

平成21年 5月12日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19580026
研究課題名（和文） レトロトランスポゾン挿入位置による革命的優良ブドウ樹選抜法の開発
研究課題名（英文） Genetic diversification among Koshu (<i>Vitis vinifera</i> L.) clones goes through retrotransposon insertion in genome
研究代表者 鈴木 俊二 (SUZUKI SHUNJI) 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授 研究者番号：60372728

研究成果の概要：

日本の固有品種である甲州ブドウのゲノムに存在するレトロトランスポゾンの挿入位置をもとに、遺伝的に全く等しい「クローン」とされてきた甲州ブドウ種内に遺伝子レベルで異なる樹が存在することを証明した。レトロトランスポゾンの挿入位置による DNA 多型が存在することから、ゲノム上におけるレトロトランスポゾン挿入位置の同定を行い、遺伝子レベルで異なる甲州ブドウ樹を識別するための遺伝子マーカーの開発を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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：農学・園芸学・造園学

キーワード：ブドウ、レトロトランスポゾン、DNA 多型解析、クローン、優良形質

1. 研究開始当初の背景

ブドウは果実類でも収穫量が多く、全世界で年間 6,226 万トンの収穫量を誇っている（2007 年、国際連合食糧農業機関調べ）。そして、驚くべきことに、その 80%弱はワイン用ブドウである。昨今の技術革新により、ワイン醸造技術とともに、ブドウ栽培技術も格段と向上したわけであるが、未だ大きな課題として残されている問題点は「優良ブドウ樹の選抜法」である。山梨大学ワイン科学研究

センターが長年蓄積したデータは、ブドウ園によって、あるいは、同じブドウ園でも樹によって、ブドウ果実の形質やその果実から醸造されるワインの形質に差異が認められることを示した。ブドウは、一般的に、接木、挿し木で繁殖させるため、同一の遺伝子を有する「クローン」として栽培されているわけであるが、我々の結果は同一品種内にも遺伝子レベルで異なる樹が存在する可能性を示唆するものであった。そこで、山梨大学ワイン科学研究センターでは、山梨県内のブドウ

園から 10 余りの甲州ブドウ樹を集め、山梨大学が所有する育種試験地に移植し、現在まで、栽培環境の影響を受けないように、これらを極めて厳密に同一条件下で栽培してきた。この研究に甲州ブドウが選択された理由は、我が国における甲州ブドウ栽培の歴史が優に千年を超えること、そして、山梨県が誇るワイン醸造用品種であり、現実的にワイン生産者から優良ブドウ樹の育種法、選抜法の確立が強く求められている品種だからである。

予備実験の結果、甲州ブドウ樹間の遺伝子レベルの相違は、塩基置換などの緻密な遺伝子進化ではなく、よりダイナミックな遺伝子変異が関わることを示唆された。これを受け、ブドウゲノム中に挿入されているレトロトランスポゾンに着目し、その挿入位置により、甲州ブドウ樹間に遺伝子レベルでの相違が生じるのではないかと仮説を立て、本課題を遂行した。

2. 研究の目的

本課題の目的は、遺伝的に全く等しい「クローン」とされてきた甲州ブドウは、遺伝的な相違を有するいくつかのクローンに分類される、という全く新しい概念を証明することであり、研究期間内に以下の点を順次明らかにする。

- (1) レトロトランスポゾン挿入位置による DNA 多型解析を行う。
- (2) 果実およびワインの形質と DNA 多型との相関関係を確認する。
- (3) DNA 多型を示したレトロトランスポゾンの、ゲノム上での挿入位置を同定する。
- (4) ブドウ樹を識別するための遺伝子マーカーを開発する。
- (5) 項目 (4) で構築した遺伝子マーカーの有用性を検討する。

以上の研究を推進することにより、本課題で開発した遺伝子マーカーの将来的な実用化の足掛かりとする。

3. 研究の方法

本課題の研究目的を完了するために、以下の研究項目を検討した。

- (1) レトロトランスポゾンの挿入位置による DNA 多型解析

甲州ブドウのゲノム上に存在する 8 種のレトロトランスポゾン (Gret1、Ty1-copia1~4、Tvv1、Retrotransposon-like element および VINE-1) の DNA 配列を参考に、レトロトランスポゾン外向きプライマーを作製し、すべ

ての外向きプライマーの組み合わせ (136 通り) で Long-PCR 法を行った。得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供試し、電気泳動のパターンから DNA 多型解析を行った。

- (2) DNA 多型の分子系統学的解析

分子系統学的解析法を用いて、項目 (1) で得られた DNA 多型を解析し、供試した甲州ブドウ樹の系統分類を行った。

- (3) ブドウ果実およびワインの形質と遺伝的系統との相関関係

供試した甲州ブドウ樹から得られた果実と、それから醸造されたワインの形質を検討した。果実の形質として、果粒重、糖度 (Brix 換算)、pH および総酸を、ワインの形質として、比重、アルコール分、エキス分、pH、フェノール量を測定した。

- (4) レトロトランスポゾン挿入位置の同定

項目 (1) および (2) から同定した DNA 多型に係わるレトロトランスポゾンに関して、ゲノム上におけるその挿入位置を決定した。

- (5) 甲州ブドウ樹を識別するための遺伝子マーカーの開発

項目 (4) の結果より、DNA 多型を示す甲州ブドウ樹を個別に識別できる伝子マーカーの開発を行った。

- (6) 遺伝子マーカーの実用性試験

項目 (5) で開発した遺伝子マーカーの有用性を検討する目的で、国内のブドウ園から甲州ブドウの葉を採集し、日本国内における遺伝子マーカーの分布状況を調査した。

4. 研究成果

今から 20 年前、山梨県内のブドウ園から 10 余りの甲州ブドウ樹を集め、山梨大学が所有する育種試験地に移植した。現在まで、栽培環境の影響を受けないように、これらを極めて厳密に同一条件下で栽培してきた。そのうち、出生がはっきりしている 7 本の甲州ブドウ樹を本研究に供試した (図 1)。

Yamanashi prefecture
latitude, 35°36'44"N; longitude, 138°36'42"E
Area, 4,465.37 km²

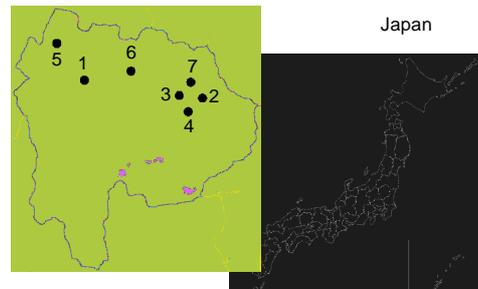


図 1 供試した甲州ブドウ樹の出生
便宜上、7 本の樹をクローン 1-7 と記す。

甲州ブドウのゲノム上に存在する8種のレトロトランスポゾン (Gret1, Ty1-copia1~4, Tvv1, Retrotransposon-like element および VINE-1) の DNA 配列から、レトロトランスポゾン外向きプライマーを作製した (図2および表1)。

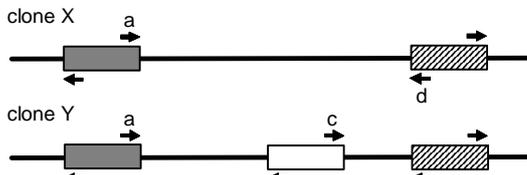


図2 レトロトランスポゾン外向きプライマーの概要
a, b, c は異なるレトロトランスポゾン外向きプライマーを示す。

表1 レトロトランスポゾン外向きプライマーの塩基配列

Name	Sequence	Accession	Source	Correspondence
GRET1-L	GTATCCGTGCGGAGGTATTG	AB242301	gag-pol	98-79
GRET1-R	CGAAGAAGAAGGGATCCTC	AB242301	LTR	7863-7882
TY1-L1	CCGTAACCTGCAACCAAGT	DQ644607	polyprotein	101-82
TY1-R1	GCTTGTGTTTCTTGGGCAAT	DQ644607	polyprotein	791-810
TY1-L2	TACCTTCTGCTCATTGCCCT	DQ644606	polyprotein	93-74
TY1-R2	GCAACTTCTTGTGCTGTCA	DQ644606	polyprotein	889-908
TY1-L3	TAAGCTCGAAATTCAGCT	DQ644605	polyprotein	312-293
TY1-R3	CTCAACAGTCGATCGCCAA	DQ644605	polyprotein	988-1007
TY1-L4	ATGCTCGAGGTGATTGCTTT	DQ644604	polyprotein	145-126
TY1-R4	TAGTTGCCCTGCCTAGTGCT	DQ644604	polyprotein	851-870
TVV1-L	TCAGCCTACAAGAAAGAAACA	AF478389	LTR	510-489
TVV1-R	TGGTCTGGTGTCTCCTATC	AF478389	gag-pol	1080-1099
RLE-L	TACAAAGCATGTCGAGGTGG	Y12558	RAPD	100-81
RLE-R	TCAACACACAATTTTCAGGCC	Y12558	RAPD	623-642
VINE1-L	TTGTGTAAGACTCCAGCTGCA	AF116598	LTR	1259-1239
VINE1-R	GTTCAGCAGCCAAAATA	AF116598	LTR	3520-3549

これら外向きプライマーを用いて PCR を行った結果、7本の甲州ブドウ樹内に DNA 多型が認められた。その一例を、図3に示す。

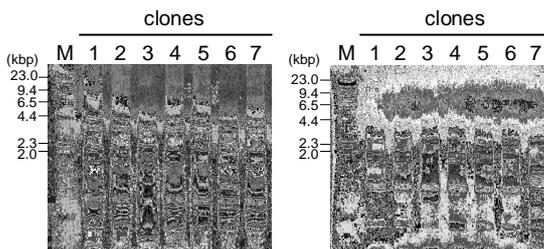


図3 レトロトランスポゾン挿入位置による甲州ブドウ樹間の DNA 多型例

136通りのPCRにより確認されたDNA多型を用いて、近隣接合法により系統樹を作製した。その結果、供試した7本の甲州ブドウ樹は、遺伝的に異なる3つのグループに大別された (図4)。特に、クローン3はアウトグループに区別され、他の6つの樹と遺伝的に大きく異なることが推察された (図4)。

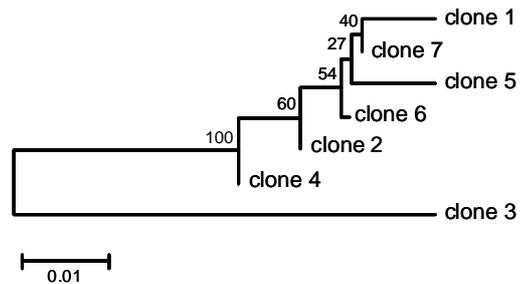


図4 DNA多型解析から導き出された甲州ブドウ樹間の系統関係

以上の結果は、遺伝的に全く等しい「クローン」とされてきた甲州ブドウ種内に、遺伝的相違を有するいくつかの「クローン」が存在することを示唆する。この結果の意義は非常に大きい。すなわち、現在栽培されている甲州種は、同一遺伝子を持つクローンと考えられており、同じ環境下で栽培すれば全く同じ果実をつけると考えられてきた。この仮説のもと、ブドウ園による甲州ブドウの品質の違いは栽培環境、栽培条件に因るものであるとされ、ブドウ栽培者は、栽培技術により高品質なブドウ果実を得ようと努力してきたわけである。しかし、遺伝子レベルで異なるクローンが甲州種内に混在しているのであれば、今まで行ってきた栽培技術の向上以上に、ブドウ栽培者は優良な果実を付ける甲州ブドウ樹を選抜し、それを積極的に栽培していかなくてはならない。この点で、本研究成果の意義は非常に大きい。

本課題で供試した甲州ブドウ樹の果実形質のデータ (2005, 2006, および 2007 年の平均値) とその果実から醸造したワイン形質のデータ (2007 年) を図5および表2に示した。果実から得られた果汁の pH および滴定酸度は、供試した7本の甲州ブドウ樹で大きな差は認められなかった。果実の大きさを示す果粒重はクローン6のみ、生育期間を通じて有意に軽かった (図5)。加えて、クローン6は成熟時の糖度 (Brix 換算) も有意に高かった。果実が小さく、糖度が高いという果実形質は、醸造用ブドウ品種にとって非常に優れている形質である。また各果実から醸造されたワインの品質にも違いが認められた (表1)。クローン4の果実から醸造されたワインは、他のものに比べ、総フェノール量が有意に少なかった。それを支持するように、官能評価でも、このワインは苦味が少ないと評価された。このように、同様な環境で20年間育てられたブドウ樹において、果実の品質が異なり、それから醸造されるワイン形質も異なることから、遺伝子レベルで優良なブドウ樹を選抜し、それを栽培する重要性は明らかである。ただし、ブドウ樹は土壌や気候条件が変わると果実形質を大きく変える

ことから、本課題で得られた果実およびワイン形質の優劣は、山梨大学育種試験地での評価であることを忘れてはならない。

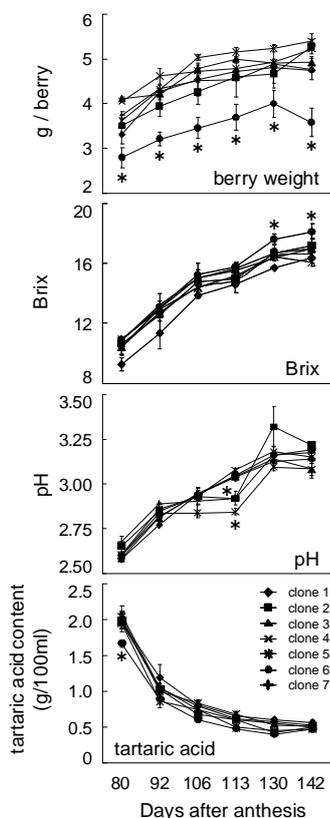


図5 甲州ブドウ果実形質の比較
2005-2007年の3年間の平均値で示した。
* p<0.05

表2 ワイン形質の比較 (2007年)

Clone no.	Specific gravity	Alcohol (%)	Extract content (g/L)	pH	Total phenol (mg/L)	Nonflavonoid phenols (mg/L)	Flavonoid phenols (mg/L)
1	0.991	13.6	29.7	2.86	180.3	136.7	43.6
2	0.992	13.5	32.0	2.83	178.2	125.6	52.6
3	0.991	13.5	29.2	2.81	174.4	124.4	50.0
4	0.992	13.2	30.9	2.81	140.3a*	96.1a	44.2
5	0.992	13.5	31.8	2.82	163.2	118.3	44.9
6	0.993	13.3	33.8	2.84	178.6	147.8	30.8a
7	0.993	13.4	34.1	2.88	160.7	115.6	45.1

* Means that are significantly different at from those of other clones (p < 0.05).

DNA多型に関与するレトロトランスポゾンのゲノム上における挿入位置を決定した。その後、その位置情報から、供試した7本の甲州ブドウ樹をそれぞれ識別する遺伝子マーカーの開発を試みた。現在のところ、特定のクローンを識別できる遺伝子マーカー候補をいくつか得ており、再現性の確認などを行っている(結果示さず)。今後、再現性が確認された遺伝子マーカーから順に、山梨県内における分布調査を行い、優良ブドウ樹選抜方法として実用化が可能であるか評価し

ていく予定である。

本課題の研究結果から、甲州ブドウ種内には遺伝子レベルで異なる「クローン」が存在することが証明され、現在、それを識別するための遺伝子マーカーの開発も順調に進んでいる。本課題が目指す選抜法が確立することにより、日本国内、特にブドウ産業の盛んな山梨県の地域産業に、本選抜法で選抜した優良形質を有する苗木を提供することが可能となり、地域社会の活性化に貢献できるであろう。加えて、レトロトランスポゾンの挿入位置による優良ブドウ樹選抜法は、醸造用、生食用ブドウ品種を問わず、汎用的に利用できる可能性が高い。故に、本課題から導き出される技術は、ブドウ栽培を行う国を対象に世界的規模で拡がると推察される。

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)

[雑誌論文] (計1件)

著者名: Keiko Fujita, Terumi Furiya, Shunji Suzuki, and Tsutomu Takayanagi

論文標題: Genetic variation among Koshu (*Vitis vinifera* L.) clones generated by retrotransposon insertion into genome

雑誌名: American Journal of Enology and Viticulture

査読: 有

発行年: 2009年

ページ: 印刷中

[学会発表] (計1件)

発表者(代表)名: 鈴木 俊二

発表課題: レトロトランスポゾン挿入位置による優良ブドウ樹選抜法の開発

学会等名: 園芸学会

発表年月日: 平成20年9月27日

発表場所: 三重県津市(三重大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 俊二 (SUZUKI SHUNJI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号: 60372728

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし