

# ブドウスティルベンシンターゼ遺伝子導入による カラタチ形質転換体の作出とその特性

栗原実・能塚一徳・小林省蔵<sup>1)</sup>・鶴丈和<sup>2)</sup>  
(果樹苗木分場)

カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターの調節下に連結した *Vitis labrusca* cv. Concord 由来のスティルベンシンターゼ遺伝子をアグロバクテリウム法によりカラタチ (*Poncirus trifoliata* Raf.) へ導入した。導入された遺伝子は PCR で検出し、77 個体が形質転換体であることを確認した。これらの形質転換体からはスティルベンシンターゼの代謝産物であるレスベラトロールは検出されなかった。しかし、多くの個体はレスベラトロールの配糖体である、抗菌活性を示さないピセイドを産生した。これは、スティルベンシンターゼにより合成されたレスベラトロールが、カラタチの内生グリコシルトランスフェラーゼにより配糖体に変換されたものと推定された。これらのことから、得られた形質転換カラタチの病害抵抗性は、向上している可能性が低いことが示唆された。

[キーワード: カラタチ, 形質転換, スティルベンシンターゼ, レスベラトロール, ピセイド]

Genetic Transformation in Trifoliolate Orange (*Poncirus trifoliata* Raf.) by Introducing the *Vitis* Stilbene Synthase Gene. KUWAHARA Minoru, Kazunori NOTSUKA, Syozo KOBAYASHI<sup>1)</sup> and Takekazu TSURU (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818 - 8549, Japan,<sup>1)</sup> Persimmon and Grape Research Center, National Institute of Fruit Tree Science, Akitsu, Hiroshima 729 - 2494, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 20 : 75 - 78 (2001)

A stilbene synthase gene of the *Vitis labrusca* cv. Concord was placed under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and introduced into the trifoliolate orange by the *Agrobacterium* - mediated gene transfer.

Seventy - seven transformants were obtained, and the integration of the gene into the plant genome was confirmed by PCR. The transformants did not produce the resveratrol, but produced the piceid (resveratrol - glucoside). It was assumed that the resveratrol synthesized by the action of the integrated gene was converted into the piceid by an endogenous glycosyltransferase of the trifoliolate orange. This would indicate that the possibility of improved disease resistance of the obtained transformed trifoliolate orange is small.

[keyword : trifoliolate orange, genetic transformation, stilbene synthase, resveratrol, piceid]

## 緒 言

現在、我が国のほとんどのカンキツ類の台木は、優秀性および均質性からカラタチ (*Poncirus trifoliata* Raf.) が利用されている。しかし、カラタチは細菌病のカンキツかいよう病や、カンキツ疫病およびカンキツ白紋羽病などの糸状菌病に弱く、加えて育苗圃では超密植で栽培するためこれらの病害に感染しやすく、感染した場合は大きな被害を被る。したがって、その台木としての特性は維持したまま病害抵抗性を強化した品種の育成が苗木生産現場から強く望まれている。

形質転換技術の開発・改良により植物の病害抵抗性品種の育成が可能となり、多数の作物で病害抵抗性が強化されている。しかし、カラタチの形質転換においては、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子<sup>7)</sup>、わい化遺伝子<sup>8)</sup> やヒトの上皮細胞成長因子<sup>9)</sup> を導入しその特性を調査した報告はあるが、病害抵抗性を付与するために外来遺伝子を導入した事例はキチナーゼ遺伝子<sup>10)</sup> の一例しかなく、しかもまだ病害抵抗性の強化は確認されていない。

糸状菌抵抗性植物の獲得には、宿主植物側の真性抵抗

性遺伝子 (R gene) や、キチナーゼ、グルカナーゼなどの感染特異的タンパク質合成遺伝子あるいはファイトアレキシン合成酵素遺伝子の導入が有効である<sup>11)</sup>。近年、ファイトアレキシンの一つである、レスベラトロール (*trans* - 3, 5, 4' - trihydroxystilbene) を合成するスティルベンシンターゼ遺伝子がブドウから単離され、構造が解析された<sup>3)</sup>。そして、このスティルベンシンターゼ遺伝子が自身のプロモーターとともにタバコ<sup>45)</sup>、オオムギ<sup>12)</sup>、イネ<sup>16)</sup> 等に導入された結果、同酵素遺伝子が発現し、形質転換体は灰色かび病菌あるいはイネいもち病菌に対し抵抗性を示している。しかしながら一方では、CaMV35S プロモーターと連結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もレスベラトロールが検出されず病害抵抗性は得られないという報告<sup>10)</sup> もあり、これがプロモーターによる影響なのか、それとも他の要因によるものなのか明らかでない。

これまでの研究事例の多くは、病害抵抗性遺伝子を発現させるためのプロモーターとして、CaMV35S プロモーターの様なあらゆる遺伝子を高発現させることができる構成的発現を示すものが用いられている<sup>19)</sup>。さらに、CaMV35S プロモーターはカラタチの各組織で導入遺伝子を強く発現させる<sup>18)</sup> ことが報告されており、病害抵抗性遺伝子を発現させるためのプロモーターとして適

1) 農林水産省果樹試験場カキ・ブドウ支場  
2) 現南筑後地域農業改良普及センター

性を備えている。そこで、ブドウのスティルベンシターゼ遺伝子をCaMV35Sプロモーターの調節下に連結してカラタチに導入し、形質転換体を獲得してその特性を調査したので報告する。

## 材料および方法

### 1 供試材料

(1) 植物材料カラタチの種子をはく皮し、1%塩素濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間滅菌後、Murashige and Skoog (MS) 培地<sup>14)</sup>に無菌播種して、25℃、暗黒条件下で約30日間培養した。発芽した実生の腋芽を除いた上胚軸を約0.5~1cmに切断し、形質転換体作出の材料として用いた。

(2) 導入遺伝子およびアグロバクテリウム Kobayashiら<sup>10)</sup>が *Vitis labrusca* cv. Concordからスティルベンシターゼ遺伝子を単離して(SSlab), pBI121のGUS遺伝子部分へ挿入したpBSLABプラスミドをもつ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404を形質転換に用いた。

### 2 形質転換

形質転換はKaneyoshiら<sup>7)</sup>の方法に準じたアグロバクテリウム法で行い、カナマイシン抵抗性発根個体を獲得した。

### 3 PCR分析

カナマイシン抵抗性発根個体へのNPT-II遺伝子とSSlab遺伝子の導入を確認するため、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による遺伝子の検出を行った。発根個体の葉50mgを採取し、Greenwood<sup>2)</sup>らの方法あるいはNucleon PhytoPure (Amersham LIFESCIENCE社)によって全DNAを抽出した。抽出DNA0.5ngを鋳型DNAとして供試し、Kobayashi<sup>10)</sup>らの反応条件でPCRを行った。増幅遺伝子の有無とその長さはPCR液をアガロースゲル電気泳動することによって確認した。

### 4 レスベラトロール分析

レスベラトロールはJeandetら<sup>6)</sup>の方法で抽出し、Satoら<sup>15)</sup>の方法に準じて高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で定量した。*in vitro* 発根個体の葉0.1gから2・の80%メタノール(v/v)で抽出し後、10,000gで5分間遠心分離後、上清をSep-pakC18で精製してHPLCに供試した。

HPLC分析は、東ソー株式会社CCP&8010シリーズを用いて次のように行った。カラムはCAPCELL PAK C18 UG 120 S-3 $\mu$ m (SHISEIDO)、移動相は、A液に0.4%リン酸(v/v)を、B液にアセトニトリルとA液を8:2(v/v)で混合したものを用い、グラジエント(段階)で分析した。グラジエントの条件は、初期がA:B=90:10で、10分間でA:B=80:20とし、その後21分間でA:B=74:26、さらに9分間でA:B=0:100とした。その後、6分間そのまま保持し、4分間で初期に戻した。なお、流速は1.0ml/分で行った。ピークの検出はUV検出器を用いて303nmで行った。

なお、対照として、非形質転換体の普通系カラタチを同様に分析した。

また、レスベラトロール配糖体の検出と同一・定量を

Jeandetら<sup>6)</sup>とSatoら<sup>15)</sup>の方法を組み合わせで行った。配糖体のピークを分取し減圧濃縮後、pHを6.0に調整し $\beta$ -グリコシダーゼ処理(1mg/ml、アーモンド製、オリエンタル酵母工業株式会社)を行い、ピークの保持時間がレスベラトロールの保持時間に移行することを確認するとともに、レスベラトロールとその配糖体を主要成分とする虎杖根(株式会社栃本天海堂)との保持時間との比較を行った。なお、配糖体含量はJeandetら<sup>6)</sup>に準じてレスベラトロール標準直線より換算した。

## 結果

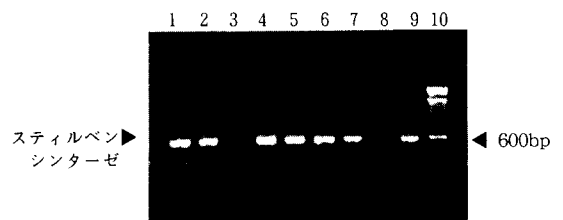
スティルベンシターゼ遺伝子のカラタチへの導入経過およびPCRによるカナマイシン抵抗性発根個体のスティルベンシターゼ遺伝子の検出結果を第1表、第1図に示した。カナマイシン抵抗性シュートは546供試切片から105個体、抵抗性発根個体はその96%にあたる101個体得られ、さらにカナマイシン抵抗性発根個体から形質の変異がなく生育が良好な83個体が選抜された。導入遺伝子の存在を確認するためにPCRを行った結果、NPT-II遺伝子は供試した83個体の全部から、スティルベンシターゼ遺伝子は供試個体の83%にあたる77個体からそれぞれ特異バンドが検出された。

形質転換で導入したスティルベンシターゼ遺伝子が発現し、酵素活性が示されれば代謝産物としてレスベラトロールが産生される。そこで、葉のレスベラトロール含量をHPLCで定量した。その結果、第2表および第2図(I)に示した通り、62供試個体数中、いずれの形質転換体からもレスベラトロールの保持時間にピークが検出されなかった。同様に非形質転換体からもレスベラトロールは検出されなかった。しかし、非形質転換体には存在しないが、形質転換体には存在するレスベラトロールとは異なるピークAが検出された。ピークAは $\beta$ -グリコシダーゼ処理によりレスベラトロールの保持時間にシフトするとともに(第2図II)、虎杖根のレスベラトロール配糖体(パイシード, 3, 4', 5-trihydroxystilbene-3- $\beta$ -mono-D-glucoside)

第1表 スティルベンシターゼ遺伝子のカラタチへの導入経過

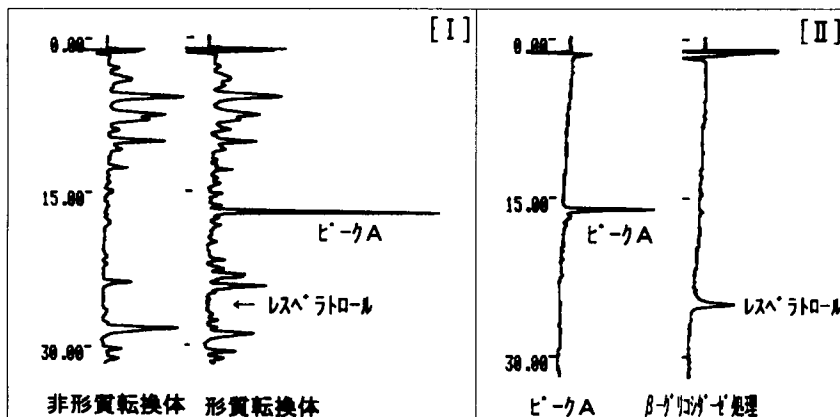
供試切片数	カナマイシン抵抗性		遺伝子検出個体数(PCR)		
	シュート数	発根個体数	供試個体数	NPT II	スティルベンシターゼ
546	105	101	83	83(100) <sup>1)</sup>	77(83)

1) ( )内は検出率%



第1図 PCRによるカナマイシン抵抗性発根個体のスティルベンシターゼ遺伝子検出

1~7: カナマイシン抵抗性発根個体  
8: 形質転換体, 9: pBSLAB  
10: 100bp ラダー



第2図 形質転換体の葉のHPLC分析結果 (I) およびβ-グリコシダーゼ処理によるパイシードの同定 (II)

第2表 形質転換体の葉におけるスティルベンシンターゼ生成産物の産生個体数

供試 個体数	産生個体数	
	レスベラトロール	パイシード
62	0	57

第3表 形質転換体の葉におけるパイシード含量の個体別分布

供試 個体数	パイシード含量の分布 (μg/g・f・w)					平均 (μg/g・f・w)
	1-10	11-100	101-200	201-500	501-	
57	4	14	27	11	1	144

のピークの保持時間も完全に一致した (データ省略)。パイシードは62供試個体中、57個体で検出された。第3表に形質転換体の葉におけるパイシード含量の個体別分布を示した。個体分布は101~200 μg/g・f・wに最も多く、その平均は144 μg/g・f・wであった。最小値は3 μg/g・f・w、最高値は557 μg/g・f・wであった。

### 考 察

カラタチにCaMV35Sプロモーターの支配下にあるスティルベンシンターゼ遺伝子を導入すると、同酵素が常時発現し代謝産物としてレスベラトロールが産生されることが想定されたが、本試験の形質転換カラタチからはレスベラトロールは検出されなかった。ブドウの *V. rupestris* では、スティルベンシンターゼにより合成されたレスベラトロールは、内生グリコシルトランスフェラーゼにより即座にその配糖体であるパイシードに変換されることが明らかとなっている<sup>6)</sup>。そのため、レスベラトロールの保持時間とは異なる大きなピークAは配糖体である可能性が考えられたのでグルコシダーゼ処理を行ったところ、ピークAはパイシードと同定された。パイシードを検出できた個体が57個体確認できたが、これらの個体は外来のファイトアレキシン遺伝子がカラタチに導入され発現していることを強く示唆するものであり、かつ初めての報告となった。さらにこれらの結果は、Kobayashiら<sup>10)</sup>のCaMV35S-スティルベンシンターゼ導入キウイフルーツの形質転換実験と一致したことから、スティルベンシンターゼ遺伝子はCaMV35Sプロモーターと連結し形質転換すると、恒常的にレスベラトロールが合成されるものの、それらが即座に転換体の内生グリコシルトランスフェラーゼにより配糖体に変換されるものと想定された。

一方、病害抵抗性の増強については、パイシードを産

生した形質転換キウイフルーツが灰色カビ病菌に対する抵抗性が付与されず、糸状菌抵抗性が獲得できていないことから、配糖体化されたパイシードにはレスベラトロールのような抗菌活性はない<sup>10)</sup>と考えられている。現在のところ、ファイトアレキシンとしての機能はレスベラトロールだけにしか認められておらず、パイシードには確認されていない。したがって、本試験では菌接種による耐病性検定は行っていないが、形質転換キウイフルーツの場合と同様に形質転換カラタチにも糸状菌抵抗性は付与されていないと考えられた。

ブドウではレスベラトロール合成能と糸状菌耐性とは強い相関があり、レスベラトロール生産量が多い品種ほど病害抵抗性が強く、菌感染後およそ30~200 μg/g・f・wのレスベラトロールを合成し糸状菌の侵入を防ぐ<sup>11,17)</sup>。今回の形質転換カラタチではスティルベンシンターゼが発現しているのは明らかであるので、パイシードへの変換がなければ、十分量のレスベラトロールが蓄積されることが予想され、病害抵抗性を付与できる可能性は高い。また、病害抵抗性が高まったタバコの形質転換体<sup>4,5)</sup>では、プロモーターにスティルベンシンターゼ遺伝子自身のプロモーターを使っているため、菌感染時にのみレスベラトロールが産生され抗菌作用を示し抵抗性が高まったと報告している。そのため、今後は、*V. labrusca*よりスティルベンシンターゼ遺伝子自身のプロモーターを単離し、再度感染特異的発現型のベクターを構築し直して形質転換体を作成すれば、カラタチに病害抵抗性が付与されることが期待される。

なお、本研究は平成8年度農林水産省依頼研究員として農林水産省果樹試験場カキ・ブドウ支場で一部実施したものである。研究の遂行にあたり、協力していただいた関係各位に深くお礼申し上げる。

## 引用文献

- 1) CORNELISSEN, B. J. and L. S. MELCHERS (1993) Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. *Plant Physiol.* **101**: 709-712.
- 2) GREENWOOD, M. S., C. A. HOPPER and K.W. HUTCHISON (1989) Maturation in Larch. I. Effect of Age on shoot growth, foliar characteristics, and DNA methylation. *Plant Physiol.* **90**: 406 - 412.
- 3) HAIN, R. P. STABEL, A. P. CZERNILOFSKY, H. H. STEINBIß, L. HERRERA - ESTRELLA and J. SCHELL (1985) Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene by plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 161 - 168.
- 4) HAIN, R., B. BIESELER, H. KINDL, G. SCHRODER and R. STOCKER (1990) Expression of stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of phytoalexin resveratrol. *Plant Mol. Biol.* **15**: 325 - 335.
- 5) 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 (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*. **361**: 153 - 156.
- 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) KANEYOSHI, J., S. KOBAYASHI, Y. NAKAMURA, N. SHIGEMOTO and Y. DOI (1994) A Simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Plant Cell Rep.* **13**: 541 - 545.
- 8) KANEYOSHI, J. and S. KOBAYASHI (1999) Characteristics of transgenic trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.) possessing the rolC gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **68** (4): 734 - 738.
- 9) KOBAYASHI, S., Y. NAKAMURA, J. KANEYOSHI, H. HIGO and K. HIGO (1996) Transformation of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) and trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) with a synthetic gene encoding the human epidermal growth factor (hEGF). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **64** (4): 763 - 769.
- 10) 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 (resveratrolglucoside). *Plant Cell Rep.* **19**: 904 - 910.
- 11) LANGCAKE, P. and W. V. MCCARTHY (1979) The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*. **18**: 244 - 253.
- 12) LECKBAND, G. and H. LORZ (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.
- 13) 松本亮司 (2000) 組換え台木利用によるカンキツの安全性向上技術の開発. 組換え体の実用化のための安全性確保に関する研究 (農林水産技術会議事務局): 59 - 61.
- 14) MURASHIGE, T. and F. SKOOG (1962) A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473 - 479.
- 15) SATO, M., Y. SUZUKI, T. OKUDA and K. YOKOTSUKA (1997) Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. *Biosci. Biotech. biochem.* **61** (1): 1800 - 1805.
- 16) STARK - LORENZEN, P., B. NEIKE, G. HANBLER, H. P. MUHLBACH and J.E. THOMZIK (1997) Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* **16**: 668 - 673.
- 17) STEIN, U and R. BLAICH (1985) Untersuchungen über Stilbenproduktion und Botrytisfalligkeit bei *Vitis* - Arten. *Vitis*. **24**: 75 - 87.
- 18) 上野敬一郎・東明弘・宇垣正志・市川裕章・大島正弘・大橋祐子 (1993) カラタチ形質転換における形質発現. *育学雑* **43** (別2): 34
- 19) 吉田和哉・浅尾浩史・庄司猛・新名惇彦 (1995) 植物における外来遺伝子発現システムの構築を考えたプロモーター解析. *植組培* **12** (3): 243 - 249.