

「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

デンプンメタボリックエンジニアリングは人口爆発に備えた食糧増産、消費者の多様なニーズに応えるための食品の品質向上、工業製品への用途拡大などの期待が向けられている分野である。

デンプンは食糧や加工食品のほか、産業用素材として広く利用されている。その物性は植物種特異的(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)であり、品種特異的(ジャポニカ米、インディカ米、酒米など)である。それぞれのデンプンが固有の物性を持つものとして経験的に選別されている。

にもかかわらず、われわれのデンプンに関する科学的な理解は極めて限定されたものに過ぎない。デンプンの主成分であるアミロペクチンはマルチプルクラスター構造をしているがいまだにだれもが合意できる立体的な分子モデルは作られていない。最近のゲノム解析研究の成果などにより、合成に関わる酵素は少なく10種類にも及ぶことが明らかになったが、各酵素のデンプン構造への寄与など、合成モデルを作成するために必要な多くの基本事項がいまだに解明されていない。

今後バイオ技術の応用によって新形質デンプンの創出をめざす時、アミロペクチン合成システムを分子レベルで解明し、アミロペクチンの分子構造、分子構造とデンプンの物性との関係などの重要な課題を明らかにした上で、形質転換デンプン作成のための戦略・戦術を確立しなければならない。

私たちはこれまで、イネ胚乳をモデルとして高等植物の完成したアミロペクチン合成システムを構成している4クラスの酵素(ADP グルコースピロフォスホリラーゼ ADPglucose pyrophosphorylase, AGPase; スターチ シンターゼ starch synthase, SS; デンプン枝作り酵素 starch branching enzyme, BE; デンプン枝切り酵素 starch debranching enzyme, DBE)のうち主要なアイソフォームの構造と機能を、変異体の解析や形質転換体の解析を通じて解析してきた。その結果、アミロペクチン合成システムの概要をつかむことが可能になってきた。また、イネ胚乳がデンプンメタボリックエンジニアリングの場として極めて有効である可能性を示すことができた。今後、デンプン合成システムに対する理解をさらに深め、その制御機構を進化学的な視点から解析するとともに、デンプンを創生するためのグラウンドデザインを作成することをめざす。さらに、それら新規形質を有するデンプンの利用分野への展開の可能性を探る。

2. 研究実施内容

(1) イネデンプン合成システムの解析

1) イネアミロペクチン合成新モデルの提案

従来高等植物のアミロペクチン合成代謝に関しては代表的なものでも数種類のモデルが提出されているが、各アイソフォームの機能を説明したモデルはまだ提案されていない。イネは遺伝子解析のめざましい進展を背景に、本研究を中心とした変異体の単離と解析、形質転換体の作成と解析研究が進み、多数のアイソフォームの機能が最も精密に解析された植物種ということができよう。これらの知見を元に、胚乳におけるアミロペクチン代謝の新モデルを提唱した(Plant Cell Physiol. 印刷中)。“Two-step branching and improper clearing model”と命名し、クラスター構造を形成する上での各酵素の役割を説明した。本モデルはもとよりアミロペクチン合成の決定版というものではないが、今後さらに解析を進める上での指針となり得るであろう。

2) 日印水稻のデンプン品種間差異の原因遺伝子は SSIIa 遺伝子である

イネの栽培品種は、ジャポニカ型とインディカ型に大別される。今年度、アジアで栽培されている129 品種について胚乳デンプンの性質(熱糊化)、アミロペクチン構造、アミロース含量を調べ、これらの品種でデンプン特性に影響を与える原因を探索した。

その結果、日本人が食べている温帯型ジャポニカ米では調査した 47 品種全てが、クラスターの側鎖が短い S 型アミロペクチンを、インディカ米の多くは側鎖の長い L 型アミロペクチンを持っていた。また、アミロペクチンの分子構造とデンプンの熱糊化特性の間には強い相関があり、S 型ほど糊化し易かった。一方、アミロース含量と熱糊化特性の間には一定の相関が認められなかった。

結論として、これまで、日印イネ系統のデンプン特性の差異はアミロース含量の違いが原因であるといわれてきたが、本研究によってアミロペクチンの分子構造が両者のデンプン特性の差異を決定していることが明らかになった(図1)。

また今後 SSIIa 遺伝子を制御することによって食味や物性が異なるコメを作る道筋が示された。

(2) デンプン合成システムの進化学的解析

1) 藻類の α ポリグルカン構造

種々のラン藻(シアノバクテリア)、灰色藻、紅藻、緑藻についてポリグルカン分子の側鎖長構造をキャピラリー電気泳動法で解析した。その結果、殆どのシアノバクテリアはグリコーゲンを生産するのに対し、灰色藻や紅藻では例外なくグリコーゲンよりはアミロペクチンに近いシューードアミロペクチンを生産することが明らか

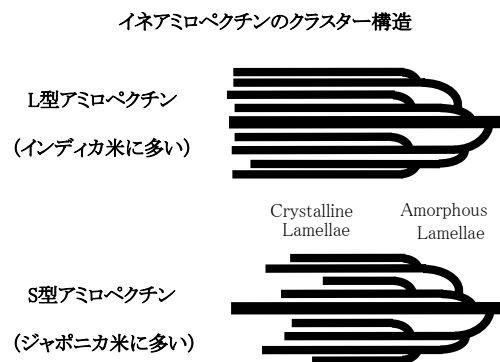


図1. イネアミロペクチンのクラスター構造

アジア各地で栽培されている品種の内、温帯ジャポニカ型はクラスターの側鎖が短いS型アミロペクチンを、インディカ型は主として側鎖の長いL型アミロペクチンを有する。そのため、ジャポニカ型のデンプンは、糊化し易い。この差異は、ジャポニカイネでは SSIIa 遺伝子機能が損傷しているためと思われる。

かになった。緑藻では種間差が見られ、ほぼ完成したアミロペクチンを生産するものと未完成のシユードアミロペクチンを生成するものに分かれた。これらの事実から、藻類は系統進化の過程でグリコーゲン合成系からデンプン(アミロペクチン)合成システムを獲得してきたと考えられる。また種々の藻類がデンプン合成システムを進化的に解析する良い材料であることが判明した。

2) ラン藻におけるデンプン合成形質転換系の確立

ラン藻を利用した解析システム構築の足掛かりとして、*Synechococcus* sp. を材料に、グリコーゲン BE、および DBE のイソアミラーゼの変異株を遺伝子組換え法により作成した。これらの変異株、および、今後これらに他の藻類やイネ由来遺伝子を導入して得られる形質転換株を解析し、このことを通じてデンプン合成システムの進化のメカニズムを明らかにする計画である。

(3) イネ形質転換体における新規デンプン素材の創出

1) イソアミラーゼ遺伝子制御

イネのイソアミラーゼ ISA が欠損した変異体 *sugary-1* では、胚乳にデンプンの結晶構造が消失し、アミロペクチンの代わりにフィトグリコーゲンが蓄積するが、この変異体に正常なコムギ ISA 遺伝子を導入した形質転換体において、デンプン粒が形成され、フィトグリコーゲンがアミロペクチン様のポリグルカンに変わっていた(図2)。ただし本デンプンは、正常のイネ胚乳デンプンとも、昨年度解析したイネアンチセンス ISA 系統のデンプンとも、熱糊化特性などの物性が明確に異なっていた。本結果は、ISA 遺伝子制御によって天然には存在しない新規デンプンを合成できることを示すとともに、デンプンメタボリックエンジニアリングにお

いて異種遺伝子の導入が効果的であることを示した。またこの結果から、ISA がアミロペクチン合成に必須であり、本酵素が関与しないとクラスター構造が形成されないことが明らかになった。

2) BE 遺伝子制御

イネ胚乳において BEIIb はクラスターの最短鎖を特異的に合成しアミロペクチンの分子構造に大きな影響を与えるキー酵素である。イネ BEIIb 変異体にイネ BEIIb のゲノミック DNA を導入して得た形質転換体を調査したところ、BEIIb の発現レベルに応じて、アミロペクチンの分子構造が連続的に変化し、デンプン物性も顕著に変化するという驚くべき結果が得られた。本結果は、BEIIb 遺伝子の発現を制御することによって種々の新規デンプンが出来ることを示している。

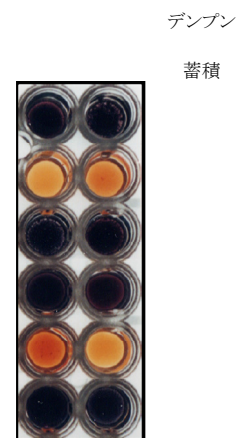


図2. ヨウ素染色による形質転換体の選抜

正常なイネ(金南風)の胚乳デンプンはヨウ素液に反応し濃茶色に染まるが、EM273(*sugary-1* 変異体)ではデンプンが可溶性多糖に変わるため、染まらない。形質転換体(イネ変異体にコムギ ISA 遺伝子を導入)ではヨウ素反応性を示す系統があり、可溶性多糖がデンプンにへ変化したことがわかる。ISA 遺伝子のデンプン合成への関与が証明された。

3. 研究実施体制

秋田県立大学グループ

- ① 研究分担グループ長:中村保典(秋田県立大学生物資源科学部、教授)
- ② 研究項目:イネ組換え体における新規デンブロン創出法の開発および遺伝子発現系の確立

東京薬科大学グループ

- ① 研究分担グループ長:都筑幹夫(東京薬科大学薬学部、教授)
- ② 研究項目:藻類ポリグルカン合成系の分子進化学的解析

CSIRO グループ

- ① 研究分担グループ長:サデクァー ラーマン(豪州 CSIRO、主任研究員)
- ② 研究項目:コムギデンブロン合成遺伝子の解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表(合計 9 件)

- Fujita N., Hasegawa H., Taira T. The isolation and characterization of a *waxy* mutant of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.) *Plant Science* 160 (2001) 595-602
- Nakajima Y., Fujiwara S., Sawai H., Imashimizu M., Tsuzuki M. A phycocyanin-deficient mutant of *Synechocystis* PCC6714 with a single-base substitution upstream of the *cpc* operon. *Plant Cell Physiol* 42 (2001) 992-998
- Nishi A., Nakamura Y., Tanaka N., Satoh H. Biochemical and genetic analysis of the effects of *amylose-extender* mutation in rice endosperm. *Plant Physiol* 127 (2001)459-472
- Kobayashi I., Fujiwara S., Shimogawara K., Kaise T., Usuda H., Tsuzuki M. Arsenate uptake by Pi transport system of an arsenate-resistant mutant, AR3, of *Chlamydomonas*. PS2001 Proceedings 12th International Congress on Photosynthesis (2001)
- Umemoto T., Yano M., Satoh H., Shomura A., Nakamura Y. Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between *japonica*-type and *indica*-type rice varieties. *Theor Appl Genet* 104 (2002) 1-8
- Takahashi J., Fujiwara S., Kikyo M., Hirokawa Y., Tsuzuki M. Discrimination of the cell surface of the coccolithophorid *Pleurochrysis haptanemofera* from light scattering and fluorescence after fluorescein-isothiocyanate-labeled lectin staining measured by flow cytometry. *Marine Biotechnology* 4 (2002) 94-101

(2) 特許出願(合計 7 件)

1. 国内出願 7件
2. 外国出願 なし