

Short Report

分子マーカーを用いたイネ品種育成と品種鑑定

藤田直子^{1, 2}, 三浦聡子¹, クロフツ尚子¹, 中村保典^{1, 2}¹ 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科² 株式会社スターチテック

米澱粉は、我々日本人にとって、炭水化物源の多くを占める。秋田県立大学設立以来、私たちのグループでは、イネを用いて澱粉生合成メカニズムの解明研究を行ってきた。澱粉生合成に関わる多くの酵素遺伝子が欠損した変異体を多数単離・収集し、澱粉構造、物性および生理生化学的な分析を行うことで、各酵素の機能が明確になってきた。その過程で、変異体米の中には、通常の米とは全く異なる性質をもつものが存在することが明らかになってきた。我々は、これらを用いて、実用化に結び付ける研究も同時に行ってきた。本稿では、新しい品種の育成過程で用いた分子マーカーを用いた選抜手法を紹介する。同時にこれらの分子マーカーを用いて品種鑑定も可能であり、新規開発した機能性米等の品種を特定できる。

キーワード：分子マーカー、変異体米、澱粉生合成、品種育成、品種鑑定

秋田県立大学設立以来、著者のグループではイネの澱粉生合成メカニズムの解明研究に取り組んできた。米は日本人にとって主食であり、炭水化物源の多くを占める最重要な食材である。秋田県は、全国有数の米の産地であることから、著者は本学に赴任（1999年4月）が決まった際、このテーマは、最も秋田らしいテーマの1つだと確信した。

澱粉生合成メカニズムの解明には、澱粉生合成に関わる多数の酵素（図1）のそれぞれの機能を解明することが、まず行わなければならないことであった。私たちは、2000年当時、既に単離されていたSSIIa, GBSSI, BEIIb, ISA1以外の酵素の変異体を単離・収集することに集中した。現在では、胚乳（米飯として食べている部分）で強い発現のある10種類の酵素の変異体がすべて単離され、胚乳以外の葉身等で発現する酵素も含めて、14種類の酵素の変異体が得られている。このうち、ほとんどの変異体は、その胚乳澱粉の構造が野生型（ジャポニカ米）と綿密に比較され、その機能がある程度明確になってきた(Fujita, 2014)。しかし、変異体は得られているが、

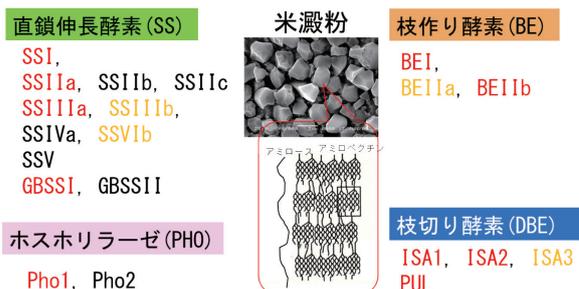


図1 イネの澱粉構造に影響を与える酵素群
 赤字は、胚乳で強い発現のある酵素、黄色はそれ以外の組織で発現する酵素を示す。黒字は、まだ変異体等が得られていない酵素を示す。

胚乳澱粉の特性が野生型と類似しているため、未だに機能が明確でないもの、変異体さえも得られておらず、全く機能未知であるものも存在する。現在も変異体の探索や機能未知の酵素の機能解明に共同研究者とともに励んでいる。

得られた変異体の中には、通常の米とは全く異なる性質をもつものも存在した。例えば、胚乳で強く発現している直鎖伸長酵素（スターチシンターゼ）の一つ、SSIIIaの欠損変異体は、アミロース含量が

高く、アミロペクチンの長鎖が少なく、糊化澱粉の粘度が極端に低い、という特徴があった(Fujita ら, 2007). また、私たちは、単離された変異体同士を交配により掛け合わせ、二重変異体の単離も試みた。SSIIIaに加えて BEIIb が欠損した二重変異体(#4019)は、アミロース含量がこれまで発見されたイネの中では最も高く(Asai ら, 2014), 当時から将来的にこの米をダイエット米にしようともくろんでいた。

これらの変異体米は、澱粉生合成に関与する重要な酵素が欠損しているため、種子が小さかったり、発芽率が低いなど、農業形質が悪く、とても品種として普及することは無理であると思われた。特に、これら変異体のもととなった品種が西日本で開発された「日本晴」や「金南風」であったことから、緯度が高く、冷涼な秋田で栽培するには、開花が遅く、収穫が10月後半になる、という大きな欠点があった。そこで、秋田で栽培するのに適し、農業形質を向上した系統を確立するため、「あきたこまち」や超多収米である「秋田63号」と戻し交配することで育種を試みた(藤田ら, 2014)。

戻し交配を行う際、ユニークな澱粉の原因となる遺伝子の欠損を維持しながら優良品種を交配する、という操作を繰り返す(藤田ら, 2014)。その際、必要となってくる操作が、「遺伝子欠損の確認」である。遺伝子の欠損は、例えば、SSIIIa 欠損変異体であれば、澱粉の形質、即ち、この変異体のアミロース含量が高いことや、アミロペクチンの長鎖が少ないといった特徴をチェックするのが一つの方法である。また、SSIIIa タンパク質や SSIIIa 活性が欠失していることをウエスタンブロットイングや Native-PAGE 活性染色法で確認するのも一つである。しかし、多検体を分析する際の簡便性から、品種育成の選抜過程で最も用いられている方法は、分子マーカー法、

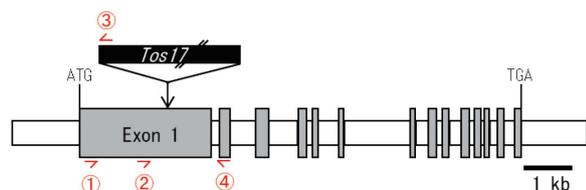


図2 イネ SSIIIa 遺伝子の構造と選抜に用いたプライマーの位置
イネの SSIIIa 遺伝子は、14個のエキソンからなる。ATGとTGAは、それぞれ開始コドンと終止コドンを示す。我々が単離した SSIIIa 欠損変異体は、レトロトランスポゾン *Tos17* (約4 kb) がエキソン1に挿入されている。①～④は、プライマーの位置を示す。

即ち DNA で選抜する方法である。我々が持つ SSIIIa 欠損変異体は、SSIIIa 遺伝子 (AP004660) のエキソン1にレトロトランスポゾンである *Tos17* (Hirochika, 2001) が挿入されることで生じている (Fujita ら, 2007, 図2)。従って、*Tos17* が SSIIIa 遺伝子に挿入されているか否かを調べることで、変異型を選抜し、次の戻し交配に使うことが可能である。本研究では、分子マーカーによる選抜法と品種鑑定について、解説する。

材料と方法

選抜対象のイネ種子をシャーレに播種し、発芽させ、セルトレーに移植した。葉身が5~8 cm程度まで成長したら、各個体の葉身を約1 cm採取し、ビーズショッカー(安井理化機器)用の試験管に入れ、使用するまで冷凍保存した。各個体の葉身を液体窒素で凍結させたのち、ビーズショッカーで粉碎し、Miura ら(2018)の方法でDNAを抽出した。SSIIIa 遺伝子に *Tos17* が挿入されているかどうかを確認するため、SSIIIa 遺伝子および *Tos17* の配列を参考に、プライマーを設計した(図2, 表1)。

表1. 分子マーカーによる選抜に用いたプライマー配列

プライマー名	配列
イネ SSIIIa 遺伝子の配列上のフォワードプライマー	
①SSIIIa-5F	5'-TGACACAGTGTTCACATGGGG-3'
②SSIIIa-10F	5'-GTGGTGACGATGATTTGCCA-3'
<i>Tos17</i> 遺伝子の配列上のリバースプライマー	
③T1R	5'-CGGTGAAAAGGACAGTGGAG-3'
イネ SSIIIa 遺伝子の配列上のリバースプライマー	
④SSIIIa-10R	5'-CGTTAGTCATGGCATTGGA-3'

①～④は、図2のプライマーの配列を示す。

PCR (Polymerase chain reaction, DNA の増幅操作) は、以下の条件で行った。各イネ葉身から抽出した DNA 0.4 μ g に、10 μ M プライマーを各 1 μ L, 10 X Expand Long Template Buffer 1 (Roche) を 1 μ L, 2.5 mM dNTPs を 0.8 μ L, Expand Long Template Enzyme mix (Roche) 0.25 μ L (1.25 U) を混合した。サーマルサイクラーを用いて 94 $^{\circ}$ C, 3分を1サイクル, 94 $^{\circ}$ C, 30秒, 62 $^{\circ}$ C, X秒, 68 $^{\circ}$ C 5分を10サイクル, 94 $^{\circ}$ C 30秒, 62 $^{\circ}$ C,

X 秒, 68 °C, 5 分 (X 秒は、1 サイクル当たり 10 秒ずつ伸長時間を延長) を 25 サイクル行った。増幅した DNA 断片は、0.8 % アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロミドに 20 分浸したのち、紫外線を照射して検出した。

結果と考察

SSIIIa 遺伝子に *Tos17* が挿入されているかどうかを確認するために、4 か所にプライマーを設計した (図 2)。*SSIIIa* 遺伝子の *Tos17* が挿入されている箇所より 5' 側にフォワードプライマーを 2 箇所 (①と②)、挿入された *Tos17* の 5' 末端側にリバースプライマーを 1 箇所 (③)、*SSIIIa* 遺伝子の *Tos17* が挿入されている箇所より 3' 側にリバースプライマーを 1 か所 (④) 設計した。①と③のプライマーを用いた PCR では、*Tos17* が挿入されていれば、2,080 bp の断片が増幅するが、挿入されていなければ、増幅されない。一方、②と④のプライマーを用いた PCR では、*Tos17* が挿入されていなければ、約 1,240 bp

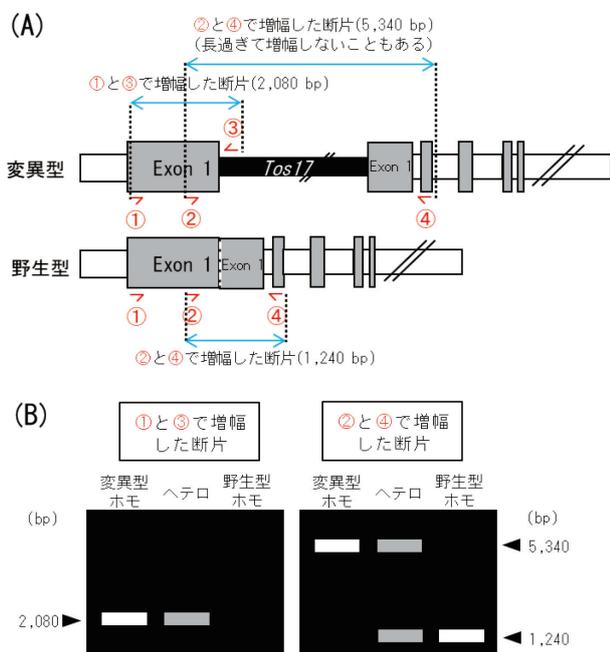


図3 分子マーカーによる選抜の原理
*Tos17*が挿入された個体に変異型になり、挿入されていない個体は、野生型となる。イネは2倍体なので、変異型ホモが変異体となる。(A)野生型と変異型の*SSIIIa*遺伝子構造とプライマー (①~④) の位置およびPCR増幅断片の長さ。(B)PCRで増幅した断片をアガロース電気泳動に供した際の予想されるバンドパターン。

の断片が増幅するが、約 4100 bp の *Tos17* が挿入された場合、1,240 bp + 4,100 bp = 5,340 bp の断片が増幅されるはずである (図 3)。これは、非常に長いので、増幅されない場合もある。増幅した DNA をアガロースゲル電気泳動に供すると、図 3 (B) のようなパターンになるはずである。

平成 30 年度に品種登録申請した「あきたばらり」と「あきたさらり」は、SSIIIa 欠損変異体にそれぞれ「あきたこまち」と「秋田 63 号」を 3 回戻し交配した系統である。戻し交配する際は、交配した F₁ 種子を播種し、これらの分子マーカー法でヘテロであることを確認した個体を選抜し、連続的に戻し交配親を交配していった (藤田ら, 2014)。3 回戻し交配した F₁ 種子 (BC₃F₁) の自殖種子 (BC₃F₂) から、劣性ホモ個体を同様にこれらの分子マーカーで選抜し、さらに自殖を繰り返して品種とした。実際の電気泳動像を図 4 に示す。

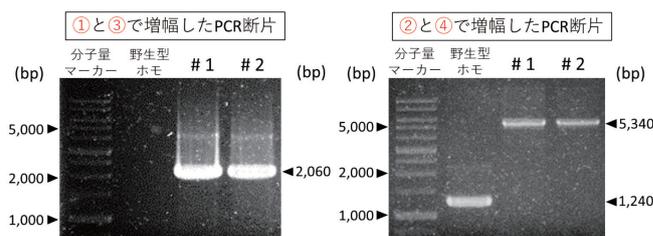


図4 「あきたばらり」の遺伝子型の確認 (実際のアガロース電気泳動写真)
供試したすべての個体 (#1と#2は、個体番号) が変異型ホモになっていることを示す。

上記で述べた分子マーカーは、戻し交配時の選抜のみならず、品種鑑定に用いることができる。我々が開発した品種は、基本特許 (特許第 4711762 号) と品種育成権 (品種登録出願第 33352 号および 33353 号) の二つの知的財産権が関与している。従って、これらの商用を目的とした栽培や販売は、出願人や育成権者に許諾された者のみが可能となる。万が一、許諾を得ないで栽培・販売した場合は不正使用となる。仮に許可を得ずに使用された場合も、その種子から発芽させた幼苗の DNA を抽出し、表 1 のプライマーを用いて図 4 に示すバンドパターンが検出されれば、我々の材料を用いた品種あるいは改良を加えた品種であることが明確になる。すなわち、これらの分子マーカーを用いることで遺伝子鑑定が可能

となる。以上のことから、これらの情報を公開することで、不正使用を未然に防ぐことが可能である。

謝辞

本研究は、本学平成 29 年度学長プロジェクト科研費チャレンジ研究および農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業・実用技術開発ステージ (28029C, 平成 28~30 年度) の支援で行われた。

文献

- Asai, H., Abe, N., Matsushima, R., Crofts, N., Oitome, N., Nakamura, Y. & Fujita, N. (2014). Deficiencies in both starch synthase (SS) IIIa and branching enzyme IIb lead to a significant increase in amylose in SSIIa inactive japonica rice seeds. *Journal of Experimental Botany* 65, 5497-5507.
- Hirochika, H. (2001) Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics. *Current Opinion of Plant Biology* 4, 118-122.
- 藤田直子, 立木芳, 追留那緒子, 阿部美里, クロフツ尚子, 川本朋彦, 小玉郁子, 加藤和直, 佐藤健介, 高橋竜一, 伏見力 (2014). 「新規澱粉米品種の育成に向けて~BC₂F₃ 種子および BC₂F₂ 植物の解析~」『秋田県立大学ウェブジャーナル B』1: 7-11
- 藤田直子, 中村保典, 吉田真由美, 齋藤かほり, 廣近洋彦, 宮尾安藝雄. 「スターチシンターゼ IIIa 型の機能解明と新規デンプン作出」. 特許第 4711762 号 (平成 23 年 4 月 1 日) (出願人: 国立研究開発法人科学技術振興機構, 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構)
- Fujita, N., Yoshida, M., Kondo, T., Saito, K., Utsumi, Y., Tokunaga, T., Nishi, A., Satoh, H., Park, J.-H., Jane, J.-L., Miyao, A., Hirochika, H. & Nakamura, Y. (2007) Characterization of SSIIIa-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.); the function of SSIIIa and pleiotropic effects by SSIIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiology* 144, 2009-2023.
- Miura, S., Crofts, N., Abe, M., Murai, K., Iwaki, K., Fujita, S., Fujita, N. (2018) Identification of a point mutation in the Granule-bound starch synthase I gene (*GBSSI*) in a waxy diploid wheat mutant and design of molecular markers for backcrossing. *Journal of Applied Glycoscience* 65, 9-11.
- 中村直子, クロフツ尚子, 藤田那緒子, 小玉郁子, 川本朋彦, 加藤和直, 柴田智, 高橋竜一, 佐藤健介, 伏見力. 「あきたさらり」 品種登録出願第 33352 号 (平成 31 年 1 月 21 日出願公表) (出願人: 公立大学法人秋田県立大学, 秋田県, 国立研究開発法人国際農林水産業研究センター)
- 中村直子, クロフツ尚子, 藤田那緒子, 小玉郁子, 川本朋彦, 加藤和直, 柴田智, 高橋竜一, 佐藤健介, 伏見力. 「あきたぱらり」 品種登録出願第 33353 号 (平成 31 年 1 月 21 日出願公表) (出願人: 公立大学法人秋田県立大学, 秋田県, 国立研究開発法人国際農林水産業研究センター)

〔 2019 年 6 月 30 日受付
2019 年 7 月 9 日受理 〕

Rice breeding and variety determination of novel cultivars using molecular markers

Naoko Fujita¹, Satoko Miura¹, Naoko Crofts¹, Yasunori Nakamura^{1,2}

¹ *Department of Biological Production, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

² *Starch Technologies Co., Ltd.*

Rice starch is the greatest source of carbohydrates for the Japanese. At Akita Prefectural University, we have studied starch biosynthesis mechanisms using rice since 1999. The isolation and collection of rice mutant lines related to starch biosynthesis genes and the analyses of their starch structure, physicochemical properties, and physiological biochemistry have contributed to the understanding of rice starch biosynthesis. During these processes, we found unique starch properties in isolated mutant rice lines. Therefore, we also researched their application for practical use. In the present study, we introduced the molecular marker selection method for breeding novel rice cultivars. This method can also be used in genetic screening to identify novel rice cultivars with unique starch properties.

Keywords: Molecular marker, rice mutant lines, *starch biosynthesis*, rice breeding, variety determination