

緑茶の品種識別マニュアル

平成 17 年 2 月

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構

野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点

【はじめに】

茶では、近年、一品種偏重による香味の画一化の反省から、品種の多様化のニーズが高まり、品種茶が販売されるようになってきました。しかし、育成者権の侵害や偽装表示（不正表示）などの問題も生じてきています。このため、客観的な品種識別技術の開発が求められています。米など他の作物ではDNAによる品種識別技術が実用化されています。この技術を緑茶にも応用して、市販の緑茶での品種識別が可能になりました。

【緑茶の品種識別】

DNA抽出

茶葉1枚ごとにDNAを抽出します。

DNA抽出については、様々な市販のキットが出ていますが（QIAGEN社 DNeasy Plant Mini Kit、ニッポンジーン社 ISOPLANT II など）キットを使用しなくても簡易なCTAB（臭化トリメチルアンモニウム）法での抽出が可能です。図1には、CTAB法による抽出手順を示します。

茶葉1枚を1.5 ml マイクロチューブ（以下チューブ）に取り、650 μ l のCTAB抽出液を加え65°C、5-10 min インキュベートした後、

マイクロチューブ用ホモジナイザーですりつぶし、65°C、1 hr インキュベートし茶葉の細胞を破壊します。

等量(650 μ l)のCIA（クロロホルム：イソミルアルコール 24:1, v/v）を加え、よく混和し、

短時間（遠心機の最大回転数で1 min）遠心してクロロホルム層（下層）と水層（上層）に分画し、水層(400 μ l)を新しいチューブに移します。

等量のイソプロピルアルコールを加え、遠心します。

上清を捨て、沈殿を70% エタノールでリンスした後乾燥させます。

250-300 μ l のTEバッファ(Tris 100 mM, EDTA 1 mM)に溶解し、DNA試料とします。

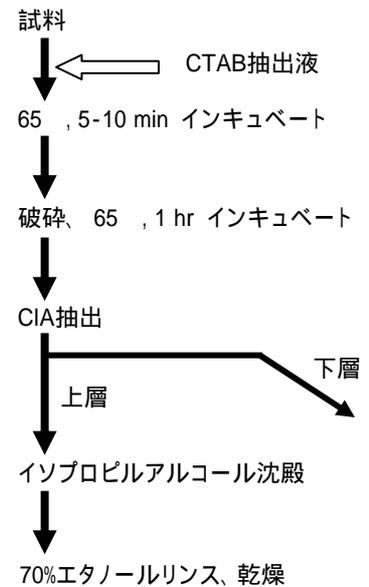


図1 CTAB法による茶葉からのDNA抽出

サンプル数によりますが、おおよそ1時間半～2時間半程度の操作です。約5 mgの茶葉から、250～300回PCRができる程度のDNAが抽出できます。

PCR

品種の識別に必要なDNA領域のみを大量に増幅します。反応液量は25 μ l（もしくはその半量でも可能です）とし、その組成は、プライマーを0.625 μ M ずつ、dNTPを200 μ M、MgCl₂を2 mM、1×ExTaq buffer、DNAポリメラーゼ（TaKaRa ExTaq DNA polymerase）0.625 Uを含み、DNA溶液は、1反応あたり1 μ l 使用し、滅菌蒸留水で全体の液量を25 μ l に合わせます。

PCRプライマーと増幅領域、制限酵素を表1に示します。

PCR反応プログラムは、図2に示す通りです。

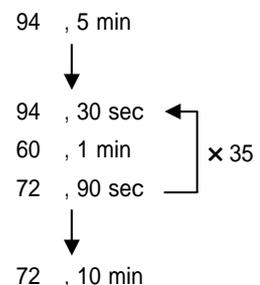


図2 PCRプログラム^{1),2)}

制限酵素処理

PCR反応液を3 μ l、10×制限酵素バッファを2 μ l、制限酵素0.2 μ l、滅菌蒸留水で液量を20 μ l に合わせ、制限酵素ごとに至適反応温度で1時間半～2時間インキュベートします。

電気泳動

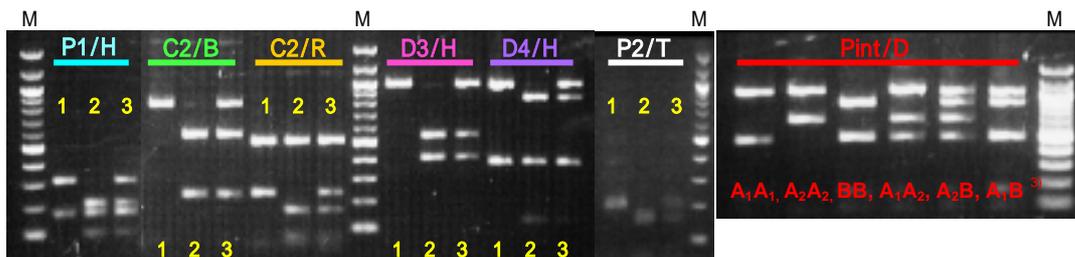
制限酵素処理により生じた断片をアガロースゲル電気泳動で分離・検出し、緑茶葉1枚ごとの遺伝子型を決定します(図3)。

この遺伝子型を、既に明らかにされている茶品種の遺伝子型と比較することで、品種の同定をします。現在、47の品種(表2)について遺伝子型が明らかにされており、これらの同定が可能です²⁾。

国内で広く栽培されている‘やぶきた’は、マーカーの1つPALintron/DdeIでは、他の46品種とは異なる特異的な遺伝子型を示すため、容易に識別が可能です。また、ある品種に他の品種が混入された場合、混入率が7%以上であれば1緑茶試料につき24枚の茶葉について品種を同定することにより、信頼度95%で検出が可能です。

表1 増幅する領域と増幅用プライマー、制限酵素^{1),2)}

増幅する領域	プライマー(5' 3')	制限酵素
PAL exon 1	TCCATCAATCTATACACCTACCTG CCTTCTTTGGTCCTCCTATGTGA	<i>Hpa</i> II
PAL intron	CACATAGGAGGACCAAAGAAGG GGCAATGTAAGATAGGGGGACT	<i>Dde</i> I
PAL exon 2	AGTCCCCCTATCTTACATTGCC ATAGAAGAAACCAAGCCGGAAC	<i>Taq</i> I
CHS exon 2	AAACCCAAATGTGTGTGCCTAC AGGATAAACAACACACAAGCGC	<i>Bsp</i> I, <i>Rsa</i> I
DFR intron 3	CCAGGAACACCAACAACCCGT CCATGCTGCTTTCTCTGCCAA	<i>Hind</i> III
DFR intron 4+5	AACATTCCCACCAAGCCTAATC ATGAGAACGACACAACCTGGCAA	<i>Hpa</i> II



1, 2: ホモ、3: 1と2のヘテロ

‘やぶきた’のみ
‘あさつゆ’、‘うじみどり’のみ

図3 品種識別に使用するマーカーの、各遺伝子型の電気泳動パターン

2% アガロースゲル(臭化エチジウム 0.5 μl/ゲル 1mlを含む)で泳動した結果です。

P1/H: PALexon1/*Hpa* II 処理 C2/B: CHSxon2/*Bsp* I 処理 C2/R: CHS/*Rsa* I 処理 D3/H:
DFRintron3/*Hind* III 処理 D4/H: DFRintron4+5/*Hpa* II 処理 P2/T: PALexon2/*Taq* I 処理
Pint/D: PALintron/*Dde* I 処理 M: 分子量マーカー(100 bp DNA ladder, NEB)

【在来種について】

現在、日本国内で栽培されているほとんどの品種が同定可能ではありますが、国内では、優良品種の他にも在来種と呼ばれる茶が栽培されています(図4)。在来種は遺伝的に非常に多様性に富むため、全ての遺伝子型を調査することはとてもできません。したがって、在来種がブレンドされた市販の緑茶を分析した場合、どの品種にも当てはまらないサンプルが出てくる可能性があります。

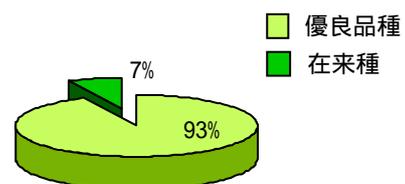


図4 茶の優良品種化率³⁾

表2 識別が可能な茶品種

識別が可能な品種	
あさつゆ	ふじかおり
ふくみどり	ふうしゅん
ほうりょく	かなやみどり
くりたわせ	くらすわ
まきのはらわせ	めいりょく
なつみどり	おおいわせ
おくひかり	おくみどり
おくむさし	おくゆたか
りょうふう	さえみどり
さやまかおり	さやまみどり
しゅんめい	するがわせ
つゆひかり	とよか
やぶきた	やえぼ
やまかい	やまとみどり
ゆたかみどり	いずみ
たかちほ	たまみどり
やまなみ	あさぎり
あさひ	ごこう
こまかげ	さみどり
うじみどり	べにふじ
べにふうき	べにひかり
べにほまれ	はつもみじ
からべに	ただにしき
Z1	

【様々な緑茶での品種識別】

煎茶(蒸熱時間の長短は問いません)の他、釜炒り茶、玉露、てん茶の分析が可能なが確認されています。抹茶については、マーカーの性質上、この方法での品種識別は不可能ですが、DNAは抽出できますので、単一品種で製造された抹茶への他品種の混入は検出が可能な場合があります。

この他、オーソドックス製法の紅茶や半発酵茶の一部からもDNAが抽出できることを確認しています。

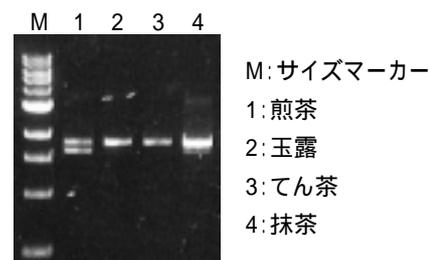


図5 各種緑茶から抽出したDNAを用いたマーカーの増幅

【参考資料】当研究所で使用しているものです

主な機器	・恒温水槽	・遠心機	・サーマルサイクラー	・電気泳動装置	・トランスイルミネーター	・その他実験器具	合計	約¥2,500,000
主な試薬	・制限酵素(6種で約¥60,000)							
	・DNAポリメラーゼ(TaKaRa ExTaq, ¥27,000/250 U)							
	・その他試薬						合計	約¥100,000

<このマニュアルに関するお問い合わせ先>

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 野菜茶業研究所 金谷茶業研究拠点
428-8501 静岡県榛原郡金谷町金谷 2769

TEL: 0547-45-4101 (代表) FAX: 0547-46-2169
企画調整部 連絡調整室茶業分室 TEL: 0547-45-4105
機能解析部 茶品質化学研究室 TEL: 0547-45-4982

<参考文献>

- 1) Kaundun, S.S. and Matsumoto, S. 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
- 2) Kaundun, S.S. and Matsumoto, S. Identification of processed Japanese green tea based on polymorphisms generated by STS-RFLP analysis. *J. Agr. Food Chem.*, **51**, 1765-1770
- 3) 社団法人日本茶業中央会、平成16年度版茶関係資料
- 4) 平成14年度野菜茶業研究成果情報 p143-144

<http://www.naro.affrc.go.jp/top/seika/2002/vegetea/ve014.html>