

「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研究へは、食糧増産や食品品質向上分野にとどまらず、工業製品などの産業利用分野からも大きな期待が寄せられるようになってきた。生物資源の利用による脱石油化の動きは今後一段と加速されると予想される。

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を行ってきた。その結果、主要なキー酵素の機能と制御に関する知見が急速に集積してきた。それらが欠損した場合のデンプン構造への影響や、メタボリックエンジニアリングによるデンプン構造やデンプン物性への効果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。今後は、これまで解明されていない遺伝子の機能や複数の遺伝子機能を同時に制御した時のデンプン形質を明らかにするとともに、胚乳におけるデンプン合成に関連する他の代謝系との関係を調べることによって、高等植物の高度なデンプン合成システムに関する全体像を描くことをめざす。またメタボリックエンジニアリングによって新規形質を有するデンプン創製の可能性を拡大するために、異種遺伝子を導入する。さらに、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調査する。

### 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SSIIIa変異体を単離し、表現型を調査した。その結果以下の興味ある形質を見出した。

①アミロペクチン構造に変化に伴ってデンプンの糊化温度が3~5℃低下していた。

②胚乳デンプン粒は、やや小さくなり丸みを帯びていた（図1）。

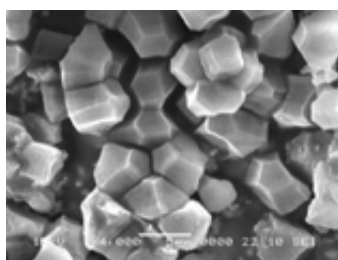
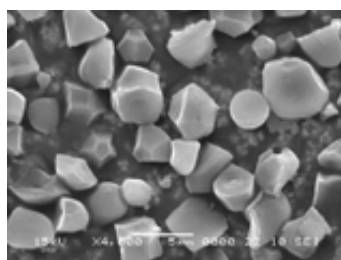
③SSIIa変異体の玄米は、白濁していた（図2）が、重量はコントロールと変わらなかった。

次に、これまで機能が不明なイネAGPaseの大小サブユニット遺伝子とホスホリラーゼ遺伝子が欠損した変異体を解析した結果、デンプンの蓄積量や構造に顕著な影響が現れることから、それらがデンプン合成に必須であることが明らかになった。今後さらに詳細な解析を行う。

4種類（BEIIaxSSI, ISAxSSI, PULxPho, PULx心白変異体）の二重変異体のホモ系統を単離した。

## 2) 酵素機能の解析

前年度までにジャポニカ型イネのデンプンがインディカ型と異なるのは、ジャポニカ型でSSIIa遺伝子の機能が低下しているためであることを突き止めた。

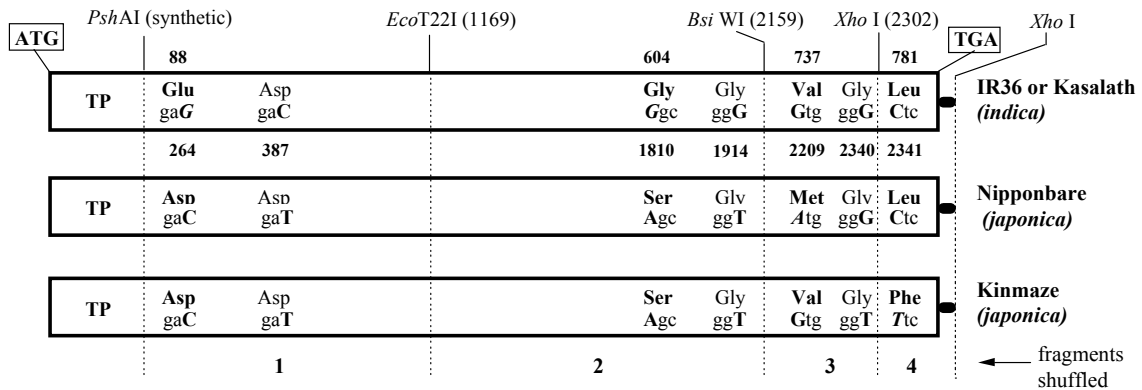


【図1】SSIIa変異体（左図）とそのコントロール（右図）のデンプン粒の走査電子顕微鏡像。SSIIa変異体のデンプン粒は、やや小さく、丸みを帯びている。



【図2】SSIIa変異体（左図）とそのコントロール（右図）の玄米形態の比較。SSIIa変異体の種子は、白濁しているのが特徴であるが、玄米重量に変化はなかった。

本年度は、SSIIaの構造と機能の関係を解析した。日印型イネSSIIaがアミノ酸置換を起こす変異は全部で4箇所あったので、それらの変異を組み合わせた遺伝子シャフリングを行い、大腸菌内にSSIIaを大量発現させ、それらの活性を調べた結果、SSIIa機能に関するアミノ酸部位が3カ所特定された（図3）。興味あることに、日印のキメラ遺伝子のある種のもは、両者の中間型の活性を示した。これらの特異性の解析とイネへの遺伝子導入を計画している。



【図3】 ジャポニカ型（品種、日本晴および金南風）およびインディカ型イネ（品種、IR36およびKasalath）間のSSIIa遺伝子構造の比較。大文字の塩基は品種間差が認められる箇所を示す。塩基置換に伴い88, 604, 737, 781の位置のアミノ酸に置換が起きる。

### 3) 遺伝子発現制御の解析：発現プロファイリング

イネのデンプン合成に関与すると考えられるAGPase, SS, BE, DBE, ホスホリラーゼ、D酵素をコードする全ての遺伝子の発現プロファイリングをリアルタイムPCR法で調べた。その結果、胚乳特異的に発現することが判明した遺伝子の胚乳発達時期による発現変化パターンは4種類に分類され、種子のデンプン合成に関与する遺伝子群の発現調節が厳密な制御を受けていることがわかった。

#### (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) 紅藻のポリグルカン構造

アミロース様の成分を有する紅藻*Porphyridium purpureum*において多糖結合型デンプン合成酵素 (GBSS) 活性が見出されたことから、これまでアミロースの存在が不確かであった原始紅藻類でもアミロースが合成されていることが事実となった。また、走査型電子顕微鏡観察 (SEM) やX線結晶解析などの結果から、*P. purpureum*の貯蔵多糖はイネのデンプンに比べても粒子サイズが小さいこと、Aタイプの結晶性を示すことなどが明らかとなった。これらの結果から、シアノバクテリアが細胞内共生により原始紅藻となり、その後多細胞性の紅藻へと進化する過程で貯蔵多糖類の合成系に大きな変化が生じ、原始紅藻で生じたアミロース合成能が緑藻へ受け継がれた可能性が考えられる。紅藻のポリグルカン合成系の多様性について今後さらに調査する。

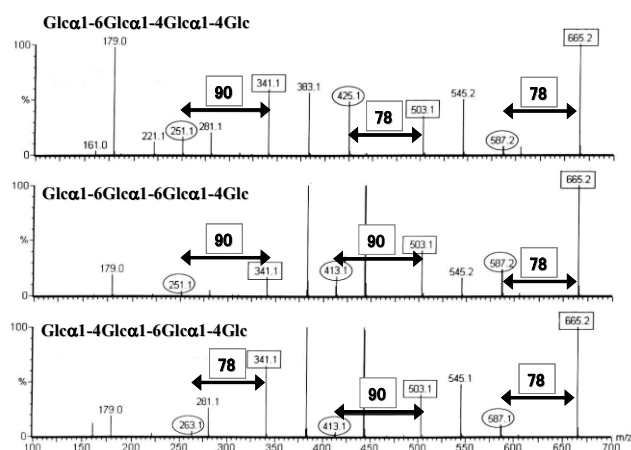
##### 2) シアノバクテリア形質転換系

シアノバクテリアを用いたイネ胚乳デンプン合成再構成系確立の一環として、*Synechococcus*にイネSSIIa遺伝子を導入した形質転換株を解析した。形質転換の親株として用いたGS欠損株では多糖合成、蓄積能は完全に消失していたが、イネSSIIa遺伝子を導入した形質転換株では多糖合成が回復した。形質転換株が生産する多糖 (グリコーゲン) の鎖長分布を調べた結果、グルコース重合度 (DP) 6にピークを示す点では野生株と同じであったが、DP4>DP5というモル比を示す特異な構造を持つことが明らかになった。この

結果は、シアノバクテリア細胞内という基質供給系、酵素系におけるSSIIaの酵素特性を示すものとして興味深い。

### (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の精密な解析法がまだ確立されていない。<sup>1</sup> Hおよび<sup>13</sup>C-NMR法による分岐オリゴ糖の網羅的な解析結果は、結合様式の区別や分岐の程度を解析には確かに有効な方法であるが、とりわけ $\alpha$ -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った。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。その結果、本法が分岐オリゴ糖の非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 (図4)。



【図4】 マルトオリゴ糖異性体におけるMS/MSスペクトルの違い。

今後分岐オリゴ糖鎖解析法を推進するために、アミロペクチンの部分構造とりわけ構造の明確な分岐オリゴ糖を調製し、これら糖鎖のラインナップの整備に努める。作製した分岐オリゴ糖のMS分析法を中核にした網羅的解析を行うことで、デンプン科学の分野で未踏とされていた分岐オリゴ糖分子構造に関する新しい解析法を開発する。

### (4) イネ形質転換体における新規デンプン素材の創出

イネBEには3種類のアイソザイム (BEI, BEIIa, BEIIb) が存在する。既にそれぞれの変異体の解析によりそれぞれの役割が決定されたが、2ないし3種類の複数の遺伝子の全ての組み合わせについて、発現を同時に抑制した形質転換体を作成した。プロモーターはユビキチンとグルテリン遺伝子のプロモーターを利用している。T1種子において期待通りBEの発現が顕著に低下している系統を複数見いだした。今後これらの解析を行う。

### (5) デンプンの産業利用

デンプンを木材接着用の接着剤として利用するための基礎実験を開始した。そのためまず市販のデンプンを化学修飾し、それに従来の架橋剤を添加させて接着テストを行う。本年度は化学修飾デンプン作成のための条件や架橋剤との配合割合などを検討した。これら

を用いた予備実験の結果、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を示している。今後化学修飾デンプン性能の最適化を図る。さらに変異体などデンプン構造が変化したものを用いて検討し、これまでにない高性能木材接着剤を開発することを目指す。

### 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)発表および2) 要旨

- 著者名：Nakamura Y, Francisco Jr. PB, Hosaka Y, Sato A, Sawada S, Kubo A, Fujita N.

タイトル：Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between *japonica* and *indica* rice varieties

掲載誌名：Plant Molecular Biology (2005) in press.

要旨：イネSSIIa活性に関係するアミノ酸部位が3カ所特定された。この箇所のアミノ酸置換がジャポニカ型とインディカ型イネのSSIIa活性の差異の原因であることを明らかにした。また、SSIIaがアミロペクチンのクラスター内部鎖を伸張する特異的な働きがあることを起こすことを*in vitro*実験で示し、日印イネデンプンの差異の原因を直接的かつ完全に証明することに成功した。

- 著者名：Tanaka N, Fujita N, Nishi A, Satoh H, Hosaka Y, Ugaki M,

Kasawaki S, Nakamura Y.

タイトル : The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm.

掲載誌名 : Plant Biotechnology J. (2004) 2: 507-516.

要旨 : イネの枝作り酵素IIb(BEIIb)遺伝子をBEIIb変異体に形質転換したところ、BEIIb活性が様々なレベルのものが作出できた。それらのデンプン特性は、BEIIb発現量によってグラデーションになっていた。

- 著者名 : Kubo A, Rahman S, Utsumi Y, Li Z, Mukai Y, Yamamoto M, Ugaki M, Harada K, Satoh H, Konik-Rose C, Morell M, Nakamura Y.

タイトル : Complementation of *sugary-1* phenotype in rice endosperm with the wheat isoamylase1 gene supports a direct role for isoamylase1 in amylopectin biosynthesis.

掲載誌名 : Plant Physiol. (2005) 137: 43-56.

要旨 : コムギのイソアミラーゼ(ISA1)遺伝子をISA1変異体イネに形質転換したところ、その形質が相補された。

- 著者名 : Sakamoto F, Suzuki E, Fujii Y.

タイトル : Recent development of artificial nuclease with specificity of cleavage site.

掲載誌名 : Recent Res. Devel. Nucleosides Nucleotides (2004) 2: 1-27.

要旨 : 切断部位特異性を示す種々の化学試薬について、標的 DNA の種類、核酸切断試薬の化学構造、配列特異性を検討した。

- 著者名 : 中村保典.

タイトル : 植物のデンプン合成代謝システムに関する一考察 : イネ胚乳を中心に.

掲載誌名 : J Appl. Glycosci. (2004) 51: 259-266.

要旨 : イネ胚乳をモデルとしたデンプン合成代謝システムについて述べた。

- 著者名 : Umemoto T, Aoki N, Lin H, Nakamura Y, Inouchi N, Sato Y, Yano M, Hirabayashi H, Maruyama S.

タイトル : Natural variation in rice starch synthase IIa affects enzyme and starch properties.

掲載誌名 : Func. Plant Biol. (2004) 31: 671-684.

要旨 : イネの在来品種、起源種のSSIIa遺伝子のSNPsについて述べ、デンプンの構造と物性と関連づけた。

- 著者名 : Nakamura Y, Takahashi J-I, Sakura A, Inaba Y, Suzuki E, Nihei S, Fujiwara S, Tsuzuki M, Miyashita H, Ikemoto H, Kawachi M, Sekiguchi H, Kurano N.

タイトル : Some Cyanobacteria synthesize semi-amylopectin type  $\alpha$ -

polyglucans instead of glycogen.

掲載誌名 : Plant Cell Physiol. (2005) 46:539-545

要旨 : シアノバクテリアは一般的にはグリコーゲンを蓄積するが、いくつかの種はアミロペクチンとグリコーゲンの中間的な構造を示すポリグルカンを貯めるものがあることを示した。

- 著者名 : Kawagoe Y, Kubo A., Satoh H, Takaiwa F, Nakamura Y.  
タイトル : Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis in rice endosperm.  
掲載誌名 : The Plant Journal (2005) 42:164-174  
要旨 : イネの *sugary-1*, *shrunk* 変異体の登熟種子内で GFP タンパク質を発現させ、登熟段階における胚乳内部を詳細に観察した。
- 著者名 : Sato N, Suda K, Tsuzuki M.  
タイトル : Responsibility of phosphatidylglycerol for biogenesis of the PSI complex.  
掲載誌名 : Biochim. Biophys. Acta (2004) 1658: 235-243  
要旨 : チラコイド膜構成酸性脂質ホスファチジルグリセロールが光化学系 I の生合成に関与していることを示した。
- 著者名 : Kobayashi I, Fujiwara S., Shimogawara K, Sakuma C, Shida Y, Kaise T, Usuda H, Tsuzuki M.  
タイトル : High intracellular phosphorus contents exhibit a correlation with arsenate resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*.  
掲載誌名 : Plant Cell Physiol. (2005) 46: 489-496  
要旨 : 緑藻クラミドモナスにおけるヒ酸耐性は、細胞内のリン酸濃度が強く関係していることを示した。
- 著者名 : Hirokawa Y, Fujiwara S., Tsuzuki M.  
タイトル : Three types of acidic polysaccharides associated with coccolith of *Pleurochrysis haptanemofera*: Comparison of the biochemical characteristics with those of *P. carterae* and analysis using fluorescein-isothiocyanate-labeled lectines.  
掲載誌名 : Marine Biotechnology. (2005) in press  
要旨 : 円石藻 *Pleurochrysis* の円石に存在する酸性多糖類を解析し、*Pleurochrysis* 属の中で共通性が高く、しかし、種間差があることを示した。
- 著者名 : 都筑幹夫  
タイトル : 植物プランクトンにおける環境応答解析—環境応答生物学研究室における10年間の研究—  
掲載誌名 : 東京薬科大学紀要 第8号 (2005) in press  
要旨 : シアノバクテリアや微細藻類におけるタンパク質機能に対する脂質の作用

や遺伝子発現調節などについて最近の研究成果をまとめた。

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：5件（CREST研究期間累積件数：20件）