

助成番号 0827

## Na<sup>+</sup>イオン排出ポンプ制御に機能する塩応答性シグナル分子を利用した 高糖度トマトの分子育種法の開発

湯浅 高志, 井上 眞理

九州大学大学院農学研究院

**概要** 【目的】 高等植物の塩ストレス耐性やミネラル吸収の調節に SNF1 関連キナーゼ (SnRK) サブファミリーに属する CBL 結合キナーゼ (CIPK/SnRK3) が重要な働きをしている。CBL-CIPK 複合体は Ca<sup>2+</sup> 依存的に活性化し細胞膜や液胞膜にある Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体および塩ストレス応答性転写因子をリン酸化して塩ストレスに適応していることがシロイヌナズナの塩感受性変異体 (*sos*) を用いた研究から示されている。CBL、CIPK には多くのアイソフォームが存在し、器官特異的発現や活性化するイオン輸送体などが異なっており、生理的機能についてまだ未解明な点が多い。そこでトマトにおける CBL、CIPK の各アイソフォームの発現プロファイルや生理機能を明らかにする目的で半定量的 RT-PCR と免疫化学的手法を組み合わせて CBL、CIPK の器官特異的発現を遺伝子とタンパク質レベルで解析した。

【材料および方法】 MiBASE (<http://www.kazusa.or.jp/jsol/microtom/indexj.html>) からトマトの CBL、CIPK ホモログ候補およびストレス応答関連転写因子遺伝子を検索し、分子種特異的プライマーを設計した。トマトの CBL4/SOS3 ホモログの組換え体タンパク質を発現・精製し、これを抗原とし抗-SICBL4/SOS3 ウサギ抗体を作成した。芽生え、根、茎、葉、花および未熟果実の組織抽出液を調製した。超遠心画分により可溶性画分および膜画分を調製した。これらの試料の CBL、CIPK 関連タンパク質をイムノブロットにより解析した。

【結果および考察】 トマトで器官特異的発現する CIPK 分子種を RT-PCR により調べたところ SICIPK2 mRNA が花で強く発現し、他の器官では発現しないか弱いシグナルしか検出されなかった。抗-ササゲ CIPK 抗体を用いたイムノブロットでは分子量約 50 kDa の強いシグナルが花で検出され、さらに花器官のうち特に葯で抗 CIPK 抗体と交差するシグナルが強く検出された。イムノブロットでは CIPK は花の膜画分に、CBL は葉の膜画分に検出され、どちらも可溶性画分には検出されなかった。一方、RT-PCR 解析では塩ストレス耐性に関与すると考えられる SICBL4/SOS3 は根で強く発現し、SICBL1、2、10 は植物体全体で発現していた。抗 SICBL4/SOS3 抗体を用いたイムノブロットでは葉身で分子量 30 kDa のシグナルが検出され、塩ストレスにより増加した。これまでに CIPK は根や葉において細胞膜および液胞膜の Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体や K<sup>+</sup> チャンネルの調節に重要な働きをしていることが示されている。上記のように SICIPK2 がトマトの花器官、特に葯で強く発現していることは、他の CIPK 分子種には報告されていないユニークな点である。これまでに CIPK の多くが水分ストレス耐性に関与していることから SICIPK2 が花粉形成時の浸透溶質の輸送や花粉の成熟にもなる乾燥耐性獲得機構に関与している可能性が示唆された。また SOS3 は CBL 関連分子のうち特に塩ストレスや乾燥ストレス耐性に重要な分子である。また塩ストレス耐性や乾燥ストレス耐性メカニズムの向上は、しばしば温度ストレス耐性も向上させることが知られている。したがって花や葯で発現の低い特定の CBL 分子、例えば SISOS3 の発現レベルを向上した品種を選抜することで、塩ストレス耐性に加えて温度ストレス耐性の向上に役立つ可能性が期待出来る。

### 1. 研究目的

トマトの養液栽培において希釈海水や高濃度 Ca<sup>2+</sup> イオンを添加することで果実の甘味を向上する方法が広く用

いられている。植物は乾燥、塩ストレス、低温などの環境ストレスへの適応メカニズムにおいて、タンパク質リン酸化、脱リン酸化やカルシウムが重要な役割を果たしていること

が知られている。アブシジン酸(ABA)にตอบสนองした  $K^+$  イオンチャンネルの活性化と気孔閉鎖には孔辺細胞の ABA 活性化プロテインキナーゼ(ABA-Activated Protein kinase, AAPK)が関与している(Li and Assmann, 1996; Mori and Muto, 1997)。AAPK は酵母の糖代謝遺伝子調節に働く SNF1 キナーゼと高い相同性を示すことや(Li *et al.*, 2000)、様々な植物のゲノムに多数の SNF1 ホモログ遺伝子が存在し、ストレス応答や栄養代謝に機能していることが明らかとなってきた。これら植物 SNF1 ホモログ(SnRK)は栄養代謝で働く SnRK1 と SnRK2 のように乾燥・塩ストレス・ABA に関わる SnRK2、カルシニューリン B 様分子 CBL と結合する SnRK3/CIPK (Fig. 1) の三つのサブファミリーに分れる。トマトのストレス応答性 SNF1 関連キナーゼ SISRK2C が果実特異的に発現することを 2005 年度ソルトサイエンス助成財団成果報告会において報告した (Tomikubo *et al.*, 2007)。

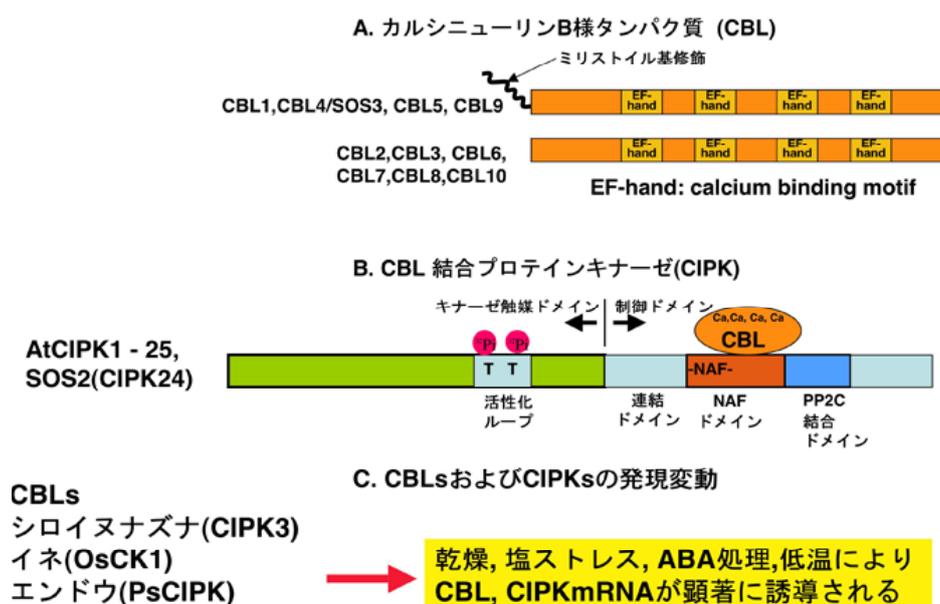
SnRK3 に属する CBL-CIPK 複合体は  $Ca^{2+}$  依存的に活性化し細胞膜や液胞膜にある  $Na^+/H^+$  交換輸送体および塩ストレス応答性転写因子をリン酸化して塩ストレスに適応していることがシロイヌナズナの塩感受性変異体(*sos*)を用いた研究から示されている。CBL、CIPK には多くのアイソフォームが存在し、器官特異的発現や活性化するイオン輸送体などが異なっており、生理的機能についてま

だ未解明な点が多い。そこでトマトにおいて塩処理により誘導される果実の糖度上昇を引き起こす塩ストレスシグナルの分子機構を明らかにして、高糖度トマトの分子育種を目指すうえで CBL および CIPK は塩ストレスシグナルに関わる第一候補遺伝子と期待される。そこでトマトにおける CBL-CIPK 複合体の機能を明らかにする目的で免疫化学的手法によりトマト各組織における CBL および CIPK のタンパク質レベルを解析した。また半定量的 RT-PCR により器官特異的に発現するトマト CIPK 分子種を推定した。

## 2. 研究方法

トマト EST データベース MiBASE (<http://www.kazusa.or.jp/jsol/microtom/indexj.html>) から CBL および CIPK のトマトホモログ候補遺伝子を検索し、CBL、CIPK ホモログ候補およびストレス応答関連転写因子遺伝子を検索し、分子種特異的プライマーを設計した (Table 1)。トマト Micro-Tom の各器官および塩ストレス処理した植物体から SDS-フェノール LiCl 法によりトータル RNA を抽出した。トマト Micro-Tom トータル RNA から M-MLV 逆転写酵素 (TaKaRa) と KOD plus DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) を用いてトマトの CBL および CIPK ホモログをクローニングした。

CBL ホモログの内、塩ストレスシグナルに最も重要な役



**Fig. 1.** Structures and regulation mechanism of CBL-CIPK/SnRK3. (A) CBLs bind calcium, (B) CIPKs associate to CBL on their COOH-terminus. (C) CBLs and CIPKs are induced by various stresses and ABA.

**Table 1.** Primers used for RT-PCR analysis and cloning of *SICBLs* and *SICIPKs*

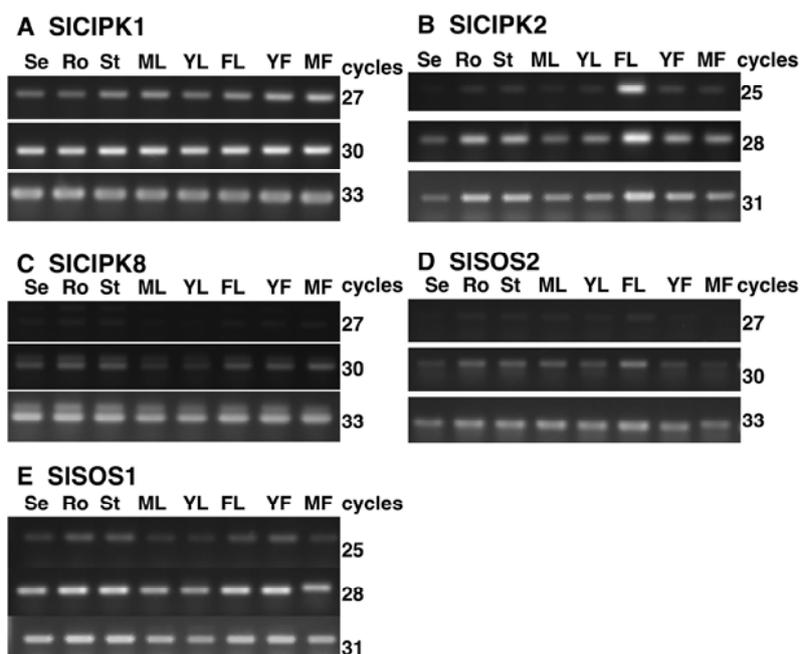
Forward primers	Reverse primers
<i>SICIPK1</i> (Contig20886) 5- GATGGATCCTTGAAAGTGATGATCACGTC- 3'	5-AATGTCGACGCTATCACAACAAACAGTAGG -3'
<i>SICIPK2</i> (Contig20640) 5- AAAGGATCCGAGTCTAGAAACACGGTAACC -3'	5-CATGTCGACACGATTAGCTGGCTGCTCGCC -3'
<i>SICIPK8</i> (Contig22116) 5- GAAGGATCCAACGAGCAATGTGACAATGCG -3'	5- AAAGTCGACTCTCTTTCTACTCCTTGCTTT -3'
<i>SICIPK24</i> (AJ717348) 5- TACGGATCCGTTAAAGCTAAAGCAGATGAA -3'	5- ATCTGTCGACGCGAGTCCTTGTCTAAGCA -3'
<i>SICBL1</i> (Contig8940) 5- CTCGGATCCATGGGCTGCTTTAATTCTAAG -3'	5- ATGGTCGACATTTTCTAGTGTATGTAGC -3'
<i>SICBL2</i> (Contig7486) 5- GACGGATCCATGCTGCAGTGCTTAGGTTCT -3'	5- ATGGTCGACTATGTTTCATGGAATCATAATT -3'
<i>SICBL10</i> (Contig4835) 5-TACGGATCCATGGATTCCACTCGAAATTCT -3'	5- TTAGTCGACAACCTTGTCACAACAAATGGAT -3'
<i>SISOS3</i> (contig18692) 5- CCCTCTTTCTAAAGAATATGACCCTTCC -3'	5- GCTAAAAGCTTGAGTCTAGACTTCCG -3'
SOS1 (TC179261, DFCI) 5- GCGGGATCCCTATCAGGCAGGGGTCTCCAG -3	5- CTGCCAT GGATGTTTTATCTTCTCTCGC -3
SIPP2C (Contig8155) 5-ATCTAGAAATGGAAGAGATGTCTCCAGCTGTTG-3	5-TCAGCTCTAACTTTTGCTTTTGAACTTCTCT-3
ubiquitin (Contig18367) 5-ACGTGGATCCATGCAAATCTTTGTGAAGAC-3	5-AAAGTCGACTAACCACCACGGAGACGGAGG-3

割をしている CBL/SOS3 のトマトホモログを pQE9 ベクターに組み込み Hisx6 タグ融合トマト CBL/SOS3 を発現精製し、これを抗原として抗-トマト SOS3 抗体を作成した。抗体の交差反応性を検証するためにグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合 CBL を調製するために pGEX4T-1 ベクターにトマト CBL1、CBL2、CBL10 をクローニングして、それぞれ GST 融合タンパク質を発現精製した。またマルトース結合タンパク質 (MBP) 融合全長トマト CIPK を組換え体タンパク質として発現・精製した。これを抗原として抗-ササゲ CIPK 抗体とトマト CIPK との交差反応性を確認した。トマト Micro-Tom 植物体の根、シュートおよび葉、花、果実から抽出したタンパク質試料を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の後、PVDF 膜に転写した。次に CBL および CIPK を検出するために抗-トマト SOS3 特異的ウサギ抗血清、抗-VuCIPK1 特異的ウサギ抗血清を一次抗体、そして西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG ヒツジ抗体を二次抗体としてイムノブロットを行い、冷却 CCD 微小発光検出装置 (FluorChem, AlphaInnotech) を用いて Enhanced Chemi-Luminescence (ECL) 法により検出した。トマト植物体の芽生え、根、茎、葉、花および未熟果実の組織抽出液を調製した。また葉と花の組織抽出液を超遠心分画 (100k x g) して可溶性画分およびマイクロソーム画分を調製した。これらの試料における CBL および CIPK 関連タンパク質の存在量をイムノブロットにより解析した。さらに各組織から調製した全 RNA、M-MLV 逆転写酵素と GoTaQ Green Master DNA ポリメラーゼキット (Promega) と

遺伝子特異的プライマーを用いて半定量的 RT-PCR により、CBL および CIPK 各分子種の mRNA 発現レベルを解析した。

### 3. 研究結果

複数の CIPK 分子種のトマトにおける器官特異的発現プロファイルをトマト CIPK アイソフォームを区別できる特異的プライマーを用いて半定量的 RT-PCR により解析したところ SICIPK2 の mRNA が花で顕著に発現し、芽生え、根、茎、葉、果実での発現レベルが低いことが示された (Fig. 2B)。また乾燥応答や ABA 応答に関与していることが知られているシロイヌナズナ CIPK、AtCIPK1 のホモログと考えられる SICIPK1 はトマト植物体の各器官で広く顕著な発現が検出された (Fig. 2A)。その他に Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送系を活性化することで Na<sup>+</sup> イオン排出機能の調節に関与する SOS2 ホモログと考えられる SICIPK24 (Fig. 2C) と機能不明の SICIPK8 (Fig. 2D) はトマト植物体の各器官で弱い発現が観察された。SOS3/CBL4 および SOS2/CIPK24 の下流で制御される Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送系 SOS1 のトマトホモログ SISOS1 は植物体全体で発現していた (Fig. 2E)。シロイヌナズナ CIPK の研究において特定の CIPK アイソフォームが根や維管束組織で発現して、K<sup>+</sup> チャンネルのリン酸化を介してミネラル吸収を調節していることが知られているが、SICIPK2 のように花器官で特異的に発現する CIPK/SnRK3 や SnRK2 の例はまだ報告されていない。



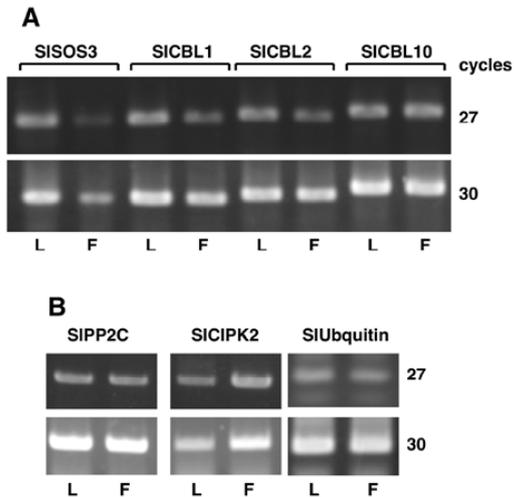
**Fig. 2.** Expression profiles of tomato CIPK homologs in various organs of tomato plant. Apparent expression levels of mRNAs of SICIPK1(A), SICIPK2(B), SICIPK8(C), SISOS2(D) and SISOS1(E) in various organs are shown by signals of PCR products at sets of 25-31 cycles and 27-33 cycles. Semi-quantitative RT-PCR was carried out at indicated numbers of thermal cycles and with cDNA prepared from various organs and sets of specific primers for detection of tomato CIPK homologs and SISOS1.

そこで花器官特異的に発現する SICIPK2 着目して、CIPK と相互作用する調節分子の発現レベルを解析した。まず CIPK の調節因子であるカルシニューリン B 様分子 CBL の器官特異的発現を RT-PCR により解析した。CIPK24/SOS2 と共同して  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送系 SOS1 を活性化することで塩ストレス耐性に関与すると考えられる *SICBL4/SOS3* は葉で発現が検出された (Fig. 3A)。*SICBL1* および *SICBL2* は葉に比較的高く、花で弱い発現が観察されたが SISOS3 よりはその差は顕著でなかった (Fig. 2A)。また SISOS3 の発現レベルは花、茎および葉に比べて根において最も発現レベルが高かった (data not shown)。一方、*SICBL10* は葉と花で発現に差は見られなかった (Fig. 3A)。いくつかの CIPK アイソフォームや SnRK2 分子と相互作用して、脱リン酸化により CIPK 活性を負に調節してアブシジン酸シグナルの調節に関与することが知られているタンパク質脱リン酸化酵素 2C のトマトホモログ SIPP2C の発現はユビキチンと同様に葉と花で発現に差は見られなかった (Fig. 3B)。葉と花における SICIPK2 の発現レベルは Fig. 1 と同様に花において高い

ことが示された (Fig. 2B)。

このようにトマトの花器官特異的に発現する CIPK 分子の存在が明らかになったことから、さらにタンパク質レベルでのトマト CBL-CIPK 関連タンパク質の器官局在についてより詳細に解析するため、抗-ササゲ CIPK 抗体を用いたイムノブロットを行った。まずはじめに抗-ササゲ CIPK 抗体 (Imamura *et al.*, 2008) とトマト CIPK タンパク質との交差特異性について検討した。GST 融合トマト CIPK2 を発現精製して、抗-ササゲ CIPK 抗体を用いたイムノブロットを行ったところ、CBB 染色と同じサイズの位置に顕著な交差シグナルが検出されたことから、抗-ササゲ CIPK 抗体がトマトの CIPK の検出に用いることが可能であることが示された (Fig. 3A)。またこの抗-ササゲ CIPK 抗体を用いてイムノブロットを行ってトマト、ササゲ、ダイズ、ラッカセイおよびシロイヌナズナの植物体抽出液の約 50 kDa の CIPK 関連タンパク質を検出できることが示されている (Imamura *et al.*, 2008)。

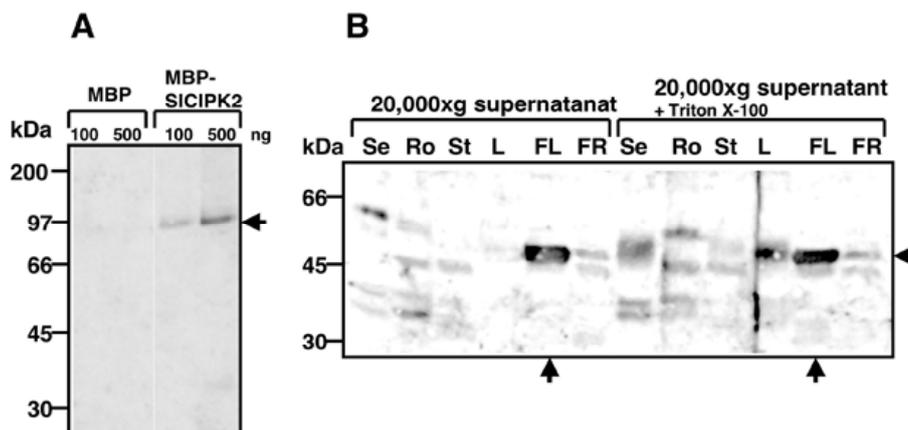
トマトの各器官における CIPK 関連タンパク質をイムノブロットにより解析したところ、うち花で分子量約 50 kDa の強



**Fig. 3.** Expression profiles of tomato CBL homologs, SICIPK2, tomato PP2C and ubiquitin in leaf (L) and flower (F) of tomato plant. Apparent expression levels of mRNAs of tomato CBLs (upper), and SICIPK2, tomato PP2C and ubiquitin (lower) in are shown by signals of PCR products at a set of 27 and 30 cycles. Semi-quantitative RT-PCR was carried out at indicated numbers of thermal cycles and with cDNA prepared from leaf and flower and sets of specific primers for detection of tomato CBL homologs, SICIPK2, tomato PP2C and SISOS1.

いシグナルが検出され、葉と芽生えにも同じく 50 kDa のシグナルが検出された (**Fig. 4A**)。さらに花器官のうちどの部分に CIPK 関連タンパク質が発現するか詳細に調べるためにガク、花弁、葯、子房を試料としてイムノブロットを行ったところ CIPK 関連タンパク質は葯に最も強く検出された。また葉と花の可溶性画分とマイクロソーム画分を用いたイムノブロットにより CIPK は共にマイクロソーム画分に存在することが示された。

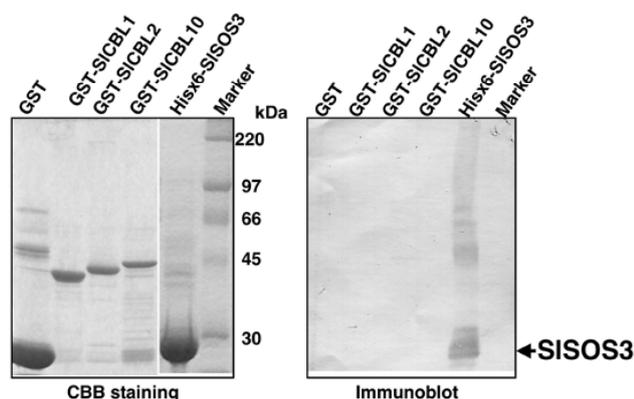
続いて抗 SICBL4/SOS3 抗体を用いたイムノブロットによりトマト CBL 関連タンパク質の解析をおこなった。まず今回作成した抗-SISOS3 抗体の交差特異性を検定するためにトマト CBL 関連タンパク質のうち SICBL1、SICBL2、SICBL10 についてグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) および GST 融合タンパク質を発現精製し、抗原として用いた Hisx6 融合 SISOS3 と共に抗-SISOS3 抗体によるイムノブロットを行った (**Fig. 5**)。その結果、CBB 染色 (**Fig. 5, left**) で明瞭に検出される GST や GSTSICBL1、2、10 とは抗体は交差反応をせず、Hisx6SISOS3 タンパク質と強い交差反応をすることが示された (**Fig. 5, right**)。このことから抗-SISOS3 抗体はトマト CBL 関連タンパク質のうち、特に SISOS3/CBL4 分子種を高い特異性で認識することが示された。



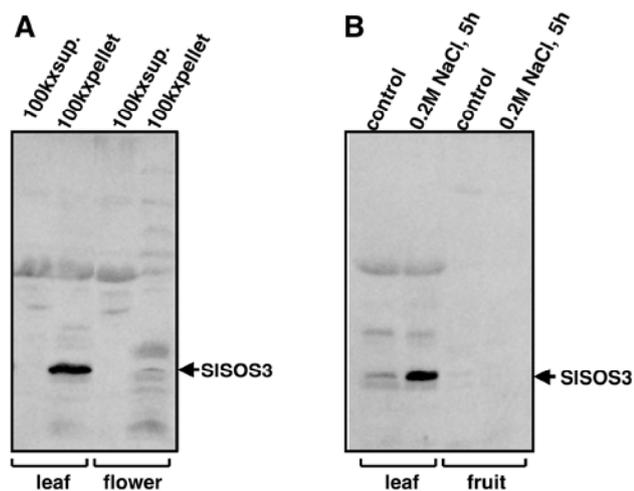
**Fig. 4.** Detection of immunologically CIPK-related proteins in various organs of tomato. Recombinant SICIPK2 (A) and protein extracts prepared from seedling, root, stem leaf, flower and fruit (B) were analyzed by immunoblot with anti-CIPK specific antibody and ECL kit. Recombinant protein of MBP-SICIPK and MBP were subjected to immunoblot by the antibody using indicated amounts of proteins. The  $10,000 \times g$  soluble fractions were prepared from crude extracts of leaves of each plants in the presence (right) or the absence (left) of 1% Triton X-100. Each 50  $\mu g$  protein extracts per lane was subjected to SDS-PAGE (10% acrylamide gels) and electroblotted to PVDF membrane.

次にトマト CIPK 関連タンパク質と同様に、トマトの葉および花の粗抽出画分を用いたイムノブロットにより SISOS3 タンパク質の器官特異的発現を解析した。

トマトの葉のマイクロソーム画分において SISOS3 の予想分子量と同じ 30 kDa の免疫交差シグナルが検出され、可溶性画分には検出されなかった。一方、花器官の場合、マイクロソーム画分にも可溶性画分のいずれにも抗-SISOS3 抗体と交差する 30 kDa タンパク質のシグナルは



**Fig. 5.** Immunoblot of recombinant tomato CBLs by anti SI-SOS3- antibody (left) CBB staining, (right) Immunoblot. Recombinant proteins of tomato CBL1, CBL2, CBL10 were expressed as GST fusion proteins. Hisx6-SISOS3 was expressed and used for raising the antibody.



**Fig. 6.** Immunoblot of extracts of leaf and flower by anti SI-SOS3- antibody (A) Immunoblot of soluble fraction and microsomal fraction of leaf and flower, (B) Immunoblot of extract leaf and flower of tomato plant treated by salt stress.

検出されなかった (**Fig. 6A**)。次に、塩ストレス処理をした場合の SISOS3 タンパク質の変動をイムノブロットにより解析した。コントロールおよび塩ストレス処理をしたトマト植物体の葉および花から粗抽出画分を調製してイムノブロットを行った時に、葉において 30 kDa の SISOS3 タンパク質を示す交差シグナルは塩ストレス処理により顕著に増加した (**Fig. 6B**)。一方、花器官の場合、コントロールと塩ストレス処理のいずれにおいても 30 kDa タンパク質のシグナルは検出されなかった。

#### 4. 考察

これまでに CIPK は塩ストレスやアブジジン酸に応答した  $Ca^{2+}$  シグナルを介して細胞膜および液胞膜に局在して  $Na^{+}$  イオン排出や  $K^{+}$  イオン取り込みに関与するイオントランスポーターの調節に重要な働きをしていることが示されている。今回、SICIPK2 の mRNA (**Fig. 2**) および CIPK タンパク質 (**Fig. 4**) がトマトの花器官で顕著に発現していること、特に CIPK 特異的抗体を用いて薬に顕著に CIPK タンパク質が発現していることが示された。この花器官における SICIPK2 の発現は他の CIPK 分子種には報告されていないユニークな点であり、SICIPK2 が花器官、特に薬および花粉特異的な物質輸送機能の調節に関与している可能性が示唆された。花粉の成熟過程において強い乾燥耐性を獲得するためにプロリンやショ糖が高濃度で蓄積することが知られている。また LEA タンパク質や花粉特異的な熱ショックタンパク質の発現しており、これらが花粉の乾燥耐性に関与していることも示唆されている。これまでそうした花粉における適合溶質や乾燥耐性に関わるタンパク質の蓄積や発現調節のメカニズムについてはほとんど明らかにされていなかった。薬特異的に発現する SICIPK2 の機能はいまのところ不明であるが、これまでに報告されている CIPK の機能の多くが  $K^{+}$  イオンや  $Na^{+}$  イオンの輸送体の調節、およびストレス応答性転写因子のリン酸化を介して ABA 応答や乾燥耐性に関与する重要なシグナル分子として働くことが示されている。したがって SICIPK2 も花器官・薬においてプロリンや糖の輸送体を調節したり、ストレス応答性転写因子のリン酸化を通して花粉特異的 LEA タンパク質や熱ショックタンパク質の発現と乾燥耐性や他のストレス耐性に関与している可能性が考えられる。

## 5. 今後の課題

トマト栽培において、熱ストレスや低温ストレスは果実成長や植物体自体の生育を阻害すると共に、マイルドな環境ストレスでも花粉不稔などを引き起こすことで、収量低下や異常果を生じることが問題となっている。したがって、薬特異的に発現する SICIPK2 がそうしたストレス環境下での花粉成熟とストレス耐性獲得に関与しているとすれば SICIPK2 の機能改変や発現レベルの上昇により、温度ストレスに強いトマトの育種が可能になるかもしれない。また今回、塩ストレス耐性に関与する SOS3 のトマトホモログの mRNA 発現とタンパク質発現を RT-PCR (Fig. 3) と特異的抗体 (Fig. 5) により解析したところ、葉において SOS3 タンパク質の発現と塩ストレスによる発現上昇が観察されたのに対し、花では SOS3 の発現はほとんど検出されなかった (Fig. 6)。SOS3 は CBL 関連分子のうち特に塩ストレスや乾燥ストレス耐性に重要な分子である。また塩ストレス耐性や乾燥ストレス耐性メカニズムの向上は、しばしば温度ストレス耐性も向上させることが知られている。したがって花や葯で発現の低い特定の CBL 分子、例えば SISOS3 の発現レベルを向上した品種を選抜することで、塩ストレス耐性に加えて温度ストレス耐性の向上に役立つ可能性が期待出来る。

## 文献

- Imamura M., Yuasa T., Takahashi T., Nakamura N., Nang M.P.S.H., Zheng S.H., Shomazaki K., Iwaya-Inoue M. (2008) Isolation and characterization of a cDNA coding cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) calcineurin B-like protein\_interacting protein kinase, VuCIPK1, *Plant Biotechnology* 25, 437-445
- Li, J. and Assmann, S. M. (1996) An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of fava bean. *Plant Cell* 8, 2359–2363
- Li, J., Wang, X. Q., Watson, M. B. and Assmann, S. M. (2000) Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase, *Science* 287, 300-303
- Mori, I. C. and Muto, S. (1997) Abscisic acid activates a 48-kilodalton protein kinase in guard cell protoplasts, *Plant Physiol.* 113, 833–839
- Yuasa T, Tomikubo Y, Yamauchi T, Inoue A, Iwaya-Inoue M (2007) Environmental stresses activate a tomato SNF1-related protein kinase 2 homolog, SISnRK2C, *Plant Biotechnol.* 24, 401-408

No. 0827

## A Novel Breeding Method of Sweet Tomato by Utilizing Salt Sensing Signal Molecules Regulating Na<sup>+</sup> Transporter

Takashi Yuasa and Mari Iwaya-Inoue

Kyushu University

### Summary

Floral and reproductive organs are relatively sensitive to biotic and abiotic stresses compared with vegetative organs. Calcineurin B-Like molecule (CBL) Interacting Protein Kinase (CIPK) has appeared to be involved in acquiring tolerance and acclimation under environmental stress such as salinity, drought and chilling. To examine whether CIPK functions in reproductive organ-specific stress signaling, expression profiles of Calcineurin B-Like molecule (CBL) Interacting Protein Kinases (CIPK) were analyzed by semi-quantitative RT-PCR with a set of CIPK homolog specific primers. SICIPK2 has been identified as a floral organ-specific CIPK in tomato Micro-Tom. Furthermore, an anti-CIPK specific antibody cross-reacted to a CIPK-related polypeptide at a significant level in flower particularly, in stamen, to the recombinant protein of the flower specific CIPK, SICIPK2. The flower specific CIPK is tightly associated with the microsomal fractions. A specific antibody was raised against tomato SOS3 homolog which is possibly involved in salt tolerance. The anti-SISOS3 antibody cross-reacted to a 30-kDa polypeptide in leaf but not in flower. Protein level of SISOS3 in leaf increased when tomato plant was subjected to salt stress. SISOS3 appeared to bind to microsomal fraction of leaf as same as tomato CIPK. The present data suggests that the flower-specific CIPK, SICIPK2, is involved in calcium signaling and stress tolerance in stamen and pollen in tomato and that tomato SOS3 possibly regulating salt stress signaling function in leaf but not in flower.