

平成22年 6月16日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580008  
 研究課題名（和文）米の貯蔵性改良と米油利用促進のためのホスホリパーゼD欠失性遺伝子の同定と特性解明  
 研究課題名（英文）Identification of rice seed phospholipase D null gene and characterization of seed phospholipase D null rice  
 研究代表者  
 鈴木 保宏（SUZUKI YASUHIRO）  
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所米品質研究チーム長・チーム長  
 研究者番号：40370548

## 研究成果の概要（和文）：

申請者らは米ヌカ脂肪貯蔵顆粒膜の分解に関与するホスホリパーゼD（PLD）が欠失した変異体「03s-108」を選抜し、その欠失性は一つの劣性遺伝子に支配されることを明らかにしている。今回、種子 PLD 遺伝子は第1染色体の RPLD1 であり、03s-108 では終止コドンへの一塩基置換が生じていることを明らかにした。この変異を利用して、PLD タンパク質の有無を判別できる DNA マーカー検出方法を開発した。これにより、品種育成の効率化が期待される。

## 研究成果の概要（英文）：

Rice bran could be a valuable source of nutrition because of its high content of fat, protein, and crude fiber, but its use for human consumption is severely limited by the rapid degradation of rice bran oil and more rapid development of hydrolytic rancidity than occurs in other vegetable oils. Triacylglycerols (TAGs), which are the primary lipids contained in rice bran, occur in oil bodies with phospholipid membranes. These membranes are disintegrated by phospholipase D (PLD) and the released TAGs are degraded by lipase to free fatty acids, resulting in poor bran quality. Since PLD serves as a trigger to initiate the lipid degradation and the deterioration of bran quality, we isolated a PLD-null rice mutant, "03-s108" by using anti-PLD polyclonal antibodies. Although PLD null phenotype is inherited as a single recessive trait, the screening method for PLD null strains involves western blotting with progeny test that consumes time and effort. To develop a convenient PLD null strain detection method, we performed a linkage analysis between PLD null phenotype and SSR markers using F2 progeny from "03-s108" and "Koshihikari" and mapped PLD null phenotype near RM3453 on chromosome 1 carrying one putative PLDs genes (*AB001920*).

In the DNA sequencing analysis, the "03-s108" allele of *AB001920* showed a transition mutation from G to A on the third exon. This change resulted in a stop codon, implying a nonsense mutation in the "03-s108" allele. Using this DNA sequence data, we developed cleaved amplified polymorphic sequence and dot-blot-single nucleotide polymorphism analyses for screening and breeding of PLD null rice varieties. These methods are easy and cost-effective for screening PLD null strains.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			

年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：ホスホリパーゼD、イネ、貯蔵安定性、欠失性遺伝子、連鎖解析、

DNA マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

米ヌカには風味成分や栄養成分が豊富に存在するが、劣化しやすい欠点を有する。その原因は、ホスホリパーゼD (PLD) による脂肪貯蔵顆粒膜の分解を初期反応とする、一連の脂質の分解酸化に帰因すると考えられている。従ってこの劣化が抑制できれば米油の歩留まりが向上するばかりでなく、米の貯蔵性の向上や玄米全粒粉の利用促進につながる事が期待される。

### 2. 研究の目的

PLD 欠失性を簡易に実用品種へ導入・選抜するための技術として、PLD 欠失性原因遺伝子のマッピングを行う。具体的には、PLD 欠失系統と PLD を有する品種との F2 株を栽培し、PLD 欠失性と SSR マーカー等との連鎖解析を行う。また、PLD 欠失性遺伝子の構造を解析し、その特徴を利用した DNA マーカーを用いた簡易な選抜方法を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1)PLD 欠失性の連鎖解析

03-s108 とコシヒカリの交配し、その F2 株の DNA 多型 (SSR マーカー) と PLD の有無に関する表現型 (抗 PLD 抗体を用いたウエスタンブロッティング) の連鎖解析を行った。

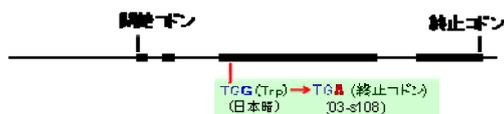
#### (2)遺伝子構造解析と DNA マーカー選抜法の開発

03-s108 と ND0052 のコシヒカリの「AB001920」の塩基配列を決定した。CAPS 法とドットプロット SNP 法は既報の方法 (Shirasawa *et al.* 2008) に従って行った。

### 4. 研究成果

03-s108 とコシヒカリの交配に由来する F2 株葉身より DNA を抽出するとともに、F2 株あたり 10-20 粒以上の F3 種子中の PLD の有無を解析し、F2 株の遺伝子型を判定した。これらを元に PLD 欠失性と SSR マーカーとの連鎖解析を行った。

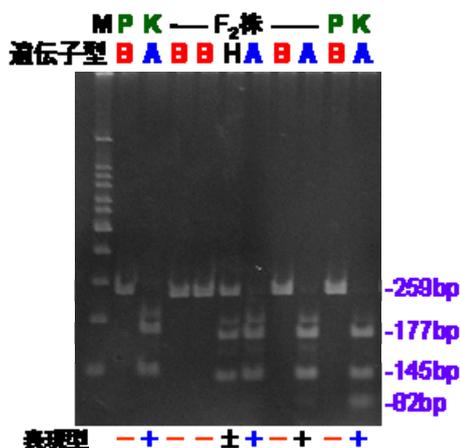
種子 PLD 遺伝子は第 1 染色体に AB001920 = RPLD1 (24.0cM) として登録されている。そこで、この近傍で 03-s108 とコシヒカリの間



に多型を生じる SSR マーカーを検索し、RM6331 (10.9cM)、RM3453 (25.0cM)、RM6740 (73.4cM)を見出した。03-s108 とコシヒカリの交配に由来する F2 株を対象に PLD 欠失性の連鎖解析を行ったところ、PLD 欠失性は RM3453 と 4.5%の組み換え価で連鎖することが明らかになった。なお、RM6331 とは 14.8%であった。これらの結果から、第 1 染色体に登録されている「AB001920」が、種子 PLD 遺伝子である可能性が高いことが明らかになった。

次に、「AB001920」が本当に PLD 欠失性の原因となっているかを明らかにするために、PLD 欠失系統「03-s108」、およびこの系統の原系統である「ND0052」における AB001920 の塩基配列を解析した。すると、「ND0052」の第 3 エクソンのトリプトファンをコードする TGG が、「03-s108」においては終止コドン TGA となる変異、一塩基置換 SNP が生じていることが明らかになった (上図)。この結果は、G から A への SNP が原因となり「03-s108」では成熟型の PLD タンパク質が生成されないことを示している。

今回見出された SNP を利用した PLD 欠失



性の簡易な選抜方法を2種類、開発した。CAPS法によると、一塩基変異を含む領域のPCR産物を制限酵素PsrIで処理することにより、DNAの塩基配列の違いを検出可能となった(上図)。また、ドットプロットSNP法により一塩基の違いを点のシグナルとして判定でき、大量の試料を解析することが可能となった。これらDNAマーカーを利用することにより、簡単な操作でPLD欠失イネ品種の早期選抜ができ、品種育成の効率化が期待される。

#### 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13件)

- ① 青木法明・梅本貴之・鈴木保宏、グルテン添加米粉パンにおける多収性稲品種の製パン特性、日本食品科学工学会誌、査読有、57巻、2010、107、113
- ② 鈴木保宏、古米臭くならないイネを簡易に選抜す技術、NARO代表的研究成果<技術>2009、査読無、一、2009、5、一
- ③ 鈴木保宏、古米臭くないイネ品種を簡単な操作で選抜できるDNAマーカーの開発、くろつぶニュース、査読無、33巻、2009、3、一
- ④ 鈴木保宏・松葉修一、「新規需要米」の行方。[米粉用] 軟らかく砕けやすい粉質米が製粉に適するが、精米時損失が課題、ニューカントリー、査読無、664巻、2009、22、24
- ⑤ 高橋 誠・本間紀之・諸橋敬子・中村幸一・鈴木保宏、米の品種特性が米粉パン品質に及ぼす影響、日本食品科学工学会誌、査読有、56巻、2009、394、402
- ⑥ Sasaki T, Kohyama K, Suzuki Y, Noel T R, Ring S G, Physicochemical characteristics of waxy rice starch influencing the in vitro digestibility of a starch gel, Food Chemistry、査読有、116巻、2009、137、142
- ⑦ 鈴木保宏、新規に育成された多様な品質特性を有する米とその利用、Techno Innovation、査読無、71巻、2009、20、29
- ⑧ 鈴木保宏、米の古米臭の原因となる酵素の有無を判別するDNAマーカーの開発、ブレインテクノニュース、査読無、131巻、2009、11、16
- ⑨ Shirasawa K., Takeuchi I Y., Ebitani T. and Suzuki Y. Identification of gene for rice (*Oryza sativa* L.) seed lipoygenase-3 involved in the generation of stale flavor and development of SNP markers for the lipoygenase-3 deficiency. Breed. Sci.、査読有、58巻、2008、169、176
- ⑩ Mikami I., Uwatoko N., Ikeda Y., Yamaguchi J., Hirano H. Y., Suzuki Y. and Sano Y. Allelic diversification at the wx locus in

landraces of Asian rice. Theor. Appl. Genet. 査読有、116巻、2008、979、989

- ⑪ Suzuki Y, Sano Y., Ise K., Matsukura U., Aoki N. and Sato H. A rice mutant with enhanced amylose content in endosperm without affecting amylopectin structure. Breed. Sci.、査読有、58巻、2008、209、215
- ⑫ 荒木悦子、鈴木保宏、米粉の新たな利用「米粉パン」、農産物検査とくほん、査読無、163巻、2007、33、34
- ⑬ 大関美香、長嶺敬、池田達哉、鈴木保宏、関和孝博、山口恵美子、加藤常夫、育種学研究、査読有、ビール大麦日本品種のリポキシゲナーゼ活性の変異と新たなLox-1活性欠損突然変異系統の作出、9巻、2006、55、61

[学会発表] (計20件)

- ① 鈴木保宏、松田智明、白澤健太、岩澤紀生、ホスホリパーゼDが欠失した変異体におけるコメ脂質貯蔵組織の特徴、日本育種学会、2009年9月、北海道大学
- ② 青木法明、梅本貴之、鈴木保宏、アミロペクチン構造が異なる準同質遺伝子系統遺伝子系統を用いた米粉パンの製パン特性、日本育種学会、2009年9月、北海道大学
- ③ 三上一保、上床修弘、池田祐志、山口淳一、平野博之、鈴木保宏、佐野芳雄、アジアイネ在来品種におけるwx座対立遺伝子の多様化：日本型品種からインド型品種へのwx遺伝子の移入、日本育種学会、2009年9月、北海道大学
- ④ 村上美奈、坂田茜、鈴木保宏、鈴木啓太郎、石井卓朗、久保田紀久枝、コシヒカリ由来のアミロース含有率が異なる変異系統炊飯米の香気特性、日本食品科学工学会、2009年9月、名城大学
- ⑤ 鈴木保宏、米粉パン等の非炊飯的な米の利用研究～現状と展望～、第19回西日本食品産業創造展'09セミナー、2009年5月、福岡市・マリンメッセ福岡
- ⑥ 青木法明、梅本貴之、鈴木保宏、多収性稲を用いた米粉パンの製パン特性、日本育種学会、2009年3月、筑波大学
- ⑦ 白澤健太、長峰 司、伊勢一男、鈴木保宏、稲のリポキシゲナーゼ3欠失性遺伝子の変異とその由来について、日本育種学会、2009年3月、筑波大学
- ⑧ 大関美香、天谷正行、鈴木保宏、長嶺敬、春山直人、五月女敏範、サチホゴールドの突然変異処理によって得られた新たなリポキシゲナーゼ1欠失遺伝子とそのDNAマーカーの開発、日本育種学会、2008年10月、滋賀県立大学
- ⑨ 白澤健太、竹内善信、蛭谷武志、鈴木保宏、イネ種子リポキシゲナーゼ3遺伝子の同定とその欠失系統の選抜のためのSNPマーカーの開発、日本育種学会、2008年10月、

滋賀県立大学

⑩ 青木法明、梅本貴之、鈴木保宏、Qualities of dough and bread made from rice with various starch properties、American Association of Cereal Chemists Annual Meeting、2008年9月、米国・ハワイ

⑪ 荒木悦子、池田達哉、芦田かなえ、高田兼則、谷中美貴子、鈴木保宏、飯田修一、グルテン添加米粉パンの比容積に影響する米粉の性状、日本食品科学工学会、2008年9月、京都大学

⑫ 青木法明、高橋 誠、本間紀之、梅本貴之、鈴木保宏、米の品種・成分特性と米粉パン製造(第2報)、日本食品科学工学会、2008年9月、京都大学

⑬ 佐々木朋子、早川文代、鈴木保宏、岡本和之、神山かおる、高速餅硬化性をもつ糯米品種系統の餅のテクスチャーと官能評価、日本食品科学工学会、2007年9月、福岡市・中村学園大学

⑭ 高橋 誠、青木法明、鈴木保宏、本間紀之、米の品種・成分と米粉パン製造特性(第1報)、日本食品科学工学会、2008年9月、京都大学

⑮ 青木法明、梅本貴之、鈴木保宏、3種のイネ高アミロース変異体の特性解明と同座性検定、日本育種学会、2008年3月、明治大学

⑯ 鈴木保宏、竹内善信、青木法明、白澤健太、イネ種子におけるホスホリパーゼDの欠失をもたらすSNPの同定とそれを利用したホスホリパーゼD欠失系統選抜方法の開発、日本育種学会、2008年3月、明治大学

⑰ 鈴木保宏、米ヌカにおけるホスホリパーゼDの有無とスフェロゾーム特性の関係解析、日本食品科学工学会、2007年9月、福岡市・中村学園大学

⑱ 鈴木保宏、竹内善信、白澤健太、イネ種子のホスホリパーゼDが欠失した変異体の遺伝解析、日本育種学会、2007年9月、山形大学

⑲ 岩澤紀生・松田智明・森田正文・鈴木保宏・新田洋司、発芽に伴うイネ種子胚乳糊粉層におけるスフェロゾームの動態に関する組織化学的解析、日本作物学会、2007年9月、金沢大学

⑳ Sasaki T、Kohyama K、Suzuki Y、Physicochemical characteristics of waxy rice starch influencing in vitro digestibility of starch gel、Institute of Food Technologists Annual Meeting、2007年8月、米国・シカゴ

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：ホスホリパーゼD欠失性イネ系統

発明者：鈴木保宏

権利者：(独)農研機構

種類：特許

番号：特開2008-245638

出願年月日：2008年11月

国内外の別：国内

名称：イネ種子リポキシゲナーゼ3変異型遺伝子、並びリポキシゲナーゼ3が欠失しているイネの選抜方法及び育種方法

発明者：鈴木保宏、白澤健太

権利者：(独)農研機構

種類：特許

番号：特願2007-192499

出願年月日：2007年7月

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 保宏 (SUZUKI YASUHIRO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究米品質研究チーム・チーム長

研究者番号：40370548

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし