



マメ科植物発芽種子中の α - , 及び β -アミラーゼ の量的変動と電気泳動的特性

河野, 昭子

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1992-04-24

(Date of Publication)

2009-05-18

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1645

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3090180>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001645>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	こう の あき こ 河 野 昭 子 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(農学)
学位記番号	博ろ第20号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成4年4月24日
学位論文題目	マメ科植物発芽種子中の α -、及び β -アミラーゼの量的変動と電気泳動的特性

審査委員	主査 教授 新家 龍
	教授 山口 禎 教授 王子善清

論文内容の要旨

- 1) 植物由来のアミラーゼ活性測定法の検討を行った結果、 β -アミラーゼは基質に、p-nitrophenyl- α -maltopentaoside および hexaoside を用いる Pantrac 法、 α -アミラーゼは基質に不溶性色素デンプンを用いる Phadebas 法が簡便な方法であることが判明した。特に、Phadebas 法は α -アミラーゼ活性の検出に高い特異性を示した。
- 2) 本測定法を用いて、各種植物発芽種子中のアミラーゼ活性変動を測定した。活性変動の様式は、従来から定説とされているもの(発芽過程で α -アミラーゼ活性が増大し、 β -アミラーゼ活性は乾燥種子中に含まれる。)とは一致しない例が見いだされた。
- 3) アンホラインゲルを用いる等電点電気泳動後に、ゲル中の α -アミラーゼを β -リミットデキストリンと反応させヨウ素ヨウ化カリウムで活性染色することにより、粗酵素液中の α -アミラーゼが検出された。イモビラインゲルを用いる等電点電気泳動後に、ゲル中の β -アミラーゼを可溶性デンプンと反応させ活性染色することにより、粗酵素液中の等電点の近接した β -アミラーゼアイソホームが分離された。
- 4) 活性測定および電気泳動像より、マメ科植物アルファルファの乾燥種子中に既に α -アミラーゼが含まれ、発芽につれて量が減少してゆくのに反して、 β -アミラーゼ量は、発芽過程で倍加されるという特殊例が示され、さらに、5) アルファルファ種子中の α -アミラーゼ(pI4.92)、及び β -アミラーゼの5個のアイソホーム(pI4.77, 4.82, 4.85, 4.98, 5.05)を生化学的方法でそれぞれ均一状態に精製し、これらの酵素の同定を行い、その結果、アルファルファ発芽種子で得られた4)の結果が証明された。そこで、6) この方法(活性測定法と電気泳動法)を用いて、クローバー、ダイ

ズ、アズキの発芽中の α -、及び β -アミラーゼ活性の変動を検討した結果、アルファルファと同じ連“Trifolieae”に属するクローバー発芽種子は、アルファルファ発芽種子と同様のアミラーゼ変動様式(α -アミラーゼの減少と β -アミラーゼの増大)を示した。ダイズは、乾燥種子中に大量に存在する β -アミラーゼが減少し、 α -アミラーゼ活性が増加した。一方、アズキ種子は発芽過程で、 α -アミラーゼ活性は急増するが、 β -アミラーゼ活性は変化しない事が示唆された。

7) アルファルファ、クローバー、ダイズ、アズキ、リョクトウ、エンドウなどマメ科植物の α -アミラーゼ分子は、イモビラインゲルで等電点電気泳動を行った場合、ゲル中を正常に泳動せず、かつ失活し、活性染色不能という共通性を有していた。

8) かかる電気泳動的特性は、マメ科植物以外の α -アミラーゼには認められず、そこで、9) この特性故に、マメ科植物の α -アミラーゼ、及び β -アミラーゼの各個同定が容易になった。

10) この特性は、リョクトウ、アルファルファの精製 α -アミラーゼでも認められ、マメ科の α -アミラーゼ分子の遺伝子のPCR増幅断片を調製し、大腸菌クローンを得、その塩基配列を決定し、同じマメ科植物のケツルアズキの α -アミラーゼやコメ、オオムギ、コムギなどの α -アミラーゼのアミノ酸配列と比較検討した結果、マメ科植物エンドウ、ケツルアズキの α -アミラーゼ分子中の固有的な親水領域の存在を見出した。その部位の配列はコメではMIGWLPで、オオムギではMIGWVPと疎水性アミノ酸であるトリプトファン(W)残基が存在していたが、ケツルアズキではMIGVKP、エンドウではLIGIKPとそれぞれ、親水性アミノ酸であるリジン残基(K)に置換していた。

学位論文において、第I章には『植物の α -、及び β -アミラーゼ活性測定法』について、第II章には『アルファルファ発芽種子中のデンプン分解系酵素』について、第III章では『クローバー、アズキ、ダイズ種子発芽中における α -、及び β -アミラーゼ活性変動』について、第IV章では『マメ科植物 α -アミラーゼの電気泳動的特性』について、第V章では『マメ科植物 α -アミラーゼ分子中の固有的親水領域の存在とアミノ酸配列』について記述した。なお学位論文は、主として、『論文目録』に記載した5報の報文内容より成る。

論文審査の結果の要旨

α -アミラーゼは、貯蔵性多糖である澱粉の α -1,4結合を切断するエンド型の酵素で、 β -アミラーゼは、非還元性末端よりマルトース単位で切断するエキソ型酵素である。これらのアミラーゼは、動物や微生物にも分布し、農学的見地から有用な酵素である。両酵素は、古くから研究されているにもかかわらず、共存下の個々の活性測定法には検討の余地があり、また、種々の植物性食品中や植物発芽種子中における両酵素の存在様式、植物種間における分子特性等にも不明の点が多い。そこで、本論文は、これらの点を解明しようとしたものである。

第1章では、植物の α -、及び β -アミラーゼ活性測定法の検討を行った結果、 β -アミラーゼは、基質に、p-nitrophenyl- α -maltopentaoside 及び hexaoside を用いる Pantrac 法、 α -アミラー

ゼは基質に不溶性色素澱粉を用いる Phadebas 法が簡便な方法であることを示している。特に、Phadebas 法が、 α -アミラーゼ活性の検出に高い特異性を示すことを指摘した。次に、本活性測定法を、各種植物発芽種子中のアミラーゼ活性変動の解析に適用し、従来から定説とされている変動様式（発芽種子中では α -アミラーゼ活性が増大し、 β -アミラーゼ活性は乾燥種子中に含まれる）とは一致しない例（アルファルファ発芽種子）を見いだしている。

第II章では、アルファルファ発芽種子中の α -、及び β -アミラーゼに関して得られた知見を述べている。すなわち、アンホラインゲルを用いる等電点電気泳動後に、ゲル中の α -アミラーゼを β -リミットデキストリンと反応させ、ヨウ素ヨウ化カリウムで活性染色することにより、粗酵素液中の α -アミラーゼが検出することができた。また、イモビラインゲルを用いる等電点電気泳動後に、ゲル中の β -アミラーゼを可溶性澱粉と反応させて活性染色することにより、粗酵素液中の等電点の近接した β -アミラーゼアイソフォームを分離することができた。一方、活性測定及び電気泳動像より、マメ科植物アルファルファの乾燥種子中に既に α -アミラーゼが含まれ、発芽の進行につれてその量が減少し、逆に、 β -アミラーゼ量は発芽種子中で倍加されるということを明らかにした。さらに、アルファルファ種子中の α -アミラーゼ (pI4.92)、及び β -アミラーゼの5個のアイソホーム (pI 4.77, 4.82, 4.85, 4.98, 5.05) をそれぞれ均一状態に精製後、同定し、アルファルファ発芽種子中における両アミラーゼの存在様式を明らかにしている。

第III章では、クローバー、アズキ、ダイズ発芽種子中における α -、及び β -アミラーゼ活性の変動について述べている。アルファルファと同じ連 (Trifolieae) に属するクローバー発芽種子は、アルファルファ発芽種子と同様のアミラーゼ変動様式を示すことを明らかにした。反対に、ダイズでは乾燥種子中に大量に存在する β -アミラーゼが減少し、 α -アミラーゼ活性が増加することを示した。さらに、アズキ種子は発芽種子中では α -アミラーゼ活性は急増するが、 β -アミラーゼ活性は変化しないことを示している。

第IV章では、マメ科植物の α -アミラーゼの電気泳動的特性について検討し、アルファルファ、クローバ、ダイズ、リョクトウ、エンドウなどマメ科植物の α -アミラーゼ分子は、イモビラインゲルで等電点電気泳動を行なった場合、ゲル中を正常に泳動せず、かつ失活し、活性染色不能という共通性を有することを明らかにした。このような電気泳動的特性は、マメ科植物以外の α -アミラーゼには認められず、この特性故に、マメ科植物種子の α -アミラーゼ及び β -アミラーゼの各個同定が容易になったことを示した。また、この特性は、リョクトウ、アルファルファの精製 α -アミラーゼでもみとめられ、マメ科植物の α -アミラーゼ分子の生化学的特性に起因する可能性を示唆した。

第V章では、マメ科植物種子 α -アミラーゼ分子中の固有的な親水領域の存在とアミノ酸配列を示している。エンドウの α -アミラーゼ遺伝子のPCR増幅断片を調製し、大腸菌クローンを得、その塩基配列を決定し、同じマメ科植物のケツルアズキの α -アミラーゼやイネ、オオムギ、コムギなどの α -アミラーゼのアミノ酸配列と比較検討した結果、マメ科植物エンドウ、ケツルアズキの α -アミラーゼ分子中の固有的な親水領域の存在を見いだしている。その部位の配列は、イネでは MIGWLP で、オオムギでは MIGWWP と疎水性アミノ酸であるトリプトファン (W) 残基が存在していた

が、ケツルアズキでは、MIGVKP、エンドウでは LIGIKP とそれぞれ、親水性アミノ酸であるリジン残基（K）に置換していることなどを発見している。

本研究において、植物発芽種子中の α -、及び β -アミラーゼの存在様式の解析方法を確立し、それを適応して従来の定説とは逆の活性変動様式を示す植物種子の発見、さらに、マメ科植物種子 α -アミラーゼに共通する電気泳動的特性の発見や一次構造特徴などが明らかにされており、これらのことは、農学的に意義のある植物酵素に関する研究分野での新知見である。

よって、本審査委員会は、学位申請者河野昭子が博士（農学）の学位を得る資格があると認める。