

氏名	ドロシー マチュンダ ギンビ Dorothy Machunda Gimbi
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	農博第 1375 号
学位授与の日付	平成 15 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Studies on Properties and Structure of α -Amylase from African Finger Millet (アフリカ産シコクビエの α -アミラーゼの構造と特性に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 北 嶋 直 文 教授 小 川 正 教授 伊 谷 樹 一

論 文 内 容 の 要 旨

シコクビエ (英名: Finger Millet, 学名: *Eleusine coracana* (L.) Gaertner) は禾本科植物であり, 世界最古の栽培植物の一つとされる。アフリカ, 南アジア, 東南アジア, 東アジアに跨る照葉樹林帯の代表的作物であり, サバンナ農耕文化の伝播を示す栽培指標作物として知られる。アフリカもしくはインドを原産地として, 現在でもこれらの地域に加え, 東南アジア, 中国など各地において広く栽培されている。日本においても30年ほど前までは焼畑農業の作物として栽培され, 儀礼食などにも欠かせない食材であった。シコクビエは耐乾燥性など環境への適応性が高く, 保存性にも優れ, 炭水化物食に依存する地域で不足しがちな微量栄養素などに富む重要な作物である。東アフリカにおいてシコクビエ種子は製粉して主食として用いられてきただけでなく, 古くよりその発芽種子粉末が伝統食品の製造に利用されてきた。近年では乳幼児や高齢者, 病人食としての利用も薦められている。また, 地酒は栄養食品としての機能のみならず, 地域社会に無くてはならない存在となっている。このようにシコクビエは非常に重要な作物であり, その発芽粉末に含まれるアミラーゼは伝統的食品加工の主要な酵素であるにもかかわらず, アミラーゼの特性や構造はほとんど明らかでない。

本論文では, はじめにシコクビエの発芽時における α -、並びに β -アミラーゼ活性の発現を検討している。発芽温度が高くなるにつれ, 最大活性を示すまでの生育期間は短くなり, 15℃では9日目, 20℃では6日目にもっとも高い値を示すことを明らかにした。一方, β -アミラーゼの場合も α -アミラーゼと同じように発芽温度が高くなるにつれ, 最大活性を示すまでの生育期間は短くなったが, 測定した範囲内で最も高い値を示したのは30℃, 5日目の値であった。発芽シコクビエ抽出液をポリアクリルアミド電気泳動に供し, アミラーゼの活性染色を行い, 発芽後3本の活性バンドが見出し, それらが生育期間に依存せず常にほぼ同じ割合で見出されることを示した。つぎに, シコクビエ粉体を様々な条件で保存したときの活性の変化を調べている。発芽シコクビエ種子粉体ならびに発芽シコクビエ種子を, 温度 (20℃, 30℃, 40℃) と湿度 (10%, 65%, 90%) の異なる条件下で保存し, 保存条件の α -アミラーゼ活性への影響を調べた。90%の湿度の場合, いずれの温度においても一ヶ月以内で著しい活性の低下が見られた。最も残存活性を示したのは20℃, 10%の条件下において保存した場合であった。とりわけ保存の温度条件が品質維持に重要であることが認められた。

続いて, RAPD法 (Random Amplified Polymorphic DNA) によるシコクビエの解析を行っている。東アフリカ, タンザニアにおいて栽培されているシコクビエの品種, 栽培種については不明な点が多い。そこでタンザニア各地において栽培されているシコクビエ種子を入手し, DNA多型解析法により, それらの相違を検討した。その結果, タンザニア西部のスンバワンガ地域のシコクビエと南部ムビンガ地域のシコクビエに共通性が高く, 西部スンバワンガ地域のシコクビエは中部モロゴロ地域, 東部ダルエスサラーム地域のシコクビエに共通性が認められた。北部キリマンジャロ地域のものは他のものとは異なることが明らかになった。また, 日本産のシコクビエはタンザニアのいずれのシコクビエとも異なることが示された。

発芽時には α -アミラーゼ活性が発現し, 3種類の α -アミラーゼアイソザイムの存在が電気泳動の活性染色法によって

示された。そこでこの α -アミラーゼの特性と構造を明らかにする目的で、精製を行った。最初のDEAEイオン交換クロマトグラフィーによって三つの活性ピークが現れた。それらはそれぞれ上記の活性染色法によって認められた各々のバンドに対応した。これらの酵素をAmyF1, AmyF2, AmyF3と命名した。いずれの精製酵素もSDS電気泳動においては一本のバンドを示した。これらの酵素の至適温度、温度安定性、ならびにpHに対する影響を検討している。精製酵素のN末端10残基のアミノ酸配列(QILFQGFNWE)を決定した。つぎに、発芽種子からmRNAを単離後、RT-PCRを行い、部分塩基配列を決定した。未知である3'末端側の配列は3'-RACEにより決定した。得られた塩基配列からシコクビエ α -アミラーゼは403アミノ酸残基からなると推定された。シコクビエと他の穀物由来の α -アミラーゼの多重配列比較をClustal Wを用いて行ったところ、イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシとの相同性はそれぞれ86%、72%、62%、71%と高い相同性を示した。

論文審査の結果の要旨

シコクビエ(英名:Finger Millet)はアジア、アフリカの代表的作物のひとつであり、サバンナ農耕文化の伝播を示す栽培指標作物として知られる。東アフリカにおいてシコクビエは製粉後、主食の原料として用いられてきたばかりではなく、古くよりその発芽種子粉末が伝統食品の製造に利用されてきた。特に、そのアミラーゼ活性を利用して得られる澱粉加水分解物を主成分とする独特の発芽種子飲料と、さらに酵母による発酵工程を経て得られる地酒がよく知られている。その発芽種子粉末に含まれるアミラーゼは、伝統的食品加工の主要な酵素であるにもかかわらず、その特性や構造に関してほとんど明らかにされていない。本論文はシコクビエの発芽時におけるアミラーゼ活性の発現の様相、並びにシコクビエ粉体を様々な条件で保存したときの活性の変動を調べている。その結果について、アミラーゼ活性の発芽種子の粉体の調整法、保存法を提示している。さらに α -アミラーゼの精製を行い、全長構造を明らかにし、その特徴を考察している。

- (1) シコクビエ種子の発芽に伴う α -及び β -アミラーゼの活性変動を測定し、ゲル電気泳動による活性染色法を用いて、3種のアイソザイムの存在を見出した。粗抽出液における α -アミラーゼの温度安定性を明らかにした。
 - (2) 発芽シコクビエ種子並びにその粉体の保存に伴う活性変動を調べ、低湿度条件下での保存が品質保存に好ましいことを明らかにした。
 - (3) タンザニア各地から入手したシコクビエのRAPD解析を行い、タンザニア西部と南部のシコクビエに共通性が高く、北部のものはそれらとは異なることを示した。
 - (4) 発芽シコクビエ種子粉末から α -アミラーゼを精製し、3種類のアイソザイムの存在を確認するとともに、精製酵素の特性を明らかにした。
 - (5) シコクビエ α -アミラーゼのクローニングを行い、全アミノ酸配列を決定し、その一次構造上の特徴を明らかにした。また得られたcDNAをサブクローニングした後、酵母に形質転換し、澱粉加水分解能を有する組換え α -アミラーゼを得た。
- 以上のように本論文はシコクビエ α -アミラーゼの特性について詳細な検討を行い、構造に関する多くの新知見をもたらしたもので、これらの成果は食環境学、食品分子機能学、熱帯作物学の分野に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年9月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。