

# 高温登熟耐性イネのオンデマンド作出技術の開発

新潟大学 農学部

三ツ井 敏明

地球温暖化は疑う余地はない。国際協調の枠組みの中で温室効果ガス排出量の削減が行われようとしているが、しばらくは温室効果ガス濃度の高まりは続くため、温暖化が進むと予測されている。地球温暖化によって様々な気候変動が引き起こされ、干ばつや巨大化した台風による塩害の多発も大きな問題となっている。我が国においては、特に夏場の猛暑により、新潟県等の良食味米・高品質米の生産地でも一等米比率が激減する問題が生じている。一等米比率の低下は米生産農家の収入減にとどまらず、長期的には産地のブランドイメージを損ないかねないことから、今後もより厳しくなる異常高温への対応は最重要課題の1つとなっている<sup>1)</sup>。

玄米の外観品質はその市場価格に大きく影響する。粒食用途のうるち玄米で好まれる整粒（完全粒）は豊満で左右・上下均整の取れた形で、全体が透明で表面に光沢を持つ。様々な環境要因、特に、登熟期に高温ストレスを受けると白濁粒や胴割れ粒といった不完全粒が多発する。玄米の白濁化の発生は、様々な因子が複雑に絡み合っただけでなく、最終的には澱粉合成・分解のバランス異常によるものであると考えられる。我々は、生物化学、分子細胞生物学、応用糖質科学、植物生理学、作物学、環境農学等、様々な観点から高温登熟による玄米白濁化メカニズムの研究を行い、澱粉分解酵素  $\alpha$ -アミラーゼが玄米の白濁化そして品質低下の主要因子の1つであることを明らかにした<sup>2-4)</sup>。

これまでに環境ストレス（乾燥ストレス、高温・高CO<sub>2</sub>ストレス等）下における様々なイネ品種の栽培を行い、それらの応答性を調べてきた。その結果、調査したイネの中で酒米品種は環境ストレスに弱く、特徴的な応答をすることが分かった。このようなことから、高温登熟耐性イネの開発の材料として酒米品種を選んだ。本研究課題では、澱粉の生合成・分解のバランスを制御するという戦略によって高温登熟耐性酒米の開発を進めた。

## 実験方法

$\alpha$ -アミラーゼの働きを強める強発現体では、平温条件でも厳しい玄米の白濁化が発生した。一方、 $\alpha$ -アミラーゼの働きを弱めた発現抑制体では、高温登熟による白濁化を顕著に軽減できることが示された。このようなことから、 $\alpha$ -アミラーゼの発現制御が高温登熟性の改善のための1つの戦略であると考えられる。しか

し、 $\alpha$ -アミラーゼは様々な生理機能、特に種子発芽に無くてはならない役割を果たす<sup>5)</sup>。したがって、我々は登熟期における $\alpha$ -アミラーゼ発現のファインコントロールを試みた。

イネの第7染色体長腕部に存在する休眠関連遺伝子 *Seed dormancy 4* (*Sdr4*) が杉本ら<sup>6)</sup> によって見いだされた。*Sdr4* 遺伝子は、イネ子実の登熟に関わる転写因子をコードする *OsVP1* 遺伝子の下流にあり、さらに下流に休眠に関わる転写因子 *OsDOG1L* を刺激する。*OsDOG1L* は活性型ジベレリン合成に関わる *OsGA20ox-1* の発現を抑制し、ジベレリンによって誘導される $\alpha$ -アミラーゼ発現を低下させる (図1)。*Sdr4* 遺伝子には日本晴型の *Sdr4-n* とカサラス型の *Sdr4-k* の対立遺伝子が存在し、*Sdr4-k* を導入した日本晴では穂発芽耐性が向上する。本研究においては、 $\alpha$ -アミラーゼ発現を押さえ、深い休眠性をもたらす *Sdr4-k* 遺伝子を酒米品種 (越淡麗および五百万石) に導入し、栽培特性や醸造特性への効果を評価した。

#### 【酒米への *Sdr4-k* 導入】

*Sdr4-k* 遺伝子の酒米への導入は戻し交配育種法とマーカー選抜・迅速世代促進技術<sup>7,8)</sup> を駆使して行った。交配は、コシヒカリ *Sdr4-k*(NIL)<sup>9)</sup> を花粉親とし、酒米品種 (越淡麗, 五百万石) と掛け合わせた。交配は親同士の交配を1回、戻し交配を3回、自家後代を3回の計7回行い、BC3F3 世代以降の種子を *Sdr4-k* 導入系統 (越淡麗 *Sdr4-k*, 五百万石 *Sdr4-k*) とした。

#### 【越淡麗 *Sdr4-k* および五百万石 *Sdr4-k* の栽培特性と醸造特性の解析】

越淡麗 *Sdr4-k*, 五百万石 *Sdr4-k* およびそれぞれの母本を圃場あるいはバイオトロンを用いて出穂後に平温区 (明/暗: 26°C/23°C) と高温区 (明/暗: 30°C/26°C) で栽培した。基本的農業パラメーターとして、草丈 (全長), 稈長, 穂長, 穂数, 全粒重, 出穂日を測定した。玄米外観品質・整粒率は、サタケ穀粒判別器と目視により測定した。穂発芽検定は、開花後6週間の穂サンプルを用いて実施した。醸造特性解析は、各酒米サンプルの蒸し米消化性, 発酵性, 酒成分分析および官能試験を実施した。

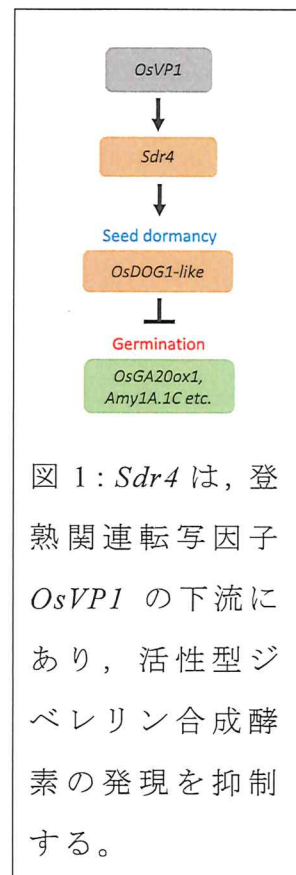


図1: *Sdr4* は、登熟関連転写因子 *OsVP1* の下流にあり、活性型ジベレリン合成酵素の発現を抑制する。

### 【越淡麗 Sdr4-k および五百万石 Sdr4-k の遺伝子発現解析】

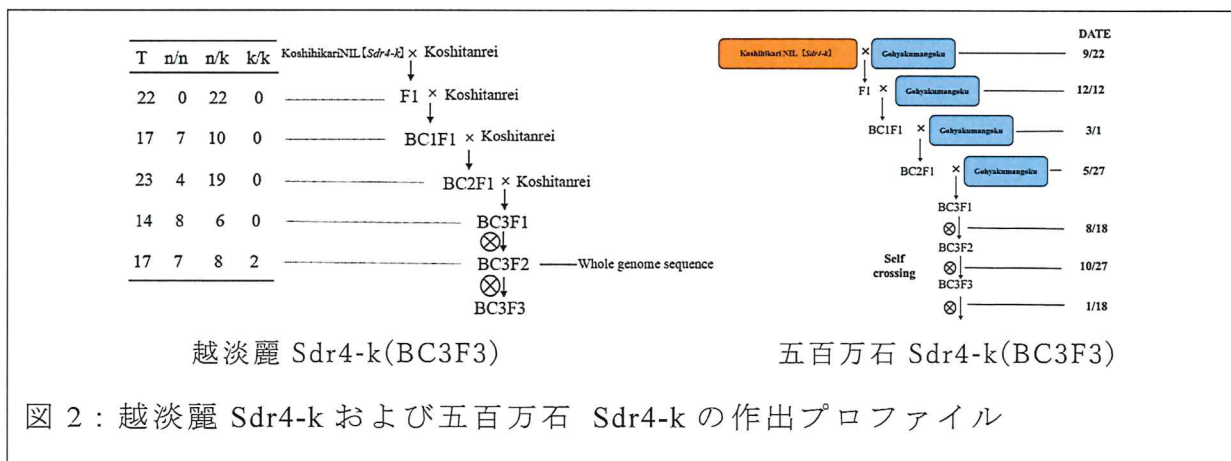
各試験区のそれぞれの品種の開花後 10 日および 20 日の登熟種子をサンプリングし、澱粉代謝関連遺伝子 (*GBSSI*, *BEI1b*, *Amy1A*, *Amy1C*, *Amy3E* 等) の発現解析をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。

### 結果と考察

#### 【越淡麗 Sdr4-k および五百万石 Sdr4-k の作出】

コシヒカリ NIL【Sdr4-k】と越淡麗の掛け合わせによって得られた F1 に、母系となる越淡麗を 3 回戻し交配することで、最終的には 2 個体の越淡麗 Sdr4-k (BC3F3 (k/k))を得た。全ゲノム配列解析から、第 7 染色体に *Sdr4-k* 遺伝子が存在し、全ゲノム配列の 90%以上が越淡麗由来であることを確認した。

五百万石 Sdr4-k についても、コシヒカリ NIL【Sdr4-k】を父、五百万石を母とし、交配を 1 回、戻し交配を 3 回、自家後代を 3 回行い、BC3F3(k/k) 13 個体を作成した。迅速世代促進技術によりイネのライフサイクルを短縮させ、1 回のライフサイクルを平均 81 日間まで短縮することができた (図 2)。加えて、迅速世代促進技術によって作出された系統は圃場栽培において何ら支障は見いだされず、本技術が有用であるものと判断された。



#### 【越淡麗 Sdr4-k および五百万石 Sdr4-k の栽培特性】

越淡麗 Sdr4-k および五百万石 Sdr4-k を刈羽村圃場において栽培した。出穂期に 35°Cを超える日が数日あった他は平年並みという気象条件で草丈 (全長)、稈長、穂長、穂数、全粒重、出穂日を測定した (表 1)。五百万石 Sdr4-k では、開



花日の異なる 2 つの形質が見られ、開花日が早い形質を持つ五百万石 Sdr4-k を五百万石 Sdr4-k\_early, 遅い形質を持つ五百万石 Sdr4-k を五百万石 Sdr4-k\_late と表記した。開花日以外の形質では、*Sdr4-k* 導入によって稈長に有意な差が見られた。越淡麗 Sdr4-k, 五百万石 Sdr4-k\_late では母本 (WT) よりも稈長が 10cm 程度長くなった。その他の穂長, 穂数, 全粒重には有意な差は見られなかった。

資料名	草丈 (cm)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数	全粒重 (g)	開花日
越淡麗	133.8	107.4	24.5	23.2	86.9	8/1,2
越淡麗Sdr4-k	142.1	*117.3	24.1	25.8	77.3	8/1,2
五百万石	116.6	92.6	24	18.3	69.3	7/16-18
五百万石Sdr4-k_early	119.5	95.4	24.2	20	n.d	7/16-18
五百万石Sdr4-k_late	**132.7	**105.8	24.3	20.8	79.5	8/1,2

表 1 : 越淡麗 Sdr4-k および五百万石 Sdr4-k の農業形質の比較  
 \* P < 0.05%, \*\* P < 0.01% (student t test), n = 4-5.

玄米品質調査は、整粒 (心白米), 整粒 (無心白米), 被害米の 3 つに大別し, 評価した。その結果, 越淡麗, 五百万石ともに *Sdr4-k* 導入による整粒率の大きな差は確認されなかったが, 整粒心白米 (perfect grain (white-core)) は *Sdr4-k* 導入によって増加した (図 3)。

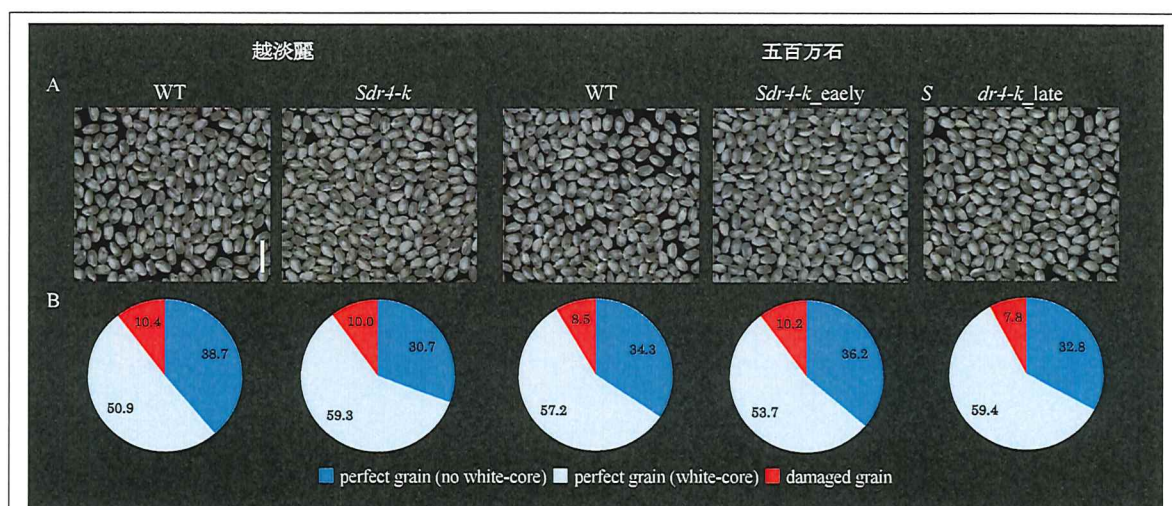
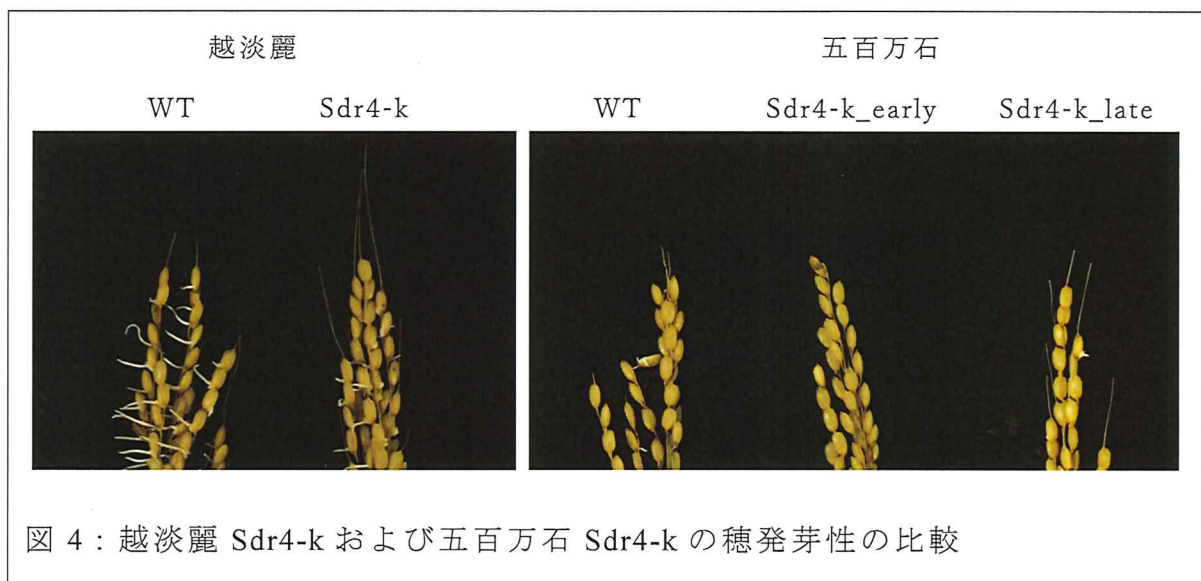


図 3 : 越淡麗 Sdr4-k および五百万石 Sdr4-k の玄米形質の比較

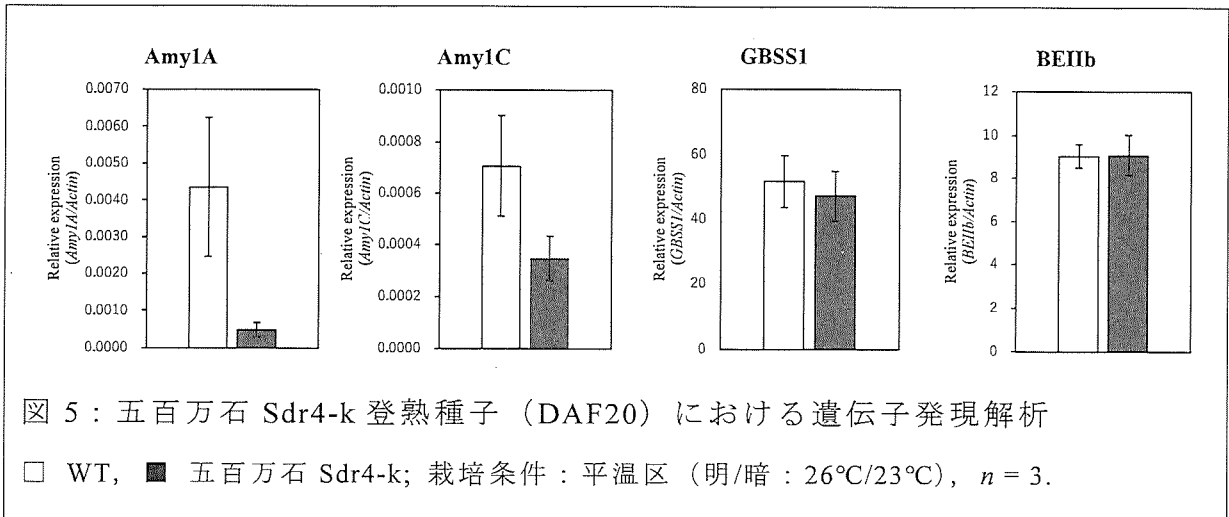
(A) 玄米外観 Bar = 1 cm. (B) 玄米品質 (%), n = 3.

種子の休眠性はイネを栽培する上で重要な形質の1つである。種子休眠が関わる農業形質の1つに穂発芽性が挙げられる。穂発芽した種子は品質が大きく下がってしまうため、穂発芽性は水稻育種の現場において重要な選抜項目の1つとして扱われている。今回の越淡麗，五百万石の穂発芽性は，越淡麗が”易”，五百万石が”中”と報告されている。本実験では越淡麗，越淡麗 Sdr4-k，五百万石，五百万石 Sdr4-k\_early，五百万石 Sdr4-k\_late の開花後6週間の穂サンプルを使用した。濡らしたキムワイプで覆うことで冠水状態を再現し，穂発芽の様子を観察した。その結果，越淡麗 Sdr4-k，五百万石 Sdr4-k\_early，五百万石 Sdr4-k\_late のいずれも穂発芽耐性の向上が見られた（図4）。越淡麗はWTが穂発芽性”易”のため穂発芽が多く見られたが，Sdr4-k導入によって穂発芽は抑えられた。五百万石はWTが穂発芽性”中”のためWTでの穂発芽もあまり見られなかったが，Sdr4-k導入による若干の穂発芽抑制が確認できた。

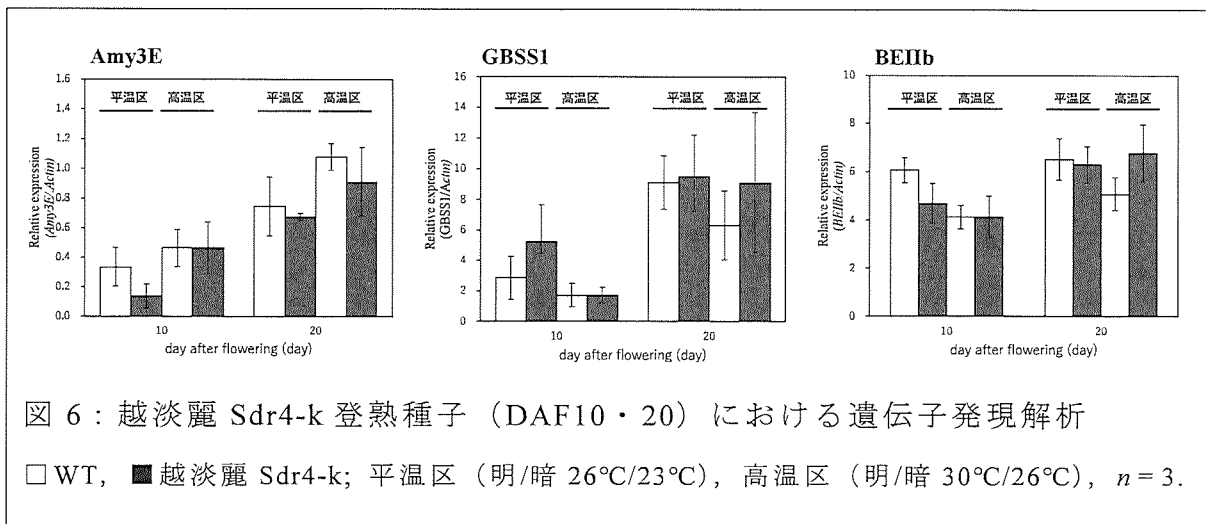


#### 【越淡麗 Sdr4-k および五百万石 Sdr4-k の遺伝子発現解析】

高温による米の品質低下は澱粉生合成・分解バランスの乱れが原因の1つであると考えられる。そこで Sdr4-k 導入による米品質の改善にも，澱粉生合成・分解関連遺伝子の変化が見られるかをグロースチャンバーを用いて解析した。五百万石 Sdr4-k の DAF20 の登熟種子においては， $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 *Amy1A* および *Amy1C* の発現が WT と比較して明らかに低かった。澱粉生合成関連酵素遺伝子 *GBSSI*，*BE1b* については顕著な違いは無かった。（図5）



越淡麗 Sdr4-k については平温区と高温区で処理し、DAF10 と DAF20 の登熟種子における遺伝子発現を調べた。高温区では高温ストレスで発現が誘導される熱ショックプロテイン *HSP22a* 遺伝子の顕著な発現誘導が確認された。統計的に有意な差は無いが、*Amy3E* は *Sdr4-k* 導入による発現減少傾向が見られ、*GBSS1* と *BE1b* では高温区 DAF20 において発現の増加傾向が見られた (図 6)。全体の傾向として、*Sdr4-k* 導入は澱粉生合成・分解バランスを正の方向に調節すると推察された。



### 【越淡麗 Sdr4-k および五百万石 Sdr4-k の醸造特性】

試験用精米機を用いて精米歩合 70%となるように精米した。測定の結果、玄米と白米ともに *Sdr4-k* 導入によって千粒重の微増が確認された。また、玄米外観品質は越淡麗、五百万石ともに *Sdr4-k* 導入で整粒率の微増を示し、特に五百万石では胴割歩合が 3 分の 1 に減少した。また、白米の吸水率は *Sdr4-k* 導入によ

って越淡麗ではやや減少，五百万石ではやや増加が確認された。(表 2)

表 2：越淡麗 Sdr4-k および五百万石 Sdr4-k の玄米・白米の品質と形質

試料名	玄米水分(%)	千粒重(g) 水分15%換算	外観品質			試料名	白米水分(%)	千粒重	白米外観	
			整粒歩合(%)	胴割歩合(%)	その他(%)				碎米率(%)	胴割率(%)
越淡麗	14.72	26.39	97.2	1.8	1.0	越淡麗	14.45	19.00	0.5	0.3
越淡麗sdr4-k	15.18	26.72	98.5	0.7	0.8	越淡麗sdr4-k	14.95	19.09	0.2	0.3
五百万石	15.30	25.50	92.7	6.1	1.2	五百万石	15.08	17.96	0.9	6.7
五百万石sdr4-k	14.78	25.95	97.8	1.9	0.3	五百万石sdr4-k	14.64	18.76	0.4	1.7

越淡麗，越淡麗 Sdr4-k，五百万石，五百万石 Sdr4-k\_late を材料として小仕込試験を行った。小仕込試験は総米 150 g 規模で実施し，発酵によって重量減少率が 30%となり次第，遠心分離し，上清を回収した。この上清を製成酒とし，各種解析を行った。小仕込試験の発酵経過では，越淡麗は Sdr4-k 導入により 2 日程度発酵日数が長くなり，五百万石では Sdr4-k 導入により 2 日程度発酵日数が短くなった。製成酒の一般成分および香気成分には Sdr4-k 導入による影響は見られなかった。また，製成酒の官能評価においても顕著な差は認められなかった。

## 要約

本研究では，休眠遺伝子 *Sdr4-k* を酒米に導入することで，酒米における *Sdr4-k* の機能および米形質への影響を調査した。使用した酒米品種は，新潟県で広く栽培されている「越淡麗」，「五百万石」の 2 品種である。*Sdr4-k* 遺伝子の導入には戻し交配育種法と迅速世代促進法を駆使し，約 1 年半で *Sdr4-k* 導入系統である「越淡麗 Sdr4-k」，「五百万石 Sdr4-k」を作出した。圃場あるいはバイオトロンを用いた高温条件下での生育を行い，*Sdr4-k* の機能を調査した。*Sdr4-k* を導入することで酒米でも種子休眠の深化により穂発芽耐性が向上した。また，高温条件下で生育した越淡麗 *Sdr4-k* は越淡麗母本と比較して整粒率の上昇が見られた。高温条件下で生育した登熟種子での遺伝子発現解析では，澱粉代謝関連遺伝子の発現が *Sdr4-k* を導入することで澱粉生合成・分解バランスを正に調節する方向へ変動した。そのため，この遺伝子発現の変動が高温登熟耐性に関与していると示唆された。一方で，酒造特性については *Sdr4-k* 導入による有意な差は示されず，*Sdr4-k* の導入は酒造特性に影響を及ぼさないことが示唆された。



## 文献

- 1) 三ツ井敏明:米の機能性食品化と新規利用技術・高度加工技術の開発 ～食糧, 食品素材, 機能性食品, 工業原料, 医薬品原料としての米～第5・1・3項「高温耐性イネの開発」テクノシステム, 2023. ISBN: 978-4-924728-92-9 C3050
- 2) S. Asatsuma, C. Sawada, A. Kitajima, T. Asakura and T. Mitsui:  $\alpha$ -Amylase affects starch accumulation in rice grain. *J. Appl. Glycosci.*, 53, 187-192, 2006.
- 3) M. Hakata, M. Kuroda, T. Miyashita, T. Yamaguchi, M. Kojima, H. Sakakibara, T. Mitsui, H. Yamakawa: Suppression of  $\alpha$ -amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature. *Plant Biotechnol. J.*, 10(9), 1110-1117, 2012.
- 4) T. Mitsui, H. Yamakawa, T. Kobata: Molecular physiological aspects of chalking mechanism in rice grains under high-temperature stress. *Plant Prod. Sci.*, 19(1), 22-29, 2016.
- 5) 三ツ井敏明: イネ種子発芽制御の分子メカニズム, 日本農芸化学会誌, 73(12), 1273-1281, 1999.
- 6) K. Sugimoto, Y. Takeuchi, K. Ebana, A. Miyao, H. Hirochika, N. Hara, K. Ishiyama, M. Kobayashi, Y. Ban, T. Hattori, M. Yano: Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(13), 5792-5797, 2010.
- 7) M.M. Rana, T. Takamatsu, M. Baslam, K. Kaneko, K. Itoh, N. Harada, T. Sugiyama, T. Ohnishi, T. Kinoshita, H. Takagi, T. Mitsui: Salt tolerance improvement in rice through efficient SNP marker-assisted selection coupled with speed-breeding. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(10), 2585, 2019.
- 8) L. Nahar, M. Aycan, E.M.L. Hornai, M. Baslam, T. Mitsui: Tolerance with high yield potential is provided by lower  $\text{Na}^+$  ion accumulation and higher photosynthetic activity in tolerant YNU31-2-4 rice genotype under salinity and multiple heat + salinity stress. *Plants*, 12(9), 1910, 2023.
- 9) 小林麻子, 杉本和彦, 林猛, 近藤始彦, 園田純也, 塚口直史, 和田卓也, 山内歌子, 岩澤紀生, 矢野昌裕, 富田桂: 穂発芽耐性を強化した水稻品種コシヒカリの準同質遺伝子系統の育成と高温登熟耐性の評価. *育種学研究*, 181, 1-10, 2016.