農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

Studies on Differentiation of Japanese Tea Cultivars (Camellia sinensis var. sinensis) Acoording to the Genetic Diversity of Phenylalanine Ammonia-Lyase

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): phenylalanine ammonia-lyase, tea (Camellia sinensis), RFLP analysis, cultivar differentia-tion 作成者: 松元, 哲 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001574

Phenylalanine ammonia-lyase（PAL）の遺伝的多様性に基づく日本のチャ（*Camellia sinensis*（L.）var. *sinensis*）の品種分化に関する研究†

松　元　　哲

（平成17年12月12日受理）

Studies on Differentiation of Japanese Tea Cultivars (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) Acoording to the Genetic Diversity of Phenylalanine Ammonia-Lyase

Satoru MATUMOTO

Synopsis

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) cDNA of tea was used in evaluating the genetic diversity of tea genetic resources and in determining the differentiation process of Japanese green tea cultivars. The PAL cDNA was also very useful for identifying interspecific hybrids between *C.sinensis* and *C. japonica*. PAL DNA diversity was found not only between *C. sinensis* var. *sinensis* and var. *assamica*, but among var. sinensis. Three multi-allelic fragments, A, B and D, were detectable by RFLP analysis using the PAL cDNA probe, and Japanese green tea cultivars were divided into 5 genotype groups: AA, AB, AD, BD and DD. Cultivars belonging to the BB type do not exist. Japanese green tea cultivars and local tea plants, including mountain tea, yama-cha, were analyzed to determine the process of differentiation of Japanese tea plants by using the PAL DNA markers, A, B and D. Since the genetic frequencies in yama-cha and local tea plants were also the same, these teas may have the same origin. A comparison of DNA diversity between Japanese and Korean-Chinese germplasm suggested that limited populations of tea from China have been introduced into Japan. Then, the limited populations were distributed within Japan and local varieties were formed in tea cultivated regions. 'Yabukita' which was selected from this population, is a leading variety. In green tea breeding, a change of selection from local variety populations to hybrids with 'Yabukita' influenced PAL genetic frequency among Japanese green tea cultivars. These results using PAL markers cleared the differentiation process of Japanese green tea cultivars and the information in this study will contribute to the breeding of new cultivars.

Key Words : phenylalanine ammonia-lyase, tea (*Camellia sinensis*), RFLP analysis, cultivar differentiation

目　次

Ⅰ　**緒言** …… 64
1　チャの植物学的な分類，起源，日本への導入と品種分化 …… 64
2　化学成分を用いたチャおよびカメリア属植物の分類 …… 65
3　DNA マーカーを用いたチャおよびカメリア属植物の分類 …… 66

〒514-2392　三重県安芸郡安濃町大字草生360
機能解析部

†本論文は岐阜大学学位審査論文（平成17年2月）を基に編集・加筆したものである．本報告の一部は，*Theor. Appl. Genet.* 87, 671-675(1994); *Theor. Appl. Genet.* 104, 998－1002(2002); *Breed. Sci.* 54, 231－237(2004)において発表した．

４　Phenylalanine ammonia-lyase 活性とカテキン含量との関係 …… 67
Ⅱ　チャの phenylalanine ammonia-lyase cDNA の単離と構造解析 …… 68
１　PAL cDNA の単離と塩基配列 …… 68
２　チャ PAL 遺伝子の構造 …… 72
Ⅲ　DNA 抽出のためのチャ保存法の検討と海外のチャの遺伝的多様性 …… 78
１　DNA 抽出方法の検討と種間雑種の確認のための PAL マーカーの活用 …… 78
２　PAL RFLP 解析を用いた海外のチャの多様性の検出 …… 82
Ⅳ　日本のチャ在来種の成立と緑茶用品種の分化の解明 …… 91
１　日本在来種の PAL RFLP 解析 …… 91
２　PAL 遺伝子型に基づく日本の茶品種の分類 … 96
Ⅴ　総合考察 …… 101
１　PAL cDNA の単離と品種分化解明のためのマーカーの評価 …… 101
２　DNA 抽出のための試料の保存法の開発と海外のチャの遺伝的多様性 …… 102
３　PAL の遺伝的多様性からみた日本の緑茶用品種分化の解明 …… 103
Ⅵ　摘要 …… 104
引用文献 …… 105
Summary …… 110

Ⅰ　緒　　言

１　チャの植物学的な分類，起源，日本への導入と品種分化

陸羽は“茶は南方の嘉木なり”と茶を賛辞し，初めて科学的な観察を試み，760 年に「茶経」三巻を著した（諸岡，1941）．日本では，1211 年に茶の祖栄西禅師が喫茶養生記の中で，“茶は養生の仙薬，延齢の妙術なり”とし茶の効能を説き，茶の名称，樹形，効能，摘葉時期，摘葉方法および茶の調製の方法などを記し，わが国で初めての解説の書を著している（古田，2000）．以来日本人の生活に定着した茶は日常茶飯事の言葉に代表されるように，最も身近な飲み物となった．緑茶（荒茶）の国内生産量は 1975 年の 105 千トンをピークに減少し，2003 年は 91.9 千トンに止まった（日本茶業中央会，2004）．一方で緑茶の輸入量は毎年増えており，2001 年度は17.7千トンに上っている（日本茶業中央会，2004）．国内生産量の減少と輸入量が増加する中，緑茶生産は大きな転機を迎えている．経営的な優位性を保った省力化，軽作業化の実現と化学合成農薬使用量の減少や硝酸態窒素の環境への低減技術の開発は，ほぼ全ての日本の農産物生産に当てはまることではあるが，特に緑茶生産には不可欠である．さらに緑茶生産の中で取り組まなければならないことに，品種占有率 82%（日本茶業中央会，2004）を占める‘やぶきた’一辺倒を打破し，嗜好の多様化に応えた品種の多様化が挙げられる．

チャはカメリア属（Genus *Camellia*）のチャ節（Sect. *Thea*（L）Dyer）に分類されている．橋本（1980）によれば，最初にチャを植物学的に整理したのはイギリス人の Watt であり，一種四変種 *Camellia thea* var. *viridis*, var. *bohea*, var. *stricta*, var. *lasiocalyx* に分類し，次に Cohen Stuart は Watt の分類を変更し，葉長，葉の先端の形，樹高などの形態的な特徴から *Camellia theifera* var. *bohea*（中国変種）, var. *macrophylla*（中国大葉変種）, var. *burmensis*（シャン変種）, var. *assamica*（アッサム変種）４変種を設けた．これに対して北村は中国大葉変種を中国種の forma として，シャン変種をアッサム変種に含ませ，*Camellia sinensis* var. *sinensis* と var. *assamica* の二つの変種に大別した（橋本，1988a）．さらに花柱の合着程度，総苞または小苞の存在程度に着眼し，ツバキ属を 12 節に分類した Sealy もチャを２変種に分類することを支持した（Sealy，1958）．その後，Chang ら（1984）は，var. *pubilimba* と var. *waldenae* を，Ming（1999）は var. *dehungensis* と var. *pubilimba* を加え４変種としているが，現在最も広く用いられているのは *sinensis* と *assamica* の二つの変種の分類である．そのため本論でも北村の分類にしたがって飲用と供試されているチャ *Camellia sinensis* をアッサム変種(var. *assamica*)と中国変種（var. *sinensis*)に分けて論議した．

橋本（1988b）はチャの起源に関する知見を以下のとおりとりまとめている．まず 1919 年に Cohen Stuart が形態の違いによりチャを二つに分け，葉の大きいチャの原産をインドのアッサム地方，葉の小さいチャを中国の東部および東南部地方とする二元説を提唱した．これに対して，Eden（1958）はイラワジ川の水源に近い地域を起源として，中国東南部，インドシナおよびアッサム地方に拡大したとして一元説をとり，さらに橋本（1978）は日本，台湾，タイ，ビルマ，インドにわたるチャの形態学的な調査から中国四川省，雲南省，貴州省などに，チャの起源の中心地があるとして二元説を批判した．

チャの起源に関する中国の研究者では，陳椽と陳震古が，雲南，西双版納は気象，土壌条件は茶樹の生育に適し，野生茶樹，近縁種も多くみられるとして遺伝子中心説からこの地方を起源と推定した．さらに皐芦原種を原始的なチャに想定し，東方へは中，小葉種に，南にはシャン種に，西にはアッサム種に分化した説を提唱した．一方，呉覚農は地史学的および植物学的な観点から，ツバキ科植物の分布が雲南，貴州，四川の一帯に集中していることから，この地域を原産地とする雲貴高原説を発表した．また庄晩芳は，野生大茶樹調査によって中国西南部，華南の各省には樹形，葉形，花や果型に幅広い変異のあることが多くの材料で確認されているとして，変異の大きい雲貴高原，大婁山脈地帯を起源と推定した．虞冨蓮は雲南省文山地区の変異の多様性を挙げ，雲南省文山地区を一次中心地として,西双版納を二次中心としている(橋本，1988b)．また橋本ら（1978）は形態学的な特徴に基づく中国のチャのクラスター分析から四川・雲南に起源の中心地を推定した．茶樹の起源と文化の発生とを分け，前者を中国西双版納地域，後者を雲貴高原周辺との推察も報告されている（松下，2002a)．鳥屋尾は種内の変異が多いのは，中国の「西南山地」と推定し，これより範囲を狭めるにはより科学的な手法に基づく研究の必要性を説いている（鳥屋尾，1989)．

以上のようにチャの起源については諸説入り乱れている状態である．その一因として以下に示すチャの特異性がある．チャは，アッサム変種と中国変種では大きな形態的な違いがあるが，ともに強い自家不和合性をもち，二変種間で生殖隔離がなく，交雑集団は連続的な変異を示すため，分類の指標を見つけることが難しい．また栽培の歴史が長く，主たる栽培種である var. *sinensis* の野生の状態を原産国の中国でもみることは難しいと言われている．こうした事情は，チャの起源の解明を困難にしている．いずれにせよ，その変異の大きさからチャの起源が中国西南部であることは，研究者の一致した考えであろうが，より狭い地域に限定しようとするならば，新たな手法の開発が必要である．

日本の茶の歴史では，815 年近江の国滋賀韓崎の梵釈寺で僧永忠が嵯峨天皇に茶を煎じて献じたことが日本後紀に記載されており，飲茶のはじめとされている（山田，1998；村井，2003)．その後約 400 年にわたり茶を記した文献は見当たらず，1191 年僧栄西が中国から持ち帰った茶の種子を佐賀県の背振山に播いたことが茶の栽培のはじまりとされている．しかし類聚国史に収める記事によれば 815 年の献茶の 2 ヶ月後に天皇は畿内および近江・播磨などの国々に「木茶」を植え，貢進することを命じていると記載されている．このような資料は，栄西が茶を導入する以前にも日本にはチャの植物体があったことを想像させるが，詳細は明らかではない．また九州，徳島・高知，中国地方には，焼畑を行っていた地域をはじめとして山野に茶樹をみることができる．こうしたチャは茶畑で栽培されているチャとは区別され，「ヤマチャ」と呼ばれている（谷口，1936；松下，2002b)．「ヤマチャ」の由来は不明であり,多くの研究者が「ヤマチャ」を有史以前より本邦に茶樹があったことを示す論拠の一つにし「自生説」を提唱した(茶業組合中央会議所, 1914)．その一方で，「ヤマチャ」は栽培種からのエスケープであるとする「渡来説」があり，また両説を採用した「折衷説」で，日本のチャの起源に関する論争が展開されてきた（松崎，1992)．しかし「ヤマチャ」と栽培に用いられている在来種の間には形態的特徴（橋本ら，1975）や DNA 多型（Matsumoto ら，2002；宇田川ら，2002）でもその差異が見出されていない等，現在では「ヤマチャ」は在来種からのエスケープであることが強く支持され,「自生説」は疑問視されつつある．緑茶の育種では，品質，生産性を向上させる目的で，在来種の中から優良な形質をもつ個体を選抜し，品種化が行われた．1953～1954 年には紅茶用品種の‘べにほまれ’，緑茶用品種の‘やぶきた’など 27 品種が登録され，以後日本の茶園は在来種の実生から挿し木繁殖による品種に変わっていった．2001 年の日本の茶園面積に占める緑茶用品種の割合は 91.6%（日本茶業中央会，2004）であるが，品種化が進んだ現在でも在来種が残存している．在来種からの選抜に始まった育種は，品種・系統間交雑により新たな品種が育成されるようになり，これまで農林登録された茶品種は紅茶用等も含めると 52 にものぼる．しかしながら，日本の緑茶用品種の基となった在来種について，中国や韓国のチャとの比較の中で遺伝的な背景や多様性の違いが科学的に十分な解明がなされたとは言えない．新しい品種を育成する上で材料となる系統や集団の多様性を正しく評価することは，育種目標に叶う最適な交雑組み合わせの一助となる．そのためには新たな分類，遺伝的多様性の評価手法の開発が極めて重要になる．

2　化学成分を用いたチャおよびカメリア属植物の分類

チャ *Camellia sinensis* は葉長，葉の先端の形，樹高などの形態的な特徴から var. *assamica* と var. *sinensis* に分類される．しかしこれらの変異は連続変異であるた

め，亜種の分岐点は明瞭ではない．形態による分類とは別に，植物の系統発生や類縁関係を含有する化学成分の異同により明らかにする試み，いわゆる化学分類学(Chemotaxonomy)が導入された．カメリア属植物ではフラボノイド類，アントシアニン色素を分析した報告があり，ツバキには15個のアントシアニン色素が存在し，その構成や量比からツバキの系統分化あるいは品種分化が提唱されている（坂田，1988）．またチャと近縁種のカメリア属植物との違いは，チャ葉にはカフェイン，テオブロミン，テアニンが蓄積されているのに対して，ツバキ，サザンカからはこれらの成分は検出されていない（Tsushida ら，1984；Nagata ら，1984；Nagata ら，1985a）．またツバキ，サザンカに含まれるカテキン類はエピカテキンのみに対して，チャではエピガロカテキンガレートを主体にエピカテキン，エピカテキンガレート，エピガロカテキンが含まれている（Nagata ら，1985b）．チャとその近縁種との種間雑種をこれらの化学成分の値を用いることで識別した例も報告されている．中枢神経系を興奮する作用をもつカフェイン，渋みの主成分のカテキン類，旨み成分の一つといわれるテアニンなどを，チャが他のカメリア属植物に比べて特徴的に有することは，飲料としての性質を具備しているとも言える．したがって，チャと近縁種とは形態学的な特徴や内成成分の違いからも識別することが困難なことではないと言える．

チャの変種間の比較では，‘やぶきた’をはじめとする日本の緑茶用品種と，アッサム変種との交雑種である‘べにほまれ’など紅茶用品種との間には，エステル型および遊離型カテキンの個別の組成には，明確な変異は認められていない（中川ら，1964a；中川ら，1964b）．しかし全カテキン類の蓄積量では緑茶用品種に比較して紅茶用品種が多いことが報告されている（中川ら，1975）．香気成分であるリナロールとゲラニオールの成分比の指標（テルペン・インデックス）は茶芽の熟度あるいは茶期によりほとんど変動せず，常に一定の値を示し，この値を利用してチャを分類した例が報告されている（Takeo ら，1983；Takeo，1983；Owuor ら，1987）．テルペン・インデックスの地理的分布の解析からチャの原産地を雲南からアッサムにかけての地域と推察している（Takeo ら，1992）．これらの化学成分による分類は，形態学や地理的分布による特徴を指標とする分類に新たな知見を与え，極めて有用な分類手法であった．特にカメリア属植物におけるチャ節とチャ節以外の植物との分類および中国変種とアッサム変種間の違いが明らかにされたことに意義がある．しかし日本のチャはアッサム変種とは明らかに異なり，その多様性が中国変種内に収まることを考えると，中国変種内での分類の指標が必要である．

３　DNA マーカーを用いたチャおよびカメリア属植物の分類

生物は進化の軌跡を生命の設計図とも言えるゲノム上に残存させ，同じ祖先から系統分化を遂げた生物種はゲノム上に共通の構造を有していると考えられている．ゲノム上に散在している配列の違いを明らかにする最も一般的な手法として，DNA 多型の検出がある．DNA 多型とは，比較する品種や系統間で同じ実験操作を通じて恒常的に得られる DNA 検出上の差のことである．その差は DNA 配列の違いから生じる DNA 断片の長さ，有無あるいは DNA に標識された物質の異同である．DNA 多型の検出方法が多く考案されるようになり，解析目的，実験環境や結果の許容度によって研究者が適切な手法を選択している．Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)解析（Williams ら，1990）は実験操作が簡便であり，全ゲノム領域を対象にして多くのマーカーを用いることで，種分化の解明などに最も多用されている．しかしながら，アニーリング温度が低いために起こるミスマッチにより非特異的な DNA が増幅され再現性が失われる場合がある．一方で Restriction Fragment Length Polymorphism（RFLP）解析は制限酵素で消化可能な DNA が大量に必要であり，実験操作が煩雑であるものの，得られる多型は再現性が高く共優性の場合が多い．多くの DNA マーカーは，対象とする植物のゲノムに相同性があると，異種の植物であってもマーカーとして使用できるが，特に RFLP 用のプローブは，一般に PCR 用のプライマーより長く，ハイブリダイズする可能性が高いので情報が得られやすいと考えられている．そのため，RFLP マーカーは，アラビドプシスとアブラナ科植物などのように，プローブと対象植物が異種の場合にも連鎖地図の作成や系統分化の解明に用いられている．PCR ベースでの RFLP 解析として Cleaved Amplified Polymorphism Sequence (CAPS)や単純反復配列の差異により多型を識別する，操作性に優れた Simple Sequence Repeats (SSR)が多くの作物で開発が進んでいる．しかしこれらの PCR ベースのマーカーの開発には，シーケンス情報が不可欠であり，マーカーの開発に高いコストを要している．

チャと近縁種を対象に RAPD 解析を用いた系統分化が試み，系統樹が作成されている（Chen ら，2002）．一

方チャを対象にした研究では，Amplifed Fragment Length Polymorphism（AFLP）（Paul ら，1997；Wachira ら，1997），Inter-Simple Sequence Repeat（ISSR）（Mondal，2002），RAPD（Singh ら，2004）解析により，遺伝資源の多様性を明らかにし，その種内変異を解明する研究が報告されている．RAPD と SSR マーカーを用いた交雑来歴を確認する親子鑑定(田中ら,1996；田中ら，2003）や CAPS および SSR マーカーによる品種識別技術（Kaundun ら，2003a；Kaundun ら，2003b；Kaundun ら，2004）に DNA 多型を活用した研究がなされている．これらの DNA 多型を用いた研究の一部は中国変種（var．*sinensis*）内の多様性を検出した例であり，植物形態学，植物地理学（または植物地史学）や化学分類学では，分類の指標を見出すことが難しい領域であった．DNA 多型は種分化に関し従来の知見を指標とするより，種，変種，系統あるいは個体レベルでの遺伝的な相違をはるかに強く反映する解析が可能となることを示唆している．

4　Phenylalanine ammonia-lyase 活性とカテキン含量との関係

チャは葉中に多くのカテキンを含んでおり，高カテキン含量の系統では乾燥重量当りのカテキン量が 30%にも上る（根角ら，1998）．しかし，この蓄積量はチャの品種や系統によって大きく異なる．紅茶用品種ではカテキン含量が高く，煎茶品種ではそれよりも低い傾向にあることが報告されている（中川ら，1964ab；中川ら，1975）．カテキン類は味覚の上では「渋さ」の主成分であるため，その量を人為的に増減することが耕種的にも育種的にも求められてきた．例えば玉露やてん茶は栽培中の光量を制限することにより，カテキン含量を減らし，「渋さ」の少ない茶を実現している（岩浅，1968；阿南ら，1974）．煎茶品種の育種にはカテキン含有量の少ない中国変種が素材として活用される一方で，「渋さ」が煎茶よりも強調される紅茶の育種素材にはカテキン含量を多く含むアッサム変種，アッサム雑種が用いられてきた．

二次代謝産物であるカテキン類は，phenylalanine ammonia-lyase（EC4.3.1.5，PAL）をはじめとするフェニルプロパノイド合成系により生合成される(岩浅,1974；Iwasa，1977）．PAL はフェニルアラニンを脱アミノし，トランスーケイ皮酸を生成する酵素であり，高等植物においてはフラボノイド，フェニルプロパノイド，リグニンなどのポリフェノール化合物の合成に関与し，二次代謝産物の生成のキー酵素である（Halbrock ら，1979；Dixon ら，1983a）．PAL 活性の測定では酵素活性の検出がなされてきたが，近年ではノーザン，RT－PCR などの解析手法を用いて，m-RNA の発現を検出することにより，特定の部位や時期，刺激で発現することをモニタリングすることが可能になっている．ニンジン（Ozeki ら，1990），パセリ（Lois ら，1989），エンドウマメ（Kawakami ら，1992），アルファルファなどマメ科植物（Gowri ら，1991；Manners ら，1995），タバコ（Pellegrini ら，1994，Nagai ら，1994），ジャガイモ（Joos ら，1992），ポプラ（Subramaniam ら，1993；Osakabe ら，1995ab），サツマイモ（Tanaka ら，1989），サクランボ（Wiersma ら，1998），ラズベリー（Kumar ら，2001），レモン（Seelenfreund ら，1996），アラビドプシス（Ohl ら，1990），ラン科植物（Liew ら，1996），コムギ（Liao ら，1996），イネ（Minami ら，1989；Zhu ら，1995），マツ（Whetten ら，1992）などをはじめとする多くの植物で完全長 PAL cDNA クローンが単離されている．単離された cDNA の情報を活用して，m-RNA の発現を定量的に検出し，特に PAL 活性と植物の防御反応機構の関連が研究されている．例えば，植物の器官や培養組織に UV 光（Kuhn ら，1984；Chappell ら，1984；Cramer ら，1985ab），傷害（Tanaka ら，1977）を与えることや病原菌やエリシター（Dixon ら，1983a，b；Lawton ら，1983a，b；Edwards ら，1985）で処理すると PAL 活性が短時間で急激に活性化されることが報告されている．パセリやエンドウマメではストレスに対応する PAL の発現が報告されている（Liang ら，1989；Lois ら，1989）．また PAL を形質転換技術によりタバコで過剰発現させると二次代謝産物が増加し，複雑な代謝経路を解明するための一つの技術とされている（Howles ら，1996）．チャにおいても光や傷により活性が高まる（Takeuchi ら，1994）．二次代謝産物が植物の一部の防御機構に関与していることは知られており，反応の初期に PAL が重要な役割を果たすことが推定されている．

PAL は，一次代謝から二次代謝の最初の段階でおこる反応を司るために二次代謝産物の蓄積に関する研究が進められている．ポプラ，マツではリグニン形成時に PAL がキー酵素として関与するため，cDNA がクローニングされている（Subramaniam ら，1993；Whetten ら，1992）．チャでは，光の量を制限することにより PAL 活性は弱まり，またカテキン蓄積能の高いアッサム雑種の系統は，日本の系統に比較してその活性が高いことが報

告され，PAL 活性とカテキン合成との間に相関関係が論議されている（岩浅, 1974；Iwasa, 1977；Saijo, 1980）．そのためカテキンの蓄積が育種目標の一つであるチャにとって，PAL は重要な酵素と位置づけられる．

作物の種を分類する新たな手法として，その作物の育種上重要な形質に関与する遺伝子構造を比較することにより類縁関係あるいは系統分化を明らかにすることが考えられる．特にチャのように栽培化の歴史の長い植物にとっては，品種分化に人為的な選択圧がかかったと想像される．分類の指標が十分でない植物にとって，指標を明らかにすることは，極めて重要である．これは遺伝資源の分類，評価技術の開発や品種分化経路の解明など多くの点で有効な手段となると考えられるためである．

以上の記した背景に基づいて本研究を行った．すなわち，チャの PAL の構造解析のために cDNA の単離を試み，すでにクローニングされているチャ以外の植物の PAL 塩基配列を比較することにより，PAL が系統，品種分化のための DNA マーカーとして適正であるかどうかを検討した．次に RFLP 解析に必要な DNA を得るために葉の保存法について検討した．さらに PAL を DNA プローブに用いた RFLP 解析を行い，チャとツバキ（*Camellia japonica*）との種間，var. *assamica* と var. *sinesis* との変種間，さらに韓国，中国と日本の在来種の変種内の遺伝的な多様性を明らかにした．そして集団遺伝学的な考察を用いて日本のチャがどのようにして伝わり，品種分化を遂げたかを推察した．これまで来歴に疑問がもたれていた緑茶用品種について PAL の多様性から推察することによって来歴を是正するとともに，遺伝資源を再評価し今後の緑茶育種の方向を図る上での基礎的な情報を提供することを目的とした．

本論文は，著者ならびに共同研究者によって既に発表された報告（Matsumoto ら, 1994；Matsumoto ら, 2002；Matsumoto ら，2004），および未発表のデータを一括してとりまとめたものである．

本研究の計画から実施，取りまとめにあたり静岡大学農学部人間環境科学科教授早津雅仁博士と静岡大学農学部応用生物化学科助教授森田明雄博士ならびに農業・生物系特定産業技術研究機構野菜茶業研究所茶業研究官武田善行博士に終始御指導とご助言を頂きましたことを深く感謝いたします．独立行政法人農業生物資源研究所南栄一博士からはイネ PALcDNA の分譲を賜りました．また愛媛大学農学部助教授山口聰博士と野菜茶業研究所茶業研究部根角厚司育種研究室長には，分析試料の分譲，チャをはじめとするカメリア属植物の分類や遺伝資源の評価法についてご指導ならびに実験結果についてのご助言を頂き，野菜茶業研究所機能解析部野菜機能解析研究室竹内敦子主任研究官には分子生物学実験について指導を頂きました．大妻女子大学家政学部教授大森正司博士と香川大学教育学部教授加藤みゆき博士には，ミャンマーの茶樹の貴重な DNA サンプルを分譲いただきました．さらに静岡大学農学部生物生産科学科切岩祥和博士には韓国と日本在来種の分析に御協力を頂きました．ここに記して感謝の意を表します．

さらに，本研究の遂行に際し，袴田勝弘前茶業研究官をはじめ野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点および機能解析部遺伝特性研究室の職員諸氏に多大な御協力と御助言を賜りました．記して感謝致します．

Ⅱ　チャの phenylalanine ammonia-lyase cDNA の単離と構造解析

１　PAL cDNA の単離と塩基配列

生物の系統間における特定の遺伝子の塩基配列を比較し分類を行う，いわゆる分子系統学がヒトのゲノムを中心に精力的に行われており，ヒト（長谷川ら，1996a）や日本人の起源（松本，1992）について新たな知見が報告されている．分子系統樹を作成する際には，進化速度の異なる遺伝子同士を比較した場合（paralogous な比較）には分子系統樹と形態学から得られた従来の系統樹とが一致しない誤った結論を導くおそれがあるため，比較する遺伝子は同じ機能をもち機能制約が等しい遺伝子同士（orthologous な比較）を比較する必要がある（長谷川ら，1996b；舘野，1999）．Orthologous な比較研究から，これまで提唱されてきた種の類縁関係と遺伝子の系統樹はほぼ同等の結果が得られている．植物では，葉緑体ゲノム上に存在する *rbc*L，*atp*B，*mat*K 遺伝子の塩基配列を植物間で比較し，その変異に基づいて類縁関係が明らかされ，系統樹における新たな位置関係が報告されている（Soltis ら，1999；Qiu ら，1999）．植物は葉緑体を有しているため，これらの遺伝子は系統の発生や属や種レベルの分化の解明には適している．塩基配列の変異に基づく系統関係を解明する試みは，イネ（Kanno ら，1993）をはじめチャ（Katoh ら，2003）を含む多くの作物で行われている．

チャは本邦での自生に大きな疑問がもたれており，もともと栽培植物として導入されたとも推定されている．このような栽培植物は人為的な選抜圧を知らず知らずのうちに加えられている可能性がある．そのため選抜圧の

対象とされるような形質に関与する遺伝子の多様性を調べることにより，品種レベルでの分化の解明が期待できる．チャにおいてはカテキンの生合成に関与するPALの多様性が考えられる．

チャのPALに関しては酵素発現に関する報告は存在するが，塩基配列に関する情報は見当たらない．そこでチャのPAL遺伝子情報を得るため，cDNAクローンの単離を行い，得られたクローンの塩基配列と既知の植物のPAL配列とを比較することにより，PALが植物の種分化を解明する遺伝子として適当であるかどうかを検討した．

a　材料および方法

1)　チャPAL cDNAの単離

PAL活性は光の強度と比例して発現するため（岩浅，1974；IWASA，1977），晴れた日の午後にチャ‘やぶきた’の新葉を実験材料として採集した．この新葉から作成されたcDNAライブラリー（ベクターλgt10，サイズ1×10^8）をスクリーニングに用いた．ナイロンメンブレン（アマシャム）を角型シャーレ（14cm×10cm）上に形成させた約1×10^8個のプラーク上に3分間静置し，変性液（0.5 N NaOH，1.5 M NaCl），中和液（0.5 M Tris-HCl pH 7.0，1.5 M NaCl，1mM EDTA）を湿らせたろ紙上にそれぞれ2分間置いた．次に2×SSC（0.3 M NaCl，30 mM Citric Acid）に浸して洗浄した．その後80℃，2時間乾燥させ，DNAをナイロンメンブレンに固着した．イネPAL cDNAクローン（MINAMIら，1989）をプローブとして用いるため，ラジオアイソトープ標識した．約2.4kbのイネPAL cDNA断片を95℃2分間処理後氷冷し，1本鎖に変性した．ランダムプライム法により，この一本鎖DNAを鋳型にしてクレノー断片の伸長反応によりα-P^{32}dCTPを取り込んだ．

ハイブリダイゼーション溶液（5×SSPE（1×SSPE：18mM NaCl，1 mM EDTA，10 mMリン酸ナトリウム），50% フォルムアミド，0.1% BSA，0.1% 葉酸，0.1% ポリビニルピロリドン（PVP），0.5% SDS，20μgl変性処理したサケ精子由来DNA）に入れたナイロンメンブレンを42℃1時間で保温した後，標識したDNAプローブを添加し，42℃約16時間保温した．ハイブリダイゼーション後，メンブレンを室温で0.1% SDSを含む0.1×SSPEで2回軽く洗浄し，42℃で30分間の洗浄を2回繰り返した．洗浄したメンブレンをX線フィルムとともに−80℃下で保存し，1〜2日後，X線フィルム上にポジティブクローンを検出した．ポジティブな反応を示したプラークを単離し，再度ハイブリダイゼーションを行い，ポジティブクローンを確認した．

2)　塩基配列の決定

単離したクローンをプラスミドベクター，ブルースクリプトKS＋（ストラタジーン），*Eco*RIサイトにサブクローニングした．蛍光標識されたM13フォワードまたはリバースプライマーを用いて，サブクローニングしたプラスミドを鋳型とするサイクルシーケンス法によりDNA断片を増幅し，DNAシーケンサー(ABI社製373型)により塩基配列を決定した．これらのクローンの配列とエンドウマメ（アクセッション・ナンバー；D10001）のPAL cDNA配列との比較を行った．さらに完全長の

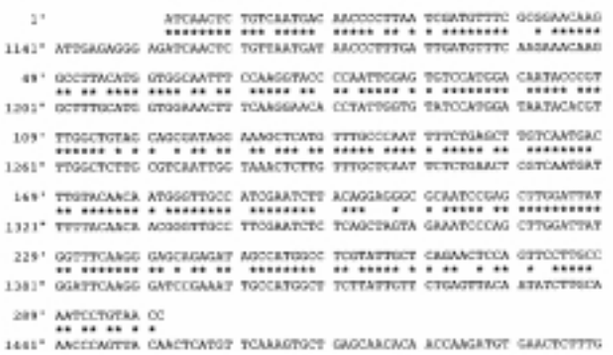


図1−1　チャPAL cDNAクローン（A02)とエンドウマメ（D10001）の相同性比較
上段：チャPAL cDNAクローン，下段：エンドウマメ
★は同じ塩基配列を示す

```
   1 GTTCCATCAA TCTATACACC TACCTGAGTT TTTGGAGACT GTCACTTTTT TACTTTTTCC
  61 AAAACACCTC TCTTGATAAC TGTTTTTAAC TGTTTCAATT CTCTTAGATA GATCCAACTG
 121 CTTCAAATAA CATGGATAGT ACCACCGCCA TTGGAAACGG TGTCGGGAGT GGCGGTTCAC
 181 CGGGTTTTTG TCTGAAAGAC CCTTTGAATT GGGGAGTGGC GGCGGAGGCA ATGAAGGGGA
 241 GTCATTTGGA GGAAGTGAAG GGCATGGTGG AGGAGTTTCG GAAGCCAGTG GTGAGGCTGG
 301 GAGGGGAGAC TTTGACGATA TCGCAGGTGG CGGCGATCGC GGTGAGGGGT AGTGAGGTGG
 361 CGGTGGAGCT GTCGGAGTCT GCGAGGGAGG GAGTGAAGGC CAGTAGTGAT TGGGTTATGG
 421 AGAGTATGAA TAAAGGGACA GATAGTTATG GTGTTACTAC TGGTTTTGGT GCTACTTCAC
 481 ATAGGAGGAC CAAAGAAGGT GGTGCTCTTC AAAAGGAGCT TATTAGGTTC TTGAATGCTG
 541 GAATATTTGG CAATGGAACA GAGTCATGTC ACACATTGCC ACAATCAGCC ACAAGGGCAG
 601 CTATGCTTGT AAGGATCAAC ACCCTCCTCC AAGGATACTC CGGCATTAGG TTCGAAATTT
 661 TGGAAGCCAT TTCCAAATTC CTCAACAACA ACATCACTCC ATGCCTGCCG TTACGCGGCA
 721 CTATCACCGC CTCCGGTGAC CTAGTCCCCC TATCTTACAT TGCCGGGCTT TTGACAGGCC
 781 GGCACAATTC GAAGGCGGTC GGGCCTACTG GAGAAATCCT CCACCCCAAG GAAGCCTTCC
 841 GTCTAGCTGG AGTTGAGGGC GGGTTTTTTG AGTTGCAACC CAAGGAAGGC CTTGCGCTTG
 901 TCAACGGCAC AGCTGTTGGT TCCGGCTTGG CTTCTATGGT TCTTTTCGAG GCTAACATAC
 961 TCGCCGTGTT ATCAGAAGTT TTGTCAGCGA TTTTCGCTGA AGTTATGCAA GGCAAGCCCG
1021 AGTTCACCGA CCATTTGACA CACAAATTGA AGCACCACCC TGGCCAAATT GAAGCTGCTG
1081 CCATTATGGA ACACATTTTG GATGGTAGCT CTTATGTCAA GGCAGCCCAA AAACTACATG
1141 AAATGGATCC ATTGCAAAAA CCAAAACAGG ACAGATATGC CCTTAGAACA TCTCCTCAAT
1201 GGCTAGGACC ACTAATTGAA GTCATCCGAT CATCGACAAA ATCAATTGAG AGGGAGATAA
1261 ACTCGGTGAA TGACAACCCT TTGATCAATG TTTCAAGGAA CAAGGCCTTA CATGGTGGAA
1321 ATTTCCAAGG TACCCCAATC GGAGTCTCCA TGGACAATAC ACGTCTAGCT GTTGCCTCAA
1381 TAGGGAAGCT CATGTTTGCC CAATTCTCTG AGCTTGTTAA TGACTTCTAC AACAATGGGT
1441 TACCATCAAA TCTTTCCGGG GGACGAAATC CAAGTTTGGA TTATGGTTTC AAGGGAGCCG
1501 AGATTGCCAT GGCTGCTTAT TGCTCAGAAC TCCAATTCCT TGCCAATCCT GTAACCAACC
1561 ATGTCCAAAG CGCCGAGCAA CATAACCAAG ATGTGAACTC TTTAGGCCTA ATCTCTTCAA
1621 GAAAGACAGC CGAGGCAGTT GATATCTTGA AGCTCATGTC CTCTACATAT CTAGTAGCAC
1681 TCTGCCAAGC CGTAGATTTG AGGCATTTTG AGGAGAATTT GAGGAACACT GTCAAGAGCA
1741 CGGTGAGCCA AGTAGCGAAG CGCGTTCTAA CTATGGGCGT TAACGGAGAG CTTCACCCTT
1801 CAAGGTTTTG TGAAAAGGAC TTGCTCAGAG TGGTAGACCG TGAATACATC TTTGCCTACA
1861 TTGATGACCC TTGCAGTGCA ACCTACCCAT TGATGCAAAA ACTAAGGCAA GTACTTGTTG
1921 AGCATGCATT GAAAAATGGT GAAAGTGAGA AGAATTTGAG CACTTCAATC TTCCAAAAGA
1981 TTAGGGCTTT TGAGGAGGAA ATAAAGACCC TTTTGCCTAA AGAGGTAGAG AGTACAAGAG
2041 CAGCAATTGA GAACGGGAAT TCGGCTATTC CGAACCGGAT TAAGGAATGC CGGTCTTATC
2101 CACTATACAA GTTTGTGAGG GAAGAATTGG GAACTGAATT GTTGACCGGA GAGAAGGTCC
2161 GGTCACCGGG AGAGGAGTTT GACAAGGTGT TCACCGCTCT GTGCAAGGGA GAGATGATTG
2221 ATCCATTGAT GGATTGTCTC AAGGAGTGGA ATGGTGCTCC TCTTCCTATC TGTTAGTGCA
2281 ATTCTTATCG CATTGGAACA ATGTTTTTCA GTCCTTGTCT TAAGTTTTTC
```

図1−2　チャPAL cDNAをコードするクローンA21の全塩基配列

cDNA クローンを得るために，チャのポジティブクローンのインサート部分をプローブにして同様の方法により再度スクリーニングを行った．得られたクローンをプラスミドにサブクローニングし，制限酵素 *Bam*HI と *Kpn*I で消化し，エクソヌレアーゼを経時的に反応させ，突出した5' 側からＤＮＡを削除した．次にマングビーンヌレアーゼにより１本鎖となった側を完全に消化し，これらのプラスミドを再結合させデリージョンクローンを作成した．インサート断片長が最も近いデリージョンクローン同士は 100bp 以上の重複を有しており，これらのクローンを用いて塩基配列を決定した．

3）チャの PAL と他の植物の PAL との相同性比較

単離したクローンの塩基配列と既報の植物の PAL オープンリーディングフレーム（ORF）部分の塩基配列および推定されたアミノ酸配列を比較し，PAL をコードするクローンであるかを推定した．なお解析は Genetyx Ver.6.0.4 を用い，その検索条件は「Unit size to compare」は 6,「Pick up location」は５で行った．さらにチャを含む 18 科 34 種合計 56 個の PAL 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列について作物間での相同性の検索を行い，塩基配列に基づいた Unweighted Pair-Group Method with Arithmatic mean（UPGMA）法により系統樹を作成し，従来の分類体系と比較した．

b　結　　果

1）　チャ PAL cDNA の単離

イネの PAL cDNA をプローブに用いてスクリーニングをした結果，最終的に 2 個のポジティブクローン A01, A02 が得られた．この二つのクローンはいずれも予想される PAL の鎖長より短かった． A02 の約 300bp について塩基配列を決定したところ，エンドウマメの PAL と高い相同性を示した（図１－１）．完全長 cDNA を得るために A02を DNA プローブに用いて再度スクリーニングを行ったところ，新たに21個のクローンが得られ，この中で最も鎖長の長いクローンは A21であった．

2）　塩基配列の決定

A21 はポリ A 配列を除き 2,300bp からなるクローンであった（図１－２）． A21 のアミノ酸配列の推定では，メチオニンから終止コドンまでの最大の ORF は 2,142bp の 714 アミノ酸残基であった．なお， A02 と A21 との塩基配列の違いは 300bp 中 37bp あり，その中でアミノ酸置換を伴うものは５個であった（図１－３）．また A21 には， *Eco*RI， *Pvu*II， *Eco*RV， *Kpn*I， *Bam*HI などの制限酵素認識部位が存在した（図１－４）．

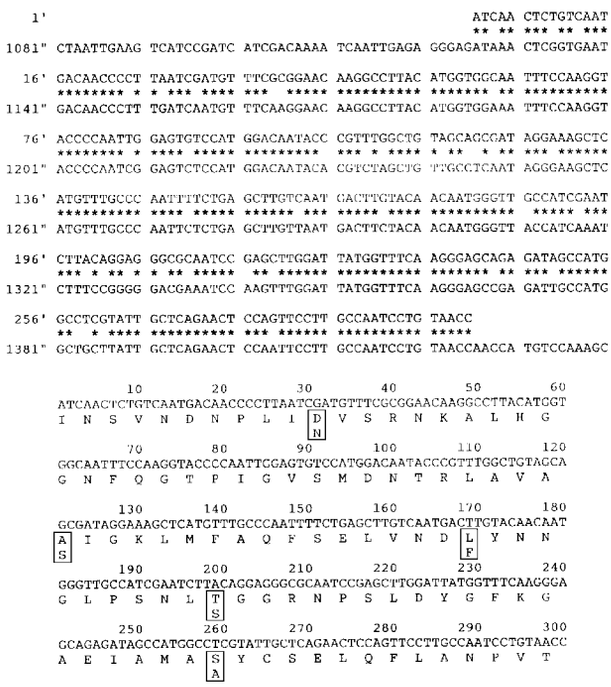


図１－３　チャPAL cDNAクローンA02とA21の塩基（上）およびアミノ酸配列（下）の比較
上段：A02，下段：A21，配列が異なる塩基は★なし，アミノ酸は□で囲んで示した．

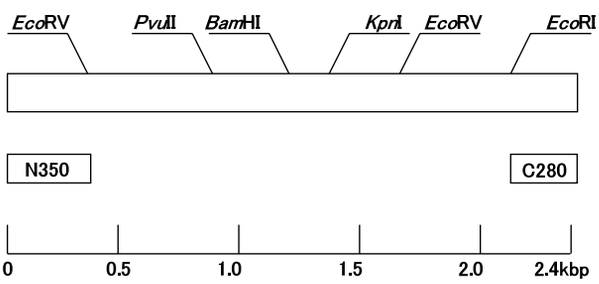


図１－４　チャPAL cDNAクローンA21の主要な制限酵素地図とN350，C280プローブの位置

3）　チャの PAL と他の植物の PAL との相同性比較

クローニングしたチャ PAL cDNA A21 のアミノ酸配列から推定された分子量は 77,750 であり，これはサツマイモの PAL の SDS-PAGE から推定された分子量 77,000（Tanaka ら，1989）に近似していた．これまで cDNA またはゲノム DNA の PAL は，チャを含み 20 科 38 種の植物で単離が試みられ，18 科 34 種で合計 56 個の完全長クローンの単離が報告されている（表１－１）．チャの属する双子葉植物における塩基配列レベルでの相同性の比較では，セリ科ニンジン（AB089813，D85850）とパセリ（X17462， X81158， X81159）で 79.3～79.9 %と高い相同性を示し，次にナス科タバコ（AB008199,

D17467，X78269，AB008200）で78.6～78.9%であった．比較した双子葉植物の中で最も値の低かった植物はアブラナ科のアラビドプシス（L33678）であったが，その値は72.2%であり，最も高かったニンジンとの差は7.7%の違いに止まり，比較的高い相同性を示した．またアミノ酸レベルでの相同性の比較でも，ニンジンとパセリが87.9～88.2%と最も高く，次にバラ科ラズベリー（AF237955）87.4%，マメ科エンドウマメ（D10001，D10002）87.3%と高かった．逆に最も値の低かったのも，ラズベリー（AF237954）81.5%であり，概して双子葉植物内では保存性が高かった．

一方，単子葉植物の完全長のPALは，ラン科で2件

表1－1　チャと各植物種におけるPAL遺伝子のアミノ酸配列とORF部分の塩基配列の相同性の比較

植物			項目		比較した配列	
科　名	和　名	学　名	アクセッションナンバー	種類	DNA	アミノ酸
ツバキ科	チャ	*Camellia sinesis*	D26596	cDNA	100.0	100.0
セリ科	ニンジン	*Daucus carota*	D85850	gene	79.3	88.2
セリ科	ニンジン	*Daucus carota*	AB089813	gene	79.5	88.1
セリ科	パセリ	*Petroselinum crispum*	X17462	cDNA	79.9	87.9
バラ科	ラズベリー	*Rubus idaeus*	AF237955	cDNA	77.8	87.4
マメ科	エンドウマメ	*Pisum sativum*	D10001	cDNA	77.0	87.3
マメ科	エンドウマメ	*Pisum sativum*	D10002	cDNA	77.0	87.3
アカネ科	コーヒー	*Coffea canephora*	AF460204	cDNA	77.2	87.2
マメ科	ジモグリツメクサ	*Trifolium subterraneum*	M91192	gene	76.9	87.0
マメ科	ダイズ	*Gycine max*	X52953	gene	76.1	87.0
トウダイグサ科	キャッサバ	*Manihot esculenta*	AY036011	cDNA	77.4	86.7
マメ科	エンドウマメ	*Pisum sativum*	D10003	cDNA	76.6	86.7
セリ科	パセリ	*Petroselinum crispum*	X81158	cDNA	79.3	86.5
マメ科	(マメ科の牧草)	*Stylosanthes humilis*	L36822	cDNA	76.2	86.4
マメ科	アルファルファ	*Medicago sativa*	X58180	cDNA	76.5	86.4
セリ科	パセリ	*Petroselinum crispum*	X81159	cDNA	79.3	86.4
キク科	レタス	*Lactuca sativa*	AF299330	cDNA	75.0	86.2
ナス科	タバコ	*Nicotiana tabacum*	D17467	cDNA	78.9	86.1
ナス科	タバコ	*Nicotiana tabacum*	AB008199	gene	78.9	86.1
ナス科	タバコ	*Nicotiana tabacum*	X78269	cDNA	78.9	86.0
ゴマノハグサ科	地黄ジオウ	*Rehmannia glutinosa*	AF401636	cDNA	77.0	85.9
アカネ科	コーヒー	*Coffea canephora*	AF460203	cDNA	74.7	85.9
ヤナギ科	アメリカヤマナラシ	*Populus tremuloides*	AF480620	cDNA	77.3	85.6
ミカン科	レモン	*Citrus limon*	U43338	cDNA	77.3	85.5
ヒルガオ科	アサガオ	*Ipomoea nil*	AF325496	cDNA	76.6	85.5
バラ科	サクランボ	*Prunus avium*	AF036948	cDNA	77.1	85.3
ムラサキ科	ムラサキ	*Lithospermum erythrorhizon*	D83075	cDNA	77.4	85.1
ヤナギ科	交雑ヤマナラシ	*Populus kitakamiensis*	D43802	gene	76.7	84.8
ヤナギ科	交雑ヤマナラシ	*Populus kitakamiensis*	D30657	gene	75.9	84.8
ミカン科	ミカン科種間雑種	*Citrusclementina X Citrus reticulata*	AJ238753	cDNA	77.3	84.8
ナス科	タバコ	*Nicotiana tabacum*	AB008200	gene	78.6	84.6
アブラナ科	アラビドプシス	*Arabidopsis thaliana*	L33677	gene	73.8	84.5
ヤナギ科	アメリカヤマナラシ	*Populus tremuloides*	AF480619	cDNA	76.9	84.5
キク科	レタス	*Lactuca sativa*	AF411137	cDNA	76.2	84.3
ヤナギ科	バルサムポプラ	*Populus x generosa*	L11747	cDNA	77.3	84.3
ヤナギ科	交雑ヤマナラシ	*Populus kitakamiensis*	D30656	gene	76.9	84.2
ムラサキ科	ムラサキ	*Lithospermum erythrorhizon*	D83076	cDNA	77.8	84.2
アブラナ科	アラビドプシス	*Arabidopsis thaliana*	BT000035	cDNA	72.3	84.0
アブラナ科	アラビドプシス	*Arabidopsis thaliana*	L33678	cDNA	72.2	84.0
マメ科	ヒヨコマメ	*Ccer arietinum*	AJ250836	cDNA	75.0	84.0
ミカン科	ミカン科種間雑種	*Citrusclementina X Citrus reticulata*	AJ238754	cDNA	77.9	83.4
シソ科	カワミドリ	*Agastache rugosa*	AF326116	cDNA	74.5	83.4
ナス科	トマト	*Lycopersicon esculentum*	M90692	gene	77.3	82.4
ヒルガオ科	サツマイモ	*Ipomoea batatas*	M29232	cDNA	76.8	82.2
ヒルガオ科	サツマイモ	*Ipomoea batatas*	D78640	cDNA	76.3	81.7
バラ科	ラズベリー	*Rubus idaeus*	AF237954	cDNA	75.3	81.5
ラン科	ブロムヘディア	*Bromheadia finalaysoniana*	X99997	cDNA	72.7	81.3
ラン科	ドリテノプシス	*Phalaenopsis x Doritaenopsis*	AY281156	gene	72.1	81.0
イネ科	コムギ	*Triticum aestivum*	X99705	gene	67.7	77.3
イネ科	イネ	*Oriza sativa*	X87946	gene	66.9	74.0
イネ科	イネ	*Oriza sativa*	AY224546	cDNA	64.7	71.4
イネ科	イネ	*Oriza sativa*	X16099	gene	64.1	69.0
イネ科	トウモロコシ	*Zea Mays*	L77912	cDNA	64.2	67.1
マツ科	テーダマツ	*Pinus taeda*	U39792	cDNA	63.9	67.6
マツ科	フランスカイガンショウ	*Pinus pinaster*	AY321088	cDNA	62.8	64.0
マツ科	フランスカイガンショウ	*Pinus pinaster*	AY321089	cDNA	62.6	64.0

（X99997，AY281156），イネで３件（X87946，AY224546，X16099），コムギ（X99705）とトウモロコシ（L77912）でそれぞれ１件ずつが単離されている．双子葉植物の中で最も相同性が低かったアラビドプシスの72.2%（アミノ酸レベルで84.0%）と比較して，ラン科では平均72.4%（同81.2%）で同等の値を示し，イネで65.2%（同71.5%），コムギ67.7%（同77.3%），トウモロコシ64.2%（同67.1%）と低い値を示した．裸子植物であるマツ科のテーダマツ（U39792），フランスカイガンショウ（AY321088，AY321089）との比較では，それぞれ63.9%（アミノ酸レベル67.6%），62.7%（同64%）と単子葉植物と比べてもさらに低い値であった．しかしながら，イネ科やマツ科の内で比較すると，イネとトウモロコシ，トウモロコシとコムギ，コムギとイネでそれぞれ77.4～90.0%（アミノ酸レベル72.2～89.4%），75.6%（同71.3%），75.5～81.3%（70.9～84.4%）と値に差が見られたものの概して高い相同性を示した．

PALのORF配列をもとにUPGMA法で系統樹を作成すると，マツ科植物が属する裸子植物と被子植物が大きく分かれ，被子植物では単子葉植物のイネ，コムギ，トウモロコシが大きなグループを形成し，さらに次のグループでラン科植物と双子葉植物群が分かれた．双子葉植物のグループでは，同じ属種の植物が同じグループに分類される傾向が強かった（図１－５）．ヤナギ科のポプラのPALは二つのグループに分かれ，それぞれのグループ内のクローン同士は高い相同性を示した．クローニングしたチャPAL cDNAクローンA21との比較では，セリ科およびナス科植物のPALと高い相同性が認められた．双子葉植物ではアブラナ科，単子葉植物のラン科，イネ科，裸子植物のマツ科の植物とは，他に比較して相同性の程度が低く，チャとは離れた位置にクラスタリングされた．以上の結果から，A21はチャのPALをコードしていると断定するとともに，PALは植物の系統分化と同じように分化してきたと推定された．

c　考　　察

チャcDNAクローンA21はORFの長さ，推定された分子量および塩基配列の相同性より完全長のPAL cDNAをコードした．ORF配列の比較から，PALは同じ属種の植物間では非常に高い相同性を示し，A21はチャが属する双子葉植物から，単子葉植物，裸子植物へと植物分類上の類縁関係が遠くなるほど，相同性が低くなることが明らかになった（表１－１）．本実験の結果からPALの塩基配列が属や種によって配列が微妙に異なりながらも，ポプラ，コーヒー，アラビドプシス，イネなど同じ植物から複数のPALがクローニングされている植物では，クローン間の塩基配列は非常に高い相同性を持つことが示された．一方で，ポプラの仲間では6個のPALが同定されているが，これらを比較すると3個ずつの異なる二つのクラスターに分かれた．同じクラスター内では90%程度の相同性がみられるものの，クラスター間では70%代に止まった．ポプラでは二つの異なるPAL遺伝子座が存在し（Subramaniamら，1993；Osakabeら，1995ab），対立遺伝子間では相同性が高く，異なる座のPAL遺伝子同士では相同性が低くなると考えられ，明らかにPALの中でも構造上の分化が進んでいることを示している．

チャの不完全長のクローンA02と完全長のA21とは，300bp中で87%以上の塩基が同じ配列であることから，対立遺伝子の可能性も示唆された．植物のPALは系統が分化するとともに二次代謝への初期の反応を制御する重要な役割を保持しつつ，カテキンなどの代謝に関与するいわば種特異的な変異を拡大してきたと考えられた．PAL遺伝子に基づく系統樹と形態学的な特徴から推定されている系統樹とは非常に近似していた．したがってPAL遺伝子のゲノム構造上の変異は，チャの系統・品種分化を反映している可能性が極めて高いと考えられた．

２　チャPAL遺伝子の構造

カテキン含量はチャの遺伝資源間で多様な変異を示し，その増減は育種目標の一つである（根角ら，1998）．PALはカテキン代謝に関与する遺伝子であり，その活性はカテキンの蓄積量との相関が一部に認められている（岩浅，1974）．PAL遺伝子の多様性を活用して品種分類，系統分化のためのマーカーにするには，まずゲノム内の構造を明らかにする必要がある．

PALはcDNAやゲノムDNAの部分配列も含めると20科38種の植物種でクローニングされている．一部のマツ（Whettenら，1992）を除くと，ほとんどの植物でPALは多重遺伝子族を形成し，PALの多様な役割に機能を分化していると考えられる．品種分化の解明に用いるDNAマーカーが多重遺伝子族の場合，DNA多型の頻度は増す可能性はあるものの，多型の複雑化によって，解析が困難な場合も生じる．一方，単一遺伝子を用いる場合には，多型の頻度を低下させ，マーカーによっては多様性の検出に使用できないこともありうる．本実験では，チャのPAL遺伝子がどのような構造で存在しているかを明らかにするため，PAL cDNAをDNAプ

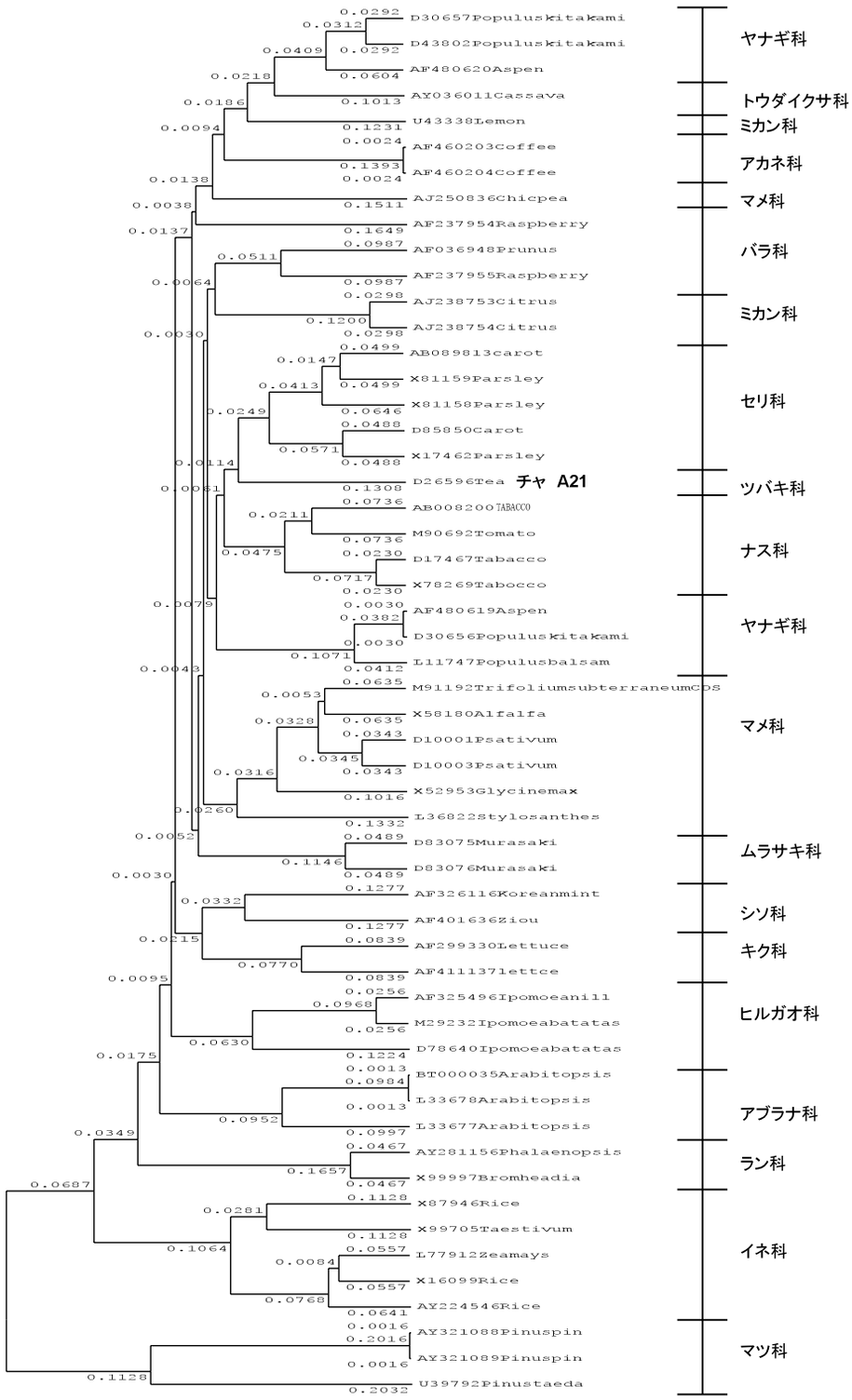


図１－５　植物のPAL塩基配列の相同性に基づく系統樹
植物名はDNAデータベースにおけるアクセッションナンバーに種名または作物名を付記し表した

ローブに用いて以下の RFLP 解析を行った．まず６種類の制限酵素を用いて，主要品種の‘やぶきた’の DNA を消化し，酵素ごとに多型を検出した．次に品種・系統間による多型の有無と，得られた多型と遺伝子の構造との関係を明らかにするため PAL cDNA の5’，3’側の短い DNA プローブにより DNA 断片を検出した．さらに異なる多型をもつ品種・系統間の交雑後代を用いて，多型の遺伝様式を明らかにした．

a 材料および方法

1) RFLP 解析によるチャ‘やぶきた’の多型解析

DNA 抽出方法は GUILLERMAUT ら(1992)の方法を改変して次のとおり行った．新葉２g を乳鉢上ですりつぶし，DNA 抽出溶液 17ml （100mM 酢酸ナトリウム，50mM EDTA, 50mM NaCl, 0.5% ポリビニルピロリドン, 1.4% SDS）を加えさらに細かくすりつぶした．50ml 遠心管に移し 65℃で 30 分間保温した．室温で 10,000rpm10 分間遠心した後，上清 15ml を新しい遠心管に移して 6.9ml の 4M 酢酸カリウム（pH4.8）を添加し，転倒混和後 30 分間氷冷した．4℃で 12,000rpm 20 分間遠心した後，上清を新しい遠心管に移し，同量の氷冷したイソプロパノールを添加した．遠心管をゆっくりと揺らし，上清とイソプロパノールの境界面にできる糸状の DNA を抽出した．この後の操作では DNA の分解を避けるため，可能な限り遠心を避けた．遠心管内に残る液層を捨て，15ml 70%エタノールで２回 DNA を洗浄し，風乾した．5ml TE を添加，完全に溶解させた後，10mg/ml の RNase 20μl を添加し 55℃で 20 分間保温し RNA を分解した．イソプロパノール 5ml を添加し DNA を再沈殿させ，70%エタノールを用いて２回洗浄，風乾後，最終的に 0.5～1.0ml の TE 溶液に完全に溶解させた．この溶液中の一部をとり分光光度計（ベックマン DU-7000）により 260 および 280nm の波長で吸光度を計測し，内蔵している Warburg-Christian Concentration の計算式により DNA 濃度を求めた．

プローブの調整としてチャ PAL cDNA クローン A21 のインサート全領域をアガロースゲルから切り出し，ランダムプライム法により α-P^{32} dCTP で標識した．

RFLP 解析には６種類（*Xba*I， *Sac*I， *Hin*dⅢ， *Bgl*Ⅱ，*Eco*RI および *Eco*RV）の制限酵素を用いた．制限酵素処理は，‘やぶきた’DNA 15μg 相当量の溶液に所定の制限酵素反応バッファーと制限酵素 100 ユニットを添加し，37℃で 16 時間以上保温することにより行った．消化した DNA を 0.8%アガロースゲル電気泳動により分画し，ナイロンメンブレン（ハイボンド N ＋，アマシャム・ファルマシア）に転写し，2 × SSC で洗浄，乾燥後，紫外線により DNA をナイロンメンブレンに固定した．ナイロンメンブレンをハイブリダイゼーション溶液（6 × SSC （0.9MNaCl， 90ｍM クエン酸），5 × Denhardt's 溶液（0.1% 葉酸，0.1% PVP，0.1% BSA），0.1% SDS, 100μg/l 変性処理したサケ精子由来 DNA））が含まれているハイブリダイゼーションバックに入れ 65℃で１時間以上保温した後， RI 標識した PAL cDNA プローブを添加し，65℃で 16 時間以上保温した．ナイロンメンブレンを一次洗浄液（2 × SSC,0.1 % SDS）中で５分間の浸漬を２回，65℃の二次洗浄液（0.2 × SSC,0.1 % SDS）中で 30 分の浸漬を２回繰り返し余分な標識プローブを洗浄した．洗浄後のナイロンメンブレンと X 線フィルムをカセットに入れ，－80℃冷凍庫内で２日から７日間保存後， X 線フィルムを現像し，サンプルごとに多型を検出した．

2) *Hin*dⅢと *Eco*RV を用いた日本の緑茶用品種間多型の検出

品種間での PAL の多様性を検出するため，日本で緑茶用に育成された 13 品種・系統（Z1，ふうしゅん，さえみどり，やぶきた，かなやみどり，たまみどり，めいりょく，くりたわせ，しゅんめい，あさつゆ，あさぎり，なつみどり，さやまかおり）から前述の方法で DNA を抽出し，制限酵素処理に断片が多く見られた *Hin*dⅢと *Eco*RV で別々に消化し， RFLP 解析を行った．検出された多型のパターンに従って，各品種をグループに分けるとともに， *Hin*dⅢと *Eco*RV で検出された多型の関連について調べた．

3) プローブ領域（5’側と3’側）の違いによる特異的断片の検出

プローブに用いた PAL cDNA と RFLP 解析により検出された PAL の DNA 断片の関係を明らかにするため，PAL cDNA クローン A21の全領域および５’末端部分約 350 塩基（N350）と３’末端部分約 280 塩基（C280）の長さの断片を別々に標識した（図１－４）．Ⅱ.2.2）の結果，多型が見出された５品種（やぶきた，かなやみどり，たまみどり，めいりょく，あさぎり）を選び，各品種の DNA を *Hin*dⅢにより消化し３種類のプローブによる RFLP 解析を行った．

4) PAL RFLP 解析で検出される多型の遺伝様式

検出された DNA 断片の遺伝様式を明らかにするため，‘さやまかおり’と‘やぶきた’の交雑後代 22 個体と‘さやまかおり’と Z1の交雑後代 32 個体を供試し，RFLP 解析を行った．

b 結　　果

1) RFLP 解析によるチャ‘やぶきた’の多型解析

‘やぶきた’のゲノム DNA を *Eco*RⅠ， *Bgl*Ⅱ， *Sac*Ⅰ，*Xab*Ⅰで消化した RFLP 解析では，高分子側に強く検出される１本の断片と 3kb 以下に弱く検出される１，２本断片のパターンであった．一方， *Hin*dⅢで消化したパターンでは約 5～7kb の間に３種類の断片を， *Eco*RV で

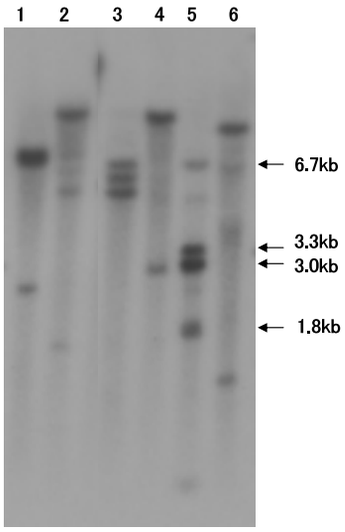


図１－６　チャ‘やぶきた’DNAを6種類の制限酵素で消化し，PAL cDNAをプローブに用いたRFLPパターン
1 *Xba*Ⅰ，2 *Sac*Ⅰ，3 *Hind*Ⅲ，4 *Bgl*Ⅱ，5 *Eco*RⅤ，6 *Eco*RⅠ

消化した場合では3.3kb 以下に３本の断片を検出した（図１－６）.

2)　*Hind*Ⅲと *Eco*RⅤ を用いた日本の緑茶用品種間多型の検出

品種・系統のゲノム DNA を制限酵素 *Hind*Ⅲで消化した場合の RFLP 解析では，分子量の異なる４種類の DNA 断片が検出され，この４種類の断片を高分子の順にＡ（7.3kb），Ｂ（6.7kb），Ｃ（5.9kb），Ｄ（5.3kb）とした（図１－７）．Ｃ断片は供試したすべての品種に共通に検出されたが，Ａ，Ｂ，Ｄの３断片は品種によって１個もしくは２個が検出された．Ｃ断片を除いて多型を示す断片により品種をグループ分けすると，Ａのみを有する品種は‘たまみどり’，‘くりたわせ’，Z1であり，Ｄのみを有する‘あさぎり’，‘なつみどり’，ＡとＢを有する‘かなやみどり’，‘あさつゆ’，‘ふうしゅん’，ＡとＤを有する‘めいりょく’，‘しゅんめい’，ＢとＤを有する‘やぶきた’，‘さやまかおり’，‘さえみどり’であった．*Eco*RⅤで消化した実験結果では，0.2，1.6，1.8，3.0，3.3，6.5kb の６種類の DNA 断片が検出された（図１－７）．このうち 0.2，3.0 と 6.5kbp の断片はいずれの品種にも検出され，多型性を示す断片は 1.6，1.8 と 3.3kb の３個であり，それぞれａ，bd，b1 とした．この３個の多型により緑茶用品種をグループ分けするとａ（1.6kb）のみをもつ‘たまみどり’，‘くりたわせ’，Z1，bd（1.8kb）のみをもつ‘あさぎり’，‘なつみどり’，ａ，bd と b1（3.3kb）をもつ‘かなやみどり’，‘あさつゆ’，‘ふうしゅん’，ａと bd をもつ‘めいりょく’，‘しゅんめい’，bd と b1をもつ‘さえみどり’，‘さやまかおり’，‘やぶきた’の５群となった．この５群の組み合わせは，*Hind*Ⅲで検出されたＡ，Ｂ，Ｄの各組み合わせによってグループ分けした結果と同じであった（表１－２）．したがって緑茶用品種を５群に分類することが可能になった（表１－３）.

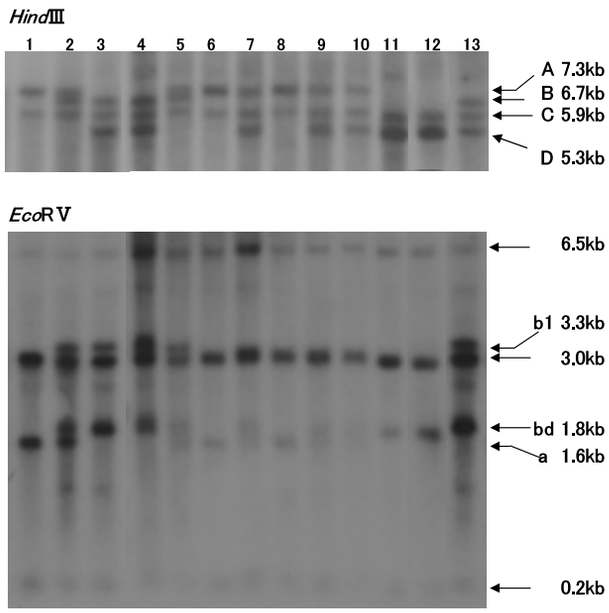


図１－７　*Hind*Ⅲ，*Eco*RⅤを用いた緑茶12品種，1系統のRFLPパターン
1 Z1，2 ふうしゅん，3 さえみどり，4 やぶきた，5 かなやみどり，6 たまみどり，7 めいりょく，8 くりたわせ，9 しゅんめい，10 あさつゆ，11 あさぎり，12 なつみどり，13 さやまかおり

表１－２　２種類の制限酵素とPAL cDNAプローブを用いて検出されるDNA断片と遺伝子型の関係

*Hind*Ⅲ				遺伝子型	*Eco*RⅤ					
7.3 A	6.7 B	5.9 C	5.3 D		6.4	3.3 b1	3.0 com	1.8 bd	1.6 a	0.2
＋		＋		AA	＋		＋		＋	＋
＋	＋	＋		AB	＋	＋	＋	＋	＋	＋
＋		＋	＋	AD	＋		＋	＋		＋
	＋	＋	＋	BD	＋		＋	＋	＋	＋
		＋	＋	DD	＋	＋	＋	＋		＋

検出されたDNA断片を＋で示した

表１－３　PAL遺伝子型による緑茶用品種・系統の分類

PAL遺伝子型	品　種　名
AA	たまみどり，くりたわせ，Z1
AB	かなやみどり，あさつゆ，ふうしゅん
AD	めいりょく，しゅんめい
BD	やぶきた，さやまかおり，さえみどり
DD	あさぎり，なつみどり

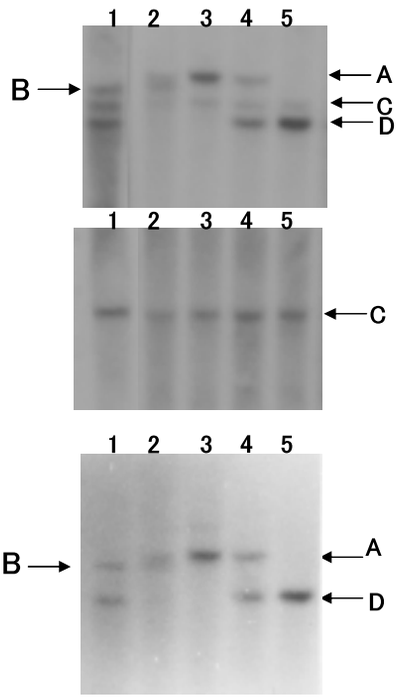


図１－８　PAL cDNA の５‘および３’側をプローブとする RFLP パターン
上：PAL cDNA の全領域，中：N 末端350，下：C 末端280
1 やぶきた（BD），２　かなやみどり（AB），３　たまみどり（AA），４　めいりょく（AD），　５　あさぎり（AG）

3）　プローブ領域（5’側と3’側）の違いによる特異的断片の検出

PAL cDNA の5’側と3’側を別々に DNA プローブとして，品種間で多型の生じた５品種（やぶきた，かなやみどり，たまみどり，めいりょく，あさぎり）の多型を検出した（図１－８）．その結果，5’側を用いた場合にはいずれの品種にも共通にみられる C 断片のみが検出され，3’側を用いた場合には多型を示す A，B，D の３種類の断片が検出された．

4）　PAL RFLP 解析で検出される多型の遺伝様式

RFLP 解析に *Hin*dⅢを用いて検出される多型の中で‘さやまかおり’と‘やぶきた’はともに B と D が検出された．そこで‘さやまかおり’と‘やぶきた’の交雑後代 22 個体では，B のみ，B と D，D のみの個体がそれぞれ 5，12 と 5 個体が見出された（図１－９，表１－４）．B あるいは D のみの個体と B と D を両方持つ個体の検出される DNA 断片の強さは，前者で濃く，後者では薄かった．また‘さやまかおり’と A のみをもつ Z1の交雑後代 32 個体は，A と B を有する 18 個体と A と D を有する 14 個体に分離した（図１－10）．A，B，D が一遺伝子座の対立遺伝子として遺伝するならば‘さやまかおり’と‘やぶきた’，‘さやまかおり’と Z1の

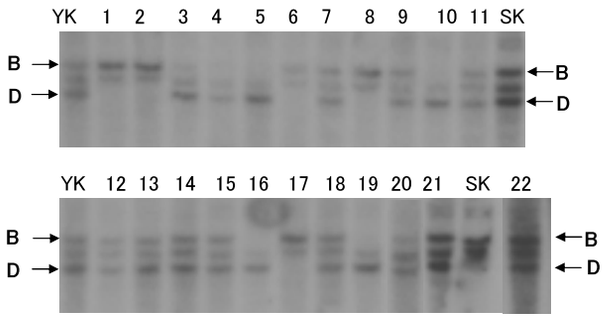


図１－９‘やぶきた’と‘さやまかおり’の後代の PAL cDNA をプローブとする RFLP パターン
YK：やぶきた，SK：さやまかおり

表１－４　PAL cDNA プローブを用いて検出される各断片の遺伝様式

交配組み合わせ	後代の個体数			総数	χ^2
	BB	BD	DD		
さやまかおり(BD)×やぶきた(BD)	5	12	5	22	0.18[a]
	AB		AD		
さやまかおり(BD)×Z1(AA)	18		14	32	0.50[b]

[a] 期待比１：２：１に対して5%レベルで有意差なし
[b] 期待比１：１に対して5%レベルで有意差なし

交雑後代は，メンデルの分離比にそって，1：2：1と1：1が期待される．実験値は χ^2 検定の 5%水準でこれを支持した（表１－４）．A，B，D は一遺伝子座の複対立遺伝子として遺伝することが明らかになった．

以上の結果から，チャの PAL は単一遺伝子としての存在が考えられ，日本の緑茶用品種では３個の複対立遺伝子が確認された．*Hin*dⅢで消化したときに得られる多型 A，B と D を PAL 遺伝子型と表記した．このマーカーを用いて日本の緑茶用品種を AA，AB，AD，BB，BD と DD 型の６種類に分類可能であったが，BB 型に該当する品種はなかった．

c　考　　察

特定の遺伝子が多重遺伝子族として存在しているかどうかの確認は，複数の制限酵素と短いプローブを用いた RFLP 解析によって行われるのが一般的である．遺伝子が多重遺伝子族を形成し，ゲノム上に分散していると RFLP 解析では複数の DNA 断片が異なる位置に検出される可能性が高く，単一遺伝子であると断片は１個か少数になることが予想される．‘やぶきた’を６種類の制限酵素で消化し，PAL cDNA 全領域をプローブに用いた場合には，*Hin*dⅢと *Eco*RV を除いては，いずれも単一の DNA 断片が 7kb を超える比較的高分子側に強く検

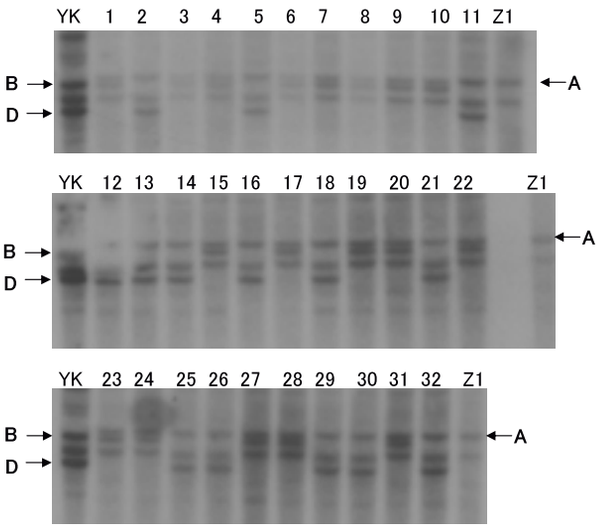


図１－10 ‘やぶきた’とZ1の後代のPAL cDNAをプローブとするRFLPパターン
YK：やぶきた

出された．これらの結果からチャのPALは多重遺伝子族として存在する可能性は少ないことが予想された．さらに複数のDNA断片が強く検出された*Hin*dⅢと*Eco*RVの多型について詳細に検討した．

*Hin*dⅢを用いたRFLP解析において検出された４種類の断片を用いて緑茶用品種が５グループに分類された．一方で，*Eco*RVを用いたRFLP解析においても多型を示す断片の出現から緑茶用品種・系統を５つに分類でき，しかも*Eco*RVによる解析から分類された品種構成と，*Hin*dⅢの解析からのそれとは全く同じであった．さらに*Hin*dⅢに結果で多型性を示すA，B，Dと，示さないC断片がそれぞれPAL cDNAの3’側と5’側にハイブリダイズし，多型を示すA，B，Dの各断片はいずれも同じ遺伝子座の複対立遺伝子として遺伝した．このため，緑茶用品種をPAL遺伝子型としてAA，AB，AD，BB，BD，DD型の６種類に分類することが可能となったが，供試した12品種，１系統の中にはBB型を示すものはなかった．以上の結果から，チャのPALは単一遺伝子として存在すると考えられ，日本の緑茶用品種はRFLPレベルで識別可能な３個の複対立遺伝子で構成されていることが明らかになった．

PALは一次代謝から二次代謝への反応を司るキー酵素として，二次代謝産物合成や防御機構の初期の反応に関与している．多様なはたらきへの対応のため，多くの植物でPAL遺伝子はゲノム上に２個以上存在する多重遺伝子族を形成していることが知られている．ニンジンの培養細胞を用いた実験系では，新しい培地の移植によって誘導されるPALとアントシアニン合成に関与するPALとは異なっている（Ozeki ら，1990）．ポプラのPALは他の植物と同様に多重遺伝子族を形成しているが，クローンによって発現する組織が著しく異なることが明らかにされている（Osakabe ら，1995a,b）．インゲンマメの3個のPALを解析した結果，発現部位や環境ストレスによって個別に発現することが報告されている（Liang ら，1989）．チャは葉中にカテキンを多量に含み，その含量は品種・系統によって変異がある．PAL活性とカテキンの蓄積には相関があること（岩浅，1974）やカテキンの代謝以外でも傷や光の外部刺激によって活性が高まることが報告されている（Takeuchi ら，1994）．カテキンを合成するフェニルプロパノイド合成系で働く別のキー酵素であるカルコンシンターゼは，少なくても３個以上の塩基配列の異なるクローンが単離され，複数の遺伝子座が推定されている（Takeuchi ら，1994）．このようにチャにおいてもPALの役割は多岐にわたっているため，他の植物と同様に多重遺伝子族を形成していることが予想されたが，単一遺伝子としての存在が考えられた．PALのコピー数は植物種によって大きな変異があり，報告されている中では最も多いジャガイモでは半数体当り30～50個が存在し，マツ（*Pinus taeda*）では単一遺伝子として存在する（Whetten ら，1992）．Subramaniam ら(1993)は，ポプラの遺伝子構造について二つの遺伝子座から構成されるが，それらはクラスターを形成せず独立に遺伝することを報告するとともに，マツが単一遺伝子であったことを引用し，理由は不明だが，木本性植物は大きなPAL多重遺伝子族を要求しないのではないかと言及している．チャの遺伝資源の中では形態的な特徴の変異の幅が小さい日本の緑茶用品種だけにも制限酵素認識部位の異なる３個の複対立遺伝子が存在した．これらがどのような作用機作の違いがあるのか不明であるが，個々が個別の機能をもつ多重遺伝子族とは異なり，対立遺伝子の違いにより発現が制御されている可能性も十分に考えられた．

二つの制限酵素を用いて得られた品種の識別結果が一致したことから，PALの遺伝子周辺のゲノム領域での二つの制限酵素認識部位の突然変異は，日本の緑茶用品種や系統が分化する以前に起こったと考えられる．３種類のPAL複対立遺伝子の存在は，日本のチャの起源を考える上では有用な情報である．‘やぶきた’と‘さやまかおり’の交雑後代からは，BB型が正常な分離比で得られたにもかかわらず，12品種，１系統ではBB型に該当するものは見出されなかった．さらにBD型にい

たっては‘やぶきた’以外の２品種はいずれも‘やぶきた’の交雑後代であることを考えると，もし‘やぶきた’が存在しなければ見出せないグループ型であった．

複対立遺伝子の多い単一遺伝子を標的にして，RFLP解析を行うと，一個体当りに検出されるDNA断片の数が少数であるが，遺伝資源の多様性を明らかにする場合は，明瞭な断片のパターンの違いにより個体間および集団間で識別することができる．したがってPALは日本の緑茶用品種がどのように成立してきたかを解明するには，有効なDNAマーカーであると考えられた．

Ⅲ　DNA抽出のためのチャ保存法の検討と海外のチャの遺伝的多様性

１　DNA抽出方法の検討と種間雑種の確認のためのPALマーカーの活用

日本の緑茶用品種の分化を考えていく上では，海外のチャ遺伝資源との遺伝的多様性の違いを比較しなければならない．特に日本在来種，品種と同じ中国変種（*C. sinensis var. sinensis*）に属する中国，韓国のチャとどのような違いがあるのかを明らかにすることが重要である．チャのRFLP解析には１サンプル当り約15μg程度の高品質のDNAが必要であり，制限酵素数を増やして解析を行うと15μgの倍数を用意しなければならない．RFLP解析に用いるDNAのソースは，細胞数が多く重量の少ない未展開葉が適している．またサンプルは新鮮なものが望まれるため，生の試料を迅速に運搬するか，凍結して運搬することが不可欠である．しかしながら海外での探索や国内であっても遠隔地で大量のサンプルの調製を要する場合には，新鮮葉を凍結して運ぶことは非常に困難である．

植物組織からDNAを抽出する場合には，組織を破砕し，多糖類，タンパク質を除いて，エタノール沈殿と洗浄によって抽出する手法が一般的である．しかし植物種によって抽出の難易度が異なるのは，二次代謝産物など特有の物質の存在がDNA抽出に影響を及ぼしていると予想されている．そのため植物種に応じて，様々なDNA抽出法が考案されている（Cheng ら，1997；Lin ら，1997；Whettasinghe ら，1998；Green ら，1999；Sharma ら，2002；Tanaka ら，2002a）．

ヤブツバキ（*Camellia japonica*）はチャと近縁であるばかりでなく，凍結保存した花粉を使用することで交雑が可能で，種間雑種である茶中間母本農１号「チャツバキ」，観賞用の品種‘春待姫’や‘彩祭り’が作出されている（武田ら，1987．柴田ら，2003a,b）．ツバキの耐寒性を導入する目的で育種された「チャツバキ」は茶としての品質に問題があるものの，カメリア属植物において種間雑種を用いたチャの育種が遺伝変異を拡大できることを示した．チャとツバキの種間雑種を育成するには，両種が遠縁であることから多くの交雑を行う必要があり，特に幼苗時に種間雑種であるかを判定する手法の確立は極めて重要である．雑種性の判定には，DNAマーカーを用いる方法が有効である．しかしながら，ツバキ，チャツバキはチャに比べてDNA抽出することが難しく，一般に用いられているC-TAB法ではDNA抽出が困難である．またⅡ.2.a.1)に記載したチャの新葉からのDNA抽出方法を用いてツバキ，チャツバキからDNAの抽出を行うと，最終的なDNA溶液の粘性が高くRFLP解析に用いることはできない．市販のDNA抽出キットを用いて多くのサンプルを処理するには高額になるため，より安価で行える手法が必要である．

以上の点から，採集からDNA抽出が可能になるまでの一定期間内にチャの試料を室温で保存できる手法を確立する必要がある．そこで本実験では遠隔地での採集に対応するため，冷蔵設備を必要としない保存方法を検討した．また，開発した保存方法を用いてチャツバキからのDNA抽出の可能性と雑種性の判定にPAL cDNAを用いたRFLP解析の有効性を検討した．

ａ　材料および方法

1)　エタノール保存および押し葉保存サンプルからのDNA抽出方法の検討

チャ‘やぶきた’，アッサム変種と推定されるミャンマー産「ルエサイ１」，アッサム雑種の‘べにふうき’各新鮮葉約2gを用いて以下の保存区を設けた．新鮮葉を50mlのエタノールが入った管びん中に入れ保存（エタノール保存）した．また適当な紙の上に新鮮葉を載せさらに紙を重ねて，挟んで保存した（押し葉保存）．いずれも室温で１週間以上放置した．これらの葉から，Ⅱ.2.a.1)に記載した方法により各区５個体のDNAを抽出した．抽出したDNA溶液の一部を分光光度計（Beckman DU-7500）により260nm，280nm吸光度を測定し，濃度と純度の指標となる260/280nmの比を求めた．また0.8%アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色によりDNAの分解程度を比較した．さらに各区から抽出した‘やぶきた’DNA15μgを制限酵素*Hin*dⅢ，*Eco*RV，*Eco*RIで消化して，PAL cDNAをプローブとするRFLP解析を行い，検出されるDNA断

片の強度を比較した．なお対照区として－20℃で保存した新鮮葉（冷凍保存）を用いた．

2）チャツバキ，ツバキのエタノール保存葉からのDNA抽出とRFLP解析

チャとツバキの種間雑種チャツバキ1～9号（1号は茶中間母本農1号‘チャツバキ’）と種子親のチャ‘さやまかおり’，花粉親とされるヤブツバキの新葉約2～5gをエタノール中に1週間保存し，Ⅱ.2.a.1)に記載した方法により粗DNAを抽出した．この粗抽出液から陰イオン交換樹脂を用いて以下のバッチ法によりDNAを精製した．陰イオン交換樹脂（DEAEセファデックスA-25，ファルマシア）10gを抽出バッファー（2M NaCl，100mM Tris-HCl pH7.5，1mM EDTA）に一晩浸漬後，洗浄バッファー（0.4M NaCl，100mM Tris-HCl pH7.5，1mM EDTA）で3回洗浄し，同バッファー200ml中で保存した（陰イオン交換樹脂溶液）．DNA約300μgを含む粗抽出液を陰イオン交換樹脂溶液10mlに添加し，10分間ゆっくり混ぜた．陰イオン交換樹脂が沈降した後に上清を除き，20mlの洗浄バッファーを加え，懸濁させた．この操作を2回繰り返し，DNAを洗浄し，上清を取り除いた．次に50℃に保温した抽出バッファー5mlを加えてDNAを溶出させた．DNAを含む溶液をエタノール沈殿と70%エタノールで洗浄し，乾燥後TE1mlに溶解した．分光光度計の値よりDNA濃度を算出するとともに，260nmと280nmの吸光度の比を比較した．15μg相当を制限酵素*Hind*Ⅲと*Eco*RVを別々に消化後，ナイロンメンブレンに転写，紫外線によりDNAを固定した．これらのナイロンメンブレン，ハイブリダイゼーションバッファーとRI標識されたPAL cDNAプローブを65℃で16時間以上保温した．その後メンブレンを2× SSCで2回，簡単に洗浄し，続いて65℃で0.2 × SSC溶液に15分間浸漬を2回繰り返し洗浄した．PALプローブとハイブリダイズしたDNA断片を検出するため，メンブレンをX線フィルムおよび増感紙とともに－80℃で3日間保存後，現像した．

b　結　　果

1）エタノール保存および押し葉保存サンプルからのDNA抽出方法の検討

エタノール保存および押し葉保存のいずれからもDNAの抽出を確認した．‘やぶきた’では－20℃保存の対照区から抽出されたDNAの総量が468.5μgであったのに対して，エタノール，押し葉保存区ではそれぞれ356.6，346.5μgと減少した．「ルエサイ1」と‘べにふうき’では‘やぶきた’に比べて抽出されたDNAの平均の総量は減少したものの，エタノール保存，押し葉保存の順に抽出量は減少する傾向は同様であった（表2－1）．260nm / 280nmの比では，3品種および3の保存区を通じて1.83～1.88の間であった（表2－2）．

表2－1　チャ葉の保存法の違いによるDNAの抽出量（μg）

	冷凍保存	エタノール保存	押葉保存
やぶきた	468.5	356.6	346.5
ルエサイ1	302.6	195.5	175.1
べにふうき	292.9	238.0	181.3

各品種の生葉2gを採取から1週間，－20℃（冷凍），エタノール中に保存（室温）または押葉（室温）にした，各サンプルから抽出されたDNA

表2－2　異なる方法によって保存されたチャ葉から抽出されたDNAの 260nm / 280nm 比

	冷凍保存	エタノール保存	押葉保存
やぶきた	1.87	1.84	1.83
ルエサイ1	1.84	1.83	1.84
べにふうき	1.88	1.83	1.84

各品種の生葉2gを採取から1週間，－20℃（冷凍），エタノール中に保存（室温）または押葉（室温）にした，各サンプルから抽出されたDNA

アガロースゲル電気泳動により抽出した各DNAの分解の程度を検出した結果，エタノール保存したサンプルおよび対照区から抽出されたDNAのパターンは，高分子領域に断片として検出され，分解の程度が少なかったが，押し葉保存したサンプルから抽出されたDNAは高分子側から低分子側に連続的に検出され，DNAの分解がみられた（図2－1）．押し葉保存のDNAの分解は，‘やぶきた’だけでなく，「ルエサイ1」，‘べにふうき’でも同じ傾向を示した．

各保存区から抽出した‘やぶきた’のDNAを3種類の制限酵素で消化し，PAL cDNAをDNAプローブに用いたRFLP解析の結果では，保存区に関係なく目的とするDNA断片の検出が可能であった（図2－2）．しかしながら，エタノールと押し葉保存から抽出したDNAを用いて得られたDNA断片の強度は対照区に比較して弱く，特に押し葉保存のDNAでは識別が困難であった．エタノール保存でも検出断片の強度の低下はみられたが，その程度は小さく，十分に識別可能であった．

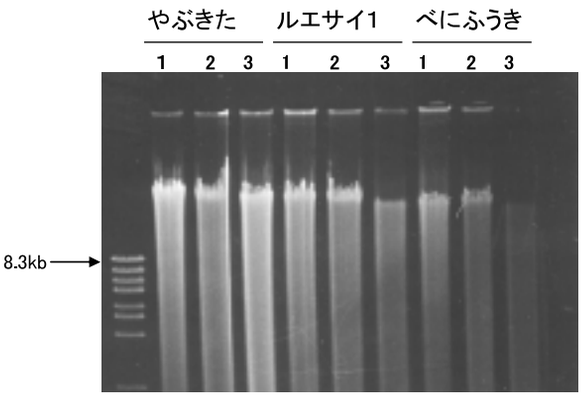


図２－１　チャ葉の保存条件の違いが抽出されたDNAの分解に及ぼす影響
１：冷凍保存，２：エタノール保存，３：押し葉保存

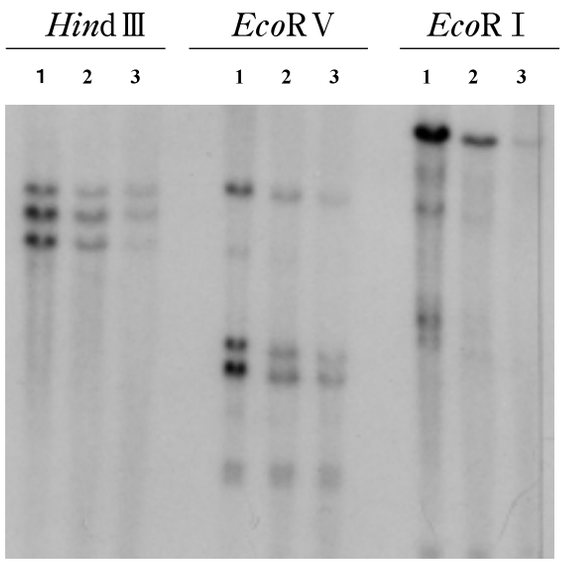


図２－２　チャ葉の保存条件の違いによるRFLP検出強度の差異
１：冷凍保存，２：エタノール保存，３：押し葉保存

2)　チャツバキ，ツバキのエタノール保存葉からのDNA抽出とRFLP解析

エタノール中に浸漬したツバキとチャツバキの葉から得られた粗抽出液は，新鮮葉から抽出された粗抽出液に比べて粘性がなく，バッチ処理の際にセファデックス溶液と混ざりやすかった．制限酵素に*Hin*dⅢを用いたRFLP解析では，種子親の‘さやまかおり’はPALの遺伝子型ではBD型であるために，B，C，Dの位置に強く断片が検出された（図２－３）．一方，花粉親とされるヤブツバキは高分子側に一つの断片（TH1）が検出されたのみであった．チャツバキの各系統は，B断片の位置に検出された個体が3，4，9号で，D断片の位置には1，2，3，6，7，8号であり，BまたはD断片を持つ個体に分離した．チャツバキにはチャのRFLPパターンでは検出されない特定の断片CTH1（図２－３）がすべての系統で検出された．しかしながら，この断片は花粉親の候補として今回供試したヤブツバキには認められず，またヤブツバキにしか検出されなかった高分子の断片TH1はチャツバキのいずれの系統にもみられなかった．

‘さやまかおり’を*Eco*RV処理した解析では，共通に検出される3.0kbの断片の他にb1断片を有する（Ⅱ.2.b.2）．b1断片と*Hin*dⅢを用いた場合に検出されるB断片とは相関があり，B断片を有する品種はb1断片を有している．b1断片を有するチャツバキは3，4，9号で，これらはいずれもB断片を有する個体であった（図２－３，３－４）．ヤブツバキ（図２－４レーン11）では3種類の断片（TE1，TE2，TE3）が検出された．この中で3.0kbに検出されるTE3は，同じ位置にチャでも強く検出される断片があるため，分類の指標に用い

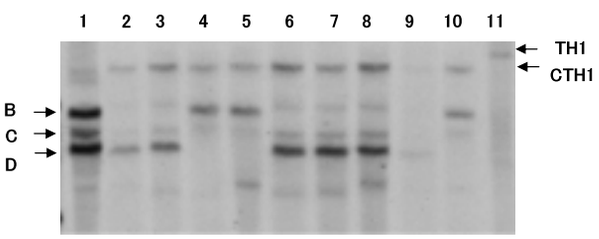


図２－３　PAL cDNAをプローブに用いたチャツバキのRFLPパターン
１：さやまかおり，２～10：チャツバキ1号～9号，11：ヤブツバキ
制限酵素：*Hin*d Ⅲ
矢印CTH1はチャツバキの花粉親，TH1はツバキ，B，C，Dは子房親の‘さやまかおり’由来の断片と推定

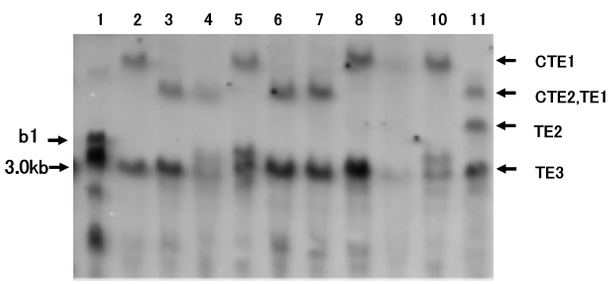


図２－４　PAL cDNAをプローブに用いたチャツバキのRFLPパターン
制限酵素：*Eco*RV
１：さやまかおり，２～10：チャツバキ1号～9号，11：ヤブツバキ
矢印CTE1とCTE2はチャツバキの花粉親，TE1，TE2，TE3はツバキ，矢印b1は子房親の‘さやまかおり’由来の断片と推定

ることはできず，またTE 2は‘さやまかおり’とチャツバキのどの系統にも検出されなかった．チャツバキ１～9 号では，‘さやまかおり’には検出されない２種類（CTE1，CTE2）が認められ，各系統はこの２本のうちの１本を必ず有していた．CTE 2とヤブツバキのTE1はほぼ同じ位置に検出された（図２－４）．

c　考　　察

RFLP 解析に使用しうる品質の DNA を得るために，チャ葉を室温で短期間保存する二つの方法（押し葉とエタノール中での保存）について，アッサム変種，アッサム雑種と中国変種に属する‘やぶきた’を用いて検討した．押し葉保存したサンプルは保存１週間後には，乾燥し葉色が変色した．特にアッサム変種である「ルエサイ１」とアッサム変種の後代である‘べにふうき’は，‘やぶきた’に比べて褐変の度合いが強かった．押し葉保存の葉から抽出されたDNA 量は，凍結したサンプルのそれより大幅に少なかったもののエタノール保存のサンプルとほぼ同等であった．DNA 溶液にタンパク質などの不純物が混合すると制限酵素の活性を阻害することが知られている．DNA 溶液の 260nm / 280nm 比は，DNA 溶液の純度を簡易に調べることに利用されており，その比が 1.8～2.0 であれば適正とされている．押し葉保存のサンプルは，1.83～1.84 であり，不純物の混入の点では問題なかった．しかし，抽出されたDNA の電気泳動像は高分子だけでなく低分子側にもみられ，分解が進んでいた．またRFLP 解析により検出された断片の強度は他の二つの区に比較して弱かった．この原因は，検出に用いたDNA は他の区と同じ15 μg であったが，DNA が分解しているために供試量に見合うだけの強度が得られなかったためと考えられた．押し葉にした植物標本からDNA を抽出した複数の事例が報告されているが（Drabkova ら，2002；Ristaino ら，2001），その多くは，抽出後の微量なDNA を鋳型にし，PCR により増幅する手法がとられ，DNA の分解が進んだサンプルであっても検出上の大きな問題は論じられてこなかった．乾燥した茶サンプルからもDNA が抽出され，PCR 用の鋳型に用いられている（Singh，1999；Kaundun ら，2004）．しかしRFLP 解析では，制限酵素で消化可能なDNA を比較的大量に必要とするために，分解の進んだ試料を使用することは困難である．これらの結果から押し葉保存はチャのRFLP 解析用に保存する手段としては適切ではないと判断した．

チャ葉をエタノールに浸漬し，7 日後にはクロロフィルがエタノール中に溶出し，葉は白から薄い黄色になった．浸漬後の組織は硬く脆くなっており，乳鉢上で破砕する作業が非常に容易であった．DNA の抽出量は，冷蔵保存したサンプルよりも大幅に少なかったものの，最も少なかった「ルエサイ１」が新鮮葉 2g から 195.5 μg が抽出され，RFLP 解析を行うには十分な量であった．DNA の分解の程度は，ポジティブコントロールの凍結保存したサンプルとほぼ同等であり，RFLP 解析でも容易に認識可能なDNA 断片が検出された．エタノールによる保存は，エタノールを準備しなければならない手間を必要とするものの，小瓶や小袋があれば簡単に行え，室温での保存で１週間程度であればRFLP 解析に供試可能なDNA が得ることが可能であった．これらの結果から，実験室から離れた場所での採集では，エタノール浸漬による保存を行った．

チャとツバキは，同じカメリア属植物に属しながらも開花期が異なることなど形態上の特徴の違いからかなり分化した植物と考えられている．ツバキはチャに比較してDNA 抽出の困難な植物であり，Guillemaut ら（1992）が報告した方法や植物組織からDNA の抽出に汎用されているCTAB 法では，抽出した溶液が粘性の高いものとなり，RFLP 解析に供試できるDNA は抽出できない．溶液の粘性を高める物質がこれらの方法ではDNA と挙動を同じにするためと考えられる．そのため陰イオン交換樹脂等を用いてDNA をさらに精製する必要があるが，その際にもできる限り粘性の低い溶液が望まれる．ツバキとチャとは葉に含まれる物質が異なることが報告されており（Nagata ら，1984），チャには含まれない物質の一部がDNA の抽出を阻害していると考えられている．また，チャツバキのDNA 抽出の難易は，ツバキほどでないが，チャのように容易ではなく，阻害物質の生成機構がツバキから遺伝している．またツバキ，チャツバキは，チャに比べてその葉が厚く，硬いために，新葉以外ではDNA 抽出の際に組織を磨り潰すことに手間がかかる．ツバキ，チャツバキの葉をエタノールに浸漬保存することにより，クロロフィルが脱色され，容易に破砕できるばかりでなく，生葉から抽出されたDNA の溶液のような高い粘性のものとはならなかった．陰イオン交換樹脂による精製後，RFLP 解析に使用しうるDNA が抽出された．ツバキ，チャツバキからのDNA 抽出には，エタノール保存した葉サンプルは，作業のしやすさや阻害物質の混入除去の点から考慮すると，生葉サンプルよりも効果的であった．

*Hind*Ⅲを用いたチャツバキ 1～9 号のRFLP 解析では，

種子親である‘さやまかおり’由来のＢまたはＤ断片のいずれかとＣ断片が検出され，チャツバキをＢ型とＤ型に分類できた．一方で‘さやまかおり’では検出されないCH1断片をすべてのチャツバキが有していた．また花粉親の候補として検討されたヤブツバキではTH1のみが検出された．*Eco*RVを用いたチャツバキの解析では，‘さやまかおり’に検出されるb1と3.0kbの断片以外に，CTE1とCTE2の２個の断片が検出された．しかしこの２個の断片は９系統のチャツバキがいずれか１本を有していたことから，対立遺伝子の関係にあることが推定された．多くの植物のPALは多重遺伝子族を形成しているが，チャ（Matsumotoら，1994）やマツ（Whettenら，1992）では単一遺伝子と推定されており，ポプラ（Subramaniamら，1993）でも２個の遺伝子を有しているにすぎず，木本性植物のPALは多重遺伝子族を形成しない傾向がある．チャツバキで検出された断片数が少なかったことは，チャツバキの花粉親ののヤブツバキのPALが多重遺伝子族としてではなく，チャと同様に単一遺伝子として存在することを示唆した．

チャツバキと種子親の‘さやまかおり’の多型には強い関連性が認められるため‘さやまかおり’を種子親とすることは否定できなかった．また種子親は種子をつけたという事実から，一般に花粉親に比べて疑念が及ぶことは少ないため，チャツバキ１～９号の種子親を‘さやまかおり’とすることには問題ないと考えられた．しかし花粉親の候補として供試したヤブツバキとチャツバキでは，*Hind*Ⅲの解析で検出されたTH1とCTH1，*Eco*RVでのCTE1には共通性が認められず，供試したヤブツバキをチャツバキの花粉親とすることは否定され，真の花粉親のヤブツバキは別に存在することが示唆された．本実験では，チャツバキ１～９号をヤブツバキとの交雑後代であることを厳密には確認することはできなかった．しかしながら，チャツバキから検出されたCH1，CTE1，CTE2またヤブツバキで検出されたTH1，TE1，TE2の各断片は，いずれもアッサム変種と中国変種を通じてもチャでは検出されていない．これらの断片はツバキに特異的な断片であることが容易に想像できる．しかもCTE2とTE1は同じ位置に検出されており，ヤブツバキの中でも多様性があり，その一部がチャツバキの真の花粉親と今回候補とされたヤブツバキとが共有していたと考えられる．RFLPパターンから真の花粉親の遺伝子型は，CTH1をホモに，CTE1とCTE2をヘテロに有する単一個体か，CTE1もしくはCTE2をどちらかホモに有する複数個体であることが強く示唆された．

種間交雑は遺伝変異を広げる育種として園芸植物では多用されている．しかし形態的な特徴が発揮されていない幼植物で雑種植物の判断を行うことは極めて困難であった．キンカチャとヤブツバキの雑種（西本ら，2003），チャとサザンカの雑種（田中ら，2003）の確認のためにRAPDマーカーおよびSSRマーカーが用いられるなどDNA多型は極めて有用である．RAPDマーカーは最も簡易にできるものの，マーカーのスクリーニングが必要である．PALと*Hind*Ⅲや*Eco*RVの組み合わせたRFLP解析は明確な多型が得られたため，雑種性の確認のためには有用であると言える．PALをDNAプローブに用いた解析は，DNAを多量に用いるものの，抽出の方法を確立することによりチャとヤブツバキの種間雑種の判定に極めて有効な技術であることが示された．チャとツバキのPALのDNA配列はRFLPパターンから考えるとかなりの変異があることが予想される．そのためPALをターゲットに用いたPCRベースのマーカー（Kaundunら，2003a）が確立できれば，さらに容易に検出が可能と考えられる．

2　PAL RFLP解析を用いた海外のチャの多様性の検出

チャ（*Camellia sinensis*）はツバキ属に属し，アッサム変種（var. *assamica*）と中国変種（var. *sinensis*）の二つの変種がある．この二つの変種の主な違いは，生育特性，葉の大きさ，形，葉の付きかた（Leaf pose）等である．しかし両変種が交雑可能であり，これらの諸形質は連続的な変異を示すため雑種の形質の多様性は極めて大きく，中国変種やアッサム変種の原型となる植物は今でも野生状態で存在するのかが議論されるほどである（Banerjee，1992）．典型的なアッサム変種は，葉長が20cmを超える大きな葉となるものの着葉数が少ないために生じる収量減や，高木性による栽培作業の困難さから，経済栽培には不適である．またアッサム変種は耐寒性に乏しく，日本では紅茶用品種は耐寒性の強い中国変種との交雑により育成されている．紅茶独特の香りや発酵特性はアッサム変種から由来するものと考えられているが，栽培化には中国変種との交雑により栽培特性の向上が欠かせない．遺伝資源の評価や品種分化の解明のためには，有用なマーカーの開発が必要であるが，連続的な変異を有するなどの上述した理由から，アッサム変種内の多様性の検出や中国変種との多様性の違いを検出する上で有用な形質マーカーは極めて少ない．

日本の緑茶用品種が属している中国変種は，アッサム

変種に比べ耐寒性を有し，葉の小さい灌木であり，その分布は中国西南部を中心に朝鮮半島南部と日本に伸びている．またアッサム変種との交雑により経済栽培に適した品種・系統が育成され，インドを含むアジアの国々で茶の生産を支えている．韓国のチャは仏教との繋がりが強く，その起源は中国から修行僧によって導入されたと考えられている．現在においても韓国の古い寺院の庭や裏山にはチャの木が植栽されており，これらは導入されたチャの後代と推定されている．他方，近代になって茶園をつくる目的から日本や台湾から大量のチャの種子が導入された．さらに中国はチャ樹の起源地であり，アッサム変種から中国変種まで分布し，遺伝資源の宝庫でもある．日本のチャの起源や品種分化を考える上では，中国のチャの解析は欠かせない．そのため同じ中国変種に属する海外のチャと日本のチャの間で遺伝的な多様性を客観的に明らかにする必要がある．このような観点から，アッサム変種と中国変種の遺伝的な多様性を検出し，両変種の違いを明らかにするとともに，日本と韓国，中国のチャの遺伝的多様性の比較を行った．

a　材料および方法

アッサム変種の解析のために，野菜茶業研究所金谷研究拠点に保存されている遺伝資源（表２－３）および中国，ミャンマーで採集され，エタノール漬けしたサンプル合計 25 点を用いた（加藤ら，1998）．これらのチャは大型の葉を有し，葉の先端が細く尖るなど，典型的なアッサム変種の諸形質を有するものであった． DNA 抽出および PAL cDNA を用いた RFLP 解析はⅡ.2.a.1）に記載した手法を用いた．検出した RFLPs の中で，主要な断片と思われるものだけをカウントし，パターンによる比較を行った．

表２－３　PAL cDNA をプローブとする RFLP 解析に用いたアッサム変種（*C. sinensis* var. *assamica*）の来歴，個体数および導入年

略称	来　　歴	供試個体数	導入年
アッサム	インド	1	1928
Ab2	トクライ茶試，インド	1	1954～1955
Thai	不明	1	不明
Ace	セイロン種	4 ※1	1964
Abo	ボー農園，マレーシア	4 ※2	1955
Ash22	シャン種,ベトナム	1	1957
南糯山	雲南省，中国	2 ※3	1995葉を採集
カチン	カチン州,ミャンマー	11	1996葉を採集
合計		25	

※1 Ace5，Ace21，Ace33，Ace70，※2 Abo8，Abo11，Abo45，Abo50
※3 南糯山1，南糯山2

供試した韓国のチャは，韓国国内の 6 箇所の古い寺の庭園および１箇所の宝城郡会川面の茶園に植栽されているチャの木から採集した種子を，野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点内の圃場に播種し，遺伝資源として保存されている合計 273 点であった（図２－５）．また中国（一部インド）のチャについては，野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点および枕崎茶業研究拠点に保存されている7系統合計187点を用い解析を行った（表２－４）．これらは特に導入中国種と呼ばれているため（武田，2002），本論文でもこの呼称を用いた．韓国および中国のチャはいずれも新葉 2 または 3 枚をエタノール漬けし，採集，保存から１週間以内に DNA を抽出した． PAL cDNA を用いた RFLP 解析手法はこれまでと同様であり，検出さ

表２－４　中国，インドのチャ（*C. sinensis* var. *sinensis*）のサンプルの来歴と供試個体数

記号	来　　歴	供試個体数
枕Cm	中国安徽省東郷県	24
枕Cd	インドダージリン	60
宮Ck，枕Ck	中国安徽省祁門	51
金Cn，枕Cn	中国江西省	34
静Ca	中国湖南省安化	4
C	中国湖北省	5
金Cp	中国浙江省	9
合計		187

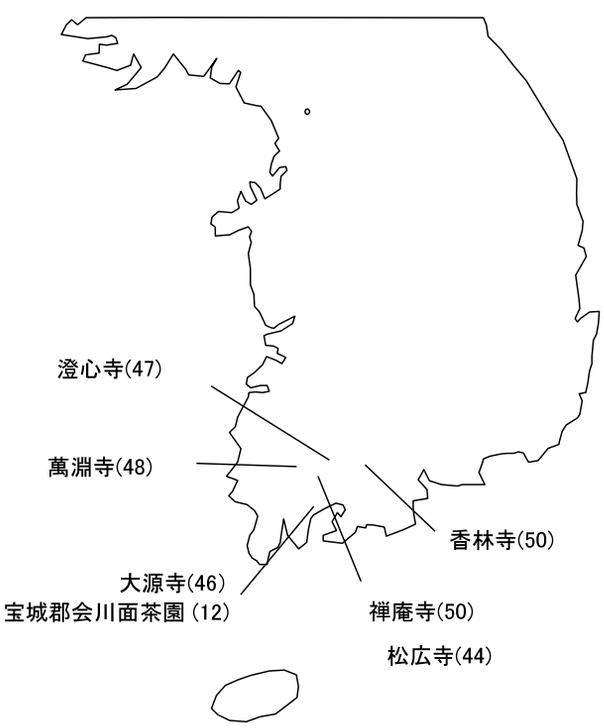


図２－５　韓国のチャの採集地点と供試個体数

れた多型のパターンにしたがってグループ分けを行い，複対立遺伝子を推定した．さらに頻度を算出し，各サンプル地点別の違いを明らかにした．導入中国種については，サンプル数が 24 以上の Cm，Cd，Ck，Cn の４系統およびすべての中国変種のデータを統合した結果について，A，B，D を日本型，韓国のチャの解析で検出された K1～K7 を中国・韓国型として呼称し，日本型と中国・韓国型の割合について図示した．

b　結　　果

1）アッサム変種の RFLP 解析

Abe2，Thai，Ace5，Ace21，Ace33 を *Hin*dⅢで消化した結果，C 断片付近に単一の断片のみが強く検出された（図２－６）また，インド（「アッサム」）やスリランカの一部の系統（Ace70）では，C 断片付近と 4.1kb の断片がみられ，マレーシアのボー農園から導入された 4 個体（Abo8，Abo11，Abo45，Abo50）は，いずれも 7.5kb，8.2kb と推定される高分子の位置に断片がみられたものの，検出された断片の中では C 断片付近のシグナルが最も強かった．中国南糯山で採集された 2 個体のアッサム変種は，*Hin*dⅢでは C 断片のみを，*Eco*RV ではほぼすべてのチャで共通に見出される 3kb の断片のみを有し，2 系統間では差がなかった（図２－７）．ミャンマーのアッサム変種 11 個体は，図２－６，図２－７で検出されたパターンと同様に，C 断片のみを有する個体，8.2kb の断片を付加する個体と，さらに 1 個体ではあるが，7.5kb と 8.2kb とを同時に有するチャがあった（図２－８）．また *Eco*RV で消化し得られたパターンでは，3.0kb の断片のほかに，3.3kb の断片を有する 2 個体が見出され，1.8kb の断片は 11 個体中 10 個体から検出された．以上のとおり，供試した *C.sinensis* var．*assamica* の系統間によっては，マイナーな断片の有無の違いは見出されたものの，*Hin*dⅢでは C 断片が，*Eco*RV では 3.0kb の断片が主たる断片として検出された．var．*sinensis* の解析では C 断片のみの個体は見出されていないため，変種間では PAL の構造に大きな違いがあることが示唆された．

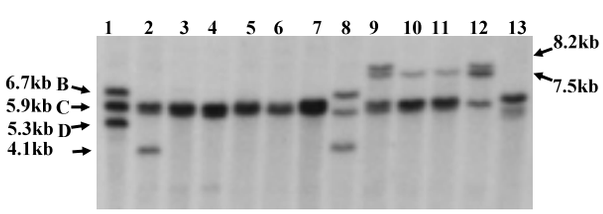


図２－６　アッサム変種の PAL cDNA をプローブに用いた RFLP パターン
１やぶきた，２アッサム，３ Abe2，４ Thai，５ Ace5，６ Ace21，７ Ace33，８ Ace70，９ Abo8，10 Abo11，11 Abo45，12 Abo50，13 Ash22

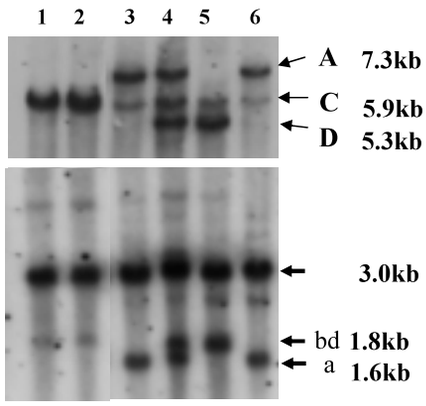


図２－７　アッサム変種（中国）と日本在来種との PAL cDNA をプローブに用いた RFLP パターンの比較
上；*Hin*d Ⅲ，下；*Eco*RV
１南糯山１，２南糯山2，３在来種 AA 型，４在来種 AD 型，５在来種 DD 型，６在来種 AA 型

2）韓国の 6 箇所の寺院に植栽されているチャと茶園のチャの PAL 遺伝的多様性

(1)　寺院に植栽されているチャの遺伝的多様性

澄心寺のチャの RFLP パターン（図２－９下）では，2.3 kb（レーン 8，10，12），2.5 kb（レーン 10），3.6 kb（レーン 3，5，8，9）と 4.1 kb（レーン 1，2，4，6，7，11）の位置に，また禅庵寺（図２－９上）では，3.6 kb（レーン 2，3，5，12，13），4.1 kb（レーン 1-11，13）と約 9.5kb（レーン 7,12）の位置にそれぞれ標識した PAL cDNA とハイブリダイズした断片が強く検出された．2.3kb と 2.5kb の断片を有するチャは，必ず B 断片もしくは B より若干分子量の小さい位置の断片が検出された．同様に，3.6kb と 9.5kb の断片を有するチャには，いずれも C 断片（もしくは C に近い）が検出された．チャの PAL 遺伝子が単一遺伝子として存在し，しかもこれらの断片は同時に検出されることから，日本のチャには検出されない新しい複対立遺伝子と推定し，2.3，2.5，3.6 と 9.5kb のそれぞれの断片を PAL 複対立遺伝子，K1，K2，K3 と K7 とした．4.1kb の断片は，C 断片と同様に，プローブとなる PAL cDNA の 5’側の配列にハイブリダイズすると考えられている（Matsumoto ら，2002）．韓国のチャでは 4.1kb の断片と同時に A 断片もしくは B 断片が検出された．A と B 断片は 3’側の配列にハイブリダイズするため，それぞれの PAL は，4.1kb-A と 4.1kb-B の構造をなしている

と考えられ，K4とK5とした．禅庵寺のチャは，レーン12を除いて，全てK5を有し，澄心寺のレーン2，4，6と11はK4とK5をそれぞれヘテロにもつ個体であると推定された．4.1kbの断片は日本の在来チャの中には検出されるもののその遺伝子頻度は非常に低く0.03程度であったが（MATSUMOTOら，2002），韓国のチャでは高い割合で検出された．さらに松広寺のRFLPパターンを図２－10に示した．‘やぶきた’を制限酵素*Eco*RVで消化し，検出される断片は，3.3kb（b1），3.0kbと1.8kbであるが，このうちb1断片は*Hin*dⅢでのB断片と関係している．日本のチャではB断片とb1断片は相引に連鎖しており，B断片を有する個体の*Eco*RVでの

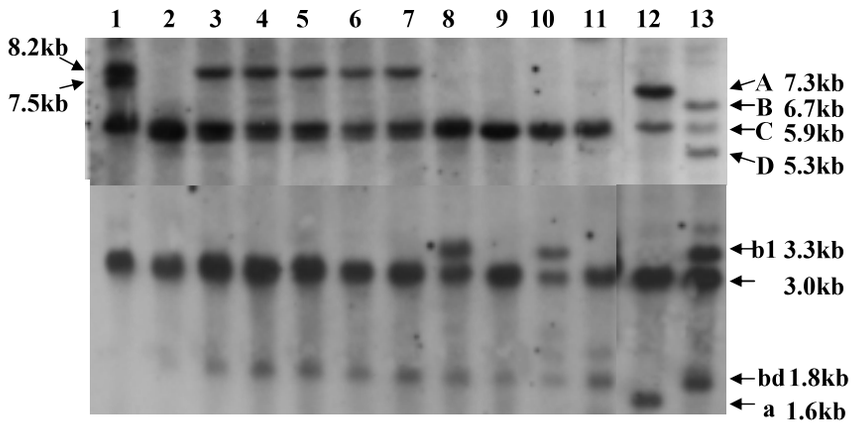


図２－８　ミャンマー国カチン州で採取されたアッサム変種のPAL cDNAをプローブに用いたRFLPパターン
上；*Hin*d Ⅲ，下；*Eco*RV
レーン１～11：アッサム変種，12：うじひかり（AA），13：やぶきた（BD）

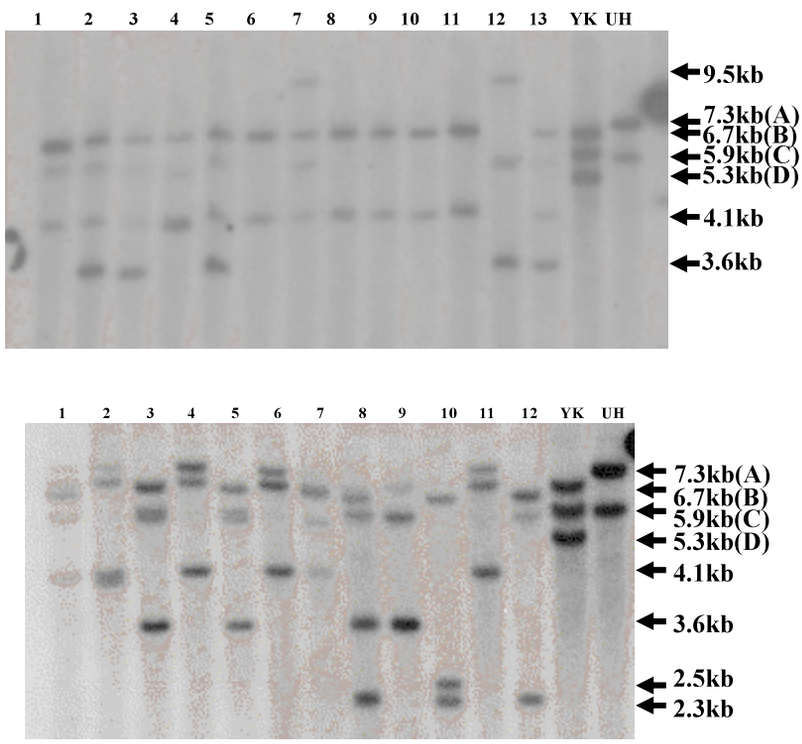


図２－９　韓国禅庵寺（上）と澄心寺（下）に植栽されているチャのPAL cDNAをプローブに用いたRFLP解析パターン
YK：やぶきた（BD），とUH：うじひかり（AA）

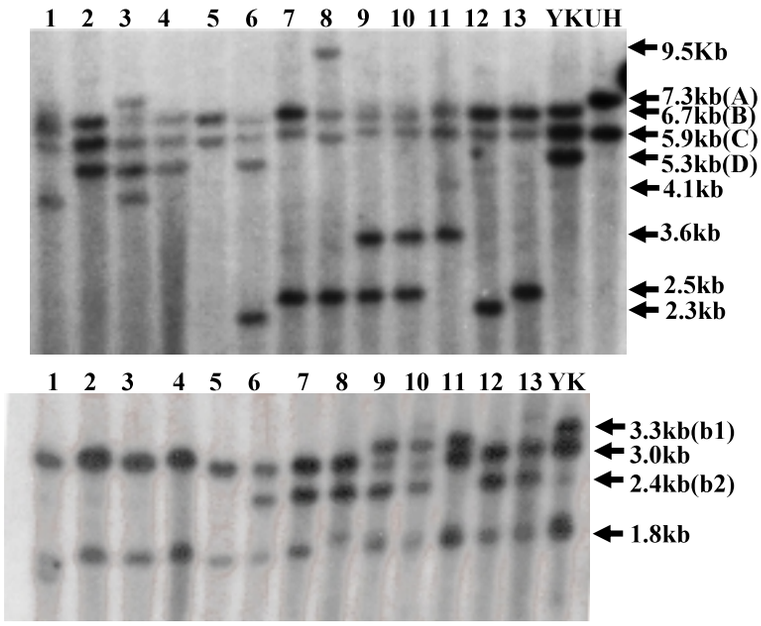


図２－10 韓国松広寺に植栽されているチャの PAL cDNA を用いた RFLP パターン

Hind Ⅲ（上），*Eco*RV（下）
YK ：やぶきた(BD)，UH ：うじひかり(AA)
‘やぶきた’の B 断片（上）は b1断片（下）と対応しており.同様の関係は 3.6kb 断片と b1断片， 2.5，2.3kb 断片と b2断片に認められる.

パターンでは必ず b1断片が検出された．韓国のチャ（図２－10，レーン5）では B と C の位置に断片が検出され，このチャの PAL の遺伝子型は BB 型のようにみえたが，b1断片が全く検出されなかった．このように b1を有しない B 断片の PAL 複対立遺伝子を日本型の B とは区別して K6 とした． K6 は図２－10のレーン１，2，4，5，7，11，12と 13 で見出されたが，レーン 6，8，9 と 10 に見出された B 断片は K1 もしくは K2 由来と考えられた．レーン 7，12 と 13 は，他のレーンに比べて B 断片が比較的強く検出されているため， K6 と K1 もしくは K6 と K2 が組み合わさったものと推定された． b1 断片は， K3（3.6kb 断片）を有する個体の *Eco*RV 解析でも検出された（レーン9，10，11）． K3 と B アレルの *Eco*RV の制限酵素認識部位が同じであるために， b1 断片に相当する 3.3kb の断片が検出されると考えられた．同様の関係は， K1（2.3kb）と K2（2.5kb）の間にも認められ，これら２個のアレルを有する個体の *Eco*RV の解析パターンには，必ず b2 断片が検出された．以上のとおり，韓国のチャには日本で見出された３種類の PAL 複対立遺伝子の他に新たな７を含む 10 種類を推定した（表２－５）．

表２－５ RFLP 解析に基づく韓国と日本のチャ PAL 複対立遺伝子の検出断片パターン

DNA断片長	韓国型							日本型		
	K1	K2	K3	K4	K5	K6[1)]	K7	A[2)]	B	D
9.5kb	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－
7.3kb(A)	－	－	－	＋	－	－	－	＋	－	－
6.7kb(B)	＋	＋	－	－	＋	＋	－	－	＋	－
5.9kb(C)	－	－	＋	－	－	＋	＋	＋	＋	＋
5.3kb(D)	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋
4.1kb	－	－	－	＋	＋	－	－	－	－	－
3.6kb	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－
2.5kb	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	－
2.3kb	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－

検出される DNA 断片長を＋で示した
1) 韓国型 K6 は日本型 B と似ているが， *Eco*RV のパターンが異なる
2) 3複対立遺伝子(A,B,D)により,日本のチャを6遺伝子型(AA,AB,AD,BB,BD と DD)に分類することができる(MATSUMOTO et al. 1994).

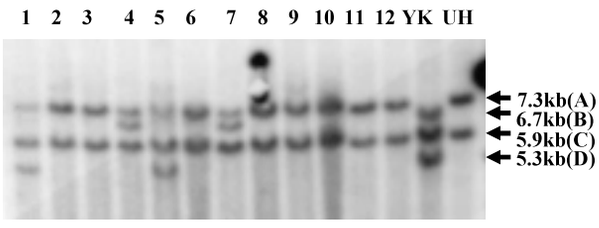


図２－11 宝城郡会川面茶園のチャの PAL cDNA を用いた RFLP パターン

レーン 1 ～ 12: 茶園のサンプル．YK: やぶきた（BD），UH: うじひかり（AA ）
レーン下に PAL 遺伝子型を示した

表２－６　韓国のチャの採集地点による PAL 遺伝子頻度

系統名	分析個体数	複対立遺伝子 K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	A	B	D	不明
禅庵寺	50	0.00	0.01	0.13	0.00	0.41	0.26	0.04	0.03	0.00	0.00	0.12
香林寺	50	0.00	0.29	0.26	0.03	0.11	0.24	0.02	0.05	0.00	0.00	0.00
燈心寺	47	0.03	0.20	0.12	0.17	0.18	0.14	0.00	0.04	0.06	0.03	0.02
松広寺	44	0.03	0.24	0.13	0.01	0.10	0.23	0.05	0.14	0.00	0.07	0.01
大源寺	46	0.04	0.14	0.09	0.18	0.14	0.05	0.04	0.15	0.00	0.13	0.02
萬淵寺	48	0.02	0.19	0.01	0.10	0.08	0.26	0.04	0.19	0.07	0.03	0.00
合計/頻度	285	0.02	0.18	0.12	0.08	0.17	0.20	0.03	0.10	0.02	0.04	0.03
宝城郡会[1)]川面茶園	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.83	0.08	0.08	0.00

[1)] 宝城郡会川面茶園のサンプルは上段の6寺とは明らかに検出される遺伝子型が異なっていたので，計算から除外した

(2)　宝城郡会川面の茶園のチャの遺伝的多様性

宝城郡会川面の茶園から採取した 12 個体の PAL RFLP 解析パターンを図２－11 に示した．12 個体の中で８個体の AA 型（レーン2，3，6，8-11と12），２個体の AB 型（レーン4と7）と AD 型（レーン１と5）にいずれも日本型の PAL の遺伝子型に分類された．また *Eco*RV を用いた解析でも全く同じ結果が得られ，寺院で栽培されているチャとは PAL RFLP 解析に基づく遺伝子型の違いが明らかになった．

(3)　採集地別の PAL 遺伝子頻度の比較

表２－６ に各採集地域別の PAL 遺伝子頻度を表した．禅庵寺と香林寺のチャでは，日本型の PAL 遺伝子型の割合はそれぞれ 0.03 と 0.05 と極めて低かった．また澄心寺，松広寺，大源寺と萬淵寺の日本型の割合は，それぞれ 0.13，0.21，0.28 と 0.29 であり，寺院のチャ全体では 0.16 しか日本型の PAL 複対立遺伝子は存在しなかった．日本型の中では，A 型頻度が最も多く，その割合は全体で 0.10，次に D 型（0.04），B 型（0.02）であった．寺院のチャの中で，最も遺伝子頻度の高かった K6 型は，約２割を占めたものの，日本在来種ではほとんど検出されない遺伝子型であった．一方で，供試個体数は 12 と少なかったが宝城郡会川面の茶園のサンプルはすべてが日本型の PAL を示した．これらの結果から，寺院に植栽されているチャと宝城郡会川面の茶園のチャとは異なる遺伝的な背景を有する集団であった．

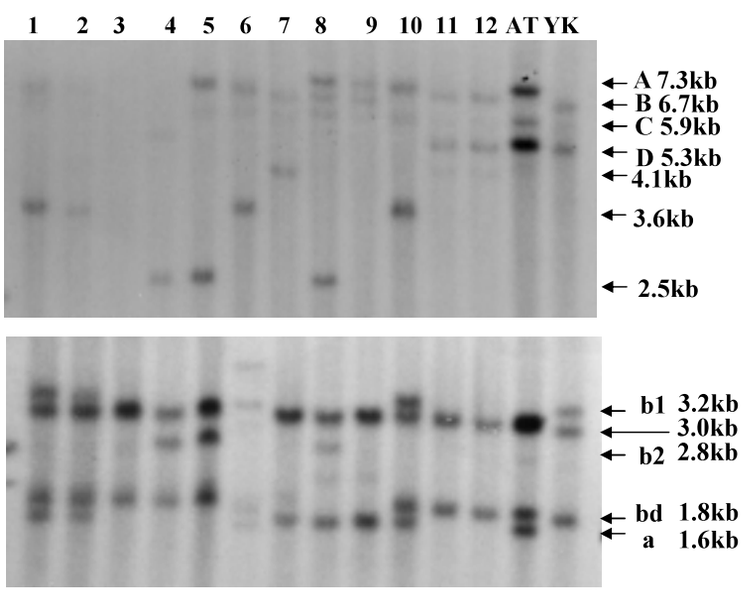


図２－12　PAL cDNA をプローブに用いた導入中国種（枕 Cn）の RFLP パターン
レーン1～12：枕 Cn 系統，AT:‘あさつゆ’，YK:‘やぶきた’
上：*Hin*dIII，下：*Eco*RV

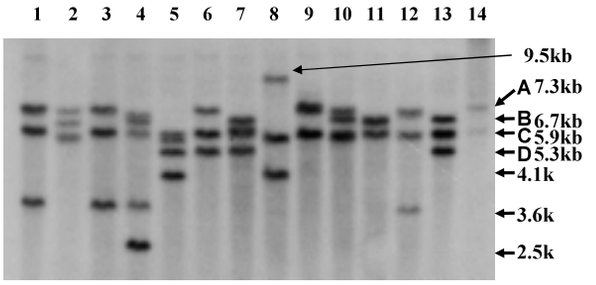


図２－13　PAL cDNA をプローブに用いた導入中国種（宮 Ck，金 Cp，金 Cn）の RFLP パターン
1. 宮 Ck20，2. 金 Cp20，3. 金 Cp16，4. 金 Cp14，5. 金 Cp3，6. 金 Cp1，7. 金 Cn18，8. 金 Cn13，9. 金 Cn11，10. 金 Cn10，11. 金 Cn6，12. 金 Cn1，13.‘やぶきた’，14. Z1

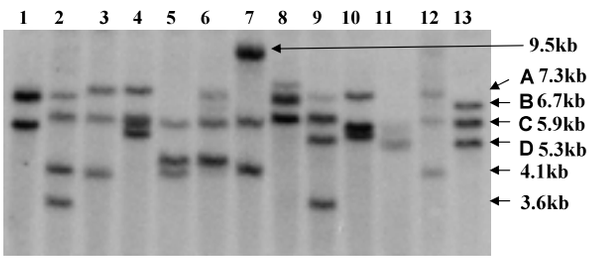


図２－14　PAL cDNA をプローブに用いた導入中国種（C，宮 Ck）の RFLP パターン
1. C15，2. C14，3. C13，4. C12，5. C11，6. C10，7. 宮 Ck41，8. 宮 Ck38，9. 宮 Ck34，10. 宮 Ck30，11. 宮 Ck28，12. 宮 Ck23，13.‘やぶきた’

3)　中国，インドにおける中国変種の PAL 遺伝的多様性

(1)　導入中国種の PAL 複対立遺伝子の検出

導入中国種中国江西省（枕 Cn）の RFLP パターンを図２－12 に示した．日本型の A ～ D の DNA 断片に加えて，韓国のチャで検出された 2.5kb（レーン4，5，8），3.6kb（レーン1，2，6，10），4.1kb（レーン7，11，12）の断片が Cn 系統の中でも検出された．*Hind*Ⅲ解析で 2.5kb の断片が検出された個体は，*Eco*RV 解析では b2 断片を，同様に 3.6kb の断片を有する個体は b1 断片を有した．これらは韓国のチャの PAL 複対立遺伝子である K2 と K3 と同じパターンを示した．さらにレーン 11 と 12 で見出された B 付近の断片を有する個体はいずれも *Eco*RV で b1 断片を有せず，K6 と同じパターンであり，レーン７の個体は 4.1kb と B 断片が検出されたことから K5 と判断された．金 Cn13（図２－13）と宮 Ck41（図２－14）は 9.5kb の断片と C 断片の K7 を有した．浙江省，祁門と湖北省由来のサンプルの中で金 Cp14は K2 を，宮 Ck34，金 Cp16，金 Cp14は K3 を有した（図２－13，図２－14）．また金 Cp3 と金 Cn13 の解析では 4.1kb の断片が検出されたが，A や B の断片は検出されなかったため，これらは韓国のチャで検出された K4 および K5 とは異なるアレルであると判断された．

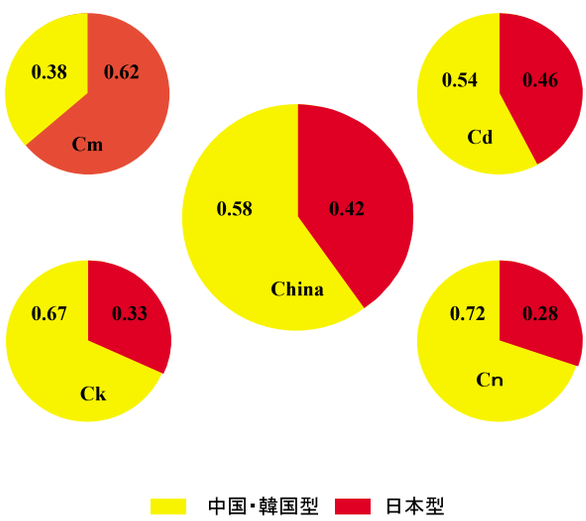


図２－15　中国，インドのチャ（*C. sinensis* var. *sinensis*）における PAL RFLP 多型解析に基づく中国・韓国型と日本型の遺伝子頻度
Cm: 安徽省東郷，Cd: インドダージリン，Ck: 安徽省祁門，Cn: 江西省，China は解析に用いたすべてを統合した結果

表２－７　中国，インドのチャ（*C.sinensis* var. *sinensis*）における PAL 遺伝子頻度

系統名	供試個体数	韓国型							日本型			不明	合計
		K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	A	B	D		
中国安徽省東郷県（枕Cm）	24	0.00	0.06	0.08	0.06	0.06	0.02	0.00	0.35	0.04	0.23	0.08	1.00
インドダージリン（枕Cd）	60	0.00	0.02	0.32	0.02	0.03	0.13	0.02	0.18	0.02	0.26	0.03	1.00
中国安徽省祁門（宮Ck,枕Ck）	51	0.00	0.04	0.15	0.04	0.05	0.33	0.04	0.19	0.03	0.11	0.03	1.00
中国江西省（金Cn,枕Cn）	34	0.00	0.09	0.15	0.01	0.01	0.38	0.00	0.09	0.10	0.09	0.07	1.00
中国湖南省安化（静Ca）	4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.75	0.00	0.00	0.25	1.00
中国浙江省（金Cp）	9	0.00	0.11	0.00	0.06	0.06	0.28	0.00	0.22	0.00	0.28	0.00	1.00
合計	182	0.00	0.05	0.18	0.03	0.04	0.22	0.02	0.20	0.04	0.18	0.05	1.00

金 Cp3（図２－13），C12（図２－14），宮 Ck30（図２－14）はそれぞれ C 断片が二つに分離し，断片の長さが微妙に異なる C 断片が検出された．また，湖北省のサンプル C11 と C10（図２－14）は 4.1kb の断片よりやや高分子側に DNA 断片が見出された．このような断片は，韓国の在来種の解析には見出されなかったパターンであり，中国のチャは PAL の遺伝的多様性に極めて富んでいた．

(2)　来歴別の PAL 遺伝子頻度の比較

安徽省東郷県（枕 Cm）の遺伝子頻度では，日本型の A (0.35)と D (0.23)が高く，次いで韓国型の K3(0.08)，同じ値（0.06）を示した K2，K4，K5であり，祁門（宮 Ck，枕 Ck）では，K6（0.33），A (0.19)，K3（0.15）で高い頻度を示した（表２－７）．江西省（金 Cn，枕 Cn）のチャ集団は最も高い頻度を示した PAL 複対立遺伝子は，K6(0.38)，K3(0.15)，ダージリン(枕 Cd)では，K3(0.32)，D (0.26)，A (0.18)であった（表２－７）．すべてのサンプルを統合した結果，K6(0.22)，A (0.20)，K3(0.18)，D (0.18)の 4 個のアレルで全体の約 80%を占めた（表２－７）．

(3)　日本型と韓国型の PAL 遺伝子頻度の比較

解析数が 24 以上の 4 集団について，日本型の A,B,D と韓国在来種で推定された各 PAL 遺伝子頻度を比較した（図２－15）．サンプル数は最も少ない 24 の安徽省東郷県では日本型が 0.62 で韓国型を上回ったが，祁門，江西省，ダージリンでは 0.33，0.28，0.46 といずれも下回り，すべてのサンプルを統合した結果，中国の導入中国種は 4 割程度が日本型と同じ PAL 複対立遺伝子を有した．日本型の中では A が 0.20，D が 0.18 と高く，B は 0.04 と低い出現頻度であった（表２－７）．

c　考　　察

解析したアッサム変種のサンプルは，その来歴が様々であるが，いずれも葉が大型であり，明らかに中国変種とは形態上の違いがある．PAL の RFLP パターンでは，サンプル間にマイナーな断片の有無の違いはあったものの，主要な断片は *Hind*Ⅲ解析では C 断片，*Eco*RV 解析では 3.0kb の断片であった．特に C 断片だけを有する系統が，異なる来歴をもつアッサム変種で見られたことは，アッサム変種の PAL の起源がこのタイプと考えられた．チャの起源は，アッサム変種と中国変種が別々に成立した二元説よりアッサム変種の一部が中国変種に変異し，分化したとする一元説が有力である(橋本ら，1978)．「アッサム」や Ace70 の RFLP パターンから検出された 4.1kb の断片は中国変種にも比較的高い割合で検出されている．またミャンマー・カチン州で採集されたアッサム変種の中には，*Eco*RV で 3.3kb（b1）が検出されており，導入中国種や日本の主要品種である‘やぶきた’も b1 断片を有している．これらの断片を有しながら形態的にはアッサム変種を示すチャの存在は，一元説を強く支持するとともに，これらのチャがアッサム変種から中国変種への分化途上のタイプの可能性を示唆した．一方で，matK の塩基配列を比較し，アッサム変種に属するミャンマーや中国南部のチャの塩基配列が近縁種の *C. taliensis* と *C. irrawadiensis* と相同性が高いことが明らかにされている（Katoh ら，2003）．本実験と Katoh らの結果からアッサム変種は，中国変種とは PAL の断片の相同性，近縁種とは matK の DNA 配列の相同性があり，これらはチャの起源や分化を考慮する上で重要な知見と考えられる．

日本の品種・在来種の PAL は，一遺伝子座に 3 個の複対立遺伝子で構成されているのに対し，韓国のチャではこの 3 個を含み，さらに少なくても 7 個の新たな複対立遺伝子が推定され，10 個以上の複対立遺伝子により構成されていた．韓国の 6 箇所の寺院に植栽されていたチャは，日本のチャに比較して極めて多様性に富んでいた．

RAPD 解析を用いた日本と韓国のチャの比較でも同様の結果が報告されている（Park ら，2002）．日本の緑茶 8 品種，台湾の 5 品種と韓国の 14 系統の RAPD 解析から，最も多様性に富んでいるのは韓国のチャ，次いで台湾，最後に日本の品種であり，日本の品種が多様性に乏しかった原因は，限られた遺伝資源を用い，しかも育種過程で強い選抜圧がかかったと考察している（Kaundun ら，2000）．また日本と韓国，それぞれ 25 と 23 個体のチャを用いた別の RAPD 解析からも同様に韓国のチャの多様性が報告されている（Lee ら，1995）．

本実験に用いた韓国のチャの形態的な特徴は，葉形が長く，細いものの，その変異の幅は，日本のチャの変異内に留まることが報告されている（池田ら，2002）．そのため，葉の形態を中国変種内の遺伝資源を識別する上での指標にすることは極めて難しいと言わざるを得ない．花器の形態は，系統間差があり，特に日本在来種と中国のチャとの違いについて，詳細な報告がある．チャの系統は，柱頭の長さが短く，葯に隠れるタイプ（S 型），葯と同じ高さになるタイプ（M 型）と逆に長さが長く，葯の外に飛び出し容易に柱頭を観察できるタイプ（L）型の 3 つに大別できる．柱頭と葯の相対的な高さは，変

種間や中国変種の中でも日本のチャと中国チャとでは異なることが知られている．アッサム変種や中国のチャの多くは，Ｌ型やＭ型が多く，日本のチャではＭ型とＳ型が多い（武田ら，1980）．実験に用いたアッサム変種の中で花器形態を観察できたチャはすべてがＬ型を示し，韓国のチャ（池田ら，2002），導入中国種，インドの系統も，ほとんどがＬ型を示し，日本のチャとは異なった．

一方，宝城郡会川面の茶園由来の12個体すべてのPAL複対立遺伝子はすべて日本型を示した．これらのチャは形態学的観察から，柱頭の高さは日本在来種に多くみられるＳ型であり，葉形は寺院のチャのような細長くはなく，丸みを帯びる特徴があった．成葉の長さ，成葉の幅，成葉の先端長，新葉の毛茸の分布，新葉の毛茸の長さと密度，花径，雌ずいの抽出度，雌ずいの分岐点の深さ，雌ずいのくびれの有無の９形質についてクラスター分析を用いた結果，宝城郡会川面茶園の集団は，6箇所の寺院のチャとは明らかに異なるグループで分類された．DNA多型だけでなく，形態学的な特徴から寺院のチャとは明らかに異なった（池田ら，2002）．

韓国のチャの起源に関しては，1世紀にインドから導入された記録と９世紀に中国から導入され，智異山に播種した記録が残されている（Choi，2000）．智異山に播種されたチャが，韓国における茶樹栽培の起源と考えられている一方で，固有種と渡来種説の両面から研究されている（木村，1993）．チャは仏教との繋がりが強く，「野生茶樹」として確認されている茶樹の地域は寺院の周辺に多く分布していることが特徴である（木村，1996）．近代になり，1910年から1945年にかけて日本からの移民が韓国の光州，井邑，宝城で茶園を開拓し（金，2000），また大量のチャの種子が熊本，京都，愛媛から韓国に導入された（木村，1996）．以上の歴史的な事実は，韓国には古い時代に中国よりチャが導入され，寺院で保存されたチャと近代になって日本から導入されたチャの大きく二つの異なる集団が存在することを物語っている．Lee らは，23系統の韓国のチャのRAPD分析から作成したクラスターでは３系統が日本のチャのグループに分類されたことを報告し，この原因を日本のチャの後代もしくは雑種であると推定している（Lee ら，1995）．また鳥屋尾は，アッサム変種10系統，中国変種27（日本在来種17，韓国２，中国６，インド・ダージリン2）系統とその他５（育成系統）系統について，花の大小，雌ずい抽出度，花柱分岐点，雌ずい基部のくびれの有無，子房の毛の６項目について，主成分分析を行った結果，韓国の２集団が日本在来種と導入中国種・アッサム雑種のグループに分かれたことを明らかにしている（鳥屋尾，1999）．今回のRFLP解析およびRAPD解析や形態学的な分析から，韓国には日本から導入されて茶園として残っているチャと中国から以前に導入されたチャの起源が異なる二つの系統のチャが存在するという結果は，歴史上の事実と照らし合わせると自然な結果であると考えられる．

６箇所の寺院のチャに出現する日本型のPAL複対立遺伝子（A，B，D）の割合は，最も高い値でも萬淵寺の0.29で全体の３分の１にも満たず，禅庵寺と香林寺では0.03,0.05と日本型の割合はほとんど見出せなかった．日本と韓国のチャは，同じ中国変種でありながら，形態的にもDNAの多型性でも非常に異なる集団と言える．両国のチャの起源を中国とすれば，中国から導入されたチャがそれぞれの環境に順応しつつ互いに影響を及ぼしあうことなく，独自の分化を遂げたと考えられた．

中国安徽省祁門（宮Ck,枕Ck）とインドダージリン（枕Cd）の集団では，日本型のＡ～Ｄと韓国型K2～K7と推定される９個のPAL複対立遺伝子が検出された．PAL複対立遺伝子は*Hin*dⅢと*Eco*RVでの解析で検出される断片の長さが決まっており，例えば*Hin*dⅢ解析で2.3kb（K1）や2.5kb（K2）の断片が検出された個体は，*Eco*RV解析ではb2断片が検出される．同様にＢ断片や3.6kb（K3）の断片を有する個体は，b1断片を有する．導入中国種およびインド在来種を用いた解析では二つの制限酵素を用いて，個々の植物体について遺伝子型を決定した．しかし供試個体の中には日本型と韓国型と合わせて10個に及ぶPAL複対立遺伝子以外の断片パターンを有する個体が見出された．これらの断片については遺伝様式やPAL cDNAの中で相同性の配列を有する場所が特定されておらず，またその頻度も高くなかったため，確固とした複対立遺伝子として同定できなかった．未同定の複対立遺伝子の存在は，その集団の遺伝的な多様性が高いことを示している．特にＣ断片の変異は，アッサム変種の*Hin*dⅢを用いたRFLP解析で生じる断片がＣ断片に集中し，一部はＣ断片付近で二本に分離可能な断片が見出されることから，中国変種とアッサム変種の分化を考える上で非常に重要である．中国のチャには，多数のPAL複対立遺伝子の存在が強く示唆され，韓国のチャよりも多様性に富んでいると推定された．

AFLP解析によりインドで保存してある49品種を評価した結果，これらの品種群はAssam，China，Cambodの３グループに分類でき，遺伝的多様性の比較にお

いては，Chinaが最も多様であることが報告されている（Balasaravanana ら，2003）．またアッサム変種でと推察される Assam（*Camellia assamica*）と，China（*Camellia sinensis*），Cambod（*Camellia assamica* subsp. *lasiocalyx*）タイプに属する29系統を用いてAFLP解析を行ったMishra らも同様の結果を得ている（Mishra ら，2004）．中国のチャの多様性は，前述した花器の形態の他に，生化学的手法を用いて解析される諸形質を指標に日本のチャと比較することにより明らかにされている．テルペン・インデックス（TI）は，チャ芽に含まれる代表的なモノ・テルペンアルコールである，リナロールとゲラニオールの成分比を指標化したものである．日本在来種から選抜された品種のTIは0.3から0.7の間に分布し，その主体は0.5付近に集中していたが，アッサム変種を除いた導入中国種では浙江省C3(TI=0.15)，C7(同0.10)からCk23(同0.90)まで多様な変異を示した(竹尾,2003)．さらに竹尾は，中国のチャの中でTIの値が日本のものと近似している集団として浙江省の杭州周辺のチャを挙げ，日本のチャが中国中央部沿岸から伝来した可能性を示している．武田（2001）は，導入中国種（Cp，Cm，Cd，Ck）のタンニンとカフェインの含有率がアッサム変種や日本在来種とは異なることを明らかにし，また二つの物質の含有率はアッサム変種，導入中国種，日本在来種の順に低下し，原産地が東進するにつれて低下する形質傾斜を認めている．

日本型のPAL遺伝子頻度では，韓国の寺院のチャでは0.16であったが，導入中国種では0.42であった．PALのマーカーからは，日本のチャは，韓国のチャよりも中国のチャの方がより近縁であると考えられた．テルペン・インデックスやタンニンとカフェイン含有率に，アッサム変種，中国と日本在来種で傾斜傾向があることを考えれば，導入中国種の集団内に日本型のPALが高い割合で含まれていることは理にかなった結果だと言える．導入中国種CpとCkがタンニン，カフェイン含有率が高く，これらの系統は葉や花器の形態学的な特徴からもアッサム変種に近いことが示されている（武田，2001）．本実験に使用したCkの日本型の遺伝子頻度は0.33であり，平均を下回っていたが，タンニン，カフェイン含有率がCpやCkよりも低く，日本在来種に近かったCnの日本型遺伝子の頻度は0.28と低かった．導入中国種間の詳細な識別にはさらなる検討が必要であるが，変種間等における比較で得られた結果は，これまでのAFLP解析や形態的な特徴，生化学的解析の結果と同じ結論が導き出された．PALの遺伝的な多様性は，チャの種分化と極めて密接に関係していることが明らかになった．換言すればDNA多型を用いてアッサム変種，導入中国種，韓国在来種の遺伝的な多様性を検出し，集団間の違いを明らかにする目的にはPAL遺伝子のRFLPは効果的であった．

Ⅳ　日本のチャ在来種の成立と緑茶用品種の分化の解明

1　日本在来種のPAL RFLP解析

日本には茶品種が普及する以前に栽培されていた在来種と里山を中心に人手を借りずに繁殖している「ヤマチャ」と呼ばれるチャがある．在来種は優良な品種の導入とともにその割合は，1978年には5割を，1998年には1割を切った（日本茶業中央会，2004年）．現在ではほとんどの茶は，品種のチャから生産されている．茶品種が最初に登録されたのは1953年であったが，緑茶用の品種はすべて日本各地の在来実生群から，形質の優れた個体を選抜したものであった．在来種の栽培は経営的な優位性は少ないものの，在来種の耐病性や早晩性などの個々の形質を評価すると貴重な育種素材であると言える．「ヤマチャ」はその名のとおり山に生えているために，以前より日本のチャが自生であることを示す「自生説」の主たる理由とされてきた（谷口，1935）．在来種とヤマチャとの間には生殖隔離がないばかりか，これらを分けるような明確な形態的な指標が見出せず，ヤマチャを根拠とする自生説には疑問が持たれている（松下，1999）．しかしながら，ヤマチャが日本のチャの遺伝資源の中でどのような位置づけになるかを客観的なデータをもって示した例は少ない．

育種は分類，評価された遺伝資源の中から優れた形質をもつ個体を交雑母本として選び，交雑し，目標とする形質を集積することである．したがって，育種の効率化のためにはこれまで用いられてきた育種素材の来歴や特性を明らかにすることが極めて重要である．中国から導入されたチャが日本で，どのようにして在来実生群を形成し，緑茶用品種へと分化したかを明らかにすることは育種を効率的に行う上で必要な情報である．また遺伝資源としてのヤマチャを考える上では，分類上のヤマチャの位置を明らかにする必要がある．中国，韓国，日本の在来種およびヤマチャについての形態学的な特徴に基づく分類・評価手法によって得られた結果は，不連続なデータとなりがちであるため，データの解釈に困難さがあった．日本と中国の在来種間の異同は，花器形態の違

表３－１　在来種の来歴と供試個体数

府県名	来歴の市町村名等	供試個体数 地点別	府県別	保存場所等
静岡	足久保	49	149	現地サンプリング
	梅地	50		現地サンプリング
	大久保	50		現地サンプリング
京都	宇治田原町南東所	7	98	金谷茶業研究拠点
	宇治田原町荒木東出	5		金谷茶業研究拠点
	宇治市宇治好楽	5		金谷茶業研究拠点
	宇治市宇治善法	5		金谷茶業研究拠点
	宇治市小倉久保	4		金谷茶業研究拠点
	宇治市木幡中村	7		金谷茶業研究拠点
	宇治市六地蔵紺屋	6		金谷茶業研究拠点
	宇治市六地蔵町並	4		金谷茶業研究拠点
	宇治市五ヶ庄	23		枕崎茶業研究拠点
	宇治市木幡	24		枕崎茶業研究拠点
	八幡市上津屋	3		枕崎茶業研究拠点
	和束町原山	5		枕崎茶業研究拠点
滋賀	大津市阪本	36	36	枕崎茶業研究拠点
徳島	上勝	36	36	現地サンプリング
※高知	槙山村	12	42	枕崎茶業研究拠点
	多野川村	8		枕崎茶業研究拠点
	本山村	4		枕崎茶業研究拠点
	富山村	2		枕崎茶業研究拠点
	鏡村	4		枕崎茶業研究拠点
	多野川村，多野川村，本山村，鏡村	12		枕崎茶業研究拠点
※福岡	宝珠山村大蔵	5	24	枕崎茶業研究拠点
	宝珠山村竹，釜割	8		枕崎茶業研究拠点
	小石原村鶴，湯ノ口	4		枕崎茶業研究拠点
	来歴不詳	2		枕崎茶業研究拠点
	甘木市高木黒川	1		枕崎茶業研究拠点
	甘木市上秋月栗河内	3		枕崎茶業研究拠点
	甘木市上秋月鮎返り	1		枕崎茶業研究拠点
佐賀	背振山霊仙寺	58	58	現地サンプリング
※長崎	平戸	8	8	枕崎茶業研究拠点
※熊本	五木村桧平	2	13	枕崎茶業研究拠点
	五木村大薮	2		枕崎茶業研究拠点
	五木村坂下	1		枕崎茶業研究拠点
	五木村椿下	3		枕崎茶業研究拠点
	椎原村	1		枕崎茶業研究拠点
	仁田尾村下屋敷	1		枕崎茶業研究拠点
	泉村せんだん轟	3		枕崎茶業研究拠点
※大分	中津江村竹原峠	1	15	枕崎茶業研究拠点
	因美村井上	1		枕崎茶業研究拠点
	因美村曽河内	2		枕崎茶業研究拠点
	小野市村落水	4		枕崎茶業研究拠点
	白山村久部	7		枕崎茶業研究拠点
宮崎	日ノ影町	6	21	枕崎茶業研究拠点
	諸塚村家代	8		枕崎茶業研究拠点
	三カ所村内ノ口	3		枕崎茶業研究拠点
	東米良村小椎葉	1		枕崎茶業研究拠点
	東米良村奥畑	1		枕崎茶業研究拠点
	東米良村上揚土尾	2		枕崎茶業研究拠点
※鹿児島	鹿児島ヤマチャ	1	1	枕崎茶業研究拠点
合計		501	501	

※ヤマチャを示す

い（鳥屋尾，1999）やテルペン・インデックス（竹尾，2003）に特徴があることが報告されているものの，日本在来種とヤマチャの異同を示すような指標は報告されていない．そこで在来種およびヤマチャを PAL cDNA による RFLP 解析により遺伝子型を決定し，遺伝的な多様性を明らかにした．さらに中国や韓国のチャとの比較や

表３－２　チャ在来種における採集府県別の PAL 複対立遺伝子別個体数および遺伝子頻度

採集地	供試個体数	PAL複対立遺伝子マーカー別個体数										遺伝子頻度				
		AA	AB	AD	BB	BD	DD	AK4※1	DK4	AK6※2	DK6	A	B	D	K4	K6
静岡	149	70	8	50	1	17	1	2	0	0	0	0.67	0.09	0.23	0.01	0.00
京都	98	39	11	23	0	4	8	10	2	0	1	0.62	0.08	0.23	0.06	0.01
滋賀	36	9	5	11	0	0	1	8	2	0	0	0.58	0.07	0.21	0.14	0.00
徳島	36	19	0	10	0	1	6	0	0	0	0	0.67	0.01	0.32	0.00	0.00
佐賀	58	26	4	17	1	3	4	3	0	0	0	0.66	0.08	0.24	0.03	0.00
宮崎	21	13	1	3	0	1	2	0	1	0	0	0.71	0.05	0.21	0.02	0.00
合計	398	176	29	114	2	26	22	23	5	0	1	0.65	0.07	0.24	0.04	0.00

※1 ＡＫ４，ＤＫ４：Ｋ４をもち，片方のアレルはＡまたはＤである個体
※2 ＡＫ６，ＤＫ６：Ｋ６をもち，片方のアレルはＡまたはＤである個体

在来種とヤマチャの比較により，在来種の成立およびヤマチャについて考察を行った．

a　材料および方法

供試材料の来歴と個体数を表３－１ に示した．現地で採集を行った地方在来種は，静岡県静岡市の３地点(足久保，梅地，大久保)，佐賀県背振山霊仙寺と徳島県上勝町であった．京都，滋賀の供試材料は野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点，高知，福岡，長崎，熊本，大分，宮崎，鹿児島の供試材料は同枕崎茶業研究拠点で保存されている遺伝資源を用いた．また高知，福岡，長崎，熊本，大分，鹿児島のサンプルはヤマチャであった．採集から DNA 抽出までの間，静岡，佐賀のサンプルは－30℃で保存し，これら以外についてはエタノール中に保存した．凍結葉またはエタノール保存葉からⅡ.2.a.1）に記載した方法により DNA を抽出した． DNA 15 μg を *Hin*dⅢ，*Eco*RV により処理し，エタノール沈殿によりバッファーを交換した後，0.8%アガロースゲル電気泳動により DNA をサイズ別に分画した．次にナイロンメンブレン「ハイボンドＮ＋」(アマシャム・ファルマシア）に分画した DNA を写し取り，ハイブリダイゼーションのメンブレンとした． PAL cDNA の標識には ^{32}PdCTP とフルオレセン（ジーンイメージ，アマシャム・ファルマシア）の二つの方法を用いた．ハイブリダイゼーションと洗浄の条件および α-^{32}P dCTP をプローブに用いた場合の検出操作はⅡ.2.a.1）に記載した方法と同様であった．フルオレセン標識をプローブに用いた場合は，検出キットに添付されたマニュアルにしたがって検出操作を行い，プローブとハイブリダイズした DNA 断片を X 線フィルム上に検出した．検出された DNA 断片パターンから PAL 複対立遺伝子を特定した．各産地および在来種とヤマチャの違いを比較するため，遺伝子頻度を算出した．

b　結　　果

1)　在来種（静岡，京都，滋賀，徳島，佐賀，宮崎）の RFLP 解析と遺伝子頻度の比較

供試材料についての PAL 複対立遺伝子別の検出個体数と頻度を表３－２ に示した．静岡市で採集したチャ合計 149 個体の中では， AA 型が 70 個， AD 型が 50 個体であり，この二つの遺伝子型で８割以上の個体数を占

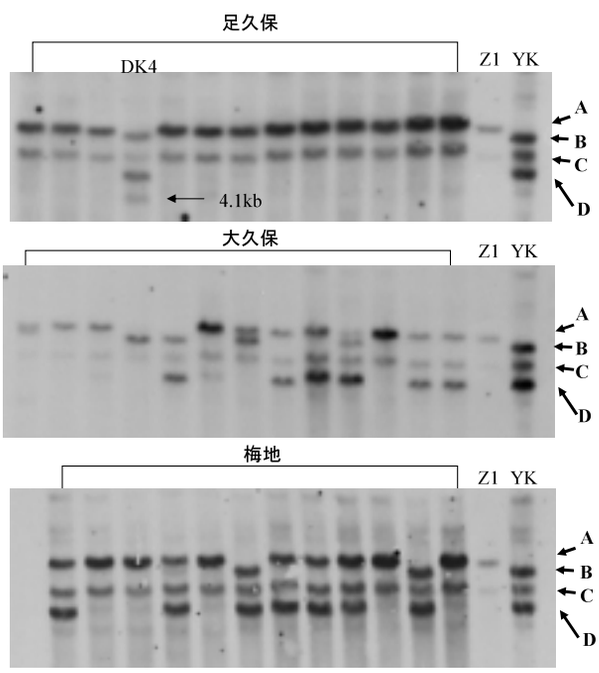


図３－１　静岡市周辺の在来茶園のチャの PAL cDNA を用いた RFLP パターン
制限酵素： *Hin*d Ⅲ， YK ：やぶきた， Z1：系統名「Z1」，足久保のサンプルに見出された中国・韓国型 PAL 複対立遺伝子 K4型（検出された片方のアレルはＤ であったため「ＤＫ4」と表記した）

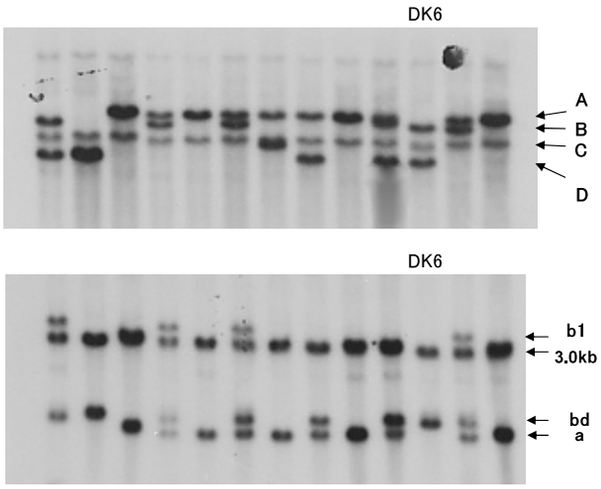


図３－２　京都の在来種のチャの PAL cDNA を用いた RFLP 解析のパターン

上：*Hin*d Ⅲ，下：*Eco*RV，K6はＢ断片（上）を有し，b1 断片（下）をもたないため，日本型の「B」とは区別し，「K6」とした.（検出された片方のアレルはＤ であったため「Ｄ K6」と表記した）

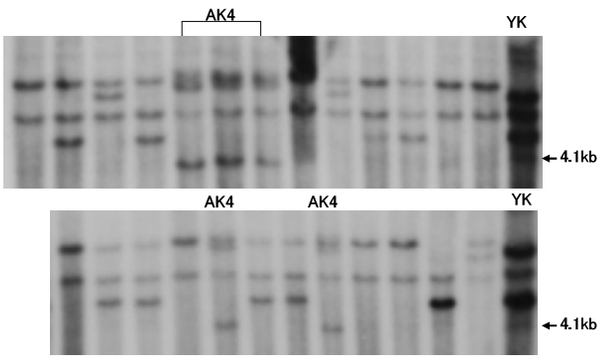


図３－３　滋賀の在来種のチャの PAL cDNA を用いた RFLP パターン

制限酵素：*Hin*dⅢ，YK ：やぶきた（BD），検出された片方のアレルはいずれも A であったため「AK4」と表記した.

めた．また 4.1kb の断片を有するチャも検出された（図３－１）．次に京都と滋賀の在来種では，AA 型がそれぞれ 39 と 9 個，AD 型が 23 と 11 個で，AA 型と AD 型を合計するといずれも 6 割程度であり，静岡のチャに比べると低かった．B と D 遺伝子頻度は他の地域に比べて同程度であったが，A の頻度は京都が 0.62，滋賀が 0.58 と少なかった．京都の在来種の中には，*Hin*dⅢではＢ断片をもち，*Eco*RV ではｂ1 断片をもたない K6 型を示すチャが 1 個体見つかった（図３－２）．また中国や韓国の在来種で高い割合で検出される K4型をもつチャがそれぞれ 12 と 10 個と多く，この頻度は 0.06 と 0.14 であり，特に滋賀の在来種に高頻度で現れることが特徴的であった（図３－３）．徳島の在来種では，AB と BB 型に該当するチャがなく，BD 型が1個体のみであったため，B 頻度が 0.01 と他に比べて極端に少なかった．佐賀在来種の頻度は，A （0.66），B （0.08），D （0.24），K4 （0.03）であり，この値は 398 個体のすべての在来種のデータを統合した値 A （0.65），B （0.07），D （0.24），K4（0.04）とほぼ同じであった．供試した佐賀在来種は PAL の遺伝子頻度を平均的に有する集団と考えられた．宮崎の在来種では，A （0.71），B （0.05），D （0.21），K4（0.02）であり，他の地域と比較して A の比率が高かった．これは，宮崎の供試個体は 21 個体と少なく 1 個体当りの値が遺伝子頻度に寄与する割合が大きく，変動しやすかったためと考えられた．以上のとおり，いずれの地域でも A の頻度が一番大きく，その値は 0.58～0.71 であり，次いで D の 0.21～0.32 であった．滋賀の在来種では中国・韓国型の K4 が B を上回ったものの，他の地域では B が第 3 番目に多い頻度で 0.01～0.09 であった．K4 型は徳島の在来種では見出されなかったが，他の地域では少ない頻度で検出された．また K6 型は京都で 1 個体のみが見つかり，その頻度は最も少なかった．PAL 複対立遺伝子の頻度

表３－３　ヤマチャの供試個体数，PAL 複対立遺伝子型別個体数，遺伝子頻度

採集地	供試個体数	PAL複対立遺伝子マーカー別個体数										遺伝子頻度				
		AA	AB	AD	BB	BD	DD	AK4※1	DK4	AK6※2	DK6	A	B	D	K4	K6
高知	42	24	6	4	1	1	2	0	2	2	0	0.71	0.11	0.13	0.02	0.02
福岡	24	7	1	10	0	1	0	3	2	0	0	0.58	0.04	0.27	0.10	0.00
長崎	8	3	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0.69	0.00	0.31	0.00	0.00
大分	15	10	0	2	0	1	1	1	0	0	0	0.77	0.03	0.17	0.03	0.00
熊本	13	6	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0.73	0.08	0.19	0.00	0.00
鹿児島	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
合計	103	51	9	26	1	3	3	4	4	2	0	0.69	0.07	0.19	0.04	0.01

※1 ＡＫ４，ＤＫ４：Ｋ４をもち，片方のアレルはＡまたはＤである個体
※2 ＡＫ６，ＤＫ６：Ｋ６をもち，片方のアレルはＡまたはＤである個体

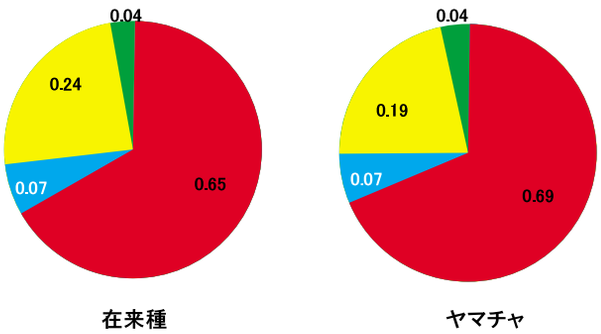


図３－４　在来種とヤマチャの PAL 遺伝子頻度の比較

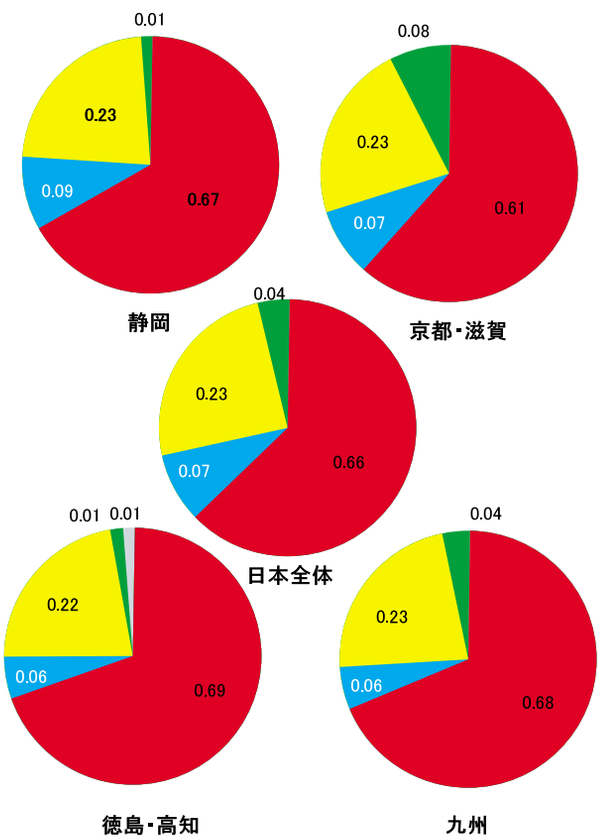


図３－５　日本各地地域の在来種の PAL 遺伝子頻度の比較

分布は，京都と滋賀のチャで中国・韓国型の頻度が若干高かったものの，静岡，京都・滋賀，徳島・高知，九州ともにほぼ同様の傾向を示した．このため，PAL の遺伝的な多様性からは，日本在来種は地域間差に乏しい集団であった．

2）ヤマチャ（高知，福岡，長崎，熊本，大分，鹿児島）の RFLP 解析と遺伝子頻度

高知のヤマチャでは，B 型の頻度が 0.11 と他より高く，D 型の頻度が 0.13 と低く，K6 型をもつ個体が検出されるなど，やや特異的な傾向を示した（表３－３）．九州各県で採集されたヤマチャはいずれも個体数が少なく頻度分布に偏りが生じたものの，鹿児島を除くと，A 型が 6～8 割で最も頻度が高く，次いで D 型が 1～3 割，残る B 型もしくは中国・韓国型を合わせて 0～1 割程度となる傾向はほぼ共通していた．

在来種 398 個体とヤマチャ 103 個体について，遺伝子頻度を比較した．在来種の A，B，D，K4 型のそれぞれの頻度は 0.65，0.07，0.24，0.04 であり，ヤマチャの頻度は 0.69，0.07，0.19，0.04 であった(図３－４)．在来種とヤマチャの間においては B と K4 型の頻度が同じであり，A と D 型の差もわずかであった．このように二つの集団間で PAL 遺伝子頻度の差異はほとんど見出せなかった．

在来種とヤマチャ間で頻度分布に大きな差異がなかったため，これらは同一の起源の集団と考えられた．供試個体数が少ないことによる頻度分布の偏りを小さくするため，在来種を４地域（静岡，京都・滋賀，徳島・高知，九州）に分けて遺伝子頻度を比較した．京都・滋賀の在来種は，他に比べて A 型の頻度が 0.61 と低く，K4 型が 0.08 と高かった．しかしながら，日本型の遺伝子頻度は A，B，D 型で，それぞれ 0.61～0.69，0.06～0.09，0.22～0.23 とほぼ同じ値を示した（図３－５）．以上のことから，在来種とヤマチャの間に集団を分けるような頻度分布の違いはなく，また地域間差も小さいことが明らかになり，ヤマチャを含めた日本在来種は遺伝的に均一な集団であった．

C　考　　察

1）在来種（静岡，京都，滋賀，徳島，佐賀，宮崎）の PAL 遺伝子頻度の比較と多様性

供試した 1 府 5 県の合計 398 個の在来チャの PAL 複対立遺伝子 A，B，D の頻度の合計は，0.96 であり，在来種のほとんどはこの 3 個の組み合わせで生じる 6 グループに分類された．導入中国種および韓国在来種の解析では，日本型の A，B，D の 3 個を含めて少なくても 10 個の複対立遺伝子を推定した．複対立遺伝子数の違いは，変異の幅に強く影響する．一座当り 3 個のアリルでは 6 個の組み合わせしかないが，10 個のアリルでは理論的には 55 個もの組み合わせが可能である．

日本在来種の頻度はＡとＤに極端に偏っており，Ａの頻度は0.65であるので，ＡＡ型の個体出現率は理論的には0.4225となり，在来種の４割以上はＡＡ型となる．各地のＡＡ型の頻度は，静岡（0.46），京都・滋賀（0.36），徳島・佐賀・宮崎（0.50）となり，ほぼ予想された値であった．さらにＡとＤ型の頻度の合計は0.89となり，約９割はＡとＤ型のみの遺伝子型で構成されていた．アリルの数と頻度の解析から中国や韓国の在来種に比較して，日本在来種は遺伝的な多様性に乏しいことが明らかとなった．

京都・滋賀のチャでは中国・韓国のチャに比較的高い割合で見出されるK4型の頻度が高かった．チャは分類の指標となる形態的な特徴に乏しいが，柱頭の長さと形は集団の特異性が高い．日本在来種は柱頭が短く雄蕊に隠れて見えない花の構造であるＳ型が多いのに対して，アッサム変種や中国在来種などは雌蕊が雄蕊より長く，飛び出る花の構造をもつＬ型が多い．京都，奈良の近畿の在来茶園からはＬ型のチャが他の地域に比べて高い頻度で見つかり，中国からの導入種に直接関わるものと推定されている（鳥屋尾ら，1996；鳥屋尾，1999）．近畿地域のチャは，雌蕊の長さとPALの多型でも中国在来種に類似したチャの頻度が高いことが裏付けられた．宇治の在来種など茶栽培の歴史が長い茶産地にはＬ型の花をもつチャが比較的高い割合で見つかることが報告されている（山口ら，1996）．中国から日本にチャが導入され早期に形成された茶園では，花柱のＬ型やPALのK4型をもつチャが低頻度ながら集団内に維持されていたと考えられる．このような集団から日本各地にチャが広がる過程で，遺伝子頻度の少ない形質や多型は，淘汰される機会が多かったのではなかろうか．その後造られた茶園ではＬ型やK4型の頻度に低下したと推定された．K4型の頻度の違いはあるものの，日本各地の在来種では総じてＡの頻度が非常に高く，次にＤであり，Ｂが最も少ない傾向は変わらなかった．中国から導入されたチャは，中国在来種がもつ遺伝変異に比べるとわずかな変異しか持たない集団であり，日本各地に広がる際に選択圧に関係の薄い形質や多型は淘汰されて，各地の在来種を形成したと推定された．

2）PAL遺伝子頻度比較に基づくヤマチャの来歴の推定

ヤマチャと在来種のPAL複対立遺伝子の各頻度は大差なかった．橋本らは，成葉の形態のクラスター分析から，中国在来種と徳島・高知，九州のヤマチャとは類似性が高く，ヤマチャを在来種からのエスケープであると推定している（橋本ら，1978）．鳥屋尾らは，樹高，株張り，葉の大小の変異についてヤマチャと在来種との間に大きな差は認められなかったが，Ｌ型が全く出現しない集団が一部のヤマチャ地帯に典型的に認められることから，ヤマチャと在来種とは起源が異なる可能性を示唆している（鳥屋尾ら1996）．一方で研究材料に供試するヤマチャが異なると，在来種とヤマチャの集団を区別できないこともまた報告している（鳥屋尾，1999）．この相反する事象はヤマチャと在来種をどのように区別するかが非常に難しいことを示す一端ではないだろうか．形態学的な観察やそれに基づくクラスター分析による結果（鳥屋尾，1999）とPAL複対立遺伝子の頻度比較の結果は，在来種とヤマチャは識別できない集団であるという点で一致している．

ヤマチャは栽培されている植物ではないために，日本固有の植物であるとの報告がなされ，日本のチャの起源と位置付けられることも少なくなかった．松下（1999）は，日本全国のヤマチャを詳細に現地調査した報告の中で，ヤマチャが日本固有の種である可能性を事実上否定している．それは“ヤマチャの古木が見出せない”，“ヤマチャの生育するところには焼畑農耕文化が一体となっている”，“日本の照葉樹林地域にヤマチャを見ることができない”，“ヤマチャを見ることができるのは一次林以外の地である”等の理由のようにヤマチャの存在が人為的な関与によってのみ成立し，純自然状態にはないためである．

PAL以外のDNA多型による研究では，宇田川ら（2001）がRAPD解析により検出された多型性から，ヤマチャと日本の栽培系統に遺伝的背景の違いはなく，ヤマチャは日本固有の系統として独自の発展を遂げたものではないことを報告している．

葉形と花器形態や本研究で得られたDNA多型による解析結果からヤマチャと在来種は起源を同じにする集団であり，ヤマチャは在来種からのエスケープであることが強く示唆された．

２　PAL遺伝子型に基づく日本の茶品種の分類

日本で育成された茶品種は，紅茶と緑茶に二大別される．煎茶を中心とする緑茶の育種では，まず在来種から優れた形質を有する系統が選抜され，次に‘やぶきた’を主とする品種を交雑母本にする育種が展開されるなど，国内の遺伝資源の活用による育種であった．他方，紅茶用品種を育成する素材には日本在来種および緑茶用品種は適さない．紅茶の独特の香りと水色は，収穫後の茶葉

を萎凋し発酵させることにより得られる．アッサム変種やアッサム雑種を由来とする種が紅茶に適する形質を有しているものの，耐寒性に乏しく，日本の栽培環境には適していない．そのため，紅茶用品種を育成するためには，アッサム雑種および中国在来種と耐寒性を有する日本在来種の間で交雑と選抜が行われた．紅茶用品種育成は海外の遺伝資源の活用なしにはありえず，多田元吉などによって遺伝資源の海外探索が早期から取り組まれてきた（川口，1989）．日本の紅茶および緑茶用品種の成立や品種分化の過程を，文献上の記載を参照する以外には客観的に判断できる形質やマーカーは少ない．特定の品種の特性が来歴と一致しない場合や交雑組み合わせに疑問が持たれる場合などの判断には，現状ではDNAマーカーによる解析が最も適している．そこで，日本の紅茶と緑茶用品種のPAL複対立遺伝子を解析し，品種分化を解明するとともに，登録されている交雑来歴に疑問がもたれている品種について考察を行った．

a　材料および方法

日本在来種から選抜された品種である‘みよし’，‘きょうみどり’，‘さみどり’，‘あさひ’，‘ごこう’，‘こまかげ’，‘ひめみどり’，‘うじひかり’，‘さやまみどり’，‘たかちほ’，‘うじみどり’，‘まきのはらわせ’，‘こやにし’，‘ろくろう’，‘やえほ’，‘やまとみどり’の16品種と，交雑により育成された品種である‘ふくみどり’，‘するがわせ’，‘とよか’，‘おくむさし’，‘うんかい’，‘りょうふう’，‘くらさわ’，‘おおいわせ’，‘やまかい’，‘ゆたかみどり’，‘おくみどり’，‘おくひかり’，導入中国種から選抜された‘やまなみ’，アッサム雑種から選抜された‘ほうりょく’および来歴不詳の‘ふじみどり’の15品種，合計31品種を供試した．また日本で育成された紅茶用品種の解析では，表３－４に記載した来歴の品種を用いた．以上の品種について，PAL cDNAをプローブとするRFLP解析を通じて遺伝子型を検出した．なお‘やぶきた’とアッサム変種の一系統「アッサム」を対照として加えた．

DNA抽出方法，制限酵素処理，PAL cDNA全領域の標識，ハイブリダイゼーションおよび洗浄・検出などRFLP解析の手法は，Ⅱ.2.a.1）に記載した手順と同様であった．

b　結　　果

1）日本型のPAL複対立遺伝子をもつ緑茶用品種の分類

供試した31品種の中で，日本型のPAL複対立遺伝子が検出された品種の結果を，Ⅱ.2.2）で用いた13品種・系統を含めて表３－５にまとめて記載した．海外のチャを交雑親に用いて育成された品種や日本在来種からの選抜および交雑であっても多型解析の結果，中国・韓国型の多型を生じた品種は表３－６に示した．17品種が日本型のPAL複対立遺伝子のみを有する品種であった（図

表３－４　日本で育成された紅茶用品種および育成系統における推定されたPAL複対立遺伝子型と来歴

品種名	PAL複対立遺伝子型		来　　歴
べにほまれ	D	K7	インドから導入した実生
べにふじ	D	K7	べにほまれ×C19
べにたちわせ	A	K7	Ai2×NkaO1
静-印雑131	A	K7	
べにかおり	D	K2	Ai21×NkaO3
あかね	A	K2	Ai21×NkaO3
さつまべに	A	K6	NkaO3×Ai18
ただにしき	D	K3	多田系印雑の実生
A10	A	K3	育成系統
いんど	K5	K5	インド雑種実生
はつもみじ	K5	※1不明	Ai2×はつみどり
からべに	A	K4	湖北省種の実生
べにつくば	D	K7	茨城県在来系統選抜
べにひかり	D	K3	べにかおり×Cn1
いずみ	D	D	べにほまれ実生

※1 不明は、アッサム変種に検出されるC断片を有する複対立遺伝子と推定される．

表３－５　PAL遺伝子型に基づく日本の緑茶用品種の分類

PAL遺伝子型	緑茶用品種及び系統名
AA	みよし,たまみどり,きょうみどり,さみどり,あさひ,ごこう，こまかげ，ひめみどり，くりたわせ，うじひかり，Z1
AB	さやまみどり，たかちほ，かなやみどり，ふうしゅん
AD	あさつゆ，うじみどり，しゅんめい，まきのはらわせ，ふくみどり，めいりょく
BD	やぶきた，するがわせ，さやまかおり，とよか，さえみどり
DD	こやにし，ろくろう，なつみどり，あさぎり

下線部は‘やぶきた’交雑種

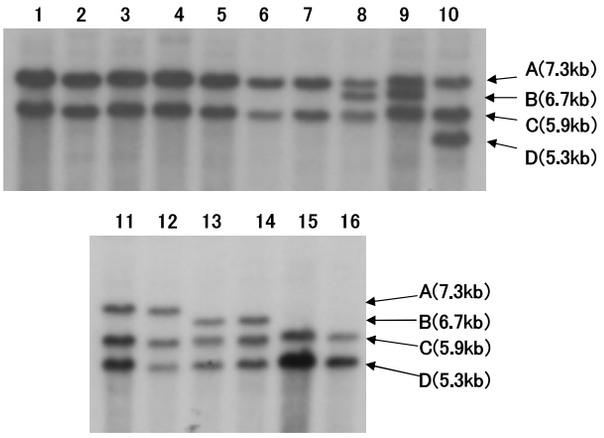


図３－６　PAL cNDA をプローブに用いた日本の緑茶用品種の RFLP パターン

1: きょうみどり，2: さみどり，3: あさひ，4: ごこう，5: こまかげ，6: ひめみどり，7: うじひかり，8: たかちほ，9: さやまみどり，10: うじみどり，11: ふくみどり，12: まきのはらわせ，13: するがわせ，14: とよか，15: こやにし，16: ろくろう

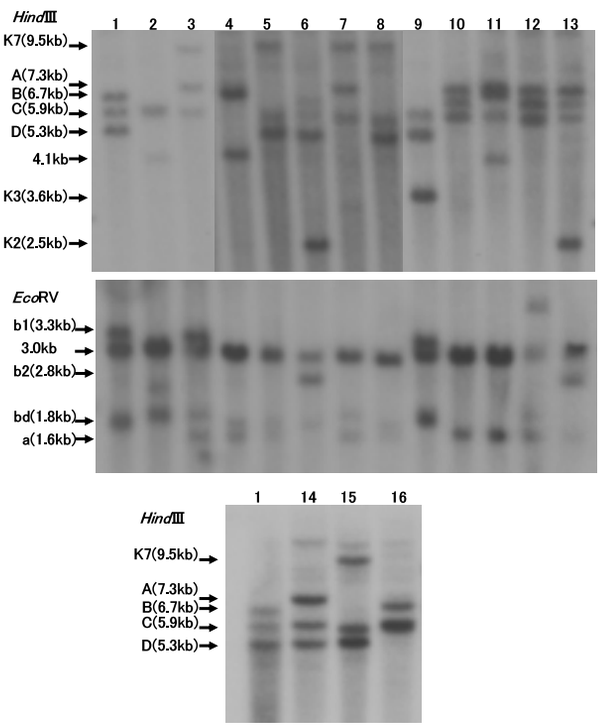


図３－７　日本で育成された紅茶用品種および親系統の DNA を *Hind*Ⅲ，*Eco*RV で消化後，PAL cDNA をプローブに用いて検出された RFLP パターン

1: やぶきた（BD），2: アッサム雑種，3: 静印雑131，4: いんど，5: べにつくば，6: べにかおり，7: べにたちわせ，8: べにふじ，9: べにひかり，10: さつまべに，11: からべに，12: ただにしき，13: あかね，14: まきのはらわせ（AD），15: べにほまれ，16: はつもみじ

３－６，表３－４）．AA 型には，Ⅱ.2.2).で検出された‘たまみどり’，‘くりたわせ’，Z1の他に‘みよし’（データ略），‘きょうみどり’，‘さみどり’，‘あさひ’，‘ごこう’，‘こまかげ’，‘ひめみどり’，‘うじひかり’の合計 11 の品種・系統が含まれた．‘たまみどり’の実生である Z1 を除く 10 品種の来歴は，8 品種が宇治・京都在来種由来，1 品種ずつが静岡と福岡の在来種由来であった．また AA 型以外のグループでは属する品種数が 4～6 であるのに対して AA 型は 11 と最も品種数が多く，しかも 1953～1954 年にかけて登録された古い品種数は 8 にも上った．AB 型には，‘かなやみどり’，‘ふうしゅん’の他に宇治と宮崎在来種由来の‘さやまみどり’，‘たかちほ’が含まれた．AD 型には，‘あさつゆ’，‘めいりょく’，‘しゅんめい’，‘まきのはらわせ’他に，宇治在来種由来の‘うじみどり’と‘やぶきた’の後代である‘ふくみどり’が含まれた．BD 型には，‘やぶきた’，‘さやまかおり’，‘さえみどり’の他に，‘するがわせ’と‘とよか’が含まれた．BD 型に属する品種は‘やぶきた’と‘やぶきた’後代であった．DD 型には，‘あさぎり’，‘なつみどり’の他に，宇治と静岡の在来種由来の‘こやにし’，‘ろくろう’が含まれた．また BB 型に属する品種・系統は，供試した中に該当する品種はなかった．

‘やまとみどり’をはじめとする残りの 14 品種につ

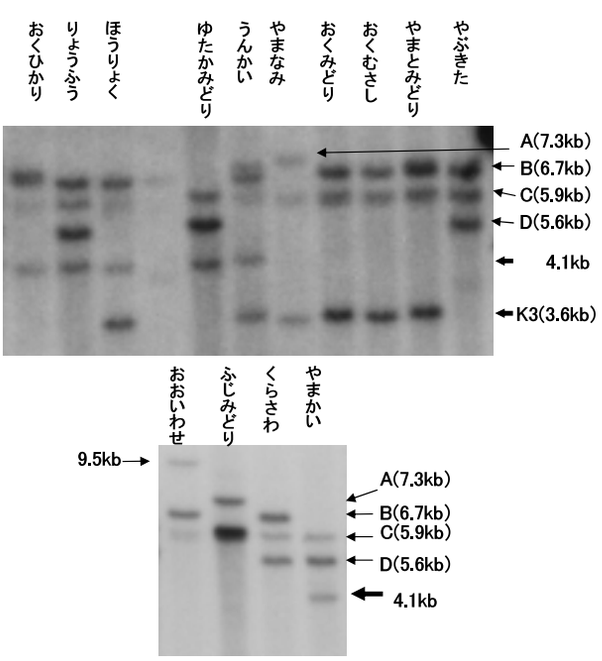


図３－８　中国・韓国型 PAL 複対立遺伝子およびアッサム変種に特異的に検出断片を有する日本の緑茶用品種

表３－６　中国・韓国型 PAL 複対立遺伝子を有する日本の緑茶用品種と来歴

品種名	PAL	複対立遺伝子	来　歴
やまとみどり	B	K3	奈良県在来実生選抜
おくむさし	B	K3	さやまみどり×やまとみどり
おくみどり	B	K3	やぶきた×静在16
やまなみ	A	K3	中国湖北省導入実生選抜
うんかい	K3	K4	たかちほ×宮F_1-9-4-48
ほうりょく	K3	K5	アッサム雑種選抜
りょうふう	B	K5	ほうりょく×やぶきた
おくひかり	B	K4	やぶきた×静Cy 225(中国羊楼洞導入種)
くらさわ	D	K6	やぶきた実生選抜
やえほ	A	K7	静岡県在来実生選抜
おおいわせ	B	K7	やえほ×やぶきた
やまかい	D	※1不明	やぶきた実生選抜
ゆたかみどり	D	※1不明	あさつゆ実生選抜
おくゆたか	B	※1不明	ゆたかみどり×F_1NN8（たまみどり×S6）
ふじみどり	A	※2不明	不明（静岡県試験実生群）

※1 不明は、4.1kbを有する複対立遺伝子.
※2 不明は、アッサム変種に検出されるC断片を有する複対立遺伝子と推定される.

いては，中国・韓国型の PAL 複対立遺伝子が検出されたので，さらに詳細に検討した.

2)　紅茶用品種の PAL 複対立遺伝子の解析

‘べにほまれ’とその交雑後代である‘べにふじ’からは D と K7 が検出された（図３－７，表３－５）．また‘べにたちわせ’，静印雑 131 と‘べにつくば’も K7 を有していた.‘べにかおり’と‘あかね’は同じ両親から育成された品種であるが，*Hin*dⅢでは 2.5kb，*Eco*RV では b2 断片をもつ K2 をそれぞれ有していた.‘べにかおり’の後代である‘べにひかり’は，D と K3 型を示し，‘べにかおり’から D 型が遺伝したと考えられた．K6が検出された品種として多田系雑種である‘ただにしき’と‘さつまべに’があった.‘いんど’はＢ断片と 4.1kb の断片のみを有し，C 断片が検出されなかった．そのため K5 のホモ型と推定したが，*Eco*RV では a 断片が検出されたため，K5 のホモ型かどうかの判断が困難であった．また‘はつもみじ’にも K5 が検出されたが，もう１個のアレルは判断できなかった.‘いずみ’（データ略）は種子親である‘べにほまれ’からと来歴不詳の花粉親からそれぞれ D 型を遺伝された DD 型であった．紅茶用品種は，日本と海外のチャとの交雑により育成されている．紅茶用品種の PAL 複対立遺伝子は，その大部分が日本型と中国・韓国型で構成されていることが明らかになった.

3)　中国・韓国型の PAL 複対立遺伝子を有する日本の緑茶用品種の解析

日本の緑茶用品種の中で，中国・韓国型の PAL 複対立遺伝子を有する品種のパターンを図３－８ に，来歴を含めた結果を表３－６ に示した.‘やまとみどり’および‘やまとみどり’の後代である‘おくむさし’と‘おくみどり’，‘やまなみ’，‘うんかい’，‘ほうりょく’６品種が K3 を有した.‘うんかい’，‘ほうりょく’および‘ほうりょく’と‘やぶきた’の後代である‘りょうふう’，‘やぶきた’の後代である‘おくひかり’と‘やまかい’，‘あさつゆ’の自殖といわれる‘ゆたかみどり’からは 4.1kb の断片が検出された．静岡在来実生由来の‘やえほ’とその後代‘おおいわせ’は K7 を有した．来歴が不詳の‘ふじみどり’は，A 型を有することは明らかであったが，C 断片が他の品種に比べて濃く検出された．そのためアッサム変種に特異的に生じるアレルを有することが示唆された．これらの品種の中には，‘やまとみどり’や‘おくみどり’のように日本在来種からの選抜および日本の品種・系統間での交雑後代とされてきたものの，明らかに中国・韓国型の PAL 複対立遺伝子が検出された品種があった.

c　考　　察

日本の緑茶用品種を PAL 複対立遺伝子によって分類した結果，遺伝子型によって特徴が生じた．AA 型は品種数が多く，比較的古い年代に在来種から選抜された集団であり，BB 型に該当する品種はなく，BD 型は‘やぶきた’と‘やぶきた’交雑種で占められていた．1953～1954 年にかけて在来種から品種が選抜された．これらの品種を用いて，解析を行った 19 品種の中で 8 品種は AA 型であった．AA 型品種の割合は約 4 割になり，在来種の中に生じる AA 型の割合とほぼ同等であった．また，B 型の頻度は 0.07 であり，BB 型が出現する確率は 200 個体に１個体にも満たない．そのため在来種から選抜された品種の数が 20 程度では，BB 型品種が存在しなかったことは，理に叶っていた．さらに唯一 BD 型を示した品種の‘やぶきた’はその優秀性から日本中の茶園を席巻し，育種親としても頻繁に使用されるようになった．交雑後代は，必ず B もしくは D 型をもつことになり，‘やぶきた’を交雑親に用いる体系からは AA 型の品種が作り出されることはなく，AA 型が激減し，BD 型の品種が増えることに繋がった．PAL RFLP 解析により，在来種の中から品種が選抜され，‘やぶきた’の遺伝子がその後の交雑種に受け継がれた過程を明らかにすることができた.

日本の紅茶は重要な作物の一つであったが，日本在来種だけでは紅茶として具備すべき特性を得ることをできず，アッサム雑種等との交雑が必要であった．特に日本で普及させるためには，耐寒性などを付与した日本の栽

培に向けての新しい品種の育成が重要であった．品種育成はアッサム雑種やその血を引く中国のチャと日本型のチャを交雑，選抜することにより行われた．PAL RFLP 解析の結果，日本の紅茶用品種の遺伝子型は一方を中国・韓国型あるいはアッサム変種に検出される C 型と日本型の A，B，D を有する遺伝子型の組み合わせであった．また，同じ交雑組み合わせの結果得られた‘べにかおり’と‘あかね’はともに特徴的な K2 型を有するとともに，‘べにほまれ’の交雑後代である‘べにふじ’，‘べにかおり’の後代の‘べにひかり’はともに‘べにほまれ’，‘べにかおり’の対立遺伝子を受け継いでいた．‘べにつくば’は茨城県真壁町から選抜された，唯一の日本在来種から選抜された紅茶用品種であるが，D と K7 型を有していた．K7 型が日本在来種の中には見出せないことや緑茶と紅茶とは品種特性が大きく異なり，紅茶に適した素材が日本在来種に存在することの可能性の低さを考慮すると，‘べにつくば’が日本在来種から選抜されたという来歴には疑問が持たれ，海外の遺伝資源との後代と考えるほうが適切と考えられた．

緑茶用品種の中にも PAL 複対立遺伝子の種類からその来歴を海外のチャに求められる品種が存在した．‘やまとみどり’と‘おくみどり’およびその後代の品種は K3型を有した．2 品種は，深い休眠性をもち晩生である（八戸ら，1988）とともに，花柱の長さも L 型である（武田ら，1980）．特に‘やまとみどり’は，他の品種と比較しても非常に深い休眠性をもつ極晩生品種であり，その特異性は際立ち，日本在来種の特性から外れることから，奈良県在来種の来歴には無理があると言える．花器形態による主成分分析・判別分析においては，この二つの品種は導入中国種のグループに判別されている（鳥屋尾，1999）．また鳥屋尾は同じ報告で‘やまなみ’，‘うんかい’，‘べにふじ’は海外の系統のチャとの交雑後代であるにもかかわらず日本在来種に分類された結果を，花器形態による判別法の限界であると言及している．しかしながら，PAL 複対立遺伝子ではいずれの品種も日本在来種および品種とは明確に判別可能であり，より詳細な来歴の解明には有効な手法であった．日本の品種間におけるテルペン･インデックス値は，0.3～0.7 の間に分布し，その主体は 0.5 付近に集まっている（竹尾，2003）．0.5 付近の値を持つ品種は，‘あさつゆ’，‘たまみどり’，‘あさひ’，‘やぶきた’であり，これより大きく外れる品種として‘やまかい’（0.69），‘やえほ’（0.30），‘くらさわ’（0.30），‘ふじみどり’（0.25）であることを考慮すると，日本型の PAL 複対立遺伝子を持つ品種は主に 0.5 付近の TI 値であり，中国・韓国型を持つ品種はそれより外れることを示している．‘やまかい’は非常に特徴的な香気をもち，‘くらさわ’はもち病に対する感受性が非常に高い．中国・韓国型を持つ品種は，来歴上は日本在来種とされていても在来種とは異なる特性を有しているか，もしくはその来歴に日本在来種以外のチャが関与していることが明らかなものが多かった．

‘めいりょく’，‘ゆたかみどり’と‘おくみどり’はそれぞれ文献上の来歴に疑問がもたれている品種である．‘めいりょく’（PAL 遺伝子型は AD）は種子親‘やぶきた’（BD）と花粉親‘やまとみどり’（DK3）の交雑組み合わせとされている．種子親は種子がついた事実から間違える要素が少なく，‘めいりょく’の D 型は‘やぶきた’から遺伝したと推定すると，花粉親は A を必ずもつことになるが，‘やまとみどり’は A を有しないために花粉親にはならない．‘めいりょく’の花粉親が‘やまとみどり’とされていることには，諸形質の違いからこれまでも疑問視されており，最も有力な花粉親の候補として Z1（AA）が挙げられてきた．Z1 が花粉親であることを否定するような結果は PAL の遺伝子型だけでなく，二つの座によって支配されている輪斑病抵抗性遺伝子の形質の違い（武田，2001），RAPD（田中ら，1996）や CAPS（Kaundun ら，2003a）の多型解析によっても得られていない．葉形などの諸形質が非常に似ていることや各種の複数のマーカーの遺伝様式に矛盾がないことから，‘めいりょく’の花粉親は Z1 であること推定された．‘あさつゆ’（AD）の自殖後代であるとされる‘ゆたかみどり’の来歴が正しければ，PAL 遺伝子型は AA，AD，DD のいずれかになるはずである．しか‘ゆたかみどり’の遺伝子型はいずれも該当しないばかりか，4.1kb の断片を有した．‘ゆたかみどり’がもつ 4.1kb の断片は K4，K5 型のどちらでもなく，日本，中国，韓国の在来種を通じても極めて出現頻度の少ない PAL 複対立遺伝子である．そのため‘ゆたかみどり’の花粉親は，海外のチャの中で，中国変種以外の系統の可能性が示唆された．‘ゆたかみどり’の来歴に関して，武田（2001）はまず輪斑病抵抗性遺伝子の異同から‘あさつゆ’の自殖を否定し，さらに新葉の毛茸密度，フラボノイド成分から花粉親はアッサム雑種が有力としている．‘おくみどり’（K3）は，‘やぶきた’と静在 16 号との後代から選抜された品種である．しかし静在 16 号は K3 型を有していない（データ略）ため，‘おくみどり’の来歴には疑問があった．K3 は約 500 個体を用いた日本在来種の解析では出現していない，また花柱も中国・韓

国の在来種に多いL型を示すことから，花粉親は日本の系統ではなく，海外の系統である可能性が高いと考えられた（松元ら，2000）．以上のように在来種，緑茶用品種のPAL遺伝子型を検出することにより，緑茶用品種が在来種を経て，‘やぶきた’を交雑母本にして，多くの品種が育種された分化過程を明らかにした．また日本の品種とされながらも諸特性に特徴がある品種は，中国・韓国型を保持し，海外のチャの関与が明らかにされた．さらに来歴が不明や交雑組み合わせに疑問が持たれている品種の花粉親を推定することも可能であった．

Ⅴ　総合考察

1　PAL cDNAの単離と品種分化解明のためのマーカーの評価

分子系統樹による植物の比較では葉緑体ゲノム上に座上する*rbc*L，*atp*B，*mat*Kなどが用いられている例が多い．葉緑体など細胞質のゲノムは一般に母性遺伝をするために，その起源を種子親に求めることができ，また多くの研究者による情報量の蓄積が十分にあることがこれらの遺伝子を分化の解明に求める最も大きな端緒であろう．チャにおいてもmatKの塩基配列を比較し，インド，バングラディシュ，中国東部，日本で栽培されているチャが中国変種のグループに該当することが明らかにされている（Katohら，2003）．また細胞質由来のRAPDマーカーが見出されている（田中ら，2002b）．しかしながら高度に育種された作物では細胞質由来の遺伝子だけでは，変異性の検出が不十分であり，栽培化された系統や品種分化の解明には必ずしも最適とはいえない．そのため作物の育種目標となるような形質に関与する遺伝子をDNAマーカーにすることにより，より詳細な情報が得られることが期待できる．栽培化された植物には，目的形質が人為的に選抜されることによる「栽培化に伴う選択圧」が生じる．その選択圧の対象となる目的形質に密接に関係する遺伝子には，栽培化の過程で，変異が生じている可能性が高い．チャについては渋みの主成分であり保健的な機能性を有するカテキンとその生合成系に関与しているPALがその一つに挙げられる．そこでチャの系統・品種分化の解明に用いるDNAマーカーとしてPALを検討する目的で，PAL cDNAクローンを単離し，他の植物のPALとの相同性を比較した．

チャ新葉から抽出したm-RNAを由来とするcDNAライブラリーから得られたクローンA21は，その塩基配列から推定した情報からPALをコードすることが明らかであった．植物のPALは裸子植物のマツ科3，単子葉植物ではラン科2，イネ科5，双子葉植物ではマメ科8，ヤナギ科6，ナス科5，セリ科4，バラ科，ヒルガオ科，ミカン科，アブラナ科で各3，アカネ科，ムラサキ科，キク科，シソ科で各2，トウダイクサ科，ゴマノハグサ科でそれぞれ1種類の完全長の塩基配列が公表されている．本実験でクローニングしたチャを含む植物のPALの塩基配列を比較し分子系統樹を作成した．チャと比較して最も遠縁の裸子植物のマツとは63%程度の相同性しかなく，被子植物の中では単子葉植物に属する2種のラン科とは72.1%，72.7%と比較的相同性が維持されていたが，イネ科植物とは64.1～67.7%の低い相同性しか示さなかった．PAL配列の比較により，これまで主に形態学的な知見から導きだされた植物の分類と矛盾しない系統樹が得られた．以上の結果からPALは植物の進化とともに変異していることが強く示唆された．

本実験では，完全長のPAL cDNAをプローブと複数の制限酵素を用いた解析，品種間で多型の認められた*Hin*dⅢ多型の遺伝様式と，短いDNAプローブを用いることにより単一の断片のみが検出された結果から，チャのPALは単一遺伝子座であると考えられた．これまで報告のある被子植物のPALは，通常1個のイントロンによりエクソンが2個に分断されている構造を持ち，半数体当り2個以上の多重遺伝子族を形成している．裸子植物で最初に報告されたマツ（*Pinus taeda*）のPALは単一遺伝子座とされたが（Whettenら，1992），同じ属の*Pinus banksiana*では少なくても8～10座の多重遺伝子族を形成していた（Butlandら，1998）．チャのPALが単一遺伝子であると推定された点は，他の植物とは異なる結果であった．また日本の緑茶用品種，系統では3種類のPAL複対立遺伝子が認められた．多くの植物では，PALは複数の機能に関与するため多重遺伝子族として存在したが，チャは単一遺伝子で複対立遺伝子を変異させることにより多様性を担うことが推定された．

チャは、チャ節の一部の植物からチャの祖型が分化，成立し，さらには変種，系統，品種に分化したと考えられる．PALが植物の進化とともに変異している点とを考慮すると，品種間で見出されたPAL遺伝子における*Hin*dⅢや*Eco*RVの認識部位の変異は，二つの点突然変異が偶然同時に起こったのではなく，チャが共通の祖先から分化する中で順次起こり，日本の緑茶用品種の祖型となる在来種は，PAL遺伝子が変異した後に分化した集団であったと考えられた．PALをDNAマーカーに

用いることにより，中国変種（*C.sinensis* var. *sinensis*）に属する日本の緑茶用品種，系統を分類することが可能となった．PAL RFLP 解析は，日本の緑茶の系統・品種分化を解明するには適当な DNA マーカーである．

２　DNA 抽出のための試料の保存法の開発と海外のチャの遺伝的多様性

チャの系統分化を解明する目的で DNA 多型を行う場合には，DNA を抽出する試料の簡易な保存法の開発が重要である．試料の採取から DNA 抽出を行うまでの間は，短期では 4℃程度の低温または長期では凍結による保存が必要である．しかしチャの遺伝的な多様性の解明を進める上では，海外での採集が欠かせず，海外では必ずしも低温での輸送が実現できる環境にはない．そこで室温による短期保存する方法を検討した結果，チャの新葉をエタノール中で保存することにより，少なくても１週間程度の期間であれば，RFLP 解析に使用可能な DNA が十分に抽出可能であった．エタノールに保存することにより，葉中のクロロフィルが溶出されるとともに，組織が硬く脆くなることから，抽出作業も効率的に行うことができた．また通常の CTAB 法でツバキの DNA 抽出を行う場合に，抽出の過程で DNA と挙動を同じにする多糖類が多く含まれるために，DNA との分離が困難であり，抽出された液は粘性の高い溶液となった．しかしエタノールに浸漬することにより多糖類の影響が若干ではあるが，軽減され粗抽出液の粘性が低下し，以後の精製がスムーズになるなどの副次的な効果も得られた．そこで以後，エタノール中で保存後の試料を用いて実験を行った．PAL cDNA をプローブに用いた RFLP 解析により，チャとツバキの種間交雑種である「チャツバキ」から，種子親である‘さやまかおり’由来の多型は検出されたが，花粉親とされたヤブツバキとは異なる多型を示し，供試したヤブツバキとの親子関係は否定された．検出された断片の中には，種子親由来でないものは，真の花粉親の由来の断片であることが容易に想像できた．種間交雑は遺伝変異を拡大するために有用な育種法であるが，その雑種胚が得られる確率は必ずしも高いものとはいえず，幼苗期での雑種判定が極めて重要となる．チャの PAL は複対立遺伝子によって制限酵素認識部位の塩基配列が異なる．Kaundun らは PAL の変異配列を標的に CAPS マーカー PAL-*Dde*I を開発し，品種識別が可能なことを報告している（Kaundun ら，2003a）．PCR を用いれば，胚レベルで解析が可能であることから，その利用が期待できる．

アッサム変種の PAL cDNA を用いた RFLP 解析で得られたパターンは，中国変種とは異なるパターンを示した．また中国変種に属する導入中国種と 6 箇所の寺院の韓国在来種で推定された PAL 複対立遺伝子の種類と数は日本在来種に比べて多かった．さらに日本型の複遺伝子頻度を比較すると，導入中国種は韓国在来種に比べて高かった．チャの起源に関する記述は諸説あるものの，アッサム変種と中国変種は同一の起源をもち，分化しつつ現在の分布地に広がったとする一元説が有力である（橋本，978）．アッサム変種から中国変種への変種内の分化と中国変種内の分化を形態学的な特徴の変化で追うと，樹高は「高から低」へ，花や葉の大きさは「大から小」へと変異している．また，花器形態の差異を比較すると，アッサム変種では抽出度が大きく，花柱の分岐点が浅く，基部にくびれがある雌しべの形が，中国変種では抽出度が小さく，分岐点が深く，くびれを生じない形に変異している（鳥屋尾ら，1999）．さらに日本在来種は，導入中国種，韓国在来種に比べて，雌しべの抽出度が小さく，その抽出の程度を示す M 型，S 型の変異が小さい傾向にある．チャの葉に含まれるタンニン，カフェインの含有率（武田，2001）や香気成分の１指標であるテルペン・インデックスの変異の幅（竹尾，2003）においても，チャの起源地と推定される地域から離れると変異の幅が小さくなることが報告されている．以上のことは，これまでの研究から明らかにされてきたが，RFLP 解析を通じて検出される PAL の多型性にも同様のことが見出された．形質や DNA の多様性が導入中国種から日本在来種になるにつれて小さくなることがより明白になった．これらの結果は，チャが東進する過程で，さまざまな環境がもたらす選択圧の中で選抜されたことを如実に表している．さらに RFLP 解析では，PAL 複対立遺伝子のプロトタイプをアッサム変種では C 断片，日本型のチャでは A，B，D の 3 個，導入中国種と韓国在来種では、これらに加えて K1～K7 として，多様性の指標として解析を行った．導入中国種や韓国の寺院に植栽されているチャと日本のチャの間には，遺伝的な多様性に大きな違いがあった．さらに韓国には，来歴の異なる二つの集団のチャが存在することを明らかにするとともに，日本のチャの起源を中国か韓国かのどちらかに求めるならば日本型の PAL 複対立遺伝子の割合の高い中国の方が適当と考えられた．PAL 複対立遺伝子を用いた解析により，これまでの知見と矛盾のない結果が得られるだけでなく，中国変種内の分化について新たな知見が得られた．

3　PAL の遺伝的多様性からみた日本の緑茶用品種分化の解明

日本在来種約 500 個体を用いた PAL 遺伝子型の検出による解析では，中国・韓国型の K4 と K6 は非常に低頻度で検出されるものの，主な PAL 複対立遺伝子は A，B，D の 3 種類であり，しかもこれらの複対立遺伝子は静岡から九州までほぼ同じ出現頻度であった．したがって PAL 複対立遺伝子からみた日本のチャは非常に均一の集団であると考えられた．他方，中国や韓国のチャでの PAL 複対立遺伝子の数は 10 個以上に上ることから，日本のチャの PAL の変異は非常に乏しいものであった．さらに日本のチャの遺伝的な変異の欠如は，形態学的な差異（花柱，葉形など），内成成分（カフェイン・タンニンの含有率，テルペン・インデックスなど），病害抵抗性（輪斑病，炭疽病）など諸形質においても報告されている．また RAPD マーカーを用いた韓国のチャとの比較でも日本のチャの多様性は乏しいことが報告されている（Lee ら，1995；Kaundun ら，2000）．日本のチャは，中国のチャに比べて PAL の変異性のみならず，他の DNA マーカーや形質の変異幅が小さいことは明らかであった．韓国は冬季の低温のためにチャの生育にとっては日本より厳しい環境にあるが，韓国のチャの遺伝的変異は日本のチャよりも多様であった．これは韓国が中国と陸路で結ばれていることや距離的にも近いために，導入が容易であったためと想像される．一方日本への導入には必ず海路を使う必要があり，導入に関して韓国よりもはるかに厳しい環境であり，地理的に不利であった．そのため，導入，定着した時に非常に強い瓶首効果が働き，結果として日本のチャは中国のチャのほんの一部の変異しか保持できなかったと考えられた．導入に成功した一部の中国変種だけの集団が創始者効果により日本在来種を形成した．中国のチャでは 10 個以上の PAL 複対立遺伝子が，瓶首効果と創始者効果により，日本在来種では A，B，D 型の 3 個，あるいは K4型を含んで 4 個になったが，頻度は A 型と D 型に偏っているため，B 型や K4型を有する個体は少なかった．

「ヤマチャ」の存在は，日本に固有のチャが存在したことを示す一つの根拠とされてきた．その一方で橋本（1973）や松下（1999）の研究から，その可能性に疑問をもつ考えもあった．ヤマチャと在来種の PAL 複対立遺伝子の頻度に大差なく，花器形態による形態学的な研究においても明確な差は見出されてはいないことから，二つの集団を分ける根拠は見出せなかった．チャと同じカメリア属植物に属するツバキ（*Camellia japonica*）は，形態学的および生態学的な知見から日本固有種である．日本のヤブツバキは，花色素であるフラボノイドを指標とする化学分類学においても中国のツバキとは異なり，固有の色素構成を持つことが報告されている（坂田，1988）．チャがヤブツバキと同様に日本固有種であれば，本邦での分化の際に中国導入や韓国在来種とは違う，特徴的な独自の形質が生み出され，長い年月のうちには，その形質が固定してくると考えられる．しかし日本のチャ在来種，品種中から，ツバキのように，中国大陸のチャには存在しない固有の形質やマーカーが見出されておらず，日本のチャの諸形質の変異の幅は，中国のチャの変異の中に留まっている．この原因は，日本へ導入された時期が有史以前というレベルではなく，それよりは極めて遅かったために日本在来種独自の遺伝的な形質を固定させるのに必要な時間や世代が十分ではなかったと推察できる．以上の点から日本のチャの導入と在来種の形成過程を推定すると中国から導入されたチャは，中国のチャの変異の一部のみをもつ集団によって形作られ，栽培種からエスケープしたチャが「ヤマチャ」と呼ばれるようになったと考えられた．

狭い遺伝資源から成立した日本のチャは，人手により運ばれ各地の茶園が形成され，在来種を形成した．収量や品質の向上を目指して，在来茶園から優れた形質をもつ系統が選ばれ，品種化された．特に 1958～1959 年にかけて，20 を超える品種が登録された．PAL 複対立遺伝子で分類すると，供試した 19 品種の中ではほぼ半数が AA 型であった．これは在来種内の A 型の遺伝子頻度が 0.67 であるので，AA 型の個体は 0.45 の割合で存在することになる．また B の頻度は 0.07 であり，BB 型の個体が出現する頻度は 0.5%未満であることを考えると，選抜された品種群に BB 型の品種が存在しないことは当然の結果であった．さらに唯一 BD 型の‘やぶきた’の諸形質の優位性は当時の品種の中では群を抜いており，交雑親としても多用されるようになった．育種法が選抜から交雑に変わると，育成された品種の PAL 遺伝子型は，AA 型の品種が激減し，BD 型の品種は‘やぶきた’か‘やぶきた’交雑後代によるものばかりとなった．

紅茶用品種の解析においては，紅茶形質を確保するために積極的に海外のチャと交雑したことが交雑組み合わせの来歴だけでなく，PAL 複対立遺伝子により明らかになった．その一方で海外のチャを積極的に緑茶育種に導入した例は少ない．宮崎県で釜炒り用に‘うんかい’などが育成されている．釜炒り用は独特の香味が特徴で

ある．海外のチャを用いることによりこの香味を引き出すことに成功している．‘やまとみどり’は3.6kb の断片を有する K3 型であった．500 個体以上調べた日本在来種の中には K3 型を示すものは見出されていない．また，‘やまとみどり’は炭疽病，輪斑病に対する耐病性も強く，花柱が長い L 型で，極晩生であることを考慮すると，日本在来種の中に‘やまとみどり’の性質を見出すことは難しく，奈良在来種とする由来に大きく疑問が持たれた．‘やまとみどり’から‘おくむさし’が育成され，‘おくむさし’も K3 を受け継いでいた．一方‘おくみどり’は‘やぶきた’と静在 16 号との交雑後代とされたが，静在 16 号は K3 を有していないことから，文献上の交雑組み合わせは誤りであった．また‘めいりょく’と‘ゆたかみどり’も，PAL の多型から交雑来歴上の花粉親とされた品種ではなかった．‘めいりょく’と‘ゆたかみどり’の花粉親は，品種の諸特性からそれぞれ，Z1 とアッサム雑種と推定されている．PAL の多型解析結果からも，これらが花粉親であることを支持した．

これまで煎茶の育種には，積極的に海外のチャ遺伝資源を活用する試みはなされてこなかった．それは海外のチャの諸特性と煎茶を中心とする日本の緑茶の特性の間に隔たりが大きいことが一因とも言われてきた．しかしながら，優れた製茶品質をもつことが知られている‘おくみどり’は，K3 断片を有していたことから，海外のチャとの交雑後代であることが確実となった．同様に，‘やまとみどり’，‘ゆたかみどり’，‘やまかい’，‘くらさわ’，‘やえほ’，‘ふじみどり’など形質に特徴をもつ品種は，すべて日本型以外の PAL 複対立遺伝子を有していることから，海外の遺伝資源との交雑品種であることが示唆された．PAL をマーカーとして活用することにより，品種の来歴が解明されるとともに，海外のチャとの交雑によって品質の優れた煎茶品種が育成され得ることを明らかにした．日本国内のチャ遺伝資源の変異の幅は，中国の遺伝資源に比較すると極めて乏しく，遺伝変異を拡大するには海外の遺伝資源の活用が重要である．特徴のある形質を導入することにより，より差別化した煎茶用品種の育成も進められており，中国変種由来の‘あさのか’やアッサム雑種の後代であり特徴的な香りをもつ‘そうふう’などが育成されている．今後，嗜好の多様化に対応するためには，海外のチャをどのように用いていくかが大きなポイントであると考えられる．

Ⅵ 摘　要

チャの遺伝資源の分類，評価技術の向上を目指して，phenylalanine ammonia-lyase （PAL） cDNA を単離し，PAL をプローブに用いた RFLP 解析の多型情報に基づいて，種間雑種であるチャツバキ，アッサム変種（*Camellia sinensis* var. *assamica*）と中国変種（*Camellia sinensis* var. *sinensis*）を解析した．チャと他の植物間で PAL の塩基配列を比較したところ，セリ科，マメ科，バラ科植物などと相同性が高く，植物分類学上遠縁の単子葉植物のラン科やイネ科植物とは相同性が低く，さらに類縁関係が離れている裸子植物のマツとは最も低い相同性であった．植物種間の PAL の配列の違いは，植物種の進化上の類縁関係を反映していた．PAL は，多くの植物において多重遺伝子族を形成していることが知られているが，チャの PAL は単一遺伝子としての存在が考えられ，日本の緑茶用品種では３種類の複対立遺伝子（A， B， D）が見出され，品種を５種類（AA， AB， AD， BD， DD）に分類することができた．BB 型に該当する品種はなかった．

DNA 解析を目的とした，海外や国内でも遠方の採集では DNA 抽出操作までに試料の保存が必要である．実験試料の室温での保存法を検討したところ，エタノール中に葉を１週間程度保存することにより，RFLP 解析に使用可能なレベルの DNA が抽出可能であった．さらに本保存法は DNA 抽出がより難易なツバキ，チャツバキでも応用可能であった．PAL cDNA を用いた RFLP 解析によりチャとツバキの種間雑種であるチャツバキ１～９号は，種子親である 緑茶用品種‘さやまかおり’由来の断片とツバキ由来と推定される多型を有した．PAL は種間雑種の確認においても有用な DNA マーカーであった．

アッサム変種の集団では，PAL cDNA の5’側プローブによって検出される C 断片が中国変種に比較すると強く検出される傾向があるなど，多型パターンに違いがあった．また中国変種内であっても日本の品種・在来種と韓国在来種，導入中国種との間には検出される PAL 複対立遺伝子の種類と頻度が異なった．韓国では古い時代に中国から導入されたチャが複数の寺に残っている．６箇所の古寺から採集したチャの後代では，日本で検出される３種類を含んで少なくても７個（K1～ K7），合計 10 個の PAL 複対立遺伝子が推定された．古寺のチャの中には日本型の PAL 複対立遺伝子をほとんど含まな

い集団も見出されるなど，日本在来種とは遺伝的に異なる背景をもつことが示唆された．一方で，韓国の一つの茶園から採集した個体はすべて日本型の PAL 複対立遺伝子を示した．戦前，茶園を作る目的で日本から韓国に大量の種子が運ばれており，この集団は日本から導入された後代であると推定された．したがって韓国には古い時代に中国から導入されたチャと近代になって日本から導入されたチャの二つの集団が存在することが明らかになった．また中国（一部インド）の中国変種（*C.sinensis* var. *sinensis*）の解析においては，韓国のチャの解析で推定された 6 個の PAL 複対立遺伝子が検出された他に，未同定のマーカー遺伝子型が複数推定されるなど遺伝的な多様性が極めて大きかった．

日本のチャには栽培に供されている在来種と来歴が不詳のヤマチャがあり，この二つの集団について PAL の遺伝的多様性を調べた．検出された PAL 複対立遺伝子の種類はいずれも A，B，D と一部の中国・韓国型であり，その主な遺伝子頻度は A が 0.66，B が 0.07，D が 0.23 で，集団間でほぼ同様であった．形態学的な特徴を加味すると，ヤマチャは在来種からのエスケープであるとことが強く示唆された．中国や韓国の在来種が少なくても 10 種類の PAL 複対立遺伝子から構成されているのに対して，日本在来種は 3 もしくは 4 種類のみであり，特に遺伝子頻度を考慮に入れると A 型と D 型に突出した，遺伝的変異の少ない集団であった．PAL の遺伝的な多様性から，中国から日本に導入され，定着したチャの品種分化の過程について，以下の通り考察した．まず，中国から導入され日本に定着した祖型のチャは，中国のチャの遺伝変異を十分に受け継いでいない，一部の集団であった．次に栽培化によって在来種が形成されたが，一部エスケープし野生化したものがヤマチャとなった．育種が進むにつれて優良形質をもつ個体が在来種の中から選抜され，品種登録された．約半数の在来種の PAL 複対立遺伝子が AA 型であったため，在来種から選抜され品種の半数が AA 型となり，B の遺伝子頻度は極端に低かったため，BB 型に該当する品種はなかった．主要品種となる‘やぶきた’は唯一 BD 型であり，その後‘やぶきた’を母本に用いた交雑育種が進むと‘やぶきた’の遺伝子型を引く品種群が出現し，従来型の AA 型が激減した．AA 型の品種の多くは 1953～1954 年に登録された古い品種であるのに対して，BD 型の品種は‘やぶきた’と‘やぶきた’の交雑後代の新しい品種で構成された．

特徴的な形質を有する‘べにつくば’，‘やまとみどり’，‘おくみどり’の由来は，これまで日本在来種からの選抜や交雑による育成とされてきた．これらの 3 品種は日本在来種には検出されない PAL 複対立遺伝子を有することから海外のチャとの交雑後代の可能性が極めて強かった．また登録されている交雑組み合わせに疑問がもたれている，‘めいりょく’と‘ゆたかみどり’は，その来歴に誤りがあることが，本マーカーによって確認された．品質において高い評価がなされている‘おくみどり’が海外のチャとの交雑後代であることは，たとえ遺伝的な多様性が異なる日本と中国・韓国のチャを交雑母本に用いても，優良な緑茶が育種できることを意味している．PAL をマーカーとしたチャ遺伝資源の新たな分類，評価の結果から，日本の緑茶用品種は遺伝的な多様性に乏しい遺伝資源の中で育成されており，海外のチャとの交雑により遺伝変異が大きく拡大可能であることが示された．

引用文献

1）阿南豊正・中川致之(1974)：茶葉の化学成分含量に及ぼす光の影響．農化．**48**，91－96．

2）Balasaravanana,T., P.K.Pius, R.R.Kumara, N. Muraleedharana and A.K.Shasanyb (2003): Genetic diversity among south Indian tea germplasm (*Assamica sinensis, C. assamica* and *C. assamica* spp. lasiocalyx) using AFLP markers. *Plant Science*, **165**,365－372.

3）Banerjee, B. (1992) : Botanical classification of tea. (Willson,K.C. and Clifford,M.N.) , *TEA*. 1st ed.pp. 25－50, Chapman & Hall, London.

4）Butland, S. L., M.L.Chow and E.Ellis (1998) : A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures. *Plant Mol.Biol.*, **37**, 15－24.

5）Chang, H. T. and B. Bruce (1984) : *Camellias*. pp149－150, Timber press, Oregon.

6）Chappell, J. and K. Hahlbrock (1984) : Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature*, **311**, 76－78.

7）Chen, L. and S.Yamaguchi (2002) : Genetic diversity and phylogeny of tea plant (*Camellia sinensis*) and its related species and varieties in the section Thea genus *Camellia* determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Hort. Sci. & Biotech*, **7**, 729－732.

8）Cheng, F. S., S. K. Brown and N. F. Weeden (1997) : A DNA extraction protocol from various tissue in woody species. *Hortscience*, **2**, 921－922.

9）CHOI,H.K. (2000) : Tea breeding and cultivation in Korea. J. Korean Tea Soc., 6, 121－137.

10）Cramer, C. L., J. N. Bell, T. B. Ryder, H. A. Bailey, W. Schuch, G. P. Bolwell, M. P. Robbins, R. A. Dixon and C. J. Lamb (1985) : Coordinated synthesis of phytoalexin biosynthetic enzymes in biologically-stressed cells of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) . *EMBO J.*, **4**, 285－289.

11）Cramer, C. L., T. B. Ryder, J. N. Bell and C. J. Lamb (1985) : Rapid switching of plant gene expression by fungal elici-

tor. *Science*, **227**, 1240－1243.
12) Dixon, R., P. M. Dey and C. J. Lamb (1983a) : Phytoalexins : Enzumology and molecular biology. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **55**, 1－135.
13) Dixon, R., P. M. Dey, M. A. Lawton and C. J. Lamb (1983b) : Phytoalexin induction in French bean. Intercellular transmission of elicitation in cell suspension cultures and hypocotyl sections of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.*, **71**, 251－256.
14) Drabkova, L., J. Kirschner and C. Vlcek (2002) : Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **20**,161 － 175.
15) Eden, T. (1958) : Tea. 1st, pp.1 － 4, Longmans, London, UK.
16) Edwards, K., C. L. Cramer, G. P. Bolwell, R. A. Dixon, W.SCHUCH and C.J.LAMB (1985) : Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6731 － 6735.
17) 古田紹欽(2000) : 喫茶養生記，初版 pp.44－76，講談社学術文庫，東京.
18) Gowri, G., N. L. Paiva and R. A. Dixon (1991) : Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) 12. Sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) cDNA clones and appearance of PAL transcripts in elicitor-treated cell cultures and developing plants. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 415 － 429.
19) Green, M. J., D. A. Thompson and D. J. Mackenzie (1999) : Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasamas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, **83**, 482 － 485.
20) Guillermaut, P. and L. Marechal-Drouard (1992) : Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive, and reliable method. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **10**, 60 － 65.
21) 八戸三千男・近藤貞昭・池田奈実子・和田光正・根角厚司(1988) : 暖地におけるチャ品種の休眠特性と気象要因の影響．野菜茶試研報 D1，69－78.
22) Hahlbrock, K., K. H. Knobloch, F. Kreuzaler, J. R. M. POTTS and E. Wellmann (1976) : Coordinated induction and subsequent activity changes of two groups of metabolically interrelated enzymes. Light-induced synthesis of flavonoid glycosides in cell suspension cultures of *Perolinum hortense*. *Eur. J. Biochem.*, **61**,199－206.
23) 長谷川政美・岸野洋久(1996a) : 分子系統学，初版 pp. 149－171．岩波書店，東京.
24) 長谷川政美・岸野洋久(1996b) : 分子系統学，初版 pp. 31－35．岩波書店，東京.
25) 橋本実(1973) : 日本茶の伝来に関する知見．植物と分化，8.
26) 橋本実・矢島喜一・藤井系一 (1975) : 那賀川，吉野川および韮生川流域のヤマチャについて．地方茶の研究，28－41.
27) 橋本実・志村喬(1978) : 茶樹の起源に関する形態学的研究第5報クラスター分析による１元説の提唱．熱帯農業，**21**，93－101.
28) 橋本実(1980) : 茶樹の起源に関する形態学的研究．熱帯農業，**24**，94－95.
29) 橋本実 (1988a) : 茶の起源を探る，初版 pp90－95．淡交社，京都.
30) 橋本実 (1988b) : 茶の起源を探る，初版 pp112－121．淡交社，京都.
31) Howles, P. A., V. J. H Sewalt, N. L. Paiva, Y. Elkind, N. J. Bate C. Lamb and R. A. Dixon (1996) : Overexpression of L-phenylalanine ammonia-lyase in transgeic tobacco plants reveals control points for flux into phenlpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol.*, **112**, 1617-1624.
32) 池田奈実子・朴龍求 (2002) : 韓国チャ在来種の形態的特性．育種学研究，**4**，193－200.
33) 岩浅潔(1968) : 茶葉カテキン組成に及ぼす遮光栽培の影響．茶業技術研究，**36**，63－69.
34) 岩浅潔(1974) : 茶葉におけるフェニルアラニン・アンモニア・リアーゼ活性の変化．農化，**48**，445－450.
35) Iwasa, K. (1977) : Biosynthesis of Catechins in Tea *Plant. Bull. Natl. Res Inst. Tea.* **13**, 101－126.
36) Joos, H. J. and K. Hahlbrock (1992) : Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.) : Genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 621－629.
37) Kanno, A., N. Watanabe, I. Nakamura and A. HIRAI (1993) : Variations in chloroplast DNA from rice (*Oryza sativa*) : Differences between deletions mediated by short direct-repeat sequences within a single species. *Theor Appl Genet.*, **86**. 579－584.
38) 加藤みゆき・松元哲・大森正司(1988) : フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) c DNA を用いたミャンマーのチャの RFLP 解析．日本農芸化学会1998大会講演要旨集，164.
39) Kato, Y., M. Katoh, Y. Takeda and M. Omori (2003) : Genetic diversity within cultivated teas based on nucleotide sequence comparison of ribosomal RNA maturase in chloroplast DNA. *Euphytica*, **134**, 287－295.
40) Kaundun, S. S., A. Zhyvoloup and Y. G. Park (2000) : Evaluation of the genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) genotypes using RAPD markers. *Euphytica*, **115**, 7－16.
41) Kaundun, S. S. and S. Matsumoto (2003a) : Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in Tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, and differentiation between *assamica* and *sinensis* varieties. *Theor. Appl. Genet.*, **106**, 375－383.
42) Kaundun, S. S. and S. Matsumoto (2003b) : Identification of processed Japanese green tea based on polymorphisms generated by STS-RFLP analysis. *J. Agri. & Food Chem.*, **51**, 1765－1770.
43) Kaundun, S. S. and S. Matsumoto (2004) : PCR-based amplicon length polymorphisms (ALPs) at micosatellite loci and indels from non-coding DNA regions of cloned genes as a means of authenticating commercial Japanese green teas. *J. Sci. Food Agri.*, **84**, 895－902.
44) 川口国昭(1989) : 茶業開花，第3版 pp.107－194．山童社，東京.
45) Kawakami, S., T. Yamada, S.TANAKA, P. SRIPRasertsak, H. kato, Y. Ichinose, H. Kato, T. Shiraishi and H. Oku (1992) : Molecular cloning of phenylalanine ammonia-lyase cDNA from *Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.*, **20**, 167－134.
46) 木村和夫(1993) : 韓国の茶の調査研究．瀬戸内短期大学紀要，**23**，39－47.
47) 木村和夫(1996) : 韓国における茶の現状の調査研究．瀬戸内短期大学紀要，**26**，29－46.
48) 金明培(2000) : 韓国煎茶の系譜と日本との関係．（煎茶の起源と発展シンポジウム委員会）煎茶の起源と発展シンポジウム発表論文集，pp. 19－45．黒船印刷，静岡.
49) Kuhn, D. N., J. Chappell, A. Boudet, and K. Hahlbrock

(1984) : Induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate: CoA ligase mRNAs in cultured plant cells by UV light or fungal elicitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **81**, 1102－1106.

50) KUMAR, A. and B. E. ELLIS (2001) : The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry.Structure,expression and evolution. *Plant Physiol.,* **127**, 230－239.

51) LAWTON, M. A., R. A. DIXON, K. HAHLBROCK and C. J. LAMB (1983a) : Rapid induction of the synthesis of phenylalanine ammonialyase and of chalcone synthase in elicitor-treated plant cells. *Eur. J. Biochem.,* **129**, 593－601.

52) LAWTON, M. A., R. A. DIXON, K. HAHLBROCK and C. J. LAMB (1983a) : Elicitor induction of mRNA activity. Rapid effects of elicitor on phenyalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA activities in bean cells. *Eur. J. Biochem.*, **130**, 131-139.

53) LEE, S. H., H. S. CHOI, R. H. KIM, H. Y. LEE and I. S. NOU (1995) : Identification of Korean wild tea plants and Japanese green tea cultivars using RAPD markers. *J. Kor. Tea Soc.*, **1**, 129－148.

54) LIANG, X., M. DRON, C. L. CRAMER, R. A. DIXON and C. J. LAMB (1989) : Diffrential Regulation of Phenylalanine Ammonia-lyase Genes during Plant Development and by Environmental Cules. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, 14486－14492.

55) LIAO, Y., H. LI, F. M. KREUZALER, and R. FISCHER (1996) : Nucleotides sequence of one of two tandem genes (accession No. X99705) encoding phenylalanine ammonia- lyase in *Triticum aestivum. Plant Physiol.,* **112**, 1398.

56) LIEW, C., C. GOH, C. LOH and S. LIM (1996) : Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding phenylalanine ammonia-lyase from *Bromheadia finlaysoniana* (Lindl.) Rchb.f (accession No. X99997) *Plant Physiol.*, **112**, 863.

57) LIN, H. and M. A. WALKER (1997) : Extacting DNA from cambium tissue for analysis of grape rootstocks. *Hortscience*, **32**, 1264－1266.

58) LOIUS, R., A. DIETRICH, K. HAHLBROCK and W. SCHULZ (1989) : A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO J.*, **8**, 1641－1648.

59) MANNERS, J. M., C. L. MCLNTYRE and J. P. NOURSE (1995) : Cloning and sequence of a cDNA encoding phenylalanine ammonia-lyase from the tropical forage legume *Stylosanthes humilis. Plant Physiol.*, **108**, 1301－1302.

60) 松下智(2002a) : ヤマチャの研究，初版 pp．7－9．岩田書院，東京．

61) 松下智(2002b) : ヤマチャの研究，初版 pp．15－30．岩田書院，東京．

62) 松本秀雄 (1992) : 日本人は何処から来たか-血液型遺伝子から解く，第11版 pp.103－177．日本放送協会，東京．

63) MATSUMOTO, S., A. TAKEUCHI, M. HAYATSU and S. KONDO (1994) : Molecular cloning of phenylalanine ammonia-lyase cDNA and classification of varieties of tea plants (*Camellia sinensis*) using tea PAL cDNA probe. *Theor. Appl. Genet.,* **87**, 671-675.

64) 松元哲・切岩祥和・武田善行(2000) : RFLP マーカーを用いた中国のチャの遺伝的多様性の解析と日本在来種との違いについて．育種学研究（別2）2，209．

65) MATSUMOTO, S., K. KIRIIWA and Y. TAKEDA (2002) : Differentiation of Japanese green tea cultivars as revealed by RFLP analysis of phenylalanine ammonia-lyase DNA. *Theor. Appl. Genet.,* **104**, 998－1002.

66) MATSUMOTO, S., K. KIRIIWA and S. YAMAGUCHI (2004) : The Korean Tea Plant (*Camellia sinensis*): RFLP Analysis of Genetic Diversity and Relationship to Japanese *Tea. Breed. Sci.*, **54**, 231－237.

67) 松下智 (1999) : 幻のヤマチャ紀行，初版 pp.238－239．淡交社，京都．

68) 松崎芳郎 (1992) : 年表　茶の世界史，初版 pp.250－253．八坂書房，東京．

69) MINAMI, E., Y. OZEKI, M. MATSUOKA, N. KOIZUKA and Y. TANAKA (1989) : Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase from rice plants. *Eur. J. Biochem.*, **185**, 19－25.

70) MING, T. L. (1999) : A systematic synopsis of the genus *Camellia. Acta.Botanica Yunnanica*, **21**, 149－159.

71) MISHRA, R. K. and S. SEN-MANDI (2004) Genetic diversity estimates for Darjeeling tea clones based on amplified fragment length polymorphism markers. *Journal of Tea Science*, **24**, 86－92.

72) MONDAL, T. K. (2002) : Assessment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction. *Euphytica,* **128**, 307－315.

73) 諸岡存(1941) : 茶経評釈　初版 pp．2－20．茶業組合中央会議所，東京．

74) 村井康彦(2003) : 遣唐留学僧と茶．(茶学の会・お茶の郷博物館)，日本茶の起源を探るシンポジウム発表論文集，pp．231－243．黒船印刷，静岡．

75) NAGAI, N., F. KITAUCHI, M. SHIMOSAKA and M. OKAZAKI (1994) : Cloning and sequencing of a full length cDNA coding for phenylalanine ammonia-lyase from tobacco cell culture. *Plant Physiol.,* **104**, 1091－1092.

76) NAGATA, T. and T. SAKAI (1984) : Differences in Caffeine, Flavanols and Amino Acids Contents in Leaves of Cultivated Species of *Camellia. Japan. J. Breed.,* **34**, 459－467.

77) NAGATA, T. and T. SAKAI (1985a) : Purine Base Pattern of *Camellia irrawadiensis. Phytochmistry,* **24**, 2271－2272.

78) NAGATA, T. and T. SAKAI (1985b) : Caffeine, Flavanol and Amino Acid Contents in Leaves of Hybrids and Species of the Section Dubiae in the Genus *Camellia. Japan. J. Breed.,* **35**, 1－8.

79) 中川致之・鳥居秀一 (1964a) : 茶のカテキンに関する研究（第2報）茶芽の生育に伴うカテキン含量の差異．茶業技術研究．**29**，85－98．

80) 中川致之・鳥居秀一 (1964b) : 茶のカテキンに関する研究（第3報）品種によるカテキン類の変異．茶業技術研究．**29**，76－84．

81) 中川致之・古谷弘三(1975) : 茶葉中のアミノ酸，タンニン，全窒素含量の品種間差異．茶業技術研究．**48**，84－95．

82) 根角厚司・武田善行 (1998) : タンニン・カフェイン高含有系統および花香保有特性系統「Makura 1号」の育成．育雑 **48** (別2) : 172．

83) 西本慎一・清水圭一・橋本文雄・坂田祐介(2003) : 胚珠培養によるツバキ属種間雑種（キンカチャ×ヤブツバキ）の作出．園学雑，**72**，236－242．

84) OHL, S., S. A. HEDRICK, J. CHORY and C. J. LAMB (1990) : Function properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis. The Plant Cell*, **2**, 837－848.

85) OSAKABE, Y., Y. OTSUBO, S. KAWAI, Y. KATAYAMA and N. MOROHOSHI (1995a) : Structure and tissue-specific expression of genes for phenylalanine ammonia-lyase from a hybrid aspen, *Populus kitakamiensis. Plant Sci.*, **105**, 217-226.

86) OSAKABE, Y., K. OSAKABE, S. KAWAI, Y. KATAYAMA and N. MOROHOSHI (1995b) : Characterization of the structure and determination of mRNA levels of the phenylalanine ammonia-lyase gene family from *Populus kitakamiensis*. *Plant Mol. Biol.,* **28**, 1131－1141.

87) OWUOR, P. O., T. TAKEO, H. HORITA, T. TSUSHIDA and T. MURAI (1987) : Differentiation of clonal teas by terpene index. *J. Sci. Food and Agri.,* **40**, 341－345.

88) OZEKI, Y., K. MATSUI, M. SAKUTA, M. MATSUOKA, Y. OHASHI, Y. KANO-MURAKAMI, N. YAMAMOTO and Y. TANAKA (1990) : Diffierential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during anthocyanin synthesis and by transfer effect in carrot cell suspension cultures. *Physiologia Plantarum*, **80**, 379－387.

89) PARK, Y. G., S. S. KAUNDUN and A. ZHYVOLOUP (2002) : Use of the bulked genomic DNA-based RAPD methodology to assess the genetic diversity among abandoned Korean tea plantations. *Genetic Resources and Crop Evolution,* **49**, 159－165.

90) PAUL, S., F. N. WACHIR, W. POWELL and R. WAUGH (1997) : Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.,* **94**, 255－263.

91) PELLEGRINI, L., O. ROHFRITSCH, B. FRITIG and M. LEGRAND (1994) : Molecular cloning and gene expression during the Hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiol.,* **106**, 877－886.

92) Y. L. QIU, J. LEE, F. BERNASCONI-QUADRONI, D. E. SOLTIS, P. S. SOLTIS, M. ZANIS, E. A. ZIMMER, Z. CHEN, V. SAVOLAINEN and M. W. CHASE (1999) : The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature*, **402**, 404－407.

93) RISTAINO, J. B., C. T. GROVE, and G. R. PARRA (2001) : PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens. *Nature,* **411**, 695－697.

94) SAIJO, R. (1980) : Effect of shade treatment on biosynthesis of catechins in tea plants. *Plant and Cell Physiol.,* **21**, 989－998.

95) 坂田祐介(1988) : ツバキ属植物の花色素に関する研究-特に系統発生との関連について．鹿大農学術報告，**38**，9－62.

96) SEALY, J. R. (1958) : A revision of the genus *Camellia*. pp111－132, The Royal Hort. Soc., London.

97) SEELENFREUND, D., M. CHIONG, S. LOBOS and L. M. PREZ (1996) : A full length cDNA coding for phenylalanine ammonia-lyase from *Citrus limon* (accession No. U43338) : *Plant Physiol.,* 111, 348.

98) SHARMA, A. D., P. K. GILL and P.SINGH (2002) : DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Mol. Bio. Rep.,* 20, 415.

99) 柴田道夫・間竜太郎・岸本早苗・谷川奈津・小野崎隆・家弓實行(2003) : ツバキとチャとの種間交雑によるつばき農林１号 ‘春待姫’の育成経過とその特性．花き研報，**3**，1－9.

100) 柴田道夫・間竜太郎・岸本早苗・谷川奈津・小野崎隆・家弓實行(2003) : テオプシス節ツバキ属種間交雑によるつばき農林２号‘彩祭り’および同３号‘雪祭り’の育成経過とその特性．花き研報，**3**，11－19.

101) SINGH, M. (1999): Isolation and PCR Amplification of Genomic DNA from Market Samples of Dry Tea. *Plant Mol. Biol. Rep.,* **17**, 171－178.

102) SINGH, M., J. SAROOP, B. DHIMAN (2004) : Detection of Intra-Clonal Genetic Variability in Vegetatively Propagated Tea Using RAPD Markers. *Biologia Plantarum.,* **48**, 113－115.

103) SOLTIS, P. S., D. E. SOLTIS and M. W. CHASE, (1999) : Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. *Nature,* **402**, 402－404.

104) SUBRAMANIAM, R., S. REINOLD., E. K. MOKITOR, C. J. DOUGLAS (1993) : Structure, Inheritance and Expression of Hybrid Poplar (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) Phenylalanine Ammonia-lyase Genes. *Plant Physiol.,* **102**, 71－83.

105) 武田善行・鳥屋尾忠之(1980) : 花器形態による緑茶用品種の識別と分類．茶研報，**52**，1－6.

106) 武田善行・簗瀬好充・安間瞬(1987) : チャとツバキのF1雑種の育成とその特性について．野菜茶試研報B1．11－21.

107) 武田善行(2001) : わが国チャ遺伝資源の多様性とその育種への利用に関する研究．野菜茶研報，**1**，97－180.

108) TAKEO, T. (1983) : Effect of clonal specificity of the monoterpene alcohol composition of tea shoots on black tea aroma profile. *JARQ,* **17**, 120－124.

109) TAKEO, T. and P. K. MAHANTA (1983) : Comparison of black tea aromas of orthodox and CTC tea and of black teas made from different varieties. *J. Sci. Food and Agri.*, **34**, 307－310.

110) TAKEO, T., X. Q. YU, H. F. WANG, H. KINUKASA, LI M. J., Q. K. CHEN, and H. S. WANG (1992) : One speculation on the origin and dispersion of tea plant in China - one speculation based on the chemotaxonomy by using the content-ratio of terpene-alcohols found in tea aroma composition. *Journal of Tea Science,* **12**, 81－86.

111) 竹尾忠一(2003) : 茶の香気成分から見た日本茶の起源（茶学の会・お茶の郷博物館）日本茶の起源を探るシンポジウム発表論文集，pp.70－86．黒船印刷，静岡.

112) TAKEUCHI, A., S. MATSUMOTO and M. HAYATSU (1994) : Chalcone Synthase from *Camellia sinensis*: Isolation of the cDNAs and the Organ-Specific and Sugar-Responsive Expression of the Genes. *Plant Cell Physiol.,* **35**, 1011－1018.

113) TANAKA, Y. and I. URITANI (1977) : Synthesis and turnover of phenylalanine ammonia-lyase in root tissue of sweet potato injured by cutting. *Eur. J. Biochem.,* **73**, 255－260.

114) 田中淳一・山口聰(1996) : RAPD（Randomly amplified polymorphic DNA）によるチャ品種の親子関係の検定．野菜茶試研報B9，31－36.

115) TANAKA, J. and S. IKEDA (2002) : The rapid and robust DNA extraction method from various plant species using diatomaceous earth and a spin filter. *Breed. Sci.,* **52**, 151－155.

116) 田中淳一・太田(目徳) さくら(2002) : 正逆交雑集団を用いたチャの母性遺伝RAPDの検出．育種学研究，**4**，215－222.

117) 田中淳一・太田（目徳）さくら・武田善行(2003) : ツバキ園芸品種‘炉開き’が種子親ヤブツバキ(*Camellia Japonica*) x 花粉親チャ(C. *sinensis*)の種間交雑種であることのRAPDおよびSSRマーカーによる確認とチャ育種への可能性．育種学研究，**5**，149－154.

118) TANAKA, Y., M. MATSUOKA, N. YAMAMOTO, Y. OHASHI, Y. KANO-MURAKAMI and Y. OZSEKI (1989) : Structure and characterization of a cDNA clone for phenylalanine ammonia-lyase from cut-injured roots of sweet potato. *Plant Physiol.*, **90**, 1403－1407.

119) 谷口熊之助(1936) : 「ヤマチャ」調査報告．茶業組合創立50周年記念論文集，87－101.

120）舘野義男(1999)：パラロガス遺伝子とオルソロガス遺伝子．生化学，71，1251．
121）鳥屋尾忠之(1989)：チャのルーツをめぐって発祥地と伝播(6)チャのルーツの一試論．「茶」，3月号，26－32．
122）鳥屋尾忠之・武田善行・家弓実行・松下繁(1988)：チャならびに近縁種の耐凍性の変異と地理的分布．野菜茶試研報B2，25－39．
123）鳥屋尾忠之・武田善行・松下繁・家弓実行・近藤貞昭(1996)：チャの日本在来種における地理的変異と適応性．野菜茶試研報B9，1－29．
124）鳥屋尾忠之(1999)：チャの花器形態の地理的変異と数値分類．茶研報，87，39－57．
125）TSUSHIDA, T. and T. TAKEO (1984) : Occurrence of theanine in *Camellia japonica* and *Camellia sasanqua* seedlings. *Agricultural and Biological Chemistry,* 48, 2861－2862.
126）宇田川明彦・田中淳一・縄田栄治・櫻谷哲夫(2001)：DNAマーカーによるヤマチャと栽培系統のチャの比較．熱帯農業，45（別1），91－92．
127）WACHIRA, F. N., W. POWELL and R. WAUGH (1997) : An assessment of genetic diversity among *Camellia sinensis* L. (cultivated tea) and its wild relatives based on randomly amplified polymorphic DNA and organelle specific STS. *Heredity,* 78, 603－611.
128）WETTASINGHE, R. and E. B. PEFFEY (1998) : A rapid and efficient extraction method for onion DNA. *Plant Breeding,* 117, 588－589.
129）WHETTEN, R. and R. R. SEDEROFF (1992) : Phenylalanine ammonia-lyase from Loblolly Pine(Purification of the Enzyme and Isolation of Complementary DNA Clones): *Plant Physiol.*, 98, 380－386.
130）WIERSMA, P. A. and Z. WU (1998) : A full-length cDNA for Phenylalanine ammonia-lyase cloned from ripe sweet cherry fruit (Accession No. AF036948) : *Plant Physiol.*, 118, 1102.
131）WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI and S. TINGEY (1990) : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research,* 18, 6531－6535.
132）山田新市(1998)：日本喫茶世界の成立，初版 pp.100－110．ラ･テール出版局，東京．
133）山口聰・田中淳一・松元哲(1996)：チャの起源と伝播についてⅤ.雌しべの形態から見た日本在来チャの特徴.育雑誌，46（別2）284．
134）ZHU, Q., T. DABI, A. BEECHE, R. YAMAMOTO, M. A. LAWTON and C. LAMB (1995) : Cloning and prooerities of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Mol. Biol.,* 29, 535－550．
135）茶業組合中央会議所編(1914)：日本茶業史，我が国の自生茶，pp2－3．
136）日本茶業中央会編（2004）：平成16年版茶関係資料 pp1－26，pp74．

Studies on Differentiation of Japanese Tea Cultivars (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) Acoording to the Genetic Diversity of Phenylalanine Ammonia-Lyase

Satoru MATUMOTO

Summary

A full-length cDNA of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) was cloned from a tea (*Camellia sinensis*) cDNA library for use in evaluating the genetic diversity of tea genetic resources and in determining the differentiation process of Japanese green tea cultivars. A comparison of the DNA and amino acid sequence estimated from the tea PAL cDNA with those of other plants showed that the tea PAL had a higher degree of homology to PAL from dicotyledons (Apiaceae, Leguminosae and Rosaceae) than to those from monocotyledons (Orchidaceae and Gramineae) or gymnosperms (Pinaceae): A different homology matched the degree of evolutionary distance of these plants. Although PAL in most plants is encoded by a multi-gene family, RFLP analysis using 6 restriction enzymes and analysis of the inheritance of polymorphic fragments indicated that the tea PAL is thought to be coded by a single gene. Three multi-allelic fragments, A, B and D, were detectable by RFLP analysis, and Japanese green tea cultivars were divided into 5 genotype groups: AA, AB, AD, BD and DD. Cultivars belonging to the BB type do not exist.

Since tea leaves tend to become brown after harvesting due to their high content of polyphenol compounds, they must be preserved at low temperature until DNA extraction. However, it is difficult to preserve them under such conditions when samples are collected overseas or in the field far from the laboratory. However, preserving tea leaves in ethanol at room temperature for one week proved useful for obtaining enough DNA for RFLP analysis. The DNA of 'Chatsubaki' No. 1 — 9, which are interspecific crosses between *C. sinensis* and *C. japonica,* was extracted from leaves preserved in ethanol and was analyzed to identify interspecific plants. Polymorphic DNA fragments from Chatsubaki No. 1-9 detected with a tea PAL cDNA probe were thought to be derived from each parental plant *C. sinensis* cv. 'Sayamakaori' and *C. japonica.*

PAL DNA diversity was also found between *C. sinensis* var. *sinensis* and var. *assamica.* Greater amounts of C fragment, which was hybridized with a 5' site-specific PAL cDNA probe, were detected in var. *assamica* than in var. *sinensis.* In addition, PAL fragment patterns in Korean and Chinese teas indicated that at least 10 fragment alleles, including 3 Japanese types, were present. Korean teas planted near 6 old temples and thought to be progenies introduced from China contained 7 new multi-allelic markers, K1-K7, and showed greater genetic diversity than Japanese teas. On the other hand, PAL markers from 12 plants collected on a Korean tea farm were composed of only Japanese types. Analysis of PAL markers indicated that the Korean teas were divided into two different genetic groups. One group was that found around old temples and was probably derived from China, and the other originated from Japanese teas that were introduced before World War II. Analysis of Chinese and Indian teas showed more diversity, further study is

Received: December 12, 2005
Department of Physiology and Quality Science
360 Kusawa, Ano, Mie, 514-2392 Japan

needed with larger tea populations to generate new PAL allelic markers.

Japanese green tea cultivars and local tea plants, including mountain tea, *yama-cha*, were analyzed to determine the process of differentiation of Japanese tea plants by using the PAL DNA markers, A, B and D. The AA group included many cultivars selected from local tea plants. The BD group consisted of cv. 'Yabukita' and descendants of 'Yabukita' produced by artificial crossing. Allelic frequencies of A, B and D were 0.66, 0.07 and 0.23, respectively, and these values were the same in tea plants collected from all regions of Japan. Since the frequencies in *yama-cha* and local tea plants were also the same, these teas may have the same origin. A comparison of DNA diversity between Japanese and Korean-Chinese germplasm suggests that limited populations of tea from China have been introduced into Japan. These results indicate a process of differentiation from the ancestral material presumably introduced from China to the local tea plants and, finally, to cultivars that were produced by selecting local tea plants and crossing.

Utilization of resources such as Chinese or Korean teas is thought to be a way of achieving cultivars with more useful traits. Indeed, the cultivars 'Benitsukuba', 'Yamatomidori', 'Okumidori' and 'Yutakamidori' are regarded as Japanese teas, even though they possess the Chinese-Korean type of PAL marker or unidentified PAL allelic markers. Because these markers are not detected in local tea plants in Japan, the origin of these cultivars must be from Korea or China or an Assam hybrid. Some of their morphological or agronomic traits are different from those of conventional Japanese teas. For example, 'Benitsukuba' is the only black tea cultivar among Japanese local teas. The budding period of 'Yamatomidori' is the latest among Japanese teas, and 'Okumidori' is also a late-budding cultivar whose market share is increasing because of its good quality. Even if overseas resources with different genetic back-ground need to be used as breeding parents, such examples show that new cultivars of good quality can be produced. This study of PAL genetic markers indicated that the genetic resources utilized for green tea breeding in Japan have been limited to a narrow range and has demonstrated the potential of using overseas genetic resources for extending the diversity of Japanese teas.