

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06032

研究課題名（和文）LsDREBパラログおよびレギュロンによるレタスのストレス応答機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of stress response mechanisms in Lettuce with LsDREB paralogs and their regulons

研究代表者

宇野 雄一（Yuichi, Uno）

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：90304120

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：植物のストレス応答の代表的な経路はDREB遺伝子を介している。研究代表者はこれまでにレタスのDREB転写因子がストレス応答に関わる遺伝子群の転写を活性化し、耐性を付与することを解明してきた。しかしながらLsDREBに調節を受けるレギュロンや、LsDREBのパラログの解析は進んでいなかった。本研究ではレタスのストレス応答に関わるLsDREB遺伝子のパラログ、並びにレギュロンのプロモーターを解析した。その結果、レタスのストレス耐性を高めるためには機能型のLsDREB7を用い、LsDHN12のプロモーターにより制御することが望ましいと結論づけられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年では環境ストレス耐性の向上が重要な育種目標の1つに挙げられている。その背景として、温暖化がもたらす異常気象による不作、塩類集積土壌や乾燥地の土地活用などがある。例えば全米のレタス生産量の74%を産出するカリフォルニア州では異常干ばつによるレタスの減収が深刻な問題となっている。レタスの環境ストレス耐性が向上すれば、国内外において不良環境下での品質維持や適応作型の拡大に貢献できる。本研究成果により、非ストレス時の生育が抑制されず、温暖化等による異常気象にも対応が可能な実用性のある品種育成が期待できる。またレタスを材料としたことでキク科植物のストレス耐性機構の解明が学術的に前進した。

研究成果の概要（英文）：The typical pathway of stress response in plants is through DREB genes. We have previously shown that lettuce DREB transcription factors activate transcription of target genes involved in stress response and tolerance. However, both the regulons and the paralogs of LsDREB have not been analyzed deeply. In this study, we analyzed the paralogs of the LsDREB gene and the cis-element of the regulon involved in the stress response of lettuce. As a result, it was concluded that a functional LsDREB7 of the wild-type allele under the control of LsDHN12 promoter should be used to enhance stress tolerance in lettuce.

研究分野：野菜園芸学

キーワード：レタス ストレス 乾燥 低温 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物のストレス応答の代表的な経路は *DREB* 遺伝子を介している。研究代表者は、研究開始当初までにレタスの *DREB* オルソログ遺伝子 (*LsDREB*) がコードする転写因子が、ストレス応答に関わる遺伝子群の転写を活性化し、耐性を付与することを解明してきた。しかしながら、*LsDREB* に調節を受けるレギュロンのプロモーターや、10 種類以上と推定される *LsDREB* のパラログの解析は進んでいなかった。レギュロンとパラログの関係性が特定できれば、ストレス応答機構の全体像が見え、ストレス耐性レタスの分子育種を前進させることができると予想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、レタスのストレス応答に関わる *LsDREB* 遺伝子のパラログ、並びにレギュロンのプロモーターを解析することとした。そのため、*LsDREB* のパラログのストレス応答性を確認し、分類整理を行った。また下流ターゲット遺伝子の *LsDHN* を同定し、転写量とプロモーター::*GUS* 形質転換体を解析した。最後に酵母ワンハイブリッド法により *LsDHN* プロモーターと *LsDREB* の結合解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 植物材料の調整と処理

レタス (*Lactuca sativa* L.) ‘岡山サラダ菜’を用いた。無菌播種を行い、25°C、16 時間日長、50~100 $\mu\text{mol/s/m}^2$ の培養室で育苗した。7 日目の実生を寒天培地から引き抜き根を処理液に浸漬した。各シャーレに 8 個体ずつ置床し、4 個体で 1 反復とした。乾燥ストレスとして 40 % PEG 溶液を用いた。低温ストレスとして蒸留水を用い、4°C のインキュベーター内に静置した。0、0.5、1、3、5、10、24 時間の短期ストレス処理を行った後に実生を回収して液体窒素により凍結し-80°C で保存した。長期ストレスに対する発現解析には別品種の‘フリルアイス’を用い、湛液型水耕で栽培し、収穫前約 1 週間の時点で水位を 2~4cm 低下させ、7 日間の乾燥ストレスを与えた。

(2) クローニングとシーケンス

凍結サンプルをマルチビーズショッカーにより破砕しパウダー化した。gDNA は、パウダー約 100 mg を用い、Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kits (GE Healthcare) により抽出した。Total RNA は Maxwell RSC Plant Kit (Promega) により抽出した。cDNA は Rever Tra Ace R qPCR RT Kit (TOYOBO) により合成した。gDNA または cDNA を鋳型として配列特異的なプライマーを用いて PCR で増幅し、得られた DNA 断片は TArget Clone (TOYOBO) によるクローニングを行い、BigDye Terminator Ver 3.1 (Thermo fisher) を使用してシーケンス反応を行った。シーケンス結果の解析には CLC Main Workbench 20 (Filgen) を使用した。

(3) Real Time PCR による発現解析

リアルタイム PCR には THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いた。cDNA を鋳型として配列特異的なプライマーを加え、LightCycler Nano または LightCycler 480 を用いて増幅し、コントロールの *Actin* 遺伝子に対する相対発現量を求めた。統計解析は JMP 12 (SAS Institute) を使用した。有意差検定は、Student の t 検定による 2 群間比較を行い、有意水準は 5%とした。生物学的反復は 4 回を行い、標準誤差を算出した。

(4) One hybrid 法による結合解析

GAL4 転写活性化ドメイン (GAL4-AD) との融合タンパク質発現用ベクター pGAD10 に、*LsDREB* の cDNA を導入した。*LsDHN12* プロモーター断片を 3 個つなぎ、pHisi-1 ベクターの *HIS3* 遺伝子の upstream、および pLacZi ベクターの *LacZ* 遺伝子の upstream に In-fusion 反応により挿入した。2 種類のベクターを YM4271 株に導入し、バックグラウンドの揃った株を選抜した。この酵母レポーター系統に、*LsDREB* を含む pGAD10 ベクターを導入し、形質転換体を得た。アッセイ用の培地には 3AT を添加し、30°C で 3 日間培養してコロニーの状態を確認した。

(5) *LsDHN* プロモーター::*GUS* 形質転換体の解析

LsDHN12 のプロモーター領域を In-Fusion HD Cloning Kit (TAKARA) を用いてエンタリーベクターである pRAFLentr に挿入した。Gateway システムの LR 反応によりDESTINY ションベクターの pFAST-G04 の *GUS* 遺伝子の upstream に *LsDHN* プロモーター配列を組み込み、ベクタープラスミドのコンストラクトを構築した。ベクターコンストラクトはアグロバクテリウム LBA4404 株に形質転換してレタス葉片の感染に使用した。感染後の葉片からカルス形成を経て再分化したシュートを発根培地に移植し再分化植物を得た。馴化した植物を自殖させて T₁ を採種した。解析には T₃ 世代を使用した。

4. 研究成果

(1) *LsDREB* パラログの分類とストレス応答性の解析

レタスのゲノム配列を検索したところ、14 種類の *LsDREB1* パラログが存在した。PROSITE

を使用してアミノ酸配列のモチーフ検索を行い、AP2 ドメインの保存を確認した。同ドメインの中で DRE との結合に重要とされている 14 番目のバリン、19 番目のグルタミン酸、37 番目のアラニンについて調べたところ (Sakuma et al., 2002; Yu et al., 2006; Liu et al., 2006; Sun et al., 2008) *LsDREB4* は 14 番目のバリンがイソロイシン、*LsDREB13* は 19 番目のグルタミン酸がバリン、*LsDREB14* は 19 番目のグルタミン酸がトリプトファンであった。また *LsDREB7* は、DNA 結合領域において、70 番目のトリプトファン (TGG) がストップコドン (TGA) に置き換わるナンセンス SNP を有する偽遺伝子であった。この SNP については、ヨーロッパ、アメリカ、および日本で育成された品種群は変異型 (W70X) を示し、茎レタスを中心とする中国および韓国由来の品種群の一部が野生型 (X70W) を示すことが明らかとなっている (宇野・関, 2017)。

40%の PEG を用いて実生に浸透圧ストレスと低温ストレスを与えた際の短期応答と、収穫前に 7 日間の乾燥ストレスを与えた長期的応答を調査した。RNA-seq 解析を行ったところ、短期的乾燥ストレスに対しては *LsDREB10* および *LsDREB11* が応答した。短期的低温処理ではほとんどの *LsDREB* (10/14 種類) は発現を上昇させた。最も誘導されたのは *LsDREB11* で約 3587 倍、続いて *LsDREB12*、*LsDREB10* であった。リアルタイム PCR により *LsDREB7* の低温応答の継時変化を調査したところ、0.5 時間から誘導がかり、3 時間で発現のピークを示し、その後減少した。

LsDREB パラログのプロモーター領域を検索し、スタートコドンから上流 1kbp 内のシスエレメントを調べたところ、5 種類の *LsDREB* が DRE/CRT 配列 (RCCGAC および GTCGAC) を保存していた。また、季節変動などによる緩やかな低温への応答に関わる Evening Element (Kidokoro et al., 2017) は *LsDREB7* および *LsDREB10* のプロモーター内でのみ確認された。

以上の結果から、レタスの中では *LsDREB7*、*LsDREB10*、*LsDREB11*、*LsDREB12* がストレス応答に強く関わると考えられた。*LsDREB7* および *LsDREB12* は乾燥に対して応答しないことから、プロモーターの改変が望ましいと考えられた。また *LsDREB7* はほとんどのレタス品種で偽遺伝子に変化していることから、機能型をコードする野生型アレルを使用する必要がある。

(2) *LsDREB* レギュロンの *LsDHN* のストレス応答性とプロモーター解析

LsDREB7 過剰発現型レタスのトランスクリプトーム解析の結果、デハイドリンをコードする *LsDHN12* の転写量が最も高く上昇していた。レタスのゲノム配列を検索したところ、15 種類の *LsDHN* が存在することが明らかとなった。全てのアイソフォーに K セグメントが確認でき、*LsDHN12* は最も多い 8 個を保存しており、酵素の保護活性が高いと考えられた。他種植物の先行研究において、デハイドリンは荷電アミノ酸および極性アミノ酸の含有率が高く (Rosales et al., 2014) Cys と Trp の含有率が低い (Graether and Boddington, 2014; Malik et al., 2017) と報告されており、レタスの *LsDHN* もこの特徴に一致していた。40%の PEG を用いてレタスの実生に浸透圧ストレスを与え、RNA-seq 解析を行ったところ、*LsDHN12* を含む 11 種類のデハイドリン遺伝子の転写量の増加が認められた。また長期間 (7 日間) の乾燥ストレス時の RNA-seq 解析を行ったところ、4 種類の *LsDHN* の発現量が増加していた (図 1)。

Real Time PCR の追試により *LsDHN3* および *LsDHN12* の有意な増加が再確認できた (図 2)。*LsDHN12* のプロモーター領域 2kb を調査したところ、DRE/CRT 配列 (RCCGAC および GTCGAC) が 3 カ所存在していた。*LsDHN12* プロモーター::*GUS* のコンストラクトを作成し、アグロバクテリウムを介して導入した形質転換体を獲得し、自殖により T₃ を育成した。浸透圧ストレス下の *GUS* の転写量を調査したところ、1 時間の PEG 処理で 6.6 倍、3 時間の処理では 8.5 倍上昇し、全ての処理区においてベクターコントロール系統より有意に高い発現量を示した。この傾向は Real Time PCR により解析した *LsDHN12* の発現パターンと似ていた。

以上により、*LsDHN12* は *LsDREB7* により転写制御されるメジャーレギュロンであること、約 2kb のプロモーター内に DRE を含み、乾燥ストレス時に速やかに応答することが明らかとなった。

(3) *LsDREB* パラログおよびレギュロンプロモーターの結合解析

イーストワンハイブリッド法により *LsDREB* パラログと *LsDHN* プロモーター配列の結合解析を行った。パラログによって結合特性に差があり、*LsDREB7*、*LsDREB11*、および *LsDREB12*

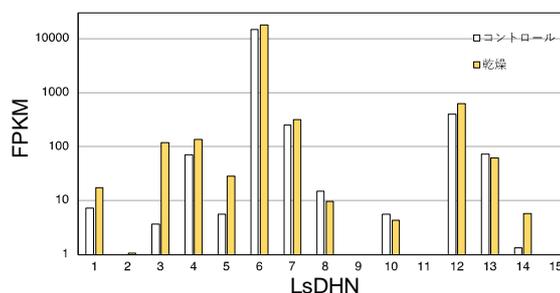


図 1 レタスデハイドリン遺伝子の乾燥応答
湛液型水耕栽培の水位を下げて 7 日間の乾燥ストレスを与えた。RNA-seq による転写産物の FPKM 値を示す。

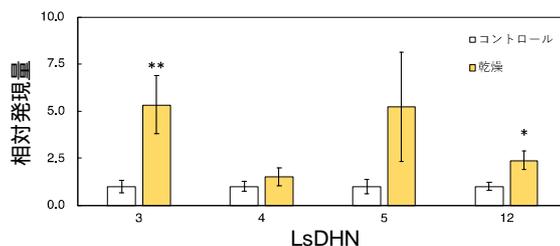


図 2 RealTimePCR による *LsDHN* の乾燥応答の確認
湛液型水耕栽培の水位を下げて 7 日間の乾燥ストレスを与えた。Actin 遺伝子をコントロールとした時の相対発現量を示す。

が強いことを確認できたが、バックグラウンドが高いため再現性が課題として残った。

(4)まとめ

レタスのストレス耐性を高めるためには、機能型の *LsDREB7* を用い、*LsDHN12* のプロモーターにより制御することが望ましいと結論づけられた。本研究成果により、非ストレス時の生育が抑制されず、温暖化等による異常気象にも対応が可能な実用性のある品種育成が期待できる。

(5)謝辞

本研究の遂行にあたり、神戸大学大学院農学研究科の吉本愛香氏・斎藤安希子氏・石橋美咲博士・小山竜平博士には種々の実験や議論において格別の御協力を賜りました。ここに記して厚くお礼申し上げます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koyama Ryohei, Yoshimoto Aika, Ishibashi Misaki, Itoh Hiromichi, Uno Yuichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Enzymatic Activities and Gene Transcript Levels Associated with the Augmentation of Antioxidant Constituents during Drought Stress in Lettuce	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Horticulturae	6. 最初と最後の頁 444 (11 pages)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/horticulturae7110444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉本愛香, 石橋美咲, 小山竜平, 宇野雄一
2. 発表標題 レタスDREB/CBFが転写を調節するデハイドリン遺伝子の解析
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斎藤安希子, 野尻増俊, 田岡直明, 宇野雄一
2. 発表標題 外生アラントインがレタスの浸透圧耐性に与える効果
3. 学会等名 園芸学会近畿支部奈良大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇野雄一, 斎藤安希子, 野尻増俊, 浅田隆之
2. 発表標題 浸透圧ストレス下のレタスにアラントインが与える効果
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉本愛香, 宇野雄一
2. 発表標題 レタスDREB/CBFの転写調節に関わるシスエレメントの検索
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本愛香, 宇野雄一
2. 発表標題 レタスDREB/CBFのパラログおよびレギュロンの解析
3. 学会等名 神戸大学研究基盤センター若手フロンティア研究会2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関