Recent Views on the Biosynthesis of the Plant Starch Granule

植物澱粉粒の生合成についての最近の見解

Ball, Steven G.

Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S. n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, Fax: 33-20-43-65-55

Key Words: amylopectin synthesis, amylose synthesis, starch**Abstract**

Plant starch can be distinguished from bacterial, fungal and animal glycogen by the simultaneous presence of at least 2 distinct fractions (amylose and amylopectin) whose relative arrangement inside a huge insoluble granule remains to be determined. Amylopectin, the major branched fraction is itself a highly organized molecule displaying a succession of clusters of glucans packed in crystal arrays. The unit cluster size (9 nm) is a remarkably constant feature of all plants examined which in turn suggests the existence of a highly conserved and ordered biosynthetic pathway. This review after giving a brief overview on starch structure and metabolism will focuss on the building of the granule's architecture. The genetic and biochemical evidence summarized here all point to the presence of multiple elongation and branching enzymes who are only partly redundant in function for starch biosynthesis. We suggest that each enzyme is responsible for the building of specific granule substructures.

要 約

植物の澱粉は少なくとも2つの明瞭に区別のできる区分(アミロースおよびアミロペクチン)からなっており、それが細菌、かび、および動物のグリコーゲンと異なる点である。巨大な不溶性澱粉粒の内部でのこれら2つの区分の相対的な配置はまだ分かっていない。アミロペクチンは枝分かれ構造をもった主成分であるが、それ自身、結晶の配列中にグルカンの房状構造(クラスター)が連続して詰め込まれた形の高度に組織化された分子である。その房の大きさ(9nm)は研究されたすべての植物においておどろくほど一定であるが、このことは、植物には高度に保存され、かつ秩序だった生合成経路が存在していることを示唆している。この総説では、澱粉の構造と代謝について簡単に振り返った後、澱粉粒の構造の構築に関して焦点をあててみたい。ここで要約した遺伝学および生化学的なすべての証拠は、グルカンの伸長と分岐形成に関与する多様な酵素が存在し、おのおの酵素の澱粉生合成における役割はほんの部分的にしか重複していないことを示している。私達はこの総説で、それぞれの酵素が澱粉粒の特定の基本構造を構築する役割をもっていることを示唆したい。

A. Introduction

Starch accumulates as a complex granular structure made of a glucans (α 1,4-linked and α 1,6-branched) both in the leaf cell chloroplast (transient starch) or in the amyloplast of the plant storage tissue cell (storage starch). All published structural characterizations of starches to date deal with storage starch (Fig. 1) and very little remains known about the fine structure and composition of leaf (transient) starch. The storage polysaccharide is usually defined as a mix of 2 distinct fractions: amylopectin and amylose. Amylopectin, the major compound, is composed of intermediate size α 1,4-linked glucans (the A and B1 chains) that are clustered together and hooked to longer spacer glucans (the B2, B3 and B4 chains) by α 1,6 linkages (1, 2). Segments of these chains intertwine to form parallel arrays of double helices responsible for the crystallinity of

A. はじめに

澱粉は α グルカン(α 1,4-結合および α 1,6-分岐)からなる複雑な構造をもった顆粒として、葉細胞葉緑体(一過性の澱粉、同化澱粉)あるいは植物における貯蔵組織細胞のアミロプラスト(貯蔵澱粉)に蓄積する。今までに報告された澱粉の構造解析はすべて貯蔵澱粉(図1)について行われたものであり、葉の(同化)澱粉についてはほとんど分かっていない。この貯蔵多糖は通常2つの明瞭に区別される区分、即ち、アミロースおよびアミロペクチンの混合物として定義されている。アミロペクチンはその主成分であり、中間的な長さの α 1,4-結合からなるグルカン鎖(AおよびB1鎖)が集まって房状構造を形成し、これらがより長いグルカン鎖(B2、B3、およびB4鎖)に α 1,6-結合によって結合した構造をもつ(1,2)。これらの鎖の一部は織り合わさって二重らせんの平行配列を形成しており、これが澱粉の結晶性の原因となっている

This work was supported by the Université des Sciences et Technologies de Lille, by the Ministère de l'Éducation Nationale, by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111. Director André Verbert) and by a special grant from the starch processing company Roquette Frères (Lestrem-France).

Abbreviations: SSSII, soluble starch synthase II; SSSI, soluble starch synthase I; GBSS, granule-bound starch synthase; BEI, branching enzyme I, BEII, branching enzyme II

Fig. 1. Starch granule organization and amylopectin primary and secondary structures. (A) Panel A displays a schematic view of the granule with its succession of amorphous and crystalline growth rings. (B) Panel B relates a section of the granule to the molecular organization of amylopectin (note that the position of amylose is too uncertain to be drawn) shown on the same scale in panels C and D. (C) Secondary structure of 3 successive amylopectin clusters. (D) Primary structure of 3 successive amylopectin clusters explaining the nomenclature adopted for the different types of chains

starch. Tuber and seed storage starches differ by their crystalline types [for review see (3)]. The A-type is characteristic of all cereal starches while the B-type can be found in potato tubers and high amylose mutant maize starch. The exact conservation in the case of storage starch of the amylopectin cluster size (9 nm) throughout the plant kingdom (4) suggests the existence of a highly ordered, precise and well conserved biosynthetic pathway. Amylose is often referred to as a smaller linear molecule with very few α 1,6 branches whose association with amylopectin inside the granule remains to be determined. In this review, we will focus our attention on the building of the starch structure itself and will deal only very briefly with the supply of the nucleotide-sugar precursor. In fact, we believe that the supply of ADP-glucose can to some extent regulate the composition and structure of starch.

B. The Supply of ADP-glucose

There is an overwhelming body of evidence pointing to ADP-glucose as the sole precursor for starch synthesis in plants. The discovery was initially made by Leloir (5, 6) who realized that ADP-glucose was favored over UDP-glucose by the starch synthases for incorporation into glucans. Since these initial observations, the enzyme responsible for the synthesis of ADP-glucose from Glc-1-P and ATP (ADP-glucose pyrophosphorylase) has been purified to homogeneity in many different organisms [(7), for review see (8)]. It was shown to be a heterotetramer enzyme composed of 2 large and small subunits of about 50 to 55 kDa (8). The enzyme is subject to allosteric interactions. 3-Phosphoglycerate is the most potent activator while orthophosphate modulates the activity negatively.

る。塊茎および種子の貯蔵澱粉はそれらの結晶形において異なっている[総説としては(3)]。Aタイプの結晶型はすべての種子澱粉にみられ、一方Bタイプはジャガイモ塊茎およびトウモロコシの高アミロース変異体にみられる。貯蔵澱粉のアミロペクチンの房状構造の大きさ(9nm)が植物界を通して正確に保存されている(4)ことから、高度に秩序だった、精密かつ良く保存された生合成経路の存在が示唆される。アミロースはしばしば、非常に少数の α 1,6分岐をもつアミロペクチンより低分子の直鎖状分子といわれるが、澱粉粒内でアミロペクチンとどのような関係で存在しているかはよく分かっていない。この総説では、澱粉の構造自体の構築に焦点を絞ることとし、糖ヌクレオチド前駆体の供給についてはごく簡単に触れることとする。実際、私達はADP-グルコースの供給が澱粉の構造や組成をある程度制御していると信じている。

B. ADP-グルコースの供給

植物においてADP-グルコースが澱粉生合成の唯一の前駆体であることを示す証拠は圧倒的に存在する。このことはLeloir (5,6)によって初めて発見されたが、このとき彼は澱粉生合成の際のグルカンへの取り込みが、ADP-グルコースの方がUDP-グルコースよりも高いことに気がついた。これらの最初の報告の後に、グルコース-1-リン酸およびATPからADP-グルコースを合成する酵素(ADP-グルコースピロホスホリラーゼ)が多く異なる生物から精製された[(7),総説としては(8)]。この酵素は大小2種のサブユニット(およそ50から55 kDa)からなる4量体の酵素であることが示された(8)。この酵素はアロステリック制御を受ける。3-ホスホグリセリン酸は最も効果のある活性化剤であり、正リン酸は負の制御を行う。この制御は澱粉合成と葉緑体

This regulation not only tightly couples starch synthesis to photosynthesis in the chloroplast but also seems to be at work in the amyloplast for storage starch synthesis. That ADP-glucose pyrophosphorylase is the mandatory rate-limiting step for starch biosynthesis has received considerable support from genetic and molecular biological studies. Mutants with reduced enzyme activity in maize (9), pea (10) and *Arabidopsis* (11) have correspondingly reduced rates of starch biosynthesis and starch content. In potato the expression of antisense RNAs directed against one of the enzyme subunits leads to a proportional decrease in enzyme activity and starch content (12). In *Arabidopsis* mutants have been obtained that completely lack both enzyme activity and starch (13). Similar mutants have very recently been obtained in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Moreover in *Chlamydomonas* mutants have been obtained that displayed reduced sensitivity to 3-PGA activation (14). These mutants, while having wild-type levels and kinetics of the unactivated enzyme, displayed a 90% drop in starch content in all conditions tested. Conversely, transgenes from mutant bacteria coding for a high specific activity enzyme were overexpressed in potato tubers and yielded a 30 to 60% increase in starch content (15). The involvement of a plastidic form of phosphoglucomutase for the supply of Glc-1-P to the leaf chloroplast has also been confirmed by mutant isolation in *Arabidopsis thaliana* (16) and *Nicotiana sylvestris* (17). Interestingly despite intensive investigations no such mutant has ever been reported in maize or other starch accumulating crops. This is suggestive evidence for the import of Glc-1-P into the amyloplast. In fact conclusive biochemical evidence for hexose transport (both Glc-1-P and Glc-6-P) has been obtained initially from maize and wheat (18) and since then in other starch storing crops (19, 20). Thus it would be very tempting to speculate that in leaves starch synthesis would rely on the flow of carbon from the Calvin cycle to Glc-6-P and its subsequent conversion to Glc-1-P by plastidic phosphoglucomutase while in non-photosynthetic amyloplasts hexose-phosphates including Glc-1-P would be massively imported. The ATP needed for synthesis of ADP-glucose stems from photophosphorylation in the chloroplast. In the non photosynthetic storage tissues, ATP is probably imported into the amyloplast through an adenylate translocator such as that coded by the maize *BT1* gene (21). Other issues such as the existence of an alternate pathway for starch synthesis in maize or the likely cytosolic localization of one specific isoform of ADP-glucose pyrophosphorylase in barley or wheat endosperms are still controversial and will not be dealt with here. In any case, whether it be in an alternate or classical pathway, we will end up with ADP-glucose in the plastid as the sole glucose donor for the biosynthesis of a very complex and ordered structure: the plant starch granule.

での光合成を緊密に共役させているだけでなく、アミロプラストでの貯蔵澱粉の合成においても機能しているように思われる。ADP-グルコースピロホスホリラーゼが澱粉合成に必須の律速段階であることは、遺伝学的にも分子生物学的にもかなり支持されている。トウモロコシ(9)、エンドウ豆(10)、および *Arabidopsis*(11)でこの酵素活性の減少した変異体では、それに相当して澱粉合成の速度と澱粉含量が減少していた。ジャガイモにおいて、この酵素の一方のサブユニットを標的にしたアンチセンスRNAの導入により、酵素活性とそれに比例した澱粉含量の減少がみられた(12)。 *Arabidopsis*では完全に酵素活性と澱粉の双方を消失した変異体が得られている(13)。同様な変異体が単細胞緑藻である *Chlamydomonas reinhardtii* でごく最近得られた。そのうへ *Chlamydomonas* では3-PGAによる活性化に対する感受性の低下を示す変異体も得られている(14)。これらの変異体は、活性化されない状態で調べると野生型と同等のレベルの酵素活性と動力学パラメーターを示すにもかかわらず、テストしたすべての条件で澱粉含量が90%低下していた。逆に、細菌由来の高比活性を示す変異酵素の遺伝子を導入し、高発現させたジャガイモ塊茎では澱粉含量が30から60%増えていた(15)。プラスチド型のホスホグルコムターゼが葉細胞葉緑体へのグルコース1リン酸の供給に関与していることもまた *Arabidopsis thaliana*(16)および *Nicotiana sylvestris*(17)の変異体を分離することで確認された。しかし、おもしろいことに徹底的に研究されているにもかかわらず、トウモロコシや他の澱粉を蓄積する作物ではそのような変異体が報告されたことが無い。このことはグルコース-1-リン酸のアミロプラストへの輸送を示唆する。実際、ヘキソース輸送(グルコース-1-リン酸およびグルコース-6-リン酸の両方)の決定的な生化学的証拠は最初トウモロコシおよび小麦(18)で得られ、それから他の澱粉貯蔵作物で得られた(19, 20)。このようなことから、次のように推測することは非常に魅力的である。すなわち、光合成をしないアミロプラストにはグルコース-1-リン酸を含むヘキソースリン酸は大量に入ってくるが、葉における澱粉合成はカルビン回路からグルコース-6-リン酸に至る炭素の流れとそれに続くプラスチドのホスホグルコムターゼによるグルコース1リン酸への転換に頼っているであろうということである。ADP-グルコースの合成に必要なATPは葉緑体での光リン酸化によって生じる。光合成をしない貯蔵組織ではATPはトウモロコシBT1遺伝子(21)によってコードされているようなアデニル酸輸送体を通しておそらくアミロプラストに入ってくるものと思われる。その他の争点、例えばトウモロコシにおける澱粉合成の別の経路の存在、あるいは大麦もしくは小麦の胚乳におけるひとつの特異的なADP-グルコースピロホスホリラーゼのアイソフォームが細胞質にあるらしいなどといったことがらについては未だ論争の的であるのでここでは扱わない。別の経路であるのか伝統的な経路であるのか、いずれにしても、プラスチド内のADP-グルコースが非常に複雑かつ規則正しい構造、すなわち植物の澱粉粒を生合成する唯一のグルコース供与体であると私達は結論しよう。

C. The Building of Amylose

As noted above amylose is the minor (typically 15 to 30% in weight) fraction of the starch granule. It is a moderately branched polymer (up to 1% branches) of mass ranging between 0.2 to 1.3 kDa. Amylose biosynthesis can be attributed to the major granule-bound starch synthase (GBSSI or GBSS) that accounts in most cases for over 70% in weight of the total granule associated proteins. As in the case of the other granule-bound and soluble starch synthases, GBSS is an ADP glucose:1,4- α -D-glucosyltransferase. It thus transfers glucose from the nucleotide sugar to the non reducing end of a growing a 1,4 linked chain. In fact this is the activity originally discovered by Leloir (5). Unlike other starch synthases it is to some extent able to incorporate glucose with non physiological concentrations of UDP-glucose (5, 6). This property disappears upon solubilization of the enzyme from the granule (22, 23). The K_m of GBSS for ADP-glucose is very high when the enzyme is bound to starch. Again this K_m drops to levels comparable to the soluble starch synthases when the enzyme is released from the granules (22, 23). The involvement of GBSS in amylose biosynthesis was clearly demonstrated by genetic experiments. Waxy mutants of maize containing wild-type amounts of starch with no amylose have been shown to be defective for GBSS (24). The mutants either lacked the GBSS protein or harbored a modified enzyme activity. Similar mutants have been obtained in a great number of species including rice (25), barley (26), potato (27) and *Chlamydomonas* (28). In all these cases, the defective gene product was shown to be the GBSS protein. GBSS catalyzes a step in amylose biosynthesis which seems to be at least in some physiological conditions rate-limiting. Gene dosage experiments performed on hexaploid and triploid maize endosperms clearly showed a linear increase of the activity with the number of wild-type genes. In the same experiments an increase in amylose content correlated with the increase of the wild-type allele dose (29). This increase was not strictly proportional and peaked at two-fold while the activity increased 3 to 6 fold. Since these experiments have been carried out, a number of waxy genes and cDNAs have been cloned, allowing molecular approaches to this problem (45). Similar results were obtained with transgenic potato tubers containing antisense constructs directed against GBSS (30). In this case however, interpretation of the results are further complicated by interferences due to the possible developmental regulation of expression of both the GBSS and the antisense genes. Thus we are left with an overwhelming case for the involvement of the major granule-bound ADPglucose:1,4- α -D-glucosyltransferase in the synthesis of the amylose fraction. In storage tissues amylose and amylopectin are synthesized asynchronously. It is known that starch from young maize kernel endosperms contain far less amylose than mature kernels. The same observation holds for rice, bar-

C. アミロースの構築

先に述べたように、アミロースは澱粉粒の少ない方の成分(典型的には15から30重量%)である。アミロースはわずかの分岐(高々1%)をもった高分子であり、分子量は0.2から1.3 kDaの範囲である。アミロースの生合成は、往々澱粉粒結合タンパク質の70%以上をも占める澱粉粒結合型スターチシンターゼの主成分(GBSSIあるいはGBSS)によって行われる。他の澱粉粒結合型および可溶性スターチシンターゼの場合と同様に、GBSSはADP-グルコース:1,4- α -D-グルコシルトランスフェラーゼであり、糖スクレオチド由来のグルコースを伸長しつつある1,4結合した糖鎖の非還元末端に転移する。実はこの活性がLeloir(5)により最初に発見されたものである。他のスターチシンターゼと違って、本酵素は生理的に意味のある濃度をこえたUDP-グルコースからは、アミロースにグルコースをある程度取り込むこともできる(5,6)。この性質は澱粉粒から酵素を可溶化したときに消失する(22,23)。GBSSのADP-グルコースに対する K_m 値は酵素が澱粉に結合しているときは非常に高いが、酵素が澱粉粒から離れると可溶性スターチシンターゼと同等のレベルまで低下する(22,23)。GBSSがアミロースの生合成に関与していることは遺伝学的な実験から明らかにされた。トウモロコシのWaxy変異体は野生型と同じくらいの澱粉を含むにもかかわらずアミロースが存在しないが、これはGBSSの欠損であることが示されている(24)。この変異体はGBSSタンパク質を欠損しているかあるいは酵素活性が修飾されているかのいずれかである。同様な変異体がイネ(25)、大麦(26)、ジャガイモ(27)、および*Chlamydomonas*(28)など、多くの植物種で得られてきている。これらすべての場合において、欠損している遺伝子産物はGBSSタンパクであることが示されている。GBSSは少なくともある生理的条件下ではアミロースの生合成の律速段階となっていると考えられるステップを触媒している。6倍体および3倍体のトウモロコシ胚乳において行われた遺伝子増幅実験では、野生型遺伝子の数に比例して活性がはっきりと増大した。同じ実験において、アミロース含量も野生型対立遺伝子の分量に応じて増大した(29)。この増加は厳密には比例関係ではなく、活性の3から6倍の増加に対して2倍が最高であった。これらの実験が行われてから、多くのWaxy遺伝子およびcDNAがクローン化され、この問題について分子的にアプローチすることが可能になった(45)。GBSSに対してのアンチセンス組み換え遺伝子を含むトランスジェニック馬鈴薯塊茎を用いて同じような結果が得られている(30)。しかしながらこの場合は、GBSSおよびアンチセンス遺伝子の発現が発達に伴って制御されるかもしれないという問題があるため、結果の解釈がさらに複雑である。このように、澱粉粒結合型ADP-グルコース:1,4- α -D-グルコシルトランスフェラーゼの主成分がアミロース画分の合成に関与していることについては圧倒的な事例が示されている。貯蔵組織においてはアミロースとアミロペクチンの合成は同調していない。トウモロコシの未熟な胚乳の澱粉は成熟したそれよりもはるかにアミロースが少ないことが知られている。同様なことが、米、大

ley, wheat, peas and potatoes [for a review, see (30)]. In *Chlamydomonas*, growth arrested cells will accumulate large amounts of a polysaccharide that we are unable to distinguish from maize endosperm storage starch (32). This starch harbors normal amylose amounts (28). *Chlamydomonas* further mimicks higher plants by showing during storage a similar increase with age of the amylose content. However, the structure and composition of starch that was purified from growing cells came as a total surprise (33). Not only is there less polysaccharide but the granules also harbor very little or no amylose. Surprisingly, the absence of amylose correlates with a very spectacular increase in specific GBSS activity (33). This means that GBSS while being required for amylose biosynthesis is clearly not sufficient to allow synthesis of this starch fraction during growth and photosynthesis. We believe that the additional factors required might be either the absence of a particular enzyme or the presence of specific physiological conditions leading to a high supply of ADP-glucose. These two apparently very different explanations are not necessarily mutually exclusive since modification in starch synthesis and content might directly or indirectly lead to changes in enzymatic balances on the granule's surface. That the additional factor is the presence of another protein selectively needed for amylose synthesis seems unlikely. Unless the protein was needed for cell survival, this would have lead by now to the identification of a second waxy locus in the most intensively studied plant species.

Branching enzymes (1,4- α -D-glucan: 1,4- α -D-glucan 6- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferases) remain however good candidates for proteins acting negatively on amylose biosynthesis. The evidence supporting this stems from genetic interaction studies performed in maize. It is known that, in corn, the waxy mutations are epistatic over all other defects in starch biosynthesis [(34), for review see (30)]. This means that inbred lines carrying a homozygous *wx* defect will never contain amylose. The only exception to this rule are the double mutants homozygous for both *wx* and *ae* (the *AE* locus is the branching enzyme II (BEII) structural gene). In these double mutants the amylopectin becomes less branched while the dispersed glucans adopt a bimodal or even in some cases trimodal size distribution upon gel filtration (35, 36). The molecular weight of the smaller and minor peak is that of amylose while that of the second is intermediate between amylose and normal amylopectin [a situation reminiscent of type II amylopectin (see below)]. The excluded fraction contains the atypical moderately branched amylopectin. It is not clear from the published data that the structure of the small size material is significantly different from that of the loosely branched amylopectin. In any case this material does not comply either to the definition of amylose (because of higher branching) nor to that amylopectin (because both of small size and lower branching). Thus in the absence of GBSS activity and provided BEII is absent, the re-

麦、小麦、エンドウ豆、およびジャガイモで観察されている[総説としては(30)]。Chlamydomonasにおいては、増殖を抑制された細胞はトウモロコシ胚乳の貯蔵澱粉と区別できない多量の多糖類を蓄積する(32)。この澱粉は通常のアミロース量を示した(28)。Chlamydomonasは(増殖を抑制した状態で)貯蔵しておく、時間とともにアミロース含量の増加がみられるという点でさらに高等植物に似ている。しかしながら、増殖中の細胞から精製した澱粉の構造と構成は全く驚くべきものであった(33)。多糖の量が少ないだけでなく、この澱粉粒にはほとんどあるいは全くアミロースが存在しなかったのである。驚いたことに、アミロースの欠如は特定のGBSSの活性の劇的な増加と相関していた(33)。このことはGBSSがアミロースの生合成に必要なものの、増殖と光合成の過程においてこの澱粉区分を合成するには、それだけでは不十分であることを明らかにしている。私達はこの必要とされる追加的要因として、特定の酵素の欠如あるいはADP-グルコースの供給を高める特定の生理的条件の存在があると考えている。これら2つの事柄は一見したところ大きく違った説明にみえるが、かならずしも相反しない。なぜならば、澱粉合成および澱粉含量の変化は直接的あるいは間接的に澱粉粒表面での酵素バランスの変化の原因となるかもしれないからである。アミロース合成に選択的に必要なもうひとつのタンパク質の存在という追加要因の可能性は低い。もしそうしたタンパク質が存在し、かつそれが細胞の生存に必須でないならば、この最も精力的に研究されている植物種における2番目のwaxy 遺伝子座の発見につながっていたはずである。

一方、ブランチング酵素(1,4- α -D-グルカン: 1,4- α -D-グルカン 6- α -D-(1,4- α -D-グルカノ)-トランスフェラーゼ)はアミロース生合成に負に作用するタンパク質の候補と考えることができる。これを遺伝子の相互関係から裏付ける証拠がトウモロコシにおいて得られている。トウモロコシにおいてはwaxy変異は澱粉生合成におけるどの欠損に対しても遺伝的に上位に位置している[(34)、総説としては(30)]。このことはwx欠損をもつホモ接合体型の近交系はアミロースを決して含まないことを意味する。この唯一の例外はwxおよびae(AE遺伝子座はブランチング酵素II(BEII)の構造遺伝子である)の両方のホモ接合変異株である。この二重変異株においてはアミロペクチンの枝分れが少なくなる一方、グルカン画分を溶媒に分散してゲルろ過すると2ピークあるいは場合によっては3ピークのサイズ分布を示すようになる(35,36)。低分子量側で、量的にも少ないピークの分子量はアミロースに対応し、2番目のものの分子量はアミロースと通常のアミロペクチンの中間に位置する[タイプIIアミロペクチン(以下参照)を思い出させる]。また、排除限界に溶出される画分は、通常のものとは異なった、分岐度の低いアミロペクチンである。公表されたデータからでは、低分子量側の物質の構造がこの分岐の少ないアミロペクチンと有意に異なるかどうか明らかではない。いずれにしても、この物質はアミロースの定義からも(なぜならば高度に分岐している)アミロペクチンの定義からも(なぜならば分子サイズも小さく、分岐度も低い)はずれる。このように、GBSS活性を欠き、またBEIIが無い場合には、残った

maintaining soluble starch synthases are able to synthesize fractions of intermediate structure between amylose and amylopectin. This suggests that the soluble starch synthases have the biochemical potential to synthesize linear glucans but that they are overpowered *in vivo* by the branching enzymes. During storage it is evident that GBSS is not overpowered by the branching enzymes. However this situation is likely to be changed in growing or photosynthesizing cells and could lead to synthesis of amylopectin by GBSS (see below). In fact, clear-cut direct evidence for the involvement of GBSS in the building of amylopectin has been obtained from growing *Chlamydomonas* cells (33).

An alternative simple explanation for the lack of amylose synthesis in specific physiological conditions resides in the high K_m of the bound enzyme for ADP-glucose (22, 23). We can hypothesize two populations of GBSS. The first would be located at the very surface of the granule and would have access to all the soluble enzymes necessary to obtain amylopectin. The second would be less accessible and involved in amylose biosynthesis because of its physical isolation from the other enzymes. It is the latter which would be responsible for the high K_m of the granule-bound activity. When in presence of high amounts of ADP-glucose (as in storage) amylose synthesis would thus occur through GBSS on the granules while in low nucleotide sugar supply this activity would be unable to do so. Thus as noted above the supply of ADP-glucose will control starch composition. That this is indeed the case is suggested by our recent observation that mutants impaired either in ADP-glucose pyrophosphorylase or phosphoglucomutase display structural phenocopies of the starch extracted from growing cells. Such mutants with reduced amounts of starch and ADP-glucose have no traces of amylose.

D. The Building of Amylopectin

Amylopectin synthesis is likely to be more complicated than both amylose and glycogen synthesis. Fig. 1 shows that the branched clusters of amylopectin are composed of amorphous and crystalline lamellae. It has been shown that the sum of both lamellae in a single cluster amounts precisely to 9 nm in all plant species examined (4). The clusters alternate in a highly regular fashion with amorphous regions of the molecule. The amorphous lamellae inside the clusters contain a very high density of closely spaced branches (1, 2). The close spacing of the branches is responsible for maintaining the chains in parallel position facilitating the formation of the glucan double helices. We have known for years that the enzymes necessary for the synthesis of the α 1,4 (starch synthases) and the α 1,6 linkages are present in plants [for reviews, see (37-39)]. In maize 2 distinct branching enzymes (BEI and BEII) and 2 soluble starch synthases (SSSI and SSSII) have been identified (40, 41), purified and intensively studied. All these enzymes are the prod-

可溶性スターチシンターゼはアミロースとアミロペクチンの中間のようなものを合成する。このことは可溶性スターチシンターゼは直鎖のグルカン合成する生化学的能力をもつが、生体内ではブランチング酵素がより高い活性をもっている(従ってその影響が強く出る)ことを示唆している。貯蔵中ではブランチング酵素がGBSS活性を上回ることがないのは明らかである。しかしながら、増殖過程あるいは光合成中の細胞においては状況はおそらく異なっており、GBSSによるアミロペクチンの合成が起こり得る(以下参照)。事実、GBSSがアミロペクチンの構築に関与している明瞭な証拠が増殖中の*Chlamydomonas*細胞から得られている(33)。

特定の生理的条件下でアミロースが合成されないことに関する別の簡単な説明は、粒結合型の酵素がADP-グルコースに対して高い K_m 値を示すということの中に見いだすことができる(22, 23)。我々はGBSSには2つのタイプがあるという仮説を考えることができる。ひとつは澱粉粒のごく表面に存在し、アミロペクチンを合成するのに必要なすべての可溶性酵素と接近することができるであろう。もうひとつは、そのような酵素が接近しにくく、他の酵素から物理的に隔離されることでアミロースの生合成に関与しているのであろう。澱粉粒結合型活性の高い K_m 値は後者のせいであろう。このような仕組みにより、ADP-グルコースが大量に存在するとき(貯蔵時のように)には、澱粉粒のGBSSによってアミロース合成が起こるが、糖ヌクレオチドの供給が少ないときにはこの反応は進まないであろう。このようにして先に述べたようにADP-グルコースの供給が澱粉の組成を制御する。最近、私達はADP-グルコースピロホスホリラーゼあるいはホスホグルコムターゼのどちらかを損なった変異体から得られた澱粉が、増殖過程の細胞から抽出した澱粉と同様の構造を示すことを観察しているが、これがまさに上に述べたような事情を示唆するものと考えられる。そのような変異体では澱粉やADP-グルコースの量も低下しているし、アミロースも全く無い。

D. アミロペクチンの構築

アミロペクチンの合成はアミロースおよびグリコーゲンの合成よりもさらに複雑であると思われる。図1はアミロペクチンの枝分れした房が無定形および結晶性の薄層から構成されていることを示している。単一の房における両薄相の合計は調べられたすべての植物で正確に9nmに達することが示されている(4)。これらの房はその分子の無定形の領域と非常に規則正しく交互になっている。房のなかの無定形の薄層は非常に高密度で間隔の近い枝分れを含んでいる(1,2)。間隔の近い枝分れは鎖を平行の位置に維持し、グルカンの二重らせんを形成するのに役立っている。私達は以前から α 1,4(スターチシンターゼ)および α 1,6結合の合成に必要な酵素が植物に存在することを知っている[総説としては(37-39)]。トウモロコシにおいては2つのブランチング酵素(BEIおよびBEII)と2つの可溶性スターチシンターゼ(SSSIおよびSSSII)が同定されていて(40,41)、精製され集中的に研究されてきた。これらすべての酵素は別々の遺伝子産物であ

ucts of distinct genes and differ by their substrate specificities or the structures they generate. Understanding their *in vivo* function however is further complicated by the recent observation that maize BEI and (or) BEII expressed in a *E. coli* branching enzyme deficient mutant generate a quite different structure from that observed *in vitro* (42). Recent reviews (37-39) have well covered the biochemical properties of these branching and elongation enzymes, we will thus focuss our attention on the genetic evidence supporting their proposed functions. Suffice it to say here that SSSI and SSSII display similar affinities for ADP-glucose but differ by their primer specificities and their reaction to high concentrations of citrate. Of particular importance is the observation that SSSI has a marked preference for glycogen while SSSII elongates amylopectin more efficiently. From this observation it was proposed that SSSI would favor the short exterior chains (A chains) while SSSII might prefer the longer B chains (39). Maize BEI and BEII also differ by their substrate preference and the type of branches they produce (43, 44). BEI is particularly efficient for branching of amylose and branched amylopectin at 5% of the amylose branching rate. BEII branched amylopectin at twice the rate it branched amylose and 6 fold faster than BEI. Moreover the chain sizes transferred by BEI were greater than those transferred by BEII. All plant systems to date seem to contain SSSI and SSSII-like activities. This might not be the case for the two branching enzymes which have both been shown to be present in cereal endosperms and pea embryos. The existence of BEII in potato tubers however is presently controversial.

From a genetic point of view, maize has been the most intensively studied plant system. Five loci have been described that interfere with the building of the granule's architecture (others such as *Sh1*, *Sh2*, *Bt1*, *Bt2* interfere with the supply of ADP-glucose). These are *Wx* (waxy), *Ae* (amylose extender), *Du* (dull), *Su1* (sugary) and *Su2*. *Wx* is the GBSS structural gene (45) and has been shown to be necessary for amylose biosynthesis (see above). *Ae* is the maize equivalent of the pea *R* locus originally defined by Gregor Mendel (46). Both loci (*R* and *Ae*) have now been shown to encode type II branching enzymes (46, 47). *Du* has been shown to be defective for both one particular isoform of BEII (BEIIa) and SSSII (48, 49). *su1* mutants have been shown to lack a specific debranching enzyme (61). No defective function was reported for *su2* mutants. *ae* and *r* mutants display very similar phenotypes. They both have a modest decrease in starch amounts and a drastic increase in amylose content. Moreover they accumulate both novel low and intermediate molecular weight fractions known as intermediate materials (50). The residual amylopectin is considerably modified with a decrease in branching and an increase in the number of long chains. The mutants from peas and maize exhibit a B X-ray diffraction pattern while the wild-type and all other mutant starches (including in the presence of *su2* or *du*)

り、基質特異性あるいはそれらが作り出す構造も異なっている。しかしながらこれらの生体内での機能を理解することはもっと複雑であることが、大腸菌のブランチング酵素の欠損株においてトウモロコシBEIおよび(または)BEIIを発現させた時に、試験管内での実験で観察された構造と大幅に異なった構造が作り出されるという最近の研究からも示される(42)。最近の総説(37-39)はこれらのブランチング酵素および伸長酵素の生化学的性質についてよく書かれているので、私達はこれらの酵素の機能に関する仮説を支持する遺伝学的証拠に焦点をあてることにしよう。ここではSSSIおよびSSSIIがADP-グルコースに対して同様の親和性をしめすが、プライマーの特異性とクエン酸高濃度下での反応が異なっていることについて述べておけば十分である。特に重要なことはSSSIがきわだってグリコーゲンを好むのに、SSSIIはアミロペクチンをより効率的に伸長させるという知見である。この結果からSSSIは短い外部の鎖(A鎖)を好み、SSSIIは長いB鎖を好むであろうという提案がなされた(39)。トウモロコシBEIおよびBEIIもまた基質の好みや作り出す枝分れのタイプが異なっている(43, 44)。BEIは特にアミロースの枝付けを効率良く行い、アミロペクチンではアミロースの5%の速度である。BEIIはアミロペクチンをアミロースの2倍の速度で枝付けし、それはBEIよりも6倍も速い。そのうえBEIで転移される鎖の長さはBEIIによるそれよりも大きい。現在までに報告されているすべての植物でSSSIおよびSSSIIに似た活性が含まれている。穀物の胚乳およびエンドウ豆の胚で存在が示されている二つのブランチング酵素はこの事例にあてはまらないかもしれない。ジャガイモ塊茎のBEIIの存在は今のところ論争の余地がある。

遺伝学的な見地から言えば、トウモロコシは最も徹底的に研究された植物系である。5つの遺伝子座が澱粉粒の構造の構築にかかわるといわれている(他の座*Sh1*、*Sh2*、*Bt1*、および*Bt2*などはADP-グルコースの供給に関わっている)。これら5つは、*Wx* (waxy)、*Ae* (amylose extender)、*Du* (dull)、*Su1* (sugary)、および*Su2*である。*Wx*はGBSSの構造遺伝子であり(45)、アミロースの生合成に必要なことが示されている(上述)。*Ae*はエンドウ豆の*R*遺伝子座に相当し、Gregor Mendelにより初めて定義されたものである(46)。両方の遺伝子座(*R*および*Ae*)は現在ともにタイプIIのブランチング酵素をコードしていることが示されている(46, 47)。*Du*はBEII(BEIIa)およびSSSIIの両方においてひとつの特別なアイソフォームが欠損していることが示されている(48, 49)。*su1*変異株は特定の枝切り酵素が欠損していることが示されている(61)。*Su2*変異株については機能の欠損は報告されていない。*ae*および*r*変異株は非常に似た表現型を示す。それら両方は若干の澱粉含量の減少と劇的なアミロース含量の増加がみられる。そのうえ、それらは中間物質として知られる独特の低あるいは中程度の分子量の区分を蓄積する(50)。残りのアミロペクチンは構造がかなり変化しており、枝分れが少なく長い鎖の数が多くなっている。エンドウ豆およびトウモロコシの変異株はBタイプのX線回折パターンをとるが、野生型あるいはすべての他の変異株(*su2*あるいは*du*変異の存在下を含む)の澱粉は標

still display the classical cereal A type (31). It is striking to note that if the absence of BEII in potato tubers was to be confirmed, it would correlate with the specific B type of X-Ray diffraction pattern displayed by potato tuber amylopectin. In yeast, we have proven that a knock-out of glycogen branching enzyme leads to a considerable decrease in glycogen synthesis (52). This is clearly not the case for BEII. We believe that the phenotypes of the BEII mutants point to a downstream function for this enzyme in the starch biosynthetic pathway. Indeed, the BEII defective mutants still have 9 nm amylopectin clusters with reduced amorphous lamellae and increased crystalline lamellae yielding B type diffraction patterns. A selective downstream action of BEII on the amylopectin cluster architecture correlates with what we now know about its *in vitro* preference for amylopectin and its ability to transfer short chains. Yet, even if *in vivo* BEII functions predominantly as a downstream enzyme, one cannot exclude that it could partly substitute for a BEI deficiency. This objection seems all the more valid if one considers that branching enzyme activities are in vast physiological excess. The problem of partial functional redundancy complicates considerably all studies dealing with starch biosynthesis and will also be encountered with the starch synthases. No mutants to date have been reported to be defective for BEI. Both *du* and *su2* carrying mutants are characterized by a relative enrichment in amylose content and a decrease in the number of intermediate size chains in amylopectin (53, 54). In combination with *wx* they only accumulate amylopectin. However this polysaccharide was reported in both cases to harbor more short (A and B1 chains) chains than waxy amylopectin (55). In *Chlamydomonas* similar mutants defining also 2 distinct loci (*STA3* and *STA4*) have been described (56, 33). One of these has an established enzymological defect. *sta-3* carrying mutants lack all SSSII activities and display a dramatic decrease in the number of amylopectin chains whose length ranges between 8 to 40 glucose residues (56). The mutants have a 50 to 70% decrease in starch content. In the presence of an additional disruption in the GBSS structural gene the starch level falls beneath 5% of wild-type levels which cannot be accounted by the sole disappearance of amylose (57). Moreover double mutants carrying a *sta3* mutation and progressively more severe *sta2* point mutations display a decrease in the number of amylopectin long chains (57). The severity of this decrease comes as simple function of the residual mutant GBSS activity. These facts strongly suggest that GBSS is not only an amylose biosynthetic enzyme but is also an important enzyme for the building of the long B chains of amylopectin (B3, B4, B5 chains) (57). This conclusion is also supported by a recent report establishing that the crystalline lamellae of the amylopectin cluster is significantly shorter in waxy amylopectin (58). This can indeed be easily explained if one assumes that GBSS participates in cluster biosynthesis. All mutants defective for

標準的な穀物のAタイプを示す(31)。ジャガイモ塊茎においてBEIIの欠損が確認されれば、ジャガイモ塊茎のアミロペクチンが特異なBタイプのX-線回折パターンを示すことと関連させることができるが、これはおおいに注目される点である。酵母においては、グリコーゲンブランチング酵素をこわすとグリコーゲン合成がかなり低下する(52)。これは明らかにBEIIの場合と異なっている。私達はBEII変異株の表現型は澱粉の生合成経路の下流に位置する機能にあてはまると信じている。実際、BEII欠損変異株でも、無定形の薄層が減少し結晶性の薄層が増加した9nmのアミロペクチンの房をもち、Bタイプの回折パターンを示す。アミロペクチンの房を構築する場合の下流の反応におけるBEIIの選択的役割は、試験管内実験で得られた、BEIIがアミロペクチンを好み、かつ短い鎖を転移する能力をもつことに関連づけられる。生体内でのBEIIの機能が主に下流の酵素であるとしてもなお、それがBEIの欠損を部分的に補填する可能性を除外することはできない。このことは、ブランチング酵素の活性が生理的に大過剰であることを考えた場合、より根拠のあることであると思われる。部分的な機能の重複という問題は澱粉生合成を扱う研究すべてをかなり複雑にしているし、スターチシンターゼでも同様なことに出くわす。今までのところ、BEIの欠損した変異株は報告されていない。*du*および*su2*変異の両方をもつ株はアミロース含量が比較的多く、アミロペクチンの中間的なサイズの鎖の数が減少している(53,54)。これに*wx*変異が加わるとアミロペクチンだけが蓄積する。しかしながら、この両方の事例においてこれらの多糖類はwaxyアミロペクチンよりも短い鎖(AおよびB1鎖)をもっている(55)。Chlamydomonasにおいてもやはり2つの明確に区別される遺伝子座(*STA3*および*STA4*)に対応した類似の変異体が報告されている(56,33)。これらのうちひとつは酵素の欠損が確認されている。*sta-3*変異をもつ変異株ではすべてのSSSII活性が欠損しており、アミロペクチンの鎖の長さも劇的に減少し、8から40グルコース残基である(56)。この変異体では澱粉含量が50から70%減少している。GBSSの構造遺伝子の破壊がこれに加わると、澱粉のレベルは野生型の5%以下に減少し、これはアミロースだけが消失したことでは説明がつかない(57)。さらに、*sta3*変異とよりきびしい変異の*sta2*の点変異の二重変異をもつ株ではアミロペクチンの長い鎖の数が減少している(57)。この減少の程度は残存する変異GBSSの活性によって左右される。これらの事実から、GBSSはアミロースの生合成酵素であるばかりでなく、アミロペクチンの長いB鎖(B3、B4、およびB5鎖)を構築するのに重要であることが強く示唆される(57)。この結論はアミロペクチンの房の結晶性薄層がwaxyアミロペクチンでははっきりと短くなっていることを明らかにした最近の報告(58)によっても支持される。このことはGBSSが房の生合成に関与していると考えれば実に簡単に説明できる。SSSIIを欠損しているすべての変異株では非常に選択的にアミロペク

SSSII have a very selective increase in the small glucans of amylopectin with a typical maximum in the number of chains with 6 Glc residues. Interestingly this distribution was also reported for that of the glycogen produced in *E. coli* in the presence of the maize branching enzymes (42). In *Chlamydomonas*, mutants defective for both GBSS and SSSII synthesize minute amounts of granular material whose branching is intermediate between glycogen and amylopectin (57). The presence of abundant small glucans in this material argues in favor of the role proposed for SSSI in the building of the A and small B chains. It is worth noting that the maize *du* carrying mutants behave much like the *Chlamydomonas* SSSII defective strains. SSSII was reported to be defective in *du* carrying mutants (48, 49). However, since BEIIa was also lacking a regulatory function was proposed for that locus. In *Chlamydomonas* a second locus (*STA4*) was identified that led to similar defects that were exclusively witnessed during storage (33). However the small glucans of the *sta4* mutants displayed a distinct highly specific size distribution. No enzymological defects were scored neither in *Chlamydomonas sta4* nor in maize *su2* carrying mutants. The failure to find these defects suggest that in addition to the well characterized elongation and branching enzymes other functions might be required to build mature amylopectin clusters. Another example of this stems from the biochemical investigations performed with the maize *su1* mutants. Homozygous *su1* mutants have a significant reduction (50%) in starch content that correlates with the appearance of phytoglycogen (59). This fraction defines a water soluble polysaccharide with a degree of branching and other physico-chemical properties analogous to those displayed by standard glycogen. The finding of phytoglycogen in sweet corn led Erlander back in 1958 (60) to propose that glycogen was a precursor of normal starch synthesis. Partial debranching of phytoglycogen would lead to the synthesis of amylopectin while complete debranching would yield amylose. Erlander's proposal led many investigators to purify debranching enzymes from wild-type and sweet corn. While the results obtained by different laboratories lead to divergent interpretations, a convincing report has been made concerning a selective decrease in debranching activity in the mutants (61). Pan and Nelson despite this finding have argued that debranching and branching activities are balanced in the maize endosperm in a way that yields the observed A to B chain ratios in amylopectin (61). In that sense phytoglycogen would not be a natural precursor for starch biosynthesis. While we are still very far from understanding the biochemical defects in sweet corn and their phenotypic consequences we would like to propose here that glucan trimming is required to build both amylopectin and amylose. The concept of glucan trimming although presently entirely speculative is especially attractive because it would explain how the close spacing of branches of the amylopectin cluster amorphous lamella could be generated

チンの短いグルカン鎖が増加しており、典型的には6つのグルコース残基からなる鎖がもっとも多くなっている。おもしろいことに、この分布はトウモロコシ由来ブランチング酵素を発現させた大腸菌が生産するグリコーゲンでも報告されている(42)。Chlamidomonasにおいては、GBSSおよびSSSIIの両方を欠損した変異株は微量の顆粒物質を合成し、その分岐度はグリコーゲンとアミロペクチンの中間であった(57)。この物質のなかに短いグルカン鎖が豊富に存在することはSSSIがA鎖と短いB鎖を形成するという提案を支持する。トウモロコシの*du*変異株がChlamidomonasのSSSII欠損株とよく似ているということは注目に値する。SSSIIは*du*変異をもつ変異株では欠損していることが報告されている(48, 49)。しかしながら、BEIIaもまた制御機能がないことがこの遺伝子座に関して提案されている。Chlamidomonasにおいては、貯蔵時にのみ目撃される類似の欠損を引き起こすものとして2番目の遺伝子座(*STA4*)が同定されている(33)。しかし、*sta4*変異株の短いグルカン鎖は非常に特異的な分子量分布を示す。Chlamidomonasの*sta4*あるいはトウモロコシの*su2*の変異株では酵素的な欠損は見出されなかった。こうした欠損が見つからなかったことは、よく研究された伸長酵素と枝付け酵素に加えて、さらに他の機能が成熟したアミロペクチンの房を形成するには必要なことを示唆している。生化学的研究から得られるもうひとつの重要な例はトウモロコシ*su1*変異株を用いて示された。ホモ接合型の*su1*変異株では澱粉含量がかなり低下(50%)しているが、これはファイトグリコーゲンの出現と関連している(59)。この区分(ファイトグリコーゲン)は分岐の度合いや物理化学的性質が通常のグリコーゲンに似た水溶性多糖として定義される。Erlander(60)によりスイートコーンからファイトグリコーゲンが発見されたのは1958年であり、彼はグリコーゲンは正常な澱粉の合成の前駆体であると提案した。ファイトグリコーゲンを部分的に枝切りするとアミロペクチンの合成となり、完全に行うとアミロースが得られるであろうというものである。Erlanderのこの提案をもとに、多くの研究者が野生型およびスイートコーンから枝切り酵素を精製した。それぞれの研究室で得られた結果により、色々な解釈がされたが、この変異株において枝切り酵素が選択的に減少していることを示した説得力のある報告がなされた(61)。PanおよびNelson(61)はこの発見にもかかわらず、トウモロコシ胚乳では枝切りと枝付け活性がある意味で釣り合いを取ってアミロペクチンのA鎖とB鎖を観察されるような割合にしているのだと主張した。その意味ではファイトグリコーゲンは澱粉合成の自然な前駆体ではないだろう。私達はスイートコーンにおける生化学的欠陥とその表現型への影響を理解するには未だ程遠いが、ここではアミロースやアミロペクチンの構築にはグルカンのトリミングが必要であると提案したい。グルカンのトリミングという概念は現在のところ完全に推定の域を出ないが、これがアミロペクチンの房の無定形薄層部分における非常に密集した分岐構造をど

by the branching enzymes. One can assume that phytoglycogen is generated in plants by BEI and BEII which are in vast excess just as glycogen is synthesized *in vivo* by the expression of the same enzymes in *E. coli* (42). As was documented in *E. coli* very closely spaced branches are likely to be produced among moderately and loosely spaced branches. A selective debranching enzyme would then be responsible for clipping off those moderately or loosely spaced branches leaving the mature future amorphous lamella of the amylopectin cluster to be elongated by the starch synthases without further branching. The close spacing of the branches will favor formation of parallel double helices which will achieve a particularly dense packing of glucose in the structure. This dense packing seems indeed to have been the natural selection drive behind the appearance of starch in plants.

E. Perspectives

Although in theory starch could be synthesized by the sole combination of elongation and branching enzymes, we believe that additional enzyme activities are required to tailor the highly ordered dense glucan packing observed in the amylopectin clusters. Splicing and trimming of glucans are in this respect especially attractive mechanisms. If these were to be confirmed by cloning of the maize *su1* locus and identification of debranching enzyme as its gene product, many questions would still remain unanswered. In particular what specifies the 9 nm cluster size, what prevents amylose from becoming branched, is amylopectin synthesis a prerequisite to amylose biosynthesis, what is the priming mechanism? We believe that the random selection of new mutants and the complete characterization of preexisting ones (such as those carrying *su1*, *su2* and *du* in maize) is the best way to probe the unknown. With the exception of genes known by virtue of their gene products, most are defined by mutations that confer particular phenotypes and the initial characterization of phenotype is frequently the way in which new biological phenomena are discovered (62).

References

1. Hizukuri, S. (1986) Carbohydr. Res. **147**, 342–347
2. Robin, J.P., Mercier, C., Charbonnière, R., and Guilbot, A. (1974) Cereal Chem. **51**, 389–406
3. Manners, D.J. (1989) Carbohydr. Polymers **11**, 87–112
4. Jenkins, P.J., Cameron, R. E., and Donald, A. M. (1993) Starch/Stärke, **45**, 417–420
5. Leloir, L.F., Rongine De Fekete, M.A., and Cardini, C.E. (1961) J.Biol.Chem. **236**, 636–641
6. Recondo, E., and Leloir, L. (1961) Biochem. Biophys. Res. Commun. **6**, 85–88
7. Copeland, L., and Preiss, J. (1981) Plant Physiol. **68**, 996–1001
8. Preiss, J. (1993) Denpun Kagaku **40**, 117–131
9. Tsai, C.Y., and Nelson, O.E. (1966) Science **151**: 341–343
10. Smith, A.M., Bettey, M., and Bedford, I.D. (1989) Plant Physiol. **89**, 1279–1284
11. Lin, T.P., Caspar, T., Somerville, C., and Preiss, J. (1988) Plant Physiol. **88**, 1175–1181

のようにしてブランチング酵素が作り出せるのかを良く説明できる点で特に魅力的である。大腸菌でBEIおよびBEIIを発現させてグリコーゲンを生成させたように(42)、植物でも大過剰に存在するこれらの酵素がファイトグリコーゲンを生成していると仮定することが可能である。大腸菌でも証明されたように、非常に近接した枝は中間的およびばらばらに間隔のあいた枝のなかに作られるらしい。そして選択的に働く枝切り酵素がそれらの中間的あるいはばらばらに間隔のあいた枝を刈っていき、将来アミロペクチンの房の無定形薄層となる部分を残し、この部分がそれ以上の枝分かれをすることなくスターチシンターゼにより伸長されると考えられる。接近した枝は平行の二重らせんを形成するのに都合がよく、構造中にグルコースを特に密に詰め込むのに役立っている。この(グルコースの)密な詰め込みこそが植物の澱粉の出現の背景にある自然の選択であるようにみえる。

E. 展 望

理論的には澱粉は伸張と枝付け酵素の組み合わせのみにより合成され得るが、私達は、アミロペクチンの房のなかに見られるこの高度に秩序だつて密に詰め込まれたグルカン鎖を仕立て上げるには、別の追加の酵素活性が必要であると信じている。グルカン鎖の組み継ぎやトリミングはこの見地から特に魅力的な機構である。こうしたことが、トウモロコシの*su1*遺伝子座のクローニングおよびその遺伝子産物の枝切り酵素の同定によって確認されても、多くの疑問が答えられないまま残るであろう。特に、房の大きさを9nmに特定するのは何か、アミロースに枝をつけるのを妨げているのは何か、アミロペクチンの合成はアミロース生合成の先行条件か、合成開始の機構はなにか(などの問題が残っている)。新しい変異株の無作為選択と既に存在している変異株(例えばトウモロコシの*su1*、*su2*、および*du*変異)の特性を十二分に解析することが、これら未知の疑問を解明する最も良い方法であると私達は考えている。遺伝子産物の側から明らかにされた遺伝子を例外として、ほとんどの遺伝子は特定の表現型を与える変異により定義され、こうした表現型の特性解析が新しい生物学的現象の発見の端緒となるのである(62)。

ミシガン州立大学・生化学部門
栗木 隆訳

12. Müller-Röber, B.T., Sonnewald, U., and Willmitzer, L. (1992) *EMBO J.* **11**, 1229–1238
13. Lin, T.P., Caspar, T., Somerville, C., and Preiss, J. (1988) *Plant Physiol.* **86**, 1131–1135
14. Ball, S., Marianne, T., Dirick, L., Fresnoy, M., Delrue, B., and Decq, A. (1991) *Planta* **185**, 17–26
15. Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J., and Kishore, G.M. (1992) *Science* **258**, 287–292
16. Caspar, T., Huber, S.C., and Somerville, C. (1985) *Plant. Physiol.* **79**, 11–17
17. Hanson, K.R., and McHale N.A. (1988) *Plant Physiol.* **88**, 838–844
18. Keeling, P.L., Wood, J.R., Tyson, R.H., and Bridges, I. G. (1988) *Plant Physiol.* **87**, 311–319
19. Heldt, H.W., Flugee, U-I., and Borchert, S. (1991) *Plant Physiol.* **95**, 341–343
20. Hill, L.M., and Smith, A.M. (1991) *Planta* **185**, 91–96
21. Sullivan, T.D., Sterlow, L.I., Illingworth, C.A., Phillips, R.L. and Nelson, O.E. (1991) *Plant Cell* **3**, 1337–1348
22. Macdonald, F.D., and Preiss, J. (1983) *Plant Physiol.* **73**, 175–178
23. Macdonald, F.D., and Preiss, J. (1985) *Plant Physiol.* **78**, 849–852
24. Nelson, O.E., and Rines, H.W. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 297–300
25. Murata, T., Sugiyama, T., and Akazawa, T. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 371–376
26. Eriksson, G. (1969) *Hereditas* **63**, 180–204
27. Hovenkamp-Hermelink, J.H.M., Jacobsen, E., Ponstein, A.S., Visser, R.G.F., Vos-Scheperkeuter, G.H., Bijmolt, E. W., de Vries, J. N., Witholt, B., and Feenstra, W.J. (1987) *Theor. Appl. Genet.* **75**, 217–221
28. Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszkeski, J.M., Van Den Koornhuyse, N., Maddelein, M.L., Fournet, B., and Ball, S.G. (1992) *J.Bacteriol.* **174**, 3612–3620
29. Tsai, C-Y. (1974) *Biochem. Genet.* **11**, 83–96
30. Kuipers, A.G.J., Jacobsen, E., and Visser, R.G.F. (1994) *Plant Cell* **6**, 43–52
31. Shannon, J.C., and Garwood, D.L. (1984) in *Starch: Chemistry and Technology*, 2nd ed. (Whistler, R. L., Bemiller, J. N., and Paschall, E. F., eds.) pp.25–86, Academic Press, Orlando
32. Ball, S.G., Dirick, L., Decq, A. Martiat, J.C., and Matagne R.F. (1990) *Plant Sci.* **66**, 1–9.
33. Libessart, N., Maddelein, M-L, Van Den Koornhuyse, N., Decq, A., Delrue, B., Mouille, G., D'Hulst, C., and Ball, S.G. (1995) *Plant Cell*, in press
34. Creech R.G. (1965) *Genetics* **52**, 1175–1186
35. Yeh, J.Y., Garwood, D.L., and Shannon, J.C. (1981) *Starch/Stärke* **33**, 222–230
36. Boyer, C.D., and Liu, K-C. (1985) *Starch/Stärke* **37**, 73–79
37. Preiss, J., and Levi, C. (1976) in *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*, vol. 3 (Stump, E.P.K., and Conn, E.E., eds.) pp. 371–423, Academic Press, San Diego
38. Preiss, J. (1991) in *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, vol 7 (Miflin, B.J., ed.) pp. 59–114, Oxford Univ. Press, Oxford
39. Preiss, J., and Sivak, M.N. (1996) in *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-sink Relationships* (Zamski, E., and Schaffer, A. A., eds.) Marcel Dekker Inc., New York, in press
40. Boyer, C.D., and Preiss, J. (1978) *Carbohydr.Res.* **61**, 321–334
41. Ozbun, J.L., Hawker, J.S., and Preiss, J. (1971) *Plant Physiol.* **48**, 765–769
42. Guan, H.P., Kuriki, T., Sivak M., and Preiss, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **92**, 964–967
43. Takeda, Y., Guan, H.P., and Preiss, J. (1993) *Carbohydr. Res.* **240**, 253–263
44. Guan, H.P. and Preiss, J. (1993) *Plant Physiol.* **102**, 1269–1273
45. Shure, M., Wessler, S., and Federoff, N. (1983) *Cell* **35**, 225–233
46. Bhattacharyya, M.K., Smith, A.M., Noel Ellis, T.H., Hedley, C., and Martin, C. (1990) *Cell* **60**, 115–122
47. Stinard, P.S., Robertson, D.S., and Schnable, P.S. (1993) *Plant Cell* **5**, 1555–1566
48. Preiss, J., and Boyer, C.D. (1980) in *Mechanisms of Saccharide Polymerization and Depolymerisation* (Marshall, J.J., ed.) pp. 161–174, Academic Press, New York
49. Boyer, C.D., and Preiss, J. (1981) *Plant Physiol.* **67**, 1141–1145
50. Colonna, P., and Mercier, C. (1984) *Carbohydr. Res.* **126**, 233–247
51. Kossmann, J., Visser, R.G.F., Müller-Röber, B., Willmitzer, L., and Sonnewald, U. (1991) *Mol. Gen. Genet.* **230**, 39–44
52. Thon, V.J., Vigneron-Lesens, C., Marianne-Pepin, T., Montreuil, J., Decq, A., Rachez, C., Ball, S.G., and Cannon, J.F. (1992) *J.Biol.Chem.* **267**, 15224–15228
53. Inouchi, N., Glover, D.V., and Fuwa, H. (1987) *Starch/Stärke* **39**, 259–266
54. Takeda, Y. and Preiss, J. (1993) *Carbohydr. Res.* **240**, 265–275
55. Fuwa, H., Glover, D.V., Miyaara, K., Inouchi, N., Konishi, Y., and Sugimoto, Y. (1987) *Starch/Stärke* **39**, 295–298
56. Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M-L., Routier, F., Marianne-Pepin, T., Decq, A., Wieruszkeski, J.M., Delrue, B., Van Den Koornhuyse, N., Bossu, J-P., Fournet, B., and Ball, S.G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16223–16230
57. Maddelein, M-L, Libessart, N., Bellanger, F., Delrue, B., D'Hulst, C., Van Den Koornhuyse, N., Fontaine, T., Wieruszkeski, J.M., Decq, A. and Ball, S.G. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**, 25150–25157
58. Jenkins, P.J., and Donald, A.M. (1995) *Int. J. Biol. Macromol.* in press
59. Sumner, J. B., and Somers, G.F. (1944) *Arch. Biochem.* **4**, 7–9
60. Erlander, S. (1958) *Enzymologia* **19**, 273–283
61. Pan, D., and Nelson, O.E. (1984) *Plant Physiol.* **74**, 324–328
62. Struhl, K. (1983) *Nature* **305**, 391–397

Received on May 22, 1995, accepted on June 16, 1995