

氏 名	三浦 聡子 ^{みうら さとこ}
授 与 学 位	博士 (生物資源科学)
学 位 授 与 年 月 日	令和3年9月27日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研 究 科 専 攻	秋田県立大学大学院生物資源科学研究科 博士後期課程 生物資源科学専攻
学 位 論 文 題 目	イネの枝作り酵素 (BE) 二重変異体の単離と異なる器官 の澱粉特性解析
指 導 教 員	教授 藤田 直子
論 文 審 査 委 員	主査 教授 藤田 直子 副査 教授 鈴木 英治、准教授 上田 健治 学外 弘前大学 准教授 濱田 茂樹

論 文 内 容 要 旨

緒言

澱粉は植物が光合成産物を用いて合成する重要な炭水化物であり、直鎖状のアミロースと分岐分子のアミロペクチンから構成され、多くの澱粉生合成関連酵素によって形成されている (図 1A)。澱粉の主成分であるアミロペクチンの分岐形成に関与する枝作り酵素 (BE) は、イネでは BEI、BEIIa、BEIIb の 3 種類が存在する (Yamanouchi and Nakamura, 1992)。BEI と BEIIa は、胚乳や葉鞘などの様々な器官で発現しているのに対し、BEIIb は胚乳で特異的に発現している (図 2)。各 BE の変異体は既に単離され、胚乳澱粉の鎖長分布解析により、アミロペクチン構造の特徴が明らかになっている (図 3A)。be1 は野生型と比べてグルコース重合度 (DP) 10 以下の鎖が増加し、DP 12-21 と DP31 以上がわずかに減少していた。be2a は野生型とほとんど差がなかった。be2b は 3 つの変異体の中で最も変化が大きく、 $DP \leq 13$ の短鎖が激減し、 $DP \geq 14$ が増加していた (図 3A)。be2b は、野生型と比べてアミロース含量が多くなることも示されている (Nishi et al., 2001)。また、BEIIb 欠損変異体のアミロペクチンを基質として各 BE 組換え酵素を反応させたインビトロ研究で BEI は DP6-15 と DP26-39 の分岐形成、BEIIa は DP6-12、BEIIb は DP6-7 の短鎖を特異的に形成することが示唆された (Nakamura et al., 2010) (図 3B)。以上の先行研究から、BEI はアミロペクチンの非結晶領域で中長鎖の分岐形成、BEIIa と BEIIb は結晶領域で短鎖の分岐形成への関与が示された (図 1B)。さらに、各 BE のうち 2 つの酵素活性を低下させたイネも作出され、より BE の機能を明確にする研究が実施されたが、これらのほとんどは組換え手法によるもので、実用化を目指した研究ではなかった。また、以上の先行研究のほとんどは胚乳澱粉を扱ったものであり、胚乳以外の栄養器官等への BE 欠損の影響は未解明だった。

本研究では、ジャポニカ米由来の既存の BE 変異体同士を交配させることで 3 種類の非組換えの BE 二重変異体を作成し、胚乳と葉鞘澱粉の構造と特性を調べることで、各 BE の機能分担と相補関係を明確にした。さらに特異な胚乳澱粉を持つ二重変異体の実用可能性を検証することを目的とした。

1. BE 二重変異体の単離

化学突然変異源 (N-メチル-N-ニトロソウレア) 処理によって既に単離されている EM557 (*be1*)、EM19 (*be2a*)、EM10 (*be2b*) を相互に交配し (図 4)、ウエスタンブロッティング及び各分子マーカーによって 3 種類の BE 二重変異体、即ち #1404 (*be1 be2a*)、#1403 (*be1 be2b*) 及び #1310 (*be2a be2b*) を単離した (図 4)。

be1 be2b は、F₂ 種子から二重変異体が単離できたが、*be1 be2a* と *be2a be2b* は BE 遺伝子のどちらかがヘテロの F₃ 種子から単離され、二重劣性ホモの取得率は理論値のそれぞれ約 25%、約 14% と低かった。*be1 be2b* の稔実率は野生型と同程度の約 90% だったが、*be1 be2a* は 53.6~63.4% と、これらと比べると有意に低く、*be2a be2b* は、0.3~3.4% と極端に低かった (表 1)。以上のことから *BEIIa* に加えていずれかの BE が欠損すると稔実率が低下し、アミロペクチンの短鎖の分岐を形成する両 *BEII* が同時に欠損すると稔実率が劇的に低下することが明らかとなった。このことは、*be2a be2b* が単離しにくかったことにも関連していると考えられる。*be1 be2a* の種子は半透明で種子重量は 20.5 mg であり、野生型と同等だったが、*BEIIb* が欠損した *be1 be2b* と *be2a be2b* は *be2b* と同様に種子は白濁し、種子重量はそれぞれ 12.8 mg と 10.6 mg であり、野生型と比べて小さかった (図 5)。以上のことから、胚乳で特異的に発現している *BEIIb* が正常であれば、種子形態と重量に影響がないことが明らかとなった。また、*BEIIb* と同時に *BEI* が欠損しても *be2b* と種子重量は同等であったが、*BEIIb* と同時に *BEIIa* が欠損すると *be2b* の種子重量よりも低かった。これは、*BEII* の二重欠損が胚乳澱粉の合成を著しく低下させるからであると考えられる。

2. BE 二重変異体の胚乳の澱粉構造と特性

3 系統の BE 二重変異体の胚乳澱粉を用いて、分岐をイソアミラーゼで分解 (枝切り) した後、ゲルろ過法で見かけのアミロース含量 (AAC) とアミロペクチン長鎖に対する短鎖の割合 (III/II) を調べた (図 6)。*be1 be2a* と *be2a be2b* の AAC は、それぞれ 17.1% と 17.4% であり、野生型の約 20% に比べてやや低く、*be1 be2b* は 51.7% と劇的に高かった (図 6)。III/II は、*be1 be2a* が野生型と同等の 3.4 に対して、*be2a be2b* は 0.9 と *be2b* の 1.0 と同様に低かったが、*be1 be2b* は 0.5 とさらに低く、アミロペクチン長鎖の割合が格段に高かった。

3. BE 二重変異体の葉鞘の澱粉構造と特性

次に *be1 be2a* と *be1 be2b* の BE 二重変異体 2 系統の葉鞘から澱粉を精製し、それらの構造解析を行った (図 7)。*be1 be2a* の AAC は 29.2% であり、野生型の 22.3% と比べて高かったが、*be2a* の 37.4% より低かった。*be1 be2b* の AAC

は 14.9%と系統間で最も低かった。*be1 be2a* の III/II は、0.8 であり野生型の 2.0 と比べてアミロペクチン長鎖の割合が多く、*be2a* の 1.0 と同程度だった。*be1 be2b* の III/II は 2.2 であり、野生型と同程度だった。

4. *be1 be2b* を用いた応用研究

難消化性澱粉（レジスタントスターチ：RS）は、消化酵素への抵抗性が高く、小腸を通過して高分子のまま大腸に到達する澱粉のことで、血糖値上昇抑制や整腸作用などの機能性が示されている（Englist et al., 1992; Nugent, 2005）。RS を胚乳に多く蓄積する高 RS 米は、健康に資する機能性米として期待されている。一般にアミロース含量が高いと RS 値が高くなるとされてきたが、実際には BEIIb が欠損し、アミロペクチン長鎖が増加すると RS 値が劇的に高くなることが分かってきた（図 8; Tsuiki et al., 2016）。胚乳澱粉の構造が激変した *be1 be2b* 米の RS 値を測定し、実用化の可能性を検討した。

RS 値は、測定するサンプルの状態によって変わることが予想される。そのため、炊飯米（粒のままとすりつぶし）、米粉（生と糊化）の 4 つの試験区の RS 値をメガザイムの RS アッセイキットで測定した（表 2）。野生型と *be1* の RS 値は 4 つの試験区で約 1%程度であるのに対し、*be2b* は 3.9~27.4%と高く、*be1 be2b* は 26.6~76.2%と劇的に高かった。RS 値が高かった *be1 be2b* と *be2b* の RS の構造を明らかにするため、両系統を用いて、米粉とすりつぶした炊飯米の消化酵素で分解されなかった部分（RS）をジメチルスルホキシドで溶解し、枝切り後の RS の構造をゲルろ過法で分析した。米粉の *be2b* の RS の構造はアミロースに相当する Fr. I' がほとんど検出されず、アミロペクチンに相当する Fr. II' と III' に精製澱粉よりも高いピークが検出された。*be1 be2b* は Fr. I' に精製澱粉の Fr. I の面積の 30~40%のピークが残存し、Fr. II' と III' に穏やかなピークが検出された（図 9A、B）。*be2b* はアミロペクチン長鎖と部分分解したアミロースが二重らせんを形成し、*be1 be2b* はこれらに加えて分解されなかったアミロースが残存したと予想される。*be2b* と *be1 be2b* のすりつぶした炊飯米の RS は Fr. I' がほとんど存在しなかった。*be2b* は米粉と比べて Fr. II' のピークが低く、*be1 be2b* は Fr. II' と III' が繋がったピークが検出された（図 9C、D）。2 系統とも、アミロースはほぼ分解され、アミロースの分解物と長いアミロペクチン鎖が会合したものによって RS が構成され、*be1 be2b* のこれらは *be2b* に比べてより高分子量であることが示唆された。

be1 be2b は、どの試験区でも RS 値が非常に高かったことから、様々な加工食品の実用化が期待できる。*be1 be2* は種子が小さいため、超多収米である秋田 63 号と戻し交配を行った。戻し交配後の系統は、*be1 be2b* と類似した澱粉構造を示し、種子重量も戻し交配前の 1.3 倍大きくなった。RS 値は高 RS 米品種「まんぷくすらり」と比べて 3.3~11.9 倍高かった。現在、個体選抜を行って農業形質が優れた系統を選び、品種化を目指している。

5. まとめ（図 10）

イネの BE には BEIIa と BEIIb という短鎖の分岐を形成するアイソザイムが 2

つ存在し、主として栄養器官である葉鞘等と貯蔵器官である胚乳のそれぞれで機能している。各組織でメインに働く BEII が欠損すると澱粉構造が激変した。即ち、BEIIa 欠損では葉鞘、BEIIb 欠損では胚乳の AAC が増加してアミロペクチン短鎖が激減した。両 BEII の欠損は、胚乳澱粉の合成を強く阻害し、稔実率を極限まで低下させた。このことは、澱粉合成において、長鎖の分岐は BEII のいずれかで相補できるが、短鎖の分岐は BEI では相補しづらいということを明確に示している。また、特異な澱粉を胚乳に蓄積した *be1 be2b* は RS 値が非常に高く、戻し交配によって種子重量の農業形質が向上したので、今後、機能性米として実用化が期待できる。

(A) イネの澱粉生合成関連酵素

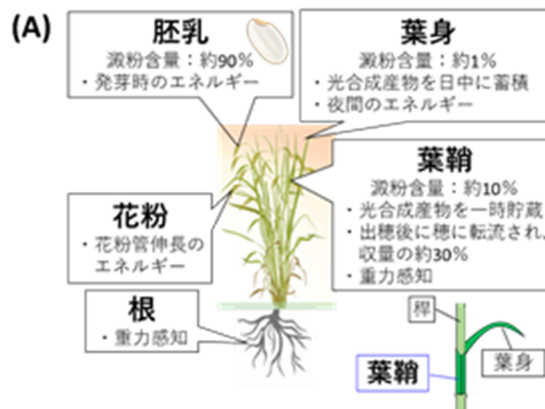
*太文字は主に胚乳で発現のある酵素

SS: 直鎖伸長酵素	BE: 枝作り酵素	DBE: 枝切り酵素
SSI, SSIIa, SSIIb SSIIc, SSIIla, SSIIlb, SSIVa, SSIVb, SSV, GBSSI, GBSSII	BEI BEIIa BEIIb	プルラーゼ[PUL] インアミラーゼ[ISA]1, ISA2, ISA3

(B) イネ胚乳での各澱粉生合成関連酵素の働き



図 1. イネの澱粉生合成関連酵素とその役割

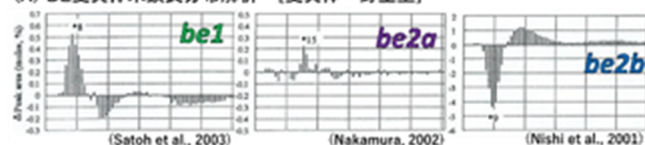


(B) 各BEの発現量

	BEI	BEIIa	BEIIb
胚乳	++	+	+++
葉鞘	+	+++	±

図 2. イネ植物体の澱粉を蓄積する器官とその機能 (A) 及び胚乳と葉鞘における各 BE の発現量 (B)

(A) BE変異体米鎖長分布解析 [変異体-野生型]



(B) 組換え酵素による in vitro 実験 (反応後-反応前の鎖長分布の差分)

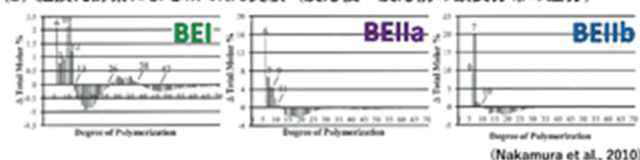


図 3. 既存の BE 変異体の特徴と機能

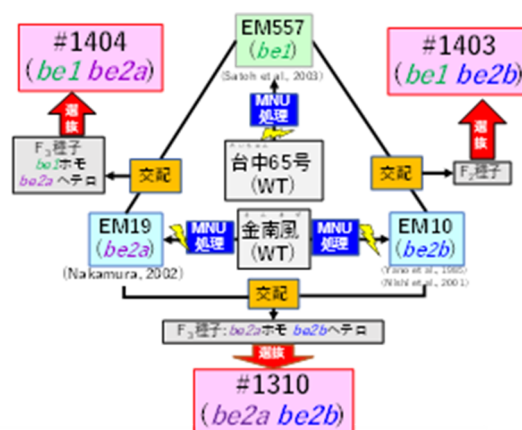


図 4. BE 二重変異体の単離法

表 1. BE 二重変異体の稔実率

系統名 (遺伝子型)	稔実率 (%)			
	2017年	2018年	2019年	2020年
台中65号 (WT)	93.5±1.5ab	88.5±0.4a	93.0±1.3a	95.4±0.3a
EM557 (<i>be1</i>)	85.1±2.3ab	71.7±0.9ab	79.0±0.6b	80.9±2.1ab
金南風 (WT)	96.0±0.2a	90.5±1.3a	87.8±0.7ab	84.0±1.8ab
EM19 (<i>be2a</i>)	92.0±1.1ab	74.7±2.5ab	82.6±2.1ab	89.7±1.2a
#1404 (<i>be1 be2a</i>)	81.2±0.7b	53.6±1.9b	54.6±0.9c	63.4±6.1b
EM10 (<i>be2b</i>)	89.4±2.4ab	80.0±4.9ab	87.9±1.6ab	89.1±0.7a
#1403 (<i>be1 be2b</i>)	96.1±0.3a	90.1±2.0a	86.1±2.6ab	92.6±0.8a
#1310 (<i>be2a be2b</i>)	-	-	3.4±1.2d	0.3±0.0c

平均値±標準誤差、n=3、a~d の異なる符号は有意差あり：Tukey-Kramer 法 (P<0.05)

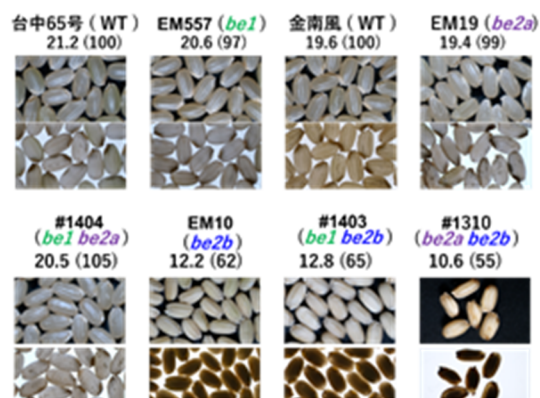


図 5. BE 二重変異体の種子形態と重量

数値は玄米重量 (2016 年~2020 年の 5 ヶ年、#1310 は 2020 年のみの平均値、n=20) を示す。() 内の数値は野生型を 100% とした数値を示す。

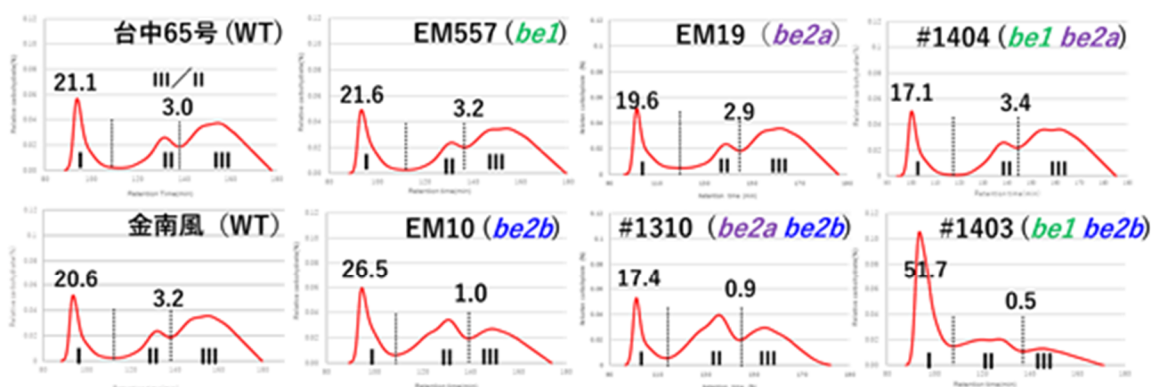


図 6. 枝切りした胚乳澱粉のゲルろ過法による見かけのアミロース含量とアミロペクチン長鎖に対する短鎖の比率

I: 見かけのアミロース含量、II: アミロペクチン長鎖、III: アミロペクチン短鎖、III/II: アミロペクチン長鎖に対する短鎖の割合

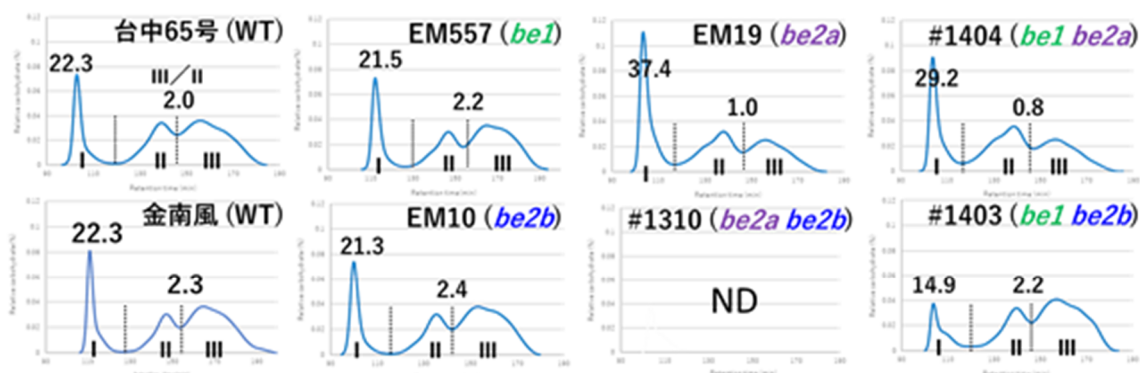


図 7. 枝切りした葉鞘澱粉のゲルろ過法による見かけのアミロース含量とアミロペクチン長鎖に対する短鎖の比率

I: 見かけのアミロース含量、II: アミロペクチン長鎖、III: アミロペクチン短鎖、III/II: アミロペクチン長鎖に対する短鎖の割合、ND: Not determined.

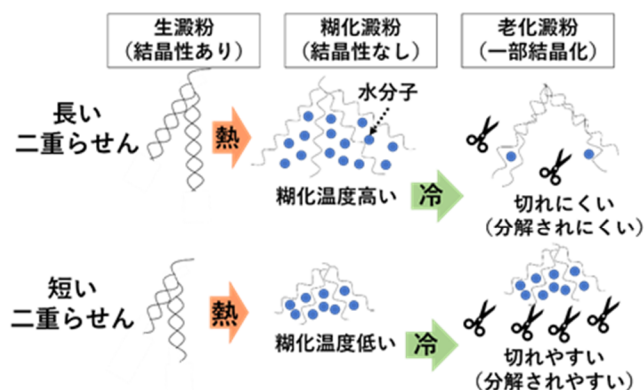
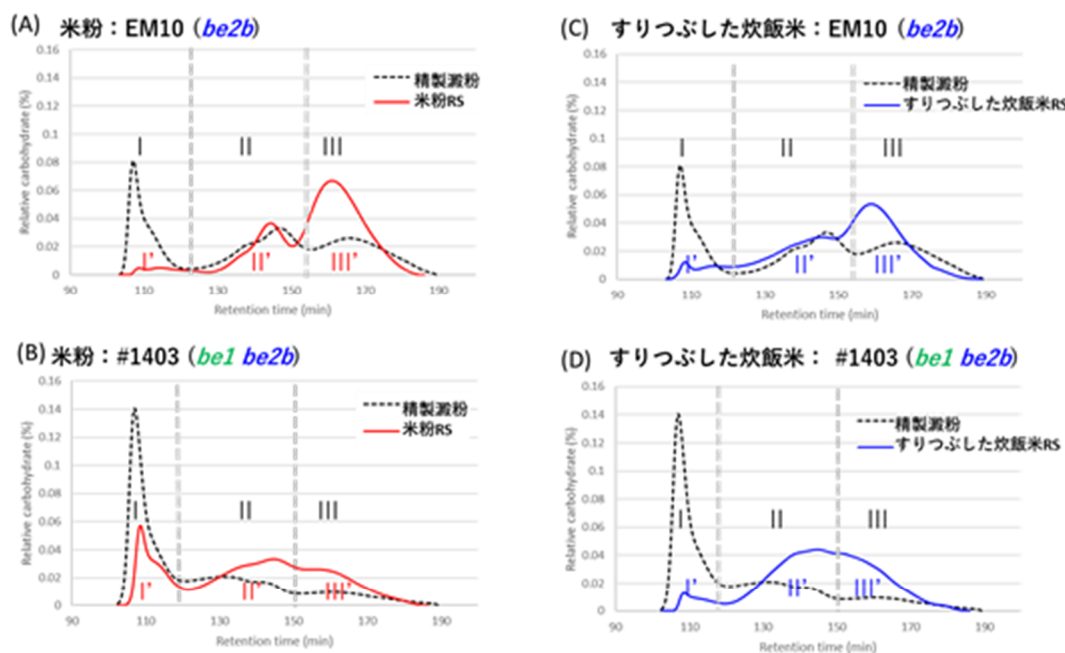


図 8. 澱粉 (アミロペクチン鎖) の糊化、老化、消化モデル

表 2. *be1 be2b* 及び親系統の胚乳のレジスタントスターチ (RS) 測定

系統名 (遺伝子型)	粒のままの 炊飯米 (%)	すりつぶした 炊飯米 (%)	米粉 (%)	糊化米粉 (%)
台中65号 (WT)	1.3±0.0d	0.9±0.0d	0.2±0.0c	0.9±0.0c
EM557 (<i>be1</i>)	1.4±0.3d	1.2±0.0d	0.1±0.0c	0.5±0.0c
金南風 (WT)	1.2±0.0d	0.9±0.0d	0.2±0.0c	0.9±0.0c
EM10 (<i>be2b</i>)	27.4±1.6b	10.8±0.2b	11.6±0.2b	3.9±0.0b
#1403 (<i>be1 be2b</i>)	76.2±1.4a	28.4±0.4a	35.1±1.0a	26.6±0.2a

平均値±標準誤差、n=3、a~dの異なる符号は有意差あり：
Tukey-Kramer 法 (P<0.05)、Miura et al., 2021)

図 9. イソアミラーゼで枝切りした *be2b* および *be1 be2b* の米粉とすりつぶした炊飯米の RS のゲルろ過パターン

黒の点線は精製澱粉を枝切りしたゲルろ過パターンで、I は見かけのアミロース、II はアミロペクチン長鎖、III はアミロペクチン短鎖、赤線 (米粉)、青線 (すりつぶした炊飯米) が RS のゲルろ過パターンで、各ピークを I' ~III' と名付けた。

系統名 (遺伝子型)	残存 酵素	単離 過程	稈実率	種子	胚乳澱粉		葉鞘澱粉	
					アミロース	アミロ ペクチン	アミロース	アミロ ペクチン
#1404 (<i>be1 be2a</i>)	BEI b	やや 難	減↓	WTと 同等	減↓	WTと 類似	増↑	長鎖 増↑
#1403 (<i>be1 be2b</i>)	BEI a	容易	WTと 同等	白濁 小	激増↑	長鎖 激増↑	減↓	WTと 類似
#1310 (<i>be2a be2b</i>)	BEI	超難	激減↓	白濁 小	やや 減↓	長鎖 増↑	ND	ND

図 10. 本研究で分析した各 BE 二重変異のまとめ

WT: 野生型、ND: Not determined.

論文審査結果要旨

三浦聡子氏は、社会人大学院生として2017年4月に本学大学院生物資源科学研究科博士前期課程に入学し、博士前期課程の2年間で、澱粉生合成に重要なスターチシンターゼIIaの変異体の特性および分子マーカーの構築と利用に関する研究成果が2報の査読付き英文誌に掲載された。2019年4月から博士後期課程に進学し、同じく澱粉生合成に重要な澱粉枝作り酵素(BE)の研究に取り組んだ。イネには、3種類のBE(BEI, BEIIa, BEIIb)が存在し、各BEの変異体は既に単離されていたが、三浦氏はこれらを交配した後代から、2種のBEが欠損した3種類の二重変異体をすべて単離し、その胚乳澱粉および葉鞘澱粉の構造や特性解析を行い、各BEの機能分担と相補関係を明らかにした。また、二重変異体のうち、特異な澱粉を胚乳に蓄積する *be1 be2b* の炊飯米や米粉の難消化性澱粉(RS)値を測定し、機能性食品の素材として有望であることを明らかにした。さらに、種子が小さいこの二重変異体を超多収米品種と戻し交配することで、将来、品種登録出願が可能な状況にまで育成した。2020年11月に、特異な澱粉構造を示す *be1 be2b* の研究成果が査読付き英文誌 RICE への掲載が決定したことから、2年半での早期修了を目指した。早期修了の審査は、生物資源科学研究科・藤田直子教授(主査)、同鈴木英治教授(副査)、同上田健治准教授(副査)、弘前大学農学生命科学部・濱田茂樹准教授(学外審査員)および佐藤孝教務委員長により審査され、承認された。論文審査は、佐藤孝教授を除く上記の4名によって、以下の本学大学院生物資源科学研究科学学位論文審査基準に準じて行われた。

- ① 専門性、②研究テーマの適切性、③研究方法の適切性：未だ未解明な点が多い澱粉生合成メカニズムの中核を担うBEを二重に欠損する二重変異体イネを作出し、適切かつ専門的な手法を用いてそれらの胚乳および葉鞘澱粉の特性を明確にし、新規性の高い重要な知見を多数得た。
- ④ 独創性：これまで澱粉生合成メカニズムの解明に関しては、貯蔵澱粉に関する研究がほとんどであったが、三浦氏はイネの栄養器官の澱粉特性を解明したこと、および基礎研究のみならず、特異な二重変異体の応用研究にまで発展させたことから、新規性と独創性は十分であると判断できた。
- ⑤ 論旨の適切性：得られたデータから、各BEの機能分担および相補関係を考察し、学位論文に明確に記載した。
- ⑥ 発表・質疑応答：学位論文発表会は、2021年8月17日に、本学講堂にてオンラインとのハイブリッド形式で行われ、40分の講演と20分の質疑応答が行われた。多数の質疑に対して、適切に回答した。
- ⑦ 研究者倫理・技術者倫理：大学院生対象の研究倫理講習会に出席し、研究計画の立案から研究の実施、資料の収集や取りまとめ、論文発表の各段階で学内、学会等の倫理基準等を遵守して行い、適切に倫理的配慮がなされた。

以上のように、審査基準を満たしており、人物的にも博士の学位を授与されるものとして十分な資質を有していることが確認できた。