

発表番号 37 (0325)

野生稲 (*Oryza latifolia* Desv.) の塩ストレス耐性機構の解明

助成研究者：村山盛一 (琉球大学 農学部)

共同研究者：東江 栄 (佐賀大学 農学部)

これまでイネの耐塩性に関する研究は栽培品種に限られており、塩の吸収量を低く抑える根の塩排除機能が、イネの一般的な耐塩性機構と考えられてきた。我々は、国際農林水産業研究センターと共同で、栽培品種が枯死するような高塩環境下でも生育できる野生稲 *Oryza latifolia* を選抜することに成功した。この野生種は、塩排除能が低く、栽培種に比べ塩を多量に吸収蓄積するが、塩濃度の高い葉身においても光合成速度を維持するというこれまで報告の無い新しい耐塩性機構を有していることが明らかとなった。

本種の光合成能力維持機能を調べるために、まず液相型酸素電極法で異なる NaCl 濃度存在下における葉身の光合成速度を測定したところ、光合成速度は *O. rufipogon* に比べほとんど低下せず、*O. latifolia* では葉肉部の光合成器官の耐塩性が高いことが示唆された。さらにチラコイド膜を単離し同様な測定を行ったところ、ここでも *O. latifolia* の値が高く、チラコイドの耐塩性の高さが光合成速度の耐塩性の基盤であることが示唆された。

*O. latifolia* のチラコイド膜の光合成速度が高塩環境下でも維持される要因を、チラコイド膜のタンパク質組成から検討した。まず SDS - PAGE で調べたところ、*O. latifolia* はチラコイド膜に 20.3 kDa, 及び 22.4 kDa の本種に特異的なタンパク質を有していることが明らかとなった。ついでこれらのタンパク質について二次元電気泳動法を用いて詳細に調べた結果、SDS-PAGE でみられた 20.3 kDa, 及び 22.4 kDa のタンパク質はそれぞれ少なくとも二つ、及び三つのタンパク質を含んでいることが明らかとなった。

以上の結果から、*O. latifolia* はチラコイド膜の耐塩性が高く、高 NaCl 条件下でも光合成能力を維持することができること、またチラコイド膜に本種に特異的なタンパク質を有していることがわかった。



野生稲 (*Oryza latifolia*) の塩ストレス耐性機構の解明

助成研究者：村山盛一 (琉球大学 農学部)

共同研究者：東江 栄 (佐賀大学 農学部)

## 1. 研究目的

熱帯・亜熱帯を中心とする乾燥地域では、塩類を多く含んだ低質水の灌漑や不適切な排水により、塩類集積土壌が急速に増加している。また湿潤地帯においても過剰施肥や地下水水位の上昇によって同様なことが起きている。今後食糧の需要が増加することが予想されることから、塩類集積土壌や汽水域においても生育できる新規作物の育成は急務である。

これまでイネの耐塩性に関する研究は栽培品種に限られており、根における塩の排除機能が、イネの一般的な耐塩性機構と考えられてきた。最近、申請者らは、国際農林水産業研究センターと共同で、栽培品種が枯死するような高塩環境下でも生育できる野生稲を選抜することに成功した。この野生稲 *Oryza latifolia* は、耐塩性品種として知られる SR26B よりも多くの塩を吸収・蓄積するが、SR26B が枯死する高塩環境下でも生育できる。また、通常イネでは、塩の吸収に伴い葉身の水ポテンシャルは低下し、それに伴い光合成速度も低下するが、*O. latifolia* の光合成速度はそのような環境下でも維持された。

本研究では、*O. latifolia* の耐塩性機構を明らかにするために、高塩環境下における葉身、及びチラコイド膜の光合成能力を測定し、さらにチラコイド膜のタンパク質組成を調べ、耐塩性栽培品種、感受性栽培品種、及び感受性野生稲間で比較した。

## 2. 研究方法

## 2.1. 栽培方法

葉身の光合成速度、及びチラコイド膜の酸素放出速度の測定には、耐塩性野生稲、*Oryza latifolia* Desv (IRGC Acc .No .100965)、及び感受性野生種 *O. rufipogon* Griff. (IRGC Acc .No . 105390) を供試した。また、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS PAGE) には、これらの品種に加え、比較品種として *O. sativa* L. の耐塩性品種 SR26B、及び同感受性品種 IR28 を供試した。野生稲の種子は、籾殻を取り除き 45 条件下で 3 日間静置し休眠打破した。予措として種子をベンレート T 水和剤 2000 倍希釈液に 24 時間浸漬し、水洗後 32 で 24 時間水に浸種した。播種後、葉齢が 3~4 葉期に達した幼苗を吉田氏液 (Yoshida et al. 1976) を用い、ガラスハウス内において水耕栽培した。実験には第 8~11 葉期の植物体を用いた。SDS PAGE と二次元電気泳動 (2 DE) には、明期、暗期をそれ

ぞれ 14 時間及び 10 時間 , 室温を明期 28 , 暗期 21 に設定したグロースチャンバーで生育させた植物体を用いた .

## 2.2 光合成速度の測定

光合成速度は , 葉身の酸素放出速度で評価した . 測定は , 液相型酸素電極( Clark-type, Rank Brothers, England ) を用いて Ishii et al. ( 1977 ) の方法で行なった . 最上位展開葉の中央  $1\text{cm}^2$  を採取し ,  $0.5\text{mM}$  硫酸カルシウムを含む  $50\text{mM}$ HEPES ( pH7.2 ) 緩衝液中で  $2\text{mm} \times 2\text{mm}$  に細断した . NaCl を終濃度で 100 , 300 , 及び  $655\text{mM}$  となるよう加えた緩衝液に葉片を加え , 光照射後 ,  $30\text{mM}$ NaHCO<sub>3</sub> を添加して反応を開始させた . 測定時の緩衝液の温度は 25 , 光強度は  $1200\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  とした . 測定後 , 葉片を集めて  $-80$  に保存し , クロロフィル含量の測定に用いた . 測定は , Porra et al. ( 1989 ) の方法に従った .

## 2.3 チラコイド膜の単離

チラコイド膜の単離は , Kura Hotta et al. ( 1987 ) の方法で行なった . 最上位展開葉  $1.8\text{g}$  を細断し ,  $50\text{mM}$ HEPES NaOH ( pH 7.5 ) ,  $400\text{mM}$  スクロース ,  $10\text{mM}$  塩化ナトリウム , 及び  $5\text{mM}$  塩化マグネシウムを含む緩衝液  $30\text{ml}$  とともにホモジナイザー ( SM KM37, Sanyo ) で 30 秒間破碎した . 懸濁液をミラクロス ( Calbichem, USA ) でろ過し , ろ過液約  $8\text{ml}$  を  $4$  ,  $250 \times g$  で 5 分間遠心分離した . さらに上清液を  $4$  ,  $5500 \times g$  で 15 分間遠心分離し , 得られた沈殿物をチラコイド膜サンプルとして酸素放出速度の測定に用いた . 光による分解を避けるため , これらの作業はすべて弱光下で行なった .

## 2.4 チラコイド膜の酸素放出速度の測定

単離したチラコイド膜を ,  $400\text{m}$  スクロース ,  $10\text{mM}$  塩化ナトリウム ,  $5\text{mM}$  塩化マグネシウム , 及び  $50\text{mM}$ HEPES NaOH ( pH 7.5 ) 緩衝液に懸濁し , 液相型酸素電極( Clark type, Rank Brothers, England) を用いて酸素放出速度を測定した . 測定は , ジメチルスルホキシド ( DMSO ) に溶解した  $1\text{mM}$  フェニル *p* ベンゾキノン ( PPBQ ) をチラコイド膜の懸濁液に添加し反応を開始させ , 光強度  $1200\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  で行なった . NaCl は , 終濃度 100 , 300 , 及び  $655\text{mM}$  となるよう緩衝液に加えた .

## 2.5 チラコイド膜タンパク質の SDS PAGE

$0.3 \sim 0.4\text{g}$  の葉身から単離したチラコイド膜を ,  $0.06\text{M}$ Tris HCl ( pH 6.8 ) ,  $5\%$  ( w/v )  $\beta$ メルカプトエタノール ,  $2\%$  ( w/v ) ドデシル硫酸ナトリウム ( SDS ) , 及び  $5\%$  ( w/v ) グリセロールを含む SDS 可溶化液 ( Henriques et al.1975 ) に懸濁し ,  $90$  で 1 分間熱処理した . SDS PAGE は Laemmli ( 1970 ) の方法に従い ,  $10\%$  ( v/v ) のスラブゲルで行なった . 泳動に用いたサンプルのタンパク質含量は ,  $1\mu\text{g}$  とした . ゲルの染色には , クマシーブリ

リアントブルーR 250 を用いた。タンパク質含量は、ブラッドフォード法( Bradford 1976) で測定した。

## 2.6 チラコイド膜タンパク質の 2 DE

チラコイド膜タンパク質の可溶化は、Rabilloud( 1988 )の方法を一部改変して行なった。すなわち、7M 尿素、2M チオ尿素、2mM トリブチルホスフィン、4% 3 [(3 コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ] 1 プロパンスルホンサン、0.5%トリトン X 100、0.5%IPG buffer ( pH 3 pH10)( Amersham Bioscience ) を含む緩衝液にチラコイド膜サンプルを懸濁した。一次元目の等電点電気泳動には、一次元用プレキャストゲル( Immobiline DryStrips pH 3 10) を用いた。二次元目の SDS PAGE には、二次元用プレキャストゲル( ExcelGel SDS XL) を用いた。泳動に用いたサンプルのタンパク質含量は、30 $\mu$ g とした。ゲルは、サイプロルビー( Bio Rad) で染色し、染色されたタンパク質のスポット検出には、Typhoon 9000E ( Amersham Bioscience ) を用いた。スポット解析は、Image Master 2D software( Amersham Pharmacia Biotech) を使用し、タンパク質の等電点( pI) と分子量( Mw) を元にした相同性検索には、ExPASy TagIdent tool ( <http://tw.expasy.org/tools/tagident.html>) を利用した。等電点、及び分子量の検索範囲は、等電点 $\pm$ 0.1、及び分子量 $\pm$ 10%とした。

## 3. 研究結果

### 3.1 光合成速度に及ぼす NaCl の影響

液相型酸素電極を用い、反応液中の NaCl 濃度をかえて酸素放出速度を測定した( Fig. 1)。300mMNaCl 存在下で *O. latifolia* の光合成速度は、無処理区とほぼ同じ値だったのに対し、感受性種 *O. rufipogon* では約 25%低下した。655mMNaCl 存在下の酸素放出速度は、*O. latifolia* では処理前の約 60%、*O. rufipogon* では約 30%まで低下した。無処理区と 655mMNaCl 処理区との間には 5%水準で統計的に有意な差が認められた。また、両品種間にも 5%水準で有意差が認められた。

液相型酸素電極法では、気孔の影響を除いた光合成能力を測定することができる。また測定に供試した葉身には浸透調節等の塩ストレスに対する適応反応は起きていないと考えられるため、*O. latifolia* は光合成を支配する気孔以外の要因、すなわちチラコイド膜の光化学反応系や細胞質の炭酸固定反応系の耐塩性が高いことが示唆された。

### 3.2 チラコイド膜の酸素放出速度に及ぼす NaCl の影響

*O. latifolia* の光合成速度が NaCl 存在下で維持される要因として、チラコイド膜の酸素放出速度に及ぼす NaCl の影響を調べた。野生稻ではチラコイド膜を単離した例はこれまでなかったため、まず電子授与体の有無が酸素放出に及ぼす影響を調べた。その結果、チラコイド膜の酸素放出は、電子授与体である PPBQ の存在下でのみ観察され、本研究で単離

したチラコイド膜標本は、電子を授与する夾雑物をほとんど含んでいないと考えられた。この標本を用いてチラコイド膜に及ぼす NaCl の影響を調査した (Fig. 2)。*O. latifolia* の酸素放出速度は、300mM NaCl 存在下では無処理区とほとんど変わらず、655mM NaCl 存在下の酸素放出速度は無処理区の 87%であった。NaCl 処理区間には統計的な有意差は無く、NaCl の影響をほとんど受けていないと考えられた。一方、*O. rufipogon* では、300mM、及び 655mM NaCl 存在下の酸素放出速度がそれぞれ、無処理区の 90%、及び 70%となった。NaCl 処理を込みにした場合、両品種間に 5%水準で有意差が認められた。これらの結果は、*O. latifolia* のチラコイド膜自体の耐塩性が、*O. rufipogon* のそれよりも高いことを示している。

### 3.3 SDS PAGE によるチラコイド膜タンパク質の解析

*O. latifolia* のチラコイド膜の耐塩性を、チラコイド膜のタンパク質組成から検討した (Fig. 3)。ここでは比較品種として耐塩性品種 SR26B、及び感受性品種 IR28 も合わせて検討した。その結果、*O. latifolia* のチラコイド膜には、分子量 20.3 及び 22.4 kDa の本種に特異的なタンパク質があることがわかった。また、*O. rufipogon*、SR26B、及び IR28 のバンドパターンは互いによく似ており、これらのチラコイド膜には *O. latifolia* には無い分子量 24kDa のタンパク質が存在していた。

#### 3.4.2 DE を用いたチラコイド膜タンパク質の解析

SDS PAGE でみられた *O. latifolia* に特異的なタンパク質をさらに詳細に解析するために、2 DE を用いて *O. latifolia* と *O. rufipogon* のタンパク質組成を比較した (Fig. 4)。その結果、*O. latifolia* では約 200 個の、*O. rufipogon* では約 180 個のタンパク質が検出された。また SDS PAGE では検出できなかった低分子のタンパク質、特に等電点約 9 付近のタンパク質に両者で顕著な違いがあることがわかった。

SDS PAGE による解析で、*O. latifolia* にみられた分子量 20.3 及び 22.4 kDa の特異的なタンパク質は、2 DE の結果、それぞれ二つ (29, 31) 及び三つ (28, 32, 34) の等電点の異なるタンパク質を含むことがわかった。また、*O. rufipogon* の SDS PAGE における 24 kDa のバンドは、2 DE の結果から一つのタンパク質 (25) であることがわかった。

上記のタンパク質について等電点と分子量をもとに ExPASy TagIdent tool による相同性検索を行なった (Table 1)。その結果、*O. latifolia* のタンパク質 31 は、トマトのクロロフィル a b 結合タンパク質 6A、トマトやシロガラシ等の葉緑体前駆物質、ジャガイモやシロガラシ等の酸素放出エンハンサータンパク質 2、シロイヌナズナのチラコイドルーメン 21.5 kDa タンパク質、及びトウモロコシやミヤコグサ等の光化学系 Ⅱ 集合タンパク質 ycf3 等と類似する特性を有していることが示唆された。また、タンパク質 32 の等電点と分子量は、キュウリ等の酸素放出エンハンサータンパク質 2 と類似し、28, 29, 及び 34

は、報告が無く、未知のタンパク質である可能性が高い。*O. rufipogon* に特異的なタンパク質(25)は、緑藻やシロイヌナズナの酸素放出エンハンサータンパク質11、キュウリやトウモロコシ等の葉緑体前駆物質、及びトウモロコシ等のクロロフィル a b 結合タンパク質151と同様の等電点と分子量をもっていた。

#### 4. 考察

##### 4.1 葉身の光合成、及びチラコイド膜の酸素放出における耐塩性

イネの塩ストレスにともなう光合成速度の低下要因については、多くの報告があり(Kawasaki et al. 2001)、以下の3つに大別することができる。すなわち、1)水ポテンシャルの低下による気孔の閉鎖、2)炭酸固定に関わる酵素の失活、及び3)葉内の炭酸ガス拡散抵抗の増大である。今回実験に供試した葉身は、塩ストレスをうけていない個体から採取したため、適合溶質の蓄積や、液胞内への塩の隔離といった塩ストレスに対する適応反応が少なく、また細断して  $\text{NaHCO}_3$  を高濃度(30mM)に含む緩衝液で測定したため、葉片内外の基質の濃度勾配が大きく、葉組織内への炭酸ガス拡散抵抗は小さいと考えられる。したがって、NaCl 存在下での酸素放出速度が *O. latifolia* で維持されたのは、葉身の光合成関連酵素あるいは、チラコイド膜の NaCl に対する耐性の高さを示していると考えられる。

一般に、細胞質にある光合成関連酵素群の耐塩性は低く、耐塩性の高い塩生植物でも酵素の耐塩性は中生植物と同程度である(Flowers et al.1977)。また、シアノバクテリアでは、NaCl 存在下で光合成能力の高い変異株のチラコイド膜が高い耐塩性を示すことが示されている(Chauhan et al. 2000)。このようなことから本研究では、光合成速度に違いを生じさせる要因としてチラコイド膜に着目し、NaCl 存在下におけるチラコイド膜からの酸素放出速度を *O. latifolia* と *O. rufipogon* とで比較することにした。本研究では、光合成速度の測定と同様、浸透調整の影響をなくすために塩処理していない葉身からチラコイド膜を単離し、緩衝液に NaCl を添加して酸素放出速度を測定した。NaCl 存在下でのチラコイド膜の酸素放出速度は (Fig. 2)、*O. latifolia* で高く、本種チラコイド膜の耐塩性の高さが示唆された。また葉身の光合成速度と比較すると、*O. latifolia* の葉身の光合成速度は NaCl 処理で40%低下したのに対し、チラコイド膜の低下率は13%であり、葉身よりチラコイド膜の方が NaCl に対する耐性が高かった。

光化学系に及ぼす NaCl の影響を調べた報告は少ないが、光化学系 II の活性は、イネ(Hoshida et al. 2000)では150mM NaCl で14日間、シアノバクテリア(Allakhverdiev et al. 2001)では500mM NaCl で4時間処理するとほとんど消失する。イネでは、光化学系 II の酸化による損傷が、シアノバクテリアでは、光化学系 II 複合体の酸素放出部位の損傷が原因と考えられている。*O. latifolia* のチラコイド膜の酸素放出速度が NaCl 存在下で維持されたことは、本種の光化学系 II の耐塩性を示唆している。

#### 4.2 耐塩性に関わるチラコイド膜タンパク質

耐塩性の高い要因を明らかにするため、チラコイド膜タンパク質の組成を SDS PAGE で調べた。ここでは、耐塩性品種の SR26B 及び感受性品種の IR28 も比較品種として供試した。*O. latifolia* のバンドパターンは他の3種と大きく異なり、20.3 kDa、及び22.4 kDa 付近にこの種に特異的なバンドが見出された。*O. latifolia* 以外の3種、すなわち *O. rufipogon*、SR26B、及び IR28 のバンドパターンはお互いに良く似ていた。これら3種のゲノムタイプは AA であり、*O. latifolia* のそれは CCDD ゲノムであることと関連しているのかもしれない。イネのゲノムタイプとチラコイド膜タンパク質の組成との関係を論じた報告はほとんど無く、この結果はイネの進化の観点からみて興味深い。

チラコイド膜タンパク質の網羅的解析を行った例はまだ少ないが、Ramani and Apte (1997) は、イネを3日間 100 mM NaCl 存在下で栽培し、莖葉に誘導されるタンパク質を 2 DE で調べ、塩処理によって35個のタンパク質が発現し、17個のタンパク質の発現が抑制されることを明らかにした。本研究では、*O. latifolia*、及び *O. rufipogon* のチラコイド膜のタンパク質をそれぞれ約200個、及び約180個分離し、両野生種に特異的なタンパク質を検出することができた(第1表)。*O. latifolia* に特異的に見られたタンパク質は、クロロフィル a-b 結合タンパク質 6A、葉緑体前駆物質、酸素放出エンハンサータンパク質 2、チラコイドルーメンタンパク質、及び光化学系 集合タンパク質 *ycf3* 等と等電点、及び分子量が類似していた。このように光化学系に関連したタンパク質が *O. latifolia* で多く発現していることは、チラコイド膜の耐塩性の高さとの関連性を示唆している。

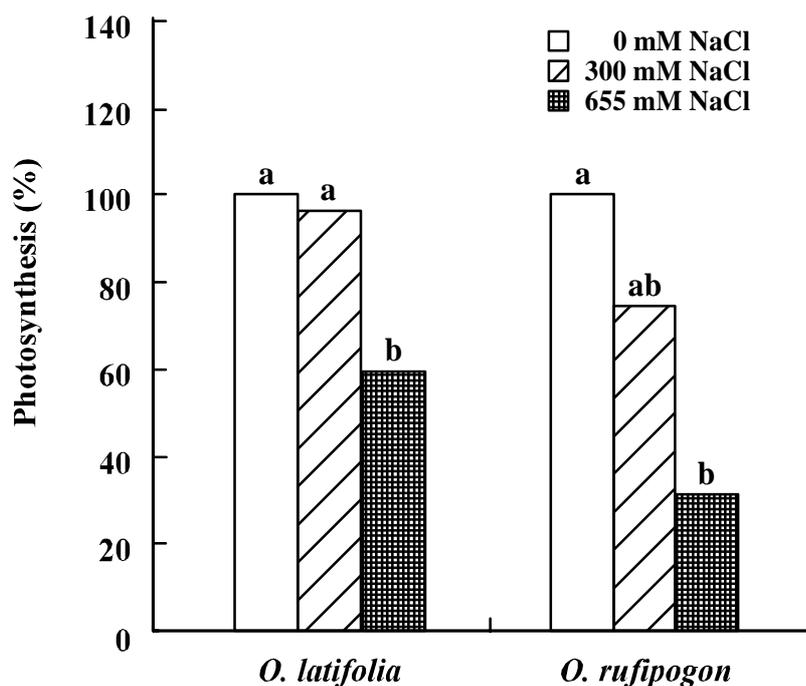
#### 5. 今後の課題

SDS-PAGE、及び 2 DE による解析から、*O. latifolia* には本種に特異的なタンパク質を有していることがわかった。今後はペプチドマスフィンガープリント法、シーケンスタグ法、及びエドマン分解法などによって本種特異的なタンパク質のアミノ酸配列を決定し、耐塩性に関与するタンパク質、及びそれをコードする遺伝子を同定していきたい。

#### 6. 文献

- Allakhverdiev, S.I., M. Kinoshita, M. Inaba, I. Suzuki and N. Murata 2001. Unsaturated fatty acids in membrane lipids protect the photosynthetic machinery against salt induced damage in *Synechococcus*. *Plant Physiol.* 125:1842-1853.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Chauhan, V.S., B. Singh, S. Singh, R.K. Gour and P.S. Bisen 2000. Isolation and characterization of the thylakoid membranes from the NaCl Resistant ( $\text{NaCl}^r$ ) mutant

- strain of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Curr. Microbiol.* 41:321-327.
- Flowers, T.J., P.F. Troke and A.R. Yeo 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:89-121.
- Henriques, F., W. Vaughan and R. Park 1975. High resolution gel electrophoresis of chloroplast membrane polypeptides. *Plant Physiol.* 55:338-339.
- Hoshida, H., Y. Tanaka, T. Hibino, Y. Hayashi, A. Tanaka, T. Takabe and T. Takabe 2000. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol. Biol.* 43:103-111.
- Ishii, R., T. Yamagishi and Y. Murata 1977. On a method for measuring photosynthesis and respiration of leaf slices with an oxygen electrode. *Jap. J. Crop Sci.* 46:53-57.
- Kawasaki, S., C. Borchert, M. Deyholos, H. Wang, S. Brazille, K. Kawai, D. Galbraith and H. J. Bohnert 2001. Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice. *The Plant Cell.* 13:889-905.
- Kura Hotta, M., K. Satoh and S. Katoh 1987. Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* 28:1321-1329.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Porra, R.J., W.A. Thompson, P.E. Kriedemann 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents : Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975:384-394.
- Rabilloud, T. 1998. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19:758-760.
- Ramani, S. and S.K. Apte 1997. Transient expression of multiple genes in salinity stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Bura Rata. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233:663-667.
- Yoshida, S., D. A. Forna, J. A. Cock and K. A. Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. : 62.



**Fig. 1. Leaf photosynthesis of wild *Oryza* species in different NaCl conditions.**

Leaf photosynthesis estimated by oxygen evolution.

0mM NaCl value of *O. latifolia* and *O. rufipogon* was 89 and 78  $\mu\text{molO}_2 \text{mgChl}^{-1} \text{hr}^{-1}$ , respectively. Values represent mean of three or four plants per treatment.

Means followed by the same letters are not significantly different at 5% of probability according to Fisher multiple range test.

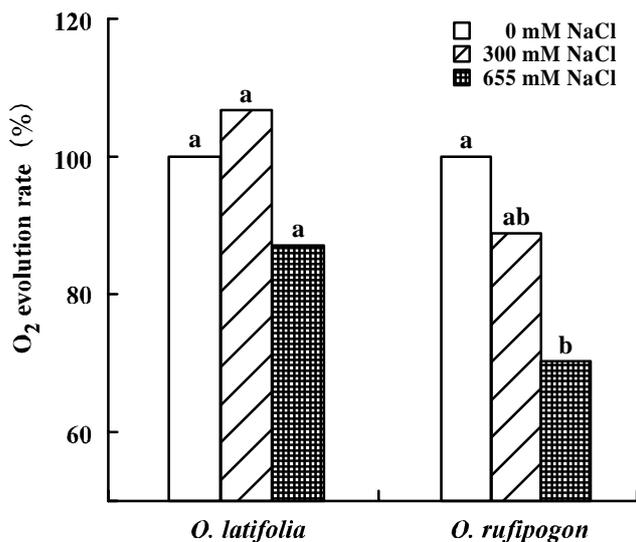


Fig. 2. O<sub>2</sub> evolution rate of thylakoid membrane in wild *Oryza* species. Initial values of *O. latifolia* and *O. rufipogon* were 33 and 58  $\mu\text{molO}_2 \text{mgChl}^{-1} \text{hr}^{-1}$ , respectively. Values represent mean of three plants per treatment. Means followed by the same letters are not significantly different at 5% of probability according to Fisher multiple range test.

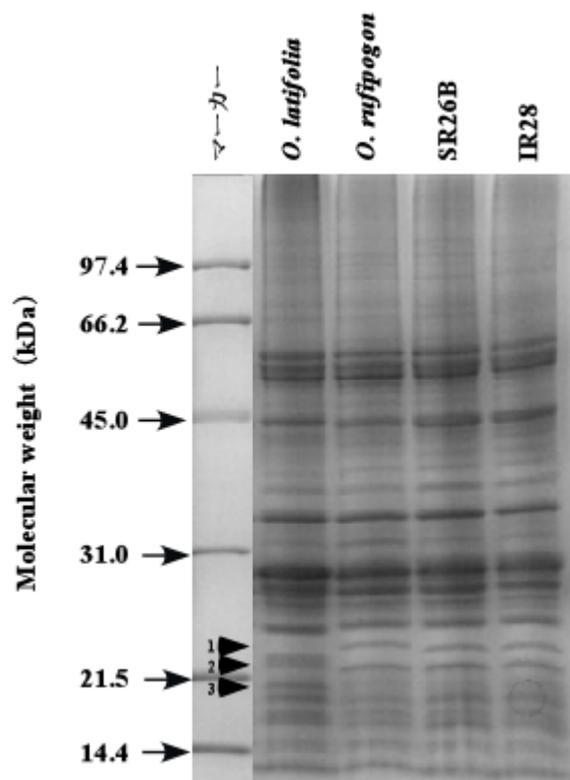


Fig. 3. Polypeptide composition of isolated thylakoid membrane.

A sample of 1mg was loaded for SDS-PAGE. Arrow 1,2, and 3 stand for 24 KDa, 22.4KDa and 20.3KDa, respectively.

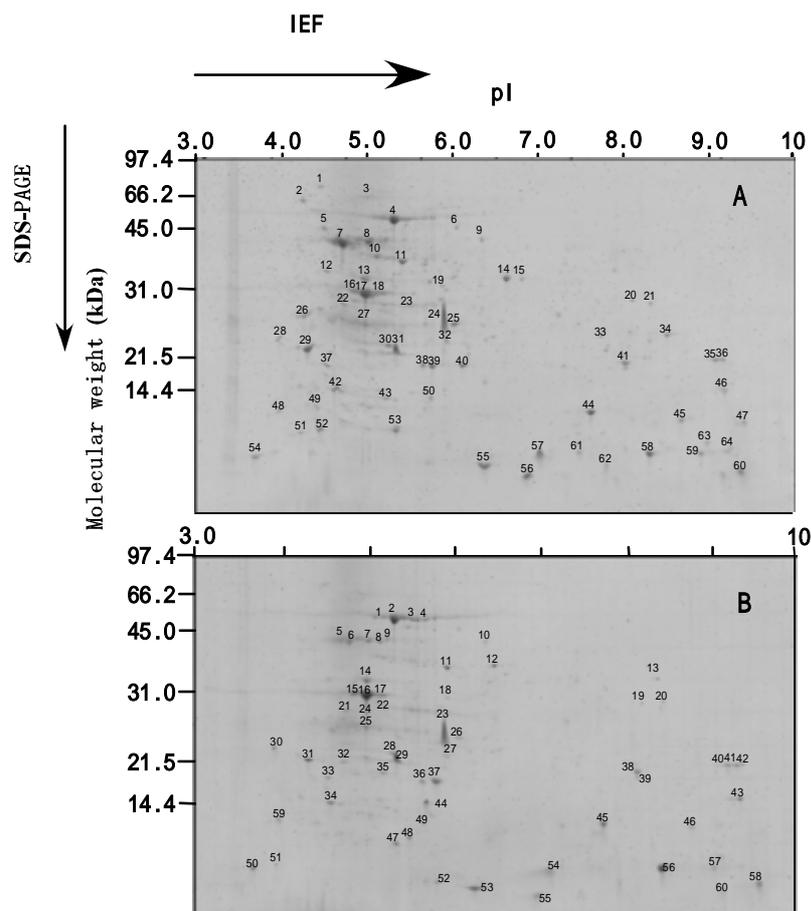


Fig. 4. Sypro ruby-stained 2-DE maps of thylakoid proteins of *O. latifolia* (A) and *O. rufipogon*.

Table 1. Characteristic of specific thylakoid membrane protein obtained from 2-DE in two wild *Oryza* species.

Species	Spot No.	Molecular weight (kDa)	pI	Identity
<i>O. latifolia</i>	2	60.4	4.2	
	10	38.0	5.1	Photosystem Q (B) protein, PS protein D1
	15	32.3	6.8	Apocytochrome f precursor, Cytochrome c biogenesis protein
	26	25.6	4.2	
	28	21.8	3.9	
	29	20.6	4.3	
	31	20.6	5.3	Chlorophyll A-B binding protein 6A, Chloroplast precursor (LHC type CAB-6A), Oxygen-evolving enhancer protein 2, Thylakoid lumenal 21.5 kDa protein, Photosystem assembly protein ycf3
	32	21.8	5.9	Oxygen-evolving enhancer protein 2, Chloroplast precursor (OEE2), (23 kDa subunit of oxygen evolving system of PS ) (23 kDa thylakoid membrane protein) (OEC23)
	34	23.2	8.5	
	40	18.3	6.1	
47	12.3	9.5		
52	10.9	4.4	Plastocyanin, Chloroplast precursor (PC6-2)	
53	10.9	5.4		
61	8.9	7.4	PS iron sulfur center (PS subunit ) (9 kDa polypeptide)	
<i>O. rufipogon</i>	11	35.0	5.9	ATP synthase gamma chain, chloroplast precursor (EC3.6.3.14)
	25	24.6	4.9	Oxygen-evolving enhancer protein 1, Chloroplast precursor (OEE1), Chlorophyll a-binding protein
	42	19.6	9.4	PS reaction center subunit, Chloroplast precursor (PS 20 kDa subunit)

Identity given in ExPASy by TagIdent tool (<http://tw.expasy.org/tools/tagident.html>). Search was conducted range of pI  $\pm$  0.1 and molecular weight  $\pm$  10%.

**Study on mechanisms of salt tolerance in wild *Oryza* species,  
*O. latifolia* Desv.**

Seiich Mrayama<sup>a</sup> and Sakae Agarie<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus.

<sup>b</sup> Faculty of Agriculture, Saga University.

Summary

We had isolated the wild *Oryza* species, *O. latifolia* Desv., which could survive under the conditions that the salt-tolerant cultivated rice SR26B died. The CO<sub>2</sub> assimilation rate was maintained under the high salinity condition that the leaf water potential was decreased with increased NaCl level in the water-culture solution. To elucidate the mechanisms of salt tolerance in *O. latifolia*, we compared the photosynthetic activities of leaves and thylakoid membranes in this wild *Oryza* species with those in a salt susceptible wild *Oryza* species, *O. rufipogon* under high salt conditions. Photosynthetic O<sub>2</sub> evolution rate (OER) of leaves measured with liquid-phase type oxygen electrode was maintained in *O. latifolia* under the salt stress condition. In *O. rufipogon* the OER declined by 75% and 30% of that in non-stress leaves under 300mM and 655mM NaCl, respectively. Whereas in *O. latifolia* the OER was unchanged under 300mM NaCl, and decreased under 655mM NaCl by 60% of that in non-stress leaves. Thylakoid membrane of *O. latifolia* also showed salt tolerance. The OER from isolated thylakoid membrane in *O. latifolia* decreased only 13% under 655mM NaCl. On the other hand, in *O. rufipogon*, it decreased 30% under 655mM NaCl. The peptide compositions of thylakoid membranes examined by SDS PAGE showed that *O. latifolia* has species-specific proteins with 20.3 kDa and 22.4 kDa of molecular weight. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) of thylakoid membrane proteins showed that the 20.3 kDa and 22.4 kDa proteins contained at least two or three proteins with different isoelectric points. Some of them were novel proteins that had not been published in the data base.

These results suggest that thylakoid membrane of *O. latifolia* has high salt tolerance and this plant can maintain photosynthetic activity under high NaCl condition. The results of SDS-PAGE and 2-DE showed that the thylakoid membrane of *O. latifolia* had specific proteins which may be partially responsible for the salt tolerance.