

澱粉合成研究の材料としてのイネ

中村 保典

冒頭から私事で恐縮であるが、筆者がイネを実験材料として使用したのは、植物の貯蔵器官における澱粉合成代謝の解明研究を開始した1986年に遡る。折しも東大から農水省生物研に転出した時期に重なる。当初は、穀類、イモ類の中からいずれでも選べたのであるが、イネを材料に選んだのは、大した動機があったわけではない。農学分野を中心に、イネを材料とする研究者は世界に星の数ほどもあるが、私の場合、イネを知りたくて澱粉を研究したのではなくて、澱粉を研究したくてイネを選んだのである。しかし、イネを選んだことと、その後の研究内容と進行は大いに相関しているのは疑い得ない。

世界で約30億トンの澱粉性作物生産量のうち、イネ(図1)はトウモロコシに次いで多い(FAO STATS-2015)。コメ澱粉はアジアの国々を中心に世界の半数を越える人々の主要なカロリー源となっている。イネの栽培化は揚子江中流域を起源とする説が有力であるが、最近、詳細なゲノム分析の結果から、中国珠江中流域とする説も提案されている^{1,2)}。周知のように、栽培イネ(*Oryza sativa*)は*O. rufipogon*を起源とし、ジャポニカ型とインディカ型に大別される¹⁾。一方、アフリカで栽培されているイネ(*Oryza glaberrima*)は、*O. barthii*を起源

とする¹⁾。一度コメを食べると、もう二度と他の作物を主食にできない、と書物で読んだことがあるが、ジャポニカ米の品質を生かした食品や調理法は古来日本の食文化に深く根を下ろしている。筆者も子供のころ、野山を駆け回った後、祖母が握ってくれた味噌おにぎりのおいしさを忘れることができない。

イネ胚乳澱粉

コメ澱粉は、イネ種子の胚乳組織に蓄積される。穀類の胚乳での澱粉合成・蓄積能は驚異的で、澱粉は精白米重量の約85%以上を占める(図2A, B)。全能性を旨とし水分が大部分であるはずの植物細胞にどのようにしてこのようなことが可能なか不思議という他ない。イネ種子形成過程が劇的な変化を伴うことは、日本人ならば誰もが、身近な水田で稲穂が実る風景から、劇的な変化が起きていることは容易に理解できる。種子内では、受精前には胚乳細胞はゼロであるが、脱水過程を経た完熟時には、1粒で約20ミリグラムもの澱粉が3週間ほどで蓄えられる(図1下)。

「米粒ほどの大きさ」といえば、小さいことの例えて

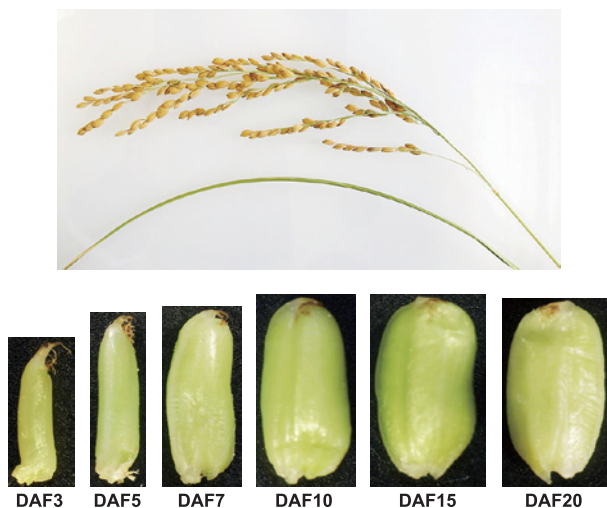


図1. イネ穂(上)と発達時期が異なる穎果(下)。DAF, 開花(受精)後の日数。

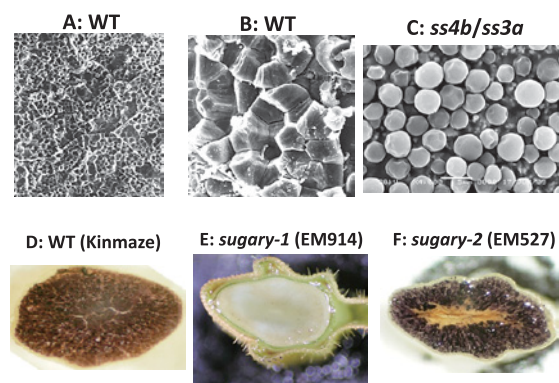


図2. イネ胚乳内の澱粉粒。AとB(拡大図):野生型イネ。C:*ss4b/ss3a*二重変異体の澱粉粒^{23,24)}(後述)。野生型品種の澱粉粒は多角形で、胚乳細胞内に隙間なく蓄積しているが、変異体の澱粉粒は球形である(写真は文献23より転載許可済み)。D-F:種子横断面をヨウ素染色。D:野生型イネ。E:*sugary-1*変異体。F:*sugary-2*変異体。変異体にはヨウ素に反応しないクラスター構造を失ったフィトグリコーゲンと呼ばれる可溶性グルカンが合成されている。

あるが、種子そのもので小宇宙を構成しているといっても過言ではなく、とりわけ胚乳内部の変化は驚異的でさえある。穀類種子の胚乳は、受精を契機に文字通りゼロから出発し、特有の様式で細胞を増幅し、機能を特化する。つまり、重複受精 (3n細胞化double fertilization)、多核融合細胞化 (syncytium formation)、細胞分裂による多細胞化 (cellularization)、ゲノム増幅 (endoreduplication/endopolyploidy)、細胞死 (乾燥化) (programmed cell death, desiccation) と区分される劇的な変化を伴う各登熟過程を経ながら、澱粉貯蔵庫としての特殊な役割を担う³⁾。

そろそろ澱粉のことを説明する必要がある。まず、「澱粉は植物が進化の過程で構造を磨き上げてきた優れモノである」といっても、大多数の読者は面食らうかもしれない。大体、どの教科書を見ても、これを裏付けるような説明が見当たらない。澱粉分子の組成はグリコーゲンと同様、基本的にグルコースポリマー (グルカン) で、ごく少量のリン酸 (グルコース分子当たり、ジャガイモ澱粉で約0.4%、穀類澱粉で0.001%程度のリン酸分子) がグルコース炭素の3位と5位に、共有結合しているのみである。澱粉は、基本的に直鎖状のアミロース (約15-30%) と分岐状のアミロペクチン (約70-85%) から成っている。アミロペクチンは、化学結合の上では、 α -1,4グルコシド結合から成る直鎖とそれを分岐状に連結する α -1,6グルコシド結合から構成されている点で、グリコーゲンと同一である。しかし、アミロペクチンとグリコーゲンでは、分子全体の構造 (主として分岐結合のパターン) がまったく異なり、規則性が高いかランダム状かの相違がある (図3)。詳細は文献4を参照していただく他はないが、アミロペクチンには、クラスターと呼ばれる単位構造がある。それが多数直列状に配列し、分子サイズが 10^8 を超える巨大分子となる。

アミロペクチンでは、構成する鎖の長さが決定的に重

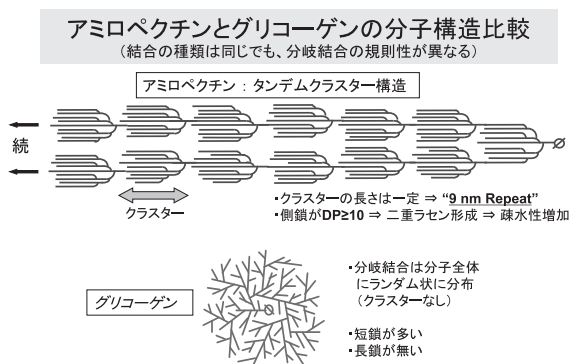


図3. アミロペクチンとグリコーゲンの分子形の違い

要な意味を持つ。この長さがグルコース重合度 (DP, degree of polymerization) が10以上になると、隣接する鎖同士で二重ラセンを形成するようになる^{5,6)}。実はこれが、澱粉が水に難溶性で、半結晶性を示す最大の要因となる。DP値がさらに増加する (直鎖部分が長くなる) ほど疎水性が増加することも理解されよう。澱粉には水を加えて熱すると糊状になる (糊化する) 性質があるが、糊化の開始現象は、二重ラセンがほどける現象である。側鎖が短い澱粉は易糊化澱粉、長い澱粉は難糊化澱粉あるいは難消化性澱粉となる。単に側鎖の長さが若干変化するだけで、澱粉の性質は顕著に変化し、この変化は、澱粉の調理法や製品の製造工程や品質に大きく影響するのである。

澱粉のもう一つの構造上の特徴として、分子が規則的に配列し、特有の粒構造を形成する点があげられる。サイズは0.1-100 μm 、形状は球形から円盤型、楕円型から多角形と、植物種によってまったくまちまちで、多様性に富んでいる。澱粉粒の大きさや形態も澱粉の物性に少なからぬ影響を及ぼす。コメ澱粉粒は小さい (粒径は約1-8 μm) 部類に入り、穀類澱粉特有のシャープなエッジを持つ多角形をしている (図2B)。

イネ胚乳澱粉合成研究

さてこれからが本題である。澱粉分子の合成にはどのような酵素が関与しているのだろうか。1980年代後半から2010年代にかけて各植物で解析され、どの酵素がどのような役割を果たすのかの概要が、ほぼ明らかになった⁷⁾。澱粉のグルコース供与体はADPグルコース (ADPG; AGPaseが合成する) である。アミロペクチンは、ADPGを用いて直鎖 (α -1,4鎖) を伸長するスターチシンターゼ (starch synthase, SS)、分岐結合 (α -1,6鎖) を形成する枝作り酵素 (starch branching enzyme, BE)、余分な分岐結合を除去し、アミロペクチンの形状を整える枝切り酵素の1種イソアミラーゼ (ISA) の計3クラスの酵素で合成される。一方アミロースは、ADPGを用いて直鎖 (α -1,4鎖) を伸長するGBSS (granule-bound starch synthase) と呼ばれる酵素により合成されることが分かった。

これだけで済めば簡単であるが、SS、BE、ISAの各酵素には複数のアイソザイムがある。各アイソザイムの機能を証明するためには、変異体の澱粉形質を解析するなどの生化学実験の他、遺伝解析、形質転換体を使用した機能相補実験、精製酵素の反応産物を分析する *in vitro* 実験など、各方面からの理詰めのアプローチが不可欠であった。多数のアイソザイムの機能を一つひとつ、

すべてのデータを点検しながら、ジグソーパズルの隙間を埋めるように解いていったのである(図4A)。

一例を述べる。周知のように世界のイネ品種は大別してジャポニカ型とインディカ型に分かれる。私たち日本人はもっぱらジャポニカ品種を主食としているが、東南アジア諸国ではむしろインディカ型を栽培しているケースが多い。両タイプのコメの性質は対照的であり(例: ジャポニカ品種の澱粉は糊化しやすい)それぞれの特徴を生かした調理法が選ばれ食文化に色濃く反映している。従来、インディカ米澱粉のアミロース含量が高く、それが両者の差異の決め手であるとの説が支配的であった。事実、GBSSIの活性がインディカ品種で高いことも証明された。私たちはアミロペクチンの微細構造を精密に調査できるようになった1990年代後半に、アミロペクチン構造の違いはないものか調査することにした。その結果、共同研究者の梅本貴之博士(現、農業研究機構作物研究所研究リーダー)とともに、アミロペクチンの短鎖から中間鎖のDP値が特異的に低いことが分かった(図4B)。その後、生物資源研究所のイネゲノムチームの矢野昌宏博士らに相談して、当時開発されたばかりの遺伝子マーカーを使用してのマッピング解析の結果、ほぼSSIIa遺伝子であることが判明した。その後、確かにジャポニカイネ品種ではSSIIa遺伝子に変異しており、その結果、SSIIaの短・中間鎖を伸長する特異的な機能が欠損し(実際、SSIIIaやSSIはこの機能をほとんど相

補できない)、アミロペクチンのクラスターを構成する鎖の長さが短くなり、二重ラセン構造ができないもしくはできても、水素結合を介した結合力は弱くなり、澱粉の糊化温度が低下した(澱粉が易糊化性になった)ことが、形質転換体を使用した実験やSSIIa精製酵素を使用した*in vitro*実験で証明することができた⁸⁾(図4B)。

このようにして、各アイソザイムの緊密な協同作用の下で胚乳澱粉が生産される反応の基本骨格が明らかになった。合成された分子が比重約1.5に達する程高密度で充填され、多角形の澱粉粒構造を取って、細胞のアミロプラスト空間一杯を占めるようになる(図2A, B)。

筆者は、イネでの研究成果をもとに、各アイソザイム特有の機能を付与したアミロペクチン合成モデルを提唱した⁹⁾。アイソザイムの機能を付与したモデルとしては初で、現在でも、他のモデルは提唱されていない。後述するように、澱粉合成制御機構の完全解明にはまだまだほど遠い。しかし、貯蔵澱粉の合成過程に関しては、イネでもっとも精度の高い豊富な知見が得られていると信じている。もちろん、そうした知見は私たちのグループだけでなく、世界各地の研究者たちの成果であることは言うまでもない。

澱粉合成過程の特殊性と研究材料としてのイネ

どうしてイネの澱粉研究がもっとも進んでいるのだろうか。全ゲノム解析¹⁰⁾、オミックス分析技術¹¹⁾、MS-イメージング技術¹²⁾などの網羅分析法の開発と普及で、この傾向は今後さらに強まるであろう。主な理由を列記する。

1. イネには遺伝資源が豊富である。世界中のイネ品種系統が入手でき、各地域に適応した品種特性が明らかになっている。日印イネ間の澱粉形質の比較研究の他、アフリカイネとの比較も研究対象になってきた¹³⁾。
2. 穀類では最初に全ゲノム情報が2002年に解明された。精密なゲノム情報の他、品種間差異に関するDNA情報ももっとも豊富である。関連する遺伝子マーカーや完全長cDNAなどが利用可能である¹⁴⁾。ゲノムサイズがコンパクトで、使い勝手が良い。
3. 遺伝解析や生化学解析に有用な変異体、ノックアウト集団株が入手可能である。「変異体なしの解析研究は、暗闇をさ迷い歩くようなものだ」と先輩研究者に言われた通りである。変異体はまた、新規澱粉を生産するNon-GMの新品種ともなり得る。
4. 容易に形質転換体が作製できる。ゲノムエディティング法¹⁵⁾などの遺伝子改変技術や発現調節技術の

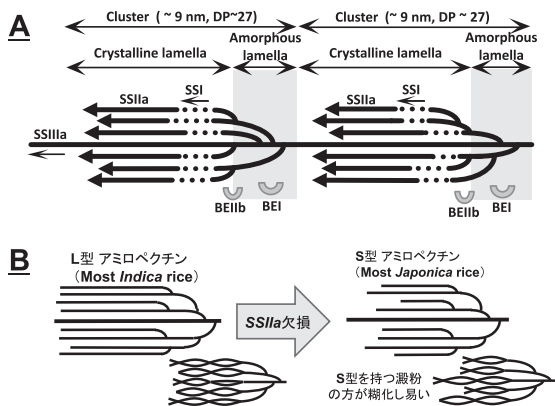


図4. A: アミロペクチンの構造単位であるクラスターの概念図と、これの合成に関わるSSとBEアイソザイムが働く場所を示す。SSIは短鎖, SSIIaは中間鎖, SSIIIaは長鎖(クラスターを連結する鎖)を合成する。BEIはクラスターの基部の分岐結合, BEIIbは内部の分岐結合を作る。B: インディカ型イネとジャポニカ型イネで合成されているアミロペクチン構造の違い。ジャポニカ型イネのアミロペクチン(S型)は、クラスター内の中間鎖を特異的に伸ばすSSIIa遺伝子が欠損しているため、平均鎖長が短くなり、二重ラセン結合力が弱くなる。結果として、ジャポニカ型イネは、インディカ型に比べ、糊化しやすい澱粉を生産する。

進展も著しい。

- 加工しないで粒食を基本とする主食として使用されている。そのため、各国各地域でこだわりのある多様な品質が選抜されてきた。

改めて澱粉合成代謝過程の特徴（特殊性）をあげ、上記の研究状況がいかに生かされる分野であるかを少し触れてみたい。

関与酵素が多い AGPase, SS, BEの他、ホスホリラーゼ、リン酸付加酵素、加水分解酵素、転移酵素のアイソザイムやサブユニットを加えると30種類は越える。これらが相互作用や役割分担しながら、全体として、高度に制御されて代謝系を形成している。実際、各組織の澱粉構造は植物種や系統で総じて均一に保たれており、各アイソザイムの活性が一定になるようになりかなり厳密に制御されている。こうした多数の酵素レベルのバランスが保たれていることから、高度の遺伝子発現制御系が存在するに違いない。

澱粉は行動するポリマーである すでに述べたように、アミロペクチンの側鎖は一定の長さ(DP値)以上になると二重ラセンを形成し、それが水素結合によって一定数の水分子と空間に充填されると半結晶状態になり、疎水性が一気に増加する。SSやBEの活性はDP値に鋭敏に影響する^{16,17)}。酵素の中には澱粉と結合状態になるものもあるが、この結合性にもDP値は大きく影響する。さらにstarch binding domain (SBD) や starch binding sites (SBS) と呼ばれる特異的な部位を持つ酵素もあり、澱粉分子と特異的に結合し¹⁸⁾、相互作用する。

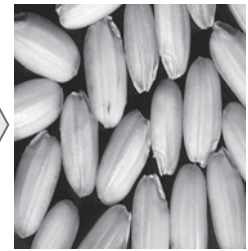
澱粉は高次の階層構造を持つ アミロペクチンの単位構造のクラスターのサイズはnmのオーダーで、多くの植物の澱粉粒は数10 μmのオーダーであるので、分子の基本構造から粒構造までは10⁴倍のスケールに及ぶ。クラスター構造(二重ラセン構造)の充填、スーパークラスター構造、球塊(blocklet)構造、粒構造と、アミロペクチン分子の充填の仕方は階層的である^{4,19,20)}。

澱粉性作物としてのイネの特徴、新品種の開発動向も述べてみたい。第一に、基本的に住民の主食として栽培され、時には貨幣としての役割を担って流通してきたため、質や収量、栽培特性へのこだわりが格段に高い。厳密な澱粉品質評価法や栽培特性に基づいて育種選抜された品種に加え、高い栽培技術が集積されている。今後は、通常の品種には見られない澱粉形質を持つ変異体米の開発も期待されるが、変異体米の収量が低下する場合も頻繁に起きる。この欠点を抑えるため、変異体を多収米品種と戻し交配させて、収量を大きく増加させることに成功した例もある(図5)²¹⁾。

高RS変異体米
(16.6 mg±0.1)



A6 BC₃
(25.1 mg±0.2)



戻し交配により、
玄米重量は1.5倍に!

図5. 難消化性澱粉形質を持つイネ変異体の澱粉収量を上げるために、多収米の秋田63号と戻し交配し、玄米重量を約1.5倍に増加させた種子²¹⁾(写真、藤田直子博士提供)。

第二に、消費者ニーズの多様性に伴い、ダイエット米の開発²²⁾など、おいしさ以外の澱粉品質への用途拡大が急速に高まっている。

第三に、パンや麺などに向けた品種、飼料用多収品種など、米飯以外の用途に適性を持つ品種の開発傾向が急速に高まっている。

こうした新たな潮流の中、求められる澱粉の特性は用途ごとに大きく異なる。イネでは、澱粉合成に関わる多くの酵素アイソザイムの機能が明らかとなり、澱粉分子構造や澱粉形質(物性や機能性など)を制御するには、それらの個々のあるいは複数の活性をどのように変化させれば可能になるかがデザインできる時を迎えている。すなわちスマートな育種が可能になってきた。球形澱粉も可能になっている^{23,24)}(図2C)。

澱粉合成研究のこれからと結び

コメは世界の半数以上の人々の主食となっている。それだけコメの地位は高い。全世界の澱粉作物の収穫量を比べると、コメは収穫量トップのトウモロコシの約73%に過ぎないが、トウモロコシは主食というよりも、食品や工業品の素材やバイオエタノールの原料としての使用量が高い。しかも生産は主要国に集中している。イネ以外の主要作物は、多分に工業製品のような大量生産方式で栽培されている。一方、コメはアジアの人々にとっては、一日も欠かすことができない食糧そのものである。地産地消の代表格としてのコメは、各国・各地域の社会、経済、食文化に強く広く根づいている。イネ栽培は各地域でそれぞれ特殊な地位を占める。

種子が成熟し澱粉生産が最盛期を迎える時期、胚乳細胞には数十コピーの遺伝子が増幅され、澱粉合成に関わる主要酵素レベルは、葉など他の組織でのレベルより格段に高いピークを迎える。転写・翻訳・タンパク質合成過程、澱粉合成に関連する代謝過程は躍動し、胚乳は澱

粉生産工場として機能を特化し、驚くほどのスピードで澱粉が生産され蓄積する。

澱粉合成には、転流されたスクロースが胚乳細胞に輸送される段階から始まり、細胞質での糖転換代謝過程を経て、アミロプラストの澱粉合成代謝過程に至るまで、実に多数の因子が関与している。他にも、ATP生産・供給過程など、澱粉合成過程を支える代謝もある。澱粉研究は、このきわめて複雑な代謝制御機構を扱う。

アジア各国での研究者数の増加は爆発的ともいえる。最新の生命科学研究アプローチが中国・韓国をはじめとしてアジア各国にも普及し、最重要作物であるイネ研究が加速的に進展している。将来はアフリカ地域のイネ研究も盛んになるであろう。

イネを材料に30年以上も研究してきたといっても、読者が初めて聞くような特殊な品種を選んで使用してきた訳でもない。材料そのものからはサプライズが生まれるはずもないが、イネを使用したかゆえに現在に至った研究内容、世界の潮流の一端を感じ取っていただければ幸いである。おそらく今後、世界のイネ澱粉合成研究は、他の植物での研究とは、中味も精度も異彩を放ちながら進展すると予想される。

イネは円熟した澱粉研究にもっとも適した材料である。イネを材料とする澱粉研究の面白さは何といっても、この分野でもっとも精度の高い研究ができることである。十分基礎情報が蓄積しており、遺伝資源がほぼ完璧に整備されており、研究材料として扱いやすく、分析結果に基づく澱粉形質が既存形質とどんなにささいな差異であっても、ただちに新素材として商品に生かされる可能性がある。澱粉形質に関しては、イネのデザイン育種が可能であるのは、基礎研究の膨大で精密な裏付けデータが備わってきたからに他ならない。コメ澱粉を多様な用途に利用しようとする新潮流に乗り、応用研究と基礎

研究の距離感がぐんと接近している。おいしいおコメ以外の澱粉の多様な品質を生かした品種が生まれ、それを生かした商品が次々と開発される日が来ることを期待している。

文 献

- 1) Sweeney, M. and McCouch, S.: *Ann. Bot.*, **100**, 951 (2007).
- 2) Huang, X. *et al.*: *Nature*, **490**, 497 (2012).
- 3) Sabelli, P. A. and Larkins, B. A.: *Plant Physiol.*, **149**, 14 (2009).
- 4) Pérez, S. and Bertoft, E.: *Starch*, **62**, 389 (2010).
- 5) Kainuma, K. and French, D.: *Biopolymers*, **11**, 2241 (1972).
- 6) Gidley, M. J. and Bulpin, P. V.: *Carbohydr. Res.*, **161**, 291 (1987).
- 7) Nakamura, Y.: *Starch: Metabolism and Structure*, p. 161, Springer (2015).
- 8) Nakamura, Y. *et al.*: *Plant Mol. Biol.*, **58**, 213 (2005).
- 9) Nakamura, Y.: *Plant Cell Physiol.*, **43**, 718 (2002).
- 10) Bolger, M. E. *et al.*: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **26**, 31 (2014).
- 11) Gorzolka, K. *et al.*: *PLoS ONE*, **11**, e0150208 (2016).
- 12) Boughton, B. A. *et al.*: *Phytochem. Rev.*, **15**, 445 (2016).
- 13) Huang, X. *et al.*: *Mol. Plant*, **8**, 958 (2015).
- 14) McCouch, S. R. *et al.*: *Nat. Commun.*, **7**, 10532 (2016).
- 15) Baysal, C. *et al.*: *Mol. Breed.*, **36**, 108 (2016).
- 16) Nakamura, Y. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **51**, 776 (2010).
- 17) Nakamura, Y. *et al.*: *Plant Sci.*, **224**, 1 (2014).
- 18) Christiansen, C. *et al.*: *FEBS J.*, **276**, 5006 (2009).
- 19) Gallant, D. J. *et al.*: *Carbohydr. Polym.*, **32**, 177 (1997).
- 20) Tang, H. *et al.*: *Carbohydr. Polym.*, **63**, 555 (2006).
- 21) 藤田直子ら：秋田県立大学ウェブジャーナルB, **1**, 7 (2014).
- 22) Kubo, A. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 4463 (2010).
- 23) 藤田直子：化学と生物, **51**, 400 (2013).
- 24) Toyosawa, Y. *et al.*: *Plant Physiol.*, **170**, 1255 (2016).