

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2018～2021

課題番号：18KT0095

研究課題名(和文) 耕作放棄地を利用した茶油生産のための施肥管理技術の構築

研究課題名(英文) Development of Fertilizer Management Technology for Tea Oil Production Using Abandoned Land

研究代表者

真野 昌二 (Mano, Shoji)

基礎生物学研究所・オルガネラ制御研究室・准教授

研究者番号：20321606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：耕作放棄地において、施肥条件を変えて生育させた茶種子の経時的なサンプルを用いた脂質の成分分析やRNA-seq解析を行い、施肥の種類が種子のオレイン酸含量に影響を与え、茶油脂の特徴である高オレイン化には秋冬の窒素施肥を抑制することが必要であることを明らかにした。さらに、茶油の高オレイン化の一端を担うと考えられる現象として、1月～2月におけるリノール酸からオレイン酸への変換を発見し、候補遺伝子としてCsLipase1、CsLipase2を同定した。CsLipase1、CsLipase2の発現量は秋冬の窒素施肥量を反映していると考えられ、窒素施肥量を判断するマーカー候補であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、野外における茶種子の発達機構および遺伝子レベルでの油脂合成制御機構の一端を明らかにしただけでなく、施肥の種類と濃度の検討といった遺伝子組換えでない取組により、茶油の高品質化を可能するための基盤情報を提供できた。同定したバイオマーカーを用いることにより、他の耕作放棄された茶畑における茶種子の生育状況の指標として活用できるものと期待される。より高付加価値した茶油脂の生産につなげることができれば、山間、中山間地域社会の自立促進および持続的な社会の構築につながる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Component analysis of lipids and RNA-seq analysis using samples of tea seeds grown under different fertilization conditions in abandoned fields over time revealed that the type of fertilization affects the oleic acid content of seeds and that suppression of nitrogen fertilization in autumn and winter is necessary for the characteristic high oleation of tea oil. The expression levels of CsLipase1 and CsLipase2 are thought to reflect the amount of nitrogen fertilizer applied in the autumn and winter. The expression levels of CsLipase1 and CsLipase2 were considered to reflect the amount of nitrogen fertilizer applied in autumn and winter, and were considered to be candidate markers for determining the amount of nitrogen fertilizer.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：チャ種子 耕作放棄地 油脂 施肥 RNA-seq解析 遺伝子発現 バイオマーカー 愛知県設楽郡

1. 研究開始当初の背景

都市への人口流入に伴う農業従事者の高齢化により、都市部から離れた山間、中山間地域の耕作放棄地は年々拡大している。特に傾斜地の割合が高い中山間地域の農地は、集積・集約化や機械化が困難であり、作業効率と生産性が低いために耕作放棄地が広がり続けている。中山間地域の適切な管理は、地域社会の維持のみならず、生態系の保存、洪水や土壌侵食の防止、河川上流域の保全等に重要であり、平地にある都市の発展にとっても必須である。中山間地域の耕作放棄を防止し、地域社会と都市が共存する持続的社會を構築するためには、中山間地域において高い価値をもつ、独自性の高い農産物を生産することは有効な方策となり得る。

研究代表者のグループは、愛知県内で最も耕作放棄地率の高い設楽郡の調査を行い、放棄された茶畑において、茶葉を摘み取られずに成長した茶樹が大量の種子を結実させること、茶種子は多量の油脂を含む脂肪性種子であり、オレイン酸を多量に含むため、食用および低刺激化粧品原材料として最適であることを明らかにしていた。茶 (*Camellia sinensis*) は、日本における重要な園芸作物であり、良質な茶葉を得るための研究が古くから行われている。しかしながら、茶種子に関する研究は少数であり、そのほとんどは茶葉を対象としており、茶種子の発達や脂質合成に関する情報は極めて乏しい。また、施肥管理技術も良質な茶葉を生産するために特化されたものであり、茶種子の生産を対象にしたものではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、耕作放棄された茶畑を高品質な植物油である茶油生産の場として再利用することを目標とし、省力で低コスト、低環境負荷を達成するための施肥管理技術の確立を目指した。これまで研究対象とされてこなかった茶種子の収穫量を向上させ、より高品質な油脂を生産するための施肥管理技術の確立のためには、茶種子の登熟に伴う油脂合成系を分子生物学、生化学手法を用いて定量的に理解し、それらが施肥の濃度や種類によってどのように変動するかを遺伝子レベルで明らかにすることが必要である。また、茶油生産に適した施肥管理の指標となるバイオマーカーを選抜することでできれば、条件の異なる耕作放棄茶畑においても適切な施肥管理を可能とする技術の確立でき、全国の耕作放棄された茶畑を高品質な植物油である茶油生産の場として再利用することができる考えた。

しかしながら、茶に関する研究のほとんどは茶葉を対象としたもので、茶種子を材料とした研究例は少なく、遺伝子発現情報などの基礎研究はあまりされてこなかった。本研究の中心となる RNA-seq 解析を行うためには、高純度の RNA を必要とするが、種子には炭水化物や油脂など大量の貯蔵物質が蓄積しているために RNA 抽出は難しい。研究代表者のグループは、既に油糧植物種子からの高純度の RNA を抽出する方法を確立しており、本研究を効率的に遂行することができる。このような研究代表者らが開発してきた分子生物学手法と RNA-seq の様な先端的技術を、耕作放棄地で自生している茶に応用することで、上記の課題に迫ることができる考えた。

3. 研究の方法

本研究では、施肥方法の異なる試験区を設定し、茶種子の結実から完熟までの過程における種子を経時的にサンプリングし、成分分析や遺伝子発現の変動を解析した。

2018～2019 年度は、施肥方法の異なる 4 試験区 (A: 無施肥区、B: 窒素施肥区、C: 窒素リン酸施肥区、D: 窒素 (春夏) - リン酸 (秋冬)) を設定し、各試験区において、9 月から翌年の 2 月まで 1 ヶ月ごとに種子のサンプリングを行い、細胞観察、脂質分析、タンパク質含量分析、糖分析 (グルコース、スクロース、デンプン)、遺伝子発現定量 (RNA-seq 解析) を行った。

2019～2021 年度は、異なる条件の圃場を用いて施肥の効果を検証した。愛知県設楽郡において、日照と水はけが異なる 2 箇所の耕作放棄茶畑に、それぞれ A: 無施肥区、D: 窒素 (春夏) - リン酸 (秋冬) 施肥区を設定した。9 月から翌年の 2 月まで 1 ヶ月ごとに種子をサンプリングし、脂質分析、タンパク質含量分析、糖分析 (グルコース、スクロース、デンプン) を行った。

加えて、2018～2019年度のRNA-seq解析で見出された、バイオマーカー候補である遺伝子の発現解析も行った。

4. 研究成果

サンプリングした種子の脂質分析から、茶種子では9月～11月において胚乳の肥大および糖の蓄積が、12月～翌年2月において脂質合成と蓄積が行われることが明らかとなった。また、1月～2月の期間において脂質含量は大きく増加しなかったものの、リノール酸含量が低下し、オレイン酸含量が増加した。この結果は、茶油のオレイン酸濃度が高い理由の1つとして、1月～2月の期間において、リノール酸がオレイン酸に変換していると考えられる。施肥区画ごとの種子の脂肪酸組成を比較すると、A：無施肥区、D：窒素（春夏）—リン酸（秋冬）施肥区と比較して、B：窒素施肥区、C：窒素リン酸施肥区から収穫された種子はオレイン酸含量が低く、リノール酸含量が高い傾向が見られ、1月～2月におけるリノール酸からオレイン酸への変換の程度が低かった。B：窒素施肥区、C：窒素リン酸施肥区は秋冬においても窒素施肥を行っており、A：無施肥区、D：窒素（春夏）—リン酸（秋冬）施肥区は秋冬の窒素施肥は行っていない。この結果は、1月～2月におけるリノール酸からオレイン酸への変換は、秋冬期の土壤中の窒素量の影響を受けている可能性を示しており、秋冬の窒素施肥の抑制は、茶油の高オレイン化を達成する方策の1つであることが明らかとなった。施肥区画ごとの脂質含量の違いについては明確な違いを確認できなかったものの、種子収穫量についてはA：無施肥区と比較して、B：窒素施肥区、C：窒素リン酸施肥区、D：窒素（春夏）—リン酸（秋冬）施肥区の収穫量は1.5倍～3倍程度であり、施肥による種子生産量の増大を確認できた。一方で、施肥の種類による差については場所ごとのばらつきが大きく、明確な違いを確認することはできなかった。

サンプリングした茶種子のRNA-seq解析を行い、茶種子において強く発現する脂質代謝酵素をコードする遺伝子をカタログ化した。上記に示したように、茶油の高オレイン化に貢献すると考えられる1月～2月におけるリノール酸からオレイン酸への変換に関わる遺伝子に焦点を絞り、関与すると考えられる遺伝子の探索を進めた。1月～2月において特に高発現し、A：無施肥区、D：窒素（春夏）—リン酸（秋冬）施肥区において発現が高い脂質代謝系遺伝子を調べたところ、チャ特異的なリパーゼ（*CsLipase1*、*CsLipase2*）遺伝子を発見した。この2つのリパーゼはトリアシルグリセロールリパーゼであると予測されるものの、ダイズなナタネなど他の油糧作物のゲノムには相同性の高い遺伝子は見い出されなかった。*CsLipase1*、*CsLipase2*は1月～2月においてトリアシルグリセロールからのリノール酸の切り出しに関与すると予想され、その発現は秋冬の土壤中の窒素濃度に影響を受けることが考えられる。そのため、*CsLipase1*、*CsLipase2*発現量はオレイン酸含量の高い茶種子を生産するためのバイオマーカー候補と考えられる。*CsLipase1*、*CsLipase2*の発現を指標にして、窒素施肥量をコントロールし、収穫量を減らすことなく高品質な茶油の生産が可能となることが期待される。

【まとめ】

本研究では中山間地域において増加している耕作放棄茶畑を活用した茶油生産を目指し、茶油の生産量増加および高品質の指標となる高オレイン化を達成するための施肥方法の検討およびその科学的根拠となる基盤情報を取得した。施肥の種類が種子のオレイン酸含量に影響を与え、高オレイン化には秋冬の窒素施肥を抑制することが必要であることを明らかにした。これは、種子のオレイン酸含量を高めるためには、茶葉の生産のために行われている窒素の多い施肥は適切ではなく、種子生産に最適化された施肥技術を確立していくことで収量と品質を高めることが可能になることを示している。さらに、茶油の高オレイン化の一端を担うと考えられる現象として、1月～2月におけるリノール酸からオレイン酸への変換を発見し、候補遺伝子として*CsLipase1*、*CsLipase2*を同定した。*CsLipase1*、*CsLipase2*の発現量は秋冬の窒素施肥量を反映していると考えられ、窒素施肥量を判断するマーカー候補であると考えられた。

2019年度以降のCOVID-19の影響と天候不順の影響を受け、当初計画していた研究計画の一部は期間延長により遂行することになったものの、上記のように、これまで基盤的な情報がほとんどなかった野外における茶種子の登熟過程における網羅的な遺伝子発現のデータを得ることができた。それらを用いたデータから同定したバイオマーカーは、他の耕作放棄された茶畑にお

ける茶種子の生育状況の指標として活用できるものと期待される。今後は、省エネルギーで低コストの次世代農業につなげてもらえるよう、得られた研究成果を論文としてまとめて公開していきたい。

植物はその種に独自の油脂を蓄積していることから、油脂合成系において異なる制御機構が働いていると考えられる。研究代表者のグループでは、ヒマヤダイズ等の油脂植物の油脂合成系についても研究を行っており、今回の茶で得られた情報と他の植物との情報を統合することで、油脂合成系の共通性と特異性に迫ることができると考えている。

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 Kanai, M., Yamada, T., Hayashi, M., Mano, S., and Nishimura, M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Soybean (<i>Glycine max</i> L.) triacylglycerol lipase GmSDP1 regulates the quality and quantity of seed oil.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45331-8	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kanai, M., Nagata, K., Hikino, K., Nishimura, M., Komazawa, K., and Mano, S.
2. 発表標題 Identification and Expression Analysis of U6 Promoters from Caster Bean
3. 学会等名 The 23rd International Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kanai, M., Yamada, T., Hayashi, M., Mano, S. and Nishimura, M.
2. 発表標題 Triacylglycerol lipase “SDP1” controls seed oil content and fatty acid composition in soybean
3. 学会等名 The 23rd International Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井雅武、杉浦（中井）篤、山口勝司、重信秀治、真野昌二
2. 発表標題 茶油の有効利用に向けたチャ (<i>Camellia sinensis</i>) 種子のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金井雅武、永田恭子、曳野和美、西村幹夫、駒澤謙史、真野昌二
2. 発表標題 ヒマU6遺伝子の発現を制御する5'上流域の同定
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金井雅武、杉浦(中井)篤、山口勝司、重信秀治、真野昌二
2. 発表標題 チャ (<i>Camellia sinensis</i>) 種子における脂質合成の特徴
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kanai, M., Tamura, K., Tarnawska-Glatt, K., Goto-Yamada, S., Yamada, K., and Mano, S.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 CABI	5. 総ページ数 印刷中
3. 書名 Plant omics: Advances in big data biology.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>オルガネラ制御研究室 http://www.nibb.ac.jp/plantorganelles/</p>
--

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	金井 雅武 (Kanai Masatake) (30611488)	基礎生物学研究所・オルガネラ制御研究室・特任助教 (63904)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関