

# CAPS マーカーを用いた山口県の幻のミカン クネンボ (九年母) の探索

## CAPS marker screening of the illusive Kunenbo

～ a Mandarin orange from Yamaguchi ～

柴田 勝<sup>1</sup>, 樋口 尚樹<sup>2</sup>, 元水 在斗<sup>1, 4</sup>, 岡崎 芳夫<sup>3</sup>,

西岡 真理<sup>3</sup>, 五島 淑子<sup>1, 5</sup>

Masaru Shibata<sup>1</sup>, Naoki Higuchi<sup>2</sup>, Arito Motomizu<sup>1, 4</sup>, Yoshio Okazaki<sup>3</sup>,

Mari Nishioka<sup>3</sup>, Yoshiko Goto<sup>1, 5</sup>

<sup>1</sup> 山口大学 教育学部, <sup>2</sup> 松陰神社宝物殿 至誠館, <sup>3</sup> 山口県 農林総合技術センター  
農業技術部 柑きつ振興センター

(現所属)

<sup>4</sup> 岡山大学大学院 環境生命科学研究科, <sup>5</sup> 山口大学 地域未来創生センター

<sup>1</sup> Faculty of Education, Yamaguchi University, <sup>2</sup> Shoin Memorial Museum, Shoin

Shrine, <sup>3</sup> Citrus Fruits Promotion Center, Agricultural Technology Department,

Yamaguchi Prefectural Agriculture & Forestry General Technology Center, <sup>4</sup> Graduate

School of Environmental and Life Science, Okayama University,

<sup>5</sup> Yamaguchi University Community Future Center

### 要旨

農産物の多くは、その時代にあった新しい品種に置き換えられ栽培が行われてきた。その一つにカンキツがあり、現在、国内で最も栽培されているカンキツ品種はウンシュウであるが、明治初期にはミカン(蜜柑)、コウジ(柑子)に次いでクネンボ(九年母)が多く、クネンボの生産額は山口県が全国一であった。しかし、今ではクネンボ(*Citrus nobilis* var. *kunep*)の名前を知る人もほとんどいない幻のミカンとなり、県内でクネンボの樹があるのかさえ分かっていない。このカンキツは、江戸から明治期の食文化を考える上で重要な農産物でもあり、当時の長州と英国との異文化交流などを知ることができる貴重な食材の一つとなっている。クネンボを地域の資源として現代に復元させるために、県内の品種不明のカ

ンキツからクネンボのスクリーニングを行った。天保期の長州藩の地誌『防長風土注進案』に記載されたカンキツの地理情報や史料、気象条件などからクネンボの探索地域を3か所に絞り込み、次いでDNAマーカーであるCAPS(Cleaved Amplified Polymerase Sequence)を用いて農研機構(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構)で保存されているクネンボ(NIAS Genebank, JP 117387)と県内に自生している品種不明カンキツのゲノムDNAの多型を比較することでクネンボの探索を行った。品種同定のために既存のカンキツ112種を識別できる7種のCAPSからなる最少マーカーセットを選抜し、次いでアレルの組合せが多様な交雑種からでもクネンボを識別させるために5CAPSを加えたマーカーセットを使用した。しかしながら、採取したすべてのサ

ンプルにおいてクネンボを見出すことはできなかった。特に萩地域では、品種不明のカンキツの多くが小型のナツダイダイであり、長州藩家臣の屋敷跡地や植栽図で200年以内に確実にクネンボが植えられていた園庭であっても、クネンボを見出すことはできなかった。一方、宗像大社の祭事で用いられてきたクネンボは、農研機構と同じ遺伝子型を示した。これらの結果は、ゲノムサイエンスにより、今まで曖昧であった地域の農産物などの品種を特定すると共に、かつてはその地域を代表する農産物でありながら現在では入手困難な農産物であっても、DNA多型を調べることで「埋もれた地域資源」を掘り起こし、復活させることができることを示唆していた。

## 1. はじめに

山口県の代表的な農産物の一つにカンキツがあり、現在はウンシュウやナツダイダイをはじめとして様々な品種が栽培されている。明治のはじめ、当時の代表的なカンキツ品種であったクネンボ (*Citrus nobilis* Lour. var. *kunep* Tanaka) は西日本を中心に広範囲に栽培され、山口県が全国の46%の生産額を占めていた(藤原, 1966; 花木, 2010; 五島 2019)。クネンボ(九年母, くねぶ)は、現在のウンシュウと比べて酸味が強く、大果であるが、当時としては糖度が高く甘い生食用果物であった(塚本, 1984; 豊田ら, 2018; 白上, 2021)。さらに、江戸から明治期の食文化を考える上で重要な農産物でもあり、日英饗応料理に長州藩藩主の毛利敬親から英国艦隊のキング提督へのおもてなし料理のデザートとして提供されるなど和食の文化的転換期での関わりが強く、当時の状況を知ることができる貴重な食材の一つとなっている(Goto & Senneck, 2019; Senneck & Goto, 2020; 「楫取素彦書簡 杉民治宛」; 「英国人三田尻渡来一件」)。江戸後期には、幕末の思想家である吉田松陰が野山獄へ入獄した際の差し入れ内容を記した日記や長州藩寄組熊谷家の上屋敷や長州藩寄組国司家の屋敷の史料でのクネンボの植栽記録などから、当時の暮らしに根付いたカンキツであると考えられている(山口県文書館 1983; 山口県教育委員会, 1972; 「熊谷家上屋敷植栽樹木」)。このように長州藩にとって重要な農作物であるクネンボの栽培は、現在の山口県内では行われておらず、クネンボの名前を知る人もほとんどいない幻の食材となっている。これは、クネンボが有核果(種子あり)であり、さらに果皮に独特な臭気をもつことから、より甘みが強く、食べやすい無核のウンシュウへの品種転換が行われてきたためだと考えられている(豊田ら, 2018)。

本研究では、「失われた農産物」の復活を通して、食文化の変遷や地域に眠る資源の発掘を行うことを目的に、山口県の品種不明のカンキツからクネンボ

の探索を行った。はじめに天保期(1840年代)の長州藩の地誌『防長風土注進案』を基礎資料として、クネンボの生産分布から探索範囲を絞り込み、品種不明のカンキツの品種識別を行うことで、クネンボを選抜した(松森ら, 2021; 中村大ら, 2021)。生育環境が大きく異なるカンキツからクネンボを識別するには、従来の形態的な特徴や果実の早晩性のみでは難しいことから、品種同定には採取時期や生育環境に依存しないDNA多型による品種同定法を用いた(Fujii *et al.*, 2016; Nonaka *et al.*, 2017)。一般的にゲノムDNA多型による品種分析には、RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)、RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)などのDNAマーカー法が用いられてきた(松山ら, 1992; Fang, 1997; Bolaric *et al.*, 2008)。最近、カンキツの品種分析に利用できる簡便なDNA多型分析法としてPCR(polymerase chain reaction)と制限酵素処理を組合わせたCAPS法(Cleaved Amplified Polymerase Sequence)が報告されている(Shimada *et al.*, 2014; 二宮ら 2015, Fujii *et al.*, 2016; Nonaka *et al.*, 2017)。さらに、ミカンゲノムデータベース(MiGD; <https://mikan.dna.affrc.go.jp/>)にてカンキツの遺伝子のアノテーションや遺伝子座などの情報が整理され、26CAPSの組合せにより国内の主要カンキツの同定が可能となっている(Fujii *et al.*, 2019)。

本報告では、クネンボのスクリーニングを行うためにCAPSマーカーセットの選抜と共に、農研機構に保存されているクネンボと県内の品種不明のカンキツのCAPSアレルの比較を行った。

## 2. 材料と方法

### 2.1. サンプルと採取地域

クネンボの標準試料として、農研機構の果樹茶業研究部門から供与されたクネンボ(NIAS Genebank, JP 117387)を用いた。宗像大社(福岡県)のサンプルを神社の境内の果樹園に植栽されている継代クネンボから、ウンシュウ(宮川早生)を山口県農林総合技術センター柑きつ振興センターから、ナツダイダイを萩の150年生の古木から採取した。

クネンボは1つの種子に複数の胚をもつ多胚性を示すため、種子親と同一のゲノムを持つ珠心胚由来の個体が継代されている可能性が高い(上野ら, 1967; 奥代ら, 1981)。このため、クネンボの過去の生産地域を特定するために江戸後期(天保期後半, 1840年代)に長州藩の各村の農産物の品目、生産高が記載されている防長風土注進案データを現代の地図へ定量的にマッピングしたGIS(geographic information system)から過去の栽培地域の絞り込みを行った(山口県文書館 1983; 松森ら, 2021; 中村ら, 2021)。さらに、GISデータに加えて史料によるクネ

ンボの存在や位置が確認されている萩市、現在でもミカン栽培が盛んな防府市、萩から防府に抜ける街道(萩往還)の山口市の3地域を対象に各地域で7~8種の品種不明のカンキツのサンプリングを行った。特に萩地域では、武士、豪商などの旧家屋の園地や江戸後期にクネンボが植栽されていた屋敷園や手記などの史料を基に採取を行った。クネンボは多核(農研機構クネンボ 12.8 個, 4.3~21.5 個: 山本ら, 2006)であり、翼葉が小さいために、種子がないまたは明らかに少ないもの、翼葉が極端に大きいカンキツ葉のサンプリングを行わなかった。この時、果実の大きさや特有のニオイについては生育環境に大きく依存することから、判断基準に含めなかった。表1に各カンキツの採取された地域, 年月, 生育場所, 実生/接木について示す。

## 2.2. ゲノム DNA の抽出と PCR, 制限酵素処理

品種を識別するためにゲノム DNA の単離を行った。約 50 mg の各カンキツ類の葉を液体窒素で破碎し、粉体の一部から 1.5%PVP (polyvinylpyrrolidone) を含む CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 溶液によりゲノム DNA を抽出し、常法に従い精製後、Tris-EDTA 緩衝溶液に溶解し、使用するまで -65°C で冷凍保存した (Dellaporta *et.al.*, 1983)。PCR による

DNA 増幅は、表 2 の各プライマーを用いてコンベンショナルまたはタッチダウンにより行い、PCR 産物を制限酵素により処理した(Nonaka *et.al.*, 2017; 農研機構, 2019)。2.0%アガロースゲルにより電気泳動後ミドリグリーン Midori Green Xtra (0.1uL/mg) で染色し、次いでトランスイルミネーターによりバンド検出を行った。

## 2.3. CAPS 分析

実験に用いた CAPS マーカー (表 2) は、農研機構の品種分析技術(2019)に示されている 12CAPS に加えて、二宮(2015)の 9CAPS、Nonaka(2017)の 19CAPS の中から 12CAPS を選抜した。共優性マーカーである CAPS による多型解析は、制限酵素部位の有無により判定されるため、農研機構のクネンボと品種不明カンキツ検体のアレルの PCR 増幅断片のバンドパターンの比較を行った。増幅断片長の長いバンドからアルファベットを割振り、PCR 産物に制限酵素部位が存在しないアレルを *a*、存在するアレルを *b* とし、各品種・系統においてホモ接合を *aa*、*bb* およびヘテロ接合を *ab* とし、CAPS マーカーの遺伝子型をその組合せで表した。複数の CAPS マーカーのアレル解析からクネンボ品種の識別を行った。

表 1. 山口県内の品種不明カンキツの採取年月、採取地、生育条件

地域	No.	試料名	採取年月	生育場所	接ぎ木跡	備考
防府地域	01	放棄園地(西浦) 01	2018年12月	放棄園地	あり	クネンボ旧産地
	02	放棄園地(西浦) 02	2018年12月	放棄園地	あり	クネンボ旧産地
	03	放棄園地(西浦) 03	2018年12月	放棄園地	あり	クネンボ旧産地
	04	放棄園地(西浦) 04	2018年12月	放棄園地	あり	クネンボ旧産地
	05	旧沿岸(三田尻)	2018年12月	民家庭地	なし	江戸末期の港
	06	沿岸(東三田尻)	2018年12月	集合住宅	なし	江戸末期の港
	07	御舟倉跡近く(警固町)	2018年12月	民家庭地	あり	三田尻御舟倉跡
山口地域	08	萩往還01	2018年12月	空き地・林	なし	古い地域
	09	萩往還02	2018年12月	川沿い	不明	
	10	萩往還03	2018年12月	川沿い	不明	
	11	萩往還04	2018年12月	古民家庭地	なし	旧農家
	12	萩往還05	2019年3月	古民家庭地	あり	旧農家
	13	萩往還06	2019年3月	雑木林	不明	
	14	萩往還07	2019年3月	民家庭地	不明	
萩地域	15	了性院(長門)	2020年3月	了性院 境内	なし	長州藩土草刈家菩提寺
	16	旧青木周密邸(萩)	2020年3月	旧青木邸 庭園	なし	長州藩蘭方医
	17	宝物殿至誠館(萩)	2020年4月	松陰神社	なし	松陰神社境内
	18	山根家(萩)	2020年4月	山根家 雑木林	なし	長州藩医
	19	黒川家(萩)	2020年12月	民家庭地	不明	長州藩上級藩士
	20	須子家(萩)	2020年12月	民家庭地	不明	長州藩豪商
	21	阿武町奈古(阿武郡)	2021年3月	民家庭地	不明	比較的温暖な地域
	22	熊谷家(萩)	2021年3月	旧庭園	あり	長州藩の豪商

表2. CAPS マーカーのプライマー配列と制限酵素

CAPS	フォワードプライマー		リバースプライマー	制限酵素	参照
Tf0420	TGGAGGCCATTTCTTATTAGA	/	CTCTGACCACGGGATCA	<i>Hae</i> III	1, 2
Tf0001	AAAAGTTCACAAGTACGAGGG	/	AGCAATCCTTGAGAATACGCA	<i>Msp</i> I	1, 2
Bf0158-2	TCCGAGATCCTACCCGGAGAGGCGT	/	GCGATAACGGCGACAGTAGAG	<i>Pvu</i> II	2
Tf0318	GACGACTACCGCTACTACTAC	/	ACAGCCAGGAACAAGCTTT	<i>Hinc</i> II	1, 2
If0208	AATATTTCTGCGAATCACTGA	/	GCAAACCAACCAAGGA	<i>Hinf</i> I	2, 3
Tf0271	AGTTATCCAACGGAATCT	/	CATGGCAATACTTTGTAGTTC	<i>Rsa</i> I	2, 3
Tf0150	ACAGAAGAGGCCACAATCT	/	TTTCTTCAGCTAAAGCGTCAC	<i>Hinf</i> I	2, 3
Cp0635*	GGCCTGGTGTCAATCAT	/	TGCAAGCTGCCATCTTACAAC	<i>Dra</i> I	1
Tf0293	CTTTCTTTCCGGTTATCTAA	/	TGCAGCAGAAGGCCTCTTATA	<i>Hind</i> III	1
Tf0419	GGTGATGAGAAGCCAATTAT	/	ATCTTGATCATGGCGAAAT	<i>Pvu</i> II	1, 2
Tf0300	GCTGCGATTAGGGTTGC	/	TAAACATATCCCACGGAACAT	<i>Dra</i> I	2, 3
Tf0013	GTTCTATGCGTTGTTAAGGTT	/	GCCCTGAAGTTGAACGAGAC	<i>Rsa</i> I	1

1: 二宮ら, 園学研, 2015

2: 農研機構マニュアル「CAPSマーカーによる柑橘22品種のDNA品種識別技術」, 2019.

3: Nonaka *et. al.*, 2017

\* : Cp0635のみ葉緑体DNAマーカー

### 3. 結果と考察

#### 3.1. クネンボ同定用 CAPS セットの作成

クネンボを特異的に検出できる CAPS マーカーセットの選抜を行った。マーカーの選抜では、各品種・系統を識別できる最少マーカーセットを決める必要がある。最少マーカーセットの作成には、母集団となる複数カンキツのアレルの比較から CAPS を選抜できる Minimal Marker が用いられてきた (Fuji *et. al.*, 2013; 岡本ら, 2018; Fujii *et. al.*, 2019)。Fujii (2019) はアレルを判別しやすく、さらに多様な特性から品種を分析するために DNA 断片やコンティグなどの DNA 配列をつなぎ合わせたスキヤホールド (scaff) や連鎖群 (LG) の異なる CAPS マーカーが複数選択されるように CAPS マーカーの選択基準を示している。具体的には、サンプルの PCR 産物の大きさが均一であること、制限酵素処理により明確でシンプルな断片を示すこと、異なるスキヤフォルド(scaff)1~9 の中で少なくとも 2 マーカーを含むこと、LG に少なくとも 2 マーカーを含むことの 4 つを挙げている。このため、Fujii (2019) の 26CAPS マーカーは遺伝子座や遺伝子アノテーションが明確であり、ゲノムワイドな多型検出によるカンキツ品種分析が可能となっている。実際、Fujii (2019) の CAPS を 5 つ組み合わせた CAPS セット (9 サブセット) を用いて、カンキツ主要品種 25 品種 (国内マーケットの主要なカンキツの 90%以上) を区別することができることが報告されている。新見ら (2021) は、この 26CAPS を用いて香酸カンキツの品種同定について 6CAPS からなる 16 組のサブセットを示している。

しかし、本研究では様々なアレルパターンを持つ交雑種のカンキツからクネンボを選別しなければならぬために、比較する品種を特定せずにクネンボを特異的に検出できるマーカーセットを選択する必要がある。このため、二宮 (2015) と Nonaka (2017) の比較的幅広く分析可能な CAPS マーカーに加えて、農研機構のカンキツの DNA 品種識別技術(2019)に報告されているマーカーを加えた 12CAPS を選択した。この 12CAPS のうち 7CAPS セットにより、112 種の品種について区別が可能であり、現在、アレルが報告されているカンキツからクネンボを識別することができる (二宮ら, 2015; Nonaka *et. al.*, 2017; 農研機構, 2019)。農研機構による品種分析マニュアル (2019) の 12CAPS の scaff は 1, 3, 4, 5, 6, 8 であり、また、Fujii (2019) や新見 (2021) のサブセットは全ての CAPS で scaff が異なり、幅広く選択されていた。しかし、本実験で使用した 12CAPS に対応する scaff は少なく、さらに 8CAPS が scaff\_3 に集中していた。このため、既存のカンキツ 112 種を識別できる 7 種の CAPS (カッコ内は scaff を示す) Tf0318(4), Tf0420(3), Tf0001(3), If0208(5), Bf0158-2(3), Tf0150(8), Tf0271(6) を最少マーカーとして、次いで交雑種からでもクネンボを識別できるよう残りの 5CAPS を加えたセットを使用した。

#### 3.2. 農研機構と宗像大社のクネンボ比較

12 種類の CAPS マーカーを用いて PCR を行い、制限酵素処理によるバンドの変化から各サンプルの遺伝子型を決定した。得られた遺伝子型を表 3 に示

す。基準となるクネンボの遺伝子型として、農研機構から入手したクネンボ（クネンボ-A, NIAS Genebank, JP 117387）の葉から単離したゲノムおよび MiGD カンキツデータベース(Kawahara *et al.*, 2020)等を用いて 12CAPS のアレルを決定した(表 3)。Shimizu (2016) の報告では、クネンボについてクネンボ-A (NIAS Genebank, JP 117387)とクネンボ-B の同名異種の 2 種が示されており、それぞれキシウミカンとダイダイを花粉親とするカンキツであった。このため、農研機構のクネンボ-A 以外のカンキツに対してもクネンボと呼ばれるカンキツが存在しており、それらが地域に根差したクネンボとして残存している可能性がある。このため、他の地域においてクネンボと呼ばれ大切に保存されてきたカンキツとクネンボ-A (Genebank, JP 117387) とのアレルの比較を行った。地域に残るクネンボとして宗像大社(福岡県)の古式祭において神饌として御供されているクネンボを用いた。その結果、宗像大社と農研機構のクネンボの 12CAPS のアレルはすべて一致し、同じ品種のカンキツであることが示された(表 3)。この結果は、クネンボは少なくとも室町時代までには沖縄に入り、九州から北上して関東へと伝搬したとする説や農研機構のクネンボ-A(JP No.117387)が鹿児島(JP No.247450)と神饌島(JP No.117950)のクネンボと同じ遺伝子型を示す報告との間に矛盾はみられなかった(田中, 1948; 山田 1994; 伊藤 1994; Fujii *et al.*, 2016)。宗像のクネンボは、およそ 600 年前にはすでに古式祭の特殊神饌として神々に御供されていたことが一条兼良の公事根源(1422 年)に記されていることから、比較的早い時期に宗像に伝わったと考えられる(葦津, 2014)。江戸時代中期には諸藩においてクネンボが広く栽培されていたが、現在では宗像大社を除いた福岡県においてもクネンボ栽培は行われていない(盛永・安田 1986)。このため、各地域に保存されている古木を中心にスクリーニングを行った。山口県には庭木としてカンキツを植える習慣が残っており、神社仏閣以外に武家屋敷跡や農家などにカンキツの古木が点在している。しかし、上屋敷や放棄園地の樹はウンシュウ、ナツダイダイが多く、サンプルにはこれらのカンキツが高頻度でコンタミしやすい。このため、クネンボと共にウンシュウミカン、ナツダイダイについても同時に CAPS によるアレルの比較を行った。

### 3.3. 山口県のサンプルの比較

栽培管理されていないカンキツはゴマダラカミキリなどにより枯死しやすく、当時の原木が残存している可能性は低い。クネンボは自家不和合性のため他家受粉の交雑胚となるが、多胚性のため種子親の形質を受け継いだ実生が発生する確率が高い(上

野ら, 1967)。これらのことから、過去にクネンボが生育していた地域を絞り込むために、『防長風土注進案』の農作物の生産高を現在の山口県の地図にプロットした GIS マップを用いた。そして、現在でもカンキツ栽培が行われている防府市、熊毛郡・大島郡(山口県の東南部)に加えて下関市においてクネンボ生産が比較的盛んに行われていたことが明らかとなった(松森ら, 2021)。その中で最も栽培が盛んであった防府地域、200 年以内にクネンボの植栽が確認されている萩地域、萩から防府に抜ける街道(萩往還)の比較的暖かな山口地域の 3 か所を中心にカンキツ採取を行った(表 1)。現在の防府地域は沿岸の干拓地が広がっているために、放棄園と江戸時代の旧海岸線に沿った農家などを中心に品種不明のカンキツを採取した。防府地域の No1~4 は、改植が進んだミカン園に隣接している放棄園地の 20 年生以上の樹から採取した。また、旧海岸線より内陸側で採取された No5~7 のうち No6 は高さが 5m 以上のカンキツ古木であった(表 1)。CAPS による品種同定を行ったところ、防府地域の品種不明のカンキツの Tf031、Tf0420 のアレルがクネンボと異なっており、防府地域で採取したカンキツの全てがクネンボ以外の品種であった(表 3)。山口地域は、防府・萩に比べて冬の気温が低く、カンキツ栽培には適していない。クネンボがインドシナ原産で温暖な地域で生育可能であることから、藩庁の置かれていた萩市から防府市に抜ける萩往還の街道筋で比較的暖かい地域の農家や川沿いを中心に品種不明のカンキツを採取した(田中, 1948)。農家には、5m 以上のカンキツ古木が点在しており、その中でクネンボと明らかに異なる葉の形態を示すカンキツを除き、葉を採取した。No8~14 にはクネンボと同じアレルを示すカンキツは得られなかった。萩地域では比較的町並みが保存されていることから、武士、豪商などの旧家屋の園庭や植栽園などの史料を基に毛利藩に由来する武家屋敷や菩提寺を中心に No15~22 のサンプリングを行った(水沢, 1997; 「熊谷家上屋敷植栽樹木」)。CAPS 分析の結果、No19~22 の 4 か所のサンプルは、ナツダイダイと同じアレルを示した。180 年前にはクネンボが植えられていた(20 本の植栽カンキツのうち 12 本)熊谷家屋敷のサンプル No22 においても、品種不明のカンキツ古木はナツダイダイであった(表 3)。その他、旧屋敷敷地・跡地に放置されているカンキツの多くがナツダイダイやアマナツであった。

今後、熊毛郡、大島郡を中心にサンプリングを行うが、萩地域のように史料が残っていないことから、測定数が膨大となる。このため、現在使用している CAPS について再検討を行った。表 3 のクネンボの品種識別用の予備 CAPS マーカー Tf0293/Hind III

表3. 12CAPSのlinkage map, scaffold, transcript IDおよびびゲノタイプの分離パターン.

マーカー名	Tf0420	Tf0001	Bf0158-2	Tf0318	If0208	Tf0271	Tf0150	Cp0635	Tf0293	Tf0419	Tf0300	Tf0013
制限酵素名	HaeIII	Msp I	Pvu II	Hinc II	Hinf I	Rse I	Hinf I	Dra I	HindIII	Pvu II	Dra I	Rse I
AGI 地図連鎖群 No. *	AGI-05	AGI-05	AGI-05	AGI-07	AGI-09	AGI-08	AGI-08	AGI-06	—	—	AGI-05	AGI-08
スキャフォールド No. * (Clementine genome)	3	3	3	4	5	6	8	—	3	3	3	8
転写 ID: C. clementina (v1.0) *	Ciclev100 22018m	Ciclev100 20248m	Ciclev100 21285m	Ciclev100 31873m	Ciclev100 01680m	Ciclev100 10976m	Ciclev100 28292m	—	Ciclev100 19219m	Ciclev100 19228m	Ciclev100 22370m	Ciclev100 27769m
農研機構果実茶葉研 赤條大社	ab ab	ab* ab	bb bb	bb bb	ab ab	ab ab	ab ab	ab* ab	aa* aa	bb* bb	ab ab	ab* ab
カワノナツダイ*	ab	ab	bb***	ab	ab	ab	ab	—	aa	bb	ab	ab
ベニアマナツ**, **	ab	ab	bb***	ab	ab	ab	—	—	aa	bb	ab	ab
ナツダイ (150年生 古木)	ab	ab	bb	ab	ab	ab	ab	ab	aa	bb	ab	ab
ウシユワ (宮川早生)	ab*	ab*	ab	bb*	ab*	ab*	ab*	bb*	aa*	bb*	ab*	ab*
01 放棄圃地 (西浦) 01	ab	—	—	ab	—	—	—	—	aa	—	—	ab
02 放棄圃地 (西浦) 02	ab	—	—	—	—	—	—	—	aa	ab	—	ab
03 放棄圃地 (西浦) 03	aa	—	—	aa	—	—	—	—	aa	ab	—	ab
04 放棄圃地 (西浦) 04	aa	—	—	ab	—	—	—	—	aa	ab	—	ab
05 防府市三田尻	aa	ab	ab	ab	ab	aa	bb	aa	aa	bb	ab	ab
06 防府市東三田尻	ab	—	—	ab	—	—	—	—	aa	aa	—	ab
07 防府市警固町	aa	aa	ab	aa	ab	ab	ab	aa	aa	bb	ab	aa
08 萩往還01	bb	bb	ab	bb	bb	aa	bb	bb	aa	bb	bb	aa
09 萩往還02	aa	bb	ab	ab	bb	aa	bb	bb	aa	ab	bb	aa
10 萩往還03	bb	bb	ab	bb	bb	aa	bb	ab	aa	bb	bb	aa
11 萩往還04	bb	bb	ab	bb	bb	aa	bb	ab	aa	bb	bb	ab
12 萩往還05	ab	—	—	aa	—	—	—	—	aa	aa	—	ab
13 萩往還06	ab	—	—	bb	—	—	—	—	aa	ab	—	ab
14 萩往還07	aa	—	—	aa	—	—	—	—	aa	aa	—	ab
15 了性院 (奥門)	aa	aa	bb	ab	ab	aa	bb	bb	aa	bb	ab	ab
16 旧青木酒造邸 (萩)	aa	aa	bb	aa	ab	aa	bb	bb	aa	bb	ab	ab
17 至感館 (萩)	aa	aa	bb	aa	ab	aa	bb	bb	aa	bb	ab	ab
18 山根邸 (萩)	ab	ab	bb	bb	ab	aa	bb	ab	aa	ab	ab	ab
19 黒川家 (萩)	ab	ab	bb	ab	ab	aa	bb	ab	aa	bb	ab	ab
20 湊子邸 (萩)	ab	ab	bb	ab	ab	ab	ab	ab	aa	bb	ab	ab
21 阿武町奈古 (萩)	ab	ab	bb	ab	ab	ab	ab	ab	aa	bb	ab	ab
22 熊谷家 (萩)	ab	ab	bb	ab	ab	ab	ab	ab	aa	bb	ab	ab

\* Mikan Genome DB, MiGD (<https://mikan.dna.affrc.go.jp/>), \*\* 品種識別マニユアル 藤井 20180511、修正20181016, \*\*\* Bf0158-2によるデータ

のアレルは、valencia, washington navel のようなスイートオレンジ以外でホモアレル *aa* を示す確率が高く、今後のスクリーニングから Tf0293/*Hind* III を省略することができる。CAPS マーカー選択の基準では、葉緑体マーカーの Cp0635 は、マーカーセット候補から外れることになる。MiGD で連鎖群が示されていない Tf0293 (scaff\_03), Tf0419 (scaff\_03)は、現在では保留となる。最少マーカーセットの1つである Tf0271/*Rsa* I はホモのマイナーアレルを示さず、なおかつ他の7つの最少マーカーにより112種のカンキツを区別できるが、品種不明の交雑種においてクネンボとの比較を行うためには重要なマーカーであった(表3)。さらに、地域の特徴に合わせたCAPS選択も考慮する必要がある。ナツダイダイがコンタミしやすい萩地域などでは、特定のカンキツを明確に選別できるCAPSセットでなければならない。今回選択した7種のCAPSからなる最少セットでは、クネンボとナツダイダイを識別できるCAPSがTf0318 (scaffold\_4)のみであることから、Bf0036-2 (scaffold\_1)やMf0090 (scaffold\_7)のようなナツダイダイを比較的識別しやすいCAPS、または、葉緑体マーカーである *trnL-trnF/Mbo* I, *rbcL/Hha* I などのクネンボでアレルに違いが出やすいマーカーによる検定が必要となる可能性がある。

### 3.4. ゲノムサイエンスによる地域資源の発掘

伝統野菜や果樹などの作物は、その生産性の低さなどから急速に失われてきた。しかし、独特な風味などを生かすことで地域の新たな農産資源(食材)としての掘り起こしが各地で行われている。一方で、「地場産」「特産」のみのブランディングでは、地域間での差別化が難しく、伝統作物に希少価値、歴史的、文化的な価値などを与えることで、さらなる高付加価値化が期待されている。しかし、これらの価値づけや訴求性を与えることができる有効な方法や技術はあまり知られていない。

本研究では、ゲノムDNAの解析により地域に眠る資源の発掘を行い、歴史的に重要な役割を持つ失われた食品素材の復活を通して、食文化の変遷を明らかにすることを目的に、山口県の品種不明のカンキツから県内に自生しているクネンボ(*Citrus nobilis* var *kunep*)の探索を試みた。その結果、山口県内からクネンボを見出すことはできなかったが、採取時期や樹勢の強弱の影響を受けない品種の識別方法としてDNAマーカーが有効であり、ゲノムサイエンスによる地域資源の掘り起こしの有用な技術として利用できることを示唆した。

### 4. おわりに

本研究は、過去に失われた山口県の農産資源を発掘するために、地誌、古文書をもとに幻のミカンとなったクネンボの探索を遺伝子マーカーであるCAPSを用いて行うなど、歴史、文化、ゲノムサイエンス、栽培の複数の分野を横断した文理融合型の研究である。さらに、県内の歴史、文化との関わり合いや幕末の異文化交流を食文化の視点から見つめ直すことで、現代の食生活を理解し、食育や食生活の改善などにつなげ、直接的な産業への寄与だけではなく教育分野など、山口の未来への貢献も十分に期待できる。今後、ゲノムサイエンスにより、希少性に加えて歴史的・文化的な価値をもつ生物資源を復活させ、また、地域資源としての価値を担保する方法として、有用であると考えられる。

### 謝辞

本研究を進めるにあたり、カンキツ採取にご協力いただきました松陰神社 上田俊成 名誉宮司、白上陽一郎 宮司、宗像大社 権禰宜 御床直之様、権禰宜長友貞治様、萩市役所の樹木医 草野隆司様、防府市市役所産業振興課の岡田元子様(元 おもてなし観光課)、松田農園の松田祥治様、石本造園 石本真司様に感謝いたします。農研機構カンキツ研究領域カンキツ育種ユニット長 吉岡照高様には、クネンボの試料を供与していただき深く感謝いたします。また、池田廣司先生(元 山口大学大学院教育学研究科 特命教授)、山本貞壽様、須子義久様、須子聖子様には、試料採取および県内カンキツについて多大なるご協力を賜りました。本研究は、山口学研究プロジェクトおよび2019年度アサヒグループ学術振興財団の研究助成金交付により研究が遂行されました。この場を借りて深くお礼申し上げます。

### 【引用・参考文献】

英語文献

- Bolaric,S., Barth,S., Melchinger,E.A., & Posselt,K.U., Genetic diversity in European perennial ryegrass cultivars investigated with RAPD markers, *Plant Breeding*, vol.124, No.2, pp161-166, 2008.
- Dellaporta,S.L., Wood,J. & Hicks, B. J., A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: pp19-21, 1983.
- Fang,Q.D & Roose,L.M., Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers, *Theor Appl Genet*, vol.95, pp408-417, 1997.
- Fujii,H., Ohta,S., Nonaka,K., Katayose,Y., Matsumoto,T., Endo,T., Yoshioka,T., Omura,M. & Shimada,T., Parental diagnosis of satsuma mandarin

- (*Citrus unshiu* Marc.) revealed by nuclear and cytoplasmic markers, *Breeding Science*, vol.66, pp683–691, 2016. doi:10.1270/jsbbs.16060
- Fujii,H., Narita,T. Oshino,H., Endo,T., Kawakami,T. & Goto,H., Yoshioka,T., Omura,M. & Shimada.T., CAPS markers with stability and reproducibility for discriminating major citrus cultivars in Japan. *DNA polymorphism*, vol.27, pp71–77, 2019.
- Goto,Y. & Senneck,A. The Art of Culinary Diplomacy in the Mid-19th Century:Britain Meets Japan at the Dining Table, *Japan Society Proceedings*, pp62-78, 2019.
- Kawahara,Y., Endo,T. Omura,M. Teramoto,Y. Itoh,T. Fujii,H. & Shimada,T. Mikan genome database (MiGD): integrated database of genome annotation, genomic diversity, and CAPS marker information for mandarin molecular breeding, *Breeding Science*, vol.701, pp200-211, 2020.
- Nonaka,K., Fujii,H., Kita,M., Shimada,T., Endo,T., Yoshioka,T. & Omura,M., Identification and Parentage Analysis of Citrus Cultivars Developed in Japan by CAPS Markers, *The Horticulture Journal*, vol.86, No.2, pp208–221. 2017.
- Senneck,A. & Goto,Y. Food Served to Guests from Other Cultures in *Bakumatsu* Japan: Analysis of Three Examples of Anglo-Japanese Culinary Cultural Exchange in the Chōshū Domain in the mid-19th Century, 「和食文化研究」, vol.3, No3, 2020.
- Shimada,T., Fujii,H. Endo,T., Ueda,T., Sugiyama,A., Michiharu Nakano,M., Kita,M., Yoshioka,T., Shimizu,T., Nesumi,H., Ikoma,Y. Moriguchi,T. & Omura,M. Construction of a citrus framework genetic map anchored by 708 gene-based markers, *Tree Genetics & Genomes*, vol.10, 1001–1013, 2014.
- Shimizu,T., Kitajima,A., Nonaka,K., Yoshioka,T, Ohta,S. Goto,S. Toyoda,A., Fujiyama,A., Mochizuki,T., Nagasaki,H., Kaminuma,E. & Nakamura,Y., Hybrid Origins of Citrus Varieties Inferred from DNA Marker Analysis of Nuclear and Organelle Genomes, *PLOS ONE*, vol.11, No.11, e0166969, 2016.
- 日本語文献  
 葦津泰國,『日本神話から現代までの歴史 むなかたさま(第3版)』, p118, 129-130, 宗像大社社務所, 福岡, 2014.
- 岡本充智, 奥貞丈博, 山本紗綺, 二宮泰造, 「愛媛県育成カンキツ品種識別法の妥当性検証に 利用可能な CAPS マーカーの選抜」, 『愛媛果樹セ研報』, vol.6, pp1-10, 2018.
- 奥代直巳, 生山巖, 「多胚性カンキツ類における雑種実生獲得率の向上に関する研究. I 品種, 系統間の胚数及び雑種実生獲得率の差異について」. 『果樹試報』. D3, pp9–21, 1981.
- 上野勇, 岩政正男, 西浦昌男, 「カンキツ属および近縁属品種の胚数」, 『園芸試験場報告. B』, 7, pp11-21, 1967.
- 国立研究開発法人, 農業・食品産業技術総合研究機構, 「CAPS マーカーによるカンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術」, 2019.
- 五島淑子, 「幕末における日英饗応料理からみる食文化の変遷」, 『アサヒグループ学術振興財団 食生活科学・文化 環境に関する研究助成紀要』, vol.34, pp89-98, 2021.
- 田中愉一郎, 『日本柑橘図鑑譜(下巻)』, p414-427, 養賢堂, 東京, 1948.
- 塚本学, 1984, 「江戸のみかんー明るい近世像ー」, 『国立歴史民俗博物館研究報告』, 4, p29-54 (塚本学『生き物と食べ物の歴史』高志書院, 2021 206-238 に再録)
- 豊田紘子, 小口千明, 伊藤大生, 山下史雅, 鈴木修斗, 佐藤壮太, 川添航, 鈴木秀弥, 野場隆汰, 「明治期日本における温州蜜柑の普及と在来小蜜柑からの嗜好変化」, 『歴史地理学野外研究』, vol.18, pp21~84, 2018.
- 中村大, 五島淑子, 「幕末長州藩における柑橘類栽培の特徴」, 『山口大学教育学部研究論叢』, vol.71, 2021 (印刷中)
- 二宮泰造, 島田武彦, 遠藤朋子, 野中圭介, 大村三男, 藤井浩, 「CAPS マーカーによるカンキツの品種識別法の開発と親子鑑定」, 『園学研』, vol. 14, No.2, pp127–133, 2015.
- 花木宏直, 「近世後期～明治前期における柑橘品種と受容: 和歌山市街及び周辺地域を事例に」, 『地理空間』, vol.3, No.2, pp96-112, 2010.
- 藤原正人編(1966)『明治前期産業発達史資料第1集一明治七年府県物産表』明治文献資料刊行会
- 松森智彦, 中村大, 五島淑子, 「防長風土注進案」産物・産業記載データベースシステムの改良」, 『山口大学教育学部研究論叢』, vol.70, pp181-185, 2021.
- 松山知樹, 本橋令子, 秋浜友也, 大村三男, 「DNA フィンガープリントによるカンキツ栽培品種の識別」, 『育種学雑誌』, vol.42, No.1, pp155-159, 1992.
- 盛永俊太郎・安田健(編著), 1986, 『江戸時代中期における諸藩の農産物ー享保・元文 諸国産物帳からー』, 日本農業研究所, 189, 190, 196, 264, 271.
- 山口県教育委員会, 吉田松陰全集(第7巻), p262, p279, p402, 大和書房, 東京, 1972.
- 山口県文書館, 1960～1965, 防長風土注進案 全 22 巻, 山口県立山口図書館(復刻マツノ書店 1983) .
- 山本雅史, 福田麻由子, 古賀孝徳, 久保達也, 富永茂人, 「喜界島(鹿児島県)の在来カンキツである



ケラジミカン (*Citrus keraji*) の来歴の検討, 『園学研』, vol.9, No.1, pp7-12, 2010.

#### 史料

「熊谷家上屋敷植栽樹木」, 弘化4年(1847?), 萩博物館蔵.

「楫取素彦書簡 杉民治宛」, 明治17年(1884), 萩博物館蔵.

「英国人三田尻渡来一件」(山口県文書館蔵)(藩政文書・毛利家文庫・9 諸省 請求番号 9 諸省 601)  
山口県文書館

#### 参考 URL

萩市保存樹木等台帳, 2018, 第64号,  
<https://www.city.hagi.lg.jp/uploaded/attachment/10199.pdf>  
(最終アクセス: 2021年11月25日)

「防長風土注進案」産物・産業記載データベースシステム, [https://ds0n.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~hoc\\_hofudo/](https://ds0n.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~hoc_hofudo/) (公開期間: 2021年3月13日~)  
(最終アクセス: 2021年11月21日)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構,  
「Citrus CAPS Marker Database (MiGB)」, 2019年8月.  
<https://mikan.dna.affrc.go.jp/>  
(最終アクセス: 2021年11月25日)