

原著論文

ブドウ‘巨峰’へのスティルベンシンターゼ遺伝子の導入†¹

中島育子・小林省藏・松田長生†²・佐藤明彦・山田昌彦†³・副島淳一

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

果樹研究所遺伝育種部

305-8605 茨城県つくば市藤本

Genetic Transformation of ‘Kyoho’ Grape with Stilbene Synthase Gene

Ikuko NAKAJIMA, Shozo KOBAYASHI, Nagao MATSUTA†²,

Akihiko SATO, Masahiko YAMADA†³ and Junichi SOEJIMA

Department of Breeding, National Institute of Fruit Tree Science

National Agriculture and Bio-oriented Research Organization

Fujimoto, Tsukuba, Ibaraki 305-8605, Japan

Summary

A stilbene synthase gene, isolated from *Vitis riparia*, controlled under the cauliflower mosaic virus 35S promoter (35SP), was introduced into ‘Kyoho’ grape (*Vitis × labruscana*) via the *Agrobacterium*-mediated method. Ninety-one regenerated plants were obtained. PCR analysis showed that 55 plants contained the 35SP-stilbene synthase gene. Stilbene content of 34 transformants was measured by HPLC. The transformants contained stilbene derivative instead of resveratrol, and piceid (resveratrol-glucoside) was the candidate for the derivative. The highest content of the stilbene derivative was 19.7 µg/g (fresh weight) among the transformants. Detached leaf test of transformants did not show disease resistance against gray mold (*Botrytis cinerea*).

Key words: genetic transformation, grapevine, ‘Kyoho’, stilbene synthase

緒 言

日本のブドウ栽培地帯は、気候温暖で多雨多湿のため、べと病、黒とう病、晩腐病、灰色かび病、うどんこ病などの糸状菌の病害が発生しやすく、耐病性品種の育成が強く求められている。レスベラトロールはブドウにおけるファイトアレキシンで、灰色かび病菌・べと病菌など

の感染により合成され、レスベラトロール含量とこれら病害抵抗性には強い関連があることが報告されている(Stein・Blaich, 1985; Dercksら, 1995)。また、レスベラトロールあるいはその誘導体はピーナッツ(Ingham, 1976)、イタドリ(野々村ら, 1963)などでも産生されている。レスベラトロールは、レスベラトロール合成のキーエンザイムであるスティルベンシンターゼの働きによりフェ

†¹ 果樹研究所業績番号：1392

(2005年10月25日受付・2005年12月19日受理)

†² 現 花き研究所企画調整室 305-8519 茨城県つくば市

†³ 果樹研究所ブドウ・カキ研究部

ニルプロパノイド系で合成されるクマロイルCoAと3分子のマロニルCoAが重合してできるスティルベン骨格を持つスティルベンの一つである。ブドウのスティルベンシンターゼ遺伝子は遺伝子ファミリーを形成しており (Wiese ら, 1994), *Vitis vinifera*の品種‘Optima’からは *Vst1*, *Vst2*, *Vst3*, SV21, SV25, SV368が単離され (Melchior・Kindl, 1991; Wiese ら, 1994), それぞれの遺伝子ごとの発現が解析されている (Wiese ら, 1994)。

これらのことから糸状菌病害に対する抵抗性付与を目的としてスティルベンシンターゼ遺伝子を作物に導入する試みが数多く行われている。タバコに *Vst1* および *Vst2* 遺伝子を導入した場合, 灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) に抵抗性を増した形質転換体が得られている (Hain ら, 1993)。トマトでは *Vst1* および *Vst2* 遺伝子の導入によってジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) に抵抗性を増した形質転換体が獲得されている (Thomzik ら, 1997)。イネに *Vst1* のプロモーターと *Vst1* を導入した場合は, いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) に対して抵抗性を増した個体を得られている (Stark-Lorenzen ら, 1997)。オオムギおよびコムギへ *Vst1* のプロモーター, あるいはそれに4つの35Sエンハンサーをつないだ *Vst1* を導入した場合には, エンハンサーをつないだコンストラクトを導入したオオムギ形質転換体で灰色かび病 (*Botrytis cinerea*) に抵抗性を増したものが得られている (Leckband・Lörz, 1998)。ブドウではアルファルファのPR10プロモーターで制御した *Vst1* 遺伝子を台木品種である‘41B’へ導入し, 灰色かび病 (*Botrytis cinerea*) に抵抗性を増した形質転換体を得られたと報告されている (Coutos-Thévenot ら, 2001)。Kobayashi ら (2000) は, 6つの調べられたスティルベンシンターゼ遺伝子の中で最も高い発現をするSV25 (Wiese ら, 1994) の塩基配列を元に, レスベラトロール合成能の低い *Vitis vinifera* の品種‘Optima’, 中程度の *V. labrusca* の品種‘Concord’ および合成能の高い *V. riparia* より単離したスティルベンシンターゼ遺伝子をキウイフルーツに導入している。得られた形質転換体はレスベラトロールではなく配糖体であるパイシードを産生しており, 形質転換体においてコンストラクトの違いによるパイシード蓄積量に差はみられず, 灰色かび病への抵抗性は認められなかった。

本研究では, 日本の経済品種である‘巨峰’へ耐病性を付与するために, ブドウ野生種 *V. riparia* より単離したスティルベンシンターゼ遺伝子 (Kobayashi ら, 2000) をアグロバクテリウム法によって導入し, 得られた形質転換体の灰色かび病抵抗性を調査した。病害検定にご助言とご援助いただいた今田準博士, ブドウの培養にご助言

とご援助いただいた能塚一徳博士, 有益なディスカッションをしていただいた山本俊哉博士, 今井剛氏, 岩波宏氏, また, 実験補助をしていただいた中墨珠美氏, 増田照子氏に心から謝意を表する次第である。

材料及び方法

遺伝子導入および再分化

‘巨峰’の未受精胚珠より Nakajima ら (2000) の方法で誘導したエンブリオジェニックカルス (EC) を材料とした。プラスミド pBI121 (Clontech) のGUS部分を切り出し, *V. riparia* より単離されたスティルベンシンターゼ遺伝子 pRIP をカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターの下流に配置したプラスミド pBSRIP を持つ *Agrobacterium* LBA4404/pBSRIP (Kobayashi ら, 2000) を‘巨峰’のECへ感染させた。また, コントロールとして35Sプロモーターの下流にGUS遺伝子を配置した pBI121 ベクターを持つ *Agrobacterium* LBA4404/pBI121 も‘巨峰’のECへ感染させた。形質転換は Nakajima ら (2006) の方法によって行った。すなわち, 感染後のECを100 μ M アセトシリンゴンを含んだ1/2MS培地 (Murashige・Skoog, 1962) (5%マルトース, 0.85%寒天) で6日間共存培養した後, 15 μ g/mlカナマイシンと200 μ g/mlセホタキシムを含んだ1/2MS培地 (5%マルトース, 0.85%寒天) で約2週間選抜した。その後, 寒天濃度が3%の同様の培地で選抜した。成長した再分化個体は, 鉢上げて順化させた。

導入遺伝子のPCR解析

得られた再分化個体はPCR法によりスティルベンシンターゼ遺伝子の導入を確認した。葉からゲノミックDNAを Nakamura ら (1998) の方法によって抽出し, 抽出したDNAを鋳型に導入遺伝子を確認した。プライマーとしてスティルベンシンターゼ遺伝子内の配列である5'-GAGTACGGTAACATGTCAAGT-3' と, Nosターミネーター内の配列である5'-GTATAATTGCGGGACTCTAAT-3' を用いた。PCRはTaq gold (Takara) を使い, 95 $^{\circ}$ C12分の後94 $^{\circ}$ C30秒, 63 $^{\circ}$ C30秒, 72 $^{\circ}$ C1分を40回繰り返し, 72 $^{\circ}$ C7分, 4 $^{\circ}$ Cの条件で行った。GUS遺伝子の導入についてはX-glucを用いた染色により確認した。再分化個体におけるアグロバクテリウムのコンタミネーションについては, 再分化個体の葉をすりつぶしてLB培地上に広げて培養し, アグロバクテリウムの増殖の有無で調査した。

HPLC分析によるスティルベン含量の測定

得られた形質転換体のスティルベン含量を調査するため, Jeandet ら (1997) の方法を一部改良した Kobayashi ら

(2000)の方法により、展開後間もない葉から80%メタノールを用いてスティルベンを抽出し、HPLC分析を行った。
形質転換体の病害抵抗性検定

形質転換体の切離葉の裏面に直径6mmのガーゼ(3重)を置き、 5×10^5 個/mlに調製した灰色かび病の胞子懸濁液を20 μ 滴下し、20 $^{\circ}$ C暗黒、湿潤条件下で10日間置いた。コントロールとして非形質転換体の切離葉を同様に処理した。各系統10枚の切離葉を用い、1枚の葉につき2ヶ所接種して10日後の病斑の直径を測定し、分散分析を行い灰色かび病に対する抵抗性を評価した。

結果および考察

遺伝子導入およびPCR解析

アグロバクテリウムを感染させた‘巨峰’のECを選抜培地で培養した。暗黒下でもやし状に伸びてきたエンブリオを明条件下に移し、再分化を図った。

その結果、96個体の再分化個体を得た。91個体についてPCR法によりスティルベンシンターゼ遺伝子導入の確認を行ったところ、55個体で目的のサイズのバンドが認められた (Fig. 1)。また、アグロバクテリウムによるコ

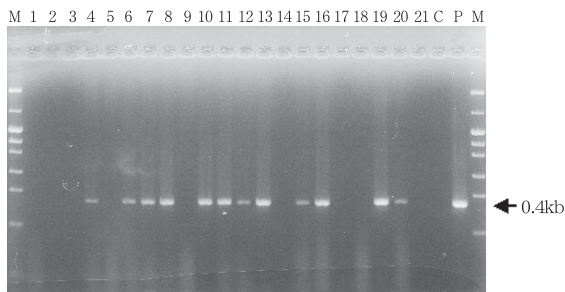


Fig. 1. Detection of the stilbene synthase gene in regenerated ‘Kyoho’ plants by PCR. Lanes 1-21, transformed plants; C, non-transformed plant; P, plasmid; M, pHY marker.

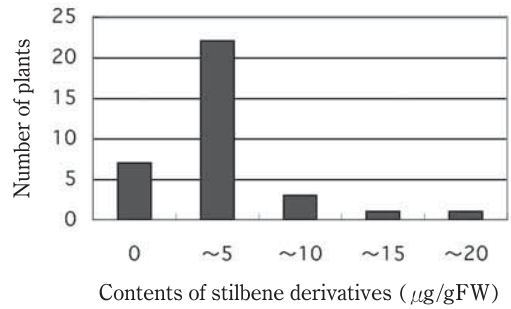


Fig. 3. Content of stilbene derivatives of transgenic ‘Kyoho’ containing stilbene synthase gene.

ンタミネーションはなかった。

形質転換体のHPLC分析によるスティルベン含量の測定

PCRで遺伝子導入が確認された個体のうち34個体についてHPLC分析を行ったところ、形質転換体にはGUS遺伝子導入形質転換体と比べて、レスベラトロールではないスティルベン誘導体が高濃度に含有されていることが明らかとなった。このピークは、キウイフルーツに同遺伝子を導入したKobayashiら(2000)から、レスベラトロールの配糖体であるパイシードである可能性が考えられた (Fig. 2)。形質転換体の34個体中29個体はスティルベン誘導体含量が5 μ g/g(新鮮重)以下であったが、5個体は5 μ g/g(新鮮重)以上のスティルベン誘導体を産生しており、最もスティルベン誘導体含量の高い個体では19.7 μ g/g(新鮮重)であった。一方GUS遺伝子を導入した形質転換体でのスティルベン誘導体の含量は0.5 μ g/g(新鮮重)であった (Fig. 3)。

ブドウ‘41B’形質転換体の場合、HPLCを用いた分析で非形質転換体の約100倍の2,000 μ g/g乾物重(約200 μ g/g新鮮重相当)程度のレスベラトロールの蓄積が認められている (Coutos-Thévenotら, 2001)。タバコとトマトでブドウのスティルベンシンターゼ遺伝子を導入した場合

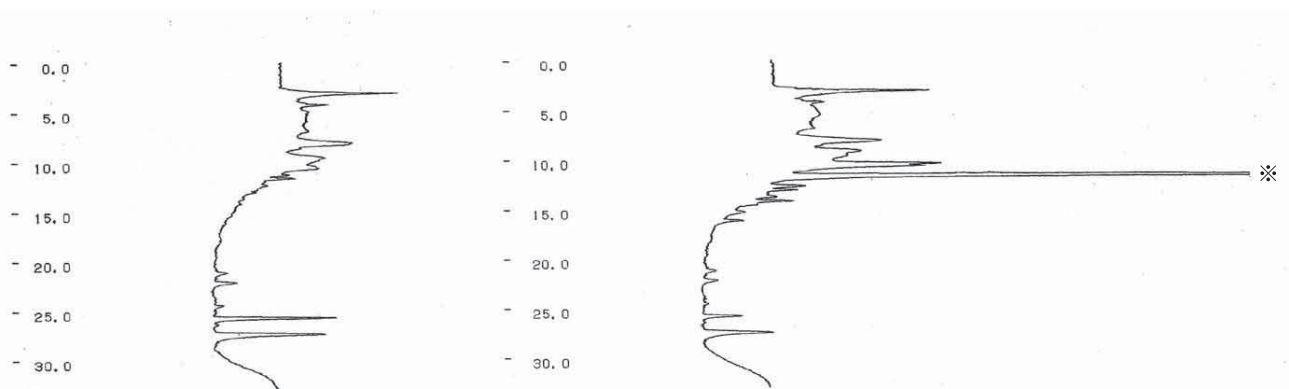


Fig. 2. HPLC profiles of stilbene derivatives from ‘Kyoho’ transformed with stilbene synthase gene (right) or with GUS gene (left). The vertical line shows retention times. A peak of a stilbene derivative which obviously appeared in a transformant with stilbene synthase gene is marked by *.

についてはELISAで間接的にはあるが、タバコでは最大400 $\mu\text{g/g}$ (新鮮重)、トマトでは最大600 $\mu\text{g/g}$ (新鮮重)のレスベラトロールの蓄積が確かめられている (Hainら, 1993; Thomzikら, 1997). 一方、ブドウのスティルベンシンターゼ遺伝子を導入したキウイフルーツ (Kobayashiら, 2000)、ピーナツのスティルベンシンターゼ遺伝子を導入したアルファルファ (Hipskind・Paiva, 2000)ではレスベラトロールに糖が付加したパイシードが蓄積されていた. Jeandetら (1997)は、おそらくレスベラトロールはスティルベンシンターゼ遺伝子によって合成されるが、その後速やかにグリコシルトランスフェラーゼによって配糖化されパイシードになると考察している. スティルベン誘導体が蓄積された本研究およびパイシードが蓄積されたキウイフルーツ (Kobayashiら, 2000)では、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターを用いており、遺伝子が恒常的に発現しているものと考えられる. 一方タバコ、トマトでは*VstI*自身のプロモーター、ブドウ '41B'ではアルファルファPR10プロモーターを用いているため、糸状菌などの感染に伴って発現誘導される. このことから、恒常的にレスベラトロールが産生されるようなプロモーターを用いた場合にはレスベラトロールが配糖化されてパイシード、あるいはスティルベン誘導体となって蓄積され、一時的に産生されるようなプロモーターを用いた場合にはレスベラトロールの

まま修飾されない状態で蓄積するのではないかとと思われる.

キウイフルーツではパイシードが最大182 $\mu\text{g/g}$ (新鮮重) (Kobayashiら, 2000)、本研究のブドウではスティルベン誘導体が最大19.7 $\mu\text{g/g}$ (新鮮重)蓄積された. これはキウイフルーツの場合はもともとレスベラトロール合成経路がないためパイシードが分解されずに蓄積し、ブドウはレスベラトロール合成遺伝子をもともと持つためにスティルベン誘導体がさらに代謝された可能性が考えられる.

形質転換体の灰色かび病への病害抵抗性

スティルベン誘導体を最も多く含有していた形質転換体とGUSを導入したコントロール個体とを用いて灰色かび病に対する耐病性検定を行ったところ、スティルベン誘導体を最も多く含有していた個体では病斑の直径の平均は8.7mm (Fig. 4A)、コントロールでは8.0mm (Fig. 4B)で、有意な差は認められなかった. また、スティルベン誘導体を5 $\mu\text{g/g}$ (新鮮重)以上産生する形質転換体3系統、5 $\mu\text{g/g}$ (新鮮重)以下1系統についても顕著な差は認められなかった.

パイシードが蓄積した形質転換キウイフルーツでは灰色かび病に対する病害抵抗性はみられなかった (Kobayashiら, 2000). 一方、ピーナツのスティルベンシンターゼ遺伝子 (35Sプロモーター)を導入してパイ

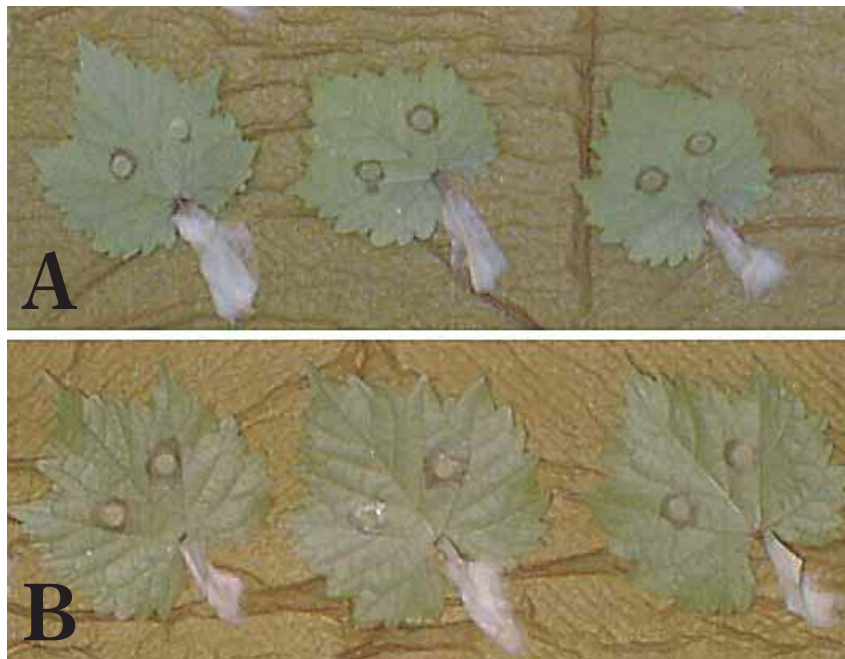


Fig. 4. An example of gray mold susceptibility on leaves of the transformant of stilbene synthase gene (A) and control plant (B).

シードが蓄積したアルファルファでは *Phoma medicaginis* (アルファルファ茎枯病) に対して病害抵抗性が認められている。パイシードを50 µg/ml含んだPDA培地上で *Phoma medicaginis* を培養したところ、菌糸の成長が同濃度のレスベラトロールと同程度に抑制され、アルファルファ形質転換体の若い葉にはパイシードが15 µg/g(新鮮重)以上含有されていた (Hipskind・Pavia, 2000)。本研究でも同じ程度のスティルベン誘導体の蓄積が認められたが、病害抵抗性が付与されなかったのは、病原菌のパイシードへの感受性が違うか、パイシード以外のスティルベン誘導体が蓄積したためと考えられた。

以上のことから灰色かび病耐性を付与するにはスティルベン誘導体ではなくレスベラトロールを高濃度蓄積させる必要があると考えられた。そのためには、35Sプロモーターのように恒常的に働くプロモーターではなく Coutos-Thévenot ら (2001) がブドウ‘41B’で用いたような、病原菌が感染したときのみに働くプロモーターを用いて今後研究を進める必要があると考えられる。

摘 要

*Vitis riparia*より単離されたスティルベンシンターゼ遺伝子を、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターの下流に配置し、ブドウ‘巨峰’のエンブリオジェニックカルスヘアグロバクテリウム法により導入した。再分化個体91個体について導入遺伝子をPCR法で確認したところ55個体でバンドが確認された。バンドが確認された個体のうち34個体についてHPLC分析を行ったところ、形質転換体はレスベラトロールではなくスティルベン誘導体を蓄積しており、レスベラトロールの配糖体であるパイシードである可能性があった。最もスティルベン誘導体の蓄積の多かった形質転換個体では19.7 µg/g(新鮮重)であった。形質転換体の切離葉を用いた検定では灰色かび病への抵抗性は認められなかった。

引用文献

- 1) Coutos-Thévenot P., B. Poinssot, A. Bonomelli, H. Yean, C. Breda, D. Buffard, R. Esnault, R. Hain and M. Boulay. 2001. *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *VstI* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. J. Exp. Bot. 52:901-910.
- 2) Dercks, W., L. L. Creasy and C. J. Luczka-bayles. 1995. Stilbene phytoalexins and disease resistance in *Vitis*. In : Daniel, M. and R. P. Purkayastha (eds.). Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action. p.287-315. Marcel Dekker, Inc.
- 3) Hain, R., H.-J. Reif, E. Krause, R. Langebartels, H. Kindl, B. Vornam, W. Wiese, E. Schmelzer, P. H. Schreier, R. H. Stöcker and K. Stenzel. 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature 361:153-156.
- 4) Hipskind, J. D. and N. L. Paiva. 2000. Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. Mol. Plant-Microbe Interact. 13:551-562.
- 5) Ingham, J. L. 1976. 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). Phytochemistry 15:1791-1793.
- 6) Jeandet, P., A. C. Breuil, M. Adrian, L. A. Weston, S. Debord, P. Meunier, G. Maume and R. Bessis. 1997. HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. Anal. Chem. 69:5172-5177.
- 7) Kobayashi, S., C. K. Ding, Y. Nakamura, I. Nakajima and R. Matsumoto. 2000. Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). Plant Cell Rep. 19:904-910.
- 8) Leckband, G. and H. Lörz. 1998. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. Theor. Appl. Genet. 96:1004-1012.
- 9) Melchior, F. and H. Kindl. 1991. Coordinate- and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis* cv. Optima. Arch. Biochem. Biophys. 288:552-557.
- 10) Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- 11) Nakajima, I., S. Kobayashi and Y. Nakamura. 2000. Embryogenic callus induction and plant regeneration from unfertilized ovule of 'Kyoho' grape. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 69:186-188.
- 12) Nakajima, I., N. Matsuta, T. Yamamoto, S. Terakami and J. Soejima. 2006. Genetic transformation of 'Kyoho' grape with a GFP gene. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 75:188-190.
- 13) Nakamura, Y., S. Kobayashi and I. Nakajima. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration from hypocotyl segments of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb). Plant Cell Rep. 17:435-440.

- 14) 野々村進, 神奈川宏, 牧本有浩. 1963. タデ科植物成分の研究 (第1報) 虎杖根の成分研究. 薬学雑誌 83:988-990.
- 15) Stark-Lorenzen, P., B. Nelke, G. Hänßler, H. P. Mühlbach and J. E. Thomzik. 1997. Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Rep. 16:668-673.
- 16) Stein, U. and R. Blaich. 1985. Untersuchungen über stilbenproduktion und botrytisanfälligkeit bei *Vitis*-arten. Vitis. 24:75-87.
- 17) Thomzik, J. E., K. Stenzel, R. Stöcker, P. H. Schreier, R. Hain and D. J. Stahl. 1997. Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 51:265-278.
- 18) Wiese, W., B. Vornam, E. Krause and H. Kindl. 1994. Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment. Plant Mol. Biol. 26:667-677.