

## [研究報文]

## ブドウのスチルベンシンターゼ遺伝子プロモーター配列の品種間比較

高柳 勉, 奥田 徹, 松土俊秀, 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

Comparison of Stilbene Synthase Gene Promoter Sequences in Grape Varieties  
Producing Different Amounts of Resveratrol

Tsutomu TAKAYANAGI, Tohru OKUDA, Toshihide MATSUDO and Koki YOKOTSUKA

The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University

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

Stilbene synthase gene promoter regions (390 bp) were cloned from grape genomes using cassette-ligation mediated polymerase chain reaction (PCR). The homology of the promoter was over 96% among 6 grape varieties (Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Semillon, Pinot noir, Koshu, and St. George), and one deletion and several point mutations were detected in their promoter sequences. Differences in the promoter sequences in 13 grape varieties were analyzed by a PCR procedure. Specific primers for the detection of a single nucleotide mutation were designed at 5 positions (I-V) of the promoter region. Gel electrophoresis analysis of PCR products amplified with the specific primers showed that nucleotides at positions I, III, and IV were the same among 10 varieties of *Vitis vinifera*, whereas nucleotides at positions I, III, and IV in St. George (*V. rupestris*) differed from those of the *V. vinifera* varieties. St. George produced over 2-fold more resveratrol than the other grape varieties by elicitor treatment using chitin-oligosaccharides. These results suggest that mutations at positions I, III, and IV in the promoter of the stilbene synthase gene are related to the resveratrol-producing ability of grapevines.

Key words: resveratrol, stilbene synthase, promoter, *Vitis*, grapes.

## 緒言

リスベラトロールは病原菌の感染によってブドウに誘導されるフィトアレキシンである。リスベラトロールは幾つかのエリシター (*Botrytis cinerea* 細胞壁 (5, 6) およびその主成分であるキチン (12), 紫外線 (1, 9), オゾン (11)) によっても誘導されることが報告されており, ブドウのストレス応答において重要な役割を持つと考えられている。ブドウ細胞におけるリスベラトロール合成の最終段階を触媒する酵素がスチルベンシンターゼで, この酵素の発現の有無がリスベラトロール合成を制御している (3, 10)。我々は, エリシターとしてキチンオリゴ糖を塗布した葉に誘導されるリスベラトロール量とスチルベンシンターゼ遺伝子の発現量を二つのブドウ品種, シャルドネ (*V. vinifera*) とセント・ジョージ (*V.*

*rupestris*) において測定し, 両品種間のリスベラトロール誘導量の差が, スチルベンシンターゼ mRNA の発現レベルに依存していることを明らかにした (12)。エリシター刺激がブドウ細胞表面の受容体に伝わり, 細胞内のシグナル伝達系を経てスチルベンシンターゼ遺伝子の発現を誘導する過程は, ブドウのストレス応答の根幹に関わる重要な機構であるが, それらに関する知見はほとんど得られていない。本研究では, スチルベンシンターゼ遺伝子のプロモーター領域の配列に着目した。遺伝子のプロモーター領域は, 細胞内シグナル伝達系の最終段階として遺伝子の発現を制御している可能性が高い。スチルベンシンターゼ遺伝子のプロモーター領域の配列をリスベラトロール合成量の異なるブドウ品種間で比較することにより, リスベラトロール合成におけるプロモーター上のキー配列を推定することを本研究の目的とした。

---

2003年4月7日受理

## 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で路地栽培されている 13 のブドウ品種、すなわち、*V. vinifera* の 10 品種（メルロー、ピノ・ノワール、ツバイゲルト・レーベ、セミヨン、カベルネ・ソービニオン、シラー、リースリング、ソービニオン・ブラン、シャルドネ、甲州）およびマスカット・ベリーA [*Muscat Hamburg* (*V. vinifera*) x *Bailey* (*V. lincecumii* x *Triumph*)], SO4 (*V. berlandieri* x *V. riparia*), セント・ジョージ (*V. rupestris*) を使用した。

### 2. キチンオリゴ糖の塗布とリスベラトロール測定

各ブドウ品種の 5 カ月齢の新梢の第 1 葉（最も葉齢の高い葉）に 25%エタノールを含む 8% (W/V) キチンオリゴ糖水溶液 (NA-COS-Y, 重合度  $n = 1 \sim 6$ , 焼津水産化学) を塗布し、その葉を 48 時間後に採取した (12)。コントロールの葉は 25%エタノール水溶液のみを塗布し、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、20,000xg で 5 分間遠心分離した。この上清を 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過した後に HPLC により分析した (7, 8)。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のピークを 300 nm の吸光度で検出し、定量した。溶媒はアセトニトリル-水-リン酸の溶媒系 (溶媒 A : 0.3%リン酸水溶液, 溶媒 B : 0.3%リン酸を含む 80%アセトニトリル水溶液) を用い、A90%→A80% (0-10分), A80%→A70% (10-30分), (A70%30-35分), A20% (35-60分), A90% (60-80分) のグラディエント条件 (流速 0.7 mL/分) で分離した。

### 3. スチルベンシンターゼ遺伝子プロモーター領域のクローニング

ブドウの葉から、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を分離した。スチルベンシンターゼ遺伝子プロモーター領域をカセットとカセットプライマーを用いたジーンウォーキング法 (Takara

LA PCR *in vitro* cloning kit) (4) によりクローニングした。すなわち、ブドウ葉から分離した DNA を各制限酵素 (*Sau3A* I, *EcoR* I, *Hind* III, *Xba* I) で切断後、スチルベンシンターゼ遺伝子に特異的プライマー-S1 (5'-CAGTCATGTGCTTAGTGACCC-3') (6) とアダプタープライマー-C1 (5'-GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTATACGACTCA-3') を用いて PCR を行った。次に、この PCR 生成物とスチルベンシンターゼ遺伝子特異的な nested プライマー-S2 (5'-CGCGAATTCGGGTAGCTGTGCCAATGG-3') と nested アダプタープライマー-C2 (5'-CGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGAGA-3') を用いて nested PCR を行った。PCR 生成物は 1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動で分画し、pUC18 DNA ベクターにサブクローニングした。クローニングした DNA の塩基配列は ALFexpress DNA Sequencer (Pharmacia) により決定した。

### 4. PCR による変異部位の解析

ブドウ 6 品種のスチルベンシンターゼ遺伝子プロモーター領域を比較し、1 塩基変異が見られたプロモーター上の 5 箇所 (I~V) について、変異特異的な sense プライマー (primer I - V, Fig. 2) を設計して PCR を行った。Antisense プライマーはスチルベンシンターゼ構造遺伝子の配列をもとに設計した共通のプライマー (5'-CAACTAAAGAGTCCAAACGATCTTCGGAA-3') を用いた (6)。PCR 反応液の組成は DNA 溶液 0.5  $\mu\text{L}$ , 10 x Universal buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 2.5 mM dNTP mixture 2.0  $\mu\text{L}$ , 変異検出用プライマー 1.0  $\mu\text{L}$  (sense と antisense 各 25 pmol), Gene Taq 0.1  $\mu\text{L}$  (0.5 unit, ニッポンジーン), 滅菌水 18.9  $\mu\text{L}$  からなり、反応条件は、94°C 5分 (94°C 1分, 64°C 1分, 72°C 1分, 35 サイクル) 72°C 10分を用いた。PCR 生成物を 1.2%アガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロミドにより染色して、バンドの有無を確認した。

## 結果と考察

### 1. リスベラトロール誘導量の品種間比較

キチンオリゴ糖を塗布したブドウ葉およびコントロール葉のリスベラトロール量をブドウ品種間で比較した (Fig. 1)。キチンオリゴ糖を塗布した葉のリ

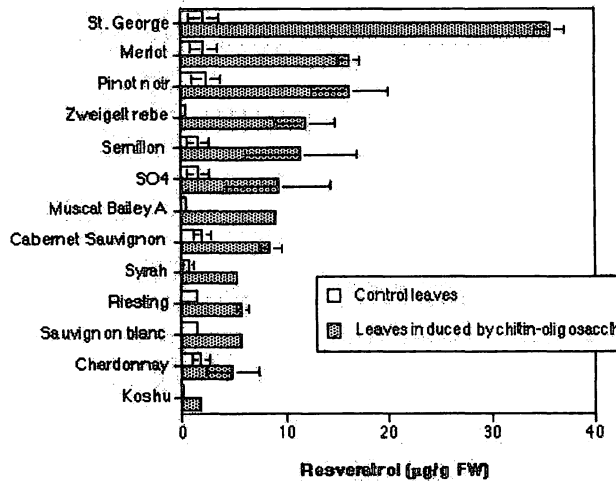


Fig. 1. Resveratrol production in leaves of 5-month-old shoots of 13 grape varieties induced by a chitin-oligosaccharide mix. An 8% chitin-oligosaccharide mix dissolved in 25% ethanol was applied to primary leaves (the most mature leaves) of 5-month-old shoots of 13 grape varieties (■). The control leaves of those varieties (□) were treated with a 25% ethanol solution. The leaves were removed 48 h after treatment and the resveratrol content was analyzed by HPLC. Data points represent the means (n = 3). No SE vertical bar is shown when the SE is less than the size of the symbol.

スベラトロール量は、セント・ジョージ (*V. rupestris*) が、他の品種に比べて顕著に大きかった。今回用いたブドウ品種は、*V. vinifera* に属するものが10品種、その他、*V. vinifera* 以外のマスカット・ベリーAやSO4も含まれているが、*V. rupestris* に属するセント・ジョージの誘導量が特に大きいことを除けば、種の違いとリスベラトロール誘導量の間特定の傾向は見られなかった。Sbaghiらは(9)、各ブドウ品種の灰色カビ病菌 (*Botrytis cinerea*) に対する抵抗性とブドウ葉におけるリスベラトロール合成量との間に高い相関関係があることを報告している。彼らは、ブドウの *B. cinerea* に対する耐病性レベルを1~4の4段階に分け4が最も高い耐病性レベルとしている。今回の実験では、耐病性レベル4のセント・ジョージ (*V. rupestris*) のリスベラトロール合成量が 33.6 µg/g fresh weight (gFW)、一方、耐病性レベル2のシャルドネはリスベラトロール合成量が 3.0 µg/gFWとセント・ジョージに比べて低くなっており、Sbaghiらの報告を支持する結果となった。キチンオリゴ糖を塗布していないコントロールの葉からも少量の

スベラトロールが検出された (Fig. 1)。本実験では、路地栽培している健全なブドウ樹を使用した。キチンオリゴ糖以外の何らかのストレス、すなわち、病原菌、紫外線、温度変化などが、ブドウ樹に抵抗性レスポンスを誘導している可能性が考えられる。

## 2. スチルベンシンターゼ遺伝子プロモーター領域の配列

シャルドネのゲノム DNA からジーンウォーキングによりクローニングしたスチルベンシンターゼ遺

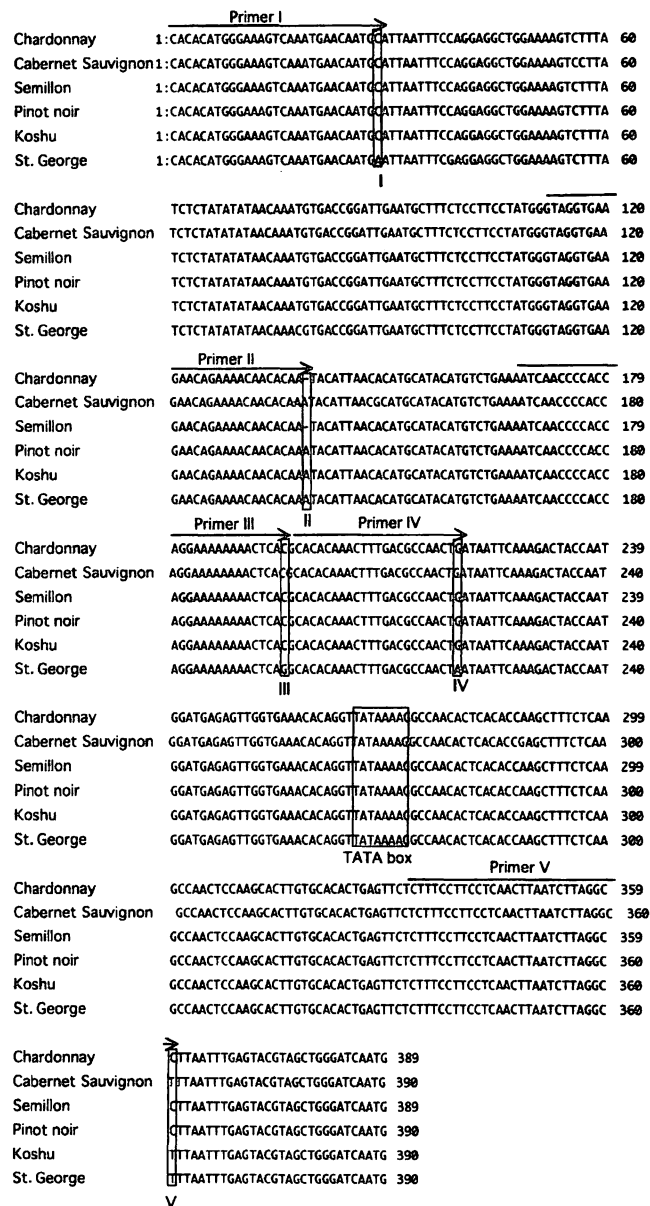


Fig. 2. Comparison of promoter nucleotide sequences of 6 grape varieties.

伝子プロモーター領域の配列を Fig. 2 に示した。シャルドネ以外の品種、すなわち、カベルネ・ソービニオン、セミヨン、ピノ・ノワール、甲州、セント・ジョージの配列は、各ブドウの葉から単離した DNA とシャルドネの配列を基に設計したプライマー (sense primer: 5'-TTCCACACATGGGAAAGTC-3' と antisense primer: 5'-TGATCCCAGCTACGTACTCA-3') を用いて PCR を行い、その PCR 生成物をサブクローニングして配列を決定した。いずれの品種においても開始コドン ATG とその上流 122 bp の位置に TATA box が確認された。各品種間の塩基配列のホモロジーは 96% 以上と高かったが、数カ所の 1 塩基変異と 1 カ所の欠失が認められた。

### 3. PCR による 1 塩基変異の検出

1 塩基変異が見られたプロモーター上の 5 箇所 (I ~ V, Fig. 2) について、変異検出用プライマーを設計した (2)。Sense primer は変異部位 (I ~ V) ごとに 3' 末端がそれぞれ A, C, G, T となるように 4 種類作成した。従って、3' 末端の塩基が一致するいずれか一つのプライマーで DNA 鎖が伸長し、増幅 DNA が得られることになる (Fig. 3)。プライマーのゲノム DNA 上の位置から計算すると、primer I は 971 bp, primer II は 871 bp, primer III は 805 bp, primer IV は 781 bp, primer V は 640 bp の DNA 鎖が増幅されるはずである。*V. vinifera* の 10 品種 (メルロー、ピノ・ノワール、ツバイゲルト・レーベ、セミヨン、カベルネ・ソービニオン、シラー、リースリング、ソービニオン・ブラン、シャルドネ、甲州)、マスカット・ベリー A [*Muscat Hamburg* (*V. vinifera*) x *Bailey* (*V. lincecumii* x *Triumph*)], SO4 (*V. berlandieri* x *V. riparia*)、セント・ジョージ (*V. rupestris*) について 1 塩基変異の有無を確認した (Table 1)。分析した全ての品種の変異部位 I ~ V の 5 カ所において、3' 末端が A, C, G, T のいずれか一つのプライマーから DNA の増幅産物が得られた。得られた増幅 DNA の鎖長は理論的に推測される長さとも一致した。変異部位 I, III, IV の塩基が *V. vinifera* の 10 品種、マスカ

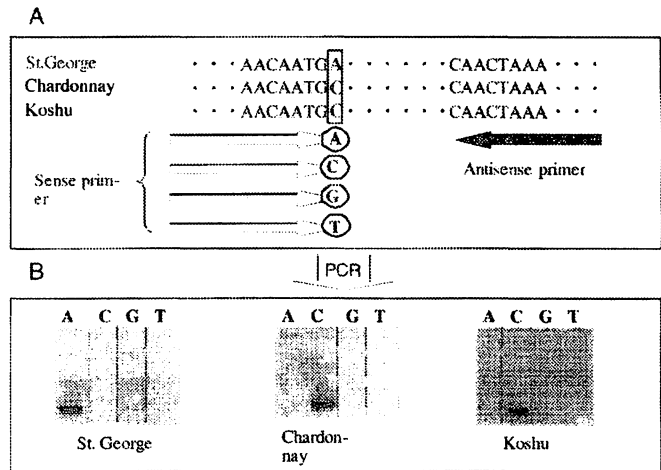


Fig. 3. Schematic representation of PCR strategy for detecting a single nucleotide mutation. A, design of specific primers for detecting a single nucleotide mutation. B, agarose gel analysis showing the expected PCR outcome using specific primers containing A, C, G, T nucleotides at the 3' end, respectively.

ット・ベリー A, SO4 においてすべて同一であったのに対して、セント・ジョージ (*V. rupestris*) の I, III, IV の塩基は、分析した他のブドウ品種と異なっていた。葉にキチンオリゴ糖を塗布して誘導されるリスベラトロール量を品種間で比較すると、セント・ジョージのリスベラトロール誘導量が最も大きく、他の品種に比べて 2 倍以上であった。リスベラトロール誘導量は、リスベラトロール合成のキー酵素であるスチルベンシンターゼの遺伝子発現量に依存すると考えられることから (12)、プロモーター領域のこの微小な変異 (1 塩基変異) がリスベラトロールの誘導量に影響している可能性が高いと推測された。セント・ジョージの変異部位 I, III, IV に見られた

Table 1. Comparison of base in positions (I-V) in the promoter region of the stilbene synthase gene among 13 grape varieties.

Mutation position	I	II	III	IV	V
<i>V. rupestris</i>	A	A	G	A	T
Merlot	C	A	C	G	T
Pinot noir	C	A	C	G	T
Zweigelt rebe	C	A	C	G	T
Semillon	C	-	C	G	C
SO4 ( <i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i> )	C	A	C	G	T
Muscat Bailey A (Bailey x Muscat Hamburg)	C	A	C	G	T
Cabernet Sauvignon	C	A	C	G	T
Syrah	C	A	C	G	T
Riesling	C	A	C	G	T
Sauvignon blanc	C	A	C	G	T
Chardonnay	C	-	C	G	C
Koshu	C	A	C	G	T

特徴的な配列が、リスベラトロール誘導量を規定するキー配列であるか否かを明確にするためには、今後、レポータージーンを用いたプロモーター評価などの直接的な証明実験が必要になると考えられる。

セント・ジョージ以外の 12 品種においては、変異部位 I~V における大きな違いは見いだせなかった。しかし、これら 12 品種においても、リスベラトロール量は品種間で異なっており、さらに上流域のプロモーターを解析することにより、DNA 配列とリスベラトロール誘導量との関係について新たな知見が得られる可能性がある。将来、リスベラトロール誘導量を規定する DNA 上のキー配列が明らかになれば、この塩基配列を基にした DNA マーカーの作成が可能となり、クローン選抜あるいは交配育種におけるブドウ品種の選抜効率を飛躍的に向上することができると期待される。

### 要 約

ブドウ 13 品種のリスベラトロール誘導量を測定するとともに、その合成酵素であるスチルベンシンターゼの遺伝子プロモーター領域 (390 bp) 配列を決定し、その塩基配列とリスベラトロール誘導量との関係を検討した。スチルベンシンターゼプロモーター領域をカセットと PCR を用いたジーンウォーキングによりクローニングした。6 ブドウ品種のプロモーター領域の塩基配列は相互に 96%以上のホモロジーを示したが、1 カ所の欠失と数カ所の 1 塩基変異が見られた。1 塩基変異を特異的に検出するプライマーを 5 種類 (I -V) 設計し、13 のブドウ品種について 1 塩基変異の有無を測定した。変異部位 I, III, IV において *Vitis vinifera* の 10 品種はすべて同じ塩基であったのに対して、セント・ジョージ (*V. rupestris*) の塩基は異なっていた。セント・ジョージは、キチンオリゴ糖を用いたエリクター処理によって、他のブドウ品種に比べて 2 倍以上のリスベラトロールを誘導することから、この 1 塩基変異がリスベラトロール生産能と関連している可能性が示唆された。

### 文 献

1. Bais, A. J., P. J. Murphy, and I. B. Dry. The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 425-433 (2000).
2. Drenkard, E., et al. A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphisms facilitates map-based cloning in Arabidopsis. *Plant Physiol* 124: 1483-1492 (2000).
3. Hain, R., et al. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361: 153-156 (1993).
4. Isegawa, Y., J. Sheng, Y. Sokawa, K. Yamanishi, O. Nakagomi, and S. Ueda. Selective amplification of cDNA sequence from total RNA by cassette-ligation mediated polymerase chain reaction (PCR): application to sequencing 6.5 kb genome segment of hantavirus strain B-1. *Mol Cell Probes* 6: 467-475 (1992).
5. 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).
6. 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).
7. 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).
8. 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).
9. 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).

10. 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).
11. Schubert, R., R. Fischer, R. Hain, P. H. Schreier, G. Bahnweg, D. Ernst, and H. Sandermann, Jr. An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. *Plant Mol Biol* 34: 417-426 (1997).
12. 高柳 勉, 奥田 徹, 松土俊秀, 横塚弘毅. 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. *J. ASEV Jpn.* 13: 113-117 (2002).