

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07629

研究課題名（和文）玄米に含まれる二次代謝産物に注目したインド型水稻多収品種の登熟特性の解明

研究課題名（英文）Analysis of ripening feature of indica rice cultivars based on secondary metabolites

研究代表者

中野 洋（Hiroshi, Nakano）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・グループ長

研究者番号：10414814

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：水稻の高温登熟バイオマーカーのphenylpropanoid glycoside及び -oryzanolの含有率は、高温環境下での登熟に優れる「タカナリ」が「コシヒカリ」に比べ低かった。さらに、「コシヒカリ」と「タカナリ」の交雑に由来する正逆染色体断片置換系統群（CSSLs）において、phenylpropanoid glycoside及び -oryzanolの含有率を調べた。その結果、phenylpropanoid glycoside及び -oryzanolの合成に關与する量的形質遺伝子座（QTLs）は、それぞれ第4及び5染色体に存在することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、水稻の高温登熟バイオマーカーのphenylpropanoid glycoside及び -oryzanolの合成に關与する遺伝子候補領域がそれぞれ第4及び5染色体に存在することが明らかになった。今後、これらの領域の絞り込みを進め、遺伝子を単離・同定することで、高温環境下でも登熟の優れる品種の育成に繋げることができる。また、phenylpropanoid glycoside及び -oryzanolは動物に対して様々な生理活性を持つ化合物として知られているため、機能性を持つ品種の育成にも繋げることができる。

研究成果の概要（英文）：The rice cultivar Takanari, which has a high potential of ripening under high temperature condition, had lower concentrations of phenylpropanoid glycoside, such as 3',6-di-O-sinapoylsucrose, and -oryzanol, such as 24-methylenecycloartanyl ferulate, which are biomarkers with rice plants ripened under high temperature condition, in brown rice than the standard cultivar Koshihikari. To detect the quantitative trait loci (QTLs) for the concentrations of 3',6-di-O-sinapoylsucrose and 24-methylenecycloartanyl ferulate, the concentrations in the reciprocal chromosome segment substitution lines (CSSLs) were examined. The QTLs for the concentrations of 3',6-di-O-sinapoylsucrose and 24-methylenecycloartanyl ferulate were detected on chromosomes 4 and 5, respectively, in reciprocal genetic backgrounds. These concentrations were increased by the Koshihikari alleles but decreased by the Takanari alleles.

研究分野：作物学

キーワード：水稻 高温 登熟 バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化と人口増加が進む中で、気候変動に適応した米の増収技術の開発が喫緊の課題となっている。水稻の登熟期における高温は、玄米の粒重の低下や白濁の発生を引き起こすことが知られている (Morita et al., 2016)。

これまでに研究代表者らは、高温ストレスバイオマーカーを単離・同定するため、日本型品種において、高温登熟した玄米と常温登熟した玄米に含まれる成分を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で比較した (Nakano et al., 2013)。その結果、phenylpropanoid glycoside の 3',6-di-*O*-sinapoylsucrose 及び 3'-*O*-sinapoyl-6-*O*-feruloylsucrose や、 $\gamma$ -oryzanol の 24-ethylenecycloartanyl ferulate が高温で含有率が增加することを明らかにした。

水稻は、形態的及び生理的特徴から日本型とインド型に主に分類することができる (Khush, 1997)。日本型水稻は主に温帯地域で栽培され、インド型水稻は主に熱帯地域で栽培されている (GriSP, 2013)。先行研究において、日本型品種とインド型品種の登熟適温 (日平均気温) が比較され、日本型品種の適温が 16°C ~ 22°C であるのに対し、インド型品種の適温が 19°C ~ 25°C であることが明らかになっている (Yoshida & Hara, 1977)。このため、インド型品種は日本型品種に比べ高温環境下での登熟が優れると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、高温登熟した日本型品種「コシヒカリ」及びインド型品種「タカナリ」玄米における phenylpropanoid glycoside 及び  $\gamma$ -oryzanol の含有率を明らかにする。また、「コシヒカリ」と「タカナリ」の交雑に由来する正逆染色体断片置換系統群 (CSSLs) を用いて phenylpropanoid glycoside 及び  $\gamma$ -oryzanol の合成に関与する量的形質遺伝子座 (QTLs) を明らかにする。

### 3. 研究の方法

「コシヒカリ」及び「タカナリ」に加え、「コシヒカリ」と「タカナリ」の交雑に由来する正逆 CSSLs (「コシヒカリ」及び「タカナリ」の遺伝的背景のそれぞれ 41 系統及び 39 系統) の種子を収穫した。

phenylpropanoid glycoside (1~3)の含有率については、玄米 50 粒を微粉碎し、室温で 20 mL のアセトン水溶液 (acetone/H<sub>2</sub>O, 50:50 (v/v)) で抽出した。その後、抽出液を減圧下で濃縮・乾固し、抽出物を C<sub>18</sub> HPLC (TSKgel ODS-80Ts, Tosoh, 4.6 × 250 mm; eluent, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA, 5:95:0.05 to 35:65:0.05 (v/v) for 60 min by liner gradient; flow rate, 0.8 mL/min; UV detection at 320 nm) に供し、6-*O*-feruloylsucrose (1) (*t*<sub>R</sub> 28.8 min)、3',6-di-*O*-sinapoylsucrose (2) (*t*<sub>R</sub> 44.1 min)及び 3'-*O*-sinapoyl-6-*O*-feruloylsucrose (3) (*t*<sub>R</sub> 45.2 min)を検出した。含有率はピーク面積に基づく検量線から算出した。

$\gamma$ -oryzanol (4 及び 5)の含有率については、玄米 50 粒を微粉碎し、室温で 20 mL のアセトンで抽出した。その後、抽出液を減圧下で濃縮・乾固し、抽出物を C<sub>18</sub> HPLC (Sunfire, Waters, 4.6 × 250 mm; eluent, CH<sub>3</sub>CN/MeOH, 15:85 (v/v); flow rate, 0.8 mL/min; UV detection at 320 nm) に供し、24-methylenecycloartanyl ferulate (4) (*t*<sub>R</sub> 33.0 min)及び cycloartanyl ferulate (5) (*t*<sub>R</sub> 30.5 min)を検出した。含有率はピーク面積に基づく検量線から算出した。

### 4. 研究成果

「コシヒカリ」と「タカナリ」玄米に含まれる phenylpropanoid glycoside (1~3)を調べてみると、「コシヒカリ」は 6-*O*-feruloylsucrose (1)、3',6-di-*O*-sinapoylsucrose (2)及び 3'-*O*-sinapoyl-6-*O*-feruloylsucrose (3)の含有率 (w/w) が「タカナリ」に比べそれぞれ 57%、162%及び 84%高かった。また、 $\gamma$ -oryzanol (4 及び 5)を調べてみると、「コシヒカリ」は 24-methylenecycloartanyl ferulate (4)及び cycloartanyl ferulate (5)の含有率が「タカナリ」に比べそれぞれ 20%及び 34%高かった。

phenylpropanoid glycoside (1~3)の合成に関与する QTLs を明らかにするために、正逆 CSSLs 玄米における phenylpropanoid glycoside の含有率を調べた。その結果、6-*O*-feruloylsucrose (1)の含有率 (w/w) に関与する QTLs は、第 1、第 2、第 3、第 5、第 7、第 8、第 9 及び第 10 染色体上にあり、このうち、第 2 染色体短腕上の QTL については、「タカナリ」型の対立遺伝子が「コシヒカリ」の遺伝的背景において含有率を減少させ、逆に「コシヒカリ」型の対立遺伝子が「タカナリ」の遺伝的背景において含有率を増加させることが明らかになった (図 1 及び 2)。

また、3',6-di-*O*-sinapoylsucrose (2)の含有率 (w/w) に関与する QTLs は、第 4、第 8 及び第 11 染色体上にあり、このうち、第 4 染色体長腕上の QTL については、「タカナリ」型の対立遺伝子が「コシヒカリ」の遺伝的背景において含有率を減少させ、逆に「コシヒカリ」型の対立遺伝子が「タカナリ」の遺伝的背景において含有率を増加させることが明らかになった (図 1 及び 2)。

さらに、3'-*O*-sinapoyl-6-*O*-feruloylsucrose (3)の含有率 (w/w) に関する QTLs は、第3、第4、第5、第6、第7及び第11染色体上にあることが明らかになった (図1及び2)。

$\gamma$ -oryzanol (4及び5)の合成に關する QTLs を明らかにするために、正逆 CSSLs 玄米における  $\gamma$ -oryzanol (4及び5)の含有率を調べた。その結果、cycloartenyl ferulate (4)の含有率 (w/w) に関する QTL は、第1、第2、第3、第4、第5、第9、第11及び第12染色体上にあり、このうち、第2染色体長腕上の QTL については、「タカナリ」型の対立遺伝子が「コシヒカリ」の遺伝的背景において含有率を増加させ、逆に「コシヒカリ」型の対立遺伝子が「タカナリ」の遺伝的背景において含有率を減少させることが明らかになった (図1及び2)。これに対し、第4染色体長腕及び第11染色体上の QTL は、「タカナリ」型の対立遺伝子が「コシヒカリ」の遺伝的背景において含有率を減少させ、逆に「コシヒカリ」型の対立遺伝子が「タカナリ」の遺伝的背景において含有率を増加させることが明らかになった (図1及び2)。

また、24-methylenecycloartanyl ferulate (5)の含有率 (w/w) に関する QTL は、第1、第2、第4、第5、第10及び第12染色体上にあり、このうち、第5染色体上の QTL については、「タカナリ」型の対立遺伝子が「コシヒカリ」の遺伝的背景において含有率を減少させ、逆に「コシヒカリ」型の対立遺伝子が「タカナリ」の遺伝的背景において含有率を増加させることが明らかになった (図1及び2)。

高温登熟した玄米はアリューロン層が厚くなり (Nagato & Ebata, 1960)  $\gamma$ -oryzanol はアリューロン層に多く含まれることが知られている (Mandak & Nystrom, 2012)。今回、高温環境下での登熟が優れる「タカナリ」は「コシヒカリ」に比べ phenylpropanoid glycoside (1~3) 及び  $\gamma$ -oryzanol (4及び5)の含有率が低かった。これらのことから、phenylpropanoid glycoside (1~3) や  $\gamma$ -oryzanol (4及び5)の含有率と登熟の良否との関係が存在する可能性が示唆された。また今回、高温登熟バイオマーカーの 3',6-di-*O*-sinapoylsucrose (2)及び 24-methylenecycloartanyl ferulate (5)の合成に關する遺伝子候補領域がそれぞれ第4及び第5染色体等に存在することが明らかになった。今後、これらの領域の絞り込みを進め、遺伝子を単離・同定することで、高温環境下でも登熟の優れる品種の育成に繋げることができると考えられる。また、phenylpropanoid glycoside 及び  $\gamma$ -oryzanol は動物に対して様々な生理活性を持つ化合物として知られている (Kernan et al., 1998; Mandak & Nystrom, 2012) ため、機能性を持つ品種の育成にも繋げることができると期待される。

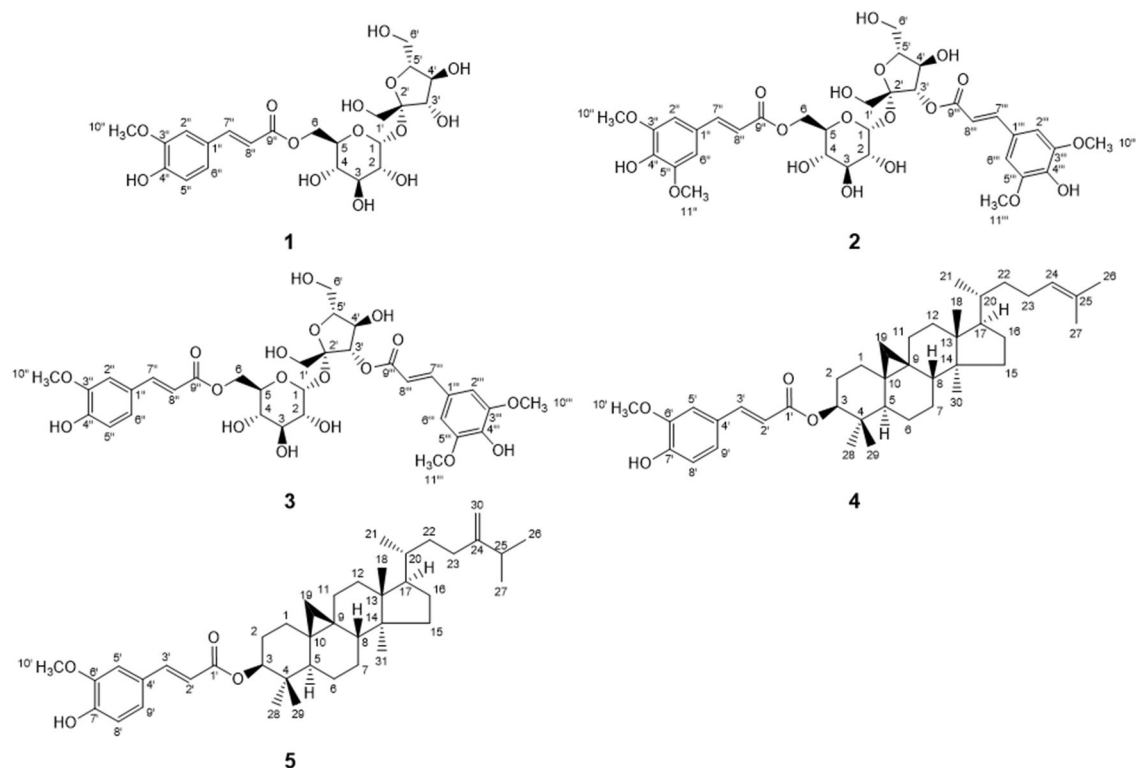


図1 玄米に含まれる phenylpropanoid glycoside の 6-*O*-feruloylsucrose (1)、3',6-di-*O*-sinapoylsucrose (2)、3'-*O*-sinapoyl-6-*O*-feruloylsucrose (3)及び  $\gamma$ -oryzanol の cycloartenyl ferulate (4) 及び 24-methylenecycloartanyl ferulate (5)の化学構造。

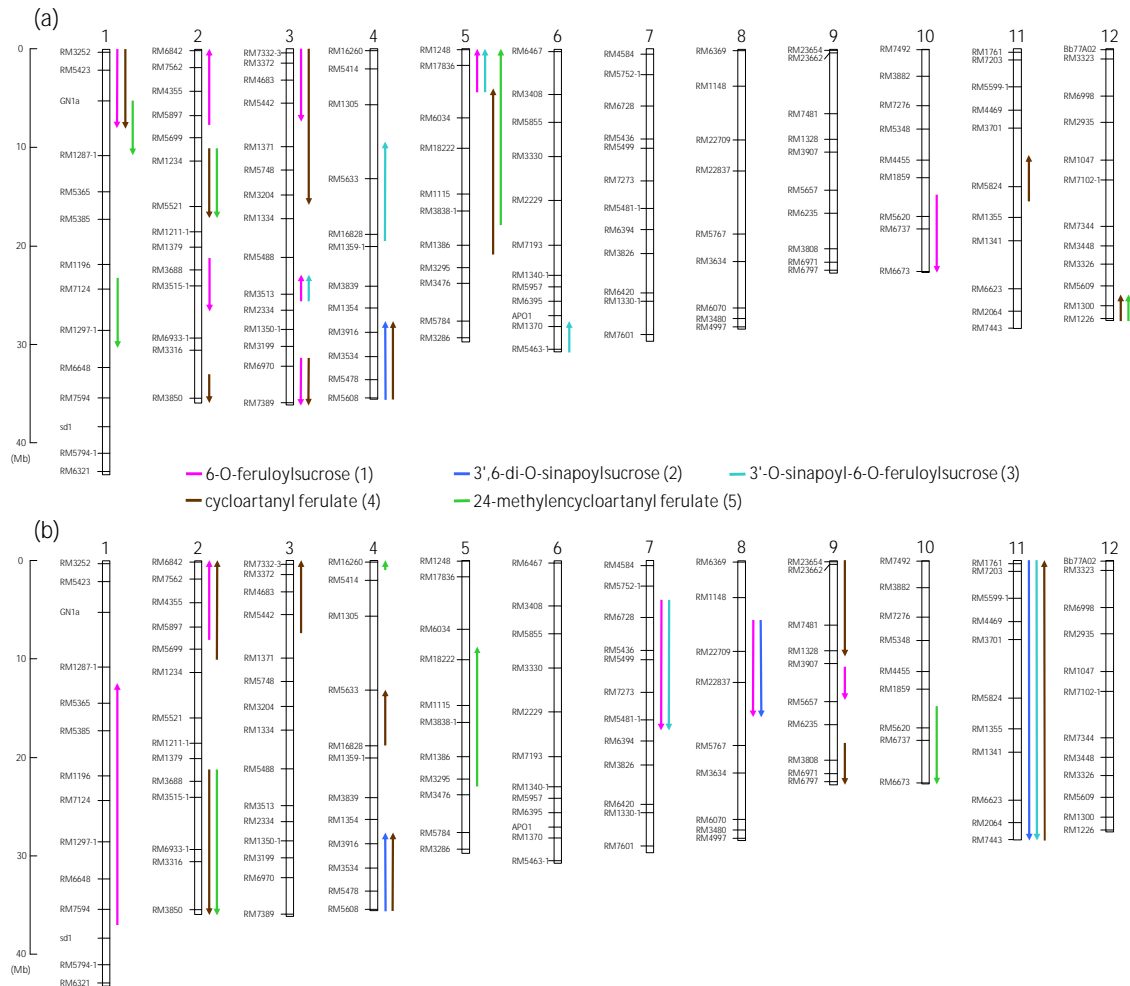


図2 「コシヒカリ」と「タカナリ」との交雑に由来する正逆染色体断片置換系統群 (CSSLs) の比較に基づく玄米中の phenylpropanoid glycoside の 6-O-feruloylsucrose (1)、3',6-di-O-sinapoylsucrose (2)、3'-O-sinapoyl-6-O-feruloylsucrose (3)及び  $\gamma$ -oryzanol 24-methylenecycloartenyl ferulate (4)及び cycloartenyl ferulate (5)の含有率に関与する量的遺伝子座のマッピング。(a)は「コシヒカリ」の遺伝的背景に「タカナリ」の染色体断片を導入した CSSLs を材料とした試験の結果を、(b)は「タカナリ」の遺伝的背景に「コシヒカリ」の染色体断片を導入した CSSLs を材料とした試験の結果を示す。染色体上部の数字は染色体番号を、染色体左側の文字はマーカーを示す。矢印は化合物 1~5 の濃度に関与する QTL を、上向き及び下向きはそれぞれ「コシヒカリ」型及び「タカナリ」型の対立遺伝子により増加することを示す。

< 参考文献 >

GriSP (Global Rice Science Partnership). (2013). Rice Almanac (4th ed.). Los Baños: International Rice Research Institute.

Kernan, M. R., Amarquaye A., Chen, J. L., Chan, J., Sesin D. F., Parkinson, N., Ye, Z., Barrett, M., Bales, C., Stoddart, C. A., Sloan, B., Blanc, P., Limbach, C., Mrisho, S., & Rozhon, E. J. (1998). Antiviral phenylpropanoid glycosides from the medicinal plant *Markhamia lutea*. *Journal of Natural Product*, 61, 564–570.

Khush, G. S. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology*, 35, 25–34.

Mandak, E., & Nyström, L. (2012). Steryl ferulates, bioactive compounds in cereal grains. *Lipid Technology*, 24, 80–82.

Morita, S., Wada, H., & Matsue, Y. (2016). Countermeasures for heat damage in rice grain quality under climate change. *Plant Production Science*, 19, 1–11.

Nagato, K., & Ebata, M. (1965). Effects of high temperature during ripening period on the development and the quality of rice kernels. *Japanese Journal of Crop Science*, 34, 59–66.

- Nakano, H., Ono, H., Iwasawa, N., Takai, T., Arai-Sanoh, Y., & Kondo, M. (2013) Isolation and identification of phenolic compounds accumulated in brown rice grains ripened under high air temperature. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 11921–11928.
- Yoshida, S., & Hara, T. (1977). Effects of air temperature and light on grain filling of an indica and a japonica rice (*Oryza sativa* L.) under controlled environmental conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, *25*, 121–134.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakano Hiroshi, Takai Toshiyuki, Kondo Motohiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Identification of quantitative trait loci for the concentrations of phenylpropanoid glycosides in brown rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 17317 ~ 17325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02030">https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02030</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Hiroshi, Takai Toshiyuki, Kondo Motohiko	4. 巻 95
2. 論文標題 Quantitative trait loci regulate the concentrations of steryl ferulates in brown rice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cereal Chemistry	6. 最初と最後の頁 800 ~ 810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1002/cche.10099">https://doi.org/10.1002/cche.10099</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----