

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 25 日現在

機関番号：85403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580050

研究課題名（和文） ブドウ‘甲州’の特徴を比較ゲノムと遺伝子発現から解明する

研究課題名（英文） Characterization of a grape variety ‘Koshu’ through comparative genomic hybridization and transcriptomic analysis

研究代表者

後藤 奈美（GOTO NAMI）

独立行政法人酒類総合研究所・醸造技術基盤研究部門・部門長

研究者番号：60372190

研究成果の概要（和文）：わが国在来のブドウ品種‘甲州’の遺伝子全体（ゲノム）の配列は、西洋系の *Vitis vinifera* 品種よりも東洋系品種に近く、野生ブドウとは大きく異なった。‘甲州’のゲノムには、ごく一部特異的に異なる配列が見いだされたが、このことは‘甲州’の形質に有意な影響を与えないと考えられた。遺伝子発現の面からは、成熟期の‘甲州’果皮では、‘シャルドネ’と比較して、耐病性・ストレス応答に関連する遺伝子の発現が比較的高いことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Genomic structure of ‘Koshu’ was more closely related with oriental *Vitis vinifera* cultivars than with occidental cultivars and largely different from that of a wild grape species. Even though the genome of ‘Koshu’ contained a limited number of characteristically different sequences, these differences probably do not influence the character of ‘Koshu’. Transcriptomic analysis revealed that the expression of some disease resistance and stress response related genes in the berry skin of ‘Koshu’ during ripening was higher than in ‘Chardonnay’.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、園芸学・造園学

キーワード：ブドウ、*Vitis vinifera*、‘甲州’、ゲノム、CGH 解析、DNA マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

1) ブドウ‘甲州’について

‘甲州’はわが国在来のブドウ品種で、生食用のほか、日本の白ワイン用品種として重要な品種である。‘甲州’の白ワインは穏やかな香味で、強い特徴がないとされてきたが、近年、‘ソービニオン・ブラン’と共通の香气成分を有することが報告され、改めて注目されている。また、最近では海外へも輸出され

ており、その特徴を明らかにすることは、国産ワイン振興のためにも重要と考えられる。

‘甲州’は東洋系 *Vitis vinifera* に属すると考えられており、研究代表者らの Simple Sequence Repeat (SSR) 解析等の DNA 多型解析によってもこのことが確認されている。また、‘甲州’は同じくわが国在来のブドウ品種である‘甲州三尺’に近いが、予想に反して中国の‘竜眼’や‘和田紅’等の品種とは

あまり近くないことも明らかになっている。
‘甲州’の特徴として、西洋系の *V. vinifera* 品種と異なり、わが国の高温多湿な気象条件に比較的栽培適性がある点があげられる。世界の主要なワイン醸造用ブドウはすべて西洋系 *V. vinifera* 品種であり、わが国でもこれらの品種の人気が高いが、病害を受けやすく、農薬を多用せざるを得ない状況にある。‘甲州’の耐病性などの栽培特性は、将来の育種に役立つ貴重な遺伝資源と考えられた。

(2) ‘甲州’の DNA マクロアレイ解析

申請当時、ブドウの Expression Sequence Tag (EST)解析結果に基づく GeneChip (Affymetrix社)が発売されていた。この GeneChip を用いて、‘甲州’と西洋系品種‘カベルネ・ソービニオン’のゲノム DNA をラベルしてハイブリダイズさせ、両者を比較したところ (Comparative Genomic Hybridization, CGH 解析)、大部分のプローブセットのハイブリダイズ強度には両品種に有意な差が認められなかった。しかし、一部‘甲州’のハイブリダイズが‘カベルネ・ソービニオン’の 1/10 以下のプローブセットがあり、大幅なシーケンスの差や欠損が示唆されていた。そこで他の東洋系品種、西洋系品種にもこのような差が共通しているか、興味を持たれた。また、大部分のプローブセットについては、‘甲州’と西洋系品種の配列に有意な差がないと考えられることから、ブドウ GeneChip を用いた‘甲州’の網羅的遺伝子発現解析が可能であることが示されていた。

2. 研究の目的

(1) 西洋系及び東洋系 *V. vinifera* の比較ゲノムの検討 (CGH 解析)

各種西洋系、東洋系 *V. vinifera* 品種について、GeneChip を用いた CGH 解析を行い、‘甲州’と‘カベルネ・ソービニオン’で認められた差違が、東洋系、西洋系品種に共通のものであるか、検討する。また、CGH 解析に基づく供試品種の類縁関係の推定を行い、これまでに DNA 多型解析で明らかになった東洋系、西洋系品種の類縁関係が、ゲノム DNA 全体から見た場合にも見いだせるか、検討する。以上の研究から、西洋系品種や他の東洋系品種と比較した‘甲州’のゲノム配列の特徴を明らかにする。

(2) ‘甲州’の遺伝子発現解析

‘甲州’は西洋系品種の栽培が困難なわが国の風土に適応した品種であり、その特徴は遺伝子のシーケンスや発現のレベルの違いに起因すると考えられる。特に、‘甲州’は耐病性に関与する遺伝子の発現強度に違いがあるのではないかと予想されることから、

果皮及び新葉を用いた網羅的発現解析を行い、‘シャルドネ’などの西洋系品種や他の東洋系品種との比較を行う。また、耐病性以外にも特徴的に発現が高い/低い遺伝子がないか、検討する。以上の研究から、西洋系品種と比較した‘甲州’の遺伝子発現の特徴を明らかにし、‘甲州’の特性に関わると想定される遺伝子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GeneChip を用いた CGH 解析

東洋系 *V. vinifera* として‘甲州’、‘甲州三尺’、‘竜眼’、‘白鷄心’、‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’、西洋系 *V. vinifera* として‘カベルネ・ソービニオン’、‘ピノ・ノアール’、‘シャルドネ’、並びに野生ブドウのリウキュウガネブ (*V. ficifolia* var. *ganebu*) を供試した。各品種の新葉からゲノム DNA を抽出し、1 反応当たり 100 ng のゲノム DNA を、BioPrime DNA Labeling System (Invitrogen) を用いてビオチンラベルした。ラベル後、2 倍量のエタノールによるエタノール沈殿を 5 回繰り返して、ラベルされていない DNA を除去した。ビオチンラベル DNA を 10 ug/50 uL に調整し、発現解析と同じ方法で Affymetrix 社製 Vitis GeneChip へハイブリダイズ、洗浄、染色 (ビオチン抗体結合)、スキャンを行った。得られたシグナル値は Global Scaling Factor 500 でスケールリング (中央値を合わせる操作) をした。1 品種のハイブリダイズをラベルから 2 回繰り返して、GeneSpring GX11 ソフトウェアを用いて解析した。

(2) GeneChip を用いた‘甲州’及び‘シャルドネ’の網羅的発現解析

2009 年は、‘甲州’及び‘シャルドネ’の新葉、並びに幼果期、ベレゾン (成熟開始期)、ベレゾン後 3 週目、及び収穫期の果皮を供試した。当所圃場で栽培する両品種から樹ごとに 3 回の繰り返してサンプリングし、Reid et al. (2006)の方法で total RNA を抽出、RNeasy Mini Kit (Qiagen, RNA clean up protocol)を用いて DNase I 処理及びカラム精製を行った。バイオアナライザー (Agilent RNA 6000 ナノキット) で RNA の純度及び分解がないことを確認し、total RNA 500 ng から GeneChip 3' IVT Express kit を用いて 2 本鎖 cDNA 合成、これを鋳型にしたビオチンラベル aRNA 合成 (16 時間反応)、及びフラグメント化を行った。得られた aRNA フラグメントを Vitis GeneChip へハイブリダイズし、(1)と同様にハイブリダイズ～スケールリングを行った。2010 年は‘甲州’及び‘シャルドネ’のベレゾン後 3 週目の果皮を用いて、同様の発現解析を行った

(3) NimbleGen Chip を用いた西洋系品種・東洋系品種の網羅的発現解析

2010年、2011年は、東洋系品種として‘甲州’、‘甲州三尺’、‘竜眼’、‘白鷄心’、‘和田紅’、西洋系品種として‘シャルドネ’、アメリカ系 (*V. labrusca* 系) 品種として‘ナイアガラ’を供試した。樹ごとまたは房ごとに3回の繰り返しをとり、ベレゾン後3週目の果皮を供試した。(2)と同様の方法で精製した total RNA 10 ug から、Invitrogen SuperScript Double-strand cDNA Synthesis Kit を用いて2本鎖 cDNA を合成した。この cDNA 1ug を Cy3 標識ランダム 9mer でラベルし、イソプロパノール沈殿で精製後、4 ug x 12 サンプルを熱変性させてアレイにハイブリダイズさせた。洗浄後、NimbleGen MS 200 マイクロアレイスキャナーで Cy3 の蛍光をスキャンし、生データからノーマライズされた遺伝子単位の発現強度データ (**RMA.calls) を求めた。

4. 研究成果

(1) GeneChip を用いた CGH 解析

各プローブセットのハイブリダイズ強度の品種間の相関係数は、‘甲州’と東洋系品種間 (0.942~0.982、平均 0.982) の方が、‘甲州’と西洋品種間 (0.928~0.965、平均 0.951) よりも概ね高く、‘甲州’が東洋系 *V. vinifera* であることを裏付ける結果となった。なお、野生ブドウのリウキュウガネブとの相関係数は 0.905 と低い値であった (図1)。

以前に見いだした‘カベルネ・ソービニオン’と比較して甲州で特異的にハイブリダイズ強度が低いプローブセットがあるという現象は、東洋系品種共通ではなく、むしろ‘ピノ・ノール’と共通のものがあるという興味深い結果が得られた (図1)。

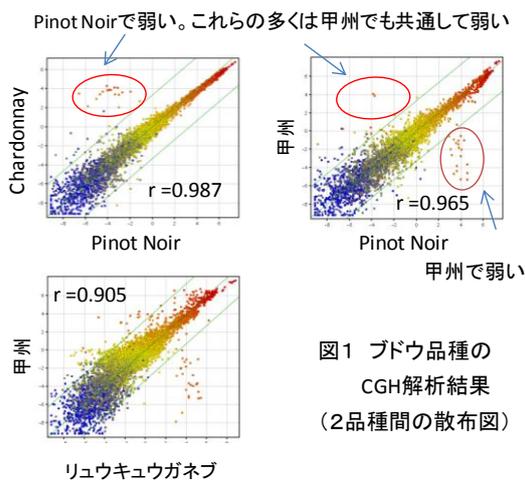


図1 ブドウ品種のCGH解析結果 (2品種間の散布図)

これら‘甲州’で特異的にハイブリダイズ強度が低いプローブセット 40 個には、同じゲノム配列と対応しているものが、12 組含ま

れていたことから、実際には 28 ヶ所の配列であった。そのうち、プローブセットの全プローブで有意なハイブリダイズが認められなかった4ヶ所について、該当する‘甲州’の配列をサザン解析で検討した。その結果、‘甲州’ではフラグメントが検出されず、該当配列の欠損が示唆された。これらの配列はいずれも機能未知の配列であった。

一方、これら 28 ヶ所のうち、プローブセットの一部のプローブでのみ‘甲州’のハイブリダイズが弱いもの2ヶ所について、該当部分の甲州の配列を PCR やゲノムウォーキングなどで確認したが、大きな欠損などは検出されなかった。従って、これらの場合は‘甲州’以外の品種では、類似する他の配列がハイブリダイズしている可能性も想定された。

いずれの場合も、この 40 個のプローブセットは、西洋系品種の EST データベース、並びに (2) で述べる発現解析でハイブリダイズ強度の低い配列であった。したがって、これらの差違は‘甲州’のゲノムの特徴ではあるが、その形質に大きな影響を及ぼすものではないと推定された。

(2) GeneChip を用いた‘甲州’及び‘シャルドネ’の網羅的発現解析

2009年は‘甲州’と‘シャルドネ’の果皮を経時的にサンプリングするとともに、新葉も供試した。ハイブリダイズデータを 75% percentile でノーマライズし、続いて各品種のゲノム DNA のハイブリダイズデータに対して baseline transformation をした。これによって、両品種の遺伝子配列の差違の影響が排除されると考えられる。

両品種とも、新葉と果皮ではハイブリダイズ強度の相関係数が 0.6 前後と低く、遺伝子発現のパターンが大きく異なった。果皮では、MIPS の分類 32. ストレス応答に分類される遺伝子のうち、ベレゾン前には‘シャルドネ’で有意に高発現するものが多かったが、ベレゾン後3週目及び収穫期には‘甲州’で高発現する方が多かった。

2009年、2010年のベレゾン後3週目のデータの相関係数から、同年の品種による遺伝子発現の差違は、同品種の年による差違よりも大きいことが示された (表1)。

表1 ハイブリダイズ強度の相関係数

	Char 09	Char 10	甲州 09	甲州 10
Char 09	0.988			
Char 10	0.967	0.995		
甲州 09	0.932	0.919	0.987	
甲州 10	0.903	0.921	0.951	0.984

値は n=3 の平均値

次に、品種によって特異的な発現パターンを示す遺伝子を検索するため、少なくとも同一年の1品種で3回とも Present または Marginal と判定されたプローブセット (10,404/16,602) を用いて品種×年の2元配置の分散分析を行った。品種によってハイブリダイズ強度に有意な差が検出された 8,171 個のプローブセット (年によって有意差が検出されたものは 4,464 個) から、2年とも品種間で3倍以上の差があるプローブセット 272 個を選択した。このうち、‘甲州’ > ‘シャルドネ’ の 141 個には、‘甲州’ の果皮がピンクに着色することから、アントシアニン合成系遺伝子 (UFGT, GST など) が含まれていたが、その他にフラボノールシンターゼ、スチルベンシンターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ (2 個)、アクアポリン (4 個) などが含まれていた。これらの遺伝子の高発現は、‘甲州’ にフェノール化合物が多く、褐変しやすいこと、またスチルベンシンターゼが高いことから耐病性との関連が推察された。さらに、アクアポリンが高発現していることから、果粒の肥大との関連も示唆された。一方、‘シャルドネ’ > ‘甲州’ の 131 個には、アミノ酸 permease 6、ジベレリンオキシダーゼ 1 (2 個) などが含まれていたが、‘シャルドネ’ の性質との関連が推定されるものは少なかった。MIPS の分類 32. ストレス応答に分類される遺伝子は、‘甲州’ で高発現するグループには 14 個、‘シャルドネ’ で高発現するグループには 8 個が含まれていた。‘甲州’ のみでストレス応答関連遺伝子が高発現した訳ではなかったが、‘甲州’ の方が‘シャルドネ’ よりも高発現するストレス応答遺伝子の多いことが示された。

(3) NimbleGen Chip を用いた西洋系品種・東洋系品種の網羅的発現解析

1 サンプル当たりのコストが低い NimbleGen チップの利用が可能になったことから、これを用いて、‘甲州’ を含む東洋系 5 品種、‘シャルドネ’ 及び *V. labrusca* 系品種の‘ナイアガラ’の発現解析を行った。2年間のデータを合わせて階層的クラスター解析を行ったところ、*V. vinifera* 品種が1つのクラスターを形成したが、東洋系品種のみのクラスターは形成されなかった。このことは、東洋系品種群の遺伝子発現パターンが西洋系品種とさほど大きく異なるものではないことを示唆するものと考えられる。

次に、各遺伝子のハイブリダイズ強度について、各年の‘シャルドネ’の平均値に対する比をとり、両年とも‘シャルドネ’と東洋系品種で有意に差のある遺伝子 532 個を抽出した。これらの遺伝子を GO 解析したところ、東洋系に共通して発現が低い遺伝子にモノテルペンアルコール合成遺伝子の Terpene

synthase 群が、高い遺伝子に植物ステロール生合成系の Cycloartenol synthase 群が見いだされた。モノテルペンアルコールはブドウの香気成分の一つであり、東洋系品種に共通して低いことは、これまで認識されていなかった。また、ブドウ果皮細胞のステロール成分についてはこれまで報告がなく、東洋系、西洋系の品種による差があるのか興味を持たれる。

以上の結果から、‘甲州’のゲノム配列は、*V. vinifera* のなかでも東洋系品種に近いこと、並びに成熟期の‘甲州’果皮では、耐病性やストレス応答に関連する遺伝子に発現に高いものがあることなどが明らかになった。さらに、東洋系品種群に特徴的な遺伝子の発現パターンについても新たな情報が得られた。今後は、SNPs 解析によって‘甲州’の分類的位置づけを明らかにするとともに、その有用形質の利用についても研究が期待される。

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)

[学会発表] (計 3 件)

① 後藤 (山本) 奈美、沼田美子代: ブドウ‘甲州’及び‘Chardonnay’果皮 (2009, 2010) の遺伝子発現の比較、園芸学会平成 24 年度春季大会、平成 24 年 3 月 29 日、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス

② 上岡大嗣・沼田美子代・後藤 (山本) 奈美: ブドウ甲州とシャルドネ果皮の遺伝子発現の比較、日本農芸化学会 2010 年度 (平成 22 年度) 大会、平成 22 年 3 月 28 日、東京大学駒場キャンパス

③ 上岡大嗣・沼田美子代・後藤 (山本) 奈美: ブドウ甲州の遺伝子配列の特徴、日本ブドウ・ワイン学会 (ASEV Japan) 2009 年度大会、平成 21 年 11 月 21 日、広島大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者
後藤 奈美 (GOTO NAMI)
独立行政法人酒類総合研究所
醸造技術基盤研究部門長
研究者番号: 60372190

(2) 研究分担者
(該当なし)

(3) 連携研究者
(該当なし)