第3回応用糖質フレッシュシンポジウム

Involvement of Enzyme Complexes during Starch Biosynthesis In Rice Endosperm イネ胚乳澱粉生合成過程における酵素複合体の関与

¹ 秋田県立大学生物資源科学部² 日本学術振興会特別研究員 (RPD)クロフツ尚子 (くろふつ なおこ)^{1,2,*}, 藤田直子 (ふじた なおこ)¹¹ Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University² RPD Research fellowship for young scientists, Japan Society for the Promotion of ScienceNaoko Crofts^{1,2,*} and Naoko Fujita¹

1. はじめに

米は世界人口の半数の食糧であり、年間約4億トンが消費される重要な穀物である^{1,2)}。米澱粉はイネ種子重量の約7割5分を占め、その主要成分であるアミロペクチンは、規則性の高い、分岐構造を持つグルコースポリマーである³⁻⁵⁾。アミロペクチンが澱粉中に占める割合^{3,5)}、アミロペクチンの分岐構造や澱粉の物性(糊化温度、膨潤性、粘弾性、老化速度等)、澱粉粒の形態の違いなどが、米の炊飯・加工特性や工業利用用途を大きく左右する⁶⁻¹¹⁾。用途に応じて求められる澱粉の特性は多様であるが、これらを制御する分子機構は未解明な部分が多い。

アミロペクチンは基質供給酵素であるADP-glucose Pyrophosphorylaseに加えて、それぞれ複数のアイソザイムから成る、主に4種類の以下の澱粉生合成関連酵素(1) ADP-glucoseを基質として α 1,4グルカン鎖を伸長するStarch Synthase (SS; EC 2.4.1.21), (2) α 1,6結合の分岐鎖を形成するBranching Enzyme (BE; EC 2.4.1.18), (3) 分岐鎖を取りはらうIsoamylase (ISA; EC 3.2.1.68)やPullulanase (PUL; EC 3.2.1.41)といった枝切り酵素, (4) Glucose 1-phosphateを基質として直鎖を伸長し、澱粉合成初期過程での関与が示唆されているPhosphorylase (Pho; EC 2.4.1.1)によって合成される¹²⁻¹⁴⁾。

これら複数の酵素が共働し、また、適切に制御されるからこそ、大量の光合成産物を、規則だった構造を持つ、不溶性のアミロペクチンとして、効率的に合成し、蓄積できると考えられてきた。イネ種子において、澱粉生合成関連酵素が物理的に相互作用し、複合体を形成していることが最近明らかになってきたので、本稿で紹介させて顶きたい。

2. 澱粉生合成関連酵素の相互作用

2.1 イネの澱粉生合成に関わる酵素群

イネは、SSアイソザイムを11種類 (SSI, SSIIa, SSIIb,

SSIIc, SSIIIa, SSIIIb, SSIVa, SSIVb, SSV, GBBSSI, GBBSSII), BEアイソザイムを3種類 (BEI, BEIIa, BEIIb), DBEアイソザイムを4種類 (ISA1, ISA2, ISA3, PUL), Phoアイソザイムを2種類 (Pho1, Pho2) と、複数の澱粉生合成関連酵素遺伝子を持つが、胚乳ではSSI, SSIIa, SSIIIa, SSIVb, BEI, BEIIa, BEIIb, ISA1, PUL, Pho1が主に発現している^{15,16)}。それぞれ基質特異性はあるものの、特定の酵素が欠損した変異体の解析から、欠損したアイソザイムの機能を他のアイソザイムがある程度相補できることも明らかになってきている^{11,17,18)}。

イネ胚乳のアミロペクチン生合成における既知の酵素の役割¹⁴⁾を図1に示した。BEIIbによって作られたアミロペクチンの結晶領域の短鎖をSSIが伸長し、SSIIa (ジャポニカ米では不活性型) がさらに伸長する^{14,19-21)}。SSIIIaはアミロペクチンのクラスター間をつなぐ長鎖の伸長を行い^{14,22)}、BEIが非結晶領域の分岐鎖を形成する^{14,18)}。GBSSIは主にアミロースを合成する^{23,24)}、アミロペクチンの超長鎖の合成にも関わっており^{25,26)}、Pho1は澱粉合成の初期過程に関与する²⁷⁾と考えられている。

大腸菌で発現後に精製したイネのSSIとBEおよびPho1とBEには機能的な相互作用があり、相互の活性を相乗的に上げ、グルカンを非常に効率的に合成する^{28,29)}。このことから、澱粉合成を効率的に行うためには、酵素-酵素間に物理的相互作用があることが容易に推測できる。

2.2 穀類の澱粉生合成関連酵素間相互作用

近年、コムギ^{30,31)}やトウモロコシ³²⁻³⁵⁾、オオムギ³⁶⁾の胚乳において、SSI, SSIIaとBEアイソザイムが、リン酸化修飾に依存して、3量体を形成することが明らかになっている^{31,33-35,37)}。また、トウモロコシやオオムギではBEIIbが欠損するとPho1が新たに複合体に組み込まれており^{33,34,36)}、一酵素の欠損は複合体の構成にも変化をもたらす。

一方で、(1) その他の澱粉生合成関連酵素が複合体を形成するか、その詳細な構成要素は何か、(2) 複合体が実際に澱粉合成活性を持つか、(3) 複合体の形成とアミロペクチン構造の関係など、核心部分は不明である。また、トウ

*連絡先 E-mail: ncrofts@akita-pu.ac.jp

図1. SSとBEの機能分担モデル

SSIIIaがクラスターを連結するアミロペクチンの長鎖を形成し、BEIは非結晶領域に分岐鎖を形成する。BEIIbが結晶領域に分岐鎖を形成し、その鎖はSSIによって伸長され、さらに、SSIIa (ジャボニカ米では不活性型) によって伸長される。

モロコシではリン酸化されているアミノ酸が、イネでは保存されておらず、複合体の構成の制御機構も、種間で違いがあると考えられる³⁷⁾。

穀類の澱粉生成関連酵素は相同性が高いため、イネにおいても澱粉生成関連酵素が複合体を形成すると予想される。さらにイネでは、澱粉生成関連酵素を欠損した変異体 (多重変異体を含む) および抗体が網羅的に作成されており、変異体の澱粉構造や物性に対する知見が豊富である^{14,19,21,22,27)}。以上のことから、澱粉構造制御の分子機構を明らかにすることを最終目標として、まず、野生型イネの澱粉生成関連酵素の相互作用を明らかにすることを目的とした³⁸⁾。

3. イネ澱粉生成関連酵素の複合体形成

3.1 イネの澱粉生成関連酵素は超高分子量の複合体を形成する

イネにおいて、澱粉生成関連酵素がどのような分子量の複合体を形成するかを明らかにするために、澱粉合成が最も盛んに行われている、開花後10~12日目の登熟胚乳から、澱粉生成関連酵素を可溶性画分に抽出し、ゲル濾過カラム (Superdex 200) を用いて、タンパク質複合体を分子量ごとに分画した。分画した画分を煮沸変性後、SDS-PAGEで分離し、モノマーになったタンパク質を、アイソザイム特異的抗体を用いたウエスタンブロットで検出した。その結果、イネ胚乳で主要なアイソザイム (SSI, SSIIa, SSIIIa, SSIVb, BEI, BEIIa, BEIIb, ISA1, PUL, Pho1) は高分子量で存在することが明らかになった³⁸⁾ (図2)。その一部は、他の穀類では見られない700 kDa以上の巨大な複合体を形成していた³⁸⁾ (図2)。特に、高分子量に共に溶出したアイソザイムは、物理的な相互作用をしていると示唆される。ゲル濾過後の画分を限外濾過で濃縮後、Native-PAGE 活性染色法を行ったところ、高分子量に溶出したSS, BE, DBE アイソザイムにも活性が認められた。これらの結果より、イネにおいても澱粉生成関連酵素が、活性を維持した複合体を形成していることが明らかになった³⁸⁾ (図3)。

3.2 イネ澱粉生成関連酵素複合体の構成要素

澱粉生成関連酵素複合体の構成成分を明らかにするた

図2. イネ澱粉生成関連酵素は高分子量の複合体を形成する

イネ登熟種子より可溶性タンパク質を抽出し、ゲル濾過カラムでネイティブ分子量ごとに分画後、煮沸変性し SDS-PAGE に供した。さらに、右に示したアイソザイム特異的抗体を用いてウエスタンブロットを行った。図上の数字は、ネイティブ分子量マーカーの溶出位置を、抗体の右の数字は、モノマーの分子量サイズを示す。

図3. 酵素活性を維持した複合体の形成

ゲル濾過カラム分画後、限外濾過で濃縮し、Native-PAGE 活性染色法を行った。高分子量に溶出したSS, BE, DBE も活性を維持していた。

めに、免疫沈降法を行った。上記の可溶性画分をアイソザイム特異的抗体と反応後、Protein A Sepharoseで複合体を単離、洗浄後、煮沸変性したものを、SDS-PAGEで分離し、モノマーになったタンパク質を、アイソザイム特異的抗体を用いたウエスタンブロット法で検出した³⁸⁾ (図4)。結果より、複数の澱粉生成関連酵素が他のアイソザイムと複合体を形成することが明らかになった。BEIIbは少なくともSSI, SSIIa, BEIと複合体を形成していたことか

図4. 複合体を構成する澱粉生成関連酵素

イネ登熟種子より抽出した可溶性タンパク質から、図上に示したアイソザイム特異的抗体と Protein A レジンを用いて、複合体を単離した。図右の矢印で示したアイソザイムに対する抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。バンドが検出された場合は、そのアイソザイムが複合体に含まれていたことを示す。

ら、他の穀類とも共通である SSI, SSIIa, BEI または BEIIb の3量体の複合体を形成していることが示唆された。さらに、イネにおいては、他の穀類では知見が無い、PUL と BEI が複合体を形成することが新たに判明した³⁸⁾ (図4)。PUL が欠損したトウモロコシの葉身では、BEI 活性が低下している³⁹⁾ことから、BEI と PUL の相互作用は、澱粉の合成のみならず分解にも関与している可能性も考えられる。

3.3 Blue-Native PAGE 法による複合体の活性検出

澱粉生成関連酵素の複合体を分子量ごとに分離し、どのサイズの複合体がグルカン合成活性を持つかを明らかにするため、Blue-Native-PAGE 活性染色法を立ち上げた。既製の Gradient native gel と CBB-G250 を添加した陽極泳動バッファーを用いて泳動後、Glucose 1-phosphate を基質として、ゲルと反応させた (図5 (a))。その結果、Pho と BE が相互作用していると推測される複合体が、ヨウ素で染まるグルカンを合成した (図5 (b))。このような活性バンドは、約 100, 200, 400, 500 kDa に明確に確認できた³⁸⁾(図5 (b))。また、Glucose 1-phosphate を含む反応液にウサギ由来の Phosphorylase a (Phoa) を添加したところ、約 400, 500, 600, 1,000, 1,200 kDa の複体に、グルカン合成活性バンドが確認できた (図5 (c))。このことは、Phoa と結合できる BE がこれらの複体に存在することを示唆する。

ヨウ素染色されたグルカンの色調の違いから、分子量の異なる複合体では、枝作り機能とグルカン伸長機能のバランスが異なると推測できる⁴⁰⁾(図5 (b), (c))。BE 由来の枝作り活性が強い複合体は、比較的短鎖の多いグルカンを形成するため、ヨウ素染色後に茶色を呈すと考えられる。一方、Pho によるグルカン伸長活性が強い場合は、長鎖の多いグルカンを形成するため、ヨウ素染色後には濃紺を呈したと考えられる。

ここでは示さないが、基質となる Glucose 1-phosphate を

図5. 澱粉生成関連酵素複合体によるグルカン合成

イネ登熟種子より抽出した可溶性タンパク質を Blue-Native-PAGE で、複体のネイティブ分子量に応じて分離した。(a) 電気泳動に用いた CBB によって青く染色された、ヨウ素染色前の Blue-Native-PAGE ゲル。(b) Glucose 1-phosphate と反応後、酵素複合体が形成したグルカンをヨウ素で検出した。(c) Glucose 1-phosphate とウサギ由来 phosphorylase a を添加し、反応後、形成されたグルカンをヨウ素で検出した。矢印はイネ由来の BE と Pho が形成したグルカンを示し、矢頭はウサギ由来の Phosphorylase a の添加によって、活性が増した複合体を示している。赤色の矢印と矢頭で示した BE 活性が高い複合体は、短鎖の多いグルカンを形成するため、ヨウ素で茶色に染色された。一方、青の矢印と矢頭で示した Pho 活性が高い複合体は、長鎖の多いグルカンを形成するため、ヨウ素で濃紺に染色された。

添加しなければ、ゲルはヨウ素で染まらないことから、Blue-Native-PAGE で分離した複合体には、少なくともヨウ素で染色できるような多量の鎖長の長いグルカン鎖は含まれていない。しかし、澱粉生成関連酵素が、微量の短いグルカンをプライマーとして抱え込んでいることは想定し

ており、そのようなグルカンの構造にも興味を持たれる。

4. おわりに

本研究では、(1) イネにおいても澱粉生合成関連酵素が幅広い分子量の複合体を形成する、(2) 高分子量の澱粉生合成関連酵素複合体にも活性がある、(3) 他の穀類と共通である SSI, SSIIa, BEIIb が相互作用する、(4) 他の穀類では明らかになっていない BE と PUL の相互作用が明らかになった。

今後、翻訳後修飾や澱粉合成のプライマーとなるグルカンの構造を明らかにすることで、イネ澱粉生合成関連酵素アインザイム間の相互作用の形成条件を突き詰めたい。また、特定の澱粉生合成関連酵素が欠損したイネ変異体や二重変異体の酵素間相互作用を詳しく分析し、澱粉生合成関連酵素の複合体形成と澱粉構造の関係を明確にしていきたい。

澱粉生合成関連酵素の複合体形成例は、現在のところ、澱粉を多量に蓄積する穀類の胚乳に集中している。葉や茎など、澱粉のターンオーバーが起こる器官や、根茎など種子以外の器官でも澱粉生合成関連酵素が相互作用し、高分子量の酵素複合体を形成しているか、興味を持たれる。また、進化の過程で、より効率的に澱粉を蓄積するメカニズムとして、澱粉生合成関連酵素が複合体を形成するようになったのかどうか、藻類などの糖質合成関連酵素の相互作用を解析すると明らかにできる可能性もある。

謝辞

本稿で紹介した研究は、秋田県立大学の中村保典名誉教授、阿部奈津子氏、追留那緒子氏、林真里氏、岡山大学の松島良助教、ゲルフ大学 (カナダ) の Prof. Ian J. Tetlow, Prof. Michael J. Emes との共同研究によるものです。また、本研究は「秋田県立大学学長重点プロジェクト (研究代表者: 藤田直子)」および「日本学術振興会特別研究員奨励費 (研究代表者: クロフツ尚子)」の支援を受けて実施されました。皆様の支援に感謝いたします。

文献

- 1) T.H. Fairhurst and A. Dobermann: Rice in the global food supply. *Better Crops Intl.*, **16**, 3–6 (2002).
- 2) J.M. Awika: Major cereal grains production and use around the world. in *Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion*, J.M. Awika, V. Piironen and S. Bean, eds., American Chemical Society, Washington, pp. 1–13 (2011).
- 3) B.O. Juliano, C.M. Perez, A.B. Blakeney, D.T. Castillo, N. Kongsee, B. Laigneket, E.T. Lapis, V.V.S. Murty, C.M. Paule and B.D. Webb: International cooperative testing on the amylose content of milled rice. *Starch*, **33**, 157–162 (1981).
- 4) G.E. Vandepute and J.A. Delcoul: From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch. *Carbohydr. Polym.*, **58**, 245–266 (2004).
- 5) M.K. Pandey, N.S. Rani, M.S. Madhav, R.M. Sundaram, G.S. Varaprasad, A.K. Sivaranjani, A. Bohra, G.R. Kumar and A. Kumar: Different isoforms of starch-synthesizing enzymes controlling amylose and amylopectin content in rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1697–1706 (2012).
- 6) N. Singh, L. Kaur, K.S. Sandhu, J. Kaur and K. Nishinari: Relationships between physicochemical, morphological, thermal, rheological properties of rice starches. *Food Hydrocoll.*, **20**, 532–542 (2006).
- 7) J. Jane, Y. Chen, L.F. Lee, A.E. McPherson, K.S. Wong, M. Radosavljevic and T. Kasemsuwan: Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chem.*, **76**, 629–637 (1999).
- 8) X.Z. Han and B.R. Hamaker: Amylopectin fine structure and rice starch paste breakdown. *J. Cereal Sci.*, **34**, 279–284 (2001).
- 9) C. Lii, V.M.F. Lai and M.C. Shen: Changes in retrogradation properties of rice starches with amylose content and molecular properties. *Cereal Chem.*, **81**, 392–398 (2004).
- 10) Z. Tian, Q. Qian, Q. Liu, M. Yan, X. Liu, C. Yan, G. Liu, Z. Gao, S. Tang, D. Zeng, Y. Wang, J. Yu, M. Gu and J. Li: Allelic diversities in rice starch biosynthesis lead to a diverse array of rice eating and cooking qualities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 21760–21765 (2009).
- 11) N. Fujita: Manipulation of rice starch properties for application. in *Starch, Metabolism and Structure*, Y. Nakamura, ed., Springer, Berlin, in press.
- 12) 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).
- 13) J.S. Jeon, N. Ryoo, T.R. Hahn, H. Walia and Y. Nakamura: Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol. Biochem.*, **48**, 383–392 (2010).
- 14) N. Fujita: Starch biosynthesis in rice endosperm. *AGRI-Biosci. Monogr.*, **4**, 1–18 (2014).
- 15) T. Hirose and T. Terao: A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, **220**, 9–16 (2004).
- 16) T. Ohdan, P.B. Jr. Francisco, T. Sawada, T. Hirose, T. Terao, H. Satoh and Y. Nakamura: Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *J. Exp. Bot.*, **56**, 3229–3244 (2005).
- 17) N. Fujita and Y. Nakamura: Distinct and overlapping functions of starch synthase isoforms. in *Essential Reviews in Experimental Biology Vol. 5: The Synthesis and Breakdown of Starch*, I.J. Tetlow, ed., The Society for Experimental Biology, London, pp. 115–140 (2012).
- 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, 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).
- 20) Y. Nakamura, P.B. Jr. Francisco, Y. Hosaka, A. Sato, T. Sawada, A. Kubo and N. Fujita: Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between japonica and indica rice varieties. *Plant Mol. Biol.*, **58**, 213–227 (2005).
- 21) N. Abe, H. Asai, H. Yago, N.F. Oitome, R. Itoh, N. Crofts, Y. Nakamura and N. Fujita: Relationships between starch synthase I and branching enzyme isozymes determined using double mutant rice lines. *BMC Plant Biol.*, **14**, 80 (2014).
- 22) 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: the function of SSIIa and pleiotropic effects by SSIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiol.*, **144**, 2009–2023 (2007).
- 23) Z.Y. Wang, F.Q. Zheng, G.Z. Shen, J.P. Gao, D.P. Snustad, M. G. Li, J.L. Zhang and M.M. Hong: The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the waxy gene. *Plant J.*, **7**, 613–622 (1995).
- 24) R. Terada, M. Nakajima, M. Isshiki, R.J. Okagaki, S.R. Wessler and K. Shimamoto: Antisense waxy genes with highly ac-

- tive promoters effectively suppress waxy gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 881–888 (2000).
- 25) Y. Takeda, S. Hizukuri and B.O. Juliano: Structures of rice amylopectins with low and high affinity for iodine. *Carbohydr. Res.*, **168**, 79–88 (1987).
 - 26) I. Hanashiro, K. Itoh, Y. Kuratomi, M. Yamazaki, T. Igarashi, J. Matsugasako and Y. Takeda: Granule-bound starch synthase I is responsible for biosynthesis of extra-long unit chains of amylopectin in rice. *Plant Cell Physiol.*, **49**, 925–933 (2008).
 - 27) 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: Mutation of the plastidial α -glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. *Plant Cell*, **20**, 1833–1849 (2008).
 - 28) Y. Nakamura, M. Ono, C. Utsumi and M. Steup: Functional interaction between plastidial starch phosphorylase and starch branching enzymes from rice during the synthesis of branched maltodextrins. *Plant Cell Physiol.*, **53**, 869–878 (2012).
 - 29) Y. Nakamura, S. Aihara, N. Crofts, T. Sawada and N. Fujita: *In vitro* studies of enzymatic properties of starch synthases and interactions between starch synthase I and starch branching enzymes from rice. *Plant Sci.*, **224**, 1–8 (2014).
 - 30) I.J. Tetlow, K.G. Beisel, S. Cameron, A. Makhmoudova, F. Liu, N.S. Bresolin, R. Wait, M.K. Morell and M.J. Emes: Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiol.*, **146**, 1878–1891 (2008).
 - 31) I.J. Tetlow, R. Wait, Z. Lu, R. Akkasaeng, C.G. Bowsher, 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).
 - 32) T.A. Hennen-Bierwagen, F. Liu, R.S. Marsh, S. Kim, Q. Gan, I.J. Tetlow, M.J. Emes, M.G. James and A.M. Myers: Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes. *Plant Physiol.*, **146**, 1892–1908 (2008).
 - 33) F. Liu, A. Makhmoudova, E.A. Lee, R. Wait, M.J. Emes and I. J. Tetlow: The *amylose extender* mutant of maize conditions novel protein-protein interactions between starch biosynthetic enzymes in amyloplasts. *J. Exp. Bot.*, **60**, 4423–4440 (2009).
 - 34) F. Liu, Z. Ahmed, E.A. Lee, E. Donner, Q. Liu, R. Ahmed, M. K. Morell, M.J. Emes and I.J. Tetlow: Allelic variants of the *amylose extender* mutation of maize demonstrate phenotypic variation in starch structure resulting from modified protein-protein interactions. *J. Exp. Bot.*, **63**, 1167–1183 (2012).
 - 35) F. Liu, N. Romanova, E.A. Lee, R. Ahmed, M. Evans, E.P. Gilbert, M.K. Morell, M.J. Emes and I.J. Tetlow: Glucan affinity of starch synthase IIa determines binding of starch synthase I and starch-branching enzyme IIb to starch granules. *Biochem. J.*, **448**, 373–387 (2012).
 - 36) Z. Ahmed, I.J. Tetlow, R. Ahmed, M.K. Morell and M.J. Emes: Protein-protein interactions among enzymes of starch biosynthesis in high-amylose barley genotypes reveals differential roles of heteromeric enzyme complexes in the synthesis of A and B granules. *Plant Sci.*, **233**, 95–106 (2015).
 - 37) A. Makhmoudova, D. Williams, D. Brewer, S. Massey, J. Patterson, A. Silva, K.A. Vassall, F. Liu, S. Subedi, G. Harauz, K. W. Siu, I.J. Tetlow and M.J. Emes: Identification of multiple phosphorylation sites on maize endosperm starch branching enzyme IIb, a key enzyme in amylopectin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **289**, 9233–9246 (2014).
 - 38) N. Crofts, N. Abe, N.F. Oitome, R. Matsushima, M. Hayashi, I. J. Tetlow, M.J. Emes, Y. Nakamura and N. Fujita: Amylopectin biosynthetic enzymes from developing rice seed form enzymatically active protein complexes. *J. Exp. Bot.*, **66**, 4469–4482 (2015).
 - 39) J.R. Dinges, C. Colleoni, M.G. James and A.M. Myers: Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *Plant Cell*, **15**, 666–680 (2003).
 - 40) J.M. Bailey and W.J. Whelan: Physical properties of starch: I. Relationship between iodine stain and chain length. *J. Biol. Chem.*, **236**, 969–973 (1961).