

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 コムギ澱粉変異体の作出とその特性に関する研究

氏名 新畑 智也

## 論文内容の要旨

コムギは紀元前から世界中で栽培されてきた重要な穀物であり、大半が製粉工程を経て小麦粉にされ、食品の原材料として広範囲に利用されている。今般の、消費者ニーズの多様化と食品メーカーの差別化戦略の両面から、小麦粉を利用した製品には色々な特徴が求められている。食品メーカーは副資材や加工技術の開発を進め、製品の味や食感の改良を図っているものの、これら技術的改良のみでは十分な成果が得られているとは言い難い。

小麦粉の約70%を占める澱粉は、栄養源(エネルギー源)となるばかりでなく、加工性や製品の食感に大きな影響を持つことが知られている。即ち、澱粉特性の改変によって小麦粉の品質を改良できれば、消費者ニーズに適合した、差別化された製品の開発が可能となる。澱粉は、グルコースを基本構成単位とした高分子で、構造の違いからアミロースもしくはアミロペクチンに分けられる。アミロースは、 $\alpha$ -1,4結合を介した、基本的に直鎖状の構造で、コムギ澱粉の約25から30%を占める。もう一方のアミロペクチンは、 $\alpha$ -1,4結合の主鎖に $\alpha$ -1,6結合を介した側鎖を持つ樹状構造を取り、アミロースより大きな分子量を持つ。この両者の比率(アミロース含量)の違いや、アミロペクチンの分子構造(側鎖の分岐頻度や側鎖長等)の違いは、糊化特性や老化特性、あるいは糊液の粘度特性といった澱粉特有の物理化学的特性に影響を与えることで加工性や製品の食感の違いをもたらす。

澱粉の生合成には多種類の酵素が関与し、イネ、トウモロコシ、オオムギでは、それら酵素の変異に起因する、澱粉変異体が同定され、その遺伝的背景、澱粉の特性(構造的、物理化学的性質等)が解析され、その幾つかは、古くから食品利用が進んでいる。これら2倍体植物に比べて、コムギはゲノム構成が複雑(異質6倍体)であるため、天

然の澱粉変異体は容易には見出されず、酵素系の研究や遺伝学的手法による澱粉の特性の改変は容易でなく、相対的に研究は進んでいない。

そこで本研究では、コムギの澱粉合成に関わる2種類の酵素をターゲットとして、①新規澱粉変異体開発のための技術基盤の開発、②新規澱粉変異体候補の開発とその種子澱粉の特性分析、を目標とした。具体的には、アミロペクチン側鎖伸長に係わる酵素の1つである starch synthase IIa (SSIIa) の、変異体選抜のための DNA マーカー開発、SSIIa 変異体の澱粉特性の分析、さらに、アミロース合成を担う granule bound starch synthase I (GBSSI) との新規二重変異体における澱粉や種子の特性の分析等を行い、その将来の可能性を展望した。

第一章では、コムギ SSIIa 変異体の選抜に資する DNA マーカーの開発を目的とした。普通系コムギは、7対の相同染色体で構成される3セットのゲノム(A、B、Dゲノムと呼称される)からなる異質6倍体である。コムギ SSIIa には、各ゲノムに由来する3種類の同祖遺伝子が存在し(*SSIIa-A1*、*-B1*、*-D1*)、それぞれが SSIIa-A1 (115 kDa)、*-B1* (100 kDa)、*-D1* (108 kDa) をコードしている。また、各々の欠失型変異体が見出されており、3種の変異体を集積した SSIIa 完全欠失変異体では、アミロペクチンの単位鎖長分布における短鎖比率が増加し、同時に、アミロース含量が通常に比べて3から4割程度増加した、高アミロース澱粉となることが知られている。種子は細身となるため製粉歩留まりが低くなるという小麦粉生産上には不利な特徴も併せ持つものの、この澱粉には整腸作用等の生理作用が知られている難消化性澱粉が多く含まれることから、このコムギは健康機能素材としての利用が期待されている。*SSIIa-A1*、*-B1*、*-D1* 各々の欠失型変異体の遺伝子配列解析の結果、変異型 *SSIIa-A1* には開始コドンを含む289塩基の欠失および8塩基の挿入が、変異型 *SSIIa-B1* にはエクソン8への175塩基の挿入が、そして変異型 *SSIIa-D1* にはエクソン5とイントロン5のジャンクションを含む63塩基の欠失が、それぞれ見出された。これらの遺伝子配列情報を基に、野生型と変異型をPCRフラグメントサイズの違いで識別可能な、共優性DNAマーカーを開発し、これが SSIIa 変異体の選抜に利用できることを確認した。

3種の SSIIa の野生型と変異型の組み合わせは、SSIIa-A1、*-B1*、*-D1* の順に野生型を○、変異型を×で表した場合に、○○○、×○○、○×○、○○×、○××、×○○、××○、×××の8通りである。第二章では、第一章で開発した SSIIa 変異体選抜用の DNA マーカーを用いて選抜された、組み合わせの異なる8系統の準同質遺伝子系統の種子を用いて、澱粉の構造や特性を比較し、SSIIa の澱粉の構造や特性に及ぼす量効果 (dosage effect)、および3種類の SSIIa の寄与度(表現形質への影響の違い)を比較することを目的とした。その結果、SSIIa を1つ欠失(1酵素欠失型部分変異体)、2つ欠失(2酵素欠失型部分変異体)、全て欠失(完全変異体)となるに従い、澱粉の構造や特性における野生型との差異は拡大し、SSIIa のこれら澱粉特性に対する量効果が確認された。さらに、3種類の SSIIa の、澱粉の構造や特性への寄与度には、SSIIa-B1>D1>A1 の違いがあると結論した。また、部分変異体6系統(野生型と完全変異体以外)の種子は野生型と外観上の違いは見られなかったことから、これら系統は

製粉工程を経ても歩留まりへの影響は低いと考えられた。部分変異体の中では、SSIIa-A1のみを持つ系統が、野生型との差異が最大となり、特に老化耐性に優れているため、老化の進行が遅い食品の開発に利用できる可能性があると考えられた。

第三章では、SSIIa 遺伝子に関する同 DNA マーカーと、既に開発されていた GBSSI 遺伝子の同様の DNA マーカーを用いて選抜された、SSIIa と GBSSI を全て欠失した、新規な二重変異体の特性を明らかにすることを目的とした。得られた二重変異体の種子は、開花後 35 日目付近までは、野生型のコムギと、外観上の差異は見られなかった。しかしその後の水分含量の減少に伴い種子の形状が変化し、完熟種子は皺粒となった。この種子の登熟期全般で、低分子糖、特にマルトースとスクロース、の蓄積が見られ、特に開花後 25 日目付近での蓄積が顕著で、種子は甘く感じられた。従って、この二重変異体は、トウモロコシの甘味種 (sweet corn) と同様、コムギの甘味種 (sweet wheat:SW) に分類される最初のものと言えた。SW の種子の澱粉粒子は微小化し、アミロースは検出されず、アミロペクチン分子の低分子化と単位鎖長分布の短鎖側へのシフト (特に重合度 2 および 3 の単位鎖比率の増加) が見られた。さらに、重合度 14 程度を中心とした直鎖状のマルトオリゴ糖と、わずかに分岐した低分子  $\alpha$  グルカンが検出された。これらは澱粉合成過程における  $\beta$ -amylase や isoamylase の関与を示唆するものであった。

第四章では、SW の種子特性を明らかにすることを目的とした。SW の種子の成分分析の結果、澱粉含量の著しい低下と、脂質、食物繊維、低分子糖の増加が認められた。水溶性食物繊維を分析した結果、フルクトオリゴ糖 (フルクタン) 含量の、3 から 6 倍の増加が見られた。フルクトオリゴ糖のプレバイオティクス効果の報告は多く、SSIIa 完全変異体と同様に健康機能素材として期待される。また総遊離アミノ酸含量も 3 から 4 倍に増加し、特にプロリン、アスパラギン、グルタミンの著しい増加が観察され、風味の改良効果も期待される。これらの結果は、コムギの GBSSI と SSIIa の二重変異が、澱粉特性ばかりでなく、種子成分へも影響することを示していた。

第五章では、SSIIa 変異体および SW の解析結果に基づき、実用化への可能性と課題を考察した。さらに、コムギ澱粉変異体の今後の研究を展望した。

