

20

助成番号 0120

## 塩生植物アイスプラントの耐塩性機構ならびに塩集積メカニズムの解明

助成研究者：東江 栄 (佐賀大学 農学部)

共同研究者：野瀬昭博 (佐賀大学 農学部)

アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) は、海水とほぼ同程度の塩を含む土壌でも正常にライフサイクルを完結できる植物である。本種が塩に遭遇すると、表皮表面にあるブラッター細胞 (EBC) とよばれる細胞を発達させ、そこに塩を蓄積し、さらに光合成型を、イネ、ムギなどが行う C3 型からサボテンなどの CAM 型へ変換させる。アイスプラントの塩集積、及び耐塩性機構を調べるために、種子に中性子線を照射して得た突然変異株をスクリーニングし、塩条件下でも CAM にならない CAM 型欠損突然変異体と EBC をもたない EBC 突然変異体を単離することに成功した。両変異体の遺伝的、生化学的特性を調査し、以下の結果を得た。

### 1. CAM 型欠損突然変異体

CAM 型欠損株の選抜は、CAM 植物の葉身が夜間に酸性化することを利用した。約 3 万個体スクリーニングして 2 系統を単離した。変異株では、CAM に特徴的な夜間の酸性化、及びリンゴ酸の蓄積がほとんどみられなかった。またデンプンの蓄積量も野生株より低く、変異株は、CAM を特徴づける炭素代謝系を欠失した突然変異体と考えられた。野生株と突然変異株の葉身から RNA を単離してマイクロアレイを行い、塩処理に伴う約 1600 個の遺伝子の発現量の変化を調査した。変異株で発現量が有意に増加した遺伝子は 17 個あり、その中には、タウマチン様タンパク質や抗病原体タンパク質のような防御機構に関連する遺伝子や、オーキシン結合タンパク質のようなホルモン反応に関与している遺伝子、及び細胞骨格のアクチン遺伝子が含まれていた。逆に、発現が有意に (約 50%) 抑えられた遺伝子は 65 個で、その中には、塩による発現誘導が報告されているホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子、プロテアーゼ、及びピニトール合成に関わる遺伝子等が含まれていた。

### 2. EBC 欠損突然変異体

走査型電子顕微鏡で表皮表面の微細構造を観察したところ、野生株では、葉身の両面、茎表面に EBC がよく発達しており、EBC の容量は塩処理によって増加することがわかった。一方、変異株では、EBC は葉の裏表いずれにもほとんどみられず、塩処理にともなう EBC の発達は表側のみでわずかにみられた。生長に及ぼす塩の影響は変異株で大きかった。400mM の塩化ナトリウムを含む培養液で 21 日間栽培したところ、変異株の生重は野生株の約 60% まで低下した。また塩処理区の変異株では、葉身に枯死が目立ち、葉内にイオンストレスが生じていることが推察された。野生株では、最高で約 2 g の NaCl を蓄積したが、変異株の NaCl 蓄積量はその約半分であった。この NaCl 蓄積量の違いは、塩吸収能と生長量の違いによる。野生株では、塩吸収能が高く、かつ高い塩濃度下でも生育を高く維持できた。EBC の存在は、光合成器官周辺から塩類を排除し、高塩環境下での光合成能力の維持、ひいては生長量の保持を可能にすると考えられる。



20

助成番号 0120

## 塩生植物アイSprアントの耐塩性機構ならびに塩集積メカニズムの解明

助成研究者：東江 栄 (佐賀大学 農学部)

共同研究者：野瀬昭博 (佐賀大学 農学部)

## 1. 研究目的

本研究の究極的な目標は、塩生植物であるアイSprアントの耐塩性ならびに塩集積機構を解明し、作物への耐塩性付与による安定収量の実現、及び植物を用いた塩性土壌からの塩類除去法の確立である。

アイSprアント(*Mesembryanthemum crystallinum*)は、300mM 500mM (重量比で 1.8 3.0%) の塩化ナトリウムを含む土壌でも正常にライフサイクルを完結できる植物である。本種が塩に遭遇すると、表皮表面にあるブラッダー細胞(EBC)とよばれる細胞を発達させ、そこに塩を蓄積し、さらに、光合成型をイネ、ムギなどがもつ C3型からサボテンなどのCAM型へ変換させる。本種は発見当初から環境条件に伴う光合成変換機構ならびに環境ストレス耐性機構を解析するモデル植物として注目されてきた<sup>2)</sup>。しかし、これまでの研究では、CAM型光合成関連遺伝子や適合溶質合成遺伝子を個別に単離する試みが多く、CAM化を制御する遺伝子の相互関係や耐塩性機構の獲得に関わる遺伝子群の挙動を包括的に解析した例は少なかった<sup>3)</sup>。また、EBCに関しては、本細胞中の塩蓄積量を測定した例はあるが、塩集積のメカニズム、ならびに耐塩性に対する本細胞の役割等について調査した例はほとんどなく、さらに本細胞の発達に関わる遺伝子の単離を試みた例はない。

本研究では、アイSprアントの種子に中性子線を照射して突然変異体を誘導し、CAMにならない突然変異体とEBCを持たない突然変異体の単離を試みた。さらに、それぞれの突然変異株の生理生化学的な特性や塩特異的な遺伝子発現を調査し、遺伝子レベルでのアイSprアントの耐塩性獲得機構、及び塩集積機構を解析した。

## 2. 研究方法

## 2.1 突然変異の誘導と選抜

突然変異体の誘発は、中性子線を照射して行った。実験には40Gyと50Gyの中性子線を照射した種子を供試した。種子は0.43%のMS培地塩類、B5ビタミン類及び3%スクロースを含む0.5%寒天培地上に播種した。播種1週間後、培養土(メトロミックス200)を含む1Lポットに移植し、25°Cに調整したビニールハウス内で1/2倍濃度のホークランド液を与えて栽培した。播種4週間後300mM NaClをホークランド液に混和して施与し、塩処理を開始した。CAM型欠損株は、CAM植物の葉身が明け方に酸性化することを利用した。塩処理1週間後、葉身の一部(0.23cm<sup>2</sup>)を採取してpH指示薬のクロロフェノールレッドに浸漬し、この指示薬が赤色(中性)になる個体を選抜した。選抜した個体は自植させ、次世代の個体を上述した方法で栽培し、塩処理を施した。塩処理1週間後、葉身を4時間ごとに7回採取した。採取後直ちに液体窒素に浸漬して-80°Cに保存し、代謝産物含量の測定、並びにマイクロアレイ解析に供試した。EBC欠損株は葉身表面を観察して選抜した。自植

させて得た次世代の種子を、上述のとおり播種・栽培した。播種後3週間目に400mM、及び800mMのNaClを含む水耕装置に移植し、処理開始から1週間ごと4回、個体を採取して、各器官の生重、乾物重、及び塩濃度を測定した。

## 2.2 適定酸度、リンゴ酸、及びデンプン含量の測定

冷凍保存した葉組織0.3gを液体窒素中で磨砕した。磨砕サンプルは、80°Cに保った80%メタノールの中に入れ、70°Cで1時間インキュベートした。懸濁液を1mlに分けて分注し、適定酸度、リンゴ酸及びデンプン含量の測定に供試した。適定酸度はKuら<sup>6)</sup>の方法に従った。メタノール粗抽出液を80°Cで4-5時間おき、メタノールを揮発させた。1mlの蒸留水を沈殿物に加え8分間沸騰させた後、12000gで10分間遠心し、得られた上清に10mMのKOHでpH10.0になるまで適定した。メタノールを揮発させた沈殿物を200mMのBicine buffer (pH7.8)に懸濁し、混合物を12000gで10分間遠心した。上清に含まれるリンゴ酸含量をHohorst<sup>5)</sup>の方法で測定した。エタノール粗抽出液を12000gで5分遠心し、沈殿物を300mlの0.1M酢酸バッファー (pH4.7)に溶かして、100°Cに30分おいた。混合液にアミログルコシダーゼと $\alpha$ アミラーゼを加え40°Cで16時間おきデンプンを分解させた。12000gで10分遠心した後、上清中のグルコースをDuboisら<sup>4)</sup>の方法で定量した。

## 2.3 マイクロアレイ

### 2.3-1 RNA抽出と純化

2.2で用いた葉組織からRNAを抽出した。抽出は、TRIzol試薬(Life Technologies)を用いて、Taybi and Cushman<sup>7)</sup>の方法で行った。RNAは純化キット(RNeasy plant mini kit, QIAGEN)で純化した。

### 2.3-2 アレイの作成

塩処理30時間及び48時間後の葉身から単離した約8000個のESTクローンを、その塩基配列の相同性から分類し、重複をなくして1632個のクローンを選抜した。プラスミドDNAを鋳型にT3及びT7プライマーを用いてPCRを行い、40サイクル、アニーリング温度55°Cでクローンを増幅した。PCR産物を純化キット(QIAGEN)で純化した後、遠心濃縮機で濃縮し、沈殿物をMicrospotting solution (ArrayIt)に懸濁した。このDNA溶液をスポットター(GeneMachines)でスライドガラス(Corning)上にスポットした。

### 2.3-3 プローブの蛍光ラベル

蛍光ラベルされたプローブは、逆転写反応でcDNAに蛍光ヌクレオチドアナログ(Cy3-dCTP及びCy5-dCTP, Amersham)を取り込ませて作成した。純化したトータルRNA(100 $\mu$ g)を95°Cで3分間熱処理した後、Oligod(T)プライマー2 $\mu$ g、0.5mM dATP、dTTP、dGTP及び0.2mM dCTP、0.5ユニット逆転写酵素(SuperscriptII, GIBCO)、2nM Cy3-dCTP及びCy5-dCTPを含む反応液に加え、42°Cで90分間逆転写反応を行った。反応液をカラム(PCR cleanup kit; QIAGEN)に通し、ラベルに取り込まれなかった蛍光色素、ならびに塩基を除去した。遠心濃縮機で30 $\mu$ lに濃縮し、3.6 $\times$ SSC、0.09% SDSを含む9%ハイブリダイゼーション溶液(liquid block, Amersham)に懸濁した。

### 2.3-4 アレイとのハイブリダイゼーション、及びデータ解析

プローブ溶液をアレイ上のにせて、カバーガラスで覆った。スライドガラスを50mLチ

ューブの中に静置し、65°Cで12時間おいた。その後、0.1×SSCと0.1%SDSで各5分間、及び0.1×SSCで5分間洗浄した。蛍光シグナルはScanArray3000(GSI Luminomics)で検出し、解析ソフトImaGeneIII(BioDiscovery)を用いて解析した。

## 2.4 生育調査

EBC欠損突然変異株と野生株は、塩処理2週間後に水耕装置から取り除き、各器官に分け、それぞれの生重を測定した。葉面積は葉面積計(HAYASHIDENCO, TYPE AAM-8)で測定した。生重測定後、各器官を3日間乾燥させ、それぞれの乾物重を測定した。

## 2.5 葉、及び茎のNa<sup>+</sup>、及びCl<sup>-</sup>含量の測定

乾物重測定後、葉及び茎の組織を乳鉢中で磨砕した。磨砕したサンプル1gを20mlの超純水とともに乳鉢中でさらに磨砕して、3000gで15分間遠心分離した。上澄み液をろ紙で濾過して、得られたろ液に超純水を加え50mlとした。Na<sup>+</sup>含量は、炎光光度法を用いて土壌・作物体総合分析計(島津, SPCA-626D)で測定した。Cl<sup>-</sup>含量は、キャピラリー式イオン分析計(Waters Capillary Ion Analyzer)で測定した。まず、抽出液5mlをセルアセテート0.45μmHVフィルターで濾過した。0.46mMアニオンBT溶液、アニオン用電解質バッファ濃縮液(4.6mM Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>, 0.031mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)を加え、アニオン用電解液バッファ(pH8.0)とした。このバッファにサンプルを入れCl<sup>-</sup>含量を測定した。いずれもNaCl標準溶液で作成した検量線から含量を算出した。

## 2.6 実体顕微鏡、及び走査型電子顕微鏡による微細構造の観察

播種35日後から25日間300mM NaClで塩処理した野生株と変異株の葉の裏表を実体顕微鏡(Olympus, SZX12)を用いて観察した。走査型電子顕微鏡で観察するために、葉の表面の型をとった。氷上でExtrude Wash BaseとExtrude Wash Catalystを同量混ぜ、実体顕微鏡で観察した葉の表面に滴下した。固化後、樹脂を葉から剥がしてその上にボンドをのせ、乾かして葉の表面の型をとった。この型にイオンスパッタリング装置(HITACHI)で3~5分ほど金を蒸着させた。その後、走査型電子顕微鏡(HITACHI, S-2050)で葉の表面の微細構造を観察した。

## 3. 研究結果及び考察

### 3.1 CAM欠損突然変異体

アイズプラントはCAM型植物の遺伝子解析を行うモデル植物になりつつあるが<sup>1)</sup>、これまでに突然変異体を単離した例はない。本研究では、中性子線を変異源として突然変異を誘導した突然変異系統からCAM型欠損突然変異体とブラッター細胞欠損突然変異体の選抜、及び単離を試みた。中性子線は、ゲノム塩基の欠損や再配列を誘発させるため、遺伝子の単離のために行うゲノムサブトラクションやRDA解析を容易にする。アイズプラントの種子に20~120Gyの中性子線を照射し、植物体の生存率を調査したところ、30Gy~50Gyの中性子線を照射した個体で生存率が約50%となった(データは示さず)。照射量がこれより高いと生存率は低下し、逆に照射量が低いと形質変化がほとんど見られなかった。したがって本研究では、中性子線を40Gyと50Gyそれぞれ照射した2系統を調査するこ

とにした。

CAM型欠損株の選抜は、CAM植物の葉身が夜間に酸性化することを利用した。第4葉齢の個体に300mM NaClを与え1週間栽培した後、葉身の一部を早朝と夕方採取してクロロフェノールレッドに浸漬した。クロロフェノールレッドに浸漬した葉片が朝方に赤色(中性)を示す個体をCAM型欠損突然変異株として選抜した。EBC突然変異株は形態観察で選抜した。Table 1にスクリーニングの結果を示した。M2世代では、40Gy照射系統で、368系統(7236個体)、50Gyで1149系統(18317個体)をそれぞれ調査し、685系統のCAM型欠損突然変異系統を選抜した。そのうち86系統が何らかの形態異常を示す個体を含んでいた。CAM型欠損突然変異株が生じる頻度は、40Gyで0.3%、50Gyでは0.4%であった。選抜した個体は自殖させ、次世代について同様な選抜を行った。M3世代ではCAM型突然変異体の出現頻度は0.7%となり、分離比が低下する傾向にあった。このような選抜の結果、2系統(25D6及び351)をCAM型欠損突然系統として単離した。

CAM植物は、夜間に気孔を開きCO<sub>2</sub>を固定してリンゴ酸を生成する。リンゴ酸の蓄積に伴い葉内は酸性化する。また、リンゴ酸生成に必要な中間代謝産物はデンプンの分解によって得られるため、夜間にはデンプン含量が低下する。逆に日中は気孔が閉じ、リンゴ酸の分解(脱炭酸)によって得られたCO<sub>2</sub>からデンプンが生成される。したがって、CAM植物の葉身では、夜間にはリンゴ酸含量の増加とデンプン含量の低下が、日中にはその逆の反応がみられる。CAM型欠損突然変異株がこのようなCAMの特徴を有しているかを調べるために、系統25D6の細胞液pH、葉身細胞液の適定酸度、デンプン含量、及びリンゴ酸含量の日変化を測定した(Fig. 1)。NaCl 300mMを含む培養液を灌水し1週間栽培したところ、野生株ではCAMが誘導され、調査した項目に典型的なCAMの日変化パターンがみられた。すなわち、野生株のpHは早朝から午前中にかけて大きく低下し、午後から再上昇した。一方、変異株では夜間の酸性化は認められず、pHは午前10時にわずかに低下しただけであった(Fig. 1A)。適定酸度で酸度を詳細に調べたところ、野生株では早朝から午前中にかけて酸度が大きく増加したのに対し、変異株では、酸度は午前10時にわずかに増加した(Fig. 1C)。さらにリンゴ酸の蓄積は野生株、変異株いずれもpH及び適定酸度の結果とよく一致した。変異株では、リンゴ酸の蓄積がほとんどみられなかったのに対し、野生株では午前10時には夕方の約4倍のリンゴ酸が蓄積された(Fig. 1D)。クエン酸含量にはこのような傾向はなかった(データ示さず)。したがって、葉内の酸度の日変化は、リンゴ酸の蓄積に強く依存していると考えられた。デンプン含量の日変化は変異株と野生株で同様な傾向を示したが、一日を通じて野生株より低く推移した(Fig. 1B)。以上のことから、変異株は、CAMを特徴づける炭素代謝系、すなわちリンゴ酸、クエン酸、及びデンプン生成能力が欠失している突然変異体と考えられた。

変異株の遺伝子の発現パターンを網羅的に調べるために、野生株と変異株の葉身から単離したRNAを用いてマイクロアレイを行った(Fig. 2)。マイクロアレイ法は最近開発された手法で、一度に数千 数万の遺伝子の発現様式を調べることができる。本研究では、約1600個のアイズプラントの遺伝子をのせたアレイを用いて変異株と野生株の塩処理に伴う遺伝子発現の違いを調査した。300mM NaClで1週間処理した個体の葉身を早朝6時に採取した。採取した葉身からRNAを抽出し、このRNAから蛍光ラベルして合成したcDNAをアレイとハイブリダイズした。第2図には調査した全遺伝子の発現量を遺伝子番号順に示し

た。遺伝子の発現量は蛍光色素の蛍光シグナルの強さの比で表される。図中央の直線は、野生株と変異株の発現量比が1:1の値を示している。したがって、この直線より上にある遺伝子は、変異株において発現が誘導されたもの、逆に下にあるものは発現が抑制された遺伝子である。変異株で発現が2倍以上有意に増加したものは17個あり、その中には、タウマチン様タンパク質や抗病原体タンパク質のような病原体に対する防御機構に関連する遺伝子や、オーキシン結合タンパク質のようなホルモン反応に関与している遺伝子、及び細胞骨格のアクチン遺伝子が含まれていた。逆に、発現が有意に(約50%)抑えられた遺伝子は65個で、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子(PEPC)、プロテアーゼ、及びピニトール合成に関わる遺伝子が含まれていた。これらは、アイスプラントにおいて塩によって発現が誘導されると報告されている代表的な遺伝子であった。特にPEPCはリンゴ酸の生成に深く関わっており、この酵素をコードする遺伝子の発現が変異株で抑えられていたことは、上述のリンゴ酸含量の結果と一致する。この突然変異体は、塩処理にともなって誘導されるCAM型変換機構に変異が生じていると考えられる。

Table 2には変異株において発現が誘導される遺伝子を機能ごとに分類して示した。発現が誘導された17個の遺伝子のうち最も多かったのは、機能がまだ知られてないか、報告のない遺伝子であった。ついで、糖代謝、生長調整物質や防御機構に関わる遺伝子が多かった。

Table 3には、突然変異株で発現が抑制された遺伝子を機能ごとに分類して示した。様々な代謝に関わる遺伝子の発現が抑制を受けていた。特に多かったのが、光合成関連遺伝子と液胞膜プロトンATPaseに関わる遺伝子で共に6個、ついでタンパク質分解反応(4個)、及びC4光合成、アミノ酸代謝、糖代謝等に関わる遺伝子であった。

### 3.2 EBC欠損突然変異体

アイスプラントが塩を吸収するとEBC内の液量が劇的に増加する<sup>1)</sup>。またこの細胞内には葉身の約1.5倍濃度の塩が蓄積される。本細胞の耐塩性に対する寄与度は古くから提唱されてきたが、直接的な証明例はなく、本細胞を形成する遺伝子を単離した例もなかった。この細胞の有無によって塩吸収量は異なるのか、どの程度の塩が葉内に集積すれば葉身が枯死するのかを調査することで、この細胞の塩集積能、ならびに葉身の塩耐性(枯死抑制)に対する本細胞の寄与度を知ることができると考えられた。本研究では、上述のスクリーニングを通して、EBCのない変異株を1個体単離することに成功した。ここでは、形態観察と生育量、塩濃度を調査し、耐塩性に関わるEBCの役割を検討した。

Fig. 3は走査型電子顕微鏡で観察した変異株、及び野生株の葉身表面の微細構造写真である。野生株では、EBCは根以外の器官の表面によく発達しており、塩処理によって容積が増加した(Fig. 3 A, C)。変異株では、EBCは葉の裏表いずれにもほとんどみられず、塩処理にともなうEBCの発達は表側のみでわずかにみられた(Fig. 3 B, D)。

Fig. 4は、野生株と変異株の塩処理に伴う地上部生重の変化を示した。対照区では両者同等の生育量を示したが、塩処理区では変異株の生育が大きく阻害された。400mM NaClを含む培養液で21日間栽培した場合、変異株の生重は野生株の約60%まで低下した。800mM NaClでは両者とも著しい生育阻害がみられ、両者に大きな差異は認められなかったが、塩処理7日目、及び14日目で変異株の生育量が低い傾向がみられた。塩処理区の変異株の葉身には枯死が目立ち、葉身内部にイオンストレスが生じていることが推察された。

Fig. 5 は、塩処理に伴う NaCl 含量の変化を示した。野生株では、最高で個体当たり約 2 g の NaCl を蓄積することがわかった。変異株の NaCl 含量は野生株の約半分であった。このように 1 個体あたりの NaCl 含量に大きな差がみられたのは、塩処理下での野生株の塩吸収能、及び生育量の高さによると考えられる。野生株では、体内の塩を EBC に蓄積し、光合成器官周辺の塩を排除することで、高塩環境下での光合成能力を維持し、生長量を高く保持できたと考えられる。EBC の効果は、400mM といった海水に近い塩濃度下で大きくなることがわかった。EBC の蓄積能力の向上は、塩類集積土壌からの塩類除去に有効と考えられる。

#### 4. 今後の課題

今後は、RDA 法などを駆使して野生株と変異株のゲノムを比較し、ゲノム上の変異部位を特定する必要がある。EBC 変異株では分離がほとんどなく遺伝的に固定されたように見受けられた。したがって本変異株では、ゲノム解析が比較的容易に行えると考えられる。マイクロアレイ法の結果から、CAM 型欠損突然変異体では複数の遺伝子の発現が同時に抑制をうけていることがわかった。これらが個別に制御されているのか、あるいは複数の遺伝子発現を制御する統一的な制御メカニズムがあるのか、またはそれらの相互作用はあるのか等を今後明らかにしていきたい。このような解析を通して、耐塩性獲得機構としての CAM の生理的意義を明確にし、作物の耐塩性付与に対する指針を得たいと考えている。

#### 謝辞

走査型顕微鏡による観察にあたってご協力頂いた名城大学農学部近藤歩博士に厚く御礼申し上げます。また実験の遂行にあたって終始ご協力頂いた佐賀大学農学部院生下田敏史君、及び同学生清水有美さんに感謝する。

#### 5. 文献

- 1) H. J. Bohnert and J. C. Cushman, *J. Plant Growth Regul.*, 19, 334-346 (2000)
- 2) H. J. Bohnert, D. M. Vernon, E. J. DeRocher, C. B. Michalowski, J. C. Cushman, *Inducible plant proteins*, J. L. Wray (ed)., Cambridge University Press pp. 113-117 (1992)
- 3) J. C. Cushman, H. J. Bohnert, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 305-322 (1999)
- 4) M. Dubois, K. A. Giles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chemist.*, 28, 350-356 (1956)
- 5) H. J. Hohorst, *Methods of Enzymatic Analysis*, H. U. Bergmeyer (ed)., Academic Press, London, pp. 328-332. 1965
- 6) S. -B., Ku, Y. -J. Shieh, B. J. Reger and C. C. Black, *Plant Physiol.*, 68, 1073-1080 (1981)
- 7) T. Taybi, J. C. Cushman, *Plant Physiol.*, 121, 545-556 (1999)



Table 1. Frequency of CAM and morphological mutants

Generation	Dose (Gy)	Total No. screened		Mutant lines	
		Lines	Plants	CAM	Morphological
M2	40	368	7,236	87	26
M2	50	1,149	18,317	598	60
M3	50	434	7,145	53	29

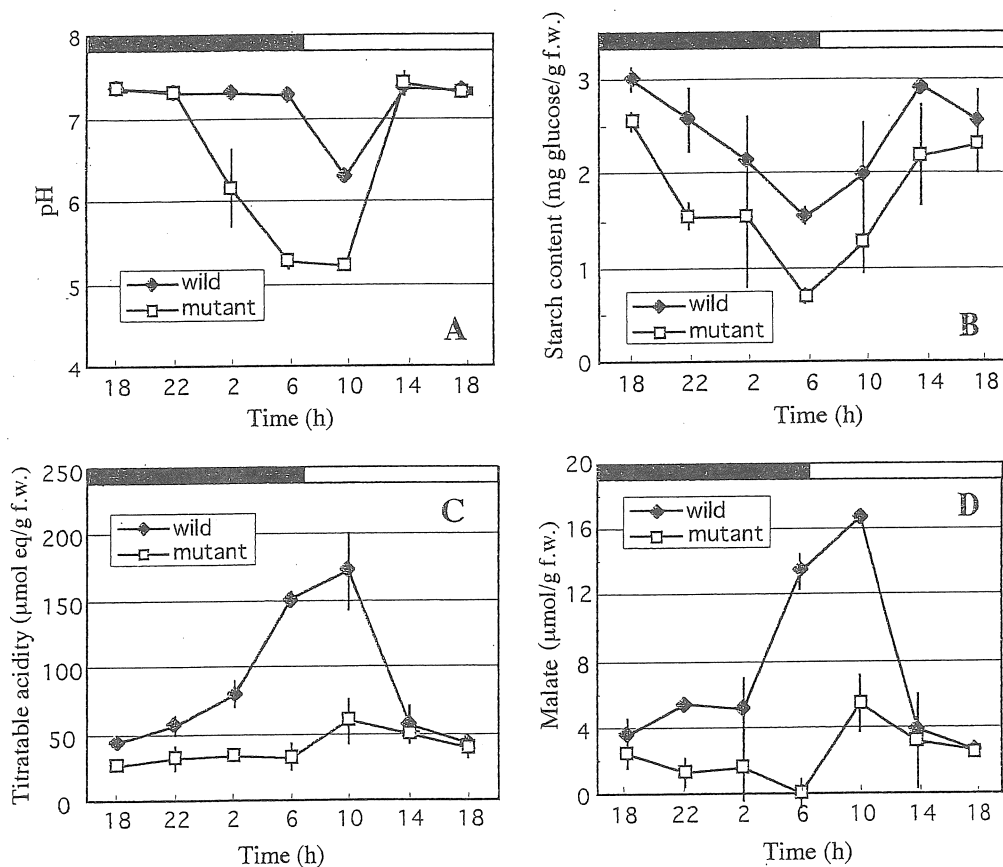


Fig. 1. Diel changes in pH in the cell saps (A), starch content (B), titratable acidity (C), and malate content (D) of leaves in the wild type and the CAM defective mutant.

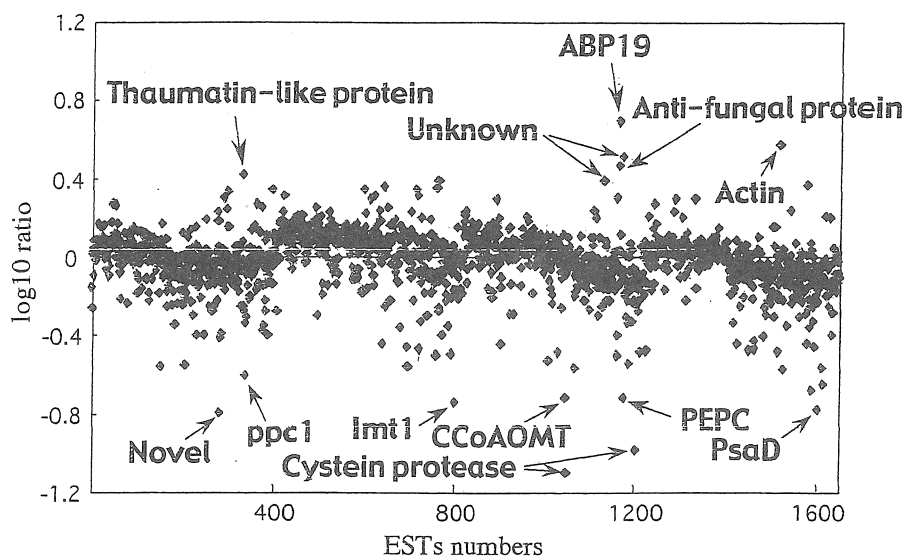


Fig. 2. Transcript expression in CAM defective mutant of *M. crystallinum*.

ABP19, auxin-binding protein; Imt1, Myo-inositol 4-O-methyltransferase;  
 ppc1, phosphoenolpyruvate carboxylase; CCoAOMT, S-adenosyl-L-methionine:trans-  
 caffeoyle-CoA 3-methyltransferase; PsaD, Photosystem I reaction centersubunit II precursor;  
 PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase

Table 2. Functional classification of genes induced more than 2-fold at dawn after treatment with 300 mM NaCl in CAM defective mutant.

Putative function	Description of putative protein	Ratio of signal intensity
Sugars/ polysaccharide metabolism	Beta-Amylase	2.01
	Putative beta-D-galactosidase precursor	2.15
	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	2.23
Growth regulators	Auxin-binding protein ABP19/germin-like protein	2.41
	Auxin-binding protein ABP19/germin-like protein	4.88
Ribosomal proteins	60S ribosomal protein L18	2.02
Cytoskeleton (Cell structure)	Actin 2	3.73
Defense-related	Anti-fungal protein	2.89
	PR-1a pathogenesis related protein (Hv-1a)	2.29
Stress responses	Jasmonate-induced protein	2.20
	Putative thaumatin-like protein	2.60
	Unknown protein	2.17
	Hypothetical 21.5 KD protein	2.00
	Unknown protein	2.43
	Unknown protein	3.21
	Novel	2.14
	Novel	2.15

Table 3. Functional classification of genes repressed more than 2-fold at dawn after treatment with 300 mM NaCl in CAM defective mutant.

Putative function	Discription of putative protein	Ratio of signal intensity
Amino acid metabolism	L-allo-threonine aldolase	0.38
	S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	0.19
	S-adenosylhomocysteine hydrolase	0.49
Nucleotide metabolism	Adenylate kinase, chloroplast (ATP-AMP transphosphorylase)	0.32
Sugars/ polysaccharide metabolism	4-alpha-glucanotransferase	0.27
	Beta-amylase (1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase)	0.32
	Myo-inositol 1-phosphate synthase	0.27
Glycolysis	Glucose-6-phosphate isomerase	0.31
Gluconeogenesis	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplast precursor	0.34
Respiration	NADH dehydrogenase subunit 4	0.43
	Formate dehydrogenase precursor, mitochondrial	0.40
C3-Photosynthesis	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, NAD <sup>+</sup> , cytosolic	0.38
	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor	0.35
	NADP <sup>+</sup> glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.28
	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, small subunit 2	0.46
	Triosephosphate isomerase	0.31
	Photosystem I reaction center subunit II precursor (PsaD)	0.16
C4-Photosynthesis/CAM	ppc1 protein	0.24
	Phosphoenolpyruvate carboxylase	0.19
	Malate dehydrogenase	0.28
Other RNA binding protein	RNA binding protein	0.27
Ribosomal proteins	Prenyl transferase	0.39
Proteolysis	Cysteine proteinase	0.08
	Cysteine proteinase 1	0.10
	Cysteine proteinase	0.21
	Cysteine proteinase 1	0.22
Other ion transporters	Nitrate/chlorate transporter	0.36
Mitochondrial H-ATPase	ATP synthase subunit d precursor	0.46
	ATP synthase F0 subunit, mitochondrial	0.44
Vacuolar H-ATPase	Proton-ATPase-like protein subunit, probable 21 kDa proteolipid	0.39
	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase c subunit, 16 kDa proteolipid	0.44
	Vacuolar H <sup>+</sup> -transporting ATPase, catalytic subunit A	0.39
	Vacuolar ATPase subunit D, Ac39 subunit	0.50
	Vacuolar proton pump subunit SFD alpha/beta isoforms	0.32
	Vacuolar H <sup>+</sup> -transporting ATPase, subunit F	0.32
Mediators	Adenylyl cyclase isoform DAC9	0.35
Defense-related	Gamma-thionin	0.41
Stress responses	Myo-inositol 4-O-methyltransferase	0.18
Detoxification	Peroxioredoxin TPx1	0.45
	Catalase	0.50
germination related gene	PGP219	0.45
Glycolysis	P-glycerol_mutase	0.16
	P-glycerate_mutase	0.40
Amino acid metabolism	Methionine synthase, cobalamin-independent	0.46
DNA binding protein	KappaE3' enhancer-binding protein NF-E1	0.48
	Unknown protein	0.49
	Unknown protein	0.27
	Putative protein	0.34
	Unknown protein	0.33
	Unknown protein	0.33
	Unknown protein	0.46
	Hypothetical protein	0.49
	Albumin 2	0.50
	GAST 1 protein homolog	0.40
	Putative adenylate cyclase	0.35
	Putative DNA binding protein	0.30
	Unknown protein	0.39
	Unknown protein	0.44
	Unknown protein	0.34
	Unknown protein	0.43
	Hypothetical protein	0.28
	Novel	0.46
	Novel	0.37
	Novel	0.34
Novel	0.50	

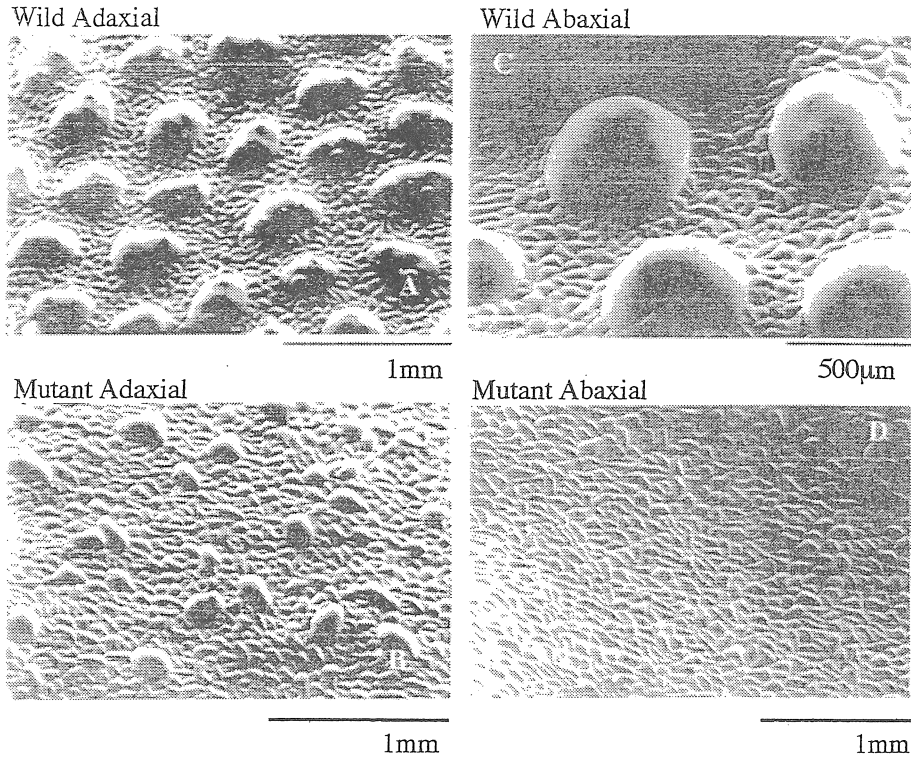


Fig. 3. Scanning electron micrographs of adaxial (A, B) and abaxial (C, D) surfaces of NaCl-treated leaves in wild (A, C) and CAM defective mutants (B, D) of *M. crystallinum*.

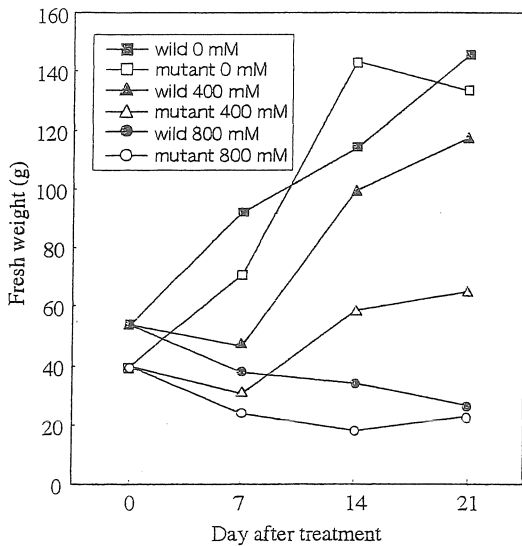


Fig. 4. Time course changes in growth of the wild type and the EBC mutant after salt treatment.

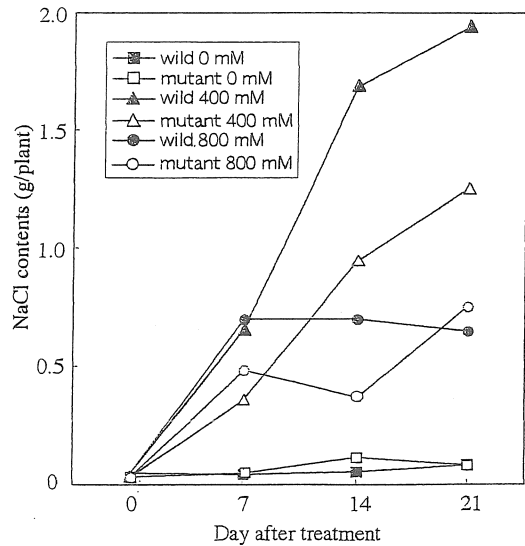


Fig. 5. Time course changes in NaCl contents in the wild type and the EBC mutant after salt treatment.

## Genetic and biochemical studies on mechanisms for salt accumulation and tolerance in the facultative CAM halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum*

Sakae Agarie and Akihiro Nose  
Faculty of Agriculture, Saga University

### Summary

*Mesembryanthemum crystallinum*, a facultative CAM halophyte, can survive and complete its life cycle under high salinity condition. Following salt stress, *M. crystallinum* shift its photosynthetic mode from C3 to CAM, and develop epidermal bladder cells (EBC) to accumulate salt into these cells. To elucidate the biochemical and molecular mechanisms that regulate these processes, we have established the large-scale mutant collections generated by irradiation of fast-neutron in *M. crystallinum*. We screened more than 30,000 plants over three generation, and we have isolated the mutants that are defective in their ability to develop CAM and EBC. Genetic and biochemical characteristics of those mutants are as follows:

#### 1. CAM defective mutant

The M3 plants of the mutant showed the even less accumulation of starch and malate than in wild type plants. We have simultaneously analyzed the expression pattern of 1600 selected genes at dawn in the wild type and the mutant using cDNA microarray. Approximately 5% of transcripts showed significant up- and down-regulation in the mutant. Seventeen unique transcripts showed at least a two-fold increase in abundance, whereas 65 genes were down regulated to a similar extent. Up-regulated genes played functional roles in sugars/polysaccharide metabolism, growth regulators, defense-related, and stress responses. In contrast, down-regulated genes were mainly involved in photosynthesis processes, vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and proteolysis, which are known to be expressed at high levels in the wild type leaves.

#### 2. EBC mutant

The EBC mutant has small EBCs with 10 to 20% volumes of the wild type EBCs, which are found only on its adaxial surfaces. The growth of the mutant was reduced by 60% of that in the wild type plants under 400 mM NaCl for three weeks. The wild type plants accumulated salt in higher extent than in the mutant leaves, but grew more than the mutant. Consequently, NaCl contents on whole plant basis were higher in wild type. These results suggest that the EBCs accumulated NaCl, and hence sequestered salt away from photosynthetic tissues still contributing to maintain photosynthetic ability under the salinity condition.

This work should provide new insights into the genetic basis of the response mechanisms that contribute to survival following exposure to high salinity stress.