

「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

食糧の増産、食品の品質向上、産業用素材への用途拡大など、デンプンメタボリックエンジニアリングへの期待は大きいものがある。

高等植物のアミロペクチン合成代謝は複数のアイソザイムを有する4クラスの酵素（ADPグルコースピロフォスホリラーゼAGPase、スターチシンターゼSS、枝作り酵素BE、枝切り酵素DBE）から成る。（ただしDBEにはイソアミラーゼ（ISA）とプルラーナーゼ（PUL）の2タイプがある）

私たちはイネ胚乳をモデルとして解析研究を行い、イネデンプン変異体や形質転換体の解析、種々の藻類のポリグルカン構造や合成関与遺伝子の解析などを通じ、高等植物デンプン合成過程が極めて高度に制御されたシステムであることを明らかにしてきた。これまでの研究を通じて、システムに関する理解度がデンプンメタボリックエンジニアリングの成否を左右することも痛感した。昨年度までに、主要なキー酵素の特異的な役割についてはある程度見通しをつけることができた。今後さらに、これまで全く解析されなかった上記以外の遺伝子を含めて、未解析の遺伝子機能を明らかにするとともに、システムに関する理解を精密なものにする必要がある。

2002年のイネ全ゲノム解析完了のタイミングに、これまでイネのデンプン合成システムに関する独自の基礎知見、実験材料を集積してきたことは、研究の基盤となって今後大いに生かされると考える。組換え体、変異体、藻類を用いている当チームの優位性を生かし、基礎研究としてのレベルを向上させつつ、創出されるデンプンの利用分野への展開を図る。

2. 研究実施内容

今年度に、アミロペクチン合成に関する新モデルを公表した。これは各アイソザイムの機能を付与した最初のモデルで、世界から広く反響が寄せられた。また、大規模な国際シンポジウムを主催し、本分野での最新情報を交換することができた。本チームが使用しているジャポニカ型イネ組換え体は、デンプン合成システムの解析材料としても、新規デンプン素材を生産する生物材料としても、他の植物に比べすぐれていることが明らかとな

った。特定の遺伝子が欠損し特徴的な表現型を示す変異体を遺伝子導入先に用いることが有効であることも明確になった。

(1) イネデンプン合成システムの解析

1) 変異体の解析と新規変異体の単離

イネのBEIとBEIIa変異体を解析した。その結果、BEIはアミロペクチンの長鎖形成に関与し、BEIIaはBEIIb（短鎖形成）とBEIの機能を相補すると推定された。これで、植物ではじめて全てのBEアイソザイムの機能が解析された。

ロックアウトイネ集団から、SSIとPUL変異体をそれぞれ複数系統（エキソンとイントロンが変異した）単離することに成功した。SSI変異体の単離は植物ではじめてである。4系統のSSI変異体のアミロペクチンは、重合度DP8-12の短鎖が減少し、DP6,7超短鎖およびDP16-20の中間鎖が増加していた。変化の程度は残存SSI活性と相関があった。この結果は、SSIが超短鎖を短鎖に伸長するという、他のSSアイソザイムには相補されない働きがあることを示唆する。

2) 酵素大量発現系の確立

デンプン合成関与酵素はいずれも組織中の含量が低く、タンパク質大量発現系の構築が急務である。イネSSIIaの他、シアノバクテリア*Synechococcus*のBEとグリコーゲンシンターゼ（GS）の発現に成功した。今後の解析に有用である。

(2) 藻類を利用したデンプン合成系の解析と制御系の開発

1) 藻類の合成系

シアノバクテリア57種のポリグルカン微細構造をキャピラリー電気泳動法で調べた結果、ほとんどがグリコーゲンを生産するのに対し、4種がグリコーゲンとアミロペクチンの中間的なシュードアミロペクチンを生産することがわかった。これらの系統では、ポリグルカン構造の進化が起きている可能性が示された。

紅藻12種についてもポリグルカン構造を調べた。ほとんどの系統ではシュードアミロペクチンを合成するのに対し、原始紅藻の系統には、グリコーゲンに近い構造を持つものが見出された。

以上の事実は、シアノバクテリアや紅藻をはじめとする藻類が、デンプン合成システムの進化過程を解析するよい実験系となることを示している。この結果を踏まえ、シュードアミロペクチンを生産するシアノバクテリア*Synechocystis aquatilis*のゲノムDNAからショットガンライブラリを作成し、大規模塩基配列を行った。現在までに、AGPase, 2種類のGS, BE, ISA, PULなどの遺伝子が同定された。

2) シアノバクテリア形質転換系

グリコーゲンタイプのポリグルカンを合成する*Synechococcus* PCC7942のGS遺伝子ロックアウト株にはポリグルカン合成およびGS酵素活性がほとんど見られず、本酵素が細胞内活性の大部分を占めることが明らかになった。また、前年度に作成したISAロックアウト株に、異種シアノバクテリアである*Synechocystis* PCC6803株（全ゲノム解析が完了していて、グリコーゲンを合成する）由来の2種類のISA遺伝子を別々に導入した。ISA変異株

では、野生株と比較して、ポリグルカン中の短鎖の存在比率が増加していたが、形質転換相補株では、親株と比べると短鎖の比率が減少していることが認められた（図1）。これらの結果から、グリコーゲンを合成するシアノバクテリアにおいても、ISAがポリグルカンの合成過程に関与していることが示唆された。また、異種生物由来の遺伝子が本形質転換体の体内で機能することから、この系が、導入遺伝子の機能解析やポリグルカン合成過程の再構成系として有用であることが示された。

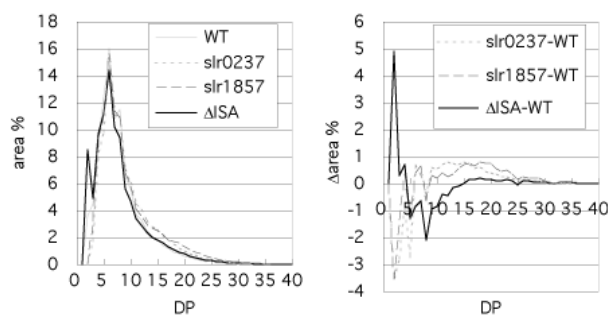


図. ラン藻 *Synechococcus* 野生株、ISA 変異株 (DISA) および ISA 変異株を親株として異種ラン藻 *Synechosystis* PCC 6803 株由来の ISA 遺伝子を導入した形質転換株 (slr0237、slr1857) から抽出した貯蔵ポリグルカンの鎖長分布解析。

(3) イネ形質転換体における新規デンプン素材の創出

1) SSIIa遺伝子制御

前年までに、SSIIa遺伝子はアミロペクチンのクラスター内部の短鎖合成に関与し、本遺伝子機能が損傷しているのがジャポニカ型のイネで、正常なインディカ型とは、デンプン物性の糊化特性において差異が起きる原因と考えられる結果を得た。この考えを証明し、かつ本遺伝子の制御によって、新規形質を持つデンプンを作る可能性を調べるために、ジャポニカ型イネ品種の金南風に、インディカ型品種IR36とジャポニカ型品種の日本晴のSSIIa遺伝子 (cDNA) をグルテリンプロモーターに連結して導入した。現在ホモ系統を選抜中であるが、IR36のSSIIa遺伝子を導入した系統においてのみ、ジャポニカ型イネに特有な短鎖が多いS型アミロペクチンが、インディカ型イネに特有の長鎖が多いL型アミロペクチンに変化し、かつ、デンプンの糊化特性 (アルカリ崩壊性) も、ジャポニカ型の易糊化性から、インディカ型の難糊化性に変化した (図2)。このことは、SSIIa機能は特異的で、本遺伝子の操作によって、デンプンの品質を制御できることを示している。

2) イソアミラーゼ遺伝子制御

イネのISA変異体は *sugary-1* 変異体とよばれ、胚乳にデンプンの代わりにフィトグリコーゲンを蓄積する。この変異体にコムギの正常なISA遺伝子を導入し、デンプン様のポリグルカンを合成するようになった形質転換体の解析を継続した。まず形質転換体のアミロペクチンの分子構造は、正常なイネのものとは異なり、このことがデンプンの物性に影響を与えることが明らかになった。また、イネとコムギのISAを精製する方法を確立し両者を比較したところ、等電点や電気泳動の移動度などで異なっていた。この結果から、イネとコムギのISAが異なる特性を持ち、イネ *sugary* 形質がコムギISAによって完全には相補されない原因であると考えられた。

【図1】ラン藻 *Synechococcus* 野生株、ISA 変異株 (Δ ISA) および ISA 変異株を親株として異種ラン藻 *Synechosystis* PCC 6803 株由来の ISA 遺伝子を導入した形質転換

株 (slr0237、slr1857) から抽出した貯蔵ポリグルカンの鎖長分布解析.

【図2】 イネSSIIa形質転換体の解析

- A. 宿主の金南風 (ジャポニカ型) とインディカ型イネのIR36のSSIIa遺伝子を導入した形質転換体 (#78-2) のアミロペクチンの鎖長分布の比較.
- B. デンプンのアルカリ崩壊性. 形質転換体 (#78-2) のデンプンが金南風タイプからIR36タイプの難崩壊性に変化したことがわかる. 一方対照 (#78-1) のデンプンは金南風タイプのままである.

3. 研究実施体制

中村グループ

- 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プン創出法の開発および遺伝子発現系の確立

都筑グループ

- ① 研究分担グループ長: 都筑 幹夫 (東京薬科大学 生命科学部 教授)
- ② 研究項目: 藻類ポリグルカン合成系の解析

Rahmanグループ

- ① 研究分担グループ長: S. Rahman (CSIRO・豪州)
- ② コムギ遺伝子の解析

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文 (原著論文) 発表

- 著者名: Umemoto T, Yano M, Satoh, H, Shomura A, Nakamura Y.
タイトル: Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between *japonica*-type and *indica*-type rice varieties.
掲載誌名: **Theor. Appl. Genet.** (2002) 104: 1-8.
- 著者名: Sakamoto F, Suzuki E, Fujii Y.
タイトル: Novel approach for the effective determination of DNA scission site using the Sanger method.
掲載誌名: **J. Biochem. Biophys. Methods** (2002) 52: 97-109.
- 著者名: Nakamura Y, Sakurai A, Inaba Y, Kimura K, Iwasawa N, Nagamine T.
タイトル: The fine structure of amylopectin in endosperm from Asian cultivated rice can be largely classified into two classes.
掲載誌名: **Starch** (2002) 54: 117-131.
- 著者名: Nakamura Y.
タイトル: Towards a better understanding of metabolic system for amylopectin biosynthesis in plant: rice endosperm as a model tissue.

掲載誌名 : **Plant Cell Physiol.** (2002) 43: 718-725.

- 著者名 : Minoda A, Sato N, Nozaki H, Okada K, Takahashi H, Sonoike K,
Tsuzuki M.

タイトル : Role of sulfoquinovosyl diacylglycerol for the maintenance of
photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*.

掲載誌名 : **European J Biochem.** (2002) 269: 2353-2358.

- 著者名 : Takahashi J, Fujiwara S, Kikyo M, Hirokawa, Y, and Tsuzuki M.

タイトル : Discrimination of the cell surface of the coccolithophorid
Pleurochrysis haptanemofera based on the light scattering and
fluorescence after FITC-labelled lectin staining measured by flow
cytometry.

掲載誌名 : **Marine Biotech.** (2002) 4: 94-101.

- 著者名 : Kawasaki K, Matsuda T, Nakamura Y, Ueno O, Taniguchi M, Nitta Y,
Miyake H.

タイトル : Structure and immunocytochemical characterization of the synthesis
and accumulation of starch in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.)
tuberous root.

掲載誌名 : **Plant Prod. Sci.** (2002) 5: 152-159.

- 著者名 : Wong K-S, Kubo A, Jane J-J, Harada K, Satoh H, Nakamura Y.

タイトル : Structure and properties of amylopectin and phytoglycogen in the
endosperm of *sugary-1* mutants of rice.

掲載誌名 : **J Cereal Sci.** (2003) 37: 139-149.

- 著者名 : 中村保典.

タイトル : コメの糊化特性にアミロペクチンの側鎖構造を支配する遺伝子が関与.

掲載誌名 : ブレインテクノニュース第95号 (2003) :16-20.

(2) 特許出願 (H14年度特許出願件数5件)