

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870116

研究課題名(和文) 野生イネイントロgression系統を用いた玄米栄養の改変および分子マーカーの作製

研究課題名(英文) Identification of germplasm and development of molecular markers for breeding of nutritional traits in rice grain

研究代表者

大森 良弘 (Ohmori, Yoshihiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：20398390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イネの玄米中栄養成分を改良するための新たな遺伝子資源を発見するために、野生イネに注目し、玄米中のミネラルや遊離アミノ酸の濃度を増加させる野生イネ遺伝子資源を探索しました。その結果、6種の野生イネから、鉄や亜鉛などのミネラルや遊離アミノ酸の玄米中濃度を増加させる遺伝子資源を同定することができました。また、これら遺伝子資源を育種に利用可能にするために、ゲノム情報を利用した遺伝学的解析を行い、分子マーカーの作成を行いました。遺伝子資源や分子マーカーは、イネの玄米栄養を改良するために必要不可欠な材料です。そのため、本研究の成果はイネの玄米栄養育種の進展に大きく貢献すると考えられます。

研究成果の概要(英文)：Minerals and amino acids in grains are important as nutrition. Increasing a concentration of minerals and amino acid in grains are expected to improve nutritional conditions not only for plant themselves but human living who eating crops. In this study, I focused on genetic factors in wild rice that can improve mineral concentrations or amino acid concentrations in rice grains.

In order to identify genetic factors from wild rice, I used 6 wild rice introgression lines as a source of wild rice germplasm and performed large scale screening of their grain traits. I could find wild rice introgression lines that had high iron or zinc concentration and high lysine or isoleucine concentration in grains. Furthermore, I could develop molecular markers that link high iron concentration in rice grain.

Germplasm and molecular markers identified and developed in this study would be a important tools for breeding of rice grain nutrition in the future.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：野生イネ ミネラル 遊離アミノ酸 植物育種学 植物栄養学

## 1. 研究開始当初の背景

日本のカロリーベースの食料自給率は他の先進国と比べ極めて低い。自給率低下の大きな要因として主食用米の消費が減少していることが挙げられており、米の需要の拡大が求められている。そのため、これまでの収量や良食味といった形質に関する育種だけではなく、機能性成分等の形質を付加し米に付加価値を与えようとする育種が、1989年のスーパーライス計画以降、公的なイネ育種プロジェクトにより進められており、血圧降下作用が期待される GABA (γ-アミノ酪酸) を多く含む巨大胚米、腎臓疾患患者の食事療法に用いられる低グルテリン米がこれまでに機能性成分を含む米品種として育成されている (農林水産省: 新しい米を創る '09)。一方で、ミネラル強化米、高アミノ酸米など、大きな需要が期待される形質については、これまで品種として育成された事例が無い。その原因の一つとして、新形質米・機能性成分米の育種に用いられてきたイネ品種は、その遺伝的背景が近いために、遺伝子資源が限られていたことが挙げられる。このことは、近年の育種により作製されたイネ品種に、さらに新たな形質を付加するためには、これまでとは異なる遺伝子資源を探索し利用する必要があることを示唆している。

現在アジア地域で栽培されているイネ品種 (栽培イネ) は全て、野生イネの一つの種である *Oryza rufipogon* に由来する (Huang *et al.*, Nature 490:497-501, 2012)。野生イネは *O. rufipogon* 以外にも世界で約 20 種が知られており、アジア、アフリカ、オセアニア、および中南米の熱帯から亜熱帯の地域に広く自生している。近年、これら野生イネには栽培イネが栽培化の過程で失った有用な遺伝子が存在することが報告された (Hattori *et al.*, Nature 460: 1026-1030, 2009)。このことは、野生イネには栽培イネが持たない遺伝子資源が存在することを示すとともに、栽培イネの祖先種とは風土の異なる地域に自生している他の野生イネ種は、栽培イネを育種する上で遺伝子資源の宝庫であることを期待させる。

申請者は当時 (平成 25 年度) に、「野生イネのミネラル輸送と利用」という研究テーマで、日本学術振興会の特別研究員として、野生イネが持つミネラルの輸送と利用に関する有用な遺伝子資源を探索しており、その過程で、鉄や亜鉛などの玄米中のミネラル含有量が増加する野生イネ由来の系統を見出していた (大森ら, 日本育種学会第 123 回講演会)。このことは、野生イネには玄米中の栄養価を高める遺伝子資源が存在することを示唆している。そこで申請者は、「野生イネイントログレッション系統を用いた玄米栄養の改変および分子マーカーの作製」という、これまでの研究を発展させる新たな研究課題を提案した。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、機能性成分米として大きな需要が期待されるがこれまでに品種化されていないミネラル強化米、高アミノ酸米の作出に貢献することを目的として、以下の玄米形質を改変する遺伝子資源を探索し、さらに一部形質については品種化を促進するための分子マーカーの作製を試みた。

### ミネラル強化米

これまでに遺伝子組換え体により玄米中含有量の増加が試みられるなど、玄米中の機能性成分として注目されているミネラルは鉄および亜鉛であるが、本研究では、近年の厚生労働省国民健康・栄養調査結果において摂取量の低下が報告されている 5 つの微量元素 (鉄、亜鉛、カルシウム、マグネシウム、銅) に注目して、幅広く玄米中ミネラルに関する遺伝子資源の探索を行なった。

### 高アミノ酸米

米はリジンやイソロイシンの含有量が低く、アミノ酸スコアが低い食べ物である。そこで本研究では、玄米中のリジンおよびイソロイシンの含有量を増加させることにより、米のアミノ酸スコアを上昇させることを目指し、玄米中の遊離リジンおよび遊離イソロイシン含有量に注目して遺伝子資源の探索を行なった。

## 3. 研究の方法

### 野生イネ遺伝子資源の探索

野生イネから遺伝子資源を探索するために、本研究では野生イネから作製されたイントログレッション系統を用いた。イントログレッション系統とは、染色体の一部が野生イネに置換された栽培イネ系統であり、数十系統で野生イネのゲノムをほぼカバーする系統群である。これら系統群は遺伝的背景が均一であるため、系統間の比較が容易であり、有用形質の検出感度が他の遺伝子資源探索方法に比べて高いという利点がある。本研究ではアジアの野生イネ *O. rufipogon*、中南米の湿地に広く分布する野生イネ *O. glumaepetula*、オーストラリア北部に生育する野生イネ *O. meridionalis*、アフリカに広く分布する野生イネ *O. longistaminata* および *O. barthii*、西アフリカの栽培イネ *O. glaberrima* (日本の栽培イネとは異なる祖先種に由来しており、近代的な品種改良を受けていない)、から作成された 6 つの野生イネイントログレッション系統 (全 250 系統) を用いた。

玄米中のミネラル、ならびに遊離アミノ酸の濃度の測定には、Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) ならびに Ultra Performance LC (UPLC) を用い、上記野生イネイントログレッション系統を対象とした玄米中ミネラルまたは遊離アミノ酸濃度を増加させる野生イネ遺伝子資源

の探索を行なった。

玄米中ミネラルの測定には、2012 年と 2013 年に東京大学弥生キャンパスに設置されているイネ圃場で栽培・収穫した種子を用いた。また、遊離アミノ酸の測定には、2012 年から 2014 年の 3 年間、同圃場で栽培・収穫した種子を用いた。

#### 分子マーカーの作成

野生イネ遺伝子資源を育種に効率的に利用するためには、有用形質と連鎖する分子マーカーの作成が重要である。

本研究では、野生イネ遺伝子資源の探索から得られた、玄米中ミネラルを増加させる 3 つの野生イネイントログレッション系統について、戻し交雑 F2 集団を作成し、次世代シーケンサーを利用した全ゲノム配列決定、ならびに MutMap+ 解析を行なうことで有用形質を支配する遺伝子座の同定を試みた。さらに得られたゲノム情報から、有用形質と連鎖する分子マーカーの作成を試みた。

#### 4. 研究成果

##### 玄米中ミネラル

東京大学弥生圃場で 2 年間に渡り栽培・収穫された 6 つの野生イネイントログレッション系統 (全 250 系統) における玄米中ミネラル濃度の測定から、各イントログレッション系統において、遺伝的背景である栽培イネよりも有意に玄米中铁濃度が高い 8 系統、亜鉛濃度が高い 17 系統、カルシウム濃度が高い 9 系統、マグネシウム濃度が高い 24 系統、ならびに銅濃度が高い 13 系統を同定することに成功した。これら玄米中のミネラル濃度が高い系統では、各ミネラルについて、最高で、栽培イネよりもそれぞれ、鉄で 1.5 倍、亜鉛で 1.8 倍、カルシウムで 2.6 倍、マグネシウムで 1.4 倍、ならびに銅で 1.8 倍の濃度増加が見られた。

これまでの野生イネ遺伝子資源を対象とした類似の研究は、主に栽培イネの祖先種である *O. rufipogon* を用いて行なわれていたが、本研究で、新たに 5 つの野生イネから玄米中ミネラル含有量を増加させる遺伝子資源を発見したことにより、野生イネにはこれまでは発見されていなかった、栽培イネの玄米中ミネラル濃度を増加させる遺伝子資源が存在することを明らかにした。

##### 玄米中遊離アミノ酸

東京大学弥生圃場において、3 年間に渡り栽培・収穫された 4 つの野生イネイントログレッション系統 (*O. glumaepetula*, *O. meridionalis*, *O. longistaminata* および *O. glaberrima*) について、玄米中の 19 種類の遊離アミノ酸 (ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン、セリン、グルタミン、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アラニン、プロリン、チロシン、バリン、メチオニン、リジン、イソロイシン、ロイシン、

フェニルアラニン、トリプトファン) 濃度を測定した。その結果、玄米中遊離リジン濃度が栽培イネよりも有意に増加している野生イネイントログレッション系統を 2 系統、ならびに遊離イソロイシンの玄米中濃度が有意に増加している野生イネイントログレッション系統を 3 系統同定した。これら系統では、最高で、玄米中遊離リジン濃度が栽培イネの 1.9 倍、遊離イソロイシン濃度が 1.8 倍をそれぞれ示した。また、その他の遊離アミノ酸についても栽培イネよりも有意に玄米中濃度が増加している系統を複数見出すことができた。

これまでに、野生イネ遺伝子資源を対象とした玄米中遊離アミノ酸濃度に関する研究報告は無いため、本研究により、初めて野生イネに玄米中遊離アミノ酸濃度を増加させる遺伝子資源が存在することを明らかにすることができた。

##### 種子貯蔵タンパク質

玄米中の遊離アミノ酸濃度と種子貯蔵タンパク質には関連性が示唆されている。そこでさらに、本研究で見出した、玄米中で 19 種類の遊離アミノ酸のいずれかの濃度が有意に変化している野生イネイントログレッション系統 (全 31 系統) について、種子貯蔵タンパク質の組成を SDS-PAGE により調査した。その結果、玄米中遊離アミノ酸含有量が増加している野生イネイントログレッション系統の中には、種子貯蔵タンパク質の組成が変化している系統が存在することを明らかにした。

種子貯蔵タンパク質は、コメの食味を決定する要因の一つであり、また近年ではバイオリアクターとしても注目され、コメの種子貯蔵タンパク質を改変しようとする試みがなされるなど、イネ玄米中成分育種において重要な形質の一つである。これまで、野生イネの種子貯蔵タンパク質に関する研究は行なわれているが、栽培イネの種子貯蔵タンパク質組成を変化させる遺伝子資源が、野生イネ遺伝子資源に存在することを明らかにしたのは、野生イネイントログレッション系統を用いた本研究が初めてである。

##### 分子マーカーの作成

本研究で同定された玄米中ミネラル、遊離アミノ酸、ならびに種子貯蔵タンパク質に関する野生イネ遺伝子資源は、イネの玄米中成分育種に有用な系統であると考えられる。そこでさらに、これら遺伝子資源を有効的に育種に活用するために、分子マーカーの作成を試みた。分子マーカーの作成は、玄米中の鉄、または亜鉛濃度が高い 3 つの野生イネイントログレッション系統について行なった。

3 つの野生イネイントログレッション系統から作成された戻し交雑 F2 集団を用いた MutMap+ 解析から、2 つのイントログレッション系統について、栽培イネの玄米中铁

濃度を増加させる野生イネ遺伝子座を、第 4 染色体の 16 ~ 19 Mbp 付近、および第 12 染色体の 5 ~ 25 Mbp 付近に見出した。一方で、玄米中亜鉛濃度が高い系統については、亜鉛濃度と関連した野生イネ遺伝子座を見出すことができなかった。

MutMap+ 解析では、次世代シーケンサーを用いた戻し交雑 F2 集団におけるゲノムリシーケンスを行なっていたため、MutMap+ 解析に用いた 3 つの野生イネイントログレッション系統のゲノム情報を栽培イネのゲノム情報と比較することで、各野生イネイントログレッション系統に得着的な DNA 挿入、欠失、ならびに一塩基多型の検出を行なうことで分子マーカーの作成を行なった。

これら分子マーカーにより、玄米中鉄濃度に関連した野生イネ遺伝子座における遺伝子型の判定が可能となる。これら分子マーカーは、今後、本研究で得られた野生イネ遺伝子資源を用いて育種を遂行する上で有用な情報になると考えられる。

#### 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 1 件)

Yoshihiro Ohmori, Naoyuki sotta, and Toru Fujiwara、Identification of introgression lines of *Oryza glaberrima* Steud. with high mineral content in grains、Soil Science and Plant Nutrition、査読有、Volume 62、2016、456-464、DOI: 10.1080/00380768.2016.1204896.

##### [学会発表](計 4 件)

大森良弘、藤原徹  
野生イネイントログレッション系統の玄米中遊離アミノ酸解析  
日本育種学会第 130 回講演会  
2016 年 9 月 23 日 ~ 25 日  
鳥取県・鳥取市

大森良弘、藤原徹  
イネのミネラルに関する育種学的研究  
日本育種学会第 128 回講演会  
2015 年 9 月 11 日 ~ 9 月 12 日  
新潟県・新潟市

大森良弘、藤原徹  
低栄養耐性イネ作出に向けた野生イネ遺伝資源の探索  
日本土壌肥料学会 2015 年度京都大会  
2015 年 9 月 9 日 ~ 2015 年 9 月 11 日  
京都市・左京区

大森良弘、反田直之、藤原徹  
野生イネイントログレッション系統を用いた玄米中元素濃度に関する遺伝資源の

#### 探索

日本土壌肥料学会 2014 年度東京大会  
2014 年 9 月 9 日 ~ 9 月 11 日  
東京都・小金井市

##### [図書](計 1 件)

Kenji Yano, Yoshihiro Ohmori, and Toru Fujiwara、Elsevier、Plant macro-nutrient use efficiency: molecular and genomic perspectives in crop plants、Chapter 17: introduction to GWAS and MutMap for identification of genes/QTL using next-generation sequencing、2017、印刷中

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大森 良弘 (OHMORI, Yoshihiro)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教  
研究者番号: 20398390