

## 27

助成番号 0027

## 塩生植物シチメンソウの耐塩性維持機構の解析

助成研究者：谷本 静史 (佐賀大学 農学部 応用生物科学科)  
共同研究者：仁藤 伸昌 (佐賀大学 農学部 応用生物科学科)

有明海沿岸の潮間帯に自生する塩生植物シチメンソウ(*Suaeda japonica* Makino)は、細胞内に取り込まれた塩を液胞に隔離し、液胞と細胞質との浸透圧バランスを維持するためにグリシンベタインを合成して耐塩性を維持していると考えられる。塩ストレスがグリシンベタインの合成酵素であるbetaine-aldehyde dehydrogenase (BADH)の遺伝子を発現誘導させている可能性については、昨年度の本助成研究で明らかにした。

そこで今年度は、シチメンソウのcDNAの単離を試みた。その結果、1,342塩基の部分cDNAを単離し、その塩基配列を決定した。その塩基配列及び類推されるアミノ酸配列は、同じアカザ科に属するホウレンソウのBADHときわめて類似しており、塩基配列で99.2%、アミノ酸配列で98.5%相同であった。また各種aldehyde dehydrogenaseに共通に存在しよく保存されていると思われるアミノ酸配列を有していた。サザン分析の結果、シチメンソウには複数コピーのBADH遺伝子が存在することがわかった。このBADH遺伝子の発現は塩ストレスにより誘導され、塩濃度を上昇させると、mRNA量も増加した。また乾燥ストレスの代用として与えたpolyethyleneglycolによっても発現誘導された。全長cDNAが得られなかったので、cDNAライブラリーを作成し直して再度BADHのcDNA単離を試みている。

塩ストレスによるBADH遺伝子の発現誘導の機構を解析するためには、遺伝子の5'上流域に存在すると思われるcis element及びその部分に結合して転写を制御する転写因子の解析が必要である。そこで、シチメンソウのゲノミックDNAライブラリーを作成した。シチメンソウBADHのcDNAの断片をクローニングし、これをプローブに用いてスクリーニングした結果、16から24kbpのサイズの34個のポジティブクローンを単離することができた。今後これらのクローンをさらに詳細にスクリーニングし、BADHを含むクローンを単離する予定である。そして、その上流域の解析を行うことで、塩生植物シチメンソウの耐塩性維持機構を明らかにしたいと考えている。



## 27

助成番号 0027

## 塩生植物シチメンソウの耐塩性維持機構の解析

助成研究者：谷本 静史 (佐賀大学 農学部 応用生物科学科)

共同研究者：仁藤 伸昌 (佐賀大学 農学部 応用生物科学科)

研究目的

有明海沿岸の潮間帯に自生する塩生植物シチメンソウ(*Suaeda japonica* Makino)は強い耐塩性を持っている。我々は、シチメンソウの耐塩性機構を解明するために、塩ストレス下での発芽、培養細胞の成長について調べてきた。その結果シチメンソウの耐塩性維持機構について以下の点を明らかにすることができた。すなわちシチメンソウはある程度の期間塩ストレスに曝されていると、細胞内に取り込まれた塩を液胞に隔離している可能性があること、その結果液胞と細胞質との浸透圧バランスが崩れるので、それを回避するために適合溶質であるグリシンベタイン(以下ベタインと略す)を高濃度で細胞質に蓄積すること、その合成酵素であるbetaine-aldehyde dehydrogenase (BADH)活性は塩ストレスによって上昇すること(1)、さらにそのBADHの活性上昇には葉緑体の発達が関与していること(2)等を明らかにしてきた。さらに昨年度の助成研究によって、塩ストレス下でのシチメンソウの発芽率の低下が、ベタインやその前駆体であるベタインアルデヒドの添加により回復すること、そして、ベタインアルデヒドと同時に添加したmRNAや蛋白質合成の阻害剤がベタインアルデヒドの回復効果を阻害することを明らかにした(3)。この最後の結果は、塩ストレスによってBADH遺伝子が発現し、合成されたBADHによってベタインアルデヒドからベタインが生産され、それによって耐塩性を維持している可能性を示唆するものである。

以上のことから、まず、BADHのcDNAクローンの単離を行い、その塩基配列を決定することとした。cDNAクローンの単離後は、その一部をプローブに用いて、サザン分析を行い、この遺伝子のコピー数を明らかにする。また、塩ストレスや乾燥ストレスにより、このBADHのmRNAがどのように出現してくるのか、ノーザン解析によって明らかにする。といった点について検討することとした。また、シチメンソウのゲノミックDNAライブラリーを作成し、上記のプローブによってBADH遺伝子の上流域を含むクローンを単離し、塩という刺激がどのようにしてBADH遺伝子の発現を誘導すること、という点についても検討することとした。

研究方法

## 1. シチメンソウのcDNAライブラリーの作成とBADHのcDNAクローンの単離

0.5 MのNaClを加えたパーミキュライトにシチメンソウの種子を播種し、4日間育てた。実生約10gを採取し、guanidine thiocyanate/CsCl法により全RNAを抽出した。すなわち、材料を液体窒素中乳鉢で粉碎し、guanidine thiocyanate溶液に移し、ホモジナイザーで完全に破碎後、15,000rpmで15分間遠心した。上清を5.7 M CsCl溶液を入れた遠心管に重層してSRP28スウィングローターを用い、28,000rpmで24時間遠心した。沈殿を蒸留水に溶解後、エタノール沈殿し、TE緩衝液に溶解した。全RNAからのmRNAの単離は、PolyATtract mRNA Isolation System(Promega)を用いて行った。ノーザン解析のためのmRNA調製も同様の手順で行った。

cDNAライブラリーの作成は、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社)を用いて行った。作出したライブラリーに対して青白判定を行った結果、およそ $3 \times 10^6$ pfu/ $\mu$ gの組換えプラークが得られたので、おそらくこのライブラリー中にはBADHのcDNAクローンが含まれるものと考えられた。そこでこのライブラリーからBADHのcDNAクローンを単離するために、プローブとして用いるoligonucleotideをデザインした。BADHのcDNAはすでに、ホウレンソウ(4)、サトウダイコン(5)、オオムギ(6)で単離されている。3種の植物のBADH cDNAに存在し、よく保存されていると思われる部分から以下の配列を合成した。その配列は、5'-GGTCCAGATGCTGGTGCACCATTAGTATCACACCCGGATGTTGAC-3'である。これをプローブとしてシチメンソウのcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。

## 2. 塩基配列の決定

cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、ポジティブクローンが14個得られた。それらの挿入cDNAサイズをagaroseゲル電気泳動によって確認した結果、1kbp以上のものは1個であった。そこで、その塩基配列をABI PRISM 310 (Applied Biosystems社)を用いて決定した。

## 3. 全DNAの単離

パーミキュライトに播種して1週間育てたシチメンソウの実生からCTAB法により全DNAを抽出した。実生(約10g)を液体窒素で凍結後、乳鉢で粉碎した。これに70°Cの2×CTAB液を加え、55°Cで10分静置した。クロロホルム/イソアミルアルコールを加えて振盪後遠心して水層を採取した。水層に10% CTAB液を加え、混和後、1% CTABを含む沈殿緩衝液を加え、遠心して沈殿とした。これをイソプロピルアルコール、次いでエタノールを用いてDNAを沈殿させ、TE緩衝液に溶解後、

RNase処理によりRNAを分解した。このDNA標品をサザン分析及びゲノミックDNAライブラリー作成に使用した。

#### 4. サザン分析及びノーザン解析

サザン分析については、上記のようにして単離した全DNAを、*Eco* RI, *Bam* HI, *Hin* dIIIあるいは*Xba* Iで消化した。その消化産物を0.8%agaroseゲルを用いて電気泳動にかけ、Hybond-N<sup>+</sup> membraneに転写した。プローブには以下のクローンをを用いた。単離したシチメンソウのBADH cDNAクローンは644の位置に1ヶ所の*Eco* RI消化部位を持っていた。そこで、BADH cDNAを*Eco* RIで消化し、電気泳動後約600bpの断片をゲルから切り出し、TA cloning kit (Invitrogen社)を用いてクローニングした。このクローンをclone Aと名付けた。32Pによる標識にはRandom primer labelling kit (STRATAGENE社)を用いた。定法により洗浄し、最終的には0.1 % SDSを含む0.2×SSCで65℃で洗浄した。

ノーザン解析については、パーミキュライトにシチメンソウの種子を播種し、コントロールとしては水を与え、また、0.2Mあるいは0.5 M NaClを与えて塩ストレスをかけ、乾燥ストレスに関しては400g/lのpolyethyleneglycol (PEG)を与えた。それぞれ、播種後1週間の実生から、上記のようにmRNAを単離した。これらのmRNAを変性後、1.5%agarose/formaldehydeゲルで電気泳動後、Hybond-N<sup>+</sup> membraneに転写し、clone Aをプローブに用いてノーザン解析を行った。

#### 5. シチメンソウゲノミックDNAライブラリーの作成

上記の方法でシチメンソウの全DNAを単離した。DNAを*Sau* 3AIで消化し、ショ糖密度勾配超遠心により分画した。15から25kbpの断片を*Bam* HIで消化した入EMBL3にライゲーションした。最終的にこれを*in vitro* パッケージングに持ち込んだ。ライブラリー中のBADHクローンの単離には上述のclone Aを用いた。

### 研究結果

#### 1. シチメンソウBADHのcDNAの構造とホウレンソウBADHのcDNAとの相同性

約1.3kbpのシチメンソウのcDNAクローンの塩基配列を決定した。その塩基配列及びそれから類推されるアミノ酸配列をFig. 1に示す。これまでに報告されているBADHのコード領域は、ホウレンソウ(4)、サトウダイコン(5)、オオムギ(6)のいずれにおいても約1.5kbpである。このことから推定できるように、今回単離したクローンは全長cDNAを含んでおらず、3'側が欠損していた。

塩基配列を決定したシチメンソウBADHの部分cDNAの塩基配列を、同じアカザ科に属するハウレンソウBADHのcDNAの塩基配列と比較した。Fig. 2から明らかなように、両者の塩基配列はきわめて類似していた。Table 1に示したように、両者は塩基配列で99.2%、アミノ酸配列で98.5%相同であった。

さらに、BADHはaldehyde dehydrogenase (ALDH)であることから、他のALDHとの相同性検索を行った。その結果(Fig. 3)、細菌類や哺乳類のALDHやハウレンソウBADHと共通のアミノ酸配列を有していた。

## 2. サザン分析及びノーザン解析

シチメンソウBADHの全長cDNAは得られなかったが、BADHのcDNAの部分的クローンであることが確認できた。Eco RI切断部位が1ヶ所存在したので、このcDNAをEco RIで消化後クローニングし、clone Aと名付け、これを用いてサザン分析及びノーザン解析を行った。

サザン分析の結果をFig. 4に示す。Eco RI消化物では4本、Bam HI消化物では2本、Hin dIII消化物では2本、そしてXba I消化物では主要な1本のバンドとマイナーな2本のバンドが出現した。これらの結果から、少なくともシチメンソウでは複数コピーのBADH遺伝子が存在するものと推測できる。

播種後1週間、0.3あるいは0.5MのNaCl存在下で育てた実生、400g/lのPEG存在下で育てた実生及び蒸留水のみで育てた実生(control)からmRNAを単離し、clone Aをプローブとしてノーザン解析を行った。その結果(Fig. 5)、controlでは全くBADHのシグナルは得られなかった。NaClによりBADH mRNAは出現し、その量はNaCl濃度を上げると上昇した。PEGによってもBADH mRNAは誘導された。

## 3. シチメンソウBADHのゲノミッククローンの単離

シチメンソウのゲノミックDNAライブラリーを作成した。clone Aをプローブとしてスクリーニングを行った結果、34個のポジティブクローンを得ることができた。それらのサイズは16から24kbpであった。

## 考察

今回シチメンソウのBADH cDNAクローンの単離を試みた。その結果、ポジティブクローンは得られたが、それは全長cDNAではなかった。おそらくmRNAからのcDNA作成時になんらかのミスをしたものと思われる。

部分cDNAの塩基配列とそれから類推されるアミノ酸配列は、ハウレンソウときわ

めて類似していた(Table 1). シチメンソウとホウレンソウは同じアカザ科に属するので、この相同性は当然であるともいえ、両者のBADHは活性としてはほぼ同じであろうと想像できる。ホウレンソウは塩に弱く、シチメンソウは強い耐塩性を有していることから、シチメンソウでは、BADHのコピー数が多い、あるいはBADH遺伝子発現が塩によって強く誘導される、という二つの可能性が考えられる。シチメンソウではサザン分析の結果(Fig. 4)から、BADH遺伝子が複数コピー存在していた。

シチメンソウのBADH遺伝子は塩ばかりでなく、PEGによる乾燥ストレスによっても発現した(Fig. 5)。すなわちシチメンソウは、塩ばかりでなく乾燥ストレスに対してもBADH遺伝子を発現することで、耐性を維持しているものと思われる。

### 今後の課題

シチメンソウの全長cDNAを得ることができなかった。この結果はおそらくcDNA作成時のなんらかのミスによると思われるので、現在再度cDNAライブラリーを作成し直している。

また本研究における最終目的は、塩ストレスによるシチメンソウのBADH遺伝子の発現機構にある。ゲノミックDNAライブラリーからBADHクローンを単離し、その5'側上流域のcis elementの解析を行う必要がある。その観点からは全長cDNAの単離は必要がないともいえる。ゲノミックDNAライブラリーからはポジティブクローンを34個得ることができたので、今後はそれらからBADHのゲノミッククローンを単離し、cis element及び転写因子の解析を行う予定である。

### 文献

- (1) Yokoishi, T. and Tanimoto, S. (1994) Seed germination of the halophyte *Suaeda japonica* under salt stress. J. Plant Res. 107; 385-388.
- (2) Tanimoto, S., Itoh, Y. and Yokoishi, T. (1997) Possible involvement of greening in cell growth of *Suaeda japonica* under salt stress. Plant Cell Physiol. 38; 129-132.
- (3) 谷本静史・仁藤伸昌(2001) 塩生植物シチメンソウの耐塩性維持機構の解析. 平成11年度助成研究報告集. 1 理工・農・生物系編. pp187-197 財団法人ソルトサイエンス振興財団
- (4) Weretilnyk, E. A. and Hanson, A. D. (1990) Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87; 2745-2749.
- (5) McCue, K. F. and Hanson, A. D. (1992) Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beat: cDNA cloning and expression. Plant Mol. Biol. 18; 1-11.
- (6) Ishitani, M., Nakamura, T., Han, S. Y. and Takabe, T. (1995) Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. Plant Mol. Biol. 27; 307-315.

1 CGTTGCGTGCTCGCCTTACCCTCTCAACTCAGTTTCTTCAACCCAATTCCTTCGCATTTAACCAAGA  
 M A F P I P A R Q L F I D G E W R E P I  
 68 ATGGCGTTCCCAATTCCTGCCTGCTCAGCTATTCATCGACGGAGAGTGAGAGAACCCATT  
 K K N R I P V I N P S T E E I I G D I P  
 128 AAAAAAATCGCATCCCGTCATCAATCCGTCCACTGAAGAAATCATCGGTGATATTCGG  
 A A T A E D V E V A V V A A R R A F R R  
 188 GCAGCCACGGCTGAAGATGTGGAGGTAGCGGTGGTGGCAGCTCGAAGAGCCTTTAGGAGG  
 N N W S A T S G A H R A T Y L R A I A A  
 248 AACAATTGGTCAGCAACATCTGGGGCTCATCGTCCACATACTTGCCTGCTATTGCTGCT  
 K I T E K K D H F V K L E T I D S G K P  
 308 AAGATAACAGAAAAAAGATCATTTTCGTTAAACTGGAAACCATGATTCTGGGAAACCT  
 F D E A V L D I E D V A S C L E Y F A G  
 368 TTTGATGAAGCAGTGTGGACATTGAAGACGTTGCTTCATGTTTAGAATATTTGCCGGA  
 Q A E A L D G K Q K A P V T L P M E R F  
 428 CAAGCAGAAGCTCTTGATGGTAAACAAAAGGCTCCAGTACCCTGCCTATGGAAAAGTTC  
 K S H V L R Q P L G V V G L I S P W N Y  
 488 AAAAGTCATGTTCTCAGGCAGCCCTTGGTGTGTTGGATTAATATCCCATGGAATTAC  
 P L L M A T W K T A P A L A A G C T A V  
 548 CCACCTCTAATGGCTACATGGAAAACCGCTCCAGCACTTGCTGCTGGGTGTACAGCTGTA  
 L K P S E L A S V T C L E F G E V C N E  
 608 CTTAAGCCATCCGAGTTGGCATCTGTGACTTGCTAGAATTCGGTGAAGTTTGCAACGAA  
 V G L P P G V L N I L T G L G P D A G A  
 668 GTGGGACTTCTCCAGGCGTGTGAATATCTTGACAGGATTAGGTCCAGATGCTGGTGCA  
 P L V S H P D V D K I A F T G S S A T G  
 728 CCATTAGTATCACACCCGATGTTGACAAGATTGCCTTTACTGGGAGTAGTGCCACTGGA  
 S K V M A S A A H L V K P V T L E L G G  
 788 AGCAAGGTTATGGCTTCTGCTGCCACTTGGTTAAGCCTGTTACATTAGAACTTGGGGGT  
 K S P I V V F E D V D I D K V V E W T I  
 848 AAAAGTCCTATTGTAGTGTGTTGAAGATGTTGATATTGATAAAGTTGTGGAATGGACTATT  
 F G C F W T N G Q I C S A T S R L L V H  
 908 TTTGGCTGTTTCTGGACAAATGGTCAAATATGTAGTGCAACGTCTAGACTGCTTGTGCAT  
 E S I A A E F V D K L V K W T K N I K I  
 968 GAAAGTATTGCAGCTGAGTTTGTGATAAGCTTGTAATAATGGACGAAAAACATTAATAAT  
 S D P F Q E G C R L G P V I S K G Q Y D  
 1028 TCTGACCCATTTCAAGAAGGATGCCGGCTTGGCCCTGTTATTAGTAAAGGACAGTACGAC  
 K I M K F I S T A K S E G A T I L Y G G  
 1088 AAAATTATGAAGTTCATATCAACAGCAAAGAGTGAGGGGGCAACTATTTTGTATGGAGGT  
 S R P E H L K N G Y Y I E P T I V T D I  
 1148 TCCCGTCTGAGCATTTGAAGAATGGTTATTACATTGAACCCACCATTGTAAGTATGATC  
 S T S M Q I W K E E V F G P V L C V K T  
 1208 TCCACATCCATGCAAATATGGAAAAGAGGAAGTTTTTGGCCCTGCTTGTGTGTTAAAACA  
 F S S E D E A I A L A N D T E Y G L A A  
 1268 TTTAGTTCGAAGATGAAGCCATTGCATTGGCAAATGATACAGAGTACGGTTTAGCTGCT  
 A V F S N  
 1328 GCTGTGTTTTCTAAT

Fig. 1 Partial nucleotide sequence of BADH cDNA, and the deduced amino acid sequence in *Suaeda japonica*.



S. j. : CGTTGCGTGCTCGCCTTACCCTCTCAACTCAGTTTCTTCAACCCAATTCCTTCGCATT  
 S. o. : CGTTGCGTGCTCGCCTTACCCTCTCAACTCAATTTCTTCAACCCAATTICTTCGCATT  
 ↓  
 TAACCAAGAATGGCGTTCCCAATTCCTGCTCGTCAGCTATTCATCGACGGAGAGTGGAGAGAA  
 TAACCAAGAATGGCGTTCCCAATTCCTGCTCGTCAGCTATTCATCGACGGAGAGTGGAGAGAA  
 CCCATTAAAAAAATCGCATCCCCGTCATCAATCCGTCCACTGAAGAAATCATCGGTGATATT  
 CCCATTAAAAAAATCGCATACCCGTCATCAATCCGTCCACTGAAGAAATCATCGGTGATATT  
 CCGGCAGCCACGGCTGAAGATGTGGAGGTAGCGGTGGTGGCAGCTCGAAGAGCCTTTAGGAGGA  
 CCGGCAGCCACGGCTGAAGATGTGGAGGTTGCGGTGGTGGCAGCTCGAAGAGCCTTTAGGAGGA  
 ACAATTGGTCAGCAACATCTGGGGCTCATCGTGCCACATACTTGCCTGCTATTGCTGCTAAG  
 ACAATTGGTCAGCAACATCTGGGGCTCATCGTGCCACATACTTGCCTGCTATTGCTGCTAAG  
 ATAACAGAAAAAAAGATCATTTTCGTTAAACTGGAAACCATTGATTCTGGGAAACCTTTTGAT  
 ATAACAGAAAAAAAGATCATTTTCGTTAAACTGGAAACCATTGATTCTGGGAAACCTTTTGAT  
 GAAGCAGTGCTGGACATTGAAGACGTTGCTTCATGTTTAGAATATTTTGCCGGACAAGCAGAAG  
 GAAGCAGTGCTGGACATTGATGACGTTGCTTCATGTTTIGAATATTTTGCCGGACAAGCAGAAG  
 CTCTTGATGGTAAACAAAAGGCTCCAGTCAACCCTGCCTATGGAAAGGTTCAAAAGTCATGTT  
 CTCTTGATGGTAAACAAAAGGCTCCAGTCAACCCTGCCTATGGAAAGGTTCAAAAGTCATGTT  
 CTCAGGCAGCCCCTTGGTGTTGTTGGATTAATATCCCATGGAATTACCCACTTCTAATGGCT  
 CTCAGGCAGCCCCTTGGTGTTGTTGGATTAATATCCCATGGAATTACCCACTTCTAATGGCT  
 ACATGGAAAACCGCTCCAGCACTTGCTGCTGGGTGTACAGCTGTACTTAAGCCATCCGAGTTG  
 ACATGGAAAATTGCTCCAGCACTTGCTGCTGGGTGTACAGCTGTACTTAAGCCATCCGAGTTG  
 GCATCTGTGACTTGTCTAGAAATTCGGTGAAGTTTGCAACGAAGTGGGACTTCTCCAGGCCGTG  
 GCATCTGTGACTTGTCTAGAAATTCGGTGAAGTTTGCAACGAAGTGGGACTTCTCCAGGCCGTG  
 TTGAATATCTTGACAGGATTAGGTCCAGATGCTGGTGCACCATTAGTATCACACCCGGATGTT  
 TTGAATATCTTGACAGGATTAGGTCCAGATGCTGGTGCACCATTAGTATCACACCCGGATGTT  
 GACAAGATTGCCTTTACTGGGAGTAGTGCCACTGGAAGCAAGGTTATGGCTTCTGCTGCCAC  
 GACAAGATTGCCTTTACTGGGAGTAGTGCCACTGGAAGCAAGGTTATGGCTTCTGCTGCCAA  
 TTGGTTAAGCCTACATTAGAACTTGGGGGTAAGTGCCTATTGTAGTGTGGAAGATGTTGAT  
 TTGGTTAAGCCTACATTAGAACTTGGGGGTAAGTGCCTATTGTAGTGTGGAAGATGTTGAT  
 ATTGATAAAGTTGTGGAATGGACTATTTTGGCTGTTTCTGGACAAATGGTCAAATATGTAGT  
 ATTGATAAAGTTGTGGAATGGACTATTTTGGCTGTTTCTGGACAAATGGTCAAATATGTAGT  
 GCAACGCTAGACTGCTTGTGCATGAAAGTATTGCAGCTGAGTTTGTGATAAGCTTGTA  
 GCAACGCTAGACTGCTTGTGCATGAAAGTATTGCAGCTGAGTTTGTGATAAGCTTGTA  
 TGGACGAAAAACATTAATAATTTTCAAGAAGGATGCCGGCTTGGCCCTGTTATTAGTAAAGGA  
 TGGACGAAAAACATTAATAATTTTGAAGAAGGATGCCGGCTTGGCCCTGTTATTAGTAAAGGA  
 CAGTACGACAAAATTATGAAGTTCATATCAACAGCAAAGAGTGAGGGGGCAACTATTTTGTAT  
 CAGTACGACAAAATTATGAAGTTCATATCAACAGCAAAGAGTGAGGGGGCAACTATTTTGTAT  
 GGAGGTTCCCGTCTGAGCATTTGAAGAATGGTTATTACATTGAACCCACCATTGTA  
 GGAGGTTCCCGTCTGAGCATTTGAAGAAAGGTTATTACATTGAACCCACCATTGTA  
 ATCTCCACATCCATGCAAATATGGAAAGAGGAAGTTTTTGGCCCTGCTTGTGTGTTAAAACA  
 ATCTCCACATCCATGCAAATATGGAAAGAGGAAGTTTTTGGCCCTGCTTGTGTGTTAAAACA  
 TTTAGTCCGAAGATGAAGCCATTGCATTGGCAAATGATACAGAGTACGGTTTAGCTGCTGCT  
 TTTAGTCCGAAGATGAAGCCATTGCATTGGCAAATGATACAGAGTACGGTTTAGCTGCTGCT  
 GTGTTTTCTAAT  
 GTGTTTTCTAAT

Fig. 2 Comparison of nucleotide sequences of BADH cDNAs from *Suaeda japonica* (S. j.) and *Spinacia oleracea* (S. o.). Different bases are underlined. Arrow indicates translation start site (ATG).

Table 1 Identity of nucleotide and amino acid sequences between BADH cDNAs from *Suaeda japonica* and *Spinacia oleracea*.

	Identity (%)
Nucleotides	99.2
Amino acids	98.5

<i>Suaeda japonica</i> BADH	AAHLVKP <u>VTLELGGK</u> SPIVVFEDVDIDKVVWETIFGCFWTNGQICSATS
<i>Spinacia oleracea</i> BADH	AAQLVKP <u>VTLELGGK</u> SPIVVFEDVDIDKVVWETIFGCFWTNGQICSATS
<i>Pseudomonas oleovorans alkH</i>	ASKTLAS <u>VTLELGGK</u> SPTIIGPTANLPKAARNIVWGKFSNNGQT <u>CI</u> APD
<i>Aspergillus nidulans aldA</i>	AKSNLKK <u>VTLELGGK</u> SPNIVFDDADIDNAISWANFGIFFNHGQCC <u>AG</u> SR
Rat hepatoma ALDH	AAKHLTP <u>VTLELGGK</u> SPCYVDKDCDLVACRRIAWGKFMNSGQT <u>CV</u> APDY
Human cytosolic ALDH	GKSNLKR <u>VTLELGGK</u> SPCIVLADADLDNAVEFAHHGVFYHQQCC <u>IA</u> ASR

Fig. 3 Presence in *Suaeda japonica* BADH of the same decapeptide sequence and cysteine residue, double-underlined sequence, as occur in spinach BADH and non-specific aldehyde dehydrogenases (ALDHs) from microbial and mammalian sources.

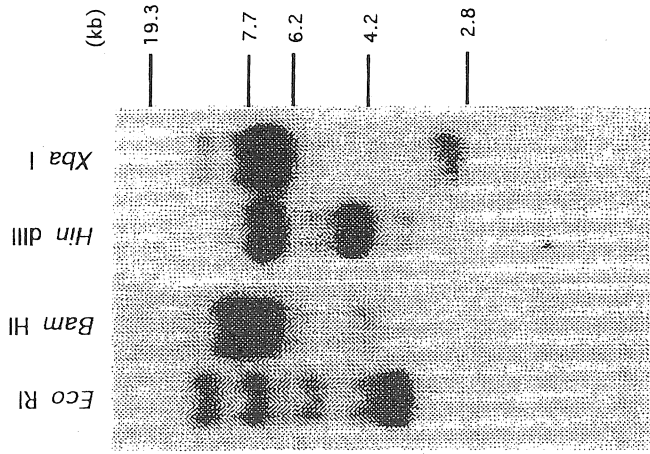


Fig. 4 Southern blot analyses of DNA from *Suaeda japonica* seedlings. Approximately 15  $\mu$ g of DNA was digested with Eco RI, Bam HI, Hin dIII or Xba I, and separated on 0.8% agarose gels. Filters transferred genomic DNA were hybridized with the  $^{32}$ P-labelled clone A, and washed with 0.2  $\times$  SSC and 0.1% SDS at 65  $^{\circ}$ C.

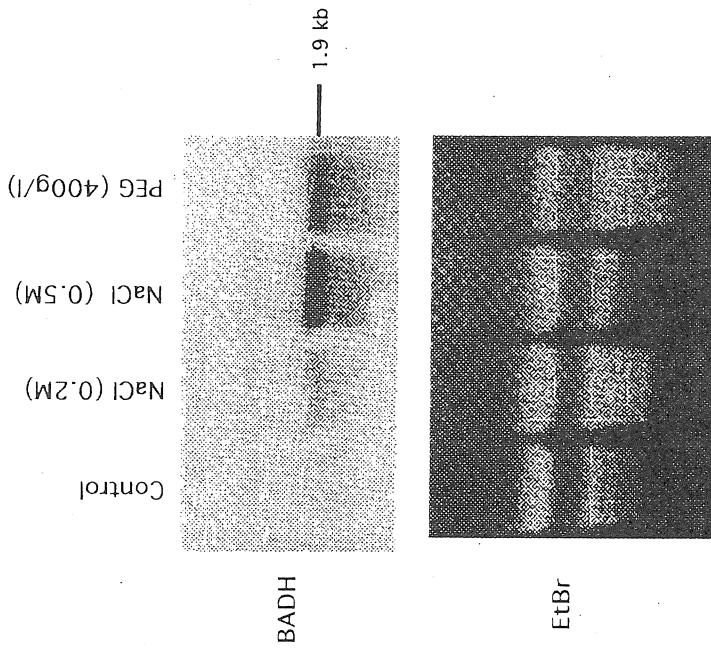


Fig. 5 RNA gel blot analysis of BADH mRNA. Poly (A)<sup>+</sup> RNA (ca. 3  $\mu$ g) isolated from seedlings of control, grown with 0.2 or 0.5 M NaCl, or 400g/l polyethyleneglycol (PEG) was electrophoresed, transferred to nitocellulose, and probed with  $^{32}$ P-labelled clone A. The photograph of ethidium bromide-stained gel before RNA transfer is shown at the bottom.

Analysis of Salt Tolerant Mechanism in Halophyte *Suaeda japonica*

Shizufumi Tanimoto and Nobumasa Nitoh

Department of Applied Biological Sciences,

Faculty of Agriculture, Saga University

Summary

*Suaeda japonica* Makino is a halophyte and grows at the shore of Ariake sea in Japan. In this plant, incorporated salts were isolated to vacuoles and high levels of glycinebetaine, compatible solute, were produced in cytosol for maintenance of osmotic balance between vacuole and cytosol. The glycinebetaine is synthesized from betaine-aldehyde by betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH). So we tried to isolate the cDNA clone for BADH. The partial cDNA clone for BADH could be isolated, and the nucleotide sequence was determined. The nucleotide and deduced amino acid sequences were extremely homologous to spinach BADH. *S. japonica* and spinach belong to the family Chenopodiaceae. The BADH amino acid sequence in *S. japonica* contained consensus sequence of Val-Thr-Leu-Glu-Gly-Lys-Ser-Pro, which is highly conserved among general aldehyde dehydrogenases. As the results of Southern analysis, *S. japonica* has several copies of BADH genes. The BADH gene was induced by NaCl stress, and expression was stimulated as NaCl concentration increase. The gene also induced by polyethyleneglycol treatment, as substitute for drought stress. Therefore, glycinebetaine was synthesized by both salt and drought stresses and maintained osmotic balance in *S. japonica*. We also tried to create genomic DNA library. Using fragment of BADH as probe, 34 BADH genomic clones could be isolated, these sizes were 16 to 24 kbp. Efforts are directed to obtain more information regarding the mechanism of BADH gene expression, especially cis elements and transcriptional factors, in *S. japonica* under salt stress.