

平成 22 年 1 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500673

研究課題名 (和文) 低アミロース性パンコムギ澱粉におけるアミロペクチンの構造および特性の解明

研究課題名 (英文) Structure and properties of amylopectin isolated from endosperm starch of low-amylose bread wheat

研究代表者

安井 健 (YASUI TAKESHI)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・近畿中国四国農業研究センター・

パン用小麦研究近中四サブチーム・上席研究員

研究者番号：00343947

研究成果の概要 (和文) : *Wx-D1* 座以外の遺伝的背景がほぼ同一な系統から分離したアミロペクチンのヨウ素-アミロペクチン複合体の極大吸収波長および青価には、研究材料による違いが認められなかった。アミロペクチンの側鎖をイソアミラーゼで切断した検体について、側鎖長分布をサイズ排除クロマトグラフィーおよび高速陰イオンクロマトグラフィーで測定したところ、研究材料による違いは認められなかった。以上の結果から、*Wx-D1* 座遺伝子の機能とアミロペクチンの構造および特性との関連は認められないと結論した。

研究成果の概要 (英文) : Large A-type endosperm starch granules were isolated from near-isogenic waxy and non-waxy lines and low-amylose mutant lines of bread wheat with a common genetic background. The amylose contents of A-type starch ranged from 2.6% to 23.6%. Amylopectin was isolated by concanavalin A (Con A) precipitation from the isolated starch. The  $\lambda_{\max}$  and blue values at 680 nm of the iodine-amylopectin complex were not significantly different among the isolated amylopectins, indicating that amylopectins from non-waxy and low-amylose lines did not contain such long chains as amylose or extra-long chains of amylopectin affecting iodine complex properties. Chain-length distribution profiles measured by both high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) and high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC) showed that the amylopectin structure of these lines was indistinguishable from each other. Extra-long chains were not detected in the amylopectins by HPSEC measurement. The alleles on the *Wx-D1* locus, i.e. *Wx-D1a*, *Wx-D1d*, *Wx-D1f*, and *Wx-D1g*, responsible for granule-bound starch synthase (GBSS I) biosynthesis had no influence on the properties of iodine-amylopectin complex and the chain-length distribution profiles of amylopectin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食素材、澱粉

## 1. 研究開始当初の背景

穀類の胚乳澱粉のウルチ・モチ性やアミロース含量は、顆粒結合性澱粉合成酵素 (GBSSI) の生合成を支配するワキシー蛋白質遺伝子により決定されている。

パンコムギ (*Triticum aestivum* L.) は六倍体の作物であり、3種類のワキシー蛋白質遺伝子座 (*Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1*) をもつ。自然突然変異によって、3種類のワキシー蛋白質遺伝子座の機能が同時に喪失したり、低下したりする確率は極めて低いため、ごく最近まで、パンコムギにはモチ性や低アミロース性の品種系統は存在せず、1990年代後半に初めて、交雑由来あるいは人為突然変異由来のモチ性系統が作出された。

研究代表者は、人為突然変異由来のモチ性系統を作出し、続いてアミロース含量が通常品種の半分以下に低下した低アミロース性系統を作出した。これらのモチ性あるいは低アミロース性系統は、原系統の小麦関東107号では機能している *Wx-D1a* 対立遺伝子が、突然変異原処理により、それぞれ機能を喪失した *Wx-D1d* 対立遺伝子に、あるいは機能が低下した *Wx-D1g* 対立遺伝子に変化したために生じたものである。

モチ性澱粉はアミロペクチンのみから構成されるため、アミロースに起因する老化は起こらない。従って、適切に利用すれば小麦粉製品の老化防止に有用である。しかし、小麦粉製品の多くは、澱粉がアミロースを含むウルチ性であることを前提に、製造法が開発され、改良されてきた歴史があるため、従来の製造法ではモチ性の原料からは良い製品ができない場合がある。例えば、モチ性小麦粉から食パンを作ろうとすると、焼成の際にはよく膨らむものの、冷却の際にアミロースの老化による気泡膜の固化が起こらないため、クラム (内相) が潰れ、良い食パンができないことが知られている。

それに対して、低アミロース性澱粉はアミロースを含むため、従来の製造法を変更せずに製品ができる可能性がある。また、通常の澱粉に比べ、アミロース含量が低下しているので、アミロースに起因する製品の老化が遅延し、製品のシェルフ・ライフの延長が期待できる。このため、少なくとも老化防止を目的に添加される各種の食品添加物の使用を低減できる可能性があり、自然志向の消費者の要求にもかなう食素材と考えられている。

低アミロース性系統は、このように有用な素材と考えられるものの、その特性は十分には解明されていない。そこで、原系統およびモチ性系統を対照として、低アミロース性系統の化学成分組成の違いを精査すると共に、ワキシー蛋白質遺伝子の化学成分への多面作用を解明する研究を進めている。

パンコムギの胚乳澱粉は、粒径の異なる大粒澱粉 ( $10 \mu\text{m} \leq$ ) と小粒澱粉 ( $10 \mu\text{m} >$ ) とから構成されている。それらの構成比率は登熟に伴って変化し、成熟した種子においては、個数では小粒澱粉が90%以上を占める。大粒澱粉と小粒澱粉の特性は異なるが、重量では大粒澱粉が70%以上を占めるため、澱粉の特性のほとんどは大粒澱粉の特性で決まると考えられている。

アミロペクチンは、大きさの異なる3種類の分子種から構成されており、最も大きな分子種と中間の大きさの分子種はブロックレット (blocklet) に相当することが示唆されている。また、ウルチ性澱粉から分離したアミロペクチンには極長鎖 (extra long chain) あるいは超長鎖 (super long chain) と呼ばれる側鎖 (以下、長鎖) が存在する。長鎖は、アミロースに類似した特性をもち、アミロペクチンの重量の数%-10数%を占める。また、GBSSIはアミロペクチンの側鎖を前駆体としてアミロースを合成するというモデルが提案されている。モチ性澱粉のアミロペクチンには長鎖が存在しないため、長鎖の存在はアミロペクチン分子レベルでのワキシー蛋白質遺伝子の多面発現と考えられる。

現在までに、ワキシー蛋白質遺伝子や長鎖がアミロペクチンの構造および特性に与える影響に関して、コメ澱粉では、アミロペクチンに占める長鎖の割合は、澱粉中のアミロース含量やワキシー蛋白質量と正相関があると報告されている。また、モチ性澱粉のアミロペクチンには長鎖が存在しないため、ウルチ性澱粉のアミロペクチンに比べ分子量が大きいことが、回転半径で表した分子サイズは小さいと報告されている (Yoo *et al.* 2002)。しかし、これらの報告では遺伝的背景の異なる試料を用いており、厳密な比較がなされていないため、これらの報告における結論の妥当性には疑問がある。

## 2. 研究の目的

パンコムギのワキシー蛋白質遺伝子の機能の変化に伴うアミロペクチンの構造および特性の変化に関する明確な結論を得るため、*Wx-D1* 座以

外の遺伝的背景がほぼ同一で、アミロース含量が4水準で異なるパンコムギの突然変異系統および準同質遺伝子系統の大粒澱粉を研究試料として用いて、比較研究を実施し、澱粉の低アミロース化に伴うアミロペクチンの構造および特性(側鎖長分布、ヨウ素複合体の極大吸収波長等)の変化を解明する。

### 3. 研究の方法

- (1) 胚乳澱粉の分離：穀粒からクアドルマツト・ジュニア製粉機を用いて小麦粉を調製する。小麦粉からドウを作り、水中で揉み出し、澱粉を分離する。澱粉乳を遠心分離し、沈殿の上層部を除去して大粒澱粉を得る。これを80%塩化セシウム溶液に重層した後、遠心分離して、混在する蛋白質を除去する。
- (2) 大粒澱粉の特性：アミロース含量をコンカナバリンA法で測定する。
- (3) アミロペクチンの分離：分離した澱粉を溶解し、コンカナバリンA法により、アミロペクチンを沈殿させ回収する。アミロペクチンに結合しているコンカナバリンAは、Proteinase Kで分解し、除去する。
- (4) アミロペクチンのヨウ素複合体の特性解析：アミロペクチンをエタノール沈殿法で回収し、ヨウ素複合体の特性(極大吸収波長等)を解析する。
- (5) アミロペクチンの側鎖長分布の解析：1) アミロペクチンの側鎖をイソアミラーゼにより切断し、示差屈折率検出器を付属させたサイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC-RID)を用いて、アミロペクチンの側鎖長分布を解析する。2) アミロペクチンの側鎖をイソアミラーゼにより切断し、水素化ほう素ナトリウムで還元後、パルスド・アンペロメトリー検出器を付属させた高速陰イオン交換クロマトグラフィー(HPAEC-PAD)を用いて、重合度60程度までの側鎖について側鎖長分布を、解析する。
- (6) ワキシー蛋白質遺伝子の機能(アミロース含量)とアミロペクチンの構造および特性の違いとの関連を解析する。

### 4. 研究成果

- (1) 大粒澱粉の分離：走査型電子顕微鏡による観察の結果、分離した大粒澱粉に小粒澱粉が混在していなかった。分離した大粒澱粉のアミロース含量は、供試系統の特徴により、2.6-23.9%の範囲にあった。
- (2) アミロペクチンの分離：原報では、Proteinase Kで処理した溶液からアミロペクチンを回収する際に、ヨウ素複合体として沈殿させた後、亜ヒ酸ナトリウム溶液で脱色・溶解しているが、毒物の使用を避けるため、この操作を省略し、直接エタノール沈殿法で回収した。
- (3) アミロペクチンのヨウ素複合体の特性：

分離したアミロペクチンの極大吸収波長( $\lambda_{max}$ )は532 nmから538 nmの範囲に、680 nmにおける青価は0.026から0.038の範囲にあり、供試系統間に有意差は認められなかった。この結果は、分離したアミロペクチンには、ヨウ素複合体の特性に影響するような成分を含まないことを示唆した。これまでの報告では、ウルチ性パンコムギ澱粉から、1-ブタノール/3-メチル-1-ブタノールでアミロースを沈殿させた上清から分離したアミロペクチンの $\lambda_{max}$ は547 nmから560 nmとされている： $\lambda_{max}$ は $\alpha$ -1,4-グルコース重合体の重合度が大きくなるとより長波長にシフトすることが報告されているので、本研究で分離したアミロペクチンは、これまでの報告のものとは比べ、アミロースの混入がより少ないか、長鎖の割合がより少ないと考えられた。

- (4) HPSEC-RID測定における硫酸イオンの除去：アミロペクチンの側鎖の切断に用いるイソアミラーゼは硫酸アンモニウム懸濁液であるため、硫酸イオンが、HPSEC-RID測定の際、比較的短い側鎖と同様な保持容量で溶出し、妨害ピークとなる。この硫酸イオンによる妨害は、バリウムイオンを等モル以上添加することにより除去できた。しかし、ウルチ性準同質遺伝子系統の澱粉を供試した結果、高分子量の側鎖が同時に沈殿することが認められたので、バリウムイオンの添加をしない対照区を常に設け、高分子量の側鎖の存在を見落とすことがないようにした。
- (5) HPSEC-RIDによるアミロペクチンの側鎖長分布の解析：供試したアミロペクチンには3ピークが認められ、それぞれアミロペクチンのB2-B4鎖、B1鎖およびA鎖に相当する画分F1、F2およびF3とした。画分F1、F2およびF3の割合は、平均すると、19.9%、32.3%および47.8%で、供試系統間に有意差は認められなかった。超長鎖は認められなかった。
- (6) HPAEC-PADによるアミロペクチンの側鎖長分布の解析：側鎖の重合度により4グループに分類すると、DP 6-12、DP 13-24、DP25-36およびDP 37-60の側鎖の割合は、それぞれ、26.5-27.5%、43.6-44.1%、13.6-14.2%および11.0-11.7%の範囲にあり、DP 37-60の側鎖を除くと、供試系統間に有意差は認められなかった。
- (7) 以上のように、Wx-D1座以外の遺伝的背景がほぼ同一な系統から分離したアミロペクチンのヨウ素-アミロペクチン複合体の極大吸収波長および青価には、供試系統間に違いが認められなかった。アミロペクチンの側鎖をイソアミラーゼで切断した検体について、側鎖長分布をHPSEC-RIDおよびHPAEC-PADで測定したところ、供試系統間に違いは認められなかった。また、ウルチ性澱粉から分離したアミロペクチンにも超長鎖は認められなかった。これらの結果に基づ

き, *Wx-D1*座遺伝子 (*Wx-D1a*, *Wx-D1d*, *Wx-D1f*, および *Wx-D1g*) の機能とアミロペクチンの構造および特性との関連は認められないと結論した。また, 本研究の供試系統は, アミロペクチンの構造が同一なので, アミロース含量が澱粉の特性に与える影響の解析に好適な材料であると考えられた。

#### 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)

[雑誌論文] (計2件)

- (1) Takeshi Yasui, Kanae Ashida, Tomoko Sasaki: Chain-length distribution profiles of amylopectin isolated from endosperm starch of waxy and low-amylose bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with common genetic background, *Starch/Stärke*, **61**, 677-686. Published Online: Nov 24 2009 1:16AM, DOI: 10.1002/star.200900177, 査読有.
- (2) Pham Van Hung, Takeshi Yasui, Tomoko Maeda, Naofumi Morita: Physicochemical characteristics of starches of two sets of near-isogenic wheat lines with different amylose content, *Starch/Stärke*, **60**, 34-40 (2008), 査読有.

[学会発表] (計1件)

安井 健: パンコムギのアミロース含量変異系統とその特性, 日本穀物科学研究会 第140回例会, 2009.11.28, エル・おおさか (大阪).

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安井 健 (YASUI TAKESHI)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・近畿中国四国農業研究センター・パン用小麦研究近中四サブチーム・上席研究員

研究者番号: 00343947