

# イネの組換え体、変異体を用いたデンプン構造改変に関する研究

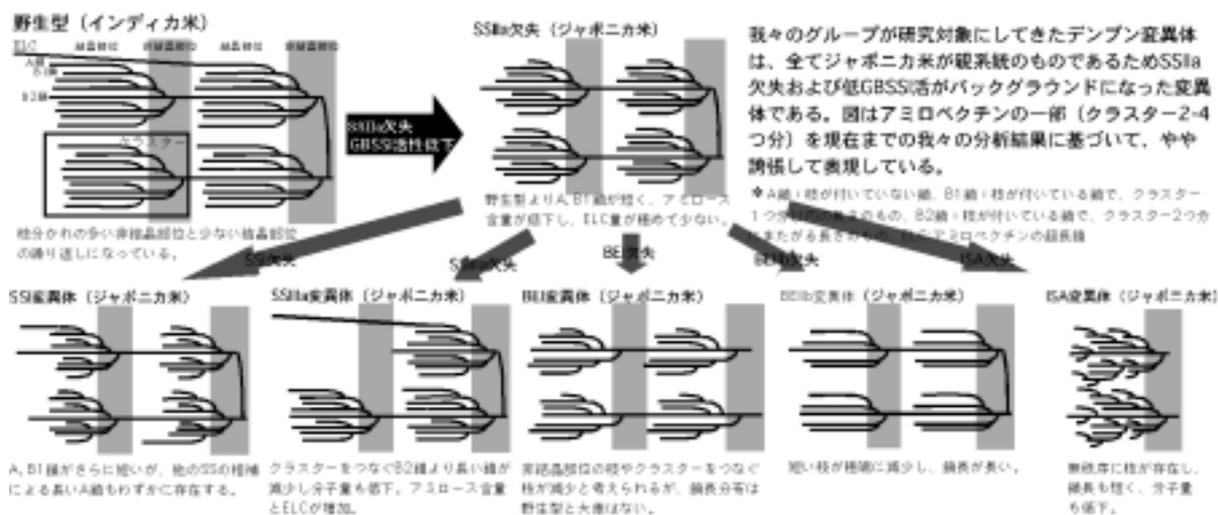
藤田直子 (秋田県立大学 生物資源科学部)

naokof@akita-pu.ac.jp

デンプン合成メカニズムの解明および新規デンプンの開発のため、デンプン生合成に関与する酵素のうち、特にアミロペクチン生合成に関与する主要アイソザイムの遺伝子制御を追究し、イネ胚乳のデンプン構造を実際に改変することに成功した。また、アミロペクチン合成に関与するアイソザイムの新規変異体を複数単離することに成功し、それらを解析することにより、デンプン生合成における個々のアイソザイムの機能を明確にした。

## はじめに

デンプンは、植物がその貯蔵器官に蓄積する最重要炭水化物であり、人類は、デンプンを食料、加工品、工業品等、非常に広範に利用している。現在、エネルギー危機、環境破壊、食糧不足が叫ばれる中、デンプンを従来よりも有効な方法で、多様な分野に利用していくことが農学分野の最も推進すべき課題の一つである。しかしながら、これほどまでに重要であるにもかかわらず、その研究がなおざりになっている分野もないように思う。それは、デンプン蓄積が植物の生命活動の最後の、既に死にかけた組織での出来事であるように思われがちだからかもしれない。これは、とんでもない誤解であり、胚乳内で多くの酵素群がデンプンや貯蔵タンパク質の合成をめまぐるしく行っているこの時期こそ、植物にとっては、クライマックスなのである。蓄積されたデンプンは、植物にとっては、次の世代の発芽のためのエネルギー源となるが、大部分は、従属栄養しかできない動物、微生物のエネルギー源となる。また、たった一種類の構成成分、グルコースのみからなる退屈な高分子で、研究対象としてつまらないと思われがちである。しかし、これも完全な誤解である。デンプンは、わずかに2種類、即ち 1,4 グルコシド結合と 1,6 グルコシド結合によるグルコースポリマーであるが、基本的に直鎖のみからなるアミロースと結晶部位と非結晶部位の繰り返しになった房状の構造をもった(図参照)超巨大分子( $10^{8-9}$ )アミロペクチンからなり、分子量は一定ではない。動物や微生物の貯蔵多糖であるグリコーゲンは、結合様式と構成成分では、アミロペクチンと全く同一であるが、分岐位置、分岐頻度、鎖長、分子量等の違いで、水に溶ける(グリコーゲン) 溶けない(アミロペクチン)ほどの性質の差を生むのである。また、デンプンが示す糊化、老化、粘性、弾性、膨潤性、吸水性等の物性はその構造いかんで大幅に変化する。さらに、これら独特の物性は、他の物質では考えられないデンプンならではの特性である。



デンプン科学は、昔から日本人研究者の優れた実績がある。特に、その構造解析や応用分野においては、世界に先駆けており、食品への利用も盛んである。一方、デンプン科学の分野で、最近まで研究が最も遅れていたのが、その生合成メカニズムであり、未だ完全解明には至っていない。

### 多数のアイソザイムの存在

デンプン生合成は、現時点で基質供給酵素(AGPase)、直鎖伸長酵素(Starch synthase, SS)、枝作り酵素(BE)、枝切り酵素(DBE)の4種類が関与しているとされている。高等植物は、その進化の過程で、これらの酵素の多数のアイソザイムを獲得し、バクテリアや原始的な藻類などが生産するグリコーゲンよりも複雑な構造を持つアミロペクチンの生産能力を獲得した。我々は、より精密なデンプン生合成モデルの構築には、これに関与するアイソザイムの機能および役割分担を詳細に解明することであると考へ、各アイソザイムの変異体の探索とその詳細な解析を実施した。また、メタボリックエンジニアリングの可能性を検証するため、機能が明確になりつつあるアイソザイムの遺伝子操作により、実際にデンプンの構造を改変できるかどうかを試みた。以下に、概ね年代順に受賞者が携わってきた研究を中心に紹介する。

### 枝切り酵素の一つイソアミラーゼ(ISA)1

‘デンプン生合成’という過程を考えたとき、当然、低分子から高分子を構築する必要がある。鎖長を伸長するSSや、分岐鎖を作るBEがデンプン合成に関わることは誰しも想像しやすい。ところが、胚乳にデンプンの代わりにヨウ素染色されない多糖を蓄積する *sugary-1(sug-1)* 変異体イネの詳細な分析<sup>1)</sup>では、*sug-1* 変異体ではISA1の活性が極端に低下しており<sup>2)</sup>、この変異体が蓄積する多糖は、アミロペクチンよりずっと分岐頻度の高いフィトグリコーゲンが蓄積されていることが明確になった(図参照)<sup>12)</sup>。以上のことから、ISA1が分解酵素であるにも関わらず正常なアミロペクチン構造を構築するのに必須であり、おそらく正常なアミロペクチンでは付いてはいけない余計な位置の分岐鎖をトリミングする機能があると推察した。この結果に基づいて、野生型イネのISA1活性をアンチセンス法で低下させた形質転換イネを作成したところ、世界で初めてアミロペクチン構造が改変した、分岐頻度の高いアミロペクチンを蓄積するイネを遺伝子操作によって作ることに成功した<sup>3)</sup>。

### 枝作り酵素(BE)

イネの枝作り酵素は、BEI, BEIIa, BEIIbの3種類が存在し、これらの各変異体は、九州大学佐藤光教授のグループで開発され、その解析により、BEIはアミロペクチン中の長い鎖の枝作り<sup>4)</sup>、BEIIbは、短い鎖の枝作りを主として担当している<sup>5)</sup>ことが明確になった(図参照)。3つのBEの中では、BEIIbが欠失(*amylose-extender[ae]*変異体)したときにアミロペクチンの短鎖が激減することで生じる難糊化性<sup>5)</sup>など最も激しい表現型を示す。*ae* 変異体に、イネBEIIbを遺伝子導入し、アミロペクチン構造が元に戻るかどうかの実験を行った<sup>6)</sup>ところ、さまざまなBEIIb活性レベルを示すイネが単離され、BEIIb活性レベルが野生型と同レベルに戻ったものは、完全にアミロペクチン構造も正常に戻り、BEIIb活性レベルが高いほど、アミロペクチン短鎖が増加することが確認された。また、アミロペクチン構造の違いに反映して、熱糊化温度も変化しており、BEIIb活性のレベルを制御することで、好みの糊化温度を示すコメデンプンを開発できる可能性を示唆した<sup>6)</sup>。

### インディカ米、ジャポニカ米の違い

お米の味にはうるさい日本人は、インディカ米とジャポニカ米の食感の違いは明確に判別できよう。これは、デンプンの成分の違い、即ちGBSSIによるアミロース含量の差異が原因であることは古くから知られていた。

一方、アミロペクチンの構造にも、両者で歴然とした違いがあり（図参照）この違いが熟糊化温度にして8の差を生み<sup>7)</sup>、その原因遺伝子はSSIIaであった<sup>8)</sup>。SSIIaの3カ所のアミノ酸変異がジャポニカ米のSSIIaの不活化の原因であることがわかり、ジャポニカ型イネにインディカ型の正常なSSIIa遺伝子を導入した形質転換イネは、インディカ型のアミロペクチン構造になることを明らかにした<sup>9)</sup>。

### 新たなデンブン変異体の探索

デンブン変異体の検索は、多くは種子の形態から判別する。上記で示した *sug-1* 変異体は、乾燥種子はしわになり、*ae* 変異体は、種子が白濁する。種子形態の原因をタンパク質レベルで特定し、原因遺伝子を決定するのが従来の方法（正遺伝学）であった。しかし、この方法では、種子形態に全く変化のない変異体は単離できないことになる。デンブン生合成に関わる酵素は、20種類以上存在するが、このうち、変異体が単離されているアイソザイムはごく一部であった。そこで、（独）農業生物資源研究所の廣近洋彦博士らが開発した、トランスポゾンによるノックアウトイネ集団から、これまで単離されていないためにその機能が不明であったアイソザイムの変異体検索を試みた。つまり、トランスポゾンが欲しいアイソザイム遺伝子に挿入され、発現しなくなったイネを選び、どのような表現型が現れるかを調べる方法であり、上記の正遺伝学に対して、逆遺伝学と呼ばれている。我々がまず着手したのは、これまでいかなる植物でも単離されていなかった SSI の変異体である。SSI は、禾穀類の登熟胚乳の中で最も主要な成分であることが知られており、このアイソザイムの欠失は、デンブンの構造や蓄積に劇的な変化を及ぼすことが予想され、SSI 変異体の単離が世界のこの分野の研究者の待望であったからである。

我々は、4種類の SSI 活性がさまざまなレベルで低下した変異体の単離に成功した。驚くことに、これらの種子は、野生型と全く見分けがつかず、デンブン結晶性、デンブン粒形態に至って、何ら野生型と変わらなかった。このことは、SSI の欠失を、他の SS アイソザイムが部分的に相補できることを示す。一方、アミロペクチンの構造には変化が見られ（図参照）それに基づいて、SSI のアミロペクチン合成における機能を明確に示した<sup>10)</sup>。

また、イネ登熟胚乳の SS 活性のうち、SSI に次いで主要成分である SSIIIa の変異体も単離し、分析した（投稿中）この変異体では、SSIIIa 欠失が原因の SSI および GBSSI の増強作用を引き起こしており、野生型とは全く異なるユニークな構造のデンブンを蓄積することが分かった（図参照）この他にも、いくつかの変異体が単離されており、今後、これらの分析により、これまでは不明であったアイソザイムの機能が明確になり、より具体的なデンブン生合成モデルを描くことができることを期待している。

### 謝辞

まず、本受賞にあたり、ご推薦いただいた秋田県立大学生物資源科学部長 室伏旭教授ならびに同学部生物生産科学科長 野間正名教授に感謝申し上げます。本研究は、（独）農業生物資源研究所(1997～1999年)で、当時上席研究官であった、現秋田県立大学 植物生理・形態学講座 中村保典教授のグループに科学技術特別研究員として参加して以来、現在に至るまで、同教授の指導の元に行ってきたもとで、終始、ご鞭撻、叱咤激励を頂き、感謝している。さらに、本研究は2001～2005年度に同教授が研究代表者として実施した（独）科学技術振興機構、戦略的基礎研究(CREST)、2005～2006年度の科学研究費補助金若手研究B、2000～2002年度（独）農業生物資源研究所イネゲノムプロジェクトおよび1999年の開学から現在まで秋田県からの多大な研究費によって行われた。特に、CREST実施中は、同講座の鈴木英治准教授、当時のメンバーだった研究員ならびに大学院生および学部生の支えの元行われ、研究を推進することができた。また、九州大学農学部 佐藤光教授、（独）農業生物資源研究所 廣近洋彦先生をはじめ、共同研究者の方々から厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Nakamura, Y., Kubo, A., Shimamune, T., Matsuda, T., Harada, K. and Satoh, H. (1997) Correlation between activities of starch debranching enzyme and  $\alpha$ -polyglucan structure in endosperms of *sugary-1* mutants of rice. *Plant J.* 12: 143-153.
- 2) Kubo A, Fujita N, Harada K, Matsuda T, Satoh H, Nakamura Y (1999) The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol.* 121:399-409
- 3) Fujita N, Kubo A, Suh D-S, Wong K-S, Jane J-L, Ozawa S, Takaiwa F, Inaba Y, Nakamura Y (2003) Antisense inhibition of isoamylase alters the structure of amylopectin and the physicochemical properties of starch in rice endosperm. *Plant Cell Physiol.* 44:607-618
- 4) Satoh H, Nishi A, Yamashita K, Takemoto Y, Tanaka Y, Hosaka Y, Sakurai A, Fujita N, Nakamura Y. (2003) Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm. *Plant Physiol.* 133: 1111-1121.
- 5) Nishi, A., Nakamura, Y., Tanaka, N. & Satoh, H. (2001) Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiol.* 127, 459-472
- 6) Tanaka N, Fujita N, Nishi A, Satoh H, Hosaka Y, Ugaki M, Kasawaki S, Nakamura Y. (2004) The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm. *Plant Biotechnology J.* 2: 507-516.
- 7) Nakamura Y, Sakurai A, Inaba Y, Kimura K, Iwasawa N, Nagamine T (2002) The fine structure of amylopectin in endosperm from Asian cultivated rice can be largely classified into two classes. *Starch* 54: 117-131
- 8) Umemoto T, Yano M, Satoh H, Shomura A, Nakamura Y (2002) Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between japonica-type and indica-type rice varieties. *Theor Appl Genet* 104: 1-8
- 9) Nakamura Y, Francisco Jr. BP, Hosaka Y, Satoh A, Sawada T, Kubo A, Fujita N (2005) Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between *japonica* and *indica* rice cultivars. *Plant Mol Biol* 58: 213-227
- 10) Fujita N, Yoshida M, Asakura N, Ohdan T, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y (2006) Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol* 140: 1070-1084

### **Study on modification of starch structure using mutants and transformants of rice**

Naoko Fujita (Akita Prefectural University, Faculty of Bioresource Sciences)

naokof@akita-pu.ac.jp