

<平成 28 年度助成>

日本人の食嗜好に最適化した水稲品種「つや姫」の 良食味ファインチューニング

星野 友紀

(山形大学 農学部食料生命環境学科)

研究背景・目的

近年の自由貿易の加速化により、日本における食品生産の維持は、非常に困難であると予想される。日本の食品生産が生き残るためには、海外のような大規模栽培や大量加工による大量流通のモノマネではなく、日本にしかできない、きめ細やかな独自の対策が必要である。本研究は、その解決策の一つとして、日本産食品の代表格であるコメに着目し、世界的に最も食嗜好に敏感な日本人の嗜好能力を生かし、日本人の食嗜好に最適化したコメの改良、つまり「コメの良食味ファインチューニング」を提案する。

山形県で育成された水稲品種「つや姫」は、良食味ブランド米として知られ、日本穀物検定協会が実施する官能食味ランキングで、平成 28 年まで 7 年連続で最高ランク「特 A」評価を受け続けている (<http://www.kokken.or.jp>)。これまでの米の嗜好に関する研究により、米のおいしさは、デンプンの構成成分であるアミロースと、タンパク質および水分の 3 つの含量比率で決定されることが知られている。米の嗜好を判定する官能食味試験の結果、「つや姫」は日本のブランド米の元祖である「コシヒカリ」と比べて食嗜好スコアが高く、より良食味であると判定されているが、その理由は明確ではない。少なくとも、これまで常識であった食味に関する 3 つの成分については、「つや姫」と「コシヒカリ」でほぼ同等な値を示しており、「つや姫」の良食味を決定する第 4 のファクターについて、その解明が期待されている。

本研究では、いまだ明らかではない「つや姫」の良食味を支配する第 4 のファクターについては、あえて標的とせず維持したまま、「つや姫」を対象に非遺伝子組み換え法を用いて人工的にデンプン代謝を操ることで、「つや姫」の良食味をさらに強化することを目指す。「つや姫」の良食味は維持しつつ、デンプン代謝をピンポイントで改良するために、「つや姫」を遺伝背景とする突然変異集団を構築し、その集団からさらなる良食味に有用な変異アレルを見つけ出すことが有効であると考えられる。本研究では、変異アレルの探索法として、より現実的な品種改良を行うために、遺伝子組み換えによらない Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING) 法を導入し、デンプン代謝に関する突然変異体の探索を行った。デンプン代謝に関与する遺伝子^{1,2)}の突然変異体を網羅的に単離し、白米中のアミロース含量をファインチューニングすることによって、日本人の食嗜好に最適化された「つや姫」の良食味強化の可能性について議論したい。

材料および方法

・新規な「つや姫」突然変異集団の構築

山形大学農学部附属やまがたフィールド科学センターの圃場において、エチルメタンスルホン酸 (EMS) とジエポキシブタン (DEB) 処理を施した突然変異 M₂ 系統を栽培し、それぞれ合計で 4,529 と 4,326 系統の個別の DNA と突然変異体種子からなる新規な突然変異体ライブラリーを構築した (図 1)。

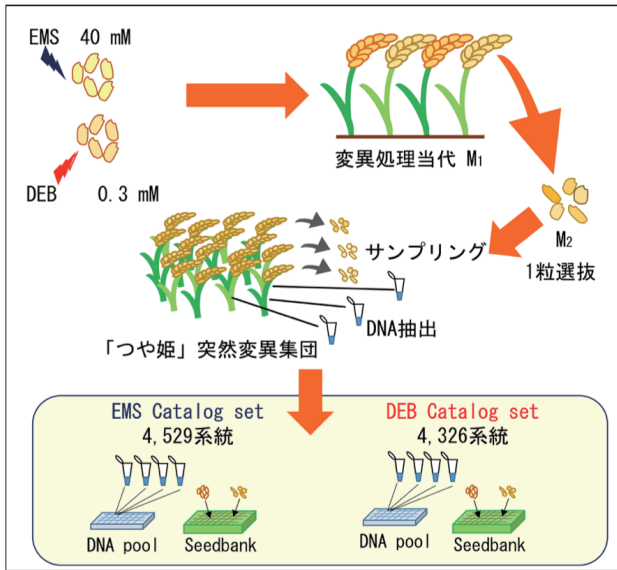


図1 つや姫突然変異集団の構築

・ TILLING 法によるデンプン代謝突然変異体の単離

本研究では、遺伝子組み換えに頼らずに、より現実的に新たな食料開発を目指すために、突然変異集団から DNA レベルで変異を検出することが可能な TILLING 法を導入し、アガロース電気泳動法、あるいは高解像度融解曲線分析 (AriaMx, Agilent Technologies) により塩基置換の検出を行った(図2)^{3,4)}。

新規に作出した「つや姫」突然変異集団群を対象に、食味に関係するアミロース含量を司る遺伝子として知られる *Os06g0133000* (*GBSSI*) と *Os09g0252700*²⁾ について、網羅的に突然変異体を

単離した。得られた変異体候補についてシーケンス解析を行い、変異の生じた部位を特定した。

・ デンプン代謝突然変異体の食味値評価とその要因メカニズムの解明

TILLING 法で得られた突然変異体群について、イネの食味に強く関与するアミロース含量の定量を行った。また、アミロース含量の低下メカニズムを解明するために、定量的リアルタイム RT-PCR (AriaMx, Agilent Technologies) によって、*GBSSI* 遺伝子の発現量を比較した。また、ウエスタンブロット法⁵⁾を用いて、野生型と突然変異体における *GBSSI* タンパク質の定量解析を行った。

結果および考察

「つや姫」の良食味をファインチューニングする遺伝資源の獲得を目指し、*Os06g0133000* と *Os09g0252700* 遺伝子を標的に突然変異体を探索した結果、全て1塩基置換を有する突然変異体が、EMS 集団から 39 系統、DEB 集団から 10 系統単離された(表1)。興味深いことに、EMS から見出された変異は、39 系統中 35 系統でトランジション変異であったのに対して、DEB から見出された変異は、10 系統中 9 系統でトランバージョン変異であった。本研究で用いた2種類の変異源は、DNA の変異

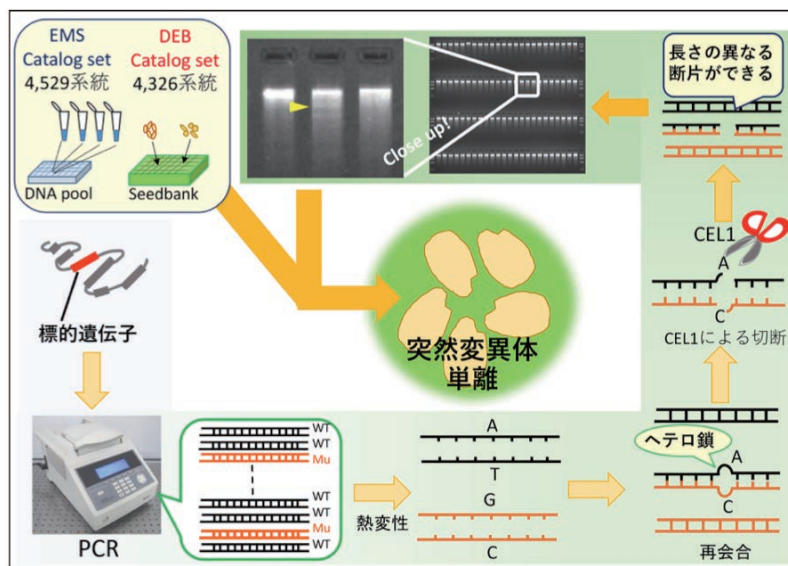


図2 TILLING 法の概略図

表 1 EMS および DEB 突然変異集団から得られた突然変異体と変異パターンの比較

	Gene		Line		Position														
	Gene	Line	Line	Position	Line	Position													
EMS	<i>Os06g0133000</i>	Tya16-2663	G285T	Tya16-3813	C→T														
		Tya16-3219	G285T	Tya16-2214	C801T														
		Tya16-4400	C→T	Tya16-4589	C801T														
		Tya16-0104	A→G	Tya16-1831	G1487A														
		Tya16-1051	G→A	Tya16-2707	C→T														
		Tya16-3379	C660A	Tya16-3641	T→C														
		Tya16-2056	C626T																
		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>トランジション</th> <th>トランスバージョン</th> <th>total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>EMS</td> <td>35系統</td> <td>4系統</td> <td>39系統</td> </tr> <tr> <td>DEB</td> <td>1系統</td> <td>9系統</td> <td>10系統</td> </tr> </tbody> </table>							トランジション	トランスバージョン	total	EMS	35系統	4系統	39系統	DEB	1系統	9系統	10系統
			トランジション	トランスバージョン	total														
		EMS	35系統	4系統	39系統														
		DEB	1系統	9系統	10系統														
		EMS	<i>Os09g0252700</i>	Tya16-0254	G→A	Tya16-3708	T8667G												
				Tya16-0314	G→A	Tya16-0016	G9933A												
				Tya16-1460	G→A	Tya16-3590	G9948A												
				Tya16-4412	G→A	Tya16-1061	G9948A												
Tya16-2684	C2636A			Tya16-1957	C→T														
Tya16-2097	C3026T			Tya16-2001	C→T														
Tya16-1648	C416T			Tya16-3114	C10187T														
Tya16-3833	G1968A			Tya16-3423	C→T														
Tya16-3708	C2198T			Tya16-1256	C→T														
Tya16-2952	C5279T			Tya16-1405	C→T														
Tya16-2992	C5723T			Tya16-2533	C→T														
Tya16-4604	A6270G			Tya16-0900	G3847A														
Tya16-3653	C7276T			Tya16-1100	G3950A														
Tya16-0143	C7389T			Tya16-2574	G4009A														
Tya16-0117	C7456T			Tya16-2730	G4012A														
Tya16-0809	G8112A	Tya16-0375	G4479A																
Tya16-3860	G8207A																		
DEB	<i>Os06g0133000</i>	Tya14-0767	T362A																
		Tya14-1373	T362A																
		Tya14-0699	A154T																
		Tya15-1694	A154T																
		Tya14-1478	T675A																
		Tya14-1411	A→T																
		Tya14-1433	T→A																
DEB	<i>Os09g0252700</i>	Tya14-0456	T3707A																
		Tya14-0892	A7354T																
		Tya14-1216	A7688T																
		Tya14-1192	A→T																
		Tya15-0512	A→T																
		Tya14-0040	A15691G																

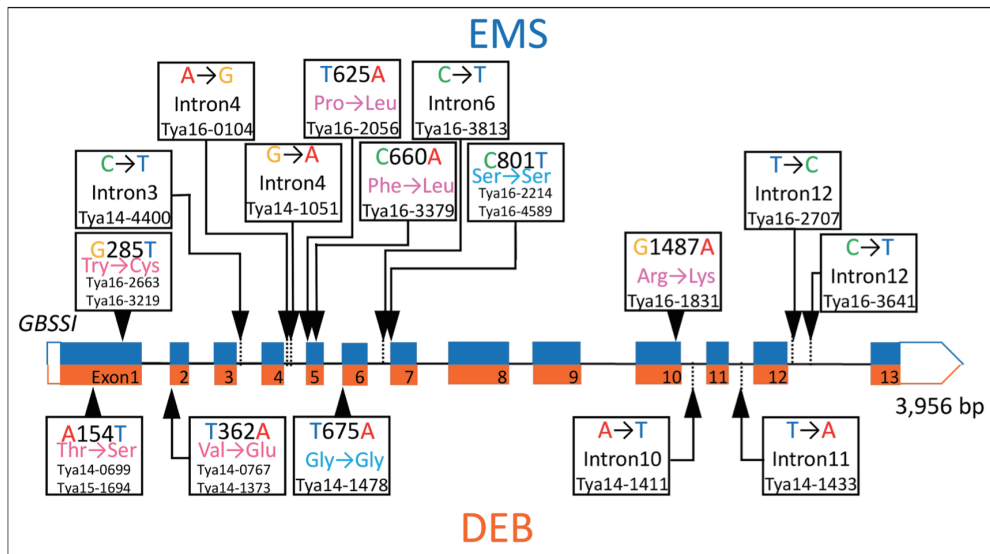


図 3 EMS および DEB 突然変異集団から得られた *GBSSI* 突然変異体

様式に異なる作用点を持ち、いずれの変異源においても、遺伝子機能に影響を及ぼすことが予想される非同義置換変異を生じさせることが明らかとなり、本研究で作出した「つや姫」突然変異集団の有効性が示された。

Os06g0133000 (*GBSSI*) 遺伝子では、EMS 変異集団から独立した 11 系統の突然変異体を得られ、

そのうち 5 系統ではエキソン内に 1 塩基置換を有しており、そのうち 4 系統で非同義置換が確認された (図 3)。一方、DEB 変異集団からは、独立した 5 系統の突然変異体を得られ、そのうち 3 系統ではエキソン内に 1 塩基置換を有しており、そのうち 2 系統で非同義置換が確認された (図 3)。これらの突然変異体では、*GBSSI* タンパク質の構造が変化するこ

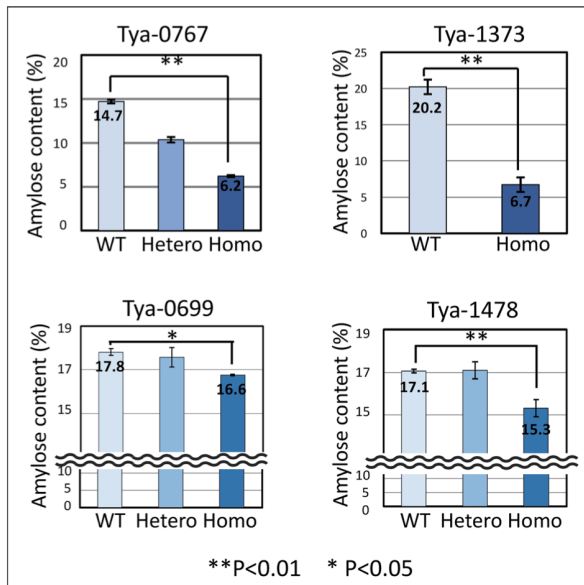


図4 GBSSI 突然変異体における白米中のアミロース含有率

とにより、酵素活性が低下し、アミロース含量の低下が予想される。そこで、先行して得られた DEB 由来の突然変異体を対象に、食味形質に係するアミロース含量を測定した。

白米中のアミロース含量を測定した結果、非同義置換変異体 Tya-0767、-1373、および -0699 のアミロース含有率は、野生型が平均 18.4% 対して、変異体は 6.2%、6.7%、および 16.6% と、有意に低下していた (図 4)。GBSSI 遺伝子の機能が消滅するとアミロース含有率は 0% になることから、今回得られた突然変異体は、アミノ酸置換によって遺伝子機能が一部低下したことにより、アミロース含有率が低下したと考えられる。さらに、いずれの変異体においてもアミノ酸置換は生じているが、アミロース含有率の低下に系統間差が認められたことから、GBSSI 遺伝子における突然変異の生じる部位、あるいは突然変異の形態によって、様々なアミロース含量を示す突然変異体を取得できることが示された。

一方、同義置換変異体 Tya-1478 では、興味深いことに、野生型のアミロース含有率 17.1% と比較し、変異体で 15.3% と有意に低下した (図 4)。アミロース含有率の決定には、GBSSI 遺伝子の発現量やタンパク質量が影響を与えることが知られているため¹⁾、同義置換変異体 Tya-1478 におけるアミロース含有率低下の原因を探るために、塩基配列解析および遺

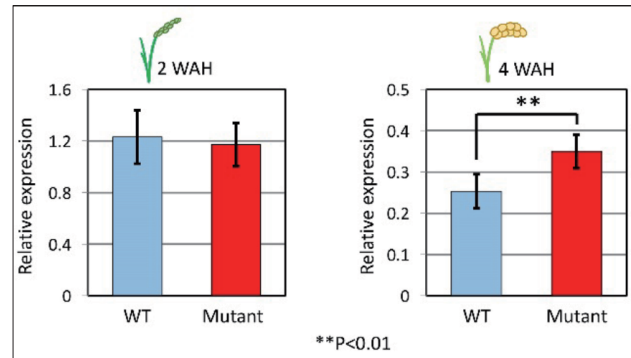


図5 野生型と同義置換変異体 Tya-1478 における GBSSI 遺伝子の発現量の比較

伝子発現解析を行った。

塩基配列解析の結果、野生型と変異体の cDNA 配列に違いはなかった (結果省略)。発現解析の結果、同義置換変異体 Tya-1478 における GBSSI 遺伝子の発現量は、出穂 2 週後では変化がなかったものの、出穂 4 週後の胚乳において、野生型と比較して有意に増加していた (図 5)。

これらの結果より、同義置換変異体におけるアミロース含有率の低下は、1 塩基置換によって生じた翻訳効率の低下に起因することが推察された。出穂 4 週後に認められた GBSSI 遺伝子の発現量の増加は、1 塩基置換によって生じた翻訳効率の低下により、正のフィードバック調節が働いていることが原因ではないかと考え、同義置換変異体 Tya-1478 における GBSSI タンパク質の定量を行った。

ウエスタンブロット解析の結果、野生型と同義置換変異体 Tya-1478 の GBSSI タンパク質量に明確な差は認められなかった (図 6)。本変異体は、野生型

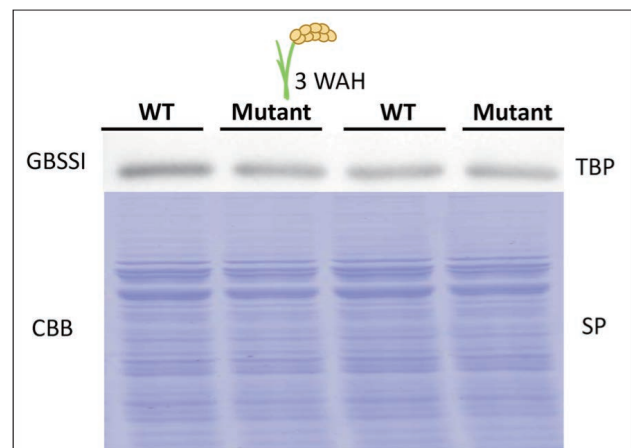


図6 野生型と同義置換変異体 Tya-1478 における GBSSI タンパク質量の比較

と比較して、アミロース含量が約2%低下しており(図4)、その差が非常に小さいため、仮に我々の仮説が正しかったとしても、ウエスタンプロット解析での定量は難しかったのかもしれない。今後は、より詳細な定量解析を行うことで、我々の仮説の正誤を検証する必要がある。

まとめ

山形県で育成された水稻品種「つや姫」は、安定収量かつ高品質で、粒ぞろいや炊飯米の光沢、食味など、「コシヒカリ」を上回る優良な形質を有している。アミロースは、炊飯米の食味特性に関与しており、その含有率が低下すると炊飯米に柔らかさや強い粘りをもたらし、高い食味値を示すことが知られている。つまり、「つや姫」のアミロース含有率を人為的に低下させることによって、さらなる食味評価の向上が期待できると考えられる。そこで本研究では、「つや姫」の優良形質は維持しつつ、「つや姫」のさらなる良食味化を目指し、遺伝子組み換え技術に頼らない逆遺伝学的手法として TILLING 法を採用し、新規な変異アリルを探索した。本研究において、「つや姫」を遺伝背景とした *GBSSI* 遺伝子の新規変異アリルによって、「つや姫」白米のアミロース含有率のバリエーションを増大できることが示された。本研究で得られたこれら新規な変異アリルは、遺伝子組み換えで得られたものではないため、即座に品種改良に利用可能である。これら有用な変異アリルは、日本人の食嗜好に最適化した「つや姫」食味評価向上のためのファインチューニングによって、貴重な遺伝資源になると考えられる。今後は、本研究で得られた有用アリルを、実際の品種改良に利用することにより、「つや姫」のさらなる食味強化を実現させたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、貴重な研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団および関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。また、GBSSI タンパク質の抗体は、秋田県立大学の藤田直子教授に分与いただきました。ここに深く御礼申し上げます。本研究データは、山形大学大学院農学研究科修士課程2年の川上珠恵さんによって実施されました。また、山形大学大学院農学研究科修士課程1年の飯島信繁さん、山形大学農学部4年の畑昌和さんには研究補助として本研究に参画いただきました。ここに御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Isshiki M, Morino K, Nakajima M, Okagaki RJ, Wessler SR, Izawa T, Shimamoto K. (1998) A naturally occurring functional allele of the rice waxy locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron. *Plant J.* 15:133-138.
- 2) 阿部陽、高木宏樹、宇津志博恵、八重樫弘樹、菊池秀子、小笠原由美子、植村亜衣子、川代奈恵、寺内良平 (2015) MutMap 法を用いたイネ胚乳アミロース含量に関与する新奇遺伝子の単離. *育種学研究* 17(別2):123
- 3) Hoshino T, Takagi Y, Anai T. (2010) Novel *GmFAD2-1b* mutant alleles created by reverse genetics induced marked elevation of oleic acid content in soybean seeds in combination with *GmFAD2-1a* mutant alleles. *Breed. Sci.* 60: 419-425.
- 4) Hoshino T, Watanabe S, Takagi Y, Anai T. (2014) A novel *GmFAD3-2a* mutant allele developed through TILLING reduces α -linolenic acid content in soybean seed oil. *Breed. Sci.* 64: 371-377.
- 5) Fujita N, Yoshida Y, Asakura N, Ohdan T, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y (2006) Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol.* 140:1070-1084.

Development of the 'Tsuyahime' mutant libraries and isolation of starch biosynthetic mutants using a reverse genetics approach for the enhancement of rice eating quality

Tomoki Hoshino

Department of Food, Life and Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Yamagata University

'Tsuyahime' rice has been cultivated with care in Yamagata Prefecture over the course of 10 years, with the aim of rivaling Koshihikari as the quintessential Japanese rice brand. Tsuyahime's most characteristic feature is its delicious taste. The Japan Grain Inspection Association, which conducts evaluations of rice taste, found 'Tsuyahime' to be glossy, even-grained, and delectable in its flavor examination. Amylose content is widely recognized as an important determinant of rice eating quality, because it reflects the functionality of the rice grain's starch. It is thought that an enhancement of rice eating quality can be expected by reducing the amylose content of 'Tsuyahime'. In this study, we developed EMS and DEB-treated 'Tsuyahime' mutant libraries, and isolated starch biosynthetic mutants using a reverse genetics method, Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING). Because the Granule-Bound Starch Synthase I (GBSSI) enzyme is required for amylose synthesis in rice, we targeted a *GBSSI* gene for enhancement of 'Tsuyahime' eating quality. We identified 16 independent mutations within the *GBSSI* gene in the 'Tsuyahime' background from 8,855 M₂ plants by TILLING screening. Since there were missense mutations, inducing amino acid substitutions among those mutants, we expected that they would influence enzyme activity. To clarify the contributions of the missense mutant alleles to the amylose content in rice grains, we determined the amylose content of these mutants. By using novel *GBSSI* mutant alleles, we successfully generated 'Tsuyahime' with variations in amylose content (6-17%). The reverse genetics approach employed in this study offers both a non-transgenic alternative for the efficient generation of novel genetic resources and perfect markers for conventional breeding programs. In future studies, we would like to make enhancements of the eating quality of 'Tsuyahime' using these novel *GBSSI* mutant alleles.