

## はじめに

澱粉は、いずれもグルコースポリマーである直鎖のアミロースと分岐構造をもつアミロペクチンで構成される(図1)。アミロースとアミロペクチンの割合やアミロペクチンの分岐の頻度と枝の長さの違いが米の物性や用途を左右する。アミロースは澱粉粒結合型スターチシンターゼ(GBSSI)によってのみ合成されるが、アミロペクチンは次の3種類の酵素が絶妙なバランスで働くことで合成される(図1)。スターチシンターゼ(SS)はADP-グルコースを基質として $\alpha$ 1,4結合の直鎖グルカンを伸長する。SSが伸長した $\alpha$ 1,4結合を枝作り酵素(BE)が切り、 $\alpha$ 1,6結合の分岐を形成する。そして、BEが過剰に形成した $\alpha$ 1,6結合の分岐を、枝切り酵素であるイソアマラーゼ(ISA1)が切除する。それぞれの酵素には、発現する器官・発現時期・発現量だけでなく、好む基質構造や産物構造、耐熱性が異なる複数のアイソザイムが存在し、機能的・物理的に相互作用してアミロペクチンを合成する。本研究ではBEアイソザイムとISA1を単独もしくは複数欠失したイネ変異体を解析し、アイソザイム固有の機能と相補作用に加えて、酵素間のバランスが重要であることを明確にした。



図1. 澱粉の合成と構造

## 枝作り酵素や枝切り酵素の欠失が米澱粉に与える影響

イネのゲノムに3種類存在するBEアイソザイムのうち、BEIが欠失すると胚乳のアミロペクチンではグルコース重合度15以下の分岐が微増したことから、BEIIはアミロペクチンの長い枝を形成すると考えられる<sup>1</sup>。BEIIaが欠失しても胚乳のアミロペクチン構造はほとんど変化せず、葉身や葉鞘ではアミロペクチン短鎖が減少し、アミロペクチン長鎖が増加したことから、BEIIaは葉のアミロペクチン合成において主要な働きをすると考える<sup>1,2</sup>。一方、BEIIbが欠失すると、胚乳ではアミロペクチンの短鎖が減少し、長鎖が増加した。その結果、糊化温度が上昇し、難消化性澱粉含量が大幅に増加した<sup>3,4,5</sup>。また、BEIIbが欠失すると玄米が白濁し、種子重量が野生型の6割に低下するなど、農業形質にも影響することが明らかになった。しかし、BEIIbが欠失しても、葉身や葉鞘のアミロペクチン構造はほとんど変化しないことから、BEIIbは胚乳のアミロペクチン合成において主要な働きを担うと言える。

BEIとBEIIaを欠失すると、胚乳の澱粉構造はBEI欠失と酷似していたことから、BEIIbのみ存在すれば胚乳のアミロペクチンは合成できると考える<sup>2</sup>。BEIとBEIIbが欠失すると、胚乳ではアミロペクチンの短鎖が激減し、長鎖が激増した<sup>6</sup>。それに伴い、糊化温度が大幅に上昇し、難消化性澱粉含量とアミロース含量が劇的に増加したが、種子重量は5割に低下した<sup>6</sup>。以上から、BEIIaのみでもアミロペクチンは合成できるが、澱粉の消化性が著しく低下することが明らかになった。一方、BEIIaとBEIIbが欠失すると、植物体は正常に生育するが、稔実率が極めて低くなったことから、BEIだけでは胚乳のアミロペクチンが合成できないと言える<sup>2</sup>。上記を鑑みBEアイソザイムの組織別発現量と相補作用を図2に示した。

ISA1が欠失するとアミロペクチンの短鎖が大幅に増加し、不溶性の澱粉ではなく、水溶性のフィトグリコーゲンを蓄積するため、扁平種子になり、種子重量が4割に低下した<sup>7</sup>。一方、BEIIbとISA1を同時に欠失させると、BEIIbとISA1が単独で欠失した変異体よりもア

ミロペクチン構造が野生型に近づき、難消化性澱粉含量が低下し、種子重量の低下が緩和した<sup>5</sup>。このことから、BEIIbとISA1のバランスによって、澱粉構造や消化性を制御できることが明らかになった。

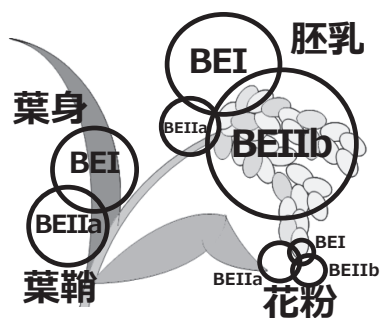


図2. BEの組織別発現量と相補関係

## 今後の展望

「アミロペクチンの枝の形成と切除がどのようなバランスになると米の消化性や収量が変わるのか。その臨界点はどこか?」、「そのような澱粉を蓄積するためにはどのBEアインザイムとISA1を欠失させた組合せが必要か?」は不明である。今後、BEアインザイム、およびISA1の組合せや強弱が異なるイネ変異体を分析することで、枝作りと枝切りのバランスが米の物性・消化性・収量に与える影響が明確になると期待される。

## 謝辞

本研究は秋田県立大学および秋田工業高等専門学校で行われた。研究の遂行にあたり、藤田直子教授(秋田県立大学)および、三浦聡子博士(新潟食料農業大学)、秋田県立大学植物生理研究室の皆様にも多大なるご支援・ご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。

## 引用文献

1. Satoh, H. *et al. Plant Physiol.* **133**, 1111-21 (2003)
2. Miura S. *et al. Plant Mol. Biol.* **15**, 51 (2025)
3. Nishi A. *et al. Plant Physiol.* **127**, 459-72 (2001)
4. Tsuike K. *et al. J. Cereal Sci.* **68**, 88-92 (2016)
5. Nagamatsu S. *et al. Plant Mol. Biol.* **108**, 497-512 (2022)
6. Miura, S. *et al. Rice.* **14**, 3 (2021)
7. Kubo A. *et al. Plant Physiol.* **121**, 399-410 (1999)

## 略歴

- 2001年 9月 山口県立大学家政学部食生活科学科 卒業
- 2001年 5月 ワシントン州立大学 生物化学研究所 研究員
- 2009年 8月 ワシントン州立大学大学院 一貫制博士課程 分子植物科学専攻 修了(学術)
- 2011年 4月 秋田県立大学 生物資源科学部 流動研究員
- 2013年 4月 秋田県立大学 生物資源科学部 特任助教
- 2015年 4月 秋田県立大学 日本学術振興会 特別研究員RPD
- 2018年 6月 秋田県立大学 日本学術振興会 特別研究員RPD
- 2021年 7月 秋田県立大学 生物資源科学部 博士研究員
- 2022年 4月 秋田県立大学 生物資源科学部 特任助教
- 2023年 4月~ 秋田工業高等専門学校 創造システム工学科 准教授(現在に至る)

# Mechanism of starch biosynthesis in rice focusing on the balance between branching and debranching enzymes.

Naoko Crofts, Department of Chemical and Biological Engineering, School of Creative System Engineering, National Institute of Technology, Akita college

## Introduction

Starch is composed of glucose polymers of essentially linear amylose and highly branched amylopectin (Fig. 1). The ratio of amylose to amylopectin, as well as the frequency of branch and the length of the branches, determine the physical properties and uses of rice. Amylose is solely synthesized by granule-bound starch synthase I (GBSSI), whereas amylopectin is synthesized by the coordinated actions of following three enzymes (Fig. 1). Starch synthases (SSs) use ADP-glucose as a substrate to elongate linear  $\alpha$ 1,4-linked glucan chains. Those chains elongated by SSs are cleaved by branching enzymes (BE) to form  $\alpha$ 1,6-linked branches. Subsequently, excess  $\alpha$ 1,6-linked branches formed by BEs are removed by the debranching enzyme, isoamylase (ISA1). Each enzyme possesses multiple isozymes with different tempo-spatial expression pattern, expression levels, preferred substrate and product structures, and heat resistance. Those isozymes interact functionally and physically to synthesize amylopectin. In this study, rice mutants lacking one or more of BE isozymes were used to reveal isozyme-specific and compensatory functions of BE isozymes, as well as the balance between BE isozymes and ISA1.

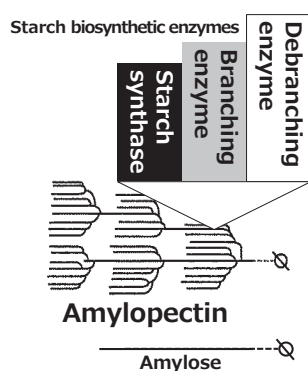


Fig. 1. Starch structure and its synthesis

## The Effects of the Absence of BEs and ISA1 on Rice Starch

There are three BE isozymes present in rice genome, loss of BEI led a slight increase in amylopectin branches with a degree of polymerization of 15 or less in endosperm, and that BEI contributes to the formation of long branches in amylopectin<sup>1</sup>. In the absence of BEIIa, the endosperm amylopectin structure was essentially the same as the wild type, however, the proportion of short amylopectin chains decreased and that of long amylopectin chains increased in its leaf blades and leaf sheaths. Therefore, BEIIa plays a major role in amylopectin synthesis in leaves<sup>1,2</sup>. In contrast, when BEIIb was absent, the proportion of short amylopectin chain was decreased and that of long amylopectin chain was increased in the endosperm. As a result, the gelatinization temperature and the resistant starch content of starch were significantly increased<sup>3,4,5</sup>. Furthermore, loss of BEIIb resulted in opaque seeds and reduced seed weight to 60% of that of the wild-type, affecting agronomic traits. However, starch in leaf blades and leaf sheaths was not affected by the absence of BEIIb. Thus, BEIIb plays a major role in amylopectin synthesis in the endosperm.

The phenotype of double mutant lacking BEI and BEIIa closely resembled that of BEI single mutant indicating that amylopectin in the endosperm can be synthesized by BEIIb alone<sup>2</sup>. When both BEI and BEIIb were absent, the short amylopectin chain was drastically decreased and long amylopectin chain increased in the endosperm<sup>6</sup>. Consequently, the gelatinization temperature and resistant starch content were significantly increased. Furthermore, the amylose content was greatly increased, and seed weight decreased to 50% of the wild-type<sup>6</sup>. Based on these findings, it became clear that although amylopectin can be synthesized with BEIIa alone, the digestibility of the starch is significantly reduced. When both BEIIa and BEIIb are absent, the plant grew normally, but the fertility rate was extremely low; therefore, BEI alone is insufficient for amylopectin synthesis in endosperm<sup>2</sup>. Schematic representation of expression levels and compensatory functions are shown in Fig. 2.

When ISA1 was absent, short amylopectin chains were significantly increased, and water-soluble phytyglycogen was accumulated instead of insoluble starch; consequently, flat wrinkled mature grains were produced and seed weight was

decreased to 40% of the wild type<sup>7</sup>. On the other hand, when both BEIIb and ISA1 were absent, its amylopectin structure became closer to that of the wild type than their single mutants of BEIIb or ISA1. Its resistant starch content was starch decreased, while the reduction of seed weight was mitigated<sup>5</sup>. This indicates that the balance between BEIIb and ISA1 is important for controlling starch structure and digestibility.

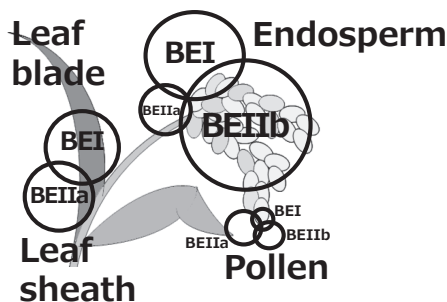


Fig. 2. Expression pattern of BE isozymes

## Perspective

It remains unclear “How does the balance between the formation and removal of amylopectin branches affect rice digestibility and yield?” and “Which combination of BE isozymes and ISA1 deletions is required to accumulate such starch?”. Analysis of rice mutants with different combinations of expression levels of BE isozymes and ISA1 will clarify the effects of the balance between branch formation and branch pruning on the physical properties, digestibility, and yield of rice.

## Acknowledgements

This research was conducted at Akita Prefectural University and National Institute of Technology, Akita college. I would like to express my sincere gratitude to Prof. Naoko Fujita (Akita Prefectural University) and Dr. Satoko Miura (Niigata Agro-Food University), and members of plant physiology laboratory, Akita Prefectural University.

## References

1. Satoh, H. *et al. Plant Physiol.* **133**, 1111-21 (2003)
2. Miura S. *et al. Plant Mol. Biol.* **15**, 51 (2025)
3. Nishi A. *et al. Plant Physiol.* **127**, 459-72 (2001)
4. Tsuiki K. *et al. J. Cereal Sci.* **68**, 88-92 (2016)
5. Nagamatsu S. *et al. Plant Mol. Biol.* **108**, 497-512 (2022)
6. Miura, S. *et al. Rice.* **14**, 3 (2021)
7. Kubo A. *et al. Plant Physiol.* **121**, 399-410 (1999)

## Brief Biography

September	2001	B.S. in Department of Food Science, Yamaguchi Prefectural University
May	2001	Researcher, Institute of Biological Chemistry, Washington State University
August	2009	Ph.D. in Department of Molecular Plant Sciences, Washington State University
April	2011	Researcher, Akita Prefectural University
April	2013	Select assistant professor, Akita Prefectural University
April	2015	JSPS research fellow (RPD)
June	2018	JSPS research fellow (RPD)
April	2021	Researcher, Akita Prefectural University
April	2022	Select assistant professor, Akita Prefectural University
April	2023	Associate Professor, National Institute of Technology, Akita college