

## イノシトール代謝経路の活性化による塩ストレス耐性強化植物の作出

吉田 薫

東京大学大学院農学生命科学研究科

**概要** 人類にとって 21 世紀に克服すべき最大の課題は「食糧危機と環境問題」である。地球の自浄能力を超えた急速な環境劣化が進む中で、様々なストレス環境に耐性を示し、かつ収量性の高い作物の開発が急務である。ストレス環境下での作物の代謝調節機構を明らかにし、適切に制御することは、将来の食糧確保にとって極めて重要である。

イノシトールは、動植物の成育に必須な栄養素の一つであり、多岐にわたる生化学的プロセスの中心的な物質である。イノシトールの代謝産物には、抗酸化作用を持つフィチン酸、活性酸素消去系で働くアスコルビン酸、浸透圧調節作用を持つ適合溶質であるラフィノース族オリゴ糖のほか、生体反応のシグナル物質として働くイノシトールリン酸類、細胞膜や細胞壁の成分となるガラクトシロン酸やグルクロン酸など、植物の成長制御やストレス耐性に重要な働きをする物質が多く存在する。従って、イノシトール生合成の制御は植物のストレス耐性向上やバイオマス増産の決め手となる可能性がある。

我々は、イノシトール生合成の最初のステップで働くイノシトール 1 リン酸合成酵素 (MIPS) に着目し、これを過剰発現させた形質転換イネ (MIPS 系統) で、塩ストレス耐性が向上することを見出した。本研究では、MIPS 系統を用いた網羅的なメタボローム解析を行うことで、MIPS 系統で塩ストレス耐性が向上する原因を明らかにし、イノシトール代謝の制御を通じた食糧増産への道筋をつけることを目的とした。

MIPS 系統では非形質転換イネに比べ、250 mM の NaCl 処理後もクロロフィル濃度が高く維持され、最上位の第4葉の成長が止まらないことがわかった。さらにメタボローム解析からも、塩ストレスに応答する物質、特にアブシジン酸 (ABA) に応答する物質の増加が非形質転換体に比べて有意に小さいこと、解糖系や TCA 回路へのダメージも小さいことがわかり、MIPS 系統の塩ストレス耐性向上が表現型と代謝物質の両面から明らかとなった。一方、通常時の代謝物質の比較からは、MIPS 系統が、イノシトールの代謝産物でストレス耐性に重要な働きをするアスコルビン酸やラフィノースを多く蓄積していることがわかった。さらに、解糖系、ペントースリン酸経路、及び TCA 回路に関連する代謝物質の増加から、これらの経路の活性化が示唆された。従って、MIPS 系統では、ペントースリン酸経路の活性化により活性酸素消去系で必要とされる NADPH が蓄積している可能性も指摘された。

以上の結果は、MIPS 系統は通常時にストレスを緩和する準備が整っていることを示しており、このことが MIPS 系統の塩ストレス耐性向上につながったと考えられた。

### 1. 研究目的

イノシトールは、動植物の成育に必須な栄養素の一つである。イノシトールの代謝産物には、リンの貯蔵物質であると同時に抗酸化作用を持ち、植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) シグナル伝達系への関与が示されているイノシトール 6 リン酸 (フィチン酸) や、細胞膜成分であるイノシトールリン脂質、様々な生体反応のシグナル物質とし

て働くことが示唆されているジアシルグリセロールやイノシトールリン酸類、細胞壁成分であるガラクトシロン酸とその下流の活性酸素除去系で働くアスコルビン酸、ストレス耐性に関連する適合溶質であるラフィノース族オリゴ糖などがあり、植物の成長制御やストレス耐性に重要な働きをする物質が多く存在する (Irvine and Schell, 2001)。これら重要なイノシトール代謝産物は全て、グルコース-6-リン酸か

らイノシトール 1 リン酸を経てイノシトールを合成する経路から作り出される。従って、この経路の最初のステップを担う酵素、イノシトール 1 リン酸合成酵素 (MIPS) がイノシトール代謝の鍵となる (Yoshida *et al.*, 1999)。申請者は、イネの MIPS を過剰発現させたイネで塩ストレス耐性が向上することを見出した。

これまでも、MIPS 遺伝子の発現が塩ストレスや ABA に誘導されることや (Ishitani *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2002)、塩生植物の MIPS 遺伝子を過剰発現させると塩ストレス耐性が向上することが報告されている (Das-Chatterjee *et al.*, 2006; Joshi *et al.*, 2013)。これらの過剰発現体で、イノシトールの増加は確認されているものの、それ以外のイノシトール代謝産物がどのように変化するのか、イノシトールには直接関係しない代謝経路は影響を受けるのか、などの網羅的な解析は行われておらず、塩ストレス耐性向上のメカニズムの解明には至っていない。

そこで、本研究では、MIPS 過剰発現イネの塩ストレス耐性が、どのような代謝物質の変化によりもたらされたのかを、網羅的なメタボローム解析により明らかにすることを目的とした。

## 2. 材料および手法

### 2.1 形質転換系統

イネのイノシトール 1 リン酸合成酵素遺伝子 MIPS (Os03g0192700) の cDNA 領域を、アクチンプロモーター (Zhang *et al.*, 1991) に連結したコンストラクトを作成し、イネ品種キタアケに導入した。得られた 27 形質転換系統の中から、フィチン酸合成の活性化により登熟種子での無機リン酸が大きく減少した 4 系統を選抜した。さらに、発現量の解析 (RT-PCR 及び real time RT-PCR) から、発現量の高い系統を選抜し、メタボローム解析に用いた (以下 MIPS 系統)。本研究では、ホモ系統であることを確認した T<sub>3</sub> または T<sub>6</sub> 植物を用いた。

### 2.2 塩ストレス処理

MS 培地 (0.1% グランガム) で 8 日間育成した実生を、250 mM の NaCl を添加した MS 培地 (液体) に移植し、塩ストレス処理を行った (28°C, 14 時間日長)。塩ストレス無処理の場合は、液体の MS 培地に移植した。

### 2.3 クロロフィル濃度の測定

塩ストレス処理 2 日目の地上部の葉全体を材料として、クロロフィル濃度を測定した。葉からのクロロフィル抽出方法は Arnon (1949) の 80% アセトン抽出法に準じた。クロロフィル濃度は抽出液の 663 nm と 645 nm の吸光度から計算した。

### 2.4 メタボローム解析

塩ストレス処理開始後 0 時間、6 時間、12 時間の植物から第 4 葉のみを実体顕微鏡下で摘出し、CE-MS 解析および GC-MS 解析の材料とした。15 mg 以上を 1 サンプルとし、反復は 6 サンプルとした。コントロールとして、塩ストレス無処理で培養した植物からも第 4 葉を摘出し、解析に用いた。メタボローム解析は植物科学最先端研究拠点ネットワークの理化学研究所植物科学研究センターメタボローム機能研究グループ (草野博士, 及川博士) に依頼した (Kusano *et al.*, 2011; Oikawa *et al.*, 2011)。

アスコルビン酸は、塩ストレス処理 0 日目、2 日目の地上部の葉を材料として、ascorbate oxidase assay 法 (Rao and Ormrod, 1995) を用いて測定した。

## 3. 研究結果

### 3.1 MIPS 過剰発現体の塩ストレス耐性

MIPS 遺伝子の高発現が確認できた 3 系統の後代ホモ系統を用いて、塩ストレス耐性を評価した。塩ストレスにより発生した活性酸素種は細胞に酸化ストレスを与える。そこで、酸化ストレスにより分解されやすいクロロフィルの量を比較した。その結果、塩ストレス処理 2 日後、調査した全ての MIPS 系統でキタアケよりも高いクロロフィル濃度を維持していることが明らかとなった (図 1A)。さらに塩ストレス処理中の植物の成育を調べたところ、塩ストレス処理 3.5 日目において、MIPS 系統の方が第 4 葉を抽出している個体が多いことがわかった (図 1B)。以上より、MIPS 系統は塩ストレス耐性が向上しており、塩ストレス処理後もクロロフィル濃度が高く維持され、第 4 葉の成育阻害も起こりにくいことが示唆された。

MIPS 系統の塩ストレス耐性向上の原因を探るため、本研究では、塩ストレス後の成育に差が見られた第 4 葉のみを用いたメタボローム解析を行い、原因となる代謝物質に迫ろうと考えた。予備実験により塩ストレス処理中の第 4 葉の成育を調査したところ、塩ストレス処理 12 時間後まではキタアケと MIPS 系統の間で成育に差が見られないことか

ら、本研究では、処理0時間、6時間後、および12時間後の第4葉を材料としてメタボローム解析を行った。

### 3.2 メタボローム解析

イネの第4葉を用いたCE-MS解析により173種の代謝物質を、GE-MS解析により98種の代謝物質をそれぞれ検出することができた。まず、MIPS過剰発現により、実際にイノシトール生合成が活性化されているかを調べたところ、発芽後8日目の第4葉において、イノシトール1リン酸もイノシトールもMIPS系統の方がキタアケに比べて有意に高い濃度であること、塩ストレス処理後も同様であることが明らかとなった(図2)。また、MIPSの基質であるグルコース-6-リン酸は、塩ストレス処理前はキタアケとMIPS系統で差が見られないが、塩ストレス処理後はMIPS系統の方が高い濃度を維持していた(図2)。

植物は塩ストレス以外の乾燥、低温といった非生物学的ストレスに対して共通した反応を示すことが知られており、その反応にはABAに依存する反応と依存しない反応の2種類あることが知られている(Kempa *et al.*, 2008; Urano *et al.*, 2009)。非形質転換体キタアケ第4葉の塩ストレス処理後の代謝物質の変化を見ると、ABAに依存して増加することが知られている各種アミノ酸、サッカロピン、及びポリアミン類の顕著な増加が認められた(図3, 4)。20種のアミノ酸のうち、適合溶質として働くプロリンを始め、11種のアミノ酸が塩ストレス処理後に有意に増加した(図3)。また、アルギニンから合成されるポリアミン類のうち、塩ストレス処理後の増加が顕著なのは、アグマチン、シトルリ

ン、オルニチンであった(図4)。ABAに依存せずにストレスに反応することが知られている代謝物質のうち、ガラク

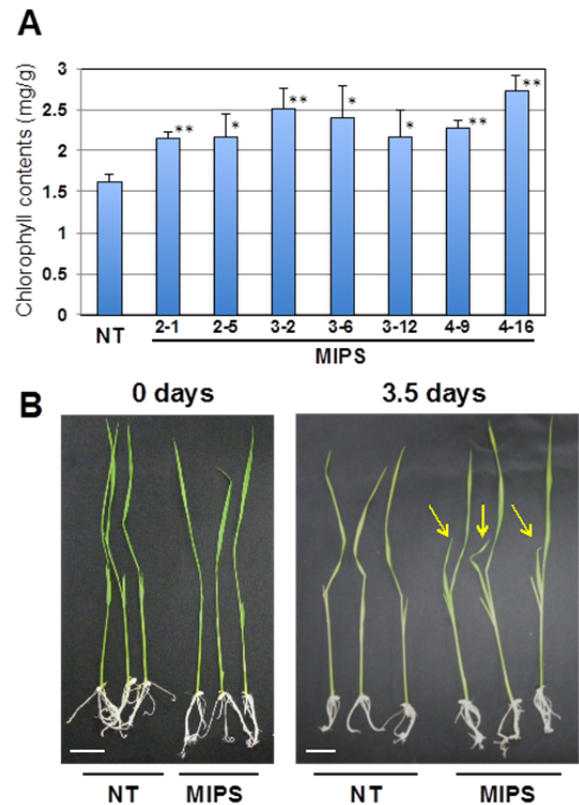


図1. MIPS過剰発現体の塩ストレス耐性  
A: 塩ストレス処理2日目の地上部のクロロフィル濃度。B: 塩ストレス処理前と処理後3.5日目の植物体の様子。NT: キタアケ、MIPS: MIPS過剰発現体、下線: 2 cm、矢印: 第4葉。

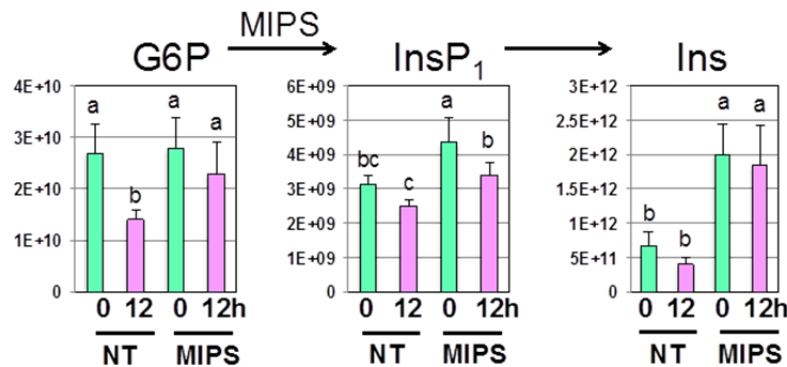


図2. イネ第4葉に含まれるイノシトール合成経路に含まれる物質のメタボローム解析  
G6P: グルコース-6-リン酸、InsP1: イノシトール1リン酸、Ins: イノシトール。NT: キタアケ、MIPS: MIPS過剰発現体、0h: 塩ストレス処理前、12h: 処理後12時間。

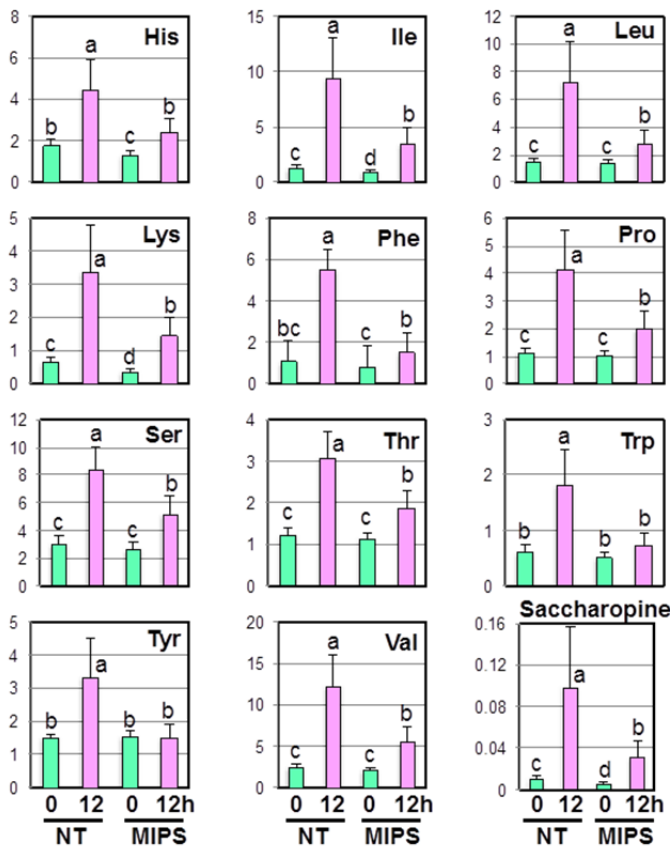


図3. 塩ストレス処理前後の第4葉に含まれるアミノ酸及びサッカロピンの濃度

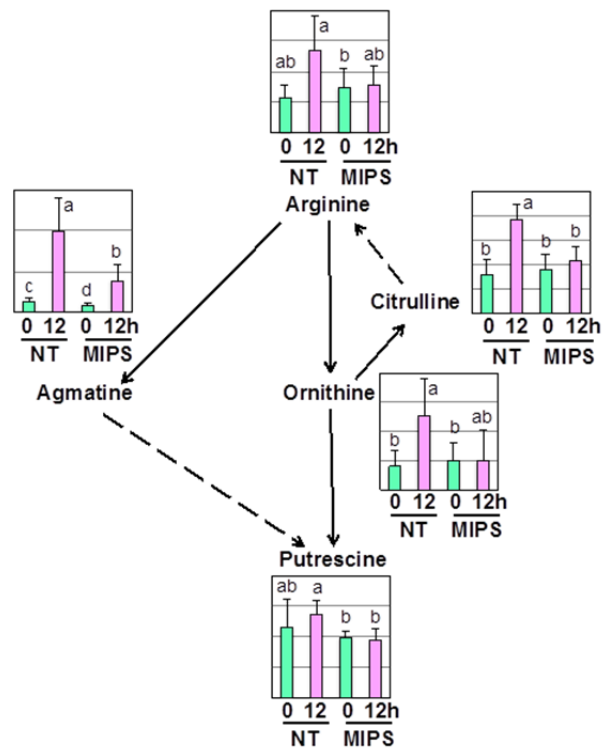


図4. 塩ストレス処理前後の第4葉に含まれるポリアミン類の濃度

チノールは、塩ストレス処理 12 時間目まで有意に増加するが、ラフィノースは、ほとんど変化しなかった(図5)。

一方、MIPS 系統では、ABA に依存して増加する代謝物質(アミノ酸, サッカロピ, ポリアミン類)の塩ストレス処理後の増加は、キタアケよりも有意に小さいことがわかった(図3, 4)。これらの代謝物質の塩ストレス処理後の時間経過を調べると、処理6時間目までは MIPS 系統でもキタアケと同様に増加するにもかかわらず、12 時間目では増加せずむしろ減少した(図6)。キタアケで増加する11種のアミノ酸全てが同様の傾向を示した。ABA に依存しない反応で応答するガラクトチノールとラフィノースの MIPS 系統における変化はキタアケと同じであった。以上の結果は、MIPS 系統では、キタアケに比べて塩ストレスに対する初期応答が小さいこと、特に、ABA に依存した経路の応答が小さいことを示している。

次に、MIPS 系統のストレス耐性向上が何に起因するかを調べるため、塩ストレス処理開始時(発芽後8日目)の第4葉の代謝物質に着目して詳細に比較した。まず、ストレ

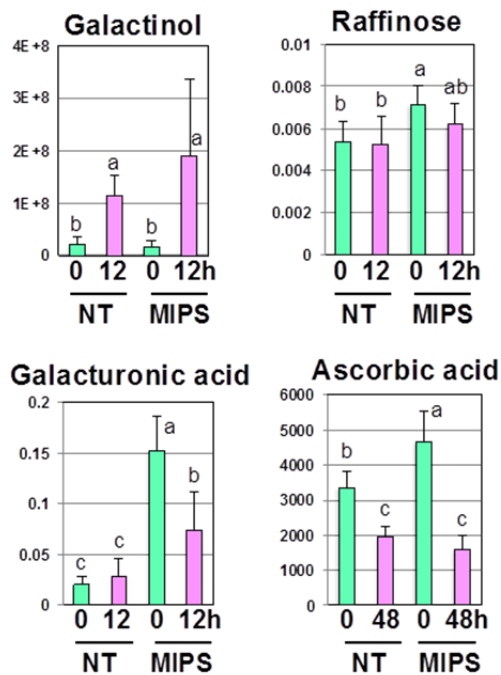


図5. ストレス耐性に関するイノシトール代謝産物のメタボローム解析

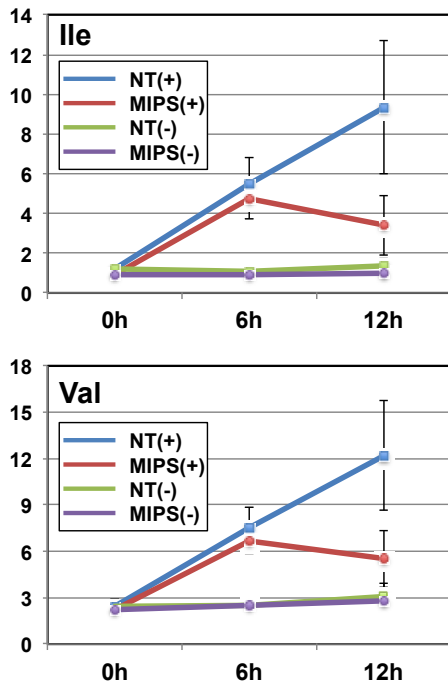


図 6. 塩ストレス処理後のアミノ酸濃度の推移  
 NT(+):キタアケ(塩ストレス処理あり)  
 MIPS(+):MIPS 過剰発現体(塩ストレス処理あり)  
 NT(-):キタアケ(塩ストレス処理なし)  
 MIPS(-):MIPS 過剰発現体(塩ストレス処理なし)

ス耐性に直接関わる代謝物質について検討した。イノシールの代謝産物の中では、適合溶質であり浸透圧調節の働きを持つラフィノースと活性酸素種の消去系で働くアスコルビン酸およびその中間産物であるガラクトソロン酸が、発芽後 8 日目の時点で MIPS 系統の方がキタアケよりも高い濃度で存在することがわかった(図 5)。塩ストレスをかけると、ラフィノースもアスコルビン酸も減少し、キタアケと変わらないレベルになった。また、適合溶質としての働きを持つアミノ酸であるプロリンは、発芽後 8 日目の時点では MIPS 系統とキタアケに差は見られなかった(図 3)。塩ストレス処理後は上述の通り、キタアケでの上昇が顕著であった。

塩ストレス処理前の発芽後 8 日目の第 4 葉において、ストレス耐性に直接関わる代謝物質以外で MIPS 系統とキタアケに差が見られる代謝物質を調べたところ、解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路に関する代謝物質のいくつかに差が見られることがわかった(図 7, 8)。環状ヒドロキシ酸であるシキミ酸とキナ酸の濃度は、MIPS 系統の方が

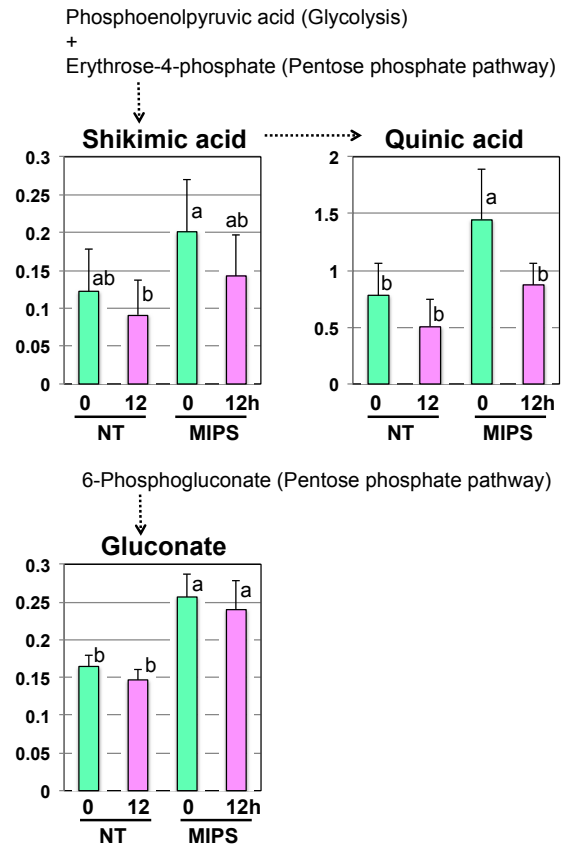


図 7. 解糖系とペントースリン酸経路に関する代謝物質のメタボローム解析

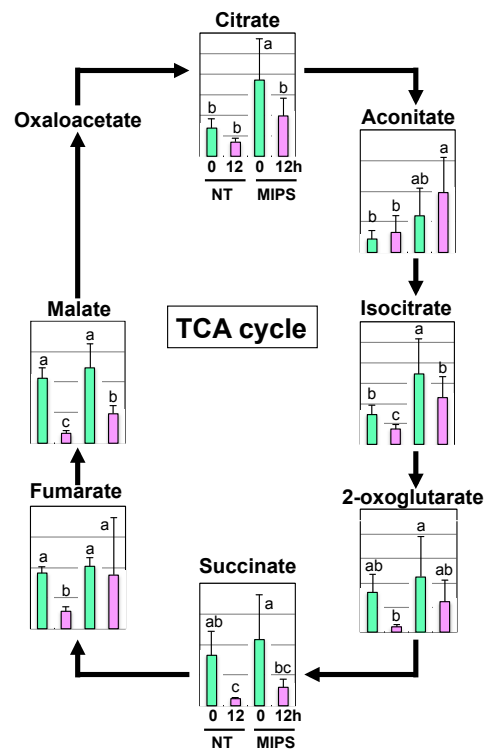


図 8. TCA 回路の物質のメタボローム解析

キタアケよりも発芽後 8 日目の時点で高かった(図 7)。シキミ酸とキナ酸は解糖系の中間産物ホスホエノールピルビン酸とペントースリン酸経路の中間産物エリトローサー4-リン酸から合成される。さらに、ペントースリン酸経路の中間産物である 6-ホスホグルコン酸から生成するグルコン酸の濃度も MIPS 系統の方が有意に高く、塩ストレス処理 12 時間でもその傾向が続いた(図 7)。また、TCA 回路の代謝物質を比較すると、発芽後 8 日目の時点で MIPS 系統の方が高い傾向にあり、クエン酸とイソクエン酸は有意に高かった(図 8)。塩ストレス処理 12 時間目では、キタアケでは TCA 回路の多くの物質が大きく減少するのに対し、MIPS 系統の減少は小さく、アコニット酸、イソクエン酸、フマル酸、およびリンゴ酸の濃度はキタアケよりも有意に高かった(図 8)。キタアケでは、解糖系も塩ストレスにより影響を受け、グルコース-6-リン酸やフルクトース-6-リン酸の有意な減少が観察されたが、MIPS 系統では、塩ストレス処理後 12 時間では処理前とほとんど変わらなかった。

#### 4. 考察

本研究では、塩ストレス耐性が向上した MIPS 過剰発現イネのメタボローム解析を行うことで、塩ストレス耐性向上のメカニズムを明らかにしようとした。まず、MIPS 過剰発現により、イノシトール 1 リン酸およびイノシトールが増加することが示され、イノシトール合成経路の入口の遺伝子の高発現が合成産物の量に反映することが示された。また、MIPS 系統では、塩ストレス処理後に非形質転換イネで観察されるクロロフィルの減少や第 4 葉の成長抑制がすぐには見られないことに加えて、メタボローム解析からは、アミノ酸の増加やポリアミンの増加が抑えられていること、解糖系や TCA 回路の代謝物質の減少が抑えられていることが示され、MIPS の過剰発現により植物の塩ストレス耐性が向上することが代謝物質の側面からも明らかとなった。今回、非形質転換イネにおいて処理後 12 時間目で塩ストレスに応答して増加したのは、主に ABA に依存する経路で応答する代謝物質であり(Kempa *et al.*, 2008; Urano *et al.*, 2009)、MIPS 系統との差もこれらの物質で顕著であった。以上のことから、MIPS 系統では、塩ストレスに伴う ABA の生合成が遅延していることが示唆される。

塩ストレス処理開始 12 時間という早い時点で、塩ストレスに対する応答に差異が見出されたことから、MIPS 系統

の塩ストレス耐性の向上は、塩ストレス処理開始時点での植物の状態の差を反映していると考えられる。実際、塩ストレス処理開始時点の代謝物質を比較したところ、イノシトールの代謝産物で塩ストレス耐性向上に寄与するラフィノースやアスコルビン酸が MIPS 系統では増加していることがわかった。さらに、MIPS 系統では TCA 回路の代謝物質の増加や解糖系とペントースリン酸経路に関連した代謝物質の増加が見られたことから、細胞の基本的な代謝を担うこれらの経路が MIPS 系統で活性化していることが示唆された。特に、ペントースリン酸経路の前半の代謝物質である 6-ホスホグルコン酸から生成するグルコン酸が増加したことは、ペントースリン酸経路の前半部分(oxidative branch)が活性化され、そこで発生する NADPH の増加が示唆される。NADPH は、塩ストレスに起因する活性酸素種を消去するアスコルビン酸-グルタチオン酸化還元回路で使われるため、NADPH の増加は酸化ストレス耐性の向上、ひいては塩ストレス耐性の向上に寄与するものと考えられる。塩ストレス耐性の高いオオムギ品種では、oxidative branch で働く酵素タンパク質の量が多くなっており、これらの酵素を導入した酵母では塩ストレス耐性が向上したことから、ペントースリン酸経路前半の高い活性が塩ストレス耐性と密接に関係していることが示唆されている(Witzel *et al.*, 2010)。

以上のように、MIPS 系統ではストレスを緩和する様々な代謝物質が通常時に蓄積しており、それによりストレスに強くなっている可能性がある。塩生植物では、ストレスのない条件においても様々な適合溶質が蓄積すると同時にストレス関連遺伝子が高発現しているなど、ストレスを予期した準備がなされており、それが強い塩ストレス耐性につながっていることが指摘されている(Gong *et al.*, 2005)。MIPS 系統においても、ストレスを緩和する準備が整っていることが、塩ストレス耐性の向上につながったと考えられた。

#### 5. 今後の課題

今回、イノシトール合成を活性化することで植物細胞の様々な代謝経路が影響を受けることを明らかにすることができた。MIPS 系統で、なぜイノシトールとは直接関係のない解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路までもが活性化されたのかは明らかでない。今後の詳細な解析が必要

である。MIPS 系統にストレスを緩和する様々な準備が整っているとすれば、塩ストレス以外の低温ストレスや乾燥ストレスなどにも強くなっている可能性がある。今後検証していかなければならない。

## 謝 辞

本研究の遂行に当たり、ご支援をいただいた公益財団法人ソルトサイエンス研究財団に心より感謝申し上げます。なお、メタボローム解析は、植物科学最先端研究拠点ネットワークの支援を受けて実施した。

## 文献等

- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24: 1-15.
- Das-Chatterjee A, Goswami L, Maitra S, Dastidar KG, Ray S, Majumder AL (2006) Introgression of a novel salt-tolerant L-*myo*-inositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka (PcINO1) confers salt tolerance to evolutionary diverse organisms. FEBS Lett 580: 3980-3988.
- Gong Q, Li P, Ma S, Rupassara SI, Bohnert HJ (2005) Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. Plant J 44: 826-839.
- Irvine RF, Schell MJ (2001) Back in the water: the return of the inositol phosphates. Nat Rev Mol Cell Biol. 2: 327-338.
- Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG, Bohnert HJ (1996) Coordinate transcriptional induction of *myo*-inositol metabolism during environmental stress. Plant J 9: 537-548.
- Joshi R, Ramanarao MV, Baisakh N (2013) Arabidopsis plants constitutively overexpressing a *myo*-inositol 1-phosphate synthase gene (*SaINO1*) from the halophyte smooth cordgrass exhibits enhanced level of tolerance to salt stress. Plant Physiol Biochem 65: 61-66.
- Kempa S, Krasensky J, Santo SD, Kopka J, Jonak C (2008) A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. PLoS ONE 3: e3935.
- Kusano M, Tabuchi M, Fukushima A, Funayama K, Diaz C, Kobayashi M, Hayashi N, Tsuchiya YN, Takahashi H, Kamata A, Yamaya T, Saito K (2011). Metabolomics data reveal a crucial role of cytosolic glutamine synthetase 1;1 in coordinating metabolic balance in rice. Plant J 66: 456-466.
- Oikawa A, Matsuda F, Kikuyama M, Mimura T, Saito K (2011) Metabolomics of a single vacuole reveals metabolic dynamism in an alga *Chara australis*. Plant Physiol 157: 544-551
- Rao MV, Ormrod DP (1995) Ozone exposure decreases UVB sensitivity in a UVB-sensitive flavonoid mutant of Arabidopsis. Photochem Photobiol 61: 71-78.
- Tan J, Wang C, Xiang B, Han R, Guo Z (2013) Hydrogen peroxide and nitric oxide mediated cold- and dehydration-induced *myo*-inositol phosphate synthase that confers multiple resistances to abiotic stresses. Plant Cell Environ 36: 288-299.
- Urano K, Maruyama K, Ogata Y, Morishita Y, Takeda M, Sakurai N, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2009) Characterization of ABA-regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics. Plant J 57: 1065-1078.
- Witzel K, Weidner A, Surabhi GK, Varshney RK, Kunze G, Buck-Sorlin GH, Börner A, Mock HP (2010) Comparative analysis of the grain proteome fraction in barley genotypes with contrasting salinity tolerance during germination. Plant Cell Environ 33: 211-222.
- Yoshida KT, Fujiwara T, Naito S (2002) The synergistic effects of sugar and abscisic acid on *myo*-inositol-1-phosphate synthase expression. Physiol Plant 114: 581-587.
- Yoshida KT, Wada T, Koyama H, Mizobuchi-Fukuoka R, Naito S (1999) Temporal and spatial patterns of

accumulation of the transcript of *myo*-inositol  
-1-phosphate synthase and phytin-containing  
particles during seed development in rice. *Plant  
Physiol* 119: 65-72

Zhang W, McElroy D, Wu R (1991) Analysis of rice *Act1*  
5' region activity in transgenic rice plants. *Plant  
Cell* 3: 1155-1165.



## Engineering of Salt-Stress Tolerance in Plants through Activation of Inositol Metabolic Pathway

Kaoru YOSHIDA

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

### Summary

One of the largest problem that should overcome in the 21st century is “food crisis and environmental degradation”. The rapid environmental degradation, which exceeds the self-cleaning power of the earth, progresses. Development of the crop with a high yield performance and with a high environmental stress tolerance is urgent target of plant breeding. It is important for future food guarantee that we reveal the metabolic regulation of the crop under various environmental stresses and control it appropriately.

Inositol is one of the essential nutrients for the growth of plants and animals, and is the central substance of the divergent biochemical processes. Metabolites of *myo*-inositol have various biological roles and participate in several important cellular processes, that is, ascorbic acid works in active oxygen scavenging system, raffinose family oligosaccharides work for osmo-protection, phytic acid acts as antioxidant, inositol phosphates act as signal transduction factors, and glucuronic acid and galacturonic acid are components of the cell wall and cell membrane, respectively. Thus, inositol metabolism is crucial for stress tolerance, normal plant growth and development. The appropriate control of inositol metabolism may lead to the increase in biomass production and the improved stress tolerance. *Myo*-inositol-1-phosphate synthase (MIPS; EC 5.5.1.4) catalyzes the reaction from glucose-6-phosphate to *myo*-inositol-1-phosphate, the first step of inositol metabolism. We have found that overexpression of *MIPS* gene in transgenic rice plants (MIPSox) leads to improve salt-stress tolerance in rice. To clarify which metabolic change leads the improved salt stress tolerance in the MIPSox plants, we performed metabolome analysis.

Compared to non-transgenic rice, chlorophyll concentration of MIPSox was maintained and the growth of the fourth leaf did not stop after 250mM NaCl treatment. From the metabolome analysis, we found that both the increase of metabolites, which are responsible to ABA-dependent signaling pathway, and the damage to TCA cycle and glycolysis in MIPSox plants under salt stress conditions were significantly smaller as compared to non-transformants. Then, the improvement of salt stress tolerance in MIPSox has become clear from both sides of the metabolites and phenotypes. From a comparison of the metabolites at the time before salt stress treatment, MIPSox accumulated both raffinose and ascorbic acid that play an important role in stress tolerance. Additionally, the activation of glycolysis pathway, pentose phosphate pathway, and TCA cycle was suggested, because the increase in metabolites associated with these pathways was observed. Activation of the pentose phosphate pathway may lead to the accumulation of NADPH that is needed in the active oxygen scavenging system of ascorbate-glutathione redox cycle.

These results suggest that the stress-anticipatory preparedness in MIPSox plants under control conditions might be responsible for the improved salt tolerance.