

ラフィノース属オリゴ糖の合成による作物の塩・乾燥ストレス耐性増強法の開発

井上 眞理, 湯淺 高志

九州大学大学院農学研究院

概要 シロイヌナズナでは、塩・乾燥ストレスにより、ラフィノース属オリゴ糖の蓄積により耐性を獲得していることが報告されているが、主要作物であるトマトやダイズではその詳細は知られていない。本研究では、これらの植物を対象に、主にラフィノース属オリゴ糖合成の律速酵素であるガラクトキノール合成酵素 *GalS* に焦点を当て、塩・乾燥ストレス耐性遺伝子の発現メカニズムを明らかにした。トマトに塩ストレス処理 (0.2 M 3, 8 h) を行い、本研究室において新規にクローニングされたガラクトキノール合成酵素遺伝子 (*SlGalS2*, accession number, AB486014) は塩ストレスや高温ストレスに応答して顕著に誘導されることや、塩ストレスに応答した ABA シグナルとは別の経路により遺伝子発現が誘導されることが示唆された。*SlGalS2* を発現した大腸菌は 0.4 M NaCl と *myo*-イノシトールを含む塩ストレス培地においてコントロールベクターと比較して、顕著な増殖速度の増加を示したことから大腸菌内で発現した *SlGalS2* がガラクトキノールを合成することにより、浸透圧耐性を向上させたと考えられる。また、ダイズの乾燥ストレス処理において、 H_2O_2 前処理は *myo*-イノシトールリン酸合成酵素 (*MIPS2*) や *GalS* を誘導し、*myo*-イノシトールやガラクトキノールを蓄積していることが明らかになった。 H_2O_2 前処理により、乾燥ストレス条件でも気孔を閉鎖しなかったことから、ラフィノース属オリゴ糖の合成による浸透圧の増大により、乾燥ストレスを軽減していると考えられる。

さらに、*GalS* 遺伝子に加えて、一連の塩ストレス応答遺伝子の発現に関わるマスター調節因子として、CBF/DREB および植物の塩ストレス・低温応答においてアブシジン酸を経由しないシグナルカスケードの上流で働くマスター調節遺伝子である MYC 転写因子 ICE (Inducer of CBF Expression) にも着目した。トマトゲノムデータベース MiBASE (かずさ DNA 研究所) から得られたトマト ICE1 ホモログと他の植物種の ICE1 ホモログを比較したところ、bHLH ドメインの 19 アミノ酸が高度に保存されていることを見いだした。この ICE 特異的ペプチドを抗原として抗-ICE 特異的ペプチド抗体を作成し、塩ストレスシグナルに関わる ICE-CBF カスケードについて免疫化学的な解析を行った。

その結果、従来シロイヌナズナにおいてのみ分子遺伝学的な研究対象となっていた低温応答性遺伝子発現をマスター調節する MYC 型 bHLH タイプ転写因子が、トマトにおいても塩ストレスに応答した遺伝子発現調節に関与することが示された。またシロイヌナズナ ICE1 は GFP や FLAG タグなどを融合して組み換え植物で過剰発現した ICE 分子の抗原タグを検出して得られた研究であった。これに対し、今回 ICE 特異的ペプチド抗体を用いた実験は、植物の内在性 ICE 関連タンパク質の直接検出を可能にした。これにより、主要作物の塩ストレスに対する ICE ホモログの機能解析に、免疫化学的な手法を確立した点に意義があると考えられる。これらの基礎研究により、塩類蓄積した土壌においても栽培可能な作物を作出する育種法を開発することが期待される。

1. 研究目的

モデル植物のシロイヌナズナにおいて、塩・乾燥ストレスにより誘導される浸透圧ストレス耐性メカニズムとして、ラフィノース属オリゴ糖を蓄積することで植物が耐性を獲得

していることが報告された (Nishizawa *et al.*, 2008)。器官特異的な発現としては、成熟に伴って乾燥耐性を獲得する種子においてラフィノース属オリゴ糖合成の律速酵素であるガラクトキノール合成酵素 (*GalS*) が高いレベルで発現

する(Fig. 1)。そこで、シロイヌナズナ *GolS* と高い相同性を示すトマトのホモログ遺伝子候補を EST 配列情報から検索し、その全長 cDNA (*SlGolS2*) をクローニングし、発現調節とその機能について明らかにする。本研究では、*GolS* 遺伝子に加えて、一連の塩ストレス応答遺伝子の発現に関わるマスター調節因子として、CBF/DREB および植物の浸透圧ストレス応答においてアブシジン酸を経由しないシグナルカスケードの上流で働くマスター調節遺伝子 ICE (Inducer of CBF Expression) にも着目した。ICE は植物特有の AP2/ERF 型転写因子である塩・低温応答性転写因子 CBF/DREB の発現調節に機能していることも知られているが (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Dubouzet 2003; Zarka *et al.*, 2003)、トマトではまだその報告がない。本研究では、浸透圧ストレスに応答して ICE タンパク質がユビキチン-プロテアソーム分解系により調節を受けることから、抗 ICE 特異抗体を作成し (Nakamura *et al.*, 2011; in press)、その発現を調べることにより、塩ストレスに伴う新規転写因子 ICE の機能について解析する。一方、乾燥ストレス下の植物における活性酸素種 (ROS) の機能についても注目した。ROS は乾燥応答に重要な気孔の開閉を調節することが報告されており、様々なストレス耐性メカニズムにおいてセカンドメッセンジャーとして働くことも知られている。

本研究では、塩や乾燥ストレス下で ICE を高発現する作物を作出するための基礎研究として、主にラフィノース属オリゴ糖合成の律速酵素であるガラクトキノール合成酵素 *GolS* に焦点を当て、トマトとダイズにおける塩・乾燥ストレス耐性遺伝子の発現メカニズムを明らかにする。

2. 研究方法

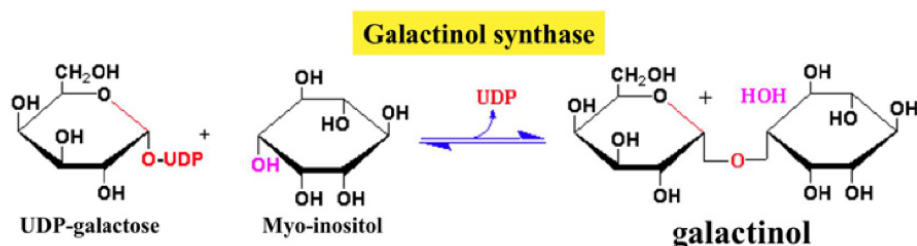


Fig. 1. Galactinol synthase (*GolS*) の働き。UDP-ガラクトースからガラクトースを myo イノシトールへ転移してガラクトキノールを合成する。

2. 1 材料

トマト *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom を用いた。種子は Tomato Grower Supply Company (USA) より入手した。1×MS を含む 0.4% ゲランガム培地に播種し、暗黒条件下、4°C 2 日間の春化処理を行った後、インキュベーター (16L/8D, 25°C) にて 10 日間栽培を行った。播種 4 週間目のトマトに対して、塩 (0.2 M NaCl)、高温 (42°C) 条件および ABA 添加区を設け 3、8 時間の処理を行い、以下の方法により実験を行った。

一方、乾燥ストレス実験には、ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) cv. フクユタカを用いた。プラポット 4 号 (0.7 L) を用いて、22°C、自然光条件下で 3 週間栽培した。乾燥ストレスは灌水を断つことにより与えた。乾燥処理開始日に、葉に 1 mM H₂O₂、対照区として蒸留水 (DW) を 1 ポットあたり、それぞれ 100 ml スプレー散布し、その後 8 日間の乾燥処理を行った。植物体の変化に及ぼす要因として (Fig. 2)、乾燥ストレス処理 2 日毎に、土壌含水率、葉の相対含水

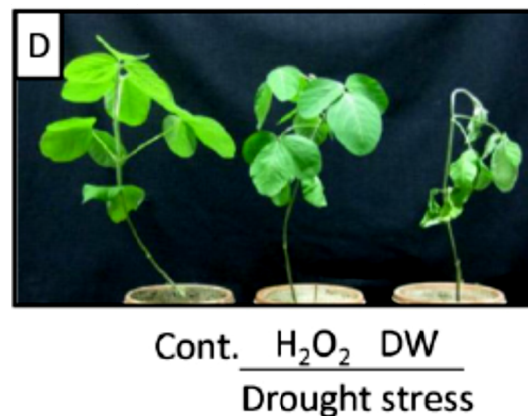


Fig. 2. ダイズの乾燥ストレスにおける H₂O₂ 前処理効果。乾燥処理後 6 日目。

率、光合成関連パラメーターおよび乾燥ストレス応答遺伝子の発現について以下の実験を行った。

2. 2 光合成速度の解析

携帯型光合成測定装置 (LCpro+Portable Photosynthesis System, ADC BioScientific 社)を用いて光合成速度を測定した。設定条件として、CO₂ 濃度 370 μmol CO₂ mol⁻¹、葉温 28°C、光強度 1500 μmol m⁻²s⁻¹で行った。測定部位として最上位の展開葉から数えて 3 番目の葉を用いた。反復数は 3~4 とした。

2. 3 ガラクチノール、ラフィノースの解析

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 機器は、SHIMAZU HPLC LC-10A システム(ポンプ:LC-10AD, カラムオープン:CTO-10A, 検出器:RID-10A)を使用し、定量用カラムとして Shodex Asahipak NH2P-50 4Eを用いた。移動相はアセトニトリル:蒸留水 = 75:25 で混合したものを用い、流速は 0.7 ml min⁻¹、カラムオープンと示差屈折計の温度を 30°C に設定して分析し、ラフィノース、ガラクトノール、myo-イノシトール、スクロースを定量した。

2. 4 CBF/DREB, GolS発現変動の解析

SlGolS2, *GmGolS2* およびストレスシグナル関連遺伝子の発現変動を半定量的 RT-PCR により解析した。トマトゲノムデータベース MiBASE (かずさ DNA 研究所) から *AtGolS1*, 2, 3 と同源性の高いトマト GolS ホモログの 5', 3' 部分配列 EST (TC20064, TC208540) を元にトマト Micro-Tom cDNA ライブラリーから PCR によりトマト GolS (*SlGolS2*, AB486014) の全長 cDNA をクローニングした。播種 4 週間目のトマト Micro-Tom にストレス処理した植物

体から SDS-フェノールー LiCl 法によりトータル RNA を抽出した。ダイズ葉でも同様に、常法に従いトータル RNA を抽出した。

Rever TraACE 逆転写酵素 (TOYOBO) および GoTaqDNA ポリメラーゼ (Promega) と遺伝子特異的プライマー (Table 1, 2) を用いて半定量的 RT-PCR により、トマト植物体の *SlGolS2* およびダイズ葉の *GmGolS*、熱ショックタンパク質 *HSP17.6* とアクチンの発現レベルを解析した。トマトおよびダイズの GolS 組換え体タンパク質を発現するプラスミドを構築し、GolS を発現する大腸菌の塩ストレス耐性を解析した。全長 *SlGolS2* および全長 *GmGolS* を PCR で増幅して GST 誘導タンパク質発現ベクター pGEX-KG ori に挿入した。コントロールベクター、pGEX-*SlGolS2* および pGEX-*GmGolS* を持つ大腸菌 NovaBlue 株の増殖速度を 0 M NaCl (コントロール) 及び 0.4 M NaCl を含む LB アンピシリン寒天培地を用いて 37°C で培養して比較した。

2. 5 マスター調節転写因子 ICE の免疫化学的解析

植物体からのタンパク質の抽出および SDS-PAGE 用サンプル調製は常法によって行った。ICE はそのタンパク質レベルがユビキチン-プロテアソーム分解系により調節を受けることから、ICE の機能を調べるには植物内在性 ICE タンパク質を検出する方法が必要である。そこでトマト、ダイズ、シロイヌナズナなど高等植物の ICE、MYC を含む bHLH 型転写因子ホモログを比較した。その結果、ICE ファミリーに良く保存された 19 アミノ酸から成るペプチド配列を見だし、それを抗原として抗 ICE 特異的ペプチド抗体

Table 1. トマト適合溶質合成関連遺伝子の配列

Table I A set of oligo DNA primers used for RT-PCR of <i>SlGolS2</i> (AB486014) and other genes	
<i>SlGolS2</i> -FL-5 :	5-AATGGCACCTAATGTTTTTGGTCTTGCAAC-3
<i>SlGolS2</i> -RTPCR-3:	5-GAGTGATGGCTTAGGGCCCAAGTCTTCAGT-3
<i>SlGolS2</i> -FL-3:	5-TAGAAGAAGTAAATTGCCTGCTCCCCTAT -3
LeHSP17.6-5:	5-GCCGATCCAAAATGGATTTGAGGTTGTTGGGTATCGAT -3
LeHSP17.6-3:	5-CCGAATTCAACTTTCACCTCAATTGTTTTGGG-3
Actin-5:	5-ACCCAATTGAGCACGGAATT-3
Actin-3:	5-GCCAATGCAGTAATTTCTTTGC-3

SlGolS2-FL-5 and *SlGolS2*-FL-3 were used for construction of pGEX-*SlGolS2*. *SlGolS2*-FL-5 and *SlGolS2*-RTPCR-3 were used for detection of *SlGolS2* in RT-PCR.

Table 2. サイズ適合溶質合成関連遺伝子の配列

Table II A set of oligo DNA primers used for RT-PCR of <i>GmGolS</i> , raffinose synthase (<i>RS</i>) and other genes	
GmHsfA	2-5'5'-CTGAGATTCTATCTACTCCTCAAG
GmHsfA2-3'	5'-GCTAAGGTTACCTTGCACAATATG
GmGolS-5'	5'-ACTGGATCCATGGCTCCTAATATCACCCT
GmGolS-3'	5'-GACAAGCTTAAGCAGCAGATGGGGCACGGA
GmGolS-FL-5	5'-TTCGGATCCATGGCACCTAACATCACCACC-3
GmRS-5'	5'-TCTGATGTTGACCTCATCACACAA
GmRS-3'	5'-TTACAACAAAACCCCTTCTCCTGAT

GmGolS-5 and GmGolS-3 were used for detection of GmGolS in RT-PCR. GmGolS-FL-5 and GmGolS-3 were used for construction of pGEX-*GmGolS*.

を作成した。トマト植物体における塩ストレスに応答したタンパク質レベルの変動をイムノブロットにより解析した。塩ストレスに応答したICEのタンパク質レベルの変動と、その下流で塩ストレス応答遺伝子の調節に関わる CBF/DREB 遺伝子の発現レベルを半定量的 RT-PCR により調べた。

3. 研究結果

3.1 トマトの塩ストレス応答

AtGolS1, *AtGolS2* は塩・高温ストレスや乾燥で発現上昇するほか種子で強く発現している (Nashizawa *et al.*, 2008)。トマトに塩ストレス (0.2 M NaCl 3, 8 h) 処理を行い、*SlGolS2* mRNA の変動を解析した。半定量的 RT-PCR により *SlGolS2* は低分子量熱ショックタンパク質 *LeHSP17.6* と同様に塩ストレスにより一過性の発現上昇が認められた (Fig. 3)。次に高温ストレスおよび ABA 処理による *SlGolS2* の発現変動を塩ストレス処理と比較した。半定量的 RT-PCR により塩ストレスは *SlGolS2* mRNA を顕著に増加させると共にその mRNA レベルは 8 時間でも維持されていることが明らかになった。一方、*LeHSP17.6* は熱ストレスによってのみ増加し、塩ストレスや ABA 処理では変動が観察されなかった。

以上の結果から、トマトから新規にクローニングされたガラクトキノール合成酵素遺伝子 *SlGolS2* は塩ストレスや高温ストレスに応答して顕著に誘導されること、塩ストレスに応答した ABA シグナルとは別の経路により遺伝子発現が誘導されることが示唆された。今回クローニングされた *SlGolS2* の 1014 bp の ORF は 338 アミノ酸、分子量 38.8 kDa、等電点 5.35 のタンパク質をコードしていた。シロイヌ

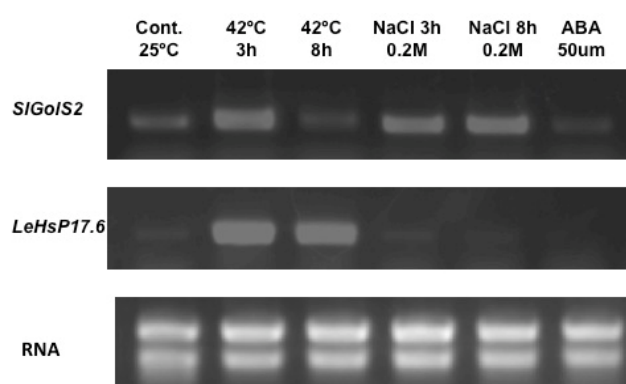


Fig. 3. トマトの塩、高温ストレスおよび ABA 処理による *SlGolS2* 発現

ナズナのストレス応答性 *GolS* である *AtGolS1* と 75%、トマトの種子特異的に発現する *LeGolS1* とは 61% の相同性を示したことから、この *SlGolS2* 遺伝子は種子特異的な発現を示す *LeGolS1* と異なりトマトのストレス応答に関与していることが推定された。

SlGolS2 の機能解析のために GST 融合タンパク質発現ベクターにクローニングして大腸菌に導入した際の適合溶質合成能力を検討した。*SlGolS2* を発現した大腸菌は 0.4 M NaCl と *myo*-イノシトールを含む塩ストレス培地においてコントロールベクターと比較して、顕著な増殖速度の増加を示した (Fig. 4)。このことは大腸菌内で発現した *SlGolS2* がガラクトキノールを合成することで大腸菌の浸透圧耐性を向上させたと考えられる。我々はイネ *GolS* を発現させた大腸菌の浸透圧耐性が向上することを報告しており (Thuy *et al.*, 2009)、*SlGolS2* と *OsGolS1* のいずれの遺伝子もガラクトキノール合成能を持つことが示唆された。

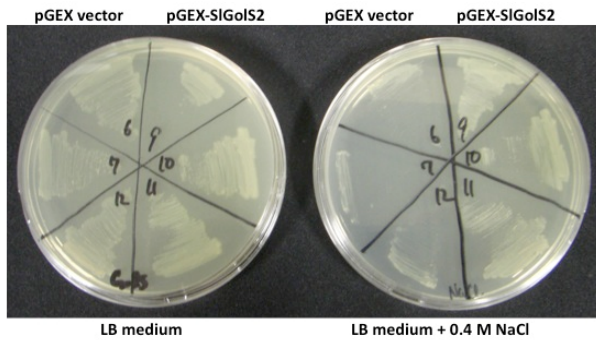


Fig. 4. *SiGolS2* を発現した大腸菌の耐塩性の獲得

3. 2 ダイズの乾燥ストレス応答

ダイズの乾燥ストレス処理において、栽培ポットの土壌含水率は、 H_2O_2 散布処理区 (H_2O_2 + 乾燥区) と DW (蒸留水) 散布処理区 (DW + 乾燥区) において有意な差はみられなかったことから、両処理区に同様の乾燥ストレスが与えられたことを確かめた (data not shown)。乾燥処理後 6 日目において、DW+乾燥区で顕著な萎れがみられたが、 H_2O_2 + 乾燥区ではみられなかった (Fig. 1)。乾燥処理期間中、葉の相対含水率は DW + 乾燥区に比べ H_2O_2 + 乾燥区において高かったことから、 H_2O_2 散布処理により葉の水分が保持されたことを示唆した。光合成速度は DW + 乾燥区に比べ H_2O_2 + 乾燥区が高かった (Fig. 5)。また、気孔コンダクタンスでは対照区と有意な差が見られなかったことから、前処理として、 H_2O_2 散布による葉の水分保持は気孔の閉鎖によるものではないことが示唆された。

近年、植物のラフィノース属オリゴ糖 (ガラクトキノール) が乾燥・低温などのストレスに対する耐性を得るために適合溶質として機能することが知られていることから (Nishizawa *et al.*, 2008)、 H_2O_2 前処理におけるガラクトキノール合成酵素 (*GolS*) とガラクトキノール合成の上流で働く *myo*-イノシトール合成酵素 (MIPS1, MIPS2, MIPS3, MIPS4) をコードする遺伝子発現解析を行った (Fig. 6A)。その結果、 H_2O_2 前処理は *MIPS2* と *GolS* を著しく誘導することが明らかになった。また、*myo*-イノシトールは H_2O_2 前処理 6 日後に顕著に蓄積しその後急激に減少したのに対し (Fig. 6B)、ガラクトキノール (Fig. 6C) は乾燥処理 4 日以降から高い値を推移した。今回の発現解析で着目した *GmGolS* を pGEX ベクターに組み込み発現した大腸菌は 0.4 M NaCl と *myo*-イノシトールを含む塩ストレス培地においてコントロールベクターと比較して、顕著な増殖速度の増加を示したこ

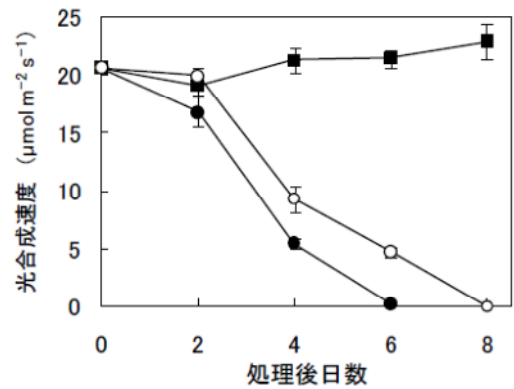


Fig. 5. 乾燥ストレス下のダイズの葉の光合成速度の推移。

■, 対照区; ○, H_2O_2 +乾燥区; ●, DW+乾燥区。

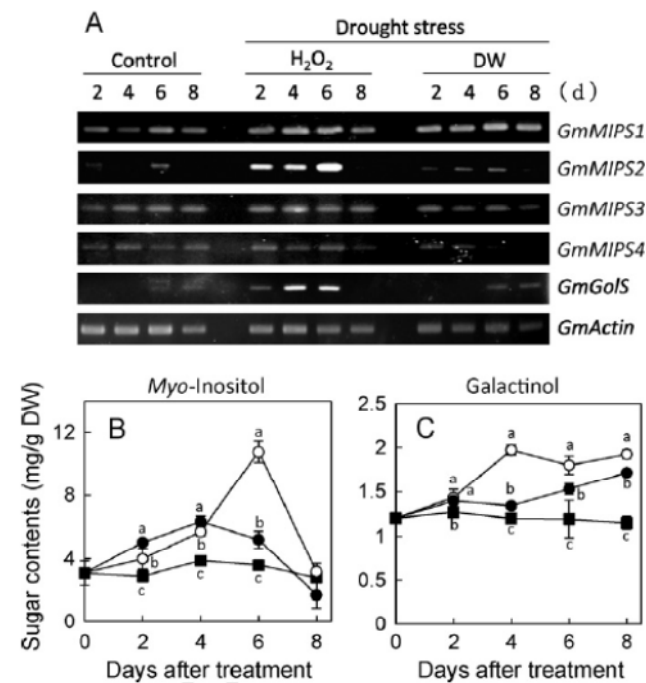


Fig. 6. 乾燥ストレス下のダイズの葉の *GmMIPs*, *GmGolS* など適合溶質関連遺伝子発現と糖含量の推移。■, 対照区; ○, H_2O_2 +乾燥区; ●, DW+乾燥区。

とから、*GmGolS* は実際にガラクトキノール合成機能をダイズで発揮していると推測された (data not shown)。これらの結果から、 H_2O_2 前処理は *MIPS2* や *GolS* を誘導し、*myo*-イノシトールやガラクトキノールを合成していることが明らかになった。即ち、これらの適合溶質の合成により、葉内の浸透圧を高め、乾燥ストレス条件でも気孔を閉鎖せずに葉の水分を保持することで、乾燥ストレスを軽減すると考えられる。このことから、乾燥ストレス回避技術として H_2O_2

前処理は、農業の現場で応用可能であることを示唆している。

4. 考察

植物は浸透圧・温度ストレスの適応メカニズムにおいて、トマトではプロリン、トレハロース(Tomikubo *et al.*, 2007)、イネでは、ガラクトキノールなど適合溶質の増大が重要な役割を果たしている事を報告した(Phan *et al.*, 2009)。本研究により、トマトから新規にクローニングされたガラクトキノール合成酵素遺伝子 *SlGolS2* は塩ストレスに応答して顕著に誘導されることが示唆された(Fig. 3)。*SlGolS2* を発現した大腸菌は 0.4 M NaCl の塩ストレス培地において、コントロールベクターと比較して顕著な増殖速度の増加を示したことから(Fig. 4)、大腸菌内で発現した *SlGolS2* がガラクトキノールを合成することで大腸菌の浸透圧耐性を向上させたと考えられる。

塩ストレスにより非 ABA 経路を介して *SlGolS2* が発現誘導されたことから(Fig. 3)、浸透圧シグナルカスケードのうち SnRK2 (Yuasa *et al.*, 2007) もしくは SnRK3/CIPK (Imamura *et al.*, 2008) などのストレス活性化キナーゼが *SlGolS2* の発現誘導に働く可能性が考えられる。シロイヌナズナでは *AtGolS1* および *Hsp17* は HSF2 を介して誘導される(Nishizawa *et al.*, 2008)。それらのトマトのオルソログである *SlGolS2*、*SlHSFA2*、*SlHSP17.6* の発現変動を解析したところ、高温処理と同様に H₂O₂ 処理により *SlGolS2*、*SlHSFA2* および *SlHSP17.6* の発現が顕著に上昇したことから(data not shown)、トマト植物体においてもシロイヌナズナにおいて示された活性酸素応答性 HSF2 を介した GolS 誘導メカニズムが保存されていることが示された。

トマトの塩ストレス耐性向上を目的として、トマトの MYC 転写因子 ICE1 (Inducer of CBF Expression) ホモログに着目し、塩ストレスシグナルに関わる ICE-CBF カスケードについて生化学的な解析を行った。トマトゲノムデータベース MiBASE (かずさ DNA 研究所) から得られたトマト ICE1 ホモログと他の植物種の ICE1 ホモログを比較して、bHLH ドメインの 19 アミノ酸が高度に保存されていた(Fig. 7A)。この共通アミノ酸配列 N-KMDRASILGDAIDYLKELL-C を抗原ペプチドとして抗 ICE1 特異抗体を作成した。抗-ICE1 抗体は *E. coli* で発現したトマト ICE1 組換え体タン

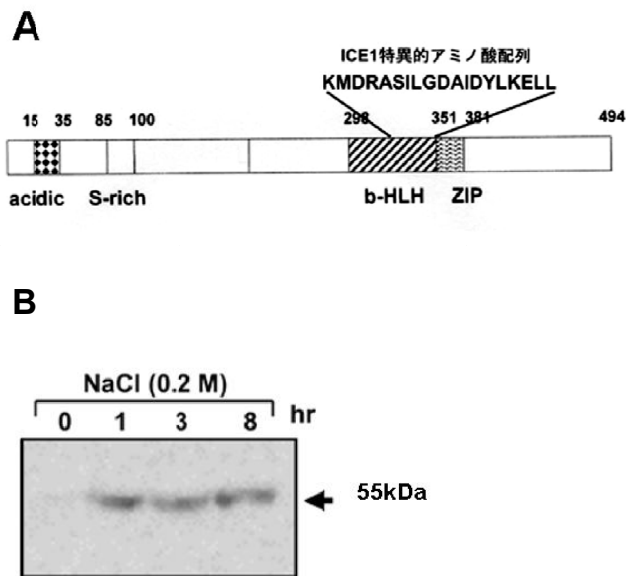


Fig. 7. トマトの cMYC 型転写因子 ICE1 の構(A)と塩ストレスにより誘導される ICE1 タンパク質(B)

パク質と特異的に交差反応することを確認した。塩ストレスに応答してトマト ICE1 の予想分子量と一致する 55 kDa タンパク質の増加がイムノブロットにより示された(Fig. 7B)。

一方、乾燥ストレス下のダイズにおいてもガラクトキノール合成の前駆体となるイノシトールの合成に働く myo-イノシトールリン酸化酵素をコードする遺伝子 *MIPS* の発現も乾燥や H₂O₂ 前処理で上昇した(Fig. 6)。対照区に比べ、乾燥ストレスによりラフィノースやガラクトキノールの含量が高い値を示したことから、ダイズは乾燥によりラフィノース属オリゴ糖が新たに合成され蓄積したと考えられる。さらに、H₂O₂ 前処理+乾燥区では、乾燥区に比べて高い適合溶質の含量を示したことから、H₂O₂ 前処理による適合溶質合成を促進したことで、細胞内の浸透圧や生体膜の健全性が維持されたと考えられる。このことから、ダイズ葉への H₂O₂ 処理により乾燥耐性の向上が示された(Ishibashi *et al.*, 2011)。ダイズにおいても乾燥ストレスや ROS により *GmGolS* 遺伝子の発現が誘導されたことから、シロイヌナズナやトマトと共通する *HSFA2* に加えて、それとは別のストレス応答性転写因子が *GmGolS* 発現調節に関与する可能性がある。シロイヌナズナでは高温ストレスに応答して生成した ROS が ROS 特異的熱ショック因子である *HSFA2* を誘導し、さらに *HSFA2* はガラクトキノール合成酵素遺伝子 *AtGolS1* のプロモーターに結合して *AtGolS1* の発現上

昇を介してガラクトキノール合成を増加することで、熱ストレス耐性を付与することが知られている (Nishizawa *et al.*, 2008)。最近、我々はトマトからラフィノース属オリゴ糖の律速酵素であるガラクトキノール合成酵素遺伝子 (*SiGolS2*) の単離と、*SiGolS2* が高温に応答して遺伝子発現が強く誘導されることを報告した (Yuasa *et al.*, 2009)。これに対し、低温ストレスに応答して、*OsGolS1* の発現上昇がイネの幼植物体で観察された (Phan *et al.*, 2010)。これらのことは、*GolS* 遺伝子発現調節メカニズムが植物種によって異なることを示している。*SiGolS2* の発現調節における活性酸素および活性酸素特異的熱ショック応答因子 HSFA2 の関与について検討した。その結果、ROS はストレスであるとともにシグナル分子として機能し、ROS 特異的シグナル分子 HSFA2 を介してガラクトキノール合成を誘導する遺伝子発現調節メカニズムがトマトとシロイヌナズナで共通していることが示された。

今回の研究で、従来シロイヌナズナにおいてのみ分子遺伝学的な研究対象となっていた低温応答性遺伝子発現をマスター調節する MYC 型 bHLH タイプ転写因子が、トマトにおいても塩ストレスに応答した遺伝子発現調節に関与することが示された。またシロイヌナズナ ICE1 は GFP や FLA タグなどを融合して組み換え植物で過剰発現した ICE 分子の抗原タグを認識して得られた研究であった (Dong *et al.*, 2006)。従って、今回 ICE 特異的ペプチド抗体を用いた実験により、植物の内在性 ICE タンパク質を直接、検出可能にしたことで、多くの作物における塩ストレスに ICE ホモログが関与するかどうか免疫化学的な解析手法を確立した点に意義があると考えられる。

5. 今後の課題

今後は、活性酸素処理によるオリゴ糖合成促進を利用したトマトの塩ストレス耐性の向上について栽培レベルで応用の可能性について検討を進める予定である。ICE1 タンパク質は塩ストレスや乾燥ストレス耐性に重要な分子である。塩ストレスや低温ストレスに応答した ICE1 タンパク質増加に対するプロテアソーム阻害剤およびプロテインキナーゼ阻害剤の影響について解析を進めており、塩ストレスシグナルに応答したトマト ICE1 の翻訳後修飾およびシグナルカスケードについて議論を予定している。今後は *SiGolS2* の発現調節メカニズムを分子レベルで解明するこ

とと、*SiGolS2* 過剰発現植物体などを用いたストレス耐性植物の作出とストレス耐性の表現型の解析を予定している。以上のような基礎研究によって得られた知見を応用し、塩類蓄積した土壌においても栽培可能な作物を作出する育種法を開発することが期待される。

謝 辞

本研究にご援助いただいたソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。

文 献

- Dong C-H, Agarwal M, Zhang Y, Xie Q, Zhu J-K (2006) The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8281-8286.
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 33: 751-763.
- Imamura M, Yuasa T, Takahashi T, Nakamura N, Nang MPSH, Zheng SH, 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 Biotechnol.* 25: 437-445.
- Ishibashi Y, Yamaguchi H, Yuasa T, Iwaya-Inoue M, Arima S, Zheng SH (2011) Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *J. Plant Physiol.* 168: In press
- Nakamura J, Yuasa T, Huong T, Harano K, Tanaka S, Iwata T, Phan T and Iwaya-Inoue M (2011) Rice homologs of inducer of CBF expression (*OsICE*) are involved in cold acclimation. *Plant Biotechnol.* 28: In press
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* 147: 1251-1263.
- Thuy P, Yuasa T, Okuda M, Tanaka S, Kurauchi E, Koda

- Y, Fujino T, Ishibashi Y, Iwaya-Inoue M (2009) Expression of chaperone-related genes in rice seedling under abiotic stresses. *Proceeding of the 6th International Joint Symposium between Japan and Korea 2009*, 6: 516-519.
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH (2003) The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15: 1749-1770.
- Tomikubo T, Yuasa T, Iwaya-Inoue M (2007) Analysis of chilling-induced trehalose-6-phosphate synthase (TPS) in tomato plants. *Cryobiol. Cryotechnol.* 53: 95-100.
- 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.
- Yuasa T, Phan T, Yamaguchi Y, Takahashi T, Ujiie M, Iwaya-Inoue M (2009) Tomato galactinol synthase (*SlGols2*) and environmental stress signaling. *Proc. 45th Conf. Biol. Haloph. Microorg* 45: 17-23.
- Zarka DG, Vogel JT, Cook D, Thomashow MF (2003) Cold induction of *Arabidopsis* CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a coldregulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiol.* 133: 910-918.

Development of Salt/Drought-Tolerant Crops by enhancing Raffinose-Related Oligosaccharide Synthesis

Mari Iwaya-Inoue, Takashi Yuasa

Faculty of Agriculture, Kyushu University

Summary

Salt stress and related drought stress on crops result in severe yield losses through growth retardation and irreversible damage. Recent studies indicated that raffinose-related oligosaccharides such as galactinol, *myo*-inositol and stachyose are synthesized in response to various stresses, salt stress and drought in higher plants and that the oligosaccharides play important roles in protection of proteins and biomembranes as osmolytes and antioxidants. In *Arabidopsis*, a galactinol synthase (*AtGolS1*) gene is expressed in seed and multiple *GolS*s are differentially regulated in plant under drought, salt stress and chilling. By searching for tomato EST coding *GolS* homologs in MiBASE (Kazusa DNA Institute), we isolated a novel tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) *GolS* full length cDNA (DDBJ accession number, AB486014) designated *SlGolS2* based on partial sequences of *GolS* homologs in MiBASE. *SlGolS2* was transiently induced in response to salt and heat stresses. The predicted protein of *SlGolS2* has high similarity to *AtGolS1* (75% in amino acid identity) rather than *LeGolS1* (61%). Furthermore, in signaling of salt stress in *Arabidopsis*, inducer of *CBF* expression 1 (*ICE1*) has been identified as the master regulator inducing dehydration responsive element binding protein / C-repeat binding factor (*DREB/CBF*)-type transcriptional factors. To examine whether tomato *ICE* homologs function in osmotic treatment via regulation of tomato *DREB/CBF* homologs in response to salt stress, profiles of *ICE*-related polypeptides in tomato were assessed by immunoblot with an antibody which was raised against a polypeptide epitope containing an *ICE*-specific motif. Salt stress on tomato plants induced an *ICE*-related protein with molecular masses of approximately 55 kDa indicating that the size is consistent with that predicted for tomato *ICE1*.

Furthermore, H_2O_2 pre-spraying to soybean (*Glycine max*) leaves exposed to drought stress immediately caused an increase in the mRNA levels of D-*myo*-inositol 3-phosphate synthase 2 (*GmMIPS2*) and *GmGolS*. In addition, H_2O_2 -presprayed soybean plant was more drought tolerant than DW-presprayed one. The levels of *myo*-inositol and galactinol were higher in H_2O_2 -pretreated leaves than in DW-pretreated leaves. These results indicated that H_2O_2 spraying enabled the soybean plants to avoid drought stress through the maintenance of leaf water content, and that this water retention was caused by the promotion of oligosaccharide biosynthesis rather than by rapid stomatal closure.