

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05989

研究課題名(和文) 新奇低アミロース性突然変異米を軸としたデンプン生合成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of starch biosynthesis with a novel rice dull mutant

研究代表者

濱田 茂樹 (Hnamada, Shigeki)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：90418608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：米胚乳澱粉が低アミロース性を示す dull 変異体を発見し、その原因遺伝子の同定と機能特性を明らかにした。低アミロース形質は、RRM タンパク質をコードする LowAC1 遺伝子のトリプトファンから終止コドンへのナンセンス変異が原因であった。RRM タンパク質の欠失は、Wxb 遺伝子の第1イントロンのスプライシングに特異的に影響を与えていた。これにより、Wxb がコードしている GBSSI タンパク質レベルが低下し、アミロースを低減させていた。lowac1 変異体では他の澱粉生合成関連酵素群の mRNA 発現レベルにも影響しており、親品種(WT)とは異なるアミロペクチン構造を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食料自給率向上や安定的な食料生産の観点から、米の新規用途開発のために多様な形質をもった品種開発が望まれる。米の胚乳デンプンのアミロース含量は、炊飯米の食味の良否はもちろんのこと、米加工食品の加工適性においても重要な形質であることから、新たな付加価値が期待される低アミロース選抜系統について、原因遺伝子の同定および形質発現の機序を解明した。得られた成果は、デンプン生合成メカニズムの解明と新規形質米育成の基盤となる。さらには、加工適性や利用方法が見出されれば、米の新たな需要が開拓され農業や食品業界の活性化にも繋がり、次世代の食の多様性をもたらす農資源の開発に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：A new dull grain rice mutant with low amylose content, designated lowac1, has been isolated and characterized. Genotypes using the CAPS marker of the identified LowAC1 gene encoding an RNA recognition motif (RRM) protein were entirely consistent with low amylose phenotypes in BC1F2 progeny. lowac1 involves a single-nucleotide polymorphism from G to A within the gene, resulting in the stop codon generation. The RRM protein deletion in the mutant seed specifically affected the splicing efficiency of Waxyb (Wxb) in the 5' splice site of intron 1, resulting in decreased protein levels of granule-bound starch synthase I (GBSSI) encoded by Wxb. Also, the mutation induced a little variation in the expression levels of some genes involved in starch biosynthesis. Aside from low amylose content, lowac1 seeds included an amylopectin structure reducing short chains compared to that of WT seeds. Overall, our data suggest that LowAC1 is a novel regulatory factor for starch synthesis in rice.

研究分野：植物生化学 酵素化学

キーワード：イネ デンプン 低アミロース 突然変異

1. 研究開始当初の背景

近年の米の消費量低下を背景に水田の転作が進められている一方で、稲作としての水田維持のために飼料用イネや米粉用イネなどの生産が推し進められている。しかし、日常的な炊飯米としての消費低下のみならず、加工用米においても需要が伸び悩んでいる現状がある。食料自給率向上や安定的な食料生産の観点からも、米の新規用途開発が強く求められており、新たな食感や加工適性を有する多様な形質をもった品種の開発が望まれる。

米の成分において、特に胚乳デンプンのアミロース含量は、炊飯米の食味の良否はもちろんのこと、米の加工適性においても重要な形質である。胚乳アミロースを低減させることで日本人が好む粘りの強い食感が出ることから、これまでも低アミロース品種が育成されてきた。特に低アミロース性デンプンの特徴に由来する「冷めても美味しい」という性質を活かし、コンビニおにぎりなどの外食・中食産業にとってなくてはならない品種となっている。しかしながら、これまでの低アミロース品種は温度感受性であり、登熟温度によるアミロース含量の変化が品質を不安定にし、加工性にも影響するなどの問題点があった。アミロース含量の安定化は、米の加工食品分野の消費増大にとって大きな課題である。この低アミロース性を支配する遺伝的背景は、*Wx* 座と *Du* 座が同定されているだけで多くはない。既存の低アミロース品種は元をたどれば同じ遺伝背景に由来したものが多く、これらの問題に対応していくためには、これまでの遺伝的背景とは異なる新規の低アミロース系統による多様性が重要である。

2. 研究の目的

上述の背景から、つがるロマン突然変異系統を作製し、低アミロース性に着目して選抜を行った結果、アミロース含量が9%程度と低アミロース性を示しながら、低アミロース米の特徴である胚乳の「白濁」が少ない、新規の低アミロース系統の選抜に成功した。これまでに *Wx* 座にコードされたアミロース合成酵素 (GBSSI: デンプン粒結合型 Starch synthase) 以外にアミロース含量を制御する因子は知られていない。また、上述した *Du* (*dull*) 座は GBSSI の発現制御に関わるとされているが未だ詳細は不明なままであり、得られる知見はデンプン生合成メカニズムの解明と新たな低アミロース品種開発の糸口となると考えられる。本課題では、選抜された新規 *dull* 変異体の原因遺伝子の同定および形質発現メカニズムを解明するとともに、デンプン構造を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 原因遺伝子の同定および機能解析

選抜系統の変異遺伝子同定のため、次世代シーケンサーによる一塩基多型 (SNP) 解析を行なった。戻し交配後代 F_2 の分離集団から低アミロース性を示す 10 個体を選抜し、抽出したバルクゲノムを用いて MutMap 法により候補 SNP を見出した。さらなる絞り込みのため、 BC_1F_2 の葉からゲノムを抽出し、SNP 配列をもとに構築した CAPS マーカーを用い、種子形質と SNP ジェノタイプの相関を解析した。同定された変異遺伝子については、イネ登熟種子から調製した mRNA を鋳型とした RT-PCR 法で cDNA を単離し、大腸菌による大量発現系を構築し、得られた発現タンパク質を用いて特異的抗体を作製した。この抗体を用いて、登熟種子胚乳の核抽出画分における原因タンパク質欠失の有無を確認した。

(2) GBSSI の発現解析

選抜系統について、低アミロース性が GBSSI のタンパク質発現量に依存した形質なのか検討した。完熟種子デンプンからデンプン粒結合性タンパク質を抽出し、抗 GBSSI 抗体を用いたウェスタンブロット解析によりタンパク質レベルでの発現を確認した。この原因遺伝子が *Wx* 座のスプライシングに与える影響について、定性・定量 PCR を用いて解析した。さらには、インディカタイプである *Wx^a* 型を有する「ほしゆたか」と選抜系統を交配し、原因遺伝子の *Wx^a* に対する影響も解析した。

(3) デンプン生合成関連酵素群の発現解析およびアミロペクチン構造の解析

GBSSI を含むデンプン生合成関連酵素群について、乳熟期の種子より mRNA を抽出し、real-time PCR による遺伝子発現解析を行なった。また、選抜系統の胚乳デンプンをイソアミラーゼ処理することで、アミロペクチンの分岐グルカン鎖を加水分解し、陰イオンクロマトグラフィーに供することで、アミロペクチンを構成するグルカン鎖長を解析した。

4. 研究成果

(1) 種子形態とアミロース含量

外観の白濁および種子断面のヨウ素呈色の結果にもとづいて、突然変異系統の集団から低アミロース性を示した系統 *lowac1* を選抜した。*lowac1* 種子の大きさや形状、デンプン顆粒の構造は、WT と類似していた外観は WT と比較して少々白濁しており、ヨウ素染色から低アミロースの形質を示していることが確認された (図 1-A)。*lowac1* 変異体の各世代のアミロース含有量は 6~9%の間で推移していることが明らかとなり (図 1-B)、栽培年次によってもそれほど大きな変動は見られなかった。

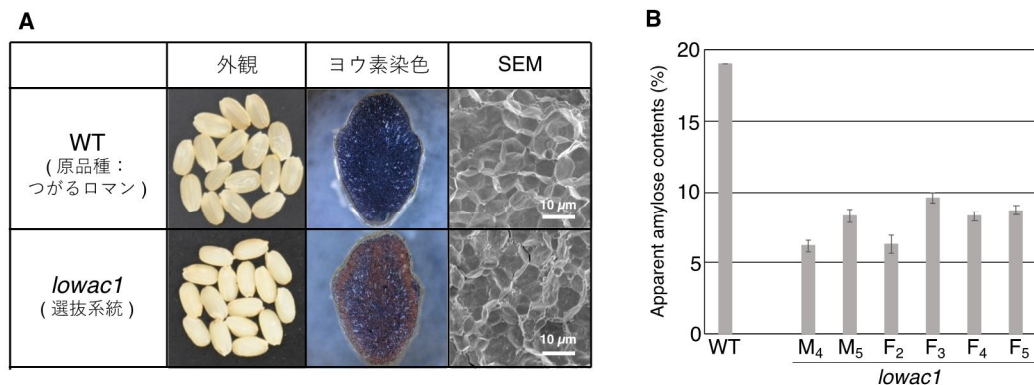


図1: 選抜種子の形質およびアミロース含量

(2) GBSSI をコードする *Wx^b* の遺伝子発現

アミロース合成を担う GBSSI をコードする *Wx^b* について半定量的 RT-PCR により mRNA 発現レベルでの発現解析を行った。*Wx^b* 遺伝子の mRNA は、intron1 の有無による 2 種類の転写産物が知られている (Issiki et al., 1998)。*lowac1* 変異体は、intron1 を含む転写産物が増加し、intron1 が正常にスプライシングされた GBSSI タンパク質に翻訳される転写産物の減少が確認された。抗 GBSSI 抗体を使用したウエスタンブロット解析からも、*lowac1* 変異体において胚乳デンプンに結合する GBSSI タンパク質が WT よりも減少していることが明らかとなった (図 2)。一方で、*Wx^b* 遺伝子の他のイントロンや、他のデンプン生合成関連酵素遺伝子のスプライシングには影響しないことが推測された。

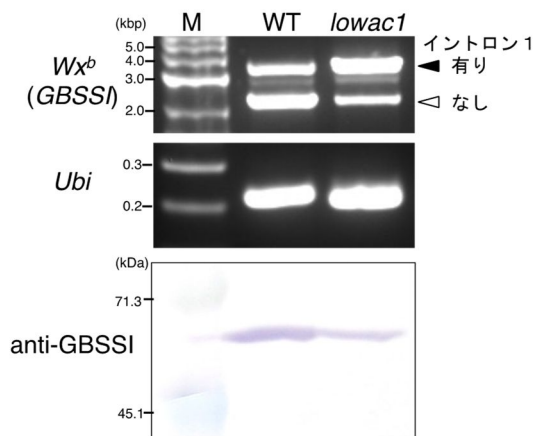


図2: GBSSI 遺伝子およびタンパク質の発現解析

(3) *LowAC1* 遺伝子の同定

次世代シーケンスによる全ゲノム配列の比較解析ならびに CAPS マーカーを用いた遺伝子型解析から、第 2 染色体の短腕に存在する低アミロース含量に関与する *lowac1* 変異体の原因遺伝子同定に成功した。配列アライメント解析の結果、合計 145 の SNP がスクリーニングされ、オープンリーディングフレーム (ORF) 上で、Os02g0167500、Os02g0185500、Os06g0530700、Os07g0532500 の 4 つ SNP が確認された。そのうち、*Wx^b* mRNA のスプライシングが異常であったことから、RNA recognition motif (RRM) タンパク質をコードしている Os02g0167500 を *LowAC1* 遺伝子として解析を進めた。変異体は *LowAC1* 遺伝子上のトリプトファンから終止コドンへのナンセンス変異であることが明らかとなった (図 3-A)。*lowac1*-BC₁F₂ 分離世代を用いた CAPS 法によるジェノタイプングの結果、*LowAC1* 遺伝子の CAPS 多型は、解析に供した 73 個体すべてが種子表現型と一致した。近傍 SNP の連鎖の分離も確認できたことや *lowac1*-BC₁F₂ 集団の分離比が約 3:1 の潜在一遺伝子変異であることから、*LowAC1* が原因遺伝子であることが明らかになった。*LowAC1* 遺伝子がコードする 1000 アミノ酸からなる RRM タンパク質は、ジンクフィンガードメインを取り囲んだ 2 つの RRM (RNA 認識モチーフ) と C 末端近くにグリシンリッチドメインを含んでおり、その分子量は約 110 kDa であった (図 3-B)。登熟種子における、*LowAC1* 遺伝子の mRNA 発現レベルを real-time PCR で測定した結果、WT と差異が見られなかった (図 3-C)。また、登熟種子の胚乳から核画分を抽出し、作製した抗 *LowAC1* (RRM) 抗体を用いたウエスタンブロットングによりタンパク質レベルで比較した結果、推定分子量付近に WT のみ特異的なバンドが検

出された (図 3-D)。これらの結果より、*lowac1* 変異体では、RRM タンパク質が完全に欠失していたことが確認できた。

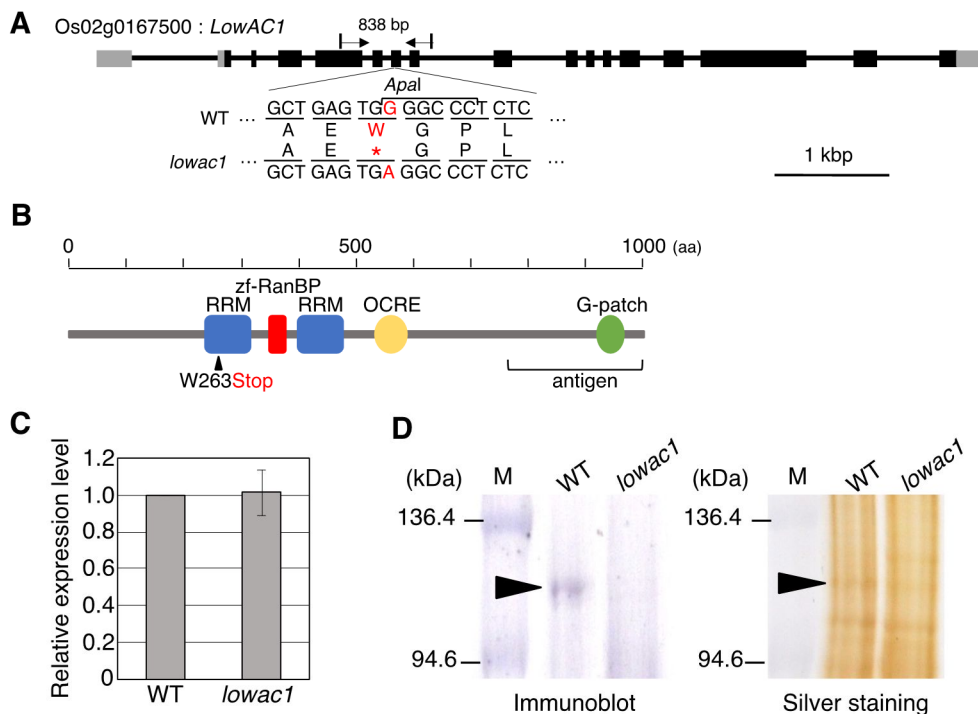


図3: *LowAC1* 遺伝子の同定

(4) *LowAC1* タンパク質の Wx^a および Wx^b に対する特異性

lowac1 変異体は、*LowAC1* タンパク質の欠失によって Wx^b pre-mRNA スプライシングが制御されて低アミロース形質を表現していたことが明らかとなった。そこで、インディカタイプが有する Wx の対立遺伝子である Wx^a において、同様の制御が行われるか検討した。 Wx^a 遺伝子によって高アミロース形質を示すインディカ品種「ほしゆたか」と *lowac1* 変異体を交配し、 F_2 分離世代を作出した。*LowAC1* および Wx のマーカー選抜によって、*lowac1/Wx^b* 7 系統、*LowAC1/Wx^b* 14 系統、*lowac1/Wx^a* 9 系統、*LowAC1/Wx^a* 10 系統が得られた。これらの選抜された各系統に由来する F_3 種子を用いてアミロース含量測定をした結果、それぞれ平均して 10.0%、19.9%、26.6%、27.5%を示した (図 4)。このことから、*LowAC1* タンパク質は Wx^b に対して特異的に作用し、 Wx^a には作用せずアミロース含有量の変動に影響を与えないことが示された。

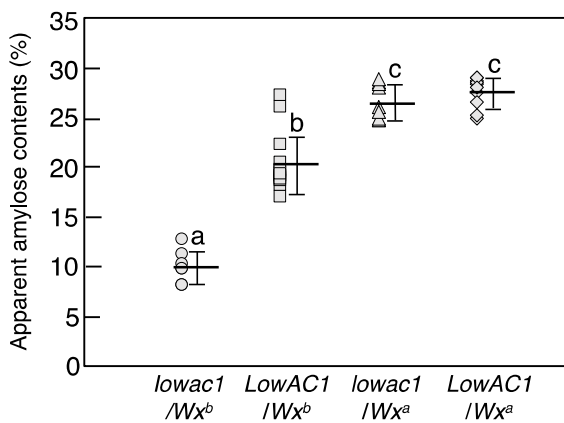


図4: Wx^a 対立遺伝子に対する *LowAC1* の特異性

(5) アミロペクチン構造とデンプン生成関連酵素群の発現解析

HPAEC-PAD 法でアミロペクチンの構造を解析した結果、WT に比べて短鎖 (< 15 DP) が減少し、中長鎖 (> 35 DP) が増加していたことが明らかになった (図 5)。このアミロペクチン合成に参与する *GBSSI* 以外のデンプン生成関連遺伝子群について Real-time PCR を用いて、WT との発現レベルを比較した。その結果、アミロペクチン生成に参与するいくつかの遺伝子発現レベルが *lowac1* 変異の影響を受けていた。特に、*SSIIa* が減少する一方で、*SSIIa*、*SSIVb*、*SBEI*、*SBEIIb*、*PUL*、*AGPL2* の mRNA 発現レベルは、およそ 1.5 倍以上増加していた。アミロペクチンの側鎖構造は、新しい側鎖をつくるデンプン分岐酵素 (SBE) の働きと、作られた側鎖を伸長する

可溶性デンプン合成酵素(SS)の働きのバランスによって決定される (Nakamura, 2002)。このことから、これらの酵素群の発現量が変動することで、アミロペクチンのグルカン鎖長に影響を与えたものと考えられる。

以上より、本研究課題では、新規の低アミロース系統を選抜するとともに、新たな *Wx^b* 遺伝子のスプライシング制御因子を同定し、低アミロース米の食味向上に貢献できる有用な遺伝資源を見出すことに成功した。

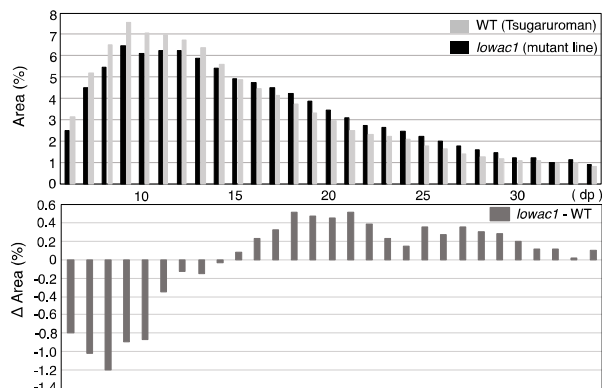


図5: *lowac1* 変異体のアミロペクチン鎖長解析

<引用文献>

Isshiki, M., Morino, K., Nakajima, M., Okagaki, R.J., Wessler, S.R., Izawa, T., Shimamoto, K., 1998. A naturally occurring functional allele of the rice waxy locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron. *Plant J.* 15, 133-138.

Nakamura, Y. 2002. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol.* 42, 718-725.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Igarashi H., Ito H., Shimada T., Kang DJ., Hamada, S	4. 巻 162
2. 論文標題 A novel rice dull gene, LowAC1, encodes an RNA recognition motif protein affecting Waxyb pre-mRNA splicing.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 100-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plaphy.2021.02.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi S., Kumagai Y., Igarashi, H., Horimai K., Ito H., Shimada T., Kato Y., Hamada S.	4. 巻 251(1)
2. 論文標題 Biochemical analysis of a new sugary-type rice mutant, Hemisugary1, carrying a novel allele of the sugary-1 gene.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-019-03321-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 濱田茂樹	4. 巻 57(9)
2. 論文標題 新たな簡易選抜法を用いた糖質米の向上	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 520-521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 五十嵐秀成, 伊藤浩之, 島田透, 姜東鎮, 濱田茂樹
2. 発表標題 米の低アミロース性を制御する新規遺伝子 LowAC1 の同定および機能解析
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱田茂樹
2. 発表標題 ノングルテン米粉を使用した食品開発～グルテンフリー米粉パンの品質向上に向けた取り組み～
3. 学会等名 第21回食物アレルギー研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五十嵐秀成，伊藤浩之，濱田 茂樹
2. 発表標題 新規低アミロース米系統 Lowamy-1 の澱粉特性および遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会東北支部第11回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南雲菜穂，濱田茂樹
2. 発表標題 グルテンフリー米粉パンの膨らみを向上させる方法とメカニズムの解明
3. 学会等名 日本応用糖質科学会東北支部第11回大会（秋田大）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柏木貴裕，濱田茂樹
2. 発表標題 米糠由来の新規フェルラ酸エステラーゼの精製及び同定
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第154回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月政利, 山口知美, 若本由加里, 神田伸一郎, 上村豊和, 梶田啓, 前田一春, 濱田茂樹
2. 発表標題 青森県酒造好適米品種「華さやか」を用いた製パン適性の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第154回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室山龍児, 伊藤浩之, 姜東鎮, 濱田茂樹
2. 発表標題 粉質米突然変異系統 F1oTR1 の原因遺伝子同定および SNP の影響
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山澤 涼介、八嶋良樹、伊藤浩之、濱田 茂樹
2. 発表標題 イネ胚乳由来 D-cysteine desulphydraseの同定および酵素学的諸性質の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第156回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本和也、高橋すみれ、熊谷裕、五十嵐秀成、伊藤浩之、島田透、 濱田茂樹
2. 発表標題 外観品質の向上した新規糖質米の選抜および原因遺伝子の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第156回大会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------