

## 海草アマモの耐塩性に関与する遺伝子を用いた耐塩性植物の作出

福原 敏行, 伊豆田 猛

東京農工大学大学院農学研究院

**概要** 農作物に対する乾燥や塩による被害は、世界中の農作物の収量を下げる最も大きな要因である。世界的な人口増加や砂漠化(塩分集積)に伴う耕作地の減少による食糧不足を克服するために、乾燥や塩などの環境ストレスに対して強い農作物を作出することが緊急の課題として求められている。

海草アマモ(*Zostera marina*)は、日本各地の海岸に見られる沈水性の被子植物で、イネやムギと同じ単子葉植物に分類されることから、陸上の単子葉植物が海水環境に適応・進化した植物であると考えられている。海水は、陸上植物にとって有害な塩(塩化ナトリウム)を約 3% 含むことから、このような高塩濃度環境下で生育できる農作物はほとんど存在しない。このように、海草は陸上植物にとって有害な塩化ナトリウムを多量に含む海水という厳しい環境に適応した植物である。本研究では、海草アマモの耐塩性を担う遺伝子を農作物に導入することによって耐塩性を付与することを最終目的とし、アマモから耐塩性候補遺伝子を選抜、モデル植物シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)やイネに遺伝子導入し、それら遺伝子導入植物について耐塩性・耐乾燥性・耐冷性の評価を行った。

アマモの成熟葉から精製した RNA から cDNA ライブラリーを作製し、大腸菌へと導入した後、6% の塩化ナトリウムを添加した培地でスクリーニングを行い、耐塩性への関与が期待される遺伝子(cDNA)を選抜した。選抜された 4 種類の cDNA (C2, C21, C81B, C107) をモデル植物シロイヌナズナに導入し、得られた遺伝子導入植物に対して、塩・乾燥・低温ストレスを処理した時の表現型や、アブシジン酸などの植物ホルモンを添加した培地での発芽率を解析した。その結果、機能未知のタンパク質をコードしている C21 遺伝子の導入によって塩・乾燥ストレスに対する耐性、エチレン応答性転写因子(ethylene response factor)をコードしていると考えられる C107 遺伝子の導入によって低温ストレスに対する耐性が付与されることが示唆された。同時に、以前の研究からアマモの耐塩性に関与することが示唆されている細胞膜プロトン ATPase 遺伝子(*ZHAI*)をイネに導入し、*ZHAI* 遺伝子導入イネの耐塩性の試験をすることを試みた。しかし、得られた *ZHAI* 遺伝子導入イネは、激しい矮性を示しストレス試験に供することができなかった。

アマモ由来の C21 遺伝子は、シロイヌナズナへの導入によって塩・乾燥ストレスへの耐性を付加するとともに、その遺伝子導入植物は通常栽培条件において野生型と比較した場合、成長の遅れや、矮性化、種子の減少等の負の表現型が観察されなかった。作物への耐塩性・耐乾燥性付与の為の有用な遺伝子資源になる可能性が示唆された。

### 1. 研究目的

食糧問題は 21 世紀最大の課題であり、人類の持続可能な社会を構築するために解決しなくてはならない問題である。農作物に対する乾燥や塩による被害は、世界中の農作物の収量を下げる最も大きな原因である。世界的な人口増加や砂漠化(塩分集積)に伴う耕作地の減少による食糧不足を克服するために、乾燥や塩などの環境ス

レスに対して強い農作物を作出することが緊急の課題として求められている。世界の耕地の約 20%、灌漑地の 50% 近くが塩害による影響を受けているといわれていることから、作物に対する塩ストレス耐性付与は非常に重要な研究課題である(Rhoades and Loveday, 1990)。

高濃度の塩に曝されることによって植物は、水ポテンシャルの低下や、細胞内外のイオンの恒常性攪乱、酵素活

性の低下などの影響を受ける。その結果、過酸化水素をはじめとした活性酸素種などが二次的に発生し、植物の成長・発達に悪影響が及ぶことが知られている。植物は、これらの要因に対してプロリンやグリシンベタインなどの適合溶質の産生、細胞膜および液胞膜プロトンポンプによるイオンの恒常性維持、活性酸素種除去酵素の生産を行うことで塩による障害を最小限に抑える(Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001)。しかし塩への応答性は植物種によって様々であり、イネ、コムギ、トウモロコシなど主要作物の多くは 100 mM 程度の塩でも生育・収量に悪影響が出てしまうため、土壌塩濃度の高い地域での栽培は難しい(Greenway and Munns, 1980)。そこでこれらの有用作物に遺伝子を導入して耐塩性を付与することを本研究の最終目標とした。

海草アマモ(*Zostera marina*)は、日本各地の海岸に見られる沈水性の被子植物で、イネやムギと同じ単子葉植物に分類されることから、陸上の単子葉植物が海水環境に適応・進化した植物であると考えられている。海水は、陸上植物にとって有害な塩(塩化ナトリウム)を約 3% 含むことから、このような高塩濃度環境下で生育できる農作物などの陸上植物はほとんど存在しない。このように、海草は陸上植物にとって有害な塩化ナトリウムを多量に含む海水という厳しい環境に適応した植物である(図 1)。そのため、アマモには高濃度の塩を含む海水中で生育するために何らかの耐塩性機構が発達していると考えられる。また、アマモは、イネなどの主要穀物と同じ単子葉植物に分類されることから、アマモ由来の遺伝子は、イネなどの穀物に遺伝子導入することによって耐塩性が付与されやすいと考えた。本研究では、海草アマモの耐塩性を担う遺伝子を農作物に導入することによって耐塩性を付与することを最終目的とし、アマモから耐塩性候補遺伝子を選別し、モデル植物シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)やイネに遺伝子導入し、それら遺伝子導入植物について耐塩性・耐乾燥性・耐冷性の評価を行った。

## 2. 研究方法

### 2.1 アマモ由来の耐塩生候補遺伝子のスクリーニング

千葉県富津市富津公園の海岸から海草アマモを採取し、研究室で人工海水にて付着したプランクトンなどの微生物を除去後、成熟葉からグアニジンチオシナネートを用



図 1. 海草アマモの群落(干潮時, 千葉県富津市で撮影)

いた RNA 精製法にて、RNA を精製した。精製した RNA の純度等は、アガロース電気泳動で確認後、その RNA を鋳型に逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。その cDNA をプラスミド pUC19 に挿入し、大腸菌 DH5 $\alpha$  株に導入した。このようにして作成したアマモ cDNA ライブラリーを導入した大腸菌を、6% NaCl を添加した培地で培養・スクリーニングを行い、耐塩性候補遺伝子 112 クローンを得た。これらのクローンを再度大腸菌に導入しスクリーニングを繰り返した。得られた cDNA クローンの塩基配列を決定し、BLAST 法により cDNA クローンがコードするタンパク質を推定した。

### 2.2 シロイヌナズナへの遺伝子導入

大腸菌によるスクリーニングにより得られた 4 種のアマモ由来 cDNA (C2, C21, C81B, C107, 表 1) について、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーターを付加し、遺伝子導入用プラスミド pART27 に導入した。作成したプラスミドをアグロバクテリウムに導入し、プロールディップ法にてシロイヌナズナの種子に遺伝子導入した。得られた種子を、カナマイシン添加培地でスクリーニングし、得られた候補株について、ノーザンハイブリダイゼーションにて、導入遺伝子の発現を確認した。

### 2.3 イネへの遺伝子導入

イネへの遺伝子導入には、パーティクルデリバリーシステムを使用した。アマモの細胞膜プロトン ATPase 遺伝子 (ZHA1) の全長 cDNA の上流に 35S プロモーターを付加し、pCAMBIA1302 に挿入したコンストラクトを作成した。

表 1. 海草アマモからスクリーニングされた耐塩性候補遺伝子

クローン番号	cDNA のサイズ(bp)	相同性のある遺伝子
C2	496	Glutathion S-transferase
C21	1496	Unknown
C25	432	Glutathion S-transferase
C27	784	Cyclophilin
C33	906	Chlorophyll a/b-binding protein
C38	824	Chlorophyll a/b-binding protein
C43	563	Cytochrome subunit
C63	527	Histone H2B
C81A	358	Glutaredoxin
C81B	1339	Kelch repeat-containing F-box family protein
C105	897	Chlorophyll a/b-binding protein
C107	1214	Ethylene response factor

ボンバートメントを行ったカルスをハイグロマイシン B 添加培地で選抜し、さらに植物体の再生を試みた。

#### 2. 4 シロイヌナズナの発芽試験

シロイヌナズナの種子 25 粒を滅菌処理した後、MS 培地と MS+ABA 培地に播種し、4°C の暗所で 2 日間低温処理を行った後、恒温室 (22°C, 明期 16 時間: 暗期 8 時間) に移し、発芽した個体の数をカウントして発芽率を求めた。本実験では根が出た時点で発芽と見なしている。

#### 2. 5 シロイヌナズナの葉の蒸散試験

シロイヌナズナを恒温室 (22°C, 湿度 45%, 明期 16 時間: 暗期 8 時間) で播種後 10 日間栽培し、5 個体ずつ地上部のみを切り取って薬包紙上に置き、重量の変化を計時的に測定した。独立した 3 回の実験の平均を求めた。

#### 2. 6 シロイヌナズナのストレス試験

B5 培地で発芽後、バーミキュライトに移植して栽培した 7 週齢の植物体を、育苗ポットごと乾燥したトレーに移し、以降は水の代わりに塩化ナトリウム水溶液 (150 mM および 250 mM) を週に 2 回、100 ml ずつ与えることにより塩ストレス処理を行った。同様に栽培した 7 週齢の植物体を、育苗ポットごと乾燥したトレーに移し、以降は給水を停止することによって乾燥ストレス処理を行った。塩・乾燥ストレス処理中も温度・光条件は通常の栽培条件と同様に保った。低温ストレスは、5 週齢の植物体を 4°C・長日 (明期 16 h: 暗期 8 h) 条件の低温室に移して処理した。

### 3. 研究結果と考察

#### 3. 1 大腸菌を用いたスクリーニングにより得られたアマモ耐塩性候補遺伝子

アマモ cDNA ライブラリーを導入した大腸菌を、6% NaCl を添加した培地で培養・スクリーニングを行い、耐塩性候補遺伝子 112 クローンを得た。これらのクローンを再度大腸菌に導入しスクリーニングを繰り返し、最終的に 12 クローンを選抜した。これら 12 クローンの cDNA の塩基配列を決定し、BLAST 法により、得られた cDNA クローンがコードするタンパク質を推定した (表 1)。さらに、その中から C2 (グルタチオン S トランスフェラーゼ, Glutathione-S-transferase, GST)、C21 (機能未知のタンパク質)、C81B (F-BOX タンパク質)、C107 (エチレン応答性転写因子, ethylene response factor, ERF) の 4 種の遺伝子 (cDNA) について、モデル植物シロイヌナズナに導入し、得られた遺伝子導入植物の表現型を解析した。

グルタチオン S トランスフェラーゼはグルタチオンと協調して過酸化水素を除去する抗酸化酵素であることが知られている。イネにおいてグルタチオン S トランスフェラーゼを過剰発現させた結果、過酸化水素の発生が減少し、塩耐性が付加されることも既に示されている (Gill and Tuteja, 2010)。エチレン応答性転写因子は、GCC box を持つ調節領域に結合する転写因子であり、エチレンやメチルジャスモン酸などの植物ホルモン応答性遺伝子の転写を調節することが知られている。オオムギ由来の ERF 型転写因子をシロイヌナズナで過剰発現させると塩に対して耐性を示すという報告がある (Jung *et al.*, 2007)。

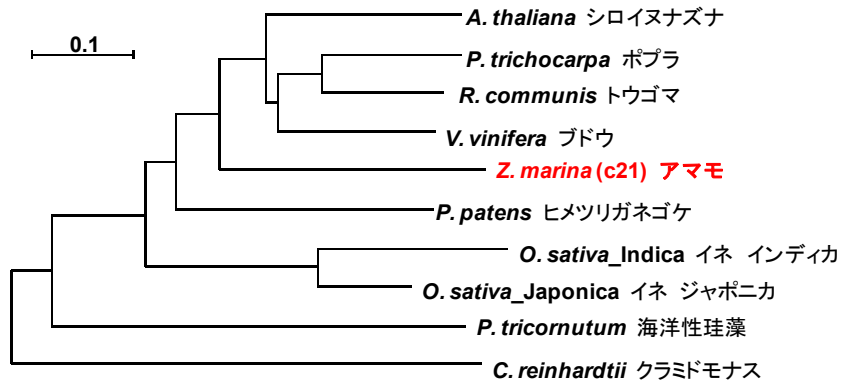


図 2. C21 タンパク質およびその相同タンパク質の系統樹

C21 遺伝子と相同性の高い遺伝子は、イネやシロイヌナズナといった草本をはじめ、セイヨウブドウなどの木本類、緑藻など他の多くの生物に存在し、良く保存された遺伝子であることが明らかになったが、いずれも機能未知であった。また、アマモの C21 タンパク質は、同じ単子葉類のイネの相同タンパク質に比べて、双子葉植物であるシロイヌナズナや木本であるセイヨウブドウなどとの相同性が高かった(図 2)。

### 3. 2 アマモ遺伝子導入シロイヌナズナの塩ストレス試験

B5 培地に播種し発芽させた後、バーミキュライトに移植し、ストレス処理を行わずに恒温室(22°C, 長日条件)で栽培した植物体を観察したところ、遺伝子導入植物体と野生型シロイヌナズナの間で表現型の顕著な差は見られなかった(図 3A, 図 4A, 図 5A)。

バーミキュライトで栽培した 7 週齢の植物体を、育苗ポットごと乾燥したトレーに移し、以降は水の代わりに 150 mM の塩化ナトリウム水溶液を週に 2 回、100 ml ずつ与えることによって、塩ストレス処理を行った。処理開始から 2 週間で C21 過剰発現体のみ、他の系統に比べて葉の白化した面積が少ないことが観察され、C21 遺伝子によってシロイヌナズナが耐塩性を獲得したことが示唆された(図 3B)。

また、塩ストレス処理前に比べて葉の色が濃くなっている。250 mM の塩化ナトリウム水溶液を用いて処理を行った場合は、全ての系統が一樣に白化、枯死した。塩ストレス処理の際、時間が経過するにつれて水分が蒸発し、塩化ナトリウム濃度が上がってしまうため正確ではないが、150 mM 程度の塩化ナトリウム濃度であれば、C21 遺伝子導入シロイヌナズナは耐性を示すことが示唆された。

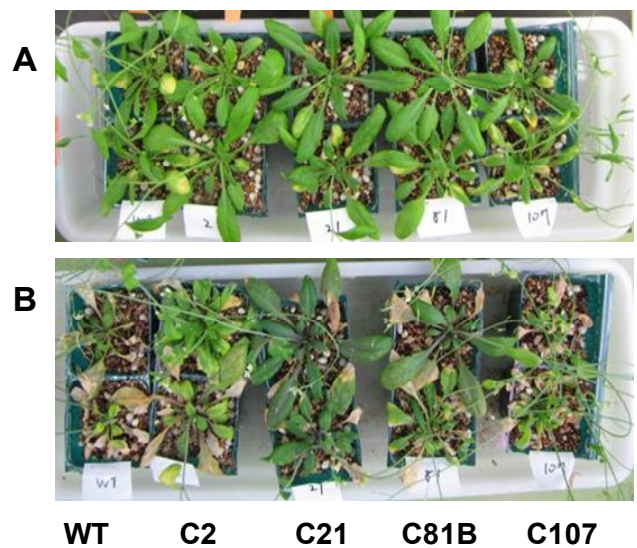


図 3. アマモ遺伝子導入シロイヌナズナの塩ストレス試験(150 mM NaCl)。A: ストレス処理前の植物、B: 塩ストレス処理開始から 14 日目の植物。WT: 野生型植物、C2: C2-1-4 株、C21: C21-1-5 株、C81B: C81B-1-1 株、C107: C107-1-1 株。

### 3. 3 アマモ遺伝子導入シロイヌナズナの乾燥ストレス試験

一般的に植物は様々なストレスに対して共通の耐性を示すことが多いため、塩以外のストレスに対する耐性が付加された可能性を考え、乾燥ストレスについても試験した。バーミキュライトで栽培した 7 週齢の植物体を、育苗ポットごと乾燥したトレーに移し、以降は給水を停止することによって乾燥ストレス処理を行った。その結果、乾燥ストレス処理開始から 2 週間で、C21 遺伝子導入個体で葉がほとんど白化しない個体が見られ、C21 遺伝子の導入によって



耐乾燥性を獲得したことが示唆された(図4B)。

### 3.4 アマモ遺伝子導入シロイヌナズナの低温ストレス試験

C107 がコードすると考えられるエチレン応答性転写因子は、低温、凍結ストレスに反応して下流の遺伝子の転写を活性化することが知られているため、低温ストレス試験を行った。バーミキュライトで栽培した5週齢の植物体を低温温室(4℃, 明期16時間:暗期8時間)に移して栽培し観察したところ、C107 遺伝子導入系統以外の系統ではストレス処理開始から1週間程度で葉に色素(アントシアニン)が蓄積し始め、5週間後には紫色の呈色が顕著に見られた。しかし、C107 遺伝子導入系統には、葉の色がほとんど変化しない個体が見られた(図5)。このことから、C107 遺伝子の過剰発現によってシロイヌナズナが低温に対して耐性を獲得した結果として植物への損傷が軽減されアントシアニンの蓄積が抑えられたという可能性と、本来発現するはずのストレス応答性遺伝子の発現が抑えられた

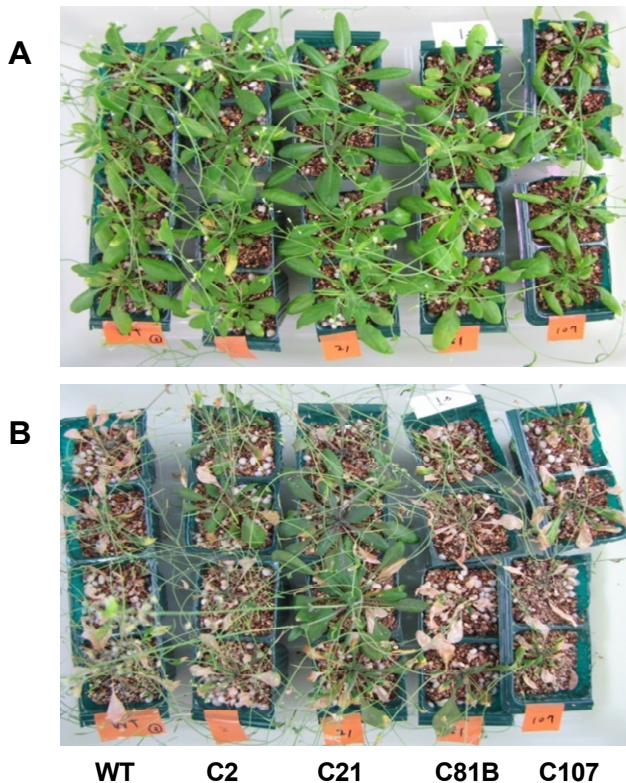


図4. アマモ遺伝子導入シロイヌナズナの乾燥ストレス試験。A: ストレス処理前の植物、B: 乾燥ストレス処理開始から14日目の植物。WT: 野生型植物、C2: C2-1-4株、C21: C21-1-5株、C81B: C81B-1-1株、C107: C107-1-1株。

結果、元来シロイヌナズナが持つ低温に対する応答が行われなかったという可能性が考えられた。しかし、アントシアニンの蓄積が顕著に見られた植物では葉の緑色が退色したアントシアニンが蓄積していること、C107 遺伝子導入系統の植物体の大きさや成長は他の遺伝子導入系統や野生型植物と同様であったことから、前者である可能性が高いと推測した。

### 3.5 アマモ遺伝子導入シロイヌナズナの発芽試験

植物は、塩や乾燥などの様々なストレスに対して、植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)やエチレンなどを介したシグナル伝達経路を介してストレスに反応することが知られている。そこで、アマモ由来遺伝子を導入したシロイ

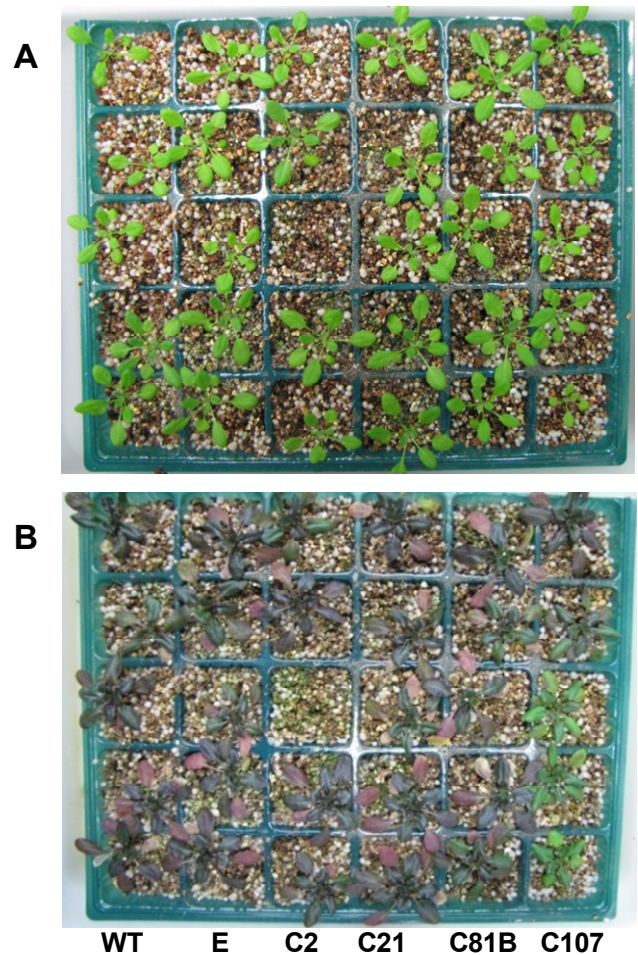


図5. アマモ遺伝子導入シロイヌナズナの低温ストレス試験。A: ストレス処理前の植物、B: 低温(4℃)ストレス処理開始から5週間目の植物。WT: 野生型植物、E: 空ベクター導入植物、C2: C2-1-4-7株、C21: C21-1-5-8株、C81B: C81B-1-1-5株、C107: C107-1-1-7株。

ヌナズナに対し、アブシジン酸やエチレンにたいする応答について試験した。

まず、アブシジン酸(ABA)を添加した培地での発芽・生育を試験した(図6)。ABAを含まないMS培地では系統間で発芽率に大きな差は見られなかった。しかし0.1 μMのABAを含む培地において、10日後の最終的な発芽率はどの系統も100%に近い結果となったが、C107遺伝子導入系統では発芽の遅れが見られた。このことからC107遺伝子の過剰発現によってABAに対する感受性が上がっていると考えられた。ERFファミリーにはABAによって発現が誘導される遺伝子が多く、RAP2.6と呼ばれるERFを過剰発現させた場合にもABAに感受性になることが知られている(Zhu *et al.*, 2010)。

C107がエチレン応答性転写因子と相同な遺伝子をコードしているため、エチレンの前駆体である1-アミノ-1-シクロプロパンカルボン酸(ACC)を添加した培地でも試験を行い、感受性の変化が見られるかを確認した。試験の結果、C107遺伝子を導入した植物では生育の抑制が起きていた(data not shown)。エチレンもストレス応答経路において重要な役割を示すことが知られており、その感受性の増加はこのC107もエチレン応答性の遺伝子がコードされていること、そして何らかのストレス応答経路に関与することが示唆された。

このように、アマモ由来のERF様遺伝子C107を導入することにより、複数の植物ホルモン(ABAとエチレン)に対する感受性が変化した。C107タンパク質は、シロイヌナズナ植物体中で本来のストレス応答性の転写因子として機

能していることが示唆された。

### 3.6 アマモ遺伝子導入シロイヌナズナの蒸散試験

乾燥ストレスに対して、植物は気孔を閉じることによって水分の損失を抑える機構を持っている。耐乾燥性の向上が見られたC21遺伝子導入植物について、葉からの水の蒸散の程度を、野生型および他のアマモ遺伝子導入系統と比較した。B5培地で10日間生育させたシロイヌナズナ5個体から地上部のみを切り取って薬包紙上に置き、葉の生重量を計時的に測定し、気孔からの水分蒸散に関連した短期的な水分調節に変化を解析した。その結果、各系統間で顕著な違いは見られなかった(data not shown)。C21遺伝子を含めアマモ遺伝子導入植物は、気孔の開閉に関与した短期的な水分調節には変化がないことが示唆された。

### 3.7 イネへのアマモ細胞膜プロトン ATPase 遺伝子(ZHA1)の導入

本研究室では、以前から海草アマモの耐塩性機構に注目し研究を続けてきた。その過程で、種子植物において細胞内外のイオンの恒常性維持に最も重要と考えられる細胞膜プロトン ATPase をコードする遺伝子(ZHA1)をアマモからクローニングし、その遺伝子発現の特徴等を解析した(Fukuhara *et al.*, 1996)。その結果、アマモの細胞膜画分のATPase活性は、海水程度の塩濃度(約0.5 M NaCl)では活性が阻害されないなど、陸上植物にはない酵素特性が明らかになり、この酵素がアマモの耐塩性に関与することが示唆された(Muramatsu *et al.*, 2002)。

本研究では、アマモ細胞膜プロトン ATPase 遺伝子

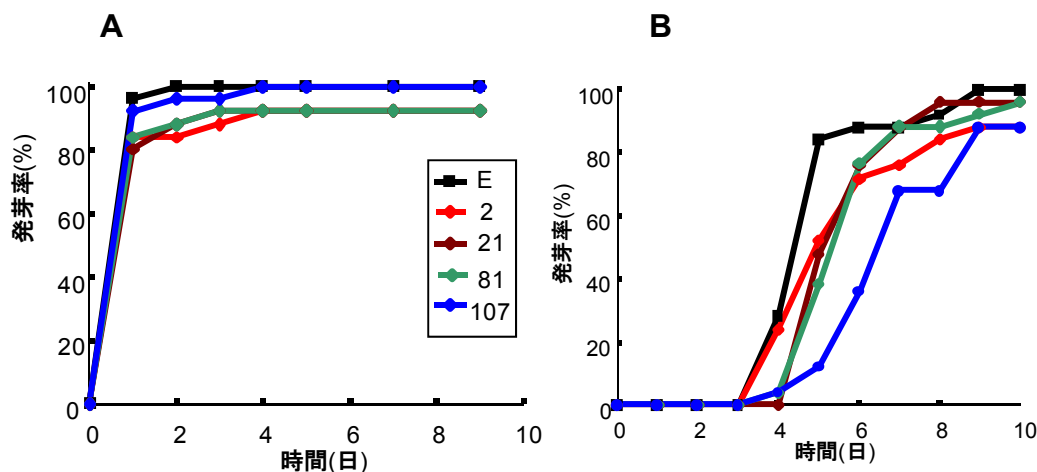


図6. アマモ遺伝子導入シロイヌナズナの発芽試験。A:MS培地、B:0.1 μM ABA含有MS培地、E:空ベクター導入植物、2:C2-1-4株、21:C21-3-7株、81:C81B-1-1株、107:C107-1-1株。



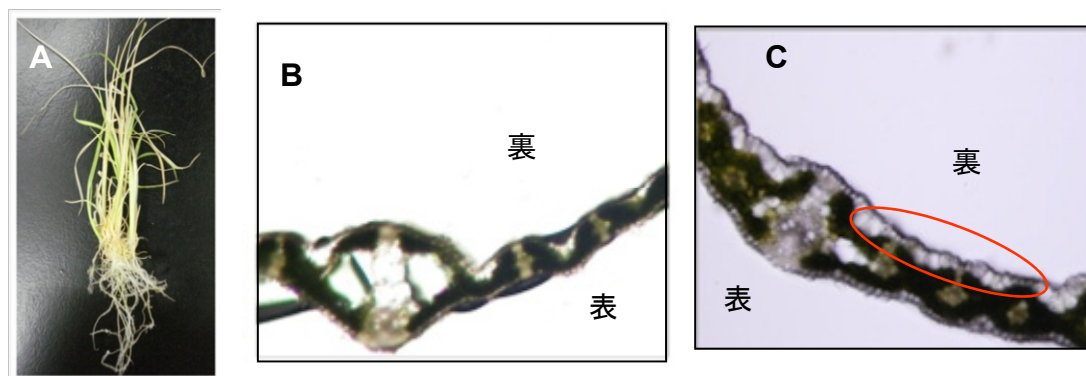


図 7. アマモ細胞膜プロトン ATPase 遺伝子 (*ZHAI*) 導入イネの表現型。A: 遺伝子導入イネ、野生型 (B) および遺伝子導入イネ (C) の葉の断面の顕微鏡図。アマモ *ZHAI* 導入イネは、強い矮性の表現型を示し、葉の裏側の表皮細胞が膨張している (赤楕円印)。

(*ZHAI*) をイネに遺伝子導入し、得られた *ZHAI* 遺伝子導入イネについて、耐塩性等のストレス応答試験をすることを試みた。日本晴品種のイネ胚にパーティクルガンを用いて遺伝子導入を行い、再分化した遺伝子導入イネを 10 数系統得た。しかし、*ZHAI* 遺伝子の導入が確認されたイネはどれも強い矮性を示した (図 7)。また、一部の遺伝子導入イネの葉では、その根元がねじれるような形をとる表現型が見られた。その葉を切除し、光学顕微鏡で横断面を観察したところ、葉の裏側の組織の細胞が野生型と比較して膨張していることが確認できた (図 7)。アマモ由来の細胞膜プロトン ATPase 遺伝子の導入・強制発現がイネの葉の形態形成や植物体の成長に対して負の影響を与えたことが示唆された。野生型イネと同様に成長した遺伝子導入個体が得られなかったため、遺伝子導入イネに対する種々のストレス試験は断念した。

#### 4. 今後の課題

モデル植物シロイヌナズナにおいて、アマモ由来の遺伝子 C21 の導入によって塩・乾燥ストレス耐性、C107 遺伝子の導入によって低温ストレス耐性が付加されることが示唆された。特に、C21 遺伝子は導入によって複数のストレスへの耐性を付加するとともに、その遺伝子導入植物は通常栽培条件において野生型と比較した場合、成長の遅れや、矮性化、種子の減少等、作物への導入にあたってのマイナスの表現型が出なかった。そのため、作物への耐塩性付与の為の有用な遺伝子資源になる可能性がある。

今後は、ストレス耐性の分子機構を明らかにするとともに、イネ等の作物に導入し、同様の耐塩性・耐乾燥性・耐冷性の効果が得られるか検討を進めてゆきたい。

#### 謝 辞

本研究にご援助頂きました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。本研究は、東京農工大学大学院農学府生物制御科学専攻、大堀智也氏、山本毅史氏、中村哲平氏の協力のもとに実施されました。心より感謝申し上げます。

#### 文献等

- Fukuhara T, Pak J-Y, Ohwaki Y, Tsujimura H and Nitta T (1996) Tissue-specific expression of the gene for a putative plasma membrane  $H^+$ -ATPase in a seagrass. *Plant Physiol.* 110, 35-42.
- Gill SS and Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909-930.
- Greenway H. and Munns R (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 31, 149-190.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. and Bohnert, H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- Jung J, Won SY, Suh SC, Kim H, Wing R, Jeong Y, Hwang

- I and Kim M (2007) The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* 225, 575-588.
- Muramatsu Y, Harada A, Ohwaki Y, Kasahara Y, Takagi T and Fukuhara T (2002) Salt-tolerant ATPase activity in the plasma membrane of the marine angiosperm *Zostera marina* L. *Plant Cell Physiol.* 43, 1137-1145.
- Rhoades JD, Loveday J (1990) Salinity in irrigated agriculture. In: Steward BA and Neilsen DR, eds. Irrigation of Agricultural Crops. ASA, CSSA, SSSA, Madison WI, pp. 1089-1142.
- Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6, 66-71.
- Zhu Q, Zhang J, Gao X, Tong J, Xiao L, Li W and Zhang H (2010) The Arabidopsis AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses. *Gene* 457, 1-12.



## Making Salt-Tolerant Plants by using Genes from a Seagrass

Toshiyuki Fukuhara and Takeshi Izuta

Tokyo University of Agriculture and Technology

### Summary

The majority of higher plants are sensitive to a high-salt environment. In particular, almost all crops are unable to tolerate saline conditions. Nevertheless, some unusual angiosperms, such as seagrasses, are able to thrive in saline environment. Seagrasses, which are monocotyledonous angiosperms, are peculiar in their ability to thrive in seawater. Terrestrial plants have almost entirely lost their tolerance to high salinity during the course of their evolution. However, tolerance mechanisms have evolved anew in seagrasses and allow these plants to thrive in seawater. Therefore, these marine angiosperms should have salt-tolerance mechanisms controlled by specific genes.

In order to make salt-tolerant plants (crops) by using genes from a seagrass (*Zostera marina*), we have screened candidate genes by using *E. coli*. A cDNA library was constructed from total RNAs purified from seagrass leaves, and transformed *E. coli* cells containing a seagrass gene were screened on a medium containing 6% NaCl. Twelve candidate genes involving salt-tolerance were obtained by this screening. Four of them (C2, C21, C81B and C107) were introduced into a model plant *Arabidopsis thaliana*, and then transgenic *Arabidopsis* plants have been characterized for their sensitivity against various stresses, such as salt, drought and cold (4°C). Transgenic plants with over-expressing a C21 gene, which encodes an unknown protein, exhibited to be tolerant against both drought and salt (150 mM NaCl) stresses. Transgenic plants with over-expressing a C107 gene, which is supposed to encode a homologous protein with ethylene response factor, exhibited to be tolerant against cold stress. Furthermore, we have made transgenic rice plants with over-expressing a putative plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene (*ZHA1*), which is likely to be involved in salt tolerance in a seagrass. However, since these transgenic rice plants exhibit a severe dwarf phenotype, further characterization to these rice plants for stress tolerance have not been carried out yet.

Introduction of the seagrass C21 gene confers both drought and salt tolerance to *Arabidopsis* plants, and do not affect negatively, such as dwarfism and growth retardation, to *Arabidopsis* plants on normal growth conditions. Therefore, C21 may be a potential gene for conferring drought and salt tolerance to crop plants.