

多摩川流域河川に生育する水草の イオン吸収機構の細胞分子生物学的研究

2000年

福原敏行

東京農工大学農学部助教授

目 次

1. 緒 言	1
2. 材料と方法	1
2-1 材 料	1
2-2 粗マイクロソーム画分の調整	2
2-3 細胞膜画分の調整	2
2-4 標識酵素活性測定	2
2-5 プロトン輸送活性測定	3
2-6 抗体を用いた細胞膜H ⁺ -ATPaseの検出	4
2-7 遺伝子クローニング	4
2-8 塩基配列の解析	5
2-9 陽イオン含量の解析	5
2-10 野外調査	5
3. 結果と考察	5
3-1 細胞膜画分の調製	5
3-2 細胞膜画分におけるオオセキショウモ細胞膜H ⁺ -ATPaseの存在の確認	9
3-3 NaCl添加による細胞膜ATPase活性に対する阻害効果	13
3-4 オオセキショウモ細胞膜プロトンポンプ遺伝子のクローニング	13
3-5 オオセキショウモ、ママモ、イネ葉の陽イオン組成	17
3-6 多摩川および琵琶湖周辺河川における水草の調査	19
ま と め	19
謝 辞	25
引用文献	26

研究組織

代表研究者	福原 敏行	東京農工大学農学部 助教授
共同研究者	高木 慎吾	大阪大学大学院理学研究科 講師
	大脇 良成	農林水産省農研センター 主任研究員
	朴 俊泳	朝鮮大学校教育学部 講師

1. 緒言

多摩川流域の河川には、コカナダモ、エビモ、ホザキノフサモなどの沈水性の植物（水草）が生育している。これらの水草は、河川の窒素、リン酸等のイオンを吸収し成長するため直接的に多摩川流域河川の水質浄化に寄与していると共に、魚、水生昆虫、プランクトンなどの生育場所を提供することにより、間接的にも環境浄化に寄与している。すなわち、水草は多摩川の自然環境に対して直接的にも間接的にも重要な植物である。生物学的観点からは、水草は水環境に高度に適応した高等植物であるが、その環境適応機構についてはほとんど研究されていない。

本研究では、淡水産単子葉植物オオセキシヨウモ (*Vallisneria gigantea*) をモデル植物として、水草の環境適応機構について特にイオン吸収機構に焦点をあて、細胞生理生化学および分子生物学的手法で研究を行った。高等植物のイオン吸収機構に関する細胞分子レベルでの研究から、細胞膜プロトンポンプ (=細胞膜 H^+ -ATPase) が細胞内のアデノシン 3 リン酸 (ATP) を加水分解して得られるエネルギーを用いてプロトンを細胞外に汲み出すことにより作り出される細胞膜を介したプロトンの濃度勾配を駆動力として、種々のイオンが細胞内に吸収されること、すなわち植物においては細胞膜 H^+ -ATPase が細胞のイオン代謝 (イオンホメオスタシス) のマスター酵素として働くことが知られている(1-3)。そこで、細胞膜 H^+ -ATPase に焦点をあて、水草オオセキシヨウモの葉より細胞膜画分を単離し ATP 加水分解活性およびプロトン輸送活性を解析すると共に、陸上植物イネ、海草アマモの葉からも細胞膜画分を単離し、それらの酵素活性を 3 植物間で比較した。さらに、詳細に水草の細胞膜 H^+ -ATPase を解析する目的で、この遺伝子のクローニングを試みた。また、オオセキシヨウモ、イネ、アマモの葉のイオン組成についても原子吸光法を用いて比較検討した。このような研究室内の研究と平行して、セキシヨウモをはじめとする水草の多摩川および流域河川さらには琵琶湖周辺河川における生育状況について野外調査した。

2. 材料と方法

2-1. 材料

淡水性植物トチカガミ目トチカガミ科オオセキシヨウモ (*Vallisneria gigantea*) は、20L ポリバケツの底に土を入れ、22 °Cで明暗期をそれぞれ 12 時間に設定して維持した。単子葉類レースソウ目アマモ科アマモ (*Zostera marina*) は、千葉県富津沖より採集し、人工海水にて 4°Cで維持した。また、イネ目イネ科イネ (*Oryza sativa*) は、芽出し後ポットに移植し、25°Cにて維持した。

2-2. 粗マイクロソーム画分の調製

粗マイクロソーム画分の調製は、高木らの方法に従って行った(4)。葉を蒸留水で洗った後、カッターナイフで細かく刻み、ポリトロンホモゲナイザーで破碎した。破碎液の組成は、50 mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid(MOPS)-KOH (pH 7.6)、0.3 M ショ糖、10 mM ethyleneglycol-bis(2-amino-ethylether)-N,N,N,N-tetraacetic acid (EGTA)、5 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA)、1% (w/v) カゼイン、10 µg/ml butylated hydroxy toluene (BHT)、5 mM $K_2S_2O_8$ 、1.2 mg/ml アプロチニン、2.5 µg/ml ペプスタチン、1 mM dithiothreitol (DTT)、20 mg/ml ポリビニルポリピロリドン(Polyclar AT) で、生重量 60 g に対して 240 ml を用いた。以下の操作は全て 4°C にて行った。破碎した葉を 6 層のガーゼで絞り、低速冷却遠心(8,000g、15 分間、4°C)後、上清を超遠心(156,000×g、60 分間、4°C)した。沈殿をテフロンホモゲナイザーを用いて溶液 A [0.25 M ショ糖、10 mM リン酸バッファー (pH7.8)] に懸濁し、さらに超遠心(156,000×g、60 分間、4°C)した。沈殿を溶液 B [0.25 M ショ糖、5 mM MOPS-KOH (pH7.6)、0.1 mM DTT] で懸濁したものを粗マイクロソーム画分とした。

2-3. 細胞膜画分の調製

水性二層分配法を用いて、粗マイクロソーム画分から、細胞膜画分を調製した(4-6)。粗マイクロソーム画分を 5.6 % (W/V) Dextran T-500、5.6 % (W/V) PEG P-3640、30 mM NaCl、0.25 M ショ糖、10 mM リン酸バッファー(pH7.8)からなるポリマー混合液中に注意深くのせ、ボトルを 30 回穏やかに反転させた。上のボトルと粗マイクロソーム画分を含まないボトルを 30 分間静置後、上層を注意深く回収し、予め上層を除いてある新しい下層の上に乗せた。ボトルを 30 回穏やかに反転させ、ボトルを 30 分間静置後、上層を注意深く回収して溶液 B [0.25 M ショ糖、5 mM MOPS-KOH (pH 7.6)、0.1 mM DTT] にて 2 倍以上に希釈し、超遠心(156,000×g、60 分間、4°C)を行った。沈殿は溶液 B に懸濁し細胞膜画分とした。

2-4. 標識酵素活性測定

ATPase、UDPase 活性は、ATP, uridine diphosphate (UDP) を基質として、加水分解により遊離した無機リン酸 (Pi) を、Fiske-Subbarow 法を改変した方法に従い定量した(7)。Triton 促進性 UDPase 活性は、Nagahashi らの方法に従い、25 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane - 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, monohydrate (Tris-Mes) (pH7.0)、3 mM $MnSO_4$ 、3 mM UDP/2Na、0.25 M ショ糖の反応液を用いた(8)。ATPase 活性は Staal らの方法に従い、25 mM Tris-Mes (pH

7.0)、5.0 mM MgSO₄、2 mM ATP/2Na、0.25 M ショ糖の反応液を用いた(9)。溶液 B に懸濁した膜タンパク質 10 μg に 50 μg/ml Brij 58 と、それぞれ 50 mM KNO₃ (液胞膜 ATPase 阻害剤)、1 mM NaN₃ (ミトコンドリア ATPase 阻害剤)、0.1mM パナジン酸(細胞膜 ATPase 阻害剤)、0.03% Triton X-100 (ゴルジ体 UDPase 促進)を加え、全量を 0.25 ml とし、pH 7.0 の反応液 0.25 ml を加え、30°C・30 分間反応させた。5 % (W/ V) SDS と AAM 溶液 [1 容 10 mM モリブデン酸アンモニウム、1 容 5N 硫酸、2 容アセトン] を加えて発色させ、75 mM クエン酸を加え、分光光度計を用いて 355 nm にて測定した。

細胞膜 ATPase 活性は、溶液 B に懸濁した細胞膜画分 10 μg に、500 μg/ml Brij 58、0.1 mM パナジン酸(細胞膜 ATPase 阻害剤)、140 mM KCl を加え、pH 6.5 もしくは pH 7.0 の反応液を用いて測定した。液胞膜 ATPase 活性は、溶液 B に懸濁した粗マイクロソーム画分 10 μg に、50 μg/ml Brij 58、50 mM KNO₃ (液胞膜 ATPase 阻害剤)、50 mM KCl を加え、pH 7.5 の反応液を用いて測定した。ミトコンドリア内膜 ATPase 活性は、溶液 B に懸濁した粗マイクロソーム画分 10 μg に、0.03% Triton X-100、1 mM NaN₃ (ミトコンドリア ATPase 阻害剤)を加え、pH 8.0 の反応液を用いて測定した。

NADH-チトクロム *c* 還元酵素活性は、チトクロム *c* の還元による吸光度の消光を、25°C、550 nm にて測定した。270 μg/ml チトクロム *c*、2.7 mM NaN₃、54 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)からなる基質液 0.75 ml に対し、溶液 B に懸濁した膜タンパク質 25 μl と 0.31 mM nicotiamde-adenine dinucleotide (NADH)を加え反応を開始させた(10)。また、NADH-チトクロム *c* 還元酵素はアンチマイシン A 非感受性であることから、1 ng/ml アンチマイシン A を加え、酵素活性を測定した。タンパク質定量は、BSA を標準とし、ピシンコニン酸法を用いた(11)。

2-5. プロトン輸送活性測定

プロトン輸送活性は、アクリジンオレンジの吸光度の消光を、分光光度計を用いて測定した(12,13)。10 mM MOPS-bis tris propane (BTP) (pH 7.0)、140 mM KCl、2 mM ATP-BTP (pH 7.0)、20 μM アクリジンオレンジ、1 mg/ml 脱脂 BSA、1 mM EDTA-BTP (pH 7.0)、1 mM DTT、10 μg/ml パリノマイシン、500 μg/ml Brij 58 の溶液中に溶液 B に懸濁した細胞膜画分を 200 μg 加え、30°C、30 分間放置した後、5 mM MgSO₄ (pH 7.0)を加えて反応をスタートさせた。測定光の波長は、495 nm とした。反応が飽和に達した後、ナイジェリシンを 10 μg/ml となるように加えた。

2-6. 抗体を用いた細胞膜 H⁺-ATPase の検出

アマモ、オオセキショウモ、イネ細胞膜画分から、それぞれ 0.5 μg になるように細胞膜画分を分取し、等量の 2×サンプル緩衝液 [100 mM Tris-HCl (pH6.8)、10% グリセロール、5% メタノール、8% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.001% bromophenol blue (BPB)] を加え、8% 変性アクリルアミドゲルを用い電気泳動した。泳動終了後、ゲルを適当な大きさに切り、ブロッティング緩衝液 A、B、C で湿らせたろ紙にゲルとメタノールで前処理したクリアプロット P 膜 (PVDF 膜) を重ね、ホライズプロット (ATTO) を用いてタンパク質をブロッティングした。ブロッティング緩衝液の組成は、A は 300 mM Tris、0.1% SDS、20% メタノール、B は 25 mM Tris、0.1% SDS、20% メタノール、C は 25 mM Tris、250 mM グリシン、0.1% SDS、20% メタノールとした。

酵素抗体染色は、アルカリフォスファターゼ法を用いた(14)。ブロッティングした PVDF 膜をブロッキング溶液 [4% スキムミルク、TTBS; 20 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5 M NaCl、0.05% Tween 20、0.05% Na₂S₂O₃] で 1 時間・室温にて振とうした。1 次抗体は、イネ細胞膜 H⁺-ATPase 由来のものを用い、PVDF 膜を一次抗体液 [2,500 倍希釈したイネ H⁺-ATPase 抗血清] に 4°C・一晩つけ、TTBS で 5 分間・2 回、10 分間・2 回洗浄後、二次抗体液 [5,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識ウサギ IgG ヤギ抗血清] を 1 時間・室温にて反応させた。TTBS で 5 分間・2 回、10 分間・2 回洗浄し、AP9.5 [0.1 M Tris-HCl (pH 9.5)、0.1 M NaCl、5 mM MgCl₂] で 5 分間・3 回洗浄した。その後、基質液 [75 mg/ml nitoroblue tetrazorin (NBT)、X-phosphate] につけ、発色が十分進んだら AP9.5 で洗い、自然乾燥して保存した。

イネ細胞膜 H⁺-ATPase 由来のポリクローナル抗体は、農林水産省北海道農試の笠原賢明氏より分譲を受けた。

2-7. 遺伝子クローニング

オオセキショウモ細胞膜 H⁺-ATPase 遺伝子のクローニングは、RT-PCR 法 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction、逆転写反応と PCR 反応を組み合わせた方法) により行った(15)。オオセキショウモ葉より、GTC (グアニジンチオシアネート・フェノールクロロフォルム) 法で、RNA を単離した(16)。この RNA を鋳型に SuperScriptII 逆転写酵素 (Gibco-BRL) で cDNA を合成し、その cDNA を鋳型に、PCR 反応を行った。PCR のプライマーは、植物細胞膜 H⁺-ATPase の保存領域のアミノ酸配列 (LVMKGAPE, TGDGVNDS) を参考に、5'-CTIGTIATGAA-(A/G)GGIGCICCGA-3' と 5'-GA(A/G)TC(A/G)TTIACICC(A/G)TCICCGT-3' を用いた。得られた PCR 産物を T4 DNA 合成酵素で平滑末端化処理後、アガロースゲル電

気泳動で分画し、Gene Clean Kit (フナコシ) で精製した。精製したDNA断片をpUC18のSmaIサイトにクローニングし、大腸菌JM109に形質転換した。得られた大腸菌は、アンピシリンとX-galを含むLB培地で選択し、その大腸菌から、アルカリーSDS法でプラスミドを単離した。単離したプラスミドは、制限酵素処理でインサートを確認した後、塩基配列決定のサンプルとした。

2-8. 塩基配列の解析

クローニングしたDNA断片の塩基配列は、ABI377シーケンサーで決定し、遺伝子解析プログラム(Genetyx)で解析した。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列のマルチプルアラインメントおよび系統樹は、NJ法(ClustalX)で作成した。

2-9. 陽イオン含量の解析

乾燥した葉を10N塩酸で処理した後、原子吸光法で分析した。イオン含量は、葉の乾燥重量に対する百分率(%)であらわした。

2-10. 野外調査

多摩川本川永田橋付近、多摩川支流平井川、国分寺市野川、琵琶湖周辺河川(滋賀県高島郡安曇川町および高島町)で、水草の野外調査を行った。

3. 結果と考察

3-1. 細胞膜画分の調製

細胞膜H⁺-ATPaseは、ATPの加水分解時のエネルギーを用いてH⁺を細胞外に汲み出すことによって細胞膜に電気化学的H⁺勾配を生み出す酵素であり、P型ATPaseに分類される。P型ATPaseは、反応過程で、酵素自身がリン酸化された中間体(phosphorylated intermediate)を形成することからP型と呼ばれ、カチオン輸送型ATPaseのスーパーファミリーに属している。このグループに属するイオンポンプには、H⁺-ATPaseの他、Na⁺/K⁺-ATPaseやCa²⁺-ATPaseがある。細胞膜H⁺-ATPaseは、約100kDaのタンパク質で、単量体あるいは2量体の形で存在する。単量体は、10回膜貫通型であり、ATP結合領域を含む大きな親水性のループを持つ。また、シロイヌナズナでは10個以上、タバコやイネにおいても複数個のアイソフォームが見つかっており、それぞれのアイソフォームは組織や器官によって発現が異なるようである(1-3)。

細胞膜H⁺-ATPaseのATP加水分解活性およびH⁺輸送活性を生化学的に解析するために、オオセキショウモ、アマモ、イネの葉から細胞膜画分を単離精製すること

試みた (図 1)。3種の植物の葉を破碎し、その破碎液を分画遠心して粗マイクロソーム画分を得、さらに水性二層分配法により細胞膜画分を単離した。植物の細胞膜は、一般に、シヨ糖密度勾配もしくは水性二層分配法のどちらかを用いて分画される。水性二層分配法は、デキストラン T-500 とポリエチレングリコール (PEG) の 2 つの高分子を用いるシステムで、膜表面の電荷の違いを利用するのに対し、シヨ糖密度勾配法は、各細胞内の膜の大きさと、密度の違いによって分画する。水性二層分配法は、PEG がタンパク質の安定性を低める作用があることが示されているものの、操作が簡単な上、タンパク質の電気的性質によって分離するため、細胞膜とそれ以外の画分に分けることができる(4-6)。今回は、水性二層分配法を用いて細胞膜画分を得た。また、調製した細胞膜画分では、細胞質側が内側の right side-out とその逆の inside-out の小胞 (反転小胞膜) が混在しており、二層分配法を用いて細胞膜画分を調製すると、画分中の小胞の 80-90 %が right side-out になる。ATPase の反応部位は細胞質側にあるため、 H^+ -ATPase 活性を測定するためには、ATP 反応部位の露出した反転小胞膜にする必要がある。界面活性剤 Brij 58 を用いると、100 % シールされた反転小胞膜が得られ、また細胞膜 H^+ -ATPase の活性は損なわれないことから、Brij 58 を加え反転小胞膜を得た(17)。

得られた細胞膜画分における細胞内膜系の混入の有無を、各内膜の標識酵素活性 (表 1) を測定することにより確認した。表 2 に示したように、アマモ、オオセキシヨウモ、イネ細胞膜画分において、細胞膜の標識酵素である K^+ -促進性 ATPase 活性は、約 2 倍、7.4 倍、4.5 倍に濃縮されているのに対し、他の内膜系標識酵素の割合は低かった。この結果は、各植物の葉組織から、細胞内膜系が混入しない高純度の細胞膜画分を単離することができたことを示している。この水性二層分配法によって得られた画分を細胞膜画分とし、以下の実験に用いた。

表 1 標識酵素一覧

細胞膜	K^+ 促進性ATPase(バナジン酸感受性)
ミトコンドリア	アジド感受性ATPase NADH-チトクロムc還元酵素(アンチマイシンA感受性)
液胞	硝酸感受性ATPase
ゴルジ体	トライトン促進性UDPase
小胞体	NADH-チトクロムc還元酵素(アンチマイシンA非感受性)



図1 アマモ(左)とオオセキショウモ(右)

表2 粗マイクロソーム、細胞膜画分の標識酵素活性
CM: 粗マイクロソーム画分 PM: 細胞膜画分.

	アマモ		オオセキシヨウモ		イネ	
	CM	PM	CM	PM	CM	PM
ATPase 活性 (μ moles Pi / mg タンパク質 / 60分間)						
バナジン酸感受性 (細胞膜)	10.416	21.660	1.674	12.420	5.652	25.572
硝酸イオン感受性 (液胞膜)	13.638	4.632	1.416	-0.690	3.360	-7.212
アジド感受性 (ミトコンドリア)	22.452	1.830	1.602	0.282	3.054	-2.622
UDPase 活性 (ゴルジ体) (μ moles Pi / mg タンパク質 / 60分間)	19.224	3.768	5.316	1.110	6.420	1.254
チトクロムc還元酵素 活性 (μ moles cytochrome c / mg タンパク質 / 60分間)						
アンチマイシン A 感受性	10.626	1.278	1.530	0.960	2.214	0.432
アンチマイシン A 非感受性 (小胞体)	10.908	1.260	1.656	0.870	2.676	0.426

(n \geq 4)

3-2. 細胞膜画分におけるオオセキシヨウモ細胞膜 H⁺-ATPase の存在の確認

得られた細胞膜画分について、H⁺輸送活性測定及びウエスタンブロッティングにより細胞膜 H⁺-ATPase が含まれるか確認した。

H⁺輸送活性は、色素のアクリジンオレンジ(AO)を用いて測定した。Na⁺/K⁺-ATPase や Ca²⁺-ATPase の場合、イオンの流れはラジオアイソトープを用いて測定できるが、H⁺-ATPase の場合、そのような測定は不可能である。そのため、H⁺輸送活性は、膜小胞中の pH 勾配の状態に応答して吸光度もしくは蛍光特性を変える色素を使用することで間接的に測定される。色素(AO)を用いた H⁺輸送活性測定の原理を、図2に模式的に示した。AO は、H⁺と結合していない時は膜を通過することができるが、H⁺と結合すると通過できなくなる(AO-H⁺)。AO と AO-H⁺は小胞の内外で平衡を保っているが、H⁺-ATPase が働いて H⁺が小胞中に輸送されると平衡が移動し、小胞中の AO-H⁺が増えていく。AO-H⁺の吸光度は AO よりも低いいため、AO-H⁺増加すると吸光度は下がる(12,13)。H⁺-ATPase は、MgATP を基質として反応するので、Mg²⁺を加えて反応を開始させた。反応が飽和した後、K⁺と H⁺を交換する薬剤であるナイジェリシンを加え、H⁺の漏出によって消光が元に戻ることを確認した(図3)。Mg²⁺を加えることによって消光が見られることから、オオセキシヨウモ細胞膜画分に H⁺輸送活性があることを確認した。

一次抗体にイネ細胞膜 H⁺-ATPase ポリクローナル抗体を用いて、ウェスタンブロットティングを行った。植物細胞膜 H⁺-ATPase は約 100 kDa のタンパク質である。アマモ、オオセキショウモ、イネ細胞膜画分において、約 100 kDa の位置にバンドが検出された (図 4)。 また、各植物に含まれている単位タンパク質あたりの細胞膜 H⁺-ATPase 量には、大差がなかった。これらの結果から、オオセキショウモ細胞膜画分において細胞膜 H⁺-ATPase の存在が確認された。

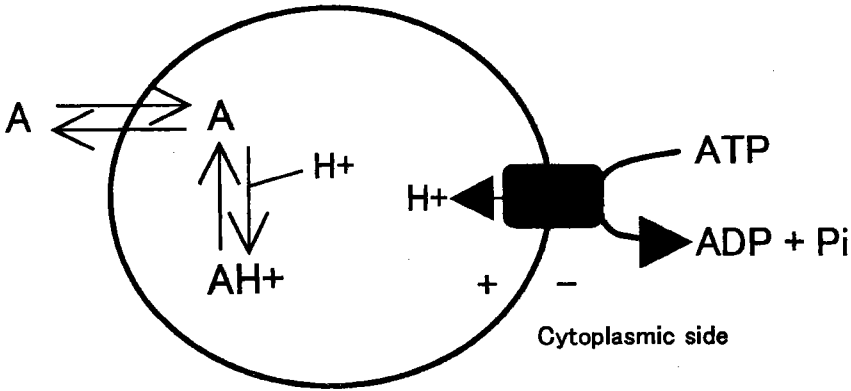


図 2 反転小胞膜とアクリジンオレンジを用いた H⁺ 輸送活性測定 の原理
 A : アクリジンオレンジ AH⁺ : アクリジンオレンジ-H⁺ 複合体

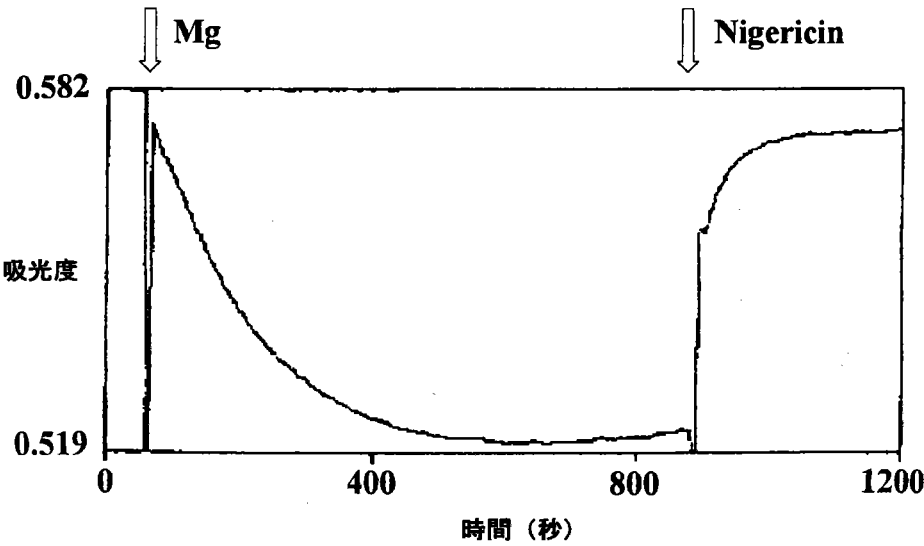


図 3 オオセキショウモ細胞膜画分における ATP に依存した H⁺ 輸送活性
 Mg²⁺ を加え反応開始、反応飽和後ナイジェリシンを添加。
 Abs : 吸光度 横軸の単位は秒 (S).

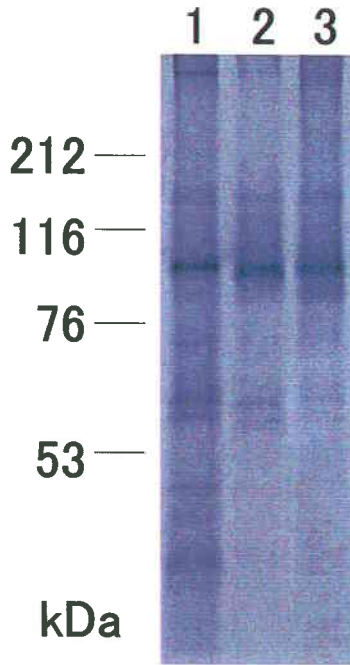


図4 細胞膜H⁺-ATPaseのウェスタンブロッティング
 レーン1：アマモ レーン2：オオセキショウモ レーン3：イネ.

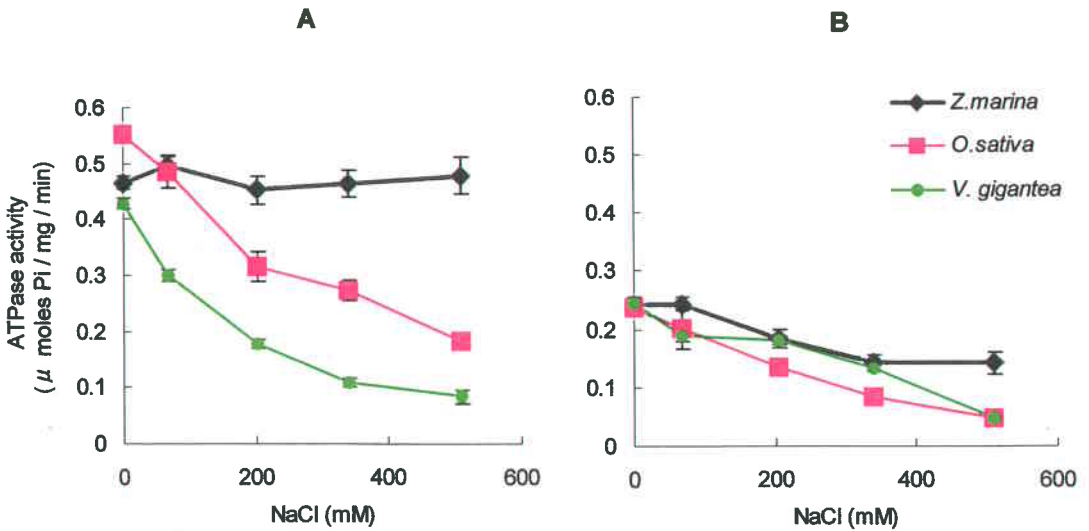


図5 オオセキショウモ (*V.gigantea*)、アマモ (*Z.marina*)、イネ (*O.sativa*)
 細胞膜ATPase活性に対するNaClの阻害効果

A : pH6.5 B : pH7.0 誤差範囲は標準誤差(SE). n ≥ 5

3-3. NaCl 添加による細胞膜 ATPase 活性に対する阻害効果

細胞膜プロトンポンプは、ATPの加水分解のエネルギーを用いてプロトンを細胞外に排出する活性を持ち、またこのATP加水分解活性はバナジン酸により特異的に阻害されることが知られている。今回調製した膜画分は、バナジン酸感受性ATP加水分解活性を含み、その活性の至適pHは6.5であった。アマモ、オオセキシヨウモ、イネ細胞膜画分に *in vitro* で様々な濃度の NaCl を加え、NaCl の細胞膜 ATPase 活性に対する阻害効果を調べた。図5に示すように、オオセキシヨウモ、イネにおいては、NaCl 濃度が上がるにつれて細胞膜 ATPase 活性が阻害され、510 mM NaCl (海水と同程度) では、ATPase 活性が NaCl を加えていない時の約 20-30 % まで減少した。一方、アマモでは活性がほとんど阻害されておらず、これは pH6.5 において顕著であり、pH 7.0 の場合も同じ傾向が見られた。細胞膜 ATPase は、pH の差及び電位の差から成る電気化学的 H^+ 勾配を生み出す酵素であり、そのエネルギーによって二次輸送系が駆動される。NaCl を加えることで、細胞膜 H^+ -ATPase 活性が阻害されると溶質やイオンの輸送も大幅に阻害されると考えられるが、海草アマモでは、高塩濃度下でもそのような状態に陥らないことが推察される。

3-4. オオセキシヨウモ細胞膜プロトンポンプ遺伝子のクローニング

オオセキシヨウモの細胞膜 H^+ -ATPase (細胞膜プロトンポンプ) について、その ATPase 活性やプロトン輸送活性について生化学的手法により解析してきたが、さらに詳細にオオセキシヨウモ細胞膜 H^+ -ATPase を解析するために、この遺伝子をクローニングすることを試みた。

オオセキシヨウモ葉組織から RNA を単離し、その RNA を鋳型に cDNA を合成し、更に PCR 法で DNA 断片を増幅した後、pUC18 プラスミドにクローニングした。得られた約 30 のクローンの塩基配列を決定し、その塩基配列からコードされているタンパク質のアミノ酸配列を推定した。これらのクローンの塩基配列を解析した結果、4 種の P 型 ATPase 遺伝子を含むことが明らかとなり、これらを *Vga1*, *Vga2*, *Vga5*, *Vga7* と命名した。これらの遺伝子の塩基配列および塩基配列から推定されるアミノ酸配列を図6に示す。これらのアミノ酸配列を比較すると、VGA5 だけが他の 3 種の遺伝子を異なる配列であった (図7)。これらの配列を基にホモロジー検索を行った結果、VGA1, VGA2, VGA7 は、植物の細胞膜 H^+ -ATPase 遺伝子、VGA5 は、P 型 Ca^{2+} -ATPase 遺伝子と最も相同性が高かった。

今回クローニングした遺伝子と、既報の ATPase 遺伝子との進化系統関係を考察するために、アミノ酸配列を基に系統樹を NJ 法 (ClustalX) で作成した。その結果、今回クローニングしたオオセキシヨウモの 3 種の細胞膜プロトン ATPase 様遺

Vga5

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 TGGTGAATAAGGGCCGGAGGTTCCAGATCCGATCGGATTAGAAAGTGTACCATCAGGAATTCAGCTTGGTTGGTTAACAGGTGACAAATCCCAACAGCCTGTCAAGTATTGCTTCCCAAG
 V M K G A P E V P D A I R K C Y D A G I D V R L V T G D N P N T A V S I A F Q A

 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
 CCGGCATATTAAGAGACCGGATTTCAACCCCAACACTACAGAACGGAGTTCCGATGAATTTGAAAGAAATGTTTGTGTAAGAAGGAGGATTTCCGGCTCCAAGTGTATCGTCAAGGGC
 G I L R D T H F Q P N T T E R V A M N L K E N V L M E G R D F R S K V Y R D G P

 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 CTAGTGTGAGAAGGAGTTTGACCAAGTTGCTTTGACCGTATTTGGCCGATTTCCCGTCTCGCAGCAGCTACCGGAGGACAAAGTCACTTGGCACATGGATGAACCAAGTCA
 S G E K E F D Q V A F D R I W P H L R V L A R S S P D D K L T L A H G L N Q S T

 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 CTTTGTTCGTGATAAATCCAAATACTGCAAAAACACTACCGGATGAACATGGGATTAATGTGTTCGGATCGCAAGTGGTAGCAATGACCGCGGATGGGCTCAACGACTCGGGTACCGAGC
 L F A D K S I C K K L R D E H G I N V F P D R Q V V A M T G D G V N D S G T E L

Vga7

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 CCTGGTCAAGGGGGCCGGACAGATCCFGAATCTGTGCAACTGCAAGAAGATGTTAGGAAGAAGTCCACtCTGTATTGACAACTATGCTGAAAGAGGGcTCCGTTCCTTGGC
 L V M K G A P E Q I L N L C N C K E D V R K K V H S V I D K Y A E R G L R S L A

 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
 TGTGGTGGACAGGAGTTCTGAGAAAAGCAAGGAGAGTGTGGCCCATGGCACTTTTGGCTGGTACtCTATTGGACCCAGCTAGcATgAtAGTGCAAAACCCATCCGCGAG
 V G R Q E V P E K S K E S A G G P W Q F F V G L L P L F D P P R H D S A K T I R R

 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 GGCACTTAACCTTGGGTCAACGTLAAGATGATTACTGGAGATCAGTTGCCATTGCCAAGGAACCCGGGAAGAGACTTGGAAATGGGCACAAACATGTACCCCTTCtTCCTTGCTCGG
 A L N L G V N V K M I T G D Q L A I A K E T G R R L G M G T N M Y P S S S L L G

 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 CAACCACAGGATGAATCACTTGGTACGATTECCGTTGAGGAAGTGAAGAGGCTGACGGcTTTGGCGGAGTTTCCCTGAGCACAACTTCAAAATAGTAAAGAAATTCGAGGAAAAG
 N H K D E S L G T I A V E E L I E K A D G F A G V F P P E H K F F E I V K K L Q E R

 490 500 510 520
 AAAGCACATCTGTGTATGACCGGCGcAcGGCTCaaGatTCG
 K H I C G M T G D G V N D S

図6 オオセキショウモ細胞膜H⁺-ATPase様遺伝子の塩基配列および推定されるアミノ酸配列

```

VGA2 : CAPEIIRKICGSDSRKIVHSIDKADIDSRSSLAVAPGKPKNSKESGTRPQVALLRPL : 62
VGA1 : CAPEIIRKICGSDSRKIVHSIDKADIDSRSSLAVAPGKPKNSKESGTRPQVALLRPL : 62
VGA7 : CAPEIIRKICGSDSRKIVHSIDKADIDSRSSLAVAPGKPKNSKESGTRPQVALLRPL : 62
VGA5 : --PEVPDAIRKCYDAGIDVRIAVTGKNPNT---AVSLRFGAGILDTHEQPNTTERRVAMN-L : 55
gaPEqiln6cnCked rkkvhs iDKya rglrs6a6arQev e4skésagpp 2fvG6lpL

```

```

VGA2 : SPSRRHSGAETIRKALNIEGNNVRRITGEGHOLAALERTSRRLSFGNNMYPSSSLIGGQVAVSLA : 124
VGA1 : SPSRRHSGAETIRKALNIEGNNVRRITGEGHOLAALERTSRRLSFGNNMYPSSSLIGGQVAVSLA : 124
VGA7 : SPSRRHSGAETIRKALNIEGNNVRRITGEGHOLAALERTSRRLSFGNNMYPSSSLIGGQVAVSLG : 124
VGA5 : KENVIMEGRDFRSIVYRDGPSGEKE-FLQVAFDR-IWPHRVLARSSDDKILTLAHG-LNQS : 114
fdpprhdsa tir4alnlgvvnkmitgDQ6Aia4etgrrLg6gtmmyPsssllg kd s

```

```

VGA2 : ALEVRSIIRKADCFEIVREHKSRIIVNIGLQSSGHTGMTGDGVND- : 169
VGA1 : ALEVRSIIRKADCFEIVREHKSRIIVNIGLQSSGHTGMTGDGVND- : 169
VGA7 : TIAEELIIRKADCFEIVREHKSRIIVNIGLQSSGHTGMTGDGVND- : 170
VGA5 : TIFAKSICLK-----LRDEHGINVFPDRQ----VAVMTCGGVARIK : 151
6 vdelIeKadgfa 6fpEHk e6vkkllQe k 6cgMTGDGVnd

```

図7 オオセキシヨウモ細胞膜H⁺-ATPase様遺伝子のアミノ酸配列の比較

伝子は、すべてアマモおよびトマトの細胞膜プロトン ATPase 様遺伝子と最も相同性が高いことが示された (図 8)。また、オオセキショウモ P タイプ Ca^{2+} -ATPase 様遺伝子 (*Vga5*) は、ヒトやブタの細胞膜 Ca^{2+} -ATPase 遺伝子と最も相同性が高いことが示された (図 9)。予備的なノーザンハイブリダイゼーション実験の結果から、4 遺伝子の中で *Vga7* が、葉において最も発現量が多いことが示唆された。今後、より詳細な実験により、これら 4 遺伝子の遺伝子発現パターンを解析していきたい。

今回、水草オオセキショウモから 4 種の P 型 ATPase 様遺伝子の部分配列をクローニングし、その内 3 種が細胞膜 H^{+} -ATPase 遺伝子であることが示唆された。細胞膜 H^{+} -ATPase 遺伝子は、複数の植物から既にクローニングされているが、水草の細胞膜 H^{+} -ATPase 遺伝子クローニングは、初めての報告となる。今後、水草のイオン吸収機構を解析するうえでは、生理生化学的な解析と共に遺伝子レベルでの解析は必須と考えられる。水草を研究対象とした遺伝子レベルの研究は、今までほとんど報告されていないことから、今回の研究成果は、大きな前進である。今までは個体レベルでの水草研究の成果が報告されているが、今後は遺伝子レベルの研究を加えることにより、水草のイオン吸収機構、さらには水草の水質浄化機構を細胞分子レベルで理解することにつながると確信する。

3-5. オオセキショウモ、アマモ、イネ葉の陽イオン組成

原子吸光法を用いて、イネ、海草アマモ、水草オオセキショウモの葉の陽イオン (Na^{+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+}) 組成を解析した。 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の 3 種の陽イオン含量については、3 種の植物間でさほど大きな差は見られなかったが、 Na^{+} イオンの含量において大きな差が見られた。陸上植物のイネでは Na^{+} イオンがほとんど検出されないのに対し、オオセキショウモの葉では、海草アマモの場合と同程度に Na^{+} イオンの蓄積が見られた (表 3)。

表 3 葉における陽イオン含量 (%)

	Na^{+}	K^{+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}
オオセキショウモ	3.76	3.64	0.53	0.85
アマモ	3.06	3.39	0.59	0.45
イネ	0.02	2.82	0.24	0.19

```

AtPMCA : PGVKSVEICRRAGLIVRMVTGDNNTANLAIRFGGIIIT-----D : 41
McCA   : PGVKSVAICRSAGIVRMVTGDNNTANLAIRFGGIIIT-----D : 41
AtChCA : PGVKSVAICKSAGIVRMVTGDNNTANLAIRFGGIIIT-----D : 41
humanPMCA : PEVPDAIKKQQRAGIVRMVTGDNNTANLAIRFGGIIHP-----GE : 43
pigPMCA : PEVPAIKKQQRAGIVRMVTGDNNTANLAIRFGGIIHP-----GE : 43
VGA5   : PEVPDAIRKCYDAGIDVRLVTGDNPNLTVSIFQAGIILRDTHFQPNTTERTVAMNLIK : 57
P V 6 C AGITVR6VTGDN nTA aIA cGII d

```

```

AtPMCA : GIAIEGPFVFEKNELEIIICQMPFIMPISTLQQRIT : 85
McCA   : GIAIEGPFVEKSELEIIICQMPFIMPISTLQQRIT : 85
AtChCA : GIAIEGPFVEKSDLEIIICQMPFIMPISTLQQRIT : 85
humanPMCA : FLCLEGGDENRRIRNE---KGEIEERLWIKRLELIDIALVIGGDS : 96
pigPMCA : FLCLEGGDENRRIRNE---KGEIEERLWIKRLELIDIALVIGGDS : 96
VGA5   : NVLMEGRDESSKVIYRDGPSGEKEFDVAFFWEHLRLARHGENQS : 114
6 6EG F E qe 6 Pk6 V6ARSSP DKhtLV 3

```

```

AtPMCA : FD-----EVAVVTGDPGNDIA : 101
McCA   : FN-----EVAVVTGDPGNDIA : 101
AtChCA : MFQ-----EVAVVTGDPGNDIA : 101
humanPMCA : NVSDQR-----QAVVVTGDPGNDIA : 114
pigPMCA : VSEQR-----QAVVVTGDPGNDIA : 114
VGA5   : LFADKSI CKKLRDEHGINVFPDRQAVVVTGDPGNDIA : 151
7 2VVA6TGDGtND

```

図8 オオセキシヨモP型Ca²⁺-ATPase様遺伝子(VGA5)と既報のP型Ca²⁺-ATPase遺伝子の比較
 AtPMCA シロイヌナズナ細胞膜 Ca²⁺-ATPase、AtChCA シロイヌナズナ葉緑体 Ca²⁺-ATPase、
 McCA アイスプラント Ca²⁺-ATPase、humanPMCA ヒト細胞膜 Ca²⁺-ATPase、
 pigPMCA ブタ細胞膜 Ca²⁺-ATPase.

海辺に生育する塩生植物では Na^+ の蓄積が報告されており(18)、例えば、ホソバノハマアカザ(アカザ科) 2.19%、ハママツナ(アカザ科) 3.52%等、今回、我々が得た海草アマモや水草オオセキショウモの測定値 3.76%、3.06%と同様な値を示している。今回の測定で海水中に生育する海草アマモにおいて Na^+ イオンの蓄積が測定されたことは不思議ではないが、水草オオセキショウモにおいても Na^+ イオンの蓄積が検出された。水草における Na^+ イオンの蓄積の生物学的な意味はまったく分らないが、水中で生活するための適応機構として、 Na^+ イオンを積極的に蓄積利用しているのかもしれない。

3-6. 多摩川および琵琶湖周辺河川における水草の調査

室内の生化学的実験と平行して、セキショウモをはじめとする水草の多摩川および流域河川における生育状況について調査した。多摩川永田地区および平井川において、水草の生育状況を調査した結果、1998年の調査では、多摩川およびその流域河川では、水草の優占種としてコカナダモが観察された。また、同年、国分寺市野川を調査した結果、エビモおよびツルモが繁茂していることが観察された(図11)。

1999年8月、琵琶湖周辺河川(滋賀県高島郡安曇川町および高島町)で水草の野外調査を行った。ここでは、セキショウモの1種コウガイモ(*Vallisneria denseserrulate*)が繁茂していることを確認した(図12)。コウガイモは、オオセキショウモ(*Vallisneria gigantea*)と同じくセキショウモ(*Vallisneria*)属に分類される水草で、琵琶湖およびその周辺河川で群生していることが知られている(19)。琵琶湖周辺河川では、コウガイモ以外にも、コカナダモ、ナガエミクリ、コウホネなどが観察された。これらのセキショウモを含めた水草は、河川の環境浄化に寄与しているに違いない。

まとめ

水草オオセキショウモ(*Vallisneria gigantea*)をモデル植物として、水草の水環境適応機構について、水草のイオン吸収機構を中心に細胞生理生化学および分子生物学的手法で研究を行った。水草オオセキショウモの葉より細胞膜画分を単離しATP加水分解(ATPase)活性およびプロトン輸送活性を確認した。オオセキショウモにおいても、細胞膜 H^+ -ATPase(細胞膜プロトンポンプ)が、イオン代謝のマスター酵素として働いていることが示唆された。また陸上植物イネ、海草アマモの葉からも細胞膜画分を単離し、それらの酵素活性を3植物間で比較した。海草アマモでは、細胞膜ATP加水分解(ATPase)活性が NaCl によってほとんど阻害されな

```

*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
OS A2  :  --- GAPEQI I I LAHN T E S E P P R A V I D K E A R G L R S L Q Y H V D G R S P G G P Q F : 57
OS A1  :  --- GAPEQI I I LAHN T O E P E H A V I D K F A E R G L R S L A Y Y P D G R S P G G P R F : 57
L H A1  :  --- GAPEQI I I LAHN S P E P P H A V I D K F A E R G L R S L G Y Y V P G R S A G G P Q F : 57
V G A2  :  --- GAPEQI I I L N C E E P R K A H S I I D K Y A D R G L R S L V R V H K S S A G G P R O F : 57
V G A1  :  L V M N GAPEQI I I L N C E E P R K A H S I I D K Y A E R G L R S L V R V H S S A G G P O F : 61
L H A4  :  --- GAPEQI I I L N C E E P R K A H S I I D K Y A E R G L R S L V R V H S S T G G P O F : 57
V G A7  :  --- GAPEQI I I L N C E E P R K A H S I I D K Y A E R G L R S L V R V H S S A G G P O F : 57
Z H A1  :  --- GAPEQI M T L N C P P K A H S I I D K Y A E R G L R S L G G O V N S P G G P O F : 57
A H A2  :  --- GAPEQI I E L A K A S N E S P K A H S I I D K Y A E R G L R S L V R V T S P A P S E : 57
A H A9  :  --- GAPEQI I E L N L E E A S P A D I I D K F A D F G L R S L V G R T I S D N S P G E P S H : 57
A H A10 :  --- GAPEQV I L L C O O N E A Q R Y A I I D R E A K G L R S L V Y I I S N N S P G G P R E C : 57
GAPEQ66 L
4 6ID45Ae4GLRSLav q 6 e keS Ggpw F

```

```

*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
OS A2  :  S L P L E D P P R H D S A E T I R K A L S L G V N V M I T G D Q L A I G K E T A F R L G M G T M M Y P S A L L G O B : 118
OS A1  :  A L L P L E D P P R H D S A E T I R K A L S L G V N V M I T G D Q L A I G K E T A F R L G M G T M M Y P S A L L G O B : 118
L H A1  :  A L L P L E D P P R H D S A E T I R K A L S L G V N V M I T G D Q L A I G K E T A F R L G M G T M M Y P S A L L G O T : 118
V G A2  :  S L P L E D P P R H D S A E T I R K A L S L G V N V M I T G D Q L A I A K E T A P R L G M G T M M Y P S S L L G O B : 118
V G A1  :  S L P L E D P P R H D S A E T I R K A L S L G V N V M I T G D Q L A I A K E T A P R L G M G T M M Y P S S L L G O B : 122
L H A4  :  S L P L E D P P R H D S A E T I R K A L S L G V N V M I T G D Q L A I A K E T A P R L G M G T M M Y P S S L L G O B : 118
V G A7  :  S L P L E D P P R H D S A E T I R K A L S L G V N V M I T G D Q L A I A K E T A P R L G M G T M M Y P S S L L G N H : 118
Z H A1  :  V L P L F D P P R H D S A E T I R K A L S L G V N V M I T G D Q L A G K E T A F R L G M G T M M Y P S S L I G D H : 118
A H A2  :  S L P L E D P P R H D S A E T I R K A L S L G V N V M I T G D Q L A I G K E T A F R L G M G T M M Y P S A L L G T H : 118
A H A9  :  S L P L F D P P R H D S A E T I R K A L S L G V N V M I T G D Q L A I G K E T A F R L G M G T M M Y P S A L L G O B : 118
A H A10 :  S L P L F D P P R H D S A E T I R A L S L G V C V M I T G D Q L A I A K E T A F R L G M G T M M Y P S S L L G N H : 118
96LPFDPPRRHDSaeTir4AL LGVnVKMITGDQLAI KETgRRRLG6GTTNMYPSS LLG

```

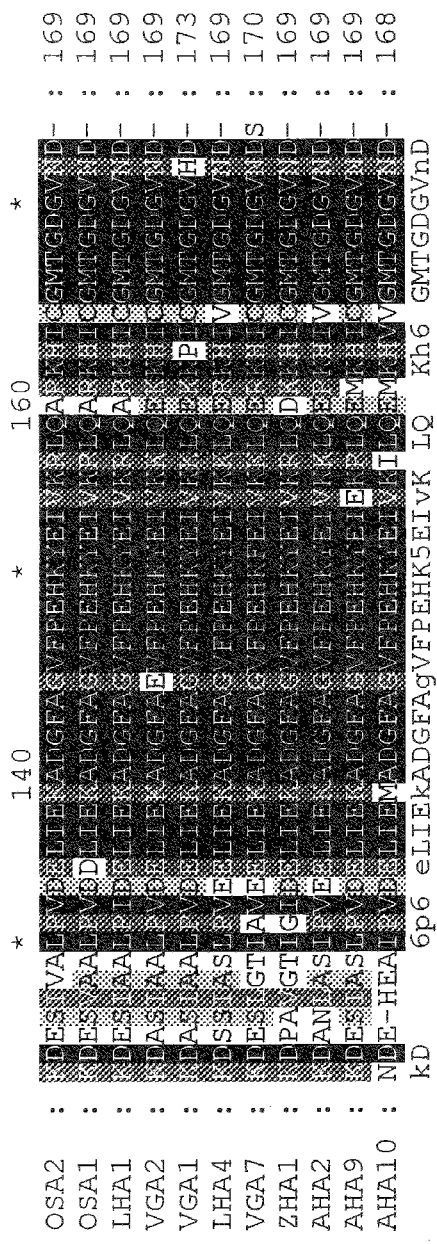


図9 オオセキシヨウモ細胞膜 H⁺-ATPase 様遺伝子 (VGA 1、VGA 2、VGA 7) と他の植物細胞膜 H⁺-ATPase 遺伝子の比較

AHA シロイヌナズナ細胞膜 H⁺-ATPase、LHA トマト細胞膜 H⁺-ATPase、OSA イネ細胞膜 H⁺-ATPase、ZHA アマモ細胞膜 H⁺-ATPase.

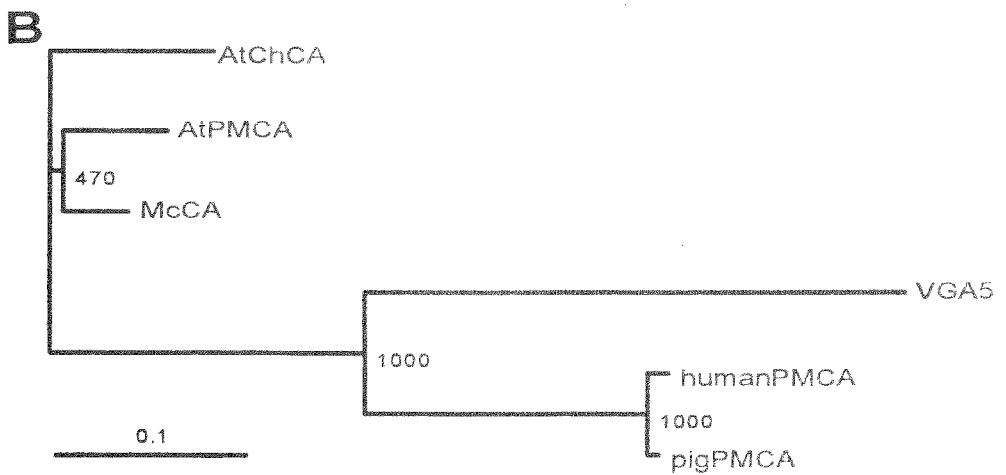
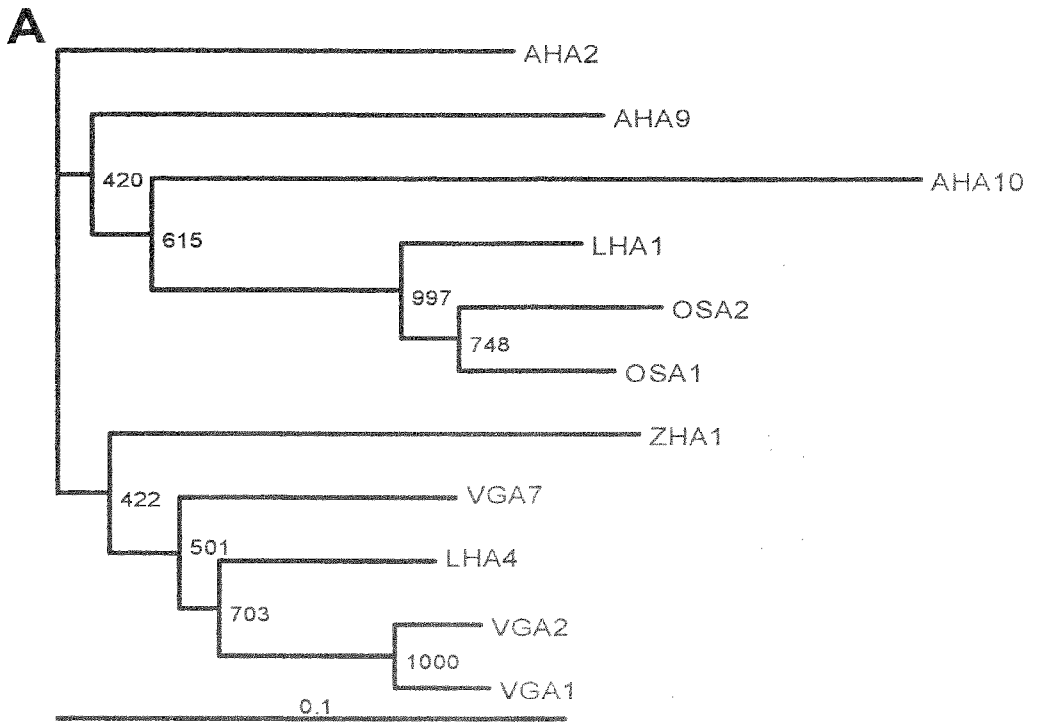


図10 A : オオセキショウモ細胞膜 H^+ -ATPase様遺伝子(VGA 1、VGA 2、VGA 7)を含む植物細胞膜 H^+ -ATPase遺伝子の分子系統樹

B : オオセキショウモP型 Ca^{2+} -ATPase様遺伝子(VGA 5)を含むP型 Ca^{2+} -ATPase遺伝子の分子系統樹



図11 エビモとツルモ(野川、国分寺市)



図12 コウガイモ (*Vallisneria denseserrulate*)
(琵琶湖周辺河川、滋賀県高島郡安曇川町)

かったのに対し、オオセキショウモやイネでは、その活性は NaCl によって阻害された。さらに詳細に水草の細胞膜 H⁺-ATPase を解析する目的で、この遺伝子のクローニングを試み、オオセキショウモから 3 種の細胞膜 H⁺-ATPase 様遺伝子 (*Vga1*, *Vga2*, *Vga7*)、および 1 種の P 型 Ca²⁺-ATPase 様遺伝子 (*Vga5*) の部分配列を得た。

また、オオセキショウモ、イネ、アマモの葉のイオン組成についても原子吸光法を用いて比較検討した。K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺の 3 種の陽イオン含量については、3 種の植物間でさほど大きな差は見られなかったが、Na⁺イオンの含量において大きな差が見られた。陸上植物のイネでは Na⁺イオンがほとんど検出されないのに対し、オオセキショウモの葉では、海草アマモの場合と同程度に Na⁺イオンの蓄積が見られた。このような研究室内の研究と平行して、セキショウモをはじめとする水草の生育状況について、多摩川本川、平井川、野川、琵琶湖周辺河川において野外調査した。

謝辞

本研究は、大阪大学大学院理学研究科大学院生原田明子氏および東京農工大学大学院連合農学研究科大学院生村松由貴氏の協力がなければ成り立たないものでした。ここに深く感謝いたします。

引用文献

1. Serrano, R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61-94
2. Sussman M. (1994) Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 211-234
3. Michelet, M., and Boutry, M. (1995) The Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 108: 1-6
4. Takagi, S., Yoshida, S., and Nagai, R. (1988) A model for cell membrane isolation using *Vallisneria* leaves. *Methods in bryology. Proc. Bryol. Meth. Workshop, Mainz.* Pp: 81-88. Hattori Bot. Lab., Nichinan.
5. Ros, R., Sanz, A., Segura, J., and Picazo, I. (1991) Characterization of ATPase activities in rice root plasmalemma vesicles isolated by two-phase partitioning. *Physiol. Plant.* 83: 75-82
6. Yoshida, S., Uemura, M., Niki, T., Sasaki, A., and Gusta, L.V. (1983) Partition of membrane particles in aqueous two-polymer phase system and its practical use for purification of plasma membrane from plants. *Plant Physiol.* 72:105-114
7. Heinonen, J.K., and Lanhti, R.J. (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its appreciation to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* 113: 33-317
8. Nagahashi, J., and Nagahashi, S.L. (1982) Triton-stimulated nucleotide diphosphate: Characterization. *Protoplasma* 112: 174-180
9. Staal, M., Maathuis, F.J.M., Elzenga, J.T.M., Overbeek, J.H.M., and Prins, H.B.A. (1991) Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt-tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media*. *Physiol. Plant.* 82: 179-184
10. Yoshida, S. (1979) Freezing injury and phospholipid degradation in vivo in woody plant cell III. Effect of freezing on activity of membrane-bound phospholipase D. *Plant Physiol.* 64: 252-256
11. Smith, P.K., Krohn, R.J., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Garner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85
12. Palmgren, M.G. (1990) An H⁺-ATPase Assay: Proton pumping and ATPase activity determined simultaneously in the same sample. *Plant Physiol.* 94: 882-886

13. Palmgren, M.G. (1991) Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations. *Anal. Biochem.* 192: 316-321
14. 大海忍、辻村邦夫、稲垣昌樹著 (1994) 「抗ペプチド抗体実験プロトコール、細胞工学別冊」秀潤社
15. Fukuhara, T., Pak, J.Y., Ohwaki, Y., Tsujimura, H., and Nitta, T. (1996) Tissue-specific Expression of the Gene for a Putative Plasma Membrane H⁺-ATPase in Seagrass. *Plant Physiol.* 110: 35-42
16. 渡辺格監修、杉浦昌弘編集 (1989) 「クローニングとシークエンス」農村文化社
17. Johansson, F., Olbe, M., Sommarin, M., and Larsson, C. (1995) Brij 58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles. *Plant J.* 7: 165-173
18. 新免輝男編 (1991) 「現代植物生理学 4、環境応答」朝倉書店
19. 角野康郎監修 (1990) 「滋賀の水草」新学社

「た まがわりゅういき か せん せいいく みずくさ
多摩川流域河川に生育する水草の
きゅうきこう さいぼうぶん し せいぶつがくてきけんがう
イオン吸収機構の細胞分子生物学的研究」

(研究助成・一般研究 VOL. 29-No.207)

著者 ふく はら とし ゆき
福原敏行
発行日 2001年3月31日
発行 財団法人とうきゅう環境浄化財団
〒150-0002
渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)
TEL (03)3400-9142
FAX (03)3400-9141
