

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450004

研究課題名(和文) 澱粉粒を巨大化させるしくみの解明と利用

研究課題名(英文) Characterization and utilization of enlarged starch grain of 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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：澱粉粒とは、植物内で合成された澱粉が形成する粒子のことであり、植物種によってその形状ならびに大きさは多様性を示す。しかし、澱粉粒の大きさや形を決定する分子機構は未だ分かっていない。本研究課題では、申請者が独自の方法で単離した澱粉粒が巨大化するイネの突然変異体ssg4とssg6変異体の解析を通して、澱粉粒の大きさを決定する分子群の同定ならびにその機能解明を行なうことを目的としている。

研究成果の概要(英文)：Starch is a biologically and commercially important polymer of glucose and is synthesized to form starch grains (SGs). Despite the simple composition of glucose polymer, SG exhibits various morphologies and sizes depending on plant species. However, the molecular mechanisms underlying this SG diversity remain unknown. To answer this question, this project analyzed rice mutants (ssg4 and ssg6), that developed enlarged SG in endosperm.

研究分野：植物資源学

キーワード：澱粉粒 イネ 胚乳 突然変異体 シミュレーション オルガネラ アミロプラスト

1. 研究開始当初の背景

「澱粉粒」とは、植物内で合成された澱粉が形成する粒子のことであり、植物種によってその形状ならびに大きさは多様性を示す。例えばイネの場合、複数の澱粉粒子が1つの澱粉粒として集合しており「複粒型」と呼ばれる。これに対して、1つの澱粉粒子から成る澱粉粒(例えば、コムギやトウモロコシのもの)は「単粒型」と呼ばれる。さらに、澱粉粒の大きさには、同じ属間においてさえも多様性があり、その大きさは植物種によって千差万別である。澱粉粒の用途は2000種類以上にのぼるが、その利用用途と精製効率を規定しているのは、この澱粉粒の形状と大きさである。本研究課題では、澱粉粒の「大きさ」に注目して解析を進めた。本研究課題開始当初、澱粉粒の大きさを決定している機構は何も分かっていなかった。一方、申請者は、独自の方法により澱粉粒が巨大化するイネの突然変異体(*ssg4*と*ssg6*変異体)の単離しており、*ssg4*変異体に関しては、原因遺伝子の同定と機能解析も行っていた。

2. 研究の目的

本研究では*ssg4*と*ssg6*変異体の分子遺伝学的な解析を通して、澱粉粒の大きさを決定する分子群の同定とその機能解明を行なうことを主な目的とした。特に、*ssg6*変異体の原因遺伝子の同定と機能解析を中心に行った。さらに、イネの複粒型澱粉粒が登熟期にどのように形成されるかについて理解するために、登熟期の澱粉粒を詳細に観察し、得られた結果をもとに澱粉粒の成長過程のシミュレーション解析を行なった。シミュレーション解析を行なうことで、複粒型澱粉粒の規則正しい構造がいかに出来上がるのかを理解することを目指した。

3. 研究の方法

*ssg4*ならびに*ssg6*変異体の解析については、様々な表現型解析、*ssg6*変異のマップベースクローニング、SSG6タンパク質とGFP融合タンパク質を用いた細胞内局在性解析を行った。さらに、*ssg4ssg6*二重変異体の表現型解析も行った。

澱粉粒の成長過程のシミュレーション解析のために、コシヒカリの登熟ならびに完熟種子の澱粉粒の成長過程を観察した。観察は、胚乳から薄切切片を調整し、ヨウ素染色により行った。観察した澱粉粒の形状解析は、画像解析ソフトImageJを用いた。研究の過程で、複粒型澱粉粒を構成する澱粉小粒子の形状が、複粒型澱粉粒の断面をボロノイ分割により分割した場合に得られる分割領域の形状と一致することを見出した。そのため、本研究では、ボロノイ分割を基盤として複粒型澱粉粒の形成過程のシミュレーション解析を行なった。ボロノイ分割の計算は、R環境とRuby環境を用いた。

4. 研究成果

① *ssg6*変異体の解析

*ssg6*変異体の胚乳では、野生型に比べて巨大化した澱粉粒が観察された(図1)。

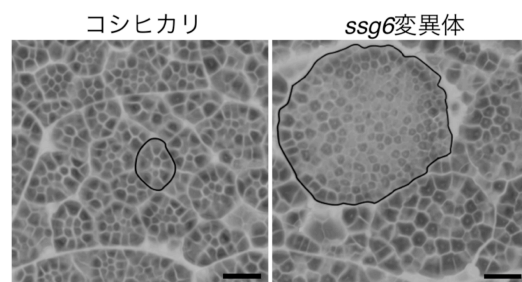


図1 胚乳切片のヨウ素染色像
黒線が1つの澱粉粒を示す。イネの胚乳の澱粉粒は、複数の澱粉粒子が集合して構成される複粒型澱粉粒である。Bars = 10 μ m.

登熟初期の胚乳で野生型と比較観察すると、*ssg6*変異体における澱粉粒の巨大化は開花後3日目の段階で既に始まっていた。また花粉においては、野生型で細長い形状の澱粉粒が観

察されたのに対して、*ssg6*変異体の花粉では、球状の澱粉粒が観察された(図2)。

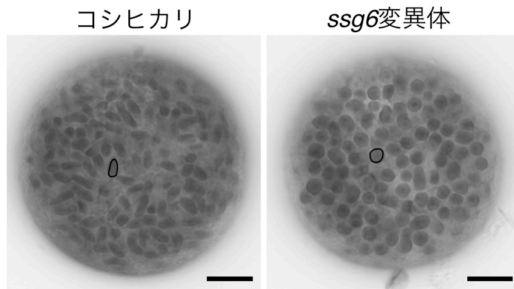


図2 花粉のヨウ素染色像

黒線が1つの澱粉粒を示す。イネの花粉の澱粉粒は、1つの澱粉粒子で構成される単粒型澱粉粒である。Bars = 10 μ m.

マップベーススクローニングの結果、*ssg6*変異体の原因遺伝子は「アミノ基転移酵素」と相同性を持つタンパク質をコードしていた。細胞内局在性解析の結果、SSG6タンパク質はアミロプラストの包膜に局在する膜タンパク質である事が分かった。*ssg4ssg6*二重変異体の花粉の観察から、*ssg4*変異と*ssg6*変異が澱粉粒の大きさの制御に関して、協調的に機能している事が示唆された。

② 複粒型澱粉粒のシミュレーション解析

複粒型澱粉粒を構成する澱粉粒子の形状と類似していたボロノイ分割とは、分割対象(今回の場合は複粒型澱粉粒)の内部に複数の母点を想定し、分割対象を構成する点集合を「どの母点到最も近接しているか」という基準によって分割する方法である。複粒型澱粉粒内部の適切な位置に母点を想定すると、ボロノイ分割によって得られた各分割領域の形状は、澱粉小粒子の形状に良く一致していた(図3)。この結果は、複粒型澱粉粒が形成される過程で、澱粉小粒子の合成について以下の3つの特徴を示唆している。

1. 澱粉小粒子の合成開始のタイミングは、同一である。
2. それぞれの澱粉小粒子の成長スピードは同一である。

3. 複粒型澱粉粒を構成する澱粉小粒子の数は登熟初期に決定され、完熟するまで変化しない。

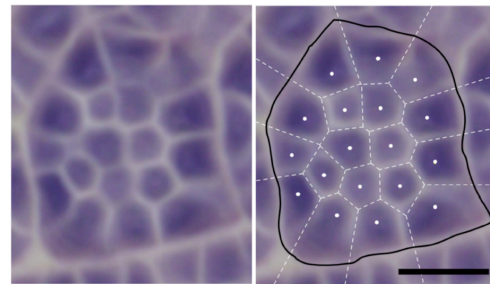


図3 イネの複粒型澱粉粒とそのボロノイ分割

黒実線が1つの複粒型澱粉粒、白点がボロノイ分割に用いた母点の位置、白点線がボロノイ分割を示す。澱粉小粒子の形状とボロノイ分割で得られた領域の形状は極めて類似している。Bar = 5 μ m.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① [Matsushima, R.](#), Maekawa, M., Kusano, M., Tomita, K., Kondo, H., Nishimura, H., Crofts N., Fujita N., Sakamoto W., Amyloplast membrane protein SUBSTANDARD STARCH GRAIN6 controls starch grain size in rice endosperm., *Plant Physiology*, 査読有, Vol.170., 2016, 1445- 1459.
- ② Toyosawa, Y., Kawagoe, Y., [Matsushima, R.](#), Crofts, N., Ogawa, M., Fukuda, M., Kumamaru, T., Okazaki, Y., Kusano, M., Saito, K., Toyooka, K., Sato, M., Ai, Y., Jane, J.- L., Nakamura, Y., Fujita, N., Deficiency of Starch Synthase IIIa and IVb Alters Starch Granule Morphology from Polyhedral to Spherical in Rice Endosperm., *Plant Physiology*, 査読有, Vol.170., 2016, 1225- 1270.
- ③ [Matsushima, R.](#), Maekawa M., Sakamoto, W., Geometrical formation of compound starch grains in rice implements Voronoi diagram., *Plant Cell Physiology*., 査読有, Vol.56., 2015, 2150- 2157.
- ④ Crofts, N., Abe, N., Oitome, N. F., [Matsushima, R.](#), Hayashi, M., Tetlow, I. J., Emes, M. J., Nakamura, Y., Fujita, N., Amylopectin

biosynthetic enzymes from developing rice seed form enzymatically active protein complexes., *Journal of Experimental Botany.*, 査読有, Vol. 66, 2015, 4469- 4482.

⑤ Kamau, P. K., Sano, S., Takami, T., Matsushima, R., Maekawa, M., Sakamoto, W., A Mutation in GIANT CHLOROPLAST Encoding a PARC6 Homolog Affects Spikelet Fertility in Rice., *Plant Cell Physiology.*, 査読有, Vol. 56, 2015, 977- 991.

⑥ Asai, H., Abe, N., Matsushima, R., Crofts, N., Oitome, N. F., Nakamura, Y. Fujita, N., Deficiencies in both starch synthase IIIa and branching enzyme IIb lead to a significant increase in amylose in SSIIa- inactive japonica rice seeds., *Journal of Experimental Botany*, 査読有, Vol.65., 2014, 5497- 5507.

[学会発表] (計 6 件)

① 松島良、久野裕, 蛍光タンパク質によるイネとオオムギの澱粉粒の可視化, 第 131 回日本育種学会年会, 2017 年 3 月 30 日, 名古屋大学

② 松島良, 穀類の澱粉粒の形状多様性についての研究, 第 8 回中国地域育種談話会・第 11 回ムギ類研究会(共催), 2016 年 12 月 10 日, 岡山大学

③ 松島良, 前川雅彦, 草野都, 富田桂, 近藤秀樹, 西村秀希, クロフツ尚子, 藤田直子, 坂本亘, 澱粉粒が巨大化するイネ突然変異体 ssg6 の解析, 第 129 回日本育種学会, 2016 年 03 月 22 日, 横浜市立大学金沢八景キャンパス

④ 松島良, 植物が澱粉粒の大きさを決定するしくみとその利用, 粉体工学会春期研究発表会, 2015 年 05 月 18 日, 東京都千代田区連合会館

⑤ 松島良, 前川雅彦, 坂本亘, イネ胚乳の澱粉粒形成機構のシミュレーション解析, 第 127 回日本育種学会, 2015 年 03 月 22 日, 玉川大学

⑥ 松島良, 穀類の澱粉粒の形状多様性についての研究, おかやまバイオアクティブ研究会 第 45 回シンポジウム(招待講演), 2014 年 06 月 27 日, 倉敷市芸文館

[図書] (計 1 件)

① Matsushima, R., Springer, Morphological variations of starch grains. In *Starch: Metabolism and Structure*, 2015, 425-441.

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 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