

## [研究報文]

キチンオリゴ糖を塗布したブドウ葉におけるリスベラトロール誘導と  
スチルベンシンターゼ遺伝子の発現

高柳 勉・奥田 徹・松土俊秀・大橋宏之・横塚弘毅

山梨大学ワイン科学研究センター 〒400-0005 甲府市北新1-13-1

Induction of Resveratrol and Stilbene Synthase mRNA in Grape Leaves Treated with  
Chitin-OligosaccharidesTsutomu TAKAYANAGI, Tohru OKUDA, Toshihide MATSUDO, Hiroyuki OHASHI  
and Koki YOKOTSUKA

The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University

1-13-1 Kitashin, Kofu, Yamanashi 400-0005, Japan

Resveratrol induction and gene expression of stilbene synthase in leaves of two grape varieties (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay and *Vitis rupestris* cv. Saint George) were investigated. Resveratrol induction by elicitor treatment with an 8% chitin-oligosaccharide solution was examined in leaves of 5-month-old shoots of the two grape varieties. The maximum amount of resveratrol produced in Saint George was 34.0  $\mu\text{g/g}$  FW, 48 h after the elicitor treatment. In the case of Chardonnay, it was 17.6  $\mu\text{g/g}$  FW at 24 h. Stilbene synthase mRNA, determined by the quantitative RT-PCR method, was 3-fold greater in treated Saint George leaves 6 h after the elicitor treatment than that in Chardonnay leaves. The results suggest that differences in the quantity of resveratrol induced in the two grape varieties are due to transcription of the gene for stilbene synthase.

**Key words:** Resveratrol, stilbene synthase, elicitor, *Vitis*

## 緒言

フィトアレキシンの生産は植物が病原菌に対して示す代表的な生体防御反応であり、植物種により生産されるフィトアレキシンの構造は異なっている。ブドウのフィトアレキシンの構造としてはリスベラトロールとその誘導体が知られており、ブドウ病原菌の感染とリスベラトロール生産の関係について活発に研究が行われている(5, 8, 13, 17)。特に、灰色カビ病の病原菌である *Botrytis cinerea* に対する耐性と誘導されるリスベラトロール量の間に関連が見られることから、リスベラトロール誘導量は、灰色カビ病に耐性のあるブドウ品種を選抜するのに有用な指標になると考えられている(1, 4, 12, 15)。ブドウ細胞において、リスベラトロール合成速度を左右するキー酵素はスチルベンシンターゼであると推測されている(16)。この酵素は、植物に広く存

在するフェニルプロパノイド経路の中間産物である4-クマロイル-CoAと3分子のマロニル-CoAを基質としてリスベラトロールを合成する。*B. cinerea* 細胞壁がブドウの培養細胞に接触することにより、スチルベンシンターゼは迅速かつ一時的に合成される(9)。さらに、同様の実験により、遺伝子のレベルでもスチルベンシンターゼのmRNAがブドウ培養細胞に発現することが確認されている(10)。これらの実験結果はすべて、リスベラトロールがリスベラトロール合成のキー酵素であることを支持している。しかし、これらの研究の多くは、培養細胞という *in vitro* の系で測定されており、実際に栽培されているブドウにおけるスチルベンシンターゼ遺伝子の発現に関する研究、特に遺伝子の発現量とリスベラトロール合成との関係を定量的に測定した研究はほとんどない。

本研究では、UV照射に対するリスベラトロール誘導量が異なる二つのブドウ品種(15)、すなわち、

2002年9月9日受理

リスベラトロール生産能の低いブドウ品種としてシャルドネ (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay)、そして高いブドウ品種としてセント・ジョージ (*Vitis rupestris* cv. Saint George) を用いた。両ブドウ品種の葉にエリシター処理を施し、リスベラトロール誘導量とスチルベンシンターゼ遺伝子の発現量を測定した。エリシターとして、植物に対して広くエリシター活性が確認されているキチンオリゴ糖を用いた (6)。両ブドウ品種のリスベラトロール誘導量とスチルベンシンターゼ遺伝子の発現量を比較することにより、両ブドウ品種間のリスベラトロール生産量の違いがスチルベンシンターゼ遺伝子の転写レベルで制御されているか否かを検討した。

## 材料と方法

### 1. 供試材料

山梨大学ワイン科学研究センターにおいて路地栽培されている7年生のシャルドネ (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay) およびセント・ジョージ (*V. rupestris* cv. Saint George) を用いた。

### 2. エリシター処理とリスベラトロール測定

シャルドネとセント・ジョージの5カ月齢の新梢の第1葉 (最も葉齢の高い葉) にエリシターを塗布し、リスベラトロールを誘導した。エリシターとしてキチンオリゴ糖 (NA-COS-Y、重合度  $n = 1 \sim 6$ 、焼津水産化学) を用いた。すなわち、25%エタノール水溶液に溶解した8% (W/V) キチンオリゴ糖 NA-COS-Yをブドウの葉に塗布し、0、24、48、72時間後に採取した。コントロールの葉は25%エタノール水溶液を塗布し、同様に採取した。採取した葉は、直ちに液体窒素で凍結し、乳鉢で粉末化した。この粉末0.2 gに5 mLの酢酸エチルを加え、乳鉢でホモジナイズした。この混合液をプラスチック遠沈管 (15 mL) に移し、遮光して1時間振とう抽出した後、20,000gで5分間遠心分離した。この上清を0.45  $\mu$ mのメンブレンフィルターで濾過した後に、内部標準物質の *trans*-4-hydroxystilbene を加え、HPLCにより分析した。HPLCは、ODSカラム (LiChrospher 100RP18, 4 x 250 mm, Merck) を用い、分離したリスベラトロールおよび内部標準物質のピークを300 nmの吸光度で検出し、定量した。

Table 1. Gradient conditions of reverse-phase HPLC used to determine resveratrol content in extract from grape leaves.

Gradient time (flow rate: 0.9 mL/min)	Final concentration	
	% A <sup>a</sup>	% B <sup>b</sup>
0	90	10
0 to 10 min	78	22
10 to 20 min	78	22
20 to 25 min	65	35
25 to 40 min	65	35
40 to 55 min	10	90
55 to 65 min	0	100

a Solvent A, 0.4% phosphoric

b Solvent B, 20% solvent A mixed 80% acetonitrile.

溶媒はアセトニトリル-水-リン酸の系を用い、Table 1のグラディエント条件で分離した (11、14)。

### 3. 定量RT-PCRによるmRNAの測定

リスベラトロール測定と同様の方法でエリシター処理を行った。8%キチンオリゴ糖溶液でエリシター処理した葉およびコントロールの葉を6時間後に採取し、CTAB法 (3) によりトータルRNAを分離した。得られたトータルRNA (5  $\mu$ g) から、First-strand cDNA reaction mix beads (Pharmacia) とpd (N)<sub>9</sub>を用いた逆転写反応により、一本鎖cDNAライブラリーを作成した。定量PCRはYokoiらの方法 (2、19) により行った。定量PCR用マスターミックス、すなわち、3.3  $\mu$ Lの一本鎖cDNAライブラリー、1.7  $\mu$ LのEX Taq polymerase (8.75 U, Takara)、32.5  $\mu$ Lの10 x EX buffer、26  $\mu$ Lの2.5 mM dNTP mixture、13  $\mu$ Lのスチルベンシンターゼおよび18S rRNAのプライマー (各32.5 pmol)、248.5  $\mu$ Lの滅菌水からなる混合液を200  $\mu$ L容のPCRチューブに25  $\mu$ Lずつ分注し、サーマルサイクラー (Applied Biosystems 2400) により14から36サイクルの間で増幅反応を行った。サイクルプログラムは、94°C (30秒)、60°C (30秒)、72°C (1分) を用いた。スチルベンシンターゼのプライマーは418bpのスチルベンシンターゼ遺伝子が増幅するプライマー (sense primer:5'-AGGTGGAAGTCTCCTTCGAA-3', anti-sense primer:5'-ACCTGGGTGAGCAATCCAAA-3') (10) と18S rRNAのプライマーは307 bpの18S rRNA遺伝子が増幅するプライマー (sense primer:5'-GCCTCCGGTGTCTTACTTTGAAGA-3', anti-sense primer:5'-GGTCGGCATCGTTTATGGTTGAGAC-3') を用いた。PCR反応終了後、8  $\mu$ Lの反応液と2  $\mu$ Lの

loading solution (40% スクロース、0.25% ブロムフェノールブルー、1 mM EDTA) を混合し、1.5% アガロースゲル電気泳動 (1 x TAE buffer) により分離した。泳動後のゲルを0.5% エチジウムブロマイド溶液で染色し、DNAに由来する各バンドの蛍光強度をCCDイメージングシステム (ChemiDoc, Bio-Rad) により測定した。

結果と考察

キチンオリゴ糖溶液をシャルドネおよびセント・ジョージの葉に塗布し、誘導されるリスベラトロール量を経時的に測定した (Fig. 1)。セント・ジョージの葉に誘導されるリスベラトロール量は塗布後48時間で最大値 (34.0 μg/g fresh weight) に達したのに対して、シャルドネの葉に誘導されるリスベラトロール量は塗布後24時間で最大値 (17.6 μg/g fresh weight) に達した。誘導されたリスベラトロール量の最大値を両ブドウ品種で比較すると、セント・ジョージの誘導量がシャルドネの約2倍であった。両ブドウ品種ともに、コントロールの葉にも少量のリスベラトロールが検出されたが、その値は、

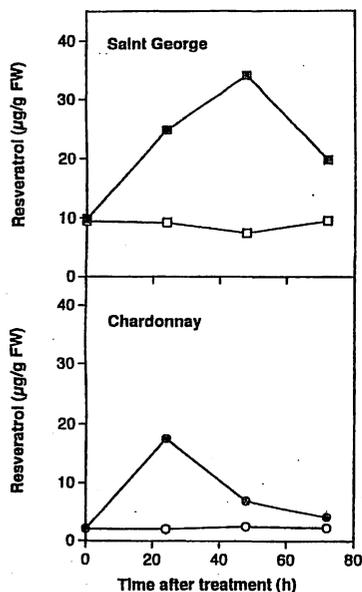


Fig. 1. Resveratrol production in leaves of 5-month-old shoots of Chardonnay and Saint George induced by a chitin oligosaccharide mix. An 8% chitin oligosaccharide mix dissolved in 25% ethanol was applied to primary leaves (the most mature leaves) of 5-month-old shoots of Chardonnay (●) and Saint George (■). The control leaves of Chardonnay (○) and Saint George (□) were treated with 25% ethanol solution. The leaves were removed 0, 24, 48, 72 h after treatment and the resveratrol content was analyzed by HPLC. Data points represent the mean (n = 3). Vertical bars for SE are not shown because the SE is less than the size of the symbols.

測定期間を通してほぼ一定であった。

リスベラトロールの誘導実験と同様の方法でエリシター処理されたシャルドネおよびセント・ジョージの葉のスチルベンシンターゼ mRNA の量を定量 RT-PCR法により測定した (2, 10)。葉のトータル RNA から作成した一本鎖 cDNA をテンプレートとして、スチルベンシンターゼと 18S rRNA に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、その PCR 生成物を電気泳動により分析した (Fig. 2)。スチルベンシ

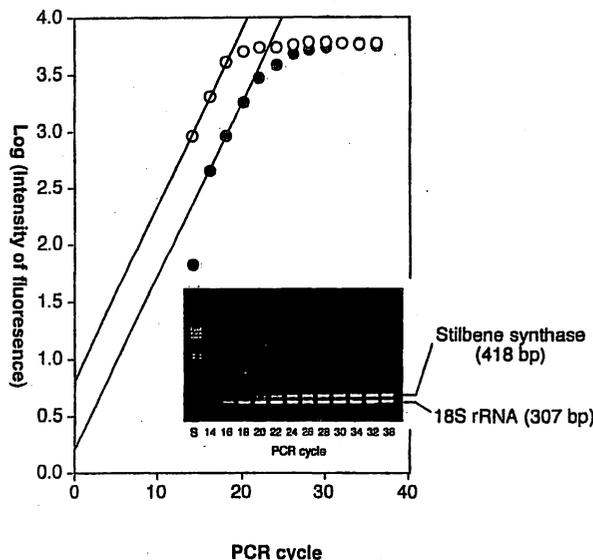


Fig. 2. Quantitative RT-PCR analysis of stilbene synthase mRNA and 18S rRNA in grape leaves. The figure shows the results for Saint George leaves 6 h after elicitation. PCR products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels in 1 x TAE buffer and then visualized by ethidium bromide staining. The intensity of the ethidium-bromide fluorescence of each band was measured using a CCD imaging system. The intensity data of the PCR products of each reaction cycle are plotted semi-logarithmically (stilbene synthase, ●; 18S rRNA, ○).

ンターゼ遺伝子 (418 bp) および 18S rRNA 遺伝子 (307 bp) に由来するバンドの蛍光強度は PCR の初期サイクル (14~24 サイクル) において指数関数的に増加した。すなわち、回帰方程式  $y = I \times E^n$  (ここで、 $y$  は PCR 生成物の収量、 $n$  はサイクル数、 $I$  は初期テンプレート DNA 量を反映した係数) にこの蛍光強度の増加を当てはめると、片対数グラフは初期サイクルにおいて直線性を示した (Fig. 2)。このグラフから、スチルベンシンターゼと 18S rRNA の初期テンプレート cDNA 量を反映した係数  $I$  をそれぞれ求め、両者の比より相対的な mRNA レベルを算出した。ここで、18S rRNA の mRNA の発現量は、ブドウ細胞において一定量発現している内部

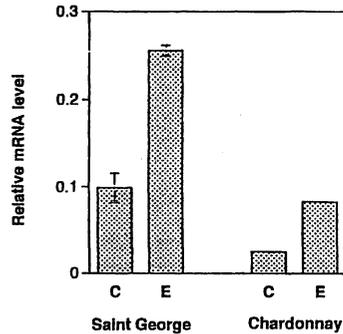


Fig. 3. Relative amounts of stilbene synthase mRNA in leaves of Saint George and Chardonnay. Quantitative RT-PCR analysis was performed using total RNA isolated from grape leaves 6 h after elicitation with an 8% chitin<sup>o</sup>oligosaccharide mix dissolved in 25% ethanol (E). The control leaves were treated with 25% ethanol (C). The relative mRNA level was determined by calculating the ratio of cDNA segments of stilbene synthase to that of 18S rRNA. Data represent the mean (n = 3). Vertical bars for SE are not shown because the SE is less than the size of the symbols.

標準として用いた (18)。

キチンオリゴ糖を塗布して6時間後のスチルベンシンターゼ遺伝子のmRNA量をシャルドネとセント・ジョージの葉で比較すると、セント・ジョージの葉のスチルベンシンターゼmRNA量はシャルドネのスチルベンシンターゼmRNA量の約3倍であった (Fig. 3)。エリシター刺激に対するスチルベンシンターゼmRNAの発現をノーザンプロットで解析した幾つかの研究では、いずれも処理6~8時間後にmRNA量が最大となり、その後減少している (7, 10)。本研究においても、処理後6時間のこのmRNA量が最大値に近い値と推測され、その後合成されるリスベラトロール量に影響していると考えられた。セント・ジョージのリスベラトロールmRNAの発現量がシャルドネの3倍であり、セント・ジョージに誘導されるリスベラトロール量の最大値がシャルドネの約2倍であるという結果は、両品種のブドウのリスベラトロール誘導量の違いが、スチルベンシンターゼ遺伝子の発現量の違いに起因していることを示しており、これまで培養細胞などで確認されてきた、リスベラトロール合成はスチルベンシンターゼ遺伝子の発現量に依存するという結果を支持するものであった。今回の実験で使用したプライマーは、Optima種の培養細胞でエリシター依存的に発現することが確認されているスチルベンシンターゼ遺伝子SV21とSV25のcDNA配列を基に、両遺伝子の共通配列部分用いて設計した (10)。従っ

て、SV21またはSV25に類似の構造を持つスチルベンシンターゼ遺伝子の総量が測定されているものと推測される。また、コントロールの葉においてもスチルベンシンターゼmRNAが発現していた (エリシター処理を施した葉に較べると低いレベル)。コントロール葉のリスベラトロール量が、測定した3日間を通して一定であったことから (Fig. 1)、5カ月齢の新梢の葉には常に一定量のスチルベンシンターゼmRNAが発現していると推測される。両ブドウ品種間でコントロール葉のスチルベンシンターゼmRNA量を比較するとやはりセント・ジョージの発現量が大きかった。さらに、エリシター処理葉とコントロール葉のスチルベンシンターゼmRNA発現量の比は両ブドウ品種でほぼ同じであった。このことは、キチンオリゴ糖によるエリシター処理と同様の発現システムが、低レベルではあるものの、コントロール葉でも稼働していることを示唆しているものと推測される。

## 要約

エリシター処理を施したシャルドネ (*Vitis vinifera*) とセント・ジョージ (*Vitis rupestris*) のリスベラトロール誘導量とスチルベンシンターゼ遺伝子の発現量を調べた。エリシターとして8%キチンオリゴ糖溶液を用い、両ブドウ品種の新梢 (5カ月齢) の葉に塗布した。シャルドネに誘導されるリスベラトロール量の最大値は17.6  $\mu$ g/g FW (処理後24時間)、セント・ジョージの最大値は34.0  $\mu$ g/g FW (処理後72時間) であった。エリシター処理後6時間のブドウ葉のスチルベンシンターゼmRNA量を定量RT-PCR法により測定したところ、セント・ジョージがシャルドネの3倍であった。これらの結果は、両品種のブドウのリスベラトロール誘導量の違いが、スチルベンシンターゼ遺伝子の発現量の違いに起因していることを示唆していた。

## 文献

1. Barlass, M., R. M. Miller, and T. J. Douglas. Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew. II. Resveratrol production. Am. J. Enol. Vitic. 38: 65-68 (1987).

2. Burleigh, S. H. Relative quantitative RT-PCR to study the expression of plant nutrient transporters in Arbuscular mycorrhizas. *Plant Science* 160: 899-904 (2001).
3. Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Report* 11: 113-116 (1993).
4. Creasy, L. L. and M. Coffey. Phytoalexin production potential of grape berries. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 113: 230-234 (1988).
5. Dai, G. H., C. Andary, L. Mondolot-Cosson, and D. Boubals. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus. *Plasmopara viticola*. *Phsiol. Mol. Plant Pathol.* 46: 177-188 (1995).
6. Ebel, J. Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *BioEssays* 20: 569-576 (1998).
7. Hain, R., H. J. Reif, E. Krause, R. Langebartels, H. Kindl, B. Vornam, W. Wiese, E. Schmelzer, P. H. Schreier, R. H. Stocker, and K. Stenzel. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361: 153-156 (1993).
8. Langcake, P. and W. V. McCarthy. The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 18: 244-253 (1979).
9. Liswidowati, F. M., F. Hohmann, B. Schwer and H. Kindl. Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells. *Planta* 183: 307-314 (1991).
10. Melchior, F. and H. Kindl. Coordinate-and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis* cv. Optima. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 552-557 (1991).
11. Okuda, T. and K. Yokotsuka. Trans-resveratrol concentrations in berry skins and wines from grapes grown in Japan. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 93-99 (1996).
12. Pool, R. M., L. L. Creasy, and A. S. Frackelyon. Resveratrol and the viniferins, their application to screening for disease resistance in grape breeding program. *Vitis* 20: 136-145 (1981).
13. Sarig, P., Y. Zutkhi, A. Monjauze, N. Lisker, and R. Ben-Arie. Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. *Phsiol. Mol. Plant Pathol.* 50: 337-347 (1997).
14. Sato, M., Y. Suzuki, T. Okuda, and K. Yokotsuka. Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 1800-1805 (1997).
15. Sbaghi, M., P. Jeandet, B. Faivre, R. Bessis, and J. C. Fournioux. Development of methods using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine in vitro cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*). *Euphytica*. 86: 41-47 (1995).
16. Schroder, J. and G. Schroder. Stilbene and chalcone synthases: related enzymes with key functions in plant-specific pathways. *Z Naturforsch [C]* 45: 1-8 (1990).
17. Stein, U. and R. Blaich. Investigations on the production of stilbenes and susceptibility to *Botrytis* of *Vitis* spp. *Vitis* 24: 75-87 (1985).
18. Wiese, W., B. Vornam, E. Krause, and H. Kindl. Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment. *Plant Mol. Biol.* 26: 667-77 (1994).
19. Yokoi, H., S. Natsuyama, M. Iwai, Y. Noda, T. Mori, K. J. Mori, K. Fujita, H. Nakayama, and J. Fujita. Non-radioisotopic quantitative RT-PCR to detect changes in mRNA levels during early mouse embryo development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195: 769-75. (1993)