

第 2 章 α -アミラーゼインヒビター (α AI) - 2 の構造と機能

第 1 章において、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L) 種子の α -アミラーゼインヒビター (α AI) とアルセリン (arcelin) の各変異型について、遺伝様式と相互の遺伝的關係を調査した。その結果、 α AI とアルセリンはともに、1 優性遺伝子に支配されること、さらに、両形質が遺伝的に強度の連鎖関係にあることを明らかにした。1 遺伝子支配の形質は、交配法や遺伝子組換え技術のいずれの方法をとるにしても、育種的な制御は比較的容易である。上記の 2 種タンパク質に認められた変異の中で、 α AI-1 とアルセリン 1 及び 4 については、マメゾウムシ類に対する生育阻害性が確認されている。

人工豆を用いた飼育試験において、 α AI-1 は、0.4 ~ 0.5 % (w/w) 濃度でアズキゾウムシ (*Callosobruchus chinensis* (L.)) とヨツモンマメゾウムシ (*C. maculatus* (F.)) の生育を阻害した (Ishimoto and Kitamura 1989)。同様の試験で、アルセリン 1 と 4 は、7 ~ 10 % (w/w) 濃度で、ブラジルマメゾウムシ (*Zabrotes subfasciatus* (BOHEMAN)) の生育を阻害した (Osborn et al. 1988, Minney et al. 1990)。 α AI は、幼虫の α -アミラーゼ活性を阻害することにより生育を阻害し、アルセリンは、幼虫に消化吸収されず、栄養欠乏を引き起こすという機構で生育を阻害している。それ故、アルセリンは、 α AI に比べて、種子に高濃度で含有されなければ、マメゾウムシ類の生育を阻害しない。

α AI は、アルセリンに比べて低濃度でマメゾウムシ類の生育を抑えるため、種子の成分を大きく変えることなく虫害抵抗性を付与できる点で、非常に有望と考えられる。しかしながら、 α AI-1 は、ブラジルマメゾウ

ムシ幼虫の α -アミラーゼ活性と生育を阻害しない (Ishimoto and Kitamura 1989)。 α AIの変異の中で本虫の α -アミラーゼ活性を阻害するものは、 α AI-2と α AI-3であり、本虫の生育を阻害する可能性がある。 α AI-2は、ブラジルマメゾウムシ抵抗性の野生種から見いだされ、同じく種子に含まれるアルセリン4とともに、本抵抗性への関与が推測されている (Gatchouse et al. 1987, Ishimoto and Kitamura 1993)。

そこで本章では、 α AI-2のマメゾウムシ類に対する生育阻害性を調査するとともに、タンパク質構造と α -アミラーゼ活性阻害性を分析した結果について述べる (Suzuki et al. 1993)。さらに、 α AI-2のcDNAをクローニングし、塩基配列を決定するとともに、本遺伝子を用いた抵抗性品種の育成法に関して考察する (Suzuki et al. 1994)。

第 1 節 α A I - 2 の精製ならびにタンパク質構造

Ishimoto et al (1995) は、インゲンマメの栽培種及び野生種について、種子の α -アミラーゼインヒビター (α A I) 活性と電気泳動パターンの分析から、 α A I を大きく 4 つに分類した (α A I - 1, 2, 3, 0)。これらのうち、 α A I - 1 は、タンパク質構造と機能について詳細な研究がなされており (Jaffe et al. 1973, Marshall and Lauda 1975, Powers and Whitaker 1977, Pick and Wober 1978, Lajolo and Finardi-Filho 1985, Moreno et al. 1990, Yamaguchi 1991)、既に遺伝子の塩基配列も明らかにされている (Hoffman et al. 1982, Moreno and Chrispeels 1989)。 α A I - 2 は、ブラジルマメゾウムシ抵抗性のインゲンマメ野生種に見いだされ、 α A I - 1 で阻害されないブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性に対して阻害性を示す (Ishimoto and Kitamura 1993)。従って、 α A I - 2 は、 α A I - 1 とは異なる構造と機能を有し、ブラジルマメゾウムシの生育を阻害する可能性がある。

そこで本節では、 α A I - 2 を精製してタンパク質構造を解析し、 α A I - 1 と比較検討する。

材料および方法

1. 種子および昆虫

栽培品種大福 - 5 (α A I - 0) と野生系統 G12953 (α A I - 2) を交配し、 α A I - 2 を有する系統 (OAr4) を育成し、 α A I - 2 の精製材料とした (図 7)。 α A I - 1 の単離・精製は、栽培品種大正金時を材料とした (図 7)。また、OAr4、大正金時及び、ササゲ栽培系統



図7. インゲンマメ種子タンパク質の SDS-ゲル電気泳動分析

1, Taishou-kintoki (α AI-1); 2, OAr4 (α AI-2).

PI165486 を飼育試験に供試した。

ブラジルマメゾウムシは、 30 ± 2 °C、70% 相対湿度、暗黒条件下で PI165486 に産卵させ、飼育したものをを用いた。

2. 飼育試験

α A I - 2 を含む育成系統 OAr4 のブラジルマメゾウムシ抵抗性を、人工豆を用いた飼育試験により確認した。OAr4、大正金時、PI165486 の種子をそれぞれ粉碎し、以下のように 0.5g / 1 粒の人工豆を作製した (Ishimoto and Kitamura 1989)。0.5g の種子粉に 150 μ l の蒸留水を加えて固め、鋳型により高さ 18mm、底面直径 6mm の円柱状にし、 -80 °C で凍結した。マメゾウムシ類は、産卵条件として種子にあるような曲面を好み、極端な例では、ガラス玉の表面でも産卵を行う。そこで、表面を滑らかにするために、凍結乾燥後の人工豆を約 55 °C の 9% ゼラチン溶液に 1 秒間浸し、0 °C で固め (約 10 分間) 皮膜した。

作製した人工豆を 1 粒ずつシャーレに入れ、マメゾウムシ類の飼育環境下 (温度 30 °C、湿度 70%) に 1 昼夜静置し、その後、ブラジルマメゾウムシ成虫を 10 ~ 15 対放飼し、産卵させた (図 8)。3 日後に成虫を除去し、1 週間後に孵化した卵の数を数えた。成虫を除去した日から 30 日目に、生存している幼虫、蛹、そして成虫を数え、生存率 (成虫を含む) と羽化率を算出した。試験は、6 反復行った。

3. 幼虫消化管抽出液の調製

ブラジルマメゾウムシの終齢幼虫を種子から取り出し、中腸を摘出した。中腸 40 個体分につき 1ml の 20mM リ



図8. 飼育試験に用いた人工豆

ン酸緩衝液 (pH6.8) を加え、超音波等でよく磨砕し、15,000rpm で遠心した。上清を 0.20 μ m のフィルターでろ過し、ろ過液を α -アミラーゼ活性の測定に用いた。

4. α A I 活性

α A I の阻害活性は、Bernfeld (1955) に準じた Ishimoto and Kitamura (1989) の方法により測定した。30 $^{\circ}$ C にてデンプンを加水分解し、マルトースを 80 μ g / 分の割合で生成するブタすい臓の α -アミラーゼ (Sigma, USA) または、幼虫消化管抽出液と、 α A I の試料を混合し、20mM リン酸緩衝液 (pH6.8) で全量を 250 μ l とした。30 $^{\circ}$ C 15分保持した後、250 μ l の 1% デンプン溶液を加え、5分間反応させた。3,5-ジニトロサリチル酸試薬を加えて反応を停止させ、100 $^{\circ}$ C 10分間保ち、発色させた。室温にて10分間冷やし、546nm の吸光度を測定した。 α A I の試料を添加しなかった吸光度を α -アミラーゼの活性とし、 α A I の試料を添加した場合の α -アミラーゼ活性の低下を、 α A I の阻害活性とした。

5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とゲルの染色および脱色

13.5% のアクリルアミドゲルを用いて、第1章第1節と同様に電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルを取り出し、0.225% クマシーブリリアントブルー G250、44% メタノール、6% 酢酸を含む染色液で3時間染色した。その後、20% メタノールと5% 酢酸を含む脱色液により、バックグラウンドがなくなるまでゲルの脱色を行った。

6. レクチン活性

レクチン活性は、Lis and Sharon (1973) に従って測定した。ウサギ保存血 4ml を 0.9% 塩化ナトリウムを含む 10ml の 20mM リン酸緩衝液 (pH6.8) で 3 回洗浄し、50ml の同緩衝液中に懸濁してウサギ赤血球を得た。マイクロタイタープレート上に、試料液を順次希釈して入れ、そこに調製した赤血球を添加した。混合後、30 分間静置し、血球凝集反応を肉眼で判定した。

7. α A I - 1 の精製

Ishimoto and Kitamura (1988) の方法に基づき、インゲンマメ栽培品種大正金時の種子から α A I - 1 を精製した。

8. 種子抽出液の調製

育成系統 OAr4 の種子を高速振動試料粉碎機により粉碎し、100メッシュで種皮を除去した。種子粉 30g を 800ml の 20mM リン酸緩衝液 (pH6.8) に加え、4℃、4 時間攪拌した。攪拌抽出後、11,000g、20 分間遠心分離を行い、得られた上清を種子抽出液とした。

9. α A I - 2 の精製

精製は常に 4℃ 以下で行い、操作段階ごとに α A I - 2 の阻害活性とタンパク質をモニターしながら進めた。 α A I - 2 の阻害活性は上記 4 により、タンパク質分析は 280nm の吸光度及び上記 5 により行った。

上記 8 で得られた種子抽出液を、硫酸沈澱により分画した。飽和度が 20% となるように硫酸を加え、4℃ で

1 時間攪拌後 11,000g で 20 分間遠心し、上清と沈澱物に分けた。α A I - 2 を含む上清に飽和度が 80 % になるように硫酸を加え、4 °C で 1 時間の攪拌の後、遠心した。沈澱物を 200ml の 20mM リン酸緩衝液 (pH6.8) に溶解し、本緩衝液に対して 4 °C で一晩の透析を行った。

透析後の画分を、カラムクロマトグラフィーに供試した。まず、電気的性質の差で分離するイオン交換クロマト DEAE-Sephacel (Pharmacia, Sweden) カラムを 20mM リン酸緩衝液 (pH6.8) で平衡化し、硫酸沈澱画分を添加した。カラムから溶出する非吸着画分を 280nm の吸光度で測定し、この画分が除去されるまで 20mM リン酸緩衝液で洗浄した。その後、600ml の 0.25mM のリン酸緩衝液 (pH6.8) により吸着画分を溶出した。DEAE 吸着、非吸着画分について、α A I - 2 の阻害活性を調査した。阻害活性の検出された吸着画分を Con A 用バッファー (0.5M NaCl, 0.02M PB, pH6.8) で平衡化した Con A-Sepharose 4B (Pharmacia, Sweden) のアフィニティーカラムに添加した。非吸着画分を Con A 用バッファーで除去した後、30ml の 0.3M メチルー α - D - マンノピラノシド溶液 (Con A 用バッファー中) を加え、吸着画分を溶出した。α A I - 2 は糖タンパク質であり、Con A-Sepharose に吸着される。そのため、非吸着画分には α A I - 2 の阻害活性は検出されなかった。Con A 吸着画分を 20mM リン酸緩衝液 (pH6.8) に対して 4 °C で一晩透析し、再度 DEAE-Sephacel カラムに吸着させた。吸着画分を 0.02 ~ 0.25M リン酸緩衝液 (pH6.8) の濃度勾配により溶出、分画した。

α A I - 2 の阻害活性を示す画分を硫酸で沈澱させ、0.15M 塩化ナトリウムを含む 20mM リン酸緩衝液 (pH6.8) で平衡化した Sephacryl-S200 (Pharmacia, Sweden) によるゲルろ過を行った。ゲル濾過後、蒸留水に対して透析を行い、α

A I - 2 の阻害活性を示す画分を凍結乾燥してデシケータ中で保存した。

10. ゲルろ過法による分子量の推定

0.15M 塩化ナトリウムを含む 0.02M リン酸緩衝液 (pH6.8) により、Superose 12 (Pharmacia, Sweden) カラムを平衡化し、FPLC システム (Pharmacia, Sweden) を用いて、ゲルろ過を行った。0.1 μ g の α A I - 2 を 100 μ l の平衡化緩衝液に溶解し、Superose 12 に添加した。毎分 0.4ml の流速でゲルろ過を行い、280nm の吸光度で検出した。分子量推定のために、Pharmacia (Sweden) の低分子量標準キットと Serva (Germany) の分子量標準キット MSII を用いて、標準曲線を求めた。

11. N 末端アミノ酸配列の決定

Hirano (1989) の方法に準じ、 α A I - 2 を SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、PVDF 膜にプロットティング、クマシー染色した後、サブユニットバンドを切り出した。それぞれのサブユニットバンドをエドマン法による気相プロテインシーケンサー (477A; アブライドバイオシステム) で分析し、N 末端アミノ酸配列を決定した。

結果

- 1) インゲンマメ育成系統 OAr4 のブラジルマメゾウムシ抵抗性

インゲンマメ栽培品種大福 - 5 (α A I - 0) と野生系統 G12953 (α A I - 2) を交配し、 α A I - 2 を有する系統 OAr4 を育成した。系統 OAr4 は α A I - 2 とともに、アルセリン 4 を含んでいた。人工豆を用いた飼育試験において、ブラジルマメゾウムシの生存率は、インゲンマメ栽培品種大正金時とササゲ栽培系統 PI165486 で 81% 台であったのに対し、系統 OAr4 では 58% であった。また、羽化率は、大正金時と PI165486 が 60 ~ 75%、OAr4 が 0% であった (表 4)。OAr4 は G12953 と同様に、ブラジルマメゾウムシに強度抵抗性であることを確認した。

2) α A I - 2 の精製

ブラジルマメゾウムシ抵抗性の育成系統 OAr4 の種子から α A I - 2 の単離・精製を試みた。 α A I - 2 は、種子抽出液の硫安 20 ~ 80% 画分、イオン交換クロマト DEAE-Sephacel 及び糖タンパク質に関するアフィニティークロマト Con A-Sepharose の吸着画分に存在した。DEAE-Sephacel カラムによる濃度勾配溶出の段階で 3 つのタンパク質ピークを認めた (図 9)。第 1 ピークはレクチン活性を示し、血球凝集素である P H A (phytohemagglutinin) が存在した。第 2 ピークは α A I - 2 の阻害活性を示したが、 α A I - 2 以外に P H A 等の他のタンパク質が混在していた (図 10)。第 3 ピークは、レクチン活性と α A I - 2 の阻害活性のどちらも示さなかった。

上記第 2 ピークを Sephacryl-S200 のゲルろ過に供試したところ、第 3 のピークに α A I - 2 を単一のタンパク質として精製することができた (図 11, 12)。 α A I - 2 は種子重の 0.4 ~ 0.5% (w/w) 含まれていた。これまでの精製過程を図 13 に記載する。

表4. 人工豆におけるブラジルマメゾウムシの生育

人工豆の 材料とした種子粉	生存率 (%)	羽化率 (%)
OAr4 ¹⁾	58.45 ± 2.65 ²⁾	0.00 ± 0.00
Taishou-kintoki	81.25 ± 3.87	60.70 ± 3.44
PI165486	81.69 ± 5.01	75.88 ± 5.12

1) Ofuku-5 と G12953 の交配より得た α A I - 2 を含む系統.

2) 標準誤差を示す (6 反復試験).

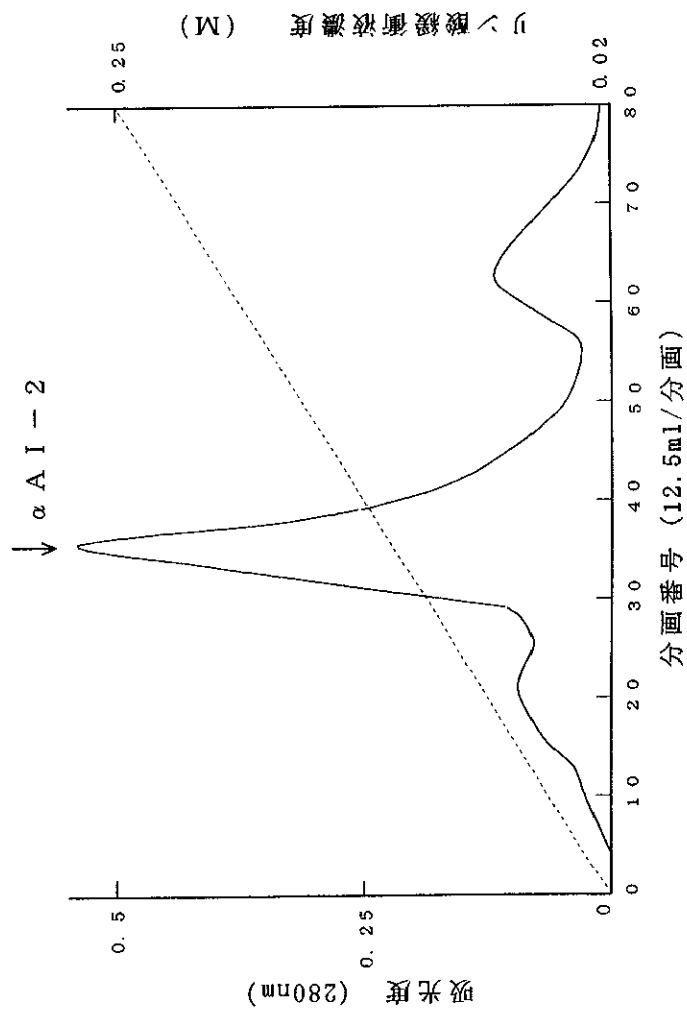


図9. DEAE-Sephacel イオン交換クロマトによる α A I - 2 の分離

α A I - 2 を含む Con A-Sephacel 吸着画分を DEAE-Sephacel イオン交換クロマトに吸着させ、リン酸緩衝液による濃度勾配溶出を行った。矢印は、ブラジルマゼウムシの幼虫 α -アミラーゼ活性に対する阻害活性のピークを示す。破線は、リン酸緩衝液 (pH 6.8) の濃度を示す。

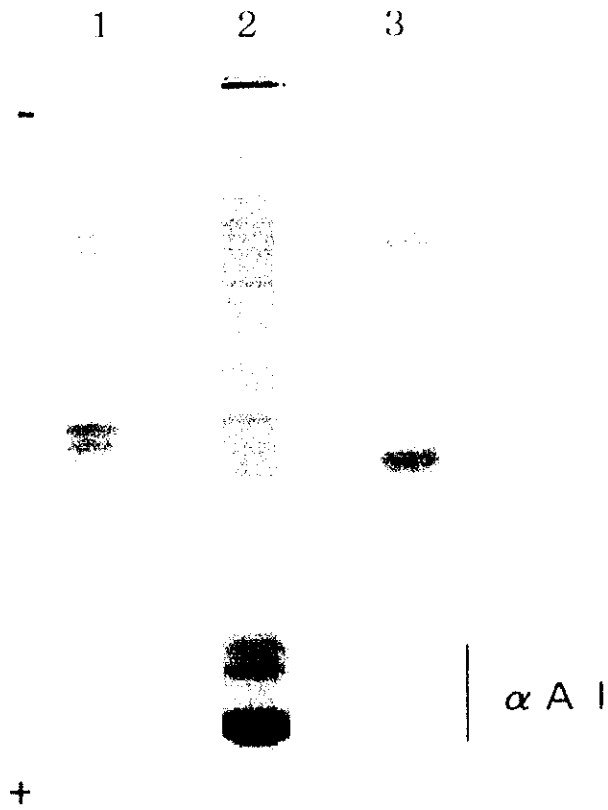


図 10. DEAE-Sephacel イオン交換クロマトによる分離画分の SDS-
ゲル電気泳動分析

1, 第 1 ピーク画分; 2, $\alpha A I-2$ を含む第 2 ピーク画分; 3, 第 3 ピーク画分. $\alpha A I-2$ を含む Con A-Sepharose 吸着画分を DEAE-Sephacel イオン交換クロマトで濃度勾配溶出 (リン酸緩衝液 0.02-0.25M, pH6.8) した.

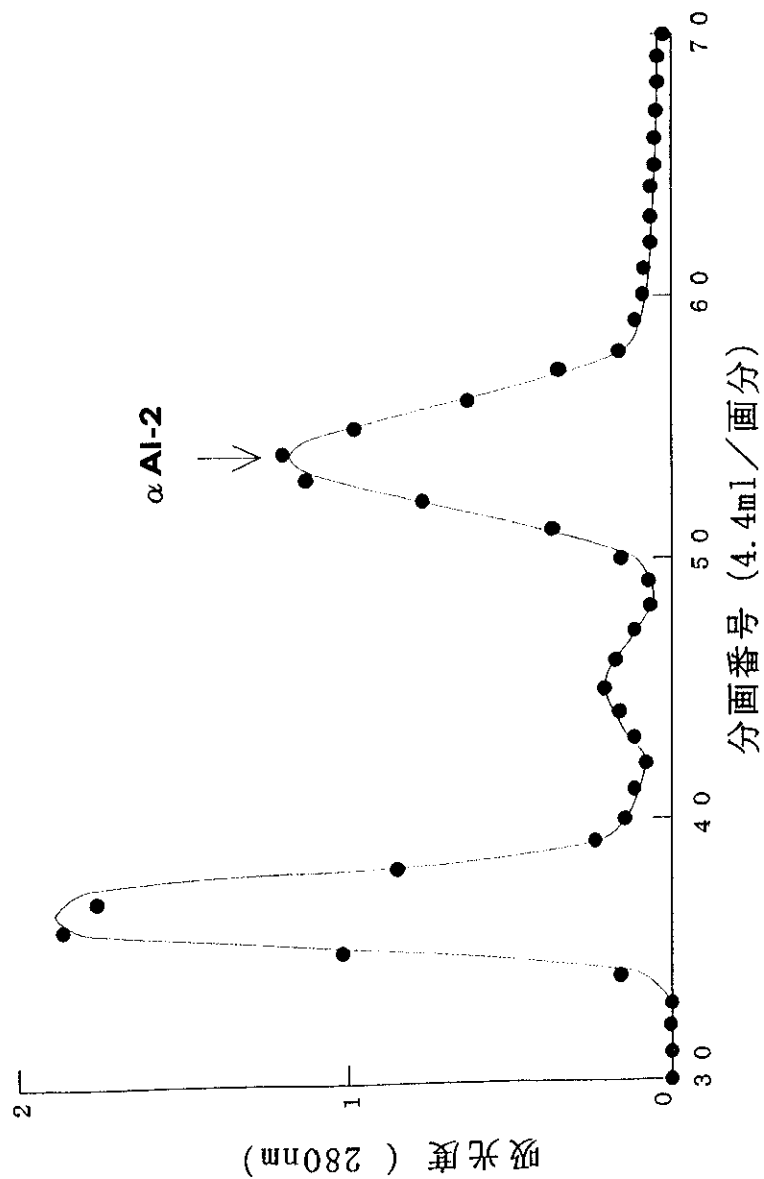


図 11. Sephacryl S-200 ゲル濾過による α AI - 2 の分離

α AI - 2 を含む DEAE-Sephacel 吸着画分を Sephacryl S-200 ゲル濾過で分離した。矢印は、ブラジルマメゾウムシの幼虫 α - アミラーゼ活性に対する阻害活性のピークを示す。

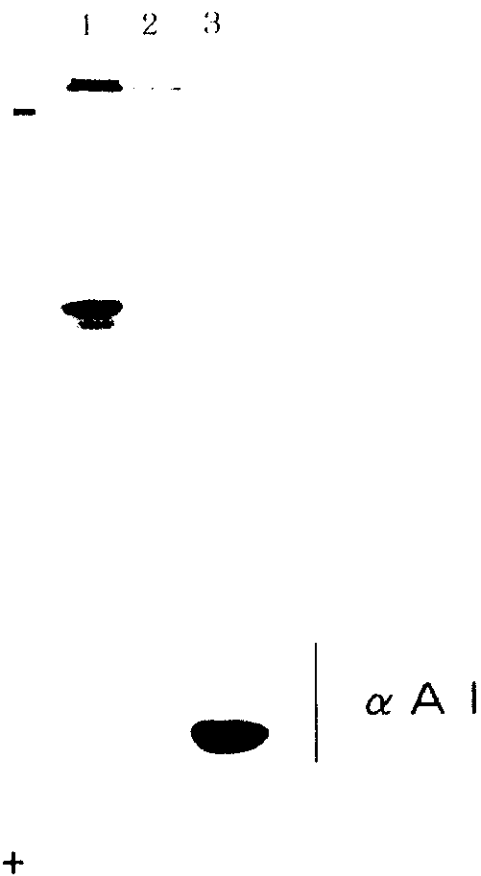


図 12. Sephacryl-S200 ゲル濾過による分離画分の SDS-
ゲル電気泳動分析

1, 第 1 ピーク画分 ; 2, 第 2 ピーク画分 ; 3, $\alpha A 1-2$
を含む第 3 ピーク画分. $\alpha A 1-2$ を含む DEAE- Sephacel
吸着画分を Sephacryl S-200 ゲル濾過で分離した.

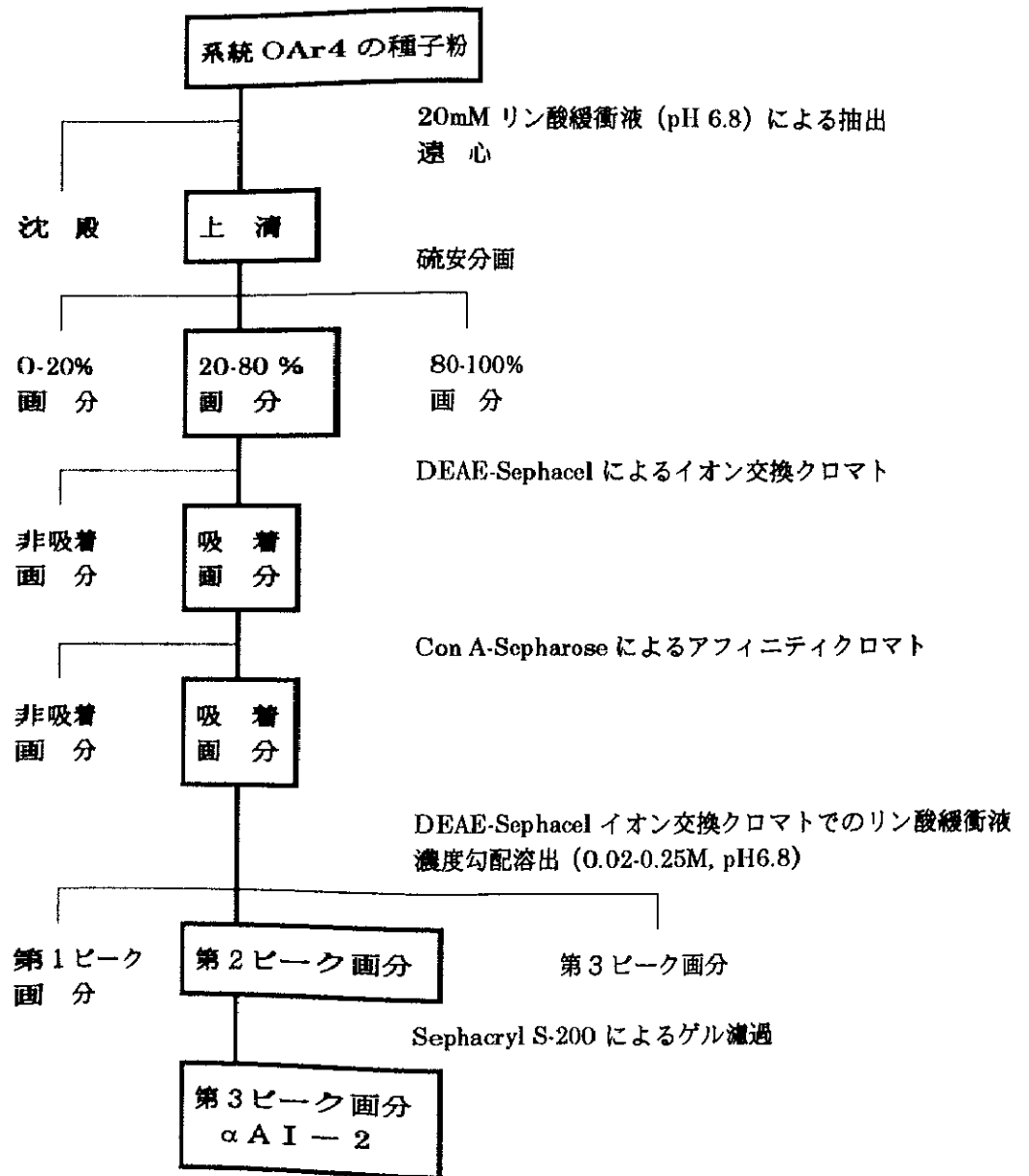


図13. 系統 OAr4 種子からの α AI - 2 の精製

3) α A I - 2 のタンパク質構造

精製した α A I - 1 と 2 を、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供試したところ、 α A I - 1 が分子量 14,400 ~ 20,100 域に 5 本のバンドを示したのに対し、 α A I - 2 は同じ分子量域に異なる 3 本のバンドを与えた (図 14)。また、ゲルろ過法により推定した未変性状態の α A I - 2 の分子量は、49,000 であった (図 15)。

上記電気泳動で分離した α A I - 1 及び 2 のサブユニットバンドについて、N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、 α A I - 1 と 2 から、ともに 2 種類のアミノ酸配列が得られ、両者とも異なる 2 種類のサブユニットからなることが示された。それらの配列とインゲンマメの血球凝集素である P H A、そしてアルセリン (arcelin) のアミノ酸配列を比較したところ、高い相同性が認められた (図 16)。

考察

本節では、ブラジルマメゾウムシ抵抗性のインゲンマメ系統 OAr4 の種子から、 α A I - 2 を単離・精製してタンパク質構造を解析し、 α A I - 1 と比較した。

α A I - 2 は、電氣的性質の差で分離する DEAE-Sephacel イオン交換クロマトの濃度勾配溶出において、P H A の後に溶出した。 α A I - 1 も P H A の後に溶出するため (Ishimoto and Kitamura 1988)、 α A I - 2 が α A I - 1 と同様な電氣的性質を持つことが推察された。また、 α A I - 2 は α A I - 1 と同様に、アフィニティークロマト Con

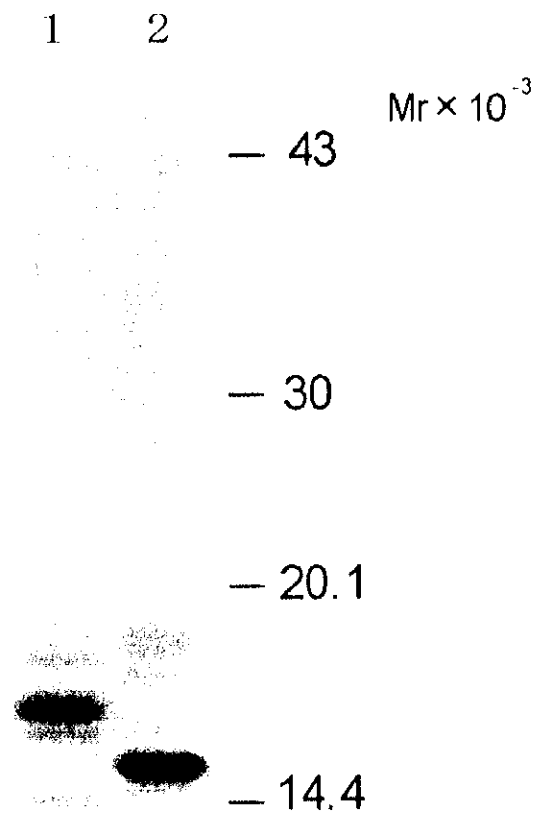


図 14. 精製した α A I - 1 と α A I - 2 の SDS-ゲル電気泳動分析

1, α A I - 1 ; 2, α A I - 2. 分子量を kDa で示す.

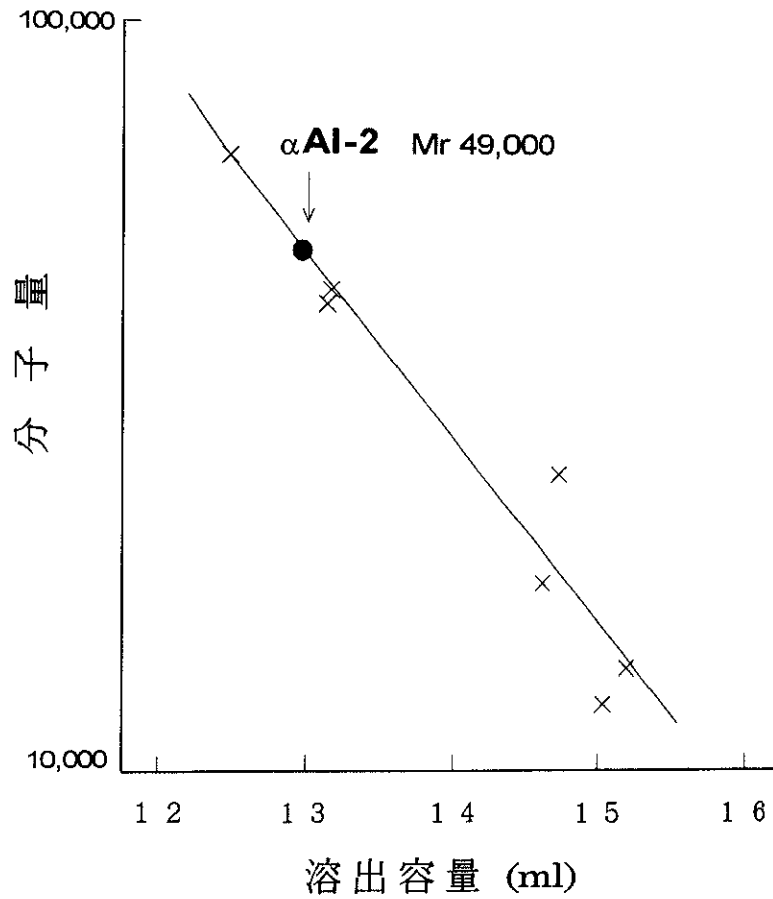


図 15. Sephacryl S-200 ゲル濾過による α A I - 2 の分子量推定

‘ ● ’, α A I - 2; ‘ x ’, 分子量マーカー.

	1	5	10	80
PHA-E	A S Q T S F S F Q R F - - P A D G L A F V L V P			
PHA-L	S N D I Y : N : : : - - - : : : : : A : : :			
Arcelein4	: E : : : X : T S :			
α AI-1- α	: T E : : : I I D A :			
α AI-2- α	: : D : : : N : Y S :			
			1	10
α AI-1- β			S : V : : D : : : :	
α AI-2- β			S V I : : D : A : : :	

図 16. PHA-E、PHA-L (Hoffman and Donaldson 1985)、Arcelein 4 (Hartweck et al. 1991)、 α AI-1 (Hoffman et al. 1982) 及び α AI-2 のアミノ酸配列の比較

α AI-1 と α AI-2 の 2 種類のサブユニットを α 、 β で示す。記号 (:) は、PHA-E のアミノ酸と同一であることを示す。記号 (X) は、同定されていないアミノ酸を示す。記号 (-) は、アミノ酸配列を比較するうえで与えたスペースを示す。

A-Sepharose に吸着したため、糖タンパク質であることを追認した (Ishimoto et al. 1995)。

SDS - ポリアクリルアミド電気泳動において、 α A I - 2 は α A I - 1 と同じ分子量域 (M_r 14,400 ~ 20,100) に、 α A I - 1 とは異なる 3 本のバンドパターンを示した。分離した 3 本のバンドを PVDF 膜に電氣的に転写し、気相プロテインシーケンサーで N 末端アミノ酸配列を決定したところ、2 種類の異なる配列が得られた。 α A I - 2 の未変性状態の分子量が 49,000 であることを踏まえると、 α A I - 2 は、2 種類のサブユニットからなるヘテロ 4 量体であることが考えられた。 α A I - 1 も分子量 40,000 ~ 45,000 のヘテロ 4 量体と推定されていることから (Powers and Whitaker 1977, Moreno and Chrispeels 1989)、 α A I - 1 と α A I - 2 がほぼ同様なタンパク質 3 次構造を有することが推察された。

α A I - 1 は、約 15% の糖質を含む糖タンパク質で、アスパラギン残基結合型の糖鎖が存在する (Powers and Whitaker 1977)。 α A I - 1 は、2 つの異なるサブユニットからなるが、電気泳動では 5 本のバンドを示した。この違いは、糖鎖の有無や結合数により、バンドの移動度に差が生じるためと考えられている (Moreno et al. 1989, Yamaguchi 1991)。 α A I - 2 も糖タンパク質であり、2 種類のサブユニットが糖鎖の結合度合いなどにより、電気泳動で 3 本のバンドとして分離したと考えられた。

α A I - 1 と α A I - 2 の N 末端アミノ酸配列を比較したところ、それぞれのサブユニット間に高い相同性が認められた。また、インゲンマメのレクチンである P H A - E 及び L、そしてアルセリンに対しても高い相同性が確認された。Moreno and Chrispeels (1989) は、 α A I - 1 の 2 つの N 末端アミノ酸配列をデータベース検索にか

け、既報のレクチン遺伝子 (Hoffman et al. 1982) が α A I - 1 をコードすることを見いだした。その遺伝子を用いた研究により、 α A I - 1 が N 末端にシグナルペプチドをもつ前駆体タンパク質として合成され、糖鎖の付加、シグナルペプチドの除去、さらにポリペプチドの内部切断といった修飾を受けて成熟することが示された (Moreno et al. 1990)。 α A I - 2 から得られた 2 つの N 末端アミノ酸配列も、内部切断の修飾の結果生じたものと考えられた (図 17)。このような内部切断によるタンパク質の成熟化は、PHA やアルセリンでは報告されていないことから、 α A I に特有なもので、機能発現のための重要な過程であると推察した。

以上、本節において、 α A I - 2 の単離・精製に成功した。精製した α A I - 2 タンパク質は、1 次構造とサブユニット構造が α A I - 1 とかなり類似していた。 α A I - 1 と α A I - 2 はともに、2 種類のサブユニットからなるヘテロ 4 量体であり、この 3 次構造が α A I の阻害活性に寄与しているものと考えられた。

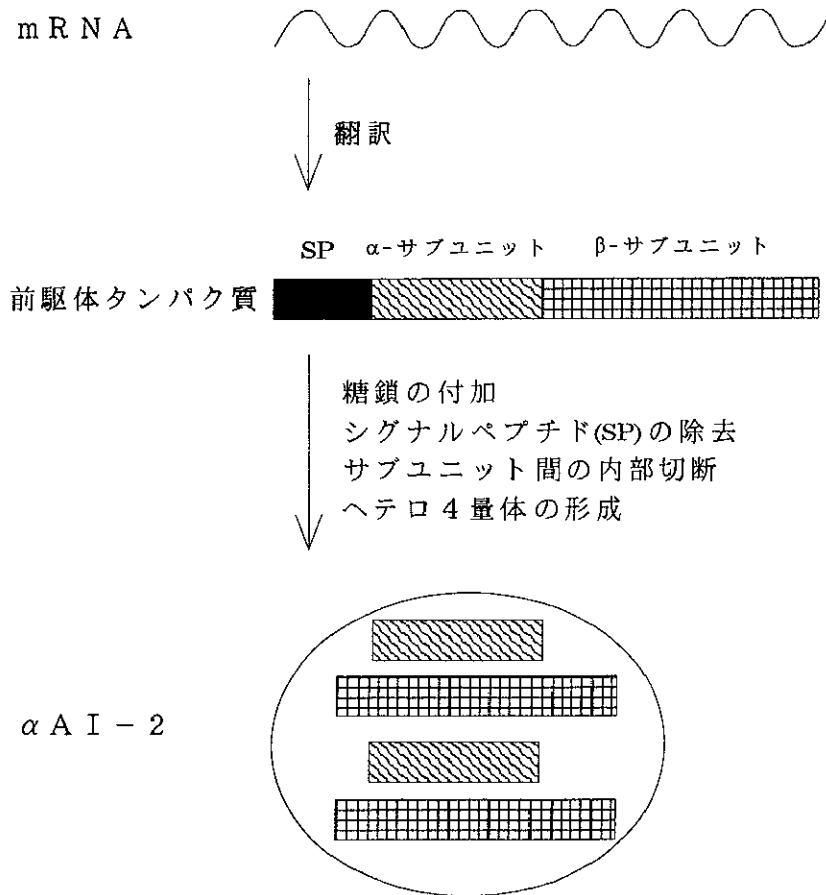


図 17. 推定した α A I - 2 の生合成経路

第2節 α A I - 2 の α -アミラーゼ活性に対する阻害性ならびにマメゾウムシ類の生育に及ぼす影響

インゲンマメ種子の α -アミラーゼインヒビター (α A I) - 1 は、ブタすい臓と、アズキゾウムシ及びヨツモンマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を強く阻害する (Ishimoto and Kitamura 1989)。人工豆を用いた生育阻害性の検定において、 α A I - 1 は、0.5%濃度で両マメゾウムシの生育を強く阻害し、インゲンマメのアズキゾウムシ、ヨツモンマメゾウムシ抵抗性に関与することが明らかになった。しかしながら、インゲンマメを寄主とするブラジルマメゾウムシ幼虫に対しては、 α -アミラーゼ活性を阻害せず、生育にも影響を与えなかった (Ishimoto and Kitamura 1989)。一方、 α A I - 2 は、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を阻害する変異型として見いだされ、本虫の生育を阻害する可能性がある。

そこで本節では、前節で精製した α A I - 2 について、各種 α -アミラーゼ活性に対する阻害性を分析し、 α A I - 1 と比較する。さらに、 α A I - 2 のマメゾウムシ類に対する生育阻害性を調査し、虫害抵抗性への利用価値を探る。

材料および方法

1. 種子および昆虫

ササゲ栽培系統 PI165486 を飼育試験のコントロールとして使用した。

アズキゾウムシとブラジルマメゾウムシは、 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 、

70% 相対湿度で、PI165486 の種子で飼育したものをを用いた。

2. 幼虫消化管抽出液の調製

アズキゾウムシとブラジルマメゾウムシの終齢幼虫を種子から取り出し、第1節の方法にて幼虫消化管抽出液を調整した。

3. α A I 活性

精製した α A I - 1 または α A I - 2 を 0.0 ~ 100 μ g になるように、 α -アミラーゼ活性分析用の反応液に加え、第1節に記した方法で α A I の阻害活性を測定した。

4. 飼育試験

ササゲ栽培系統 PI165486 の種子粉に α A I - 1 または、 α A I - 2 を 0.0 ~ 2.0% 濃度になるように添加し、第1節の方法により人工豆を作製した。

作製した人工豆を1粒ずつシャーレに入れ、第1節の方法により、アズキゾウムシまたは、ブラジルマメゾウムシの飼育試験を行った。 α A I のマメゾウムシ類の生育に及ぼす影響を、生存率（成虫を含む）と羽化率で示した。試験は、アズキゾウムシとブラジルマメゾウムシに対して、それぞれ6反復ずつ行った。

5. マメゾウムシ類幼虫の α -アミラーゼ活性程度

アズキゾウムシ幼虫とブラジルマメゾウムシ幼虫の1匹当たりの α -アミラーゼ活性を調査するため、幼虫 10

匹当たりの α -アミラーゼ活性を5反復測定した。

6. 幼虫消化管抽出液による α AIの加水分解活性

α AI-1または α AI-2を幼虫消化管抽出液に添加し、30℃で一定時間保った後、第1節に準じてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供試した。電気泳動のパターンから、幼虫消化管抽出液の加水分解活性の有無・程度を調査した。

結果

1) α AIの α -アミラーゼ活性に対する阻害性

α AI-1は、フタスイ臓とアズキゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を強く阻害したが、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性に対してはほとんど阻害性を示さなかった(図18)。一方、 α AI-2は、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を強く阻害し、アズキゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性に対しても弱い阻害性を示した。また、フタスイ臓の α -アミラーゼ活性に対しては、全く阻害性を示さなかった(図18)。

アズキゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性は、100 μ gの α AI-2で約40%阻害されるにすぎなかったが、ブラジルマメゾウムシ幼虫の活性は、その100分の1の量で、同じく約40%阻害された(図18)。幼虫1匹当たりのブラジルマメゾウムシの α -アミラーゼ活性は、アズキゾウムシの活性よりも約2.6倍ほど高い(表5)。そ

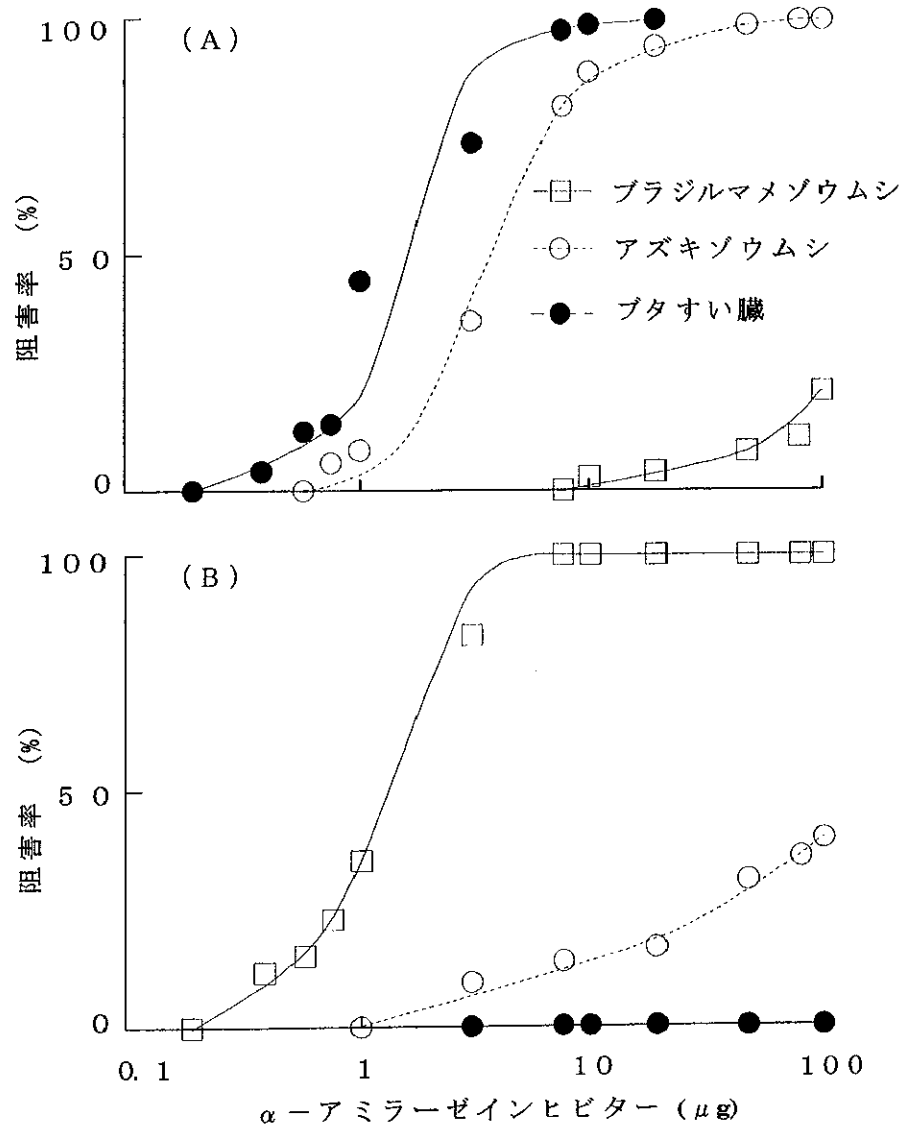


図 18. α -アミラーゼ活性に対する α A I の阻害活性

A, α A I - 1 による阻害活性; B, α A I - 2 による阻害活性. 各種 α -アミラーゼ試料は、30°C で 80 μ g マルトース/分のデンプン分解活性を有するものを用いた.

表5. アズキノゾウムシとブラジルマメゾウムシの幼虫
 α -アミラーゼ活性

試験番号	アズキノゾウムシ	ブラジルマメゾウムシ
1	94.0	225.5
2	81.4	153.5
3	91.9	260.5
4	97.3	231.2
5	85.7	304.7
平均	90.1	235.1

活性は、幼虫 1 匹当たりのマルトース生成量で示す
 (単位, μg マルトース/分).

れ故、 α A I - 2 は、アズキゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性よりも、ブラジルマメゾウムシ幼虫の活性を約 38 倍強く阻害すると算出できた ($1/2.6 \times 100 = 38$)。

2) α A I のマメゾウムシ類の生育に及ぼす影響

人工豆を用いた飼育試験において、ブラジルマメゾウムシの生育は、 α A I - 2 により強く阻害された (図 19)。1.0% 濃度の α A I - 2 を含む人工豆では、ブラジルマメゾウムシの成虫は認められず、羽化率が 0.0% であった。 α A I - 1 は、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性に阻害性を示さず、生育にも何ら影響を及ぼさなかった (図 19)。

アズキゾウムシの生育は、 α A I - 1 と 2 の両 α A I により強く阻害された (図 19)。人工豆に 0.3% 以上の α A I を混入させると、羽化率 0.0% または、生存率 0.0% の強い生育阻害性が認められた。

3) 幼虫消化管抽出液の加水分解活性

マメゾウムシ類の幼虫消化管抽出液は、 α -アミラーゼ以外に、プロテアーゼなどの消化酵素を含んでいる。Ishimoto and Kitamura (1992) は、ブラジルマメゾウムシの幼虫消化管抽出液が、 α A I - 1 を速やかに分解し、 α A I 活性を消失させていると報告した。

本研究において、 α A I - 2 は、ブラジルマメゾウムシ幼虫とアズキゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性に対して阻害性を示したが、その程度は 38 倍もの開きがあった。そこで、両マメゾウムシ類が α A I - 2 を加水分解し、 α A I 活性を低減させているかどうかを調査する

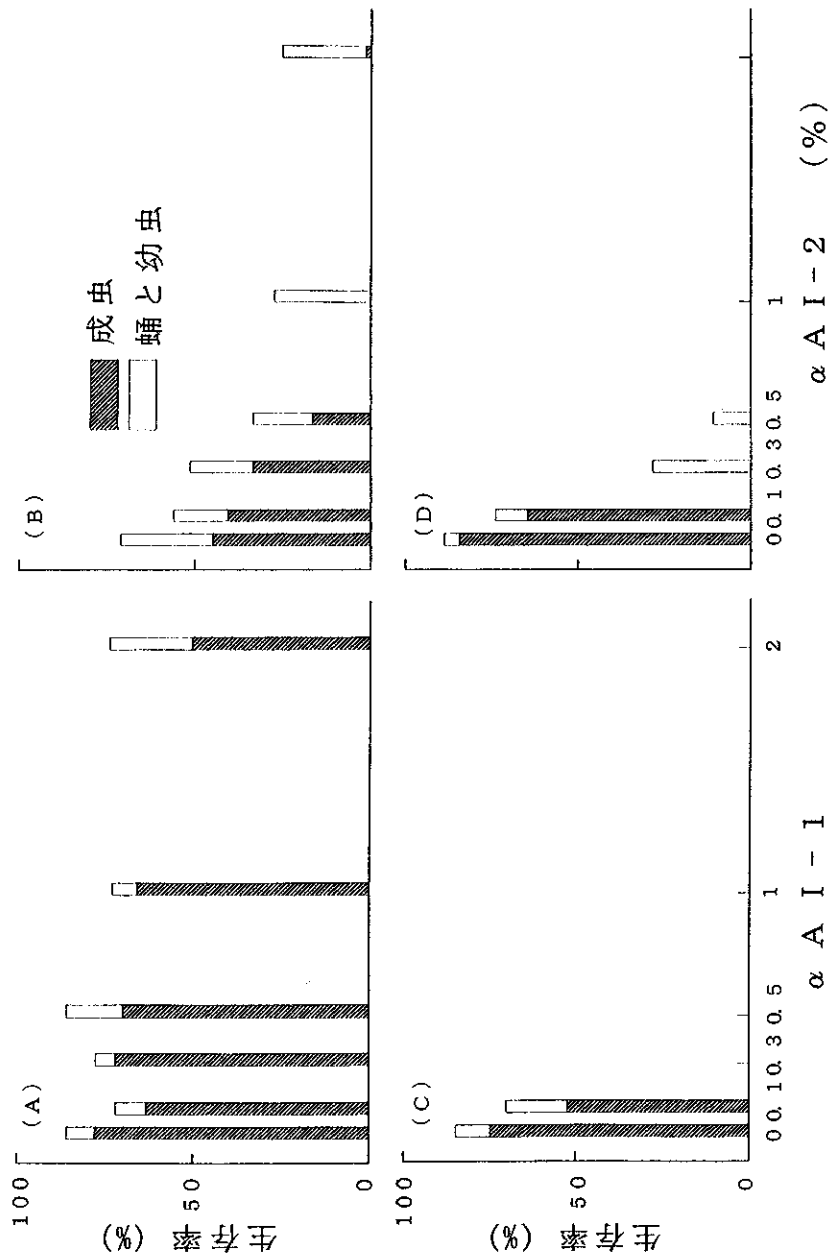


図 19. アズキゾウムシとブラジルマメゾウムシの生育に及ぼす α AI-1 と α AI-2 の影響

A, ブラジルマメゾウムシの生育に及ぼす α AI-1 の影響; B, ブラジルマメゾウムシの生育に及ぼす α AI-2 の影響; C, アズキゾウムシの生育に及ぼす α AI-1 の影響; D, アズキゾウムシの生育に及ぼす α AI-2 の影響. α AI-1 または α AI-2 を混入した人工豆を用いて、6 反復の飼育試験を実施した. 成虫が人工豆に産卵した後、30 日目に生存している成虫、蛹、幼虫を数え、生存率を算出した.

ため、幼虫消化管抽出液に α AIを添加して一定時間保った後、電気泳動を行った。その結果、 α AI-1と α AI-2は、アズキゾウムシによる加水分解を受けていなかった(図20)。 α AI-1は、ブラジルマメゾウムシの抽出液により限定的に分解されたが、 α AI-2は、12時間の保持時間後も分解を受けていなかった(図20)。 α AI-2は、ブラジルマメゾウムシの加水分解活性に強い耐性を有していた。

考察

本節では、精製した α AI-2について、 α -アミラーゼ活性に対する阻害性を分析し、さらに、マメゾウムシ類生育阻害性を調査して、 α AI-1と比較した。

α AI-2は、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を強く阻害し、生育も阻害した。1.0%濃度の α AI-2を含む人工豆において、飼育30日後、ブラジルマメゾウムシの羽化は認められなかったが、種子に含まれる濃度(0.4~0.5%)では、 α AI-2は、明確な生育阻害性を示さなかった。それ故、 α AI-2は、インゲンマメ野生種のブラジルマメゾウムシ抵抗性に部分的な役割を果たしているものと考えられた。抵抗性を示す野生系統G12953と育成系統OAr4は、 α AI-2以外に、抵抗性に関与するとされるタンパク質アルセリン4を含んでいる。アルセリン4は、約7%という高濃度でブラジルマメゾウムシの生育を阻害すると報告されている(Minney et al. 1990)。Ishimoto and Kitamura (1993)及び第1章第2節の研究結果から、 α AI-2とアルセリン4が遺伝的に強連鎖関係にあることが明らかになった。それ故、

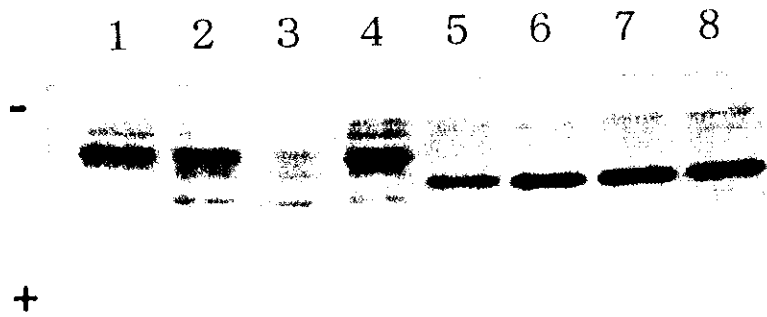


図 20. マメゾウムシ類幼虫消化管抽出液と反応させた $\alpha\Lambda I-1$ と $\alpha\Lambda I-2$ の SDS-ゲル電気泳動分析

1, $\alpha\Lambda I-1$; 2 と 3, ブラジルマメゾウムシとそれぞれ 5 分、12 時間反応させた $\alpha\Lambda I-1$; 4, アズキゾウムシと 12 時間反応させた $\alpha\Lambda I-1$; 5, $\alpha\Lambda I-2$; 6 と 7, ブラジルマメゾウムシとそれぞれ 5 分、12 時間反応させた $\alpha\Lambda I-2$; 8, アズキゾウムシと 12 時間反応させた $\alpha\Lambda I-2$.

野生系統 G12953 の有するブラジルマメゾウムシ抵抗性は、アルセリン 4 と α A I - 2 の両タンパク質がともに関与しているものと推察された。

精製した α A I - 2 は、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を強く、アズキゾウムシ幼虫の活性を弱く阻害した。 α A I - 1 は、ブラジルマメゾウムシ幼虫の消化管抽出液により短時間で分解され、 α A I 阻害活性を消失した。一方、 α A I - 2 は、ブラジルマメゾウムシまたは、アズキゾウムシにより分解を受けなかった。これらのことから、 α A I - 2 の示す阻害特性は、 α A I - 2 がマメゾウムシ類の分解作用に耐性を備えていることに加え、 α -アミラーゼ分子種に対する特異性の違いにより決定されていると考えられた。

Ishimoto and Kitamura (1989) は、 α A I - 1 の α -アミラーゼ活性阻害性とマメゾウムシ類の生育阻害性に、正の相関を見いだしている。本研究においても、 α A I - 1 については、 α -アミラーゼ活性阻害性が生育阻害性と相関を示した。しかしながら、 α A I - 2 については、 α A I - 1 のような相関が認められなかった。 α A I - 2 は、アズキゾウムシ幼虫よりも、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を約 38 倍強く阻害することから、生育についても、アズキゾウムシよりもブラジルマメゾウムシを強く阻害するものと考えられた。しかしながら、 α A I - 2 は 0.3% の低濃度でアズキゾウムシの生育を強く阻害し、当初考えた仮説とは異なる結果が得られた。この矛盾と思われる現象は、以下のように説明できる。1: アズキゾウムシは、ブラジルマメゾウムシよりも、炭水化物による栄養摂取依存度が高く、 α -アミラーゼ活性を阻害されると、すぐに栄養欠乏に陥ってしまう、という考え。アズキゾウムシが 0.3% の α A

I-1により死に至ったのに対し、ブラジルマメゾウムシが同濃度の α AI-2で明らかな生育阻害を受けていないこと、がその根拠である。2： α AI-2は、種子に侵入したばかりの初期齢のアズキゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性をより強く阻害する、という考え。1、2齢という初期齢の幼虫は、体長が小さいため解剖することが困難である。 α -アミラーゼ活性の測定には、解剖可能な終齢幼虫を用いて行ったため、飼育試験で矛盾と思われるような結果が生じたのかもしれない。

以上、本節により、 α AI-2は、ブラジルマメゾウムシ (*Zabrotes* 属) とアズキゾウムシ (*Callosobruchus* 属) の2属のマメゾウムシ類に生育阻害性を示すことが明らかになった。 α AI-1は、上記2属のマメゾウムシ類のうち、*Callosobruchus* 属のアズキゾウムシのみに生育阻害性を示したため、 α AI-2の方が、虫害抵抗性の育種素材として有用性が高いものと考えられた。また、 α AI-2は、ほ乳類であるブタの α -アミラーゼ活性を阻害しないことから、人に対する安全性も高いものと推察された。

第3節 α A I - 2 の c D N A 塩基配列

近年の植物育種分野において、遺伝子組換えによる外来遺伝子の導入法が、新しい技術として注目されている。比較的少数の遺伝子に支配されている耐病虫性、薬剤耐性あるいは、品質成分のような形質についての改良は、遺伝子組換え技術を応用できる可能性が高い。

作物の虫害抵抗性の育種分野においても、最近、遺伝子組換え技術を用いた成功例が見受けられるようになった。Hilder et al. (1987) は、マメ科作物のササゲからトリプシンインヒビターの遺伝子をクローニングし、アグロバクテリウムを用いて、この遺伝子をタバコ (*Nicotiana tabacum* L.) に導入した。得られた形質転換体は、タバコの鱗翅目害虫に対して抵抗性を示し、はじめて抵抗性品種育成に、遺伝子組換え技術の応用が実証された。植物のもつ生育阻害物質を利用した成功例は、これ以外にも、ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) 及びトマト (*Lycopersicon esculentum* Mill.) のプロテアーゼインヒビターの遺伝子を導入したタバコなどで報告されており (Johnson et al. 1989)、また、イネ (*Oryza sativa* L.) においても、オリザシスタチン (oryzacystatin) がその候補にあげられている (Kuroda et al. 1996)。植物由来以外の遺伝子では、昆虫の病原菌である *Bacillus thuringiensis* のもつ殺虫性タンパク質、bt2エンドトキシンが遺伝子組換えの対象として利用されているが (Vaeck et al. 1987)、安全性の問題が危惧されている。

前節において、インゲンマメ種子の α -アミラーゼインヒビター (α A I) - 2 がアズキゾウムシとブラジルマメゾウムシに対して、生育阻害物質として作用することを明らかにした。 α A I - 1 も、アズキゾウムシとヨツモンマメゾウムシの生育を阻害することから (Ishimoto

and Kitamura 1989)、これらの α A I は、虫害抵抗性の育種素材として有望である考えられる。 α A I - 1 遺伝子は、既に単離されているレクチン様遺伝子 (Hoffman et al. 1982) によりコードされることが明らかにされている (Moreno and Chrispeels 1989)。この遺伝子は、アグロバクテリウムを介した形質転換法によりエンドウマメ (Shade et al. 1994) 及びアズキ (Ishimoto et al. 1996) に導入され、得られた種子に α A I - 1 が正常に蓄積した。飼育試験により、アズキゾウムシとヨツモンマメゾウムシに対する高度抵抗性が確認され、 α A I - 1 を用いた遺伝子組換えによる育種が実証された。

本節では、前節までにタンパク質構造と機能を解析した α A I - 2 について、c D N A をクローニングし、その塩基配列を決定するとともに、本遺伝子を用いた抵抗性品種の育成法に関して述べる。

材料および方法

1. 種子

α A I - 2 を含むインゲンマメ系統 OAr4 の登熟中の種子 (受粉後約 20 日) を液体窒素で凍結保存し、c D N A ライブラリーの作成に用いた。

2. 内部アミノ酸配列の分析

第 1 節で精製した 1mg の α A I - 2 を 0.5ml の 0.05M 炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH7.8) に溶解した。100 °C で 2 分間の熱変性を行った後、15 μ g の *Staphylococcus aureus* V8 プ

ロテアーゼ (Boehringer Mannheim, Germany) を加え、30 °C で 12 時間消化した。その後、1ml の 20 % アセトニトリルを加え、 μ -Bondasphere 5 μ C18-300A の逆相カラム (Waters, USA) に添加し、20 ~ 80 % のアセトニトリル濃度勾配溶出によりペプチド断片を分離した。各ペプチド断片を含む溶液を遠心濃縮機と凍結乾燥機により乾固し、第 2 節と同様にアミノ酸配列を解析した。

3 . 抗 α A I - 2 抗血清の調製

0.5mg の α A I - 2 を 0.5ml の 0.87% 塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 (pH6.8) に溶解し、等量の Freund's 完全アジュバンドとともに、3 週間間隔で 3 回ウサギに皮下投与した。抗血清の力価を免疫二重拡散法 (Moreira et al. 1981) により測定し、十分量の力価が得られた後、ウサギから採血した。採取した血液を、37 °C で 1 時間保温して血餅を形成させ、4 °C で 12 時間静置した。得られた抗血清を - 80 °C で保存した。

4 . 抗 α A I - 2 ポリクローナル抗体の精製

上記 3 で調整した抗 α A I - 2 抗血清を、免疫沈降により粗精製した。2ml の抗血清に、第 1 節の α A I - 2 の精製の過程で得られたアルセリン 4 を含む 4mg の粗画分を加え、4 °C で 1 時間静置した。沈降した抗体とアルセリン 4 の複合体を遠心により除去した。

粗精製した抗血清をアフィニティーカラムに供試し、 α A I - 2 と特異的に反応する抗 α A I - 2 ポリクローナル抗体を精製した。Eijk and Noort (1976) の方法に準じ、CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia, Sweden) に α A I - 1 を反応

させ、アフィニティー吸着担体を作成した。1gのCNBr-activated Sepharose 4Bを1mM塩酸により膨潤させ、塩酸を除去した後、15mlのカップリング緩衝液（0.5M NaCl, 0.1M NaHCO₃, pH8.3）でCNBrを活性化した。直ちに20mlのカップリング緩衝液に溶解した25mgの α A I - 1を加え、4℃で振とうした。12時間後、溶液を取り除き、過剰活性基を20mlの0.2Mグリシンにより室温で2時間ブロックした。カップリングしなかった α A I - 1を除去するために、カップリング緩衝液と0.5M塩化ナトリウムを含む酢酸緩衝液（pH4.0）で交互に4回洗浄した。 α A I - 1をカップリングしたSepharoseを4℃にて平衡化緩衝液（15mM succinate, 20mM CaCl₂, 0.5M NaCl, pH5.6）中で保存した。

免疫沈降で得られた2mlの抗血清を0.5M塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液（pH6.8）で平衡化したアフィニティーカラムに添加し、4℃で16時間循環させた。非吸着画分を平衡化緩衝液により溶出し、0.1Mグリシン-塩酸緩衝液（pH2.5）により吸着画分を溶出した。直ちに溶出した吸着画分にトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを加え、pHを中性（6～7）にした。精製した抗 α A I - 2ポリクローナル抗体を-80℃で保存した。

5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とイムノブロットイング

α A I - 2を含む系統OAr4の種子粉をSDSサンプル緩衝液に溶解し、第1章第1節の方法に従って電気泳動を行い、分離したタンパク質をPVDF膜に転写した。調製した抗 α A I - 2抗血清または、抗 α A I - 2ポリクローナル抗体と、PVDF膜上のタンパク質を、室温で1時間抗原抗体反応させた後、ヤギ抗ウサギIgGパーオキシ

ダーゼ標識抗体の2次抗体 (Cappel, USA) を用いて、タンパク質の検出を行った。

6. cDNAライブラリーの作成

系統 OAr4 の登熟中の種子 (受粉後約 20 日) から、SDS-フェノール法 (Brawerman et al. 1972) により全 RNA を抽出した。オリゴ (dT) セルロースカラム (Pharmacia, Sweden) を用いて、ポリ(A)⁺ RNA を単離し、cDNA 合成キット (Pharmacia, Sweden) により cDNA を合成した。末端が平滑になった 2 本鎖の cDNA に EcoRI/NotI の接着末端アダプター (Pharmacia, Sweden) を付加し、予め EcoRI で切断し脱リン酸化しておいた λ gt11 ベクター (Stratagene, USA) に連結した。できあがった DNA を Gigapack II Plus packaging extract (Stratagene, USA) によりパッケージングし、大腸菌 Y1090r を宿主菌として増殖させた。

7. α AI-2 の cDNA クローンの単離

Hybond-C extra 膜 (Amersham, UK) にブランクのレプリカを取り、上記 4 において精製した抗 α AI-2 ポリクローナル抗体を用いて、イムノスクリーニングを行った。

λ gt11 に組み込まれた cDNA の発現をイソプロピル- β -D-チオ-ガラクトピレノシド (IPTG) により誘導し、合成された遺伝子産物を抗 α AI-2 ポリクローナル抗体と抗原抗体反応させ、2 次抗体により陽性クローンを検出した。1 次スクリーニングで得た陽性クローンについては、さらに 2 次、3 次スクリーニングを行い、目的のクローンを選択した。

8 . 塩基配列の分析

λ gt11 に組み込まれた陽性の c D N A を EcoRI により切り出し、予め EcoRI で切断し脱リン酸化しておいた pUC19 ベクターにサブクローニングした。組換え後のプラスミドを大腸菌 JM109 に導入し、増殖させた。大腸菌から精製したプラスミドを用いて、c D N A の物理地図を作成し、Taq Dye Deoxy Terminator 法 (Applied Biosystems, USA) により、塩基配列を決定した。得られた陽性クローンのうち、タンパク質翻訳領域の全長を含むと推定される 1 クローンについては、物理地図に従って D N A をいくつかの小断片に切断し、それぞれを pUC19 ベクターにサブクローニングした。上記と同様に、これらデリーションクローンの塩基配列を決定した。塩基配列のデータを Genetyx program (Software Development Co. Ltd, Japan) により解析した。

結果

α A I - 2 をコードする c D N A をイムノスクリーニングするため、種子から精製した α A I - 2 タンパク質をウサギに投与し、抗 α A I - 2 抗血清を調製した。本抗血清は、大腸菌の溶菌物と抗原抗体反応を示し、さらに α A I - 2 以外に系統 OAr4 の種子中に含まれるアルセリン 4 にも反応した (図 21) 。そのため、本抗血清を、そのままイムノスクリーニングに用いることはできなかった。そこで、本抗血清から、 α A I - 2 に特異的に反応するポリクローナル抗体の精製を試みた。

まず、抗血清にアルセリン 4 を加えて免疫沈降を行い、アルセリン 4 と反応して沈降した抗体を除去した。次に、

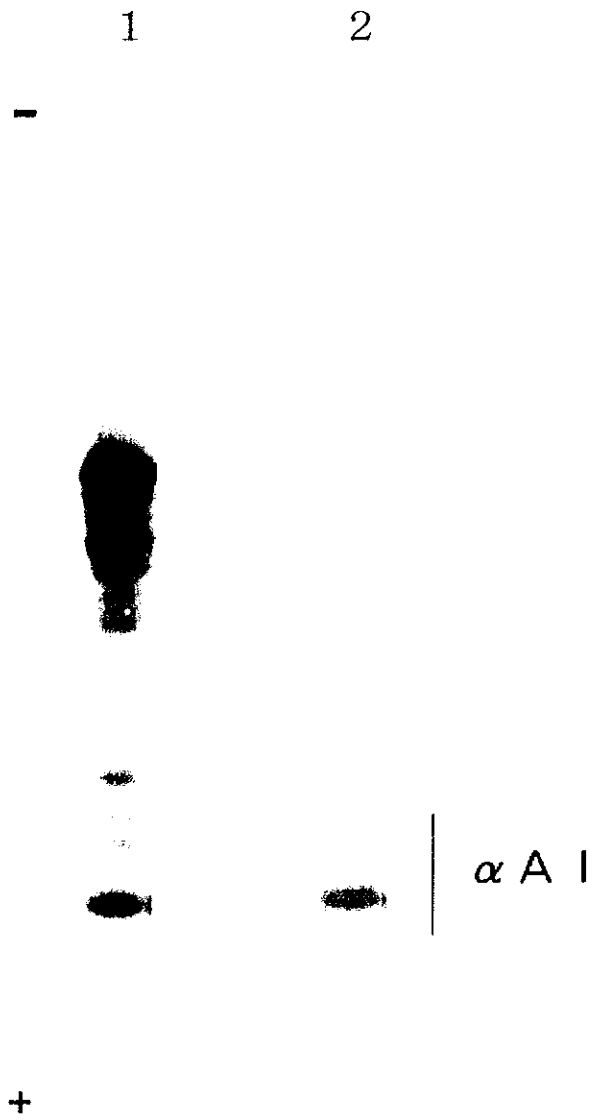


図 21. インゲンマメ系統 OAr4 種子タンパク質のイムノブロッティング分析

1, 抗 $\alpha A I$ - 2 抗血清との反応; 2, 抗 $\alpha A I$ - 2 ポリクローナル抗体との反応.

大腸菌の溶菌物と反応する抗体を除去するために、 α A I - 2 をリガンドとしたアフィニティーカラムによる精製を試みた。しかしながら、アフィニティーカラムの作成に必要な量の α A I - 2 を得られなかったため、本抗血清と反応し、栽培品種大正金時から容易に精製できる α A I - 1 をリガンドにしたカラムを作成した。 α A I - 1 をカップリングしたアフィニティーカラムを用いて、最終的に精製した抗 α A I - 2 ポリクローナル抗体は、大腸菌にはほとんど反応を示さず、 α A I - 2 に対して特異的に反応した (図 21)。

α A I - 2 を含む系統 OAr4 の登熟種子を材料とし、 λ gt11 ベクターを用いた c D N A ライブラリーを作成した。c D N A ライブラリーを抗 α A I - 2 ポリクローナル抗体を用いてイムノスクリーニングし、24 個の陽性クローンを得た (図 22)。それぞれのクローンのインサート長を調べるとともに、pUC19 ベクターへのサブクローニングを行った。24 個のいずれのクローンも制限酵素 XbaI により切断された。

比較的インサートの長い 11 クローンについて、5'側と 3'側の両方向から塩基配列を解析した結果、いずれのクローンも同一の遺伝子をコードしていた。これらの中で、タンパク質翻訳領域の全長を含むと考えられる 1 クローンについて、全塩基配列を決定した (図 23)。本クローンの翻訳領域は 720bp からなっており、240 残基のアミノ酸の配列をコードしていた (図 24)。

α A I - 2 をコードする c D N A を同定するために、種子から精製した α A I - 2 の部分アミノ酸配列を、前述の c D N A から推定されるアミノ酸配列と照合した。第 2 節で決定した α A I - 2 の 2 つの N 末端配列は、上記 c D N A クローンの 64 及び 284 から始まるアミノ酸配



図 22. $\alpha A 1-2$ cDNA のイムノスクリーニング

抗 $\alpha A 1-2$ ポリクローナル抗体を用いて、cDNA ライブラリーをスクリーニングした。矢印は、陽性クローンを示す。

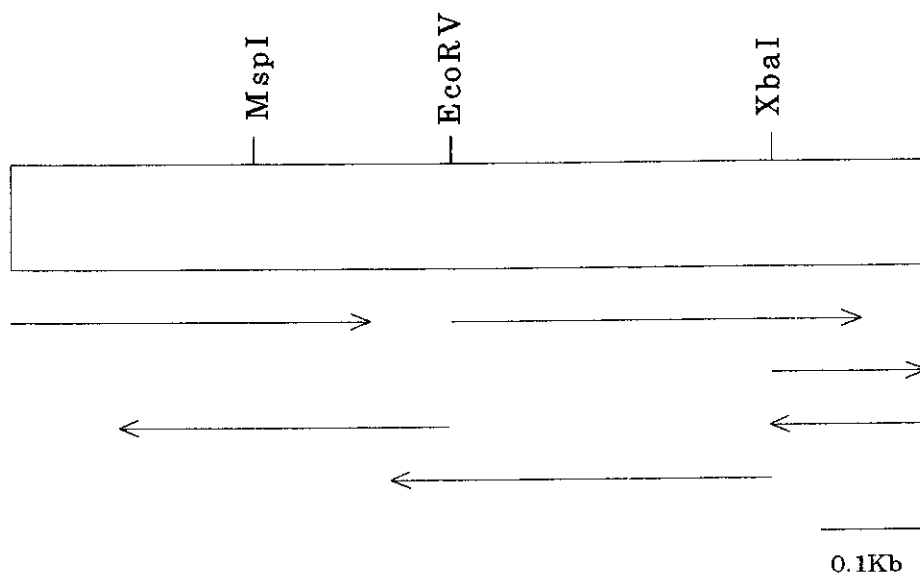


図 23. α AI-2 cDNA の物理地図とシーケンス方向
 シーケンス方向を矢印で示す。

1 ATGGCTTCCTCCAACCTACTCACCCCTAGCCCTCTTCCTTGTGCTTCTCACCCACGCAAAC 60
 M A S S N L L T L A L F L V L L T H A N
 61 TCAGCCAGCGACACCTCCTTCAACTTCTATAGTTTCAACGAAACCAACCTTATCCTCCAA 120
 S A S D T S E N E Y S E ~~N E T~~ N L I L Q
 121 GGCGATGCCACCGTCTCATCCAAAGGCTACTTACAACCTACATACAGTGGACTCTATGTGC 180
 G D A T V S S K G Y L Q L H T V D S M C
 181 AGCGCCTTCTACTCCGCCCCATCCAAATCAGGGACAGCACCACCGGCAACGTCGCCAGC 240
 S A F Y S A P I Q I R D S T T G N V A S
 241 TTCGACACCAACTTCACAATGAATATCACCACTCAACGCGAAGCAAATTCGGTCATTGGC 300
 F D T ~~N F T~~ M ~~N I T~~ T Q R E A N S V I G
 301 CTTGACTTTGCTCTCGTCCCCGTCCAGCCCCAAATCCAAAGGCCATACTGTGACTGTGCAG 360
L D F A L V P V Q P K S K G H T V T V Q
 361 TTCGACACCTTCCGCAGCCGTATTAGCATCGACGTGAACAACAACGATATCAAAGCGTG 420
 F D T F R S R I S I D V N N N D I K S V
 421 CCTTGGGATGAACAGGACTACGACGGACAAAACGCCAAGGTTCCGGATCACCTATAACTCC 480
 P W D E Q D Y D G Q N A K V R I T Y ~~N S~~
 481 TCCACGAAGGTCTTGGCGGTTTCTCTGTCAAACCCTTCTACGGGAAAGAGCAACGAGGTC 540
S T K V L A V S L S ~~N P S~~ T G K S N E V
 541 TCTGCCAGAATGGAGGTGGAGAAAGAACTTGACGACTGGGTGAGGGTTGGGTTCTCTGCC 600
 S A R M E V E K E L D D W V R V G F S A
 601 ATCTCAGGGGTTTCATGAATATAGCTTTGAAACGAGAGACGTGCTCTCTTGGTCTTTTTCT 660
 I S G V H E Y S F E T R D V L S W S F S
 661 TCCAAGTTCTCCCAACACACCACATCTGAACGTTCCAACATCCTCCTCAACAATATCCTC 720
 S K F S Q H T T S E R S N I L L N N I L
 721 TAGACTCCAGAACCCAGCTTCACTGTGACAGCAAACCCAGCTTATACTCACTTTTCTTT 780
 END
 781 CCTGCTAATAATCTTCATCTGTCACACAACTAA**ATAATAAA**ATGGGTGTTTCATATAA 840
 841 AAAAAAAAAAAA

図24. α AI-2 cDNAの塩基配列と推定されるアミノ酸配列

分析した α AI-2タンパク質のN末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列をそれぞれ2重下線と下線で示す。アスパラギン残基結合型糖鎖の付加位置を取消線のある太字で示す。ポリA付加認識配列を太字で示す。

列と完全に一致した (図 24)。また、V8 プロテアーゼの切断により得られた α A I - 2 の 3 つのポリペプチド断片のアミノ酸配列も、クローンから推定されるアミノ酸配列と完全に一致したことから、本クローンは、 α A I - 2 をコードするものと判断した。

推定された α A I - 2 のアミノ酸配列を α A I - 1、アルセリン (arcelin) 1、P H A (phytohemagglutinin) - L 及び E と比較した (図 25)。 α A I - 2 は、アルセリン 1、P H A - L 及び E に 50.6 ~ 55.5 % の相同性を示し、 α A I - 1 とは最も高い 75.8 % の相同性を示した (表 6)。

考察

抗体を用いた遺伝子のスクリーニングは、大腸菌内の組換え D N A から生産される抗原と用いる抗体との反応性によって大きく左右される。本研究においては、 α A I - 2 と特異的に反応する抗 α A I - 2 ポリクローナル抗体を精製し、これを用いて α A I - 2 をコードする c D N A をイムノスクリーニングした。

系統 OAr4 の登熟種子の c D N A ライブラリーをスクリーニングした結果、24 個の陽性クローンを得ることができ、そのうち 1 クローンのみがタンパク質翻訳域の全領域を含んでいた。塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、分析した α A I - 2 の N 末端及び、内部アミノ酸配列と完全に一致したことから、本クローンが α A I - 2 をコードするものと判断した。クローンの 5' 領域側にある 21 残基のアミノ酸配列は成熟タンパク質の N 末端には認められず、疎水的であることから前駆体タンパク質のシグナルペプチドであると考えられた。また、284

	1		50
	.	↓	.
α AI-2	MASSNLLTLALFLVLLTHANSASDTSFNFYSFNETNLILQGDATVSSKGY		
α AI-1K..S.....A..S.....TE...IIDA..K.....N.N		
Arcelin1SN.A...VET..K.....E.H		
PHA-LKFF.-V.....SN.IY...QR.....R..S...S.Q		
PHA-ES.....Q...S.QR.....R.....Q		
	51		100
	.		.
α AI-2	LQL-----HTV-----DSMCSAFYSAPIQIRDSTTGNVASFDTNFTM		
α AI-1	...-----SYNSY-----SR.....		
Arcelin1	.L.-----TN.KGNEE...GR.....N.R.ID.L...S...F		
PHA-L	.R.TNLNGNGEPR.-----G.LGR.....W.N...T...A.S..F		
PHA-E	.R.TNVNDNGEP.L-----S.LGR.....W.N...A..ASP.S..F		
	101		150
	.	↓	.
α AI-2	NITTQREANSVIGLDFALVPV--QPKSKG-----HTVTVQ		
α AI-1	..R.H.Q...AV....V....--..E...-----D...E		
Arcelin1	R.NAKNIE..AY..A.....GSR..L..RYLGLFNTTNYDRDA...A.V		
PHA-L	..QVPNN.GPAD..A.....GS...D..GFLGLFDG--SNSNF...A.E		
PHA-E	..DVPNNSGPAD..A.V.L..GS...D..GLLGLFNKYDSNA...A.E		
	151		200
	.		.
α AI-2	FDT-----FRSRISIDVN--NNDIKSVPWDEQDYDGQNAKVRITYNSS		
α AI-1	...-----L.....-.....VH.....E.....		
Arcelin1	...-----VSN..E...SIRP.ATESCNFGHNN.EK.E...D.P		
PHA-L	...LYNKDWDPTERH.G....SIRS..TTR.--FVN.E..E.L...D..		
PHA-E	...LYNVHWDPKPRH.G....SIKS..TTT.--FVK.E..E.L...D..		
	201		250
	.		.
α AI-2	TKVLAVSLSNPSTGKSNEVSARMEVEKELDDWVRVGFSAISGVHEYSFET		
α AI-1	...FS.....N..TTV.L...VY...S.....T..AYQW.Y..		
Arcelin1	KND.R...LY..SEEKCH...TVPL...VE...S.....T..SKKETT..		
PHA-L	.NL.VA..VY..QKT.FI..DTVDLKSV.PE..S.....TT..INKGNV..		
PHA-E	..L.VA..VY..LKT.FI..DTVDLKSV.PE..I...T.TT.ITKGNV..		
	251	275	
	.	.	
α AI-2	RDVLSWSFSSKF--SQ--HTTS-E---RSNILLNNIL		
α AI-1	H.....INLK--DQK.-....V..K..		
Arcelin1	HN.....N.INFK--GKK.-....K..		
PHA-L	N.....A..L--D--G...-GLNLA.LV..K..		
PHA-E	N.I.....A..L--D--G...-ALNLA.FA..Q..		

図25. α AI-2、 α AI-1 (Hoffman et al. 1982)、Arcelin 1 (Osborn et al. 1988)、PHA-L及びPHA-E (Hoffman and Donaldson 1985)のアミノ酸配列の比較

記号(・)は α AI-2と同じアミノ酸を、記号(-)はギャップを示す。矢印は、 α AI-1、2のN末端アミノ酸を示す。

表6. α AI-2、 α AI-1、アルセリン(Arcelin)1、PHA-L及びEのアミノ酸配列の相同性

	α AI-1	Arcelin1	PHA-L	PHA-E
α AI-2	75.8	55.5	50.6	50.9
α AI-1		57.0	49.3	49.3
Arcelin1			56.6	54.5
PHA-L				81.1

Genetyx program (Software Development Co. Ltd)により算出した (単位, %).

からはじまる N 末端配列は、 α A I - 1 の場合と同じく (Moreno and Chrispeels 1989, Moreno et al. 1990)、前駆体タンパク質の内部切断により生じるものと考えられた。

α A I - 2 のアミノ酸配列は、 α A I - 1 と 75.8 % の高い相同性を示し、アルセリン 1、P H A - L 及び E に対しても 50.6 ~ 55.5 % の相同性を示した。第 1 章第 2 節で述べたように、 α A I、アルセリン及び P H A は、遺伝的に強連鎖の関係にある。これらのタンパク質は、インゲンマメのレクチン族 (phytohemagglutinin family) として分類され (Chrispeels and Raikhel 1991)、その一次構造の相同性が高いため、共通の祖先遺伝子から重複や乗換えなどで進化してきた可能性がある。本節で明らかにした α A I - 2 とレクチン族タンパク質の構造上の類似性は、これらタンパク質の進化の過程を反映しているものと推察された。

遺伝子組換え技術により、 α A I - 1 遺伝子をタバコに導入した報告において、 α A I - 1 は、正常にプロセッシングを受け、 α -アミラーゼ活性に対する阻害活性を示した (Altabella and Chrispeels 1990)。また、 α A I - 1 の内部切断部位に変異を起こした遺伝子を導入したタバコでは、 α A I - 1 は、正常にプロセッシングを受けずに阻害活性を消失した。それ故、内部切断のプロセッシングは、機能発現のための重要な過程であると報告されている (Pueyo et al. 1993)。最近、エンドウマメ及びアズキに α A I - 1 遺伝子が導入され、これらマメ科植物においても、 α A I - 1 は、正常なタンパク質として合成された。その結果として、形質転換体は、アズキゾウムシとヨツモンマメゾウムシに高度抵抗性を示した (Shade et al. 1994, Ishimoto et al. 1996)。本研究でクローニングした α A I - 2

遺伝子も、糖鎖の付加、内部切断など、 $\alpha A I - 1$ と同様の生合成経路を経てタンパク質を産出するものと推測された。それ故、遺伝子組換え技術により、マメ科植物へ導入した場合、 $\alpha A I - 2$ は、正常なタンパク質として合成されるものと推測された。

以上、本節により、 $\alpha A I - 2$ をコードするcDNAをクローニングした。感受性作物に $\alpha A I - 2$ 遺伝子を導入することで、新たなマメゾウムシ類抵抗性が付与できるものと考えられる。また、前節で明らかにしたように、 $\alpha A I - 1$ と $\alpha A I - 2$ は、全く異なる $\alpha A I$ 活性を有することから、今後、 $\alpha A I - 1$ と $\alpha A I - 2$ の活性中心を解明することで、標的とする害虫の α -アミラーゼの構造に合わせて $\alpha A I$ を改変、設計できるようになるものと期待される。

第 4 節 要約

本章では、インゲンマメ種子に見いだされた α -アマミラーゼインヒビター (α AI) の変異のうち、 α AI-2 の単離・精製を行い、タンパク質構造を解析し、 α -アマミラーゼ活性阻害性とマメゾウムシ類に対する生育阻害性について調査した。さらに、 α AI-2 の cDNA をクローニングして塩基配列を決定するとともに、本遺伝子を用いた抵抗性品種の育成法に関して考察した。

α AI-2 を有するインゲンマメ野生系統 G12953 と α AI 欠失の栽培品種大福-5 (α AI-0) を交配し、 α AI-2 について選抜した系統 OAr4 を育成した。育成系統 OAr4 は野生系統 G12953 と同様に、インゲンマメの主要害虫であるブラジルマメゾウムシに対して抵抗性を示した。本系統の種子粉を材料として、 α AI-2 の精製を試みたところ、 α AI-2 は、リン酸緩衝液 (pH6.8) で抽出され、20~80% 硫酸沈殿、イオン交換クロマト DEAE-Sephacel、糖タンパク質に関するアフィニティークロマト Con A-Sepharose 及び、ゲル濾過 Sephacryl-S200 の段階を経て単離・精製することができた。

精製した α AI-2 は、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アマミラーゼ活性を強く阻害し、アズキゾウムシ幼虫の α -アマミラーゼ活性に対しても弱い阻害性を示した。また、ブタすい臓の α -アマミラーゼ活性に対しては、全く阻害性を示さなかった。インゲンマメに広く存在する α AI-1 は、ブタすい臓とアズキゾウムシ幼虫の α -アマミラーゼ活性を強く阻害したが、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アマミラーゼ活性に対しては、ほとんど阻害性を示さなかった。 α AI-1 はブラジルマメゾウムシ

の幼虫消化管抽出液により短時間で分解されたが、 α A I - 2 は分解作用を受けなかった。これらのことから、 α A I - 2 の示す阻害特性は、 α A I - 2 がマメゾウムシ類の分解作用に耐性を備えていることに加え、 α -アミラーゼ分子種に対する特異性の違いにより決定されていると考えられた。

人工豆を用いた飼育試験において、ブラジルマメゾウムシの生育は、 α A I - 1 で阻害されなかったが、 α A I - 2 では 1.0 % 濃度で強く阻害された。また、アズキゾウムシについては、0.3 % 以上の α A I - 1 または α A I - 2 により、生育が強く阻害された。以上のことから、 α A I - 1 よりも α A I - 2 の方が虫害抵抗性の育種素材として有用性が高いと考えられた。 α A I - 2 の精製材料となった系統 OAr4 はブラジルマメゾウムシ抵抗性であるが、 α A I - 2 を種子中に含まれる濃度 (0.5 %) で混入させた人工豆において、ブラジルマメゾウムシの生育は、強くは阻害されなかった。このため、本抵抗性は、 α A I - 2 が単独ではなく、アルセリン 4 などの他の因子とともに関与しているものと推察された。

α A I - 2 を含む系統 OAr4 の登熟中の種子から cDNA ライブラリーを作成し、抗 α A I - 2 ポリクローナル抗体を用いたイムノスクリーニングを行った。得られた陽性クローンの配列を α A I - 2 の N 末端及び、内部アミノ酸配列と比較し、 α A I - 2 をコードするクローンを同定した。本クローンは、タンパク質翻訳領域が 720bp からなっており、240 残基のアミノ酸の配列をコードしていた。クローンの 5' 領域にある 21 残基のアミノ酸配列は疎水的であることから、シグナルペプチドであると考えられた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した α A I - 2 の 3 本のポリペプチドから

は、異なる2つのN末端アミノ酸配列のみが得られ、その1つがcDNAクローンから推定される内部アミノ酸配列に一致した。これらのことから、 α A I - 2は α A I - 1と同様に、前駆体タンパク質として合成され、シグナルペプチドの除去と内部切断といったプロセッシングを受けて成熟化するものと考えられた。

α A I - 1、アルセリン及びP H Aは、遺伝的に強連鎖関係にあり、そのタンパク質構造の相同性は高いことが報告されている。そのため、これらのタンパク質は、レクチン族としてまとめられており、遺伝子の重複や乗換えなどにより共通の祖先遺伝子から進化してきた可能性がある。本章で明らかにした α A I - 2のアミノ酸配列は、 α A I - 1に対して75.8%、アルセリン1、P H A - L及びEに対しては、50.6~55.5%の高い相同性を示した。また第1章第2節において、 α A Iの各変異がアルセリンと遺伝的に強連鎖関係にあることを明らかにした。 α A Iとこれらタンパク質の構造上の類似性と遺伝的な関係は、レクチン族タンパク質の進化の過程を反映しているものと推察された。

以上、本章の研究により、 α A I - 2の構造と機能に新しい知見を得た。 α A I - 2は、ブラジルマメゾウムシとアズキゾウムシに対する生育阻害性を有するため、虫害抵抗性の育種素材として有望と考えられる。これまでに、 α A I - 1遺伝子を導入したタバコ、エンドウマメ、アズキの種子において、 α A I - 1は、正常にプロセッシングを受け、阻害活性を示すことが報告されている。それ故、 α A I - 1に類似した構造を持つ α A I - 2も、遺伝子組換えによりマメ科植物等に導入した場合、阻害活性を持つタンパク質として合成され、マメゾウムシ類抵抗性を付与するものと考えられる。また、今後、

α A I - 1 と α A I - 2 の活性中心を解明することで、
標的とする害虫の α - アミラーゼの構造に合わせて α A
I を改変、設計できるようになり、新たな生育阻害物質
を合成できるものと期待される。