

[総説]

醸造用ブドウの DNA 多型解析に関する研究

後藤 (山本) 奈美

(独) 酒類総合研究所 〒739-0046 東広島市鏡山 3-7-1

Polymorphic DNA Analysis of Wine Grapes

Nami GOTO-YAMAMOTO

National Research Institute of Brewing, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-0046, Japan

ブドウには非常に多くの品種があり、仏語には“ampélographie” (ブドウ分類学) という単語がある程である。近年、DNA の塩基配列の多様性、すなわち DNA 多型を生物の分類・識別に利用する研究が多く報告されている。筆者らは DNA 多型解析を用いたブドウ栽培品種及び野生種の類縁関係の推定、並びに品種の同定を行ってきた。この総説では、それらの研究結果を報告した下記の原著 4 編をまとめるとともに、海外の代表的な報告を紹介したい。

- 1 Goto-Yamamoto, N., R. Mochioka, L. Bonian, K. Hashizume, N. Umeda, and S. Horiuchi. RFLP and RAPD analysis of wild and cultivated grapes (*Vitis* spp.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64: 483-490 (1998).
- 2 Goto-Yamamoto, N. Phenetic clustering of grapes (*Vitis* spp.) by AFLP analysis. Breeding Sci. 50: 53-57 (2000).
- 3 後藤 (山本) 奈美・万光華・沼田美子代・荒巻功・橋爪克己. Simple Sequence Repeat (SSR) 解析による不明ブドウ品種の同定. J. ASEV Jpn. 15: 52-57 (2004).
- 4 Goto-Yamamoto, N., H. Mouri, M. Azumi, and K.J. Edwards. Development of grape microsatellite markers and microsatellite analysis including oriental cultivars. Am. J. Enol. Vitic. 57:105-108 (2006).

1. DNA 多型解析の概要

同じ種の生物が、個体によってある形態や性質などについて多様性を示すことを多型性 (または多形性、polymorphism) と呼ぶ。メンデルが遺伝の研究に用いたエンドウの実の色や草丈の高低などは多型の一例である。また、アイソザイム解析に用いられる酵素の電気泳動度の違いなどはタンパク質多型と呼ばれ、タンパク質のアミノ酸配列の違いに起因する。同様に、対応する遺伝子 (DNA) の塩基配列 (シーケンス) の違いを DNA 多型と呼ぶ。DNA のシーケンスを多数のサンプルで調べるためには、時間とお金がかかるが、これを簡便に検出する方法が種々実用化されている。

最初に用いられた DNA 多型の解析方法は、サザン解析を用いる制限酵素断片長多型 (Restriction

Fragment Length Polymorphism, RFLP) 解析 (Figure 1) である。これは、DNA を制限酵素で消化して、ゲル電気泳動し、2 本鎖 DNA をアルカリ処理で 1 本鎖に解離 (変性) させた後、ナイロン膜に転写させ (ブ

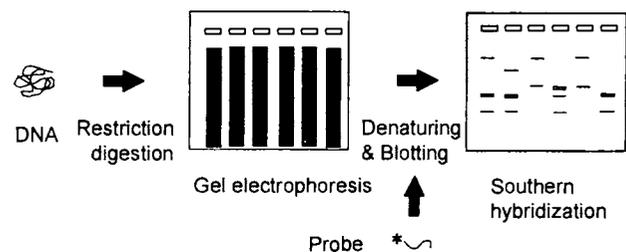


Figure 1 Schematic representation of the method of RFLP analysis.

ロットティング)、RI 等でラベルした 1 本鎖 DNA 断片 (プローブ) を、膜上の DNA に相補的に結合させ (ハイブリダイゼーション)、結合した位置を検出する方法である。プロットティングやハイブリダイゼーションに時間が掛かるため、多数のサンプルを処理するには問題が多い。

2 カ所の DNA 配列 (プライマー) に挟まれた DNA 鎖を増幅させる PCR が実用化されると、これを用いた DNA 多型解析方法が次々と開発された。PCR を用いた方法は、基本的には増幅された DNA 断片をゲル電気泳動で検出し、その泳動度の違いで増幅断片の長さの違いを求めるため、RFLP 解析よりもはるかに簡便で、多数のサンプルの処理にも適している。PCR で増幅した断片を制限酵素消化し、電気泳動で検出する PCR-RFLP 法も利用されている。以下、筆者らが行った Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 解析、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 解析、及び Simple Sequence Repeat (SSR) 解析の結果を紹介する。

2. RAPD 解析及び AFLP 解析によるブドウの類縁関係の推定

RAPD 解析は、ランダムに選んだ 10-12 塩基の配列を PCR プライマーに用い、若干のミスマッチを許した条件で PCR を行い、増幅断片をゲル電気泳動で検出する解析方法である。塩基配列の情報なしに多型が検出できるため、一時期多くの栽培植物の研究に利用されたが、再現性やデータの互換性に問題があるとされている。筆者らは、10 塩基のプライマー 5 種類を用いて、ブドウの野生種及び栽培品種の RAPD 解析を行い、各サンプルのフラグメントの有無から非共有率を求め、非加重平均法で樹形図を作成した。その結果、野生種及び栽培品種が一部の例外を除いて大きく 2 つのクラスターに分かれ、さらに *V. vinifera* と *V. labrusca* がそれぞれのクラスターを形成した。しかし、*V. vinifera* の品種間の関係は、必ずしも従来の知見と一致するものではなかった (原著論文 1)。

そこで、当時新しく開発された、多型の検出感度の高い AFLP 解析を行った。AFLP 解析は、2 種類の制限酵素 (*EcoRI* と *MseI*) で消化したゲノム DNA の断片に、*EcoRI*、*MseI* 切断サイトを相補するアダプタ

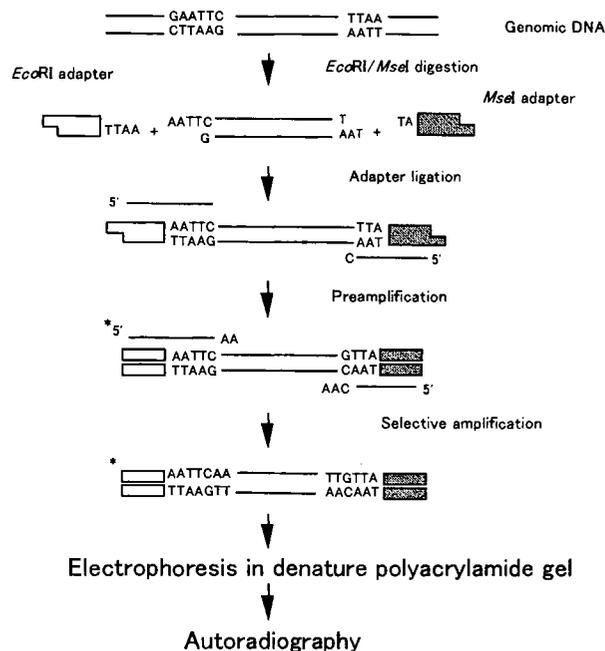


Figure 2 Schematic representation of the method of AFLP analysis using a RI labeled primer.

ーを結合し、アダプターの配列及び 1~2 塩基の選択配列を持つプライマー (*EcoRI* 側のみ RI 等でラベル) で PCR を行い、シーケンスゲルで電気泳動して、フラグメントを検出する方法である (Figure 2)。一度に多くのフラグメントが検出されるため、多型の検出感度が高い。しかし、不完全な制限酵素消化や、不適切な条件による制限酵素のスター活性 (塩基配列認識の特異性が低下する現象) が起こらないよう、注意が必要である。

AFLP 解析のフラグメント非共有率から、樹形図を作成したところ、野生種、*V. labrusca* 及び *V. vinifera* がそれぞれのクラスターを形成するとともに、*V. vinifera* の東洋系品種及び西洋系品種もそれぞれクラスターを形成し、*V. vinifera* の生態学的な分類ともよく一致する結果となった。(原著論文 2、Figure 3)。すなわち、生態や形態で分類されていた西洋系品種と東洋系品種の違いは、遺伝子レベルの差異を反映したものであることが明らかになった。なお、この樹形図は、サンプル間の類似度 (表型距離) を示すものであり、必ずしも進化の系統を示すもの (系統樹) ではない。

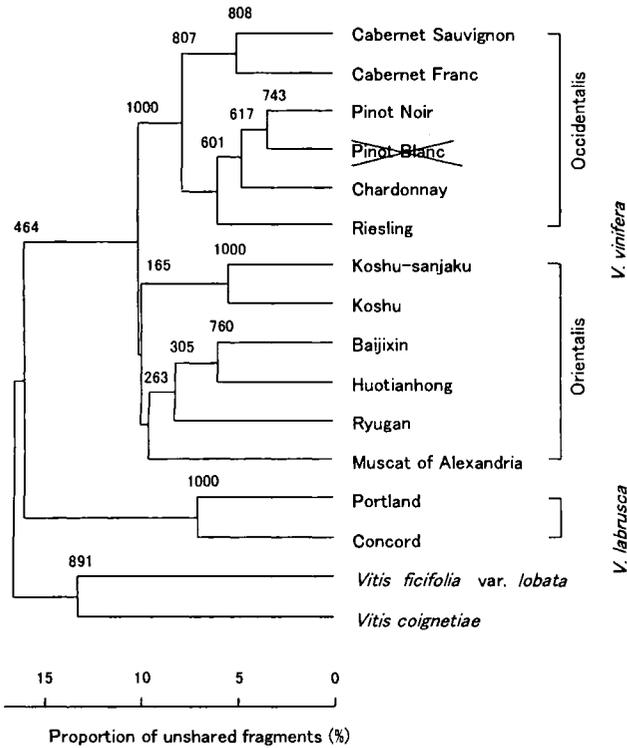


Figure 3 Phenetic clustering of grapes based on AFLP fragments. DNA sample of Pinot blanc was proved to be not correct. The numbers on the clusters indicate bootstrap probabilities per 1000.

3. 甲州の類縁関係の推定

わが国固有のブドウ品種と考えられている甲州は、アイソザイム解析の結果から *V. vinifera* と野生種の自然交雑品種と推定されるという報告 (1) もあるが、同じく日本の品種である甲州三尺や中国の竜眼、白鷄心などとともに *V. vinifera* 東洋系カスピ海亜系に属するという説が一般的である (2)。

上記 RAPD 解析及び AFLP 解析の結果から、甲州は甲州三尺と類縁関係が高いこと、並びに両品種とも東洋系の *V. vinifera* のクラスターに含まれることが示された。なお、甲州は竜眼の実生ではないかと推定する説や和田紅の子孫と推定する説もあるが、リボゾーム DNA のスペーサー配列をプローブに用いた RFLP 解析の結果、甲州からは竜眼や供試した他の栽培品種には認められないマイナーなフラグメントが検出され、少なくとも竜眼や和田紅の自家受粉による実生ではないことが明らかになった (原著

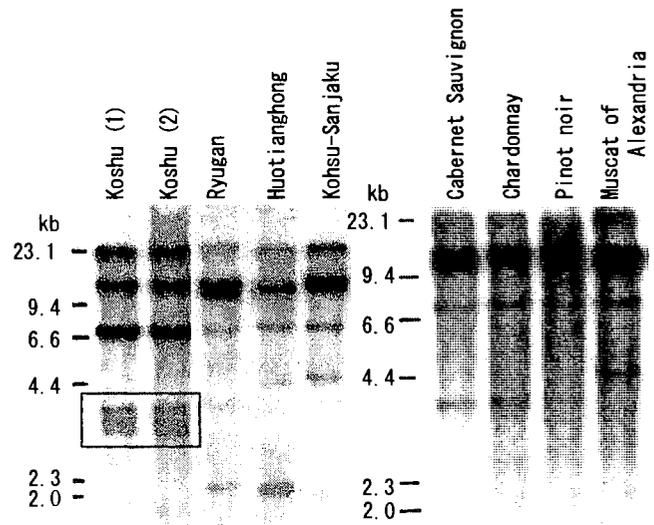


Figure 4 RFLP analysis of Oriental and Occidental cultivars of *V. vinifera*. HindIII digested DNA was hybridized with the spacer region of rDNA.

論文 1、Figure 4)。

4. SSR マーカーの開発と利用

SSR 解析はマイクロサテライト解析とも呼ばれ、ゲノム中に散在する 2-4 塩基のコア配列の繰り返し (マイクロサテライト DNA) の長さの違いを PCR で検出する方法である。マイクロサテライト DNA は繰り返し回数の違いによる変異が起こりやすいため、ブドウの品種間のような極めて近いサンプル間であっても、容易に差異を検出することができる。また、SSR 解析は再現性が高く、遺伝子座特異的な解析であることから、有用形質との連鎖解析や遺伝子地図の作製にも利用されている (3)。

この方法を用いて、UC Davis の Meredith らは Cabernet Sauvignon が Cabernet franc と Sauvignon blanc の自然交雑によって生じた可能性が高いこと (4)、同様に Pinot と Gouais blanc から Chardonnay, Melon, Gamay, Aligoté 等が生じたと考えられること (5) を明らかにし、大きな話題となった。また、Müller Thurgau は Riesling と Silvaner の交配品種とされていたが、以前から交配親が異なるのではないかと指摘されていた。オーストリアの Sefc ら (6) は、交配親は Riesling と Chasselas de Courtilier と推定されると

報告した。しかし、ドイツの Dettweiler ら (7) は、Müller Thurgau は Chasselas de Courtiller ((6) とスペルが異なるが、原報のままとする) と形質が大きく異なることから、オーストリアの Chasselas de Courtiller を調べたところ、ドイツで保存されている株や本の記載と性質が異なっており、Müller Thurgau の交配親は Riesling と Madeleine Royale と推定されると報告した。

筆者らはブドウの SSR マーカーを開発する共同研究、Vitis Microsatellite Consortium に参加し、9 種類のマーカーを実用化した。RAPD 解析や AFLP 解析も品種の異同や交配品種の親子関係の証明に有用であるが、品種の同定にはデータベース化に適した SSR 解析が有用と考えられる。SSR データは研究グループによって若干のズレがあるものの互換性があり、いくつかのグループから多くの品種について報告されている。共通に解析されている品種のデータの比較からズレを補正することで、他の研究グループのデータとの比較が可能になり、不明品種の同定を行うことができた (原著論文 3)。

また、欧米の研究グループが解析を行っていない東洋系品種 8 品種を含むブドウの SSR 解析を行い、フラグメント非共有率に基づく樹状図を作成したところ、東洋系品種は西洋系品種とクラスターが分離し、AFLP 解析の結果同様、東洋系品種が西洋系品種と異なる遺伝的バックグラウンドを持つ貴重な遺伝資源と考えられることが示された (原著論文 4, Figure 5)。なお、SSR データによるフラグメント非共有率からも甲州が甲州三尺と近い品種であることが確認されたが、甲州と東洋系カスピ海亜系に属する竜眼や和田紅、白鷄心とのフラグメント非共有率は、甲州と Riesling や Sauvignon blanc とのフラグメント非共有率と同程度あり、予想に反して、甲州は竜眼などの品種からやや遠い関係にあることが明らかになった。

ただし、ここで用いているブドウ品種は数や原産地が限られていることから、海外で報告されている多品種のデータとの比較が必要と考えられた。Sefc ら (8) は、ヨーロッパ各国のグループの共同研究として、162 品種の SSR データを公開するとともに、ドイツ、イタリア、スペインなどを原産地とする品種の多くは、アサイメントテストでそれぞれの原産

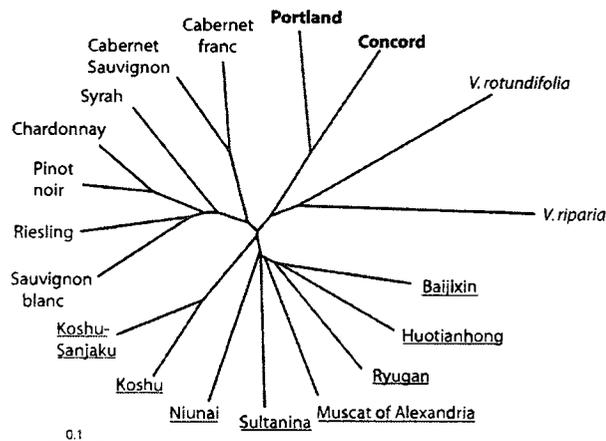


Figure 5 UPGMA dendrogram on the SSR analysis using 17 markers. The Occidental and Oriental cultivars of *V. vinifera* are shown by Roman font and underlined Roman font, respectively. The bold font represents the cultivars of *V. labrusca*.

地にアサインされること、すなわち、栽培品種の原産地によって SSR データに偏りがあるため、これを利用した判別分析によって原産地の推定が可能であることを報告している。そこで、この報告と同じマーカーで東洋系品種と *V. labrusca* 2 品種の SSR 解析を行い、データのズレを補正した上で、西洋系、東洋系、*V. labrusca* の 3 つのグループでアサイメントテストを行った。その結果、甲州、甲州三尺ともに東洋系にアサインされ、東洋系品種に特有の SSR データの偏りを持っていることが示された (9)。

5. 終わりに

海外ではこれらの DNA 多型をマーカーにした有用形質との連鎖解析も行われており、今後は育種への応用も期待される。さらに、SSR マーカーを利用したブドウの遺伝子地図の作製や、これを利用した全ゲノムシーケンスも進められている (<http://www.evry.inra.fr/public/projects/genome/grape.html>)。また、ブドウの Expression Sequence Tag (EST) 解析 (cDNA シーケンスを網羅的に解析し、どのような遺伝子が発現しているかを解析する方法) のデータに基づくジーンチップも発売されており、ブドウのゲノミクス研究、さらにプロテオミクス研究は今後急速に進展することが予想される。

文 献

1. 大見千枝・若菜章・白石眞一. ブドウにおける GPI, PGM アイソザイム対立遺伝子の種特異性と‘甲州’の起源. 園学雑. 59 別 2: 186-187 (1990).
2. 雨宮毅. 果樹園芸大百科 3. ブドウ. 品種の系統分類. pp. 125-130. 農文協. (2000).
3. Riaz, S., G.S. Dangl, K.J. Edwards, and C.P. Meredith. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. Theor. Appl. Genet. 108: 864-872 (2004).
4. Bowers, J.E., and C.P. Meredith. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. Nat. Genet. 16: 84-87 (1997).
5. Bowers, J., J.M. Boursiquot, P. This, K. Chu, H. Johansson, and C. Meredith. Historical genetics: The parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France. Science 285: 1562-1565 (1999).
6. Sefc, K.M., H. Steinkellner, H.W. Wagner, J. Glössl, and F. Regner. Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. Vitis 36: 179-183 (1997).
7. Dettweiler, E., A. Jung, E. Zyprian, and R. Töpfer. Grapevine cultivar Müller Thurgau and its true to type descent. Vitis 39: 63-65 (2000).
8. Sefc, K.M., M.S. Lopes, F. Lefort, R. Botta, K.A. Roubelakis-Angelakis, J. Ibáñez, I. Pejić, H.W. Wagner, J. Glössl, and H. Steinkellner. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. Theor. Appl. Genet. 100: 498-505 (2000).
9. 後藤 (山本) 奈美・沼田美子代・万光華・島本敏・橋爪克己. Simple sequence repeat (SSR)解析によるブドウ‘甲州’の類縁関係の推定. 園学雑. 75 別 1 : 67 (2006) .