澱粉合成関連酵素遺伝子の解析†

川崎 努, 馬場 忠*

(三井業際植物バイオ研究所, *筑波大学応用生物化学系)

1. はじめに

澱粉は、グルコースが α -1,4 結合した直鎖状のアミロースと α -1,6 結合による分枝構造を持つアミロペクチンから構成されている。アミロースを欠損しているモチ種の澱粉でも正常なアミロペクチンを合成していることから、アミロースとアミロペクチンは澱粉粒中で別々に合成されていると考えられる。

澱粉合成の出発点は、ADP グルコースピロホスホラーゼ (AGPP) の反応による ADP グルコースの生成である。澱粉粒に結合している顆粒性澱粉合成酵素 (GBSS) は、この ADP グルコースを基質としてアミロースを合成する。アミロペクチンもまた同じ基質から可溶性澱粉合成酵素 (SSS) の触媒で合成されるが、その α -1,4 結合鎖の伸長途中でおそらく枝つけ酵素 (BE) により分枝が形成されているものと思われる。このように澱粉の合成機構に関する研究を行ううえで、AGPP, GBSS, SSS, BE は重要なターゲットである。

澱粉合成関連酵素をコードする遺伝子は、トウモロコシの GBSS に対する遺伝子が約 10 年ほど前にトランスポゾンタギングによって単離されたことに始まった⁽¹⁾。また、トランスポゾンの挿入による GBSS 遺伝子の異常な転写が澱粉中のアミロース欠損の原因であることがその研究によって証明され、GBSS がアミロース合成に直接関与していることが明らかにされた。現在までに、多数の植物種から GBSS 遺伝子が単離・解析され、アミロース合成に関する多くの知見が得られている^(2,3)。澱粉合成に関与する遺伝子のうちすでに単離されているものを表 1 にまとめた。

澱粉合成酵素の基質合成に関与する AGPP は、澱粉含量を調節する第一の重要な酵素であるため精力的にその遺伝子に関する研究が行われた。1989 年にイネ⁽⁴⁾とコムギ⁽⁵⁾から cDNA が単離されたのをきっかけにして、これまでに多くの植物からその遺伝子が単離されている。最近、ジャガイモでアンチセンス法を用いて AGPP 活性を抑え、生成澱粉含量を減少させることに成功した例⁽⁶⁾と、大腸菌の AGPP を発現させて澱粉含量を増大させることに成功した例⁽⁷⁾が報告された。このような GBSS と AGPP の明確な研究成果に比較して、アミロペクチン合成に働く酵素、すなわち SSS⁽⁸⁾ と BE 遺伝子⁽⁹⁻¹⁵⁾に関する研究例は非常に乏しかった。このような観点から、われわれは、これらの酵素蛋白質と遺伝子にフォーカスをあて研究を進めている。本稿では、おもにイネの BE 遺伝子について最近の知見を中心に紹介する。

2. 枝つけ酵素 (BE) 遺伝子の単離と解析

最初に BE 遺伝子の単離に成功したのは、イギリスの John Innes 研究所のグループであった⁽⁹⁾。彼らはメンデルによって発見されたしわエンドウマメ (*rr* 変異株) の形質が、トランスポゾンの挿入による BE アイソザイム (SBEI) 遺伝子の異常な転写によって生じていることを明らかにした。興味深いことに、そのトランスポゾン (*Ips-r*) はトウモロコシ由来の *Ac* によく似た配列を持っていることが判明した。また、*rr* 変異株がしわという表現型のみならず、種子中の澱粉の量、形、構成成分、さらに脂質や蛋白質などの生成量にも影響を受けていることから、SBEI 遺伝子の発現がどのように正常な種子形成と関係しているかが今後の研究課題である。しかし、残念なことに、単離された SBEI 染色体遺伝子の配列がいまだに公表されていない。

われわれは、イネ登熟種子から BE を精製し、いくつかのアイソザイム (RBE 1, RBE 2, RBE 3, および

† Molecular Analysis of the Genes Involved in Starch Synthesis.

Tsutomu KAWASAKI and Tadashi BABA* (Mitsui Plant Biotechnology Research Institute, Tsukuba 305, *Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Tsukuba 305)

表 1 遺伝子 (cDNA) が単離されている澱粉合成関連酵素

ADP グルコースピロホスホリラーゼ		
蛋白質名	植物	文献
AGPP	イネ	Anderson <i>et al.</i> (1989; <i>Gene</i> , 97 , 199—205)
Shrunken-2	トウモロコシ	Bhave <i>et al.</i> (1990; <i>Plant Cell</i> , 2 , 581—588)
Brittle-2	トウモロコシ	Preiss <i>et al.</i> (1990; <i>Plant Physiol.</i> , 92 , 881—885)
AGP-S	コムギ	Olive <i>et al.</i> (1989; <i>Plant Mol. Biol.</i> , 12 , 525—538)
WL: AGA 1	コムギ	Ainsworth <i>et al.</i> (1992; <i>Plant Mol. Biol.</i> , 23 , 23—33)
AGPase-B	ジャガイモ	Müller-Röber <i>et al.</i> (1990; <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 224 , 136—146)
AGPase-S	ジャガイモ	Müller-Röber <i>et al.</i> (1990; <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 224 , 136—146)
澱粉粒結合型澱粉合成酵素		
蛋白質名	植物	文献
Waxy	イネ	Wang <i>et al.</i> (1990; <i>Nucleic Acids Res.</i> , 18 , 5898)
Waxy	トウモロコシ	Klosgen <i>et al.</i> (1986; <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 203 , 237—244)
Waxy	コムギ	Clark <i>et al.</i> (1991; <i>Plant Mol. Biol.</i> , 16 , 1099—1101)
Waxy	オオムギ	Rhode <i>et al.</i> (1988; <i>Nucleic Acids Res.</i> , 16 , 7185)
GBSS	ジャガイモ	van der Leij <i>et al.</i> (1991; <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 228 , 240—248)
GBSS I	エンドウ	Dry <i>et al.</i> (1992; <i>Plant J.</i> , 2 , 193—202)
GBSS II (SSS II)	エンドウ	Dry <i>et al.</i> (1992; <i>Plant J.</i> , 2 , 193—202)
GBSS	キャッサバ	Salehuzzaman <i>et al.</i> (1993; <i>Plant Mol. Biol.</i> , 23 , 947—962)
可溶性澱粉合成酵素		
蛋白質名	植物	文献
SSS	イネ	Baba <i>et al.</i> (1993; <i>Plant Physiol.</i> , 103 , 565—573)
枝つけ酵素		
蛋白質名	植物	文献
BE I	トウモロコシ	Baba <i>et al.</i> (1991; <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 181 , 87—94)
BE II	トウモロコシ	Fisher <i>et al.</i> (1993; <i>Plant Physiol.</i> , 102 , 1045—1046)
RBE 1 (QE I)	イネ	Mizuno <i>et al.</i> (1992; <i>J. Biochem.</i> , 112 , 643—651)
		Nakamura <i>et al.</i> (1992; <i>Plant Physiol.</i> , 99 , 1265—1266)
RBE 3	イネ	Mizuno <i>et al.</i> (1993; <i>J. Biol. Chem.</i> , 268 , 19084—19091)
PBE	ジャガイモ	Kossmann <i>et al.</i> (1991; <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 230 , 39—44)
SBEI	エンドウ	Bhattacharyya <i>et al.</i> (1990; <i>Cell</i> , 60 , 115—122)
B 40	キャッサバ	Salehuzzaman <i>et al.</i> (1992; <i>Plant Mol. Biol.</i> , 20 , 809—819)

RBE 4) を同定した⁽¹⁰⁾. このうち, RBE 1 と RBE 2 は, アミノ末端アミノ酸配列が同一であることから同じ遺伝子に由来する産物であることが判明した. RBE 1 と RBE 3 に対応する cDNA の単離を行い, それらの推定アミノ酸配列を比較したところ, 4つのアミラーゼドメインを含む中心部分の領域には高い相同性が検出されるが, アミノ末端領域とカルボキシル末端領域では相同性が低いことが明らかとなった^(10,11). この両末端でのアミノ酸配列の違いは, RBE 1 と RBE 3 の異なる酵素機能と関係しているのではないかと推定される. 事実, RBE 1 と RBE 3 に関係する胚乳突然変異体の解析から, 生成澱粉中のアミロペクチンの構造が異なっていることが明らかとなった^(11,12). また, トウモロコシ種実の2種の枝つけ酵素アイソザイム (BE I⁽¹³⁾ と BE II⁽¹⁴⁾) をコードする cDNA の解析から, RBE 1 は BE I に, また

RBE 3 は BE II に相当すると考えられる. したがって, イネ RBE 1 と RBE 3 のアミロペクチン合成における役割は, トウモロコシの BE I と BE II に対応しているものと思われる.

われわれは, RBE 1 と RBE 3 の染色体遺伝子領域を含むゲノムクローンを単離し, 枝つけ酵素遺伝子では初めて遺伝子構造とその構成 (図1) を明らかにした^(15,16). RBE 1 と比較すると, RBE 3 遺伝子におけるエクソン・イントロンの構成には有意な類似性が見出せなかった. しかし, 両遺伝子とも, イネゲノム中にシングルコピーで存在し, アミラーゼ遺伝子などで知られているようなファミリーを形成していないことが明らかとなった⁽¹⁷⁾. RBE 1 と RBE 3 の遺伝子は, 登熟種子において大量に発現し, 開花後の発現パターンも非常によく似ている⁽¹¹⁾. このことは, これらの遺伝子発現がほぼ登

図 1 イネ枝つけ酵素遺伝子の構造と発現。(A) 枝つけ酵素遺伝子 (RBE 1) の構造。黒い部分はエクソン、白い部分はイントロンを示している。(B) 枝つけ酵素遺伝子 (RBE 1 と RBE 3) の開花後の登熟種子における発現パターン。ノーザンブロット分析のプロープには、それぞれの cDNA 断片を用いた。(C) 枝つけ酵素 RBE 1 と RBE 3 遺伝子発現の組織特異性。

図 2 澱粉合成関連酵素遺伝子の発現調節に関係した変異体。(A) イネ *floury-2* 変異種の登熟種子における澱粉合成関連酵素遺伝子の発現。登熟種子における RBE 1, RBE 3, GBSS, AGPP の遺伝子の発現量は、*floury-2* 変異によって減少している。これは、これらの遺伝子発現が野生型 *Floury-2* 遺伝子産物によって制御されていることを示唆している。一方、SSS と SPK 遺伝子の発現は、*floury-2* 変異の影響を受けていない。(B) *floury-2* 変異種の解析から推定される澱粉合成関連酵素遺伝子の発現調節のためのカスケード。葉においては、RBE 1 遺伝子の発現量が減少していないことから、*Floury-2* 遺伝子産物は登熟種子でのみ機能しているものと考えられる。DBE (枝切り酵素) に関する結果は、ウェスタンブロット分析によって得られた。

熟種子特異的に何らかの機構によって制御されているものと考えられる。最近、イネ変異体の解析によって、登熟種子における RBE 1 と RBE 3 遺伝子を含む数種の澱粉合成関連酵素遺伝子の発現が、共通の因子によって制御されていると思われるデータ⁽¹²⁾を得ることができた(図 2)。澱粉の合成にはいくつかの澱粉合成関連遺伝子の協調発現が必要であり、そのために澱粉合成関連遺伝子群に共通の発現調節因子が存在しているのではないかと考えられる。同様なことがフラボノイド合成系の遺伝子においても発見され、フラボノイド合成系遺伝子の発現が共通の転写制御因子によって調節されていることが明らかとなった⁽¹⁸⁾。また、ジャガイモでは BE 遺伝子を含む数種の澱粉合成関連酵素遺伝子の発現がショ糖によって誘導されることが報告されている⁽¹⁹⁾。イネ SSS の cDNA⁽⁸⁾ と染色体遺伝子⁽²⁰⁾の単離・解析もすでに終了しており、この遺伝子を含めた澱粉合成関連酵素遺伝子の発現調節に関する詳細な検討が進められている。

RBE 1 遺伝子の構造解析を行っている過程で、RBE 1 遺伝子のすぐ上流にカルシウム依存性プロテインキナーゼをコードする遺伝子 (*spk*) が存在していることを見出した⁽²¹⁾。*spk* は、染色体上で RBE 1 遺伝子と向かいあって存在し、RBE 1 と *spk* 遺伝子の TATA ボックス間の距離は約 1.4 kb であった。しかも、*spk* 遺伝子は RBE 1 遺伝子と同様な発現パターンを示すことから、これらの遺伝子は共通のシス因子を持っている可能性が示唆された。グリコーゲン合成系では、グリコーゲン合成酵素の活性がリン酸化・脱リン酸化によって調節されている。SPK が澱粉合成系酵素の活性調節に何らかの役割を果たしている可能性が残されている。

3. おわりに

近年、植物分子生物学の急速な発展に伴い、澱粉合成関連酵素遺伝子に関する研究も盛んになりつつある。今後、これらの遺伝子の詳細な検討によって、澱粉合成の分子機構が解明されていくであろう。また、澱粉合成関連酵素遺伝子を用いた分子育種などの応用面での実用化も期待される。

- (1) M. Shure, S. Wessler, and N. Fedoroff : *Cell*, **35**, 225—233 (1983).
- (2) R. G. F. Visser, I. Somhorst, G. J. Kuipers, N. J. Ruys, W. J. Feenstra, and E. Jacobsen : *Mol. Gen. Genet.*, **225**, 289—296 (1991).
- (3) H. Shimada, Y. Tada, T. Kawasaki, and T.

- Fujimura : *Theor. Appl. Genet.*, **86**, 665—672 (1993).
- (4) J. M. Anderson, J. Hnilo, L. Raymond, T. W. Okita, M. Morell, and J. Preiss : *J. Biol. Chem.*, **264**, 12238—12242 (1989).
- (5) M. R. Olive, R. J. Ellis, and W. W. Schuch : *Plant Mol. Biol.*, **12**, 525—538 (1989).
- (6) B. Müller-Röber, U. Sönnewald, and L. Willmitzer : *EMBO J.*, **11**, 1229—1238 (1992).
- (7) D. M. Stark, K. P. Timmerman, G. F. Barry, J. Preiss, and G. M. Kishore : *Science*, **258**, 287—292 (1992).
- (8) T. Baba, M. Nishihara, K. Mizuno, T. Kawasaki, H. Shimada, E. Kobayashi, S. Ohnishi, K. Tanaka, and Y. Arai : *Plant Physiol.*, **103**, 565—573 (1993).
- (9) M. K. Bhattacharyya, A. M. Smith, T. H. N. Ellis, C. Hedley, and C. Martin : *Cell*, **60**, 115—122 (1990).
- (10) K. Mizuno, K. Kimura, Y. Arai, T. Kawasaki, H. Shimada, and T. Baba : *J. Biochem.*, **112**, 643—651 (1992).
- (11) K. Mizuno, T. Kawasaki, H. Shimada, H. Satoh, E. Kobayashi, S. Okumura, Y. Arai, and T. Baba : *J. Biol. Chem.*, **268**, 19084—19091 (1993).
- (12) T. Kawasaki, K. Mizuno, H. Shimada, H. Sato, S. Okumura, N. Ichikawa, and T. Baba : submitted.
- (13) T. Baba, K. Kimura, K. Mizuno, H. Etoh, Y. Ishida, and Y. Arai : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 87—94 (1991).
- (14) D. K. Fisher, C. D. Boyer, and L. C. Hannah : *Plant Physiol.*, **102**, 1045—1046 (1993).
- (15) T. Kawasaki, K. Mizuno, T. Baba, and H. Shimada : *Mol. Gen. Genet.*, **237**, 10—16 (1993).
- (16) E. Kobayashi and T. Baba : in preparation.
- (17) N. Huang, N. Koizumi, S. Reinl, and R. L. Rodriguez : *Nucleic Acids Res.*, **18**, 7007—7014 (1990).
- (18) E. Grotewold, B. J. Drummond, B. Bowen, and T. Peterson : *Cell*, **76**, 543—553 (1994).
- (19) B. T. Müller-Röber, J. KoBmann, L. C. Hannah, L. Willmitzer, and U. Sönnewald : *Mol. Gen. Genet.*, **224**, 136—146 (1990).
- (20) K. Tanaka, S. Ohnishi, H. Shimada, T. Kawasaki, and T. Baba : in preparation.
- (21) T. Kawasaki, N. Hayashida, T. Baba, K. Shinozaki, and H. Shimada : *Gene*, **129**, 183—189 (1993).