

発表番号 28 (0315)

ダイズの耐塩性に関与する新規遺伝子の分子学的特徴付けと 育種素材としての検討

助成研究者：小島 俊雄（茨城大学農学部資源生物科学科）

当研究室では、良質なタンパク質や脂質、有用な生理活性物質を豊富に含み、栽培作物の中でも比較的高い耐塩性を示すダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)が潜在的に保有する塩ストレス応答機構を遺伝子レベルから解析し、ダイズの耐塩性を効果的に向上できる遺伝子(群)を探索している。これまでにcDNA-AFLP法を利用して100 mM NaClを含む水耕栽培液で3日間処理したダイズにおいて転写量を増加させる遺伝子を調査した結果、106種類のダイズ塩ストレス応答性遺伝子に由来する部分cDNA (GmTDFと命名)を単離することができた。各GmTDFのDNA配列を決定し、既知遺伝子との相同性を調査した結果、その中に3種類の未同定配列を見出した。これらの配列に由来するダイズ遺伝子は、これまでに報告のない植物の塩ストレス応答機構への関与が示唆されると共に、この解析を通じてダイズ独自に発達させた耐塩性機構を同定できるかもしれない。

そこで本研究では、ダイズに特徴的な塩ストレス応答機構とそれに基づく耐塩性能力を同定することを目的とし、未同定配列を持つ3種類のGmTDFの中から特に塩ストレスに対して強い応答性を示したGmTDF-5 (417-bp)に由来する新規ダイズ塩ストレス応答性遺伝子を単離し、遺伝子/タンパク質構造、細胞内局在性、塩ストレスに対する転写応答性を特徴付けることにした。RACE法によりGmTDF-5の全長cDNAを単離した結果、この遺伝子は367アミノ酸残基からなる推定分子量40.7-kDaのタンパク質をコードする、全長1,422-bpのイントロンレスなダイズ遺伝子であることが明らかとなった。GmTDF-5の推定アミノ酸配列に対するBLAST検索では既知配列との有意な相同性は見られなかったが、配列情報に基づく解析からDNA結合因子に多く見られるHelix-Turn-HelixやLeucine-Zipperモチーフを有していることが推測された。実際、GFPタンパク質を利用したトランジェント解析ではGmTDF-5は核、もしくはその周辺に局在することが示された。一方、塩ストレスに対するGmTDF-5の経時的な転写応答性を解析した結果、ストレス処理3時間後からその転写量が増加しはじめ、以降、時間の経過に従いその量は増加し続けた。また、GmTDF-5の転写は浸透圧の変化や乾燥、アブシジン酸処理(ABA)によっても制御されることが明らかとなった。

以上のことから、GmTDF-5はABA誘導型の新規なダイズ塩ストレス応答性遺伝子であり、核やその周辺で機能することでダイズの耐塩性機構に関与していることが示唆された。

ダイズの耐塩性に関与する新規遺伝子の分子学的特徴付けと育種素材としての検討

助成研究者：小島 俊雄 (茨城大学 農学部 資源生物科学科)

1. 研究目的

世界の全陸地面積の7%に相当する塩類集積土壌では、細胞の水分吸収率の低下やイオンバランスの恒常性異常が原因となり植物を育成することができない。しかし、地球規模で増加傾向にある劣悪環境の修復や人口の増加に伴う食糧増産を達成するには、このような塩類集積土壌でも生育できる栽培作物を開発しなければならない。これまでに多数の塩ストレス応答性遺伝子が単離され、植物が保有する塩ストレスに対する分子応答機構の一端が明らかとなった。また、一部の遺伝子は過剰発現させることで植物の耐塩性を直接高めることも報告されている。しかし、これら塩ストレス応答性遺伝子がコードするタンパク質の生理機能が耐塩性を向上させるその具体的な機構について不明な点も多い。一般に、移動性を持たない植物は周囲の環境に適応するため、長い進化の過程を経て形態や細胞、生理の各レベルで多様な能力を獲得してきている。このことから、環境適応に優れた品種を開発する場合、植物が潜在的に保有している種固有の環境ストレス応答機構を体系的に理解し、その種に適した適応(耐性)能力を選抜し、付与していくことが重要である。

当研究グループでは、タンパク質や脂質、有用な生理活性物質を豊富に含み、栽培作物の中でも比較的高い耐塩性を有するダイズ¹⁾の塩ストレス応答機構を遺伝子レベルから解析し、ダイズの耐塩性を効果的に付与できる遺伝子群の探索を進めている。これまでに系統間の微量な遺伝子発現差を検出できるcDNA-AFLP法を適用して、100 mM 塩化ナトリウム(NaCl)を含む水耕栽培液で72時間処理したダイズ栽培品種エンレイにのみ検出した106種類の部分cDNA断片をクローニングした(Fig. 1)。 *Glycine max* Transcript-Derived Fragment (GmTDF)クローンとデザインしたこれらダイズ塩ストレス応答性遺伝子候補についてDNA配列を決定し、既知遺伝子との同源性検索を実施したところ、環境ストレス応答に関与する既知遺伝子と高い同源性を示すクローン以外にも機能未知タンパク質をコードする遺伝子やESTと同源性を示すクローンも多数見出した。この結果からダイズが他の植物にも共通に存在するストレス応答機構に加えて、進化の過程で独自に発達させた応答経路や耐塩性機構を連携させることでより高い耐塩性を獲得していると予想した。実際、GmTDFクローンの中には3種類の未同定配列が存在しており、この配列に由来する新規ダイズ遺伝子はダイズ独自の耐塩性機構に大きな影響を及ぼすタンパク質をコードしている可能性がある。

そこで本研究では、未同定遺伝子の解析を通じてダイズに特徴的な塩ストレス応答機構/耐塩能力を同定するため、特に強い塩ストレス応答性を示した未同定配列、GmTDF-5 (417-bp) に由来する新規ダイズ塩ストレス応答性遺伝子を単離し、遺伝子およびそこにコードされたタンパク質の構造、緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質を利用した細胞内局在性を明らかにした。さらに、塩ストレスをはじめ、様々な環境要因に対する応答性を転写レベルから解析し、ストレス応答における新規遺伝子の機能を推測した。

2. 研究方法

2.1. 植物材料とストレス処理

本研究では、植物材料としてダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)の栽培品種エンレイ(cv. enrei)を使用した。ダイズ種子をパーミキュライト上に播種後、明期14時間/暗期10時間、温度25℃の短日条件に設定した人工気象室内で第2葉が展開するまで育成した。その後、水耕栽培液(Hoagland's Solution)に移し、第3葉が展開するまでの約3日間の順化処理を経て、各種ストレス処理を実施した。ストレス条件として100 mM 塩化ナトリウム(NaCl)、塩化カリウム(KCl)、塩化カルシウム(CaCl₂)を添加した塩ストレス、100 mM マンニトールを添加した浸透圧ストレス(高)、蒸留水のみで育成した浸透圧ストレス(低)、水分を与えず静置した乾燥ストレス、塩や乾燥ストレス応答を制御する植物ホルモン、アブシジン酸(ABA)を100 μM添加したABA処理の8処理区を設定し、それぞれ24時間処理した。また、塩ストレスに対するGmTDF-5の経時的な転写動態を明らかにするため、順化処理を終えたダイズに対して100 mM NaCl処理後、0 (コントロール)、1、2、3、4、5、6、12、24時間の個体、さらに塩ストレス処理後24時間の個体を水耕栽培液に戻し、6、12、24時間後の個体も採取した。

2.2. 全RNA抽出とノーザン解析

採取したダイズ個体の全RNAは、フェノール-SDS/LiCl法²⁾により抽出した。各ダイズ全RNAサンプル20 μgをホルムアルデヒド-MOPS/1.2%アガロースゲルで電気泳動後、キャピラリーシステムを利用してナイロン膜、Hybond N⁺ (Amersham)上にトランスファーした。なお、トランスファー溶液として10x SSCを使用した。ナイロン膜上に移した全RNA分子はメチレンブルー染色により視覚化した。ノーザン解析はRoche社のジゴキシゲニン(DIG)を用いた非アイソトープ化学発光システムを採用し、DIG application manual for filter hybridizationに記載された方法に準じて行った。なお、ハイブリダイゼーションはPCRによってDIGを取り込ませたGmTDF-5 cDNAプローブを添加した50%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液にナイロン膜を浸し、42℃で一晩反応させることで行った。洗浄/検出後、DIG-GmTDF-5の発光シグナルはX-線フィルム(New A; Konica)上に露光することで視覚化した。各シグナルはBioMax-1D Image Analysis Software (Eastern Kodak)を使用し、リボソームRNA分子を内部標準として定量化した。

2.3. cDNAクローニング

*GmTDF-5*の全長cDNAは、cDNA-AFLP法によってクローニングした部分cDNA配列、417-bpに基づいてデザインしたプライマーを使用し、RACE法(Rapid Amplification of cDNA ends)によって獲得した。なお、このRACE法の鋳型cDNAには、100 mM NaClを添加した水耕栽培液で3日間ストレス処理したダイズ全RNAから逆転写酵素、Superscript™ II RNase H⁻ reverse transcriptase (Invitrogen)によって合成したものを使用した。RACE法によって得られた*GmTDF-5* cDNAの5'-末端、3'-末端に由来する増幅断片をTA-クローニングによってプラスミドpBluescript II SK(+) (Stratagene)に挿入後、大腸菌に形質転換することでクローン化した。各クローンのDNA配列を決定した後、遺伝子解析ソフトGenetyx-Win (ver. 6; Software Development)を使用して*GmTDF-5*の全長cDNA配列、および遺伝子配列に基づいてORFを検索し、アミノ酸配列へと変換した。

*GmTDF-5*タンパク質の機能を推測するため、既知遺伝子との相同性とアミノ酸配列上に見られる特徴的な領域を調査した。*GmTDF-5*と相同性を示す既知遺伝子の探索はBLAST³⁾を利用した。アミノ酸配列は、Prositeによるドメイン検索⁴⁾、Chou-Fasman法による二次構造予測⁵⁾、Kyte & Doolittleパラメーターを利用した親水性/疎水性プロット⁶⁾によって特徴付けた。また、等電点(*pI*)と分子量(MW)はGenetyx-Winを利用して算出した。

2.4. ゲノムDNA抽出とサザン解析

ダイズゲノムDNAは、その成熟葉からCTAB法⁷⁾を利用して抽出した。ゲノムDNA 7 μgを制限酵素*Bgl*II、*Dra*I、*Eco*RI、*Hind*III (いずれもNippongene)でそれぞれ切断後、TBE/0.6%アガロースゲル電気泳動上でサイズ分画した。泳動後、キャピラリーシステムを利用してナイロン膜、Hybond N⁺上にトランスファーした。なお、トランスファー溶液として0.4 M NaOHを使用した。サザン解析は「2.2. 全RNA抽出とノーザン解析」で述べた方法と同様に行った。

2.5. GFPを用いた細胞内局在解析

PCRで増幅した*GmTDF-5*のORF領域をカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(CaMV35S)で制御されたsGFP (S65T)タンパク質発現ベクターに挿入することで、CaMV35Sで制御された*GmTDF-5*::sGFP融合タンパク質を発現するプラスミド、*pGmTDF-5*::sGFPを構築した。*GmTDF-5*-sGFPタンパク質の細胞内局在は、このプラスミドをパーティクルガンによって植物細胞内に導入後、蛍光顕微鏡によりGFPシグナルを検出することで調査した。なお、パーティクルガンはPDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System (Bio-Rad)、蛍光顕微鏡はBX-51システム生物顕微鏡(Olympus)、植物細胞はタマネギ(*Allium cepa*)表皮細胞を使用した。

3. 研究結果

3.1. 新規ダイズ塩ストレス応答性遺伝子 *GmTDF-5* の構造

cDNA-AFLP法によって得られた未同定な部分cDNA配列、*GmTDF-5*に関する遺伝子構造、およびそこにコードされたタンパク質の機能を解析するため、RACE法によりその全長cDNA配列をクローニングした。*GmTDF-5*の部分cDNA配列(417-bp)に基づいてデザインしたプライマーを利用して解析した結果、その5'-、3'-末端のそれぞれに対応するcDNA配列を得ることができた。これらの配列に基づいて*GmTDF-5*の全長cDNAを決定したところ、367アミノ酸残基に相当する単一のORFをコードする1,422-bpの長さを有していることが明らかとなった(Fig. 2)。なお、5'-側、3'-側の非翻訳領域(UTR)はそれぞれ18-bp、300-bpの長さであった。データには示していないが、ダイズのゲノムDNAを鋳型とし、*GmTDF-5*の全長を増幅するプライマーによって得られたPCR産物についてもDNA配列を決定したところ、そのcDNA配列と同一であったことから*GmTDF-5*はイントロンを保有しないダイズ遺伝子であることも明らかとなった。次に、ダイズゲノム中に存在する*GmTDF-5*の遺伝子数をサザン解析によって調査した結果、使用した4酵素、*Bgl* II、*Dra* I、*Eco* RI、*Hind* IIIのそれぞれからシグナル強度の強い一断片を検出した(Fig. 3)。*Dra* Iを除く3酵素において弱い強度のシグナルを1~2本検出しているが、部分的に低い相同性を示すDNA領域を検出していると考えられたことから、*GmTDF-5*はダイズゲノム中に単一遺伝子として存在していることが示された。

*GmTDF-5*がコードする全長367アミノ酸残基、分子量40.7-kDa、等電点5.44の推定タンパク質と相同性を示す既知遺伝子をBLASTにより検索したが、有意な相同性を示す既知遺伝子は存在しなかった。次にアミノ酸配列情報に基づいて特徴的な領域を特定するため、ドメイン検索、二次構造予測、親水性/疎水性プロット解析を行った(Fig. 2)。Prositeを利用したドメイン検索では、*GmTDF-5*タンパク質のN末端側3領域(Leu-I: 40-61、II: 57-78、III: 64-85)にL-X₆-L-X₆-L-X₆-Lのロイシンジッパー様配列を検出した。Chou-Fasman法によりこの領域の二次構造を解析すると、Leu-Iはヘリックス-ターン-ヘリックス(HTH)を形成する可能性が示された。そのほかにもHTHモチーフを形成する可能性のある領域が存在した。一方、*GmTDF-5*の推定アミノ酸配列に対してKyte & Doolittleパラメーターを用いた親水性/疎水性プロットを作成したが、その傾向に特徴的な偏りは見られなかった(Fig. 2)。

3.2. *GmTDF-5::sGFP*融合タンパク質の細胞内局在

*GmTDF-5*タンパク質の細胞内局在を明らかにするため、レポーター遺伝子の一つ、sGFP(S65T)と融合させた*GmTDF-5*タンパク質を過剰発現するプラスミドp*GmTDF-5::sGFP*を作成し、そのトランジェント解析を行った(Fig. 4)。パーティクルガンを利用してタマネギ表皮細胞に導入したp*GmTDF-5::sGFP*に由来する蛍光を検出した結果、蛍光試薬DAPIにより染色した核と同一の箇所にその蛍光は見られた。このことから、*GmTDF-5*は核、もしくはその周辺で機能するタンパク質であることが示唆された。

3.3. 塩ストレスに対する *GmTDF-5* 遺伝子の経時的な応答性

*GmTDF-5*は、100 mM NaClを含む水耕栽培液で3日間ストレス処理したダイズから得られた塩ストレス応答性遺伝子の一つである。そこで、同濃度の塩ストレスに対して示す時間的な応答性を調査するため、塩ストレス処理時間の異なるダイズから抽出したRNAに対して *GmTDF-5*をDNAプローブとするノーザン解析を行った。その結果、塩ストレス処理2時間後までにその転写は見られないが、3時間後から *GmTDF-5*の転写が活性化し、24時間後まで上昇し続けた(Fig. 5)。また、塩ストレス処理24時間後のダイズ個体を塩の含まない水耕栽培液に戻すと処理後12時間までにその転写量が半減したことから、*GmTDF-5*は塩ストレスに対して比較的早い時間で応答するダイズ遺伝子であることが明らかとなった。

3.4. 環境ストレス因子に対する *GmTDF-5* の応答性

塩ストレスは植物細胞に対して水分ポテンシャルとイオンバランスの恒常性に異常を与える。そこで、*GmTDF-5*遺伝子の環境ストレス因子に対する応答性の詳細を調査するため、塩(KCl、CaCl₂)、浸透圧(高/低)、乾燥、水分ストレスに關与する植物ホルモンABAで処理したダイズ由来のRNAに対してそれぞれノーザン解析を行った(Fig. 6)。その結果、*GmTDF-5*の転写は塩ストレスに対してはCaCl₂に対する応答性が高く、次いでNaClであったが、KClに対して *GmTDF-5*の転写は見られなかった。また、浸透圧ストレス処理では、マンニトールによる高浸透圧、蒸留水のみによる低浸透圧のいずれにおいても高い応答性が見られた。加えて、乾燥、ABA処理でも他のストレス因子同様 *GmTDF-5*の転写は見られ、そのレベルはNaCl処理と同程度であった。

4. 考察

本研究では、cDNA-AFLP法によりクローニングした未同定な部分cDNA配列、*GmTDF-5*に由来する新規のダイズ塩ストレス応答性遺伝子を単離した。全長1,422-bpからなる *GmTDF-5*は、ダイズゲノム中に単一で存在するイントロンレス遺伝子であった(Fig. 2, 3)。*GmTDF-5*は367アミノ酸からなる分子量40.7-kDa、その等電点を酸性側($pI = 5.44$)にもつタンパク質であり、BLAST検索の結果から未同定タンパク質をコードしていることが明らかとなった。*GmTDF-5*のN末端側にはタンパク質二量体を形成するロイシンジッパー様配列が3領域(Leu-I, II, III)で重なるように見出されたことから、その領域の二次構造は α -ヘリックスを構成することが推測された。しかし、Chuo-Fasman法により二次構造を予測した結果、Leu-II, IIIに相当するアミノ配列は β -シートを形成する傾向にあることからロイシンジッパー構造の示す機能は有していないことが推測された。一方、Leu-Iは α -ヘリックスを形成するがその間にターン構造の存在が予測されたことから、ロイシンジッパー様構造よりもHTHモチーフを形成する可能性の高いことが示された。HTH、ロイシンジッパー構造共にDNA結合タンパク質によく見られる構造であることから、*GmTDF-5*は核に局在するタンパク質であることが考えられた。そこで、*GmTDF-5*とGFPを融合したタンパク質を用

いたトランジェント解析によりその細胞内局在を明らかにした結果、GFPのシグナルは核に局在することが明らかとなった(Fig. 4)。このことはGmTDF-5が核内、もしくはその周辺で機能する新規なダイズ塩ストレス応答性遺伝子であることを示唆した。

*GmTDF-5*の塩ストレスに対する応答性を転写レベルで調査した結果、ストレス処理後3時間でその転写を検出することができた(Fig. 5)。以降、時間の経過と共にその転写量は増加傾向を示した。さらに、環境ストレス因子に対する応答性を調査した結果、塩や浸透圧、乾燥という水分ストレスに対して高い応答性を示すことが明らかとなった(Fig. 6)。しかし、塩ストレスにおいてNaClやCaCl₂に対して高い転写応答性が見られた一方、KClに対して転写量の増加が見られなかったことから、*GmTDF-5*の転写は塩ストレスを構成する陽イオンに対して選択性を示すかもしれない。水分ストレス応答を制御する植物ホルモン、ABAで処理した結果、*GmTDF-5*の転写が高いレベルで誘導されていた(Fig. 6)。植物のストレス応答経路にはABAを介する経路と介さない経路の2つが存在しているが⁸⁾、*GmTDF-5*の遺伝子発現はABAを介する経路に位置していることが明らかとなった。

以上のことから、*GmTDF-5*はABA応答型の新規なダイズ塩ストレス応答性遺伝子であり、そこにコードされたタンパク質はDNA結合性を示すHTHモチーフやロイシンジッパー領域を持ち、核内、もしくはその周辺で機能することが推測された。しかし、*GmTDF-5*のアミノ酸配列上には核移行シグナルが見出されていないことから、本当にDNA結合因子として機能しているか断定することはできない。事実、3D-1D法⁹⁾によりGmTDF-5のタンパク質立体構造を予測し、既知の立体構造と比較した結果、マウスの核輸送タンパク質と類似する構造を持つことが推測された(データは示していない)。現時点で、GmTDF-5タンパク質の分子機能を特定することはできないが、この新規なダイズ塩ストレス応答性遺伝子に関する詳細な解析を進めていけば、ダイズだけでなく高等植物における新しい塩ストレス応答経路を同定できる可能性があり、分子生物学的にも育種学的にも有用な知見を提供できるであろう。

今後の課題

現在、*GmTDF-5*を過剰発現する形質転換植物をシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)を利用して作出している。宿主となるそれぞれの野生型からゲノムDNAを抽出し、*GmTDF-5*をDNAプローブとしてサザン解析を行ったところ、ミヤコグサではシグナルを検出したが、シロイヌナズナでは検出されなかった。このことから同じマメ科であるミヤコグサはGmTDF-5が関与する応答経路を保有し、シロイヌナズナにはそれが存在しないと推測された。両者において過剰発現させた場合に獲得できる耐塩性を比較評価することで、ダイズだけでなく他の植物への汎用性も検討する。さらに、上述の形質転換体を活用してGmTDF-5の分子機能を明らかにし、GmTDF-5が関与するダイズ塩ストレス応答機構およびその耐塩性を特徴付ける。

引用文献

- 1) **Larcher, W.** (1994) *Okophysiologie der Pflanzen*, 5. Auflage. Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart, Germany (Japanese Translation edition, Springer-Verlag Tokyo).
- 2) **Shirzadegan, M., Christie, P., Seemann, J.R.** (1991) An efficient method for isolation of RNA from tissue cultured plant cells. *Nucl. Acid Res.* 19:6055.
- 3) **Altschul, S.F., Thomas, L.M., Alejandro, A.S., Jingui, Z., Zheng, Z., Webb, M., David, J.L.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid Res.* 25:3389-3402.
- 4) **Prosite website:** <http://www.expasy.ch/prosite/>
- 5) **Chou, P.Y., Fasman, G.D.** (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-148.
- 6) **Kyte, J., Doolittle, R.F.** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- 7) **Murray, M.G., Thompson, W.F.** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acid Res.* 8:4321-4325.
- 8) **Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115:327-334.
- 9) **Ota, M., Nishikawa, K.** (1997) Assessment of pseudo-energy potentials by the best-five test: a new use of the three-dimensional profiles of proteins. *Protein Eng.* 10:339-351.

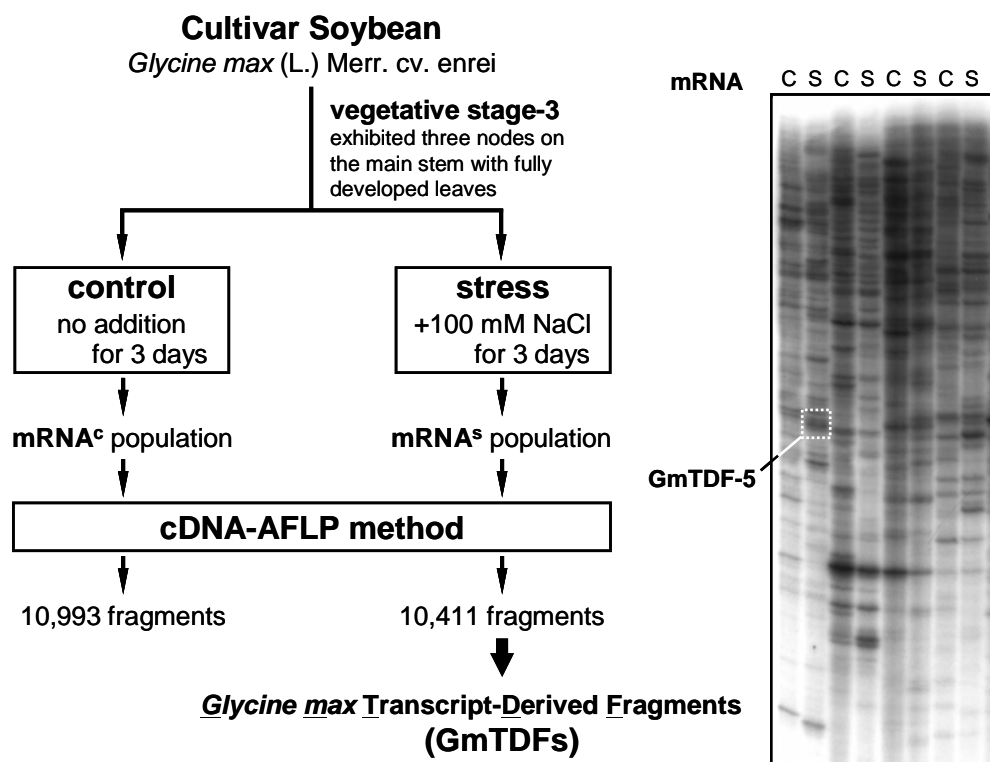


Fig. 1. *Glycine max* Transcript-Derived Fragment No.5, *GmTDF-5*, detected differentially in 100 mM NaCl-treated soybean, as displayed by cDNA-AFLP method.

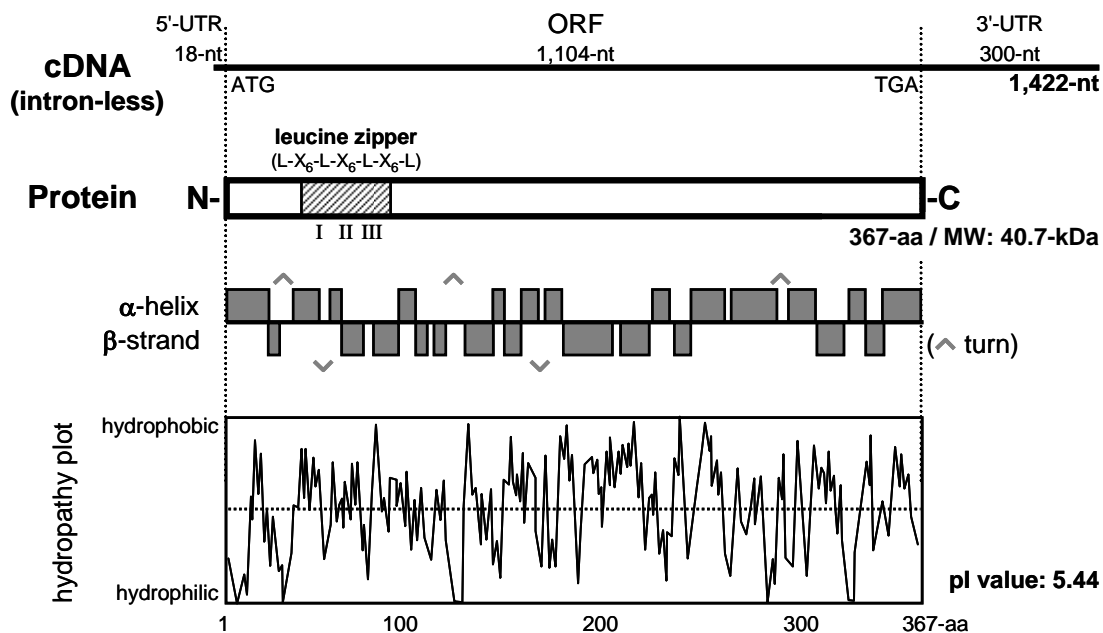


Fig. 2. Structural profile of a novel salt-inducible gene, *GmTDF-5*, in soybean.

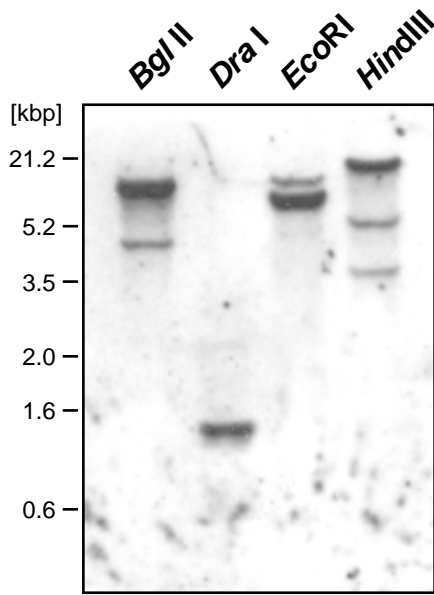


Fig. 3. Gene distribution of *GmTDF-5* on soybean genome detected by Southern blot hybridization.

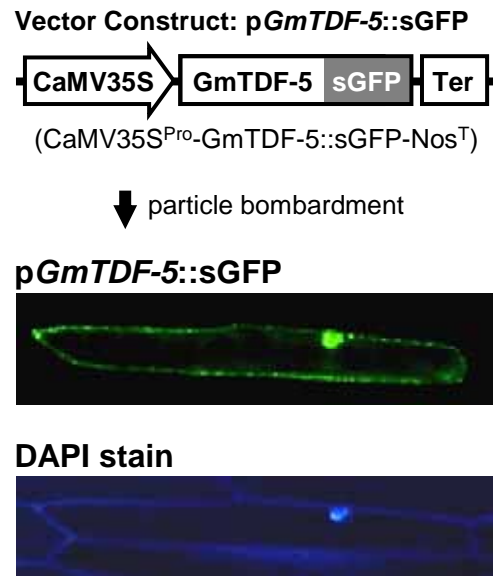


Fig. 4. Subcellular localization of the *GmTDF-5::sGFP*-fused protein in plant cell.

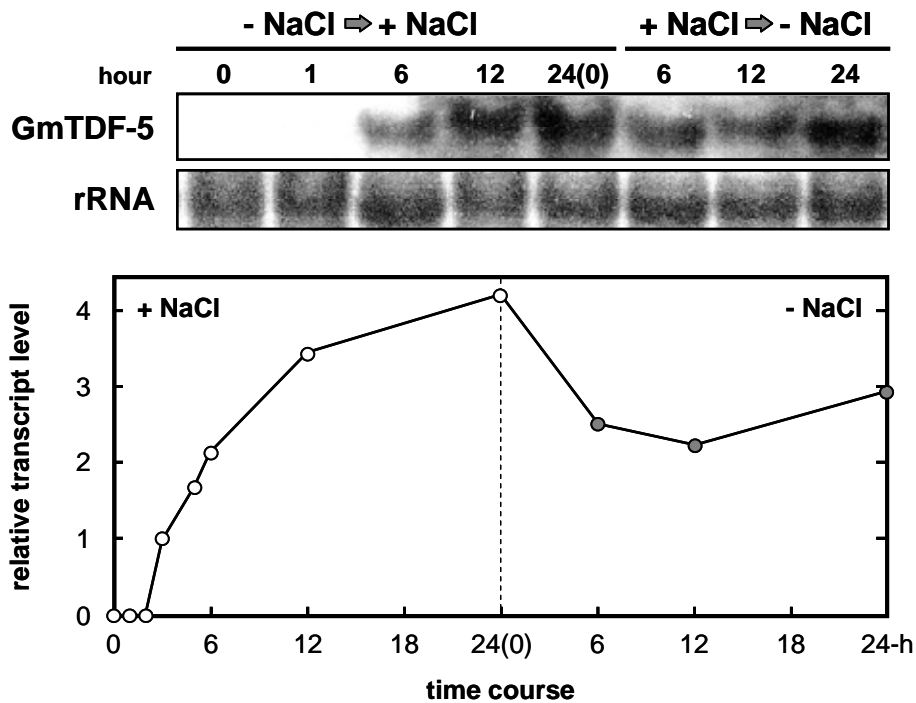


Fig. 5. Temporal induction of *GmTDF-5* transcription in response to 100 mM NaCl treatment detected by Northern blot hybridization.

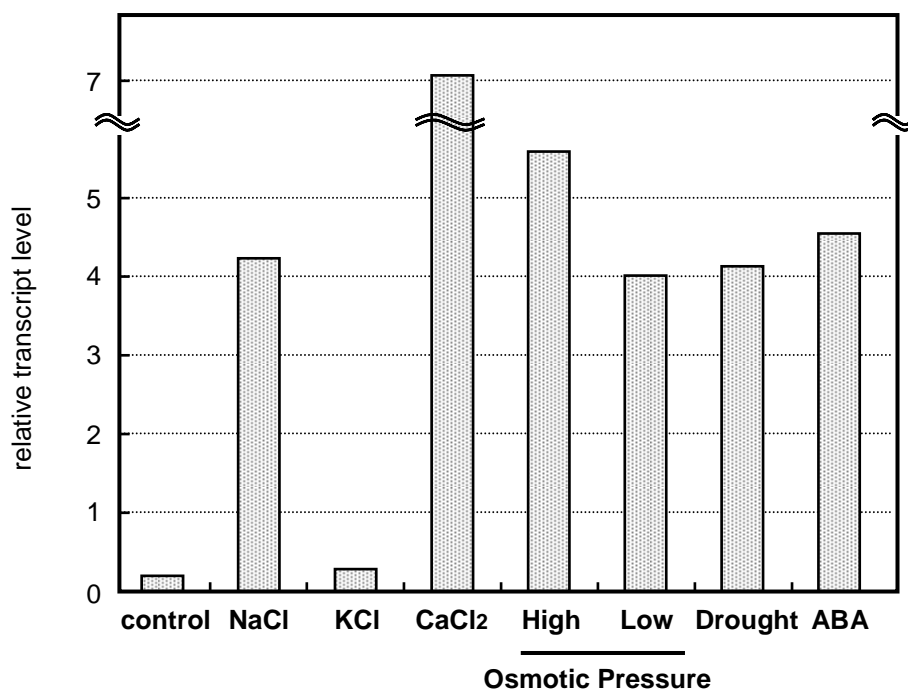


Fig. 6. Transcriptional induction of *GmTDF-5* gene to various environmental stresses and a biochemical metabolite.

Molecular Cloning and Characterization of Novel Salt-Inducible Gene *GmTDF-5* Involved in Soybean Salt Tolerance towards Improvements in Crops

Toshio Kojima

School of Agriculture, Ibaraki University

Summary

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), which contains abundant proteins, lipids and valuable chemical metabolites and is a major source of protein and vegetable oil for human nutrition, has a higher salt tolerance in comparison with other crops. To understand salt responsive/adaptable mechanism in soybean, we have screened salt-inducible genes, differentially transcribed in soybean treated with 100 mM NaCl for 3 days, by cDNA-AFLP method. As a result, 106 of partial cDNAs from salt-inducible genes were cloned and designed as *Glycine max* Transcript-Derived Fragment (GmTDF). Of them, 3 GmTDFs were unidentified nucleotide sequences as compared to known ones in DNA databases. This suggests that soybean genes from these clones encode novel proteins involved in plant salt tolerance.

Final objective of our study is identification of salt responsive mechanisms and its tolerant abilities unique to soybean via molecular characterization of the unidentified salt-inducible genes. In this report, we characterized the gene/protein structure, subcellular localization and transcriptional response to salt stress of an unidentified clone, *GmTDF-5*. A 1,422-bp of full-length cDNA for *GmTDF-5* gene encodes a putative protein of 367 amino acid residues and has a calculated molecular mass and an isoelectronic value of 40.7-kDa and 5.44, respectively. GmTDF-5 protein is characterized based on its sequence profiles as an unidentified protein with helix-turn-helix motif and leucine-zipper motif and, interestingly, localized on and/or around nucleus as detected by transient analysis using the GFP-fused GmTDF-5 protein. Temporal transcription of *GmTDF-5* gene in response to 100 mM NaCl stress was induced at 2- to 3-hour after stress treatment and was increased by 24-hour. In addition, *GmTDF-5* transcription was also regulated by other environmental factors, such as osmotic pressure, drought and a plant hormone abscisic acid (ABA).

These results suggest that the *GmTDF-5* gene might function as one of DNA-binding factors in soybean salt tolerance.