

助成番号 0124

## 耐塩性維持に寄与するマンニトール-1-リン酸脱水素酵素の精製と クローニング

岩本浩二 (筑波大学・生物科学系)

猪川倫好 (上武大学・経営情報学部)

川野辺英昭 (秋田大学・教育文化学部)

白岩善博 (筑波大学・生物科学系)

【目的】マンニトールは適合溶質の一つとして、植物の浸透圧調節や細菌・菌類の貯蔵糖類として生合成される。アヤギヌは河口域の干満のある場所に生育し、マンニトールの合成および代謝系を有することで幅の広い浸透圧変動に適応できる広塩性紅藻である。本藻の有するマンニトール生合成は fructose-6-phosphate (F6P)→mannitol-1-phosphate (F6P)→mannitol であり、その経路は M1P dehydrogenase (M1PDH) および M1P phosphatase (M1Pase) により触媒される。従って、本藻におけるマンニトール合成系の代謝調節を明らかにし、その代謝系を遺伝子組み換えにより他の植物に付与するためには、M1PDH および M1Pase の酵素学的解析とそれら酵素のクローニングが不可欠である。我々は既に M1Pase の特性解析を終了したので、本研究においては M1PDH の精製、酵素の特性解析およびクローニングを目的とした。

【方法・結果・考察】本研究では PEG-硫酸二相分配、Sephadex G-25 によるゲルろ過、Reactive Red 120 agarose によるアフィニティークロマトグラフィー、BioAssit Q による陰イオン交換クロマトグラフィーおよび Sephacryl S-100 によるゲルろ過法を組み合わせる方法により、M1PDH 酵素タンパク質の高効率の精製を達成した。その結果、精製度 50,957 倍 ( $228\mu\text{mol}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) の M1PDH 精製標品を得た。また SDS-PAGE により、M1PDH は分子量 53.6kD の単量体からなるタンパク質であることが明らかとなった。本酵素の基質特異性は極めて高く、還元反応では F6P と NADH を、酸化反応では M1P と NAD のみを基質とした。また、アヤギヌ M1PDH は SH 酵素であり、さらに、 $\text{Zn}^{2+}$  によりその活性が著しく阻害された。さらに、本酵素の F6P 還元活性における基質親和性や最大活性、至適 pH 等は NaCl の存在により著しく変化し、さらにその変化は基質 (F6P) 濃度によっても変化することが分かった。これらの特性はアヤギヌ M1PDH に特有のものであり、本酵素が F6P を生合成する細胞内炭素代謝活性や NAD(H) を供給する還元状態および外界からの塩ストレスに応じてマンニトールの生合成量を巧みに調節していることを示している。現在、N 末端および内部アミノ酸配列の情報と本酵素に特異的な抗血清を作成し、cDNA 塩基配列の決定を行っている。



## 耐塩性維持に寄与するマンニトール-1-リン酸脱水素酵素の精製とクローニング

助成研究者：岩本浩二 (筑波大学・生物科学系)  
 共同研究者：猪川倫好 (上武大学・経営情報学部)  
 川野辺英昭 (秋田大学・教育文化学部)  
 白岩善博 (筑波大学・生物科学系)

### 1. 研究目的

マンニトールは生物界で最も広く分布するヘキシトールの一つである。細菌や菌類および原生動物ではマンニトールは炭素源として分解、もしくはヘテロ発酵により合成され、一部の寄生性生物では貯蔵糖類として合成されることが知られている。一方、植物や藻類では、マンニトールは浸透圧調節物質として機能していることが明らかとなっている。ところで本研究で用いたアヤギヌ *Caloglossa continua* (Okamura) King et Puttok は東北以南の太平洋岸河口域に広く見られる藻体約 2 cm の紅色植物門イギス目に属する大型藻類である。河口域に生息しているため潮の干満の影響を受け、満潮時には海水環境、干潮時には淡水環境といった幅広い塩環境に適応している。さらに、潮の引ききった状態では水面から完全に露出することから、乾燥状態に対しても耐性を有している。一般的に、紅色植物の適合溶質として heteroside floridoside や digeneaside 等が知られているが、アヤギヌ属は例外的にマンニトールを適合溶質として蓄積する。そのため、本藻は藻類におけるマンニトール合成機構の解明ための研究材料としてよく用いられる。藻類では、マンニトールは fructose-6-phosphate (F6P)→mannitol-1-P (M1P)→mannitol の経路で合成され、それぞれ M1P dehydrogenase (M1PDH) および M1P phosphatase (M1Pase)によって触媒されている(Fig. 1)。一

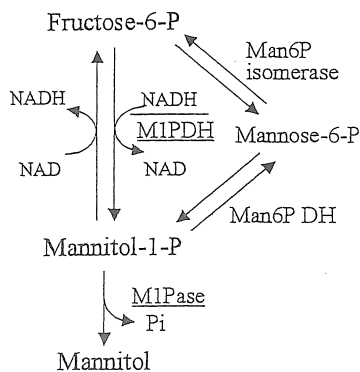


FIG. 1 Proposed pathway for mannitol biosynthesis in photosynthetic organism.

方、陸上植物のマンニトール合成経路ではマンニトールの前駆体である M1P は Mannose-6-phosphate (Man6P) isomerase と Man6P dehydrogenase により F6P から Man6P を経由して合成された後、M1Pase によりマンニトールへ代謝される(Fig. 1)。従って、マンニトールの生合成経路を遺伝子組換えによって有用植物に付与するこ

とで耐塩性植物を分子育種する場合、藻類タイプのマンニトール合成能を付与する方が効率が良いと考えられることから、M1PDH をコードする *mtlD* (大腸菌由来) が導入された遺伝子組換え植物が作成されている(Tarczynski *et al.* 1992). しかし、その耐塩性は充分とは言えず、実用化には更なる耐塩能の向上が必要とされる. そのためにはまず、M1PDH の反応生成物である M1P をマンニトールに変換する M1Pase の遺伝子を導入する必要がある. M1Pase については平成12年度のソルトサイエンス研究財団助成研究により、光合成生物では初めてM1Paseを単離し、酵素学および分子生物学的諸性質を明らかにすると共に、マンニトールの生合成調節においてM1PDHが重要な役割を果たしていることを明らかにした(Iwamoto *et al.* 2001). 生体内では様々な代謝反応が複雑に影響しあって代謝バランスがとられていることから、マンニトール生合成系路を導入する場合でも、他の代謝経路を阻害しないことが健全な植物体の成長、すなわち耐塩能の向上につながると考えられる. この点において藻類以外のマンニトール代謝で用いられるM1PDHでは、環境の塩ストレスに対応した適切なマンニトールの合成調節は望むことが出来ないと予測される. そのため、藻類由来のM1PDHを詳細に研究する必要があると思われる. そこで本研究では、広塩性紅藻アヤギヌよりM1PDHを単離し、その酵素学的諸性質を明らかにすると共に、M1PDHに特異的な抗体の作成や、N末端および内部アミノ酸配列の解明に必要な精製タンパク質を得ることで、マンニトール合成関連遺伝子導入による有用植物の分子育種に寄与することを目的とした.

## 2. 研究方法

### 2.1 材料

アヤギヌは千葉県木戸川河口の汽水域において、河川護岸壁上部に生育する藻体を干潮における水面からの露出時に採取した. 藻体は直ちに実験室に持ち帰り、大きな夾雑物を取り除いた後、ディープフリーザー(-80℃)で保管した.

### 2.2 M1PDH の精製

全ての酵素精製操作は4℃もしくは氷中で行った. 藻体100gを抽出用緩衝液として300mLの1mM benzamidine-HCl, 10mM 6-aminocaproic acid, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 4mM 2-mercaptoethanol, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone K-90 (PVP)を含む500mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) および少量の石英砂と共に自動乳鉢を用いて破碎した. ただし、PVPの添加は溶液の粘性の上昇に伴う抽出効率の低下が懸念されたため、破碎の後半に相当する量(3g)を粉末として添加した. 得られた破碎液から6,000 x g, 10

min の遠心により上清を得た後、50 % (w/v) polyethylene glycol 6000 (PEG) を含む抽出用緩衝液(ただしPVPは含まない)を用いてPEG濃度を12.5 % (w/v) とした。さらに、この溶液に12 % (w/v)となるように固体硫酸を加え、攪拌後、遠心(20,000 x g, 20 min)した。遠心によりフィコビリタンパク色素等の夾雑物は上層に移行し、M1PDH活性は下層に濃縮されたため、下層を回収しそれをPEG/AS標品とした。PEG/AS標品を、Buffer Aとして5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 4 mM 2-mercaptoethanol, 20 % (v/v) glycerolを含む50 mM HEPES緩衝液(pH 7.0)で平衡化したSephadex G-25(Amersham Biosciences社)を用いたゲルろ過法により緩衝液交換を行った後、Reactive Red 120 agarose (Sigma社)によるアフィニティークロマトグラフィーに供した。この場合、カラムをBuffer Aで平衡化し、M1PDHを担体に吸着させた後、Buffer Bとして5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 4 mM 2-mercaptoethanol, 20 % (v/v) glycerolを含む50 mM bistrispropane緩衝液(pH 7.0)で洗浄した。M1PDH活性画分は0.5 mM NADHを含むBuffer Bにより溶出した。その後、活性画分をTSKgel BioAssist Q (Tosoh社)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。Buffer Bでカラムを洗浄した後、M1PDHを0 mMから500 mMのNaClを含むBuffer Bグラディエント液で溶出した。活性画分をさらにHiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR (Amersham Biosciences社)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーに供した。平衡および溶出にはBuffer Aを用い、得られた活性画分を回収し、精製酵素標品とした。

### 2.3 活性測定

M1PDH活性はF6PのM1Pへの還元に伴い消費されるNADHの減少、もしくはM1PのF6Pへの酸化に伴うNADHの生成を分光光学的に測定した(Ikawa et al. 1972)。タンパク質濃度はBio-Rad Protein Assay (Bio-Rad社)を用いて測定した。

### 2.4 電気泳動

試料中のタンパク質の分析にはSDS-PAGEを用いた。泳動後のゲルをCoomassie Brilliant Blue G 250によるCBB染色または銀染色で染色し、タンパク質を可視化した(Iwamoto et al. 1996)。

## 3. 研究結果

### 3.1 M1PDHの精製

精製過程における比活性の変化をTable 1に示した。最終的にSephacryl S-100によるゲルろ過の結果、粗抽出液の約50,957倍にまでM1PDHが精製された。精製度が大幅に上昇した操作は、PEG/AS処理とReactive Red 120 agaroseによるアフィニティークロマトグラフィーであった。また本精製操作により、最終

的に高い比活性( $227.8 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ )を示す酵素標品が得られた (Table 1). これは粗抽出液から PEG/AS 処理, Sephadex G-25 によるゲルろ過, そして Reactive Red-120 agarose によるアフィニティークロマトグラフィーと精製段階の進行に従って総活性が上昇, つまり酵素が活性化されたためと考えら

Table 1 Activation of M1PDH from the red alga *C. continua* during the purification steps.

Purification Step	Total protein (mg)	Total activity ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )	Specific activity ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ )	Recovery of activity (%)	Purification (fold)
Crude extracts	662	18.4	0.004	100	1
PEG/AS	283	998.4	0.567	5419	127
G-25	249	1731.8	1.118	9400	250
R 120	6.00	4672.0	125.1	25358	27999
BioAssist Q	0.83	1363.2	263.4	7399	58915
S-100	0.70	992.2	227.8	5384	50957

れる. Sephadex G-25 によるゲルろ過によっても M1PDH が活性化されたことから, この活性化には粗抽出液中に存在する阻害活性を有する低分子成分の除去が考えられた. しかし, その後のアフィニティークロマトグラフィーによりさらに総活性が上昇したことから, より分子量の大きい成分も活性阻害に関与していたものと推定される.

さらに SDS-PAGE により, 本精製操作により, M1PDH は単一タンパク質バンドが得られるまでに精製され, さらにサブユニット分子量が約 53.6 kD であることが示

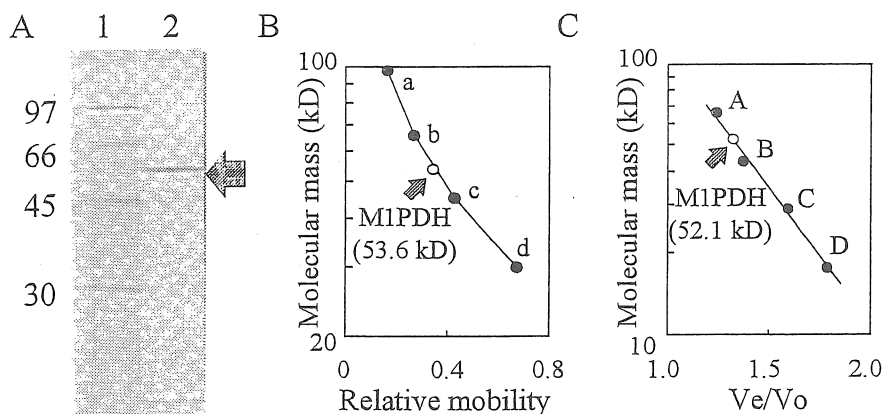


FIG. 2 A: Estimation of molecular mass of subunit (A, B) and native forms (C) of M1PDH from the red alga *C. continua*. A and B: SDS-PAGE pattern with 10 % acrylamide gel and estimation of molecular mass. Molecular weight markers (Lane 1): a, phsphorylase b (97,000); b, bovine serum albumin (66,000); c, ovalbumin (45,000), d, carbonic anhydrase (30,000); purified enzyme (Lane 2). C: Gel filtration of Sephacryl S-100 column. Molecular weight markers: A, bovine serum albumin (66,000); ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (29,000), and myoglobin (17,600).

された (Fig. 2A, B). また, Sephacryl S-100 によるゲルろ過から Native 分子量が約 52.1 kD (Fig. 2C) であり, これら Native 分子量およびサブユニット分子量の推定から, 本酵素は単量体で機能していることが明らかとなった.

3.2 M1PDH の酵素学的諸性質

3.2.1 活性, 基質親和性および至適 pH におよぼす塩の影響

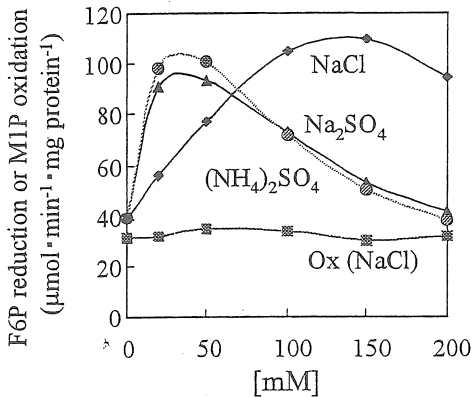


FIG. 3 The effects of various salts on the activity of M1PDH purified from the red algae *C. continua*. The activities were assayed in 5 mM Bis-Tris-Propane buffer, pH 7.0, with 5 mM F6P for the reduction, and in 5 mM Bis-Tris-Propane buffer, pH 9.0, with 1.25 mM M1P for the oxidation (OX).

M1PDH 活性における塩の添加に伴う影響を調べたところ, 本酵素の M1P 酸化活性(M1P→F6P)は NaCl 添加によってもほとんど活性が変化しなかったが, F6P 還元活性(F6P→M1P)は NaCl 等の塩の添加により活性化されることが明らかとなった(Fig.3). また最大活性は, 50 mM の Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> および (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 存在下, 100mM~150 mM NaCl 存在下で得られた.

M1PDH の基質親和性を調べたところ, 本酵素の基質親和性と最大活性は NaCl の添加により変化することが分かった (Table 2). 特に, F6P 還元活性における F6P に対する基質親和性の低下, すなわち  $K_m$ (F6P)の増大は顕著であり, 200 mM NaCl 添加によりその親和性が 1/9 にまで低下した. F6P 還元活性における  $K_m$ (NADH)は F6P 濃度が 0.5 mM および 5.0 mM のいずれにおいても 200

M1PDH の基質親和性を調べたところ, 本酵素の基質親和性と最大活性は NaCl の添加により変化することが分かった (Table 2). 特に, F6P 還元活性における F6P に対する基質親和性の低下, すなわち  $K_m$ (F6P)の増大は顕著であり, 200 mM NaCl 添加によりその親和性が 1/9 にまで低下した. F6P 還元活性における  $K_m$ (NADH)は F6P 濃度が 0.5 mM および 5.0 mM のいずれにおいても 200

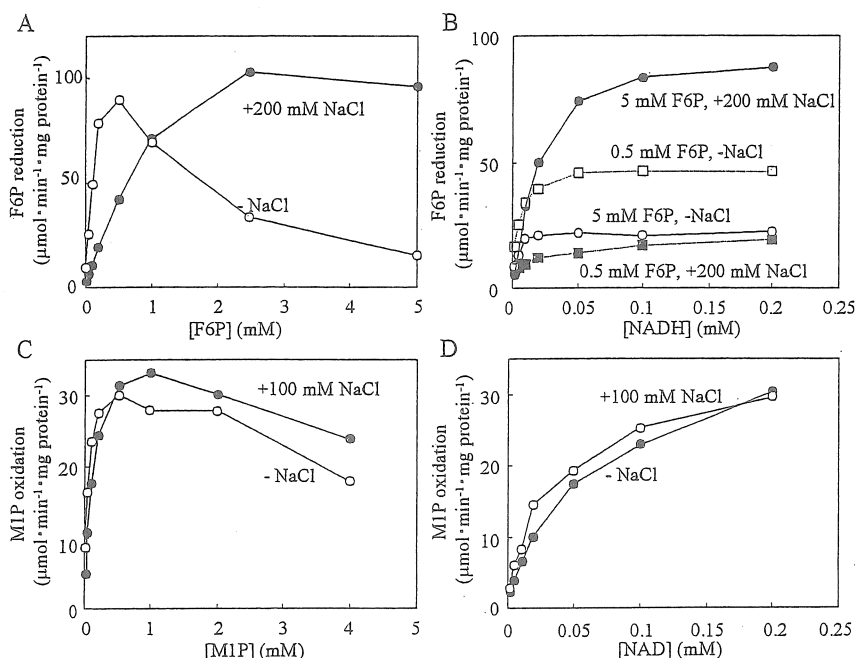
Table 2 The  $K_m$ - and  $V_{max}$ - values for the F6P reduction and M1P oxidation by M1PDH purified from the red alga *C. continua*. The activities were assayed at pH 7.0 for F6P reduction, and 9.0 for M1P oxidation.

Substrate 1	Substrate 2 (mM)	NaCl (mM)	$K_m$ for substrate 1 (μM)	$V_{max}$ (μmol·min <sup>-1</sup> ·mg protein <sup>-1</sup> )
F6P reduction				
F6P	NADH (0.2)	0	147.6	121.8
F6P	NADH (0.2)	200	1325	158.2
NADH	F6P (5.0)	0	2.9	22.8
NADH	F6P (5.0)	200	1.9	97.9
NADH	F6P (0.5)	0	4.2	48.3
NADH	F6P (0.5)	200	4.9	14.8
M1P oxidation				
M1P	NAD (0.2)	0	51.9	33.9
M1P	NAD (0.2)	100	13.9	39.9
NAD	M1P (0.5)	0	26.0	32.8
NAD	M1P (0.5)	100	56.7	38.7

mM NaCl 添加による影響を受けなかった. さらに F6P に対する基質濃度依存曲線から, F6P 還元活性は NaCl が添加されていない場合, 1 mM 以上の F6P によ

り基質阻害を受けるが, 200 mM NaCl 存在下においては基質阻害が消失することが分かった (Fig. 4A). 一方, NADH 濃度変化による基質阻害は認められず, NADH に対する基質親和性の変化も見られなかった (Table 2, Fig. 4B). また, M1P 酸化活性については, 100 mM NaCl 添加による  $K_m$ (M1P) および  $K_m$ (NAD) の変化が見られたが, F6P 還元活性に比べた場合, 塩濃度環境の変化による活性変動はそれほど大きいものではなかった (Table 2, Fig. 4C, D).

また, M1PDH の至適 pH は基質 (F6P) 濃度にかかわらず, NaCl 添加により



**Fig. 4** Kinetic analysis of M1PDH purified from the red alga *C. continua*. The activities were assayed in 5 mM Bis-Tris-Propane buffer, pH 7.0 for the reduction, and in 5 mM Bis-Tris-Propane buffer, pH 9.0, for the oxidation with (closed symbol) or without (open symbol) NaCl. A: the F6P reducing activity versus the concentration of F6P. B: the F6P reducing activity versus the concentration of NADH. C: the M1P oxidizing activity versus the concentration of M1P. D: the M1P oxidizing activity versus the concentration of NAD.

低 pH から pH 7.0 にシフトした. この傾向は F6P 濃度が 0.5 mM よりも 5 mM の場合, より顕著であった (Fig. 5). 一方, M1P 酸化活性については NaCl 添加条件においても至適 pH は 9.0 を維持した. 以上の結果より, M1PDH の F6P 還元活性は NaCl の存在により基質親和性に加え, 至適 pH も変動し, 調節されることが明らかとなった.

### 3.2.2 阻害剤および金属イオン等の影響



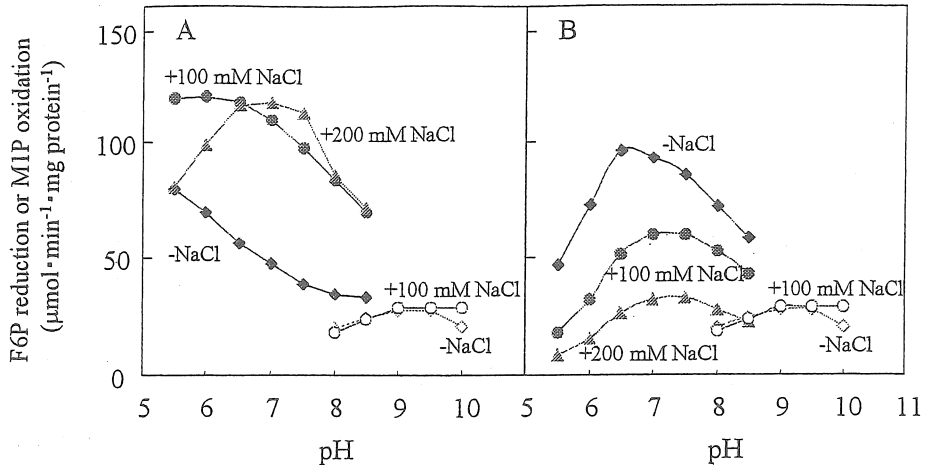


Fig. 5 The pH profiles of the F6P reducing (closed symbols) or M1P oxidizing (open symbols) activity of M1PDH purified from the red alga *C. continua*. The pH values of the reaction mixture were adjusted with 5 mM of Bis-Tris-Propane buffer. A: 5 mM F6P or 0.5 mM M1P was added as substrate. B: 0.5 mM F6P or 0.5 mM M1P was added as substrate.

M1PDH は SH 酵素の阻害剤として知られる *N*-ethylmaleimide (NEM) や *p*-hydroxymercuribenzoic acid (*p*-HMB) により強く阻害された。また、*p*-HMB による阻害効果は SH 基の保護剤として知られる 2-mercaptoethanol の存在下では低減した(Fig. 6)。金属 2 価イオンの中で、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> および Ca<sup>2+</sup> は M1PDH 活性に影響せず、Zn<sup>2+</sup> は本酵素活性を著しく阻害した(Table 3)。

Table 3 Effect of various metals on the activity of M1PDH purified from the red alga *C. continua*. The activity was assayed in the presence of 100 mM NaCl and 50 mM Bis-Tris-Propane (pH 7.0) with 5 mM F6P and 1.25 mM M1P for F6P reduction, and M1P oxidation, respectively. The activity in the control was 86.0 and 11.0 μmol·min<sup>-1</sup>·mg protein<sup>-1</sup> for F6P reduction and M1P oxidation, respectively.

Metal (1mM)	Reduction (% to control)	Oxidation
MgCl <sub>2</sub>	100	100
MnCl <sub>2</sub>	100	-
CaCl <sub>2</sub>	100	100
ZnCl <sub>2</sub>	5	0

### 3.2.3 基質特異性

本酵素の基質特異性は極めて高く、F6P 還元活性については F6P と NADH に、M1P 酸化活性については M1P と NAD に限定され、Glucose-1-P は基質として利用出来ないことが分かった (Table 4)。

### 4. 考察

本研究において紅藻アヤギヌの M1PDH の完全精製が達せられ

た。一般的に、紅藻類は多量のフィコビルタンパク質や糖類を含み、それらが精製の障害となることから、精製には非常な困難が伴う。今回、精製操作の第一段階において PEG/AS 処理を行ったことで、目的タンパク質と夾雑物との分離が可能となり、そのことが精製成功の一因となったと考えられる。さらに、本研究における高純度かつ高効率の M1PDH タンパク質の精製を可能にした要

因として, Reactive Red 120 agarose を用いたアフィニティークロマトグラフィーが有効であったことがあげられる.

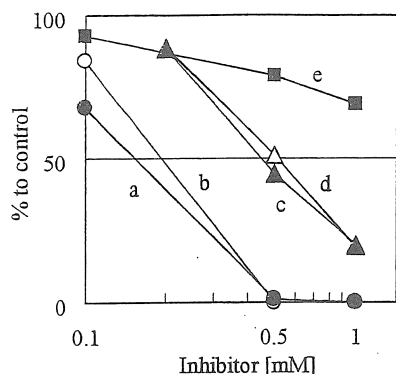


Fig. 6 Effects of various inhibitors on M1PDH purified from the red alga *C. continua*. The activity was assayed in the presence of 100 mM NaCl at pH 7.0, and 9.0 adjusted with Bis-Tris-Propane for reduction (red) and oxidation (ox), respectively. (a) *p*-HMB (red); (b) *p*-HMB (ox); (c) NEM (red); (d) NEM (ox); (e) *p*-HMB (red) in the presence of 2.5 mM 2-mercaptoethanol. The activities in control were 91.3 and 18.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$  for F6P reduction and M1P oxidation, respectively.

Table 4 Substrate specificity of the M1PDH purified from the red alga *C. continua*. The activities were assayed in the presence of 100 mM NaCl at pH 7.0 and 9.0 adjusted with Bis-Tris-Propane for reduction and oxidation, respectively.

Substrate (5 mM)	Activity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ )			
	Reduction		Oxidation	
	NADH	NADPH	NAD	NADP
Fructose-1-P	0	0	0	0
Fructose-6-P	84.32	0	0	0
Fructose-1,6-BP	0	0	0	0
Glucose-1-P	0	0	0	0
Glucose-6-P	0	0	0	0
Mannose-6-P	0	0	0	0
Mannitol-1-P	0	0	13.34	0
Sorbitol-6-P	0	0	0	0

本研究は光合成生物における M1PDH 精製の初めての報告である. 光合成生物以外の M1PDH については, 真性細菌の *Escherichia coli* (Novotny et al. 1984) や *Brochothrix thermosphacta* (Singh and Rogers 1993), 菌類の *Aspergillus niger* (Kiser and Niehaus 1981) や *Cryptococcus* (Suvarna et al. 2000) 等で完全精製がなされている他, M1PDH の遺伝子 *mtlD* が明らかになっているなど分子生物学的情報が蓄積されている. さらに近年, ゲノムプロジェクトにより *Salmonella* 等いくつかの細菌で *mtlD* が発見されている. これら従属栄養生物の M1PDH と紅藻アヤギヌの M1PDH との関連については不明であるが, 細菌や菌類の M1PDH のサブユニット分

子量がいずれもほぼ 40kD であったのに対し, アヤギヌ M1PDH のサブユニット分子量は 53.6 kD であったことや(Fig. 2), 酵素学的諸性質が大きく異なることから, アヤギヌ M1PDH は既知の M1PDH とは系統を異にする可能性も考えられる.

M1PDH の酵素学的諸性質については, 部分精製や粗抽出標品を含めると, 細菌や菌類の他, プラシノ

藻 *Platymonas* (Richter and Kirst 1987), 褐藻 *Spatoglossum* (Ikawa et al. 1972), および紅藻 *C. lepriurii* (ササバアヤギヌ, Karsten et al. 1997) で報告がある. M1PDH の基質特異性についてはいずれの生物由来の M1PDH も極めて高く, F6P 還元反応では NADH と F6P, M1P 酸化反応では M1P と NAD 以外とはほとんど反応しないことが知られているが, 本研究で用いたアヤギヌ M1PDH においても同様の性質が確認できた (Table 4). また, SH 酵素である点も他の生物の M1PDH の性質と一致していた. アヤギ

ヌ M1PDH の至適 pH は F6P 還元反応および M1P 酸化反応では各々 pH 7.0 および pH 9.0 であった(Fig. 5). これは褐藻 *Spatoglossum* の M1P 酸化反応では pH 10.2 を中心とした狭い pH 特性が報告されているものの(Ikawa *et al.* 1972), 他の M1PDH においては F6P 還元反応では pH 7, M1P 酸化反応は pH 9 付近に至適 pH が示されており, 研究結果と一致した. しかし, アヤギヌ M1PDH における NaCl による F6P 還元反応の活性化や至適 pH の変化および基質親和性の変化は他の生物の M1PDH では報告されておらず, 潮間帯において著しい塩濃度変化にさらされるアヤギヌに特徴的な性質として特定できる(Table 2, Fig. 3, 4, 5). 唯一, 塩による M1PDH の活性化がプラシノ藻 *Platymonas* で報告されているが, *Platymonas* では至適 pH の変化や  $K_m$  値の変化は報告されていない(Richter and Kirst 1987). ところで本酵素の活性は NaCl により活性化された(Fig. 3). この活性化は, 至適 pH の変化と基質親和性, NaCl 濃度および塩濃度に依存した基質阻害の有無が複雑に関与しているものと考えられる. NaCl 濃度に関しては高塩濃度暴露下での細胞内に流入する  $\text{Na}^+$  や  $\text{Cl}^-$  イオンに迅速に反応するための機構と考えられるが, 基質親和性の変化や基質阻害の有無についてはアヤギヌのマンニトールの生合成調節が塩濃度の変化に直接反応するのではなく, 基質である F6P の生合成にも調節される可能性を示している. また, 精製の過程で何らかの因子が本酵素の活性化に関与していることも示唆された. これらのことから, M1PDH は複雑な細胞内代謝環境においてマンニトール生合成を調節する中心的役割を果たしていると考えられる. 今後, マンニトール合成関連遺伝子を導入して耐塩性植物を分子育種する場合, M1PDH としてアヤギヌ由来の M1PDH を導入することで, 細胞内の微妙な炭素代謝や還元力の変化に対応したマンニトール合成が行われるという利点が考えられる.

## 5. 今後の課題

今後は精製タンパク質を用いて, 抗体作成や内部アミノ酸配列決定を行い, さらにそこで得られた情報を利用し, M1PDH の cDNA 配列を行う必要がある. cDNA の情報は細菌, 菌類, 植物の M1PDH の進化, つまりマンニトール生合成経路の進化を明らかにするだけでなく, 本酵素および M1Pase 遺伝子の導入による耐塩性植物の分子育種に大きく貢献するものと考えられる.

## 6. 文献

- Ikawa, T., Watanabe, T., and Nisizawa, K. (1972). Enzymes involved in the last steps of the biosynthesis of mannitol in brown algae. *Plant Cell Physiol.* 13:1017-1029.
- Iwamoto, K., Kawanobe, H., Shiraiwa, Y. and Ikawa, T. (2001). Purification and

- characterization of mannitol-1-phosphatase in the red alga *Caloglossa continua* (Ceramiales, Rhodophyta). *Mar. Biotechnol.* 3: 493-500.
- Iwamoto, K., Suzuki, K., and Ikawa, T. (1996). Purification and characterization of glycolate oxidase from the brown alga *Spatoglossum pacificum* (Phaeophyta). *J. Phycol.* 32:790-798.
- Karsten, U., Barrow, KD., Nixdorf, O., West, JA., and King, RJ. (1997). Characterization of mannitol metabolism in the mangrove red alga *Caloglossa leprieurii* (Montagne) J. Agardh. *Planta* 201: 173-178.
- Kiser, RC., and Niehaus, WG. (1981). Purification and kinetic characterization of mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.* 211: 613-621.
- Novotny, MJ., Reizer, J., Esch, F., and Saier, MH. (1984). Purification and properties of D-Mannitol-1-Phosphate dehydrogenase and D-glucitol-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159: 986-990.
- Richter, DFE., and Kirst, GO. (1987). D-mannitol dehydrogenase and D-mannitol-1-phosphate dehydrogenase in *Platymonas subcordiformis*: some characteristics and their role in osmotic adaptation. *Planta* 170: 528-534.
- Singh, SP., and Rogers, PJ. (1993). Isolation and characterization of mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Brochothrix thomosphaeta*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 39: 327-337.
- Suvarna, K., Bartiss, A., and Wong, B. (2000). Mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Cryptococcus neoformans* is a zinc-containing long-chain alcohol/polyol dehydrogenase. *Microbiol.* 146: 2705-2713.
- Tarczynski, MC., Jensen, RG., and Bohnert, HJ. (1992). Expression of a bacterial *mtlD* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2600-2604.

## The Molecular Characterization and Cloning of Mannitol-1-Phosphate Dehydrogenase that Contributes to the Salt Tolerance in Plants

Koji IWAMOTO<sup>1</sup>, Tomoyoshi IKAWA<sup>2</sup>, Hideaki KAWANOBE<sup>3</sup>,  
and Yoshihiro SHIRAIWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

<sup>2</sup> Faculty of Management and Information Sciences, Jobu University

<sup>3</sup> Faculty of Education and Human Studies, Akita University

### Summary

Mannitol, as a compatible solute, acts in plants as osmoregulator and as storage substance in bacteria and fungi. In the former study, the authors suggested the importance of mannitol-1-phosphate dehydrogenase (M1PDH) for the efficient regulation of the biosynthesis of mannitol in the red alga *Caloglossa continua* (Iwamoto *et al.*, *Mar. Biotechnol.*, 3: 493-500, 2001). Hence, in this study, we attempted to purify M1PDH to characterize biochemical properties of the enzyme and to obtain molecular informations much as the cDNA sequences of M1PDH in the red alga *C. continua*.

The enzyme M1PDH was purified by the combination of aqueous two-phase partitioning method with polyethylene glycol-ammonium sulfate, gel filtration by Sephadex G-25, affinity chromatography by Reactive Red 120 agarose, anion chromatography by BioAssist Q, and gel filtration by Sephacryl S-100. The enzyme was finally purified 50,957-fold, and its specific activity was shown to be 228  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{ mg protein}^{-1}$ . Since gel filtration and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gave close values of apparent molecular weights of 53,600 and 52,100, respectively, the enzyme was shown to be a monomer. The substrate specificity of the M1PDH was very high enough to metabolize only F6P and NADH for reduction, and M1P and NAD for oxidation. The enzyme was inhibited by *N*-ethylmaleimide, and *p*-hydroxymercuribenzoic acid (*p*CMB) and the inhibition by *p*CMB was rescued by the addition of 2-mercaptoethanol, indicating that the enzyme is a SH-enzyme.  $\text{Zn}^{2+}$  strongly inactivated, however  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  did not affect the activity. The pH optimum for reduction was pH 7.0 in the presence of 200 mM NaCl, and it was shifted to under 5.0 in the absence of NaCl. Moreover, the kinetic analysis of M1PDH revealed that the affinity of the enzyme was greatly affected by NaCl. These findings indicated that the M1PDH activity was controlled by F6P concentration and also influenced NaCl concentration. Hence, it could be said that M1PDH is the key enzyme for regulation of mannitol biosynthesis *in vivo*.