

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

令和 3年 3月 31日

所属機関名 山梨大学ワイン科学研究センター

職名・氏名 研究員・青木 是直

【研究テーマ】

ブドウ樹内マイクロフローラによるテロワールの形成

【背景と目的】

ワイン醸造の原料となる醸造用ブドウ品種の特徴はワインの特徴に強く影響するとともに、ワインのエチケットに品種が記載されることで市場における購買意欲を刺激する。醸造用品種は、世界中で栽培される国際品種と、各産地に古くから根つきワイン醸造に利用されてきた産地固有品種と大別される(表1)。国際品種は欧州で選抜され、脈々と栽培され続けている品種であり、世界中のワイン生産地で栽培される世界共通の標準品種である。一方、産地固有品種は各栽培地で古くから栽培されてきた土着品種であり、栽培地のアイデンティティを主張する品種として尊重され、我が国では“甲州”がそれにあたる(表1)。すなわち、醸造用ブドウの品種は栽培地域にとって文化であり、伝統である。結果として、醸造用ブドウ栽培では品種の「モノカルチャー化」が優先されてきた。

国際品種	産地固有品種
カベルネ・ソーヴィニヨン	ジンファンデル(アメリカ・カリフォルニア)
メルロ	サンジョヴェーゼ(イタリア・トスカーナ)
シャルドネ	テンプラニーリョ(スペイン・リオハ)
リースリング など	甲州(日本・山梨) など

醸造用ブドウのモノカルチャー化は「テロワール」を生みだした。テロワールはフランス語であり、日本語、英語にはそれに相当する言葉はない。我が国でも頻繁に用いられるが、その定義は曖昧模糊としている。テロワールとは何か?という問いに答えるとすれば、「土地の要素」、「気候の要素」、「人的要素」を総合したブドウ栽培の環境を示す概念であろう(図1)。ワイン醸造の長い歴史をもつフランスでは、経験的かつ体感的にテロワールを概念化してきたと思わ

れる。一方、ワイン後進国である我々はテロワールの真の意味を感じ取ることができないまま、「テロワールを良く表現しているワイン」などと評価している。

テロワールが生じる理由を解明するため、多くの研究者が気象条件や土壌の性質がブドウ果実に与える影響を研究してきた。オーストラリアおよびアメリカでは、ブドウ栽培地の土壌生物叢(マイクロフローラ)解析プロジェクトが2016年に発表された。更に、2016年5月、オーストラリアの政府組織ワインオーストラリアは、土壌に生息する微生物の遺伝的多様性の大規模解析に4年間で850万ドルの研究開発投資を行うと発表した。同年9月には、ワイン科学研究で世界を牽引するカリフォルニア大学デービス校が「ブドウの生産地域は個別のマイクロフローラを持つのか」、「ブドウ畑の区画別に固有のマイクロフローラが存在するのか」、「各地域の微生物相はワインに影響を与えるのか」という仮説の検証に乗り出すと発表した。しかしながら、土壌1gには数百万種の細菌が存在し、個体としては数十億に達するほどの膨大な数の細菌が存在すると概算されている(Gans et al., 2005 Science)ため、最新のテクノロジーを持ってしても土壌生息細菌の全容を把握することは未だに不可能である。また、土壌生息糸状菌においては約5%しか属種が明らかになっておらず、残りの95%は未同定のままである。したがって、これらプロジェクトの成否はテクノロジーの更なる進歩に依存していると言える。

本申請課題では、「共生微生物叢(樹内マイクロフローラ)がブドウ樹の個性として認識される」ことを実証する。いかなる植物も内生の共生微生物が存在している。近年これらの中に植物細胞の代謝を変化させるものが発見されており(Huang et al., 2018 PLoS ONE)、植物と内在性共生菌との相互依存によって宿主植物の特性が変化する可能性が示唆されている。本申請課題では、「ブドウ品種により樹内マイクロフローラが異なるか?」、「一度獲得した樹内マイクロフローラは季節および年次により変動するか?」という仮説を検証し、テロワールを説明する新しい概念を探索する(図1)。

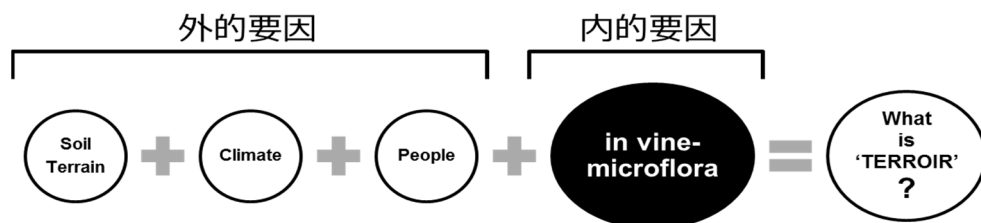


図1 テロワールを説明する新しい概念の検証

従来の内的要因3種に加え、ブドウ樹の内的要因：※in vine-microflora (樹内マイクロフローラ) がテロワールを形成するという新概念を本申請課題では検証する。

【ニーズと実社会への貢献】

本申請課題は、まったく新しい視点「樹内マイクロフローラ」から、テロワールを科学的に解析するための研究である。樹内マイクロフローラの相違が同一品種で土地別に確認できれば、醸造用ブドウをその土地に植える際の検討の一助になることが期待できる。研究においても、微生物農薬など醸造用ブドウに対し有用な微生物を探索する際に、樹内マイクロフローラのデータを利用しより効率的な探索が可能となる。一連の成果は、醸造用ブドウ栽培およびそこから生まれるテロワールを学術的に説明することを可能にする。これにより、全国のブドウ生産地で醸造されるワインをテロワールによってブランド化することが可能となる。

以上から、本申請課題の成果は、テロワールを科学的に明らかにし、地域資源としての醸造用ブドウの価値を向上させることによって果樹園芸産業、ワイン産業などの地域産業へ大きく貢献できると考える。

【研究の方法と成果】

1. ブドウ品種ごとによる樹内マイクロフローラの違い

同一栽培地の品種間および季節において樹内マイクロフローラが異なるかを検証するため、当該センターが有する品種保存圃場から醸造用ブドウ 4 品種の樹内マイクロフローラの網羅解析を行った。

供試品種はシャルドネ、甲州、ピノ・ノワール、カベルネ・ソーヴィニヨンの白ワイン用品種 2 種、赤ワイン用品種 2 種の計 4 種で、1、5、8、9 月(春夏秋冬)にそれぞれのサンプルを採集した。以下にサンプルの処理方法を記載する。

- 1) 回収した新梢を日和見感染菌の除去のため次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌する。
- 2) 表皮をはいだ新梢を金おろしで削り DNA を抽出し、PCR 法に供試する。その際、1 つの試料を 5 つに分け DNA 抽出作業を行い、最終的に得られた DNA 溶液すべてを 1 つのチューブにまとめることで、試料の均等性およびデータの信頼性を確保する。
- 3) PCR 法を用いて、糸状菌の Internal Transcribed Spacer1 領域および細菌 16S rDNA 領域を増幅する。
- 4) ゲノムシーケンサー FLX シーケンスシステム(ロシュダイアグノスティクス)に増幅産物を供試し、リード(シーケンスを解読できた配列を意味する)を取得する。本学に次世代シーケンサーが無いため、本項目は外部に委託する。リードは BLASTclust (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/blastclust>)により 97%以上相同な配列を持つリードをグループ化し、新梢に内生するマイクロフローラを解明する。目標値は各サンプルから 10,000 リードとする。
- 5) 得られたリードを、データ解析パイプライン(QIIME および RDP)を用いて統計学的に解析処理を行う。

以上方法により得られた結果を、図 2、図 3 および図 4 にまとめた。それぞれ図 2、図 4 は細菌、図 3 は真菌の網別リード数を集計しており、1 サンプルの全リード数を 100%としたとき、それぞれの割合を表している。

19 年度における細菌では白ワイン用品種である甲州およびシャルドネの 1、5 月において、Cyanobacteria が大きな割合を占めており、赤ワイン用品種である他 2 品種ではほとんど見られなかった。また、気温が上がる 5 月になると Cyanobacteria の割合が大きく増加し、8、9 月になると全く確認できなくなるなど、菌叢の季節変動が顕著にみられた。Cyanobacteria の多くは窒素

固定能を持ち、その一部は植物等に共生して宿主に窒素源を供給していることが知られている(John et al., 2007 Prokaryotic Symbionts in Plants)。5月には、ブドウ樹が1年で最も伸びる時期であり、特に甲州は多品種と比較して著しく成長する。このことから、これらのCyanobacteriaがブドウと共生関係にあり、ブドウの栄養成長に関与している可能性が示唆された。また、赤ワイン用品種であるピノ・ノワール、カベルネ・ソーヴィニオンでもFirmicutesの季節変動が顕著に起こっているのを確認できた(図2)。20年では、12月においてどの品種からもCyanobacteriaが確認されており、各品種の樹内マイクロフローラに変化がみられた。しかしながら、Cyanobacteriaの増加傾向については前年度と同様に気温が上がるにつれて樹内マイクロフローラの大半を占めていることが分かった(図4)。以上より2年間のみ結果であるものの各品種別に樹内マイクロフローラの季節変動を確認できた。

真菌では、全ての品種において気温の上昇に伴いBasidiomycotaの割合が増加しており、甲州では1月に10%ほどであったのが5月で30%以上、8、9月では50%に急増している。Basidiomycotaにはほとんどの肉眼で見れる子実体を形成する真菌、すなわちキノコが含まれている。このことからわかる通り、Basidiomycotaには植物寄生性の真菌が多く含まれるため、植物病原菌が増加している可能性が高い。これに加え、9月の甲州では判別できない真菌が4割近くを占めており、日本固有の醸造品種として他の品種とは異なる樹内マイクロフローラを持つことが示唆された(図3)。

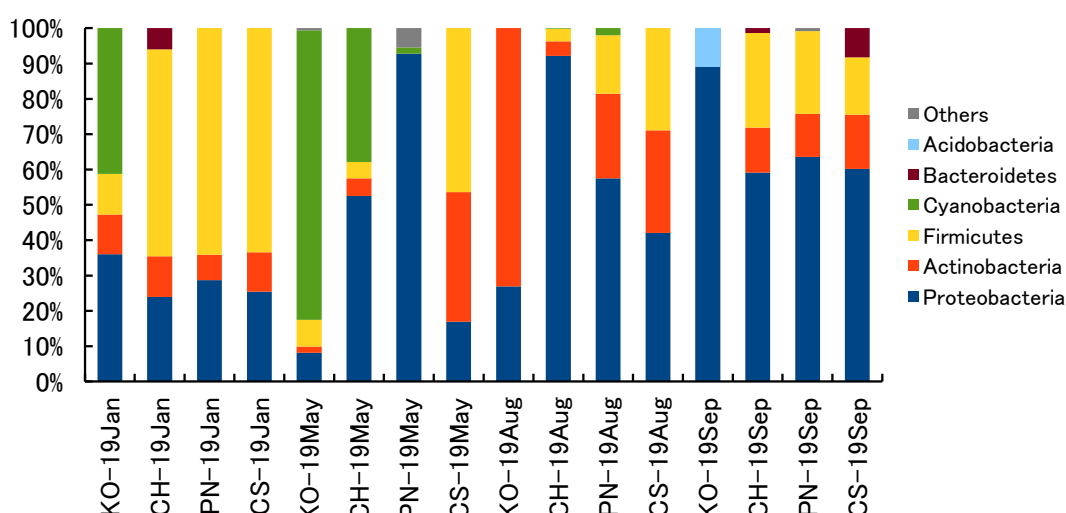


図2 19年におけるブドウ品種および季節別のバクテリア樹内マイクロフローラ比較

KO：甲州、CH：シャルドネ、PN：ピノ・ノワール、CS：カベルネ・ソーヴィニオン

19Jan：2019年1月、19May：2019年5月、19Aug：2019年8月、19Sep：2019年9月

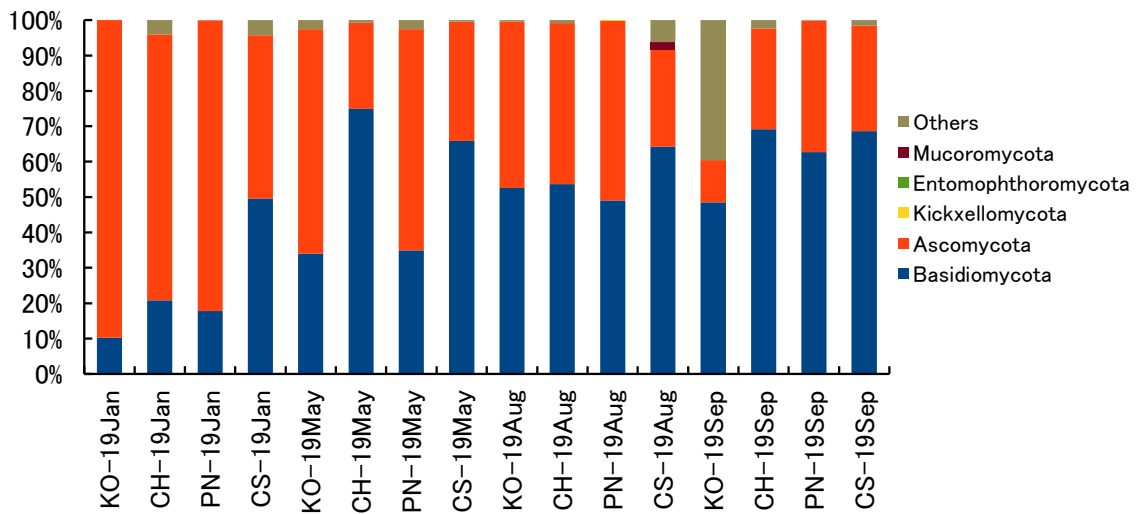


図3 19年におけるブドウ品種および季節別の真菌樹内マイクロフローラ比較

KO：甲州、CH：シャルドネ、PN：ピノ・ノワール、CS：カベルネ・ソーヴィニヨン

19Jan：2019年1月、19May：2019年5月、19Aug：2019年8月、19Sep：2019年9月

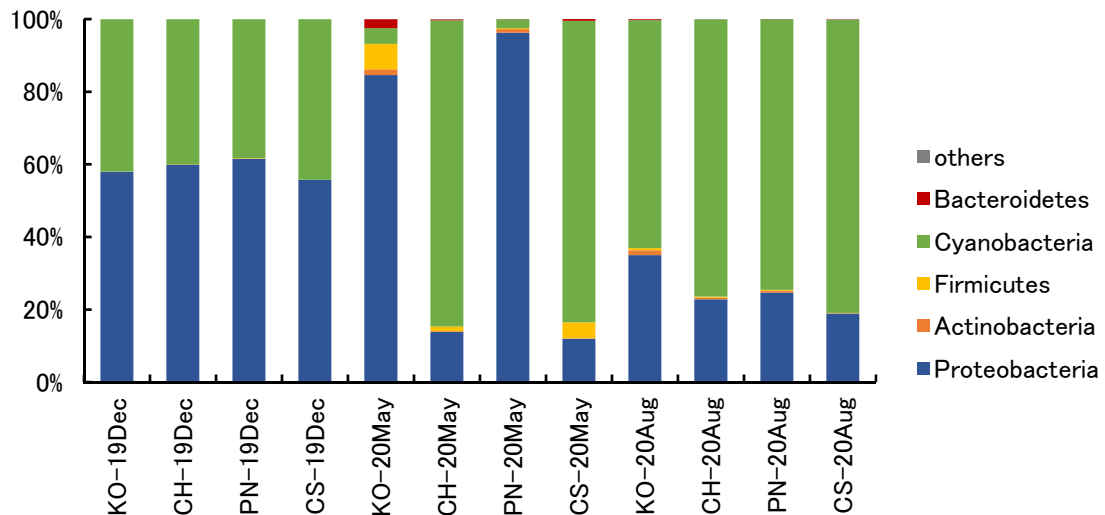


図4 20年におけるブドウ品種および季節別の細菌樹内マイクロフローラ比較

KO：甲州、CH：シャルドネ、PN：ピノ・ノワール、CS：カベルネ・ソーヴィニヨン

19Dec：2019年12月、20May：2020年5月、20Aug：2020年8月

2. 栽培地域ごとの樹内マクロフローラの違い

栽培地域における同一品種の樹内マクロフローラを比較するため、山梨県甲府市、山梨県甲斐市、長野県小諸市、長野県上田市で栽培されているカベルネ・ソーヴィニヨン(台木 5BB)を材料とし、樹内マイクロフローラの網羅解析を行った。その際、サンプルの処理および解析は1. と同様の手順で行った。

5月、8月にそれぞれのサンプルを採集し、これらの結果を以下の図5にまとめた。1. と同様に細菌の網別リード数を集計しており、1 サンプルの全リード数を100%としたとき、それぞれの割合を表している。傾向として、5月の段階でCyanobacteria およびProteobacteria が大半を占めており、8月にかけて1. の結果と同様に菌の種類が減る傾向にある。また、8月になると山梨県ではProteobacteria が、長野県ではCyanobacteria が大幅に増加している(図5)。以上から、単年の結果であるものの季節変動のほかに、地域における特異的な変動が確認された。

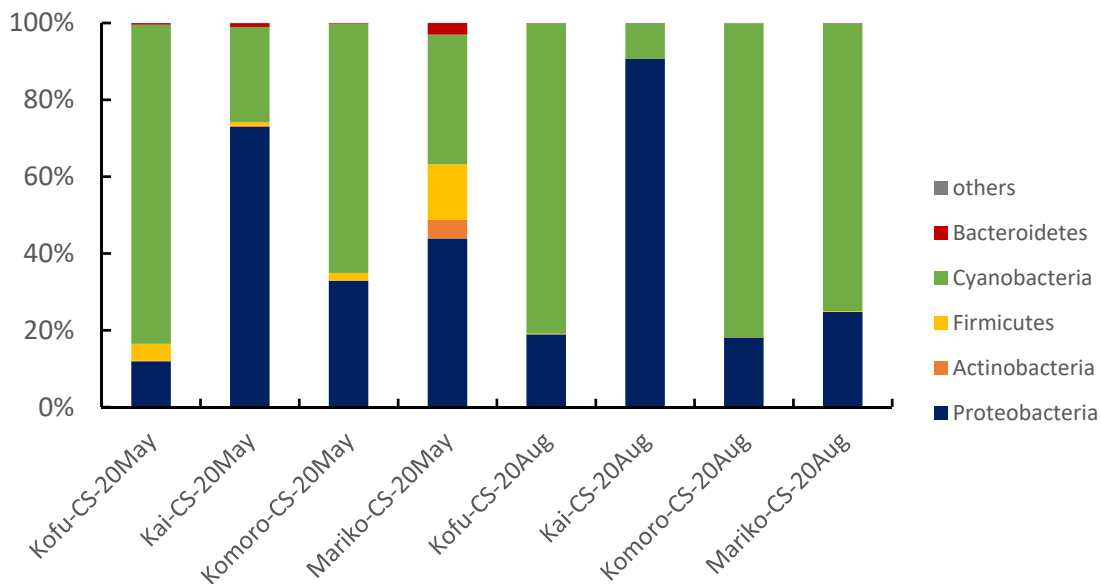


図5 20年度における地域別および季節別のバクテリア樹内マイクロフローラ比較

CS:カベルネ・ソーヴィニヨン Kofu:山梨県甲府市、Kai:山梨県甲斐市、Komoro:長野県小諸市
Mariko:長野県上田市、20May:2020年5月、20Aug:2020年8月

【今後の展望】

本研究は、「樹内マイクロフロー」から、テロワールを科学的に解析することを目的に行ったものである。期間中には、上記の研究成果報告内容に記述したように、2年間のみの結果であるもがブドウ品種ごとの樹内マイクロフローの季節変動を示した。また、単年ではあるが樹内マイクロフローが栽培地域ごとに異なった季節変動を起こすことも示唆できた。しかしながら、上記で重ねて述べているように今回の結果は2年間もしくは単年の結果であるため、今年も同じ圃場からサンプル採集およびシーケンス解析を行う予定である。

今後は上記の内容について、別途資金を工面して研究を進め、結果を出していきたい。また資金調達がかなわなかった場合でも、現状までの成果を完遂し学術論文として世に発表する所存である。その後は、これらの成果知見を活かし樹内マイクロフローによる栽培地選択指標の確立や、ブドウ微生物資材の探索など、農芸科学分野の応用研究に取り掛かりたい。それらは山梨の地場産業でもあるブドウ果樹、ワイン産業への貢献が可能であると考えられるため、積極的に推進していきたい。

【研究成果の発信方法（予定を含む）】

本研究の成果は、国内の農業関係者に向け植物科学や園芸分野での学会発表および世界中への成果発表を目的に海外の学術雑誌への投稿掲載を考えている。上記展望にある程度の目途が付いたら、これらの方法による発信は必ず行いたい。また併せて、今年県で行われる予定の成果報告会は当然の事、HP等で県民や専門分野内外の関係者へ向けて、広い情報発信を行っていく予定である。