



岡山大学資源植物科学
研究所 非常勤研究員
氷見英子

共同研究者
松浦恭和

1993年 日本女子大学家政学部家政理学科卒業
1995年 広島大学大学院理学研究科修士課程修了
2002年 岡山大学大学院自然科学研究科博士課程
修了
2002年 岡山大学非常勤研究員
2010年 岡山大学研究生
2012年 岡山大学非常勤研究員

オオムギおよびコムギの種皮色素合成と貯蔵タンパク 質合成との相互作用

1. 目的

コムギは世界の三大穀類の一つであり、パンを始め麺やお菓子などの主原料である。日本においても一世帯当たりのパンの購入金額が米の購入金額を上回り(総務省・2011年度家計調査)、その重要性は年々高まっている一方で、コムギの自給率は12%程度にとどまっている。その大きな理由は収穫期の降雨によって刈り取り前に種子が穂についたまま発芽する「穂発芽」という現象である(図1)。穂発芽は種子内のデンプンを分解し小麦粉の品質を著しく低下させるため、日本では穂発芽耐性(休眠の強い)コムギの育成が強く望まれている。経験的に種子の色が種子休眠に関係があることが古くから知られており、種皮色の赤い赤粒コムギは白粒コムギよりも休眠が強く、穂発芽しにくい。そのため日本で栽培されているコムギのほぼ全ての品種が赤粒コムギであるが、赤粒コムギを製粉した小麦粉は色が悪いという難点がある。日本以外でも収穫期に降雨の多いイギリスなどではかねてから同じ問題点が指摘され、休眠に強く色の悪い赤粒コムギが栽培されている。しかし近年の世界的な天候不順により、これまで穂発芽被害が少なかったために色の良い白粒コムギが栽培されていたロシア、カナダ、アメリカなどのコムギ主要産出国において穂発芽現象が多発している。このために輸出量が制限され、日本国内においても小麦粉の値段が上昇していることは周知の通りである。



図1. コムギの穂発芽

このようにコムギは世界的に主要な作物であり、さらに穂発芽のメカニズム解明は急務であるにもかかわらず、他の植物に比べて研究が遅れているのが現状である。その理由はゲノムサイズが一般的なモデル植物であるアラビドプシスの約100倍と巨大であること、またコムギはA, B, Dの3つのゲノムから構成される異質6倍体であること、さらにコムギは倍数体のため突然変異体の作出が極めて難しいことも遺伝子レベルでの実験を困難に

している。

そこで本実験はコムギと同じ麦類で遺伝子配列が類似している 2 倍体のオオムギをモデル植物として用いた。オオムギの種子色素であるプロアントシアニジンはビールのにごりを引き起こすため、プロアントシアニジンを欠失した突然変異体(*ant* 突然変異体)が既に多数単離されている。この突然変異体を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、発現に差のあった遺伝子には、色素合成に関わるとみられる酵素遺伝子が予想通り多数見いだされたが、驚くべきことに、種子色素合成とは一見何の関連もないとみられる種子特異的に蓄積されるタンパク質をコードする遺伝子も複数見いだされた。

これまで種子色素と休眠との関連は複数の報告があるが、種子色素と種子貯蔵タンパク質との関連、さらには休眠と種子貯蔵タンパク質との関連を示すデータはほとんどない。そこで本研究では種子色素の合成と種子貯蔵タンパク質の合成との関連性について明らかにすることを目的に、それぞれの合成に関与する因子の特定とメカニズムの解明を試みるとともに、さらに種子休眠への影響について調査した。

2. 内容・方法

実験の流れを図2に示す。

これまでの実験で、種皮にプロアントシアニジンを含まない突然変異体(*ant* 突然変異体)とプロアントシアニジンを含む野生型を用いてマイクロアレイ解析を行った。変異体で発現量が低下する遺伝子を探索したところ、色素合成に関わる遺伝子群と、種子貯蔵タンパク質合成に関わる遺伝子群が見いだされている。

本研究では

- (1) *ant* 変異体の種子タンパク質調査
- (2) 色素が欠失する原因となった *Ant* 遺伝子の探索
- (3) *ant* 変異体の休眠性調査について実験を行った。

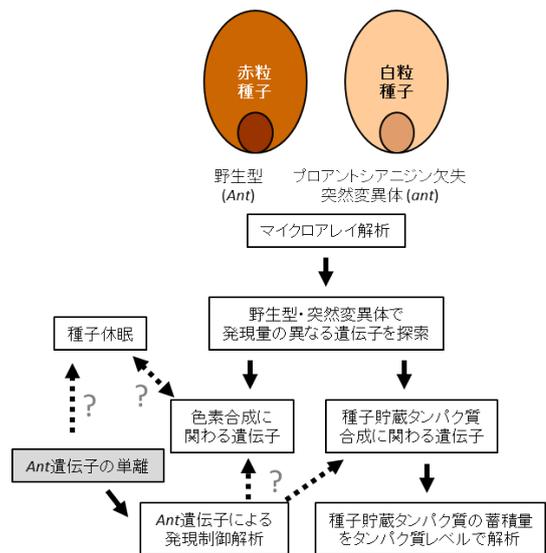


図2. 実験の流れ
種皮にプロアントシアニジンを蓄積した野生型(*Ant*)と、*Ant*遺伝子に変異を起こしプロアントシアニジンを含まない突然変異体(*ant*)でマイクロアレイ解析を行った。発現量の異なる遺伝子を探索し、色素合成に関わる遺伝子および種子貯蔵タンパク質合成に関わる遺伝子群が見いだされた。本実験では*ant*変異体の種子内での貯蔵タンパク質量をタンパク質レベルで解析するとともに、*ant*遺伝子の種子休眠について調査した。変異の起こった*Ant*遺伝子の座標位置は解析したが、単離には至らなかった。なお、点線の矢印は発現制御の可能性を示している。

3. 結論

- (1) *ant* 変異体の種子タンパク質調査

野生型および *ant* 変異体の完熟種子を半切し、種子内側の胚乳部分をミニルーターで削りだした。25mg の胚乳粉を材料にアルコール可溶・不溶性画分をそれぞれ抽出し、SDS 電気泳動を行った。

その結果を図3に示す。野生型(*Ant*)および変異体(*ant*)それぞれのアルコール可溶・不溶性画分を SDS 電気泳動したところ、可溶性画分に主に含まれるプロラミン、不溶性画分に主に含まれるホルデンとともに、同じパターンを示した。このことから、*ant* 変異体の

種子タンパク質組成は野生型と同じと考えられた。

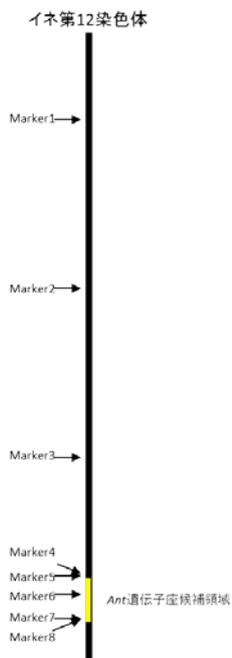


図4. Ant遺伝子座候補領域
Ant遺伝子座はイネ第12染色体とコリニアリティが認められる領域に座乗していると予想される

(2) 色素が欠失する原因となった *Ant* 遺伝子の探索

ant 変異体を「赤神力」と交配し、得られたF₂集団を用いてマッピングを行った。その結果、イネの第12染色体とコリニアリティが認められる領域に座乗していたことから、この *Ant* 遺伝子座はオオムギ 5H 染色体上に座乗していると考えられる。

(3) *ant* 変異体の休眠性調査

一般的に白粒種子は赤粒種子に比べて休眠性が弱く、穂発芽しやすいことが知られている。この *ant* 変異体は種皮にプロアントシアニジンを含まない白粒系統であることから、種子休眠を調査した。

その結果を図5に示す。野生型および *ant* 変異体の種子を開花後30日目では発芽しにくく、休眠しているが、日数を経るにつれ徐々に休眠がさめて発芽しやすくなる。*ant* 変異体は野生型に比べてやや発芽しやすいが、有意差は見られず、休眠性は同程度と考えられた。

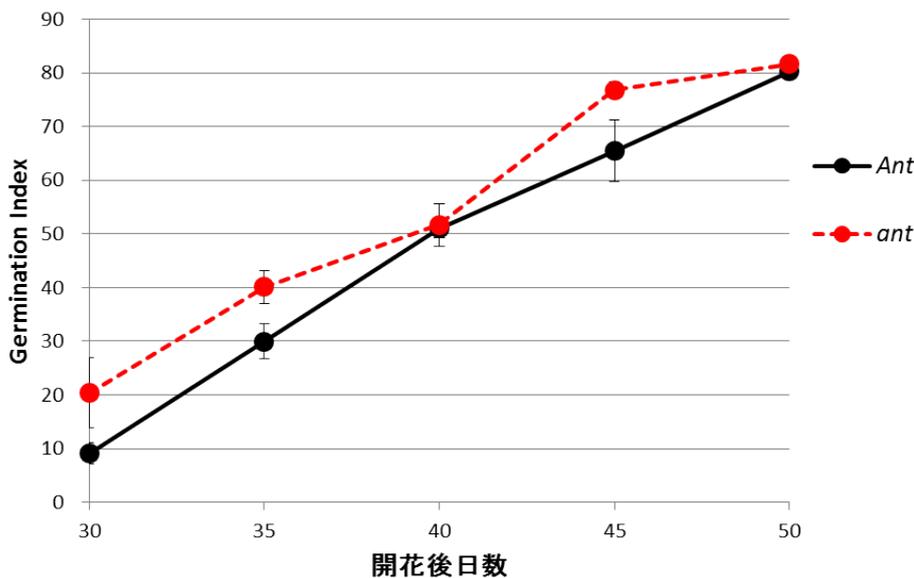


図5. 野生型(*Ant*)と*ant*変異体の休眠性試験
開花後30日目から5日おきに50日目までの種子を採取し、吸水させたあと7日間発芽種子数を調査した。縦軸は早く発芽したものに重みづけをした Germination Indexであり、「発芽しやすさ」を示す。

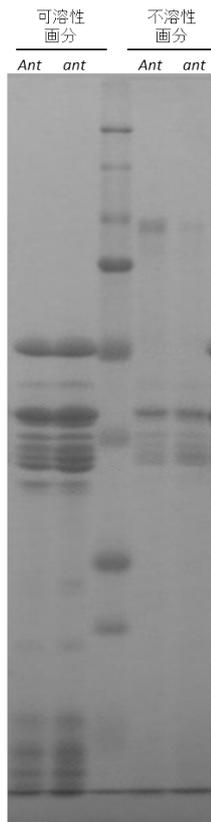


図6. 種子貯蔵タンパク質SDS電気泳動
野生型(*Ant*)および*ant*変異体の種子胚乳から得られたアルコール可溶性画分(左側)、アルコール不溶性画分(右側)を泳動した。

4. 考察

本実験で用いた *ant* 変異体は種皮にプロアントシアニジンを含まない変異体である。この変異体は種皮色素を合成しないが、植物体の葉耳や芒ではアントシアニン着色が見られることから、アントシアニン/プロアントシアニジン合成に関わる酵素遺伝子ではないと考えられている。

野生型 (*Ant*) と *ant* 変異体の未熟種子から RNA を抽出し、マイクロアレイを行ったところ、種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子に発現量の差が見られた。このことからこの *ant* 変異体は種子貯蔵タンパク質の組成あるいは蓄積量に変化があると予想されたが、今回 SDS 電気泳動を行った結果、組成は野生型および *ant* 変異体で同じであった。しかしながらこの *ant* 変異体の種子は野生型に比べて細い傾向が見られたことから一粒あたりのタンパク質量には差異がある可能性が考えられる。また今回はデンプンについて解析が出来なかったため、今後デンプン含量について調査する必要があると考えられる。

この *ant* 変異体の原因遺伝子は今回特定に至らなかったが、F₂ 集団を用いたマッピングにより、イネの第 12 染色体とシンテニーのあるオオムギ 5H 染色体上に座乗していることが明らかになった。今後はさらにマーカーを増やして実験することでより詳細な座乗位置を特定し、これまでに明らかになっているイネのゲノム情報を利用することで原因遺伝子の単離に近づけると予想される。

また今回の実験で特筆すべきことは、休眠性調査の結果この *ant* 変異体は野生型に比べて同程度の休眠性を示したことである。これまで種子色を欠落したコムギやオオムギでは休眠性が低下し、穂発芽しやすいことが知られてきた。最終加工品の色に直接影響するコムギはもちろん、オオムギの種皮色素は炊飯後褐変やビールのにごりに影響するため、色の良い白粒系統の作出が望まれてきたが、穂発芽耐性を失うことから栽培が難しいとされてきた。今回着目した *ant* 変異体は休眠性が低下しないことから、今後の新しいオオムギ品種育成にも利用できると思われる。今後この *Ant* 遺伝子座が単離されることで、コムギへの応用も大いに期待できる。

5. 要約

オオムギやコムギの種子色は最終加工品の色に影響する重要な品質項目である。一方で色の良い白粒系統は休眠性が弱く穂発芽しやすい。本実験では種皮色素を欠失した *ant* 変異体について、種子タンパク質解析および休眠性調査を行い、貯蔵タンパク質の組成に変化が見られないこと、さらに休眠性が低下しないことを明らかにした。*ant* 変異体と赤神力とを交配して得られた F₂ 集団を用いたマッピングにより、原因遺伝子は 5H 染色体に座乗していることが明らかになった。

6. その他

<研究発表>

Eiko Himi, Shin Taketa

Grain color is controlled by MYB transcription factors

The 12th International Wheat Genetics Symposium, 2013 年 9 月 10 日

氷見英子・前川雅彦・松浦恭和・武田真

ゲノム DNA を用いたリアルタイム PCR によるコムギ種子色に関する Tamyb10-D1 遺伝子ホモ/ヘテロ接合性判定

第 124 回日本育種学会、2013 年 10 月 12 日

氷見英子

フラボノイド化合物が種子休眠に及ぼす影響

第 18 回穂発芽研究会、2014 年 1 月 29 日

氷見英子

コムギ・オオムギを用いた種子色と種子休眠の関連性

日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会例会、2014 年 1 月 30 日

氷見英子・塔野岡卓司・武田真

オオムギプロアントシアニジンレス *ant* 遺伝子が種子休眠性におよぼす効果の準同質遺伝子系統を用いた解析

第 125 回日本育種学会、2014 年 3 月 22 日

7. 謝辞

本研究に助成下さいました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に心から感謝いたします。助成者は健康上の理由で一時研究から離れていましたが、2010 年から再度研究生として研究を再開させ、2012 年から非常勤研究員として研究を行っています。文科省の科学研究費を始め多くの財団助成金は申請資格を常勤研究者に制限しており、貴財団のように年齢および肩書きを制限せずに広く門戸を開いている研究助成財団は数少ないのが現状です。今回採択され、助成を頂いたおかげで実験を行うことが出来、またそれらの成果を発表する機会を頂き、さらには日本育種学会で優秀発表賞を頂くことが出来ました。重ねて感謝を申し上げます。

種子タンパク質の電気泳動につきましては（独）農研機構 近畿中国四国農業研究センター小麦育種研究グループ主任研究員の池田達哉博士にご指導いただきました。

最後に、本研究課題をご推薦下さいました岡山大学資源植物科学研究所武田真教授にお礼申し上げます。