

シンポジウム

講 演 要 旨

期 日：平成 5 年 10 月 7 日(木)

場 所：北海道大学農学部大講堂

日本農芸化学会北海道支部
北 海 道 農 芸 化 学 協 会

〒080 帯広市稲田町 帯広畜産大学生物資源化学科内
Tel 0155-48-5111 内線 331・330・484

シンポジウム

「遺伝子技術を利用した作物の改変をめざして」

13:00 開会の辞

日本農芸化学会北海道支部長 伊藤 精亮

● 13:10 「澱粉合成関連酵素遺伝子の作物改変への利用」

筑波大学応用生物化学系 馬場 忠
(座長 松井 博和)

14:00 「ジャガイモ・ホスホリラーゼ - タンパク質工学による機能改変と器官特異的発現の解析」

大阪大学産業科学研究所 谷澤 克行
(座長 本間 守)

14:50 休憩

● 15:10 「ナビンアンチセンスを導入したトランスジェニックナタネの解析」

植物工学研究所 今村 順
(座長 三上 哲夫)

16:00 「作物のエチレン生成制御を目指して」

名古屋大学農学部 今関 英雅
(座長 内藤 哲)

16:50 閉会の辞

シンポジウム司会人 本間 守

澱粉合成関連酵素遺伝子の作物改良への利用
筑波大学応用生物化学系 馬場 忠

澱粉は、 α -1, 4結合より成る直鎖状のアミロースと α -1, 6結合の分枝を有するアミロペクチンより構成されており、植物起源をとわずある一定の割合でこれらの多糖が含まれている。しかし、澱粉合成の分子機構については未だに不明な点が少なからず残されている。我々にとって穀物は主要なカロリー供給源であり、炭水化物のみならずタンパク質や脂質などの重要な摂取源である。とりわけ、穀物中の澱粉は食物・食品の食味、調理・加工特性、さらに保存性などに大きな影響を与える。したがって、主要穀物中の澱粉の微細構造やアミロース含量を人為的にコントロールするような、新しい品種の開発などが可能となれば、食品化学、植物育種学分野などへ大きな貢献を与えるものと思われる。ここでは、イネ登熟種子の澱粉合成酵素と枝つけ酵素のタンパク質と遺伝子の構造と機能を中心に話題を提供し、これらの遺伝子の利用と応用について考察を加えたい。

澱粉合成酵素は、澱粉粒に結合した形の顆粒性酵素と可溶性の酵素の2形態で存在する。顆粒性澱粉合成酵素は澱粉中のアミロース合成に関与しているが、可溶性澱粉合成酵素の生体内での機能・役割などは未だ不明である。おそらく、枝つけ酵素との共同作用によりアミロペクチン合成に関与しているものと考えられる。イネ登熟種子より可溶性澱粉合成酵素を精製し、そのcDNAクローニングを行った¹。この酵素は626アミノ酸残基より成る前駆体として生合成され、アミノ末端に113残基のアミロプロラスト（クロロプロラスト）への移行シグナルを有していた。顆粒性澱粉合成酵素や大腸菌グリコーゲン合成酵素とのアミノ酸配列の相同性はいくつかの領域に限定されており、特に、アミノ、カルボキシル末端での相同性はほとんど認められなかった。顆粒性酵素遺伝子が登熟種子だけで特異的に発現しているのと対比して、可溶性酵素遺伝子は、葉においても種子とほぼ同じレベルで発現していた。また、その染色体遺伝子は、全長約8キロ塩基対で15個のエクソンより構成されていた。

登熟種子中の枝つけ酵素について調べてみると、みかけ上4種類の酵素成分（RBE1, 2, 3, および4）が見いだされた²。RBE1と2は同じアミノ末端アミノ酸配列を持っており同一の遺伝子産物であると考えられる。RBE1と3の一次構造の比較を行うと、アミノ酸配列の相同性は約50%程度であり、アミノ末端とカルボキシル末端近傍の配列は相当に異なっていた³。しかし、両酵素とも、アミラーゼ類の活性部位を構成している4つの領域を高く保存していた⁴。酵素の性質の検討からRBE1と3は、それぞれアミロペクチン中のB鎖とA鎖の合成に関与しているものと思われる。さらに、RBE1と3をコードする染色体遺伝子クローニングの単離とその塩基配列の解析を行った^{5, 6}。RBE1と3遺伝子は、それぞれ、全長約8および11キロ塩基対より成っており、14個と21個のエクソンから構成されていた。また、RBE1遺伝子が登熟種子のほか、葉や茎などで発現が認められるのに対し、RBE3遺伝子は登熟種子特異的に発現していた。

現在、これらの澱粉合成関連酵素遺伝子の発現とその制御機構を明らかにするために各遺伝子のプロモーター領域の解析を行っている。あわせて、これらの遺伝子を人為的に修飾後イネ植物体に導入し、その有用性について検討中である。

- (1) Baba, T., et al. (1993) *Plant Physiol.*, in press. (2) Mizuno, K., et al. (1992) *J. Biochem.*, 112: 643-651. (3) Mizuno, K., et al. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 19084-19091. (4) Baba, T., et al. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181: 87-94. (5) Kawasaki, T., et al. (1993) *Mol. Gen. Genet.*, 237: 10-16. (6) Kawasaki, T., et al. (1993) *Gene*, 129: 183-189.

— メモ —

ジャガイモ・ホスホリラーゼ 一タンパク質工学による機能改変と器官特異的
発現の解析

(大阪大学・産業科学研究所) ○谷澤克行, 森 博幸, 峰 利喜, 福井俊郎

生育中のジャガイモでは、緑葉において合成されたスクロースが塊茎に転送され、塊茎細胞内でデンプンに転換された後、アミロプラスト内に大量集積される。このデンプンの生合成と集積過程において、スクロース合成酵素、 α -グルカン・ホスホリラーゼ、ホスホグルコムターゼ、UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼ、ADP-グルコース・ピロホスホリラーゼ、デンプン合成酵素などが主要な働きをしている。このうち、 α -グルカン・ホスホリラーゼは、グリコーゲンやデンプンなどの α -1,4-グルカン鎖をその非還元末端より順次加リン酸分解し、グルコース-1-リン酸を生成する反応、及びその逆反応を触媒する酵素である。植物組織中では、この酵素は、細胞内局在性（細胞質とプラスチド内）、基質特異性（分岐鎖グルカンに対して高親和性と低親和性）、サブユニット分子量（9万と10万）を異にする2種のアイソザイム（H型とL型）として存在している。また、ジャガイモ緑葉においては、両アイソザイムがほぼ等量発現しているのに対し、塊茎中においては、L型のみが高発現している。本シンポジウムでは、両ホスホリラーゼ・アイソザイムの性質の違いを分子レベルで明らかにするとともに、両者の器官特異的発現調節の機構を解明することを目的として行った以下の研究結果について述べる。

未熟ジャガイモ塊茎cDNAライブラリーから、両アイソザイムをコードするクローニングを各々単離して全塩基配列を解析した。推定アミノ酸配列を比較した結果、両者の間には2つの大きな違いが見られた。第1に、L型アイソザイムのアミノ末端には、プラスチドへの移行に関与すると考えられる50残基の延長配列が存在していた。第2には、L型アイソザイムのポリペプチドの中央部位に、両者の分子量差を説明する78残基の挿入配列がみられた。次に、両アイソザイムの大腸菌における発現系を構築するとともに、L型アイソザイムの挿入配列を含む領域をH型の対応する領域で置換させたキメラ酵素を作製した。このキメラ酵素の分岐鎖グルカンに対する親和性は、L型酵素よりもはるかに高く、L型酵素中の挿入配列が分岐鎖グルカンに対する親和性に直接的な影響を及ぼすことが示された。さらに、L型酵素の挿入配列を含む領域を動物酵素の対応する高親和領域（グリコーゲン貯蔵部位）で置き換えたキメラ酵素を作製した。得られた酵素は、分岐鎖グルカンはもとより、直鎖グルカンを含む種々の α -グルカンに対して高い親和性をもっていた。

両ホスホリラーゼ・アイソザイムに特異的なcDNA断片をプローブとすることにより、両酵素のゲノム遺伝子の5'-上流域を含む断片を単離した。次に、両遺伝子断片をTiプラスミド系バイナリーベクター中のGUSリポーター遺伝子の上流に接続し、これらを導入したアグロバクテリウムを無菌ジャガイモの塊茎ディスクに感染させることにより、トランスジェニック体を作製した。得られたトランスジェニックジャガイモの各器官中のGUS活性を測定したところ、L型アイソザイムの遺伝子上流域断片をもつトランスジェニック体の各器官には、顕著なGUS活性の発現が認められ、特に塊茎の粗抽出液において、塊茎貯蔵タンパク質であるパタチンの発現量に匹敵するほどの高いGUS活性が検出された。また、 β -glucにより組織染色した結果、塊茎内のデンプン顆粒の集中する柔組織細胞が特異的に染色された。一方、H型アイソザイムの遺伝子上流域断片をもつトランスジェニック体では、いずれの器官においてもほぼバックグラウンド程度のGUS活性を示すに過ぎなかった。以上の結果から、ホスホリラーゼL型アイソザイムの5'-上流域中には、塊茎特異的発現に関与するシス配列が存在することが明らかになった。このホスホリラーゼ遺伝子を利用する作物の改変の試みについても言及する。

— メモ —

1. 本年は、前年より、生産量が増加する傾向にある。
2. 本年は、前年より、生産量が増加する傾向にある。
3. 本年は、前年より、生産量が増加する傾向にある。
4. 本年は、前年より、生産量が増加する傾向にある。
5. 本年は、前年より、生産量が増加する傾向にある。
6. 本年は、前年より、生産量が増加する傾向にある。
7. 本年は、前年より、生産量が増加する傾向にある。
8. 本年は、前年より、生産量が増加する傾向にある。
9. 本年は、前年より、生産量が増加する傾向にある。
10. 本年は、前年より、生産量が増加する傾向にある。

3

ナビンアンチセンスを導入したトランスジェニックナタネの解析 (植物工学研究所) 今村順

油糧作物の1つであるナタネ (*B. napus*)は種子中に40%の脂質と20%のタンパク質を蓄積しており、食用油やショートニング、マーガリンの原料だけでなく、榨油後の残渣も家畜の重要なタンパク質源として利用されている。現在、日本ではナタネ油の生産量は大豆油を凌ぎ、最も重要な植物油ある。

我々はナタネ種子の改良の1つの手段として、遺伝子操作を用いて脂質とタンパク質の量比および組成の改変を試みている。

ナタネの主要貯蔵タンパクであるナビンとクルシフェリンはそれぞれ全種子タンパク質の20-30%、60%を占めている。ナビンの平均分子量は13万ダルトンで9万ダルトンと4万ダルトンのサブユニットから成っていて、90%以上の相同意性のあるマルチジーンファミリーにコードされている。また、これらのナビン遺伝子の発現は主に転写レベルで制御されている事が知られている。

一方、いくつかの種で貯蔵タンパク質、脂質、澱粉の代謝は相互に関連している例が知られている。

そこでナビンの蓄積を転写レベルで制御することで、ナタネ種子の脂質とタンパク質を改変することを試みた。

ナビンのアンチセンス遺伝子をアグロバクテリウム法によりナタネに導入し、得られた6個体の形質転換体の種子のタンパク質と脂質を調べた。SDS-PAGEで調べたところ、ナビン含量が大幅に減少している個体からほとんど変化のない個体までが観察された。

そのうちナビン含量が最も減少していた個体の種子を2つに切断し、一方をSDS-PAGEでタンパク質組成を調べ、他方を発芽させてDNAを抽出しPCRで導入遺伝子の確認をしたところ、遺伝子を持った種子のみ対照区に比べてナビン含量が減少していた。しかし、ナビン含量が減少した種子の全タンパク質量に差は認められなかった。これは、ナビンの減少分を他のタンパク質が補ったことを示唆している。これを裏付けるように、クルシフェリンは増加しており、また、全種子タンパク質のアミノ酸組成も変化していた。

ナビン含量が減少した種子の脂質含量は対照区に比べ変化はなかっが、18:1の減少と18:2と18:3の増加が観察された。この脂質組成の変化は導入したアンチセンス遺伝子の存在とカップルしていた。

この様に、貯蔵タンパク質のアンチセンス遺伝子を導入することで狙ったタンパク質の量をさまざまな割合で減少させることができた。その減少が他の貯蔵タンパク質の増加で補われることで種子全タンパク質のアミノ酸組成を変化させることができた。この事は、ナタネ種子タンパク質の栄養学的な価値を改良できる可能性を示唆している。

—メモ—

(名古屋大学農学部) 今関英雅

我々の生活は極めて多種多様の植物生産物を利用することで成り立っている。食糧、繊維、木材等は植物体を直接利用する代表的なものであるが、澱粉、蔗糖、医薬品、嗜好品等のように植物生産物を分離して利用する側面を含めると、我々が人間の立場から植物に期待（要求）する内容は極めて多岐にわたっている。また、植物のどの部分を主として利用するかと言う点でも様々である。葉、茎、果実、種子、根のほか園芸的には花も利用の対象としており、それそれに期待する内容もまた様々である。我々は期待する部分、内容を出来るだけ多量に、品質を高く、しかも確実に得られるように育種、栽培技術を発展させ多大の成功をおさめてきた。その過程は植物の遺伝的性質、生理的性質を上手く「手なづけ」てきたものであって、植物が「本来持っている形質発現能力」を人間の要求に合うように調整してきたものといえる。しかし、近年の分子生物学の知見に基づいた遺伝子操作技術を植物にも適用することで、極めて過激な手段ではあるが「本来持っている形質発現能力」を改変してまでも人間の要求を満たすことが出来そうな状況となってきた。大変画期的な技術ではあるが、様々な生物現象の仕組みを生体成分の相互作用で解きあかそうとしてきた過去の地道な基礎的研究の成果があつて初めて可能となる技術である。人間の要求を直ちに特定の遺伝子に結び付け、遺伝子操作技術を単純に応用しても期待する結果を得ることは出来ないし、危険なことであつてある。

私どもの研究も、初めから作物を遺伝的に改変しよう等という意図があつた訳ではなく、植物の傷害応答の作動分子としてのエチレンの生合成調節の機構を明らかにすることが主目標である。幸いにして、エチレンの生理作用に関しては基礎、応用に亘って膨大な知見が蓄積されており、エチレン生成を何らかの手段で制御することが出来るならば、人間が作物に要求する内容の一部を達し得ることは明かであった。それは、果実、葉菜の品質と保藏性の向上である。C A 貯蔵に代表される物理的手段の開発、化学調節で代表される化学物質の使用による手段の模索、そして遺伝子操作が可能となったことによる作物の遺伝的組成の直接改変へと模索は続いている。しかし、生理現象に対する確実な生化学的理解がなければ操作すべき遺伝子も的外れになるであろうし、模索は模索に終わってしまうであろう。エチレン生合成の研究から何が明かとなり、その結果が作物のエチレン生成制御技術の確立へどう応用され得るか、私どもの研究や関連の研究を含めて話題とする。

私どもの現時点での結論は「エチレンの生合成が色々な刺激で増加することの仕組みは、生合成の律速酵素であるACC合成酵素がアイソザイムからなり、各アイソザイム遺伝子の発現が刺激特異的に起こることによる。したがって、どういう作物の状態のエチレン生成を制御するかによって導入するアイソザイム遺伝子の種類を選択しなければならない」「期待する形質を発現する転換体は容易には出来ないばかりでなく、説明の困難な形質転換体が現れる」と言うことである。

— メモ —



北海道農芸化学協会特別会員御芳名

(ABC順)

旭油脂株式会社
ベル食品株式会社
恵庭リサーチ・ビジネスパーク株式会社
福山醸造株式会社
富良野市ぶどう果樹研究所
合同酒精株式会社
北海道アサヒビール株式会社
北海道日産化学株式会社
北海道糖業株式会社
北海道和光純薬株式会社
北海三共株式会社
北海製罐株式会社 罐詰研究所
池田町ブドウ・ブドウ酒研究所
岩田醸造株式会社
株式会社北開水工コンサルタント
株式会社ズコーシャ
関東化学販売株式会社
キッコーマン株式会社 千歳工場

麒麟麦酒株式会社 千歳工場
日本化学飼料株式会社
日本清酒株式会社
日本新薬株式会社 千歳クリエートパーク
日本甜菜製糖株式会社 技術部
ニッカウヰスキー株式会社
サッポロビール株式会社 北海道工場
サッポロビール株式会社 札幌工場
札幌酒精工業株式会社
サントリー株式会社 千歳工場
宝酒造株式会社 札幌工場
高砂香料工業株式会社 札幌出張所
十勝農業協同組合連合会 農産化学研究所
よつ葉乳業株式会社
雪印乳業株式会社
雪印食品株式会社
有限会社 和科盛商