

コムギ澱粉変異体の作出と その特性に関する研究

新畑 智也

2014年11月

目次

目次	- 1 -
略語	- 3 -
序章	- 4 -
第一節 序	- 5 -
第二節 穀類貯蔵澱粉の構造と機能的性質	- 8 -
第三節 穀類貯蔵澱粉の生合成	- 12 -
第四節 コムギにおける澱粉変異体の育成	- 17 -
第五節 研究の目的	- 20 -
第一章 コムギ <i>starch synthase IIa</i> 遺伝子における変異同定と DNA マーカーの開発	- 21 -
第一節 序	- 22 -
第二節 材料及び方法	- 23 -
第三節 結果	- 25 -
第四節 考察	- 28 -
第五節 図表	- 31 -
第二章 コムギ <i>starch synthase IIa</i> が胚乳澱粉特性に及ぼす影響	- 41 -
第一節 序	- 42 -
第二節 材料及び方法	- 43 -
第三節 結果	- 46 -
第四節 考察	- 49 -
第五節 図表	- 52 -
第三章 コムギ <i>granule bound starch synthase I</i> と <i>starch synthase IIa</i> の 二重変異体（甘味種コムギ）の開発とその種子および胚乳澱粉特性	- 64 -

第一節 序	- 65 -
第二節 材料及び方法	- 66 -
第三節 結果	- 70 -
第四節 考察	- 75 -
第五節 図表	- 78 -
第四章 甘味種コムギ完熟種子の成分特性	- 95 -
第一節 序	- 96 -
第二節 材料及び方法	- 97 -
第三節 結果	- 100 -
第四節 考察	- 103 -
第五節 図表	- 106 -
第五章 総合考察	- 113 -
第一節 starch synthase IIa 変異体および甘味種コムギの 実用化に向けた課題と今後の応用	- 114 -
第二節 コムギ澱粉変異体研究の展開	- 119 -
引用文献	- 122 -
謝辞	- 144 -

略語

AGPase	ADP-glucose pyrophosphorylase
DAF	days after flowering
db	dry weight basis
DBE	de-branching enzyme
DH	doubled haploid
DP	degree of polymerization
DSC	differential scanning calorimeter
FACE	fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis
GBSSI	granule bound starch synthase I
HPAEC-PAD	high performance anion exchange chromatography equipped pulsed amperometric detector
HPSEC	high performance size exclusion chromatography
HMW-SDF	high molecular weight soluble dietary fiber
IDF	insoluble dietary fiber
LMW-SDF	low molecular weight soluble dietary fiber
MAS	marker assisted selection
MOS	malto-oligosaccharide
NIL	near isogenic line
PPA	porcine pancreatic α -amylase
SBE	starch branching enzyme
SGP-1	starch granule protein-1
SS	starch synthase
SSIIa	starch synthase IIa

序章

第一節 序

1) コムギの起源と染色体構造

コムギは、人類の食料として古くから世界中で栽培されてきた重要な穀物であり、イネ科コムギ属に属する一年生植物である。コムギ属には一般的な小麦粉の原料として用いられる普通系コムギ (*Triticum aestivum*; パンコムギとも呼ばれる) の他、パスタ等に用いられるデュラムコムギ (*Triticum durum*; マカロニコムギとも呼ばれる) やクラブコムギ (*Triticum compactum*) などが含まれる。しかし、これらのゲノム構成は異なり、普通系コムギとクラブコムギは異質 6 倍体 (AABBDD)、デュラムコムギは異質 4 倍体 (AABB) である (木原、1973)。

普通系コムギのゲノムの由来は、A ゲノムは野生種である一粒系コムギ (*Triticum urartu*) から、B ゲノムはクサビコムギ (*Aegilops speltoides*) から、とする説が有力であり、これらの自然交配によって、二粒系コムギ (*Triticum turgidum*, 異質 4 倍体; AABB) ができ、さらにこの二粒系コムギが栽培化された後、D ゲノムを持つタルホコムギ (*Aegilops tauschii*) と交配して普通系コムギ (AABBDD) になったと考えられている (図 序-1) (木原、1973、小田、2001)。各ゲノムは、7 対の相同染色体 (1A~7A、1B~7B、1D~7D) から構成され、その染色体数は $2n = 42$ 本である。A、B、D は同祖ゲノムと呼ばれ、各ゲノムセットにはほぼ同じ遺伝子 (群) が座乗しており、対応する 3 種類の遺伝子は同祖遺伝子と呼ばれる。以下、本論文において、コムギとは普通系コムギを指す。

2) 小麦粉

世界のコムギ生産量は年間約 6.5 億トンで、主要生産国は中国、インド、アメリカ、ロシアである。国内のコムギ生産量は、1960 年には約 150 万トンであったが、近年は概ね 80 万から 80 万トンで推移し、2011 年は約 75 万トンであった。また、その半分以上が北海道で生産されている。日本国内の食糧用コムギの総需要量、約 570 万トン (2011 年) の大半が輸入で賄われており、主な輸入先はアメリカ、カナダ、オーストラリアである。コムギを製粉して得られる小麦粉の国内生産量は約 470 万トンで、その用途 (二次加工品) としてパン用約 122 万トン、めん用約 128 万トンである (農林水産省、2013)。

小麦粉の成分は、約 70% が澱粉 (starch)、約 10% がタンパク質 (protein) で、残りが脂質 (lipid) や繊維質 (dietary fiber) である。小麦粉は、これに含まれるタンパクの含量や、グルテン (gluten) の性質に拠って、強力・中力・薄力に分類されるのが一般的である。小麦粉に加水して混捏した生地は、進展性や弾性を示し、これはグルテン特有の性質に拠る。パン用には、タンパク含量が高くグルテンの強い強力粉が、逆に菓子用にはタンパク含量が低くグルテンの弱い薄力粉が、麺用にはそれぞれ中程度の中力粉が通常用いられている。

グルテンに比較して、小麦粉主成分の澱粉 (starch) の研究は遅れている。これはグル

テン特性の多様性に比べてコムギ澱粉には多様性が見られなかったことが原因であると推察される。こうした状況の中、麺、特にうどんの食感と澱粉中のアミロース含量の関係が我国において明らかにされ（小田、1988）、コムギの澱粉にも注目があたることとなった。これを契機にコムギ澱粉の研究が進展し、モチコムギを代表とする革新的なコムギが、世界に先駆けて国内で開発されている（Nakamura et al., 1995）。

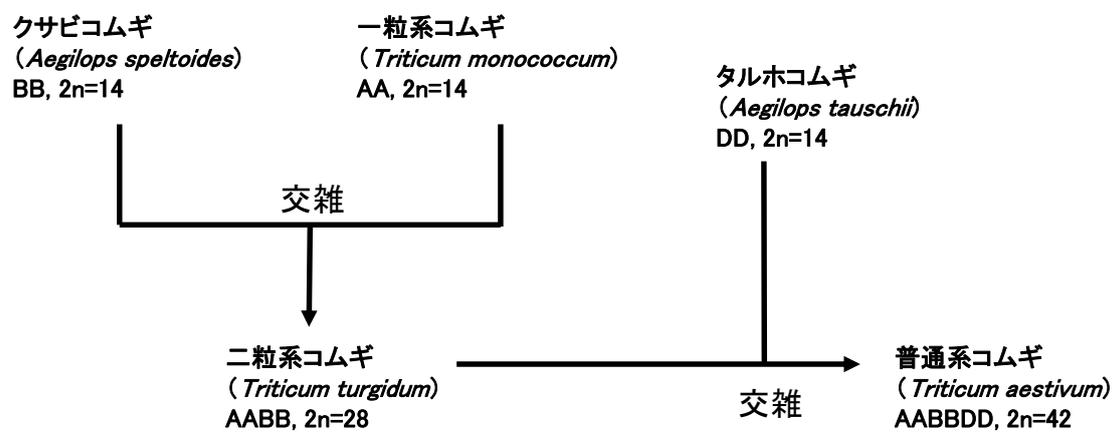


図 序-1 普通系コムギの起源 (小田、2001 より適用)

第二節 穀類貯蔵澱粉の構造と機能的性質

1) 穀類貯蔵澱粉の構造

穀類においては、変異体が多数存在するイネやトウモロコシで澱粉の研究が先行しており、その構造や機能的性質あるいは生合成の機構が、変異体や遺伝子組換え法の利用、あるいは種々の分析法の発達によって明らかにされつつある。澱粉は高分子多糖の一種であり、多くの高等植物の種子、根、葉等に蓄積される。澱粉は、光合成によって葉や茎等に一時的に蓄積される同化澱粉と、次世代の生育のための栄養源として、種子や根等に蓄積される貯蔵澱粉とに大別される。コムギ、イネ、トウモロコシ等の穀物では種子の胚乳部に貯蔵澱粉が蓄積され食料とされている。

貯蔵澱粉は粒子状で、植物種によって形状や大きさが異なる。例えば、イネの澱粉は粒径3~10 μ m程度の多角形状の粒子、トウモロコシは10 μ mから30 μ mの多角形ないし球形、コムギやオオムギでは直径10から50 μ mのレンズ型の大粒澱粉(A-type)と、10 μ m以下の球状に近い小粒澱粉(B-type)の、2種類から構成される(Bathgate and Palmer, 1972、Davis et al., 2003)。

澱粉はグルコースを基本単位とした α グルカンで、アミロース(amylose)とアミロペクチン(amylopectin)の2種類の高分子から構成される。アミロースは、グルコースが α -1,4結合によって連なった基本的には直鎖状の分子である。 α -1,6結合による分岐を持つ分子も存在するが、基本的には分岐を持たないものと性質に大きな違いは見られない(Hizukuri et al., 1986、Takeda et al., 1987a)。アミロペクチンは α -1,4結合から構成される α グルカン鎖(単位鎖)が α -1,6結合を介して樹状に結合した巨大分子である(図 序-2)。単位鎖のうち、唯一還元末端を持つものが主鎖(あるいはC鎖:C chain)と呼ばれ、それ以外の単位鎖は側鎖と呼ばれる。側鎖はその構成グルコース基の6位に他の単位鎖の結合がないもの、あるいは他の単位鎖が結合するものでさらに区別され、前者がA鎖(A chain)、後者がB鎖(B chain)とされている(Hizukuri, 1986、檜作, 2003)。これらアミロペクチンを構成する側鎖は、一定の間隔のもとで規則的に結合して房状のクラスター構造を形成している(図 序-2)(Robin et al., 1974、Hizukuri, 1986、檜作, 2003)。クラスターを構成する側鎖のうち、A鎖は1クラスターのみを形成するに留まるのに対して、B鎖はその長さの違いによって1クラスターの形成に留まるものと複数のクラスターにまたがるものがあり、関与するクラスターの数(n)に応じて、B_n鎖と呼ばれる。クラスター構造は澱粉粒子の結晶性と密接に関連し、糖鎖が密に会合しているクラスター部分は結晶領域(Crystalline lamellae)に相当し、クラスター間の糖鎖が疎の領域が非晶領域(Amorphous lamellae)に相当すると考えられている(Tetlow, 2006)。

澱粉の基本的構造は植物種を越えて共通であるものの、アミロースやアミロペクチンのグルコース残基の結合数(重合度、degree of polymerization; DP)、アミロースとアミロペクチンの比率(アミロース含量、amylose content)、アミロペクチンの側鎖構造等は植

物種あるいは品種によって大きく異なる（檜作、2003）。コムギ澱粉の場合、アミロースの重合度は 10^3 から 10^4 、アミロペクチンの重合度は 10^5 から 10^7 であり、アミロース含量は約 25%である（Rahman et al., 2000）。

澱粉中アミロース含量やアミロペクチンの側鎖構造を明らかにするために種々の分析法が開発されている。アミロース含量は、ヨウ素との親和力を元に測定する方法（McCready and Hassid, 1943, Takeda et al., 1987b）、 α -1,6 結合に特異的に作用する脱枝酵素（isoamylase; 後述）を作用させた後、高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いてゲルろ過クロマトグラフィーをおこない溶出曲線から測定する方法（Batey et al., 1996）、あるいはコンカナバリリン A を用いてアミロペクチンと分離後にグルコースに分解して定量する方法（Yun and Matheson, 1990, Morrison and Laignelet, 1983）などによって分析される。アミロペクチンの側鎖構造の推定には、これを構成する単位鎖の重合度の分布（単位鎖長分布）分析がよく用いられる。この分析では、まず isoamylase を作用させて側鎖を切り出して単位鎖とし、これをイオン交換カラムで分離し、パルス電流検出器で検出する方法（Koizumi et al., 1991, Wong and Jane, 1995）、あるいは単位鎖の還元末端を蛍光物質で標識し、キャピラリー電気泳動法等で分離する方法などが開発されている（O'Shea et al., 1998）。

2) 澱粉の機能的性質

澱粉の機能的性質の中でも、食品の加工性や品質に大きな影響を与えるのは糊化および老化特性である。澱粉を水中で加熱すると澱粉粒は次第に膨潤を始め、これに伴って溶液の粘度が増大し透明度が高くなる。100°C付近で粘度はピークに達し、さらに加熱を続けると澱粉粒子が崩壊し、粘度は一気に低下する。糊化とは、巨視的には、澱粉粒が水分を吸って膨潤し、崩壊に至る一連の過程であり、微視的には、結晶構造を形成している α グルカン鎖が水分子と水和する過程を示す。澱粉は古くから研究されているため、慣用的に日本ではこれら一連の過程を指して糊化と呼ぶことが多い。しかし厳密には糊液の粘度変化を指す場合には pasting property（粘度特性）、 α グルカン鎖と水分子の水和の過程を指す場合には gelatinization property（糊化特性）と区別される（Atwell et al., 1988, 山田ら、2003）。以下本稿でもこのように区別して用いる。糊化特性の分析には、示差走査熱量分析法（differential scanning calorimetry; DSC）がよく用いられる（Atwell et al., 1988, 山田ら、2003）。これは、水分の存在下で加熱した際の、アミロースとアミロペクチンの分子内あるいは分子間の水素結合の崩壊に伴う吸熱反応を測定する方法で、特にアミロペクチンの糊化の過程を良く反映する。また粘度変化を測定する方法としては、rapid visco analyzer（RVA）を用いる方法（Jane et al., 1999, Sasaki et al., 2000）や、アミログラフを用いる方法などがある。うどんの嗜好性との関係では、アミログラフの粘度低下の大きい澱粉を含む小麦粉はうどん適性に優れているとされている（小田、1988）。

老化（retrogradation）とは、糊化によって水和して崩壊した澱粉の結晶構造が、グル

カン鎖内部あるいはグルカン鎖間での二重らせん構造の再形成によって復活する現象で、糊化とは逆の過程をたどる（山田ら、2003、Karim et al., 2000）。ただし、結晶構造が再形成されても、アミロペクチンやアミロースが元のように密に充填された状態に戻ることはないため、糊化前のような澱粉粒子に戻るわけではない。老化の進行は水分含量や温度に大きく影響を受け、4℃付近で保存した場合に最も進行しやすく、これに伴ってゲルの濁度の上昇（透光度の低下）や硬化、離水などが観察される（山田ら、2003、Karim et al., 2000）。食品の老化は、通常食感の硬化をもたらすため出来立て直後の「おいしさ」を維持するためには老化をいかに抑制するかが重要である。この食品の老化には澱粉の老化が大きく関与するため、澱粉の老化抑制は食品産業において非常に重要な課題である。澱粉の老化を分析する方法としては、DSC によって老化澱粉の吸熱エネルギーを測定し、糊化時の吸熱エンタルピーとの比較から再結晶化の程度を分析する方法（Miles et al., 1985、Kalichevsky et al., 1990）や、澱粉ゲルの離水量、あるいは硬化度を測定する方法などが開発されている（Karim et al., 2000）。

また澱粉は糊化前の粒子の状態（生澱粉:raw starch）では消化酵素に対して高い抵抗性を示す。しかし糊化するにつれて抵抗性は低下し分解されやすくなる。また老化した澱粉では、結晶性の回復に伴い消化抵抗性は高まる（貝沼ら、1986）。このため一般的には生澱粉や老化した食品は摂取時に消化吸収されにくい。しかし近年では、動物体内の消化酵素に対して抵抗性を持つ澱粉画分の生理学的機能性が注目されている（Annison and Topping, 1994、Fuentes-Zaragoza et al., 2010）。この消化抵抗性画分は、難消化性澱粉（レジスタントスターチ）として知られ、上部消化管での消化吸収をまぬがれて腸内に到達し、腸内細菌叢や便通を改善することが多数報告されており（Annison and Topping, 1994、Fuentes-Zaragoza et al., 2010）、生活習慣病等に対する予防効果が期待されている。

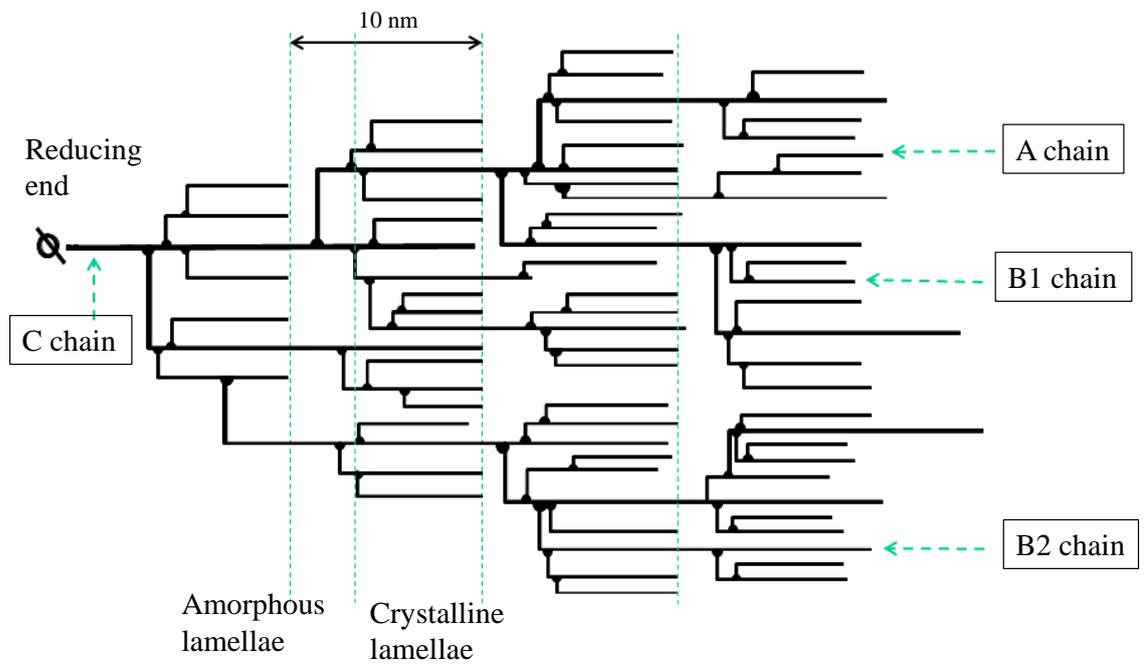


図 序-2 アミロペクチンのクラスター構造 (Robin et al., 1974より適用)

第三節 穀類貯蔵澱粉の生合成

1) 澱粉合成酵素の分類

穀類の貯蔵澱粉は、多くの酵素の秩序だった働きにより合成される。これら酵素系はよく保存されており、多くの植物種で変異体解析や生化学的手法を用いて遺伝子の同定や酵素の機能解明が進んでいる。貯蔵澱粉の生合成に係わる酵素は、①ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase; EC 2.7.7.27)、②starch synthase (SS; EC 2.4.1.21)、③starch branching enzyme (SBE; EC 2.4.1.18)、④starch de-branching enzyme (DBE) (isoamylase; EC 3.2.1.68、pullulanase; EC 3.2.1.41) の4種類に分類される(図序-3、序-4)(中村、2006)。以下これら酵素の澱粉生合成における役割を説明する。

2) AGPase

AGPaseはグルコース-1リン酸とATPからADP-グルコースとピロリン酸を遊離する反応を触媒する。産生されたADP-グルコースはこの後のSSによる α グルカン鎖合成の基質となる。AGPaseは、分子量の異なる大小2種類のサブユニットから構成され、 $\alpha_2\beta_2$ の4量体構造を持つ(Kleczkowski et al., 1993、Smith-White and Preiss, 1992)。AGPaseによる反応は、澱粉合成の律速反応であり(Stark et al., 1992、Buléon et al., 1998)、3-phosphoglycerate (3-PGA)で活性化され、リン酸により阻害されるアロステリック調節を受ける(Ball and Preiss, 1994)。このアロステリック調節を制御し、ADP-glucoseの生成速度を上げることで澱粉合成能を高め、種子重量や澱粉の収量を向上できる可能性が示されている(Giroux et al., 1996、Sakulsingharoj et al., 2004)。ただし、コムギやオオムギでは、3-PGAやリン酸への応答性は見られないとの報告もある(Kleczkowski et al., 1993、Olive et al., 1989)。イネやトウモロコシのAGPaseにおいて、大サブユニットの変異体は*shrunk-2* (*sh2*)、小サブユニットの変異体は*brittle-2* (*bt2*)と呼ばれている(Giroux and Hannah, 1994)。*sh2*変異体、*bt2*変異体共に、種子内に糖の蓄積をもたらすため、スイートコーンの品種改良に広く利用されている(Tracy, 2000)。

3) SS

SSはADP-グルコースからグルコース残基を既存の α グルカン鎖の非還元末端へ転移してグルカン鎖を伸長する反応を触媒する酵素で、顆粒結合型澱粉合成酵素(granule bound starch synthase; GBSS)、および可溶性澱粉合成酵素(soluble starch synthase; SSS)に分類される。このうちGBSSIはwaxyタンパクとも呼ばれ、アミロース合成に関与する唯一の酵素で、さらにはアミロペクチン側鎖のうち超長鎖の合成にも関与している(Nelson and Rines, 1962、Maddelein et al., 1994、van de Wal et al., 1998)。GBSSIは胚乳澱粉粒に強く結合して存在しており、それ以外の胚乳画分にはほとんど見出されない。このGBSSIが欠失した変異体ではアミロースが合成されず、その澱粉はアミロペクチンのみか

らなるモチ形質となる (Shure et al., 1983)。このモチ形質はイネやトウモロコシでは古くから自然界に見出され利用されてきた。コムギの場合は後述の理由により、この形質の報告は比較的近年になるまでなかった。

SSS には、SSI~SSV の 5 種類がこれまでに同定されている。SSI、SSII、および SSIII は、アミロペクチンの側鎖伸長に関わる酵素である。SSI は、後述する SBE によって作られた重合度 6 程度の側鎖に作用して、これを伸長する (Commuri and Keeling, 2001)。続いて SSII が、さらに SSIII が段階的に側鎖を伸長してゆくと考えられている (Tetlow, 2006)。SSI 活性を抑制した場合、アミロペクチン側鎖のうち超短鎖 (DP6 から 7) の単位鎖比率が上昇し、それより長い DP8 から 12 の比率が低下する (Fujita et al., 2006)。

SSII には SSIIa と SSIIb の 2 種類のアイソフォームが知られているが (Harn et al., 1998)、穀物胚乳における SS 活性の主体は SSIIa であることが分かっている (Tetlow, 2006)。最近では、トウモロコシとコムギにおいて SSIIc がクローニングされたが、その機能は明らかになっていない (Yan et al., 2009)。SSIIa 活性が失われた場合 (トウモロコシでは *sugary-2* 変異体として知られている)、貯蔵澱粉の粒子は上げた外観を示し、クラックが見られるようになる。分子構造的には、アミロペクチン側鎖のうち、DP6-10 の単位鎖比率が増加し、逆に DP11-24 の比率が低下する。さらにアミロペクチンに対してアミロースが増加した「高アミロース澱粉」となる。

SSIII 変異体では、DP30 以上の単位鎖比率が減少し、SSIIa 変異体同様にアミロース含量が増加する (Fujita et al., 2007)。またこの酵素の活性が低下した変異体は、トウモロコシでは *dull* 変異体として知られている (Gao et al., 1998)。

SSIV (双子葉植物では SSV として知られている) の機能は未だ不明で、この酵素が欠失した場合、アミロペクチン構造への影響は見られない。しかし、アミロプラスト内部の澱粉粒子数が減少することから、澱粉合成の開始反応に関与している可能性が考えられている (Roldán et al., 2007)。

4) SBE

SBE は、伸長された α -1,4 グルカン鎖の非還元末端から DP6 程度の α グルカン鎖を切り出し、 α -1,6 結合を介して別の α グルカン鎖に結合させることで、枝分かれ構造を作り出す。この酵素にはこれまでに SBEI、SBEIIa、SBEIIb の 3 種類のアイソフォームが見出されている。SBEI はアミロースに対する親和性が高く、SBEII はアミロペクチンに対する親和性が高い (Guan et al., 1994a, 1994b, Rydberg et al., 2001)。トウモロコシやイネでは、SBEIIa は主に葉で発現し、SBEIIb が胚乳で発現する。*Amylose-extender (ae)* と呼ばれる変異体では、SBEIIb 活性が著しく低下し、アミロース含量の増加 (アミロース分子数の増加) に加えて、アミロペクチン側鎖数の減少と長鎖化が観察されている (Boyer and Preiss, 1978, Mizuno et al., 1993, Stinard et al., 1993)。長鎖アミロペクチンはヨウ素との複合体を形成するため、ヨウ素との親和性を利用したアミロースの定量法では、見かけ上

のアミロース含量の増加をもたらす結果となる。SBE 変異体の見かけ上のアミロース含量は 50%にもなり (通常は 25 から 30%)、高アミロース澱粉として利用されている (Ferguson, 2000)。

5) DBE

DBEには isoamylase タイプと pullulanase (limit-dextrinase, R-enzyme と呼ばれる) タイプの 2 種類が知られている (Nakamura, 1996)。共に α -1,6 結合を切断することによりアミロペクチン側鎖を遊離させる。ただし isoamylase タイプは、マルトトリオースが α -1,6 結合で連結したプルランに作用できないのに対して、pullulanase タイプは動物体内に蓄積される多糖であるグリコーゲンに作用しない (Nakamura, 1996)。isoamylase には ISA1、ISA2、ISA3 の 3 クラスがある (Hussain et al., 2003)。ISA1 と ISA2 はアミロペクチン合成に関与し、クラスター構造の形成に支障となる α グルカン鎖を切り出してトリミングする働きを担っていると考えられているのに対して (Fujita et al, 2003, Kubo et al., 2005)、ISA3 は澱粉の分解時に作用すると考えられている (Zeeman et al., 2010)。pullulanase も ISA3 と同じく、主に澱粉の分解時に作用すると考えられている (Dinges et al., 2003)。DBE の変異体の内、isoamylase タイプの変異体は *sugary-1* (*su1*) と知られており (James et al., 1995)、この澱粉ではアミロペクチンの単位鎖長分布が短鎖側にシフトし、側鎖の分岐箇所がランダムでかつ分岐頻度も高まった結果、クラスター構造が形成されなくなる。さらに澱粉粒子数が低下し、フィトグリコーゲンと呼ばれる可溶性ポリサッカライドの含量が著しく増加する (Fujita et al, 2003)。pullulanase タイプの酵素活性の低下によっても *su1* 表現型はより強く現れることから (Rahman et al., 1998, Kubo et al., 1999)、共にアミロペクチンのクラスター構造の形成には重要な酵素であると考えられている。また *su1* もスイートコーンの品種改良に利用されている変異体である。

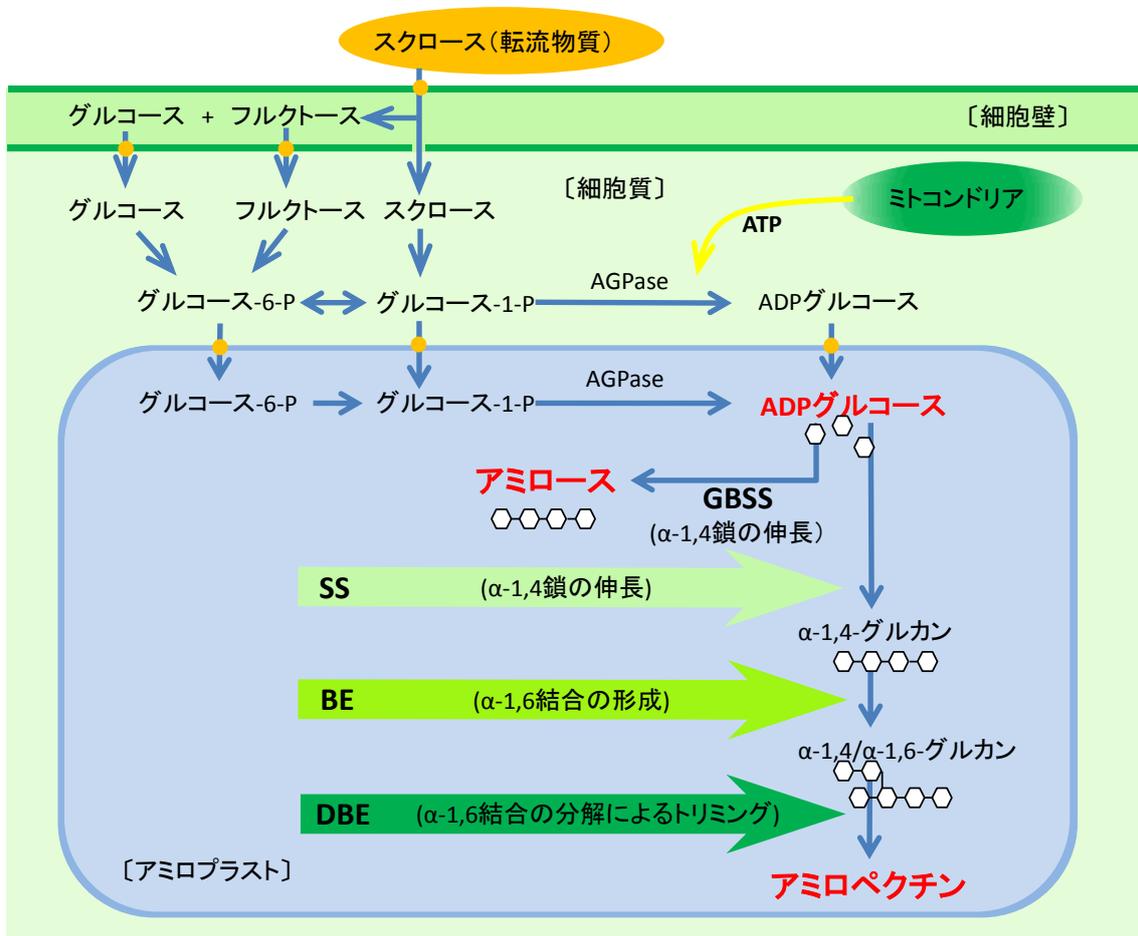


図 序-3 穀物種子における澱粉合成の代謝経路 (中村、2006 より適用)

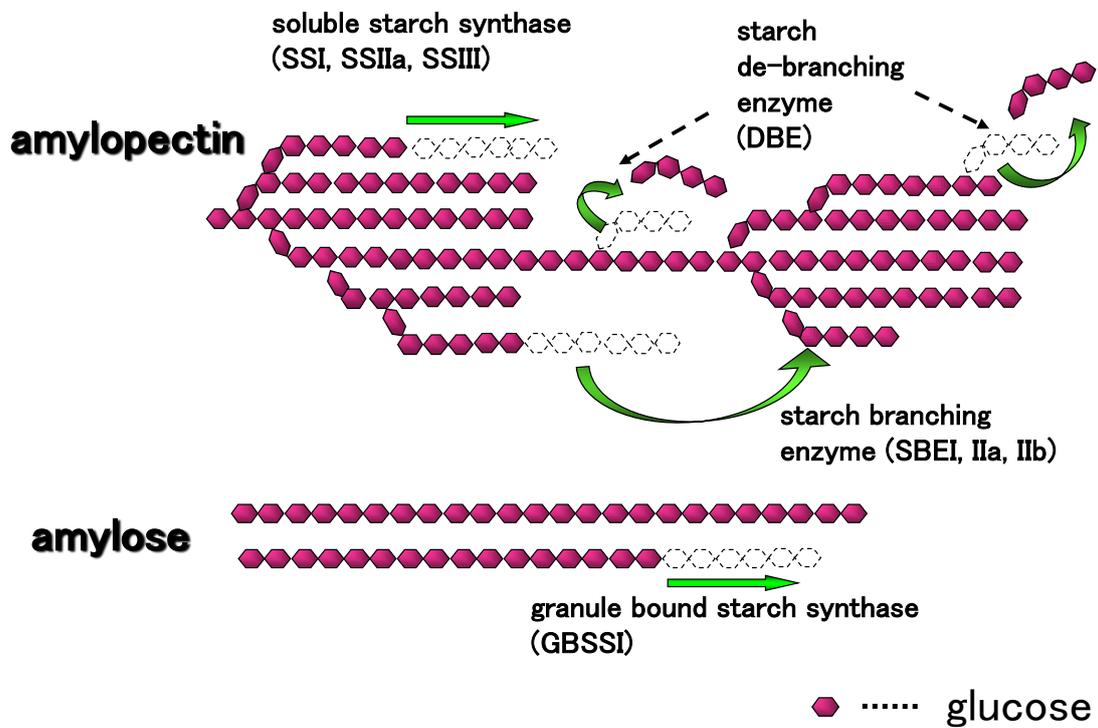


図 序-4 澱粉の構造と生合成に関わる酵素

第四節 コムギにおける澱粉変異体の育成

1) モチコムギの開発

イネやトウモロコシ、オオムギ等では古くからモチ形質が知られていたのに対して、コムギではその存在は知られていなかった。これは、イネやトウモロコシが2倍体であるのに対して、コムギは異質6倍体で、基本的に3つの同祖遺伝子を持つことに起因する。第三節に述べた澱粉の生合成に関わる酵素群はコムギでも保存されており、各酵素は同祖遺伝子に由来する3つのアイソザイムを発現している。仮に1つの酵素タンパク遺伝子に変異が入って機能を失ったとしても、残りの2つの同祖遺伝子はその機能を補うことができるため、表現型への影響は限定され、結果として変異体を見出すことが難しかったことによる。

コムギでは通常、澱粉中にアミロースは25%程度含まれており、これがモチ形質となるためにはアミロース合成を完全に阻害する必要がある。コムギ胚乳澱粉のアミロースは3種の同祖遺伝子 *GBSS-A1*、*-B1*、*-D1* (*waxy-A1*、*-B1*、*-D1*とも呼ばれる)によってコードされる *GBSS-A1*、*GBSS-B1*、*GBSS-D1* (*waxy-A1*、*-B1*、*-D1*) タンパクによって合成されており (Nakamura et al., 1992, Nakamura et al., 1993a, Miura et al., 1994)、これら全ての酵素機能を欠失させなければモチ形質にならない。しかし自然条件下あるいは変異誘発などによる突然変異が、3つの同祖 *GBSSI* 遺伝子全てに同時に起こる確率は非常に低い。育種によって変異を集積する場合、各酵素タンパク質の発現量や酵素活性との関連を知る必要があり、これは電気泳動等の、酵素タンパク質の分析を可能にする手法の登場で初めて可能となった (Nakamura et al. 1993a)。これら手法を駆使し膨大な遺伝資源から、関東109号 (*GBSS-A1* および *B1* を欠失, Nakamura et al. 1993b) および白火 (*Bai-Hou*, *GBSS-D1* を欠失, Yamamori et al., 1994) が見出され、これらの交雑による後代から *GBSSI* を全て欠失したコムギが選抜された。このコムギがモチ形質であると証明されたことでモチコムギが登場した (Nakamura et al., 1995)。このコムギの開発は、同祖遺伝子に関する変異を集積することで澱粉変異体を得ることができること、この手法を応用することで他にも澱粉変異体育成が可能であることを示した点で大きな成果であった。このモチコムギの澱粉は他の穀物のウルチとモチの関係同様に、糊化時には低温で粘度が上昇し、老化しにくい特徴を備えている (Hayakawa et al., 1997)。このモチコムギの実用化に向けて、各国で育成や、様々な加工用途における評価が盛んにおこなわれている (Kiribuchi-Otobe et al., 1997, Abdel-Aal et al., 2002, Guo et al., 2003, Hayakawa et al., 2004)。この小麦粉を食パンに用いた場合には柔らかく、モチリとした食感となる。また水分の保持力が高く、数日の保存後でも柔らかさが維持されることから、老化抑制による日持ち向上につながることを期待されている (Morita et al., 2002, Hayakawa et al., 2004)。麺に用いた場合にも基本的には柔らかくてモチリとした食感になり、配合量によっては適度な粘弾性が得られる (Hayakawa et al., 2004, Guo et al., 2003)。さらに日本食の餅様食

品に用いた場合に、噛みやすく、飲み込みやすいため、高齢者向けの食品への応用も期待されている (Fujita et al., 2012)。

2) 部分モチ変異体の開発

モチコムギ開発の過程で3つのGBSSIそれぞれに、酵素タンパクが欠失した変異体が見出された。各々の野生型と変異型の組み合わせは、野生型を○、変異型を×で表すと、GBSSI-A1、-B1、-D1の順に、①○○○、②×○○、③○×○、④○○×、⑤○××、⑥×○×、⑦××○、⑧×××の合計8通りとなる。通常①が野生型、⑧が変異(体、型)、②から⑦は部分変異(体、型)と呼ばれる。①から⑧の各組み合わせとアミロース含量の関係が詳細に調べられており (Yamamori and Quynh, 2000、Nakamura et al., 2002)、①のアミロース含量に対して、1酵素が変異型となった部分変異体(②から④)では1~2%低下する。2酵素が変異型の部分変異体(⑤から⑦)ではさらに数%低下し、20%前後のアミロース含量となる。3つ全てが欠失した変異体(⑧)の場合に、前述のモチコムギとなる。つまりGBSSIはアミロース含量に対して量効果(dosage effect)を示す。ただし上述のように、この効果は単純な相加効果ではなく、特に1酵素でも野生型が存在する場合には、アミロース含量は20%程度となり、アミロースを含まないモチコムギとの差は非常に大きいものとなる。加えて、1酵素変異型、2酵素変異型の部分変異体いずれにおいても、どの酵素を欠失するかによってアミロース含量が異なることがわかっている (Yamamori and Quynh, 2000、Nakamura et al., 2002)。1酵素の変異型では、GBSS-B1が欠失した場合にアミロース含量が最も低くなる。2酵素変異型ではGBSS-B1とD1が欠失した場合に(GBSS-A1のみ野生型)、最も低くなる。つまり、3種類のGBSSI間で、各々のアミロース含量への寄与度が異なるわけである。ただしGBSSIの寄与度の違いによってもたらされるアミロース含量の違いは量効果に比べれば小さい。しかしながら、このわずかなアミロース含量の違いが、うどん等の麺の食感に影響するため、近年国内ではGBSS-B1のみを欠失したものが「やや低アミロース」系統として多数育成され実用化されている(柳沢ら、2007、谷中ら、2013)。

部分変異体の利用は、本論文においても重要な意味を持っている。以降、本論文では、3種類全ての機能を欠失したものを(完全)変異(体、型)と呼称し、1酵素が欠失した1酵素欠失型部分変異(体、型)および2酵素欠失型部分変異(体、型)に分けて呼称する。

3) 高アミロースコムギの開発

コムギ澱粉粒に結合するタンパクのうち、115 kDa、108 kDa、100 kDaの3つのタンパクはstarch granule protein-1 (SGP-1)として知られ、それぞれ7A染色体、7D染色体、7B染色体に由来することが示されたことで、各々SGP-A1、-D1、-B1と名づけられた (Yamamori and Endo, 1996)。その後、ペプチドマッピングによるアミノ酸配列分析 (Takaoka et al., 1997)や、cDNAライブラリの発現クローニング (Li and Corke, 1999)、

遺伝子発現解析 (Gao et al., 2000) などにより、SGP-1 がコムギにおける SSIIa アイソフォームであることが明らかとなった。GBSSI 同様に、多数の遺伝資源の中から見出されたこの酵素の変異体、Chosen 57 (SGP-A1 欠失)、Kanto 79 (SGP-B1 欠失)、Turkey 116 (SGP-D1 欠失) (Yamamori and Endo, 1996) を順次交雑して SSIIa が全て欠失したコムギが作出された (Yamamori et al., 2000)。この変異体の澱粉粒は、前述したように変形やひび割れが見られる等、粒子外観への影響が現れるだけでなく、アミロース含量は野生型に比べて 1.3 倍程度に増加した高アミロース変異体となる。またアミロペクチン側鎖のうち、DP6 から 10 程度の短鎖の単位鎖比率が増加し、DP11 から 25 の中鎖比率が低下し、糊化温度や糊化エンタルピー変化量、糊化時のピーク粘度が低下する (Yamamori et al., 2000、Hung et al., 2007)。この変異体の小麦粉を食パンに用いた場合には、配合量が高まるにつれて比容積が低下し、クラムが硬くなる。麺に用いた場合にも硬い食感となるが、この食感は中華麺に向いている可能性があるとされている (Hung et al., 2005)。一方で、この澱粉には腸内細菌叢の改善効果が知られるレジスタントスターチが多く含まれることが示されており (Hung et al., 2005、2006、Yamamori et al., 2006、Hallström et al., 2011)、健康面での寄与が期待されている。このように、澱粉合成酵素変異体の利用により、多様な特性の澱粉を持つコムギが育成でき、特性をうまく利用することで新しい用途の開発が期待される。この SSIIa についても GBSSI 同様に部分変異体が可能であるものの、その報告は未だ少ない。この詳細については第二章で述べられる。

第五節 研究の目的

食に対する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、製品には多様な特徴が求められている。これに応えるために、食品メーカーは副資材や加工方法の研究を進め、製品の味や食感の改良・差別化を図っている。小麦粉の加工品においても同様であり、特に、パンや麺などの小麦粉が主要な原材料である製品においては、小麦粉の基本的な特性が重要な位置を占めており、澱粉特性の多様性が低い小麦粉にこれらを求めることは難しい。また副資材の利用や加工方法の工夫だけでは、十分な効果が得られない場合も多い。一方で、2008年には副資材の中でも重要な加工澱粉の使用に添加物表示が必要となり（厚生労働省令第119号（平成21年）、厚生労働省告示第325号（平成21年））、添加物を避けたいというニーズへの対応も求められている。

即ち、澱粉の改変により小麦粉の特性を改良することができれば、消費者のニーズに適合した、差別化した製品の開発につなげることが可能となる。これまで述べたように、コムギは異質6倍体であるために変異体の開発は容易ではなく、効率的な技術基盤の確立が必要である。また、ニーズの多様化を受け、一種類の遺伝子の変異ではなく、二種以上の多重変異体の作出基盤の確立が必要である。さらに、こうした技術基盤を整備することで、コムギの特徴である部分変異体を生かし、よりファインな育種を展望することが可能となる。

遺伝子組換え技術の急速な進展も見られるものの、多重変異体や部分変異体作出に向けた技術的課題はまだ多く、さらに組換え作物に対する消費者の理解も必要であるため、この技術の利用は未だ現実的ではない。

よって本研究は、伝統的育種技術を応用することを前提に、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、更にこれを踏まえ、多重部分変異体の作出を展望することを目的とした。具体的には、SSIIa 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、GBSSI と SSIIa の二重変異体の開発とその澱粉特性等の分析結果を示し、これを基に将来を展望した。

第一章

コムギ *starch synthase IIa* 遺伝子における
変異同定と DNA マーカーの開発

第一節 序

コムギの SSIIa 変異体は、序章に述べたように高アミロースとなり、新規な食品素材となる可能性を秘めている (Yamamori et al., 2000)。この形質を有するコムギを実用化していくためには、播種から収穫までの生産、種子から小麦粉を製造する一次加工、小麦粉を使って食品を製造する二次加工の各工程において、多くの課題をクリアしていく必要がある。小麦粉の製造では、上質の粉が多く取れる品種が望まれる。種子の硬軟質や、胚乳組織と皮部の結合性 (皮離れ)、多糖類の多寡、灰分含量などがこれに影響する。小麦粉としての利用においては、パンや麺、菓子といった用途によって蛋白含量やグルテン特性、粉色等が重要である。加えて安定した生産をおこなうために栽培地域に適した出穂期、耐病性等の農業特性の導入も必要である。これら必要条件を満たし、かつ早急に品種を育成する方法としては、栽培地域で用途別に既に主要品種として栽培されているコムギに、SSIIa 変異のみを導入することが最適と考えられる。こうした工程において、目的とする系統の選抜には、澱粉粒結合性タンパクのポリアクリルアミドゲル電気泳動分析が検討されている (Yamamori and Endo, 1996、Yamamori et al., 2000)。この分析方法は確立された手法ではあるが、多検体処理が難しい、ヘテロ接合体の判定が難しい、といった問題点があり、多くの検体を迅速に分析することが要求される育種現場においては、適切な手法ということはできない。そこで本章においては、近年急速に発展の見られる DNA マーカーを用いた選抜法 (marker assisted selection: MAS) を、SSIIa 変異体の選抜に応用することとした。コムギにおいては、*GBSSI (waxy)* 遺伝子 (Nakamura et al., 2002、Saito et al., 2009) や、グルテン遺伝子 (鈴木ら、2006、高田ら、2008、谷口ら、2013)、硬軟質に関わる *puroindolin* 遺伝子 (池田ら、2003、鈴木ら、2006) 等の DNA マーカーが既に開発、実用化されている。そこで 3 種類の同祖染色体に由来する SSIIa を、それぞれ個別に欠失する系統を用い、その変異部位の同定および野生型と変異型を識別できる共優性 DNA マーカーの開発を目指した。

第二節 材料及び方法

1) 植物材料

野生 (wild) 型 *SSIIa* 遺伝子のゲノム DNA の塩基配列の決定には、3 種類の *SSIIa* を発現することが知られている普通系コムギ (*Triticum aestivum*) 品種 Chinese Spring (CS) を用いた (Yamamori et al., 2000)。 *SSIIa* の欠失をもたらす変異 (null) 型 *SSIIa* 遺伝子のゲノム DNA 塩基配列の決定には、3 種類の *SSIIa* それぞれの部分変異体系統、Chosen 57 (C57 ; *SSIIa*-A1 欠失)、Kanto 79 (K79 ; *SSIIa*-B1 欠失)、Turkey 116 (T116 ; *SSIIa*-D1 欠失) を用いた (Yamamori et al., 2000)。

各同祖遺伝子を識別する DNA マーカーの特異性は、CS 由来の染色体置換系統 (ナリソミック/テトラソミック系統 ; NT 系統) を用いて確認した。 *SSIIa* 遺伝子は 7 群染色体上に座乗しているため (Li et al, 1999, Yamamori and Endo, 1996)、7A 染色体が 7D 染色体に置き換わったナリソミック 7A テトラソミック 7D (N7AT7D) 系統、7B 染色体が 7D 染色体に置き換わったナリソミック 7B テトラソミック 7D (N7BT7D) 系統、および 7D 染色体が 7B 染色体に置き換わったナリソミック 7D テトラソミック 7B (N7DT7B) 系統 (Sears and Miller, 1985) を用いた。

Chosen 57 および Turkey 116 は (独) 農業生物資源研究所 (NIAS) より分譲を受けた。全ての系統は東北農業研究センター (東北農研) 内の温室にて栽培された。

2) コムギゲノム DNA の調製

各コムギ系統のゲノム DNA は、発芽後 3 葉期の若葉より DNeasy Plant Mini kit (キアゲン社、東京・日本)、または Nucleon Phytopure plant DNA Extraction kit (アマシャムバイオサイエンス社、東京・日本) を用い、プロトコルに従って調製した。

3) 野生型及び変異型 *SSIIa* 遺伝子のゲノム DNA の増幅

SSIIa 遺伝子のゲノム DNA を増幅するためのプライマーの設計には、*Aegilops tauschii* (*Ae. Tauschii*) の *SSIIa* 遺伝子ゲノム DNA 配列 *ATSSII* (accession no. AY133248, Li et al., 2003)、および普通系コムギの以下の 3 種の *SSIIa* 遺伝子 cDNA 配列を用いた (Gao and Chibbar., 2000) : Ss2a-1 (AJ269502)、Ss2a-2 (AJ269503)、Ss2a-3 (AJ269504)。具体的には、同祖染色体由来の 3 種類の遺伝子を同時に増幅できるプライマーセットを、*ATSSII* 及び上記 3 種類の cDNA 配列の共通配列部分に設定した。即ち、*SSII* Fow1/Rev1、*SSII* Fow2/Rev2、*SSII* Fow3/Rev3 の 3 セットのプライマーによって、開始コドン上流から終止コドンを含む領域を、重複を持つ 3 つのセグメントに分けて増幅できるように設計した (図 1-1)。ただし、開始コドン上流領域については、上記 cDNA の配列情報では不十分であったため、この領域を増幅するためのプライマー *SSII* Fow1 は、*ATSSII* 配列のみを用いて設計した。PCR の反応液は、プライマー各 5.0 pmol、20.0 ng ゲノム DNA、2.5 mM 塩化マグネ

シウム、0.2 mM dNTP、0.5 U LATAq DNA polymerase (タカラバイオ社、京都・日本)および同ポリメラーゼに添付のバッファーを含み、超純水で合計 20 μ l にした。反応温度サイクルは、98°Cで5分間の変性の後、98°C 30秒、64°C 30秒、74°C 2分を40サイクルおこない、最後に74°C 15分間の伸長をおこなった。増幅産物は、0.8%アガロースゲル電気泳動にて確認した。

4) 増幅産物のクローニングと塩基配列の解析

PCRの増幅産物は、pCR2.1ベクター(タカラバイオ社)を用いてTAクローニングした。塩基配列解析はABIプリズム310シーケンサー(ライフテクノロジーズジャパン社、東京・日本)を用いておこなった。得られた塩基配列は、遺伝子解析ソフトウェアのGenetyx ver7.0(日立ハイテクノロジーズ社、東京・日本)を用いて解析した。

5) 野生型および変異型を識別する特異的プライマー

同定した野生型及び変異型の*SSI1a*遺伝子のゲノムDNAの配列情報を基に、これらを特異的に識別するためプライマーセットを設計した(表1-1)。これらプライマーセットは、変異箇所を挟み込む形でアニールし、野生型と変異型の両者を共に増幅できるように設計した。PCRの反応液は、プライマー各10.0 pmol、20.0 ng ゲノムDNA、2.25 mM 塩化マグネシウム、0.2 mM dNTP、0.5 U LATAq DNA polymerase (タカラバイオ社)および同ポリメラーゼに添付のバッファーを含み、超純水で合計20 μ l とした。温度サイクルは、98°Cで5分間の変性の後、98°C 30秒、65°C 30秒、74°C 1分を40サイクルおこない、最後に74°C 5分間の伸長をおこなった。増幅産物は、3%アガロースゲル電気泳動にて確認した。

6) 澱粉の単離

収穫した種子を乳鉢と乳棒を使って粉碎し、得られた種子粉末から中村らの方法(Nakamura et al., 1992)に従って澱粉を単離した。種子粉末20 mgにSDSバッファー(55 mM Tris-HCl (pH6.8)、2.3% SDS(w/v)、5% 2-mercaptoethanol、10% glycerol)を1 ml 加え、氷上でよく攪拌した。この懸濁液を遠心分離(17,000 \times g)して澱粉を沈澱させ上層を取り除いた。再度SDSバッファーを加えて同様に2回の処理をおこなった。続いて超純水1 mlで同様の処理を2回、さらに超純水をアセトンに変えて3回おこない、最後に真空乾燥した。

7) 澱粉粒結合性タンパクの分析

単離した澱粉粒に結合するタンパクの分析は、Nakamura ら(Nakamura et al., 1992)の方法に従い、SDS-PAGEで分離し、クマシーブリリアントブルーによる染色にて確認した。

第三節 結果

1) *SSIIa* 遺伝子のゲノム DNA 配列

CS(野生型)のゲノム DNA から、3 セグメントに分けて増幅された配列をつなぎ合わせることで、6,898 塩基、6,811 塩基および 7,010 塩基の 3 種類のコンティグ配列が得られた。この 3 種類のコンティグ間の相同性は、82~87%であった。これらコンティグのうち、7,010 塩基のコンティグは *ATSSII* と非常に高い相同性を示し(99.8%)、ミスマッチはわずかに 17 塩基であった。このうちの 5 塩基はエクソンに位置し、残りの 12 塩基はイントロンに位置していた。*ATSSII* は、普通系コムギの D ゲノム供与体と推定されている *Ae. tauschii* の *SSIIa* ゲノム DNA 配列であり(Li et al., 2003)、7,010 塩基のコンティグ配列は、CS の D ゲノムに座上する *SSIIa-DI* のゲノム DNA 配列と推定した。

また、3 種類のコンティグから推定されたエクソン/イントロン構造は、*ATSSII* で推定されているもの(Li et al., 2003)と、非常に高い類似性を示した。また、このようにして推定されたコーディング領域の配列は、3 種類のコンティグ間で高い相同性(96%以上)を示した。さらに、6,898 塩基と 6,811 塩基のコンティグから予測されたコーディング配列は、*SSIIa* の cDNA 配列である Ss2a-2 と Ss2a-3 に、それぞれ完全に一致した。Ss2a-2 と Ss2a-3 については、SSIIa-A1、SSIIa-B1 のアミノ酸配列データ(Li et al., 1999)との比較から、それぞれ *SSIIa-A1*、*SSIIa-B1* の cDNA 配列と考えられた。また、7,010bp のコンティグから予測されたコーディング領域の配列は、同じく Ss2a-1 と 1 塩基の違いで一致した。以上の結果から、コンティグ配列 6,898bp、6,811bp および 7,010bp は、それぞれ *SSIIa-A1*、*SSIIa-B1* および *SSIIa-DI* のゲノム DNA 配列であると推定した。こうした結果を踏まえ、CS のナリテトラ系統のゲノム DNA を用いた試験(後述する)から、コンティグ配列 6,898bp、6,811bp および 7,010bp は、それぞれ *SSIIa-A1*、*SSIIa-B1* および *SSIIa-DI* のゲノム DNA 配列と結論し、それぞれ AB201445、AB201446、AB201447 (GenBank accession number) として登録された。

2) 変異型 *SSIIa* 遺伝子ゲノム DNA 塩基配列

C57、K79、T116 の、澱粉粒結合性タンパクを SDS-PAGE で解析し、それぞれが SSIIa-A1、-B1、-D1 を欠失することを確認した(図 1-2) (Yamamori and Endo, 1996)。次に野生型の 3 種類の *SSIIa* ゲノム DNA の増幅と同様に、この 3 系統のゲノム DNA から、それぞれの遺伝子に対応すると考えられる 3 種類のコンティグ配列、それぞれ 6,619 塩基、6,986 塩基、6,946 塩基を得た。これらを CS 由来の野生型 *SSIIa* 遺伝子と比較し、以下の点が明らかになった。

- ① C57 由来 *SSIIa-A1* 遺伝子では、開始コドンを含む 289 塩基の欠失および 8 塩基の挿入配列が見出された(図 1-3)。また 2 箇所のイントロンに、1 塩基ずつの挿入が見られた。

- ② K107 由来 *SSIIa-BI* 遺伝子では、exon8 の内部に 175 塩基の挿入配列が見出された (図 1-4)。
- ③ T116 由来 *SSIIa-DI* 遺伝子では、exon 5 と intron 5 にまたがるジャンクションを含む 63 塩基の欠失が確認された (図 1-5)。また、exon7 に 1 塩基の挿入が見られた。

3) 野生型および変異型 *SSIIa* 遺伝子を識別できる PCR ベースの DNA マーカー

野生型および変異型 *SSIIa* 遺伝子の配列を元に、PCR ベースでこれらを識別できる 3 セットのプライマーをデザインした (表 1-1 および図 1-6)。このプライマーセットは、野生型ホモ接合体、変異型ホモ接合体およびヘテロ接合体を全て識別できる共優性マーカーとするために、特異的変異領域の両側に設定されている。これらが、ターゲットである各同祖遺伝子を特異的に増幅していることを確認するために、NT 系統のゲノム DNA を用いて確認した。

SSII AF1 と SSII AR1 を用いて PCR をおこなった結果 (図 1-7A)、野生型 *SSIIa-AI* 遺伝子を持つ CS と N7BT7D、N7DT7B からは 454 塩基の単一バンドが増幅された。これに対して、7A 染色体を持たない N7AT7D からバンドは増幅されなかった。変異型 *SSIIa-AI* 遺伝子を持つ C57 からは 173 塩基付近に単一のバンドが得られた。これらは全て予想された増幅結果であり、本プライマーを用いて目的の遺伝子を特異的に増幅できることが示されたと共に、*SSIIa-AI* が 7A 染色体に座乗している (Yamamori and Endo, 1996、Li et al., 1999) ことも改めて確認された。

SSII BF1 は *SSIIa-BI* 遺伝子にのみ存在する特異的領域にアニールするように設計したものである。予想通り、CS、N7AT7D、N7DT7B から 671 塩基の単一バンドが得られた。これに対して、N7BT7D からはバンドが得られなかった (図 1-7B)。K79 からは予想された 846 塩基付近に単一のバンドが得られた。

SSIIa-DI 遺伝子の識別のために設計したプライマーのうち SSII DF1 は *SSIIa-AI* および *BI* 遺伝子とは 26 塩基中に 4 塩基、SSII DF1 は *SSIIa-AI* 遺伝子とは 20 塩基中に 5 塩基のミスマッチがある。PCR の結果、CS、N7AT7D、N7BT7D から 558 塩基のバンドが増幅され、N7DT7B からはフラグメントが得られなかった。また T116 からは、495 塩基の単一バンドを増幅することができたことから、ターゲットである *SSIIa-DI* からのみバンドを増幅していると考えられた (図 1-7C)。

CS、C57、K79、および T116 より得られた増幅産物の塩基配列を確認したところ、全て予想された配列であった。

4) DNA マーカーを用いた SSIIa 変異体の選抜

開発した DNA マーカー (表 1-1) を用い、SSIIa 変異体の選抜をおこなった。C57 と K79 との交雑、および K79 と T116 との交雑をおこない、各々の F₂ 集団より変異型 *SSIIa-AI* および *SSIIa-BI* 遺伝子を共にホモ接合で持つ KC1 と、同様に変異型 *SSIIa-BI* および *SSIIa-DI*

遺伝子を持つKT1を選抜した(図1-8)。次にKC1とKT1を交雑し、F₂集団96個体から3つのSSIIa遺伝子座が全て変異型ホモ接合体である系統(HA)を3個体同定した(図1-9A)。得られたHAの種子(F₃)より澱粉粒を単離し、これより抽出した澱粉粒結合性タンパクをSDS-PAGEに供したところ、3つ全てのSSIIaが失われており(図1-9B)、本DNAマーカーを用いたMASが有効に機能したことが示された。また、KC2(SSIIa-A1とB1がヘテロ接合)、KT2(SSIIa-B1とD1がヘテロ接合)によって示されるように、この共優性マーカーは、ヘテロ接合体をも識別できた(図1-9A)。

第四節 考察

本章では、先ず CS に由来する野生型 *SSIIa-A1*、*-B1*、*-D1* 遺伝子のゲノム DNA 配列を決定した。次に、C57、K79、T116 に由来する変異型 *SSIIa-A1*、*-B1*、*-D1* 遺伝子のゲノム DNA 配列を決定した。さらに、これらの野生型および変異型を共に識別できる共優性 DNA マーカーを開発し、これが育種に応用可能であることを示した。

変異型 *SSIIa-A1* 遺伝子では開始コドンを含む 289 塩基の配列が欠失し、代わりに 8 塩基の挿入配列が確認された(図 1-3)。欠失変異部位にはしばしば数塩基から 100 塩基対を超える挿入配列 (filler DNA) が見られる (Wessler et al., 1990、Li et al., 1997、Grant et al., 1998)。このような挿入配列は、挿入部位周辺に同様の配列が見出されることが多く、挿入変異に何らかの関与をしている可能性が示されている (Wessler, 1990)。しかし、今回見出された filler DNA には、*SSIIa-A1* 遺伝子内に同一の配列は見られなかった。この欠失により翻訳開始コドンを含む周辺領域が失われているため、翻訳が適性におこなわれるとは考えにくく、*SSIIa-A1* タンパク質が欠失する直接的な要因であると考えられた。

T116 に由来する変異型 *SSIIa-D1* 遺伝子では、エクソン 5 とイントロン 5 のジャンクション領域にまたがる 63 塩基の領域が欠失していた。このためこの領域ではスプライシングがおこなわれない可能性が高い(図 1-5)。mRNA のスプライシングが起こらず翻訳がそのまま進んだと仮定した場合、開始コドンから 392 番目以降 4 残基のアミノ酸配列が元とは異なるものとなり、5 番目には終止コドンが現れると予測された。この場合、野生型に比べて C 末端側のおよそ半分が失われたアミノ酸配列になる。*SSIIa* の活性部位は C 末端領域に見出されており (Harn et al., 1998、Gao et al., 1998)、この変異型 *SSIIa-D1* タンパクは活性ドメインを持たない異常なタンパクとなる。*SSIIa-D1* タンパクの N 末端には、サイトゾルからプラスチド内部への輸送シグナルであるトランジットペプチドが存在する (Li et al., 1999)。このトランジットペプチドは変異型 *SSIIa-D1* にも存在と考えられるため、この変異型 *SSIIa-D1* が発現され組織内にとどまったとすれば、澱粉粒結合性タンパク画分からこのタンパクが検出されるはずである。しかし、澱粉粒結合性タンパクの SDS-PAGE 解析の結果、T116 からは野生型 *SSIIa-D1* よりも低分子にこのようなタンパクの存在を示すようなバンドは確認されなかった (図 1-2)。途中で終始コドンが発生するような異常タンパクは、その mRNA 自体が、nonsense-mediated mRNA decay (NMD) によって分解されるメカニズムが知られており (Baker and Parker, 2004、van Hoof and Green, 2006、Schweingruber et al., 2013)、エンマーコムギにおける *Wx-A1* タンパクの欠失型変異についても、このメカニズムによる mRNA 量の低下が引き起こされている可能性が指摘されている (Saito et al., 2005)。T116 に由来する変異 *SSIIa-D1* 遺伝子に関しても同様のメカニズムによってタンパクの発現低下がもたらされた可能性がある。

変異型 *SSIIa-B1* 遺伝子には 8 番目のエクソン内部に 175 塩基の挿入配列が見出された

(図 1-4)。この配列は Miniature Inverted-repeat Transposable Element (MITE)である Hikkoshi (Saito et al., 2004, 2005)と高い相同性(88%)を示していた。この配列が転写そして翻訳された場合、MITE 配列内にストップコドンが生じて翻訳が停止し、結果として 197 アミノ酸残基分短く、24 残基が元の配列とは異なるアミノ酸配列へと置き換わった異常なタンパクが生じると考えられた。Zhang ら (Zhang et al., 2004) によって見出されたトウモロコシ SSIIa 変異体にも MITE 配列が確認されている。この MITE 配列による挿入変異の結果、エクソン内部に終止コドンが現れ、正常なタンパクの発現が起らなくなったと考えられている。MITE による塩基配列挿入がコムギ SSIIa-B1 タンパクの異常をもたらすことは明らかであり、この変異型 *SSIIa-B1* についても、*SSIIa-D1* 同様に NMD 系によって転写産物が分解された可能性が考えられる。

変異型 *SSIIa-B1* 遺伝子に見られた Hikkoshi 配列はトルコ品種の *Wx-A1* アリルに最初に見出された(Saito et al., 2004)。12 塩基の terminal inverted repeats (TIRs)は、変異型 *Wx-A1* 座に見出されたものと変異型 *SSIIa-B1* に同定されたものとで一致していた。ただし、宿主 DNA 塩基配列に由来する 8 塩基対の target site duplication は両者で異なっていた。さらに、*Wx-A1* と *SSIIa-B1* 遺伝子間の挿入部位周辺の配列の類似性は低く、一定の傾向を見つけることはできなかった。*Wx-A1* 遺伝子に見出された Hikkoshi MITE は、トルコの Erzurum 周辺において収集された在来種より見出されたものである。その一方で変異型 *SSIIa-B1* 遺伝子を持つ K79 の系譜にトルコ品種は含まれていない。さらに、CS においても Hikkoshi は存在する (Saito et al., 2005) ことも考慮すると、Hikkoshi MITE は世界中のコムギ品種に見出される可能性がある。

本章の研究により、*SSIIa-A1*, *-B1*, *-D1* について野生型と変異型を識別できる PCR 条件を確立でき、SSIIa を全て欠失した変異体(図 1-9A)を選抜することができた。この系統の澱粉粒結合性タンパクの SDS-PAGE による分析結果(図 1-9B)では、Yamamori et al. (2000) の報告と同様、SSIIa タンパクが失われているのみならず、SSI と BEII にも発現量の減少が見られた。また次章で詳しく述べられるが、澱粉特性もこれまでの報告(Yamamori et al., 2000, Morita et al., 2002) と同様の特性を示していた。これらは本章における PCR ベースの MAS がうまく機能し、SDS-PAGE による選抜に代替しうる方法であることを示している。ただし、本章で開発された DNA マーカーは、C57 や K79、T116 に特異的な変異体の解析のみ応用可能であるため、他の *SSIIa* 変異体が見出された場合には、これに対応した DNA マーカーを開発する必要がある。本 DNA マーカーを用いた MAS を実施する際には対象とするコムギ系統の系譜を考慮する必要がある。

DNA マーカー法、特に共優性マーカーを利用した選抜方法は、ヘテロ接合体を識別することができる点で優れており、劣性形質の導入をおこなう連続戻し交雑育種において威力を発揮する(齊藤ら、2012)。劣性形質の一般的な戻し交雑法では、親の 2 系統を交雑した後、F₂以降の世代より目的形質の個体を選抜し、これを戻し親との交雑に用いるというサイクルを複数回おこなう必要がある。これに対し連続戻し交雑では、2 サイクル目以降 (1

サイクル目では F_1 はヘテロ接合のため選抜の必要はない)の交雑において目的遺伝子のヘテロ接合体が選抜できれば、これを次の交雑に用いることができる。つまり F_2 の育成を待たずに次の交雑サイクルに移ることができる。温度管理が可能な温室等での栽培でも、播種から収穫まで4ヶ月程度の期間を必要とするコムギの育種において、 F_1 で選抜が可能となる意義は非常に大きく、育種期間の大幅な短縮および労力の軽減につながる。加えて、数多くのサンプルを扱う場合にはSDS-PAGEよりもPCRのほうが効率的に実施でき、さらには他の形質に関するマーカー、例えば種子のテクスチャー(Ellis et al., 2002)、グルテン強度(Ma et al., 2003)などと共に用いることで、複数の重要形質を同時に選抜することも可能である。Knight (2003)、Dubcovsky (2004)はコムギ育種プログラムにおけるMASの利用状況についての総説で、望ましい特性をコントロールする遺伝子の同定と、この遺伝子に関するDNAマーカーセットの充実が必要であると述べており、本章の研究成果は今後の育種研究に大きく貢献できると考えられる。

第五節 図表

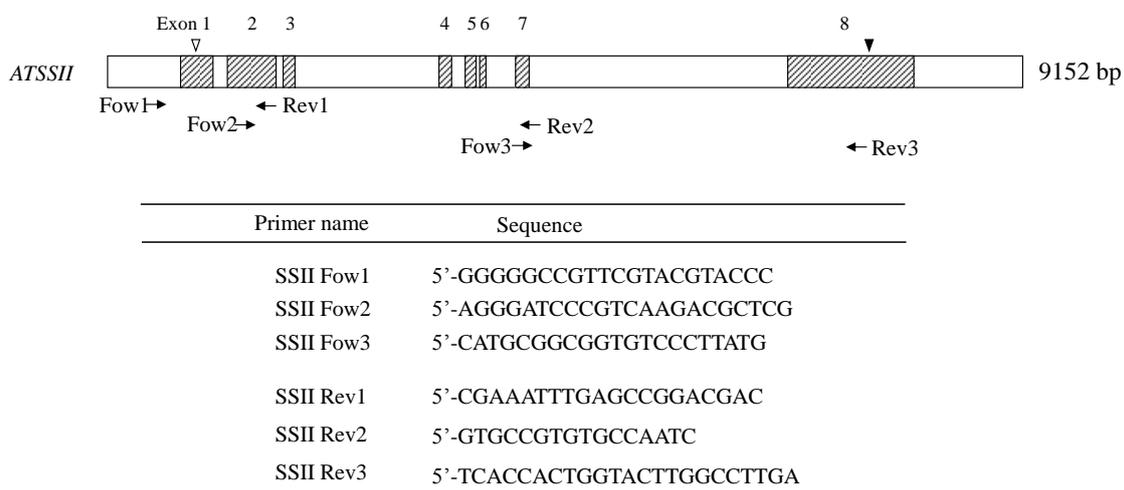


図 1-1 *ATSSII* 遺伝子の一次構造模式図と PCR 増幅用プライマーセットの設計位置および塩基配列

ゲノム DNA 塩基配列解析用に設計したプライマーの、*ATSSII* 遺伝子配列上の位置の概要を示す。exon-intron 構造は Li ら (Li et al., 1999) の報告より引用した。→は設計されたプライマー、▽は推定される開始コドン、▼は終止コドンを示す。

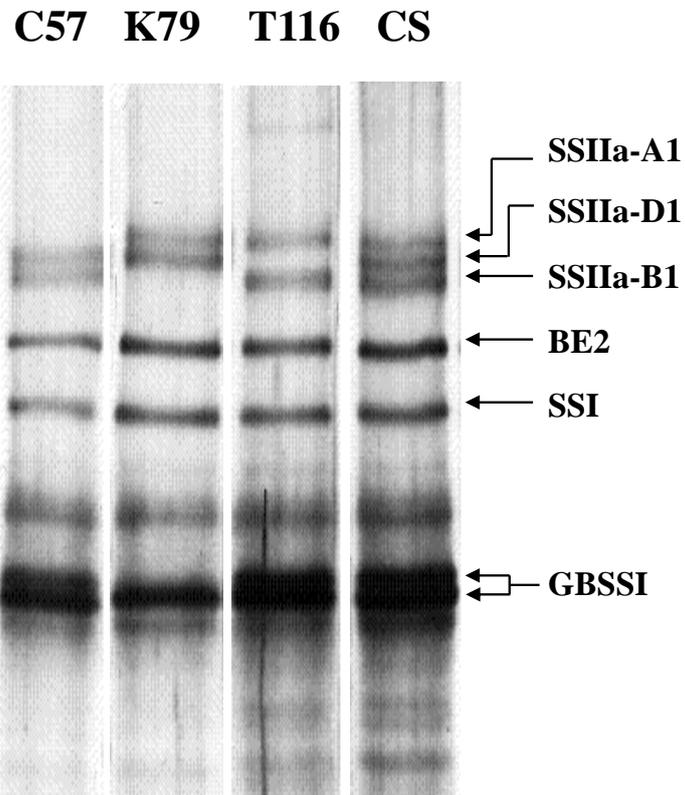


図 1-2 SDS-PAGE による澱粉粒結合性タンパクの泳動図

コムギ種子より単離された澱粉粒から澱粉粒結合性タンパク画分を調製し、SDS-PAGE およびクマシーブルー染色をおこなった。C57: Chosen 57、K79: Kanto 79、T116: Turkey 116、CS: Chinese Spring を示す。

```

SSIIa-AI (wild):-160  CCGTGCGTTTACCCACAGAGCACACTCCAGTCCAGTCCAGCCCACTGCCGCCGCGCTACTCCCACTCCCGCTGCC
SSIIa-AI (null):      CCGTGCGTTTACCCACAGAGCACACTCCAGTCCAGCGCAGCAC-----
                                     *****
SSIIa-AI (wild):-82  ACCACCTCCGCCTGCGCCGCGCTCTGGGGCGGAGGACCAACCCGCGCATCGTACCATCGCCCGCCCGATCCCGGCCGC
SSIIa-AI (null):      -----
                                     +1
SSIIa-AI (wild):-4   CGCCATGTCGTCGGCGGTCCGCTCCGCGGCTCCTTCCTCGCGCTCGCCTCCCGCGGAGATCAGCAGGGC
                                     M S S A V A S A A S F L A L A S A S P G R S R R R
SSIIa-AI (null):      -----
SSIIa-AI (wild):75   GCGGAGGGTGAGCGCGCCGCCACCCACGCCGGGGCCGGCAGGCTGCACTGGCCGCCGTGGCCGCCGAGCGCACGGC
                                     A R V S A P P P H A G A G R L H W P P W P P Q R T A
SSIIa-AI (null):      -----
SSIIa-AI (wild):153  TCGCGACGGAGGTGTGGCCGCGCGCGCCGGGAAGAAGGACGCGAGGGTCGACGACGACGCGCGTCCGCGAGG
                                     R D G G V A A R A A G K K D A R V D D D A A S A R
SSIIa-AI (null):      -----TGGCCGCGCGCGCCGGGAAGAAGGACGCGAGGGTCGACGACGACGCGCGTCCGCGAGG

```

図 1-3 野生型と変異型 *SSIIa-AI* 遺伝子のゲノム DNA 塩基配列および推定アミノ酸配列
 CS に由来する野生型 *SSIIa-AI* 遺伝子ゲノム DNA 配列(*SSIIa-AI* (wild))と、C57 由来変異型 *SSIIa-AI* 遺伝子のゲノム DNA 配列(*SSIIa-AI* (null))との比較を示す。太字はエクソン、下線は変異型の欠失部位、*は挿入配列 (filler DNA) を示す。枠で囲まれた開始コドンよりアミノ酸配列を示す。ただし変異型は開始コドンを含む 289 塩基が欠失しているため、アミノ酸配列は示していない。

```

SSIIa-BI (wild):5853   GGCATCGACAACATGGAGTGGAAACCCGAGGTGGACGTCCACCTCAAG-----
                        G I D N M E W N P E V D V H L K
SSIIa-BI (null):     GGCATCGACAACATGGAGTGGAAACCCGAGGTGGACGTCCACCTCAAGCAGTGGCGTAGCCAATCCAATACGCCAG
                        G I D N M E W N P E V D V H L K Q W R S Q S N T P G
SSIIa-BI (wild):5901 -----
SSIIa-BI (null):     GGTGGTCCATTGATAGAAACATTACATAAGATTATTTATTTTAAAGAAATACTTTTTACTGCACTGTACATAAG
                        W S I D R N I Y I R L F I F ***
SSIIa-BI (wild):5901 -----TCGGACGGC
                        S D G
SSIIa-BI (null):     CTATGGAGAAATTCAGGGTGGTCCATGGACCACCCCTGGCCACCCCTAGCTACGCCACTGACCTCAAGTCGGACGGC
SSIIa-BI (wild):5910 TACACCAACTTCTCCCTGGGGACGCTGGACTCCGGCAAGCGGCAGTGAAGGAGGCCCTGCAGCGGGAGCTGGGCCTG
                        Y T N F S L G T L D S G K R Q C K E A L Q R E L G L
SSIIa-BI (null):     TACACCAACTTCTCCCTGGGGACGCTGGACTCCGGCAAGCGGCAGTGAAGGAGGCCCTGCAGCGGGAGCTGGGCCTG

```

図 1-4 野生型と変異型 *SSIIa-BI* 遺伝子のゲノム DNA 塩基配列および推定アミノ酸配列

CS に由来する野生型 *SSIIa-BI* 遺伝子ゲノム DNA 配列 (*SSIIa-BI* (wild)) と、K79 由来変異型 *SSIIa-BI* 遺伝子のゲノム DNA 配列 (*SSIIa-BI* (null)) との比較を示す。下線は変異型の挿入変異部位を示す。変異型 *SSIIa-BI* 遺伝子では、挿入配列内でも翻訳は継続すると仮定した場合の推定アミノ酸配列を示す。

```

SSIIa-DI (wild):2263 ATCAATTTTAAAGTGTTTTTTTGTCTGCAGGATATGGAAGTGAATTATTTCCATGCTTATATCGATGGAGTTGATT
                                     D M E V N Y F H A Y I D G V D F
SSIIa-DI (null): ATCAATTTTAAAGTGTTTTTTTGTCTGCAGGATATGGAAGTGAATTATTTCCATGCTTATATCGATGGAGTTGATT
                                     D M E V N Y F H A Y I D G V D F
SSIIa-DI (wild):2341 TTGTGTTCAATTGACGCTCCTCTCTCCGACACCGTCAGGAAGACATTTATGGGGCAGCAGAGGTTAATCTTCTAT
                                     V F I D A P L F R H R Q E D I Y G G S R Q
SSIIa-DI (null): TTGTGTTCAATTGAC-----T
                                     V F I D Y
SSIIa-DI (wild):2419 ATGTTGGTGTGATTGCACTGATAAACTGAGAACAAGCCAAGGCCTACTGACTGGCATATGATTACACATTTTATTT
SSIIa-DI (null): ATGTTGGTGTGATTGCACTGATAAACTGAGAACAAGCCAAGGCCTACTGACTGGCATATGATTACACATTTTATTT
                                     V G V ***

```

図 1-5 野生型と変異型 *SSIIa-DI* 遺伝子のゲノム DNA 塩基配列および推定アミノ酸配列

CS に由来する野生型 *SSIIa-DI* 遺伝子ゲノム DNA 配列 (*SSIIa-DI* (wild)) と、T116 由来変異型 *SSIIa-DI* 遺伝子のゲノム DNA 配列 (*SSIIa-DI* (null)) との比較を示す。太字はエクソン、下線は変異型の欠失部位を示す。変異型のアミノ酸配列は、mRNA のスプライシングが起こらずに翻訳されたと仮定した場合の推定アミノ酸配列を示す。

表 1-1 野生型及び変異型 *SSIIa* 遺伝子の識別に用いられたプライマーセット

Primer name	Sequence
SSII AF1	5'-GCGTTTACCCCACAGAGC
SSII AR1	5'-ACGCGCCATACAGCAAGTCATA
SSII BF1	5'-ATTTCTTCGGTACACCATTGGCTA
SSII BR1	5'-TGCCGCAGCATGCC
SSII DF1	5'-GGGAGCTGAAATTTTATTGCTTATTG
SSII DR1	5'-TCGCGGTGAAGAGAACATGG

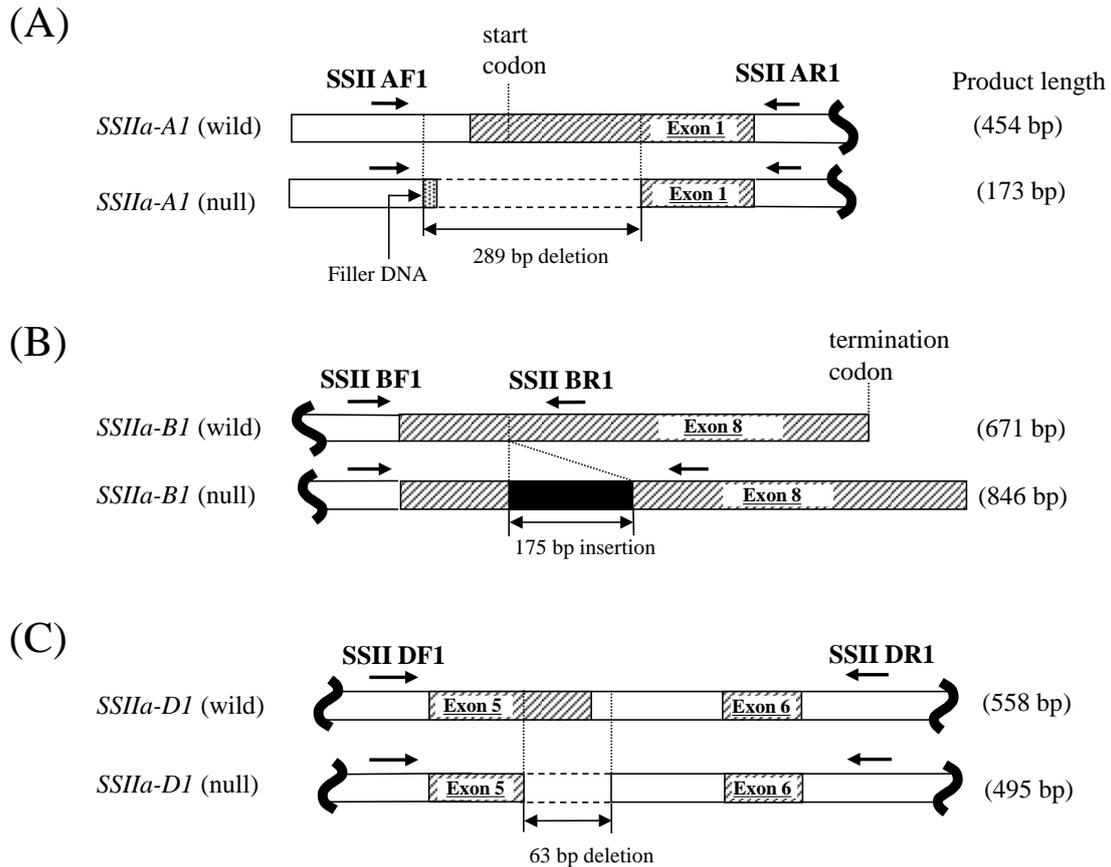


図 1-6 野生型および変異型 *SSIIa-A1*、*-B1*、*-D1* 遺伝子構造の模式図と特異的 DNA マーカーのアニール位置

CS に由来する野生型 (wild) の *SSIIa-A1*、*-B1*、*-D1* 遺伝子と、(A) C57 由来変異型の *SSIIa-A1* 遺伝子 (*SSIIa-A1* (null))、(B) K79 由来変異型の *SSIIa-B1* 遺伝子 (*SSIIa-B1* (null))、(C) T116 由来変異型の *SSIIa-D1* 遺伝子 (*SSIIa-D1* (null)) 構造の比較および両者の識別用 DNA マーカープライマーセットのアニール位置を示す。

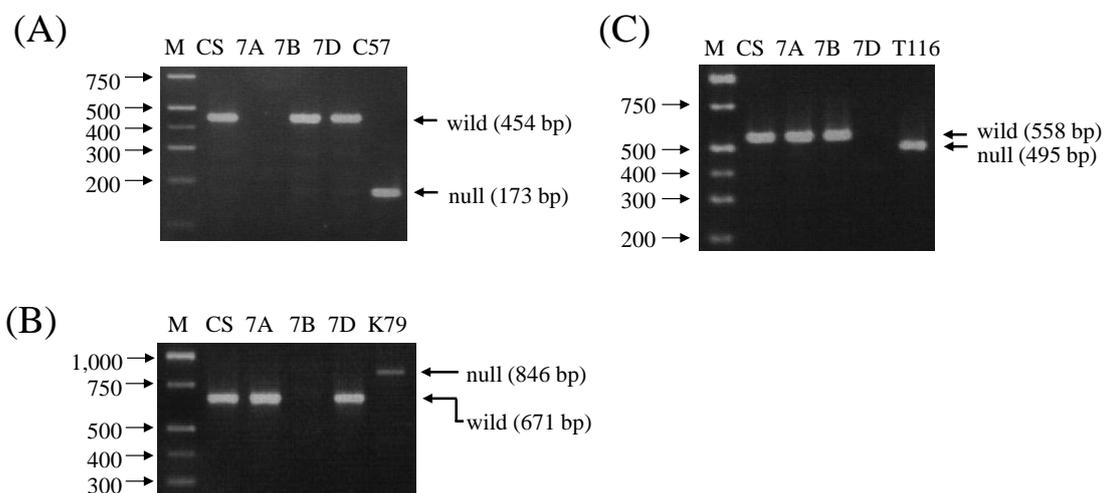


図 1-7 特異的 DNA マーカーを用いた PCR 産物の電気泳動図

特異的 DNA マーカーを用いて PCR 増幅をおこない、3%アガロースゲル電気泳動により分離した。M: サイズマーカー、CS: Chinese Spring、7A:N7AT7D、7B:N7BT7D、7D:N7DT7B、C57: Chosen 57、K79: Kanto 79、T116: Turkey 116 を示す。また wild は野生型を、null は変異型を示す。(A) *SSIIa-A1* 特異的 DNA マーカーによる PCR の結果、(B) 同 *SSIIa-B1*、(C) 同 *SSIIa-D1* を示す。

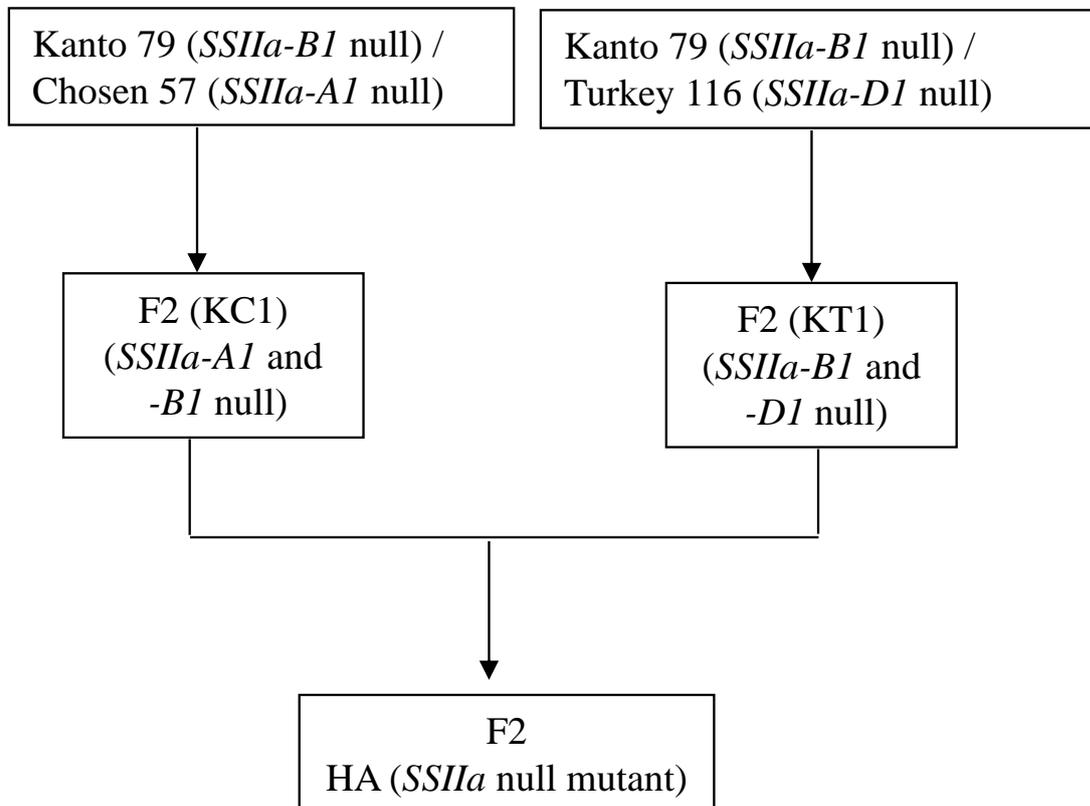


図 1-8 *SSIIa* 変異体選抜のための交雑スキーム

SSIIa-A1 が変異型の Chosen 57 と *SSIIa-B1* が変異型の Kanto 79 を交雑し、 F_2 集団から特異的 DNA マーカーの利用により、*SSIIa-A1* および *-B1* に変異型をホモ接合で持つ個体 (KC1) を選抜した。また *SSIIa-D1* が変異型の Turkey 116 と Kanto 79 を交雑し F_2 集団より *SSIIa-B1* と *-D1* に変異型をホモ接合で持つ個体 (KT1) を選抜した。KC1 と KT1 を交雑し、 F_2 集団より *SSIIa* を全て変異型ホモ接合で持つ個体 (HA) を選抜した。

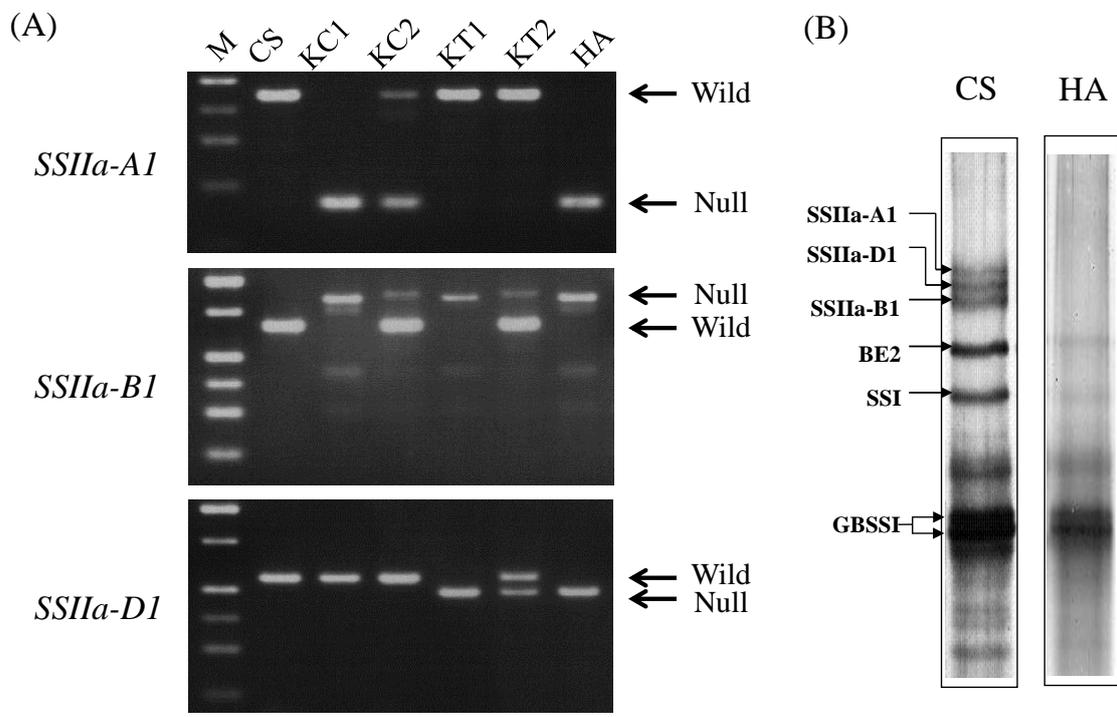


図 1-9 SSIIa 変異体の DNA マーカーによる選抜と澱粉粒結合性タンパクの SDS-PAGE 分析
 特異的プライマーを用いた遺伝子型判定結果の例を示す。(A) M:分子量マーカー、CS:
 Chinese Spring、KC1 および KC2 : Kanto 79 と Chosen 57 の交雑に由来する F₂ 集団より得
 た個体、KT1 および KT2: Kanto 79 と Turkey 116 の交雑に由来する F₂ 集団より得た個体、
 HA: 選抜された SSIIa 変異体を示す。(B) CS および SSIIa 変異体における澱粉粒結合性タ
 ンパクの SDS-PAGE 分析結果を示す。種子より澱粉を単離し、澱粉粒結合性タンパク画分を
 SDS-PAGE とそれに続くクマシー染色にて分析した。

第二章

コムギ starch synthase IIa が
胚乳澱粉特性に及ぼす影響

第一節 序

第一章で開発した *SSIIa* 遺伝子に関する DNA マーカーを用いることで、コムギ *SSIIa* 変異体および部分変異体の効率的な選抜が可能になった。*SSIIa* 変異体の種子澱粉の特性や小麦粉の加工性については序章で述べたように良く知られている（序章 第四節参照）。しかし、部分変異体の種子澱粉特性に関する情報は少なく、遺伝子型と澱粉特性を体系的に比較した報告はわずかに 1 報（Konik-Rose et al., 2007）で、アミロペクチンの単位鎖長分布や特定の物理化学的性質について、染色体倍化系統集団（doubled haploid; DH）を用いた結果が報告されているのみである。その報告では、野生型に対して、1 酵素欠失型の部分変異体、同 2 酵素欠失型、(完全)変異体の澱粉のアミロペクチン単位鎖長分布は、*SSIIa* の欠失数が増加するに従い、重合度 6 から 10 の単位鎖の比率が増加し、11 から 24 の単位鎖比率が低下することが示されている。粘度特性、膨潤特性、糊化特性についても同様に *SSIIa* の欠失数の増加に伴って大きく変化したことで、*SSIIa* が澱粉特性に量効果(dosage effect)を持つことが示された。ただし、GBSSI で観察されるような（序章第四節参照）、*SSIIa*-A1、-B1、-D1 それぞれの欠失による差異は検出されていない。*SSIIa* の欠失によってもたらされる澱粉特性の変化についても、大きな変化では無いが有意な変化（比較的小さな差異）が、小麦粉の加工性や加工品の食感等に影響を与えられ、その関連を正確に評価する必要がある。Konik-Rose ら（Konik-Rose et al., 2007）の報告で *SSIIa* 間の差異が検出されなかった理由としては、彼らが *SSIIa* 以外の遺伝的背景が固定されていない DH 集団に由来する系統を用いたためではないかと考えられる。そこで本章では、連続戻し交雑をおこない遺伝的背景がより均質化された準同質遺伝子系統（Near Isogenic Line; NIL）を用いて、*SSIIa* の欠失が澱粉特性に及ぼす影響を調査した。

NIL は、戻し親との数回の交雑を経て目的形質を戻し親へ導入した系統で、交雑の回数に依存して、目的遺伝子以外の染色体領域が戻し親のものに置き換わっている。理論的に 1 回の交雑ごとに形質寄与側のゲノムの半分ずつは、戻し親ゲノムに置き換わってゆくために、交雑回数を n 回とすれば、NIL のゲノムは $1-1/2^n$ の率で戻し親のゲノムに置き換わる。戻し交雑 5 回（BC5）の場合、最初の交雑を入れて 6 回の交雑をおこなうため、同 NIL の遺伝的背景は 98%以上が戻し親のものになっていることになると言え、目的遺伝子以外の遺伝子の構成を同じにして、その機能を評価するのに適していると考えられる。そこで本章では、戻し交雑を 5 回おこなった *SSIIa* 遺伝子型の異なる NIL を育成し、それらを用いて澱粉特性を比較することを目的とした。これにより、部分変異体の澱粉特性を詳細に検証すること、特に 3 種の *SSIIa* が各々澱粉特性に及ぼす影響を、精度良く評価することが可能と考えた。

第二節 材料及び方法

1) 植物材料

本研究では、九州地域の主要品種であるシロガネコムギ(*SSIIa* 遺伝子が3種類とも野生型)をNIL育成のための戻し親とした。NILの選抜は東北農研にておこない、戻し交雑及び栽培は九州沖縄農業研究センター(九沖農研)でおこなわれた。*SSIIa* 欠失変異型導入親には、*SSIIa* 遺伝子が全て変異型の高アミロースコムギである和系RB3668-1が用いられた。*SSIIa* 遺伝子の野生型、変異型判定は、第一章で開発された*SSIIa-A1*、*-B1*、*-D1*の共優性DNAマーカーを利用した。シロガネコムギと和系RB3668-1の交雑から得られたF₁個体は再度シロガネコムギと交雑され(BC₁)、得られたBC₁F₁集団より*SSIIa-A1*、*-B1*、*-D1*遺伝子が全てヘテロ接合した個体が選抜された。この個体は次のシロガネコムギとの戻し交雑に用いられた(連続戻し交雑)。合計5回の連続戻し交雑の後、選抜された植物体(各遺伝子ヘテロ接合)の自殖によりBC₅F₂集団が得られた(図2-1)。この集団から野生型(type 1)、及び部分変異型(type 2から7)、そして(完全)変異型(type 8)までの8種類の系統が選抜された(表2-1)。得られた種子は2008年11月に九沖農研の圃場(福岡県筑紫)にて播種され、2009年6月に収穫されたF₃種子を検討に用いた。

2) 澱粉の単離

収穫された種子を超遠心粉碎機(ZM-200, レッチェジャパン社、東京・日本)で粉碎し、全粒粉を得た。澱粉の単離はHayakawaら(Hayakawa et al., 1997)の方法に従った。全粒粉100gに対して超純水を60ml加え、よく捏ね上げて生地を作製した。この生地を薄く延ばして手のひら大の大きさに切り分け、氷冷しながら超純水に1時間浸した。その後、同じ水の中で生地をまとめ、この生地から澱粉を水中に揉みだした。次に、澱粉の懸濁液を目開き65μmのナイロンメッシュに通し、通過液をさらに遠心分離(1,100×g、10分間、4℃)して澱粉画分を沈殿させた。遠心上清を取り除いた後、澱粉画分の上部に沈降した画分(不溶性ペントザンやタンパク)をスパーテルで除去し、残った澱粉画分を超純水に懸濁した。この澱粉の洗浄操作を、澱粉画分の上部画分がなくなるまで繰り返した(5回程度)。十分に洗浄された澱粉画分を凍結乾燥し、単離澱粉とした。この澱粉の水分含量は、135℃で1時間加熱前後の重量変化から算出した。

3) 澱粉およびアミロース含量

全粒粉中の澱粉含量は、total starch assay kit (Megazyme社、ブルーレイ・アイルランド)を用いて測定した。また単離した澱粉中のアミロース含量は、amylose/amylopectin assay kit (Megazyme社)を用いて測定した。

4) アミロペクチン単位鎖長分布分析

単離した澱粉は、メタノール、次にエタノールで洗浄し、再度凍結乾燥した。この澱粉 2 mg を測りとり、100 μ l の DMSO に分散させた。これを 5 分おきのボルテックス攪拌 (5 秒) をおこないながら、20 分間沸騰水中で加熱した。室温まで冷却した後、その 20 μ l をとり、0.5 M 酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) を 2 μ l、isoamylase (Megazyme 社) を 70U 添加し、最後に超純水で 100 μ l にメスアップした。これを 37°C で一晩反応させて側鎖を切り出した後、沸騰水中で 5 分間加熱して isoamylase を失活させ、10 μ l を濃縮遠心乾燥機で乾燥した。単位鎖長分布分析は、Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis 法 (FACE 法) (O'Shea et al., 1998) によりおこなった。乾燥品を 2 μ l の 1 M sodiumcyano-borohydride 溶液 (シグマアルドリッチ ジャパン社、東京・日本) に溶解し、これに 2 μ l の 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid (APTS) (ベックマン・コールター社、東京・日本) を加えて 37°C で 4 時間、暗所に静置することで、単位鎖の還元末端を蛍光標識した。46 μ l の超純水を加えて反応を停止し、これを超純水でさらに 10 倍に希釈して分析用サンプルとした。蛍光標識された単位鎖は、eCAP-NCH0 capillary (内径 50 μ m、有効長 500 mm、ベックマン・コールター社) 中、Beckman PA800 capillary electrophoresis system (ベックマン・コールター社) を使って分離した。分離された単位鎖の検出には蛍光検出装置 (488 nm Laser Module、ベックマン・コールター社) を用いた。サンプルは 10°C で保存し、インジェクションは 0.5 psi 10 sec とした。キャピラリー温度は 20°C とし、N-Linked carbohydrate separation gel buffer (ベックマン・コールター社) を分離バッファーに用いて、30 kV で 30 分間分離し、励起波長 488 nm 蛍光波長 520 nm にて検出した。32Karat ソフトウェアを用いて、波形データから、DP6 以上 45 まで各単位鎖のピーク面積を得た。このピーク面積合計値に対する各単位鎖のピーク面積の比率を算出し、さらに type 1 (wild-type) との差分を算出して遺伝子型間で比較した。

5) 示差走査熱量測定法 (differential scanning calorimetry; DSC) による熱分析

単離した澱粉の糊化特性とアミロース脂質複合体分離特性は示差走査熱量分析装置 (DSC-60A、島津製作所社、京都・日本) を用いてした。澱粉 (5-7 mg) をアルミニウム製 DSC パンに精秤し、2 倍の重量の超純水を加えて懸濁後、密封した。一晩室温で放置して澱粉に水を良くなじませた。リファレンスにはアルミナ粉末を用いて、DSC パンを、30°C から 120°C まで 5°C/min の速度で加熱、120°C で 2 分間保持した後、5°C/min の速度で 30°C まで冷却した。加熱時の吸熱ピークから、糊化特性とアミロース脂質複合体の解離特性を分析した。

澱粉の老化特性分析のために、糊化特性を測定した DSC パンごと 4°C で 7 日、もしくは 14 日保存した後、糊化特性の測定と同じ条件で測定し、エンタルピー変化量を求めた。老化度 (%R) は、次式により算出した。

$$\text{老化度 (\%R)} = (\text{保存後のエンタルピー変化量} / \text{糊化時のエンタルピー変化量}) \times 100$$

6) rapid visco analyzer (RVA) による粘度特性分析

澱粉の粘度特性は AACC 法 76-21 に従って測定した。分析用アルミニウム容器に単離した澱粉を 14%水分換算で 3.5 g となるよう秤量し、超純水を 25 ml 加え、よく攪拌した後、Rapid Visco Analyzer (Newport Scientific 社、メリーランド・アメリカ) に供した。温度プログラムは、AACC 法 76-21 の STD3 を用いた。

7) 糊化澱粉の濁度

60 mg の澱粉 (乾燥重量) を 20 ml の超純水に懸濁し、沸騰水中で 30 分間加熱して糊化させた。これを室温まで冷却した後、640 nm における吸光度を測定した (0 日目)。サンプルを 4°C の暗所にて 2 週間保存し、1、7、14 日目にサンプルを取り出し、30 分間室温に放置してサンプルを常温に戻してから吸光度を測定した。各測定日の吸光度の値と 0 日目の吸光度との差分を濁度上昇値 (Increased absorbance) とした。

8) 生澱粉 (raw starch) および糊化澱粉 (gelatinized starch) の porcine pancreatic α -amylase (PPA) に対する消化性

生澱粉の酵素による加水分解は Setiawan らの方法 (Setiawan et al., 2010) の変法にておこなった。澱粉 (1%, w/v) を PPA (500 U/g starch、シグマアルドリッチジャパン社、東京・日本) に懸濁して、35°C で軽くシェイク (100 rpm) しながら加水分解をおこない、可溶性糖へ分解した。この間、3、6、12、24 時間後にサンプリングし、上清の可溶性糖を遠心後 (5200 \times g, 5 分間) に回収し、glucoamylase (Megazyme 社) によってグルコースへと分解した。遊離したグルコース量は D-glucose assay kit (Megazyme 社) を用いて定量した。澱粉の加水分解率 (hydrolysis, %) は次式により算出した。

$$\text{hydrolysis (\%)} = 100 \times (\text{遊離グルコース量}) / (\text{反応に用いた澱粉の乾燥重量}) \times (162/180)$$

糊化澱粉の酵素消化性の検討のために、乾燥重量で 200 mg の澱粉を 19 ml の水に懸濁して、15 分間加熱した。温浴で 37°C まで冷却した後、32 units の PPA を含む 1 ml のリン酸バッファー (pH6.9、100 mM 塩化カルシウムを含む) を加えた。加水分解はシェイクしながら (100 rpm) 37°C でインキュベートすることでおこなった。30、60、90、120 分後に 0.4 ml を回収し、0.6 ml の 100% エタノールと混合した。この上清を回収し、上記と同様に glucoamylase による処理をおこない、遊離したグルコースを定量した。

9) 統計解析

得られたデータは、一元配置分散分析 (Analysis of Variance: ANOVA) をおこない、Scheffe' s test による多重比較をおこなった。また相関分析は Spearman の順位相関にておこなった。

第三節 結果

1) 澱粉含量およびアミロース含量

用いた種子材料中、type 1 から 7 の種子外観および断面形状には大きな違いは観察されず(図 2-2)、澱粉含量、アミロース含量にも有意差は見られなかった(表 2-2)。これに対して type 8 は細身の種子となり(図 2-2)、有意に澱粉含量が低く、アミロース含量が高かった(表 2-2)。

2) アミロペクチン単位鎖長分布

野生型である type 1 の単位鎖長分布と type 2 から 8 の単位鎖長分布の差分を比較した(図 2-3)。type 2 から 7 は短鎖(DP6 から 12)の比率が増加し、DP13 から 24 の比率が低下していた。この変化は 1 酵素欠失型(type 2~4)(図 2-3A)よりも 2 酵素欠失型(type 5~7)に大きく現れた(図 2-3B)。type 8 では DP6 から 10 の比率が高く、DP11 から 24 の比率が低下し、その変化量も type 2~7 に比べて著しく大きかった(図 2-3B)。また type 8 では DP8 の鎖の比率が最大となった。type 8 に見られた単位鎖長の変化はトウモロコシやオオムギの *SSIIa* 変異体に見られる特徴と一致していた(Morell et al., 2003, Perera et al., 2001)。

DP45 までの単位鎖に占める DP6 から 10 の比率を比較した場合(表 2-3)、type 3(SSIIa-B1 欠失型)と type 4(SSIIa-D1 欠失型)は、type 1 との間に有意差が見られた。2 酵素欠失型の 3 系統間では、type 5(SSIIa-B1 および D1 欠失型)が type 6(SSIIa-A1 および D1 欠失型)と type 7(SSIIa-A1 および B1 欠失型)に比べて有意な差を示した。この結果は、A ゲノムに由来する SSIIa-A1 は、SSIIa-B1 や D1 に比べ、単位鎖長構造への寄与度が小さいことを示唆していた。また type 6 は 1 酵素欠失型の type 3 や 4 との有意差はなかったのに対して、type 7 は有意に高い値を示していた。type 7 (15.6%) と type 6 (15.1%) の間では有意差はなかったもの、Type 7 が若干高い値を示したことから、SSIIa-B1 は D1 よりも寄与度が大きいことが示唆された。

3) 糊化特性およびアミロース脂質複合体乖離特性

澱粉の糊化ピーク(gelatinization peak)における糊化開始温度(T_0)は、野生型に対して、1 酵素欠失型、2 酵素欠失型、(完全)変異型へと、SSIIa の欠失数の増加に伴って有意に低くなる傾向を示した(表 2-4)。この傾向は糊化ピーク温度(T_p)にも見られた。また、1 酵素欠失型の 3 系統間では、type 2(SSIIa-A1 欠失型)のピーク温度は type 3 や type 4 よりも有意に高かった。2 酵素欠失型では、type 6 が有意に高いピーク温度を示し、次いで type 7 が高く、type 5 は最も低い温度であった。

糊化エンタルピー変化量(ΔH)は、野生型に対して 1 酵素欠失型は有意に低い値であった。2 酵素欠失型の 3 系統は全て 1 酵素欠失型よりも低い値を示した。type 6 は 1 酵素欠

失型との有意差は見られなかったものの、type 5 と type 7 は有意に低い値を示した。type 8 は、これ以外の系統に対して、著しく低い値であった。2 酵素欠失型系統間では、type 6、type 7、type 5 の順に低い値となり、type 6 は type 5 に対して有意に高い値を示した。

以上の結果から、SSIIa の欠失数の増加に伴って T_o 、 T_p 、 ΔH は低下することが確認された。加えてこれら特性への影響は、SSIIa-A1 が最も小さく、B1 が最も大きいと言えた。この寄与度の序列は、アミロペクチン単位鎖長分布の結果から推測されたものと一致していた。

アミロース・脂質複合体の解離における T_o 、 T_p は type 8 のみ有意に低い値、 ΔH は type 8 のみ有意に高い値を示していた (表 2-4)。このピークはアミロースと結合した脂質が乖離する際の吸熱反応と考えられており、アミロースを多く含む type 8 では (表 2-2)、 ΔH が高い値になったと考えられた。しかし、 T_o 、 T_p が低下した理由は不明である。

4) 老化特性分析

熱分析および分光学的手法によって、2 週間の 4°C 保存における糊化澱粉の老化特性を調べた。熱分析 (表 2-5) では、再糊化時の T_o は、type 1 から type 7 で 36.4 から 38.3°C の範囲、 T_p は 44.4 から 46.5°C の間で変動が見られたものの、SSIIa の欠失数に対応した変動とはいえなかった。保存 7 日目では、SSIIa の欠失数の増加に伴って老化度は低くなる傾向を示し、野生型と 2 酵素欠失型系統間で有意差が見られた。14 日後では、type 5 および type 7 は type 1 との間に有意差が見られた。2 酵素欠失型系統間では、type 5 の老化度が最も低く、type 6 が最も高い値を示していた。また type 8 は 7 日目ではピークが観察されなかったものの、14 日目にはわずかにピークが観察された。以上の結果は、単位鎖長分布や糊化特性と同様に、老化の程度も SSIIa の欠失数の増加に伴って変化すること、さらに 3 つの SSIIa 間にも影響の程度には差があることを示唆していた。

また糊化澱粉の保存期間中、吸光度の上昇値を測定することで老化特性を比較した (図 2-4)。糊化した澱粉は、4°C に保存することで再結晶化し、結果として濁度の上昇をもたらす。14 日間の濁度の変化を測定した結果、type 8 はこの期間を通して最も上昇値が大きかった。type 8 を除けば、濁度の上昇は野生型が最も高い値で推移し、次いで 1 酵素欠失型、2 酵素欠失型と続いた。しかし 3 つの SSIIa 間の影響の違いは明確ではなかった。

5) 粘度特性

RVA による粘度特性分析の結果にも SSIIa 欠失の影響が観察された (図 2-5)。type 8 と type 5 は明確なピークを描かなかったため、ピーク粘度は 95°C 到達時点の粘度とし、ブレイクダウンは 0 とした。type 1 は、8 つの系統の中で、最も高い粘度とブレイクダウン、最終粘度を示した。2 酵素欠失型系統間で比較すると、明確な粘度ピークがなく、最終粘度も低い値となった type 5 に対して、type 6 にはピークおよびブレイクダウンが見られ最終粘度も他の 2 つに比べて高い値であった。type 7 は type 5 と type 6 の中間的な特性

を示した。一方、type 8 は他の系統とは明らかに異なり、測定の全般にわたって粘度変動は小さかった。

6) PPA による生澱粉および糊化澱粉の消化性

生澱粉を PPA 処理した結果、全てのサンプルで約 80% が 24 時間以内に加水分解された (図 2-6A)。type 1 由来の生澱粉は、全サンプル中で最も分解速度が遅かった。一方、type 8 の加水分解は反応開始後 3 時間以内にプラトーに達していた。1 酵素欠失型系統では、type 2 と 4 がほぼ同程度の速度で分解され、type 3 の抵抗性が少し低かった。2 酵素欠失型系統では、最も消化性の高かったものは type 5 であり、type 6 は最も抵抗性が高かった。また、糊化澱粉の場合には、type 1 から 7 は反応開始後 60 分後には全て同程度の消化性を示していたのに対して、type 8 のみが変わずかに抵抗性を示した (図 2-6B)。

7) 相関分析

SSIIa の欠失が直接影響を及ぼすと考えられるアミロペクチン単位鎖長分布 (DP6-10) は、糊化ピーク温度、糊化エンタルピー変化量、老化度、ピーク粘度、ブレイクダウン、最終粘度、生澱粉の分解速度と非常に強い相関を示した。これに対して、澱粉含量、アミロース含量、濁度上昇、糊化澱粉の消化性との相関は見られなかった。

第四節 考察

本章では、*SSIIa* の遺伝子型が異なる NIL を用いて、澱粉構造や糊化、老化、粘度等の物理化学的特性の違いを検証し、*SSIIa* の各種澱粉特性に対する量効果および 3 種の *SSIIa* 間の澱粉特性への寄与度の違いを比較した。

本章で用いられた NIL は、連続戻し交雑によって早期に育成された。通常の選抜では、一回の戻し交雑から F_2 集団を得て目的の個体が選抜され、これが次の戻し交雑に用いられる。これに対して、連続戻し交雑では目的遺伝子がヘテロ接合である個体を F_1 集団から見出すことで、これを次の交雑に用いることができるため、栽培回数を 1 回減らすことが可能となる。本章で用いられた NIL は 5 回の戻し交雑を経て育成されたことで、5 回分の栽培期間が短縮された。これは第一章で開発された共優性 DNA マーカーによりヘテロ接合体の識別が可能になったことによるもので、本 DNA マーカーの有用性が実証された結果であるといえる。

Konik-Rose ら (Konik-Rose et al., 2007) は、*SSIIa* が、アミロペクチン単位鎖長分布、糊化特性、粘度特性に量効果を示すことを報告している。彼らの報告では、オーストラリアの既存品種と *SSIIa* 変異体 (Yamamori et al. 2000) を交雑して育成された DH 系統を用いている。一方、本章では、彼らの材料とは遺伝的背景を異にするシロガネコムギを戻し親にして、遺伝的背景を整えた NIL を利用した。本章の結果の多くが彼らのデータと一致していたことから、澱粉特性に *SSIIa* が遺伝子量効果を示すことは明白である。

本章の結果、*SSIIa* の欠失は澱粉の老化特性にも、その欠失数の増加に伴って影響を及ぼすことが新たに明らかとなった (表 2-5、図 2-4)。特に、低温保存された type 8 の糊化澱粉が、熱分析で極端に小さいエンタルピー変化量を示したことは非常に興味深い (表 2-5)。このような傾向は、トウモロコシにおける *SSIIa* 変異体である *su2* 変異体にも見られる (Perera et al., 2001)。澱粉の老化は、糊化によって結晶性を失った澱粉が自然に結晶性を回復する現象である。DSC による熱分析では糊化澱粉中アミロペクチンの再結晶化の程度がよく反映される (Jane et al., 1999)。糊化したアミロペクチンの再結晶化には DP14-18 の外部鎖の存在比率が関与しており、この鎖長の存在比率が高まるとアミロペクチン分子間で二重らせん構造が形成されやすくなって再結晶化が進むと考えられている (Karim et al., 2000)。この範囲の単位鎖比率の低下は、部分変異型 (type 2~7) および変異型 (type 8) の全てに観察されており (図 2-3 および表 2-3)、*SSIIa* の欠失によってアミロペクチンの再結晶化の速度が低下したことを示していると考えられる。Type 8 はアミロペクチン分子だけに注目した場合、最も再結晶化の進行が遅い構造になっているとも考えられる。

熱分析の結果に対して、糊化澱粉の濁度上昇を吸光度変化で観察した結果は異なる傾向が見られた (図 2-4)。1 酵素欠失型の 3 系統 (type 2~4) は、野生型よりも濁度の上昇は緩やかであり、2 酵素欠失型 (type 5~7) はさらに緩やかな増加を示していた。これに対

して、変異型である type 8 は測定期間の全般にわたって濁度の増加は最も大きかった。アミロペクチンの短鎖比率の増加は、再結晶化しにくい特性につながることは熱分析の結果からも明らかであり、この場合濁度の上昇も緩やかになると考えられる。しかし、この分析法では、アミロースの再結晶化による影響を考慮しなければならない。通常糊化した澱粉は、先ずアミロースの再結晶化による老化が進行し、これに遅れてアミロペクチンの結晶化が起こる (Karim et al., 2000)。加えてアミロースは鎖長の短いものが、長いもの比べて老化が速く進行することが知られている (Gidley and Bulpin, 1989)。SSIIa 変異体のアミロース平均鎖長は野生型に比べて短く (Hanashiro et al., 2004)、構造的には野生型よりも老化しやすいアミロース分子であると考えられる。Type 8 は最も再結晶化しにくいアミロペクチンを持つものの、濁度上昇にはアミロースの再結晶化の影響が強く現れたと考えられた。

生澱粉の酵素加水分解抵抗性は、SSIIa 欠失数の増加に伴って低下した (図 2-6A)。アミロペクチン単位鎖中、短鎖比率の増加した澱粉粒子は結晶性が低下し、その結果酵素加水分解に対して感受性が高くなることが知られている (Perera et al., 2001)。これは本章の結果とも矛盾しない。一方で、糊化澱粉の消化性は、type 8 のみがわずかに抵抗性を示した (図 2-6B)。高熱処理で糊化した高アミロース澱粉 (type 8) には、難消化性成分であるレジスタントスターチが 10%以上含まれ (Yamamori et al., 2006, Hung et al., 2005)、同様の傾向は多くの高アミロース澱粉にも観察されている (Bjorck et al., 1990, Yang et al., 2006)。脂質と複合体を形成したアミロース、あるいは老化により再結晶化したアミロースは、消化酵素に対して抵抗性が向上することが知られており (Rahman et al., 2007)、type 8 に多く含まれるアミロースが、この澱粉の消化酵素に対する抵抗性の上昇をもたらしたと考えられた。

本章では、3 種の SSIIa 間で澱粉構造や特性への寄与度に違いがあることも示された。この結果は、DH 材料を用いた場合 (Konik-Rose et al., 2007) では観察されていない。本章の場合 NIL を用いており、5 回の連続戻し交雑の結果、目的遺伝子以外の染色体は、大部分が戻し親のシロガネコムギに置換されていると考えられる (斉藤ら、2012)。このため、SSIIa 間の澱粉特性への寄与度の違いが精度良く検証できたと考えられる。

この寄与度の違いは 2 酵素欠失系統間の DP6 から 10 の比率の違いによく現れていた (表 2-3)。DP6 から 10 の単位鎖の相対比率は type 5 で最も高く、type 6 で低かった。これにより SSIIa-A1 はアミロペクチン側鎖構造への寄与度が最も小さく、B1 が最も大きく、D1 はこれらの中間的な寄与度であると考えられた。これはアミロペクチンの側鎖長構造の違いがよく反映される熱分析の結果とも一致していたこと、粘度特性や生澱粉分解性などの結果にもおよそこの順序で変動が大きくなったことから、各酵素の寄与度には SSIIa-B1 > D1 > A1 の関係があると結論付けた。澱粉特性への SSIIa の寄与度の順序が GBSSI のアミロース含量に対する寄与度のそれ (Yamamori and Quynh, 2000, Nakamura et al., 2002) と一致していたことは興味深い。3つのGBSSIのアミロース含量への寄与度の違いは、各GBSSI

のタンパク発現量の違いと相関することが報告されており、最も発現量の多いGBSS-B1がアミロース含量への寄与度が高いと考えられている (Yamamori and Quynh, 2000)。SSIIa に関しても同様のことが言える可能性は十分に考えられる。

アミロペクチンの鎖長構造変化と、糊化、老化、粘度、生澱粉の消化性が非常に強く相関した結果は、逆にこれら特性を改変するには、アミロペクチン構造を改変することが手段の一つとなりうることを示している。本章と同様な手法で他の澱粉合成酵素に関する変異体を得ることができれば、さらに物理化学的特性の異なる澱粉が得られる可能性がある。

ジャポニカタイプのイネ品種である「日本晴」は、インディカタイプのものに比べてSSIIa 活性が低下し、アミロペクチン短鎖比率が増加している (Umemoto et al., 2002、Umemoto and Aoki, 2005)。しかし日本晴の種子澱粉は、コムギやオオムギ、エンドウマメのSSIIa 変異体に見られるような澱粉粒子形状の異常や澱粉含量低下、高アミロース等の特徴を示さない。また、日本晴からは非常に低いレベルであるが、SSIIa タンパクが発現している可能性が示されている (Umemoto and Aoki, 2005)。つまりインディカタイプと日本晴のイネ品種におけるアミロペクチン構造の違いは、本研究における type 1 とSSIIa の部分変異体、特に 2 酵素欠失型のものに近いと推察される。同じくイネでは、SSIIa 活性を遺伝子組換えによって抑制した場合に、炊飯してから長時間経過した後でも食味が維持されることが確認されている (Umemoto et al., 2008)。小麦粉食品の老化を抑制するためには、アミロース含量の低い小麦粉を使用する、あるいは老化抑制効果のある副資材 (加工澱粉や増粘多糖類など) を添加する等の工夫がなされているものの、未だ十分に解決されているとは言い難い。その観点から、本章で育成されたコムギは食品の老化耐性向上に利用可能な新たな素材となることが期待され、実際に小麦粉加工食品にどのような効果をもたらすか、今後さらに検証する必要がある。本章で用いた材料のうち、アミロペクチン特性から最も老化耐性向上が期待できるのは (完全) 変異型の type 8 と言える。しかし、この系統は本章の結果にも見られたように、種子が痩せ型 (図 2-1) で、このため種子重量や製粉歩留まりも低下するという実用上には不利な特徴がある。これに対して部分変異体では種子の外観形質等は野生型となんら変わらず (図 2-2)、このような問題は見られないため実用化への障害は低いといえる。この部分変異体の中で、最も老化耐性が期待できる系統は type 5 であると判断される。しかし、用途によっては食感や加工性等との総合的な評価が必要であり、1 酵素欠失型などの部分変異体を用いるほうが好ましい場合も考えられる。

以上のようにSSIIa 変異体あるいは部分変異体は、食品加工分野において新しい小麦粉素材として期待されるものである。食品の加工性や食感、老化は小麦特有の蛋白であるグルテンによる影響も考慮しなければならないため、今後様々な品種への導入、そして実用化のための評価をおこなう必要がある。本章では、今後これら新規コムギの加工利用のための重要な知見が得られたと考えられる。

第五節 図表

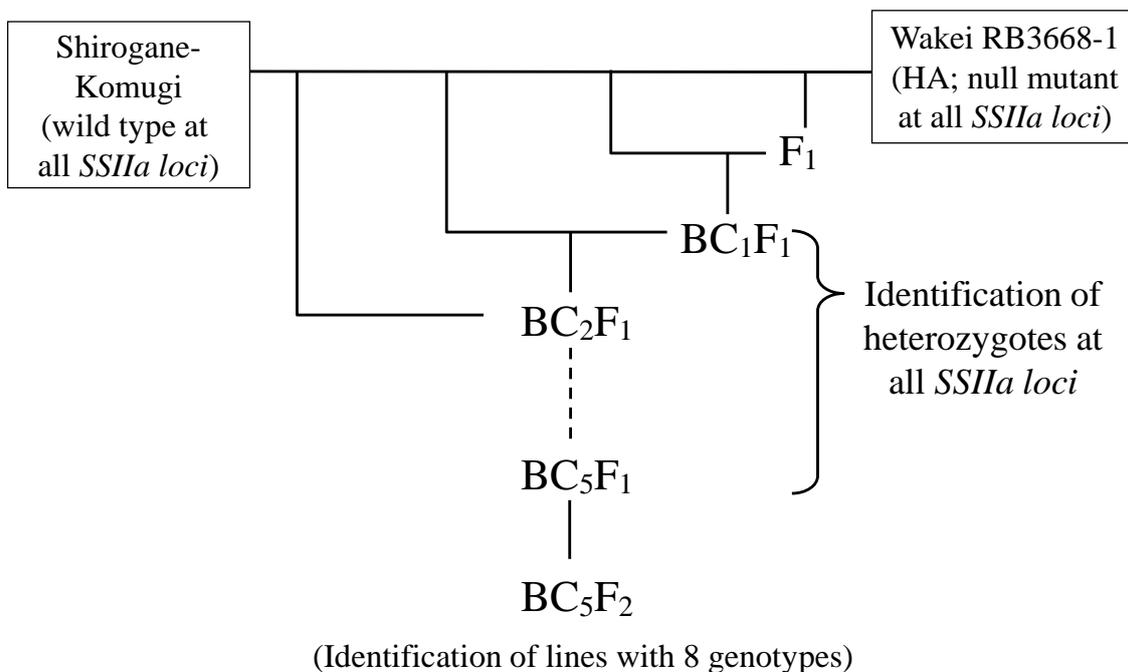


図 2-1 シロガネコムギ準同質遺伝子系統(シロガネコムギ NIL)の育成

SSIIa 遺伝子型の異なるシロガネコムギ NIL の育成スキームを示す。シロガネコムギの *SSIIa* 遺伝子は全て野生型、和系 RB3668-1 は全て欠失変異型の高アミロースコムギである。戻し交雑で得られた BC_nF₁ 集団から、3 つの *SSIIa* 遺伝子座が全てヘテロ接合である個体を選抜し、次の戻し交雑に用いられた。BC₅F₂ 集団から *SSIIa* 遺伝子型の異なる 8 系統が選抜された。

表 2-1 材料の *SSIIa* 遺伝子型^a

Line	<i>SSIIa</i> genotype		
	<i>SSIIa-A1</i>	<i>SSIIa-B1</i>	<i>SSIIa-D1</i>
type 1	+	+	+
type 2	-	+	+
type 3	+	-	+
type 4	+	+	-
type 5	+	-	-
type 6	-	+	-
type 7	-	-	+
type 8	-	-	-

^a +:野生型、-:変異型を示す。



図 2-2 シロガネコムギ NIL の種子外観および断面図

選抜された各 NIL の完熟種子外観と横断面の様子を示す。

表 2-2 澱粉含量およびアミロース含量^a

Line	Starch (% db)	Amylose (%) ^b
type 1	62.8a	23.0b
type 2	58.7a	22.6b
type 3	63.2a	21.9b
type 4	59.7a	21.9b
type 5	61.9a	22.4b
type 6	61.1a	22.0b
type 7	63.9a	22.7b
type 8	46.8b	31.4a

^a 同一列内の異なるアルファベットは、多重比較検定 (Scheffe 法) において 5%水準で有意差があることを表す (n=3)。

^b 単離された澱粉中のアミロース含量を示す。

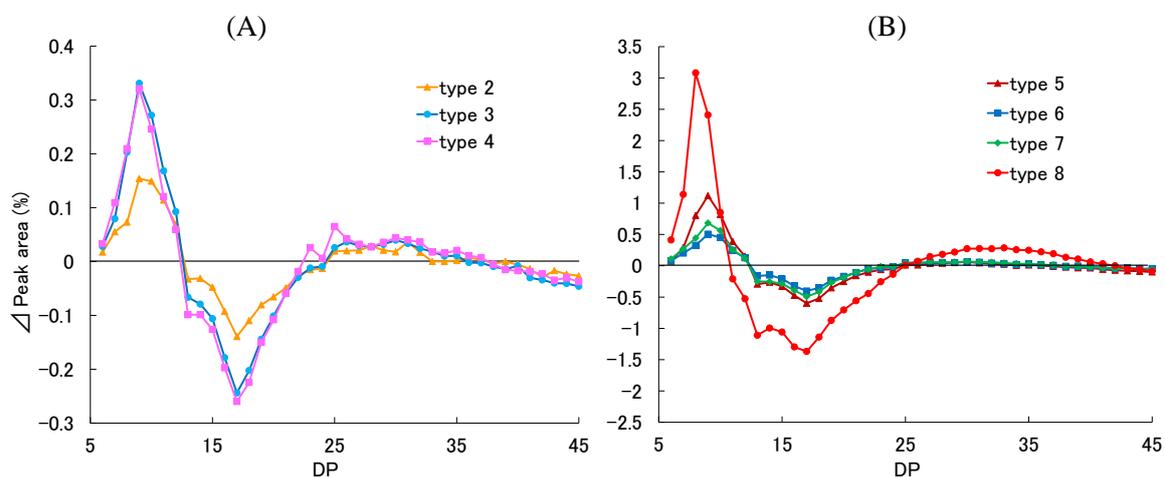


図 2-3 澱粉の単位鎖長分布分析

DP6~45 の単位鎖に対する各単位鎖の比率を算出し、単位鎖ごとに type 1 との差分を算出してプロットした。(A) type 2~4 と type 1 との差分、(B) type 5~8 と type 1 との差分を示す。

表 2-3 単位鎖の相対比率^a

Line	DP6-10 (%)	DP11-24 (%)	DP25-45 (%)
type 1	13.6a	64.7a	21.8a
type 2	14.0ab	64.1ab	21.8a
type 3	14.5bc	63.7abc	21.8a
type 4	14.5bc	63.5abc	22.0a
type 5	16.7e	61.7d	21.6a
type 6	15.1cd	62.8bcd	22.0a
type 7	15.6d	62.3cd	22.1a
type 8	21.5f	54.0e	24.6b

^a 同一列内の異なるアルファベットは、多重比較検定 (Scheffe 法) において 5%水準で有意差があることを表す。(n>3)

表 2-4 示差走査熱量測定装置 (DSC) による熱分析^a

Line	Gelatinization peak			Amylose-lipid dissociation peak		
	<i>To</i> (°C)	<i>Tp</i> (°C)	ΔH (J/g)	<i>To</i> (°C)	<i>Tp</i> (°C)	ΔH (J/g)
type 1	54.2a	59.2a	10.3a	96.5a	102.0a	0.7a
type 2	52.8b	57.8b	9.4b	97.6a	102.0a	0.7a
type 3	52.5b	57.0c	9.4b	97.1a	101.9a	0.6a
type 4	52.4b	57.2c	9.3b	97.1a	102.4a	0.7a
type 5	50.0d	53.5f	7.8d	96.9a	101.7a	0.7a
type 6	51.3c	55.6d	8.8bc	96.9a	101.7a	0.7a
type 7	50.4d	54.6e	8.3cd	96.3a	102.3a	0.8a
type 8	44.5e	50.1g	2.1f	92.8b	99.5b	1.5b

^a 同一列内の異なるアルファベットは、多重比較検定 (Scheffe 法) において 5%水準で有意差があることを表す (n>3)。To:糊化開始温度、Tp:糊化ピーク温度、 ΔH :エンタルピー変化量を示す。

表 2-5 熱分析による老化特性の比較^a

Line	7day			14day		
	<i>To</i> (°C)	<i>Tp</i> (°C)	Percentage of retrogradation (%R)	<i>To</i> (°C)	<i>Tp</i> (°C)	Percentage of retrogradation (%R)
type 1	37.4a	46.4a	41.4a	36.4b	45.2a	58.3a
type 2	37.0a	45.7a	40.2ab	36.7b	44.8a	53.2ab
type 3	38.1a	46.2a	37.7ab	37.6ab	44.6a	47.2ab
type 4	38.3a	46.5a	38.9ab	37.1ab	45.1a	52.3ab
type 5	37.7a	45.1a	34.1b	37.3ab	44.4a	42.1b
type 6	38.2a	45.6a	34.4b	37.2ab	44.9a	47.2ab
type 7	38.2a	45.5a	34.2b	36.8b	44.4a	44.8b
type 8	ND	ND	0.0c	39.4a	42.9a	16.3c

^a 同一列内の異なるアルファベットは、多重比較検定 (Scheffe 法) において 5%水準で有意差があることを表す (n>3)。*To*:糊化開始温度、*Tp*:糊化ピーク温度を示す。

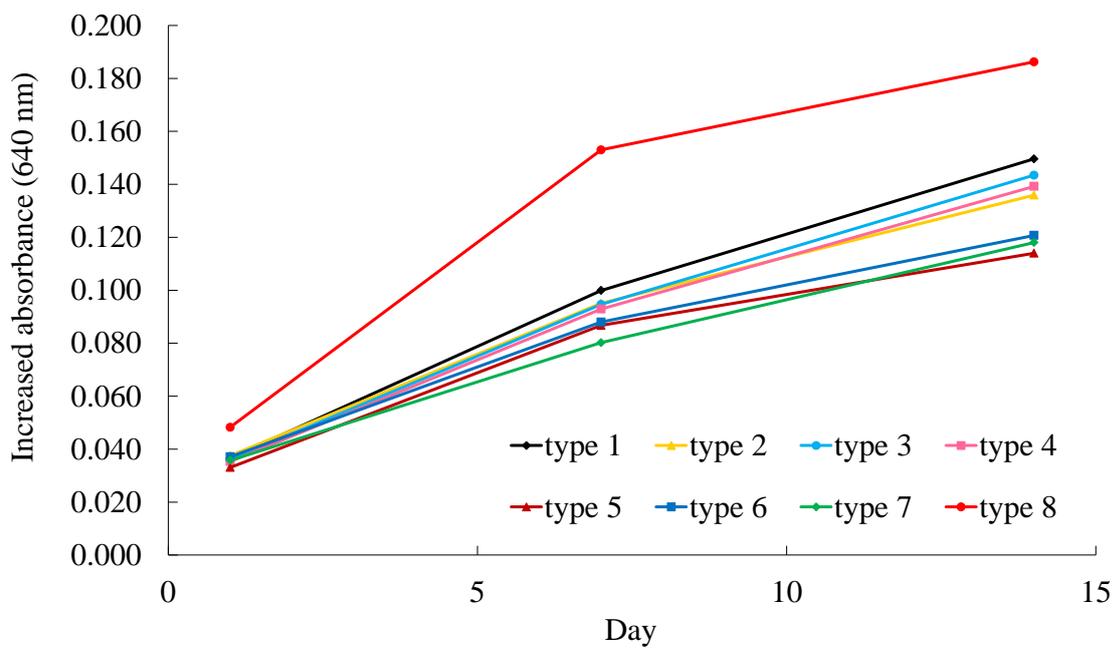


図 2-4 糊化澱粉の冷蔵保存中の濁度上昇

0.3% (w/v) の糊化澱粉を 4℃にて 2 週間保存した際の、濁度の上昇を示す。糊化直後を 0 日目として、1、7、14 日目に吸光度 (640 nm) を測定し、0 日目との差分をプロットしている。

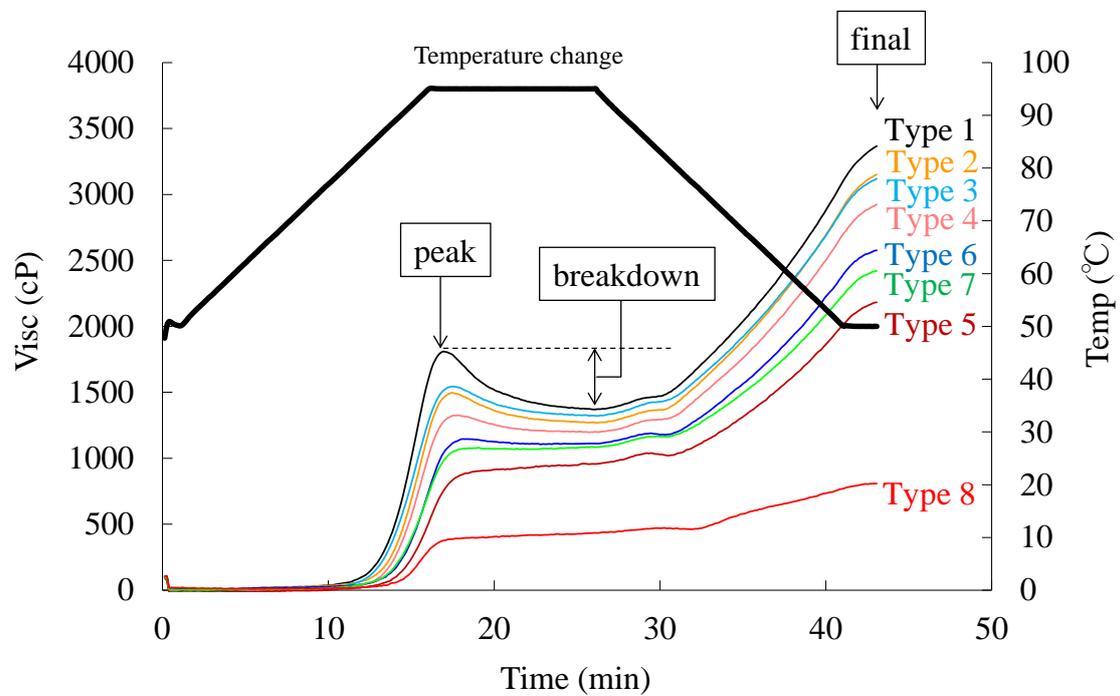


図 2-5 澱粉の粘度特性分析

rapid visco analyzer (RVA) による粘度特性分析の結果を示す。peak はピーク粘度、final は最終粘度を示す。Breakdown (ブレイクダウン) はピーク粘度とピーク粘度が現れて以降の最低粘度との差分である。

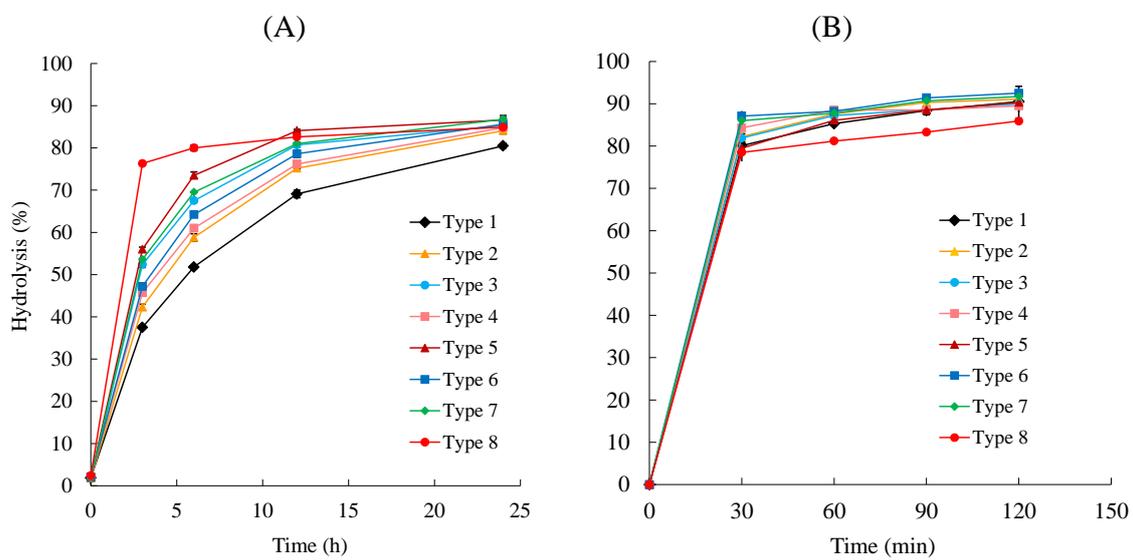


図 2-6 澱粉の酵素消化性分析

(A) 生澱粉 (raw starch) の porcine pancreatic α -amylase (PPA) に対する消化性を示す。(B)糊化澱粉 (gelatinized starch) の同酵素に対する消化性を示す。

表 2-6 澱粉特性の相関分析

	Starch (%)	Amylose (%)	DP6-10 (%)	Tp (°C)	Enthalpy (J/g)	Retrogradation (%)	Peak visc (cP)	Breakdown (cP)	Final visc (cP)	Turbidity (△A640nm)	Raw starch hydrolysis (%)	Gelatinized starch hydrolysis (%)
Starch (%)	1.000											
Amylose (%)	-0.168	1.000										
DP6-10 (%)	-0.144	0.205	1.000									
Tp (°C)	0.095	-0.204	-0.994 (**)	1.000								
Enthalpy (J/g)	0.252	-0.247	-0.982 (**)	0.958 (**)	1.000							
Retrogradation (%)	0.060	-0.187	-0.982 (**)	0.994 (**)	0.934 (**)	1.000						
Peak visc (cP)	0.310	-0.287	-0.958 (**)	0.929 (**)	0.994 (**)	0.898 (**)	1.000					
Breakdown (cP)	0.144	-0.157	-0.988 (**)	0.970 (**)	0.988 (**)	0.952 (**)	0.970 (**)	1.000				
Final visc (cP)	0.190	-0.204	-0.994 (**)	0.976 (**)	0.994 (**)	0.958 (**)	0.976 (**)	0.994 (**)	1.000			
Turbidity (△A640nm)	-0.333	0.299	-0.252	0.238	0.287	0.204	0.310	0.347	0.262	1.000		
Raw starch hydrolysis (%)	-0.024	0.168	0.958 (**)	-0.976 (**)	-0.898 (**)	-0.994 (**)	-0.857 (**)	-0.922 (**)	-0.929 (**)	-0.167	1.000	
Gelatinized starch hydrolysis (%)	0.095	-0.671	-0.192	0.238	0.132	0.275	0.119	0.120	0.143	-0.476	-0.310	1.000

*Spearman の順位相関による相関分析の結果。(**)は 1%水準で有意であることを示す。

Starch;澱粉含量、Amylose;アミロース含量、DP6-10;単位鎖長分布比率(DP6-10)、Tp;糊化ピーク温度、Enthalpy;糊化エンタルピー変化量、Retrogradation;老化度(14日)、Peak Visc;最高粘度、Breakdown;ブレイクダウン、Final Visc;最終粘度、Turbidity:濁度上昇(14日)、Raw Starch hydrolysis:生澱粉消化率(3時間)、Gelatinized starch hydrolysis;糊化澱粉消化率(60分)。

第三章

コムギ granule bound starch synthase I と
starch synthase IIa の二重変異体
(甘味種コムギ) の開発と
その種子および胚乳澱粉特性

第一節 序

第一章では3種の同祖 *SSIIa* 遺伝子の野生型および変異型を識別可能な DNA マーカーを開発した。一方、序章でも述べたようにアミロース合成に関わる *GBSSI* (*waxy*) 遺伝子に関しても、同様の DNA マーカーが開発され (Nakamura et al., 2002, Saito et al., 2009)、既に品種育成に利用されている。この2酵素、各3個の同祖遺伝子の DNA マーカー (合計6個) を用いることで、野生型、モチコムギ、高アミロースコムギに加えて合計64個の遺伝子型の異なる系統の効率的な選抜が可能になると考えられた。本章では、その64系統の中で、*GBSSI* 及び *SSIIa* が全て変異型である二重変異体 (double mutant) の作出を試みた。

これまでに多くの胚乳澱粉変異体が見出されているイネやトウモロコシでは、それらを組み合わせることにより二重変異体、三重変異体が得られており、大きく澱粉特性が変化した系統が育成され、商業的にも利用されている (Ferguson, 2000)。今回コムギで試みようとする *GBSSI* と *SSIIa* の二重変異は、トウモロコシでは *wx/su2* 二重変異体に相当する。この変異体澱粉は、アミロースが無く、アミロペクチンの単位鎖長分布が短鎖側にシフトし、糊化温度の低下、老化の進行が遅い、酵素消化抵抗性が低下する、といった特徴を持つ (Ikawa et al., 1981, Liu and Thompson, 1998)。コムギにおいても同様な特性変化が期待でき、老化進行の遅延や酵素消化抵抗性の低下は小麦粉製品の差別化につながる可能性があり、その実用価値は高いと考えられた。よってこの変異体の、種子特性や澱粉特性を検証することを目的とした。なお、本研究は東北農研を主とした共同研究でおこなわれたものである。

第二節 材料及び方法

1) 植物材料

GBSSI および SSIIa の二重変異体 (double mutant; DM) 育成のために、東北農研で育成された GBSSI 変異体のモチコムギ(Wx、SSIIa は全て野生型) (Nakamura et al., 1995)、および第一章で育成された SSIIa 変異体の高アミロースコムギ(HA、GBSSI は全て野生型) が交雑に用いられた。この F₁ 世代を自殖し F₂ 以降の集団が遺伝子型の判定に用いられた。選抜された二重変異体および Wx、HA、CS (GBSSI、SSIIa は全て野生型) から得られた完熟種子を澱粉分析に用いた。また開花後 (days after flowering; DAF) 10 日目より 40 日目までの種子を採取するために、DM および Wx、HA、ナンブコムギ (GBSSI、SSIIa は全て野生型) およびネバリゴシ (GBSSI-A1 および B1 が欠失型) を用いた。交雑、栽培は全て東北農研内の温室にておこなわれた。

2) 遺伝子型の判定

ゲノム DNA の抽出および SSIIa 遺伝子型の判定は第一章の方法に従い、GBSSI 遺伝子型の判定は Nakamura ら (Nakamura et al., 2002) の方法に従って、東北農研にておこなわれた。

3) 澱粉の単離と澱粉粒結合性タンパクの SDS-PAGE 分析

完熟種子からの澱粉粒の単離は、Echt and Shwartz の方法に従った (Echt and Shwartz, 1981)。澱粉粒結合性タンパクの SDS-PAGE による分析は第一章と同様の方法にて、東北農研でおこなわれた。

4) 糖含量分析

開花後 25 日目の種子胚乳組織における糖含量を測定するために、CS、Wx、HA、DM より種子を採取した。氷上にて冷却したガラス板上で、剃刀刃を用いて、粒溝に沿って種子を分割し、胚と果皮を除去して胚乳部のみを採取した。胚乳組織 10 mg に対して 100 μ l のジメチルスルホキシド(DMSO)を加えてすりつぶした。1.5 ml チューブに回収し、10 分間沸騰水中で加熱後、遠心分離により上清を回収し、5 μ l ずつ分注し、遠心濃縮機で乾燥した。これを 2 μ l の sodium cyano-borohydride 溶液 2 μ l に溶解し、さらに 2 μ l の 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid (APTS) (ベックマン・コールター社)を加えて 37°C で 4 時間、暗所に静置することで糖の還元末端を蛍光標識後、超純水で適宜希釈して分析用サンプルとした。この後、キャピラリー電気泳動を用いてグルコース、マルトース、マルトトリオース含量を分析した。分離は P/ACE システム 5000 および Laser Module 488 を用い、分離条件は第二章と同様におこなった。また Sucrose の測定には HP capillary electrophoresis (bare-fused silica capillary (i. d. 50 μ m, total length 112.5 cm)

(アジレントテクノロジーズ社、東京・日本)を用いた。上記の抽出液を超純水で100倍に希釈して分析用サンプルとし、Agilent Basic Anion buffer (アジレントテクノロジーズ社)を用いて分析した。分離条件はSoga and Serweの方法 (Soga and Serwe, 1999)に従った。

また、開花後、10、15、20、25、30、35、40日目の種子を収穫して糖含量分析に用いた。収穫した種子は、凍結乾燥後、超遠心粉砕機 (ultracentrifugal mill ZM-200、レッチェ社)にて、0.75 mmのスクリーンを用い14,000 rpmの速度にて粉砕した。この粉末20 mgあたり80%エタノール800 μ lを加えて密封し、沸騰水中で20分間の加熱により糖を抽出した。遠心分離 (17,800 \times g、20 $^{\circ}$ C、5分)により上清400 μ lを回収し、遠心濃縮機にて乾固した。これに超純水75 μ lを加えて溶解後、等量のアセトニトリルを混合し、フィルター濾過 (DISMIC-3jp PTFE 0.5 μ m、アドバンテック社、愛媛・日本)して分析用サンプルとし、HPLCを用いて分析した。分析にはAlliance system (日本ウオーターズ社、東京・日本)を用いた。Shodex NH2P 50G-4A ガードカラム、NH2P-50 4E カラム (ϕ 4.6 mm \times 250 mm) (Shodex社、東京・日本)を用い、75% (v/v)アセトニトリルを分離溶媒として1.0 ml/minの流速で20 μ lのサンプルを分離した。検出には示唆屈折検出器 (e2695、日本ウオーターズ社)を用い、カラム温度と検出器温度は30 $^{\circ}$ Cに保温した。

5) 澱粉含量分析

超遠心粉砕機を用いて調製した全粒粉を用いて、第二章と同様に澱粉含量を分析した。

6) 澱粉粒子の観察

澱粉粒子の観察には、光学顕微鏡 (オリンパス社、東京・日本)もしくは走査型電子顕微鏡 VE-8000 (キーエンス社、東京・日本)を用いた。未熟種子の澱粉観察には、開花後25日目 (25 DAF)の未熟種子をスライスし、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液 (0.2% KI、0.04% I₂)で染色後、光学顕微鏡下で観察した。

7) アミロース含量および最大吸収波長解析

単離した澱粉のアミロース含量分析は、AutoAnalyzer (Bran+Luebbe、東京・日本)を用いて、Kurodaらの方法に従っておこなった (Kuroda et al., 1989)。ヨウ素澱粉複合体の最大吸収波長 (λ max)はKonishiらの方法 (Konishi et al., 1985)に従った。

8) High-performance size-exclusion chromatography (HPSEC)分析

単離した澱粉を第二章と同様に、isoamylaseを用いた脱枝処理をおこなった。ただし、本章では、あらかじめ加熱により失活させた変性 isoamylaseを isoamylaseの代わりに加えたものを未脱枝サンプルとして比較に用いた。37 $^{\circ}$ Cで一晩静置後、沸騰水中で isoamylaseを失活させ、HPSEC用分析サンプルとし、分析直前まで60 $^{\circ}$ Cで保温した。なお

このサンプルから 10 μ l を分取し、後述する単位鎖長分布分析にも用いた。HPLC による分離には LaChrom Elite HPLC システム (HPLC ポンプ L-2130、refractive index detector (L-2490)、日立ハイテクノロジーズ社、東京・日本) を用いた。カラムオープンと検出器はそれぞれ 60°C および 45°C にセットした。分離には OHpak SB-G ガードカラム (Shodex 社) と OHpak SB-804 HQ 分離カラム (ϕ 8.0 \times 300 mm) (Shodex 社) を用い、0.1M NaCl を含む 10 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH6.0) を分離溶媒に用いて 0.5 ml/min の流速で分離した。分子量の推定には、Maltoheptaose (ナカライテスク、東京・日本)、とプルランスタンダード (Shodex 社) を用いた。二重変異体特異的に検出された低分子量の 2 峰性ピーク (保持時間 17.0-20.5 min) は、HPSEC にて分離した同画分を回収して遠心濃縮機により乾固した。これを DMSO に分散した後、isoamylase による処理をおこない (熱変性した isoamylase を用いた未脱枝処理サンプルを含む)、再度 HPSEC 分析に供した。

9) 単位鎖長分布分析

HPSEC 分析に調製したサンプルより 10 μ l を分取して遠心濃縮機により乾燥し、第二章に示した方法と同様に、遊離した単位鎖を蛍光標識し、FACE 法にて単位鎖長分布分析をおこなった。ただし本章では、DM 澱粉には未脱枝処理のものからもピークが検出されたため (他の系統の同ピークは無視できるレベル)、DM 澱粉のみ脱枝後のピーク面積から未脱枝のピーク面積をあらかじめ差し引いた値をピーク面積比の算出に用いた。またエタノール分画をおこなって得た澱粉画分の各種加水分解酵素処理溶液は、High-Performance Anion Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detector (HPAEC-PAD) 法により分析した (Koizumi et al., 1991)。遊離した単位鎖を Dionex DX-300 システム (PAD II 検出器を含む) (日本ダイオネクス社、東京・日本) を用いて、Carbopack PA-100 (日本ダイオネクス社) カラムにより分離した。0.2% (w/v) の濃度に調製した脱枝処理および未脱枝処理サンプル 25 μ l を供した。150 mM 水酸化ナトリウム中、硝酸ナトリウム濃度を、0~2 min; 8 mM、2~37 min; 50-350 mM、37~45 min; 350~850 mM の濃度勾配にて 1 ml/min の流速で溶出した。

10) DM 澱粉のエタノール分画

DM 完熟種子より単離した澱粉を DMSO 中に 0.5% (w/v) の濃度になるように分散した。これに等量のエタノールを加え、6,500 rpm、20 分間の遠心分離をおこなった。沈殿 (ppt①; 50%エタノール沈殿画分) を回収し、上清には等量のエタノールを加えて同条件にて遠心分離をおこない、沈殿を回収した (ppt②; 67%エタノール沈殿画分)。さらにエタノール濃度を、75% (ppt③)、83% (ppt④)、90% (ppt⑤) となるように加えて同様の操作をおこない、5 つの画分を得た。これら画分は DMSO に分散し、フェノール硫酸法 (坂野、1986) にて α グルカン濃度を決定した。これら画分を次の反応液組成にて脱枝処理をおこなった; 0.5% (w/v) 分画 α グルカン、40 U/ml isoamylase、10 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH5.5)。

反応終了後、沸騰水中で5分間酵素を加熱変性し、HPSEC分析およびHPAEC-PAD分析をおこなった。

さらに ppt⑤画分は、isoamylase の他、同濃度の酢酸ナトリウムバッファー中、glucoamylase (EC 3.2.1.3) (50 U/ml)、 β -amylase (EC 3.2.1.2) (20 U/ml)、 β -amylase と isoamylase (各 5 U/ml) による加水分解反応をおこなった。37°C、2時間で各反応をおこない、沸騰水中で加熱して各酵素を失活させた。この溶液は HPAEC-PAD 分析に用いた。

11) X線回折 (X-Ray diffractogram; XRD) 分析

単離した澱粉の X 線回折分析は、X' pertPROMPD (Panalytical 社、アルメロ・オランダ) を用い、40 mA、50 kV、回折角 (2θ) = $4^\circ \sim 30^\circ$ の条件でおこなった (Hayakawa et al., 1997)。

12) DSC による熱分析

DSC による熱分析は、第二章と同様の方法でおこなった。

第三節 結果

1) DM の選抜

Wx と HA との交雑から得られた F₂ 集団 728 個体の遺伝子型判定の結果、SSIIa-DI のみヘテロ接合体で、それ以外の遺伝子が全て変異型ホモ接合体である 1 個体が同定された。この個体を播種して得た F₃ 集団 55 個体から、6 遺伝子が全て変異型となった 8 個体が同定された (図 3-1)。SDS-PAGE による澱粉粒結合性タンパク質の分析結果から (図 3-2)、DM 澱粉粒では GBSII および SSIIa が失われていることが確認された。同時に DM では 90 kDa の SBEII および 77 kDa の SSI が、HA と同様に減少していた。

2) 登熟過程における種子形状の変化

CS、Wx、HA、DM の完熟種子の外観および種子重量を図 3-3A に示す。DM の種子は他のコムギに比べて著しく皺粒の外観を示し、種子重量は CS および Wx に比べて、それぞれ 35%、41% 低い値となった。細身で種子重量が低くなる HA と比較しても 11% 低い値を示していた。DM の登熟過程における種子外観形状の変化を図 3-3B に示す。開花後 35 日目までの DM 種子外観は、通常となんら変わらない生育状態であったが、水分含量が低下し始める完熟期に入ると、急激にやせ細り、45 日目には皺粒となった。

3) 未熟種子における糖の蓄積

DM の顕著な特徴は、種子への糖の蓄積であった。登熟中期における未熟種子 (開花後 25 日) に強い甘味が感じられたために、糖尿病検査試薬を用いて磨砕した胚乳組織上清画分の糖濃度を簡易調査したところ、DM 特異的に強い発色が見られ、グルコースもしくはマルトースの蓄積が示唆された (図 3-4)。ブリックス糖度計を用いて同抽出液の糖度を測定した結果、DM の糖度は 22 で CS や Wx の約 2 倍の値を示していた (図 3-4)。以上の結果より、DM 種子に甘味をもたらした原因は糖分であると考えられたため、キャピラリ電気泳動法で胚乳抽出液に含まれる低分子糖の分析をおこなった。この結果、グルコース、マルトース、スクロース、マルトトリオースが二重変異体特異的に高含量で蓄積していることがわかった (図 3-5)。DM におけるグルコースは他のコムギに比べて、3.6 から 5.9 倍、スクロースは、2.6 から 4.9 倍と、数倍の蓄積を示した。これらに対して、マルトトリオースは約 25 倍の含量、マルトースでは 33.0 から 138 倍と、著しく高い蓄積が観察された。

これら糖の蓄積が、登熟過程における一時的なものかどうか確認するために、Wx や HA に加えて、東北地方の実用品種であるナンブコムギ、ネバリゴシを比較対照として、開花後 10 日目より 40 日目まで 5 日ごとの種子について、種子中糖含量の推移を経時的に調べた。採取した各種子の外観から、Wx は 5 日程度生育が遅いと考えられ (図 3-6)、経時変化の比較には生育状態の違いを考慮する必要があると考えられた。

これら種子におけるフルクトースとグルコース含量は、全サンプルとも、初期 (10 もし

くは 15 日目) が高く、種子の発達に伴い徐々に低下していた (図 3-7A、B)。Wx の生育の遅れを考慮すると、登熟過程全体を通して、DM 種子中の含量は高く推移していると考えられた。スクロースについては、DM 以外の系統では、15 日目以降緩やかな減少を示していたのに対して、DM は 30 日目まで緩やかに増加した (図 3-7C)。その後緩やかな減少に転じたものの 40 日目においても高いレベルが維持されていた。マルトースは、ナンブコムギ、Wx、ネバリゴシは全期間に渡って非常に低いレベルで推移していたのに対して、HA と DM は初期の段階から増加し、HA では 20 日目、DM では 25 日目まで著しく増加した (図 3-7D)。その後は両者とも急激に含量は低下した。25 日目における DM のマルトース含量はナンブコムギやネバリゴシ、Wx に対して 40 倍以上、HA と比較しても 10 倍以上の蓄積量を示していた。マルトリオースは、マルトースに近い傾向を示し、DM には高含量で蓄積が見られ、HA にも 20 日目付近にわずかに蓄積が認められた (図 3-8)。以上の結果から、DM における糖の蓄積は登熟期間全般を通して高いレベルで維持されていることが確認された。麦類において、顕著に糖を蓄積する報告はこれまでになく、本二重変異体が麦類初の甘味種の報告である。そこで、トウモロコシの甘味種を「Sweet Corn」と呼ぶのに対応させて、コムギの甘味種を「甘味種コムギ (Sweet Wheat:SW)」と名付け、本二重変異体をそのカテゴリーに入れることとした。以下本稿では DM を SW と表記する。

4) 種子中澱粉含量の推移

SSIIa と GBSSI の欠失の影響が澱粉蓄積量に及ぼす影響を調べるため、登熟過程における澱粉含量の推移を調べた (図 3-9)。初期 (10 日目) には SW とそれ以外のコムギ系統で大きな違いは見られなかった。しかしこれ以降、他の系統は 40 日目までに 40%以上の蓄積を示したのに対して、SW は 25 日目までは緩やかに増加したものの、それ以降はわずかに減少し、40 日目には 13%程度の蓄積に留まった。SW の澱粉含量は登熟初期から低いレベルで推移することが明らかになった。

5) SW 澱粉粒外観

SW 完熟種子由来の澱粉は、単離時における遠心分離後の沈殿画分の性状に違いが見られた (図 3-10A)。CS、Wx、HA の澱粉は遠心分離後にはチューブ底面に硬い Pellet が形成されるのに対して、SW ではこのような Pellet はわずかしき得られず、かつ SW にはその上層にゲル様の性状を示す画分 (Upper) が大量に沈澱した。ただし Upper と Pellet は明確に分離できるものではなく、上層ほど柔らかく、下層ほど硬めの性状を示した。

CS、HA のアミロース含量はそれぞれ 28.3、36.9%で、これに対して Wx と SW にはアミロースは含まれていなかった (図 3-10B)。電子顕微鏡下では、CS や Wx、HA 澱粉には 10 μ m 以上の大粒澱粉と 10 μ m 以下の小粒澱粉が観察された (図 3-10B)。SW の Pellet には、明らかにサイズが小さく、異常な形状の澱粉粒子が観察された。また Upper は光学顕微鏡下での観察ではゲル様物質に思われたが、電子顕微鏡下ではこれらが非常に小さい粒子から

構成されていることがわかった (図 3-10 B)。このような SW 澱粉の性状が、種子登熟期間中のどの時期から観察されるのか検証するため、開花後 25 日目の未熟種子を採取した。種子の横断切片にヨウ素ヨウ化カリウム溶液を滴下して光学顕微鏡下で観察した結果 (図 3-11)、既にこの時点で完熟種子同様の性状を示す澱粉の蓄積が見られた。よって完熟種子の異常な澱粉粒子は種子の乾燥に伴って澱粉が崩壊するといったような現象で生じたのではないことが確認された。

6) SW 澱粉の分子構造分析

各系統の未脱枝澱粉 (図 3-12A) および isoamylase による脱枝処理澱粉 (図 3-12B) を、HPLC によるサイズ排除クロマトグラフ (HPSEC) にて分析した。Wx の未脱枝澱粉に見られた高分子量のピーク (9.5 min) (図 3-12A) は、脱枝処理によって 17 min から 20.5 min のピークへとシフトした (図 3-12B)。これは Wx アミロペクチン分子の側鎖が isoamylase によって単位鎖へと切り出されたことを示している。CS および HA も同様にアミロペクチンが分解された。また CS、HA には未脱枝澱粉中 11.5 min (プルラン換算で DP4860) にもピークが見られ、これは脱枝反応後にも残存していたことから、アミロースに由来するピークであることは明らかであった。SW 未脱枝澱粉では、高分子量のピークトップが 11.5 min 付近に現れたことは、他のコムギのアミロペクチン分子に比べて低分子化していることを示していた。加えて 17 min 付近以降には特異的に 2 峰性のピークが検出された。脱枝処理後には、17 min 以降のピークのみが観察され、その形状は CS や Wx よりも HA に近いパターンを示していた。

SW 特異的に検出された 2 峰性ピークは、溶出液を回収し未脱枝および脱枝処理して再度分離した (図 3-12A 内の嵌めこみ図)。2 峰性ピークのうち先に溶出されるピーク (18.5 min 付近) は脱枝処理によって失われたことから、分岐構造を持った α グルカンが含まれていると考えられた。また後半のピーク (19.5 min) は脱枝処理によって面積が増大したものの溶出時間には変化が見られなかったことから、直鎖状の α グルカン (マルトオリゴ糖 : MOS) および (または) わずかに分岐を持つ α グルカンが含まれると考えられた。

FACE 法による各澱粉の単位鎖長分布分析の結果、CS と Wx の分布パターンは良く一致した (図 3-12、C および D)。HA は CS に比べて DP6 から 10 の単位鎖比率が増加し、DP11 から 24 までの比率が低下した。この結果は第二章の type 8 の結果と良く一致していた。SW 澱粉は HA に近い分布を示し、比較的短い鎖 (DP<10) が増加し、これに対して中鎖 (DP11-25) の減少が観察された (図 3-12D)。この特徴は HPSEC の結果 (図 3-12B) とも一致していた。しかし HA に対して SW ではさらに短い鎖 (DP2-5)、特に DP2 と DP3 の比率が増加していた。

SW 澱粉の構造をより詳細に検討するため、糊化した SW 澱粉を、濃度の異なるエタノール (50% から 90% (v/v)) で段階的に沈澱させて分子量の異なる 5 つの分画を得た (図 3-13A)。ppt①には 9.5 min から 13 min に溶出される高分子画分が含まれ、ppt②には比較的高分子から低分子までが含まれていた (図 3-13B)。SW 澱粉特異的 2 峰性ピークのうち 18.5 min

のピークは主に ppt③に、19.5 min のピークは主に ppt⑤へと分画された。ppt④は両ピークを含んでいると推察された (図 3-13B)。

各画分の未脱枝サンプル、脱枝サンプルを HPAEC-PAD 分析に供した (図 3-14)。ppt①、②、および③の未脱枝サンプルにはピークは検出されなかったのに対して、ppt④および⑤には DP6 から 25 付近のピークが検出された (図 3-14A)。脱枝処理した ppt①の単位鎖長分布は未分画澱粉のそれと同様の分布を示した。これに対して ppt②では、DP10 以下の単位鎖、特に DP2 および DP3、が顕著に増加した。ppt③および ppt④のパターンはこれらと明らかに異なり、DP14 を頂点とした分布を示した。未脱枝の ppt⑤には DP2 から 6 の短鎖ピークが検出されたものの、脱枝前後で分布に大きな変化は見られなかった。また ppt⑤の分布は、ppt③に比べてシャープな分布パターンを示した。

ppt⑤はさらに、各種加水分解酵素による消化をおこない、HPAEC-PAD 分析に供した (図 3-15)。isoamylase 処理をおこなったものは、未脱枝 (non-digested) と同様のパターンを示していたことから、ppt⑤に含まれる α グルカンの大半は MOS であることは明らかであった。ただし、 β -amylase 処理により DP3 より重合度の大きいピークがわずかに検出されたこと、 β -amylase と isoamylase を同時に作用させた場合、これらのピークは検出されなかったことから、この画分にも分岐構造を持った α グルカンがわずかに含まれていると考えられた。

7) SW 澱粉の結晶構造と糊化特性

SW 澱粉の X 線回折 (XRD) 結果は CS と大きく異なった (図 3-16)。CS や Wx に見られた $2\theta = 18^\circ$ におけるピークが SW では観察されず、加えて 22° のピーク強度が低下した。また 5° には小さなピークが観察された。HA では 20° のピークが見られたものの、全体的にフラットなパターンとなっていた。

穀物澱粉に典型的な XRD パターンは、 $2\theta = 15^\circ$ 、 17° 、 18° 、 20° 、 23° に主要なピークを示す、A タイプと呼ばれるものである。これに対して主に塊茎に由来する澱粉に見られる B タイプは、 5° にピークがあり、 15° のピークは平らになる。さらに 18° と 23° のピークが失われ、 22° 、 24° にピークが現れる (Cheetham and Tao, 1998)。SW のパターンは、 23° のピークが非常に小さくなっている、 5° のピークが明確ではない、という点に違いはあるものの、B タイプの特徴とも一致する点があることから、C タイプ (legume 澱粉に見られる特徴で、A タイプと B タイプの混合とも言われている) に近いパターンであると言える。HA の XRD パターンは、 $2\theta = 20^\circ$ のピークを頂点としているが全体に渡ってピーク強度が大幅に低下した。このパターンは V タイプとして知られており (Cheetham and Tao, 1998、Singh et al., 1998)、アミロース分子が脂質などの分子とシングルヘリックスを形成する場合にも見られるパターンである (Buléon et al., 2007)。HA では明確なピークを持った回折像が得られないのに対して、SW では複数のピークが検出されていたことは、アミロースが失われたことで HA に比べて結晶性が高まっている可能性を示していた。

熱分析の結果、SWの糊化ピーク温度はHAに近い値を示していた(表3-1)。SWのアミロペクチン構造はCSやWxよりもHAに近いため(図3-12C、D)、糊化ピーク温度やエンタルピー変化量がCSやWxに比べて低下したことは妥当な結果と考えられた。また予想されたとおり、アミロースを含まないSW澱粉には、Wx同様、アミロース脂質複合体解離ピークが検出されなかった。

第四節 考察

本章では、澱粉合成に関与する主要な酵素である GBSSI と SSIIa を全て欠失した二重変異体を作成し、この二重変異体が種子内に糖を高含量で蓄積すること、種子胚乳澱粉が形状や構造、物理化学的特性において特異的な特性を備えていることを明らかにした。

GBSSI および SSIIa 各 3 遺伝子、合計 6 遺伝子が全て変異型である目的個体の選抜において、DNA マーカーを利用した MAS は非常に有効であった。目的個体の F₂ 集団における出現確率は 1/4096 という低い確率であったため、多数のサンプルを分析する必要性があり、この目的には多サンプル分析にも対応できる PCR 法が簡便であった。さらに今回用いた DNA マーカーセットは共優性マーカー (GBSSI-B1 を除く) であったため、F₂ 世代で SSIIa-DI のみヘテロ接合体を得ることができた。この個体を見出したことで、次世代では 1/4 の確率で目的の個体を取得することが可能であると判断できたことで、労力を大幅に削減することができた。MAS 育種が効率的に実施された例と言える。

選抜された SW の特徴の一つは種子形状の変化であった。登熟過程中期までは他のコムギ系統とは大きな違いは観察されず、これが 35 日目以降になると明らかに皺粒となった (図 3-3、3-6)。通常コムギ種子内部では、大小の澱粉粒子が密に詰まっており、これが種子の充実度を高めている。SW では澱粉含量が低く (図 3-9)、かつ澱粉粒子が微小化しているため (図 3-10B) に種子内部の充実度が低下し、その結果ふっくらとした種子形状を維持できなくなったと考えられる。トウモロコシでは、isoamylase 変異体である *su1* や ADP-glucose pyrophosphorylase の大サブユニット変異体である *sh2* 変異体の完熟種子が同様に皺粒になることが知られている (Tracy, 2000)。それら変異体においても澱粉構造は大きく変化しており、糖蓄積や澱粉の形状変化が、結果として種子の形状維持に大きな影響を与えていると考えられる。

GBSSI と SSIIa を欠失した二重変異体の種子内に糖が蓄積されることは予想を超えた特徴であった。SW 未熟種子において、マルトースとスクロースが顕著に蓄積されることは、本章の結果から明らかである (図 3-5 および図 3-7)。一方で、SW 種子内の澱粉量は 20 日目には、他のもの (生育の遅い Wx は除く) に比べて明らかに低い蓄積量を示していた。少なくともこの段階では種子内部に何らかの変化が起こっていると考えられる。通常澱粉粒の蓄積は開花後 7 日目付近に開始され、35 日目付近まで継続する (長尾ら、2007)。最も澱粉合成の盛んな 15 日目以降から 25 日目の期間、SW では澱粉含量の増加が見られなかった (図 3-9)。同時期に、通常のコムギの場合スクロース含量は低下してゆくのに対して、SW では高いレベルが維持されていたことは (図 3-7C)、澱粉合成速度が低下し、基質であるスクロースが利用されずに蓄積した可能性を示している。

マルトースの蓄積は SW と HA に特異的なパターンを示していた。これ以外のコムギ系統では全過程を通じて低い含量で推移しているのに対して、SW と HA は 15 日目以降、HA は 20 日、SW は 25 日目にかけて急激に増加し、その後は急激に減少した。スイートコーン

種においてマルトースを蓄積する変異は、*su1* と *sugary enhancer (se)* の二重変異体 (*su1/se*) に観察されるのみである (Ferguson et al., 1979)。*se* は *su1* の劣性修飾因子であり、その原因遺伝子は未だ不明である。ただしこの系統におけるマルトースは登熟期間を通じて増加するという点で、一時的に含量が高まる SW とは異なっており、*su1/se* 変異体と SW のマルトース蓄積のメカニズムは異なるものと考えられる。

SW におけるマルトースの蓄積は澱粉合成能力の低下によるものではなく、澱粉の分解に起因する可能性が高い。胚乳澱粉の合成経路において、中間体としてマルトースが生じるステップは知られていない (図 序-3)。一方澱粉に作用してマルトースを生じる酵素としては、 α グルカン鎖の非還元末端からマルトースを順次切り離してゆく β -amylase (EC 3.2.1.2) が知られている。 β -amylase が登熟過程で働いた可能性は、澱粉の鎖長構造からも示唆される。SW 澱粉で低分子化したアミロペクチン分子は DP2 から 5、特に DP2 と DP3 の単位鎖比率が顕著に高まっていた (図 3-12D、図 3-14)。これは、トウモロコシ由来のモチ澱粉 (アミロペクチン) の β -amylase 消化後に得られる鎖長分布パターンに近い (Mendez-Montealvo et al., 2011)。また β -amylase によるアミロペクチン側鎖の分解は、 α -1,6 結合の手前でグルコース 2 もしくは 3 単位を残して停止する (檜作, 2003)。SW 澱粉における DP2 や 3 の単位鎖の増加 (図 3-12C、3-12D) はこの酵素が作用した痕跡であると考えられる。コムギ種子で発現する β -amylase には、ユビキタス型と胚乳型の 2 種類が知られており、種皮ではユビキタス型、胚乳では胚乳型 β -amylase が発現することが知られている。このうち胚乳型は種子の発芽時に貯蔵澱粉を分解する役割を担うと考えられている (Daussant and Laurière, 1990、Mason-Gamer, 2005)。ただし、この酵素が登熟過程において澱粉を分解するためには、澱粉合成の場であるアミロプラスト内部に存在しなければならない。 β -amylase がコムギ胚乳のアミロプラスト内部に存在するというを示す報告は見当たらないが、澱粉合成が抑制されたことでスクロースが蓄積し、これによって細胞内に浸透圧差が生じてアミロプラスト細胞膜が破壊され、 β -amylase がアミロプラスト内部に入り込む可能性が考えられる。葉での光合成による澱粉合成時に、MOS を蓄積するシロイヌナズナ変異体では、クロロプラストの分解が起こることが知られており (Stettler et al., 2009)、SW の胚乳でも同様のことが発生している可能性が考えられる。

マルトースの蓄積に β -amylase が関与しているという仮説には、通常生澱粉に対して作用しにくいこの酵素が、なぜ SW 種子に蓄積される生澱粉を分解できるのか、という点についての議論も必要である。第二章では、HA に由来する生澱粉は野生型や、他の SSIIa 部分変異体に比べて消化酵素に対する感受性が上昇していることが示された。また、トウモロコシ *wx/su2* 二重変異体に由来する生澱粉の加水分解酵素に対する抵抗性は著しく低下することも知られている (Ikawa et al., 1981、Liu et al., 1998)。これらは、澱粉の構造の違いによって、 β -amylase に対する感受性が影響を受けることを示している。SSIIa と GBSSI の二重変異により、SW における澱粉構造に大きな変化をもたらされたことは明らかで (図 3-12D、図 3-14)、この変化によって β -amylase に対する感受性が高まった可能性

は十分に考えられる。さらに SW 澱粉は小粒子化しているため、澱粉粒子の総表面積が増大し、感受性が高まった可能性も考えられる (図 3-10、図 3-11)。

しかしながら、 β -amylase の関与だけでは、SW に特異的に見られた低分子量の 2 峰性ピークの存在は説明できない。このピークに含まれていた、重合度 14 をピークとした MOS は β -amylase のみの働きによって生じるとは考えにくい。直鎖状の α グルカン鎖を遊離させる酵素には、DBE である isoamylase が挙げられる (Hussain et al., 2003, Takashima et al., 2007)。植物で広く保存されている isoamylase は、本研究でもアミロペクチンの脱枝処理に用いているように、 α -1,6 結合を加水分解して、アミロペクチンより単位鎖を切り出す機能を持つ (Takashima et al., 2007)。SW 澱粉に観察された DP14 程度の MOS は isoamylase の働きによって遊離した側鎖なのかもしれない。加えて SW に見られた遊離マルトトリオースの蓄積 (図 3-8) も isoamylase の関与を示唆している。 β -amylase がアミロペクチン (あるいは分岐グルカン) を加水分解した場合、残った側鎖は重合度が 2 ないし 3 となる。isoamylase による脱枝反応によりこの側鎖が切り出されたと考えると、DP2 (マルトース) や DP3 (マルトトリオース) が検出されることになるからである。

澱粉合成は SS、SBE、DBE 等の酵素による秩序だったバランスの上に成り立っている。GBSSI と SSIIa の欠失により引き起こされる、アミロースの欠如、アミロペクチン構造の変化、澱粉合成能力の低下、澱粉粒子構造の変化は、これら酵素の協調的作用バランスを崩すことになり、結果として通常の澱粉合成機構では観察されない合成あるいは代謝メカニズムをもたらし、これがさらに種子への糖の蓄積 (図 3-5、図 3-7)、あるいは特異的な構造や物理化学的特性 (図 3-16、表 3-1) を持つ澱粉の蓄積をもたらしたと考えられる。

本章では、特性が改変された澱粉を蓄積する新規コムギの育成を、SSIIa と GBSSI の二重欠失変異体に求めた。この結果、両親系統とは大きく異なる特性を示す澱粉を蓄積し、かつ種子内に糖を蓄積する麦類初の甘味種の育成につながった。この甘味種の種子の甘さは、市販のスイートコーンほどの甘さほどではなかったものの、十分に甘いと感じられるレベルであった。スイートコーンの食味には種子に蓄積される糖含量が大きく寄与している (Tracy, 2000)。スイートコーンが一般的に利用され始めた 1800 年代のアメリカでは、その育成には主に *su1* 遺伝子が用いられた (Tracy, 2000)。その後、*su1* に対して *sh2* 遺伝子がより多くの糖を蓄積すること、さらには *ae* や *waxy* などの変異遺伝子を組み合わせることで、より糖含量が高まることが明らかにされた結果 (Creech, 1965, Garwood et al., 1976)、甘味が増強された品種が多く開発されてきた。これらは初期のスイートコーンに対してスーパースイート種、あるいはエクストラスイート種とも呼ばれている (千葉ら、1986、Tracy, 1997、Tracy, 2000)。本章で開発された SW も他の澱粉合成酵素変異体との組合せ、あるいは GBSSI や SSIIa 以外の酵素変異体の組合せにより、より強い甘さを持つコムギを開発することは十分に可能であると考えられる。コムギ研究における新しい方向性を示せたことで、本章の研究は有意義であるといえる。

第五節 図表

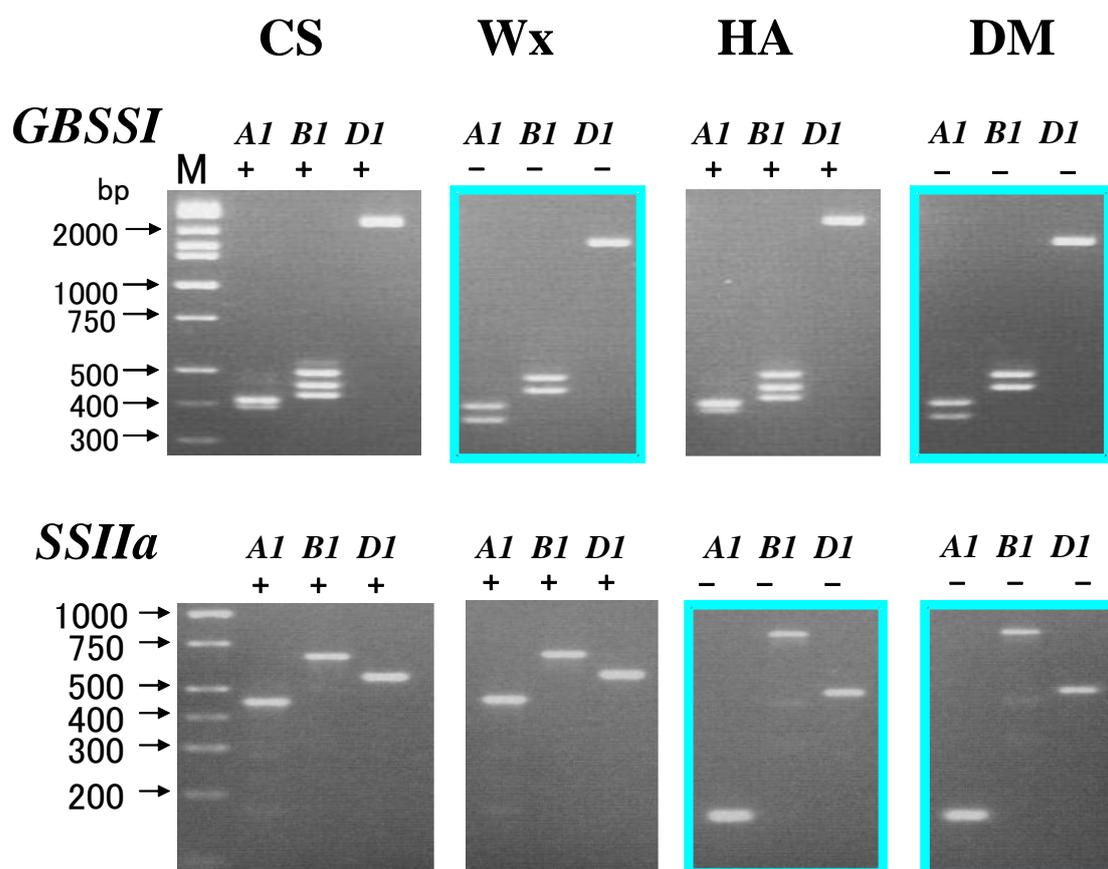


図 3-1 *GBSSI* および *SSIIa* 遺伝子の DNA マーカーによる増幅結果

SSIIa に関する DNA マーカーを用いた遺伝子型判定は第一章に示される方法に従った。*GBSSI* に関しては Nakamura らの方法 (Nakamura et al., 2002) に従った。CS: Chinese Spring、Wx: モチコムギ、HA: 高アミロースコムギ、DM: 二重変異体を示す。二重変異体では *GBSSI* は Wx と同じ、*SSIIa* は HA と同じパターンであることから、6 遺伝子全てが変異型遺伝子をホモ接合で持つことがわかる。

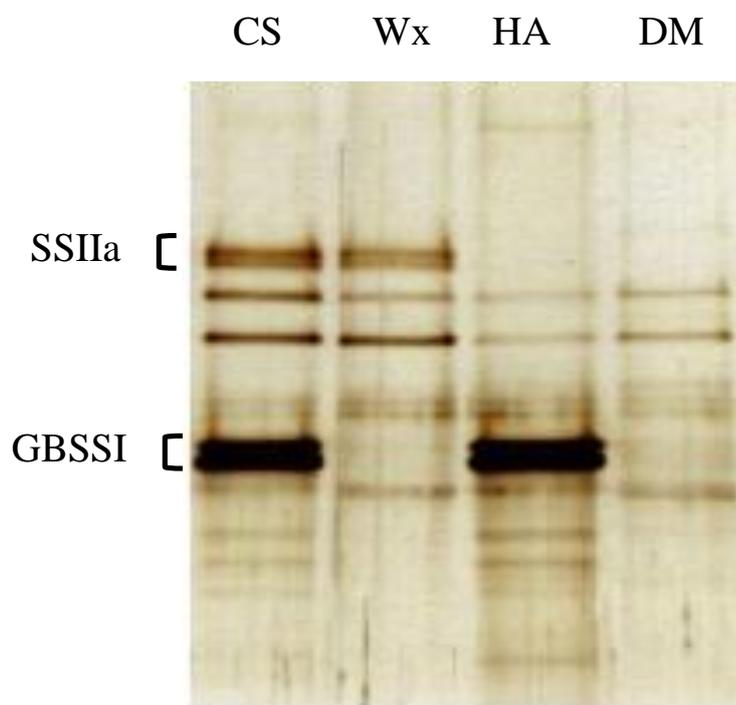


図 3-2 澱粉粒結性タンパクの SDS-PAGE 分析

単離した澱粉粒より澱粉粒結合性タンパクを抽出後、SDS-PAGE をおこない、銀染色法により可視化した。CS : Chinese Spring、Wx : モチコムギ、HA : 高アミロースコムギ、DM : 二重変異体を示す。DM では SSIIa および GBSSI が欠失している。

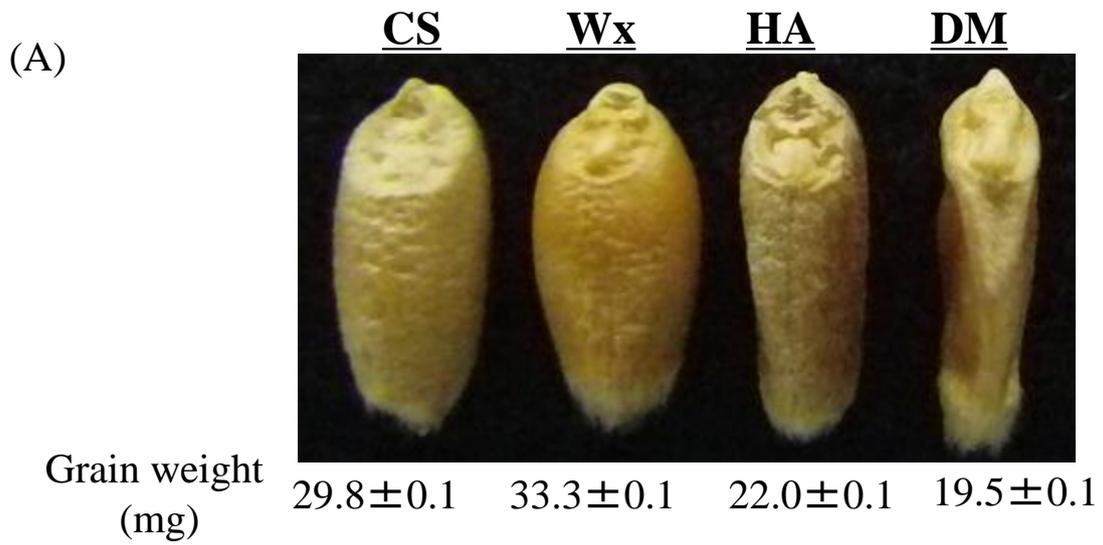


図 3-3 各コムギ系統の種子外観

(A) CS (Chinese Spring)、W_x (モチコムギ)、HA (高アミロースコムギ)、DM (二重変異体) の開花後 45 日目の種子外観を示す。写真下部には種子重量を示している。(B) DM (二重変異体) の開花後 25、35、40 日目の種子外観を示す。

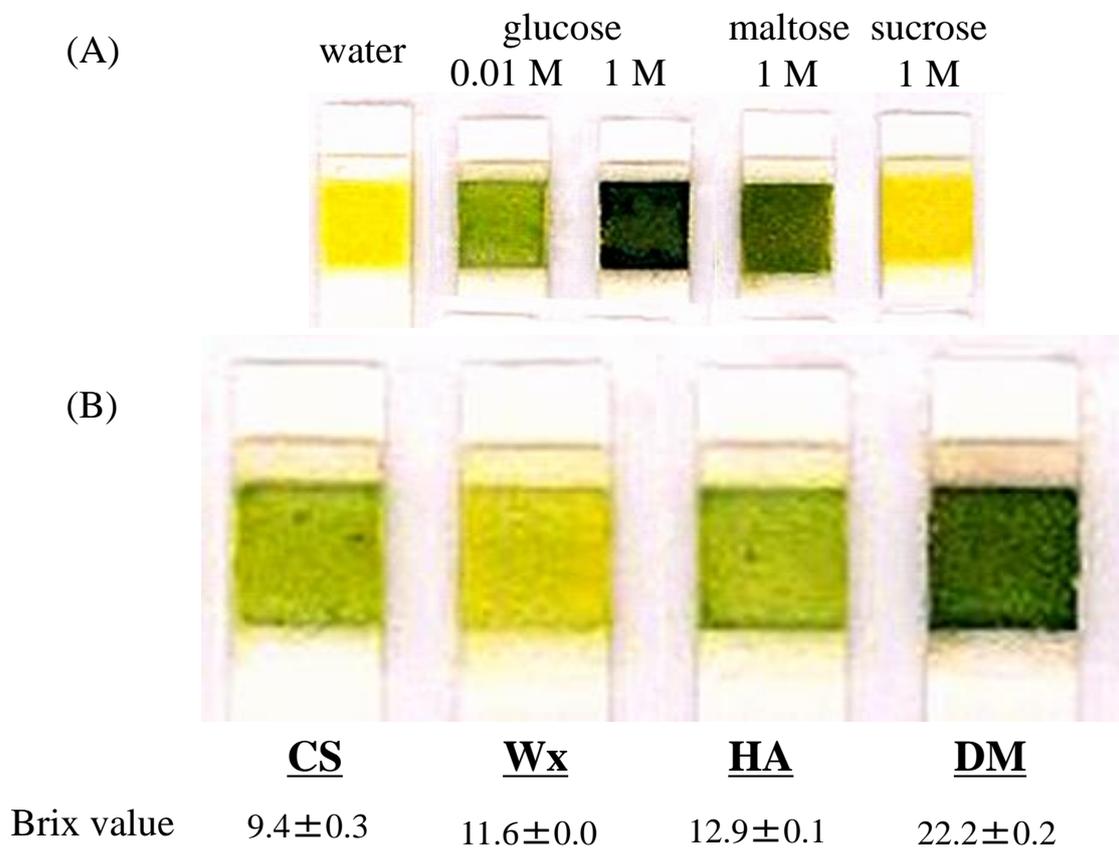


図 3-4 未熟種子胚乳における糖含量の簡易測定

(A) 市販の糖尿病検査試薬（新ウリエース Ga、TERUMO 社、東京・日本）に超純水、0.01 M および 1 M glucose 溶液、1 M Maltose 溶液、1 M Sucrose 溶液を滴下した結果を示す。
 (B) 未熟種子胚乳組織をすり潰し、遠心後の上清を同試薬に滴下して発色を比較した。また同上清の糖度（サンプル名の下に示す）を Brix 糖度計を用いて測定した。CS: Chinese Spring、W_x: モチコムギ、HA: 高アミロースコムギ、DM: 二重変異体を示す。

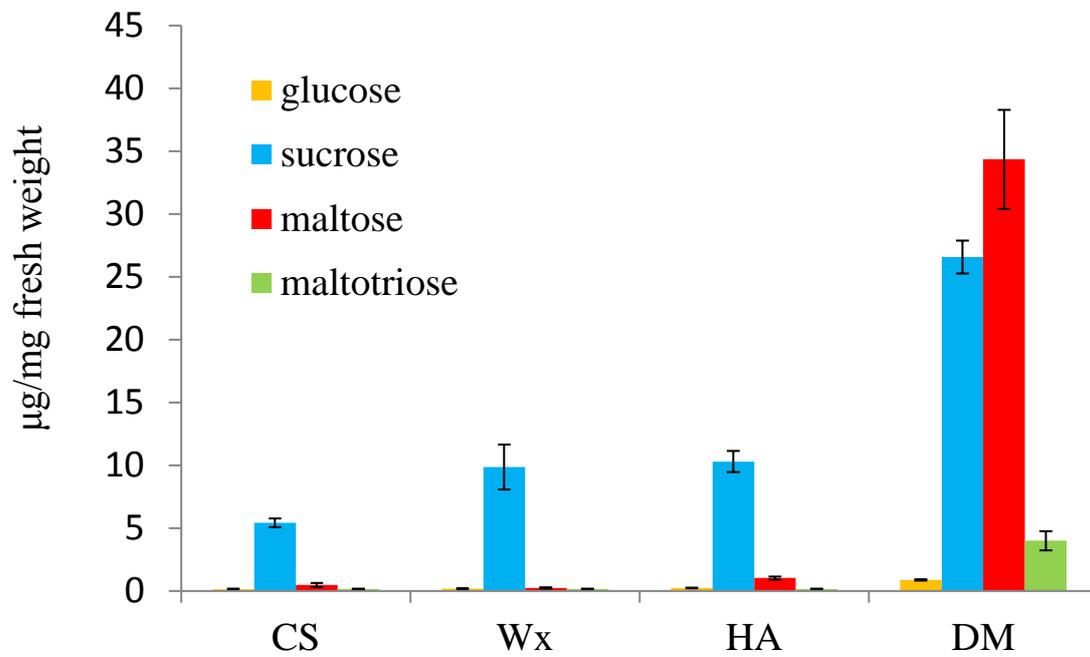


図 3-5 未熟種子胚乳における糖含量

未熟種子より胚乳組織を分離し、糖を抽出後、キャピラリ電気泳動で分析した。CS : Chinese Spring、Wx : モチコムギ、HA : 高アミロースコムギ、DM : 二重変異体を示す。

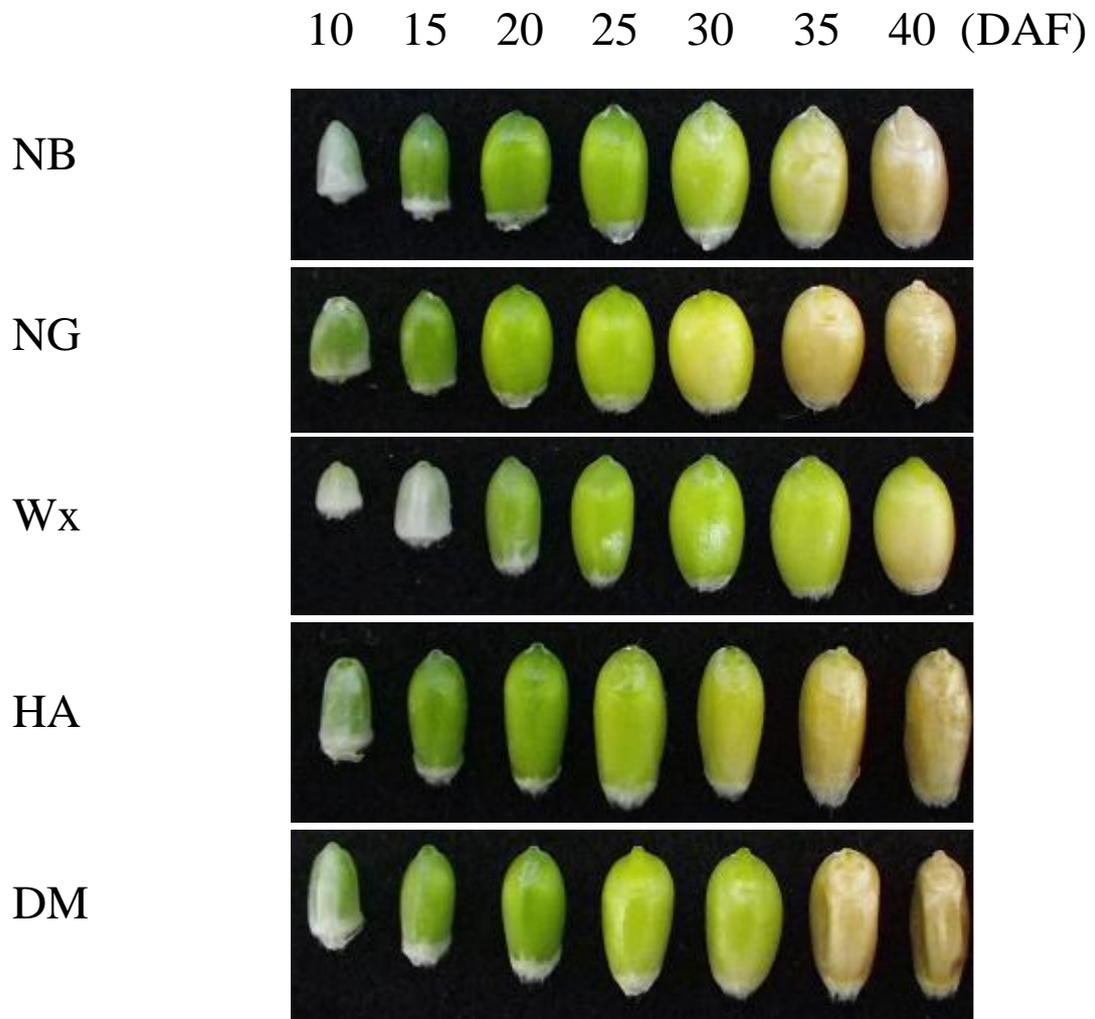


図 3-6 開花後 10 日目以降の登熟過程における種子

開花後 10 日目より 5 日ごとに 40 日目までの種子を採取した。NB:ナンブコムギ、NG:ネバリゴシ、Wx:モチコムギ、HA:高アミロースコムギ、DM:二重変異体を示す。

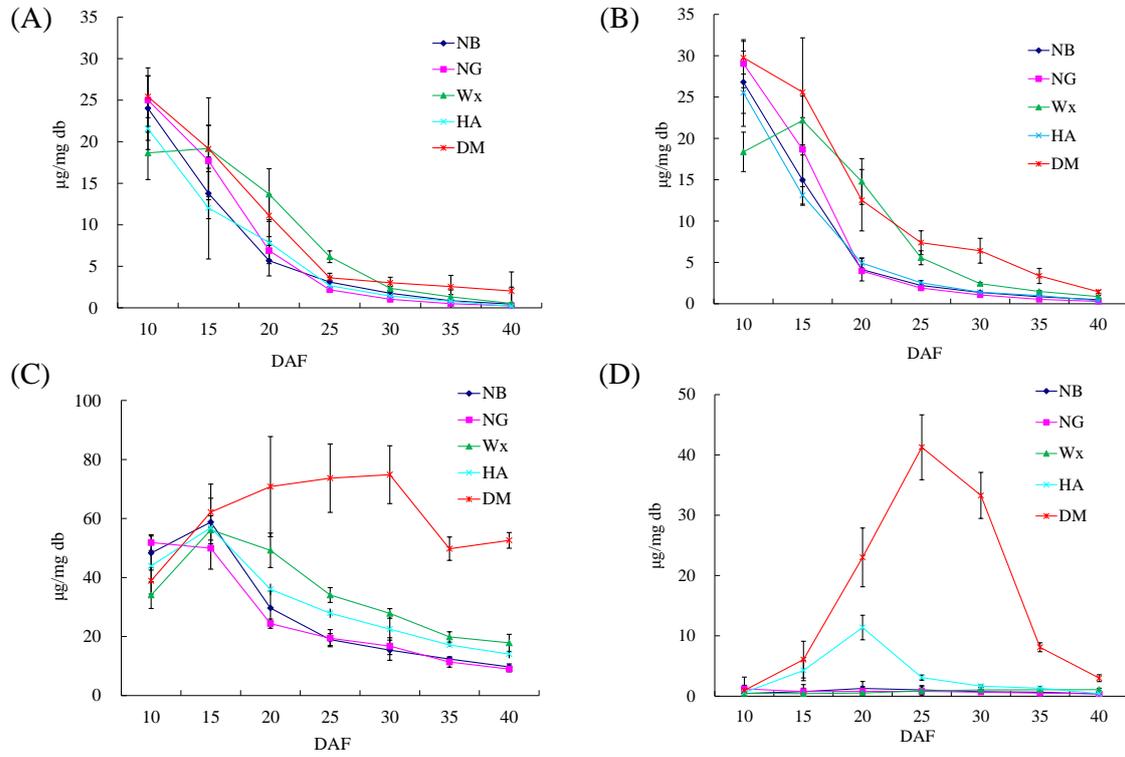


図 3-7 登熟過程における種子中糖含量の推移

登熟過程における種子中糖含量を HPLC 法にて測定した。(A) フルクトース、(B) グルコース、(C) スクロース、(D) マルトースの含量の推移を示す。NB: ナンブコムギ、NG: ネバリゴシ、Wx: モチコムギ、HA: 高アミロースコムギ、DM: 二重変異体を示す。

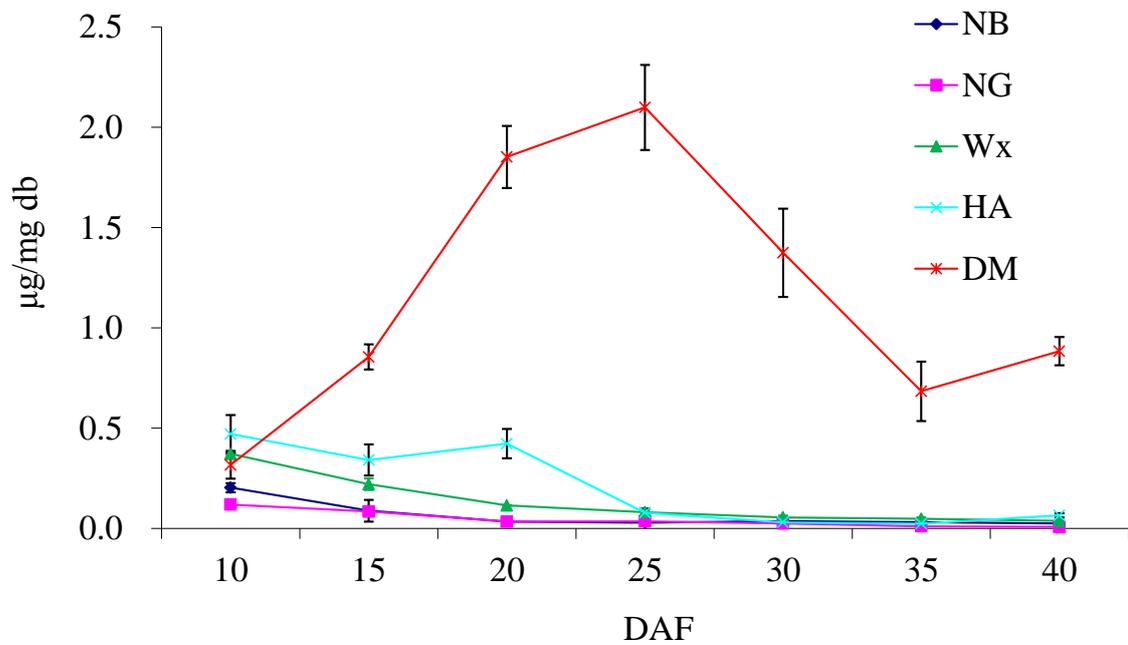


図 3-8 登熟過程における種子中マルトトリオース含量の推移

登熟過程におけるマルトトリオース含量の推移を示す。全粒粉から DMSO 抽出をおこない FACE 法にて分析した。NB: ナンブコムギ、NG: ネバリゴシ、Wx: モチコムギ、HA: 高アミロースコムギ、DM: 二重変異体を示す。

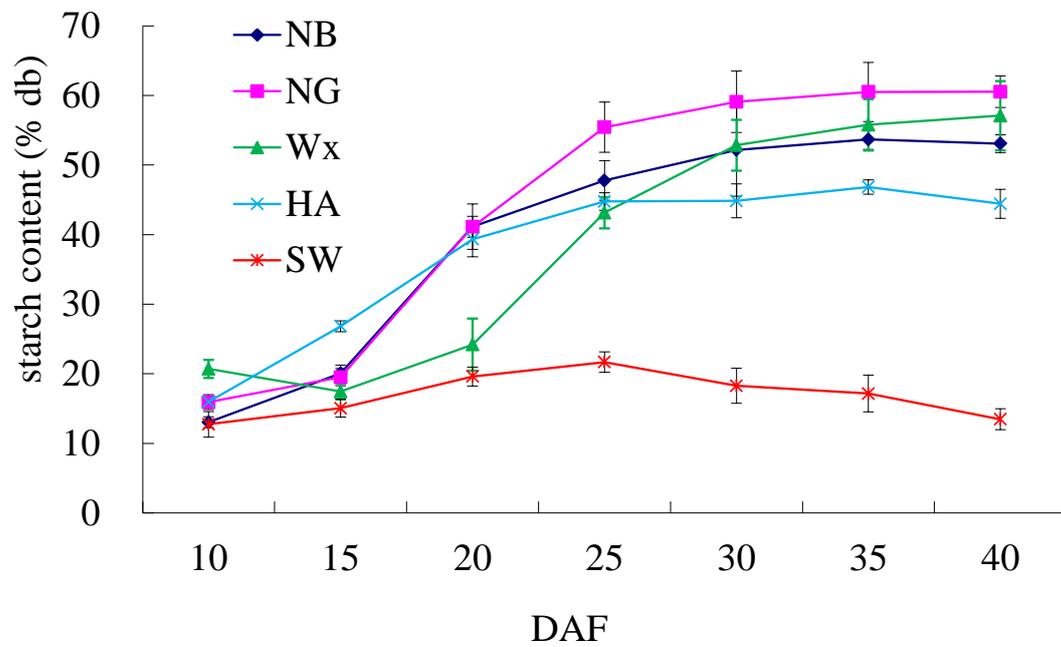
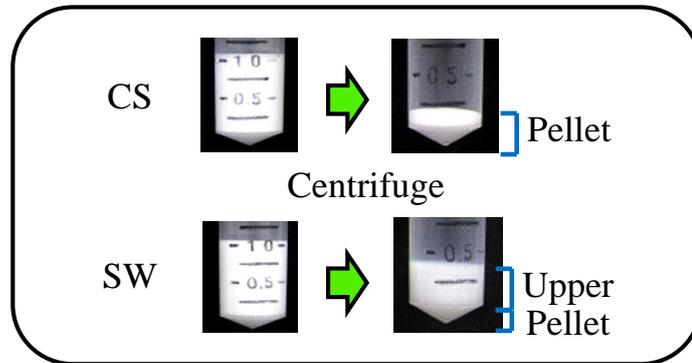


図 3-9 登熟過程における種子中澱粉含量の推移

登熟過程における種子中の澱粉含量の推移を示す。NB:ナンブコムギ、NG:ネバリゴシ、Wx:モチコムギ、HA:高アミロースコムギ、SW: Sweet Wheat を示す。

(A)



(B)

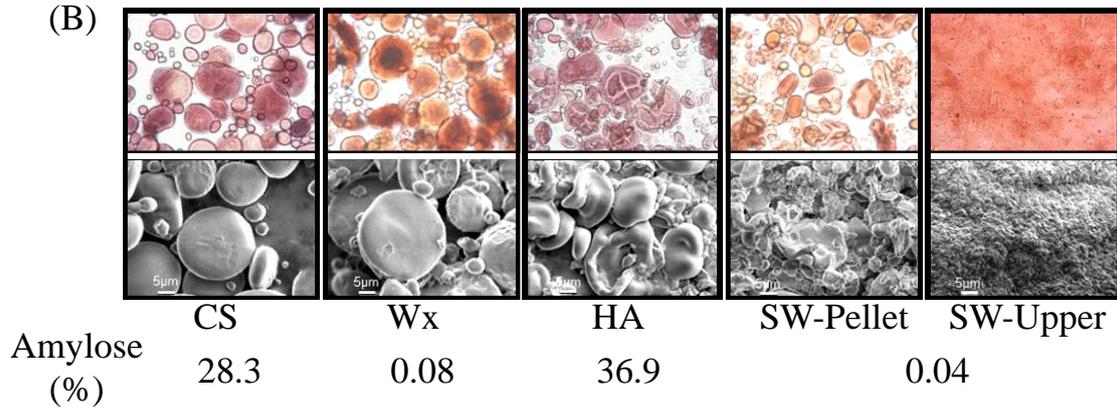


図 3-10 完熟種子より単離された澱粉

(A) 完熟種子より単離された澱粉懸濁液の遠心(17,800 ×g、10 分間)後の様子を示す。
(B) 単離された澱粉のヨウ素染色後の光学顕微鏡写真(上段)、および電子顕微鏡写真(下段)。SW は Upper と Pellet に分けて観察した。CS : Chinese Spring、Wx : モチコムギ、HA : 高アミロースコムギ、SW : Sweet Wheat を示す。

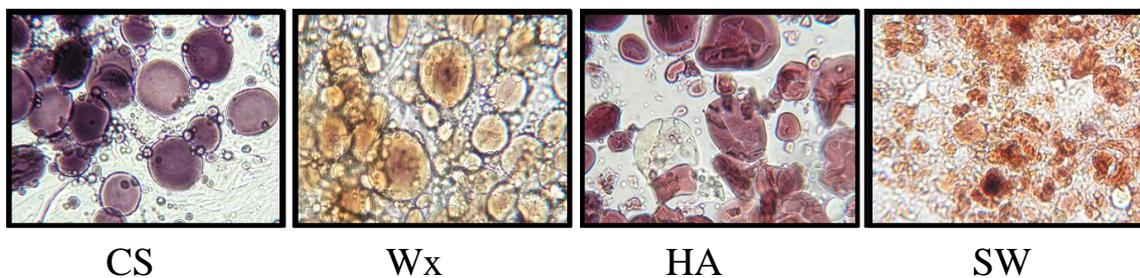


図 3-11 未熟種子における澱粉の光学顕微鏡観察図

開花後 25 日目の種子を収穫後、スライスしてヨウ素ヨウ化カリウム溶液を滴下し光学顕微鏡下にて観察した。CS : Chinese Spring、Wx : モチコムギ、HA : 高アミロースコムギ、SW : Sweet Wheat を示す。

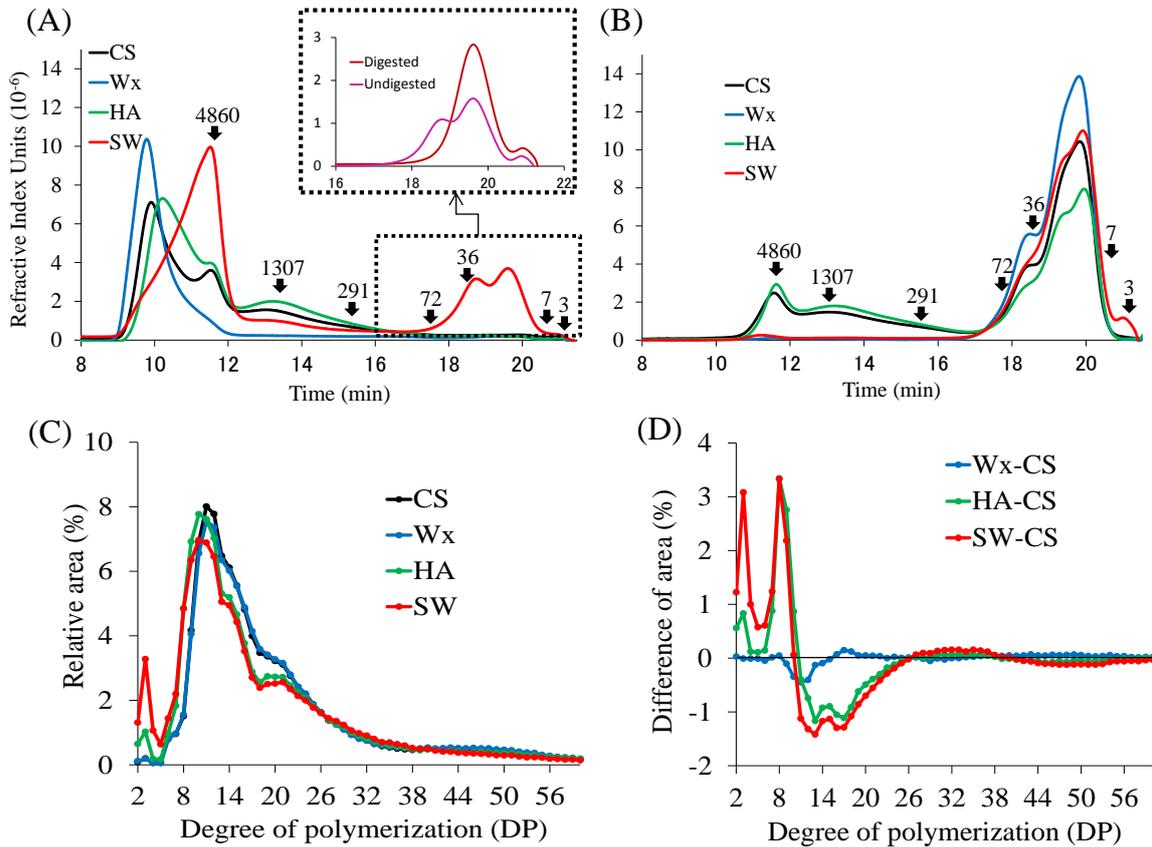


図 3-12 澱粉の分子量分布とアミロペクチン単位鎖長分布

(A) 未脱枝処理の各澱粉の HPSEC 分析結果を示す。矢印で示した位置はプルランから推定される重合度を示す。嵌め込み図は、SW における 2 峰性ピーク（点線で囲まれた溶出ピーク）を回収後、未処理 (undigested) および isoamylase による脱枝処理 (digested) をおこない、同様に分析した結果である。(B) 同 isoamylase 処理後の HPSEC 分析結果である。(C) 単離した澱粉の FACE 法による単位鎖長分布解析の結果を示す。(D) Wx、HA、SW の単位鎖長分布を CS を基準とした差分で示す。CS : Chinese Spring、Wx : モチコムギ、HA : 高アミロスコムギ、SW : Sweet Wheat を示す。

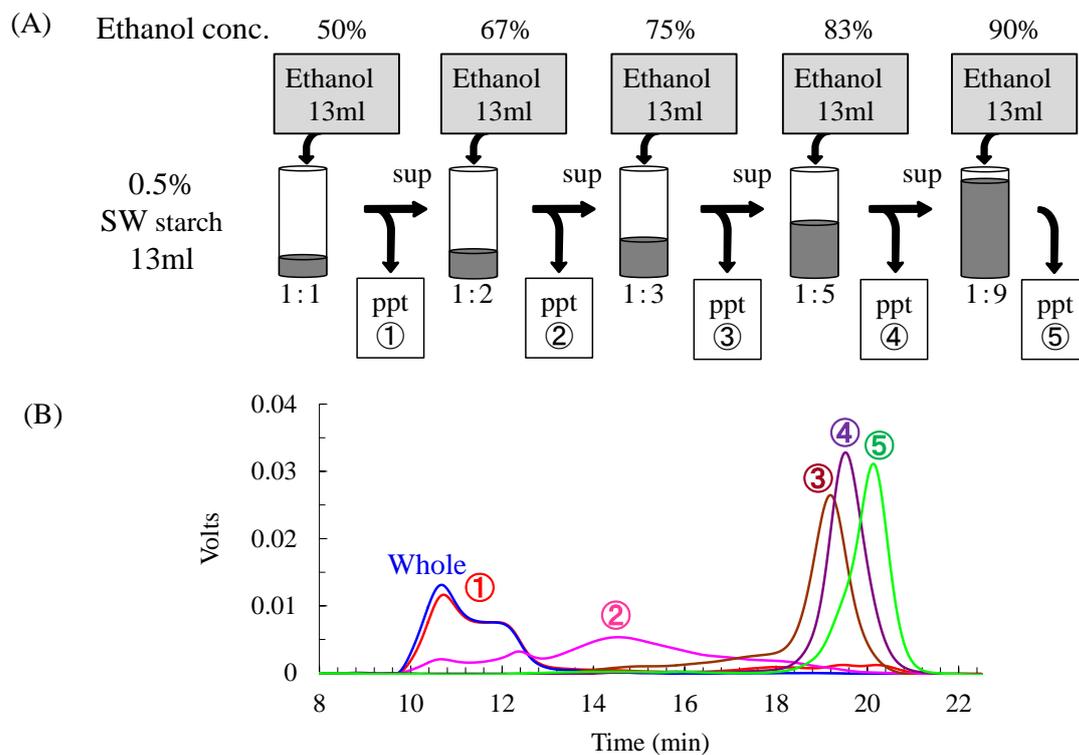


図 3-13 SW 澱粉のエタノール沈殿による分画と、各画分の HPSEC 分析

(A) DMSO 中に加熱分散した SW 澱粉にエタノールを順次加えて沈殿 (ppt①～⑤) を回収した。(B) 回収した各画分を DMSO 中で分散し、HPSEC 分析をおこなった(未脱枝)。” whole” は未分画の澱粉を示す。

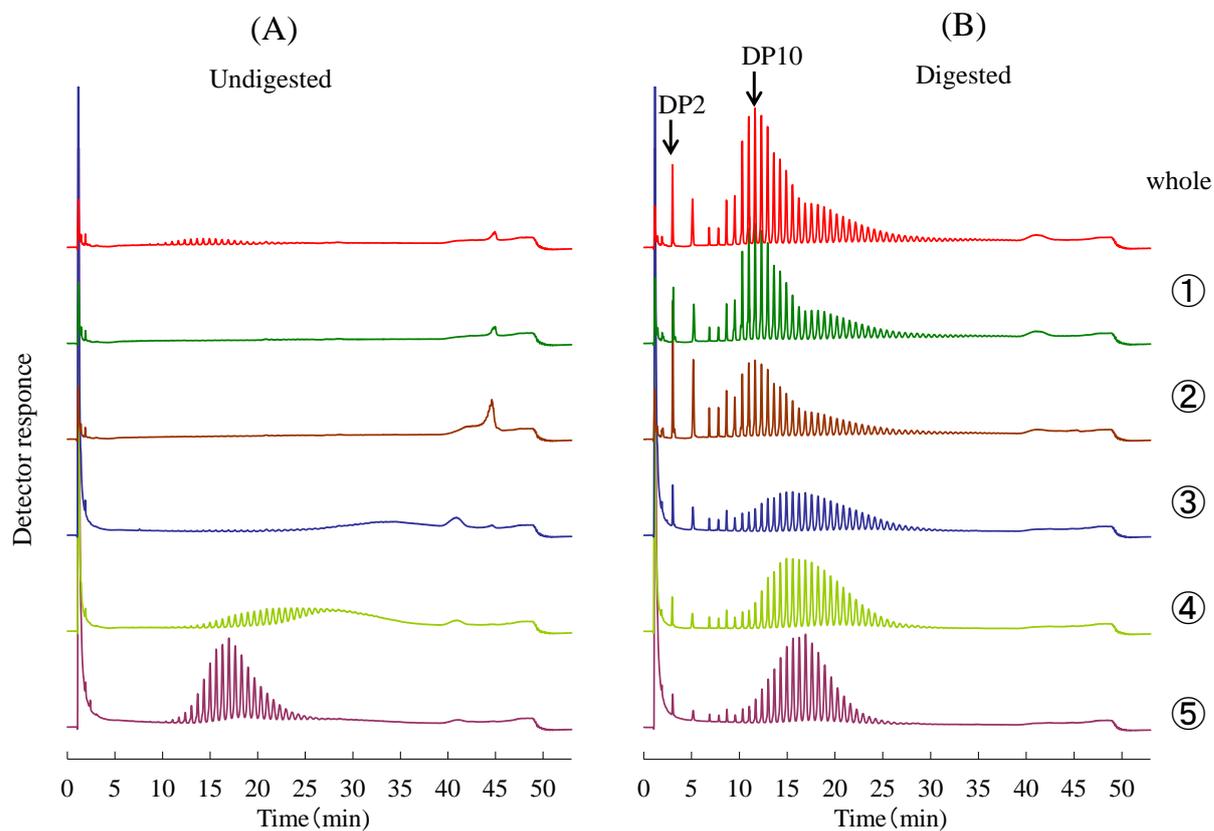


図 3-14 エタノール沈殿により分画した SW 澱粉の HPAEC 分析

エタノール沈殿により得られた SW 澱粉画分①から⑤を isoamylase 未処理 (A) および消化後 (B) に HPAEC-PAD 分析をおこなった。Whole : 未分画の澱粉、①50%エタノール沈殿画分 (ppt①)、②67%エタノール沈殿画分 (ppt②)、③75%エタノール沈殿画分 (ppt③)、④83%エタノール沈殿画分 (ppt④)、⑤90%エタノール沈殿画分 (ppt⑤) を示す。

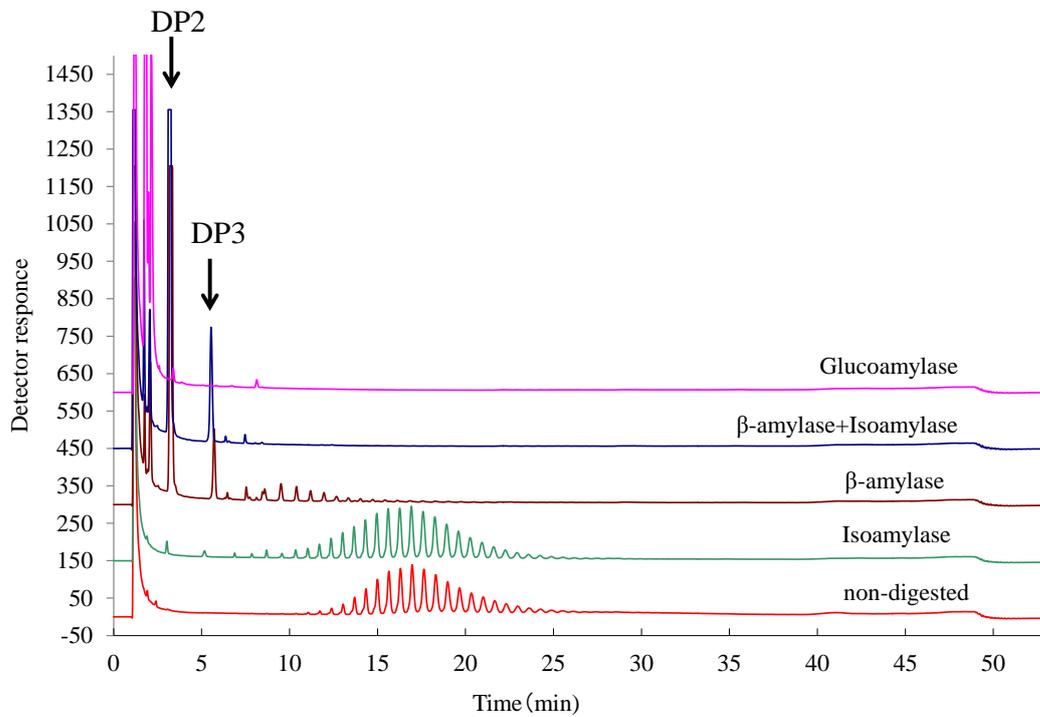


図 3-15 SW 澱粉画分⑤の各種分解酵素による消化性

SW 澱粉画分 (ppt⑤) を glucoamylase、 β -amylase、isoamylase、 β -amylase および isoamylase で加水分解後、HPAEC-PAD 法にて分析した。

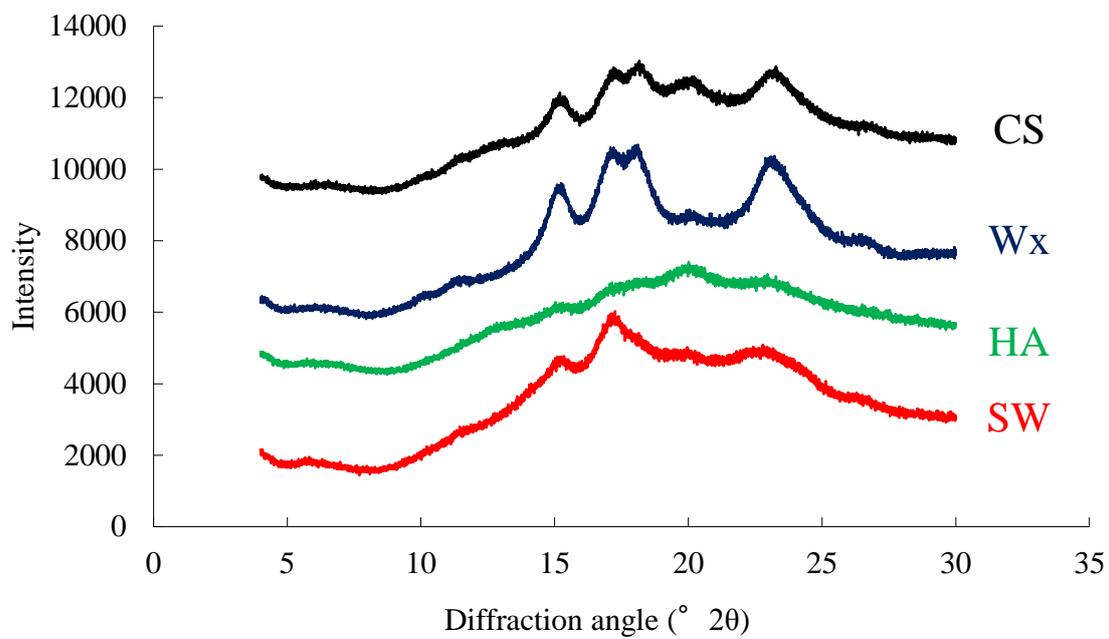


図 3-16 各澱粉の X 線回折(XRD)分析

各澱粉を X 線回折により分析した。CS : Chinese Spring、Wx : モチコムギ、HA : 高アミロースコムギ、SW : Sweet Wheat を示す。

表 3-1 熱分析による糊化特性分析^a

Sample	Gelatinization peak				Amylose-Lipid Dissociation Peak			
	<i>To</i> (°C)	<i>Tp</i> (°C)	<i>Tc</i> (°C)	ΔH (J/g)	<i>To</i> (°C)	<i>Tp</i> (°C)	<i>Tc</i> (°C)	ΔH (J/g)
CS	55.5	60.2	65.9	10.1	91.0	95.4	100.2	1.2
Wx	57.2	63.1	73.5	13.6	ND	ND	ND	ND
HA	44.8	50.2	55.1	5.0	87.9	93.5	98.6	2.1
SW	43.4	48.5	61.9	5.9	ND	ND	ND	ND

^a *To*:糊化開始温度、*Tp*:糊化ピーク温度、*Tc*:糊化終了温度、 ΔH :エンタルピー変化量を示す。ND:ピークは検出されなかった。CS:Chinese Spring、Wx:モチコムギ、HA:高アミロースコムギ、SW:Sweet Wheatを示す。

第四章

甘味種コムギ完熟種子の成分特性

第一節 序

新規に育成された GBSSI/SSIIa 二重変異体である、Sweet Wheat (SW)には種子中に糖が蓄積され、一方澱粉含量は低下していることが示された。その結果、その他の成分含量も、一般的なコムギに比べれば大きく異なっていることが予想される。食品の、水分、灰分、蛋白、脂質、炭水化物の5成分を中心とした成分組成を把握することは食品開発をおこなう上で必須であり、また SW に適した用途開発をおこなうためにも重要である。よって、本章では SW の完熟種子における一般的成分の分析をおこない、他のコムギ品種系統と比較することを目的とした。

第二節 材料及び方法

1) 植物材料

前章で得られた SW の F₄ 集団から比較的成熟期が早く、草丈が低い 1 系統を選抜し、これを自殖して得た F₆ 世代の完熟種子を材料に用いた。比較対照として SW の親系統のモチコムギ (Wx) および高アミロースコムギ (HA)、および Chinese Spring (CS) を用いた。これら材料は、播種後 3 葉期に 5°C で春化处理をおこない、その後は温度 25/17°C (日中/夜間) 下で成熟期まで東北農研内の温室にて栽培された。また、2007、2008 年秋 (9 月下旬) に、東北農研の圃場に播種し、いずれも翌年夏 (7 月中旬) に収穫した完熟種子を用いた。比較対照としては、同時に東北農研で播種収穫された「ゆきちから」、「キタカミコムギ」、さらに 2008 年群馬県産の「農林 61 号」を用いた。

2) 全粒粉の調製

第二章と同様におこなった。

3) 澱粉含量分析

超遠心粉砕機を用いて調製した全粒粉を用いて、第二章と同様に澱粉含量を分析した。

4) 糖含量分析

全粒粉 20 mg あたり 80% エタノール 800 μ l を加えて密封し、沸騰水中で 20 分間の加熱により糖を抽出した。この後は第三章の HPLC 法と同様におこなった。

5) タンパク、灰分、脂質含量分析

タンパク含量 (protein)、灰分含量 (ash)、脂質含量 (lipid) はそれぞれ、AACC 法 46-30、08-02、30-10 に従って、全粒粉を用いて分析した (AACC methods 10th ed.)。

6) 植物繊維含量分析

総食物繊維含量 (不溶性食物繊維 (insoluble dietary fiber; IDF)、高分子可溶性食物繊維 (high molecular weight-soluble dietary fiber; HMW-SDF)、低分子可溶性食物繊維 (low molecular weight-soluble dietary fiber; LMW-SDF)) は、食品衛生検査指針 (理化学編) に従い分析した。この方法において LMW-SDF 含量測定のために調製したエタノール可溶性画分は、これに含まれるフルクタン含量の測定にも用いた。グリセロールの添加後、サンプルを 70 μ l ずつ分注し、20 mM の酢酸ナトリウムバッファー (pH4.5) 中、① fructanase (2.5 U/ml の exoinulinase と 0.25 U/ml の endoinulinase (共に Megazyme 社) を含む)、② α -galactosidase (20 U/ml) (Megazyme 社)、③ 酵素未添加、による加水分解処理をおこなった。各サンプルとも 40°C で 4 時間反応をおこなった後、HPLC を用いて分析

した。HPLCによる分析では、Ultron PS 80-Nカラム(id 8.0 mm、300 mm、信和化工社、京都・日本)を用い、alliance HPLC システム (示差屈折検出器 e2695 を含む) にて分析した。分離溶媒には超純水を用い、流速 0.5 ml/min で分離した。カラム温度は 60°C、検出器温度は 30°Cとした。LMW-SDF に含まれるフルクタン全粒粉に対する含量は次式により算出した。

$$\text{全粒粉中のフルクタン含量 (\%)} = a \times [(b-c)/b - (b-d)/b] = a \times (d-c)/b$$

ここで、a; LMW-SDF 含量 (%)、b ; 酵素未処理 (反応③) における LMW-SDF ピークの合計面積、c; fuructanase 処理後 (反応①) のピーク合計面積、d; α -galactosidase 処理後 (反応②) のピーク合計面積、である。

7) 総フルクタン含量分析

総フルクタン含量 (total fructan) は Fructan Assay kit (Megazyme 社) を用い、マニュアルに従って分析した (α -galactosidase 処理によるラフィノースシリーズのオリゴ糖の除去処理を含む)。

8) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成分析は AACC 法 07-01、07-11、07-20 に従った (AACC methods 10th ed.)。

9) 遊離アミノ酸含量分析

遊離アミノ酸は、100 mg の全粒粉に、75%のエタノールを 5 ml 加えて沸騰水中で 5 分間加熱後、ローテーターで 30 分間室温にて攪拌して抽出した。800×g で 10 分間室温で遠心分離して上清を回収した。上清 1 ml を Millex-LH および Ultrafree-MC を用いて濾過した。濾液 10 μ l を 70 μ l の ACCQTag Fluor Borate Buffer と 20 μ l の AccQTag fluor reagent (日本ウオーターズ社) を用いて 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate によりアミノ酸を誘導体化した。HPLC システム(waters 717 オートサンブラ、waters 600 controller, TOSOH CO-8000 カラムオーブンをを用い、AccQ Tag カラムでアミノ酸を分離した (39°C)。分離溶媒には A : アミノ酸高分離バッファーA (56 mM トリエチルアミンを含む 100 mM 酢酸ナトリウムバッファー pH5.7)、B : 高分離バッファーB (56 mM トリエチルアミンを含む 100 mM 酢酸ナトリウムバッファー pH6.8)、C : アセトニトリル、D : 超純水の 4 溶媒を用いて、次のプログラムにより分離した。なお濃度勾配は全て直線グラジエントとした。0 min: A:B:C:D=90:10:0:0 (1.0 ml/mi)、0.5 min: A:B:C:D=89:10:1:0 (1.0 ml/min)、17 min: A:B:C:D=88:10:2:0 (1.0 ml/mi)、24 min: A:B:C:D=86:9:5:0 (1.0 ml/mi)、32 min: A:B:C:D=63:25:12:0 (1.0 ml/mi)、33.5 min: A:B:C:D=0:88:12:0 (1.3 ml/mi)、33.8 min: A:B:C:D=0:88:12:0 (1 ml/mi)、33.8 min: A:B:C:D=0:88:12:0 (1.3 ml/mi)、37 min: A:B:C:D=0:87:13:0 (1.3 ml/mi)、48min: A:B:C:D=0:85:15:0 (1.3 ml/mi)、48.1min: A:B:C:D=0:0:60:40 (1.3 ml/mi)。トリプトファンの検出には UV 検出器 (WATERS

486 Tunable Absorbance Detector、日本ウォーターズ社) を用いて 254 nm における吸収波長を測定し、これ以外のアミノ酸の検出には、蛍光検出器 (TOSOH FS-8010、東ソー社、東京・日本) を用い、励起波長 250 nm、蛍光波長 390 nm で測定した。

第三節 結果

1) 一般成分

CS、Wx、HA、SW の種子重量、灰分、タンパク、脂質、炭水化物（内、食物繊維と澱粉を個別に記載）の含量の分析結果を表 4-1 に示す。SW の種子重量は軽く、CS の約 71%、Wx の約 64%、HA の約 81%であった。灰分及びタンパクは、他系統と比較し統計的には有意に高い値となったが、顕著な違いとは言えなかった。その一方、脂質は大幅に増加し、CS の約 2.6 倍、Wx の約 2.9 倍、HA の約 1.9 倍となった。炭水化物（総量）(carbohydrate) は SW でやや高い値となったが、その違いは顕著ではなかった。しかし、炭水化物中の個々の成分に着目すると、食物繊維では、(IDF) + (HMW-SDF) および (LMW-SDF) のどちらにおいても顕著に高い値を示し、逆に澱粉は著しく低い値となった。以上の結果から、SW は、CS や Wx や HA と比較し、灰分、タンパク、総炭水化物含量においては基本的に同様の値を示す一方、炭水化物の組成については著しい特徴を示すことがわかった。

2) 完熟種子中の糖含量

SW の特徴である糖（スクロース、グルコース、フルクトース、マルトース）の蓄積量の高さは完熟種子においても維持されていた（表 4-2）。SW 完熟種子中のそれぞれの含量は、CS と比較して、3.5、8.0、4.0、11.4 倍であった。これらの比率は Wx と比較した場合でも同程度であった。一方、HA と比較した場合では、それぞれ 1.8、3.2、1.8、5.7 倍と差は小さくなっていた。これは、第三章に示されたように HA でもこれら糖は CS や Wx に比べて若干高い蓄積が見られるためである。SW 完熟種子中では、スクロース含量がもっとも高く、次いでマルトース、グルコース、フルクトースであった。これら傾向は第三章で示された登熟期後半の結果（図 3-7）とも一致していた。

3) LMW-SDF の組成と総フルクタン含量

SW 全粒粉における LMW-SDF 含量は、CS、Wx、HA それぞれに対して、4.3、3.3、3.0 倍であり、SW で顕著な増加を示していた（表 4-1）。LMW-SDF 画分は、78%エタノール可溶性の低分子量食物繊維で、低分子の難消化性オリゴ糖等が含まれる。このようなオリゴ糖の候補として、コムギには 1-kestose や rafinose、stachyose、fructo-oligosaccharide (フルクタン) などの 3 糖以上の難消化性オリゴ糖が挙げられる (MacArthur and D' Appolonia, 1979, Henry and Saini, 1989)。LMW-SDF 画分に含まれるオリゴ糖の定性と定量を目的に、LMW-SDF 画分を fructanase と α -galactosidase による加水分解処理をおこなった。 α -galactosidase は、ラフィノースやスタキオース、ベルバスコースなどラフィノースシリーズのオリゴ糖を分解するがフルクタンは分解しない。これに対して fructanase はフルクタンに加えてラフィノースシリーズのオリゴ糖も分解する酵素である。

これら酵素による加水分解の結果を、未消化（酢酸ナトリウムバッファのみ）の

LMW-SDF 画分のクロマトグラムと合わせて図 4-1 に示す。SW の LMW-SDF 画分は、fructanase 処理によって 12.3%まで低下した (図 4-1B)。これに対して α -galactosidase による消化では 92.1%が分解されずに残存していた (図 4-1B)。このため、fructanase と α -galactosidase による分解率は、それぞれ 87.7%と 7.9%と見積もられた。これは LMW-SDF 画分の 79.8%がフルクタンであることを示していた。全粒粉中、LMW-SDF 画分は 8.5%であるため (表 4-1)、この画分に含まれるフルクタンは、全粒粉中の 6.8%に相当する。また、コントロールの LMW-SDF のクロマトグラムには複数のピークが観察されたことから (図 4-1A)、この画分は異なった重合度のオリゴ糖から構成されていると考えられた。これらピークは CS、Wx、HA にも検出されており、保持時間に違いは見られなかったことから、SW 由来の LMW-SDF 画分に含まれるフルクタンは、他のコムギ系統に含まれるものと同じ重合度を持つ分子であると推測した。

LMW-SDF 画分には、78%エタノール不溶性の、比較的分子量の大きいオリゴ糖は含まれない。よって種子中のフルクタンが全てこの画分に抽出されているとは限らない。このため全粒粉中のフルクタン含量 (総フルクタン含量) を測定し、LMW-SDF 画分に抽出されたフルクタン含量と比較した (表 4-3)。どの系統においても、総フルクタン含量は、LMW-SDF 画分に含まれるフルクタン含量から推定された値と非常に近い値を示していた。また SW における総フルクタン含量は、CS の 6.5 倍、Wx や HA の 3.6 倍であった。以上の結果から、SW 全粒粉中のフルクタン含量は他のコムギに比べて有意に高く、このフルクタンの大部分は比較的 low molecular weight のオリゴ糖から構成されていることが明らかとなった。

4) アミノ酸組成と遊離アミノ酸含量

全粒粉中のアミノ酸組成は、4 系統に大きな違いは見られず (図 4-2)、従来の知見とも一致していた (Labanauskas et al., 1974, del-Molino et al., 1988)。しかし、遊離アミノ酸含量は SW とそれ以外のコムギ系統間で大きく異なった (図 4-3)。総遊離アミノ酸含量は、CS、Wx、HA、SW のそれぞれで、2.4、3.4、3.4、9.8 mg/g であった。CS の 20 種個々の遊離アミノ酸含量は、以前に報告されているデータとほぼ同程度で (Labanauskas et al., 1974)、Wx や HA も同様の結果であった。これらと比較して SW では、20 種のアミノ酸のうち 18 種の含量が顕著に高くなっていた。SW で最も含量の高いアミノ酸はプロリンで、全遊離アミノ酸のうち 24.1%を占め、CS や Wx、HA と比べると、それぞれ 57.8、29.2、8.7 倍の蓄積を示した。プロリンに次いで SW での増加が大きかったグルタミンは、CS、Wx、HA の 23.3、14.1、19.2 倍の蓄積であった。一方で、アスパラギン酸は、SW での増加は認められず、CS や Wx と同程度、トリプトファンは、CS と SW が同程度で Wx や HA の半分程度であった。

5) 栽培環境による変動

2007 年から 2008 年および 2008 年から 2009 年にかけて圃場で栽培収穫された SW、ゆき

ちから、キタカミコムギおよび 2008 年群馬県産農林 61 号の成分を比較した(表 4-4)。ゆきちから、キタカミコムギおよび農林 61 号は、タンパク含量には違いがあるものの、その他の成分には大きな差は見られなかった。これらに対して SW は、2008 年、2009 年共に、灰分、タンパク、脂質、糖含量、フルクタン含量、遊離アミノ酸含量が高く、澱粉含量が低かった。一方、圃場と温室収穫種子の成分を比較すると、2008 年圃場栽培 SW は温室栽培 SW とほぼ同程度の成分含量を示したのに対して、2009 年の場合、圃場栽培では、糖含量（フルクトース、グルコース、スクロース、マルトースの合計値）は温室栽培に比べて 1.7 倍、遊離アミノ酸含量は 2.9 倍の蓄積が見られた。また、2009 年の SW 完熟種子は 2008 年に比べて、穂発芽粒が高い頻度で観察された。

第四節 考察

本章では、SW 完熟種子の成分を分析し、脂質やフルクトオリゴ糖（フルクタン）、遊離アミノ酸が増加していることを見出し、澱粉合成酵素の欠失がコムギ種子内成分に多面的に影響を及ぼすことを明らかにした。

SW 未熟種子における高い糖含量は、完熟種子でも維持されていた。第三章では登熟過程における糖含量は、35 日目以降ほぼ一定となる傾向にあることが観察された（図 3-7）。完熟種子中の各糖含量は、40 日目とほぼ同程度の値であったことから、糖含量は 35 日目以降、完熟期までほぼ一定に保たれると考えられた。澱粉含量についても同様に、図 3-9 の 35 から 40 日目と完熟のものではほぼ同程度の値であった。未熟種子ほどには感じられなかったものの、完熟 SW 種子全粒粉にもほのかに甘さは感じられた。加えて、SW には他のコムギ全粒粉とは異なる独特の風味が感じられ、糖や澱粉含量以外にも成分的な変化が伴っていることが予測された。

澱粉合成に関わる 2 種類の酵素の欠失が、澱粉とは異なる多糖類であるフルクタンの蓄積に影響を与えたことは非常に興味深い。フルクタンの生合成における基質はスクロースであり（Ritsema and Smeekens, 2003）、SW 種子でのフルクタンの蓄積は、成育過程を通じて種子内部でスクロースが過剰となったため（図 3-7C）に、合成が促進された結果である可能性が考えられる。また、フルクタンはストレスにより誘導され蓄積する代謝産物としても知られており、低温や乾燥、高塩濃度にさらされた植物体での蓄積が報告されている（Kerepesi and Galiba, 2000、Tognetti et al., 1990）。しかし、温室栽培の SW は、温度コントロールされた条件下で栽培されたため、環境ストレスが原因で蓄積が増加したとは考えにくい。一方、オオムギでは、SSIIa を欠失した M292 変異体種子で糖やフルクタンの蓄積が増加することが報告されている（Clarke et al., 2008）。この変異体の種子登熟過程において、*dnaK* や *hsp* 等ストレス応答性遺伝子の発現レベルが上昇していたことから、彼らは糖の蓄積量の増加が種子内におけるストレス様の状況、例えば浸透圧差などを作り出し、これがストレス応答性機構を活性化させたと考察している。SW においても同様なメカニズムによってフルクタンが蓄積した可能性が考えられる。

フルクタンは大腸内の細菌叢のうち乳酸菌などの有用微生物を選択的に増殖刺激するプレバイオティクス素材として知られ、ミネラル吸収促進効果や血糖値上昇の抑制効果も報告されている（Ritsema and Smeekens, 2003、Scholz-Ahrens, and Schrezenmeir, 2007、Abrams et al., 2005）。SW 種子の総食物繊維が 37.2%にも上り、かつフルクタンが通常より多く含まれることを考慮すると、SW は健康機能増進に有用な素材であると期待される。コムギ種子中のフルクタン含量は品種によって異なり（Huynh et al., 2008a）、この含量に関連する QTL は 6D あるいは 7A 染色体上に見出されている（Huynh et al., 2008b）。SW にこれらの QTL を導入することで、フルクタン含量をより高めることができれば、より有望な素材となる可能性がある。フルクタンはフルクトースの結合様式の違いから、イヌリ

ン型、イヌリンネオ型、レバン型、グラミナン型に分類されており (Shiomi, 2008)、比較的研究が進んでいるのはイヌリン型やイヌリンネオ型である。コムギの葉に蓄積されるフルクタンはグラミナンタイプであることは明らかにされているものの (Bancal, 1992)、種子に蓄積されるフルクタンの詳細な構造についてはほとんど知られていない。フルクタンのミネラル吸収促進効率には、フルクタンの分子量や構造が影響を与えることが分かっており (Coudray et al., 2003)、コムギ種子に含まれるフルクタンに同様の機能を期待できるかは今後の課題であろう。同様の機能が期待できる場合には、この含量の高い SW の利用価値は非常に大きいといえる。

SW 種子における遊離プロリン量は、全遊離アミノ酸中で最大の値を示し、その蓄積量は他のコムギに比べて突出していた (図 4-3)。プロリンは、フルクタン同様にストレス環境下で蓄積される分子としても知られている (Kumar et al., 2003、Wang et al., 2007、Poustini et al., 2007)。この点からも、SW 種子内で何らかのストレスが発生した可能性が示唆される。また、プロリンを含む遊離アミノ酸 (アスパラギン酸とトリプトファンを除く) の増加は、ストレスが原因でタンパク合成が抑制された結果である可能性も考えられる。登熟期に高温にさらされたイネの種子内においても遊離アミノ酸が増加し、同時に種子内貯蔵タンパク合成遺伝子の発現量が低下することが見出されている (Yamakawa and Hakata, 2010)。コムギでも、高塩濃度の土壌や水分の不足といったストレス環境下で栽培された場合に、植物体あるいは種子内での遊離アミノ酸増加が観察されており、イネ同様にタンパク合成の抑制によるものと推測されている (Labanauskas et al., 1978、Labanauskas et al., 1981、Kerepesi and Galiba, 2000)。よって種子内のタンパク合成が抑制されれば遊離アミノ酸の蓄積が増加する可能性は高い。ただし外部環境によるストレスとは異なり、糖の蓄積による高浸透圧のような種子内部で発生するストレスがタンパク合成の抑制を引き起こす可能性については、種子内部でのタンパク合成に関わる遺伝子発現等を確認する必要がある。一方で、遊離アミノ酸の増加は合成されたタンパクが分解されて蓄積した可能性も否定できない。予備試験的に登熟過程における種子内の総遊離アミノ酸量の推移を分析したところ、SW と他のコムギとの間では、遊離アミノ酸ごとに含量や変動パターンに違いが観察された。これらの中には登熟初期から中期にかけて含量が最も増加し、完熟期にかけては減少するものが見られた。このパターンは澱粉の分解によって生じると考えられるマルトースやマルトトリオース (図 3-7D、図 3-8) に似た傾向である。また登熟過程における胚乳ではプロテアソームサブユニットやアミノペプチダーゼ様タンパク等の発現も確認されていることから (Balmer et al., 2006、Guo et al., 2012)、タンパクの分解が起こっている可能性は考えられる。この可能性は、タンパクの部分分解物であるペプチドの含量を測定することなどで検証できると考えられる。遊離アミノ酸の蓄積増加は、あるいは第三章でも考察した澱粉と同様、タンパク合成の抑制と分解が同時に進行した結果である可能性もある。

CS, Wx, HA, SW の各サンプルにおける遊離アミノ酸含量は、タンパク量に対してそれぞれ

れ1、2、2、4%で比率的には大きくはない。しかしこの遊離アミノ酸がSW全粒粉に独特の風味をもたらした可能性がある。遊離アミノ酸はそれぞれに異なる味覚を呈する。SWで蓄積の多かったL-プロリンはわずかに苦味を呈する。L-アスパラギンは酸味、L-グルタミンは甘味を呈し、さらにこの2つは共に高濃度ではうま味も呈する(河合、2003)。上述したように、SW全粒粉に独特の風味が感じられたのは、これらの遊離アミノ酸の蓄積による影響もあると考えられる。

穀物種子を利用する場合、品質低下を招く穂発芽は大きな問題である。穂発芽は収穫期の高温多湿条件が引き金となり、穂についている種子が発芽する現象で、種子内のアミラーゼ活性が上昇し胚乳に蓄積された澱粉が分解される。2009年収穫期は、2008年に比べて高温多湿環境で推移し、このことがSWの穂発芽多発を招いた原因と考えられた。ただし同一条件で栽培された、ゆきちからやキタカミコムギには穂発芽は観察されておらず、SWは通常の品種系統に比べて穂発芽しやすい特性を持っていると示唆された。これはSWの完熟種子の品質に大きく影響する事項であり、今回観察された穂発芽性がGBSSI及びSSIIaの二重変異体に俱するものなのか、これ以外の遺伝的背景によるものなのか見極める必要がある。

第五節 図表

表 4-1 全粒粉中の一般成分組成^a

Sample	1000 kernel weight (g db) ^b	Ash (% db) ^c	Protein (% db) ^c	Lipid (% db) ^c	Carbohydrate ^d (% db)	Total dietary fiber		Starch (% db) ^c
						(IDF)+(HMW-SDF) (% db) ^e	(LMW-SDF) (% db) ^e	
CS	30.9a	2.36a	20.6a	3.1a	73.9	13.5a	2.0a	52.3a
Wx	34.2b	2.20b	15.8b	2.8a	79.2	14.0b	2.6b	56.9b
HA	27.0c	2.69c	22.6c	4.3b	70.4	18.2c	2.8b	42.8c
SW	22.0d	3.00d	23.0d	8.0c	66.0	28.7d	8.5c	17.8d

^a 同一列内の異なるアルファベットは、多重比較検定（Scheffe 法）において 5%水準で有意差があることを表す。

^b 100 粒の重量を測定し 10 倍している（n=5）

^c 3 反復測定による結果を示す。

^d Ash、Protein、Lipid の合計値を 100%から差し引いた値を示す。

^e 2 反復測定による結果を示す。

表 4-2 全粒粉中の糖含量^a

Sample	Fructose (mg/g db)	Glucose (mg/g db)	Sucrose (mg/g db)	Maltose (mg/g db)	Total sugars (mg/g db) ^b
CS	0.2a	0.2a	12.3a	0.5a	13.2a
Wx	0.4b	0.3a	14.8a	0.7a	16.2a
HA	0.4b	0.5b	27.9b	1.0a	29.7b
SW	0.7c	1.6c	49.1c	5.7b	57.0c

^a 同一列内の異なるアルファベットは、多重比較検定 (Scheffe 法) において 5%水準で有意差があることを表す(n>3)。

^b フルクトース、グルコース、スクロース、マルトースの合計値を示す。

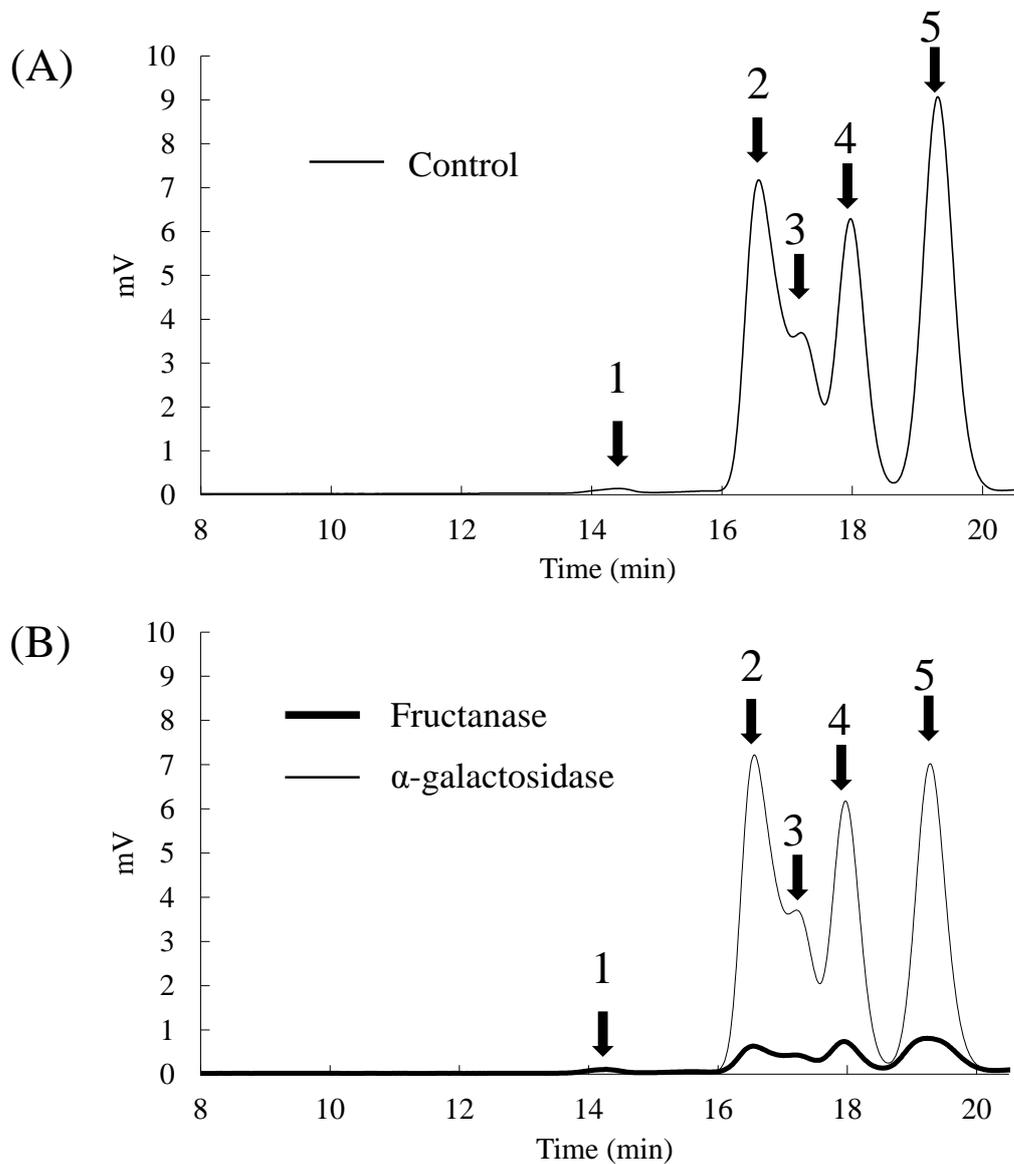


図 4-1 SW 由来 LMW-SDF 画分の fructanase、 α -galactosidase による消化性

SW より抽出された LMW-SDF 画分を、(A) 酵素未処理、(B) fructanase (太線) および α -galactosidase (細線) で消化後、HPLC で分析した。(A) および (B) の両者で対応するピークを同一の数字で示している。

表 4-3 LMW-SDF 画分、および全粒粉中のフルクタン含量^a

Sample	Fructan in LMW-SDF (% db) ^b	Total fructan (% db) ^c
CS	1.0a	1.1a
Wx	1.7b	2.0b
HA	1.8b	2.0b
SW	6.8c	7.2c

^a 同一列内の異なるアルファベットは、多重比較検定 (Scheffe 法) において 5%水準で有意差があることを表す (n>3)。

^b 全粒粉に対する LMW-SDF 画分含量および LMW-SDF 画分中のフルクタン含量から算出した全粒粉中のフルクタン含量 (推定値)。

^c Fructan assay kit を用いて分析した全粒粉中のフルクタン含量。

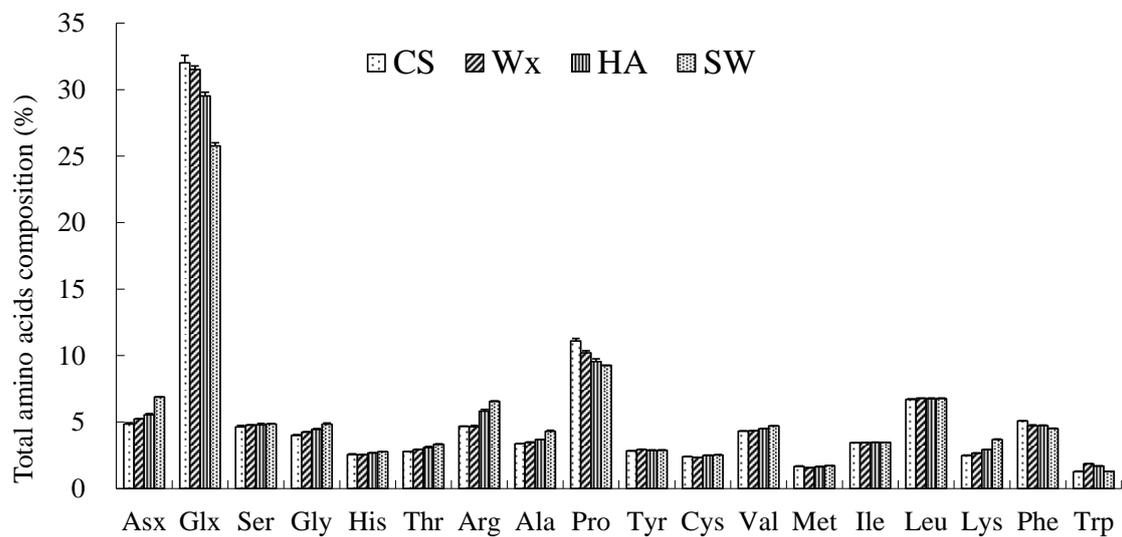


図 4-2 各全粒粉における総アミノ酸量比

各全粒粉に含まれる総アミノ酸量に対して、各アミノ酸の構成比率を百分率で示す。Glxはグルタミンおよびグルタミン酸、Asxはアスパラギンおよびアスパラギン酸を含む。

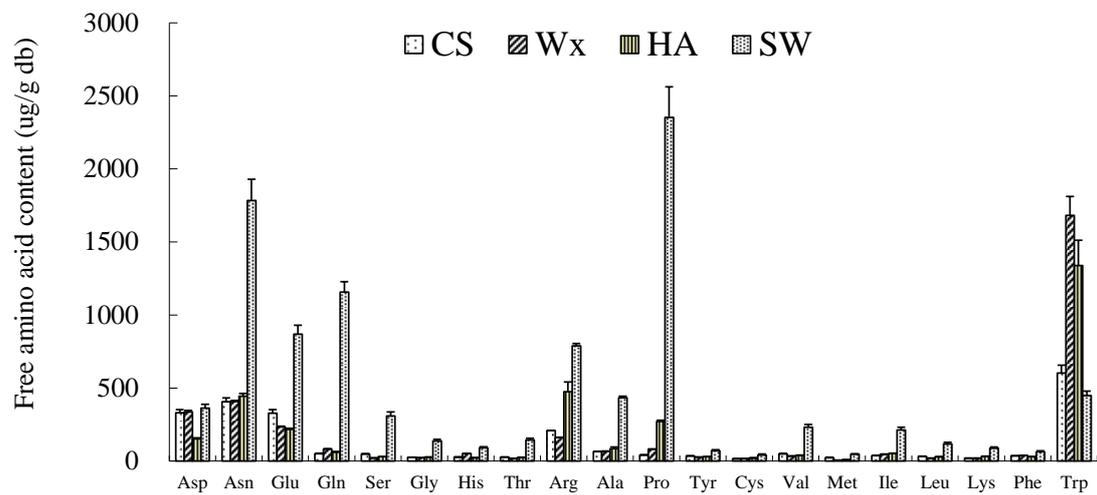


図 4-3 各全粒粉に含まれる遊離アミノ酸含量

全粒粉より遊離アミノ酸を抽出し、誘導体化後、HPLCにて分析した。

表 4-4 コムギ種子各種成分の栽培年次による変動

Sample	Season	Ash (% db)	Protein (% db)	Lipid (% db)	Starch (% db)	Total sugars (mg/g db) ^b	Total Fructan (% db)	Total Free Amino Acids (mg/g db) ^c
SW	2008	2.54 ± 0.01a	20.8 ± 0.1a	9.5 ± 0.5a	16.3 ± 0.9a	52.5 ± 1.4a	10.4 ± 0.6a	14.0 ± 1.4a
	2009	2.47 ± 0.01a	22.0 ± 0.1b	9.4 ± 0.2a	15.1 ± 0.9a	95.5 ± 2.4b	7.3 ± 0.1b	28.2 ± 5.2b
YKC	2008	1.86 ± 0.01b	16.6 ± 0.0c	3.0 ± 0.1b	61.9 ± 1.3bc	9.4 ± 0.3c	1.5 ± 0.2c	0.9 ± 0.0c
	2009	1.88 ± 0.00b	16.3 ± 0.0d	2.9 ± 0.2b	60.4 ± 1.3bc	8.8 ± 0.1c	1.2 ± 0.0c	1.5 ± 0.3c
KTKM	2008	1.75 ± 0.01cd	15.0 ± 0.1e	2.8 ± 0.1b	62.5 ± 1.3bc	10.3 ± 0.6c	1.2 ± 0.0c	1.3 ± 0.1c
	2009	1.80 ± 0.00c	14.9 ± 0.1e	2.8 ± 0.1b	63.2 ± 1.1b	9.5 ± 0.7c	1.2 ± 0.1c	1.5 ± 0.4c
N61	2008	1.90 ± 0.01b	10.6 ± 0.1f	2.6 ± 0.2b	61.2 ± 1.2bc	9.1 ± 0.4c	1.2 ± 0.1c	0.9 ± 0.1c

^a YKC; ゆきちから、KTKM; キタカミコムギ、N61; 農林 61 号を示す。

^b フルクトース、グルコース、スクロース、マルトースの合計値。

^c 20 遊離アミノ酸の合計値。

第五章

総合考察

第一節 starch synthase IIa 変異体および甘味種コムギの実用化に向けた課題と今後の応用

本論文では、コムギ澱粉合成酵素変異体に関する研究をおこない、その結果、SSIIa 欠失変異による澱粉特性への影響、また GBSSI と SSIIa の二重変異の澱粉特性や種子特性への影響を中心に新たな知見が得られた。

第一章では、アミロペクチン合成に係わる *SSIIa* 変異を、品種・系統に効率良く導入するための DNA マーカーを開発した。簡単には、まず 3 ゲノム由来の *SSIIa* が全て野生型である通常品種の同遺伝子のゲノム配列を全て決定した。次に、各ゲノム由来の *SSIIa* タンパクをそれぞれ欠失した 3 種の部分変異体系統の各遺伝子の配列を決定し、野生型配列と比較した。その結果、野生系統からは、*SSIIa-A1* (115 kDa)、*-B1* (100 kDa)、*-D1* (108 kDa) タンパク質をコードする 3 種の遺伝子配列を明らかにできた。それらとの比較により、変異型 *SSIIa-A1* では、開始コドンを含む 289 塩基の欠失と 8 塩基の filler 配列の挿入が、*SSIIa-B1* ではエクソン 8 への 175 塩基の挿入が、さらに *SSIIa-D1* ではエクソン 5 とイントロン 5 のジャンクションを含む 63 塩基の欠失が確認された。これらの配列情報を用いて、野生型と変異型の *SSIIa* を、PCR 増幅産物のサイズの違いで識別可能な、共優性 DNA マーカーを開発した。

第二章では、開発した DNA マーカーを用いた連続戻し交雑により、西日本の普及品種に変異型 *SSIIa* 遺伝子を導入した、野生型も含む 8 種（野生型、変異型、部分変異型 6 種）の NIL を用いて、種子澱粉の構造、糊化、老化、粘度等の澱粉特性を分析した。その結果、澱粉特性に対する *SSIIa* の量効果と、*SSIIa* 酵素間の寄与度の違いを明らかにした。即ち、*SSIIa* を全て野生型で持つコムギと比較して、*SSIIa* を 1 つ欠失した 1 酵素欠失型部分変異体、2 つを欠失した 2 酵素欠失型部分変異体、さらに全て欠失した完全変異体となるに伴って、澱粉特性の差異は大きくなった。さらに、*SSIIa* の寄与度は、*SSIIa-B1* > *D1* > *A1* と順位付けられると結論した。

近年先進国では糖尿病等の生活習慣病の増加が著しく、食を通じた予防への意識が高まっている。世界保健機関 (WHO) や国連食糧農業機関 (FAO) は日常の食を通じた食物繊維の摂取を推奨しており (Joint WHO/FAO Expert Consultation, 2003)、厚生労働省も「日本人の食事摂取基準 (2010 年版) において、成人の食物繊維摂取目標量は 18g/日以上としている。食物繊維様の機能性を持つレジスタントスターチへの期待も高まっていることから (Topping and Clifton, 2001, Topping et al., 2003)、レジスタントスターチを多く含む高アミロース変異体の育成および研究は今後ますます加速されるであろう。実際に、本稿と同じ変異型 *SSIIa* を導入した高アミロースコムギはオーストラリアやイタリアでも複数の系統が育成されている (Hung et al., 2008, Hallström et al., 2011)。また本稿で用いた変異型とは別に、突然変異誘発処理をおこなった集団からも、新規な変異が見いだされ (Sestili et al., 2010)、さらにはデュラムコムギでも *SSIIa* 変異体が育成されて

いる (Hogg et al., 2013)。

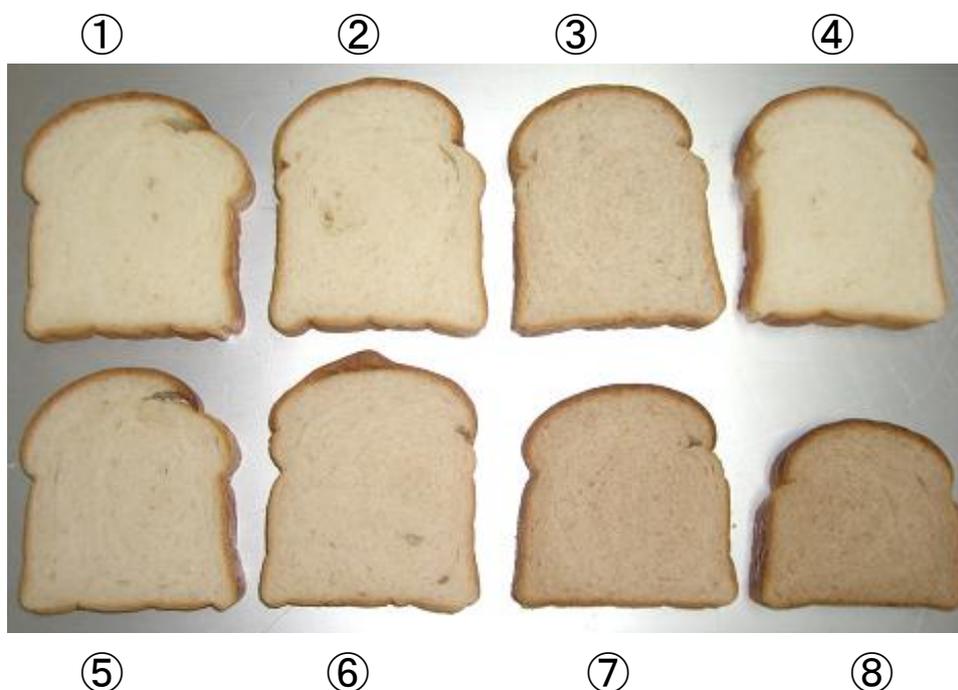
SSIIa 部分変異体のアミロース含量は野生型と同レベルであったため、高アミロース変異体のようにレジスタントスターチ含量の増加は期待できない。しかし第二章に示されたような澱粉特性の変化による二次加工性や食感の改良効果が期待される。育成された系統を用いて予備的に実施した二次加工試験（製菓試験）の結果では、野生型（type 1）に比べて type 5 には明らかな食感の違いが感じられた。今後様々な用途への加工試験をおこない、澱粉特性の違いによる影響を有効に利用できる用途開発を進める予定である。このコムギ系統の実用化にあたっては、既存のコムギ系統だけでなく、増粘剤や乳化剤等、一般的に食品に用いられる副資材との競合等も考えられ、澱粉特性の改良による優位性を見極める必要がある。

第三章では、第一章で開発したアミロペクチン合成に係わる *SSIIa* 遺伝子の DNA マーカーと、既に開発されていたアミロース合成に係わる *GBSSI* 遺伝子の DNA マーカーを組み合わせ、*SSIIa* と *GBSSI* を全て欠失した新規な二重変異体を選抜した。この二重変異体の種子は、開花後 35 日目付近までの登熟期間では、通常のコムギと外観上の違いは見られなかったものの、その後の水分含量の低下に伴って種子形状が著しく変化し、完熟種子は皺粒となった。この種子には、登熟期全般を通して低分子糖、特にマルトース、スクロースの著しい蓄積が認められた。特に開花後 25 日目付近では、これら糖の蓄積は顕著であり、実際にその種子を噛むと甘さを感じたことから、この二重変異体は麦類では初の甘味種の報告であり、Sweet Wheat (SW) に分類されるべき新規な変異体であると結論した。SW に蓄積された澱粉にはアミロースは含まれず、アミロペクチンのみから構成されていた。また、澱粉粒子は著しく微小化し、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 MOS と、わずかに分岐した低分子 α グルカンが検出された。これらは澱粉合成過程における β -amylase や isoamylase の関与を示唆するものであった。

第四章では、前章で開発された SW 完熟種子の特性を明らかにするために、その成分分析をおこなった。その結果、灰分やタンパクは、野生型と比較して大きな変化は見られなかったのに対し、澱粉含量の著しい低下と、脂質、食物繊維および低分子糖の増加が観察された。これらの成分をさらに詳細に分析した結果、食物繊維においては、フルクトオリゴ糖（フルクタン）で数倍の増加を、遊離アミノ酸においては、特にプロリン、グルタミン、アスパラギンの著しい増加を確認した。フルクタンにおいては、プレバイオティクス効果との関連が、遊離アミノ酸においては味との関連が、それぞれ期待された。これらの結果は、コムギにおける *GBSSI* 及び *SSIIa* の二つの澱粉合成酵素の欠失が、澱粉特性ばかりでなく、種子成分全体に影響を与えることを示していた。

完熟 SW 種子は第三章で示されたように、皺粒の形状を示すことから製粉性は著しく劣り、小麦粉の製造には適さない。しかし種子全体を粉碎した全粒粉としての利用、あるいはシリアルのように種子を粉碎することなく用いる粒食としての利用が考えられる。種子全体

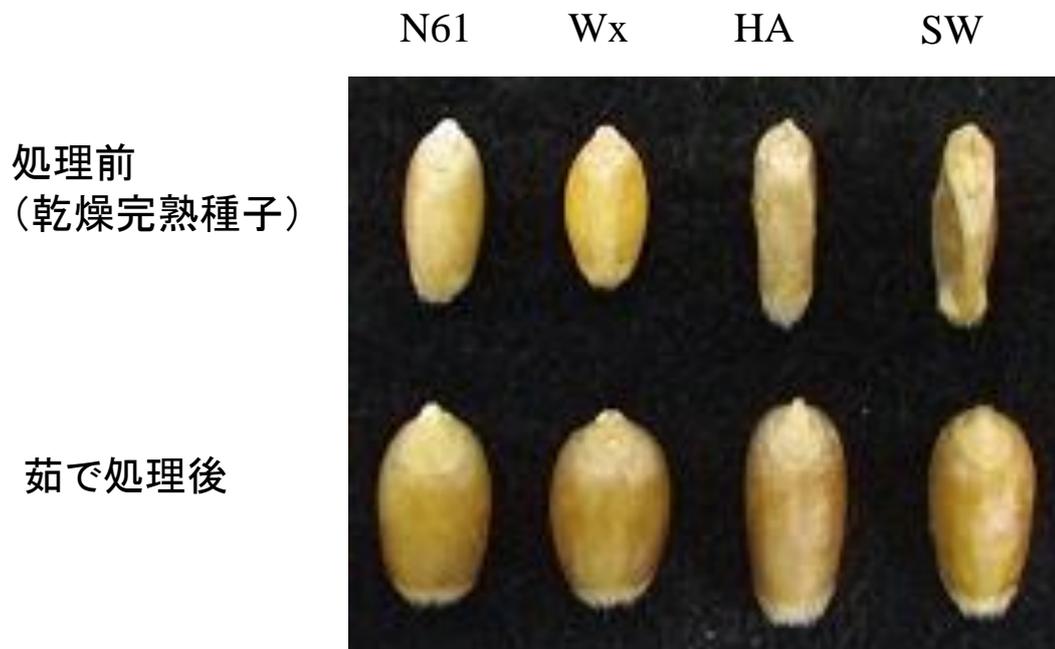
を食品として利用することは、前述の WHO や FA 省の提言 (Joint WHO/FAO Expert Consultation, 2003、厚生労働省、日本人の食事摂取基準 (2010 年版)) にも合致する。SW 全粒粉を用いて食パンを試作すると、市販の小麦粉の 5%程度の置換えでも、風味に違いが感じられ、食物繊維等の生理的作用効果への期待に加えて風味付けの効果も期待される (図 5-1)。一方麦類の粒食として、オオムギでは完熟種子を圧片した「押し麦」や、外皮を剥皮してコメに混ぜて炊飯する麦飯が古くから知られている。しかしコムギは通常小麦粉として用いられてきたため、日本に粒食の文化はほとんどない。SW の完熟種子は、茹でることで種子粒は膨潤し、外観上は通常のコムギと同程度となり、シャキッとした歯ごたえの特徴ある食感となることを予備的試験で確認している (図 5-2)。トルコを中心とした西アジアや欧米では完熟コムギ種子を挽き割りしたブルグル(Bulgur)がピラフやサラダ、スープの具材として利用されており、このような用途への SW の応用が期待される。一方、SW の特徴である甘さを生かす目的では、未熟種子 (図 3-6 参照) の粒食利用も考えられる。この未熟種子は完熟種子を茹でたものに比べると柔らかく、風味は枝豆とスイートコーンの中間的なもので、甘さも十分に感じられた。CS や Wx、HA の未熟種子粒は SW に比べれば明らかに硬く、風味にも乏しいものであった。SW 未熟種子の利用は、穀物でありながら野菜に分類されるスイートコーンと同様に、コムギを野菜として食することができる新たな用途を提供できる可能性がある。近年未熟コムギ種子を収穫後に乾燥したフリーカ (Freekeh) が欧米を中心に広まりつつあり、ブルグルと同様にピラフやサラダ、スープの具材に利用されている。このような用途への SW の利用が期待される。



Sample	配合量(%)		重量(g)	体積(ml)	比容積(ml/g)
①	市販強力粉	100	399 ± 1	1735 ± 21	4.3 ± 0.0
②	市販強力粉	95 農林61号	398 ± 2	1695 ± 7	4.2 ± 0.0
③	市販強力粉	80 農林61号	402 ± 2	1685 ± 7	4.2 ± 0.0
④	市販強力粉	99.5 SW	399 ± 2	1705 ± 7	4.3 ± 0.0
⑤	市販強力粉	95 SW	400 ± 1	1675 ± 7	4.2 ± 0.0
⑥	市販強力粉	90 SW	401 ± 2	1660 ± 28	4.1 ± 0.0
⑦	市販強力粉	80 SW	408 ± 0	1485 ± 7	3.6 ± 0.0
⑧	市販強力粉	70 SW	408 ± 1	1235 ± 21	3.0 ± 0.0

図 5-1 農林 61 号および SW を配合した製パン試験

市販の強力小麦粉（イーグル、日本製粉社、東京・日本）をベースに、農林 61 号もしくは SW 全粒粉を一部置き換えて食パンを試作した。



茹で処理後重量(g)	34.0	36.3	39.7	51.5
重量増加率(%)	170	182	199	258

図 5-2 完熟種子の熱水処理前後の変化

完熟種子 20g を沸騰水中で 40 分間茹でた。図下の数値は熱水処理後の重量と種子重量の増加率（処理前重量に対する処理後重量の百分率）を示す。N61:農林 61 号、Wx:モチコムギ、HA:高アミロースコムギ、SW: Sweet Wheat を示す。

第二節 コムギ澱粉変異体研究の展開

第三章では、SSIIa と GBSSI の完全欠失変異体を選抜した。GBSSI と SSIIa それぞれの同祖遺伝子の野生型、変異型の組み合わせにより 64 種の遺伝子型の異なる系統が作出可能である (図 5-3)。SW はこれらのうちで最も野生型との特性の差が大きい変異体であると考えられる。GBSSI 同祖遺伝子の変異の組み合わせの違いによってもたらされるアミロース含量の段階的な変化 (Yamamori and Quynh, 2000、Nakamura et al., 2002) と SSIIa 同祖遺伝子の変異の組み合わせの違いによってもたらされるアミロペクチン構造の変化(第二章)の違いを組み合わせることにより、澱粉特性はこれまで以上に多様なものになると考えられる。実際に、既に 64 全ての遺伝子型の系統が東北農研にて選抜されており、その澱粉特性の解析が進んでいる。その結果、現在までに解析された澱粉特性を見る限り、予想通り澱粉特性が段階的に変化していることがわかってきた。これらの特性についても今後報告してゆく予定であり、Wx、HA、SW 以外の (部分) 変異体の中にも有用なものが見出せると期待している。このような部分変異体は、イネやトウモロコシなどの 2 倍体植物での作出は不可能であり、異質 6 倍体で同祖遺伝子が 3 重複するコムギの特性を上手く利用したものであると言える。

近年、コムギに変異誘発処理した集団から SBEIIa の部分変異体が見出され、これらの交雑により育成された完全変異体においてはアミロース含量が 55%にまで高まっていることが報告された (Slade et al., 2012)。RNAi 法により SBEIIa と SBEIIb を同時に抑制した遺伝子組み換え体ではアミロース含量は 65%にも達するとの報告もある (Regina et al., 2006)。SBE 活性の抑制の結果、アミロペクチン側鎖数の低下と長鎖の比率が増加し、かつ高アミロース澱粉となる点はトウモロコシ (Ferguson, 2000) やイネ (Wei et al., 2010、Man et al., 2013) と共通している。SBEIIa の部分変異体 (2 酵素欠失変異体) のアミロース含量は野生型と同程度で、3 酵素が完全に失われて始めて高アミロースとなることも報告されており (Slade et al., 2012)、2 酵素欠失型と (完全) 変異型との間で、澱粉特性が大きく異なることは、SSIIa や GBSSI の傾向と同様である。

SBEIIa 変異体が見出されたことで、GBSSI と SSIIa との二重変異、三重変異のコムギ育種が可能となった。GBSSI と SBEIIa の二重変異はトウモロコシやイネにおける *wx/ae* 変異体と同様の特性を持つと推測される。トウモロコシやイネの *wx/ae* 変異体では、*wx* 変異体と同じくアミロースがなく、アミロペクチン構造は *ae* 変異体同様に、DP6-14 の鎖長の比率が低下する。糊化ピーク温度の上昇や糊化エンタルピー変化量が増大し、生澱粉や老化後の澱粉の消化酵素に対する抵抗性が上昇する (Shi and Seib, 1995、Kubo et al., 2010)。他方、SSIIa と SBEIIb の二重変異体はトウモロコシ *su2/ae* 変異体に相当する。この変異体ではアミロース含量は 50%程度となり (Campbell et al., 2000)、アミロペクチン側鎖数が少なく、その側鎖長は *ae* 変異体に比べて短い構造となっている (Ikawa et al., 1981)。 *wx/su2* 同様に明確な糊化ピーク温度はなく、消化酵素抵抗性が上昇し (Inouchi et al.,

1991)、レジスタントスターチ含量は約 70%にも達するという報告もある (Evans and Thompson, 2004)。また *wx/ae* 変異体と *su2/ae* 変異体は共に糖含量が増加する変異体でもある (Creech, 1965)。さらに GBSSI、SSIIa および SBELIIa の三重変異体も糖が蓄積する変異体である (Creech, 1965)。コムギにおける GBSSI と SSIIa の二重変異体の澱粉特性はトウモロコシなどの他の作物に観察される澱粉特性とは異なる特性を持つ結果となった。SBELIIa 変異体との組み合わせによって作り出されるコムギ澱粉が、イネやトウモロコシの二重変異体のような特性を持つか、今後の開発が待たれる。*GBSSI*、*SSIIa*、*SBELIIa* の変異体の利用により、遺伝子型だけで考えれば、その組み合わせは 512 通り (=8×8×8) であり、澱粉特性の多様性はさらに広がると考えられる。このような変異体が、小麦粉としての一次加工性、二次加工性へどのような影響を及ぼすのか非常に興味深い。加えてこれらはアミロース含量やアミロペクチン側鎖構造などの澱粉構造と物理化学的特性の関係を詳細に検証する上でも重要な材料となるであろう。

さらにコムギ *GBSSI* 遺伝子には、本研究で用いられた欠失型変異だけでなく、アミロース含量の低下をもたらす変異アリルも複数報告されている (Yamamori, 2009, Yamamori and Yamamoto, 2011)。また GBSS-D1 には GBSS-A1 および B1 欠失下で粘度特性に変化をもたらす変異アリルも報告されている (Kiribuchi-Otobe et al., 2004)。これらの変異型アリルも上記のような欠失型変異体との組み合わせに用いることができる。

コムギ澱粉変異体の開発を今後さらに進めるためには、変異体の効率的な同定法の開発が重要となる。SBELIIa 変異体の同定にも用いられた TILLING 法は、比較的簡便で効率的な手法であるといえる (McCallum et al., 2000, Slade et al., 2012)。一方コムギでもゲノム解読プロジェクトが国際コンソーシアムによって進められ、最近になってドラフトシーケンスが決定された (Kobayashi, et al., 2013, The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), 2014)。コムギ品種間の遺伝子多型を網羅的に解析する手法も開発されており (Poland et al., 2012, Cavanagh et al., 2013)、これら技術の進歩によって変異体の同定も加速されるに違いない。

本研究の最終目的は、消費者のニーズに合わせた差別化できる製品への新規なコムギの応用にある。現在本研究で育成された多くの系統についての実用化の可能性を検討しており、将来的にこれらコムギが広く市場に受け入れられることを期待してやまない。本研究が今後のコムギ澱粉変異体研究の発展の一助になることを願っている。

		type of <i>GBSSI</i>								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
type of <i>SSIa</i>	1	+++ +++	-++ +++	+--+ +++	+-+ +++	+-- +++	-+- +++	--+ +++	--- +++	W _x
	2	+++ -++	-++ -++	+--+ -++	+-+ -++	+-- -++	-+- -++	--+ -++	--- -++	
	3	+++ +--+	-++ +--+	+--+ +--+	+-+ +--+	+-- +--+	-+- +--+	--+ +--+	--- +--+	
	4	+++ +-+	-++ +-+	+--+ +-+	+-+ +-+	+-- +-+	-+- +-+	--+ +-+	--- +-+	
	5	+++ +--	-++ +--	+--+ +--	+-+ +--	+-- +--	-+- +--	--+ +--	--- +--	
	6	+++ -+-	-++ -+-	+--+ -+-	+-+ -+-	+-- -+-	-+- -+-	--+ -+-	--- -+-	
	7	+++ --+	-++ --+	+--+ --+	+-+ --+	+-- --+	-+- --+	--+ --+	--- --+	
	8	+++ ---	-++ ---	+--+ ---	+-+ ---	+-- ---	-+- ---	--+ ---	--- ---	SW

図 5-3 *GBSSI* および *SSIa* の遺伝子型の異なる 64 ハプロタイプ

GBSSI の遺伝子型の異なる 8 タイプと *SSIa* の遺伝子型の異なる 8 タイプの組み合わせにより 64 通りのハプロタイプが可能である。各セルの上段は *GBSSI* の遺伝子型、下段は *SSIa* の遺伝子型を示し、野生型を (+)、変異型を (-) とした。

引用文献

AACC methods 07-01, 07-11, 07-20, 08-02, 30-10, and 46-30. In *Approved methods of the AACC*, 10th ed.; American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN, 2000.

Abdel-Aal, E.-S., M., Hucl, P., Chibbar, R., N., Han, H., L., Demeke, T., (2002) Physicochemical and Structural Characteristics of Flours and Starches from Waxy and Nonwaxy Wheats. *Cereal Chem.*, 79, 3, 458-464.

Abrams, S., A., Griffin, I., J., Hawthorne, K., M., Liang, L., Gunn, S., K., Darlington, G., Ellis, K., J., (2005) A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.*, 82, 2, 471-476.

Annison, G., Topping, D., L., (1994) Nutritional role of resistant starch: Chemical Structure vs Physiological Function. *Annu. Rev. Nutr.*, 14, 297-320.

Atwell, W., A., Hood, L., F., Lineback, D., R., Zobel, H., F., Varriano-Marston, E., (1988) The terminology and methodology associated with basis starch phenomena. *Cereal Foods World*, 33, 3, 306-311.

Baker, K., E., Parker, R., (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16, 3, 293-299.

Ball, K., Preiss, J., (1994) Allosteric sites of the large subunit of the spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase. *J. Bol. Chem.*, 269, 24706-24711.

Balmer, Y., Vensel, W., H., DuPont, F., M., Buchanan, B., B., Hurkman, W., J., (2006) Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability. *J. Exp. Bot.*, 57, 7, 1591-1602.

Bancal, P., Carpita, N. C., Gaudillère, J. P., (1992) Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis. *New Phytol.*, 120, 313-321.

Batey, I., L., Curtin, B., M., (1996) Measurement of amylose/amylopectin ratio by high-performance liquid chromatography. *Starch*, 48, 338-344.

Bathgate, G. N., Palmer, G. H., (1972) A reassessment of the chemical structure of barley and wheat starch granules. *Starch*, 24, 10, 336-341.

Bjork, I., Eliasson, A., C., Drews, A., Gudmundsson, M., Karlsson, R., (1990) Some nutritional properties of starch and dietary fiber in barley genotypes containing different levels of amylose. *Cereal Chem.*, 67, 4, 327-333.

Boyer, C., B., Preiss, J., (1978) Multiple forms of starch branching enzyme of maize: Evidence for independent genetic control. *Biochem Biophys Res Comm.*, 80, 1, 169-175.

Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S., (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 23, 85-112.

Buléon, A., Véronèse, G., Putaux, J., L., (2007) Self-association and crystallization of amylose. *Aust. J. Chem.*, 60, 706-718.

Campbell, M., R., Sykes, J., Glover, D., V., (2000) Classification of Single- and Double-Mutant Corn Endosperm Genotypes by Near-Infrared Transmittance Spectroscopy. *Cereal Chem.*, 77, 6, 774-778.

Cavanagh, C., R., Chao, R., Wang, S., Huang, B., E., Stephen, S., Kiani, S., Forrest, K., Sainenac, C., Brown-Guedira, G., L., Akhunova, A., See, D., Bai, G., Pumphrey, M., Tomar, L., Wong, D., Kong, S., Reynolds, M., da Silva, M., L., Bockelman, H., Talbert, L., Anderson, J., A., Dreisigacker, S., Baenziger, S., Carter, A., Korzun, V., Morrell, P., L., Dubcovsky, J., Morell, M., K., Sorrells, M., E., Hayden, M., J., Akhunov, E., (2013) Genome-wide comparative diversity uncovers multiple targets of selection for improvement in hexaploid wheat landraces and cultivars. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 20, 8057-8062.

Cheetham, N., W., H., Tao, L., (1998) Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohydr. Polym.*, 36, 277-284

- Clarke, B., Liang, R., Morell, M., K., Bird, A., R., Jenkins, C., L., Li, Z., (2008) Gene expression in a starch synthase IIa mutant of barley: changes in the level of gene transcription and grain composition. *Funct. Integr. Genomics*, 8, 211-221.
- Commuri, P., D., Keeling, P., L., (2001) Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties. *Plant J.*, 25, 5, 475-486.
- Coudray, C., Tressol, J., C., Gueux, E., Rayssiguier, Y., (2003) Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *Eur. J. Nutr.*, 42, 91-98.
- Creech, R., G., (1965) Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. *Genetics*, 52, 1175-1186.
- Daussant, J., Laurière, C., (1990) Detection and partial characterization of two antigenically distinct β -amylases in developing kernels of wheat. *Planta*, 181, 4, 505-511.
- Davis, J., P., Supatcharee, N., Khandelwal, R., L., Chibbar, R., N., (2003) Synthesis of novel starches in planta: Opportunities and challenges. *Starch*, 55., 107-120.
- del-Molino, I., M., M., Rojo, B., Martínez-Carrasco, R., Pérez, P., (1988) Amino acid composition of wheat Grain. 1: Changes during development. *J. Sci. Food Agric.*, 42, 29-37.
- Dinges, J., R., Colleoni, C., James, M., G., Myers, A., M., (2003) Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *The Plant Cell*, 15, 666-680.
- Dubcovsky, J., (2004) Marker-assisted selection in public breeding programs: The wheat experience. *Crop Sci.*, 44, 1895-1898.
- Echt, C., S., Schwartz, D., (1981) Evidence for the inclusion of controlling elements within the structural gene at the waxy locus in maize. *Genetics*, 99, 275-284.

- Ellis, H., Spielmeier, W., Gale, R., Rebetzke, J., Richards, A., (2002) 'Perfect' markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 105, 1038-1042.
- Evans, A., Thompson, D., B., (2004) Resistance to α -Amylase Digestion in Four Native High-Amylose Maize Starches. *Cereal Chem.*, 81, 1, 31-37.
- Ferguson, V., (2000) High amylose and waxy corns. In *Specialty Corns Second Edition* (ed: A.R. Hallauer), pp. 63-84. CRC, Boca Raton, FL.
- Ferguson, J., E., Dickinson, D., B., Rhodes, A., M., (1979) Analysis of endosperm sugars in a sweet corn inbred (Illinois 677a) which contains the sugary enhancer (*se*) gene and comparison of *se* with other corn genotypes. *Plant Physiol.*, 63, 416-420.
- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M., J., Sánchez-Zapata, E., Pérez-Álvarez, J., A., (2010) Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Res. Int.*, 43, 4, 931-942.
- Fujita, N., Kubo, A., Suh, D., S., Wong, K., S., Jane, J., L., Ozawa, K., Takaiwa, F., Inaba, Y., Nakamura, Y., (2003) Antisense inhibition of isoamylase alters the structure of amylopectin and the physicochemical properties of starch in rice endosperm. *Plant Cell Physiol.*, 44, 6, 607-618.
- Fujita, N., Yoshida, M., Asakura, N., Ohdan, T., Miyao, A., Hirochika, H., Nakamura, Y., (2006) Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol.*, 140, 1070-1084.
- Fujita, N., Yoshida, M., Kondo, T., Saito, K., Utsumi, Y., Tokunaga, T., Nishi, A., Satoh, H., Park, J., H., Jane, J., L., Miyao, A., Hirochika, H., Nakamura, Y., (2007) Characterization of SSIIIa-deficient mutants of rice: The function of SSIIIa and pleiotropic effects by SSIIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiol.*, 144, 2009-2023.
- Fujita, S., Kumagai, T., Yanagimachi, M., Sakuraba, S., Sanpei, R., Yamoto, M., Tohara, H., (2012) Waxy wheat as a functional food for human consumption. *J. Cereal Sci.*, 55, 361-365.

- Gao, M., Wanat, J., Stinard, P., S., James, M., G., Myers, A., M., (1998) Characterization of *du111*, a maize gene coding for a novel starch synthase. *Plant Cell*, 10, 399-412.
- Gao, M., Chibbar, R., N., (2000) Isolation, characterization, and expression analysis of starch synthase IIa cDNA from wheat (*Triticum aestivum L.*). *Genome*, 43, 768-775.
- Garwood, D., L., McArdle, F., J., Vanderslice, S., F., Shannon, J., C., (1976) Postharvest carbohydrate transformations and processed quality of high sugar maize genotypes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 101, 400-404.
- Gidley, M., J., Bulpin, P., V., (1989) Aggregation of amylose in aqueous systems: the effect of chain length on phase behavior and aggregation kinetics. *Macromolecules*, 22, 341-346.
- Giroux, M., J., Hannah, L., C., (1994) ADP-glucose pyrophosphorylase in *shrunk-2* and *brittle-2* mutants of maize. *Mol. Gen. Genet.*, 243, 4, 400-408.
- Giroux, M., J., Shaw, J., Barry, G., Cobb, B. G., Greene, T., Okita, T., Hannah, L., C., (1996) A single mutation that increases maize seed weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5824-5829.
- Grant, M., R., McDowell, J., M., Sharpe, A., G., de Torres Zabala, M., Lydiate, D., J., Dangl, J., L., (1998) Independent deletions of a pathogen-resistance gene in Brassica and Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 15843-15848.
- Guan, H., P., Baba, T., Preiss, J., (1994a) Expression of branching enzyme I of maize endosperm in Escherichia coli. *Plant Physiol.*, 104, 4, 1449-1453.
- Guan, H., P., Baba, T., Preiss, J., (1994b) Expression of branching enzyme II of maize endosperm in Escherichia coli. *Cell. Mol. Biol.*, 40, 7, 981-988
- Guo, G., Jackson, D., S., Graybosch, R., A., Parkhurst, A., M., (2003) Asian salted noodle quality: Impact of amylose content adjustments using waxy wheat flour. *Cereal Chem.*, 80, 437-445.

- Guo, G., Lv, D., Yan, X., Subburaj, S., Ge, P., Li, X., Hu, Y., Yan, Y., (2012) Proteome characterization of developing grains in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol.*, 12, 147. doi:10.1186/1471-2229-12-147.
- Hallström, E., Sestili, F., Lafiandra, D., Björck, I., Östman, E., (2011) A novel wheat variety with elevated content of amylose increases resistant starch formation and may beneficially influence glycaemia in healthy subjects. *Food Nutr. Res.*, 55, doi: 10.3402/fnr.v55i0.7074.
- Hanashiro, I., Ikeda, I., Yamamori, M., Takeda, Y., (2004) Increased amylose content and altered molecular structures of wheat starch by SGP-1 null mutation. *J. Appl. Glycosci.*, 51, 217-221.
- Harn, C., Knight, M., Ramakrishnan, A., Guan, H, Keeling, P., L., Wasserman, B., P., (1998) Isolation and characterization of the *zSSIIa* and *zSSIIb* starch synthase cDNA clones from maize endosperm. *Plant Mol. Biol.*, 37, 4, 639-649.
- Hayakawa, K., Tanaka, K., Nakamura, T., Endo, S., Hoshino, T., (1997) Quality characteristics of waxy hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.): Properties of starch gelatinization and retrogradation. *Cereal Chem.*, 74, 576-580.
- Hayakawa, K., Tanaka, K., Nakamura, T., Endo, S., Hoshino, T., (2004) End use quality of waxy wheat flour in various grain-based foods. *Cereal Chem.*, 81, 666-672.
- Henry, R., J., Saini, H., S., (1989) Characterization of cereal sugars and oligosaccharides. *Cereal Chem.*, 66, 362-365.
- Hizukuri, S., (1986) Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydr. Res.*, 147, 342-347.
- Hogg, A., C., Gause, K., Hofer, P., Martin, J., M., Graybosch, R., A., Hansen, L., E., Giroux, M., J., (2013) Creation of a High-Amylose Durum Wheat through Mutagenesis of Starch Synthase II (*SSIIa*). *J. Cereal Sci.*, 57, 3, 377-383.
- Hung, P., V., Yamamori, M., Morita, N., (2005) Formation of Enzyme-Resistant Starch

in Bread as Affected by High-Amylose Wheat Flour Substitutions. *Cereal Chem.*, 82, 690-694.

Hung, P., V., Maeda, T., Morita, N., (2006) Waxy and high-amylose wheat starches and flours-characteristics, functionality and application. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 448-456.

Hung, P., V., Maeda, T., Morita, N., (2007) Study on physicochemical characteristics of waxy and high-amylose wheat starches in comparison with normal wheat starch. *Starch*, 59, 125-131.

Hung, P., V., Maeda, T., Miskelly, D., Tsumori, R., Morita, N., (2008) Physicochemical characteristics and fine structure of high-amylose wheat starches isolated from Australian wheat cultivars. *Carbohydr. Polym.*, 71, 4, 656-663.

Hussain, H., Mant, A., Seale, R., Zeeman, S., Hinchliffe, E., Edwards, A., Hylton, C., Bornemann, S., Smith, A. M., Martin, C., Bustos, R., (2003) Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *Plant Cell*, 15, 133-149

Huynh, B., L., Palmer, L., Mather, D., E., Wallwork, H., Graham, R., D., Welch, R., M., Stangoulis, J., C., R., (2008a) Genotypic variation in wheat grain fructan content revealed by a simplified HPLC method. *J. Cereal Sci.*, 48, 369-378.

Huynh, B., L., Wallwork, H., Stangoulis, J., C., Graham, R., D., Willsmore, K., L., Olson, S., Mather, D., E., (2008b) Quantitative trait loci for grain fructan concentration in wheat (*Triticum aestivum L.*). *Theor. Appl. Genet.*, 117, 701-709.

Ikawa, Y., Glover, D., V., Sugimoto, Y., Fuwa, H., (1981) Some Structural Characteristics of Starches of Maize Having a Specific Genetic Background. *Starch*, 33, 1, 9-13.

Inouchi, N., Glover, D., V., Sugimoto, Y., Fuwa, H., (1991) DSC Characteristics of Retrograded Starches of Single-, Double-, and Triple-Mutants and Their Normal Counterpart in the Inbred Oh43 Maize (*Zea mays L.*) Background. *Starch*, 43, 12, 473-477.

James, M., G., Robertson, D., S., Myers, A., M., (1995) Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell*, 7, 417-429.

Jane, J., Chen, Y., Y., Lee, L., F., McPherson, A., E., Wong, K., S., Radosavljevic, M., Kasemsuwan, T., (1999) Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chem.*, 76, 629-637.

Joint WHO/FAO Expert Consultation, (2003) Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases., In *WHO technical report series 916*.

Kalichevsky, M., T., Orford, P., D., Ring, G., S., (1990) The retrogradation and gelation of amylopectins from various botanical sources. *Carbohydr. Res.*, 198, 49-55.

Karim, A., A., Norziah, M., H., Seow, C., C., (2000) Methods for the study of starch retrogradation. *Food Chem.*, 71, 9-36.

Kerepesi, I., Galiba, G., (2000) Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Sci.*, 40, 482-487.

Kiribuchi-Otobe, C., Nagamine, T., Yanagisawa, T., Ohnishi, M., Yamaguchi, I., (1997) Production of Hexaploid Wheats with Waxy Endosperm Character. *Cereal Chem.*, 74, 1, 72-74.

Kiribuchi-Otobe, C., Kurita, K., Yanagisawa, T., Takeda, G., Inazu, A., (2004) Interactions Among Wx Genes and Effects of a Mutated Wx-D1e Allele on Starch Properties in Wheat. *Cereal Chem.*, 81, 1, 48-50.

Kleczkowski, L., A., Villand, P., Luthi, E., Olsen, O., A., Preiss, J., (1993) Insensitivity of barley endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation. *Plant Physiol.*, 101, 179-186.

Knight, J., (2003) Crop improvement: A dying breed. *Nature*, 421, 568-570.

Kobayashi, F., Katagiri, S., Karasawa, W., Hanawa, Y., Kanamori, H., Ito, Y., Fujisawa,

H., Mukai, Y., Tanaka, T., Kaneko, S., Watanabe, S., Sakaguchi, T., Nasuda, S., Hayakawa, K., Abe, C., Ohno, R., Iehisa, J., Takumi, S., Dolezel, J., Ogihara, Y., Matsumoto, T., Katayose, Y., Wu, J., Handa, H., (2013) Development of the BAC physical maps of wheat chromosome 6B for its genomic sequencing. *12th IWGS program and abstracts*, 56.

Koizumi, K., Fukuda, M., (1991) Estimation of the distributions of chain length of amylopectins by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr.*, 585, 233-238.

Konik-Rose, C., Thistleton, J., Chanvrier, H., Tan, I., Halley, P., Gidley, M., Kosar-Hashemi, B., Wang, H., Larroque, O., Ikea, J., McMaugh, S., Regina, A., Rahman, S., Morell, M., Li, Z., (2007) Effects of starch synthase IIa gene dosage on grain, protein and starch in endosperm of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 115, 1053-1065.

Konishi, Y., Nojima, H., Okuno, K., Asaoka, M., Fuwa, H., (1985) Characterization of starch granules from waxy, nonwaxy, and hybrid seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1965-1971.

Kubo, A., Fujita, N., Harada, K., Matsuda, T., Satoh, H., Nakamura, Y., (1999) The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol.*, 121, 2, 399-410.

Kubo, A., Rahman, S., Utsumi, Y., Li, Z., Mukai, Y., Yamamoto, M., Ugaki, M., Harada, K., Satoh, H., Konik-Rose, C., Morell, M., Nakamura, Y., (2005) Complementation of *sugary-1* phenotype in rice endosperm with the wheat isoamylase1 gene supports a direct role for isoamylase1 in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol.*, 137, 1, 43-56.

Kubo, A., Akdogan, G., Nakaya, M., Shojo, A., Suzuki, S., Satoh, H., Kitamura, S., (2010) Structure, physical, and digestive properties of starch from wx ae double-mutant rice. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 4463-4469.

Kumar, S. G., Reddy, A. M., Sudhakar, C., (2003) NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Sci.*, 165, 1245-1251.

Kuroda, A., Oda, S., Miyagawa, S., Seko, H., (1989) A method of measuring amylose content and its variation in Japanese wheat cultivars and Kanto breeding lines. *Jpn. J. Breed.*, 39, Suppl 2, 142-143 (In Japanese).

Labanauskas, C., K., Luxmoore, R., J., Stolzy, L., H., (1974) Soil temperature and soil aeration effects on protein and free amino acid concentrations in wheat grain. *Plant and Soil.*, 41, 351-363.

Labanauskas, C., K., Bingham, F., T., Cerda, A., (1978) Free and protein amino acids, and nutrient concentrations in wheat grain as affected by phosphorus nutrition at various salinity levels. *Plant and Soil*, 49, 581-593.

Labanauskas, C., K., Stolzy, L., H., Handy, M., F., (1981) Protein and free amino acids in wheat grain as affected by soil types and salinity levels in irrigation water. *Plant and Soil*, 59, 299-316.

Li, D., Blakey, C., A., Dewald, C., Dellaporta, S. L., (1997) Evidence for a common sex determination mechanism for pistil abortion in maize and in its wild relative *Tripsacum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4217-4222.

Li, J., Corke, H., (1999) Physicochemical properties of maize starches expressing dull and sugary-2 mutants in different genetic backgrounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4939-4943.

Li, Z., Chu, X., Mouille, G., Yan, L., Kosar-Hashemi, B., Hey, S., Napier, J., Shewry, P., Clarke, B., Appels, R., Morell, M., K., Rahman, S., (1999) The localization and expression of the class II starch synthases of wheat. *Plant physiol.*, 120, 1147-1156.

Li, Z., Sun, F., Xu, S., Chu, X., Mukai, Y., Yamamoto, M., Ali, S., Rampling, L., Kosar-Hashemi, B., Rahman, S., Morell, M., K., (2003) The structural organisation of the gene encoding class II starch synthase of wheat and barley and the evolution of the genes encoding starch synthases in plants. *Funct. Integr. Genomics*, 3, 76-85.

Liu Q., Thompson D., B., (1998) Effects of moisture content and different gelatinization heating temperatures on retrogradation of waxy-type maize starches. *Carbohydr. Res.*, 314, 3-4, 221-235.

- Ma, W., Zhang, W., Gale, K., R., (2003) Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat. *Euphytica*, 134, 51-60.
- MacArthur, L., A., D' Appolonia, B., L., (1979) Comparison of oat and wheat carbohydrates. I. Sugars. *Cereal Chem.*, 56, 455-457.
- Maddelein, M., L., Libessart, N., Bellanger, F., Delrue, B., D'Hulst, C., Van den Koornhuysse, N., Fontaine, T., Wieruszeski, J., M., Decq, A., Ball, S., (1994) Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Determination of granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis. *J. Biol. Chem.*, 269, 40, 25150-25157
- Man, J., Yang, Y., Huang, J., Zhang, C., Chen, Y., Wang, Y., Gu, M., Liu, Q., Wei, C., (2013) Effect of Simultaneous Inhibition of Starch Branching Enzymes I and IIb on the Crystalline Structure of Rice Starches with Different Amylose Contents. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 41, 9930-9937.
- Mason-Gamer, R., J., (2005) The β -amylase genes of grasses and a phylogenetic analysis of the Triticeae (Poaceae). *Am. J. Bot.*, 92, 6, 1045-1058.
- McCallum, C., M., Comai, L., Greene, E., A., Henikoff, S., (2000) Targeting induced locallesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant physiol.*, 123, 2, 439-442.
- McCready, R., M., Hassid, W., Z., (1943) The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato. *Carbohydr. Res.*, 65, 1154-1157.
- Mendez-Montealvo, G., Wanga, Y. J., Campbell, M., (2011) Thermal and rheological properties of granular waxy maize mutant starches after β -amylase modification. *Carbohydr. Polym.*, 83, 1106-1111
- Miles, M., J., Morris, V., J., Orford, P., D., Ring, S., G., (1985) The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydr. Res.*, 135, 2, 271-281.

- Miura, H., Tanii, S., Nakamura, T., Watanabe, N., (1994) Genetic control of amylose content in wheat endosperm starch and differential effects of three *Wx* genes. *Theor. Appl. Genet.*, 89, 2-3, 276-280.
- Mizuno, K., Kawasaki, T., Shimada, H., Satoh, H., Kobayashi, E., Okumura, S., Arai, Y., Baba, T., (1993) Alteration of the structural properties of starch components by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice seeds. *J. Biol. Chem.*, 268, 19084-19091.
- Morell, M., K., Kosar-Hashemi, B., Cmiel, M., Samuel, M., S., Chandler, P., Rahman, S., Buleon, A., Batey, I., L., Li, Z., (2003) Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *Plant J.*, 34, 173-185.
- Morita, N., Maeda, T., Miyazaki, M., Yamamori, M., Miura, H., Ohtsuka, I., (2002) Dough and baking properties of high-amylose and waxy wheat flours. *Cereal Chem.*, 79, 491-495.
- Morrison, W., R., Laignelet, B., (1983) An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *J. Cereal Sci.*, 1, 9-20.
- Nakamura, T., Yamamori, M., Hidaka, H., Hoshino, T., (1992) Expression of HMW *Wx* protein in Japanese common wheat (*Triticum aestivum L.*) cultivars. *Japan J. Breed.*, 42, 681-685.
- Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S., (1993a) Identification of Three *Wx* Proteins in Wheat (*Triticum aestivum L.*). *Biochem. Genet.*, 31, 75-86.
- Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S., (1993b) Decrease of waxy (*Wx*) protein in two common wheat cultivars with low amylose content. *Plant Breed.*, 111, 99-105.
- Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S., Nagamine, T., (1995) Production of Waxy (Amylose-free) Wheats. *Mol. Gen. Genet.*, 248, 253-259.
- Nakamura, T., Vrinten, P., Saito, M., Konda, M., (2002) Rapid classification of

partial waxy wheats using PCR-based markers. *Genome*, 45, 1150-1156.

Nakamura, Y., (1996) Some properties of starch debranching enzymes and their possible role in amylopectin biosynthesis. *Plant Sci.*, 121, 1-18.

Nelson, O., E., Rines, H., W., (1962) The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9, 297-300.

Olive, M., R., Ellis, R., J., Schuch, W., W., (1989) Isolation and nucleotide sequences of cDNA clones encoding ADP-glucose pyrophosphorylase polypeptides from wheat leaf and endosperm. *Plant Mol. Biol.*, 12, 525-538.

O'Shea, M., G., Samuel, M., S., Konik, C., M., Morell, M., K., (1998) Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of oligosaccharides: efficiency of labelling and high-resolution separation. *Carbohydr Res.*, 307, 1-12.

Perera, C., Lu, Z., Sell, J., Jane, L., (2001) Comparison of Physicochemical Properties and Structures of Sugary-2 Cornstarch with Normal and Waxy Cultivars. *Cereal Chem.*, 78, 249-256.

Poland, J., Endelman, J., Dawson, J., Rutkoski, J., Wu, S., Manes, Y., Dreisigacker, S., Crossa, J., Sánchez-Villeda, H., Sorrells, M., Jannink, J., L., (2012) Genomic selection in wheat breeding using genotyping-by-sequencing. *The Plant Genome*, 5, 3, 103-113.

Poustini, K., Siosemardeh, A., Ranjbar, M., (2007) Proline accumulation as a response to salt stress in 30 wheat (*Triticum aestivum L.*) cultivars differing in salt tolerance. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 54, 925-934.

Rahman, A., Wong, K-s., Jane, J-l., Myers, A., M., James, M., G., (1998) Characterization of SU1 isoamylase, a determinant of storage starch structure in maize. *Plant physiol.*, 117, 425-435.

Rahman, S., Li, Z., Batey, I., Cochrane, M., P., Appels, R., Morell, M., (2000) Genetic Alteration of Starch Functionality in Wheat. *J. Cereal Sci.*, 31, 91-110.

Rahman, S., Bird, A., Regina, A., Li, Z., Ral, j., P., McMaugh, S., Topping, D., Morell, M., (2007) Resistant starch in cereals: Exploiting genetic engineering and genetic variation. *J. Cereal Sci.*, 46, 3, 251-260.

Regina, A., Bird, A., Topping, D., Bowden, S., Freeman, J., Barsby, T., Kosar-Hashemi, B., Li, Z., Rahman, S., Morell, M., (2006) High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 3546-3551.

Ritsema, T., Smeekens, S., (2003) Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 223-230.

Robin, J., P., Mercier, C., Charbonniere, R., Copyright, A., (1974) Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chem.*, 51, 389-406.

Roldán, I., Wattebled, F., Lucas, M. M., Delvallé, D., Planchot, V., Jiménez, S., Pérez, R., Ball, S., D'Hulst, C., Mérida, A., (2007) The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J.*, 49, 3, 492-504.

Rydberg, U., Andersson, L., Andersson, R., Aman, P., Larsson, H., (2001) Comparison of starch branching enzyme I and II from potato. *Eur. J. Biochem.*, 268, 6140-6145.

Saito, M., Konda, M., Vrinten, P., Nakamura, K., Nakamura, T., (2004) Molecular comparison of *waxy* null alleles in common wheat and identification of a unique null allele. *Theor. Appl. Genet.*, 108, 1205-1211.

Saito, M., Nakamura, T., (2005) Two point mutations identified in emmer wheat generate null *Wx-A1* alleles. *Theor. Appl. Genet.*, 110, 276-282.

Saito, M., Vrinten, P., Ishikawa, G., Graybosch, R., A., Nakamura, T., (2009) A novel codominant marker for selection of the null *Wx-B1* allele in wheat breeding programs. *Mol. Breed.*, 23, 209-217.

- Sakulsingharoj, C., Choi, S. B., Hwang, S. K., Edwards, G. E. Bork, J., Meyer, C. R., Preiss, J., Okita, T. W. (2004) Engineering starch biosynthesis for increasing seed weight: the role of the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Sci.*, 167, 1323-133.
- Sasaki, T., Yasui, T., Matsuki, J., (2000) Effect of Amylose Content on Gelatinization, Retrogradation, and Pasting Properties of Starches from Waxy and Nonwaxy Wheat and Their F₁ Seeds. *Cereal Chem.*, 77, 1, 58-63.
- Scholz-Ahrens, K., E., Schrezenmeir, J., (2007) Inulin and oligofructose and mineral metabolism: The evidence from animal trials. *J. Nutr.*, 137, 2513S-2523S.
- Schweingruber, C., Rufener, S., C., Zünd, D., Yamashita, A., Mühlemann, O., (2013) Nonsense-mediated mRNA decay - Mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *BBA Gene Regulatory Mechanisms*, 1829, 6-7, 612-623.
- Sears, E., R., Miller, T., E., (1985) The history of Chinese wheat. *Cereal Res. Commun.*, 13, 261-263.
- Sestili F., Botticella E., Bedo Z., Phillips A., Lafiandra D., (2010) Production of novel allelic variation for genes involved in starch biosynthesis through mutagenesis. *Mol. Breeding*, 25, 145-154.
- Setiawan, S., Widjaja, H., Pakphongphairoj, V., Jane, J., L., (2010) Effects of drying conditions of corn kernels and storage at an elevated humidity on starch structures and properties. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 12260-12267.
- Shi, Y., C., Seib, P., A., (1995) Fine structure of maize starches from four *wx*-containing genotypes of the W64A inbred line in relation to gelatinization and retrogradation. *Carbohydr. Polym.*, 26, 2, 141-147.
- Shiomi, N., (2008) Food biochemical study on fructans and related synthesis enzymes. *J. Appl. Glycosci.*, 55, 25-33.
- Shure, M., Wessler, S., Fedoroff, N., (1983) Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus in maize. *Cell*, 35, 1, 225-233.

Singh, N., Cairns, P., Morris, V. J., Smith, A. C., (1998) Physical properties of extruded wheat starch-additive mixtures. *Cereal Chem.*, 75, 325-330.

Slade, A., J., McGuire, C., Loeffler, D., Mullenberg, J., Skinner, W., Fazio, G., Holm, A., Brandt, K., M., Steine, M., N., Goodstal, J., F., Knauf, V., C., (2012) Development of high amylose wheat through TILLING. *BMC Plant Biol.*, 12, 69. doi:10.1186/1471-2229-12-69.

Smith-White, B., J., Preiss, J., (1992) Comparison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources. *J. Mol., Evol.*, 34, 5, 449-464.

Soga, T., Serwe, M., (1999) Rapid Monitoring of Carbohydrates in Food with Capillary Electrophoresis. Publication number 5968-6985E, library on the web site of Agilent Technologies (<http://www.chem.agilent.com/scripts/PHome.asp>).

Stark, D., M., Timmerman, K., P., Barry, G., F., Preiss, J., Kishore, G., M., (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science*, 258, 287-292.

Stettler, M., Eicke, S., Mettler, T., Messerli, G., Hörtensteiner, S., Zeeman, S., C., (2009) Blocking the metabolism of starch breakdown products in *Arabidopsis* leaves triggers chloroplast degradation. *Mol. Plant*, 2, 1233-1246.

Stinard, P., S., Robertson, D., S., Schnable, P., S., (1993) Genetic isolation, cloning, and analysis of a *mutator*-induced, dominant antimorph of the maize amylose extender1 Locus. *Plant Cell*, 5, 1555-1566.

Takaoka, M., Watanabe, S., Sassa, H., Yamamori, M., Nakamura, T., Sasakuma, T., Hirano, H., (1997) Structural characterization of high molecular weight starch granule-bound proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2929-2934.

Takashima, Y., Senoura, T., Yoshizaki, T., Haniada, S., Ito, H., Matsui, H., (2007) Differential chain-length specificities of two isoamylase-type starch-debranching enzymes from developing seeds of kidney bean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2308-2312

Takeda, Y., Hizukuri, S., (1987a) Structure of branched molecules of amyloses of various origins and molar fractions of branched and unbranched molecules. *Carbohydr. Res.*, 165, 139-145.

Takeda, Y., Hizukuri, S., (1987b) Structures of rice amylopectins with low and high affinities for iodine. *Carbohydr. Res.*, 168, 79-88.

Tetlow, I., J., (2006) Understanding storage starch biosynthesis in plants: a means to quality improvement. *Can. J. Bot.*, 84, 8, 1167-1185.

The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, 345, 6194, DOI: 10.1126/science.1251788.

Tognetti, J., A., Salerno, C., L., Crespi, M., D., Pontis, H., G., (1990) Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. *Physiol. Plant*, 78, 554-559.

Topping, D., L., Clifton, P., M., (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.*, 81, 3, 1031-1064.

Topping, D., L., Morell, M., K., King R., A., Li, Z., Bird, A., R., Noakes, M., (2003) Resistant Starch and Health - *Himalaya 292*, a Novel Barley Cultivar to Deliver Benefits to Consumers. *Starch*, 55, 12, 539-545.

Tracy, W., F., (1997) History, Genetics, and Breeding of Supersweet (*shrunk2*) Sweet Corn. *Plant Breed. Rev.*, 14, 189.

Tracy, W., F., (2000) Sweet corn. In: *Specialty Corns Second Edition* (ed: A.R. Hallauer), pp. 155-199. CRC, Boca Raton, FL.

Umemoto, T., Yano, M., Satoh, H., Shomura, A., Nakamura, Y., (2002) Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between *japonica*-type and *indica*-type rice varieties. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 1-8.

Umemoto, T., Aoki, N., (2005) Single-nucleotide polymorphisms in rice starch synthase IIa that alter starch gelatinisation and starch association of the enzyme. *Funct. Plant Biol.*, 32, 763-768.

Umemoto, T., Horibata, T., Aoki, N., Hiratsuka, M., Yano, M., Inouchi, N. (2008) Effects of variations in starch synthase on starch properties and eating quality of rice. *Plant Prod. Sci.*, 11, 472-480.

van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, j., P., Buléon, A., Visser, R., Ball, S., (1998) Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin. *J. Biol. Chem.*, 273, 35, 22232-22240.

van Hoof, A., Green, P., J., (2006) NMD in plants. *Nonsense-Mediated mRNA Decay*, edited by Maquat L. E., *Eurekah. Com.*, Chapter 13, 167-172.

Wang, Z., Q., Yuan, Y., Z., Ou, J., Q., Lin, Q., H., Zhang, C., F., (2007) Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *J. Plant Physiol.*, 164, 695-701.

Wei, C., Xu, B., Qin, F., Yu, H., Chen, C., Meng, X., Zhu, L., Wang, Y., Gu, M., Liu, Q., (2010) C-Type Starch from High-Amylose Rice Resistant Starch Granules Modified by Antisense RNA Inhibition of Starch Branching Enzyme. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 7383-7388.

Wessler, S., Tarpley, A., Purugganan, M., Spell, M., Okagaki, R., (1990) Filler DNA is associated with spontaneous deletions in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8731-8735.

Wong, K., S., Jane, J., (1995) Effects of pushing agents on the separation and detection of debranched amylopectin by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Liq. Chromatogr.*, 18, 63-80.

Yamakawa, H., Hakata, M., (2010) Atlas of Rice Grain Filling-Related Metabolism under High Temperature: Joint Analysis of Metabolome and Transcriptome Demonstrated

Inhibition of Starch Accumulation and Induction of Amino Acid Accumulation. *Plant Cell Physiol.*, 51, 5, 795-809.

Yamamori, M., Nakamura, T., Endo, T., R., Nagamine, T., (1994) Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 89, 179-184.

Yamamori, M., Endo, T., R., (1996) Variation of starch granule proteins and chromosome mapping of their coding genes in common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 93, 275-281.

Yamamori, M., Fujita, S., Hayakawa, K., Matsuki, J., Yasui, T., (2000) Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylose. *Theor. Appl. Genet.*, 101, 21-29.

Yamamori, M., Quynh, N., T., (2000) Differential effects of Wx-A1, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 32-38.

Yamamori, M., Kato, M., Yui, M., Kawasaki, M., (2006) Resistant starch and starch pasting properties of a starch synthase IIa-deficient wheat with apparent high amylose. *Aust. J. Agric. Res.*, 57, 531-535.

Yamamori, M., (2009) Amylose content and starch properties generated by five variant *Wx* alleles for granule-bound starch synthase in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 165, 607-614.

Yamamori, M., Yamamoto K., (2011) Effects of two novel *Wx-A1* alleles of common wheat (*Triticum aestivum* L.) on amylose and starch properties. *J. Cereal Sci.*, 54, 2, 229-235.

Yan, H., Jiang, H., Pan, X., Li, M., Chen, Y., Wu, G., (2009) The gene encoding starch synthase IIc exists in maize and wheat. *Plant Sci.*, 176, 1, 51-57.

Yang, C., Z., Shu, X., L., Zhang, L., L., Wang, X., Y., Zhao, H., J., Ma, C., X., Wu, D., X., (2006) Starch properties of mutant rice high in resistant starch. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2, 523-528.

Yun, S., H., Matheson, N., K., (1990) Estimation of Amylose Content of Starches after Precipitation of Amylopectin by Concanavalin-A. *Starch*, 42, 302-305.

Zeeman, S., C., Kossmann, J., Smith, A., M., (2010) Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61, 209-234.

Zhang, X., Colleoni, C., Ratushna, V., Sirghie-Colleoni, M., James, M., Myers, A., (2004) Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa. *Plant Mol. Biol.*, 54, 865-879.

池田達哉、長嶺敬、矢野博、(2003) 小麦の硬質性にかかわるピュロインドリソリン遺伝子型の分類、*近畿中国四国農業研究成果情報*, 2002, 57-58.

小田聞多 (1988) 小麦デンプン特性と製めん適性、*食品工業*, 37, 17, 49-55.

小田桂三郎 (2001) ムギの分類と起源、*転作全書 第1巻ムギ (農文協編)*、農山漁村文化協会, 39-43.

檜作進 (2003) 澱粉の分子構造、*澱粉科学の事典 (不和英次、小巻利章、檜作進、貝沼圭二編)*、pp11-38、朝倉書店

貝沼圭二、坂野好幸 (1986) 澱粉の加水分解、*澱粉・関連糖質実験法 (中村道徳、貝沼圭二編)*、pp211-223、学会出版センター

河合美佐子 (2003) アミノ酸の味 その2、*Ajico News*, 209, 23-28.

木原均 (1973) 小麦の合成、*木原均随想集*、12-40、講談社

厚生労働省 (2010) 日本人の食事摂取基準 (2010年版) 4 炭水化物.

齊藤美香、小林史典、伊藤裕之、新畑智也、乙部千雅子、石川直幸、藤田雅也、石川五郎、中村俊樹 (2012) 連続戻し交雑による品種育成における DNA マーカー選抜の効率的適用に関する一考、*東北農研研報 (Bull. Tohoku Agric. Res. Cent.)*, 114, 55-65.

坂野好幸 (1986) II 澱粉の化学的および物理的分析法、II-7 糖、澱粉・関連糖質実験法 (中村道徳、貝沼圭二編)、pp41-47、学会出版センター、

鈴木孝子、佐藤導謙、神野裕信、中野浩司、佐藤奈奈、西村努、小林聡、池永充伸、吉村康弘、竹内徹 (2006) 北海道小麦品種における DNA マーカーを利用したピュロインドリン、グルテニン、Wx 遺伝子タイプの解析、育種・作物学会北海道談話会会報、47、89-90

谷口義則、中村和弘、伊藤裕之、平将人、中村俊樹、石川吾郎、吉川亮、八田浩一、前島秀和、伊藤美環子、中村洋、伊藤誠治 (2013) 寒冷地向け超強力小麦新品種「銀河のちから」の育成、東北農研研報 (Bull. Tohoku Agric. Res. Cent.), 115, 21-36.

谷中美貴子、高田兼則、石川直幸、長嶺敬 (2013) 製粉性と製麺適性に優れる日本麺用硬質小麦品種「ふくはるか」の育成、近畿中国四国農業研究センター研究報告、12号、7-23.

高田兼則、谷中美貴子、池田達哉、石川直幸 (2008) 日本麺用小麦の生地物性に対する Glu-A1 と Glu-D1 対立遺伝子の相互作用と gluA1 対立遺伝子の PCR マーカーの開発、育種学研究、10、41-48.

千葉茂行、高宮泰宏、長谷川寿保 (1986) スーパースイート系品種における形態的変異と分類、日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報、26、17、1986-02

長尾精一、久保田肇、品川剛、田谷省三、小柳敦史、関昌子、松中仁、外山正昭、藤木盛康 (2007) 種子の形態及び組成、小麦粉—その原料と加工品—改訂第四版、pp123-145、麦類研究会

中村保典 (2006) デンプンメタボリックエンジニアリング、化学と生物、44、3、155-162.

農林水産省 (2013) 麦の需給に関する見通し.

柳沢朗、吉村康弘、天野洋一、小林聡、西村努、中道浩司、荒木和哉、谷藤健、田引正、三上浩輝、池永光伸、佐藤奈奈 (2007) 秋まきコムギ新品種「きたほなみ」の育成、北海道立農試集報、91、1-13.

山田哲也、岡田実、高橋彰、西成勝好、北村進一 (2003) 澱粉の機能的性質、澱粉科学の

事典（不和英次、小巻利章、檜作進、貝沼圭二編）、pp193-217、朝倉書店

食品衛生検査指針（理化学編）（2005）厚生労働省監修、社団法人日本食品衛生協会.

謝辞

本研究の全体に渡り、多大なご指導とご鞭撻を頂きました、独立行政法人 農業食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター 中村 俊樹 博士に深く感謝いたします。また本研究の遂行にあたり、ご指導とご協力を頂きました、同センター 石川 吾郎 博士、齊藤 美香 博士、米丸 純一 博士(現 同機構 作物研究所)、Bioriginal Food&Science 社 Patricia L. Vrinten 博士に心より感謝いたします。SW 澱粉の分子構造解析を実施頂きました、江崎グリコ株式会社 生物化学研究所、鷹羽 武士 博士、柳瀬 美千代 博士に深く感謝いたします。生澱粉及び糊化澱粉の消化性に関する分析を実施頂きました、アイオワ州立大学 Jay-lin Jane 教授、Yongfeng Ai 博士に深く感謝いたします。シロガネコムギ準同質遺伝子系統を御提供頂いた、独立行政法人 農業食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター (現 同機構 作物研究所) 藤田 雅也 博士に深く感謝いたします。

最後に、本研究の機会を頂きました、日本製粉株式会社、ご支援頂きました中央研究所長、豊田 勝彦 様、清水 弘和 様、落合 潔 様、栗本 洋一 様、ならびに中央研究所の皆様、厚く御礼申し上げます。日頃からご指導、ご協力を頂きました、中央研究所生物科学研究所の皆様、関口 哲 所長、瀧屋 俊幸 博士、猪熊 貴之 氏、春原 愛 氏に篤く御礼申し上げます。