

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：85403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580063

研究課題名(和文) 一塩基多型及び葉緑体ゲノム解析によるブドウ「甲州」の分類学的位置づけ

研究課題名(英文) Taxonomic study of a Japanese native grape cultivar 'Koshu' through SNPs analysis and partial sequence of chloroplast DNA

研究代表者

後藤 奈美 (Goto, Nami)

独立行政法人酒類総合研究所・役員・理事

研究者番号：60372190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本の在来ブドウ品種「甲州」は、東洋系 *Vitis vinifera* とされていたが、異なる意見もあった。そこで「甲州」の分類的位置づけを明らかにすることを目的に、DNA多型解析を行った。核DNAの一塩基多形(SNPs)解析の結果、「甲州」の祖先は *V. vinifera* が70%強、東洋系野生種が30%弱であることが示唆された。また、母方から遺伝する葉緑体DNAの部分シーケンスは野生型で、中国の野生ブドウ *V. davidii* に最も近かった。以上の結果から、「甲州」は *V. vinifera* の割合が高いが、母方の祖先に *V. davidii* または近縁の野生種を持つ交雑品種であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：'Koshu' is a Japanese native grape cultivar and had been believed to be an oriental variety of *Vitis vinifera*; however, there were different opinions. Thus, to clarify the taxonomic position of 'Koshu', we carried out polymorphic DNA analyses. The result of single nucleotide polymorphisms (SNPs) analysis indicated that genomic DNA of 'Koshu' consists of slightly more than 70% of *V. vinifera* and slightly less than 30% of Asian wild species. In addition, the chloroplast DNA, which is inherited from the maternal ancestor, of 'Koshu' is a wild type and most closely related to that of a Chinese wild species *V. davidii*. From these results, it was revealed that 'Koshu' is a hybrid cultivar with *V. davidii* or closely related species as the maternal ancestor, even though the percentage of *V. vinifera* is higher than that of wild species.

研究分野：醸造学

キーワード：ブドウ 甲州 SNP 葉緑体DNA *Vitis vinifera*

1. 研究開始当初の背景

(1) ブドウ‘甲州’とその分類的位置づけ

わが国在来のブドウ品種‘甲州’は、わが国の白ワイン用ブドウとして重要な品種である。研究開始時には、‘甲州’ワインは著しく品質が向上し、EU を含む海外へ輸出しよう、という取り組みがなされていた。EU のワイン規則では、ラベルに原料ブドウの品種名を示すためには、その品種が国際ブドウ・ワイン機構(OIV)などの国際機関に登録されている必要がある。そこで、独立行政法人酒類総合研究所は、山梨県果樹試験場等と協力して、品種名‘甲州’を OIV に登録する作業を行った(<http://www.nrib.go.jp/info/infopdf/220405info.pdf>)。その際、下記の研究代表者らの報告などを本品種が *Vitis vinifera* に属することの科学的根拠として提出したが、「本品種が *V. vinifera* かどうかは検討中である」との但し書き付きで登録が通知された。‘甲州’ワインが世界で広く認められていくには品質向上とともに、当品種の分類的な位置づけを明確にすることが必要と考えられた。

ブドウ *V. vinifera* には非常に多くの品種が知られており、西洋系、黒海系、東洋系の3つの生態系(Prole)に分類されている。‘甲州’は、その形態から野生ブドウではないことは明らかで、中国または朝鮮半島から仏教とともに、または渡り鳥によってもたらされた東洋系 *V. vinifera* と考えられていた。研究代表者らは、それまでにブドウの Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 解析、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 解析、及び Simple Sequence Repeat (SSR) 解析等の DNA 多型解析に取り組み、‘甲州’が東洋系 *V. vinifera* のクレードに含まれることを示していた。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 DNA 多型からみた類縁関係が近いが、予想に反して中国の‘竜眼’や‘和田紅’などの品種とはあまり近くないことも明らかになった。さらに、東洋系品種群は、クロアチアやギリシャの品種と比較的近縁であり、‘甲州’を含む東洋系

品種がシルクロードを経て伝搬したという説を裏付ける結果が得られていた。

一方、‘甲州’は、ブドウの GeneChip を用いた Comparative Genomic Hybridization 解析によって、そのゲノムに一部西洋系の *V. vinifera* とは異なる、または欠損する配列を持つことが研究代表者らによって明らかにされた。またブドウの分類の専門家であるフランスの J.M. Boursiquot (Personal communication) は、SSR のうち VVS2 のデータが台木(野生種)及び交雑種からしか報告がないこと、並びに‘甲州’の新梢の付け根にある小さなトゲの特徴から、‘甲州’には野生種の遺伝子が入っているとの考えを示していた(Personal communication)。従って、‘甲州’が *V. vinifera* に属するか否かを明らかにするには、精度の高い解析方法の導入が必要と考えられた。

(2) ブドウの DNA 多型解析及びゲノム解析

DNA 多型解析、なかでも SSR 解析は、品種の同定、類縁関係の推定、並びに有用形質との連鎖解析などに有用な方法である。ブドウでも、類縁関係を解析する目的で多数のブドウ栽培品種が解析され、データベース化されている。

2007 年にブドウの全ゲノムシーケンスが発表された。その後、米国・カナダの研究チームは、次世代シーケンサーを用いて、多数の一塩基多型(SNPs)情報を得た。その中から約 9,000 の SNPs を選択した SNPs アレイを作成し、1,000 以上の品種・系統及び野生種の解析を行っていた。SNPs 解析はそれまでの解析方法よりも精度の高い類縁関係の推定が可能と考えられた。

しかし、これらの SSR 解析や SNPs 解析では、東洋系 *V. vinifera* としてギリシャ~ロシア・インド・アフガニスタンの品種しか扱っておらず、‘甲州’を含む日本や中国の品種は解析の対象となっていなかった。

2. 研究の目的

本課題では、‘甲州’の分類的位置づけを明らかにすることを目的に、‘甲州’及び他の東

洋系品種の核ゲノム DNA の SNPs 解析、‘甲州’を含む東洋系品種、及び対照とする西洋系品種の葉緑体 DNA の部分シーケンスを行うこととした。

上述のように、これまで EU やアメリカを中心にブドウの DNA 多型解析が精力的に行われているにも拘わらず、中国や日本の品種は解析されていなかった。本課題の取り組みによって、世界で最も経済的価値の高い果樹であるブドウの遺伝的多様性が、その伝搬の東端に位置する中国や日本の品種を含めて解明されることになると期待された。

また併せて、‘聚楽’と呼ばれているブドウ等、古くから栽培されているが由来が明らかでないブドウの情報が得られたことから、‘甲州’との関係を明らかにするため、DNA 多型解析を行った。

3. 研究の方法

(1) SNPs 解析

大規模なブドウ SNPs 解析を報告している Myles et al. (2010) (カナダ、Dalhousie University) から、ブドウ野生種と栽培品種の識別に有効な SNPs のシーケンス情報 (SNP の前後各 100 base) の提供を受けた。これを基に PCR プライマーの設計、増幅及びサンガー法によるシーケンスを 48 SNP 遺伝子座について行い、SNPs 情報を得た。ヘテロザイガスな SNP の判定は、シーケンスの波形データから目視で行った。DNA は、‘甲州’を等東洋系 5 品種、‘ピノ・ノアール’、アメリカ系品種の‘コンコード’、及び東アジア系野生種 4 種を用いた。

Myles らの SNPs アレイの結果から、*V. vinifera* 33 サンプル、及び東アジア系野生種 33 サンプル(ここで得られた 4 種のデータを含む)の SNPs データを用いて主成分分析を行った。

(2) 葉緑体 DNA の部分シーケンス

Zecca et al. (2012) をもとに、*Vitis* 属で多型が報告されている 4 か所の葉緑体 DNA の部分配

列 (trnH-psbA, trnK-rps16, trnF-nahJ, rpl32-trnL) 計約 2 kbp を増幅し、ダイレクトシーケンスを行った。DNA は‘甲州’‘甲州三尺’‘竜眼’‘和田紅’‘白鷄心’及びコントロールとして‘シャルドネ’を用いた。また、Zecca らが報告したブドウ野生種のシーケンスをダウンロードし、得られたシーケンスと比較した。

(3) SSR 解析

‘聚楽’と呼ばれているブドウ等と‘甲州’との関係を明らかにするため、新葉から DNA を抽出し、代表的な 8 箇所 (VVS2、VVMD5、VVMD7、VVMD27、VVMD28、VVMD32、VrZAG62、VrZAG79) を解析した。

4. 研究成果

(1) SNPs 解析

得られた SNPs の大部分は Myles らのデータと同じ 2 塩基多型であったが、1 遺伝子座 (vv:1:13794046) のみ、他の品種が C/T の多型であるのに対し、‘甲州’、及び‘甲州三尺’は A/T を示した。

野生種ではヘテロザイガスな遺伝子座が 48 箇所中 0~5 箇所のみであったが、交雑品種の‘コンコード’では 25 箇所あった。在来品種のうち、‘ピノ・ノアール’などはヘテロザイガスな遺伝子座が 7~12 箇所であったが、‘甲州’及び‘甲州三尺’は 25 及び 23 箇所と多かった。

3. (1) に示した方法で SNPs データの主成分解析を行い、Myles らのデータとともに本研究で得られた SNPs データを第 1 主成分 (73.16%)、第 2 主成分 (7.84%) 平面にプロットした。その結果、東アジア系のブドウ野生種と *V. vinifera* 栽培品種が第 1 主成分で大きく分かれた。‘甲州’、‘甲州三尺’などは *V. vinifera* に近いが、やや野生種寄りにプロットされた。第 1 主成分上の距離から *V. vinifera* の割合を計算すると、‘甲州’ 71.5%、‘甲州三尺’ 81.8%、‘竜眼’ 91.7%、及び‘和田紅’ 90.4% となった。白鷄心は *V. vinifera* 100% であることが示された (図 1)。

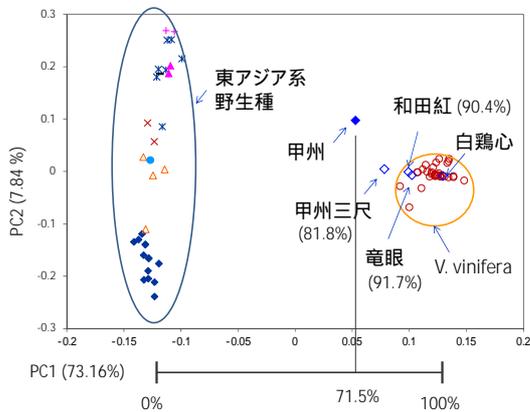


図1 SNPsデータの主成分解析に基づく甲州及び東洋系品種の散布図

(2) 葉緑体 DNA の部分シーケンス

葉緑体 DNA の部分シーケンスでは、‘甲州’と‘シャルドネ’の間に 8 か所で SNPs または in/del による差異が認められた(表1)。一方‘甲州三尺’など東洋系4品種の葉緑体 DNA は *V. vinifera* 型であった。‘甲州’と‘シャルドネ’で差違のある 8 箇所について、データベースに登録されている野生種の葉緑体 DNA シーケンスと比較したところ、‘甲州’は北米系の野生種とは一致する箇所が少ないが、東アジア系の野生種と一致する箇所が多く、そのうち、*V. davidii* の1系統と 8 か所全部で一致した。

得られたシーケンス全体から、各サンプル間の距離を求め、主座標分析で散布図を作成した(図2)。その結果、‘甲州’は *V. davidii* の1系統と最も近い位置にプロットされた。その他、*V.*

表1 シャルドネと甲州の葉緑体DNAシーケンスの差異

位置	<i>trnH-psbA</i>		<i>trnK-rps16</i>	<i>trnF-ndhJ</i>
	260	301	4942	52,400-52,403
シャルドネ	T-	G	C	CATA
甲州	TC	A	A	-

位置	<i>rpl32-trnL</i>			
	119,887	119,996-120,004	120,130-120,139	120,242
シャルドネ	C	(T) ₉	GGAAAC AGAA	G
甲州	T	(T) ₈	-	T

flexuosa の1系統とも近い位置にあったが、*V. flexuosa* の他の系統は遠い位置にプロットされた。この結果から、‘甲州’は *V. davidii* または近縁の野生種を胚珠親の系統に持つことが明らかになった。

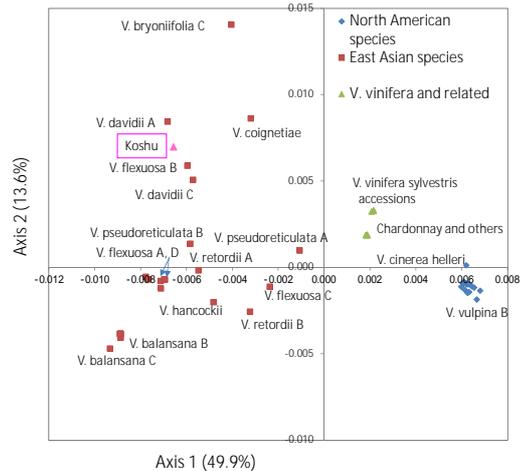


図2 葉緑体DNAの部分シーケンスから得られた距離に基づく主座標分析結果

(3) ‘甲州’及び他の東洋系品種の起源に関する考察

SNPs 解析の結果から、‘甲州’‘甲州三尺’‘竜眼’‘和田紅’のゲノムは、大部分が *V. vinifera* に由来すると推定されるが、一部野生種の遺伝子が含まれることが示唆された。*V. vinifera* の割合が高いことから、雑種第一代ではなく、第二代または三代であろうと推定される。また、葉緑体 DNA の部分シーケンスの結果から、‘甲州’は胚珠親の系統に東アジア系の野生種、*V. davidii* または近縁の種を持つことが示された。*V. davidii* は中国に分布する野生種で、一部栽培もされている。通常、野生ブドウは雌雄異株で黒色の果皮を持つが、最近、中国には両性花及び白色の果実を付ける *V. davidii* があり、*V. vinifera* との交雑種と推定されることが報告され(Jiao et al., 2014)、野生種と *V. vinifera* の交雑が実際に起こっていることが示された。

これらのことから、*V. vinifera* がシルクロードを通して日本に伝えられる途中で、東アジア系の野生ブドウと交雑し、さらに *V. vinifera* と自然にま

たは人為的に戻し交雑されたことで、‘甲州’や‘甲州三尺’などの品種が生じたものと推定される。

‘竜眼’‘和田紅’は推定される *V. vinifera* の割合が高いことから、わずかに野生種の遺伝子を持つ可能性もあるが、純粋の *V. vinifera* である可能性も否定できない。

(4) ‘聚楽’等と呼ばれているブドウの DNA 多形解析

‘甲州’とは別に、古くは‘聚楽’ブドウ等の名前が文書に記録されているが、現在はその存在が知られていない。しかし、古くから栽培されているが品種が不明のブドウや、‘聚楽’として伝わっているブドウがあるとの情報が得られた。そこで、関係者の協力を得て新葉を入手し、核 DNA の SSR 解析と葉緑体 DNA の部分シーケンス(4か所、3.(2)と同じ)を行い、‘甲州’と比較した。

その結果、熊本県天草市に明治時代から伝わるブドウは‘甲州’と同じ SSR 及び葉緑体 DNA の結果を示し、‘甲州’であることが示唆された。

京都府京丹波町に明治時代から栽培されているブドウは‘聚楽’と呼ばれているが、SSR 及び葉緑体 DNA の結果からアメリカ系の品種と推定された。

また、京都市高台寺近くで栽培されているブドウは、葉緑体 DNA の部分シーケンスが‘甲州’と一致した。一方 SSR 解析の結果は、1か所(VVMD5)で2塩基異なる長さを示すことを除くと、‘甲州’の実生と考えて矛盾のない結果を示した。

(5) まとめ

‘甲州’は *V. vinifera* の割合が高いが、胚珠親の祖先に *V. davidii* または近縁の野生種を持つ交雑品種であることが明らかになり、その分類的位置づけを明らかにすることができた。

< 引用文献 >

Jiao J. et al., (2014) Study of the relationship between the cultivars of *Vitis vinifera* and the white-fruited and hermaphrodite Chinese wild grapes. *Mol. Breeding* 34: 1401-1411.

Myles S. et al. (2010) Rapid genomic characterization of the genus *Vitis*. *PLoS ONE* 5: e8219.

Zecca G. et al. (2012) The timing and the mode of evolution of wild grapes (*Vitis*). *Mol. Phylogenet. Evolut.* 62: 736-747.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1件)

Nami Goto-Yamamoto, Jason Sawler, Sean Myles. Genetic analysis of East Asian grape cultivars suggests hybridization with wild *Vitis* *PLoS ONE*, 査読有, 10, 2015, e0140841
DOI: 10.1371/journal.pone.0140841

[学会発表] (計 3件)

後藤(山本)奈美. 日本各地で昔から栽培されているブドウの DNA 解析. 日本ブドウ・ワイン学会 2015 年度大会, 平成 27 年 11 月 7 日, 上越教育大学(新潟県・上越市)

後藤奈美. DNA 多型解析による甲州の分類に関する研究. 平成 26 年度日本醸造学会大会(技術賞受賞講演), 平成 26 年 10 月 7 日, 北とぴあ(東京都・北区)

後藤(山本)奈美, 河野弘美, 沼田美子代, 上用みどり, Jason SAWLER, Sean MYLES. ‘甲州’の SNPs 解析及び葉緑体 DNA 解析による分類学的検討. 日本ブドウ・ワイン学会 2013 年度大会, 平成 25 年 11 月 9 日, 山梨大学(山梨県・甲府市)

[その他]

甲州ブドウのルーツを解明

http://www.nrib.go.jp/data/nrtpdf/2013_1.pdf

酒類総合研究所広報誌エヌリブ、特集「甲
州ブドウのルーツ」

<http://www.nrib.go.jp/sake/pdf/NRIBNo27.pdf>

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・理事

研究者番号: 60372190

(4) 研究協力者

Jason Sawler,

Dalhousie University, Canada

Sean Myles

Dalhousie University, Canada