

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07602

研究課題名(和文) イネとオオムギにおける澱粉粒のライブイメージング解析

研究課題名(英文) Imaging Amyloplasts in the Developing Endosperm of Barley and Rice

研究代表者

松島 良 (Matsushima, Ryo)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：80403476

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)：澱粉合成を担うオルガネラであるアミロプラストに蓄積するGFPを発現する形質転換体をイネとオオムギで作出した。澱粉粒の合成時期である種子登熟期に注目し、アミロプラストの形状を観察した。その結果、オオムギとイネ両方において、複数個の澱粉粒が内在しているアミロプラストを見出した。特にオオムギにおいては、澱粉粒の観察だけでは独立に存在していると思われた大小二極性の澱粉粒が、1つのアミロプラストに内包されている事が分かった。登熟の過程でまず大澱粉粒が形成され、その後に小澱粉粒が形成されることも分かった。さらに、澱粉粒の形状に異常を示す変異体をオオムギで新しく単離し、解析を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

澱粉は我々の主食としてだけでなく、様々な加工製品として利用されており、澱粉は人類に重要な物質である。近年、消化性や糊化特性が変化した澱粉を発達させるイネやムギ類が育種されており、新しい澱粉素材として期待されている。本研究で得られた澱粉粒ならびに澱粉粒を合成するオルガネラであるアミロプラストについての観察結果は、今後の澱粉育種の基盤となる新知見を提供する。また、本研究で作出した形質転換体は、アミロプラストだけでなく他の組織の色素体も可視化できることから、植物病理学や植物発生学を専門とする研究者から材料のリクエストがあり、学際的に有用な研究ツールを提供できたと思われる。

研究成果の概要(英文)：We generated transgenic plants expressing amyloplast-accumulating GFP in barley and rice. In this transgenic plant, amyloplasts and starch grains can be visualized directly and indirectly, respectively. We could observe amyloplasts and starch grains in developing endosperm to capture the live images how amyloplasts and starch grains are developed. In the case of barley, the multiple simple starch grains were present in a single amyloplast, and the large and small starch grains were also present in the same amyloplast. In the case of rice, some amyloplasts contained multiple compound starch grains especially in the early stage of development. These observations are the novel discovery of new morphological features for amyloplasts and starch grains in these cereals. The transgenic plants produced in this study will be an important tool for the analysis of cereal starch-related mutants in the future.

研究分野：植物細胞育種学

キーワード：澱粉粒 アミロプラスト イネ オオムギ GFP 可視化 胚乳 種子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「澱粉粒」とは、植物細胞内で合成された澱粉が形成する粒子のことである。澱粉粒は、色素体の一種であるアミロプラストという植物オルガネラの内部で合成される。澱粉粒の形状は植物種によって多様性を示す。例えば、イネの胚乳の澱粉粒は複数の澱粉粒子が集合してできている。これは「複粒型澱粉粒」と呼ばれている。一方、オオムギやコムギは、1つの澱粉粒子から構成される「単粒型澱粉粒」を発達させる。澱粉の食品ならびに工業用の利用用途は2000種類以上にのぼり、澱粉関連製品は毎年3700万トン以上が流通している。澱粉特性に関する澱粉粒の形状については、その形状決定機構はほとんど未解明である。従来、澱粉粒の観察にはヨウ素染色法が長く用いられていた。ヨウ素溶液で染色した胚乳を顕微鏡で観察すると澱粉粒が紫色に染色される。このヨウ素染色法は澱粉粒の形状を明瞭に観察できる一方、澱粉粒を合成するオルガネラであるアミロプラストを可視化することはできない。アミロプラストは、その内部を澱粉粒にほぼ占有されているため、「澱粉粒の形状≒アミロプラストの形状」と信じられているが、アミロプラストを直接可視化して明瞭に観察した例はほとんどない。

### 2. 研究の目的

アミロプラストがどのような形状で澱粉粒を合成しているかを明らかにするため、本研究ではアミロプラストを可視化できる形質転換体をオオムギならびにイネを用いて作出し観察を行った。イネとオオムギという澱粉粒の形が異なる2つの植物種を用いて、アミロプラストの形態を比較することで、澱粉粒の形状多様性とアミロプラストの形状の関係を明らかにすることを目的とした。さらに、澱粉粒の形状決定の仕組みを分子レベルで解明するために、澱粉粒の形状に異常を示すオオムギ突然変異体のスクリーニングを開始した。

### 3. 研究の方法

#### (1). *AmyloTarget-GFP*植物体の作出

色素体中でアミロース合成を担う *GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE I (Os06g0133000)* のN末79アミノ酸をコードする塩基配列 (*AmyloTarget*) をイネゲノムから増幅した。この断片を *GFP* 遺伝子の upstream に挿入し *AmyloTarget-GFP* 遺伝子を作成した。 *AmyloTarget-GFP* 遺伝子を pBUH3 ベクターに挿入しイネ品種「日本晴」ならびにオオムギ品種「Golden Promise」に形質転換を行なった。これらの形質転換植物を以下、 *AmyloTarget-GFP* 植物体と呼ぶことにする。イネ *AmyloTarget-GFP* 植物体は 28-30°C で、オオムギ *AmyloTarget-GFP* 植物体は 16 時間日長 (明期 15°C、暗期 13°C) で育成した。

#### (2) 登熟種子の生切片の作成

観察する登熟種子は、その大きさを記録するために最初に写真撮影を行った。その後、その登熟胚乳からマイクロームとカミソリを用いて切片を作成した。切片は、スライドガラス上で 550 mM のソルビトールでマウントした後に、共焦点走査型レーザー顕微鏡 (Olympus FV1000) で *GFP* のシグナルを観察した。

#### (3) テクノビット樹脂を用いた澱粉粒を観察

登熟種子を固定液 (20mM カコジル酸緩衝液 (pH7.4), 3% (v/v) グルタルアルデヒド) で一晩固定し、エタノール系列中で脱水した。脱水試料をテクノビット樹脂に包埋し、包埋試料からダイ

ヤモンドナイフとウルトラマイクロトームを使って切片を作成した。得られた切片を、ヨウ素溶液で染色して澱粉粒を可視化した。

#### (4) 胚乳細胞の透過電子顕微鏡観察

登熟中の胚乳を、4%(w/v)パラホルムアルデヒド、2%(v/v)グルタルアルデヒド、50mMカコジル酸緩衝液(pH7.4)で一晩固定した後、4°Cで3時間、2%(w/v)四酸化オスミウムで後固定した。試料をエタノールで脱水後、酸化プロピレンに置換し、Quetol-651樹脂(日新EM)に包埋した。試料の樹脂ブロックから極薄切片を調製し、透過型電子顕微鏡(JEM-1400Plus、日本電子)を用いて観察した。

#### (5) 澱粉粒の形状に異常を示すオオムギ突然変異体の単離

澱粉粒の形状が野生型と異なる突然変異体を単離するために、アジ化ナトリウムを変異源として種子処理した突然変異集団から育成した M3 系統を用いた。このオオムギ突然変異集団の種子は、岡山大学資源植物科学研究所佐藤和広教授ならびに久野裕准教授に分譲していただいた。スクリーニングでは1系統あたり5粒以上の種子に対して、申請者が以前に開発した澱粉粒簡便観察法(Matsushima et al. 2010)を用いて澱粉粒の観察を行い、澱粉粒の形状に異常が有るかどうかを指標にしてスクリーニングを行った。得られた突然変異体について、後代における表現型の遺伝性を確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) アミロプラスト可視化植物体の作出

*AmyloTarget-GFP* 遺伝子を導入したイネならびにオオムギでは、強い GFP 蛍光のシグナルが観察できた。特にイネの場合には玄米の状態でも GFP 蛍光が観察できた。蛍光シグナルの有無を元に *AmyloTarget-GFP* 遺伝子の有無を評価し、分離比からホモ接合体を単離した。そして、*AmyloTarget-GFP* 植物体の登熟種子から生切片を作成して観察したところ、アミロプラスト内部の澱粉粒の部分が黒抜けた状態で観察することができた。*AmyloTarget-GFP* 植物体において、GFP はアミロプラスト内部に輸送されるが、澱粉粒内部には浸透しないため、このような現象が観察されたものと考えられる。この結果は、*AmyloTarget-GFP* 植物体において間接的に澱粉粒を可視化できることを意味している。

#### (2) オオムギの登熟胚乳におけるアミロプラストの観察

オオムギの登熟過程の澱粉粒の動態を調べるために、形質転換に用いた品種「Golden Promise」の登熟種子からテクノビット切片を作成し、澱粉粒を観察した。その結果、登熟前期に単粒型澱粉粒が成長して大澱粉粒を形成する一方で、小澱粉粒は登熟の後期に初めて出現することが分かった

(図 1)。

続いて、*AmyloTarget-GFP* 植物体の登熟前期の種子胚乳から生切片を作成し、共焦点走査型レーザー顕微鏡で観察を行った。その結果、複数の単粒型澱粉粒が1つのアミロプラスト内に存在し

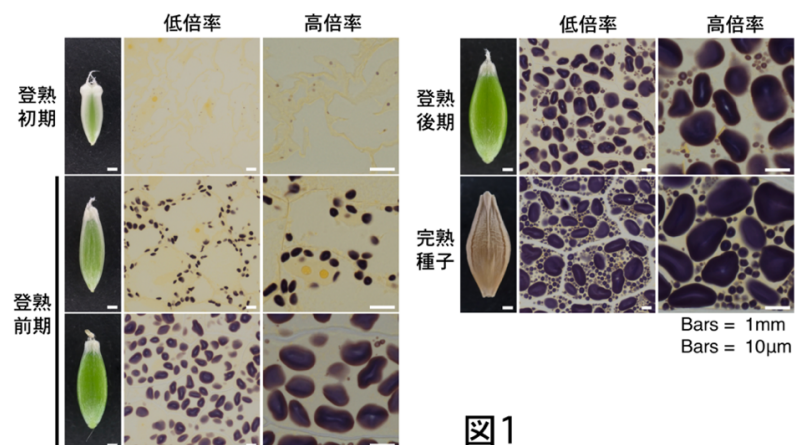


図 1

ている像が確認できた(図2上段, 矢印)。また、このような像は野生型を透過電子顕微鏡観察した際にも同様に観察できた(発表雑誌論文1参照)。また、登熟後期においては大澱粉粒と小澱粉粒が同一のアミロプラスト内に共局在している像が観察できた(図2下段, 矢頭)。

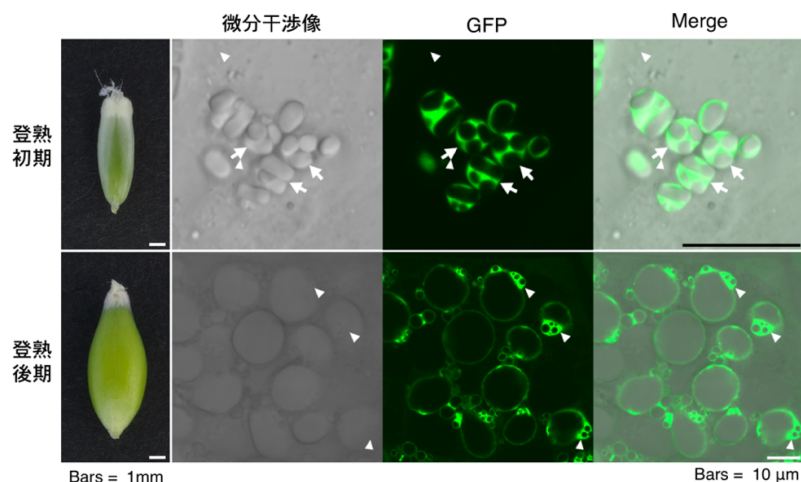


図2

これらの結果は、オオムギの胚乳には、複数個の澱粉粒を内在するアミロプラストが存在していることを意味している。

### (3) イネの登熟胚乳におけるアミロプラストの観察

イネ *AmyloTarget-GFP* 植物体の登熟初期(開花後4日前後)のアミロプラストを観察した結果、複数個の複粒型澱粉粒が1つのアミロプラスト内に存在する像が観察された(図3上段)。

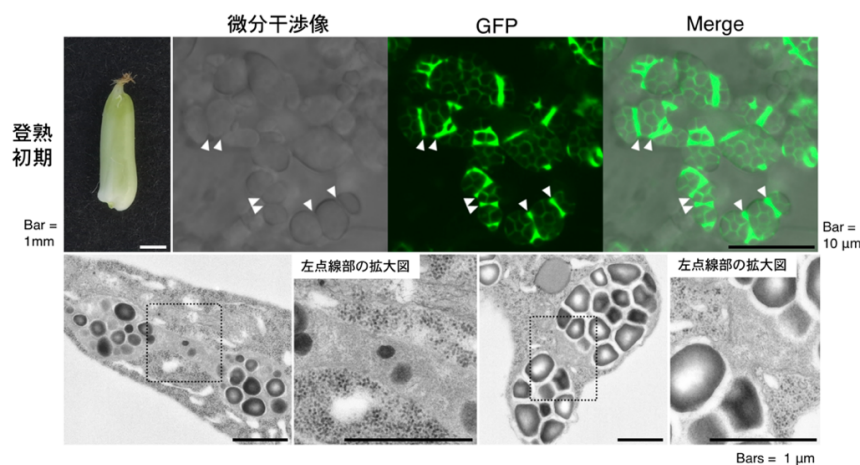


図3

上記の像が非形質転換体でも観察できることを確認するために、実験圃場で育成した日本晴から登熟種子を回収し、胚乳細胞の透過電子顕微鏡観察を行った。その結果、GFP像と同様に複数個の複粒型澱粉粒を内在するアミロプラストが観察された(図3下段)。これらの結果は、イネの登熟初期の種子でも、複数個の複粒型澱粉粒を内在するアミロプラストが存在することを意味する。

### (4) 澱粉粒の形状に異常を示すオオムギ突然変異体の単離

スクリーニングの結果、本来単粒型澱粉粒を発達させるオオムギで、複粒型を発達させる変異体、細長い単粒型澱粉粒を発達させる変異体を単離できた(次ページ図4)。得られた変異体と上記のアミロプラストを可視化できる形質転換体と交配し、澱粉粒の形状異常とアミロプラストの形態に関係があるのかを現在検証している。また、アミロペクチン

の鎖長分布解析や澱粉の消化性についても調査を行い、得られた変異体でこれらの澱粉物性が変化していることも見出している。今後、これらの検証と共にさらに新しい突然変異体の単離、得られた変異体同士の多重変異体の作成と解析、原因遺伝子の同定などを行う予定である。

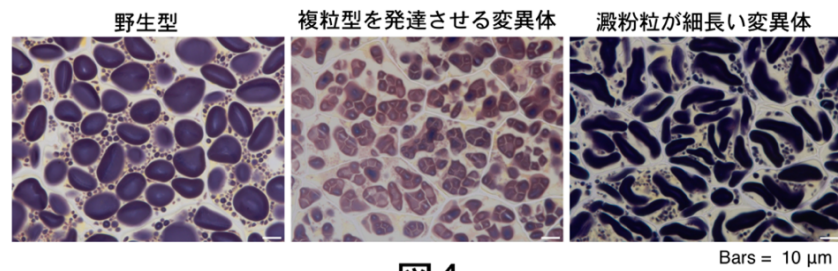


図4

【謝辞】

オオムギ変異系統を分譲していただいた、佐藤和広 博士(岡山大学)、久野裕 博士(岡山大学)ならびに文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトに感謝申し上げます。両博士には、オオムギを用いた実験手法や育成法について終始貴重なアドバイスをいただきました。また、本研究で用いた形質転換用ベクター(pBUH3)を分与していただいた伊藤幸博 博士(東北大学)に感謝申し上げます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsushima, R., Hisano, H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Imaging Amyloplasts in the Developing Endosperm of Barley and Rice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-019-40424-w">https://doi.org/10.1038/s41598-019-40424-w</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Crofts, N., Iizuka, Y., Abe, N., Miura, S., Kikuchi, K., Matsushima, R., Fujita, N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Rice Mutants Lacking Starch Synthase I or Branching Enzyme IIb Activity Altered Starch Biosynthetic Protein Complexes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01817">https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01817</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松島 良
2. 発表標題 植物細胞の中で澱粉粒の形はいかに決定されるのか？
3. 学会等名 第65回 日本食品科学工学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松島 良, 久野 裕, 佐藤和広
2. 発表標題 イネとオオムギにおけるアミロプラストの比較イメージング解析
3. 学会等名 平成30年度 日本育種学会秋季大会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 松島 良, 久野 裕, 佐藤和広
2. 発表標題 オオムギを用いた澱粉粒形状決定機構についての細胞生物学的研究
3. 学会等名 第1回オオムギ資源開発研究セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松島 良, 久野 裕, 藤田直子, 佐藤和広
2. 発表標題 オオムギを用いた澱粉粒の形についての研究
3. 学会等名 第12回ムギ類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松島 良, 久野裕, 三浦聡子, クロフツ尚子, 保坂優子, 藤田直子, 佐藤和広
2. 発表標題 複粒型澱粉粒を発達させるオオムギ変異体の単離と解析
3. 学会等名 第137回日本育種学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松島 良
2. 発表標題 種子胚乳の澱粉粒の形から見たオオムギの特徴
3. 学会等名 岡山大植物研拠点共同研究ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松島 良
2. 発表標題 澱粉粒の形はいかに決定されるのか？
3. 学会等名 第19回 生物生産フロンティアセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松島 良・久野 裕・藤田直子・佐藤和広
2. 発表標題 澱粉粒の形状が変化したオオムギ突然変異体の単離と解析
3. 学会等名 第136回日本育種学会秋季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	久野 裕  (Hisano Hiroshi)  (70415454)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授    (15301)	