

### 第3章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター ( $\alpha$ AI) - 3 の構造と機能ならびに RFLPs 分析

インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) 種子の  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター ( $\alpha$ AI) は、 $\alpha$ -アミラーゼ活性に対する阻害性の違いにより、 $\alpha$ AI-1、2、3 及び欠失型の  $\alpha$ AI-0 に分類される (Ishimoto et al. 1995)。第1章において、これらの変異が複対立遺伝子によって支配されることを明らかにした。

$\alpha$ AI-1 は、インゲンマメに広く分布し、分子量 15,000 ~ 18,000 の 2 種類のサブユニットから成るヘテロ 4 量体構造をとる (Powers and Whitaker 1977, Moreno and Chrispeels 1989)。その生合成過程についての研究は、遺伝子が同定された後に進展した。 $\alpha$ AI-1 は、器官、時期特異的発現性をもつ種子貯蔵タンパク質に分類され、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る。前駆体タンパク質として合成された  $\alpha$ AI-1 は、糖鎖の付加と内部切断といったプロセッシングを受けて成熟化し、液胞に蓄積する (Moreno and Chrispeels 1989, Moreno et al. 1990, Pueyo et al. 1993)。第2章で明らかにしたように、もう1つの変異である  $\alpha$ AI-2 も、2つの異なるサブユニットからなるヘテロ 4 量体であり、そのアミノ酸配列は、 $\alpha$ AI-1 と 75.8% の高い相同性を示した。 $\alpha$ AI-2 と  $\alpha$ AI-1 は、タンパク質構造に類似点が多く、種子での生合成過程もほぼ同様であることが推測された。

$\alpha$ AI-1 は、アズキゾウムシ (*Callosobruchus chinensis* (L.)) 及びヨツモンマメゾウムシ (*C. maculatus* (F.)) 幼虫の  $\alpha$ -アミラーゼ活性を阻害することにより生育を阻害し、インゲンマメの主要な抵抗性因子となっている (Ishimoto and Kitamura 1989)。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 (*Zabrotes subfasciatus* (BOHEMAN)) 幼虫は、 $\alpha$  A I - 1 の  $\alpha$ -アミラーゼ活性と生育に対する阻害性に耐性を有し、インゲンマメ種子を食害する (Ishimoto and Kitamura 1989)。一方、 $\alpha$  A I - 2 は、ブラジルマメゾウムシ幼虫の  $\alpha$ -アミラーゼ活性を強く阻害し、アズキゾウムシ幼虫に対しては弱い阻害性を示す (第 2 章)。人工豆を用いた飼育試験において、 $\alpha$  A I - 2 は、ブラジルマメゾウムシだけではなく、アズキゾウムシの生育も強く阻害した。

$\alpha$  A I - 3 は、 $\alpha$  A I - 1 と  $\alpha$  A I - 2 の両  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害性を有し、インゲンマメ野生種及び、栽培種に数パーセントの頻度で分布する (Ishimoto et al. 1995)。第 1 章において、 $\alpha$  A I - 3 は、単一の優性遺伝子により支配され、 $\alpha$  A I - 1、2 よりも生育阻害物質としての有用性が高い可能性が考えられた。しかしながら、電気泳動分析において、 $\alpha$  A I - 3 は、 $\alpha$  A I - 1 と  $\alpha$  A I - 2 のバンドを重ね合わせたようなパターンを示したため (図 4)、単一のタンパク質分子種であることに疑問が生じた。

そこで本章では、 $\alpha$  A I - 3 をインゲンマメ種子から単離・精製するとともに、タンパク質構造と  $\alpha$ -アミラーゼ活性に対する阻害性を調査し、虫害抵抗性の育種素材としての有用性を検討する (Suzuki and Ishimoto 1999)。さらに、RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms, 制限酵素断片長多型) 分析を行い、 $\alpha$  A I - 3 の進化の過程について考察する。

## 第 1 節 $\alpha$ A I - 3 の単離・精製

インゲンマメ種子には、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター ( $\alpha$  A I) の変異が存在する (Ishimoto et al. 1995)。これらのうち、 $\alpha$  A I - 1 については、構造と機能に関する多くの報告があり (Jaffe et al. 1973, Marshall and Lauda 1975, Powers and Whitaker 1977, Pick and Wober 1978, Lajolo and Finardi-Filho 1985, 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)。 $\alpha$  A I - 2 については、第 2 章において、インゲンマメ種子から単離・精製し、 $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害性とマメソウムシ類に対する生育阻害性を明らかにした。さらに、タンパク質ならびに遺伝子の構造も解析した。

$\alpha$  A I - 3 は、 $\alpha$  A I - 1 と  $\alpha$  A I - 2 の両  $\alpha$  A I 活性を併せ持つため、 $\alpha$  A I 変異の中で、生育阻害物質として最も有用性が高いと考えられた。第 1 章の交配試験において、 $\alpha$  A I - 3 は、優性の 1 遺伝子に支配されることを示したが、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、 $\alpha$  A I - 3 は、 $\alpha$  A I - 1 と  $\alpha$  A I - 2 を重ね合わせたようなバンドパターンを与えた (図 4)。そのため、 $\alpha$  A I - 3 を有する種子には、 $\alpha$  A I - 1 と  $\alpha$  A I - 2 に類似した 2 種類のタンパク質が共存している可能性があると考えられた。

そこで本節では、 $\alpha$  A I - 3 が単一のタンパク質として存在しているのか、それとも  $\alpha$  A I - 1 と  $\alpha$  A I - 2 に類似した 2 種類のタンパク質が共存しているのかを明らかにするため、インゲンマメ種子から  $\alpha$  A I - 3 の単離・精製を試みた。

## 材料および方法

### 1. 種子および昆虫

インゲンマメ栽培種 G1221 を  $\alpha$  A I - 3 の精製材料に用いた (表 1)。

ブラジルマメゾウムシは、30 °C、70 % 相対湿度、暗黒条件で飼育、維持したものをを用いた。

### 2. $\alpha$ A I - 3 の精製

G1221 の種子を高速振動試料粉砕機により粉砕し、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 °C、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。精製は、各段階ごとに  $\alpha$  A I - 3 の阻害活性、すなわち、ブタすい臓とブラジルマメゾウムシ幼虫の  $\alpha$ -アミラーゼ活性に対する阻害活性を測定し、また、280nm の吸光度及び、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、タンパク質をモニターして行った。

上記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 °C で 1 時間攪拌、11,000g で 20 分間遠心し、上清と沈澱物に分けた。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 で一晚の透析を行った。

透析後の硫酸飽和度 20 ~ 80 % 沈澱画分について、DEAE-Sephacel (Pharmacia, Sweden) を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行った。20mM リン酸緩衝液 (pH6.8) で

DEAE-Sephacel カラムを平衡化し、沈澱画分を添加した。非吸着画分が除去されるまで 20mM リン酸緩衝液 (pH6.8) を流し、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。

0.5M 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 Con A-Sepharose 4B (Pharmacia, Sweden) のアフィニティーカラムに DEAE 吸着画分を添加した。平衡化緩衝液により非吸着画分を溶出した後、30ml の 0.3M メチルー $\alpha$ -D-マンノピラノシド溶液 (平衡化緩衝液中) を加え、吸着画分を溶出した。

Con A 吸着画分を 20mM リン酸緩衝液 (pH6.8) に対して 4 °C で一晚透析し、その後、再度 DEAE-Sephacel カラムに吸着させた。吸着画分は、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。

濃度勾配で分画したブタすい臓の $\alpha$ -アミラーゼ活性に対して強い阻害性を示す画分と、ブラジルマメゾウムシ幼虫の $\alpha$ -アミラーゼ活性に対して強い阻害性を示す画分を、それぞれ硫酸で沈澱させ、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 Superose 12 カラム (Pharmacia, Sweden) を用いて、FPLC システム (Pharmacia, Sweden) によりゲルろ過を行った。

$\alpha$  A I の阻害活性を示す画分を蒸留水に対して透析し、凍結乾燥後にデシケータで保存した。

### 3. ブタすい臓の $\alpha$ -アミラーゼをカップリングしたアフィニティーカラムの作成と $\alpha$ A I - 3 の単離

Eijk and Noort (1976) の方法に準じ、第 2 章第 3 節と同様に CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia, Sweden) にブタすい臓の $\alpha$ -アミラーゼをカップリングしたアフィニティー吸着担

体を作成した。

上記 2 で粗精製した 2 画分について、ブタすい臓の  $\alpha$ -アミラーゼを担体としたアフィニティークロマトグラフィーを行った。平衡化緩衝液 (15mM succinate, 20mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5M NaCl, pH5.6) に溶解した 1mg のタンパク質を Sepharose カラムに添加し、30 °C で 1 時間循環させた。平衡化緩衝液を流して非吸着画分を得た後、吸着画分をクエン酸緩衝液 (pH3.0) により溶出した。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、直ちに pH を中性 (6 ~ 7) にした。吸着画分と非吸着画分を蒸留水に対して 4 °C で一晩透析し、凍結乾燥した。

#### 4 . 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

第 2 章第 1 節と同様に電気泳動を行い、クマシーブリリアントブルー染色した。

#### 5 . 幼虫消化管抽出液の調製

第 2 章第 1 節の方法で幼虫消化管抽出液を調整した。

#### 6 . $\alpha$ A I 活性

第 2 章第 1 節の方法により、 $\alpha$  A I 活性を測定した。

#### 7 . レクチン活性

第 2 章第 1 節の方法により、レクチン活性を測定した。

## 結果

インゲンマメ栽培種 G1221 の種子を材料として、 $\alpha$  A I - 3 の単離・精製を試みた。 $\alpha$  A I - 3 は  $\alpha$  A I - 1、2 と同様 (Ishimoto and Kitamura 1988, 第 2 章 第 1 節) に、DEAE-Sephacel のイオン交換担体及び Con A-Sepharose のアフィニティー担体に吸着した。 $\alpha$  A I - 3 を含む Con A 吸着画分を再度 DEAE-Sephacel に吸着させた後、リン酸緩衝液の濃度勾配による溶出を行った。その結果、 $\alpha$  A I の阻害活性が認められない画分 (fraction 20 ~ 35)、ブラジルマメゾウムシ幼虫の  $\alpha$ -アミラーゼ活性に対して強い阻害活性を示す画分 (fraction 36 ~ 47)、そしてブタすい臓の  $\alpha$ -アミラーゼ活性に対して強い阻害活性を示す画分 (fraction 48 ~ 62) が順次溶出され (図 26)、 $\alpha$  A I - 3 が単一タンパク質の分子種ではないことが明らかになった。後者 2 画分の主要なタンパク質をそれぞれ  $\alpha$  A I - 3 b、 $\alpha$  A I - 3 a と命名した。最初に溶出した画分は、レクチン活性を示したため、P H A (phytohemagglutinin) であると考えられた。

後者 2 画分について、再度 DEAE-Sephacel を用いた濃度勾配溶出を行ったが、 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b は、完全には分離しなかった。そこで、これらを硫酸で沈澱させ、Superose 12 カラムに添加し、FPLC システムによるゲルろ過を行った。その結果、 $\alpha$  A I - 3 b は 32.63 分、 $\alpha$  A I - 3 a は 35.38 分の時間で溶出した (図 27)。ゲルろ過を再度行い、 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b の精製を進めたが、両方とも単一タンパク質までは精製できなかった。

$\alpha$  A I - 3 a は、ブタすい臓の  $\alpha$ -アミラーゼ活性を阻害するため、ブタすい臓の  $\alpha$ -アミラーゼ分子と結合

分 画 番 号

20 23 26 29 32 35 38 41 44 47 50 53 56 59 62

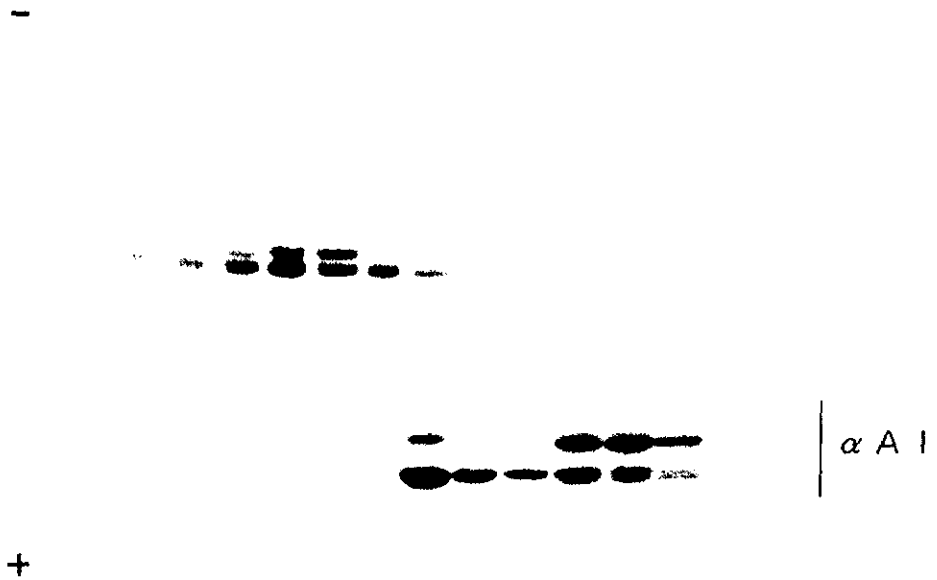


図 26. DEAE-Sephacel イオン交換クロマトによる分離画分の SDS-ゲル電気泳動分析

$\alpha A 1-3$  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.



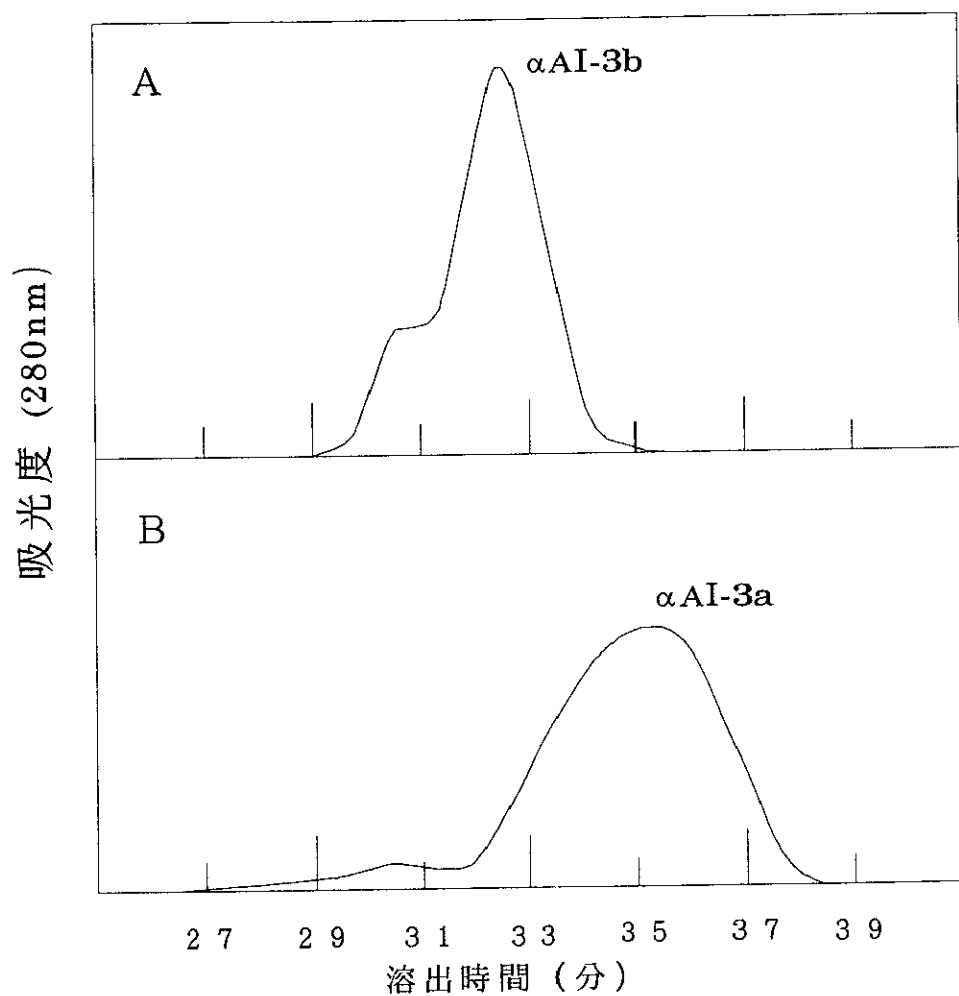


図 27. Superose 12 ゲル濾過による  $\alpha$ AI-3a と  $\alpha$ AI-3b の分離

A,  $\alpha$ AI-3b を含む画分; B,  $\alpha$ AI-3a を含む画分.  $\alpha$ AI-3a または  $\alpha$ AI-3b を含む DEAE-Sephacel 吸着画分を Superose 12 ゲル濾過で分離した.

するものと考えられた。そこで、CNBr-activated Sepharose 4B にブタすい臓の  $\alpha$ -アミラーゼをカップリングさせたアフィニティーカラムを作成し、 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b の単離を試みた。ゲルろ過により精製した  $\alpha$  A I - 3 a をアフィニティーカラムに添加し、カラムを  $\alpha$ -アミラーゼ活性の測定条件温度である  $30^{\circ}\text{C}$  で 1 時間循環させた。その後、非吸着画分と吸着画分を分離した。同様の方法で、 $\alpha$  A I - 3 b についても行った。その結果、 $\alpha$  A I - 3 a はアフィニティー担体に結合し、 $\alpha$  A I - 3 b は結合しなかった。アフィニティーカラムにより単離された  $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b は、それぞれゲルろ過により単一のピークを示した。これまでの精製過程を図 28 に記載する。

#### 考察

SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、 $\alpha$  A I - 3 は、 $\alpha$  A I - 1 と  $\alpha$  A I - 2 のバンドを重ね合わせるようなパターンを示し (図 4)、 $\alpha$  A I - 3 が単一タンパク質の分子種であることに疑問が生じた。そこで本節では、 $\alpha$  A I - 3 を含む栽培種 G1221 を材料として、 $\alpha$  A I - 3 の単離・精製を試みた。

その結果、G1221 の種子抽出液から  $\alpha$  A I の阻害活性を示す 2 種類のタンパク質、 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b が単離され、 $\alpha$  A I - 3 が単一タンパク質ではないことが明らかになった。

第 1 章において、 $\alpha$  A I の変異 ( $\alpha$  A I - 1, 2, 3, 0) は、遺伝的に対立的で共優性関係にあることを示した。しかしながら、 $\alpha$  A I - 3 は、単一分子種ではなく、

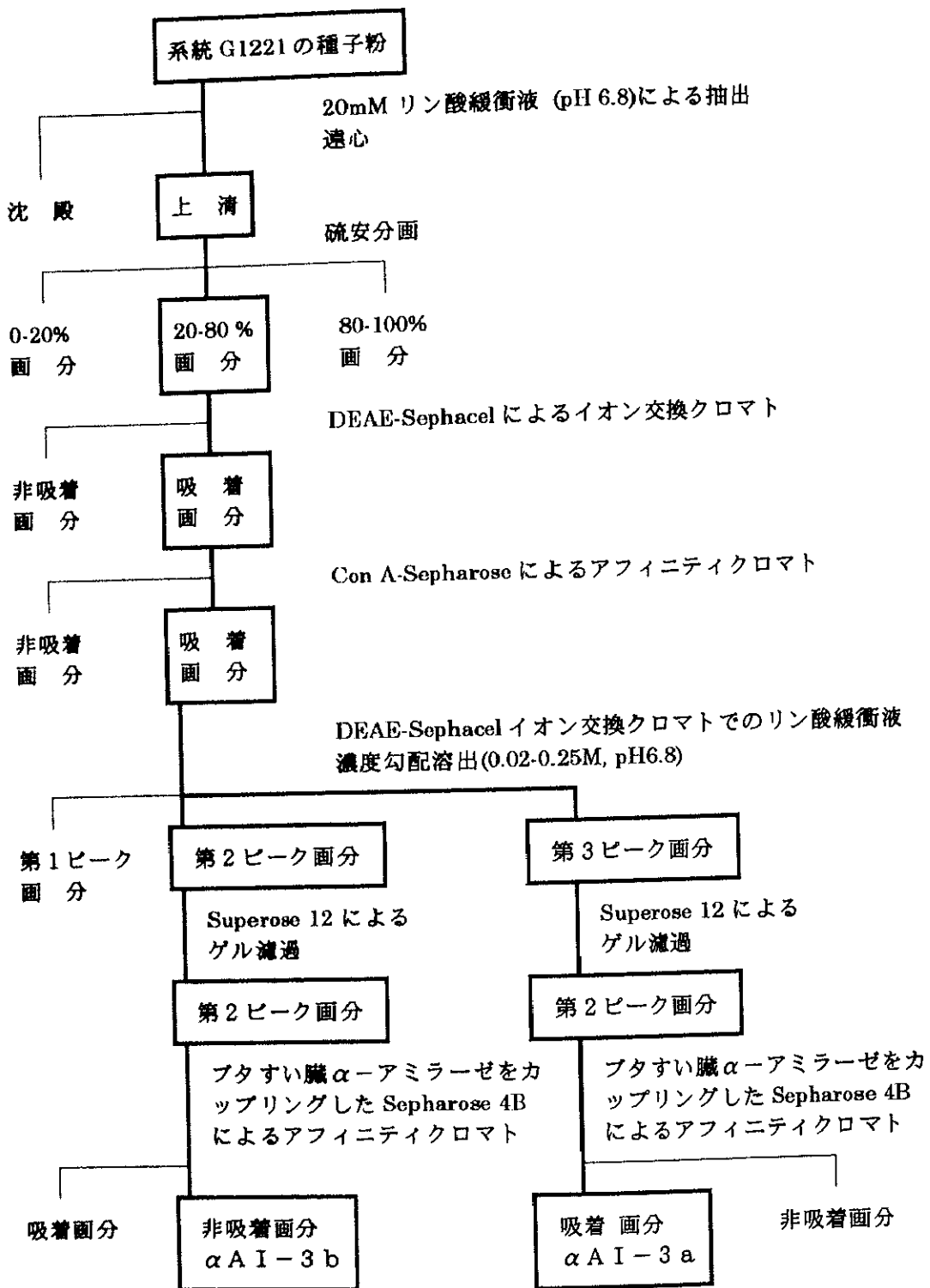


図 28. 系統 G1221 種子からの  $\alpha$  AI-3 a と  $\alpha$  AI-3 b の精製

種子に  $\alpha A I - 3 a$  と  $\alpha A I - 3 b$  の異なる 2 種類のタンパク質が混在した形質であった。そのため、 $\alpha A I - 3 a$  と  $\alpha A I - 3 b$  を支配する遺伝子は、遺伝的に強度の連鎖関係にあることが示された。仮に、 $\alpha A I - 3 a$  が  $\alpha A I - 1$  に、 $\alpha A I - 3 b$  が  $\alpha A I - 2$  に、それぞれ同一の遺伝子により支配されるとすれば、これらが  $\alpha A I - 1$  遺伝子と  $\alpha A I - 2$  遺伝子の不均等乗換などで生じた可能性があると考えられた。

これまでに、P H A (phytohemagglutinin) と  $\alpha A I - 1$  またはアルセリン (arcelin) 1、2、3、4 に、そして  $\alpha A I - 2$  とアルセリン 4 に強連鎖の関係が報告されており (Osborn et al 1986, Ishimoto and Kitamura 1991, 1993)、本研究においても第 1 章で、 $\alpha A I$  とアルセリンの各変異型に強連鎖関係を確認した。これらのタンパク質は、一次構造上、高い相同性を有しており (第 2 章第 3 節)、レクチン族 (phytohemagglutinin family) としてグループ化することが提唱されている (Chrispeels and Raikhel 1991)。レクチン族は、共通の祖先遺伝子から重複や乗換えなどにより進化し、あるものは P H A やアルセリンに、また、あるものは  $\alpha$ -アミラーゼ活性を阻害する  $\alpha A I$  に、機能分化したものと考えられた。 $\alpha A I - 3 a$  と  $3 b$  からなる  $\alpha A I - 3$  の形質も、レクチン族の進化の過程を反映しているものと推察された。

## 第 2 節 $\alpha$ A I - 3 のタンパク質構造ならびに $\alpha$ - アミラーゼ活性に対する阻害性

前節において、インゲンマメ種子の  $\alpha$  - アミラーゼインヒビター ( $\alpha$  A I) - 3 が 2 種類のタンパク質、 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b の混合物であることを明らかにした。 $\alpha$  A I - 3 a は  $\alpha$  A I - 1 と同様に、 $\alpha$  A I - 3 b は  $\alpha$  A I - 2 と同様に、それぞれブタすい臓の  $\alpha$  - アミラーゼ活性とブラジルマメゾウムシ幼虫の  $\alpha$  - アミラーゼ活性を阻害した。しかしながら、 $\alpha$  A I - 3 a が  $\alpha$  A I - 1 と、 $\alpha$  A I - 3 b が  $\alpha$  A I - 2 と、それぞれ同一のタンパク質であるかは不明である。

そこで本節では、 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b について、タンパク質構造及び  $\alpha$  - アミラーゼ活性に対する阻害性を調査し、 $\alpha$  A I - 1 または  $\alpha$  A I - 2 との異同を調査した。

### 材料および方法

#### 1. 昆虫

ブラジルマメゾウムシは、30℃、70% 相対湿度、暗黒条件で飼育、維持して用いた。

#### 2. $\alpha$ A I - 1、2、3 a および $\alpha$ A I - 3 b

$\alpha$  A I - 1 はインゲンマメ栽培種大正金時から、 $\alpha$  A I - 2 は系統 OAr4 から、それぞれ第 2 章第 1 節の方法で精製した。 $\alpha$  A I - 3 a と 3 b は、栽培種 G1221 から

前節の方法で精製したものをを用いた。

### 3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるサブユニット構造の分析

第2章第1節と同様に電気泳動を行った。単離した20 $\mu$ gの各 $\alpha$ AIタンパク質をSDSサンプル緩衝液に溶解し、泳動に供した。マーカーとして、インゲンマメ栽培系統G1221の種子タンパク質と低分子量標準キット(Pharmacia, Sweden)を用いた。

### 4. N末端アミノ酸配列の決定

Hirano(1989)の方法に準じ、第2章第1節の方法で、 $\alpha$ AI-3aと3bのN末端アミノ酸配列をエドマン法による気相プロテインシーケンサー(477A; アプライドバイオシステム)で決定した。

### 5. 幼虫消化管抽出液の調製

第2章第1節の方法で幼虫消化管抽出液を調整した。

### 6. $\alpha$ AI活性

第2章第1節の方法により、 $\alpha$ AI活性を測定した。

## 結果

精製した $\alpha$ AI-1、2、3a及び3bをSDS-ポリ

アクリルアミドゲル電気泳動により分析したところ、いずれの $\alpha$  A I も 14,000 ~ 20,100 の分子量域に複数のバンドを与えた (図 29)。 $\alpha$  A I - 1 と  $\alpha$  A I - 3 a は、バンドパターンの中央部に最も太いバンドを示し、 $\alpha$  A I - 2 と  $\alpha$  A I - 3 b は、バンドパターンの最下部に最も太いバンドを示した。 $\alpha$  A I - 1 と  $\alpha$  A I - 3 a 及び、 $\alpha$  A I - 2 と  $\alpha$  A I - 3 b は、それぞれ類似したバンドパターンを示したが、同一パターンではなかった。

$\alpha$  A I - 1 と  $\alpha$  A I - 2 は、異なる 2 種類のサブユニット ( $\alpha$  及び  $\beta$ ) から構成される。 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b の N 末端アミノ酸配列を分析したところ、両  $\alpha$  A I から、 $\alpha$  及び  $\beta$  サブユニットに相当する 2 種類の配列が得られた (図 30)。 $\alpha$  A I - 3 a の 2 つのサブユニットの配列は、 $\alpha$  サブユニットの 1 アミノ酸を除き、 $\alpha$  A I - 1 のものと一致した。また、 $\alpha$  A I - 3 b の配列は、 $\alpha$  A I - 2 のものと完全に一致した (図 30)。

$\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b の  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害性を調べた結果、ブタすい臓の  $\alpha$ -アミラーゼ活性は、 $\alpha$  A I - 3 a により強く阻害されたが、 $\alpha$  A I - 3 b には全く阻害されなかった (図 31)。また、ブラジルマメゾウムシ幼虫の  $\alpha$ -アミラーゼ活性は、 $\alpha$  A I - 3 b により強く阻害され、 $\alpha$  A I - 3 a にはほとんど阻害されなかった。

## 考察

本節では、前節で精製した  $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b について、タンパク質構造及び  $\alpha$ -アミラーゼ活性に対する阻害性を調査し、 $\alpha$  A I - 1 または  $\alpha$  A I - 2 と

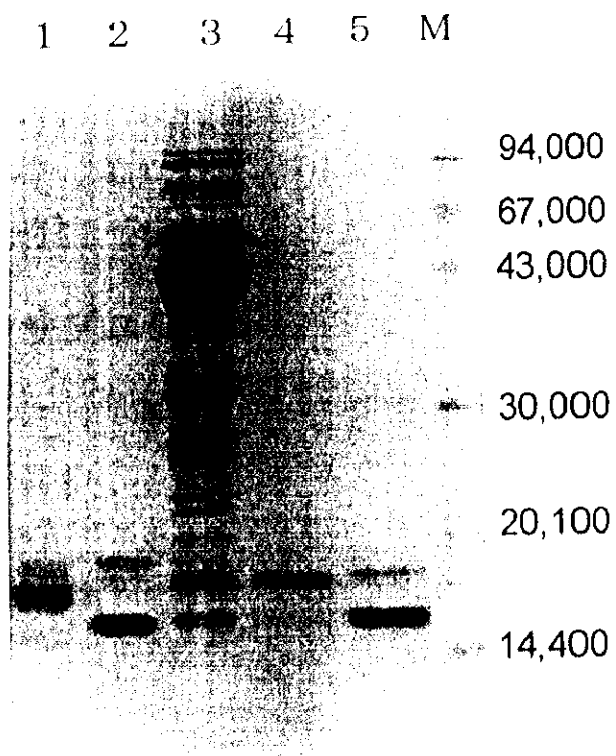


図 29. 系統 G1221 種子タンパク質と精製した  $\alpha$  A I の SDS-  
ゲル電気泳動分析

1,  $\alpha$  A I-1; 2,  $\alpha$  A I-2; 3, G1221 種子タンパク質;  
4,  $\alpha$  A I-3 a; 5,  $\alpha$  A I-3 b; M, 分子量マーカー.



(A)  $\alpha$ -サブユニット

$\alpha$ AI-1	A T E T S F I I D A F
$\alpha$ AI-3a	· · · · · N · · · ·
$\alpha$ AI-2	· S D · · · N F Y S ·
$\alpha$ AI-3b	· S D · · · N F Y S ·

(B)  $\beta$ -サブユニット

$\alpha$ AI-1	S A V G L D F V L V P
$\alpha$ AI-3a	· · · · · · · · · ·
$\alpha$ AI-2	· V I · · · · A · · ·
$\alpha$ AI-3b	· V I · · · · A · · ·

図 30.  $\alpha$ AI-1 (Hoffman et al. 1982)、 $\alpha$ AI-2 (図 25)、 $\alpha$ AI-3a 及び  $\alpha$ AI-3b のアミノ酸配列の比較

記号(·)は、 $\alpha$ AI-1 の  $\alpha$ -サブユニット(A) または  $\beta$ -サブユニット(B) と同じアミノ酸を示す。

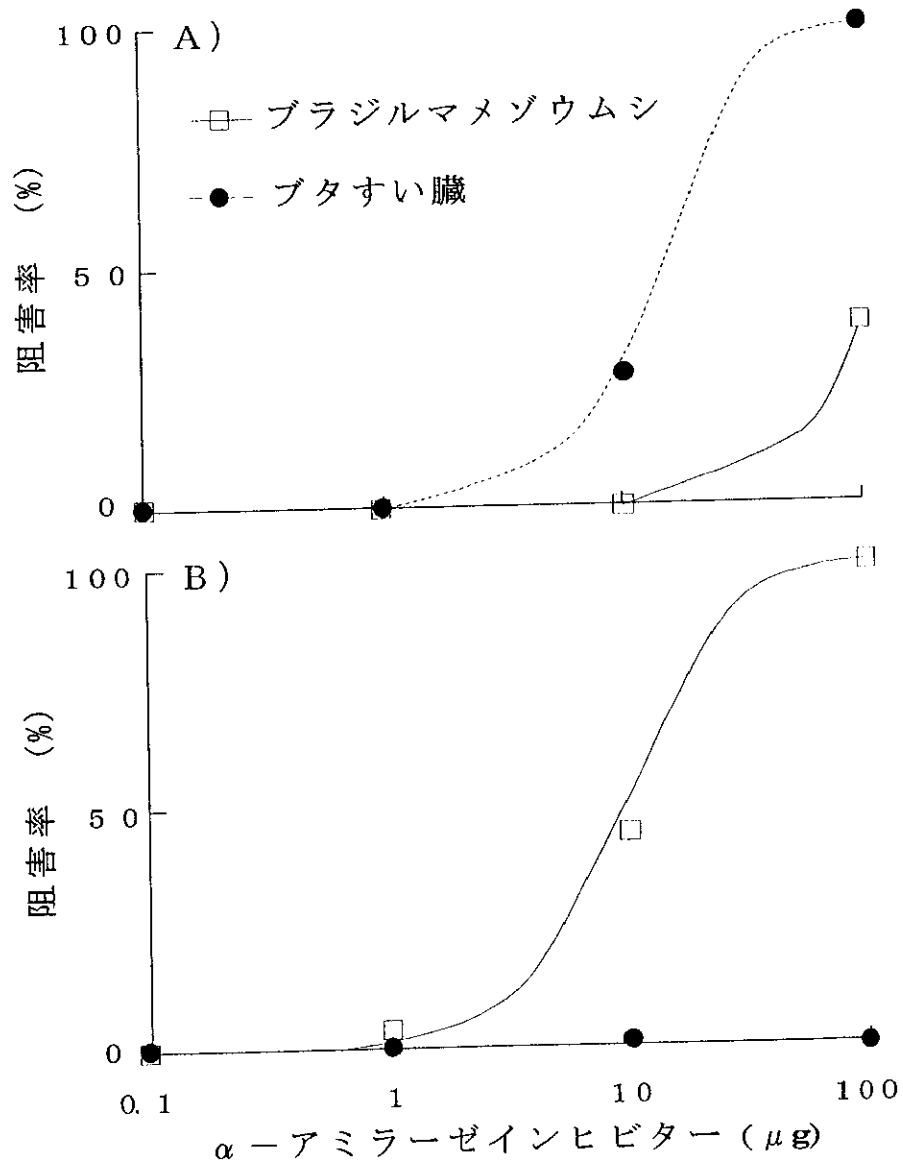


図 31.  $\alpha$ -アミラーゼ活性に対する  $\alpha$  AI の阻害活性

A,  $\alpha$  AI-3 a による阻害活性; B,  $\alpha$  AI-3 b による阻害活性. 各種  $\alpha$ -アミラーゼ試料は、30°C で 80  $\mu$ 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.

の異同を調査した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、 $\alpha$ AI-3aのパターンは $\alpha$ AI-1に、 $\alpha$ AI-3bのパターンは $\alpha$ AI-2に類似していたが、同一ではなかった。しかしながら、N末端アミノ酸配列を分析した結果、 $\alpha$ AI-3aと $\alpha$ AI-3bは、2種類の異なるサブユニットから構成され、それぞれ分析した18アミノ酸が、 $\alpha$ AI-1または $\alpha$ AI-2とほぼ一致した。各 $\alpha$ AIは、糖質に関するアフィニティ担体 Con A-Sepharose に吸着することから、糖鎖を含むタンパク質である。電気泳動において、同じサブユニットであっても、糖鎖の有無や結合数により、バンドの移動度に差が生じ、泳動パターンが異なることがある (Moreno et al. 1989, Yamaguchi 1991)。それ故、 $\alpha$ AI-3aは $\alpha$ AI-1と、 $\alpha$ AI-3bは $\alpha$ AI-2と、糖鎖以外の構造について、かなり類似していることが推測された。

$\alpha$ AI-3aは $\alpha$ AI-1と同様に、ブタすい臓の $\alpha$ -アミラーゼ活性を強く阻害し、ブラジルマメゾウムシ幼虫の活性をほとんど阻害しなかった。一方、 $\alpha$ AI-3bは $\alpha$ AI-2と同様に、ブタすい臓の $\alpha$ -アミラーゼ活性に全く阻害性を示さず、ブラジルマメゾウムシ幼虫の活性を強く阻害した。

以上のことから、 $\alpha$ AI-3aは $\alpha$ AI-1に、 $\alpha$ AI-3bは $\alpha$ AI-2に、それぞれ構造的、機能的に非常に類似していることが明らかとなり、マメゾウムシ類の生育に及ぼす阻害性も、 $\alpha$ AI-1、2とほぼ同様であると考えられた。 $\alpha$ AI-3を含む系統は、ブラジルマメゾウムシに抵抗性ではなく (Toro et al. 1990)、これは、種子中の $\alpha$ AI-3b濃度が低いことに原因があるためと考えられた。それ故、 $\alpha$ AI-3の変異は、育種素材

として特に有用とは考えられなかった。また、 $\alpha A I - 3 a$  を  $\alpha A I - 1$  に、 $\alpha A I - 3 b$  を  $\alpha A I - 2$  に、それぞれグループ化させることにより、 $\alpha A I$  の変異を大きく  $\alpha A I - 1, 2$  及び欠失型に分類することができた。

### 第 3 節 $\alpha$ A I - 3 の RFLPs 分析

RFLPs ( Restriction Fragment Length Polymorphisms, 制限酵素断片長多型 ) は、植物の遺伝、進化を研究する上で、有効な技術である ( Beckman and Soller 1986, Helentjaris et al. 1985 )。制限酵素断片という分子標識により、個々の染色体のいろいろな位置をマークし、染色体地図を作成することができる。この技術を利用し、遺伝学的及び育種学的に重要な遺伝子を同定する試みがなされている。また、ゲノム進化、植物の起源・栽培化の時期、遺伝変異の探索等の研究にも使われている。

前節までに、インゲンマメ種子の  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター (  $\alpha$  A I ) - 3 は、 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b の 2 種タンパク質の混合物であることを明らかにした。 $\alpha$  A I - 3 a は  $\alpha$  A I - 1 に、 $\alpha$  A I - 3 b は  $\alpha$  A I - 2 にほぼ同様の構造と機能を有していることから、 $\alpha$  A I - 3 は、 $\alpha$  A I - 1 様と  $\alpha$  A I - 2 様遺伝子の不均等乗換などで生じた可能性があるかと推察した。 $\alpha$  A I の多様な変異は、インゲンマメの栽培起源地とされる中南米のメキシコで大きく ( Ishimoto et al. 1995 )、この地域のインゲンマメでは、 $\alpha$  A I 以外に、主要なタンパク質であるファセオリン ( phaseolin ) や虫害抵抗性因子と考えられるアルセリン ( arcelin ) にも多様な変異が報告されている ( Gepts et al. 1986, 石本 1992 )。これらの変異は、インゲンマメの起源や進化を知る上で大きな手がかりとなり、特に、 $\alpha$  A I やアルセリンなどの変異は、インゲンマメの防御物質としての進化が考えられる。

本節では、 $\alpha$  A I - 3 または  $\alpha$  A I - 1 を含むインゲンマメ 2 品種について、RFLPs 分析を行い、 $\alpha$  A I の防御物質としての進化について考察する。

## 材料および方法

### 1. 種子および c D N A クローン

第 1 章で交配試験に用いた栽培種大正金時 ( $\alpha A I - 1$ ) と GI221 ( $\alpha A I - 3$ ) 及び、これらの交配で得た  $F_2$  種子 42 個体 ( $\alpha A I - 1$  を示すもの 12 個体、 $\alpha A I - 3$  を示すもの 30 個体) を RFLPs 分析に供試した。また、 $\alpha A I - 3$  を示す各  $F_2$  種子から得た  $F_3$  種子をウエスタンプロットにより分析した。

サザンプロットのプロープとして、 $\alpha A I - 1$  遺伝子 ( $\alpha a i 1$ ) (Hoffman et al. 1982) と  $\alpha A I - 2$  遺伝子 ( $\alpha a i 2$ ) (第 2 章第 3 節) を用いた。

### 2. ゲノム D N A の抽出

上記 1 の種子を温室において播種した。新葉を収穫して液体窒素により凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。Draper and Scott (1988) の方法に準じて、凍結した 3 ~ 5g の新葉からゲノム D N A を抽出した。

### 3. サザンプロッティング

約 6mg のゲノム D N A を制限酵素 HindIII により、 $37^{\circ}\text{C}$  24 時間で切断し、1.0% のアガロースゲルによる電気泳動を 20 ~ 24 時間行った。

サザンハイブリダイゼーションを ECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham, UK) を用いて実施した。電気泳

動後の DNA 断片を Hybond-N<sup>+</sup>膜に転写し、 $\alpha$  A I - 1 遺伝子 (*aa11*) または  $\alpha$  A I - 2 遺伝子 (*aa12*) をプローブとして、特異的断片の検出を行った。

#### 4. ウェスタンブロッティングによる糖タンパク質の検出

第 1 章第 1 節の方法により、種子タンパク質を SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離した後、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) Immobilon 膜 (Millipore, USA) に電氣的に転写し、糖タンパク質の検出を行った。

### 結果

大正金時と G1221 のゲノム DNA を制限酵素 HindIII で切断し、*aa11* または *aa12* をプローブとしたサザンブロッティングを行ったところ、DNA 断片の多型 (RFLPs) を認めた。*aa11* と *aa12* のどちらのプローブを用いても、同じ多型パターンを示した。大正金時は 5 本のバンドパターンを、G1221 は 6 本のバンドパターンを示した。これらのバンドのうち、共通したものは 3 本であった (図 32)。

プロット上での大正金時 ( $\alpha$  A I - 1) と G1221 ( $\alpha$  A I - 3 a、3 b) の  $\alpha$  A I 遺伝子を区別するため、*aa11* または *aa12* をプローブとし、種々の条件でハイブリダイゼーションを行ったが、検出されるパターンに変化は認められなかった。

交配親に認められた RFLPs のバンドは、全て F<sub>2</sub> 世代に遺伝した (図 32)。RFLPs に関する F<sub>2</sub> 世代の分離は、第

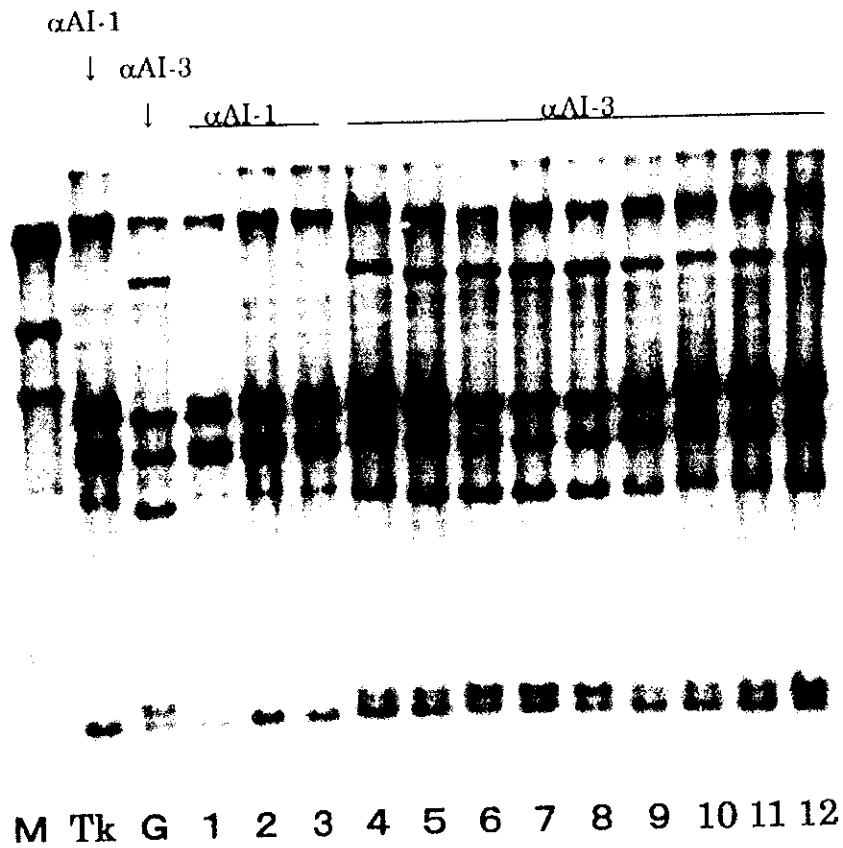


図 32. インゲンマメゲノムDNAのRFLPs分析

M, HindIII 切断の  $\lambda$  DNA; Tk, Taishou-kintoki (種子親、 $\alpha A I - 1$ ); G, G1221 (花粉親、 $\alpha A I - 3$ ); 1-3,  $\alpha A I - 1$  を示す  $F_2$  世代; 4-12,  $\alpha A I - 3$  を示す  $F_2$  世代. インゲンマメのゲノムDNAを制限酵素 HindIII により切断し、 $a a i 2$  遺伝子をプローブとしたサザンブロッティングを行った.



1 章第 1 節で明らかにした  $\alpha A I$  に関する分離 ( $\alpha A I - 1$  と  $\alpha A I - 3$ ) と完全に一致した。 $\alpha A I - 1$  を有する  $F_2$  世代は、大正金時と全く同じ RFLPs を示し、 $\alpha A I - 3$  を示す  $F_2$  世代は、2 つのグループに分かれた。G1221 と同様のパターンを示すグループ (図 32, レーン 6, 7, 8, 12) と、大正金時と G1221 のパターンを併せ持つグループ (図 32, レーン 4, 5, 9, 10, 11) である。ウエスタンブロットティングにおいて、G1221 の RFLPs を示す  $F_2$  世代から得た  $F_3$  種子は、全て  $\alpha A I - 3$  を示した。また、大正金時と G1221 の RFLPs を併せ持つ  $F_2$  世代から得た  $F_3$  種子は、 $\alpha A I - 3$  と  $\alpha A I - 1$  に分離した。

#### 考察

本節では、 $\alpha A I - 3$  または  $\alpha A I - 1$  を含むインゲンマメ 2 品種について、RFLPs 分析を行い、 $\alpha A I$  の防御物質としての進化を考察した。

$\alpha A I - 1$  遺伝子 (*aa1*) と  $\alpha A I - 2$  遺伝子 (*aa2*) をプローブとして、インゲンマメ栽培種大正金時 ( $\alpha A I - 1$ ) と G1221 ( $\alpha A I - 3$ ) の品種間に RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms, 制限酵素断片長多型) を検出した。第 2 章第 3 節で示したように、*aa1* と *aa2* のアミノ酸配列には 75.8 % の高い相同性が認められる。そのため、*aa1* または *aa2* をプローブとして、種々の条件でハイブリダイゼーションを行ったが、大正金時と G1221 の  $\alpha A I$  遺伝子を判別することはできなかった。交配親に認めた RFLPs のバンドは全て  $F_2$  世代に遺伝し、その分離は、 $\alpha A I$  の分離と完全に一致した。ウエスタンブロットティング分析では、 $\alpha A I - 3$  を示す  $F_2$  世代を、ホモ ( $\alpha A$

I-3) とヘテロ ( $\alpha$ AI-3 と  $\alpha$ AI-1 の混在) に区別できなかったが、RFLPs 分析では明確に判別することができ、RFLPs 分析の有用性が示された。

第2章第3節に述べたように、インゲンマメには、 $\alpha$ AI と類似したタンパク質が多数存在する。PHA (phytohemagglutinin) は、血球凝集作用を有するレクチンタンパク質で、哺乳類、鳥類に対して毒性を示す (Evans et al. 1973, Jayne-Williams and Burgess 1974)。アルセリン (arcelin) は、インゲンマメ野生種に見いだされたタンパク質で、ブラジルマメゾウムシ抵抗性に関与することが報告されている (Osborn et al. 1988, Cardona et al. 1990, Minney et al. 1990)。 $\alpha$ AI を含むこれらのタンパク質は、遺伝的に強連鎖関係にあり、構造の類似性が高い。それ故、これらのタンパク質をインゲンマメのレクチン族 (phytohemagglutinin family) としてグループ化することが提唱されている (Chrispeels and Raikhel 1991)。

本節の RFLPs 分析において、5~6本のバンドを認めたが、 $\alpha$ AI 遺伝子を特定することはできなかった。しかしながら、これらのバンドは、レクチン族の遺伝子または類似した遺伝子であり、連鎖群として遺伝することが確認された。レクチン族遺伝子は、ゲノム上で非常に近接した位置に存在し、遺伝子重複や乗換えなどで進化し、インゲンマメの防御機構を担うようになったと考えられた。 $\alpha$ AI-3 も、 $\alpha$ AI-1 と  $\alpha$ AI-2 の遺伝子もしくは、これらに類似した遺伝子の不均等乗換えにより生じたと推察され、この現象がレクチン族の進化の傍証になるものと考えられた。

#### 第 4 節 要約

インゲンマメ種子の $\alpha$ -アミラーゼインヒビター ( $\alpha$  A I) は、大きく 4 つの変異に分類される ( $\alpha$  A I - 1, 2, 3, 0)。これらの変異の中で、 $\alpha$  A I - 3 は、阻害する酵素の種類が最も多いため、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。そこで本章では、 $\alpha$  A I - 3 の単離・精製を行い、タンパク質構造と $\alpha$ -アミラーゼ活性に対する阻害性を調査し、 $\alpha$  A I - 1 及び  $\alpha$  A I - 2 と比較した。さらに、 $\alpha$  A I - 3 に関する RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms, 制限酵素断片長多型) 分析を行い、 $\alpha$  A I - 3 の進化について考察した。

インゲンマメ種子から  $\alpha$  A I - 3 の単離・精製を試みたところ、 $\alpha$  A I - 3 は、20mM リン酸緩衝液 (pH6.8) で平衡化した DEAE-Sephacel のイオン交換担体及び、0.5M 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 Con A-Sepharose のアフィニティー担体に吸着した。DEAE-Sephacel を用いて 0.02 ~ 0.25M のリン酸緩衝液 (pH6.8) の濃度勾配溶出を行ったところ、 $\alpha$  A I の阻害活性を示す異なる 2 つのタンパク質、 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b が分離され、 $\alpha$  A I - 3 が単一タンパク質の分子種でないことが明らかになった。これらのタンパク質を、Superose 12 のゲルろ過とフタスイ臓の $\alpha$ -アミラーゼをカップリングしたアフィニティークロマトグラフィーに供試し、それぞれ単一のタンパク質として精製した。

精製した  $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b は、それぞれ  $\alpha$  A I - 1 及び  $\alpha$  A I - 2 と同様の $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害性を示した。 $\alpha$  A I - 3 a は、フタスイ臓の $\alpha$ -アミラーゼ活性を強く阻害し、ブラジルマメゾウムシ幼虫の活性をほとんど阻害しなかった。 $\alpha$  A I - 3 b は、ブラ

ジルマメゾウムシ幼虫の活性に強い阻害性を示したが、  
ブタすい臓に対しては全く阻害性を示さなかった。

SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b は、14,400 ~ 20,100 の分子量域に複数のバンドを与え、それぞれ  $\alpha$  A I - 1 と  $\alpha$  A I - 2 のバンドパターンと類似していた。N 末端アミノ酸配列を分析した結果、 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b は、2 種類の異なるサブユニット ( $\alpha$  及び  $\beta$ ) から構成され、それぞれ分析した 18 アミノ酸が、 $\alpha$  A I - 1 または、 $\alpha$  A I - 2 とほぼ一致した。電気泳動のバンドパターンは、タンパク質に結合する糖鎖の有無や結合数で変化することが知られていることから、 $\alpha$  A I - 3 a は  $\alpha$  A I - 1 に、 $\alpha$  A I - 3 b は  $\alpha$  A I - 2 に、糖鎖以外についてタンパク質構造が非常に類似しているものと推察された。

第 1 章 第 1 節において、 $\alpha$  A I - 3 は単一の優性遺伝子に支配されることを示した。しかしながら、 $\alpha$  A I - 3 は、 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b の 2 種類のタンパク質による形質であったため、 $\alpha$  A I - 3 a と  $\alpha$  A I - 3 b が強連鎖関係にあることが示された。 $\alpha$  A I は P H A ( phytohemagglutinin ) やアルセリン ( arcelin ) とともに、インゲンマメのレクチン族 ( phytohemagglutinin family ) に属している。レクチン族タンパク質は、インゲンマメの防御物質として知られており、遺伝的に強連鎖関係にある。また、タンパク質構造の相同性が高い。 $\alpha$  A I - 3 に関する RFLPs 分析を行ったところ、5 ~ 6 本のバンドを認めたが、 $\alpha$  A I 遺伝子を特定することはできなかった。しかしながら、これらのバンドは、レクチン族の遺伝子または、類似した遺伝子であり、連鎖して遺伝することが確認された。レクチン族遺伝子は、ゲノム上で重複や乗換

えなどで進化し、インゲンマメの防御物質として分化したと考えられた。 $\alpha A I - 3$ も $\alpha A I - 1$ と $\alpha A I - 2$ の遺伝子もしくは、これらに類似した遺伝子の不均等乗換により生じた形質と推察され、この現象がレクチン族の進化の傍証になるものと考えられた。

以上、 $\alpha A I - 3$ の変異は、種子に $\alpha A I - 3 a$ と $3 b$ の2種タンパク質が混在した形質であった。 $\alpha A I - 3 a$ は $\alpha A I - 1$ に、 $\alpha A I - 3 b$ は $\alpha A I - 2$ に、それぞれ構造的、機能的に非常に類似していることが明らかになり、 $\alpha A I$ の変異を、大きく $\alpha A I - 1$ 、 $2$ 及び、欠失型に分類することができた。それ故、 $\alpha A I - 3 a$ と $3 b$ は、 $\alpha A I - 1$ 、 $2$ に比べて、虫害抵抗性の育種素材として、特に有用性が高いとは考えられなかった。