

「植物の機能と制御」
平成12年度採択研究代表者

中村 保典

(秋田県立大学生物資源科学部 教授)

「デンプンメタボリックエンジニアリングの開発」

1. 研究実施の概要

人口爆発に備えた食糧増産および消費者の多様なニーズに応えるための食品の品質向上は21世紀のバイオテクノロジー分野において緊急を要する課題である。

デンプン合成系は植物が進化の過程で獲得した生存戦略に合致したシステムである。デンプンの約70-80%を占めるアミロペクチンは、 α -1,4グリコシル結合による直鎖が α -1,6グリコシル結合による分岐を介して連結した巨大分子である点において、動物やバクテリアのグリコーゲンと何ら変わりがない。しかしアミロペクチンの分子構造は、グリコーゲンよりもはるかに規則性が高く、クラスターと呼ばれる基本構造が多数連なるマルチプルクラスター構造をしている。このことは植物の生存にとって有利であり、また、食糧の品質として多様な価値を生み出す原因となっている。

植物のデンプンは食糧や加工食品の他、産業用素材として広く使用されている。その物性は植物種特異的であり(パンやうどんに用いられるコムギ、はるさめに用いられるリョクトウなど)、品種特異的(ジャポニカ米、インディカ米、酒米など)であるが、以下に述べる理由から、アミロペクチン生合成機構の解明と制御に関する研究は重要である。

1. 従来、植物種に固有のデンプンがそのまま利用されてきた。
2. イネデンプンの品質は専らアミロース含有量という視点から研究されてきた。
3. アミロペクチンは幅広い物性をカバーするポテンシャルを秘めた多糖類である。

最近10年の間に世界各地で種々の植物で行われてきた酵素・遺伝子レベルの研究成果の結果、植物のアミロペクチンはADPglucose pyrophosphorylase(AGPase)、starch synthase(SS)、starch branching enzyme(SBE)、starch debranching enzyme(DBE)の4クラスの酵素の共同作用によって合成されることが明らかになってきた。

私たちは約10年間にわたってイネ胚乳におけるデンプン合成代謝系に関する研究を行い、各クラスの酵素はいずれも複数のアイソザイムやアイソフォームから成り、

アミロペクチン合成は少なくとも計12種類の異なる遺伝子にコードされた酵素から成る複雑な代謝ネットワークで構成されていることを明らかにしてきた。

本研究では、アミロペクチン合成システムを分子レベルで解明するとともに、バイオテクノロジーによってアミロペクチン構造を改変して、デンプンの品質を画期的に向上させ、多様な新用途に使用される道を開くことを目標にする。

2. 研究実施内容

1) 突然変異体の単離と解析

アミロペクチン合成のように多数の遺伝子・酵素が関与するシステムを解明するためには、特定の遺伝子が欠損した突然変異体を実験材料として用いることが不可欠である。イネのSBEに関しては、既に単離されているBEIIb変異体 (*amylose-extender, ae*) の解析を行なった。本年度、BEIとBEIIaに関する変異体を単離することに成功した。3種類のSBEをそれぞれ欠損した3タイプの変異体をすべて単離したのは全ての植物を通じて初めてで、今後3者の機能の解明が待たれる。

イネ*ae*変異体を解析した結果、BEIIbはアミロペクチンのクラスター構造の成立に必須で、グルコース重合度17以下の短鎖の形成反応を特異的に触媒し、他のBEIIaやBEIアイソフォームでは代替できないことが明らかになった。

イネのDBEに関しては、既にイソアミラーゼ (ISA) が欠損した*sugary-1*変異体が単離されているが、本年度、もう1種類のDBEであるプルラナーゼ (PUL) の変異体を単離することに成功した。

2) 形質転換体の作成と解析

イネ*sugary-1*変異体では、胚乳にデンプンではなくグリコーゲン様の構造をしたフィトグリコーゲンが蓄積される。私たちは、本変異体の解析を通じて、ISAとPULの両DBEが正常型アミロペクチンの合成に不可欠であることを提唱してきた。また、ISAの機能をさらに詳細に解析し、ISA遺伝子の制御を通じて新規デンプンを創生する可能性を検討するために、ISAの酵素活性をアンチセンス法によって低下させた形質転換イネを作成し、実際に酵素活性が低下した系統についての分析を行ってきた。本年度は、T₃世代のホモ系統を用いて特にそのデンプン形質について詳しく解析した。その結果、本方法によって新規デンプンをイネ胚乳に安定的に生産できる事が示された。このような例はまだ世界でも発表例がない。結果を要約すると以下のとおりである。

- ①ISA活性が低下した系統 (Anti-ISAイネ) のアミロペクチンの分子構造は変化し、低下していない系統より短鎖の割合が多かった。
- ②①の短鎖の増加に伴い、Anti-ISAイネの胚乳デンプンの糊化開始温度および糊化熱量が低下していた。

③ Anti-ISA イネの胚乳デンプンは、野生型よりも可溶性ポリグルカン分画が多かった。

④ Anti-ISA イネの胚乳デンプン粒の形態は、野生型と比べて異なっていた（図 1）。すなわち、sugary-1 変異体と類似して小さな粒がデンプン粒に付着していた。

⑤ Anti-ISA イネの胚乳デンプンの結晶性は、野生型と比べて低かった（図 2）。

以上のことから、ISA 活性を低下させることで、アミロペクチンの構造が異なり、可溶性ポリグルカンを多く含む系統を得ることができた。また、この構造や成分の違いに起因して、物性が異なる新規デンプンが生合成されることが明らかになり、新用途に使用できる可能性を示した。

3) ラン藻イソアミラーゼ遺伝子の単離と解析

原核生物シアノバクテリア（ラン藻）の貯蔵炭水化物はラン藻デンプンと呼ばれ、枝分かれの多いグリコーゲン様のポリグルカンであるといわれている。アミロペクチン合成システムの分子進化学的解析研究は遺伝子素材の探索という観点からも意義深いと思われる。その第 1 歩として、本年度は *Synechococcus* sp. PCC7942 から ISA 遺伝子 (*ScoISA*) を単離した。その結果、*ScoISA* の ORF は 2,085 bp で 1 コピー存在すること、アミノ酸配列でイネ ISA と 42.4%、トウモロコシとは 40.9% の相同性があることが明らかとなった。また、ラン藻 *Synechocystis* の 2 種類の ISA とはそれぞれ 44.1%、65.2% であったが、バクテリア *Pseudomonas amyloclavata* の ISA とは 30.3% とイネなどより相同性が低かった。

4) 遺伝子発現制御系の検討

シアノバクテリアを植物メタボリック・エンジニアリングにおける遺伝子導入の宿主として開発し、その有用性を評価する目的で、植物遺伝子による形質転換を試みた。光合成における炭素同化の初発酵素であるカーボニックアンヒドラーゼ遺伝子を欠損した *Synechococcus* sp. PCC7942 変異株に、シロイヌナズナの同酵素遺伝子の cDNA を形質転換により導入した。形質転換株は、大気レベルの低濃度の二酸化炭素条件で生育し、また、その抽出液中には抗体に反応するタンパク質が検出された。従って、シアノバクテリアを宿主とした、植物遺伝子の発現・評価システムを開発することができた。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

Isolation and characterization of arsenate-sensitive and resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*.

Fujiwara, S., Kobayashi I., Hoshino S., Kaise T., Shimogawara K., Usuda H., & Tsuzuki M.

Plant Cell Physiol. 41:77-83(2000)

Molecular phylogeny of the Haptophyta based on the *rbcl* gene and sequence variation in the spacer region of the rubisco operon.

Fujiwara S., Tsuzuki M., Kawachi M., Minaka N. & Inouye I.

J. Phycol. 37: 121-129(2001)

Algal Carbonic Anhydrase.

Fukuzawa H., Tsuzuki M. & Miyachi S.

The Carbonic Anhydrases New Horizons. Edited by Chegwiddden, W.R., N.D. Carter & Y.H. Edwards. Hirkauser Verlag, Basel, Switzerland. pp. 535-546(2000)

Requiremen of photsphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes.

Sato N., Hagio M., Wada, H., and Tsuzuki M.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 10655-10660(2000)

Direct evidence for requirement of phosphatidylglycerol in photosystem II of photosynthesis.

Hagio M., Z. Gombos Z. Varkonyi K. Masamoto N. Sato M. Tsuzuki & H. Wada

Plant Physiol. 124: 795-804(2000)