

レタスの耐塩性向上を目的とした *DREB* 相同性遺伝子の単離と解析

宇野 雄一

神戸大学大学院農学研究科

概要 *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。*DREB* 遺伝子を過剰発現させた場合に、さまざまな植物において乾燥・塩・低温ストレスに対する耐性の向上が確認されている。レタスは植物界の約 10 分の 1 を占めるキク科に属し、最も消費されている主要葉菜類であるが、耐塩性が弱い植物に分類されている。もしレタスにストレス耐性を付与することができたならば、不良環境における栽培面積の拡大が期待できる。以前に *AtDREB1A* 遺伝子をレタスに導入し解析を行った結果、乾燥ストレスおよび塩ストレス下における生存率および生存日数が増加し、同遺伝子が、レタスのストレス耐性向上に寄与していることが示された。しかしながら、作出された形質転換レタスは、*AtDREB1A* を導入した他の植物種と比較すると向上した耐性の度合いが低く、実用面で満足のいくものではなかった。この原因のひとつとしては、異種 DNA の導入であることが考えられた。そこで、レタス内在の *DREB* 相同性遺伝子 (*LsDREB*) をレタスにおいて過剰発現させた形質転換体を作成することが出来れば、*AtDREB1A* を用いた場合よりも顕著にストレス耐性が向上すると予想した。そこで本研究ではレタスの耐塩性向上を目的として、*LsDREB* 遺伝子の単離、発現解析、および機能解析を行った。レタスから単離した *LsDREB2A* 遺伝子がコードするタンパク質には、核移行シグナル配列および AP2 ドメインが存在しており、転写制御因子であることが推測できた。*LsDREB2A* の推定アミノ酸配列は、他のキク科植物と高い相同性を有しており、レタスゲノム内には 10 個以上のコピーが存在すると考えられた。*LsDREB2A* の発現は、ABA、水、低温、および高温には応答しなかったが、PEG と NaCl により誘導された。ゲルシフトアッセイの結果、GST-*LsDREB2A* 融合タンパク質は、DRE を特異的に認識して結合する能力を持つことが示唆された。また、酵母ワンハイブリッドアッセイの結果、結合能に加えて転写活性化能も持つことが明らかとなった。シロイヌナズナに *LsDREB2A* 遺伝子を過剰発現させたところ、コントロール植物よりも有意に高い耐塩性を示した。

以上により、本研究で単離と解析を行った *LsDREB2A* がレタスの中でストレスに関わる転写制御因子をコードしていることが示唆された。今後は、レタスにおいて *LsDREB2A* 遺伝子を過剰発現させることにより、耐塩性の付与を試みたいと考えている。

1. 研究目的

レタスは植物界の約 10 分の 1 を占めるキク科に属し、中でも最も消費されている主要葉菜類である。園芸作物であるレタスは、穀類のように長期保存が出来ない。そのため天候などの影響で不作の場合や、栽培に不適な条件の土地では、供給不足に陥りやすく、価格も不安定になりやすいのが現状である。我が国でも、夏の記録的な

猛暑や局所的豪雨といった天候不順の影響で、レタスなど葉物類をはじめとする生鮮野菜の価格が高騰し、安定供給が鈍化することがある。そこで、不良環境でも育つ耐性品種を開発できれば、現在よりも広範囲の土地で安定して手に入れることが可能となり、価格の高騰を防ぐことにも貢献出来ると考えられる。レタスの耐塩性は品種や生長段階によって異なるが (Shannon・Grieve, 1999)、比較的

塩感受性が高い植物に分類されている(Ashraf ら, 1994)。例えば、塩濃度が 1.3 dS 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 dS m^{-1} ($\approx 55 \text{ mM NaCl}$) では収量が 50%減少する(Orcutt・Nilsen, 2000)。本研究で扱うレタス‘岡山サラダナ’においても同様の研究結果があり、海水塩濃度の約 20 分の 1 にあたる 25 mM の NaCl 処理を幼苗に行ったところ、50%以上の収量が減少したことから、かなり耐塩性が弱いといえる。また、 -6°C の低温に 10 時間遭遇させると 90%以上の個体が枯死することから、凍害にも弱い。さらに灌水停止後 21 日目で 90%以上の個体が枯死することが明らかとなり、耐乾燥性も向上の余地があることが示されている。

植物の生育や生産量を制限する代表的な環境ストレスには、乾燥、塩、低温が挙げられる。これらのストレスは、植物内の水分が減少および凍結することによって、細胞中の溶質濃度の上昇を引き起こすという点で共通しており、いずれも高浸透圧ストレスとして考えることが出来る。植物では、このような浸透圧ストレスを受けると多数のストレス応答性遺伝子の発現と生理的変化が引き起こされる。またその過程において、植物ホルモンの ABA が合成され、ストレス耐性の獲得に重要な役割を果たすと考えられている(Lang ら, 1994)。ただし、外生の ABA が、ストレス応答性遺伝子を誘導する場合としない場合とがあり、植物のストレスシグナル伝達経路には ABA 依存性と ABA 非依存性の両方が存在する可能性が示されている(Zhu, 2002; Shinozaki ら, 2003; Yamaguchi-Shinozaki・Shinozaki, 2006)。

現在までに、高等植物において乾燥、低温、塩ストレスによって正に調節される多くの遺伝子が同定されてきた(Ingram・Bartels, 1996; Bohnert ら, 2001; Kawasaki ら, 2001; Kreps ら, 2002)。これらの遺伝子を利用した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 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 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には、 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。

環境ストレス応答性遺伝子の一つに、*rd29A* 遺伝子がある。Yamaguchi-Shinozaki・Shinozaki (1994) は、この遺伝子のプロモーター領域から、乾燥、低温、塩ストレス応答性遺伝子の発現調節に重要な役割を果たす ABA 非依存性シス因子 (TACCGACAT) を特定し、DRE (Dehydration-Responsive Element) とした。この DRE 配列に特異的に結合する転写因子をコードする *DREB1A* 遺伝子がシロイヌナズナから単離された(Liu ら, 1998)。*DREB1A* は、主に低温ストレスにตอบสนองして発現し、下流遺伝子のプロモーター領域内にある DRE 配列に結合して、その転写量を調節する。配列内には DNA 結合領域として AP2/EREBP ドメインが存在し、その中でも特に 14 番目のバリン、19 番目のグルタミン酸、37 番目のアラニンが DRE の認識に重要な役割を担っている(Sakuma ら, 2002)。また、配列の N 末端領域には、核移行シグナルを示す配列 (KKPAGRKKFR) があり(Raikhel, 1992)、発現したタンパク質が実際に核移行性を示すことが、ホモログを用いた実験で報告されている(Sakuma ら, 2006a; 2006b)。

これまでに、シロイヌナズナの *DREB1A* (以下、*AtDREB1A*) を過剰発現させた形質転換植物は、セイヨウアブラナ(Jaglo ら, 2001)、イネ(Oh ら, 2005)、タバコ(Kasuga ら, 2004)、ジャガイモ(Celebi-Toprak ら, 2005)、キク(Hong ら, 2006)、トマト(Hsieh ら, 2002a; 2002b) など多くの植物種において作出されてきた。これらは環境ストレス耐性を示したことから、*AtDREB1A* が種の壁を越えて機能することが証明された。また、*DREB1A* のホモログは、シロイヌナズナの他にもセイヨウアブラナ(Jaglo ら, 2001)、イネ(Dubouzet ら, 2003)、コムギ(Vagujfalvi ら, 2003)、オオムギ(Xue, 2003)、トウモロコシ(Qin ら, 2004)、トマト(Zhang ら, 2004)、オウトウ(Kitashiba ら, 2004)、アカザ(Shen ら, 2003b)、トウガラシ(Hong・Kim, 2005) など、多様な植物において同定されており、いずれも環境ストレス耐性の付与に関与することが示唆されている。

我々はこれまでに *AtDREB1A* 遺伝子をレタスに導入した形質転換体を作成し、その表現型を解析した。その結果、乾燥ストレスおよび塩ストレス下における生存率およ

び生存日数が増加し、*AtDREB1A* 遺伝子が、レタスのストレス耐性向上に寄与していることが示された。しかしながら、作出された形質転換レタスは、*AtDREB1A* を導入した他の植物種と比較すると向上した耐性の度合いが低く、実用面で満足のいくものではなかった。この原因として、遺伝子配列の異なる種間での導入であるために、目的遺伝子の発現および下流遺伝子の発現誘導が不完全であることが考えられた。このような現象はイネにおいても報告があり、*AtDREB1A* 遺伝子が調節する下流遺伝子が異なるために、過剰発現によってシロイヌナズナでは低温ストレス、イネでは乾燥・塩ストレスの耐性が向上するなど、耐性を与えるストレスの種類に差が出ている(Oh ら, 2005)。すなわち、*DREB1A* 遺伝子のオースログが存在しても、植物種固有のシグナル伝達経路が存在する可能性がある。そこで、レタス内在の *DREB* 相同性遺伝子(*LsDREB*)をレタスにおいて過剰発現させた形質転換体を作成することが出来れば、*AtDREB1A* を用いた場合よりも顕著にストレス耐性が向上すると予想した。

以上により、本研究ではレタスの耐塩性向上を目的として、*LsDREB* 遺伝子の単離、発現解析、および機能解析を行った。

2. 研究方法

2.1 供試材料

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

2.2 ストレス処理

無菌播種後7日目の実生を寒天培地から引き抜き、ストレス処理を行った。乾燥ストレス処理として1% PEG 溶液、塩ストレス処理として250 mM NaCl 溶液、ABA ストレス処理として100 μ M ABA 溶液を注いだシャーレに、それぞれレタス実生の根を浸した。蒸留水により同様に処理したものを対照区(H₂O 処理区)とした。また、低温ストレスは5°C、高温ストレスは37°Cでそれぞれ処理を行った。

2.3 *LsDREB* 遺伝子のクローニング

Sepasol RNA super I (ナカライテスク)を用いて抽出した Total RNA から、ReverTra Ace- α -First Strand cDNA Synthesis Kit(TOYOBO)により逆転写を行って cDNA を得た。その cDNA を鋳型にして PCR を行い、*DREB* 遺伝子の AP2/EREBPドメインをコードする約400 bp の PCR 産

物を得た。精製した PCR 産物は TOPO TA Cloning (Invitrogen)を使用し、添付のプロトコルに準じてクローニングを行った。ポジティブクローンからプラスミドを抽出し、BigDye Terminator(Applied Biosystems)によりシーケンシング反応を行い、ABI3700 ジェネティックアナライザーによって解析した。引き続き、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0(Invitrogen)を用いて5'末端配列のクローニングとシーケンシングを行った。3'末端配列は EST 情報から作成したプライマーを用いて PCR により増幅し、同様の操作を行った。最終的には全長 cDNA の単離を行い、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)の BLASTX プログラムを使用し、他の生物種の遺伝子との相同性を評価した。

2.4 サザンハイブリダイゼーション

ゲノミック DNA の抽出は、illustra Nucleon Phytopure for large samples(GE Healthcare)を用いて、付属のプロトコルに従った。抽出した10 μ g のゲノミック DNA を *Bam*H I、*Eco*R I、*Eco*RV によって完全に消化した。消化したゲノミック DNA は、1.0%(w/v)アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。キャピラリー法により、ゲル中の DNA 断片をナイロン製メンブレン(Amersham Bioscience, Hybond-N⁺)に転写した。プローブの標識およびハイブリダイゼーションは AlkPhos Direct Labelling Kit(GE Healthcare)を用い、付属のプロトコルに従って行った。プローブには、*LsDREB* の UTR 配列を含む全長を使用した。検出は、Amersham Hyperfilm ECL(GE Healthcare)を使用し、室温で数時間置いて、現像および定着の操作を行った。

2.5 Real Time PCR

上記2.3と同様にして Total RNA を抽出し、Prime Script RT reagent Kit(Perfect RealTime)を使用し、そのプロトコルに準じて逆転写を行った。逆転写により合成した cDNA を鋳型にして、*LsDREB2A*、*EF1 α* 遺伝子それぞれについて、約100 bp の断片が増幅されるようにプライマーを設計した。サーマルサイクラー(Thermal Cycler Dice Real Time System, タカラバイオ株式会社)にセットし、ランプ OFF 95°C 10 秒を1 サイクル、ランプ OFF 95°C 5 秒、ランプ ON 60°C 30 秒を40 サイクル、ランプ OFF 95°C 15 秒、ランプ OFF 60°C 30 秒、ランプ ON 95°C 15 秒を1 サイクルの処理を実施した後、データの解析を行った。

2. 6 ゲルシフトアッセイ

LsDREB1A の cDNA の一部を pGEX4T-1 ベクターの GST をコードする領域の上流に組み込み、大腸菌 BL21(DE3) に形質転換した。作成した LSDREB1A-GST 融合タンパク質を精製し、ゲルシフトアッセイに用いた。wild type DRE (TACCGACAT) と変異を入れた mutant DRE (TATTTTCAT) を含む 75 bp の rd29A プロモーターの一部との結合反応を行った後に、8% のポリアクリルアミドゲルで分離し、SYBR Green で染色して可視化した。

2. 7 酵母ワンハイブリッドアッセイ

wild type DRE と、変異を入れた mutant DRE を含む 75 bp の rd29A プロモーターの一部を直列に 5 個反復させて直列に繋ぎ、pHis1-1 ベクター内にコードされた *HIS3* 遺伝子上流に挿入した。また、pLacZi ベクター内にコードされた *LacZ* 遺伝子上流にも同様に挿入した。これらの DNA 配列を、CLONTECH の Yeast Protocols Handbook に沿って酵母 YM4271 株のゲノム DNA に導入し、His および Ura を含まない SD 選択プレート (SD/-His-Ura) にて互いにバックグラウンドの揃った株をレポーター系統として選抜した。全長の *LsDREB2A* を YepGAP ベクターに組み込み、酵母のレポーター系統に形質転換し、His、Ura、Leu を含まない SD 培地に塗布して 30°C で数日間培養した。

2. 8 シロイヌナズナ形質転換体の獲得

全長の *LsDREB2A* を pRAFLINTR ベクター (Ogawa ら、

2008) に挿入し、ゲートウェイシステムにより、pGWB2 ベクターの 35S プロモーターの下流に組み換えた (Nakagawa ら、2007a; 2007b)。こ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 GV3101 株を、花序浸漬法によりシロイヌナズナに感染させた。採種を行い、カナマイシン入りの培地で組換え体を選抜し、鉢上げ馴化させた後、自殖により次世代を得た。この繰り返しにより T₃ 植物を作出し、解析に用いた。

2. 9 ストレス試験

カナマイシンを添加した MS 培地で選抜し 35S -*LsDREB2A* 組換え植物の 4 日目の実生を、MS 培地を含む紙上に置いた。コントロールには pGWB2 ベクターのみを導入した植物体を用いた。3 日後、200 mM の NaCl 溶液を加え、その一週間後に生存率を確認した。

3. 研究結果

3. 1 レタスからの *DREB* 相同性遺伝子の単離

レース法により、レタスから *DREB* 相同性遺伝子を単離し、その類似性から *LsDREB2A* とした。*LsDREB2A* の推定アミノ酸配列には、核移行シグナル配列、保存性の高いバリン、グルタミン酸、およびアラニンを伴う AP2 ドメインが確認でき、AP2 転写因子の A-2 サブグループに属していると考えられた (Sakuma ら、2002)。系統樹を作成したところ、キクの *DvDREB2A* やヒマワリの *HaDREB2* と相同性が高いことが明らかとなった (Fig. 1)。レタスゲノム内のおお

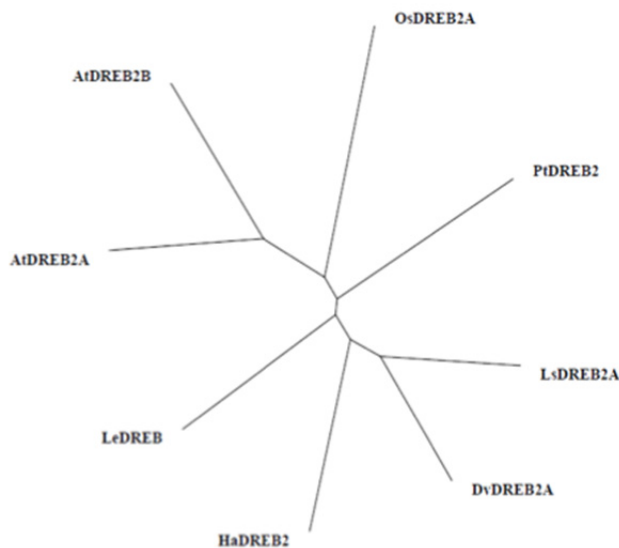


Fig. 1. Phylogenetic tree produced by CLUSTAL W shows the relationship of the isolated DREB2-type proteins from different species. The neighbor-joining tree is based on an alignment of the complete protein sequences. The sequences used are from *Dendranthema vestitum* DvDREB2A (EF633987), *Helianthus annuus* HaDREB2 (AAS82861), *Lycopersicon esculentum* LeDREB (AAN77051), *Populus trichocarpa* PtDREB2 (ABO48361), *Arabidopsis thaliana* AtDREB2A (AB007790), AtDREB2B (AB007791), *Oriza sativa* OsDREB2A (AF300971).

よそのコピー数を調べるためにサザンハイブリダイゼーションを行った結果、10 本以上のバンドが検出された(データ非掲載)。

3. 2 *LsDREB2A* の発現解析

リアルタイム PCR 法により、様々なストレスに対する *LsDREB2A* 遺伝子の応答性を調査した。*LsDREB2A* の転写産物は、ABA、水、低温、および高温では蓄積しなかったが、PEGとNaClにより増加した。NaCl処理では、1時間以内に mRNA が急速に増加し、24 時間後に最大レベルの 530 倍を示した(Fig. 2)。

3. 3 *LsDREB2A* の機能解析

LsDREB2A の結合特性を解析するため、AP2ドメインを含むタンパク質の一部を GST のタグを付けて大腸菌内で発現させた。精製した GST-*LsDREB2A* タンパク質と、wild type DRE(TACCGACAT)、mutant DRE(TATTTTCAT)を含む 75 bp の rd29A プロモーターの一部を用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、*LsDREB2A* タンパク質は、DRE を特異的に認識して結合する能力を持つことが示唆された(Fig. 3)。

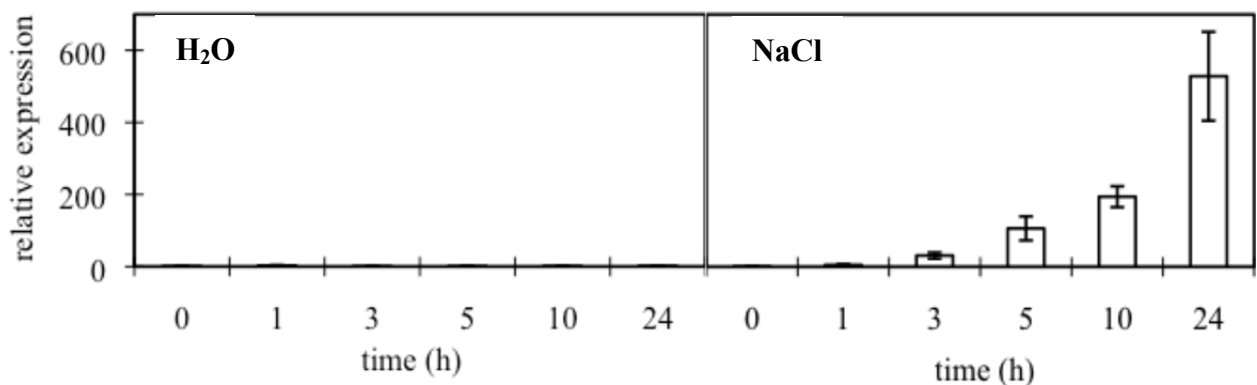


Fig. 2. Expression patterns of *LsDREB2A* under different stress conditions. Real-time PCR analysis of *LsDREB2A* expression in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Total RNA was extracted from tender leaves exposed to H₂O (left) or 200 mM NaCl (right) for 0, 1, 3, 5, 10 and 24 hours. The relative expression values were represented as ratio to control (under non-stress condition). *EF1 α* was applied in the standardization of *LsDREB2A*. Bars refer to standard error. Bars indicate the SE of 3 independent plant replicates.

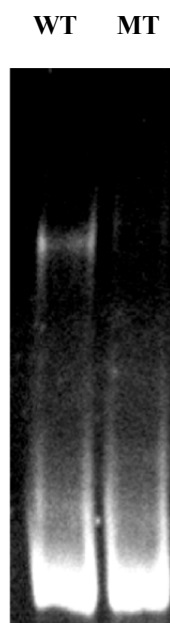


Fig. 3. DNA-binding affinities of the recombinant *LsDREB2A* protein to the 75-bp fragment (positions -219 to -145) of the rd29A promoter. Upper strand sequence of the 75-bp fragment of the rd29A promoter including wild type DRE (WT) and its mutated fragment (MT) used as probes. A recombinant GST-*LsDREB2A* protein showed DRE-specific binding in gel mobility shift assay.

次に、*LsDREB2A* の DRE 結合能と転写活性化能を調査するため、酵母ワンハイブリッドアッセイを行った。wild type DRE (TACCGACAT) を持つ酵母レポーター株に *LsDREB2A* を導入した場合に限り、ヒスチジン合成阻害剤の 3-Amino-1,2,4-triazole を添加した培地でも酵母が生存し、 β -gal アッセイで青色を呈したことから、*LsDREB2A* が DRE 配列を特異的に認識して結合し、転写を活性化させることが明らかとなった (Fig. 4)。

35S プロモーターを用いて *LsDREB2A* 遺伝子をシロイヌナズナに過剰発現させたところ、耐塩性を獲得した系統が確認された。ベクターのみを形質転換したコントロールの植物体は、200 mM NaCl の 1 週間の処理により 43.3% しか生存しなかったが、*LsDREB2A* 過剰発現体は 71.7% および 66.7% と有意に高い生存率を示した (Fig. 5)。

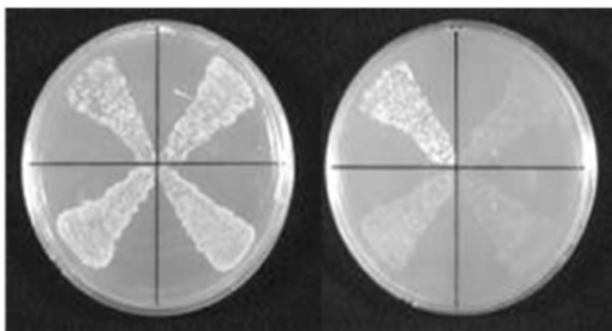


Fig. 4. Yeast one-hybrid analysis of both DNA binding and trans-activation abilities of *LsDREB2A*. The entire coding region of *LsDREB2A* was cloned into the yeast expression vector YepGAP and used for transformation into yeast carrying the dual reporter genes *HIS3* and *lacZ* under the control of the 75-bp promoter region containing the DRE or a mutated DRE (mDRE: MT in Figure 2). The transformed yeast cells were examined for growth on synthetic dextrose(SD)/His⁻Ura⁻Trp⁻ medium in the presence (+) or absence (-) of 10 mM 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT) at 30°C and tested for β -galactosidase activity (β -gal). The upper half part indicates yeasts with DRE transformed by *LsDREB2A*/YepGAP or empty YepGAP. The lower half part indicates yeasts with mDRE transformed by *LsDREB2A*/YepGAP or empty YepGAP.

4. 考察

DREB 遺伝子ファミリーは、A1-6 のサブグループに分けることができ、*DREB1*/CBF タイプは A1 に、*DREB2* タイプは A2 にそれぞれ属している (Sakuma ら, 2002)。本研究においてレタスから単離した *LsDREB2* も A2 サブファミリーに入ると考えられた。A2 サブグループに属する遺伝子の多くは、ABA 非依存的に乾燥、高塩、および高温ストレスによって主に誘導され、A1 サブグループに属する遺伝子の多くは低温ストレスに誘導されることが明らかとなっている。例えば、A2 サブグループの *DvDREB2A* および *HvDREB1* は、乾燥、高塩、および低温ストレスで誘導される (Liu ら, 2008; Xu ら, 2009)。*LsDREB2A* は、浸透ストレスおよび塩ストレスにより誘導されたが、低温や ABA では誘導されなかったことから、ABA 非依存的な塩ストレスのシグナル伝達系に関わると考えられた。レタスと同じ科のキクやヒマワリにおける *DREB2A* のオーソログは高温ストレスに応答するが、*LsDRB2A* は応答しなかった (Liu ら, 2008; Di'az-Martín ら, 2005)。レタスのゲノムサイズは、2,300-2,700 Mbp と推測されており、シロイヌナズナの 17-20 倍

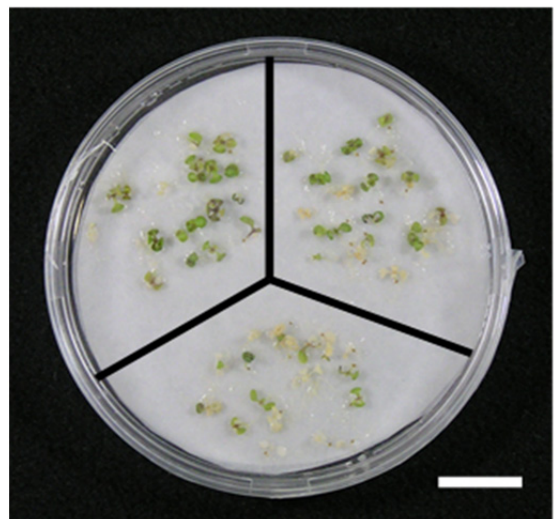


Fig. 5. Overexpression of *LsDREB2A* increases salt stress tolerance in transgenic plants. Transgenic plants were transferred to filter paper containing 200 mM NaCl solution. Two lines for 35S-*LsDREB2A* (1-2, upper left; 1-3, upper right) and a line for a control pGWB2 (lower) were used for evaluation. 20 plants were used in each line, and each test was repeated three times. Bar indicates 2 cm.

に相当する(Arumuganathan・Earle, 1991; Michaelsonら, 1991; Frijtersら, 1997)。シロイヌナズナが、14個の *DREB* 遺伝子(6個の *DREB1* と8個の *DREB2*)を持つので、レタスにもまだ多くのホモログが存在すると推定できる。実際には、サザンハイブリダイゼーションを行った結果、10本以上のバンドが検出された(データ非掲載)。すでに単離を終えている *LsDREB1A* を含め(未発表データ)、未知のオーソログが存在することが示唆された。

AtDREB2A および *OsDREB2A* を過剰発現させても形質転換体のストレス耐性は改善されないことから、訳後修飾が重要な役割を持つことが示唆されている(Liuら, 1998; Dubouzetら, 2003)。実際に *AtDREB2A* がコードするタンパク質の中には、負の調節ドメインが存在し(Sakumaら, 2006a)、タンパク質の分解に関わるシグナルペプチドの PEST 配列が含まれていた(Rogersら, 1986)。その後、DRIP1 および 2(DREB2A interacting protein 1 and 2)の働きで *AtDREB2A* が 26S プロテアソームによって分解されることが明らかとなった(Qinら, 2008)。その一方で、*ZmDREB2A* や *PgDREB2A* は PEST 配列を持たず、過剰発現体がストレス耐性を増強させることも明らかとなった(Qinら, 2007; Agarwalら, 2007)。これらと同様に、*LsDREB2A* には PEST 配列が存在しなかったので、*LsDREB2A* はアミノ酸欠失変異がなくてもシロイヌナズナの耐性を高められたと考えられた(Fig. 5)。この結果は、*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おり、耐塩性レタスの作出においても利用できる可能性が示唆された。

5. 今後の課題

現在、*LsDREB2A* を過剰発現させた形質転換レタスを作成中であり、 T_2 の採種ができれば評価を行う必要がある。その耐性能を、*AtDREB1A* 形質転換レタスと比較し、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。また、すでに *LsDREB1A* を単離しており、これらの遺伝子についても同様の解析を試みたいと考えている。

文献等

Agarwal P, Agarwal PK, Nair S, Sopory SK and Reddy MK. 2007. Mol. Gen. Genomics. 277: 189-198.

Arumuganathan K and Earle ED. 1991. Plant Mol. Biol. Rep. 9: 208-218.

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA and Blumwald E. 1999. Science. 285: 1256-1258.

Ashraf M. 1994. Crit. Rev. Plant Sci. 13: 17-42.

Bohnert HJ, Ayoubi P, Borchert C, Bressan RA, Burnap RL, Cushman JC, Cushman MA, Deyholos M, Fischer R, Galbraith DW et al. 2001. Plant Physiol. Biochem. 39: 295-311.

Celebi-Toprak F, Behnam B, Serrano G, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Naka H, Watanabe JA, Yamanaka S and Watanabe KN. 2005. Breeding Sci. 55: 311-319.

Di'az-Martín J, Almoguera C, Prieto-Dapena P, Espinosa JM and Jordano J. 2005. Plant Physiol. 139: 1483-1494.

Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Plant J. 33: 751-763.

Frijters ACJ, Zhang Z, Damme Mv, Wang GL, Ronald PC and Michelmore RW 1997. Theor. Appl. Genet. 94: 390-399.

Hong JP and Kim WT. 2005. Planta 220:875-888.

Hong B, Tong Z, Ma N, Li J, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K and Gao J, 2006. Science in China Series C: Life Sciences. 49: 436-445.

Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Charng YY, Wang YC and Chan MT. 2002a. Plant Physiol. 129:1086-1094.

Hsieh TH, Lee JT, Charng YY, and Chan MT. 2002b. Plant Physiol. 130: 618-626.

Ingram J and Bartels D. 1996. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 377-403.

Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, and Haake V. 2001. Plant Physiol. 127: 910-917.

Kasuga M, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. 2004. Plant Cell Physiol. 45: 346-350.

Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D and Bohnert HJ. 2001. Plant Cell 13: 889-905.

Kitashiba H, Ishizaka T, Isuzugawa K, Nishimura K and Suzuki T. 2004. J. Plant Phys. 161: 1171-1176.

- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, and Harper JF. 2002. *Plant Physiol.* 130: 2129-2141.
- Kumar S, Dhingra A and Daniell H. 2004. *Plant Physiol.* 136: 2843-2854.
- Lang V, Mantyla E, Welin B, Sundberg B, and Palva ET. 1994. *Plant Physiol.* 104: 1341-1349.
- Liu L, Zhu K, Yang Y, Wu J, Chen F and Yu D. 2008. *J. Plant Res.* 121: 215-226.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. 1998. *Plant Cell.* 10: 1391-406.
- Michaelson MJ, Price HJ, Ellison JR and Johnston JS. 1991. *Am. J. Bot.* 78: 183-188.
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T and Kimura T. 2007a. *J. Biosci. Bioeng.* 104: 34-41.
- Nakagawa T, Suzuki T, Murata S, Nakamura S, Hino T, Maeo K, Tabata R, Kawai T, Tanaka K, Niwa Y, Watanabe Y, Nakamura K, Kimura T and Ishiguro S. 2007b. *Bioscience. Biotech. Biochem.* 71: 2095-2100.
- Ogawa Y, Dansako T, Yano K, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K, Noji M, Saito K and Shibata D. 2008. *Plant Cell Physiol.* 49: 242-250.
- Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim M, Kim YK, Nahm BH and Kim JK. 2005. *Plant Physiol.* 138: 341-351.
- Orcutt DM and Nilsen ET, 2000. Wiley, New York, pp 177-235.
- Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li YQ, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. *Plant Cell Physiol.* 45: 1042-1052.
- Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran LP, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. *Plant J.* 50: 54-69.
- Qin F, Sakuma Y, Tran LP, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K, Tanokura M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2008. *Plant Cell* 20: 1693-1707.
- Raikhel N. 1992. *Plant Physiol.* 100: 1627-1632.
- Rogers S, Wells R and Rechsteiner M. 1986. *Science* 234: 364-368.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K, 2002. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 998-1009.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K, 2006a. *Plant Cell* 18: 1292-1309.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K, 2006b. *PNAS.* 103: 18822-18827.
- Shannon MC and Grieve CM. 1999. *Sci. Hort.* 78: 5-38.
- Shen YG, Zhang WK, He SJ, Zhang JS, Liu Q and Chen SY. 2003. *Theor. Appl. Genet.* 106: 923-930.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. and Seki M. 2003. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 410-417.
- Vagujfalvi A, Galiba G, Cattivelli L and Dubcovsky J. 2003. *Mol. Gen. Genomics* 269: 60-67.
- Xu ZS, Ni ZY, Li ZY, Li LC, Chen M, Gao DY, Yu XD, Liu P and Ma YZ. 2009. *J. Plant Res.* 122: 121-130.
- Xue GP. 2003. *Plant J.* 33, 373-383.
- Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. 2006. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 781-803.
- Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. 1994. *Plant Cell* 6: 251-264.
- Zhang JZ, Creelman RA and Zhu JK, 2004. *Plant Physiol.* 135: 247-273.
- Zhu JK. 2002. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 247-273.

Isolation and Characterization of *DREB* Gene Homolog towards the Improvement of Salt Tolerance in Lettuce

Yuichi Uno

Graduate School of Agricultural Science, Kobe University

Summary

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most consumed leafy vegetables in the world and its productivity is dramatically decreased by environmental stresses, such as heat, drought, and high salinity. Improvement of the stress tolerance of lettuce is desirable for the breeding of new cultivars. Isolation and characterization of genes involved in stress from this plant would help us understand the molecular mechanisms of stress response and generate tolerant lettuce by transgenic technology. *DREBs* (dehydration responsive element binding factors) encoding DRE/CRT-binding proteins play important roles in plant response of abiotic stress. In this study, a *DREB2*-homolog, named *LsDREB2A* was isolated from lettuce (*Lactuca sativa* L.) and analyzed its expression and function. *LsDREB2A* encoded proteins with the conserved AP2 (apetala 2) domain, and it was classified into A-2 subgroup of DREB subfamily. It was shown that there might be more than ten *DREB* homologs in the lettuce genome by southern blot analysis. Quantitative real-time PCR experiments revealed that the expression of *LsDREB2A* was significantly increased by drought and high salinity treatment, but not cold, heat and ABA (Abscisic Acid) treatment. This result suggested that *LsDREB2A* play an important role during drought and high salinity stress in ABA-independent pathway. Gel shift assay indicated that *LsDREB2A* could specifically recognize DRE (dehydration responsive element) sequence *in vitro*. In yeast one-hybrid assay, *LsDREB2A* was specifically bound to DRE sequence and activated the expression of both reporter genes of *His3* and *LacZ*. These results suggest that *LsDREB2A* might function as a transcription factor. Since *LsDREB2A* has no PEST sequence that relates with protein degradation, overexpression of *LsDREB2A* increased the tolerance of salt stress in transgenic Arabidopsis plants. These results indicate that *LsDREB2A* gene might have ability for producing transgenic lettuce that is tolerant to salt stress.