

令和元年8月30日現在

機関番号：25406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18652

研究課題名(和文)四倍体欧米雑種ブドウの果皮色に関わる遺伝子座の探索

研究課題名(英文) Investigation of genetic locus associated with skin color in *Vitis vinifera* x *V. labruscana* tetraploid grapes

研究代表者

藤田 景子 (Fujita, Keiko)

県立広島大学・生命環境学部・助教

研究者番号：50467726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：国内で栽培されている四倍体欧米雑種ブドウ‘ピオーネ’ (黒色果皮)とその枝変わり(突然変異)‘赤いピオーネ(あかり)’ (赤色果皮)を遺伝子レベルで比較することで、色が変わった原因を明らかにし、果皮色に関する遺伝子の単離を目的とした。両品種をSSRマーカーで識別を試みたができなかった。また、果皮色決定に関わるMYB様転写因子遺伝子の塩基配列とMYBハプロタイプを比較したが違いはなかった。一方、レトロトランスポゾンの外向きプライマーを用いたIRAP解析では違いがあった。両品種におけるVINE1やGret1のレトロトランスポゾンの挿入位置の解析データから、両品種間で数が所違があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに、ブドウのMYB遺伝子座が果皮色へ大きな影響を与えることが報告されてきた。しかし、今回、‘ピオーネ’と‘赤いピオーネ’の比較において果皮色の变化はこれまでに報告されていない遺伝子座が起因していることを示すことができた。この成果により、ブドウ果皮色の新たな決定機構の発見につながると考えられた。また、両品種ではレトロトランスポゾンの挿入位置の違いを明らかにした。この成果は、新品種作出に役立つ新規の遺伝子マーカーの開発の基礎データとして貢献するだろう。

研究成果の概要(英文)：Red-skinned tetraploid grape 'Akari' is thought to be a red-skinned mutation of black-skinned tetraploid grape 'Pione'. Their genomes were compared to determine the genetic locus associated with berry skin color. Simple sequence repeats (SSRs) as DNA markers showed monomorphic band patterns in both 'Akari' and 'Pione'. The MYB haplotype composition of 'Akari' was the same as that of 'Pione', and Myb-related gene sequences in 'Akari' were not unique. These findings suggested that a novel genetic locus associated with berry skin color exists. Then, 'Akari' and 'Pione' were subjected to inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) analysis and polymorphic band patterns were noted. To compare the positions of retrotransposons VINE1 and Gret1 in 'Akari' and 'Pione' genomes, data of their insertion sites in tetraploid grape cultivars were obtained with an Illumina MiSeq sequencing platform. It was revealed that the insertion sites differed between 'Akari' and 'Pione'.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：ブドウ 果皮色 レトロトランスポゾン 多型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブドウは様々な国で広く栽培されており、世界で生産量が多い果物のひとつである。ブドウ果実の果皮色は様々であるが、大きく3つ(黄緑色品種、赤色、黒色品種)に分類される。国内では、主に生食としてブドウが利用されているため、果実の外観(大きさ、色、形)は非常に重要である。また、新品種の育種では、果皮色に着目した選抜を行うことも多い。国外では、主にワインの原料として利用され、ブドウの果皮色が直接ワインの品質に影響するため、果皮の着色は重要な事項である。

ブドウ果皮色は、アントシアニンと呼ばれる赤い色素の含有量とその種類の違いによって決定される。これまでの研究により、アントシアニンの生合成経路や蓄積に関与する遺伝子およびその遺伝子発現を調節する遺伝子は単離されている。さらに、ブドウ果皮色が着色する・しないは、アントシアニン生合成の鍵酵素である UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) の遺伝子の発現を調節する Myb 様転写因子がレトロトランスポゾンの挿入によって遺伝子発現するか・しないかによって決定することが明らかにされている。また、国内で多く栽培されている四倍体欧米雑種の果皮色は、MYB ハプロタイプの構成の違いが影響することが示されている。しかし、着色するブドウ品種には、黒~ピンクの様々な果皮色が存在し、また、同じ MYB ハプロタイプの品種であってもアントシアニンの含有量に差があり(例えば、'巨峰'と'ピオーネ'は同じ MYB ハプロタイプの構成だが、前者の方が高いアントシアニン含有量である)、「MYB」以外にも果皮色に関与する未知の遺伝子座が存在することが示唆されている。

2. 研究の目的

ブドウの繁殖は、優良な品種の遺伝的特性を維持するため、通常、挿し木や接ぎ木による栄養繁殖法で行われる。つまり、新たに繁殖された樹は、母樹と同じ形質・遺伝子をもつ「クローン」であると考えられる。しかし、稀に母樹とは異なる形質を示す樹が現れる。これは、自然突然変異(芽条変異)の枝を繁殖に用いたためであると考えられる(枝変わり苗の誕生)。四倍体欧米雑種の'ピオーネ'(黒色果皮)には、枝変わりによって出現した、本来の果皮色とは異なる赤い果皮の'赤いピオーネ(あかり) 'という品種や、果粒の大きさや早晩性の異なるいくつかの'ピオーネ'系統が存在し、販売されている。現在まで、'ピオーネ'の枝変わりによる新品種や系統の出現に関わる変異の原因遺伝子は明らかにされていない。そこで、我々の研究では、果皮色に関わる遺伝子を探索するために、果皮色の異なる'ピオーネ'と'赤いピオーネ(あかり)'のゲノムを比較することとした。この成果は、変異に関わった遺伝子を明らかにし、果皮色を決定するのに関わる遺伝子座の決定に貢献すると考えられた。

3. 研究の方法

(1) 'ピオーネ'および'赤いピオーネ'は平成25年に有限会社中山ぶどう園からこれらの苗木を購入し、県立広島大学実験圃場のビニールハウス内でポット栽培されている。今回、これらの葉を採取し、DNAを抽出した。

(2) 品種識別をすることができる10種類の simple sequence repeat (SSR) マーカーおよび果皮色を識別することができる3種類の SSR マーカーをもちいて'ピオーネ'および'赤いピオーネ'の多型解析による分類を試みた。

(3) 両品種から抽出されたDNAを鋳型に、MYB ハプロタイプ HapA、HapE1、HapE2 の MYB 遺伝子型をリアルタイム PCR で判定した。

(4) 両品種の MYB 様転写因子遺伝子 (*VIMYBA1-2*、*VIMYBA1-3*、*VIMYBA2*) をクローニングし、塩基配列を解読した。

(5) レトロトランスポゾン *VINE1*、*Gret1*、*V2* の配列からプライマーを設計し、それぞれのレトロトランスポゾン間を PCR で増幅し、両品種間の違いを検討した (IRAP 法)。

(6) 県立広島大学福永健二教授、高田翔太氏、岡山大学門田有希准教授は、高速シーケンサー (MiSeq) を利用して、'巨峰'を中心とした、二倍体ブドウおよび四倍体ブドウの品種および系統23種類を対象に、レトロトランスポゾン *VINE1* および *Gret1* の挿入位置の解析を行っていた。彼らから、これらのデータをいただき、'ピオーネ'と'赤いピオーネ'の間に *VINE1* あるいは *Gret1* の挿入部位に違いがあるのか、否かを検討した。

4. 研究成果

(1) 'ピオーネ'および'赤いピオーネ'の葉から抽出したDNAを鋳型とし、SSR マーカー VVS2a、VVMD5、VVMD7、VrZAG21、VrZAG47、VrZAG64、VrZAG79、VrZAG83、VVMD27、VMCNG2E2、Vvll51、VMCNG2b7.2 を用いて、PCR バンドの有無や大きさの違いを検討した。両品種ともバンドパターンやバンドサイズに違いはなかった。このことから、今回用いた SSR マーカーでは、両品種は分類できないことが分かった。

(2) MYB 様転写因子遺伝子 (*VIMYBA1-2*, *VIMYBA1-3*, *VIMYBA2*) の塩基配列をクローニングし、塩基配列を比較した。遺伝子断片の挿入・欠失のような変異はみられなかったが、数か所で 1 塩基置換の変異はみられた。しかし、2 品種だけでなく、別系統‘ピオーネ’(いずれも黒い果皮色)の塩基配列も一緒に比較したところ、‘赤いピオーネ’に特異的な配列は見られなかった。このことから、‘ピオーネ’から‘赤いピオーネ’への変異において *VIMYBA1-2*, *VIMYBA1-3*, *VIMYBA2* は無関係であることが示唆された。

(3) ‘ピオーネ’および‘赤いピオーネ’の MYB ハプロタイプの構成を検討した結果、両品種とも黒色果皮を示すハプロタイプ HapA/ HapA/HapE1/HapE2 であることが分かった(図 1)。

(4) レトロトランスポゾン *VINE1*, *Gret1*, *V2* を利用した IRAP 法の解析にて、‘ピオーネ’および‘赤いピオーネ’で PCR バンドパターンの違いを検出した。このことから、両品種間で 3 つのレトロトランスポゾンの挿入パターンが異なることが示唆された。

(5) 研究協力者から得た MiSeq を利用した *VINE1* および *Gret1* の挿入位置のデータを解析した。両品種間の *VINE1* および *Gret1* の挿入の違いは、それぞれ一カ所ずつ存在した。さらに、この挿入位置の配列からプライマーを設計し、品種に特異的なバンドの検出を試みたが、検出されなかった。

以上の結果から、‘ピオーネ’と‘赤いピオーネ’とで果皮色の違いを生じる原因は、これまで報告されている「MYB」は、無関係である可能性が示唆された。しかし、具体的に変異を生じた原因を明らかにすることはできなかった。今後、*VINE1* や *Gret1* 以外のレトロトランスポゾンの挿入の有無の解析や、IRAP 法により検出された‘赤いピオーネ’に特異的なバンドの同定、また、果皮着色期の RNA 発現の RNA-seq 解析による原因遺伝子の発見を行う予定である。

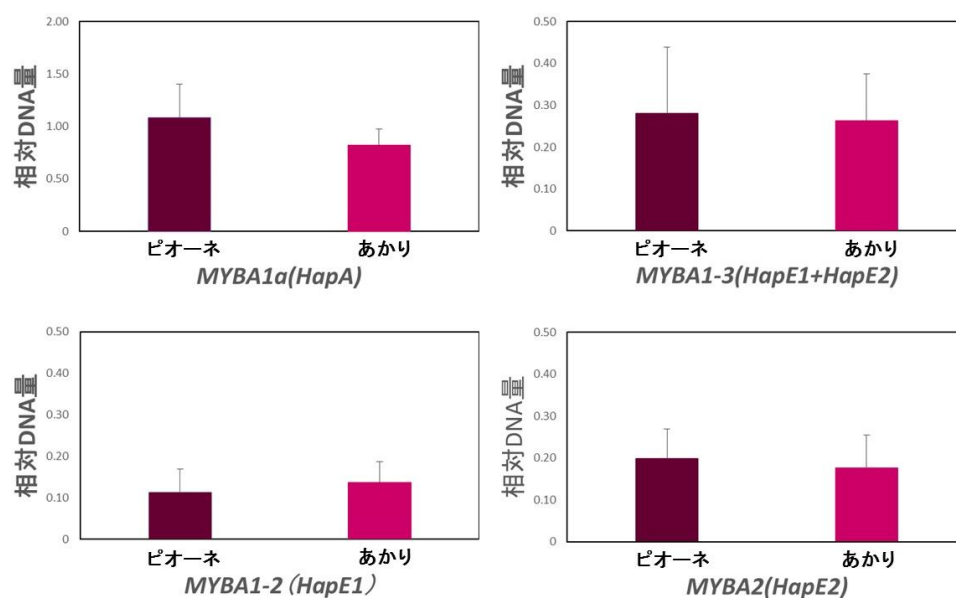


図 1 ‘ピオーネ’と‘赤いピオーネ’における *VvMYBA1a*, *VIMYBA1-2*, *VIMYBA1-3*, *VIMYBA2* の相対的な DNA 量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

特になし

〔学会発表〕(計 0 件)

特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：福永健二

ローマ字氏名：(FUKUNAGA, kenji)

研究協力者氏名：門田有希

ローマ字氏名：(MONDEN, yuki)

研究協力者氏名：高田翔太

ローマ字氏名：(TAKATA, shota)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。