

氏 名	もと やま たか やす 本 山 貴 康
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1550 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 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 農 学 専 攻
学位論文題目	Introduction of β -Conglycinin Genes into Rice to Confer High-physiological and Nutritional Functions (ダイズ β -コングリシニン遺伝子の導入による高い生理機能と栄養性をもつイネの作出)
論文調査委員	(主 査) 教 授 内 海 成 教 授 谷 坂 隆 俊 教 授 松 村 康 生

論 文 内 容 の 要 旨

ダイズ種子貯蔵タンパク質の主要成分の一つである β -コングリシニンは、多くの生理機能を示すことが報告されているが、イネ種子貯蔵タンパク質についてはそのような報告はない。また、 β -コングリシニンは、イネが制限アミノ酸としてリシンを多く含んでいる。したがって、 β -コングリシニンをイネに高度に集積させることにより、高い生理機能と栄養性をあわせもつイネを作出することができる。 β -コングリシニンは三量体タンパク質であり、 α 、 α' 、 β の3種を構成サブユニットとしている。このうち、 α' は多くの生理機能をもつが、 α はダイズの主要アレルゲンの一つであることが報告されている。そこで本論文では、 α' と β 遺伝子をイネに導入し、各サブユニットの単独および共発現系統を作出して、イネ種子中における α' と β の発現・集積挙動を解析するとともに、免疫賦活性を強化した変異型 β のイネ種子での集積と生理機能の評価を行った。その内容の主な点は以下の通りである。

1. イネの胚乳で特異的に発現するグルテリン遺伝子のプロモーターの下流に α' あるいは β 遺伝子を連結し、アグロバクテリウム法によりイネ種子由来のカルスに導入した。獲得した全ての形質転換系統の種子について、ドットプロット法により集積量を算出したところ、 α' は β と比較して約2倍の集積量を示した。しかし、これらの遺伝子の転写量や翻訳産物の安定性には差が認められなかった。 α' および β の多段階抽出による解析の結果、 α' の一部はイネの主要貯蔵タンパク質であるグルテリンとジスルフィド結合を形成して集積していることが示唆された。そこで、 α' の成熟型中に含まれる1個のシステインを欠損させた $\alpha'\Delta\text{cys}1$ 、および4個のシステインを含むプロ領域と成熟型中のシステインを欠損させた $\alpha'\Delta\text{cys}5$ のコード遺伝子をそれぞれ作成し、これら変異型 α' のイネ種子における集積量を調べた。その結果、 $\alpha'\Delta\text{cys}1$ は α' と、 $\alpha'\Delta\text{cys}5$ は β と同程度の集積量を示したことから、 α' のプロ領域は α' の高集積に大きな役割を果たしていることが示唆された。

α' および β のイネ種子における集積挙動を調べるために、免疫電子顕微鏡観察を行ったところ、 α' のプロ領域は α' の高密度集積に重要な役割を果たしていることが確認された。さらに、登熟種子の免疫電子顕微鏡観察を行ったところ、 α' 、 $\alpha'\Delta\text{cys}1$ および $\alpha'\Delta\text{cys}5$ は、ゴルジ体を通して液胞まで輸送されるが、 β の一部はこの経路のほか、小胞体からタンパク質貯蔵液胞(PSV)へ直接輸送される経路によって輸送される様子が観察された。この輸送経路は、 α' 、 $\alpha'\Delta\text{cys}1$ と $\alpha'\Delta\text{cys}5$ では観察されなかったことから、 β の低い溶解性などの物理化学的な要因がこの経路を誘導していると考えられた。

2. α' および β をそれぞれ単独発現するイネ系統間の交雑により得られた共発現系統の種子からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングを行ったところ、 α' の集積量は15%減少していたが、 β の集積量は60%増加していた。次に、多段階抽出を行ったところ、 β の一部がグルテリンと相互作用していることが示唆された。これは、 α' と β がヘテロ三量体を形成しているためであると推測された。そこで、還元剤を含まない緩衝液で抽出した後、還元剤を含む緩衝液で抽出したタンパク質をゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供したところ、 β のホモ三量体は検出されず、ヘテロ三量体のみが検出された。このことから、 β はヘテロ三量体を形成することにより、グルテリンと間接的に相互作用し、その結果 β の集積量が

増加したと考えられた。次に、登熟種子の免疫電子顕微鏡観察を行ったところ、 α' と β が共存している領域では電子密度に濃淡があり、PSVの外周部ほど電子密度が高く、また α' がより多く集積していた。このことから、 α' と β はPSV中で均一に集積するのではなく、 α' を多く含む三量体が細胞質側に集積し、 β を多く含む三量体がその内側に集積していることが示唆された。また、アミノ酸分析の結果、リシンのアミノ酸スコアの改善が確認された。

3. 好中球やマクロファージの貪食能を活性化するペプチド配列を β に導入した I122M/K124W の遺伝子をイネに導入したところ、I122M/K124W の最大集積量は β とほぼ同じであった。I122M/K124W は2ヶ所に変異をもつが、イネ種子中で β と同様に三量体を形成していた。次に、イネ種子から抽出、精製した I122M/K124W と β をそれぞれトリプシン消化した後、好中球が蛍光ビーズを取り込む活性を測定するファゴサイトーシスアッセイに供した。その結果、 β のトリプシン消化物は蛍光ビーズの取り込みに対して全く変化を与えなかったが、I122M/K124W のトリプシン消化物は蛍光ビーズの取り込みを高めることが確認された。つまり、免疫賦活活性を備えたイネを作出することに成功した。

論文審査の結果の要旨

ダイズの主要貯蔵タンパク質である β -コングリシニンは多くの生理機能を示すが、イネ種子貯蔵タンパク質が有効な生理機能を示すという報告はない。また、 β -コングリシニンはイネが制限アミノ酸としているリシンを多く含んでいる。したがって、 β -コングリシニンをイネに集積させることによって高い生理機能と栄養性をあわせもつイネを作出することができる。本論文では、ダイズ β -コングリシニンの α' と β サブユニットの遺伝子をイネに導入し、イネ種子中での α' と β の集積挙動を各サブユニットの単独および共発現系で解析するとともに、免疫賦活活性を強化した変異型 β のイネ種子での集積挙動と生理機能の解析を行っている。評価される主な点は以下の通りである。

1. ダイズ β -コングリシニンの α' と β の遺伝子をイネに導入し、各遺伝子の単独発現系統を作出している。イネにおける α' と β の集積量には差があり、 α' は β の約2倍集積すること、また α' のもつシステインを欠損させた変異型を発現させることによって、集積量の差は α' がイネの主要貯蔵タンパク質であるグルテリンとジスルフィド結合を形成して相互作用することによることを明らかにしている。さらに、 α' および変異型 α' はすべてゴルジ体を通る経路でPSVへ輸送されるが、 β はゴルジ体を通る経路のほか、小胞体からゴルジ体を経ずにPSVまで直接輸送される経路もとることを明らかにしている。

2. α' および β それぞれを単独発現する系統間の交雑により α' と β を共発現する系統を作出している。共発現することにより、 β の集積量が約60%増加することを確認している。この増加は、共発現による α' とのヘテロ三量体の形成を通して、 β がグルテリンと間接的に相互作用した結果であることを明らかにするとともに、 α' と β がPSVのマトリックス領域中で分離して集積することを確認している。また、リシンのアミノ酸スコアを改善することに成功している。

3. 好中球やマクロファージの貪食能を活性化するペプチド配列を β に導入した I122M/K124W をイネ種子で発現させている。I122M/K124W は2ヶ所に変異をもつが、イネ種子中で β と同様に三量体を形成し安定して集積することを明らかにしている。また、ファゴサイトーシスアッセイにより、イネ種子に集積した I122M/K124W は高い免疫賦活活性を示すことを確認している。

以上のように、本論文は、ダイズ β -コングリシニンの α' 、 β およびそれらの変異型遺伝子をイネ種子で発現させ、それらの翻訳産物の集積挙動を解析することによって、栄養性および生理機能性の優れたイネ種子を開発する基盤を確立するとともに、イネ種子におけるタンパク質の集積挙動の理解を深化させたものであり、品質設計開発学、育種工学、植物生理学などに寄与するところが大きい。

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18年2月16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。