

## 様式C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 4月24日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580041

研究課題名（和文） ブドウ属植物における系統進化の分子的解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of evolution in genus *Vitis*.

研究代表者

小林 省藏 (KOBAYASHI SHOZO)

農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所ブドウ・カキ研究チーム・チーム長

研究者番号：90355438

研究成果の概要：直接の祖先野生種を含めヨーロッパブドウについてはそのほとんどでブドウのアントシアニン合成制御にきわめて重要な役割を果たす MYB 様転写因子遺伝子 *VvmybA1* の上流にレトロトランスポゾン (*Gret1*) が挿入されているが、北アメリカ種群及び東アジア種群では *Gret1* の挿入は認められず、*Gret1* の挿入はヨーロッパブドウが北アメリカ種群や東アジア種群から分かれた後に起こったことが明らかになった。また、この *Gret1* の挿入は約 20 万年前に起こったと推定された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：ブドウ、果皮色、アントシアニン、転写因子、レトロトランスポゾン、進化

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ブドウの祖先が地球上に出現したのは約1億4千万年前で、第3紀の後期には地球上の各地にブドウ属植物が繁茂していたとされる。これらは第4紀の氷河期に入るとほとんど絶滅したが、カスピ海沿岸、北アメリカ、および東アジアの一部で生き

残り、氷河期の終わった約1万年前から温帯北部に分布、拡大して3大ブドウ種群（ヨーロッパ種群、北アメリカ種群、東アジア種群）が形成されたと言われている。また、ヨーロッパでは1種 (*Vitis vinifera*) しか生き残らなかったが、北アメリカ、東アジアでは多くの種が残存し、進化して今日に至

っている。

(2) ブドウ属植物の分類・類縁関係に関する研究は、葉の形態、花粉の形態、果皮中の色素、アイソザイム等の分析の他、一部 RFLP や SSR 等の DNA 分析も行われている。しかし、ブドウ属植物の類縁関係および派生関係についてはまだ十分解明されていない。

(3) ブドウの野生種は果皮色が黒色であり、黄緑色品種はアントシアニン合成に関する様々な遺伝子の突然変異により別々に生じたと考えられてきた。しかし、その実体は不明であった。我々は果皮色変異体を用いた解析から黄緑色品種ではアントシアニンの合成制御にきわめて重要な役割を果たす MYB 様転写因子遺伝子 *VvmybA1* の 5' 上流にレトロトランスポゾン (*Gret1*) が挿入されており、この *Gret1* が同遺伝子の発現を抑制するためアントシアニンが合成されないことを明らかにした (図 1)。

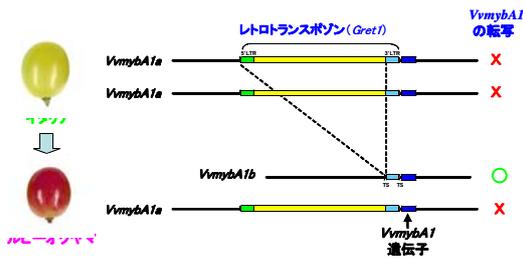


図 1 黄緑色品種イタリアとその赤色枝変わり品種ルビーオクヤマにおける *VvmybA1* 遺伝子ゲノム構造の比較

(4) レトロトランスポゾンは植物ゲノム中に数百~数万コピー存在するとされているが、レトロトランスポゾンの挿入により特定の遺伝子の発現が抑制されることが実証された例はそれほど多くない。ブドウはその少ない例の一つであり、我々はブドウ野生種の *VvmybA1* に生じた変異遺伝子 (*Gret1* の挿入) が自然交雑でホモ化したことにより黄緑色品種が生じたという仮説を提唱したが、ブドウの進化上いつ *Gret1* の挿入が起こったかは非常に興味もたれる点である。

## 2. 研究の目的

本研究では、野生種をはじめとする広範囲のブドウ属の種・品種について *VvmybA1* への *Gret1* の挿入の有無を調査するとともに、*Gret1* の 5'LTR と 3'LTR

の塩基配列比較及び SSR 解析等により *Gret1* が *VvmybA1* に挿入されたのは進化上いつなのか、どの種・品種が進化上古くてそれらはどのように関連しているかなど、ブドウ属植物の系統進化を分子レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 果樹研究所ブドウ・カキ研究拠点で保存しているヨーロッパブドウ (*V. vinifera*) の直接の祖先野生種である *V. vinifera* subsp. *sylvestris* (以下 *sylvestris* とする)、ヨーロッパブドウの中の黒海系、西ヨーロッパ系、東アジア系品種、および *V. rupestris* や *V. riparia* 等の北アメリカ種群、チョウセンヤマブドウやヤマブドウ等の東アジア種群等のブドウ属の種・品種を材料として、葉から DNA を抽出し、PCR により *VvmybA1* 遺伝子上流への *Gret1* 挿入の有無を調査する。さらに、*Gret1* の挿入が確認された種・品種については、挿入 *Gret1* における 5'LTR と 3'LTR の塩基配列比較を行う。

表 1 ブドウ属植物へのレトロトランスポゾン *Gret1* の挿入の有無

Species	Cultivar name	Skin colour	<i>Gret1</i>
<i>V. vinifera</i>			
subsp. <i>sylvestris</i> (♀)		black	+
subsp. <i>sylvestris</i> (♂)		-	+
pontica	Black Hamburg	black	+
pontica	Alphonse Lavallée	black	-
pontica	Fumint	white	+
pontica	Plavaj	white	+
occidentalis	Cabernet Sauvignon	black	+
occidentalis	Merlot	black	+
occidentalis	Pinot Noir	black	+
occidentalis	Chardonnay	white	+
occidentalis	Melon	white	+
occidentalis	Riesling	white	+
orientalis	Muscat Hamburg	black	+
orientalis	Rizamat	red	+
orientalis	Flame Tokay	red	+
orientalis	Bajan Sirej	white	+
orientalis	Italia	white	+
orientalis	Thompson Seedless	white	+
orientalis	Niunai	white	+
<i>V. aestivalis</i> : NA <sup>1)</sup>		black	-
<i>V. cinerea</i> : NA		black	-
<i>V. doaniana</i> : NA		black	-
<i>V. labrusca</i> : NA		black	-
<i>V. longii</i> : NA		black	-
<i>V. palmata</i> : NA		black	-
<i>V. riparia</i> : NA	Gloire de Montpellier (♂)	-	-
<i>V. rubra</i> : NA		black	-
<i>V. rupestris</i> : NA	Constantia	black	-
<i>V. amurensis</i> : EA <sup>2)</sup>		black	-
<i>V. coignetiae</i> (♀): EA		black	-
<i>V. coignetiae</i> (♂): EA		-	-
<i>V. quinqueangularis</i> : EA		black	-
<i>V. shiragai</i> : EA		black	-
<i>V. thumbergii</i> : EA		black	-
<i>V. vinifera</i> × <i>V. labrusca</i>	Concord	black	+
<i>V. vinifera</i> × <i>V. labrusca</i>	Steuben	black	-
<i>V. vinifera</i> × <i>V. labrusca</i>	Bronx Seedless	red	+
<i>V. vinifera</i> × <i>V. labrusca</i>	Urbana	red	+
<i>V. vinifera</i> × <i>V. labrusca</i>	Golden Muscat	white	+
<i>V. vinifera</i> × <i>V. labrusca</i>	Seneca	white	+

1) NA: 北アメリカ種群

2) EA: 東アジア種群

(2) PCR により *VvmybA1* オーソログの単離を試み、得られた *VvmybA1* オーソログについて塩基配列を決定し、構造変異 (挿入/欠失)、塩基置換等を調べる。さらに、これら種・品種について SSR 解析を行い、統計的手法により類縁関係を求める。得られた結果を総合して、ブドウ属の種・品種の類縁関係および派生関係を分子レベルで明らかにする。

#### 4. 研究の成果

(1) *sylvestris* の解析は特に興味もたれる点であり、トルクメニスタンの遺伝資源研究所から導入され、つい最近隔離解除された *sylvestris* の雄株と雌株を解析に加えた。これらブドウ属の種・品種について *Gret1* の挿入の有無を調べた結果、*sylvestris* を含めヨーロッパブドウについてはそのほとんどで *Gret1* の挿入が認められたが、北アメリカ種群及び東アジア種群では *Gret1* の挿入は認められなかった (表 1)。

(2) レトロトランスポゾンホストゲノムへの挿入機構から、*Gret1* の挿入時はその 5'LTR と 3'LTR の塩基配列は同じであるため、両 LTR における塩基配列の差は挿入後の時間経過を現し、結局塩基配列比較から *Gret1* の挿入時期を推定することができる。我々は、*VvmybA1a* アレルに挿入されている *Gret1* の 5'LTR と 3'LTR の塩基配列を調査し、5'LTR と 3'LTR ではいずれの品種においても 824 塩基中 5 塩基で差があることを見いだした (図 2)。しかし、品種間では差は認められなかった。この差を MEGA4 ソフトウェアを用いて解析した結果、挿入は約 20 万年前に起こったと推定された。

```

5'LTR TGTAGGG ACC CCTCCCTCTG GBAACAACGT GGCACGACC TCACAGTGAC ACGCAGCAGC TGTATTCAAG CGGACCATO
3'LTR .....
5'LTR TCATCCG GAT TCCTTAGG ATACGCATGA TGATGTCT CCTATCCGGA CCGCCTCAAG GAAAGGACA TGAAGTTTCA
3'LTR .....
5'LTR GCTCTT CTG TCCAAGGAG AGCAAGGAC GCTGAAGAG CATAGACATC CGGCAAACT TCATNTGTA TCCCTCCAC
3'LTR .....
5'LTR TATACAT TGC GATAGTAG CATGTGACCA TCCGGATTA ATCGTCCGGA TCATCAATTA AAGTAAAGCA AGTCTTACAC
3'LTR .....
5'LTR GGTATCA GGA CAACGAGCA TGGCCCGGT CCGATCTCT GCAGAGTGA AGGAAGGATC GAGGTGACAA CAAGTCACTT
3'LTR .....
5'LTR CCGACGA TCA TTCTACATGA TCATTTCCCA CGATATCTAG ACAGCAGCAT CACCTACAC GGTCTCTGAC AGCGCCAGT
3'LTR .....
5'LTR AAGGTGG GGA TGACCATGCT GCTCCGAT GTCATCTGA GAAACATAAA ATATCTCTCC GCCATTAATG AGAGAACAG
3'LTR .....
5'LTR TACCCCT GAA CCTGTATATA TATGCTTGG CACGAGAAG AAGGGATCC TCCTGTAAC TTCTTAATAC CTGCTAAAG
3'LTR .....
5'LTR GCGACT GAT TTATATCTCT CTCTGTGACC ATGGCTAACA AAACCTCGG AGGATGCTGC CGGAACCCCT GTCCGATGC
3'LTR .....
5'LTR CTCTTG CAG GAATGAGAC TGGATCAAA ACCTTTATGA GTTGAGATCA CCGCTCCATC CATCTGGTAA CTAGTTGAC
3'LTR .....
5'LTR GCGAAM GAC GCGAGGTAAC AACA
3'LTR .....

```

図 2 *Gret1* の 5'LTR と 3'LTR の塩基配列比較  
赤字部分が差がある塩基

(3) これらの結果から、*VvmybA1a* アレルへの *Gret1* の挿入は、*sylvestris* あるいはその祖先において、それらが北アメリカ種群や東アジア種群から分かれた後に起こったことが明らかとなった (図 3)。また、*V. vinifera* と *V. labrusca* の雑種でも *Gret1* の挿入が認められたが (表 1)、これら雑種の *Gret1* は *V. vinifera* に由来するものと考えられた。

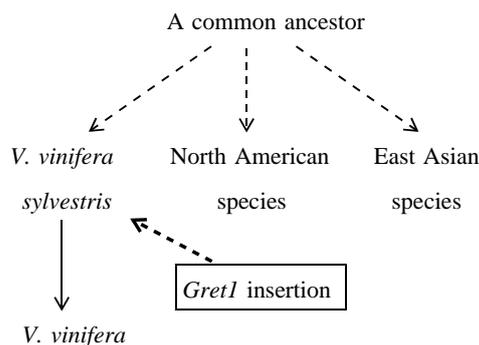


図 3 ブドウ属植物の進化と *Gret1* の挿入時期

(4) さらに、同じ種・品種を用いて SSR 解析を行った結果、ヨーロッパブドウ、北アメリカ種群及び東アジア種群は明確にグループ分けされた。また、北アメリカ種群には *VvmybA1* のオーソログ *VlmybA1-3* が存在することが判明した。その他、*VvmybA1* の対立遺伝子 *VvmybA1<sup>SUB</sup>* は、ヨーロッパブドウの東アジア系品種にしか存在しないことが明らかとなった。以上のように、*Gret1* の解析、SSR 解析、およびオーソログ等の解析によりブドウ属の種・品種の類縁関係およびその派生関係について新たな知見が得られた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Mitani, N., A. Azuma, E. Fukai, H. Hirochika and S. Kobayashi. A retrotransposon-inserted *VvmybA1a* allele has been spread among cultivars of *Vitis vinifera* but not North American or East Asian *Vitis* species. *Vitis* 48:55-56, (2009) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. Kobayashi S. Estimation of insertion date of a

retrotransposon, *Gret1*, into a transcription factor gene, *VvmybA1*, which regulates anthocyanin biosynthesis in grapes. The First Asian Horticultural Congress. 平成20年12月11日. 韓国濟州島國際會議場

2. 三谷宣仁・東暁史・深井英吾・廣近洋彦・小林省藏. レトロトランスポゾン挿入型転写因子遺伝子 *VvmybA1a* の有無を指標としたブドウ属分化の推定. 園芸学会. 平成20年9月27日. 三重大学

3. 後藤奈美・東暁史・三谷宣仁・小林省藏. ブドウ野生種及び栽培品種の SSR 解析. 園芸学会. 平成21年3月19日. 明治大学

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 省藏 (KOBAYASHI SHOZO)  
農業・食品産業技術総合研究機構・果樹

研究所・ブドウ・カキ研究チーム・チーム長

研究者番号：90355438

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者