

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「デンプンメタボリックエンジニアリングの開発」
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

中村 保典 (秋田県立大学生物資源科学部教授)

主たる研究代表者

都筑 幹夫 (東京薬科大学生命科学部教授(平成12年12月～))

碓氷 泰市 (静岡大学農学部教授(平成15年4月～))

Sadequr Rahman (豪州CSIRO(平成13年4月～))

3. 研究内容及び成果

### 3-1. 研究課題全体の研究内容

デンプンの主成分であるアミロペクチンの合成代謝システムを明らかにするために、関連主用酵素群がアミロペクチンの構造決定にどのように寄与するかに重点を置いて解析した。

さらにそれら酵素遺伝子を組み込んだイネ形質転換体のアミロペクチンを解析し、新規デンプンを作る系の開発をめざした。

### 3-2. 研究成果

高等植物のアミロペクチン合成代謝には少なくとも4クラスの酵素が関与する[ADP グルコースピロフォスホリラーゼ(ADPglucose pyrophosphorylase, AGPase;ADP グルコースの合成)、スターチシンターゼ(starch synthase, **SS**;  $\alpha$ -1,4 結合を伸長)、デンプン枝作り酵素(starch branching enzyme, **BE**;  $\alpha$ -1,6 結合を形成)、デンプン枝切り酵素(starch debranching enzyme, **DBE**;  $\alpha$ -1,6 結合を加水分解;基質特異性が異なるイソアミラーゼ ISA とプルラーナーゼ PUL の2タイプがある)。そして、各クラスの酵素には複数のサブユニットまたは複数のタイプのアイソザイムを有するのが植物の特徴で、全体の構成が極めて複雑である。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

#### ○イネデンプン合成システムの解明(中村保典グループ)

主要なキー酵素、即ち、SS の3酵素(SS1, SSIIa, SSIIIa)、BE の3酵素(BE1, BEIIa, BEIIb)、DBE の3酵素(ISA1, ISA2, PUL)についての機能をほぼ特定でき、それらが欠損した場合のデンプン構造や物性への影響に関する基本スキームを立てることができるようになった。こうした成果に基づいて、新アミロペクチン合成モデルを提唱した。

#### ○イネ組換え体を利用したデンプンエンジニアリング(中村保典グループ;一部遺伝子を都筑幹夫グループ、S. Rahman グループが提供)

アミロペクチン合成に関与し、構造決定に必須である3クラスの酵素(SS、BE、DBE)のうち、各アイソザイムの中で最も機能が特異的で、従って最もアミロペクチン構造への影響が顕著な酵素(SSIIa、BEIIb、ISA1)について、アミロペクチンエンジニアリングを試みた。

1) スターチシンターゼ(SS)エンジニアリング: SSIIa 遺伝子

S型アミロペクチンを合成するジャポニカ型イネにL型アミロペクチンを合成するインディカ型イネのSSIIa遺伝子を導入すると、形質転換体のアミロペクチンはL型を表現する。SSIIa発現レベルの異なる系統間を比べると、発現レベルに応じて、同一パターンでアミロペクチン構造が変化し、かつその構造変化の大きさとデンプンの熱糊化特性の間には強い相関があった。このことは、SSIIa発現レベルを制御することでL型とS型の間間的な構造を含む種々の構造のアミロペクチンと異なる物性を示すデンプンができることを示している。

2) デンプン枝作り酵素(BE)エンジニアリング: BEIIb 遺伝子

BEIIbタンパク質レベルが増加するにつれて、アミロペクチンクラスターの鎖数は野生型より過多になる。このクラスター構造の変化はデンプンの糊化特性に顕著な変化を引き起こし、BEIIbレベルの増加に伴い次第に易糊化性になる。BEIIb活性が過剰に多い条件下では、クラスター構造が崩れ、親水性の多糖ができる。親水性・保水性の高いデンプンは工業品や化粧品などの素材として有望であり、BEIIb制御法は有用なデンプンを作る可能性が高い方法である。

3) イソアミラーゼ(ISA)エンジニアリング: ISA1 遺伝子制御

ISA1遺伝子が欠損したイネはシュガリー-1変異体と呼ばれ、胚乳のデンプンがすべてフィトグリコーゲンに変わった系統である。このような系統にコムギの正常なISA1遺伝子を導入したところ、フィトグリコーゲンがアミロペクチンに変わり、デンプン粒構造も復元された。つまり、正常なアミロペクチン合成にはISAが必須であり、ISA制御によってアミロペクチン構造とデンプン物性をさまざまに改変できることを示す。

以上、アミロペクチン構造の改変を通じてデンプン粒の形態やデンプンの物性を変えるメタボリックエンジニアリングが極めて有効な手段であることを明らかにした。デンプンは元来糊化性、親水・疎水性、フィルム形成能などを持つユニークな物質である。本方法によって、天然の植物デンプンではカバーし切れない範囲まで、物性を大幅に変動させることができ、新デンプン素材の作出に極めて有望である。

○藻類ポリグルカン合成系の解析と利用(中村保典グループ;都筑幹夫グループ)

従来、シアノバクテリアはグリコーゲンを、紅藻は紅藻デンプンと呼ばれる不完全なアミロペクチンタイプ(アミロースは合成しない)を、緑藻以上からは完全なアミロペクチンとアミロースから成るデンプンを合成するとされてきた。藻類のポリグルカン構造を解析した結果、シアノバクテリアの多くはグリコーゲン型のポリグルカンを持つが、一部の種は

セミアミロペクチン型を合成すること、原始紅藻類ではグリコーゲン型のポリグルカンを合成するものとセミアミロペクチン+アミロース型を合成する二つのグループに分けられることを明らかにした。デンプン生合成代謝の進化過程を明らかにする上での重要な足がかりが得られた。

○新規ポリグルカン構造解析法の開発(碓氷泰市グループ)

アミロペクチンのタンデム・クラスター構造は、グリコーゲンとは異なり、極めて高次に制御された分子構造を持っているが、精密な構造解析法がまだ確立されていない。特に $\alpha$ -1,6-分岐周辺に関する正確な位置を特定するには困難を伴う。そこで飛行時間形タンデム質量分析計(TOFMS/MS)を活用して10種の分岐オリゴ糖を測定し解析した結果、本法が分岐オリゴ糖の還元末端グルコース残基からの分岐の位置やその配列順序を容易に決定できるばかりか、質量数が同じ分岐オリゴ糖であってもスペクトル解析から、これら結合異性体間の識別が可能であることを見出した。

○デンプンの産業利用(中村保典グループ)

デンプンエンジニアリングによって創出されたデンプンの産業利用分野への展開を図るため、接着剤などの利用の可能性を検討した。イネデンプンを化学修飾し、それを従来の架橋剤に添加させて接着テストを行った結果、試作接着剤は常態で良好な接着能を示しており、デンプンが木材用接着剤として十分使用できることがわかった。また、当接着剤がホルムアルデヒドを吸収できることがわかり、本品の実用化の可能性が大きく前進した。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待:口頭		ポスター		報道	特許
国内	国外	国内	国外	国内	国外		
12	38	82	4	13	4	7	24

○各々の成果は論文としてまとめられており評価できる。実用的視点の強い研究であるので仕方ない面もあるが、トップジャーナルに掲載された論文が少ない。しかし、形質転換体に関する研究は現在進行中であり、今後の論文発表に期待したい。

○国内出願数 24件と海外出願数 1件は量的・質的に評価できる。これらの中には、実用的にも興味深い素材を提供する可能性があり、高く評価したい。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

○総合的には、デンプン合成系酵素の網羅的機能解析、それぞれの変異体の単離および形質転換体を用いたメタボリックエンジニアリングの展開など、基礎的にも応用的にも有用な知見が得られた。

また多くのリソースが取得されたことも評価される。

○科学技術への貢献に関しては、実用的視点の高い研究であることから、基礎科学の最先端を切り拓いたとはいえませんが、実用面で種々の性質を保有する素材を創製する上で不可欠な、デンプン生合成系を基礎から応用を含むエンジニアリング技術の基盤を確立したといえ評価できる。また、形質転換体の作成にとどまらず、それぞれのデンプンの化学構造、特性解析が行われた。このような視点からのイネを材料とした研究では、本グループは世界的リーディンググループである。

○今後の展開としては、本研究において多様なデンプン素材を獲得したことにより、その応用的特性の解析ならびに製品化などへの途を切り拓いたと言え、今後は生産量の向上や実用性の評価などの実用化を視野に入れた解析研究が望まれる。また、酵素遺伝子のノックアウト変異体のコレクションを用いた独自の基盤研究の展開も期待される。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

○受賞歴として、マリンバイオテクノロジー学会 平成16年度論文賞 (都筑幹夫)を受賞。

○その他特記事項として、

- 1) イネデンプン生合成主要酵素の機能をほぼ特定でき、その成果に基づいて、新アミロペクチン合成モデルを提唱した。そのモデルは広く研究者に利用・引用されている。
- 2) シアノバクテリア、原始紅藻などの藻類についてのスターチ合成研究について新しい方向性(進化過程の解明)が見えつつある。
- 3) アミロペクチンの分岐構造にNMRやMS解析法を適用できる道筋を示した。
- 4) 工業的素材としての改変デンプンの利用法の一端を示すことができ応用面での途が拓かれた。