

第4章 総合考察

植物が栽培化され今日に至るまで、人類は昆虫や微生物による農産物の被害に常に頭を悩ましてきた。農産物の被害の中で、特に収穫後に受けるものをポストハーベストロスと呼んでいる。ポストハーベストロスは、害虫や微生物の繁殖しやすい熱帯、亜熱帯地域で特に大きく、また、これらの多くの地域では、人口増加に伴う食糧不足が大きな問題となっている。そのため、ポストハーベストロスを低減させることは、社会的、経済的に大きな意義をもつ。

マメ科作物は、根粒菌と共生し、比較的やせ地でも生育しやすいうえに、タンパク質含量の高い種子を生産する。このため、熱帯、亜熱帯地域で特に重要なタンパク質源となっているが、同時にマメゾウムシ類害虫により多大なポストハーベストロスも被っている。これら貯蔵害虫の防除法は、主にくん蒸剤による薬剤処理であるが、ガス状で作用する本剤は毒性が強く、その残留性も問題となっている。最近、一部の農薬について、内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）の疑いが指摘されており、無農薬、減農薬を嗜好する声が次第に大きくなっている。このような状況から、寄生虫、捕食虫あるいは微生物などの天敵を利用する方法、耕種法の改善、作物の虫害抵抗性の利用など、農薬によらない防除法に大きな期待がよせられている。

一般に作物の虫害抵抗性は、選好性（*preference*）、生育阻害性（*antibiosis*）及び、耐性（*tolerance*）の3つに大別して考えられ、抵抗性品種は、これらの性質を1つあるいは2つ以上有している（末永・岡本 1966）。これまでに、ササゲ、インゲンマメ及びリョクトウにおいて、マメゾ

ウムシ類抵抗性が見いだされており、これらの抵抗性は、いずれも生育阻害性によるものであった (Singh et al. 1985, Schoonhoven et al. 1983, Fujii and Miyazaki 1987)。しかしながら、確認された抵抗性は、マメゾウムシ類の食害を完全に防除するものではなく、また、害虫の寄生性の変化により抵抗性品種が感受性化する、いわゆる抵抗性の崩壊現象が、ササゲのヨツモンマメゾウムシ抵抗性に認められた (Dick and Credland 1986)。このようなことから、新たに抵抗性品種を育成し、抵抗性の崩壊にも対応していくためには、作物の抵抗性因子を物質的に同定し、その作用機構を解明することが非常に重要となる (喜多村・石本 1988)。

今日の分子生物学的技術の発展により、外来遺伝子を用いて植物を改良することが可能となってきた。虫害抵抗性は、病害・薬害抵抗性、品質成分などと同様に、比較的少数の遺伝子に支配されており、遺伝子組換え技術による改良可能な形質である。遺伝子組換え技術により、植物のもつ生育阻害物質を他の植物で合成させ、抵抗性を付与させた成功例として、ササゲのトリプシンインヒビター遺伝子や、ジャガイモ及びトマトのプロテアーゼインヒビター遺伝子を導入したタバコで報告されている (Hilder et al. 1987, Johnson et al. 1989)。また、マメ科作物においては、インゲンマメ種子の α -アミラーゼインヒビター遺伝子をエンドウマメ (Shade et al. 1994, Schroeder et al. 1995) 及び、アズキ (Ishimoto et al. 1996) に導入した成功例がある。

作物の虫害抵抗性を利用する試みは、従来の交配法と遺伝子組換え技術の進歩により、ますます盛んになると考えられ、抵抗性を担う育種素材の探索、機能解析が急務な研究課題となってきた。

インゲンマメ種子には、マメゾウムシ類生育阻害物質と考えられる2種類のタンパク質、 α -アミラーゼイン

ヒビター (α AI) とアルセリン (arcelin) が存在する (Ishimoto and Kitamura 1988, Osborn et al. 1988, Minney et al. 1990)。 α AI は、 α AI-1 : ブタすい臓の α -アミラーゼ活性を阻害するもの、 α AI-2 : 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もの、 α AI-3 : 両 α -アミラーゼ活性を阻害するもの、 α AI-0 : α -アミラーゼ活性阻害性を示さないもの、の4つに分類される。さらに、電気泳動パターンの違いにより、 α AI-1 は a、b、c、d の4つに、 α AI-0 は a、b の2つに分けられ (Ishimoto et al. 1995)、 α AI-1 d、2 及び 0 b については、既に遺伝様式が明らかにされている (Ishimoto and Kitamura 1991, 1993)。アルセリンは、インゲンマメ野生種に認められたタンパク質で、電気泳動のバンドパターンから6つの変異型に分類される。これらのうち、アルセリン1から4までは、複対立遺伝子により支配されることが明らかにされている (Osborn et al. 1986)。 α AI とアルセリンの変異の中で、マメゾウムシ類への生育阻害性を調査されたものは、わずかに α AI-1 d とアルセリン1及び4のみである (Ishimoto and Kitamura 1988, Osborn et al. 1988, Minney et al. 1990)。また、上で述べた α AI とアルセリンの全ての変異については、遺伝様式は明らかにされていない。

そこで本研究では、 α AI とアルセリンの変異について、遺伝様式と相互の遺伝的関係を調査するとともに、生化学的機能を解析し、虫害抵抗性の育種素材としての可能性を検討した。

まず、 α AI とアルセリンの変異について、遺伝様式と相互の遺伝的関係を調査し、 α AI の各変異型が、共優性の1遺伝子に支配され、欠失型は、1遺伝子劣性支配を受けることを明らかにした。また、アルセリンも α

A I と同様に、各変異型が、優性の 1 遺伝子に支配され、アルセリン 3、4 及び 6 が α A I - 2 と、また、アルセリン 1、2 及び 5 が α A I 欠失と、遺伝的に強連鎖していることを見いだした。

α A I 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阻害するため (Osborn et al. 1988, Ishimoto and Kitamura 1989, Minney et al. 1990)、種子中の成分を大きく変えることなく、抵抗性を付与できるものと考えられた。そこで研究の対象を α A I に絞り、 α A I - 2 と α A I - 3 について、構造と機能について解析した。その結果、インゲンマメ種子から精製した 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 -アミラーゼ活性に阻害性を示し、両マメゾウムシ類の生育を強く阻害したことから、生育阻害物質としての有用性が確認された。次に、 α A I - 3 を示す種子から、 α A I - 3 の単離・精製を試みたところ、 α A I - 3 a と α A I - 3 b の 2 種類のタンパク質が単離され、 α 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。 α A I - 3 a は α A I - 1 に、 α A I - 3 b は α A I - 2 に、それぞれ構造的、機能的に非常に類似していたため、 α A I の変異を大きく α A I - 1、2 及び、欠失型に分類することができた。

以上の基礎的知見に基づいて、インゲンマメのマメゾウムシ類生育阻害物質に関する遺伝・育種学的研究について考察する。

第 1 章において、 α A I とアルセリンの各変異間の遺伝的關係を調査し、 α A I - 2 とアルセリン 3、4 または 6 に強連鎖関係があること、また、アルセリン 1、2 及び 5 が、 α A I 欠失と強連鎖していることを明らかにした。これまでに、アルセリン 1、2、3 及び 4 がイン

ゲンマメのレクチンである P H A (phytohemagglutinin) と強連鎖関係にあること、そして、 α A I - 1 と P H A が強連鎖していることが報告されている (Osborn et al. 1986, Ishimoto and Kitamura 1991)。それ故、これら 3 種類のタンパク質、 α A I、アルセリン、P H A は、ゲノム上で非常に近接して位置することが明らかになった。 α A I とアルセリンはともに、インゲンマメのマメゾウムシ類抵抗性に関与すると考えられ (Ishimoto and Kitamura 1988, Cardona et al. 1990)、P H A も哺乳類、鳥類に対して毒性を有している (Evans et al. 1973, Jayne-Williams and Burgess 1974)。第 2 章第 3 節で明らかにしたように、これらのタンパク質は、1 次構造の類似性が非常に高いことから、インゲンマメのレクチン族と総称することが提唱されている (Chrispeels and Raikhel 1991)。レクチン族の遺伝的関係と構造の類似性、そして大きな変異は、これらが共通の祖先遺伝子から進化し、インゲンマメの防御物質として機能分化を果たしたためと考えられた。

人工豆を用いたマメゾウムシ類の飼育試験において、 α A I - 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)。また、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 A I は、幼虫の α -アミラーゼ活性を阻害することで生育を阻害するが、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 A I に比べて種子に高濃度で含有されなければ、マメゾウムシ類への生育阻害性が発揮されない。このことは、 α A I が種子成分を大きく変える

ことなく虫害抵抗性を付与できる可能性を示している。

ブラジルマメゾウムシは、寄主とするインゲンマメ以外にも、ササゲ属作物の種子を食害することから、その防除は非常に重要である。インゲンマメに広く存在する α A I - 1 は、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性と生育に阻害性を示さない (Ishimoto and Kitamura 1989)。 α A I 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 A I - 2 と α A I - 3 であり、本虫の生育を阻害する可能性がある。そこで、 α A I - 2 と α A I - 3 を種子から単離・精製し、タンパク質構造と生化学的機能の解析を試み、生育阻害物質としての有用性を検討した。

第 2 章第 1 節において、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 を精製した。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動において、 α A I - 2 は、分子量 14,400 ~ 20,100 域に 3 本のバンドを示した。N 末端アミノ酸配列と未変性状態の分子量を決定した結果、 α A I - 2 は、分子量 49,000 のヘテロ 4 量体構造をとることが明らかになった。 α A I - 1 も分子量 40,000 ~ 45,000 のヘテロ 4 量体と推定されており (Powers and Whitaker 1977, Moreno and Chrispcels 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 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 Chrispcels (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。この遺伝子を

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化することが示された (Moreno et al. 1990)。 α A I - 2 の 2 つの N 末端アミノ酸配列も、内部切断の結果生じたものと考えられ、このようなタンパク質の成熟化は、P H A 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生合成過程と推察された。

第 2 章第 2 節の機能解析において、 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阻害し、その生育も阻害した。1.0%濃度の α A I - 2 を含む人工豆において、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、明確な生育阻害性は認められなかった。このため、 α A I - 2 は、インゲンマメ系統 OAr4 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。系統 OAr4 は、 α A I - 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ことが明らかにされている (Minney et al. 1990)。 α A I - 2 とアルセリン 4 は、遺伝的に強連鎖関係にあることから、これらが共同してブラジルマメゾウムシ抵抗性に関与しているものと考えられた。

α A I - 2 は、アズキゾウムシ (*Callosobruchus* 属) とブラジルマメゾウムシ (*Zabrotes* 属) の 2 属に、 α A I - 1 は、*Callosobruchus* 属だけに生育阻害性を示し、 α A I - 2 は、阻害対象が多いことが明らかになった。インゲンマメは栽培化後、メキシコなどの中南米をはじめ、世界各

国において分布し、重要な食糧となってきた。 α A I を含むインゲンマメは 99% 以上で (Ishimoto et al. 1995)、人類は、数千年の間、インゲンマメを食して何ら問題がなかった。特に、 α A I - 2 は、哺乳類の α -アミラーゼ活性に阻害性がないため、生育阻害物質としての安全性は高いものと考えられる。これらのことから、 α A I - 2 は、 α A I - 1 よりも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。

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に分解され、 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とアズキゾウムシにより分解を受けなかった (第 2 章第 2 節)。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。

α A I の変異の中で、 α A I - 3 は、 α A I - 1 と α A I - 2 の両 α -アミラーゼ活性阻害性を示すため、最も優れた生育阻害物質と考えられた。第 1 章第 1 節の遺伝分析により、 α A I - 3 は優性の 1 遺伝子支配であることが示されたが、 α A I - 3 の電気泳動のパターンは、 α A I - 1 と α A I - 2 を重ね合わせたようなパターンであった。そのため、 α A I - 3 を生産する種子には、 α A I - 1 様、 α A I - 2 様の 2 種タンパク質が存在する可能性が考えられた。そこで第 3 章において、 α A I - 3 を有するインゲンマメの種子を材料とし、 α A I - 3 の単離・精製を試みた。その結果、 α A I の阻害活性を示す 2 種類のタンパク質、 α A I - 3 a と α A I - 3

b が単離され、 $\alpha A I - 3$ 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。このことは、 $\alpha A I - 3$ が連鎖関係にある、 $\alpha A I - 3 a$ と $\alpha A I - 3 b$ の 2 つの遺伝子により支配され、見かけ上、 $\alpha A I - 3$ として単一優性遺伝子支配を受けることにより説明される。 $\alpha A I - 3 a$ と $\alpha A I - 3 b$ のサブユニット構造、N 末端アミノ酸配列及び、 α -アミラーゼ活性に対する阻害性を調べたところ、 $\alpha A I - 3 a$ が $\alpha A I - 1$ と、 $\alpha A I - 3 b$ が $\alpha A I - 2$ と、それぞれ構造的、そして機能的にかなり類似していることがわかった。それ故、 $\alpha A I - 3 a$ と $\alpha A I - 3 b$ は、 $\alpha A I - 1$ 様及び $\alpha A I - 2$ 様遺伝子の不均等乗換などで生じた可能性が推察された。

以上、本研究により、 $\alpha A I$ とアルセリンの変異の中で、 $\alpha A I - 2$ が最も生育阻害性に優れた変異型と考えられた。第 2 章第 3 節において、抗体法により、 $\alpha A I - 2$ の cDNA 遺伝子をクローニングした。マメ科植物においては、アズキ、リョクトウ、エンドウマメ及び、インゲンマメで、既に、植物体の再分化と形質転換に成功している (Ge et al. 1989, Mendoza et al. 1992, Schroeder et al. 1993, Russell et al. 1993, Sato et al. 1993)。 $\alpha A I - 1$ については、エンドウマメとアズキに遺伝子導入が実施され、得られた形質転換体は、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獲得した (Shade et al. 1994, Ishimoto et al. 1996)。これらの成功事例を適用して、 $\alpha A I - 2$ 遺伝子をマメ科植物に導入し、ブラジルマメゾウムシを含む多くのマメゾウムシ類に対して、抵抗性が付与できるものと考えられる。また、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、設計して新たな生育阻害物質を

合成できるようになると期待される。