

イネにおける登熟気温による米中アミロース含量の変動に関与する 量的形質遺伝子座の解析

宗方 淳*・大岡直人**・大戸敦也**・荒川 誠***

Identification of Quantitative Trait Loci Involved in the Variation of Rice Amylose Content with Ripening Temperature.

Jun MUNAKATA, Naoto OOKA, Atsuya OTO and Makoto ARAKAWA

要約 ブランド米は良食味・高品質であることに加え、どの地域で生産された米であっても食味や品質のばらつきが少なく均一であることが重要となる。一方、埼玉県は早植栽培から麦跡晩植栽培まで移植時期が多岐にわたることから、登熟気温によるアミロース含量の変動とそれに伴う食味のばらつきが懸念される。そこで本研究では登熟気温によるアミロース含量の変動に関与する遺伝的要因を明らかにすることを目的とし、2017年から2019年の3ヶ年にわたり「コシヒカリ」遺伝背景に染色体の一部が「Bei Khe」に置換された染色体断片置換系統群(CSSLs)を用いた量的形質遺伝子座(QTL)の解析を実施した。その結果、アミロース含量の変動(ΔAM)に関与するQTLをイネ染色体の複数の領域で検出した。このうち、第8染色体上の $q\Delta AM8$ が最も大きな作用を示し、2017年では「コシヒカリ」の ΔAM 値を63.1%減少させた。また、戻し交配とDNAマーカー選抜により $q\Delta AM8$ 領域を「Bei Khe」型のホモで固定した「 $q\Delta AM8$ 導入系統」を4系統作出し、早植栽培と普通期栽培の異なる2つの移植時期で生産力検定を実施した。さらに、白米中アミロース含量を測定し両栽培区間のアミロース含量差を求めた。その結果、「コシヒカリ」のアミロース含量差の1.4ポイントに対し、「 $q\Delta AM8$ 導入系統」では1.2~1.7ポイントと系統間の差があり $q\Delta AM8$ の導入効果は判然としなかった。 $q\Delta AM8$ はほ場での作用が明確でないこと、また、 $q\Delta AM8$ の近傍に白未熟粒を増加させる遺伝的要因の存在が示唆されたことから、実際の育種での利用は難しいと判断された。登熟気温によるアミロース含量の変動に対してより作用の安定したQTLを同定するには、高温登熟障害による白未熟粒の発生しにくい温度帯において、ほ場でのアミロース含量の変動の評価、および変動に関与する遺伝的要因のスクリーニングを効率的に実施することが重要であると考えられた。

近年、米の需要減少に伴う全国的な米価格の低下が問題となっている。米の販売価格は長期的に低下傾向に推移しており、2017年産から2019年産米の相対取引価格は60kgあたり15,500円を超えて堅調に推移していたものの、2020年産米は14,682円と前年より

1,000円近く下落した(農林水産省2021)。そのような状況の中、各道県は高価格で取引されるブランド米の確立を目指し水稻新品種の育成と積極的なPR活動を行っている。埼玉県では県産米ブランド力の強化に向けて作付品種を集約して出荷数量を確保することを掲

*遺伝子情報活用担当, **水稻育種担当, ***水稻育種担当(現企画担当)

げており、同一品種であれば県内のどの地域で生産された米であっても食味や品質が均一であり、実需者や消費者から安定した評価を得られることが重要となる。そのため、実需者や消費者からの信頼性確保とブランド力の維持には、栽培品種の特性として食味が優れていることに加え、産地による食味のばらつきが少ないことが重要となる。一方、埼玉県産の稲作は、4月に移植をする早植栽培から麦作後の6~7月に移植をする麦跡晩植栽培など多岐にわたっている。そのため、同一品種であっても産地間の気象・栽培条件の違いによる品質や食味のばらつきの発生が懸念される。

一般的に米の食味は、穀粒中のタンパク質含量やアミロース含量などの化学成分の影響を受けると考えられている。米のタンパク質含量が高くなると米飯粒の表層が硬くなり食味が低下する(岡留ら 1999)が、窒素の施肥量や施肥時期によって変化する(山下・藤本 1974)ため、施肥の調整によって増加を防ぐことができると考えられる。一方、アミロースも食味を決定する重要な要素であり、アミロース含有率が高まれば飯は硬くて粘りが小さくなる(稲津 1988)。アミロース含量は品種固有の特徴であり栽培方法によっては大きな影響を受けない形質である(王ら 1998)とされる一方、登熟期間の気温によって増減することが知られている(Asaoka *et al.* 1984, Sano *et al.* 1985, 武田・佐々木 1988)。アミロース含量を制御する方法として移植時期の変更による登熟期間の温度の調整が考えられるが、気温は年次によって変動するとともに、移植時期は地域の水利慣行や生産者の作業体系によって制限を受けるため実施上の問題がある。また、アミロース含量は施肥条件によってほとんど影響を受けないとされている(稲津 1988, 山下・藤本 1974)。以上のことから、アミロース含量の変動はタンパク質含量の制御とは異なり、移植時期や肥培管理だけでコントロールすることは困難であると考えられる。

これまで、登熟気温によるアミロース含量の変動に関して複数の遺伝学的研究が報告されている。舘山ら(2005)は、複数の低アミロース系統を用いた研究において、低アミロース性遺伝子の違いによりアミロース含量の温度による変動幅が異なることを明らかにしている。また、Suzuki *et al.* (2002)は登熟期の低温でアミロース含量が増大しない突然変異体「*coi*」を選抜し、「*coi*」の低温非反応性は劣性の1遺伝子に支配されていることを示唆している。さらに、Zhang *et al.*

(2014)は、日本型品種「日本晴」遺伝背景に染色体の一部がインド型品種「9311」に置換されたCSSLsを用いたQTL解析を行い、高温によるアミロース含量の低下を軽減するQTLを複数の染色体領域で検出している。以上の報告から、登熟気温によるアミロース含量の変動に關与する遺伝的要因の存在が示唆され、アミロース含量の変動を制御するためには、気温による含量の変動を軽減する遺伝子を導入した品種の育成等、育種学的側面からの解決が有効であると考えられる。

アミロース含量の変動は、炊飯米物性の変化や玄米の白濁が懸念される低アミロース品種で特に問題となっている。このため、低アミロース性遺伝子がアミロース含量の変動に与える影響については複数報告されている(中場ら 2006, 仲條ら 2017, 舘山ら 2005)。しかし、低アミロース性遺伝子やWx遺伝子以外の遺伝的要因がアミロース含量の変動に与える影響は解明されておらず、また、通常アミロース含量の粳品種では、アミロース含量の変動を制御できる有用な遺伝子は報告されていない。加えて、アミロース含量の変動の評価には、異なる複数の温度条件でイネを登熟させてアミロース含量を測定する必要があるため、アミロース含量の変動を選抜目標とした育種は煩雑で多大な労力を要する。このため、登熟気温によるアミロース含量の変動を軽減した品種を効率的に育成するには、アミロースの変動に關与する遺伝子やQTLの同定とともに選抜のためのDNAマーカー開発が重要となる。

そこで本研究では、登熟気温によるアミロース含量の変動に關与する遺伝的要因を解明することを目的とし、「コシヒカリ」とインド型品種「Bei Khe」との交配に由来する染色体断片置換系統(Hori *et al.* 2015)を用いたQTL解析を行った。加えて、登熟気温によるアミロース含量の変動を抑制するQTLを導入した系統を作出し、生産力検定でそれらの特性を評価するとともに移植時期の異なる栽培条件でのアミロース含量の変動を調査した。

なお、本研究で用いた「コシヒカリ」と「Bei Khe」のCSSLs 43系統は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 次世代作物開発研究センターより分譲いただいた。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

宗方ら：イネにおける登熟気温による米中アミロース含量の変動に關与する量的形質遺伝子座の解析

材料および方法

1 供試材料および耕種概要

供試材料には国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 次世代作物開発研究センターより提供された「コシヒカリ」と「Bei Khe」由来の CSSLs および「コシヒカリ」を用いた。2017年は、CSSLs 43系統 (SL2401~SL2443) および「コシヒカリ」、2018年と2019年は、第8染色体に「Bei Khe」由来の染色体断片を有する「SL2424」, 「SL2425」 および「コシヒカリ」を栽培した。各系統 5 個体を 5 月中旬に 1/5000a ワグネルポットに移植し、穂揃期 (ポット内の穂数の約 8 割が出穂) に達するまで自然条件で栽培した。その後、穂揃期に到達した系統から平均気温 26.5°C (高温区) および 22.3°C (低温区) に設定した屋外型人工気象室 (小糸製作所 S-180A 型, 日本医化器械製作所 BT-1PT-SBS) でそれぞれ登熟させ、日平均積算気温が 1,000°C を超えてから穂を収穫した。基肥は、N, P₂O₅, K₂O 各成分 2kg/a とし、移植後 1 カ月に 1.4kg/a を追肥として施用した。

2 アミロース含量の測定

各系統の玄米をサイクロンサンプルミル (3010-018, UDY) で粉砕して試料とし、ヨード呈色法 (Juliano, 1971) により玄米中のアミロース含量を測定した。また、2017年は Yamakawa *et al.* (2007) の方法を改変して測定を行った。すなわち、試料 10mg に 95% エタノール 100 μ l と 1M 水酸化ナトリウム水溶液を 900 μ l 加え、100°C で 15 分間加熱することでアミロースを糊化抽出した。その抽出液を蒸留水で 10 倍希釈し、希釈液 100 μ l に蒸留水 860 μ l, 1M 酢酸 20 μ l およびヨウ素ヨウ化カリウム水溶液 (0.2% I₂, 2% KI) 20 μ l を加え、ヨード呈色反応を行った。反応液の 620nm の吸光度を吸光マイクロプレートリーダー (Spectra MAX Plus 384, Molecular Devices) で測定し、アミロース含量を求めた。2018年と2019年は、試料 100mg に 99.5% エタノールを 0.5ml, 0.5 N 水酸化ナトリウム溶液を 5.0ml, 蒸留水を 4.5ml 加えて糊化させた後オートアナライザ 3 型 (BLTEC) を用いて 621nm の吸光度を測定し、アミロース含量を求めた。アミロース標準物質には、いずれの年も Amylose from potato (SIGMA) と糯品種の白米粉末を用いた。2017 年についてはポット内の各個体を 1 反復、2018 年および

2019 年は 1 ポットを 1 反復とし、各系統 4 反復で測定を実施した。

3 QTL 解析

QTL 解析は Ebitani *et al.* (2005) および Madoka *et al.* (2008) の方法にしたがって実施した。各 CSSLs における高温区、低温区でのアミロース含量および両区間のアミロース含量差 (以下、 ΔAM と表記) について、「コシヒカリ」との有意差検定 (*t* 検定) を行った。QTL の検出は、有意水準 5% 以下を基準とし、有意差が認められた系統の遺伝子型データから QTL と QTL 近傍の DNA マーカーを検出した。

4 登熟気温によるアミロース含量の変動を抑制する QTL ($q\Delta AM8$) を導入したコシヒカリ系統 ($q\Delta AM8$ 導入系統) の作出

2017 年に埼玉県農業技術研究センター玉井試験場において「コシヒカリ」を母、「SL2425」を父とした人工交配を行った。2017 年から 2018 年の冬期間に人工気象室において F₁ 5 個体を養成し、2019 年に 1120 個体の F₂ をほ場に展開した。出穂期の比較のため同ほ場に「コシヒカリ」を移植し、「コシヒカリ」と同時期に出穂した F₂ 200 個体を選抜した。これらの中からイネゲノムデータベース GRAMENE (<https://www.gramene.org/>) に登録されている単純単複配列 (SSR) マーカー 32 種類を用いて $q\Delta AM8$ の領域がヘテロもしくは「Bei Khe」型ホモ、かつ、 $q\Delta AM8$ 以外の領域が「コシヒカリ」型に固定した 4 個体を選抜した。さらに、同年に各個体の F₃ 後代を 48 個体ずつ養成し、それらの中から DNA マーカーによって $q\Delta AM8$ の領域が「Bei Khe」型に固定した 4 個体を選抜した。これらについて世代促進を行い、2020 年に F₄ 世代 4 系統を生産力検定に供試した。

5 「 $q\Delta AM8$ 導入系統」の特性調査

埼玉県農業技術研究センター玉井試験場水田ほ場において、「 $q\Delta AM8$ 導入系統」4 系統 (84-A7, 136-A6, 93-A1, 136-A8) の生産力検定を実施した。試験区は早植栽培と普通期栽培の 2 区を設定した。早植栽培の移植は 2020 年 5 月 14 日に行い、栽植密度は株間 18cm 畝間 30cm, 施肥量 (窒素成分/a) は基肥 0.3kg, 穂肥 0.2kg (出穂前 19 日) とした。また、普通期栽培の移植は同年 6 月 22 日に行い、栽植密度は株間 16cm, 畝

間 33cm, 施肥量 (窒素成分/a) は基肥 0.5kg とした。なお, 調査方法は奨励品種決定調査に準じた。生産力検定で得られた玄米は, 90%に精米した後 MF10 連続式ミル (IKA) で粉碎し, 前述の方法と同様にオートアナライザ 3 型 (BLTEC) を用いてアミロース含量の測定を行った。測定は各系統につき 4 反復実施した。

結果

1 登熟気温によるアミロース含量差 (ΔAM) に関する QTL の解析

2017 年の QTL 解析の結果, ΔAM に関する QTL が第 1, 第 2, 第 3, 第 4, 第 5, 第 6, 第 7, 第 8, 第 11 染色体上の計 10 箇所の領域で検出された (表 1, 図 1)。これらのうち, 第 1 ($q\Delta AM1-1$), 第 5 ($q\Delta AM5$), 第 8 ($q\Delta AM8$) 染色体上の QTL は, 「Bei Khe」型の対立遺伝子で ΔAM を減少させる作用を示した。最も作用効果の大きかったものは $q\Delta AM8$ で, 「コシヒカリ」対し ΔAM の値を 63.1%減少させた。また, 2018 年および 2019 年に「SL2424」と「SL2425」を用いて第 8 染色体を対象とした QTL 解析を行った結果, 2018 年には $q\Delta AM8$ が再度検出され ΔAM の値を 27.5%減少させたが, 2019 年では検出されなかった。

2 $q\Delta AM8$ を保有する「SL2425」の玄米中アミロース含量

2017 年の「SL2425」の ΔAM は 0.3 ポイント, 2018 年では 2.4 ポイントとなり, 「コシヒカリ」よりもそれぞれ 1.4, 0.8 ポイント小さかった (表 2)。また, 「SL2425」の低温区でのアミロース含量は, 2018 年は 15.1%, 2019 年は 17.1%であり, 両年ともに「コシヒカリ」よりも 1 ポイント程度有意に低かった。一方, 「SL2525」の高温区でのアミロース含量は, 2017 年では「コシヒカリ」よりも 1.1 ポイント有意に高かったものの, 2018 年では同等, 2019 年では 1.2 ポイント有意に低下していた。

3 「 $q\Delta AM8$ 導入系統」のグラフ遺伝子型

DNA マーカーによる選抜により, 「コシヒカリ」遺伝的背景に第 8 染色体上の $q\Delta AM8$ の領域を「Bei Khe」型ホモで固定した 84-A7, 136-A6, 93-A1 および 136-A8 の 4 系統を作出した (図 2)。このうち, 84-A7 と 136-A6 は同じ遺伝子型であり, 「Bei Khe」由来の染色

表 1 コシヒカリ/Bei Khe CSSLs における ΔAM に関する QTL

QTL名	染色体番号	近傍のDNAマーカー	作用の大きさ		
			2017年	2018年	2019年
$q\Delta AM1-1$	1	ad01000058-ad01000510	-37.9%		
$q\Delta AM1-2$	1	ad01021428	+78.0%		
$q\Delta AM2$	2	P0793-ah02000807	+78.4%		
$q\Delta AM3$	3	ad03014349-P0567	+55.4%		
$q\Delta AM4$	4	ad04002348-AE04004008	+65.8%		
$q\Delta AM5$	5	ah05000829-ad05005823	-60.8%		
$q\Delta AM6$	6	AE06005770-ah06001883	+53.6%		
$q\Delta AM7$	7	ah07000484-ah07001035	+55.5%		
$q\Delta AM8$	8	AE08002244-P0425-4	-63.1%	-27.5%	—
$q\Delta AM11$	11	ad11000889-AD11002440	+82.8%		

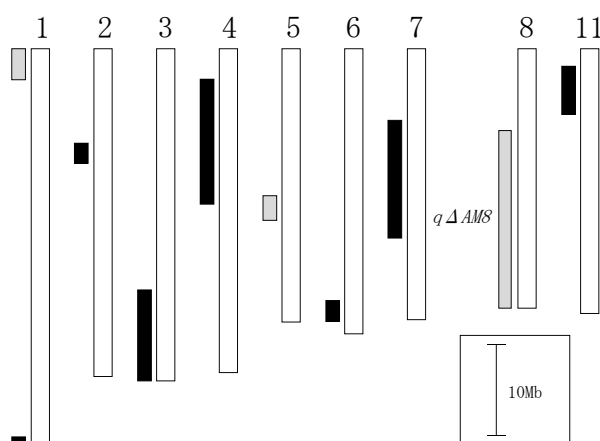


図 1 コシヒカリ/Bei Khe CSSLs における ΔAM に関する QTL の染色体上位置
灰色は, 「Bei Khe」の対立遺伝子で ΔAM を減少, 黒色は ΔAM を増加させる QTL を示す。

表 2 「コシヒカリ」と「SL2425」の玄米中アミロース含量の比較

年	系統名	高温区	低温区	ΔAM (ポイント)
		アミロース含量 (%)	アミロース含量 (%)	
2017	コシヒカリ	14.9±0.3	16.6±0.2	1.7
	SL2425	16.0±0.1 *	15.7±0.5	0.3
2018	コシヒカリ	12.8±0.2	16.1±0.1	3.2
	SL2425	12.7±0.1	15.1±0.2 **	2.4
2019	コシヒカリ	15.4±0.3	18.4±0.4	3.0
	SL2425	14.2±0.3 *	17.1±0.1 *	2.9

*と**は, 各年において「コシヒカリ」と比較し, それぞれ 5%, 1%水準以下で有意な差があることを示す (t 検定)。値は平均値±標準誤差を示す。

宗方ら：イネにおける登熟気温による米中アミロース含量の変動に關与する量的形質遺伝子座の解析

体断片が第 8 染色体上の RM22598 から RM3840 間の約 21.6Mb の領域に導入されていると推定された。また、93-A1 と 136-A8 も同じ遺伝子型を持ち、「Bei Khe」由来の染色体断片が第 8 染色体上の RM22772 から RM3840 間の約 17.5Mb の領域に導入されていると推定された。

4 「 $q\Delta AM8$ 導入系統」の特性および玄米品質

「 $q\Delta AM8$ 導入系統」のうち 93-A1 の稈長は、普通期栽培で「コシヒカリ」より有意に低かったが、いずれの系統も原品種と概ね同程度であった (表 3)。穂数については、84-A7 が早植栽培、普通期栽培ともに有意に多かった。また、早植栽培での「 $q\Delta AM8$ 導入系統」の粒厚 1.8mm 以下の層米歩合は「コシヒカリ」よりも高い傾向にあり、玄米収量も 2~8%低かった。玄米品質では、早植栽培、普通期栽培の両区ともに「コシヒカリ」と比較し白未熟粒比が高く、整粒比が低い傾向にあり、外観は劣っていた (表 4)。穂発芽性については、いずれの系統も同ランクであると判定された。

5 「 $q\Delta AM8$ 導入系統」の出穂期および白米中アミロース含量

「 $q\Delta AM8$ 導入系統」の出穂期は「コシヒカリ」と比較し早植栽培で 2~3 日、普通期栽培で 1~2 日早かった (表 5)。「 $q\Delta AM8$ 導入系統」の出穂後 30 日間の日平均気温について、早植栽培では約 29°C、普通期栽培では約 28°C となり、早植栽培と普通期栽培における日平均気温の差はいずれの系統も 1°C を下回っていた。「 $q\Delta AM8$ 導入系統」の早植栽培での白米中のアミロ

ース含量は 14.3%~14.6%となり、いずれも「コシヒカリ」と同程度であった。一方、普通期栽培における 136-A6 および 93-A1 のアミロース含量は両系統とも 16.0%となり、「コシヒカリ」よりも 0.6 ポイント有意に高かった。早植栽培と普通期栽培間の白米中アミロース含量差に関して「コシヒカリ」の 1.4 ポイントを下回った系統は、84-A7 と 136-A8 の 2 系統の 1.2 ポイントであり、136-A6 では 1.7 ポイントと「コシヒカリ」の値を上回っていた。

考察

ΔAM に關与する QTL と既報の QTL、デンブン合成遺伝子との關連性

本研究では、 ΔAM の値を減少させる QTL を 3 箇所、 ΔAM の値を増加させる QTL を 7 箇所の染色体領域で見出した (表 1, 図 1)。登熟気温によるアミロース含量の変動に關与する遺伝的要因についてはこれまで複数の報告があり、Zhang *et al.* (2014) は高温下におけるアミロース含量の低下を軽減する QTL として $qHAC4$, $qHAC8a$, $qHAC8b$ および $qHAC10$ を検出している。また、Zhang *et al.* (2019) は高温条件と低温条件の両方でアミロース含量を高める QTL として $qSAC3$ を検出している。これらの QTL のうち $qHAC4$ は本研究で見出された $q\Delta AM4$ と、 $qHAC8b$ は $q\Delta AM8$ とそれぞれ見出された領域が重複していた。 $qHAC4$ と $qHAC8b$, $q\Delta AM4$ と $q\Delta AM8$ のアミロース含量への作用はそれぞれ異なっていたため、これらの QTL の主働遺伝子が同一であるかは不明である。

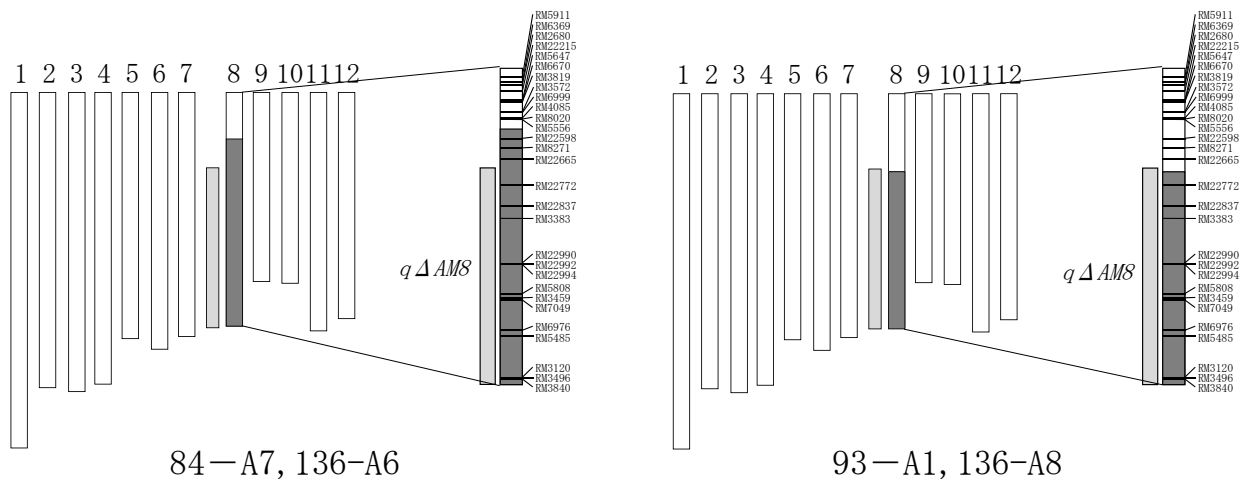


図 2 「 $q\Delta AM8$ 導入系統」の全染色体グラフ遺伝子型
白は「コシヒカリ」、灰色は「Bei Khe」の染色体領域をそれぞれ示す。

表3 「q Δ AM8導入系統」の生育・収量 (2020年)

試験区分	品種・系統名	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m ²)	玄米収量 (kg/a)	比較比率	粒厚 1.8mm以下の屑米歩合 (%)	玄米千粒重 (g)
早植栽培	84-A7	101	20.8	433 *	53.3	95	15.4	18.1
	136-A6	102	20.5	344	51.7	92	15.4	18.6
	93-A1	103	21.1	387	51.3	91	14.7	18.4
	136-A8	104	20.5	353	55.1	98	15.8	18.5
	対照 コシヒカリ	103	20.8	361	56.2	100	6.5	18.1
普通期栽培	84-A7	92	20.9	313 **	50.7	97	10.9	20.3
	136-A6	92	20.3	298 *	52.9	101	10.8	20.1
	93-A1	90 *	20.9	276	56.2	107	7.4	20.8
	136-A8	93	21.1	289	52.4	100	10.4	20.3
	対照 コシヒカリ	94	21.1	261	52.4	100	9.2	19.4

*と**は、「コシヒカリ」に対しそれぞれ 5%, 1%水準以下で有意な差があることを示す (Dunnett 検定). 玄米収量・千粒重は、水分 15%換算の値を示す.

表4 「q Δ AM8導入系統」の玄米品質 (2020年)

試験区分	品種・系統名	整粒比 (%)	胴割粒比 (%)	白未熟粒比 (%)	青未熟粒比 (%)	その他未熟粒比 (%)	砕米粒比 (%)	粒長 (mm)	粒幅 (mm)	粒厚 (mm)	粗タンパク質含量 (%)	穂発芽性
早植栽培	84-A7	40.3	0.0	31.5	0.3	17.5	1.3	5.06	2.84	1.91	7.9	2.0
	136-A6	38.4	0.5	32.9	0.6	22.3	0.6	5.03	2.86	1.93	8.2	2.5
	93-A1	34.3	0.0	35.8	0.8	20.1	1.3	4.95	2.84	1.92	8.3	2.0
	136-A8	34.1	0.4	37.1	0.3	16.4	1.6	4.98	2.85	1.92	7.9	2.0
	対照 コシヒカリ	41.5	1.0	25.9	0.8	27.9	0.1	4.91	2.78	1.94	8.1	2.0
普通期栽培	84-A7	36.0	0.0	40.3	2.3	15.5	1.5	5.22	2.85	1.97	8.5	-
	136-A6	38.8	0.0	38.0	2.0	12.8	3.5	5.12	2.83	1.96	8.7	-
	93-A1	35.8	0.0	41.3	1.3	11.8	1.8	5.19	2.85	1.99	8.4	-
	136-A8	37.0	0.3	35.8	1.5	17.0	3.3	5.18	2.86	1.98	8.6	-
	対照 コシヒカリ	58.8	1.0	19.3	3.5	13.1	2.4	5.06	2.78	1.96	8.6	-

穂発芽性は 1 極難~7 極易の 7 段階評価による結果をそれぞれ示す. 整粒比~厚みは穀粒判別器 (RGQI20A), 玄米粗タンパク質含量は INFRATEC1241 による測定値を示す.

表5 「q Δ AM8導入系統」の出穂期, 登熟期間の気温および白米中アミロース含量 (2020年)

品種・系統名	出穂期 (月・日)		出穂後30日間の日平均気温 (°C)		気温差 (°C)	白米中アミロース含量 (%)		早植と普通期のアミロース含量差 (ポイント)
	早植	普通期	早植	普通期		早植	普通期	
84-A7	7.29	8.16	29.0	28.3	0.7	14.3±0.1	15.5±0.2	1.2
136-A6	7.28	8.17	28.8	28.1	0.8	14.3±0.1	16.0±0.1 *	1.7
93-A1	7.29	8.17	29.0	28.1	0.9	14.6±0.1	16.0±0.1 *	1.4
136-A8	7.28	8.17	28.8	28.1	0.8	14.4±0.2	15.6±0.1	1.2
コシヒカリ	7.31	8.18	29.5	27.8	1.7	14.0±0.2	15.4±0.2	1.4

*は「コシヒカリ」に対し, 5%水準以下で有意な差があることを示す (Dunnett 検定). 白米中アミロース含量は, 平均値±標準誤差を示す.

一方で, Zhang *et al.* (2014) が日本型品種×インド型品種を由来とする CSSL から QTL を検出している点は本研究と共通していることから, 日本型品種の遺伝背景において, 登熟気温によるアミロース含量の変

動を制御するインド型品種由来の遺伝子が存在すると推察される.

イネのデンプン合成には, デンプン合成酵素 (Starch Synthase; SS), ADP-グルコースピロフォスホオリラ

ーゼ (ADP-glucose Pyrophosphorylase ; AGPase), 枝付け酵素 (Starch Branching Enzyme ; BE), 枝切り酵素 (Starch Debranching Enzyme ; DBE) 等の複数の酵素が關与してゐる. 本研究で検出した QTL のうち, $q\Delta AM7$ は SS 遺伝子である *GBSSII* の近傍で検出され, また $q\Delta AM8$ は AGPase の一種である *AGPS2* (*shrunk*) および DBE の一種である *ISA1* (*sugary-1*) が座する領域で検出された. *AGPS2* はアミロースやアミロペクチンの基質となる ADP グルコースを供給する酵素であり, Akihiro *et al.* (2005) は *AGPS2* の発現がアミロース合成酵素である *GBSSI* (*Wx*) の発現と同時期の種子発生後期に見られたと報告している. また, Ohdan *et al.* (2005) は複数のデンプン合成関連遺伝子の中から, *AGPS2* や *GBSSI* を出穂後 7 日以降での胚乳中のデンプン合成に關与する同じ遺伝子のグループに分類しており, *AGPS2* とアミロース合成を担う *GBSSI* との關連性が示唆されている. 一方, *ISA1* はアミロペクチン分枝の分解を行う酵素として知られ, *ISA* の変異体はアミロペクチンよりも分子頻度の高いフィトグリコーゲンを蓄積する (Nakamura *et al.* 1997, Kubo *et al.* 1999). また, *ISA1* の活性を低下させると分枝頻度の高いアミロペクチンが蓄積され, アミロペクチンの構造が変化する (Fujita *et al.* 2003). このため, *ISA1* は, 結晶領域の余計な枝を切る機能を持ち, アミロペクチンのクラスター構造を維持するのに重要であると考えられている (藤田 2013). *AGPS2* と *ISA1* は, いずれもイネのデンプン合成における重要な遺伝子であるが, これらの遺伝子と登熟気温によるアミロース含量の変動との因果關係までは明らかにされていない. $q\Delta AM8$ の主働遺伝子と *AGPS2*, *ISA1* の關連性については, 今後さらなる調査が必要である.

$q\Delta AM8$ が米中アミロース含量に与える影響

米中アミロース含量は登熟期の気温により変動することが知られ, 高温環境下ではアミロース含量は減少し低温環境下では増加する (Asaoka *et al.* 1984, Sano *et al.* 1985, 武田・佐々木 1988). このため, 気温によるアミロース含量の変動を制御するための方法として, 高温下におけるアミロース含量の減少抑制, もしくは低温下におけるアミロース含量の増加抑制の 2 つが考えられる. 本研究では ΔAM を減少させる QTL として $q\Delta AM8$ を検出した (表 1, 図 1) が, $q\Delta AM8$

を保有する「SL2425」のアミロース含量は, 2018 年と 2019 年の低温区では「コシヒカリ」よりも約 1 ポイント低かった (表 2). また, 2017 年の低温区では, 有意な差は認められなかったものの, 「コシヒカリ」よりもアミロース含量が低い傾向が見られた. 一方で, 高温区では「コシヒカリ」との比較において, 増加・減少の明確な傾向は確認されなかった. 以上の結果から, $q\Delta AM8$ の主な機能は低温下におけるアミロース含量増加の軽減であると推察された.

米中アミロース含量が気温に反応するメカニズムに關して, *GBSSI* の温度反応性がアミロース含量の変動の主要因と考えられている. 高温下では *GBSSI* の遺伝子発現が抑制される (Yamakawa *et al.* 2007) 一方, 低温によって *GBSSI* タンパク質が増加すること (Sano *et al.* 1985) や *GBSSI* タンパク質の活性が上昇すること (Umamoto *et al.* 1995) が報告されている. また, 前述した高温下におけるアミロース含量の低下を軽減する QTL とされる $qHAC4$, $qHAC8a$ および $qHAC8b$ は, *GBSSI* 遺伝子の pre-mRNA スプライシング効率を高めることで, 高温下におけるアミロース含量減少を軽減している可能性が示唆されている. 加えて, *GBSSI* はアミロースの合成だけではなく, アミロペクチン超長鎖 (LC) 合成への關与も指摘されている (Fulton *et al.* 2002). 五十嵐ら (2008) は, 見かけのアミロース含量にはアミロペクチン LC 含量も含まれており, アミロペクチン LC も低温により増加すると報告している. 本研究におけるアミロース含量の測定はヨード呈色法で実施していることから, 本研究でのアミロース含量はアミロペクチン LC 含量も加算された見かけのアミロース含量である. そのため $q\Delta AM8$ の機能や作用メカニズムを解明するためには $q\Delta AM8$ を導入したことによる *GBSSI* の発現量やタンパク質活性の温度反応の変化, さらに, アミロペクチン LC 含量の変化を明らかにすることが必要であると考えられる.

$q\Delta AM8$ と玄米品質との關連性

生産力検定の結果, 「 $q\Delta AM8$ 導入系統」は, 「コシヒカリ」よりも白未熟粒の発生が多く玄米品質が劣っていた (表 4). Yamakawa *et al.* (2008) は第 8 染色体上に座する α -アミラーゼ遺伝子 *Amy3D* と *Amy3E* が白未熟粒に關連する QTL の近傍に座していることを報告している. また, *Amy3D* と *Amy3E* は

高温条件下で発現が増加する (Yamakawa *et al.* 2007) ほか、登熟期間の高温が乳白米の発生を増加させる要因として、*Amy1A*、*Amy3C* および *Amy3D* が発現し蓄積デンプンを分解することが指摘されている (Nakata *et al.* 2017)。本研究で検出された *qΔAM8* の領域には、*Amy3D* と *Amy3E* が座していることに加え、生産力検定における出穂後 30 日間の日平均気温は、早植栽培、普通期栽培ともに 27°C を超えており (表 5)、高温登熟障害による白未熟粒の発生しやすい気象条件であったと推察される。これらの結果から、*qΔAM8* 内に存在する「Bei Khe」型対立遺伝子の *Amy3D* や *Amy3E* が、「*qΔAM8* 導入系統」における白未熟粒増加に寄与した可能性がある。

ほ場での *qΔAM8* の作用と育種における実用性

生産力検定における「*qΔAM8* 導入系統」の出穂期は早植栽培で 2~3 日、普通期栽培で 1~2 日早い程度であり (表 5)、「コシヒカリ」と同じ中生熟期であると考えられた。また、「コシヒカリ」と「*qΔAM8* 導入系統」の出穂後 30 日間の日平均気温を比較すると、両者の差は、早植栽培、普通期栽培ともに 1°C 未満であった。このため、生産検定における「*qΔAM8* 導入系統」の登熟期の温度条件は「コシヒカリ」とほぼ同程度であったと推察される。一方、早植、普通期栽培間のアミロース含量差では、「コシヒカリ」の 1.4 ポイントに対し、「*qΔAM8* 導入系統」の含量差は 1.2~1.7 ポイントとなり (表 6)、系統によってばらつきが見られ *qΔAM8* の導入によるアミロース含量の変動抑制効果は判然としなかった。また、136-A6 と 93-A1 のアミロース含量は登熟気温の低くなる普通期栽培において 0.6 ポイント程「コシヒカリ」より高くなっており、アミロース含量の増加を抑制していなかった。以上の結果から、*qΔAM8* は、ほ場条件において効果を十分に示しておらず、育種における実用性は低いと判断された。生産力検定で *qΔAM8* の効果が確認できなかった理由として、2017 年から 2019 年の 3 年にかけてほぼ同一の条件で ΔAM に関する QTL の検出を試みたが、*qΔAM8* が検出されたのは 2017 年と 2018 年の 2 ヶ年であり、*qΔAM8* の作用が年次や環境変化に対して不安定であったことが考えられる。また、生産力検定における出穂後 30 日間の日平均気温は、早植栽培で約 29°C、普通期栽培で約 28°C と QTL 解析のため CSSL を栽培していた人工気象室高温区の 26.5°C を上回って

いた。そのため、生産力検定では *qΔAM8* が安定的に作用する温度域を超えていた可能性も考えられる。

ほ場条件におけるアミロース含量の変動抑制効果が明確でなかったこと、QTL 内に白未熟粒の増加に関与する遺伝的要因の存在が示唆されたことから、*qΔAM8* の育種での利用は難しいと考えられる。ただし、*qΔAM8* は第 8 染色体上の約 20Mb の範囲に存在しており、ほ場における *qΔAM8* の効果をより詳細に評価するためには、「*qΔAM8* 導入系統」の戻し交配による QTL の矮小化と *qΔAM8* と白未熟粒の発生に関与する遺伝子との同一性の解明が必要である。

本研究では ΔAM に関する QTL が複数検出され、アミロース合成に直接関与する *GBSSI* 遺伝子の他に登熟気温によるアミロース含量の変動に関与する遺伝的要因の存在が示唆された。今後、高温登熟障害による白未熟粒の発生しにくい温度帯において、ほ場でのアミロース含量の変動の評価および変動に関与する遺伝的要因のスクリーニングを効率的に実施することができれば、作用の安定した実用性の高い QTL の同定が可能になると思われる。本研究の知見を基に、アミロース含量の増減のメカニズム解明とアミロースの変動を軽減した品種の育成に取り組んでいきたい。

引用文献

- Akihiro T., Mizuno K. and Fujimura T. (2005) : Gene expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and starch contents in rice cultured cells are cooperatively regulated by sucrose and ABA. *Plant Cell Physiol.* 46, 937-946.
- Asaoka M., Okuno K, Sugimoto Y, Kawakami J. and Fuwa H. (1984) : Effect of environmental temperature during development of rice plants on some properties of endosperm starch. *Starch/Stärke* 36, 189-193.
- 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.
- Ebitani T., Takeuchi Y, Nonoue Y, Yamamoto T, Takeuchi K. and Yano M. (2005) : Construction and evaluation of chromosome segment substitution

宗方ら：イネにおける登熟気温による米中アミロース含量の変動に關与する量的形質遺伝子座の解析

- lines carrying overlapping chromosome segments of indica rice cultivar ‘Kasalath’ in a genetic background of Japonica elite cultivar ‘Koshihikari’. *Breed. Sci.* 55, 65-73.
- 藤田直子 (2013) : 澱粉変異体米の解析と利用. 化学と生物 51, 400-407.
- Fujita N., Kubo A, Suh D.S., Wong K.S., Jane J.L., Ozawa K, Takaiwa F, Inaba Y. and Nakamura Y. (2003) : Antisense inhibition of isoamylase alters the structure of amylopectin and the physicochemical properties of starch in rice endosperm. *Plant Cell Physiol.* 44, 607-618.
- Fulton D.C., Edwards A, Pilling E, Robinson H.L., Fahy B, Seale R, Kato L, Donald A.M., Geigenberger P, Martin C. and Smith A.M. (2002) : Role of granule-bound starch synthase in determination of amylopectin structure and starch granule morphology in potato. *J. Biol. Chem.* 277, 10834-10841.
- Hori K., Nonoue Y, Ono N, Shibaya T, Ebana K, Matsubara K, Ogiso-Tanaka E, Tanabata T, Sugimoto K, Taguchi-Shiobara F, Yonemaru J, Mizobuchi R, Uga Y, Fukuda A, Ueda T, Yamamoto S, Yamanouchi U, Takai T, Ikka T, Kondo K, Hoshino T, Yamamoto E, Adachi S, Nagasaki H, Shomura A, Shimizu T, Kono I, Ito S, Mizubayashi T, Kitazawa N, Nagata K, Ando T, Fukuoka S, Yamamoto T. and Yano M. (2015) : Genetic architecture of variation in heading date among Asian rice accessions. *BMC Plant Biol.* 15, 115.
- 五十嵐俊成・神田英毅・木下雅文 (2008) : 登熟温度が米のアミロペクチン単位鎖長分布と超長鎖(LC)含量に及ぼす影響. *J. Appl. Glycosci.* 55, 191-197.
- 稲津脩 (1988) : 北海道産米の食味向上による品質改善に関する研究. 北海道立農試報 66, 1-89.
- Juliano B.O. (1971) : A simplified assay for milled-rice amylose. *Cereal Sci Today* 16, 334-340.
- Kubo A., Fujita N, Harada K, Matsuda T, Satoh H. and Nakamura Y. (1999) : The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol.* 121, 399-410.
- Madoka Y., Kashiwagi T, Hirotsu N. and Ishimaru K. (2008) : Indian rice “Kasalath” contains genes that improve traits of Japanese premium rice “Koshihikari”. *Theor. Appl. Genet.* 116, 603-612.
- 仲條眞介・佐々木力・菅原浩視・阿部 (川代) 早奈恵・木内豊・田村和彦・宍戸央子・高草木雅人・阿部陽・遠藤あや・神山芳典 (2017) : 早生の低アミロース新品種「きらほ」の育成. 岩手農研七研報 16, 23-40.
- Nakamura Y., Kubo A, Shimamune T, Matsuda T, Harada K. and Satoh H (1997) : Correlation between activities of starch debranching enzyme and α -polyglucan structure in endosperms of sugary - 1 mutants of rice. *Plant J.* 12, 143-153.
- Nakata M., Fukamatsu Y, Miyashita T, Hakata M, Kimura R, Nakata Y, Kuroda M, Yamaguchi T. and Yamakawa H. (2017) : High temperature-induced expression of rice α -amylases in developing endosperm produces chalky grains. *Front. Plant Sci.* 8, 2089.
- 農林水産省 (2021) : [https://www.maff.go.jp/j/seisan/kikaku/kome_siryu.html].
- Ohdan T., Francisco P.B. Jr, Sawada T, Hirose T, Terao T, Satoh H. and Nakamura Y. (2005) Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *J. Exp. Bot.* 56, 3229-3244.
- 岡留博司・栗原昌之・楠田幸・豊島英親・金静逸・下坪訓次・松田智明 (1999) : 窒素施肥の異なる炊飯米の多面的物性評価法. 日作紀 68, 211-216.
- Sano Y., Maekawa M. and Kikuchi H. (1985): Temperature effects on the *Wx* protein level and amylose content in the endosperm of rice. *J. Hered.* 76, 221-222.
- Suzuki Y., Sano Y. and Hirano HY. (2002) : Isolation and characterization of a rice mutant insensitive to cool temperatures on amylose synthesis. *Euphytica* 123, 95-100.
- 武田和義・佐々木忠雄 (1988) : 北海道のイネ品種におけるアミロース含有率の温度反応. 育種学雑誌 38, 357-362.
- 舘山元春・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変動の系統間差異. 育種学研究 7, 1-7.
- Umemoto T., Nakamura Y. and Ishikura N. (1995) :

- Activity of starch synthase and the amylose content in rice endosperm. *Phytochem.* 40, 1613-1616.
- 王桂云・阿部利徳・笹原健夫 (1998) : 慣行および有機栽培法で栽培した水稻白米の全窒素・アミロース含量およびアミノ酸含量・組成. 日作紀 67, 307-311.
- Yamakawa H., Ebitani T. and Terao T. (2008) : Comparison between locations of QTLs for grain chalkiness and genes responsive to high temperature during grain filling on the rice chromosome map. *Breed. Sci.* 58, 337-343.
- Yamakawa H., Hirose T, Kuroda M. and Yamaguchi T. (2007) : Comprehensive expression profiling of rice grain filling-related genes under high temperature using DNA microarray. *Plant Physiol.* 144, 258-277.
- 山下鏡一・藤本堯夫 (1974) : 肥料と米の品質に関する研究(2). 東北農試研報 48, 65-79.
- Zhang H., Duan L, Dai J.S., Zhang C.Q., Li J, Gu M.H., Liu Q.Q. and Zhu Y. (2014) : Major QTLs reduce the deleterious effects of high temperature on rice amylose content by increasing splicing efficiency of Wx pre-mRNA. *Theor. Appl. Genet.* 127, 273-282.
- Zhang H., Zhou L, Xu H, Wang L, Liu H, Zhang C, Li Q, Gu M, Wang C, Liu Q. and Zhu Y. (2019) : The qSAC3 locus from indica rice effectively increases amylose content under a variety of conditions. *BMC Plant Biol.* 19, 275.