

硫黄同化系の増強による耐塩性植物作出のための分子基盤： 塩が APS 還元酵素の発現と硫黄代謝物の蓄積を制御する分子機構の解析

丸山 明子

九州大学農学研究院

概要 硫黄は、植物の成長に必須な多量元素であり、硫黄同化効率は作物の生産性・質に大きく影響する。硫黄の同化は、硫酸イオンの吸収に始まる。硫酸イオンは、その後 APS 還元酵素 (APR) などによる数段階の還元反応をへて硫化物イオンとなり、O-アセチルセリンとの反応によりシステインへと同化される。硫黄欠乏 (-S) 下におかれた植物では、APR を含む硫黄同化系酵素の遺伝子発現および活性が上昇する。これは、限られた硫黄源を有効に活用するための植物の適応機構であると考えられる。一方、APR の発現及び酵素活性は、塩 (NaCl) 処理により促進される。このことは、NaCl による APR 活性の上昇が遺伝子発現レベルで調節されること、硫黄同化効率の増強により植物の塩ストレス耐性を向上しうる可能性を示唆している。本研究では、硫黄同化の調節に NaCl が果たす役割の解明、硫黄同化系の制御による NaCl 耐性の増強を長期的な目標とし、NaCl 及び硫黄栄養による APR 遺伝子の発現制御機構の解明を目指した。

シロイヌナズナの APR (APR1, 2, 3) の内、-S 及び NaCl に対する応答が顕著である APR2, APR3 の上流域、各 2,474 bp、2,184 bp について、5'側から約 300 bp ずつ欠失させた断片の制御下にルシフェラーゼを発現する形質転換植物を作製した。これらの形質転換体について、硫黄十分 (+S)、-S、NaCl 処理下におけるルシフェラーゼ活性を測定した。得られた結果から、APR2, APR3 どちらについても、300 bp という短い領域に NaCl および -S に対する応答を担う領域を絞り込むことができた。この結果から、両応答領域が一致する可能性が強く示唆される。両応答領域が一致するとすれば、NaCl 応答と硫黄栄養応答の情報伝達系間にクロストークが存在する可能性が示唆される。クロストークの有無およびその生理的な意義に興味を持たれる。

NaCl 処理時の硫黄同化産物量を測定したところ、低濃度の NaCl 処理により硫黄同化産物量が増す傾向が示された。このことは、NaCl 処理が硫黄同化効率を高める可能性を示している。今後、一過的な NaCl 処理の影響や総硫黄量、硫黄濃度を变化させた際の硫黄同化産物量に及ぼす NaCl の影響を調べることで、APR の発現や活性との相関をより明確にできると考えている。

今後の研究により、農業現場における NaCl の施肥法およびその有用性を実証するとともに、NaCl 処理により作物中の有用含硫化合物を増加させる方法を開発していきたい。

1. 背景および研究目的

硫黄は、植物の成長に必須な多量元素であり、硫黄栄養条件および硫黄同化効率は作物の生産性・質に大きく影響する。植物は人間に必要なアミノ酸であるシステインやメチオニンを、環境中の硫酸イオンを使って生合成しており、自然界の硫黄サイクルに大きな役割を果たす (Crowford *et al.* 2000)。また、植物内で生合成される含硫

化合物には、酸化還元物質、補酵素類や医薬として有用なものも多く含まれる。このような背景から、植物における硫黄の同化・代謝とその制御機構について理解することは、作物の生産性向上、食を通じた人間の健康増進の双方に重要であり、また、地球規模で深刻化する環境問題 (酸性雨や酸性土壌など) 解決の一助となる。

硫黄の同化は、硫酸イオンの吸収に始まる。硫酸イオン

は、その後 ATP スルフィラーゼ、APS 還元酵素 (APR)、亜硫酸還元酵素の働きにより硫化物イオンへと還元され、続いて O-アセチルセリンとの反応によりシステインへと同化される。その後、システインが基となり、グルタチオンやメチオニンが生合成される。硫黄欠乏 (-S) 下におかれた植物では、硫酸イオントランスポーター (SULTR)、APR などの硫黄同化系で働く遺伝子群の遺伝子発現および活性が上昇する (図 1; Hirai *et al.* 2004; Maruyama-Nakashita *et al.* 2003; Nikiforova *et al.* 2003; Takahashi *et al.* 1997)。これは、植物が自身の生存を維持するために、限られた硫黄源を有効に獲得・活用する機構であり、それ故に硫酸イオントランスポーター、APR による反応が硫黄同化系の鍵ステップであると考えられている。

近年、塩 (NaCl) 処理が APR 遺伝子・タンパク質の発現および酵素活性を促進することが見出された (Koprivova *et al.* 2008)。このことは、NaCl による APR 活性の増強が主に遺伝子発現レベルで調節されることを示している。また、硫黄同化効率を増強させることにより、植物に塩ストレス耐性を付与できる可能性を示唆している。-S に応答した硫黄同化系の促進を担う転写制御因子として SLIM1 が知られているが (Maruyama-Nakashita *et al.* 2006)、-S による APR の発現誘導は、SLIM1 による制御を受けない。

これらのことから、-S の認識から硫黄同化系酵素の発現制御には、より多くの情報伝達因子が関わると推定される。また、NaCl 処理・硫黄栄養変化に応じた情報伝達系にはクロストークが存在し、その情報伝達過程が APR の遺伝子発現制御に重要な役割を果たす可能性がある。

本研究では、硫黄同化の制御に NaCl が果たす役割の解明、硫黄同化系の人為的制御による NaCl 耐性の増強を長期的な目標として、NaCl および硫黄栄養による APR 遺伝子の発現制御機構の解明を目的とする。シロイヌナズナの APR には APR1、APR2、APR3 の 3 分子種があるが、中でも -S および NaCl に対する応答が顕著である APR2 と APR3 を研究対象とする。APR2、APR3 について、その上流域に存在する NaCl・硫黄栄養応答領域を同定し、それらが一致するか否かを検証する。また、APR の発現誘導が硫黄同化系の活性化に繋がることを検証するため、NaCl が硫黄同化産物の蓄積に及ぼす影響を明らかにする。

NaCl と硫黄栄養という一見関連性のないストレス応答

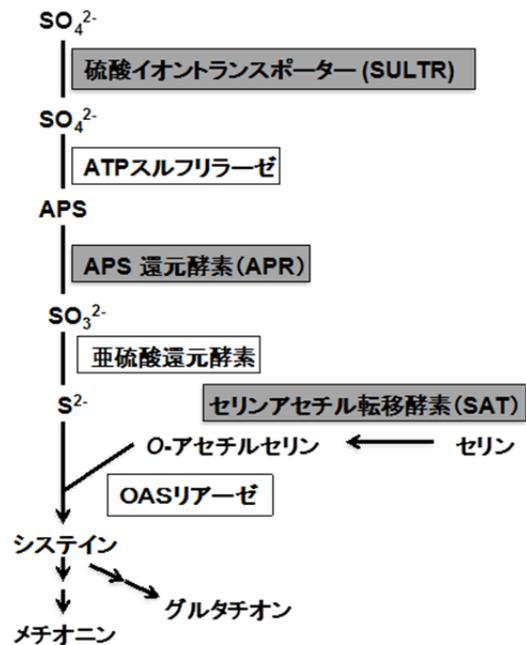


図 1. 植物の硫黄同化系。図中の は反応を触媒する酵素を示す。硫黄欠乏により遺伝子発現が誘導される酵素を で示す。

の相互作用を解明することにより、各情報伝達系に関する新しい知見を提供できる。得られる成果は、複合的なストレス条件下での植物育成法の開発、塩を用いて食品中の有用含硫化合物を増加させる方法の開発に繋がる可能性がある。

2. 材料と方法

2.1 植物の育成

植物材料としてシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, cv, Columbia-0) を用いた。植物の育成は MGRL 寒天培地上、22°C 下で 16 時間/8 時間の明暗サイクルのもとに行った。硫黄欠乏培地は、MGRL 培地中に含まれる硫酸塩を塩化物塩に置き換えることにより作製した。植物用アガロースは 5-20 g あたり約 6 l の脱イオン水、1 l の蒸留水で洗浄した後に培地の作製に用いた。デリーション系統の解析用培地には 0.5% の植物用アガロースを加え、深型丸シャーレ (直径 90 mm × 20 mm, BIO-BIK) を用いて作製した。それ以外の実験では 8% の植物用アガロースを培地中に加え、角 2 号シャーレを用いて作製した。

種子を滅菌し低温処理を施した後に培地へと播種し、植物を育成した。デリーション系統の解析では培地を水平

に置き、9 日間植物を育成した後、植物体全体を試料として用いた。それ以外の実験では、培地を立てて 7 日目植物を育成した後、処理条件の培地に植物を移動させた。育成後の植物試料を採取し、液体窒素により凍結させたものを超低温フリーザー (-80℃) に保存し、実験に用いた。

2. 2 プロモーターのデリベーションシステムおよび Luc 融合遺伝子の作製

植物形質転換用ベクターとして pBI101 (Clontech) を、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ (*Luc*; Wako) のコード領域を用いた。以下の融合遺伝子の作製には、pBI101 の *Bam*HI-*Eco*RI サイトに pTHLuc (pTH2 中の *GFP* コード領域を *Nco*I-*Not*I サイトを用いて *Luc* コード領域に置換したプラスミド) の *Bam*HI-*Eco*RI サイトを挿入した pBI101-*Luc* (Maruyama-Nakashita *et al.* 2005) を用いた。

APR2 および *APR3* の翻訳開始点より上流 2,474 bp (A2-2474)、2,954 bp (A3-2954) をシロイヌナズナのゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅し、pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) へとクローニング後、シークエンスを確認した。次に、これらのプラスミドを鋳型として、*APR2* の翻訳開始点より上流 1,841 bp、1,556 bp、1,053 bp、681 bp、309 bp、*APR3* の翻訳開始点より上流 2,184 bp、1,581 bp、1,069 bp、601 bp、228 bp を PCR により増幅し、pCR-BluntII-TOPO へとクローニング後、シークエンスを確認した。

各プラスミドより切り出した *Sall*-*Bam*HI 断片を pBI101-*Luc* の *Sall*-*Bam*HI サイトに導入した。実験に用いたプライマーの配列を以下に示す。

APR2pro2474FSal: ACTCGTCGACCCAGCTCACAC
CACATATATTATTCTTGTATACA
A2-1841Fsal: gtcgacGGTCAGCAAGTGAGCTTAC
CACAAGT
A2-1556Fsal: gtcgacGCAAGTGTGCCTTTATCCTCA
TGCATCAT
A2-1053Fsal: gtcgacGGGTACAATGACAGTTTCAAC
ATCTAGTGTT
A2-681Fsal: gtcgacCGGAGAATTATGGAACCACTTC
ATTCAACTT
A2-309Fsal: gtcgacCGCCACATCTCACACACTAATG
CTA

APR2proRBam: CATGGATCCTTCTAATCAAAAAA
AAAAAAGTGTCTCTATGATACTGA
APR3pro2954FSal: TAGTGTGACGACGGAATCGA
CGGGATCTTCGTTACTAAATGCA
A3-2184Fsal: gtcgacAGTAAAAGTTTAAAGCGTGGT
AAATACATTGCATTTGT
A3-1581Fsal: gtcgacTGCGTAGTAAATCAAGAATTA
GTCTCCAAAGACTCT
A3-1069Fsal: gtcgacGGGCTATGCTGAGGAAAGAA
GTGTTGACTA
A3-601Fsal: gtcgacGGTTCGTGCAATTTCTAGAAGA
AATGAAGAGATCGA
A3-228Fsal: gtcgacGTTTTCTCTGCCACACGACCAA
AGTGA
APR3proRBam: CATGGATCCTTTCACTCCAAACC
AAATCTCTCGAAACAATGTTCT

2. 3 ルシフェラーゼ活性の測定

植物抽出液中のルシフェラーゼ活性を Luciferase assay system (Promega)、ルミノメーター (Lumat LB9501, Berthold) を用いて測定した。植物試料を TissueLyser (QIAGEN) を用いて破碎した後、Luciferase assay system に付属の 1×CCLR 溶液を加え、混和し、遠心後に得られた上澄みを植物抽出液とした。測定試薬 10 µl に植物抽出液 2 µl を加え測定した。植物抽出液中のタンパク質量を Bradford 法により測定した。ルシフェラーゼ活性は抽出タンパク質 1 µg 当たりの発光強度として表した。

2. 4 代謝物の測定

代謝物の測定は、Maruyama-Nakashita *et al.* (2006) に従って行った。

植物試料を凍結条件下で TissueLyser を用いて破碎した後、5 倍量の 10 mM 塩酸を加えて攪拌した。4℃、14,000×g で 5 分間遠心した後の上清を植物抽出液として代謝物の測定に用いた。

硫酸イオンの測定はイオンクロマトグラフィー (IC-2001, TOSOH) により行った。分離・検出はメーカーの説明書に従って行い、標準溶液として陰イオン混合標準液 I (和光) を 20、40、60、120 倍に希釈したものを使用した。

システイン、グルタチオンの測定は、モノプロモビマン (Invitrogen) でサンプルを標識後、HPLC による分離の後、蛍光検出 (励起波長 390 nm、検出波長 482 nm) すること

により測定した。標準試料として、グルタチオン(還元型)(ナカライ)およびシステイン硫酸塩(ナカライ)を用いた。

3. 結果

3.1 APR2・APR3上流域に存在するNaCl・硫黄栄養応答領域の同定

APR2・APR3の上流域、各2,474 bp、2,184 bpをルシフェラーゼ遺伝子に連結した組み換え遺伝子を発現させた植物では、NaCl 処理や硫黄欠乏によりルシフェラーゼ活性が上昇する。このことは、NaCl や硫黄栄養に対する応答をAPR2・APR3の上流域が担うことを示している。さらに詳細な応答領域を同定するため、それぞれの上流域について5'側からのデリーション解析を行った(図2, 3)。APR2

の翻訳開始点より上流 2,474 bp、1,841 bp、1,556 bp、1,053 bp、681 bp、309 bp の制御下にルシフェラーゼを発現する形質転換シロイヌナズナ(A2-2474, A2-1841, A2-1556, A2-1053, A2-681, A2-309)および、APR3 の翻訳開始点より上流 2,184 bp、1,581 bp、1,069 bp、601 bp、228 bp の制御下にルシフェラーゼを発現する形質転換シロイヌナズナ(A3-2184, A3-1581, A3-1069, A3-601, A3-228)を作製した。

まず APR2、APR3 の上流域中に存在する硫黄栄養応答領域を定めるために、1,500 μM の硫酸イオンを含む寒天培地(S1500)、15 μM の硫酸イオンを含む寒天培地(S15)で育成し、9 日後にルシフェラーゼ活性を測定した(図2)。

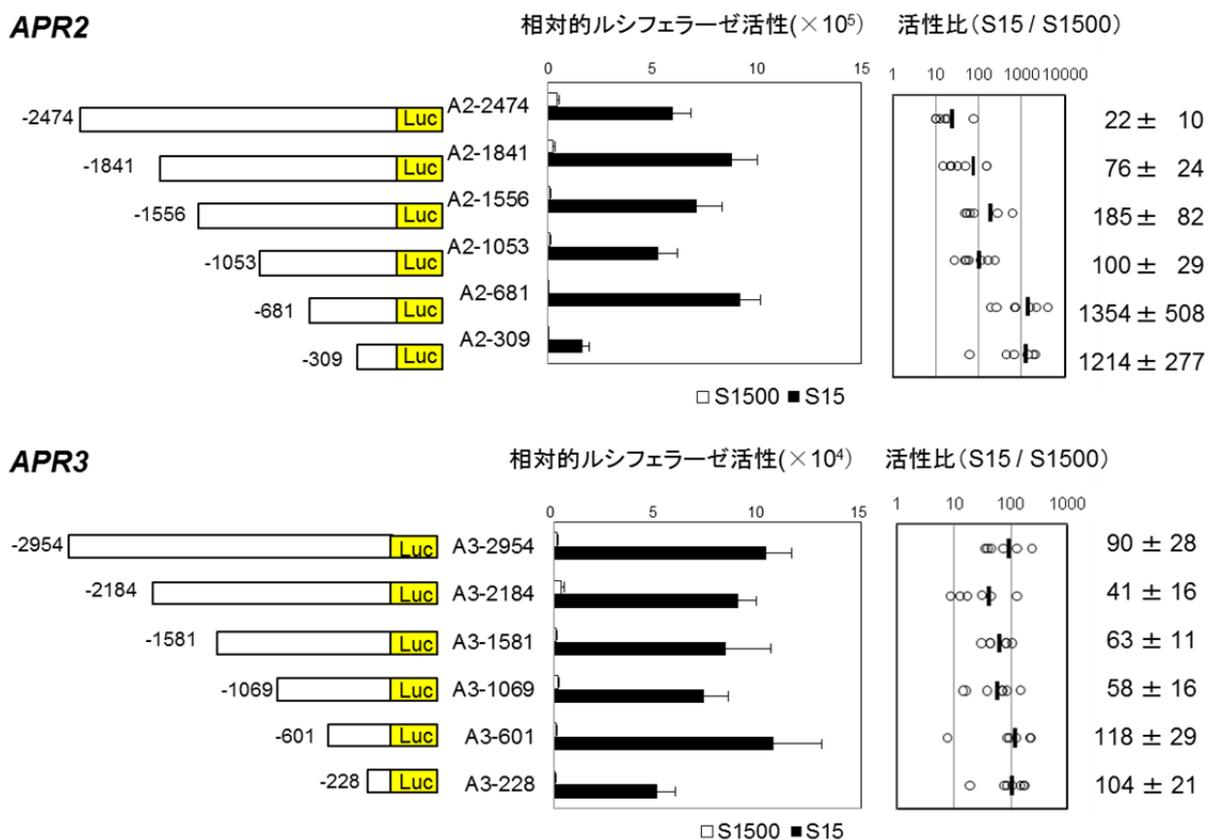


図2. APR2、APR3 上流域のデリーション解析。グラフ左は形質転換植物の作製に用いた組み換え遺伝子及びその名称を示す。測定には、組み換え遺伝子当たり8系統の植物を用いた。ルシフェラーゼ活性の測定は1系統につき2回行い、その平均値を用いてデータを解析した。植物を1,500 μM の硫酸イオンを含む培地(S1500)、15 μM の硫酸イオンを含む培地(S15)で9日間育成した後に、植物を採取し、ルシフェラーゼ活性を測定した。相対的ルシフェラーゼ活性(左グラフ)はタンパク質1 μg 当たりの発光強度で示した。左グラフのエラーバーは標準誤差を示す。右グラフは組み換え植物系統ごとの相対的ルシフェラーゼ活性の比(S15/S1500, \circ)およびその平均値(縦棒)を示す。グラフ右の値は相対的ルシフェラーゼ活性の比(S15/S1500)の平均値 \pm 標準誤差を示す。

APR2、APR3 どちらにおいてもすべてのデリーション系統においてルシフェラーゼ活性の S15/S1500 比が 20 を上回った。APR2 上流域が短くなるにつれ S15/S1500 比は高くなり、S1500 条件におけるルシフェラーゼ活性そのものは低くなった。APR3 上流域の長さが短くなっても S15/S1500 比に大きな差は見られなかった。A2-309、A3-228 において、より長い上流域を持つものと変わらずルシフェラーゼ活性の S15/S1500 比が高い値を示したことから、APR2 の翻訳開始点より上流 309 bp、APR3 の翻訳開始点より上流 228 bp という短い領域が硫黄欠乏に対する応答を担うことが明らかとなった。また、硫黄欠乏によるルシフェラーゼ活性上昇の程度は APR2 よりも APR3 の方

が高かった。これは APR2、APR3 の mRNA 量の結果とも一致していた (Maruyama-Nakashita *et al.* 2006)。

APR2、APR3 の NaCl 応答領域と硫黄栄養応答領域とが一致するか否かを検証するため、NaCl が A2-309、A3-228 のルシフェラーゼ活性に及ぼす影響を調べた。硫黄十分条件 (S1500) で育てた植物を S1500 (HH)、S1500 + NaCl (HH+NaCl)、に移してルシフェラーゼ活性を測定することにより解析した (図 3)。

A2-309 において NaCl 処理後 6 時間 (6h)、24 時間 (24h) でのルシフェラーゼ活性は、コントロール (HH) に対してそれぞれ 10 倍、52 倍となった。A3-228 においてはそれぞれ 18、22 倍となった。また、NaCl 処理後の経過時間が増加

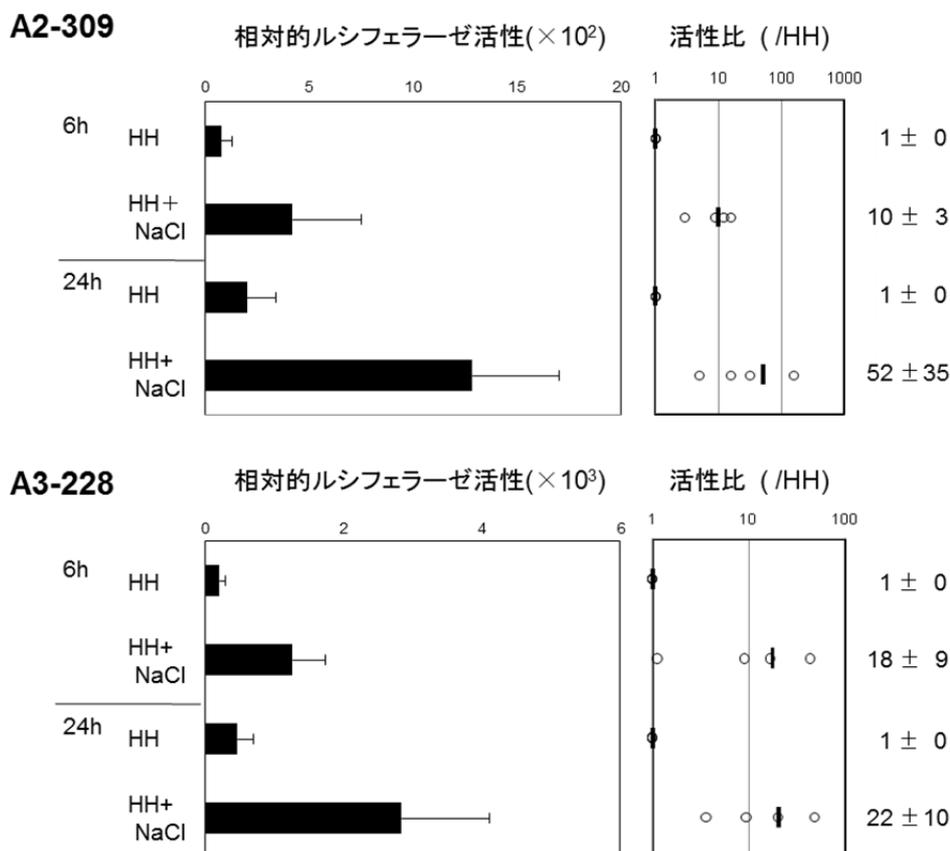


図 3. NaCl が A2-309、A3-228 のルシフェラーゼ活性に与える影響。A2-309、A3-228 について各 4 系統の植物を使用した。ルシフェラーゼ活性の測定は 1 系統につき 2 回行い、その平均値を用いて統計解析を行った。植物を S1500 培地で 7 日間育成した後、S1500 培地 (HH)、150 mM の NaCl を含む S1500 培地 (HH+NaCl) へと移動させた。植物の移動後 6 時間 (6h)、24 時間 (24h) で植物を採取し、ルシフェラーゼ活性を測定した。左グラフの相対的ルシフェラーゼ活性は、タンパク質 1 μ g 当たりの発光強度で示した。左グラフのエラーバーは標準誤差を示す。右グラフは組み換え植物あたりの HH に対するルシフェラーゼ活性の比 (○) およびその平均値 (縦棒) を示す。右グラフの値は HH に対するルシフェラーゼ活性の比の平均値 \pm 標準誤差を示す。

するにつれてルシフェラーゼ活性が上昇する傾向が見られた。Koprivovaら(2008)によればNaCl処理後5時間でAPR2とAPR3の転写産物量のコントロール比がそれぞれ3倍、4倍であり、今回の実験では10倍、18倍となった。A2-309、A3-228ともにコントロール比は大きな値となったが、APR3の方が高いコントロール比を示すという点ではKoprivovaらの報告と同様であった。これらの結果から、APR2、APR3の上流域に存在するNaCl応答領域もAPR2、APR3の翻訳開始点より上流309 bp、228 bp中に存在していることが分かった。

3. 2 NaClが硫黄同化産物の蓄積に及ぼす影響の解析

APRの遺伝子発現、APR活性はNaClにより増強される(Koprivova *et al.* 2008)。しかし、NaCl処理が硫黄同化に及ぼす影響は解析されていない。そこで、NaCl処理によるAPR活性の増強が硫黄同化に及ぼす影響を明らかにするために、NaCl処理時の硫酸イオン・システイン・グルタチオン量を測定した。

当初の計画では、シロイヌナズナを0、50、100、150、200 mMのNaClを含む培地上で育成することを予定していたが、150、200 mMでは種子が発芽せず、100 mMのNaClを含む培地上でも植物がほとんど育成しなかったため、0、5、10、20、40、60 mMのNaClを含む培地を用いて実験を行った。植物体の成育は40 mM以上のNaClを加えた場合に抑制された(図4)。

これらの植物を地上部と地下部とに分けてサンプリングし、植物体中の硫酸イオン・システイン・グルタチオン量を測定した(図5)。

硫酸イオン濃度は、地上部・地下部ともにNaCl濃度が増加するにつれ減少する傾向が認められ、5 mMの処理においても蓄積量の減少が認められた。システインについても同様の傾向にあったが、有意な減少が認められたのは60 mM処理時の地上部、10、40、60 mM処理時の地下部においてのみであった。地上部におけるグルタチオン濃度は他の化合物と同様にNaCl濃度が増加するにつれ減少する傾向を示したが、地下部においてはNaCl濃度との相関は認められず、10 mM処理で増加していた。今回の結果からは、APR発現量や活性の上昇から予測されるような硫黄同化産物量の急激な増加は認められなかったが、5、10 mMといった低濃度のNaCl処理下ではシステインやグルタチオン濃度が増加する傾向も認められた。

4. 考察および今後の展望

本研究により、APR2およびAPR3遺伝子の上流域に存在するNaCl・硫黄栄養応答領域を明らかにすることができた。各応答領域はAPR2、APR3の翻訳開始点より上流309 bp、228 bpという短い領域に存在していることから、両者が一致する可能性が強く示唆される。同定したNaCl・硫黄栄養応答領域について、さらなるデリーション断片・

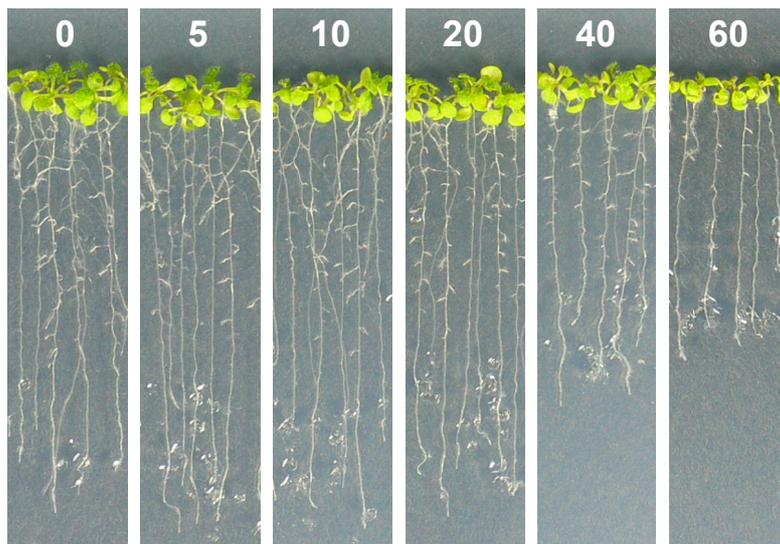


図4. NaCl処理が植物の成育に及ぼす影響。NaClを含む培地上で11日間育てた植物の様子。図中の数字はNaCl濃度(mM)を示す。

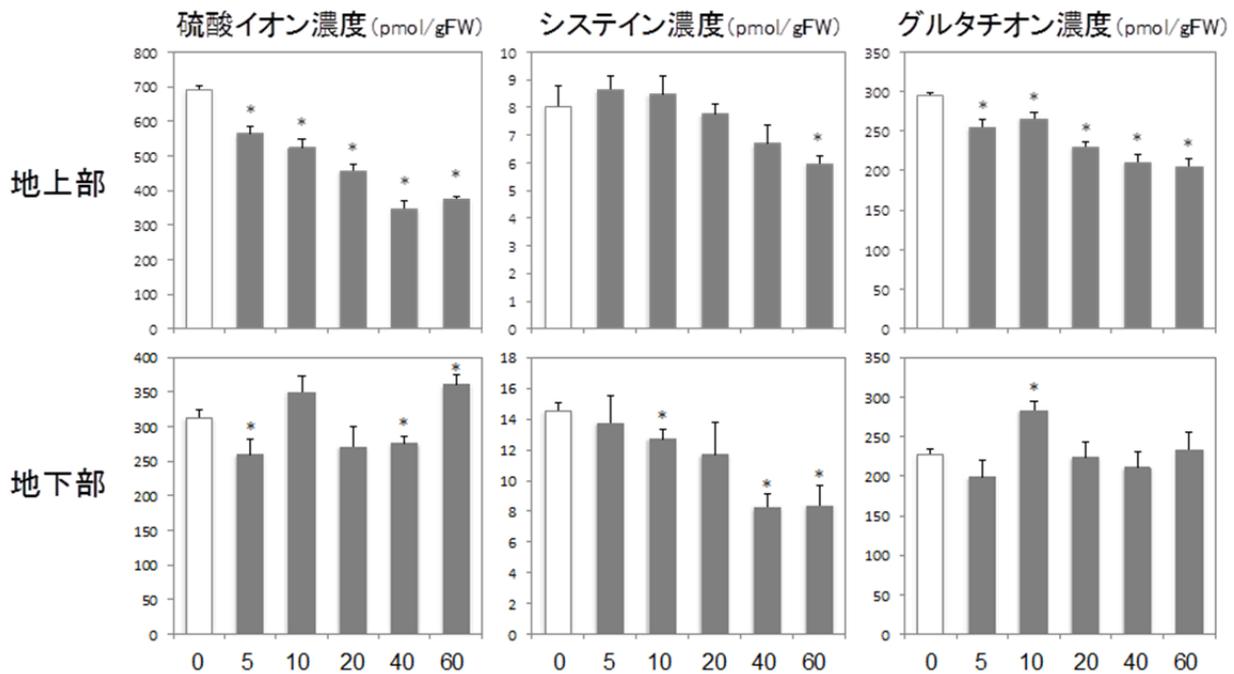


図5. NaCl処理が硫黄同化産物の蓄積に与える影響。図中に示した各濃度 (mM) のNaClを含むMGRL培地(1,500 μ Mの硫黄イオンを含む)上で11日間育成した植物を採取し、硫酸イオン、システイン、グルタチオンの含量を測定した。グラフのエラーバーは標準誤差を、*はT検定を行い有意差が認められた処理区を示す(n=3, p<0.05)。

形質転換植物を作製し、より詳細に応答領域を特定していくことで、両者が真に一致しているのかを明らかにしていきたい。

同定した NaCl・硫黄栄養応答領域が翻訳開始点に近接しているため、転写による制御ではなく mRNA の安定性が調節されることにより APR の転写産物量が変化している可能性もある。A2-309 中の TATA box と予測される領域は翻訳開始点より上流 175~171 bp に、A3-228 中の TATA box と予測される領域は翻訳開始点より上流 110~106 bp に存在し、いずれの領域においても転写領域の占める割合が高い。植物において 5'非翻訳領域による mRNA の安定性の制御、翻訳効率の調節に働くという報告が多くなされている(Bailey-Serres *et al.* 1996, Bate *et al.* 1996, Bhat *et al.* 2004, Hua *et al.* 2001, Hulzink *et al.* 2002, Iliev *et al.* 2002, Shina *et al.* 1998)。APR 転写産物量の調節が転写、mRNA の安定性のどちらによりなされているか、今後明らかにしていく必要がある。

NaCl・硫黄栄養応答領域が一致する可能性が高いことから、NaCl 応答と硫黄栄養応答の情報伝達系間にクロストークが存在する可能性が示唆される。今後、NaCl 濃度と硫酸イオン濃度を様々な組み合わせで変化させ、これらの

応答領域にどのような効果があるかを解析することで、クロストークの有無を明らかにしていきたい。また、植物ホルモンや各種阻害剤の影響を解析することで、NaCl 処理、硫黄欠乏条件から APR の発現上昇に至る情報伝達系に影響する他の因子についても明らかにしていきたい。

硫黄同化産物量は、APR発現量や活性の上昇から予測されるほど大きく増加してはいなかったが、低濃度の NaCl処理下でシステインやグルタチオン濃度が増加する傾向が認められた。今後、総硫黄量の測定や一過的な NaCl処理を施した際のこれらの蓄積量を調べることで、APRの発現や活性との相関がより明確にできるのではないかと考えている。また、発現制御領域の解析から、NaClと硫黄栄養の情報伝達系にクロストークが存在する可能性が示唆されたことから、硫黄濃度を変化させた際の硫黄同化産物量に及ぼすNaClの影響についても明らかにしていきたい。

今後、上記の研究を継続することで、農業現場におけるNaClの施肥法およびその有用性を実証するとともに、NaCl処理により作物中の有用含硫化合物を増加させる方法を開発していきたい。

文献

- Bailey-Serres J. and Dawe R.K. (1996) Both 5' and 3' sequences of maize *adh1* mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant Physiol.* 112, 685-695.
- Bate N., Spurr C., Foster G.D. and Twell D. (1996) Both 5' and 3' sequences of maize *adh1* mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant J.* 10, 613-623.
- Bhat S, Tang L., Krueger A.D., Smith C.L., Ford S.R., Dickey L.F. and Petracek M.E. (2004) The Fed-1 (CAUU)4 element is a 5' UTR dark-responsive mRNA instability element that functions independently of dark-induced polyribosome dissociation. *Plant Mol Biol.* 56, 761-773.
- Crawford N.M., Kahn M.L., Leustek T. and Long S.R. (2000) Nitrogen and sulfur. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B.B. Buchanan, W. Gruissem, and R.L. Jones, eds. (American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.), pp. 824-849.
- Hirai M.Y., Yano M., Goodenowe D.B., Kanaya S., Kimura T., Awazuhara M., Arita M., Fujiwara T. and Saito K. (2004) Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 10205-10210.
- Hua X J., Van de Cotte B., Van Montagu M. and Verbruggen N. (2001) The 5' untranslated region of the At-P5R gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation. *Plant J.* 26, 157-169.
- Hulzink R.J., de Groot P.F., Croes A.F., Quaedvlieg W., Twell D., Wullems G, J. and Van Herpen M.M. (2002) The 5'-untranslated region of the *ntp303* gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation. *Plant Physiol.* 26, 157-169.
- Iliev E.A., Xu W., Polisensky D.H., Oh M.H., Torisky R.S., Clouse S.D. and Braam J. (2002) Transcriptional and posttranscriptional regulation of Arabidopsis TCH4 expression by diverse stimuli. Roles of cis regions and brassinosteroids. *Plant Physiol.* 130, 770-783.
- Koprivova A., North K.A. and Kopriva S. (2008) Complex signaling network in regulation of adenosine 5'-phosphosulfate reductase by salt stress in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 146, 1408-1420.
- Maruyama-Nakashita A., Inoue E., Watanabe-Takahashi A., Yamaya T. and Takahashi H. (2003) Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in Arabidopsis reveals global effect on sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiol.* 132, 597-605.
- Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y., Watanabe-Takahashi A., Inoue E., Yamaya T. and Takahashi H. (2005) Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 42, 305-314.
- Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y., Tohge T., Saito K. and Takahashi H. (2006) *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulphur response and metabolism. *Plant Cell.* 18, 3235-3251.
- Nikiforova V., Freitag J., Kempa S., Adamik M., Hesse H. and Hoefgen, R. (2003) Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J.* 33, 633-650.
- Shiina T., Allison L. and Maliga P. (1998) Transcript levels in tobacco plastids are independent of light: reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability. *Plant Cell.* 10, 1713-1722.
- Takahashi H., Yamazaki M., Sasakura N., Watanabe A., Leustek T., Engler J.A., Engler G., Montagu M.V. and Saito K. (1997) Regulation of sulfur assimilation in higher plants: A sulfate transporter induced in sulfate starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 94, 11102-11107.

Molecular Mechanisms Underlay the Enhancement of APS Reductase Expression and Sulfur Assimilation by Salt — Toward the Generation of Salt Tolerant Plants by Improving Sulfur Assimilation Capacity of Plants —

Akiko Maruyama-Nakashita

Kyushu University, Faculty of Agriculture

Summary

Sulfur is one of the essential macronutrients for plants. Sulfur availability and its assimilatory capacity of plants greatly influence on yield and quality of crops. In plants, sulfur assimilation starts from sulfate uptake. Sulfates taken in plant cells are reduced to sulfide by several steps of reactions, including the reaction catalyzed by APS reductase (APR), and assimilated into cysteine. When plants are subjected to sulfur starvation (-S), transcript levels and the activities of sulfur assimilatory enzymes including APR are increased. This response should be an adaptation mechanism of plants for efficient utilization of limited sulfur source. Transcript levels and the activities of APR are also increased by salt (NaCl). These findings suggested that enhanced levels of APR activity by NaCl are due to the increased transcript levels, and the salt tolerance of plants can be increased by enhancement of sulfur assimilation. In this study, we analyzed the regulatory mechanisms of APR gene expression responded to -S and NaCl, to reveal the NaCl function in regulation of sulfur assimilation and future generation of salt tolerant plants by improving of sulfur assimilation capacity.

Among the three APRs existed in Arabidopsis, *APR2* and *APR3* are highly enhanced by -S and NaCl. Deletion constructs of every 300 bp in 2,474 bp and 2,184 bp upstream region of *APR2* and *APR3* were fused to luciferase gene, and introduced to Arabidopsis plants. Using these transgenic plants, we analyzed luciferase activities of plants under sulfur sufficient (+S), deficient (-S) and NaCl treated conditions. We succeeded to narrow down the upstream responsive regions of *APR2* and *APR3* to -S and NaCl into 300 bp. These results strongly suggested the identity of both responsive elements in *APR* promoters. The possibility that transcript levels of *APRs* are regulated through mRNA stability is also suggested. To determine the regulatory mechanisms of APR expression responsible to -S and NaCl, further deletion analysis to determine *cis*-acting elements are required. Possible identities of both -S and NaCl responsive regions also suggested the existence of crosstalk between -S and NaCl signal transduction. Verification of the crosstalk and its physiological meaning are interesting studies for future.