

オミクス情報に基づく茶樹の遺伝育種および栄養生理学的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山下, 寛人 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/81609

氏 名 (本 国 籍)	山下 寛人	(愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)	
学 位 記 番 号	農博甲第 7 6 3 号	
学 位 授 与 年 月 日	令和 3 年 3 月 1 5 日	
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻	
研究指導を受けた大学	静岡大学	
学 位 論 文 題 目	オミクス情報に基づく茶樹の遺伝育種および栄養生理学的研究	
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 森 田 明 雄 副査 静岡大学 准教授 一 家 崇 志 副査 岐阜大学 教授 小 山 博 之	

論 文 の 内 容 の 要 旨

茶 (*Camellia sinensis* L.) は、世界で最も親しまれている嗜好性飲料であり、種々の機能性成分を有すことから、世界的な注目度が高まっている。また、近年の和食人気や緑茶の機能性に関する認知度が高まり、世界的な健康食ブームも追い風となり、日本茶への注目度は非常に高く、海外への日本茶輸出も堅調に増加している。とりわけ、日本独自の栽培・加工法によって生産される抹茶は、他国の追随を許さない高品質な製造技術と高い文化性をもち、世界的な需要急増に貢献している。その一方、日本茶の国内需要は低調であり、年々栽培面積ならびに消費量は減少傾向である。その一因としては、国内茶園面積の約 7 割を「やぶきた」一品種が占めるという国内の茶栽培・育種体系が「やぶきた」に依存している現状が挙げられる。したがって、国際的な需要の高まりや日本茶のブランディングにおける多様なニーズへの対応ならびに栽培体系の高度化を目指した次世代の茶栽培並びに育種体系の構築が望まれている。本研究は、オミクス情報を活用した茶樹の遺伝育種および栄養生理学的研究を展開しており、これらの情報は次世代ゲノム育種の基盤構築に多大な貢献をもたらすと同時に、抹茶等の栽培手法である被覆（遮光）栽培における栄養生理学的知見についても明らかにしている。

まず、ゲノミクスに基づく茶樹の次世代育種基盤を構築した。様々な遺伝的背景を有する茶樹遺伝資源 167 系統（静岡県農林技術研究所茶業研究センター保管）を対象に、double digest restriction site associated DNA sequencing (ddRAD-seq) による Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) ジェノタイピングを行い、10,000 以上の SNPs を同定し、高密度な DNA マーカー情報を取得した。これら SNPs 情報を用いた遺伝構造解析により、中国種とアッサム種の変種の違いが遺伝的に明確化できることに加え、中国種内や日本系統内での集団構造とその混合度合いを明らかにした。また、日本における主要茶品種である「やぶきた」は、国内在来系統よりも中国系統に遺伝的に近いことに加え、中国系統のみが有す特徴的な血統を有することが示さ

れた。つまり、「やぶきた」は国内主要品種でありながらも、日本在来種の分化の過程で生まれたものではなく、中国系統の祖先構造を保持したものが選抜された可能性を示唆した。上述した解析系統集団の中から、同栽培環境で生育された茶樹 150 系統について、2018 年と 2019 年の一番茶新芽中の品質関連成分として、9 種の遊離アミノ酸類 [L-aspartate, L-asparagine, L-glutamate, L-glutamine, L-serine, L-arginine, L-alanine, L-theanine, γ -aminobutyric acid, 7 種の Catechins [(+)-gallocatechin (GC), (+)-catechin ((+)C), (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-catechin gallate (CG), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate (EGCG-3"Me), Caffeine および Chlorophyll 含量に関する表現型情報を取得した。これら表現型情報と SNPs 情報を用いたゲノミックプレディクション (GP) モデリングにより、遊離アミノ酸類, Chlorophyll および EGC 含量については予測精度が低かったものの, EC, ECG, EGCG, Total Catechins および Caffeine 含量は予測可能であることを示した。また, GP を活用することで, Genome Wide Association Study (GWAS) 上位関連 SNPs 数の閾値を決定し, Linkage disequilibrium (LD) decay (< 10 kb) 範囲内のゲノム領域を探索することで, 各形質変異を制御する候補遺伝子群の同定に成功した。

次に、窒素栄養ならびに被覆栽培に伴う茶樹の代謝変動機構について解析した。水耕栽培に基づくモデル試験において、詳細な窒素 (N) 栄養水準および被覆環境に対する影響を品質関連成分の視点から評価した。その結果、茶樹の主要な品質関連成分である Catechins 類、特に遊離型 Catechins 類は、低 N 条件で蓄積増加することを明らかにした。また、一般的に N 栄養に応じて変動する Chlorophyll や遊離アミノ酸類含量とともに、詳細な N 濃度条件における茶樹の品質代謝成分に関する影響を評価したことで、各成分の変動を引き起こす N 栄養状態の閾値を同定した。一方、被覆処理により、Chlorophyll 含量は増加、遊離型 Catechins [(+)C, EC, EGC, GC] 含量は減少する表現型を観察した。一方、被覆環境下では N 栄養による上記成分の変動がそれぞれ低下あるいは抑制されていた。つまり、被覆栽培に伴う Chlorophyll や Catechins 類含量の変動は、N 栄養量に対する依存が小さく、被覆処理そのものの影響が大きいことを示唆した。さらに、上述した各品質関連成分の代謝変動に関するトランスクリプトーム解析により、被覆環境に伴う代謝変動が、いくつかの生合成経路遺伝子やその上流の制御因子の発現変動により説明できることを明らかにした。しかしながら、N 栄養条件に伴う Catechins 類の代謝変動は、トランスクリプトームの変動では説明することができず、翻訳後修飾等の制御機構についても検討する必要があると考えた。

最後に、スペクトロミクスによる茶葉の非破壊形質評価技術を開発した。水耕栽培茶樹を対象として、異なる N 栄養状態の茶葉約 200 枚から Visible-Near InfraRed-Short-Wave InfraRed (VIS-NIR-SWIR) 領域 (400–2500 nm) の分光反射特性を測定した。これらハイパースペクトルデータと機械学習を活用したスペクトロミクス解析によって、茶葉中の N 含量や主要な品質関連成分について、生葉の状態から非破壊で推定できる回帰モデルを構築した。いずれの表現型においても、De-trending (DT) による前処理手法と Cubist アルゴリズムの組み合わせのパターン (DT-Cubist) が優れた予測精度を示すことを明らかにした。また、スペクトルミクス解析においては、測定誤差により生じやすいベースラインシフト等を正規化するスペクトル前処理が効果的であることを示唆した。さらに、機械学習に基づく感度分析により、各表現型を推定するために

重要なスペクトル領域を同定できることが分かった。特に、葉緑色と N 含量に正の相関が観察されない黄化葉のスペクトルデータを統合・比較解析することにより、Chlorophyll 含量に依存しない N 含量特異的なスペクトルパターンの同定に成功した。

本研究成果は、ゲノミクスを基盤とした GP・GWAS による茶樹のゲノム育種の未来を拓くとともに、トランスクリプトミクスやスペクトロミクスを活用した茶樹の施肥・栽培体系の高度化に向けた生理的理解ならびに非破壊評価法の技術基盤構築に大きく寄与するものである。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者山下寛人氏は、オミクス情報を活用した茶樹の遺伝育種および栄養生理学的研究を展開し、次世代ゲノム育種の基盤構築に貢献するとともに、抹茶等の栽培手法である被覆栽培における栄養生理学的知見を明らかにした。申請者は、茶遺伝資源を対象に高密度 DNA マーカーを取得するとともに、茶葉中の主要化学成分との関連解析を進めて、ゲノミックプレディクション (GP) とゲノムワイド関連解析 (GWAS) による茶の次世代育種法の構築に貢献した。また、大規模データ解析手法を駆使し、被覆茶のストレス程度を評価するためのバイオマーカーを構築するとともに、茶葉中の窒素含量や主要な品質関連成分を生葉の状態から非破壊で推定できる回帰モデルの構築に成功した。

これらの研究成果は、ゲノミクスを基盤とした GP・GWAS による茶樹のゲノム育種の未来を拓くとともに、トランスクリプトミクスやスペクトロミクスを活用した茶樹の施肥・栽培体系の高度化に向けた生理的理解ならびに非破壊評価法の技術基盤構築に大きく寄与するものであることを認める。

基礎となる学術論文

- 1) Yamashita, H., Katai, H., Kawaguchi, L., Nagano, A.J., Nakamura, Y., Morita, A., and Ikka, T. (2019). Analyses of single nucleotide polymorphisms identified by ddRAD-seq reveal genetic structure of tea germplasm and Japanese landraces for tea breeding. PLoS One 14: e0220981.
- 2) Yamashita, H., Sonobe, R., Hirono, Y., Morita, A., and Ikka, T. (2020). Dissection of hyperspectral reflectance to estimate nitrogen and chlorophyll contents in tea leaves based on machine learning algorithms. Sci. Rep. 10: 17360.
- 3) Yamashita, H., Uchida, T., Tanaka, Y., Katai, H., Nagano, A.J., Morita, A., and Ikka, T. (2020). Genomic predictions and genome-wide association studies based on RAD-seq of quality-related metabolites for the genomics-assisted breeding of tea plants. Sci. Rep. 10: 17480.

既発表学術論文

- 4) 山下寛人, 一家崇志, 森田明雄 (2020). 茶葉有用成分を制御するための栽培生理および育種における現状と課題. Foods & Food Ingredients Journal of Japan. 225: 265-274
- 5) Yamashita, H., Fukuda, Y., Yonezawa, S., Morita, A., and Ikka, T. (2020). Tissue ionome response to rhizosphere pH and aluminum in tea plants (*Camellia sinensis* L.), a species

adapted to acidic soils. *Plant-Environment Interactions* 1: 152–164.

6) Yamashita, H., Tanaka, Y., Umetsu, K., Morita, S., Ono, Y., Suzuki, T., Takemoto, T., Morita, A., and Ikka, T. (2020). Phenotypic Markers Reflecting the Status of Overstressed Tea Plants Subjected to Repeated Shade Cultivation. *Front. Plant Sci.* 11: 556476.