

9 8 2 3 マングローブ植物の代謝生理学的研究

助成研究者：芦原 坦 (お茶の水女子大学 理学部)

共同研究者：安本 恵理 (お茶の水女子大学 理学部)

最近、耐塩性や塩ストレスに対する応答機構などに関するモデル研究が多く試みられているが、実際に耐塩性を持つ高等植物に関してその機構を調べた研究はほとんどない。熱帯、亜熱帯の海岸沼沢地に生育しているマングローブ植物についても、生態学的あるいは形態学的研究はあるものの、その個体の生理学や代謝といったより基礎的研究は非常に少ない。これらの植物が海水中の塩とどのようなかわりをもつのかを生理学的観点から具体的に明らかにすることが本研究の目的である。

今回は、沖縄の西表島に生育するマングローブ植物のうち、強い耐塩性を持ち、さらに幼植物が得られやすいヒルギダマシ(*Avicennia marina*)と組織培養が可能なマヤブシキ(*Sonneratia alba*)を材料として、マングローブ植物のエネルギー代謝と浸透圧調節物質代謝に関しての研究を行った。ここでは、これらの研究のうち、ヒルギダマシの葉において、塩ストレスに伴う無機イオンのとりこみ、その結果変動する浸透圧調節物質の同定、この物質の生合成と前駆物質の代謝の変動について報告する。ヒルギダマシは、葉に塩腺を持ちこの構造によって塩を排出しているが、植物体にも塩を高濃度でため込んで外界との浸透圧調節に利用している。細胞質にグリシンベタインを合成することにより、液胞と細胞質の浸透圧調節を行っている。マングローブのエネルギー代謝・炭水化物代謝に関与する諸酵素活性は、塩により強く阻害され、酵素自体は耐塩性ではない。グリシンベタインは、高濃度で存在しても酵素活性を阻害しないが、酵素タンパク質の塩からの保護はしない。ヒルギダマシ葉におけるグリシンベタイン生合成経路は、エタノールアミン→ホスホリルエタノールアミン→ホスホリルモノメチルエタノールアミン→ホスホリルジメチルエタノールアミン→ホスホリルコリン→コリン→ベタインアルデヒド→グリシンベタインであることが明らかにされ、塩によりこの生合成活性の増加が確認された。塩ストレスによってコリンからのグリシンベタイン生合成とコリンの分解が活性化される。このような塩ストレスによるコリン代謝の調節機構は、高塩ストレス環境下で生育することが可能なマングローブに特有な性質かもしれない。しかし、これらを明らかにするためには、さらに詳細な研究が必要とされる。

もう一方のマングローブ植物、マヤブシキは浸透圧調節物質として葉にマンニトールを蓄積するが、NaCl存在下で育てたこのマングローブのカルスには、マンニトールは見られず、多量のグルコースとフルクトースを蓄積し、浸透圧調節を行っている。この研究についての詳細は、スペースの関係からここでは、省略したが、内容はすでに発表してある(Yasumoto et al., *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 35: 82-85, 1999)ので参照されたい。

9 8 2 3 マングローブ植物の代謝生理学的研究

助成研究者：芦原 坦 (お茶の水女子大学 理学部)

共同研究者：安本 恵理 (お茶の水女子大学 理学部)

1. 研究目的

最近、耐塩性や塩ストレスに対する応答機構などに関するモデル研究が多く試みられているが、実際に耐塩性を持つ高等植物に関してその機構を調べた研究はほとんどない。熱帯、亜熱帯の海岸沼沢地に生育しているマングローブ植物についても、生態学的あるいは形態学的研究はあるものの、その個体の生理学や代謝といったより基礎的研究は非常に少ない。これらの植物が海水中の塩とどのようなかかわりをもつのかを生理学的観点から具体的に明らかにすることが本研究の目的である。

今回は、沖縄の西表島に生育するマングローブ植物のうち、強い耐塩性を持ち、さらに幼植物が得られやすいヒルギダマシ(*Avicennia marina*)と組織培養が可能なマヤブシキ(*Sonneratia alba*)を材料として、マングローブ植物のエネルギー代謝と浸透圧調節物質代謝に関しての研究を行った。ここでは、これらの研究のうち、ヒルギダマシの葉において、塩ストレスに伴う無機イオンのとりこみ、その結果変動する浸透圧調節物質の同定、この物質の生合成と前駆物質の代謝の変動等について報告する。

2. 研究方法

2.1 植物材料

ヒルギダマシ幼植物(茎の長さ約 85 mm)と成木の葉(枝の上部に付いている淡緑色の若葉: 平均的な葉の長さ 40 mm、幅 20mm、生重量 400mg)は、沖縄県西表島に自生しているものを用いた。

2.2 無機イオンと浸透圧調節物質の定量

ヒルギダマシ葉の無機イオンの定量は、島津イオンクロマトグラフ(HIC-6A型)で行った。浸透圧調節物質の分析は、 ^1H - および ^{13}C -NMRにより、Jonesら(1986)および Larher(1988)の方法によった。

2.3 放射性化合物の投与

[1,2- ^{14}C]エタノールアミン塩酸と、[メチル- ^{14}C]塩化コリンは、Moravek Biochemicals, Inc., Brea, CA, USA と Amersham Pharmacia Biotech Ltd. Amersham, UK) から購入した。

ヒルギダマシの葉切片 (3mm x 3mm、200mg) を、0-500mM NaCl と、4.5 μ M [1,2- 14 C]エタノールアミン (比活性 4.07MBq μ mol $^{-1}$)、または、9 μ M [メチル- 14 C]コリン (比活性 2.04MBq μ mol $^{-1}$) を含む LS 培地と共に、30ml センターウェル付きエルレンマイヤーフラスコの主室に入れた。センターウェルには、放出される 14 CO $_2$ を吸着させるために 0.1ml の 20% KOH をしみ込ませた濾紙の入ったチューブを入れた。このフラスコを、暗所、27°C で、18 時間インキュベートした。インキュベーション終了後、濾紙の入ったチューブはセンターウェルから取り出し、葉の切片は水洗後、直ちに液体窒素で凍結させた。

2.4 14 CO $_2$ の放射活性測定

KH 14 CO $_3$ を含む濾紙は、チューブごと 10ml 蒸留水に移し溶出後、一部 (0.1-1.0 ml) を用いて液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

2.5 14 C-低分子代謝物の抽出

冷凍した葉の切片に、6% 過塩素酸 (PCA) 溶液を加え、乳棒、乳鉢を用いて 14 C-低分子代謝物の抽出を行った。まず、サンプルに 6%PCA 溶液を 5ml 加え、すりつぶした後、遠心分離 (1,700 \times g、7 分) した。得られた沈殿は 4ml の PCA 溶液で洗い、同様に遠心分離にかけた。2 度の遠心で得られた上清を一緒にして、 14 C-低分子代謝物分画とした。これを、20% KOH で中和し、PCA をカリウム塩として除去後、濃縮乾固した。これを 1ml の蒸留水に溶解し、薄層クロマトグラフィー (TLC) による分析に用いた。PCA 不溶性分画は、脂質の分析に用いた。

2.6 14 C-低分子代謝物の TLC による分析

14 C-低分子代謝物は微結晶セルロースプレート (東京化成工業社製) を用いた TLC で分析した。展開溶媒には、1-ブタノール : 酢酸 : 水 (4:1:2, v/v, Ashihara and Matsumura 1977) を用いた。展開後、薄層上の放射活性を、バイオイメージングアナライザー、(FLA-2000 型、富士フィルム工業社製) によって測定した。標準には、 14 C-エタノールアミン、 14 C-コリンなどの放射性化合物と一般化学試薬をもちいた。グリシンベタインの発色は、ドラッグエンドルブ試薬 (2.4mM 塩基性硝酸ビスマス、4.2%酢酸、127mM ヨウ化カリウム) によった。

TLC で得られた 14 C-化合物のうち、リン酸化合物のスポットを確認するため、サンプルとアルカリホスファターゼを反応させて、前述と同様の TLC による分析を行った。市販のアルカリホスファターゼ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) は、100mM Tris-HCl (pH9.8) に溶解した後、セファデックス G-25 カラムで脱塩してから用いた。サンプルに十分な量のアルカリホスファターゼを加え、37°C で 3 時間反応させた。この、アルカリホスファターゼ処理をしたサンプルと、未処理サンプルを同時展開し、アルカリホスファターゼ処理によって消失したスポットを、リン酸化合物のスポットと同定した。

2.7 ¹⁴C-脂質の抽出と分析

前述の PCA 不溶性分画から、エタノール:エーテル (1:1) を用いて脂質を抽出し、TLC により分析した。PCA 不溶性分画にエタノール:エーテル (1:1) を 5ml 加え、よく懸濁した後、ウォーターバスにつけ (50°C、20 分)、脂質を可溶化した後、遠心分離 (1,700 × g、10 分) した。沈殿に、エタノール:エーテル (1:1) を 5ml 加えて脂質を再度可溶化して、同様に遠心分離を行った。2 度の遠心分離で得られた上清を一緒にして、コンセントレーターにて濃縮乾固した。これを、400 μl のクロロホルムに溶解し、二次元 TLC による分析に用いた。一次元目、二次元目の展開溶媒は、それぞれ、クロロホルム:メタノール:水 (65:25:4, v/v) とクロロホルム:メタノール:イソプロピルアミン:アンモニア (65:35:0.5:5, v/v) を用いた (Ashihara and Tokoro 1985)。展開後、プラスチックプレート上の放射活性を、バイオイメージングアナライザーによって測定した。

2.8 酵素の抽出

ヒルギダマシ葉 (約 1 g) を乳鉢で抽出用バッファー [50mM イミダゾール-HCl バッファー (pH7.6) に 2mM MgCl₂、1 mM EDTA、0.1% 2-メルカプトエタノール、0.5% アスコルビン酸ナトリウム] と不溶性のポリビニルピロリドンを加えながらホモジナイズした。ホモジェネートはナイロン布でろ過し、ろ液を 20,000 × g で 20 分間遠心分離した。遠心上清に固体の硫酸を加え酵素タンパク質を塩析した。用いた硫酸の濃度は、以下のとおりである。Phosphofructokinase (PFK) と Pyrophosphate:fructose-6-phosphate-1-phosphotransferase (PFP) は、30-60% 飽和 ; Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (ALD) は、35-60% 飽和、Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P) と 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH) は、40-60% 飽和、Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) は、35-55% 飽和を用いた。これらの硫酸分画で得られた酵素液を Sephadex G25 カラムで脱塩後、酵素活性を測定した。NAD-malate dehydrogenase (NAD-MDH) は、硫酸分画をせずに、遠心上清をそのまま脱塩して用いた。

2.9 酵素活性の測定

酵素活性は、30°C で分光光度計により、340 nm の吸光度の変化をモニターすることにより測定した。各反応液の組成は、文献 (Kubota and Ashihara, 1990; Nagano and Ashihara, 1993; Ashihara et al., 1997) を参照されたい。

3. 研究結果

3.1 ヒルギダマシ幼植物の浸透圧調節物質の同定

^{23}Na -NMR のスペクトラムから、 Na^+ イオンは、植物体全体に高濃度で存在することが示された。そこで、ヒルギダマシの幼植物の葉、茎、根に蓄積されている有機化合物を ^1H -および ^{13}C -NMR spectroscopy により調べた (Fig. 1)。高濃度で見られたものは、グリシンベタイン、アスパラギン、スタキオースであった。グリシンベタインは、植物体全体に分布していたが、若い葉で一番濃度が高く (180 $\mu\text{moles/g}$ FW) 根で最も濃度が低かった (19 $\mu\text{moles/g}$ FW)。一方、スタキオースは茎と根だけにみられた。遊離アミノ酸の84% (葉) から 97% (根) がアスパラギンであり、プロリンの蓄積はみられなかった。ヒルギダマシの幼植物ではみられなかったが、成木の若葉にはグリセロールの蓄積もみられた。他の植物で、浸透圧調節物質である polyols は、この植物には蓄積していなかった。

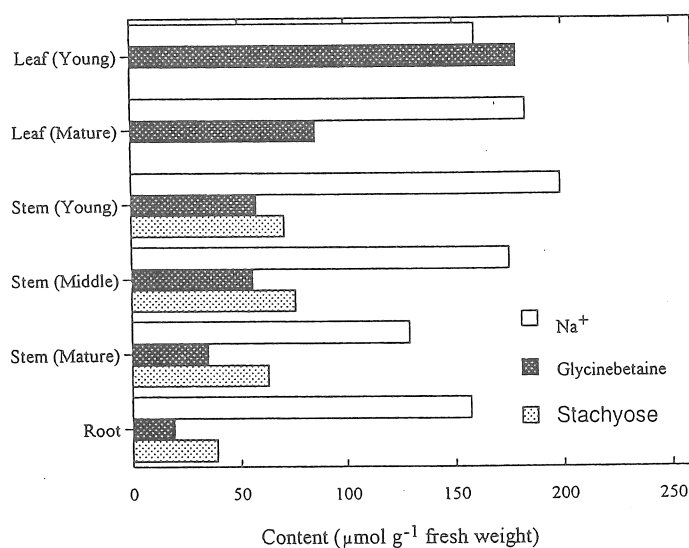


Fig. 1. Distribution of Na^+ ions, glycinebetaine and stachyose in naturally grown two-month-old seedlings of *Avicennia marina*. Concentrations are expressed as $\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight and the values shown were obtained from a typical seedling.

3.2 塩ストレスによる無機イオン、グリシンベタイン、グリセロールのレベルの変動

Table 1 に、ヒルギダマシ葉を 0 mM、250 mM、500 mM NaCl で処理した場合の無機イオンと予想される浸透圧調節物質のレベルの変動を示す。 Na^+ と Cl^- イオンは、250 mM NaCl 処理により約 2 倍に増加した。この時、 K^+ イオンも増加したが、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} イオンは、減少した。グリシンベタインのレベルも 250 mM NaCl 処理により約 2 倍に増加した。一方、グリセロールのレベルは、NaCl 処理により減少した。この結果から、グリシンベタインは浸透圧調節物質と考えられるが、グリセロールは調節物質とし

て機能しないと思われる。

Table 1. Effect of salt stress on the levels of major ions and glycinebetaine in leaf segments of *Avicennia marina*.

Levels are determined after incubation with 0, 250 and 500 mM NaCl in the LS medium for 18 hrs. Contents are expressed as $\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight with s.d. (n=3). The values in parentheses show percentage of control (0 mM)

Cations, anions and glycinebetaine	NaCl		
	0 mM	250 mM	500 mM
Na ⁺	166.5±3.5 (100)	373.0±3.0 (224)	454.5±3.5 (273)
K ⁺	45.4±7.4 (100)	74.6±4.6 (164)	87.8±12.1 (193)
NH ₄ ⁺	60.1±2.6 (100)	42.0±3.0 (70)	40.3±2.4 (67)
Mg ²⁺	14.2±2.4 (100)	18.3±0.4 (129)	18.7±4.0 (132)
Ca ²⁺	7.1±0.6 (100)	6.6±2.0 (93)	5.4±0.3 (76)
Cl ⁻	325.0±31.3 (100)	665.2±89.5 (205)	831.0±72.8 (256)
NO ₃ ⁻	32.8±3.2 (100)	17.0±2.9 (52)	14.5±1.0 (44)
SO ₄ ²⁻	8.1±0.9 (100)	6.9±0.1 (85)	7.3±1.0 (90)
Glycinebetaine	62.2±6.0 (100)	119.0±0.2 (191)	119.4±2.4 (192)

3.3 グリシンベタインの生合成

ヒルギダマシ葉を 250mM, 500mM NaCl で処理するとグリシンベタインの含量が増加することが示されたが、グリシンベタインの生合成量が、実際に増加するかどうかを ¹⁴C で標識した化合物の代謝から調べた。NaCl により [methyl-¹⁴C]コリンと [1,2-¹⁴C]エタノールアミンからのグリシンベタインの合成量が増加することが明らかとなった (Tables 2,3)。

3.4 コリン代謝と塩ストレスの影響

コリンは、グリシンベタインの直接の前駆物質であるが、ヒルギダマシの葉でコリンの代謝が、塩によりどのような影響をうけるのかを検討した。[methyl-¹⁴C]コリンの放射能のゆくえをみると、塩処理をしていない葉では、とりこまれた放射能の 80% 近くが、低分子代謝産物にみられるのに対し、250 および 500mM NaCl 処理により、この分画へのとりこみが 50% 前後に低下し、一方、CO₂ として放出される放射能が 18% から 40-50% へと顕著に増加することが示された (Table 2)。PCA 不溶性分画 (脂質) に取り込まれたラ

ベルは8-10%であるが、これは、塩ストレスにより影響を受けなかった。

[メチル-¹⁴C]コリンを葉片に18時間投与後に得られた¹⁴C-低分子代謝産物のTLCから、4つの放射活性を持つスポットが得られ、Rf値の低い順から①ホスホリルコリン、②グリシンベタイン、③メチルエタノールアミン、④コリンと同定された。[メチル-¹⁴C]コリンからホスホリルコリンへの変換は非常に活発であり、塩ストレスを与えない葉では、細胞内の放射能の約40%がホスホリルコリンに見られる。塩ストレスによりホスホリルコリンにとりこまれる放射能は著しく阻害され、250 mM NaClで細胞内の放射能の約20%、500 mMで約15%がこの物質に見られる。この反応はコリンキナーゼ (EC2.7.1.32)により触媒される (Fig.2, 反応③)が、反応で必要とされるATPが塩ストレス下で減少するのが阻害の主な理由であると推定される。ホスホリルコリンは、その後、ホスファチジルコリンなどのリン脂質の合成につかわれるが (反応④、⑤)、塩ストレスはコリンからの脂質合成にはあまり影響を与えていない。

[メチル-¹⁴C]コリンからの¹⁴CO₂放出は、塩ストレスを与えない葉片では、葉片にとりこまれた放射能の約18%にすぎないが、塩ストレス存在下ではこれが、50%にまで増加する。コリンに特異的なデメチラーゼの報告は、まだないが、他の経路から類推するとコリンの3つのメチル基が遊離し、ホルムアルデヒド、ギ酸を経由してCO₂になると推定される (反応⑥、⑦、⑧)。放射能のとりこみは、モノメチルエタノールアミンとジメチルエタノールアミンにも検出されたが、これは、コリンの3つのメチル基のうちの一部が遊離して生じたものと思われる。中間産物であるメチルエタノールアミンにラベルの取り込みが見られることは、この分解経路が機能していることを示唆している。コリンからの脱メチル化反応については全く研究がなく、より詳しい研究が必要であるが、この反応によりNADHが生じると考えられることから、塩ストレス下での還元力供給系としてこの系が働く可能性もある。

3.5 エタノールアミンの代謝と塩ストレスの影響

[1,2-¹⁴C]エタノールアミンから取り込まれたラベルが、各分画にどのように分布していたかを、Table 3に示す。低分子代謝産物が含まれるPCA可溶性分画に全放射能の63-67%が分布していた。脂質を含むPCA不溶性分画には22-30%のラベルが取り込まれており、¹⁴CO₂として放出された放射能は7-11%であった。

PCA可溶性分画について、薄層クロマトグラフィーによる分析を行った結果、7つのスポットが得られたがこれらは、①ホスホリルエタノールアミン、②ホスホリルモノメチルエタノールアミン、③ホスホリルコリン、④グリシンベタイン、⑤エタノールアミン、⑥メチルエタノールアミン、⑦コリンと同定された。

①-③はリン酸化合物であるが、これらの物質への取り込みは、総取り込み量の42-47%もあり、[1,2-¹⁴C]エタノールアミンの半分近くがリン酸化合物へと代謝されていた。

Table 2. Effect of salt stress on the metabolic fate of [methyl-¹⁴C]choline by leaf disks of *Avicennia marina*.

Leaf disks were incubated with 9 μ M [methyl-¹⁴C] choline (2.04MBq μ mol⁻¹) in the presence of 0, 250, 500mM NaCl for 18hrs. Incorporation of radioactivity was expressed as kBq g⁻¹fresh weight \pm sd and percentage of total uptake of the radioactivity (parentheses).

	NaCl(mM)		
	0	250	500
PCA Soluble	118.19 \pm 3.57 (77.0)	81.30 \pm 0.83 (51.0)	63.73 \pm 10.68 (45.2)
Betaine	6.28 \pm 0.12 (4.1)	8.02 \pm 0.36 (5.0)	9.96 \pm 0.08 (7.1)
Choline	35.21 \pm 1.32 (22.9)	30.09 \pm 1.44 (18.9)	27.49 \pm 5.75 (19.5)
mono-, di-ME*	15.87 \pm 3.18 (10.3)	7.99 \pm 0.35 (5.0)	4.99 \pm 0.73 (3.5)
P-Choline	60.20 \pm 1.31 (39.3)	34.58 \pm 0.12 (21.7)	20.95 \pm 4.03 (14.8)
Insoluble	7.96 \pm 0.27 (5.2)	9.52 \pm 0.58 (6.0)	7.91 \pm 1.20 (5.6)
Lipid	5.22 \pm 0.44 (3.4)	6.77 \pm 0.71 (4.2)	5.28 \pm 1.12 (3.7)
CO ₂	27.28 \pm 2.10 (17.8)	68.69 \pm 1.48 (43.1)	68.54 \pm 5.73 (49.2)
Total	153.43 \pm 1.75 (100)	159.50 \pm 0.08 (100)	140.19 \pm 6.15 (100)

* ME: methylethanolamine

Table 3. Effect of salt stress on the metabolic fate of [1,2-¹⁴C]ethanolamine by leaf disks of *Avicennia marina*.

Leaf disks were incubated with 4.5 μ M [1,2-¹⁴C]ethanolamine(4.07MBq μ mol⁻¹) in the presence of 0, 250 and 500mM NaCl for 18 hrs. Incorporation of radioactivity was expressed as kBq g⁻¹fresh weight \pm sd and percentage of total uptake of the radioactivity (parentheses).

	NaCl(mM)		
	0	250	500
PCA Soluble	67.41 \pm 1.35 (63.1)	70.13 \pm 1.52 (64.2)	69.79 \pm 2.76 (67.6)
Betaine	3.95 \pm 0.52 (3.7)	4.82 \pm 0.61 (4.4)	5.30 \pm 0.00 (5.1)
Choline	1.28 \pm 0.16 (1.2)	1.85 \pm 0.10 (1.7)	2.24 \pm 0.00 (2.2)
mono- & di- ME ¹⁾	5.73 \pm 0.69 (5.3)	6.42 \pm 0.42 (5.9)	9.18 \pm 1.23 (9.0)
P-Choline	17.55 \pm 1.85 (16.5)	19.32 \pm 0.38 (17.7)	17.86 \pm 1.60 (17.4)
P-EA ²⁾	24.96 \pm 4.02 (23.3)	23.44 \pm 0.43 (21.5)	17.74 \pm 4.04 (17.0)
P-MME ³⁾	8.41 \pm 2.38 (7.9)	5.80 \pm 1.26 (5.3)	7.68 \pm 1.71 (7.5)
EA ⁴⁾	0.49 \pm 0.11 (0.5)	0.43 \pm 0.09 (0.4)	0.82 \pm 0.02 (0.8)
Insoluble	32.80 \pm 0.38 (30.7)	28.12 \pm 0.54 (25.7)	23.22 \pm 3.37 (22.4)
Lipid	29.80 \pm 1.26 (27.9)	26.14 \pm 0.48 (23.9)	20.95 \pm 3.06 (20.2)
CO ₂	6.64 \pm 0.70 (6.2)	11.01 \pm 1.33 (10.1)	10.23 \pm 1.06 (10.0)
Total	106.84 \pm 2.43 (100)	109.25 \pm 0.72 (100)	103.24 \pm 5.06 (100)

¹⁾mono- and dimethylethanolamine

²⁾phosphorylethanolamine

³⁾phosphorylmonoethylethanolamine

⁴⁾ethanolamine

ることが示された。さらに、ホスファチジルコリンへの取り込みがわずかであったのに比べて、ホスホリルコリンへの取り込みは多いことから、ヒルギダマシにおけるコリン合成

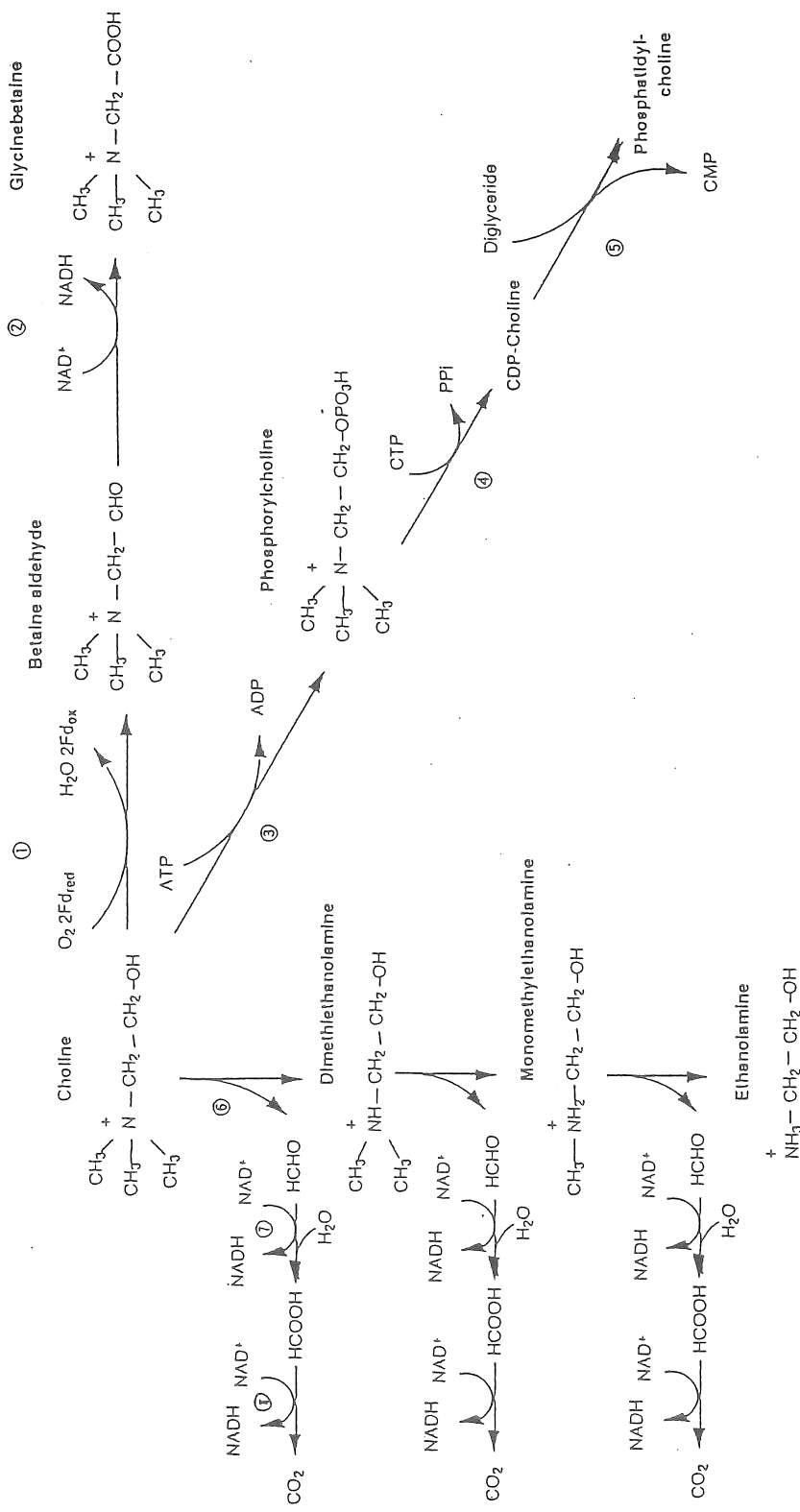


Fig. 2. Possible pathways related to the metabolism of choline in *Avicennia marina*.

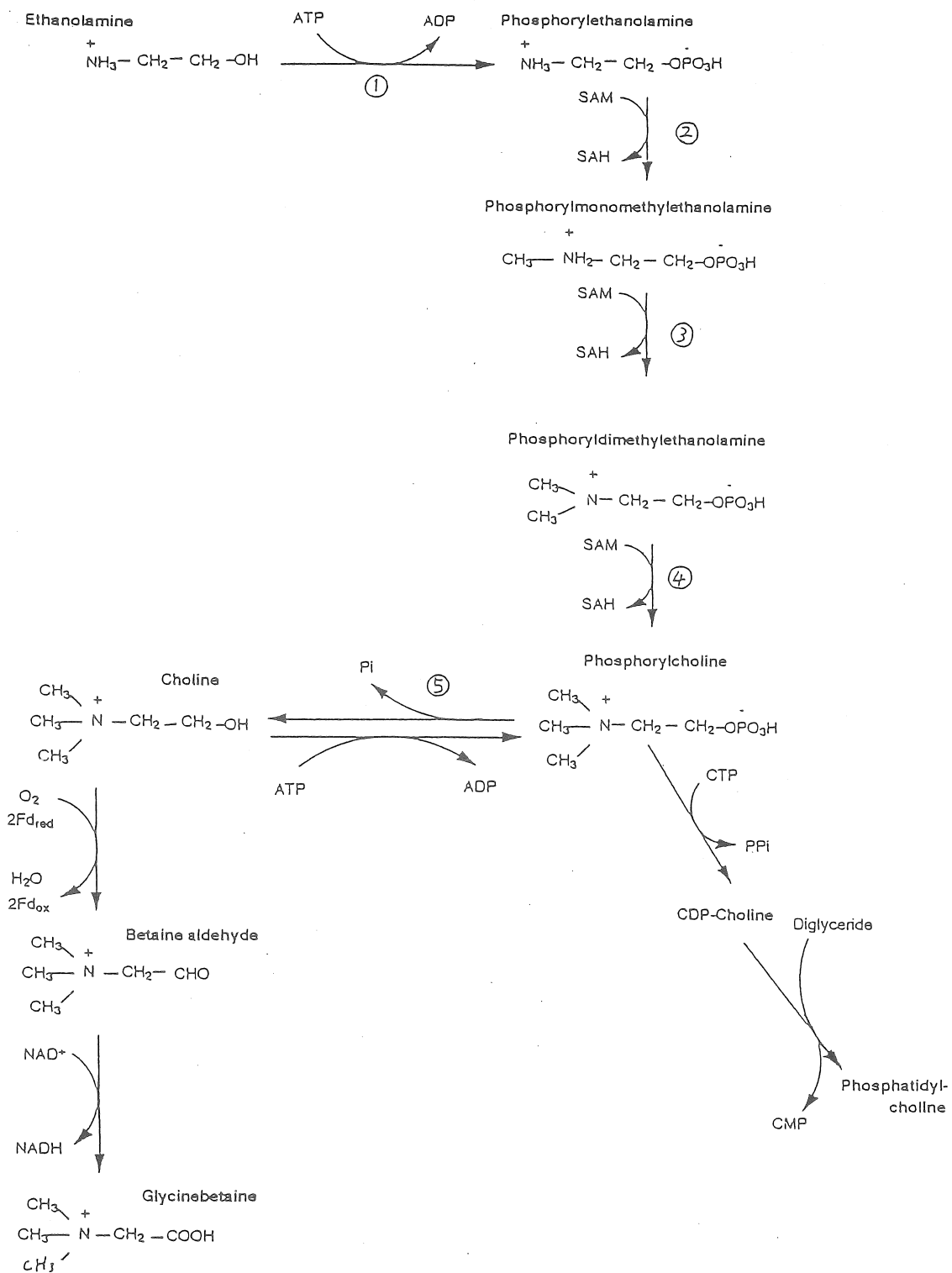


Fig. 3. Possible pathways related to the metabolism of ethanolamine in *Avicennia marina*.

は、リン酸化合物を中間代謝産物とする系で起こるのではないかと考えられる。同様の系を持つものとして、アカザ科植物であるサトウダイコン、ホウレンソウ(Hanson and Rhodes 1983, Weretilnyk et. al. 1995, Summers and Weretilnyk 1993)が報告されている。[1,2-¹⁴C]エタノールアミンからコリンへのラベル取り込みが、塩ストレスに伴って増加していることから、塩ストレスによって、コリン合成が活発になっていると考えられる。耐塩性を持たないタバコでは、コリンのプールが少なく、コリンモノオキシゲナーゼ遺伝子を導入してもグリシンベタインの合成が高まらないという報告もあり (Nuccio et.al. 1998)、コリンのプールをストレスに応じて柔軟に代謝させることが、ヒルギダマシの耐塩性を高めているのかもしれない。

[1,2-¹⁴C]エタノールアミンから取り込まれた PCA 不溶性分画のラベルは、ほとんどが脂質に分布していた。脂質分画について2次元薄層クロマトグラフィーを行った結果、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルコリンが同定された。脂質分画へ取り込まれたラベルのうち、ホスファチジルコリンへの取り込みはわずかであったことから、ホスファチジル化合物を中間代謝産物とするコリン合成系が、ヒルギダマシに存在する可能性は低い。

3.6 ヒルギダマシの酵素活性に対する NaCl とグリシンベタインの効果

Fig.4 と Fig.5 にヒルギダマシから部分精製した炭素代謝の諸酵素活性に対する NaCl とグリシンベタインの効果の結果を示した。NaCl は、すべての酵素活性を抑えたが、その程度は酵素の種類により大きく異なっていた。一番効果が大きかったのは PFP であり、100 mM NaCl で 80%阻害が見られた。一方、グリシンベタインは 500 mM の濃度でも、これらの酵素活性に影響を与えなかった。グリシンベタインは、これらの酵素の塩による阻害を保護しなかった。ヒルギダマシ葉では、NaCl の大部分は、液胞に蓄積され、細胞質でこれらの酵素活性に影響を与えないグリシンベタインが合成され、液胞と細胞質間の浸透圧を調整しているものと思われる。

4. 結論と今後の課題

マングローブ植物であるヒルギダマシは、葉に塩腺を持ちこの構造によって塩を排出しているが、植物体にも塩を高濃度でため込んで外界との浸透圧調節に利用している。細胞質にグリシンベタインを合成することにより、液胞と細胞質の浸透圧調節を行っている。マングローブのエネルギー代謝・炭水化物代謝に関与する諸酵素は、塩により強く阻害され、酵素自体は耐塩性ではない。グリシンベタインは、高濃度で存在しても酵素活性を阻害しないが、酵素タンパク質の塩からの保護はしない。ヒルギダマシ葉におけるグリシン

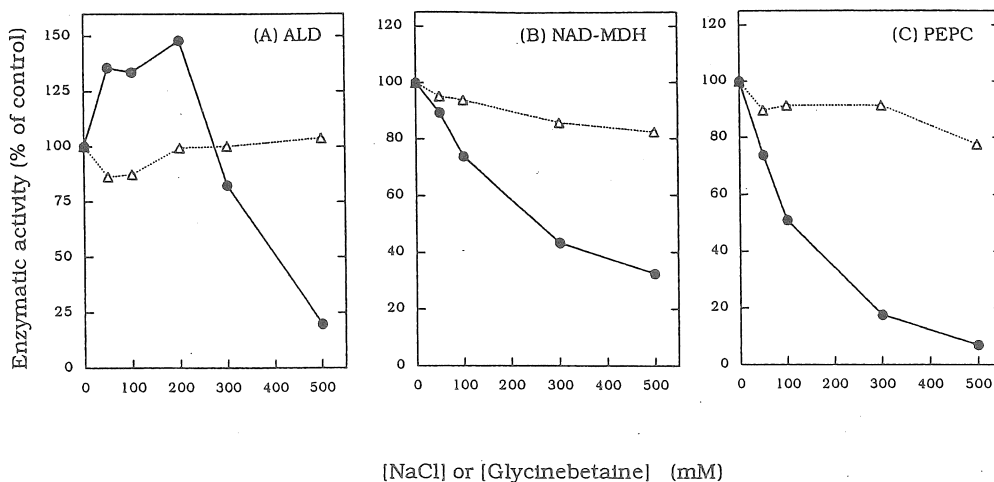


Fig. 4. Effects of NaCl (●) and glycinebetaine (Δ) on the activities of aldolase (A), NAD:malate dehydrogenase (B) and phosphoenolpyruvate carboxylase (C) from leaves of *Avicennia marina*. The values for enzymatic activity are expressed as a percentage of control activity (A: 1370 pkat mg⁻¹ protein; B: 150 nkat mg⁻¹ protein; C: 163 pkat mg⁻¹ protein).

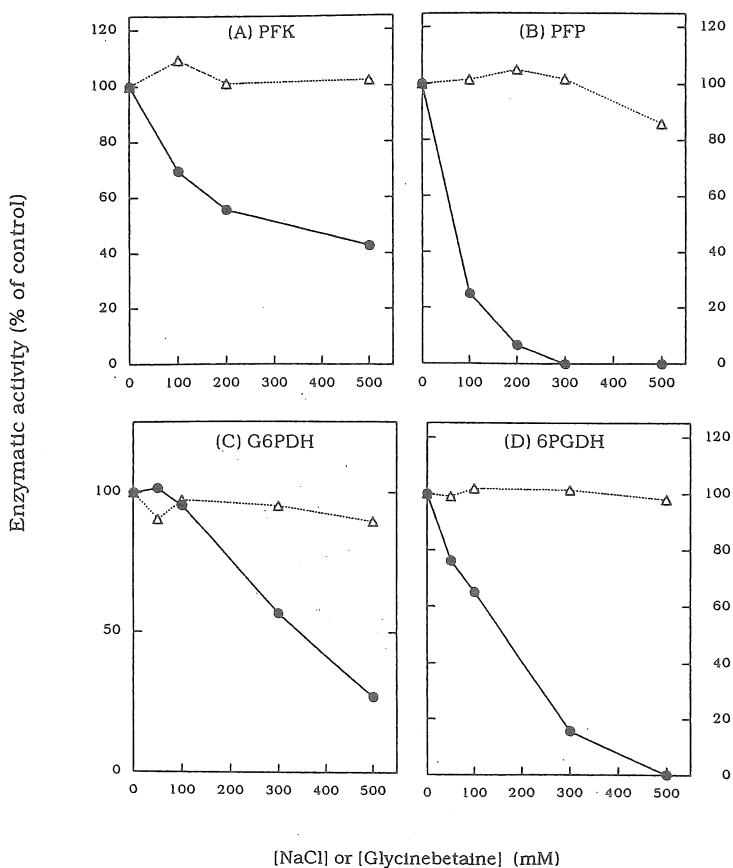


Fig. 5. Effects of NaCl (●) and glycinebetaine (Δ) on the activities of phosphofructokinase (A), pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase (B), glucose-6-phosphate dehydrogenase (C) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) (D) from leaves of *Avicennia marina*. The values for enzymatic activity are expressed as a percentage of control activity (A: 220 pkat mg⁻¹ protein; B: 440 pkat mg⁻¹ protein; C: 120 pkat mg⁻¹ protein; D: 143 pkat mg⁻¹ protein).

ベタイン生合成経路は、エタノールアミン→ホスホリルエタノールアミン→ホスホリルモノメチルエタノールアミン→ホスホリルジメチルエタノールアミン→ホスホリルコリン→コリン→ベタインアルデヒド→グリシンベタインであることが明らかにされた。また、塩によりこの生合成活性の増加が確認された。塩ストレスによってコリンからのグリシンベタイン生合成とコリンの分解が活性化される。このような塩ストレスによるコリン代謝の調節機構は、高塩ストレス環境下で生育することが可能なマングローブに特有なものかもしれないが、これらを明らかにするためには、さらに詳細な研究が必要とされる。

文献

- Ashihara, H., Adachi, K., Ottawa, M., Yasumoto, E., Fukushima, Y., Kato, M., Sano, H., Sasamoto, H., Baba, S. (1997) *Z. Naturforsch.* 52c: 433-440.
- Brouquisse, R., Weigel, P., Rhodes, D., Yocum, C.F. and Hanson, A.D. (1989) *Plant Physiol.* 90: 322-329.
- Hanson, A.D. and Rhodes, D. (1983) *Plant Physiol.* 71: 692-700.
- Jones, G.P., Naidu, B.P., Starr, R.K. and Paleg, L.G. (1986) *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 649-658.
- Kubota, K. and Ashihara, H. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1036, 138-142.
- Larher, F. (1988) *Plant Physiol. Biochem.* 26: 35-45.
- Nagano, M. and Ashihara, H. (1993) *Plant Cell Physiol.* 34: 1219-1228.
- Nuccio, M.L., Russell, B.L., Nolte, K.D., Rathinasabapathi, B., Gage, D.A. and Hanson, A.D. (1998) *Plant J.* 16: 487-496.
- Summers, P.S. and Weretilnyk, E.A. (1993) *Plant Physiol.* 103: 1269-1276.
- Weigel, P., Weretilnyk, E.A. and Hanson, A.D. (1986) *Plant Physiol.* 82: 753-759.
- Weretilnyk, E.A., Bednarek, S., MuCue, K.F., Rhodes, D. and Hanson, A.D. (1989) *Planta* 178: 342-352.
- Weretilnyk, E.A. and Hanson A.D. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 271: 56-63.
- Weretilnyk, E.A., Smith, D.D., Wilch, G.A. and Summers, P.S. (1995) *Plant Physiol.* 109: 1085-1091.

Characterization of the Mangrove Metabolism Related to the Salt Tolerance

Hiroshi Ashihara and Eri Yasumoto

Department of Biology, Faculty of Science, Ochanomizu University,
Tokyo, 112-8610, JAPAN

Naturally grown seedlings of *Avicennia marina* contain high concentrations of Na⁺ and Cl⁻. Our NMR studies revealed an accumulation of glycinebetaine, asparagine and starchyose in *A. marina*. The highest concentration of glycinebetaine was observed in young leaves, while the distribution of starchyose was restricted in stems and roots. Asparagine comprised more than 96% of total free amino acids in roots and 84% in leaves. Little or no accumulation of proline or polyols, which are proposed as compatible solutes in other plants, could be detected in *A. marina*. The cellular levels of glycinebetaine increased by the salt stress. The results from tracer experiments indicate the operation of an ethanolamine→phosphorylethanolamine→phosphorylmonomethylethanolamine→phosphoryldimethylethanolamine → phosphorylcholine → choline → betaine aldehyde → glycinebetaine pathway in young leaves of *A. marina*. The rates of the biosynthesis of glycinebetaine from both [methyl-¹⁴C]choline and [1,2-¹⁴C]ethanolamine were stimulated by the salt stress. Salt also markedly increased the degradation of [methyl-¹⁴C]choline to ¹⁴CO₂.

The activities of phosphofructokinase, pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating), phosphoenolpyruvate carboxylase and NAD:malate dehydrogenase from *A. marina* were inhibited by NaCl, while the activity of fructose-1,6-bisphosphate aldolase was activated by 50-200 mM NaCl. There was little or no effect of high concentrations (up to 500 mM) of glycinebetaine on the activities of any of these enzymes. No significant protection by glycinebetaine was detected against NaCl inhibition of these enzymatic activities. Based on these results, possible mechanisms for the salt-resistance of *A. marina* cells are discussed.