

## (第10回) 2014年度・研究助成報告

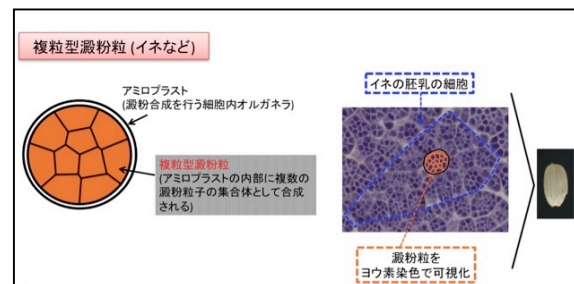
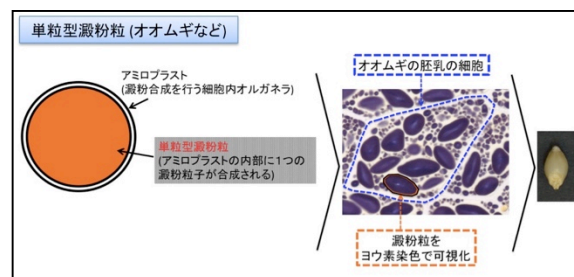
研究題名	植物が澱粉粒の大きさを決定するしくみとその利用
研究期間	2014年4月1日～2015(2016)年3月31日
研究機関・所属 研究者名	岡山大学 資源植物科学研究所 松島 良

## 1. 2014(2015)年度研究成果の概要

## 【背景】

澱粉は主食としてだけでなく、加工澱粉(化学修飾をした澱粉)という形で食品添加剤(増粘剤、安定剤、ゲル化剤)としても広く利用されている。澱粉粒の形状や大きさは、作物種によって異なる。オオムギ、コムギ、トウモロコシなどの植物では、1つのアミロプラストに1つの澱粉粒が形成される。このタイプの澱粉粒は、単粒型澱粉粒と呼ばれる(右図)。

一方、イネでは、1つのアミロプラストの内部に複数の小さな澱粉小粒子が形成され、その集合体として澱粉粒が形成される。このような澱粉粒は、「複粒型澱粉粒」と呼ばれる(右図)。



我々の研究グループでは、加工澱粉の製造効率ならびに機能性を限定する因子である「澱粉粒の形状と大きさ」に注目し、研究活動を行なっている。本研究では、申請者が独自に開発した方法によって単離したアミロプラストが巨大化するイネの突然変異体の解析を行い、澱粉粒の大きさを制御する分子群の同定を目指している。さらに、複粒型澱粉粒がどのように形成されるかについてモデルを構築しシミュレーション解析をしたので、報告する。

## 【実験方法】

我々はこれまでに澱粉粒が巨大化する $ssg6$ 変異体を単離し、その表現型解析を行なってきた。本研究では、マップベースクローニング法と相補性テストを行なうことにより、 $SSG6$ 遺伝子の同定を行なった。また、コシヒカリの登熟ならびに完熟種子の胚乳から薄切切片を作成し、ヨウ素染色により澱粉粒の成長過程を観察した。澱粉粒の形状解析は、画像解析ソフトImageJを用いた。研究の過程で、複粒型澱粉粒を構成する澱粉小粒子の形状が、複粒型澱粉粒の断面をボロノイ分割により分割した場合に得られる分割領域の形状と一致することを見出した。そのため、本研究では、ボロノイ分割を基盤として複粒型澱粉粒の形成過程のシミュレーション解析を行なった。ボロノイ分割の計算は、R環境とRuby環境を用いた。

## 【結果と考察】

### ①澱粉粒が巨大化する変異体の解析

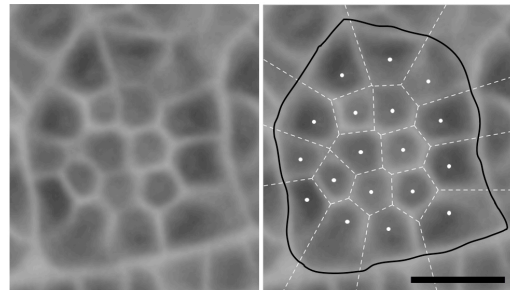
*ssg6* 変異体は、胚乳における澱粉粒の大きさに注目して、我々が単離したイネの突然変異体である。野生型に比べて胚乳の澱粉粒が巨大化している。その後の研究により、胚乳だけでなく、花粉に含まれる澱粉粒も影響を受けていることを明らかにしている。

本研究助成により *ssg6* 変異体の解析を進める事ができた。遺伝学的解析から、*ssg6* 変異体の原因遺伝子候補の単離に成功した。この遺伝子の野生型配列を *ssg6* 変異体に導入した結果、澱粉粒の大きさが野生型なみに回復したことから、この遺伝子が *ssg6* 変異体の原因遺伝子であると考えている。SSG6 タンパク質の細胞内局在性も明らかにした。以上の研究成果を論文(1)に発表した。今後澱粉粒の大きさに関する遺伝子の改変が、澱粉粒の大きさの制御技術の開発につながる事が期待される。

### ②複粒型澱粉粒の形成モデルの提唱

1つの複粒型澱粉粒は、複数の小さな澱粉小粒子の集合体として形成される。それぞれの澱粉小粒子は多角形を示し、ほぼ均一な大きさをしている。このような美しい形状が形成される仕組みについては、これまで分かっていない。これまでの我々の研究の過程で、複粒型澱粉粒を構成する澱粉小粒子の形状が、複粒型澱粉粒の断面をボロノイ分割により分割した場合に得られる分割領域の形状と一致することを見出した(右下図)。

図において、黒実線が1つの複粒型澱粉粒を示し、白点がボロノイ分割に用いた母点の位置、白点線がボロノイ分割を示す (Bar = 5  $\mu$ m)。複粒型澱粉粒を構成している澱粉小粒子の形状とボロノイ分割の形状が酷似していることが分かる。



本研究では、ボロノイ分割を基盤として複粒型澱粉粒の形成過程のシミュレーション解析を行なった。ボロノイ分割とは、分割対象の内部に複数の母点を想定し、分割対象を構成する点集合を「どの母点到最も近接しているか」という基準によって分割する方法である。複粒型澱粉粒内部の適切な位置に母点を想定すると、ボロノイ分割によって得られた各分割領域の形状は、澱粉小粒子の形状に良く一致していた。

この結果は、複粒型澱粉粒が形成される過程で、澱粉小粒子の合成について以下の3つの特徴を示唆している。①澱粉小粒子の合成開始のタイミングは、同一である。②それぞれの澱粉小粒子の成長スピードは同一である。③複粒型澱粉粒を構成する澱粉小粒子の数は登熟初期に決定され、完熟するまで変化しない。以上の結果は、複粒型澱粉粒がいかに形成されるかについて説明した初めてのモデルである。この研究成果は、論文(3)ならびに総説(1)に発表した。

## 2. 研究発表

### 【原著論文】

- 1) Amyloplast Membrane Protein SUBSTANDARD STARCH GRAIN6 Controls Starch Grain Size in Rice Endosperm.  
Matsushima, R.\*, Maekawa, M., Kusano, M., Tomita K., Kondo K., Nishimura N., Crofts N., Fujita N., Sakamoto W.  
*Plant Physiology* in press
- 2) Deficiency of Starch Synthase IIIa and IVb Alters Starch Granule Morphology from Polyhedral to Spherical in Rice Endosperm  
Toyosawa, Y., Kawagoe, Y., Matsushima, R., Crofts, N., Ogawa, M., Fukuda, M., Kumamaru, T., Okazaki, Y., Kusano, M., Saito, K., Toyooka, K., Sato, M., Ai, Y., Jane, J.-L., Nakamura, Y.  
*Plant Physiology* in press
- 3) Geometrical formation of compound starch grains in rice implements Voronoi diagram.  
Matsushima, R., Maekawa M., Sakamoto, W.  
*Plant Cell Physiology* 56: 2150-2157 (2015)
- 4) Amylopectin biosynthetic enzymes from developing rice seed form enzymatically active protein complexes.  
Crofts, N., Abe, N., Oitome, N. F., Matsushima, R., Hayashi, M., Tetlow, I. J., Emes, M. J., Nakamura, Y., Fujita, N.  
*Journal of Experimental Botany* 66: 4469-4482 (2015)
- 5) Deficiencies in both starch synthase IIIa and branching enzyme IIb lead to a significant increase in amylose in SSIIa- inactive japonica rice seeds.  
Asai, H., Abe, N., Matsushima, R., Crofts, N., Oitome, N. F., Nakamura, Y. Fujita, N.  
*Journal of Experimental Botany* 65: 5497-5507 (2014)

### 【総説】

- 1) Morphological variations of starch grains.  
Matsushima, R.  
*Starch: Metabolism and Structure* Y. Nakamura, ed (Springer Japan) Chapter 13: pp 425-441 (2015)
- 2) Thin sections of Technovit 7100 resin of rice endosperm and staining  
Matsushima, R.  
*Bio-protocol* 4: e1239 (2014)

### 【学会発表】

- 1) 松島良 (2015) 植物が澱粉粒の大きさを決定するしくみとその利用. 粉体工学会春期研究発表会
- 2) 松島良・前川雅彦・坂本亘 (2015) イネ胚乳の澱粉粒形成機構のシミュレーション解析. 育種学研究17 (別1):220
- 3) 松島良 (2014) 穀類の澱粉粒の形状多様性についての研究. おかやまバイオアクティブ研究会 第45回シンポジウム