

## 学 位 論 文 要 旨

氏名: カーン・ナダル

題目: Study on Variation of Seed Storage Protein Glutelin in Wild Rice Species  
(野生イネにおける種子貯蔵タンパク質グルテリンの多様性に関する研究)

イネ種子(コメ)は全世界の約半数以上の人々が主食とする重要な食糧であり、特にアジアの発展途上国においては貴重なタンパク源でもある。しかしながら、必須アミノ酸であるリジンが不足しており、栄養性が劣っている。また、全タンパク質の80%を占める主要貯蔵タンパク質グルテリンには、栄養性と並び重要な食品機能である食品加工特性や生理機能性は見出されていない。本研究は、食品機能の優れたイネ遺伝資源を見出し栽培イネに導入することでその品質改善を図ることを目的とし、野生イネ種子におけるグルテリンの多様性を、独自に開発した高温 SDS-PAGE 法とサブユニット特異的抗体を用いて明らかにしたものである。

### 高温 SDS-PAGE 法とサブユニット特異的抗体による多様性評価

多重遺伝子族を構成するグルテリンのサブユニットを効果的に分離して識別するために、高温 SDS-PAGE 法とサブユニット特異的抗体を開発した。高温 SDS-PAGE 法とは、室温または低温で電気泳動することが常識であった SDS-PAGE を 45℃の比較的高温で行うものである。これにより、グルテリン $\alpha$ 鎖のバンドを互いに良く分離できることを示した。一方、*O. sativa* のグルテリン $\alpha$ 鎖にある4つの可変領域から、アミノ酸配列の保存性の低い5つのサイトを選び出し、計7種の抗ペプチド抗体を調製した。幾つかのグルテリンサブユニット欠失突然変異体を用いて抗体の反応特異性の高さを確認した上で、高温 SDS-PAGE 法と組み合わせて、グルテリンの多様性を評価した。13種の野生イネと2種の栽培イネ(*O. sativa*と*O. glaberrima*)を調べたところ、グルテリンのアミノ酸配列ならびに蓄積量において著しい変異があることが明らかとなった。また、変異の程度は、可変領域間ならびにサブユニット間で異なっていた。栄養性の優れたBタイプグルテリンを多く蓄積する野生種を見出すとともに、抗体との反応性の低い未知のグルテリンを有する野生種があることを明らかにした。

### 二次元電気泳動法と逐次検出法によるサブユニットの同定と定量

野生イネ種子グルテリンの個々のサブユニット蓄積量を詳細に明らかにするために、非平衡 pH 勾配ゲル電気泳動法と高温 SDS-PAGE 法から成る二次元電気泳動法(2D-PAGE)でグルテリンサブユニットを分離した。また、複数のサブユニット特異的抗体を同一の転写膜に連続的に免疫反応させる逐次検出法を考案し、以上の手法を組み合わせるグルテリンサブユニットの同定・定量をおこなった。*O. sativa*と同じAAゲノムを有する野生イネおよび*O. glaberrima*においては、グルテリンの2D-PAGEパターンは互いに良く似ていたものの、個々のサブユニットの蓄積量には著しい変異があった。栄養性の優れたBタイプグルテリンを構成する主要なサブユニットの種類ごとに、あるいは抗体との反応性の低いタンパク質スポットについて蓄積量を定量することで、野生イネおよび*O. glaberrima*の特徴を明らかにした。非AAゲノムを有する野生イネにおいては、グルテリンの2D-PAGEパターンは互いに大きく異なり、個々のサブユニットの蓄積量にも著しい変異があった。サブユニットの同定・定量化により、Bタイプグルテリンあるいは未知のグルテリンを多く有する系統を見出した。

以上のように、本論文は、高温 SDS-PAGE 法とサブユニット特異的抗体という独自の実験系を構築し利用することで、野生イネ種子におけるグルテリンの多様性を初めて詳細に明らかにしたものである。得られた成果は、栽培イネの食品機能改善を図る上で有用であると考えられる。