

《様式B》

研究テーマ	「フィールド統合オミクス解析による白葉茶品種の特性解明」		
研究責任者	所属機関名	静岡大学学術院農学領域	
	官職又は役職	准教授	
	氏名	一家 崇志	ikka.takashi@shizuoka.ac.jp
共同研究者	所属機関名		
	官職又は役職		
	氏名		

(平成30年度募集) 第31回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要

茶園では時々新芽が緑化せず黄白色のまま生長する突然変異体の「白葉茶」が出現する。滋味に優れるため注目度が高く、日本においても数系統が栽培されており、この中でも「黄金みどり (KGN)」は常に白葉化する特殊な品種として特に重宝されている。白葉茶品種は一般的な緑葉品種と比較して遊離アミノ酸含量が3倍程度高く、その中でも特にアルギニン含量が高いが、そのアミノ酸集積要因等の詳細な生理機構と白葉化との関連性については未解明な点が多い。本研究では、光感受性型白葉茶のKGNと「会瀬きらら (OKR)」, 緑色に再度変異したKGN枝変 (KGN-B), KGNを遮光したKGN-S, 温度感受性型白葉茶系統の星野みどり (HSM)を対象に、遺伝情報、遺伝子発現、代謝産物を比較し、その詳細な特性を明確するとともに、白葉化との関連性を明らかにすることで、将来の白葉茶育種への基礎的な知見を得ることを目的とした。

新葉のアミノ酸含量を比較し、KGNと比較して緑色に変異したKGN-BやKGN-Sで低く、アミノ酸含量と白葉化が密接に関連している可能性を見出した。また、比較メタボローム解析により、KGNでは尿素回路とクエン酸回路上の化合物が顕著に増加していた。さらに、遺伝子発現を基にした多変量解析により、KGN, KGN-B, KGN-Sが異なる発現プロファイルを有し、KGNの遺伝子発現は尿素回路での顕著な変動は見られず、クエン酸代謝経路では発現が低下することを明らかにした。代謝物データとの統合解析により、KGNにおけるアミノ酸蓄積は窒素同化系の活性化に伴うものではなく、尿素回路の代謝抑制による蓄積応答であると可能性が考えられた。

一方、KGN, OKR, HSM の遺伝子発現プロファイルを比較し、各白葉系統が異なるプロファイルを有すことを示した。また、KGNに特徴的な尿素回路に着目し、アルギニン分解酵素 (*Arginase*) 発現量はHSMで低く、OKRは尿素回路代謝全体で遺伝子発現が高いことを明らかにした。MKZとHSM・OKRの比較では栽培環境の影響が大きく反映されたが、環境が類似しているHSMとOKRの発現プロファイルも大きく異なっていたことから、白葉化のパターンとアミノ酸集積機構との関連性は共通しないことが示唆された。また、MKZ, OKR, HMDの遺伝的多様性の違いが発現プロファイルの差異を生み出す要因となることが示唆された。

本研究では、白葉茶品種の特異的な形態や化学成分の変動を分子レベルで明らかにすることができ、これらデータは今後の新品種の育成や栽培技術の発展につながると考えられる。

2. 実施内容および成果の説明

茶園では時々新芽が緑化せず黄白色のまま生長する突然変異体が出現する。古くからこのような変異体は‘白葉茶（はくようちゃ）’とよばれ、滋味に優れていることが知られている。また、研究成果が農業生産に直結する優れた素材であるため、多くの生産者が独自の品種（系統）として保持する取り組みがされている。近年、世界中で白葉茶に対する関心が高まり、日本においても主に5種類の白葉茶「きら香、星野緑、やまぶき、蓬萊錦、黄金みどり」が栽培されている。この中でも「黄金みどり」は常に白葉化する特殊な品種として特に重宝されており、他の系統とは一線を画しているが、その詳細な生理応答機構については解明されていない。これまでに我々は、白葉茶品種は一般的な緑葉品種と比較して遊離アミノ酸含量が3倍程度高く、その中でも特にアルギニン含量が高いことを明らかにしてきたが、そのアミノ酸集積要因等の詳細な生理機構と白葉化との関連性については未解明な点が多い。つまり、白葉茶品種の特異的な形態や化学成分の変動を明らかにすることは、新品種の育成や栽培技術の発展につながる。

このような状況の中、「黄金みどり」と同様に常に白葉化を呈す系統「会瀬きらら」が近年育成されつつあり、両者を比較解析することにより、常に白葉化を示すためのその詳細な生理機構の解明が期待できる。一方、「黄金みどり」栽培茶園では同一樹体にも関わらず新芽が緑色を呈す現象で、‘枝変（えだがわり）’と呼ばれる変異体も見つかっている。そこで本研究では、この「黄金みどり枝変」が「黄金みどり」と遺伝的背景が同じである性質と、新規の白葉茶「会瀬きらら」を利用し、両者の遺伝情報 [Restriction Site Associated DNA Sequence (RAD-seq) 解析]、遺伝子発現（トランスクリプトーム）、代謝産物（メタボローム）を比較することにより、その詳細な特性を明確にし、さらには白葉化との関連性を明らかにすることで、将来の白葉茶育種への基礎的な知見を得ることを目的とした。

基礎的な白葉化機構とアミノ酸集積との関係を理解するために、静岡県農林技術研究所茶業研究センター内の茶園にて栽培されている「黄金みどり (KGN)」と「黄金みどり枝変 (KGN-B)」を対象とし、一心四葉期の新葉を部位ごとに採取した。一方、これまでにKGNの形態的变化（白葉化）については光強度との関係性が示唆されている。そこで、KGNを14日間85%遮光下で栽培した「黄金みどり遮光 (KGN-S)」についても解析対象とした。採取した新葉のうち、葉位別のアミノ酸含量をHPLC (High Performance Liquid

Chromatography), クロロフィル含量を吸光光度計により測定し, 上位 3 葉目を対象とした CE-TOFMS (Capillary Electrophoresis Time-Of-Flight Mass Spectrometry, Agilent) によるメタボローム解析と Hiseq4000 (Illumina) による RNA-seq (RNA sequencing) 解析を行った.

新葉のアミノ酸含量を比較したところ, KGN と比較して緑色に変異した KGN-B では低く, 遮光により緑色化した KGN-S でも低いことが分かった (Figure 1). つまり, KGN の持つアミノ酸含量が高いという特性は白葉化と密接に関連している可能性が示唆された. この要因を探るべく比較メタボローム解析を行ったところ, 平均 143 種類の代謝産物が検出され, KGN-B ならびに KGN-S と比較して, KGN では尿素回路 (Figure 2) およびクエン酸回路上の化合物が顕著に増加していることが示された.

次に, RNA-seq により得られた平均 7,000 万個のリードをチャのドラフトゲノム配列 (Wei et al., 2018, PNAS) に HiSAT2 を用い

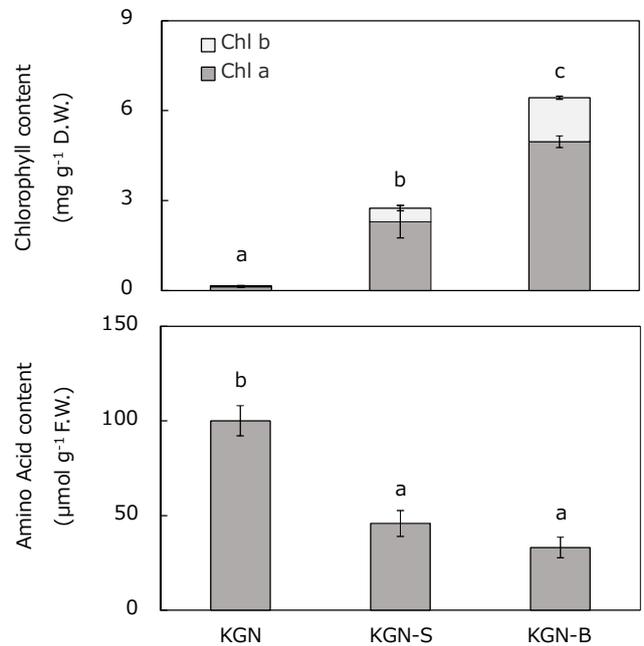


Figure 1 白葉茶「黄金みどり」の1番茶期におけるアミノ酸およびクロロフィル含量

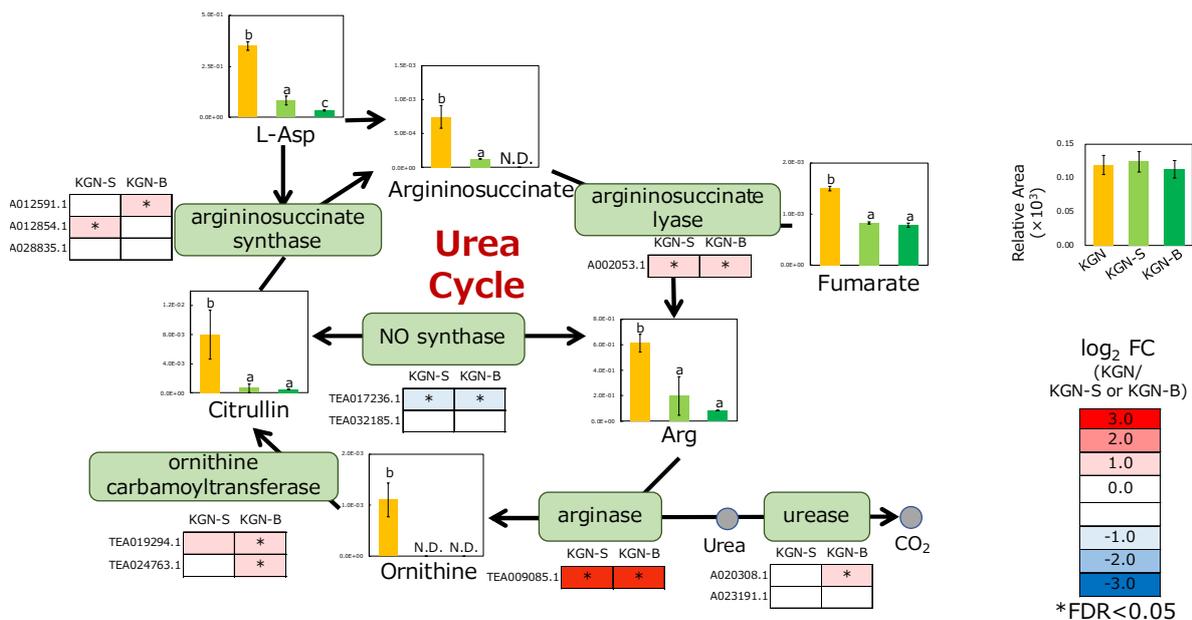


Figure 2 白葉茶「黄金みどり」の尿素回路におけるメタボロームとトランスクリプトームデータの統合解析

てマッピングし、stringtie により遺伝子発現量を定量し、トランスクリプトーム情報を取得した。なお、各試料間の発現変動遺伝子は edgeR により検出した (FDR < 0.05)。その結果、多変量解析により KGN, KGN-B ならびに KGN-S ではそれぞれ異なる発現プロファイルを示すことが示された。まず、アミノ酸代謝、特に尿素回路およびクエン酸回路周辺の遺伝子群について注目したところ、KGN-B および KGN-S と比較して KGN では、尿素回路での顕著な変動は見られず、クエン酸代謝経路のほとんどの遺伝子群の発現が低下していた。つまり、上述したメタボロームデータと統合すると、KGN におけるアミノ酸蓄積は窒素同化系の活性化に伴うものではなく、尿素回路の代謝抑制による蓄積応答であると考えられた。次に、白葉化機構について注目すると、KGN では KGN-B および KGN-S に対し、クロロフィル合成系が転写レベルで顕著に低下していることが分かった。以上の結果より、白葉化による遊離アミノ酸含量の増加は、光合成産物の変動に起因する可能性は低く、クロロフィル量に依存した光受容シグナルの変動が尿素回路関連の遺伝子群を転写レベルで制御することで、周辺代謝回路の蓄積異常を引き起こしていることに起因することが示唆された。

次に、「光感受性型」および「温度感受性型」の白葉茶系統間の特性を比較するため、静岡県静岡市葵区にて栽培されている KGN (光感受性型) と KGN-B, 福岡県八女市にて栽培されている「合瀬きらら (OKR, 光感受性型)」と「星野緑 (HSM, 温度感受性型)」の一番茶新芽 (一心四葉) を採取し、葉位別の化学成分分析と RNA-seq 解析による発現プロファイルを評価した。RNA-seq 解析は第 3 葉位を対象に Total RNA を抽出し、バイオアナライザーによる品質評価後、ライブラリ作製を行った。なお、各系統 4 反復供試した (n = 4)。ライブラリ作製は、Kamitani et al. (2019, Scientific Reports) の方法によるハイスループットかつ低コスト試験系により実施した。作製したライブラリを、HiSeq X (Illumina) を用いてペアエンド法 (PE 150+150) によりシーケンシングを行った。得られたリード配列は、Trimmomatic ツールを用いてアダプター配列のトリミング後、STAR program を用いてチャリファレンスゲノム (Wei et al., 2018, PNAS) にマッピングし、RSEM により各遺伝子の発現量を定量し、トランスクリプトーム情報を取得した。

各系統のクロロフィル含量は、KGN-B と比較して白葉系統で低く、KGN が最も低かった。遊離アミノ酸含量を測定したところ、KGN-B よりも KGN で高く、HSM と OKR は KGN よりもさらに高かった (Figure 3)。トランスクリプトーム情報を用いて主成分

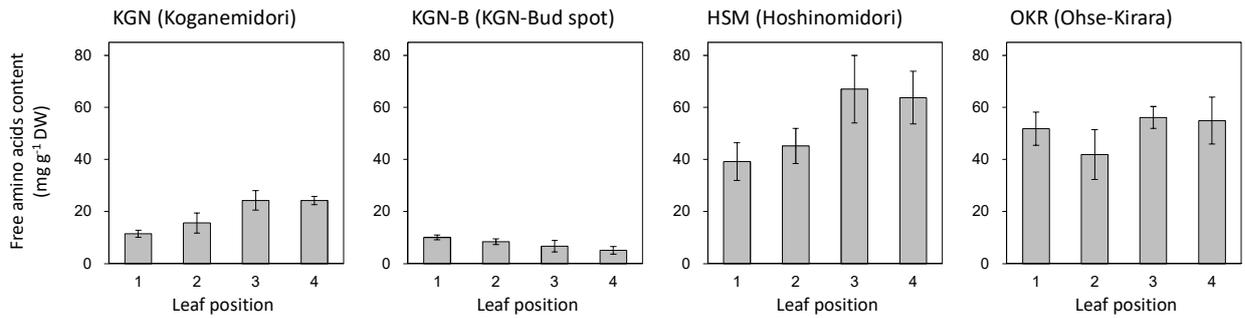


Figure 3 各白葉茶系統の1番茶期における葉位別アミノ酸含量の変動

分析を行ったところ、各系統の主成分は異なる位置にプロットされた (Figure 4). つまり、各白葉系統はそれぞれ異なるプロファイルを示すことが示された. 上述したように KGN に特徴的なアルギニン代謝を担う尿素回路に着目したところ、アルギニン分解酵素遺伝子 (*Arginase*) 発現量は HSM で低く、OKR は尿素回路代謝全体で遺伝子発現が高い特徴が

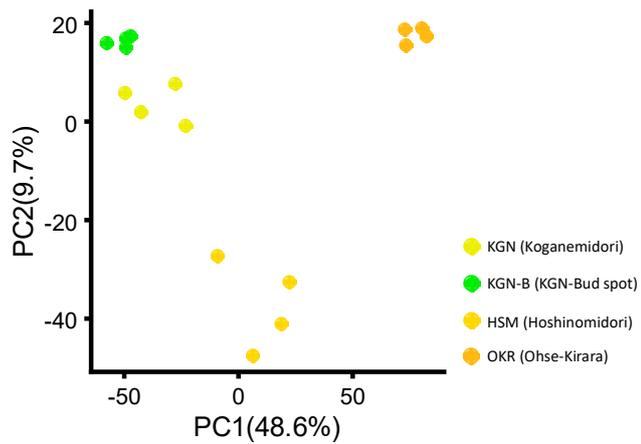


Figure 4 各白葉茶系統のRNA-seqデータを持ったPCA相関関係

みられた (Figure 5). 今回の解析試料について、MKZ と HSM・OKR では栽培環境 (施肥環境等) が大きく異なり、その影響が大きく反映される結果となったが、環境が類似している「温度感受性型」の HSM と「光感受性型」の OKR の発現プロファイルも大きく異なっていたことから、白葉化のタイプとアミノ酸集積機構との関連性は共通していないことが示唆された. なお、

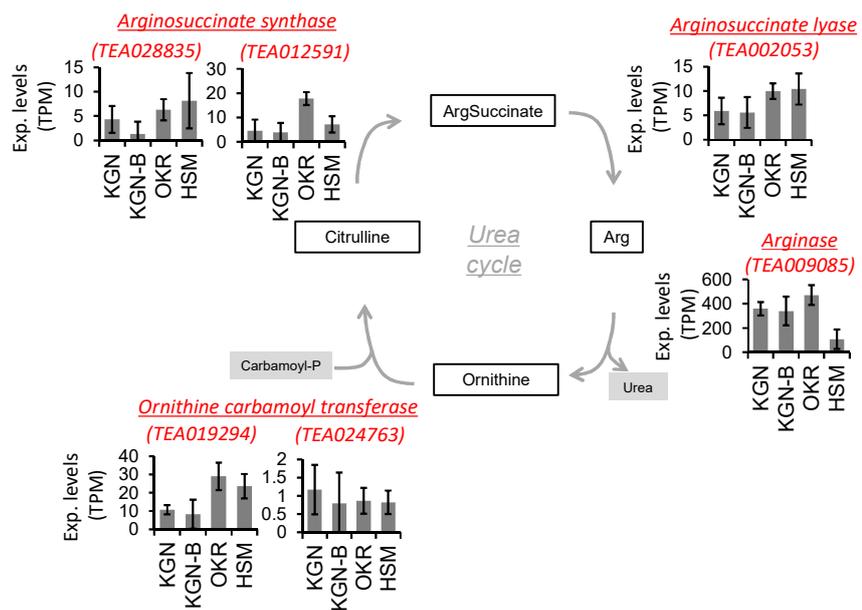


Figure 5 各白葉茶系統のUrea cycleにおける発現変動解析

MKZ, OKR, HMD の

RAD-seq 解析によるゲノム多型を調査した結果、それぞれ別のクラスターに分かれることから (Figure 6), これらの遺伝的多様性の違いが発現プロファイルの差異を生み出す要因となることが示唆された。

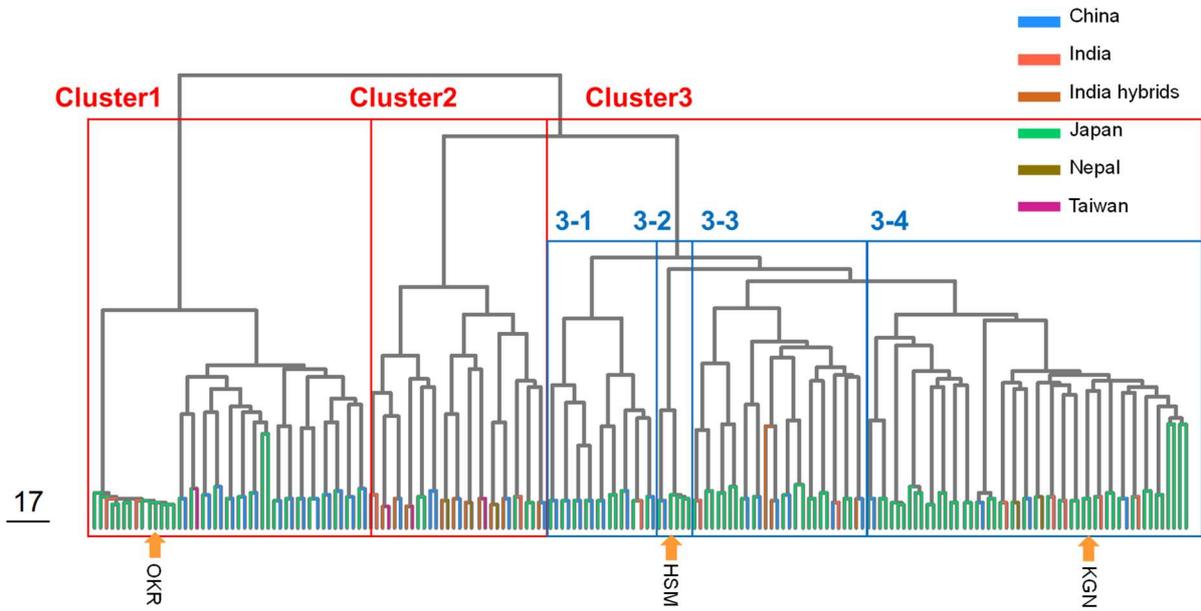


Figure 6 RNA-seq解析による各白葉茶系統の遺伝的多様性