塩性植物では、塩ストレスによりプリンの異化経路が活性化するという報告があるが、ヒルギダマシ葉では、塩の効果はみられなかった。ヒルギダマシの根と葉には、他の植物で浸透圧調節物質であることがしめされているグリシンベタインの蓄積は認められたが、プロリンの蓄積は見られず、主要な遊離アミノ酸は、アスパラギンであった。マングローブ植物にみられた代謝的特性の意義について考察する。

9425 マングローブ植物の耐塩性に関する代謝生理学的研究

助成研究者：芦原 坦（お茶の水女子大学 理学部）

共同研究者：福島 裕子（お茶の水女子大学 理学部）

1. 研究目的

熱帯、亜熱帯の海岸沼沢地に生育するマングローブ植物は、耐塩性であり、特有の代謝系を持つと思われる。これらの植物がどのような機構で塩類を排除したり有効に利用しているのかを知ることは、基礎科学のみならず、樹木の改良のような応用分野の基礎としても重要である。本研究では、沖縄・西表島に生育するマングローブ植物のうち、耐塩性が高くかつ組織培養が可能なヒルギダマシ (*Avicennia marina*) とハマザクロ (*Sonneratia alba*) を実験材料として用い、マングローブ植物の塩排出や浸透圧調節に関連を持つと思われる代謝や物質に関する基礎的データをを得ることを目的とした。

本研究では、ヒルギダマシの幼植物体とハマザクロの組織培養細胞を用いて、エネルギー関連代謝（呼吸代謝、糖代謝、プリン代謝）と浸透圧調節物質の合成を検討したが、ここでは、ヒルギダマシの結果を記す。

2. 研究方法

2.1. 植物材料

ヒルギダマシの発芽後2年の実生苗の根と葉を用いた。この実生苗は、沖縄県の西表島で採取した種子を軽石を入れた鉢で発芽させ、2週間ごとに、100 mM NaCl を含む3%ハイポネックス溶液を与え、蛍光灯と自然光で14時間以上が明期になるようにし、15℃（冬期）以上、35℃（夏期）以下で育てたものである。

2.2. 呼吸量の測定

呼吸量の測定は、マノメーター（タイテック社製 O₂ アップテスター）で行った。植物材料(300 mg)と3 mlの 100 mM、250 mM、500 mMのNaClを含むLS培地(3% スクロース、1 μM チアミンを含む)を容器に入れ、CO₂ を吸着させるために0.1 mlの20% KOH を濾紙に浸し、容器の上部に置いた。根は、長さ1 mm、葉は5 mm角の切片にして用いた。

2.3. C_6/C_1 比の測定

センターウェル付きの30 ml フラスコの主室に種々の濃度のNaClを含むLS培地($1\mu\text{M}$ チアミンを含む)を2 ml と根(500 mg)と葉(400 mg)の切片を入れた。 $[1-^{14}\text{C}]\text{glucose}$ (比活性 $0.17\text{MBq}/\mu\text{mol}$)または、 $[6-^{14}\text{C}]\text{glucose}$ (比活性 $0.17\text{MBq}/\mu\text{mol}$)を加え、 27°C で90分間インキュベートした。 $20\mu\text{l}$ の6%過塩素酸溶液を加え、液中の保留 CO_2 を除いた後、KOH に吸着された $^{14}\text{CO}_2$ を10 ml の蒸留水に溶出し、その一部を液体シンチレーションカウンターで測定した。

2.4. $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ スクロースの代謝

2.3 に述べたような方法で、 $4\mu\text{M}$ $[\text{U}-^{14}\text{C}]\text{sucrose}$ (比活性 $23.1\text{MBq}/\mu\text{mol}$)を与え18時間インキュベートした。 ^{14}C でラベルされた低分子物質は、70% エタノールで抽出し、2 種のイオン交換樹脂(Dowex 50W x4, Dowex 1 x4)を用いて、塩基性分画(アミノ酸を主に含む)、酸性分画(有機酸を主に含む)、中性分画(糖を主に含む)に分けた。各分画は、さらにTLC と HPLC により分析した。個々の操作については、すでに報告してある方法(Saito et al., 1989; Sagishima et al., 1989)によった。

2.5. $[8-^{14}\text{C}]\text{アデノシン}$ 、 $[8-^{14}\text{C}]\text{グアノシン}$ の代謝

2.3 に述べた方法で、 $11.1\mu\text{M}$ $[8-^{14}\text{C}]\text{adenosine}$ (比活性 $1.7\text{MBq}/\mu\text{mol}$)、 $8.9\mu\text{M}$ $[8-^{14}\text{C}]\text{guanosine}$ (比活性 $2.1\text{MBq}/\mu\text{mol}$)を与え、18時間インキュベートした。各物質への放射能のとりこみは、Ashihara and Nobusawa (1981)の方法で行った。

2.6. アミノ酸、グリシンベタインの抽出と定量

植物材料(根、500 mg; 葉、350 mg)を、70% エタノールでホモジナイズし、 70°C で抽出した。遊離アミノ酸は、アミノ酸分析システム、グリシンベタインは、NMR により分析した。

3. 結果および考察

3.1. 呼吸活性とその塩による影響

ヒルギダマシの根と葉における酸素吸収量を、Fig. 1に示す。根の呼吸量は、約 $40\text{nmol}/\text{min}/\text{g fresh wt.}$ であり、 100mM (この植物の生育中に与えられているNaCl濃度)でも 500mM (海水の濃度)でも、ほぼ同程度であった。一方、葉の呼吸量は、塩濃度の増加に伴い増えた。 250mM および 500mM NaCl存在下での呼吸量は、 100mM の場合のそれぞれ1.2 倍、1.4 倍であった。葉にみられる生重量あたりの呼吸量は、根の場合よりはるか

に高いが、これは組織の構造に由来するものが大きいと思われる。ヒルギダマシの根では、中心柱のまわりに、ほとんど呼吸をしていないと思われる厚いスポンジ状の組織が存在している。葉でみられた塩による呼吸の増加は、'salt respiration' としてニンジン根などで報告されている。これが、塩の排出や液胞への隔離と関連しているかどうかについては、今後の研究が必要とされる。

3.2. 糖の異化経路とその活性の塩による影響

高等植物では、グルコース-6-リン酸 (G6P) は、解糖系 (Embden-Mayerhof-Parnas 経路、いわゆる EMP 経路) とペントースリン酸 (PP) 経路によって、代謝される。どちらの経路の関与度が大きいかは、 $[1-^{14}\text{C}]$ glucose と $[6-^{14}\text{C}]$ glucose からの $^{14}\text{CO}_2$ の放出量を比較すればよい。グルコースの1位の炭素は、PP経路の 6-phosphogluconate dehydrogenase のステップで CO_2 になるので、PP経路の関与度が大きければ、 C_6/C_1 比が小さくなる。 C_6/C_1 比は、反応時間に影響を受けるため、予備の実験をした結果、90分を採用した。結果を、Fig. 2 に示す。根と葉で明確な違いが見られ、根では、PP経路が活発に機能しているのに対し、葉では、もっぱら、EMP 経路により糖の異化がおこなっていることが示唆された。PP経路の生理学的意義として、生合成反応の還元力としての NADPH の供給と生合成の素材としてのリボース-5-リン酸やエリスロース-4-リン酸の供給が考えられ、根では、実際にこのような物質の生産が PP 経路によってなされているものと思われる。葉では、これらの物質の供給は、光合成によりなされるため、根で見られたような、酸化的 PP 経路が働かないのであろう。NaCl 濃度によっては、両代謝経路の相対活性はほとんど影響を受けなかった。

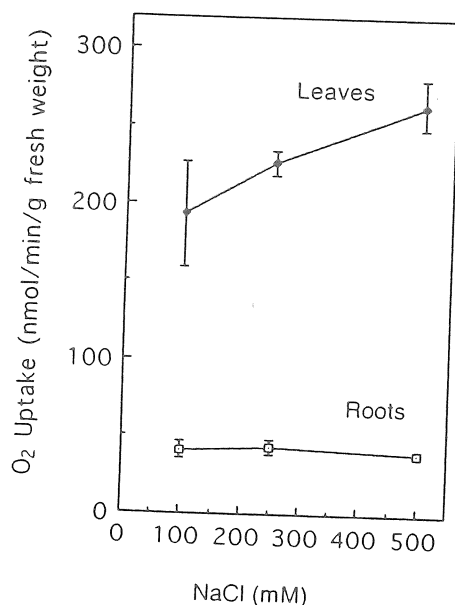


Fig. 1. Effect of NaCl on the rate of O_2 uptake by leaves and roots of *Avicennia marina*.

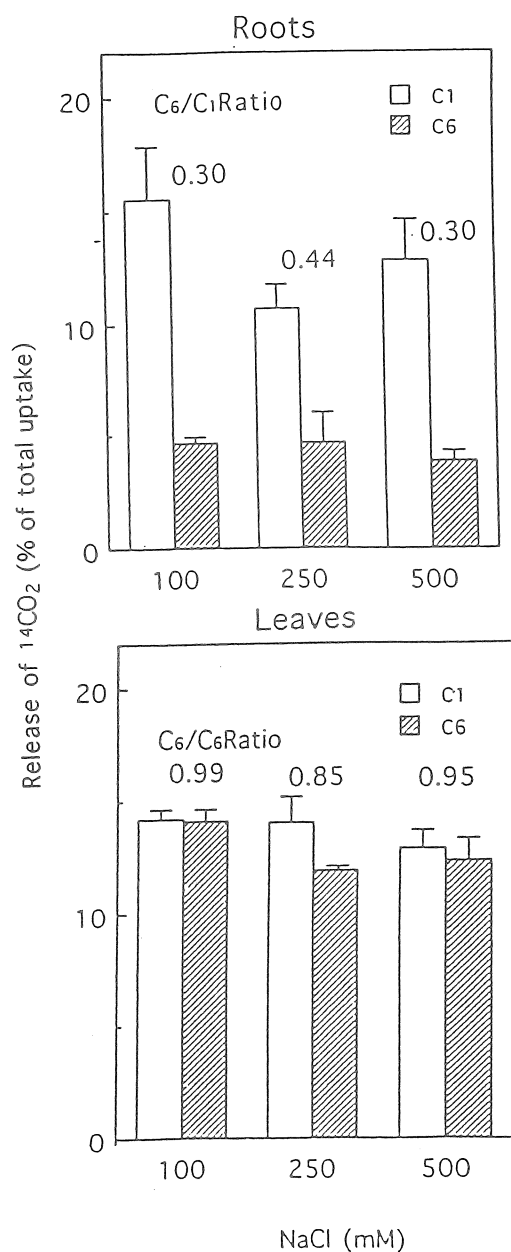


Fig. 2. Effect of NaCl on the rate of release of $^{14}\text{CO}_2$ from roots and leaves of *Avicennia marina* following incubation with $[1-^{14}\text{C}]$ - and $[6-^{14}\text{C}]$ glucose.

3.3. スクロースの代謝と塩の影響

高等植物では、光合成で固定された炭素は、スクロースとして輸送され、植物体でつくられる炭素をふくむ多くの化合物に代謝される。そこで、[U- ^{14}C]sucrose をヒルギダマシの根と葉の切片に与え、18時間後にどのような化合物にその放射能がとりこまれたかを調べた。Table 1 に根と葉の切片への[U- ^{14}C]sucroseのとりこみ (uptake) と、各物質 (分画) への放射能のとりこみ (incorporation)が、示してある。NaCl濃度の増加に伴い、組織へのsucrose のとりこみが、根、葉で共に増加した。また、葉では呼吸の結果放出される $^{14}\text{CO}_2$ の量も塩の存在下で増加していた。アミノ酸へのとりこみは、塩の影響を受けず、他の植物で浸透圧調節物質といわれているプロリンへの放射能のとりこみは見られなかった。有機酸の中では、リンゴ酸へのとりこみが多く、これは、塩により増加した(Fig. 3)。中性分画の放射能は、根では、sucrose、glucose、fructoseにほぼ均等に分布していたが葉では、この分画の半分以上の放射能が、未同定の物質に見られた (Fig. 4)。ブタノール：酢酸：水 (4:1:2 v/v)を展開溶媒としたTLC では、この物質のRf値は、0.64であり、sucrose (0.38)、glucose (0.43)、fructose (0.45) より移動度が大きかった。この未同定の物質が、浸透圧調整のための compatible soluteである可能性を考え、現在、この物質の同定を試みている。

Table 1 Metabolism of [U- ^{14}C]sucrose by roots (A) and leaves (B) of *Avicennia marina* in the presence of 100, 250 and 500 mM NaCl

Fraction	Incorporation, kBq g fresh weight ⁻¹ (% of total uptake)		
	100 mM	250 mM	500 mM
(A) Roots			
CO ₂	93.8±0.6 (54)	100.5±1.5 (52)	107.0±9.4 (55)
Amino acid	7.6±0.5 (4)	10.1±0.8 (5)	8.4±0.4 (4)
Organic acid	7.1±0.1 (4)	11.9±0.2 (6)	15.9±0.1 (8)
Sugar	15.7±1.0 (9)	16.2±0.8 (8)	21.1±1.8 (11)
Protein	49.1±3.6 (28)	54.5±5.6 (28)	43.9±0.2 (22)
Total	173.3±3.8 (100)	193.2±8.5 (100)	196.3±7.9 (100)
(B) Leaves			
CO ₂	121.8±0.8 (43)	150.7±23.4 (50)	168.5±1.8 (53)
Amino acid	36.8±0.8 (13)	37.3±1.6 (12)	40.5±2.0 (13)
Organic acid	20.1±0.4 (7)	20.4±3.1 (7)	23.5±0.8 (7)
Sugar	22.9±0.5 (8)	21.0±4.0 (7)	26.7±1.0 (8)
Protein	81.1±0.1 (29)	71.4±5.5 (24)	61.4±0.5 (19)
Total	282.7±0.1 (100)	300.7±9.2 (100)	320.5±1.0 (100)

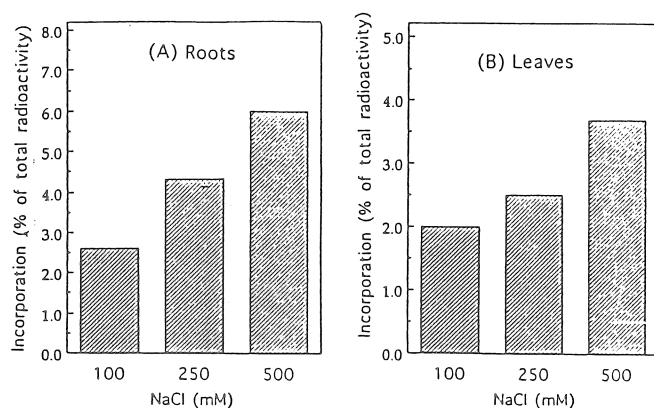


Fig. 3. Effect of NaCl on the rate of incorporation of radioactivity from [U-¹⁴C]sucrose into malate in roots and leaves of *Avicennia marina*.

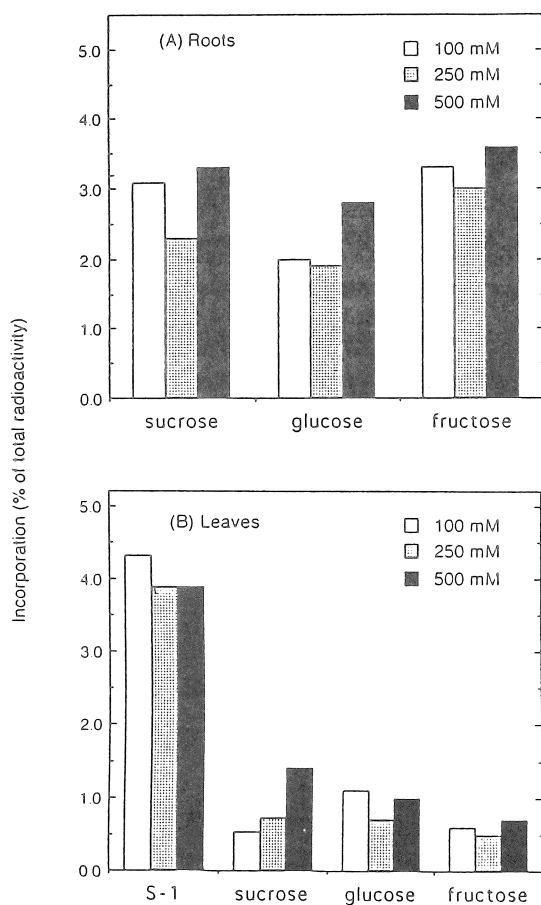


Fig. 4. Effect of NaCl on the rate of incorporation of radioactivity from [U-¹⁴C]sucrose into sugars in roots and leaves of *Avicennia marina*. S-1, unidentified sugar.

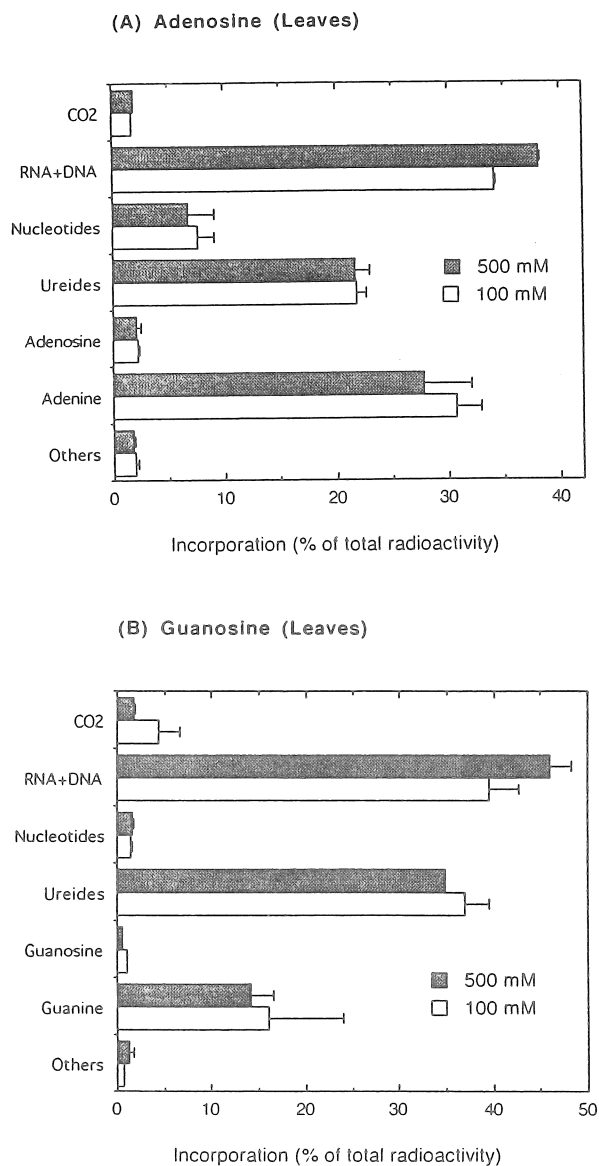
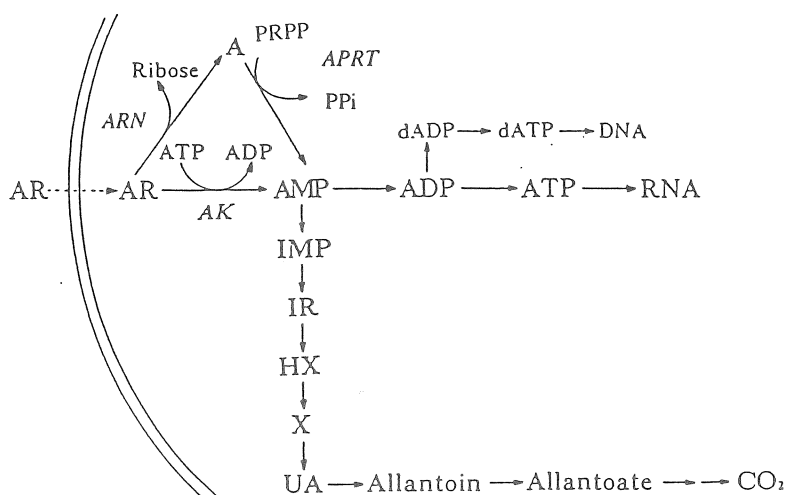


Fig. 5. Incorporation of [8-¹⁴C]adenosine (A) and [8-¹⁴C]guanosine (B) into various metabolites of leaves of *Avicennia marina* in the presence of 100 mM and 500 mM NaCl.



APRT : Adenine Phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.7)

AK : Adenosine Kinase (EC 2.7.1.20)

ARN : Adenosine Nucleosidase (EC 3.2.2.7)

Fig. 6. Possible metabolic pathways of $[8-^{14}\text{C}]$ adenosine in roots and leaves of *Avicennia marina*.

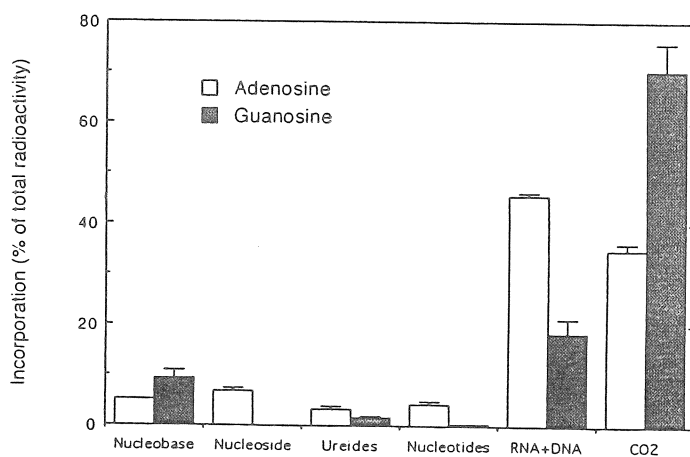


Fig. 7. Incorporation of $[8-^{14}\text{C}]$ adenosine and $[8-^{14}\text{C}]$ guanosine into various metabolites of *Avicennia marina* roots in the presence of 100 mM NaCl.

3.4. マングローブ植物のプリン代謝

耐塩性の植物では、ATP のエネルギーを使って塩の排出や移動を行うと考えられている。ATP などのプリンヌクレオチドは、*de novo* 合成やサルベージ経路により合成され、プリンの異化経路により分解されるが、合成・分解のターンオーバーは、かなり速く、いくつかの key enzyme が知られている (Hirose and Ashihara, 1984; Yabuki and Ashihara, 1990; 1991)。また、NaCl がプリンの異化経路の活性化をもたらすという報告もある (Peterson et al., 1988)。しかし、マングローブ植物のプリン代謝に関しては全く研究されていない。そこで、[8- 14 C]adenosine と [8- 14 C]guanosine の代謝を調べた。Fig. 5 は、葉におけるアデノシン(A) とグアノシン(B) の代謝を示している。ヌクレオチドと核酸に放射能が見られるので、これらの化合物は、アデノシンキナーゼ、グアノシンキナーゼの作用で AMP、GMP に変換されさらに、ATP、GTP になり核酸合成に使われたものと思われる。ヌクレオチドの放射能が低いのは、これらの物質のターンオーバーの速さを反映しているものであろう。ともに、プリンの異化経路の中間産物であるウレイド（アラントインとアラントイン酸）にかなりの放射能の分布がみられたが、 $^{14}\text{CO}_2$ はあまり多くはなかった。ヒルギダマシに特徴的なのは、アデノシン、グアノシンからアデニン、グアニンへの変換である。アデノシンヌクレオシダーゼやグアノシンヌクレオシダーゼの活性は高等植物では通常それほど高くなく、遊離のプリン塩基は、ニチニチソウなど普通の植物では、ほとんど検出されない。しかし、ハマザクロの組織培養細胞においても今回得られたヒルギダマシの傾向に近い結果、すなわち高いプリン塩基へのとりこみがみられたので、これは、マングローブ植物に特有のものかもしれない。アデノシンやグアノシンのサルベージがすでにのべたキナーゼではなく、ホスホリボシルトランスフェラーゼによる可能性もある (Fig. 6 参照)。トウモロコシの根を 87 mM NaCl で処理すると、プリンの異化経路の活性が約 3 倍に増加することが知られている (Peterson et al., 1988) が、ヒルギダマシの場合、500 mM の NaCl 存在下でもプリン代謝は、ほとんど影響を受けなかった。このことは、マングローブ植物では、高塩下でもアデニンヌクレオチド（主に ATP）を一定の水準に維持できる機能を有していると見ることもできる。同様の結果は、ハマザクロの組織培養細胞でも見られた (1994 年度日本植物学会大会発表)。

根においても、アデノシンやグアノシンは、ヌクレオチドや核酸の合成に使われるが、葉に比べ、 $^{14}\text{CO}_2$ に分解される比率が高く、特にグアノシンの場合に多かった。ウレイドやプリン塩基の放射能は、少なかった (Fig. 7)。

3.5. 浸透圧調節物質の検索

塩生植物の浸透圧調節物質として、プロリンやグリシンベタインが知られているので、ヒルギダマシの根と葉にこれらの物質が蓄積されているかどうかを調べた。プロリンの含

量は、極めて少なく、根では、全遊離アミノ酸の 0.02%、葉では、0.04% しか占めていなかった。根では、遊離アミノ酸の97%、葉では、84% がアスパラギンであったが、これが"compatible solute" となりうるかどうかは今後の研究が必要である。一方、グリシン・ベタインは、かなり多量にふくまれており、1 g 生重量あたり、葉では 77 μmol 、根では12 μmol 存在していた (Fig. 8)。

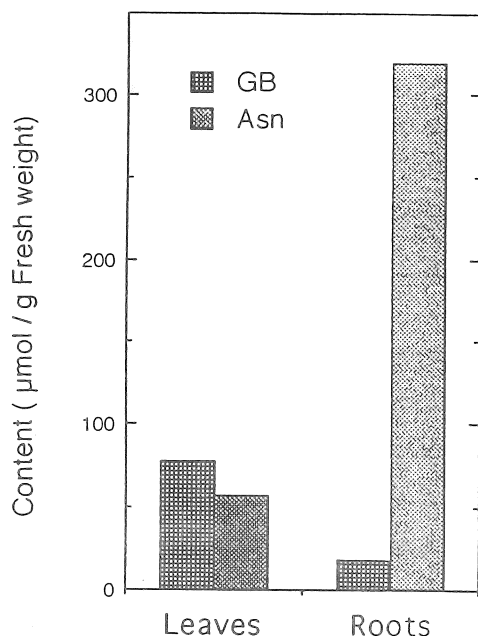


Fig. 8. Contents of glycinebetaine and asparagine in roots and leaves of *Avicennia marina*.

3.7. 結論

塩生植物であるマングローブ植物の代謝についての研究は、ほとんどなされていなかったが、本研究によりこの植物の持つ炭水化物とプリンヌクレオチドの代謝の概略が初めて明らかにされた。糖代謝に関しては、葉で浸透圧調節に関与されることが期待される中性物質（糖）の合成が見られること、塩濃度の増加に伴いリンゴ酸の合成がおこること、根におけるヌクレオチド合成の素材提供をするPP経路の関与などが明らかにされた。一方、プリン代謝に関しては、サルベージ経路や異化経路に特徴が見られ、他の植物に比べ、ヌクレオシダーゼの働きが大きいことなどが解明された。これらの特徴は、この植物の持つ耐塩性と密接な関連を持つと思われるが、詳細については、さらに、今後の研究が必要である。

文献

- Ashihara, H. and Nobusawa, E. (1981) *Z. Pflanzenphysiol.* **104**, 443-458.
Hirose, F. and Ashihara, H. (1984) *Physiol. Plant.* **60**, 532-538.
Peterson, T.A., Lovatt, C.J. and Nieman, R.H. (1988) *J. Expt. Bot.* **39**, 1389-1395.
Sagishima, K., Kubota, K. and Ashihara, H. (1989) *Ann. Bot. (Lond.)* **64**, 185-193.
Saito, M., Tokoro, T. and Ashihara, H. (1989) *Natur. Sci. Rep. Ochanomizu Univ.* **40**, 45-56.
Yabuki, N. and Ashihara, H. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1073**, 474-480.
Yabuki, N. and Ashihara, H. (1992) *Phytochemistry* **31**, 1905-1909.

Metabolic Studies Related to Salt Tolerance of Mangrove Plants

Hiroshi Ashihara and Yuko Fukushima

Department of Biology, Faculty of Science, Ochanomizu University,

2-1-1, Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo, 112, Japan

Summary

Coastal mangrove plants may produce large amounts of ATP to facilitate the removal and/or transport of excess salts and may also synthesize compounds that function as compatible solutes to lower the osmotic potential of their tissues. In the present study the metabolism of carbohydrates and purine nucleotides was investigated in roots and leaves of 2-year-old seedlings of the mangrove plant, *Avicennia marina*.

The rate of respiration (O_2 uptake) of leaves increased in the presence of increasing concentrations of NaCl in the incubation medium although root respiration was not similarly affected. In roots the rate of release of $^{14}CO_2$ from [$1-^{14}C$]glucose was more than twice that observed with [$6-^{14}C$]glucose but similar rates of $^{14}CO_2$ output were obtained when the two forms of labelled glucose were incubated with leaves. The C_6/C_1 ratios observed with roots varied from 0.30 to 0.44 while the ratios of 0.85 to 0.99 were obtained with leaves incubated in the presence of varying concentrations of NaCl. This implies that there is a greater involvement of the oxidative pentose phosphate in glucose catabolism in roots than in leaves.

[U- ^{14}C]Sucrose incubated with root segments for 18 h was converted to CO_2 , amino acids, organic acids, sugars and proteins. The incorporation of radioactivity into most of these components was not affected by NaCl. However, the release of $^{14}CO_2$ from leaves incubated with [U- ^{14}C]sucrose was enhanced by 250 and 500 mM NaCl, but similar effects were not observed with roots. Incorporation of radioactivity from [U- ^{14}C]sucrose into malate was enhanced in both roots and leaves by increasing the NaCl concentrations from 100 mM to 500 mM. Independent of NaCl concentration, more than half of the radioactivity in the neutral fraction from leaves was incorporated into an unidentified sugar while in the same fraction from roots the ^{14}C label was associated with glucose, fructose and sucrose. It is tempting to suggest that the unidentified sugar that accumulates in leaves may function as a compatible solute.

[8- ^{14}C]Adenosine and [8- ^{14}C]guanosine were salvaged to nucleotides and nucleic acids by both roots and leaves. Between 20 and 40% of total radioactivity taken up by the plant tissues was incorporated into the ureides, allantoin and allantoic acid, with <5% being released as $^{14}CO_2$. NaCl at 100 and 500 mM had little effect on the purine salvage and catabolism pathways in *A. marina* although there are reports in the literature on salt stress-induced increases in purine catabolism in glycophytes.

Both leaves and roots of *A. marina* accumulated glycinebetaine but proline, another potential compatible solute in halophytes, was present in only low amounts. Asparagine was the major free amino acids in leaves and roots of *A. marina*.

The possible roles of the investigated pathways in mangrove plants will be discussed.