

デンプンメタボリックエンジニアリングの開発

秋田県立大学生物資源科学部 教授 中村 保典

1 研究実施の概要

デンプンは食糧・食品分野にとどまらず工業製品の素材としても広く利用され、我が国では 300 万トン余のデンプンを 3000 種類に及ぶ用途に用いている。デンプンほど多種多様でユニークな物性や化学的な性質を有する物質は無い。21 世紀は有限ではない地球の許容力の範囲内で環境や資源と折り合いをつける必要がある時代である。デンプンはバイオマスとしての利用のほか、これまで使用されてこなかった産業品にも生物や環境に負荷を与えない生物資源物質として今後ますます重要性を増す可能性が高い。

デンプンメタボリックエンジニアリングへの期待が急速に拡大している状況下において、本研究では本格的な取り組みを開始した。デンプンの主成分で通常 70-80% を占めるアミロペクチンが直鎖を形成する α -1,4 グルコシド結合と直鎖同士を分岐状につなげる α -1,6 グルコシド結合から成るポリグルカンであるのに対し、もう一つの成分であるアミロースは基本的に α -1,4 グルコシド結合から成る直鎖状の分子である。アミロペクチンは化学結合上からはグリコーゲンと何ら変わることがないが、一定の構造をしたクラスターと呼ばれるポリグルカンが単位となり、それがタンデム状に多数連結した構造、いわゆるタンデム・クラスター構造をしていて、そのことが、デンプンが特有の性質を持つ（糊化性を示す、結晶状のデンプン粒を形成する等）大きな原因となっている。それに対しグリコーゲンには α -1,6 結合がランダムに形成されることから、クラスター構造のような単位構造が存在せず、従ってデンプンのような物性も持たず、結晶性の粒も形成しない。

高等植物のアミロペクチン合成代謝には少なくとも 4 クラスの酵素が関与する [ADP グルコースピロフォスホリラーゼ (ADPglucose pyrophosphorylase, AGPase ; ADP グルコースの合成)、スターチシンターゼ (starch synthase, SS ; α -1,4 結合を伸長)、デンプン枝作り酵素 (starch branching enzyme, BE ; α -1,6 結合を形成)、デンプン枝切り酵素 (starch debranching enzyme, DBE ; α -1,6 結合を加水分解 ; 基質特異性が異なるイソアミラーゼ ISA とプルラーナーゼ PUL の 2 タイプがある)]。そして、各クラスの酵素には複数のサブユニットまたは複数のタイプのアイズイムを有するのが植物の特徴で、全体の構成が極めて複雑である。それに対しアミロースは、AGPase と α -1,4 結合を伸長するデンプンに結合性の強い SS (GBSS) の 2 クラスの酵素のみで合成され、代謝系ははるかに簡素である。

このように、アミロペクチンは高度に規則性を持つ分子で、しかも後述するように (図 1 参照) 一定の規則性のもとで構造の大きなバリエーションが可能であることから、デンプン物性への影響力は、アミロースと比べはるかに大きいはずであるが、従来、デンプン物性をアミロペクチンの構造に即して解析した研究は驚くほど少ない。また、合成系も複雑である。本研究は、バイオテクノロジーによるアミロペクチン分子の構造改変を通じて、ユニークな物性を持つデンプンを作り出し、新素材として産業利用することを目的とした。私たちはイネ胚乳をモデルとして解析研究を行い多くの成果を得てきた。以下に、デンプンエンジニアリングを重点に、本研究によって得られた主要成果を 5 つに分類して述べる。

1. イネデンプン合成システムの解明

イネデンプン変異体や形質転換体の解析、種々の藻類のポリグルカン構造や合成関与遺伝子の解析などを通じ、主要なキー酵素の特異的な役割についての基本情報を得ることができた。即ち、SS の 3 酵素 (SSI, SSIIa, SSIIIa)、BE の 3 酵素 (BEI, BEIIa, BEIIb)、DBE の 3 酵素 (ISA1, ISA2, PUL) についての機能をほぼ特定でき、それらが欠損した場合のデンプン構造や物性への影響に関する基本スキームを立てることができるようになった。こうした成果に基づいて、新アミロペクチン合成モデルを提唱した (Nakamura 2002)。本モデルは各酵素のアイズイムの機能を明確に区別して説明した最初のモデルで、アミロペクチン合成に関する代表的なモデルの一つとして多数の文献に引用されてきた。

2. イネ組換え体を利用したデンプンエンジニアリング

アミロペクチン合成に関与し、構造決定に必須である 3 クラスの酵素 (SS、BE、DBE) のうち、各アイズイムの中で最も機能が特異的で、従って最もアミロペクチン構造への影響が顕著な酵素 (SSIIa、BEIIb、ISA1) について、それらが欠損したイネ変異体に正常遺伝子や他種遺伝子を導入する方法と、野生型イネ遺伝子をサイレンシングさせる方法に

よって、アミロペクチンエンジニアリングを試みた。

1) スターチシンターゼ (SS) エンジニアリング : *SSIIa* 遺伝子

S 型アミロペクチンを合成するジャポニカ型イネに L 型アミロペクチンを合成するインディカ型イネの *SSIIa* 遺伝子を導入すると、形質転換体のアミロペクチンは L 型になった。*SSIIa* 発現レベルの異なる系統間を比べると、発現レベルに応じて、同一パターンでアミロペクチン構造が変化し、かつその構造変化の大きさとデンプンの熱糊化特性の間には強い相関があった。このことは、*SSIIa* 発現レベルを制御することで L 型と S 型の間中間的な構造を含む種々の構造のアミロペクチンと異なる物性を示すデンプンができることを示している。恐らく長年の品種選抜の結果であろうが、現在のイネ栽培品種は L 型か S 型のいずれかのアミロペクチンを持ち、中間型を合成する品種はほとんど無いが、本方法によって、一連の異なる構造のアミロペクチンを作り、その変化に基づく異なる物性を持つデンプンを生み出すことができることが明らかになった。

2) デンプン枝作り酵素 (BE) エンジニアリング : *BEIIb* 遺伝子

BEIIb 遺伝子が欠損したイネ *ae* 変異体に正常なイネ *BEIIb* 遺伝子を導入すると、*BEIIb* 発現量がさまざまに異なる形質転換体ができる。*BEIIb* タンパク質レベルが増加するにつれて、アミロペクチンクラスターの鎖数が増えて野生株に近づき、驚くべきことに、*BEIIb* レベルが野生型を越えてもこの変化が続き、鎖数は野生型より過多になる。このクラスター構造の変化はデンプンの糊化特性に顕著な変化を引き起こし、*BEIIb* レベルの増加に伴い次第に易糊化性になる。この *BEIIb* レベルの広範囲の変化に応じた連続的な変化は特筆すべきことで、*BEIIb* 制御によって種々のデンプンを自在に合成できることを意味する。注目されることに *BEIIb* 活性が過剰に多い条件下では、クラスター構造が崩れ、親水性の多糖ができる。親水性・保水性の高いデンプンは工業品や化粧品などの素材として有望であり、*BEIIb* 制御法は有用なデンプンを作る可能性が高い方法である。

3) イソアミラーゼ (ISA) エンジニアリング : *ISA1* 遺伝子制御

ISA1 遺伝子が欠損したイネはシュガリー-1 変異体と呼ばれ、胚乳のデンプンがすべてフィトグリコーゲンに変わった系統がある。このような系統にコムギの正常な *ISA1* 遺伝子を導入したところ、フィトグリコーゲンがアミロペクチンに変わり、デンプン粒構造も戻った。また発現 *ISA* レベルに応じて、デンプンの糊化特性が異なるが、デンプン構造も特性も野生型と全く同一ではなく若干異なっていた。*ISA* 機能のイネ・コムギ種間差が原因と考えられる。こうした事実は、正常なアミロペクチン合成には *ISA* が必須であり、*ISA* 制御によってアミロペクチン構造とデンプン物性をさまざまに改変できることを示す。またアンチセンス法でイネの *ISA1* 発現を約 94% 抑えると、デンプン物性が顕著に変化（糊化開始温度が 10°C 以上減少）した。フィトグリコーゲンが大量に蓄積した変異体種子は完熟すると凹み重量が大きく減少するが、アンチセンス法ではフィトグリコーゲンの比率を低く（約 16%）、従って種子のデンプン収量を高く保ったままデンプンの構造や物性を変えられる利点がある。このようなデンプンは自然界には存在せず新規素材となる可能性がある。

4) アミロペクチン構造エンジニアリングのまとめと将来展望

以上、アミロペクチン構造の改変を通じてデンプン粒の形態やデンプンの物性を変えるメタボリックエンジニアリングが極めて有効な手段であることが明らかになった。アミロペクチンは構造単位であるクラスター構造を改変することによってかなり自由に変化させることができ、それによってデンプン粒の構造やデンプン物性も変えることが可能であることがわかった。注目すべきこととして、第一にアイソザイム間には機能的な階層があり、特に *SSIIa*, *BEIIb*, *ISA1* の機能は特異的で、クラスター構造の最もドラスティックな変化は、この 3 酵素の制御によって可能になった。第二には、 α -1,6 分岐反応、 α -1,4 鎖伸張反応は、クラスターの位置によって区別される複数の段階があり、それぞれ異なる酵素によって触媒されることである。この知見はバイオテク研究のデザインに極めて有用である。

デンプンを改変するバイオテクノロジーの有効性に触れる。ドラスティックな変化が実現し、天然には存在しないような構造と物性を有するデンプンを作ることが可能である。デンプンは元来糊化性、親水・疎水性、フィルム形成能などを持つユニークな物質である

が、本方法によって、天然の植物デンプンではカバーし切れない範囲まで、物性を大幅に変動させることができ、改めて素材としてのデンプンが持つポテンシャルの多様性を認識させられた。遺伝子組み換え法は新デンプン素材の作出に極めて有望である。

デンプンバイオテクノロジーが有効である背景には遺伝子操作技術特有の優位点がいくつかあげられる。①遺伝子の発現レベルを連続的に変えることが容易に可能で（1つのコンストラクトで一連の系統が得られる）、各レベルに応じた異なるアミロペクチン構造と物性を有するデンプンを合成できる。また過剰発現効果が期待される。②異種遺伝子の導入効果が期待される。③人工遺伝子の導入による効果が期待される。プロモーターの選択により、組織・時期特異的な発現が期待される。胚乳のデンプン合成だけを制御し、他の組織には（悪）影響を及ぼさないためには、胚乳特異的な強発現を誘導するプロモーターの利用が有効である。⑤RNAi法などによって複数遺伝子の制御が可能である。これは遺伝子操作技術に特有とは必ずしもいえないが、従来の育種法に比べると格段に容易である。

3. 藻類ポリグルカン合成系の解析と利用

緑色植物の原型はシアノバクテリアが一次共生して生じた真核生物であるとされている。紅藻は植物の原型である真核生物そのものかそれが派生したものとされている。この考えに従うと、シアノバクテリア、紅藻、緑藻、高等植物は一連の進化ルートに連なる生物で、紅藻は植物で最初の真核生物である。従来、シアノバクテリアはグリコーゲンを、紅藻は紅藻デンプンと呼ばれる不完全なアミロペクチンタイプ（アミロースは合成しない）を、緑藻以上からは完全なアミロペクチンとアミロースから成るデンプンを合成するとされてきた。従って藻類はデンプン合成システムの進化過程を解明する上で重要な示唆を与える材料であると期待される。

藻類のポリグルカン構造を解析した結果、シアノバクテリアの多くはグリコーゲン型のポリグルカンを持つが、一部の種はセミアミロペクチン型を合成すること、原始紅藻類ではグリコーゲン型のポリグルカンを合成するものとセミアミロペクチン+アミロース型を合成する二つのグループに分けられることが明らかとなった。このように藻類では、通常考えられているよりもはるかにポリグルカン構造が多様であることが明らかになった。また紅藻、緑藻からポリグルカン合成関与遺伝子を単離し、イネ形質転換体に用いた。

シアノバクテリアの遺伝子構成は、陸上植物のものよりはるかに簡素であり、種によっては (*Synechococcus elongatus* PCC 7942 株など) AGPase、GS、BE、DBE 遺伝子を一つずつのみ持っている。各遺伝子のノックアウト変異株の解析を通じて、デンプン生合成代謝の進化過程を明らかにする上での重要な足がかりが得られた。さらに、イネ遺伝子をシアノバクテリアへ導入し、その特性を *in vivo* で解析する系が構築できた。

セミアミロペクチンを蓄積するシアノバクテリアの一種、*Cyanobacterium* sp. MBIC 10216 株のゲノム配列を網羅的に解析した結果、多糖代謝に関し、特異な遺伝子構成を持つことが明らかとなった。

4. 新規ポリグルカン構造解析法の開発

アミロペクチンのタンデム・クラスター構造は、グリコーゲンとは異なり、極めて高次に制御された分子構造を持っているが、精密な構造解析法がまだ確立されていない。特に α -1,6-分岐周辺に関する正確な位置を特定するには困難を伴う。そこで飛行時間形タンデム質量分析計 (TOFMS/MS) を活用して10種の分岐オリゴ糖を測定し解析した結果、本法が分岐オリゴ糖の還元末端グルコース残基からの分岐の位置やその配列順序を容易に決定できるばかりか、質量数が同じ分岐オリゴ糖であってもスペクトル解析から、これら結合異性体間の識別が可能であることを見出した。

5. デンプンの産業利用

デンプンエンジニアリングによって創出されたデンプンの産業利用分野への展開を図るため、接着剤などの利用の可能性を検討した。イネデンプンを化学修飾し、それを従来の架橋剤に添加させて接着テストを行った結果、試作接着剤は常態で良好な接着能を示しており、デンプンが木材用接着剤として十分使用できることがわかった。また、当接着剤がホルムアルデヒドを吸収できることがわかり、本品の実用化の可能性が大きく前進した。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

1) イネデンプン合成システムの解明 (秋田県大)

ア) 高等植物のデンプン合成代謝には極めて多数の酵素遺伝子が関与することから、主要遺伝子が欠損した変異体をできるだけ多種類持つことが成功の鍵を握ることは明白である。本研究では、NMU (化学変異原) 処理によって作成されたイネ変異体集団およびレトロトランスポゾン Tos17 が挿入されたノックアウトイネ集団から変異体を単離し、順次各酵素の機能を解析した。また、それら変異体の胚乳デンプンの構造や性質を解析し、酵素機能の制御によってデンプンがどのように改変できるかを予測する。

イ) 上記研究から解析された酵素機能はあくまで生理学的役割を推定したものである。ここでは大腸菌による酵素大量発現系を利用し、またイネ胚乳から酵素を直接調製し、精製した後、精製酵素について *in vitro* 実験を行い、酵素機能を直接解析する。

ウ) 主要酵素の機能を特定し、それをもとにアミロペクチンの合成モデルを作成する。特に SS、BE、DBE の各アイソザイムの役割を明確にしたモデルを作り、改良を続ける。

また、研究途中でイネ全ゲノム解析が完了し、結果が公表された幸運を受け、イネデンプン合成に関与する全酵素遺伝子候補を予測することができた。これらの胚乳デンプン合成代謝への関与を決めるために、トランスクリプトーム解析を行うこととした。この成果と上記の成果をあわせ、イネデンプン合成システムの全体像を描くことを目標にする。

2) イネ組換え体を利用したデンプンエンジニアリング (秋田県大；一部遺伝子を東薬大と CSIRO が提供)

最もアミロペクチン構造への影響が顕著であろうと予測される酵素 (SSIIa、BEIIb、ISA1) について重点的に、それらが欠損したイネ変異体に正常遺伝子 (他種遺伝子を含む) を導入する方法と、野生型イネ遺伝子をサイレンシングさせる方法によって、アミロペクチンエンジニアリングを試みた。また、研究途中で植物の RNAi 法が技術的に確立したのを受けて、複数遺伝子を同時にサイレンシングさせたイネ形質転換体を作成し解析する。

3) 藻類ポリグルカン合成系の解析と利用 (秋田県大、シアノバクテリア；東薬大、紅藻および緑藻)

シアノバクテリア (秋田県大)、紅藻 (東薬大)、緑藻 (東薬大) の α ポリグルカンの分子構造を解析することによって、植物のデンプン合成システムの進化過程を解明する手がかりを得る。またシアノバクテリアは遺伝子構成が簡素であることから、ポリグルカン合成系を解析する実験系としての形質転換体を構築する (秋田県大、形質転換体の形質の調査を一部東薬大が担当)。

この研究成果によって、シアノバクテリアの中に通常のグリコーゲンではなくセミ-アミロペクチンを合成する系統が発見されたことから、この系統の遺伝子大量解析を計画した (秋田県大)。

4) 新規ポリグルカン構造解析法の開発 (静岡大)

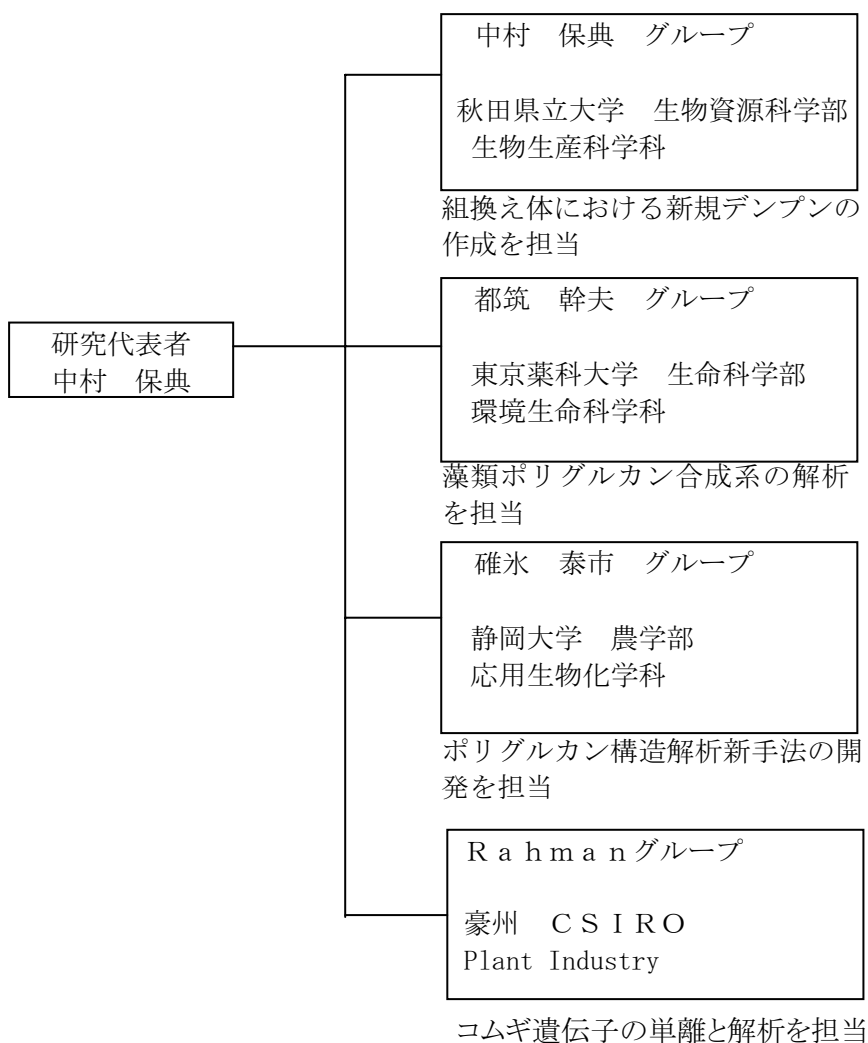
アミロペクチンの分子構造、とりわけ α -1,6 結合の分岐構造周辺の特殊なパターンを精密に解析し、基礎データをデータベース化することができれば、デンプン合成システム (多種多様なアミロペクチン分子の形成径路とその制御機構) やデンプンの物性変化の分子論的機序に関する理解が一層深まることが期待できる。しかしながら現状では、 α -1,4 結合鎖の鎖長分布の解析以外には有力な解析法がなく、アミロペクチン分子の汎用性の高い微細構造解析に関しては、未踏の研究領域でもある。本研究では、核磁気共鳴法 (NMR) と質量分析法 (マスマスペクトルメトリー、MS) 法とを主な解析手段として活用し、手始めにホモグルカンであるデンプン由来の多種多様なアミロペクチン分子に関連した分岐オリゴ糖ライブラリーの網羅的解析を行う。本データ解析を通してデンプン科学の分野では未踏とされていた分岐オリゴ糖の分岐に関するグルコースの結合配列順序 (一次構造) の正確

な決定や、パターン解析から分岐構造を決定するポリグルカン分子構造決定法に関する微量かつルーチン化した新しい解析手法を開発することを目的とした。

5) デンプンの産業利用 (秋田県大)

メタボリックエンジンリングによって新規形質を有するデンプンが創生されることが明らかになったことを受けて、そうしたデンプンの産業利用への展開を図るため、接着剤などへの利用を調査するための基礎実験を行う。

(2) 実施体制



3 研究実施内容及び成果

本論に入る前に、アミロペクチン分子構造の特徴とバリエーションおよびデンプン粒について概説する。研究実施内容および成果を理解する上で必要である。

アミロペクチン分子は、クラスターと呼ばれる単位がタンデム状に連結した構造、いわゆるタンデム・クラスター構造をしている（図1）。クラスターの長さは植物種によらず、約9 nm とほぼ一定であるという法則性がある。クラスターの内部はさらにアモルファス・ラメラとクリスタル・ラメラと呼ばれる2つの領域に分けられる。前者はクラスター全体の還元末端部（前部）に位置し、 α グルカン鎖の密度が低い部分である。後者は α グルカン鎖が密集している結晶性の高い領域で、分岐結合の位置も還元末端側（図の右側）に局在していると考えられる。側鎖の長さはグルコースの重合度（DP 値 degree of polymerization）に比例しており、DP 値が10以上の側鎖が隣り合うと自動的に左巻きの2重ラセンが形成される。クラスター全体では複数の2重ラセンが平行に並ぶ。このクリスタル・ラメラで形成される2重ラセンがアミロペクチンの疎水性を画期的に高め、デンプン特有の結晶構造や機能特性・物性を大きく左右していて、鎖長が長いラセンほど疎水性が高まる。ラセンは高温でほどけるが、長いものほどほどけにくい。

デンプン物性の多様性はクラスター構造のバリエーションと深い関係がある。デンプンの性質が植物種や品種によって異なっており、その違いを生かしてさまざまな食品や産業品の素材として選別して利用されているが、相当部分がクラスター構造のバリエーションに起因していると予想される（こうした視点からの解析研究例が少ないが）。クラスターのサイズは一定であるから、クラスター構造のバリエーションは、①クラスター当たりの鎖数（分岐結合数+1）②構成鎖の鎖長③分岐結合の位置によって生ずる。

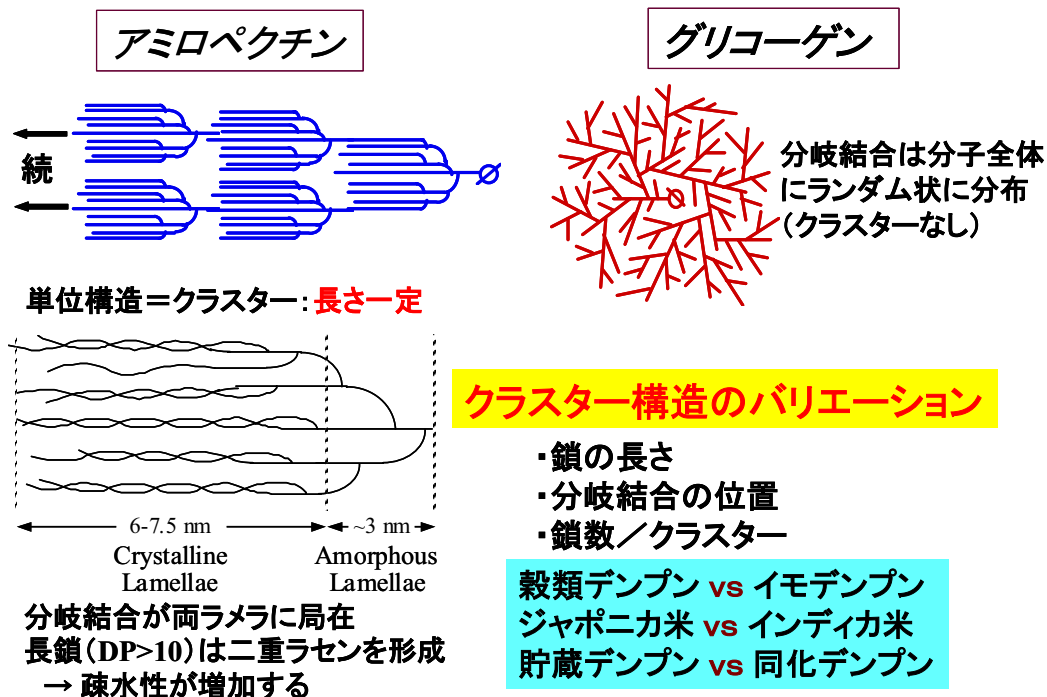


図1. アミロペクチンとグリコーゲンの分子構造比較（模式図）。両分子とも α -1,4 グルコシド結合（直鎖結合）と α -1,6 グルコシド結合（分岐結合）から成る点では同じであるが、分岐結合の規則性と直鎖の長さが異なるため、分子全体の形状がそれぞれ長い筒状と球状になる。線の長さはグルコース重合度に比例している。 Φ は還元末端。詳細は本文および図中の説明文を参照。デンプンは植物種間、系統間、組織間で異なるが、アミロペクチンクラスター構造のバリエーションが原因であるケースが多い。

デンプンはさらに特有の形状とサイズを持つデンプン粒を形成している。デンプンは澱粉と書くように、水にさらすと沈殿するがこれがデンプン粒である。水中で加熱すると、デンプン粒は膨潤するため粘性が急激に高まり糊状になる。さらに加熱すると粒が壊れ内部にパックされたアミロペクチン分子やアミロース分子が飛び出し、この状態の物性に影響するようになる。このようにデンプンが示す特有の物性には、アミロペクチンやアミロースの分子構造に基づく要因とデンプン粒に基づく要因とがある。

以下に本研究の具体的な研究実施内容及び成果について述べる。

3.1 イネデンプン合成システムの解明：(秋田県大 中村グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1) 酵素機能の解明：変異体の単離・解析と精製酵素の解析

高等植物のデンプン合成代謝には極めて多数の酵素遺伝子が関与する(図2)ことから、主要遺伝子が欠損した変異体をできるだけ多数持つことが成功の鍵を握ることは明白である。本研究では第一の方法として、九州大学佐藤光教授が NMU (化学変異原) 処理によって作成したイネ変異体集団から、種子形態や電気泳動のバンド欠失等の表現型選抜から単離したデンプン変異体 (AGPase, BE, ISA) の詳細な解析を行った。さらに、これまで存在しなかった変異体の単離を精力的に推進するため、第2の方法としてレトロトランスポゾン Tos17 がさまざまな遺伝子上に挿入されたノックアウトイネ集団 ((独) 生物研廣近洋彦博士らが開発) からキー酵素遺伝子の変異体を選抜・単離し、順次各酵素 (SS, PUL) の機能を解析した。この方法はいわゆる逆遺伝学的手法を利用したものである。即ち、変異体が“欲しい遺伝子”をねらい打ちし、その酵素活性が低下した変異体のデンプン構造等の表現型がどう変化しているかを調べることで、遺伝子とデンプン構造に影響を与える表現型とを直接関連づけることができる。本研究では、重要ではあるが従来からの化学突然変異源処理等では単離できないために機能が不明であったものから優先的に Tos17 変異体の単離を行った。

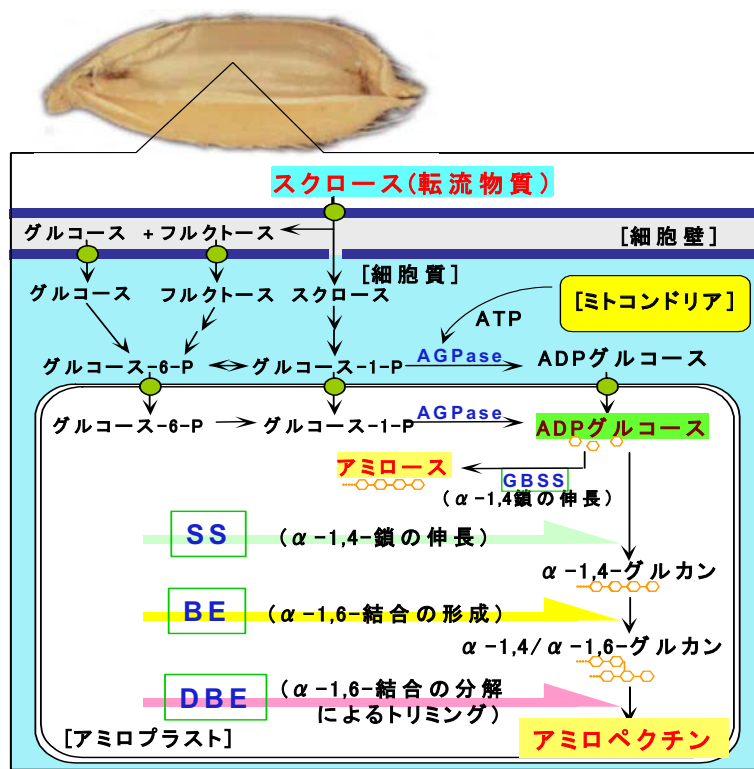


図2. 貯蔵器官におけるデンプン合成経路および関連代謝経路 (模式図)。

それら変異体の胚乳デンプンの構造や性質を解析し、酵素機能の制御によってデンプンがどのように改変できるかを解析し予測した。アミロペクチン合成に関与する AGPase, SS, BE, DBE をコードする全 21 種類の遺伝子のうち、本プロジェクトで扱ったものは、13 種類 (AGPL2, AGPS2, SSI, SSIIa, SSIIb, SSIIIa, SSIIIb, SSIVb, BEI, BEIIa, BEIIb, ISA1, PUL) にのぼる (表 1)。デンプン合成が最も旺盛な登熟胚乳における主要アイソザイムは全てこの中に含まれる。この研究分野で各アイソザイムの変異体および組換え体 (後述) の生物資源ストックがこれほどまでに充実し、各アイソザイムの機能が明確になっている例はいかなる植物においても存在しない。また、得られた材料の多くは天然には無いユニークな構造を持ったデンプンを生産することが明らかになっており、今後さまざまな産業分野での利用が期待される。

しかし、こうして明らかにされた酵素機能は、厳密に言えばあくまで生理学的役割を推定したものとも言える。本研究ではさらに、大腸菌による遺伝子大量発現系を利用して、あるいはイネ胚乳から酵素を直接単離・精製した後、精製酵素を用いて *in vitro* 実験を行い、機能を直接解析した。

表 1. 本研究で単離・解析したイネデンプン合成関連酵素遺伝子の変異体および遺伝子組換え体

酵素 (アイソザイム) 名	変異体			組換え体		
	単離法	解析	成果	作出法	解析	成果
基質供給酵素AGPase (ADP-glucose pyrophosphorylase)						
AGPL1						
AGPL2	MNU処理	△				
AGPL3						
AGPL4						
AGPS1						
AGPS2	MNU処理	△	Ohdan et al. (2005) Kawagoe et al. (2005)			
α 1,4伸長酵素 SS (Starch synthase)						
SSI	Tos17	○	Fujita et al. (印刷中), 特			
SSIIa		○	Nakamura et al. (2002), 特	相補実験	○	Nakamura et al. (2005), 特
SSIIb	Tos17					
SSIIc						
SSIIIa	Tos17	○	特			
SSIIIb	Tos17					
SSIVa						
SSIVb	Tos17					
GBSSI	MNU処理					
GBSSII						
枝作り酵素BE (Branching enzyme)						
BEI	MNU処理	○	Satoh et al (2003)	RNAi	△	
BEIIa	MNU処理	○		RNAi	△	
BEIIb	MNU処理	○	Nishi et al. (2001)	相補実験	○	Tanaka et al. (2004), 特
				RNAi	△	
枝切り酵素DBE (Debranching enzyme)						
ISA1	MNU処理	○	Wong et al. (2003)	アンチセンス	○	Fujita et al. (2003)
				相補実験	○	Kubo et al. (2005)
ISA2				RNAi		
ISA3				RNAi		
PUL	Tos17	○	特			

注: 赤字は本プロジェクトで扱ったアイソザイム。○および△は本プロジェクトで行った項目。
解析の○は、解析がほぼ終了、△は進行中。特は、特許出願済

以下に主要成果を述べる。

ア) スターチシンターゼ (SS)

イネは SSI, II, III, IV まで 4 タイプの SS を持ち、それぞれ 1, 3 (SSIIa, SSIIb, SSIIc), 2 (SSIIIa, SSIIIb), 2 (SSIVa, SSIVb) 種類のアイソフォームがある。従来のイネや他の植物を用いた世界の研究の成果によって、SSI, SSIIa, SSIIIa が主要な酵素であることから、本研究ではそれぞれの変異体を単離し解析した。

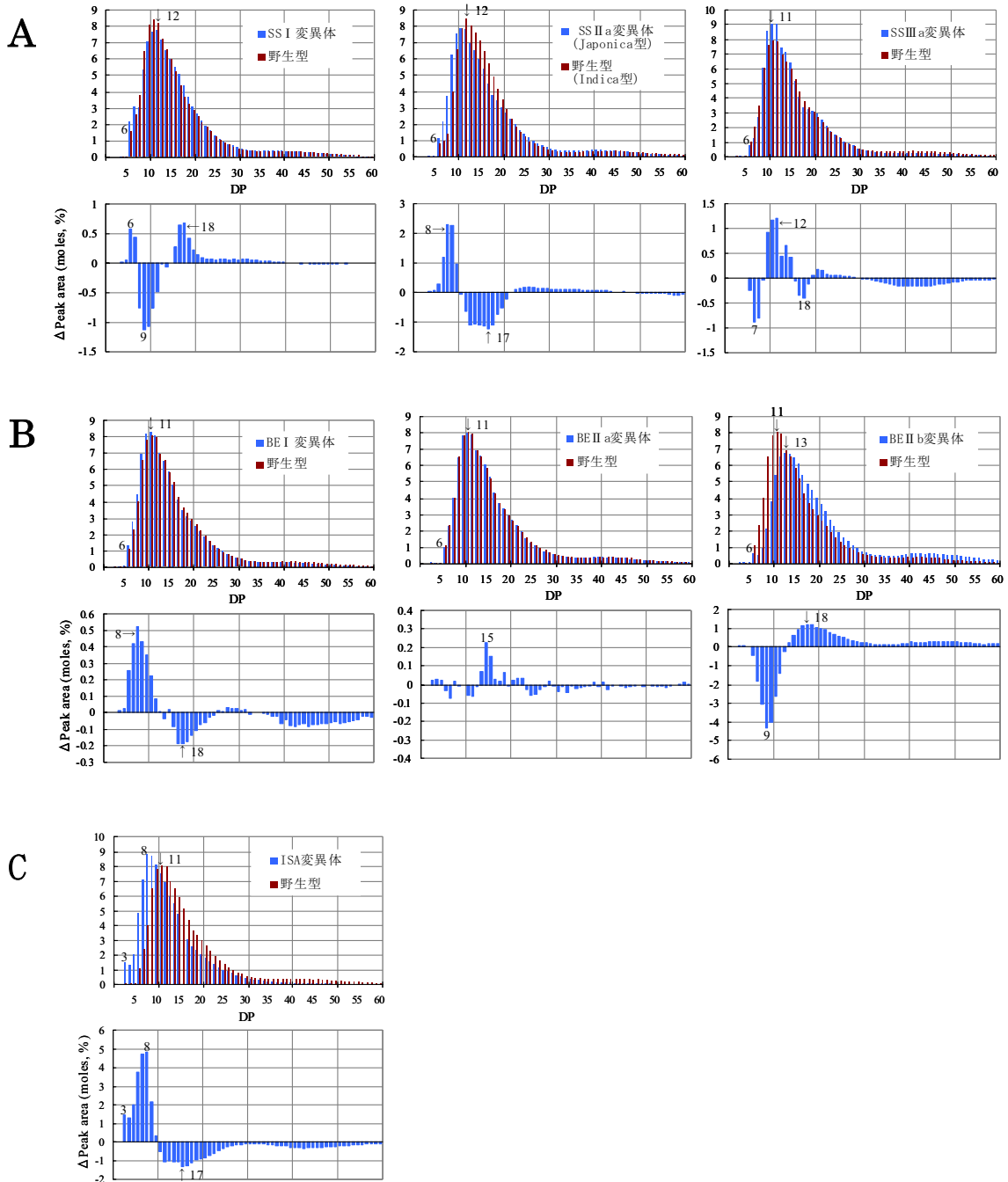


図 3. イネ変異体胚乳におけるアミロペクチン分子構造変化。上図はアミロペクチンの鎖長分布 [構成 α -1,4 鎖の鎖長 (DP 値) ごとによる存在比 (%)] を表し、下図は野生型と変異体の値の差を各鎖長について表した。A. SS 変異体 B. BE 変異体 C. ISA1 変異体。

SSI はトウモロコシ登熟胚乳の可溶性の酵素粗抽出液中の全 SS 活性の 60-70%を占めることが明らかになっている(Cao et al. 1999)が、この酵素の変異体は、本研究のノックアウトイネを用いた手法によりいかなる植物種に先駆けて世界で初めて単離された(Fujita et al. in press)。SSI 活性レベルの異なる 4 種類の SSI 変異体の鎖長分布解析から、SSI がアミロペクチンのブランチポイントから DP6-7 の A 鎖および B₁ 鎖の極短鎖にグルコース残基を 2-6 個伸長することで DP8-12 の長さに伸長する機能を持つことが明らかになった(図 3 A、4)。驚いたことに、SSI 活性を完全に失った変異体においても種子重量やデンプン粒の形態、結晶性には変化が無かったため、他の SS アイソザイムの相補作用が予想された(後述)。

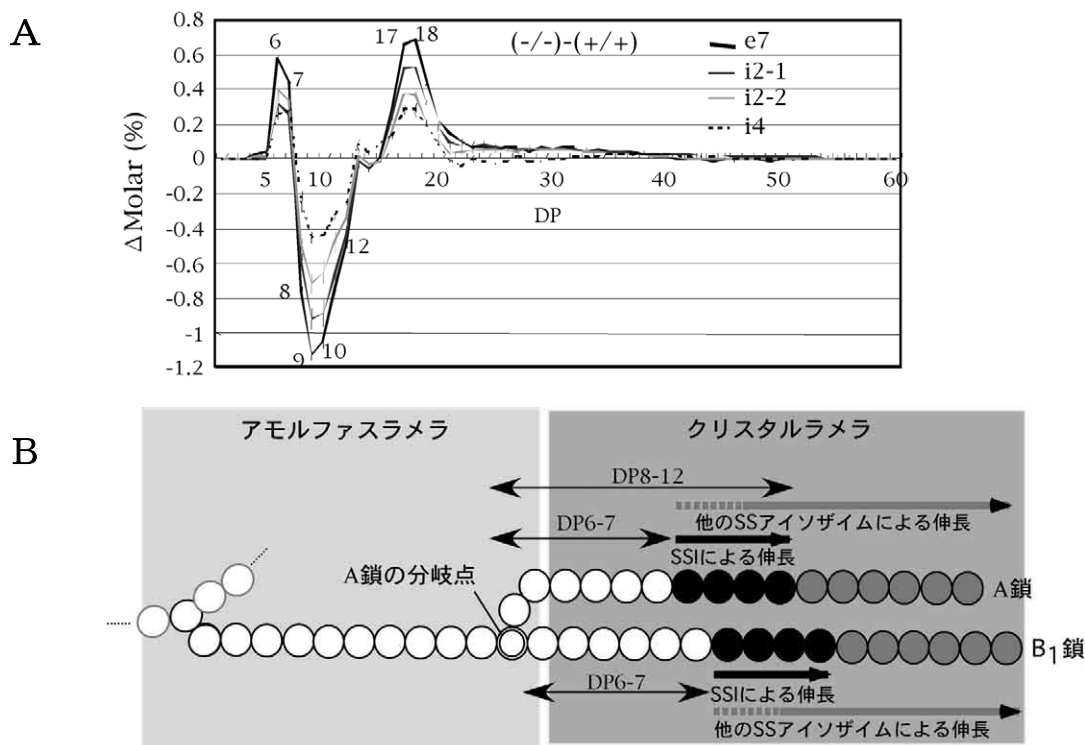


図 4. A. ノックアウトイネから選抜された 4 種類の SSI 変異体(e7, i2-1, i2-2, i4)の胚乳アミロペクチンの鎖長分布解析。グラフは、変異体(-/-)の鎖長分布(Molar %)からそれぞれのコントロール(+/-)の鎖長分布を引いた値(Δ Molar %)を示す。いずれの変異体も DP6-7, 16-19 が増加し、DP8-12 が減少していた。4 種類の SSI 変異体の SSI 残存活性は $0=e7 < i2-1 < i2-2 < i4$ であり、SSI 残存活性が低いほど、鎖長分布の変化が大きい。

B. SSI 変異体の解析からその機能を示したモデル。図は、アミロペクチン構造の一部を示すが、SSI は、図中の●部分を伸長し、●部分は、SSI が伸長した鎖をプライマーにして、SSIIa や SSIIIa 等の別の SS アイソザイムが伸長すると考えられる。SSI が欠失している SSI 変異体では、●部分もある程度は、他のアイソザイムによって伸長される。

SSIIa の機能は、デンプンの日印イネ品種間差の研究から明らかになった。日本人が好むジャポニカ米はインディカ米と食感が異なるが、アミロペクチン分子構造の差異が大きく影響している (Nakamura et al. 2002; Umemoto et al. 2002)。即ちジャポニカ型イネはクラスター内部の鎖の鎖長が短い S 型アミロペクチン (クラスター内部の鎖のうち、 $DP \leq 10$ の鎖の割合が 24-29%) を合成するのに対し、インディカ型イネの多くは鎖長の長い L 型アミロペクチン ($DP \leq 10$ の鎖の割合が 15-20%) を合成する (図 3 A、6)。両者でクラスター内部の短い鎖 (特に $7 \leq DP \leq 10$ の鎖) の伸長反応を特異的に担う SSIIa の機能に差異にあ

り、ジャポニカ型イネでは、SSIIa の機能を失っているために S 型アミロペクチンができ、そのデンプンは易糊化性を示す(Nakamura et al. 2005)。最近、この SSIIa の機能を *in vitro* 実験でも証明し、ジャポニカイネ SSIIa のアミノ酸変異箇所も特定した (Nakamura et al. 2005)。

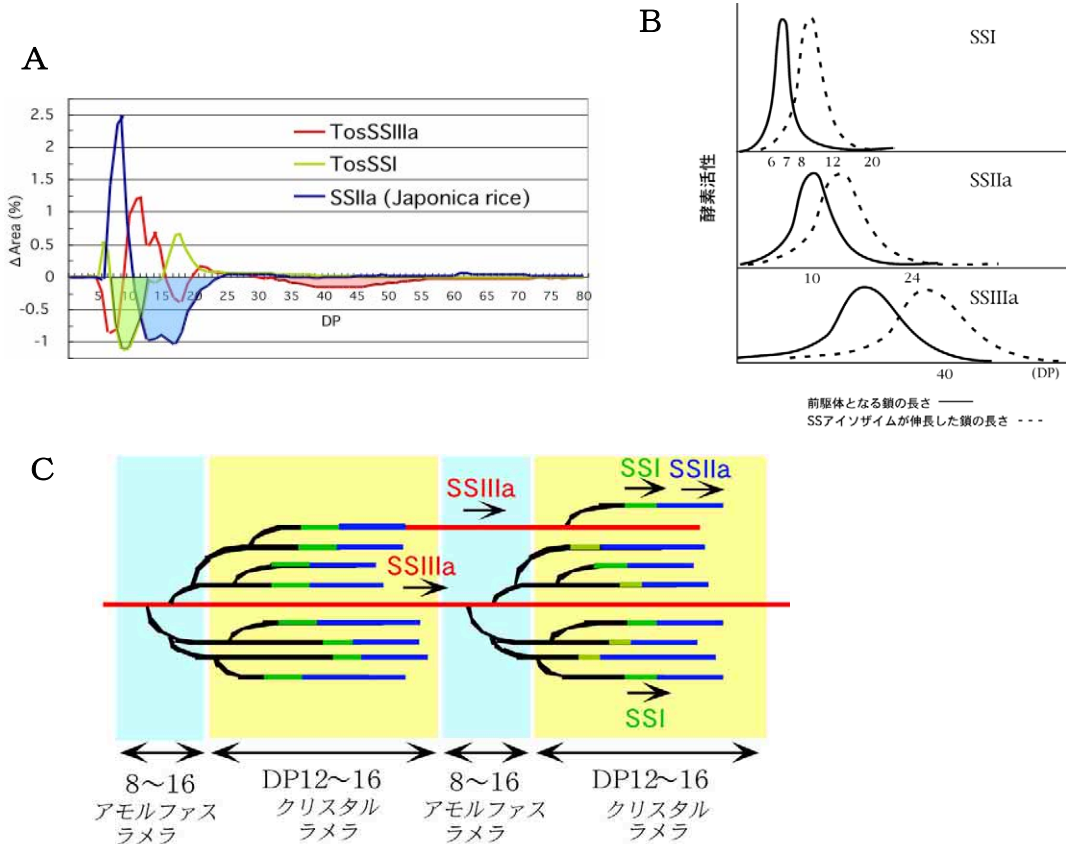


図5. A. SSI 変異体、SSIIa 変異体 (ジャポニカ米)、SSIIIa 変異体の胚乳アミロペクチンの鎖長分布。グラフは、各鎖の存在率、変異体からそれぞれのコントロール (ジャポニカ米の場合はインディカ米) を引いた値(Δ area %)を示す。SSI 変異体と SSIIa 変異体で、マイナスの値を示す鎖 (それぞれ緑色と青色の部分) は、それぞれの酵素が特異的に伸長していると解釈できる。特異性の大きさは数値の大きさになって現れる。SSIIIa 変異体では、DP20 以下のパターンは SSI 変異体のパターンと対照的で、SSIIIa 変異体では SSI 活性が高くなったことによりこのような変化が現れたと考えられるが、SSIIIa の本来の機能は、DP33-60 の長鎖 (ピンク部分) の伸長であると解釈できる。それぞれのアイソザイムが伸長する鎖長範囲 (緑、青、ピンクの各色の付いた部分) は、少しずつずれており、各アイソザイムの役割分担が明確に現れている。

B. イネ登熟胚乳でアミロペクチンの鎖長伸長に主に関わっている SSI, SSIIa, SSIIIa のそれぞれの前駆体となる鎖長 (実線) および伸長してできた鎖長 (点線) を、本プロジェクトの結果から模式的に示したもの。SSI が最も短い鎖長を、しかも非常に限定された範囲の鎖長をターゲットにして伸長し、付加するグルコースも最も少ない (即ち、グラフの幅が非常に狭い)。これに対し、SSIIIa は、SSI や SSIIa よりも長く、かつ広範囲にわたって長さの異なる鎖を、長く伸長する特徴がある (即ち、グラフの幅が広い) と考えられる。SSIIa は、SSI と SSIIIa の中間的な性質を持つ。3 者のグラフの重なりは、それぞれの酵素が相補し合えることを示す。

C. アミロペクチンのクラスターにおける SS 伸張反応。黄色の部分は、直鎖が密集し結晶性の高いクリスタルラメラ、空色の部分は分岐点が多く存在し、直鎖の密集度が低く結晶性の低いアモルファスラメラを示す (図1 参照)。SSI は、BE が生産した DP6-7 の A 鎖や B₁ 鎖を伸長し、SSI が伸長したこれらの鎖をプライマーとして SSIIa がさらに伸長すると考えられる。SSIIIa はクラスターをまたがる長鎖を伸長すると考えられる。

SSIII 変異体としては、トウモロコシの *dull-1* が古くから知られていた。本研究で、ノックアウトイネを用いて、SSIIIa の変異体の単離に成功した。SSIIIa 変異体は、SSIIIa 活性が完全に欠失している代わりに SSI 活性が野生型の約 3 倍高くなっており、そのため、アミロペクチンの鎖長分布も DP20 以下において SSI 変異体のパターンと対照的であった (図 3 A、5 A)。しかし、この変異体の最も重要な鎖長分布の特徴は DP33-60 の B₂, B₃ 鎖 (アミロペクチンのクラスター構造 2, 3 個にまたがる B 鎖) に相当する長鎖が最大 50% にまで低下していたことであり、アミロペクチン合成における SSIIIa の機能は、B₂, B₃ 鎖の伸長であることが明らかになった。また、SSIIIa 変異体完熟種子は、トウモロコシ *dull-1* 変異体と同様に中央が白濁しており、この変異体がトウモロコシの変異体に相当するものであることが明らかになった。

以上、総合すると、SSI, SSIIa, SSIIIa は、イネ登熟胚乳のアミロペクチン合成において、それぞれ極短鎖 (DP8-12)、中間鎖 (DP11-24)、長鎖 (DP33-60) の生成に関与し (図 5 A, B)、前駆体となる鎖の鎖長および生成する鎖の鎖長にそれぞれ特徴があることが明確になった (Nakamura 2002; Fujita et al. in press)。おそらく、BE によって形成された DP6-7 の鎖をまず伸長するのが SSI であり、SSI が DP8-12 に伸長した後、それを前駆体として SSIIa がさらに鎖長を伸長するのであろう。また、SSIIIa はクラスター間をまたがる長い鎖の伸長に関わるのであろう (図 5 C)。また、いずれかのアイソザイムが欠失した際には他のアイソザイムが相補することも明確になった。本研究の成果によって、植物の SS が少なくとも 3 タイプの SS を持つゆえんが初めて明確になった。

SSI, SSIIa, SSIIIa 以外に、ノックアウトイネから SSIIb, SSIIIb, SSIVb 変異体候補を得た。これらのアイソザイムは、登熟胚乳においては発現量が微量である (Ohdan et al. 2005) ことから、胚乳以外の組織のデンプン合成に関わるのであろう。

イ) デンプン枝作り酵素 (BE)

イネには BEI, BEIIa, BEIIb の 3 種類の BE がある。BEI は胚乳で約 3 分の 2 の活性を占める。本酵素が欠損すると、クラスターを連結する鎖 (DP \geq 37) や、クラスター内部にあってアモルファス・ラメラで分岐している鎖 (12 \leq DP \leq 21) の割合が減少するので、それらの長い鎖の分岐形成反応を触媒すると考えられた (Satoh et al. 2003) (図 3 B)。

BEIIa と BEIIb の分化は穀類に特有で、双子葉植物は BEII タイプの酵素は 1 種類のみである。イネでは BEIIa があらゆる組織で発現しているのに対し、BEIIb は胚乳のみに発現し、穀類デンプンの特徴づけている。この酵素が欠損した *amylose-extender (ae)* 変異体のアミロペクチンは、DP \leq 17 の短鎖の比率が顕著に減少するのに対し、クラスターを連結する長い鎖 (DP \geq 37) の割合が大きく増加することから、クラスター当たりの鎖数が少ない“やせたクラスター”を持つことになる (図 3 B、6) (Nishi et al. 2001; Nakamura 2002)。これは、BEIIb がクラスター内のクリスタル・ラメラにおける鎖 (短鎖) の形成 (分岐形成) を特異的に担っていて、他の BE ではこの作用が相補できないために、本酵素が欠損するとクラスター構成鎖数が顕著に減少するためと考えられる。クラスター内部の鎖の鎖長は長くなる (BEIIb が欠損するため、相対的に全 SS 活性/全 BE 活性比率が高くなることが原因と考えられる) ため、*ae* 変異体のデンプンは極めて強い難糊化性を示すようになる。また、デンプンの結晶構造が変化 (A 形結晶から B 形結晶へ) し、コメの断面が半透明から白濁状を示す。

BEIIa 変異では、見かけ上アミロペクチンの鎖長分布には変化が起きず (図 3 B)、デンプンの物性や種子の形状などにもほとんど変化が現れない (Satoh et al. 投稿準備中)。BEIIa は胚乳発達の初期から強く発現しており、その機能は BEIIb や BEI の特異的な機能をサポートすることではないかと推定される。BEIIa はイネのあらゆる組織に発現していて、BEIIb が発現しない胚乳以外の組織において BEIIb と同様にクラスター内部の短鎖合成に寄与している可能性が高い。事実、BEIIa 変異体の葉においては短鎖が少ない *ae* 型に近いアミロペクチンが合成される (Kubo et al. 未発表)。

以上、BEI や BEIIb が欠損するとアミロペクチン構造 (鎖長分布) が極めて対照的に変

化するが、変化の大きさを比べると、前者は後者ほどではない(図3B)。このことは、BEIIbの働きが極めて特異的であるのに対し、BEIの働きはそれほどは無く、その作用がBEIIaやBEIIbによってもかなりの程度まで相補できることを示すと考えられる。

本研究によって、アミロペクチンの分岐構造に最も影響力の強い酵素であるBEについて、イネ胚乳で発現しているBEI, BEIIa, BEIIbのすべてのアイソザイムの変異体が単離され、それぞれの機能をほぼ特定できた意義は高い。3者の機能をさらに解明するため、大腸菌内で高発現させた酵素を精製することに成功し、現在 *in vitro* 解析を実施中である。基質となるアミロースやマルトオリゴ糖を調製する必要がある(市販では入手できない)など、実験系の整備・開発を進める必要があるが、予備データでは、BEIに対し、BEIIが短鎖の形成に優位であることが確認された。今後両者の機能分化の機構が解明される可能性がある。また、BEの反応産物(分岐鎖)の存在比が、鎖長の違いによって一様に変化するのではなく、変化パターンに一定の周期があることが明確になった。この結果は、BE特性の中に、クラスターが繰り返し形成される性質がすでに内在することを示すように思われる。一定の構造を持つクラスターがどのような機構でタンデム状に形成されるかという点は、アミロペクチン合成上の最大の謎の一つであるが、重要なヒントが示されたと考える。

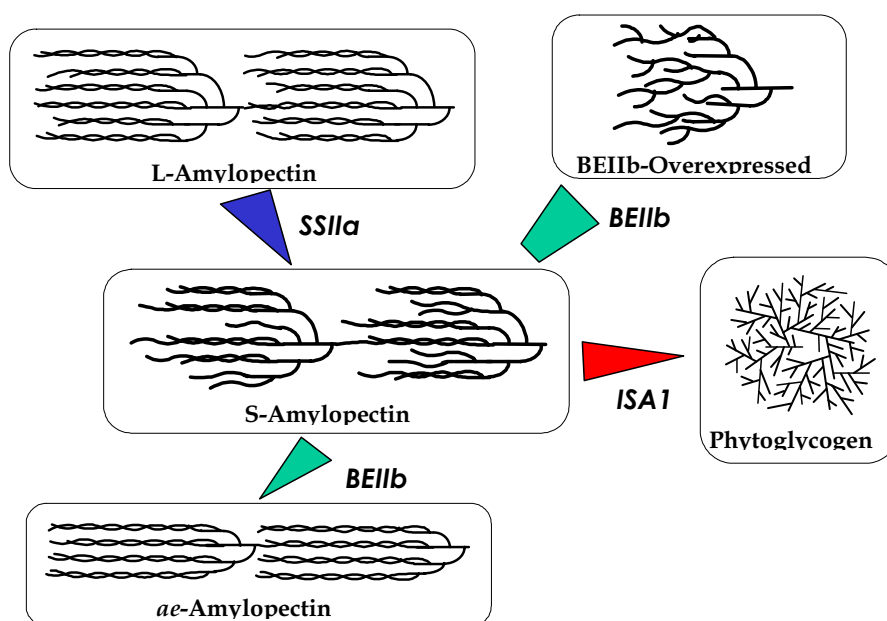


図6. イネデンプンメタボリックエンジニアリングによるアミロペクチンの構造変化(模式図)。イネ変異体や形質転換体の解析から、酵素活性が変動すると、胚乳アミロペクチン構造は、酵素の種類ごとに特有のクラスター構造パターンの範囲内で変化することが明らかになった。変異体や形質転換体の解析結果などから推定した最も代表的なパターンを示す。図中の矢印の太さは活性の強さに対応する。①SSIIa活性が十分であるとL型クラスター(を有するL型アミロペクチン、以下同じ)が生じ、活性を失うと鎖長が短いS型クラスターになる。②BEIIb活性が低下すると、クラスターを構成する鎖の数が少ないae型クラスター(ただし構成鎖の鎖長が極めて長いことに注目)が生ずる。逆にBEIIb活性が過剰になると、過度に分岐した異常な構造のクラスターになる。③ISA1遺伝子が欠損すると、分岐が規則性を失ってクラスター構造がなくなり、鎖長が短いフィトグリコーゲンとなる。

ウ) デンプン枝切り酵素(DBE)

α -1,4グルコシド結合を加水分解するDBEのもともとの生理機能は、 α -1,4結合の加水分解酵素と協調して、デンプンを完全に分解することにある。近年のデンプン合成研究のハ

イライトの一つに、DBE がクラスター構造の形成に必須であることを証明した成果が挙げられよう (Nakamura 2002; Ball and Morell 2003)。DBE には ISA と PUL の 2 タイプがあるが、ISA が欠損した変異体がトウモロコシ、イネ、オオムギ、シロイヌナズナ、緑藻クラミドモナスなどから単離され、共通してアミロペクチンがフィトグリコーゲンに変化している。つまり ISA はクラスター形成に必須で、欠損するとクラスターを持たないグリコーゲンタイプの多糖しか合成できず、デンプン粒構造も完全に消失し、糊化などデンプン特有の性質も失う。

イネには他の植物と同様、ISA1, ISA2, ISA3 の 3 遺伝子と、PUL の 1 遺伝子が存在する。私たちのグループは 1990 年代初期から ISA1 が欠損したイネ *sugary-1* (*sug1*) 変異体を使用したり、イネ胚乳から精製した ISA1 や PUL を使用した研究を通じて、DBE の機能に関する基礎データを蓄積してきた。すなわち従来の *sug1* イネ変異体の研究 (Nakamura et al. 1996, 1997; Kubo et al. 1999) に引き続き、ISA1 形質転換体の研究 (後述、Fujita et al. 2003, Kubo et al., 2005) から、ISA1 がアミロペクチンのクラスター構造の構築に必須であることがもはや疑い得ないものになった (図 3 C、6)。加えて、従来どの植物のフィトグリコーゲンの構造も詳細には解析されてなかったが、イネ *sug1* 変異体のフィトグリコーゲンがアミロペクチンと比べて、①分子量が 1-2 オーダー小さく、②半径が 1 オーダー小さく、③比重は 1 オーダー大きいことを明らかにした (Wong et al. 2003)。

これまで最もよく酵素学的な性質が研究されている微生物のシュドモナス ISA は単量体であるのに対して、植物 ISA タンパク質は ISA1 と ISA2 とが複合体を形成してデンプン合成に寄与していることも特徴的である (Hussain et al. 2003)。イネの場合、3 種の ISA のうち、ISA1 と ISA2 の転写発現量は胚乳で極めて高いが葉ではほとんど無く、逆に ISA3 の転写発現量は胚乳ではほとんど認められず葉で多い (Kubo et al. 2005)。胚乳における ISA 複合体についての知見を得るため、イネ種子からカラムクロマトグラフィーにより酵素精製を行い ISA タンパク質複合体の挙動について詳細に解析を行った (Utsumi and Nakamura 2006)。その結果、ISA1 のみのホモ複合体と ISA1 と ISA2 のヘテロ複合体の完全精製に植物で初めて成功した。植物で ISA1 ホモ複合体の存在はこれまで確認されていない。またヘテロ複合体はホモ複合体に比べ、熱安定性が高く、フィトグリコーゲンに対する親和性が顕著に高い。以上、イネデンプン合成には ISA1 と ISA2 が会合したヘテロ複合体が大きく寄与し、ホモ複合体はヘテロ複合体の機能を相補していると推定した。

sug-1 変異体では、ISA1 活性の低下と同時に一つの枝切り酵素である PUL の活性も低下し、複数の *sug-1* アレリック変異体の中で PUL 活性量とデンプン蓄積量が比例関係にあることが知られていた (Nakamura et al. 1997) が、PUL のアミロペクチン合成における機能は明確ではなかった。そこでノックアウトイネ集団から、酵素活性が完全に欠失したものを含む 2 種類の PUL 変異体を単離し解析した。PUL 活性が完全に欠失した (e10)、あるいは 6% に低下した (i16) PUL 変異体の ISA1 活性はほぼ正常でアミロペクチンの鎖長分布は、野生型とほとんど変わりがなかったことから、PUL 活性単独の低下だけではアミロペクチンの構造にはほとんど影響が現れない可能性が高い。しかしその一方で、デンプンの糊化温度がわずかに低下していたこと、DMSO などの溶媒に対するデンプンの溶解度が野生型と異なっていたことから、PUL のアミロペクチン構造への寄与を有無を含めて明確にするには、鎖長分布以外のアミロペクチン内部構造の詳細な解析が必要である。

以上総合すると (図 7)、注目すべきこととして、第一にアイソザイム間には機能的な階層があり、SSIIa, BEIIb, ISA1 の、それぞれ SS, BE, DBE クラスのアイソザイム中での機能は特異的である。従って、クラスター構造の最もドラスティックな変化は、この 3 者の制御によって可能である。例えば、ある種のアイソザイム (BEIIa など) の機能は他のアイソザイムによってほぼ完全に相補できるのに対し、SSIIa, BEIIb, ISA1 のように、他のアイソザイムではほとんど相補できない機能を有するものがある。第二に、 α -1,6 分岐反応、 α -1,4 鎖伸張反応には、クラスターの位置やプライマーとなる鎖の長さによって明確に区別される複数のタイプがあり、それぞれ異なるアイソザイムによって触媒される。

Starch Branching Enzymes (BE)

- BEI : B1, B2, B3鎖の形成に関与
(ただし特異性はそれほど高くない)
BEIIa : BEIIbやBEIの機能を補う
BEIIb (A θ) : A鎖 (DP<13) 形成に特異的に関与

Soluble Starch Synthases (SS)

- SSI : DP6,7の最短鎖をDP8-12に伸長
SSIIa : Crystalline lamellae を構成する鎖 (A鎖) を特異的に伸長
SSIIIa (*Dul-1*) : 長いB1鎖、B2, B3鎖の合成に関与

Starch Debranching Enzymes (DBE)

- Isoamylase1 (*Sugary-1*) : 不適切な分岐鎖を除去
Pullulanase : 不適切な分岐鎖を除去
(クラスターのトリミング)

図7. イネアミロペクチン合成における各酵素アイソザイムの機能。イネ変異体や組換え体の解析研究から導かれたアイソザイムの機能をまとめた。

2) アミロペクチン合成新モデルの提唱

以上の SS、BE、DBE の各アイソザイムの役割を明確にした結果、および形質転換体の解析結果 (後述) に基づいて、アミロペクチンの合成モデルを作成した (図8)。本モデルは“Two step branching and improper branches clearing model”と命名し発表した

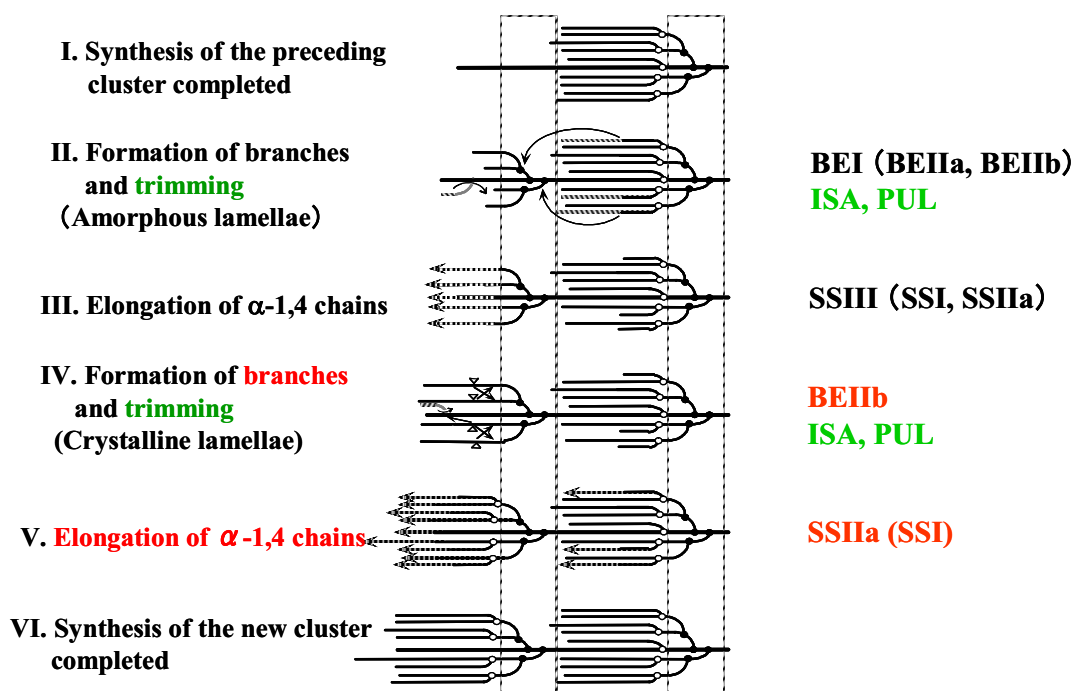


図8. 本研究をもとに構築したイネアミロペクチン合成モデル。“Two step branching and improper branches clearing model”と命名して公表した(Nakamura 2002)。アミロペクチン合成にアイソザイムの役割を付与した最初のモデルで、イネだけではなく、他の植物にも適用されるモデルである。 α -1,6 結合形成反応が異なる BE アイソザイムによる 2 段階で行われること、DBE の役割は、クラスターの不適切な位置かつ疎にできた α -1,6 結合を除去することによって、クラスター構造を一定の形状にトリミングする点などが特徴。

(Nakamura 2002)。本モデルは、それまで多く提唱された“想像上”のアミロペクチン合成モデルと異なり、主要アイソザイムを付与した最初のもので、その後アミロペクチン合成の代表的なモデルの一つとして広く学術文献に引用されている。その後明らかになったアイソザイムの機能もあるが、基本骨格は現在でもその後の多くの知見とも合致している。本モデルのポイントは第一に、SS伸張反応とBE分岐反応が密接にリンクしており、さらにクラスター構造の完成には異なるコンビネーション (SSIIIa-BEIとSSIIa-BEIIb)を要する。第二に、DBEの役割は、他の研究者の従来の考えとは異なり、ある確率で発生する不適切な分岐結合を除去し、クラスターの基本構造を調整・保持することである。

本モデルはアミロペクチン構造を改変するバイオテクノロジー実験をデザインする際に、また本モデルの有効性を検討する上で有用である。

3) イネデンプン合成システムの解析

緑葉における同化デンプンと貯蔵器官における貯蔵デンプンでは基本的な構成が異なっている (図9)。第一に、デンプン合成に通じるスタート物質とデンプン基質 ADP グルコースに至る経路が根本的に異なる。葉緑体で合成される同化デンプンは、光合成カルビン・ベンソンサイクルのメンバーであるフルクトース 6-リン酸が出発物質であるが、アミロプラストで合成される貯蔵デンプンは、転流物質であるスクロースが出発物質である。従っ

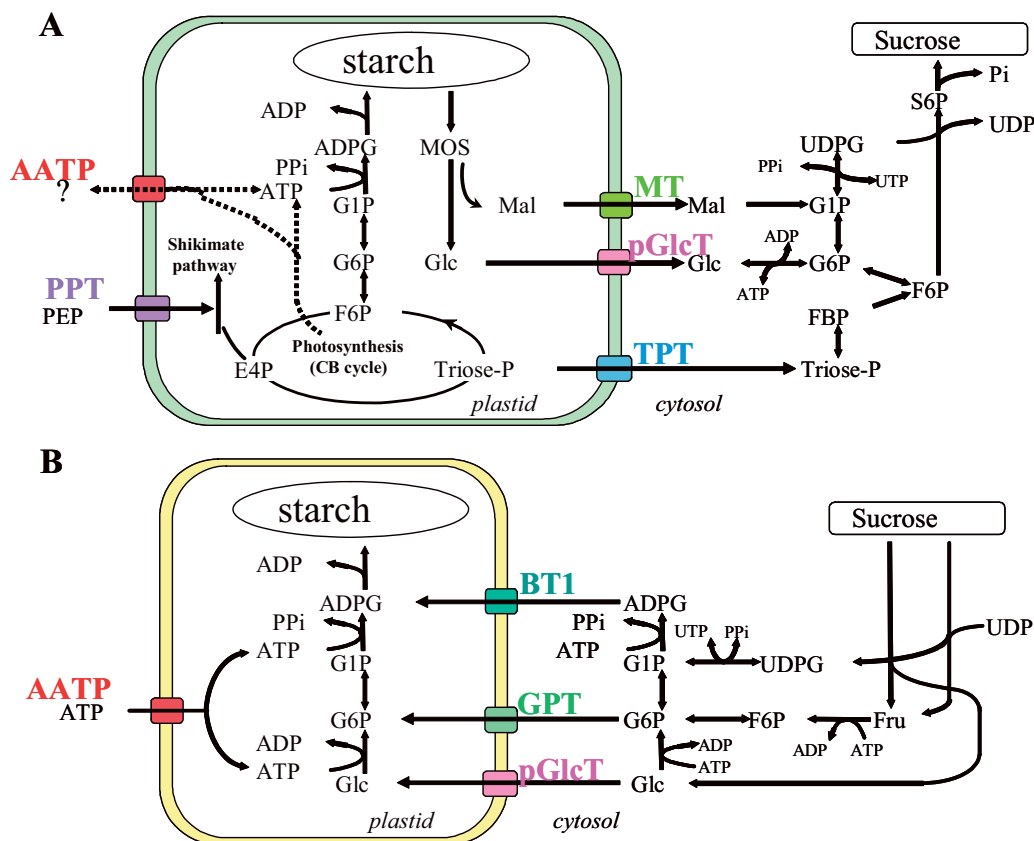


図9. 光合成組織 (A) および非光合成組織 (B) におけるデンプン代謝およびスクロース代謝と関連炭素代謝 (概念図)。両組織における代謝経路とトランスロケーターの差異と共通点を示す (Toyota et al. 2005 参照)。

て貯蔵デンプンの合成過程には、スクロースの原形質膜を介した細胞質への輸送、スクロースからヘキソースリン酸に至る代謝過程が細胞質に備わっていないとできない。第二に、ADP グルコースの供給を可能にする、ADP グルコースまたはヘキソースリン酸の細胞質からアミロプラストへのプラスチド膜を介した輸送が必要である。第三に、デンプン合成を支える ATP 供給源の違いである。同化デンプンの場合には、葉緑体チラコイドの光合成光リン酸化系から直接 ATP は補給されるが、貯蔵デンプンの場合には、ATP はミトコンドリアの酸化的リン酸化系から供給されるに違いない。スクロースからの TCA 回路に至るまでの炭素代謝系の働きがなくては貯蔵デンプンの合成はスムーズに進行しない。このように、植物の貯蔵器官には特有の炭素代謝系や代謝物質の輸送に関わるタンパク質（トランスポーター）が備わっている。貯蔵器官の機能を向上させ、これを利用するバイオテクノロジーが成功するためには、貯蔵器官の複雑かつ巧妙な代謝全体の知識と制御機構に関する分子レベルでの理解が欠かせない。

研究途中でイネ全ゲノム解析が完了し（2002年）、結果が公表された幸運を受け、イネデンプン合成に関与する全酵素遺伝子を予測することができた。これらの胚乳デンプン合成への関与を推定するために、トランスクリプトーム解析を行うこととした。この成果と上記の成果をあわせ、イネデンプン合成システムの全体像を描くことを目標にする。イネ全ゲノム情報にもとづいて、イネのデンプン合成に関わる可能性のある酵素 6 クラス（AGPase, SS, BE, DBE, PHO, DPE）全 27 遺伝子（Ohdan et al. 2005）、およびプラス

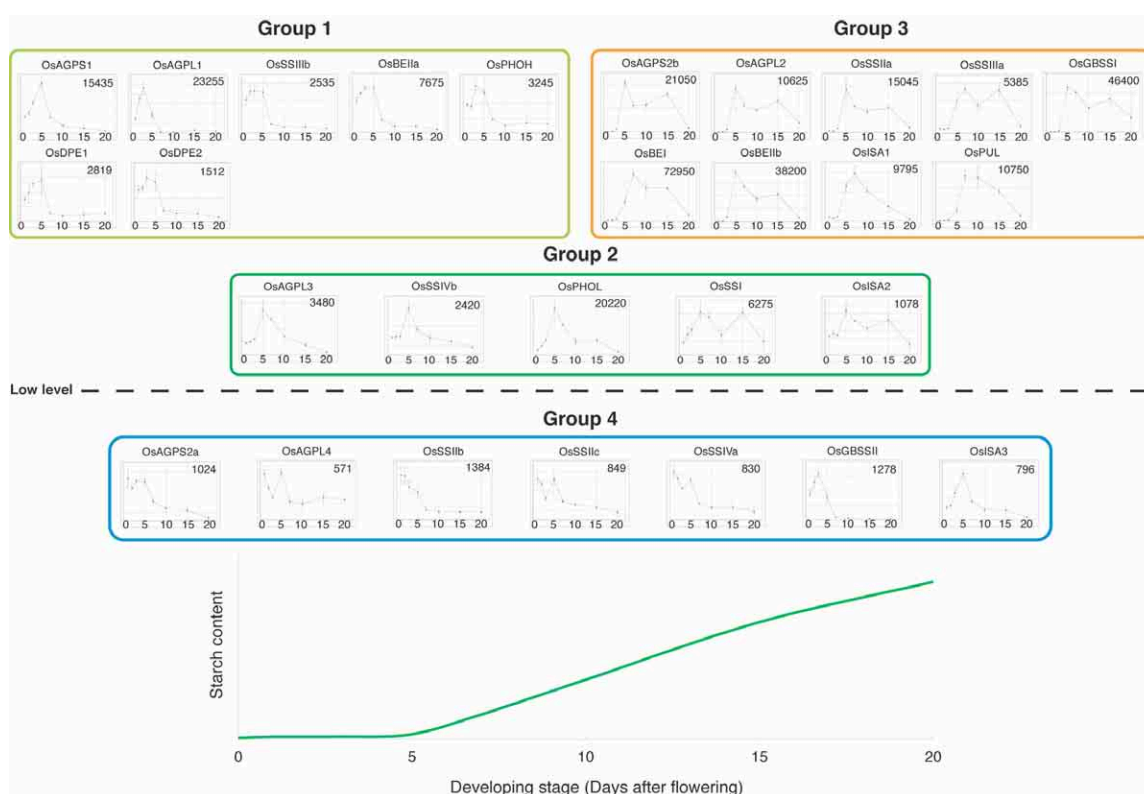


図 10. イネ種子（胚乳）デンプン合成関与候補遺伝子のトランスクリプトーム解析。AGPase, SS, GBSS, BE, DBE, Phosphorylase (PHO), Disproportionating enzyme (DPE)の各アイソザイム遺伝子について、種子の発達時期（開花後日数）に応じた転写量の変化パターンから 4 グループに分類した（Ohdan et al. 2005）。

チドのトランスロケーターである可能性の高い7クラス (TPT, GPT, PPT, BT1, NTT, GlcT, MT) 全 16 遺伝子 (Toyota et al. 2005) を推定し、それら全てのトランスクリプトーム解析を Real-time PCR 法を用いて行った。

まずデンプン合成関与遺伝子のトランスクリプトーム解析の結果、種子の発達時期に応じた転写レベルの変動パターンによって、4つのグループに分類されることが明らかになった (G1: 登熟初期に強く発現し、グルカンプライマーの形成に関与する; G2: 登熟時期全般にわたって発現する; G3: 登熟初期には発現せず、胚乳のデンプン合成が盛んになる時期に合わせて強く発現する; G4: 全般に低レベルの発現) (図 10)。このことから、胚乳の発達時期に応じて遺伝子発現が綿密に制御されていることが示された。

種子 (胚乳) 特異的に発現する遺伝子 8 種類と緑葉特異的に発現する遺伝子 9 種類が区別され、貯蔵デンプンと同化デンプンで異なる組織特異的な遺伝子発現制御機構が存在することが明らかになった (図 11)。

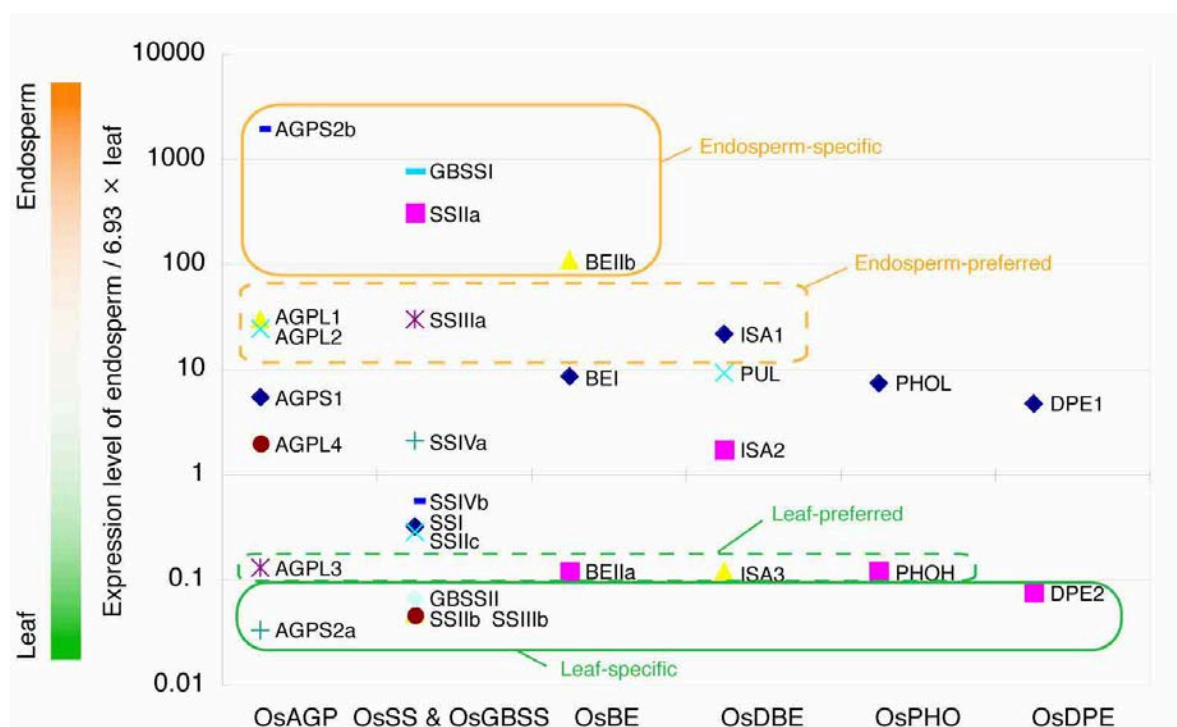


図 11. イネ種子および緑葉におけるデンプン合成関与候補遺伝子のトランスクリプトーム解析。両器官における各遺伝子の転写レベルの比から、胚乳特異的発現型遺伝子 (8 遺伝子)、緑葉特異的発現型遺伝子 (9 遺伝子) などの分類が可能である (Ohdan et al. 2005)。

ADG グルコースの細胞質からアミロプラストへの輸送に関与すると推定される BT1-1 が、胚乳のデンプン合成が盛んな時期に特異的に発現しており、デンプン基質の供給に重要な役割を果たすと推定された (Toyota et al. 2005)。逆に TPT, PTT, NTT は緑葉にのみ強く発現しており、光合成組織での炭水化物代謝制御に関与していることと考えられた。

以上の結果から特に注目されることは、胚乳特異的に発現している酵素のうち、①SSIIa, SSIIIa, BEIIb, ISA1 は胚乳アミロペクチンの分子構造への寄与が高い酵素、②GBSSI は胚乳におけるアミロース合成に必須な酵素、③AGPS2b, AGPL2 は胚乳の細胞質型 AGPase で、デンプン合成のグルコース供与体 ADG グルコースを供給する酵素、といずれも胚乳における貯蔵デンプン合成で極めて重要な役割を果たす酵素である点であった。本研究は、

従来からあくまで生化学的な知見に基づいてアミロペクチン合成のキー酵素を予測し、解析を進めてきた。その途中で公表されたイネの全ゲノム情報に基づき、最近遺伝子の関与に関するトランスクリプトーム解析を行ったわけであるが、この情報が得られた時点で、従来の推定・方向性が正しかったことが確認された。

本研究成果の意義について要約してみよう。第一に、イネ胚乳をモデルとした高等植物のデンプン合成システムの全体像が明らかになった。アミロペクチン構造に直接関与する3クラスの酵素(SS, BE, DBE)には複数タイプのアイソザイム[SSI, SSII, SSIII, SSIV; BEI, BEII; DBE (ISA, PUL)]が存在することはあらゆる植物種に共通しているが、本研究によって、アイソザイム毎に異なる機能があることが初めて明らかにされ、各クラスの酵素に複数のアイソザイムがなぜ必要なのかが明確になった。

第二に、デンプンメタボリックエンジニアリングをデザインする際に必要な基礎知見が集積した。バイオエンジニアリングの成功の如何はデザインの良し悪しが鍵を握っている。本研究によって、ほぼすべてのキー酵素の機能の特性(アミロペクチンクラスター構造のどこの部位の形成に関与するか)と重複性(他のアイソザイムの機能と重複する部分とその重複度合い)が明確になり、その活性の増減によってアミロペクチン構造とデンプン構造・物性がどのような変化を受けるかがほぼ定量的に明らかになった。

第三に、生物材料の整備・充実があげられる。本研究によって、各酵素遺伝子機能が欠損した変異体の独自のコレクションがほぼ完備し、基礎研究の解析材料としてはもとより、バイオ実験のよい遺伝子宿主としてきわめて有効な素材となった(後述)。

最後に類似研究との比較を述べる。植物のデンプン合成代謝に関する基礎研究はイネのほか、トウモロコシ、コムギ、ジャガイモ、オオムギ、シロイヌナズナ、単細胞緑藻クラミドモナスなどを材料として世界各国で行われている。イネの研究は最近中国などでも実施されているが、先端的研究成果に関しては、分子生物学、生理生化学からデンプン構造・物性解析まで一連の研究蓄積がある本研究グループがほぼ独占的に発表している。また、他の植物種の研究成果と比べても、複数タイプのアイソザイムの機能に関してこれほど徹底的かつ網羅的かつ定量的に研究しているグループは無い。最近シロイヌナズナを用いた先端的なデンプン代謝研究の成果が海外の複数のラボから続けざまに報告されているが、その多くが緑葉のしかもデンプン分解制御機構の解明をめざしたものである。

貯蔵デンプン代謝制御に関する基礎研究には変異体の整備が必須であるが、世界のあらゆる植物種の変異体のストックと比較しても、当研究グループのイネ変異体が最も充実したコレクションである。トウモロコシにおいては古典的なデンプン変異体の研究が多数存在するが(特許の関係上、学術的知見が明らかにされていない事実も多い)、ゲノム解析研究がイネより遅れていることもあり、個々のアイソザイムの機能に関する知見はイネより劣る。他の研究グループが持つ変異体は個別あるいは少数の遺伝子に関するもので、網羅的ではない。今後シロイヌナズナのデンプン変異体のコレクションが急速に整備されるであろうが、イネの研究にはイネ独自のコレクションを持つことの重要性は変わらない。単子葉と双子葉植物とでは遺伝子構成、遺伝子そのものの機能、遺伝子発現特性などに大きな違いがあることも次第に明らかになってきていることも理由の一つにあげられる。

デンプン合成に関与する全遺伝子のトランスクリプトーム解析は本研究の他にはシロイヌナズナの報告(Smith et al. 2005)があるに過ぎない。ただしこれは葉での転写レベルを調べたものである。プラスチドのトランスロケーター遺伝子に関する網羅的な解析は本研究があらゆる植物を通じて最初である。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究によって単離されたイネデンプン合成変異体には実に多種多様でユニークなデンプンが合成されることが明らかになった。デンプンは植物種や品種毎に物性が異なることから、通常産産品の用途によって選別し使用されているが、イネ変異体デンプンの中にはどのような天然素材にも存在しないような物性を持つものが多数見出されたことか

ら、これらのデンプンは食品や工業品の素材として直接利用できる。

本研究の成果はまた、今後の基礎研究分野の展開にきわめて重要な基礎的知見と素材を提供する。野生型デンプンは、一定の分子構造・形態に整えられて蓄積されるまでに、多数の構造と機能の異なる酵素・アイソザイムが関与し、合成最終段階までの間、何段階にも分子構造を変えている（図8参照）。ここには酵素・酵素間に精妙な相互作用があるに違いない。現在まだほとんど不明である各酵素の活性制御機構の解明とともに、酵素・酵素間の相互作用の解析も、今後の重要な研究課題である。

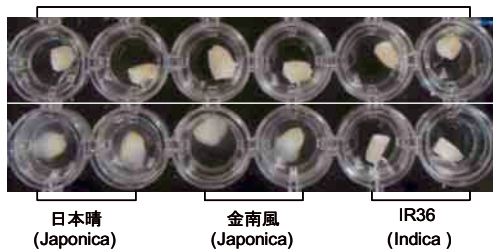
また上述したように、アミロプラストにおける貯蔵型デンプン合成代謝系は、細胞質のスクロース代謝系、ミトコンドリアの呼吸代謝系、細胞膜やアミロプラストの物質輸送系などと緊密な関係を保っている。こうした代謝経路間の制御機構の解明は種子の物質生産能を向上・利用するバイオ技術の開発研究に欠かせない。本研究で得られた成果はこうした将来の研究に貴重な知見やヒントを与えるものである。

3.2 イネ組換え体を利用したデンプンエンジニアリング (秋田県大 中村グループ; 一部の遺伝子は東薬大およびCSIRO から提供)

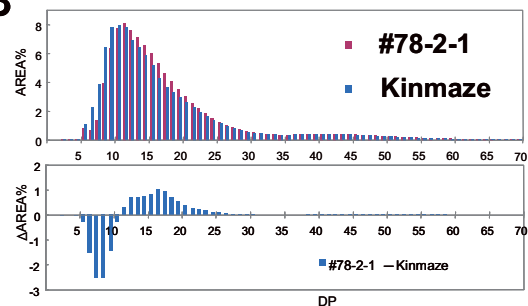
(1) 研究実施内容及び成果

1) スターチシンターゼ(SS)エンジニアリング: *SSIa* 遺伝子制御

A SSIa-形質転換体 #78-2-1



B



C

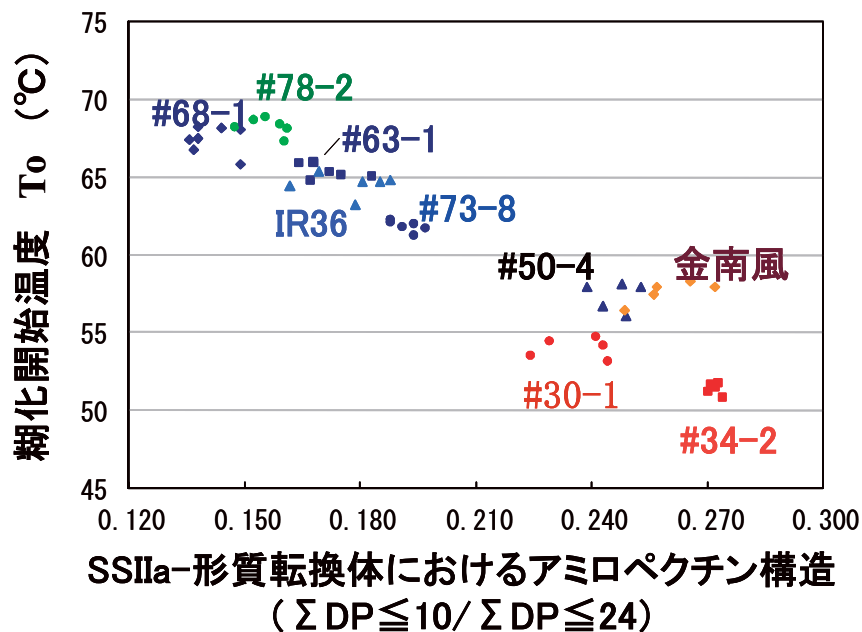


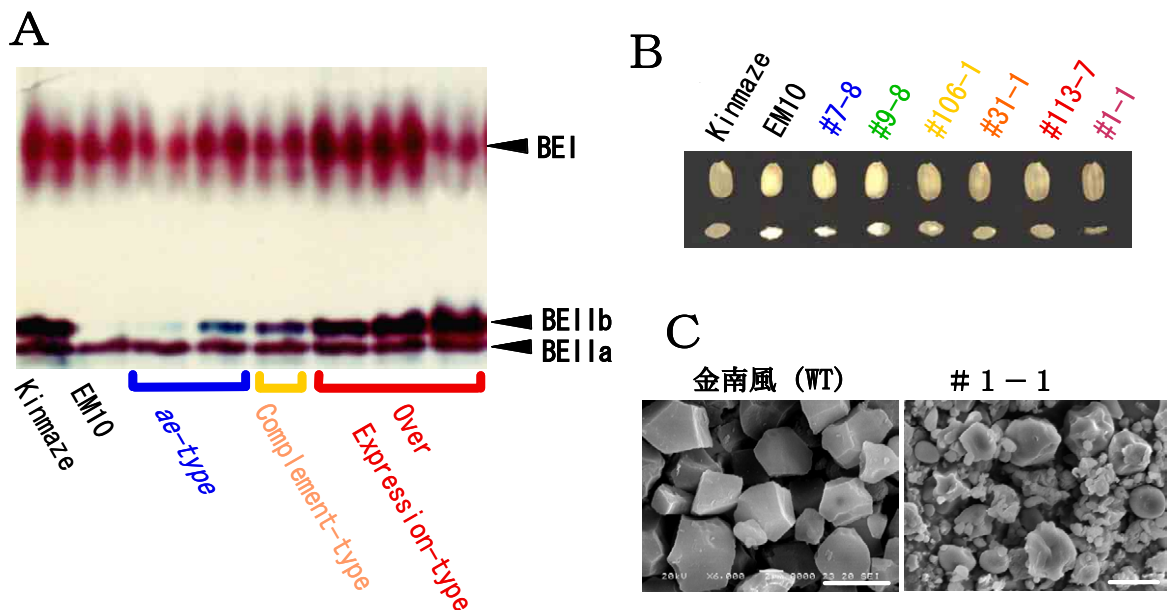
図12. S型アミロペクチンを合成する金南風に、L型を合成するIR36の*SSIa*遺伝子を導入して作成された形質転換体ホモ系統(#78-2-1)のデンプン形質。

- A. デンプンの糊化性。尿素液 (4 M) 条件下で、金南風デンプンは易糊化 (膨潤・崩壊) 性を示すが、形質転換体デンプンは目立った変化をせず、IR36 デンプンと同様、難糊化性を示す。
- B. アミロペクチン構造。非活性型 *SSIIa* と S 型アミロペクチンを持つ金南風が、活性型 *SSIIa* 遺伝子 (IR36 に由来) の導入により、L 型アミロペクチンを合成することが示された。
- C. アミロペクチン構造 [クラスターを構成する全ての α -1,4 鎖 (DP 値が 24 以下) に対する短鎖 (DP 値が 10 以下の鎖) の存在率] とデンプン熱糊化特性 (糊化開始温度) との関係。両者の相関関係が成り立つことが示された。

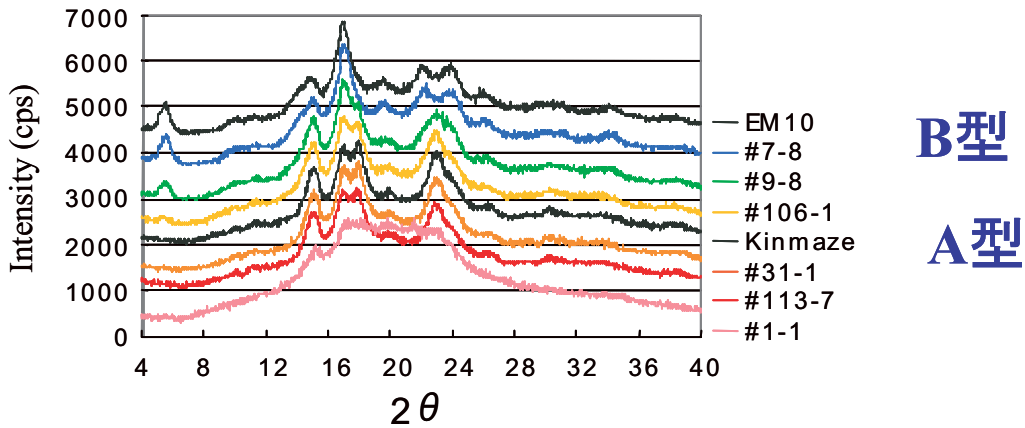
SSIIa 遺伝子制御によるデンプンエンジニアリングの結果 (Nakamura et al. 2005) を示す。ジャポニカ型イネに L 型アミロペクチンを合成するインディカ型イネの *SSIIa* 遺伝子を導入すると、形質転換体のデンプンは、ジャポニカ米の易糊化性からインディカ米特有の難糊化性になり (図 12 A)、アミロペクチンは L 型になった (図 12 B)。 *SSIIa* 発現レベルの異なる系統間を比べると、発現レベルに応じてアミロペクチンの鎖長分布が変化し、かつアミロペクチンの構造変化とデンプンの熱糊化特性の間には強い相関があった (図 12 C)。このことは、活性型 *SSIIa* の発現レベルを制御することで L 型と S 型の中間的な構造を含む種々のアミロペクチンと異なる物性を持つデンプンができることを示している。恐らく長年の品種選抜の結果であろうが、現在のイネ栽培品種は L 型か S 型のいずれかのアミロペクチンを持ち、中間型を合成する品種はほとんど無い (Nakamura et al. 2002) が、バイオ技術では一連の異なるデンプン物性を生み出すことができる。

2) デンプン枝作り酵素 (BE) エンジニアリング

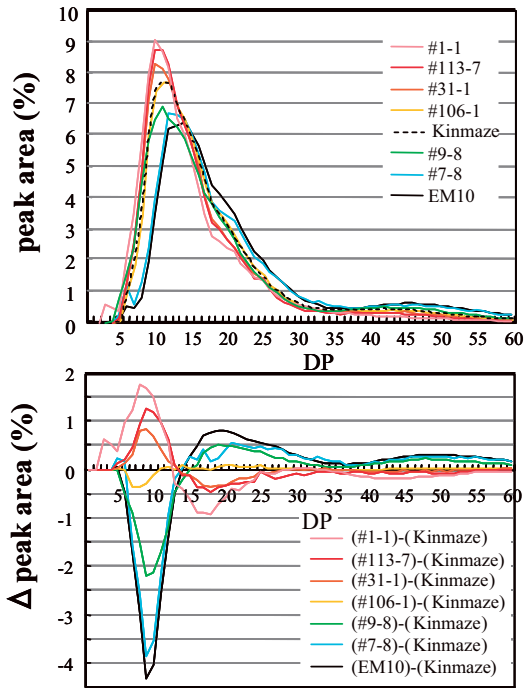
イネ *ae* 変異体に正常な *BEIIb* 遺伝子を導入すると、*BEIIb* 発現量がさまざまに異なる形質転換体ができる (Tanaka et al. 2004) (図 13 A)。 *BEIIb* タンパク質レベルが増加するにつれて、クラスターの鎖数が増えて野生株に近づき、驚くべきことに、*BEIIb* レベルが野生型を越えてもこの変化が続き、鎖数は野生型より多くなる (図 13 E)。このクラスター構造の変化はデンプンの糊化特性の顕著な変化を伴い、*BEIIb* レベルの増加に伴い次第に易糊化性になる。この *BEIIb* レベルの広範囲の変化に応じた連続的な変化は特筆すべきことで、*BEIIb* 制御によって種々のデンプンを自在に合成できることを意味する。注目さ



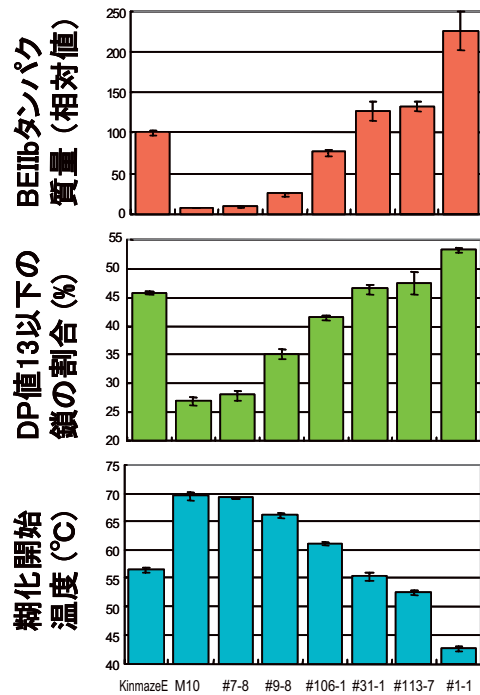
D



E



F



BEIIb-形質転換体系統

図 13. イネ *ae* 変異体 (EM10) にイネ *BEIIb* ゲノミック遺伝子を導入した形質転換体の解析 (Tanaka et al. 2004)。

A. *BEIIb* 活性。B. コメの形態と断面写真。*ae* 変異体 (EM10) では粒がやや小さく断面が白濁しているが、レベルの上昇とともに、白濁が消えて野生型に近くなるが、*BEIIb* が大過剰になると、コメは凹む (#1-1)。C. デンプンの X 線結晶回折パターン。*ae* 変異体では B 型結晶であるが、*BEIIb* レベルの上昇とともに野生型と同じ A 型結晶になる。D. アミロペクチン構造 (DP 値が 13 以下の α -1,4 鎖の存在率)。*BEIIb* レベルの変動に応じて、変化の大きさは変化するが、同一のパターンで変動する点に注目。*BEIIb* の特異的な機能が原因していると思われる。E. *BEIIb* タンパク質量、アミロペクチン構造 (DP 値が 13 以下の α -1,4 鎖の存在率) とデンプン熱糊化開始温度との関係。*BEIIb* のあらゆるレベルで 2 者が変化する点に注目。

れることに BEIIb 活性が過剰に多い条件下では、クラスター構造が崩れ、親水性の多糖 (water-soluble polysaccharides) ができる。デンプン粒の形 (図 1 3 C) や X 線結晶回折パターン (図 1 3 D) が変化し、種子の断面も BEIIb が無いか低いと白濁しているが、BEIIb の増加につれて野生型と同様に半透明になり、過剰になると種子が凹む (図 1 3 B)。親水性・保水性の高いデンプンは工業品や化粧品などの素材として有望であり、BEIIb 制御系は高い可能性を持っている。

これまで複数の BE の発現レベルを同時に制御した試みは行われていないが、BE アイソザイム同士の相互作用を理解する上で有効であると同時に、デンプンエンジニアリングの方法としても極めて有望であると思われる。

RNAi (RNA 干渉) 法により個々のイネ BE 遺伝子のほかに、全ての組み合わせの複数 BE 遺伝子を制御した形質転換体 (BEI+BEIIa), (BEI+BEIIb), (BEIIa+BEIIb), (BEI+BEIIa+BEIIb) を作成した。その結果、(BEI+BEIIb) では、単独で抑制した効果よりも顕著な相乗抑制効果が認められた。即ち (BEI) では種子の形態にはほとんど何も変化がなく、(BEIIb) では種子が白濁しやや小粒であるのに対し、T1 世代 (分離世代) の種子において、(BEI+BEIIb) では重量が顕著に少ない扁平な白濁種子が約 75% も出現した。この表現型は (BEIIa+BEIIb) においても約 30% 現れた (図 1 4)。以上の結果は、単独の制御ではほとんど現れない効果 (特に BEI または BEIIa 単独の抑制効果) が、BEIIb 抑制と組み合わせることにより増幅されることが明らかになった。また種子の解析結果から、結論は前述の変異体の解析から導かれた結論と同様であるが、BEI と BEIIa のデンプン合成上における機能、すなわちデンプン合成能およびアミロペクチン構造決定における機能がより明確に特定できた。また、これまでこのような実験に基づく知見は得られておらず、今後はホモ個体を選抜して解析することにより、複数遺伝子制御法のバイテク技術上とデンプン合成制御機構の解明研究上における有効性を解析する予定である。

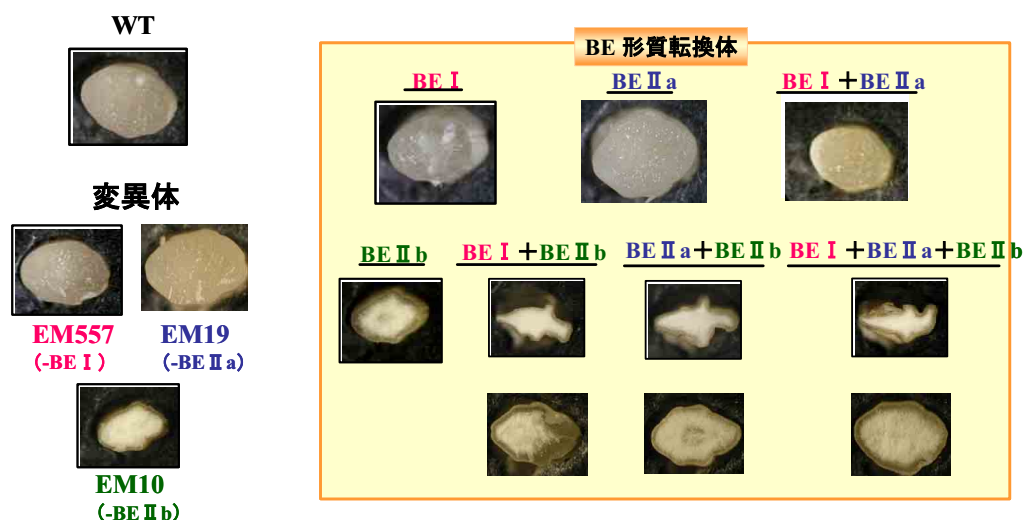


図 1 4. RNAi 法によるイネ複数 BE 遺伝子サイレンシング形質転換体シリーズの種子 (T1 世代) 断面図 (Itoh et al. 2006)。白濁度と粒のゆがみに注目。

さらに、単細胞緑藻クロレラの BE 遺伝子 (cDNA) をイネ *ae* 変異体に導入したところ、*ae* に特異的なデンプン変異形質 (アミロペクチンがやせたクラスターを持つ、デンプンが難糊化性、種子断面が白く濁るなど) が野生型のものにほぼ戻ることが T1 種子の解析で明らかになった (図 1 5)。クロレラの BE に複数のアイソザイムがあるかどうか不明である

が、しかしそれが BEI や BEIIa が正常に存在するイネ *ae* 変異体に導入された時、デンプン形質がほぼ野生型に戻る事実は、クロレラ BE がイネ BEIIb と同様の機能を有することを示唆し、極めて興味深い。しかもこの組換えデンプンは、野生型デンプンと同一ではなく、ホモ系統が単離された場合、面白いデンプン素材を有する可能性がある。

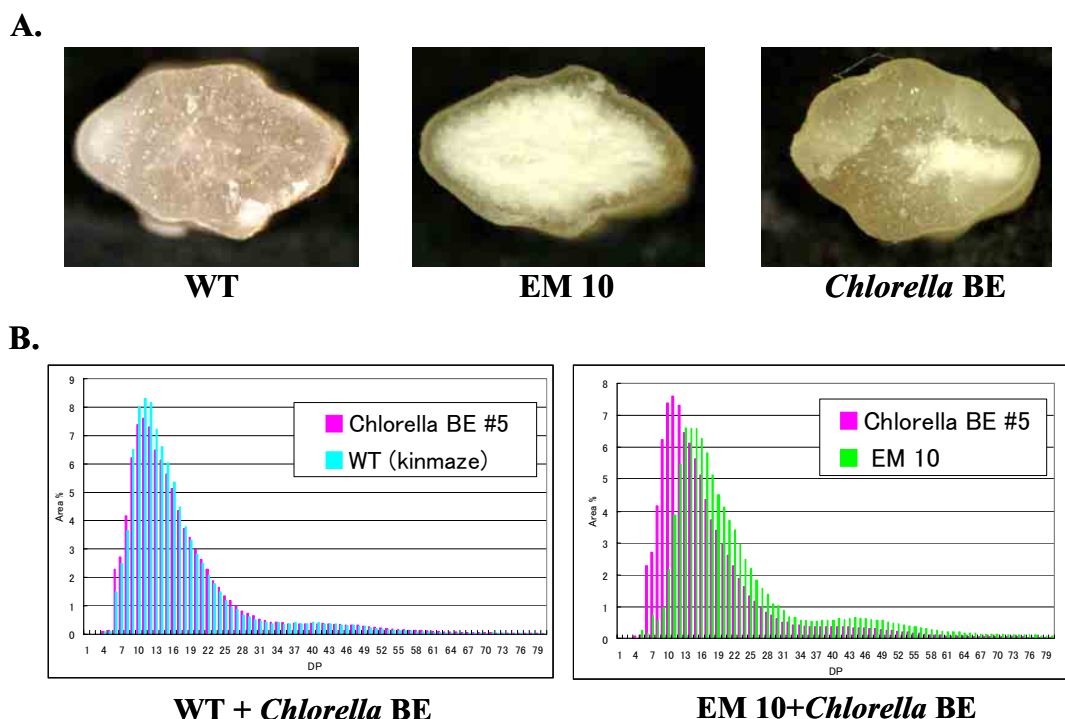


図 15. イネ *ae* 変異体 (EM10) に緑藻クロレラ *BE* (cDNA) 遺伝子を導入した形質転換体の解析 (Sawada et al. 未発表)。

A. 形質転換体種子の断面図。

B. アミロペクチン構造。形質転換体アミロペクチンの鎖長分布が変異体とは大きく変化し、野生型のものに近づいている点に注目。

3) デンプン枝切り酵素 (DBE) エンジニアリング

イネ *ISA1* の変異体である *sugary-1* (*sug-1*) 変異体の解析研究から、*ISA1* がアミロペクチン合成に必須であることを明らかにしてきたが、ここでは新規デンプンを開発する目的で、①アンチセンス法を用いた *ISA* 活性の低下した形質転換イネ、② *sug-1* にコムギ *ISA1* 遺伝子または緑藻クロレラ *ISA* 遺伝子を導入した形質転換体、③ RNAi 法によって *ISA1* と *ISA2* の発現を同時に抑制した形質転換体、をそれぞれ作成し解析した。

野生型イネにアンチセンス *ISA1* を導入した形質転換イネの中で、*ISA* 活性が約 6% に低下していた系統 (Anti-*ISA*) の胚乳は、*sug-1* が蓄積するフィトグリコーゲンと類似した可溶性ポリグルカンを含んでおり、アミロペクチンより DP12 以下の短鎖が増加し、DP13-23 が減少したポリグルカンを蓄積していた (図 16 A)。この鎖長分布の変化は、糊化開始温度の劇的な低下 (12.3°C) を引き起こし、デンプン粒の形態にも変化を生じさせた (図 16 B)。一方、*sug-1* 変異体が種子の中央部にヨウ素で染色されない可溶性ポリグルカンが局所的に蓄積しているのに対して、Anti-*ISA* は種子全体がヨウ素で染色されていた (図 16 C)。このことは、可溶性ポリグルカンが種子中に散在し、かつ、糊化温度などが劇的に変化したポリグルカン量を野生型と同等の収量で蓄積する、ユニークなコメが得られた

ことを示す(Fujita et al. 2003)。

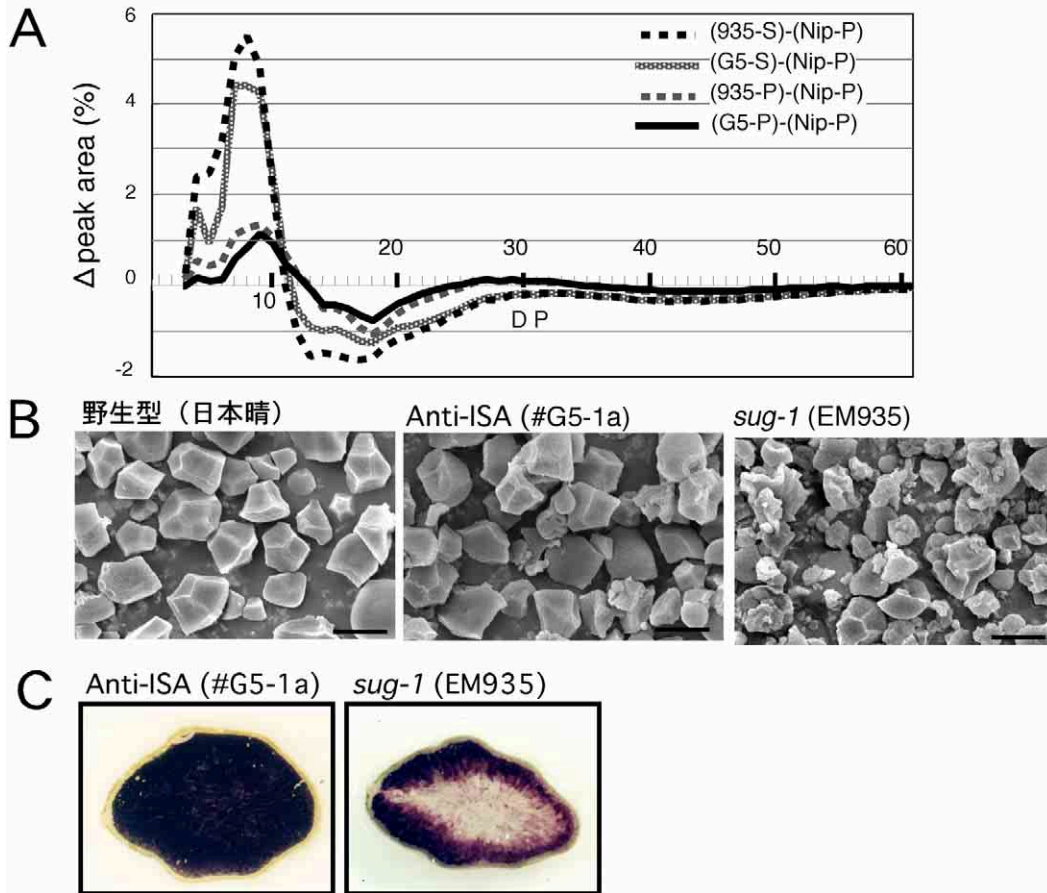


図 16. 野生型イネにアンチセンス *ISA1* を導入した形質転換体の解析 (Fujita et al. 2003)。
A. *sug-1* (EM935), Anti-ISA (#G5) の可溶性ポリグルカン (S; 600 g の遠心分離で上清にくる画分) および不溶性ポリグルカン (P; 600g の遠心分離で沈殿する画分) と日本晴のデンプン(Nip-P) の鎖長分布の差(Δ peak area, %)を示す。*sug-1*, Anti-ISA の可溶性ポリグルカンの鎖長分布は、それぞれの不溶性ポリグルカンより短鎖が多く、互いに類似している。
B: 日本晴、Anti-ISA, *sug-1* の不溶性ポリグルカン (デンプン粒) の SEM 観察。Anti-ISA では、多角形のデンプン粒に小さい粒が付着しているが、その数は *sug-1* 程ではない。Bar=5 μ m。
C: Anti-ISA と *sug-1* の登熟種子断片をヨウ素染色したもの。*sug-1* (EM935) 種子の中央がヨウ素で染まらないため、可溶性ポリグルカンが中央に局在していることを示すが、Anti-ISA は種子全体がヨウ素で染まるため、胚乳全体で約 16.2%含まれる可溶性ポリグルカンは種子全体に散在しているものと考えられる。

また、*sug-1* イネにコムギのゲノミック *ISA1* 遺伝子を導入し、コムギ ISA1 タンパク質レベルが異なる 3 系統を作出した (Kubo et al. 2005)。形質転換体の種子は *sug-1* 変異体のしわ性から正常にもどり (図 17 A)、貯蔵多糖として水溶性多糖のフィトグリコーゲンから不溶性のデンプンを蓄積した (図 17 B)。ただしアミロペクチンの分子構造は野生株と同一でなく、アンチセンス法で作出された形質転換イネのものと類似した鎖長分布を示した。また、形質転換体のデンプンの糊化温度特性は野生株と比べて同一でなく低温で糊化した。これらの結果を要約すると、コムギ ISA1 タンパク質の発現量とアミロペクチン構造の短鎖の割合との間に負の相関関係、タンパク質発現量と糊化温度特性との間に正の相関関係が認められた (図 17 C)。以上、ISA1 はデンプンの主要成分であるアミロペクチン

の構造の形成過程に直接関与する必須な酵素であることが証明されるとともに、ISA1 レベルを制御することにより、デンプンの性質もさまざまに制御することができることが明らかになった。

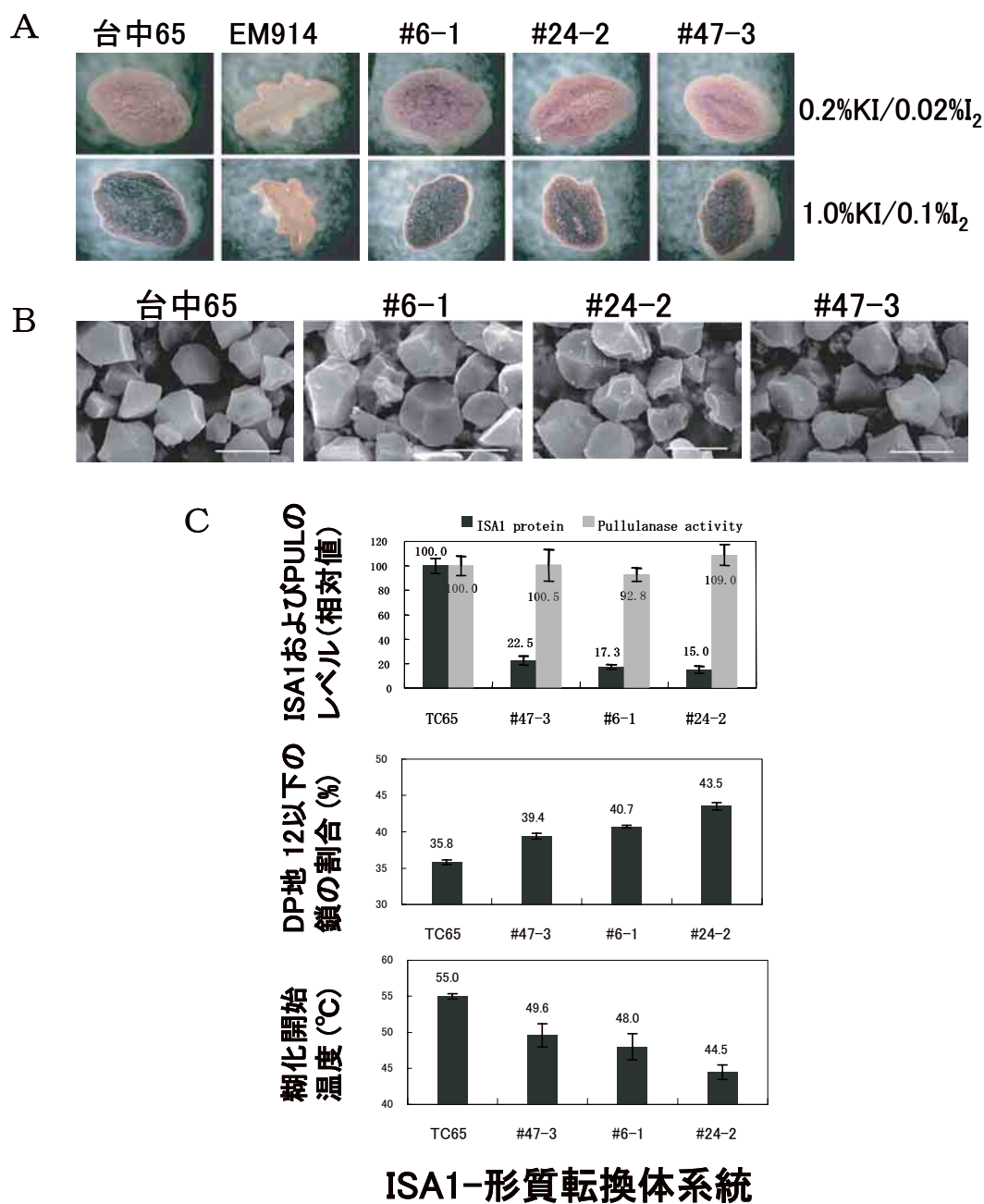


図 17. イネシュガリー-1 変異体にコムギ *ISA1* ゲノミック遺伝子を導入した形質転換体の解析 (Kubo et al. 2005)。

- A. 異なる濃度のヨウ素液と反応させたイネ種子の断面。変異体 (EM914) の種子にはフィトグリコーゲンが合成されるため、種子は凹みヨウ素には染まらないが、変異体の種子は大きさもふくらみヨウ素にも染まってデンプンが合成された (デンプン合成能が回復した) ことを示す。
- B. デンプン粒の形態。形質転換体にはデンプン特有の結晶構造をした粒が認められる。
- C. ISA1 タンパク質量、アミロペクチン構造 (DP 値が 12 以下の α -1,4 鎖の存在率) とデンプン熱糊化開始温度との関係。

さらに、*sug-1* イネに緑藻クロレラの *ISA*-cDNA を導入した。形質転換体の種子は *sug-1* 変異体のしわ性から正常にもどり、貯蔵多糖としてヨウ素に染まらない水溶性多糖のフィトグリコーゲンからヨウ素に染まるデンプンを蓄積した (図 18 A)。また鎖長分布解析からも、フィトグリコーゲンから野生株に類似したアミロペクチンができていることが示された (図 18 B)。この形質転換体のデンプンはもとの野生株のイネデンプンとは構造や性質が微妙に異なっており、クロレラ *ISA* 遺伝子の使用によって、新規デンプンが作られる可能性が示された。

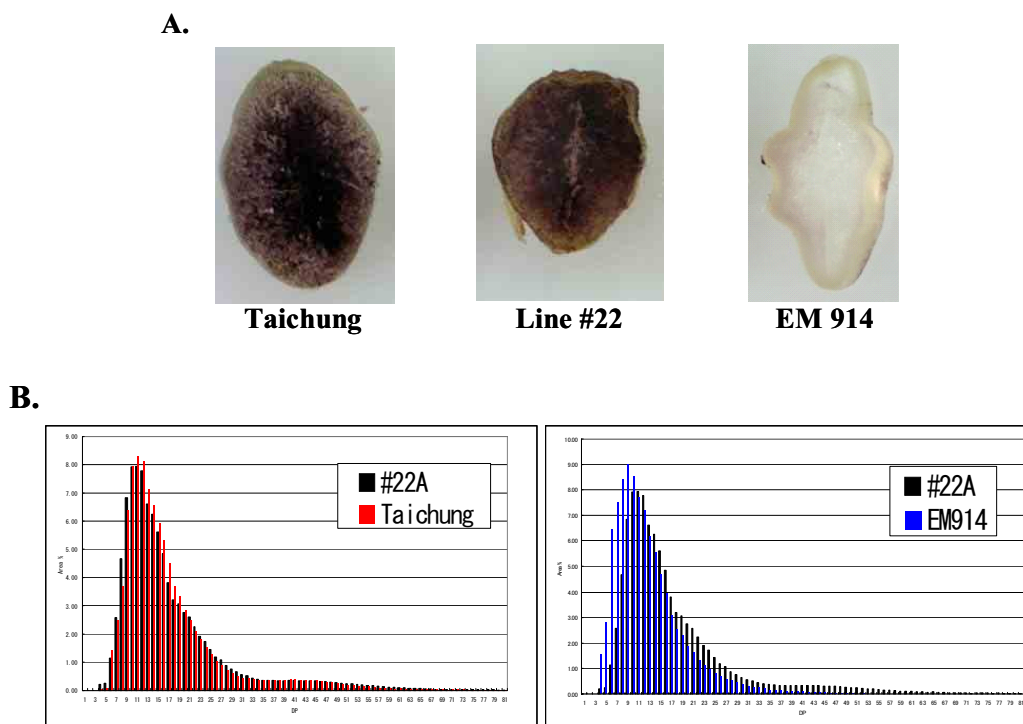


図 18. イネシュガリー-1 変異体 (EM914) に緑藻クロレラ *ISA* (cDNA) 遺伝子を導入した形質転換体の解析 (Francisco Jr. et al. 未発表)。

A. 形質転換体種子の断面図。

B. アミロペクチン構造。形質転換体アミロペクチンの鎖長分布が変異体とは大きく変化し、野生型のものに近づいている点が注目される。

第三に次の実験を試みた。既に述べたようにイネ胚乳には *ISA1* と *ISA2* が発現しており、*ISA1* ホモ複合体と *ISA1-ISA2* ヘテロ複合体の 2 タイプの酵素が存在している。しかしこれらの生理的機能、出現のメカニズム、発現量を相互に制御したときのデンプン合成系への影響などについてはまだ全く解析されていない。胚乳内特異的発現プロモーターを連結した *RNAi* ベクターを使用して、*ISA1* と *ISA2* の発現を単独もしくは同時に抑制した形質転換体を作成した (図 19)。まだ T1 世代の種子を解析中であるが、*ISA1* を抑制した形質転換イネの中に、*sug1* 変異体と同様に *ISA* 活性が顕著に欠失したものや、ホモ複合体のみが抑制された系統が観察された。また *ISA2* を抑制した形質転換イネには、*ISA1* ホモ複合体に由来すると思われる *ISA* 活性のみを持つ系統があった。これらの系統の詳細な解析は今後の検討項目であるが、*RNAi* 法によって *ISA* 複合体のデンプン合成への寄与やデンプン構造改変の効果を調査する重要な材料となることが期待される。

以上、*ISA1* がアミロペクチンのクラスター構造に必須であり、*ISA1* の活性を制御することで、野生型のデンプンとは物性が劇的に異なった新規なデンプンを人工的に生産でき

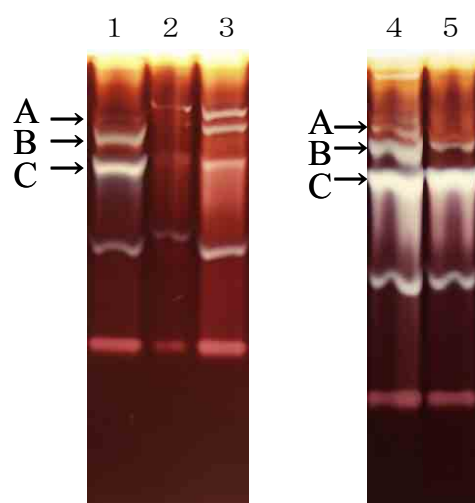


図 19. RNAi 法によるイネ ISA 遺伝子サイレンシング形質転換体シリーズの ISA 活性 (Utsumi et al. 未発表)。レーン 1, 4, 野生型 ; 2, 3, ISA1 抑制系統 ; 5, ISA2 抑制系統。図の A と B は ISA1-ISA2 ヘテロ複合体の活性バンド、C は ISA1 ホモ複合体の活性バンドを示す。

ることが示された。

成果の意義を要約してみよう。本研究によって、アミロペクチン構造を改変するデンプンメタボリックエンジニアリングが有効で、構造単位であるクラスター構造をかなり自由に改変することができ、それによってデンプン粒の構造やデンプン物性も変えることが可能であることがわかった (表 2)。イネの種子を、新規デンプンあるいは欲しい構造を持ったデンプンを生産させるための工場として積極的に利用するための基本的な筋道を確立することができた。特に SSIIa, BEIIb, ISA1 の制御によってクラスター構造をドラスティックに変化させることが可能であることを示した。特異的な機能から推定して、単一の遺伝子制御に関してはこの 3 者の制御による改変が、あらゆるアイソザイム遺伝子の制御の中で最も顕著であることを示した。

表 2. バイオテクノロジーによって達成されたアミロペクチン構造およびデンプン物性改変の事例

【アミロペクチン構造はどこまで改変可能か】	
・ ルールの存在は	遺伝子の種類による特有のパターン
・ クラスターの破壊は可能か	BEIIb 過剰発現、ISA1 抑制
【デンプンにはどのような変化が見られるか】	
・ 熱糊化特性 (粘度特性)	SSIIa, BEIIb, ISA1 レベルによって連続的に変化
・ デンプン粒の形態	BEIIb, ISA1
・ X 線回折パターン	BEIIb, ISA1
・ 保水性 (親水性デンプン)	BEIIb, ISA1
【収量への影響】	BEIIb, ISA1
【新規デンプン形質の可能性】	SSIIa, BEIIb, ISA1

デンプンを改変するバイオテクノロジーの有効性に触れる。ドラスティックな変化が実現し、天然には存在しないような構造と物性を有するデンプンを作ることが可能である。デンプンは元来、糊化性、親水・疎水性、フィルム形成能などを持つユニークな物質であるが、本方法によって、天然の植物デンプンではカバーし切れない範囲まで、物性を大幅に変動させることができ、改めて素材としてのデンプンのポテンシャルの大きさ・多様性を認識させられた。遺伝子組み換えデンプンが産業品素材として極めて有望であることを示唆している。

デンプンバイオテクノロジーが有効である背景には遺伝子操作技術特有の優位点がある。①遺伝子の発現レベルを連続的に変えることが容易に可能で（1つのコンストラクトで一連の系統が得られる）、各レベルに応じた異なるアミロペクチン構造と物性を有するデンプンを合成できる。また過剰発現効果が期待される。②異種遺伝子の導入効果が期待される。③人工遺伝子の導入による効果が期待される。プロモーターの選択により、組織・時期特異的な発現が期待される。胚乳のデンプン合成だけを制御し、他の組織には（悪）影響を及ぼさないためには、胚乳特異的な強発現を誘導するプロモーターの利用が有効である。⑤RNAi法などによって複数遺伝子の制御が可能である。これは遺伝子操作技術に特有とは必ずしもいえないが、従来の育種法に比べると格段に容易である。

類似研究と比較する。植物組換え体を利用した新規物性を持つデンプンを合成する試みは、質量とも本研究が最も充実していると思われる。ジャガイモを利用したデンプンエンジニアリングが、限られた遺伝子についてのみ成功している（Jobling 2004）。イネの組換え体に新規デンプンを合成させる試みとしては、アミロースのエンジニアリングに成功した例（Itoh et al. 2003）がある。イネアミロペクチンのエンジニアリングは本研究の外は例を見ない。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究によって、デンプンメタボリックエンジニアリングの有効性（通常の育種法では達成できない顕著で特異的な効果が達成できる、獲得した新形質が極めて安定的に継代されるなど）が実証され、技術的な基礎（どの遺伝子の制御が効果的で、どのような効果が期待できるか、プロモーターの選択によってどのような表現型の違いが発生するかなど）もほぼ確立された。これらは天然のデンプンでは得られない画期的な性質を有する新素材とも考えられ、生分解性の新たな生物系高分子として今後産業利用されることが期待される。一例を挙げると、こうしたバイオデンプンの広範囲にわたって異なる保水性・耐水性は、従来のデンプン物性の概念を変えるもので、従来法では生デンプンを化学修飾などの処理をした加工デンプンでしか得られない物性であり、今後、こうしたユニークな特性を生かした利用法の検討や新商品の開発研究が望まれる。デンプンの産業的利用分野のエキスパートとの共同研究が期待される。

また、本方法によって得られる α ポリグルカンの構造は実に多岐にわたっており、これらを酵素処理して新しい構造を持つオリゴ糖を生産するなどといったことも十分可能で、その中には生理作用を持つものも当然含まれるであろう。「スターチグリコミクス」といった新しい研究分野ができる可能性も否定できない。

ただし本研究で実際に制御した遺伝子の種類はまだ限定的であり、今後本研究で取り扱わなかった遺伝子の制御によって画期的な新デンプン素材が誕生することも十分期待される。また複数遺伝子を同時に制御する方法も、本研究ではBEでのみ実施中であるが、新たな展開が望まれる。また今後は、転写因子制御によるデンプンメタボリックエンジニアリングも、基礎・応用研究両面において、極めて有効であろう。

もっと将来的には、本研究の成果を踏まえて、植物の種子の成分比（生産物質の分配率）を変えたり、種子に高付加価値の新物質を合成させたりする分野の展開が加速すると期待される。

3. 3 藻類ポリグルカン合成系の解析と利用 (秋田県大、シアノバクテリア; 東薬大、紅藻および緑藻)

(1) 研究実施内容及び成果

植物においてデンプン合成は色素体 (プラスチド) という細胞内小器官で行われる。色素体は、同化デンプンが合成される葉では葉緑体 (クロロプラスト)、貯蔵デンプンの合成の場である穀類の胚乳や、イモの塊茎ではアミロプラストとして存在し、形態や代謝様式などが大きく異なるが、これらは同一起源の細胞内小器官から派生、分化したものであり、色素体はその総称である。そしてこの色素体は約十数億年前、現在のシアノバクテリア (ラン藻) の近縁生物が原始真核生物に取り込まれ、細胞内共生を成立させたことが起源であると考えられている。この原始シアノバクテリアの細胞内共生により、現在の灰色藻、紅藻、緑色植物の各系統が誕生したとされている。

貯蔵ポリグルカンの代謝に目を向けると、シアノバクテリア、灰色藻、紅藻、緑色植物はいずれも α -ポリグルカンを生産することから、相互の関連性が想像される。しかしながら、本プロジェクト開始時点では、各生物種、特に藻類の貯蔵多糖はラン藻デンプン、紅藻デンプンなどと呼ばれ、極めて大まかな理解しか得られていなかった状況であった。

紅藻のポリグルカン合成については、色素体内ではなく細胞質で行われ、デンプン合成酵素は基質として UDP-グルコースを用いるとする報告 (Nyvall et al. 1999) がなされていたが、全般に情報は断片的であり、分枝多糖の詳細な分子構造や、アミロースの有無など、重要な問題が未解決であった。

一方、緑色植物のデンプンは、ADP-グルコースを基質として合成される点でシアノバクテリアとの共通性が深い。しかしながら、シアノバクテリアが一般に原始的なグリコーゲンを蓄積するのに対し、緑色植物では貯蔵多糖の分子種としてアミロペクチンとアミロースへの分化が見られること、アミロペクチンが精密なクラスター構造を形成していること、DBE (ISA1) がアミロペクチン (クラスター構造) の形成に大きく関わっていること、AGPase、SS、BE、DBE がそれぞれ多重遺伝子ファミリーを構成していること、などシアノバクテリアには見られない多くの特徴が認められ、しかもこれらの諸性質は単細胞緑藻 (*Chlamydomonas*) において既に確立している。すなわち細胞内共生による色素体の成立後、早い段階で、デンプン代謝は爆発的とも言える進化を遂げたことが考えられる。

こうした進化過程を理解することは、デンプン代謝の機構そのものを解明する上でも大きな手がかりとなる。しかし従来、一部の緑藻を除いて多糖代謝に焦点を当てた研究は数少なく、断片的な知見しか得られていなかった。また、ポリグルカン構造に関する知見は分析手法が古く、データの精度や信頼性に欠けていた。このような背景のもと、シアノバクテリア、紅藻、緑藻におけるポリグルカン構造の解析および合成代謝の詳細かつ体系的な研究をめざして解析を開始した。

1) 藻類ポリグルカンの構造解析

ア) シアノバクテリアのポリグルカン構造

既に述べたように、一般にシアノバクテリアはグリコーゲンを合成するといわれてきた。26 種のシアノバクテリアについて貯蔵多糖の鎖長分布を解析したところ、多くが短鎖 ($DP \leq 8$) に富み、 $DP \geq 37$ の長い鎖がほとんど含まないグリコーゲンを蓄積していた中で、 $DP \geq 37$ の長い糖鎖の含量が高い (3.3–4.6%) 種が 3 種見出された (図 20)。この 3 種では、貯蔵多糖のピーク鎖長が DP 10-11 に認められ、他の種が生産するグリコーゲン (ピーク鎖長 DP 4-8) とは異なる形態を示したことから、これら新奇多糖を「セミアミロペクチン」と命名した (Nakamura et al. 2005)。この 3 種のうち *Cyanobacterium* sp. MBIC10216 株のセミアミロペクチンをゲルろ過カラムにかけたところ、その溶出位置は一般的なシアノバクテリアグリコーゲンより早く、イネアミロペクチンと同等であったことから、高分子量であることが示唆された。こうして本研究によって、シアノバクテリアにはすでにグリコーゲンとは明らかに構造の異なり、アミロペクチンに近づいた構造をもつポリグルカンを合成する種が存在することを示す信頼性のあるデータが初めて示された。

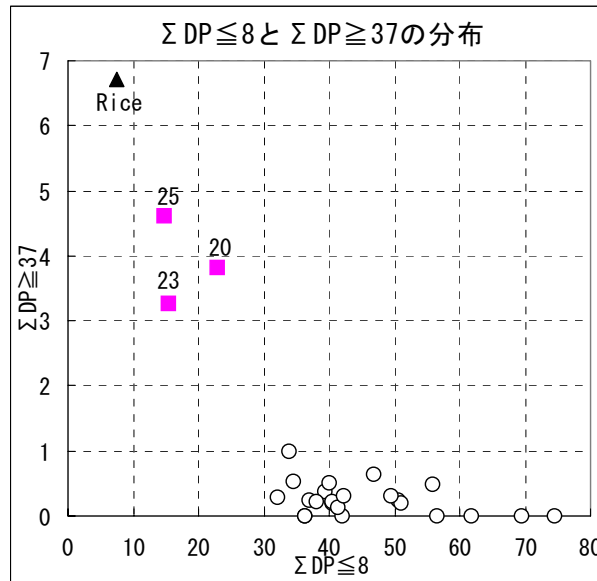


図 20. シアノバクテリアにおけるポリグルカン構造 (Nakamura et al. 2005)。
ほとんどのシアノバクテリアが、短鎖 ($DP \leq 8$) に富み (30-75%)、 $DP \geq 37$ の長い鎖がほとんど含まないグリコーゲンを蓄積していた中で、 $DP \geq 37$ の長い糖鎖の含量が高く (3.3–4.6%)、短鎖 ($DP \leq 8$) の含量が少ないシアノバクテリアが 3 種見出された (#20, *Myxosarcina burmensis*; #23, *Synechococcus* sp. BG043511; #25, *Cyanobacterium* sp. MBIC10216)。

イ) 紅藻のポリグルカン構造

原始紅藻の *Porphyridium purpureum* のポリグルカンを単離し、鎖長分析やゲルろ過クロマトグラフィを用いて解析したところ、アミロースを含むセミアミロペクチン型のポリグルカンであることが明らかになった (図 21)。一方、*Gardieria sulphuraria* のポリグルカンはグリコーゲンによく似た構造であることが判明した。そこで、その他の原始紅藻類の培養系を確立し、ポリグルカンを単離して解析したところ、*Cyanidium caldarium* もグリコーゲン型を示し、*P. sordidum*、*Rhodelia violacea-maculata* complex、*Rhodorus marinus*、*Gelidium* sp. のポリグルカンはアミロースを含むセミアミロペクチン型であった。以上の結果から、原始紅藻類は、グリコーゲンに似たポリグルカンを蓄積する種と、セミアミロペクチンとアミロースを蓄積する種とに分けられることが明らかとなった。これまで、紅藻類でアミロースを持つという報告は 1 報だけ知られているが、その真偽は不明であったが、本研究により、紅藻類にアミロースを持つ種が存在することが事実となった。また、原始紅藻類の貯蔵ポリグルカンの詳細な構造と分布はほとんど不明であったが、本研究によって、シアノバクテリアのグリコーゲン蓄積能力をひき継いだと思われる種群と、ポリグルカン合成系が変化して緑藻のポリグルカン合成系に似ていると思われる種群とに、進化の過程で変化したのではないかと推測できる。

ウ) 緑藻のポリグルカン構造

藻類には一般に、リブロース 1,5-二リン酸カルボキシラーゼから成るピレノイドが存在し、その周囲を覆うデンプン鞘 (ピレノイドデンプン) とストロマ中に存在するストロマデンプンとがあるが、これを分けることは難しい。そこでクロレラ細胞を用い、ほとんどストロマデンプンのみを持つ細胞と、ほとんどピレノイドデンプンのみを持つ細胞のデンプンを抽出して解析した。単離したストロマデンプンは円盤状であるのに対し、ピレノイドデンプンは碗状あるいはカップ状の構造をもっていた (図 22)。また、ピレノイドデンプンには鎖長の短い側鎖が比較的多いが、両者ともアミロペクチンとアミロースからなるポリグルカンであった。

図 2 1. 紅藻 *Porphyridium purpureum* のポリグルカン構造 (Shimonaga et al. 投稿中)

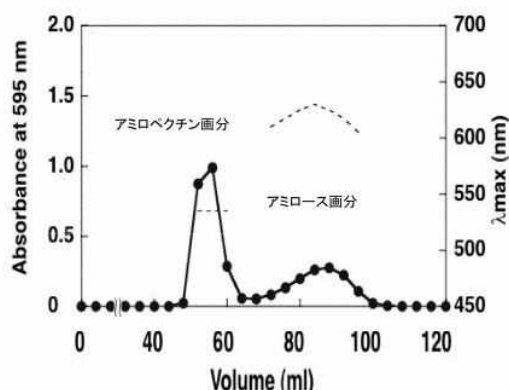


図 2 2. 緑藻クロレラのデンブンプン構造 (Oyama et al. 投稿中)。



2) シアノバクテリアのポリグルカン合成系の解明 (秋田県大 ; 光合成活性など東薬大) ア) 変異体の作成と解析

植物におけるデンブンプン合成機構を解析する上で、はるかに簡素な貯蔵多糖 (グリコーゲン) 合成系をもつシアノバクテリアは、優れたモデルシステムを提供する。陸上植物ではデンブンプン合成に関わる酵素系に多くのアイソザイムが存在するのに対し、最近ゲノム配列が決定された *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株では AGPase、GS、BE、DBE の遺伝子が 1 つずつのみ見出され、解析を行う上で適していると考えられた。また、*S. elongatus* PCC 7942 株をはじめ数種のシアノバクテリアは、高頻度で形質転換を起こすことが知られており、遺伝子の改変を通じて、代謝生理を研究する上でよい研究材料となっている。

S. elongatus PCC 7942 株を材料に、AGPase、GS、BE、DBE の変異株を作成した。AGPase 変異株においては、AGPase 活性が検出限界以下にまで低下していた。また、同時に GS 活性も野生株の数分の 1 に低下していることが明らかとなった。

GS 変異株と AGPase 変異株では、多糖合成における基質の供給、あるいは糖鎖の伸長活性が消失しているため、炭水化物代謝が大きく影響を受けていることが推測された。*S. elongatus* PCC 7942 株では、高浸透圧ストレス条件下でショ糖を合成することが知られている (Reed et al. 1984; Mackay et al. 1984)。そこで培養途中で 0.2 M NaCl を添加し、細胞内炭水化物含量に及ぼす影響を検討した。野生株ではグリコーゲンの蓄積が認められ、高浸透圧ストレス後に変動が見られるものの、ほぼ一定レベル (300 – 400 nmol/ml/OD730)

で推移した。一方シヨ糖は低塩濃度の培養条件では検出されず、高浸透圧ストレス後 4 時間以内に急速に蓄積が認められた。これに対し、AGPase、GS 変異株では、グリコーゲンの蓄積量は検出限界以下であった。また、高浸透圧ストレス後、シヨ糖含量が上昇するまで 1 日以上を要し、野生株の約 1/2 の値で一定レベルに達した。以上の結果から、シヨ糖は貯蔵多糖からだけでなく、二酸化炭素からの新生経路によっても供給されること、貯蔵多糖の動員はシヨ糖の合成ばかりではなく、高浸透圧ストレス条件下でのエネルギー生産においても重要な役割を担っていることが示唆された。

野生株のグリコーゲンは、DP = 6 に分布の最大値を示し、加えて DP = 8 に極大を示すのに対し、BE 変異株由来の貯蔵多糖は DP ≤ 10 の糖鎖が減少し、代わって 10 残基以上の糖鎖が顕著に増加することが認められた (図 2 3)。

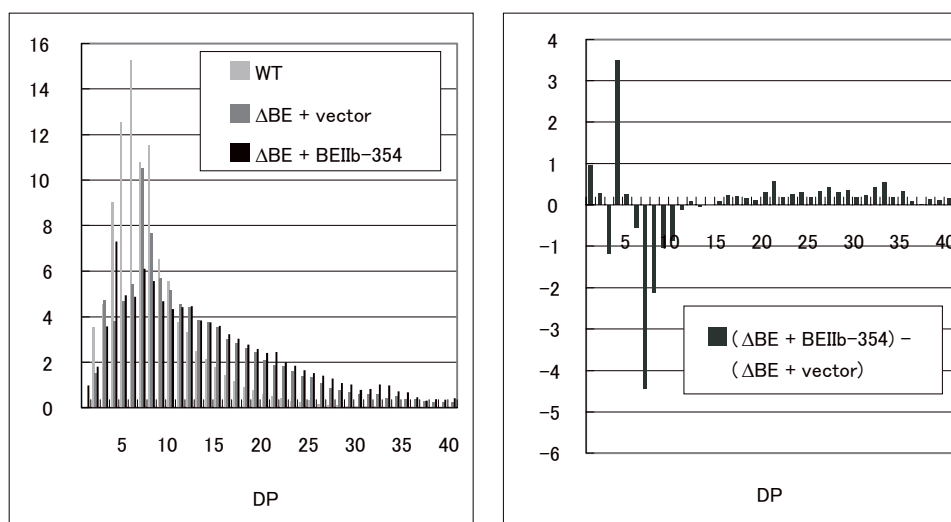


図 2 3. BE 変異株、形質転換株のポリグルカンの構造 (鎖長分布)。上段, *Synechococcus* 野生株 (WT)、BE 変異株に対照として遺伝子を含まないプラスミドベクターを導入した株 (Δ BE + vector)、および BE 変異株にイネ BEIIb 遺伝子を導入した形質転換株 (Δ BE + BEIIb-354) におけるポリグルカンの鎖長分布。下段、形質転換株とその親株である変異株での各鎖長の存在比率の差 ($(\Delta$ BE + BEIIb-354)-(Δ BE + vector))。上下図のいずれにおいても、横軸は鎖長 (グルコース重合度) を示し、縦軸は各鎖長の量の全鎖長の合計量に対する比率 (%) を示す。

DBE (GlgX)変異株では多糖蓄積量が野生株の 1/2 以下であった上、暗黒下の多糖分解速度が著しく減退し、60 時間後においても約 1/2 が未分解のまま残存していた。変異株貯蔵多糖の鎖長分布を調べた結果、DP = 2 の極超短鎖の比率が増大していることが明らかとなった (図 2 4)。これらの結果から、シアノバクテリアにおいて DBE は貯蔵多糖の分解に大きな役割を果たし、分子形態に影響を及ぼすことが明らかとなった。

イ) 形質転換体の作成と解析

以上の本研究で作製されたシアノバクテリア変異株を宿主として、イネのデンプン合成に関わる遺伝子の導入を行った。

BE 変異株にイネ BEIIb 遺伝子を導入した形質転換株では、DP 7 - 8 の鎖が減少し、短鎖 (DP 4 - 5) の割合が増大した (図 2 3)。この結果から、*Synechococcus* において BEIIb は DP = 8 以下の短いグルカン鎖に作用して、転移反応を行うことが示唆された。

次に *Synechococcus* DBE 変異株に、ラン藻 *Synechocystis* PCC 6803 株由来の DBE 遺伝子を導入した。*Synechocystis* は 2 種類の DBE 遺伝子を持つので、双方について形

質転換株を作成した。いずれの形質転換株においても、親株と比較して短鎖の比率が減少した（図 2 4）。従って、異種生物由来の遺伝子が形質転換株において機能していることが示された。本実験結果から、ラン藻の形質転換系が異種生物由来の遺伝子の機能解析において極めて有用であることが明らかとなった。

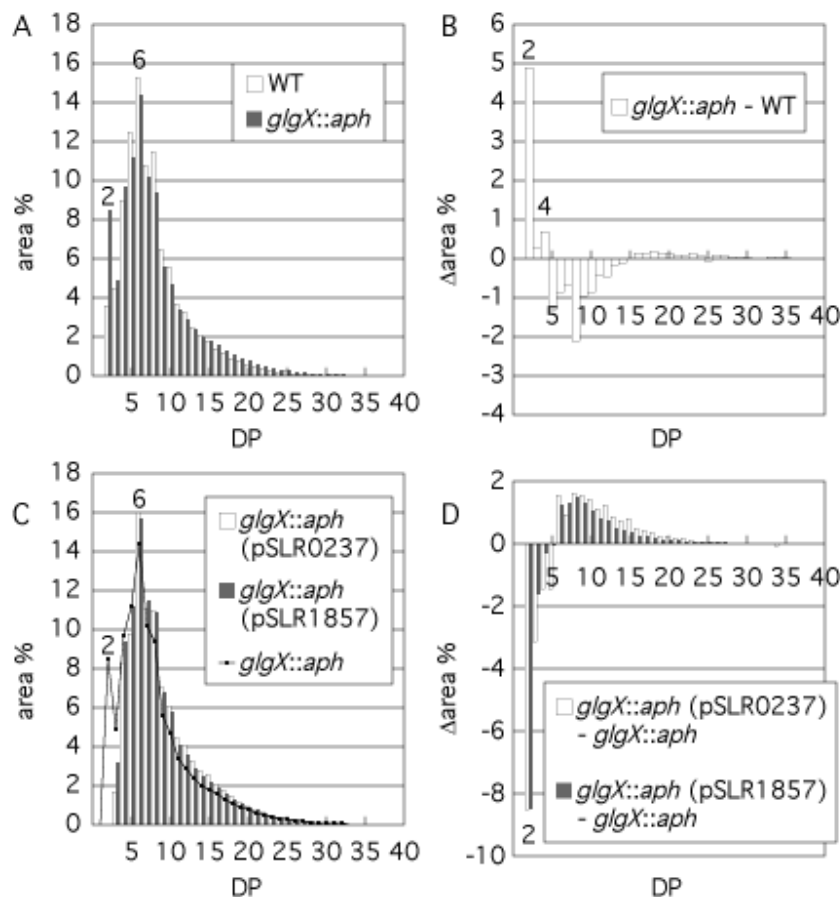


図 2 4. *Synechococcus elongatus* PCC 7942 野生株、DBE (GlgX) 変異株、および DBE 変異株に *Synechocystis* sp. PCC 6803 の DBE 遺伝子を導入した形質転換株における貯蔵多糖の鎖長分布。

3) 藻類のゲノム (遺伝子大量) 解析

通常のグリコーゲンではなく、セミアミロペクチンを合成するシアノバクテリアの 1 種 *Cyanobacterium* sp. MBIC10216 株の新奇多糖を生産する遺伝的背景を明らかにするため、ゲノム DNA についてショットガンライブラリーを構築し、網羅的な配列決定を行った。ショットガンライブラリーから得られた 12,600 配列データから 1,800 のコンティグ (連結配列) が生成された。その総計は 225 万塩基となり、近縁種と考えられる *Synechocystis* sp. PCC 6803 株のゲノムサイズ 360 万塩基対の約 63% に相当する値となった。多糖代謝を担う酵素として AGPase、GS (2 種)、BE (3 種)、イソアミラーゼ、ブルナーゼ、ネオブルナーゼ、ホスホリラーゼの各遺伝子断片を含むクローンが同定された。これまで知られている限りシアノバクテリアには単一の BE 遺伝子が存在するのみであることから、この株がセミアミロペクチンを合成する原因を解明する良い材料になる可能性がある (図 2 5)。

			○	▽▽		
<i>Escherichia</i> BE	296	SWGYPQPT	26 LNVI	64 GIDALRVD	111 VLPLSHDEV	200
<i>Synechococcus</i> BE	331	SWGYPQVT	26 IGVI	64 HIDGIRVD	111 MLALSHDEV	211
<i>C. MBIC10216</i> BE1	?	SWGYPQVV	26 IGIL	64 HIDGIRVD	109 MLSLSHDEV	?
<i>C. MBIC10216</i> BE2	?	-----	---	HIDGIRVD	111 MLAFSHDEV	?
<i>C. MBIC10216</i> BE3	189	SWGYPVVG	26 IGVI	64 GIDGARID	139 AMN-THDEC	?

図 25. 枝作り酵素 (BE) アミノ酸配列中の保存領域の比較. 活性中心 (D, ○) および基質結合部位 (DE, ▽) を示す。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究の結果、シアノバクテリアの多糖代謝を司る主要酵素について、その変異株を網羅することができた。特に AGPase、GS 遺伝子の変異により多糖蓄積能を完全に欠損した株が取得できたことから、シアノバクテリアにおける多糖代謝が非常に可塑的であることが示唆された。内在性の活性が消失したことにより、外来遺伝子産物としての酵素特性を、バックグラウンドの影響なく解析できる系が確立したことになる。すなわち、陸上植物ほか、各種光合成生物（緑藻、紅藻）由来の遺伝子を導入する宿主として、これら変異株を駆使することにより、デンプン代謝に関わるアイソザイムの特性を個別に検討する上で、強力な実験系が得られたと言える。

Synechococcus の GS 変異株における、イネ SS アイソザイム発現により、特異な鎖長分布を示す多糖生産が認められた。この結果から、外来遺伝子産物がシアノバクテリア細胞内で見事に機能を発揮すること、蓄積した多糖の構造にそれぞれのアイソザイムの特性が反映されていること、しかしながら共存する内在性酵素（この場合 BE など）の活性に強く影響を受けていることが明らかになった。

Cyanobacterium sp. MBIC 10216 株をはじめとする、セミアミロペクチンを生産するシアノバクテリアが見出されたことで、グリコーゲンからの劇的な多糖構造の変化がシアノバクテリアにおいても起こることが実証された。シアノバクテリアのゲノムサイズ（数 Mbp）を考慮すると、多糖構造の差違は、極めて限られた数の遺伝子の変化に基づくものと推察される。*Cyanobacterium* sp. MBIC 10216 株では、複数の BE 遺伝子が見出されたことが極めて特徴的であるが、これが、セミアミロペクチン合成に関わっているかどうかは、今後形質転換型シアノバクテリア (*S. elongatus* PCC 7942) への遺伝子導入とその解析により、直接的に検証することが可能である。

以上の知見は、今後のデンプン・メタボリックエンジニアリングの展開において重要な示唆を与えるであろう。

3. 4 新規ポリグルカン構造解析法の開発（静岡大学 碓氷グループ）

(1)研究実施内容及び成果

1) NMR法による構造解析

NMR法は、分子が構成している個々の原子のグループについて微視的な知見が得られるので糖質の構造研究の分野でも不可欠な研究手段となっている。一般に糖質のプロトン NMR ($^1\text{H-NMR}$) スペクトルは、シグナル同士の重なりが多く、完全に解析することは困難である。しかしながら、高分解能 NMR 装置が開発され、それに伴い測定法も発達してくると糖質の構造研究にも積極的に利用されるようになってきた。

そこで NMR 法により標準糖であるマルトオリゴ糖(重合度 2~7)と、アミロペクチン分子に関連した 1 1 種の同一分子内に(1-4)と(1-6)結合の両方を持つオリゴ糖 (重合度 3~6)

を測定し、アミロペクチン構造解析のためのデータベースの集積を行った。重合度 2～7 の直鎖マルトオリゴ糖の重水中での ^1H および ^{13}C -MNR を測定し構造の規則性と周期性を重点に解析し基礎データを集積した。このデータに基づいてアミロペクチンの部分構造である 11 種の分岐オリゴ糖 (パノース (P)、イソパノース (IP)、 $6^2\text{-O-}\alpha$ -マルトシルマルトース (MM)、 $6^3\text{-O-}\alpha$ -グルコシルマルトトリオース (GM3)、 $6^2\text{-O-}\alpha$ -イソマルトシルマルトース (IMM)、 $6^2\text{-O-}\alpha$ -マルトシルマルトトリオース (MM3)、 $6^4\text{-O-}\alpha$ -グルコシルマルトテトラオース (GM4)、 $6^2\text{-O-}\alpha$ -マルトシルマルトテトラオース (MG4)、 $6^5\text{-O-}\alpha$ -グルコシルマルトペンタオース (GM5)、 $6^3\text{-O-}\alpha$ -マルトトリオシルマルトトリオース (M3M3)、 $4^3\text{-O-}\alpha$ -パノシルパノース (PP) など) を解析した(図 26)。測定条件を以下に示す。

測定条件

機種：JEOL JNM-LA 500MHz

溶媒：重水 (D₂O)

温度：30℃

糖の濃度：0.1~0.5 μM

内部標準：TPS(トリメチルシリルプロパンスルホネート)

化学シフト：TPSからの低磁場シフトをδで表し、ppm (part per million) を単位として表示

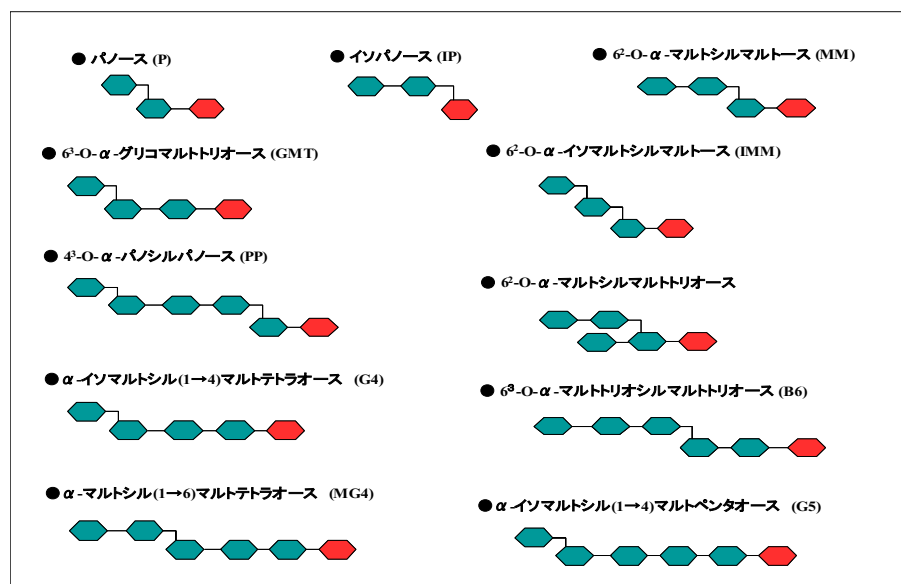


図 26. 解析用サンプル一覧

2) MS法による構造解析

MS法とは質量分析計を用いて、目的の化合物を何らかの形でイオン化させ、ついで生成したイオン質量と電荷の比で分離し、各種のデータを得る手段である。一般的に糖鎖は多くの構造異性体が存在するため、MS法により得られる情報は分子量と構成単糖の配列のみとなり、構造を決定することは困難である。例えば、グルコオリゴ二糖の場合、1-1、1-2、1-3、1-4、1-6結合の5種と、それぞれについてグルコシド結合α型とβ型配向2種の合計11種類のグルコース間の結合様式が存在し、これらをMS法で解析することは難しいとされてきた。そこで、MS法とNMR法と併用することによりアミロペクチン関連分子グルコオリゴ糖の糖鎖の配列や枝分かれに関する構造情報を得る事を目的とした。ここ数年で市販されている装置に主体は、2台の質量分離部を直列につなげたタンデム型

MS/MS が利用されるようになってきている。この原理は、イオン源で生成したさまざまな m/z のイオンを一つ目の質量分離部 (MS1) で分離し、特定の質量のイオンのみを四重極で構成された衝突室に導入し、He などのガスを衝突させることにより分解する。分解で得られたイオンを二つ目の質量分離部 (MS2) で分離しその質量を測定する。

そこで MS 法により標準糖であるマルトオリゴ糖(重合度 2~7)と、アミロペクチン分子に関連した 1 1 種の(1-4)と(1-6)結合の両方を持つオリゴ糖 (重合度 3~6) を測定し、アミロペクチン構造解析のためのデータベースの集積を行った。オリゴ糖を直接 Q-TOF MS/MS (四重極飛行時間型 MS/MS) を用いて質量測定し、各オリゴ糖を測定した。測定条件を以下に示す。

測定条件

機種：Waters Micromass Q-ToF Ultima API

Nanoflow ESI probe, glass capillary 使用

イオンモード：陽イオンおよび負イオンモード (Positive or Negative mode)

電圧：1 KV

サンプル濃度：オリゴ糖 0.1 mg を H₂O/MeOH=50/50 溶液 1 ml に溶解

<成果>

アミロペクチンの分子構造とりわけ α -1,6 結合の分岐周辺に関し精密な情報を得るための微細構造解析に関しては必ずしも確立されている方法があるわけではない。その主な理由としては、分岐オリゴ糖のグルコース配列順序を決定するための簡便かつ微量分析による汎用性の高い構造解析法が未だ確立されていないからである。これまで複雑に分岐したホモグルカンであるアミロペクチン分子の構造解析は、酵素を作用させた分解物を重合度別に丹念に分離し、メチル化分析、アセトリシス、スミス分解などによる化学的手法に依存し、煩雑な操作とともに多大な労力、時間、手間そして試料 (mmol 以上) を要してきた。従って、ポリグルカンの構造解析とりわけデンプン中のアミロペクチン分子の微細構造解析に関し、特に微量の解析法やルーチン化した新たな解析法の台頭が求められている。一方、糖鎖生物学の分野では複合糖質 (糖タンパク質や糖脂質) のオリゴ糖鎖の生化学的役割が明らかになるに連れて、その糖鎖構造解析に関し、その微量解析法やルーチン化した解析法の進歩は目覚ましい。これと比較し、デンプン科学分野でのこの種の構造解析の手法は著しく遅れを取っている。

1) オリゴ糖の NMR 解析

a) 3 糖 (パノースとイソパノース)

¹H-NMRにおいて、グルコオリゴ糖のアノメリックプロトンシグナルは他の環状プロトンよりも特異的に低磁場に化学シフトを示し、グルコピラノースのようにC1 立体配座を取る場合、アノマー水素は α -D-水素 (アクシャル) のほうが β -D-水素 (エクアトリアル) よりも高磁場に観測される。そして、そのアノメリックプロトンシグナルの示すビシナル水素の結合定数 ($J_{1,2}$) はビシナル水素間の二面角に大きく依存する。従って、グルコオリゴ糖の立体化学を考える上でアノメリックプロトンの化学シフトと結合定数は重要な意味を持っている。図 2 7 にイソパノースの 500MHz ¹H-NMR スペクトルを示す。

アノメリックプロトン (H-1) は他のプロトンと分離して 4.6 ppm 以下の低磁場領域に観測されるため、2 位のプロトン (H-2) との間に観測されるスピン結合定数 $J_{1,2}$ の大きさを容易に読み取ることが出来る。 $J_{1,2}$ の大きさは糖のアノメリック配向を反映しグルコースで α 型の $J_{1,2}$ は 3~3.5 Hz、 β 型の $J_{1,2}$ は 8~8.5 Hz となる。従ってアノメリックプロトンのスピン分裂のパターンによりグルコースのアノメリック配向を決定することが出来る。アノメリック配向の決定は他の方法では比較的手間のかかる問題であり、この点 NMR 法は利点の一つといえる。また、還元末端の H-1 は α 体と β 体の平衡組成がピークの大きさに反映されることから容易にグリコシド結合に関するアノメリックプロトン (H-1', H-1'') と区別が出来る。さらに同じ結合配向であっても結合位置の違いにより(1-4)結合由来の H-1'' は 5.393

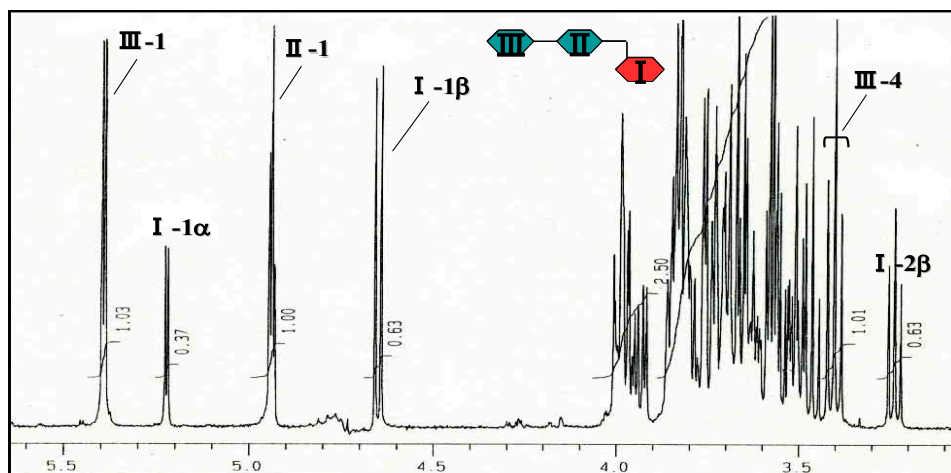


図 27. イソパノースの ^1H -NMRスペクトル

ppmに、(1-6)結合由来のH-1'は4.94 ppm付近に出現し化学シフトが異なる。構造異性体であるパノースも、この両結合に対応したH-1'とH-1''の化学シフトを示す。両者の違いはイソパノースの場合、還元末端グルコース残基の影響で α と β 体由来のH-1'シグナルとして観察されることである(図28)。通常の ^{13}C -NMRスペクトルは ^1H スピンドカップリング条件下で測定するので、スペクトルはスピン-スピン結合による分裂を含まず、化学シフトの差異で分離したシグナルのみから成る。そして ^{13}C -化学シフトの範囲は、 ^1H -化学シフトの約20倍と非常に大きくシグナルの幅が広いので、孤立したシグナルとして観察できる場合が多い。図28にイソパノースの ^{13}C -NMRスペクトルを示す。 ^1H -NMR同様に低磁場側にアノメリック炭素に由来する5本のシグナルが出現し、最も低磁場にグリコシド炭素が β 配向に由来するC-1''(100.49 ppm)およびC-1'α(98.72 ppm)、C-1'β(98.67 ppm)が、 α -体と β -体に対応するC-1β(96.96 ppm)、C-1α(93.07 ppm)が出現し、両異性体シグナルの相対強度は平衡組成を反映し、他の環状炭素と明白に区別できる。このように同じ β 結合糖であっても、(1-4)結合か(1-6)結合かによってグリコシド炭素の化学シフトが約1.5 ppm程度の違いを示すこと、また還元末端のアノマー炭素と容易に区別できることが判る。さらに、グリコシド結合配向のみならず、その結合に関与している結合位置に由来する炭素も容易に解析が可能である。即ち、70-77 ppmの領域は環状炭素のC-2~C-5由来のシグナルである

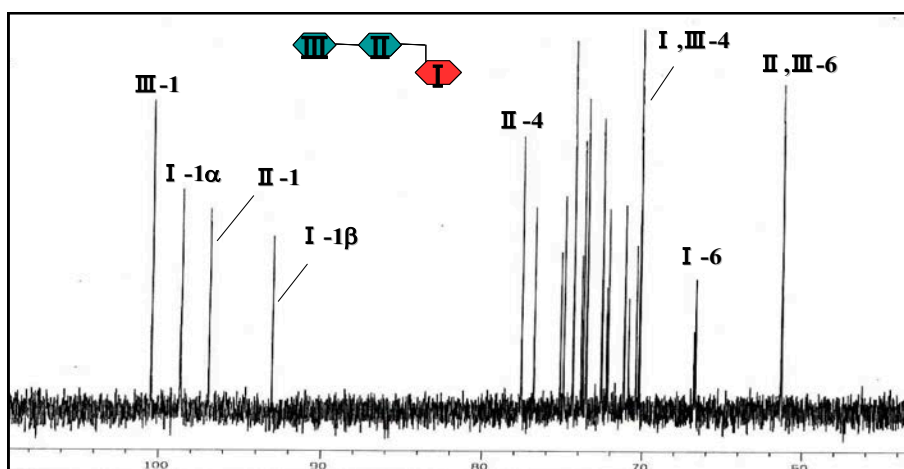


図 28. イソパノースの ^{13}C -NMRスペクトル

が最も低磁場に出ている77.59 ppmは結合位置C-4シグナルである。最も高磁場側の61 ppm付近のシグナルはヒドロキシメチル基(-CH₂OH)由来の炭素シグナル(C-6'、C-6'')であり、66.82と66.72 ppmは、それぞれ(1-6)結合でグルコースに置換したC-6 α とC-6 β に由来する。このように、環炭素の水酸基およびヒドロキシメチル基がグリコシド結合すると、4~5 ppm低磁場側にグルコシルシフトするので、容易に結合位置の炭素と同定できる。このように、三糖程度のオリゴ糖であれば還元末端からの化学シフトの情報からグルコース配列順序の解析が可能である。一方、構造異性体であるイソパノースとパノースのNMRスペクトルは酷似しており、両者を区別するには丹念な解析が必要となる。図29にアメリック領域での¹³C-NMRとイソパノースのCH-COSY NMRスペクトルを示した。

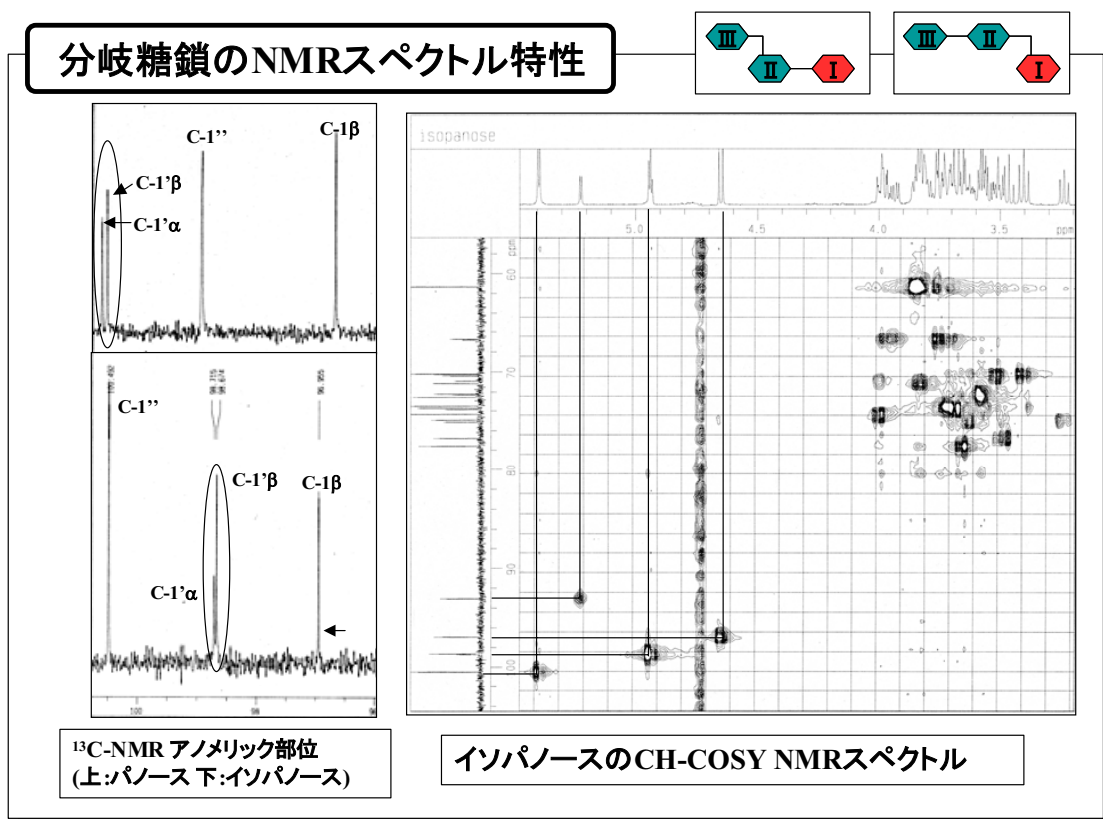


図29. 分岐糖鎖のNMRスペクトル特性

この場合、パノースはC-1'が、イソパノースはC-1''が僅かな化学シフト値の違いによって α 、 β 両異性体によるシグナルに分裂することから還元末端からのグルコースの配列順序を読み取ることが出来る。CH-COSYでは¹Hプロトンと¹³C炭素シグナルのクロスピークをたどればすべてのプロトンと炭素を確実に帰属することが出来る。特に、¹Hプロトンでは約3.5~4 ppmの間に糖の骨格のプロトンが重なって観測され、シグナルの帰属が難しいからである。本二次元NMRを用いれば糖質のシグナルの完全帰属を行うことができる。

b) 4糖 (6²-O- α -マルトシルマルトース、6³-O- α -グルコシルマルトリオース、6²-O- α -イソマルトシルマルトース)

パノースおよびイソパノースのNMRデータに基づいて(1-4)、(1-6)結合グルコ四糖のNMR解析を行った。予め既知のオリゴ糖であればアメリック領域に出現する5.2~4.6 ppm付近の(1-4)結合、(1-6)結合に由来するグリコシドプロトンと α -体と β -体に由来するアメリックプロトンは容易に帰属できる。例えば、6²-O- α -マルトシルマル

トースでは(1-4)と(1-6)の結合様式を反映した5.365 ppm (H-1'), 4.938 ppm (H-1''), 5.373ppm (H-1''')の3種類のグリコシディックプロトンと、5.215 ppm (H-1 α)と4.637 ppm (H-1 β)のアノメリックプロトンとに区別して帰属できる。図30に四糖のアノメリック領域での¹H-NMRの化学シフトのデータを纏めた。しかしながら、構造異性体である

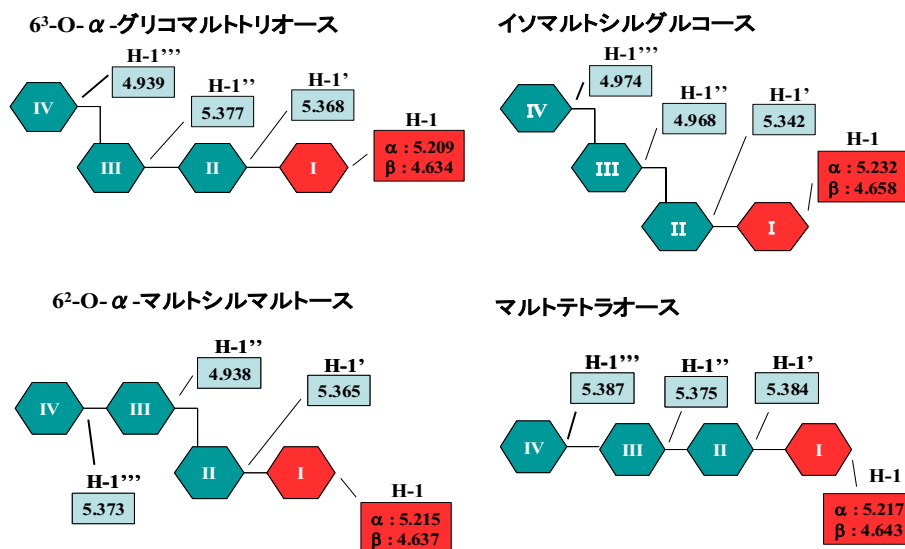


図30. 分岐4糖アノメリック部位の¹H-NMRスペクトル

6³-O-α-グルコシルマルトトリオースと6²-O-α-マルトシルマルトースとでは、NMRスペクトル上で環状のプロトンシグナルを丹念に辿って行かない限り両者を区別するのは難しい。一方、6²-O-α-イソマルトシルマルトースの場合、2残基分の(1-6)結合を含んでいるので、アノメリック領域を比較しただけで6³-O-α-グルコシルマルトトリオースと6²-O-α-マルトシルマルトースとは容易に区別できるとともに、還元末端側の結合様式も(1-4)結合であることを読み取ることができる。

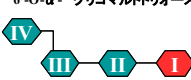
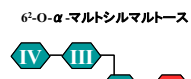
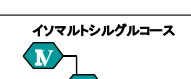
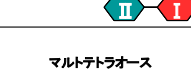
	I			II			III			IV		
	C-1	C-4	C-6	C-1	C-4	C-6	C-1	C-4	C-6	C-1	C-4	C-6
 6 ³ -O-α-グリコマルトトリオース	α 92.77	78.02	61.41	α 100.40	78.13							
	β 96.64	77.81	61.57		61.35		100.76	70.28	66.82	98.95	70.38	61.35
				β 100.32	78.09							
 6 ² -O-α-マルトシルマルトース	α 92.94	78.73	61.84	α 100.97						α 100.85		
	β 96.82	78.55	61.96		70.39	67.40	98.96		61.50		70.53	61.55
				β 100.90				β 78.18		β 100.87		
 イソマルトシルグルコース	α 92.77	78.29	61.56	α 100.67	70.35		α 98.85					
	β 96.64	78.05	61.69		66.41			70.38	66.84	98.59	70.43	61.35
				β 100.57	70.33		β 98.86					
 マルトテトラオース	α 92.78	77.92	61.43	α 100.37	77.86							
	β 96.65	77.70	61.57		61.31		100.52	77.61	61.36	100.62	70.21	61.36
				β 100.28	77.84							

図31. 分岐4糖の主シグナルの炭素の化学シフト

同様に、マルトテトラオースを標準糖として分岐四糖三種類の¹³C-NMRスペクトルにおける結合に関する主な炭素をアサイメントした(図3 1)。6²-O- α -マルトシルマルトースでは、アノメリック領域に4種の炭素シグナルが出現し、100.9 ppm付近に還元末端グルコース残基からII番目とIV番目の(1-4)結合由来グリコシディック炭素シグナルが、98.96 ppmにはIII番目グルコース残基の(1-6)結合由来のそれが、さらに、 α -体と β -体に対応するC-1 β (96.82 ppm)、C-1 α (92.94 ppm)が観測できる。また、結合に関連したシグナルとして78 ppm付近に結合位置に由来している還元末端グルコース残基の4本のC-4ピークとIII番目のC-4'が、67.40 ppmには(1-6)結合由来のC-6'が容易に同定できる。このように構造が予め判っていれば4糖程度のオリゴ糖であれば容易に解析可能である。しかしながら、構造異性体である6³-O- α -グルコシルマルトトリオースと6²-O- α -マルトシルマルトースとでは両者のNMRスペクトルは酷似しており、一次構造であるグルコース配列順序を区別するのは難しい。

c) 分岐4糖と5糖の比較

構造が極めて類似している4糖6²-O- α -マルトシルマルトースと5糖6²-O- α -マルトシルマルトトリオースのNMR解析を行った。図3 2に両オリゴ糖の¹H-NMRスペクトルを示した。全体のスペクトルパターンはおおよそ類似しており区別しにくい。

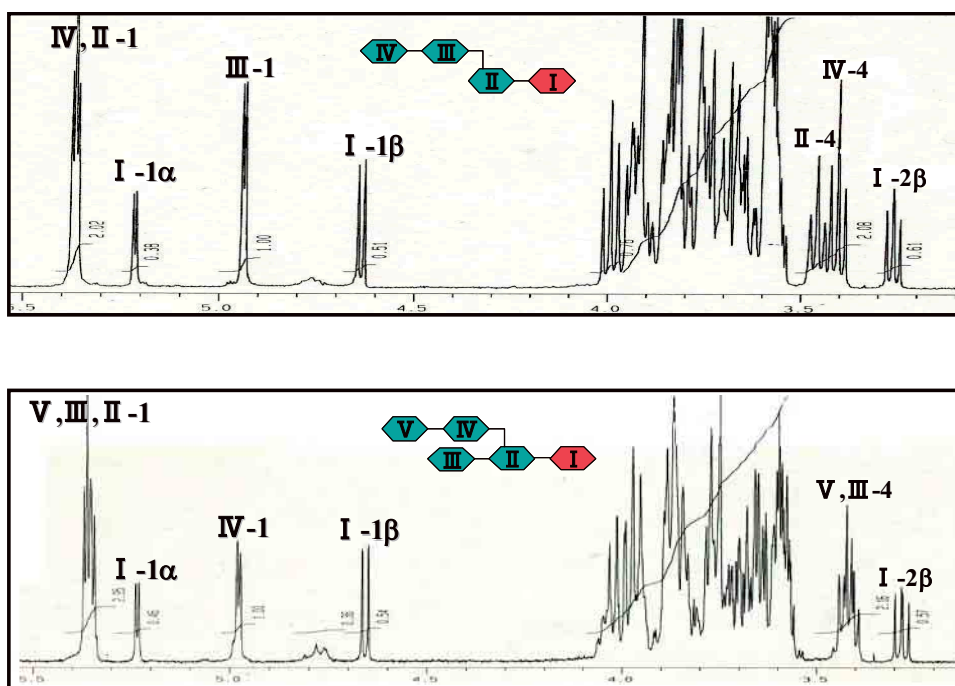


図3 2. 6²-O- α -マルトシルマルトースと6²-O- α -マルトシルマルトトリオースの¹H-NMRスペクトル

6²-O- α -マルトシルマルトースのアノメリック領域(5.4~4.6 ppm)のプロトンシグナルから、5.373 ppmと5.365 ppmは(1-4)結合由来のそれぞれH-1'和H-1''に、4.938 ppmは(1-6)結合のそれに、アノメリックプロトンは5.215 ppm (H-1 α)と4.637 ppm (H-1 β)に容易に帰属できる。また還元末端残基由来のアノメリックプロトン(5.215 ppm+4.637 ppm)を一個分とすると他の3本のグリコシディックプロトンは3個分に相当しシグナルの強度比から重合度は4、分鎖内に(1-4)結合を2つ、(1-6)結合を1つ含んでいることが判る。また、環状プロトンとは明白に分離して、3.407 ppmと3.459 ppmに還元末端からII番目のH-4'とIV番目のH-4''由来のシグナルがトリプレットとして観察され、両シグナルのシフトの差は0.6 ppmであった。次に、グルコシル残基が α -(1-4)結合で一個付加した6²-O- α -マルトシルマルトトリオースのスペクトルを解析したところ、6²-O- α -マルトシルマルト-

スのスペクトルパターンは類似しており、はっきり両者を区別することは難しい。ただし、重合度と結合組成の違いはアノメリックプロトン領域を解析することで直ちにその違いを区別出来る。即ち、(1-4)と(1-6)結合由来グリコシディックプロトンがそれぞれ5.34~5.37 ppmに3個分、5.978 ppmに1個分、 α 、 β 由来アノメリックプロトン (5.235 ppm+4.657 ppm) 1個分、計5個分のプロトンシグナルが示され、本オリゴ糖の重合度は5と算出できる。また、本スペクトルにおいて3.425 ppm付近に還元末端からIII番目のH-4”とV番目のグルコース残基のH-4””が二個分のトリプレットシグナルとしてほぼ重なった2個分のシグナルとして観察された。このことは、本オリゴ糖には2残基の非還元末端グルコース残基が存在することを示すものでもある。また、明らかに6²-O- α -マルトシルマルトースの結合に関与していないH-4由来のシグナルパターンと異なっていた。この事実は、分岐オリゴ糖の非還元末端グルコース残基のH-4シグナルを解析することで、分岐の程度や微細構造の解析にも役立てることができることを示唆している。

図33に¹H-NMR同様に6²-O- α -マルトシルマルトースと6²-O- α -マルトシルマルトトリオースの¹³C-NMRスペクトルを比較した。6²-O- α -マルトシルマルトースの¹³C-NMRスペ

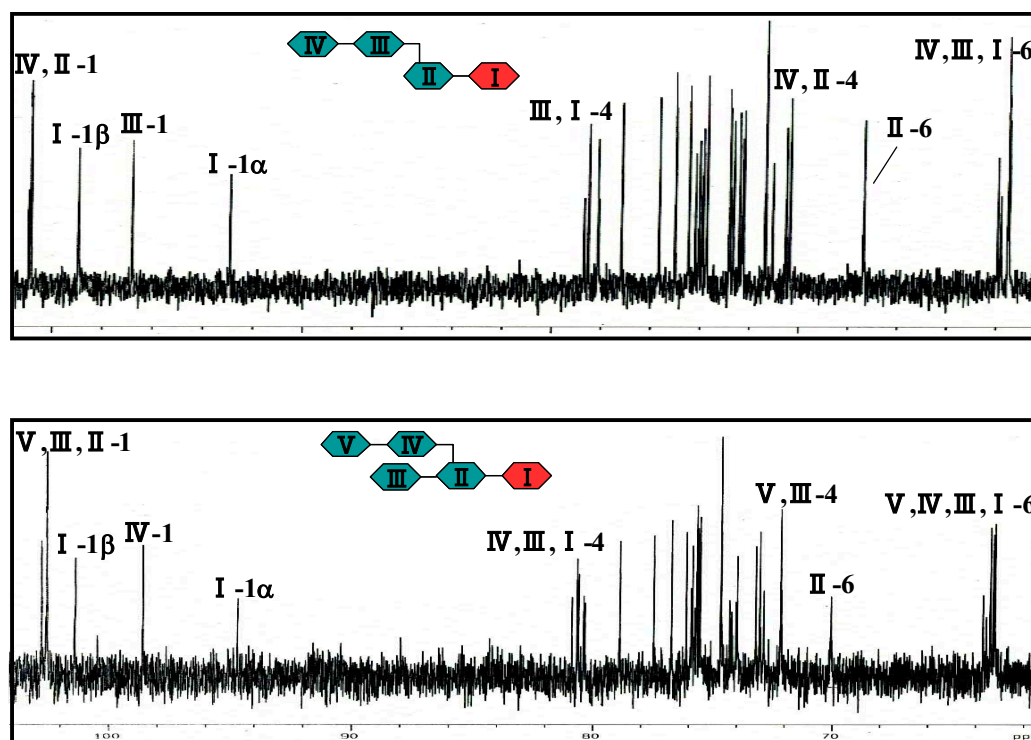


図33. 6²-O- α -マルトシルマルトースと6²-O- α -マルトシルマルトトリオースの¹³C-NMRスペクトル

クトルにおいて、低磁場であるアノメリック領域 (101~93 ppm) に相当する炭素シグナルが出現し、最も低磁場側100.87~100.97 ppmに α -(1-4)結合グリコシド炭素に由来するC-1'、C-1”シグナルが、98.96 ppmに α -(1-6)結合のC-1”が、 α -体と β -体に対応するC-1 β (96.82 ppm)、C-1 α (92.94 ppm)が観察され、他の環状炭素と明白に区別できる。このようにパノースおよびイソパノースでも観察されたように、同じ α 結合糖であっても(1-4)結合か(1-6)結合かによってグリコシド結合炭素の化学シフトが1.5 ppm程度の違いを示す。また、(1-4)結合位置に関与した炭素シグナルとして78.5 ppm付近に還元末端のC-4とIII番目のC-4”が、(1-6)結合位置として67.40 ppmにC-6”が観察出来る。最も高磁場側の61 ppm付近のシグナルはヒドロキシメチル基(-CH₂OH)由来の炭素シグナル(C-6'、C-6”)であり、

(1-6)結合でグルコースが置換したC-6と容易に区別できる。次に、6²-O- α -マルトシルマルトトリオースのスペクトルを解析したが、6²-O- α -マルトシルマルトトリオースのスペクトルパターンと酷似しており、本5糖のシグナルの帰属は出来るものの両スペクトルの比較から両者の一次構造をはっきりと区別するのは難しい。むしろ両者の区別は¹H-NMRスペクトルの比較の方が構造の違いを観察できる(図3 2)。

d) 6糖 (4³-O- α -パノシルパノース)

図3 4には6糖4³-O- α -パノシルパノースのNMRプロファイルを示す。図3 4 Aには

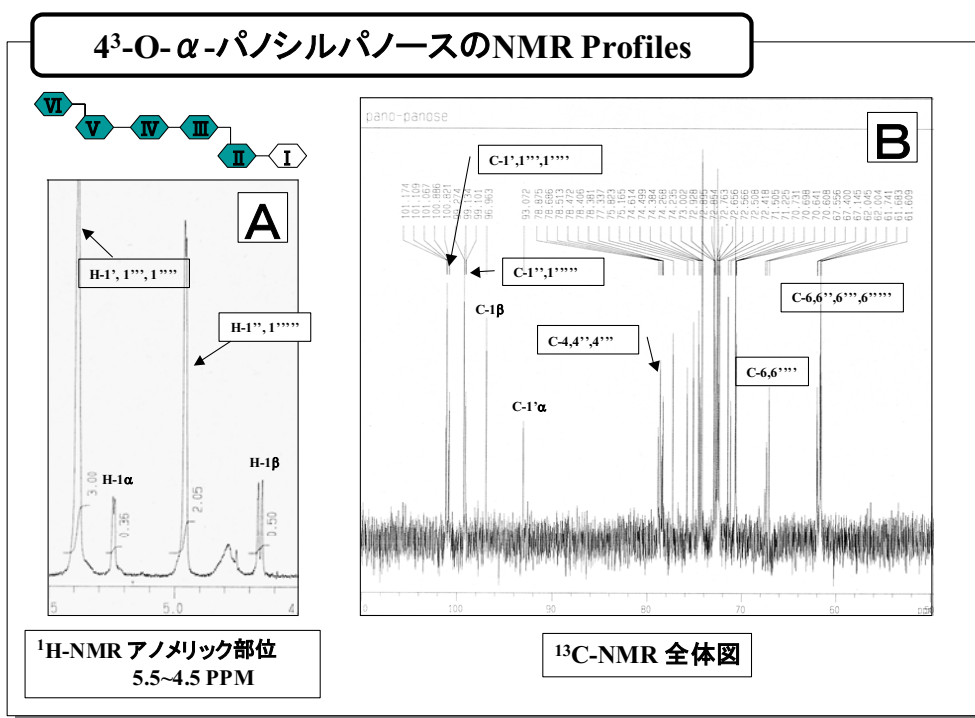


図3 4. パノシルパノースのNMR スペクトル

¹H-NMRにおけるアノメリック領域の化学シフトを示した。5.387 ppmと4.910 ppmに、それぞれ(1-4)結合由来3個分と(1-6)結合由来2個分が、5.242 ppmと4.658 ppmに α 、 β 由来アノメリックプロトン1個分、重合度6に相当する計6個分の重合度6に相当するのプロトンシグナルが示され、グルコオリゴ糖の重合度および結合組成比が簡単に決定できる。図3 4 Bには¹³C-NMRスペクトルを示した。化学構造式を念頭に入れてアサイメントすると、低磁場側に主シグナル4本からなるアノメリック炭素が観測され、101.17~100.82 ppmの範囲に α -(1-4)結合グリコシド炭素に由来するC-1'、C-1''、C-1'''シグナルが、99.27~99.10 ppmに α -(1-6)結合由来のC-1"とC-1'''"が、 α -体と β -体に対応するC-1 α (93.07ppm)とC-1 β (96.96ppm)が観測され、他の環状炭素と明白に区別できる。また、(1-4)結合位置に関与した炭素シグナルとして78.86~78.30 ppmの範囲に還元末端グルコース残基のC-4とIII番目とIV番目のC-4"とC-4'"が、(1-6)結合位置として67.56~67.15 ppmにC-6'とC-6'''"が観測出来る。最も高磁場側の61 ppm付近のシグナルはヒドロキシメチル基(-CH₂OH)由来の炭素シグナル(C-6'、C-6'")であり、(1-6)結合でグルコースが置換したC-6と容易に区別できる。このように本6糖の化学構造を合理的に解析できる。

2) オリゴ糖のMS解析

MS法による生体分子の構造解析はプロテオーム解析やグライコーム解析に応用されている。例えばタンパク質は20種類のアミノ酸の重合体であり、各アミノ酸は一級アミノ

基とカルボキシル基を共通して有しており、唯一側鎖が異なるだけである。従って、この側鎖の質量数の違いを用いればアミノ酸の同定とともに配列順序にも活用できる。今日では生物が発現するタンパク質を網羅的に解析する技術であるプロテオーム解析に応用され、1) 混合物として存在するタンパク質の分子量決定および定量、2) 酵素消化されたペプチド断片群の分離と分子量決定、3) 上述のペプチド断片群のアミノ酸配列決定など微量構造解析手法として必須な機器分析となっている。

一方、ホモグルカンのように同じ構成糖でグリコシド結合したグルコース重合体に対しては、分子量は確定できても構成単糖で形成される末端からの結合様式の配列順序や分岐周辺の微細構造などの情報を得ることは困難とされてきた。例えば、図35に示されるようなアミロペクチンの関連オリゴ糖である4糖の構造異性体(1-4)、(1-6)結合グルコテトラオースの質量数は同じであるが、還元末端からのグルコース配列順序における結合様式は異なる。このような配列順序を決定する方法は従来の構造解析法では、酵素消化させた分解物を丹念に分離し、メチル化分析、アセトリシス、スミス分解などによる化学的手法に依存し、煩雑な操作とともに多大な労力、時間、手間そして試料を要してきた。従って、



図35. 同じ質量の分岐オリゴ糖

ポリグルカンの構造解析とりわけデンプン中のアミロペクチン分子の微細構造解析に関し、ルーチンかつ簡便で迅速な微量解析法の台頭が望まれてきた。

Q-Tof Ultima APIを用い、各試料について5 µg/ml~50 µg/mlになるように水/メタノール=50/50の溶媒で希釈し、ESIイオン化法を用いて陽イオン検出モードで測定し、MS/MSスペクトルデータを得た。測定条件は、シングルショットにて測定し、質量範囲：m/z=50~2000、コリジョンエネルギー：10~60 Vで測定した。

図36は標準糖としてマルトヘキサオーズそして解析試料として3⁴-O-α-パノシルパノースのQ-Tof MS/MSによる陽イオン検出モードで測定したスペクトルを示す。いずれの試料でも陽イオン付加イオン[M+H]⁺およびナトリウム付加イオン[M+Na]⁺を検出した。プロトン付加とナトリウム付加ではプロダクトイオンスペクトルパターンが異なるため、それぞれのイオンをプリカーサーイオンとして選択し測定した。コリジョンエネルギーは10~60 Vの範囲で段階的に変え、プロダクトイオンスペクトルのパターンの最も特徴的なエネルギーを選択した。両試料において[M+H]⁺をプリカーサーとして選択した場合、プロダクトイオンスペクトルパターンに明確な差はでなかった。ただし、3⁴-O-α-パノシルパノースの方が壊れやすく、特に脱水ピークと考えられるm/z=811、973などの強度が強く観測された。グリコシ

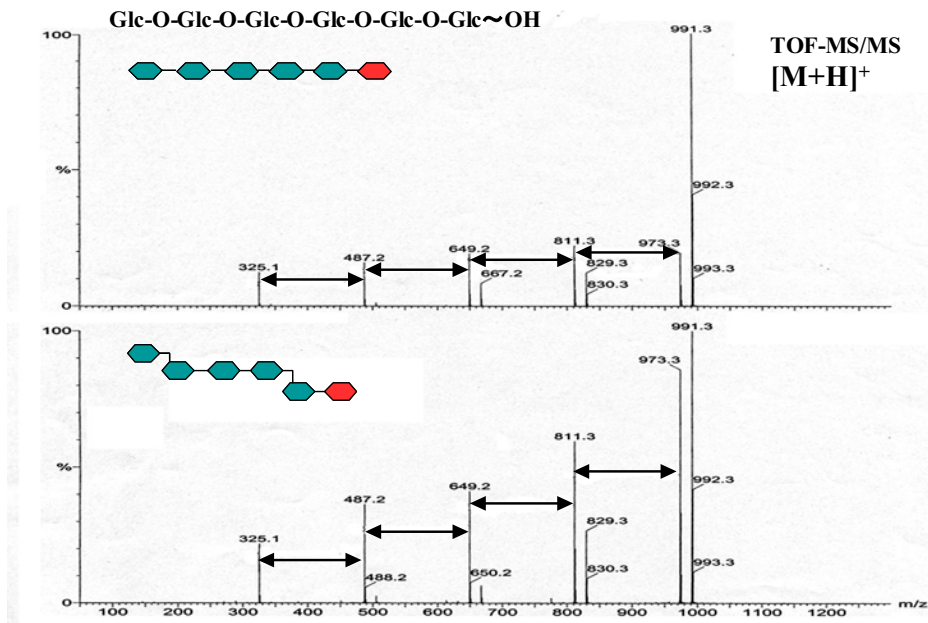


図 3 6. マルトヘキサオースとパノシルパノースのQ-Tof MS/MSスペクトル

ド結合のところで優先的にグリコシド結合が切断され、Hex-O-Hex-O+($m/z=325$)、Hex-O-Hex-O-Hex-O+($m/z=487$)、Hex-O-Hex-O-Hex-O-Hex-O+($m/z=649$)、Hex-O-Hex-O-Hex-O-Hex-O-Hex-O+($m/z=811$)のフラグメントイオンが両試料とも共通のイオンとして得られ解列パターンからは両者の構造を区別できない。

図 3 7 に、上と同様に標準糖としてマルトヘキサオース、そして解析試料として 3^+ -O- α -

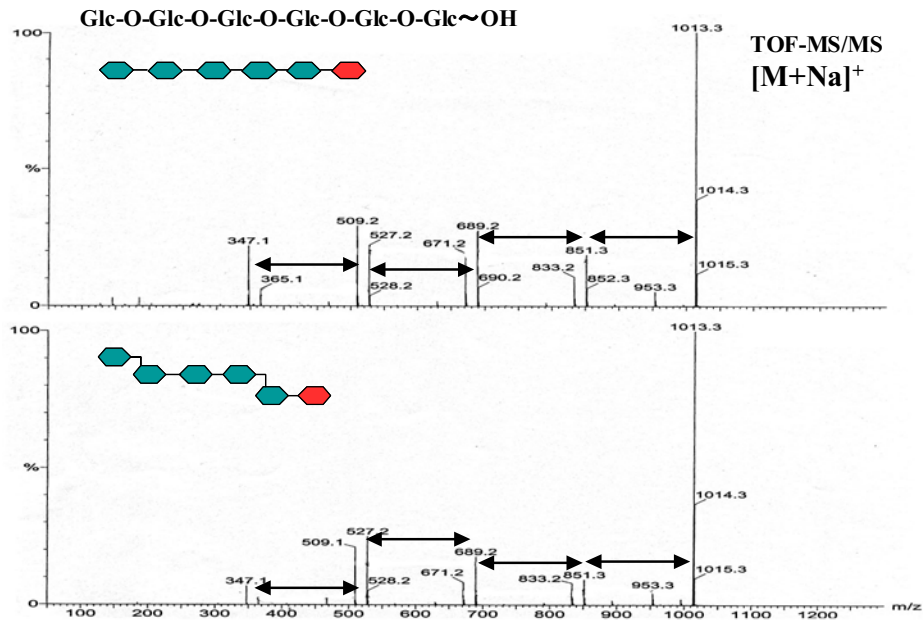


図 3 7. マルトヘキサオースとパノシルパノースのQ-Tof MS/MSスペクトル

パノシルパノースのQ-T of MS/MSによる陽イオン検出モードで測定した。[M+Na]⁺をプリカーサーとして選択した場合、m/z=509と527の強度比で区別可能であった。マルトヘキサオースでは509が、3⁴-O- α -パノシルパノースでは527が強く観測されている。強度の差はそれほど大きくないが、3日間の再現性測定ではほぼ同一のパターンを得ている（データは載せていない）。ここでも同様に優先的にグリコシド結合が切断し特徴的なヘキソーズ繰り返しのフラグメントイオンが検出されているが両者の構造は区別できない。

図38には、マルトヘキサオースと3⁴-O- α -パノシルパノースを2-アミノピリジンでシッフアミノ還元し、還元末端グルコース残基の1位の位置を2-アミノピリジル化したピリジルアミノ化6糖のQ-Tof MS/MSによる陽イオン検出モードで測定したスペクトルを示す。

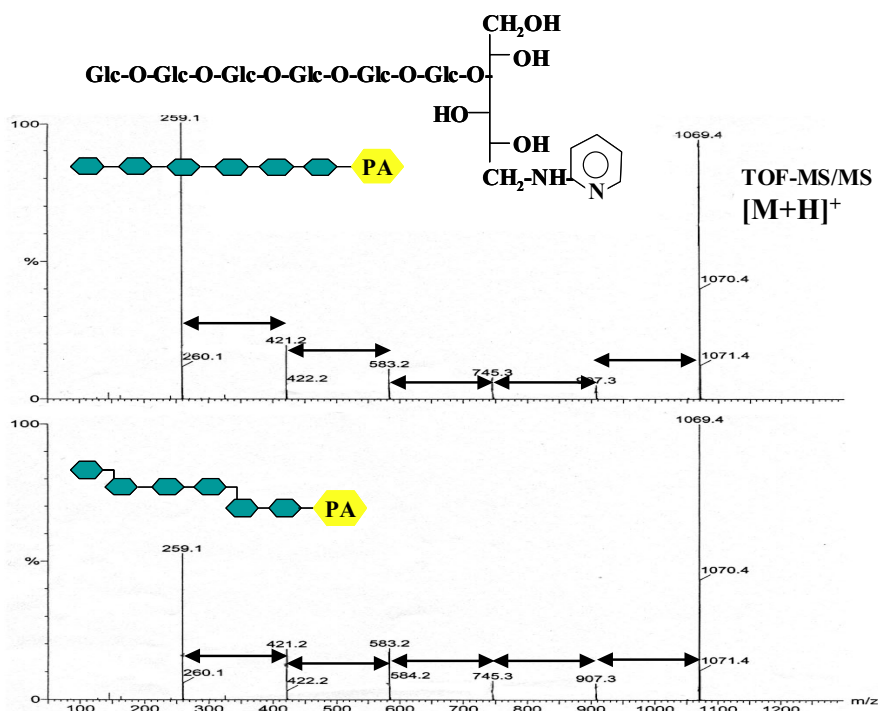


図38. PA化マルトヘキサオースとPA化パノシルパノースのQ-Tof MS/MSスペクトル

修飾6糖において[M+H]⁺をプリカーサーとして選択した場合、プロダクトイオンスペクトルパターンの明確な差は観測されない。ただし、未修飾の試料とは逆にピリジル6糖の方が壊れやすく、還元末端修飾残基のみのイオンに由来するm/z=259の強度が強く観測された。

図39に同様に、マルトヘキサオースと3⁴-O- α -パノシルパノース両試料ピリジル化6糖の[M+Na]⁺をプリカーサーとしたQ-Tof MS/MSによる陽イオン検出モードで測定した。[M+Na]⁺をプリカーサーとして選択した場合、両修飾6糖とも図11同様に、m/z=259のイオンが特徴的に強く観測された。プリカーサーイオンがナトリウム付加であるのに対し、この特徴的なイオンはプロトン付加と考えられる。なお、m/z=347、509、671、833のイオンは、それぞれピリジルアミノ基が外れたHex-O-Hex-O⁺、Hex-O-Hex-O-Hex-O⁺、Hex-O-Hex-O-Hex-O-Hex-O⁺、Hex-O-Hex-O-Hex-O-Hex-O-Hex-O⁺にナトリウムイオンが付加したイオンであると考えられる。いずれにしても、ピリジルアミノ化した6糖に関し、陽イオン検出モードでの測定では、分子量は決定できるものの、グルコースの結合様式における配列順序を解析することはできなかった。

次に、上記条件ではホモグルコオリゴ糖のグルコース末端からの結合配列順序(一次構造)の解析できなかったため、測定条件を変えて一次構造の解析を試みた。同様に、Q-Tof Ultima APIを用い、陽イオンから陰イオン検出モードで測定した以外は同一条件で、Q-Tof

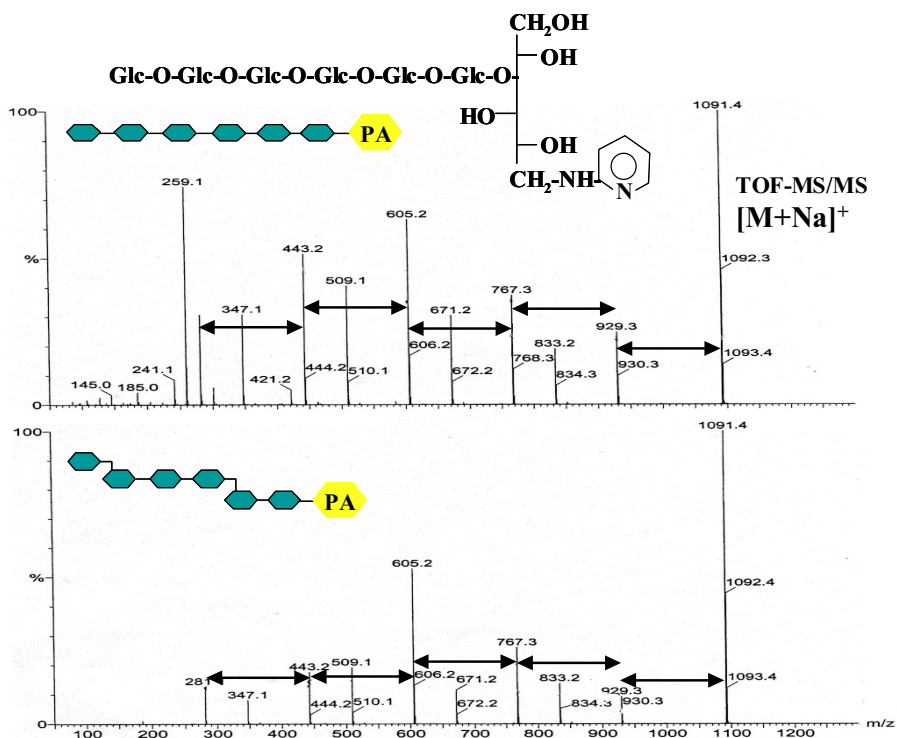


図 39. PA化マルトヘキサオース、PA化パノシルパノースのQ-ToF MS/MSスペクトル

MS/MSスペクトルデータを得た。

図 40 は、標準糖としてマルトヘキサオースそして解析試料として4³-O- α -パノシルパノースのQ-ToF MS/MSによる陰イオン検出モードで測定したスペクトルを示す。両試料とも陰イオン[M-H]⁻を検出した。両試料において[M-H]⁻をプリカーサーとして選択した場合、プロダクトイオンスペクトルパターンに(1-4)と(1-6)結合では明確な差が観察された。即ち、両試料とも、親ピークm/z 989とともにm/z 827、665、503、341の4本のフラグメントイオンが共通イオンとして観測され、これら4本のピークは、グルコース一個分に相当する質量数(G=162 amu)を差し引いた[M-Gn]⁻(n=1~4)に相当する。さらに、マルトヘキサオースにおいて5本の主ピークm/z 989、827、665、503、341からそれぞれ78 amuの減数分が規則的に観測された。これに対し、4³-O- α -パノシルパノースの主ピークからは78と90 amu分の2種類の減数が観測され、本6糖の還元末端グルコース残基からの結合配列順序を考えると、78 amuの減数分は(1-4)結合に特徴的であり、90 amuのそれは(1-6)結合に特徴的であると言える。即ち、4³-O- α -パノシルパノースの還元末端から順次、親ピーク[M-H]⁻から78 amuの減数分は(1-4)結合に、827から90 amuの減数分は(1-6)結合に、665から78 amuの減数分は(1-4)結合に、503から78 amuの減数分は(1-4)結合に、341から90 amuの減数分は(1-6)結合であり、(1-4)結合、(1-6)結合に特徴的な減数分のm/zから還元末端グルコース残基からの結合配列順序を解析できることを示唆している。

(2) 研究成果の今後期待される効果

アミロペクチンの分子構造とりわけ α -1,6結合の分岐周辺に関し精密な情報を得るための微細構造解析に関しては必ずしも確立されている方法があるわけではない。その主な原因は、分岐オリゴ糖のグルコース配列順序を決定するための簡便かつ微量分析による汎用性の高い構造解析法が未だ確立されていないからである。これまで複雑に分岐したホモグルカンであるアミロペクチン分子の構造解析は、酵素を作用させた分解物を重合度別に丹念に分離し、メチル化分析、アセトリシス、スミス分解などによる化学的手法に依存し、

Negative mode, TOF MS/MS

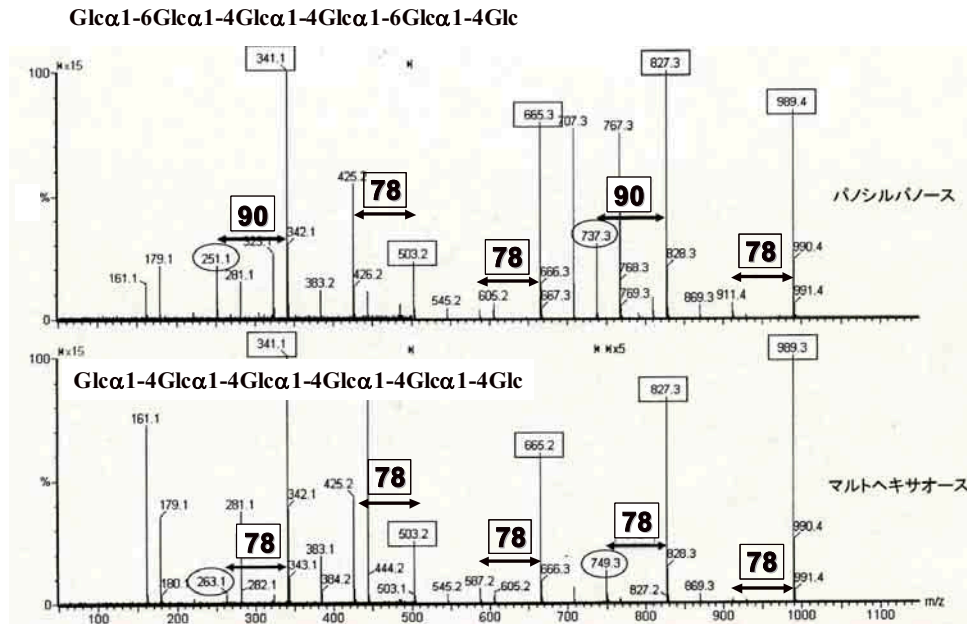


図 40. Negative modeにおけるパノシルパノースとマルトヘキサオースのスペクトル比較

煩雑な操作とともに多大な労力、時間、手間そして試料 (mmol以上) を要してきた。従って、ポリグルカンの構造解析とりわけデンプン中のアミロペクチン分子の微細構造解析に関し、特に微量の解析法やルーチン化した新たな解析法の台頭が求められている。一方、糖鎖生物学の分野では複合糖質 (糖タンパク質や糖脂質) のオリゴ糖鎖の生化学的役割が明らかになるに連れて、その糖鎖構造解析に関し、その微量解析法やルーチン化した解析法の進歩は目覚ましい。これと比較し、デンプン科学分野でのこの種の構造解析の手法は著しく遅れを取ってきたのが現状である。

本研究プロジェクトの最大の利点は、共同研究者が世界に例を見ない系統的な分岐オリゴ糖鎖のライブラリーを保有していることである。これまで分岐オリゴ糖の重合度、分岐の程度、グルコース残基の配列順序などの解析は、酵素法や有機化学的手法に依存し多段階かつ多大な労力を要していた。本構造解析法が実現すれば簡便、迅速かつ正確な微細構造の情報が得られ、デンプンの代謝や生合成研究にも大いなるインパクトを与えることが期待できる。また、NMR法やMS法は、糖化合物の保護や修飾を必要とせず直接測定に供することが出来る。前者は貴重な試料の回収が可能な非破壊法でもある。

本研究の成果として、NMR法とMS法を組み合わせることによってアミロペクチン構造由来の分岐グルコオリゴ糖を網羅的に解析し、新たな解析手法を開拓する手掛かりを得たことである。中でも特筆すべきことは、MS法による飛行時間形タンデム質量分析計 (Q-Tof MS/MS) を活用して分岐グルコオリゴ糖解析において質量数が同じ重合度であってもスペクトルからこれら異性体相互の識別が可能であること、還元末端からのグルコース残基の結合配列順序 (一次構造) の解析手法として有用であることを見出した。今後さらに、この識別原理をアミロペクチン関連分岐オリゴ糖鎖に適用し網羅的に解析していけば“スターチミクス”なる新たな分野を創出することも可能となる。また、多種多様なアミロペクチン分子の微細構造に関する情報を明らかにすることは、デンプン研究の分野にバイオインフォマティクスの概念を導入することでもあり、デンプンの形質や新品種の開発に役立てることが期待できる。

3. 5 デンプンの産業利用 (秋田県立大学 中村グループ)

(1)研究実施内容及び成果

メタボリックエンジンリングによって新規形質を有するデンプンが創生されることが明らかになったことを受けて、そうしたデンプンの産業利用への展開を図るため、木材系接着剤などへの利用の可能性を検討する基礎実験を行った。木材系接着剤はそのほとんどが石油を原料とする合成接着剤で占められている。その多くはホルムアルデヒドなどを放散するため、シックハウス症候群の原因となっている。また耐水性能が低いため、木材を極度に乾燥する必要があり、木材の品質管理費などの生産コストがかかる。こうした難点を克服できるデンプン接着剤の開発を試みた。

そのための第一歩としてイネデンプンを化学修飾した。これは広く使用されている架橋性の木材接着剤であるイソシアネートとデンプンとを架橋させるために行う。化学修飾反応の基礎データを取り、安定的に一定の置換率の修飾デンプンを作成することに成功した。次にイソシアネートに対して一定の比率(重量比で 10, 20, 30, 40%)で混合し、パーティクルボードに対する接着テスト(剥離強度、水分膨潤率など)を行った。その結果、試作接着剤は常態で良好な接着能を示しており、デンプンが木材用接着剤として十分使用できることがわかった。特に 10%の添加率の時は、イソシアネート 100%のものよりも優れた接着性能を示すことがわかった。また、フェノール系接着剤や尿素系接着剤などのホルムアルデヒド放散型接着剤に修飾デンプンを添加したところ、添加率 10%でホルムアルデヒドの放散量を約 30-40%抑制する効果が見出された。以上の結果から、木質系接着剤としてのデンプン接着剤の有用性が示され、実用化に向けて大きく前進した。

現在でもデンプンはパーティクルボードなどに接着剤の添加剤として一部使用されているが、コーンスターチやカドミウム汚染米などがそのままの形で使用されていて、化学修飾などの化工処理は行っていないため、接着剤の性能向上は図られておらず、あくまで高価格である合成接着剤の使用量を減らすためのコストメリットだけを狙った使用に過ぎない。

(2)研究成果の今後期待される効果

本実験は、材料の量的制約から、市販のコメデンプンでのテストであった。機能性を付与したデンプン接着剤開発の素材としては、本研究で得られた新物性を有するバイオデンプンの方が有望であろう。こうした商品にバイオデンプンが使用されるならば、コメデンプンの工業利用分野に一石を投じることが期待される。

4 研究参加者

①中村グループ(組換え体における新規デンブンの作成)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
中村 保典	秋田県立大学 生物資源科学部	教授	総括、組換え体の評価	平成12年12月～ 平成18年3月
鈴木 英治	同上	助教授	遺伝子発現系の開発	同上
藤田 直子	同上	助手	変異体の単離及び解析	同上
久保 亜希子	同上	CREST 研究員	形質転換体の作成及び解析	平成13年4月～ 平成16年3月
高橋 純一郎	同上	CREST 技術員	形質転換体の作成	平成13年4月～ 平成16年10月
佐藤 彩	同上	研究補助員	多糖構造解析	平成12年12月～ 平成18年3月
澤田 博子	同上	同上	研究チーム事務	平成13年1月～ 平成18年3月
小林 優子 (保坂)	同上	同上	遺伝子解析	平成13年1月～ 平成17年12月
吉田 真由美	同上	同上	遺伝子解析	平成13年1月～ 平成18年3月
中泉 裕子	同上	同上	植物の栽培	同上
内海 好規	秋田県立大学 大学院生物資源科学研究科	博士課程	多糖構造の解析	平成15年4月～ 平成18年3月
平田 華緒里	同上	修士課程	形質転換体の解析	平成15年1月～ 平成17年3月
江泉 信隆	同上	同上	酵素機能の解析	平成16年4月～ 平成18年3月
伊藤 瑞穂	同上	同上	形質転換体の解析	同上
高橋 由佳	同上	同上		平成17年4月～ 平成18年3月
ペリシオフランス コ Jr.	秋田県立大学 生物資源科学部	CREST 研究員	DNA 構造解析	平成14年4月～ 平成18年3月
豊田 健太郎	同上	同上	同上	平成14年4月～ 平成17年9月
大段 隆史	同上	CREST 技術員	同上	平成14年4月～ 平成18年3月
鈴木 倫子	同上	同上	同上	平成14年1月～ 平成18年3月
田村 昌弘	同上	研究補助員	形質転換体の作成	平成14年5月～ 平成17年6月
澤田 隆行	同上	同上	同上	平成15年4月～ 平成18年3月
白幡 幸恵	同上	同上	データ整理	平成14年2月～ 平成18年3月

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
阿部 美里	秋田県立大学 生物資源科学部	研究補助員	DNA塩基配列の決定	平成14年2月～ 平成18年3月
三浦 聡子	同上	同上	同上	同上
伊藤 友江	同上	同上	同上	同上

②都筑グループ(藻類ポリグルカン合成系の解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
都筑 幹夫	東京薬科大学 生命科学部	教授	遺伝子、多糖の解析	平成12年12月～ 平成18年3月
藤原 祥子	同上	講師	遺伝子系統解析	同上
梅田 和宏	東京薬科大学 大学院生命科学 科学研究科	修士課程	ラン藻ISAの探索	平成12年12月～ 平成13年3月
仁平 智子	同上	修士課程	ISAの機能解析	平成13年4月～ 平成15年3月
下永 高弘	同上	博士課程	藻類デンプンの構造解析	平成13年4月～ 平成18年3月
小山 泰永	同上	修士課程	緑藻の遺伝子解析	平成14年4月～
大川 元	同上	修士課程	多糖構造解析	平成16年3月
出雲 旦子	同上	修士課程	ISAの機能解析	平成15年4月～ 平成17年3月
小西 麻衣	同上	修士課程	デンプン合成の制御解析	平成16年4月～ 平成18年3月
			紅藻の純粋培養確立	平成17年4月～ 平成18年3月

③碓氷グループ(ポリグルカン構造解析新手法の開発)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
碓氷 泰市	静岡大学 農学部	教授	NMR法によるポリグルカンの構造解析	平成15年4月～ 平成18年3月
村田 健臣	同上	助教授	グルコオリゴ糖の一次構造の解析	同上
餘目 哲	同上	静岡大学 研究員	マルトオリゴ糖の立体配座解析	平成16年4月～ 平成18年3月
浅沼 俊倫	静岡大学大学院 農学研究科	修士課程	マルトオリゴ糖の立体配座解析	平成15年4月～ 平成16年3月
西本 雅	同上	修士課程	分岐オリゴ糖のデータベース化	平成15年4月～ 平成17年3月
秋本 崇	同上	修士課程	分岐オリゴ糖のデータベース化	平成16年4月～ 平成18年3月

5 成果発表等

(1) 論文発表 (国内4件, 海外38件)

1. Fujita N, Hasegawa H, Taira T. The isolation and characterization of a *waxy* mutant of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.) **Plant Science** 160: 595-602. (2001)
2. Nakajima Y, Fujiwara S, Sawai H, Imashimizu M, Tsuzuki M. A phycocyanin-deficient mutant of *Synechocystis* PCC6714 with a single-base substitution upstream of the *cpc* operon. **Plant Cell Physiol** 42 : 992-998. (2001)
3. Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H. Biochemical and genetic analysis of the effects of *amylose-extendor* mutation in rice endosperm. **Plant Physiol** 127: 459-472. (2001)
4. Fujiwara S, Tsuzuki M, Kawachi M, Minaka N, Inouye I. Molecular phylogeny of the Haptophyta based on the *rbcL* gene and sequence variation in the spacer region of the *rubisco* operon. **J. Phycol.** 37: 121-129. (2001)
5. Kawasaki K, Matsuda T, Nakamura Y, Ueno O, Taniguchi M, Nitta Y, Miyake H. Structure and immunocytochemical characterization of the synthesis and accumulation of starch in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) tuberous root. **Plant Prod. Sci.** 5: 152-159. (2002)
6. Umemoto T, Yano M, Satoh H, Shomura A, Nakamura Y. Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between *japonica*-type and *indica*-type rice varieties. **Theor. Appl. Genet.** 104: 1-8. (2002)
7. Sakamoto F, Suzuki E, Fujii Y. Novel approach for the effective determination of DNA scission site using the Sanger method. **J. Biochem. Biophys. Methods** 52: 97-109. (2002)
8. Nakamura Y, Sakurai A, Inaba Y, Kimura K, Iwasawa N, Nagamine T. The fine structure of amylopectin in endosperm from Asian cultivated rice can be largely classified into two classes. **Starch** 54: 117-131. (2002)
9. Nakamura Y. Towards a better understanding of metabolic system for amylopectin biosynthesis in plant: rice endosperm as a model tissue. **Plant Cell Physiol.** 43: 718-725. (2002)
10. Minoda A, Sato N, Nozaki H, Okada K, Takahashi H, Sonoike K, Tsuzuki M. Related articles, links role of sulfoquinovosyl diacylglycerol for the maintenance of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eur J Biochem.** 269: 2353-2358. (2002)
11. Takahashi J, Fujiwara S, Kikyo M, Hirokawa, Y, and Tsuzuki M. Discrimination of the cell surface of the coccolithophorid *Pleurochrysis haptanemofera* based on the light scattering and fluorescence after FITC-labelled lectin staining measured by flow cytometry. **Marine Biotech.** 4: 94-101. (2002)
12. Kobayashi I, Fujiwara S, Shimogawara K, Kaise T, Usuda H, and Tsuzuki M. Insertional mutagenesis in a homologue of a Pi transporter gene confers arsenate resistance on *Chlamydomonas*. **Plant Cell Physiol.** 44: 597-606. (2003)
13. Fujita N, Kubo A, Suh D-S, Wong K-S, Jane J-L, Ozawa K, Takaiwa F, Inaba Y and

- Nakamura Y. Antisense inhibition of isoamylase alters the structure of amylopectin and the physicochemical properties of starch in rice endosperm. **Plant Cell Physiol.**44: 607-618. (2003)
14. Rahman S, Nakamura Y, Li Z, Clarke B, Fujita N, Mukai Y, Yamamoto M, Regina A, Tan Z, Kawasaki S, Morell M. The *sugary*-type isoamylase gene from rice and *Aegilops tauschii*: characterization and comparison with maize and Arabidopsis. **Genome** 46: 496-506. (2003)
 15. Nakamura Y, Fujita N, Kubo A, Rahman S, Morell M, Satoh H. Engineering of amylopectin biosynthesis in rice endosperm. **J Appl. Glycosci.** 50: 225-230. (2003)
 16. Satoh H, Nishi A, Fujita N, Kubo A, Nakamura Y, Kawasaki K, Okita T.W. Isolation and characterization of starch mutants in rice. **J Appl. Glycosci.** 50: 197-200. (2003)
 17. Wong K-S, Kubo A, Jane J-J, Harada K, Satoh H, Nakamura Y. Structure and properties of amylopectin and phytoglycogen in the endosperm of *sugary-1* mutants of rice. **J Cereal Sci.** 37: 139-149. (2003)
 18. 中村保典. コメの糊化特性にアミロペクチンの側鎖構造を支配する遺伝子が関与. **ブレインテクノニュース**第95号:16-20. (2003)
 19. Sato N, Aoki M, Maru Y, Sonoike K, Minoda A, Tsuzuki M, Involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in the structural integrity and heat-tolerance of photosystem II. **Planta** 217: 245-251. (2003)
 20. Sato N, Tsuzuki M, Kawaguchi A. Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11h I. Existence of a eukaryotic pathway. **Biochim. Biophys. Acta** 1633: 27-34. (2003)
 21. Sato N, Tsuzuki M, Kawaguchi, A. Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11h II. Effect of the CO₂ concentration during growth. **Biochim. Biophys. Acta** 1633: 35-42. (2003)
 22. Suzuki M, Watanabe K, Fujiwara S, Kuasawa T, Wakabayashi T, Tsuzuki M, Iguchi K, Yamori T. Isolation of peridinin-related norcarotenoids with cell growth-inhibitory activity from the cultured dinoflagellate of *Symbiodinium* sp., a symbiont of the Okinawan soft coral *Clavularia viridis*, and analysis of fatty acids of the dinoflagellate. **Chem. Pharm. Bull.** 51: 724-727. (2003)
 23. Fujiwara S, Yasui K, Watanabe K, Wakabayashi T, Tsuzuki M, Iguchi K. Molecular phylogenetic relationships between prostanoid-containing Okinawan soft coral, *Clavularia viridis*, and non prostanoid-containing *Clavularia* species based on the rbcL ITS sequences. **Marine Biotechnol.** 5 : 401–407 (2003)
 24. Imashimizu I, Fujiwara S, Tanigawa R, Tanaka K, Hirokawa T, Bakajima Y, Higo J, Tsuzuki M. Thymine at -5 is crucial for cpc promoter activity of *Synechocystis* sp. strain PCC6714. **J. Bacteriol.** 185: 6477-6480 (2003)
 25. Hashimoto N, Fujiwara S, Watanabe K, Iguchi K, Tsuzuki M. Localization of clavulones, prostanoids with antitumor activity, within Okinawan soft coral *Clavularia viridis* (*Alcyonacea, Clavularidae*): Preparation of a high-purity *Symbiodinium* fraction using a protease and a detergent. **Lipids** 38: 991-997 (2003).

26. Minoda A, Sonoike K, Okada K, Sato N, Tsuzuki M. Decrease in the efficiency of the electron donation to tyrosine Z of photosystem II in an SQDG-less mutant of *Chlamydomonas*. **FEBS Lett.** 553: 109-112 (2003).
27. 中村保典. 澱粉合成とその制御. **J Appl. Glycosci.** 50: 511-512. (2003)
28. Satoh H, Nishi A, Yamashita K, Takemoto Y, Tanaka Y, Hosaka Y, Sakurai A, Fujita N, Nakamura Y. Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm. **Plant Physiol.** 133: 1111-1121. (2003)
29. Tanaka N, Fujita N, Nishi A, Satoh H, Hosaka Y, Ugaki M, Kasawaki S, Nakamura Y. The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm. **Plant Biotechnol J.** 2: 507-516. (2004)
30. Sakamoto F, Suzuki E, Fujii Y. Recent development of artificial nuclease with specificity of cleavage site. **Recent Res. Devel. Nucleosides Nucleotides** 2: 1-27. (2004)
31. 中村保典. 植物のデンプン合成代謝システムに関する一考察: イネ胚乳を中心に. **J Appl. Glycosci.** 51: 259-266. (2004)
32. Umemoto T, Aoki N, Lin H, Nakamura Y, Inouchi N, Sato Y, Yano M, Hirabayashi H, Maruyama S. Natural variation in rice starch synthase IIa affects enzyme and starch properties. **Func. Plant Biol.** 31: 671-684. (2004)
33. Sato N, Suda K, Tsuzuki M. Responsibility of phosphatidylglycerol for biogenesis of the PSI complex. **Biochim. Biophys. Acta** 1658: 235-243. (2004)
29. Kubo A, Rahman S, Utsumi Y, Li Z, Mukai Y, Yamamoto M, Ugaki M, Harada K, Satoh H, Konik-Rose C, Morell M, Nakamura Y. Complementation of *sugary-1* phenotype in rice endosperm with the wheat isoamylase1 gene supports a direct role for isoamylase1 in amylopectin biosynthesis. **Plant Physiol.** 137: 43-56. (2005)
33. Nakamura Y, Takahashi J-I, Sakura A, Inaba Y, Suzuki E, Nihei S, Fujiwara S, Tsuzuki M, Miyashita H, Ikemoto H, Kawachi M, Sekiguchi H, Kurano N. Some Cyanobacteria synthesize semi-amylopectin type α -polyglucans instead of glycogen. **Plant Cell Physiol.** 46:539-545. (2005)
34. Kawagoe Y, Kubo A, Satoh H, Takaiwa F, Nakamura Y. Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis in rice endosperm. **Plant J.** 42:164-174. (2005)
35. Kobayashi I, Fujiwara S, Shimogawara K, Sakuma C, Shida Y, Kaise T, Usuda H, Tsuzuki M. High intracellular phosphorus contents exhibit a relationship with arsenate resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Cell Physiol.** 46: 489-496. (2005)
36. 都筑幹夫植物プランクトンにおける環境応答解析—環境応答生物学研究室における 10年間の研究—**東京薬科大学紀要** 8: 1-8 (2005)
37. Nakamura Y, Francisco Jr PB, Hosaka Y, Sato A, Sawada T, Kubo A and Fujita N. 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)
38. Ohdan T, Francisco Jr PB, Sawada T, Hirose T, Terao T, Satoh H and Nakamura Y. Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. **J. Exp Bot.** 56: 3229-3244. (2005)
39. Hirokawa Y, Fujiwara S, Tsuzuki M. Three types of acidic polysaccharides associated with coccolith of *Pleurochrysis haptonemofera*: Comparison of the biochemical characteristics with those of *P. carterae* and analysis using fluorescein-isothiocyanate-labeled lectines. **Marine Biotechnol.** in press.
40. Toyota K, Tamura M, Ohdan T and Nakamura Y. Expression profiling of starch metabolism-related plastidic translocator genes in rice. **Planta.** in press.
41. Fujita N, Yoshida M, Asakura N, Ohdan T, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y. Function and Characterization of starch synthase I using mutants in rice (*Oryza sativa* L.) **Plant Physiol.** in press.
42. Kobayashi, I., Fujiwara, S., Tsuzuki, M. Relief of arsenate-toxicity by Cd-stimulated phytochelatin synthesis in the green alga *Chlamycomonas reinhardtii*. **Marine Biotechnol.** in press.

(2) 口頭発表(国際学会発表および主要な国内学会発表)

①招待, 口頭講演

国内 82 件, 海外 4 件

②ポスター発表

国内 13 件, 海外 4 件

③シンポジウム等の主なもの

1. 発表者: 久保亜希子

タイトル: Complementation of rice *sugary-1* mutation by wheat isoamylase gene.
発表した場所: オーストラリア CSIRO, Plant Industry (2002年3月12日招待講演)

2. 発表者: 中村保典(秋田県立大学).

タイトル: アミロペクチン生合成代謝の総合的理解に向けて—イネ胚乳アミロペクチン合成システムをモデルとして.

学会名: 第42回デンプン研究懇談会(招待講演)

場所: 伊豆伊藤

日時: 2002年6月30日

3. 発表者: 中村保典(秋田県立大学)

タイトル: 遺伝子研究の最前線と驚きの研究・技術—でん粉の生合成と遺伝子.

学会名: 平成14年日本応用糖質科学会東日本支部シンポジウム(招待講演)

場所: 共立女子大学

日時: 2002年7月5日

4. 発表者: Nakamura Y. (秋田県立大学)

タイトル: Engineering of amylopectin biosynthesis in rice endosperm.

学会名: International symposium: New approaches in starch science and

carbohydrate-active enzymes. (口頭発表)

場所：共立女子大学

日時：2002年9月15日

5. 発表者：中村保典
タイトル：Engineering of amylopectin biosynthesis in rice endosperm
発表した場所：韓国高麗大学、(2004年3月24日招待講演)
6. 発表者：都筑幹夫
タイトル：レーザー実験における非密封 RI の安全取扱，平成16年度農業環境技術研究所における放射線障害防止のための教育・訓練—放射線業務従事者および取扱等業務従事者—，
発表した場所：つくば市，(2004年5月13日)
7. 発表者：都筑幹夫
タイトル：植物における光の利用—下等な生物群から高等植物まで—，立命館大学大学院理工学研究科，
発表した場所：草津市 (2004年5月28日)
8. 発表者：佐藤光，Tomas W. Okita，中村保典(九州大，ワシントン州立大，秋田県立大学)
タイトル：イネデンプン変異体の単離と特性解析
学会名：第46回日本植物生理学会 (シンポジウム)
場所：新潟市
日時：2005年3月24日
9. 発表者：中村保典，藤田直子，内海好規，久保亜希子，P. B. Francisco，大段隆史，佐藤光(秋田県立大学，九州大)
タイトル：アミロペクチン構造改変に関する分子遺伝学的アプローチ
学会名：第46回日本植物生理学会 (シンポジウム)
場所：新潟市
日時：2005年3月24日
10. 発表者：藤原祥子，岡田克彦，都筑幹夫(東京薬科大学)
タイトル：ラジオアイソトープレーザーにおけるイメージング解析
学会名：第46回日本植物生理学会 (シンポジウム)
場所：新潟市
日時：2005年3月24日
11. 発表者：佐藤光，中村保典，大坪研一(九州大，秋田県立大学，食総研)
タイトル：イネの胚乳澱粉特性に関わる遺伝子資源の開発
学会名：日本農芸化学会2005年度大会 (シンポジウム)
場所：札幌市
日時：2005年3月29日
12. 発表者：中村保典，藤田直子，久保亜希子，内海好規，Francisco P. B.，佐藤光 (秋田県立大学，九州大)
タイトル：デンプンメタボリックエンジニアリングの可能性
学会名：日本農芸化学会2005年度大会 (シンポジウム)

場所：札幌市

日時：2005年3月29日

(3) 特許出願

①国内特許 (20件)

1. 発明の名称：イネのイソアミラーゼ遺伝子のプロモーター
発明者：中村保典，藤田直子
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2001年9月10日
出願番号：特願 2001-273166
2. 発明の名称：イソアミラーゼの機能とデンプン形質の制御
発明者：中村保典，久保亜希子，佐藤光
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2001年9月12日
出願番号：特願 2001-276054
3. 発明者：藤田直子，中村保典，廣近洋彦，宮尾安藝雄
発明の名称：スターチシンターゼ I 型の機能解明と新規デンプン作出法
出願人：科学技術振興事業団，独立法人農業生物資源研究所，生物系特定産業技術研究推進機構
出願日：2001年9月12日
出願番号：特願 2001-277332
4. 発明者：中村保典，藤田直子，佐藤光
発明の名称：デンプンの改質方法
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2001年9月12日
出願番号：特願 2001-277120
5. 発明者：中村保典，藤田直子，佐藤光
発明の名称：デンプン枝作り酵素の過剰発現方法
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2001年9月12日
出願番号：特願 2001-277109
6. 発明者：中村保典，藤田直子
発明の名称：スターチシンターゼ IIa 遺伝子構造と機能およびその利用
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2001年9月20日
出願番号：特願 2001-287010
7. 発明者：都筑幹夫，下河原浩介，藤原祥子，中村保典，小林功
発明の名称：ヒ素耐性に関わる遺伝子 PTB1
出願人：科学技術振興事業団，東京薬科大学
出願日：2002年3月19日
出願番号：特願 2002-076932

8. 発明の名称：ラン藻カーボニックアンヒドラーゼの活性発現に必須なドメイン。
発明者：鈴木英治、中村保典。
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2002年6月7日
出願番号：特願 2002-167737
9. 発明の名称：遺伝子欠損ラン藻。
発明者：鈴木英治、守屋克哉、高橋純一郎、工藤春香、中村保典。
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2003年3月14日
出願番号：特願2003-69795
10. 発明の名称：(ID付与を用いる) サンプル管理方法、サンプル管理装置、端末装置、
サンプル管理プログラムおよびそれを記録したコンピュータ読み取り
可能な記録媒体。
発明者：鈴木英治、中村保典、大段隆史、ペリジオ・フランシスコ・Jr.、豊田健太郎、
鈴木倫子、他アプライド・バイオシステムズ・ジャパン一名、三菱スペース
ソフトウェア三名。
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2003年3月31日
出願番号：特願2003-097127
11. 発明の名称：(ネットワークを用いる) サンプル管理方法、サンプル管理装置、端末
装置、サンプル管理プログラムおよびそれを記録したコンピュータ読み取り可能な記
録媒体。
発明者：鈴木英治、中村保典、大段隆史、ペリジオ・フランシスコ・Jr.、豊田健太
郎、鈴木倫子、他アプライド・バイオシステムズ・ジャパン一名、三菱スペ
ースソフトウェア三名。
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2003年3月31日
出願番号：特願2003-097023
12. 発明の名称：紅藻類のチノリモ(*Porphyridium*)由来のイソアミラーゼ。
発明者：都筑幹夫・下永高弘・中村保典・藤原祥子
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2003年4月20日
出願番号：特願2003-81308
13. 発明の名称：新規なポリグルカン構造を有するデンプン代謝関連酵素類、及びその遺伝子。
発明者：中村保典・鈴木英治・鈴木倫子・大段隆史・高橋純一郎・都筑幹夫・藤原祥子・藏野憲秀
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2003年9月2日
出願番号：特願2003-310688
14. 発明の名称：デンプン合成関連酵素の機能の解析方法
発明者：鈴木英治・中村保典・吉野友博・高橋純一郎
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2004年3月12日

出願番号：特願2004-71563

- 1 5. 発明の名称：アミノ酸置換によるイネスターチシンターゼ IIa 型 (SSIIa) の活性制御法
発明者：中村保典・藤田直子・ペリジオ フランシスコ Jr.
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2004年3月23日
出願番号：特願2004-84794
- 1 6. 発明の名称：デンプン合成関連酵素等の機能解析法
発明者：藤田直子、中村保典.
出願人：科学技術振興機構
出願日：2004年7月7日.
出願番号：特願2004-200863
- 1 7. 発明の名称：スターチシンターゼ IIIa 型の機能解明と新規デンプン作出
発明者：藤田直子、中村保典、吉田真由美、齋藤かほり、廣近洋彦、宮尾安藝雄..
出願人：科学技術振興機構，農業生物資源研究所
出願日：2004年7月15日.
出願番号：特願2004-209174（国内優先権主張出願2005年7月11日）
- 1 8. 発明の名称：イネ由来デンプン合成酵素 SSIIa を発現させたシアノバクテリアの形質転換体、これを
用いた SSIIa の機能解析法、並びに同形質転換体によって生産される多糖
発明者：鈴木英治、中村保典、吉野友博、高橋由佳
出願人：科学技術振興機構
出願日：2004年7月23日.
出願番号：特願2004-215621
- 1 9. 発明の名称：カドミウムフリーデンプンの調製法.
発明者：中村保典、藤田直子、横沢広嗣.
出願人：科学技術振興機構，（有）日本スターチ総研
出願日：2005年4月12日
出願番号：特願2005-115000
- 2 0. 発明の名称：プルラナーゼ活性が低下しているイネ変異体およびイネ変異体の
生産方法ならびに当該イネ変異体により合成されるデンプン.
発明者：藤田直子、中村保典、吉田真由美、廣近洋彦、宮尾安藝雄.
出願人：科学技術振興機構，農業生物資源研究所
出願日：2005年7月15日
出願番号：特願2005-207678
- 2 1. 発明の名称：デンプン合成酵素を発現する形質転換およびその利用
発明者：中村保典、鈴木英治、高橋由佳
出願人：科学技術振興機構
出願日：2005年7月15日.
出願番号：特願2005-207695

②海外出願

1. 発明の名称：デンプン合成酵素類
発明者：中村保典、藤田直子、佐藤光
出願人：科学技術振興事業団
出願日：2002年9月10日
出願番号：PCT/JP02/09221

(4) 受賞等

①受賞

1. 都筑幹夫 マリンバイオテクノロジー学会 平成 16 年度学会賞 (論文賞)

②新聞報道

1. 被取材者名：中村保典
タイトル：テーマは「コメ」大型研究着手
掲載誌名：秋田魁新報，2000 年 10 月 24 日掲載
2. 被取材者名：中村保典
タイトル：県立大のでんぷん研究
掲載誌名：秋田魁新報「社説」，2000 年 11 月 3 日掲載
3. 被取材者名：中村保典 (秋田県大・生物資源)
タイトル：秋田県立大学・中村保典教授 コメの酵素遺伝子を決定
掲載誌名：世界日報，2001 年 12 月 11 日掲載
4. 被取材者名：中村保典
タイトル：でんぷん成分，特徴を解明，コメの食味調節可能に，秋田県立大学が 129
品種分析
掲載誌名：日経産業新聞，2002 年 11 月 5 日掲載
5. 被取材者名：中村保典.
タイトル：‘デンプン構造解析技術を確立，秋田県立大学研究グループ 用途別コメの
開発に道’
掲載誌名：商経アドバイス 2003 年 3 月 25 日掲載
6. 被取材者名：中村保典、平田華諸里
タイトル：工業製品開発に応用 イネのデンプン解明へ
掲載誌名：秋田魁新報，2003 年 5 月 7 日掲載
7. 被取材者名：中村保典
タイトル：カドミ米からデンプン
掲載誌名：秋田魁新報夕刊，2005 年 11 月 30 日掲載

③その他 (執筆等)

1. 被取材者名：藤田直子
タイトル：秋田県立大学など、イネのデンプン合成変異株を単離，新機能デンプン開発へ
掲載誌名：日経バイオテク，2001年10月15日掲載，オンライン掲載)
 2. 著者名：藤田直子
タイトル：高等植物における starch synthase の研究状況
掲載誌名：糖質科学のこぼ(Glycoforum, 2002年3月15日掲載，インターネット執筆)
 3. 著者名：中村保典・藤田直子 (共同執筆)
タイトル：遺伝子と表現型
出版社等：不破英次他編 「澱粉科学の事典」，朝倉書店:108-119 (2003)
 4. 著者名：中村保典 (共同執筆)
出版社等：日本光合成研究会編、「光合成事典」、学会出版センター、(2003)
 5. 著者名：碓氷泰市 (共同執筆)
出版社等：化合物の性質－糖質類－ 化学便覧基礎編 I (日本化学会編) 639-654 丸善 (2004)
 6. 著者名：中村保典 (共同執筆)
タイトル：植物のいとなみ (3) －光合成 (放送大学教材)
出版社等：放送大学教育振興会、pp. 68-85, 2004
 7. 著者名：中村保典 (共同執筆)
タイトル：植物のいとなみ (4) －光合成と関連代謝 (放送大学教材)
出版社等：放送大学教育振興会、pp. 86-103, 2004
 8. 著者名：中村保典
タイトル：デンプンメタボリックエンジニアリング
出版社等：化学と生物，学会出版センター，印刷中
- (5) その他特記事項
なし

7 結び

植物のデンプン合成代謝に関するシステムティックな解析と、その結果を踏まえたデンプンメタボリックエンジニアリングへの挑戦が本研究の目標であった。研究開始当初、5年間で研究が大いに進むとは予想したが、現在のレベルにまで到達できるとは正直なところ予測できなかった。当時は到達点そのものが「視界不良」であった。アミロペクチンの分子構造とそのバリエーションに関する予想を超えた奥深さと精緻さに感嘆し、新規デンプンを創出する上でのメタボリックエンジニアリングの有効性を確信できた5年間であった。形質転換植物の形質は期待通り安定的に継代しており、それが基礎研究の貴重な解析素材としてフィードバックされるものであることも明確になった。イネを材料に選んだことは、この地味な研究を周囲から理解してもらう上からも、全ゲノム解析研究の成果を利用できたことから適切であった。デンプン合成という植物進化の集積産物のような膨大な代謝システムの全体像を、格段に精度をあげた状態で見るができるまでに到達できたと思っている。

もっともこのことは、研究の終わりを意味しない。デンプン合成系は種子細胞内で単独で機能できようはずがなく、他の代謝系（呼吸系など）、物質輸送系、遺伝子発現系などと緊密に協調しながら制御されているに違いない。何がシンク器官の物質生産機能を可能にしているのか、こうした疑問にはまだほとんど何も答えられないのが現状である。デンプン合成システムの全体像がようやく見えてきた現在、植物特有の炭水化物代謝の最も核心的なテーマに取り組む機が熟してきたといえよう。また、イネ種子の物質生産能を利用し、生産性を上げ、生産する新規デンプンの範囲を広げ、種子に外来物質を含め高付加価値の有用物質の生産工場として利用するメタボリックエンジニアリングは、これから本格的な成果が期待できる分野であろう。

プロジェクト運営に関しては、申し分ありませんでした。鈴木統括と井上技術参事のご指導、ご尽力に深く感謝申し上げます。事務参事はじめ東京事務所の方々にも格別のご協力を頂き、研究推進に傾注できたことを感謝しています。ほぼ満点の運営をいただき、それは成果に反映されています。

【研究チームのメンバー in winter, 2005】

2005年12月1-2日3グループ合同会議

都筑グループ



中村グループ

碓氷グループ

