

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580031

研究課題名(和文)低温糊化デンプンを蓄積するイネ胚乳変異の原因特定及び新規デンプン素材としての評価

研究課題名(英文) Identification of the gene responsible for rice endosperm mutation that accumulates starch with low gelatinization temperature, and evaluation of the mutant as a novel starch material.

研究代表者

梅本 貴之(UMEMOTO, Takayuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター寒地作物研究領域・上席研究員

研究者番号：90370551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：柔らかさが保たれる米飯や米加工食品の製造を可能とする品種育成を最終目標として、米デンプンが糊化し易い変異系統の特性を評価し、原因遺伝子の特定を図った。変異系統「HM202」はデンプンの主成分であるアミロペクチンの短鎖比率が「コシヒカリ」より高く、糊化温度は低かった。デンプン性食品のモデルとした団子の柔らかさ保持性は、「HM202」の米粉で作ったものが「コシヒカリ」と比較して明らかに優れていた。またこの変異遺伝子の第11番染色体上の詳細な位置を決定し、育種に利用可能なDNAマーカーを開発した。

研究成果の概要(英文)：Breeding rice cultivars that enable keeping softness of cooked rice and processed foods as the final goal, we evaluated a mutant rice line with easily gelatinized starch and aimed to identify the causal gene. The mutant line 'HM202' showed higher short-chain ratio in amylopectin, and lower gelatinization temperature when compared to those of 'Koshihikari'. The rice dumplings made from rice flour of 'HM202' were superior to those made from that of 'Koshihikari' in keeping the softness. We also finely mapped the responsible gene on the chromosome 11, and developed a DNA marker, which is useful to select lines possessing the mutation in breeding programs.

研究分野：米品質・加工、稲成分育種

キーワード：イネ 変異体 デンプン アミロペクチン 米 糊化 胚乳

1. 研究開始当初の背景

わが国の人口一人当たり年間米消費量は昭和 37 年 (1962 年) の 118kg から平成 22 年 (2010 年) の 60kg へと約半分に低下している。その主な要因として食の多様化によりパン、パスタを含む麺類、シリアル類等の消費が増加し、米飯食の機会が減少したことが挙げられる。国は米粉の活用を増すことで、米の消費増と約 40% に低下した食料自給率の向上を政策目標とした。現在、米消費の 1/3 は外食・中食産業によるものである。そのため低価格化を目指しつつ、実需者が求める特徴を持った米品種の開発が消費拡大のために急務と考えられた。実需者の主要なニーズのひとつとして、米飯、米あるいは米粉を用いた加工食品の「柔らかさ保持性の向上」が挙げられる。例えばチルド販売でも硬くなりにくい弁当用の米飯、硬くなりやすいことが欠点の米粉パンの柔らかさ保持、糖・酵素類を添加なしで柔らかさが保てる餅菓子向けの糯品種の開発、などである。

2. 研究の目的

本研究課題の最終的な目標は、米デンプンが低温で糊化するイネ新規変異の原因とデンプン特性を明らかにし、同特性を持つ実用品種を育成して米飯、米加工食品の柔らかさの維持や保存性を向上することにある。その中で本研究では基礎部分にあたる以下の研究を実施し、デンプン生合成における変異遺伝子の役割を明らかにすると共に実用化の土台を作ることを目的とする。

- (1) 低温糊化変異系統の新規デンプン素材としての有用性評価
- (2) 原因遺伝子の特定および原因変異点に基づいた選抜 DNA マーカーの作成
- (3) デンプン生合成における変異原因遺伝子の役割の解明

3. 研究の方法

本研究では、一般的なジャポニカ粳米品種よりも米デンプンが低温で糊化する陸稲在来品種「早不知 D」、さらに「早不知 D」の突然変異処理後代から選抜した、よりデンプンが糊化し易い変異系統「HM202」を供試し、比較として水稻品種「コシヒカリ」、「日本晴」等も用いた。なお「早不知 D」は、アミロペクチンの側鎖を付加するデンプン枝付け酵素 I (starch branching enzyme 1, Sbe1) の欠損が原因でデンプンが糊化し易いことが、これまでの研究で明らかとなっている。

(1) 低温糊化変異系統「HM202」の新規デンプン素材としての有用性評価

米粒の尿素糊化性：半切した玄米を 2.6M 尿素溶液に浸し、糊化したデンプンのヨウ素呈色を観察することでデンプンの糊化しやすさを検証した。

米デンプンの糊化温度：アルカリ浸漬法で精製した米デンプンを供試し、ラピッドビスコアライザーの粘度上昇開始温度を糊

化温度として計測した。

アミロペクチン鎖長分布：デンプンをイソアミラーゼで枝切りし、得られた糖鎖を蛍光色素 (APTS) でラベリングした後、キャピラリー電気泳動法によって長さごとに分離したアミロペクチン側鎖の多少を比較した。

食品モデルとしての団子の物性：湿式気流粉碎米粉を用いて団子を作り、20 に 72 時間保存後、5 に 48 時間保存後、-30 に 9 日間置き解凍後のそれぞれの硬さを、クリープメーターを用いて測定した。

(2) 原因遺伝子の特定および原因変異点に基づいた選抜 DNA マーカーの作成

「HM202」が獲得した新規低温糊化性変異の遺伝解析：原品種「早不知 D」との交配後代 F₂ 集団 (100 個体) の米デンプンの尿素糊化性の遺伝子型を、各個体由来の F₃ 玄米 24 粒を用いた表現型から推定した。

「コシヒカリ」と「HM202」の交配後代 F₂ 集団 (186 個体) を供試し、SSR マーカー 40 個を用いて遺伝子型と、尿素糊化性による易糊化性遺伝子型から、変異遺伝子の染色体上座領域の特定を図った。

低温糊化性遺伝子 *lgt1* の詳細マッピング：「HM202」に「きたあおば」を 3 回戻し交配した後代集団 (BC₃F₂) から *lgt1* 座乗領域内で組換えを起こした個体を用い、マーカー遺伝子型と表現型から推定した *Lgt1* 遺伝子型を対比し、*lgt1* の詳細な座乗領域の特定を図った。

「HM202」と「早不知 D」の全ゲノム塩基配列の解析 (リシーケンシング) ならびに選抜 DNA マーカーの作成：「日本晴」を比較として両品種の全ゲノム塩基配列を BGI JAPAN 社に依頼して解析し、得られた「HM202」と「早不知 D」の塩基配列の比較を行った。さらに *lgt1* 座乗領域内に検出された 1 塩基置換を判別する DNA マーカーを作成した。

(3) デンプン生合成における変異原因遺伝子の役割の解明

lgt1 および *sbe1* 変異がアミロペクチン鎖長分布、アミロース含有率に及ぼす影響：「HM202」に北海道向け良食味品種「ゆきさやか」を 2 回戻し交配した後代集団 (BC₂F₂) から *Lgt1*、*Sbe1* の両方が機能型、いずれかが一方が欠損型、両方が欠損型の系統を、DNA マーカーを用いて選抜し、アミロペクチン鎖長分布、アミロース含有率を測定した。

登熟期胚乳における遺伝子の網羅的発現解析：開花後 6 日の胚乳から RNA を調整し、イネ 44k オリゴアレイ (アジレント社) を用いて各遺伝子発現量を網羅的に測定し、「HM202」と「早不知 D」の間で発現量の異なる遺伝子を抽出した。

4. 研究成果

(1) 低温糊化変異系統の新規デンプン素材としての有用性評価

sbe1 変異を持つ「早不知D」は「コシヒカリ」と比較して尿素溶液に糊化しやすく、「早不知D」の変異系統である「HM202」は、より一層糊化しやすかった(図1)。糊化温度の計測でも、「コシヒカリ」の糊化温度が69.9であったのに対し、「早不知D」は66.9、「HM202」は65.5と「HM202」の低温糊化性が確認された。また、アミロペクチンの鎖長分布は、「コシヒカリ」と比較して「早不知D」は既報の通り短鎖の比率が高かったが、「HM202」は「早不知D」より、さらにグルコース重合度8~12程度の短鎖割合が高かった(図2)。アミロペクチンの短鎖比率が高いほどデンプンは糊化しやすく、老化しにくいことが知られている。そこで「HM202」と「コシヒカリ」の米粉を用いて団子を調整し、異なる条件で保存した後の硬さを測定した。その結果、20に72時間もしくは5に48時間保存した際、あるいは-30で9日間冷凍後に解凍した際の硬さは、「コシヒカリ」対比でそれぞれ66%、75%、60%となり、「HM202」はデンプン性食品のモデルとなる団子の柔らかさ保持性に優れることが明らかとなった。

コシヒカリ 早不知D HM202

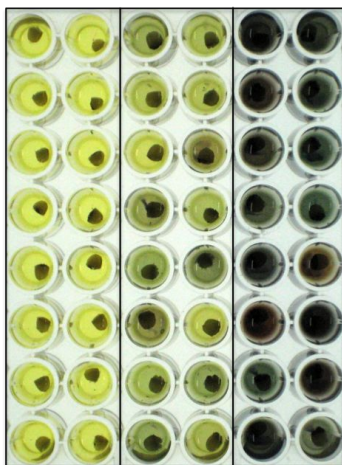


図1 変異系統の尿素糊化性

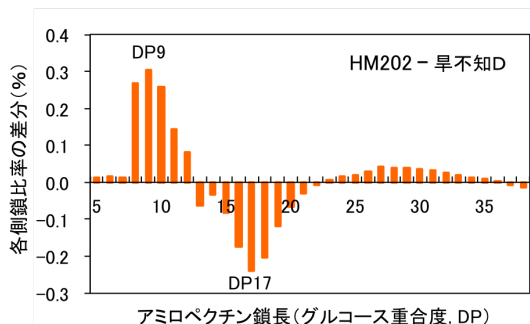


図2 アミロペクチン鎖長分布の比較

(2) 原因遺伝子の特定および原因変異点に基づいた選抜 DNA マーカーの作成

「HM202」の米デンプン易糊化性が「早

不知D」に生じた1遺伝子の変異であることを、両者を交配した後代 F₂ 集団を用いて解析した。その結果、早不知Dホモ型 26 個体、ヘテロ型 47 個体、HM202 ホモ型 27 個体となり、二乗検定の結果、1 遺伝子支配を想定した 1:2:1 の分離比と 5%水準で有意差がなく 1 遺伝子の変異と判断された ($\chi^2 = 0.380 < 5.991$)。この遺伝子を *Lgt1*¹ (low gelatinization temperature 1) とした。

「コシヒカリ」と「HM202」の交配後代 F₂ 個体 (186 個体) の葉から DNA を調整し、40 個の SSR マーカーの遺伝子型と、F₃ 玄米のデンプン糊化性から推定した *Lgt1* 遺伝子型を比較した結果、*Lgt1* 遺伝子の座乗領域は第 11 番染色体の HvSSR11-28 と HvSSR11-50 の間と推定された。

Lgt1 遺伝子座のさらに詳細な位置を特定するために、低温糊化性変異を持つ準同質遺伝子系統育成の派生材料を用いた。すなわち「HM202」に「きたあおば」を 3 回戻し交配した後代集団 (BC₃F₂) から *Sbe1* 座の遺伝子型がホモ型で固定し、且つ上記 *Lgt1* 座乗領域内で組換えを起こした 44 個体を用い、候補領域内に位置する 8 個の DNA マーカーの遺伝子型と、表現型から推定した *Lgt1* 遺伝子型を対比した。その結果、*Lgt1* は SSR マーカー RM26879 と RM26898 の間、373kb に位置することを明らかにした。

全ゲノム塩基配列の解析により「HM202」に生じた変異を上記候補領域内で検索したところ、1 つの遺伝子についてアミノ酸置換を伴う 1 塩基置換が確認された。この変異を持つ遺伝子が *lgt1* であるかは、さらに詳細な解析が必要であるが、同変異に基づく SNP マーカーを作成した(図3)。このマーカーは *lgt1* 変異を持つ実用品種育成の際に、選抜用 DNA マーカーとして有効である。

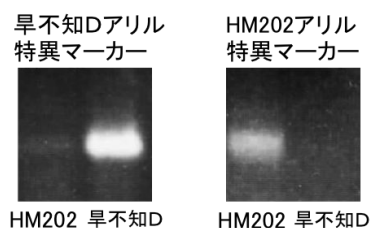


図3 *lgt1*座乗領域内の1塩基置換に基づくマーカー

(3) デンプン生合成における変異原因遺伝子の役割の解明

HM202 に「ゆきさやか」を戻し交配した BC₂F₂ から選抜した、*Lgt1*、*Sbe1* の両方が機能型、いずれか一方が欠損型、両方が欠損型の系統を用いて、アミロペクチン鎖長分布とアミロース含有率に及ぼす両変異遺伝子の効果を検証した。その結果、アミロペクチン短鎖比率 (DP5-11/DP5-24) は、両欠損 (0.371) > *sbe1* 欠損 (0.361) > *lgt1* 欠損 (0.356) > 欠損なし (0.342) となり、2 遺伝子欠損によるアミロペクチン短鎖化への相加効果が認められた。

一方、アミロース含有率は、欠損なしと *sbe1* 欠損がそれぞれ 19.6%、19.5%、*lgt1* 欠損と両欠損が 14.8%、14.7%であった。この結果から *lgt1* 欠損はアミロース含有率を低下させる作用を持つことが明らかとなった。

登熟期の胚乳で発現している遺伝子を「HM202」と「早不知D」間で比較解析した。その結果、デンプン代謝関連遺伝子は「HM202」において明確な発現低下が見られなかった。一方、発現が増加している遺伝子の中には、米の主要な貯蔵タンパク質であるプロラミンおよびグルテリンの遺伝子が多く含まれ、発現が増加した上位 30 遺伝子中、15 遺伝子を占めた。このことから *lgt1* 遺伝子はアミロペクチン鎖長やアミロース含有率だけではなく、貯蔵タンパク質の合成にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。

以上、米デンプンが低温で糊化するイネ変異系統「HM202」は、原品種「早不知D」と比較して、アミロペクチン短鎖の比率が高く、アミロース含有率が低い特徴を持ち、糊化デンプンの硬化が遅いことを明らかにした。この特徴は、柔らかさを保持できる米飯、米加工食品に適した品種開発を期待している実需者ニーズに合うものである。さらに、「HM202」が持つ新規な低温糊化性遺伝子 *lgt1* の詳細な座乗位置を特定し、選抜用 DNA マーカーを開発したことにより、*lgt1* を取り込んだ硬くなりにくい実用品種の効率よい育成に利用可能である。一方で、*lgt1* 遺伝子の同定には至らなかったため、今後も新たな組換え個体の解析を続けて変異遺伝子を特定し、そのデンプン代謝、貯蔵タンパク質合成における役割を明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

梅本貴之、アミロペクチンの短鎖化による米加工食品の柔らかさ保持性の向上、農業および園芸、2015, vol.90, 581-587, 査読無し。

Aoki N, Umemoto T, Okamoto K, Suzuki Y, Tanaka J, Mutants that have shorter amylopectin chains are promising material for slow-hardening rice bread, Journal of Cereal Science, 2014, vol.61, 105-110, 査読有り。

Okamoto K, Aoki N, Fujii H, Yanagihara T, Nishi A, Satoh H, Umemoto T, Characterization and utilization of spontaneous deficiency in starch branching enzyme I of rice (*Oryza sativa* L.), Journal of Applied Glycoscience, 2013, vol. 60, 53-60, 査読有り。

[学会発表](計 8件)

梅本貴之、池ヶ谷智仁、福岡修一、松葉修一、横上晴郁、デンプン易糊化性変異を導入した水稻準同質遺伝子系統の育成および易糊化性遺伝子 *Lgt1* のファインマッピング、日本作物学会第 239 回大会、2015 年 3 月 27 日～28 日、日本大学。

梅本貴之、陸稲在来品種「早不知D」がデンプン枝付け酵素 1 遺伝子に持つ変異、日本水稲品質・食味研究会第 6 回講演会、2014 年 11 月 8 日～9 日、京都府立大学。

梅本貴之、アミロペクチンの多様性を活かした米の品質向上、天津市・東京大学共同研究プロジェクト「都市と農村の融合に基づく持続的発展」共同シンポジウム、2014 年 8 月 21 日～22 日、中華人民共和国天津市、招待講演。

梅本貴之、多様な水稲品種の開発 - 北農研育成の品種・系統と今後の素材、北海道水稲懇話会 第 8 回夏期シンポジウム、岩見沢市、招待講演。

Umemoto T, Ikegaya T, Aoki N, Nakaura Y, Ishii T, Noda T, Matsuba S, Ashida K, Inouchi N, Mutant rice lines which shows slower hardening of cooked rice and rice bread, AACCI annual meeting (アメリカ穀類化学者会議 2013 年大会)、2013 年 9 月 29 日～10 月 2 日、Albuquerque, USA。

梅本貴之、横上晴郁、池ヶ谷智仁、松葉修一、幸谷かおり、清水博之、山内宏昭、アミロペクチンの短鎖化が米飯の食味保持性に及ぼす影響、日本食品科学工学会 2014 年 北海道支部大会、2014 年 3 月 8 日、帯広市。

池ヶ谷智仁、松葉修一、石井卓朗、野田高弘、中浦嘉子、井ノ内直良、芦田かなえ、清水博之、梅本貴之、デンプンが糊化しやすいイネ突然変異系統の解析、日本育種学会 第 123 回講演会、2013 年 3 月 27 日～28 日、東京農業大学。

梅本貴之、池ヶ谷智仁、青木法明、長澤幸二、船附稚子、松葉修一、芦田(吉田)かなえ、山内宏昭、米デンプンが糊化しやすいイネ変異系統の特性およびその利用、日本作物学会 第 235 回大会、2013 年 3 月 28 日～29 日、明治大学。

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称:低温糊化変異米の生産方法、米加工品、及び食品

発明者:梅本貴之、船附稚子、長澤幸一、山内宏昭

権利者:独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

種類:特許

番号:特願 2013-011201

出願年月日:2013 年 1 月 24 日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅本 貴之 (UMEMOTO Takayuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構北海道農業研究センター・寒地作物研
究領域・上席研究員

研究者番号：90370551

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

池ヶ谷 智仁 (IKIGAYA Tomohito)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構北海道農業研究センター・寒地作物研
究領域・研究員

研究者番号：90584350

石井 卓朗 (ISHII Takuro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構作物研究所・稲研究領域・上席研究員

研究者番号：30442750

長澤 幸一 (NAGASAWA Koichi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構北海道農業研究センター・畑作基盤研
究領域・主任研究員

研究者番号：90289299

船附 稚子 (FUNATSUKI Wakako)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構近畿中国四国農業研究センター・水田
作研究領域・主任研究員

研究者番号：60414744