

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03756

研究課題名(和文) 茶で検出されたニコチンの内生要因の解明

研究課題名(英文) Study of endogenous factors of nicotine detected in tea

研究代表者

森田 明雄 (Morita, Akio)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：20324337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：チャのニコチン生合成については、少数の遺伝子により支配されている可能性が示唆された。また、ポリアミン合成経路の活性化とニコチン含量に関連性がみられ、チャにおけるニコチン生合成についてはCsPMTを介さない別の生合成経路が存在することが示唆された。チャの組換え体作出について、アグロバクテリウム法ではカテキン類による菌の感染能力が阻害され、一般的な植物の形質転換手法の検討のみならず、植物体内のカテキン含量の制御ならびにカテキン類の抗菌作用へ耐性を持つ菌株を選択することが重要である。また、ボンバードメント法による形質転換の方がチャの形質転換に適していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

茶で微量に検出されたニコチンについては、内因性由来であることをある程度証明できた。それらを直接的に証明するためには、まだ数ステップの研究が必要であるが、その実験系に必要な情報基盤について整備できた。特に、チャの遺伝子組換え植物体作出については、本研究だけでなく、茶業関連の機能性解析や将来の育種など、様々な研究への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Tea nicotine biosynthesis may be regulated by a few genes. In addition, the activation of the polyamine synthesis pathway was associated with nicotine content, suggesting that there is another biosynthetic pathway for nicotine biosynthesis in tea plant that is not mediated by CsPMT.

It is important to control the catechin content in plants and to select strains that are resistant to the antimicrobial action of catechins, as well as to control the catechin content in plants. Furthermore, it was suggested that the transformation by bombardment method was more suitable for the transformation of tea plant.

研究分野：植物栄養学

キーワード：茶 ニコチン 遺伝子組換え

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

茶は、世界で最も愛飲されている嗜好飲料の1つである。近年、和食が世界文化遺産に登録されたことも追い風となり、茶は日本の食文化を代表するひとつに位置づけられ、今後もさらなる消費拡大が予想される。

研究代表者らのグループは、近年、アルカロイド化合物の一種であるニコチンが茶葉中にタバコ(乾物重1g当り約~2mg程度)と比較して極微量(乾物重1g当り約~0.8µg程度)存在することを発見した。ニコチンは、主にタバコ等のナス科の植物に多く含まれていることが知られており、トマトやジャガイモなどといった食品中にも含まれていることが報告されている。また、これらを主食とする北欧などの地域では食事中からのニコチン摂取が他の地域に比べて多いとされている(スウェーデン; 1.1µg/day, デンマーク; 1.3µg/day, *食事由来からのみの値)。ニコチンは即効性の非常に強い神経毒性を持つ化合物であり、主に中枢神経および末梢に存在するニコチン性アセチルコリン受容体に作用することで強い薬理作用を表す。誤飲や誤食などによる中毒症例は度々報道されることがあるが、食品からの摂取量は微量であるため直接的な問題とはなっていない。しかし、全ての生物に対して毒性を発揮するため、過去に農薬(殺虫剤)として使用されていた経歴を持つ(現在は使用を禁止されている)。厚生労働省は、食品中に残留する農薬などが人の健康に害を及ぼすことのないように、全ての農薬・飼料添加物または動物用医薬品について残留基準を設定している。その後、2003年の食品衛生法の改正に伴い、食品中に残留する農薬などの規格基準である「ポジティブリスト制度」が導入された。この結果、茶を含めた全ての農作物または食品中におけるニコチン含量は、一律基準値である0.01ppm(乾物重1g当り0.01µg)以下に定められた。これまでの分析または報告されている茶葉中のニコチン含量(乾物重1g当り~2µg)の殆どはこの基準値を大きく上回っている。基準値を超えて農薬などが残留する食品は販売や輸入などが全面的に禁止されることから、生産者や市場関係者へのダメージは莫大である。さらに、食の安全・安心の観点からも茶から検出されたニコチンの由来を明らかにすることは早急な課題である。

2. 研究の目的

先行研究で研究代表者らは、迅速性に優れた簡易な分析試料の前処理法として用いられているQuChERS(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)法による茶からのニコチン抽出法と、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を用いた高感度定量分析法を確立した。本法を用いて数百点の茶サンプルの他に、外因性(外部からのコンタミリスク)が限りなく低い水耕チャ樹、無菌条件下のチャ苗や培養細胞などの測定により、茶葉中のニコチンは内因性由来である可能性が高いことを明らかにした。また、タバコのニコチン生合成経路を参考に、チャのニコチン生合成関連遺伝子等について解析したが、内因性であることを決定付ける結果は得られていない。本研究では、チャにおけるニコチン生合成経路の解明を通じて、ニコチンの起源が内因性であることを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

次世代シーケンサー(Hiseq, Illumina)を用いて、チャ「cv. やぶきた」を対象にニコチン生合成に関連する遺伝子(図1)の単離を試みた。Hiseqにより得られたチャのmRNA配列についてローカルサーバー上にデータベースを構築し、タバコのニコチン生合成関連遺伝子群の配列を基に、*CsPMT*, *CsQPT*, *CsMPO*, *CsODC*, *CsQS*のオースログ配列取得を試みた。また、ニコチン生合成に関わる遺伝子群を解析するための情報基盤整備について、次世代シーケンズによる一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism: SNP)解析を行った。静岡県農林技術研究所茶業研究センター内圃場と市村清新技術財団研究植物研究園に保存されている167系統(中国種138系統: 日本系統96系統, 海外系統42系統, アッサム雑種29系統)の葉を採取し、DNAを抽出した。遺伝情報の取得は、*Bgl* IIと*Eco*RI-HFの制限酵素を用いたddRAD-seq(double digest Restriction site-Associated DNA sequencing)解析により行った。Hiseq2500により得られたリード配列をチャドラフトゲノム配列にマッピングし、SNPs情報を取得した。

次に、チャの遺伝資源(コアコレクション)の季節別および部位別におけるニコチン含量の差異について、先行研究で構築したQuChERS法によるニコチンの抽出と、LC-MS/MSによる定量を行った。また、ニコチン生合成とその共通の前駆体経路にあるポリアミン代謝に焦点を当て、代謝経路を活性化させるストレス条件下での応答性を調査した。まず、ポリアミン類を増加させるカリウム(K)欠乏処理し、ポリアミンおよびニコチン含量を定量した。

一方、チャのニコチン生合成に関わる遺伝子組換え体を作製するための更なる条件検討を、ボンバードメント法およびアグロバクテリウム法により行った。また、ボンバードメント法による外来遺伝子のチャゲノムへの組み込み機構を考察するため、撃ち込むベクターの形状について比較検討した。さらに、形質転換の材料は現状として、遺伝資源である中国導入系統やインド紅茶系統の培養物を使用しているが、日本の緑茶系品種の培養物が求められているため、緑茶系品種からの不定胚誘導を試みた。

4. 研究成果

CsPMT については, Hiseq システムを用いてもそのオーソログを検出することができず, その他遺伝子についても更なるオーソログの検出はできなかった. 一方, *CsODC* 配列についてチャの標準連鎖地図 (コアコレクション対応, 未発表データ) ヘマッピングしたところ, 第 1 連鎖群 (LG01) にマッピングできた. また, 茶の遺伝資源を対象に RAD-seq 解析により SNPs を検出し, ゲノムワイドアソシエーション解析 (Genome Wide Association Study: GWAS) による関連候補遺伝子の探索ができるプラットフォームを構築した. ddRAD-seq 解析により, 167 系統において頻度の高い約 10,000 以上の SNPs が検出された. このうち, 80% の SNPs が 15 連鎖群からなる連鎖地図上にゲノムワイドに座することを確認した. これら SNPs 情報を用いて遺伝構造解析を行ったところ, アッサム雑種と中国種の集団に大別され, さらに中国種の中でも国内在来系統と国外中国種の集団に分かれた.

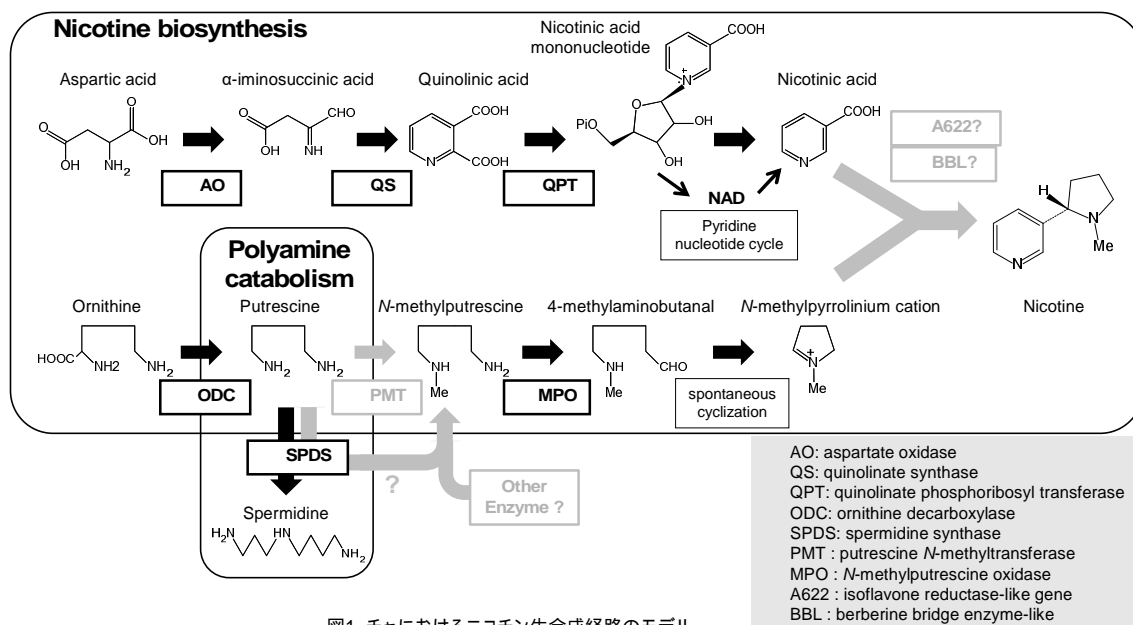


図1 チャにおけるニコチン生成経路のモデル

次に, コアコレクションを対象に季節間におけるニコチン含量の変動・分離パターンを比較したところ, チャにおけるニコチン含量の差異については, 少数の遺伝子によりニコチン合成が支配されている可能性が示唆された. また, K 欠乏によりポリアミン合成経路の活性化とニコチン含量の増加がみられ, チャにおけるニコチン合成については *CsPMT* を介さない別の合成経路が存在することが示唆された.

一方, ポンバードメント法では, 高濃度のマンニトールを添加した培地で前培養した不定胚ほど多くの形質転換体が得られた. なお, ポンバードメント法によるチャ不定胚への最適遺伝子導入条件は, マンニトール 0.4 M で 24 時間前培養した不定胚に, 遺伝子を付着させた直径 1.0 μm の金粒子を圧力 1100 psi で導入することであることを明らかにできた. また, このプロセスにより 50 日以内にチャの形質転換体が作出可能となり, 既存の培養と比較し培養期間を約 50 日短縮することができた. また, アグロバクテリウム法ではカテキン類含量が多いほど, 菌の感染能力が阻害されることがわかった. つまり, アグロバクテリウムを用いたチャの形質転換では, 一般的な植物の形質転換手法の検討のみならず, 植物体内のカテキン含量の制御ならびにカテキン類の抗菌作用へ耐性を持つ菌株を選択することが, 更なる最適化に寄与する可能性が示唆された. また, アグロバクテリウム法について, 実生を用いた効率的な感染法を検討したところ, 実生苗を用いた *in planta* 法により組換え体を得ることに成功し, いくつかの組換え毛状根を得ることができた. なお, 不定胚に対するアグロバクテリウムによる感染法について, 計 6 回の感染実験を行なったが, 不定胚からは感染の証左である毛状根は形成されず, 過剰増殖は共存培養期間に依らず生じていた. また, アグロを接種させた不定胚は未接種のものに比べ緑化するのが早かったため, 不定胚自体が持つ防衛能としてカテキンを生合成したことが示唆され, チャ不定胚へのアグロの接種においてアグロの過剰増殖を抑制するのが非常に困難であると分かった. 以上の結果より, ポンバードメント法では, 選抜培養後の培養物について外来遺伝子の発現が確認できたことから, また, チャがカテキンを合成することからも, アグロが感染できずに過剰増殖しその制御が困難であるため, ポンバードメント法による形質転換の方がチャの形質転換に適していることが示唆された. なお, 培養物の増加速度が遅く, *CsPMT* 発現解析には至らなかった.

さらに, 外来遺伝子の細胞への導入効率はベクターの形状に依存しない事が示唆され, 外来ベクターは断片化されてゲノムへ組込まれる事が判明した. 以上のことから, 余剰配列のゲノムへの組込みが生じない PCR 産物をベクターとして用い, 形質転換個体の育成を行うことが可能であると判断した. また, ベクターはクローニングの必要がない PCR 産物であっても形質転換に

支障をきたさない事が新たに判明した。本成果より、チャの二次胚形成の効率化と、目的遺伝子のみをコードしたベクターの使用によって、ボンバードメント法によるチャの形質転換を効率的に実施することができる。一方、「さやまかおり」遺伝子を引き継ぐ系統から不定胚が誘導でき、緑茶品種の *in vitro* 挿し木苗の作出と維持に成功し、今後の研究材料としての活用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikka T, Yamashita H, Kurita I, Tanaka Y, Taniguchi F, Ogino A, Takeda K, Horie N, Hojo H, Nanjo F, Morita A.	4. 巻 13(4)
2. 論文標題 Quantitative validation of nicotine production in tea (<i>Camellia sinensis</i> L.).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0195422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195422	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 寺前香里, 中村晃, 山下寛人, 山木海人, 古川一実, 小山博之, 一家崇志, 森田明雄
2. 発表標題 Rhizobium rhizogenesによるチャの形質転換にカテキン類が及ぼす影響
3. 学会等名 2018年度日本土壌肥料学会（日本大学）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺前香里, 中村晃, 山下寛人, 山木海人, 古川一実, 小山博之, 一家崇志, 森田明雄
2. 発表標題 Rhizobium rhizogenesによるチャの形質転換効率に及ぼす要因
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会（岡山大学）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山木海人, 小泉舞衣, 一家崇志, 森田明雄, 古川一実
2. 発表標題 ボンバードメント法による茶樹の形質転換は二次胚誘導条件により効率化する
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会（岡山大学）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 望月秀斗, 山木海人, 折原玲美, 寺前香里, 一家崇志, 森田明雄, 古川一実
2. 発表標題 チャ (茶樹) の形質転換におけるアグロバクテリウムの過剰増殖と抗菌作用
3. 学会等名 第26回日本育種学会中部地区談話会 (愛知教育大学)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山木海人, 小泉舞衣, 林裕二, 一家崇志, 森田明雄, 古川一実
2. 発表標題 チャ (Camellia sinensis) の二次胚形成能を利用した形質転換および培養物の発現解析
3. 学会等名 第26回日本育種学会中部地区談話会 (愛知教育大学)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirotō Yamashita, Ikuya Kurita, Takashi Ikka, Fumiya Taniguchi, Akiko Ogino, Kazuyuki Takeda, Nobuyuki Horie, Hiroshi Hojo, Fumio Nanjo, Akio Morita
2. 発表標題 High-sensitivity determination and quantification of minor amounts of nicotine in tea with LC-MS/MS.
3. 学会等名 Plant Biology 2017 (American Society of Plant Biologists, Honolulu, Hawaii, USA) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寺前香里, 伊藤弘樹, 山下寛人, 古川一実, 小山博之, 一家崇志, 森田明雄
2. 発表標題 Rhizobium rhizogenesによるチャ (Camellia sinensis L.) の形質転換.
3. 学会等名 2017年日本植物細胞分子生物学会 (ソニックシティ, 埼玉県)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山木海人, 寺前香里, 一家崇志, 森田明雄, 古川一実
2. 発表標題 チャ (Camellia sinensis L.) 抽出成分が毛状根アグロバクテリウムの感染を阻害する可能性.
3. 学会等名 2017年日本植物細胞分子生物学会 (ソニックシティ, 埼玉県)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小泉舞衣, 一家崇志, 森田明雄, 大嶋雅夫, 田部井豊, 古川一実
2. 発表標題 チャ (茶樹: Camellia sinensis L.) の形質転換における培養プロセスの短期化.
3. 学会等名 2017年日本植物細胞分子生物学会 (ソニックシティ, 埼玉県)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroto Yamashita, Ikuya Kurita, Takashi Ikka, Fumiya Taniguchi, Akiko Ogino, Kazuyuki Takeda, Nobuyuki Horie, Hiroshi Hojo, Fumio Nanjo, Akio Morita
2. 発表標題 Investigation and evaluation of minor amounts of nicotine in tea with LC-MS/MS.
3. 学会等名 The 22nd Shizuoka Forum on Health and Longevity (Shizuoka) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下寛人, 栗田郁也, 一家崇志, 古川一実, 武田和哉, 堀江紳弘, 北条寛, 南条文雄, 森田明雄
2. 発表標題 チャで検出されたニコチンは内生由来である可能性が高い.
3. 学会等名 2017年日本茶業学会 (ソニックシティ, 埼玉県)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小泉舞衣, 寺前香里, 山下寛人, 一家崇志, 森田明雄, 古川一実
2. 発表標題 ボンパードメント法によるチャ不定胚の遺伝子導入条件および培養条件の検討.
3. 学会等名 第25回日本育種学会中部地区談話会 (静岡大学)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	荻野 暁子 (Ogino Akiko) (70370567)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・主任研究員 (82111)	
研究分担者	古川 一実 (Furukawa Kazumi) (90353151)	沼津工業高等専門学校・物質工学科・准教授 (53801)	
研究分担者	一家 崇志 (Ikka Takashi) (90580647)	静岡大学・農学部・准教授 (13801)	