

[1998年度大会セミナー概要]

ブドウ・ワインにおけるバイオテクノロジー（分子生物学的研究）の現状と今後の方向性

山梨大学ワイン研究センター 奥田 徹

はじめに

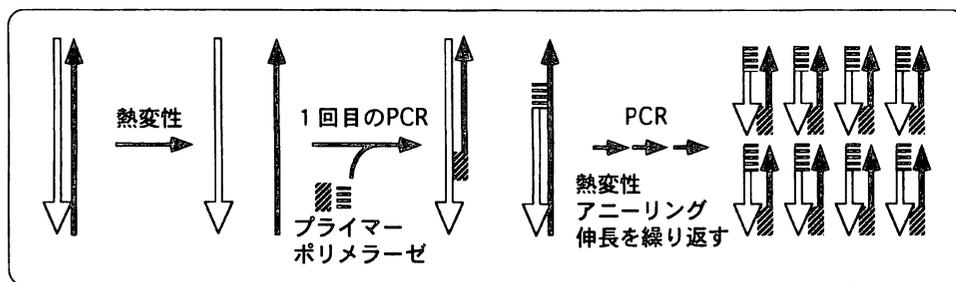
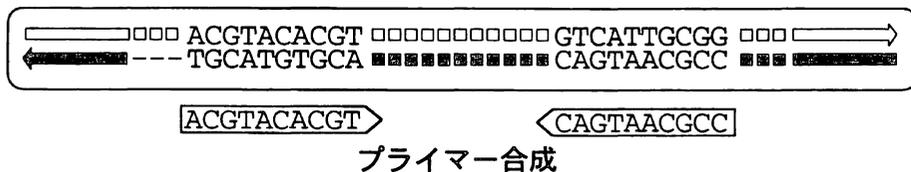
この数年の間に、バイオテクノロジーは更に大きな発展を見せている。バイオテクノロジーとは「生き物そのもの、あるいは生き物の持つ機能を巧みに利用する技術」と定義されている。従って、通常のワイン醸造や「かけ合わせ」による品種改良も立派なバイオテクノロジーの範疇である。しかし、「醸造」や「かけ合わせ」のような比較的自由に任せた方法だけではなく、「〇〇の部分の△△を□□にしたい」という、より直接的な、そして現場に即した改良が出来るようになってきている。このような技術は、生物の設計図である遺伝子を書き換えることによって達成されており、このような遺伝子に関連した学問を分子生物学と呼んでいる。最近では、従来の組換え微生物を利用した薬品やその他の製造・利用から、更に直接的な原料自体の組換えが盛んに

行われるようになった。欧米諸国では大豆やトウモロコシ、菜種をはじめとする多くの食品原料の農薬耐性や耐病性などに対する遺伝子組換えが行われ、これらの原料や加工食品を多く輸入する我が国にとって、その安全性や表示の義務化をどのようにしていくかは重要な問題である。ブドウ・ワイン産業において遺伝子に関連した研究がどのように行われているのか、どのような分野でそれらの技術が利用でき、今後どのように利用される可能性があるのかについて考えてみた。

ブドウ・ワイン産業におけるバイオテクノロジーの現状 PCR技術の発達

PCR(Polymerase Chain Reaction)は、膨大な情報を持つ遺伝子の特定の部分を増やすことが出来る技術である。鋳型となるDNAとプライマーと呼ば

れる短い一本鎖のDNA（最近では1ベース当たり百数十円で外注できる）を混合し、DNAポリメラーゼを用いた伸長反応を行うことで、プライマー間の遺伝子を倍に増幅する（第1図）。このサイクルを通常30回も繰り返せば、目的の遺伝子を 2^{30} 倍に増やすことが出来る。PCR技術は現在の分子生物学の基礎的な技術となっており、「遺伝子鑑定」から「クローニング」、「配列決定」まで広く用いられる。



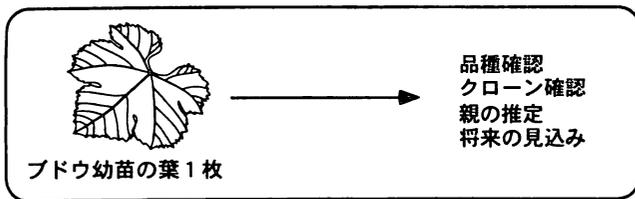
第1図 PCRの原理

増幅したい遺伝子の両側の配列をもとに短い一本鎖DNAを作成する。鋳型となるDNA（ブドウDNA等）を95℃程度で熱変性すると二本鎖が一本鎖2本に分離するので、プライマー、ポリメラーゼ、緩衝液を加え、アニール（プライマーと鋳型の結合）、伸長（プライマー部分を足場にした複製反応）を行う。変性から伸長までのサイクルを繰り返すことで、1サイクル当たり2倍にプライマー間の遺伝子が増幅する。

クローンの識別技術の発達

「クローン」とは同じ遺伝子を持った個体という意味で使われる。人間では一卵性双生児が、植物では挿し木や株分けのように同じ植物を途中で分けて栽培した場合、クローンとなる。

最近では犯罪の証拠として、遺伝子を用いる場合がある。遺伝子を用いることにより、同じクローンか違うクローンかを特定できるのである。人間の場合は、体の中の遺伝子は、皮膚から血液に至るまで全て同じであるのでこのような方法が可能となる。同



様な手法が植物にも応用できる。これによって品種 (ChardonnayとかMerlotなど) や「枝変わり」、親株の特定・識別ができる。単一の植物であれば、根から葉、茎などあらゆる部分で遺伝子は同じである (但し種子は除く)。従って、ブドウの苗 (小さ

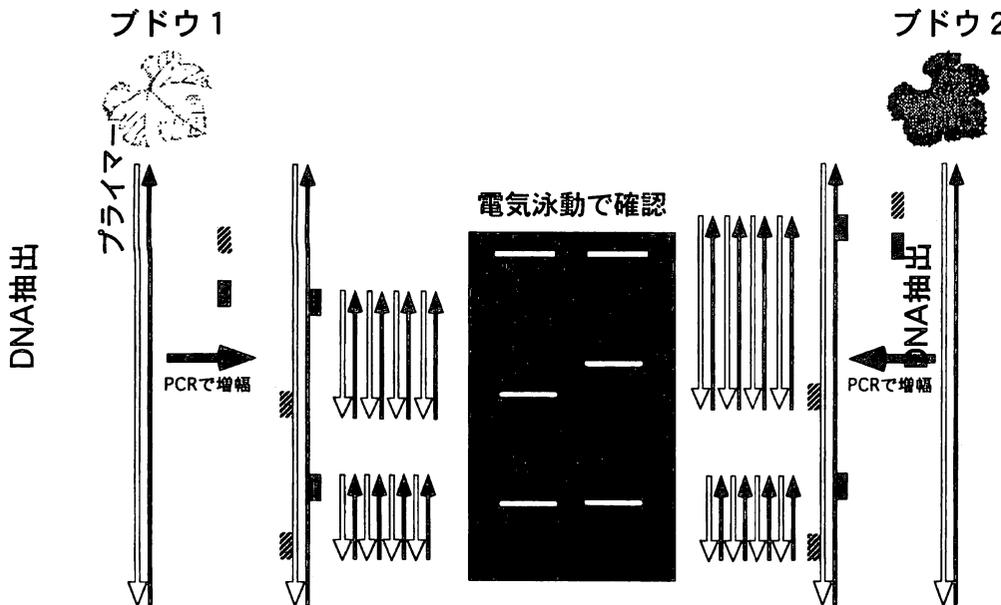
な葉が1枚) があれば、その品種、他の苗と同じか異なるかが、ブドウの実がなくても識別できる。また、遺伝子解析は、施肥や土壌、気候などに全く影響を受けない点も特徴の一つである。既に欧州系のブドウ品種では、品種の特定ができるような方法も確立されている (マイクロサテライト法)。遺伝子の解析にはRAPD (第2図)、RFLP、AFLP、SSCP などと呼ばれる手法が用いられるが、ブドウについてのこれらの手法が確立すれば、苗の段階で良いブドウ・悪いブドウの識別が可能となる。また、この技術の応用として、ブドウのウィルス遺伝子を検出する方法も開発されている。この技術を用いれば、既に畑で栽培されているブドウ樹のウィルス感染の有無を簡単に検出できる。

遺伝子の組換え技術

遺伝子組換え酵母

従来より、遺伝子操作は細菌を中心に広く研究されている。特に大腸菌は組換え体を得ることが容易で、薬品などの製造に広く用いられている。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) も全遺伝子配列が決定され、最近では工業的利用だけでなく、遺伝子の研究の「道具」として用いられるようになってきている。

酵母では数年前から Malolactic fermentation (MLF) 能を有する組換え体を得られるようになり、既に発酵試験が行われ、乳酸菌を添加しなくても酵母の発酵だけでリンゴ酸が分解できることが示されている (AJEV 48, No.2, 193-197, 1997)。同様の手法で低温発酵性、キラー性、凝集性の導入実験が行われている。酵母は比較的成長が速いので、今後ワイン醸造に適した組換え酵母が数多く作り出されると考えられる。



第2図 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)の原理
 遺伝子のクローンの違いを検出する方法の一つで、短いプライマー (非特異的プライマー) を使ったPCRを行う。プライマー間の遺伝子に変異があり、遺伝子が長くなったり短くなったりしていると電気泳動で簡単に検出できる。

遺伝子組換えブドウ

植物は一般に遺伝子が大きく研究が不十分であるため、遺伝子操作は難しいとされている。シロイヌナズナや稲、小麦などでは全遺伝子配列の決定が各国で精力的に行われているが、これらの全配列が決定されるにはまだ数年の時間が必要であると思われる（極最近の報告では、アメリカが稲の全配列の決定を開始し、年内にも稲の遺伝子が全て決定されるかもしれない）。しかし、全遺伝子配列が決定できなくても、植物に目的遺伝子を入れることは出来るので、トマトやジャガイモ等の植物では盛んに遺伝子の組換え実験が行われている。遺伝子操作の特徴として、導入する遺伝子が何から得られても、理論的には導入が可能である点がある。即ち、細菌や動物の遺伝子を植物に導入することが可能である。従って、ブドウ以外の植物で、有用な遺伝子が見つければ、それをブドウに入れることも可能であるし、その逆も可能である。ブドウではスチルベンシンターゼと呼ばれる酵素（リスベラトロール合成酵素）が、耐病性に効果があることが知られているが、この遺伝子は既にトマトに導入され、耐病性が向上したとの報告もある。

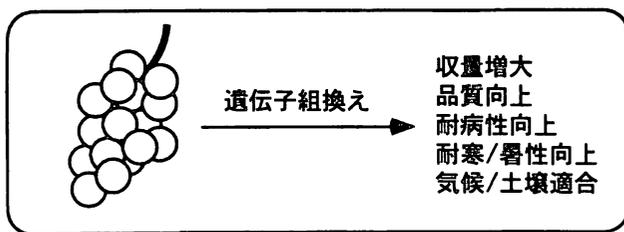
ブドウ栽培において分子生物学的研究が利用される範囲は限りが無いが、現在考えられている項目としては、以下の表のようなものがある。

目的	制御する遺伝子	現 状
耐寒性の向上	Superoxide dismutase 他	フィールド試験中？
アントシアニン増減	UFGT等アントシアニン合成酵素群	遺伝子はほぼわかっている
耐病性の向上	Stilbene synthase、Chitinase等	遺伝子はほぼわかっている
搾汁時の褐変の防御	Polyphenol oxidase	遺伝子はわかっている
熟期のコントロール	Polygalacturonase、Invertase等	遺伝子は若干わかっている
ウィルス耐性	検討中	検討中
光合成能の強化	Rubisco等	遺伝子はわかっている

従来の「かけあわせ」や「細胞融合」に比べれば、目的の遺伝子だけを入れられる上、抗生物質耐性などでスクリーニングが可能になるので、選抜作業もはるかに容易になる。また、遺伝資源はブドウに限らないので、ブドウにない遺伝子の導入も可能である。以上のように、ブドウの組換えは始まったばかりだが、少なくとも研究室レベルでは数年の内にいろいろな組換えブドウが報告されると考えられる。現在までにブドウやブドウ関連ウィルスの遺伝子は、80近くがデータベースに登録されている。残念ながら遺伝子情報は特許性があるため、実験者が公開しない場合も増えてきている。

今後の方向性

前述の通り近い将来、様々な遺伝子解析が行われるようになると考えられる。ブドウの苗に、遺伝子鑑定書が付けられる時代も来るかもしれない。また、組換え体ブドウから高品質のワインが醸造されるようになるかもしれない。海外の濃縮果汁などを利用すると、意図せずとも組換えブドウを利用することになるかもしれないし、果汁の中には遺伝子は含まれないので、後から調べることも困難になると考えられる。組換えに用いる遺伝子自体よりも、組換え操作によって生じる新しいタンパク質や二次代謝物の毒性、アレルギー性が問題になるであろう。これらの点も含めて、十分な検討をする必要がある。



現在の技術では、植物細胞にアグロバクテリウム法やパーティクルガン法で遺伝子を入れ、それを分化させて植物体とする方法が一般に行われている。しかし、ブドウ（特に *Vitis vinifera*）では分化の技術が確立していないため、組換えブドウの成功例はまだ少ない。しかし、分化の技術が確立されれば、急速な研究の進展が期待される。既に、カナダでは *Vitisi vnifera* を用いた組換えブドウが植えられたとの報告もある。

1. 新版植物のPCR実験プロトコール（島本功、佐々木卓治監修）秀潤社（1997）.
2. A Look Beyond Transcription—Mechanisms

2. A Look Beyond Transcription—Mechanisms Determining mRNA Stability and Translation in Plants (J. Bailey-Serres and D. R. Gallie ed.) American Society of Plant Physiologists (1998).
3. Methods in Plant Molecular Biology—A Laboratory Course Manual (P. Maliga, D. F. Klessig, A. R. Cashmore, W. Gruissem, and J. E. Varner ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press (1995).
4. 植物のゲノムサイエンス—遺伝子・染色体から生体機能を解明する (大山莞爾、飯田滋、島本功監修) 細胞工学別冊 秀潤社 (1996).
5. 植物の形を決める分子機構—遺伝子から器官形成へ (渡邊昭、島本功、福田裕穂、内藤哲監修) 細胞工学別冊 秀潤社 (1994).

昨年の 9 月に発行しました Vol. 9, No. 2 の本文中に誤字がありましたので、以下のよう
に訂正します (編集部)。

- | | | | |
|--------------------|---------------|---|-------------|
| P. 97 左側、下から 12 行目 | : 成木は 9 月下旬には | → | 成木は 4 月下旬には |
| P. 101 左側、上から 3 行目 | : 収穫時期の層に | → | 収穫時期の相違に |
| P. 110 右側、上から 7 行目 | : 主枝が | → | 種子が |
| P. 111 左側、上から 4 行目 | : 房の位置は貴部 | → | 房の位置は基部 |