

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月14日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20248002

研究課題名（和文） 産業用素材としてのデンプンを合成する育種素材の作出

研究課題名（英文） Preparation of plant resources having a variety of starch used as industrial materials

研究代表者 中村 保典（NAKAMURA YASUNORI）

公立大学法人秋田県立大学・生物資源科学部・理事

研究者番号：30013767

研究成果の概要（和文）：将来産業用に応用できるデンプンをイネ種子に生産するバイオ技術を開発するために、合成に関与するさまざまな酵素群の機能を制御した変異体と遺伝子組換え体のライブラリーを作製した。その性質を精査した結果、各酵素アイソザイムの活性レベルとデンプン分子構造、デンプン品質間の関係を明らかにすることができ、今後、こうした各イネ系統を育種素材として使うための初のデータベースが構築された。主要酵素の性質も明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In an attempt to establish the way in which the starch in rice endosperm can be used as industrial materials, mutants and transgenic lines were prepared and their libraries were constructed. Analysis of endosperm starches in these mutants and transformants established the relationship between the activities of individual enzymes, the fine structure of amylopectin, and physicochemical and functional properties of these starches. In addition, key enzymes such as starch branching enzymes and plastidial phosphorylase and their functional interactions were characterized.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
年度			
総計	36,600,000	10,980,000	47,580,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：デンプン、イネ育種、植物バイオテク、代謝工学、イネ変異体、イネ組換え体、酵素、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

デンプンおよびその分解産物であるデキストリン、オリゴ糖は、エネルギー源としての他、肥満などの生活習慣病に予防効果があり、免疫賦活作用があることが最近注目されている。デンプンはまた、接着性・フィルム性・物質包摂性を持つことから、抗菌性フィ

ルムや医薬品のコーティング剤の他、偏光性フィルムやカーボンナノチューブとしての利用など、脱石油化学系の天然素材としてのデンプンの利用が図られ始めている。

しかし産業用のデンプンは、植物種が生産するデンプンをそのまま原料として使用しているに過ぎない。近年のデンプンバイオ研

究の成果は、野生型の植物が示すデンプンの性質はデンプン分子が示しうる特性ポテンシャルのほんの一部であり、その構造をバイオ技術で変更することによって、通常の野生型植物品種では示しえない画期的な性能を有する新デンプンが生産可能であることを示している（中村、2006年）。

わが国では従来、デンプン形質の改良育種には、米飯食味の向上という観点から、アミロース量を制御することに主眼が置かれてきた。一方デンプンの主成分（65–85%）であるアミロペクチンの構造改変を介したデンプン品質の改良をめざした育種には実施例が乏しいのが実情である。しかし世界的には、アミロペクチン構造の改変によるデンプンの改質には極めて大きな期待がかけられている。

しかし、本ストラテジーで研究を実施するにはいくつかの困難が有する。第一に、植物のアミロペクチン合成代謝は極めて複雑な酵素系から成る。その合成は、グルコース直鎖を伸長するスターチセンターゼ（SS）、分岐鎖を形成する枝作り酵素（BE）、アミロペクチンの単位であるクラスターの構造をトリミングする分岐分解酵素の枝切り酵素（DBE）の協同作用で行われ、しかも SS, BE, DBE は構造と機能が異なる多数のアイソザイム（イネではそれぞれ、10, 3, 4 種類）が存在し、かつ各アイソザイムの発現量は厳密に制御されているという極めて精妙かつ複雑な制御系のもとで成り立っている。

今後遺伝子組換え技術を中心とした新規デンプン開発競争が激化すると予想される。イネで既に着手した豪・英・中・韓国などの国際競争に遅れを取らないためにも、わが国でも産業利用を意識したバイオ技術によるコメデンプンの開発につながる基本技術の確立と育種素材の作出が急務であった。

2. 研究の目的

本研究では、網羅的なイネデンプン変異体および形質転換体のライブラリーを構築した上で、アミロペクチンとアミロースの分子構造をバイオテクノロジーによってどの程度まで改変し得るのか、その可能性の限界と範囲を見極める。このテラーメイド・デンプンがどのような物性を有するかを解析し、将来どのような産業分野で利用可能かを具体的に調査する。

(1) イネデンプン変異体システムの整備と評価
イネ受精卵に MNU 処理する方法により、組換え体と相同のデンプン変異体ライブラリーを複製し、育種素材候補としての評価を行う。

(2) 組換え体による新規デンプンの作製

①イネ形質転換体ライブラリー作製の汎用コンストラクトの作成

ライブラリーを作成するため多種類の遺

伝子制御に汎用型の組換え用 DNA コンストラクトを作製する。またプロモーターも複数使用して調査する。植物ホルモンはデンプン合成に関わる遺伝子発現に影響を与える可能性が高い。そこで種子特異的に働くプロモーター下流にサイトカイニン合成遺伝子 *ipt* をつなげ、イネに導入し、収量やデンプン蓄積などの改変を検証する。

②複数遺伝子発現の同時制御

デンプン合成の制御には、酵素間の相互作用（実体は全く不明）が極めて重要である。本研究ではクラスをまたがった複数の遺伝子を同時に制御する RNAi 法を用いて調査する。

(3) デンプン形質に関するデータベースの作成および産業用デンプンの形質評価法の確立

本研究で得られる広範囲のデンプン資源について、多角度からデンプン物性を分析し、遺伝子制御ごとのデンプン形質と物性との関係を整備してデータベース化するとともに、具体的な産業利用分野（食品、製紙、フィルム製造など）のエキスパートとの協議を通じて、各デンプンがどのような製品に最適で、その品目がデンプンによってどのような新機能が付与されるかを明らかにする。

(4) 形質転換体と等価な形質を有する変異体のスクリーニング

組換え体のデンプンと同質の形質を有する変異体を単離し、これを育成品種候補として形質を詳しく解析する。複数遺伝子を制御した系統の選抜法としては、この方法が最も効率的である。

3. 研究の方法

(1) MNU 受精卵処理による澱粉生合成関連遺伝子変異の作製；日本型水稻品種「台中 65 号」(T65)及び「金南風」の MNU 受精卵処理を行い、M2 より目視及び SDS-PAGE 分析により変異の選抜を行うと共に、胚乳変異 1,500 系統の登熟種子の Native-PAGE 及び SDS-PAGE 分析により、酵素タンパク質レベルでの変異の検出を行った。

(2) イネデンプン形質転換体および変異体ライブラリーを作製した上で、アミロペクチンの分子構造やデンプン構造および物性をバイオテクノロジーによってどの程度まで改変し得るのか、その可能性の限界と範囲を見極める。

(3) こうして作成したテラーメイド・デンプンがどのような物性を有するかを解析し、将来どのような産業分野で利用可能かを調査・試行する。

(4) デンプン合成代謝制御過程をより詳細に理解するには、精製酵素を用いた *in vitro* 分析実験が不可欠である。BE や DBE の一種イソアミラーゼ (ISA) の他、まだ機能が明

確ではない酵素(ホスホリラーゼ Pho1 など)がある。これらの酵素を精製し、その機能を *in vitro* 分析実験によって解明する。また、複数の酵素間の相互作用を解析する実験系を確立した上で明らかにする。

(5) 研究実施期間中に、国際シンポジウムを開催し、成果を世界にアピールするとともに、世界のリーダーと意見交換し、共同研究の可能性を討議する。

4. 研究成果

(1) イネデンプン変異体ライブラリーの作製

①水稲品種「金南風」及び「T65」の MNU 受精卵処理を行い、外観形質に基づく変異体の作製と収集を進め、300 系統以上の変異系統を新たに追加することが出来た。本変異体集団の中から、デンプン合成関連酵素の活性とタンパク質量をアクリルアミド電気泳動法で検出することによって標的変異体を選抜する方法を検討し、SS や DBE、BEI、Pho1 活性が変更された変異体を選抜することに成功した。

②台中 65 号及び金南風の MNU 受精卵処理後代の TILLING 解析により、大よそ 500M2 集団を解析することにより全ての遺伝子について1個のナンセンス変異が得られることが示された。現在 MNU 受精卵処理により胚乳変異について1,500 系統以上、形態形質について6,000 以上の変異系統を作製・維持していることから、本変異プールは、イネゲノム中に含まれる全ての遺伝子について少なくとも10 個以上の変異を含むことが予想されるサチュレーションミュータントライブラリーであることが示唆された。

(2) イネ形質転換体の作製

①RNAi 法によって、3 種類の BE 遺伝子 (BEI, BEIIa, BEIIb) について、単独および複数の遺伝子発現を同時に制御したイネ形質転換体を作製した。次いで、ISA1 と ISA2 の発現を抑制した形質転換体を RNAi 法で作製した。また、ISA2 遺伝子を高発現させたイネ形質転換体を作製した。

②イネ種子の登熟初期に種子のシンク機能の発現を制御し、デンプン合成への影響を調べるために、植物ホルモンのサイトカイニンレベルが変動する形質転換体を作製した。

(3) イネ形質転換体および変異体ライブラリーのデンプンの構造解析および物性解析

①形質転換体や変異体のアミロペクチンの分子構造、熱糊化特性等を分析し、データベースを作成した。

このようなデンプンデータベースは初のケースで、今後新規デンプンがバイオ技術によって制御・開発され、それらが産業利用するために最も基本的な情報がまとめられたことを意味する。今後への波及効果の大きさは特筆されてよい。

②さらに加えて、BE変異体についてはさらに

解析を深めた。各BE変異体デンプンのレオロジー分析法を行い、データ収集した。またグルカンの分子量測定を行った結果、アミロペクチンの平均分子量として、金南風(野生型)では 4.0×10^7 (g/mol)、EM10 (BEIIb変異体)では 2.9×10^7 (g/mol)、EM19 (BEIIa変異体)では 4.1×10^7 (g/mol)、EM557 (BEI変異体)では 7.7×10^7 (g/mol)であった。各BEアイソザイム変異体間で、アミロペクチンの構造のみならず分子サイズが異なっている、つまり各BEアイソザイムがそれぞれ異なる代謝的機能を有することが証明された。

③イネ種子のホルモンレベルを改変し、登熟初期に種子のシンク機能を強化する形質転換体用を作成する目的で、Waxy およびプロラミンプロモーター下流にサイトカイニン合成遺伝子を連結し得られた種子を調査した。玄米一粒あたりの重量は強いプロモーターの WA: *ipt3* では 117~142%で、増収になったことが示された。イネ一粒におけるアミロース含量は、*ipt* 導入イネでアミロース含量が増えていた。以上の結果から、ホルモン調節によって、デンプンを質量ともに制御できる可能性が強く示唆された。

(4) 酵素機能および酵素間相互作用の解析
①イネデンプン合成のキー酵素である BE の3種類のアイソザイム BEI, BEIIa, BEIIb の性質を精査した結果、最低ドナー鎖の鎖長は DP12 である、転移鎖の最低鎖長は DP6 である、三者間では転移鎖の鎖長選択性が顕著に異なっていて、特に BEIIb においては、転移鎖はほとんど DP7 か DP6 であることが明らかになり、BE の反応メカニズムに関する理解が大幅に前進した(図1)。

1. 転移する鎖の長さはDP6以上 基質鎖の長さはDP12以上

2. 優先的に転移する鎖

- BEIIb: DP7, 6
- BEIIa: DP6-10
- BEI: DP10-12

3. 反応する鎖

- BEIIb: 外部鎖のみ
- BEIIa: 外部鎖、わずかに内部鎖
- BEI: 外部鎖、内部鎖

図1. イネBEアイソザイムの特性

②イネの BE, Pho アイソザイム間の反応特性をリコンビナント酵素標品を用いて解析し、両者が強くかつ互いの機能を活性化することによってグルカン合成を行うとの特筆すべき成果を得た。特に、酵素間の相互作用は相乗的であることを初めて明確にした点

は、デンプン代謝制御研究の新分野を開拓することにつながる成果と考える(図2)。

また、Pho1-BE相互作用によるプライマーを要しないグルカン合成反応は、デンプンの初期過程に関与する重要な反応である可能性が高まった。これまで全く不明であったグルカン合成初期過程のメカニズム解明に大きく寄与する成果となると期待される。

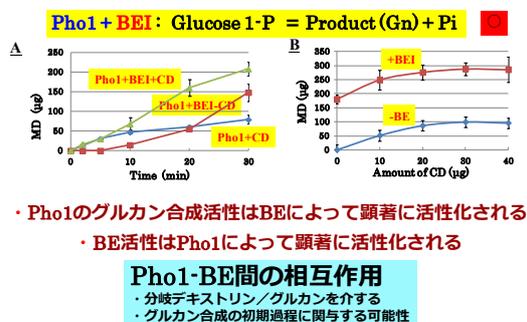


図2. Pho1-BE相互作用の解析

③BEの温度特性を調べた結果、触媒能の至適温度は20-25℃と例外的に低い。特にBEIIbは30℃以上の高温で活性が低くなり、このことがイネの高温障害の主原因となる可能性が示された。

④高等植物のISAは通常ISA1-ISA2のヘテロ複合体の状態が存在し、アミロペクチン分子がタンデムクラスター構造を形成するために不可欠なトリミング作用を行うという極めて重要な役割を担っている。ところがイネ胚乳にはヘテロ複合体のほかに、ISA1のみからなるホモ複合体が含まれている。両者の機能を形質転換体や精製酵素を用いて調べた結果、胚乳ではホモ複合体だけがデンプン合成に機能することが判明した。植物初の成果で、このことは、穀類は胚乳に特化したISA複合体を分化させてきたと推察される。ホモ複合体は熱耐性などにおいても、ヘテロ複合体とは性質が異なることも明らかになった。

(5) 新デンプンの産業利用の可能性調査

①イネ変異体デンプンの産業利用するためにカギとなる諸性質を調べた。即ち、BE変異体を重点に、デンプン粒径、吸水性、加熱膨潤度、加熱溶解度、消化性を調査した。BEアイソザイムごとに野生型のデンプンとは異なる独特のデンプン変異が生じること、それぞれ応用分野で興味ある素材となり得ることが明らかになった。

②変異体デンプンの食品への応用を検討するために、食品メーカーとの共同研究において、デンプン物性と食品の機能性(難消化性)や加工性の関連を調べた結果、多くの興味あるデータを得た。

(6) 国際シンポジウムの開催

これまでの成果を問うために、平成22年に、本分野の世界的な研究者を招待して秋田で国際シンポジウムを開催した。国内外で現在最も活発に研究成果を公表している研究者が参加し、活発な討議が行われ、新たな共同研究が提案された。平成23年度に、プロシーディングスを国際誌(Journal of Applied Glycosciences)に刊行した。

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44件)

- (1) 中村保典 澱粉合成代謝システムの解明と制御、応用糖質科学、査読有、2、(2012) 23-32.
- (2) Nakamura Y. 他3名中1番目 Functional interaction between plastidial phosphorylase and starch branching enzymes from rice during the synthesis of branched maltodextrins. Plant Cell Physiology. 査読有、53、(2012) 869-878.
- (3) Nakamura Y. 他4名中5番目 Functional diversity of isoamylase (ISA) oligomers: The ISA1 homo-oligomer is essential for amylopectin biosynthesis in rice endosperm. Plant Physiology. 査読有、156、(2011) 61-77.
- (4) Nakamura Y. 他4名中1番目 New assay method for starch branching enzyme and starch synthase by the chain-length distribution analysis. Journal of Applied Glycosciences. 査読有、58、(2011) 119-123.
- (5) Nakamura Y. 他2名中3番目 Effects of temperature on starch branching enzyme properties of rice. Journal of Applied Glycosciences. 査読有、58、(2011) 19-26.
- (6) 佐藤 光 米外観品質・食味研究の最前線 -米澱粉変異の作製と利用- 農業及び園芸. 査読有、86、257-269 (2011)
- (7) Satoh H., H. Matsusaka and T. Kumamaru. Use of *N*-methyl-*N*-nitrosourea treatment of fertilized egg cells for saturation mutagenesis of rice. Breeding Science. 査読有、60:475-485 (2010)
- (8) Nakamura Y. 他6名中1番目 Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm. Plant Cell Physiology. 査読有、51、(2010) 776-794.
- (9) Nakamura Y. 他4名中5番目 Starch biosynthesis in cereal endosperm. Plant Physiology and Biochemistry. 査読有、48、(2010) 383-392.
- (10) Nakamura Y. 他5名中5番目 Glucose 1-phosphate is efficiently taken up by

potato tuber parenchyma cells and converted to reserve starch granule. *New Phytologist*. 査読有、185, (2010) 663-675.

(11) Nakamura Y. 他 5 名中 4 番目 Development of coenzyme Q10-enriched rice using *sugary* and *shrunk* mutants. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*. 査読有、74, (2010) 182-184.
(12) Wabiko H. 他 4 名中 5 番目 Analysis of core genes supports the reclassification of strains *Agrobacterium radiobacter* K84 and *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 into the species *Rhizobium rhizogenes*. *Systematic and Applied Microbiology*. 査読有、33, (2010) 247-251.

(13) 堀 光代、長野宏子、阿久澤さゆり、下山田 真、吉田一昭、岐阜県産小麦粉の製パン性の検討—製粉法による粒度の面から—、日本調理科学会誌. 査読有、43, (2010) 31-37.

(14) Nakamura Y. 他 8 名中 9 番目 *Chlorella* starch branching enzyme (BE) can complement the function of BEIIb in rice endosperm. 査読有、50, (2009) 1062-1074.

(15) Nakamura Y. 他 5 名中 6 番目 Sequential analysis of α -glucooligosaccharides with α -(1-4) and α -(1-6) linkages by negative ion Q-TOF MS/MS spectrometry. *Journal of Carbohydrate Chemistry*. 査読有、28, (2009) 421-430.

(16) Nakamura Y. 他 16 名中 3 番目 Metabolic symbiosis and the birth of the plant kingdom. *Molecular Biology of Evolution*. 査読有、25, (2008) 536-548.

(17) Satoh H. and Y. Nakamura. 他 12 名中各 1 及び 14 番目 Plastidic α -glucan phosphorylase mutation dramatically affects the synthesis and structure of starch in rice endosperm. *Plant Cell*. 査読有、20, (2008) 1833-1849.

[学会発表] (計 2 6 件)

(1) 中村保典 澱粉生合成代謝システムの解明と制御、日本応用糖質科学会第 60 回大会、平成 23 年 9 月 29 日、北海道大学

(2) Nakamura Y. Revealing of complex system of starch synthetic metabolism in higher plants using rice mutants and transformants. *International Symposium on Induced Mutations in Plants*, (2008. 8. 13) Wien, Austria. 国連会議場

[図書] (計 3 件)

(1) Fujita N and Y. Nakamura. Distinct and overlapping functions of starch synthase isoforms. *Starch Book* (edited by I.

Tetlow). *SEB*. (2012) pp. 115-141. In press.

(2) 中村保典、澱粉研究懇談会、澱粉生合成、「澱粉の科学と技術」、山本和貴、松木順子、貝沼圭二編集)、2010 年、145-146.

(3) 中村保典、学会出版センター、種子デンプンの生合成 (「種子の科学とバイオテクノロジー」、原田久也監修)、2009 年、81-87.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：印刷用塗工紙

発明者：小野裕次ほか、(中村保典)

権利者：日本製紙株式会社

種類：

番号：

出願年月日：2009.3.30

国内外の別：国内

[その他]

(1) 中村 保典、日本応用糖質科学会学会賞、平成 23 年 9 月 29 日

(2) Nakamura Y. and N. Fujira. Meeting Report and Abstracts on the Meeting of the International Starch Symposium in Akita, 2010 “Frontiers of New Approaches to Starch Metabolism Dynamics”. *Journal of Applied Glycosciences*. 58, (2011) 151-174.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 保典 (Yasunori Nakamura)

研究者番号：30013767

(2) 研究分担者

我彦 広悦 (Hiroetsu Wabiko)

研究者番号：10191842

阿久澤 さゆり (Sayuri Akuzawa)

研究者番号：60256641

佐藤 光 (Hikaru Satoh)

研究者番号：70128031