岐阜大学機関リポジトリ
Gifu University Institutional Repository

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) の遺伝的多様性に基づく日本のチャ (Gamellia sinensis (L.) var. sinensis)の品種分化に関する研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2008-02-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 松元, 哲
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2341

氏　　名（本(国)籍）	松　元　　哲　（鹿児島県）
学　位　の　種　類	博士（農学）
学　位　記　番　号	農博乙第97号
学位授与年月日	平成17年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学　位　論　文　題　目	Phenylalanine ammonia-lyase(PAL)の遺伝的多様性に基づく日本のチャ(*Camellia sinensis* (L.) var. *sinensis*)の品種分化に関する研究
審　査　委　員　会	主査　静岡大学　助教授　森田明雄
	副査　信州大学　教　授　南　峰夫
	副査　静岡大学　教　授　早津雅仁
	副査　岐阜大学　教　授　古田喜彦

論　文　の　内　容　の　要　旨

チャのカテキン合成に関与するphenylalanine ammonia-lyase（PAL）の完全長cDNAを単離し、PALをプローブに用いたRFLP解析の多型情報に基づいて、チャの遺伝資源の分類、評価技術の構築を行った。

まず、チャ完全長PAL cDNAを単離し、チャと他の植物間でPALの塩基配列の比較したところ、双子葉植物と相同性が高く、単子葉植物とは低く、裸子植物のマツとは最も低い相同性を示し、植物種間のPAL配列の違いは、植物種の進化上の類縁関係を反映していた。チャのPALは単一遺伝子として存在し、日本の緑茶品種では3種類の複対立遺伝子マーカー（A、B、D）が見出され、品種を5種類（AA、AB、AD、BD、DD）に分類することができた。しかし、BB型に該当する品種はなかった。

海外や国内でも遠方のサンプリングでは、DNA抽出までに試料の室温での保存が強いられるが、適当な室温保存方法は検討されてない。そこで実験試料の室温での保存法を検討したところ、エタノール中に葉を一週間程度保存することにより、RFLP解析に使用可能なレベルのDNAが抽出可能であることを明らかにした。この保存方法を用いて、チャとツバキの種間雑種であるチャツバキのPAL cDNAのRFLP解析を行ったところ、緑茶品種‘さやまかおり’とツバキ由来と推定された。このことから、PALは種間雑種の確認においても有用であることが示された。

チャの変種間変異を明らかにするため、アッサム変種（*Camellia sinensis* var. *assamica*）と中国変種（*Camellia sinensis* var. *sinensis*）を供試し、PAL RFLP解析を行った。PAL cDNAの5’側プローブによって検出されるC断片を中国変種に比較すると、アッサム変種では強く検出される傾向があるなど、多型パターンに違いがみられた。さらに、中国変種内であっても日本の品種・在来種と韓国在来種、導入中国種との間には、検出されるPAL

複対立遺伝子マーカーの種類と頻度が異なった。韓国の 6 箇所の古寺から採集したチャの後代では、日本で検出される 3 種類を含んで少なくても 7 個（K1～K7）、合計 10 個の複対立遺伝子マーカーが推定され、日本の在来種とは遺伝的に異なる背景をもつことが示唆された。また中国（一部インド）の中国変種（*C.sinensis* var. *sinensis*）の解析においては、韓国のチャで推定された 6 個のマーカー他に、未同定のマーカーが複数推定されるなど遺伝的な多様性が極めて大きかった。

日本の一部の里山には、ヤマチャと呼ばれるチャが見られる。ヤマチャの来歴については形態学的な研究から在来種との関係を明らかにする試みがなされてきたが、その起源に関する明確な結論は得られていない。そこで、日本各地の在来種とヤマチャの 2 つの集団について PAL の遺伝的多様性を調べ、集団間の関連を調べた。検出されたマーカーの種類はいずれも A、B、D と一部の韓国型であり、その主なマーカーの出現頻度は A が 0.66、B が 0.07、D が 0.23 で、集団間でほぼ同様であった。ヤマチャが在来種と同じ遺伝子頻度を示し、これまでの形態学的な特徴からヤマチャ特有の形態は見出せていないことを考えると、ヤマチャは在来種からのエスケープであるとことが強く示唆された。

PAL の遺伝的な多様性から、チャの品種分化の過程を次の通り推定した。まず、中国から導入され日本に定着した祖型のチャは、中国のチャの遺伝変異を十分に受け継いでいなかった。次に栽培化によって在来種が形成されたが、一部エスケープし野生化したものがヤマチャとなった。育種が進むにつれて優良形質をもつ個体が在来種の中から選抜され、品種登録された。約半数の在来種の PAL 複対立遺伝子マーカーが AA 型であったため、在来種から選抜された品種の主要なタイプは AA 型となり、B の遺伝子頻度は極端に低かったため、BB 型に該当する品種は生まれなかった。主要品種の‘やぶきた’は唯一 BD 型であり、その後‘やぶきた’を母本に用いた交雑育種が進むと‘やぶきた’のマーカーを引く品種群が出現し、AA 型が激減した。一方、特徴的な形質を有する‘べにつくば’、‘やまとみどり’、‘おくみどり’は、日本の在来種には検出されないマーカーを有することから、海外のチャとの交雑後代の可能性が極めて強かった。

以上のことから、本論文は PAL cDNA をマーカーとして用いる手法により、日本のチャが中国から導入され、在来種を通じて品種化された過程を明らかにし、本手法がチャ遺伝資源の新たな分類、評価に有効であることを示した。さらに海外のチャとの交雑により遺伝変異が大きく拡大可能であることを示唆した。

審　査　結　果　の　要　旨

本学位論文は、チャのカテキン合成系に関与する phenylalanine ammonia-lyase (PAL) の RFLP 解析によって得られた多型情報に基づいて、日本のチャ品種の分化の過程を明らかにしたものである。本研究で得られた知見は以下のとおりである。

チャの完全長 PAL cDNA を単離し、他の植物間で PAL の塩基配列を比較したところ、植物種間の PAL の配列の違いは、植物種の進化上の類縁関係を反映していた。チャの PAL は単一遺伝子として存在し、日本の緑茶品種では 3 種類の複対立遺伝子マーカー（A、B、D）が見出され、品種を 5 種類（AA、AB、AD、BD、DD）に分類することができた。BB 型に該当する品種はなかった。

次に、DNA解析を目的とした実験試料の室温での保存法を検討したところ、エタノール中に葉を一週間程度保存することにより、RFLP解析に使用可能なレベルのDNAが抽出可能であった。

PAL cDNAを用いたRFLP解析により、チャとツバキの種間雑種であるチャツバキ1～9号が、子房親である 緑茶品種‘さやまかおり’由来の断片とツバキ由来と推定される多型を有していることを明らかにした。このことは、PALが種間雑種の確認においても有用なDNAマーカーであることを示す。

韓国の6箇所の古寺から採集したチャの後代では、日本で検出される3種類の他少なくても7個、合計10個の複対立遺伝子マーカーが推定された。一方で、韓国の一つの茶園から採集した個体はすべて日本型のPAL複対立遺伝子マーカーを示した。これらの結果から、韓国には古い時代に中国から導入されたチャと近代になって日本から導入されたチャの2つの集団が存在することが明らかになった。また中国（一部インド）の中国変種（*C. inensis* var. *sinensis*）の解析では、韓国のチャの解析で推定されたマーカーの他に未同定のマーカーが複数推定されるなど、遺伝的な多様性が極めて大きかった。

さらに、日本の在来種は、中国や韓国の在来種と比較すると、PAL複対立遺伝子マーカーが3もしくは4種類のみであり、特にマーカー頻度を考慮に入れるとA型とD型に突出した、遺伝的変異に乏しい集団であった。品種の分化では、在来種から選抜された品種群におけるマーカー型の分布は、在来種の遺伝子頻度から推定されたものと同様の傾向を示した。その後、主要品種であるBD型の‘やぶきた’を母本に用いた交雑育種が進むと‘やぶきた’のマーカーを引く品種群が出現し、頻度が増加した。また、日本在来種から選抜された品種の一部には、日本の在来種には検出されないマーカーを有するものが認められたことから、海外のチャとの交雑後代であると推定された。

以上のように、本論文では、PALのDNAマーカーを用いて、日本のチャと中国や韓国などのチャとを比較することにより、日本のチャが中国の限られた地域のチャから分化し、在来種が形成され、その後在来種からの選抜育種を経て、主要品種である‘やぶきた’を母本にした交雑育種によって育成されたという品種分化の過程を明らかにした。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1）MATSUMOTO, Satoru, TAKEUCHI, Atsuko, HAYATSU, Masahito, KONDO, Sadaaki：Molecular cloning of phenylalanine ammonia-lyase cDNA and classification of varieties and cultivars of tea plants (*Camellia sinensis*) using the tea PAL cDNA probe. Theoretical and Applied Genetics 1994　89 .(6). 671～675

2) MATSUMOTO, Satoru , KIRIIWA, Yoshikazu, TAKEDA ,Yoshiyuki : Differentiation of Japanese green tea cultivars as revealed by RFLP analysis of phenylalanine ammonia-lyase DNA. Theoretical and Applied Genetics 2002 104. (6-7). 998～1002

3) MATSUMOTO, Satoru , KIRIIWA, Yoshikazu, YAMAGUCHI, Satoshi : The Korean tea plant (*Camellia sinensis*): RFLP analysis of genetic diversity and relationship to Japanese tea. Breeding Science 2004, 54. 3, 231～237

既発表学術論文

1) MATSUMOTO, Satoru, FUKUI, Masaoki : *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to tea plant (*Camellia sinensis*) cells. Japan Agricultural Research Quarterly (*JARQ*) 1998, 32. (4) 287～291

2) KAUNDUN, Shiv Shankhar, MATSUMOTO, Satoru : Heterologous nuclear and chloroplast microsatellite amplification and variation in tea, *Camellia sinensis*. Genome 2002, 45. (6) 1041～1048

3) KAUNDUN, Shiv Shankhar, MATSUMOTO, Satoru : Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in Tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, and differentiation between *assamica* and *sinensis* varieties. Theoretical and Applied Genetics 2003, 106. (3) 375～383

4) KAUNDUN, Shiv Shankhar, MATSUMOTO, Satoru : PCR-based amplicon length polymorphisms (ALPs) at microsatellite loci and indels from non-coding DNA regions of cloned genes as a means of authenticating commercial Japanese green teas. Journal of the Science of Food and Agriculture 2004, 84.(8) 895～902