

酵母ワンハイブリッド法によるジャガイモ環境ストレス応答性転写因子 *StDREB1* の単離

遠藤 司 (筑波大学 生物学類)

指導教員：菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

§ 背景と目的

近年、塩害や気候変動による農作物の生産量の減少が深刻な問題となっている。農作物の効率的な生産は食糧問題の根本を支えている重要な課題である。ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) はイネ、コムギ、トウモロコシに並んで重要な農作物であり、優れた栄養価から、食糧問題緩和への貢献が強く期待される。また、ジャガイモは食糧としてだけではなく、澱粉原料としても利用されるため、大きな需要がある。しかし、塩害や霜害はジャガイモの生育に大きな影響を与え、収量の低下を招くため、環境ストレス下での生産量の維持が課題である。そこで、生産力の向上やジャガイモの栽培が可能となる面積を拡大するために、環境ストレスに強いジャガイモの作出が望まれる。

効果的に目的形質を付与するには、対象作物の遺伝的、生理的特性に関する情報が必要である。植物は環境ストレスに対して遺伝子発現レベルで応答しており、ストレスによって誘導される遺伝子の多くはストレス応答性転写因子によって制御される。多くの高等植物種で保存されている環境ストレス応答性転写因子として、Dehydration Responsive Element Binding protein 1 (DREB1) ファミリーが知られている。DREB1 はシス因子である Dehydration Responsive Element (DRE) と相互作用して下流遺伝子の発現を制御することが明らかとなっており、これら下流遺伝子は、環境ストレス耐性の発揮に関わる機能を持つものが数多く報告されている。また、*DREB1* 過剰発現植物では環境ストレス耐性の向上が報告されており、ジャガイモにおいても *DREB1* 過剰発現による環境ストレス耐性の向上が確認されている。そこで、ジャガイモ内在性の *DREB1* (*StDREB1*) の存在が示唆される。*StDREB1* の単離と機能解析は、ジャガイモの環境ストレス応答機構の解明につながるとともに、より効率的な品種改良における重要なヒントとなり得る。しかし、DRE 結合性が示された *StDREB1* の単離例は無い。

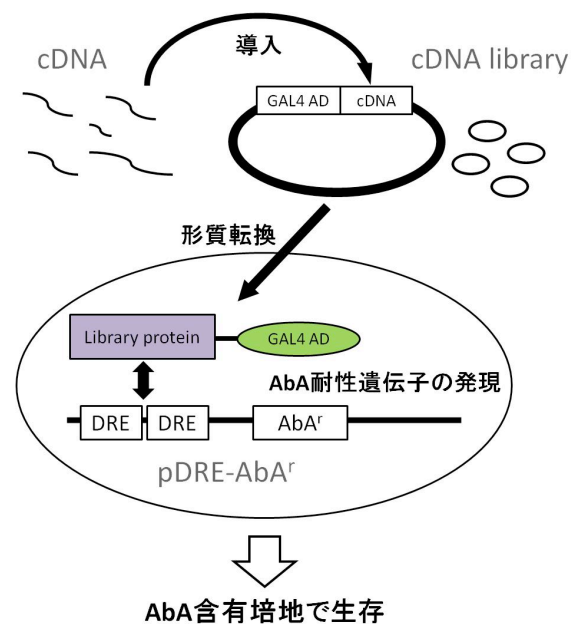
本研究では、環境ストレス下で誘導される *StDREB1* の単離を目的としている。

§ 材料と方法

酵母ワンハイブリッド法により、DRE と相互作用するタンパク質をコードする cDNA の選抜を行うため、まず、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に DRE と Aureobasidin A (AbA) 抵抗性遺伝子を含む選抜ベクター (pDRE-AbA^r) を導入し、DRE 結合因子を選抜するための菌株を作製した。

一方で、ジャガイモの品種 Desiree に乾燥 (-1.8 MPa PEG)、低温 (4°C)、塩ストレス (200 mM NaCl) 処理をそれぞれ 4 個体ずつ施し、2 時間後に茎頂付近の葉から RNA を抽出した。さらに、逆転写反応により cDNA を合成し、GAL4 転写活性領域を含むベクターに導入することで cDNA library を作製し、これらを選抜用菌株に導入した。Library 形質転換株では Library タンパク質と GAL4 転写活性領域との融合タンパク質が生産される。

導入された cDNA によって選抜用菌株内で DRE 結合因子が生産された場合、その菌株は GAL4 転写活性領域の働きにより AbA 抵抗性遺伝子の発現が誘導され、AbA 耐性を獲得する。したがって、AbA を含む培地で Library 形質転換株を培養することにより候補遺伝子のスクリーニングが可能となる。選抜により得られた菌株に導入された cDNA の塩基配列を解析し、BRAST 検索によりデータベース上の配列情報との相同性を評価し、転写因子の候補を得た。



図：酵母ワンハイブリッド法

§ 結果と考察

AbA (100 ng/ml, 150 ng/ml) を含む培地に Library 形質転換株を播き、得られた菌株のうち、562 サンプルの cDNA インサートチェックを行い、導入された cDNA の長さから配列解析を行うサンプルを決定した。200 bp 以上の cDNA が挿入された 61 サンプルの cDNA 配列をダイレクトシーケンスにより解析し、得られた配列を BRAST 検索にかけた。

その結果、乾燥ストレス応答性因子や、核酸結合活性を持つ配列が得られた。このことから、今回用いた cDNA library は環境ストレスによって誘導された遺伝子が含まれていることが示される。

導入された cDNA によって酵母内で生産されるタンパク質は、GAL4 転写活性領域との融合タンパク質であるため、発現したタンパク質が物理的に pDRE-AbA^r に結合すると AbA 耐性遺伝子が発現し、選抜用菌株は AbA 耐性を獲得する。したがって、転写活性領域の有無に関係なく、pDRE-AbA^r への結合性を持つ cDNA が単離されたと考えられる。

本発表にて、研究の詳細と引続き Library 形質転換株の cDNA インサートチェックと配列解析を行った結果を報告する。