

氏名(本籍)	鈴 ^{すず} 木 ^き 一 ^{かず} 典 ^{のり} (茨城県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第1606号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	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
主査	筑波大学教授 農学博士 生井兵治
副査	筑波大学教授 農学博士 横尾政雄
副査	筑波大学助教授 農学博士 大澤良
副査	筑波大学教授 農学博士 鈴木隆久

論文の内容の要旨

各種マメ科作物は、特に熱帯、亜熱帯地域における重要なタンパク源である。アズキ、ササゲ、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る。これら害虫の防除方法は主にくん蒸処理であるが、安全性と経済性から作物の虫害抵抗性を利用することが期待されている。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出されている。しかし、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、ササゲでは既に抵抗性の崩壊も起こっている。したがって、次々と新たな抵抗性品種を育成し抵抗性の崩壊に対応するためには、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性を解明することが非常に重要となる。

インゲンマメの種子には、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 -アミラーゼ活性を阻害する α -アミラーゼインヒビター(α AI)とアルセリンが存在する。 α AIは8つの、アルセリンは6つの変異型に分類されるが、マメゾウムシ類への生育阻害性が調査された変異型は α AI-1dとアルセリン1および4のみであり、また、各変異型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、インゲンマメのマメゾウムシ類生育阻害物質、特に α AIとアルセリンの変異型について、遺伝様式と相互の遺伝的關係ならびに生化学的機能を解明し、虫害抵抗性の育種素材としての可能性を検討した。得られた研究成果の概要は、以下の通りである。

1. インゲンマメ種子の α AIは、ブタすい臓の α -アミラーゼ活性を阻害する α AI-1 (a,b,c,d)、インゲンマメを寄主とする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 AI-2および、これら2種類の α -アミラーゼ活性を阻害する α AI-3に分類される。本研究では、各 α AIの変異型が共優性の1遺伝子に支配されていることを明らかにした。
2. ブラジルマメゾウムシに抵抗性を示すインゲンマメ野生系統の種子は、栽培種に含まれないタンパク質、アルセリンを含み、アルセリン1, 2, 3および4がインゲンマメのレクチンであるPHA (phyto-hemagglutinin)と、また、 α AI-1がPHAと、それぞれ遺伝的に強連鎖していることが分かっている。本研究では、さらに進んで、 α AI, アルセリンおよびPHAが1連鎖群として遺伝することを解明した。
3. ブラジルマメゾウムシ抵抗性のインゲンマメ系統から精製した α AI-2は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で α AI-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、未変成状態の分子

量が α AI-1とほぼ同じ49,000であることから、ヘテロ4量体構造であると推定された。

4. 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に対しても弱い阻害性を示したが、哺乳類のブタすい臓の α -アミラーゼ活性は全く阻害しなかった。 α AI-1は、アズキゾウムシとブタの α -アミラーゼ活性を強く阻害するがブラジルマメゾウムシを阻害しないことから、 α AI-2と α AI-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。

5. 人口豆を用いた飼育試験の結果、 α AI-2は、ブラジルマメゾウムシとアズキゾウムシに生育阻害を示したが、 α AI-1はアズキゾウムシにのみ生育阻害を示した。

ブラジルマメゾウムシ抵抗性のインゲンマメ系統と同様に α AI-2を0.4～0.5%含む人口豆では、ブラジルマメゾウムシの生育阻害が軽微なことから、 α AI-2は本抵抗性の主因を単独で果たしているのではなく、アルセリンなど他の要因とともに関与しているものと推察した。しかし、 α AI-2は上記2種のマメゾウムシ類の生育阻害性を示すため、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。

6. α AI-2をコードするcDNAをクローニングしたところ、タンパク質翻訳領域が720bpからなり、240残基のアミノ酸配列をコードしていた。タンパク質構造の分析から、 α AI-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するものと考えられた。

7. α AI-2のアミノ酸配列は、 α AI-1に対して75.8%の高い相同性を、アルセリン1、PHA-LおよびEに対しては50.6～55.5%の相同性を示し、これらのレクチン族（phytohemagglutinin family）には密接な連鎖関係と構造の類似性が認められたことから、これらの各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、また、レクチン族の各タンパク質にみられる生育阻害活性などの機能はインゲンマメが哺乳類や昆虫、特にマメゾ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であると推察された。

8. α AIの変異のうち、 α AI-3は α AI-1と α AI-2の α -アミラーゼ活性阻害性を併せ持つため、有用な生育阻害物質であると期待された。しかし、 α AI-3の種子から α AIの阻害活性を示す2種類のタンパク質、 α AI-3aと3bが単離され、 α AI-3が単一タンパク質の分子種ではなかった。 α AI-3aと3bは単にそれぞれが α AI-2と同様な生化学的特性を有するだけであり、 α AI-3の有用性は否定された。したがって、 α AI-2だけが有用性の高いタンパク質であることが明確となった。

審査の結果の要旨

本研究は、インゲンマメのマメゾウムシ類生育阻害物質、特に α AIとアルセリンの変異型について、遺伝様式と相互の遺伝的關係ならびに生化学的機能を解明し、虫害抵抗性の育種素材としての可能性を検討したものであり、新規性が認められる。本研究の結果、インゲンマメのマメゾウムシ類生育阻害物質の中では、 α AI-2が最も有用性の高いタンパク質であることが明らかとなった。また、 α AI-2遺伝子を受容性作物に導入する道筋を確立したことで、新たな虫害抵抗性作物の開発が可能となった。さらに、 α AI-1と α AI-2の活性中心の解明により、標的とする害虫の α -アミラーゼに合わせて α AIを改変、設計できるようになり、新たな生育阻害物質の合成も期待できることから、本研究の成果は高く評価できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。