

名大農学部酒 “なごみ桜” の醸造に使う酒米を名大ゆかりの酒米品種に切り

替えるための試み：その3

○加藤大和^{A)}、水野真也^{A)}、厚味智子^{A)}

^{A)} 教育研究技術支援室 生物生体技術系

概要

なごみ桜は、本学農学部が主体となって産学共同で醸す日本酒である。なごみ桜の醸造には、東郷フィールドで生産した酒造好適米若水と、東山キャンパスの八重桜から単離した野生酵母を育種したさくら酵母が使われている。本技術研鑽プログラムでは、なごみ桜のさらなる高付加価値化のために、醸造に用いる酒米をより本学と関わり深い品種にすることを究極的な目標としている。本年度は以下に示す3つの課題について検討を行った。

- ① 酒米品種と非酒米品種とを識別する CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) マーカーの開発
- ② 穀粒における心白発現機構の遺伝学的解析
- ③ 人工交配 F₁ 種子からの F₂ 種子取得と新規人工交配

その結果日本晴/コシヒカリ間の SNP (Single nucleotide polymorphism) 多型情報に基づく酒米と非酒米とを識別可能な CAPS マーカーを 59 箇所同定し、また五百万石とコシヒカリとの交配 F₂ 集団における心白発現率の連続的な分布を確認した。さらに昨年度までに人工交配して得た F₁ 種子を圃場に栽培して F₂ 種子集団を得るとともに、播種時期をずらすことで新たに日本晴と雄町との人工交配 F₁ 種子を得ることが出来た。

1 緒論

日本酒は、我が国が誇る伝統文化である。現在日本各地の酒蔵からそれぞれその地域や蔵の特徴を生かした銘酒が造られている。和食がユネスコの無形文化遺産に登録されたこともあり、世界でも日本酒の評価は高まってきている。本学においては盛田株式会社とあいち産業科学技術総合センターとの共同で純米酒なごみ桜を醸し、平成 23 年より名古屋大学生協を通じて毎年販売し好評を得ている。なごみ桜は東山キャンパスの農学部構内にある八重桜から単離したさくら酵母と、東山キャンパスから東に 15 km ほど離れた東郷フィールドの水田で生産した酒米若水を用いて醸造される特色ある純米酒であり、オール名大による醸造というイメージが強く意識されている^[1]。若水は 1985 年に愛知県農業試験場が育成した品種であり^[2]、なごみ桜のさらなる特徴化・差別化のためには、仕込みに使う酒米をより名大に縁の深い酒米品種に切り替えることが非常に効果的だと考えられる。

本研鑽プログラムでは、昨年度に引き続きなごみ桜の醸造に最も適した酒米品種は何か、また酒米が持つ特徴的な形質の発現がどのような遺伝的機構により制御されているのかを検討する目的で、1) 酒米品種と非酒米品種とを識別する CAPS マーカーの開発、2) 穀粒における心白発現機構の遺伝学的解析、3) 人工交配 F₁ 種子からの F₂ 種子取得と新規人工交配に取り組んだ。今回得られた結果は、DNA マーカーを利用した酒米品種育成並びに穀粒の心白発現率の制御機構の解明につながることを期待される。

2 材料と方法

イネ品種には、本学農学部で継代栽培し維持されてきた系統：日本晴、コシヒカリ、雄町、若水、五百万石、オオチカラの6系統を用い、圃場および温室での栽培と人工交配については昨年度と同様に実施した^[3]。冬季栽培には農学部の閉鎖系温室を利用した。

公開されている日本晴^[4]とコシヒカリ^[5]のゲノム情報をもとに、昨年度までの研鑽プログラム^[3]で開発した酒米/非酒米間のDNAマーカーの数が比較的少ない染色体2, 3, 8, 10, 11, 12番について、日本晴/コシヒカリ間のSNP多型のうち制限酵素 *EcoR*I で識別が可能な72箇所を抽出し、自作PerlスクリプトとBatchPrimer3 v1.0 (<http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/>) を使ってCAPS解析用のPCRプライマー配列を設計した。SNP多型の判別には、非酒米として日本晴、コシヒカリ及びオオチカラ、酒米として雄町に加えて若水と五百万石の葉からそれぞれCTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) 法により抽出したゲノムDNAをPCR反応の鋳型として使用した^[3]。PCR反応のポリメラーゼにはKOD-FX NEO (TOYOBO)を使用し、PCR産物を*EcoR*I (TAKARA) で消化後、アガロースゲル電気泳動により遺伝子型を判定した^[6]。なおコシヒカリSNP多型のゲノム上の位置についてはWEBサイト^[4]と文献^[5]の情報を元に、自作Perlスクリプトを用いてIRGSP-1.0^[7]の位置に変換した。

昨年度圃場栽培して得た五百万石とコシヒカリとの人工交配F₂種子集団96個体を東郷フィールドの水田試験圃場に展開し、種子の登熟後収穫して乾燥させ、それぞれの個体の次世代F₃種子集団における心白発現率を計測した。F₂集団の親として用いたF₁個体の遺伝子型は、F₂種子の心白発現率から両親由来のヘテロ接合体であることを推定した。心白発現率を逆正弦変換により角度に変換して分散を求め、F₂種子とF₃種子の分散から広義の遺伝率を決定した。また雄町を4月下旬に芽出しし、日本晴を6月初旬に芽出しさせ東山キャンパス内温室で栽培することで開花時期が異なる両品種の開花を調整し、人工交配を実施した。

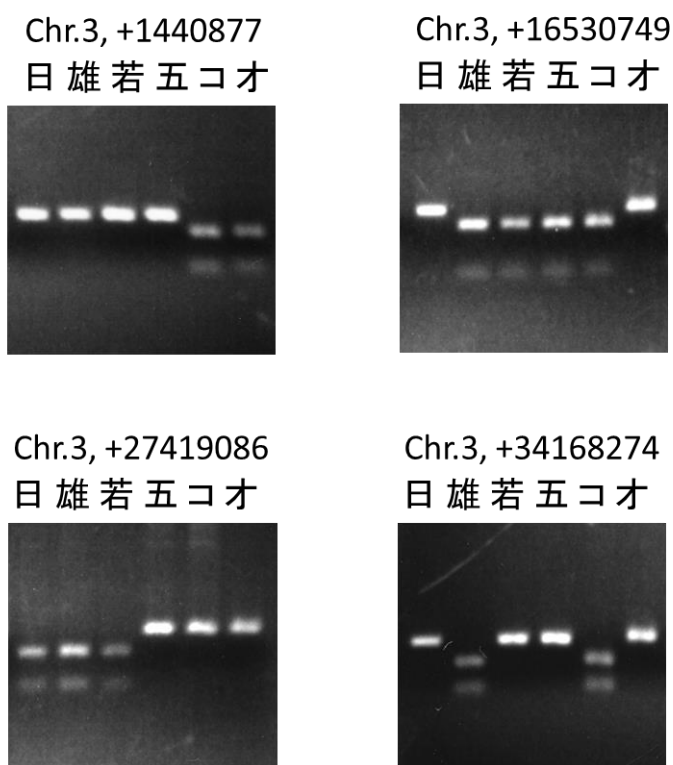
3 結果

3.1 酒米品種と非酒米品種とを識別するCAPSマーカーの開発

今世紀に入り農作物を含めた様々な植物種で全ゲノムシーケンスが解読されてきたことから、そのゲノム情報を品種改良や新品種育成に利用しようとする研究開発が活発になってきている。このような試みはMAS (Marker Assisted selection) あるいはMAB (Marker Assisted Breeding) などと呼ばれており^[8]、イネにおいても栄養要求性や病原抵抗性、乾燥耐性等を指標にしたMASの試みが幾つか報告されている。

SNP多型は個体あるいは品種や系統間におけるゲノムDNAの1塩基置換による遺伝子多型のこと、イネにおいてはリファレンスゲノムである日本晴ゲノムに対しコシヒカリゲノムは6万4千箇所あまりのSNPを持つことが報告されている^[5]。今回日本晴/コシヒカリ間

図1.



SNP 多型の情報を酒米の MAS に利用できないか検討するために、酒米のゲノム DNA に対して制限酵素 *EcoRI* による CAPS 法を適用した。CAPS 法は SNP によって生じる制限酵素認識配列の有無によって PCR 産物の酵素消化断片の塩基長が異なることを利用してゲノム間の遺伝子型の違いを調べる手法である。図 1 に 3 番染色体上の 4 箇所候補 SNP に対する CAPS 解析の結果を示す。+1440877 のような数字は置換塩基の染色体上の位置を示している。左上の写真の場合、酒米 3 品種は全て日本晴型で、*EcoRI* 認識配列 (5'-GAATTC-3') を持たず PCR 産物が切断されていないため 1 本のバンドが検出されているのに対し、コシヒカリとオオチカラはコシヒカリ型で PCR 産物が制限酵素により切断されたため、非切断型よりも塩基長の短い 2 本のバンドが検出されている。このような解析を染色体 2, 3, 8, 10, 11, 12 番上の 72 箇所の候補 SNP に対して実施した結果、酒米のいずれか (雄町、若水および五百万石) と飯米 (コシヒカリまたは日本晴) との間で遺伝子型を識別可能な SNP を 59 箇所同定することができた。紙面の都合上、染色体 3 番についてのみの結果を表 1 に示す。日本晴型を黄色、コシヒカリ型を紫色の背景で示した。遺伝子型判定に使用可能な CAPS マーカーの数は、2 番染色体に 5 箇所、3 番染色体に 7 箇所、8 番染色体に 11 箇所、10 番染色体に 7 箇所、11 番染色体に 19 箇所、12 番染色体に 10 箇所であった。

表 1

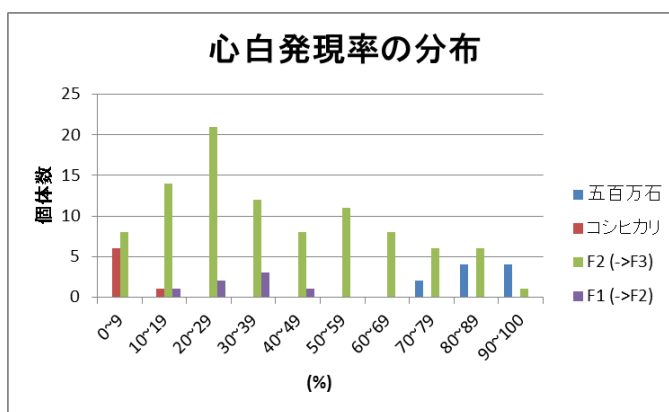
| CAPS# | Chr. No. | IRGSP-Pos | Enzyme | 品種 | | | | | |
|-------|----------|-----------|--------|-----|----|-------|------|-------|-------|
| | | | | 日本晴 | 雄町 | 若水 | 五百万石 | コシヒカリ | オオチカラ |
| 7 | chr3 | 1296786 | EcoRI | 日 | 日 | 日 | 日 | コシ | コシ |
| 8 | chr3 | 1440877 | EcoRI | 日 | 日 | 日 | 日 | コシ | コシ |
| 9 | chr3 | 11084436 | EcoRI | 日 | コシ | バンドなし | コシ | コシ | コシ |
| 10 | chr3 | 14938247 | EcoRI | 日 | コシ | コシ | コシ | コシ | バンドなし |
| 11 | chr3 | 16530749 | EcoRI | 日 | コシ | コシ | コシ | コシ | 日 |
| 12 | chr3 | 27419086 | EcoRI | 日 | 日 | 日 | コシ | コシ | コシ |
| 13 | chr3 | 34168274 | EcoRI | 日 | コシ | 日 | 日 | コシ | 日 |

3.2 穀粒の心白発現機構の遺伝学的な解析

酒造好適米に求められる大きな特徴の一つとして、穀粒内部の中心付近が白く濁るいわゆる心白の形成が挙げられる。心白粒が出現する割合を心白発現率といい、五百万石などの発現率が高い品種では 70% 以上にもなるが、一方で一般の飯米ではほとんど心白の発現は見られない。心白発現率が品種により異なっていることから遺伝的に制御されていると考えられているが、その機構の詳細についてはほとんど分かっていない。酒米の心白

発現を支配する遺伝子領域を同定する目的で、五百万石とコシヒカリとの交配 F₂ 集団を東郷フィールドで展開し、96 個体についてその次世代 F₃ 種子集団の心白発現率を計測した (図 2)。その結果 F₂ 集団の心白発現率は連続的な分布を示し、最頻値は 20% から 30% までの間で、個体数は 21 個体であった。心白発現率の最高値は 98.8%、最低値は 3.7% であった。心白発現率が F₁ の母本である五百万石並みの 70% 以上だったものは 13 個体あり、またコシヒカリと同程度の 10% 未満だったものが 8 個体あった。F₂ 集団の心白発現率が連続的に分布したことは、酒造適性に重要なこの形質の発現が単一の遺伝子ではなく、複数の遺伝子により支配されていることを示唆している。心白発現率 (角度) の平均値はそれぞれ五百万石が 59.7、コシヒカリが 2.88、

図 2.



F₁ 集団が 13.2、F₂ 集団が 24.5 であった (表 2)。両親および F₁ 集団の心白発現率の分散は小さいのに対し、F₂ 集団では分散が大きかった。全遺伝子型がヘテロ接合である F₁ 集団と、様々な遺伝子型個体からなる F₂ 集団の心白発現率の分散から計算した広義の遺伝率は 0.97 であった。

一般に草丈や収量のような農業形質は効果の異なる複数の遺伝子座により支配されることが多い。このような形質を量的形質 (Quantitative Trait) といい、量的形質を支配する遺伝子座のことを QTLs (Quantitative Trait Loci) と呼ぶ^[9]。人工交配などによる異品種間の交配では F₁ 個体は両親からそれぞれ 1 セットの染色体を受け取るため、全ての遺伝子座でヘテロ接合となる。この F₁ 個体を自殖して F₂ 集団を作る場合、配偶子形成時の減数分裂における相同組換えにより配偶子のゲノムは両親のゲノムがシャッフルされた状態となる。このような精子と卵子が受精することで、接合子のゲノムは種々の遺伝子座で接合性 (zygosity) が異なる様々な組み合わせが生じることになる。このようなゲノム構成をもつ F₂ 集団を栽培し、それらの表現型を数値化し、さらに各個体の全染色体領域に渡る DNA マーカーの遺伝子型を決定し、表現型の程度と遺伝子型との相関を調べることで、興味ある形質を支配する遺伝子領域を同定する手法を QTL 解析と呼ぶ。五百万石の心白発現を支配する遺伝子座の同定のためには今年度栽培した F₂ 集団を使って QTL 解析を実施することが不可欠である。

| 表 2. | 五百万石 | コシヒカリ | 五×コシ F ₁ | 五×コシ F ₂ |
|-----------|------|-------|---------------------|---------------------|
| 心白発現率(角度) | 59.7 | 2.88 | 13.2 | 24.5 |
| 分散 | 60.9 | 6.1 | 7.46 | 290 |

4 考察

CAPS マーカーは SSR (Simple Sequence Repeat) マーカーや indel (insertion/deletion) マーカーと比較して、PCR プライマーの位置を適切に設計すれば、アガロースゲル電気泳動により明確な泳動パターンの違いとして認識できるため、正確な遺伝子型判定が可能である。本研鑽プログラムでは、日本晴/コシヒカリ間の SNP 多型情報を酒米品種に適用することで、本研鑽プログラムで作製している酒米と非酒米との交配後代の集団中で遺伝子型の識別に利用可能な 59 箇所の SNP を同定した。今回はイネの 12 本ある染色体の内 6 本に絞って解析したが、実際に MAS に用いるためには全ゲノムに渡る CAPS マーカー情報が必要となるため、残り 6 本の染色体についても早急に同様の CAPS 解析を実施することが必要である。また日本晴/コシヒカリ間の SNP 情報を利用したため、交配の組み合わせによっては泳動パターンに違いがないものも含まれている。今後は酒米に特有な SNP 情報を用いて CAPS 解析を行うことで、交配の組合せごとに最適な DNA マーカーセットを開発することが強く望まれる。

酒米品種の中でも心白発現率が高い五百万石と心白が発現しない飯米品種コシヒカリとの人工交配 F₂ 集団の次世代穀粒の心白発現率は連続的な分布を示した。また五百万石の心白発現率の広義の遺伝率は 0.97 と非常に高かった。池上らによると、山田錦とレイホウとの交配 F₂ 集団においても心白発現率の連続的な分布と非常に高い遺伝率が報告されている^[10]。これは五百万石や山田錦の心白発現は複数の遺伝子により支配されることを示している。心白発現の遺伝的な制御機構を解明するためには、今回心白発現率を計測した F₂ 集団について今後 QTL 解析を行い、心白発現に関わる遺伝子座を同定する必要がある。QTL 解析のためには交配の組み合わせに最適な全染色体に渡る DNA マーカーセットの開発が急務である。

最後になるが、2 年前から試みてきた晩生品種の酒米雄町と中生品種の飯米日本晴との人工交配を今年度ようやく実施することができ、20 粒の F₁ 種子を得ることが出来た。現在日本各地で清酒醸造に用いられている酒米品種の多くは雄町が元になっていると考えられている。雄町のゲノム情報は東京農業大学生物資源ゲ

ノム解析センターより公開されている^[11]ことから、DNA 多型情報を利用して簡便で安価な CAPS マーカーを開発することが可能であると考えられる。また五百万石とコシヒカリとを用いた染色体断片置換系統群 (CSSLs: Chromosome segment substitution lines)^[12] の作製についても、順調に進めることができた。F₁ 個体にコシヒカリを戻し交配した BC₁F₁ 系統 64 個体について温室にて栽培し BC₁F₂ 種子を得た。現在閉鎖系温室にて BC₁F₂ 植物を栽培中である。もともと大粒種が好まれてきた酒米をさらに大粒化するために昨年度試みた酒米と超大粒種オオチカラ^[13]との人工交配 F₁ 種子についても圃場栽培により F₂ 種子を得た。今後適切な選抜を繰り返すことで、将来的に超大粒酒米育種につながるかもしれない。

参考文献

- [1] 黒田俊一, “オール名古屋大学の純米酒「なごみ桜」”, 日本醸造協会誌, 108, 352-353, (2013)
- [2] 香村敏郎, et al., “水稻酒米の新品種「若水」の育成”, 愛知農総試研報, 15, 24-34, (1983)
- [3] 加藤大和, “名大農学部酒 “なごみ桜” の醸造に使う酒米を名大ゆかりの酒米品種に切り替えるための試み その 2”, 名古屋大学技術研修会報告, 11, (2016)
- [4] <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>
- [5] Yamamoto T. et al., “Fine definition of the pedigree haplotypes of closely related rice cultivars by means of genome-wide discovery of single-nucleotide polymorphisms”, BMC Genomics, 11, 267, (2010)
- [6] Sambrook and Russel, “Molecular cloning 3rd ed.”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (2001)
- [7] Kawahara Y. et al., “Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data”, Rice, 6, 4, (2013)
- [8] Collard BCY. and MacKill DJ., “Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century”, Phil. Trans. R. Soc. B, 363, 557-572, (2008)
- [9] McCouch SR. and Doerge RW., “QTL mapping in rice”, Trends Genet., 11, 482-487, (1995)
- [10] 池上 勝 et al., “選抜反応から推定した酒米品種「山田錦」の心白発現の遺伝率”, 育種学研究, 5, 9-15, (2003)
- [11] Arai-Kichise Y. et al., “Discovery of Genome-Wide DNA Polymorphisms in a Landrace Cultivar of Japonica Rice by Whole-Genome Sequencing”, Plant Cell Physiol. 52. 274-282, (2011)
- [12] Ebitani T. et al., “Construction and evaluation of chromosome segment substitution lines carrying overlapping chromosome segments of *indica* rice cultivar ‘Kasalath’ in a genetic background of *japonica* elite cultivar ‘Koshihikari’”, Breeding Sci., 55, 65-73, (2005)
- [13] 堀内久満, et al., “水稻新品種オオチカラの育成経過と特性”, 北陸作物学会報, 26, 56-59 (1991)