Function of Starch Biosynthesis-related Isozymes in Rice and the Production of Novel Starches*

イネを用いた澱粉生合成関連酵素の機能解明とユニークな澱粉の開発*

(2010年9月27日受付)

藤田直子 (ふじた なおこ)^{1,*}

Naoko Fujita^{1,**}

¹ 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科植物分子生理グループ
010-0195 秋田市下新城野字街道端西 241-438

¹ Department of Biological Production, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University
Kaido-Bata Nishi 241-438, Shimo-Shinjo Nakano, Akita 010-0195, Japan

要旨：澱粉生合成メカニズムの完全解明を目指して、イネ (*Oryza sativa* L.) を材料に、澱粉生合成に関与する多数のアイソザイムの機能解明を行った。逆遺伝学的手法でこれまで機能が未解明であったスターチシンターゼ (SS) I 型, IIIa 型およびブルナーゼの変異体を単離し、各アイソザイムの機能を明確にした。また、枝切り酵素の1つであるイソアミラーゼ 1 (ISA1) 活性をアンチセンス法で制御することで、アミロペクチンの構造を人工的に改変させた植物澱粉を得ることに成功し、*amylose-extender* 変異体にその原因遺伝子である *BEIIb* 遺伝子を導入することで、*BEIIb* 発現量が様々に異なる形質転換イネを作出し、糊化温度や結晶型をも人工的に制御することに成功した。さらに、単離酵素の性質を直接調べる *in vitro* 実験を通して、*in vivo* 実験による各アイソザイムの機能を裏打ちした。最近では、単離済みの変異体を交配した二重変異体イネの開発を精力的に行っている。ユニークな澱粉として産業利用される可能性があるだけでなく、これまで表現型が野生型と類似していたために機能が不明であったアイソザイムの機能を明確にする材料として有効であり、今後その成果が期待される。

キーワード：澱粉生合成、アイソザイム、イネ、変異体、組換え体***

1. はじめに

澱粉は、植物が光合成産物として主にその貯蔵組織に蓄える炭水化物であり、地球上の多くの生物の生存の基盤となる物質である。我々の身のまわりには、澱粉を使った食品、加工品、工業品等にあふれている。一方で、重要なこの物質の生合成メカニズムに関しては、未解明な点が多く残されており、完全解明にはほど遠い。澱粉の生合成には、少なくとも4種類の酵素、すなわち、基質供給酵素である ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase, EC 2.7.7.27)、直鎖伸長酵素である starch synthase (SS, EC 2.4.1.21)、枝作り酵素 starch branching enzyme (BE, EC 2.4.1.18) および枝切り酵素 starch debranching enzyme (DBE) が関与している^{1,2)}。この他にも澱粉生合成に関与する酵素が存在すると考えられており、ホスホリラーゼ phosphorylase (PHO, EC 2.4.1.1)³⁾や不均化酵素 (Disproportionating enzyme, D-

enzyme, EC 2.4.1.25)⁴⁾がその候補である。イネなどの高等植物は、その進化の過程で、これらの酵素を多様化させてさらに多種類の酵素 (アイソザイム) を獲得した。澱粉は、グルコースが α -1,4 および α -1,6 グルコシド結合のみからなる巨大分子であるが、限られたスペースにグルコースをできるだけたくさん詰め込む高等植物の澱粉の独特の構造は、このように多数のアイソザイムが巧みに役割分担した結果といえる。我々は、高等植物の澱粉生合成メカニズムの完全解明を目指して、実験植物として優れ、胚乳に高濃度の澱粉を蓄積するイネ (ジャポニカ米) を材料に、澱粉生合成に関与する多数のアイソザイムの機能を1つひとつ解明することを目的に研究を進めてきた^{2,5)}。その手法として、1) 各アイソザイムの活性を失った変異体や遺伝子発現を制御した組換え体を作成し、それらの解析を行う *in vivo* による実験手法と、2) 各アイソザイムを単離、精製し、その機能を直接解明する *in vitro* による実験手法を

*本原稿は、日本応用糖質科学会平成22年度大会の奨励賞受賞講演で一部発表された。

**連絡先 (Tel. & Fax. 018-872-1650, E-mail: naokof@akita-pu.ac.jp)

***Key words: Starch biosynthesis, isozyme, rice, mutant, transgenic plant

略記: AGPase, ADP-glucose pyrophosphorylase; GBSS, granule-bound starch synthase; DP, Degree of polymerization; BE, starch branching enzyme; DBE, starch debranching enzyme; SS, starch synthase; PG, phytoglycogen; PAGE, Polyacrylamide gel electrophoresis.

行ってきた。ここでは、著者が1997年に科学技術特別研究員として独農生物資源研究所・中村保典上席研究官に1999年から秋田県立大学に赴任して現在までの研究経過について、歴史的背景も含めて述べようと思う。

2. 逆遺伝学的手法を用いた変異体の単離

1990年代に入って、主として生化学的手法を用いた澱粉生合成研究が、トウモロコシ、エンドウ、ジャガイモ等で盛んになり、クロマトグラフィー等の分離技術により、澱粉生合成関連酵素の主要なアイソザイムが検出された。そのような中で、代表的なイネの澱粉変異体である *sugary-1*⁶⁻⁸⁾(以下, *sug-1*) と *amylose-extender*^{9,10)}(以下, *ae*) の解析が行われた。これら両変異体は、九州大学の佐藤光教授のグループによって単離された変異体であり、種子がそれぞれしわと白濁と、独特の形態を示した。これらの胚乳澱粉の性質は野生型とは大きく異なることが明確になり、正遺伝学的手法でそれぞれの原因遺伝子がイソアミラーゼ1 (*ISA1*)^{7,11)}と枝作り酵素 IIb (*BEIIb*)¹⁰⁾であることが明確になった。2000年が近づくにつれ、各植物種でゲノム情報がより充実した。特に、イネでは、各国でプロジェクト化されて全ゲノム配列が決定され、澱粉生合成に関与する遺伝子では、AGPaseが大、小サブユニットがそれぞれ4つと2つ、SSは、*SSI*, *SSIIa*, *SSIIb*, *SSIIc*, *SSIIId*, *SSIVa*, *SSIVb*, *GBSSI*, *GBSSII*の10個、BEは*BEI*, *BEIIa*, *BEIIb*の3つ、DBEは、イソアミラーゼ (*ISA*) が3つとプルラーゼ (*PUL*) が1つ存在することがわかった。これらの遺伝子にコードされるすべてのアイソザイムが組織で確認されているわけではなく、今後もそれらの機能解明のために、各アイソザイムを検出、単離する生理生化学的手法を用いた研究を継続することが必須であることはいうまでもない。一方、既に生化学的手法で単離されてきたアイソザイムに関しては、それらをコードする遺伝子が同定された。2000年の時点で、澱粉生合成関連アイソザイムの変異体が単離され、それらの原因酵素および遺伝子が明確になっていたのは、欠損するとアミロースフリーになることからアミロース合成に関与することが知られていた *GBSSI*¹²⁾と上記の *ISA1*¹¹⁾, *BEIIb*¹⁰⁾のみであった。我々は、さらに各関連アイソザイムの機能解明を目指すため、逆遺伝学的手法でまだ単離されていないアイソザイムの変異体を単離することにした。独農生物資源研究所の廣近洋彦博士のグループで、レトロトランスポゾン *Tos17* が10コピー程度イネゲノム上に散在したミュータントパネルを開発していたため¹³⁾, それら約40,000個体から澱粉生合成関連アイソザイムの変異体を独自で単離し始めた。

1) *ss1* 変異体 (ΔSSI)

著者らがまず単離を試みたのは、イネ¹⁴⁾やトウモロコシ¹⁵⁾の登熟胚乳中の可溶性画分で最も多くのSS活性を示すと予想されていたSSIであった。当時、 ΔSSI はいかなる植物でも単離されておらず、トウモロコシでは、このア

イソザイムが最も主要なSSであるため、その欠損が致死になるのではないかとさえ、考えられていた¹⁶⁾。著者は、既にわかっていたイネのSSI遺伝子の配列をもとにプライマーを設計し、PCR選抜により、SSI遺伝子に*Tos17*が挿入されている系統を選抜した¹⁷⁾。幸運なことに、*Tos17*の挿入位置が異なる複数の系統が選抜され、それらはそれぞれ残存活性が異なることがわかった。すなわち、*Tos17*がエクソン7に挿入され、SSI活性が完全に欠失していたe7、イントロンに挿入されて活性が野生型の1/6, 1/5, 1/4に低下したi2-1, i2-2, i4の4系統をそれぞれ単離した。これまでの生化学的解析から、SSI活性は、登熟胚乳の主要な成分であることを考えると、少なくともSSI活性が完全に欠失した変異体では、澱粉蓄積量が大きく低下することが予想された。しかし、驚くことに実際は全く予想に反して、種子重量、澱粉蓄積量は野生型と比べてほとんど低下していなかった。そればかりか、種子形態、澱粉の結晶性、澱粉粒の形態についても野生型となんら見分けがつかなかった。一方、得られた変異体4系統のアミロペクチンの鎖長分布解析をキャピラリー電気泳動法で行ったところ、*sug-1*や*ae*にみられるほど大きな変化ではなかったものの、野生型とは異なるパターンを示し、この変化は、いずれの系統においても共通していた。さらに、SSI残存活性が少ないほどその変化が大きかった (Fig. 1)。この結果は、この鎖長分布の変化が、SSI活性が低下したためであることを強く示唆した。この鎖長分布パターンの解釈は、以下の通りである (Fig. 2)。 ΔSSI でグルコース重合度 (DP) 6および7が増加し、DP8~12が減少するのは、*BEIIb*によって枝作りされたDP6および7の鎖を本来ならばSSIが伸長してDP8~12に伸長するところが、このアイソザイムが欠失しているためにDP6~7が余り、DP8~12が減少するのである (*BEIIb*がDP6~7の枝を付加することは、後に*in vitro*実験によって明らかになった¹⁸⁾)。これらは、主としてアミロペクチンのA鎖の変化である。一方、DP16~19の増加は、ほとんどがB₁鎖の変化で、A鎖の変化と同様、非還元末端からDP6~7の鎖を伸長するはずのSSIが存在しないため、枝と枝の長さ (internal chain length) がDP10~12のB₁鎖が余って増加すると解釈した¹⁷⁾。以上のことから、SSIは、アミロペクチンの非還元末端からDP6~7の短い鎖を少しだけ伸長する

Fig. 1. Differences in chain-length distribution patterns of endosperm amylopectin between the mature seeds of *ss1* mutant lines and the wild type.

Fig. 2. Schematic representation of the proposed model for elongation of rice amylopectin glucan chains by SSI and other SS isozymes.

機能をもつことが明らかになり、このことは、後に述べる大腸菌発現系を用いた *in vitro* による実験からも示唆された¹⁹⁾。

2) *ss3a* 変異体 ($\Delta SSIIIa$)

著者らが次にミュータントパネルから単離を試みたのは、イネやトウモロコシの可溶性画分において、SSI の次に多くの SS 活性を示す $SSIIIa$ 活性が欠損した変異体であった。*ss3a* 変異体は、トウモロコシにおいて、既に古くから知られていた *dull-1* (*du-1*) 変異体であることが Gao ら²⁰⁾によって明確になったが、イネでは単離されていなかった。既知のイネ $SSIIIa$ 遺伝子配列を元にプライマーを構築し、PCR 法で選抜を行ったところ、*Tos17* がエクソン 1 に挿入された変異体系統 (e1) が単離できた²¹⁾。この変異体の登熟種子から抽出した可能性画分を native-PAGE/SS 活性染色法で SS 活性を検出したところ、移動度が最も小さいバンドが欠失していたため、このバンドが $SSIIIa$ であることが明確になった。一方、移動度が大きい SSI バンドは、野生型よりも強くなっていた (Fig. 3)。この現象はトウモロコシの *du-1* 変異体と共通であった²⁰⁾。 $\Delta SSIIIa$ の胚乳アミロペクチンの鎖長分布パターンは、 $DP \leq 20$ において、 ΔSSI とは対照的なパターンを示した (Fig. 4)。これは、SSI 活性が強くなっているに関係していると考えられる。一方、 $\Delta SSIIIa$ のアミロペクチンの

Fig. 3. Native-PAGE/SS activity staining of crude extract from developing endosperm in rice *ss3a* mutant line and the wild type.

最も特徴的な変化は、 $DP \geq 33$ の長鎖の減少である。鎖長分布解析において、長鎖はもともとそんなに多くないため、短鎖の変化に比べたらその減少もさほど大きくないようにみえるが、変異体のパターンから野生型のパターンを引いた差分を野生型のパターンで割り、変化率を算出すると、元の長鎖の 60% にまで減少していることがわかった²¹⁾。長鎖の減少は、ゲル濾過パターンでも明確であった (Fig. 5)。従って、 $SSIIIa$ の機能は、アミロペクチンのクラスターとクラスターを連結する B_2 鎖以上の長い鎖を伸長することであると判断した。

単離されたイネの $\Delta SSIIIa$ は、野生型とは異なり、種子の中央が白くなる心白が特徴であった。また、アミロース含量が野生型の約 1.5 倍高かった。これは、 $SSIIIa$ 活性が欠損することで、*SSI* 遺伝子ばかりか、*GBSSI* 遺伝子の発現量も増加したためであり、他のアイソザイムによる相補がみられた代表的な例である。また、 $\Delta SSIIIa$ の胚乳澱粉の熱糊化粘度をラピッドビスコアナライザーで測定したところ、野生型澱粉に比べて非常に低く、明確な粘度ピークを示さなかった。このような澱粉物性の変化は、アミロース含量が増加したことに加え、アミロペクチンの長鎖が減少したという澱粉成分および構造の変化によるものであろう²¹⁾。

Fig. 4. Differences in chain-length distribution patterns of endosperm amylopectin between *ss3a* and *ss1* mutant lines and the control lines.

Fig. 5. Elution profiles of isoamylase-debranched starch and purified amylopectin by gel filtration chromatography through Toyopearl HW55S-50S columns.

3) *pul* 変異体 (Δ PUL)

澱粉生合成は、グルコースの重合度を大きくしていく過程であることから、その反応系に鎖長を伸長する酵素である SS や、その基質供給酵素 AGPase、枝を作る酵素である BE が関与することには全く疑いのないことであった。一方で、トウモロコシ²²⁾やイネ⁷⁾等の *sug-1* 変異体の原因酵素が枝切り酵素 (DBE) の 1 タイプであるイソアミラーゼ (ISA1, EC 3.2.1.68) であることが明確になるまでは、分解酵素が生合成に関与することはなかなか理解されなかったようである。このメカニズムについての詳細はここでは解説しないが、簡単に述べると、アミロペクチンの様に巨大分子を構築するには、伸長や枝分かれ以外に、途中で正しくない位置に付いた枝をトリミングする役割がないといけないということであり、この役割を DBE が行っていることが、胚乳にアミロペクチンの代わりにフィトグリコーゲン (PG) を蓄積する Δ ISA1 の研究から明確になったのである²²³⁾。DBE には、基質特異性の異なるもう 1 つのタイプであるプルナーゼ (PUL, EC 3.2.1.41) が存在する。すなわち、ISA と PUL は、アミロペクチンの枝を分解することはできるが、前者はプルランを、後者はグリコーゲンをほとんど分解することができない²⁴⁾。このアイソザイムは、種子の発芽時の澱粉分解には重要であることが知られていた²⁵⁾が、ほとんどの高等植物では 1 コピーのみ存在している²⁶⁾。一方で、登熟種子において、明確な活性を示す (Fig. 6)⁸⁾にもかかわらず、その澱粉生合成における機能は不明であった。また、トウモロコシやイネの *sug-1* 変異体では、ISA1 活性の低下とともに PUL 活性の低下もみられたため、*sug-1* 変異体が ISA1 の変異体であることが明確になる^{11,22)}までは、この変異体の原因酵素が PUL ではないか、と考えられていた時代もあった^{6,27)}。PUL の機能を明確にするため、我々は *Tos17* ミュータントパネルから Δ PUL を単離することを試みた²⁸⁾。野生型の活性の 0%, 6% に低下したエキソン 10 (e10) とイントロン 16 (i16) に *Tos17* が挿入された変異体系統が得られた (Fig. 6)。 Δ ISA1 では、PUL 活性の低下がみられたが、 Δ PUL では、ISA 活性の低下はみられなかった。一方、いずれの系統も種子の形態や大きさ、澱粉含量は野生型とほとんど変わらず、わずかにアミロペクチンの短鎖が増加していたものの、 Δ ISA1 のような大きな変化はみられなかった。次に、両枝切り酵素の欠損効果を調べるため、 Δ ISA1/ Δ PUL 二重変異体を作成し、それらの分析を行った。イネの Δ ISA1 は、胚乳中に PG を蓄積するが、胚乳全体に PG を蓄積するシビアタイプと、内側に PG、外側に正常なアミロペクチンよりは短鎖の多いシュガリーアミロペクチンを蓄積するマイルドタイプの系統がそれぞれ存在する (Fig. 7)^{7,8)}。PG の蓄積量が多ければ多いほど、PUL 活性の低下が著しかったため、PG 量は、PUL 活性に依存すると考えられていた^{7,8)}。もしそれが正しいのであれば、マイルドタイプの Δ ISA1 と Δ PUL の二重変異体は、PUL 活性が欠損するため、胚乳全体に PG を貯めるような種子を形成

Fig. 6. Native-PAGE/DBE or PUL (lower panel) activity staining of developing endosperm in rice Δ PUL and Δ ISA1/ Δ PUL double mutant line.

Nip, Nipponbare (wild type); -/-, Δ PUL; +/+, control lines; EM653, Δ ISA1; i16, leaky Δ PUL; e10, null Δ PUL; #4001, Δ ISA1/ Δ PUL (EM653 $\times$ e10).

Fig. 7. Stereo micrographs of the cross-sections of mature endosperm stained by iodine solution in rice Δ PUL and Δ ISA1/ Δ PUL double mutant line. Nip, Nipponbare (wild type); e10, Δ PUL; EM653, mild Δ ISA1; #4001, Δ ISA1/ Δ PUL (EM653 $\times$ e10); EM914, severe Δ ISA1.

するはずである。しかしながら結果は、マイルドタイプの Δ ISA1 より PG 量が増加したものの、シビアタイプのようにはならなかった (Fig. 7)²⁸⁾。現時点で、ISA1 遺伝子のいろいろな箇所に変異がある *sug-1* 変異体シリーズで、PG 量が何故様々に変化するかの明確な解答は得られていないが、いずれにしても PUL は ISA1 のアミロペクチンのトリミングという機能をわずかに相補するが、その貢献度は ISA1 と比べて非常に小さいことが明確となった²⁸⁾。

3. 組換え体による澱粉構造の変化

ジャガイモでは、1990 年代の前半に既に組換え手法によってアミロース合成に関与する *GBSSI* 遺伝子を制御することで、アミロース含量を人工的に改変する試みがなされた²⁹⁾。一方で、アミロペクチンの構造改変に関しては、その構造が複雑であることもあり、未着手のままであった。イネにおいて、この 10 年間のこの分野の進歩は変異体研究とともに組換え体研究によって充実してきたといっても過言ではない。変異体研究によって明らかになった知見を用いて、特定の遺伝子の発現量を制御することで澱粉構造や成分を人工的に改変することが実際にできたからである。私が関与したアンチセンス ISA1 と過剰発現 BE11b 組換えイネについて解説する。

1) アンチセンス ISA1 組換え体

1995 年にトウモロコシで *su1* 変異体の原因酵素が ISA1 であることが明確になり²²⁾、イネにおいてもこの遺伝子を

制御することで *sug-1* 変異体のような形質が本当に得られるかどうかを証明する必要があった。そこで、当時、遺伝子発現を制御する方法としては主流であったアンチセンス法を用いて、*ISA1* の発現を低下させた組換え体イネを作出した³⁰⁾。得られた組換え体の *ISA1* 活性は、野生型の 6% に低下しており、いずれの *sug-1* 変異体 (1% 以下) より残存活性が高かった。種子断片のヨウ素染色は *sug-1* 変異体のように染まらない部分は存在せず、PG のみを蓄積する細胞は存在しなかった。一方、この種子の詳細を調べると、可溶性 α グルカン含量が 16.2% に増加しており (野生型は 8.7%)、アミロペクチンの鎖長分布は、*sug-1* 変異体のシュガリーアミロペクチンと類似しており、結晶性、糊化温度の低下も合わせて、正常なアミロペクチンよりクラスター構造が崩れていることがわかり、確かに *ISA1* が余分な枝のトリミングに機能していることが明確になった。一方で、6% にまで低下しても GP ほど激しくクラスター構造の崩壊はみられず、*ISA1* 活性が 1% 以下にならないと PG が形成されないこともわかった。この研究は、人工的にアミロペクチンの構造を制御することができた初めての例であり、*ISA1* 活性を低下させることで、短鎖が多く、糊化温度が低い澱粉を生産することができることも明確になった³⁰⁾。

2) 過剰発現 *BE11b* 組換え体

イネの $\Delta BE11b$ は *amylose-extende (ae)* 変異体として古くから知られており、アミロペクチンの短鎖が激減し、難糊化性の澱粉を蓄積する⁹⁾。*ae* の名前の由来は、澱粉-ヨウ素複合体の青価が上昇することで一見アミロース含量が増加しているようにみえるためであるが、アミロースフリーの $\Delta GBSSI$ (モチ) との二重変異体でも同様の傾向を示すため、アミロペクチンの長鎖の増加が原因で青価が上昇していることが明確になった¹⁰⁾。これらの結果から、*BE11b* は、アミロペクチンの短鎖の形成に関与していることが明確になった。我々は、*BE11b* 活性が限りなく低下した *ae* 変異体にイネの *BE11b* 遺伝子を再導入し、発現レベルがさまざまな形質転換イネを作成した³¹⁾。この中には、野生型の *BE11b* 発現レベルを遙かに超えたものも存在した。*BE11b* 発現が強ければ強いほど、アミロペクチンの短鎖の減少は穏やかになり、野生型より発現が強い系統は野生型より短鎖が増加していた。これらの構造変化は、糊化温度にも反映していた。正常なイネが示す A 型結晶に対して、 $\Delta BE11b$ はアミロペクチンの短鎖が激減するために、ジャガイモ等と同様の B 型結晶を示すことが知られているが、*BE11b* 発現の増加とともに B 型結晶から C 型、A 型へと変化することも明確になった。*BE11b* 発現が過剰な系統は、種子も扁平となり、結晶性も低下した。このように、イネ胚乳において、アミロペクチンの結晶領域の枝作りに関与し、DP 6~7 の短い枝を作ることが *in vivo* 実験で明らかになってきた¹⁸⁾*BE11b* の発現を制御することにより、アミロペクチンの短鎖の量、糊化温度、結晶型を制御することが可能であることが明らかになった³¹⁾。

4. *In vitro* 実験によるアイソザイムの機能解明

ここまで、変異体と組換え体の作出とそれらの分析による *in vivo* 実験について述べてきた。種子は植物にとって次世代に遺伝子をつなぐ最重要な存在であり、澱粉等の栄養源を蓄積することは、発芽後に確実に生育できるようにするための重要な戦略の 1 つである。従って、種子の形成は何をさしおいても最優先して行われるようである。例えば、田植えの残りの苗を水田に移植せずに栄養が少ない状態で水だけ与えて放置したとする。分けつもほとんどないまま、しかし、一本の苗に小さな穂ができて、5、6 粒の種子はなんとか稔る。変異体のように特定のアイソザイムが欠損しても、その詳しいメカニズムは未解明であるが、他のアイソザイムが欠損したアイソザイムの機能を相補したり、種子内の環境に変えることで、最大限澱粉を生産するようである。変異体や組換え体は、このような相補等が生じた結果の澱粉を分析していることになる。異なる機能をもつアイソザイムが相補することで、野生型とは異なるユニークな澱粉を蓄積することにもなるのであるが、欠損したアイソザイムの機能を評価するためには、相補の影響を差し引く必要がある。これに対して、単離酵素の直接的な分析は、他のアイソザイムの影響を受けずにそのアイソザイムの機能のみを明確に評価することができる。従って、各アイソザイムの機能解明には、*in vivo* と *in vitro* の両方の研究が必須であり、*in vivo* 実験でわかったことを *in vitro* 実験で裏打ちする必要がある。

我々は、既に変異体を単離し、その分析から機能を示唆したイネ *SSI* について、大腸菌発現系を用いて精製酵素 (*rSSI*) を単離し、*in vitro* 実験を行った¹⁹⁾。精製した *rSSI* の機能を明確に評価するために、新たな方法を開発した。すなわち、特定の基質を含むアクリルアミドゲルを用いた native-PAGE/SS 活性染色法でヨウ素染色された SS 活性バンドを切り出して、キャピラリー電気泳動法で鎖長分布解析を行い、ヨウ素で染色されない (すなわち、SS で伸長されていない) 箇所の鎖長分布も同様に分析し、比較することで評価した (Fig. 8)。DP 6 が豊富なカキグリコーゲンを基質にした場合、*rSSI* は非常に高い活性を示し、伸長していない元の構造より、*rSSI* によって伸長された α グルカンは DP 8 が増加していた (Fig. 8(a))。このことから、*rSSI* は、DP 6 を DP 8 に伸長する機能があることがわかった。次に、 ΔSSI (e7) が蓄積する澱粉から精製したアミロペクチンを基質にしたとき、DP ≤ 20 の範囲内で、小刻みな増減がみられた。これは、*rSSI* が、アミロペクチンの DP 6 等の短い鎖を少しだけ、すなわち DP 2~4 程度伸長することを物語っている (Fig. 8(b))¹⁹⁾。*rSSI*IIa や *rSSI*IIIa では、このような傾向はみられず、*SSI* の伸長パターンの特徴であると考えられ (Nakamura *et al.*, 投稿準備中)、 ΔSSI を用いて明らかにした *SSI* の機能¹⁷⁾を裏付ける結果となった。

Fig. 8. Chain-length distribution pattern of α -glucan from rSSI activity bands excised from native-PAGE/SS activity staining gel.

Chain-length differences between the unmodified substrates [oyster glycogen gel (A) and Δ SSI amylopectin gel (B)] and rSSI-elongated substrates (modified-unmodified). The inset shows the chain-length distribution patterns of unmodified α -glucans from oyster glycogen (A) and Δ SSI amylopectin (B) gel after incubation for 20 h. One, 2, 6 and 20 hours indicate the incubation times with ADP-glucose at 30°C

5. 二重変異体の作出

我々は、最近、既に単離された変異体を交配することで、いろいろな組み合わせの二重変異体を作出している。澱粉形質に関与する二重変異体は、既にトウモロコシで1980年代から盛んに行われてきた^{32,33)}。しかし、当時は、変異体の原因酵素が明確ではなく、澱粉構造の変化とアイソザイム遺伝子を結びつけるには到らなかった。澱粉構造に影響を与える主要な遺伝子と各変異体の関係が明確になった今こそ、二重変異体を用いて、各アイソザイムの機能をさらに明確にすることと、それらの間の相互作用を解明し、澱粉生合成メカニズムの解明に役立てるべきである。最近、澱粉生合成は、関与するアイソザイムが複合体を形成して行われる可能性があることがトウモロコシやコムギで示された^{34,35)}。イネにおいてもこれらのことを解明するのに、二重変異体は有効な材料となるに違いない。また、これまでに単離した変異体の中には Δ PULの例のように、野生型と比べて澱粉構造等に変化が少ないものも含む。これらは、他のアイソザイムの機能によって欠損しているアイソザイムの機能がマスクされていることが予想されるが、二重変異体にすることでマスクを外すことによって初めてその機能がみえてくることもある。一方で、我々が変異体の親系統として用いているのはジャポニカ米であるが、これらはインディカ米に比べて既にSSIIaとGBSSI活性が低下したリーキー変異体である。これらを親系統とした場合、さらに澱粉生合成に関連するアイソザイムを三重、四重に欠損させると、不稔や種子が小さくなるなどの農業形質が低下するのではないかと心配された。実際にさまざまな組み合わせの二重変異体を確立してみると、多数

の二重変異体で種子重が野生型の8~9割に達しており、生育も順調で、大規模栽培にも成功している。不稔となる組み合わせの二重変異体も存在したが、片親にリーキー変異体を用いることで、不稔を回避できる場合もあった(Fujita et al., 投稿中)。さらに、単一変異体の性質を単に相加的に合わせた変化ではない、予想外の変化もあり、単一変異体よりもさらにユニークな澱粉が生産されることがわかってきた。現在、これらの食品のみならず、工業利用も含めた産業利用を目指して、大規模栽培して大量に得た精製澱粉を用いて、さまざまなテストを行っている。一方で、これら二重変異体は、収量、開花時期、栽培のしやすさなどの面で育種する必要がある。我々は有望変異体および二重変異体を品種と戻し交配することで育種を進めつつある。育種が進んだ二重変異体が将来、国内の休耕田等を利用して産業利用されることになれば、うれしい。

6. 最後に

今回の平成22年度日本応用糖質学会奨励賞受賞にあたり、多くの方々にお世話になった。受賞対象となった成果は、(独)農業生物資源研究所・生理機能部・上席研究官室(1997~1999年)および秋田県立大学(1999~2010年)において、中村保典教授のグループで行われた。中村教授にはさまざまな方面からご指導いただいたことに、深く感謝する。また、共同研究者として、多くの優れた変異体を提供いただいた九州大学・農学研究科の佐藤光教授とラボの皆様、Tos17のミュータントパネルをご提供いただいた(独)農業生物資源研究所の廣近洋彦プロジェクトリーダー、宮尾安藝雄主任研究員、ポスドクとして研究をともにした久保亜希子博士(現 江崎グリコ(株))、ペリジオフランシスコ Jr. 博士、内海好規博士(現 理研)、豊澤佳子博士および研究補助員として実験をサポートしてくれた吉田真由美氏、伊藤るみ子氏、相原里美氏、中泉裕子氏に感謝する。また、(独)農業生物資源研究所・生理機能部・上席研究官室の当時のスタッフであった田中直樹博士、木村和子氏、稲葉由美子氏、秋田県立大学・植物生理研究室のスタッフ、学生、卒業生の皆様に感謝申し上げる。大学院生が少ない本学においては、秋田へ移ってからの私の成果のほとんどは、学部生の卒業論文から始まっていることを強調しておきたい。プロジェクトの共同研究者として支えていただいている鹿児島大学・農学部の花城勲准教授、竹田靖史名誉教授、新潟大学・自然科学系の伊藤紀美子准教授、東京農業大学・応用生物科学部の阿久澤さゆり准教授、アイオワ州立大学のJ-L Jane 教授とラボの皆様、秋田県総合食品研究センターの高橋徹主任研究員、秋田県農業試験場の小玉郁子主任研究員、日本食品化工(株)の高田正保課長、山本健課長、安東竜一研究員、佐分利亘研究員(現 北大)、ここに書ききれない方々も多数おられるが、厚くお礼申し上げます。また、研究支援していただいた、公立大学法人秋田県立大学、農水省生物研イネゲノムプロジェクト、JST・

CREST, JST・シーズ発掘試験, 科研基盤研究B, 生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業に感謝申し上げます。

文献

- 1) A.M. Smith, K. Denyer and C. Martin: The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 67–87 (1997).
- 2) Y. Nakamura: Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 718–725 (2002).
- 3) H. Satoh, K. Shibahara, T. Tokunaga, A. Nishi, M. Tasaki, S. K. Hwang, T.W. Okita, N. Kaneko, N. Fujita, M. Yoshida, Y. Hosaka, A. Sato, Y. Utsumi, T. Ohdan and Y. Nakamura: Plastidic α -glucan phosphorylase mutation dramatically affects the synthesis and structure of starch in rice endosperm. *Plant Cell*, **20**, 1833–1849 (2008).
- 4) C. Colleoni, D. Dauvillée, G. Mouille, M. Morell, M. Samuel, M.C. Slomiany, L. Liénard, F. Wattebled, C. d'Hulst and S. Ball: Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* α -1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol.*, **120**, 1005–1014 (1999).
- 5) 藤田直子, 阿久澤さゆり: 米澱粉系新規高機能性食品素材および添加剤の開発. *New Food Industry*, **52**, 41–48 (2010).
- 6) Y. Nakamura, T. Umemoto, Y. Takahata, K. Komae, E. Amano and H. Satoh: Changes in structure of starch and enzyme activities affected by *sugary-1* mutants in developing rice endosperm: possible role of starch debranching enzyme (R-enzyme) in amylopectin biosynthesis. *Physiol. Plant.*, **97**, 491–498 (1996).
- 7) Y. Nakamura, A. Kubo, T. Shimamune, T. Matsuda, K. Harada and H. Satoh: Correlation between activities of starch debranching enzyme and α -polyglucan structure in endosperms of *sugary-1* mutants of rice. *Plant J.*, **12**, 143–153 (1997).
- 8) A. Kubo, N. Fujita, K. Harada, T. Matsuda, H. Satoh and Y. Nakamura: The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol.*, **121**, 399–409 (1999).
- 9) M. Yano, K. Okuno, J. Kawasaki, H. Satoh and T. Omura: High amylose mutants of rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.*, **69**, 253–257 (1985).
- 10) A. Nishi, Y. Nakamura, N. Tanaka and H. Satoh: Biochemical and genetic analysis of the effects of *amylose-extender* mutation in rice endosperm. *Plant Physiol.*, **127**, 459–472 (2001).
- 11) N. Fujita, A. Kubo, P.B. Francisco Jr., M. Nakakita, K. Harada, N. Minaka and Y. Nakamura: Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. *Planta*, **208**, 283–293 (1999).
- 12) Y. Sano: Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. *Theor. Appl. Genet.*, **68**, 467–473 (1984).
- 13) H. Hirochika: Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 118–122 (2001).
- 14) T. Baba, M. Nishihara, K. Mizuno, T. Kawasaki, H. Shimada, E. Kobayashi, S. Ohnishi, K. Tanaka and Y. Arai: Identification, cDNA cloning, gene expression of soluble starch synthase in rice (*Oryza sativa* L.) immature seeds. *Plant Physiol.*, **103**, 565–573 (1993).
- 15) H. Cao, M.G. James and A.M. Myers: Purification and characterization of soluble starch synthases from maize endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 135–146 (2000).
- 16) P.D. Commuri and P.L. Keeling: Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinities and catalytic properties. *Plant J.*, **25**, 475–486 (2001).
- 17) N. Fujita, M. Yoshida, N. Asakura, T. Ohdan, A. Miyao, H. Hirochika and Y. Nakamura: Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol.*, **140**, 1070–1084 (2006).
- 18) Y. Nakamura, Y. Utsumi, T. Sawada, S. Aihara, C. Utsumi, M. Yoshida, and S. Kitamura: Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice Endosperm. *Plant Cell Physiol.*, **51**, 776–794 (2010).
- 19) N. Fujita, S. Goto, M. Yoshida, E. Suzuki and Y. Nakamura: The function of rice starch synthase I expressed in *E. coli*. *J. Appl. Glycosci.*, **55**, 167–172 (2008).
- 20) M. Gao, J. Wanat, P.S. Stinard, M.G. James and A.M. Myers: Characterization of *dull1*, a maize gene coding for a novel starch synthase. *Plant Cell*, **10**, 399–412 (1998).
- 21) N. Fujita, M. Yoshida, T. Kondo, K. Saito, Y. Utsumi, T. Tokunaga, A. Nishi, H. Satoh, J.H. Park, J.L. Jane, A. Miyao, H. Hirochika and Y. Nakamura: Characterization of SSIIa-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.); the function of SSIIa and pleiotropic effects by SSIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiol.*, **144**, 2009–2023 (2007).
- 22) M.G. James D.S. Robertson and A.M. Myers: Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell*, **7**, 417–429 (1995).
- 23) G. Mouille, M.L. Maddelein, N. Libessart, P. Talaga, A. Decq, B. Delrue and S. Ball: Pre-amylopectin processing: A mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell*, **8**, 1353–1366 (1996).
- 24) Y. Nakamura: Some properties of starch debranching enzymes and their possible role in amylopectin biosynthesis. *Plant Sci.*, **121**, 1–18 (1996).
- 25) A.M. Smith, S.C. Zeeman and S.M. Smith: Starch degradation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **56**, 73–98 (2005).
- 26) P.B. Francisco Jr., Y. Zhang, S.Y. Park, N. Ogata, H. Yamano-uchi and Y. Nakamura: Genomic DNA sequence of a rice gene coding for a pullulanase-type of starch debranching enzyme. *Biochem. Biophys. Acta*, **1387**, 469–477 (1998).
- 27) D. Pan and O.E. Nelson Jr.: A debranching enzyme deficiency in endosperms of the *sugary1* mutants of maize. *Plant Physiol.*, **74**, 324–328 (1984).
- 28) N. Fujita, Y. Toyosawa, Y. Utsumi, T. Higuchi, I. Hanashiro, A. Ikegami, S. Akuzawa, M. Yoshida, A. Mori, K. Inomata, R. Itoh, A. Miyao, H. Hirochika, H. Satoh and Y. Nakamura: Characterization of PUL-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.) and the function of PUL on the starch biosynthesis in the rice endosperm. *J. Exp. Bot.*, **60**, 1009–1023 (2009).
- 29) R.G.F. Visser, I. Somhorst, G.J. Kuipers, N.J. Ruys, W.J. Feenstra and E. Jacobsen: Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Mol. Gen. Genet.*, **225**, 289–296 (1991).
- 30) N. Fujita, A. Kubo, D.S. Suh, K-S. Wong, J-L. Jane, S. Ozawa, F. Takaiwa, Y. Inaba and Y. Nakamura: Antisense inhibition of isoamylase alters the structure of amylopectin and the physicochemical properties of starch in rice endosperm. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 607–618 (2003).
- 31) N. Tanaka, N. Fujita, A. Nishi, H. Satoh, Y. Hosaka, M. Uga-ki, S. Kasawaki and Y. Nakamura: The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm. *Plant Biotechnol. J.*, **2**, 507–516 (2004).
- 32) N. Inouchi, D.V. Glover, Y. Sugimoto and H. Fuwa: DSC characteristics of gelatinization of starches of single-, double-, and triple-mutants and their normal counterpart in the inbred Oh 43 maize (*Zea mays* L.) background. *Starch/Stärke*, **43**, 468–472 (1991).
- 33) Y-J. Wang, P. White, L. Pollak and J-L. Jane: Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with Oh43 inbred line background. *Cereal Chem.*, **70**, 171–179 (1993).
- 34) I.J. Tetlow, R. Wait, Z. Lu, R. Akkasaeng, C.G. Bowaher, S. Esposito, B. Kosar-Hashemi, M.K. Morell and M.J. Emes: Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *Plant Cell*, **16**, 694–708 (2004).
- 35) T.A. Hennen-Bierwagen, Q. Lin, F. Grimaud, V. Planchot, P.L. Keeling, M.G. James and A.M. Myers: Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: a model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts. *Plant Physiol.*, **149**, 1541–1559 (2009).