

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02886

研究課題名(和文)ゲノムワイド関連解析による茶葉中のアルミニウム含量低減を目指した育種素材の開発

研究課題名(英文)Development of breeding materials for reducing aluminum content in tea leaves by genome-wide association analysis

研究代表者

一家 崇志 (IKKA, Takashi)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：90580647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、茶葉中のアルミニウム(AI)含有量の制御に関わる基礎的メカニズムを明らかにするため、チャ遺伝資源を対象に茶葉中のAI含量との関連性を徹底的に調査し、統計遺伝学的手法により低AIに関連する原因因子の特定を試みた。ddRAD-seqによるSNPsジェノタイピングを実施し、高密度DNAマーカー情報の構築に成功した。これらSNPs情報を用いてチャのゲノム科学的研究のための研究基盤を確立した。さらに、詳細な生理的試験を通じて、茶葉中のAI含量は、細胞壁におけるAIの結合キャパシティが律速因子である可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チャにおいてGP技術が確立できたことで、茶樹の品種改良の効率化が大いに期待できる。つまり、機能性成分以外の重要な農業形質、例えば収量性、病害虫抵抗性、早晩性の予測もDNA情報のみで可能となる。また、茶葉中のAI含量低減に向けた基礎知見を構築でき、これらの知見は植物の酸性土壌耐性機構の全容解明に貢献する。木本系の世代促進技術の改善は憂慮すべきだが、生産者や育成者が品質成分等をオーダーメイドできる育種プラットフォームを確立することで、国際的に注目を集める「日本茶」に新たな付加価値を与えることができ、消費・輸出の拡大など茶業界への多大な貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to understand the fundamental mechanisms controlling the aluminum (Al) content in tea leaves, we conducted a thorough investigation into the relationship between Al content in tea leaves and various tea genetic resources. Using statistical genetic methods, we attempt to identify important factors associated with low Al tea. We performed SNPs genotyping using ddRAD-seq and successfully constructed high-density DNA marker information. Using this SNPs information, we established a research platforms for genomic studies in tea plant. Furthermore, through detailed physiological assays, we discovered that the Al content in tea leaves is likely regulated by the binding capacity of Al in the cell wall, which may serve as the rate-limiting factor.

研究分野：植物栄養学

キーワード：チャ アルミニウム ゲノムワイド関連解析 ゲノミック予測

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

茶は世界中で飲用されており、その健康機能性が高く評価されている。これは、茶葉に特異的かつ多様な機能性成分が豊富に含まれているためである。世界的にも茶の需要は高いため、世界の茶の生産面積は拡大しているが、日本においては近年の和食ブームを背景に茶の消費量・輸出量は拡大しているものの、生産面積は減少しており茶業の衰退が深刻化している。そのため、新たな商品価値のある日本茶の育成・開発などを通じて茶業再興を推進する必要がある。このような状況の中、2013年に「和食」がユネスコ無形文化遺産に登録されたことが追い風となり、和食文化を象徴する日本茶の輸出量が増加し、茶は日本文化の海外展開において鍵となる工芸作物として位置付けられた。その中でも特に、抹茶の注目度ははずば抜けて高い。一般的に、抹茶の原料は碾茶(てんちゃ)とよばれ、遮光(被覆)することにより栽培・生産される被覆茶のことを指す。煎じて飲用する一般的な煎茶や玉露茶とは異なり、茶葉を直接摂取するため、茶葉に含まれる多くの機能性成分を無駄なく体内に取り入れることができる利点もあるが、過剰に摂取してしまうという欠点もある。特に注意したい代表的な成分がアルミニウム (Al) である。Al については、毒性試験などの研究に基づき暫定耐容週間摂取量 (ヒトが一生涯摂取し続けても健康への悪影響がないと推定される1週間あたりの暫定的な許容量, Provisional Tolerable Weekly Intake: PTWI) が設定されている。現在、Al の PTWI 量は $2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ week}^{-1}$ と FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会が定めている。過去の統計調査によると、通常の食生活ではそれらを上回る例は報告されていないが、抹茶など茶葉を直接摂取する機会が増えれば、決して安全であるとは言いきれなくなるため、注意する必要がある。

一方、チャは Al を有用元素とする代表的な超 Al 耐性植物である。一般的な植物では、Al は生育、特に根伸長を阻害する有害な金属として知られており、Al が存在する条件でも、あまり Al を生体内に吸収しないような生存戦略をとっている。しかし、チャは酸性 (土壌 pH が 4 程度) で、最も毒性の高い形態のアルミニウムイオン (Al^{3+}) が多量に存在する条件下においても良好に生育することができる。チャがなぜ Al を有用元素とすることができるかについてはまだ未解明であるが、その一因として生体内 (特に成葉中) に多量の Al を蓄積する能力があるためだと考えられている。そのため、チャが有する Al を多量に吸収しながら良好に生育できる機構を分子レベルで解明することは、茶葉中の Al 含量を制御できる可能性と同時に、他の作物における Al 耐性の向上にも大いに貢献する。つまり、チャの生育に Al が影響しないメカニズムが解明できれば、葉中の Al 低減を目的とした品種育成が達成できる。

2. 研究の目的

チャはアジアを中心に広く分布しており、国内の各研究機関にそれらを網羅した様々な表現型・形質を持つ多数の品種・系統 (遺伝資源) が保存されている。本研究では、茶葉中の Al 含有量の制御に関わる基礎的メカニズムを明らかにするため、チャ遺伝資源を対象に茶葉中の Al 含量との関連性を徹底的に調査し、統計遺伝学的手法により低 Al に関連する原因因子を特定する。現在の茶の育種システムでは、DNA マーカーを用いたマーカー選抜 (Marker Assisted Selection, MAS) がほとんど利用されていない。樹木であるチャはライフサイクルが長く、研究材料の育成にも長い年月が必要であるため、MAS による育種の実現が強く望まれている。近年、解析対象とする形質の遺伝様式や原因分子を同定する手法として、解析個体集団 (遺伝資源等) の表現型とそれらのゲノム情報から統計学的に原因遺伝子の関連領域を検出するゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study, GWAS) が注目を集めている。また、次世代シーケンサーの登場により多数の解析集団についてゲノムワイドな一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) 同定が低コストで可能になり、GWAS による遺伝子同定が多くの生物種で加速している。GWAS には多数の個体集団やそのゲノム情報が必要であるが、申請者らは茶葉中の様々な化学成分分析系を既に確立しており、多数のチャ遺伝資源が利用可能であることに加え、ddRAD-seq (double digest Restriction site-Associated DNA sequencing) 法によりゲノムワイドな SNPs を整備しており、GWAS を進める上で鍵となる条件を既に構築している。また、SNPs 情報から表現型を予測するゲノミック予測 (Genomic Prediction, GP) モデルが作物の育種に応用されており、作物の育種が格段に高速・効率化している。以上の観点から、チャ遺伝資源のゲノム情報を再整備し、GWAS や GP により低 Al に関する遺伝要因を解明する。また、栽培環境と茶葉中の Al との関係性を明らかにし、茶葉 Al 含有量の制御に関わる要因解明を試みる。

3. 研究の方法

静岡県農林技術研究所茶業研究センターで栽培・管理されているチャ遺伝資源を対象に、ddRAD-seq 法により DNA マーカー情報を整備した。同解析集団について、複数年度に茶葉 (新芽、新葉、成葉) を採取し、各試料について高速液体クロマトグラフィーを用いて茶品質成分含量 (遊離アミノ酸類、カテキン類、カフェイン)、誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-OES) を用いて Al 含量を定量した。茶葉中の品質成分ならびに Al 含量に基づく表現型情報と DNA マーカー情報を用いて、6 つのアルゴリズムによる GP モデリングにより予測精度を

評価した。また、集団構造と血縁関係を考慮した Mixed linear model (MLM) による GWAS を行い、AI 集積に関連する候補遺伝子の同定を試みた。

AI の局在イメージングには、AI 存在下 (+AI 区) ならびに AI 非存在下 (-AI 区) で約 7 ヶ月間水耕栽培したチャ「やぶきた」の 1 年生挿し木苗を用いた。対象組織を AI 蛍光試薬の Lumogallion で染色し、共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いて観察した。また、+AI 区で生育させた「やぶきた」を -AI 区に移して生育させたときの AI 含量の変化により AI の転流を評価した。さらに、品種間における AI 応答の差異を確認するために、チャ 12 品種の 1 年生挿し木苗を +AI 区と -AI 区で約 10 週間水耕栽培した。栽培後に部位別に解体し、-AI 区に対する +AI 区の生育量により AI の要求性を評価した。+AI 処理の成葉および白色根を対象に、細胞壁の抽出および細胞壁多糖類成分 [ペクチン、ヘミセルロース 1 (HC1)、ヘミセルロース 2 (HC2)、セルロース] を分画した。各多糖類成分中の AI 含量を測定し、各細胞壁多糖類含量および AI 要求性との相関を確認した。

4. 研究成果

様々な遺伝的背景を有するチャ遺伝資源を対象に、ddRAD-seq による SNPs ジェノタイピングを実施し、10,000 以上の SNPs を同定し、高密度 DNA マーカー情報の構築に成功した。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、集団構造とその混合の程度を明らかにした。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 系統をランダムに選抜し、一番茶新芽中の品質関連成分として 10 種の遊離アミノ酸類、7 種のカテキン類、カフェインおよびクロロフィル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 GP モデリングを実施し、カテキン類 (EC, ECG, EGCG, 総カテキン類) およびカフェイン含量について高精度で予測可能であることを明らかにした (図 1)。また、GWAS 解析のためのプラットフォームを構築した。なお、GWAS については上位関連 SNPs 数の閾値を決定し、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が可能であることを見出した。

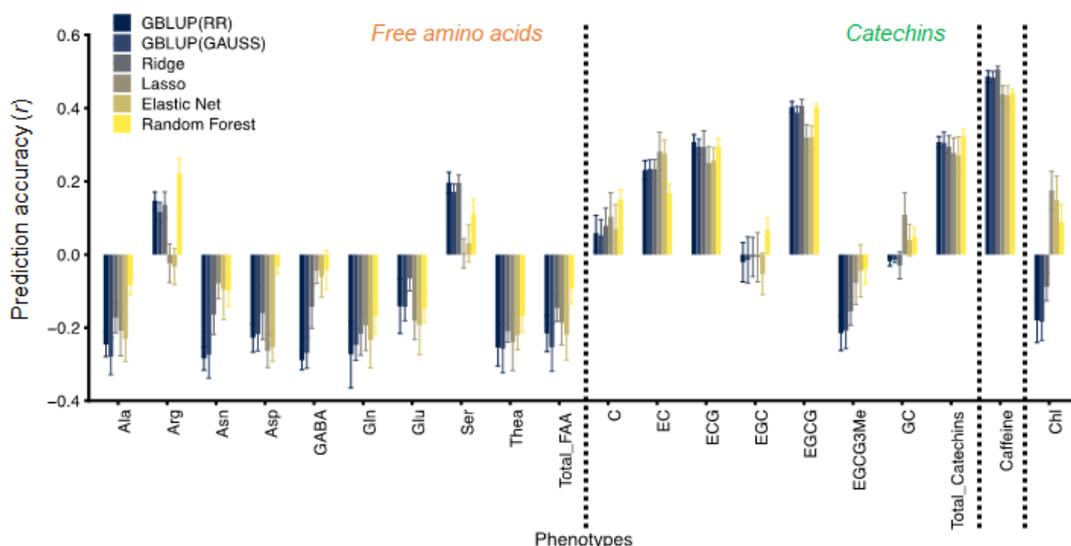


図1 ゲノミックプレディクションモデルによる茶葉中化学成分の予測精度。様々なアルゴリズムにより、DNA情報から茶葉中の機能性成分含量を予測し、その予測値と観測値の相関 (r) を算出した。RR, ridge kernel regression; GAUSS, Gaussian kernel regression.

次に、新芽の AI 含量について複数年次におけるデータの相関を確認し、茶葉の AI 含量は遺伝要因を反映した形質であることが示された。この新芽の AI 含量について、2 ヶ年の平均値を用いた GP により、適度な予測精度 ($r = 0.03-0.39$) が示された。また、予測精度の向上を目的に、新葉と茎からなる新芽ではなく、新葉のみの AI 含量を用いた GP を行ったところ、予測精度は大幅に向上した ($r = 0.25-0.52$)。以上のことから、低 AI 含有茶の育種を進めるための GP の有効性が示された。なお、本研究で検討した 6 つのアルゴリズムのうち、GBLUP (RR)、GBLUP (GAUSS) および Ridge の 3 つアルゴリズムが安定かつ優れた予測精度を示し、茶葉の AI を対象とした GP モデリングに適したアルゴリズムであることが示された。一方、Lasso および Elastic Net の 2 つのアルゴリズムは予測精度が低く、これは変数選択による情報の喪失に起因するものと考えられた。さらに、GWAS により AI 含量に関連する候補遺伝子の同定を試みたが、そのほとんどは機能未知であった。しかしながら、成葉の AI 含量を用いた GWAS では AI 耐性に関わる STOP1 転写因子のオーソログが候補遺伝子群に含まれており、STOP1 による AI 集積制御の可能性が考えられた。候補因子の機能証明が今後必要にはなるが、本研究の GP モデリングにより構築された回帰モデルと GWAS で同定された候補遺伝子群は、低 AI 含有茶のゲノム育種への

貢献が期待される。

Al 局在イメージングにより、葉の成熟に伴う表皮細胞壁への Al の集積が観察された。Al の転流については、Al 欠乏条件下において地下部からの Al の再移動が見られたが、葉に集積した Al の移動は見られなかった。これらのことから、チャにおける Al 集積の最終地点が葉の細胞壁であることが示唆された。本研究で供試したチャ品種・系統について、Al による生育促進効果には品種間差異がみられ、Al が有用元素として機能するとされるチャにおいても、Al の要求性には差異があることが明らかになった。成葉においては HC2 を除くすべての細胞壁多糖類画分において、細胞壁多糖類含量と画分中の Al 含量に正相関が見られたが、細胞壁への Al 集積量と生育との関連は見られなかった。チャが有する地上部への高い Al 集積能は、細胞壁の多糖類含量に依存するが、生育とは関連しないことが示唆された。白色根において、細胞壁多糖類含量と細胞壁多糖類画分中の Al 含量との間に高い正相関が見られた。また、HC1 画分において、細胞壁への Al 集積量と生育との間に負相関が見られた。HC1 画分に最も多くの Al が存在していることは、他の非 Al 耐性植物と共通しており、Al 耐性植物であるチャにおいても、HC1 画分に過剰に Al が存在することは生育に正に働かないことが示唆された。つまり、細胞壁における Al の結合キャパシティが、チャ系統間における Al 含量の律速因子である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 一家崇志	4. 巻 51
2. 論文標題 茶の次世代育種法の構築～DNA情報の活用～	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 緑茶通信	6. 最初と最後の頁 9-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroto Yamashita, Yusuke Fukuda, Shiori Yonezawa, Akio Morita, Takashi Ikka	4. 巻 1(2)
2. 論文標題 Tissue ionome response to rhizosphere pH and aluminum in tea plants (<i>Camellia sinensis</i> L.), a species adapted to acidic soils.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant-Environment Interactions	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pei3.10028	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 -

1. 著者名 Hiroto Yamashita, Tomoki Uchida, Yasuno Tanaka, Hideyuki Katai, Atsushi J Nagano, Akio Morita, Takashi Ikka	4. 巻 10, 17480
2. 論文標題 Genomic predictions and genome-wide association studies based on RAD-seq of quality-related metabolites for the genomics-assisted breeding of tea plants.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74623-7	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22件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 利根菜月, 福田佑介, 山下寛人, 一家崇志
2. 発表標題 チャ遺伝資源におけるテアニン生成能の系統間比較
3. 学会等名 2022年度日本土壌肥料学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石黒雄大, 山下寛人, 内田知希, 川木純平, 片井秀幸, 永野惇, 森田明雄, 一家崇志
2. 発表標題 茶遺伝資源集団を用いた主要品質成分に関するゲノミック予測
3. 学会等名 日本育種学会第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 利根菜月, 福田佑介, 山下寛人, 一家崇志
2. 発表標題 チャ遺伝資源のテアニン生成能に関するナチュラルバリエーション解析
3. 学会等名 2022年度日本茶業学会研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石黒雄大, 山下寛人, 内田知希, 川木純平, 片井秀幸, 永野惇, 森田明雄, 一家崇志
2. 発表標題 ゲノム情報を活用したチャ遺伝資源の主要成分品質に関する形質予測
3. 学会等名 2022年度日本茶業学会研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平田洲五, 稲葉蒼一郎, 山下寛人, 一家崇志, 永野惇, 古川一実
2. 発表標題 チャ (茶樹: <i>Camellia sinensis</i>) 二次胚形成因子の探索
3. 学会等名 第29回日本育種学会中部地区談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平田洲五, 稲葉蒼一郎, 山下寛人, 一家崇志, 永野惇, 古川一実
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析によるチャ (茶樹: <i>Camellia sinensis</i>) 二次胚形成因子の探索
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大澤三咲, 石黒雄大, 川木純平, 山下寛人, 一家崇志
2. 発表標題 茶品種間におけるカテキン類含量の系統間差異と栄養欠乏に対する応答
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田佑介, 山下寛人, 川木純平, 廣野祐平, 森田明雄, 一家崇志
2. 発表標題 チャのアルミニウム集積に関する系統間差異の解析
3. 学会等名 2021年度日本土壌肥料学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米澤詩織, 前田芽依奈, 山下寛人, 福田佑介, 森田明雄, 一家崇志
2. 発表標題 AI欠乏処理におけるチャ樹体内のAIの挙動
3. 学会等名 2021年度日本土壌肥料学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣野祐平, 山下寛人, 一家崇志
2. 発表標題 施肥管理がチャのアルミニウム含量におよぼす影響
3. 学会等名 2021年度日本土壌肥料学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田佑介, 山下寛人, 大野愛莉, 内田知希, 田中靖乃, 片井秀幸, 川木純平, 永野惇, 森田明雄, 一家崇志
2. 発表標題 茶葉中のアルミニウム含量を制御するためのゲノミック予測とゲノムワイド関連解析
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本悠馬, 三原春美, 山下寛人, 森田明雄, 中村順行, 一家崇志
2. 発表標題 抹茶の品質における化学成分とアルミニウムとの関連解析
3. 学会等名 2021年度日本茶業学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田佑介, 山下寛人, 大野愛莉, 柳沢直希, 内田知希, 片井秀幸, 川木純平, 森田明雄, 一家崇志
2. 発表標題 チャ遺伝資源における主要品質成分とイオノームのプロファイリング
3. 学会等名 2021年度日本土壌肥料学会中部支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 落合崇人, 平田州五, 米澤詩織, 一家崇志, 古川一実
2. 発表標題 チャ不定胚培養にけるアルミニウム添加の影響
3. 学会等名 日本育種学会第141回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 落合崇人, 谷口州五, 古川一実
2. 発表標題 チャ不定胚培養におけるアルミニウムの有効性調査
3. 学会等名 日本育種学会第28回中部談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米澤詩織, 山下寛人, 一家崇志, 森田明雄
2. 発表標題 Lumogallion染色によるチャ樹体内のアルミニウム局在イメージング
3. 学会等名 2020年度日本土壌肥料学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田佑介, 山下寛人, 一家崇志, 森田明雄
2. 発表標題 チャ遺伝資源のアルミニウムに対する応答
3. 学会等名 2020年度日本土壌肥料学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣野祐平
2. 発表標題 四要素施用量が異なる茶園における各種肥料成分の動態の比較
3. 学会等名 2020年度日本土壌肥料学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田佑介, 山下寛人, 大野愛莉, 米澤詩織, 内田知希, 片井秀幸, 森田明雄, 一家崇志
2. 発表標題 茶葉中へのアルミニウム集積に関する系統間差異の解析
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李スルギ, 川上雲々, 寺前香里, 山下寛人, 森田明雄, 一家崇志
2. 発表標題 in planta 法による効率的なチャの形質転換体作出法の構築
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田佑介, 山下寛人, 大野愛莉, 内田知希, 片井秀幸, 森田明雄, 一家崇志
2. 発表標題 チャ遺伝資源における茶葉中アルミニウム含量の変動
3. 学会等名 2020年度日本土壌肥料学会中部支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古川一実, 一家崇志, 稲葉蒼一郎, 谷口洲五
2. 発表標題 チャ(茶樹: Camellia sinensis)の不定胚培養におけるアルミニウムの影響と発現遺伝子
3. 学会等名 日本育種学会139回講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田部井豊, 七里吉彦, 三柴啓一郎, 安本周平	4. 発行年 2022年
2. 出版社 国際文献社	5. 総ページ数 413
3. 書名 ひとりではじめる植物バイオテクノロジー入門 組織培養からゲノム編集まで	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>静岡大学 農学部 植物機能生理学研究室HP https://wpp.shizuoka.ac.jp/plantfuncphys/ 日本茶の機能性成分含量を大量のDNAから予測し、新品種の開発へ https://www.shizuoka.ac.jp/event/detail.html?CN=6666</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	廣野 祐平 (Hirono Yuhei) (10391418)	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・グループ長補佐 (82111)	

6. 研究組織（つづき）

	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	森田 明雄 (Morita Akio) (20324337)	静岡大学・その他部局等・理事 (13801)	
研究分担者	川木 純平 (Kawaki Jumpei) (60881539)	静岡県農林技術研究所・静岡県農林技術研究所・主任研究員 (83804)	
研究分担者	山下 寛人 (Yamashita Hiroto) (70915488)	静岡大学・農学部・助教 (13801)	
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)	

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