

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

○加藤大和^{A)}、水野真也^{A)}、厚味智子^{A)}、加藤俊之^{B)}

^{A)} 教育・研究技術支援室 生物・生体技術系

^{B)} 共通基盤技術支援室 情報通信技術系

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。酒米には東郷フィールドで生産された若水を使用し、酵母は農学部構内の八重桜から単離したさくら酵母を使っている。本技術研鑽プログラムは、なごみ桜の醸造において将来的に本学に関わり深い酒米品種を使用することを究極的な目標としている。

本年度は次に示す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 indel マーカーの開発。
- ② 心白粒形成機構の遺伝学的な解析。
- ③ 人工交配による新しい特徴を持つ酒米品種の開発。

本稿ではこれらの課題についての進捗状況と今後の方針について報告する。

1 緒論

日本酒は、我が国が誇る伝統文化である。近年味や香りはもとより、使用する酒米や搗精歩合、造りにまでこだわって、その地方あるいはその蔵の特徴を生かした形で様々な日本酒が生産されている。本学においても名大農学部酒”なごみ桜”を醸し、卒業記念として学内向けに販売し好評を得ている。なごみ桜は本学農学部構内の八重桜から単離したさくら酵母を発酵に用い、酒米に本学東郷フィールドで生産された”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、なごみ桜の醸造に最も適した酒米品種は何か、さらにはよい酒、うまい酒を醸すためにはどのような特徴を持つ酒米が理想的であ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 DNA マーカーの開発、2) 心白粒形成機構の遺伝学的な解析、3) 人工交配による新しい特徴を持つ酒米品種の開発、に取り組んだ。その結果、酒米品種である雄町と飯米である日本晴のゲノム間多型を識別できる43個の新規 DNA マーカーを開発することができた。また麹菌による蒸米のはげ込みの程度に大きく影響する形質である心白の形成機構を遺伝学的に解析するための F₂ 種子集団を得ることができた。さらに、昨年度の研鑽プログラムにより示された、若水の短所である一株粒数の少なさを改良するための人工交配 F₁ 種子と、超大粒の酒米品種育種をめざしたオオチカラと酒米品種との人工交配 F₁ 種子を得ることができた。

ここで得られた新たな知見と新規に作製した遺伝学的解析材料および育種材料を用い、さらなる解析を続けることで、将来的になごみ桜に最も適した酒米を醸造に用いることにつながると期待される。

2 材料と方法

イネ品種には、本学農学部で継代・種子保存されてきた日本晴、コシヒカリ、雄町、若水、五百万石、オオチカラを用い、圃場での栽培と人工交配については昨年と同様に実施した^[3]。

新規 indel マーカー開発のため、公開されている日本晴^[4]と雄町^[5]のゲノム情報に基づき、両品種間で 25 bp 以上の挿入または欠失がある DNA 領域を抽出し、それら 75 箇所について候補部位近傍の日本晴型 DNA 配列を収集した。得られた全近傍配列を FASTA フォーマットに整形し、プライマー設計用のウェブサイト: BatchPrimer3 v1.0 (<http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/>) を使用して PCR 用のプライマー候補配列を得た。以上のゲノム配列処理にはスクリプト言語 Perl の自作プログラムを用いた。PCR 法やアガロースゲル電気泳動等は一般的な手法で行った^[6]。ゲノム多型の判別には、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抽出したゲノム DNA を鋳型として使用した^[3]。得られた DNA マーカーのゲノム上の位置の視覚化には Chromosome Map Tool (<http://viewer.shigen.info/oryzavw/maptool/>) を用いた。

心白粒の分離比解析には、昨年度交配して得た F₁ 個体を東郷フィールド水田試験圃場で栽培し、得られた F₂ 世代種子について実施した。

3 結果

3.1 酒米品種と非酒米品種とを識別する indel マーカーの開発

近縁種間あるいは近縁系統間でのゲノム多型を判別するために様々な DNA マーカーが開発されている^[7]。今回は日本晴と雄町とのゲノム多型を簡便に識別する目的で、indel マーカーの使用を検討した。indel マーカーとは、比較する系統間で十数 ~ 数十塩基程度の挿入あるいは欠失がゲノム配列上に存在する場合、その領域を含む DNA 断片を PCR により増幅してアガロースゲル等で電気泳動を行い、その泳動度の差から多型を判定する方法である。公開されている日本晴と雄町のゲノム配列情報をもとに、全染色体に渡って 25 bp 以上の欠失または挿入を含むゲノム部位を抽出したところ、75 箇所の存在が予測された。これらはいずれも雄町において日本晴型配列の欠失によるものであった。実際にこれらの候補部位に対して PCR 用のプライマー設計を行い、各品種から目的のゲノム断片を増幅して電気泳動したところ、日本晴と雄町間で多型を示したマーカーが 43 個存在した。また 9 個のマーカーはデータベース上では多型が存在するにも関わらず、今回の電気泳動では多型を識別できなかった。はっきりとしたバンドが認められず品種間の多型が識別できないマーカー候補が 23 個存在した。

図 1 に幾つかの indel マーカーのアガロースゲル電気泳動の結果を示す。Omachi_del1 では日本晴 / 雄町間で多型が存在し、若水と五百万石は日本晴型、コシヒカリとオオチカラは雄町型であることを示す。Omachi_del2 では日本晴以外の 5 品種は日本晴と異なる型で、ここでは便宜上雄町型とする。Omachi_del6 は雄町型が若水と五百万石で保存されており、一方でコシヒカリやオオチカラなどの非酒米品種においては日本晴型であることから、このマーカー付近のゲノム配列は何かしら酒米品種群に共通していることを示唆している。Omachi_del7 は酒米 3 品種と超大粒種のオオチカラが雄町型で、小粒種の日本晴とコシヒカリは共通して日本晴型であった。酒米 3 品種とオオチカラで型が共通していることは、単なる偶然かもしれないし、あるいは 4 品種に共通する大粒の形質に関わる遺伝子領域であることを示唆しているのかもしれない。

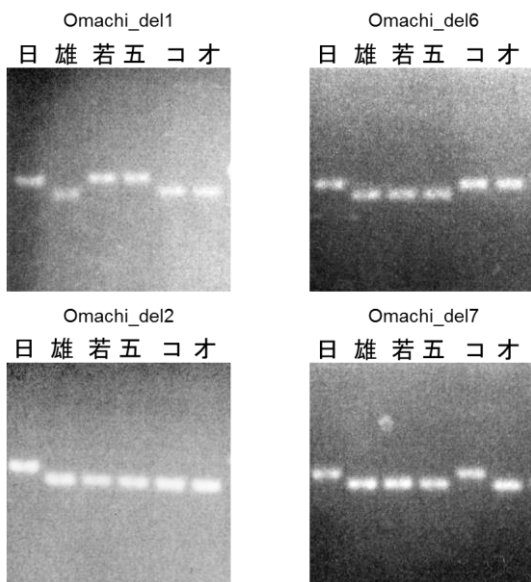


図 1.

表 1 に、染色体 1 番に関して今回解析した indel マーカーについての結果を示す。このような表を 12 本ある全染色体について作成した結果、今回用いた酒米 3 品種すべてが雄町型で、その他 3 品種においてすべて日本晴型であったマーカーが 10 箇所存在した。内訳はそれぞれ 1 番染色体長腕に 3 箇所、2 番染色体長腕に 2 箇所、5 番染色体長腕に 2 箇所、6 番染色体長腕に 2 箇所、9 番染色体長腕に 1 箇所であった。これらのマーカー付近の DNA 配列は酒米育種の過程で保存されてきたか、あるいは淘汰されずに残った可能性が高いと考えられる。

表 1.

indel marker No.	Chr. No.	品種					
		日本晴	雄町	若水	五百万石	コシヒカリ	オオチカラ
Omachi_del1	1	日	雄	日	日	雄	雄
Omachi_del2	1	日	雄	雄	雄	雄	雄
Omachi_del3	1	日	日	日	日	日	日
Omachi_del4	1	バンド薄い	バンド薄い	バンド薄い	バンド薄い	バンド薄い	バンド薄い
Omachi_del5	1	日	雄	雄	雄	日	日
Omachi_del6	1	日	雄	雄	雄	日	日
Omachi_del7	1	日	雄	雄	雄	日	雄
Omachi_del8	1	日	雄	雄	雄	日	日

3.2 心白粒形成機構の遺伝学的な解析

酒質との関連性が高いと考えられている粒形質の一つである心白の発現機構について遺伝学的な解析を行うため、昨年度酒米品種と非酒米品種間との人工交配により得た F₁ 種子について、今年度圃場にて栽培し心白粒の発現率を調査した。メンデルの遺伝法則^[8]によると、単純な 1 遺伝子座の支配による形質では、交雑 F₁ 個体の自殖による F₂ 世代の表現型分離比はおよそ 3 : 1 となる。この場合に F₁ 世代で現れた表現型を優性形質と呼ぶ。一方多数の遺伝子座に支配される量的形質においては、F₁ 世代の形質は両親の中間的形質となり、その自殖による F₂ 世代では表現型が連続的に変化する集団を作る。酒米の心白発現の遺伝的機構に関してはこれまで限られた報告しかなく^[9]、その詳細についてはほとんど分かっていない。

図 2 に今年度圃場で栽培したコシヒカリと五百万石の心白発現率を示す。飯米であるコシヒカリでは心白粒はほとんど発生しないが、酒米品種の五百万石では結実した粒の 9 割以上が心白粒であった。五百万石にコシヒカリを交配した F₁ 植物 8 個体についての心白発現率を図 3 に示した。

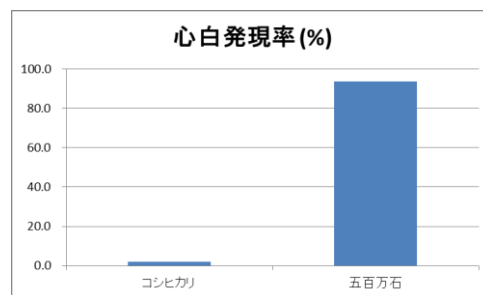
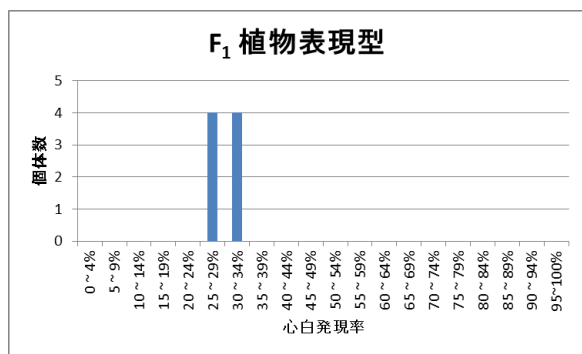


図 2.



F₁ 個体の次世代の心白発現率はどの個体も 30% 程度であった。これは両親の中間的な形質を示していると考えられるため、複数の遺伝子座に支配されているように見える。しかし、F₂ 種子自体の透明粒と心白粒の分離比はおよそ 3 : 1 であったことから、単一の遺伝子座による支配の可能性も否定できない。今回得られた F₂ 世代種子を圃場で栽培し、自殖による F₃ 世代種子の分離比を調べることで、酒米における心白粒の発現機構の

さらなる理解につながるものと思われる。

次年度は今回得た F₂ 種子集団を圃場に展開し、本研鑽プログラムで開発した DNA マーカーを指標にして酒米における心白発現率と相関する QTL の解析を実施する予定である。

3.3 人工交配による新しい特徴を持つ酒米品種の開発

本年度に実施した交配組合せを表 2、表 3 に示す。

表 2

♀	♂	交配種子	交配種子数	目的
若水	× 五百万石	F1	24	一株粒数の改良
五百万石	× 若水	F1	22	一株粒数の改良
若水	× オオチカラ	F1	20	千粒重の増加
五百万石	× オオチカラ	F1	17	千粒重の増加

表 3

♀	♂	交配種子	交配種子数	目的
(若×コシ) F1	× コシヒカリ	BC1	41	CSSL作製、高心白発現率系統の選抜
(若×日) F1	× 日本晴	BC1	13	CSSL作製、高心白発現率系統の選抜
(五×コシ) F1	× コシヒカリ	BC1	89	CSSL作製、高心白発現率系統の選抜

表 2 は昨年度示唆された若水の一株粒数改良のための新規交配と、超大粒の酒米品種開発を目指した交配であり、次年度以降に F₁ 種子を栽培して F₂ 種子集団を得る予定である。表 3 は昨年度からの継続で、酒米品種と飯米品種の交配 F₁ 植物にさらに飯米品種を戻し交配したものである。これらは継続的に戻し交配を繰り返すことで染色体断片置換系統を作出するとともに、交配集団の中から心白発現率の高い個体を選抜することで、心白発現に関わる遺伝子領域の同定を目指すための材料とする。

4 考察

本研鑽プログラムにより、日本晴と雄町間のゲノム多型を識別できる indel マーカーを 43 箇所作成することができた。染色体ごとにみると、1 番染色体に 6 箇所、2 番染色体に 4 箇所、3 番染色体に 4 箇所、4 番染色体に 10 箇所、5 番染色体に 3 箇所、6 番染色体に 4 箇所、7 番染色体に 3 箇所、9 番染色体に 2 箇所、10 番染色体に 2 箇所、11 番染色体に 3 箇所、12 番染色体に 1 箇所であった。8 番染色体においてはデータベース上で 25 bp 以上の欠失が予測される領域が 1 箇所しかなく、しかも今回の PCR では雄町においても日本晴型であったため、今のところ識別に使える indel マーカーは 1 つもない。また実際に QTL 解析や F₂ マッピングによる遺伝子領域同定、さらには DNA マーカーに基づく育種 MAS (marker assisted breeding) を行うため

には DNA マーカーの数がもっと必要となる。日本晴 / 雄町間においては SNP 多型情報を利用した CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) マーカーの開発が有効であろう。

心白発現率については酒米と飯米との交配 F₁ 個体を用いた解析から、複雑な遺伝機構の存在が示唆された。次年度以降に F₂ 集団と本研鑽プログラムで新規に開発した indel マーカーを用いた QTL 解析等を実施することで、現在までその詳細がほとんど分かっていない酒米心白粒の発現機構の理解につながるものと思われる。

オオチカラは極多収性で超大粒品種ではあるものの、腹白米の発生が多く食味もあまり良くないことから、主に加工品向けの品種となっている^[10]。今年度新たに五百万石×オオチカラ、若水×オオチカラの交配を実施した。これはオオチカラの超大粒性を酒米品種に導入しようとする試みではあるが、酒造適性にも影響を与えることが予想される。可能な限りオオチカラの大粒性以外の形質の影響を少なくするためには、これらの F₁ 個体にさらに酒米品種を戻し交配してから選抜を実施する必要があるかもしれない。これは今後の課題である。

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”, 名古屋大学技術研修会報告, 10, (2015)
- [4] <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>
- [5] Arai-Kichise, Y. et al., “Genome-wide DNA polymorphisms in seven rice cultivars of *temperate* and *tropical japonica* groups”, PLOS ONE, 9, e86312, (2014)
- [6] Sambrook and Russel, “Molecular cloning 3rd ed.”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (2001)
- [7] Jones. N. et al., “Markers and mapping revisited: finding your gene. New Phytol. 183, 935-966 (2009)
- [8] メンデル, “雑种植物の研究”, 岩波書店 (1999)
- [9] Yoshida S. et al., “QTL analysis for Plant and Grain Characters of Sake-brewing Rice Using a Double Haploid Population”, Breeding Sci., 52, 309-317 (2002)
- [10] 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)