

塩類土壌地の耐塩性作物育種を目指した ROS シグナルと 植物ホルモンのクロストーク

井上 眞理, 湯浅 高志

九州大学大学院農学研究院

概要 耐塩性植物のアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) を材料に、塩ストレスに応答した機能性糖成分 D-ピニトールの含量増加の分子メカニズムとそれに関わる活性酸素 (ROS) およびエチレンやアブシジン酸 (ABA) を中心とした植物ホルモンに着目した。近年、 H_2O_2 などの活性酸素種によって酸化修飾を受けたタンパク質が生成し、その分解のために細胞内のバルク分解経路 (オートファジー) が誘導されるということが報告されている。アイスプラントでは、塩耐性に寄与すると考えられる D-ピニトールおよび D-カイロイノシトールなどイノシトールをメチル化する酵素 (IMT) として、D-ピニトール合成の鍵酵素である IMT 遺伝子についての報告はあるが、植物ホルモンおよびオートファジーとの関係の詳細は明らかでない。

本研究では、アイスプラントにおいて、塩ストレス応答における活性酸素ストレスを介したエチレン応答性転写因子の活性化とイノシトール合成酵素遺伝子の誘導の間に強い関連が示された。即ち、D-ピニトール合成に必要な myo-イノシトールを供給する代謝経路の一つとして、ROS 応答性オートファジーを介した栄養リサイクルシステムおよび、エチレンを介したイノシトール合成系遺伝子の発現誘導メカニズムが存在する可能性が示唆された。また、 H_2O_2 処理により ACCS が活性化されたことで、エチレンの合成が促進され、エチレン応答性因子である Ein3 タンパク質レベルが上昇したと考えられる。 H_2O_2 処理 48 h 後には Ein3 の発現も遺伝子発現と同様に上昇していたことから、 H_2O_2 処理によりエチレンの合成が促進されたことは明らかであり、エチレンによりオートファジーの誘導が促進されたと考えられる。

これらの結果から、塩処理によりエチレンによりオートファジーが誘導されると共に、エチレンに応答した一連の加水分解酵素や D-ピニトールなどの適合溶質合成関連遺伝子の発現が活性化すると考えられ、塩ストレス下のアイスプラントにおいて ROS、 Ca^{2+} シグナルおよびエチレンシグナルを介した多面的な遺伝子発現調節メカニズムが存在することが示唆された。

1. 研究目的

地球温暖化に伴う水資源の枯渇と海面上昇の進行は深刻であり、8 億 ha 以上に及ぶ世界の塩類集積地は、陸地面積の 6% 以上に相当する。海水による冠水が想定される地域の作物生産には、土壌あるいは作物の改良が求められるが、前者には多大の費用や労力を要する。申請者らは新奇転写因子 ICE (Inducer of CBF Expression) 1 が低温・塩ストレスに応答してタンパク質レベルを増加することにより適合溶質オリゴ糖トレハロース合成を促進することでイネ幼植物体の塩・低温ストレス耐性の獲得に関与

することを明らかにした (Nakamura *et al.* 2011)。本研究では、耐塩性植物のアイスプラントを材料に、塩ストレスに応答した機能性糖成分 D-ピニトールの含量増加の分子メカニズムとそれに関わる活性酸素 (ROS) およびエチレンやアブシジン酸 (ABA) を中心とした植物ホルモンに着目した。特に塩ストレス下における植物ホルモンと ROS 間のクロストークに関与する細胞内シグナルカスケードを分子・タンパク質レベルで明らかにすることを目的とした。近年、 H_2O_2 などの活性酸素種によって酸化修飾を受けたタンパク質が生成し、その分解のためにオートファジーが誘導

されることが報告されている (Sasaki *et al.* 2005; Xiong *et al.* 2007)。本研究で対象とするアイスプラントでは、塩耐性に寄与すると考えられる D-ピニトールおよび D-カイロイノシトールなどイノシトールをメチル化する酵素 (IMT) として、D-ピニトール合成の鍵酵素である IMT 遺伝子についての報告があるが、高等植物の二次代謝経路に数多く存在するメチル化酵素遺伝子との関係の詳細は明らかでない。そこで、アイスプラントにおける D-ピニトール合成経路の律速酵素遺伝子の発現制御をマスター制御する転写因子候補とその制御機構に着目して、細胞内シグナル経路の特定を進めた。そこで塩ストレス・植物ホルモンシグナルをモニターする実験手法として、本研究室で作成した抗 SOS3 特異抗体、抗 Ein3 特異抗体を用いたイムノブロットおよび半定量的 RT-PCR 法により検出し、塩ストレスシグナルが活性酸素シグナルを介してエチレンシグナルを活性化している可能性について検討した。

本研究では、アイスプラントにおける H_2O_2 によるオートファジーを誘導と老化の指標となるエチレンとの関係を調べることで、植物の特定のストレスシグナル経路を活性化し、細胞内のバルク分解経路 (オートファジー) を誘導して、有機酸プール形成メカニズムおよびピニトール類合成経路を調節することで高機能性ピニトール含有量を増やすことを目的とするものである。これにより、作物の塩排出メカニズムとピニトールなどの適合溶質蓄積能力を強化する分子遺伝的改良や栽培技術を開発し、塩ストレス耐性作物の作出を目指す。

2. 研究方法

2.1 材料

アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) は南アフリカ原産 1 年草本であり、ハマミズナ科に属する CAM 植物である。バーミキュライトを入れた 9 cm プラスチックポットに、アイスプラント種子 (プチサラ品種、武蔵野種苗園) を播種し、九州大学バイオトン施設内の 25°C フェイトロン温室において自然光下で 8 週間栽培を行った。ストレス処理として、アイスプラント植物体表面およびポットに 50 mL の蒸留水、0.3 M NaCl、10 mM H_2O_2 、50 μ M ABA を散布した。低温処理として 4°C 低温室内で保温した。ストレス処理後、葉身を採取して重量を計測して液体窒素で凍結し -80°C に冷凍保存した。

2.2 オートファジー関連遺伝子、エチレン関連遺伝子、D-ピニトール合成関連酵素遺伝子の解析

ダナ・ファーバー癌研究所 (DFCI) のアイスプラント EST データベースにおいて TBLASTX 相同性検索により、グルコースから D-ピニトール合成にいたる各反応段階 (Fig. 1) を触媒する酵素遺伝子ホモログ候補 (*McIMPP*, *McIPPL*, *McMIPS*, *McIMT*) およびアブシジン酸合成を律速するチトクローム P450 ホモログ (*McCDD1*)、ABA 応答性 bZIP 転写因子ホモログ (*McAREB*) の各遺伝子に対応した EST 情報を元に遺伝子特異的オリゴ DNA プライマーを設計した (Table 1)。凍結保存したアイスプラント葉身から SDS-フェノールー LiCl 法によりトータル RNA を抽出した。常法に従い Rever TraACE 逆転写酵素 (TOYOBO) お

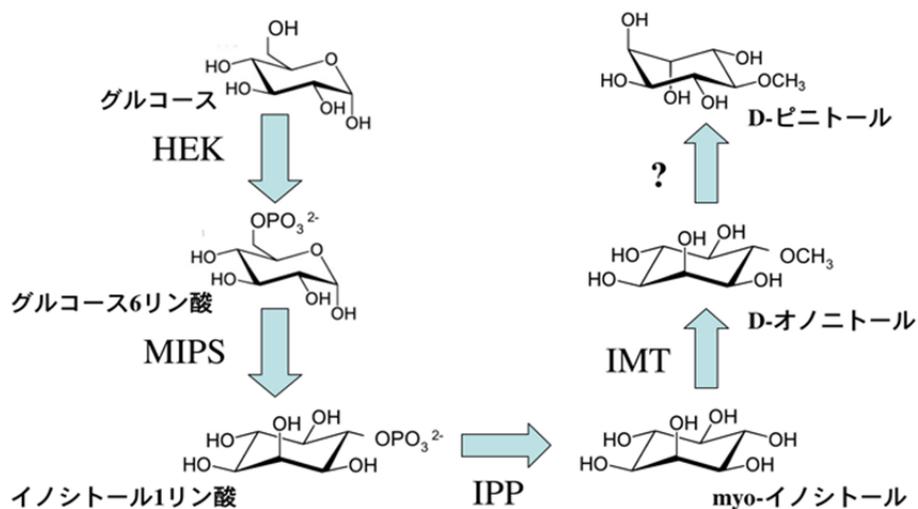


Fig. 1. D-ピニトール合成経路

Table 1. 適合溶質合成関連、オートファジー遺伝子の配列

Table 1. A set of oligo DNA primers used for RT-PCR	
<i>McGAPDH</i> (グルタルアルデヒドリン酸脱水素酵素)	Fwr-TGGCATCGTTGAGGGTCTTATGAC Rev-GCTTACTGGCACTTTGAGATGTGC
<i>McIMT</i> (イノシトール特異的メチル基転移酵素)	Fwr-GTCAAGGTCCTAGTTGATGTGGGT Rev-CACTTCTTGTAGAGCTCCATGACC
<i>McIMPP</i> (イノシトールリン酸脱リン酸化酵素)	Fwr-CCCAATACACGTGTCCTCCAAAGA Rev-GCAATGGCCGATTTTCTGACAAGC
<i>McIPPL1</i> (イノシトールリン酸脱リン酸化酵素様遺伝子)	Fwr-AGATGGATCCATGGGCAGGTGCTTAATCTCATCA Rev-TCCTGTGACAGAACACCACAGAACTGCAAAGCT
<i>McMIIPS 5</i> (イノシトール-1-リン酸合成酵素)	Fwr-CGAACACCCTGATCATGTTGTGGT Rev-CAACGCCACAACAATAGCAAACGC
<i>McCCDI</i> (ABA 合成関連酵素チトクローム P450)	Fwr-GGAACTGGGACAGCTAATACTGCT Rev-CCATGCATTGGCGTTGTGGAATAC
<i>McStachyS</i> (スタキオース合成酵素)	Fwr-AGGATGGGACCCGAAAGTGAAAAG Rev-CACAACCTCAGAAACACCACCAGC
<i>McICE1</i> (低温応答 MYC 様転写因子)	Fwr-TGGTGGATCCAATTATACCAAGTATTCACAACA Rev-CATTGTGACGAGCCAGCCGTAAGTGCATCACA
<i>McAREB</i> (ABA 応答性 bZIP 転写因子)	Fwr-TGCTGGATCCTATGCTTCTCCAATGAAGCTACCT Rev-GGTGGTGCAGTATCATTCATCACCTGATTTTCTG
<i>GmACCS</i> (ACC 合成酵素)	Fwr-GTCCATTGTGCACGCAAAATGTCAAGC Rev-GCGAGCTCAAATTGTGGCTTTAACCAGAGGTGACTG
<i>GmERF1</i> (エチレン応答性転写因子)	Fwr-CTCGGATCCATGGATTACCTTCCTCCTTCTTCAAC Rev-TTCCCCGGGCTAATTTTCTTCTCAAGGAGTGTTC
<i>GmATG8d</i> (オートファジー関連酵素)	Fwr-TTCGGATCCATTGCCATGGGCAAGAGCTCA Rev-GATGGTTCGACTGTACGACGGATTATT TCA
<i>GmATG8i</i> (オートファジー関連酵素)	Fwr-CCGGAATTCGTTGAGCTG CACAACAACCTA Rev-GATAGTCGACACTTCACAAAGTGTGGATA

McIMT (Inositol Methyltransferase), Genbank accession number: AAB05891.1

Other genes were identified by tBLAST search at DFCI plant gene index, see at Materials and Methods.

よび Oligo dT により cDNA を合成したこれを鋳型として、サーマルサイクラー (PC-816, ASTEC)、GoTaqDNA ポリメラーゼ (Promega) と遺伝子特異的プライマー (Table 1) を用いて半定量的 RT-PCR により、遺伝子発現レベルを解析した。スタンダード遺伝子としてグルタルアルデヒドリン酸脱水素酵素遺伝子 (*McGAPDH*) を用いた。

2. 3 塩ストレスシグナル分子 SOS3 および転写調節転写因子 EIN3 の免疫化学的解析

植物内在性の塩ストレス応答性カルシニューリン B 様分子 (CBL) とエチレン応答転写因子 Ein3 を検出するために、

トマト SOS3/CBL4 およびダイズ Ein3 をクローニング、組換え体タンパク質を発現精製してウサギに免疫することにより抗-SOS3 抗体と抗 Ein3 抗体を作成した (Yuasa *et al.* 2012; Okuda *et al.* 2011)。アイスプラント葉身から抽出した可溶性画分を試料として SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の後、PVDF 膜に転写した。1xTBS-2% スキムミルクに 1/3,000 倍に希釈した抗-SOS3 特異的抗体および抗 Ein3 抗体を一次抗体、そして 1xTBS-2% スキムミルクに 1/8,000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーズ (HRP) 標識抗ウサギ IgG ヤギ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 ECL 試薬 (GE) により検出した。

3. 研究結果

3.1 アイスプラントの ROS シグナル応答

アイスプラントの発現遺伝子情報データベースを活用して、活性酸素ストレスおよび塩ストレスで活性化する植物ホルモンを特定するための免疫化学的な解析を行った。さらにイノシトール関連糖代謝酵素遺伝子のうち D-ピニトール合成経路で律速酵素として機能する遺伝子のプロファイルに着目した。アイスプラントの葉に 0.3 M NaCl を処理することで顕著に SOS3 タンパク質レベルが上昇した (Fig. 2)。イノシトールと D-ピニトール合成経路に関わる遺伝子のうち、IMPP、IPPL、MIPS および IMT の発現が上昇することが示された。塩ストレスが Na⁺ イオン排出経路を活性化することは SOS3 タンパク質の上昇から示されたが、今回は塩ストレスが引き起こす様々なシグナル経路のうち ROS を介する植物ホルモンに着目してエチレン応答を Ein3 タンパク質の挙動により検証した。まず、10 mM H₂O₂ は 0.2 M NaCl 処理と同様に SOS3 タンパク質レベルを増加させた。さらに、Ein3 タンパク質レベルについても SOS3 と同じく NaCl と ROS により増加することが示された (Fig. 2A)。このアイスプラントにおける SOS3 タンパク質の増加は、NaCl ストレスに応答して ROS が生成することによ

り、ROS 活性化 Ca²⁺ チャンネルを介して Ca²⁺ シグナルが活性化し、Ca²⁺-SOS3 複合体の作用による Na⁺ イオン排出系の促進が起きることを示唆している。一方、高等植物の水分ストレスに応答した適合溶質の合成誘導には ABA やエチレンが関与することが報告されている。今回、ROS と NaCl 処理がどちらも共通して Ein3 タンパク質レベルを増加させているデータは、アイスプラントでは塩ストレスに応答してエチレンシグナルが活性化し、それが D-ピニトール合成などの適合溶質増加に関わる可能性を示唆している。また我々は先行研究において ROS がエチレンシグナルを介してオートファジーを活性化することを報告した (Fig. 3) (Okuda *et al.* 2011)。塩ストレス下のアイスプラントにおいてもエチレンシグナルはオートファジー誘導を介するタンパク質分解や有機酸生成を促進することで、適合溶質合成に必要な炭素源供給に働いていると可能性がある。

3.2 アイスプラントの ROS シグナル・塩シグナルとその他のホルモンシグナルのクロストーク

従来から塩ストレスがアイスプラントの D-ピニトール含量を増大させることが知られていたが、塩ストレスの効果は濃度、タイミングや植物体の成長段階で異なることが知られている。先の実験から NaCl ストレスは ROS シグナルや植物ホルモンシグナルを活性化することが示された。そこで、塩ストレスとその他のストレス処理によりアイスプラント

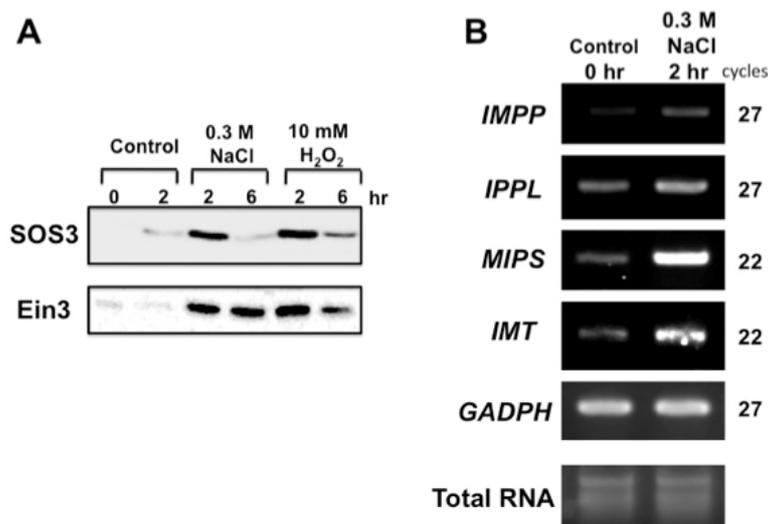


Fig. 2. アイスプラントの塩ストレス・ROS 処理に応答した (A) 塩シグナル応答分子 SOS3 とエチレン応答転写因子 Ein3 の誘導 (イムノブロット解析)、(B) D-ピニトール遺伝子発現の半定量的 RT-PCR プロファイル

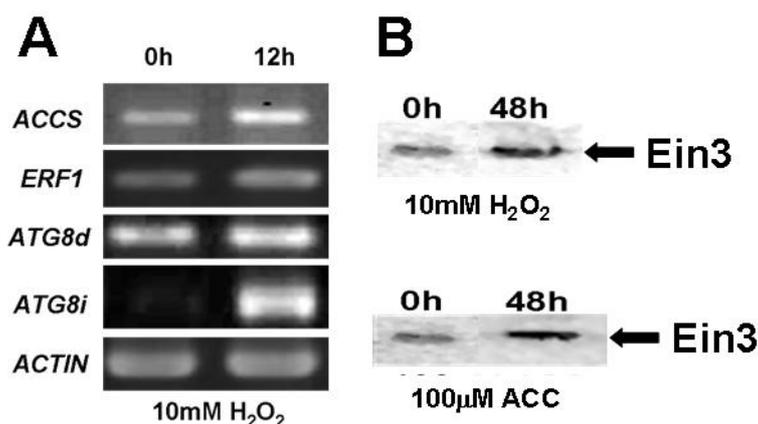


Fig. 3. ダイズの ROS 処理による (A) *ATG8i* とエチレン関連遺伝子発現、(B) ROS および ACC 処理による Ein3 イムノブロット解析

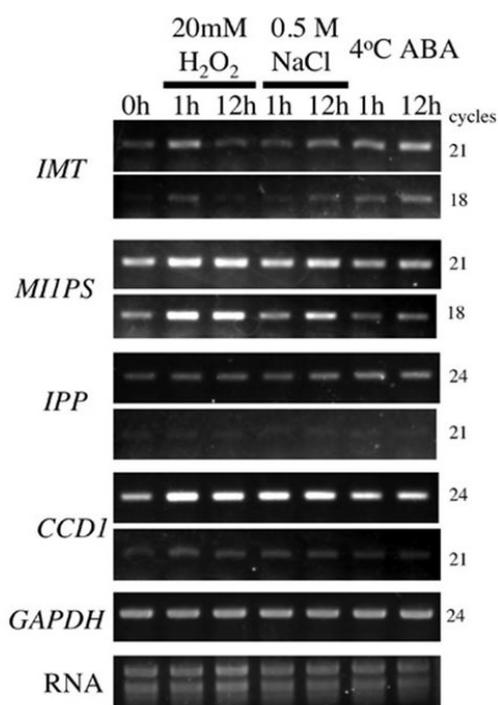


Fig. 4. アイスプラントにおける ROS、NaCl、低温および ABA に応答したピニトール合成系遺伝子の発現プロファイル

の D-ピニトール合成関連遺伝子がどのように挙動するか、それらの発現プロファイルを比較した (Fig. 4)。その結果、20 mM H_2O_2 により処理 1 h で *IMT* の発現が顕著であり、また 0.5 M NaCl では 12 h 後にその発現が認められた。また、低温 (4°C) および ABA 処理 12 h 後にも同様に特に強い発現が認められた。これらの結果は、myo-イノシトール

から D-ピニトールを合成するステップにおいて ROS、塩ストレス、低温や ABA には *IMT* 発現誘導効果があることを示している。

一方、D-ピニトール合成にはその前駆体である myo-イノシトールの供給が重要である。myo-イノシトールの生合成を律速する *MIPS* の発現上昇は ROS で最も顕著であり、NaCl ストレスにも促進効果があるものの、ABA シグナルの誘導を引き起こす低温ストレスでは大きな変動は観察されなかった (Fig. 4)。今回の実験で用いた様々なストレスで共通して ABA 合成促進に働くと思われるチトクローム P450 遺伝子ホモログ *CCD1* の発現増加が見られたが、ABA 単独の処理では *MIPS* の発現上昇は観察されなかった。

このように D-ピニトール合成に関わる *IMT* と *MIPS* では処理の違いで発現プロファイルが異なっており、*IMT* と *MIPS* の発現調節メカニズムが異なっている可能性がある。またアイスプラントの D-ピニトール含量増大には *IMT* 発現上昇のみならず *MIPS* など前駆体 myo-イノシトールの生合成を促進する遺伝子の発現上昇も同時に誘導する処理方法を開発する必要があると考えられる。また、熱ショック応答因子 (HSF) で誘導されてラフィノース属オリゴ糖合成に関与することが知られているスタキオース合成酵素 (*Stachys*) や ABA 応答転写因子 (*AREB*) は NaCl 処理では顕著な発現上昇は見られず (data not shown)、塩ストレスに誘導される *IMT* と *MIPS* の発現誘導メカニズムには HSF や ABA シグナルとは別のシグナル経路が機能している可能性がある。

4. 考 察

塩ストレス応答性シグナル分子 SOS3 は多くの植物で塩ストレスに応答して誘導される。塩ストレスや ROS は細胞内 Ca^{2+} 濃度を一過的に上昇し、 Ca^{2+} と結合した SOS3 はタンパク質リン酸化酵素 SOS2 を活性化して、 Na^+ イオン排出ポンプ SOS1 による Na^+ 輸送を促進することが知られている (Yuasa *et al.* 2012)。塩ストレスはアイスプラントの葉表面の塩腺からの塩類排出を促進しており、今回の実験から NaCl 処理に応答した SOS3 タンパク質の増加が示され、アイスプラントの NaCl 応答には CIPK 活性化による Na^+ イオン排出の増加や遺伝子発現調節に関与していることが示された (Figs. 2, 5)。また、エチレンシグナルに関連する転写因子 Ein3 はエチレンに応答してタンパク質分解が抑制されることで、Ein3 タンパク質レベルが上昇し、エチレン応答性 AP2 型転写因子 *ERF1* の発現誘導を介して一群のエチレン応答遺伝子の発現を誘導することが高等植物では報告されている (Guo and Ecker 2004)。これまでも NaCl ストレスは植物細胞膜に ROS 生成を介して細胞内 Ca^{2+} 動員を引き起こすことが報告されていた (Kudla *et al.* 2005)。また ROS に応答してエチレンシグナルが活性化することは様々な植物で知られている (Wang *et al.* 2013)。アミノシクロプロン酸 (ACC) 合成酵素 (ACCS) はエチレン合成を律速する酵素であり SAM (S-adenocylmethionin) をエチレンの前駆体である ACC を合成する際に働く酵素である。ACCS 遺伝子ファミリーは傷害応答性のもとのオーキシン誘導性の2つのサブファミリーに分類され、本研究においては傷害応答性ファミリーの ACCS 遺伝子ホモログに着目して研究を進めた。エチレンは細胞膜上のヒスチジンキナーゼ型膜貫通受容体に結合し、その下流の MAP キナーゼカスケードを調節する。その結果 Ein3、*ERF1* など一連の転写因子を誘導してエチレン応答を引き起こす (小柴ら 2006)。Ein3 は植物特有の転写因子で、プロテアソーム依存的な分解を介した Ein3 タンパク質の翻訳後調節がエチレン応答に深く関与していることが明らかとなっている。また、*ERF1* は AP2 ドメインを持ち、様々な障害に対してエチレンを介して誘導される転写因子である (Zhang *et al.* 2009; Buchanan-Wollaston *et al.* 2005)。

H_2O_2 は光呼吸により生成する他、強光、高温、低温により光照射下で生成することが知られている。 H_2O_2 は植物

個体が生成することでストレス応答シグナルとして働くことが近年明らかとなっており、そのほかにタンパク質を酸化的に修飾して異常タンパク質を生じていることが知られている (Sasaki *et al.* 2005; Li *et al.* 2009)。自食作用 (オートファジー) を司るオートファジー関連遺伝子のメンバーである *ATG8* はシロイヌナズナにおいて *ATG8a~i* が確認されており (Slavikova *et al.* 2005)、遺伝子ファミリーを構成し機能分化していることが知られている。*ATG8* はオートファジーに必須のユビキチン様のタンパク質であり、リン脂質 phosphatidylethanolamine の修飾を受ける (Yoshimoto *et al.* 2004)。*ATG8* はオートファゴソーム膜融合から液胞への移行に機能しており、栄養飢餓に応答して発現誘導が促され、タンパク質、多糖や脂質を分解して新たな代謝に必要な栄養源の供給に重要な働きをしていることが報告されている (Kirisako *et al.* 1999; 2000)。DFCI の植物遺伝子データベースにおけるアイスプラント EST 情報からアイスプラントには少なくとも 6 種の *ATG8* ホモログ (TC10585, TC8046, TC8391, TC10863, BE035126, BE033383) が発現しており、ROS 誘導性 *ATG8* とも高い相同性を持つ遺伝子が含まれている。我々の先行研究においても、ダイズの葉における ROS 応答としてエチレンシグナルを介したオートファジーの誘導が生じて、D-ピニトールなどの適合溶質の合成に必要な C 源の供給が行われることを明らかにした (Okuda *et al.* 2011)。したがってアイスプラントでも NaCl、 H_2O_2 処理に応答したエチレンシグナル活性化を示すデータから、適合溶質 D-ピニトールの生合成に必要な C 源の供給に *ATG8* 遺伝子誘導およびオートファジー活性化が関与していると推測される。

塩ストレス応答における活性酸素ストレスを介したエチレン応答性転写因子の活性化とイノシトール合成酵素遺伝子の誘導の間に強い関連が示された (Fig. 5)。以上のことから、D-ピニトール合成に必要な myo-イノシトールを供給する代謝経路の一つとして、ROS 応答性オートファジーを介した栄養リサイクルシステムの可能性と共に、エチレンを介したイノシトール合成系遺伝子の発現誘導メカニズムが存在する可能性も示唆された。シロイヌナズナでは H_2O_2 により MAP キナーゼが活性化され、その下流で ACCS が活性化されるという報告もある (Yuasa *et al.* 2001; Liu *et al.* 2004)。 H_2O_2 の処理 48 h 後には Ein3 の発現も遺伝子発現と同様に上昇していることから、 H_2O_2 処理によ

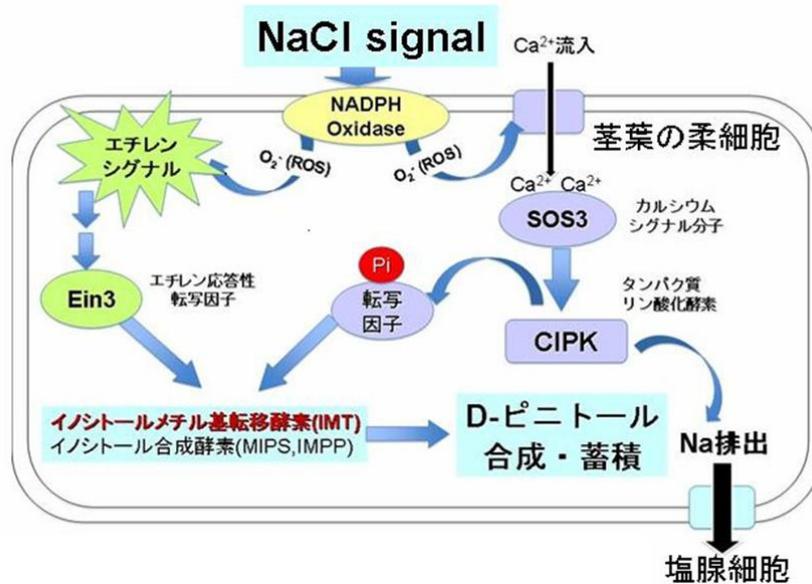


Fig. 5. アイスプラントの茎葉細胞における塩排出および D-ピニトール合成促進スキーム

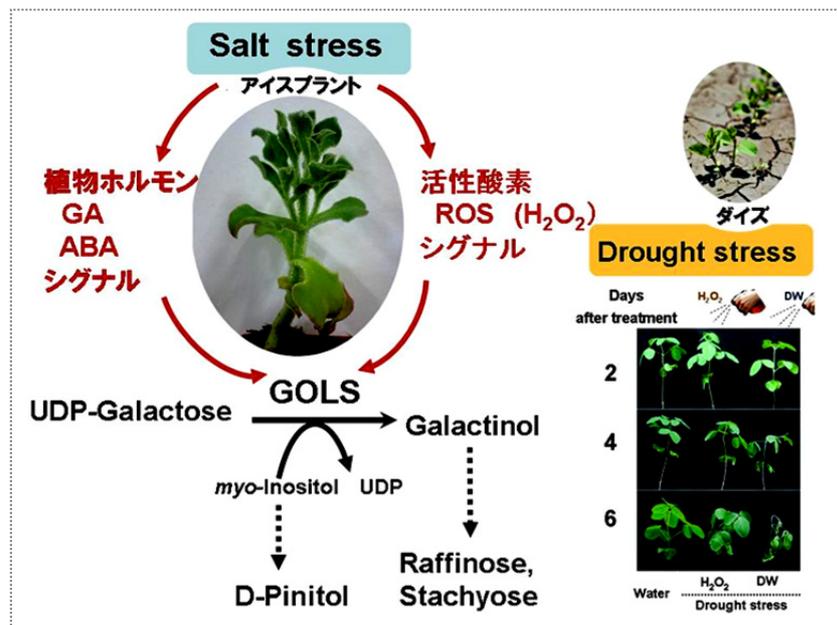


Fig. 6. アイスプラント茎葉およびダイズ葉における ROS と植物ホルモンにより誘導される D-ピニトール合成促進

りエチレンの合成が促進されたことは明らかであり、エチレンによりオートファジーが誘導されると共に、エチレンに反応した一連の加水分解酵素や D-ピニトールなどの適合溶質合成関連遺伝子の発現が活性化すると考えられる。本研究では新たに、アイスプラントにおいても塩ストレスより誘導された ROS、Ca²⁺ シグナルおよびエチレンシグナルを介した多面的な遺伝子発現調節メカニズムが存在することが示唆された。

5. 今後の課題

本研究から、塩ストレスに反応したアイスプラントの D-ピニトール含量増加に必要な *IMT* と *MIPS* の発現調節には、ROS 生成を介したエチレンシグナルとオートファジーによる栄養リサイクルが機能していることが示唆された (Fig. 6)。今後は、より細かいタイムコースを設け計測を行い、H₂O₂ との関連性を調査する必要がある。ピニトール合成は塩ストレス・乾燥に反応して促進されることが知られており、

ABA 依存的な発現調節の可能性についても、塩ストレスと植物ホルモン処理を組み合わせた条件での *MIPS*、*IMT* の発現プロファイルを調べる必要がある。また *IMT* 関連遺伝子はこれまでにアイSprantや耐塩性イネ科植物で見つかっているものの、D-ピニトールを蓄積するダイズやマメ科薬用作物においては *IMT* 関連遺伝子や D-ピニトール合成経路が未だに未解明となっている。したがってダイズなどマメ科作物の新規 *IMT* を同定し、組換え体タンパク質を用い新規 *IMT* 活性と酵素遺伝子の同定、D-ピニトール合成の新経路を特定する必要がある。

またストレス処理に加えて myo-イノシトール・ピニトール合成酵素活性の高いアイSprant品種を選抜する分子育種法として *TILLING* を利用して、D-ピニトール分解系の遺伝子破壊株のスクリーニングを進めることにより、アイSprant収穫時期に合わせた D-ピニトール合成・蓄積を最大化するための活性酸素 (ROS) 処理技術法の確立が期待される。

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

Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42: 567-585.

Guo H, Ecker JR (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol.* 7: 40-49.

Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* 151: 263-276.

小柴共一, 神谷勇治, 勝見允行 編 (2006) 植物ホルモンの分子生物学 59-75. 講談社, pp. 286 東京

Kudla J, Batistič O, Hashimoto K (2005) Calcium Signals: The lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22: 541-563.

Li Z, Wakao S, Fischer BB, Niyogi KK (2009) Sensing and responding to excess light. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 239-260.

Liu Y, Zhang S (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3386-3399.

Nakamura J, Yuasa T, Huong T, Harano K, Tanaka S, Iwata T, Phan T, Iwaya-Inoue M (2011) Rice homologs of inducer of CBF expression (*O_sICE*) are involved in cold acclimation. *Plant Biotechnol.* 28: 303-309.

Okuda M, Nang M.P.S, Oshima K, Ishibashi Y, Zheng SH, Yuasa T, Iwaya-Inoue M (2011) Ethylene signal mediates induction of *GmATG8i* in soybean plants under starvation stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 1408-1412.

Sasaki K, Kishitani S, Abe F, Sato T (2005) Promotion of seedling growth of seeds of rice (*Oryza sativa* L. cv. Hitomebore) by treatment with H₂O₂ before sowing. *Plant Prod. Sci.* 8: 509-514.

Slavikova S, Shy G, Yao Y (2005) The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in *Arabidopsis* plants. *J. Exp. Bot.* 421: 2839-2849.

Wang P, Du Y, Zhao X, Miao Y, Song CP (2013) The MPK6-ERF6-ROS-responsive cis-acting Element7/GCC box complex modulates oxidative gene transcription and the oxidative response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161: 1392-1408.

Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ, Bassham DC (2007) Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 143: 291-299.

Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S, Noda T, Ohsumi Y (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like

- proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16: 2967-2983.
- Yuasa T, Ichimura K, Mizoguchi T, Shinozaki K (2001) Oxidative stress activates ATMPK6, an Arabidopsis homologue of MAP kinase. *Plant Cell Physiol.* 42: 1012-1016.
- Zhang G, Chen M, Li L, Xu Z, Chen X, Guo J, Ma Y (2009) Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J. Exp. Bot.* 60: 3781-396.
- (ソルトサイエンス財団からの助成による研究成果の公表実績)
- Yuasa, T., Y. Ishibashi and M. Iwaya-Inoue (2012) A flower specific calcineurin B-like molecule (CBL)-interacting protein kinase (CIPK) homolog in tomato cultivar Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.), *Amer. J. Plant Sci.* 3: 753-763.

Development of Salt Tolerant Crops by Enhancing Signal Cross-Talk between Reactive Oxygen Species (ROS) and Phytohormones

Mari Iwaya-Inoue¹ and Takashi Yuasa^{1,2}

¹ Faculty of Agriculture, Kyushu University, ² Faculty of Agriculture, Miyazaki University

Summary

The halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* (ice plant) has been focused as a model halotolerant crop which can adapt to salinity environments. Ice plant accumulate D-pinitol and changes its carbon fixation system from C3 photosynthesis type to Crassulacean acid metabolism (CAM) type in response to salinity stress. Our previous studies have revealed that a reactive oxygen species (ROS) signal is involved in phytohormonal signaling for adaptation to osmotic stress. Thus, molecular mechanisms of cross talk between ROS signal and phytohormones such as ethylene and ABA were studied using leaves and stems of ice plant. We analyzed the expression profiles of D-pinitol synthesis-related genes and protein levels involved in phytohormonal and salinity signals. Salt stress and ROS such as H₂O₂ significantly induced genes coding myo-inositol O-methyltransferase (IMT) and myo-inositol-phosphate synthase (MIPS) in ice plant. IMT catalyzes the first step in the biosynthesis of the cyclic sugar alcohol D-pinitol from myo-inositol, and MIPS is a limiting enzyme for myo-inositol synthesis. Interestingly, immunoblot indicated that salt stress and ROS both up-regulate protein levels of SOS3 and Ein3, which are involved in Na⁺ ion-efflux system and ethylene perception signals, respectively. In addition, ROS treatment induced *ATG8i* encoding autophagy related protein as well as ethylene synthesis and ethylene responsive genes. We have compared the effects of various treatments, low temperature, ABA, ROS and NaCl, on the expression of the genes of D-pinitol synthesis. The induction profiles of D-pinitol synthesis-related genes in ice plant under those treatments exhibited different pattern between *IMT* and *MIPS*. We conclude that the molecular mechanisms that trigger induction of *IMT* and *MIPS* in response to salt stress in ice plant were possibly accompanied with ROS and ethylene signals and autophagy mechanism. It is suggested that the ROS treatment is a potentially more effective reagent for improvement of D-pinitol production and salinity tolerance in ice plant. There may be multiple signals or pathways that regulate D-pinitol synthesis pathway and Na⁺ ion efflux in salinity tolerance of ice plant.