

# 単純反復配列によるアジア各地のチャノキの 類縁関係に関する研究

静岡県立掛川西高等学校  
自然科学部 2年 山崎由泰 他2名

## 1 研究の背景と目的

静岡県は日本一の茶園面積・収穫量を誇る。私たちは、チャノキ(*Camellia sinensis*: 茶)の遺伝子としての伝搬ルートに興味を持った。チャノキの文化は平安初期に中国から日本に伝わった(参考文献(1))。それに対し、日本古来のチャノキの利用方法は茶文化の伝来以前から史実として伝わっている(参考文献(2))。このことから、チャノキの遺伝子には飲茶の文化とは異なる伝搬ルートがあると考えた。さらに、高知をはじめとする、日本に点在する後発酵茶は、東南アジアと同じ製法であり、中国の発酵茶とは異なる(参考文献(3))。また、沖縄県では独自の文化が根付いており、琉球王国時代には中継貿易が行われていた。そこで本研究では、四国や沖縄県において、在来種と呼ばれているものや、栽培品種について由縁を知り遺伝子の伝搬ルートの考察に向け、各地の茶の類縁関係を調査することにした。

## 2 一昨年までの研究と問題点

一昨年までの本校自然科学部の研究では、単純反復配列を用いた茶の系統解析を台湾との共同研究で行っていた。その際に、日本の栽培品種6種、在来種27種と台湾の栽培品種10種が調査された。その研究では作成した図を系統樹としていた。しかし、系統樹を作成する際にはDNAの塩基配列についての情報が必要になるため、遺伝形質には関係しない単純反復配列長のデータだけでは系統樹を作成することが出来ない。系統樹とは、種の分化を示すものであり、チャノキという一つの種の中での個体同士や品種の分化を示すものではない。一方樹形図は、一つの種についての類縁関係を明らかにするものであり、単純反復配列長や個体の形質の違いなどで作成できる。このことから、樹形図を作成したということになる。さらに、一昨年までの研究では、グループの分類方法が誤っていた。一般的には根元に近い分岐点からグループ分けを行うが、その図では分岐点をいくつか飛ばし、本来分けるべきではない分岐点で分けていた。これらの問題点について、本研究では静岡県立農林環境専門職大学の太田智先生の指導を受け、系統樹に代わる一つの種の中での個体間の類似性について示すことの出来る樹形図の作成方法や、グループ分けを根本から見直し2019年、12月より新たに研究に着手した。

## 3 方法

今回の研究では、参考文献(4)と同様に、単純反復配列(simple sequence repeat)の違いを調べ、類縁関係を調査することにした。単純反復配列とは、DNA塩基配列中に見られる、短い配列の繰り返しのことである。SSRとも呼ばれており、繰り返し数の差異に着目することで、類縁関係を調べることができる。本研究では、各地のお茶農家の方々に茶葉を採取して頂き、届いた茶葉から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、増幅したDNAをフラグメント解析し、単純反復配列長を測定し、樹形図を作成した。なお、実験で対象としたSSR座は、京都府立大学の研究(参考文献(4))と同じものにした。

### (1) 茶葉の採取

本研究で用いた生の茶葉は、後発酵茶を製造する高知県の農家を含む各地の茶農家の方々に採取して頂き、届いた茶葉の中で柔らかく綺麗なものを3~5枚選別した。その後、75%エタノールで消毒し、マイナス20℃の冷凍庫で保管した。実験で使用する試料は、高知県や香川県、沖縄県、静岡県を対象とした。また、中国とインドの試料はジーンバンクより提供して頂いた。茶葉の採取地と品種名は、以下の図1の表にまとめた。

採取地	採取したチャノキ(樹形図での表記)	種類区分	試料数
静岡県牧之原市	実生(牧之原実生)	在来種	1
高知県大豊町梶ヶ内	在来種(高知在来)	在来種	1
高知県仁淀川町下名野川	山茶(高知山茶)	在来種	1
高知県のい町	山茶(小倉挿し木1~2、小倉実生1~3 川又実生1~3)	在来種	8
高知県仁淀川町茶業試験場	ヤブキタ(ヤブキタ49年)	栽培品種	1
高知県大豊町(農家)	ヤブキタ(高知組合①、高知組合②)	栽培品種	2
香川県三豊市(農家)	めいりよく(めいりよく)	栽培品種	1
沖縄県国頭村(農家)	ヤブキタ(沖縄ヤブキタ)、インザツ(インザツ) ゆたかみどり(ゆたかみどり)、紅タチ(紅タチ)	栽培品種	4
インド(ジーンバンク)	枕cd6、枕cd70、枕cd93	在来種	3
中国(ジーンバンク)	水仙	在来種	1

図1 採取した試料と採取地、種類区分

### (2) 在来種の定義

図1中で在来種と表記したものがあるが、本研究における在来種とは、明治時代以前から生息している、実生と明らかにわかる、その地域で栽培品種が入る前から栽培されている、日本の西南暖地の山間にみられる日本古来より自生している山茶、という4項目のうち1つでも満たしているものを指す。

### (3) DNAの抽出とPCR法による増幅

DNAを抽出する試料は、生の茶葉の葉脈を避け、ピンセットで5mm四方に千切ったものを使用した。これに、DNAを調製するための試薬としてMighty Prep reagent for DNA 100μLを加え、ホモジェナイズし、ヒートブロックで95℃、10分加熱した後、遠心分離を15,000rpm、5℃で10分行った。そして、チューブ中の上清10μLを取り出し滅菌蒸留水90μLを加え100μLにし、これをDNA抽出液とした。このDNA抽出液2μLにDNAポリメラーゼとしてKOD one Master Mix 25μL、蛍光標識プライマー4μLを加え、滅菌蒸留水で50μLに調製し、混合液を作成した。そして、サーマルサイクラーを用いて増幅を行った。参考文献(4)と同様に9つのSSR座を対象とするプライマー(図2)を用いてPCR法によるDNA増幅を行った。

識別記号	蛍光標識	SSR座名	Fプライマー	Rプライマー
A	FAM	MSG0795	atcaagcgcttttcagtctctcc	gtttggttagggcaatcaacattcc
B	FAM	MSG0703	atgtgttcacagttgaggctgt	gtttgaaccctaaccctaacccttc
C	FAM	MSG0811	acaccacaccacaccactttct	gtttggtctgaagctccaaagttaa
D	FAM	MSG0609	acaccaagtccaactcaactc	gtttcgactgatcggtgaccttctcc
E	JOE	MSG0572	agcactctcaggatttctgctgt	gtttctggtgatgaaagcccagtttc
F	FAM	MSG0800	atcttgtttgaagtgtcggtgct	gtttaacagcagcaaatcgcacaactc
G	JOE	MSG0403	atgatcgccggttagagatgaat	gtttaagctggctaacctacacggagc
H	JOE	MSG0413	attgtgatccaaccaaatcg	gtttcttgggtgttctctgaggctg
I	JOE	MSG0699	atgacagctgtgctgagatttt	gtttcaaaaatggggtgtctacagaggg

図2 PCR法で用いたプライマー

### 4 ピークの読み取りについて

本研究では、フラグメント解析をMacroGen社に依頼した。そして、ピークスキナーを用いて、単純反復配列長を読み取った。ピークスキナーの使用方法を次に示す。図3でも示したように単純反復配列の領域では80bpから350bpの範囲で2塩基ごとに高さが異なる特異的なピークが見られる。こ

これは、増幅が行われる際に不完全なものが発生してしまうためである。そして、この中から最もピークサイズの大きいものを読み取る。また、読み取る際はホモの場合は最も高いピークを一つ読みとり、図3のようにヘテロの場合は二つ読みとる。この時、ピークの高さが最も高いものに比べ、半分以上の高さがあるものを読み取る。

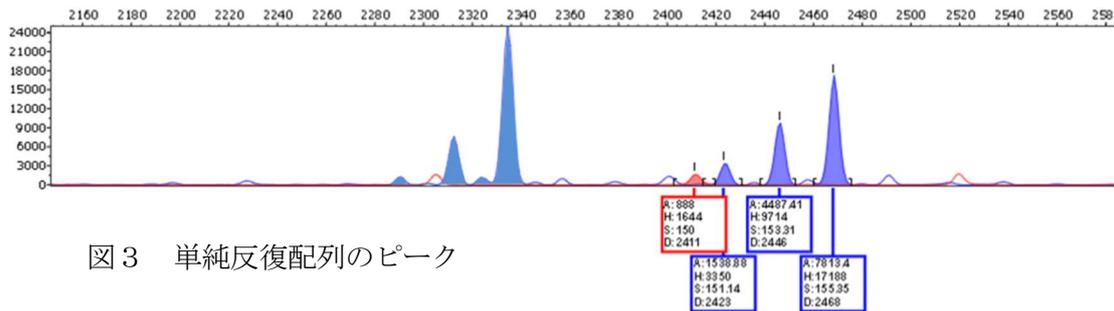


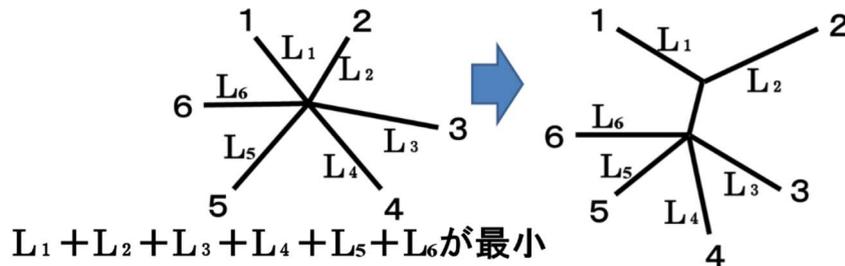
図3 単純反復配列のピーク

## 5 樹形図について

今回得られた23試料のフラグメント解析結果と、本校自然科学部での先行研究から得た解析結果から、NJ法を用いて樹形図を作成した。その手法を次に示す。

### (1) NJ法について

NJ法(近隣結合法)では、まず樹形図作成に必要な全ての試料から、無作為に2試料を抽出し、それを一つのペアとした星状樹を作成する。そして、星状樹の枝の長さの総和が最小になる近隣を用いることで、樹形図を作成する手法である。



## 6 結果

### (1) PCR法

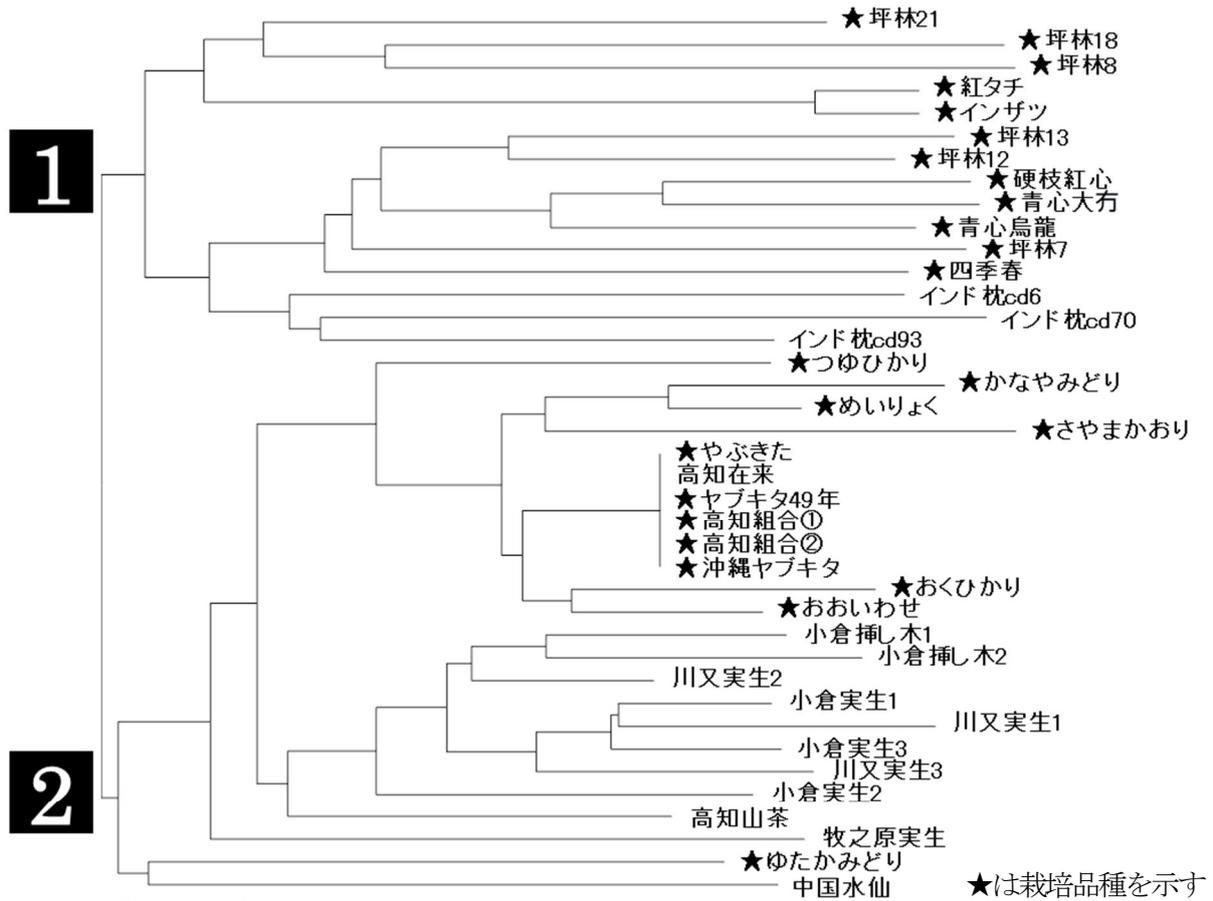
今回、在来種15種、栽培品種8種の試料の9つ全てのプライマーで計217サンプルについてPCR法によるDNA増幅を確認することができ、単純反復配列長のデータを得ることができた。その一部を抜粋する。高知県大豊町梶ヶ内の試料は在来種と言われていたが、調査したところ全ての単純反復配列長がヤブキタと一致し、在来種ではなくヤブキタであると結論付けられた。この茶を送って頂いた高知県農業技術センター茶業試験場に確認したところ、その地域でこの茶が栽培され始めたのが50年前であることに加え、その地域にヤブキタが導入されたのも50年前ということが判明した。このことからその地域で在来種と言われていても実際には栽培品種である可能性があると考えられる。

品種名	MSG 0795	MSG 0703	MSG 0811	MSG 0609	MSG 0572	MSG 0800	MSG 0403	MSG 0413	MSG 0699
やぶきた	142 155	131	133 139	101 147	158 166	201	276	264	252
ヤブキタ49年	142 155	131	133 139	101 147	158 166	201	276	264	252
高知組合①	142 155	131	133 139	101 147	158 166	201	276	264	252
高知組合②	142 155	131	133 139	101 147	158 166	201	276	264	252
高知在来	142 155	131	133 139	101 147	158 166	201	276	264	252
めいりよく	145 155	131	139	101 147	164 166	201	270 276	264 276	252
高知山茶	135 153	131 167	131 133	101 147	150 166	207 225	276 285	269 271	252 263
牧之原実生	136 168	131	142 150	85 162	150	201 222	276 282	264	263

表 ヤブキタとその他の品種

(2) 樹形図

本研究では、NJ法を用いて樹形図を作成した(図4)。図4は、新たに調査を行った10地点23試料のデータに加え一昨年度の研究のデータのうち、台湾と日本の栽培品種のデータを用いて作成した。また、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、樹形図の作成には8つのSSR座を用いた。一昨年の日本の在来種のデータは、本研究における在来種に当てはまるかどうか確認することが出来なかったため、樹形図の作成には用いなかった。なお、ヤブキタのデータは比較対象として用いた。作成した樹形図(図4)は大きく1、2のグループに分けられる。1のグループでは、沖縄県と台湾の栽培品種とインドの在来種が類似性を示した。2のグループでは、日本の茶と中国の在来種が類似性を示した。このグループ分けを地図上で示した(図5)。



0.1 図4 作成した樹形図

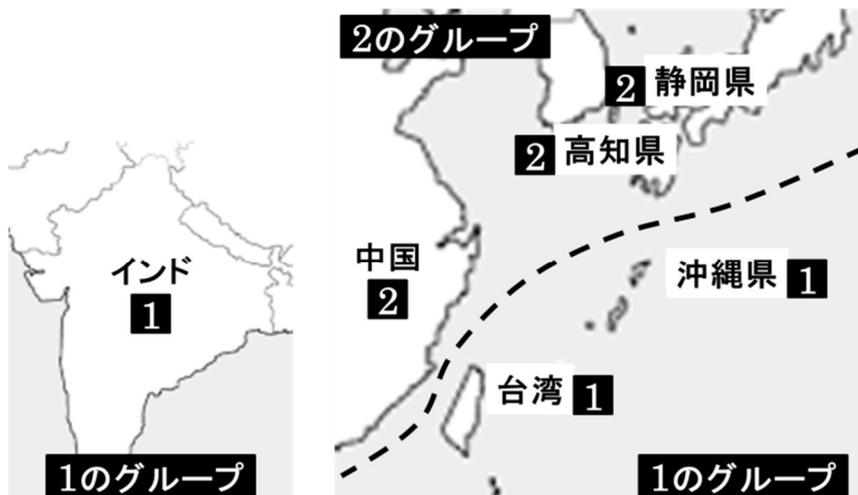


図5 グループの位置関係

## 7 考察・今後の展望

作成した樹形図の中で、ヤブキタが1つにまとまったことから、単純反復配列による各地のチャノキの類縁関係に基づくグループ分けは、信頼性が高いことが判明した。また、図4の樹形図において、沖縄と台湾、インドの茶のグループと中国と沖縄以外の日本の茶グループに分けられたことや、高知県の山茶が独立したことから、中国から緑茶が伝わったルートの他に南アジアからも日本に茶が伝わった可能性があると考えた。今後は、ヤブキタをはじめとする栽培品種の影響を受けていない在来種の試料数を増やしていく。また、アジア各地の茶と日本の茶の関係について調査していく。

## 8 謝辞

本研究に協力して下さった静岡県立農林環境専門職大学の太田智先生、高知県農業技術センター茶業試験場の濱田様、伊藤様、高知県大豊町基石茶協同組合様、国友商事株式会社の代表取締役國友昭香様、香川県高瀬茶業組合様、沖縄県奥共同店様、茶農家の皆様に感謝申し上げます。

## 9 参考文献

- (1)徐、静波 (2011). 中国におけるお茶文化の展開とその日本への初期伝来、京都大学生涯教育学・図書館情報学研究(2011), 10:153-163
- (2)寺本 益英. 古典作品に見るお茶の文化史—茶の伝来から茶道文化の成立まで—、Kwansei Gakuin University
- (3)中村 羊一郎(1995). ミャンマーにおける茶の起源伝承と「食べるお茶・ラペソー」について、『比較民俗研究』12. 1995/9
- (4)Kubo, Net 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
- (5)Taniguchi, F et al. (2012). Construction of a high-density reference linkage map of tea (*Camellia sinensis*). *Breeding Science* 62(3):263-273
- (6)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、日本食品学工学会誌、55(2):49-55
- (7)須山 杏友莉ほか. SSR解析を用いた日本と台湾の茶の系統解析