

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292022

研究課題名(和文) レタスDREB遺伝子内に存在するSNPとストレス耐性の関連解析

研究課題名(英文) Analysis of functional SNP in lettuce DREB gene in relation to environmental stress tolerance.

研究代表者

宇野 雄一 (Uno, Yuichi)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90304120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：さまざまな植物種でストレス耐性に関わる遺伝子DREB1Aはレタスにも存在するが、一塩基多型(SNP)を持ち、変異型W70Xは70番目のトリプトファン(TGG)がストップコドン(TGA)に置き換わっている。本研究では、このSNPがレタスのストレス耐性に影響すると仮定し、形質転換体とF2集団の表現型の調査により検証した。その結果、LsDREB1A野生型(X70W)過剰発現体において耐凍性、耐乾性および耐塩性が向上することが明らかとなった。耐性との関わりは、LsDREB1Aが司る遺伝子群の推定機能により裏付けられた。野生型を持つ品種群は中国・韓国の品種に限定され、有用な育種素材になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：DREB1A encoding the transcription factor that improves abiotic stress tolerance of plants. There are many DREB1A gene orthologs in various plant species. However, in lettuce (*Lactuca sativa* L.), single nucleotide polymorphism (SNP) is exist at 70th tryptophane to stop codon. In this study, the relationship between the SNP and stress tolerance was verified by investigating overexpressed transformants and F2 generations. Under freezing, drought and salt stress condition, transgenic lettuce overexpressing LsDREB1A-X70W lines showed the higher survival rate. This phenomenon was supported by stress-related target genes revealed by RNA-seq analysis. Both X70W-genotype and heterozygous F2 showed a significant higher survival rate as compared to W70X-genotype. These results suggest that the SNP of LsDREB1A is utilized as DNA marker in environmental stress tolerance of lettuce, and the cultivars possessing wild-type genotype X70W could be used as a useful breeding material.

研究分野：野菜園芸学

キーワード：環境ストレス 転写因子 耐性 レタス

1. 研究開始当初の背景

レタスは、塩や凍結ストレスに弱い植物に分類されている。例えば、塩濃度が $1.3 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ ($\approx 11 \text{ mM NaCl}$) を超えると生育低下が起こり (Ashraf ら, 1994), $5.2 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ ($\approx 55 \text{ mM NaCl}$) では収量が 50% 減少する (Orcutt・Nilsen, 2000)。また、 0°C 以下の温度では凍害が発生し、球葉の外側やその内側 2-3 枚の葉の外側が水浸状となり表皮がはがれて商品価値を損なう (吉岡, 1998)。したがって、環境ストレス耐性を高めたレタスを作成する意義は大きい。

シロイヌナズナから単離された *DREB* (Dehydration-Responsive Element Binding factor) 遺伝子は、転写活性化因子をコードしており、乾燥応答性遺伝子群のプロモーター中に存在するシス因子の *DRE* (Dehydration-Responsive Element) 配列 (TACCGACAT) を認識して結合し、各遺伝子の発現を促進する (Stockinger ら, 1997; Gilmour ら, 1998; Liu ら, 1998; Shinwari ら, 1998)。また、この遺伝子を過剰発現させた場合に、シロイヌナズナの乾燥・塩・低温ストレスに対する耐性の向上が確認された (Liu ら, 1999; Kasuga ら, 1999)。さらに、シロイヌナズナの *DREB* 遺伝子や、他の植物のオーソログ遺伝子を過剰発現させることで、イネ (Dubouzet ら, 2003)、コムギ (Shen ら, 2003)、ライムギ (Xiong・Fei, 2006)、ナタネ (Gao ら, 2002) などにおいて環境ストレス耐性の向上が確認されている。このように *DREB* 遺伝子は、多くの植物種に存在し、類似の機能を持つと推測できる。

そこで環境ストレス耐性をレタスに付与することを目的に、まずはシロイヌナズナの (*At*) *DREB* 遺伝子をレタスに導入した。その結果、形質転換レタスの 35S:*AtDREB1A* および rd29A:*AtDREB1A* の両系統は、耐乾燥性が増強していた。また、35S:*AtDREB1A* は、200mM の NaCl を含む養液栽培において生存率および生存日数を有意に増加させた。これらの結果から、シロイヌナズナの rd29A プロモーターと *AtDREB1A* 遺伝子がレタスにおいて機能し、塩や乾燥に対するストレス耐性を向上させることが示された。しかしながら、耐凍性が付与できないことや標的遺伝子が少ないことが課題として残った。異種間で *DREB* 遺伝子を導入した場合、配列の微妙な違いがタンパク質の結合特異性に関わり、標的遺伝子の発現が十分に誘導されないケースがこれまでに報告されており (Shen ら, 2003; Dubouzet ら, 2003; Oh ら, 2005; Pradeep ら, 2006)、シロイヌナズナの *AtDREB1A* 遺伝子を導入したレタスにおいても同様の現象が起きている可能性があると考えられた。そこで、同種間で過剰発現体を作成することを目的として、レタスの *DREB* オーソログ遺伝子の単離を行った。レタスの *LsDREB1A* 遺伝子の配列を解析したところ、DNA 結合領域において、70 番目の

トリプトファンがストップコドンに置き換わるナンセンス変異を含んでいた (W70X 型)。この変異を正常型に置換した X70W 型の機能解析を行った結果、核内の局在性と *DRE* 配列への結合性が確認できた。また、*LsDREB1A* の発現は、低温ストレス、塩ストレスおよび ABA に応答していた。しかしながら、この一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) が、実際にレタスの耐性に関与しているかは調査できていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、レタスのストレス耐性における *LsDREB1A* の SNP の関連性を解明することを最終目的とした。そのため、*LsDREB1A* タンパク質の検出を試み、レタス品種群の *LsDREB1A* の SNP を調査し、*LsDREB1A* (X70W および W70ST) の過剰発現体、および‘セルタス (X70W 型)’と‘岡山サラダナ (W70X 型)’の後代を作成して表現型の解析を行った。

3. 研究の方法

① タグ付き *LsDREB* タンパク質および抗体の作成と解析

LsDREB1A の全長 (F), N 末端側 (N), および C 末端側 (C) のコード領域を増幅し、pCold II ベクターにクローニングを行った後、タンパク質発現用の大腸菌 BL21 (DE3) pLYSs に形質転換を行った。低温および IPTG で 6xHis タグ付き融合タンパク質の発現を誘導し、可溶性画分と不溶性画分を抽出した。タンパク質は SDS-PAGE とイムノブロットによって検出した。1 次抗体として Anti-6xHis Monoclonal antibody (Mouse IgG1-K; ナカライテスク HI192) を、2 次抗体として Anti Mouse IgG AP Conjugate (ナカライテスク 01800-61) を用いた。

抗 *LsDREB1A* ウサギ血清は、ユーロフィンジェノミクス社に委託した。正常型 (X70W) および変異型 (W70X) 識別するため、次の 2 箇所を設計した。

配列 1: NH₂-C (Ahx) (Ahx) +MRDNGK-COOH

配列 2: NH₂-C (Ahx) +DDESLWSY-COOH
一方は、ORF1 (Nh;1-69) の C 末側を、もう一方は、ORF2 (Ch;93-217) の C 末側を標的配列とした。

核タンパク質の抽出には、CellLytic™ PN Isolation/Extraction Kit (Sigma-Aldrich) を用いた。添付のプロトコルに従い、品種‘岡山サラダ菜’の若葉を用い、細胞分解、核の単離、およびタンパク質の抽出の順に行った。

② レタス品種群における *LsDREB1A* の SNP の調査

供試材料には、var. *capitata* (ヘッドレタス)、var. *crispa* (リーフレタス)、var.

longifolia (ロメインレタス), および var. *angustana* (ステムレタス)の中から40品種を選び使用した. 種子または実生から抽出した gDNA を鋳型とし, Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS) 法により SNP を判別した. 検出すべき配列は保存性が高いドメインに存在するため, nested PCR を行った. 1st PCR は, ゲノム DNA を鋳型とし, 全長の ORF を増幅し, 2nd PCR は, 1st PCR 液を鋳型として, 部分長を増幅した. 2nd PCR の反応液から DNA を精製し, 制限酵素 *DdeI* により消化した後に, 電気泳動によりサイズを確認した.

③ *LsDREB1A* (野生型および変異型) 品種の後代の作出と解析

品種‘セルタス’および‘岡山サラダ菜’, の F2 集団を使用し, ジェノタイピングを行うとともにストレス耐性を評価した.

ジェノタイピングは, Real Time PCR を利用した HRM (High Resolution Melting) 解析により行った. 1st PCR で増幅が確認された PCR 産物の希釈液を鋳型とし, Light Cycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche) を用い, 添付のプロトコルに従った.

ストレス耐性の評価には, 播種後約 14 日間育苗し, 本葉が 3-4 枚展開したレタス苗を使用した. 栽植密度は 1 バット (38×47×14mm) 当たり 50-60 個体とし, 各苗をランダムにバット内に配置した. 成長点から新葉が展開していれば生存, それ以外は枯死という条件で評価を行い, F2 のジェノタイプ別に生存率を算出した. 乾燥ストレス試験では, 7 日間灌水を停止し, 再灌水後 7 日間栽培した. 塩ストレス試験では, 苗を 500mM NaCl 溶液に 24 時間浸した後に, 通常の養液で 7 日間栽培した. 低温ストレス試験では, 4°C・13 時間, -10°C・8 時間, 4°C・1 時間の順に低温, 凍結処理を行った後に, 25°C の環境下に戻して 7 日間栽培した.

④ *LsDREB* の形質転換体の作出と解析

LsDREB1A-X70W および *LsDREB1A-W70X* を目的の遺伝子として, pGWB2 の 35S プロモーターの下流に組み込み, 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を形質転換したアグロバクテリウム LBA4404 株をリーフディスク法によりレタス品種‘岡山サラダ菜’に感染させた. 共存, 選抜, 発根, 馴化を経た再分化個体を自殖させて T1 および T2 種子を得た. 抽出したゲノミック DNA を鋳型にして, PCR 反応を行い, 遺伝子導入の確認を行った. また, RNA を抽出し, 逆転写で cDNA を合成し, Real Time PCR によって発現解析を行った. この定量的 PCR の結果より, 発現量が異なる *LsDREB1A-W70X* および *LsDREB1A-X70W* の系統を選抜した. コン

トロール区としては, 空ベクター pGWB2 を形質転換に使用した系統を選抜した.

鉢上げした実生苗の各ストレス試験は, 上記③と同様に行った. また簡易ストレス試験として, 無菌播種 7 日目の実生を, 処理液を含む濾紙 2 枚を敷いた滅菌シャーレに置床した. 処理液は, 15%PEG#200 (乾燥ストレス), 400 および 500mM NaCl (塩ストレス) とした. また, 低温ストレス処理は, インキュベーター内で 4°C・13 時間, -10°C, -8°C・8 時間, 4°C・1 時間の順に低温, 凍結処理として与え, 25°C, 16 時間日長, 100 μ mol/mm²/s の環境下に戻して 7 日間培養した. 通常環境下における生育調査として, 無菌播種後 7 日目の実生の葉幅, 葉長および根長を測定した. *LsDREB1A* 過剰発現体の網羅的発現解析を行うため, 次世代シーケンサーによる RNA-seq を行った. 解析は BGI 社に委託した.

4. 研究成果

① タグ付き *LsDREB* タンパク質および抗体の作成と解析

大腸菌内で His タグ付き *LsDREB1A* 融合タンパク質の作成を試みた. 特に W70X 型および X70W 型の機能解析を目的とし, *LsDREB1A* の全長, N 末端側, および C 末端側の ORF をそれぞれ使用したコンストラクトを作成した. 大腸菌内で発現誘導を行った後, 可溶性画分と不溶性画分をそれぞれ抽出し, 抗 6×His モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った. それぞれの融合タンパク質の推定分子量は, *LsDREB1A-N* (W70X) が 9.7kDa, *LsDREB1A-F* (X70W) が 26.4kDa, および *LsDREB1A-C* (W70X) が 16.1kDa であり, 検出したバンドの実サイズとの比較を行った. その結果, 全長 ORF を含む *LsDREB1A-F* (X70W) のタンパク質のみが可溶性画分内に見られた. *LsDREB1A-N* (W70X) および *LsDREB1A-C* (W70X) は, 不溶性画分として検出された. これらの不溶性タンパク質を可溶性画分として回収するために, 条件検討を行った. 誘導開始時の大腸菌の濁度 (OD600) を 0.5 および 1.0, IPTG の濃度を 0.1mM および 1.0mM として誘導を試みたが, いずれも不溶性画分として発現し, 改善は認められなかった. 今後は, 発現誘導の条件検討を詳細に続けていくか, 不溶性タンパク質として回収し, 活性を保ちながら再生させる条件を検討する必要がある.

大腸菌内の発現が期待通りに進まなかったため, ORF1 (Nh; 1~69) ならびに ORF2 (Ch; 93~217) に特異性を持つように設計した合成ペプチドを抗原とするウサギ血清を委託で作成した. 推定タンパク質の実在を確認するため, *LsDREB1A-X70W* 過剰発現体, *LsDREB1A-W70X* 形質転換体, 品種‘岡山サラダ菜’および‘セルタス’の葉組織から核内タンパク質を抽出し, イムノプロ

ット法による解析を試みた。核タンパク質の抽出行程や抗体濃度などの条件検討を行ったが、結果的には推定された分子量の位置に特異的なバンドは検出されなかった。今後は、豊富に存在する核タンパク質ヒストンなどの抗体を使用することで、タンパク質の品質を実検する必要がある。

②レタス品種群における *LsDREB1A* の SNP の調査

Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS) 法により、レタス栽培品種の X70W と W70X を識別した結果の一部を図 1 に示した。10 品種が X70W を有しており、これらのうち 8 品種が中国由来の var. *angustana* に属し、残りの 2 品種は var. *capitata* に属していた。var. *capitata* の 2 品種は、他のリーフレタスとは異なり、生育初期から茎が伸びる形態を持つため、var. *angustana* に近いと考えている。var. *angustana* は、エジプト、ギリシャ、およびローマで扱われた記録がなく、おそらく西暦 600-900 年代に中国において育成されたと推定されており (Breitschneiderm, 1954)、X70W 型品種の偏在性との関連が示唆された。

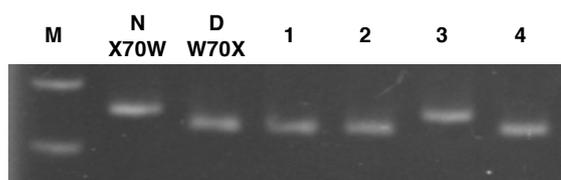


図 1 dCAPS 法による *LsDREB1A* の SNP の品種間差の検出

X70W 変異を持つ品種は、dCAPS プライマーにより制限酵素 *Ddel* の認識部位が形成されるためバンドが低い位置に出る (1, 2, 4)。(3) は変異を持たない品種を示す。N および D は、*Ddel* による未消化 (N)、または消化 (D) のコントロール。(M) は分子量マーカー。

③ *LsDREB1A* (野生型および変異型) 品種の後代の作出と解析

High Resolution Melting (HRM) 解析を適用した結果、W70X 型、X70W 型、および W70X と X70W をそれぞれ有するヘテロ型の 3 種類の波形が分かれ、個体ごとのジェノタイプングが可能であることを確認した。‘セルタス’ (C) と ‘岡山サラダ菜’ (O) の F₂ 分離集団を用いてストレス耐性を評価したところ、乾燥ストレス下において、変異型と比較して、野生型およびヘテロ型が有意に高い値を示した (図 2)。この結果は、正逆交雑の組み合わせにおいても変わらなかった。耐塩性試験や耐凍性試験は、耐乾性試験と同様の傾向を示したものの、統計的な有意差が生じない処理区間があった。その原因としては、これらのストレス耐性が複数の遺伝子座によって支配されていること、評価に用いた実験系の検出力が弱いことなどが考えられた。以上により、野生型 (X70W)

LsDREB1A は主として乾燥ストレス耐性を有意に向上させること、この遺伝子を持つ品種 ‘セルタス’ は有用な育種素材であることが示唆された。また、HRM 解析で用いた *LsDREB1A* の SNP は、DNA マーカーとして耐性個体の選抜に利用できることが明らかとなった。

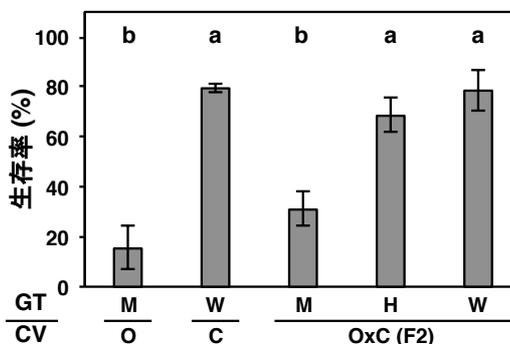


図 2 *LsDREB1A* の SNP が異なる 2 品種の F₂ 分離集団の乾燥ストレス下の生存率の比較
gt はジェノタイプを、cv は品種を示す。変異型品種 (M) には岡山サラダ菜 (O) を、野生型品種 (W) にはセルタス (C) を用いた。棒グラフの上の異なるアルファベットは 5% レベルで有意差があることを示す。

④ *LsDREB* の形質転換体の作出と解析

LsDREB1A 過剰発現体の表現型解析を行った結果、通常生育環境下では、葉や根の生育阻害が認められた。次に塩ストレス条件下では、野生型 *LsDREB1A* 過剰発現体 (X70W) の生存率は、発現量に比例して高くなり、高発現系統 (S) と、中間 (M) および低発現系統 (W)、および変異型との間には統計的有意差が認められた。また、すべての野生型の生存率は、変異型 *LsDREB1A* 過剰発現体 (W70X) やベクターコントロール (EV) よりも有意に高かった (図 3)。この傾向は、耐乾燥性試験や耐凍性試験でも同様であった。また、シャーレ内の培

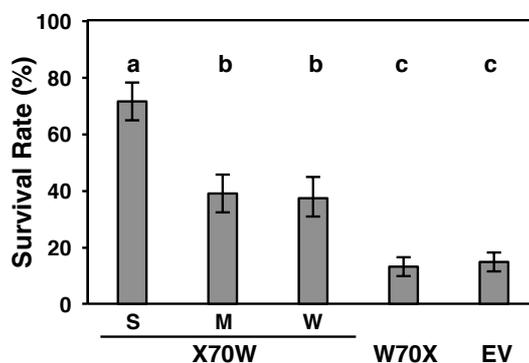


図 3 *LsDREB1A* の過剰発現体の塩ストレス下の生存率の比較

X70W は野生型 *LsDREB1A* を、W70X は変異型の過剰発現体を示す。導入遺伝子の発現レベルにより、S (強)、M (中)、W (弱) の個体を選択した。EV は、空ベクターの形質転換体 (コントロール)。棒グラフの上の異なるアルファベットは 5% レベルで有意差があることを示す。

地を使用した実生の試験においても、再現性が認められた。RNA-seq 解析を行い、*LsDREB1A* の過剰発現に伴って誘導される発現変動遺伝子 (DEGs: Differential Expressed Genes: DEG) を検索したところ、デハイドリン遺伝子などを含むレギュロンの候補が存在することを確認した。以上により、野生型 *LsDREB1A* は、レタスにおいてストレス応答に関わる遺伝子群の転写を活性化することで、耐性を向上させる能力を持つと結論した。

⑤まとめと今後の課題

本研究により、次のことが明らかとなった。
1) *LsDREB1A* 野生型 (X70W) 過剰発現体において耐凍性、耐乾性および耐塩性が向上した。
2) RNA Seq の結果、酵素の失活保護などに関わるデハイドリンをコードする遺伝子などがターゲットとして同定され、ストレス耐性との関連性が示唆された。
3) レタスのストレス耐性においては、*LsDREB1A* の SNP が DNA マーカーとして利用でき、野生型 (X70W) を持つ品種群は有用な育種素材になる。
4) 野生型の SNP を示したのは、2 品種のリーフレタスおよび 8 品種のステムレタスであり、中国・韓国の品種に限定された。

関連実験として行った *LsDREB2A* 遺伝子についても、過剰発現させたシロイヌナズナの耐塩性が向上した。*LsDREB2A* には、負の調節ドメインとしてタンパク質の分解に関わるシグナルペプチドの PEST 配列 (Sakuma ら, 2006a) が存在しない。これは、*LsDREB2A* が負の調節を受けない転写因子として働くことを示している。レタスには、10 種類以上の *DREB* のパラログが存在しているが、その機能分化に関して調査できていない。また、*LsDREB* 過剰発現体は、通常生育環境下において、葉や根の生育阻害、チップバーンのような生理障害などの農業的に負の形質を持っていた。今後はこれらの課題を克服し、実用レベルでストレス耐性を付与したレタスを作成する必要があるだろう。

⑥謝辞

本研究の遂行にあたり、元長野県野菜花き試験場の塚田元尚氏、国際農林水産業研究センターの中島一雄博士、元神戸大学理学部の渡辺邦秋教授には多くのご指摘とご助言を頂戴しました。研究材料のレタスの種子を分与していただくにあたり、長野県原種センターの武藤良一氏・油科琢也氏、農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門の野口裕司博士、同機構 中央農業総合研究センターの山内智史博士、ならびに農業生物資源研究所の農業生物資源ジーンバンク事業のご協力を賜りました。島根大学生物資源科学部の中川強教

授には、ご厚意により pGWB2 ベクターを分与いただきました。また、神戸大学大学院農学研究科・農学部の大井建氏・加藤遙氏・工藤啓太氏・小山竜平博士・杉本逸実氏・田山醇氏・丸山英樹氏・村岡文香氏・八木雅史博士・山田晃紀氏・米澤伸茂氏には、種々の実験や議論において、格別の御協力を賜りました。以上、ここに記してみなさまに厚くお礼申し上げます。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

① Yuichi Uno, Hiroshi Okubo, Hiromichi Itoh, and Ryohei Koyama, Reduction of leaf lettuce tipburn using an indicator cultivar. *Scientia Horticulturae*, 査読有, 210: 14-18, DOI:10.1016/j.scienta.2016.07.001, 2016

② Keita Kudo, Takeru Oi and Yuichi Uno, Functional characterization and expression profiling of a *DREB2*-type gene from lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 査読有, 116: 97-109, DOI 10.1007/s11240-013-0386-z, 2014

[学会発表] (計 9件)

① 宇野雄一, レタスの環境ストレス耐性の改変, 園芸学会平成 29 年度秋季大会, 第 6 回結球性野菜研究会, 酪農学園大学 (江別), 2017.9 (招待講演)

② 宇野雄一, 山田晃紀, 田山醇, 関功介, レタス *LsDREB1A* のレギュロンの解析, 園芸学会平成 29 年度秋季大会, 酪農学園大学 (江別), 2017.9

③ 宇野雄一, 山田晃紀, 関功介, レタス *DREB1* オルソログ遺伝子の過剰発現体の解析, 園芸学会平成 29 年度春季大会, 日本大学 (藤沢), 園芸学研究第 16 巻別 1: 182, 2017.3

④ 宇野雄一, 山田晃紀, 村岡文香, 関功介, レタスの *DREB1* オルソログ遺伝子の機能解析, 園芸学会平成 28 年度秋季大会, 名城大学 (名古屋), 園芸学研究第 15 巻別 2: 185, 2016.9

⑤ 宇野雄一, ストレス耐性レタスの分子育種, レタス研究会, 長野県野菜花き試験場 (塩尻), 2016.2 (招待講演)

⑥ 関功介, 芹澤啓明, 小松憲治, 田中啓介, 大竹留未, 宇野雄一, 松村英生, 林田信明, 木庭卓人, レタスゲノム情報の現状と育種への利用, 第 34 回日本植物細胞分子生物学会大会, 信州大学 (上田), 2016.8 (招待講演)

⑦宇野雄一, ストレス耐性レタスの作出に向けて, 農研機構九州沖縄農業研究センター セミナー, 筑後・久留米研究拠点(久留米), 2014.9(招待講演)

⑧宇野雄一, 米澤伸茂, レタスの *DREB1* オルソログ遺伝子の解析, 園芸学会平成 26 年度秋期大会, 佐賀大学(佐賀), 園芸学研究第 13 巻別 2:173, 2014.9

⑨Yuichi Uno, Keita Kudo, Itsumi Sugimoto, and Nobushige Yonezawa, Isolation and characterization of *DREB/CBF* gene orthologs in lettuce. the American Society for Horticultural Science 2013 Annual Conference (Palm Desert), HortScience 48:S167 (Abstr.), 2013.7

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 雄一 (UNO YUICHI)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号:90304120

(2) 研究協力者

関 功介 (SEKI KOUSUKE)

長野県野菜花き試験場・育種部・野菜担当