

助成番号 0624

植物の塩に対する生体防御におけるポリアミンの役割

草野 友延

東北大学大学院生命科学研究所

概要 植物においてポリアミンは胚発生、細胞分裂、形態形成、花器官の発育そして果実の成熟や日持ち性など細胞増殖や細胞機能維持へ機能するばかりでなく、病原菌、塩、浸透圧そして極温などの種々の環境ストレスに対する適応反応に関与していることが示唆されている。我々は、タバコモザイクウイルスに対するタバコの抵抗性反応の際にポリアミンの一つであるスペルミンがシグナル分子として機能することを見出し、このシグナル経路を「スペルミンシグナル伝達経路」と提唱している。一方で、モデル植物であるシロイヌナズナではスペルミン合成酵素遺伝子である *ACL5* と *SPMS* の二重欠損株が得られており、植物体内にスペルミンを合成できないことが確認されている。このスペルミン合成欠損株 (*acl5/spms*) は通常の条件化で普通に生育できることから、シロイヌナズナの通常の生存にスペルミンは必要でないと考えられる。では植物におけるスペルミンの機能は何であろうか。我々は、スペルミンは広範な環境ストレス応答にシグナル分子及び機能分子として機能するのではないかと、との作業仮説を立てて検証を進めている。

本助成研究では、高塩ストレスに対するスペルミン合成欠損株 (*acl5/spms*) の反応を調査した。播種後10日目の実生を225 mM NaCl 含有 MS 培地に移すことで、塩ストレスを植物に与えた。その結果、スペルミン合成欠損株は野生株よりも塩ストレスに対する感受性が高いことを認めた。このスペルミン合成欠損株の塩感受性は外部からスペルミンを加えることで回復した。しかしスペルミジンとプトレシンには同様の効果が見られなかった。本変異株は KCl に対しても高感受性を示すが、高い浸透圧や $MgCl_2$ に対しては野生株と同等の感受性であった。こうしたイオン感受性のパターンは *AtGluR2* と *CAX1* というカルシウム動態に関与する遺伝子を過剰発現した植物のものと酷似している。塩ストレスに先立ちカルシウム・チャンネル阻害剤で処理するとスペルミン合成欠損株の塩に対する高感受性は失われた。さらに、カルシウムを除いた寒天培地上に野生株とスペルミン合成欠損株の種子を播き生育を観察したところ、後者の生育は著しく悪かった。以上の結果から、スペルミン合成欠損株ではカルシウム動態が異常となっており、そのことが NaCl への適応反応が適切に起こらない原因ではないかと推察した。

序

植物においてポリアミンは胚発生、細胞分裂、形態形成、花器官の発育そして果実の成熟や日持ち性など細胞増殖や細胞機能維持へ作用するばかりでなく、病原菌、塩、浸透圧そして極温などの種々の環境ストレスに対する適応反応に関与していることが示唆されている^[1-4]。事実、種々のストレスを付加した場合に、ポリアミン合成系の酵素活性が活性化される、あるいは当該遺伝子の転写物が蓄積することはよく知られた事実である。しかし、ポリアミンがどのような生理作用をもつのかについては知られていないのが現状である^[5]。そこで本申請では、この点に迫ろうと考えた。

背景:

近年になり、種々の植物種からポリアミン生合成系酵素をコードする遺伝子群が同定されている。モデル植物であるシロイヌナズナは、他の大半の植物種と異なりオルニチンが脱炭酸されてプトレシンに変換される経路を欠いている^[6]。従って、プトレシンは全てアルギニンが脱炭酸されてアグマチンが出来る経路から合成される。そしてこの植物種では、これまでに全てのポリアミン生合成系の遺伝子が同定された。アルギニン脱炭酸酵素遺伝子が二つ、S-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子が四つ、スペルミジン合成酵素遺伝子とスペルミン合成酵素遺伝子が二つずつ存在することが明らかにされている^[7]。前者はスペルミジン合成酵素遺伝子 1 (*SPDS1*) および 2 (*SPDS2*)、後者は *ACAULIS5* (*ACL5*) およびスペルミン合成酵素遺伝子

(*SPMS*)と呼称されている(図1参照)^[8]。さらには、分子遺伝学的解析によりプトレシンやスペルミジンを合成できない突然変異系統の植物は、胚発生の途中で死に至ることが確認され、植物の生存にとってポリアミンが欠くことのできない物質であることが確認できた^[9,10]。ところが、スペルミンを合成できないシロイヌナズナは通常の生育条件下で生育し種子をつけることができた。従って、スペルミンは生育に必須ではないと結論されている^[11]。それではスペルミンはどのような役目をしているのだろうか。

申請者は、スペルミンが環境ストレスに対する適応反応に重要な役割を果たすとの作業仮説を立て、本助成研究でこの仮説の検証を行った。

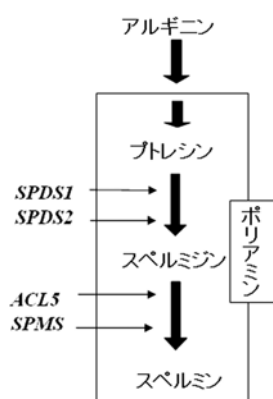


図1 シロイヌナズナのポリアミン合成系の模式図

方法と結果:

スペルミン合成酵素遺伝子である*ACL5*と*SPMS*の二重欠損株が得られている^[11]。この植物は体内にプトレシンとスペルミジンを通常量合成できるが、スペルミンを合成できないことが確認されている。このスペルミン合成欠損株(*acl5/spms*)は、図2に示すように播種後3週間以降は茎の大幅な伸長阻害が起こるが、それ以前は野生株と比べて生育に大きな違いがないことから、ムラシゲ・スクーク寒天培地上に播種後ほぼ垂直に立てた状態で10日から2週間生育させた幼植物体を用いた。その後、塩を含まない培地と225 mMのNaClを含む培地に無菌的に移し、4日間生育させた。その結果を図3に示す。対照区では、野生株とスペルミン合成欠損株との間に生育およびクロロフィル含量との間に差が見られなかった。一方、225 mM NaClを含んだ培地上では明らかにスペルミン合成欠損株は塩に弱くなっていた(図3 A)。植物体のクロロフィル含量の測定からも野生株に比べ、スペルミン合成欠損株が塩ストレスに弱くなっていることが示された。こうした現象は、

NaCl濃度を100 mM~225 mMの広範囲に変化させた状態でも確認した。



図2 スペルミン合成欠損株(右)は、野生株(左)に比べ矮化している

次に、NaCl高感受性とスペルミンの有無との関係を検討した。そのために10日間から2週間生育したスペルミン合成欠損株の幼植物体を、各1 mMのポリアミン水溶液を含むろ紙上に12時間処理後、塩を含まない培地と225 mMのNaCl含有の培地上へ移し4日間生育させた。この濃度のポリアミンはいずれもシロイヌナズナの生育に害作用を及ぼさなかった(図3 C上とD)。各ポリアミン溶液で処理したスペルミン合成欠損植物の塩を含む培地上での生育は、スペルミンで前処理した場合にのみ回復することを認めた(図3 C上とD)。すなわち、プトレシンとスペルミジンで前処理しても回復しなかった。故に、スペルミン合成欠損株が塩ストレスに高感受性となっているのは、この株がスペルミンを合成できないためであろうと考えられた。

塩ストレスは、浸透圧ストレスとイオンストレス、特にNaイオンのストレスであると考えられていることから、次にこの点を検討した。225 mM NaClと同等の浸透圧を与えるマンニトール(364 mM)を含む培地での生育には野生株とスペルミン合成欠損株に違いは見られなかった。またMgCl₂に対する感受性においても野生株とスペルミン合成欠損株とに違いは見られなかった。これは濃度を変えた条件下でも同様であった。一方、KClに対しては野生株に比べスペルミン合成欠損株は高感受性を示した。

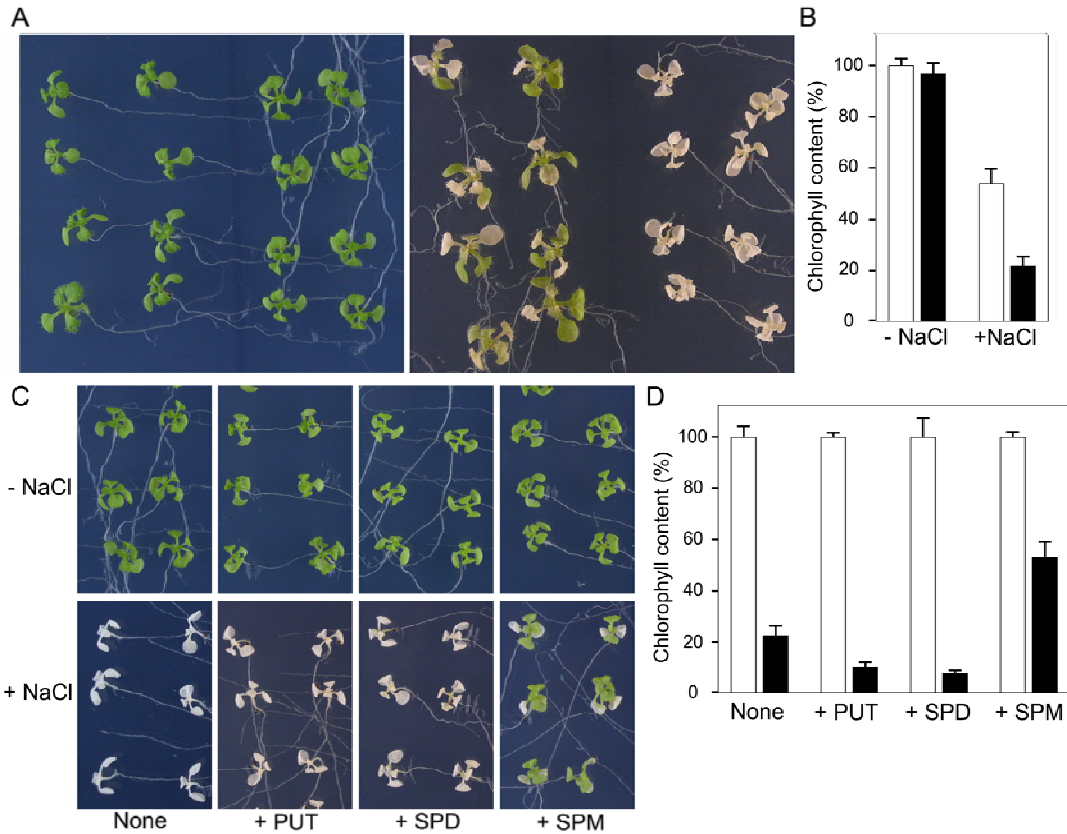


図3 スペルミン合成欠損株の塩ストレスへの反応。A. 塩を含まない培地(左側)と225 mMのNaClを含む培地(右側)上での野生株(それぞれ左側2列)とスペルミン合成欠損株(それぞれ右側2列)の移植後4日目の生育の様子。B. Aの時点での全クロロフィル含量。C. スペルミン合成欠損株を各1 mMのポリアミンで12時間前処理後、塩を含まない培地(上)と225 mMのNaClを含む培地(下)に移植し、4日間生育させた。D. Cの時点での全クロロフィル含量。

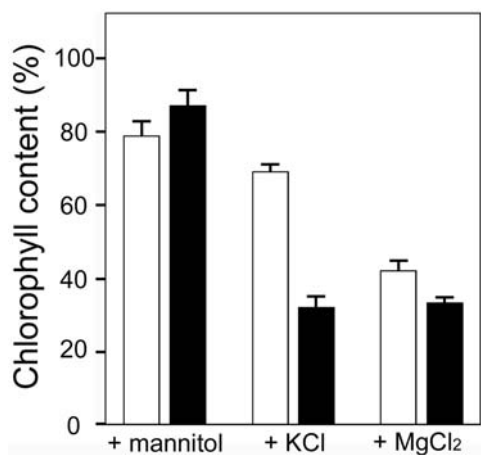


図4 スペルミン合成欠損株の浸透圧、他のイオンへの反応性。2週間通常培地で生育させた野生株とスペルミン合成欠損株を364 mMのマンニトール、150 mMのKClそして150 mMのMgCl₂を含有する培地に移植し4日目の植物体の全クロロフィル含量を測定した結果。
 白いカラム:野生株
 黒いカラム:スペルミン合成欠損株

これまでのスペルミン合成欠損株の反応性をまとめると、NaCl、KClに高感受性になっており、MgCl₂と浸透圧への反応性は野生株と同等であるというものである。文献調査の結果、極めて類似したイオン・浸透圧への反応を示すケースが二例見つかった^[12, 13]。一つ目は、原形質膜に局在すると考えられるカルシウム輸送体 *AtGluR2* であり、二つ目は、液胞に局在するカルシウム交換体 *CAX1* である。それぞれのタンパク質をコードする遺伝子を過剰発現する植物は、興味深いことにスペルミン合成欠損株と同様なイオン及び浸透圧感受性を示した。*AtGluR2* と *CAX1* は細胞内でのカルシウム動態に関与する分子であることから、カルシウム・チャンネル阻害剤の与える塩感受性への影響を調べた。ランタン及びベラパミルを前処理すると、スペルミン合成欠損株で見られた塩の高感受性は見られなくなった(図5)。*AtGluR2* と *CAX1* を過剰発現する植物は、ともにカルシウム欠損培地での生育が損なわれることから、同様の実験を行なった。図6に見られるように、カルシウ

ムを含まない培地で生育させたスペルミン合成欠損株はその生育が著しく遅れ、葉が黄化した(図6)。

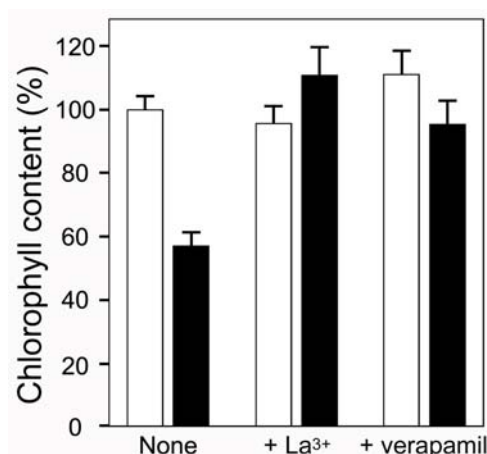


図5 スペルミン合成欠損株の塩感受性に及ぼすカルシウム・チャンネル阻害剤の影響。La³⁺は0.5 mM、verapamilは50 μMの濃度で12時間前処理し、塩処理した。
白いカラム:野生株
黒いカラム:スペルミン合成欠損株

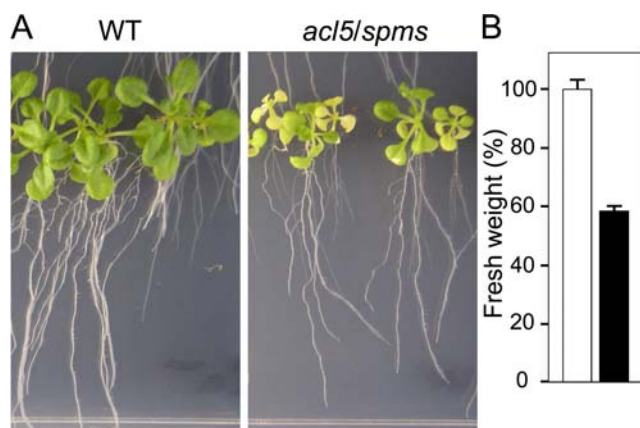


図6 カルシウムを含まない培地上での野生株とスペルミン合成欠損株の生育。A. 播種後、3週間目の生育状況。B. Aのときの生鮮重。野生株の重量平均を100としたときの相対重量で表記。
白いカラム:野生株
黒いカラム:スペルミン合成欠損株

これまでの経緯を踏まえ、次にマイクロ・アレーを用いて野生株とスペルミン合成欠損株における遺伝子発現の違いを解析した。そしてカルシウム動態に関与することが予想される遺伝子に着目して解析したところ、カルシウム・プ

ロン交換輸送体 CAX (Calcium Exchanger)をコードするCAX1、CAX2そしてCAX3の発現量が変異体で1.9、1.6そして5.5倍に高まっていた(表1)。

表1 野生株とスペルミン合成欠損株におけるCAX遺伝子群の発現量の相対値

	Relative transcript levels		
	CAX1	CAX2	CAX3
WT	1.00	1.00	1.00
<i>acl5/spms</i>	1.86 ± 0.20	1.55 ± 0.15	5.49 ± 1.79

CAX1-CAX3までの発現量の違いをリアル・タイムRT-PCR法で解析したもの。野生株(WT)の値を1としたときの相対値で表記した。

考察:

非生物ストレスをうけた植物内のポリアミン合成の変動は多くの植物種で報告されてきたもののその生物学的意義は未だに不明である。モデル植物であるシロイヌナズナではポリアミン合成に関与する全遺伝子が同定され、アルギニン脱炭酸酵素遺伝子の二重変異体、スペルミジン合成酵素遺伝子の二重変異体はいずれも胚致死となることから、改めてポリアミンの発生段階での重要性が確認された。ところがポリアミン合成系の最終産物であるスペルミン合成酵素遺伝子 *ACL5* と *SPMS* の二重変異株はスペルミンを作れないものの全ての生育段階を終え、種子をつけることも出来た。この植物体を作成した岡山大学の高橋らは、スペルミンは通常の生育に必須でない結論した[11]。

本助成研究に先立ち、我々は植物が病原菌に抵抗性反応を示すときにスペルミンがリニン酸化酵素を活性化し防護応答遺伝子の発現誘導をすることを明らかにしてきた[14]。こうした背景から我々は、非生物ストレス時においてもスペルミンは重要な役割をもつとの作業仮説のもと研究を行った。

結果に記述したようにスペルミン合成欠損株は、野生株に比べ塩ストレスに対し高感受性を示した。さらに、外部から3種のポリアミンを同一濃度で供給した場合にプトレシン、スペルミジンでは塩の感受性は変化が無いものの、スペルミンでは野生株のレベルに感受性が回復した。従って、本変異株で観察した塩高感受性はスペルミンが合成出来ない事によるものと結論した。

本変異株は高浸透圧と $MgCl_2$ に対する感受性は野生株と変わらないものの、 KCl に対しても高感受性であった。こうしたイオン感受性のプロファイルは、*AtGluR2* と *CAX1* という共にカルシウムの輸送に関わる分子をコードする遺伝子を過剰発現した植物のイオン感受性に極めて類似していた。

そこでこの点を検証した。スペルミンが合成できない植物においてカルシウム動態が異常になっていることは、次の3点から支持された。すなわち、(1)カルシウム・チャンネル阻害剤で前処理することで塩の高感受性が失われた、(2)カルシウム欠乏培地でスペルミン合成欠損株は生育異常を示した、(3)*CAX1*、*CAX2* そして *CAX3* の発現がスペルミン合成欠損株で昂進していた^[15]。ここでは結果を示さないが、スペルミン合成欠損株は乾燥に対しても高感受性であり、その原因としては乾燥処理後野生株では気孔の閉鎖が速やかに起こるのに対し変異株では気孔の閉鎖反応が極めて緩慢である結果を得た (Yamaguchi et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2007)。植物の気孔の閉鎖反応にもカルシウムが強く関与することは良く知られている。こうした結果も、本変異株のカルシウム動態の異常を裏付けるものと考えられる。

最後に何故スペルミンが合成されないと塩感受性が高まるのかを考えたい。シロイヌナズナでは分子遺伝学的手

法によりナトリウムイオンの排出に関わる三つの重要な分子が同定されている^[16]。これらは、*SOS1*、*SOS2* そして *SOS3* と名付けられている。 $NaCl$ の進入を感知したシロイヌナズナ植物では、一過的なカルシウムの流入が起こる。このカルシウムの流入はカルシウム結合タンパク質である *SOS3* で捕捉される。カルシウムが結合した *SOS3* はリン酸化酵素である *SOS2* と結合し、*SOS2* を活性化する。この活性化された *SOS2* は原形質膜に存在するナトリウム・プロトン対抗輸送体である *SOS1* を活性化して細胞外へナトリウムイオンを排出することが明らかとなっている。この情報伝達経路は *SOS* シグナル伝達経路と呼ばれている。活性化された *SOS2* には他に三つの役割が報告されている。(1) 原形質膜に存在するナトリウムの進入路となる低親和性ナトリウム輸送体である *HKT1* を阻害し、細胞内へのナトリウムの進入を防ぐ、(2)液胞膜に存在するナトリウム・プロトン対抗輸送体である *NHX1* を活性化し細胞内のナトリウムを液胞に隔離する、(3)*SOS2* は *CAX1* と分子間相互作用し *CAX1* を活性化する^[17]。このことは、*SOS* シグナル経路とカルシウムシグナル経路とがクロス・トークすることを示す知見であり極めて興味深い^[18]。

上述のように、スペルミン合成欠損株はカルシウム動態に異常が示唆されることから、*SOS* シグナル経路が十分に機能しないことが考えられる。

塩ストレス時のスペルミンの作用について

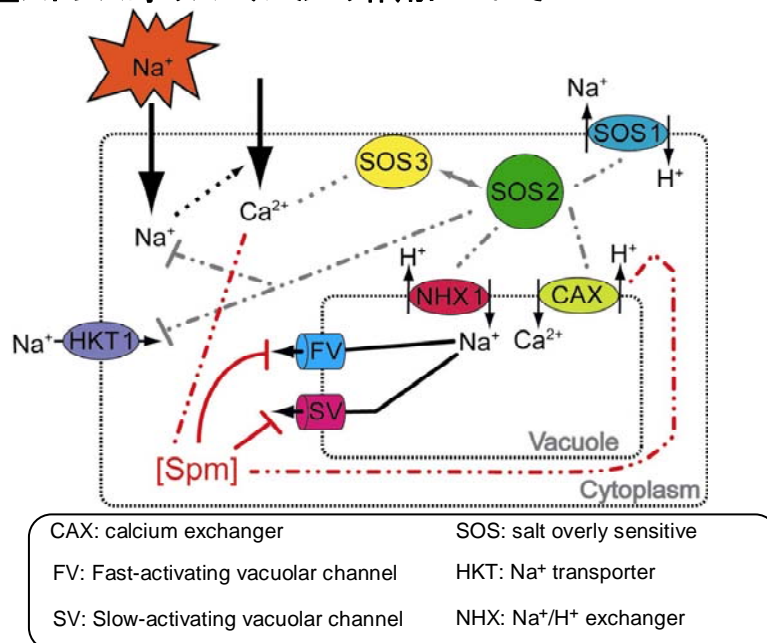


図7 塩ストレス時のスペルミンの作用の予想モデル図

動物細胞では、ポリアミンが陽イオンチャネルの活性を変化させることが良く知られている。その際、最低有効濃度はスペルミン>スペルミジン>プトレシンであることも明らかとなっている^[19-21]。植物細胞でも数少ないながら、ポリアミンのイオンチャネルへの作用が調べられている。液胞膜のSVあるいはFVチャネルを阻害することが二つの独立したグループから報告されている^[22,23]。この際にも、スペルミンは数マイクロモル濃度、スペルミジンは数十〜百マイクロモル濃度、プトレシンは数千マイクロモル濃度で阻害が起こることが示されている。

上述した知見を総合し、塩ストレス時のスペルミンの役割を予想図として図7に示した。

謝辞:

本研究は、(財)ソルト・サイエンス研究財団よりの平成18年度研究助成により成し遂げることができました。ここに記し、心より感謝申し上げます。

引用文献

- [1] Cohen, S.S. (1998) *A Guide to the Polyamines*. New York: Oxford University Press.
- [2] Kumar, A., Altabella, T., Taylor, M. and Tiburcio, A.F. (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci.* 2, 124-130.
- [3] Malmberg, R.L., Watson, M.B., Galloway, G.L. and Yu, W. (1998) Molecular Genetic Analyses of Plant Polyamines. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 199-224.
- [4] Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. and Martin-Tanguy, J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140, 103-125.
- [5] Urano, K., Yoshida, Y., Nanjo, T., Igarashi, Y., Seki, M., Sekiguchi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2003) Characterization of Arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ.* 26, 1917-1926.
- [6] Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M.J., Burtin, D. and Michael, A.J. (2001) Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J.* 27, 551-560.
- [7] Hanzawa, Y., Imai, A., Michael, A.J., Komeda, Y. and Takahashi, T. (2002) Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 527, 176-80.
- [8] Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael, A.J., Burtin, D., Long, D., Pineiro, M., Coupland, G. and Komeda, Y. (2000) *ACAULIS5*, an Arabidopsis gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO J.* 19, 4248-56.
- [9] Urano, K., Hobo, T. and Shinozaki, K. (2005) Arabidopsis *ADC* genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Lett.* 579, 1557-1564.
- [10] Imai, A., Matsuyama, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Komeda, Y. and Takahashi, T. (2004) Spermidine synthase genes are essential for survival of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 135, 1565-1573.
- [11] Imai, A., Akiyama, T., Kato, T., Sato, S., Tabata, S., Yamamoto, K.T. and Takahashi, T. (2004) Spermine is not essential for survival of Arabidopsis. *FEBS Lett.* 556, 148-152.
- [12] Kim, S.A., Kwak, J.M., Jae, S.K., Wang, M.H. and Nam, H.G. (2001) Overexpression of the *AtGluR2* gene encoding an Arabidopsis homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilization and sensitivity to ionic stress in transgenic plants. *Plant Cell Physiol.* 42, 74-84.
- [13] Hirschi, K.D. (1999) Expression of Arabidopsis *CAX1* in Tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. *Plant Cell* 11, 2113-2122.
- [14] Takahashi, Y., Uehara, Y., Berberich, T., Ito, A., Saitoh, H., Miyazaki, A., Terauchi, R. and Kusano, T. (2004) A subset of hypersensitive response marker genes, including *HSR203J*, is the downstream target of a spermine signal transduction pathway in tobacco. *Plant J.* 40, 586-595.
- [15] Cheng, N.-H., Pittman, J.K., Shigaki, T., Lachmansingh, J., LeClere, S., Lahner, B., Salt, D.E. and Hirschi, K.D. (2005) Functional association of Arabidopsis *CAX1* and *CAX3* is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiol.* 138, 2048-2060.

- [16] Zhu, J.-K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plant. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247-273.
- [17] Cheng, N.-H., Pittman, J.K., Zhu, J.-K. and Hirschi, K.D. (2004) The protein kinase SOS2 activates the *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *J. Biol. Chem.* 279, 2922-2926.
- [18] Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. and Harper, J.F. (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* S401-417.
- [19] Johnson, T.D. (1996) Modulation of channel function by polyamines. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 22-27.
- [20] Williams, K. (1997) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.* 325, 289-297.
- [21] Oliver, D., Baukowitz, T. and Fakler, B. (2000) Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 267, 5824-5829.
- [22] Brüggemann, L., Pottosin, I. and Schönknecht, G. (1998) Cytoplasmic polyamines block the fast-activating vacuolar cation channel. *Plant J.* 16, 101-105.
- [23] Dobrovinskaya, O.R., Muñoz, J. and Pottosin, I.I. (1999) Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *J. Membrane Biol.* 167, 127-140.
- 486-490
- 3) Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Miyazaki A, Takahashi T, Michael A, Kusano T (2006) The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 580: 6783-6788.

国際会議(ポスター発表)

- 1) Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Miyazaki A, Takahashi T, Inoue C, Michael A, Kusano T. Role of polyamine spermine in plant abiotic stress response. International Conference on the Role of Polyamines and Their Analogs in Cancer and Other Diseases. Tivoli, Italy Sep 10-14, 2006

国内会議(いずれも口頭発表)

- 1) 山口公志、高橋芳弘、ベルベリッヒ・トーマス、今井章裕、高橋卓、マイケル・アンソニー、草野友延 高塩および乾燥ストレス時の植物におけるスペルミンの役割 日本農芸化学会 2007 年度大会(東京農業大学) 2007, 3, 24-27
- 2) 山口公志、高橋芳弘、ベルベリッヒ・トーマス、今井章裕、高橋卓、マイケル・アンソニー、草野友延 非生物的/生物的ストレスに対する植物生体防御におけるスペルミンの役割の検証 第 21 回日本ポリアミン研究会(武蔵野大学) 2007, 1, 25-26
- 3) 山口公志、高橋芳弘、ベルベリッヒ・トーマス、今井章裕、高橋卓、草野友延 高塩および乾燥ストレス下のシロイヌナズナにおけるスペルミンの重要性 日本植物学会東北支部会(弘前大学) 2006, 12, 16-17

公表した研究成果

原著論文

- 1) Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, Takahashi Y (2007) The polyamine spermine rescues *Arabidopsis* from salinity and drought stresses. *Plant Signaling Behavior* 2(4): in press.
- 2) Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Takahashi T, Michael A, Kusano T (2007) A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* 352:

総説

- 1) Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, Takahashi Y (2007) Advances in polyamine research in 2007. *J Plant Research* in press

No. 0624

Role of Polyamine in Plant Defense Response to High Salt

Tomonobu Kusano

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University
2-1-1 Katahira, Aoba, Sendai, Miyagi 980-8577, Japan

Summary

It is well known that changes in abiotic conditions such as the concentration of ions, temperature and humidity lead to modulation of polyamine contents in plants. However, little is known about the relevant parts these polyamines play in abiotic stress responses. Here I addressed a specific role of spermine during high salt stress using an *Arabidopsis* double knockout-mutant plant (*acl5/spms*) which cannot produce spermine. The mutant showed higher sensitivity to high salt than wild type plants. This phenotype was cured by exogenous spermine but not by the other polyamines putrescine and spermidine, suggesting a strong link between spermine-deficiency and NaCl-hypersensitivity. The mutant was also hypersensitive to high levels of KCl but not to MgCl₂ or to high osmoticum. NaCl-hypersensitivity of the mutant was compromised by treatment with Ca²⁺ channel blockers. Moreover, the mutant showed poor growth on Ca²⁺-depleted Murashige-Skoog agar media. The data suggest that the absence of spermine causes an imbalance in Ca²⁺ homeostasis in the mutant plant. Based on the data obtained, I propose a model for a role of spermine in high salt stress responses.

- Ref. 1) Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Takahashi T, Michael A, Kusano T (2007) A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Commun* 352: 486-490
- 2) Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Miyazaki A, Takahashi T, Michael A, Kusano T (2006) The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 580: 6783-6788.