植物の力を引き出す

ー未知の機能の解明・利用と新しい機能の付与を目指して一

「コメデンプンの改変」

秋田県立大学·生物資源科学部 植物分子生理グループ 藤田 直子

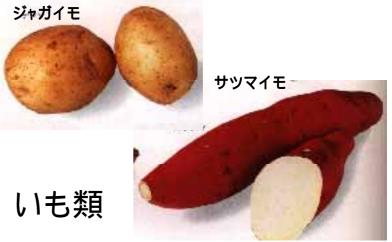
デンプン

さまざまな植物に含まれる





果物



豆類

多岐にわたって利用されている







菓子類



甘味料,オリゴ糖、修飾デンプンなどの原料





パン、パスタ

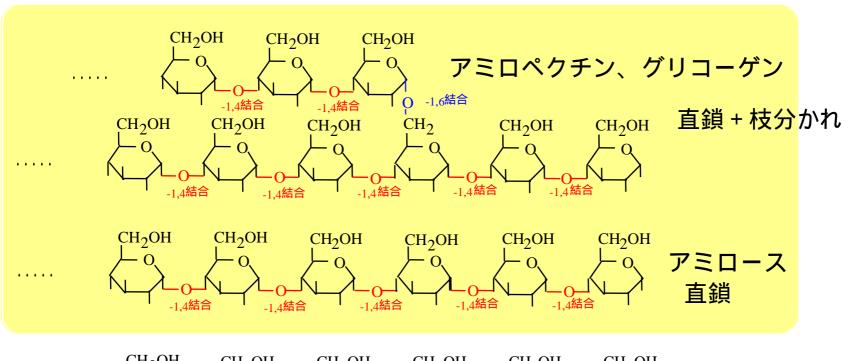




のみからなる多糖

グルコース ブドウ糖)

アミロペクチン 70-85%
・ -1,4グルコシド結合
・ -1,6グルコシド結合
アミロース 15-30%
・ -1,4グルコシド結合



アミロペクチンの構造

Α

В



A; Nikuni (1969)

B: French (1972)

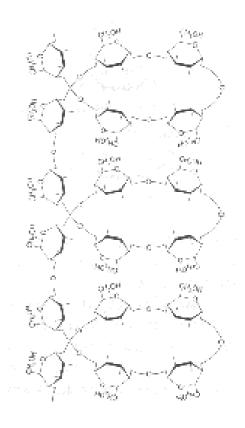
C; Hizukuri (1986)

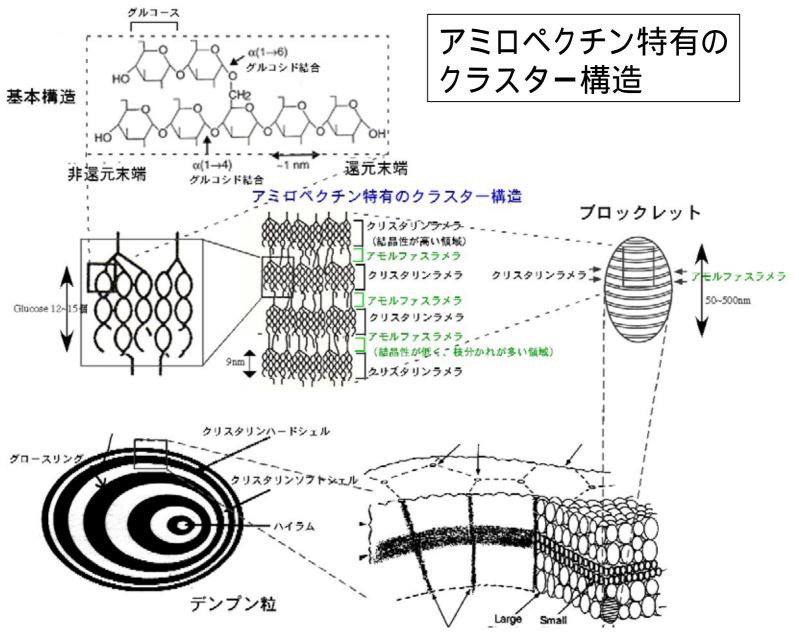
D; Robin et al., (1974)

グリコーゲンの構造



アミロースの構造

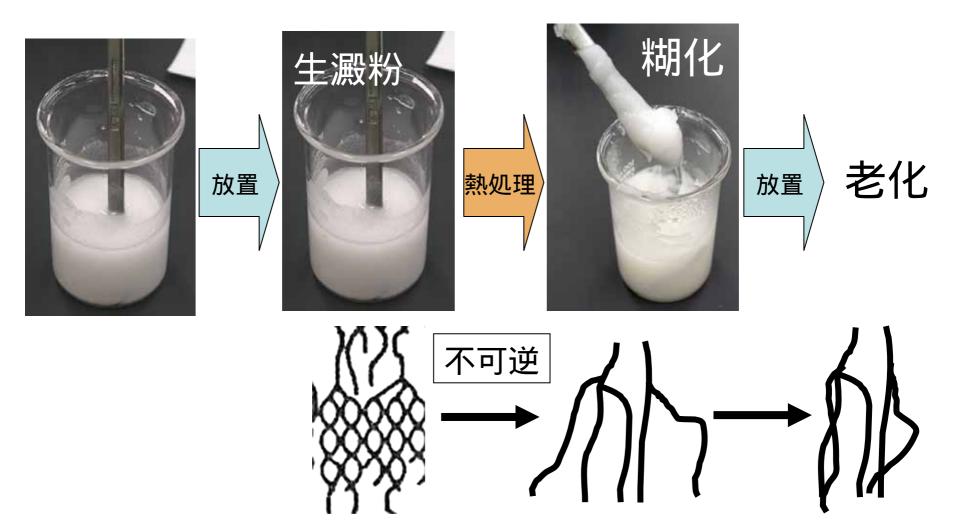




Gallant et al., (1997) Carbohydrate Polymers 32: 177-191; Smith et al., (1997) Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 67-87

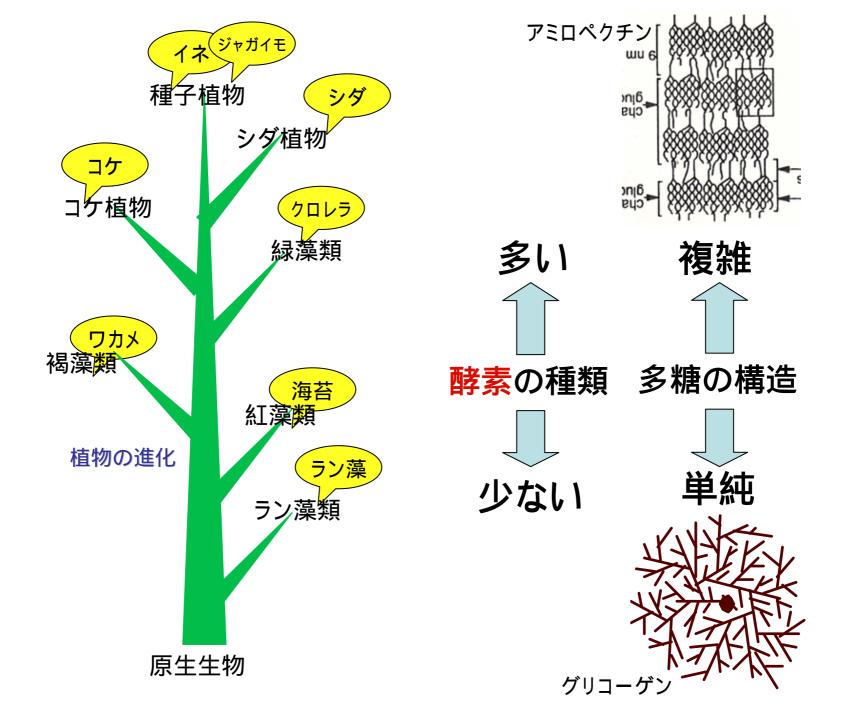
デンプンの特徴

水に溶けない 水と共に熱すると糊化する



デンプンのでき方

基質供給酵素(AGPase) 直鎖伸長酵素(SS) 枝作り酵素(BE) G1P ADPゲルコース ゲルカン直鎖 大分かれを含むゲルン鎖 G-G-G-G-G-G-G-G G-G-G-G G-G-G-G G-G-G-G-G-G-G P-P'A 枝作り酵素(BE) α-1.4-Glucan oligomer 直鎖伸長酵素(SS) 枝切り酵素(DBE) 太陽 アミロペクチン



イネの澱粉合成に関わる酵素

基質供給酵素(AGPase)

枝作り酵素(BE) LSUが4種類 SSUが2種類 BEI, BEIIa, BEIIb アミロペクチン アミロース たくさんの

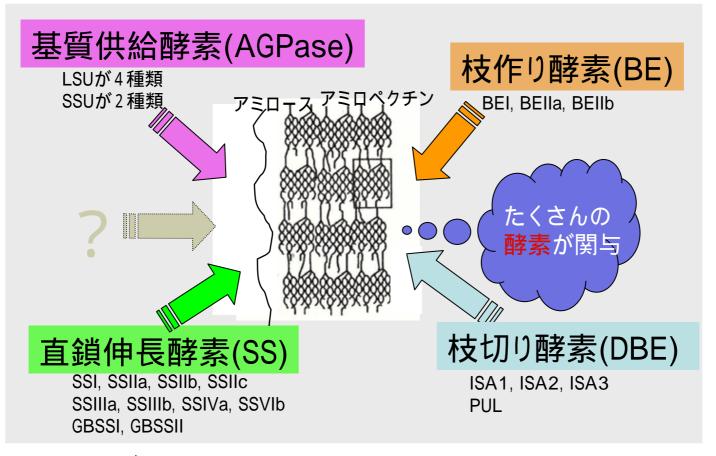
直鎖伸長酵素(SS)

SSI, SSIIa, SSIIb, SSIIc SSIIIa, SSIIIb, SSIVa, SSVIb GBSSI, GBSSII

枝切り酵素(DBE)

ISA1, ISA2, ISA3 PUL

デンプン生合成メカニズムの解明には・・・



各アイソザイムの機能,役割の解明が必要

変異体の利用 組換体の作出

In vivo実験

単離酵素の 生化学的解析

In vitro実験

さまざまなデンプン変異体

· 從来法(線、化学突然変異源処理等)

形態で選抜 どの遺伝子が破壊されているか? どの酵素がなくなっているか?



waxy

ae

野生型

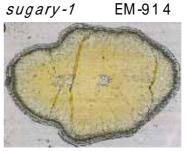
sug - 1

ISA1の機能

·sug - 1変異体はデンプンではないものを種子に貯める







PUL >



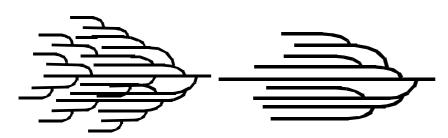


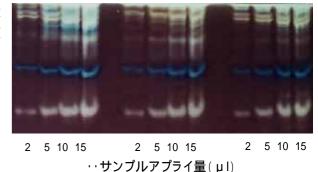
Normal

sugary-1 EM-5

sugary-1 EM -4 1

・アミロペクチン構造が変わっている





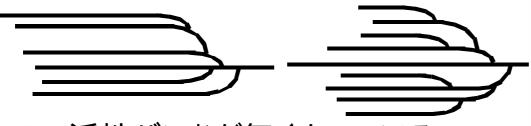
- ·イソアミラーゼ(ISA)活性バンドが無くなっている
- ・糊化開始温度が野生型に比べて10 以上低い
- ·人工的にアンチセンス法で/SA1遺伝子を抑制すると短鎖が増える
- ·変異体にISA 1遺伝子を形質転換すると, 形質が戻る。

Nakamura et al., (1997) Plant J. 12: 147-153 Kubo et al., (1999) Plant Physiol. 121: 399-409 Fujita et al., (2003) Plant Cell Physiol. 44: 607-618 Kubo et al., (2005) Plant Physiol. 137: 43-56

BEIIbの機能

amylose - extender (ae) 変異体の性質

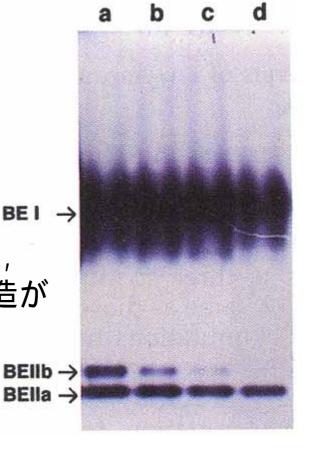
- ・糊化しにくいデンプン
- ・糊化開始温度が野生型に比べて10 以上高い
- ・アミロペクチン構造が変わっている



- ·BEIIb活性バンドが無くなっている
- ·変異体にBEIIb遺伝子を形質転換すると, BEIIb発現量に従って,アミロペクチン構造が 変化し,糊化温度も変化

Nishi et al., (2001) Plant Physiol. 127: 459-472 Tanaka et al., (2004) Plant Biotech J. 2: 507-516





形態に現れない変異体



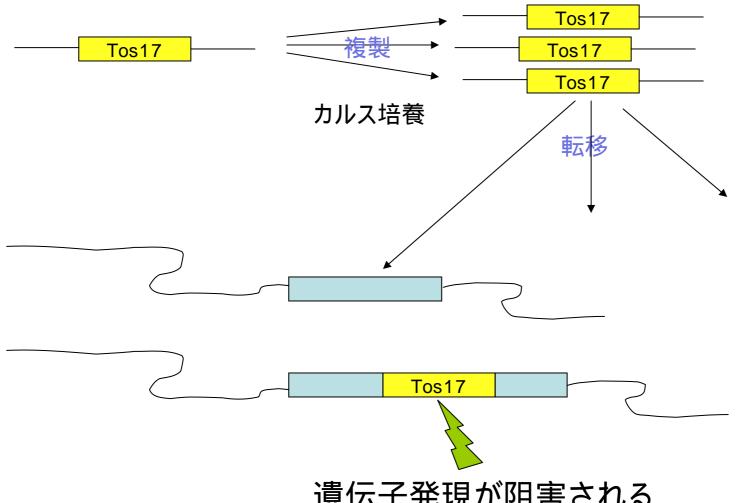
どれが変異体?

・逆遺伝学的法(遺伝子タギング法)

特定の遺伝子が破壊とんな変化?

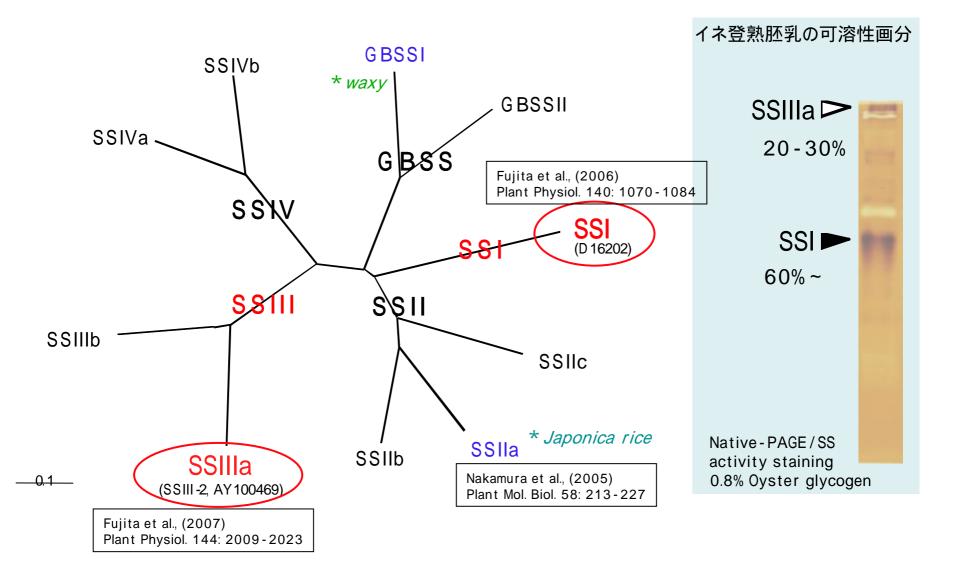
特徴:葉身DNAからPCR法で選抜 残存酵素活性が異なるものが複数選抜できる 形態に変化がない変異体が選抜できる

トランスポゾンタギング法

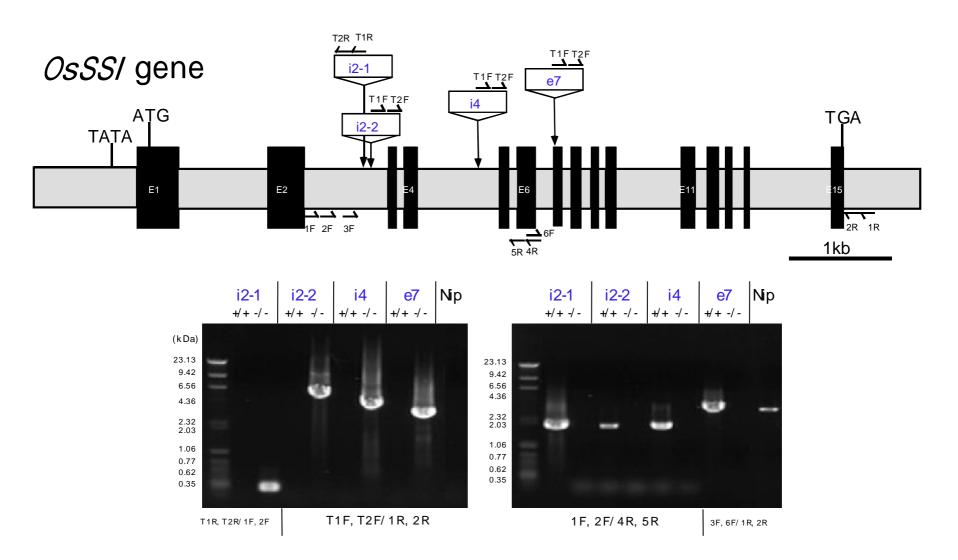


遺伝子発現が阻害される酵素ができない

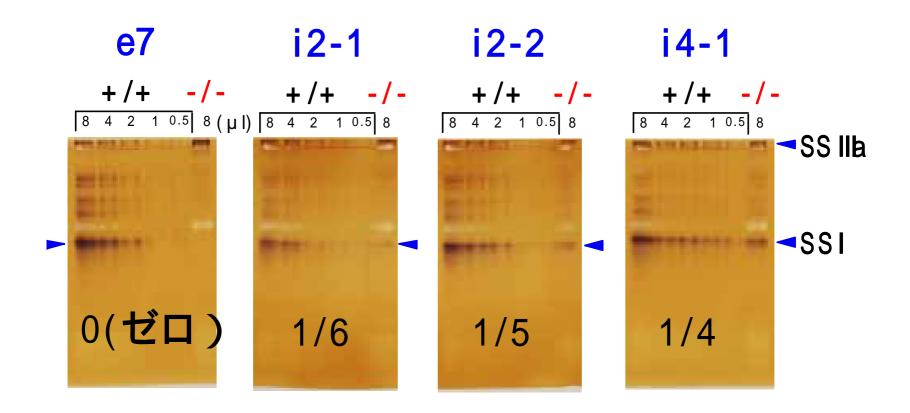
イネSSアイソザイム遺伝子の系統樹



SS/变異体



SSI変異体系統のSS活性 (Native-PAGE/SS activity staining)



0=e7 < i2 - 1 < i2 - 2 < i4 < < Wild-type

SSI変異体の種子の形態、重量

·SSI活性を完全に欠失している系統ですら,種子形態,重量は野生型と変わらなかった。

日本晴



e7 +/+



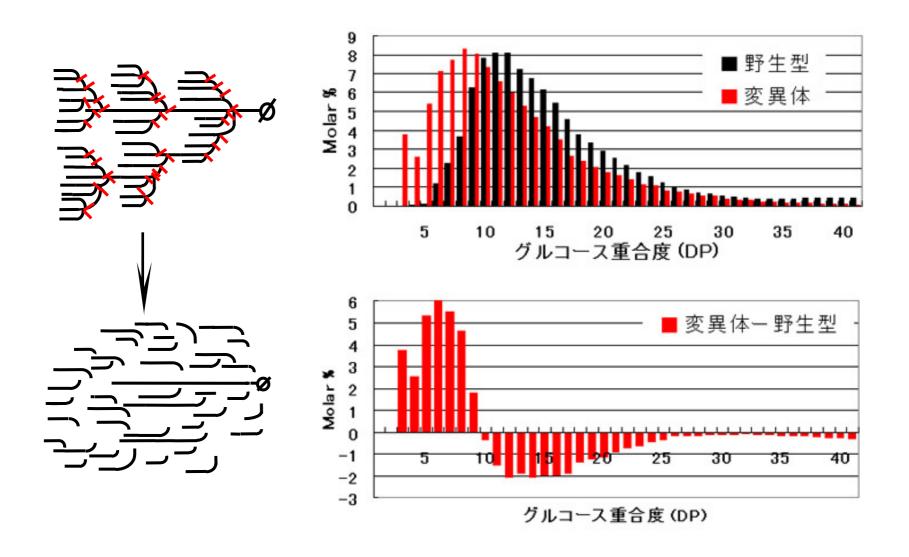
e7 _ /_



	種子重量(mg)	
系統	+/+	-/-
日本晴	^a 21.9±0.5	-
i2-1	22.8 ± 0.3	25.0 ± 0.4
i2-2	18.7 ± 0.3	$^{b}18.7 \pm 0.3$
i4-1	19.9 ± 0.3	19.0 ± 0.2
e7	21.7 ± 0.4	22.8 ± 0.4

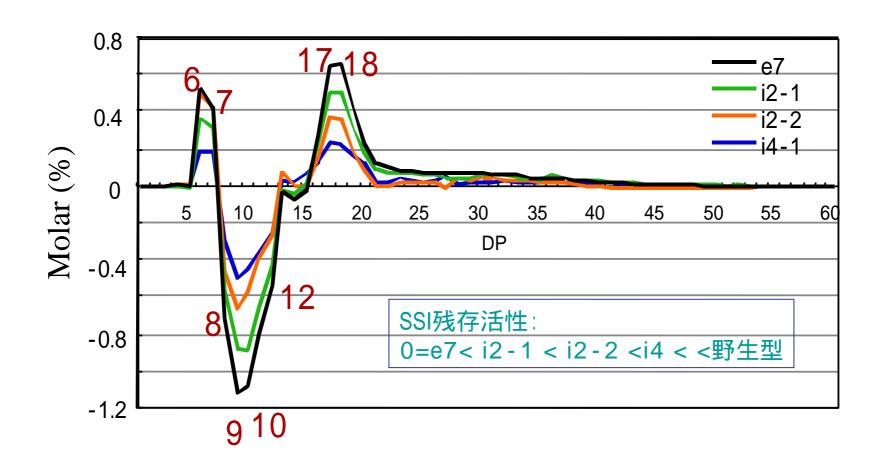
^{*a}n=50, ^bn=10,それ以外はn=20

アミロペクチンの鎖長分布解析



SSI変異体の胚乳アミロペクチンの鎖長分布(変異体からコントロールを引いた差分)

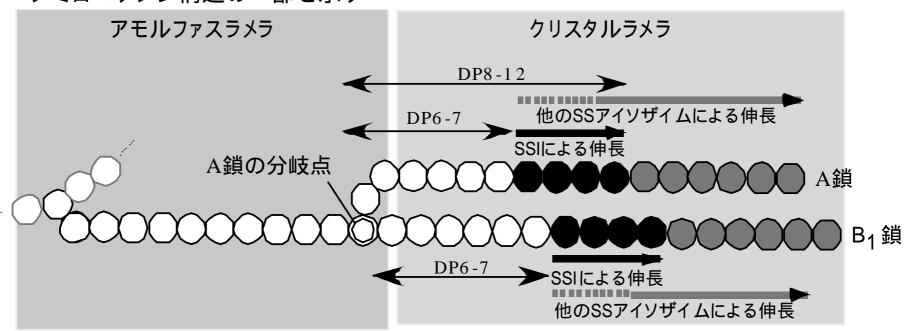
- ·全てのSSI変異体系統で同様の変化を示した。この変化はSSI欠失の影響!
- ·SSI残存活性が少ないものほど,激しい変化を示した。



アミロペクチン鎖長分布解析の解釈

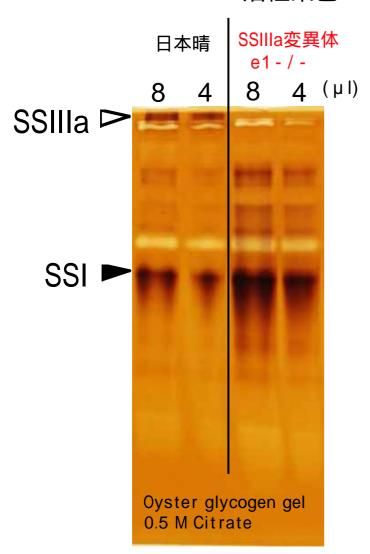
·SSIはアミロペクチンの非還元末端からDP6 - 7の鎖をDP8 - 12に伸長する (部分)

アミロペクチン構造の一部を示す



SSIIIa变異体

Native - PAGE / SS活性染色



- · SSIIIa遺伝子のエキソン1にTos17が挿入 された変異体が得られた。
- ·Native-PAGE/SS活性染色により, SSIIIa バンドが完全に欠失していた。
- ·SSI活性バンドが野生型と比べて強くなっていた。

SSIIIa変異体の種子形態,重量およびデンプン粒の形態

- · SSIIIa変異体種子は,心白であった。
- ・デンプン粒は,野生型より小さく,丸かった。

1.種子形態、重量

日本晴

SSIIIa変異体e1 - / -





系統 玄米重量 (mg)

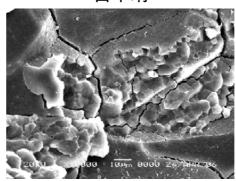
日本晴 21.6±0.3 (100)

 $e1-/-20.7\pm0.2$ (95.8)

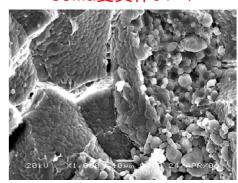
n=20

2.種子断片のSEM像

日本晴

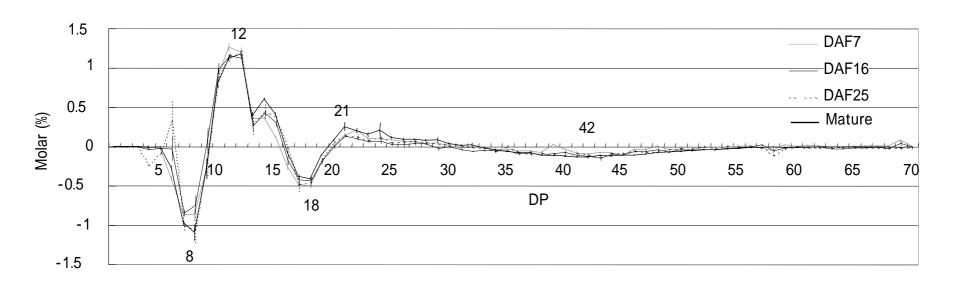


SSIIIa变異体e1 - / -



SSIIIa変異体の胚乳アミロペクチンの鎖長分布(変異体からコントロールを引いた差分)

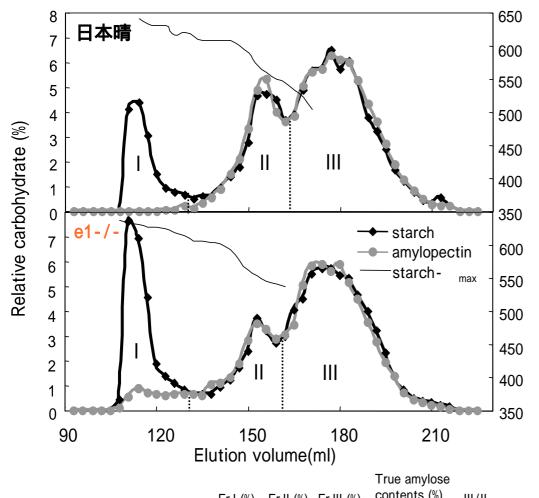
- ·異なる登熟ステージで,全て同じパターンを示した。
- ·DP 20の短鎖に変化が見られた。
- ·野生型と比べてDP40付近の減少が顕著であった。



短鎖領域の変化

長鎖領域の変化

枝切り後のデンプンおよびアミロペクチンのゲルろ過



contents (%) Fr.II (%) Fr.III (%) III/IIFr.I (%) 15.4 26.2 58.4 15.0 2.2 Starch 日本晴 26.7 59.8 2.2 0.4 Amvloepctin 3.2 18.0 57.3 24.8 20.0 Starch e1-/-2.9 19.4 56.1 4.8 Amyloepctin

*SSIIIa*変異体デンプンは 野生型と比べて・・・

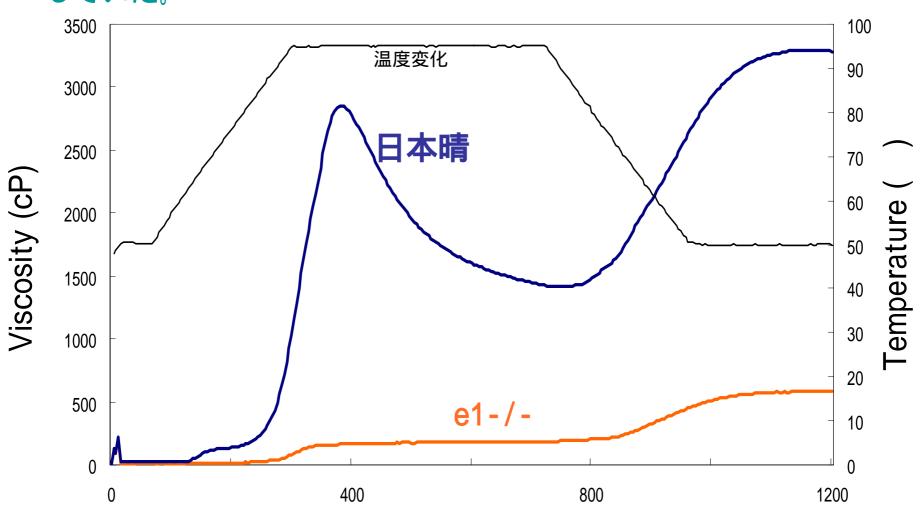
・アミロース含量が増加していた。

max (nm)

- アミロペクチンの超長鎖が増加していた。
- ·長いアミロペクチン鎖が 少なかった。

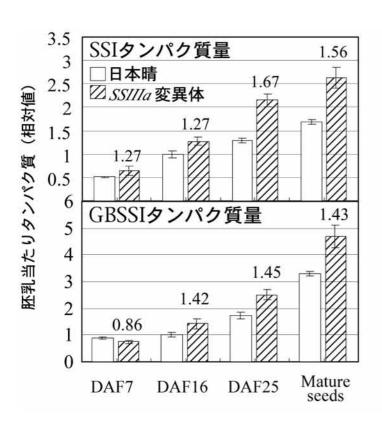
RVAを用いた胚乳デンプンの糊化粘度特性

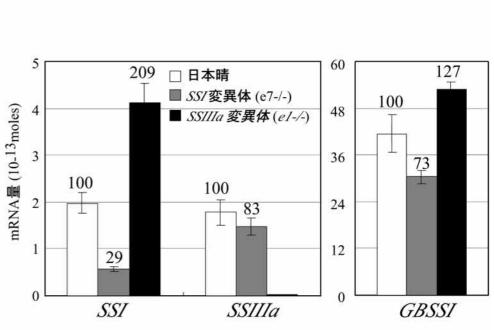
·SSIIIa変異体デンプンは野生型と比べて熱糊化粘度が激減していた。



SSIIIa欠失の他のSSアイソザイムへの影響

- ·SSIIIa欠失により、SSIおよびGBSSIタンパク質量が増加した。
- ·SSIおよびGBSSIタンパク質の増加は,転写レベルで制御されていた。





SSIIIa活性の欠失

他酵素への 影響

直接要因

間接要因

SSI活性の増加



GBSSI活性の増加



間接要因

アミロース含量 の増加

デンプン構造、 成分の変化

アミロペクチン長鎖 30の減少 DP



アミロペクチン 分子量の低下

10 DP 15 9 DP, 16 DP 19

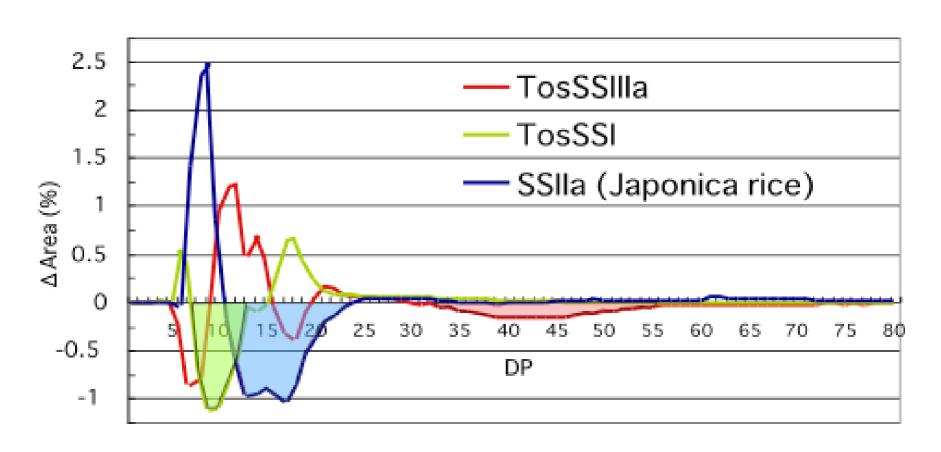
アミロペクチン

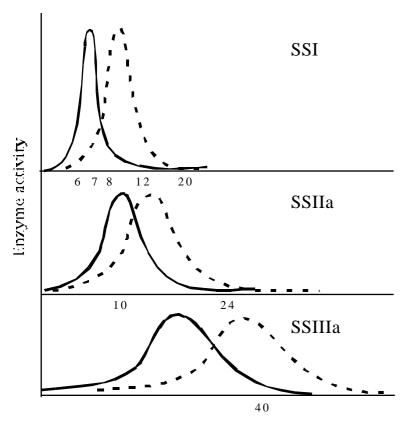
短鎖DP 30の変化

デンプン物性の激変

3種類のSS変異体の役割

·イネ胚乳で発現する3つのアイソザイムは,伸長する長さが それぞれ異なる。



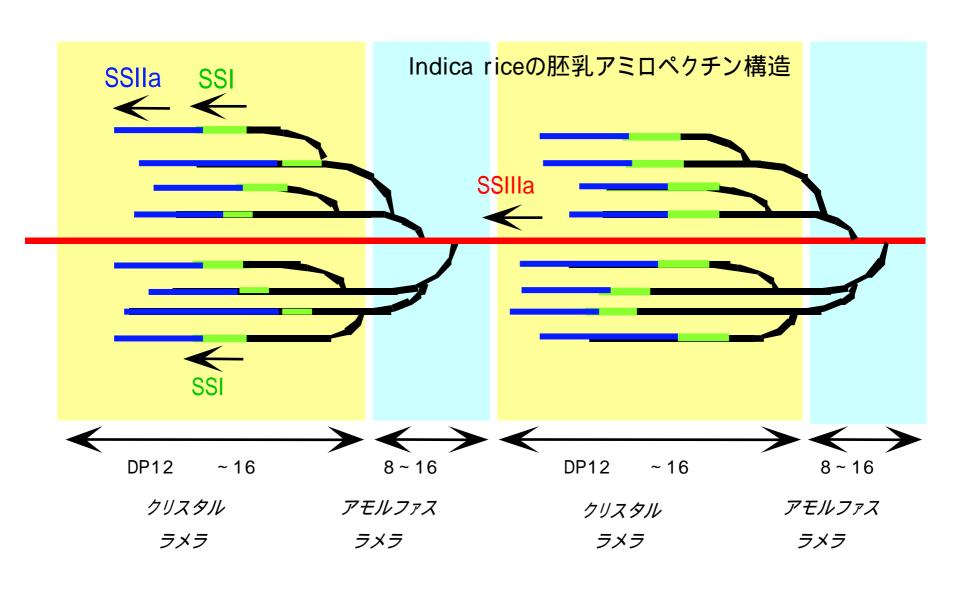


Chain length of the precursor chain ——
and elongated chain --- by SS isozymes (DP)

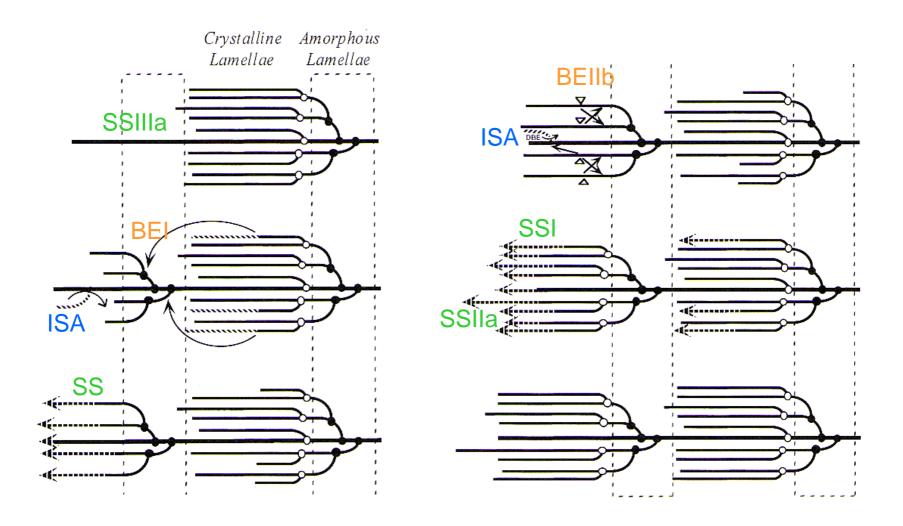
- ·SSIは, DP6 7の極短鎖 をDP8 - 12にわずかに 伸長する。
- ·SSIIaは, DP 12を 13 DP 24に伸長する。
- ·SSIIIaは,クラスターをつなぐ 長い鎖を伸長する。

文献

SSI: Fujita et al., (2006) Plant Physiol. 140: 1070 - 1084 SSIIa: Nakamura et al., (2005) Plant Mol.Biol.58: 213 - 227 SSIIIa: Fujita et al., (2007) Plant Physiol. 144: 2009 - 2023



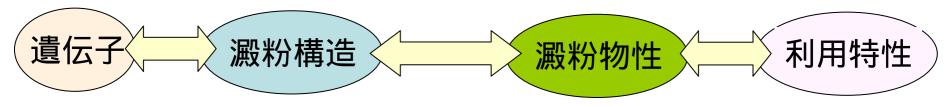
アミロペクチン生合成メカニズム



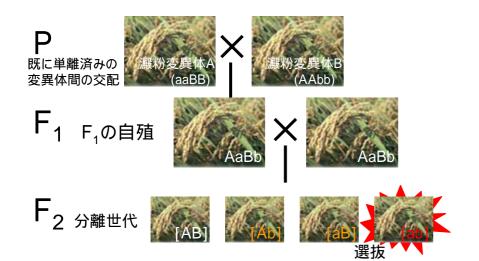
Nakamura, (2002) Plant Cell Physiol. 43: 718-725を一部改定

今後の課題,今進めている研究

デンプンの構造や物性をより制御しやすくするために...



よりユニークな構造のデンプンを開発するために...



- ・単離済みの変異体を用いた 二重変異体の開発
- ・単離済みの変異体をホストに 遺伝子導入した形質転換体

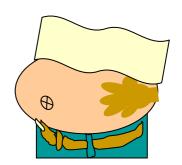
ユニークなデンプンの応用例

難消化性澱粉 ダイエット米、大腸癌予防食品 易消化性澱粉 発酵産業、甘味料

老化しにくい澱粉 練り製品などへの添加物

高アミロース澱粉 フィルム特性、食感改善剤、 クリスピー天ぷら粉

低温糊化澱粉 加工時の省エネに貢献 低分子量澱粉 エネルギー持続性ドリンク







米飯以外のコメの利用を促進

中小食品企業の活性化 食料自給率の向上 休耕田の有効利用

謝辞

秋田県大

中村保典

元CREST研究員 バイテクセンター職員

卒業生

在学生

生物研

廣近洋彦

宮尾安藝雄他

アイオワ州<mark>立大</mark>

Jay-lin Jane他

九州大

佐藤光 西愛子 大阪府大

久保亜希子

資金援助:秋田県立大学,

JST, CREST,

農水省イネゲノムプロジェクト

科学研究費若手B