

「植物の機能と制御」
平成12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への期待は、食糧増産や食品品質向上分野にとどまらず、工業製品への用途拡大などの分野においても、近年急速に拡大している。

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）から成り（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）、全体の構成は極めて複雑であることから、このシステムの制御機構の解明研究は端緒についたばかりである。

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、主要なキー酵素の特異的な役割についての基本情報を得ることができた。今後さらに、主要遺伝子の制御によって組換え体植物内に種々のデンプンを作成する系を整備する。同時に、まだこれまで全く機能が解析されていない遺伝子も多数あるので、未解析の遺伝子機能を明らかにするとともに、遺伝子の有効利用についても検討することが極めて重要である。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、基礎研究のレベルを向上させるとともに、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

（1）イネデンプン合成システムの解析

1) 変異体の単離と解析

トランスポゾンが挿入されたノックアウトイネ集団から残存SSI活性が異なるSSI変異体4系統を単離し、系統間で表現型の系統間差異を調査した。

①胚乳アミロペクチンの鎖長分布の変異には共通のパターンが見られ、残存SSI活性に応じた差が見られることから、SSIの機能が超短鎖をDP8-12に伸長することが示唆された。

②アミロペクチン構造の変化に伴って糊化温度がやや上昇した。

③アミロペクチン構造に変化が生じるものの、デンプン粒および玄米の形態、種子重量、

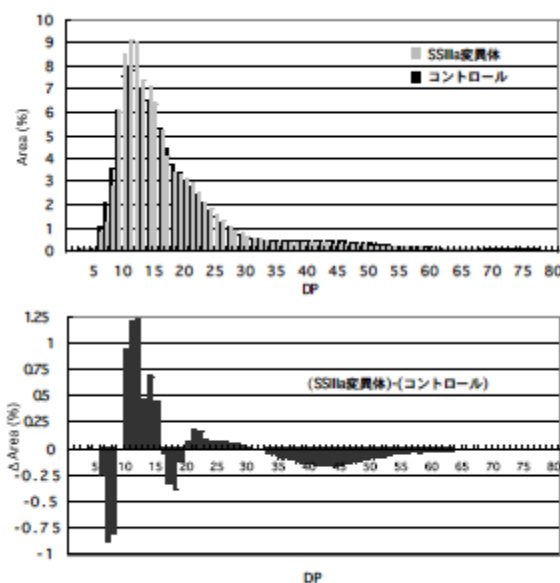
デンプン粒の結晶性には何ら変化がなかった。

④胚乳のみならず、葉身アミロペクチンの構造も胚乳と類似した変化を示した。

また、Native-PAGE/SS活性染色で得られるSSIバンドの鎖長分布解析から、SSIはDP6以下の超短鎖からDP8-12を合成することが確認された。

以上のことから、イネにおいて、SSIは、胚乳および葉身において超短鎖をDP8-12に伸長する特異的な機能を持つが、胚乳に蓄積するデンプン量は変化がないことから、他のSSアイソザイムが α 1,4鎖伸長を相補していることが明らかとなった。

次に、これまで機能が全く解析されていないイネSSIIIおよびSSIVグループの変異体の単離をノックアウトイネ集団を用いて試みている。この中で、SSIIIa変異体が単離され、それらの解析を行っている。得られたSSIIIa変異体は、Tos17がエクソン1に挿入されており、Native-PAGE/SS活性染色法から、最も移動度の小さいバンドがイネにおけるSSIIIaであることが明確になり、変異体では、このバンドを完全に欠失していることが明らかになった。また、胚乳アミロペクチンの構造解析から、対照植物と比べて、アミロペクチンを構成する α -1,4鎖のうちグルコース重合度(DP)が6-8, 17-18, 31-70の割合が減少し、DP10-15, 20-29の割合が増加していた(図1)。従って、イネのSSIIIaは、アミロペクチンのB2, 3鎖のような長鎖を特異的に合成することが明らかになった。また、構造変化に伴う熱糊化特性も異なっていたことから、SSIIIa遺伝子制御によって新素材デンプンとして利用できる可能性がある。



【図1】イネSSIIIa変異によるアミロペクチン構造変化。図はSSIIIa変異体と対照植物の胚乳アミロペクチンの鎖長分布(DP値が異なる各鎖の存在率を、対応する各ピークの面積比として百分率で表示)を示す。下図は、上図の比較のため、両者のデータの差を表わしている。

2) 酵素機能の解析

植物のイソアミラーゼ (ISA) には3つのアイソザイム (ISA1, ISA2, ISA3) が存在し、アミロペクチンの基本構造であるクラスターの形成に必須な酵素であることが知られているが、3者の存在と機能分担に関しては十分な解析がなされていない。イネ胚乳のデンプン合成にはISA1が不可欠で、本遺伝子が欠損するとデンプンがフィトグリコーゲンに変わることから、ISA1がアミロペクチン合成にとって最も重要であることが知られている。イネISA1の機能解明および過剰発現における新規デンプンの創造のため、イネISA1遺伝子をグルテリンプロモーターに連結してイネ野生株とイネISA1欠損 (シュガリー変異) 株へ導入した。現在ホモ系統を選抜中であるが、イネ野生株系統からイネISA1過剰発現系統が得られた。これらの形質転換体は、ISAの機能を解析する上で有用であろうと期待される。

またジャガイモを用いた研究から、植物のISA1とISA2は複合体を形成して酵素機能を果すとの知見が提唱されている。イネとジャガイモからISAを精製する方法を確立してタンパク質の性質を調べた結果、イネISA活性は、ISA1とISA2複合体の他に、ジャガイモでは見られないISA1のみの複合体の2タイプが存在することが明らかになり、2種類の複合体が活性を保持することが植物で始めて実証された。比活性はISA1とISA2の複合体の方が約1.5倍強いことも分かった。両複合体の生理機能の解析が今後の課題である。

3) 酵素大量発現系の確立

デンプン合成関与酵素はほとんどすべてが組織中の含量が低くかつ不安定であることから、タンパク質大量発現系の構築が急務である。既に作成したイネSSIIa、シアノバクテリア *Synechococcus* グリコーゲンシンターゼ (GS) の高発現条件を検討し、HPLCによる精製に成功した。その結果、インディカ型イネのSSIIaは十分な活性を保持するのに対し、ジャポニカ型のSSIIaは活性を有しないことが明らかになった。この日印イネ間でSSIIa活性の差異を生じさせている複数のアミノ酸部位が特定された。

(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) 藻類のポリグルカン構造

前年度までの結果で、紅藻ポリフィリディウムのポリグルカンにアミロースが含まれている可能性が高まった。本年度は、紅藻ポリグルカンから約 1×10^5 Daのアミロースを精製することができた。培養時に窒素成分を欠乏させると、アミロースの割合がやや増加することも明らかとなった。紅藻ではこれまでアミロースが知られていないことから、原始紅藻の進化の過程でデンプン構造の大きな変化が生じたと考えられ、アミロースの生理作用とともに、さらなる解析が待たれる。

2) 緑藻のデンプン合成関連遺伝子の解析

クロレラのBE遺伝子の全長を含むと思われるcDNAクローンを得ることに成功し、その塩基配列を決定した。予想されるBEは880残基から成り、4つの保存領域を持つことが明らかとなった。また、系統樹を作成したところ、高等植物のBEはI型とII型に機能分化していることが知られているが、得られた遺伝子はBEII型に近縁であった (図2A)。BEの機能分化を明らかにする良い解析系であることがわかった。

ISAのcDNAクローンも単離でき、1093残基のポリペプチドをコードしていることが明らかとなった。このポリペプチドはクラミドモナスで報告されたISAと系統的に近く（図2B）、高等植物の3種類のアイソフォームのいずれとも異なるものであることが判明した。

デンプン結合型SS (GBSS)のcDNAクローンから、コードされているポリペプチドは610残基から成ることが明らかとなった。別にデンプンを単離し、結合タンパク質のN末端アミノ酸配列（8残基）を決定した。GBSSをコードすると予想される遺伝子にその配列に対応する塩基配列が見出されたことと、SDS-PAGEでほぼ予想通りの分子量のバンドが得られたことから、得られた遺伝子がGBSSをコードしているとほぼ断定できる。なお、系統関係を図2Cに示す。

A



B



4) *Synechocystis aquatilis* の大規模塩基配列解析

未完成セミアミロペクチン様の特異なポリグルカンを蓄積するシアノバクテリア *Synechocystis aquatilis* SI-2 株について、前年度から引き続き大規模塩基配列解析を行った。これまでに同定したポリグルカン代謝を担う酵素遺伝子について詳細に解析した結果、BE をコードする遺伝子が3種類存在することが明らかとなった。3者においてはBE 活性に重要であるアミノ酸残基が全て保存されていた。他のシアノバクテリアにおいてはいずれも BE 遺伝子は1つのみ見出されていることを考えると、複数遺伝子の存在は極めて興味深い。

現在までに得られた2万あまりの塩基配列データに基づくアセンブリー解析を行った。その結果、現有の配列データは1,540個のコンティグ（ギャップの無い連続配列）、705個のスキュフォールド（ギャップを含む連続配列）に統合され、配列の総延長は2.66 Mbに及ぶことがわかった。既知の単細胞性シアノバクテリアのゲノムサイズとの比較から、既に *S. aquatilis* ゲノム情報の大部分が取得できているものと考えられる。

(3) デンプン分子構造解析法の開発

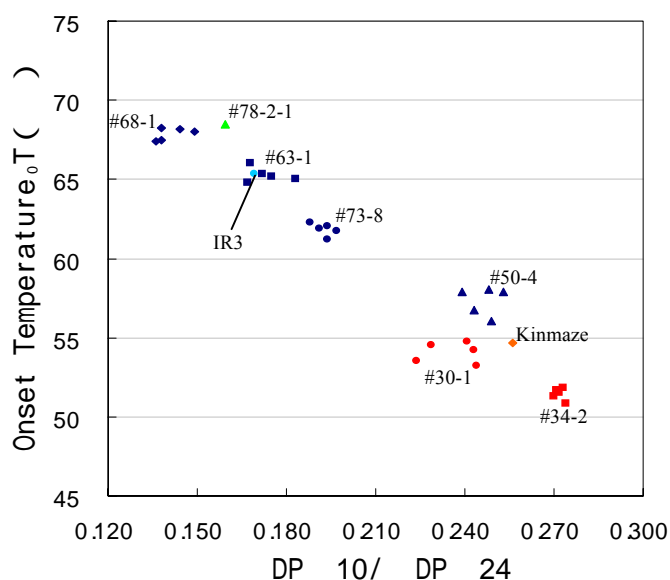
アミロペクチンのタンデムクラスター構造はグリコーゲンとは異なる極めて高次に制御された分子構造を持っているが、精密な解析法がまだ確立されていない。今後、アミロペクチン構造のバリエーションを解析し、デンプン物性との関係を明らかにする上で、分子構造の理解が欠かせない。新たな解析法を開発する目的で実験を開始した。アミロペクチンの分子構造、とりわけ α -1,6分岐構造を有するオリゴ糖を、体系的にNMR（核磁気共鳴）法や質量分析（MS）法により一次構造を解析するために、標準物質であるマルトオリゴ糖（DP2-7）と、アミロペクチンに関係した分岐オリゴ糖（DP3-6）を測定した。データベースを蓄積するために、直鎖マルトオリゴ糖の重水中での ^1H 及び ^{13}C -NMRを測定し、構造の規則性と周期性を重点に解析した。このデータに基づいて、アミロペクチンの部分構造である10種の分岐オリゴ糖（パノース、イソパノース、 $6^2\text{-O-}\alpha$ -マルトシルマルトース、 $6^3\text{-O-}\alpha$ -グルコマルトトリオース、 $6^2\text{-O-}\alpha$ -イソマルトシルマルトース、 $4^3\text{-O-}\alpha$ -パノシルパノース、 $6^3\text{-O-}\alpha$ -マルトトリオシルマルトースなど）を解析し、糖の重合度、分岐の程度、分岐に関する一次構造（グルコシル基の配列順序）の解析に応用できる可能性を示した。

(4) 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

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、本遺伝子機能が欠損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。インディカ型品種IR36のSSIIa遺伝子をジャポニカ型イネ品種の金南風に導入した組換え体において、ジャポニカ型イネに特有なDPが10以下の短鎖が多い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た。SSIIa発現量の異なるホモ系統を比較した結果、アミロペクチン構造の変化に伴って、デンプンの糊化特性が、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3）。しかも、SSIIaの発現レベルに応じて、アミロペクチン構造を変化させ、それに伴って異なる物性を有する新規デンプンを作成できることがわかった（図3）。以上の結果は、上記の仮説を支持し、SSIIaがアミロペクチンの短鎖合成に特異的な役割を果たしていることを証明するとともに、本遺伝子の操作によって、コメデンプンの品質を制御できることを明らかにした。



【図3】 イネSSIIa形質転換植物（インディカ品種IR36のSSIIa遺伝子をジャポニカ品種金南風に導入して作成）各系統のアミロペクチン構造とデンプンの熱糊化特性との関係。アミロペクチン構造の特徴は、アミロペクチンのクラスターを構成する鎖（ $DP \leq 24$ ）に対する短鎖（ $DP \leq 10$ ）の比率で比較し、デンプンの熱糊化特性は糊化開始温度（ T_0 ）で比較した。両者の間には良い相関が認められた。

2) BEII遺伝子制御

イネは3種類のBEがあるが（BEI, BEIIa, BEIIb）、BEIIbはアミロペクチンの短鎖合成に特異的な役割を果たすことが知られている。BEIIb遺伝子が欠損した*ae*変異体に正常なBEIIb（cDNA）を導入し、BEIIbの発現レベルに応じたデンプンを作成することをめざした。T2世代の種子を解析した結果、BEIIbタンパク質量がさまざまに異なる系統を選抜することができた。それらのデンプンは、*ae*と野生株のデンプンの中間的な構造と物性を示すことが明らかになった。今後ホモ系統を選抜し、詳細な解析を行う。

双子葉植物は単子葉植物と異なり、BEIIタイプの分化が見られず、BEII遺伝子は1コピーあるのみである。単子葉植物のBEIIaとBEIIbの機能分化の意義を解析するため、双子葉植物であるトラマメのBEIIb遺伝子をイネ*ae*変異体に導入した形質転換植物を作成した。今後スクリーニングと解析を行う。

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

碓氷グループ

- ① 研究分担グループ長：碓氷 泰市（静岡大学 農学部 教授）
- ② 研究項目：デンプン分子構造解析法の開発

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：Rahman S, Nakamura Y, Li Z, Clarke B, Fujita N, Mukai Y, Yamamoto M, Regina A, Tan Z, Kawasaki S, Morell M
タイトル：The *sugary*-type isoamylase gene from rice and *Aegilops tauschii*: characterization and comparison with maize and *Arabidopsis*.
掲載誌名：Genome (2003) 46: 496-506.
- 著者名：Sato H, Nishi A, Fujita N, Kubo A, Nakamura Y, Kawasaki K, Okita T. W.
タイトル：Isolation and characterization of starch mutants in rice.
掲載誌名：J. Appl. Glycosci. (2003) 50: 197-200.
- 著者名：Nakamura Y, Fujita N, Kubo A, Rahman S, Morell M, Sato H.
タイトル：Engineering of amylopectin biosynthesis in rice endosperm.
掲載誌名：J. Appl. Glycosci. (2003) 50: 225-230.
- 著者名：Fujita N, Kubo A, Suh D-S, Wong K-S, Jane J-L, Ozawa K, Takaiwa F, Inaba Y and Nakamura Y.
タイトル：Antisense inhibition of isoamylase alters the structure of amylopectin and the physicochemical properties of starch in rice endosperm.

掲載誌名 : **Plant Cell Physiol.** (2003) 44: 607-618.

- 著者名 : Satoh H, Nishi A, Yamashita K, Takemoto Y, Tanaka Y, Hosaka Y,
Sakurai A, Fujita N, Nakamura Y.

タイトル : Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm.

掲載誌名 : **Plant Physiol.** (2003) 133: 1111-1121.

- 著者名 : 中村保典.

タイトル : 澱粉合成とその制御.

掲載誌名 : **J. Appl. Glycosci.** (2003) 50: 511-512.

- 著者名 : Kobayashi I, Fujiwara S, Shimogawara K, Kaise T, Usuda H, Tsuzuki M.

タイトル : Insertional mutagenesis in a homologue of a Pi transporter gene confers arsenate resistance on *Chlamydomonas*.

掲載誌名 : **Plant Cell Physiol.** (2003) 44: 597-606.

- 著者名 : Sato N, Aoki M, Maru Y, Sonoike K, Minoda A, Tsuzuki M.

タイトル : Involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in the structural integrity and heat-tolerance of photosystem II.

掲載誌名 : **Planta** (2003) 217: 245-251.

- 著者名 : Sato N, Tsuzuki M, Kawaguchi A.

タイトル : Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11h I. Existence of a eukaryotic pathway.

掲載誌名 : **Biochim. Biophys. Acta** (2003) 1633: 27-34.

- 著者名 : Sato N, Tsuzuki M, Kawaguchi, A.

タイトル : Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11h II. Effect of the CO₂ concentration during growth.

掲載誌名 : **Biochim. Biophys. Acta** (2003) 1633: 35-42.

- 著者名 : Sato N, Sugimoto K, Meguro A, Tsuzuki M.

タイトル : Identification of a gene for UDP-sulfoquinovose synthase of a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, and its phylogeny.

掲載誌名 : **DNA Research** (2003) 10: 229-237.

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

タイトル : Decrease in the efficiency of the electron donation to tyrosine Z of photosystem II in an SQDG-less mutant of *Chlamydomonas*.

掲載誌名 : **FEBS Lett.** (2003) 553: 109-112.

- 著者名 : Suzuki M, Watanabe K, Fujiwara S, Kurasawa T, Wakabayashi T, Tsuzuki M, Iguchi K, Yamori T.

タイトル : Isolation of peridinin-related norcarotenoids with cell growth-inhibitory activity from the cultured dinoflagellate of

Symbiodinium sp., a symbiont of the Okinawan soft coral *Clavularia viridis*, and analysis of fatty acids of the dinoflagellate.

掲載誌名 : **Chem. Pharm. Bull.** (2003) 51: 724-727.

- 著者名 : Fujiwara S, Yasui K, Watanabe K, Wakabayashi T, Tsuzuki M, Iguch K.
タイトル : Molecular phylogenetic relationships between prostanoid-containing Okinawan soft coral, *Clavularia viridis*, and non prostanoid-containing *Clavularia* species based on the rbcL ITS sequences.

掲載誌名 : **Mar. Biotechnol.** (2003) 5: 401-407.

- 著者名 : Imashimizu M, Fujiwara S, Tanigawa R, Tanaka K, Hirokawa T, Nakajima Y, Higo J, Tsuzuki M.
タイトル : Thymine at -5 is crucial for *cpc* promoter activity of *Synechocystis* sp. strain PCC6714.

掲載誌名 : (2003) **J. Bacteriol.** (2003) 85: 6477-6480.

- 著者名 : Hashimoto N, Fujiwara S, Watanabe K, Iguchi K, Tsuzuki M.
タイトル : Localization of clavulones, prostanoids with antitumor activity, within Okinawan soft coral *Clavularia viridis* (Alcyonacea, Clavularidae): Preparation of a high-purity *Symbiodinium* fraction using a protease and a detergent.

掲載誌名 : **Lipids** (2003) 38: 991-997.

- 著者名 : Aoki M, Sato N, Meguro A, Tsuzuki M.
タイトル : Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria.

掲載誌名 : **Eur. J. Biochem.** (2004) 271: 685-693.

- 著者名 : Sato N, Ohmori M, Ikeuchi M, Tashiro K, Wolk PC, Kaneko T, Okada K, Tsuzuki M, Ehira S, Katoh H, Okamoto S, Yoshimura H, Fujisawa T, Kamei A, Yoshihara S, Narikawa R, Hamano T, Tabata S, Kuhara S.
タイトル : Use of segment-based microarray in the analysis of global gene expression in response to various environmental stresses in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120.

掲載誌名 : **J. Gen. Appl. Microbiol.** (2004) 50: 1-8.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数 : 4件