

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18571

研究課題名(和文) 澱粉構造を変える酵素間相互作用のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of protein-protein interaction which govern the structure of starch.

研究代表者

クロフツ 尚子 (Crofts, Naoko)

秋田県立大学・生物資源科学部・RPD特別研究員

研究者番号：30583330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：澱粉構造を制御する分子機構を明らかにするため、野生型ジャポニカ米において酵素複合体の形成が明らかになっているスターチシンターゼ(SS)I、SSIIa、SSIIa、枝切り酵素(BE)IIbが欠損したイネ変異体を用いて、ゲル濾過法を行い、酵素間相互作用が変化を明らかにした。SSIが欠損するとSSIIaとSSIVbの溶出パターンが変化し、SSIIaが欠損するとSSIの溶出パターンが変化した。一方、BEIIbが欠損するとBEIIaの溶出パターンが変化した。以上のことから特定のアイソザイムが欠損するとアイソザイム間で酵素複合体の形成を相補していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanisms which control the molecular structure of starch, protein complex formation of starch biosynthetic enzymes were analyzed by gel filtration chromatography using developing mutant rice seeds which lack starch synthase (SS)I, SSIIa, SSIIa or branching enzyme (BE)IIb since these enzymes are known to form protein complexes in wild type Japonica rice. SSI null mutant showed an altered elution pattern of SSIIa and SSIVb, while SSIIa null mutant showed an altered elution pattern of SSI. In addition, BEIIb null mutant showed an altered elution pattern of BEIIa. Taken together, formation of starch biosynthetic enzyme complexes are likely to be complemented by the isozymes in the absence of specific enzymes.

研究分野：澱粉生合成

キーワード：イネ 澱粉 アミロペクチン 酵素間相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) 米澱粉の主成分であるアミロペクチンは秩序だった分岐構造をしている。アミロペクチンの枝の頻度や長さは、澱粉の糊化温度・結晶性・粘弾性などに影響を与え、米の炊飯・加工特性や工業利用用途を大きく左右する。用途に応じて求められる澱粉特性は多様であるが、これらを制御する分子機構は未解明な部分が多い。

(2) アミロペクチンは少なくとも以下の4種類の澱粉生合成関連酵素 1,4 結合のグルカン鎖を伸長するスターチシンターゼ(SS) 1,6 結合の分岐鎖を形成する枝作り酵素(BE) 1,6 結合の分岐鎖を取り除くイソアミラーゼ(ISA)やプルラナーゼ(PUL)などの枝切り酵素、澱粉合成の初期過程で関与が示唆されるフォスフォリラーゼ(Pho1)によって合成される。

(3) それぞれの酵素には基質特異性が異なる複数のアイソザイムが存在し、イネ胚乳のアミロペクチン合成においては、SSIIIaがアミロペクチン長鎖(グルコース重合度(DP) >30)を合成し、BEIが非結晶領域の分岐鎖を、BEIIbが結晶領域の分岐鎖を形成する。BEIIbが形成したアミロペクチン短鎖(DP 6-7)は、SSIによってDP 8-12に伸長され、活性型SSIIaをもつインディカ米では、さらにDP 12-24へ伸長される(Fujita, 2014)。

(4) 複数の酵素が共働し、適切に制御されるからこそ、規則だった構造を持つアミロペクチンが形成できると考えられており、イネを始めとした穀類では、複数の澱粉生合成関連酵素が、物理的に相互作用し、多様な組み合わせの酵素複合体を形成することが明らかになってきた(Tetlow et al., 2004; Tetlow et al., 2008; Crofts et al., 2015; Ahmed et al., 2015)。また、*in vitro* 実験においても、大腸菌発現・精製したイネ BE は SS I および Pho1 と相互作用し、互いの機能を相乗的に促進することが明らかになっている(Nakamura et al., 2014; Nakamura et al., 2017)。しかし、澱粉生合成関連酵素の複合体形成とアミロペクチン構造の関係は不明である。

2. 研究の目的

複雑で精密に制御された分子構造をもつアミロペクチンが、酵素複合体によって、どのように合成されるのか? その詳細な分子機構を明らかにすることを最終目的とした。

本研究では、野生型のジャポニカ米において酵素複合体を形成することが明らかになっているアイソザイムのうち、欠損すると澱粉構造が激変するイネ変異体(SSI, SSIIa, SSIIIa, BEIIb)に着目し、これらの酵素の発現量が低下、または、完全に欠損すると、酵素間相互作用がどのように変化するかを明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SSI, SSIIa, SSIIIa, BEIIbの発現量が、低下または完全に欠損したイネ変異体の登熟種子(開花後10-15日に冷凍保存)から可溶性タンパク質を抽出し、ゲル濾過法および免疫沈降法を行った。

(2) 上記の可用性タンパク質を Superdex200 担体を用いたゲル濾過法により、ネイティブ分子量ごとに分画し、各澱粉生合成関連アイソザイムがどの分子量に存在するかを明らかにした。各溶出画分を限外濾過(Amicon Ultra 50 kDa cut off)で濃縮後、煮沸変性し、SDS-PAGEゲルで分離した。PVDF膜に転写、ブロッキング後、10種類のアイソザイム特異的抗体(SSI, SSIIa, SSIIIa, SSIVb, BEI, BEIIb, BEIIa, ISA1, PUL, Pho1)を一次抗体として、ウエスタンブロットを行った。

(3) 酵素複合体の構成成分を明確にするため、免疫沈降法を行った。先に述べた可溶性タンパク質抽出液とアイソザイム特異的抗体(SSI, SSIIa, SSIIIa, SSIVb, BEI, BEIIb, BEIIa, PUL, Pho1)を混合し、抗原抗体反応後、Protein A Sepharose 担体を加えた。十分に洗浄した後、抗体タンパク質複合体を溶出した。タンパク質複合体を煮沸変性後、(2)に示した方法でウエスタンブロットを行った。

(4) SSIIa活性を明らかにするため、活性染色法の条件検討を行った。ゲルのアクリルアミド濃度は5-10%、プライマーとなる物質は分岐の長さや頻度が異なるグルカン(グリコゲン・アミロペクチン・クラスターデキストリン) 反応液のpHは6-10で検討した。

4. 研究成果

(1) SSI欠損イネ変異体

ゲル濾過法の結果から、イネ胚乳アミロペクチンの短鎖を伸長するSSIの発現量が低下したイネ変異体では、いずれの澱粉生合成関連酵素の溶出パターンも野生型ジャポニカ米のものと同様であった。一方、SSIが完全に欠損すると、野生型ジャポニカ米では幅広い分子量に溶出していたSSIIaとSSIVbが200-400 kDaには溶出せず、高分子量(>700 kDa)にのみ溶出することが明らかになった。また、SSIが欠損すると、高分子量(>700 kDa)に溶出するBEIIbの割合が増すことも明らかになった。

これらのことから、(i) 野生型のジャポニカ米で形成されることが明らかになっている200-400kDaのSSI-SSIIa-BEIIb複合体を形成するためには一定量のSSIが必要であること、(ii) 一般的なジャポニカ米のSSIIa活性は、インディカ米の10%程度しかないにもかかわらず、SSIが欠損するとSSIIaの溶出分子量が変化したことから、複合体形成において、SSIIIaが重要な役割を担うことが推察された。

免疫沈降法の結果から、SSI が欠損すると野生型のジャポニカ米では見られなかった Pho1 と SSIIIa の相互作用が起こることが明らかになり、新たな組合せの酵素複合体の形成が示唆された。

(2) SSIIa 欠損イネ変異体

ゲル濾過法の結果から、SSIIa が完全に欠損すると 200-300 kDa に溶出する SSI の量が減少し、モノマーに溶出する SSI の量が微増した。その他の澱粉生合成関連酵素の溶出パターンに大きな変化は見られなかった(雑誌論文、学会発表)。

従前のグリコーゲンをプライマーとした SS 活性染色法では、SSI と SSIIIa の活性は検出できたが、SSIIa の活性が検出できていなかった。しかし、本研究の過程で、SSIIa の重要性が判明し、SSIIa 活性の強弱を明確にする必要性が出てきた。その為、SSIIa 活性染色法の条件検討を行った。

その結果、(i) プライマーとなるグルカンは分岐鎖が短いグルコーゲンや S 型アミロペクチン(ジャポニカ米由来)よりも、分岐鎖が長い L 型アミロペクチン(トウモロコシ由来)が適し、(ii) プライマーの濃度は 0.05% 前後の低濃度、(iii) 反応条件はグルカン分解酵素活性を抑えるアルカリ性反応液(pH 9-10)が適していることが判明した(雑誌論文)。

SSIIa が酵素複合体の形成に重要であることが示唆されたが、これまで我々が作出したイネ変異体は SSIIa 活性が弱いジャポニカ米由来であった。SS アイソザイム間の相補作用を明確にするため、SSI または SSIIIa が欠損したジャポニカ米由来変異体と高活性型 SSIIa を持つインディカ米を交配し、高活性型 SSIIa を導入した。

完熟種子の澱粉構造をキャピラリー電気泳動法で分析したところ、高活性型 SSIIa を導入した SSI 欠損イネ変異体の鎖長分布は、野生型のものに非常に似ていた。従って、SSIIa は SSI の短鎖伸長機能の大部分を相補できることが明らかになった。一方、SSIIa は SSIIIa の長鎖伸長機能を相補できず、SSI と SSIIIa は SSIIa の中間鎖伸長機能を相補できないことも明らかになった(雑誌論文、学会発表、学会発表)。これら新系統の酵素複合体については、今後、解析を行う。

(3) SSIIIa 欠損イネ変異体

ゲル濾過法の結果から、イネ胚乳アミロペクチンの長鎖を伸長する SSIIIa の発現量が低下した変異体では、SSI の発現量が増し、特に野生型では SSI の溶出が極めて少なかった 700 kDa 以上の高分子量に SSI が溶出した。この分子量(>700 kDa)は、通常、野生型の SSIIIa が溶出する分子量であり、SSIIIa が欠損したことにより、SSI が SSIIIa を相補したと考えられる(雑誌論文、学会発表)。

(4) SSI 低発現・SSIIIa 欠損イネ変異体

SSI と SSIIIa が両方欠損すると不稔になるが、SSI が低発現で SSIIIa が欠損した二重変異体は稔実する(Fujita et al., 2011)。SSI 低発現・SSIIIa 欠損イネ変異体を用いてゲル濾過法を行った。その結果、SSIIa の溶出パターンが激変し、野生型ジャポニカ米で溶出していた 400 kDa 以上には溶出せず、200-300 kDa にのみ SSIIa が溶出することが明らかになった(雑誌論文、学会発表)。

(5) BEIIb 欠損イネ変異体

ゲル濾過法の結果から、イネ胚乳アミロペクチンの短鎖を形成する BEIIb が欠損すると、野生型では 300kDa 以下にのみ溶出していた BEIIa が、200 kDa- >700 kDa の高分子量に幅広く溶出することが明らかになった。

BEIIb が欠損すると澱粉構造が大きく変わるため、これまで BEIIa は BEIIb を全く相補できないと考えていたが、少なくとも酵素複合体の形成においては、BEIIa も何らかの相補的役割を担う可能性が示唆された。

(6) 考察

以上のように、特定の澱粉生合成関連酵素が欠損すると、同じクラスのアイソザイムの溶出分子量が変化したことから、酵素複合体の形成においてアイソザイム間で相補していることが示唆された。また、澱粉生合成関連酵素複合体の形成において、構成成分である酵素の活性の有無とタンパク質の有無では、他のアイソザイムの相互作用に与える影響が異なることも示唆された。

澱粉生合成関連酵素の酵素複合体形成の研究は、トウモロコシを用いたカナダのグループが先行しているが、トウモロコシでは SSI 欠損変異体はいまだ単離されておらず、多重変異体の作成も容易ではない。しかし、澱粉生合成関連遺伝子は穀類の間で保存性が高いため、本研究で得られた成果は、他の穀類における澱粉研究の礎となる重要なものである。

<引用文献>

Fujita N. Starch biosynthesis in rice endosperm. *Agri-Biosci Monogr.* 2014; 4: 1-18.

Nakamura Y, Aihara S, Crofts N, Sawada T, Fujita N. In vitro studies of enzymatic properties of starch synthases and interactions between starch synthase I and starch branching enzymes from rice. *Plant Sci.* 2014; 224: 1-8.

Nakamura Y, Ono M, Utsumi C, Steup M. Functional interaction between plastidial starch phosphorylase and starch branching enzymes from rice during the synthesis of branched maltodextrins. *Plant Cell Physiol.* 2017; 53:869-78.

Tetlow IJ, Wait R, Lu Z, Akkasaeng R, Bowsher CG, Esposito S, Kosar-Hashemi B, Morell MK, Emes MJ. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *Plant Cell*. 2004; 16: 694–708.

Tetlow IJ, Beisel KG, Cameron S, Makhmoudova A, Liu F, Bresolin NS, Wait R, Morell MK, Emes MJ. Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiol*. 2008; 146: 1878–91.

Ahmed Z, Tetlow IJ, Ahmed R, Morell MK, Emes MJ. Protein-protein interactions among enzymes of starch biosynthesis in high-amylose barley genotypes reveals differential roles of heteromeric enzyme complexes in the synthesis of A and B granules. *Plant Sci*. 2015; 233: 95–106.

Fujita N, Satoh R, Hayashi A, Kodama M, Itoh R, Aihara S, Nakamura Y. Starch biosynthesis in rice endosperm requires the presence of either starch synthase I or IIIa. *J Exp Bot*. 2011; 62: 4819–31.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Miura Satoko, Crofts Naoko, Saito Yuhi, Hosaka Yuko, Oitome Naoko F, Watanabe Toshiyuki, Kumamaru Toshihiro, Fujita Naoko “Starch synthase IIa-deficient mutant rice line produces endosperm starch with lower gelatinization temperature than japonica rice cultivars” *Frontiers in Plant Science* 9, 645 (2018) 査読有り
DOI: 10.3389/fpls.2018.00645

Hayashi Mari, Crofts Naoko, Oitome Naoko F., Fujita Naoko “Analyses of starch biosynthetic protein complexes and starch properties from developing mutant rice seeds with minimal starch synthase activities.” *BMC Plant Biology* 18, 59 (2018) 査読有り
DOI: 10.1186/s12870-018-1270-0

Miura Satoko, Crofts Naoko, Abe Misato, Murai Koji, Fujita Shuzo, Fujita Naoko “Identification of a point mutation in the granule-bound starch synthase I gene (*GBSSI*) in a *waxy* diploid wheat mutant and design of molecular markers for backcrossing” *Journal of Applied Glycoscience*, 65, 1–1 (2018) 査読有り
DOI: 10.5458/jag.jag.JAG-2017_012

Crofts Naoko, Nakamura Yasunori, Fujita Naoko “Review: Critical and speculative review of the roles of multi-protein complexes in starch biosynthesis in cereals” *Plant Science* 262, 1–8. (2017) 査読有り
DOI: 10.1016/j.plantsci.2017.05.007

Nakamura Yasunori, Ono Masami, Sawada Takayuki, Crofts Naoko, Fujita Naoko, Steup Martin “Characterization of the functional interactions of the plastidial starch phosphorylase and starch branching enzyme from rice endosperm during reserve starch biosynthesis” *Plant Science* 264, 83–95 (2017) 査読有り
DOI: 10.1007/s11103-017-0614-8

Crofts Naoko, Sugimoto Kyohei, Oitome Naoko F., Nakamura Yasunori, Fujita Naoko “Differences in specificity and compensatory functions among three major starch synthases determine the structure of amylopectin in rice endosperm” *Plant Molecular Biology* 94, 399–417 (2017) 査読有り
DOI: 10.1007/s11103-017-0614-8.

Itoh Yuuki, Crofts Naoko, Abe Misato, Hosaka Yuko, Fujita Naoko “Characterization of the endosperm starch and the pleiotropic effects of biosynthetic enzymes on their properties in novel mutant rice lines with high resistant starch and amylose content” *Plant Science* 258, 52–60 (2017) 査読有り
DOI: 10.1016/j.plantsci.2017.02.002

Itoh Yuuki, Crofts Naoko, Abe Misato Oitome Naoko F., Fujita Naoko “Screening method for novel rice starch mutant lines introduced gene encoding *starch synthase IIa (SSIIa)* and *granule-bound starch synthase I (GBSSI)* genes from indica cultivar into Itoh *branching enzyme IIb (BEIIb)*-deficient mutant line” *Journal of Applied Glycoscience* 63: 23–30 (2016) 査読有り
DOI: 10.5458/jag.jag.JAG-2015_022

[学会発表](計16件)

三浦聡子, クロフツ尚子, 齋藤雄飛, 保坂優子, 追留那緒子, 渡辺紀之, 熊丸敏博, 藤田直子 “スターチシンターゼ(SS) IIa タンパク質欠損変異体における酵素複合体の解析と胚乳澱粉特性” 第133回日本育種学会, 419 (2018)

藤田直子, クロフツ尚子, 保坂優子, 阿部美里, 中泉裕子 “高アミロース米2系統の実用化に向けて1. 特徴および利用法” 第133回日本育種学会, 417 (2018)

川本朋彦, 柴田智, 加藤和直, 高橋竜一, 保坂優子, 阿部美里, クロフツ尚子, 三浦聡子, 追留那緒子, 藤田直子 “高アミロース米2系統の実用化に向けて 2. 農業形質、澱粉構造” 第133回 日本育種学会, 417, (2018)

藤田直子, 高原美香, 保坂優子, クロフツ尚子, 船木博幸 “難消化性澱粉を多量に含む変異体米の育種と精米を用いた食品への加工と澱粉構造の変化” 第66回 日本応用糖質科学会, Aa-7 (2017)

三浦聡子, クロフツ尚子, 齋藤雄飛, 保坂優子, 追留那緒子, 渡辺紀之, 熊丸 敏博, 藤田直子 “スターチシンターゼ(SS)IIa 欠損変異体 EM204 における変異箇所の検出と胚乳澱粉特性” 第152回 農芸化学会東北支部会 (2017)

Crofts Naoko, Sugimoto Kyohei, Oitome Naoko F., Nakamura Yasunori, Fujita Naoko “Differences in specificity and compensatory functions among three major starch synthases in rice endosperm” Starch Round Table (2017)

クロフツ尚子, 林真里, 三浦聡子, 藤田直子 “主要なスターチシンターゼ(SS)活性が低下したイネ変異体における澱粉生合成関連酵素複合体の解析” 第66回 日本応用糖質科学会, Aa-1 (2017)

三浦聡子, クロフツ尚子, 齋藤雄飛, 保坂優子, 追留那緒子, 渡辺紀之, 熊丸 敏博, 藤田直子 “スターチシンターゼ(SS)IIa タンパク質欠損変異体の変異箇所の特定と胚乳澱粉の特性解析” 第66回 日本応用糖質科学会, Aa-2 (2017)

三浦聡子, クロフツ尚子, 阿部美里, 村井耕二, 岩城啓子, 藤田修三, 藤田直子 “1粒系モチコムギの変異箇所の同定および分子マーカーの構築” 第9回 日本応用糖質科学会東北支部会, 9 (2017)

伊藤優季, クロフツ尚子, 阿部美里, 保坂優子, 藤田直子 “高アミロースで難消化性の性質をもつ澱粉を蓄積する新規変異体米系統の単離および解析” 第9回 日本応用糖質科学会東北支部会, 20 (2017)

藤田直子, 齋藤雄飛, 高原美香, 保坂優子, クロフツ尚子, 渡辺紀之 “低カロリー機能性米の実用化に向けた試み 1. 単回摂取ヒト試験” 第131回 日本育種学会, 105 (2017)

伊藤優季, クロフツ尚子, 阿部美里, 保坂優子, 三浦聡子, 藤田直子 “高アミロースかつ高難消化性澱粉を蓄積する新規変異体米系統の胚乳澱粉の解析” 第131回 日本育種学会, 106 (2017)

川本朋彦, 柴田智, 加藤和直, 高橋竜一, クロフツ尚子, 三浦聡子, 阿部美里, 追留那緒子, 藤田直子 “難消化性澱粉を含む低カロリー米品種の開発 4. *ss3a/ss4b* および *ss3a/be2b* のBC₃F₄世代の特性調査” 第131回 日本育種学会, 107 (2017)

クロフツ尚子, 杉本恭兵, 追留那緒子, 中村保典, 藤田直子 “Starch synthase (SS) IIa は SSIIIa の長鎖伸長機能を相補できない” 第65回 日本応用糖質科学会, Aa-4 (2016)

伊藤優季, クロフツ尚子, 阿部美里, 保坂優子, 藤田直子 “枝作り酵素(BE)IIb 非存在下でのスターチシンターゼ(SS)アイソザイム間の競合と澱粉構造への影響” 第65回 日本応用糖質科学会, Aa-3 (2016)

藤田直子, 豊澤佳子, 川越靖, 松島良, クロフツ尚子, 小川雅広, 福田真子, 中村保典 “スターチシンターゼ SSIIIa と SSIVb が同時に欠損するとなぜ澱粉が球形に変化するのか?” 第65回 日本応用糖質科学会, Aa-5 (2016)

〔その他〕

アウトリーチ活動の一環として、本研究で得られた成果の一部を、カナダの Connect Charter School および St. John's Kilmarnock School の中・高等学校の生徒に講演した。また、カナダの University of Calgary と University of Guelph において、大学院生や研究者に向けて講演を行った。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

クロフツ尚子 (CROFTS, Naoko)
秋田県立大学・生物資源科学部・客員研究員
日本学術振興会・RPD 特別研究員
研究者番号：30583330

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし

(4) 研究協力者

藤田直子 (FUJITA, Naoko)
秋田県立大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：90315599

中村保典 (NAKAMURA, Yasunori)
秋田県立大学・生物資源科学部・名誉教授
研究者番号：30013767