

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07289

研究課題名(和文) 葉緑体全ゲノム比較によるワサビ品種の系譜構築とDNAバーコーディング

研究課題名(英文) Analysis of pedigree record of wasabi cultivars and construction of DNA barcoding based on the comparison of whole chloroplast genome sequences

研究代表者

山根 京子 (YAMANE, Kyoko)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：00405359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：サンガー法を用いて、世界で初めてワサビ属植物6系統の葉緑体全ゲノム配列の解読に成功した。主要品種‘ふじだるま’と‘島根3号’の全葉緑体ゲノム配列約150 kbには二か所のみで多型がみられ、全ゲノム分析の優位性が示された。また、日本のワサビ属植物234系統における約2 kbの塩基配列の比較解析の結果、現在の栽培品種の母系は主要3品種に限定され、山根が作成した品種の系譜と矛盾がないことがわかった。これらのデータを用いて、主要3品種を判別するPCR-RFLPおよびマルチプレックスPCRマーカーを開発し、バンド判別のみで3品種を判別するDNAマーカーの作成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Using Sanger's method, we successfully sequenced the whole chloroplast genome of 6 wasabi accessions for the first time in the world. There were only two polymorphic sites at complete chloroplast sequences of 150kb among “Fujidaruma” and “Simane-3 go”. It showed the superiority for the whole chloroplast genome analysis. The present results of comparative study for 234 accessions of wasabi in Japan showed that only three types of maternal germplasm were detected in wasabi cultivars. It does not contradict the results. In this study, we developed DNA markers for discriminating type of three major wasabi cultivars.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：wasabi chloroplast genome sequence DNA marker cultivar genotyping

1. 研究開始当初の背景

・ワサビ品種の成立背景 主要3品種が品種改良母体とされてきた

ワサビは日本で栽培化された栽培植物であり、和食に欠かせない食材である。現在のような肥大した根茎を持つワサビの栽培の歴史は、イネやムギなどと比べると浅く、慶長年間以降とされている。寿司などの新しい食文化の浸透とともにワサビの薬味としての利用は一気に日本中に広がった。江戸後期以降、全国で自生ワサビを利用した在来品種が育成され、昭和初期になると、本格的な栽培品種も誕生する。申請者は、聞き取りや文献調査をもとに、ワサビ品種の系譜を作成した。その結果、ワサビの品種改良においては、3大品種「島根3号」「真妻」「ふじだるま」が主な育種母体として利用されてきた歴史的背景が明らかとなった。

・品種の系譜を裏付ける DNA 情報は皆無である

ワサビでは遺伝学的な研究は皆無であった。そのため、品種間の遺伝的な違いや多様性の程度などの情報も存在せず、品種改良も経験と勘に基づいて行われてきた。そのため、聞き取りなどで作成した系譜も、「種子親(または花粉親)はどちらか」、「品種間の遺伝的分化の程度は?」さらに「伝聞とおり交雑由来なのか」等の基本的かつ重要な情報が欠けたままとなっていた。

2. 研究の目的

葉緑体 DNA は植物の DNA バーコーディングに用いられてきた。一方ワサビでは近年、在来品種をブランド化し、特産物として販売を目指す動きが活発化している。しかしながらワサビは、形態による品種判別が困難であり、また DNA 情報がほとんど存在しないため、品種保証ができないという問題を抱えていた。より簡便な DNA マーカーが望まれるなか、本研究では、世界初となるワサビの全葉緑体ゲノム比較配列情報に基づく品種の系譜を構築し、品種保証用のバーコーディング情報を整備することを目的とした。これらの情報を用いて『育種の効率化』と『品種保証』をはかり、最終的には、日本原産ブランド野菜として世界展開を目指す。

3. 研究の方法

日本のワサビ属植物の遺伝的多様性をカバーするように事前検討データから選んだ系統の全葉緑体ゲノム配列を決定する。本研究では、サンガー法を用いる。プライマーは、次世代シーケンサーで解読した標準系統「ふじだるま」の全葉緑体ゲノム配列情報(全長 153852bp)をもとに、断片増幅用 Long PCR 用プライマー20セットと配列決定用プライマー370個を構築した。全長を Long PCR 法で効率よく増幅し、ABI キャピラリーシーケンサーを用いた直接塩基配列決定法によ

り解読する。また、事前の予備実験で多型多く得られた3遺伝子間領域[B: *trnP-psaJ*, D: *trnS-trnG*, H: *rpl32-trnL*]全長約2kbを直接塩基配列法で決定し、全国各地から山根が採集した数百系統の系統解析も行う。得られた塩基配列情報をもとに、日本のワサビ属植物の進化を考察し、ワサビ品種の系譜を再構築する。また、得られた品種ごとの配列多型データを、PCR法と電気泳動のみで品種が判別できるよう、DNA バーコーディング化する。

4. 研究成果

・葉緑体全ゲノム解読

「ふじだるま」の全葉緑体配列情報をもとに GenomeVx でサークルマップを作成した(図1)。

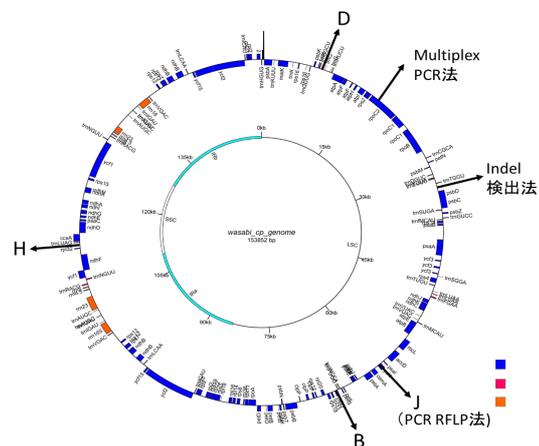


図1. 「ふじだるま」の葉緑体模式図. 内側の円は葉緑体の4領域である Large single copy (LSC), Small single copy (SSC), Inverted repeat a (IRa), Inverted repeat b (IRb) を示す。外側の円は遺伝子名と転写の向きを示す。矢印は本研究で解読した部分配列 (B, D, H, 領域) を示す。

すでに公開されているダイコンやアブラナ属植物の全葉緑体ゲノム配列と比較し、遺伝子の並びと数が完全に一致することを確認した。

サンガー法により、ワサビ5系統「島根3号」、「真妻」、石川県在来、北海道自生、高知県栽培)およびユリワサビ1系統(岐阜県自生)の全葉緑体ゲノムを解読した。これらと比較解析した結果、以下のとおり明らかとなった。事前の予備的な実験の結果、部分配列比較の結果、配列が完全一致していたため単一母系由来が示唆されていた「ふじだるま」と「島根3号」は、今回の全ゲノム比較の結果、全葉緑体ゲノム中二か所のみで多型がみられ、同一個体由来ではないこと、比較的地理的に近い場所に自生していたワサビが用いられたことがわかった。70年以上新しい品種が導入されていないことがわかっていて高知県の栽培系統は「ふじだるま」と

完全に一致していた。このことから、‘だるま系’品種が静岡県で育成されてから現在まで、多品種の母系親として長期間利用されてきたことが明らかとなった。石川県在来と‘真妻’‘ふじだるま’は配列が明らかに異なっていたことから、現在の栽培ワサビ系統は4系統存在し、少なくとも3回以上独立して起源した可能性があることがわかった。石川県在来が現地で保全されている白山地域では、ワサビは古くから薬草として利用されてきた伝承記録がある。肥大した根茎は選抜の結果であると考えられるものの、静岡県で生じた現在のような薬味としての利用のための栽培化とは異なる目的で行われていた可能性が高い。さらに、中国の *Eutrema* 属 3 種を加えた葉緑体全ゲノムによる分岐年代の推定を行った結果、日本の *Eutrema* 属植物と中国の *E. yunnanense* の分岐年代は 332 万年前と推定された (図 2)。

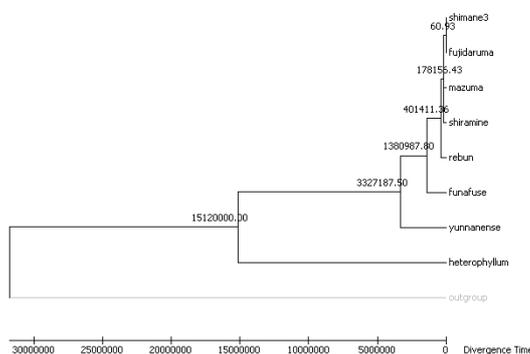


図 2. Tamura et al (2011) の方法に従い得られた日本のワサビ属植物の最尤法系統樹と各枝の分岐年代。外群は *E. salsugineum*、ギャップは使用しない、使用する配列は非コード領域であるとそれぞれ設定し GTR モデルにより解析を行った。*E. heterophyllum* の 1512 万年前を基準分岐年代に設定した。枝の基部の数字は分岐年代を示した。

日本列島の成立は、プレートの移動や地殻変動により影響を受け、さらに第四紀の氷河期の海面変化による大陸との複数回の陸橋により、現在の植物分布が形作られたことがわかっている。岐阜県のユリワサビ集団が大陸の *E. yunnanense* に最も近縁であったという結果は、日本のワサビ属植物は、日本列島が形成された後も朝鮮半島を通じて大陸との遺伝的交流が可能であったことを示している。なぜ、現在の日本列島において北方系のワサビと朝鮮半島経由で伝播したと考えられるユリワサビが、交雑稔性を保ちながら現在のような多様性を維持しているのか、複数系統を用いたネットワーク解析により考察した。

・葉緑体 DNA 部分塩基配列を利用したネットワークおよび Structure 解析

供試した日本のワサビ属植物全 234 系統は 105 のハプロタイプに分類された。このうち単独でハプロタイプを形成したのは 82 系統であった。現時点で、これらは、ジェノタイピングができる系統となり、効率よくバーコーディングができたといえる。さらにこれらを用いてネットワーク推定を行ったところ、種間の明確な分化はみられず、形態による分類とは異なる結果となった。さらに STRUCTURE 解析で得られた 4 つのクラスタの地理的分布は、日本列島の中央部 (近畿地方 - 東北北部) で遺伝的多様性が高い傾向があることを示した。以上の結果は、日本列島において氷河期と間氷期が繰り返されるなか、祖先が異なるユリワサビとワサビがレフュジア (待避地) への待避やその後の分布拡大、さらにその過程で生じた種間の浸透交雑や、近年の人為的分布拡散など、極めて複雑な進化的過程を経たことに起因すると考えられた。

・栽培品種における簡易 DNA マーカー開発

今回用いた葉緑体 DNA 非コード領域は、推定上の野生集団を効率よくジェノタイピングすることを可能にした。その一方で栽培品種 (またはその逸脱) 58 系統は主要 3 品種を含む 3 ハプロタイプに分類され、日本のワサビ品種の母系は 3 系統由来であることが示唆された。この結果は聞き取りなどにより作成された品種の系譜と矛盾しない。そこで今回、三大品種の母系系統の判別が可能な簡易マーカーの開発を試みたところ、PCR と電気泳動によるバンド判別のみで区別できるシステムの構築に成功した (図 3)。

(a) だるま系栽培品種を区別する多型

```

      10      20      30      40      50
funafuse_Y TATATGGAAA TTCGAGGTCA AGGGGCTATT CCTTTAATTC GACTGATGA
rebut_W    TATATGGAAA TTCGAGGTCA AGGGGCTATT CCTTTAATTC GACTGATGA
shiramine_W TATATGGAAA TTCGAGGTCA AGGGGCTATT CCTTTAATTC GACTGATGA
mazuma_W   TATATGGAAA TTCGAGGTCA AGGGGCTATT CCTTTAATTC GACTGATGA
shimane3_W TATATGGAAA TTCGAGGTCA AGGGGATATT CCTTTAATTC GACTGATGA
fujidaruma_W TATATGGAAA TTCGAGGTCA AGGGGATATT CCTTTAATTC GACTGATGA

```

(b) 島根 3 号系を区別する多型

```

      10      20      30      40      50
funafuse_Y ATGGATCTAG ATTAAAAAATT CTTCGGTTTT CATCGATTAA ATAAGAGTTA
rebut_W    ATGGATCTAG ATTAAAAAATT CTTCGGTTTT CATCGATTAA ATAAGAGTTA
shiramine_W ATGGATCTAG ATTAAAAAATT CTTCGGTTTT CATCGATTAA ATAAGAGTTA
mazuma_W   ATGGATCTAG ATTAAAAAATT CTTCGGTTTT CATCGATTAA ATAAGAGTTA
shimane3_W ATGGATCTAG ATTAAAAAATT CTTCGGTTTT CATCGATTAA ATAAGAGTTA
fujidaruma_W ATGGATCTAG ATTAAAAAATT CTTCGGTTTT CATCGATTAA ATAAGAGTTA

```

(c) 真妻系を区別する多型

```

      10      20      30      40      50
funafuse_Y CTAATAATAA CTAATAATAA ----- AGTTAGAGAG TAATTTAGCA
rebut_W    CTAATAATAA CTAATAATAA ----- AGTTAGAGAG TAATTTAGCA
shiramine_W CTAATAATAA CTAATAATAA ----- AGTTAGAGAG TAATTTAGCA
mazuma_W   CTAATAATAA CTAATAATAA ----- AGTTAGAGAG TAATTTAGCA
shimane3_W CTAATAATAA CTAATAATAA ----- AGTTAGAGAG TAATTTAGCA
fujidaruma_W CTAATAATAA CTAATAATAA ----- AGTTAGAGAG TAATTTAGCA

```

(c) 真妻系を区別する多型

図 3. 三大品種を区別する多型サイト。

図 3. 三大品種を区別する多型サイト。

主要三大品種の選抜種は形態による判別が難しく、これまで種子親の判定や品種保証が困難であった。本研究では、‘だるま系’栽培品種を判別する PCR-RFLP 法、‘島

根3号'を判別する Multiplex PCR 法(図4), '真妻'を判別する Multiplex PCR 法を組み合わせることで,ワサビ主要三大品種の判別がバンド判定で可能になった。

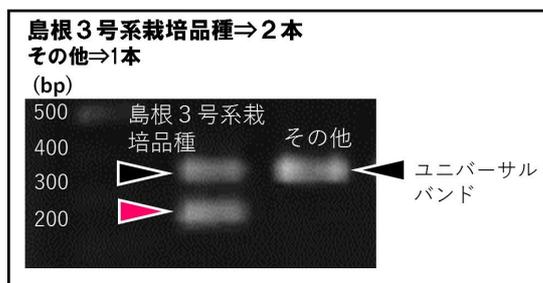


図4. 島根3号を判別するマルチプレックスPCRの電気泳動結果.今回構築したDNAマーカーの一例。

今回,複数の葉緑体全ゲノム約153kbを解読し,比較解析することにより,各品種の母系系統の判別が可能な簡易マーカーを開発することができた。本研究で得られたジェノタイピング結果や母系判別マーカーは,新たな品種育成や産地保証,保全策の策定など,幅広い分野での応用が期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

査読あり

1. 山根京子, 小林恵子, 清水祐美. 日本の若者におけるワサビと辛味の嗜好性に関するアンケート調査結果. 園芸学研究. 17: 219-229. 2018.
2. Yamane, K. and Kawahara T. Size homoplasy and mutational behavior of chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs) inferred from intra- and interspecific variations in four chloroplast regions of diploid and polyploid *Triticum* and *Aegilops* species. Genetic resources and crop evolution. 65: 727-743. 2018.
3. Tanno, K., Takeuchi, A., Akahori, E., Kobayashi, K., Kawahara, T., Yamane, K. Multiplex PCR effectively identifies tetraploid *Triticum* AABB- or AAGG-genome species. Plant Genetic Resources. 16: 279-283. 2017.
4. Ohta, A., Yamane, K., Kawahara, T.: Relationship between spike morphology and habitat of four *Aegilops* species of section Sitopsis. Genet. Resour. Crop. Evol. 64: 889-899. 2017.
5. Yamane, K., Sugiyama, Y., Lu, Y. X., Lü, N., Tanno, K., Kimura, E., and Yamaguchi, H.: Genetic differentiation, molecular phylogenetic analysis and ethnobotanical study of *Eutrema japonicum* and *E. tenue* in Japan and *E. yunnanense* in China. Hort. J. 85: 46-54, 2016.

査読なし

6. 山根京子: 食物史からみた山葵. 山葵連合会報. 第56号 12~23頁 2018.
7. 山根京子: 罰としてのワサビ. 山根京子 山葵連合会報 第55号 24~29頁 2017.
8. 山根京子: ワサビの嗜好および食味調査~もっとワサビを食べようプロジェクト 2015~. 山葵連合会報 54: 12-23, 2016.

[学会発表](計5件)

1. 小林恵子, 清水祐美, 山根京子: 日本の若者におけるワサビと辛味の嗜好性に関するアンケート調査結果. 第25育種学会中部地区談話会要旨 19, 2017(静岡).
2. 山口博志, 三柴啓一郎, 高島茂雄, 馬場富二男, 山根京子: 日本のワサビ属植物の染色体数. 第25回育種学会中部地区談話会要旨 18, 2017(静岡).
3. 山根京子, 道木菜那, 高野知之, 小林恵子, 小林正明, 矢野健太郎: 葉緑体全ゲノム比較によるワサビの進化系譜の構築. 日本育種学会第129回大会要旨 p. 168. 2017(名古屋大学)(学会記者発表課題に選出. プレスリリース, 報道多数)
4. 道木菜那, 小林恵子, 山根京子: ワサビ品種間における葉緑体全ゲノム比較. 第24回育種学会中部地区談話会要旨 p. 20, 2016(三重).(優秀ポスター発表賞)
5. 山口博志, 山根京子: ワサビ品種識別のためのDNAマーカー開発. 第24回育種学会中部地区談話会要旨 19, 2016(三重).(ポスター発表).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

岐阜大学応用生物科学部生物生産環境科学課程植物遺伝育種学研究室ホームページ  
<https://www1.gifu-u.ac.jp/~kyamane/wasabiRes3.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山根 京子 (YAMANE, Kyoko)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号: 00405359

(2) 研究分担者

矢野 健太郎 (YANO, Kentaro)

明治大学・農学部・教授

研究者番号: 00446543

(3) 連携研究者

(4)研究協力者 なし  
なし

以上