

1. 麦類品質の基礎・応用・技術開発研究の成果と今後の展開

1-1 大麦の澱粉合成関連酵素および遺伝子の機能解析

作物研究所・麦類研究部・麦類品質制御研究室 小 前 幸 三

1. はじめに

澱粉は、アミロースおよびアミロペクチンから成り、それらがアミロプラストと呼ばれる細胞内小器官に合成・蓄積され、成長し、離水・結晶化して澱粉顆粒になります。アミロースは、6個のグルコースが単位となる左巻きのらせん構造を形成して安定化し、アミロペクチンは、分岐 α -グルカンの房状構造(クラスター)が連なった巨大分子となります(Immel et al., 2000; Ball et al., 1995; Ball et al., 1996)(図1)。このような分子形態の異なるアミロースとアミロペクチンの量比や構造特性が食品の加工利用特性や食感などに強く影響を与えることが知られています。したがって、澱粉成分の量的、質的改変に向けた基礎および応用研究は、新たな澱粉性素材の開発や新規用途に向けた品種開発に直結する重要な作物研究の一つであると考えています。

ここでは、特に大麦の澱粉合成関連酵素の機能解析を中心とした最近の研究成果と今後の展望について紹介致します。

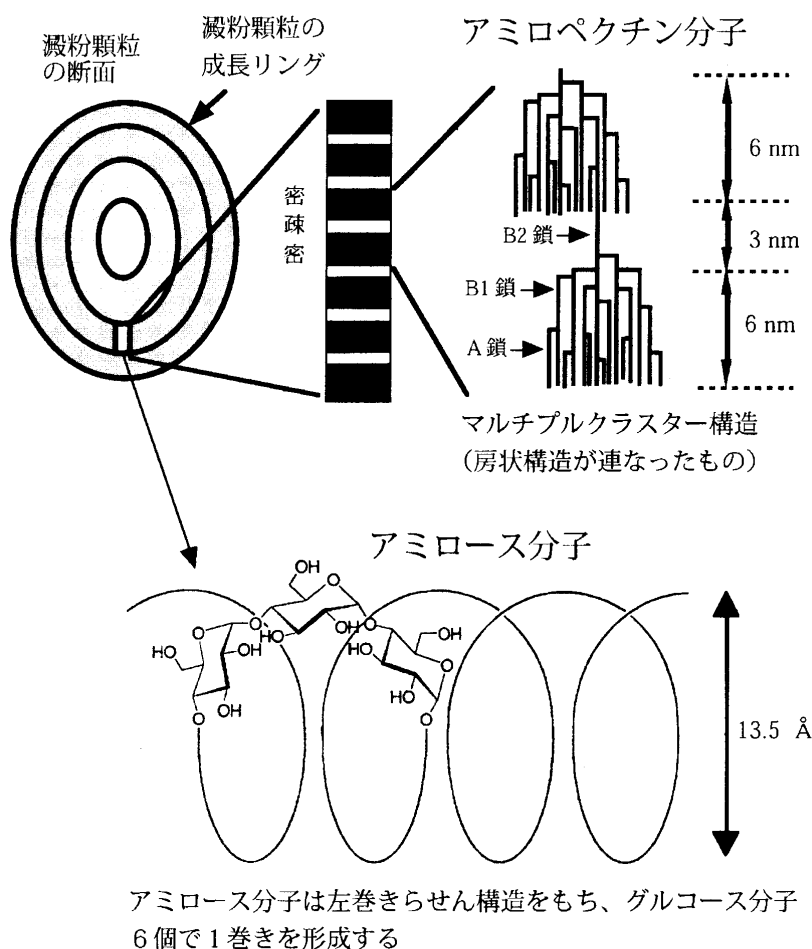


図1 アミロペクチンとアミロースの構造 (Ball および Immel らの模式図を一部改変)

2. 様々な分子構造をもつ澱粉を作るためには何が必要か

澱粉合成関連酵素には複数の酵素があり、アミロースの合成には Granule-bound starch synthase (GBSS; EC 2.4.1.21), アミロペクチンの合成には Starch synthase (SS; EC 2.4.1.21), Starch branching enzyme (SBE; EC 2.4.1.28), Debranching enzyme (DBE; EC 2.4.1.41) が必要とされています。特に、DBEの中でも Isoamylase (ISA; EC 3.2.1.68) がアミロペクチンのマルチプルクラスター構造の構築に重要な役割を担っていると考えられています (Ball et al., 1996)。さらに、澱粉合成に必要な基質の供給を担う Sucrose synthase (EC 2.4.1.23), ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase; EC 2.7.7.23) や澱粉代謝酵素である Starch phosphorylase (SP; EC 2.4.1.1), Disproportionating enzyme (DE; EC 2.4.1.25), Phosphoglucosylmutase (EC 5.4.2.2) などの酵素群がアミロプラスト内の秩序を保つために働いていると考えられています。イモ類では澱粉のリン酸化に働く α -glucan water dikinase (GWD) という酵素が多く発現し、他の作物の澱粉に比べて高度にリン酸化された澱粉が合成蓄積されることが知られています (Ritte et al., 2002; Blennow et al., 2002)。穀類は発芽過程に必要なリン酸をフィチンまたはフィチン酸として種子のアリユーロン細胞に蓄積しますが、ジャガイモや甘しょは根茎澱粉にリンを結合させて、多量に蓄積するものと考えられます。澱粉分子 (特にアミロペクチン) の構造は、これらの酵素の機能、発現時期および発現量などによって決定されることが、多くの作物のミュータントから得られた澱粉の特性や遺伝子の解析によって明らかにされてきました。

そこで、様々な澱粉を作るためには、これらの酵素遺伝子の発現制御や機能改変などが有力な方法になります。例えば、SBEのアイソザイムにはSBEI (作用様式: 長いグルコース鎖を転移) とSBEII (作用様式: 短いグルコース鎖を転移) があり、どちらかの遺伝子の発現を抑制したり、または発現量比を変えることによって、アミロペクチンの分岐密度や側鎖長が大きく改変できると考えられます。また、SSのアイソザイムの発現抑制によっても側鎖長を改変できることが考えられます。近年、これらの澱粉合成の改変技術に関する報告事例 (国内外特許を含む) が増えつつあり、今後様々な澱粉をもつ作物の品種開発が加速化されるものと思われます。

3. 大麦の澱粉合成関連酵素の機能解析

澱粉の構造改変を行うためには、澱粉合成関連酵素の機能を十分に解析する必要があります。そこで、当研究室では、これまでに二条大麦 (四国裸84号および四国裸97号) のSBEおよびISAの酵素化学的解析と遺伝子のクローニングなどを行ってきました。大麦のSBEには他の作物と同様に、作用様式が異なる2種類の酵素 (SBEI, SBEII) があり、それぞれの解析を行いました。SBE I は主に長いグルコース鎖 (11~12量体) を転移し、SBEIIbは短いグルコース鎖 (6~7量体) を転移し、どちらの酵素もトウモロコシ由来の酵素に比べて短いグルコース鎖を転移することが明らかになりました (図2)。

一方、大麦のISAは胚乳に3つのアイソザイム (ISA-a, b, c) が存在し、最低2種類のサブユニット蛋白質 (80kD: 酵素活性有りおよび85kD: 酵素活性無し) から成る6量体であり、これまで報告された他の作物由来のイソアミラーゼと同様に、その分子量が46~49万の巨大分子であることが判りました (Ishizaki et al., 1983; Rhaman et al., 1998; Fujita et al., 1999; Beatty et al., 1999; Hussain et al., 2002; Yoshioka et al., 2003) (表1)。また、これらの完全長cDNAのクローニングによって、アミロプラスト

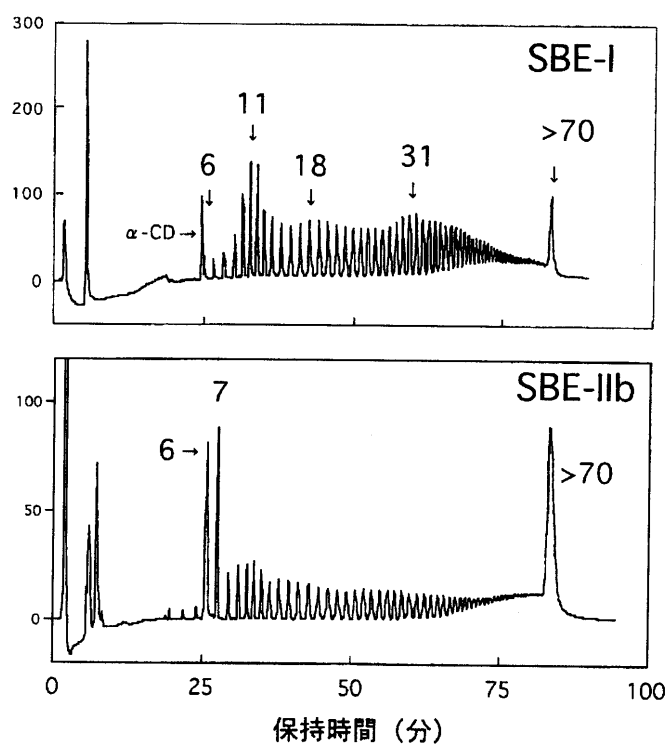


図2 大麦 SBE-I および SBE-II のアミロースに対する反応様式

表 イソアミラーゼの特性比較

諸特性	オオムギ	イネ	ジャガイモ	トウモロコシ
分子量 (k D)	460 ~ 490	340 ~ 490	520	—
サブユニットの 分子量 (k D)	80, 85	83	83, 95	79
等電点	4.7	—	—	—
至適 p H	6.5	6.5 ~ 7.0	5.5 ~ 6.0	6.0
基質特異性	Km (mg/ml)	Km (mg/ml)	Km (mg/ml)	Km (mg/ml)
アミロペクチン	0.053	7	0.84	—
β-リミット デキストリン	0.187	13	0.43	—
フィトグリコー ゲン	0.162	12	1.90	—
グリコーゲン	0.103	22	0.29	—

に移行するために必要なトランジットペプチド領域と成熟蛋白質の全塩基配列を決定することができました (図3, 日本 DNA データバンクに登録済み, 80kD: AB074189, 85kD: AB102671, 2004 年 4 月公開予定)。

さらに, 2つの遺伝子は胚乳および葉で発現することが判り, アミロペクチン合成に不可欠な酵素蛋

```

80kDa -----MKMMAMAEAPCLCARPFLAARAWRPGFAPRL 70
85kDa MASLLAPPASTRVFPPPPAPPRRPAVVAAARSRYRFRFTDDDAVVDVAVAAAEGGGYTVGVVEVPPLPGAR
80kDa RRWRPNATAGKGVGEVCAAAVEAATKAEEDDEEEEPVAEDRYALGCACRVLAGMPAPLGATALAGGVNF 140
85kDa RREGGLALRPAGSGEAVPLAPPDGGACPAEELSFAQSRAPFCLSFLLTDEGAIEIRHRTGTAFRVPVGVG
80kDa AVYSGGATAAALCLFTPEDLKADRVSEEVPLDPLMNRTGDIVVHVFLEGELHGMLYGYRFDGTFAPHCHGY 210
85kDa PGSPAPLGLSLSEAGANFALYSRGAEGVLLCLYGRGGGGEPALIEILDPFVNRTGNVHVSLESVEGY
80kDa FDSNVVVDVYAKAVISREYGVPAHGNNCWPQMAGMIPLPYSTFDWEGDLPLRYPQKDLVIYEMHLRGF 280
85kDa FSYGFRCLFGADHPLLDPAKLIIGDFVAADPVHVKEGTVPSVSVCLGSLANPPSYNWGRDKRPCLPLEN
80kDa TKHDSSNVEHPGTFIGAVSKLDYLKELGVNCIELMPCHEFNELEYATSSSKMNFWGYSTINFFSPMTRYT 350
85kDa LVVYRANVALFTKDKSSGLPNNVAGTFSGMAAKIHFGSLGVNAVLEPVFPFDQVKGYPFPHYFFSPMN
80kDa SGGIKNCGRDGINEFKTFVRESHKRGIEVILDVFNHTAEGNENGPILSFRGVDNTTYMLAPKGEFYNY 420
85kDa SYSAEGCSASAITAMKDMVKAMHRNGIEVLLEVVFTHTAEGQADGQMISISGIDKSSYY----IAD--EI
80kDa SGC-GNTFNCNHPVVRQFIVDCLRYVWMEMHIDGFRFDLASIMTRGSSSLWDPINVYGAPIEGDMITTGTP 490
85kDa AGCKSGILNCNSPVTERLILDSLRLHWVDFHVDGFCFINAPFLVRGSR-----GEY-----
80kDa LVTPLIDMISNDPILGGVKLIAEAWDAGGLYQVG-QFPHWNVWSEWNGKYRDIVRQFIKGTDFAGGFA 560
85kDa LSRPPLLESIAFDVLSKTKIIADPWSPLGISNVQFPFPHWKRAEMNTRFSIDVRNFLKG-EALIGDLA
80kDa ECLCGSPQLYQAGGRKPWHSINFCVCAHDGFTLADLVTYNTKYNLPNGEDIRDGENHNLSWNCGEEGEFAR 630
85kDa TRLCGSGDLF--SNRGAFAFSFYVSRNSGLSLVDLV--S---FSNG-----DLASESSWNCGEEGPSEN
80kDa SSVKRLRKRQMRNFFVCLMVSQGVPMFYMGEYGHGKGGNNNTYCHDSYVNYFRWDKKEEHSDLHRFCCL 700
85kDa SAVLQTRLRQIRNFIFILFVSLGIPVLNMGDECGHSSAG-STSY-KDRVPLKWKALKTSFVKEVTGFI SF
80kDa MTKFR-KECEGLGLEDFPTAEQLQWHGHQPKPDWSE-KSRFVAFSMKDETKG-----EIYVAFNTS 770
85kDa LAALRSRRGDVFORREFLKLENISWHGNNLSEPRWEDPTSKFLCMHIIAENDGNTPELTKGDLYICFNAS
80kDa HLAADVVELPERI-GHRWEPVVDGTGKPAPYDFLTDDLPRALTVQQFSHFLNSNLYPMLSYSYTVILVSRPD 840
85kDa EEPASATLPAPAEGSVWLRLVDTSLTFP-SFFT---TESNLEVQQ---VLGYSSYEVKAHSCVLFESKRD
80kDa V-----846
85kDa LPOFLG

```

図3 大麦のイソアミラーゼ分子を構成する2種類のサブユニット（80kDおよび85kD）の全アミノ酸配列の比較

囲み部分はアミロプラストに移行するためのトランジットペプチドの配列を示す。
下線部分は酵素蛋白質のペプチド解析により決定した内部アミノ酸配列を示す。

白質の分子構築に関わる遺伝子であることが判りました。しかし、イソアミラーゼのアイソザイムが3種類存在する要因が未解決のままになっており、第3のサブユニット蛋白質およびその遺伝子(iso3)の解析を継続しているところです。

4. 澱粉合成機構の全貌解明に向けた今後の展開

近年、澱粉合成に関わる酵素および遺伝子の解析は加速的に進んでいますが、アミロース分子やアミロペクチン分子の合成機構が未だ判っておりません。例えば、アミロース分子やアミロペクチン分子は何かから派生するのか。また、アミロペクチンのクラスターのサイズやマルチプルクラスター構造はどの

ように決定されるのか。これらの問題解決には、新たな手法開発などが不可欠となっています。現在、当研究室では、グリコーゲンの合成開始に関わるプライマー（Glycogeninと呼ばれる酵素蛋白質）と同様な酵素蛋白質（amylogenin?）の探索を行っており、その発見は澱粉合成機構の解明をさらに進展させるものと期待しています。また、マルチプルクラスター構築のモデル実験を行うための人工プライマー（磁性体グルカンプライマー）の開発を行い、人工澱粉の合成実験を試みてきました（図4）。これらに加え、イソアミラーゼ分子の巨大化とマルチプルクラスターの構築との関係を明らかにするために、無細胞系によるそれぞれのサブユニット蛋白質の合成、酵素分子の再構築を行い、人工プライマーを用いた澱粉合成系での実験を試みることで合成機構の解明につながるものと考えています。

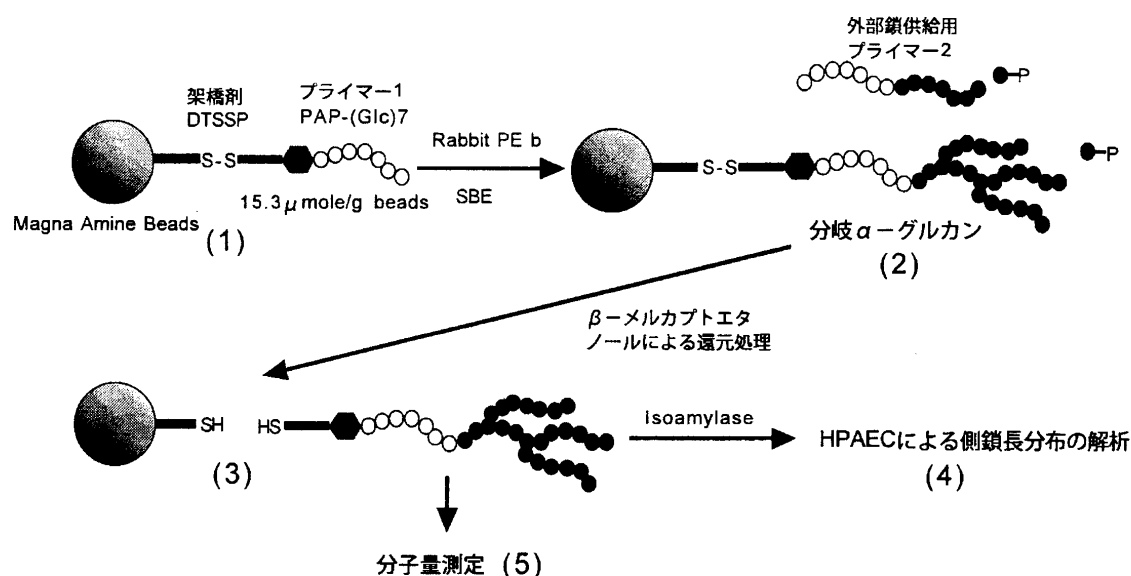


図4 人工プライマーの合成と澱粉合成関連酵素の機能解析法

磁性体ビーズと p-アミノフェニルマルトヘプタオシドを架橋剤で結合した人工プライマーを用いて、各種酵素による澱粉合成を行うと、配向性のある分岐 α -グルカン分子を構築できる。この方法によって合成された分岐グルカンの構造解析を行うことにより、酵素の反応特性および機能性を明らかにできる。

5. おわりに

澱粉研究の最終目標は、新規澱粉を蓄積する作物の開発や新たな澱粉分子を開発することだと考えております。そのためには、これまでの基礎的知見に加え、新たな知見と技術を元に、澱粉の分子設計を行い、作物の特定組織（種子、茎、根および葉）で関連遺伝子の発現制御を行うことが必要になります。それが可能になると、食品素材への利用面において、例えば、1) 糊化温度が低く、老化し難い澱粉、2) 少量で高い粘性を示す澱粉、3) 難消化性澱粉など、産業資材としての利用面では、1) 耐熱性に優れた高結晶化澱粉、2) ナノテクノロジー産業に適用できる分子部品などの多種多様な新規澱粉の開発が期待できます。これが、さらに澱粉蓄積量を制御するための「アミロプラスト工学」とも呼べる新たな研究分野の創出とその研究成果の利用につながるものと考えております。

参考文献

1. Ball, S. G., 1995, Recent views on the biosynthesis of the plant starch granule, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 7, 405-415.
2. Ball, S. G., Guan, H-P, James, M., Myers, A. M., Keeling, P., Mouille, G., Buleon, A., Colonna, P., and Preiss, P., 1996, From glycogen to amylopectin: A model for the biogenesis of the plant starch granule, *Cell*, 86, 349-352.
3. Beatty, M.K., Rahman, A., Cao, H., Woodman, W., Lee, M., Myeres, A.M., and James, M.G., 1999, Purification and molecular genetic characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize, *Plant Physiol.*, 119, 255-266.
4. Blennow, A., Engelsens, S. B., Nielsen, T. H., Baunsgaard, L., and Mikkelsen, R., 2002, Starch phosphorylation: a new front line in starch research, *Trends in Plant Science*, 7, 445-450.
5. Fujita, N., Kubo, A., Francisco, P.B., Nakakita, M., Harada, K., Minaka, N., and Nakamura, Y., 1999, Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice, *Planta*, 208, 283-293.
6. Hussain, H., Mant, A., Seale, R., Zeeman, S., Hinchliffe, E., Edwards, A., Hylton, C., Bomemann, S., Smith, A. M., Martin, C., and Bustos, R. (2002). Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *The Plant Cell*, 15, 133-149.
7. Immel, S. and Lichtenthaler, F. W. 2000, The hydrophobic topographies of amylose and its blue iodine complex, *Starch/Stärke*, 52, 1-8.
8. Ishizaki, Y., Taniguchi, H., Maruyama, Y., and Nakamura, M. (1983a). Debranching enzymes of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). I. Purification and some properties of potato isoamylase. *Agric. Biol. Chem.* 47, 771-779.
9. Rhaman, A., Wong, K-S., Jane, J-L., Myers, A. M., and James, M. G., 1998, Characterization of SU1 isoamylase, a determination of storage starch structure in maize, *Plant Physiol.*, 117, 425-435.
10. Ritte, G., Lioyd, J. R., Eckermann, N., Rottmann, A., Kossmann, J., and Steup, M., 2002, The starch-related R1 protein is an alpha-glucan, water dikinase, *PNAS*, 99, 7166-7171.
11. Yoshioka, M., Komatsu, A., Kato, T., and Komae, K., 2003, Cloning and Characterization of isoamylase from developing barley endosperm, *Plant Cell Physiol.*, 44 (supplement), 95.