

植物の塩ストレス耐性を調節する新規情報伝達分子と液胞膜機能に関する 分子生理学的研究

前島 正義, 富岡 利恵

名古屋大学大学院生命農学研究科

概要 高塩濃度の土壌に生育する植物は、異常浸透圧、脱水および塩による化学的な傷害を受け、生育に支障をきたす。耐塩性植物の多くは、塩ストレスに対して適合溶質の合成と蓄積、塩の排出、細胞質の塩の液胞への隔離等の機構を通して耐性を発揮している。本研究では、新規なカチオン結合タンパク質 PCaP2、液胞膜亜鉛輸送体 AtMTP1、液胞への塩の隔離に寄与する液胞膜プロトンポンプに焦点を当てて研究を進め、主として以下の成果を得た。

(1) 細胞膜局在型の情報変換分子 PCaP2 は根毛特異的に発現し、根毛の正常な先端成長に不可欠であることを明らかにした。PCaP2 は、脂質修飾を受けて細胞膜に結合し、その N 端領域 (23 残基) を介してカルモジュリンやホスファチジルイノシトールリン酸 (PtdInsP) との結合性をもつ。PCaP2 が情報変換分子として根毛の先端成長に不可欠であることを実験により証明し、機構モデルを提案した (Kato *et al.* 2013, *Plant J.*, 74: 690-700)。

(2) PCaP2 を過剰発現することで植物の耐塩性が向上した。例えば、80 mM NaCl 存在下で 2 週間生育させたシロイヌナズナを観察すると、PCaP2 過剰発現での生育が野生株に比べて顕著に生育がよい。発芽時期の耐性の向上が主要因の一つであることを解明した。もちろん、発芽後の耐塩性も向上した。

(3) PCaP2 の N 端領域のみを根毛特異的に発現した株 NR23 は、根毛を形成しないことを見出した。この株の生理的特性を解析したところ、吸水能力と乾燥耐性が著しく低下し、耐塩性も低下していることが明らかになった。根毛がないことで耐塩性が高まると予測したが、吸水力の低下が結果として耐塩性を低下させるという結論を得た。

(4) 液胞への Na⁺ 取込みをエネルギー的に支える H⁺-ピロホスファターゼ (H⁺-PPase) について、その機能欠失株、過剰発現株、機能改変分子発現株を作出し生育と耐塩性を比較したところ、少なくとも H⁺-PPase の過剰発現株では生育性が向上し、耐塩性の向上を示す知見も得られた。

(5) 植物の必須微量元素の吸収と蓄積に関わる亜鉛輸送体 AtMTP1 の分子構造と生理機能に関わる研究を進め、分子構造と機能の関係を明らかにするとともに (Kawachi *et al.*, 2012, *FEBS J.*, 279: 2339-2356; Tanaka *et al.*, 2013, *FEBS Open Bio*, 3: 218-224)、この輸送体遺伝子の改変が、金属元素の吸収、およびイオンバランス、耐塩性にどのように影響するのかを明らかにするため、種々の株を作出した。生理的特性の一部を解析しはじめた段階である。

はじめに

高塩濃度の土壌に生育する植物は異常浸透圧および塩による化学的な傷害を受け、生育に支障をきたす。耐塩性植物の多くは、塩ストレスに対して適合溶質の合成と蓄積、塩の排出・液胞への隔離等の機構を通して耐性を発揮している。申請者らは PCaP の過剰発現が耐塩性を付与することを見出した。本研究では、新規分子 PCaP の

生理的役割と過剰発現による耐塩性付与の機構を解明し、液胞への塩の集積機能の増強にポイントを絞った研究を進めることとした。具体的には、次の課題を設定した。(1) PCaP2 を過剰発現した植物は高塩濃度下でも高い耐性を示すので、改変分子の発現株も合わせて、PCaP の機能構造と生理機能、耐塩性付与の機構を明らかにする。(2) 植物に耐塩性を付与する PCaP2 の生化学的特性と分子

生理学的な役割を明らかにする。(3) 塩は必ずしもマイナスの影響のみではなく、低濃度においてはプラスの効果もあると推測される。この点を生育速度、細胞膜と液胞膜のイオン輸送系、さらに植物体内のイオンバランスへの影響について解析し、塩のポジティブな面の理解を進める。(4) 金属(亜鉛)輸送体からみた植物組織の塩組成のバランスの調整機構を探る。そして、(5) 液胞への Na^+ および他の金属イオンの取込みをエネルギー的に支える H^+ -ピロホスファターゼ(V-PPase)に注目し、その高機能型分子の発現、過剰発現、遺伝子欠失が耐塩性に与える影響を検証する。ここでは上記 5 項目について、研究の内容、経緯と結果を報告する。耐塩性を付与する PCaP2 に関する研究が一步前進したので、ここに力点をおく。

1. 植物の耐塩性を変える可能性をもつ情報伝達分子 PCaP2 による耐塩性付与

細胞膜に局在する情報変換機能を担うタンパク質分子 PCaP2 に注目して、その生理機能を解明する過程で、PCaP2 遺伝子の過剰発現が植物の耐塩性を高める作用をもつことを見出した。PCaP2 分子そのものの説明の前に、

耐塩性に関して得られた内容を概説する。

PCaP2 遺伝子を 35S カリフラワーモザイクウイルスのプロモータ(35S CaMV)の支配下で植物に過剰発現させた株を 3 種類 OEX4、OEX6、OEX7 用意した。これら 3 種における PCaP2 の mRNA 量は、7 倍(OEX4)、6 倍(OEX6)、4 倍(OEX7)であった。これら過剰発現株の生育を寒天培地上で比較した。ここでは、3 種の過剰発現株(OEX4、OEX5、OEX6)を実験対象としたが、50 mM、80 mM NaCl を含む培地での生育において野生株(WT)との明確な差異、すなわち過剰発現株において顕著な耐塩性向上が観察された(図 1;未発表)。100 mM NaCl では発芽率そのものが低下しており、さらに厳しい生育障害が見られるが、過剰発現株 OEX4、OEX6 での生育が明らかに良好である。植物組織内への塩あるいは金属の蓄積量を解析したところ、50 mM NaCl 培地で生育した植物では、過剰発現株の Na 含量は野生株の 130%と増大していた。他の元素では、K 含量(120%)、Fe 含量(140%)、Mg 含量(123%)、Si 含量(154%)と顕著な増大がみられた。一方、亜鉛含量は 89%に低下していた。一般に鉄吸収の増大は亜鉛吸収の低下と結びつくことが知られており、その

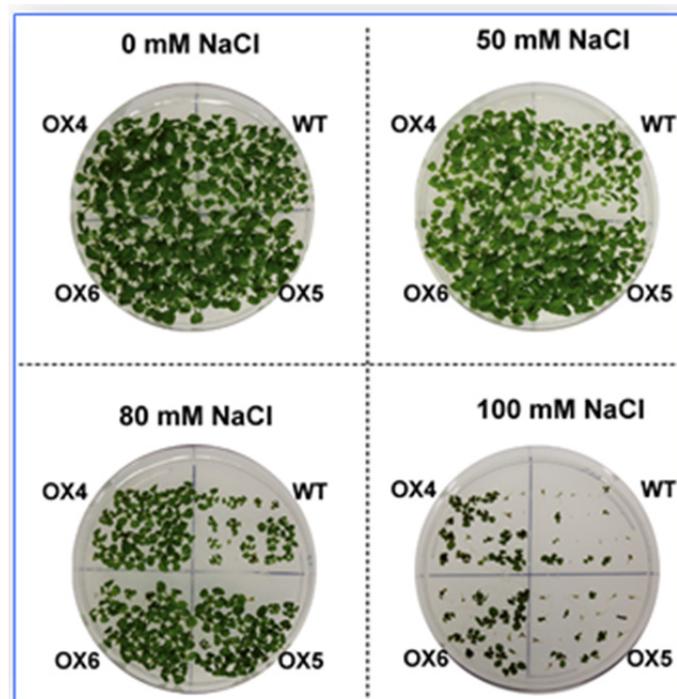


図 1. 野生株に比べて PCaP2 過剰発現株は塩存在下での生育がよい。表示されている濃度の NaCl を含む寒天培地に野生株(WT)、PCaP2 過剰発現株(OEX4、OEX5、OEX6)を播種し、約 2 週間後に生育状況を観察した。NaCl を含まない培地では生育の顕著な差異はみられないが、50 mM および 100 mM NaCl 共存下での生育は、PCaP2 過剰発現株がよい。

原因は、亜鉛と鉄が互いに同じ膜輸送体を介して植物に吸収されるためとされている。

さて上記の結果は、野生株と過剰発現株における、塩を含む培地での発芽のタイミングの差異を反映しているのか、あるいは発芽後の生育そのものの差異を反映しているのか、判断が困難である。そこで、発芽率および発芽のタイミングを検討した。まず、これらの株を、NaCl を含まない通常の培地に播種し、発芽率において野生株(WT)と同等であることを確認した。その点を確認した上で、100 mM NaCl での発芽状況を解析したところ、塩を含む培地で生育すると全体として発芽のタイミングが遅くなり、野生株(WT)では吸水後 7 日目に 50%が発芽する一方で、PCaP2 過剰発現株では発芽率の向上がみられた(図 2; 未発表)。すなわち 50%発芽率に到達する日数が、4 日目(OEX7)、4.5 日目(OEX6)、5.5 日目(OEX4)と短くなり、7 日目における発芽率の上昇が見られた。したがって、

PCaP2 過剰発現株の耐塩性の向上は、発芽時の耐塩性(野生株に比べて、塩を含む培地でも発芽のタイミングを維持できる)の高さが一つの原因であり、さらに発芽のみでなく、その後の生育期間での耐塩性の向上によるものであると結論づけられる。耐塩性の評価は、発芽後の実生あるいは幼植物を高塩濃度下で生育させた後の新鮮重の増大、草丈の増大等を指標とすることがあるが、自然界では発芽段階から塩のある環境であり、PCaP2 の強発現が発芽段階での耐塩性を向上させることの発見は、応用展開を考える上でも意義の大きな内容であると考えられる。

なお、野生株における PCaP2 の発現は、根の表皮細胞、とくに根毛に特異的であり、塩(NaCl)を含む培地で転写量が 8 倍以上増大し、他の生理的ストレス環境、たとえば低温、乾燥、高浸透圧条件においても増大する(図 3)。この点は既に公表済みである(Kato *et al.*, 2010, *Plant Cell Physiol.*, 51: 366-379)。

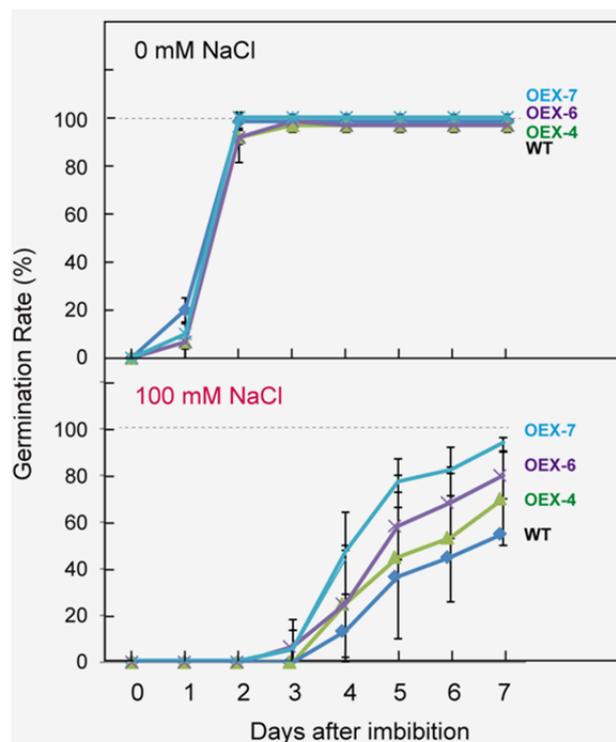


図 2. 野生株に比べて PCaP2 過剰発現株は塩存在下でも発芽率がよい。100 mM NaCl を含む寒天培地に野生株(WT)、PCaP2 過剰発現株(OEX4, OEX5, OEX6)を播種し、1 日毎に発芽状況を観察した。なお、OEX4, OEX6は図 1 の OX4、OX6 と同じラインである(表示のみの違い)。NaCl を含まない培地では播種 2 日後にはほぼ 100%発芽し、過剰発現株と野生株との差異はない(上図)。100 mM NaCl を含む培地では、野生株と過剰発現株はともに発芽のタイミングが遅くなり 1 週間後の発芽率も低下する傾向を示すが、過剰発現株では 4 日目以降の発芽率が顕著に高く耐塩性の向上が見られた(下図)。

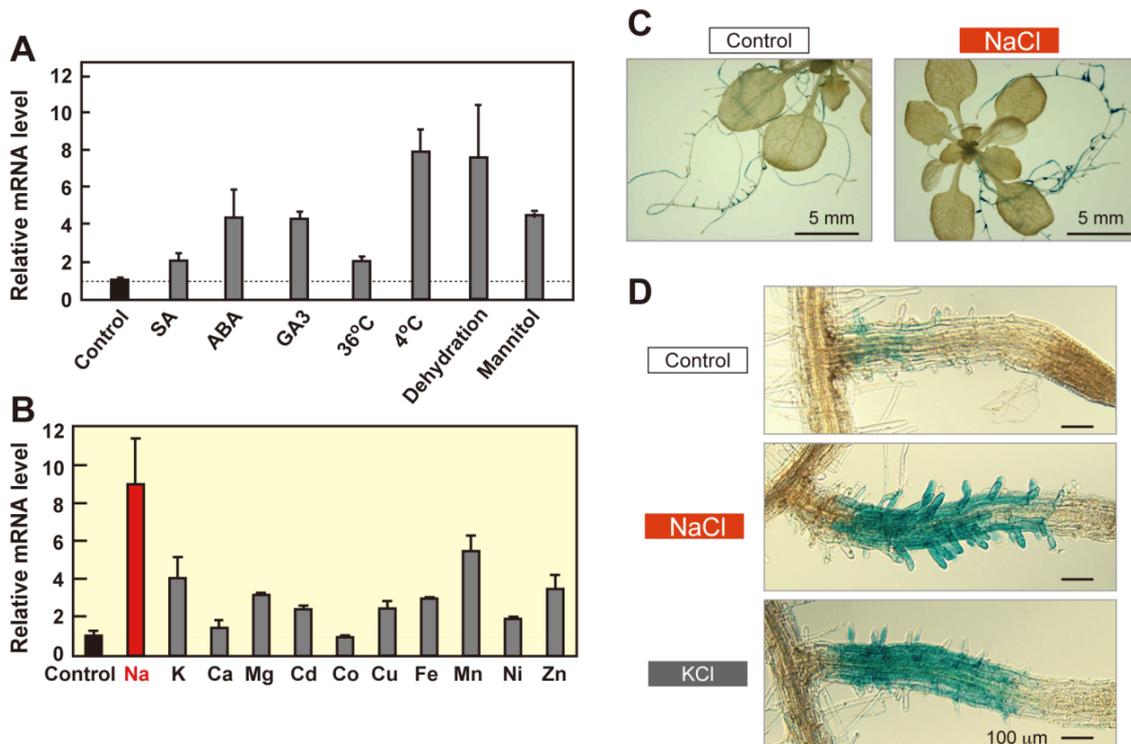


図 3. PCaP2 はストレス誘導性があり、根毛特異的な発現する。3 週間生育した実生を、表記のホルモン (SA, サリチル酸; ABA, アブシジン酸; GA3, ジベレリン) あるいは高温、低温、乾燥、浸透圧ストレスを 6 時間与えた後の PCaP2 の mRNA 量を測定し、無処理での値を 1 として、相対値として表示した (A)。同様に、100 mM NaCl、100 mM KCl 等のストレス処理を 6 時間与えた後の PCaP2 の mRNA 量の相対値をしめした (B)。PCaP2 プロモータ下流に GUS 遺伝子を付加し、100 mM NaCl 処理 2 日後 (C)、あるいは 1 日後 (D) の発現状況を写真撮影した。これらのデータは、当研究室での既報告論文 (Kato *et al.*, 2010, *Plant Cell Physiol.*, 51, 366-379) の中で発表済みである。

2. 植物の耐塩性を変える可能性をもつ情報伝達分子

PCaP2 の機能構造と分子生理学的な機能

植物に耐塩性を向上させる PCaP2 分子の構造的特徴と生理的な役割がみえてきた。PCaP2 はミリストイル化されることで細胞膜に安定に局在し、N 末端領域の 23 残基を介してホスファチジルイノシトールリン酸 (PtdInsPs) と結合し、この領域はさらにカルモジュリン/カルシウム複合体 (CaM/Ca) とも結合する。後者の結合の優先性が高い。したがって、細胞質カルシウム濃度が高い状況では CaM/Ca が結合することで、それまで結合していた PtdInsPs を遊離する。すなわち、PCaP2 は細胞内のカルシウムシグナルを PtdInsP シグナルに変換する役割を果たしている (図 4A)。PCaP2 は根毛特異的に発現する特徴ある分子である。根毛はその先端部分のみを伸長 (先端成長) させる特性をもつ。根毛の先端成長では、カルシウム濃度の先端部分での上昇、PtdIns(4,5)P₂ の存在が不可欠であ

ることが知られている (他研究グループ成果: Kusano *et al.* 2008, *Plant Cell*, 20: 367-380)。したがって、根毛の先端部分で局所的に上昇するカルシウム濃度に応答して、これを PtdIns(4,5)P₂ への信号に転換する役割を PCaP2 が担っているとの機能モデルを推測した。つまり、カルシウム濃度の低い部位では PCaP2 は PtdInsPs を結合することで情報伝達をブロックしているが、根毛の先端ではカルシウム濃度の上昇により CaM/Ca 複合体が形成され、これが PCaP2 の N 端に優先的に結合することで PtdIns(4,5)P₂ を遊離し、PtdIns(4,5)P₂ が先端成長を導いているとのモデルを提案した (Kato *et al.* 2013, *Plant J.*, 74: 690-700; 本財団研究助成成果明記) (図 4B)。このモデルを支持する知見として、PCaP2 の根毛特異的な過剰発現では、根毛の形状に異常が生じ、PCaP2 の部分構造、例えば N 端 23 残基領域を根毛特異的に過剰発現すると根毛の伸長が抑制される。

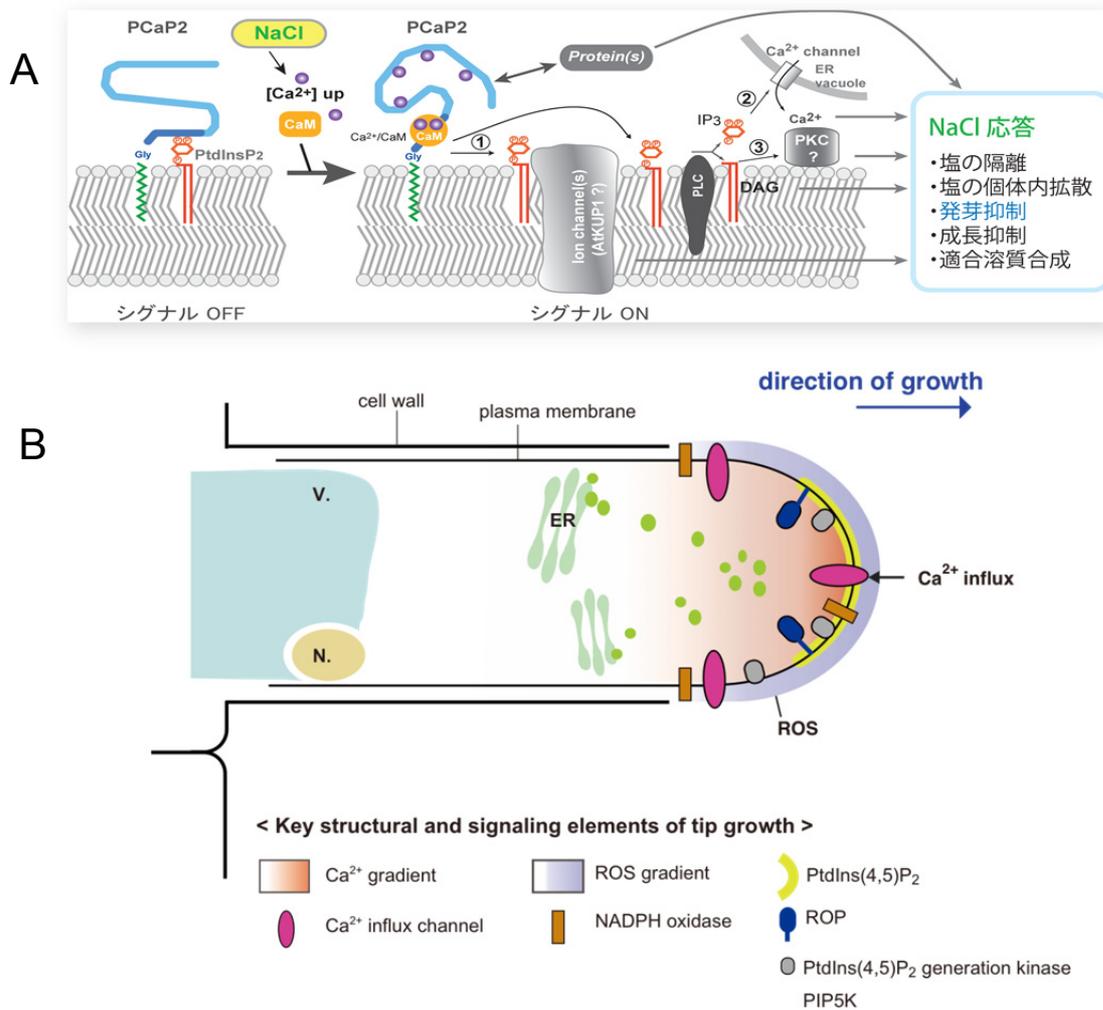


図 4. PCaP2 からみた高濃度の塩に対する応答機構の模式図(A)と根毛の先端成長における Ca^{2+} と $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ の関連図(B)。(A) PCaP2 は根毛特異的な発現特性を示す。PCaP2 は静止状態では、細胞膜の PtdInsPs を結合しているが、カルシウム濃度が上昇し、カルモジュリン/カルシウム(CaM/Ca)が形成されると、 PtdInsPs を追い出して優先的に結合する。結果として PtdInsPs は自由な動きが可能となり、情報を伝える、あるいは加水分解作用を受けて PI_3 とジアシルグリセロール(DAG)となり、それぞれが情報シグナルとなると推測される。本研究で、PCaP2 が PtdInsPs を結合すること、さらに CaM/Ca が優先的に PCaP2 の N 末端部分に優先的に結合することを証明した。(B) 根毛の先端成長に関連する分子を模式的に示した。とくに Ca^{2+} 刺激が $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ にどのように伝わるのかが不明であったが、本研究の対象である PCaP2 がその役割を担うことが強く示唆された。

上記の研究の過程で、PCaP2 の N 端 23 残基領域を過剰発現させ、根毛が全く生じない株(NR23)を得た。そして、根毛の有無は植物の生育、耐塩性、乾燥耐性に大きく関わるとの推測のもと、無根毛株 NR23 の生理的な特性を解析した。特徴的なポイントを述べる。(1) 無根毛株 NR23 ではカルシウムやカリウムの蓄積量が低下し、(2) 特定のイオン、たとえば銅カルシウム、カリウムなどを欠乏させた培地では、無根毛株 NR23 の生育が著しく低下する。

(3) 吸水量が低下し、(4) 乾燥耐性が低下する。そして、(5) 耐塩性が低下する。すなわち、正常な PCaP2 の過剰発現(組織全体)では耐塩性の向上に結びつくが、PCaP2 の細胞シグナリングの主役部分となる N 端 23 残基領域の部分的な過剰発現(根毛特異的)は根毛形成を阻害する。無根毛条件では、十分な吸水ができず塩を希釈する効果が低下し、そしてナトリウムイオンのカウンターイオンとして機能するカリウムイオンの吸収が抑制され、イオンバランス

の制御が不可能となるため、耐塩性が低下すると推測した。これらの成果の一部は学会等で発表した(投稿論文をまとめ今夏投稿の予定である)。

3. 塩の存在は過剰な銅に対する植物の耐性を高める

銅イオンは、ミトコンドリアの電子伝達鎖の複合体を含めて多様な酵素の構造と機能を支える微量必須元素である。植物では、光合成電子伝達に関与するプラストシアニン、酸化還元調節あるいは酸化ストレスに寄与するアスコルビン酸オキシダーゼやスーパーオキシドジスムターゼなどの補因子として必須機能を担っている。一方、過剰な銅は、酸化反応の促進、金属酵素の金属置換等を通してマイナスの影響を与える。たとえば、SH 酵素のジスルフィド結合を促進(S-S 結合の酸化反応による促進)して失活させ、金属イオンの特性として活性酸素を発生させる、あるいは脂質の過酸化、DNA やタンパク質に傷害を与え、非特異的に生体膜を損傷して細胞からの溶質の漏出をもたらす、細胞毒となる。細胞内では、各種の金属結合タンパク質や有機酸と結合した状態で存在し、過剰な銅イオンは液胞の中に濃縮・隔離されていると考えられている。

一般に、過剰な銅の存在はシロイヌナズナの生育を著しく阻害する。たとえば、通常の培地(銅イオン濃度は 0.1 μM)で 2 週間生育させた幼植物体を銅イオン高濃度(0.1 mM)の培地でさらに 2 週間生育させると、地上部の生重量は 30~50%低下する。シロイヌナズナは比較的耐塩性のある植物であり、50 mM の NaCl でも抑制はされるものの生育可能である。したがって、過剰な銅がなければ、50 mM の塩が存在しても植物は比較的順調に生育する。しかし、過剰な銅が存在する条件では、50 mM の NaCl を同じ培地に加えると、加算的な障害反応が見られ、植物の根の伸長は抑制され、地上部生重量も生育は抑制され、かつ黄化の度合いが著しくなる。つまり、過剰な銅イオンにより植物の生育は著しい障害を受ける。

しかし、塩の濃度を 100 mM に上げると、過剰な銅による生育阻害が顕著に軽減された。50 mM NaCl は銅耐性を向上させることはないが、100 mM にすると生重量は NaCl を添加しない場合に比べて顕著に多く、かつ緑色も強い。地上部生重量、根の伸長、葉の緑色の強さ、いずれにおいても、100 mM の NaCl 存在下では、0.1 mM の銅の有無による差異はほとんど見られなかった。この結果は、

0.1 mM という高濃度の銅イオンに対する耐性は、NaCl を 100 mM 濃度で添加することにより顕著に向上することを意味している。なお、150 mM 以上の NaCl を添加した場合は、銅の有無に関わらずシロイヌナズナの生育が著しく低下し比較検討が困難であった。

塩による銅障害の軽減の生化学的な機構と意義については、より詳細な研究が必要である。今年度は十分な解析を進めることができなかったが、現時点での推測が許されるのであれば、次の仮説が考えられる。(1) 高濃度の NaCl の存在が、根からの銅イオンの取込みを抑制する。これは量的、浸透圧的な効果による銅イオンの輸送速度の低下と、銅イオン輸送体の機能が高濃度 NaCl により阻害される2つの効果の加算的な結果である。(2) 100 mM の NaCl によって、ascorbate oxidase や superoxide dismutase などのストレス対応型遺伝子が強く誘導され、過剰な銅による細胞障害が軽減される。(3) NaCl によって、銅イオンの液胞への隔離機能が亢進する。本研究で観察したのは、高濃度の NaCl あるいは CuSO_4 で 2 週間処理した状態での植物である。したがって、短期的変化あるいは初期応答ではなく、植物がストレス対応型にゆっくりと変換するプロセスを見たことになる。上記の3つの可能性が同時あるいは時期をずらしながら寄与している可能性もある。100 mM NaCl によっていずれの遺伝子発現に変化が生じているのか、検討を進め、塩による銅ストレス耐性の向上の機構を明らかにしたい。

4. 金属(亜鉛)イオン輸送体の変異がイオン組成に与える影響

特定のイオンの輸送体が、植物体内のイオンバランスに与える影響について検討した。具体的には、植物の液胞膜で亜鉛輸送体 MTP1 (metal tolerance protein-1)を対象とした。シロイヌナズナの AtMTP1 は、液胞膜に局在し、細胞質の亜鉛イオンを液胞内のプロトンと交換し、液胞内に亜鉛を能動輸送する輸送体である(Kawachi *et al.*, 2008, *J. Biol. Chem.* 283: 8374-8383)。MTP1 が高濃度亜鉛による生理障害を防ぐために必須であること、MTP1 の機能欠失は、植物組織内でのイオンバランス、たとえば亜鉛濃度が減少し鉄含量が上昇するなどの変化が生ずることを解明し、論文として公表した(Kawachi *et al.*, 2009, *Plant Cell Physiol.*, 50: 1156-1170)。

AtMTP1 の分子構造は、大きくは、N 末端細胞質ドメイン、6 個の膜貫通ドメイン、His リッチ領域(細胞質)、C 末端細胞質ドメインに分けることができる。これらのドメインのうち亜鉛の結合と輸送に関わると推測される共通性・保存性の高いアミノ酸残基に焦点を当てて部位特異的にアミノ酸残基を置換し、その影響を酵母発現系で評価した。その結果、AtMTP1 のイオン選択性、輸送活性、輸送に伴う分子の構造変化を司る重要機能残基を多数同定し、論文として発表した(Kawachi *et al.*, 2012, *FEBS J.*, 279: 2339-2356)。この論文は、*FEBS Journal* 誌のこの号の表紙の図として採用された。

さらに、AtMTP1 分子のなかの特徴的なドメイン、すなわち His 残基に富む His リッチ領域の分子構造および亜鉛結合性について、タンパク質化学的に解析し論文として発表した(Tanaka *et al.*, 2013, *FEBS Open Bio*, 3: 218-224; 本財団研究助成成果明記)。

これまでの分子の改変とその機能の変化の研究成果をもとに、改変型 AtMTP1 を植物に導入して、亜鉛および他の元素の吸収と蓄積にどのような変化が生ずるかを検討している。一部の成果は学会等で発表した。すみやかに、論文として発表できるよう実験データを充実させ準備を急ぎたい。十分な実験的知見が蓄積すれば、特定の金属イオン輸送体が、植物組織内での元素組成あるいはイオン組成のバランスについて、どのような変化を与えるのか、統一性のある法則が見出せるものと期待される。

5. Na^+/H^+ 対向輸送体の機能を支えるプロトンポンプの生理機能について

植物は複数種の Na^+/H^+ 対向輸送体 (Na^+/H^+ exchanger, NHX) をもつが、その1つ NHX1 は液胞膜に局在する。この NHX1 はその名のとおり Na^+ の輸送体として見出されたが、 K^+ も輸送し得る。一般に、 NaCl を含む栽培条件では NHX1 の量が増えるが、この NHX1 をエネルギー的に駆動するプロトンポンプの活性も高い。現在、液胞膜プロトンポンプとしての H^+ -pyrophosphatase (H^+ -PPase) の機能と構造解析、ならびに、改変型 H^+ -PPase を導入した植物体の生理的な特性を解析している。 H^+ -PPase の高発現が、耐塩性ならびに生育そのものにプラスに効果のある知見を得つつある。

謝 辞

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団による研究助成により、塩に関する多面的な実験に取り組むことができたことを明記し、深謝申し上げます。

なお、本研究推進にあたっては、PCaP2 に関しては加藤一藤原真理子博士、大学院生田中奈月氏、AtMTP1 に関しては河内美樹博士(特任講師)、大学院生田中奈月氏、 H^+ -PPase については瀬上紹嗣博士、大学院生浅岡真理子氏の協力を得たことを明記しお礼申し上げます。

発表した関連論文(論文8, 9はソルト・サイエンス研究財団助成を明記)

- (1) Ferjani, A., Segami, S., Horiguchi, G., Sakata, A., Maeshima, M., and Tsukaya, H. (2012) Regulation of pyrophosphate levels by the H^+ -PPase is central for proper resumption of early plant development. *Plant Signaling & Behavior*, 7: 38-42.
- (2) Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N. and Miller, W.A. (2012) Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathogens*, 8(4): e1002639.
- (3) Kawachi, M., Kobae, Y., Kogawa, S., Mimura, T., Krämer, U., and Maeshima, M. (2012) Amino acid screening based on structural modeling identifies critical residues for the function, ion selectivity and structure of Arabidopsis MTP1. *FEBS J.*, 279: 2339-2356.
- (4) Tomioka, R., Takenaka, C., Maeshima, M., and Tezuka, T., Kojima, M., Sakakibara, H. (2012) Stimulation of root growth induced by aluminum in *Quercus serrata* Thunb. is related to activity of nitrate reductase and maintenance of IAA concentration in roots. *American J. Plant Sciences*, 3: 1619-1624.
- (5) Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H., Kim, H., Shim, D., Maeshima, M., Martinoia, E., Cahoon, E.B., Nishida, I., and Lee, Y. (2013) The ABCA9 transporter facilitates seeds storage lipid synthesis at the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110: 773-778.
- (6) Wang, B., Bailly, A., Zwiewka, M., Henrichs, S., Azzarello, E., Mancuso, S., Maeshima, M., Friml, J.,

- Schulz, A., and Geisler, M. (2013) *Arabidopsis* TWISTED DWARF1 functionally interacts with auxin exporter ABCB1 on the root plasma membrane. *Plant Cell*, 25: 202-214.
- (7) Nakanishi, Y., Iida, S., Ueoka-Nakanishi, H., Niimi, T., Tomioka, R., and Maeshima, M. (2013) Exploring dynamics of molybdate in living animal cells by a genetically encoded FRET nanosensor. *PLoS One*, 8(3): e58175.
- (8) Kato, M., Aoyama, T., and Maeshima, M. (2013) A Ca²⁺-binding protein PCaP2 located on the plasma membrane is involved in root hair development as a possible signal transducer. *The Plant J.*, 74(4): 690-700. (公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団による助成であることを明記)
- (9) Tanaka, N., Kawachi, M., Fujiwara, T., and Maeshima, M. (2013) Zinc-binding and structural properties of the histidine-rich loop of *Arabidopsis thaliana* vacuolar membrane zinc transporter MTP1. *FEBS Open Bio*, 3: 218-224. (公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団による助成であることを明記)
- (10) Ueoka-Nakanishi, H., Sazuka, T., Nakanishi, Y., Mori, H., Maeshima, M., and Hisabori, T. (2013) Thioredoxin-h regulates calcium-signaling proteins in plasma membranes. *FEBS J.* In press (Accepted, Apr. 15, 2013)
- (11) Bak, G., Lee, E.J., Lee, Y., Kato, M., Segami, S., Heven, S., Maeshima, M., Hwang, J.U., and Lee, Y. (2013) A role of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate in vacuolar structure change in guard cells of closing stomata. *Plant Cell* (accepted, May 17, 2013), In press.
- (12) Ferjani, A., Segami, S., Asaoka, M., and Maeshima, M. (2013) Regulation of PPi levels through vacuolar membrane H⁺-pyrophosphatase. *In Progress in Botany*, Vol. 75, ed. U. Lüttge, Springer. In press.

Molecular Physiology of a Novel Signal-Transducing Protein and Vacuolar Function, which Are Related to Salt Tolerance of Plant

Masayoshi Maeshima, Rie Tomioka

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

Summary

In salinity soils, plant growth is severely suppressed due to reduction of water potential, cellular dehydration, and ion toxicity. However, many plants survive at high salt levels. Salt tolerant plants can synthesize compatible solutes, exclude salts, compartmentalization of excess ions in the cytoplasm into vacuoles, and suppress influx of salt ions. In the present study, we found that a novel signal transducing protein PCaP2 (plasma membrane cation⁺-binding protein 2) is involved in response to salt stress. Our observations on PCaP2, vacuolar membrane zinc active transporter MTP1, and vacuolar membrane H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) are summarized.

(1) PCaP2 binds phosphatidylinositol phosphates (PtdInsPs) and Ca²⁺/calmodulin (Ca²⁺/CaM) complex. We revealed that PCaP2 is specifically expressed in root hair cells and is involved in normal tip growth of root hairs. We estimate that PCaP2 is involved in signal transduction from calcium signaling to PtdInsP signaling at the tip of root hairs (Kato *et al.* 2013, *Plant J.* 74: 690-700).

(2) *Arabidopsis* lines over-expressing PCaP2 were germinated and grew well even in 80 mM NaCl. Probably PCaP2 works as a suppressor element under salt stress to maintain the integrity of plants. Over-expression of PCaP2 may cause imbalance of the PCaP2 in cells and cancel this suppression.

(3) We got a unique line (NR23), which express the N-terminal part of PCaP2 and had no root hair, and characterized its physiological properties. NR23 had lower capacity of water absorption and became more sensitive to drought and salinity compared with wild type. High sensitivity of NR23 to salinity may be due to dysfunction of water absorption. Probably, salt entered into plant tissues must be diluted by a large amount of water.

(4) Salinity tolerance of plants partly depends on capacity of salt accumulation into vacuoles. Vacuolar accumulation of Na⁺ depends on the Na⁺/H⁺ exchanger and vacuolar proton pumps, H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) and H⁺-ATPase. We prepared several transgenic lines of H⁺-PPase. At least the overexpressor of H⁺-PPase grew well and showed higher salt tolerance.

(5) We investigated molecular structure and physiological roles of zinc transporter AtMTP1 (Kawachi *et al.* 2012, *FEBS J.* 279: 2339-2356; Tanaka *et al.* 2013, *FEBS Open Bio*, 3: 218-224), and are analyzing physiological effects of gene modification of AtMTP1.