

摘要

マメ科作物はイネ科作物とならび、人類にとっての有用な作物で、特に熱帯、亜熱帯地域において、重要なタンパク質源として栽培、利用されている。アズキ、ササゲ、リョクトウ、インゲンマメなどのマメ科作物は、種子貯蔵中に、マメゾウムシ類害虫による多大な被害を受けている（ポストハーベストロス）。これら害虫を防除する方法は、主にくん蒸処理であるが、安全性と経済的な側面から、作物の虫害抵抗性を利用することに大きな期待がよせられている。これまでに、ササゲ、リョクトウ、インゲンマメに、マメゾウムシ類抵抗性が見いだされている。しかしながら、これらの抵抗性は、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、ササゲにおいては、既に抵抗性の崩壊も起こっている。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、作物の有する生育阻害因子を物質的に同定し、その作用機構と遺伝様式を解明することが非常に重要となる。

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）が含まれる。 α AIは8つの変異型に、アルセリンは6つの変異型に分類されるが、これらの変異の中で、マメゾウムシ類への生育阻害性を調査されたものは、 α AI-1dとアルセリン1、4のみであり、また、各変異に関する遺伝学的研究も不十分である。

そこで本研究では、インゲンマメ種子の α AIとアルセリンの変異について、虫害抵抗性の育種素材としての

有用性を検討した。まず、 α A I 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明らかにした。さらに、有望な生育阻害物質として考えられた α A I - 2 と α A I - 3 の生化学的機能を解析し、 α A I - 2 については、c D N A 遺伝子をクローニングした。得られた結果は以下の通りである。

1. インゲンマメ種子の α A I は、ブタすい臓の α - アミラーゼ活性を阻害する α A I - 1 (a , b , c , d) と、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 α A I - 2 及び、これら 2 種類の α - アミラーゼ活性を阻害する α A I - 3 に分類される。 α A I - 0 (a , b) は、 α - アミラーゼ活性に対して阻害性を示さない欠失型である。本研究では、これらを含むインゲンマメ系統の交配試験から、各 α A I の変異が共優性の 1 遺伝子、 Ai^1 (a , b , c , d)、 Ai^2 、 Ai^3 、に支配されること、また、欠失型の α A I - 0 (a , b) が 1 遺伝子 (ai) 劣性支配を受けることを明らかにした。

2. ブラジルマメゾウムシは、インゲンマメを寄主とする主要な貯蔵害虫であるが、最近、インゲンマメ野生系統に本虫に対する抵抗性が見いだされた。抵抗性系統の種子には、栽培種には認められていないタンパク質アルセリンが含まれており、抵抗性への関与が推察されている。アルセリンは、電気泳動のバンドパターンから 6 種類に分類され、本研究において、 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 欠失と密接に連鎖していることを明らかにした。すでに、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、また、 α A I - 1 d が P H A とそれぞれ遺伝的に強連鎖関係にあることが報告されている。このため、 α A I、アルセリン及び、P H A 遺伝子は、ゲノム上で非常に近接して位置し、連鎖して遺伝することが明らかになった。

3. ブラジルマメソ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 の精製を試みた。 α A I - 2 は、種子抽出液の硫酸 20 ~ 80% 画分、イオン交換クロマト DEAE-Sephacel の吸着画分及び、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、これらの分離法と、Sephacryl-S200 によるゲルろ過法を組み合わせることで、 α A I - 2 を精製することができた。

精製した α A I - 2 は、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、 α A I - 1 と同じ分子量域 (Mr 14,400 ~ 20,100) に複数のサブユニットバンドを示した。未変成状態の分子量は、 α A I - 1 とほぼ同じ 49,000 であったことから、 α A I - 2 は、ヘテロ 4 量体構造をとることが推定された。また、タンパク質の 1 次部分構造をエドマン法で解析した結果、既知の α A I - 1 と相同性が高いことが明らかになった。

4. α A I - 2 の α - アミラーゼ活性に対する阻害性を調査した。 α A I - 2 は、ブラジルマメソウムシ幼虫の α - アミラーゼ活性を強く阻害し、アズキソウムシ幼虫に対しても弱い阻害性を示した。しかしながら、哺乳類のブタすい臓の α - アミラーゼ活性を、全く阻害しなかった。 α A I - 1 は、アズキソウムシ幼虫とブタの α - アミラーゼ活性を強く阻害し、ブラジルマメソウムシ

幼虫の活性を阻害しないことから、 α A I - 2 と α A I - 1 は、全く異なる阻害特性を有することが明らかになった。

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たが、 α A I - 2 は、全く分解を受けなかった。一方、アズキゾウムシ幼虫の消化管抽出液は、これらの α A I に対する分解作用を有していなかった。それ故、 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。

5. α A I - 2 のマメゾウムシ類に及ぼす生育阻害性を調査した。人工豆を用いた飼育試験において、 α A I - 2 を 1.0% 混入した人工豆では、ブラジルマメゾウムシの羽化、そしてアズキゾウムシの生存は、全く認められなかった。 α A I - 1 は、アズキゾウムシの生育を強く阻害したが、ブラジルマメゾウムシの生育は阻害しなかった。ブラジルマメゾウムシ抵抗性のインゲンマメ系統 OAr4 の種子は、 α A I - 2 を 0.4 ~ 0.5% (w/w) 濃度で含んでいる。 α A I - 2 をこの濃度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、 α A I - 2 は、単独で本抵抗性の主因を果たしているのではなく、アルセリン 4 などの他の要因とともに関与しているものと推察された。しかしながら、 α A I - 2 は α A I - 1 よりも、多くのマメゾウムシ類の生育を阻害し、また、哺乳類の α -アミラーゼ活性を阻害しないことから、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。

6. インゲンマメ系統 OAr4 から、抗体法により α A I - 2 をコードする c D N A をクローニングした。得られた α A I - 2 の c D N A 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。また、タンパク質構造の分析から、 α A I - 2 は、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のプロセッシングを受けて成熟化するものと考えられた。

塩基配列から推定した 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た。既に α A I - 1 については、内部切断のプロセッシングが、機能発現に重要であることが報告されている。 α A I - 1 の遺伝子を導入したマメ科作物の種子において、 α A I - 1 は、正常にプロセッシングされて阻害活性を示すことが報告されている。このため、 α A I - 1 と類似した構造を持つ α A I - 2 は、遺伝子組換え技術により、マメ科作物で合成させた場合も、正常に内部切断のプロセッシングを受けて阻害活性を発現するものと推察された。

7. α A I - 2 のアミノ酸配列は、 α A I - 1 に対して 75.8 % の高い相同性を示し、アルセリン 1、P H A - L 及び E に対しては 50.6 ~ 55.5 % の相同性を示した。これら 3 種類のタンパク質は、遺伝的に強連鎖関係にあり、インゲンマメのレクチン族 (phytohemagglutinin family) を形成している。レクチン族における密接な連鎖関係と構造の類似性は、これらの遺伝子が、共通の祖先遺伝子から、重複や乗換えなどで進化したため生じたと考えられた。また、レクチン族にみられる生育阻害性などの機能は、インゲンマメが哺乳類や昆虫、特にマメソウムシ類に対する防御機構を高めるために分化させたものと推察され

た。

8. α A I 変異のうち、 α A I - 3 は、 α A I - 1 と 2 の 2 つの α A I 活性を併せ持つため、有用な生育阻害物質であると考えられた。そこで、 α A I - 3 を示すインゲンマメの種子から、 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、 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。遺伝分析において、 α A I - 3 は、見かけ上、単一の優性遺伝を示したため、 α A I - 3 を構成する α A I - 3 a と α A I - 3 b の遺伝子は、強連鎖関係にあることが明らかになった。

9. α A I - 3 a と α A I - 3 b は、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、14,000 ~ 20,100 の分子量域に複数のバンドを与えた。 α A I - 3 a のバンドパターンは α A I - 1 に、 α A I - 3 b のバンドパターンは α A I - 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、 α A I - 3 a と α A I - 3 b 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 α A I - 1 または、 α A I - 2 とほぼ一致した。

α - アミラーゼ活性に対する阻害性を調査したところ、 α A I - 3 a は α A I - 1 と同様に、ブタすい臓の α - 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 α - アミラーゼ活性はほとんど阻害しなかった。また、 α A I - 3 b は α A I - 2 と同様に、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、ブタには全く阻害性を示さなかった。

このように、 $\alpha A I - 3 a$ は $\alpha A I - 1$ に、 $\alpha A I - 3 b$ は $\alpha A I - 2$ に、それぞれ類似した構造と機能を有する結果を得た。それ故、 $\alpha A I - 3 a$ が $\alpha A I - 1$ に、 $\alpha A I - 3 b$ が $\alpha A I - 2$ にそれぞれ類似した遺伝子によりコードされ、 $\alpha A I - 3$ の変異型は、これら2つの遺伝子の不均等乗換などで生じた可能性が推察された。また、 $\alpha A I$ 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。

以上、本研究により、インゲンマメ種子の $\alpha A I$ とアルセリンの変異について、遺伝様式と遺伝的關係及び、生化学的機能に新しい知見を得ることができた。調査した変異の中で、 $\alpha A I - 2$ 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属に対して生育阻害性を有し、また、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有用性が高いと考えられた。今後、遺伝子組換え技術や交配法により、 $\alpha A I - 2$ 遺伝子を受容性作物に導入して、新たな虫害抵抗性作物の開発が期待される。また、 $\alpha A I - 1$ と2の活性中心を解明することで、標的とする α -アミラーゼに合わせて $\alpha A I$ 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可能性が考えられる。