

平成30年6月18日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01130

研究課題名(和文)メロン種子遺存体の分子遺伝学的解析：選抜された果実の特性とその背景の推定

研究課題名(英文)Development of DNA markers and their application to discuss melon selection for fruit characteristic in Japan

研究代表者

田中 克典(TANAKA, Katsunori)

弘前大学・農学生命科学部・助教

研究者番号：00450213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では果実形質が選抜されていたことを検討するために、果肉色(CmOr)や果実の酸味(CmPH)に関連する遺伝子についてDNAマーカーを開発するとともに、それらのマーカーを用いてメロン種子遺存体を分析した。分析により、メロン種子遺存体の解析によって、近世の商業都市である大坂城・城下町ではメロン仲間の選択において酸味や果肉色に好みがあったこと、それらのメロン仲間が日本在来のマクワやシロウリと関連があることを示していたことがわかった。今後、作物への嗜好と選抜との対応、これに関わる社会や政治的背景を研究するため、これらDNAマーカーを幾つかの時代のメロン種子遺存体に適用する。

研究成果の概要(英文)：To analyze melon fruit traits in seed remains, we developed DNA markers in CmOr and CmPH, determine to pulp color and acid taste, respectively. By using the DNA markers in analysis of melon seed remains, it was thought that melon fruits with green- or white-pulp color and low acid, some melons may be sweet, were preferred around the Osaka Castle, where commercial town had been developed in the 17th century, and related to modern traditional melon varieties in Japan, vars. makuwa and conomon. The DNA marker will be applied for the future study to concern social and political condition, and preference, which associate with crop selection.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：メロン 種子遺存体 農業 選抜 果実特性

1. 研究開始当初の背景

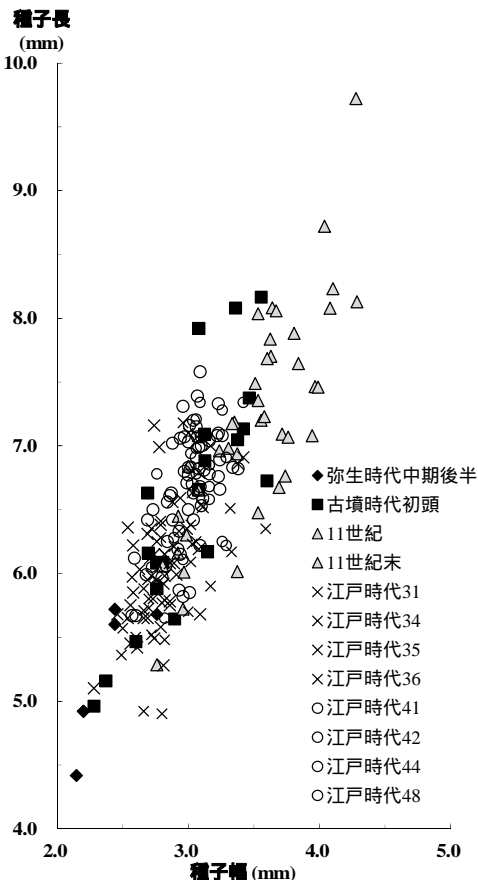
日本では遺跡から作物の種子遺存体が出土する(Crawford “Archeology of Asia” 2006 他, 第 1 図)。これらは人が選抜と利用を繰り返してきた植物である。故に、種子遺存体は時代毎の食文化のみならず、人がモノに対して選抜するに至った背景を検討する貴重な材料である (Tanaka et al. 2010, 他)。



第 1 図 遺跡から出土した作物の種子。左から、イネ、オオムギ、コムギ、メロン。この他にも様々な種子が出土しているが、中でも、イネとメロンの出土件数が多い。

マクワウリとシロウリは、日本を含む東アジアに固有なメロンの仲間 (*Cucumis melo* L.) であり、インド東部に起源する (Tanaka et al. 2007)。それらは、選抜を受けながら伝播したとされる (Nhi et al. 2010 他)。

日本において、メロン仲間は、考古学的知見 (藤下 1983 他)、また数々の史実 (『古事記』他) から鑑みて、古くから庶民に利用されていたと考えられる。これらの種子遺存体は、長さや幅が時代の経過とともに大きくなっている (藤下 1992)。



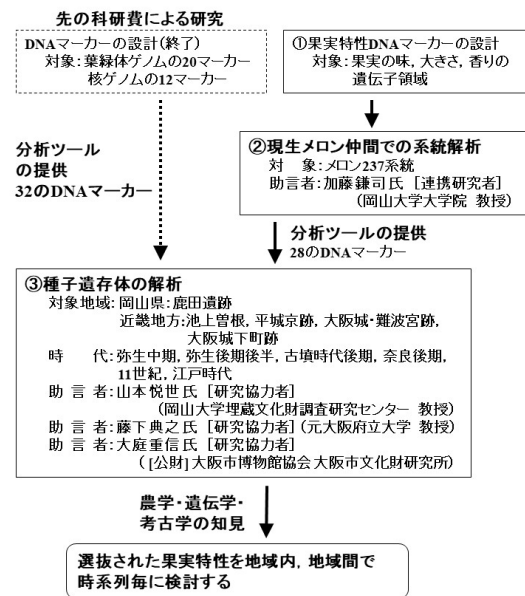
第 2 図 岡山県鹿田遺跡から出土したメロン仲間の種子遺存体におけるサイズの変異。データは田中ら (2013) より引用。

申請者は科研費「若手研究 B」(以下、「先の科研費」とする。)において、メロン種子遺存体を評価できる DNA マーカーを開発し (田中 2013, Tanaka et al. 2013), 岡山県鹿田遺跡のメロン種子遺存体を分析した。結果は、弥生時代から江戸時代に様々なメロンが導入され、また選抜されたことを示していた (第 2 図; Tanaka et al. 2016, 他)。史実 (『和名類聚抄』他) に紹介されている品種名には食味や果実の大きさを表す文字が使われている。また、在来メロンが利用されている産地では、甘さや大きさといった果実特性が選ばれている (Nhi et al. 2010, 他)。これらの研究に基づくと、弥生時代から人はモノに対する嗜好があり、メロンにおいては果実の特性を選抜していたと推察される。この仮説を実証するために、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的はメロン仲間の種子遺存体の分析から、人が嗜好によってメロンを選んだことを検討することであった。このために、下記の 2 点の課題を実施した (第 3 図)。

- ・果実の食味や大きさなど品種特性に関わる DNA マーカーを開発する。
- ・嗜好品が流入しやすい交易地にて出土したメロン種子遺存体を評価する。



第 3 図 申請研究の課題と研究の行程

3. 研究の方法

申請者は果実の形質に関わる DNA マーカーを開発して、メロン仲間の種子遺存体に適用した。このために、下記 3 つの項目を実施した。

果実に関わる候補遺伝子領域の塩基配列を現生メロンで解読し DNA マーカーを開発した。候補となる領域はメロンの有機酸合成に関わる遺伝子 (*CmPH*: Cohen et al. 2014) と果肉色に関わる遺伝子 (*CmOr*: Tzuri et al. 2015) に関わる領域とした。このうち、*CmPH* の機能はシヨ糖の蓄積量に影響して

おり、甘いメロンでは塩基配列の挿入により低下している。

設計した DNA マーカーについて分類の特性を調査すべく、世界各地の現生メロン 237 系統を解析した。この作業によりバックデータを蓄積した。

品種特性や嗜好の地域間差を調査するために先立ち、各時代で好まれた果実特性を特定する必要がある。このために、モノの流入が盛んであった近畿地方の種子遺存体を分析した。分析材料は、近畿地方の遺跡群（池上曾根 [弥生中期]、平城京跡 [奈良後期]、大阪城・難波宮跡 [7 世紀後半]、大阪城・城下町跡 [15 世紀 ~ 17 世紀]）とした。分析では、種子サイズを計測したのち、先行研究と

の研究で開発した DNA マーカーを用いて、近世の大坂城と大坂城の城下町（以下、「大坂城・城下町」とする）の計 160 粒を分析した。DNA 分析と種子サイズの分析の結果に基づいて、近世の都市部におけるメロン仲間に対する嗜好について検討した。

4. 研究成果

4 系統の代表的メロンについて有機酸代謝関連遺伝子 (*CmPH*) について遺伝子領域を解読したところ、既報 (Cohen et al. 2014) と同じく、酸味の低いメロンでは 12 塩基が挿入していた (第 4 図)。この欠失を挟み込んだプライマーによる PCR 増幅では、果肉の酸味が高いメロン系統と低いメロン系統とを識別可能で、その増幅長はそれぞれ 80bp および 92bp であった。

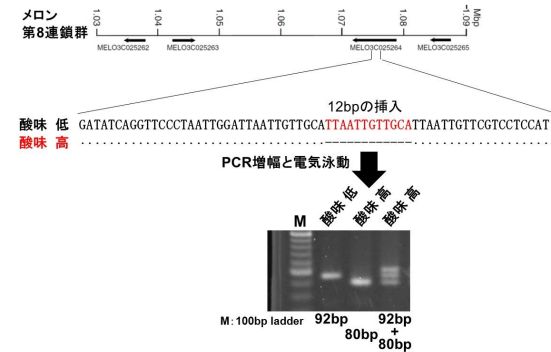
果肉色関連遺伝子 (*CmOr*) についても遺伝子領域を解読したところ、果肉が緑色のメロンとオレンジ色のメロンとで一塩基多型が認められた (第 5 図)。この一塩基多型を挟み込んだプライマーによる PCR 増幅産物を制限酵素 *HinfI* で消化したところ、果肉がオレンジ色のメロンは緑色や白色のメロンと識別可能であった。

で開発した *CmPH* のプライマーを用いて、237 系統の現生メロンで解析した結果、起源地周辺の南アジア、西・中央アジアやアフリカ中部のメロンでは遺伝子型は多様であった (第 6 図)。欧州や北米由来の果肉が甘いメロンは、92bp 型であった。また、甘いメロンのマクワも 19 系統のうち 15 系統 (78.9%) で 92bp 型であった。これに対して、野菜として利用されるシロウリは 9 系統のうち 7 系統 (77.8%) で 80bp 型であった。

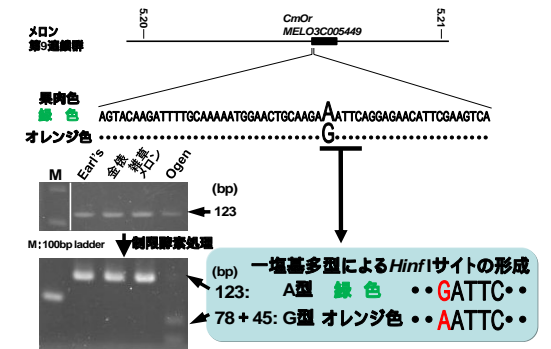
CmOr のプライマーを用いた系統解析においても、遺伝子型は起源地周辺の南アジア、西・中央アジアやアフリカ中部では多様であった (第 7 図)。一方、東アジアのマクワ (果肉色: 緑、白) やシロウリ (同: 白) では、遺伝子型は A 型と果肉色と対応していた。

以上の結果、東アジアのメロンが固有の遺伝子型に収束しており、収束する様相を本研究で開発したプライマーで検出できること、本研究で検出した *CmPH* の挿入や *CmOr* の

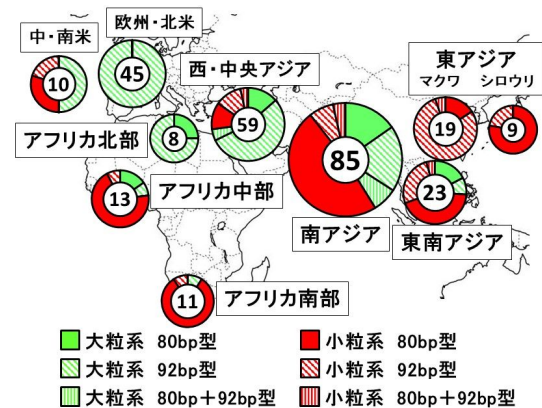
一塩基多型が果肉の酸味や甘さ、色を識別可能であることがわかった。



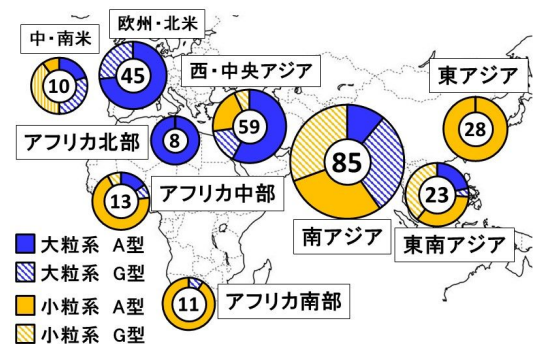
第 4 図 有機酸代謝関連遺伝子における塩基配列変異と PCR 産物の電気泳動



第 5 図 果肉色関連遺伝子における塩基配列変異と PCR 産物の電気泳動



第 6 図 有機酸代謝関連遺伝子の配列多型に基づいて決定した栽培メロンの遺伝子型とその地理的分布



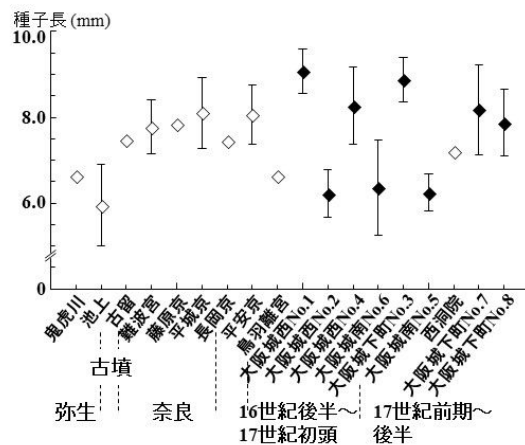
第 7 図 果肉色関連遺伝子の配列多型に基づいて決定した栽培メロンの遺伝子型とその地理的分布

大阪城・城下町跡を含む近畿地方の遺跡について種子の長さとう幅を計測したところ、長さは幅と高い相関を示した ($r = 0.975, p < 0.01$)。種子の長さは弥生時代、奈良時代と時代が経過するにつれて長くなっていた (第 8 図)。これに対し 16 世紀後半の大阪城・城下町跡では、8 つの地点は、出土したメロン種子の長さにより 2 つに分けられた。一方は、6.0mm 前後の長さのメロン種子が主に出土している地点 (No. 2, 6, 5)、他方は 8.1mm 以上の長さの種子が主に出土している地点である (No. 1, 3, 4, 7, 8)。特に、No.2 や No.5 の種子では (それぞれ、16 世紀後半および 17 世紀前期)、種子長は 7.5mm 以下と現生のマクワの種子長変異と近かった (第 9 図)。一方、No.1 や No.3 の種子では (それぞれ、16 世紀後半および 17 世紀前期)、それぞれ 90 粒の種子長は 8.1mm 以上と、インドなど南アジアに固有のモモルディカメロンの種子長変異と近かった。大阪城・城下町跡のメロン種子遺存遺体について、先の科研費で開発した DNA マーカーを用いて細胞質型を解析した。その結果、細胞質型は 46 粒で Ia 型、1 粒で Ib 型であった。

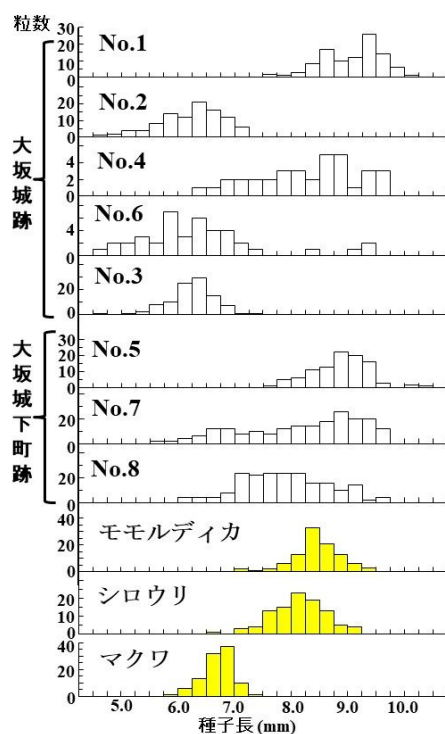
以上の結果は、大阪城周辺において豊臣期頃には既にモモルディカ型やマクワ型の種子を有したメロンが利用されたこと、それらのメロン仲間が主に Ia 型の母系から普及しており、現生メロンの育成系譜と関連があることを示していた。

CmOr に特異的 PCR プライマーを利用した増幅では期待サイズの DNA 断片が 160 粒のうち 49 粒において復元できた (第 2 図、第 1 表、30.6%)。このうち、39 粒は 17 世紀の地層から採集したメロン種子であった。これらの DNA 断片において一塩基多型の配列は A と、緑または白色の果肉である日本の在来メロンと同じであった。*CmPH* に特異的 PCR プライマーを利用した増幅では、期待サイズの DNA 断片が 11 粒において復元できた (6.9%)。塩基配列の解析により、1 粒の DNA 断片は 80bp 型で、酸味があるシロウリや雑草メロンにおいて認められる配列であった。また、この配列を有する種子の集団 No.4 は、種子長が $8.4 \pm 0.8\text{mm}$ と、大型であった。残る 10 粒の DNA 断片は挿入を有する 92bp 型で、酸味の低い欧米のメロンおよび日本のマクワやシロウリで認められる配列であった。

以上の結果は、大阪城周辺において豊臣期以降から 17 世紀後半までは酸味が低く緑色または白色の果肉のメロンが主に好まれていたこと、それらのメロン仲間が日本在来のマクワやシロウリと関連があることを示していた。



第 8 図 近畿地方の遺跡におけるメロン種子長の変異。各集団の粒数は No. 4 と No.6 を除いて 100 粒である。は藤下 (1983) の結果である。



第 9 図 大阪城・城下町跡と現生におけるメロン種子の種子長変異。大阪城・城下町跡の No.1~No.8 は地点番号を示す。各地点、メロンで種子長の計測数は No.4 と No.6 を除いて 100 粒である。

第 1 表 大阪城跡・大阪城下町跡のメロン仲間における遺伝子型の構成

地点/時代	年代/メロングループ	供試数 ¹	<i>CmOr</i>			<i>CmPH</i>			
			A	G	未同定	80	H ²	92	未同定
No.1	1580~1598	20	0	0	20	0	0	0	20
No.2	1580~1598	20	1	0	19	0	0	1	19
No.4	1580~1598	20	0	0	20	1	0	0	19
No.6	1580~1598	20	9	0	11	0	0	2	18
No.3	1598~1615	20	0	0	20	0	0	1	19
No.5	1615~1624頃	20	13	0	7	0	0	3	17
No.7	17世紀前~中	20	13	0	7	0	0	2	18
No.8	17世紀後半	20	13	0	7	0	0	1	19
	小計	160	49	0	111	1	0	10	149
現生	モモルディカ	6	0	6	0	4	2	0	0
	マクワ	19	19	0	0	3	1	15	0
	シロウリ	9	9	0	0	7	0	2	0
	雑草メロン	23	23	0	0	20	0	3	0
	小計	57	51	6	0	34	3	20	0

¹大阪城跡・大阪城下町跡のメロン仲間では粒数、その他の現生メロンでは系統数である。

²Hは80bpと92bpのDNA断片を保有するヘテロ型。

<結 論>

本研究によりメロン種子遺存体における果実の酸味や果肉色を推定する DNA マーカーを開発できた。

これらの DNA マーカーを用いた系統解析によって、起源地に近い南アジア、西・中央アジアやアフリカ中央部の現生メロンが多様であるのに対し、東アジアの現生メロンは固有の遺伝子型に収束しており、成立の過程で選抜を受けたことがわかった。

メロン種子遺存体の解析によって、近世の商業都市である大坂城・城下町ではメロン仲間の選択において酸味や果肉色に好みがあったこと、それらのメロン仲間が日本在来のマクワやシロウリと関連があることを示していた。

今後、これら DNA マーカーを利用して近畿地方や別地域における弥生時代から近世までのメロン種子遺存体を分析することで、作物への嗜好と選抜との対応を検討する。

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 2 件)

Tanaka, K., Stevens, C.J, Iwasaki, S., Akashi, Y., Yamamoto, E., Dung, T.P, Nishida, H., Fuller, D.Q, Kato, K., Seed size and chloroplast DNA of modern and ancient seeds explain the establishment of Japanese cultivated melon (*Cucumis melo* L.) by introduction and selection, Genetic Resources and Crop Evolution, 査読有、63 巻、2016、1237–1254.

Dung, T. P., Thuy, D. T., Tanaka, K., Nhi, P. T. P., Nishida, H., Kato, K., Development of RAPD-derived STS (Sequence-Tagged-Site) markers for genetic diversity assessment in melon (*Cucumis melo* L.). Journal of Agricultural Science and Technology A & B & Hue University Journal of Science, 査読有、5 巻、2016 年、449–456.

[学会発表](計 6 件)

田中克典・大庭重信・加藤謙司、近世大坂城・城下町より出土したメロン種子のサイズおよび果実形質関連遺伝子の分析、日本文化財科学会第 35 回大会、2018 年(発表確定)

Tanaka, K., Kato, K., Collection of genus *Cucumis* L. during the last decade and their variation in fruit and seed traits, 4th International Vavilov Conference, St. Petersburg, Russia, 20-24 November 2017.

田中克典、出土ウリの形状分析と DNA 分析からわかること、岡山大学埋蔵文化財調査研究センター公開講座 考古学と関

連科学『ウリとモモと人とのかわり』、岡山大学附属図書館、2017 年 1 月 21 日。
Tanaka, K., Oba, S., Kato, K., Seed size and genetic variation was shifted with changing political and social conditions in Japan, 17th International Work- Group for Palaeoethnobotany, National Museum for Natural History, Paris, 4-9 July 2016.

田中克典・大庭重信・加藤謙司、近世大坂城・城下町より出土したメロン種子の形状および DNA 分析、日本文化財科学会第 33 回大会、奈良大学、2016 年 6 月 5 日、研究発表要旨集、84-85。

田中克典・Duong Thanh Thuy・山下洋士・松永啓・松島憲一・Seang Layheng・Simso Theavy・Sakhan Sophany・友岡憲彦・加藤謙司、カンボジア東部・西部の在来メロンにおける果実および種子の多様性、日本育種学会第 129 回講演会、横浜市立大学、2016 年 3 月 22 日、育種学研究、18 巻、別冊 1 号、45 頁。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 克典 (TANAKA, Katsunori)
弘前大学・農学生命科学部・助教
研究者番号：00450213

(2) 研究分担者

該当者なし。

(3) 連携研究者

加藤 謙司 (KATO, Kenji)
岡山大学大学院・環境生命化学研究科・教授
研究者番号：40161096

(4) 研究協力者

山本 悦代 (YAMAMOTO, Etsuyo)
岡山大学・埋蔵文化財調査研究センター・教授
大庭 重信 (OBA, Shigenobu)
[公財] 大阪市博物館協会・大阪市文化財研究所・学芸員