

新規食味評価手法を用いた
水稻品種「つや姫」の遺伝解析

後藤 元

目次

略語一覧	1
序論	3
第1章 炊飯米の白さを客観的に評価する手法の開発	
第1節 分光測色計による炊飯米の白さの評価	7
第2節 味度メーターを用いた炊飯米の白さの簡易評価	17
第3節 炊飯米の分光反射特性	24
第4節 タンパク質含有率およびアミロース含有率と白さの関係	28
第5節 考察	32
第2章 メタボローム解析を用いた炊飯米の味の評価	
第1節 炊飯米の味に関与する成分の探索	35
第2節 低分子化合物組成の品種間差	55
第3節 低分子化合物組成に登熟温度が及ぼす影響	63
第4節 考察	71
第3章 「つや姫」の食味関連遺伝子の解析	
第1節 「つや姫」のゲノム構成の解析	73
第2節 「つや姫」の良食味関連遺伝子の QTL 解析	86
第3節 考察	97
総合考察	101
摘要	106
謝辞	108
引用文献	110

略語一覽

3'UTR : three prime untranslated region

5'UTR : five prime untranslated region

CE : capillary electrophoresis

CE-TOFMS : capillary electrophoresis - time of flight mass spectrometry

CSA : D - camphor - 10 - sulfonic acid

GABA : gamma aminobutyric acid

GC : gas chromatography

InDel : Insertion / Deletion

LC : liquid chromatography

LC-MS/MS : liquid chromatography - mass spectrometry / mass spectrometry

LOD : logarithm of odds

MES : 2 - (N - morpholino) ethane sulfonic acid

MRM : multiple reaction monitoring

MS : mass spectrometry

NMR : nuclear magnetic resonance

PCR : polymerase chain reaction

QTL : quantitative trait locus

RAP : rice annotation project

RIL : recombinant inbred line

S/N : signal - noise ratio

SCE : specular component exclude

SNP : single nucleotide polymorphism

SSR : simple sequence repeat

WI : white index

序論

米の消費量は 1962 年をピークに年々減少しており、一人当たりの年間の消費量は、1962 年の 118.3 kg/人から 2014 年では 55.2 kg/人と、およそ半減している（農林水産省 2016）。全国ベースでの米の需要量は毎年約 8 万トンずつの減少傾向であるのに加え、平成 30 年には生産調整の廃止が決定しており、生産量の過多による米価の低下が想定されている。このような状況の中、複数の米産地で、既存ブランド品種の再 PR の実施に加え、新たに導入する良食味品種を核としたブランディング戦略による産米の価格向上、市場確保を狙う取組みが見られるようになってきている。新品種導入によるブランディング戦略には、導入する品種の食味が特に重要であることから、育種目標として食味の重要度が年々上がっており、2009 年以降、北海道の「ゆめぴりか」(佐藤 2009)、山形県の「つや姫」(結城ら 2010)、青森県の「青天の霹靂」、新潟県の「新之助」、岩手県の「金色の風」、宮城県の「だて正夢」、福井県の「いちほまれ」等の複数の品種が、「コシヒカリ」と同等あるいは上回る食味を有することを目標に戦略的に育成されてきた。

山形県は、「コシヒカリ」を上回る食味を有するブランド品種として、2010 年に「つや姫」を育成し、全国的に高い評価を得ている。「つや姫」は「コシヒカリ」と同熟期であるため、東北南部以南で全国的に栽培が可能であるだけでなく、耐倒伏性に優れ、収量、品質も「コシヒカリ」に優る等、栽培特性が非常に優れている（結城ら 2010）。さらに、「コシヒカリ」を上回ることを目標に選抜された食味も非常に優れており、炊飯米の光沢、外観の白さ、甘味や旨味などの味、食感のひとつである粘りに優れることで食味官能試験に

において優れた評価を受けることが明らかになっている。また、タンパク質含有率やアミロース含有率等の食味に関与することがわかっている理化学特性が「コシヒカリ」と概ね同程度であることから、これらと異なる理化学特性が食味に関与していると考えられるため、遺伝資源としても非常に有望である。「つや姫」やその近縁系統の食味に関する遺伝解析は行われていない。

炊飯米の食味を測定する方法としては食味官能試験が基本であり（全国食料調査協会 1997）、外観・味・香り・粘り・硬さなどで評価されている（福井・小林 1996）。食味官能試験は食味評価の上で最も確実な試験であるものの、多くのサンプル量とパネリスト、試験時間を必要とする問題点があることから（Lestari *et al.* 2009、Wada *et al.* 2008）、多数の試料を短時間で測定が可能な、パネリストを必要としない手法の開発が求められている。新米・古米に限らず外観、味、粘りの炊飯米の3要素が総合評価に強く影響することから（Matsue *et al.* 1991）、粘り等に関係するタンパク質含有率やアミロース含有率による食味評価法の開発が進んだ（Juliano 1985、Okuno *et al.* 1983、Ramesh *et al.* 2000）。炊飯米の光沢に関する評価法は開発されたが（長沢ら 1994、蛭谷 1998、佐藤ら 2003）、「つや姫」の特徴である炊飯米の外観（白さ）、味に関する研究は十分になされていないのが現状である。

日本型品種とインド型品種の交雑後代を用いた遺伝解析から、食味に関与する QTL (quantitative trait locus) が見出され、染色体上の位置が決定されている（Wan *et al.* 2004、Takeuchi *et al.* 2007）。一方、日本型品種間の食味の差に関する遺伝解析においては、粘りに関与するアミロース含有率については研究が進んでおり、

特に W_x 座については制御機構も含めた解析が行われた。低アミロース性対立遺伝子 W_x-mq (Sato *et al.* 2002)、 W_x-y (中場ら 2006)、 W_x1-1 (Ando *et al.* 2010) が明らかとなり、気象的にアミロース含有率が高まりやすい北海道や、本州の中山間地域における育種にこれらの遺伝子が活用されている (安東ら 2007、中場ら 2006)。また、「コシヒカリ」の低アミロース性突然変異体を品種とした「ミルキークイーン」 (伊勢ら 2001) が本州東北以南で普及し、北海道では W_x1-1 を保有する「おぼろづき」「ゆめぴりか」が普及している。食味への関与が明らかなタンパク質含有率に関しても、アミロース含有率と同様に研究が進められている。倍加半数体系統を用いた解析から第 2 染色体 (Lee *et al.* 2014) に、「コシヒカリ」と「Kasalath」の戻し交雑自殖系統および染色体部分置換系統を用いた解析から第 6 染色体短腕の W_x 座近傍 (Takeuchi *et al.* 2007) に QTL が検出されているが、育種への活用は進んでいないのが現状である。また、「コシヒカリ」の良食味については、「コシヒカリ」と「アキヒカリ」の交雑後代を用いた解析から第 2 染色体上に (田中ら 2006)、「コシヒカリ」と「日本晴」の交雑後代を用いた解析から第 3 染色体短腕 (Takeuchi *et al.* 2008) に、効果の強い QTL の存在が明らかにされている。第 3 染色体短腕の QTL は、タンパク質含有率と炊飯米表面の物理特性に関与することが明らかになっているが (Hori *et al.* 2016)、機能解析、遺伝子単離などはまだ行われていないことから、日本型水稻の炊飯米の食味に関する遺伝子は、その多くが未同定である。「つや姫」の食味の特徴は炊飯米の白さ、味、食感にあり、効果の大きいとされるタンパク質含有率やアミロース含有率には「コシヒカリ」と明らかな差がないため、これまで研究が進められてき

たタンパク質含有率やアミロース含有率を制御する遺伝子以外が良食味の原因である可能性が高い。よって、「つや姫」を利用した遺伝解析を行い、遺伝子を単離すれば、新たな食味向上の遺伝資源となることが期待される。

本論文では、産地及び消費者から求められている「コシヒカリ」と同等以上の高い食味レベルに対応するため、品種育成の際の選抜指標となる新たな客観的食味評価手法を検討する。さらに、新たな食味評価手法を用いて「つや姫」の良食味遺伝子の解析を行ったので、食味関連遺伝子の座乗領域について論じる。第1章では、炊飯米の白さを評価する手法を検討するとともに、白さの要因についてアミロース含有率、タンパク質含有率との関係も含めて考察する。第2章では、新たな解析手法であるメタボローム解析が炊飯米の味の新たな評価手法として用いることが可能かを検討するとともに、品種間差と変動要因について論じる。第3章では、「つや姫」のゲノム構成について、SNP (single nucleotide polymorphism) 解析、SSR (simple sequence repeat) マーカーによる解析、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンスの結果から考察するとともに、第1章、第2章の研究で開発した食味評価手法を用いた食味関連遺伝子の QTL 解析の結果を論じる。

第1章 炊飯米の白さを客観的に評価する手法の開発

第1節 分光測色計による炊飯米の白さの評価

炊飯米の食味を測定する方法としては食味官能試験があり、外観・味・香り・粘り・硬さなどで評価されている（松江 1992、福井・小林 1996）。食味官能試験は食味評価の上で最も確実な試験であるものの、多くのサンプル量とパネリスト、試験時間を必要とする問題点がある（Lestari *et al.* 2009、Wada *et al.* 2008）ことから、良食味系統を効率的に選抜するためには、多数の試料を短時間で測定可能な、パネルを必要としない手法を開発する必要がある。

炊飯米については、外観、味、粘りが総合評価に強く影響することから（Matsue *et al.* 1991）、外観では炊飯光沢に関連する味度値（佐藤ら 2003）、粘りではタンパク質含有率（Juliano 1985）やアミロース含有率（Okuno *et al.* 1983、Ramesh *et al.* 2000）、味では糖類含量（池田 2001、香西ら 2000）やアミノ酸類含量（Tran *et al.* 2004、Tran *et al.* 2005、Kamara *et al.* 2010）など食味評価手法の研究が進み、遺伝解析も実施されている（Takeuchi *et al.* 2007、Wada *et al.* 2008、Kwon *et al.* 2011）。しかし、外観の一つである白さについては、パーボイルドライスでは重要性は認識されており、白さの評価法の研究がなされているものの（Lv *et al.* 2009）、炊いて食べる米では研究は進んでいなかった。

そこで本研究では、色彩を測定する機器である分光測色計を用い、炊飯米の白さの客観的評価法について検討した。

（1）材料

山形県農業総合研究センター水田農業試験場（山形県鶴岡市）で

2010～2012年に栽培したサンプルを用いた。山形県内で栽培が可能な11品種（「はなの舞い」、「里のゆき」、「あきたこまち」、「どまんなか」、「ササニシキ」、「ひとめぼれ」、「はえぬき」、「コシヒカリ」、「つや姫」、「越のかおり」、「ふくひびき」）と育成途中系統を供試し、基準品種は試験材料と別に栽培・収穫した「はえぬき」とした。栽培方法は4月中旬に播種、5月中旬に22.2株/m²の5本/株で200株移植し、施肥は、標肥区として窒素成分で基肥0.5kg/a、幼穂形成期に0.2kg/aの計0.7kg/a、一部品種のみ、多肥区として窒素成分で基肥0.7kg/a、幼穂形成期に0.2kg/a、減数分裂期に0.15kg/aの計1.05kg/aとした。8月下旬から10月上旬にかけて各サンプルの成熟期（試験区の穂の半数が抽出した日を出穂期とし、出穂期後の積算気温が950～1100℃）に96株または128株を刈り取りした。収穫した玄米はふるいに通し、1.9mm未満の粒を除いた。

（2）方法

調整した玄米を精米機（山本製作所、VP-30T）で、重量ベースで90%となるように搗精し精米とした。2010年の「はえぬき」については、88、89、90、91、92%と搗精歩合を変えた試料も作成した。精米350gに1.33倍量の水を加え、1時間浸漬の後、電気炊飯ジャー（東芝、RCK-5DG）で炊飯を行った。炊飯米は炊き上がり後に10分間蒸らし、その後によくかき混ぜた。20～30gの炊飯米を、白さを測るサンプルとしてガラス製のシャーレにとり、残りは食味官能試験に用いた。食味官能試験は水田農業試験場の職員16～24人で行い、炊飯米では外観、光沢、白さ、香り、味、粘り、硬さ、総合評価の8項目を評価した。評価は-3～+3の範囲で、1刻みとし、

全員の平均値を評価値とした。白さの項目は、基準米と比較して白い場合にプラス、白くない場合にマイナスとし、一目で明確に違いがわかる場合は±3、一目で違いがわかる場合は±2、2回目の確認で違いがわかる場合は±1とした。

白さの測定には分光測色計（コニカミノルタ、CM-600d）を用いた。測定モードは、目視に近いとされる SEC（specular component exclude）方式を用いた。これは、正反射光を除去し、拡散反射光のみを測定するものである。白さを表す値として、紙の白さを示す表色値 WI（white index）（ASTM E313-73）を用いた。これは、完全拡散反射面を 100 とし、白色から遠ざかるにしたがって値が低下し、0 では黒色を示す指数である。ガラス製のシャーレにとったサンプルを密封して 20℃で 2 時間置いた後、8 g を直径約 32 mm、高さ約 9 mm の円柱状に成型したサンプルを 3 つ作成し、円柱の上面および底面の中央部をそれぞれ測定し平均値を求めた。

（3）結果と考察

搗精歩合を変えた「はえぬき」の食味官能試験における白さは、玄米を搗精するほどに上昇し、-1.50（92%）～0.94（88%）の範囲であった。WI は食味官能試験による評価とよく一致し、25.4（92%）～38.6（89%）であった。食味官能試験の白さと WI には有意な相関（ $r=0.97$ 、 $p<0.01$ ）があり、 $y=0.1731x-5.8947$ （ y =食味官能試験の白さ WI、 x =WI）の関係があった（図 1）。

2010 年の WI の範囲は 29.6（「あきたこまち」多肥区）～41.6（「越のかおり」標肥区）であった。同一の施肥量（標肥区）では、「つや姫」と「越のかおり」が「里のゆき」に比較して有意に白く、「里の

ゆき」が 30.6 であったのに対し、「つや姫」は 41.0 と、「越のかおり」の 41.6 に次いで全体で 2 番目に高く、次いで「コシヒカリ」の 39.2 であった（図 2）。また、食味官能試験の白さの範囲は、-0.46（「あきたこまち」多肥区）～1.29（「越のかおり」標肥区）となり、食味官能試験の白さと WI の間には有意な相関（ $r=0.84$ 、 $p<0.01$ ）があり、 $y=0.1006x-3.2590$ （ y =食味官能試験の白さ、 x =WI）の関係があった（図 3）。

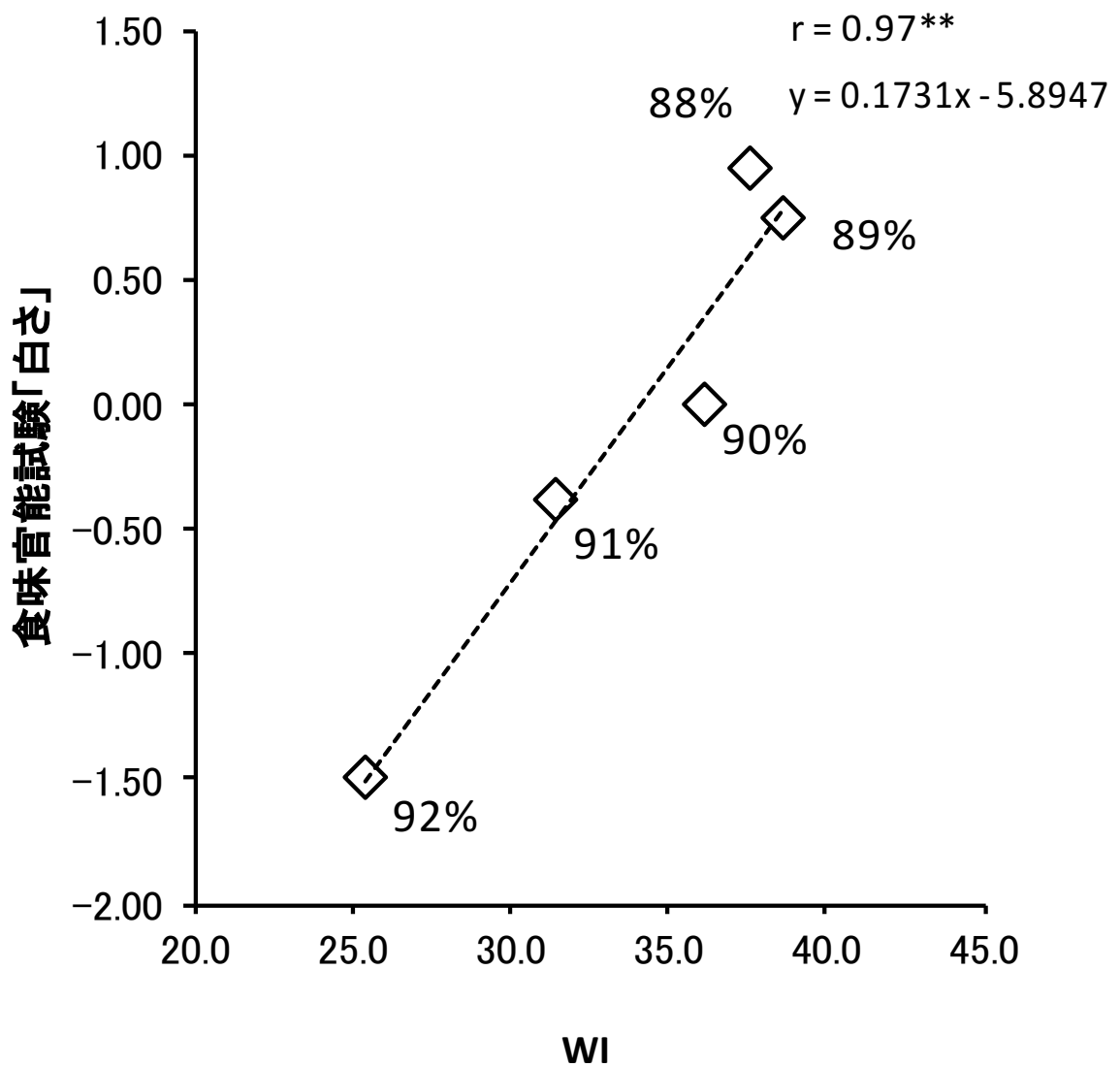


図 1 搗精歩合を変えた「はえぬき」の炊飯米の白さと成型サンプルの WI の関係

** : 1%水準で有意

マーカー横の数字は搗精歩合

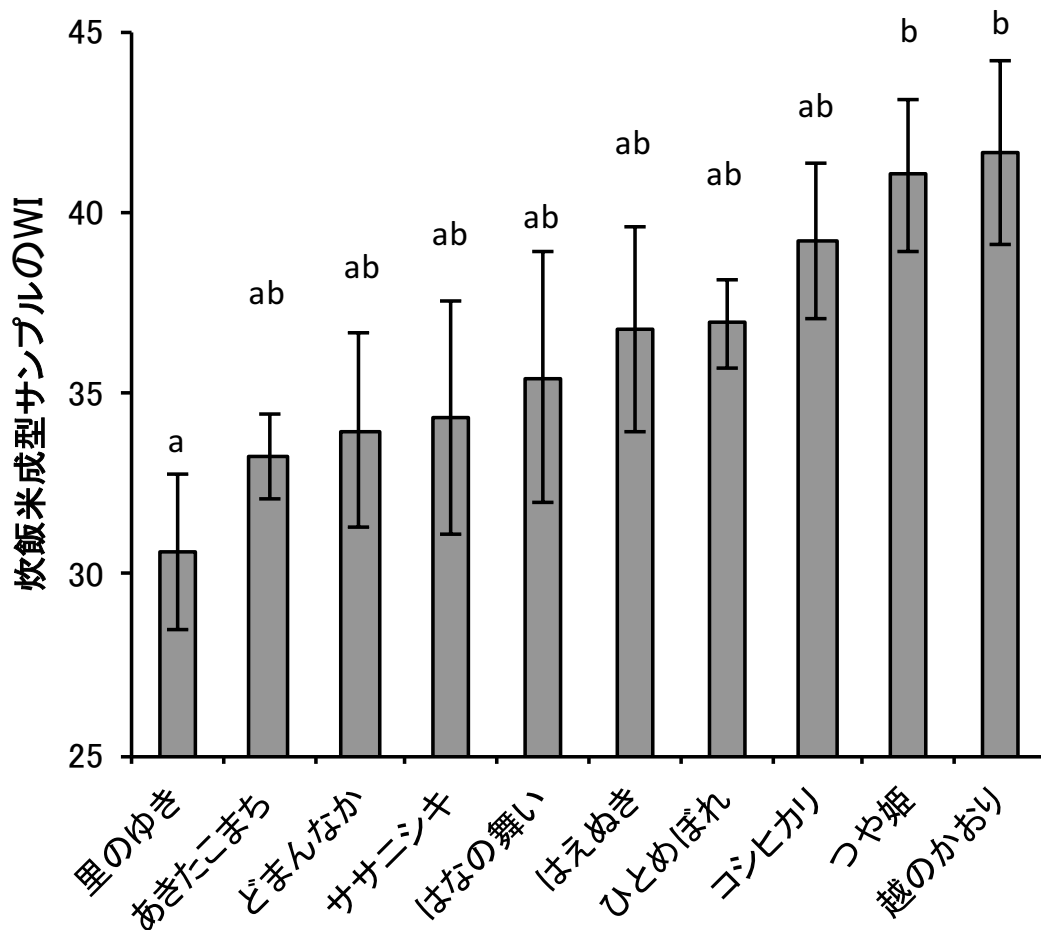


図 2 炊飯米の白さの品種間差 (2010 年)

図中バーは標準偏差 (n=6)

施肥は窒素成分で 0.7 kg/a

異なるアルファベットは Tukey 法により 5% 水準で有意差あり

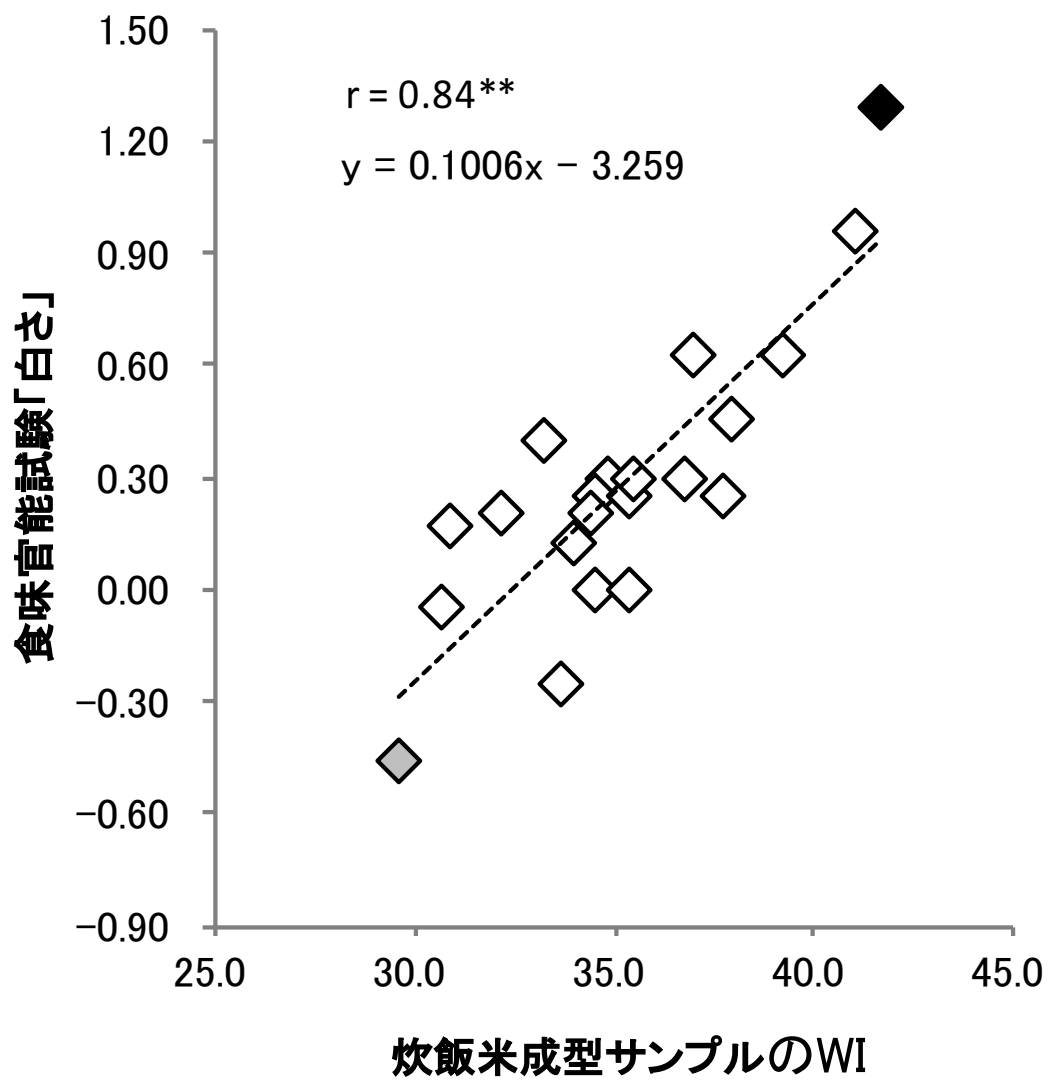


図 3 炊飯米成型サンプルの WI と食味官能試験「白さ」の関係

(2010 年、n=21)

** : 1% 水準で有意

黒色のマーカーは「越のかおり」灰色のマーカーは「里のゆき」

2011年のWIの範囲は31.7（「里のゆき」）～40.0（「つや姫」）であった。「里のゆき」に対して「つや姫」は有意に白く、「つや姫」に次いでWIが高いのは「はなの舞い」であった（図4）。2012年のWIの範囲は32.5（「里のゆき」）～40.2（「つや姫」）であった。WIは、2011年と同様に「つや姫」が40.2ともっとも高く、次いで「はなの舞い」の40.1であったが、品種間で有意差はなかった。

搗精歩合を変えたサンプルおよび複数の品種を用いた試験において、WIと食味官能試験の白さに有意な相関関係があったことから分光測色計を用いて炊飯米の白さの評価が可能であると考えられた。また、複数年で品種間のWIに有意な差があったことから、品種間差を検出することが可能であると考えられた。

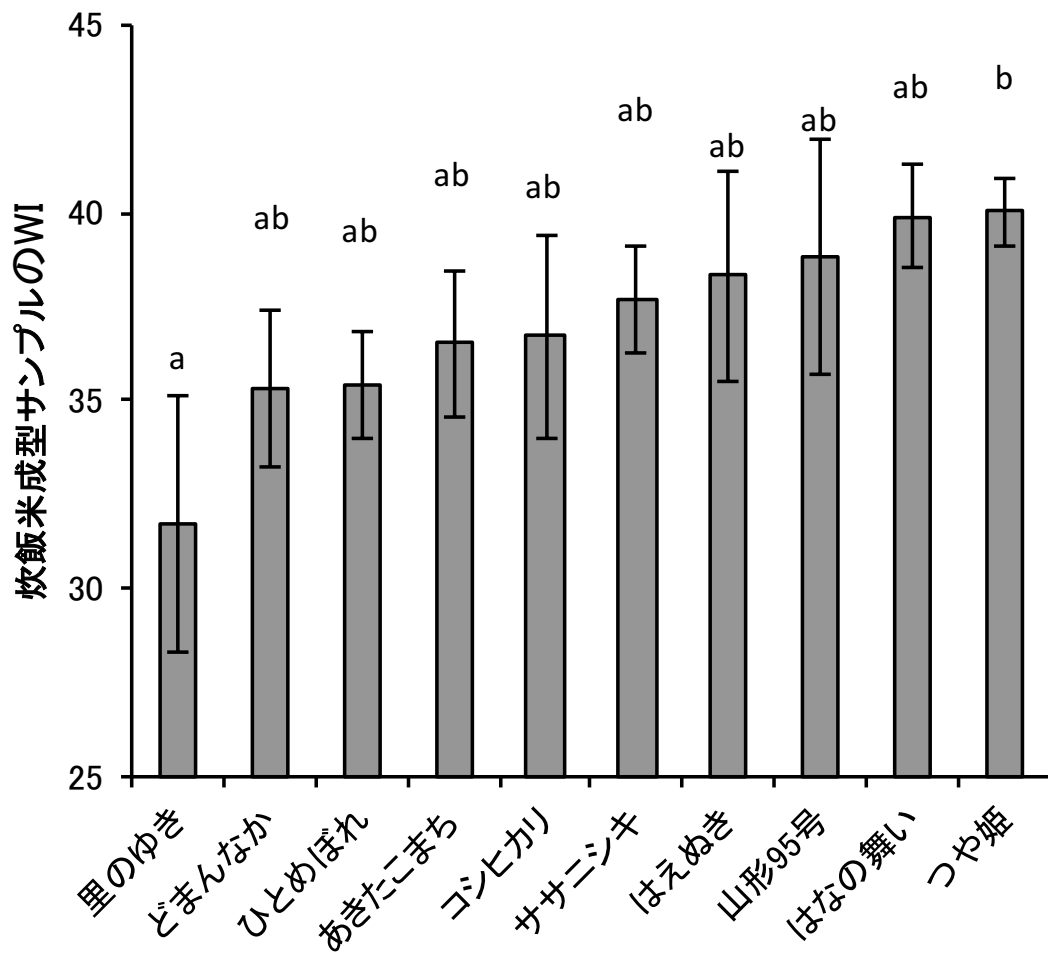


図 4 炊飯米の白さの品種間差 (2011 年)

図中バーは標準偏差 (n=6)

施肥は窒素成分で 0.7 kg/a

異なるアルファベットは Tukey 法により 5% 水準で有意差あり

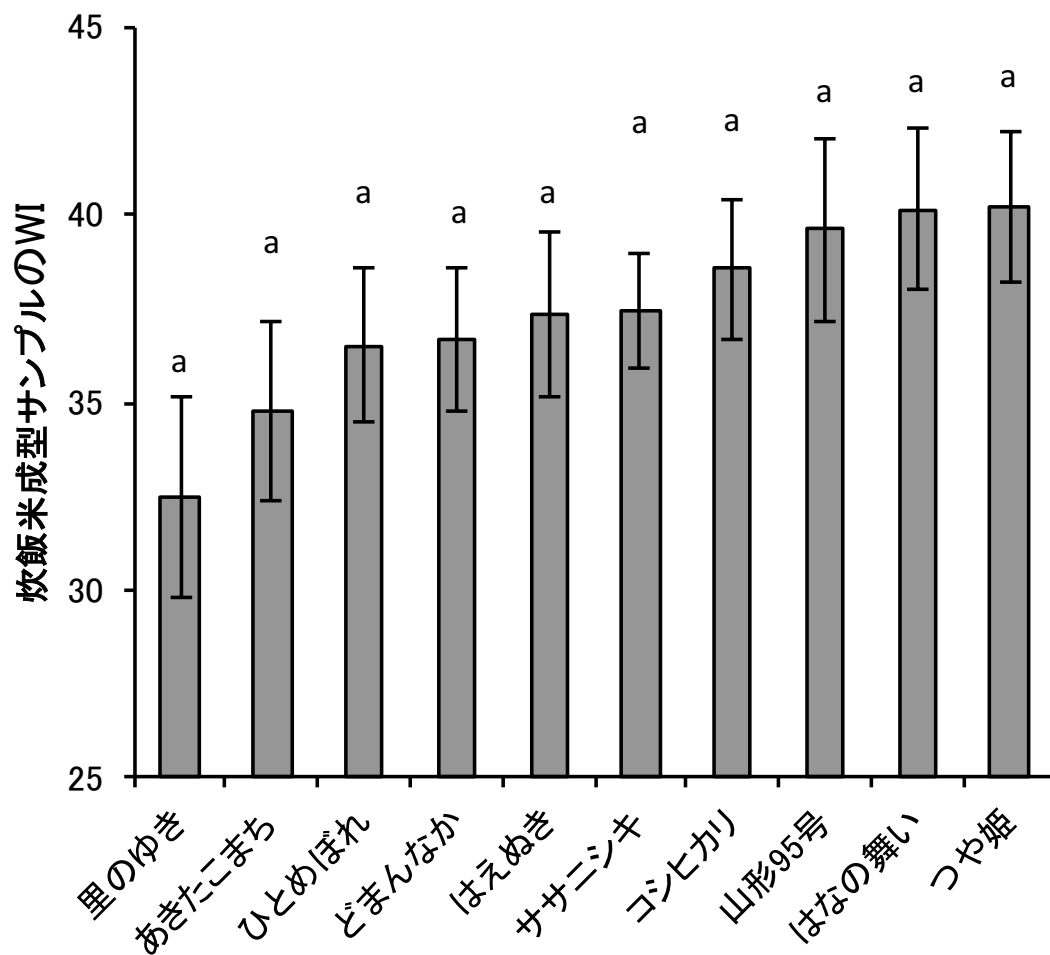


図 5 炊飯米の白さの品種間差 (2012 年)

図中バーは標準偏差 (n=6)

施肥は窒素成分で 0.7 kg/a

異なるアルファベットは Tukey 法により 5% 水準で有意差あり

第 2 節 味度メーターを用いた炊飯米の白さの簡易評価

第 1 節では、成型した炊飯米について、分光測色計の表色値 WI (ASTM E313-73) を測定することで、食味官能試験の外観に関する項目のうち、白さを客観的に評価できることが示された。分光測色計による測定では、パネルを必要としないことから食味官能試験に比べて労力の軽減が図られるものの、炊飯を行う必要があるため、労力の軽減効果は限定的であると考えられる。炊飯を行わずに外観を評価する機器として、炊飯光沢を測定する味度メーターがあり(佐藤ら 2003)、分光測色計による評価との関係が未検討である。

そこで本研究では、分光測色計による評価と味度メーターによる評価の差を検討するとともに、分光測色計を用い、炊飯を行わずに白さを評価する手法の確立を試みた。

(1) 材料

第 1 節に用いたサンプルのうち、2010 および 2012 年に栽培した玄米を用いた。

(2) 方法

調整した玄米を精米機(山本製作所、VP-30T)で、重量ベースで 90% となるように搗精し、精米とした。炊飯、食味官能試験、炊飯米の WI の測定は第 1 節のとおりとした。

精米 33 g について、米粒の表面を覆う保水膜を定量し、炊飯光沢を推定する装置である味度メーター(東洋精米機、MA-90A)で味度を測定した(佐藤ら 2003)。その後、付属のリングから円柱状の形状を保ったまま静かに外し、10 分程度放冷し、サンプルとした(以

下、味度メーターサンプルと記載)。味度メーターサンプルの円柱の上面および底面の重複のない3カ所を分光測色計(コニカミノルタ、CM-600d)で測定し、それらの平均値を求めた。測定モードはSCE方式とし、白さを表す値として表色値WI (ASTM E313-73)を用いた。

(3) 結果および考察

2010年の味度については、39(「越のかおり」)～82(「つや姫」「ひとめぼれ」)となったが、炊飯米を成型したサンプルのWIとの間に有意な相関は見られなかった(図6)。味度メーターサンプルのWIは、2010年は8.5(「あきたこまち」)～23.7(「越のかおり」)の範囲であり、食味官能試験による白さとは有意な相関($r=0.88$ 、 $p<0.01$)があり、 $y=0.1731x-5.8947$ (y = 食味官能試験の白さ、 x = 味度メーターサンプルのWI)の関係があった(図7)。同一の施肥量(標肥区)では、「里のゆき」のWIが11.9ともっとも低く、「つや姫」は23.7と「越のかおり」に次いで全体で2番目に高かった(図8)。

育成系統も加えたサンプル(2012年)については、味度メーターサンプルのWIは11.7～22.6(いずれも育成途中の系統)の範囲となり、同一の施肥量(標肥区)の品種では、「里のゆき」が13.7ともっとも低く、「つや姫」は22.1ともっとも高かった(図9)。

味度値と炊飯米を成型したサンプルのWIの間に有意な相関がないことから、分光測色計のWIと味度は異なる値を測定していると考えられた。また、味度メーターサンプルのWIと食味官能試験の白さに有意な相関があること、複数年で品種間差が確認されたこと

から、味度メーターで表層のみを糊化させた精米の WI を分光測色計で測定することで、簡易に炊飯米の白さを評価できると考えられた。

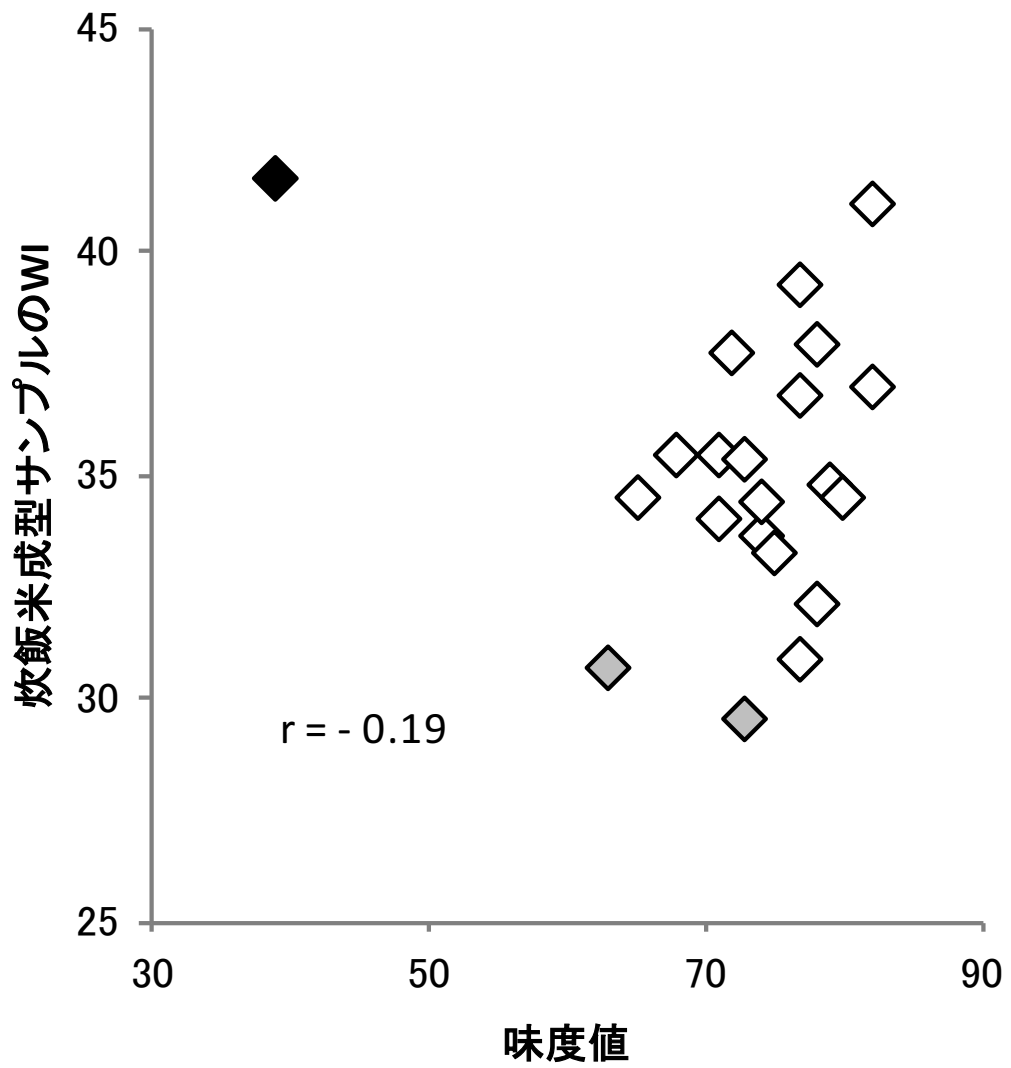


図 6 味度値と炊飯米サンプルの WI の関係 (2010 年、n=21)

黒色のマーカーは高アミロース品種 (「越のかおり」)

灰色のマーカーは低アミロース品種 (「里のゆき」)

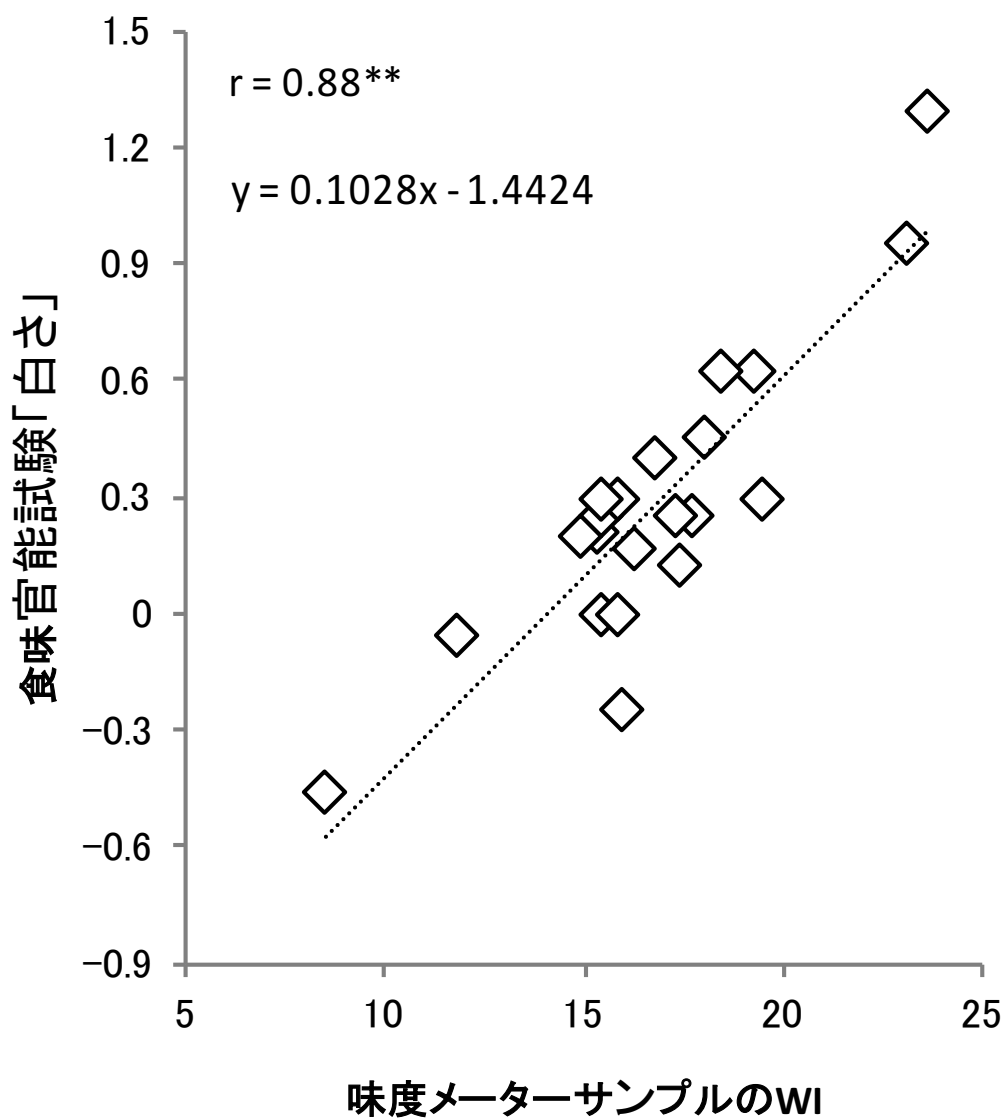


図 7 味度メーターサンプルの WI と食味官能試験「白さ」の関係
(2010 年、n=21)

** : 1% 水準で有意

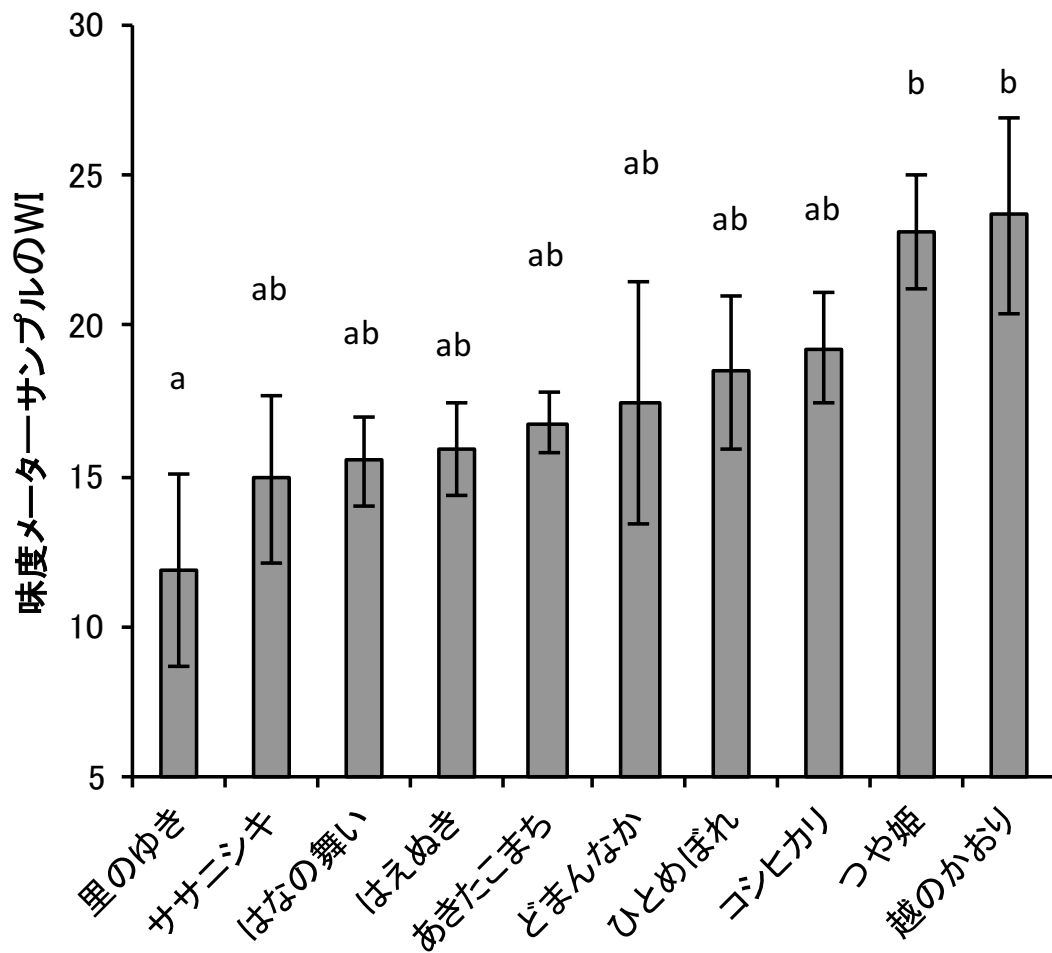


図 8 味度メーターサンプルの WI の品種間差 (2010 年)

図中バーは標準偏差 (n=6)

施肥は窒素成分で 0.7 kg/a

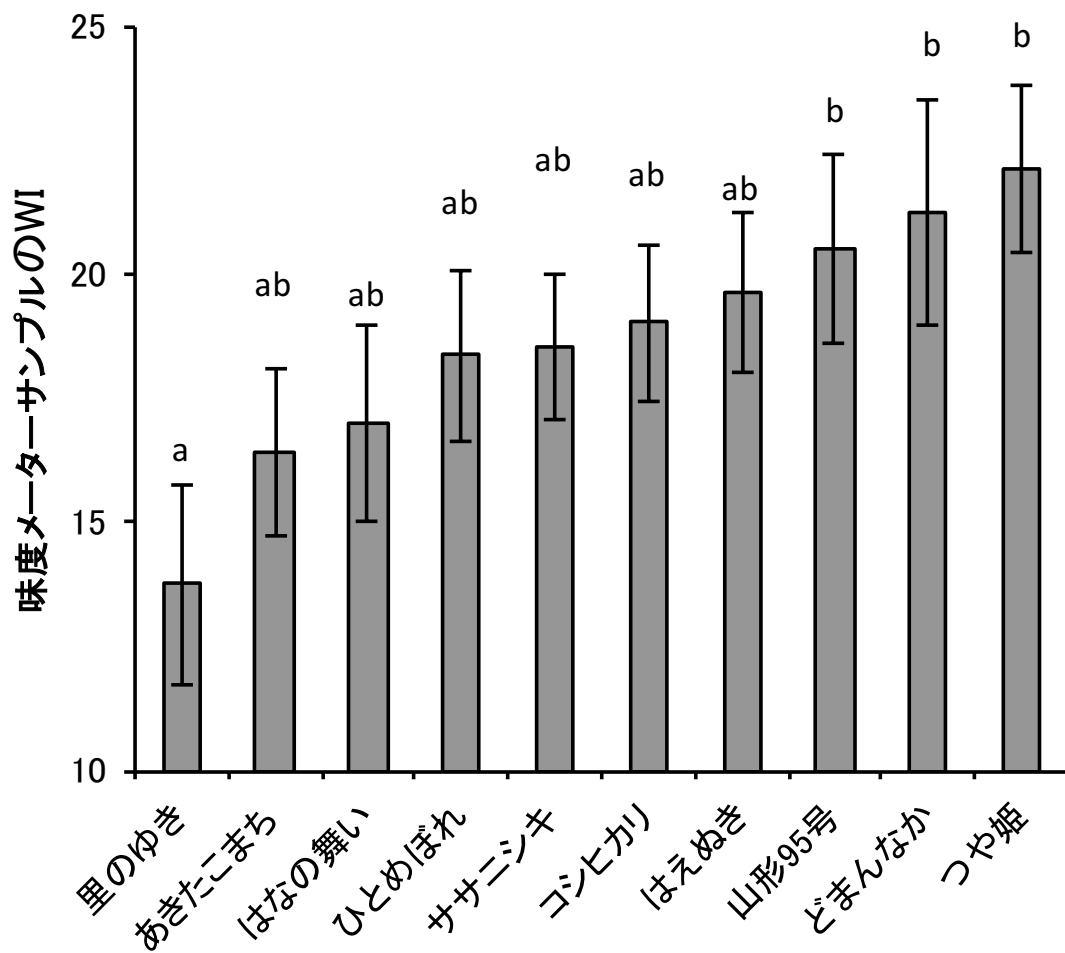


図 9 味度メーターサンプルの WI の品種間差 (2012 年)

図中バーは標準偏差 (n=6)

施肥は窒素成分で 0.7 kg/a

第 3 節 炊飯米の分光反射特性

第 2 節までに、炊飯米および表面を糊化させた精米をサンプルとし、分光測色計で WI を測定することで、炊飯米の白さを客観的に評価できることが明らかとなった。第 1 節では、炊飯米の白さに品種間差があることを示したが、その要因については明らかとなっていない。そこで本研究では、炊飯米の白さに品種間差が生じる要因について、分光反射率の面から検討を行った。

(1) 材料

山形県農業総合研究センター水田農業試験場（山形県鶴岡市）で 2010 年に栽培した「はえぬき」、「コシヒカリ」、「つや姫」を供試した。栽培方法は 4 月中旬に播種、5 月中旬に 22.2 株/m² の 5 本/株で 200 株移植し、施肥は、窒素成分で基肥 0.5 kg/a、幼穂形成期に 0.2 kg/a の計 0.7 kg/a、とした。9 月中旬から 10 月上旬にかけて各品種の成熟期に 128 株を刈り取りした。収穫した玄米はふるいに通し、1.9 mm 未満の粒を除いた。

(2) 方法

分光測色計（コニカミノルタ、CM-600d）を用い、第 1 節の手法で精米を炊飯および成型し、400 nm～700 nm まで 10 nm おきに分光反射率を測定し、JIS（JIS Z 8781-4）の明度 L*、色相と彩度を表す a*、b*を算出した。測定モードは SCE 方式とし、成型したサンプル 3 つについて、円柱の上面および底面の中央部をそれぞれ測定し平均値を求めた。

(3) 結果および考察

用いた炊飯米成型サンプルの WI は、「はえぬき」は 34.8、「コシヒカリ」は 37.9、「つや姫」は 41.0 であった。分光反射率をみると、「つや姫」では 400~550 nm 付近の反射率が他の 2 品種と比較して高い傾向であった。550~700 nm 付近の反射率では、「コシヒカリ」が他の 2 品種よりも低い傾向が見られた (図 10)。L*、a*については、3 品種では差が見られなかったものの、b*においては、「つや姫」、「コシヒカリ」、「はえぬき」の順であり、「つや姫」が「はえぬき」に比較して有意に小さかった (表 1)。

WI の高い (白い) サンプルの b*が低く、450~500 nm 付近の青色光の反射が強く、600 nm 付近の黄色光の反射が弱いことから、黄と青の反射が炊飯米の白さに関連していると考えられた。

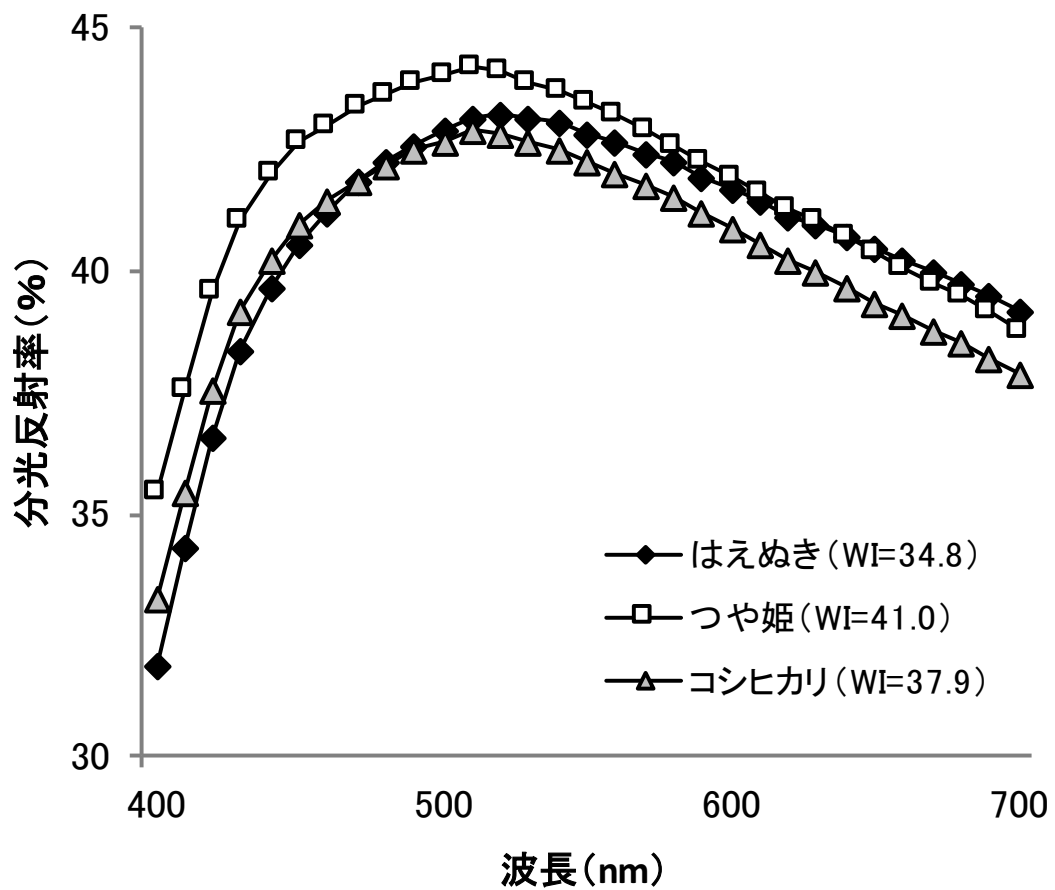


図 10 白さが異なる炊飯米の波長ごとの分光反射率

表 1 白さが異なる炊飯米の波長ごとの分光反射率

品種名	WI	L*	a*	b*
つや姫	41.0 ± 1.9	71.6 ^a ± 0.7	-2.6 ^a ± 0.1	0.9 ^b ± 0.4
コシヒカリ	37.9 ± 3.0	70.7 ^a ± 1.2	-2.7 ^a ± 0.1	1.5 ^b ± 0.5
はえぬき	34.8 ± 2.5	71.1 ^a ± 0.5	-2.6 ^a ± 0.1	2.6 ^a ± 0.8

表中の±は標準偏差 (n=6)

異なるアルファベットは Tukey 法により 5% 水準で有意差あり

第 4 節 タンパク質含有率およびアミロース含有率と白さの関係

第 3 節では、炊飯米の青色光および黄色光の反射の強弱が白さに影響を与えていることが明らかとなった。一方、白さに関する理化学特性はこれまで明らかとなっていない。そこで本研究では、食味に大きな影響を与えるとされるタンパク質含有率 (Juliano 1985) やアミロース含有率 (Okuno *et al.* 1983、 Ramesh *et al.* 2000) に着目し、これらの多寡が炊飯米の白さに与える影響を考察した。

(1) 材料

第 1 節のサンプルのうち、2012 年に栽培した玄米を用いた。

(2) 方法

第 1 節の手法を用い、玄米を精米機 (山本製作所、VP-30T) で搗精し、精米とした。精米のタンパク質含有率は、近赤外光の反射率などから推定する機器である食味計 (静岡製機、AG-RD) を用いて測定した。アミロース含有率については、精米を試験用製粉機 (ブラベンダー、279002) で粉碎し、 α -1,4-グルカンとヨウ素の複合体を対象に 620 nm の吸光度で測定するオートアナライザー (ブランルーベ、AutoAnalyzer II) を用いて測定した後、水分含量 15% に換算した値として求めた。炊飯米の WI は分光測色計 (コニカミノルタ、CM-600d) を用い、第 1 節の手法により測定した。

(3) 結果

アミロース含有率は 9.9~20.9%、炊飯米の WI は 31.8~41.6 の範囲となり、アミロース含有率と炊飯米の WI には $r=0.31$ の有意な

正の相関が見られた（図 11）。しかし、アミロース含有率が 15% 以下の 2 品種系統を除くと $r=-0.13$ と相関はなかった。タンパク質含有率は 5.9～7.2% の範囲となり、WI とは $r=-0.33$ と有意な負の相関が見られ、特にタンパク質含有率が 6.5% を超えたサンプルで白さが低くなる傾向が見られた（図 12）。

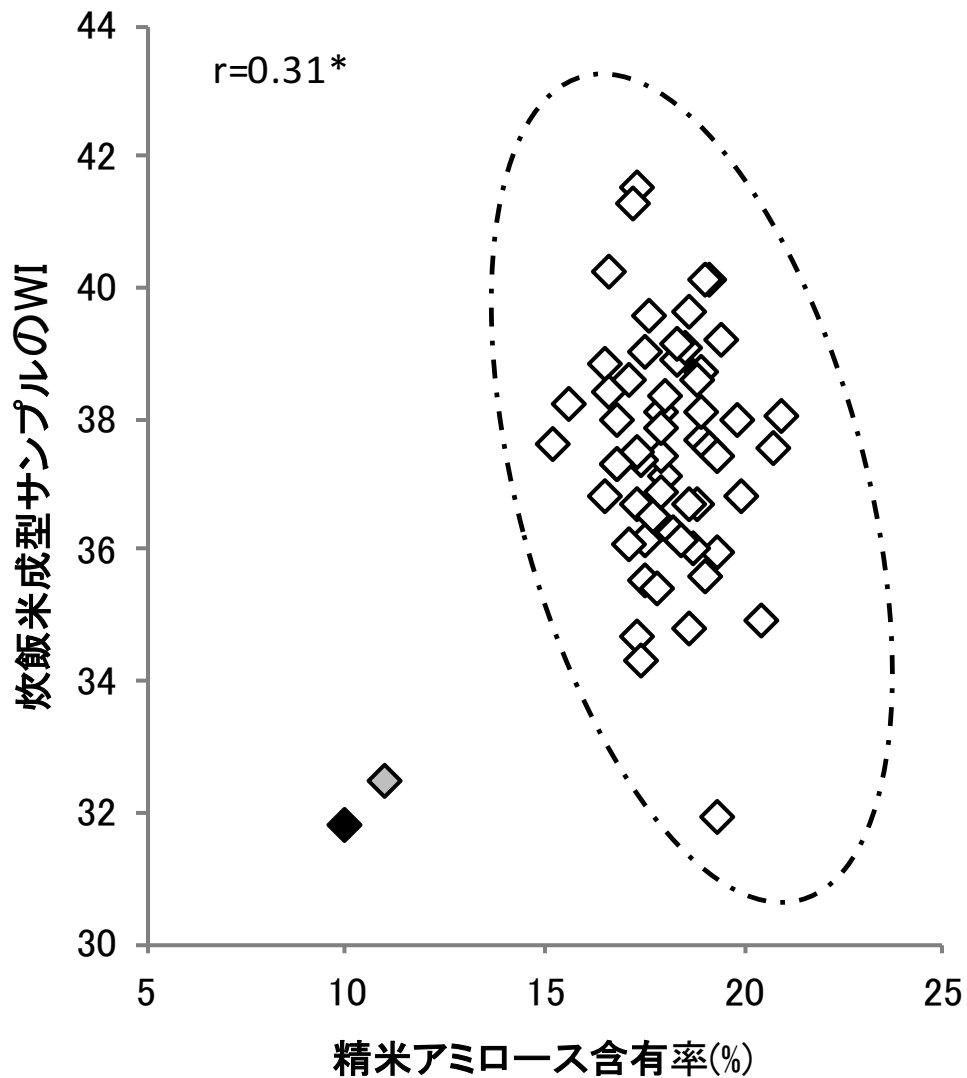


図 11 精米アミロース含有率と炊飯米の白さの関係

(2012 年、n=60)

* : 5%水準で有意

破線で囲われた 58 サンプルの相関係数は $r=-0.13$ 、有意差なし

灰色のマーカーは「里のゆき」、黒色のマーカーは「里のゆき」後代の $Wx \cdot y$ 保有低アミロース系統

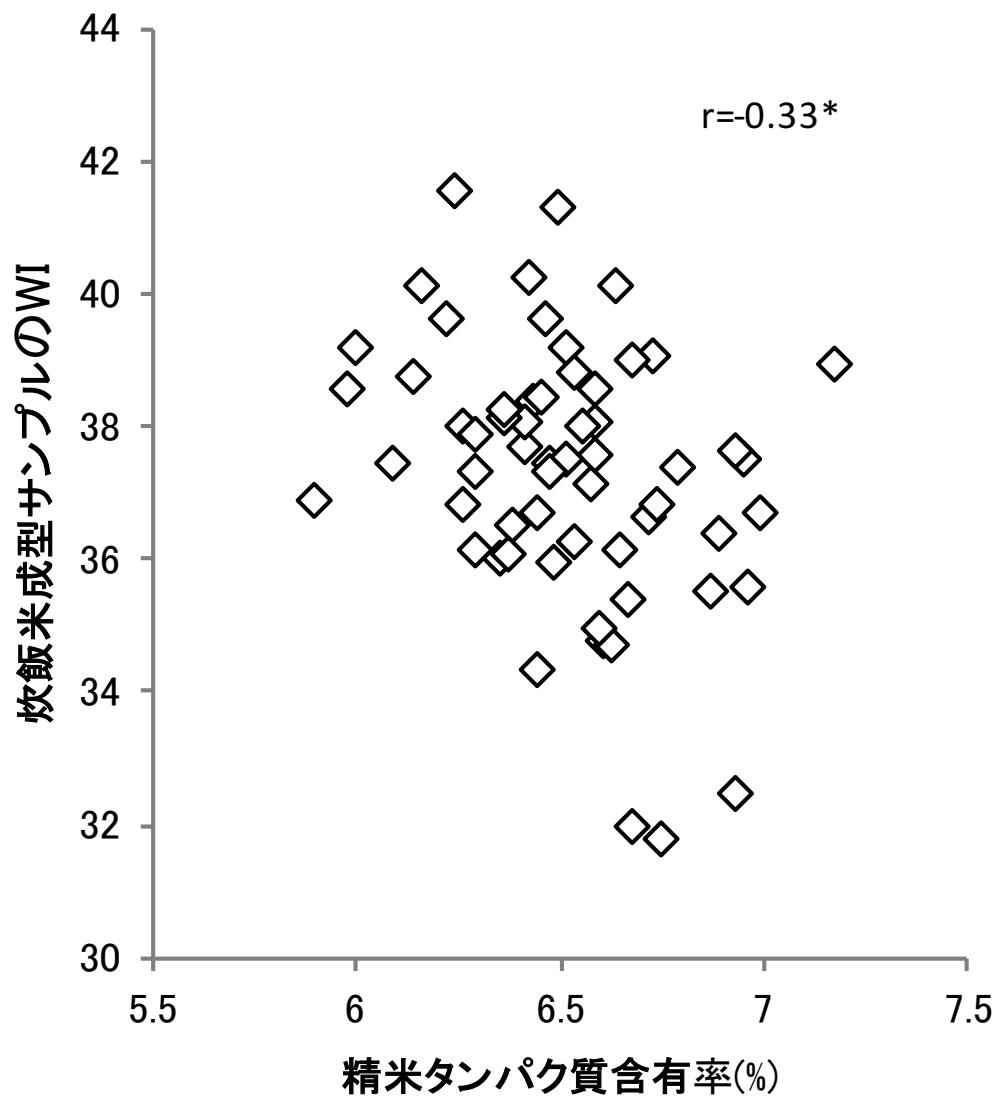


図 12 精米タンパク質含有率と炊飯米の白さの関係

(2012年、n=60)

* : 5%水準で有意

第 5 節 考察

1. 分光測色計を用いた白さの客観的評価について

搗精歩合および品種を変えて炊飯米の白さを変えたサンプルについて、炊飯米成型サンプルの WI と食味官能試験の白さの間に高い正の相関があることから（図 1、図 3）、分光測色計による測定で食味官能試験を代替できる可能性が示唆された。これまでも白度計など玄米や精米の白さを測定する機器はあったが、炊飯米の外観を測定する機器は無かったため、分光測色計は新たな食味測定機器として利用可能であると考えられた。外観を評価する測定機器には味度メーターがあるが、これは近赤外光の反射などを利用し、米粒の表面を覆う保水膜を定量し、炊飯光沢を推定する装置である（佐藤ら 2003）。可視光を測定する分光測色計とは測定の本質が異なり、味度値と炊飯米サンプルの WI の間に有意な相関がないことから（図 6）、異なる値を測定していると考えられた。

味度メーターサンプルの WI と食味官能試験の白さの間にも高い正の相関があることから（図 7）、表層のみを糊化させることで、炊飯を行わずに白さを簡易に評価できると考えられた。

表色値 WI の異なる炊飯米成型サンプルの L^* 、 a^* 、 b^* を比較すると、WI の高い（白い）サンプルは b^* が高かった（表 1）。また、波長ごとの分光反射率を見ても、450～500 nm 付近の青色光の反射が強く、600 nm 付近の黄色光の反射が弱かった（図 10）。このことから、黄と青の反射率が炊飯米の白さに関連していると考えられた。

2. 白さの品種間差異とその原因

分光測色計の測定の結果、「つや姫」「コシヒカリ」「越のかおり」は

炊飯米が白く、「里のゆき」は白さが劣る傾向が見られた（図 2、図 4、図 5）。この傾向は精米の表面のみを糊化させた味度メーターサンプルでも同様であり（図 8、図 9）、炊飯米表面の状態が白さに影響していると考えられた。「里のゆき」の炊飯米が白くなかった原因としては、アミロース含有率の低さが考えられる。「里のゆき」は低アミロース遺伝子 W_{x-y} を保有しており、アミロース含有率は 7～14%と安定して低い（館山ら 2005）。また、2012 年に供試された低アミロース系統も白さが劣る結果であった（図 11）。2012 年に供試された低アミロース系統は「里のゆき」の後代であることから、 W_{x-y} の多面発現、または、「里のゆき」の遺伝背景の影響であると考えられた。2010 年に供試された「越のかおり」は高アミロース品種であり（大澤・井上 2008）、+1.29 と同年に供試されたサンプルの中で最も白かった。このことから、アミロース含有率は白さに影響を与えることが示唆されるが、高アミロース性がインディカ品種に由来することから、 W_x 座以外の領域が原因である可能性も考えられた。

「つや姫」の炊飯米が白い原因は、アミロース含有率が「コシヒカリ」と同程度であることから（結城ら 2010）、アミロース含有率以外の要因であると考えられた。育成途中の系統の白さを見ると、精米タンパク質含有率は炊飯米の白さと負の相関があることから（図 12）、タンパク質含有率も白さに影響があると考えられるが、タンパク質含有率は「つや姫」と「コシヒカリ」は同程度であり、「つや姫」の炊飯米が白い原因はタンパク質含有率ではないと考えられた。搗精歩合を変えることで白さが大きく変化すること、89%以上の搗精歩合ではそれ以上搗精しても白さに変化がないことから

(図 1)、玄米の糠層の厚さや、表層のタンパク質の局在なども炊飯米の白さに影響する可能性が示唆された。

第2章 メタボローム解析を用いた炊飯米の味の評価

第1節 炊飯米の味に関与する成分の探索

米の食味の評価は様々な面から行われており、調理した米のテクスチャーの評価から、粘性と硬さの比率の重要性が明らかになっている (Okabe 1979)。また、光沢度 (glossiness) やゆるみ (looseness) などの特徴による評価を行い、さらに、調理時の温度の影響なども検討されている (Yau and Huang 1996)。米の食味には様々な要因が関係していることが推測されるが、化学的な特徴が物理的な特徴よりも重要であるという報告もある (Mestres *et al.* 2011)。このため、玄米、精米の成分を分析して食味との関係を検討した研究は既に多くあり、タンパク質、糖類 (Tran *et al.* 2005)、アミロース (Ward *et al.* 2006)、アミラーゼなどの酵素活性 (Tran *et al.* 2004)、金属イオン、GABA (gamma aminobutyric acid、 γ アミノ酪酸)、アミノ酸、ペプチド (Ogasawara *et al.* 2006) などが検討されている。一方、炊飯米を対象として成分分析を行う場合は、直接呈味性を示す低分子を対象にできるだけ多くの分子を測定して、包括的に解析すべきであると考えられるが、そのような研究はこれまでに行われていない。

近年、アミノ酸、有機酸や糖などの低分子を、メタボロミクス技術を用いて一斉分析して農作物や食品の官能値との関係を調べる研究が盛んになってきた (Sugimoto *et al.* 2010a、Sugimoto *et al.* 2010b)。本手法の利点は、予め狙ったいくつかの化合物だけを解析対象とするのではなく、多種多様な化合物を一斉に測定するために、その組成と食味の関係を俯瞰的に理解することができる点である。NMR (nuclear magnetic resonance) や Fourier Transform

Near-Infrared Spectroscopy は、対象を非破壊で測定できるという利点はあるものの、測定感度が低いために観測できる化合物数が少ない問題がある (Niu *et al.* 2008、Tarachiwin *et al.* 2008、Malmendal *et al.* 2011)。一方、ガスクロマトグラフィー [GC (gas chromatography)]、液体クロマトグラフィー [LC (liquid chromatography)]、キャピラリー電気泳動 [CE (capillary electrophoresis)] などの分離装置と質量分析計 [MS (mass spectrometry)] を結合した方法が、より網羅的に多くの化合物をプロファイリングできるため、包括的な化合物組成の把握にはこちらが適していると考えられる (Cuthbertson *et al.* 2012、Ochi *et al.* 2012、Ramautar *et al.* 2013)。特に、炊飯米の食味を解析対象とした場合は、呈味性を示すことが多い低分子化合物を中心に測定対象とすべきであると考えられる。

本研究では、炊飯米に含まれる成分を対象に、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 [CE-TOFMS (capillary electrophoresis - time of flight mass spectrometry)] を用いたイオン性低分子化合物の網羅的な測定と、液体クロマトグラフィー-イオン化タンデム質量分析 [LC-MS/MS (liquid chromatography - mass spectrometry / mass spectrometry)] を用いた糖類の測定を実施し、炊飯米の味と低分子化合物の組成 (プロファイル) の関係を調査した。

(1) 材料

【2008年産米】

山形県農業総合研究センター水田農業試験場 (山形県鶴岡市) または山形県鶴岡市の一般圃場で栽培した近代品種および在来品種

49 点の玄米に加え、市販の銘柄品種 29 点の玄米、計 78 点を用いた（表 1）。栽培方法は、4 月中旬に播種、5 月中旬に 22.2 株/m² の 5 本/株で 200 株移植し、窒素成分で基肥 0.3～0.6 kg/a、幼穂形成期に 0.1～0.2 kg/a の計 0.4～0.8 kg/a を施用した。一般圃場の栽培方法は、生産者の慣行とした。8 月下旬から 10 月上旬にかけて各品種の成熟期に 96 株または 128 株を刈り取りし、収穫した玄米は 1.9 mm の篩にかけて調製した。市販のサンプルは玄米の状態で購入した。

【2009 年産米】

山形県農業総合研究センター水田農業試験場または山形県農業総合研究センター（山形県山形市）で栽培した近代品種 38 点の玄米に加え、市販の銘柄品種 15 点の玄米、計 53 点を用いた（表 2）。栽培方法は、2008 年産米と同様とした。

表 2 解析に用いた 2008 年産米サンプル一覧

番号	品種系統名	都道府県	市町村	備考	番号	品種名	都道府県	地域
1	はえぬぎ	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	50	ななつぼし	北海道	JAたきかわ
2	山形106号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	51	おぼろづき	北海道	雨竜
3	はなの舞	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	52	まっしぐら	青森県	
4	山形99号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	53	ひとめぼれ	宮城県	登米郡
5	あきたこまち	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	54	ササニシキ	宮城県	黒川郡
6	どまんなか	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	55	あきたこまち	秋田県	男鹿市
7	ササニシキ	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	56	コシヒカリつくばSD1号	山形県	庄内
8	ひとめぼれ	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	57	コシヒカリ	福島県	会津喜多方
9	山形96号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	58	コシヒカリ	茨城県	河内町
10	山形107号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	59	キヌヒカリ	埼玉県	鴻巣市
11	山形102号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	60	コシヒカリ	新潟県	魚沼
12	山形103号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	61	コシヒカリ	新潟県	魚沼
13	はえぬぎ	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	62	コシヒカリ	新潟県	一般
14	山形95号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	63	こしいぶき	新潟県	
15	山形100号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	64	てんたかく	富山県	入善町
16	山形108号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	65	コシヒカリ	長野県	JA佐久浅間
17	つや姫	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	66	コシヒカリ	長野県	北安曇郡
18	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	67	ハツシモ	岐阜県	
19	はえぬぎ	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	68	コシヒカリ	滋賀県	愛知郡
20	つや姫	山形県	鶴岡市	食味解析試験	69	コシヒカリ	京都府	丹後
21	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	食味解析試験	70	コシヒカリ	兵庫県	丹波
22	はえぬぎ	山形県	鶴岡市	食味解析試験	71	キヌヒカリ	兵庫県	南あわじ市
23	キヌヒカリ	山形県	鶴岡市	食味解析試験	72	コシヒカリ	島根県	奥出雲町
24	トヨニシキ	山形県	鶴岡市	食味解析試験	73	きぬむすめ	島根県	斐川町
25	キヨニシキ	山形県	鶴岡市	食味解析試験	74	夢つくし	福岡県	
26	ササニシキ	山形県	鶴岡市	食味解析試験	75	ヒノヒカリ	福岡県	
27	どまんなか	山形県	鶴岡市	食味解析試験	76	天使の詩	佐賀県	神埼郡
28	ササシグレ	山形県	鶴岡市	食味解析試験	77	にこまる	佐賀県	
29	さわのはな	山形県	鶴岡市	食味解析試験	78	コシヒカリ	熊本県	阿蘇町
30	国宝ローズ	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
31	陸羽132号	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
32	中部32号	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
33	庄2958	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
34	はえぬぎ	山形県	鶴岡市	作況試験				
35	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	作況試験				
36	つや姫	山形県	鶴岡市	作況試験				
37	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	有機栽培				
38	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	有機栽培				
39	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	有機栽培				
40	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	有機栽培				
41	つや姫	山形県	鶴岡市	有機栽培				
42	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	有機栽培				
43	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	慣行栽培				
44	つや姫	山形県	鶴岡市	慣行栽培				
45	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	有機栽培				
46	つや姫	山形県	鶴岡市	有機栽培				
47	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	有機栽培				
48	つや姫	山形県	鶴岡市	有機栽培				
49	はえぬぎ	山形県	鶴岡市	食味官能試験基準米				

1～36、49 は山形県農業総合研究センター水田農業試験場内で栽培したサンプル

37～50 は一般圃場で栽培したサンプル

51～78 は市販の玄米を購入

表 3 解析に用いた 2009 年産米サンプル一覧

番号	品種系統名	都道府県	市町村	備考	番号	品種名	都道府県	地域
1	はえぬぎ	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	37	おぼろづき	北海道	深川市
2	山形106号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	38	ゆめびりか	北海道	砂川市
3	山形99号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	39	コシヒカリ	茨城県	常陸太田市
4	はなの舞	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	40	キヌヒカリ	埼玉県	鴻巣市
5	あきたこまち	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	41	コシヒカリ	新潟県	魚沼
6	山形111号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	42	こしいぶき	新潟県	佐渡
7	どまんなか	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	43	コシヒカリ	富山県	富山県
8	ササニシキ	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	44	コシヒカリ	長野県	佐久浅間
9	ひとめぼれ	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	45	コシヒカリ	島根県	奥出雲町
10	山形103号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	46	ヒノヒカリ	高知県	本山町
11	はえぬぎ	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	47	にこまる	高知県	本山町
12	山形112号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	48	天使の詩	佐賀県	杵島郡
13	山形95号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	49	コシヒカリ	佐賀県	唐津市
14	山形100号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	50	さがびより	佐賀県	唐津市
15	山形108号	山形県	鶴岡市	生産力検定試験	51	ヒノヒカリ	佐賀県	唐津市
16	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	生産力検定試験				
17	つや姫	山形県	鶴岡市	生産力検定試験				
18	はえぬぎ	山形県	鶴岡市	生産力検定試験				
19	つや姫	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
20	コシヒカリ	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
21	はえぬぎ	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
22	山形70号	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
23	キヌヒカリ	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
24	山形48号	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
25	東北164号	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
26	味こだま	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
27	ひとめぼれ	山形県	鶴岡市	食味解析試験				
28	つや姫	山形県	鶴岡市	少肥試験				
29	つや姫	山形県	鶴岡市	少肥試験				
30	はえぬぎ	山形	鶴岡市	作況解析試験				
31	コシヒカリ	山形	鶴岡市	作況解析試験				
32	つや姫	山形	鶴岡市	作況解析試験				
33	はえぬぎ	山形県	山形市	作況解析試験				
34	つや姫	山形県	山形市	作況解析試験				
35	コシヒカリ	山形県	山形市	作況解析試験				
36	はえぬぎ	山形県	鶴岡市	食味官能試験基準米				

1～32、36 は山形県農業総合研究センター水田農業試験場内で栽培したサンプル

33～35 は山形県農業総合研究センターないで栽培したサンプル

37～51 は市販の玄米を購入

(2) 方法

調整した玄米を精米機（山本製作所、VP-30T）で、重量ベースで $90.0 \pm 0.5\%$ となるように搗精し精米とした。2008 年産米については、精米 350 g に 1.33 倍量の水を加え、1 時間浸漬の後、電気炊飯ジャー（東芝、RCK-5DG）で炊飯を行った。炊飯米は炊き上がり後に 10 分間蒸らし、その後によくかき混ぜた。10~20 g の炊飯米をメタボローム測定用のサンプルとして -20°C 以下の冷凍庫内で保存し、残りを食味官能試験に用いた。

各年とも、メタボローム測定用のすべてのサンプルが揃ったあとに、室温で解凍後、200 mg 量り取り、標準物質として Methionine sulfone、3-Aminopyrrolidine、MES (2-(*N*-morpholino) ethane sulfonic acid)、CSA (D-camphor-10-sulfonic acid)、Trimesate、 $^{13}\text{C}_6\text{Glucose}$ を各 200 μM となるように調製したメタノール 500 μl を加え、そこに $\phi 3$ のジルコニアビーズを 2 粒入れて、Micro Smash (TOMY、MS-100R) で 4,000 rpm、5 分間破碎した。さらにクロロホルム 500 μL 、MilliQ 水 200 μL を加えて攪拌し、3,000 rpm で 8 分間遠心分離した後、上層の水・メタノール層から 250 μL を限外ろ過フィルター(分画分子量 5,000 Da)にとり 20°C 、10,000 rpm で 1 時間遠心分離を行った。ろ液 100 μL を遠心濃縮したものをサンプルとし、MilliQ 水 50 μL で溶解した。

アミノ酸、有機酸、ヌクレオチドなどのイオン性低分子化合物は、飛行時間型質量分析計と、物質を電荷・分子サイズの違いに基づく移動度の差異で分離する手法であるキャピラリー電気泳動とを組み合わせた CE-TOFMS を用いた。装置はアジレント社の G6210A LC/MSD TOF システムと Agilent 1200 HPLC ポンプ、G1603A

CE-MS アダプターキット、G1607A CE-ESI-MS スプレーキットを用いた。測定モードは Sugimoto *et al.* (2010c) のとおりとし、データの解析には MasterHands (Sugimoto *et al.* 2010c) を用いた。

糖類はマルチプルリアクションモニタリング [MRM (multiple reaction monitoring)] モードで操作するエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (LC-ESI-MS/MS) と、液体クロマトグラフィーを組み合わせた LC-MS で定量した。装置はアジレント社の Agilent 1100 HPLC システムと Agilent6410 トリプル四重極を用いた。TOSOH TSK-GEL AMIDE-80 の粒子径 5 μ m、内径 2.0 mm、長さ 250 mm のカラムを 80°C で使用し、流束は 0.2 mL/min とした。移動相には水 (A) とアセトニトリル (B) を用い、測定時間は 30 分でグラジエントは B 液 0 分 (75%) - 15 分 (65%) - 25 分 (10%) - 30 分 (10%)、その後、カラム内の平衡化のためポストタイムを 15 分設けた。ネガティブイオンモードで、MRM チャンネルはグルコースとフルクトースが m/z Q1→Q3 が 179→89、Fragmentor Voltage が 60 V、Collison Energy が 0 V、スクロースは m/z が 341→59、Fragmentor Voltage が 120 V、Collison Energy が 30 V、マルトースは m/z が 341→161、Fragmentor Voltage が 60 V、Collison Energy が 0 V とした。データの解析には MassHunter (アジレント社) を用いた。

食味官能試験は山形県農業総合研究センター水田農業試験場の職員 16~24 人をパネルとして行った。基準米は山形県農業総合研究センター水田農業試験場で栽培・収穫した「はえぬき」とし、外観、光沢、白さ、香り、味、粘り、硬さ、総合評価で評価した。評価は -3~+3 の範囲で 1 刻みとし、全員の平均値を評価値とした。味の項

目は、米飯の甘みや旨味を評価し、基準米と比較して好ましい場合にプラス、好ましくない場合にマイナスとし、一口目で明確に違いがわかる場合は±3、一口目で違いがわかる場合は±2、二口目で違いがわかる場合は±1とした。

精米のタンパク質含有率は、近赤外光の反射率などから推定する機器である食味計（静岡製機、AG-RD）を用いて測定した。

主成分分析には JMP ver 7.0.1（SAS Institute）を用いた。ヒートマップの作図は、各化合物の含量を Z-スコアに変換後、Mev TM4 software（Dana-Farber Cancer Institute）（Saeed *et al.* 2003）を用い、ピアソン相関に基づいてクラスタリングし、描画した。

（3）結果と考察

CE-TOFMS で測定した代謝物由来と考えられるピークのうち、全サンプルの測定の 90%以上で S/N>3 で検出され、標準物質の m/z および補正した移動時間と一致した 45 化合物を解析の対象とした。これら 45 化合物と、LC-MS/MS で測定したフルクトース、グルコース、スクロース、マルトースの 4 種類の糖についてピアソン相関に基づきクラスタリングした結果、2008 年産米の化合物では、食味官能試験「味」と正の相関があるアスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、5-オキソプロリン、アデニン、リンゴ酸、パントテン酸がクラスタ（ラベル E 群）を形成した（図 13）。サンプルについては、ラベル E 群と全体の化合物の量の傾向から大きく 4 つのクラスタに分類され、ラベル E 群の化合物が多く、化合物全体の量は少ないクラスタ A、化合物全体の量が少ないクラスタ B、ラベル E

群の化合物が少ないものの化合物全体の量が多いクラスター C、化合物全体の量が多いクラスター D に分類された。クラスター A に分類された 7 サンプルのうち 6 サンプルでは、食味官能試験「味」の項目が 0.25 以上と高かった。クラスター B およびクラスター C に分類されたサンプルでは多くのサンプルで食味官能試験「味」が低かった。クラスター D に分類されたサンプルでは、多くは食味官能試験「味」の評価は低いものの、優れるサンプルも一部含まれた。

2009 年産米の化合物では、食味官能試験「味」と正の相関があるアスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、5-オキソプロリン、ヒスチジン、リジン、プロリン、アラニン、 β アラニン、トレオニン、セリン、バリンなどがひとつのクラスター（ラベル J 群）を形成した（図 14）。サンプルについては、ラベル J 群と全体の化合物の量の傾向から大きく 4 つのクラスターに別れ、ラベル J 群が少なく、他の化合物全体の量が中庸なクラスター F およびクラスター G、ラベル J 群の化合物が多く、他の化合物の量が少ないクラスター H、ラベル J 群の化合物が中庸だが化合物全体の量が多いクラスター I に分類された。クラスター H に分類されたサンプルのうち、ラベル J 群が特に多いサンプルは食味官能試験「味」が優れる傾向であった。クラスター F およびクラスター G に分類されたサンプルの食味官能試験「味」は基準米と同等かやや劣り、クラスター I に分類されたサンプルの多くは「味」が劣った。

2 カ年を通じて食味官能試験「味」と正の相関がある化合物は、2008 年の相関係数が高い順に、アスパラギン酸、リンゴ酸、5-オキソプロリン、グルタミン酸、グルタミン、 β アラニン、ヒスチジン、パントテン酸、アスパラギン、アデニン、乳酸、グルタル酸の 12

物資であり、特にアスパラギン酸、グルタミン酸、リンゴ酸の3物質については、両年とも相関係数が0.2以上であった。食味官能試験「味」と負の相関関係がある化合物は、2008年の相関係数が低い順に、スクロース、クエン酸、グルコース-6-リン酸、インドール-3-アセテート、アゼレート、メチオニン、アデノシン、GABA、グルコサミン酸、シスアコニット酸、酸化型グルタチオン、グルコース、の12物資であり、特にメチオニンとアゼレートについては両年とも-0.2以下の相関係数であった。

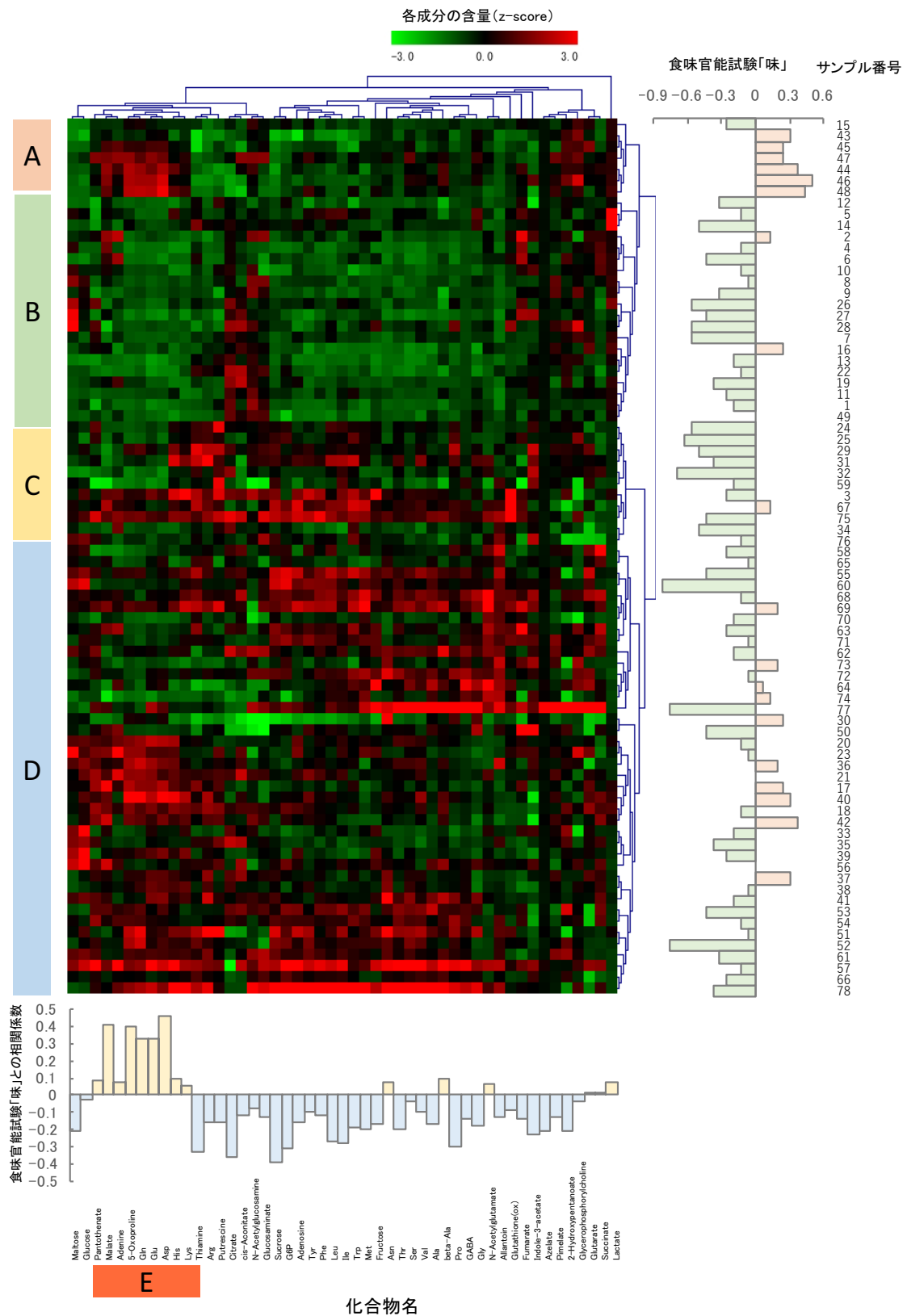


図 13 2008 年産の炊飯米の低分子化合物と食味官能評価の相関

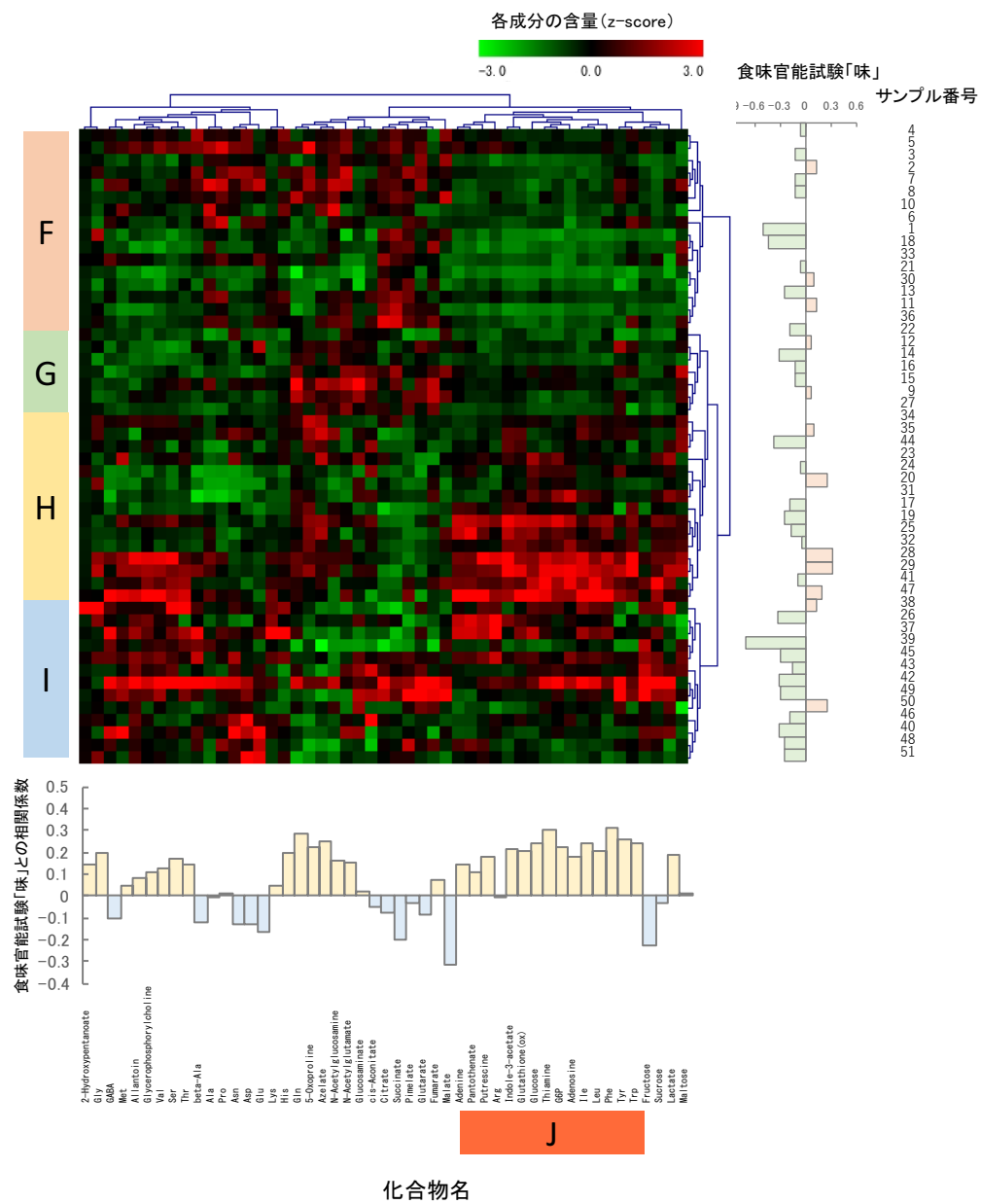


図 14 2009 年産の炊飯米中の低分子化合物と食味官能評価の相関

主成分分析の結果、2008年産米では、第1、2、3主成分の寄与率がそれぞれ37.1%、10.5%、9.2%であった(図15左)。食味官能試験「味」と第3主成分には有意な正の相関があった(図16)。また、成分の因子負荷量から、第1主成分は化合物の全体量を表す成分、第2、第3主成分は化合物の組成を表す成分と推定された(図15右)。第3主成分は、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、5-オキソプロリンなど、味と相関の高い化合物の多寡が影響する成分と推定された。第2主成分については化合物に一定の傾向は見られなかった。2009年産米では、第1、2、3主成分の寄与率はそれぞれ34.9%、13.9%、10.2%であった(図17左)。第1主成分は食味官能試験「味」との相関は無いものの、スコアが7以上の4サンプルのうち、3サンプルで「味」が優れていた(図18)。第2主成分、第3主成分については、「味」との関係は不明瞭であった。各成分の因子負荷量から、第1主成分は化合物の全体量を表す成分かつ、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、5-オキソプロリンなど、味と相関の高い化合物の多寡が大きく影響する成分と推定された(図17右)。

2カ年の結果から、アスパラギン酸、グルタミン酸などを筆頭に、複数の低分子化合物の組成(バランス)が食味に影響していると考えられた。

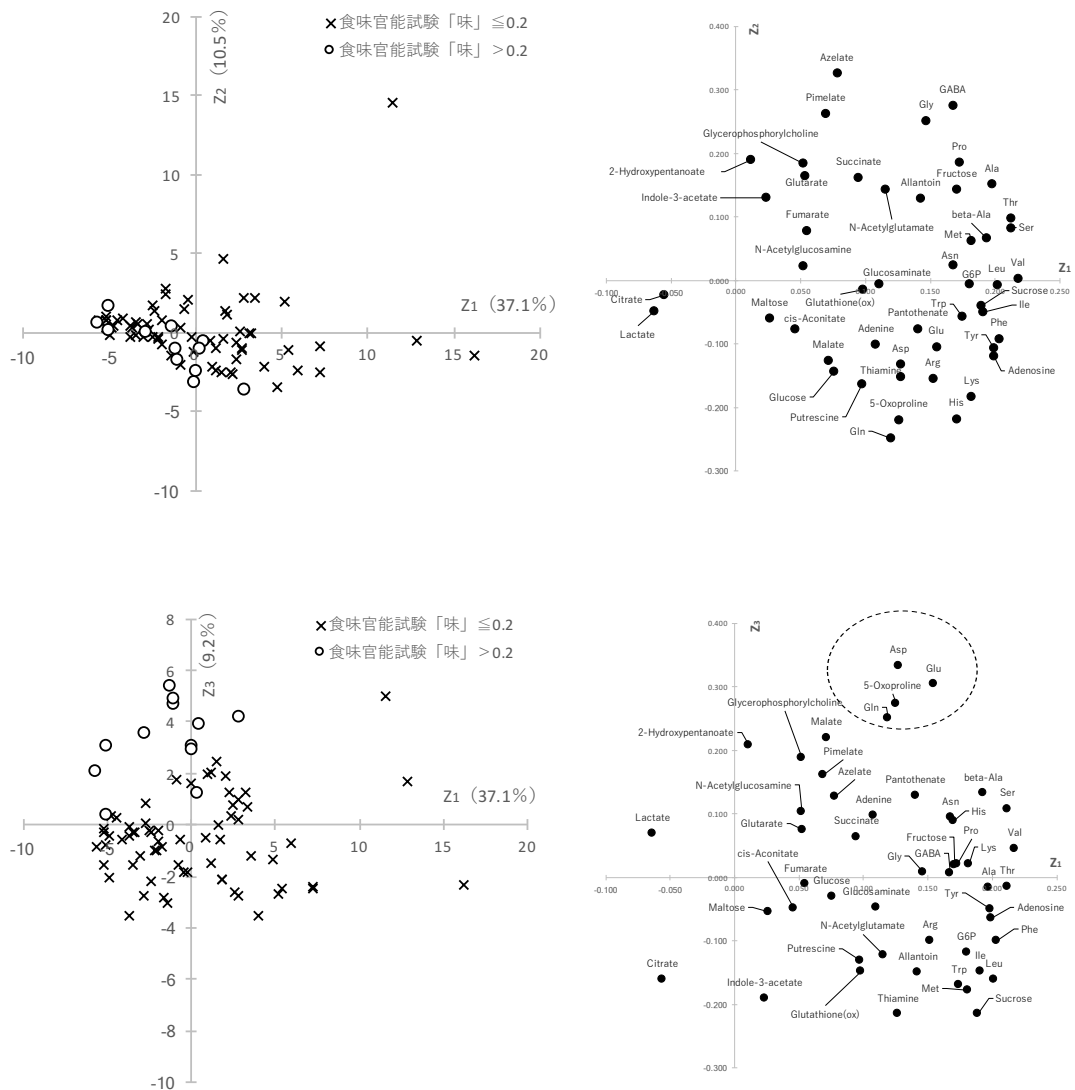


図 15 2008 年産の炊飯米中の低分子化合物の主成分スコア (左)

と因子負荷量 (右)

Z₁ : 第 1 主成分 Z₂ : 第 2 主成分 Z₃ : 第 3 主成分

() 内は各成分の寄与率

破線内は食味官能試験「味」との相関係数が高い化合物

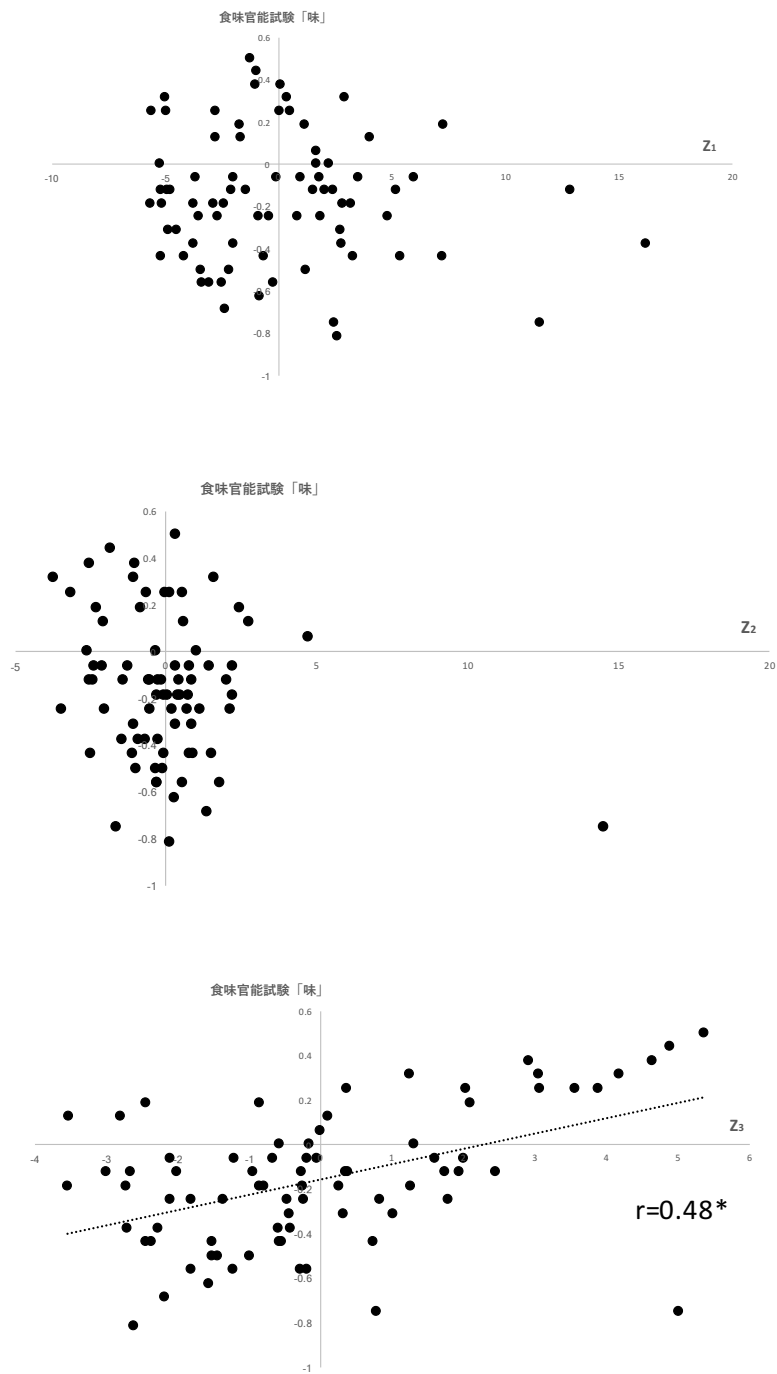


図 16 2008 年産の炊飯米中の低分子化合物の主成分スコアと食味官能試験「味」の関係

Z_1 : 第 1 主成分 Z_2 : 第 2 主成分 Z_3 : 第 3 主成分

* : 5% 水準で有意

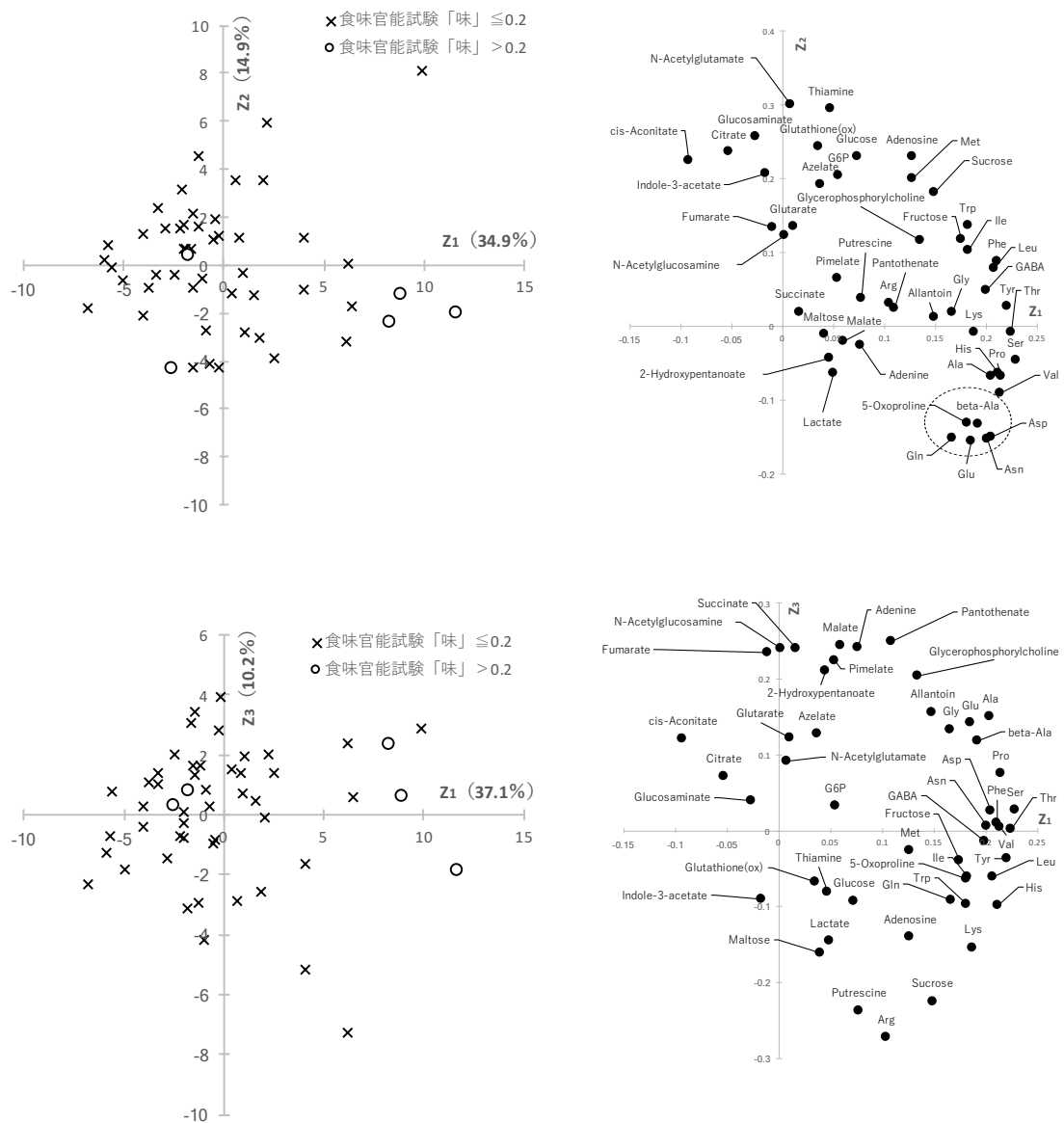


図 17 2009 年産の炊飯米中の低分子化合物の主成分スコア（左）と因子負荷量（右）

Z₁ : 第 1 主成分 Z₂ : 第 2 主成分 Z₃ : 第 3 主成分

() 内は各成分の寄与率

破線内は食味官能試験「味」との相関係数が高い化合物

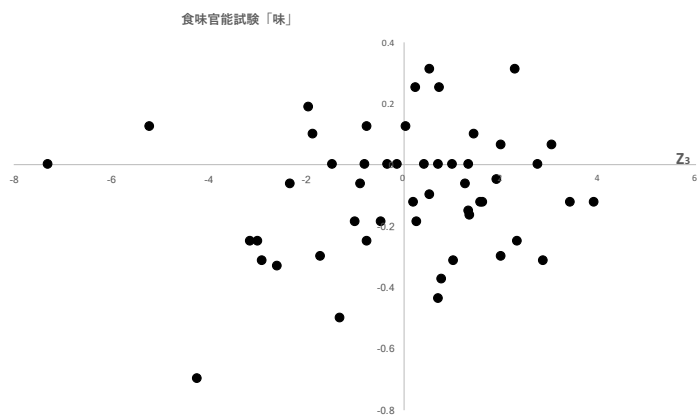
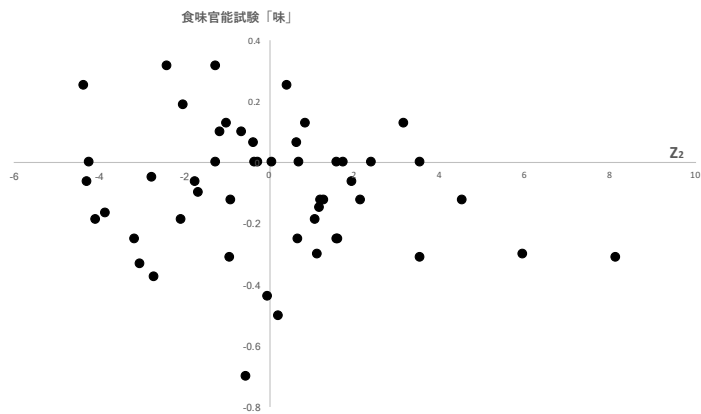
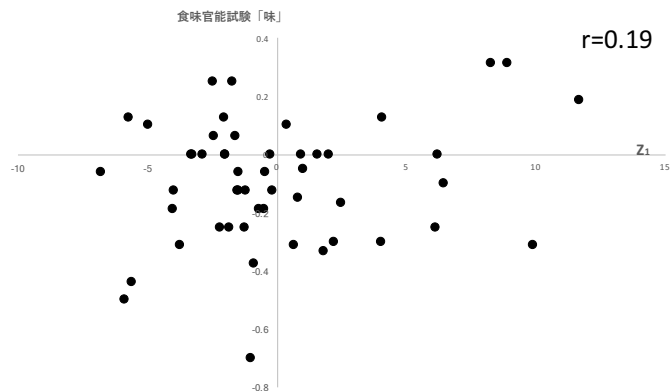


図 18 2009 年産の炊飯米中の低分子化合物の主成分スコアと食味官能試験「味」の関係

Z₁ : 第 1 主成分 Z₂ : 第 2 主成分 Z₃ : 第 3 主成分

2カ年とも食味官能試験「味」と正の相関があり、2008年産米においてももっとも食味官能試験「味」との相関が高かったアスパラギン酸は、 $R=0.46$ と有意な相関があった(図19)。精米粗タンパク質含有率と食味官能試験「味」との相関は $r=-0.40$ であった(図20)。

アスパラギン酸、グルタミン酸などが多く、メチオニンなどの多くの化合物が少ない炊飯米の「味」が優れるなど、炊飯米の低分子化合物組成が食味に影響を与えることが明らかとなった。特にアスパラギン酸については、単一の化合物でも食味官能試験「味」と有意な相関が得られ、その相関係数の絶対値は精米粗タンパク質含有率との相関を上回っていたため、食味を推定する指標として極めて有望と考えられた。

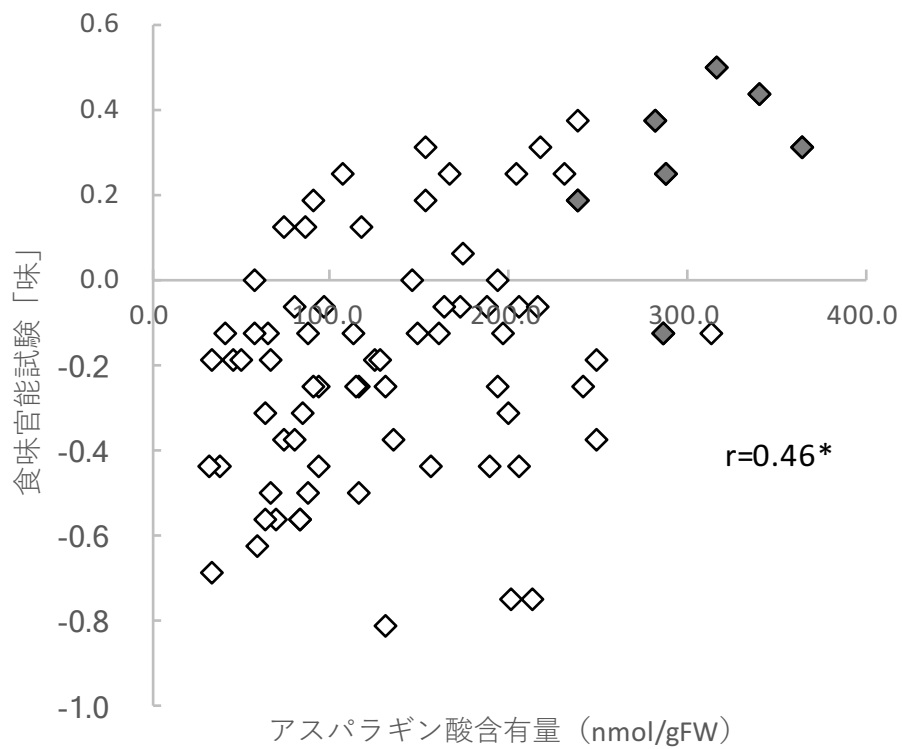


図 19 炊飯米のアスパラギン酸含有量と食味官能試験「味」の関係

2008 年産米 78 サンプル

* : 5% 水準で有意

灰色のシンボルは「つや姫」

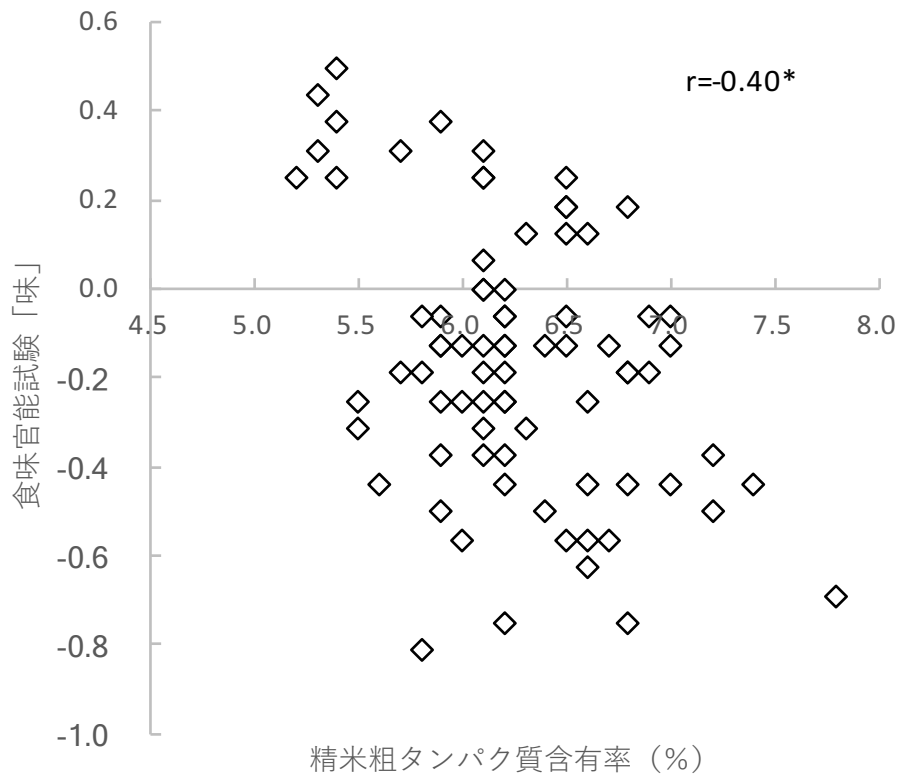


図 20 精米の粗タンパク含有率と食味官能試験「味」の関係

2008 年産米 78 サンプル

* : 5% 水準で有意

第 2 節 低分子化合物組成の品種間差

第 1 節では、炊飯米の低分子化合物組成が食味に影響していることが明らかとなった。精米の成分分析については、異なる栽培条件で食味とアミノ酸組成や糖組成の関係を検討した研究はあるものの（竹生ら 1983、田島ら 1992、杉山ら 1995、松波ら 2016）、品種間差について検討した例はない。炊飯米の成分分析については、アミノ酸組成に限定し、「コシヒカリ」「ササニシキ」などの国内産米から中国、韓国、タイなどの外国産米まで、食味に大きな幅のあるサンプルを対象とし、品種間差を検討した例があるのみである（松崎ら 1992）。そこで本研究では、近年育成された良食味品種間での低分子化合物組成の品種間差について調査した。

（1）材料

2008、2009 年に山形県農業総合研究センター水田農業試験場（山形県鶴岡市）で栽培した、「はなの舞い」、「里のゆき」、「あきたこまち」、「どまんなか」、「ササニシキ」、「ひとめぼれ」、「はえぬき」、「コシヒカリ」、「つや姫」および育成途中の系統を供試した。栽培方法および玄米の調製方法は第 1 節のとおりとした。

（2）方法

炊飯、メタボローム測定および測定の前処理については、第 1 節のとおりとした。ヒートマップの作図は、各化合物の含量を Z-スコアに変換後、Mev TM4 software（Dana-Farber Cancer Institute）（Saeed *et al.* 2003）を用い、ピアソン相関に基づいてクラスタリングし、描画した。

(3) 結果および考察

CE-TOFMS で測定した代謝物由来と考えられるピークのうち、測定率の 90%以上で、S/N (signal - noise ratio) >3 で検出され、標準物質と同定が可能であった 49 物質と LC-MS/MS で測定した 4 種類の糖を解析に用いた。ピアソン相関に基づきクラスタリングした結果、品種間差の顕著な成分のクラスタ (図 21、ラベル A 群) が形成された。ラベル A 群は第 1 節で食味に関係すると明らかとなった化合物のアスパラギン酸、グルタミン酸が含まれており、いずれの化合物も「コシヒカリ」「つや姫」「キヌヒカリ」で 2 カ年とも多い傾向であった。

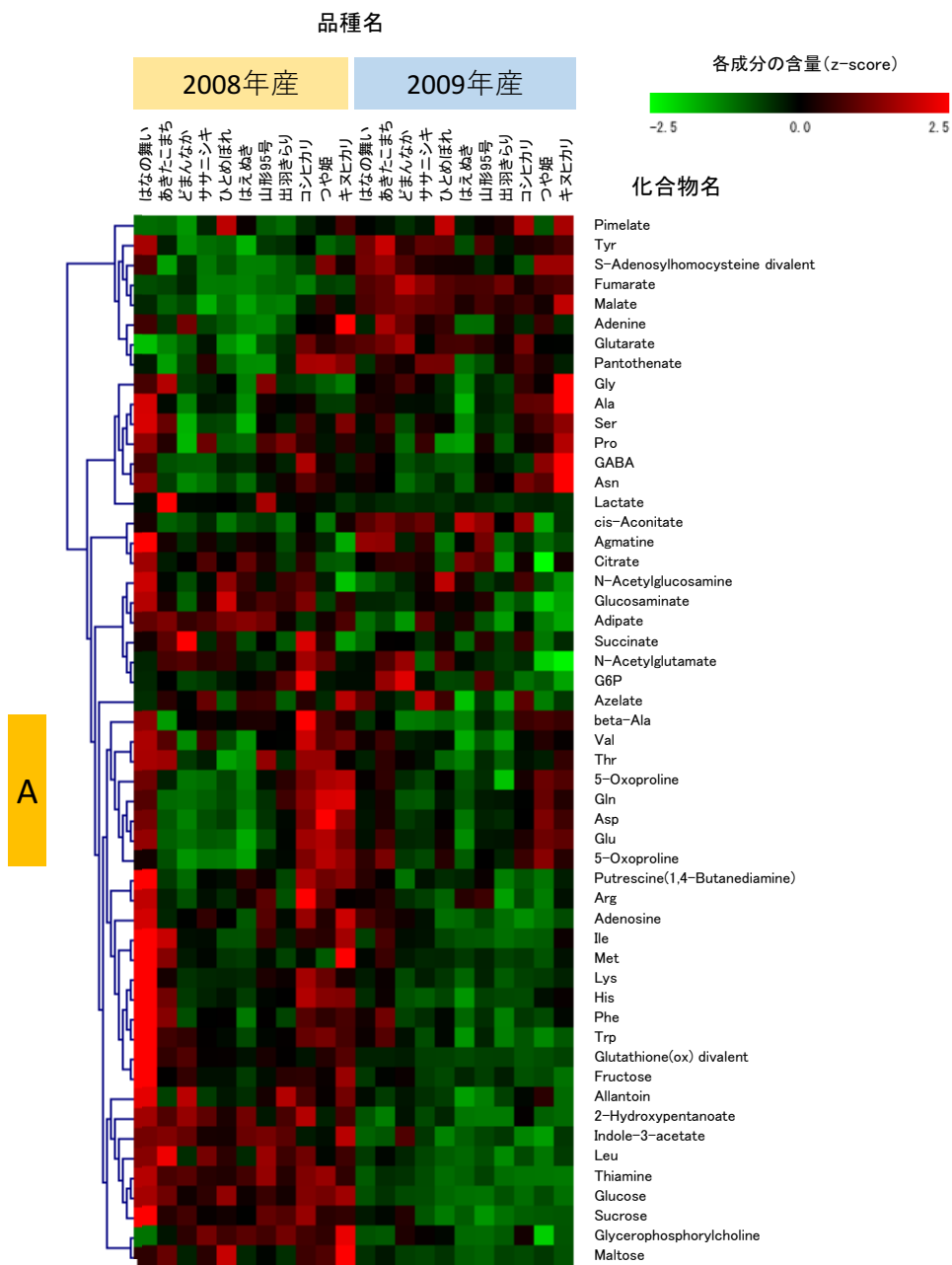


図 21 炊飯米の化合物組成の品種間差

炊飯米のアスパラギン酸含有量は、供試した 11 品種の中で「つや姫」が 2 カ年とも最も高く、2008 年は 288 nmol/gFW、2009 年は 199 nmol/gFW であった（図 22）。2 カ年とも「つや姫」に次いで「キヌヒカリ」「コシヒカリ」が高く、「はえぬき」はもっとも少なかった。山形県における熟期が中生より早い「あきたこまち」「どまんなか」「ササニシキ」「ひとめぼれ」「はえぬき」では、2009 年産米の含有量が高かったのに対し、「つや姫」「コシヒカリ」「キヌヒカリ」の晩生の品種においては 2008 年産米の含有量が高かった。

グルタミン酸含量もアスパラギン酸と同様に「つや姫」が 2 カ年とももっとも高く、2008 年は 213 nmol/gFW、2009 年は 180 nmol/gFW であった（図 23）。グルタミン酸の含有量は「つや姫」に次いで「コシヒカリ」「キヌヒカリ」「はなの舞い」が高く、アスパラギン酸と同様に、グルタミン酸でも「はえぬき」がもっとも低かった。年次による含有量の差もアスパラギン酸と同様で、中生より早い「あきたこまち」「どまんなか」「ササニシキ」「ひとめぼれ」「はえぬき」では 2009 年産米の含有量が高かったのに対し、「つや姫」「コシヒカリ」「キヌヒカリ」の晩生の品種については 2008 年産米の含有量が高かった。

食味に負の影響があると示唆されたメチオニンの含有量は、2008 年産は「キヌヒカリ」がもっとも高く、次いで「はなの舞い」「あきたこまち」の順であった（図 24）。2009 年産米は、「あきたこまち」がもっとも高く、次いで「はなの舞い」「キヌヒカリ」の順であった。また、「つや姫」は 2 カ年とももっとも低かった。

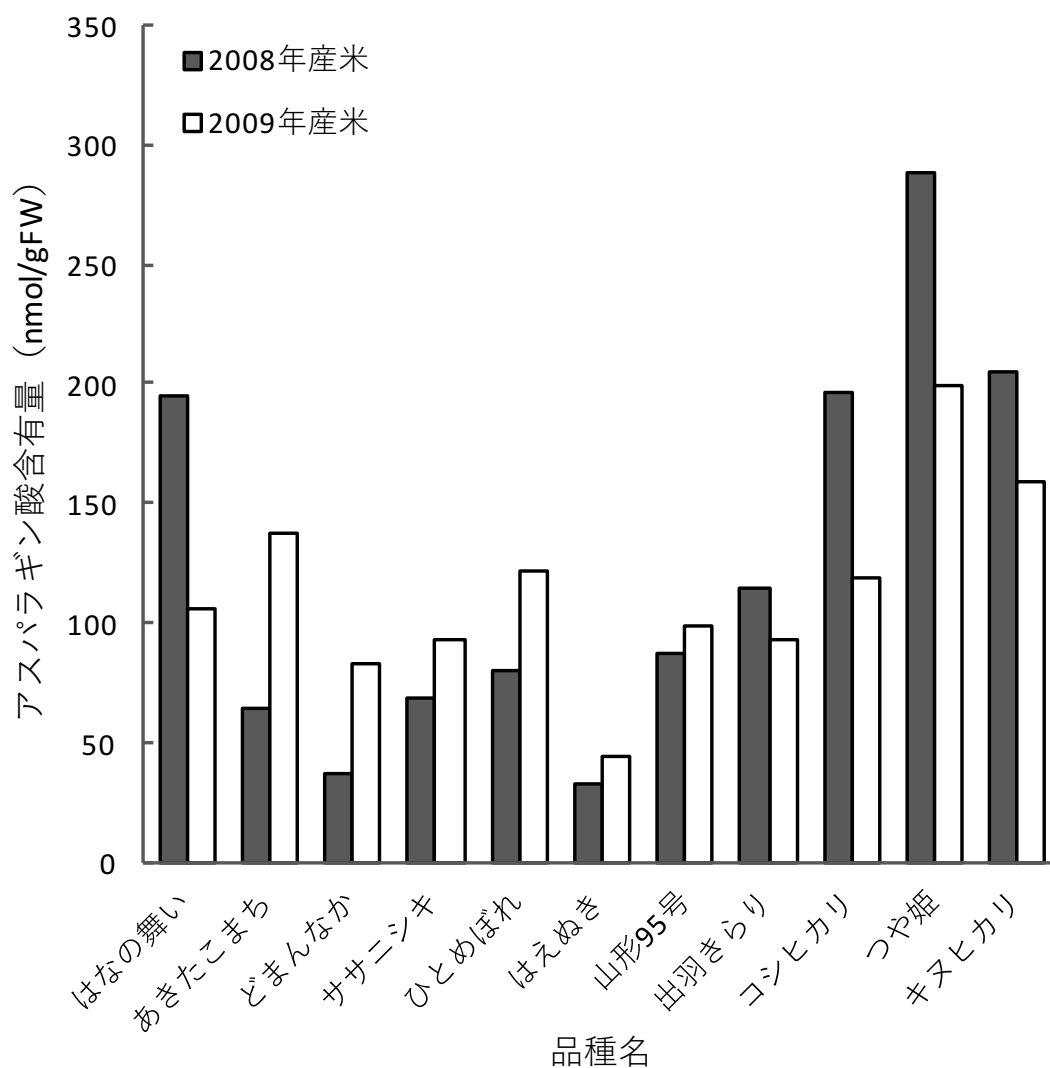


図 22 炊飯米のアスパラギン酸含有量の品種間差

品種の並びは山形県における熟期順

「はなの舞い」：早生

「あきたこまち」：早生晩

「どまんなか」：中生

「ひとめぼれ」、「はえぬき」、「山形 95 号」、「出羽きらり」：中生晩

「コシヒカリ」、「つや姫」、「キヌヒカリ」：晩生

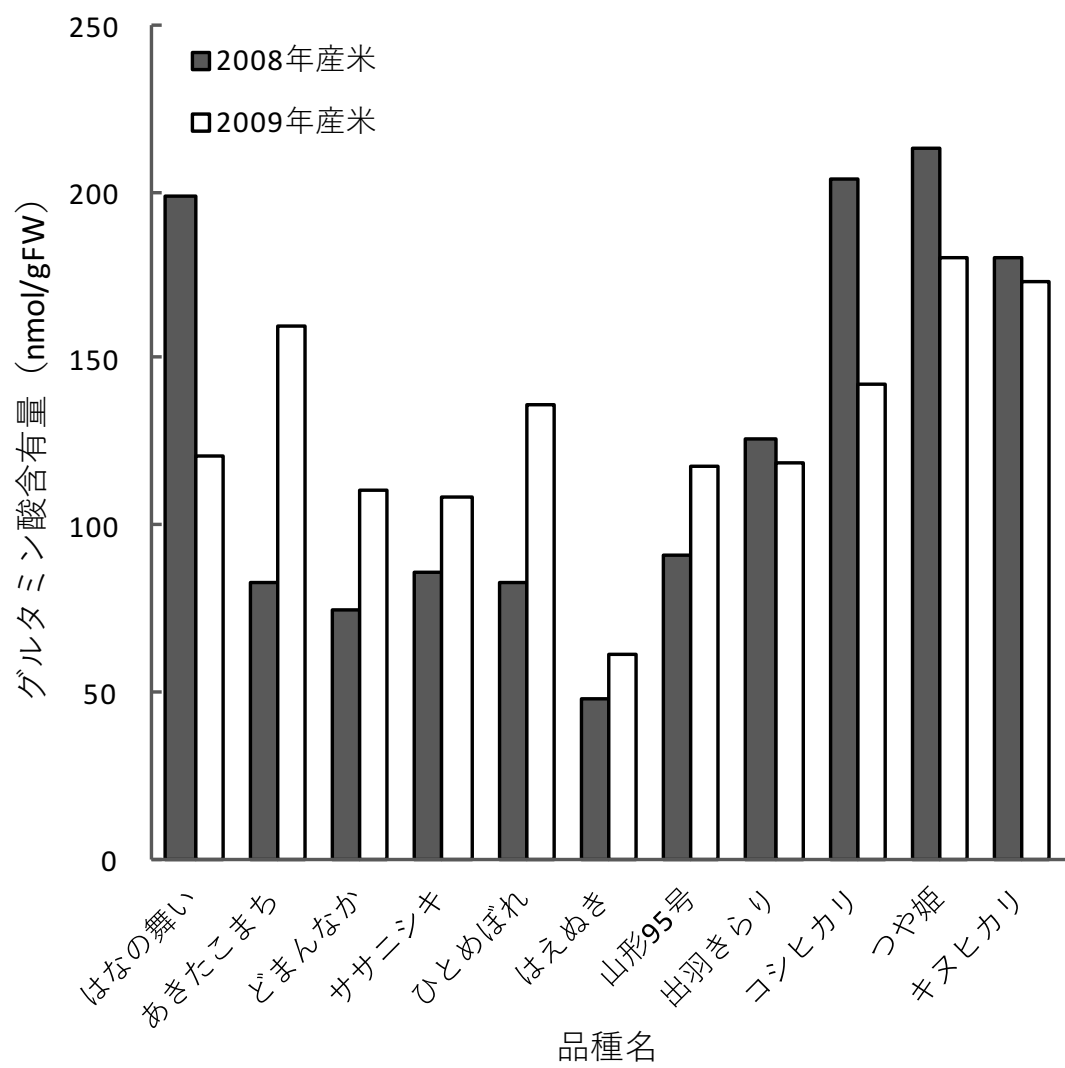


図 23 炊飯米のグルタミン酸含有量の品種間差

品種の並びは山形県における熟期順

「はなの舞い」：早生

「あきたこまち」：早生晩

「どまんなか」：中生

「ひとめぼれ」、「はえぬき」、「山形 95 号」、「出羽きらり」：中生晩

「コシヒカリ」、「つや姫」、「キヌヒカリ」：晩生

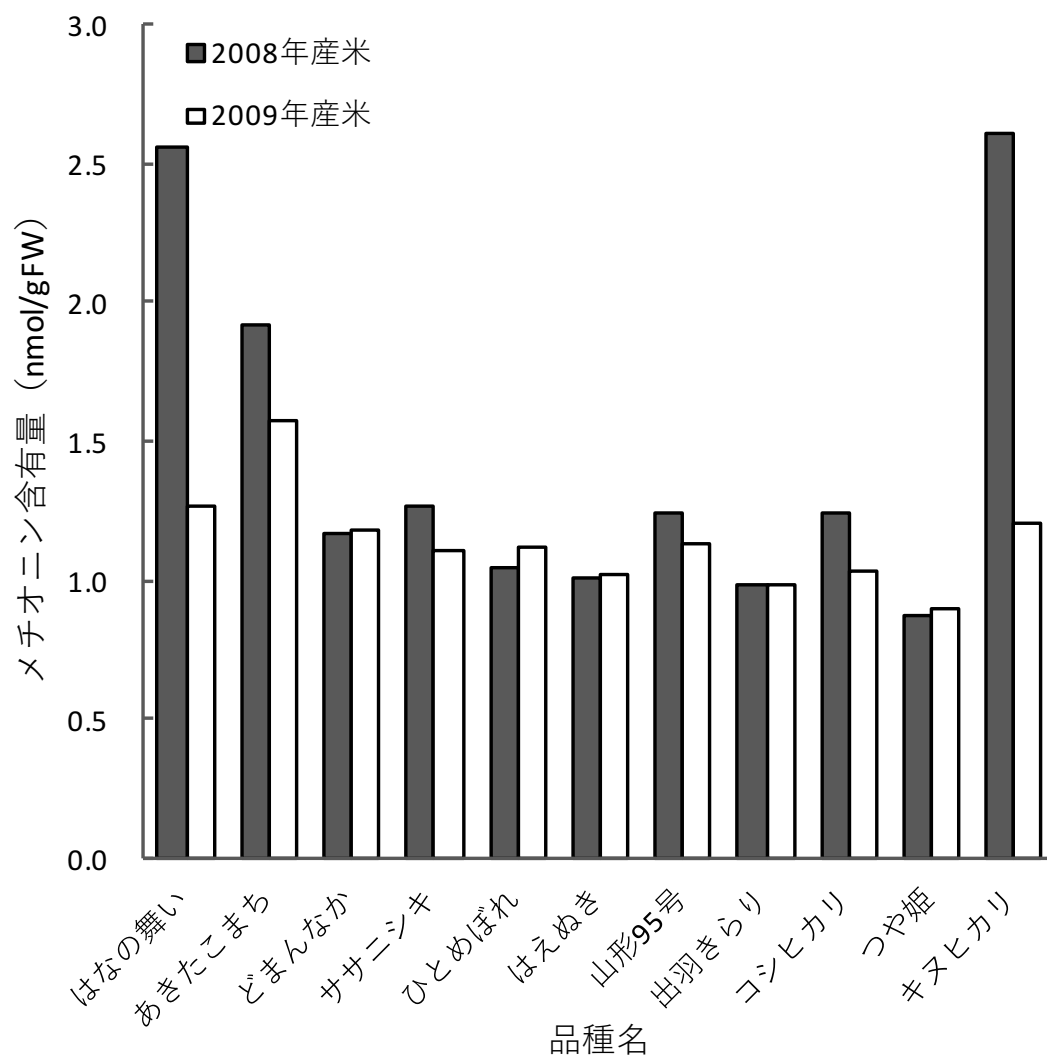


図 24 炊飯米のメチオニン含有量の品種間差

品種の並びは山形県における熟期順

「はなの舞い」：早生

「あきたこまち」：早生晩

「どまんなか」：中生

「ひとめぼれ」、「はえぬき」、「山形 95 号」、「出羽きらり」：中生晩

「コシヒカリ」、「つや姫」、「キヌヒカリ」：晩生

「つや姫」は、2カ年ともアスパラギン酸、グルタミン酸などの食味に正の相関のある化合物が多く、メチオニンなどの負の相関のある化合物が少なかったことから、品種の特徴として「味」に優れた低分子化合物組成を有するが明らかとなった。一方、年次によっても化合物の含量に差があった。出穂期が「つや姫」と同時期で晩生の「コシヒカリ」「キヌヒカリ」を、中生晩よりも早い熟期の品種と比較すると、アスパラギン酸、グルタミン酸が多いことから、品種間差だけでなく、登熟温度も低分子化合物組成に影響を与える可能性が示唆された。

第 3 節 低分子化合物組成に登熟温度が及ぼす影響

第 2 節では、「つや姫」のアスパラギン酸、グルタミン酸が特異的に多いなど、品種によって低分子化合物組成に差があることが明らかとなった。一方、熟期によって成分の多寡があること、「つや姫」「コシヒカリ」などの晩生品種の低分子化合物組成が「つや姫」と似ていることなど、登熟温度による影響が示唆された。そこで本研究では、登熟温度が異なったサンプルのメタボローム解析から、登熟温度が低分子化合物組成に与える影響を調査した。

(1) 材料

2015～2016 年に山形県農業総合研究センター（山形県山形市）で栽培した「つや姫」「コシヒカリ」「はえぬき」を供試した。栽培方法は、移植時に稚苗となるよう、両年とも 3 月下旬から 5 月下旬まで概ね 10 日間隔で播種し、5 月上旬～6 月中旬まで概ね 10 日間隔の 6 時期に、22.2 株/m² の 5 本/株で 200 株移植した。施肥は、窒素成分で基肥 0.4 kg/a、幼穂形成期に 0.15 kg/a の計 0.55 kg/a、とした。9 月上旬から 10 月中旬にかけて各サンプルの成熟期に 128 株を刈り取りした。収穫した玄米はふるいに通し、1.9 mm 未満の粒を除いた。

(2) 方法

登熟温度は、試験区の穂が 50% 出たのを確認した日である出穂期から、試験区の籾の黄化が 85% 以上となった日である成熟期までの日平均気温の平均値とした。

調整した玄米を精米機（山本製作所、VP-30T）で、重量ベースで

90.0±0.5%となるように搗精し精米とした。精米 600 g に 1.46 倍量の水を加え、電気炊飯ジャー（Panasonic、SR-HD103）で炊飯を行った。炊飯米は炊き上がり後に 10 分間蒸らし、その後によくかき混ぜた。10~20 g の炊飯米をメタボローム測定用のサンプルとして-20℃以下の冷凍庫内で保存した。CE-TOFMS によるメタボローム測定および測定の前処理については、第 1 節のとおりとした。

ヒートマップの作図は、各化合物の含量を Z-スコアに変換後、Mev TM4 software（Dana-Farber Cancer Institute）（Saeed *et al.* 2003）を用い、ピアソン相関に基づいてクラスタリングし、描画した。主成分分析には JMP ver 7.0.1（SAS Institute）を用いた。

（3）結果と考察

登熟温度の範囲は、「つや姫」では 16.9~24.7℃、「コシヒカリ」では 17.0~24.6℃、「はえぬき」では 17.4~24.9℃であった。CE-TOFMS で測定した代謝物由来と考えられるピークのうち、測定の 90%以上で、S/N>3 で検出され、標準物質と同定が可能であったのは 46 物質であった。

クラスタリングの結果、遊離アミノ酸類や糖類を含む 40 物質がひとつの大きなクラスタを形成した（図 25、ラベル A 群）。ラベル A 群の化合物は「つや姫」「コシヒカリ」「はえぬき」のいずれの品種でも、登熟温度が低下することで含有量が増加していた。アスパラギン酸、グルタミン酸などの食味との関係が示唆された化合物も A 群に含まれていた。

主成分分析の結果、第 1、2、3 主成分の寄与率はそれぞれ 52.8%、8.4%、6.8%であった（図 26）。因子負荷量より第 1 主成分は化合

物の総量を表す軸と推定され（図 27）、3 品種とも登熟温度に比例して増減し、品種間差は不明瞭な成分であった。第 2 主成分は化合物の組成を表す軸と推定され、特にマルトース、イノシトールなどの糖類の多寡が影響していた（図 27 上、破線内）。「はえぬき」では登熟温度に比例して増減していたが、「つや姫」「コシヒカリ」では登熟温度との関係は不明瞭であった。第 3 主成分も化合物の組成を表す軸と推定され、アスパラギン酸やグルタミン酸など、第 1 節で食味との関連が示唆された化合物の多寡が影響していた（図 27 下、破線内）。「つや姫」で登熟温度に比例して増減し、「コシヒカリ」「はえぬき」では一定の傾向は確認されなかった。

アスパラギン酸は登熟温度が低下することで「つや姫」「コシヒカリ」「はえぬき」のいずれの品種でも含有量が増加し、同一の温度帯で比較すると「つや姫」が多く、「コシヒカリ」と「はえぬき」は同程度に含有量が多かった（図 28）。グルタミン酸も登熟温度が低下することで「つや姫」「コシヒカリ」「はえぬき」のいずれの品種でも含有量が増加しており、同一の温度帯で比較すると「つや姫」>「コシヒカリ」>「はえぬき」の順であった（図 29）。

これらの結果から、登熟温度が低下することで、いずれの品種でも炊飯米の低分子化合物は増加することが明らかとなった。「つや姫」は「コシヒカリ」に比較して、アスパラギン酸、グルタミン酸などの食味に関連すると示唆される化合物が低温条件で特異的に増加し、「はえぬき」は、一部の糖類が登熟温度の低下により特異的に増加するなど、品種によって登熟温度に対する低分子化合物組成の変動に差があることが示された。

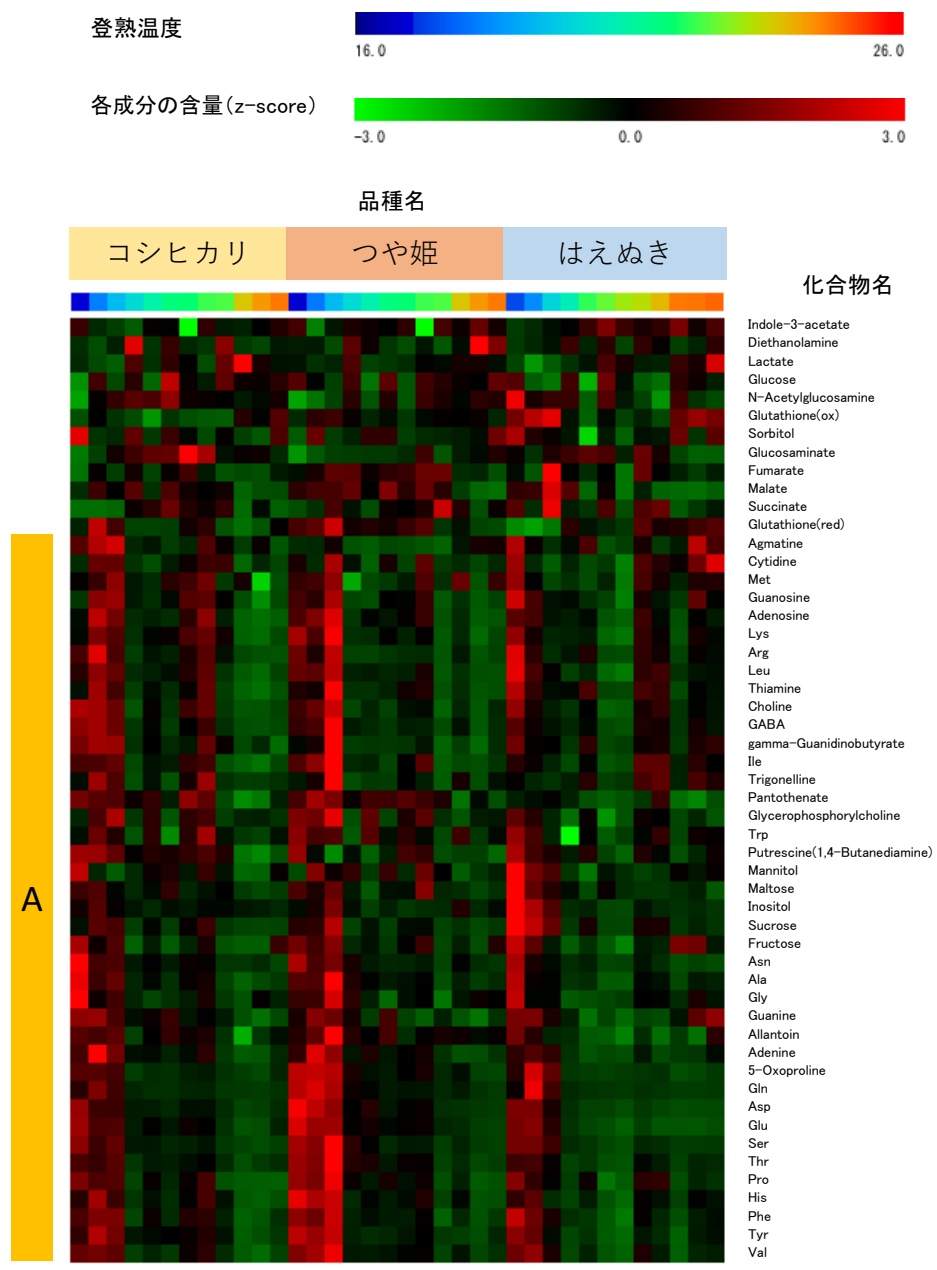


図 25 登熟温度が異なるサンプルの低分子化合物組成

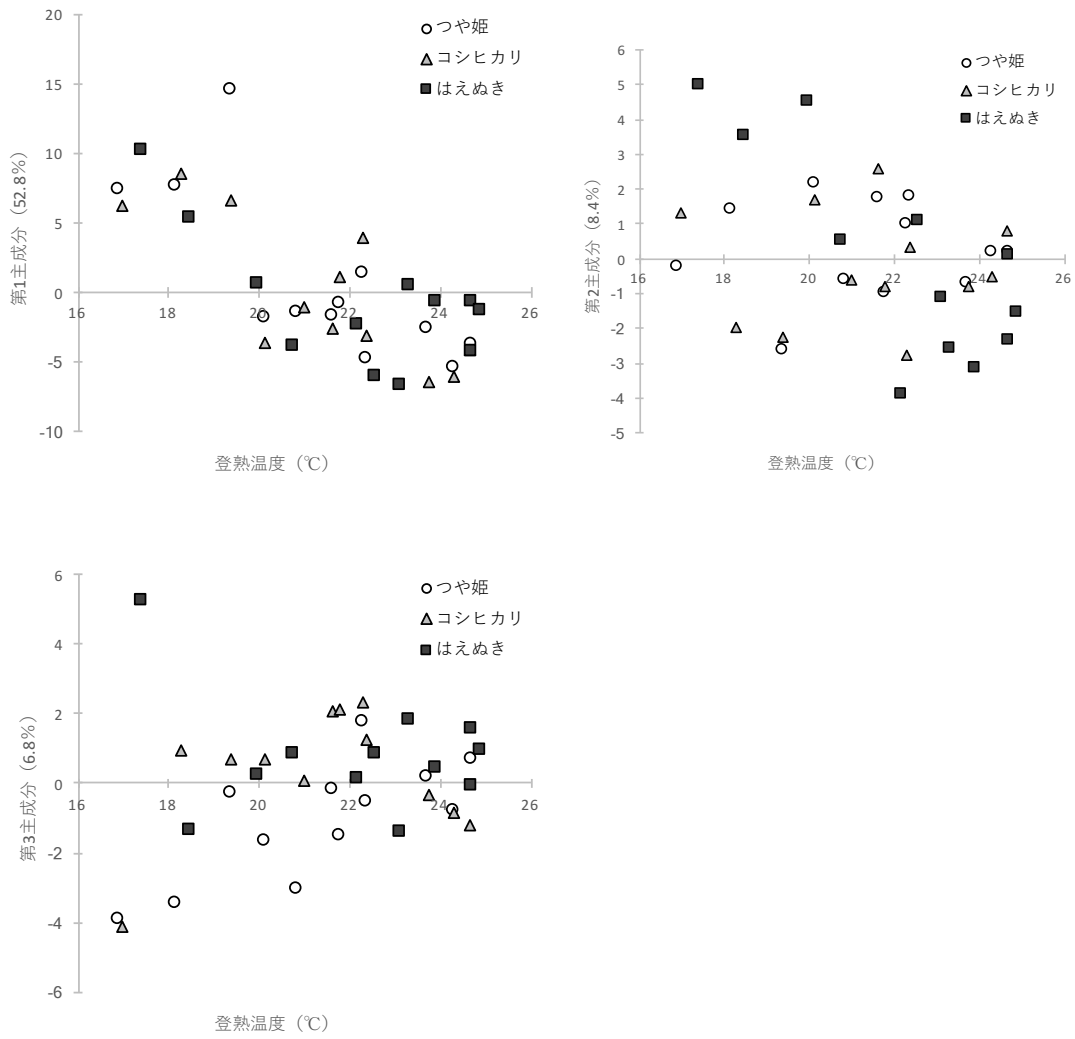


図 26 炊飯米中の低分子化合物の主成分スコアと登熟温度

() 内は各成分の寄与率

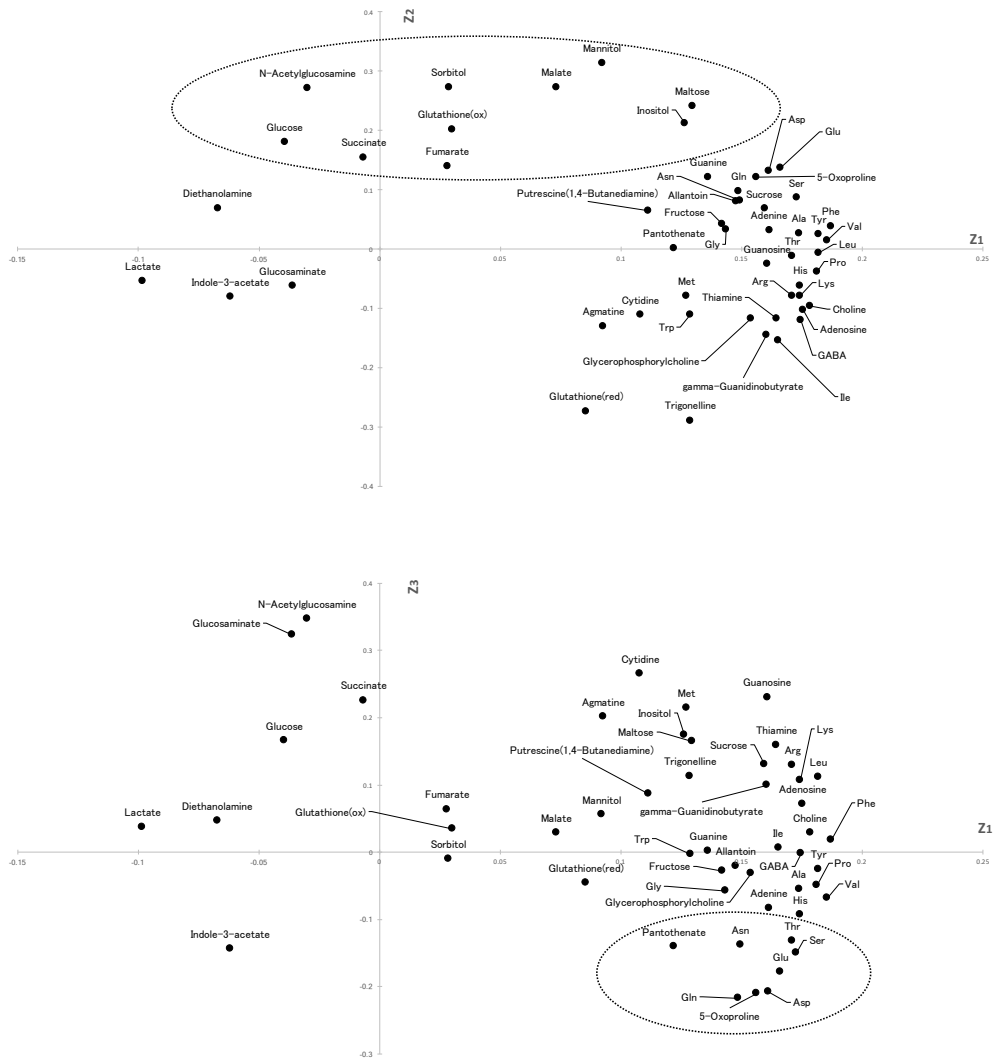


図 27 炊飯米中の低分子化合物の因子負荷量

図 26 の主成分スコアに対する因子負荷量

Z₁ : 第 1 主成分 Z₂ : 第 2 主成分 Z₃ : 第 3 主成分

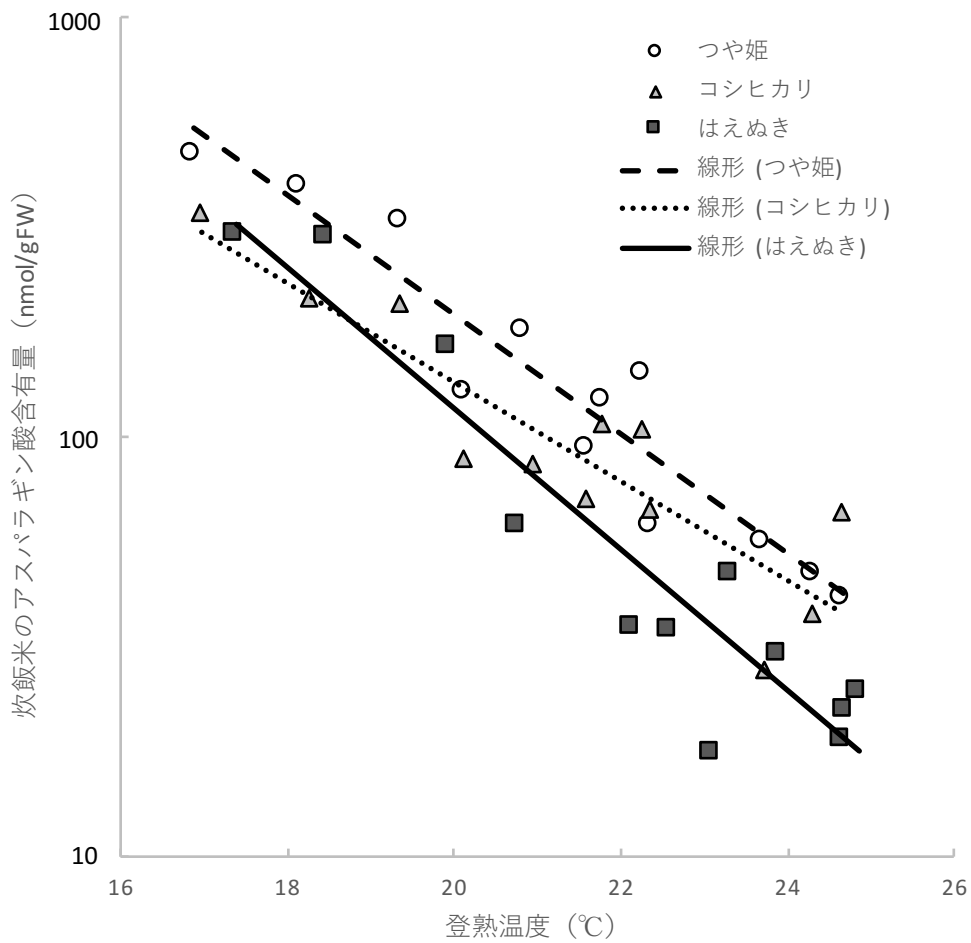


図 28 登熟温度と炊飯米のアスパラギン酸含有量の関係

登熟温度：出穂期から成熟期の日平均気温の平均値

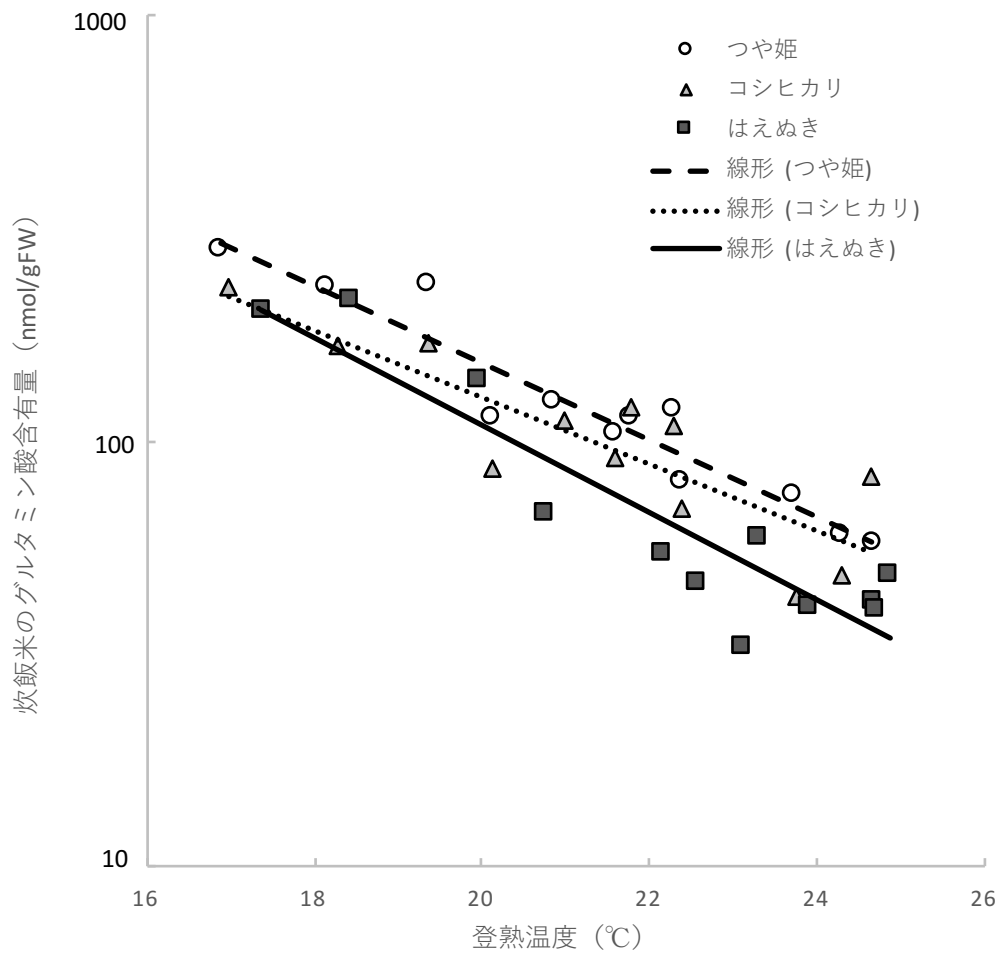


図 29 登熟温度と炊飯米のグルタミン酸含有量の関係

登熟温度：出穂期から成熟期の日平均気温の平均値

第 4 節 考察

1. 低分子化合物組成が味に及ぼす影響

クラスタ解析、主成分分析の結果から（図 13～18）、アスパラギン酸、グルタミン酸などが多く、メチオニンなどの他の多くの化合物が少ない炊飯米の「味」が優れることが示された。精米や玄米に含まれるアミノ酸の食味に対する影響は古くから研究が行われており、アスパラギン酸・グルタミン酸が多い米の食味が優れる（岡崎・沖 1961、Tamaki *et al.* 1989）という研究結果を炊飯米でも証明できた。炊飯米のアミノ酸に限った分析において、グルタミン酸、アスパラギン酸が食味に影響するとの報告があるが（松崎ら 1992）、化合物を限定せずに解析を行った本研究でも、両化合物の食味に対する影響は他の化合物に比較し大きいことが示された。一方、糖類に関しては、精米や玄米における含量が炊飯米の食味に関係するとの報告がされているものの（建部ら 1994、Konishi *et al.* 1996）、本研究では炊飯米の含有量が食味に与える影響は不明瞭であった。池田（2001）は、糖類は炊飯米表面のつやと粘りに影響を与えたとしており、本研究では食味官能評価における「味」に限定して解析を行ったことから、糖類の影響が確認できなかったと考えられた。測定された化合物の中でも食味との相関が高かったアスパラギン酸については、食味と相関があるとされるタンパク質含有率（Juliano 1985、Ramesh *et al.* 2000）とよりも相関係数の絶対値がが大きく（図 19、図 20）、食味を推定する指標として有望と考えられた。

2. 低分子化合物組成の品種間差異とその変動要因

これまで炊飯米の低分子化合物の組成を調査した例はなかったが、

本研究により、「つや姫」「コシヒカリ」「キヌヒカリ」は「はえぬき」「ひとめぼれ」「あきたこまち」などと比較して、アスパラギン酸、グルタミン酸などの食味に正の相関のある化合物が多いことが明らかとなった（図 21）。また、「つや姫」は、同熟期である「コシヒカリ」「キヌヒカリ」と比較してもアスパラギン酸、グルタミン酸が多く（図 22、図 23）、メチオニンが少なく（図 24）、「味」に優れる組成を有すると考えられた。Yamakawa and Hakata（2010）は、登熟期の高温によりタンパク質合成能が低下し、玄米のスクロースおよびアミノ酸が蓄積するとしている。本研究では、「つや姫」「コシヒカリ」「はえぬき」の 3 品種とも、登熟温度が低下することで炊飯米の低分子化合物の多くが増加していた（図 25）。これは、本研究における登熟温度は 25℃以下であり、Yamakawa and Hakata（2010）の条件に比べて低い温度帯であったためと考えられる。Maruyama *et al.*（2014）は、イネの幼植物体において、10℃の低温に 1～2 日遭遇することで、デンプン分解、スクロース代謝およびグリオキシレートサイクルに関与する酵素をコードするいくつかの遺伝子がアップレギュレートされ単糖が蓄積し、さらに、複数のアミノ酸が蓄積するとしているため、玄米についても同様に、低温により複数の低分子化合物が蓄積する可能性があると考えられる。また、登熟温度に対する低分子化合物の変動の品種間差を調査した例もこれまでになく、「はえぬき」「つや姫」「コシヒカリ」で登熟温度に対する低分子化合物組成の変動に差があったことから（図 26、27、28、29）、低分子化合物組成そのものの品種間差に加え、登熟温度による低分子化合物組成の変動にも品種間差があると考えられた。

第 3 章 「つや姫」の食味関連遺伝子の解析

第 1 節 「つや姫」のゲノム構成の解析

イネは主要な穀物として世界的に作付けされており、起源地周辺のアジア諸国のみならず、ヨーロッパ、アメリカ、アフリカなど全世界で栽培されている。近年、ゲノム研究は急速に進展し、2004年には国際的な取組みの中で、ジャポニカ水稻品種「日本晴」のゲノムの完全解読が終了した（IRGSP 2005）。その後もゲノム解読技術は向上しており、サンガーシーケンス法に比べて解読速度が飛躍的に上昇した次世代シーケンサーが開発され、日本の代表的なブランド品種である「コシヒカリ」のゲノムも解読されている（Yamamoto *et al.* 2010）。

2010年に作付けが開始され、食味に優れるブランド品種として栽培面積を増やしている「つや姫」は、水田・吉田（1994）の手法で「コシヒカリ」との近縁係数を計算すると0.7以上であることから、70%以上のゲノムが「コシヒカリ」と同一であると考えられる。また、「つや姫」は、「コシヒカリ」と比較して収量、玄米の外観品質、耐倒伏性、いもち病抵抗性などの栽培特性に優れており、炊飯米の外観、味、粘りなどの食味特性も優れることから（結城ら 2010）、「つや姫」を特徴づける遺伝子は、「コシヒカリ」と異なる30%程度のゲノムに座乗していると考えられる。

DNA マーカーが整備されたことで、両親や祖先とのDNA多型の比較により、遺伝子や染色体領域の由来を明らかにすることが可能となっている。「キヌヒカリ」および「どんとこい」の短稈性が「IR8」の *sd1* に由来し、近傍領域がインディカ品種に由来することが明らかになるなど（Asano *et al.* 2007）、ターゲットとした遺伝子の由

来が明らかにされているが、DNA マーカーによる解析のみでは、ゲノム構成を網羅的に明らかにすることは不可能である。また、「つや姫」のゲノムは解読されておらず、「コシヒカリ」「日本晴」および近縁系統とのゲノム比較の例もないことから、「つや姫」のゲノム構成は明らかになっていない。

本研究では、次世代シーケンサーにより全ゲノムシーケンスを行い、「つや姫」と「コシヒカリ」のゲノムの差異を見出すとともに、ゲノムに差異のある染色体領域を対象に、「つや姫」のゲノムの由来について考察を行った。

(1) 材料

山形県農業総合研究センター水田農業試験場（山形県鶴岡市）で栽培した「つや姫」およびその親となった品種・系統の「コシヒカリ」「山形 70 号（「つや姫」の母）」「東北」164 号（「つや姫」の父）」「山形 48 号（「つや姫」の母の母、「コシヒカリ」の葯培養変異系統）」「キヌヒカリ（「つや姫」の母の父）」「味こだま（「つや姫」の父の母）」「ひとめぼれ（「つや姫」の父の父）」「中部 7 号（「つや姫」の祖先、*Pik-m* 保有系統）」「IR8（「つや姫」の祖先、*sd1* 保有品種）」「低脚烏尖（「つや姫」の祖先、「IR8」の父、*sd1* 保有の在来品種）」の葉身を用いた（図 29）。

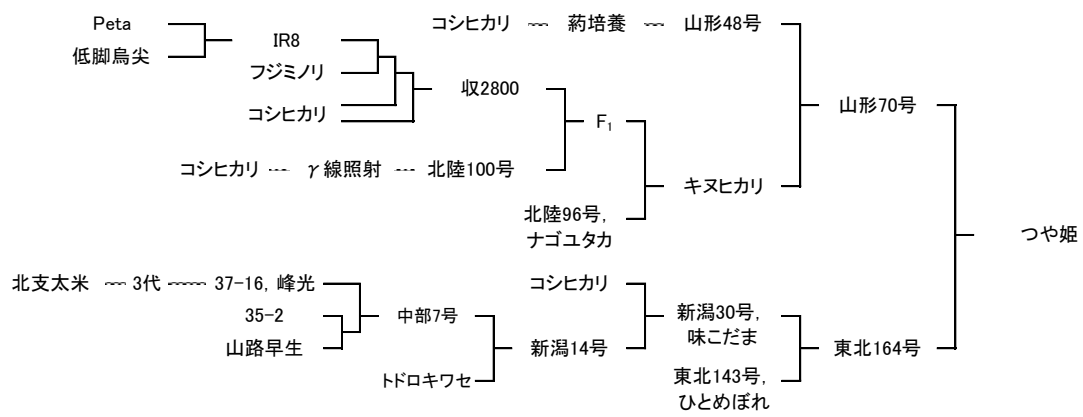


図 29. 水稻品種「つや姫」の系譜図

(2) 方法

【DNA の抽出】

葉身から臭化セチルトリメチルアンモニウム (Cetyltrimethylammonium bromide: CTAB) 法 (Murray and Thompson 1980) により抽出した。

【全ゲノムシーケンスによる SNP 解析】

葉身より抽出した DNA を次世代シーケンサー (Illumina HiSeq2000) によって解読し、「コシヒカリ」のゲノム塩基配列 (Yamamoto *et al.* 2010) と比較し、SNP を抽出した。さらに、「日本晴」・「つや姫」間の SNP を抽出し、「日本晴」・「コシヒカリ」間の SNP を差分した SNP セットを作成し、「日本晴」の RAP (rice annotation project) アノテーションに対してその SNP 位置と変異の種類を調査した。

【DNA マーカーによる多型解析】

第 1 染色体長腕の多型を検出する 17 種の SSR マーカーおよび第 11 染色体長腕の多型を検出する 35 種の SSR マーカー (McCouch *et al.* 2002、IRGSP 2005)、*Pik-m* 近傍の SNP に 3' 端を設定し、そのミスマッチを利用して多型を検出するよう設計した PCR (polymerase chain reaction) ベースのマーカー (k6441) (Hayashi *et al.* 2006)、「低脚烏尖」および「IR8」の *sd1* に存在する *GA20-ox2* の第 1 エキソンから第 2 エキシソンの 383 bp の欠失 (Monna *et al.* 2002) の両端にプライマーがアニーリングするよう設計した InDel (Insertion/Deletion) マーカー (sd1-ID) を用いた。PCR は、反

応試薬として Gotaq Green Master Mix (プロメガ) を用い、2 倍の Gotaq Green Master Mix を 10 μ l、10 μ g/ml の DNA を 1 μ l、10 μ M のプライマーペアを 1 μ l 含む 20 μ l の混合溶液を作成し、サーマルサイクラー (BIO RAD、Power Pac Basic) で行った。SSR マーカーおよび SNP 検出 PCR マーカーでは、94 $^{\circ}$ C 5 分間の後、94 $^{\circ}$ C 1 分間、55 $^{\circ}$ C 1 分間、72 $^{\circ}$ C 2 分間のサイクルを 35 回繰り返し、その後 72 $^{\circ}$ C 5 分間、4 $^{\circ}$ C 10 分間の処理、InDel マーカーでは 95 $^{\circ}$ C 2 分間の後、95 $^{\circ}$ C 30 秒間、55 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 1 分間のサイクルを 30 回繰り返し、その後 72 $^{\circ}$ C 5 分間、4 $^{\circ}$ C 10 分間の処理を行った。PCR 産物は、サブマリン電気泳動装置 (日本エイドー、NB-101) を用い、SSR マーカーによる産物は 3 %、InDel マーカーおよび SNP 判別 PCR マーカーによる産物は 1 % アガロース / Tris-borate EDTA (TBE) ゲルで分画した後、エチジウムブロマイド溶液で DNA を染色し、撮影装置 (バイオスピード、AlphaImager Mini) で観察して多型を確認した。

(3) 結果

「つや姫」-「コシヒカリ」間で 55,584 個の SNP が検出された。そのうち、遺伝子領域に存在した SNP の内訳は、エキソンに 4,666 個、イントロンに 7,227 個、3'UTR (three prime untranslated region) 領域に 1,939 個、5'UTR (five prime untranslated region) 領域に 1,132 個であった (表 4)。エキソンの変異のうち、非同義置換となる SNP は 2,424 個であった。

「つや姫」-「コシヒカリ」間の SNP の出現頻度は、染色体により大きく異なっていた (図 30)。第 1 染色体の長腕および第 11 染色

体の長腕末端には特に SNP の出現頻度の高い領域が存在していた。第 2 染色体、第 4 染色体、第 5 染色体、第 6 染色体、第 8 染色体、第 9 染色体、第 10 染色体には、それぞれ SNP の出現頻度がやや高い領域が存在していた。一方、第 3 染色体、第 7 染色体、第 12 染色体は、全体的に SNP の出現頻度が低かった。

第 1 染色体の短腕末端から 37.0~39.3 Mb の約 2.3 Mb は、周辺の領域に比較して特に SNP の頻度が高かった (図 31 上)。「コシヒカリ」・「つや姫」間で多型が確認された第 1 染色体長腕の 9 マーカーのうち、SNP 頻度の高い領域の 5 マーカーでは、「つや姫」は「低脚烏尖」型であった (図 31 下)。*sd1* の欠失を検出するマーカーである *sd1-ID* の遺伝子型は、「つや姫」、「山形 70 号」、「キヌヒカリ」、「IR 8」および「低脚烏尖」のいずれも欠失型であった。

第 11 染色体の短腕末端から 23.8~29.0 Mb の約 5.2 Mb は、周辺の領域に比較して特に SNP の頻度が高かった (図 32 上)。「コシヒカリ」・「つや姫」間で多型が確認された第 11 染色体長腕の 9 マーカーのうち、短腕末端から 23.9 Mb よりも長腕側の 7 マーカーについて、「つや姫」は「中部 7 号」型であった (図 32 下)。*Pik-m* の保有を推定するマーカーの遺伝子型は、「つや姫」、「東北 164 号」、「味こだま」および「中部 7 号」で保有型であった。

表 4 「つや姫」・「コシヒカリ」間の SNP の存在位置と種類

SNPの存在位置	SNP数	エクソン変異の種類	箇所
エクソン	4,666	非同義置換	2,424
イントロン	7,227	同義置換	2,174
3'UTR	1,939	ストップコドンの同義置換	3
5'UTR	1,132		
その他	40,620		
合計	55,584		

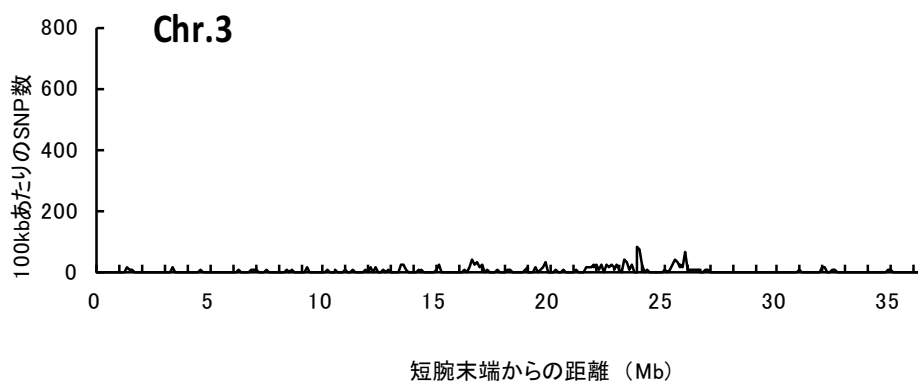
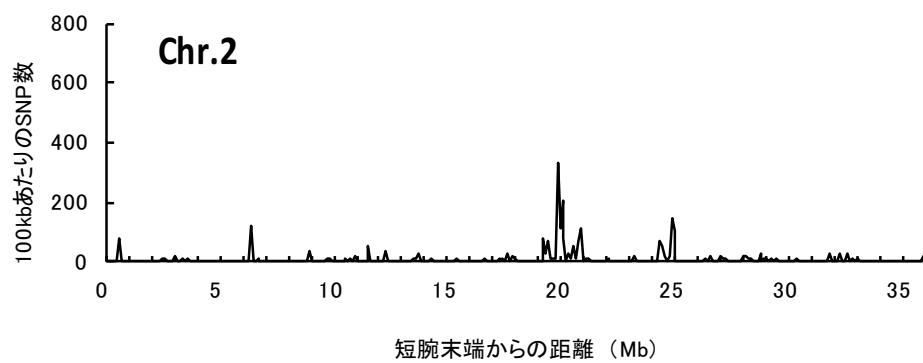
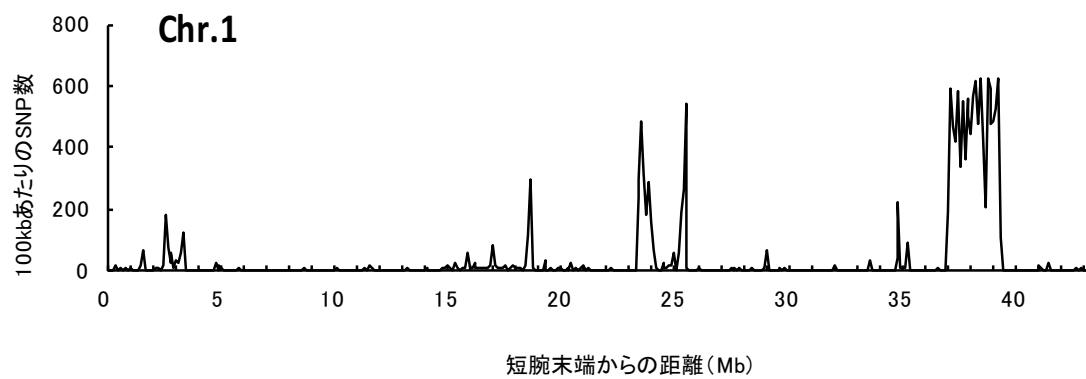


図 31 「つや姫」 - 「コシヒカリ」間の SNP の頻度と位置

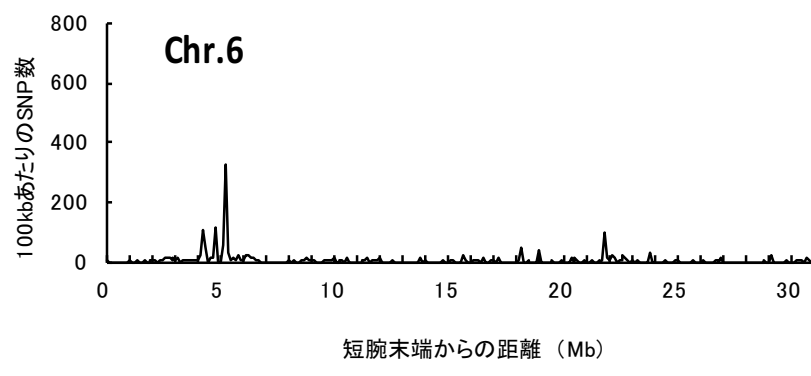
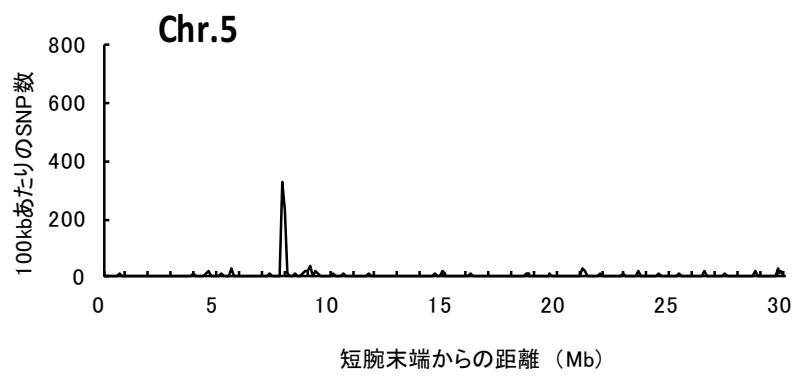
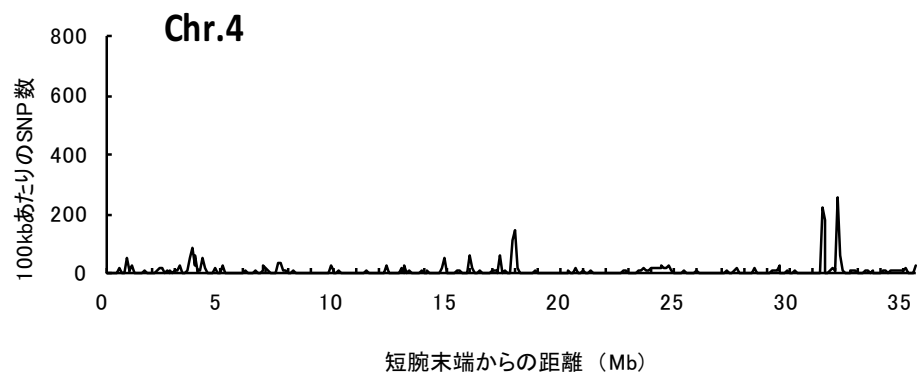


図 31 「つや姫」 - 「コシヒカリ」間の SNP の頻度と位置 (続き)

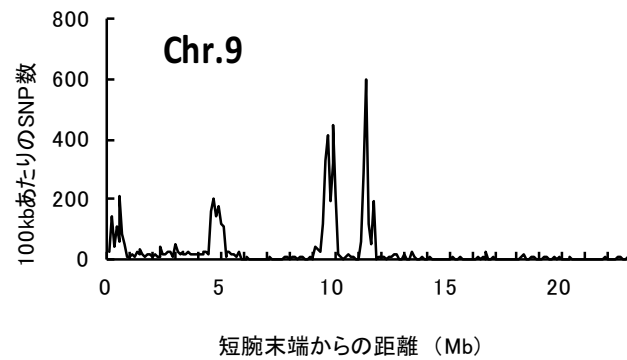
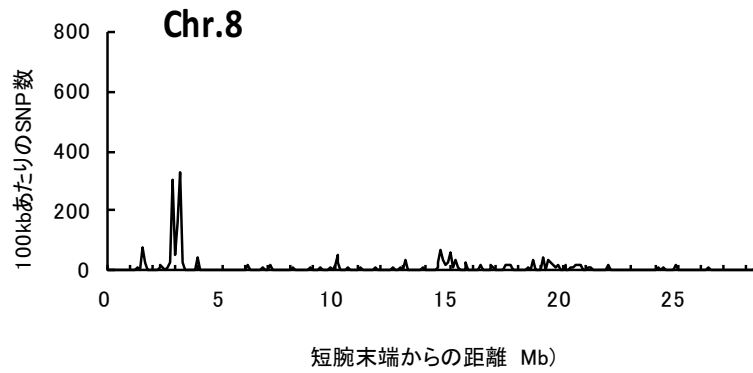
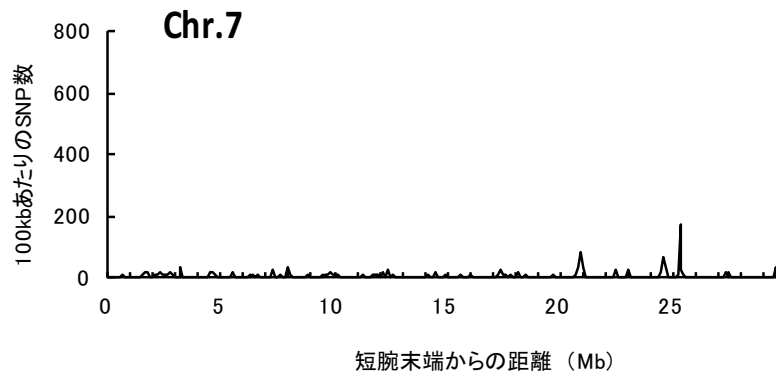


図 31 「つや姫」 - 「コシヒカリ」間の SNP の頻度と位置 (続き)

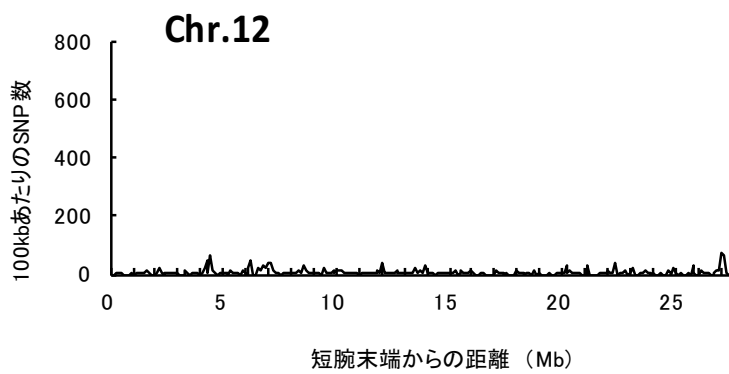
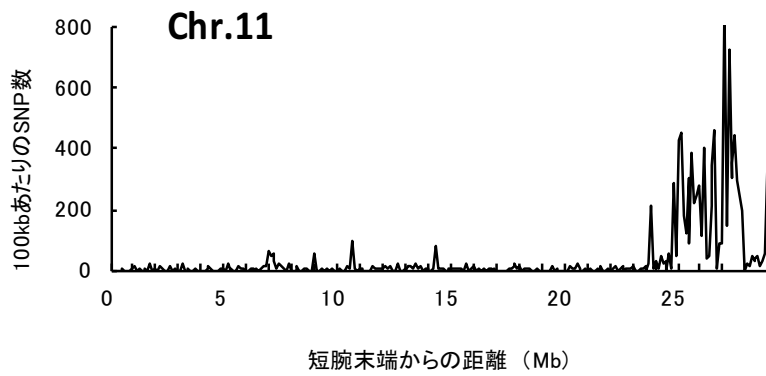
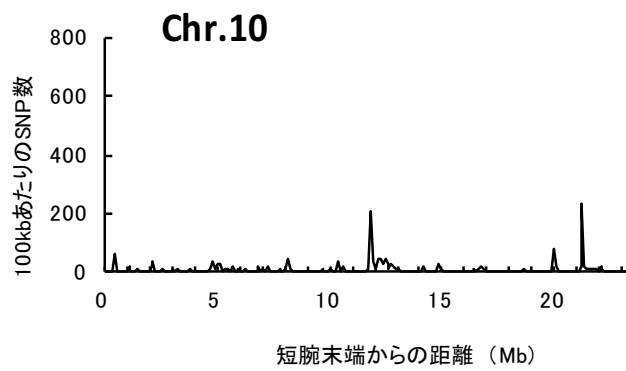


図 31 「つや姫」 - 「コシヒカリ」間の SNP の頻度と位置 (続き)

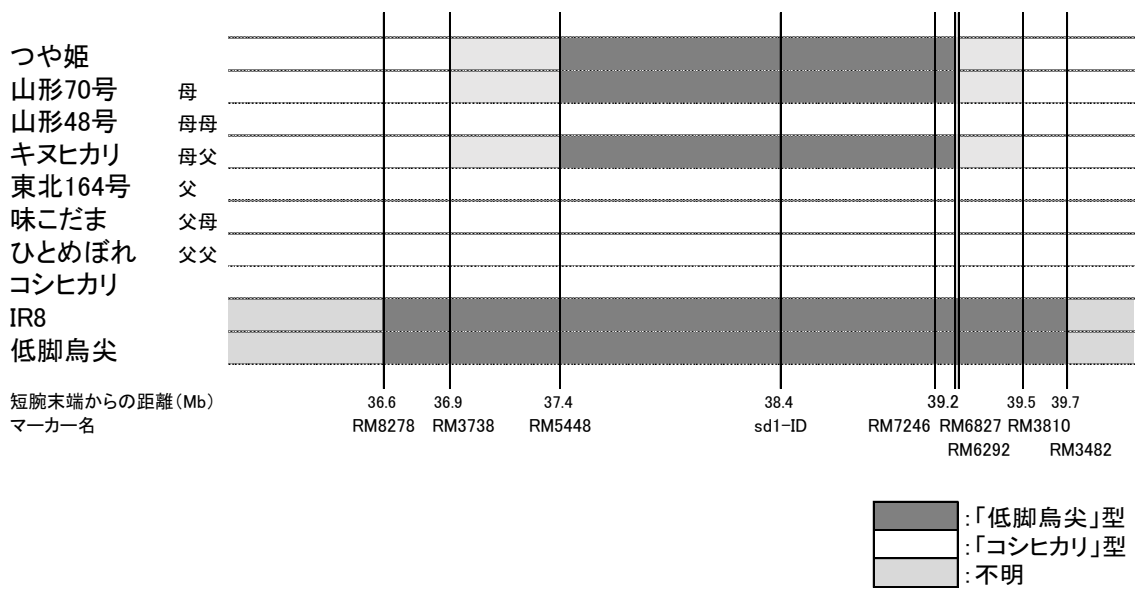
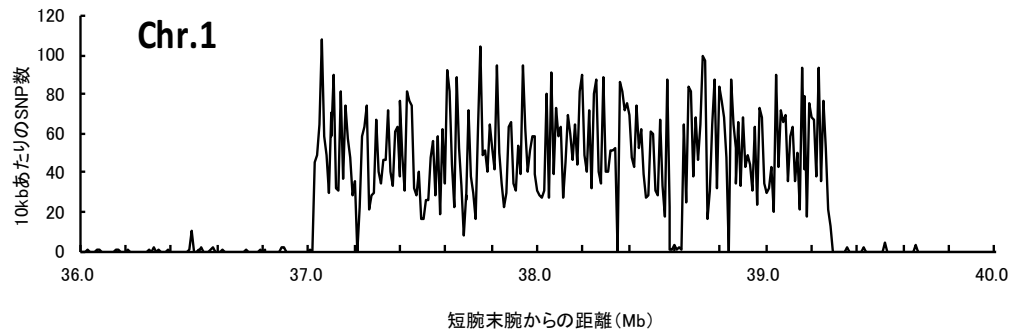


図 31 第 1 染色体の SNP 頻度と染色体断片の由来

下図の縦線は DNA マーカーの位置

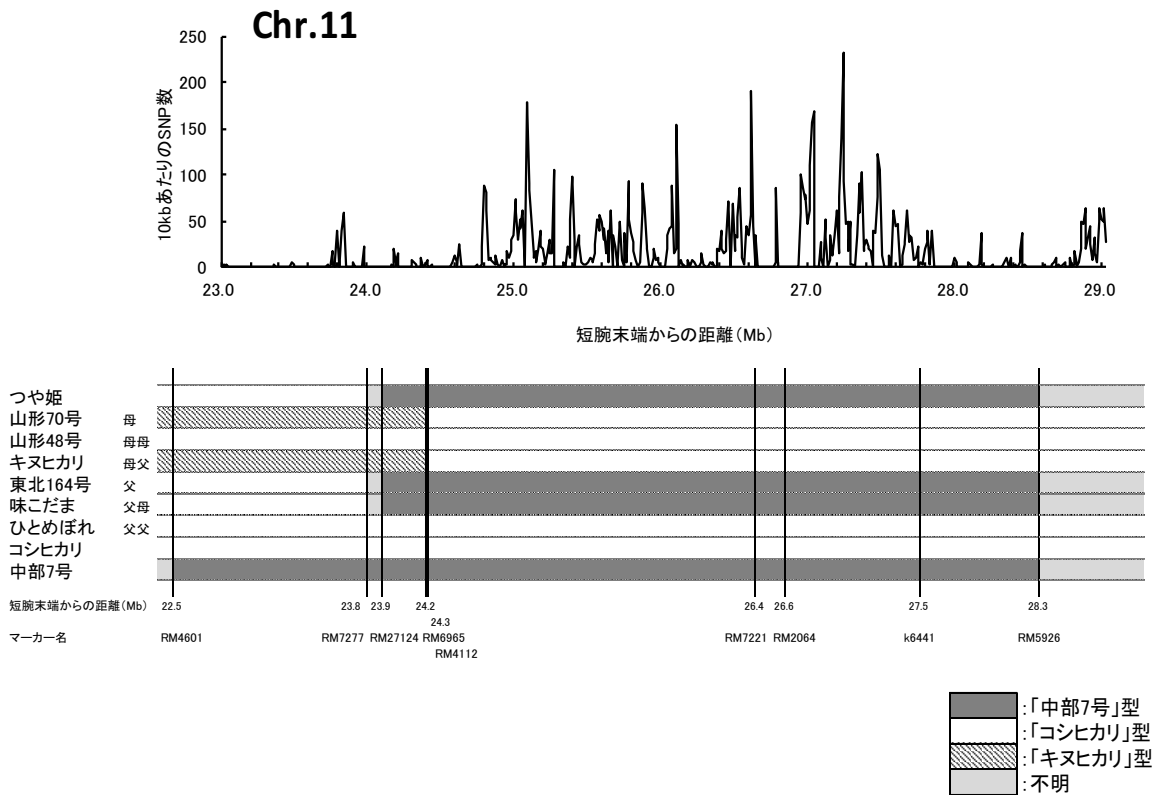


図 32 第 11 染色体の SNP 頻度と染色体断片の由来

下図の縦線は DNA マーカーの位置

第 2 節 「つや姫」の良食味関連遺伝子の QTL 解析

第 1 節では、「つや姫」と「コシヒカリ」のゲノムの差異を明らかにするとともに、「つや姫」の第 1 染色体長腕および第 11 染色体長腕に、祖先のインディカ品種に由来する染色体断片が存在することを明らかにした。

イネゲノムに関する研究は急速なペースで進んでおり、遺伝解析に用いる DNA マーカーが整備され(Kurata *et al.* 1994、Harushima *et al.* 1998)、ゲノムを広くカバーする SSR マーカーも開発されている (McCouch *et al.* 2002)。また、次世代シーケンサーによるゲノム解読の結果、多型が少ないとされる日本稲間でも比較的多型の検出しやすい SNP マーカーセットが整備され (Nagasaki *et al.* 2010)、「コシヒカリ」のゲノムの由来が明らかにされている (Yamamoto *et al.* 2010)。

DNA マーカーを用いた遺伝解析の手法として QTL 解析がある。QTL 解析は、複雑な遺伝様式に従う量的形質に関与する遺伝子座を染色体上にマッピングすることを可能とし (Yano and Sasaki 1997a)、環境による影響が大きい形質の遺伝解析に効果的な手法である (山本・矢野 2007)。同手法は、複数遺伝子が関与する量的形質である出穂期 (Yano *et al.* 1997b、Lin *et al.* 1998)、いもち病圃場抵抗性 (Fujii *et al.* 2000、Fukuoka *et al.* 2001、Zenbayashi *et al.* 2002)、穂発芽性 (Takeuchi *et al.* 2003)、穂孕期耐冷性 (Saito *et al.* 2001、Saito *et al.* 2003、Takeuchi *et al.* 2001)、玄米品質 (Wan *et al.* 2005、蛭谷ら 2008) などの解析に利用され、食味に関する形質の解析にも活用されている (田中ら 2006、Wada *et al.* 2008、Shinada *et al.* 2015)。QTL 解析により明らかとなった遺伝

子座は、近接する DNA マーカーを選抜マーカーとすることで、そのまま育種に用いることが可能である。解析された遺伝子の多くは同質遺伝子系統の作出に活用され、「コシヒカリ」に出穂に関与する *Hd1* のインディカ型の対立遺伝子を導入した「コシヒカリ関東 HD1 号」(Takeuchi *et al.* 2006)、穂いもち病抵抗性遺伝子 *Pb1* および縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* を導入した「コシヒカリ愛知 SBL」(杉浦ら 2004) などが育成されている。DNA マーカーは、同質遺伝子系統の育成だけでなく、集団育種法の各世代での選抜にも活用が可能であり、形質の評価が難しい初期世代による選抜における有効性も高い。

本研究では、良食味個体・系統を効率的に選抜する DNA マーカーを開発するため、「つや姫」/「コシヒカリ」の RIL (recombinant inbred line) を解析集団とし、DNA マーカーによるジェノタイプニング、第 1 章、第 2 章で確立した新規食味評価手法による炊飯米の評価を行い、食味関連形質の QTL 解析を行った。さらに、第 1 節で明らかとなった「つや姫」のゲノム構成をもとに、「つや姫」の保有する食味関連遺伝子の由来および食味に関する育種の方向性について考察を行った。

(1) 材料

「コシヒカリ」を母本、「つや姫」を父本として人工交配を行った後代の RIL の 94 系統を用いた。本試験に供試した年次および世代は、2014 年に F₅ 世代、2015 年に F₆ 世代、2016 年に F₇ 世代であった。栽培方法は 4 月中旬に播種、5 月中旬に 28.5 株/m² の 1 本/株 (2014 年) または 3 本/株 (2015、2016 年) で 30 株移植し、施肥

は窒素成分で 0.5 kg/a とした。各系統の成熟期に 20 株を刈り取り、収穫した玄米はふるいに通し、1.9 mm 未満の粒を除いた。

(2) 方法

【DNA 抽出】

第 1 節のとおり、CTAB 法で葉身から抽出した。

【DNA マーカー】

Nagasaki *et al.* (2010) の 768 マーカーからなる SNP マーカーコアセットを用い、GoldenGate BeadArray (Illumina、Bead Station 500G System) で遺伝子型を決定した。加えて、第 1 節で用いた *sd1* の欠失を検出するマーカーおよび「つや姫」・「コシヒカリ」間で多型のある *sd1* 近傍の 6 種の SSR マーカー (McCouch *et al.* 2002) を用い、第 1 節の PCR・電気泳動法で遺伝子型を決定した。

【到穂日数】

各系統の全穂の 50% 以上が出穂した日を出穂期とし、出穂期と移植日の差を到穂日数とした。

【玄米タンパク質含有率】

調製した玄米を用い、近赤外光等の反射率から成分を推定する機器である食味計 (静岡製機、AG-RD) を用いて測定した。

【炊飯米 WI】

調製した玄米を、重量ベースで 90% となるように精米機 (山本製

作所、VP-30T) で搗精し、精米とした。分光測色計 (コニカミノルタ、CM-600d) を用い、第 1 章第 1 節のとおり、炊飯米の WI を測定した。

【メタボローム】

CE-TOFMS および LC-MS/MS を用い、第 2 章第 1 節のとおり、炊飯米の低分子化合物を測定した。

【連鎖地図の作成】

マーカー情報 (McCouch *et al.* 2002、IRGSP 2005、Nagasaki *et al.* 2010) をもとに、MAPMAKER/EXP ver3.0b (Lander *et al.* 1987) を用いて連鎖解析を行い、連鎖地図を作成した。マーカー間距離を概算する地図関数には Kosambi 関数を用いた。

【QTL 解析】

Windows QTL Cartographer 2.5 (Wang *et al.* 2006) を用い、複合インターバルマッピング法で解析を行った。同ソフトのモデル 6 を用い、QTL の探索間隔は 1 cM 間隔とした。LOD (logarithm of odds) 値のピークが QTL の位置に相当するとし、全表現型分散に対する各 QTL の寄与率および相加効果を計算した。

(3) 結果

「つや姫」-「コシヒカリ」間で多型のある SNP マーカーは、768 マーカー中 98 マーカーであった。多型の確認されていた SSR マーカー 6 マーカー、InDel マーカー 1 マーカーと合わせ、12 本の染色

体すべてで多型を確認した（図 33）。

3カ年の QTL解析の結果、第 1 染色体短腕末端から 37.8～39.7 Mb の領域に、3 カ年とも「つや姫」型対立遺伝子でタンパク質含有率が増加する QTL と（表 5）、低分子化合物の含量が減少する QTL が検出された（表 6）。第 8 染色体の短腕末端から 3.3 Mb のマーカーの近傍には、3 カ年とも、「つや姫」型対立遺伝子で到穂日数が増加する QTL が検出され（表 5）、低分子化合物の含量が増減する QTL も同じ位置に複数年で検出された。「つや姫」型対立遺伝子でアスパラギン酸含量が増加する QTL は、第 8 染色体の短腕末端から 17.9 Mb に、2014 年のみ検出された（表 6）。第 1 染色体長腕のインディカ由来領域で、短腕末端から 39.0 Mb のマーカーの近傍には、「つや姫」型対立遺伝子で炊飯米 WI が低下する QTL を検出した。LOD 値は低いものの、同領域の短腕側の 36.7～37.4 Mb では、「つや姫」型対立遺伝子で炊飯米 WI が向上する相加効果が確認された（図 34）。

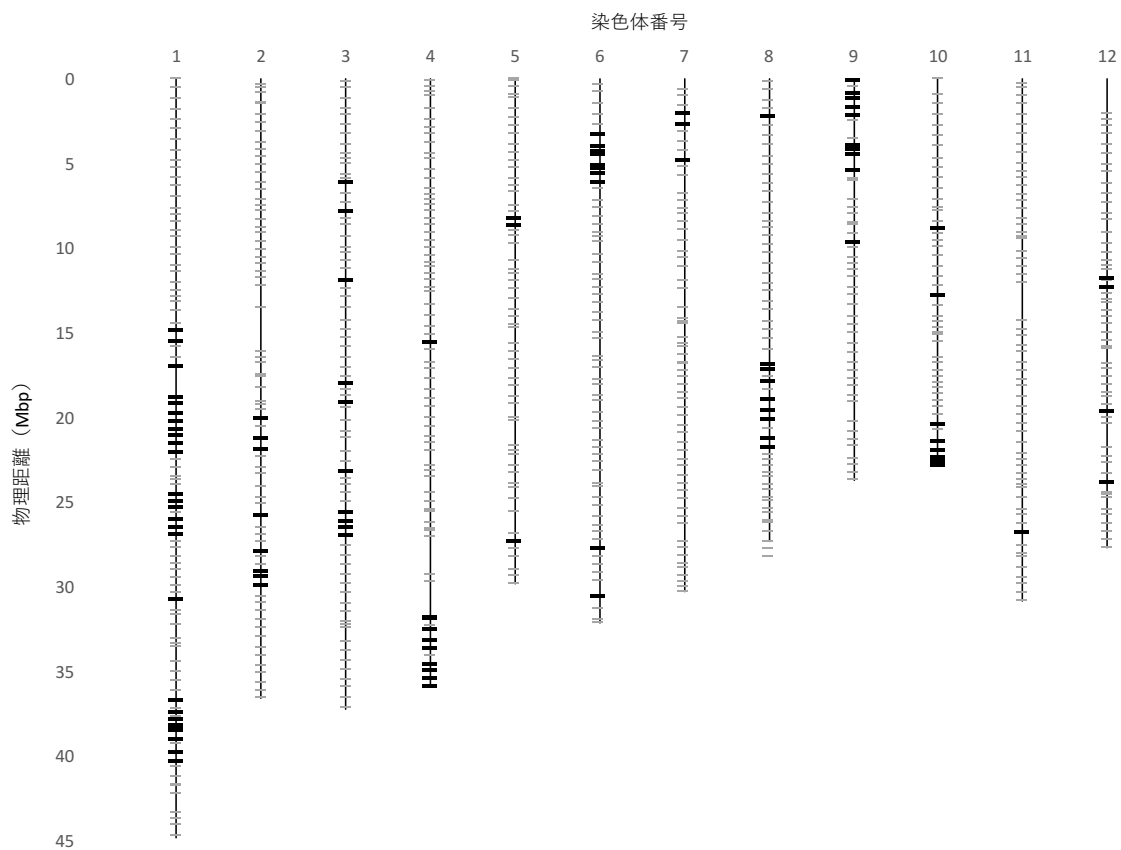


図 33 「つや姫」 - 「コシヒカリ」間のマーカー多型

黒色横棒が多型のあるマーカー位置

灰色横棒は多型のない SNP マーカー位置

表 5 「つや姫」/「コシヒカリ」集団における到穂日数、タンパク質含有率、炊飯米白色度に関する QTL の位置と遺伝効果の推定

形質 (単位)	年次	染色体	最近接マーカーの位置 (Mb)	LOD値	寄与率 (%)	相加効果
到穂日数 (日)	2014	8	3.3	7.1	46.1	1.4
	2015	8	3.3	12.2	68.8	1.8
	2016	8	3.3	11.0	52.9	1.5
タンパク質含有率 (%)	2014	1	38.2	3.2	17.2	0.2
	2014	1	39.7	2.8	14.6	0.2
	2015	1	37.8	4.8	23.3	0.2
	2015	1	38.2	6.0	28.6	0.2
	2015	1	39.7	6.1	29.2	0.2
	2016	1	37.8	7.9	36.6	0.2
	2016	1	38.4	11.6	45.8	0.2
炊飯米白色度 (WI)	2014	1	39.0	3.5	18.7	-1.3

位置は染色体短腕末端からの物理距離

LOD 値は最尤法によるスコア、2.5 以上を記載

寄与率は解析した分離集団の表現型分散に占める各 QTL の遺伝効果の寄与する割合

相加効果は「つや姫」由来の対立遺伝子の作用方向を正と定義する

表 6 「つや姫」/「コシヒカリ」集団における低分子化合物に関する QTL の位置と遺伝効果の推定

形質	年次	染色体	最近接マーカーの位置 (Mb)	LOD値	寄与率 (%)	相加効果 (単位: nmol/gFW)
グリシン	2016	1	24.9	5.9	26.9	-5.7
	2016	6	4.4	4.5	19.3	4.8
セリン	2014	1	38.2	5.8	23.5	-8.6
	2015	1	38.2	2.9	13.8	-4.7
	2016	1	24.9	3.6	15.8	-5.1
	2016	1	26.1	2.5	13.6	-4.9
	2016	1	30.8	5.4	37.7	-7.7
	2016	3	18.0	3.2	39.2	-7.9
	2016	3	24.5	2.8	12.9	-4.6
	2016	6	4.4	3.4	14.2	4.9
アラニン	2014	1	38.4	2.7	11.0	-8.6
	2014	1	40.3	2.9	11.8	-9.5
	2014	2	20.0	2.8	28.4	13.3
	2015	1	37.8	3.2	16.9	-7.9
	2015	1	38.2	2.8	14.8	-7.3
プロリン	2014	2	10.6	3.3	19.6	1.2
	2016	6	4.4	3.9	20.7	1.3
バリン	2016	1	25.3	2.6	12.3	-0.8
	2016	1	30.8	6.2	45.2	-1.5
	2016	3	18.0	2.8	40.8	-1.4
	2016	3	24.5	2.8	12.2	-0.8
	2016	6	4.4	3.8	16.4	0.9
トレオニン	2014	1	38.4	3.6	13.6	-2.0
	2014	1	39.7	3.6	14.8	-2.2
	2014	2	10.6	4.0	18.0	2.4
	2014	2	20.0	3.3	24.2	2.6

位置は染色体短腕末端からの物理距離

LOD 値は最尤法によるスコア、2.5 以上を記載

寄与率は解析した分離集団の表現型分散に占める各 QTL の遺伝効果の寄与する割合

相加効果は「つや姫」由来の対立遺伝子の作用方向を正と定義する

表 6 「つや姫」/「コシヒカリ」集団における低分子化合物に関する QTL の位置と遺伝効果の推定（続き）

形質	年次	染色体	最近接マーカーの位置 (Mb)	LOD値	寄与率 (%)	相加効果 (単位: nmol/gFW)
イソロイシン	2014	2	10.6	3.1	14.8	0.4
	2014	2	20.0	3.1	19.0	0.5
	2015	1	38.2	2.7	18.5	-0.8
	2016	1	30.8	4.6	33.3	-0.6
	2016	3	24.5	3.4	14.4	-0.4
	2016	6	4.4	2.8	11.3	0.4
ロイシン	2014	2	10.6	4.2	24.4	0.6
	2014	2	20.0	4.2	26.0	0.6
	2016	1	30.8	3.1	24.1	-0.7
	2016	3	25.6	3.0	12.4	-0.5
アスパラギン	2014	1	15.5	2.6	12.6	-5.1
	2014	8	19.5	2.7	13.9	5.2
	2014	8	21.2	2.6	15.8	5.6
	2016	1	21.5	3.6	14.4	-5.1
アスパラギン酸	2014	1	38.2	3.3	13.3	-17.7
	2014	1	39.7	3.7	16.1	-20.3
	2014	8	17.9	4.0	17.3	19.5
	2015	1	39.7	2.5	13.4	-20.1
	2016	1	24.5	2.7	20.7	-17.6
	2016	1	30.8	2.8	15.8	-15.6
グルタミン	2014	8	18.9	3.2	20.9	3.5
	2015	8	3.3	4.0	21.3	4.5
リジン	2014	1	39.0	4.4	16.0	-1.4
	2014	1	39.7	4.4	17.3	-1.5
	2014	2	10.6	2.6	9.8	1.1
グルタミン酸	2014	1	38.4	6.0	27.9	-39.1
	2014	1	40.3	6.9	31.1	-44.1
	2015	1	37.8	3.7	18.8	-29.4
	2015	1	38.2	3.6	19.5	-29.7
	2016	1	39.0	3.3	18.9	-22.0

表 6 「つや姫」/「コシヒカリ」集団における低分子化合物に関する QTL の位置と遺伝効果の推定（続き）

形質	年次	染色体	最近接マーカーの位置 (Mb)	LOD値	寄与率 (%)	相加効果 (単位: nmol/gFW)
メチオニン	2014	2	10.6	4.0	22.9	0.2
ヒスチジン	2016	1	30.8	2.6	17.0	-0.6
	2016	2	27.9	3.4	14.5	-0.5
	2016	3	25.6	2.8	11.2	-0.5
フェニルアラニン	2014	1	24.5	2.6	18.0	-0.4
	2014	1	38.2	2.6	11.2	-0.4
	2016	1	30.8	4.1	33.9	-0.5
	2016	3	18.0	2.5	41.7	-0.5
	2016	3	25.6	3.9	14.9	-0.3
	2016	4	35.8	3.8	15.2	-0.3
チロシン	2014	1	38.4	5.6	21.2	-0.9
	2014	1	39.7	5.5	22.9	-1.0
	2014	6	4.0	2.8	12.4	0.6
	2016	4	35.8	2.7	14.4	-0.5
トリプトファン	2014	1	37.8	3.1	22.6	-0.7
	2014	1	38.4	3.1	16.5	-0.4
	2015	8	3.3	2.6	16.5	-0.3
コハク酸	2014	1	40.3	2.5	12.7	-2.2
	2015	8	3.3	5.8	37.5	-5.4
	2016	8	3.3	5.2	22.6	-2.5
フマル酸	2015	5	8.7	2.5	12.0	2.6
	2016	1	24.5	2.9	12.5	2.2
	2016	1	37.8	3.2	14.1	-2.4
	2016	1	38.2	3.9	17.5	-2.7
	2016	1	39.7	3.2	15.2	-2.6
	2016	8	3.3	2.5	11.6	-2.1
乳酸	2015	3	18.0	5.0	61.8	22.6
	2015	8	3.3	4.6	34.0	14.3
フルクトース	2015	1	39.0	2.9	14.8	-17.9
	2016	1	39.0	3.6	16.7	-21.1
グルコース	2016	1	36.7	3.4	40.0	338.4

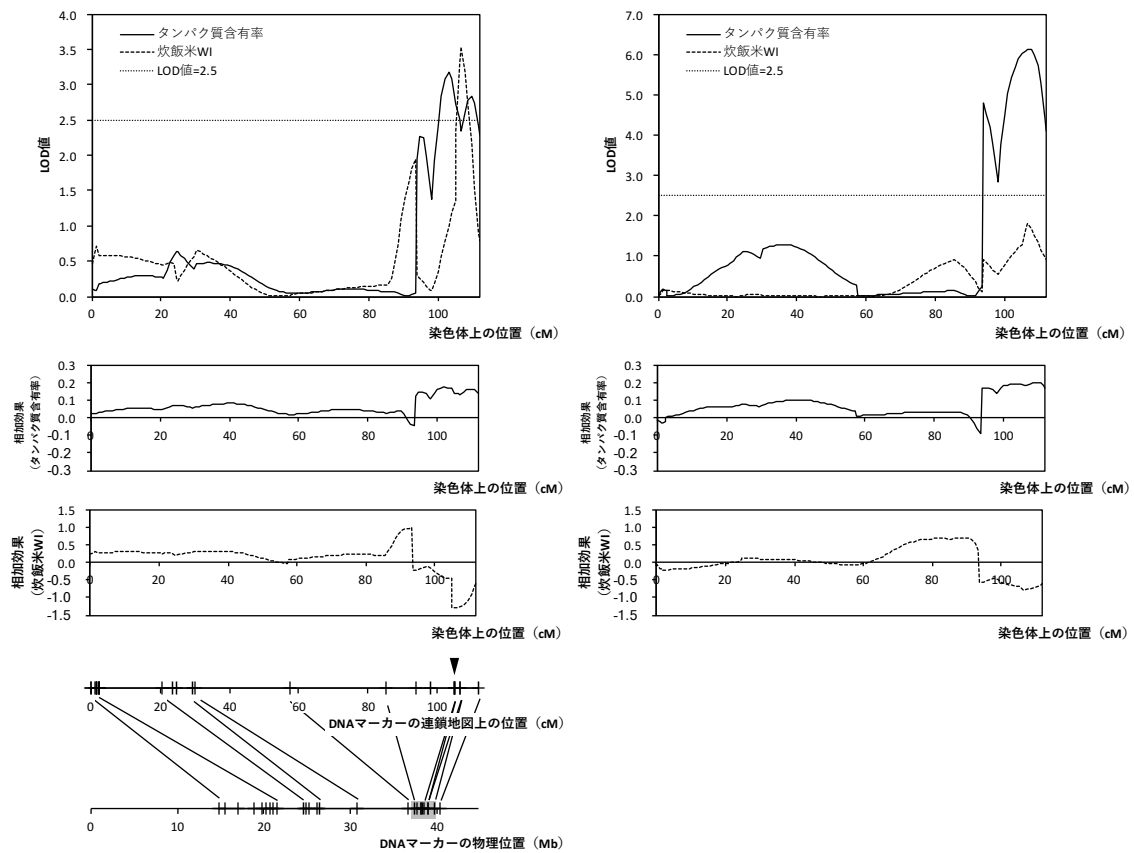


図 34 第 1 染色体のタンパク質含有率および炊飯米 WI に関する QTL 解析結果

左は 2014 年、右は 2015 年の結果

最下図の網掛けはインディカ品種由来と推定される領域

図中黒塗り三角は *sd1* の座乗位置

物理位置は染色体短腕末端からの距離

第 3 節 考察

1. 「つや姫」のゲノム構成

「つや姫」-「コシヒカリ」間で検出された SNP は 55,584 個と (表 4)、「日本晴」-「コシヒカリ」間で検出された SNP の 67,051 個 (Yamamoto *et al.* 2010) よりも 2 割程度少なく、「日本晴」-「コシヒカリ」間よりも「つや姫」-「コシヒカリ」間の方がより近縁であると考えられた。「つや姫」の第 1 染色体および第 11 染色体に、「コシヒカリ」に対する SNP の出現頻度が高い領域が存在することから (図 30)、「つや姫」は、同領域に比較的長い「コシヒカリ」と由来の異なる染色体断片を保有すると考えられた。DNA マーカーを用いた解析の結果、インディカ在来品種である「低脚烏尖」に由来すると推定される染色体断片の保有を確認したことから (図 31)、「つや姫」の第 1 染色体長腕の SNP 頻度の高い約 2.3 Mb の領域は、「キヌヒカリ」を介し、インディカ品種である「IR8」「低脚烏尖」の染色体断片が遺伝していると推定された。同領域は *sd1* の座乗する領域であり、DNA マーカーにより *sd1* に「低脚烏尖」型の 383 bp の欠失を確認したことから、「つや姫」は、*sd1* を含むインディカ品種由来の染色体断片を保有すると考えられた。また、「キヌヒカリ」と「北陸 120 号」を両親とする「どんとこい」は、第 1 染色体長腕に、インディカ品種に由来し、*sd1* を含む 2.0~2.9 Mb の染色体断片を保有しており (Asano *et al.* 2007)、「つや姫」の第 1 染色体長腕の同領域は、「どんとこい」と同じであるか、より短いと考えられた。

第 11 染色体の長腕の約 5.2 Mb は、「味こだま」を介し、「中部 7 号」の染色体断片が遺伝していると推定された (図 32)。同領域は

Pik-m が座乗しており、DNA マーカーを用いた解析の結果、「つや姫」は *Pik-m* を保有することが明らかになったことから、この領域は中国在来品種「北支太米」および後代の「峰光」に由来すると考えられた。日本の近代育成品種間の交雑育種では、遺伝的な多様性が少なくなっており (Yonemaru *et al.* 2012)、インディカ品種や中国在来由来の領域を持ち、かつ栽培特性と食味特性に優れる「つや姫」は、遺伝的多様性の観点からも貴重な交配母本かつ遺伝資源であると考えられた。

2. 「つや姫」の良食味関連遺伝子の QTL 解析

「つや姫」側対立遺伝子でタンパク質含有率が増加する QTL および多くの低分子化合物の含量が減少する QTL が検出された第 1 染色体長腕の領域は (表 5、表 6)、*sdl* を含むインディカ品種に由来する領域のため (図 31)、これらの QTL の対立遺伝子はインディカ品種由来であると考えられた。

「つや姫」の特徴であるアスパラギン酸の含量に関する QTL は、「つや姫」型対立遺伝子で増加する QTL が 2014 年に第 8 染色体の長腕に検出されたのみであった (表 6)。第 2 章では、登熟温度が高い場合に「つや姫」と「コシヒカリ」のアスパラギン酸含量に差がなくなることが明らかになっている。生育期間の温度が高く、出穂が早まったことで登熟温度が高まった 2014 年と 2015 年 (山形県の出穂期 2014 年：平年比 3 日早い、2015 年：平年比 3 日早い 東北農政局作柄概況)、8 月が高温で経過した 2016 年 (8 月平均気温 2016 年：26.4 °C、平年：25.1 °C アメダス鶴岡) のいずれの年でも、「コシヒカリ」との差が顕著でなくなったものと考えられた。

山形県における「つや姫」の出穂期は、「コシヒカリ」とほぼ同等であるものの（結城ら 2010）、QTL 解析により、「つや姫」型対立遺伝子で到穂日数が増加する QTL が第 8 染色体に検出された、同領域の近傍には *DTH8* および *Hd18* が座乗している（Wei *et al.* 2010、Shibaya *et al.* 2016）。*Hd18* の「日本晴」型対立遺伝子は、「コシヒカリ」の遺伝的背景かつ自然日長条件下で、到穂日数を 2 日または 3 日遅らせること、全ゲノムシーケンスの結果、「つや姫」の *Hd18* (*Os08g0143400*) のエキソンに非同義置換が確認されていることから、本研究で検出された QTL は、*Hd18* である可能性が高いと考えられた。

第 1 染色体長腕で検出された「つや姫」側対立遺伝子でタンパク質含有率が増加する QTL は（図 34）、「低脚烏尖」由来の *sd1* が多面発現により玄米タンパク質含有率を増加させる効果があるため（Terao and Hirose 2015）、*sd1* である可能性が高いと考えられる。「つや姫」側対立遺伝子で低分子化合物含量が減少する複数の QTL は（表 5、6）、その位置から *sd1* の多面発現が疑われるが、第 1 染色体には 6.4 kb あたり 1 つの遺伝子が座乗するとされており（Sasaki *et al.* 2002a）、「つや姫」のインディカ品種に由来する領域は約 2.3 Mb であるので、計算上約 360 の遺伝子が座乗することから、*sd1* に連鎖する遺伝子がこれらの特性の原因である可能性も十分に考えられる。「つや姫」の食味をさらに向上させるためには、*sd1* またはその近傍領域を「つや姫」型以外に置換する必要があると考えられるが、同領域を「コシヒカリ」型に置換した場合、「つや姫」の耐倒伏性は *sd1* に起因していると考えられるため、耐倒伏性が低下し、栽培特性が大きく低下する可能性が高い。一方、*sd1* に

は、野生型よりも稈長を短くする一塩基置換または欠失を原因とする複数の対立遺伝子が存在することが明らかとなっている (Ashikari *et al.* 2002、Sasaki *et al.* 2002b)。ジャポニカ品種を遺伝背景とする対立遺伝子も存在しており、「ヒカリッコ」(村井・遠藤 2006) の育種に用いられた「レイメイ」型や、「コシヒカリ」の同質遺伝子系統である「佐賀 1 号」(野中ら 1991) の育種に用いられた「十石」型がある。「レイメイ」型の *sd1* では玄米タンパク質含有率が増加しないため (Terao and Hirose 2015)、「つや姫」の *sd1* および近傍の一部を「レイメイ」型に置換することで、優れた耐倒伏性を維持したまま、さらに食味の優れた系統を育種できると考えられた。

総合考察

米の消費量、需用量は年々減少し（農林水産省 2016）、生産量の過多による米価の低下が想定され、複数の産地で良食味品種を核としたブランディング戦略が行われている。育種目標として食味の重要度が年々上昇しており、多数の試料を短時間で測定が可能な、パネリストを必要としない新たな食味評価手法の開発が求められている。そこで、本研究では、炊飯米の食味を客観的に評価する新たな手法を検討した。さらに、良食味個体・系統を効率的に選抜する DNA マーカーの開発のため、良食味ブランド品種「つや姫」のゲノム構成の解明と保有する良食味遺伝子の検討を行った。

食味官能試験における炊飯米の外観の白さと、色彩を測定する機器である分光測色計の測定値に正の相関があることから、炊飯米の白さを客観的に評価可能であることが示された（第 1 章）。炊飯米の白さは、パーボイルドライスでは重要性は認識されているものの（Lv *et al.* 2009）、炊いて食べる米では研究は進んでいなかった。また、食味官能試験では外観の中の細目の一つとしてしか評価されておらず、食味における重要度は相対的に低い状況であった。本研究の結果、炊飯米の白さを簡易に評価する手法が開発され、炊飯米の白さに品種間差があることが示されたことで、白さの重要度が向上し、白さに特徴を持つ品種の開発が大きく進むと考えられる。また、味度メーターで測定したサンプルを用いることで、30 g 程度の精米があれば、実際に炊飯せずに白さを推定できることが明らかとなった。これにより、得られる精米の量が少ない初期世代にも、新たな評価手法を用いることが可能となり、さらに、白さを向上させた品種の育成が加速すると考えられる。炊飯米の白さに関する理

科学性として、タンパク質含有率およびアミロース含有率が明らかとなった。タンパク質含有率は、窒素肥料の投入量を減らすか、追肥の時期を早めることで、低下させることが可能であり、アミロース含有率は、作付け地域を比較的冷涼な地帯とし、移植時期を遅らせることによって増加させるなど、制御が可能である。このため、栽培手法の面からも炊飯米の白さを向上させる技術の開発が進むと考えられる。

旨味や甘味などの味と、炊飯米の低分子化合物組成に関連があり、アスパラギン酸やグルタミン酸などの旨味を呈するアミノ酸類が多く、他の化合物が比較的少ないことで、炊飯米の味が良くなることが示された（第 2 章）。食味を推定する試みは多く行われており、玄米や精米における、タンパク質、アミロース（Ward *et al.* 2006）、酵素活性（Tran *et al.* 2004）、金属イオン、アミノ酸（Ogasawara *et al.* 2006）などが検討されていたが、本研究では炊飯米を解析対象とした。これは、呈味成分の探索には、実際に食べる状態の分子濃度が重要であると考えたためである。また、メタボローム解析という対象の成分を限定しない手法を用いたのは、包括的な解析を行うことで、これまでの分析手法では対象とされなかった成分を検出しようとしたためである。日本酒やエダマメなど、嗜好品に対してメタボローム解析により食味の解析を行った事例はあったが（Sugimoto *et al.* 2010a、Sugimoto *et al.* 2010b）、本研究では、主要な穀物である米を対象とした。比較的味に特徴の少ない主食となる食品でも、低分子化合物組成が味に影響を与えることが示されたことで、メタボローム解析を用いた食品の食味に関する研究が、より多くの品目に活用されると考えられる。また、低分子化合物の

多寡に登熟温度が影響し、その反応に品種間差があることから、良食味ブランド品種の育種にあたって、低分子化合物の組成による選抜はもちろんのこと、各出穂期関連遺伝子の保有などの熟期を意識した選抜、品種の栽培地域の選定も重要であると考えられた。

近年、日本の代表的なブランド品種である「コシヒカリ」のゲノムも解読されるなど (Yamamoto *et al.* 2010)、ゲノム研究は急速に進展し、次世代シーケンサーの開発によりゲノムの解読速度も飛躍的に上昇している。良食味ブランド品種「つや姫」のゲノムを解読し、その構成を検討した結果、第 1 染色体にインディカ品種に由来する染色体断片、第 11 染色体に中国在来品種に由来する染色体断片を保有することが明らかとなった (第 3 章)。第 1 染色体のインディカ品種由来の断片は、短稈遺伝子 *sd1* を含む。DNA マーカーにより、「つや姫」は「低脚烏尖」型の *sd1* を保有することが確認されたため、「つや姫」の耐倒伏性は、「低脚烏尖」型の *sd1* によると考えられた。第 11 染色体の中国在来品種由来の断片には、いもち病真性抵抗性遺伝子の *Pik*、*Pik-m* などが座乗する。いもち病真性抵抗性検定試験により、「つや姫」は *Pi-k* を保有するとされていたが (結城ら 2010)、「つや姫」の *Pik*、*Pik-m* などが座乗する領域は、*Pik-m* を保有する「中部 7 号」の染色体断片の由来することを確認したため、「つや姫」の真性抵抗性遺伝子は *Pik-m* である可能性が示唆された。このことから、「つや姫」を交配母本に用いて後代を選抜する際には、*sd1* の保有により高い耐倒伏性が得られると考えられるため、積極的に同領域を選抜することが望ましいと考えられた。一方、いもち病真性抵抗性については、これまで複数の抵抗性遺伝子が導入されたが、侵害できるレースの出現・増殖により数年で崩

壊している（清沢ら 1975）。このことから、*Pik-m* の保有については、積極的な選抜を行う必要はなく、むしろ、「つや姫」以外の品種からいもち病圃場抵抗性遺伝子の導入を検討する必要があると考えられた。

本研究により、第 1 染色体の *sd1* を含むインディカ由来の領域に、「つや姫」型の対立遺伝子でタンパク質含有率が増加し、低分子化合物の含量が減少する QTL の存在が明らかとなった（第 3 章）。「低脚烏尖」由来の *sd1* は、玄米タンパク質含有率を増加させる効果があることが明らかにされているため（Terao and Hirose 2015）、「つや姫」型対立遺伝子でタンパク質含有率が増加する QTL は、*sd1* である可能性が高いと考えられる。第 1 染色体の長腕の検出された、「つや姫」型の対立遺伝子で複数の低分子化合物の含量が減少する QTL と、炊飯米の白さが低下する QTL も、「低脚烏尖」由来の *sd1* の多面発現である可能性が疑われるが、*sd1* に連鎖する遺伝子の可能性も十分に考えられる。同領域の短腕側には、「つや姫」型の対立遺伝子で炊飯米の白さが向上する QTL の存在が示唆されたため、「低脚烏尖」型の *sd1* およびインディカ由来の領域の一部を、タンパク質含有率の上昇効果のないことが明らかにされているジャポニカ型の「レイメイ」型 *sd1* を含む領域に置換することで、優れた耐倒伏性を維持したまま、さらに食味の向上した品種を育成できると考えられた。「つや姫」の特徴であるアスパラギン酸の含量に関する QTL は、単年度ではあるが、第 8 染色体長腕に検出されている（第 3 章）。「コシヒカリ」-「つや姫」間で含量に差が生じる登熟温度が比較的低いことが明らかになったため（第 2 章）、候補領域を絞り込む際には、移植時期を遅らせるか、グロースチャンパーなどで温

度条件をコントロールする必要があると考えられた。

本研究で明らかとなった新たな食味評価手法を選抜に積極的に活用し、既存の品種に比較して「白さ」と「味」に優れる品種が数多く育成されることが期待される。また、既存の品種に本手法をもちいることで、新たな遺伝資源が見つかることも期待される。「つや姫」を交配母本に用い、DNA マーカーにより *sd1* などの栽培特性を向上させる遺伝子の保有を確認し、今後領域が絞り込まれる炊飯米の白さを向上される遺伝子や、低分子化合物の含量を増加させる遺伝子保有も確認して選抜することで、「つや姫」並の食味と品質、栽培特性を兼ね備えた新品種の育成が期待される。さらに、「つや姫」が保有するインディカ型の *sd1* を含む領域を、ジャポニカ型に組換えることで、「つや姫」よりも食味の向上した画期的な新品種の育成も期待される。

摘要

育種目標として食味の重要度が年々上がっており、効率的な育種のため、食味官能試験によらない簡易な手法の検討を行った。色彩を測定する機器である分光測色計を用いることで、炊飯米の白さを客観的に評価できることが明らかとなった。既存の外観評価手法との比較により、新規の手法であることを確認した。また、本測定法で品種間差を評価できると考えられた。さらに、味度メーターで測定を終えたサンプルを用いることで、少量の精米で炊飯せずに炊飯米の白さを評価できることを明らかにした。炊飯米の白さには黄と青の反射率が関係しており、精米のタンパク質含有率およびアミロース含有率が影響を与えることが明らかとなった。「つや姫」の白さにはタンパク質含有率およびアミロース含有率以外の要因が関わることが示唆された。

低分子化合物を一斉分析して解析を行うメタボローム解析を用い、炊飯米と低分子化合物の組成の関係を検討した結果、味に優れるサンプルは、アスパラギン酸やグルタミン酸が多く、その他の低分子化合物が比較的少ない特徴的な低分子化合物組成を持つことが明らかとなった。味の良否には低分子化合物の組成や、タンパク質含有率、アミロース含有率などの様々な要因が影響していると考えられるが、アスパラギン酸と炊飯米の味には有意な正の相関があり、ターゲットとした少数の成分で味を推定できる可能性が示唆された。「つや姫」は、アスパラギン酸、グルタミン酸が多く、「味」に優れる低分子化合物組成を有することが明らかとなった。登熟温度が炊飯米の低分子化合物組成に影響を与え、登熟温度に対する反応に品種間差があることが明らかとなった。

山形県の育成した良食味のブランド品種「つや姫」のゲノム構成の解析を試みたところ、「つや姫」-「コシヒカリ」間に 55,584 個の SNP が検出された。SNP の出現頻度が高い領域について、DNA マーカーにより染色体断片の由来を確認した結果、*sd1* を含む第 1 染色体長腕の約 2.3 Mbp はインディカ品種に由来し、第 11 染色体長腕の約 5.2 Mbp は中国在来品種に由来することが明らかとなった。「つや姫」-「コシヒカリ」の RIL94 系統を解析集団として、到穂日数、タンパク質含有率、アミロース含有率、炊飯米白色度、低分子化合物について 3 年間の QTL 解析を行ったところ、第 1 染色体 37.8~39.7 Mbp に、「つや姫」型の対立遺伝子でタンパク質含有率が増加する QTL と、アスパラギン酸を含む複数の低分子化合物の含量が減少する QTL が検出された。第 1 染色体の同領域の多くはインディカ品種に由来する領域であることから、これらの QTL の対立遺伝子はインディカ品種由来であると考えられた。第 8 染色体には、「つや姫」型の対立遺伝子で到穂日数が増加する QTL が検出された。近接マーカーの位置および相加効果から、*Hd18* であると考えられた。「つや姫」の特徴であるアスパラギン酸の含量に関する QTL は、2014 年にのみ第 8 染色体の長腕に検出された。第 1 染色体長腕のインディカ由来領域には、「つや姫」側対立遺伝子で炊飯米の白さが低下する QTL が検出されたが、同領域の短腕側では逆に「つや姫」型対立遺伝子で白さが向上する QTL の存在の可能性が示唆されたため、「つや姫」の *sd1* および近傍の一部をジャポニカ型に置換することで、優れた栽培特性を維持したまま、さらに食味の優れた系統を育種できると考えられた。

謝辞

本研究は、2008年、2009年に慶應義塾大学先端生命科学研究所、2010年から2017年に山形県農業総合研究センターにおいて行ったものである。本論文の執筆にあたっては、東北大学大学院農学研究科の西尾剛教授に懇切なご指導と丁寧なご校閲を賜った。謹んで感謝申し上げます。

第1章の「炊飯米の白さを客観的に評価する手法の開発」においては、農研機構作物研究所の鈴木啓太郎氏、山形県農業総合研究センター土地利用型作物部の浅野目謙之氏に協力をいただいた。論文のとりまとめにあたっては、水田農業試験場の松田裕之氏（現山形大学農学部）に有益な助言を頂いた。第2章の「メタボローム解析を用いた炊飯米の味の評価」においては、慶應義塾大学先端生命科学研究所の富田勝所長、曾我朋義教授に、研究への理解と多くの助言を頂いた。平山明由氏にはメタボローム測定の指導と協力をいただき、杉本昌弘氏には統計解析の指導と、論文のとりまとめにあたり助言をいただいた。また、水田農業試験場の佐野智義氏には試料収集にあたり支援をいただいた。第3章の「「つや姫」の食味関連遺伝子の解析」においては、全ゲノムシーケンスおよびQTL解析にあたり、農業生物資源研究所の堀清純氏（現農研機構次世代作物開発研究センター）に指導と助言をいただいた。解析材料の養成にあたり、水田農業試験場の阿部洋平氏に協力をいただいた。また、メタボローム測定にあたり、慶應義塾大学先端生命科学研究所の若山正隆氏に多大な支援をいただいた。なお、本研究の一部は「農林水産省次世代ゲノム基盤プロジェクト（RBS1003）」の支援を受けて実施した。

研究全般の遂行にあたっては、山形県農業総合研究センターおよび同水田農業試験場の上司、同僚、研究技能員、臨時職員の方々に、研究への理解と協力をいただいた。慶應義塾大学先端生命科学研究所への出向期間中には、職員および技術員の皆様に、多大な支援をいただいた。また、妻と家族には、研究活動の支えとなる生活面をサポートしてもらった。この他、多くの方々からご協力、ご助言をいただいた。ここに深く謝意を表す。

引用文献

安東郁男・荒木均・清水博之・黒木慎・三浦清之・永野邦明・今野一男（2007）極良食味の低アミロース米水稻品種「おぼろづき」．北海道農業研究センター研究報告 186: 31-46.

Ando, I., H. Sato, N. Aoki, Y. Suzuki, H. Hirabayashi, M. Kuroki, H. Shimizu, T. Ando and Y. Takeuchi (2010) Genetic analysis of the low-amylose characteristics of rice cultivars Oborozuki and Hokkai-PL9. *Breed Sci.* 60: 187-194.

Asano, K., T. Takashi, K. Miura, Q. Qian, H. Kitano, M. Matsuoka and M. Ashikari (2007) Genetic and molecular analysis of utility of *sd1* alleles in rice breeding. *Breed. Sci.* 57: 53-58.

Ashikari, M., A.Sasaki, M.Ueguchi-Tanaka, H.Itoh, A.Nishimura, D.Swapan, K.Ishiyama, T.Saito, M.Kobayashi, G.S.Khush, H.Kitano and M.Matsuoka (2002) Loss-of-function of a rice gibberellin biosynthetic gene, *GA20 oxidase (GA20ox-2)*, led to the rice 'green revolution'. *Breed. Sci.* 52: 143-150.

中場 勝・櫻田博・結城和博・佐野智義・中場理恵子・佐藤久実・横尾信彦・本間猛俊・佐藤晨一・宮野 斉・水戸部昌樹・佐藤久喜・渡部幸一郎（2006）低アミロース米新品種「ゆきの舞」（山形 84 号）の育成．山形農事研報 38 : 1-23.

Cuthbertson, D., P.K. Andrews, J.P. Reganold, N.M. Davies and B.M. Lange (2012) Utility of metabolomics toward assessing the metabolic basis of quality traits in apple fruit with an emphasis on antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 60: 8552-8560.

蛭谷武志 (1998) 味度メーターを用いた水稻良食味系統の早期選抜. 富山県農業技術センター研究報告 18:1-11.

蛭谷武志・山本良孝・矢野昌裕・舟根政治 (2008) 染色体断片置換系統群を利用したイネの玄米外観品質に關与する QTL の検出. 育種学研究 10: 91-99.

Fujii, K., Y. Hayano-Saito, K. Saito, N. Sugiura, N. Harashi, T. Tsuji, T. Izawa and M. Iwasaki (2000) Identical of a RFLP marker tightly linked to the panicle blast resistance gene, *Pb1*, in rice. *Breed. Sci.* 50: 183-188.

Fukuoka, K., and K. Okuno (2001) QTL analysis and mapping of *pi21*, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. *Theor. Appl. Genet.* 103: 185-190.

Harushima, Y., M. Yano, A. Shomura, M. Sato, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Yamamoto, S. Y. Lin, B. A. Antonio, A. Parco, H. Kajiya, N. Huang, K. Yamamoto, Y. Nagamura, N. Kurata, G. S. Khush and T. Sasaki (1998) A high-density rice genetic linkage

map with 2275 markers using a single F₂ population. *Genetics*. 148: 479-494.

Hayashi, K., H. Yoshida and I. Ashikawa (2006) Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. *Theor Appl Genet*. 113: 251-260.

Hori, K., K. Suzuki, K. Iijima and K. Ebana. (2016) Variation in cooking and eating quality traits in Japanese rice germplasm accessions. *Breeding Sci*. 66: 309-318.

池田ひろ (2001) 炊飯過程に溶出する糖成分の動向と米飯の食味について. *日本家政学会誌* 52: 401-409.

International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436: 793-800.

伊勢一男・赤間芳洋・堀末登・中根晃・横尾政雄・安東郁男・羽田丈夫・須藤充・沼口憲治・根本博・古舘宏・井辺時雄 (2001) 低アミロース良食味水稻品種「ミルキークイーン」の育成. *作物研究所研究報告* 2:39-61.

Juliano, B.O. (1985) Criteria and test for rice grain quality. In "Rice chemistry and technology" Juliano, B.O. (ed.), American Association of Cereal Chemists, Saint Paul. p.443-513.

Kamara, J.S., S.Konishi, T.Sasanuma and T.Abe (2010) Variation in free amino acid profile among some rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Breeding Sci.* 60: 46-54.

香西みどり・石黒恭子・京田比奈子・浜藺貴子・畑江敬子・島田淳子 (2000) 米の炊飯過程における還元糖および遊離アミノ酸量の変化. *日本家政学会誌* 51:579-585.

清沢茂久・櫛淵欽也・渡辺進二 (1975) いもち病抵抗性育種および育種研究の現状と問題点-1-. *農業および園芸* 50: 25-30.

小林和幸・松井崇晃・重山博信・石崎和彦・阿部聖一 (2002) 切り餅の食味官能試験法について. *日本作物学会紀事* 71: 250-255.

Konishi, M., K. Ide, R. Yoshimura, K. Hatae and A. Shimada (1996) Eating quality evaluation for cooked rice (2) Objective measurement including taste-active-components. *J. Cookery. Sci.* 29: 264-274.

Kurata N., Y. Nagamura, K. Yamamoto, Y. Harushima, N. Sue, J. Wu, B.A. Antonio, A. Shomura, T. Shimizu, S.Y. Lin, T. Inoue, A. Fukuda, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Toyama, Y. Miyamoto, T. Kirihara, K. Hayasaka, A. Miyao, L. Monna, H.S. Zhong, Y. Tamaru, Z.X. Wang, T. Momma, Y. Umehara, M. Yano, T. Sasaki

and Y. Minobe (1994) A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genet.* 8: 365–372.

Kwon, S., Y. Cho, J. Lee, J. Suh, J. Kim, M. Kim, I. Choi, H. Hwang, H. Koh and Y. Kim (2011) Identification of quantitative trait loci associated with rice eating quality traits using population of recombinant inbred lines derived from a cross between two temperate *japonica* cultivars. *Mol. Cells* 31: 437-445.

Lander, E. S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. J. Daly, S. E. Lincoln and L. Newburg (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.

Lestari, P., T. Ham, H. Lee, M. Woo, W. Jiang, S. Chu, S. Kwon, K. Ma, J. Lee, Y. Cho and H. Koh (2009) PCR marker-based evaluation of the eating quality of japonica rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 57: 2754-2762.

Lee. G., B. Yun and K. Kim (2014) Analysis of QTLs associated with the rice quality related gene by double haploid populations. *Int. J. Genomics* 2014 Article ID 781832: 1-6.

Lin, S.Y., T. Sasaki and M. Yano (1998) Mapping quantitative

trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. Theor. Appl. Genet. 96: 997-1003.

Lv, B., B. Li, S. Chen, J. Chen and B. Zhu (2009) Comparison of color techniques to measure the color of parboiled rice. J. Cereal Sci. 50: 262-265.

Malmendal, A., C. Amoresano, R. Trotta, I. Lauri, S. De Tito, E. Novellino and A. Randazzo (2011) NMR spectrometers as "magnetic tongues": prediction of sensory descriptors in canned tomatoes. J. Agric. Food Chem. 59: 10831-10838.

Matsue, Y., K. Mizuta and T. Yoshida (1991) Varietal difference in palatability of stored rice. Japan. J. Crop Sci. 60: 537-542.

Maruyama, K., K. Urano, K. Yoshiwara, Y. Morishita, N. Sakurai, H. Suzuki, M. Kojima, H. Sakakibara, D. Shibata, K. Saito, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki (2014) Integrated analysis of the effects of cold and dehydration on rice metabolites, phytohormones, and gene transcripts. Plant Physiol. 164: 1759-1771.

松江勇次 (1992) 少数パネル, 多数資料による米飯の官能検査. 家政誌 43: 1027-1032.

松波寿典・児玉徹・佐野広伸・金和裕 (2016) 美味しい米作りのための栽培科学的アプローチ. 日本作物学会紀事 85: 231-240.

松崎昭夫・高野哲夫・坂本晴一 (1992) 食味と穀粒成分および炊飯米のアミノ酸との関係. 日本作物学会紀事 61: 561-567.

McCouch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K.B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware and L. Stein (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). DNA Res. 9: 199-207.

Mestres, C., F. Ribeyre, P. Brigitte, F. Véronique and F. Matencio (2011) Sensory texture of cooked rice is rather linked to chemical than to physical characteristics of raw grain. J. Cereal Sci. 53: 81-89.

水田一枝・吉田智彦 (1994) ビール大麦交配両親名データベースの構築と解析. 農業情報研究 3: 65-78.

Monna, L., N. Kitazawa, R. Yoshino, J. Suzuki, H. Masuda, Y. Maehara, M. Tanji, M. Sato, S. Nasu and Y. Minobe (2002) Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in

gibberellin synthesis. DNA Res. 28: 11-17.

村井正之・遠藤雄士 (2006) ‘コシヒカリ’ に短稈性と早生性を導入した水稲新品種 ‘ヒカリッコ’ . 育種学研究 8: 183-189.

Murray, M. G. and W. F. Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.

Nagasaki, H., K. Ebana, T. Shibaya, J. Yonemaru and M. Yano (2010) Core single-nucleotide polymorphisms - a tool for genetic analysis of the Japanese rice population. Breed. Sci. 60: 648-655.

長沢裕滋・大源正明・阿部聖一 (1994) 食味関連成分および物理的食味測定値と米食味の関係 第3報 味度値と食味及び蛋白質含有率の関係. 北陸作物学会報 29: 29-31.

Niu, X., F. Shen, Y. Yu, Z. Yan, K. Xu, H. Yu and Y. Ying (2008) Analysis of sugars in Chinese rice wine by Fourier transform near-infrared spectroscopy with partial least-squares regression. J. Agric. Food Chem. 56: 7271-7278.

農林水産省 (2016) 米をめぐる状況について 平成 29 年 10 月
http://www.maff.go.jp/j/seisan/kikaku/attach/pdf/kome_siryou-1

07.pdf.

野中和弘・高木胖・松雪セツ子・横尾浩明・広田雄二・執行俊子・重富修・岸川英利・中村大四郎・金山拡・天本真登・吉富進 (1991) 水稻新品種「佐賀 1 号」の育成. 佐賀県農業試験場研究報告 27: 1-19.

Ochi, H., Bamba, T., Naito, H., Iwatsuki, K., and Fukusaki, E. (2012) Metabolic fingerprinting of hard and semi-hard natural cheeses using GC/FID for practical sensory prediction modeling. J. Biosci. Bioeng. 114: 506-511.

Ogasawara, M., T. Katsumata and M. Egi (2006) Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000Da peptide. Food chemistry 99: 600-604.

Okabe, M. (1979) Texture measurement of cooked rice and its relationship to the eating quality. J Texture Stud. 10: 131-152.

岡崎正一・沖佳子 (1961) 精白米中の遊離アミノ酸について. 日農化会誌 35: 194-199.

Okuno, K., H. Fuwa and M. Yano (1983) A new mutant gene lowering amylase content in endosperm starch of rice, *Oryza sativa* L.. Japan J. Breed. 33: 387-394.

大澤実・井上直人 (2008) 米デンプンの α -アミラーゼによる消化性と食味関連形質に関する主成分分析. 日本作物学会紀事 77: 61-68.

Ramautar, R., G.W. Somsen and G.L. de Jong (2013) CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2010-2012. Electrophoresis 34: 86-98.

Ramesh, M., K.R. Bhattacharya and J.R. Mitchell (2000) Developments in understanding the basis of cooked-rice texture. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 40: 449-460.

Saeed, A. I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush and J. Quackenbush (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. Biotechniques 34: 374-378.

Saito, K., K. Miura, Y. Hayano-Saito, H. Araki and A. Kato (2001) Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length. Theor. Appl. Genet. 103: 862-868.

Saito, K., K. Miura, Y. Hayano-Saito and A. Kato (2003) Analysis of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage

of rice. *Japan Agric. Res. Quart.* 37: 1-5.

Sasaki, T., T. Matsumoto, K. Yamamoto, K. Sakata, T. Baba, Y. Katayose, J. Wu, Y. Niimura, Z. Cheng, Y. Nagamura, B. A. Antonio, H. Kanamori, S. Hosokawa, M. Masukawa, K. Arikawa, Y. Chiden, M. Hayashi, M. Okamoto, T. Ando, H. Aoki, K. Arita, M. Hamada, C. Harada, S. Hijishita, M. Honda, Y. Ichikawa, A. Idonuma, M. Iijima, M. Ikeda, M. Ikeno, S. Ito, T. Ito, Y. Ito, Y. Ito, A. Iwabuchi, K. Kamiya, W. Karasawa, S. Katagiri, A. Kikuta, N. Kobayashi, I. Kono, K. Machita, T. Maehara, H. Mizuno, T. Mizubayashi, Y. Mukai, H. Nagasaki, M. Nakashima, Y. Nakama, Y. Nakamichi, M. Nakamura, N. Namiki, M. Negishi, I. Ohta, N. Ono, S. Saji, K. Sakai, M. Shibata, T. Shimokawa, A. Shomura, J. Song, Y. Takazaki, K. Terasawa, K. Tsuji, K. Waki, H. Yamagata, H. Yamane, S. Yoshiki, R. Yoshihara, K. Yukawa, H. Zhong, H. Iwama, T. Endo, H. Ito, J. H. Hahn, H. Kim, M. Eun, M. Yano, J. Jiang and T. Gojobori (2002a) The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature* 420: 312-316.

Sasaki, A., M. Ashikari, M. Ueguchi-Tanaka, H. Itoh, A. Nishimura, D. Swapan, K. Ishiyama, T. Saito, M. Kobayashi, G.S. Khush, H. Kitano and M. Matsuoka (2002b) Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature*. 416: 701-702.

Sato, H., Y. Suzuki, M. Sakai, and T. Imbe (2002) Molecular

characterization of *Wx-mq*, a novel mutant gene for low-amylose content in endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* 52: 131-135.

佐藤弘一・斎藤真一・平俊雄 (2003) 味度メーターおよびラピッド・ビスコ・アナライザーを利用した水稻良食味系統選抜. *日本作物学会紀事* 72: 390-394.

佐藤毅 (2009) 新品種「ゆめぴりか」の育成と今後の北海道稲育種 (特集 技術開発の成果と展望). *北農* 76: 343-357.

Shibaya, T., K. Hori, E. Ogiso-Tanaka, U. Yamanouchi, K. Shu, N. Kitazawa, A. Shomura, T. Ando, K. Ebana, J. Wu, T. Yamazaki and M. Yano (2016) *Hd18*, encoding histone acetylase related to arabidopsis FLOWERING LOCUS D, is involved in the control of flowering time in rice. *Plant Cell Physiol.* 57: 1828-1838.

Shinada, H., T. Yamamoto, E. Yamamoto, K. Hori, Y. Hirayama, T. Maekawa, H. Kiuchi, H. Sato and T. Sato (2015) Quantitative trait loci for whiteness of cooked rice detected in improved rice cultivars in Hokkaido. *Breed. Sci.* 65: 201-207.

Sugimoto, M., T. Koseki, A. Hirayama, S. Abe, T. Sano, M. Tomita and T. Soga (2010a) Correlation between sensory evaluation scores of Japanese sake and metabolome profiles. *J. Agric. Food*

Chem. 58: 374-83.

Sugimoto, M., H. Goto, K. Otomo, M. Ito, H. Onuma, A. Suzuki, M. Sugawara, S. Abe, M. Tomita and T. Soga (2010b) Metabolomic profiles and sensory attributes of edamame under various storage duration and temperature conditions. J. Agric. Food Chem. 58: 8418-8425.

Sugimoto, M., D. T. Wong, A. Hirayama, T. Soga and M. Tomita (2010c) Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. Metabolomics 6: 78-95.

杉浦直樹・辻孝子・藤井潔・加藤恭宏・坂紀邦・遠山孝通・早野由里子・井澤敏彦（2004）水稻病害抵抗性付与のための連続戻し交雑育種における DNA マーカー選抜の有効性の実証．育種学研究 6: 143-148.

杉山智美・小西雅子・寺崎太二郎・畑江敬子・島田淳子（1995）米粒中の微量成分とその偏在．日本食品科学工学会誌 42: 401-409.

田島眞・堀野俊朗・前田万里・Son, J. R. (1992) 米粒外層から抽出されるオリゴ糖類．日本食品工業学会誌 39: 857-861.

Tarachiwin, L., O. Masako and E. Fukusaki (2008) Quality

evaluation and prediction of *Citrullus lanatus* by ^1H NMR-based metabolomics and multivariate analysis. J. Agric. Food Chem. 56: 5827-5835.

建部雅子・宮田邦夫・金村徳夫・米山忠克（1994）登熟にともなう玄米の糖・アミノ酸含有率の推移および窒素栄養条件の影響．日本土壤肥料学雑誌 65: 503-513.

竹生新治郎・渡辺正造・杉本貞三・酒井藤敏・谷口善廣（1983）米の食味と理化学的性質の関連．澱粉科学 30: 333-341.

Takeuchi, Y., H. Hayasaka, B. Chiba, I. Tanaka, T. Shimano, M. Yamagishi, K. Nagano, T. Sasaki and M. Yano (2001) Mapping quantitative loci controlling cool-temperature tolerance at booting stage in temperate japonica rice. Breed. Sci. 51: 191-197.

Takeuchi, Y., S.Y. Lin, T. Sasaki and M. Yano (2003) Fine linkage mapping enables dissection of closely linked quantitative trait loci for sees dormancy and heading in rice. Theor. Appl. Genet. 107:1174-1180.

Takeuchi, Y., T. Ebitani, T. Yamamoto, H. Sato, H. Ohta, H. Hirabayashi, H. Kato, I. Ando, H. Nemoto, T. Imbe and M. Yano (2006) Development of isogenic lines of rice cultivar koshihikari with early and late heading by marker-assisted selection. Breed.

Sci. 56: 405-413.

Takeuchi, Y., Y. Nonoue, T. Ebitani, K. Suzuki, N. Aoki, H. Sato, H., O. Ideta, H. Hirabayashi, M. Hirayama, H. Ohta, H. Nemoto, H. Kato, I. Ando, K. Ohtsubo M. Yano and T. Imbe. (2007) QTL detection for eating quality including glossiness, stickiness, taste and hardness of cooked rice. Breed. Sci. 57: 231-242.

Takeuchi, Y., K. Hori, K. Suzuki, Y. Nonoue, Y. Takemoto-Kuno, H. Maeda, H. Sato, H. Hirabayashi, H. Ohta, T. Ishii, H. Kato and H. Nemoto (2008) Major QTLs for eating quality of an elite Japanese rice cultivar, Koshihikari, on the short arm of chromosome 3. Breed. Sci. 58: 437-445.

Tamaki, M., M. Ebata, T. Tashiro and M. Ishikawa (1989) Physico-ecological studies on quality formation of rice kernel. Jpn. J. Crop Sci. 58: 695-703.

田中勲・小林麻子・富田桂・竹内善信・山岸真澄・矢野昌裕・佐々木卓治・堀内久満 (2006) イネ日本品種における食味の粘りおよび外観に關与する量的形質遺伝子座の検出. 育種学研究 8: 39-47.

館山元春・坂井真・須藤充 (2005) イネ低アミロース系統の登熟気温による胚乳アミロース含有率變動の系統間差. 育種学研究 7: 1-7.

Terao, T. and T. Hirose (2015) Control of grain protein contents through *SEMIDWARF1* mutant alleles: *sd1* increases the grain protein content in Dee-geo-woo-gen but not in Reimei. *Mol. Genet. Genom.* 290: 930-954.

Tran, T.U., K. Suzukim, H. Okadome, S. Homma and K. Ohstubo (2004) Analysis of the tastes of brown rice and milled rice with different milling yields using a taste sensing. *Food Chem.* 88: 557-566.

Tran, T.U., K. Suzukim, H. Okadome, H. Ikezaki and S. Homma (2005) Detection of changes in taste of japonica and indica brown and milled rice (*Oryza sativa* L.) during storage using physicochemical analyses and taste sensing system. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1108-1118.

Wada, T., T. Ogata, M. Tsubone, Y. Uchimura and Y. Matue (2008) Mapping of QTLs for eating quality and physicochemical properties of the japonica rice 'Koshihikari'. *Breed. Sci.* 58: 427-435.

Wan, X.Y., J.M. Wan, C.C. Su, C.M. Wang, W.B. Shen, J.M. Li, H.L. Wang, L. Jiang, S.J. Liu, L.M. Chen, H. Yasui and A. Yoshimura (2004) QTL detection for eating quality of cooked rice

in a population of chromosome segment substitution lines. *Theor. Appl. Genet.* 110: 71-79.

Wan, X.Y., J.M. Wan, J.F. Weng, L. Jiang, J.C. Bi, C.M. Wang and H.Q. Zhai (2005) Stability of QTLs for rice grain dimension and endosperm chalkiness characteristics across eight environments. *Theor Appl Genet.* 110: 1334-1346.

Wang, S., C.J. Basten and Z.B. Zeng (2006) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.html>).

Ward, R.M., Q. Gao, H. de Bruyn, R.G. Gilbert and M.A. Fitzgerald (2006) Improved methods for the structural analysis of the amylose-rich fraction from rice flour. *Biomacromolecules* 7: 866-876.

Wei, X., J. Xu, H. Guo, L. Jiang, S. Chen, C. Yu, Z. Zhou, P. Hu, H. Zhai and J. Wan (2010) *DTH8* suppresses flowering in rice, influencing plant height and yield potential simultaneously. *Plant Physiol.* 153: 1747-1758.

福井清美・小林陽 (1996) イネ育種マニュアル. 山本隆一・堀末登・池田良一編「食味官能検査」養賢堂, 東京. 74-76.

Yamakawa, H. and M. Hakata (2010) Atlas of rice grain filling-related metabolism under high temperature: Joint analysis of metabolome and transcriptome demonstrated inhibition of starch accumulation and induction of amino acid accumulation. *Plant Cell Physiol.* 51: 795–809.

山本敏夫・矢野昌裕 (2007) 遺伝子情報に基づくイネのゲノム育種への展開. *科学* 77: 607-613.

Yamamoto, T., H. Nagasaki, J. Yonemaru, K. Ebana, M. Nakajima, T. Shibaya and M. Yano (2010) Fine definition of the pedigree haplotypes of closely related rice cultivars by means of genome-wide discovery of single-nucleotide polymorphisms. *BMC Genomics* 11: 267.

Yano, M. and T. Sasaki (1997a) Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice. *Plant Mol. Biol.* 35: 145-153.

Yano, M., Y. Harushima, Y. Nagamura, N. Kurata, Y. Minobe and T. Sasaki (1997b) Identification of quantitative trait loci controlling heading date in rice using a high-density linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1025–1032.

Yau, N. and J. Huang (1996) Sensory analysis of cooked rice.

Food quality and preference 7: 263-270.

Yonemaru, J., T. Yamamoto, K. Ebana, E. Yamamoto, H. Nagasaki, T. Shibaya and M. Yano (2012) Genome-wide haplotype changes produced by artificial selection during modern rice breeding in japan. PLoS One. 7: e32982.

結城和博・佐藤久実・中場勝・櫻田博・佐野智義・本間猛俊・渡部幸一郎・水戸部昌樹・宮野齊・中場理恵子・横尾信彦・森谷真紀子・後藤元・齋藤信弥・齋藤久美（2010）水稻新品種「つや姫」（山形97号）の育成．山形県農業研究報告 2: 19-40.

Zenbayashi, K., T. Ashizawa, T. Tani and S. Koizumi (2002) Mapping of the QTL (quantitative trait locus) conferring partial resistance to leaf blast in rice cultivar Chubu 32. Theor. Appl. Genet. 104: 547-552.

全国食料調査協会（1997）米の食味評価最前線．安東郁男編「米の食味と育種」全国食料調査協会，東京．77-89.