米の澱粉粒のライブ観察 複粒形成の仕組みが見えてきた

川越 靖

農業生物資源研究所

はじめに

日常生活で身近な物質の澱粉については、このセミナー室の連載でも明らかなように、生合成と分解、物性、産業利用など幅広い分野で活発な研究活動の歴史がある。今後も新たな発見や産業利用における発明は続く予想される。ところが意外なことに、澱粉生合成の場である細胞内小器官（オルガネラ）のアミロプラストはこれまであまり研究対象になっていない。そのため、アミロプラストの構造や分裂・発達の様式は不明な点が多い。この理由として、アミロプラストは単離・精製することが難しい、葉緑素を含まないため蛍光顕微鏡での観察が難しい、また葉緑体と同じ類のプラスチドとして認識されていたことなどが挙げられる。一方、観察が難しいとされていたオルガネラについて、共焦点レーザー顕微鏡と蛍光タンパク質の開発により詳細な観察が容易になった。イネは組換え体を作りやすいため、胚乳細胞のアミロプラストも蛍光タンパク質を利用してライブ観察（生きた細胞の観察）が可能になった。その結果、アミロプラストの分裂様式や内部構造の詳細が明らかになっただけでなく、澱粉粒合成の仕組みについても全く予期していなかった研究成果が得られつつある。このセミナー室では、アミロプラストのライブ観察から見えてきた複粒型の澱粉形成の仕組みを紹介する。

複粒型澱粉とは？

米の重さの約8割は澱粉粒からなる。米に含まれる澱粉粒はその名称から想像される丸いものとは異なり、氷を砕いたときにできるような角があり、一部のみに丸みのあるものが多い。このような角のある澱粉粒が2個から数十個、隙間なく集まって、全体として球状の塊（集合体）になる。玄米を中心に割って、その断面を走査型電子顕微鏡で観察すると、アミロプラストの表面に沿って割れたものと、アミロプラスト内部で割れたものが認識できる（図1）。アミロプラスト内部で割れたものでは澱粉粒が隙間なく配置している。このような形態の澱

図1 ■イネ（品種 日本晴）とオオムギ（品種 すずかぜ）の完熟種子の断面を走査型電子顕微鏡で観察

イネのアミロプラストで、その内部で割れたものを破線のみ、表面に沿って割れたものを破線と*で示す。Bar = 10 μ m.

粉粒を複粒型澱粉 (compound type) と呼ぶ。一方、トウモロコシや麦類の胚乳では一つのアミロプラストに球形やレンズ状の一つの澱粉粒が形成され、これらを単粒型澱粉 (simple type) と呼ぶ。オオムギの種子を同様にして割った断面には、レンズ状の澱粉粒が多く、澱粉粒間の隙間が大きい (図1)。ジャガイモの澱粉も単粒型である。

イネ科植物の種間における澱粉粒の形態比較から、イネ科の祖先種は複粒型澱粉を形成していたと推察される⁽¹⁾。トウモロコシや麦類で単粒型澱粉が合成されるようになった変異の実態は不明である。興味深いことに、トウモロコシでは脂質合成に関与するモノガラクトシルジアシルグリセロール合成酵素 (MGD1) 欠損変異体が複粒型澱粉と形態的に似た澱粉粒を合成する⁽²⁾。ところが、単粒型澱粉を合成するイネの変異はいまだ報告されていない。

イネ胚乳のアミロプラストの可視化

アミロプラストを可視化するためには遺伝子組換え (形質転換) 技術が必須である。イネの一般的な形質転換法では、種子の胚盤組織由来のカルスとアグロバクテリウムとを共存培養して、バイナリーベクターと呼ばれるプラスミドにコードされた目的遺伝子をカルスの核ゲノムに導入する。形質転換したカルスを抗生物質などで選抜し、適当な植物ホルモンを加えて植物体を再分化させる。緑色や赤色の蛍光タンパク質とアミロプラストに局在するタンパク質との融合遺伝子を作製し、発熟種子の胚乳細胞でそれらの遺伝子を働かせると、蛍光を手がかりにアミロプラストのライブ観察が可能になる。融合

遺伝子の作製に用いられたイネのタンパク質は、アミロプラストの分裂に関与するタンパク質 (FtsZ1, FtsZ2-1, ARC5, MinD, MinE)、澱粉代謝関連酵素 (SSI, SSIVb, GBSSI, ISA3)、外包膜タンパク質 (OEP7)、内包膜タンパク質 (BT1) などである⁽³⁾。共焦点レーザー顕微鏡の利点は蛍光タンパク質を発現する生の組織・細胞の観察が容易なことである。種子の生切片の作製では、開花後7日目ごろまでの発熟初期の組織はまだ柔らかく液状のため不向きである。これに対し、開花後1週間から3週間は適当な硬さで、切片作製が容易である。この時期の種子の中心部を輪切りにすると、糊粉層の内側に隣接する数層の細胞 (subaleurone) で発達するアミロプラストのみ観察可能である。これらの細胞のさらに内側の細胞、つまり種子の中心部に含まれるアミロプラストは、これまで試された融合タンパク質では観察できていない。中心部の蛍光が弱い理由は不明であるが、中心部の細胞の澱粉合成は開花後1週間後までにほぼ終了し、アミロプラストの包膜は一部崩壊し、アミロプラストに局在する融合タンパク質の多くは分解される可能性が高い。

アミロプラストの内部構造

アミロプラストや葉緑体などのプラスチドのストロマで機能するタンパク質の多くは核ゲノムにコードされた遺伝子産物で、細胞質で翻訳された後にプラスチドに輸送される⁽⁴⁾。核コードのストロマタンパク質が二重膜に包まれたプラスチドのストロマに輸送される経路には少なくとも2つある。一つは、外包膜 (OEM) と内包膜 (IEM) にそれぞれ存在する Toc と Tic と呼ばれるタン

図2 ■ アミロプラストの内部構造モデル

(A) イネ (品種 日本晴) の胚乳細胞のアミロプラストを tp^{GBSSI}GFP を用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察。Bar = 3 μ m. (B) 連続したストロマで複数の澱粉粒が合成される。(C, D) ストロマは SLS で仕切られ、仕切られた各ストロマで澱粉粒が独立して発達する。GFP の局在は、(C) では主にストロマであるのに対し、(D) ではストロマよりも SLS と IMS に局在する。G (starch granule); OEM (outer envelope membrane); IEM (inner envelope membrane); IMS (inter membrane space); SLS (septum-like structure)。

パク質複合体を通過してストロマに輸送される経路である。TocとTicを通過するタンパク質は、N末端に数十アミノ酸残基からなるトランジットペプチドを含み、Ticを通過する際にトランジットペプチドはストロマで切断される。2つ目の経路は小胞体の内腔から小胞輸送によってゴルジ体経由でプラスチドのストロマに輸送される経路である。分泌タンパク質の α -アミラーゼは細胞壁に加えて葉緑体にも局在するタンパク質の一つである⁽⁵⁾。

完熟種子から精製したアミロース合成酵素 (Granule-bound starch synthase; GBSSI) のN末端は78番目のアラニン残基である⁽⁶⁾。このことは、1番目から77番目までのアミノ酸残基からなるペプチドがトランジットペプチドとして機能することを示唆する。実際、GBSSIのトランジットペプチド (tp^{GBSSI}) を緑色蛍光タンパク質 (GFP) のN末端に付加した tp^{GBSSI}GFP を胚乳で発現させると、GFPはアミロプラストにターゲットされる。その結果、GFPの蛍光を手がかりにアミロプラストのライブ観察が可能になる (図2A)。このような手法を使ったイネの胚乳のアミロプラストの観察は約10年になるが、その間、得られた画像の解釈は二度修正することになった。その経緯について背景を交えながら述べてみる。

アミロプラスト内部構造モデル①

澱粉粒はアミロプラストのストロマで合成され、アミロペクチンの結晶性の構造を含む。そのため、澱粉粒の内部にはGFPなどの大きな分子が自由に入り込むスペースはないと推察した。GFPがアミロプラストのストロマに取り込まれると、澱粉粒はGFPが存在しない暗い部分として現れると推察した。すなわち、澱粉粒をGFPの蛍光で直接観察するのではなく、澱粉粒を合成する場のストロマを観察することで、間接的に澱粉粒の観察が可能になると推察した。この解釈と矛盾しない次のような結果が得られた。澱粉粒の代わりに水溶性のグリコーゲンを合成するシュガリー変異体のアミロプラストでは、GFPはストロマ全体に分散し、蛍光を発しない黒く抜けた塊は存在しない⁽⁷⁾。これらの結果を基にして作製したアミロプラストの内部構造のモデルを図2Bに示す。

アミロプラスト内部構造モデル②

プラスチドの起源である藍藻 (シアノバクテリア) の

細胞分裂では、細胞の中心部の分裂面にFtsZタンパク質が重合したリングが形成され、そのリングが徐々に縮まりながら細胞分裂が進行する。このような分裂様式は2分裂 (binary fission) と呼ばれる。同様に葉緑体の分裂様式も2分裂である⁽⁸⁾。ところが、分裂中のアミロプラストを観察したところ、小さなアミロプラストが数珠状に繋がった様子や、比較的大きなアミロプラストの表面に小さなアミロプラストが複数個所で出芽しているようなものが観察された。これらの結果は、アミロプラストの分裂様式は複数個所で同時進行的に分裂する多分裂であることを示す⁽⁹⁾。

興味深いことに、葉緑体の分裂に関与するタンパク質の過剰発現や発現抑制はアミロプラストの分裂を阻害するだけでなく、澱粉粒の形状にも変化をもたらす⁽¹⁰⁾。さらに驚くことに、内包膜の膜タンパク質 Brittle1 (BT1) とGFPの融合タンパク質は、アミロプラスト全体を包む内包膜に加えて、アミロプラスト内部の澱粉粒の間にも検出された。すなわち、澱粉粒の間に内包膜に似た膜構造が存在することが示唆された。これらの結果をもとに、藍藻の細胞分裂で形成される隔壁に類似した構造 (septum-like structure; SLS) が澱粉粒の間に形成されると提唱された⁽¹⁰⁾。その提唱されたモデルでの tp^{GBSSI}GFP の局在を模式的に図2Cに示す。1番目のモデル (図2B) との違いは、アミロプラストのストロマがSLSで仕切られていることである。

アミロプラスト内部構造モデル③

GFPと赤色蛍光タンパク質の1種Cherryを併用すると、2色の蛍光タンパク質の同時観察が可能になる。そこで、澱粉合成酵素SSIとGFPとの融合タンパク質 (SSI-GFP) と、tp^{GBSSI} をCherryのN末端に付加した tp^{GBSSI}Cherry とを同時に発現する形質転換イネを作製してアミロプラストを観察した。tp^{GBSSI}Cherry は予想どおり、図2Aに示す tp^{GBSSI}GFPと同様な局在を示した。ところがSSI-GFPは、tp^{GBSSI}Cherryが存在しない暗い部位、すなわち澱粉粒での局在を示した (未発表データ)。つまり、両タンパク質はアミロプラストの内部で異なる局在を示したのである。この予想外の結果は、SSI-GFPはtp^{GBSSI}Cherryに比べてストロマに取り込まれる効率が極めて高いことを示唆する。それと同時に、tp^{GBSSI}Cherryの主な局在は、これまで想定していたストロマよりも、むしろOEMとIEMの間の領域 (inter-membrane space; IMS) とIEMに挟まれたSLSであることが示唆された。この解釈を図2Dに模式的に示

す。

tp^{GBSSI} をN末端に付加した蛍光タンパク質を手がかりにしたアミロプラストの観察を続ける過程で、内部構造についてのモデルは2度修正することになった。今後新たなデータが得られれば、現在のモデルも修正される可能性は十分にある。内部構造のモデルの修正と関連して、アミロプラストと葉緑体との違いについて詳細な比較解析が必要である。たとえば、トランジットペプチドを切断するペプチダーゼの局在比較である。葉緑体のストロマ局在のタンパク質のトランジットペプチドは、ストロマに局在するペプチダーゼによって切断される。一方、アミロプラストではtp^{GBSSI} による蛍光タンパク質のストロマへの輸送効率が悪いことから、トランジットペプチドを切断するペプチダーゼがストロマに加えてIMSとSLSにも存在する可能性が示唆される。tp^{GBSSI} はアミロプラストのどこで切断されるか、という問題は今後の研究課題の一つである。

10年間のアミロプラストのライブ観察から得られた要点は、融合タンパク質の種類が増えるにつれて内部構造の情報も増えてきたことである。また、先入観にとらわれない粘り強い観察が肝要であることは、強調してし過ぎることはない。

複粒型澱粉はどうやってできる？

イネに特徴的な複粒型澱粉は2個から数十個の角のある澱粉粒が隙間なく集まった集合体である（図1）。ここで、2個の澱粉粒を含むアミロプラストはどのように

できるか思考してみる。一つ目のモデルを模式的に図3Aに示す。まず、アミロプラストの赤道面で澱粉粒が分解される。その赤道面にSLSが形成され、SLSで仕切られた2つの澱粉粒ができる。これに対して、2つ目のモデルでは（図3B）、澱粉粒は分解されず、ストロマ内にSLSが形成され、ストロマは不均等に分割される。新たに生じたストロマで澱粉粒の合成が開始され、2個の澱粉粒がそれぞれ発達して、2個の澱粉粒を含むアミロプラストになる。これまでの観察で、澱粉粒が赤道面で分解される様子は観察されていない。一方、アミロプラストの表面で円盤状のシートは多数観察されている⁽¹⁰⁾。このような円盤状のシートは合成されつつあるSLSの可能性があり、後者のモデル（図3B）と矛盾しない。

それでは次に、数十個の澱粉粒を含むアミロプラストはどのようにできるか思考してみる。まず、すでに多数の澱粉粒を含むアミロプラストを想定する（図3C）。そのアミロプラストの表面に面したストロマで、円盤状のSLSが複数個所で同時進行的に形成される。すると、新たにできたSLSと同じ数のストロマがアミロプラストの最外層に生じる。各ストロマで澱粉粒の合成が新たに開始され、アミロプラストの最外層で澱粉粒の数が増加する。このようにして澱粉粒の数を増やすと無制限に増えることができる。細胞内では、ほかのアミロプラストやオルガネラと接触することで最終的な澱粉粒の数が決まると推察される。

図3 ■ 複粒型澱粉の形成機構モデル

(A, B) 澱粉粒が1個から2個に増える場合。(A) 澱粉粒が中心部（赤道面）で分解され、分解された赤道面にSLSが形成される。(B) アミロプラストの表面に近いストロマでSLSが合成され、ストロマは不均等に分割される。澱粉粒を含まないストロマで2個目の澱粉粒（g）の合成が開始され、Gとgの2個の澱粉粒がそれぞれ独立に発達する。(C) 多数の澱粉粒を含むアミロプラストでさらに澱粉粒が増える場合。アミロプラストの表面に面したストロマで、複数個所でSLS（緑線）が形成される。その結果、澱粉粒を含まないストロマが生じ、それらのストロマで澱粉粒の合成が新たに開始され発達する。結果として、アミロプラストの最外層で澱粉粒の数が増える。

多角形の澱粉粒はどうやってできる？

最後に、多角形の澱粉粒はどのようにできるかを思考してみる。澱粉粒の発達は、その表面や内部で、一群の酵素タンパク質がグルカン鎖の伸長、枝付け、枝切り反応を協調して進めることに依存する。これらの合成反応は各酵素が結合したグルカン鎖で独立に進むと推察されるため、多くの酵素反応の制御のみで最終的に多角形の澱粉粒ができあがることは想像しがたい。そのため、澱粉粒の形を決める仕組みは、酵素反応とは別のところにもあると考えられる。

そこでまず、ストロマにSLSによる仕切りがない場合を想定してみる(図2B)。この場合、連続したストロマで多数の澱粉粒が同時に合成されることになる。隣接する澱粉粒との間でグルカン鎖が絡み合わない理由や、澱粉粒間の境界が最終的に平面になる仕組みを思い浮かべることは難しい。

では、ストロマがSLSによって仕切られているとどうだろう(図2D)。この場合には、仕切られたストロマを充填するように澱粉粒が合成されると角のある澱粉粒の合成は可能になる。言い換えると、SLSによる仕切りが鋳型となり、仕切られたストロマで、澱粉が空間的に可能な限り合成されれば、結果的に澱粉粒は鋳型と同じ形になる⁽³⁾。

おわりに

数十個の澱粉粒からなる複粒型澱粉ができる仕組みと、角のある澱粉粒が合成される仕組みは密接に関連していることを述べてきた。すなわち、SLSによって仕切られたストロマを想定すると、最初は関連が薄いように思える2つの仕組みは、実は表裏一体であることが見えてくる。蛍光タンパク質を手がかりにしたアミロプラストのライブ観察の結果は、SLSで仕切られたストロマの存在を強く支持する。しかしながら、SLSの構造や形成に関与する酵素などは不明である。ここで特筆されることは、秋田県立大学の藤田直子らによってSLSの構造変化を伴った変異体が最近発見されたことである。この変異体は澱粉合成酵素のSSIIIaとSSIVbの機能欠損型二重変異体である。驚くことに、この二重変異体では球

形の澱粉粒が合成される⁽¹¹⁾。その理由としては、SLSの鋳型としての機能の低下を考えることができる。今後、アミロプラストの内部構造を切り口にした澱粉研究の新たな展開が期待される。

謝辞：本稿で紹介した内容の一部は新技术・新分野創出のための基礎研究推進事業「イネ胚乳細胞のオルガネラ工学の開発と利用」の研究成果を含みます。川東広幸博士に大麦種子の提供を感謝します。若佐雄也博士に貴重なコメントを感謝します。

文献

- 1) R. Matsushima, J. Yamashita, S. Kariyama, T. Enomoto & W. Sakamoto: *J. Appl. Glycosci.*, **60**, 37 (2013).
- 2) A. M. Myers, M. G. James, Q. H. Lin, G. Yi, P. S. Stinard, T. A. Hennen-Bierwagen & P. W. Bercraft: *Plant Cell*, **23**, 2331 (2011).
- 3) Y. Kawagoe: *J. Appl. Glycosci.*, **60**, 29 (2013).
- 4) K. Cline & C. Dabney-Smith: *Curr. Opin. Plant Biol.*, **11**, 585 (2008).
- 5) A. Kitajima, S. Asatsuma, H. Okada, Y. Hamada, K. Kaneko, Y. Nanjo, Y. Kawagoe, K. Toyooka, K. Matsuoka, M. Takeuchi *et al.*: *Plant Cell*, **21**, 2844 (2009).
- 6) T. Taira, N. Fujita, K. Takaoka, M. Uematsu, A. Wadano, S. Kozaki & S. Okabe: *Biochem. Genet.*, **33**, 269 (1995).
- 7) Y. Kawagoe, A. Kubo, H. Satoh, F. Takaiwa & Y. Nakamura: *Plant J.*, **42**, 164 (2005).
- 8) S. Miyagishima: *Plant Physiol.*, **155**, 1533 (2011).
- 9) M. S. Yun & Y. Kawagoe: *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1617 (2009).
- 10) M. S. Yun & Y. Kawagoe: *Plant Cell Physiol.*, **51**, 1469 (2010).
- 11) 藤田直子：化学と生物, **51**, 400 (2013).

プロフィール

川越 靖 (Yasushi KAWAGOE)

<略歴>1987年北海道大学農学部農業生物学科卒業/1989年同大学大学院修士課程修了/1994年Louisiana State University, Ph.D./1995年The Hebrew University of Jerusalem, Golda Meir Research Fellow/1997年科学技術振興事業団長期海外在外若手研究員 (University of California, Davis)/2000年農業生物資源研究所研究官/2001年農業生物資源研究所主任研究員/2007年名古屋大学大学院生命農学研究科客員教授 (兼任)<研究テーマと抱負>コメのタンパク質と澱粉の基礎研究、米粉用イネの育種開発など。「基礎研究の成果を食卓に届ける」を合言葉に顕微鏡室や田んぼに出ています<趣味>息子の野球の試合観戦