

# 新規粉質突然変異米による米粉パン好適性品種への挑戦

弘前大学 農学生命科学部  
濱田 茂樹

## 1. 研究の目的と背景

わが国の食料自給率は38%まで低下しており、輸入小麦の一部を米で代替する米粉利用の促進は極めて重要な課題である。米粉加工では、粘りや旨みといった米自身の品質だけでなく、製粉条件がその後の加工性に大きく影響することや、粉碎時の歩留まりや玄米収量性がコストにも反映されることから、解決しなければならない問題点が多い。特に米粉を用いた製パン、すなわち米粉パンにおいては、米の品質や粉体特性がパンの膨らみに大きく影響することが知られている。これまでの食味向上を主眼とした水稲品種開発から、製粉性や加工性、収量性を兼ね備えた品種の作出が重要である。本課題では、これまでに作製・選抜した粉質米突然変異系統について、詳細な製粉特性や米粉品質、米粉パンの加工適性、さらには原因遺伝子の解明を行うことで、新たな米粉パン用品種育成の基盤形成を目指した。

## 2. 研究の方法

### 2-1. 新規粉質米の外観品質

選抜された新規粉質米突然変異系統①～③について、走査電子顕微鏡 (SEM) による種子断面構造を観察し、原品種「つがるロマン」と比較した。切断面を金でコーティングし、SEM (JSM-5300, 日本電子) により種子中心部の構造を観察した。

### 2-2. アミロース含量および損傷デンプン含量の測定

アミロース含量はヨウ素染色法を用いて行った。米粉100 mgに99.5%エタノール1 ml, 1N-NaOH 9.0 mlを加えて攪拌し、10分間煮沸した。煮沸後、蒸留水で50 mlにメスアップし攪拌したものを測定試料とした。測定試料5 mlに1N-酢酸1 ml, KI-I<sub>2</sub> 2 mlを加え、蒸留水で50 mlにメスアップして混和し、27°C, 20分間保持し620 nmの吸光度を測定した。市販もち粉 (アミロース含量0%) および、つがるロマン (アミロース含量19.0%) を基準に突然変異系統のアミロース含量を算出した。損傷デンプン含量 (%) は、損傷デンプン分析キット (日本バイオコン株式会社) を用いた酵素法で測定した。

### 2-3. 米粉粒度分析

米粉の粒度分布は、レーザ回折式粒度分布測定装置 (マルバーン・パナリティカル社 マスターサイザー 3000)

により乾式測定を行い測定した。一度の測定で3回連続で行われるレーザ回折を三度繰り返す (計9回計測)、安定して測定できた9回分の測定結果の平均を粒度分布とした。

### 2-4. 製パン試験

粉体の混合割合は米粉80%, グルテン20%とした。米粉360 gに対してグルテン90gを加え、副材料として砂糖31.5 g, スキムミルク13.5 g, 塩6.75 g, ドライイースト6.75 g, ショートニング36 gを添加し、水373.5 mlとともにミキサーで捏ねて生地を作製した。一次発酵および二次発酵をそれぞれ10分間行った後、モルダーでガス抜きおよび成形を行い、ホイロ (湿度85%, 温度38°C, 約1時間) を行った。焼成は190°Cのオーブンで25分間行った。焼成後、約1時間室温に放置することで粗熱をとり、ジップロックバックに入れ一晚25°Cの恒温器に入れ保管した。一晚保管した後にパンの比容積の測定を行った。各系統につき4斤作製した。比容積は菜種置換法で測定した。

### 2-5. 次世代シーケンス解析

粉質米突然変異系統①および原品種つがるロマンの幼葉期の葉からゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンスにより解析した。ゲノム抽出には、DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) を用い、選抜した突然変異系統①のF<sub>2</sub>世代10個体の葉からバルクでゲノムDNAを抽出した (図1)。次世代シーケンス解析は、マクロジェン社に委託しIllumina HiSeqX (Illumina) によって行われ、シーケンスデータのアライメントおよび比較解析は東北化学薬品生命システム情報研究所に委託した。

#### 次世代シーケンスによる SNP 解析

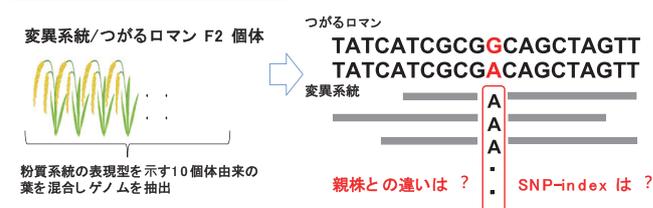


図1 次世代シーケンサーによる SNP 解析のイメージ

## 2-6. CAPS マーカーによるジェノタイプング

粉質米突然変異系統①とつがるロマンの交雑 F<sub>2</sub> 世代について、玄米の粉質形質とジェノタイプの相関を調べるため、次世代シーケンスの解析結果をもとに CAPS マーカーを構築した。候補遺伝子の配列からプライマーを設計し、F<sub>2</sub> 個体の葉から抽出した DNA を鋳型として KOD FX Neo (東洋紡) を用いた PCR により得られた増幅断片を制限酵素 *Hae*III (TaKaRa) で切断することで確認した。

## 3. 研究内容および実施経過

つがるロマン突然変異約 6000 系統から見出された 3 系統の新規粉質米は、外観が白濁し結晶性の低い構造であることが考えられ、製粉特性の向上が期待された。選ばれた新規粉質米について、以下の解析を行った。

### 3-1. 米粉の品質および製パン特性の解析

#### 1) 粉質突然変異系統の種子形態

粉質米突然変異 3 系統の種子形態について、原品種つがるロマンと比較した結果を図 2 にまとめた。粉質系統の外観はいずれも若干の歪みは見られるものの、重量とともに原品種のつがるロマンに比べて大きく劣ることはなかった。胚乳内部のデンプン構造に関しては、つがるロマンが結晶性の高い密な構造であるのに対して、粉質系統はいずれもデンプン粒が丸みを帯びており、結晶性の低いことが明らかとなった。

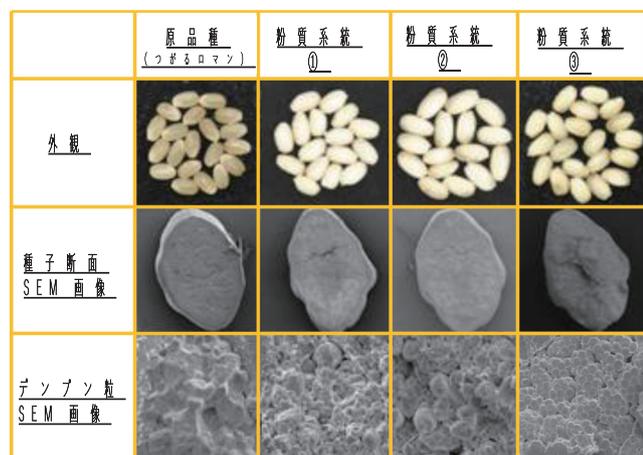


図 2 粉質突然変異系統の外観およびデンプン粒観察

#### 2) 粉質米突然変異系統由来米粉の粉体および製パン特性

本実験で使用した 3 種類の粉質米突然変異系統の粉体特性を示した (表 1)。製粉は乾式のピルミル粉砕機によって行い、パンの膨らみに影響するアミロース含量および損傷デンプン含量を測定した。見かけのアミロース含量は原品種つがるロマンと比較していずれの粉質系統も 3 ~ 5% 程度低く、低アミロース性を示した。これはパンの食感は柔らかくなるものの、膨らみにはネガティブに作用する要因となる。一方で、損傷デンプン含量は原品種つが

るロマンよりも、いずれの粉質系統も 2 ~ 3% 程度低く、パンの膨らみにはポジティブに作用する結果となった。この損傷デンプンの低下は、粉質性による製粉特性の向上によるものと考えられる。

粒度分布測定の結果、いずれの粉質突然変異系統もつがるロマンと比べて、米粉がより細くなっていることが明らかとなった (図 3)。つがるロマンの中位径は 75 μm であるのに対して、粉質系統は 55 ~ 58 μm 程度であった (表 1)。特に、粉質系統①は、他の米粉と比べてより細かい 20 μm 程度の割合が多い特徴的な結果を示した。

原品種つがるロマンおよび 3 種の粉質系統の米粉を用いて行った製パン試験の結果、つがるロマンの比容積は 3.17 cm<sup>3</sup>/g であるのに対して、粉質系統①は 3.46 cm<sup>3</sup>/g、粉質系統②は 3.39 cm<sup>3</sup>/g、粉質系統③は 3.15 cm<sup>3</sup>/g であり、特に変異系統①が、より製パン性の優れた系統であることが明らかとなった (図 4)。

表 1 米粉粉体特性

	水分 (%)	アミロース含量 (%)	損傷デンプン (%)	中位径 (μm)
つがるロマン	11.7	19.0	10.7	75.0
粉質系統①	12.2	14.7	8.02	55.3
粉質系統②	12.2	16.3	7.65	58.3
粉質系統③	12.3	13.5	7.97	57.3

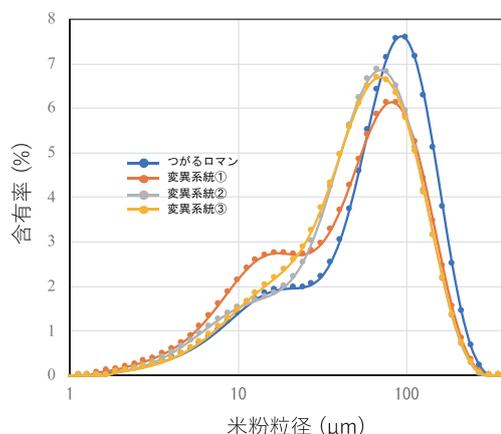


図 3 米粉の粒度分布

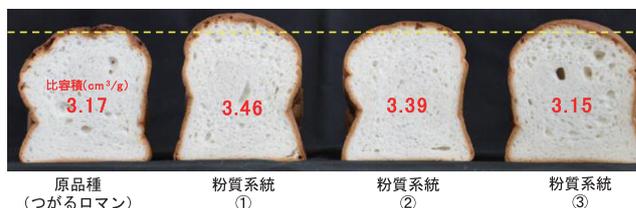


図 4 製パン特性

### 3-2. 原因遺伝子の解明と選抜マーカの作成

上記の製パン試験の結果から、膨らみの良かった粉質系統①について、全ゲノムのリシーケンスを行い原品種つがるロマンのゲノム配列と比較した。粉質系統①のつがるロマンに対する SNP-index に基づき、数種の候補遺伝子に絞り込んだ。その中に偶然にも、粉質米の原因遺伝子とし

て知られる Pyruvate phosphate dikinase (PPDK) 遺伝子上に SNP が存在したことから、PPDK を原因遺伝子候補とした。粉質系統①の PPDK 遺伝子上に見出された G→A の SNP は、グリシンからアスパラギン酸へのミスセンス突然変異であり、コードされる PPDK の酵素活性への影響が推測された (図 5 (A))。SNP 箇所をもとに CAPS マーカを構築し、粉質の形質とジェノタイプの相関を確認した。粉質系統①とつがるロマンの F<sub>2</sub> 世代において、5 個体の粉質粒と 10 個体の普通粒の個体について遺伝解析を行ったところ、粉質形質と PPDK 遺伝子のジェノタイプが完全に一致した (図 5 (B))。また、F<sub>2</sub> 世代の分離比がおおよそ 3:1 (普通粒:粉質粒) であったことから (data not shown)、粉質系統①の原因遺伝子は PPDK 遺伝子の新規アレルで、潜在的な一遺伝子によるものと考えられた。

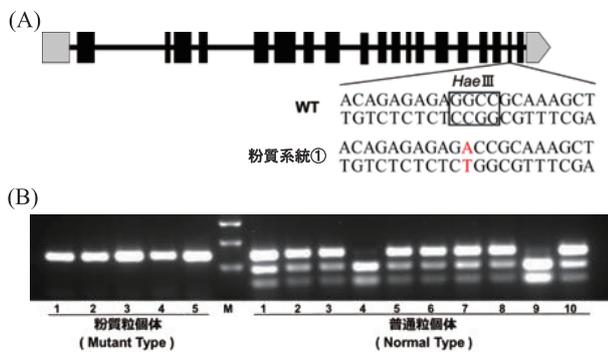


図 5 粉質突然変異系統①原因遺伝子の同定

- (A) 次世代シーケンサーによる SNP 解析: PPDK の遺伝子構造および SNP の箇所  
 (B) CAPS マーカーによるジェノタイプング

#### 4. 研究から得た結論・考察

食料自給率向上や安定的な食料生産の観点から、米の新規用途開発が強く求められており、健康志向からの機能性成分や米粉加工用など多様な形質をもった品種の開発が望まれる。本研究では、つがるロマン突然変異系統から見出した粉質性の変異系統の品質と原因遺伝子を解明することで、新たな米粉用品種開発のための基盤形成を目指した。見出された 3 種の粉質性突然変異系統はいずれもつがるロマンと比較して、より細かい粉体粒度およびデンプン損傷度の低下を示したことから、粉体特性の向上が明らかとなった。一方で、突然変異の多面的な影響として見かけのアミロース含量の低下も観察された。アミロース含量の低下は、パンの柔らかさを助長し潰れやすくなってしまいう傾向がある。このことから、粉質性による製粉特性の向上効果が、アミロース含量低下で相殺されている可能性が考えられた。しかしながら、突然変異系統は十分なパンの膨らみを示し、特に粉質変異系統①はつがるロマンに比べ製パン適性も向上することがわかった。次世代シーケンスおよび CAPS マーカーによる原因遺伝子の解析から、粉質変

異系統①の原因遺伝子は、既存粉質米の PPDK 遺伝子の新規アレルであることが明らかとなった。この PPDK 遺伝子中の SNP は、グリシンからアスパラギン酸へのミスセンス突然変異を起こし、酵素活性を低下させることが推察された。以上のことから、本研究成果によって、製パンに適した米粉用品種育成の母本となる有用な粉質性突然変異系統を見出すことができた。また、原因遺伝子を同定できたことで、効率的な選抜を可能にする分子マーカーを構築することができた。

#### 5. 残された問題、今後の課題

米の粉碎の難しさが故に、これまでのパン用米粉は水浸漬による湿式気流粉碎法といった高コストな粉碎法が必要であった。粉碎性の良い粉質系統も育成されたが、収量性・精米歩留まりの悪い系統が多く、米粉普及が進まない原因となっていた。本研究成果により、製粉性や製パン性に優れた品種開発が期待できる。研究で用いられた粉質性突然変異系統は、見かけのアミロース含量が低いことが明らかとなった。これは日本人の好む柔らかい食感を可能にするものの、一方で、パンの型崩れを引き起こし、膨らみを低下させる要因でもある。今後は、高アミロース系統と交配することで、優れた製粉特性をそのままに、よりパンの膨らみを向上させる品種へと育成を進める必要がある。それには、本研究で明らかにされた原因遺伝子の選抜マーカーにより効率的な品種育成が可能となる。原因遺伝子として明らかにされた PPDK 遺伝子は粉質性を誘導する既知遺伝子ではあるが、これまでの系統は PPDK 活性の完全欠失型であった。糖代謝に関わる重要な当該酵素の完全欠失は米の収量性も低下させることから母本として課題があった。本研究で解析された突然変異系統は、一アミノ酸置換のミスセンス変異であることから、部分的に活性が残されていることが推測される。このことは、粉質性をそのままに、収量低下も抑制できることが期待される。今後は突然変異によるアミノ酸置換が PPDK 活性に及ぼす酵素学的な影響を解析することや、実際に栽培した際の収量性を確認する必要がある。

#### 6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所ならびに関係者の皆様に心から感謝申し上げます。