

平成 31 年 1 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00779

研究課題名(和文) BE三重突然変異による超高アミロース・コメデンプンの開発とデンプン利用特性の研究

研究課題名(英文) Development of ultra-high-amylose rice starch of BEs triple mutant and study of its properties for utilization

研究代表者

伊藤 紀美子 (Itoh, Kimiko)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10281007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：新規の特性を持つデンプンの開発と研究のため、イネの三つのデンプン枝作り酵素の発現を減少させた BEs/Wxa系統を開発した。その完熟種子の外観は白濁し、粉質性であった。種子断面では丸く小さな澱粉粒が観察され、空隙が多かった。精製デンプンのX線回折パターンはB型パターンであった。BE/Wxaデンプンの単位鎖長分布は短鎖・長鎖の分布が大きく減少し、重量分布の結果から見かけのアミロース含量は最大で65%以上にも及び、これまでにない超高アミロースデンプンであった。また、真のアミロース含量は最大で47.7%であった。極めて細粒で形状も丸く、粉質であることから、極細粒の粉体としての利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To develop starch with a novel property, a BEs/Wxa line with the reduced expression of three starch branching enzymes was developed. The appearance of trait of the mature seeds was white and opaque, and floury. Round and small starch grain was observed in the cross section of the seeds. The X-ray diffraction pattern of the BEs/Wxa starch showed B type pattern. The unit chain length distribution of the starch showed that short- and long- chain fractions were greatly reduced. The apparent amylose content was up to 65% maximum, calculated from weight distribution of the unit chains. The true amylose content was up to 47.7 % maximum. Since the BEs/Wxa starch was fine grain, round, and floury, it is expected to be used as an ultrafine grain powder.

研究分野：応用糖質科学

キーワード：Branchin Enzyme Starch Synthase BE rice starch GBSSI amylose amylopectin

1. 研究開始当初の背景

デンプンは食品・工業用として様々な用途に利用されており、その用途は2000~3000種類にも及ぶ<sup>1)</sup>。日本において利用されるデンプンの多くはトウモロコシデンプンであり、過去3年間に、全デンプン需給量に占める割合は85%前後で推移している<sup>2)</sup>。

トウモロコシデンプンに比してコメデンプンの利用量は極めて少ない。その理由として、コメデンプンの価格の高さと共に、物性・利用用途の多様性が少ないことがあげられる。他方、コメデンプンは極めて細粒であり、他の植物デンプンでは代替できない用途への利用が考えられる。すなわち、新規の構造・物性・機能性の開発により、新たな食品・工業用素材としての利用性の開発が可能である。

トウモロコシに存在し、イネに存在しない特性を持つデンプンとして、超高アミロースデンプンがある。そのアミロース含量は50%から90%である。一方、イネにおいては比較的アミロース含量が高いインディカ種や新形質米においても、デンプン中のアミロース含量は20%以下である<sup>3)</sup>。

他方、2000年代にイネゲノムプロジェクトにより、28,000 遺伝子の完全長 cDNA が同定される<sup>4)</sup>と共に、トランスポゾン挿入によるイネミュータントパネルが整備された<sup>5)</sup>。これらを利用した、デンプン合成関連酵素に関わる複数の遺伝子座における対立遺伝子の組み合わせにより、澱粉組成・構造・物性の違いが発現するしくみについて知られるようになった。

イネのデンプン構造形成に関わる酵素として、デンプン合成酵素 (SS: Starch Synthase)、デンプン枝作り酵素 (BE: Branching Enzyme)、デンプン枝切り酵素 (DBE: Debranching Enzyme)、グルカン加リン酸分解酵素 (Pho: Glucan Phosphorylase)、1,4 グルカン転移酵素 (DPE: Disproportionating Enzyme) 等が知られている。そのほとんどは複数のアイソフォームを持つ (図1)。

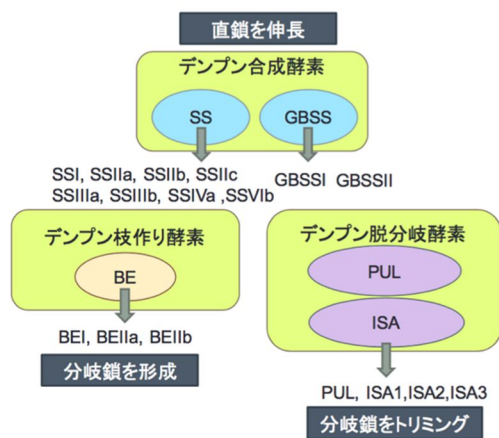


図1 イネの主要なデンプン合成関連酵素

これまでの研究から、日本稲にインディカ型の顆粒結合型デンプン合成酵素 (GBSSI) 遺伝子 ( $Wx^a$ ) を導入すると共に、デンプン枝作り酵素のひとつ、BEIIb を抑制する事により、見かけのアミロース含量の大幅な上昇が見られた。したがって、BE の全てのアイソザイム、BEI, BEIIa, BEIIb の発現を抑制する事でさらなる高アミロース・コメデンプンを開発し、構造・物性を研究する事でこれまでにない利用特性を持つコメデンプンの開発が期待できる。

2. 研究の目的

イネの BE アイソザイムである BEI, BEIIa, BEIIb の発現を抑制した BE 三重変異系統を得て、インディカ型 GBSSI をコードする  $Wx^a$  遺伝子が発現するイネ系統と交配し、 $BEs/Wx^a$  系統を得た。この  $BEs/Wx^a$  系統のデンプンのマクロ構造・ミクロ構造を詳細に解析すると共に物性を解析することでその利用特性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BE 発現の抑制

BE の発現の抑制のために、pCRUB2-SV<sup>6)</sup> ベクターを cv. Musashimochi ( $wx$ ) の完熟種子由来のカルスにアグロバクテリウム法により導入し、胚乳において BE, BE a, BE b の発現が抑制されたイネを得た。

(2) 酵素の発現解析

イネの BE, BE a, BE b 全ての発現を欠損すると共にインディカ型 GBSSI 遺伝子 ( $Wx^a$ ) を発現する  $BEs/Wx^a$  系統、その対照区として BEIIb を欠損すると共に  $Wx^a$  を発現する  $BEIIb/Wx^a$ 、いずれの BE アイソフォームも正常に発現し  $Wx^a$  を発現する  $Wx^a$  系統、GBSSI の発現を欠損する  $wx$  系統において、BEI, BEIIa, BEIIb および GBSSI の発現をウエスタンブロッティング法により解析した。

各イネ系統における受粉後 14 日目の登熟中の胚乳を液体窒素と共に乳鉢ですり潰し、抽出バッファーを用いて可溶性タンパク質を抽出した。遠心により上清を回収し、可溶性・粗タンパク質画分とした。

タンパク質を SDS-PAGE により分画した後、メンブレンにプロットし、1 次抗体として抗 GBSSI 抗体および抗 BEI, 抗 BEII 抗体を用い、Cy3 標識 2 次抗体を用いてそのシグナルを FLA9000 (富士フィルム) により検出し、発現の有無を解析した。

(3) 胚乳断面における澱粉粒構造の観察

完熟種子を 1 晩凍結乾燥させ、活断面をカーボン蒸着した後、電子線マイクロアナライザー (島津製作所 EPMA-1610) により澱粉粒の表面構造を 5 千倍, 1 万倍, 1 万 5 千倍で観察した。

#### (4) 精製デンプンの調整

完熟種子をカッターで細かく切断した後、乳鉢と乳棒ですり潰し、冷アルカリ法により精製デンプンを調整した。

#### (5) ヨウ素呈色による見かけのアミロース含量の比較解析

精製デンプンの糊液をヨウ素-ヨウ化カリウム溶液による呈色後に、660nmにおける吸光度を分光光度計（日立 U-2900）により測定した。

#### (6) X線回折パターンの解析

湿潤な箱の中で吸湿させた精製デンプンを粉末 X線回折装置（BURUKER 社 D2PHASER）により解析した。

#### (7) 鎖長分布の解析と真のアミロース含量の算出

精製デンプンをイソアミラーゼ（林原、現長瀬産業）により枝切りして単位鎖を得、各単位鎖のモル比と重量比を算出した。さらにアミロースとアミロペクチンを分別後に同様の方法で各単位鎖のモル比と重量比を算出した。その後、全デンプン量に占めるアミロースの重量を算出した。

#### (8) 難消化性デンプン量の測定

酵素法により精製デンプン中の難消化性デンプン量を測定した。測定は Resistant Starch Assay Kit (Megazyme 社) を用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 完熟種子の外観

各系統の完熟種子の外観を観察した。 $Wx^a$  系統では心白が観察され、他の全ての系統は白濁・不透明な外観を示した（図 2）。加えて  $BEs/Wx^a$  は粉質性であった。

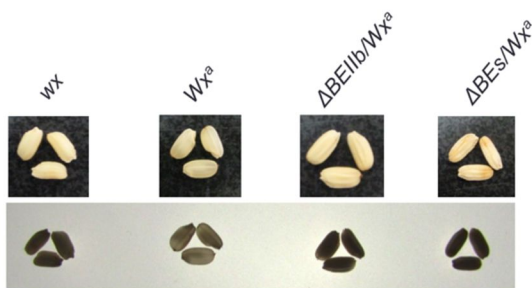


図 2 各イネ系統における玄米の外観形質  
左より  $wx$  系統、 $Wx^a$  系統、 $BEIIb/Wx^a$  系統、 $BEs/Wx^a$  系統の各玄米の外観形質。上段は落射光、下段は透過光により観察した。 $Wx^a$  系統由来の種子を除いて胚乳の白濁が見られる。

#### (2) ヨウ素呈色による見かけのアミロース含量の推定

各系統の完熟種子より冷アルカリ法にてデンプンを精製し、ヨウ化カリウム溶液による呈色後に 660nm における吸光度を分光光度計（日立ハイテクサイエンス U-2900）により測定し、相対的な見かけのアミロース含量として比較解析した。その結果、660nm の平均値は  $wx$  系統では 0.081、通常の日本稲うるち米（ $Wx^b$  系統）では 0.0211、 $BEs/Wx^a$  系統では 0.547、 $BEIIb/Wx^a$  系統では 0.375、 $Wx^a$  系統では 0.336 であった。これらの値から推定される相対的な見かけのアミロース含量は  $Wx^b$  系統（品種日本晴）と比較して、 $BEs/Wx^a$  系統では 3.58 倍に増大していた。

#### (3) 酵素の発現解析

$wx$  系統を除く全ての系統において GBSSI は発現していた。また、 $BEIIb/Wx^a$  系統では  $BEIIb$  の発現が欠損しており、他方  $BEs/Wx^a$  系統では全ての  $BE$  の発現が欠損していた。ウェスタンブロッティングによる発現解析の結果のサマリーを表 1 に示す。

表 1 胚乳における GBSSI/BE の発現

系統名	GBSSI	BEI	BEIIa	BEIIb
$wx$	-	+	+	+
$Wx^a$	+	+	+	+
$\Delta BEIIb/Wx^a$	+	+	+	-
$\Delta BEs/Wx^a$	+	-	-	-

#### (4) 澱粉粒の表面構造の観察

完熟種子を凍結乾燥し、電子線マイクロアナライザーにより、種子断面における澱粉粒の表面構造を観察した。

$wx$  系統では、角張った小さなデンプン粒が観察された。これに対し、 $Wx^a$  系統では比較的大きなデンプン粒が観察された。また、両者とも密にデンプン粒が詰まっていた。

$BEIIb/Wx^a$  系統では、大小不揃いの大きさのデンプン粒が観察されると共に、デンプン粒とデンプン粒の間に空隙が観察された。さらに  $BEIIb/Wx^a$  系統の大型のデンプン粒の表面には不規則なひび割れが生じており、表面の滑らかさが失われていた。

$BEs/Wx^a$  系統では、小さく丸いデンプン粒が多数観察されており、粉質性の要因になっていると考えられた。

#### (5) X線回折パターンの解析

各系統の精製デンプンの X線回折パターンを粉末 X線回折装置（Bruker, D2Phaser）を用いて解析した。 $wx$  および  $Wx^a$  デンプンの解説パターンは単子葉穀類デンプンに特徴的な A 型パターンであり、 $BEIIb/Wx^a$  および  $BEs/Wx^a$  デンプンでは塊茎デンプンの B 型パターンに近い結晶型であった（図 3）。

$BEIIb/Wx^a$  デンプンでは  $\approx 6.2^\circ$  に回折ピークが出現すると共に  $\approx 18.2^\circ$  前後の回折ピーク（4b）が消失した。同様に  $BEs$

$Wx^a$  デンプンでは  $\approx 6.6^\circ$  に回折ピークが出現すると共に  $\approx 18.2^\circ$  前後の回折ピーク (4b) が消失した。

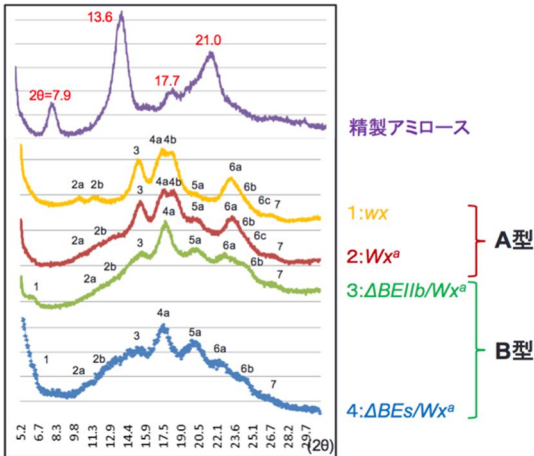


図3. 各系統由来の精製デンプンのX線回折パターン

(6)鎖長分布の解析と真のアミロース含量の算出

精製デンプンを枝切り後、還元末端を2-アミノピリジンにより蛍光標識して単位鎖のモル分布を、RIにより重量分布を解析した。

一般的に、重量分布では、コメデンプンには3つの大きなピークをもつ分布が見られる。その分布をアミロースとアミロペクチンの微細構造に当てはめて考えると、分子量の大きな順にアミロース (AM) とアミロペクチン超長鎖 (ELC; Extra-long chain) を含むピーク (AM + ELC 画分)、B2鎖とB3鎖を含むピーク (B2 + B3 画分)、A鎖とB1鎖を含むピーク (A + B1 画分) にそれぞれ該当すると考えられる (図4, 5)

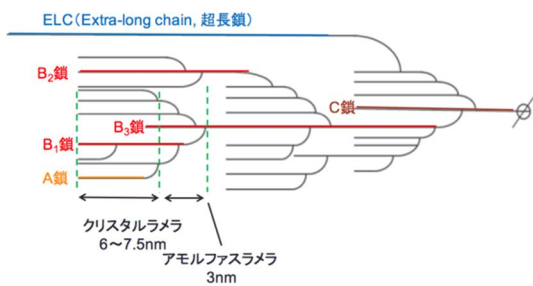


図4 アミロペクチンの微細構造モデル

アミロペクチンは結晶性の高いクリスタルラメラと、分岐の多い非結晶性のアモルファスラメラでひとつのクラスターを形成する。A鎖はそれ自身に分岐を持たない単位鎖、B鎖は分岐を持つ単位鎖、C鎖は還元末端を持つ単位鎖である。このうち、アミロースに匹敵する長さの単位鎖をELC、二つのクラスターにまたがるB鎖をB2鎖、三つのクラスターにまたがるB鎖をB3鎖とする。

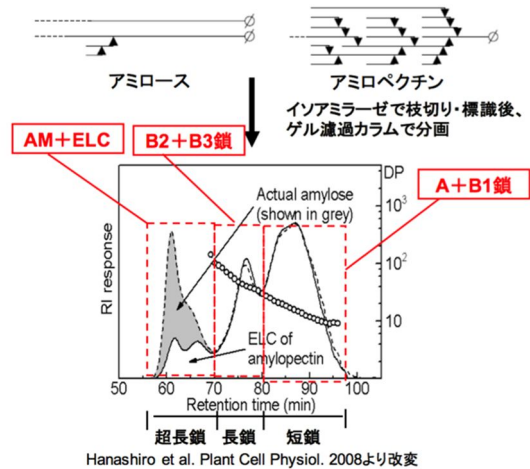


図5 鎖長分布の解析方法の概略<sup>7)</sup>

全デンプン或いはアミロペクチンをイソアミラーゼで枝切り後、標識してゲル濾過カラムにより分画、各単位鎖の鎖長分布を解析した。三つのピークを便宜上、AM + ELC、B2 + B3、A + B1 単位鎖の溶出画分とする。

$Wx^a$  発現による鎖長分布の変化

GBSSI をコードする  $Wx$  遺伝子の欠損変異である  $wx$  デンプンにおいては、AM + ELC 画分は観察されず、B2 + B3 画分と比較して、A + B1 画分に大きなピークエリアが観察された。一方、 $Wx^a$  デンプンでは AM + ELC 画分の大きなピークが観察されると共に、 $wx$  デンプンと比較して、B2 + B3 画分の増大と A + B1 画分の減少が見られた。

BEの欠損による鎖長分布の変化

$BEIIb$  が欠損した  $BEIIb/Wx^a$  デンプンでは、 $Wx^a$  デンプンに比して明らかな B2 + B3 画分および AM + ELC 画分の増大、A + B1 画分の減少が観察された。また、アミロペクチンの鎖長分布からは AM + ELC 画分のうち、ELCは減少し、AMが上昇したことから、真のアミロース含量が上昇した事が明らかになった。

一方、全てのBE (BEI, BEIIa, BEIIb) の著しい減少が見られた  $BEs/Wx^a$  デンプンでは B2 + B3 画分・A + B1 画分ともに著しく減少していた。また、AM + ELC 画分の重量分布から、見かけ上のアミロース含量は最大 65%にも及ぶことが明らかになり、これまでにない超高アミロースデンプンであることが明らかとなった。一方、真のアミロース含量は最大で47%以上であった。すなわち、超長鎖画分の増大と真のアミロース含量の増大が超高アミロースデンプン生成の要因と考えられた。

(7)難消化性デンプン量の測定

各系統から精製したデンプン中の難消化性デンプン含量を酵素法により測定した (図6)。コメデンプンは細粒であるため、消化性が良く、 $Wx^a$  系統であっても、高アミロースコーンスターチの難消化性デンプン含量が50%となる条件において、わずか0.7%程度の難消化性デンプン含量である。一方で、

$BE11b/Wx^a$  系統では 16.3%の難消化性デンプン含量であった。 $Wx^a$  系統に比較して ELC 含量は減少する一方で、B2 + B3 画分が増大していることから、B2 + B3 画分が増大が難消化性デンプンの増大に関与していると推定された。

他方、 $BEs/Wx^a$  系統の難消化性デンプン含量は 26.7%にもおよび、 $Wx^a$  系統に比較して 38 倍に増大していた。アミロペクチン構造の中心を担う B2 + B3 画分および A + B1 画分がほとんど失われている事から、アミロースが難消化性デンプン含量の増大に関与する可能性も考えられた。

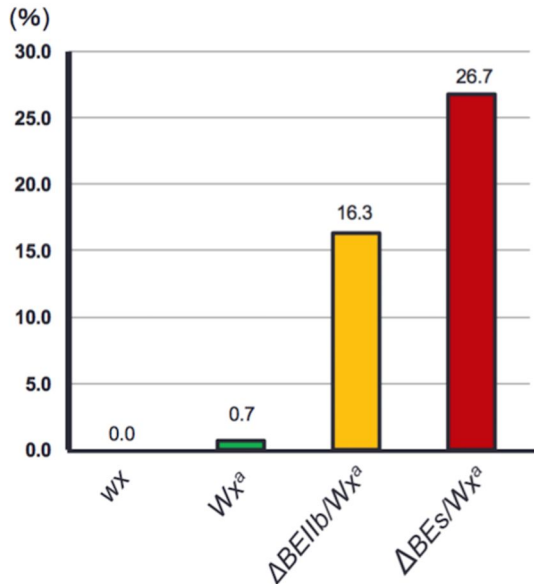


図 6 酵素法による各系統由来の精製デンプン中の難消化性デンプン含量

#### (8) 利用特性の考察

本研究で作成した  $BEs/Wx^a$  デンプンは極めて細粒で形状も丸く、粉質であることから、極細粒の粉体としての利用が期待される。また、コメデンプンとしては極めて高い難消化性デンプン含有しているため、血糖値・中性脂肪の上昇を抑制する加工素材としても有効であると考えられる。また、直鎖状分子であるアミロース含量が 40%以上にも及ぶことから、ミックスゲルの素材としても利用可能であると考えられた。一方で、糊化後の室温における分散性が悪い事から単体のゲル・ゾルとして利用するには分散性を向上させる必要があり、今後の課題となった。

#### 引用文献

- 1) 「でん粉の利用用途」独立行政法人 農畜産業振興機構
- 2) 「でん粉の需給見通しについて」農林水産省. 平成 29 年 9 月
- 3) J. Appl. Glycosci. 2009, **50**: 65-70
- 4) Science 2003, **301**:376-379
- 5) Plant Mol. Biol. 2004, **54**: 324-335.
- 6) Frontiers in Plant Sci. 23 October 2018, **19**

7) Plant Cell Physiol.2008,**49**: 925-933

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 8 件)

後藤大地, 阿部克, 花城勲, 白鳥龍一, 中村保典, 伊藤紀美子. BE 発現抑制による超高アミロース・コメデンプンの開発. 日本農芸化学会. 2018 年 3 月.

Nao Nomura, Takeshi Takamatsu, Hidekazu Shimizu, Toshiaki Mitsui, Kimiko Itoh. Whole-genome sequencing reveals a large deletion on chromosome 6 in a rice  $wx$  mutant. KAAB International Symposium 2016, Niigata City, 2016 年 9 月 28 日

Ami Hyono, Mari Watanabe, Masataka Nihei, Kentaro Kaneko, Toshiaki Mitsui, Kimiko Itoh. Comparative analysis of endosperm proteomes among seven rice cultivars vary in physicochemical properties of the starches. KAAB International Symposium 2016, Niigata City, 2016 年 9 月 28 日

Mamiko FUKUSHIMA, Goizeder ALMAGRO, Isao HANASHIRO, Javier POZUETA ROMERO, Toshiaki MITSUI, Kimiko ITOH. Production and characterization of novel glycogen-based polymer. KAAB International Symposium 2015 (招待講演) Niigata University, Niigata City. 2015 年 09 月 29 日

Ami HYONO, Mina YAMAZAKI, Michiyo TAKAHASHI, Kentaro KANEKO, Kimiko ITOH. Study of in vitro ELC (Extra-long chain) synthesis by rice GBSSI. KAAB International Symposium 2015 Niigata University, Niigata City. 2015 年 09 月 29 日

Masataka NIHEI, Mari WATANABE, Kentaro KANEKO, Kimiko ITOH, Toshiaki MITSUI Comparative proteomics of rice endosperm proteins from seven cultivars, differences in physicochemical properties of the starches. KAAB International Symposium 2015. Niigata University, Niigata City. 2015 年 09 月 29 日

伊藤 紀美子・渡邊 茉莉・金古 堅太郎・二瓶 正崇・三ツ井 敏明. 質量分析器を用いた澱粉物性の異なるイネ品種間のプロテオーム解析. 日本応用糖質科学会平成 28 年度大会 (第 65 回)・応用糖質科学

シンポジウム奈良春日野国際フォーラム, 奈良市 2015 年 09 月  
二瓶 正崇・渡邊 茉莉・金古 堅太郎・伊藤 紀美子・三ツ井 敏明. 澱粉物性の異なるイネ品種の胚乳における澱粉合成関連タンパク質群の解析第 56 回新潟生化学懇話会/平成 27 年度日本生化学会関東支部例会メディアシップ, 新潟市 2015 年 06 月 20 日

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.agr.niigata-u.ac.jp/teachers/257>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 紀美子 (ITO, Kimiko)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号: 10281007

### (2) 研究分担者

花城 勲 (HANASHIRO, Isao)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准

教授

研究者番号: 30336325

謝辞: ベクターは秋田県立大学中村保典名誉教授より、抗体は秋田県立大学藤田直子教授より供与を受けた。また、X線回折装置を用いた解析は新潟大学共用設備基盤センターの協力を得て実施された。