

## 2 1

助成番号 0121

## 耐塩性マングローブ培養細胞の耐塩性とエネルギー代謝に関する研究

助成研究者：芦原 坦 (お茶の水女子大学理学部)

共同研究者：橋岡 文、鈴木美帆子 (お茶の水女子大学理学部)

塩性土壌による砂漠化は、一般の植物の生育をさまたげるため、これらの植物への耐塩性付与が望まれている。筆者らは、海水中に成育しているマングローブ植物に注目してこれらの植物が持つ耐塩性(あるいは、好塩性)の性質が何であるのかを、マングローブ植物に特異な代謝系を探ることにより明らかにする目的で研究を進めている。植物体の持つ塩耐性の生理過程で、浸透圧調節物質の生合成や、塩の排除に伴い多量なエネルギーが必要とされるが、マングローブ植物には、一般の植物よりも効率のよいエネルギー代謝系がそなわっている可能性がある。今回の研究では、耐塩性を維持しているマングローブの培養細胞を用いて、解糖系に関する研究を行った。

ヒルギ科の *Bruguiera sexangula* の液体培養細胞は、マングローブ植物から誘導された唯一の培養細胞系で耐塩性を維持しており、分子生物学的、生化学的研究の材料としてすぐれたものである。この研究では、このマングローブ細胞の解糖系を耐塩性ではないニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) 培養細胞のものと比較した。*B. sexangula* の解糖系の間産物量から得られた質量作用比や酵素活性のプロファイルの結果は、*C. roseus* のものにほぼ類似していたが、フルクトース 2,6-ビスリン酸(F2,6BP)のレベルが極めて高いこと、解糖系の調節点に位置するホスホフルクトキナーゼ(PFK)の活性が高く、この反応のバイパス酵素であるピロリン酸依存の酵素(PFP)の活性は低いなど違いがみられた。CAM植物のPFP活性はF2,6BP非依存性であるが、*B. sexangula* のものは、*C. roseus* のPFPと同様にF2,6BP依存性であり、 $K_a$ 値は、約10 nMであった。また、ピルビン酸キナーゼや、そのバイパス経路であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼは、高い活性を示した。この細胞は、100-150mM NaCl存在下で生育が可能である。培養細胞にNaClを与えた直後に呼吸の増加が認められるが、この時の中間産物の変動から、PFKの段階のFine Controlによる活性化が示唆された。一方、100mM NaCl存在下で育てた細胞では、培養後半で、PFK、PEPC、PKのレベルが対照の2-3倍になり、これらが塩により増加することが示唆された。解糖系の鍵酵素の性質についても検討した。*B. sexangula* のPFKとPFPは、150 mMまでのNaClにより活性化され、NaClにより阻害される*C. roseus*の酵素と塩に対する応答が明らかに違っていた。本研究から、*B. sexangula*の解糖系の特徴がいくつか解明されたが、特に、*B. sexangula*の解糖系の酵素が耐塩性であるばかりでなく、塩により活性化されることが興味深い。今後は、これらの酵素についてより詳細な研究を行い、通常の植物の酵素との違いを分子レベルで明らかにしたい。



## 21

助成番号 0121

## 耐塩性マングローブ培養細胞の耐塩性とエネルギー代謝に関する研究

助成研究者：芦原 坦（お茶の水女子大学理学部）

共同研究者：橋岡 文、鈴木美帆子（お茶の水女子大学理学部）

## 1. 研究目的

塩性土壌による砂漠化は、一般の植物の生育をさまたげるため、植物の耐塩性付与が望まれている。筆者らは、海水中に成育しているマングローブ植物に注目してこれらの植物が持つ耐塩性（あるいは、好塩性）の性質が何であるのかを、マングローブ植物に特有な代謝系を探ることにより明らかにしたいと考えている。植物体の持つ塩耐性の生理過程で、浸透圧調節物質の生合成や、塩の排除に伴い多量なエネルギーが必要とされるが、マングローブ植物には、一般の植物よりも効率のよいエネルギー代謝系がそなわっているかどうかを調べることは興味深い。今回の研究では、耐塩性を維持しているマングローブの培養細胞を用いて、解糖系、ヌクレオチド代謝、デンプンやショ糖などの合成・分解に関する研究を行った。植物の解糖系は、一般の生物と異なる点がある。たとえば、ATP依存のPhosphofructokinase (PFK)のほかに、サイトゾルには、ピロリン酸(PPi)をつかうPPi: Fructose-6-P phosphotransferase (PFP)が存在したり、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼが、解糖系のバイパス酵素として働いたりする (Fig. 1)。ここでは、マングローブの解糖系についての結果を報告する。

## 2. 研究方法

## 2.1 実験材料

ヒルギ科の *Bruguiera sexangula* (Lour.) Poir. (和名：オバナオヒルギ、または、ロッカクヒルギ) の液体培養細胞を植物材料としてもちいた。この細胞系は、*B. sexangula* の胎生種子の芽生えの葉から、三村徹郎博士らにより確立されたものである。培地は、Thompson のアミノ酸培地を一部改変したものに、3% スクロース、 $2.0 \mu\text{M}$  2,4-D、 $0.02 \mu\text{M}$  4PU を含むものを用いて、室温 27°C の暗室で振とう培養をした (Kura-Hotta ら、2001)。培養は 300ml の Erlenmeyer フラスコに 50 ml の培養物を入れておこなった。細胞の植え継ぎは、通常、21 日周期で、生重量、約 500mg (5 ml の培養液) を用いて行った。いくつかの実験では、適当な濃度の NaCl を培地に加えた。

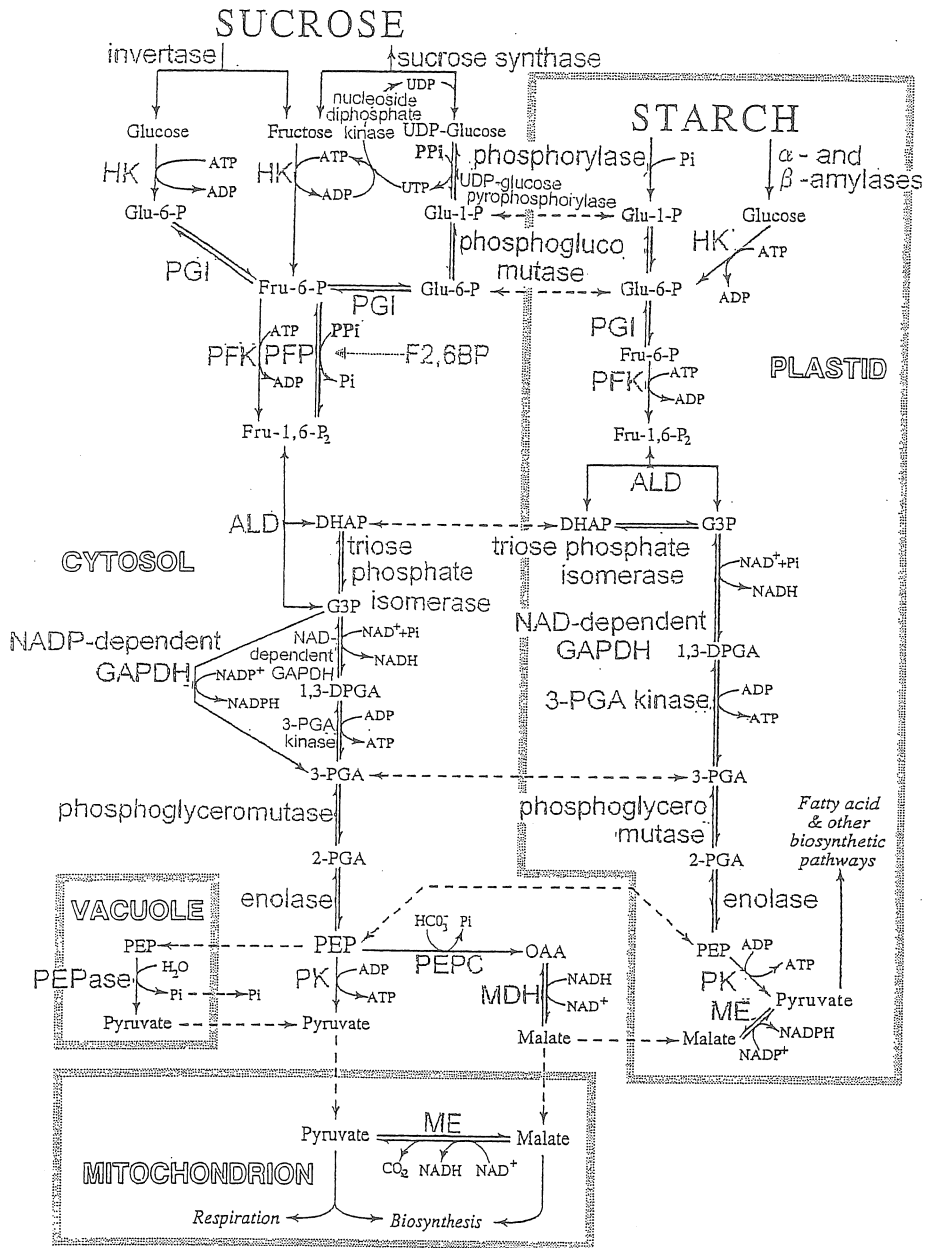


Fig. 1 Glycolytic pathways in higher plants (Redrawn from Plaxton, 1996)

## 2.2 生重量の測定

細胞培養液をミラクロス上で吸引ろ過し、蒸留水で洗浄して、細胞から培地を取り除き、ろ紙で水分を除いてから秤量した。

## 2.3 タンパク質の定量

タンパク質の定量は Bradford (1976) の方法により行った。サンプルに CBB 色素試薬 (ナカライテスク社製) を混ぜた後、590 nm の吸光度を測定した。

## 2.4 酵素の抽出

酵素の抽出は、すべて 4°C で行った。生重量 1g の細胞に 2 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA、0.1% 2-メルカプトエタノール、0.5% アスコルビン酸を含む 50mM イミダゾール-HCl buffer (pH 7.6) と 2.5% PVP を加えてガラスホモジナイザーですりつぶした。homogenate を 20,000 x g で 20 分間遠心分離し、上清をビーカーに移し、スターラーで攪拌しながら、80% 飽和になるように細かく砕いた固体硫酸アンモニウムを少しずつ加えた。さらに 10 分間攪神し、塩析したタンパク質を、20,000g で 10 分間遠心して集め、抽出用 buffer に溶かした。これを、活性測定時に用いる buffer であらかじめ平衡化しておいた SephadexG-25 カラム (PD10) で脱塩し、酵素液とし、直ちに測定に用いた。

## 2.5 酵素活性の測定

解糖系諸酵素の活性は、Nagano と Ashihara (1993) の方法で、NADH の酸化、あるいは NADP<sup>+</sup> の還元反応とカップルさせて、340 nm の吸収の増減で測定した。

## 2.6 ヌクレオチド量の測定

生重量 1g の細胞に氷冷した 0.4N 過塩素酸 (PCA) を加えて、ガラスホモジナイザーですりつぶした。20,000 x g、4°C で 15 分間遠心分離を行ない、得られた上清のうち 0.5 ml を 0.4 M PCA で平衡化したフェニル(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) SPE カラム (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) にのせ、0.4% PCA 4ml で溶出した。この操作を 3 回繰り返して得られた溶出液を合わせ、凍結乾燥させた。少量の 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaHPO<sub>4</sub> 緩衝液 (pH 7.0) に溶かし、HPLC 用試料とした。ヌクレオチドの測定は陰イオン交換 Shimpack WAX-1 カラムをとりつけた HPLC で行なった。測定は Ashihara ら (1987) の方法に従って行なった。

## 2.7 解糖系中間産物と Fructose-2, 6-bisphosphate (F2, 6BP) の定量

解糖系中間産物と F2,6BP の抽出と定量は、それぞれ、Kubota と Ashihara (1990)

および Ashihara (1986)の方法で行った。

## 2.8 呼吸（酸素吸収）の測定

細胞の呼吸は、Li と Ashihara (1990)の方法で酸素電極を用いて測定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 *B. sexangula* 液体培養細胞の成長

100 mM の NaCl の有無の状態、*B. sexangula* の成長を調べた(Fig. 2a)。植え継ぎ後、約 1 週間程度のラグが見られるが、その後、対数的に細胞の増殖がみられる。100 mM NaCl 存在下では、増殖の程度は押さえられるが、明らかな増加がみられる。対照として用いた *C. roseus* 細胞では、100 mM NaCl を培地に加えると、原形質分離がみられ、細胞は死滅した。*B. sexangula* の生重量あたりの可溶性タンパク質量は、培養 7 日目以降では、塩ストレスにより増加がみられた。

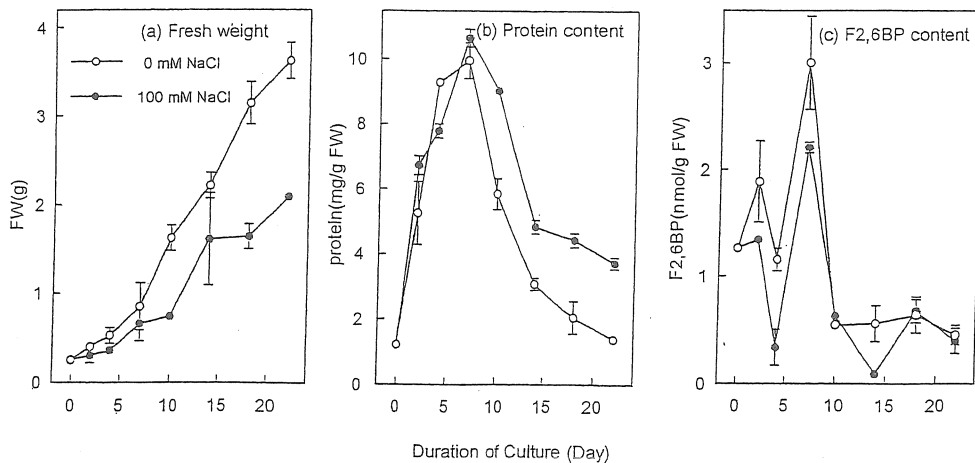


Fig. 2 Changes in fresh weight (a), soluble protein content (b) and fructose-2,6-bisphosphate content (c) in cultured *Bruguiera sexangula* cells grown with or without 100 mM NaCl

3.2 *B. sexangula* 液体培養細胞の解糖系活性への短期の塩ストレスの影響

一般的な植物の解糖系において、*in vivo* では、ほとんどの反応が平衡に近い反応であるに対して、2~3 の反応は著しく平衡から外れており、その非平衡反応を触媒する酵素によって解糖系全体の調節が行われると考えられる。*B. sexangula* の培養細胞の解糖系では、どの点が非平衡反応かを調べるために、いくつかの異なる成長期の細胞を凍結して瞬間的に解糖反応を止め、細胞内の中間産物量を測定した。これらの中間産物の濃度から各反応の質量作用比を算出し、個々の酵素の *in vitro* における平衡定数と比較したところ、塩感受性の一般の植物である *C. roseus* の場合と同じように、Hexokinase (HK)、PFK と Pyruvate kinase (PK) の反応が、著しく平衡からはずれていた (Table 1, Table 2)。これらの結果は、*B. sexangula* においても解糖系の調節点は一般の植物のものと大きく変わらないことを示唆している。Table 1 には、*B. sexangula* 細胞を 0 mM NaCl の培地に移植後 3 日に、0 mM および 150 mM NaCl を添加して、呼吸 (酸素吸収) と、解糖系の代謝物の量を比較したものである。150 mM NaCl の添加により、呼吸が 40% 増加し、解糖系の代謝物の量の変動がみられる。NaCl 添加細胞では、解糖系の初めの段階の代謝物である Glucose、Glucose-6-P (G6P)、Fructose-6-P (F6P) の減少とそれ以降の代謝物である Fructose-1,6-BP (F1,6BP)、Glyceraldehyde-3-P (GAP)、Dihydroxyacetone-P (DHAP)、Phosphoenolpyruvate (PEP)、Pyruvate の増加が見られた。このことは、塩により、F6P と F1,6BP の段階でクロスオーバーが見られ、PFK あるいは、PEP の関与する反応が塩により活性化されたことを示している。両酵素の反応の質量作用比は、150 mM NaCl により、それぞれ、10 倍と 2 倍に増加している。この短期塩処理による解糖系の活性化は、酵素タンパク質の持つアロステリックな性質による Fine control によるものが大であると考えられる。

Table1: Comparison in the levels of glycolytic metabolites in *Bruguiera sexangula* cells cultured with or without NaCl.

Metabolites Content (nmol/gFW)	<i>Bruguiera sexangula</i>		<i>Catharanthus roseus</i>
	0mM	150mM	0mM
Glucose	7670±270	2630±50	10500±2400
G6P	176±26	45.1±4.1	337.1±13.4
F6P	46.1±5.4	19.2±2.7	58.2±1.0
F1,6BP	11.8±1.5	18.8±0.8	31.8±0.2
GAP+DHAP	31.1±7.6	37.5±10.6	30.6±1.7
PEP	55.1±15.6	69.8±10.4	28.1±5.2
Pyruvate	35.8±6.5	44.1±2.6	31.0±20.5
ATP	183±15	42.2±0.4	159.8±10.0
ADP	46.4±13.3	27.7±4.9	35.6±2.0
PPi	10.2±3.8	18.8±3.8	71.9±10.9
Pi	652±6.6	447±29	5680
F2,6BP (activator)	1.9	1.3	0.04
O <sub>2</sub> uptake (nmol / gFW / min.)	514	724	—

Table2: Comparison between  $\Gamma$  and  $K_{eq}$  for the glycolytic reactions

Reaction catalysed by:	Apparent equilibrium constant ( $K_{eq}$ )	Mass-action ratio ( $\Gamma$ )			
		<i>Bruguiera sexangula</i>		<i>Catharanthus roseus</i>	
		0mM	150mM	0mM	
HK	$\frac{[G6P][ADP]}{[Glucose][ATP]}$	4700	0.006	0.011	0.0071
PGI	$\frac{[F6P]}{[G6P]}$	0.42	0.26	0.43	0.18
PFK	$\frac{[F1,6BP][ADP]}{[F6P][ATP]}$	1200	0.065	0.64	0.12
PFP	$\frac{[F1,6BP][Pi]}{[F6P][PPi]}$	3.2	6.3	13.0	1.9
PK	$\frac{[Pyruvate][ATP]}{[PEP][ADP]}$	11000	2.6	0.96	5.0

Estimated concentrations of the metabolites were calculated from measured amounts on the assumption that cytoplasmic volume is 5% of cellular mass. Cytoplasmic Pi concentration was estimated as 5 mM from the NMR studies.

HK, Hexokinase; PGI, Phosphoglucosomerase; PFK, Phosphofruktokinase; PFP, PPI:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase; PK, Pyruvate kinase.

### 3.3 *B. sexangula* 液体培養細胞の解糖系活性への長期の塩ストレスの影響

長期の塩ストレスでは、酵素タンパク質の合成、分解による酵素量の変動が解糖系の調節要因となる。NaCl を含まない培地で継代培養した細胞を、100 mM NaCl を含む培地に移し、解糖系の調節酵素の活性変動を調べた (Fig. 3)。ここで選んだ酵素は、解糖系の最初の調節点に関与する PFK と PFP、後半の調節点に関与すると思われる PK と PEP carboxylase (PEPC)、それに、Plaxton (1996) が関与していることを示唆している PEP phosphatase (PEPase) である。PEPase については、液胞およびサイトゾルの pH であると推測される pH 5.6 と 7.5 で測定した。生重量あたりの酵素活性のプロフィールは、培養初期では、塩の有無にかかわらずほぼ同様に増加し、7 日から 10 日で最大活性を示し、その後減少した。培養後期では、一般に塩添加細胞の活性が高いが、これは可溶性タンパク質のパターンと、ほぼ一致している (Fig. 2 b)。植物では、一般に、PFP 活性が PFK 活性より高く、Black ら (1987) は、PFP は環境の応答するいわゆる “Adaptive pathway” の酵素であるとしているが、*B. sexangula* ではむしろ PFK の活性の方が NaCl 存在下で高い活性を示した。特に NaCl 存在下の細胞では、PFK の方が高い活性を維持していた。PK と PEPC のレベルは、ほぼ同様であり、NaCl 存在下で増加した。PEPase 活性は、pH 5.6 で pH 7.5 よりも高い値を示した。液胞に存在すると思われる PEPase 活性は、塩存在下で、PK や PEPC より高かったが、これが解糖系に関与するかはより詳細な研究を待たねばならない。PEP が PEPC により代謝される場合には、PEP → Oxaloacetate → Malate → Pyruvate の経路が働くと思われる (Fig. 1)。



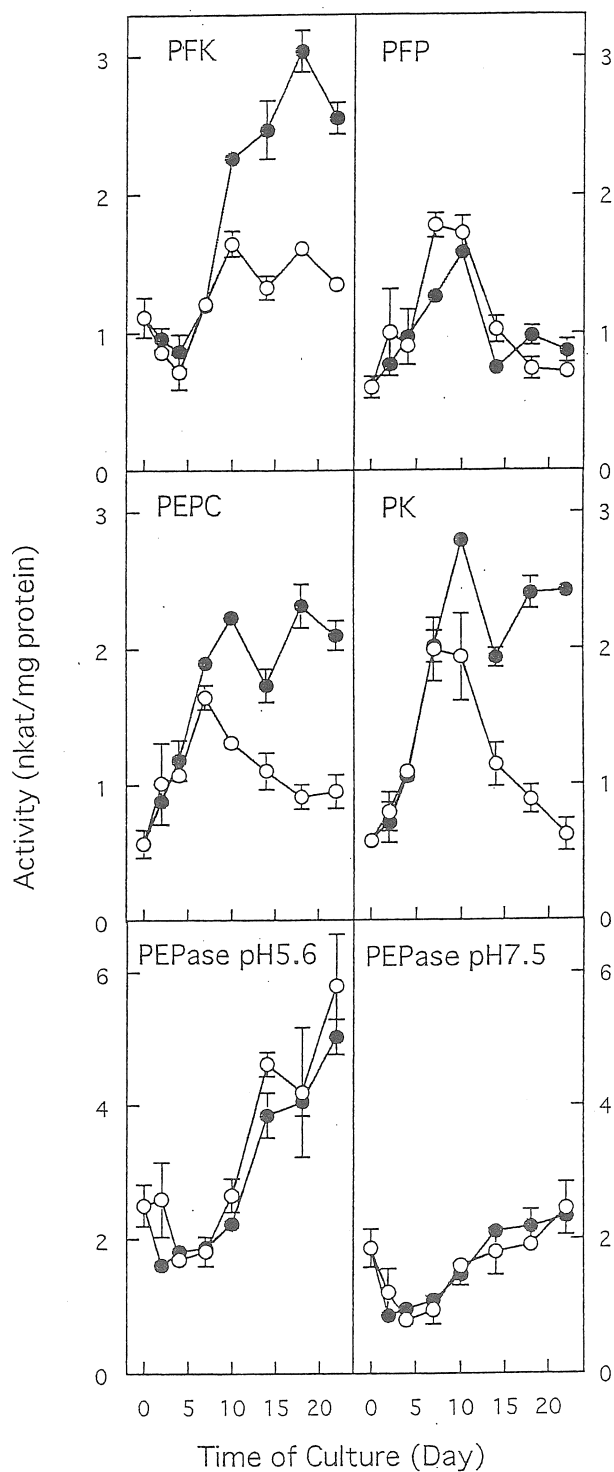


Fig. 3 Changes in activities of PFK (a), PFP (b), PEPC (c), PK (d), PEPase [pH 5.6] (e) and PEPase [pH 7.5] (f) in *Bruguiera sexangula* cells cultured with or without 100 mM NaCl

## 3.4 PFK および PFP 活性におよぼす NaCl の影響

*B.sexangula* の酵素が耐塩性を持つかどうかを調べるために、PFK と PFP を、硫酸分画 (30-60%飽和) により精製後脱塩して、NaCl 濃度による活性の変化を調べた。*B.sexangula* の酵素と同様な方法で、塩感受性の *C. roseus* の酵素を精製、活性測定をした。Fig. 4 に示したように、*B.sexangula* の PFP と PFK は、150 mM までの NaCl で活性化がみられた。一方、*C. roseus* の酵素は、100 mM NaCl で阻害された。これは、マングローブ植物である *B.sexangula* の酵素は耐塩性のみならず、むしろ塩による活性化を示すという興味ある結果である。しかし、これはすべてのマングローブ種にあてはまる訳ではなく、*Avicennia marina* (ヒルギダマシ) の PFP や PFK は、100 mM NaCl により阻害される (Ashihara et al., 1997) ので、種による PFP や PFK の性質に違いがあるものと思われる。

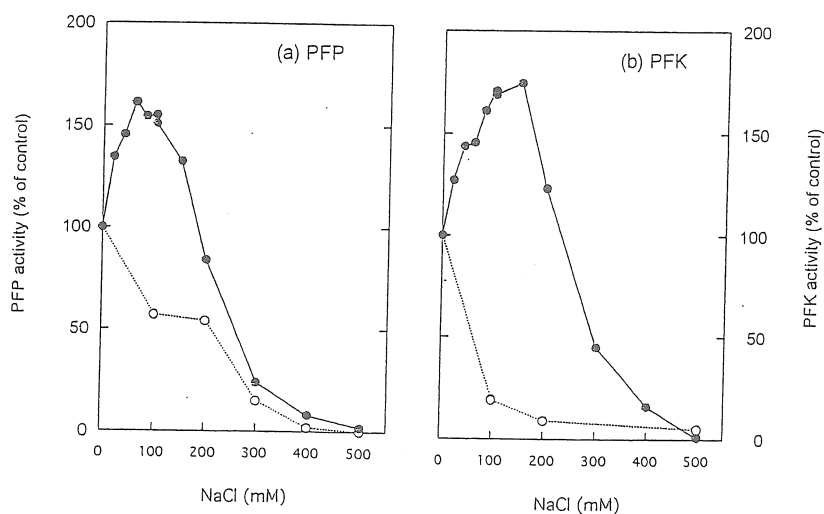


Fig. 4 Effect of NaCl on the activities of PFP (a) and PFK (b) partially purified from suspension-cultured cells of *Bruguiera sexangula* (●) and of *Catharanthus roseus* (○)

## 3.5 Fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP) のレベルと PFP の活性化

F2,6BP は、動物の PFK の活性化剤として発見されたが、植物では、低濃度で PFP の活性化と Fructose-1,6-bisphosphatase (F1,6BPase) の阻害剤として働くため、解糖系やスクロース合成の調節因子となりうる。*B. sexangula* の F2,6BP 含量は、1 g 生重量あたり、0.1~3.0 nmol の範囲で変動するが、NaCl 処理により含量はやや低下する (Fig. 2c)。F2,6BP 濃度の変動が、*in vivo* で PFP 活性に影響を及ぼすかどうかを調べるため、PFP と F2,6BP が局在するサイトゾルが細胞全体の

10%であると仮定して細胞内濃度を算出すると、1~30  $\mu\text{M}$  となる。一方、PFPのF2,6BPに対する  $K_a$  値(最大活性の半分の活性を示すのに必要なF2,6BPの濃度)は、約10 nMである。つまり、細胞内F2,6BP濃度は、 $K_a$  値の100~3000倍高く、PFPはつねにF2,6BPにより活性化されていることが示唆された。培養期間中のF2,6BPの変動のパターンは、*C. roseus* のものと似ており、培養後著しい増加の後減少する。しかし、*C. roseus* の場合、最大のピークでも1g生重量あたり0.5 nmolであり、*B. sexangula* のF2,6BPレベルが一般の植物に比べて高いことが明らかにされた。

#### 4. まとめと今後の課題

*Bruguiera sexangula* の液体培養細胞は、マングローブ植物から誘導された唯一の培養細胞系で耐塩性を維持しており、分子生物学的、生化学的研究の材料としてすぐれたものである。この研究では、このマングローブ細胞の解糖系の特徴を調べ、耐塩性ではない *Catharanthus roseus* の結果と比較した。*B. sexangula* の解糖系の中間産物量から得られた質量作用比や酵素活性のプロファイルの結果は、*C. roseus* のものにほぼ類似していたが、フルクトース 2,6-ビスリン酸(F2,6BP)のレベルが極めて高いこと、解糖系の調節点に位置するホスホフルクトキナーゼ(PFK)の活性が高く、この反応のバイパス酵素であるピロリン酸依存の酵素(PFP)の活性は低いなど違いがみられた。CAM植物のPFP活性はF2,6BP非依存性であるが、*B. sexangula* のものは、*C. roseus* のPFPと同様にF2,6BP依存性であり、 $K_a$  値は、約10 nMであった。また、ピルビン酸キナーゼや、そのバイパス経路であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼは、高い活性を示した。この細胞は、100-150mM NaCl 存在下で生育が可能である。培養細胞にNaClを与えた直後に呼吸の増加が認められるが、この時の中間産物の変動から、PFKの段階のFine Controlによる活性化が示唆された。一方、100mM NaCl存在下で育てた細胞では、培養後半で、PFK、PEPC、PKのレベルが対照の2-3倍になり、これらが塩により増加することが示唆された。解糖系の鍵酵素の性質についても検討した。鍵酵素であるPFKとPFPは、150 mMまでのNaClにより活性化され、*C. roseus* の酵素と塩に対する応答が明らかに違っていた。

本研究から、*B. sexangula* の解糖系の酵素が耐塩性であるばかりでなく、塩により活性化されることが明らかにされた。今後は、これらの酵素についてより詳細な研究を行い、通常の植物の酵素との違いを分子レベルで明らかにしたい。

#### 謝辞

本研究で用いた、*B. sexangula* 培養細胞は奈良女子大学理学部三村徹郎教授から譲渡されたものである。深く感謝申し上げます。

文献

- Ashihara, H.: Changes in fructose-2,6-bisphosphate level during the growth of suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Z. Naturforsch.* 41c, 529-531 (1986)
- Ashihara, H., Mitsui, K. and Ukaji, T.: A simple analysis of purine and pyrimidine nucleotides in plant cells by high-performance liquid chromatography. *Z. Naturforsch.* 42c, 297-299 (1987)
- Ashihara, H., Adachi, K., Otawa, M., Yasumoto, E., Fukushima, Y., Kato, M., Sano, H., Sasamoto, H., Baba, S. : Compatible solutes and inorganic ions in the mangrove plant *Avicennia marina* and their effects on the activities of enzymes. *Z. Naturforsch.* 53c, 433-440 (1997)
- Kubota, K. and Ashihara, H.: Identification of non-equilibrium glycolytic reactions in suspension-cultured plant cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1036: 138-142 (1990)
- Kura-Hotta, M., Mimura, M., Tsujimura, T., Washitani-Nemoto, S. & Mimura, T.: High salt-treatment-induced Na<sup>+</sup> extrusion and low salt-treatment-induced Na<sup>+</sup> accumulation in suspension-cultured cells of the mangrove plant, *Bruguiera sexangula*. *Plant, Cell Environ.* 24: 1105-1112 (2001)
- Li, X.-N. and Ashihara, H.: Effect of inorganic phosphate on sugar catabolism by suspension-cultured *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 29: 497-500 (1990)
- Nagano, M. and Ashihara, H.: Long-term phosphate starvation and respiratory metabolism in suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Cell Physiol.* 34: 1219-1228 (1993)
- Plaxton, W.C.: The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 47: 185-214 (1996).

## Salt Tolerance and Energy Metabolism in Cultured Mangrove Cells

Hiroshi Ashihara, Aya Hashioka and Mihoko Suzuki  
Metabolic Biology Group, Department of Biology, Faculty of Science,  
Ochanomizu University,  
Tokyo, 112-8610, Japan

As the suspension-cultured *Bruguiera sexangula* cells have tolerance to salt, these cells are useful materials for the biochemical studies of salt tolerance at the cellular level. In the present study, we characterized the glycolysis of these mangrove cells and compared them with those of a salt sensitive *Catharanthus roseus* cells previously reported. The mass action ratio ( $\Gamma$ ) of each reaction step calculated from the cellular concentration of metabolites and maximum catalytic activity of each enzyme of these mangrove cells are similar to those of *C. roseus*, except that activity of phosphofructokinase (PFK) was higher than that of pyrophosphate dependent phosphotransferase (PFP) in the mangrove cells. In contrast to the PFP from CAM plants, the mangrove PFP activity was fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP) dependent, and  $K_a$  value for F2,6BP was 10 nM. Significant activity of both pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxylase, an alternative enzyme for glycolysis, was detected. When mangrove cells were transferred to the culture medium including 150 mM NaCl, rise of respiration was observed. This may be caused by the "fine control" of PFK. In the mangrove cells grown in 100 mM NaCl, the activities of PFK, PK and PFP were 2-3 fold higher than those of cells grown without NaCl. While, no difference was found in PFP and phosphatase activities. Activities of PFP and PFK examined *in vitro* were stimulated by up to 150 mM NaCl.