

発表番号 34 (0513)

DREB 遺伝子による塩ストレス耐性レタスの分子育種

宇野 雄一 (神戸大学農学部)

塩沙漠のような不毛の土地や臨海部の未利用地においては、ナトリウムの害が顕著であり、植物が生育することは困難を極める。このような不良環境における栽培が可能な作物を作出することは、来るべき人口増加に伴う食糧需給問題や CO₂ 削減問題などを解決するひとつの戦略であるといえる。その問題を克服する方法のひとつとして、ストレス耐性植物の作出が期待されている。Liu らが 1999 年にシロイヌナズナから単離した 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。また、DREB 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ている (Kasuga ら, 1999)。レタスの耐塩性はかなり低く、NaCl 濃度がわずか 25 mM の処理で収量が半分近く減少する。もしレタスに DREB 遺伝子を導入し耐性を獲得することができたならば、栽培面積の拡大が期待できる。本研究では、レタスの NaCl ストレス耐性の評価法を確立し、DREB 遺伝子を過剰発現させたレタスの形質転換体を作成することを目的とした。

レタスの塩ストレス耐性を養液栽培によって調査した結

果、初期の成長抑制が結果として生存の延長を促進していることが示唆され、評価を行う際には生存率を指標とすることが重要であると考えられた。また、生存の閾値は、ストレス処理後 14 日目においては、175~200mM の NaCl 濃度であると考えられた。*in vitro* 試験により、Root Bending Assay および Root Recovery Assay を試したところ、根の屈曲率は成長の指標であり、復水処理による根の復活率は生存の指標になると考えられた。したがって、Root Recovery Assay は、養液栽培に比べて期間短縮と省スペース化を実現できる耐塩性評価法となる可能性を示唆した。

レタスにおいて DREB1A を恒常的に発現させた 35S::DREB1A ベクターおよびストレス誘導性の rd29A::DREB1A ベクターによる形質転換体を作成した。T₂ 個体が獲得できた系統の 35S::DREB1A-18 は、200mM の NaCl ストレス下における生存率および生存日数がコントロール個体と比較して有意に向上した。以上により、レタスにおいてシロイヌナズナの DREB1A 遺伝子を介する耐性メカニズムが機能すると考えられ、耐塩性レタスの作出において有効であることが示唆された。今後は、まだ解析していない DREB 形質転換レタスの系統を評価し、ストレス耐性の付与を明らかにしたいと考えている。

助成番号 0513

DREB 遺伝子による塩ストレス耐性レタスの分子育種

宇野 雄一 (神戸大学農学部)

① 研究目的

農業上大きな問題のひとつとして施肥や灌水による塩の蓄積がある。蒸発と蒸散は、土壌から純水を蒸気として奪い、結果として土壌の溶質を濃縮する。灌水に使う水が高濃度の溶質を含み、蓄積した塩を排出系へと洗い流す機会がない場合、塩は植物に有害なレベルまで急速に到達する。地球上の灌水を受けている土地の3分の1は、塩による影響を受けていると見積もられている(Locy, 2004)。一般的な畑土壌では、土壌コロイドに吸着されている陽イオンの殆どすべてが、カルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウムなどの塩基性陽イオンであり、その中でもナトリウムの含量は比較的少ない。従って肥料や農薬の蓄積が問題となる塩類集積土壌においてはナトリウム塩をほとんど考慮しなくて良い。しかしながら、塩沙漠のような不毛の土地や臨海部の未利用地においては、ナトリウムの害が顕著であり、植物が生育することは困難を極める。実際に沿岸部の農家においては、明らかなナトリウムの被害が農作物に出ているケースもある。このような不良環境における栽培が可能な作物を作出することは、来るべき人口増加に伴う食糧需給問題やCO₂削減問題などを解決するひとつの戦略であるといえる。我が国においても、従来の育種法によって植物を改良し耐塩性を付与する試みは長年にわたって行われてきた。しかし、度重なる交配選抜を基本とすることから、煩雑性と期間を要することは否めなかった。その問題を克服する方法のひとつとして、遺伝子工学による分子育種が盛んになり、特にストレス耐性植物の作出においては著しい発展を遂げている。例えば、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のNa⁺-H⁺アンチポーターをコードする*AtNHX1*遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナやトマトの形質転換植物は、耐塩性を増大させた(Apseら, 1999)。また、グリシンベタイン生合成経路に重要な酵素であるベタインアルデヒド・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を過剰発現させたニンジンでは、400 mMという高いNaCl濃度においても成長した(Kumarら, 2004)。このように特定の酵素やタンパク質をコードする一つの遺伝子を過剰発現させる方法とは別に、多くのストレス関連性遺伝子を一挙に発現させることで耐性を付与する試みもなされている。Liuらが1999年にシロイヌナズナから単離

した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DREBホモ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 YおよびFei, 2006)、ナタネ(Gaoら, 2002)など多くの植物種において環境ストレス耐性の向上が確認されてきている。このようにDREB遺伝子は、多くの植物種に共通して存在し、共通の機能を持つことが推測できる。

レタスは植物界の10分の1をしめるほどのキク科の代表的野菜であり、葉をそのまま食するので収量評価が容易である。また半結球性の品種を用いれば、省スペースで栽培が行える。あわせて自殖により維持される固定種であるので採種作業が容易である。その耐塩性はかなり低く、NaCl濃度がわずか25 mMの処理で収量が半分近く減少する。もしレタスにDREB遺伝子を導入し耐性を獲得することができたならば、栽培面積の拡大が期待できる。本研究では、レタスのNaClストレス耐性の評価法を確立し、DREB遺伝子を過剰発現させたレタスの形質転換体を作成することを目的とした。

② 研究方法

1. 供試材料

レタス(*Lactuca sativa* L.)品種 岡山サラダ菜(タキイ種苗株式会社)を用いた。

2. 養液栽培試験

2.1 レタスの播種および育苗

育苗成形培地(OASIS growing medium [H-1] 2×2×2 cm)にレタス種子を播種した。発芽一週間後より1,000倍希釈したハイポネックス液肥(N:P:K=6:10:5)を底面灌水により与えた。育苗は25日間、恒温室(23°C, 30% 湿

度, 16 hr 日長)で行った。

2.2 塩ストレス処理

播種後 25 日目の実生を支持体となる発泡スチロールに成形培地とともに移植した。0, 125, 150, 175 および 200 mM の NaCl を含む液肥を満たして塩ストレス処理とした。塩ストレス処理は 28 日間、恒温室で行った。エアポンプで通気を行い、吸水、蒸発による減少分は適宜継ぎ足し、1 週間ごとに養液を全交換した。

3. 養液栽培による耐塩性試験

処理開始後 7, 14, 21 および 28 日目に生存個体数を数え、生存率を求めた。生長点の黒化、もしくは完全な萎凋を枯死の判断基準とした。また、成長の評価として 0, 4, 8, 12, 16 および 20 日目に各処理区につき 3 個体のサンプリングを行い、地上部および地下部の新鮮重ならびに乾物重、葉面積、葉数、根長を測定した。

4. *in vitro* 培養試験

4.1 レタスの無菌播種および培養

0.02%の界面活性(Tween20)を含む有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液にレタス種子を入れ約10分間攪拌し、表面殺菌した後、滅菌蒸留水で洗浄し、無菌播種を行った。発芽培地には、スクロース 3%を含むMS基本寒天培地(寒天濃度0.8%, pH 5.7-5.8)を120°Cで20分間、オートクレーブ滅菌して用いた。播種後は培養室(25°C, 16 hr 日長)で4日間育苗した。

4.2 根の屈曲率と側根発生率による耐塩性試験

根の屈曲率の判定には、Howden および Cobbett (1992)によって確立され、Wuら(1996)によって改変された root-bending assay 法を用いた。無菌播種後 5 日目のレタス実生を播種培地から引き抜き、0~350 mM の NaCl を含む検定用培地に根を伸ばして置床した。検定用培地は、寒天濃度を 1%とした他は播種培地と同様に作成した。移植後、根が垂直上向きになるように培養器を静置し、7 日目に根の屈曲を観察した。その後、検定用培地から、NaCl を含まない復水培地に移植し、14 日間の培養期間を経て根の観察を行い、復活した個体の発生率を求めた (root recovery assay)。

5. レタス形質転換体の獲得

本実験に使用したベクターおよびベクターコンストラクトを Table 1 に示した。

プロモーターには、恒常的発現を誘導するカリフラワーモザイクウィルスの 35S と、ストレス誘導性のシロイヌナズナの *rd29A* を用いた。導入した遺伝子は、*GUS* およびシロイヌナズナの *DREB1A* を用いた。これらのベクタープラスミドを形質転換させたアグロバクテリウム LBA4404 株を、抗生物質を含む LB 固形培地に植菌し、28°C で 2 日

間培養して感染に供した。播種後 6 日目の子葉を、中肋に沿って二等分に切除し、アグロバクテリウムを植菌した LB 固形培地上に置き、滅菌ナイフで 2 mm 間隔に 5 箇所切り目を入れた。その葉片を NAA 0.1 mg/l, BA 0.1 mg/l を加えた MS 基本培地 (30 g/l スクロース, pH 5.8; 8 g/l 精製寒天) に背軸面を下にして置床し、3 日間共存培養を行った。その後、共存培養用培地と同組成の培地にカナマイシン 100 mg/l、カルベニシリン 500 mg/l を添加した選抜培地で 30 日間培養を行った。30 日後 2 mm 以上に再分化したシュートを切り出し、ホルモンを無添加とした以外は選抜培地と同組成の発根培地に植え付けた。発根の見られた感染個体は順化を行い、16 時間日長で 23°C, 200 μmol/s/m² の光条件下で栽培し、抽台、開花、自殖を経て T₁ および T₂ 種子を得た。

Table 1 Promoter and gene sets of clones used in this study.

vector / construct	promoter	gene
pBE2113	35S	
pIG121Hm	35S	<i>GUS</i> (with intron)
rd29A-GUS	<i>rd29A</i>	<i>GUS</i>
DREB1A-pBE2113	35S	<i>DREB1A</i>
rd29A-DREB1A	<i>rd29A</i>	<i>DREB1A</i>

6. 形質転換の確認

形質転換されたことを確認するためにサザン分析および GUS 染色を行った。

6.1 サザンハイブリダイゼーションおよびノーザンハイブリダイゼーション

ゲノミック DNA を Murray and Thompson (1980) の CTAB 法を改変した方法により T₂ 個体の葉 3 g から抽出した。total RNA は、100 mg の葉からセパゾール(ナカライテスク)を用いて抽出した。サザンハイブリダイゼーションおよびノーザンハイブリダイゼーションは、Sambrook ら (1989) の方法に準じて行った。

6.2 組織の GUS 染色

再分化したシュートから葉片を切り出し、1 ml の GUS 反応液 (1 mM X-Gluc, 50 mM リン酸バッファー, 5% メタノール, 5 mM DTT 溶液) に入れ、減圧脱気を 30 分間行った。37°C で一晩放置した後、組織中の葉緑素を除去するために 100% エタノールで色素が完全に除去できるまで洗浄を繰り返し行った。

③ 研究結果

1. レタスの耐塩性評価方法の確立

1. 1 養液栽培法による評価

塩ストレスを受けたレタスは葉が肉厚になり、色は濃い緑色を呈した。NaCl 濃度が高く、また長期になるにつれ外側の葉から萎凋し、黄色く枯れていった。弱い程度の塩ストレスを長期に受けたものでは、外葉が萎凋する前に生長点が黒く堅くなった個体があった。根は塩ストレスに大いに影響を受け、非常に細く、もろい根になった。生存率は、日数経過とNaCl 濃度に依存して生存率が低下する傾向があった(Figure 1)。処理後 14 日目の生存率は、100 mM までは 100%を保持していたが、それ以上の濃度処理区においては、125, 150, 175 および 200 mM の NaCl でそれぞれ 98, 41, 17 および 17%と降下した(Figure 2)。この時点で、125 mM 区と 150 mM 区、150 mM 区と 175 mM 区の間には有意差が認められた。また、

処理後 28 日目には 54, 11, 0 および 0%であった(data not shown)。レタスの成長も塩ストレスによって抑制された。その程度は NaCl 濃度、処理期間によって、また同じ処理区内でも個体間で差が観察された(Figure 1)。

生育調査を行った結果、全ての調査項目(地上部および地下部の新鮮重ならびに乾物重、葉面積、葉数、根長)において、塩処理区は対照区に比べて有意な減少が認められた(data not shown)。Figure 2 に処理後 14 日目の葉面積の NaCl 濃度依存的減少を示した。葉面積は、わずか 25 mM の処理によって対照区に比べて約 60%が減少した(Figure 2)。それ以上の濃度においては、175 mM の濃度で大半が死に至るまで緩やかな降下を続けた。この葉面積の減少傾向と他の成長に関する調査項目の傾向は、ほぼ一致していた(data not shown)。

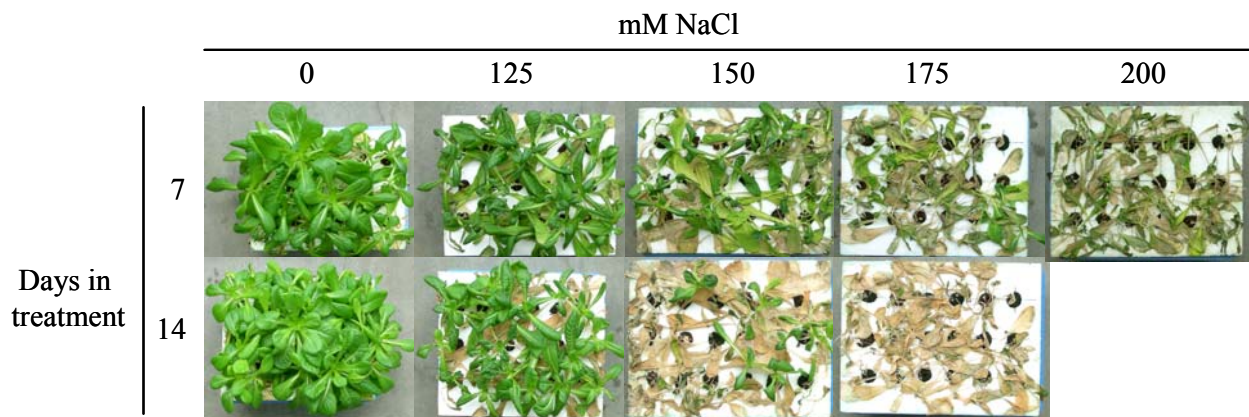


Figure 1 The growth aspects of lettuce cultured hydroponically under NaCl stress. Lettuce seedlings plants were grown in nutrient solution including 0, 125, 150, 175 and 200 mM NaCl, respectively.

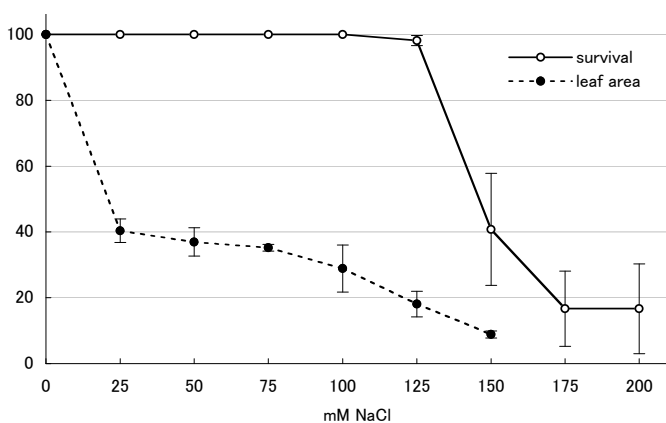


Figure 2 The comparison between survival and growth of lettuce grown hydroponically under NaCl stress. Each plot represents percent to control (0 mM) of survival (○) and leaf area (●). Vertical bars indicate standard error (n=3)

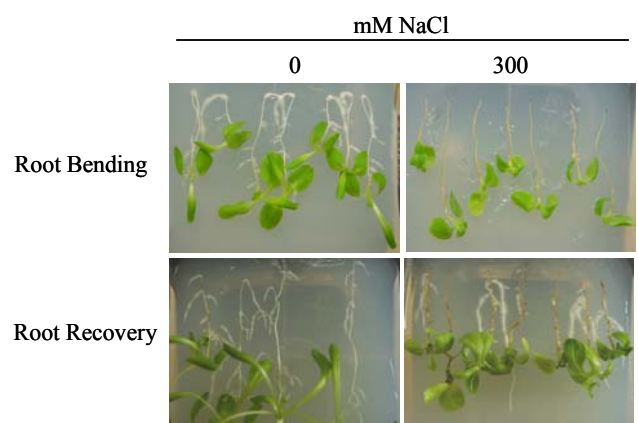


Figure 3 Root bending and recovery of lettuce assayed *in vitro*. Lettuce seedlings grown in MS normal media were removed onto assay media including 0 (left) and 300 mM NaCl (right), respectively (root-bending assay). Stressed lettuce seedlings were rehydrated with normal medium (root recovery assay).

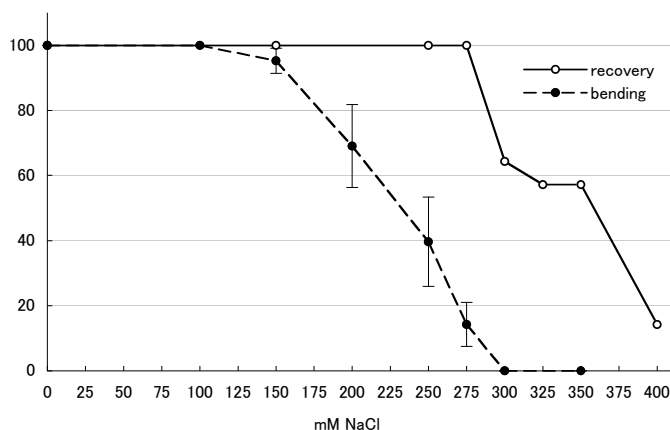


Figure 4 The comparison between recovery and bending of lettuce roots grown *in vitro* under NaCl stress. Each plot represents percent to control (0 mM) of root recovery (○) and bending (●). Vertical bars indicate standard error (n=3).

1. 2 根の屈性と側根の発生による評価

播種後 4 日目のレタス実生を根が垂直上向きになるように NaCl を含む MS 寒天培地に置床し 7 日後に根の観察を行ったところ、NaCl を含まない対照区の培地では屈曲し、長く伸長した (Figure 3; 0 mM, Root Bending)。しかしながら、300 mM の処理区においては、根は屈曲せず先端が黒く壊死し、葉が黄化した個体も存在した (Figure 3; 300 mM, Root Bending)。100 mM 以下の NaCl 濃度の処理区では全ての個体が屈曲したが、150, 200, 250 および 275 mM においては、それぞれ屈曲率は 95, 69, 40 および 14% と低下した (Figure 4)。

その後、この屈曲率の検定用培地から、NaCl を含まない復水培地に移植し、14 日間の培養期間を経て再び根の観察を行った。300 mM の塩ストレスによって根の屈曲が認められなかったが、いくつかの個体は、復水培地において再度根を伸張させるか、側根を発生させて復活した (Figure 3; 300 mM, Root Recovery)。個体の復活率を求めたところ、NaCl 濃度が 275 mM までは 100% であったが、300 mM から急激に低下し、それぞれ 64% (300 mM)、57% (325 および 350 mM)、14% (400 mM) の値を示した (Figure 4)。

2. 35S および rd29A プロモーターのレタスにおける機能解析

レタスの中でカリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーターが機能することを確認するために、T-DNA 領域に 35S::GUS 遺伝子を保有する pIG121Hm ベクターによる形質転換体を作成し、GUS 活性の検出を行った。非感染個体では青に染色されている部分は認められなかったが、感染個体から再分化してきた植物体の葉片は葉

脈にそって青に染色されていることが確認できた (data not shown)。ストレスに応答して短時間かつ急激に誘導されるシロイヌナズナの遺伝子である *rd29A* のプロモーターがレタスにおいても機能するか否かを判断するために *rd29A::GUS* ベクターにより形質転換した個体の GUS 活性の検出を行った (Figure 5)。アグロバクテリウムによる感染を行い再分化したシュート (T₀ 世代) の葉片では、ストレスを受けていない条件下 (対照区) において葉脈に沿って GUS 遺伝子の弱い発現が見られ、特に主脈の基部はやや強く青に染色された。2 時間までの乾燥ストレスを与えてもそれほど変化は見られなかったが、5 時間乾燥を行った葉片は葉全体が青に染まり、24 時間の乾燥ストレスでも同様に葉全体が染色されていた。T₁ 世代では植物体全体を GUS 分析に供した。その結果 T₀ 世代の葉片と同様に対照区においても弱い発現が見られ、葉脈、胚軸、根が青に薄く染色された (data not shown)。30 分の乾燥では、あまり変化は見られなかったが、1 時間および 2 時間の乾燥を行うと対照区と比較して本葉の葉身における染色の程度が強くなった。5 時間の乾燥ストレスでは、葉全体が強く染色され、子葉においても GUS 遺伝子の発現が見られるようになった。8 時間後にはさらにその染色の程度は強まった。GUS 遺伝子を 35S プロモーターによって恒常的に発現させている pIG121Hm-GUS 形質転換体は、対照区においても本葉全体が青く染色され、根においても強く染色された (data not shown)。本葉と比較すると子葉における染色の程度は弱かった。また、乾燥ストレスを与えることによる染色の程度の差は認められなかった。

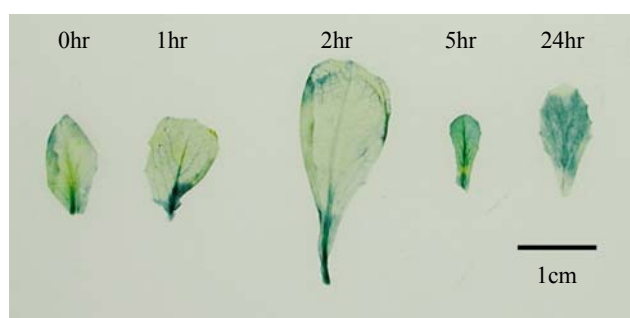


Figure 5. Histochemical GUS staining in transgenic plants after the desiccation stress. Mature leaf excised from a plant regenerated from a cotyledon infected with *Agrobacterium* harboring *rd29A::GUS* gene. Horizontal bar shows a scale.

3. DREB1 形質転換レタスの獲得と発現の確認

レタスにおいてシロイヌナズナの *DREB1* 遺伝子が耐塩性を付与するかを調べるために、*35S::DREB1A* および *rd29A::DREB1A* 遺伝子を T-DNA 領域に保有するベクターを用いてそれぞれの形質転換体を作成した。各 10 系統の形質転換レタスが得られ、それぞれの系統を栽培し、抽台、開花、自殖を経て T₁ および T₂ 種子を順次得ている。その中で T₂ 世代の種子が得られた *35S::DREB1A-18* 系統について、*DREB1A* を含む PCR 断片をプローブに用いてサザン分析を行ったところ、導入された遺伝子のコピー数は 1 以上であることが確認できた (data not shown)。ノーザン分析を行った結果、*35S::DREB1A-18* は、非ストレス条件下で *DREB1A* 遺伝子を発現しており、200 mM の NaCl ストレス下においても発現が確認できた (data not shown)。

4. *35S::DREB1* 形質転換レタスの評価

ストレスを受けていない条件下では、*35S::DREB1A-18* とコントロールの pBE2113 形質転換体間に表現型の違いは認められなかった。しかしながら、NaCl ストレスを与えた場合、*35S::DREB1A* の生育がコントロールを上回る傾向が観察できた (Figure 6)。

成長に関する調査項目 (地上部および地下部の新鮮重ならびに乾物重、葉面積、葉数、根長) について

35S::DREB1A-18 とコントロールの間で最小有意差法による検定を行った。その結果、非形質転換体および pBE2113 形質転換体どちらのコントロールに対しても有意な増加が認められたのは 100 mM の NaCl 処理区の葉面積、ならびに 200 mM の NaCl 処理区の *35S::DREB1A-18* の地下部新鮮重であった (data not shown)。

また、ストレス処理後 14 日目の生存率は、175 mM の NaCl 濃度で両者ともに 55% と差はなかったが、200 mM では pBE2113 系統が 0% であったのに対し、*35S::DREB1A-18* は 25% と有意に増加した。さらに、最長生存日数の比較を行った場合、NaCl 濃度 150 mM の処理区において 18 日間 (pBE2113) と 22 日間 (DREB) の差が、200 mM では 12 日間 (pBE2113)、22 日間 (DREB) の差が生じた。

④ 考 察

1. レタスの耐塩性評価法

ほとんどの地上の植物は NaCl などの塩によって生育が阻害されるが、この原因はナトリウムイオンの毒性と浸透圧ストレスであり、これに対し植物は細胞膜のイオン輸送体による細胞内へのイオン流入の制限や液胞内への分画と、浸透圧の調節で適応しようとする (Locy, 2004)。

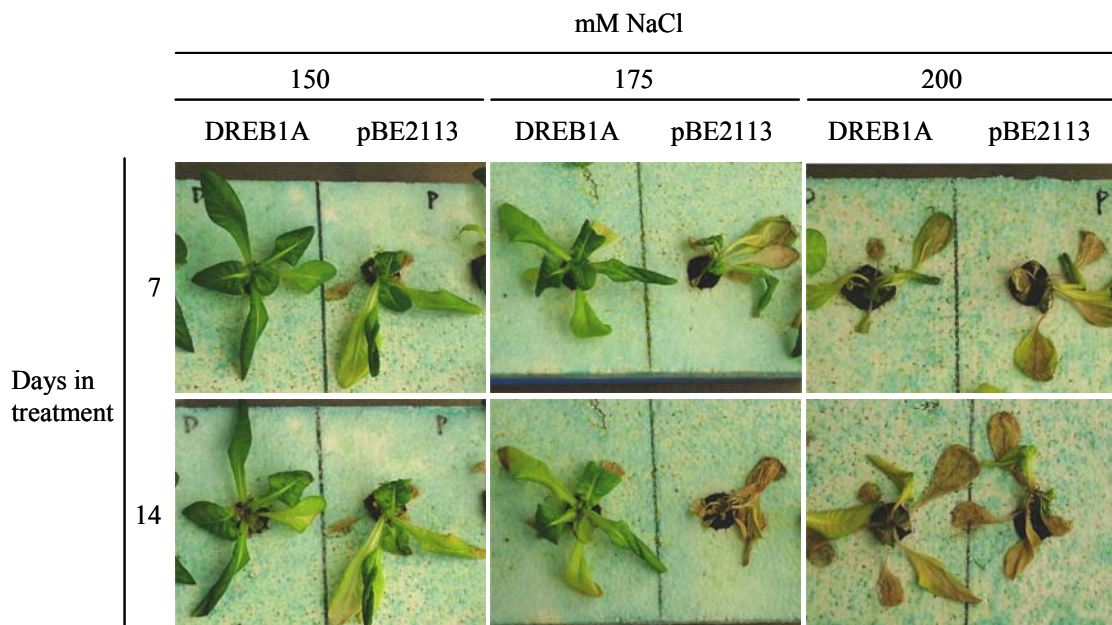


Figure 6 The evaluation of transgenic lettuce cultured hydroponically under NaCl stress. Lettuces were transformed with *35S::DREB1A* (DREB1A) and pBE2113 control vector (pBE2113), respectively. T₂ plants were obtained and grown in nutrient solution including 150, 175 and 200 mM NaCl, respectively

前者のイオンストレスへの対処策としては、前述した $\text{Na}^+\text{-H}^+$ アンチポーター (Apse ら, 1999) などが例として挙げられる。また、後者の浸透圧ストレスにおいては、ストレス下で生産が促進されるグリシンベタイン、プロリン、マンニトール、ピニトールおよびショ糖などが耐性維持に寄与していると考えられている。そのほかにも気孔の閉鎖や葉面積の低下、葉の脱離等が直接的な馴化方法として考えられている (Locy, 2004)。これらのことを踏まえると、植物は NaCl による直接的な成長の抑制とは逆に、耐性を獲得するために結果的に成長を抑える、あるいは成長に使われていたエネルギーを耐性維持のために使用していると説明することも可能であり、ストレス下における成長の増減によって耐性の付与を論じることに疑問が生じる。実際に、シロイヌナズナ、トマトおよびイネにおいて、*DREB* 遺伝子を過剰発現させたところ、成長抑制が観察されている (Liu ら, 1998; Hsieh ら, 2002; Dubouzet ら 2003)。以上の知見から、ストレス耐性の向上と成長促進との間には反比例ともいえる関係があることが示唆される。本研究において、レタスの塩ストレス下における成長の調査を行った結果、全ての調査項目 (地上部および地下部の新鮮重ならびに乾物重、葉面積、葉数、根長) の値は、 NaCl 濃度に依存的な減少を示した。またそれらの因子で表される成長量は、わずかに 25 mM の NaCl によって急激に低下した後は、 NaCl 濃度の等差級数的増加に反比例するように緩やかに減少していた。このため、成長抑制を耐塩性の評価に用いた場合、閾値濃度を設定しにくいことに加えて、仮に基準を決定したとしてもそれが果たして適当であるか判断できない可能性がある。植物のストレス耐性を評価する方法として、成長の増減の測定の他に、生存率を求める場合がある。塩ストレス条件下での養液栽培におけるレタスの生存率を見たところ、処理後 14 日目の生存率は、 125 mM 以下の NaCl 濃度までは、ほぼ 100% を保持していたが、 150 mM になると 50% 以下に低下し、 175 mM 以上の濃度では 0% に近いほぼ一定の値を示した (Figure 2)。従って 14 日という期間に限定すると、 $175 \sim 200 \text{ mM}$ が生存の閾値であると考えられるので、耐塩性を生存率で評価する場合は、この範囲の NaCl 濃度を用いることが適していると考えられた。

Howden と Cobbett (1992) は、カドミウム感受性の変異体を選抜するために Root Bending Assay 法を確立した。この方法は、Wu ら (1996) により改変されており、耐塩性変異株のスクリーニングに用いられたもので、塩ストレス下における根の屈曲を基準とした評価に有効であると報告されている。レタスにおいて Root Bending Assay を試したところ、根の屈曲率は、 100 mM を境にして、 NaCl 濃度

の上昇とともに緩やかに低下した (Figure 4)。この緩やかな降下は、養液栽培の成長の調査結果と類似しており (Figure 2)、実際に根の屈曲は、根の伸張と重力屈性で起こる現象であることから、屈曲率は成長の指標であると考えられる。一方、Root Recovery Assay により個体の復活率を求めたところ、 NaCl 濃度が 275 mM までは 100% であったが、それを超えると急降下し (Figure 4)、この曲線は養液栽培の生存率の調査結果と類似していた。根は植物の吸水部位であることから、根の復活が生死を左右すると考えられる。 NaCl 濃度のより詳細な検討が必要であり、根の復活の判定基準にまだいくつかの問題点は残されるが、Root Recovery Assay は、養液栽培に比べて期間短縮と省スペース化を実現できる耐塩性評価法となる可能性を示唆した。

2. レタスにおけるシロイヌナズナの遺伝子の機能維持

カリフラワーモザイクウイルスの *35S* のような恒常的に遺伝子を発現させるプロモーターを用いた形質転換体は、発現量にばらつきが大きい、発現量が低いなどいくつかの問題点を生じることがある。また、非ストレス下でもタンパク質を生産することでエネルギーを浪費させ、生育に負の影響を与えることがある (Rohila, 2002)。そのためストレスを受けたときのみタンパク質を生産する組換え体を作出することが望まれ、最近になりストレス誘導性のプロモーターを用いた形質転換体が生産され始めた (Rohila, 2002)。*rd29A* 遺伝子はストレスに応答して急速かつ短時間に誘導される遺伝子であり、そのプロモーターはタバコにおいても機能することが明らかになっている (Yamaguchi-Shinozaki および Shinozaki, 1993)。

rd29A::GUS ベクターで形質転換を行った子葉から再分化したシュートの葉片および T_1 世代の実生のどちらにおいても乾燥ストレスを与えることで *GUS* 遺伝子の発現が誘導されたことから、レタスにおいても同様に *rd29A* プロモーターが機能することが明らかになった (Figure 5)。

DREB1 がターゲットとしている遺伝子は数多く報告されており、*rd29A/cor78*, *kin1*, *cor6,6/kin2*, *cor47/rd17*, *cor15a*, *erd10* といった低温や乾燥により誘導される遺伝子が含まれることが報告されている (Jaglo-Ottosen ら, 1998, Kasuga ら, 1999, Seki ら, 2001, Fowler および Thomashow, 2002)。*DREB1* を過剰発現させたシロイヌナズナの形質転換体は、乾燥、凍結、高塩といったストレスに対して著しい耐性を示した (Jaglo-Ottosen ら, 1998, Liu ら, 1998, Kasuga ら, 1999, Gilmour ら, 2000)。そこで本研究では、レタスにおいて *DREB1A* を恒常的に発現させた *35S::DREB1A* ベクターおよびストレス誘導性の *rd29A::DREB1A* ベクターによる形質転換体を作出した。

T₂ 個体が獲得できた系統の 35S::DREB1A-18 は、200 mM の NaCl ストレス下における生存率および生存日数がコントロール個体と比較して有意に向上した。以上により、レタスにおいてシロイヌナズナの *DREB1A* 遺伝子を介する耐性メカニズムが機能すると考えられ、耐塩性レタスの作出において有効であることが示唆された。

⑤今後の課題

作出した形質転換植物のうち、まだ解析していない 9 系統の 35S::DREB1A と 10 系統の rd29A::DREB1A を評価する必要がある。解析に供した 1 系統はシングルコピーであったことから、マルチコピーを持つ系統が高い耐塩性を獲得している可能性がある。また、rd29A::DREB1A の系統については、非ストレス下の成長阻害が起きていない可能性があるため (Kasuga ら, 1999)、実用面から考えると興味深い。さらに、*DREB* 遺伝子は、シロイヌナズナだけでなく、他の多くの植物種にも保存されていることから、レタスの *DREB* 相同性遺伝子についても調べる必要があるだろう。わずかな遺伝子配列の差が耐塩性形質を支配している可能性も否定できないため、種固有の遺伝子を過剰発現させることによって生じる耐塩性の変化を明らかにしたいと考えている。

文献等

- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA and Blumwald E. 1999. *Science*. 285: 1256-8.
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. *Plant J*. 33(4): 751-63.
- Fowler S and Thomashow MF. 2002. *Plant Cell* 14, 1675-1690.
- Gao MJ, Allard G, Byass L, Flanagan AM and Singh J. 2002. *Plant Mol Biol*. 49:459-71.
- Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger, EJ, Salazar, MP, Houghton, JM and Thomashow, MF. 1998. *Plant J*. 16:433-442.
- Howden R and Cobbett CS. 1992. *Plant Physiol*. 100. 100-107.
- Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Charng YY, Wang YC and Chan MT. 2002. *Plant Physiol*. 129: 1086-94
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O and Thomashow, MF. 1998. *Science* 280: 104-106.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. 1999. *Nat Biotechnol*. 17: 287-291.
- Kumar S, Dhingra A and Daniell H. 2004. *Plant Physiol*. 136: 2843-54.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. 1998. *Plant Cell*. 10(8): 1391-406.
- Locy DR. 2002. *Stress Physiology :in Plant Physiology, Third Edition*. ed by Taiz L and Zeiger E. Sinauer Associates. Chapter 25.
- Rohila JS, Jain RK and Wu R. 2002. *Plant Science* 163: 525-532.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 9.31-9.62.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y and Shinozaki K. 2001. *Plant Cell* 13, 61-72.
- Shen YG, Zhang WK, He SJ, Zhang JS, Liu Q and Chen SY. 2003. *Theor Appl Genet*. 106: 923-30.
- Shinwari ZK, Nakashima K, Miura S, Kasuga M, Seki M, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. 1998. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 250: 161-170.
- Stockinger EJ, Gilmour SJ and Thomashow MF. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1035-1040.
- Wu SJ, Ding L and Zhu JK. 1996. *The Plant Cell*. 8. 617-627.
- Xiong Y and Fei SZ. 2006. *Planta. in print*.
- Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. 1993. *Mol. Gen. Genet*. 236:331-340.

0513

Genetic improvement of lettuce for salt tolerance by *Arabidopsis DREB* gene transfer

Yuichi UNO

Faculty of Agriculture, Kobe University

Summary

A cDNA encoding transcription factor DREB1A was introduced into lettuce (*Lactuca sativa* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation to improve the salt tolerance. As a first step to establish the evaluation of salt stress tolerance of lettuce, the effect of stress on both growth and survival were investigated. Salinity treatments were imposed by irrigating with nutrient solution containing various concentration of NaCl. Plant growth parameters such as total leaf area and dry weight were reduced gradually with increasing concentrations of NaCl ranged from 0 to 200 mM. In contrast, salinities up to 100 mM did not affect on the survival percentage but more than 150 mM NaCl significantly reduced it to less than 40 %. Therefore, we concluded that early growth retardation might be one of the strategies for survival under salt stress. The assessment of stress tolerance *in vitro* by both root bending assay (Howden and Cobbett, 1992) and root recovery assay had the similar tendency to the result from hydroponic culture. The rate for lack of root bending under stress, which is a sign of growth inhibition, showed the dose response curve in parallel with that of dry mass reduction. The root recovery rate after removal of plants to normal condition also showed the parallel curve to survival percentage. These results suggested that combination of root bending and recovery assay could be a rapid and space-saving method for evaluation of salinity tolerance of lettuce *in vitro*.

Both *35S* or *rd29A* promoter and *GUS* or *DREB* gene cassettes were successfully transferred to lettuce and transgenic plants were obtained for further analysis. *GUS* activity driven by the *rd29A* promoter was induced by desiccation and that by *35S* promoter showed constitutive induction. A *35S::DREB1A-18* strain showed enhanced survivability under salt stress by 200 mM NaCl compared to control plants. These results indicate that the *Arabidopsis rd29A* promoter and *DREB1A* gene might be potentially useful for producing transgenic lettuce that are tolerant to salt stress.