

## 9325 植物耐塩機構の分子遺伝学的解析

助成研究者:小林 裕和(静岡県立大学 食品栄養科学部)

共同研究者:丹羽 康夫(静岡県立大学)

佐伯 真理(静岡県立大学)

小林 京子(静岡県立大学)

## 目 的

人類の生存に必要な食糧(家畜飼料を含む)および酸素(O<sub>2</sub>)は、太陽エネルギーを利用して光合成を営む植物に主として由来している。砂漠乾燥地帯の緑化を図るためには灌漑が必要であるが、水の確保が可能な場合も、水分蒸発による土壌中塩分の地表層集積の問題が生じる可能性が高い。また、海岸乾燥地域においては希釈海水灌漑が考えられる。いずれの場合も、植物に耐塩性を付与しなければならない。この目的に対し、耐塩機構を支配している遺伝子をクローニングし、それを有用植物において有効に発現させたいと考える。耐塩機構発動に関与するタンパク質の中には、微量かつ不安定なものも含まれ、タンパク質の側からの研究には限界があると考えられる。塩に対し耐性および超感受性になった突然変異植物体を作製し、変異相補により遺伝子をクローニングするという方法論を遺伝学に適したモデル植物シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)に適用したい。

## 結果と考察

塩ストレス条件化においては、光合成機能構築活性も低下し、したがって恒常的光合成遺伝子発現も抑制されていると考えられる。代表的な光合成遺伝子としてリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(rubisco)のSサブユニット遺伝子(*RbcS*)とクロロフィル*a/b*結合タンパク質遺伝子[*Cab*(*Lhc*)]両遺伝子群のうち、シロイヌナズナ *RbcS-3B* および *Cab1*(*Lhcb1\*At3*)に注目した。これら遺伝子発現をモニターするために、植物形質転換により遺伝子プロモーター(上流制御部位を含む)の制御下に各種 reporter 遺伝子を導入した。200 mM NaCl 添加培地にて12日間、また250 mM NaCl 添加培地において7日間放置すると、シロイヌナズナは塩ストレスのため枯死し、またクロロフィル含量も低下した。reporter 遺伝子発現を指標にした *RbcS-3B* および *Cab1* それぞれの遺伝子発現は、植物体の死に先行して NaCl 濃度に敏感に応答することが明らかになった。現在までに、200 mM および 250 mM NaCl 添加培地を用い、変異原 ethylmethanesulfonate (EMS) 処理系統 8,200 種類およびT-DNA挿入変異系統 4,900 種類を塩耐性および塩超感受性について選抜した。その結果、数系統の塩耐性変異体 (ste) およびいくつかの塩超感受性変異体候補を見いだした。EMS処理系統についてはさらに選抜を継続している。

耐塩機構としては、浸透圧調節物質の集積あるいは膜能動輸送系の変異が考えられ、ste 変異体候補においてそのいずれが機能しているのか現在検討を加えている。生物は海水条件において進化し、やがて陸上生活に適応したと考えられ、陸上植物も潜在的に耐塩性を有し、その能力は通常抑制されているのではないかと想像される。したがって、遺伝子変異によりその抑制機構を解除できれば塩耐性になるのではないかと考える。



## 9325 植物耐塩機構の分子遺伝学的解析

助成研究者:小林 裕和(静岡県立大学 食品栄養科学部)

共同研究者:丹羽 康夫(静岡県立大学)

佐伯 真理(静岡県立大学)

小林 京子(静岡県立大学)

## 1. 研究目的

人類の生存に必要な食糧(家畜飼料を含む)および酸素(O<sub>2</sub>)は、太陽エネルギーを利用して光合成を営む植物に主として由来している。地球上陸地に残された不毛砂漠乾燥地帯は、地上の1/3までも占め、さらに毎年約60,000 km<sup>2</sup>(四国と九州を合わせた面積に相当)ずつ拡大している。砂漠乾燥地帯の緑化を図るためには灌漑が必要であるが、水の確保が可能な場合も、水分蒸発による土壌中塩分の地表層集積の問題が生じる可能性が高い。また、海岸乾燥地域においては希釈海水灌漑が考えられる。いずれの場合も、植物に耐塩性を付与しなければならない。この目的に対し、耐塩機構を支配している遺伝子をクローニングし、それを有用植物において有効に発現させたいと考える。

耐塩機構発動に関与するタンパク質の中には、微量かつ不安定なものも含まれ、タンパク質の側からの研究には限界があると考えられる。塩に対し耐性および超感受性になった突然変異植物体を作製し、変異相補により遺伝子をクローニングするという方法論は極めて有効であると考えられる。モデル植物シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)は、この種の分子遺伝学的解析に不可欠な条件を備えている。すなわち、高等植物の中でゲノムが最も小さく(1×10<sup>8</sup>塩基対)、1世代が短く(4~5週間)、交配が可能であり、高密度栽培できるのみならず、変異原処理および挿入突然変異(insertion mutagenesis)による変異植物体の作製、さらに、野生植物体DNAによる変異体の形質転換に基づく変異相補という方法論の適用も可能である。このような観点から、昨今、モデル植物シロイヌナズナに対する関心は高い。しかしながら、塩のような光合成活性阻害環境ストレスに対し耐性および超感受性になった植物突然変異体の研究は未だ他に報告がない。原因の1つとして、著しく光合成活性が低下した環境ストレス感受性突然変異体は植物個体としては致死であり、したがって変異植物体を得られないことが挙げられる。本助成研究者らは、薬剤処理により光合成能が低下したシロイヌナズナが培地に糖を添加することにより生育することを見いだしており、本助成課題研究は遂行可能である。

## 2. 研究の方法

## 2.1. 突然変異体選抜遺伝子の光合成遺伝子プロモーター制御下への導入: 塩ストレス条件

下においては、光合成機能構築活性も低下し、したがって恒常的光合成遺伝子発現も抑制されていると考えられる。代表的な光合成遺伝子として、リブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (rubisco) のSサブユニット遺伝子 (*RbcS*)とクロロフィル *a/b* 結合タンパク質遺伝子 [*Cab* (*Lhc*)] 両遺伝子群のうち、シロイヌナズナ *RbcS-3B* および *Cab1* (*Lhcb1\*At3*) に注目した。これらプロモーター (上流制御部位を含む) の制御下に突然変異体選抜遺伝子 (reporter 遺伝子) として $\beta$ -glucuronidase (GUS) 遺伝子 (*uidA*) あるいは luciferase 遺伝子 (*luc*) を (Fig. 1), また薬剤耐性遺伝子として hygromycin B phosphotransferase 遺伝子 (*hph*) あるいは bialaphos resistance 遺伝子 (*bar*) を導入し、シロイヌナズナ (Columbia) を根切片より *Agrobacterium tumefaciens* Ti プラスミド法 (1) により形質転換した。一方、自殺遺伝子としてアルコール脱水素酵素遺伝子 (*Adh*) を上記 *RbcS-3B* 遺伝子プロモーターの下流につなぎ、シロイヌナズナ [Bensheim (*Adh*)] に Ti プラスミド法により導入した。

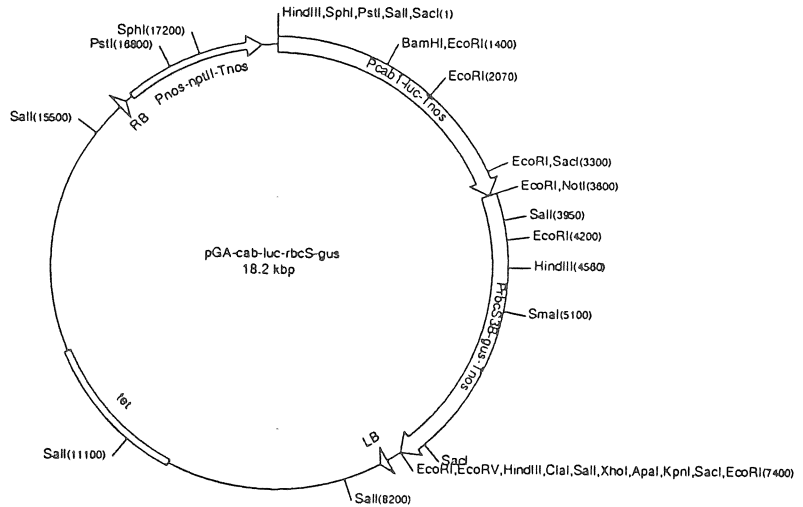


Fig. 1. A construct of binary vector for making *A. thaliana* transgenic to monitor the activities of *RbcS-3B* and *Cab1* promoters.

2.2. 塩ストレス条件に対する光合成遺伝子発現の応答： 上記形質転換ホモ接合植物体を発芽後、Murashige-Skoog および mineral 栄養培地で1週間生育させ、異なる濃度のNaClを含む同一の培地に移植した。なお、シロイヌナズナは、22 °C、湿度 50~60 %、および約 3,000 lux の連続白色蛍光下で生育させた。クロロフィル *a* および *b* は Arnon の方法 (2) により、また、GUS および luciferase 活性は既報 (3,4) にしたがって測定した。

2.3. 塩ストレス条件下における突然変異体の選抜： 上記植物体 (ホモ接合体) 種子を突然変異原 ethylmethanesulfonate (EMS) により処理した。変異誘導処理をした形質転換植物体 (M1個体) の自花受粉によるM2個体実生をMurashige-Skoogおよびmineral栄養培地において生育させ、高濃度 NaCl [200 mM (1.2 %, w/v)~ 250 mM (1.5 %, w/v), 海水の約半分の塩濃度に相当] を含む同一の培地に移し、耐性 (光合成遺伝子発現継続) および超感受性 (光合成遺伝子発現停

止) 突然変異体の選抜を試みた。これらのうち、耐性突然変異体は、塩ストレス条件下における生存、および光合成遺伝子プロモーターに制御された薬剤耐性遺伝子の発現を指標にして選抜した。一方、超感受性突然変異体は、光合成活性低下植物体が長波長紫外光の照射により赤色蛍光を発するという性質、および *RbcS-3B* プロモーター制御下の自殺遺伝子 *adh* の発現停止により生存することにより選抜を試みた。自殺遺伝子 *adh* は、その発現量が低下した場合、与えられた allyl alcohol を毒性アルデヒド acrolein に変換できないために生存できる。

### 3. 研究結果

研究材料として優れているシロイヌナズナに関し、まず播種・栽培し、シロイヌナズナが本研究目的に対して必要な条件を兼ね備えていることを確認した。特に、阻害剤による光合成活性低下シロイヌナズナが、糖添加培地により育成可能なことを見いだした。シロイヌナズナ各組織から調整した mRNA を用いた primer extension を行ない、シロイヌナズナ *RbcS* および *Cab* 遺伝子群のうち、*RbcS-3B* および *Cab1* は光に依存して葉組織特異的に発現していることを見いだした。したがって、これらプロモーターとそれらの上流を含むそれぞれ約 1,500 ヌクレオチドからなる領域に着目し、対応する DNA 断片をシロイヌナズナ葉 DNA を鋳型として校正活性を有する DNA ポリメラーゼを用い DNA ポリメラーゼ増幅法 (PCR) により増幅した。また、シロイヌナズナの葉、莖、根、種子、および培養カルスから DNA を抽出し、その *in vitro* 転写鋳型活性および DNA メチル化の状態を解析した結果、DNA 転写鋳型活性の変化による組織特異的遺伝子発現の制御の可能性は低いことが明らかになった。

3.1. 突然変異体選抜遺伝子の光合成遺伝子プロモーター制御下への導入： *PrbcS-uidA-Pcab-luc* 形質転換体 18 系統、*PrbcS-hph-Pcab-bar* 形質転換体 4 系統、両 constructs 導入形質転換体 4 系統、また、*PrbcS-adh* 形質転換体 3 系統について、これら導入遺伝子は、系統により発現量に差はあるものの、内在性 *RbcS-3B* および *Cab1* と同様に葉組織特異的に発現していることを確認した。これらのうち、発現量の高いそれぞれのホモ接合植物体を変異原処理に供した。

3.2. 塩ストレス条件に対する光合成遺伝子発現の応答： 塩ストレス条件下において光合成活性が低下した植物体も生存させるために、糖添加培地での突然変異体の選抜を計画した。糖添加培地は雑菌の混入を防ぐために無菌的に処理しなければならない。無菌的植物組織培養に広く用いられている Murashige-Skoog 培地の  $K^+$  濃度は 20.1 mM であり、シロイヌナズナの土壌栽培に用いられる mineral 栄養液の  $K^+$  濃度 7.5 mM より高い。植物の NaCl 感受性への培地中  $K^+$  濃度の影響について、Murashige-Skoog および mineral 栄養培地を用い、さらにショ糖の添加効果について検討した (Fig. 2)。Murashige-Skoog 培地 (内在  $Na^+$ , 0.10 mM)

を用いた場合は、50 mM NaCl 添加の方が NaCl 無添加の培地よりも僅かではあるが生育が良好であった。mineral 栄養培地 (内在 Na<sup>+</sup>, 0.010 mM) の場合は、NaCl 無添加において生育が最良であった。2 % (w/v, 58.4 mM) ショ糖添加により、植物体の生育は著しく向上し、また mineral 栄養培地の方が Murashige-Skoog 培地より生育がよかった (Fig. 2)。一方、200 mM NaCl 添加培地にて9~12日間、また250 mM NaCl 添加培地において6~7日間放置すると、シロイヌナズナは塩ストレスのため枯死し (Fig. 3)、あわせてクロフィル含量も低下した (Fig. 4)。さらに、*RbcS-3B* の転写制御の指標となるGUS活性は、塩ストレスに対応して減少した (Figs. 5 and 6)。*RbcS-3B* および *Cab1* それぞれのプロモーターの制御下で発現している *uidA* および *luc* 転写産物量は、200 mM NaCl 添加培地での生育においてほとんど検出できないのに対し、生細胞において恒常的に存在する 28 S rRNA は、200 mM NaCl 存在下でも NaCl 無添加とほぼ同量存在した (Fig. 7)。したがって、*RbcS-3B* および *Cab1* それぞれの遺伝子発現は、植物体の死に先行して NaCl 濃度に敏感に応答し抑制されることが明らかになった。

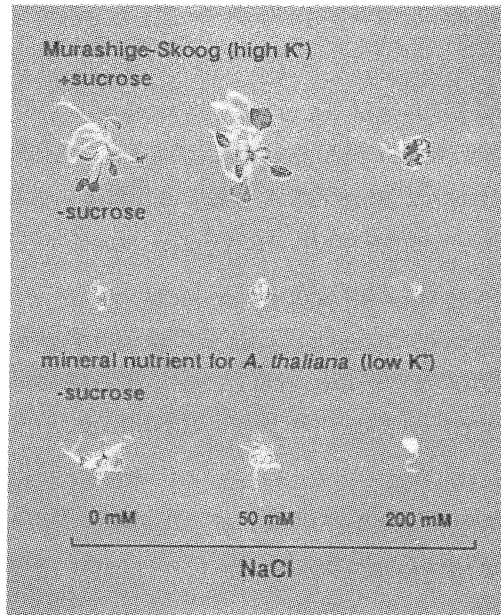


Fig. 2. Effects of NaCl and sucrose added to nutrient solutions on the growth of *A. thaliana* (Columbia)

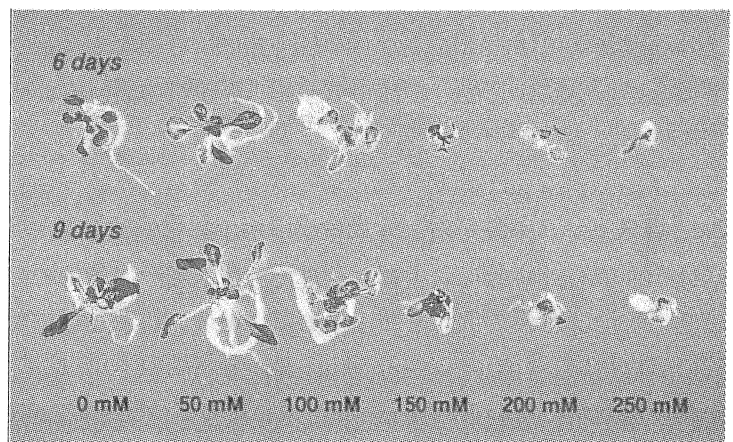


Fig. 3. Effects of NaCl on the growth of transgenic *A. thaliana* (Columbia)

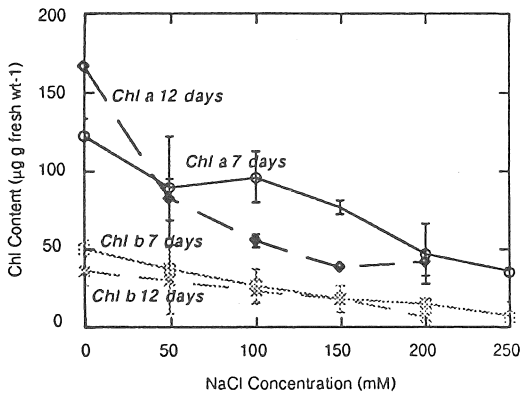


Fig. 4. Effects of NaCl on chlorophyll contents of transgenic *A. thaliana* (Columbia).

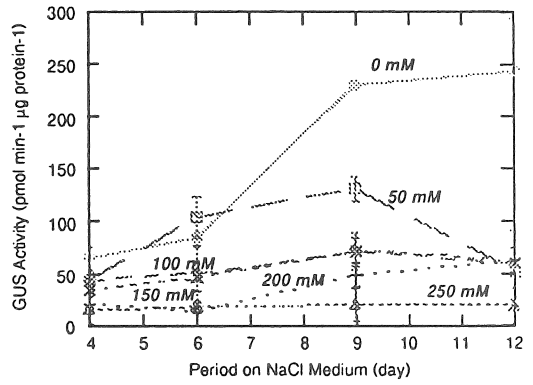


Fig. 5. Effects of NaCl on GUS activity in *A. thaliana* transformed with *rbcS-3B* promoter - *uidA* construct.

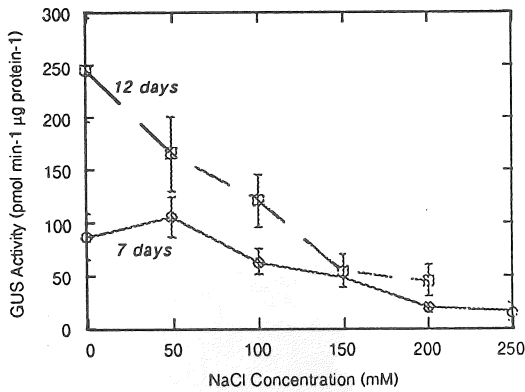


Fig. 6. Effects of NaCl on GUS activity in *A. thaliana* transformed with *rbcS-3B* promoter - *uidA* construct.

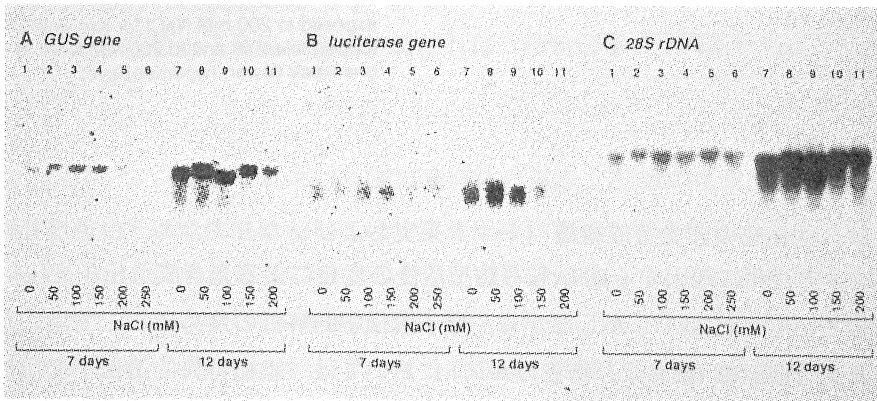


Fig. 7. Effects of NaCl on transcript levels in *A. thaliana* transformed with *RbcS-3B* promoter-*uidA* (GUS gene) and *Cab1* promoter-*luc* (luciferase gene) constructs

3.3. 塩ストレス条件下における突然変異体の選抜: シロイヌナズナにおいて特定の形質を支配するすべての遺伝子座の変異を解析するためには、少なくとも 40,000 系統から変異体を選抜しなければならない。現在までに、変異原 ethylmethanesulfonate (EMS) 処理系統 8,200 種類および T-DNA 挿入変異系統 4,900 種類に対して、塩耐性 (Table 1) および塩超感受性変異体を選抜した (Fig. 8)。その結果、数系統の塩耐性変異体 (stc, salt tolerant expression of photosynthesis genes; 先に命名した "sat" を同名他遺伝子既報のため改名) およびいくつかの塩超感受性変異体候補を見いだした。EMS 処理系統についてはさらに選抜を継続している。

Table 1. A partial list of selection of salt-tolerant M2 *A. thaliana* after treatment with EMS

Group no.	No. seeds	No. lethal seedlings	No. survived plants		
			Salt	None	Soil
34	210	8	11	1	
35	277	15	5	0	
36	661	48	10	5	
37	346	12	21	0	
38	316	1	38	0	
39	83	0	5	0	
40	112	7	11	1	
41	257	13	26	0	
42	352	4	20	1	
43	292	8	11	3	
44	392	3	22	0	
45	466	0	16	0	1
46	334	7	40	19	
47	415	13	33	0	
48	912	23	11	2	1
49	574	0	50	0	
50	340	9	5	0	
51	293	0	0	0	
52	299	0	8	0	1
53	0	0	0	0	
54	726	25	0	0	
55	361	15	23	3	
56	167	3	21	4	
57	226	9	16	1	
58	342	3	23	3	
59	267	4	21	6	
60	966	38	14	0	
<b>Total</b>	<b>9,986</b>	<b>268</b>	<b>461</b>	<b>49</b>	<b>3</b>

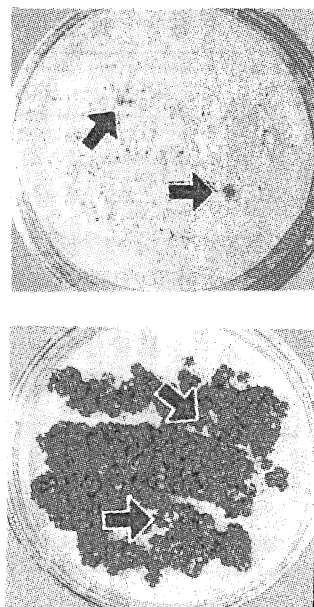


Fig. 8. EMS-treated *A. thaliana* M2 plants exposed to 200 mM NaCl for two weeks (upper, tolerant) and to 200 mM NaCl for one week (lower, hypersensitive).

#### 4. 考 察

本助成研究者らは、他植物の非光合成組織 (トマト果実およびシカモアカエデ白色培養細胞) において、DNAメチル化に起因するDNA転写鋳型活性の変化による光合成遺伝子発現抑制機構を明らかにしている (5,6)。しかしながら、分子遺伝学的解析のためにここで用いたシロイヌナズナの非光合成組織 (根および培養カルス) においては、組織特異的遺伝子発現抑制機構としてDNA転写鋳型活性による制御を否定する結果が得られた。本課題研究で取り上げたシロイヌナズナの根および培養カルスは、共に植物ホルモンの添加により緑色光合成組



織への再分化能を有しており、この点がトマト果実およびシカモアカエデ白色培養細胞と異なる。すなわち、再分化能を有するシロイヌナズナ根および培養カルスにおいては、光合成遺伝子発現は一時的に抑制されており、この場合にはDNAメチル化は介在しないと考えられる。

4.1. 突然変異体選抜遺伝子の光合成遺伝子プロモーター制御下への導入：*PrbcS-uidA-Pcab-luc* 形質転換, *P rbcS-hph-Pcab-bar* 形質転換, これら両 constructs 導入形質転換, および*PrbcS-adh* 形質転換において, それぞれ複数の形質転換体を得たが, 同一 construct を導入した際の各形質転換体における reporter 遺伝子の発現量は異なっていた。これは, 各形質転換体における細胞当たりの導入遺伝子のコピー数 (gene dose) の差および reporter 遺伝子を含む T-DNA が染色体DNAにランダムに挿入されたための位置効果 (position effect) によると考えられる。

4.2. 塩ストレス条件に対する光合成遺伝子発現の応答：植物の根は、 $K^+$  の細胞内への、また  $Na^+$  の細胞外への能動共輸送系を有していると考えられ、これら両イオンによる membrane potential を一定に保つために、細胞外  $K^+$  濃度が高い場合は、細胞外  $Na^+$  に対する耐性も高くなると考えられる。しかしながら、植物に耐塩性を付与するためには、施肥土壌における  $K^+$  濃度に近い mineral 栄養培地を用いた変異体の選抜が適当であると考えられる。また、糖添加によりシロイヌナズナの生育が著しく向上することから、光合成の最終産物である糖が根から吸収され有効に利用されることが考えられる。したがって、光合成遺伝子発現が塩耐性になった突然変異体を選抜するためには、糖無添加 mineral 培地が適当であると考えられた。なお、*RbcS-3B* および *Cab1* それぞれの遺伝子発現は、植物体の死に先行して、 $NaCl$  濃度に敏感に応答し抑制されることが見いだされた。このことは、植物の生育に必須である光合成機能の維持は、土壌中の塩に対して容易に阻害され、したがって、指標としての光合成遺伝子発現が塩耐性になれば、植物個体の生育も耐塩性を獲得したことになると考えられる。

4.3. 塩ストレス条件下における突然変異体の選抜：複数の塩耐性変異体 (stc) 候補を得ることができた。耐塩性機構としては、浸透圧調節物質の集積あるいは膜能動輸送系の変異が考えられ、stc 変異体候補においてそのいずれかが機能しているのか現在検討を加えている。また、可能性があるすべての突然変異体を得るためには、合計 40,000 系統の母集団から選抜しなければならず、したがって、さらに選抜を継続している。生物は海水条件において進化し、やがて陸上生活に適応したと考えられ、陸上植物も潜在的に耐塩性を有し、その能力が通常抑制されているのではないかと想像される。したがって、遺伝子変異によりその抑制機

構が解除された場合に塩耐性になるのではないかと考えられる。

## 5. 今後の課題

可能性があるすべての突然変異体を得るためにさらに選抜を継続したい。また、既に得られた ste 変異体候補については、戻し交配および染色体マーカー系統との交配によりその遺伝子座を特定したい。T-DNA挿入変異体については inverse PCR により、また、EMS変異体については RFLPマーカーおよびシロイヌナズナ染色体 DNA yeast artificial chromosome (YAC) library を用い、変異遺伝子をクローニングしたい。

## 6. 引用文献

1. D. Valvekens, M. Van Montagu, and M. Van Lijsebettens: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5536-5540, 1988.
2. D. I. Arnon: *Plant Physiol.* **24**, 1-15, 1949.
3. R. A. Jefferson: *Plant Mol. Biol. Reporter.* **5**, 387-405, 1987.
4. K. R. Luehrsen, J. R. de Wet, and V. Walbot: *Meth. Enz.* **216**, 397-414, 1992.
5. H. Kobayashi, J. Ngerprasisiri, and T. Akazawa: *EMBO J.*, **9**, 307-313, 1990.
6. J. Ngerprasisiri, H. Kobayashi, and T. Akazawa: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7919-7923, 1989.

## 7. 研究成果発表

### 7.1. 原著論文

1. K. Isono, Y. Niwa, and H. Kobayashi: A dominant regulatory step at transcription in expression of the photosynthesis gene *rbcL* in root plastids of *Arabidopsis thaliana*. 投稿中.
2. Y. Niwa, M. Seki, H. Morikawa, K. Goto, K. Kobayashi, and H. Kobayashi: Potency of *Arabidopsis thaliana* roots for transcription under the controls of promoters of the nuclear photosynthesis gene *RbcS* and *Cab*. 投稿中.

### 7.2. 国際会議における発表および招待講演

1. H. Kobayashi, K. Kobayashi, K. Isono, and Y. Niwa: Approaches with *Arabidopsis thaliana* to understanding the regulatory mechanisms of expression of genes for photosynthesis. *First Lawrence Bogorad Symposium, Cambridge, Massachusetts, U.S.A.*, 5月, 1993.
2. Y. Niwa, K. Isono, M. Seki, H. Morikawa, and H. Kobayashi: Regulatory mechanisms of the tissue-specific expression of genes for photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Fifth International Conference on Arabidopsis Research, The Ohio State University, Columbus,*

Ohio, U.S.A., 8月, 1993.

4. H. Kobayashi, K. Isono, K. Kobayashi, and Y. Niwa: Regulatory mechanisms of expression of genes for photosynthesis during formation of chloroplasts and nongreen plastids in *Arabidopsis thaliana*. *Symposium, XV International Botanical Congress*, 横浜, 9月, 1993.
5. K. Isono, Y. Niwa, K. Satoh, and H. Kobayashi: A dominant regulatory step at transcription in expression of the photosynthesis genes *rbcl* and *psbA* in root plastids of *Arabidopsis thaliana*. *XV International Botanical Congress*, 横浜, 9月, 1993.
6. H. Kobayashi, K. Kobayashi, K. Isono, and Y. Niwa: Molecular genetical approaches to understanding signal transduction pathways for gene expression in plants. *The Second Tottori Symposium on Host-Specific Toxin: Biosynthesis, Receptor and Molecular Biology*, 大山, 9月, 1993.
7. H. Kobayashi: Approaches with *Arabidopsis thaliana* to understanding the regulatory mechanisms of expression of genes for photosynthesis. *Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles, France*, 1月, 1994.
8. H. Kobayashi: Approaches with *Arabidopsis thaliana* to understanding the regulatory mechanisms of expression of genes for photosynthesis. *Institut de Biologie Moleculaire des Plantes, Strasbourg, France*, 1月, 1994.
9. H. Kobayashi: Approaches with *Arabidopsis thaliana* to understanding the regulatory mechanisms of expression of genes for photosynthesis. *DuPont Central Research and Development, Wilmington, U.S.A.*, 1月, 1994.

### 7.3. 国内における学会発表

1. 丹羽康夫, 塚谷裕一, 増田拓也, 佐伯真理, 米田好文, 小林裕和: 形質転換 *Arabidopsis* を用いた光合成遺伝子発現制御機構の解析. 日本分子生物学会年会, 幕張, 12月, 1993.
2. 清水正則, 丹羽康夫, 堀池剛, 小林裕和: *Arabidopsis* 根組織特異的発現遺伝子の解析. 日本分子生物学会年会, 幕張, 12月, 1993.

## Molecular Genetical Analysis of Mechanisms of Salt Tolerance in Plants

Hirokazu Kobayashi, Yasuo Niwa, Mari Sacki, and Kyoko Kobayashi

*School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka*

### Summary

Plants associated with the ability of photosynthesis utilizing solar energy bring foods and oxygen gas to us, without which animals including the human cannot sustain their lives. Although irrigation is needed to make dry desert areas green, accumulation of salts derived from sandy soil on the land surface by desiccation is a serious problem even when irrigation is partially possible. Irrigation with diluted sea water may be available in areas closed to sea. In any cases, it is desired to confer the salt tolerance ability on plants. Therefore, we intended to characterize genes regulating to make plants salt tolerant and further bestow that ability on cultivating plants. There seems to be a limitation of biochemical approaches with analysis of proteins due to the possible trace amounts and instability of proteins responsible for expression of genes for salt tolerance. To overcome this limitation, we have applied genetical methodology to the model plant *Arabidopsis thaliana*, which is suited for mutagenesis and the subsequent gene cloning by complementation.

It is speculated that the rate of formation of the photosynthetic machinery is reduced under salt stress conditions, resulting from suppression of constitutive expression of genes for photosynthesis. We have focused on well known genes for photosynthesis, the genes for the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) (*RbcS*) and for chlorophyll *a/b*-binding proteins (*Cab*, *Lhc*), especially their gene members *RbcS-3B* and *Cab1* (*Lhcb1\*At3*) of *A. thaliana*. In order to monitor their expression, several reporter genes were placed under the controls of their promoter regions including their upstream sequences. Chlorophyll contents of *A. thaliana* decreased and the plant died when it was exposed to 200 mM NaCl for 12 days or 250 mM NaCl (approx. a half of NaCl concentration in sea water) for 7 days on solid medium containing elementary minerals. The expression of *RbcS-3B* and *Cab1* as demonstrated with the reporter genes is dramatically reduced prior to the death of *A. thaliana* under such salt conditions. The 8,200 lines of M2 plants after ethylmethanesulfonate (EMS) treatment and 4,900 lines of T-DNA insertion mutagenesis have been screened for salt tolerance or salt hypersensitiveness, resulting in finding a few mutants of salt tolerance (*ste*) and of salt hypersensitiveness. We are continuously screening EMS-treated lines.

There are two mechanisms proposed for salt tolerance, the accumulation of osmoticants in the cells and the strengthened activities of ion or water pumps. We are analyzing which mechanism is involved in the *ste* mutant candidates. Organisms have been evolved under sea conditions to adapt to living on land, expecting us that land plants may potentially have the ability of salt tolerance which must be usually suppressed. Therefore, it is not unexpected that plants may become salt tolerant if genes for repressing the ability is disrupted by mutagenesis.