

9 8 2 1 耐塩性シカクマメ培養細胞の耐塩性獲得機構の解明

助成研究者：江坂 宗春 (広島大学 生物生産学部)
 共同研究者：西村 幹夫 (岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)
 田中 善之 (農林水産省 農業生物資源研究所)
 前島 正義 (名古屋大学大学院 生命農学研究科)

土壌中の塩類が集積し、熱帯、亜熱帯地方を中心に、農作物の育たない不毛化土壌が増大し、深刻な問題となっている。シカクマメは亜熱帯性植物で、大豆に匹敵する栄養価を有する植物として知られ、亜熱帯地方での食糧資源として期待されている。シカクマメが亜熱帯地方の砂漠化・塩類集積土壌でも生育可能になれば、食糧不足が深刻な亜熱帯地方において非常にメリットが大きい。これまでに、シカクマメの耐塩性獲得をめざした研究を行ってきており、2% (w/v) NaCl を含む培地でも増殖可能な耐塩性シカクマメ培養細胞を得ることができた。

耐塩性シカクマメ培養細胞において特異的に生産されるタンパク質についてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により調べた。非耐塩性および耐塩性シカクマメ培養細胞を液体培養し、細胞内および培地に分泌されるタンパク質について解析した。その結果、耐塩性シカクマメ培養細胞において6つのタンパク質 (SAP1, SAP2, SAP3, SAP4, SAP5, SAP6)が特異的に分泌生産されることがわかった。アミノ末端側のアミノ酸配列を決定したところ、SAP1 は細胞壁タンパク質として知られるヒドロキシプロリンリッチタンパク質であることがわかった。一方、SAP2、SAP4、SAP5、SAP6 はプロリンリッチタンパク質であることが示された。プロリンリッチタンパク質も細胞壁の構造タンパク質として知られていることから、耐塩性獲得に細胞壁の構造が関与していることが示唆された。また、SAP3 についても、アミノ末端側のアミノ酸配列を決定したところ、キュウリやアラビドプシスの塩基性クラス I キチナーゼと有意なホモロジーを示した。キチナーゼは植物の病原菌抵抗性に関与する生体防御酵素と考えられており、キチナーゼが耐塩性にどのように関わっているのか興味深い。

SAP1は1.0% NaCl 耐塩性細胞で最も大量に分泌し、その量は1g 新鮮細胞重あたり4 mgにも達した。そこで、SAP1の分泌がNaClに特異的かどうかを調べた。その結果、KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂を培地に加えた時ではSAP1は分泌されなかったが、AlCl₃を培地に加えた場合にはSAP1の分泌が認められた。また、SAP1 はマンニトールやシュクロースを添加しても分泌は認められず、SAP1が単に浸透圧の上昇によって分泌されたのではないことが示された。

現在、SAP1とSAP3についてはcDNAクローニングを試みている。

9 8 2 1 耐塩性シカクマメ培養細胞の耐塩性獲得機構の解明

助成研究者：江坂 宗春 (広島大学 生物生産学部)
共同研究者：西村 幹夫 (岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)
田中 善之 (農林水産省 農業生物資源研究所)
前島 正義 (名古屋大学大学院 生命農学研究科)

1. 研究目的

地球レベルで砂漠化が進行している。土壤中の塩類が集積し、熱帯、亜熱帯地方を中心に、農作物の育たない不毛化土壤が増大し、深刻な問題となっている。植物の中には高塩土壤でも生育が可能な植物が存在する。これら耐塩性植物の耐塩性機構の詳細については未だ明らかになっていないが、これまでに、プロリンやグリシンベタインなどの適合溶質を高濃度に蓄積することにより、浸透圧の障害から身を守る機構や、塩を液胞に隔離することにより、塩による細胞内代謝の攪乱を防止するなどの機構が知られている。また、細胞膜に存在するポンプにより塩を排出することにより、細胞内の塩濃度の上昇を抑えたり、クエン酸やニッケルなどのキレート物質を根から分泌して細胞外の塩をキレート化・不溶化させ、塩の細胞内への浸入を防止するなどの機構も知られている。

シカクマメは亜熱帯性植物で、大豆に匹敵する栄養価を有する植物として知られ、亜熱帯地方での食糧資源として期待されている。シカクマメが亜熱帯地方の砂漠化・塩類集積土壤でも生育可能になれば、食糧不足が深刻な亜熱帯地方において非常にメリットが大きい。これまでにシカクマメの耐塩性獲得をめざした研究を行ってきており、2%(w/v) NaClを含む培地でも増殖可能な耐塩性シカクマメ培養細胞を得ることができた¹⁾。

本研究では、まず、耐塩性シカクマメ培養細胞がどのような機構で耐塩性を獲得できたかを詳細に解析するとともに、耐塩性獲得に関わる遺伝子を同定、クローニングし、将来的には遺伝子組み換え技術を用いることにより耐塩性植物を育種することを目標とした。

2. 研究方法

2.1 材料

シカクマメ (Winged bean; *Psophocarpus tetragonolobus* L. DC.)は、Nigeria TPT-2を用いた。Nigeria TPT-2は農林省熱帯農業センターより寄贈していただいた。シカ

クマメ培養細胞はシカクマメ種子を無菌的に発芽させ、その子葉からカルス化させた。すなわち、シカクマメ子葉を植物ホルモンとして1.0mg/l 2,4-Dおよび0.1mg/l kinetinを加えたMurashige and Skoogの寒天培地上に置き、25℃でカルス培養化した。シカクマメ培養細胞はおよそ4週間おきに植えつぎ、継体培養した。耐塩性シカクマメ培養細胞は、順次0.5%、1.0%、1.5%、2.0%NaClを含む培地にカルス細胞を植え付けることにより耐塩性細胞を選抜し得た。

2.2 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGEは、0.1%SDSを含む12%ポリアクリルアミドゲルを用いてLaemmliの方法により行った。泳動後はゲルをCoomassie brilliant blue Rにより染色し、脱色後、泳動バンドを観察した。

2.3 ウェスタンブロッティング

キチナーゼとヒドロキシプロリンリッチタンパク質の抗体は、SDS-PAGE後に切り出し精製したタンパク質を兎に免疫して作製した。ウェスタンブロッティングはTowbinの方法によりおこなった。

2.4 N末端アミノ酸配列の決定

SDS-PAGE後に切り出し精製したタンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写した後、Applied Biosystems 477Aシーケンサーにより自動的にエドマン分解がなされた。アミノ末端側から分解されたアミノ酸がApplied Biosystems 120A PTH analyzerによって同定された。

2.5 cDNAクローニング

シカクマメ培養細胞からSDS-フェノール法、LiCl沈殿によりRNAを調製した。調製したRNAから、oligotexTM-dT30(宝酒造株式会社)を用いてmRNAを精製した。

mRNAを鋳型としたcDNAの合成は、cDNA Synthesis System Plus (Amersham) を用いた。cDNAへのアダプターの連結はcDNAクローニングシステム(Amersham)を用いた。アダプターを結合したcDNAは、さらにλgt10ベクターアームと連結させ in vitro パッケージングを行い、cDNAライブラリーを作製した。スクリーニングはオリゴヌクレオチドを用いたプライクハイブリダイゼーションにより行った。

塩基配列の決定は、DNAシーケンサー (Applied Biosystems) を用いてダイデオキシ法により行った。

2.6 ノーザンブロッティング

植物組織を液体窒素を充填した乳鉢に入れ、乳棒を用いて磨砕した。粉状になった試料をSDS-フェノール法、LiCl沈殿によりRNAを調製した。RNAをアガロースゲル電気泳動し、RNAをメンブレン(Hybond-N,Amersham)へ転写、固定化を行った。プレハイブリダイゼーション後、プローブを $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ により標識し、ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンを洗浄した後、オートラジオグラフィを行った。

2.7 キチナーゼ活性の測定

キチナーゼ活性はグリコールキチンを基質として、加水分解に伴う還元力の増大を指標として測定した。

2.8 タンパク質定量

タンパク質定量は、Bradfordの方法により行い、BSAあたりで換算した。

3. 研究結果および考察

3.1 耐塩性シカクマメ培養細胞の獲得

耐塩性シカクマメ培養細胞の獲得は、順次0.5%、1.0%、1.5%、2.0% NaClを含む培地にカルス細胞を植え付け、増殖した細胞だけを継代培養し、増殖速度が高く安定化した細胞を耐塩性細胞とした。0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% NaClに耐性のシカクマメ培養細胞を、それぞれSA-0、SA-0.5、SA-1.0、SA-1.5、SA-2.0と名付けた。まず、これら耐塩性シカクマメ培養細胞の増殖速度について調べた (Fig. 1)。SA-0 (非耐塩性細胞) は0.5%、1.0%、1.5%、2.0% NaCl存在下ではまったく生育しなかった。一方、SA-0.5、SA-1.0、SA-1.5、SA-2.0などの耐塩性細胞はそれぞれのNaCl存在下で良好な生育を示した¹⁾。

3.2 耐塩性シカクマメ培養細胞から特異的に分泌されるタンパク質

SA-0 (非耐塩性細胞) およびSA-0.5、SA-1.0、SA-1.5、SA-2.0などの耐塩性細胞から生産されるタンパク質についてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により調べた。それぞれの培養細胞を液体培養し、細胞内をおよび培地に分泌されるタンパク質について解析した。細胞内のタンパク質において非耐塩性、耐塩性の細胞においては有意な差はみとめられなかったが、培地に分泌されるタンパク質については非耐塩性、耐塩性の細胞においては大きな差が認められた。すなわち、耐塩性シカクマメ培養細胞において6つのタンパク質 (SAP1, SAP2, SAP3, SAP4, SAP5, SAP6)

が特異的に分泌されることがわかった (Fig. 2)¹⁾。それぞれの分子量は、84kD、57kD、41kD、21kD、19kD、17kDであった。

3.3 耐塩性シカクマメ培養細胞から特異的に分泌されるタンパク質の同定

SAP1のアミノ末端側のアミノ酸配列を決定したところ、決定した32アミノ酸残基のうち10アミノ酸がヒドロキシプロリンで、5つのアミノ酸がプロリンであった (Fig. 3)。すなわち、SAP1は細胞壁のタンパク質として知られるヒドロキシプロリンリッチグリコタンパク質であることが示唆された¹⁾。一方、SAP2, SAP4のアミノ末端側のアミノ酸配列はまったく同じで、ダイズのプロリンリッチタンパク質とホモロジーを示した²⁾ (Fig. 4)。また、SAP5とSAP6もアミノ末端のアミノ酸配列はまったく同じで、両者ともプロリンリッチタンパク質であることが示された²⁾ (Fig. 5)。プロリンリッチタンパク質も細胞壁の構造タンパク質として知られていることから、耐塩性獲得に細胞壁の構造が関与していることが示唆された。

また、SAP3についても、アミノ末端側のアミノ酸配列を決定したところ、キュウリやアラビドプシスの塩基性クラス I キチナーゼと有意なホモロジーを示した³⁾ (Fig. 6)。キチナーゼは、ストレスタンパク質の一種で、植物の病原菌抵抗性に関与する生体防御酵素と考えられている。しかし、これまでに、キチナーゼが耐塩性に関わっているという報告はない。キチナーゼが耐塩性に関わっているとすれば、その作用機構について大変興味深い。

3.4 SAP1 (ヒドロキシプロリンリッチグリコタンパク質) と耐塩性との関係

耐塩性シカクマメ培養細胞に特異的に生産される6つのタンパク質 (SAP1, SAP2, SAP3, SAP4, SAP5, SAP6)のうち、発現量の多いSAP1のヒドロキシプロリンリッチグリコタンパク質に着目した。SAP1はSA-1.0 (1.0% NaCl)耐塩性細胞で最も大量に分泌し、その分泌量は1g新鮮細胞重あたり約4mgにも達した。SAP1の分泌がNaClに特異的かどうかを調べるために、KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂, AlCl₃を培地に加え、SAP1が分泌されるかどうかを調べた。その結果、AlCl₃を培地に加えた時にのみSAP1の分泌が認められた (Fig. 7)。また、SAP1が浸透圧の上昇により特異的に分泌されたのかを調べるために、マンニトールやシュクロースを培地に添加したが、SAP1の分泌は認められなかった (Fig. 7)。SAP1が単に浸透圧の上昇によって分泌されたのではないことが示唆された。NaCl以外にAlCl₃を加えた場合のみSAP1の分泌が高まる理由については今のところ不明である。また、耐塩性獲得に関与するホルモンと考えられているアブシジン酸を加えた場合もSAP1の分泌は認められなかった。

一方、耐塩性獲得に伴う遺伝子発現機構を調べるために、SAP1のcDNAクローニン

グを試みた。耐塩性シカクマメ培養細胞からcDNAライブラリーを作製し、アミノ酸配列に対応したオリゴヌクレオチドをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングした。二つの陽性クローンが得られたが、両者とも部分鎖cDNAで、SAP1の全鎖cDNAを得ることはできなかった。

3.5 SAP3 (塩基性クラス I キチナーゼ) と酸性クラスIIIキチナーゼの分泌

SAP3が塩基性クラス I キチナーゼであることが分かった。これまでに、カボチャ培養細胞においても塩基性クラス I キチナーゼが大量に分泌され⁴⁾、おそらく液体培養時の傷害ストレスにより誘導・分泌されることが示唆された⁵⁾。しかし、これまでに、耐塩性獲得によりキチナーゼが誘導されるという報告はないことから、この塩基性クラス I キチナーゼが耐塩性にどのように関わっているか興味深い。SA-0 (非耐塩性細胞) と耐塩性細胞についてタイムコース実験を行ったところ、SA-0 (非耐塩性細胞) では培養とともに29kDのタンパク質が徐々に分泌され、培養25日および30日後には、培地中の主要なタンパク質になることがわかった。そこで、そのタンパク質についても精製し、アミノ末端側のアミノ酸配列を決定したところ、キュウリやアラビドプシスの酸性クラスIIIキチナーゼとホモロジーを示した。すなわち、SA-0 (非耐塩性細胞) では培養後期に酸性クラスIIIキチナーゼが分泌されることが示された。耐塩性シカクマメ培養細胞においても同様に培養後期になると酸性クラスIIIキチナーゼの分泌が認められた。これらのことから、非耐塩性細胞では酸性クラスIIIキチナーゼのみが分泌されるのに対して、耐塩性シカクマメ培養細胞では、酸性クラスIIIキチナーゼに加え、塩基性クラス I キチナーゼも大量に分泌されることがわかった。非耐塩性細胞および耐塩性細胞で2つのキチナーゼの分泌生産がどのように調節されているのか興味深い。そこで、シカクマメ培養細胞の酸性クラスIIIキチナーゼと塩基性クラス I キチナーゼのcDNAのクローニングを試みた。耐塩性シカクマメ培養細胞からcDNAライブラリーを作製し、それぞれのアミノ酸配列に対応したオリゴヌクレオチドをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、全鎖の酸性クラスIIIキチナーゼcDNAを得ることができた⁶⁾。しかし、塩基性クラス I キチナーゼのcDNAを得ることはできなかった。シカクマメ培養細胞における酸性クラスIIIキチナーゼmRNAの発現様式を調べた結果、培養後期に高いmRNAが認められた。現在、RT-PCR法を用いて塩基性クラス I キチナーゼのcDNAをクローニングすることを試みている。

4. 今後

耐塩性シカクマメ培養細胞において特異的に分泌生産される6つのタンパク質

(SAP1, SAP2, SAP3, SAP4, SAP5, SAP6)を同定することができた。発現量の多いSAP1のヒドロキシプロリンリッチグリコタンパク質、SAP2のプロリンリッチタンパク質、SAP3の塩基性キチナーゼのcDNAをクローニングし、それらcDNAをプローブとしたノーザンブロットイングにより、実際に、耐塩性のシカクマメ培養細胞で、SAP1, SAP2, SAP3のmRNAが増大するかを調べ、SAP1, SAP2, SAP3が耐塩性に伴い特異的に発現する遺伝子かどうかを調べたい。また、非耐塩性および耐塩性シカクマメ培養細胞においてSAP3 (塩基性クラス I キチナーゼ) と酸性クラスIIIキチナーゼの発現および分泌の調節がどのように行われているのかも調べたい。

一方、SAP1, SAP2, SAP3のcDNAを、非耐塩性シカクマメ培養細胞のプロトプラストにエレクトロポレーション法により導入し、SAP1, SAP2, SAP3の高発現シカクマメ培養細胞を作成したい。そして、それらのトランスジェニックシカクマメ培養細胞が耐塩性を獲得できるかどうかを調べたい。また、その形質について調べ、耐塩性の獲得にともない細胞壁がどのように変化しているのかについても調べてみたい。逆に、耐塩性シカクマメ培養細胞のプロトプラストにSAP1, SAP2, SAP3のアンチセンスDNAを導入して、SAP1, SAP2, SAP3の発現を抑えたシカクマメ培養細胞を作成し、耐塩性が消失するかどうかについても調べたい。最終的に、これらのSAPタンパク質が耐塩性にどのように関わっているかを調べ、シカクマメの耐塩性獲得機構を明らかにしたい。

5. 参考文献

- (1) Esaka M., Hayakawa H., Hashimoto M., Matsubara N. (1992) Specific and abundant secretion of a novel hydroxyproline-rich glycoprotein from salt-adapted winged bean cells. *Plant Physiol.*, 100, 1339-1345.
- (2) Esaka M., Hayakawa H. (1995) Specific secretion of proline-rich proteins by salt-adapted winged bean cells. *Plant Cell Physiol.* 36: 441-446
- (3) Esaka M., Toyota A., Hayakawa H. (1994) Secretion of basic and acidic chitinases from salt-adapted and unadapted winged bean cells. *Physiol. Plant.*, 92, 90-96.
- (4) Esaka M., Enoki K., Kouchi B., Sasaki T. (1990) Purification and characterization of abundant secreted protein in suspension-cultured pumpkin cells. : Abundant secreted protein may be a chitinase. *Plant Physiol.*, 93, 1037-1041.
- (5) Esaka M., Toyota A., Kitabayashi M. (1993) Marked induction of basic chitinase in pumpkin in response to wounding. *Phytochemistry*, 34, 631-635.
- (6) Esaka M., Teramoto T. (1998) cDNA cloning, gene expression and secretion of chitinase in winged bean. *Plant Cell Physiol.* 39: 349-356.

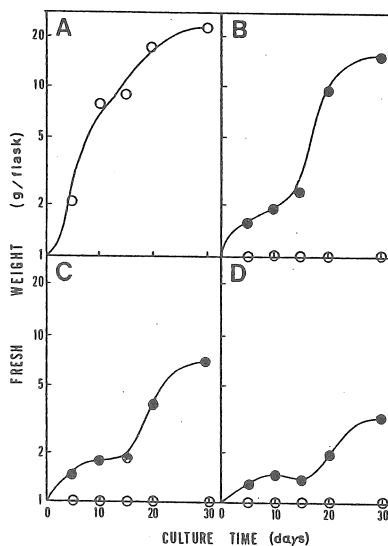


Figure 1. Growth of NaCl-adapted and unadapted winged bean callus cells. Winged bean callus cells adapted to 1.0 (SA-1.0) (B, ●), 1.5 (SA-1.5) (C, ●), and 2.0% (w/v) NaCl (SA-2.0) (D, ●) were cultured at 25°C in the presence of 1.0, 1.5, and 2.0% (w/v) NaCl, respectively. Unadapted callus cells (SA-0) (O) were also cultured at 25°C in the presence of 0 (A), 1.0 (B), 1.5 (C), or 2.0% (w/v) NaCl (D). The callus cells were harvested at the indicated times and weighed.

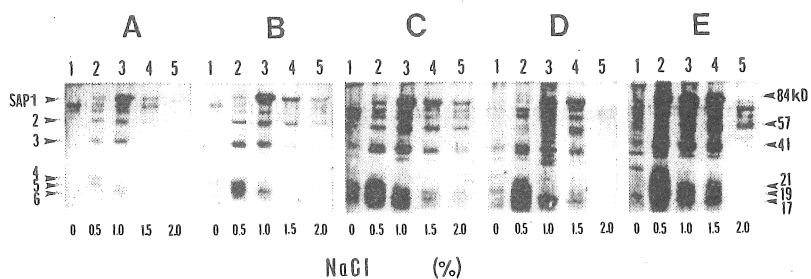


Figure 2. SDS-PAGE of culture media after cell suspension culture of winged bean callus cells adapted to 0 (SA-0), 0.5 (SA-0.5), 1.0 (SA-1.0), 1.5 (SA-1.5), and 2.0% (w/v) NaCl (SA-2.0). SA-0 (lane 1), SA-0.5 (lane 2), SA-1.0 (lane 3), SA-1.5 (lane 4), and SA-2.0 (lane 5) were cultured at 25°C for 2 (A), 4 (B), 6 (C), 10 (D), or 15 d (E) in the presence of 0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0% (w/v) NaCl, respectively. The culture media (90 μ L each) were separated on a 12% (w/v) polyacrylamide gel containing 0.1% (w/v) SDS as described in "Materials and Methods." The lanes 1, 2, 3, 4, and 5 in panel A contain about 3, 4, 10, 4, and 2 μ g of protein, respectively. The lanes 1, 2, 3, 4, and 5 in panel B contain about 3, 11, 20, 7, and 4 μ g of protein, respectively. The lanes 1, 2, 3, 4, and 5 in panel C contain about 15, 33, 42, 18, and 10 μ g of protein respectively. The lanes 1, 2, 3, 4, and 5 in panel D contain about 22, 38, 60, 25, and 11 μ g of protein, respectively. The lanes 1, 2, 3, 4, and 5 in panel E contain about 22, 83, 87, 68, and 18 μ g of protein, respectively.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
 Asn Lys Tyr Ser Tyr Pro Xaa Hyp Hyp Hyp Hyp Hyp Lys Arg Ala Pro

17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
 Tyr His Tyr Pro Hyp Hyp Hyp Hyp Hyp Val Lys Asn Pro Tyr Pro His

Figure 3. Amino-terminal amino acid sequences of SAP1. Xaa, Non amino acid derivative was detected by HPLC. Proline is underlined. Hydroxyproline is double-underlined.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
SAP2	1	D	Y	G	K	P	P	V	E	K	P	P	V	V	K	K	P	P	I	E	K	
SAP4	1	D	Y	G	K	P	P	V	E	K	P	P	V	V	K	K	P	P	I	E	K	
Soybean PRP1	27	D	Y	E	K	P	P	I	Y	K	P	P	V	Y	T	-	P	P	V	Y	K	
Soybean PRP2	58	P	I	Y	K	P	P	V	E	K	P	P	V	Y	K	-	P	P	V	E	K	
Soybean PRP3	67	P	Y	K	K	P	P	Y	K	K	P	P	Y	G	K	Y	P	P	V	E	D	
Soybean N-75	228	E	Y	Q	-	P	P	H	E	K	P	P	E	H	K	P	P	H	E	K	K	
Daucus PR33	85	P	V	Y	K	P	P	V	Q	K	P	P	A	P	E	H	K	P	P	V	H	K

Fig. 4 Comparison of the amino-terminal amino acid sequences of SAP2 and SAP4 from salt-adapted winged bean cells and partial amino acid sequences of other proline-rich proteins, namely, soybean PRP1 (Datta et al. 1989), PRP2 (Hong et al. 1987) and N-75 (Franssen et al. 1987), and *Daucus* PR33 (Chen et al. 1985). Amino acids identical to those of SAP2 are boxed.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
SAP5	1	Y	E	K	P	K	V	Y	K	P	K	V	E	K	P	K	V	Y	K
SAP6	1	Y	E	K	P	K	V	Y	K	P	K	V	E	K	P	K	V	Y	K
Soybean PRP1	78	I	Y	K	P	P	V	Y	K	P	P	V	E	K	P	P	V	Y	K
Soybean PRP2	54	T	E	K	P	P	V	Y	K	P	P	V	E	K	P	P	V	Y	K
Soybean PRP3	29	I	K	K	P	P	V	Y	K	P	P	V	Y	K	P	P	V	Y	K
Daucus PR33	37	I	H	K	P	P	V	Y	T	P	P	V	H	K	P	P	V	Y	T

Fig. 5 Comparison of the amino-terminal amino acid sequences of SAP5 and SAP6 from salt-adapted winged bean cells and partial amino acid sequences of other proline-rich proteins, namely, soybean PRP1 (Datta et al. 1989), PRP2 (Hong et al. 1987) and PRP3 (Hong et al. 1987), and *Daucus* PR33 (Chen et al. 1985). Amino acids identical to those of SAP5 are boxed.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Winged bean	E	Q	X	G	K	Q	G	G	G	A	V	V	P	N	G	L
Kidney bean	E	Q	C	G	R	Q	A	G	G	A	L	C	P	G	G	N
<i>Arabidopsis</i>	E	Q	C	G	R	Q	A	G	G	A	L	C	P	N	G	L
Tobacco	E	Q	C	G	S	Q	A	G	G	A	R	C	A	S	G	L
Pumpkin	E	Q	P	G	R	Q	A	N	G	A	L	G	P	N	G	L

Fig. 6 Comparison of the amino-terminal amino acid sequences of SAP3 in salt adapted winged bean cells and basic chitinase in kidney bean, *Arabidopsis*, tobacco and pumpkin. The sequence data of kidney bean chitinase, *Arabidopsis* chitinase, tobacco chitinase and pumpkin chitinase are from Hedrick et al. (1988), Samac et al. (1990), Shinshi et al. (1987) and Esaka et al. (1990), respectively. X, no amino acid derivative was detected by HPLC. Identical amino acids are boxed.

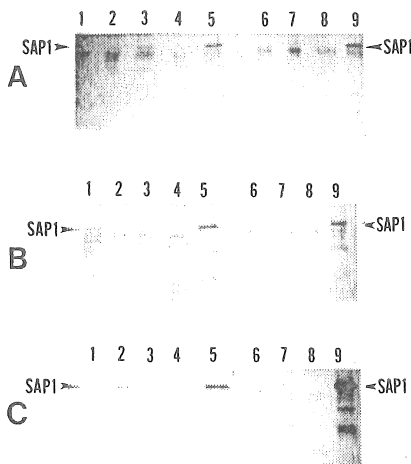


Fig. 7. SDS-PAGE of culture media after cell suspension culture of 1.0% (w/v) NaCl-adapted winged bean callus (SA-1.0) in the presence of 171 mM KCl (lane 1), LiCl (lane 2), CaCl₂ (lane 3), MgCl₂ (lane 4), AlCl₃ (lane 5), mannitol (lane 6), sucrose (lane 7), or 0 (lane 8) or 1.0% (w/v) NaCl (lane 9). The callus cells were cultured at 25°C for 5 (A), 10 (B), or 15 d (C). The culture media (90 μL each) were separated on a 12% (w/v) polyacrylamide gel containing 0.1% (w/v) SDS as described in "Materials and Methods."

Mechanism of salt tolerance in salt-adapted winged bean cultured cells

Muneharu Esaka (Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University)

Mikio Nishimura (National Institute for Basic Biology)

Yoshiyuki Tanaka (National Institute of Agrobiological Resources)

Masayoshi Maeshima (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

Summary

Cultivated land is becoming progressively polluted by salt, and this salinization presents a major problem for the future of agriculture. Therefore, much attention has recently been focused on mechanisms of salt tolerance in higher plants. Winged bean, a tropical plant with the ability to withstand heat and drought, has attracted special interest as a high protein and oil food source of the humid tropics.

Winged bean callus was adapted to increasing concentrations of NaCl by sequential transfer to medium with 0, 0.5, 1.0, 1.5 or 2.0% (w/v) NaCl. When the culture media after cell suspension cultures of the salt-adapted callus were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, six specific polypeptide bands named SAP1, SAP2, SAP3, SAP4, SAP5 and SAP6 were observed. When the amino-terminal amino acid sequence of SAP1 was determined, 10 and 5 of the amino-terminal 32 amino acid residues were found to be hydroxyproline and proline, respectively. SAP1 on an acrylamide gel was stained by the periodic acid-Schiff method. Thus, SAP1 was suggested to be hydroxyproline-rich glycoprotein, which is known to be localized in cell wall. The amino-terminal amino acid sequences of SAP2, SAP4, SAP5 and SAP6 were homologous to the sequences of proline-rich proteins. These results suggest that cell wall proteins may play some role in salt tolerance of winged bean cells. On the other hand, the amino-terminal amino acid sequence of SAP3 was homologous to the sequences of basic class I chitinases, a kind of pathogen related proteins. It is very interesting how the chitinase takes part in salt tolerance.

SAP1 was abundantly secreted in suspension cultures of winged bean cells adapted to 1.0 and 1.5% NaCl. The SAP1 yield was about 4 mg/g cells fresh weights. SAP1 was secreted also in the presence of AlCl₃, but little was secreted in the presence of KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂, mannitol or sucrose.

Further studies are now required to clarify molecular mechanism of salt tolerance of salt-adapted winged bean cells.