

ごとう はじめ

氏名（本籍地）後藤元

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農博第1191号

学位授与年月日 平成30年3月27日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項

研究科、専攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科応用生命科学専攻

論文題目 新規食味評価手法を用いた水稻品種「つや姫」の遺伝解析

博士論文審査委員（主査）教授 西尾剛

教授 高橋英樹

教授 南條正巳

論文内容要旨

新規食味評価手法を用いた
水稻品種「つや姫」の遺伝解析

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

後 藤 元

指導教員

西尾 剛 教授

論文内容要旨

新規食味評価手法を用いた水稻品種「つや姫」の遺伝解析

I. 序論

日本の米の消費量は1962年をピークに年々減少し、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にある。さらに、2018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、複数の米産地で良食味品種を核としたブランディング戦略が取られており、育種目標として食味の重要度が年々上がっている。その中で山形県は、良食味のブランド品種として「つや姫」を育成した。「つや姫」は栽培特性に優れているだけでなく、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によって食味官能試験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。

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、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開発が求められている。これまでに硬さや粘り、外観に影響する、タンパク質含有率やアミロース含有率、光沢を評価軸とした食味評価手法が開発され、育種に活用されているが、炊飯米の白さ、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。

食味に関しては遺伝学的研究も進んでおり、粘りに関与するアミロース含有率に関わるWx座の変異が育種に活用されており、「ミルキークイーン」や「おぼろづき」、「ゆめぴりか」などの低アミロース品種が普及している。タンパク質含有率に関しては、QTLが検出された例はあるものの、そのQTLの染色体領域を導入した実用品種の育種に至っていないのが現状である。良食味品種の代表である「コシヒカリ」の食味については、第3染色体短腕にタンパク質含有率と炊飯米表面の物理特性に関与するQTLが明らかになっているのみであり、「コシヒカリ」などの日本の良食味品種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」とその近縁系統では、食味に関する遺伝解析は行われておらず、タンパク質含有率やアミロース含有率等が「コシヒカリ」と概ね同程度であることから、これらとは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、遺伝資源としても有望である。

以上のことから、「コシヒカリ」と同等以上の高い食味の品種を効率的に育成するため、炊飯米の白さと味の選抜指標となる新たな食味評価手法を検討するとともに、白さと味を評価する手法を用いて「つや姫」の良食味遺伝子の解析を試みた。

II. 炊飯米の白さを客観的に評価する手法の開発

1. 分光測色計による炊飯米の白さの評価

炊飯米の白さは食味に重要であるにもかかわらず、炊いた米ではこれまで評価法が存在しなかった。そこで、色彩を測定する機器である分光測色計を測定機器として検討した結果、炊飯米を成型したサンプルの WI（白さを示す表色値）を指標とすることで、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（図 1）。既存の外観評価手法である味度値と WI とは相関が無いことから、WI は外観の評価手法として新規であることを確認した（図 2）。また、「つや姫」などが白く、「里のゆき」などが白さで劣ることを機器測定でも確認できたことから、本測定法で品種間差を評価できると考えられた（図 3）。

2. 味度メーターを用いた炊飯米の白さの簡易評価

上記の WI 測定法では、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、労力および必要サンプル量の低減効果は限定的であると考えられた。そこで、炊飯を行わずに白さを評価する手法を検討した結果、味度メーターで測定を終えたサンプルの WI を指標とすることにより、30 g 程度の精米を用いることで、炊飯せずに簡易に炊飯米の白さを評価可能であることが明らかとなった（図 4）。

3. 炊飯米の分光反射特性

炊飯米の白さの品種間差の要因を明らかにするため、分光反射率の検討を行った結果、400～550 nm 付近の反射率が高く、550～700 nm 付近の反射率が低いことで白く見えることが明らかとなった（図 5）。L*、a*には品種間差がなかったものの、炊飯米の白い「つや姫」および「コシヒカリ」の b*が「はえぬき」よりも低いことから、黄と青の反射が炊飯米の白さに影響を与えると考えられた（表 1）。

4. 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

アミロース含有率と炊飯米の白さに $r=0.31$ の有意な相関があったことから、アミロース含有率が炊飯米の白さに正の影響を与えることが明らかとなった（図 6）。アミロース含有

率が低く、炊飯米の白さが劣るサンプルは「里のゆき」とその後代系統であるため、低アミロース遺伝子 *Wx-y* の多面発現または「里のゆき」の遺伝背景の影響の可能性が示唆された。タンパク質含有率と炊飯米の白さに $r=-0.33$ の有意な負の相関があったことから、タンパク質含有率が炊飯米の白さに負の影響を与えることが明らかとなった（図 7）。炊飯米の白い「つや姫」のタンパク質含有率およびアミロース含有率は、「コシヒカリ」と差がないことから、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「つや姫」の白さに関わることが示唆された。

III. メタボローム解析を用いた炊飯米の味の評価

1. 炊飯米の味に関する成分の探索

近年、アミノ酸、有機酸や糖などの低分子化合物を対象に、メタボローム解析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いる。本手法は、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。そこで、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）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）を用いた糖類の測定を、78 サンプルを用いて実施し、炊飯米の味と低分子化合物の組成の関係を調査した。低分子化合物組成からクラスタリングを行った結果、78 サンプルが大きく 4 つのクラスタに分類された（図 8）。味に優れるサンプル（クラスタ A）は、アスパラギン酸やグルタミン酸など（ラベル E 群）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示唆された。低分子化合物組成から主成分分析を行った結果、食味官能試験「味」の項目に優れるサンプルは、グルタミン酸、アスパラギン酸などの低分子化合物の多寡と推定される第 3 主成分が多く、低分子化合物の総量と推定される第 1 主成分が少ないとから（図 9）、低分子化合物の組成が炊飯米の味に影響を与えることが明らかとなった。アスパラギン酸と炊飯米の味には $r=0.46$ の正の相関がある（図 10）。タンパク質含有率と炊飯米の味にある $r=-0.41$ の相関係数よりも絶対値で上回ることから（図 11）、タンパク質含有率と同程度か、より大きな寄与があり、食味を推定する指標として有望と考えられた。

2. 炊飯米の低分子化合物組成の品種間差

本研究で、炊飯米の低分子化合物の組成が食味に影響していることが明らかとなったが、

品種間差を検討した例はこれまでになかった。そこで、良食味品種間で低分子化合物の組成を比較した結果、「つや姫」はアスパラギン酸、グルタミン酸などが多く、「味」に優れる低分子化合物組成を有するが明らかとなった（図 12）。一方、2008 年産米が、登熟温度が約 2~3 °C 低かった 2009 年産米に比較して低分子化合物の含量が全体的に多いこと、「コシヒカリ」「つや姫」「キヌヒカリ」の晚生品種の低分子化合物の含量が多く、熟期によって低分子化合物組成が異なることから、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。

3. 炊飯米の低分子化合物組成に登熟温度が及ぼす影響

登熟温度が低分子化合物の組成に影響することが示唆されたため、移植時期を変えて異なる登熟温度としたサンプルの解析を行った。その結果、「コシヒカリ」「つや姫」「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、炊飯米の低分子化合物が増加することが明らかとなった（図 13）。アスパラギン酸などの「味」と正の相関のある化合物は、登熟温度が 24°C 前後と比較的高い場合には、「つや姫」 ≈ 「コシヒカリ」 > 「はえぬき」であるのに対し、登熟温度が低下するにつれて「つや姫」 > 「コシヒカリ」 ≈ 「はえぬき」となることから、登熟温度に対する反応にも品種間差があることが明らかとなった（図 14）。

IV 「つや姫」の食味関連遺伝子の解析

1. 「つや姫」のゲノム構成の解析

水稻品種「つや姫」は、その系譜からゲノム構成の 70% 以上が「コシヒカリ」と同一であるとされている。しかし、栽培特性および食味特性において、「コシヒカリ」と明瞭な違いがあり、残りの 30% 程度のゲノムに「つや姫」を特徴づける遺伝子が座乗していると考えられる。そこで、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」のゲノムの差異を調査した結果、55,584 個の SNP が検出され、そのうち、非同義置換となる SNP は 2,424 個であった。SNP の出現頻度を染色体ごとに調べた結果、第 1 染色体長腕および第 11 染色体長腕で明らかに SNP の出現頻度が多い領域を確認した（図 15）。第 1 染色体の長腕の約 2.3 Mb の領域には *sd1* が座乗しており、この領域は、「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（図 16）。第 11 染色体の長腕の約 5.2 Mb は *Pik-m* が座乗しており、この領域は、「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 17）。DNA マーカーの分析によって「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。

2. 「つや姫」の良食味関連遺伝子の QTL 解析

これまで行われた「日本晴」および「コシヒカリ」のゲノム解読の結果、近縁な日本稻間でも多型を検出しやすい SNP マーカーセットが整備されている。日本稻用の SNP マーカーセットおよび *sd1* 近傍の SSR マーカー、InDel マーカーで「コシヒカリ」・「つや姫」間の多型を解析した結果、SNP マーカーでは 768 マーカー中 98 マーカー、SSR マーカーでは 22 マーカー中 6 マーカー、InDel マーカーでは 1 マーカー中 1 マーカーで多型が検出された。多型は 12 本の染色体すべてで検出されたものの、多型の頻度が低い染色体もあった（図 18）。前述の 105 マーカーと「つや姫」／「コシヒカリ」の RIL94 系統を用いて、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（遊離アミノ酸類 20 化合物、有機酸類 4 化合物、糖類 4 化合物）について、3 カ年の QTL 解析を行った結果、第 1 染色体 37.8～39.7 Mb に、「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、低分子化合物の含量が減少する QTL が検出された（表 2）。第 1 染色体の同領域の多くは *sd1* を含むインディカ品種に由来する領域（約 37.0～39.3Mb）のため、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 染色体の短腕末端から 3.3Mb のマーカーの近傍には「つや姫」型対立遺伝子で到穂日数が増加する QTL が検出された。この領域の近傍には *Hd18* が座乗しており、検出された QTL の位置および相加効果から、検出された到穂日数の QTL は *Hd18* であると考えられた。一方、「つや姫」型対立遺伝子でアスパラギン酸の含量が増加する QTL は 2014 年に第 8 染色体の長腕に検出されたのみであった。これは、2014～2016 年の登熟温度が高く、「コシヒカリ」との差が顕著でなかったためと考えられた。第 1 染色体長腕のインディカ由来領域のうち、短腕末端から 39.0Mb のマーカー近傍に「つや姫」側対立遺伝子で炊飯米の白さ(WI)が低下する QTL が検出されたが、同領域の短腕側(短腕末端から 36.7～37.4Mb)では逆に、「つや姫」型対立遺伝子で白さが向上する QTL が確認された（図 19）。「つや姫」の *sd1* および近傍の一部を「レイメイ」などのジャポニカ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可能性が示唆された。

V まとめ

近年、水稻の育種目標として重要度が高まっている炊飯米の食味を、品種育成の選抜過

程で効率的に評価するため、炊飯米の白さと味を評価する新たな手法を検討するとともに、「つや姫」の白さと味に関する遺伝子の解析を試みた。

分光測色計を用い、成型した炊飯米の WI（白さを示す表色値）を測定することで、炊飯米の白さを客観的に評価することが可能であった。炊飯米の白さには黄と青の光の反射率が関与しており、タンパク質含有率とアミロース含有率も影響を与えることを明らかにした。

炊飯米のメタボローム解析（イオン性低分子化合物の網羅的な測定）により、味に優れる炊飯米は、アスパラギン酸やグルタミン酸が多く、他の多くの物質が少ない特徴的な低分子化合物組成を持つことを明らかにした。低分子化合物の組成には品種間差と登熟温度による影響が確認され、登熟温度への反応にも品種間差があると考えられた。

「つや姫」の全ゲノムシーケンスおよび DNA マーカーによる解析の結果、「つや姫」の *sd1* を含む第 1 染色体長腕の約 2.3 Mb および *Pik-m* を含む第 11 染色体長腕の約 5.2 Mb がインディカ品種に由来することを明らかにした。「つや姫」／「コシヒカリ」の RIL を用いた QTL 解析の結果、第 1 染色体のインディカ品種由来の領域に、「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、低分子化合物の含量が減少する QTL が検出された。第 1 染色体のインディカ品種由来の領域の短腕側には、「つや姫」型対立遺伝子で炊飯米の白さが向上する領域の存在が示唆された。第 8 染色体には「つや姫」型対立遺伝子で到穂日数が増加する QTL と低分子化合物の含量が増減する QTL が検出された。「つや姫」型対立遺伝子でアスパラギン酸が増加する QTL は、単年度ではあるが第 8 染色体の短腕末端から 17.9 Mb に検出された。

本研究により、炊飯米の白さと味を客観的かつ効率的に評価する手法が確立された。今後、多様な遺伝資源の評価や育種における各世代の選抜に本技術を利用することで、育種される品種の食味の向上が期待できる。また、「つや姫」のゲノム構成が明らかとなり、食味に関する QTL が見出されたことから、今後、さらに解析が進むことで、より食味が向上した品種の育種が期待される。

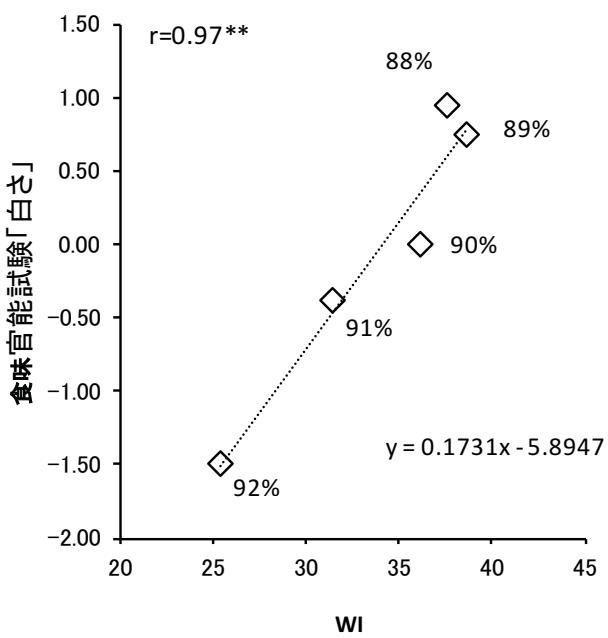


図1 搗精歩合を変えた「はえぬき」の炊飯米の白さと成型サンプルのWIの関係

** : 1%水準で有意

マーカー横の数字は搗精歩合

図中の式は回帰式

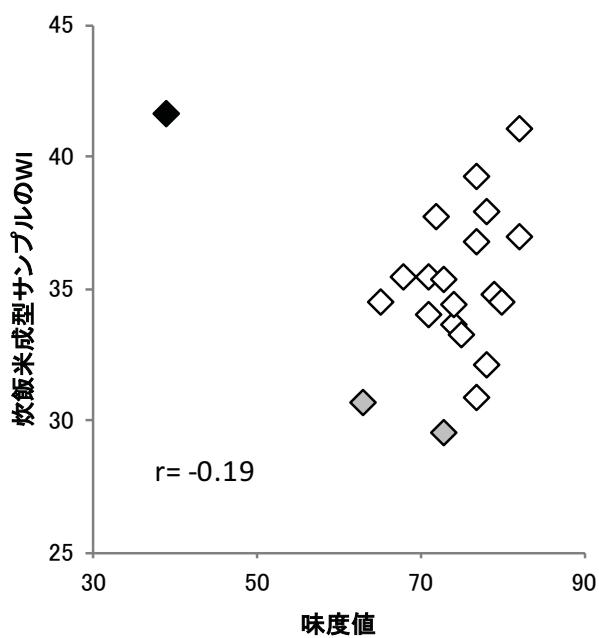


図2 味度値と炊飯米サンプルのWIの関係 (2010年、n=21)

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」）

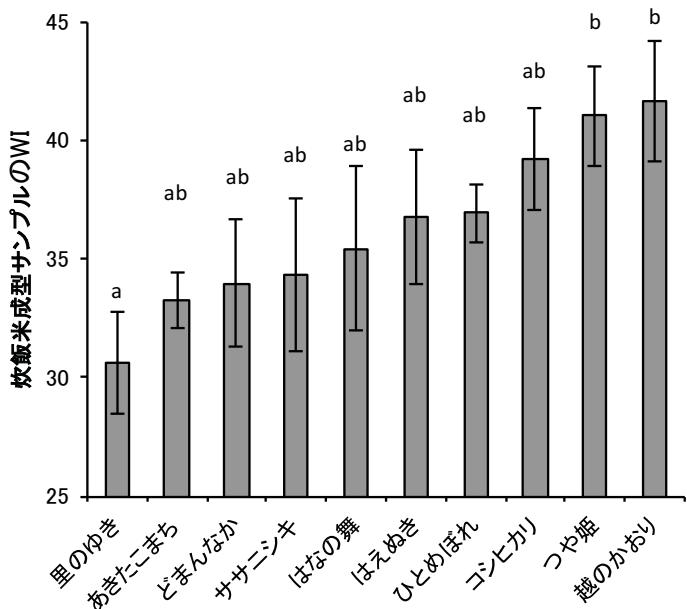


図3 炊飯米の白さの品種間差（2010年）

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

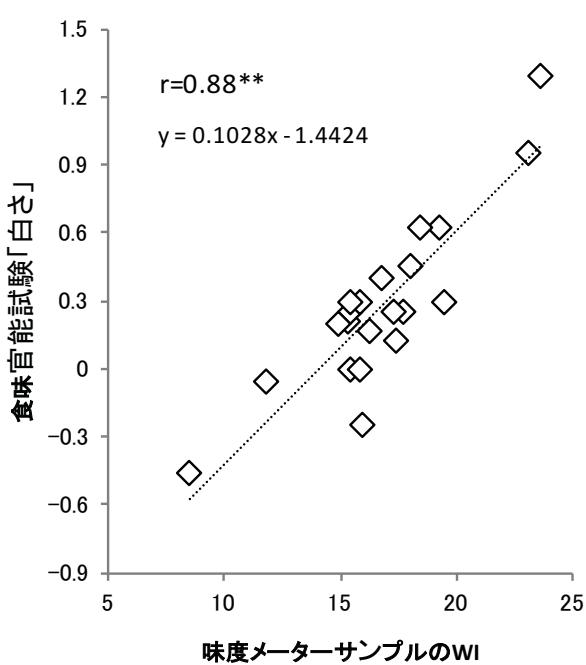


図4 味度メーターサンプルのWIと食味官能試験「白さ」の関係
(2010年、n=21)
** : 1%水準で有意
図中の式は回帰式

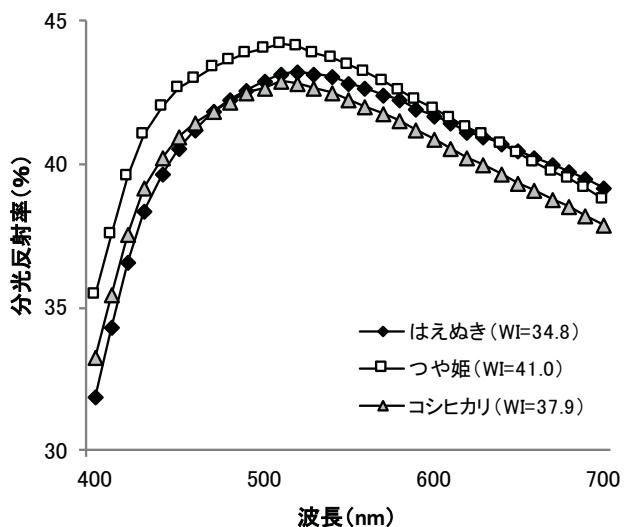


図5 白さが異なる炊飯米の波長ごとの分光反射率

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*
はえぬき	34.8 ± 2.5	71.1 ^a ± 0.5	-2.6 ^a ± 0.1	2.6 ^a ± 0.8
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

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

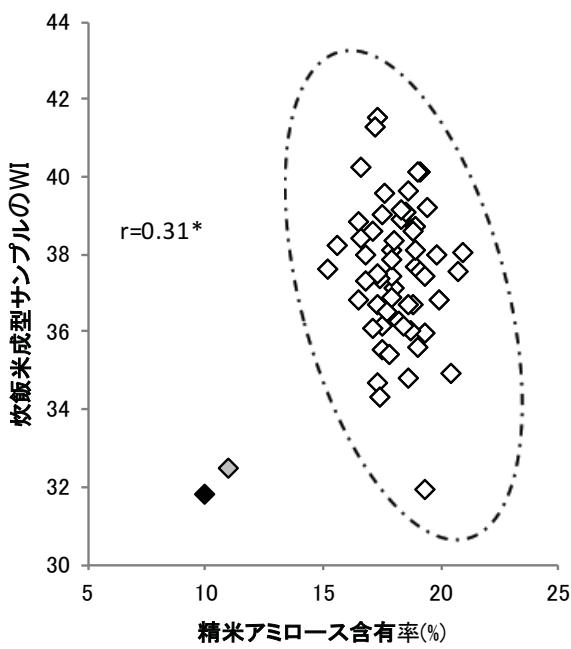


図6 精米アミロース含有率と炊飯米の白さの関係

(2012年, n=60)

* : 5%水準で有意

図中左の値は全60サンプルの相関係数

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-y保有低アミロース系統

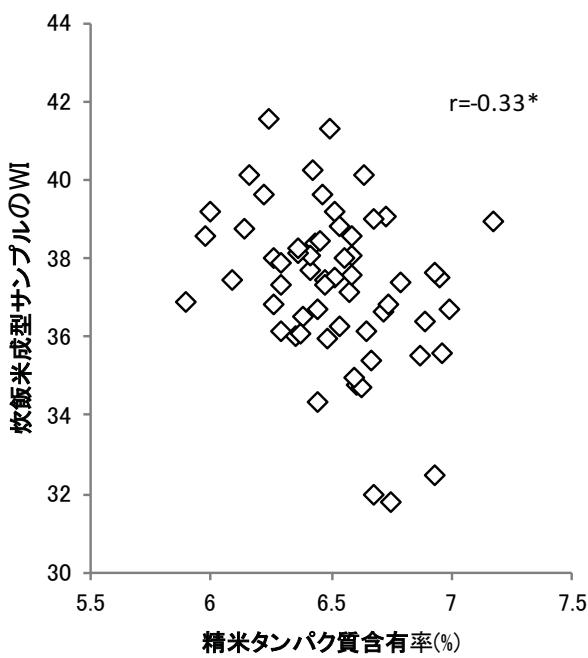


図7 精米タンパク質含有率と炊飯米の白さの関係

(2012年, n=60)

* : 5%水準で有意

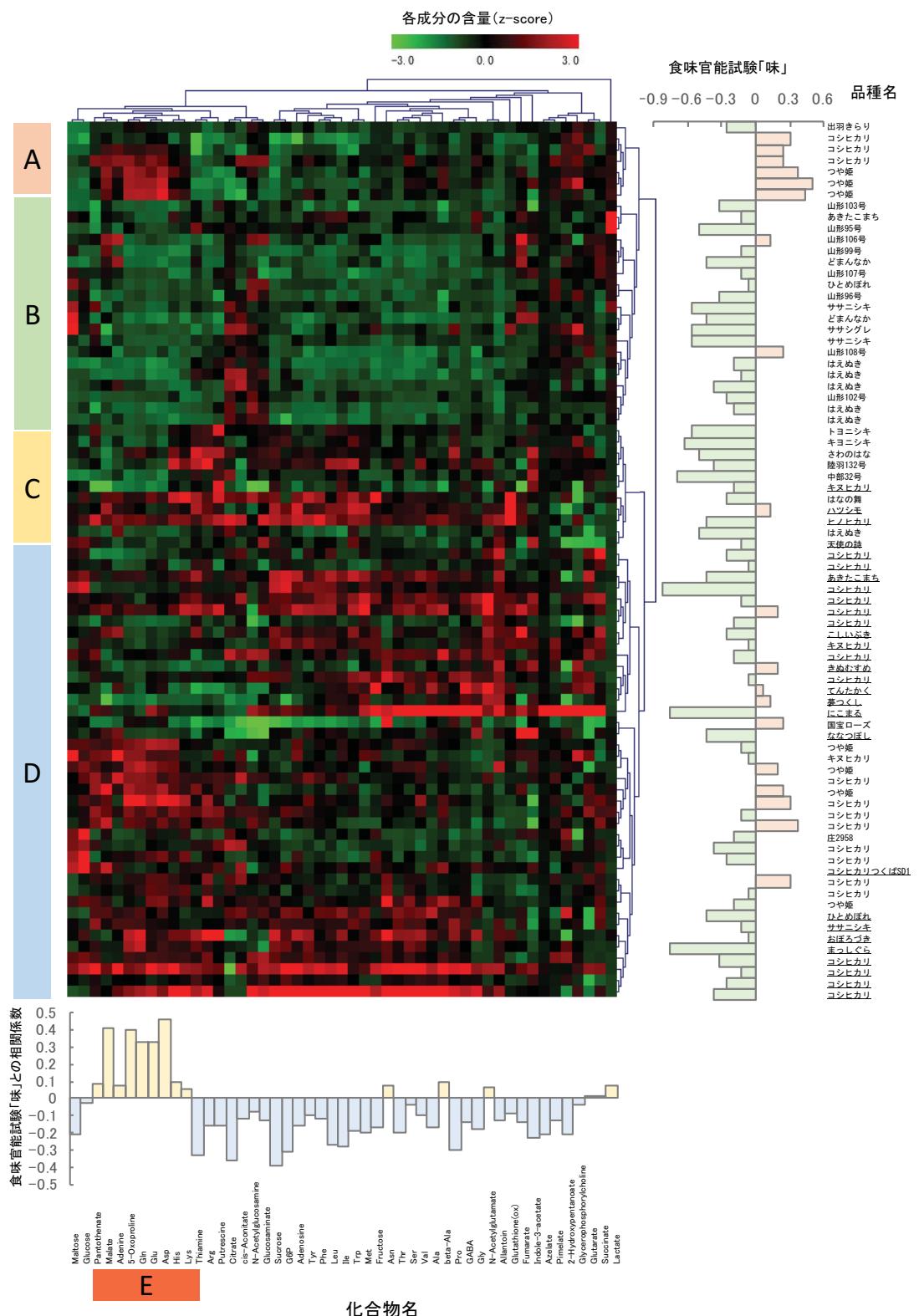


図 8 炊飯米中の低分子化合物と食味官能評価の相関（2008 年）

A, B, C, D は、低分子化合物組成の類似性で 78 サンプルを 4 つに分類したクラスター
E は、低分子化合物組成の類似性で 49 化合物を分類したクラスターのうち、「味」に正の相関のある化合物が形成したクラスター
品種名に下線が付してあるサンプルは市販のサンプルを購入、他は山形県内で試験栽培したサンプル

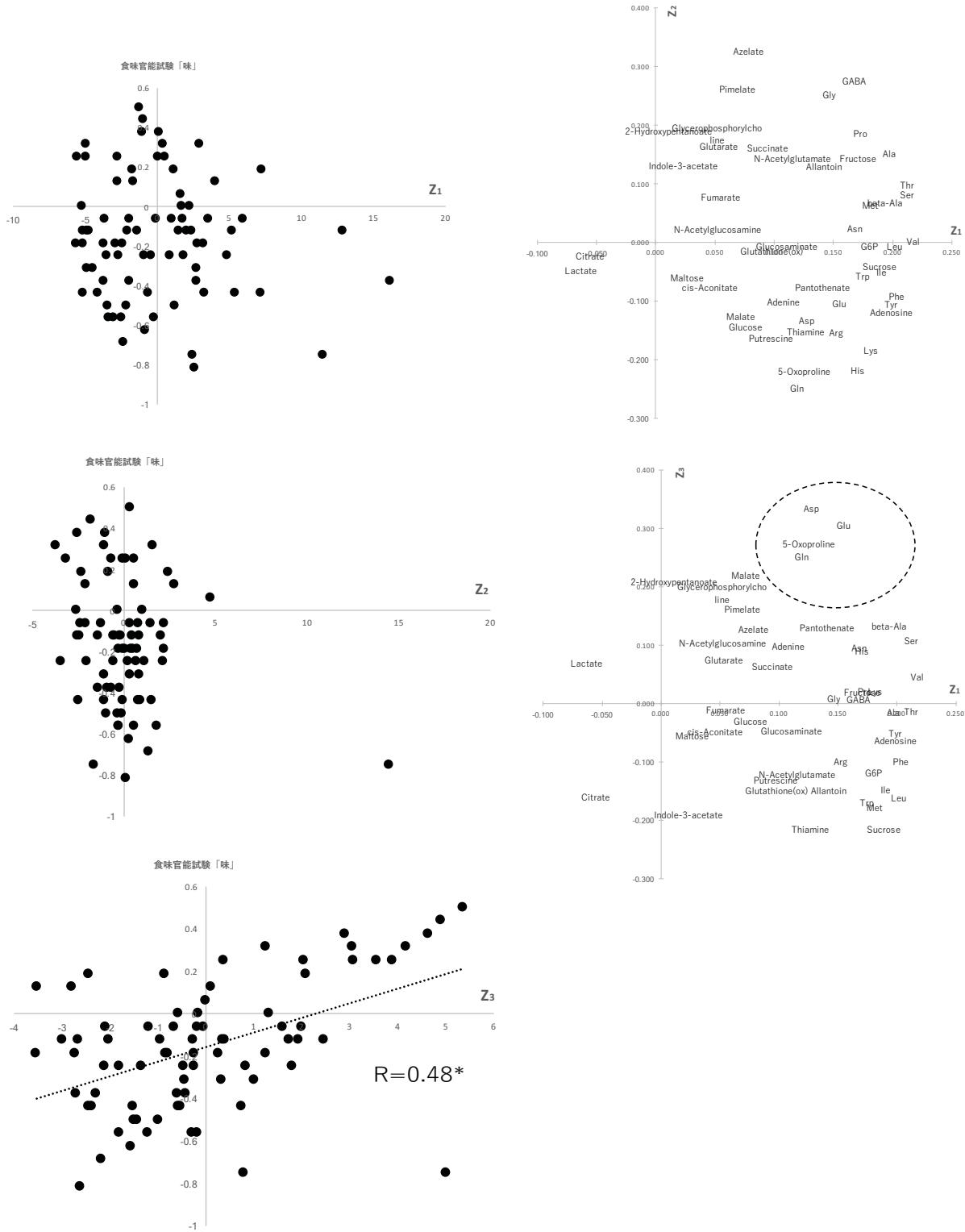


図9 炊飯米中の低分子化合物の主成分スコアと炊飯米の味の関係(左)と因子負荷量(右)

2008年産米78サンプルの結果

破線内は食味官能試験「味」との相関係数が高い化合物

Z₁: 第1主成分(寄与率37.1%) 因子負荷量から低分子化合物の総量と推定される成分。多いと食味が劣る。

Z₂: 第2主成分(寄与率10.5%) 低分子化合物の組成に関与すると推定される成分。「味」への寄与は少ない。

Z₃: 第3主成分(寄与率9.2%) 「味」との相関係数が高い化合物(破線内)の多寡が影響する成分。食味への寄与が大きく、多いと食味が優れる。

*: 5%水準で有意

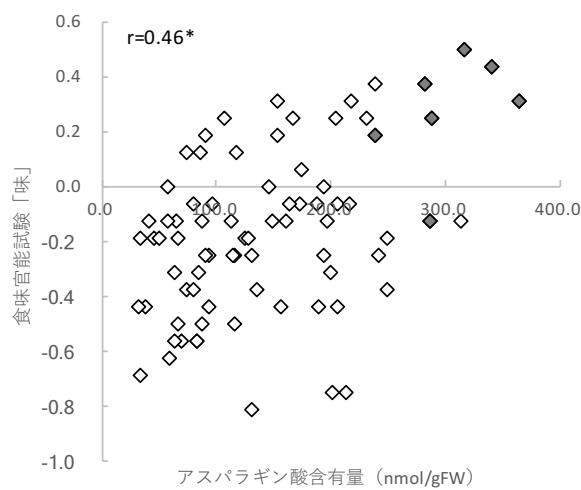


図10 炊飯米のアスパラギン酸含有量と食味官能試験「味」の関係
2008年産米78サンプル
*: 5%水準で有意
灰色のシンボルは「つや姫」

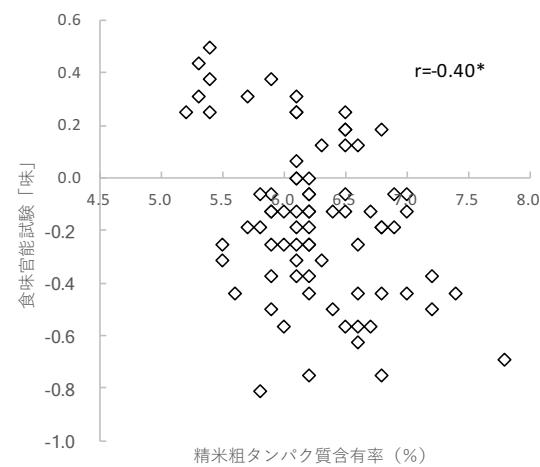


図11 精米の粗タンパク含有率と食味官能試験「味」の関係
2008年産米78サンプル
*: 5%水準で有意

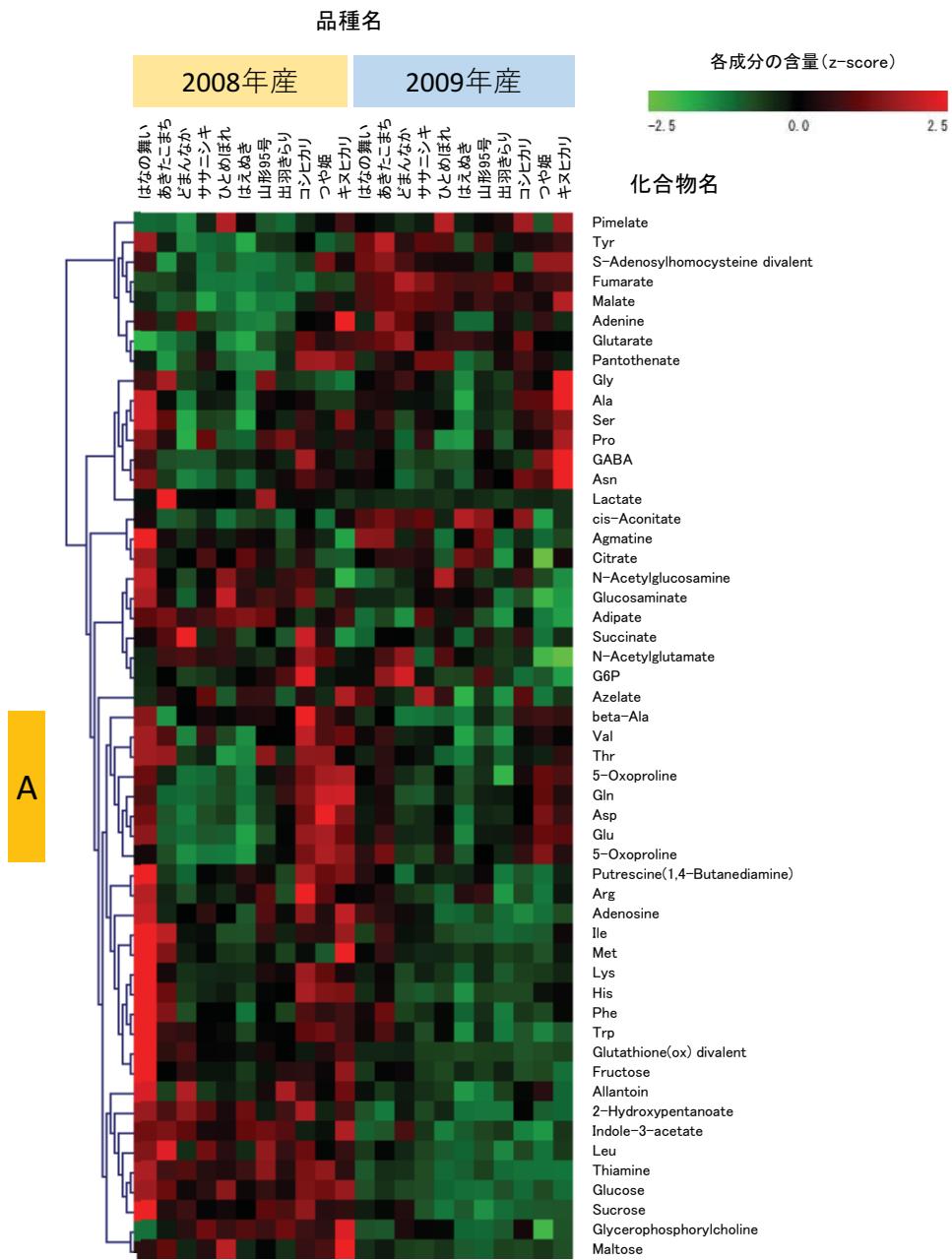


図 12 炊飯米の化合物組成の品種間差

A は、低分子化合物組成の類似性で 53 化合物を分類したクラスタのうち、「味」に正の相関のある化合物が形成したクラスタ

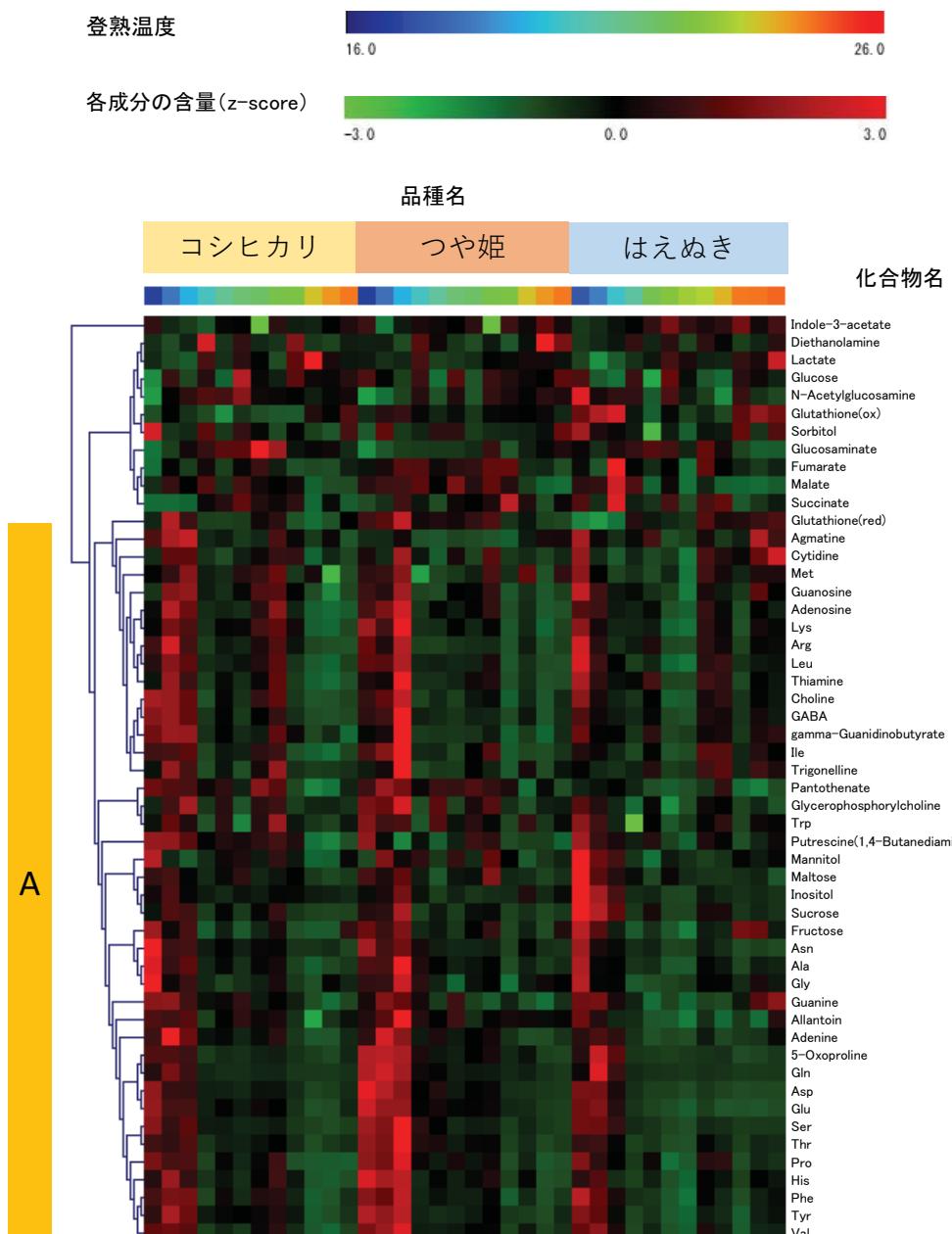


図 13 登熟温度が異なるサンプルの低分子化合物組成

A は、低分子化合物組成の類似性で 52 化合物を分類したクラスタのうち、登熟温度が低下すると含量が増加する傾向のある化合物のクラスタ

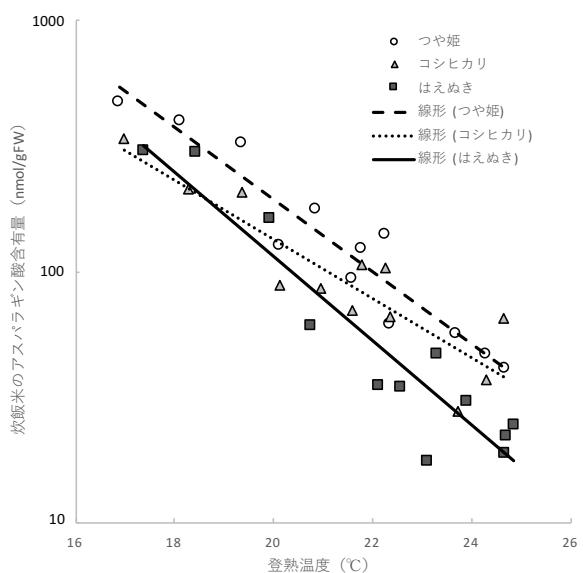


図14 登熟温度と炊飯米のアスパラギン酸含有量の関係
登熟温度：出穂期から成熟期の日平均気温の平均値

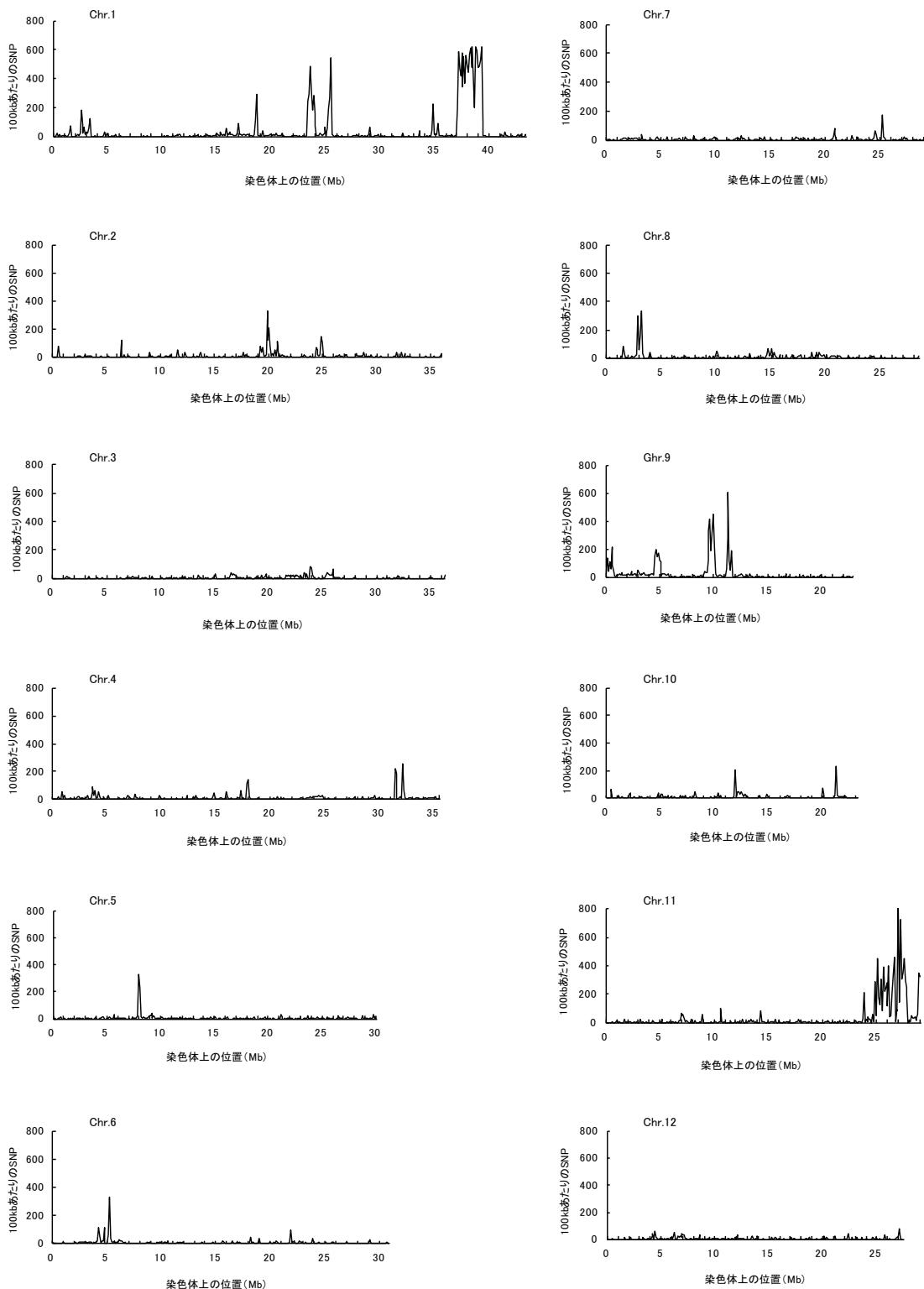


図 15 「つや姫」 - 「コシヒカリ」 間の染色体上の SNP 頻度

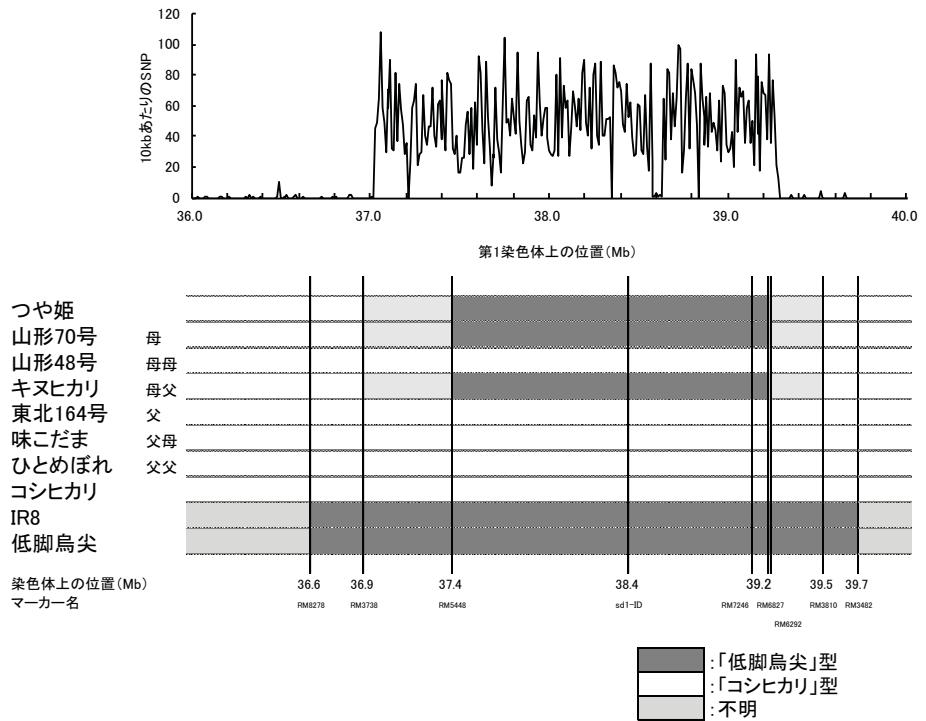


図16 第1染色体のSNP頻度と染色体断片の由来
下図の縦線はDNAマーカーの位置

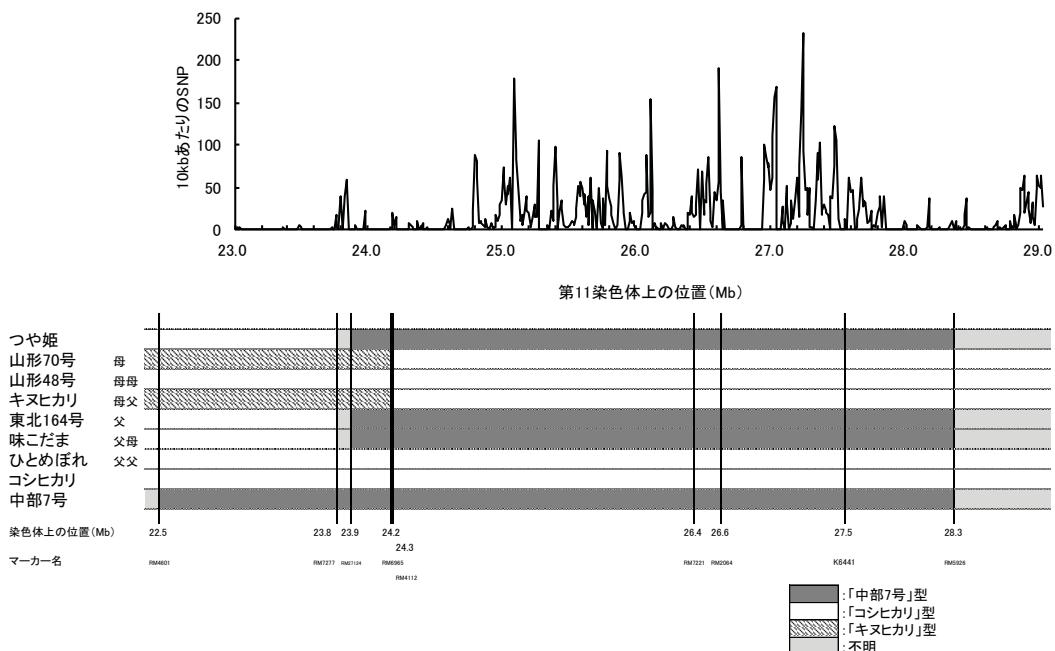


図17 第11染色体のSNP頻度と染色体断片の由来
下図の縦線はDNAマーカーの位置

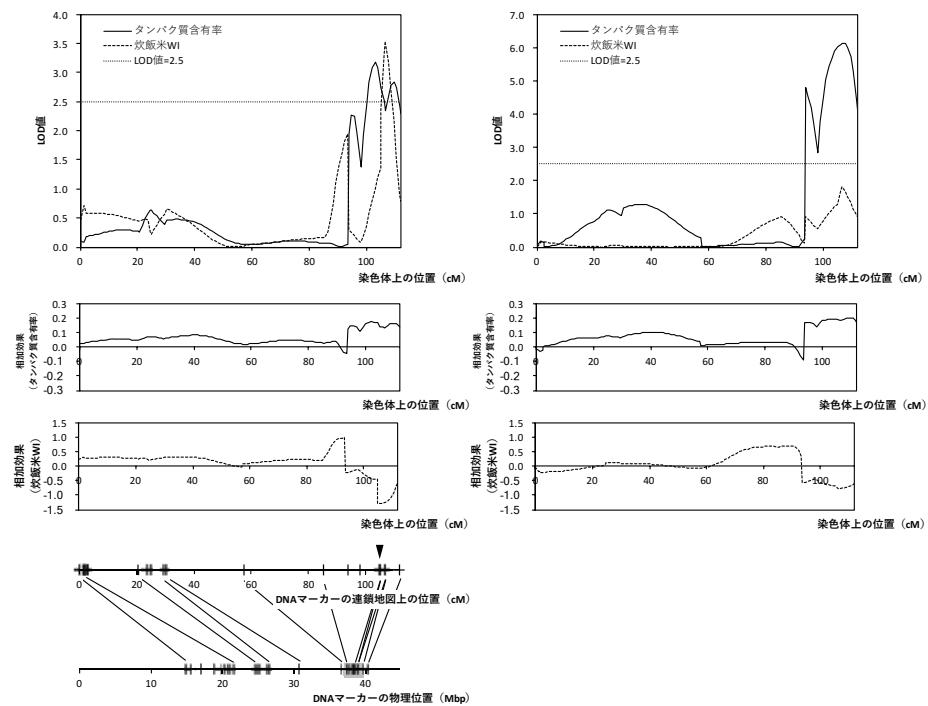


図19 第1染色体のタンパク質含有率および炊飯米WRIに関するQTL解析結果
左は2014年、右は2015年の結果

最下図の網掛けはインディカ品種（IR8）由来と推定される領域
図中黒塗り三角は sdl の座乗位置を示す

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名	後藤 元
審査委員	主査：教授 西尾 剛 副査：教授 高橋 英樹 教授 南條 正巳
学位論題	新規食味評価手法を用いた水筒品種「つや姫」の遺伝解析

論文審査の結果の要旨

米の食味は、硬さや粘りなどの物理的な特性が重視され、これに大きく影響するアミロース含量が、イネ育種系統の重要な選抜指標となってきた。一方、成分特性による味や、目で感じる白さの評価は、ペネラーによる官能試験で行われてきた。官能試験は、多量の米を必要とし、労力もかかることから、育種系統の選抜に利用するのは困難である。本研究は、これら特性を評価する手法を開発し、それらに優れる品種「つや姫」を用いて実施された。

炊飯米の白さは食味評価に影響する重要な特性であるが、その評価法はなかつた。本研究では、炊飯米を成形したサンプルを分光測色計で測定し、WI値を指標として、官能試験による白さの評価に代替できることを明らかにした。味度メーターのサンプルで炊飯米に代替できることも示した。さらに、炊飯米が白い「つや姫」は、白さが低い「はえぬき」に比べて、青色光の反射

率が高く、黄色光の反射率が低いことを見出した。炊飯米 78 サンプルに含まれる低分子化合物をメタボローム解析技術で一斉分析し、クラスター分析を行った結果、食味官能試験で味に優れるサンプルは、グルタミン酸やアスパラギン酸が多く、他の化合物が少ないことがわかった。主成分分析により、アスパラギン酸の多寡が大きく関わる第 3 主成分が味と相関が高いことがわかった。タンパク質含有率は味とは負の相関が見られた「つや姫」の炊飯米はアスパラギン酸やグルタミン酸を多く含むが、それらの含量は登熟温度の影響を受け、登熟温度が低下すると、アスパラギン酸含有率が増加することがわかつた。

「つや姫」の全ゲノム塩基配列を決定し、「コシヒカリ」と比較して、第 1 染色体長腕と第 11 染色体長腕に SNP 頻度が高い領域があることを見出した。その第 1 染色体長腕領域は、半矮性に開わる *sdl* を含む領域であり、第 11 染色体長腕領域は、いともち病抵抗性遺伝子の *Pik-m* を含む領域であった。炊飯米の白さや、アスパラギン酸、グルタミン酸の含量の QTL は、第 1 染色体長腕領域に検出された。いずれも「つや姫」型が低下させることがわかったため、その第 1 染色体長腕領域をジャポニカ品種の *sdl* 変異に置換することで、さらには優れた食味を持つ品種を育成できる可能性が示唆された。

以上のように本研究は、炊飯米の白さや味の新たな評価法を開発してイネ育種の効率化を図り、「つや姫」のゲノム塩基配列を解読してその良食味特性に関わる遺伝子座を明らかにしたもので、その農学上の貢献が大きい。審査員一同は、本論文は博士の学位を授与するに値する内容であると判定した。