

学 位 論 文 題 名

Physiological and enzymological studies on
sucrose : sucrose 1F fructosyltransferase (SST) in
the tubers of *Helianthus tuberosus* L.

（キクイモにおけるスクロース：スクロース1F
フルクトシルトランスフェラーゼ（SST）の生理学的及び酵素学的研究）

学位論文内容の要旨

フルクタン生合成代謝の鍵酵素である、スクロース：スクロース 1F
フルクトシルトランスフェラーゼ（以下SSTと略す）の活性変動をキクイモ
（*Helianthus tuberosus* L. 野生種及び品種都城）の生育期、開花期、結実期及
び枯草期について季節学的、酵素学的に検討した。フルクタン代謝においてSST
は2分子のスクロースよりイソkestースを合成する酵素であり、2分子のイソ
kestースはフルクタン：フルクタン フルクトシルトランスフェラーゼ
（FFT）によりニストースを合成する。このようにしてフルクタンの長鎖、例
えばイヌリンが合成される。またイソkestースはオリゴ糖甘味料として栄養
的に重要な資源である。

キクイモの花芽形成初期には塊茎中のSSTの活性及び塊茎の肥大は一時的に抑
えられるが、塊茎形成の初期、即ち開花期にはSST活性は最大であった。塊茎の
生育肥大は開花後期には最大に到達し、その後SST活性は急激に低下し、休眠塊
茎のSST活性は認められなかった。

また、休眠中のキクイモ塊茎組織を無菌組織培養し、SSTの活性誘導を試みた。
培養組織を0.3Mスクロース中で培養すると、SSTの活性が増加し60時間後最大
に到達するが、0.3Mマニトールで培養した組織ではSSTの活性誘導は認められ
なかった。

これらの結果はキクイモにおけるSSTの活性をフルクタン代謝活性として表わ
すならばフルクタン代謝は塊茎発育と著しい関連を持つことになる。

キクイモの開花初期における塊茎中のSSTの活性が最も高いことからこの期の
塊茎を用いてSSTの抽出精製純化を試みた。精製は粗抽出液の硫酸塩析、ゲルろ

過、疎水逆相カラム、高速液体クロマトグラフィ及び二次元電気泳動法を用いた。高速液体クロマトグラフィによる溶出液のSSTの K_m は127 mMで、比活性は97.4 nKat/mg Proteinであった。

等電点電気泳動法によるSSTの分離ではpIは5.0でその分子量は65,000であった。二次元電気泳動によるSDS-PAGEでの分子量は46,700と21,300の二つのペプチドに分かれた。このことはSST酵素蛋白質が二本のヘテロダイマーから成り立つことを示唆している。

また、46.7 kDaペプチドのN-末端アミノ酸配列はジャガイモ及びトマトの70 kDaのインベルターゼと61%の相同性を示した。一方、21.3 kDaペプチドのN-末端はトウモロコシのインベルターゼ（55%相同性）及び63 kDaのニンジンのインベルターゼ（51%相同性）と類似性が高く、トマト及びジャガイモのインベルターゼとの類似性の低いことを明らかとした。46.7 kDaペプチドはトマト及びジャガイモのインベルターゼのN-末端アミノ酸配列と、また21.3 kDaのペプチドはトウモロコシ、ニンジンのインベルターゼのC末端近傍のアミノ酸配列と類似しており、一本のペプチドからヘテロダイマーが生成することを示唆した。また、無変性二次元電気泳動によるウエスタンブロッティングでは、46.7 kDa及び21.3 kDaに対する抗体は一箇所反応した。さらに等電点電気泳動とSDSによる二次元電気泳動後のSSTとの抗体反応では46.7 kDa及び21.3 kDaにのみ免疫反応が認められたが、抽出液に直接SDSを加えて変性した蛋白質溶液のSDSPAGEによるウエスタンブロッティングの免疫学的検出によって70 kDa、46.7 kDa及び21.3 kDaに免疫反応が認められ、モノマーのSSTペプチドの存在が確認された。

これらの実験結果から70 kDaの不活性型のモノマーSSTが生成し、これが2本のヘテロダイマーに分かれ再構築されて活性型SSTを形成すると結論できる。

スクロースを加水分解する酵素インベルターゼはすべての植物に分布しているが、フルクタンを貯蔵する植物には分類学的にキク目、キキョウ目、イネ科及びユリ目など特異的に限られた種類が含まれており、両者のアミノ酸配列の類似性は興味ある結果である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜久田 嘉 郎

副 査 教 授 生 越 明

副 査 教 授 上 田 一 郎

学 位 論 文 題 名

Physiological and enzymological studies on
sucrose : sucrose 1F fructosyltransferase (SST) in
the tubers of *Helianthus tuberosus* L.

(キクイモにおけるスクロース：スクロース1F
フルクトシルトランスフェラーゼ (SST) の生理学的及び酵素学的研究)

本論文は、図24、表7、引用文献81編、総ページ数96頁からなり、4章をもって構成される。その他7編の参考論文を添えている。

フルクタン生合成代謝の鍵酵素である、スクロース：スクロース 1F
フルクトシルトランスフェラーゼ (以下SSTと略す) の活性変動をキクイモ
(*Helianthus tuberosus* L. 野生種及び品種都城) の生育期、開花期、結実期及
び枯草期について季節学的、酵素学的に検討した。フルクタン代謝においてSST
は2分子のスクロースよりイソkestースを合成する酵素であり、2分子のイソ
kestースはフルクタン：フルクタン フルクトシルトランスフェラーゼ
(FFT) によりニストースを合成する。このようにしてフルクタンの長鎖、例
えばイヌリンが合成される。またイソkestースはオリゴ糖甘味料として栄養
的に重要な資源である。

キクイモの花芽形成初期には塊茎中のSSTの活性及び塊茎の肥大は一時的に抑
えられるが、塊茎形成の初期、即ち開花期にはSST活性は最大であった。塊茎の
生育肥大は開花後期には最大に到達し、その後SST活性は急激に低下し、休眠塊
茎のSST活性は認められなかった。

また、休眠中のキクイモ塊茎組織を無菌組織培養し、SSTの活性誘導を試みた。
培養組織を0.3Mスクロース中で培養すると、SSTの活性が増加し60時間後最大
に到達するが、0.3Mマニトールで培養した組織ではSSTの活性誘導は認められ
なかった。

これらの結果はキクイモにおけるSSTの活性をフルクタン代謝活性として表わすならばフルクタン代謝は塊茎発育と著しい関連を持つことになる。

キクイモの開花初期における塊茎中のSSTの活性が最も高いことからこの期の塊茎を用いてSSTの抽出精製純化を試みた。精製は粗抽出液の硫酸塩析、ゲルろ過、疎水逆相カラム、高速液体クロマトグラフィ及び二次元電気泳動法を用いた。高速液体クロマトグラフィによる溶出液のSSTの K_m は127 mMで、比活性は97.4 nKat/mg Proteinであった。

等電点電気泳動法によるSSTの分離ではpIは5.0でその分子量は65,000であった。二次元電気泳動によるSDS-PAGEでの分子量は46,700と21,300の二つのペプチドに分かれた。このことはSST酵素蛋白質が二本のヘテロダイマーから成り立つことを示唆している。

また、46.7 kDaペプチドのN-末端アミノ酸配列はジャガイモ及びトマトの70 kDaのインベルターゼと61%の相同性を示した。一方、21.3 kDaペプチドのN-末端はトウモロコシのインベルターゼ（55%相同性）及び63 kDaのニンジンのインベルターゼ（51%相同性）と類似性が高く、トマト及びジャガイモのインベルターゼとの類似性の低いことを明らかとした。46.7 kDaペプチドはトマト及びジャガイモのインベルターゼのN-末端アミノ酸配列と、また21.3 kDaのペプチドはトウモロコシ、ニンジンのインベルターゼのC末端近傍のアミノ酸配列と類似しており、一本のペプチドからヘテロダイマーが生成することを示唆した。

これらの実験結果から70 kDaの不活性型のモノマーSSTが生成し、これが2本のヘテロダイマーに分かれ再構築されて活性型SSTを形成すると結論できる。

スクロースを加水分解する酵素インベルターゼはすべての植物に分布しているが、フルクタンを貯蔵する植物には分類学的にキク目、キキョウ目、イネ科及びユリ目など特異的に限られた種類が含まれており、両者のアミノ酸配列の類似性は興味ある結果である。

よって、審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者伊勢島エリザ美智子は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。