

SSR 解析を用いた日本と台湾の茶の系統解析

静岡県立掛川西高等学校
自然科学部 3 年 須山杏友莉 他 2 名

1 研究の目的

チャノキ (*Camelia sinensis*: 茶) は現在世界各国で飲用や食用など様々な用途を目的として栽培されている。また、茶には発がんの抑制や、老化の予防など様々な効能をもつ可能性があることが近年の研究からわかってきた。日本には九州地方や京都府など、多くの茶の名産地が存在する。その中でも静岡県は有数の産地で、主に掛川市やその周辺の牧之原台地での生産が盛んである。このように茶に囲まれた環境で生活している私たちは、近年、DNA による茶の系統解析が行われていると知り⁽¹⁾、日本国内において私たちの住む地域の茶や、名産地の茶がどのような系統に分かれているのか調査しようと考え、研究に着手した。また、本研究では、日本と同様に茶が有名である台湾の茶の系統解析もあわせて行うこととし、台北市立建國高級中學との共同研究を行った。

2 方法

今回の研究では、参考文献(1)と同様に、SSR マーカーを用いた蛍光プライマー法により、反復配列の繰り返し数の違いを調べ、系統解析を行うこととした。SSR とは、単純反復配列 (simple sequence repeat) の略であり、DNA 塩基配列中にみられる、短い配列の繰り返しである。SSR マーカーはこの繰り返し数の差異に着目するもので、品種識別や DNA 鑑定で用いられている。

本研究では、①各地で茶葉を採取し、②茶葉から DNA を抽出した後、DNA 抽出液を蛍光色素で標識したプライマーを用いた PCR 法で増幅、DNA 増幅液をフラグメント解析し、SSR を含む DNA 長を測ることで繰り返し数の違いを測定した。

なお、実験に使用した SSR 座は、京都府立大学の先行研究と同じものを使っている。

(1) 茶葉の採取

茶葉の採取方法は、3 本程度の茶の木からそれぞれ木の中央付近の、きれいかつやわらかい葉を 3~5 枚程度採取した。採取した葉は 75% エタノールで消毒し、マイナス 20℃ の冷凍庫で保管した。実験で使用する葉は、静岡県農林技術研究所茶業研究センターで「やぶきた」の基準木とされている木から採取したものと、「さやまかおり」や「おくひかり」、「かなやみどり」などの



図 1 茶葉の採取の様子

基準木から採取した栽培品種と、京都府京田辺市、宮崎県宮崎市、福岡県八女市、静岡県掛川市、菊川市、島田市、牧之原市、台湾の坪林で採取した在来種を対象とした。在来種の茶葉の採取地は以下の図 2 の地図にまとめている。



図2 静岡県内(左)と日本各地(中央)、台湾(右)の在来種茶葉の採取地

(2) DNAの抽出・増幅とフラグメント解析

採取した葉をピンセットで1 cm程度切ったものを使用した。これをホモジェナイズし、DNA抽出液としてMighty Prep reagent for DNAを加え、95°Cで10分加熱した後、遠心分離を行い、上澄み液をDNA抽出液とした。このDNA抽出液1 μLにDNAポリメラーゼとしてKOD one Master MixもしくはQuick Taqを加え、蛍光標識プライマーを用いたPCR法によりDNAを増幅した後、アガロースゲルを用いた電気泳動法でDNAの増幅を確認した。PCR法を行う際の温度サイクルを図3に示す。プライマーは参考文献で用いられていた9つのプライマーを使用した(図4)。フラグメント解析はMacrogen社に依頼し、測定結果はPeak Scanner™ Software v2.0で解析した。

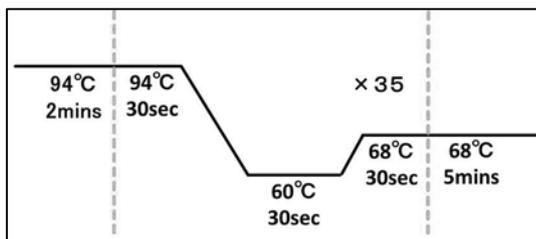


図3 PCR温度サイクル

識別記号	蛍光標識	SSR座名	Fプライマー	Rプライマー	増幅塩基数	繰り返し回数
A	FAM	MSG0795	atcaagcgcttttcagctctcc	gtttggttagggcaatcaacattcc	148	tc 16回
B	FAM	MSG0703	atgttgttcacgagttgaggctgt	gtttgaaccctaaccctaacccttc	159	ag 18回
C	FAM	MSG0811	acaccacaccacaccactttct	gtttggtctgaagctcceaagtga	151	tc 15回
D	FAM	MSG0609	acaccaagtccaactcaaactc	gtttcgactgatcggtgaccttctcc	158	ag 19回
E	JOE	MSG0572	agcactctcaggattctgctcgt	gtttctggtgatgaaagcccagtttc	157	tc 20回
F	FAM	MSG0800	atcttgtttgaagtgcggtgct	gtttaacagcagcaaatagcacaactc	181	tc 25回
G	JOE	MSG0403	atgatcgccggttagagatgaat	gtttaagctggctaacctacaggagc	298	tc 16回
H	JOE	MSG0413	attgtcgatccaaccacaatcg	gtttctggtgttctctgaggctg	290	tc 25回
I	JOE	MSG0699	atgacagctgttctgagatttt	gtttcaaaaatggggtgtctacagagg	249	ag 18回

図4 PCR法に用いたプライマーの蛍光標識、塩基配列、繰り返し数

3 結果

増幅された DNA の長さをフラグメント解析データから読み取り、整理した後、系統樹を作成した(図 5)。系統樹は POPTREE 2 を用いて、NJ 法で作成した。なお、group 3, 4 にある台湾の茶については、日本と同じ方法で台北市立建國高級中學校が解析したものである。分析機器の誤差については、双方で同じ基準木の茶葉を分析することで修正した。しかし、9つの対象 SSR 座のうち1つ (MSG0800) については台湾の品種でピークを確認できないものがあったため、系統樹の作成には8つの SSR 座を用いた。

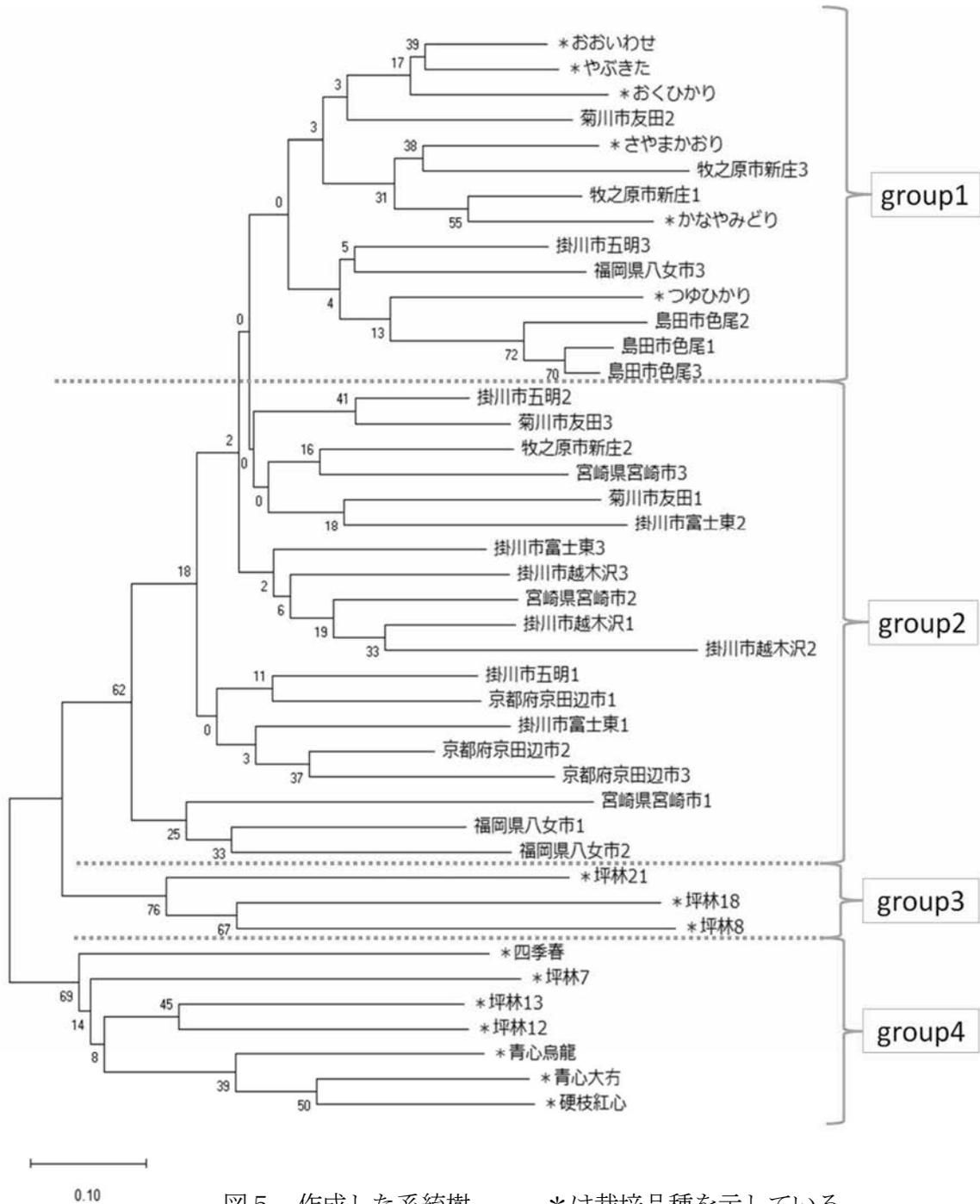


図 5 作成した系統樹 *は栽培品種を示している。

4 考察

図5に示したように、今回分析した茶については、大きく4つの group に分類できると考えた。

group 1、group 2は中国から直接日本に伝来したグループで、group 3、group 4は中国から台湾に伝来したグループであることが考えられた。1900年代、日本と台湾は交流が盛んだったため、茶についても何らかのやりとりがあり、遺伝子が同じである可能性も予想したが、それぞれの国で本来の系統が残っていることが今回の結果からは推測された。また、日本国内と台湾内で大きく異なる系統が存在し、それらは両国とも栽培品種と在来種で大きく系統が分かれていることが確認できた。

各 group の考察を以下に示す。

- group 1 . . . 日本国内で品種改良が行われ、その系統とこれらの系統間の交配により生じた「実生個体」と考えられる。
- group 2 . . . 中国から日本に伝来したものが、それぞれの地域で受け継がれた在来種と考えられる。また、九州産の茶が系統樹で独立していることから、中国から九州への伝搬ルートと京都・静岡への伝搬ルートが異なっている可能性が考えられる。
- group 3 . . . 古い時代に台湾に伝来した系統が残ったものと考えられる。
- group 4 . . . 日本より古い時代に、台湾あるいは中国で品種改良が行われた系統と、これらの系統間の交配により生じた「実生個体」の可能性はある。

これらの結果をより確かにするために、今後は試料数と採取地点を増やしていく必要がある。特に在来種は一つの茶畑で複数種が混在しているため、試料数をよく検討しなければならない。また、採取地点については日本国内における茶の伝搬ルートを推測しながら決定していき、同時に中国本土でも同様の分析を行うことで、さらなる調査を進めていきたい。

5 謝辞・参考文献

本研究に協力してくださった京都府立大学の久保中央教授、静岡大学農学部的一家嵩志准教授、静岡県立大学の河原崎泰昌准教授、静岡県農林技術研究所茶業研究センター、京都府茶業研究所、京都府茶協同組合茶業センター、JA 福岡八女、宮崎県総合農業試験場茶業市場、茶農家の皆様に感謝申し上げます。本研究は、公益財団法人はごろも教育研究奨励会の助成を得て行っております。また、本研究は台湾・台北市立建國高級中學との共同研究として行っております。

- (1) Kubo, N et al. (2019). Classification of tea (*Camellia sinensis*) landraces and cultivars in Kyoto, Japan and restriction site-associated DNA sequencing analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 66(2):441-451
- (2) Taniguchi, F et al. (2012). Construction of a high-density reference linkage map of tea (*Camellia sinensis*). *Breeding Science* 62(3):263-273
- (3) 加藤 史子ほか (2008). 単純反復配列 (SSR) マーカーを利用したチャの品種識別、日本食品科学工学会誌、55(2):49-55

補足資料：フラグメント解析について

PCR法によりDNA増幅に成功した試料は、Macrogen社に依頼し、フラグメント解析した。測定結果はDNA長(bp)を横軸に、検出強度を縦軸にとったグラフで送られる。これを、Peak Scanner™ Software v2.0というソフトで解析し、DNA長を測定した。図5の系統樹のもととなった、各茶葉のDNA長を以下の補足I～IVに示す。

補足-I 日本国内の品種のフラグメント解析結果

系統	MSG0811	MSG0609	MSG0572	MSG0403	MSG0413	MSG0795	MSG0703	MSG0699
やぶきた	133 139	101 147	158 166	276	264	142 155	131	252
かなやみどり	139 147	101	164 166	270	264	155 157	131	252 256
おくひかり	131 139	101	152 158	276 284	264 269	144	131	252
おおいわせ	133 139	101 147	158	286	264	153 155	131	252
さやまかおり	133 142	99 101	156 158	270	264	142 151	131	252 256
つゆひかり	133 139	147	150 158	266 276	264	164 166	131	248

補足-II 静岡県内の在来種のフラグメント解析結果

採取地	MSG0811	MSG0609	MSG0572	MSG0403	MSG0413	MSG0795	MSG0703	MSG0699
五明1	142	147	158 166	276 286	264 279	136	131	252
五明2	139 142	101	150 158	286	264	151 153	131	252
五明3	139	147	150 158	270 276	264 269	159 161	131	261 263
越木沢1	133	147	150 158	270	264	142	131	252
越木沢2	139	156 158	150	282	264	166 168	131	250 252
越木沢3	139	99 101	150 166	270 276	264 269	136 142	131	250 252
色尾A	133	147 158	150 158	270	264	142	131	252
色尾B	133	85 147	150	270	264	166	131	252
色尾C	133	85 147	150 158	270	264	136	131	252
友田1	131 139	101	150 158	282	264	145 153	131 163	261 263
友田2	131	99 101	156 158	282	277 279	166 168	131 163	261 263
友田3	142	101 147	150 158	270 282	264 269	153	131	261 263
新庄1	139 142	101	166	270	264	155 157	131	256 263
新庄2	131 139	101	148 150	276 286	264	142	131	261 263
新庄3	139 146	101	156 158	270	264	142 157	131 143	254 256
富士東1	131	85	156	286	269	207	131	261
富士東2	131	85	166	282	264	207	131	252
富士東3	139	85	158	276	264	207	131	261

補足-III 日本国内各地の在来種のフラグメント解析結果

採取地	MSG0811	MSG0609	MSG0572	MSG0403	MSG0413	MSG0795	MSG0703	MSG0699
福岡1	133 142	147 147	150 150	286 301	264 264	145 145	145 163	261 263
福岡2	142 142	87 147	152 158	286 301	279 279	145 145	145 163	261 263
福岡3	133 139	99 147	150 152	270 270	264 264	145 145	131 163	261 263
京都1	139 142	85 147	152 158	276 286	269 279	151 153	131	252 252
京都2	139 142	85 147	156 158	270 276	264 279	145 153	131 158	261 263
京都3	139 142	85 147	156 158	270 270	279 279	153 168	131 163	250 250
宮崎1	133 135	85 147	160 166	276 286	262 269	153 164	145 145	261 263
宮崎2	139 142	99 99	150 150	282 282	264 279	151 153	131 163	261 263
宮崎3	131 139	85 147	152 166	286 286	262 264	136 136	131 131	261 263

補足-IV 台湾茶のフラグメント解析結果

系統	MSG0811	MSG0609	MSG0572	MSG0403	MSG0413	MSG0795	MSG0703	MSG0699
青心烏龍	133 137	149	150 152	276 286	266	149 151	165 167	234 248
青心大冇	133	149	150	267	266	139	149	234
TTES21	142	110	142	266	261	143	131	260
TTES13	137	163	150	280	267	139	147	248
TTES12	133	149	140	280	266	149	147	248
TTES8	146	111	138	268	261	147	137	252
硬枝紅心	133	149	150	266	266	139	167	248