

9822 海草アマモの海水環境適応機構に関する細胞分子生物学的研究

助成研究者：福原 敏行 (東京農工大学 農学部)
共同研究者：高木 慎吾 (大阪大学大学院 理学研究科)
大脇 良成 (農林水産省 農業研究センター)
朴 俊泳 (朝鮮大学校 教育学部)

日本各地の海岸には、アマモ、スガモなどの沈水性の単子葉植物(海草)が生育している。海草アマモは、海水中という厳しい環境に適応した植物で、その海水環境適応機構の解明は、植物の耐塩性機構を解明するために適した植物材料と考えられる。

海草アマモからプロトプラストを調製すると、未成熟葉からは球形の、成熟葉からは非球形のプロトプラストが得られ、非球形プロトプラストは、ソルビトールによる浸透圧変化や NaCl の濃度変化に対して耐性がある。アマモ成熟葉の表皮細胞を電子顕微鏡で観察すると細胞膜が入り込んだ転送細胞様の構造が観察され、細胞表面積が増えることでイオンの輸送を促進していることが示唆された。植物細胞のイオンホメオスタシスを維持するために最も重要なタンパク質として細胞膜 H^+ -ATPase があげられるが、アマモからも細胞膜 H^+ -ATPase 様 cDNA(ZHA1)がクローニングされ、成熟葉におけるこの遺伝子の発現は、未成熟葉のそれよりも高いことが確認されている。これらのことから、転送細胞様の入り組んだ構造をとる細胞膜構造とその細胞膜に存在する H^+ -ATPase がアマモの海水環境適応機構に重要な役割を果していることが示唆された。

海草アマモ、水草オオセキショウモ、陸上植物イネの葉から、水性二層分配法を用いて細胞膜画分を調製し、NaCl 添加による ATPase 活性の阻害効果を3種の植物間で比較した。イネやオオセキショウモの細胞膜 ATPase 活性が、NaCl 添加により著しく阻害されるのに対し、アマモ細胞膜 ATPase 活性は、NaCl 添加に対して耐性が見られた。海水の塩濃度と同程度(0.5M NaCl)の反応溶液中で、オオセキショウモおよびイネの ATPase 活性は、NaCl を添加していない場合に比べて活性が 25-30%に減少しているのに対しアマモの ATPase 活性は、ほとんど阻害されなかった。それぞれの細胞膜画分について、アクリジンオレンジを用いたプロトンの輸送活性測定および抗イネ細胞膜 H^+ -ATPase 抗体を用いた Western blotting により、細胞膜 H^+ -ATPase の存在を確認した。

以上の結果から、アマモの細胞膜 ATPase 活性は、海水程度の塩に対し抵抗性があることが示された。海草アマモは、この海水耐性細胞膜 ATPase (おそらく細胞膜 H^+ -ATPase) 活性により積極的にイオンを汲み出すことにより海水環境に適応していることが示唆された。

9822 海草アマモの海水環境適応機構に関する細胞分子生物学的研究

助成研究者：福原 敏行 (東京農工大学 農学部)
 共同研究者：高木 慎吾 (大阪大学大学院 理学研究科)
 大脇 良成 (農林水産省 農業研究センター)
 朴 俊泳 (朝鮮大学校 教育学部)

1. 研究目的

日本各地の海岸には、アマモ、スガモなどの沈水性の単子葉植物(海草)が生育している。これらアマモ類の海草は、日本沿岸の生態系に極めて重要な植物群である。海藻がほとんど生えることができない砂地や砂泥の内湾では、アマモ類が群生して海中に“草原”(アマモ場)を作っている。例えば、東京湾には、広い範囲にアマモ(*Zostera marina*)が生育しておりアマモ場(藻場)を形成している。アマモ場は、魚介類が産卵し稚魚が育つ生産の場として重要であるだけでなく、アマモが海水中の窒素、リン酸等のイオンを吸収し成長するため、東京湾の水質浄化にも役立っている。このように、アマモに代表される海草が日本各地の海岸の生産性や環境に対し非常に重要な役割を果たしていることは、多くの海洋生態学者から指摘されている(1)。生物学的視点からみると、海草は海水という非常に厳しい環境に適応した植物で、その海水環境適応機構の解明は、植物の耐塩性機構を解明するために適した植物材料と考えられる。しかしながら、海草の海水環境適応機構についての細胞分子レベルでの研究は、ほとんどなされていない。

海草アマモからプロトプラストを調製すると、未成熟葉からは球形の、成熟葉からは非球形のプロトプラストが得られる。非球形プロトプラストは、球形のプロトプラストに比べてソルビトールによる浸透圧変化やNaClの濃度変化に対して耐性がある(2)。また、アマモ成熟葉の表皮細胞を電子顕微鏡で観察すると細胞膜が入りくんだ転送細胞(Transfer Cell)様の構造が観察される(3)。転送細胞は、入りくんだ細胞膜により細胞表面積が増えることで溶質の輸送を促進していると考えられている。一方、細胞膜H⁺-ATPaseは、植物細胞のイオンホメオスタシスを維持するため、二次輸送体(シンポーター、アンチポーター、チャンネル)にエネルギーを供給する重要な酵素で、耐塩性においてもその関与が示唆されている(4, 5)。これまでの研究から、アマモより細胞膜H⁺-ATPase様cDNA(ZHA1)がクローニングされ、アマモ成熟葉におけるこの遺伝子の発現は、未成熟葉のそれよりも高いことが確認されている(6)。これらのことから、転送細胞様の入り組んだ構造をとり表面積が増加した細胞膜構造をもつ表皮細胞とその細胞膜に存在するH⁺-ATPaseがアマモの海水環境適応機構に重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究では、海草アマモの細胞膜について

H⁺-ATPase 活性を中心に解析し、陸上植物イネおよび淡水性沈水植物(水草)オオセキショウモの細胞膜と比較することにより、海草アマモの海水環境適応機構を細胞分子レベルで解析することを目的とした。

2. 研究方法

2.1. 材料

単子葉類レースソウ目アマモ科アマモ(*Zostera marina*)は、千葉県富津岬で採集した。単子葉類トチカガミ目トチカガミ科オオセキショウモ(*Vallisneria gigantea*)は、25℃で明条件、暗条件をそれぞれ12時間に設定して維持したものをを用いた。

2.2. 粗マイクロソーム画分および細胞膜画分の調製

粗マイクロソーム画分の調製は、高木らの方法(7)に従った。細胞膜画分は、Dextran T-500 と Polyethyleneglycol P-3350 を用いた水性二層分配法(8)に従って調製した。

2.3. ATPase 活性の測定

ATPase 活性は、基質として ATP を入れた反応液とサンプルを一定時間反応させ、遊離してきたリン酸をモリブデン酸アンモニウムによって定量する方法 (Fiske-Subbarow 法を改変した方法) に従って行った(9)。

2.4. プロトン輸送活性の測定

細胞膜画分にアクリジンオレンジ加え、Brij58 で処理し、反転膜小胞を作製した。アクリジンオレンジの吸光度 (495nm) の減少を測定することにより、H⁺輸送活性を確認した。反応は MgSO₄ (終濃度 5mM) を添加することにより開始し、イオノフォア (nigericin、終濃度 5μg/ml) を添加することにより H⁺の漏出を確認した。

2.5. Western blotting

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した細胞膜画分のタンパク質を PVDF 膜に転写し、一次抗体として抗イネ細胞膜 H⁺-ATPase ウサギ抗血清、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗血清を用い、アルカリフォスファターゼ法を用いて細胞膜 H⁺-ATPase を検出した。抗イネ細胞膜 H⁺-ATPase (OSA1) ウサギ抗血清は、北海道農業試験場、笠原賢明氏より分譲を受けた。

2.6. 酵母を用いた H⁺-ATPase 活性の確認

アマモ細胞膜 H⁺-ATPase の cDNA を、グルコースの培地添加により遺伝子を誘

導発現させるベクターに挿入したコンストラクトを構築し、酵母の内在性細胞膜 H^+ -ATPase をガラクトース誘導性プロモーターに支配されている変異株(RS-72) に導入した。得られた形質転換体を SD- galactose 培地で前培養し、SD- galactose、SD- glucose プレートにスポットした(外側を 10 倍希釈、内側を 100 倍希釈した)。AHA2 は、シロイヌナズナ細胞膜 H^+ -ATPase isoform2 を示す。細胞膜 H^+ -ATPase の C 末端領域を削ったインサートは Δ を用いて表し、ZHA1、ZHA1 Δ については各々のインサートについて 2 クローンずつ drop test を行った(Fig. 5, 22-1,2、 Δ 22-1,2)。

2.7. 陽イオン組成の解析

植物体サンプルを微粉碎した後、1N-HCl で緩やかに一昼夜振とう抽出後、ろ過し、その一定量を希釈して原子吸光法により分析した。

3. 研究結果

3.1. アマモ細胞膜画分の調製および純度の確認

海草アマモ、水草オオセキショウモ、陸上植物イネの葉から、粗マイクロソーム (CM) 画分を単離し、その画分から水性二層分配法を用いて細胞膜 (PM) 画分を調製した。タンパク質量後、それぞれの画分について、ATPase 活性、UDPase 活性およびチトクロム C 還元酵素活性を測定した(Table 1)。UDPase およびチトクロム C 還元酵素は、それぞれゴルジ体および小胞体のマーカー酵素である。Table 1 より、CM 画分に比べ PM 画分では、UDPase およびチトクロム C 還元酵素活性が低くなっており、PM 画分では、ゴルジ体および小胞体由来の膜成分の混入が少ないことを確認した。また阻害剤として NaN_3 、 KNO_3 を用いた ATPase 活性測定の結果(Table 1, 上段)、PM 画分に混入しているミトコンドリア内膜および液胞膜由来の ATPase 活性の混入も少ないことを確認した。これらの結果から、水性二層分配法を用いて調製した細胞膜 (PM) 画分は、純度の高い画分であることが確認できた。細胞膜 H^+ -ATPase が属する P-type ATPase 活性は、バナジン酸で阻害されることから、バナジン酸で阻害された活性を P-type ATPase 活性とした (Table 1)。他の植物の例から、P-type ATPase 活性の大部分は、細胞膜 H^+ -ATPase に由来すると見なすことができる。

3.2. アマモ細胞膜画分の ATPase 活性

細胞膜 (PM) 画分のバナジン酸で阻害される(P-type)ATPase 活性の pH 依存性について測定した (Fig. 1)。アマモの細胞膜 ATPase 活性は、pH 6.0 で最大となった。次に、pH 6.5 および 7.0 で反応溶液に NaCl を加え、種々の NaCl 濃度における細胞膜(P-type)ATPase 活性を測定し、NaCl 添加による ATPase 活性の阻害効果を

3種の植物間で比較した(Fig. 2)。イネやオオセキショウモの細胞膜 ATPase 活性が、NaCl 添加により著しく阻害されるのに対し、アマモ細胞膜 ATPase 活性は、NaCl 添加に対して耐性が見られた。この傾向は、pH6.5 の実験で顕著に表れ、海水の塩濃度と同程度(0.5M NaCl)の反応溶液中で、オオセキショウモおよびイネの ATPase 活性は、NaCl を添加していない場合に比べて活性が 25-30%に減少しているのに対しアマモの ATPase 活性は、ほとんど阻害されなかった。

3.3. アマモ細胞膜画分のプロトン輸送活性

各植物の細胞膜画分について、アクリジンオレンジを用いて H⁺輸送活性を測定した。アクリジンオレンジの吸光度(495nm)は、時間とともに減少し、イオノフォア(nigericin)を加えると、吸収度が回復したことから、プロトンの輸送活性が確認された(Fig. 3)。

3.4. 抗体を用いた H⁺-ATPase タンパク質の確認

抗イネ細胞膜 H⁺-ATPase 抗体を用いて、アマモ、オオセキショウモ、イネ細胞膜画分より得られた膜タンパク質に対して Western blotting を行った。その結果、それぞれの画分において約 100kDa の位置に特異的なバンドが検出された(Fig. 4)。ZHA1 の塩基配列から推定される ZHA1 タンパク質の分子量は 104,464Da であることから、アマモ細胞膜画分には ZHA1 の遺伝子産物と推定される細胞膜 H⁺-ATPase が検出された。この2つの結果は、アマモ細胞膜に H⁺-ATPase タンパク質の存在を示している。

3.5. 酵母を用いた ZHA1 遺伝子の相補性テスト

ZHA1 遺伝子(アマモ細胞膜 H⁺-ATPase 様遺伝子)を酵母に導入し、酵母細胞膜 H⁺-ATPase を相補するか検討した。具体的には、グルコースによって遺伝子発現誘導できるベクターに ZHA1(cDNA)を挿入したコンストラクトを、酵母内在性細胞膜 H⁺-ATPase 遺伝子がガラクトース誘導プロモーターに支配されている酵母株(RS-72)に導入した。この方法で、シロイヌナズナ細胞膜 H⁺-ATPase の研究が進んでいる。ガラクトース培地では、内在性細胞膜 H⁺-ATPase が発現しているため、全ての株が生育できるが、グルコース培地では、MP213(酵母細胞膜 H⁺-ATPase 遺伝子を含む)株、MP142 および MP194(シロイヌナズナ細胞膜 H⁺-ATPase 遺伝子 AHA2 を含む)株だけでコロニー形成が見られた。細胞膜 H⁺-ATPase C 末端領域には、自己阻害ドメインがあると言われており、MP194の方がMP142よりもよく相補している。ZHA1によって相補された株は、得られなかった(Fig. 5)。

3.6. アマモの葉のイオン組成

アマモ、オオセキショウモ、イネの葉の陽イオン (Na, K, Mg, Ca) 含量を原子吸光法を用いて解析した (Table 2)。Na イオンの含量は、陸上植物イネで低いのに対し、海草アマモ、水草オオセキショウモでは高かった。他の陽イオンの含量には有意な差が見られなかった。

4. 考察

本研究では、海草アマモの海水環境適応機構を研究するため、アマモの細胞膜の生化学的特性を中心に解析した。特に細胞膜 H^+ -ATPase がアマモの海水環境適応機構に重要な役割を果たしていると仮定し、アマモの細胞膜 H^+ -ATPase の存在を確認しその活性を測定するとともに、陸上植物イネ、淡水性沈水植物オオセキショウモでも同様の実験を行い、3種間における ATPase 活性を中心とした細胞膜の特性について比較検討した。水草オオセキショウモおよび陸上植物イネの細胞膜画分の ATPase 活性が、NaCl の添加により著しく活性阻害を受けるのに対して、アマモ細胞膜画分の ATPase 活性は NaCl の添加により阻害を受けなかった。特に海水の塩濃度と同程度 (0.5M NaCl) の反応溶液中で、オオセキショウモおよびイネの ATPase 活性は、NaCl を添加していない場合に比べて活性が 25-30% に減少しているのに対しアマモの ATPase 活性は、ほとんど阻害されなかった。この結果は、アマモの海水環境適応機構を考える上で非常に興味深い。アマモの細胞膜 ATPase 活性は、海水程度の塩に対し抵抗性があることが示され、この ATPase 活性により積極的にイオンを汲み出していることが示唆された。

Western blotting 実験の結果から、細胞膜タンパク質中での H^+ -ATPase タンパク質量は 3 种植物間で大差がなかったことから、アマモの細胞膜 ATPase 活性の耐塩性は、細胞膜 H^+ -ATPase タンパク質量の差に起因するものではないことが示唆された。

3種の植物の葉の陽イオンの組成を解析した結果は、オオセキショウモとアマモで、Na イオン含量が、イネと比較すると多いという一見意外な結果が得られた。水性植物は、陸上植物とは異なるイオンホメオスタシス機構を備えている可能性が考えられる。

5. 今後の課題

今年度の助成研究により、海草アマモの細胞膜 ATPase 活性が、海水程度の塩濃度に対して耐性があることが示され、この ATPase 活性により積極的にイオンを汲み出していることが示唆された。おそらくアマモの細胞膜 ATPase 活性の中心は H^+ -ATPase タンパク質であると考えられることから、既にクローニングしているアマモ細胞膜 H^+ -ATPase 様遺伝子 (ZHA1) を、酵母やアフリカツメガエルの卵母細胞で発現させ、ZHA1 タ

ンパク質の NaCl に対する特性を生化学的および電気生理学的手法でより詳細に明らかにして行くことが今後の課題としてあげられる。

また、ZHA1 遺伝子をイネ等の作物に導入し、形質転換体の表現系や細胞膜画分の NaCl に対する ATPase 活性の変化を解析することで、海草アマモの海水環境適応機構だけでなく、耐塩性作物の作出といった応用面への発展が期待できる。

さらに、アマモの海水環境適応機構には、入り組んだ細胞膜を作ることによる細胞膜表面積の増加も重要な要素と考えられる。この点では、動物細胞で細胞膜と細胞外マトリックス (植物細胞では細胞壁) を繋ぐ重要な働きをするタンパク質として研究が進んでいるインテグリンのようなタンパク質の存在が考えられる。このような働きを持つ膜タンパク質をアマモから単離すべく現在研究を進めている。

6. 文献

- (1) 川口弘一 (1999) ソルトサイエンス研究財団 平成9年度研究報告集 I : 341-352.
- (2) Arai M., Pak J.Y., Nomura K. and Nitta T. (1991) Seawater-resistant, non-spherical protoplasts from seagrass leaves. *Physiol. Plant.* 83: 551-559.
- (3) Pak J.Y., Fukuhara T. and Nitta T. (1995) Discrete subcellular localization of membrane-bound ATPase activity in marine angiosperms and marine algae. *Planta* 196: 15-22.
- (4) Serrano R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61-94.
- (5) Sussman M.R. (1994) Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 211-234.
- (6) Fukuhara T., Pak J.K., Ohwaki Y., Tsujimura H. and Nitta T. (1996) Tissue-specific expression of the gene for a putative plasma membrane H⁺-ATPase in a seagrass. *Plant Physiol.* 110: 35-42.
- (7) Takagi T., Yoshida Y. and Nagai R. (1988) A model for cell membrane isolation using *Vallisneria* leaves. In J.M. Glime, ed., *Method in Bryology*, Hattori Bot. Lab., Nichinan, pp81-88.
- (8) Yoshida S., Uemura M., Niki T., Sakai A. and Gusta L.V. (1983) Partition of membrane particles in aqueous two-polymer phase system and its practical use for purification of plasma membranes from plants. *Plant Physiol.* 72: 105-114.
- (9) Heinonen J.K. and Lahti R.J. (1981) A new convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* 113: 313-317.

Table 1. Marker enzyme activities in crude microsome (CM) and plasma membrane (PM) fractions of *Zostera marina*, *Vallisneria gigantea* and *Oryza sativa*.

	<i>Zostera marina</i>		<i>Vallisneria gigantea</i>		<i>Oryza sativa</i>	
	CM	PM	CM	PM	CM	PM
ATPase activities (μ moles Pi / mg protein / min)						
Vanadate sensitive ATPase	0.1736	0.361	0.0279	0.207	0.0942	0.4262
Nitrate sensitive ATPase	0.2273	0.0772	0.0236	-0.0115	0.056	-0.1202
Azide sensitive ATPase	0.3742	0.0305	0.0267	0.0047	0.0509	-0.0437
UDPase activity (μ moles Pi / mg protein / min)						
	0.3204	0.0628	0.0886	0.0185	0.107	0.0209
Cytochrome <i>c</i> reductase activity (μ moles cytochrome <i>c</i> / mg protein / min)						
Antimycin A sensitive	0.1771	0.0213	0.0255	0.016	0.0369	0.0072
Antimycin A insensitive	0.1818	0.021	0.0276	0.0145	0.0446	0.0071

Table 2. Compositions of positive ions in leaves of *Z. marina*, *V. gigantea* and *O. sativa*

	Na	K	Mg	Ca
<i>Z. marina</i>				
mature	3.06	3.39	0.59	0.45
immature	3.36	3.43	0.34	0.50
<i>V. gigantea</i>	3.76	3.64	0.53	0.85
<i>O. sativa</i>	0.02	2.82	0.24	0.19

mature, mature leaves
immature, immature leaves

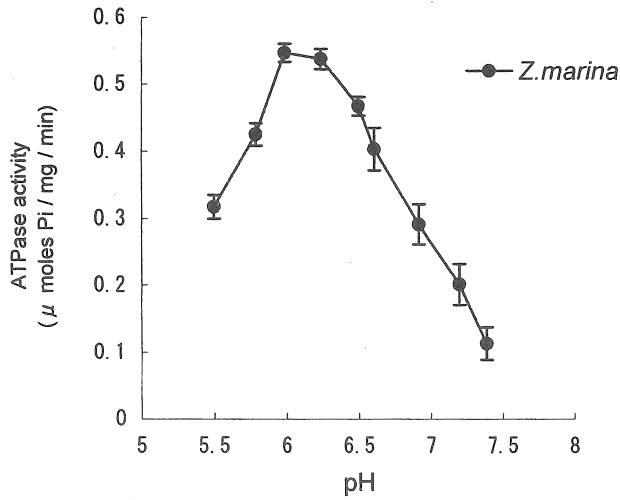


Figure 1. pH sensitivity of the vanadate-sensitive (P-type) ATPase in the plasma membrane fractions of *Zostera marina*.

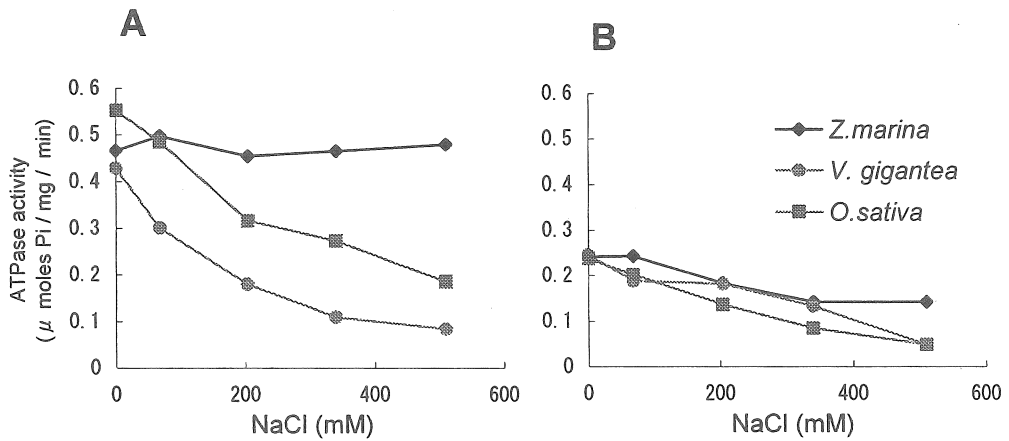


Figure 2. Effect of NaCl on vanadate-sensitive (P-type) ATPase activities in the plasma membrane fractions of *Z. marina*, *V. gigantea* and *O. sativa*. A, pH 6.5; B, pH 7.0.

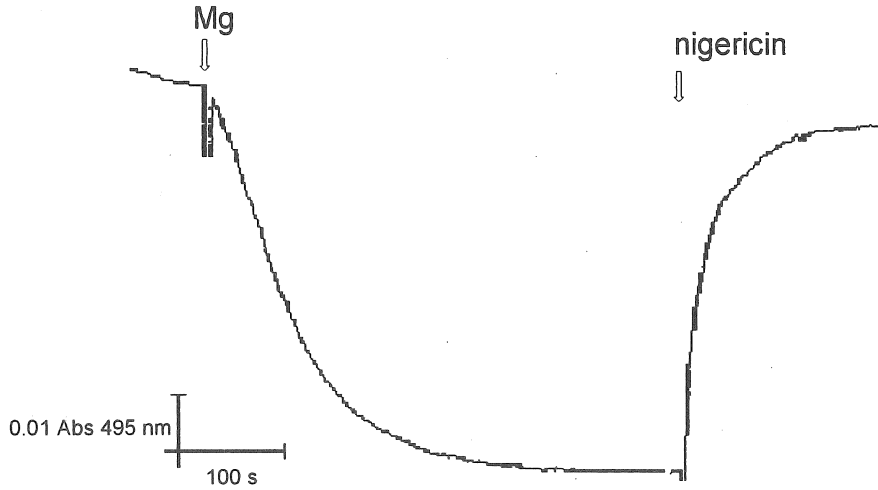


Figure 3. Proton pumping activity in the plasma membrane fraction of *Zostera marina*

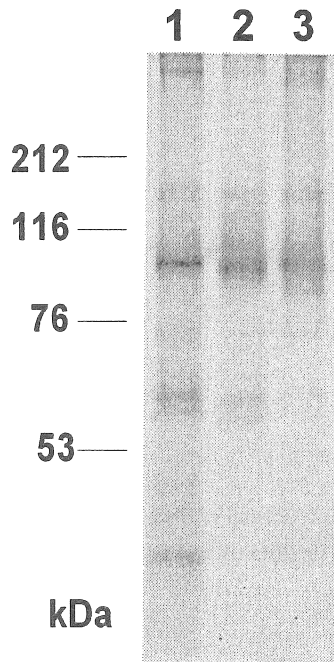
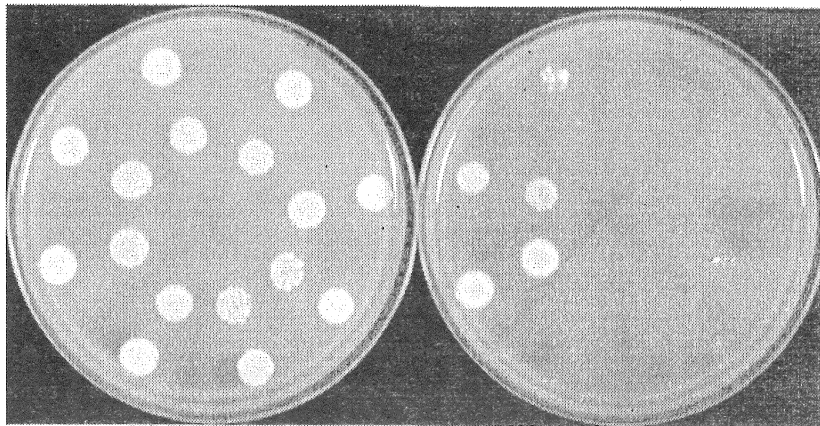
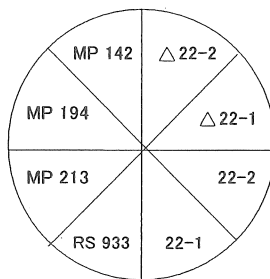


Figure 4. Western blot analysis of plasma membrane H⁺-ATPases. 0.3 mg of proteins in the plasma membrane fractions were electrophoresed by 8% SDS-polyacrylamide gel. Lane 1, *Z. marina*; lane 2, *V. gigantea*; lane 3, *O. sativa*.



SD-galactose

SD-glucose



strain	plasmid	insert
RS-933	YEp351	no insert
MP-213	pRS-890	yeast H ⁺ -ATPase
MP-142	pMP136	AHA2
MP-194	pMP132	AHA2Δ92
136-22	p136-22	ZHA1
136-Δ22	p136-Δ22	ZHA1Δ

Figure 5. Drop tests for complementation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase mutants

Study on Salinity Tolerance in a Seagrass (*Zostera marina*)

Toshiyuki FUKUHARA (Tokyo University of Agriculture and Technology)

Shingo TAKAGI (Osaka University)

Yoshinari OHWAKI (National Agriculture Research Center)

JunYong PAK (Korea University)

Summary

The majority of higher plants are sensitive to a high-salt environment. However, a few species of monocotyledonous angiosperms, namely, seagrasses, have acquired salt-tolerance mechanisms that allow them to thrive in seawater. Ability to thrive in seawater is one of the most prominent examples of adaptation in higher plants. Such adaptation must be accompanied by morphological and physiological changes in seagrass plants, and these changes must be genetically regulated.

The epidermal cells of mature leaves of a seagrass (*Zostera marina*) change morphologically and physiologically in response to salinity; cells isolated from immature-leaf tissues are sensitive to salinity, while mature leaf cells with the morphological characteristics of transfer cells are resistant to salinity. It is generally accepted that transfer cells are highly active in transporting various ions and nutrients and the invaginated plasma membranes of typical transfer cells are associated with high levels of ATPase activity. Plasma membrane H^+ -ATPases are responsible for creating an electrochemical proton gradient (proton-motive force) which is used for the transport of ions and nutrients that is mediated by specific carriers and channels (secondary transport). The high degree of invagination of the plasma membrane of transfer cells increases the surface area of the membrane and the number of these H^+ -ATPases, carriers and channels.

We characterized biochemical properties of the plasma membrane fraction from a seagrass (*Z. marina*) to compare with those from a freshwater grass (*Vallisneria gigantea*) and a land plant (rice, *Oryza sativa*). Amounts of the H^+ -ATPase protein in the plasma membrane fraction of these three plants that were detected by a polyclonal antibody against the rice H^+ -ATPase protein were similar. The proton pumping activity in the plasma membrane fraction of the seagrass was confirmed by quenching of acridine orange absorbance. The ATPase activity in the plasma membrane fraction from the seagrass was resistant to high-salt buffer, but the ATPase activities in those from the freshwater-grass and rice were sensitive. Therefore, the differentiation of the transfer cell-like structures, accompanied by the salt-resistant plasma membrane ATPase activity, in the epidermal cells of mature leaves may be important for the excretion of various ions by these cells. These specifically differentiated epidermal cells may play a crucial role in the survival of the seagrass in seawater.