

Glycine 属植物の種分化に関する
遺伝育種学的研究

中 村 郁 郎

報告番号	甲第 1767 号
------	-----------

Glycine 属植物の種分化に関する
遺伝育種学的研究

名古屋大学図書	
和	949353

中 村 郁 郎

目 次

第 I 章 緒論	— 1
第 II 章 本論文の構成および <u>Glycine</u> 属植物の分類に関する 既往の研究	— 5
第 1 節 本論文の構成	— 5
第 2 節 既往の研究と問題の所在	— 9
第 3 節 供試材料について	— 13
第 III 章 <u>Glycine</u> 属植物の Kunitz Trypsin Inhibitor(KTI)様 タンパク質の比較研究	— 16
第 1 節 <u>Glycine</u> 属植物の K T I 様タンパク質の同定および 電気泳動的特性	— 18
1) 材料および方法	— 19
2) 結果	— 27
1. <u>Glycine</u> 属植物の K T I 様タンパク質 の同定	— 27
2. <u>Glycine</u> 属植物の K T I 様タンパク質 の電気泳動的な特性	— 32
3) 考察	— 37
第 2 節 <u>Glycine</u> 亜属各種の K T I 様タンパク質 (K T I L P) の電気泳動的特性の比較	— 42
1) 材料および方法	— 43

2) 結果	— 46
1. K T I L P の易動度 (Rf 値) の比較	— 46
2. K T I L P の S / F 量比の比較	— 49
3. K T I L P の分子量の比較	— 49
3) 考察	— 56
第3節 <u>Soja</u> 亜属植物の K T I 様タンパク質の比較	— 63
1) 材料および方法	— 65
2) 結果および考察	— 68
第IV章 種子に含まれる貯蔵タンパク質の比較研究	— 74
第1節 種子貯蔵タンパク質の SDS- ゲル電気泳動法による比較	— 77
1) 材料および方法	— 79
2) 結果	
<u>Glycine</u> 属およびインゲンマメ族6属の種子貯蔵	
タンパク質の比較	— 82
3) 考察	— 91
第2節 <u>Glycine</u> 属植物の種子貯蔵タンパク質のポリペプチド・	
マップの比較	— 94
1) 材料および方法	— 96
2) 結果	— 99
1. ポリペプチド・マップに認められたスポット・	
パターンの変異	— 99
2. ポリペプチド・マップの亜属間・種間差異	— 102
3) 考察	— 118

1. <u>Glycine</u> 属植物の類縁関係について	-118
2. <u>Soja</u> 亜属の起源について	-122
第V章 種子に含まれる酵素の比較研究	--124
第1節 ダイズ β -アミラーゼの3種の電気泳動特性の比較	-127
1) 材料および方法	-129
2) 結果および考察	-135
1. 実験条件の検討	-135
2. ダイズの β -アミラーゼの3種の特性間の 関係	-139
第2節 <u>Glycine</u> 属植物の種子アミラーゼおよびパーオキシ ダーゼの SDS-電気泳動法による比較	-145
1) 材料および方法	-147
2) 結果	-151
1. アミラーゼおよびパーオキシダーゼの SDS- ゲル電気泳動法において認められた変異	-151
2. 統計学的手法による類縁関係の推定	-157
3) 考察	-167
1. <u>Glycine</u> 属植物の類縁関係について	-167
2. SDS-電気泳動法による酵素分析法の系統 分類における有効性について	-171
第VI章 総合考察	--174
第1節 <u>Glycine</u> 属植物の類縁関係と種分化	-174

第2節	ダイズ (<u>Soja</u> 亜属) の起源	-188
第3節	種子貯蔵タンパク質の分子進化とその育種学的意義	-198
第4節	<u>Glycine</u> 属野生種の遺伝子源としての有効性	-205
第VII章	英文摘要	--208
	引用文献	-214

第 I 章

緒 論

最近、医療の進歩にともない世界人口が急激な増加を見せている。一方、アフリカ、東南アジアおよび南アメリカなどでは焼き畑農業およびパルプ材の伐採による森林の破壊のために、また、アメリカ、オーストラリアなどでは化学肥料の過施用のために農耕地の破壊や砂漠化が急速に進行している。このような状況の中でかねてから食糧危機の到来が心配されて来たが、この状況は一向に改善されておらずむしろ悪化の一途をたどっている。現在のアフリカの食糧不足は目をおおうばかりであるが、なかでもタンパク質栄養失調症 (Kwashiorkor, Marasmus) が種々の病気の引き金となっている。また、先進国においては動物性タンパク質の取り過ぎがいろいろな成人病の原因とされ、植物性タンパク質の見直しが叫ばれている。

このような局面を迎えて、植物性タンパク質の遺伝的改良に関する諸研究が展開されてきたが、とりわけ Hertz et al. (1964) がトウモロコシの高リジン突然変異系統 (Opaque-2) を発見して種子タンパク質のアミノ酸バ

ランスを遺伝学的に変更できることを示して以来、おもに禾穀類でこのような研究が進められた。しかし、マメ科作物においてはほとんど研究が行なわれていない。

マメ科植物には、イネ科と並んで重要な食用作物が含まれているが、なかでもダイズは、作物の中では単位面積当たり最も高いタンパク質生産量を示し、アミノ酸のバランスにおいても最も優れている作物であるので、今後、植物性タンパク質供給源として重要性の高い作物である。そして、ダイズなどの植物性タンパク質は、動物性タンパク質に較べて、単位面積当たりの生産量、生産費、生産効率などにおいて数倍優れている。海妻(1975)は、このような状況を踏まえ、ダイズのタンパク質育種に関する理論的基礎研究を行なった。そのなかで、海妻は、含硫アミノ酸(Cys, Met)含量の向上およびタンパク質含量の増大が必要であることを指摘した。また、ダイズは油料作物としても最も重要な地位を占めており、食用の植物油の70 - 90%をまかなっている。この他、加工目的に応じた成分の改良が指摘され、もちろん収量性の向上(洪・小島 1972)も望まれている。こうした多様な要求に答えるためには、Glycine 属においてダイ

ズ (G. max (L.) Merrill) およびその祖先型野生種である
ツルマメ (G. soja Sieb. & Zucc.) の 2 種がどのような種
分化を経て成立したのかを解明することが基礎研究とし
て必須であり、ダイズの近縁野生種の類縁関係を明らか
にして遺伝子源として確保して行くべきであると思われ
る。本研究は、ダイズ種子の成分育種を進めるための基
礎的知見を得ることも目標のひとつとしている。そこで、
種子成分に関する成分分類学の立場から Glycine 属各
種の類縁関係および種分化のプロセスを解明しようとし
た。とりわけ、Soja 亜属と他の 2 亜属との相互類縁関
係を明らかにして、Soja 亜属 (ダイズ) の起源につい
て考察を試みた。本研究で得られた知見はダイズ育種の
基礎となると確信するものであり、ここに概略を報告し、
各位の御批判をあおぐ次第である。

本研究は、岩手大学農学部遺伝育種学研究室の農学博
士海妻矩彦教授の御指導のもとに始められたものである。
同博士からは、研究の遂行上終始変わらぬ御鞭達を頂い
た。また、同研究室の農学博士喜多村啓介助教授には数
々の御助言を頂いた。さらに、名古屋大学農学部栽培原
論および育種学研究室の農学博士蓬原雄三教授には本論

文の完成に至るまで貴重な御助言を頂いたばかりではなく、校閲の労をわずらわした。同学部生化学制御研究施設の農学博士平井篤志助教授、同学部栽培原論および育種学研究室の農学博士武岡洋二助教授、服部一三助手、農学博士和田富吉助手および職員、学生には、温かい励ましと御援助を賜わった。これらの方々に対して、心より感謝の意を表する次第である。

第 II 章 本論文の構成および Glycine 属植物の 分類に関する既往の研究

第 1 節 本論文の構成

本論文は、以下に述べるような内容に分けて記述した。まず、本章の第 2 節において Glycine 属植物の分類に関するこれまでの研究を整理し、Glycine 属の分類について問題の所在を明らかにした。また、第 3 節では、本論文で取り扱う供試材料について全体的な説明を加えた。次いで、第 III 章から第 V 章にわたり本論文の主要な研究内容である Glycine 属植物の種子タンパク質に関する比較研究について記述した。まず、第 III 章では、Glycine 属植物の Kunitz Trypsin Inhibitor(KTI)様タンパク質の比較研究を行なった。その第 1 節において、ダイズ種子に含まれる K T I と相同なタンパク質を Glycine 属のいくつかの種において同定し、それらの電気泳動的に認められる特徴を明らかにした。第 II 節では、第 I 節で明らかにされた K T I 様タンパク質の 3 つの特性を比較して Glycine 亜属種間の類縁関係を解明しようとした。

第3節では、ツルマメ (G. soja) からダイズへの進化経路が、1つまたは複数のいずれであるのか推定するために若干の実験を行なった。つづく第IV章では、第III章のようにたったひとつの成分を比較するという方法のみを選択すると全体的な類縁性を見失う恐れがあると考えられるので、一度に多くのタンパク質分子種を比較することを目的として全貯蔵タンパク質を SDS-電気泳動法および2次元電気泳動法により分析した。その第1節では、供試材料をインゲンマメ族 (tribe Phaseoleae) に広げ、ダイズ (Glycine 属) の種子貯蔵タンパク質にはどのような特徴があるのか明らかにしようとした。本節を設けた理由の1つは、ダイズの起源を考える上で供試材料を Glycine 属に限定して良いのかどうか確認するためである。第1節の結果をうけて第2節では、Glycine 属各種の種子タンパク質を詳細に比較した。その結果、特に、コングリシニン (β -conglycinin) 様成分が Glycine 属植物の類縁関係を検討するために注目すべき成分であることがわかった。また、本節において本論文の重要な成果の1つであるダイズの起源に関する仮説を提出する発端となる結果を得た。第V章では、種子に含まれる酵

素の比較研究を行なった。まず、第1節においてダイズ種子に含まれる β -アミラーゼの3種の電気泳動法における特性の間の関連を調べた。この実験により、酵素の電荷 (charge)を比較するアイソザイム分析よりは、酵素の分子量 (size)を比較する方がより Glycine 属の類縁関係を調べるために適していると思われたので、つづく第2節では、SDS-電気泳動法により Glycine 属各種の β -アミラーゼおよびパーオキシダーゼの比較を行なった。本節で得られた実験結果は、第III章および第IV章の内容を指示するものであった。

最後の第VI章では、以上の三つの章における知見を総合し、Glycine 属植物の種分化について考察を行なった。そして、その中でも特に注目されるダイズ (Soja 亜属)の起源については新たに節を設けて考察した。また、第3節として、本論文でおもに検討した種子貯蔵タンパク質の比較研究の結論として導き出される貯蔵タンパク質それ自体の種分化についておよび得られた知見がタンパク質の成分育種においてどのような意義を持つのかについて考察した。さらに、第IV節として、ダイズをさらに改良するために、Glycine 属野生種が果たし得る役割に

ついて論究した。

第 2 節

既往の研究と問題の所在

はじめに、Glycine 属の類縁関係について既往の研究を整理し、その後、分類における問題点を明らかにする。

現行の Glycine 属植物の分類は、HERMANN(1962) によって基礎づけられた。その後、VERDCOURT(1966) が亜属名および種名について若干の改訂を行ない、Glycine 属を 3 亜属 9 種とした。すなわち、Glycine 亜属には、G.tabacina, G.clandestina, G.canescens, G.tomentella, G.falcata, G.latrobeana の 6 種が含まれ、Soja 亜属には、G.max (ダイズ) とその祖先型野生種 G.soja (ツルマメ) の 2 種が含まれ、Bracteata 亜属には、G.wightii 1 種が含まれるとした。VERDCOURT 以後、次の 2 つの重要な変更が行なわれた。その 1 つは、LACKKEY(1977) によって Bracteata 亜属が花器形態の差異を理由に Glycine 属とは独立した新しい属 Neonotonia 属として取り扱われるようになったことである。他の 1 つは、NEWELL and HYMOWITZ(1980) によって G.tabacina の一部が G.latifolia と呼ばれるようになったことである。

Glycine 属植物の分類体系の変遷は以上の通りであるが、本論文では、基本的に VERDCOURT の分類にしたがって記述した。これは、属を分つべきか否かの議論は別として Glycine および Soja 亜属の種分化に対する Bracteata 亜属の係わり合いが本論文の重要な論点の1つであるからである。しかし、Glycine 亜属は、NEWELL and HYMOWITZ の指摘どおり G. latifolia を含めた7種として取り扱った。この理由は次節において詳しく述べる。Glycine 属植物の類縁関係を解明するために最もよく行なわれている研究は生殖的隔離程度の比較である。Glycine 亜属と Soja 亜属との交雑は、PALMER and HADLEY(1968) , HADLEY and HYMOWITZ(1973) , 詹(1969) , LADIZINSKY et al. (1979)によって試みられたが、いずれも成功しなかった。しかし、最近、BROUÉ et al. (1979)が、G. tomentella と G. canescens の F₁ 植物を G. max と交雑して雑種植物を得ることに成功した。また、NEWELL and HYMOWITZ(1982) も G. tomentella と G. max との交配を行ない雑種植物を作出した。これらの雑種植物は、いずれも不稔であるが、以上の結果は、かろうじて交雑が可能な程度の近縁関係が Glycine 亜属と Soja

亜属との間には存在することを示している。残りの Glycine 亜属と Bracteata 亜属との交雑については、ほとんど試験されていないこともあるが、成功例は、報告されていない。

Glycine 亜属に関する種間の交雑は、鷹 (1969), PALMER and HADLEY (1968), PUTIEVSKY et al. (1979), NEWELL and HYMOWITZ (1983) によって行なわれている。なかでも注目すべき結果としては、PALMER and HADLEY が、G.tomentosa (= G.latifolia, $2n=40$) のコルヒチン倍化による同質4倍体と G.tabacina ($2n=80$) との相反交雑を行ない、非常に稀ではあるが雑种植物を得たことである。彼らは、この研究から、G.latifolia のゲノム式を $2A_1$, G.tabacina のそれを $2(A_0 A_2)$ とした。また、PUTIEVSKY et al. (1979) は、6種の間で広範な交配実験を行ない、G.canescens と G.clandestina が近縁であることおよび両種のいずれか一方のゲノムが G.tomentella に取り込まれていると報告した。同様な結果は、NEWELL and HYMOWITZ (1983) によっても報告されている。しかし、まだ Glycine 亜属のほとんどの種間で雑种植物が得られていないので、種の類縁関係を考察するには不十分な

情報しか得られていない。

NEWELL and HYMOWITZ(1978) は、Glycine 亜属 5 種の形態形質に関するクラスター分析を行ない、G.tabacina と G.clandestina とが近縁であると報告している。

以上のように、Glycine 亜属内の種間の類縁関係を明らかにしようとする研究はいくらか見受けられるが、まだ包含されるすべての種間の系統発生における関係をきめ細かく明らかにするまでには至っていない。

Soja 亜属の 2 種、G.max と G.soja は同種であるという説があるほどきわめて近縁であると思われ、両者の種間交雑はたいへん容易である (KARASAWA 1936, WILLIAMS 1948, 海妻 1975, AHMAD et al. 1977)。ダイズの祖先種がツルマメであるということは多くの研究者により受け入れられているが、ツルマメからダイズへの進化の道筋がいくつであったのか、さらにツルマメ (Soja 亜属) がどのようにして起源したのかについてはまだ解明されていない。以上の点を踏まえ本研究では、Glycine 属の全体的な類縁関係を把握するために、種子成分を対象とした成分分類学 (Chemotaxonomy) を主体とした研究を行った。

第3節

供試材料について

本節では、本研究で用いた供試材料の種名および系統名について説明を加える。

本研究で用いたすべての供試材料を Table II - 1 に示した。これらは、1972年に岩手大学農学部の高妻矩彦教授が収集されたものであるが、好意により分譲していただいた。

Table II - 1 には、供試材料の学名、系統名、染色体数および地理的起源などを示した。前節においても触れたが、属および亜属レベルの分類は VERDCOURT(1966)にしたがい、Glycine 亜属内の種名については、NEWELL and HYMOWITZ(1980)にもとづいた。また、各種各系統の染色体数は、NEWELL and HYMOWITZ(1978, 1980)によって決定された値である。

G.latifolia の4系統(脚注)は、もともと G.tomentella あるいは G.tabacina と記載されていたが、これらの系統の形態形質、貯蔵タンパク質の電気泳動パターンおよびアミラーゼアイソザイムのパターンを調べたところ、他の G.tomentella および G.tabacina の系統とは異なり、

Table II - 1 The materials used, their chromosome numbers and geographical distribution.

Species name	Line name	2n ²⁾	Origin ²⁾
subgenus <i>Glycine</i>			<i>Australia, S.E.Asia, Pacific Is.</i>
<i>G. latifolia</i>	PI.245332 ³⁾	80	Taiwan
	Inverelle ³⁾	40	Inverelle N.S.W., Australia
	PI.319696 ³⁾	40	Anchorfield Qd., Australia
	G.1213		Burren Junc. N.S.W., Australia
	G.1343		Leichhardt Qd. Australia
	Obtusa ⁴⁾	40	
<i>G. tabacina</i>	Giken	80	Unknown
	Hutton	80	Mt. Hutton Qd., Australia
	Helidon	80	Helidon Qd., Australia
	Taichung	80	Taichung Taiwan
	PI.319697	80	Quemoy Taiwan
	PI.193232	80	Sydney N.S.W., Australia
	PI.272099	80	Hunter Valley Australia
	Chinchila	80	Chinchila Qd., Australia
	Miyakojima-tsurumame	80	Miyako Is., Japan
	Bouko-tsurumame	80	Okinoerabu Is., Japan
	Canberra	80	Canberra N.S.W., Australia
	Quemoy	80	Quemoy Taiwan
	PI.248253	80	Bungonia P.L. N.S.W., Australia
	Miles	80	
<i>G. clandestina</i>	PI.233138	40	Australia
	PI.255745	40	Mt. Coree A.C.T., Australia
	PI.246590	40	Mt. Sidbeirbilla A.C.T., Australia
	PI.248252	40	Mt. Coree A.C.T., Australia
	Gandai	40	Australia
<i>G. canescens</i>	PI.399478	40	Alice Spring N.T., Australia
	White cliff	40	
	G.1117	40	N.S.W., Australia
	G.1249	40	Thurloo Downs N.S.W., Australia
	G.1301	40	Alice Spring N.T., Australia
<i>G. tomentella</i>	Eskdale	78	Eskdale N.S.W., Australia
	Lindeman	80	Lindeman Is. Qd., Australia
	Maopitou	80	Maopitou Taiwan
	Bexampton	80	
<i>G. falcata</i>	Nagoya	40	Australia
	G.1155	40	Charleville Qd., Australia
	G.1246	40	Taroon Qd., Australia
subgenus <i>Bracteata</i> (= genus <i>Neonotonia</i>)			<i>Africa, India, S.E.Asia</i>
<i>G. wightii</i>	Clarence	22	
	Cooper	22	
	Tinaroo	22	
	Q7004	22	
	Miyasakashiro	22	
subgenus <i>Soja</i>			<i>S.E.Asia - E.Asia</i>
<i>G. soja</i>	E 1	40	Hirosaki Japan
	E 6	40	Morioka Japan
	E 11	40	Iwate Japan
	K 38 (Kankoku)	40	Korea
	PI.101404	40	
	PI.342618	40	Siberia USSR
	PI.342622	40	Siberia USSR
	Morioka	40	Morioka Japan
<i>G. max</i>	Shirozaya	40	cultivar
	Norin 2	40	cultivar
	Sakagami 2	40	cultivar
	Raiden	40	cultivar
	Mo-shi-dou	40	cultivar
	Amsoy	40	cultivar
	Ichigo-wase	40	cultivar
	Keburi	40	cultivar

1) All materials were given by Dr. N.Kaizuma (Fac. Agric., Iwate Univ.).

2) Chromosome numbers and geographical distribution based on Newell and Hymowitz (1978).

3) Revised from *G. tomentella*

4) Revised from *G. tabacina*

あらたに Dr. A.H.D.Brown(CSIRO, Australia)から譲り
受けた G.latifolia の系統 (G.1213, G.1343) とすべて
の調査した特性において同一であったので G.latifolia
の系統としたことを断わっておく。

第 III 章 Glycine 属植物の Kunitz Trypsin Inhibitor (KTI) 様タンパク質の比較研究

Kunitz Trypsin Inhibitor(KTI) は、ダイズ種子に含まれているタンパク質分解酵素インヒビターである。KTI は、Kunitz(1945)によりブタのトリプシンに対する阻害因子として見いだされた。この阻害因子は、種子中に約4%程度含まれており、BBI(Bowman-Birk Inhibitor, BOWMAN 1946, BIRK 1961)とともにダイズのトリプシン阻害活性の大部分を占めている。

KTI のタンパク質化学的な性質は、多くの研究者によって調べられている。最近、KOIDE et al.(1973)は、KTI が181個のアミノ酸残基からなる約20 Kdの分子量を持つタンパク質であることを明らかにした。また、KTI の動物由来の酵素に対する作用機作については詳しく解析されているが、植物における生理作用については解明されていない。

一方、KTI は、遺伝様式についても詳しく調べられている。SIGHN et al.(1972)は、ゲル電気泳動法により3つの多型(Ti^a , Ti^b , Ti^c)を見いだした。そして、

HYMOWITZ and HADLEY(1972) および ORF and HYMOWITZ (1977)は、これらの多型が一遺伝子座の共優性複対立遺伝子(co-dominant alleles)により支配されていることを明らかにした。また、海妻ら(1980)および KAIZUMA and HYMOWITZ(1981)は、地理的起源の異なるダイズ品種群において各多型の分布頻度を調べ、全体的に Ti^a 型の頻度が高いことおよび Ti^b 型の分布に地域性があることを認めた。

このように、K T I は植物のタンパク質のなかでも最も研究されているもののひとつである。このことが、K T I を研究対象として選んだ理由のひとつである。海妻および喜多村(1980)は、G.wightii をのぞく Glycine 属野生種の種子に K T I と免疫反応をしめす成分があることを認めた。そこで、本研究は各野生種の K T I と相同なタンパク質を同定して相互に比較することにより、種あるいは亜属間の類縁関係を推定するための一連の分析を行なった。

第 1 節

Glycine 属植物の K T I 様タンパク質
の同定および電気泳動的特性

本節では、Glycine 属植物の K T I 様タンパク質の比較研究を行なうための第一歩として、カラムクロマトグラフィーおよび免疫化学的手法を用いて各種の K T I 様タンパク質を同定した。そして、同定した各種のタンパク質をゲル電気泳動法および SDS-ゲル電気泳動法にかけて分析を行ない、どのような特性が検出できるかについて検討した。なお、実験を進めるにあたり K T I には、つぎのような利点があった。1) 種子に比較的多く含まれる単純タンパク質であるので精製が容易であった。2) 酵素とちがい安定であるが、その特異的な活性により同定ができた。3) ゲル電気泳動法により識別できる変異が認められた。

材料および方法

1) 供試材料

本研究では、Glycine 亜属 4 種、Bracteata 亜属 (= Neonotonia 属) 1 種、Soja 亜属 2 種からそれぞれ 1 系統を選び実験に供試した (Table III -1)。1979 年および 1980 年に岩手大学農学部のカラス室においてすべての供試材料をポットを用いて栽培し、各熟期ごとに適宜成熟種子を採集して分析に供した。

2) 粗抽出液の調製

各供試材料の脱脂粉 3 g からイオン交換クロマトグラフィーにかけるための粗抽出液 (約 40 ml) を調製した (Fig. III -1)。

3) イオン交換クロマトグラフィー

緩衝液 (Fig. III -1 の Standard Buffer) で充分平衡

Table III-1 The materials used to identify KTI like proteins in the genus *Glycine*.

Species name	Line name	2n ¹⁾	Distribution
subgenus <i>Glycine</i>			
<i>G. latifolia</i>	PI. 245332	80	Australia, Pacific island
<i>G. tabacina</i>	Giken	80	Australia, Pacific island
<i>G. clandestina</i>	PI. 233138	40	Australia
<i>G. canescens</i>	PI. 399478	40	Australia
subgenus <i>Bracteata</i> (=genus <i>Neonotonia</i>)			
<i>G. wightii</i>	Miyasakashiro	22	India, Ceylon, SE-Asia, Africa
subgenus <i>Soja</i>			
<i>G. soja</i>	E 1	40	Asia, USSR
<i>G. max</i>	Shirozaya	40	cultivar

¹⁾ after NEWELL and HYMOWITZ (1980)

化した DEAE-セルロースカラム (2.20 X 22 cm) のベッドに得られた粗抽出液を重層し、非吸着分を洗い流した後、NaCl濃度を 0.05 M から 0.4 M まで連続的にあげた緩衝液 880 ml を用いてタンパク質を溶出し、展開した。フラクションサイズは 4.0 - 4.3 ml として 17 - 22 ml/h の流速で採取した。各フラクションのタンパク質含量は 280 nm の紫外線の吸光度として求めた。

4) カゼイン消化法

得られた各フラクションのトリプシン (trypsin) およびアルファキモトリプシン (α -chymotrypsin) 阻害活性を Kunitz のカゼイン消化法の変法 (堀井・宮崎 1973) にしたがって測定した。トリプシン阻害活性はすべての供試材料について、アルファキモトリプシン阻害活性は各亜属のそれぞれ 1 種 (G. soja, G. latifolia および G. wightii) について測定した。阻害活性値は 280 nm の紫外線の吸光度として得たカゼインの消化程度を示す値から次のように数値変換して求めた。すなわち、各フラクションの吸光度からインヒビターがないと思われるフ

ラクションの吸光度の平均値を差し引いて得られた数値を阻害活性値とした。

5) Ouchterlony(1953)の免疫二重拡散法

抗血清は市販のダイズ K T I (Sigma Chemical Co.)を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによって再精製し、これをウサギに注射して作成した。常法にしたがってシャーレに薄くのばした寒天に穴をあけ、中央の穴に抗血清、外側の穴に濃度を調節した検液を投与した。

6) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

DAVIS(1964)-ORNSTEIN(1964)の方法にしたがい、10 % ポリアクリルアミドゲル (カラムの大きさ 0.50 X 10 cm) により、3 - 4 mA/tube の定電流で電気泳動を行なった。ゲルの染色は易動度の測定のみを目的とする場合はコマジープリリアントブルー - 染色液 (0.04 % Coomassie Brilliant Blue G-250, 3.5 % 過塩素酸, 15 %

酢酸)で行なった。この染色法によれば脱色操作をすることなしに15分程度で染色バンドが観察できた。また、定量を目的とする場合はアミドブラック染色液(1% Amino Black 10 B, 15% 酢酸)と7% 酢酸で染色および脱色を行なった。その後、ゲルをデンシトメーター(DCD - 16 Digital Computing Densitometer, Gelman Ins. Co.)にかけて得たデンシトグラムから易動度(Rf値)および量比を求めた。易動度および量比は全行程を2反復して求めた。

7) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

タンパク質の分子量的特性を調べるため、本研究ではLAEMMLI(1970)の方法に準じたSDS(sodium dodecyl-sulfate)-ゲル電気泳動法を用いた。アクリルアミドの濃度勾配(10 - 15%)をつけたスラブゲル(縦10 X 横12 X 厚さ0.2 cm)を用いて試料を50 V(一晚) - 120 V(6時間)の定電圧で泳動した。ゲルはコマジープリリアントブルー染色液(0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 4.6% 酢酸, 45.5%, メタノール)中で1

- 2 時間染色し、脱色液(30 % メタノール, 10 % 酢酸)中で一晩振とうして脱色を行なった。

8) 活性染色法

URIEL and BERGES(1968) の方法にしたがいゲル中の K T I 様タンパク質のバンドをトリプシンおよびアルファキモトリプシン阻害活性によって検出した。この方法は、電気泳動的に同定した K T I 様タンパク質が本当にトリプシンおよびアルファキモトリプシンを阻害するかどうかを調べるために用いた。

9) K T I 様タンパク質の同定手順

Glycine 属植物の種子中に含まれる K T I 様タンパク質を同定するための諸実験は、つぎのような手順で行なった。まず、Glycine 属各種 1 系統からそれぞれ Fig. III - 1 に示した方法にしたがって粗抽出液を調製し、それを DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにかけ、分画した。ついで、各画分のトリプシンおよびアルファキモトリプシン阻害活性をカゼイン消化法により調べ、

検出されたいくつかの阻害活性のピークを示す画分について Ouchterlony の免疫二重拡散法を適用し、K T I 抗体との免疫反応を起こしたトリプシン阻害活性のピーク画分を同定した。ついで、それらのピークを構成する画分を連続的にポリアクリルアミドゲル電気泳動法にかけたところ、どの画分においても通常複数のバンドが現われたが、トリプシン阻害活性の量的変化と密接に関連した染色濃度の変化を示すタンパク質バンドを K T I 様タンパク質のバンドとみなした。

結 果

1. Glycine 属植物の K T I 様タンパク質の同定

Fig. III-2は、3亜属をそれぞれ代表する DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによるタンパク質の溶出パターンと各画分のトリプシンおよびアルファキモトリプシンの阻害活性のパターンを示した図である。阻害活性のパターンは、Soja 亜属の2種ではまったく同じパターンを示した。Glycine 亜属4種でもこの亜属に特徴的な互いに類似したパターンを示していた。Bracteata 亜属については1系統だけを供試したが、上記した2亜属のパターンとは違っていた。したがって、このレベルで亜属間の違いが認められた。すなわち、Glycine 亜属4種ではおもなトリプシン阻害活性のピークが1つであったのに対して、Soja 亜属では B B I (Bowman-Birk Inhibitor), unknown inhibitor, K T I の3つのピーク、Bracteata 亜属でも α , β , γ の3つのピークを認めた。Glycine 亜属および Soja 亜属のトリプシン阻害活性を持つピークはすべてアルファキモトリプシ

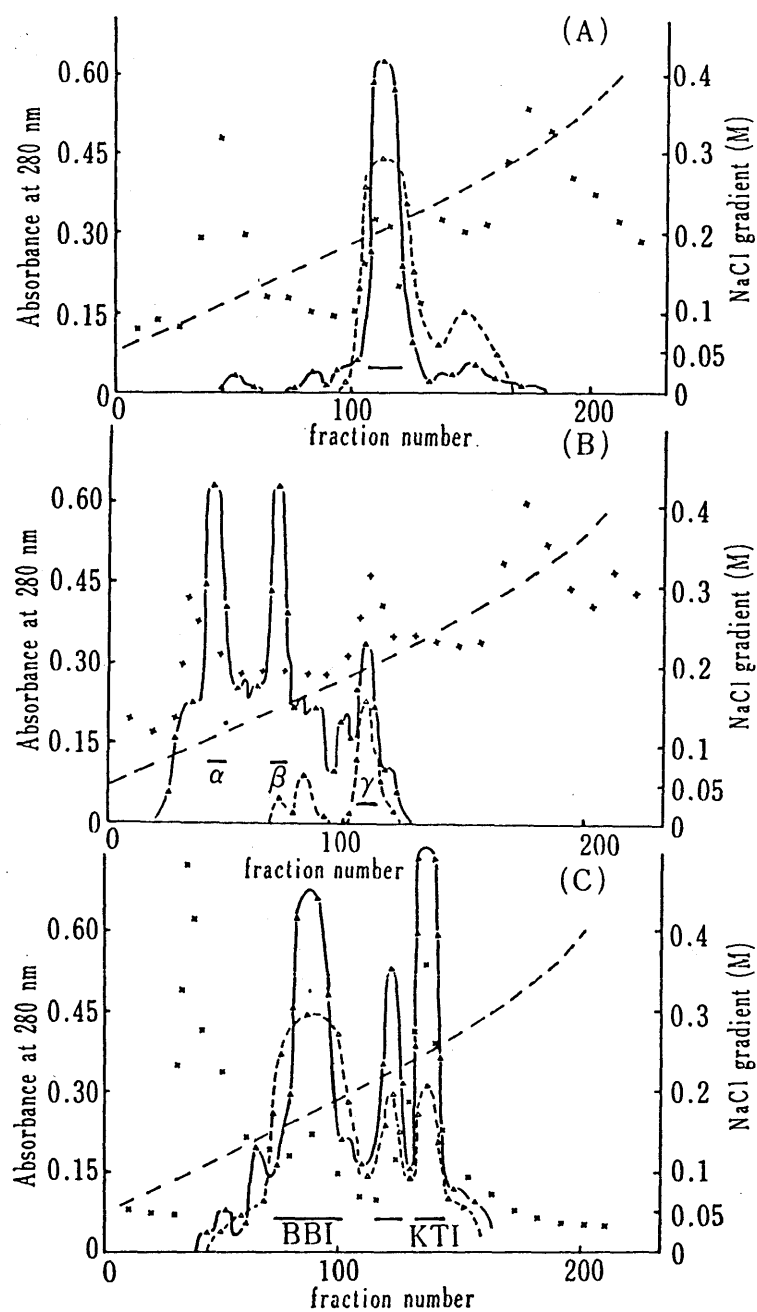


Fig. III-2 DEAE cellulose column chromatogram on trypsin and chymotrypsin inhibitor of *G. latifolia* (A), *G. wightii* (B) and *G. soja* (C). \blacktriangle - \blacktriangle - \blacktriangle : trypsin inhibitor activity, \triangle - \triangle - \triangle : chymotrypsin inhibitor activity, $\times\times\times\times$: protein content, ---: NaCl gradient.

ンに対しても阻害活性を持っていたが、Bracteata 亜属では、トリプシンおよびアルファキモトリプシンの両者に対して阻害活性を示したのは γ ピークのみであり、 α および β ピークはトリプシン阻害活性のみを持っていた。

K T I は、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにおいて、0.2 M NaCl 流下点付近に溶出するが、Glycine 亜属の供試各種では、その 0.2 M NaCl 流下点付近に明瞭なタンパク質の溶出ピークが現われ、その画分はいずれの種においても高いトリプシンおよびアルファキモトリプシン阻害活性を有しており、K T I 抗体と免疫反応を起こした。一方、Bracteata 亜属の γ ピークもおなじく 0.2 M NaCl 流下点付近に溶出し、トリプシンおよびアルファキモトリプシン阻害活性を示したが、K T I 抗体との免疫反応は確認できなかった。

3 亜属の 0.2 M NaCl で溶出したきた画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動法にかけたところ、Glycine 亜属 4 種では、わずかに易動度を異にした 2 本の主要なバンドを認めた。そして、両者ともトリプシンおよびアルファキモトリプシンに対して阻害活性を有していること

が活性染色法により確認された。このことから、Gly-
cine 亜属 4 種においてはこの 2 つのタンパク成分を K
T I 様タンパク質として認め、易動度のより大きな成分
を F (fast) タンパク質、より小さな成分を S (slow) タン
パク質と命名した (Fig. III-3)。

Soja 亜属および Bracteata 亜属についても同様な
分析を行なったところ、Glycine 亜属の K T I 様タンパ
ク質とは違い、Soja 亜属においては K T I のみ、Bra-
cteata 亜属においては γ タンパク質のみのひとつの
K T I 様タンパク質しか持たないことが認められた。

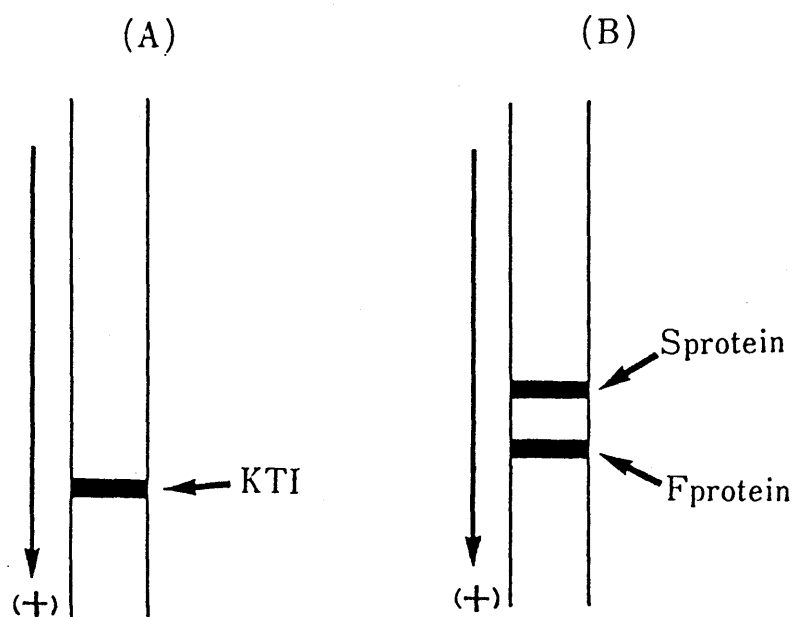


Fig. III-3 Disc gel electrophoretic patterns of the fractions from DEAE cellulose column chromatography, containing trypsin inhibitor activity. (A) *G. soja*, (B) *G. latifolia*.

2. Glycine 属植物の K T I 様タンパク質の

電気泳動的な特性

Fig. III-4 は、各供試材料の全アルブミン画分から B B I など低分子量のインヒビターを除いて調製したサンプルをゲル電気泳動法にかけて得られたデンストグラムである。各種の K T I 様タンパク質はアルブミン画分のなかで最も濃く染色されるバンドとして認められ、容易に識別できた。なかでも、Soja 亜属 2 種の K T I 様タンパク質はアルブミン画分の大部分を占め、Glycine 亜属の K T I 様タンパク質は S および F タンパク質の 2 つのバンドよりなる特徴的なバンドパターンを示したので容易に同定できた。

そこで、各種の K T I 様タンパク質の易動度をデンストグラムから測定したところ、その易動度には差異が認められた (Table III-2)。また、Glycine 亜属においては、S タンパク質と F タンパク質との相対的な量比を求めた。その結果、各種の S / F 量比は、G. latifolia で 2.1, G. tabacina で 1.9, G. clandestina で 4.3, G. canescens で 0.6 を示し、それぞれの種で異なった値を示

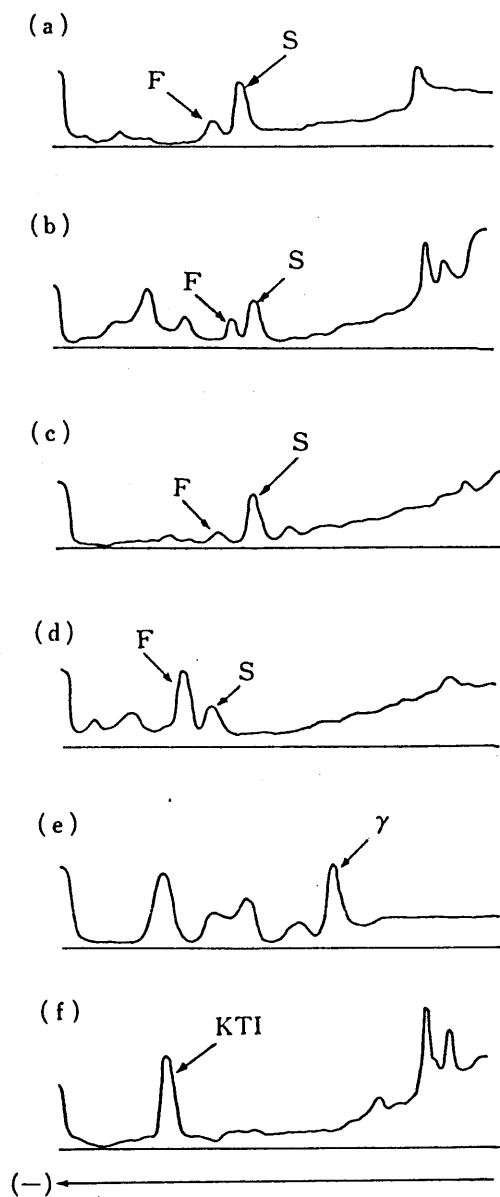


Fig. III-4 Densitograms of albumin fractions on Davis-Ornstein PAGE gel in the genus *Glycine*. (a) *G. latifolia*, (b) *G. tabacina*, (c) *G. clandestina*, (d) *G. canescens*, (e) *G. wightii*, (f) *G. soja*. S : S protein, F : F protein, γ : γ protein.

した (Table III - 2) 。

さらに DEAE-セファロース CL-6B を用いて精製した K T I 様タンパク質の S タンパク質、F タンパク質、 γ タンパク質 (Bracteata 亜属) およびダイズの K T I を SDS-ゲル電気泳動法にかけ、これらの分子量を比較した。Fig. III - 5 の上半分は S および F タンパク質をジスルフィド結合を切断せずに泳動させたものである。これによると、Glycine 亜属のどの種の S および F タンパク質もほとんど等しい易動度を示した。そして、 γ タンパク質や K T I とほぼ同じ易動度であった。しかし、メルカプトエタノールを用いてジスルフィド結合を還元して切断すると、Fig. III - 5 の下半分に示したように、S タンパク質、 γ タンパク質および K T I の易動度は変化しなかったが、F タンパク質は、 f_1 と f_2 の 2 個のペプチドに別れた。 f_1 ペプチドの易動度は Glycine 亜属の 4 種の間でほとんど差がなかったが、 f_2 ペプチドは、G. latifolia, G. tabacina, G. clandestina, G. canescens の順に易動度が減少することが認められた。

Table III-2 Rf values and S/F ratios of KTILP
in the genus *Glycine*

Species name	Rf value		S/F ratio
	S	F	
<i>G. latifolia</i>	0.61	0.65	2.1
<i>G. tabacina</i>	0.63	0.66	1.9
<i>G. clandestina</i>	0.61	0.65	4.3
<i>G. canescens</i>	0.69	0.72	0.6
<i>G. wightii</i>	0.61		—
<i>G. soja</i>	0.79		—
<i>G. max</i>	0.79		—

Data was obtained from the densitogram in
Fig. III-4.

S : KTILP S or S-like protein.

F : KTILP F protein.

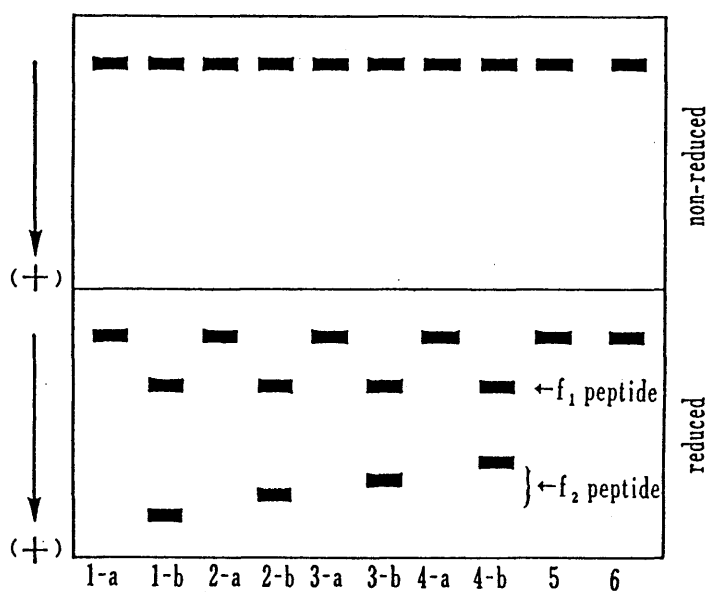


Fig. III-5 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of purified KTILP. upper : non-reduced sample, lower : reduced sample. 1-a : *G. latifolia* S protein, 1-b : *G. latifolia* F protein, 2-a : *G. tabacina* S protein, 2-b : *G. tabacina* F protein, 3-a : *G. clandestina* S protein, 3-b : *G. clandestina* F protein, 4-a : *G. canescens* S protein, 4-b : *G. canescens* F protein, 5 : *G. wightii* γ protein, 6 : *G. soja* KTILP and KTI.

考 察

Glycine 属植物は、形態学的観点に基づいて3亜属 (Glycine, Bracteata, Soja) に分類されている (HERMANN 1962, VERDCOURT 1966) が、この3亜属の区分は本研究の K T I 様タンパク質 (K T I L P, K T I like protein) に関する分析結果からもその妥当性が認められた。すなわち、Glycine 亜属各種の K T I L P はいずれも S タンパク質および F タンパク質の2成分を含んでいること (Fig. III-3)、F タンパク質はさらに f_1 および f_2 の2つのポリペプチドから構成されていることにより特徴づけられる (Fig. III-5)。これに対し、Soja 亜属と Bracteata 亜属の K T I および K T I L P は Glycine 亜属の S タンパク質に似た単一成分であった (Fig. III-3, -5)。しかし、Bracteata 亜属の K T I L P は、ダイズの K T I に対して作成した抗血清と免疫反応を起こさなかった。一方、Glycine 亜属各種の K T I L P は K T I と免疫化学的に相同であった。BROUÉ *et al.* (1982) は、Soja 亜属の G. max と Glycine 亜属の G. tomentella と G. canescens の雑種との交配を行ない雑

種個体を得た。残りの Glycine 亜属と Bracteata 亜属および Soja 亜属と Bracteata 亜属との間の交雑例は知られていないので、3 亜属の中では Soja 亜属と Glycine 亜属との間が最も近縁で Bracteata 亜属は他の 2 亜属と若干の距離があるものと思われる。このことは、供試した材料が各種 1 系統と少なかったにもかかわらず、本研究における免疫実験などからも支持される。

Soja 亜属の 2 種、G. max と G. soja の DEAE-セルロースカラムクロマトグラムおよびトリプシン、アルファキモトリプシンに対する阻害活性のパターンがまったく同じであることおよび精製した G. soja の K T I L P は K T I と呼んでもほとんど問題ないを考える。なお、Bracteata 亜属の γタンパク質は K T I 抗血清と免疫反応を起こさなかったが、本研究では、この γタンパク質を Bracteata 亜属の K T I L P として扱った。これはこのタンパク質の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける溶出位置やトリプシンおよびアルファキモトリプシンに対する阻害活性のパターンが、他の 2 亜属の K T I および K T I L P と比較して良く似ていること (Fig. III-2)、そしてその分子量が K T I と等しい

こと (Fig. III-5) などからみて γ タンパク質は K T I とタンパク質化学的に相同で K T I L P として扱ってもさしつかえないと考えたからである。

Glycine 亜属の K T I L P は、前述したように S および F タンパク質の 2 成分があるが、種間でゲル電気泳動における易動度が異なっていた。しかし、S および F タンパク質の易動度の差はいずれの種においても Rf 値にして約 0.04 と一定しており、両者の易動度は共に変化していることが認められた。また、S タンパク質と F タンパク質の相対的な量比 (S/F 比) を調べたところ、G. canescens の 0.6 から G. clandestina の 4.3 まで 7 倍以上の変異が認められた (Table III-2)。このような S / F 比の変異は、まだ生理的役割がわかっていない K T I の機能を考える上でも興味深い現象である。

また、Glycine 亜属の F タンパク質は、ジスルフィド結合を切断せずに SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にかけると S タンパク質とほとんど同じ易動度を示すが、還元剤を用いてジスルフィド結合を切断すると f_1 および f_2 の 2 個のペプチドにわかれた (Fig. III-5)。そして、 f_2 ペプチドの易動度は、G. latifolia,

G. tabacina, G. clandestina, G. canescensの順に小さくなることが認められた (Fig. III-5)。このような F タンパク質の特徴は、Glycine 亜属の類縁関係を調べるために有効なマーカーとなると同時に種間でその一次構造にかなりの違いがあることを示唆しており、将来、K T I L P のアミノ酸組成やアミノ酸配列などを比較できるならば、興味あるデータが得られると思われる。

さらに、Glycine 亜属にのみ 2 個の K T I L P が存在することはタンパク質合成の遺伝的調節の点からも注目される。これには次の 2 つの事が考えられる。1) S および F タンパク質のそれぞれを支配する遺伝子が存在し、他の 2 亜属では F タンパク質を支配する遺伝子が欠失あるいは抑制されている。2) Glycine 亜属においてのみ S タンパク質遺伝子の post-transcriptional あるいは post-translational な修飾によって F タンパク質が生じる。これらのいずれによるのかについては今後の研究に待たなければならない。

ダイズ種子にはたくさんのトリプシンインヒビターが含まれているが、その中で主要なものは B B I (ODANI and IKENAKA 1976) 型と K T I (KUNITZ 1945) 型のトリ

プシンインヒビターである。これまで B B I 型のトリプシンインヒビターはマメ科植物に広く存在することが知られている (LASKOWSKI and KATO 1980) が、最近、K T I 型についてもシカクマメ (winged bean) やネムノキ (silk tree) の種子中に K T I とアミノ酸組成が良く似ているトリプシンインヒビターが存在することが相次いで報告された (KORIT 1979, ODANI et al. 1979)。今後、このような K T I 型のインヒビターが他のマメ科植物においても広く見いだされるならば、それらの比較研究によりマメ科植物の類縁関係についても検討を加えることが可能になると思われる。

第2節 Glycine 亜属各種のK T I様タンパク質の電気泳動的特性の比較

Glycine 亜属植物の類縁関係を明らかにすることは、ダイズの起源を考察し、これらの植物群を遺伝子源として有効に利用するために重要な問題である。

前節において、Glycine 亜属各種の種子中に含まれるK T I様タンパク質(K T I L P)はいずれもSおよびFタンパク質の2成分から成り、Fタンパク質はさらに f_1 および f_2 の2つのペプチドから構成されていることを示した。そして、K T I L Pには電気泳動法により検出できる易動度(Rf値)の変異、Sタンパク質とFタンパク質との量比(S/F量比)の変異および f_2 ペプチドの分子量の変異が認められた。本節では、これら3つの電気泳動的特性について比較検討を行ない、Glycine 亜属の類縁関係を解明しようとした。

材料および方法

1. 供試材料

供試材料は Table III-3 に示した Glycine 垂属 5 種 22 系統である。これらの系統を 1979 年および 1980 年の 2 カ年にわたり岩手大学農学部（盛岡）のガラス室において栽培しそれぞれ成熟種子を収穫した。

2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

ゲル電気泳動法を用いて、各系統の K T I L P の易動度および S / F 量比を比較した。DAVIS (1964) - ORNSTEIN (1964) の方法にしたがい、10 % ポリアクリルアミドゲルディスク (0.5 ϕ X 10 cm) を用いて試料を 3 - 4 mA/tube の定電圧で約 3.5 h 電気泳動を行なった。各供試材料の種子粉末 100 mg を 0.092 M Tris-HCl (pH 8.3), 0.023 M CaCl₂, 0.01 % 2-メルカプトエタノールを含む抽出バッファー 3 ml とともに乳鉢中で摩砕し、3000 rpm で 10 分間遠心して得られた上清を泳動試料

とした。泳動後、ゲルは 1 % アミドブラック 10B 染色液で 20 分間染色し、7 % 酢酸中で拡散により脱色を行った。

脱色の終了したゲルをデンストメーターにかけてそれぞれの K T I L P の移動度および S / F 量比を求めた。移動度および S / F 量比は全行程を 2 反復して求めた。

3. 2次元電気泳動法

各 K T I L P を精製せずに相対的な分子量を比較するために 2次元電気泳動法を用いた。1次元目は、DAVIS - ORNSTEIN のゲル電気泳動法に準じて行ない、2次元目は、LAEMMLI(1970) の SDS- ゲル電気泳動法にしたかった。すなわち、ゲル電気泳動法は、 0.4×0.5 cm のガラスチューブに充填した 10 % ポリアクリルアミドゲルを用いて、泳動試料を 1 mA/tube の定電流にて泳動した。泳動終了後、ゲルをチューブから抜取り、4 ml の 2次元目の SDS- サンプルバッファー (0.03 M Tris-HCl, 6 M urea, 0.1 % SDS, 0.01 % mercaptoethanol, pH 8.0) に入れて 15 分間平衡化した。平衡化の終了し

たゲルをアクリルアミドの濃度勾配(10 - 18 %)をつけた SDS- スラブゲル(13 X 13 X 0.3 cm) の試料溝に水平に押し込み、50 V(定電圧)で 12 h 電気泳動を行った。スラブゲルは、0.25 % コマジープリリアントブルー-R 染色液(45 % メタノール, 5 % 酢酸)および脱色液(30 % メタノール, 10 % 酢酸)で染色および脱色を行った。

結 果

1. K T I L P の 易 動 度 (Rf 値) の 比 較

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって測定した各系統の K T I L P の 易 動 度 は Table III-3 に示したとおりである。Glycine 亜属のすべての供試系統の K T I L P には、S タンパク質および F タンパク質の 2 成分が認められた。そして、両タンパク質の易動度の差はいずれの系統においても Rf 値において 0.03 - 0.05 とほとんど一定の値を示した。

G. tabacina PI.248453, Miles および G. tomentella Eskdale の 3 系統は、デンストグラムに 3 個以上のピークが現われ、S および F タンパク質を特定することができなかったので、易動度を測定できなかった (Fig. III-6)。各種の K T I L P の 易 動 度 には、それぞれかなりの種内変異があり、G. latifolia および G. tabacina では変異の幅が大きかった。また、K T I L P の 易 動 度 は種間でも相互に重複しており、この特性の種特異性は低いと思われた。

Table III-3. The materials used, their chromosome numbers and electrophoretic properties in the subgenus Glycine.

Species Name and Line No.	Line Name	2n	Rf value		S/F ratio	Subspecific Group
			<u>S pr.</u>	<u>F pr.</u>		
<u>G. latifolia</u>						
1	PI.245332	80	0.61	0.65	2.1	LAT A
2	Inverelle	40	0.64	0.67	2.1	LAT A
3	PI.319696	40	0.71	0.74	3.0	LAT B
<u>G. tabacina</u>						
4	Giken	80	0.63	0.66	1.9	TAB A
5	Hutton	80	0.62	0.67	1.1	TAB B
6	Helidon	80	0.65	0.69	1.1	TAB B
7	Taichung	80	0.67	0.71	2.0	TAB C
8	PI.319697	80	0.70	0.74	1.1	TAB C
9	PI.193232	80	0.69	0.72	1.8	TAB C
10	PI.272099	80	0.69	0.72	1.9	TAB C
11	Chinchila	80	0.69	0.72	2.1	TAB C
12	Miyako	80	0.70	0.73	2.0	TAB C
13	Bouko	80	0.72	0.75	1.8	TAB C
14	PI.248253	80				amphidiploid
15	Miles	80				amphidiploid
<u>G. clandestina</u>						
16	PI.233138	40	0.61	0.65	4.2	CLAND
17	PI.255745	40	0.62	0.67	3.0	CLAND
18	PI.246590	40	0.66	0.70	4.1	CLAND
19	Gandai	40	0.66	0.70	4.1	CLAND
20	PI.248252	40	0.61	0.65	4.2	CLAND
<u>G. canescens</u>						
21	PI.399478	40	0.69	0.72	0.6	CAN
<u>G. tomentella</u>						
22	Eskdale	78				TOM

Miyako: Miyakojima-tsurumame, Bouko: Bouko-tsurumame.

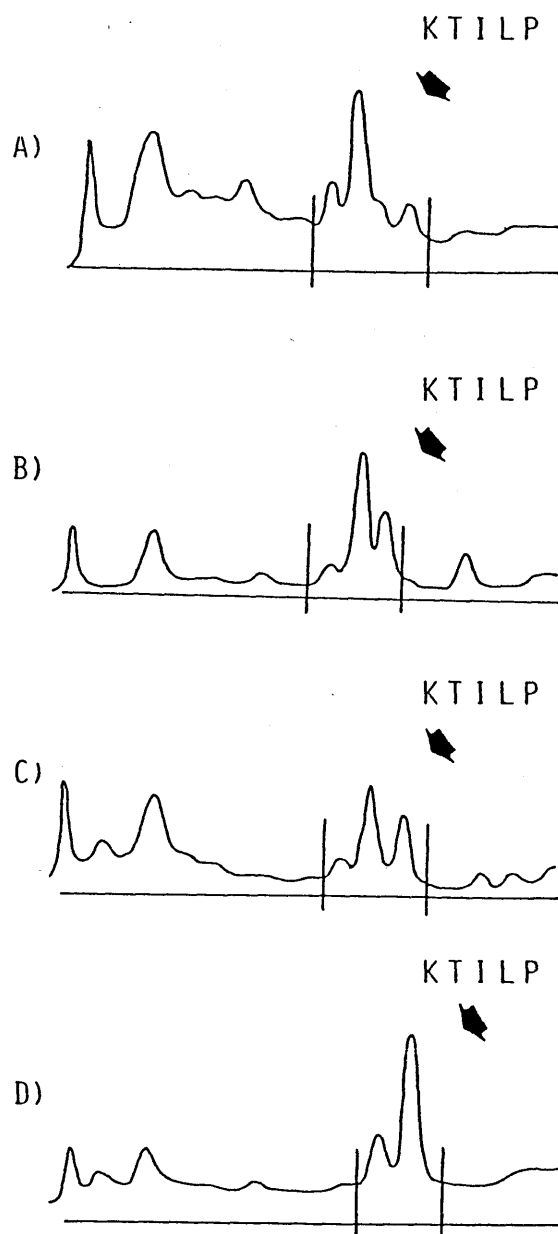


Fig. III-6 Densitograms of KTILP in the subgenus Glycine, showing more than three bands on Davis-PAGE gel. A) G.tomentella Eskdale, B) G.tabacina PI.248253, C) G.tabacina Miles, D) G.latifolia Inverelle.

2. K T I L P の S / F 量比の比較

Fig. III - 7 は、S / F 量比を測定する際のデンストグラムを例示したものであるが、種・系統による S タンパク質と F タンパク質との量比の違いは視覚的にも明瞭にみとめられた。供試各系統の S / F 量比は、Table III - 3 に示したとおりである。1. K T I L P の易動度が測定できなかった 3 系統は同じ理由で測定の対象からはずした。S / F 量比においても種内変異が認められたが、G. tabacina 1.1 - 2.1, G. latifolia 2.1 - 3.0, G. clandestina 3.0 - 4.5 とそれぞれの種に特異的な値を示した。G. canescens では 1 系統のみを供試したが、S / F 量比が 0.6 と他の 2 種とは異なり、F タンパク質が S タンパク質より多いという特徴があった。

3. K T I L P の分子量の比較

供試各系統の K T I L P の相対的分子量を比較するために、本研究では、S および F タンパク質をそれぞれ個別に精製することなく各成分の同定ならびにその分子量

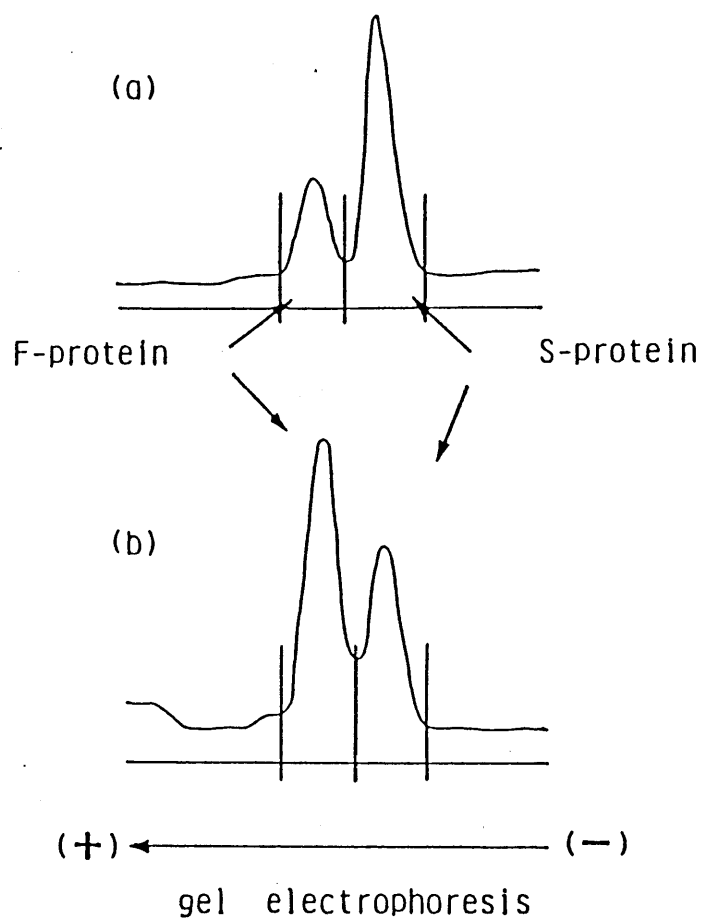


Fig. III-7 Species difference on S/F ratio of KTILP among the species of the subgenus Glycine.
(a) G.latifolia PI.245332, (b) G.canescens PI. 399478.

の比較ができるようにゲル電気泳動法と SDS-ゲル電気泳動法から構成された2次元電気泳動法を用いた。この方法によれば、Fig. III-8 に模式的に示したようにSタンパク質、 f_1 および f_2 ペプチドの3個のスポットから構成される特徴のあるパターンが認められるので、各スポットをスラブゲル上で同定し、分子量を比較することができた。 f_1 ペプチドの易動度は G. clandestina を除くすべての種・系統で等しく、Sタンパク質および f_2 ペプチドには4種類の易動度が認められた。そして、この3成分は、G. tabacina (Giken, type 2) を除いて、いずれの系統においてもおおよそ

Sタンパク質の分子量 =

$$f_1 \text{ ペプチドの分子量} + f_2 \text{ ペプチドの分子量}$$

という等式が成り立つような泳動パターンを示した。G. tomentella を除く Glycine 亜属4種21系統のKTILPを2次元電気泳動法によって比較した結果、Fig. III-9 に示したような7タイプのスポットパターンに類別することができた。すなわち、Sタンパク質およ

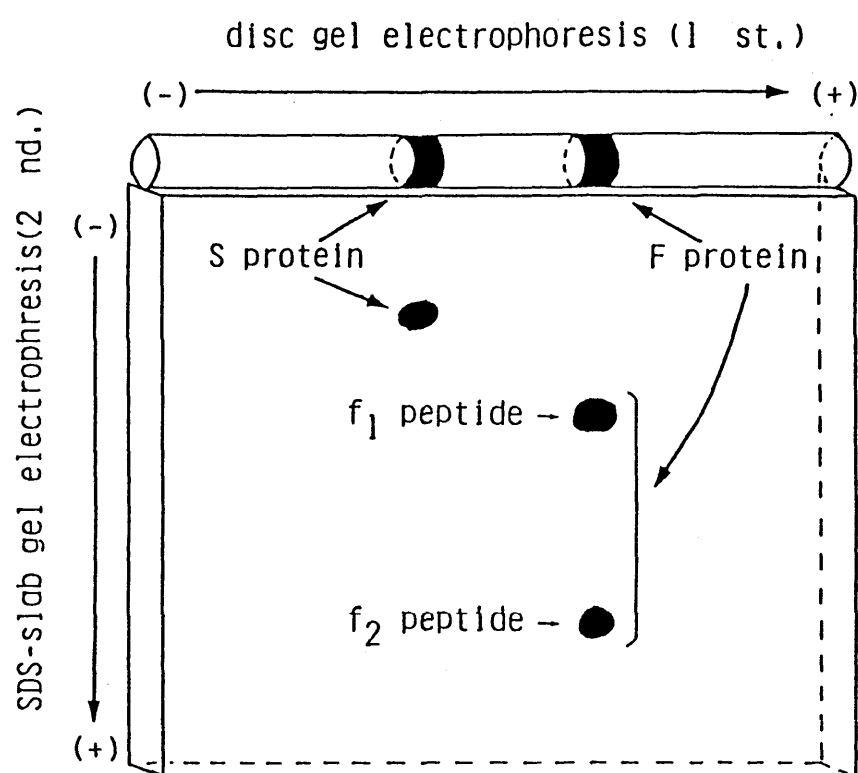


Fig. III-8 Schematic diagram of KTILP migrating pattern by two-dimensional electrophoretic analysis.

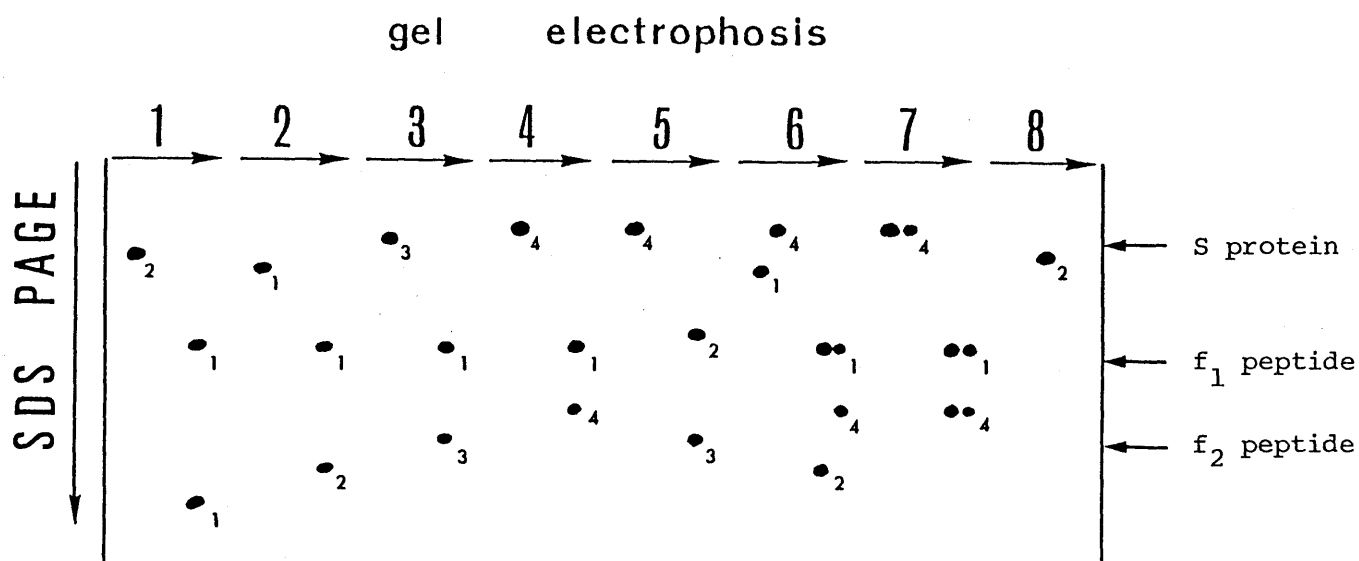


Fig. III-9 Seven types of KTI like protein patterns representing seven subspecific groups and two amphidiploids classified by two-dimensional electrophoresis.

type 1: LAT A(G.latifolia), type 2: TAB A(G.tabacina), type 3: TAB B (G.tabacina), type 4: LAT B(G.latifolia), TAB C(G.tabacina) and CAN(G.canescens), type 5: CLAND(G.clandestina), type 6: G.tabacina PI.248253, type 7: G.tabacina Miles, type 8: G.max KTI.

The number with each spot shows a grade of its relative mobility on the second dimension.

び f_2 ペプチドの易動度の相違により、G. latifolia は LAT A(type 1) および LAT B(type 4) の2つのサブグループに分けられ、G. tabacina では TAB A(type 2), TAB B(type 3) および TAB C(type 4) の3つのサブグループと2組のSおよびFタンパク質を有する2系統(後述)とに類別された。一方、G. clandestina(CLAND, type 5) および G. canescens(CAN, type 4) では種内変異が認められなかった。このうち、LAT B, TAB C および CAN の3つのサブグループはいずれもタイプ4の泳動パターンをしめし、3成分の易動度が一致することが認められた。

G. tabacinaの2系統(PI. 248253, Miles) から調製したサンプルを2次元電気泳動法にかけたところ、Fig. III-9 のタイプ6およびタイプ7にしめしたようなスポットパターンが現われた。すなわち、タイプ6のPI. 248253はタイプ2とタイプ4を合成したパターンと類似しており、タイプ7のMilesはタイプ4のパターンをわずかにずらして重ね合わせたようなパターンを示した。この2系統は、種子を1粒ごとに分析してもまったく同じパターンを示したので、このことは

他の種子が混入したためによるのではないと思われる。

考 察

前節において、Glycine 亜属各種の種子に含まれている K T I L P には、ゲル電気泳動法により検出できる易動度 (Rf 値) の変異および S タンパク質と F タンパク質との量比 (S/F 量比) の変異、SDS-ゲル電気泳動法により検出できる易動度 (相対的分子量) の変異が存在することを認めた。前節ではさらに、Glycine 亜属植物の類縁関係を解明するための基礎資料を得るため、K T I L P のこれら 3 つの電気泳動的特性について比較検討した。その結果、K T I L P の分子量が最も種内変異の幅が小さく、種間の類縁関係を判定するために適していると考えられた。そこで、まず、分子量について考察を行ない、ついで、残りの 2 つの特性について考察を行ないたい。

K T I L P の S タンパク質および F タンパク質 (f_1 , f_2 ペプチド) の相対的分子量を比較したところ、Glycine 亜属の類縁関係を考察するために重要な事項をまとめると次のとおりである。a) G. latifolia および G. tabacina は、2次元電気泳動法により 2 つおよび 5 つのサブグループにそれぞれ分けられるので、両種は種内

変異が大きいと思われる。これに対し、G.clandestina では5系統を供試したが、種内変異は認められなかった。

b) G.latifolia の LAT A, G.tabacina の TAB C および G.canescens の CAN の3つのサブグループでは3成分のスポットパターン(タイプ 4)が一致したことからこれら3種の間には遺伝的な交流があったことが予想される。また、このタイプのスポットパターンのみが形態および生殖的隔離の点において別種とされている複数の種に共有されていたことは、このタイプのパターンを示す種・サブグループが Glycine 亜属植物の祖先種となんらかの関係を持っている可能性がある。c) 各種・系統の f_1 および f_2 ペプチドを較べて分子量が近ければ近いほど相互のペプチドの相対的類似性が高いと仮定すると、各種・サブグループの類縁関係は Fig. III-10 のようになるが、この点についてはさらに慎重に検討する必要があると思われる。d) G.tabacina の2組の K T I L P を重複して持つ系統が存在することは、Glycine 亜属において複二倍体化による進化が起きていることのひとつの証拠になるとと思われる。

Fig. III-11 は、各供試材料の K T I L P の S タンパク

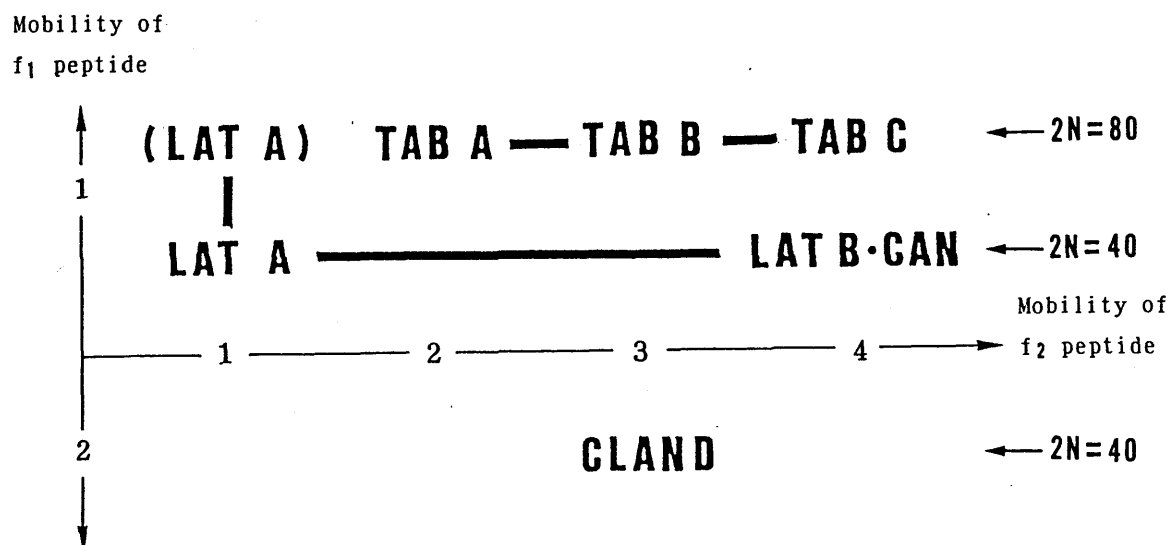


Fig. III-10 Relationships among seven subspecific groups in the genus *Glycine*, inferred from similarity on the mobility of f_1 and f_2 peptide of KTI like F protein (Fig. III-9).

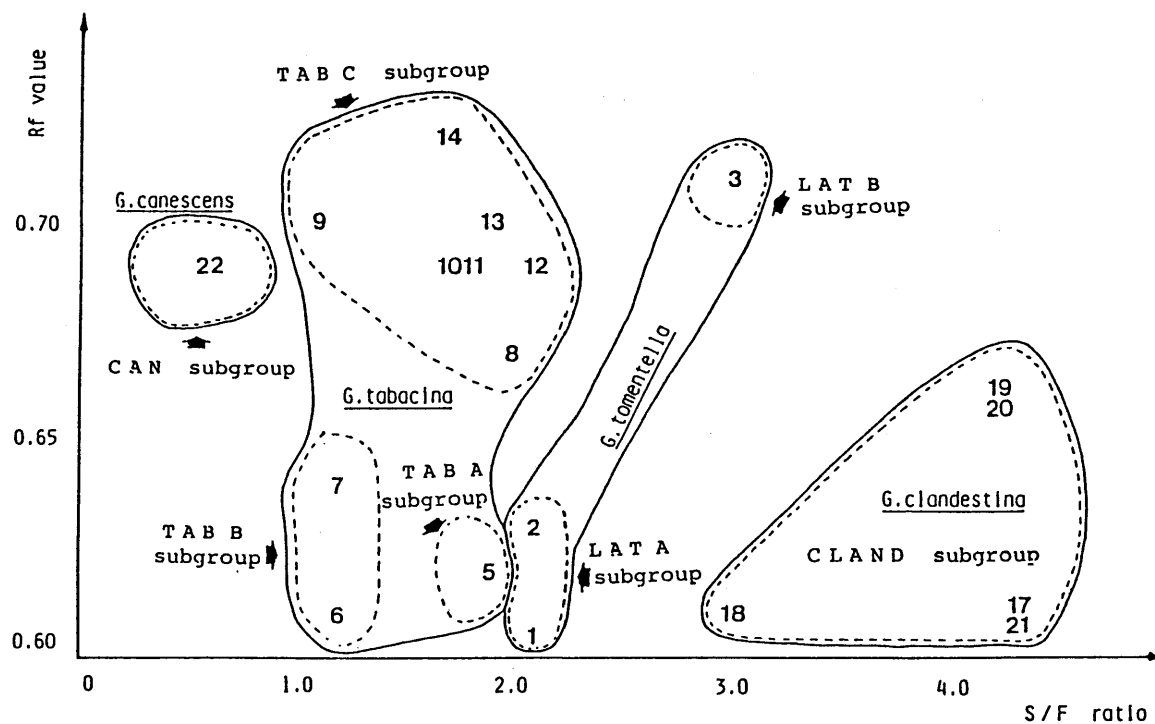


Fig. III-11 Relationships among four *Glycine* species, based on the differences of Rf value and S/F ratio. — : specific area, ----- : subspecific area, the numbers represent the line used (Table III-1).

質の易動度を縦軸にとり、S / F 量比を横軸にとってプロットしたものである。数字は系統番号 (Table III -3)、破線は2次元電気泳動法により類別したサブグループおよび実線は種の区分を示している。これによると、G. latifolia は、LAT A および LAT B の2つのサブグループに、G. tabacina は、TAB A, TAB B および TAB C の3つのサブグループに明瞭に分かれた。そして、LAT A サブグループと TAB A サブグループとは非常に近い位置関係にあり、LAT B サブグループは LAT A サブグループよりもむしろ TAB C サブグループに近いところに位置していた。また、G. canescens (CAN) も TAB C サブグループと密接な位置関係にあった。これらのことは、前述した K T I L P の分子量の比較に基づいた考察と良く一致している。G. tomentella については1系統しか分析しなかったが、2組以上の K T I L P を含んでいると思われる (Fig. III -6, -10) ので、複雑な進化の過程を経て成立したものと思われる。

Glycine 亜属に関する成分分類学的研究としては、MIES and HYMOWITZ (1973) が、ゲル電気泳動法を用いて G. tabacina, G. tomentella, G. clandestina の3種が易

動度の等しいトリプシンインヒビターを含んでいることを認めた研究がある。しかし、本節の実験結果によれば、K T I L P の易動度には MIES and HYNOWITZ が報告しているよりも多様な変異のあることが認められた。また、BROUÉ et al. (1977) は、Glycine 亜属 4 種を用いて数種のアイソザイム分析を行ない G.tomentella および G.tabacina の種内変異が大きいことを認めた。この G.tabacina の種内変異が大きいという結果は本研究の結果と一致するものである。

本研究の結果から Glycine 亜属の K T I L P の 3 つの特性には、種・系統間でさまざまな変異があることを認めた。そして、これら 3 つの特性の変異は、Glycine 亜属植物の類縁関係を解明するための指標として利用できると思われる。また、2 組の K T I L P を含んでいる系統が認められたことは、Glycine 亜属において複二倍体化が進化のひとつのプロセスであることの証拠であると思われる。今後、各種の K T I L P の一次構造をさらに詳細に比較することができるならば、Glycine 亜属内の類縁関係および Glycine 亜属と Soja 亜属（ダイズが属する）との類縁関係について多くの情報を得ること

ができると思われる。

第3節

Soja 亜属植物の K T I 様タンパク質

(K T I L P) の比較

ダイズ (G. max) は、ツルマメ (G. soja) から起源したということとは多くの研究者が認めるところであるが、その進化経路が1つであったのかあるいは複数存在したのかについては興味ある問題のひとつである。前述したように、ダイズの K T I には3種の多型 (Ti^a , Ti^b , Ti^c) が存在する (SIGHN et al. 1969) が、ツルマメにおいても2つの多型 (Ti^a , Ti^b) が見いだされ、両種の Ti^a および Ti^b はそれぞれゲル電気泳動法において同じ易動度を示すことが認められた (海妻ら 1980)。HYMOWITZ (1973) および HYMOWITZ and KAIZUMA (1980) は、各地方のダイズおよびツルマメの系統を集め、各多型の分布頻度を調査した。その結果、 Ti^a はダイズにおいて約 87 % , ツルマメにおいて約 91 % の系統に分布していた。また、 Ti^b の分布頻度は、ダイズにおいて約 12 % , ツルマメにおいて約 9 % であった。このように、 Ti^a は、ダイズおよびツルマメにおいて圧倒的に多く分布しているので、 Ti^a のツルマメから Ti^a のダイズが起源した

ということは容易に考えられる。したがって、 Ti^b のダイズが Ti^b ツルマメから起源したことが証明できれば、複数の進化の道すじが存在したことの傍証になると思われる。そこで本節では、両種の Ti^b 型 K T I が同一であるかどうか比較検討を行なった。

材料および方法

1. 供試材料

供試材料としては、 Ti^b 型 K T I を含んでいる系統の中からダイズ 1 系統 (Norin 2) およびツルマメ 2 系統 (Kankoku, Morioka) を選び実験に供した。各系統の種子 3 g を用いて、本章第 1 節に記述した方法にしたがって粗抽出液を調製し、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを反復して、K T I が電気泳動的に均一になるまで精製を行なった。通常、2 回のクロマトグラフィーにより精製が可能であった。精製した各 Ti^b 型 K T I は、凍結乾燥して以後の実験に用いた。コントロールとしては、市販の K T I (Ti^a , Sigma Chemical Co.) を DEAE-セルロースクロマトグラフィーによって再度精製して得られた標品を充てた。

2. アミノ酸分析

各 Ti^b 型 K T I およびコントロールの凍結乾燥標品

から 1 mg をひょう量し、0.6 ml の 1 % フェノールを含む 6 N 定沸点塩酸とともに試験管に入れ、冷却・脱気した後、封管して 110 °C で 24 h 加水分解を行なった。加水分解終了後、開管して 1 h 加熱脱気を行ない HCl を除去した。得られた乾固物を 0.2 N クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2) に溶解し、Dionex DC-4A アミノ酸自動分析機にかけてアミノ酸組成を求めた。得られた結果は、K T I の総残基数 181 に対する個々のアミノ酸残基数で示した。

3. ブロムシアン (CNBr) 分解物の分析

ツルマメの 2 系統 (Kankoku, Morioka) とダイズ 1 系統 (Norin 2) から精製した Ti^b 型 K T I およびコントロールの凍結乾燥標品 10 mg を 70 % ギ酸 1 ml に溶解し、等量の CNBr 溶液 (CNBr 10.6 mg / 70 % formic acid 1 ml) と良く混合した後、密栓して 37 °C の恒温器の中で 48 h 分解を行なった。分解終了後、5 倍量の水を加えて凍結し、凍結乾燥を行なった。CNBr を完全に除去するために凍結乾燥したサンプルを再び水に溶解し

て凍結乾燥を行なった。それぞれの最終標品は、LAEM-MLI(1970)のSDS-ゲル電気泳動法にかけ、CNBrによって切断されたペプチドの長さを比較した。ただし、分離ゲルには、10 - 15 % のアクリルアミドの濃度勾配をつけた。

結果および考察

ダイズの Ti^a 型 K T I のアミノ酸配列は、ODANI et al. (1973) によってすでに決定されており、181 個のアミノ酸残基から構成されていることが知られている。最近、残りの Ti^b および Ti^c 型 K T I についても一次構造が解明された (金ら 1984)。これによると、 Ti^a 型と Ti^b 型との間で注目すべき差異は、 Ti^a 型にはメチオニン残基が 2 個 (^{84}Met , ^{114}Met) 含まれているのに対し、 Ti^b 型は Met 残基を 1 個 (^{84}Met) しか含んでいないことである。したがって、本節ではこれらの Met 残基に注目して実験を行なった。

Table III-4 は、ダイズおよびツルマメの Ti^b 型 K T I のアミノ酸組成を示している。同時に分析した Ti^a 型 K T I の Met 残基数は 2 個であったのに、 Ti^b 型 K T I は、ダイズおよびツルマメの両種において 1 個の Met 残基しか含んでいなかった。また、両種は他のすべてのアミノ酸残基についても同じ組成であった。

ついで、タンパク質ポリペプチド鎖の中の Met 残基を特異的に認識して切断する薬品であるシアン化臭素

Table III-4 Comparison of the amino acid compositions of the Ti^b-type KTI(G.soja and G.max).

Amino Acid	Kankoku	E 6	Norin 2
Asp	26.9	27.4	27.9
Thr	8.2	8.0	8.2
Ser	12.9	13.6	11.3
Glu	19.7	19.6	19.7
Pro	9.4	9.1	9.4
Gly	19.2	20.0	17.4
Ala	10.0	10.5	8.8
Val	13.1	12.2	12.5
Ile	12.8	13.0	13.5
Leu	12.6	12.3	13.0
Tyr	3.4	3.4	3.5
Phe	10.0	10.1	11.4
Lys	9.5	9.2	10.3
Arg	9.4	9.0	10.6
His	1.3	1.1	0.6
Met	0.6	0.7	0.7
Cys	2.0	1.8	2.1
Total	181.0	181.0	181.0

24 h hydrolysates were analyzed. Number of the amino acid residues was calculated under the condition that total residues of KTI(Ti^b) were assumed as 181 each. Kankoku and E 6(G.soja) and Norin 2(G.max).

(CNBr)を用いて Met 残基の個数とポリペプチド鎖中のおおよその位置を推定した。ダイズの Ti^b 型 K T I は、Met 残基が鎖内のほぼ中央に位置しており、これをはさんでジスルフィド架橋が形成された構造をしている。そこで、これを CNBr により Met 残基のところで切断して SDS-ゲル電気泳動法にかけると、ジスルフィド架橋を切断しない場合、コントロールと同じ易動度のバンドを与え、切断するとほとんど同じ大きさの2本の断片 (fragment)に分かれるものと考えられるが、予想どおりの結果が得られた (Fig. III-12)。そして、ツルマメの2つの Ti^b 型 K T I においてもまったく同じ結果が得られた。

以上の分析結果は、ダイズとツルマメの Ti^b 型 K T I がまったく同じタンパク質であることを示している。金ら (1984) がダイズの3つの多型の一次構造を比較した結果、 Ti^a 型と Ti^b 型で8残基、 Ti^b 型と Ti^c 型で9残基、 Ti^a 型と Ti^c 型で1残基のアミノ酸においてそれぞれ差異が認められた (Fig. III-13)。 Ti^c 型 K T I は、ダイズ4系統においてしか認められていないので、ダイズが分化した後で1回の点突然変異 (point muta-



Fig. III-12 CNBr-cleavage of Ti^b -type KTI in *G. soja* and *G. max*. Right: non-reduced condition, Left: reduced condition. 1: *G. soja* E.6, 2: *G. soja* Kankoku (K.38), 4: *G. max* Norin 2, 4: control (non-cleaved Ti^b -type KTI purified from Norin 2).

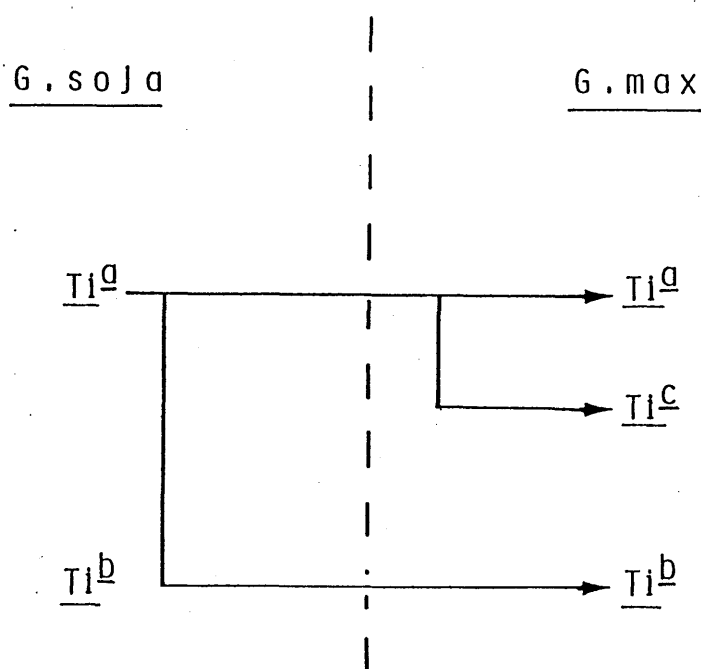


Fig. III-13 Phylogenetic relationship between cultivated and wild soybeans, based on comparison of SDS-PAGE patterns for CNBr-treated KTI's and amino - acid composition.

tion) により出現したと思われる。一方、 Ti^b 型 K T I は、 Ti^a 型 K T I と相互に独立した 8 残基において異なっているので、両者は、少なくとも 8 度の point mutation を経て分化したことになるとと思われる。このことから、ツルマメとダイズにおいて、それぞれ独立に Ti^a と Ti^b の分化がまったく同様に起こったと考えることは非常に難しい。したがって、Fig. III-14 に示したように、ツルマメにおいて Ti^a 型 K T I と Ti^b 型 K T I が分化し、それぞれ独立にダイズに継承され、後に、ダイズにおいて Ti^c 型 K T I が Ti^a 型 K T I から分化したと考えるのが妥当であると思われる。

このように、本節の実験結果は、ツルマメからダイズへの進化の道筋が 2 つ以上あったことを示唆していると思われる。

第 IV 章 種子に含まれる貯蔵タンパク質の 比較研究

種子タンパク質は、発芽の際、胚に窒素やアミノ酸を供給しているのみならず、人間や動物の主たるタンパク質の供給源として重要である。このために、貯蔵タンパク質に関する研究が 1875 年に開始されたことは不思議ではない。その後の研究は、ほかのタンパク質におくれをとった。しかしながら、最近、貯蔵タンパク質に関する研究が注目されてきた。これは、健康上の理由で動物性タンパク質に代わって植物性タンパク質の重要性が認識されてきたこと、および、このタンパク質が大量に産生されるため遺伝子発現の制御のモデルとして魅力的であるからである (LARKINS 1980)。

OSBORNE and CAMPBELL (1898) は、エンドウ (Pisum sativum) を材料として貯蔵タンパク質に関する研究を開始した。彼らは、種子タンパク質の大部分がグロブリン (globulin) であり、これがレグミン (legumin) およびビシリン (vicilin) の 2 つに分けられることを発見した。その後、DANIELSSON (1949) は、超遠心分離法を用いて

分析を行ない、レグミンおよびヒシリンの沈降定数がそれぞれ 7 S および 11 S であることを報告した。さらに、DANIELSSONは、マメ科 8 族 34 種のグロブリン画分を分析し、小数の例外を除いてすべての種がおおよそ 7 S および 11 S の沈降定数を持つ 2 種類のグロブリンを含んでいることを認めた。KLOZOVÁ and KLOZ(1972) および DUDMANN and MILLARD(1975) は、マメ科数族の 7 S および 11 S 成分の免疫化学的類似性を比較した。DERBYSHIRE et al.(1976) は、超遠心分析およびアミノ酸分析によりマメ科植物全般に 7 S および 11 S 成分が存在していることを明らかにした。

多くのマメ科植物の種子は、乾燥重量の 25 - 35 % のタンパク質を含んでいる。これに対して、ダイズは、40 - 45 % のタンパク質を含んでおり、野生種（ツルマメ、G. soja）では、50 % に達する系統も見いだされている（海妻 1975）。ダイズの貯蔵タンパク質の 7 S および 11 S に相当する成分は、それぞれ グリシニン（glycinin）およびコングリシニン（ β -conglycinin）と呼ばれており、両者は、ダイズタンパク質の約 80 % を占めていることが知られている（越山 1976, THANH

and SHIBASAKI 1976)。ダイズの 7 S および 11 S グロブリンは、それぞれ数種のサブユニットから構成されている。すなわち、7 S サブユニットは、 α 、 α' 、 β に分けられ (THANH and SHIBASAKI 1977)、11 S サブユニットは、酸性 (Acidic) および塩基性 (Basic) 2 種に大きく分けられる (CATSIMPOOLAS et al. 1971)。さらに、これらのサブユニットは、2 個以上のポリペプチドから成っているいわゆる "microheterogeneity" を有していることが知られている (KITAMURA and SHIBASAKI 1975)。また、これらのタンパク質は、酵素のように特異的な活性が認められないが、"量が非常に多い" というユニークな特徴を有している。

前章では、K T I および K T I L P という特定のタンパク質分子種にのみ注目して実験を行なった。その結果、Glycine 属植物の類縁関係についていくつかの知見が得られた。しかしながら、特定の成分のみを比較することによって全体的な類縁関係を反映した結果が得られるのかどうか疑問が持たれる。そこで、本章では、種子に含まれている貯蔵タンパク質の比較を試みた。

第 1 節 種子貯蔵タンパク質の SDS-ゲル電気泳動法による比較

本節では、Glycine 属 9 種 30 系統を供試材料として、これらの種子貯蔵タンパク質を SDS-ゲル電気泳動法を用いて比較し、Glycine 属各種の類縁関係について検討した。また、Glycine 属と他のインゲンマメ族 (tribe Phaseoleae) 6 属との泳動パターンを比較することにより、(1) Glycine 属の種子タンパク質にはどのような特徴が認められるか、(2) ダイズの起源について検討するための供試材料の範囲を Glycine 属に限定して良いかの 2 点について知見を得ようとした。

本論に入る前にひとつ断わっておかなければならない。ダイズの 7 S グロブリンサブユニットの α 、 α' 、 β サブユニットの分子量は、それぞれ 57, 58, 43 Kd であるが、SDS-電気泳動法においては二量体となって泳動する性質があるために、それぞれの分子量があたかも 68, 76, 53 Kd であるかのような挙動を示すことが知られている (THANH and SHIBASAKI 1977)。そこで本節にかぎり、7 S サブユニットの分子量を SDS-電気泳動法に

おける易動度を基準として 50 Kd 以上の分子量を持つ成分として取り扱うことにする。

材料および方法

1) 供試材料

本研究では、Glycine 亜属 6 種 25 系統、G.latifolia (4 系統)、G.tabacina (8)、G.clandestina (4)、G.canescens (5)、G.tomentella (3)、G.falcata (1)、Bracteata 亜属 1 種 3 系統、G.wightii (3) および Soja 亜属 2 種 2 系統、G.soja (1)、G.max (1) の完熟種子を粉碎し、実験に供した。インゲンマメ族からは、種子が入手できた 6 属、チョウマメ属 (Clitolia)、クズ属 (Pueraria)、ヤブマメ属 (Amphycarpaea)、ノササゲ属 (Damasia)、ササゲ属 (Vigna)、インゲンマメ属 (Phaseolus) を供試材料として用いた (Table IV-1)。

2) 尿素系 SDS- ゲル電気泳動法

各供試材料の粉碎種子 15 mg を 0.5 ml の SDS- サンプルバッファーとともに試験管に入れ、ブレンダーにかけて抽出した後、3000 rpm で 15 分間遠心分離を行な

Table IV-1 The materials used to compare seed storage proteins
in the genus *Glycine* and tribe *Phaseoleae*.

Genus and Species Name	No. of Line	Line Name (2n)
<i>Glycine</i> subgenus <i>Glycine</i>		
<i>G. latifolia</i>	4	PI.245332(80), Inverelle(40) PI.319696(40), Obtusa(40)
<i>G. tabacina</i>	8	Giken(80), Hutton(80) Helidon(80), Taichung(80) PI.319697(80), PI.193232(80) PI.272099(80), PI.248253(80)
<i>G. clandestina</i>	4	PI.233138(40), PI.246590(40) PI.248252(40), Gandai(40)
<i>G. canescens</i>	5	PI.399478(40), G.1117(40) G.1249(40), G.1301(40) White cliff(40)
<i>G. tomentella</i>	3	Eskdale(78), Lindeman(80) Moapitou(80)
<i>G. falcata</i>	1	Nagoya(40)
subgenus <i>Bracteata</i>		
<i>G. wightii</i>	3	Clarence(22), Cooper(22) Tinaroo(22)
subgenus <i>Soja</i>		
<i>G. soja</i>	1	Morioka(40)
<i>G. max</i>	1	Raiden(40)
<i>Phaseolus coccineus</i>	1	(22)
<i>Vigna mungo</i>	1	(22)
<i>Pueraria lobata</i>	1	(24)
<i>Dumasia truncate</i>	1	(20)
<i>Amphicarpaea edgeworthii</i>	1	(20)
<i>Clitoria ternatea</i>	1	(16)

い、上清を泳動試料とした。1レーン当たり、10 - 15 μ l の試料量で良好な泳動パターンを得ることができた。本実験でもちいた SDS- 電気泳動法は、アクリルアミドの濃度勾配を 10 - 15 % としたことを除いて、III - 1) で用いた方法と同じである。

結 果

Glycine 属およびインゲンマメ族6属の

種子貯蔵タンパク質の比較

ダイズ種子に含まれるいくつかのタンパク質分子種はすでにその構造が解明されており、SDS-ゲル電気泳動法における易動度が知られている。なかでも、7 S および 11 S グロブリンは種子タンパク質の約9割を占めているために粗抽出液を泳動試料としても両者のサブユニットのバンドが同定できた。すなわち、Fig. IV-1 に示したとおり、7 S グロブリンの3つの主要なサブユニット (α , α' , β) と 11 S グロブリンの酸性 (Acidic) および塩基性 (Basic) サブユニットは濃い明瞭なバンドとして現われた。この他、Kunitz トリプシン・インヒビター (Kunitz trypsin inhibitor)、リボキシゲナーゼ (lipoxygenase) のバンドが粗抽出液の泳動パターンにおいて識別できた。そして、これらの主要な成分は大きく4つの領域；第I領域 (68-100 Kd)、第II領域 (53-64 Kd)、第III領域 (35-42 Kd)、第IV領域 (21-23 Kd) に分かれて泳

動し、第 I、II 領域には 7 S サブユニットが、そして、第 III、IV 領域には 11 S サブユニットがそれぞれ主要成分として含まれていることが知られている (Fig. IV-1, Table IV-2)。

冒頭に述べたように、まず、Glycine 属と他のインゲンマメ族 6 属の種子貯蔵タンパク質の比較を行なった。Fig. IV-2 に示したように、インゲンマメ族各属の種子タンパク質の泳動パターンには著しい変異が認められた。しかし、分子量が約 50 Kd 以上に相当するゲル領域 (第 I、第 II 領域) に認められる主要なバンドに着目すると、つぎの 3 つのグループに分けられた。a) アズキ、クズおよびインゲンマメ属においては、第 II 領域のみに主要なバンドが認められた。b) チョウマメ属では、第 I 領域に主要なバンドを持っていた。ほかに、分子量 10 Kd 以下の領域に濃く染色されるバンドが認められた。c) ダイズ (Glycine)、ヤブマメおよびノササゲ属では、第 I 領域および第 II 領域の 2 つの領域に主要なバンドが存在していた。ヤブマメおよびノササゲ属のパターンを Glycine 属 3 亜属のそれと詳しく比較したところ、まず、注目されたことは、Glycine 属の G. wightii とヤブマ

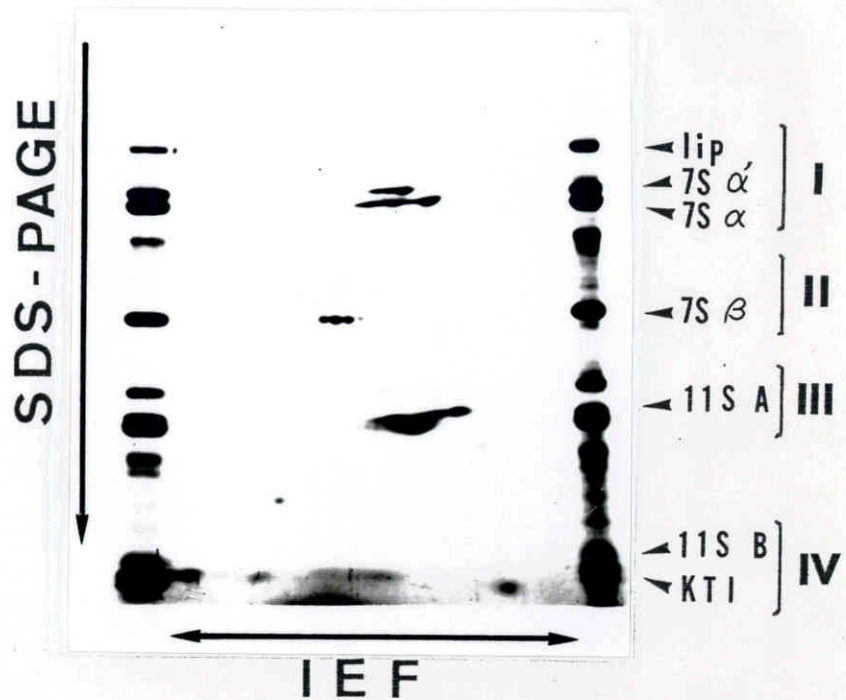


Fig. IV-1 One dimensional (SDS-gel electrophoresis) and two dimensional (isoelectric focusing X SDS-gel electrophoresis) electrophoretic patterns of soybean seed storage proteins. Major bands of globulin subunits were separated into four regions (I - IV) by SDS-gel electrophoresis.

lip: lipoxygenase, 7S α' : 7S globulin α' subunit, 7S α : 7S globulin α subunit, 7S β : 7S globulin β subunit, 11S A: 11S globulin acidic subunits, 11S B: 11S globulin basic subunits, KTI: Kunitz trypsin inhibitor.

Table IV-2a Molecular weight of 7 S globulin subunits.

<i>Subunit</i>	<i>Mr.</i>	
	<i>Monomer</i>	<i>Dimer</i>
α	57 Kd	68 Kd
α'	58 Kd	76 Kd
β	43 Kd	53 Kd

determined by Thanh and Shibasaki (1977).

Table IV-2b Molecular weight of 11 S globulin subunits.

<i>Subunits</i>	<i>Mr.</i>
Acidic	35 - 42 Kd
Basic	21 - 23 Kd

determined by Kitamura and Shibasaki (1975).

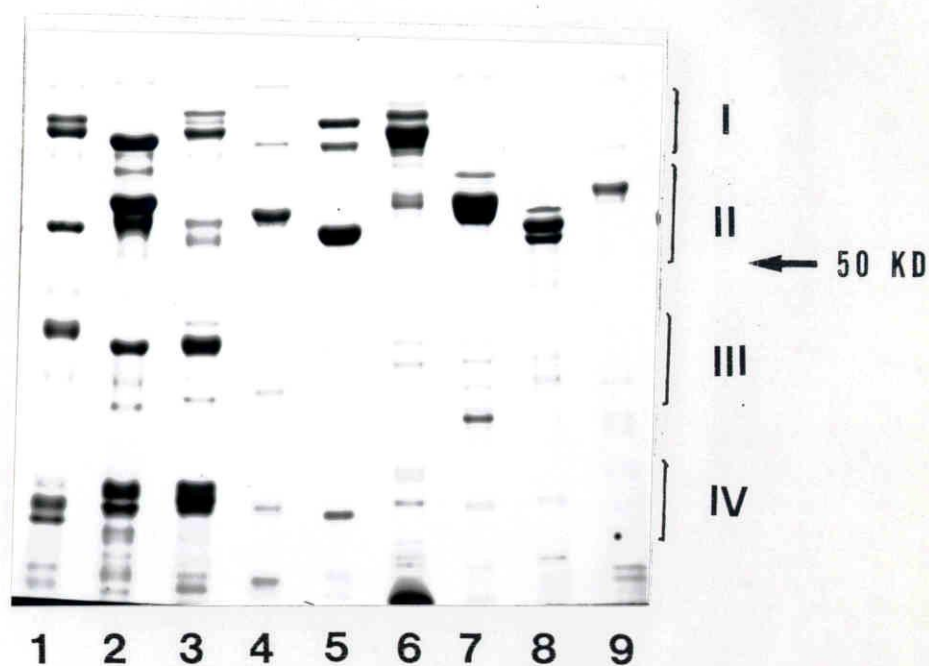


Fig. IV-2 SDS-gel electrophoretic patterns of total seed proteins in seven genus of Phaseoleae. 1: *Glycine max* (soybean), 2: *G. wightii*, 3: *G. tomentella*, 4: *Amphicarpaea edgeworthii*, 5: *Damasia truncata*, 6: *Clitolia ternatea*, 7: *Phaseolus coccineus*, 8: *Vigna mungo*, 9: *Pueraria lobata*.

メの第Ⅰおよび第Ⅱ領域のメジャーバンドの易動度がほとんど等しいことであった。また、ノササゲ属の第Ⅰ、Ⅱ領域のパターンは、ダイズと良く似ていたが、第Ⅲ、Ⅳ領域のバンドはヤブマメと同様にまったく貧弱であった。

ダイズ(Glycine)属を除くインゲンマメ族の他の属では、分子量 50 Kd 以上の領域(第Ⅰおよび第Ⅱ領域)に認められるバンドが著しく濃く染色されたが、50 Kd 以下の領域(第Ⅲおよび第Ⅳ領域)にはほとんどバンドが認められなかった。これに対し、Glycine および Bracteata 両亜属は、第Ⅰ、Ⅱ領域とともに第Ⅲ、Ⅳ領域にもダイズと較べて量的には少ないけれども主要なバンドを現わした。したがって、インゲンマメ族における Glycine 属のタンパク質のひとつの特徴としては、第Ⅲ、第Ⅳ領域に主要成分(分子量が 50 Kd 以下のグロブリン)が存在することを挙げることができる。

つぎに、Glycine 属内の亜属間・種間で種子貯蔵タンパク質の比較を行なった。上述したように Glycine 亜属および Bracteata 亜属のパターンには、ダイズと同

様に 4 つの領域に主要なバンドが認められ、種子に含まれる貯蔵タンパク質の組成が亜属間で良く類似していることが判明した (Fig. IV-3)。しかし、これらの主要成分のバンドパターンには、亜属間・種間で多様な変異が認められた。なかでも、ダイズの 11 S 酸性サブユニットは他の 2 亜属の対応するバンドと較べてはるかに発達していることは注目に値することであった。

Glycine 亜属各種の種間・種内変異について調べた結果、G.latifolia では供試した 4 系統間で主要成分のパターンに差異が認められなかった。このうち PI.245332 は 4 倍体の系統であるが、そのパターンは、2 倍体の系統のそれと同じであった。G.canescens と G.clandestina の両種のバンドパターンは、全体的に良く類似していた。G.clandestina では、第 II 領域のバンドにわずかな変異が認められた以外は種内変異は認められなかった。また、G.canescens では、1 系統 (G 1117) が第 I 領域に 2 本のバンドを持っていた他は、主要なバンドのパターンに種内変異は認められなかった。一方、4 倍体種である G.tomentella および G.tabacina の両種は、2 倍体種よりもバンドの数が多く、すべての領域にわたっ

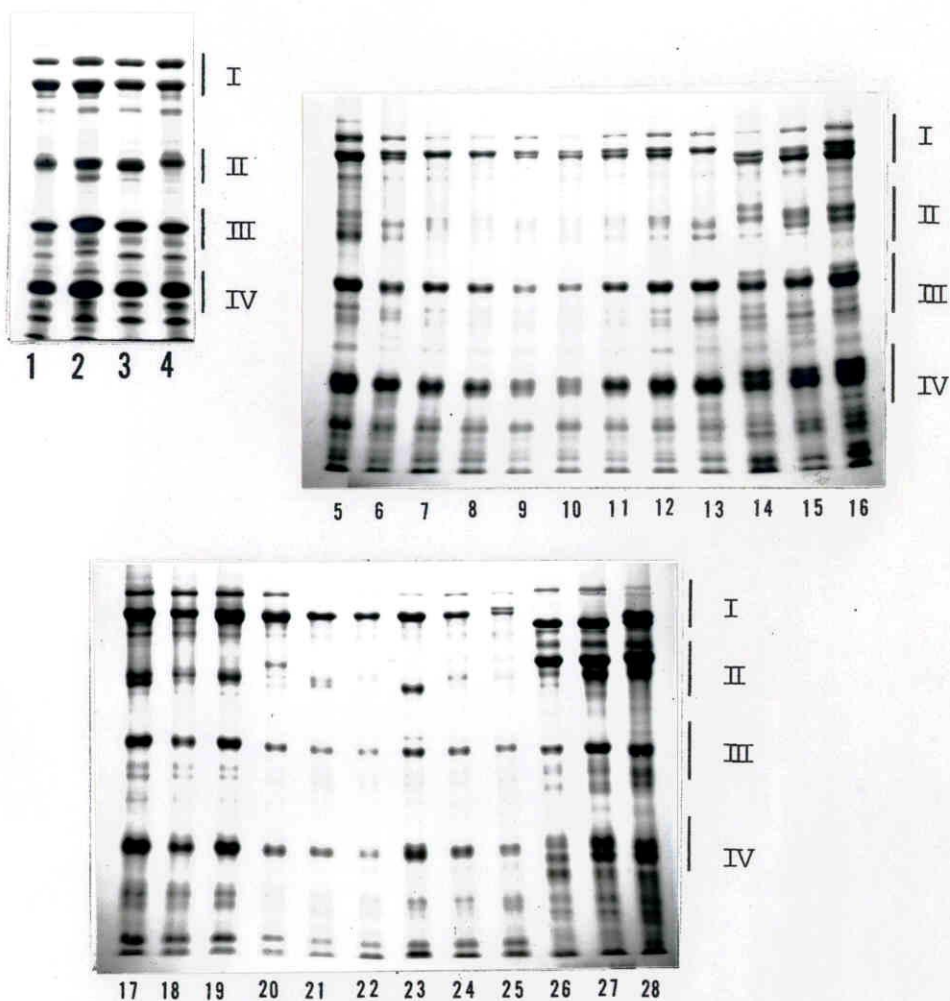


Fig. IV-3 SDS-gel electrophoretic patterns of total seed proteins from *G. latifolia*(1-4), *G. falcata*(5), *G. tabacina*(6-13), *G. tomentella*(14-16), *G. clandestina*(17-20), *G. canescens*(21-25) and *G. wightii*(26-28) in the genus *Glycine*.

て変異に富んでいた。G. tabacina は 7 S サブユニット（第 I 領域）のバンドの数に 1 - 3 本の変異を有し、G. tomentella では第 I 領域に 2 - 4 本のバンドが認められ、Glycine 亜属のなかで最も発達した 11 S サブユニット（第 III、IV 領域）を持っていた。G. falcata は 1 系統のみを供試したが、第 I、II 領域のバンドが良く発達していた。

Bracteata 亜属の G. wightii の 3 系統では第 I 領域の 7 S サブユニットのバンドの数に 1 - 2 本の変異が認められた。また、第 IV 領域のバンドにも差異が認められた。一方、Soja 亜属に属しているダイズとツルマメのバンドパターンはまったく同じであった。

考 察

ダイズ種子の 7 S グロブリンは、分子量 53-78 Kd のサブユニットから構成され、11 S グロブリンは、分子量 23-42 Kd のサブユニットから構成されている。

Glycine 属の 2 亜属 (Glycine, Bracteata) においても、これに対応する領域に主要なバンドを認めた。一方、本研究の結果、Glycine 属以外の属の種子タンパク質には、分子量 50 Kd 以下の主要成分がほとんど認められなかった。DANIELSSON(1949) は、超遠心分析によりこれらすべての属に、7 S および 11 S の沈降定数を持つグロブリンが主要成分として含まれていることを明らかにした。したがって、これらの属の 11 S グロブリンは、7 S グロブリンと同様に 50 Kd 以上の分子量を持つ“高分子量”のサブユニットから構成されていると推測される。もしそうであるならば、ダイズおよび Glycine 属のタンパク質の特徴は、“低分子量”の 11 S グロブリンサブユニットを多量に含んでいることにあるので、この高分子量 11 S サブユニットから低分子量サブユニットへの進化は、ダイズの起源と関連して興味深い問題

である。

分子量 50 Kd 以上の主要なバンドに注目して比較したところ、インゲンマメ属の中でヤブマメ属およびノササゲ属の種子タンパク質は、Glycine 属により類似した組成を持っていると考えられた。しかし、この2つの属は、前述したようにダイズの特徴である低分子量の主要成分を含んでいないことからダイズの成立に直接関与した可能性は低いと思われた。本論文の主たる目的は、ダイズの起源を調べることであるので、この2つの属をこの後の実験の供試材料とはしなかった。しかしながら、このヤブマメおよびノササゲ属と Glycine 属との類縁関係は密接であることが予想されるので今後解決しなければならない重要なテーマであると考ええる。

Glycine 属 3 亜属の電気泳動パターンを比較した結果、Glycine および Bracteata の亜属間・種間で 7 S サブユニット（第 I 領域）のバンドの数にいろいろな変異が認められた。しかし、このような変異が類縁関係の指標となるかどうかについてはさらに詳しい分析を行なう必要があると思われる。

Glycine 亜属の種間の類縁関係については、G.cland-

estina と G.canescens のパターンが類似していたこと以外は注目すべき結果は得られていない。しかし、G.latifolia において 2 倍体および 4 倍体の系統のパターンに差異が認められなかったこと、そして、4 倍体種である G.tabacina および G.tomentella は他の 2 倍体種に較べてバンドの数が多く、種内変異が大きかったことは興味ある結果である。

グイズの 11 S 酸性サブユニット（第Ⅲ領域）は他の 2 亜属のそれと較べてはるかに発達していたが、Glycine 属野生種の中で第Ⅲ領域のバンドが最も発達していた種は G.tomentella であった。グイズと G.tomentella が近縁であるということはこれまでもいくつかの観点から言われているが、本実験の 11 S サブユニットに関する知見はこのことと一致していると思われる。両種の 11 S サブユニットをさらに詳しく比較することができれば、グイズの起源に関する重要な知見が得られるであろう。

第 2 節

Glycine 属植物の種子貯蔵タンパク質の
ポリペプチド・マップの比較

O'Farrell によって開発された 2 次元電気泳動法（ポリペプチドマップ分析）は、検出感度がたいへんにすぐれている方法である。例えば、大腸菌を用いた実験では、1000 個以上のタンパク質によるスポットが検出されている（O'FARRELL 1975）。換言すれば、比較の対象としているタンパク質が持つユニークな特性が同じであるという条件のもとで、ポリペプチドマップ分析法にかけてスポットの現われる位置が類似していればいる程、両タンパク質の間の相同性が高いと考えられる。マメ科種子のグロブリンには、特異的な活性が認められないが、前述した“量が格段に多い”という特徴が利用できると思われる。

このように、ポリペプチドマップ分析は、複数のタンパク質分子種を一度に比較することができることおよび 2 次元に展開したスポットパターンとして比較できるので、一次元の電気泳動法によるバンドパターンに較べて多くの情報を得ることができることなど多くの利点を有

している。この2次元電気泳動法は、これまでに、モルモット (AQUADRO and AVISE 1981)、クワ (HIRANO 1982) などの系統進化の研究に應用されており、今後、系統分類学における有力な分析法となると思われる。そこで本研究でも、Glycine 属植物の類縁関係についての研究の一環としてポリペプチドマップ分析の適用を試みた。

材料および方法

1) 供試材料

供試材料としては、Glycine 亜属 6 種 23 系統、Bracteata 亜属 1 種 4 系統および Soja 亜属 2 種 2 系統を用いた (Table IV-3)。

2) ポリペプチド・マップ分析

本研究に用いた方法は、O'FARRELL(1975)の方法に準拠した 2 次元電気泳動法である。まず、粉碎種子 100 mg を秤とり 0.1 % 2-mercaptoethanol, 8 M 尿素を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 1 ml とともに乳鉢中で摩砕し、遠心分離 (3000 rpm) して得られた上清を泳動試料とした。

1 次元目の等電点焦点法は以下のようにして行なった。
0.5 % アンフォライン (Ampholine pH 3.5 - 10.0)、
1.8 % ファルマライト (Pharmalyte pH 4.5 - 6.0)、
6 M 尿素および 5 % アクリルアミドを含むディスクゲ

Table IV-3 The materials used for polypeptide map analysis.

Species name	No. of line	Line name (2n)
subgenus <i>Glycine</i>		
<i>G. latifolia</i>	3	PI.245332 (80) Inverelle (40) PI.319696 (40)
<i>G. tabacina</i>	12	Giken (80) Hutton (80) Helidon (80) Taichung (80) PI.319697 (80) PI.193232 (80) PI.272099 (80) Chinchila (80) Miyakojima- tsurumame (80) Bouko-tsurumame (80) PI.248253 (80) Miles (80)
<i>G. clandestina</i>	5	PI.233138 (40) PI.255745 (40) PI.246590 (40) PI.248252 (40) Gandai (40)
<i>G. canescens</i>	1	PI.399478 (40)
<i>G. tomentella</i>	1	Eskdale (78)
<i>G. falcata</i>	1	Nagoya (40)
subgenus <i>Bracteata</i>		
<i>G. wightii</i>	4	Clarence (22) Cooper (22) Tinaroo (22) Miyasakashiro (22)
subgenus <i>Soja</i>		
<i>G. soja</i>	1	E. 1 (40)
<i>G. max</i>	1	Raiden (40)

ル ($0.5\phi \times 55 \text{ cm}$) を用意し、上部 (陰極側) の試料溝に $15 - 50 \mu\text{l}$ の試料を添加した。試料の上に厚さ 5 mm 程度の保護液 (1 % Ampholine, 4 M 尿素) を重層して、試料が直接電極液に触れないようにした。泳動は、陽電極液として 3 % リン酸、陰電極液として 0.2 M 水酸化ナトリウムを用いて 150 V の定電圧で 3.5 h 行なった。泳動終了後、直ちにガラス管からゲルを取り出し、4 ml のサンプルバッファーに 15 分間浸漬して平衡化を行なった。

2次元目の SDS-電気泳動法は、前章の2次元泳動法の2次元目と同じであるが、アクリルアミドの濃度勾配は 10 - 18 % とした。なお、3本のディスクゲルを並べて泳動する場合は、ゲルの陽極側 1 cm をカットして行なった。

Table III-2 Rf values and S/F ratios of KTILP
in the genus *Glycine*

Species name	Rf value		S/F ratio
	S	F	
<i>G. latifolia</i>	0.61	0.65	2.1
<i>G. tabacina</i>	0.63	0.66	1.9
<i>G. clandestina</i>	0.61	0.65	4.3
<i>G. canescens</i>	0.69	0.72	0.6
<i>G. wightii</i>	0.61		—
<i>G. soja</i>	0.79		—
<i>G. max</i>	0.79		—

Data was obtained from the densitogram in
Fig. III-4.

S : KTILP S or S-like protein.

F : KTILP F protein.

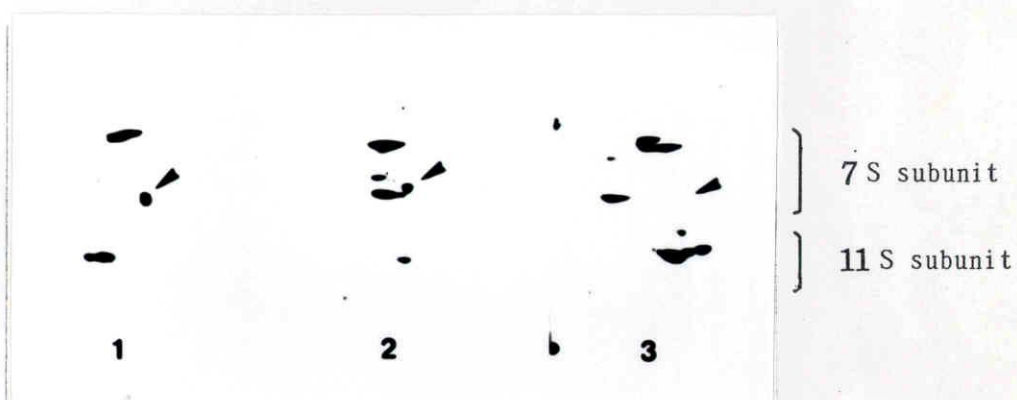


Fig. IV-4 Comparison of the polypeptide maps on the total seed proteins between three subgenera in the genus *Glycine*.

1: subgenus *Glycine* (*G. tabacina* Hutton)

2: subgenus *Bracteata* (*G. wightii* Miyasakashiro)

3: subgenus *Soja* (*G. soja* E.1)

Arrow: 50 Kd protein.

このスポット群は Glycine および Bracteata の両亜属には存在していたが、Soja 亜属でははっきりとしたスポットが認められなかった。Glycine 亜属の 50 Kd タンパク質のスポット群は多様な変異性を有していた。

これ以外には注目すべき成分を認めなかったので、本章では、主として 7 S グロブリンサブユニットのパターンの類似性や相違の程度にもとづいて、Glycine 属の類縁関係や種分化の解析を行なった。また、パターンの異なる2種の試料を等量混合したものから得られる合成パターンを既存の種のパターンと比較するという方法も行なった。

2. ポリペプチドマップの亜属間種間差異

ダイズの 7 S グロブリンには主要な構成サブユニットとして、 α 、 α' 、 β の3種がある。 α および α' サブユニットは分子量がそれぞれ 57 Kd および 58 Kd であるが、他方、 β サブユニットのそれは 43 Kd である。このため、両者は SDS-電気泳動法による易動度のはっきりと異なるので、それぞれ α 成分および β 成分と分子量的に区別して呼ぶことにする (Fig. IV -5)。

まず、Soja 亜属に属しているツルマメとダイズの2種を比較したところ、両種のパターンはまったく同じであった。この結果は供試系統を変えて実験をしても同様であった。

Fig. IV -6 には、Bracteata 亜属の3系統のポリペプチドマップを示した。7 S サブユニットのスポットの個数は、系統により変異しており、 α 成分には1個または2個、 β 成分には2個または3個の変異が認められた。

Glycine 亜属6種のポリペプチドマップは、Fig. IV -7 に示したとおりであるが、7 S サブユニットに関して次のような変異を見いだした。a) Soja 亜属および

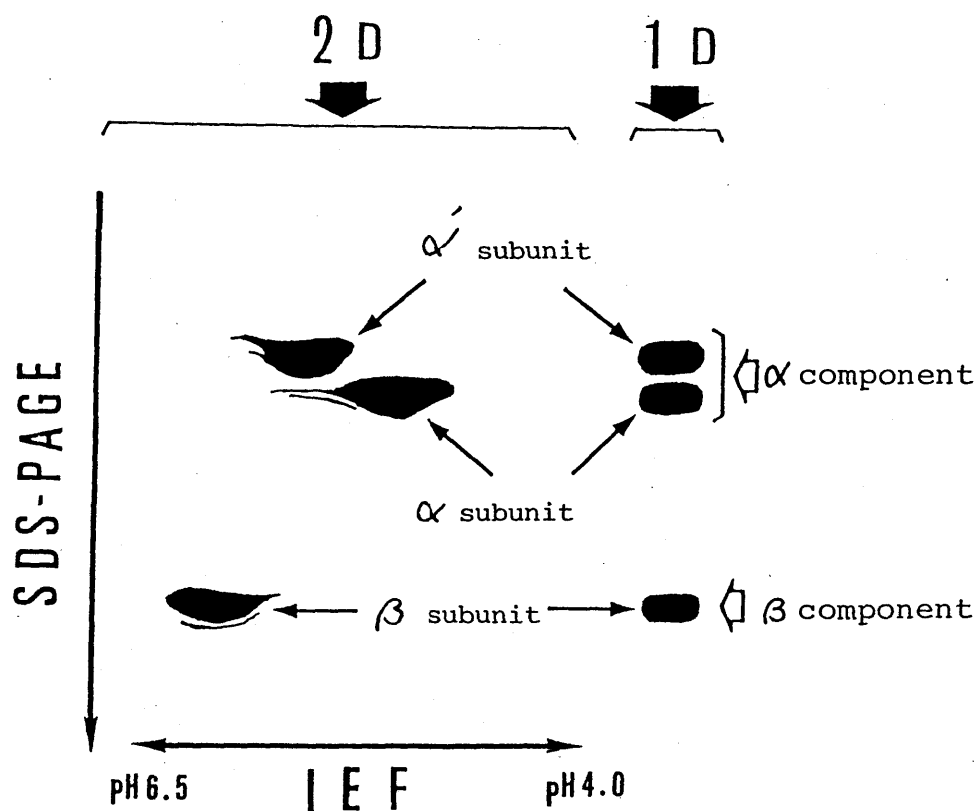


Fig.IV-5 Schematic representation of one and two dimensional electrophoretic patterns of 7S subunits from soybean (*Glycine max*). 1D: one dimensional SDS-gel electrophoresis, 2D: two dimensional gel electrophoresis (IEF X SDS-PAGE).

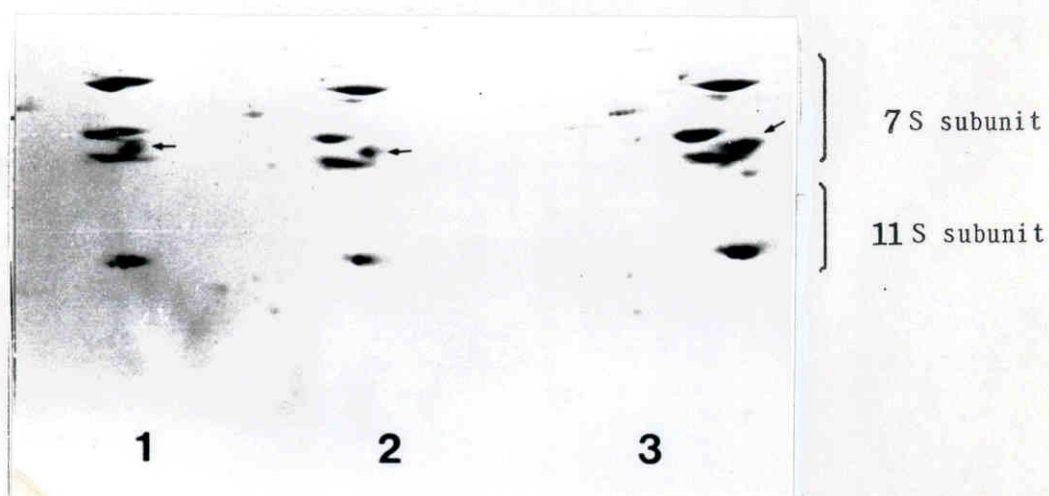


Fig. IV-6 Polypeptide maps of the total seed proteins in *G. wightii* (subgenus *Bracteata*).

1: Tinaroo, 2: Clarence, 3: Cooper.

Arrow: 50 Kd protein.

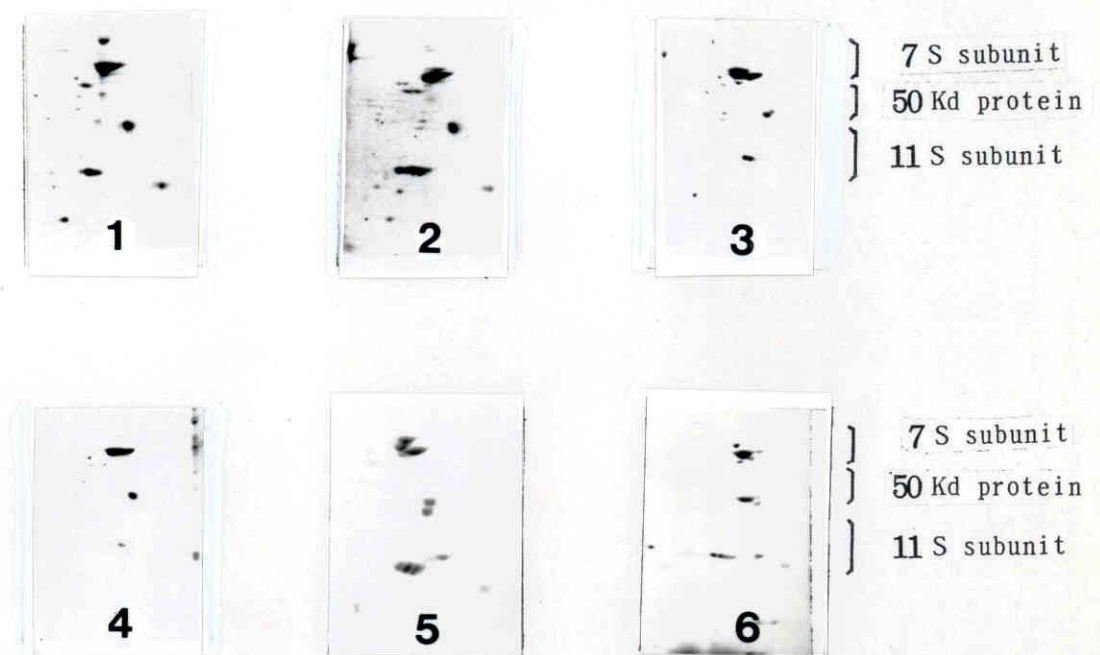
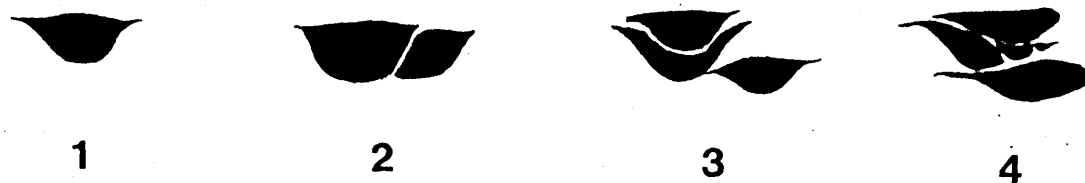


Fig. IV-7 Comparison of polypeptide maps on the total seed proteins extracted from six species of the subgenus *Glycine*. 1: *G. latifolia* (PI.245332), 2: *G. tabacina* (Tai-chung), 3: *G. clandestina* (PI.248252), 4: *G. canescens* (PI.399478), 5: *G. tomentella* (Eskdale), 6: *G. falcata* (Nagoya).

Bracteata 亜属で認められた β 成分が Glycine 亜属のいずれの種・系統においても認められなかった (Fig. IV -7)、b) α 成分の個数には、種や系統によって1個から5個の変異があった。すなわち、G.latifolia では1個、G.canescens では2個、G.clandestina では3個、G.tomentella では5個のそれぞれ α 成分を含んでいた。また、G.tabacina では1個から3個のスポットから成る3種のパターンが観察された (Fig. IV -8)。 G.latifolia および G.clandestina では種内変異が認められなかったが、G.canescens と G.tomentella には前節の SDS-電気泳動法による泳動パターンからみて種内変異があることが予想される。

11 S グロブリンの酸性サブユニットは、3亜属のいずれの種においても認められた。Soja 亜属の2種では濃く染色されたスポットから成る同様なスポットパターンを示した。Glycine および Bracteata 両亜属では、ダイズの 11 S サブユニットと同じ領域に認められるスポットは極めて貧弱であった (Fig. IV -4)。この両亜属の中では、G.tomentella の 11 S サブユニットがスポットの数および量ともに発達していた。

A



B

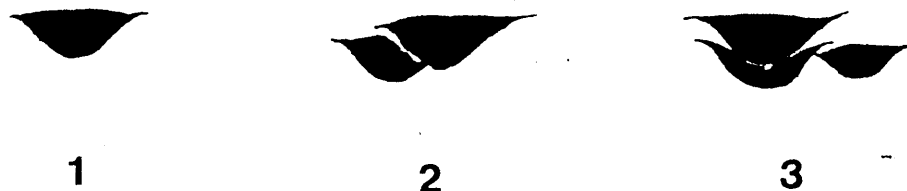


Fig. IV-8 Schematic representation of 7S spot patterns in the subgenus *Glycine*.

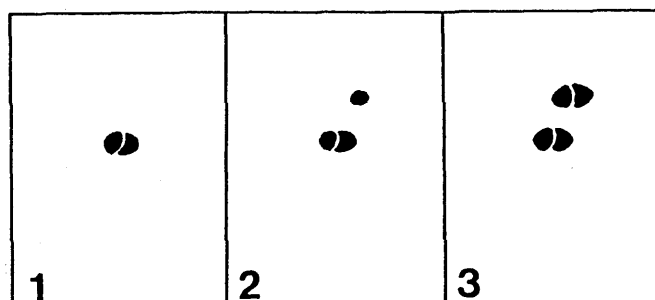
A 1: *G. latifolia*, 2: *G. canescens*, 3: *G. clandestina*,
4: *G. tomentella* (Eskdale).

B 1: *G. tabacina* (Giken, PI.193232, PI.272099,
Chinchila, Miyakojima-tsurumame, Miles),
2: *G. tabacina* (Hutton, Helidon, Taichung, PI.
319697),
3: *G. tabacina* (Bouko-tsurumame).

Glycine および Bracteata 亜属各種では、7 S 構成サブユニット群と 11 S 構成サブユニット群のスポットの間に小さなスポット群を認めた。このスポット群は、冷沈殿タンパク質画分 (WOLF and BRIGGS 1956) を泳動試料としても主要成分として認められるので、11 S 構成サブユニットの一種であると考えられた。そして、SDS-電気泳動法において 7 S の β サブユニットとほとんど同じ易動度を示すので、便宜的に 50 Kd タンパク質と命名した。この 50 Kd タンパク質には、Glycine 亜属においてさまざまな変異が認められた。すなわち、a) スポットの個数の変異、G.latifolia, G.canescens および G.falcata では 2 個、G.clandestina では 3 個、G.tomentella では 4 個のスポットを認めた。b) スポットパターンの変異、G.tabacina においてのみ Fig. IV-9 に示したような変異が認められた。

7 S および 11 S サブユニットや 50 Kd タンパク質のスポットなどを含めたポリペプチドマップ全体としてのパターンを比較したところ Glycine 亜属において最も多様な変異を認めた。しかし、各種に特異的なパターンを決定することは困難であった。G.tabacina の 1 系

A



B

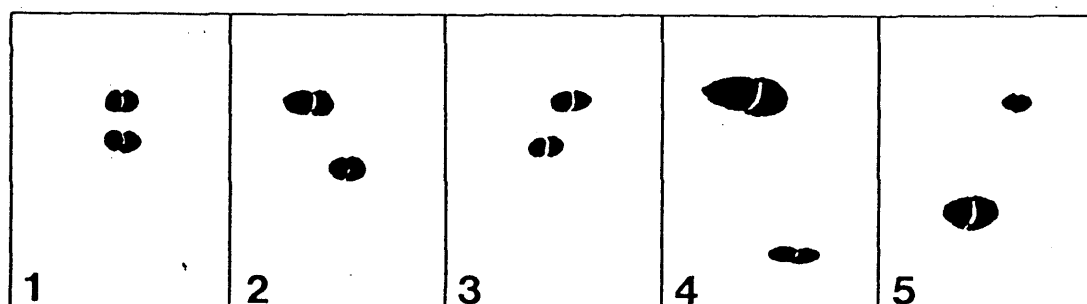


Fig. IV-9A Variability of spot numbers on 50 Kd protein in the genus *Glycine*.

1: 2 spots - *G.latifolia*, *G.canescens*, *G.falcata*,

2: 3 spots - *G.clandestina*

3: 4 spots - *G.tabacina*, *G.tomentella*.

B Variability of spot patterns on 50 Kd protein in *G.tabacina*.

1: Hutton, 2: Bouko-tsurumame, 3: PI.193232,

4: Chinchila, 5: Miyakojima-tsurumame.

統 (*Giken*) は、*G. latifolia* と良く類似したパターンを示した (Fig. IV -10)。*G. clandestina* と *G. canescens* の両種のスポットパターンはたいへん似通っていた。*G. tabacina* は種内変異が大きかったが、前節の K T I L P の分析では2つの異なるサブグループ (TAB B および TAB C) に分けられた4系統がまったく同じパターンを示したことは興味深い (Fig. IV -11)。さらに、*G. tomentella* のスポットパターンが *G. canescens* と *G. clandestina* との合成マップのパターンと矢印をほどこしたスポットを除いてほとんど一致したことは注目すべきことであった (Fig. IV -12)。

Bracteata 亜属については、供試した系統数が少なかったが、これらの系統間のスポットパターンにはかなりの変異が認められた (Fig. IV -6)。しかし、詳しい比較は行なわなかった。

亜属間の類縁関係を知るためには、どの亜属・どの種にも認められ、容易に比較できる 7 S サブユニットのスポットを手がかりとするのが適当であると考えた。そこで、*Soja* 亜属の 7 S グロブリンの α 、 α' および β サブユニットと2次元電気泳動において相同な成分が

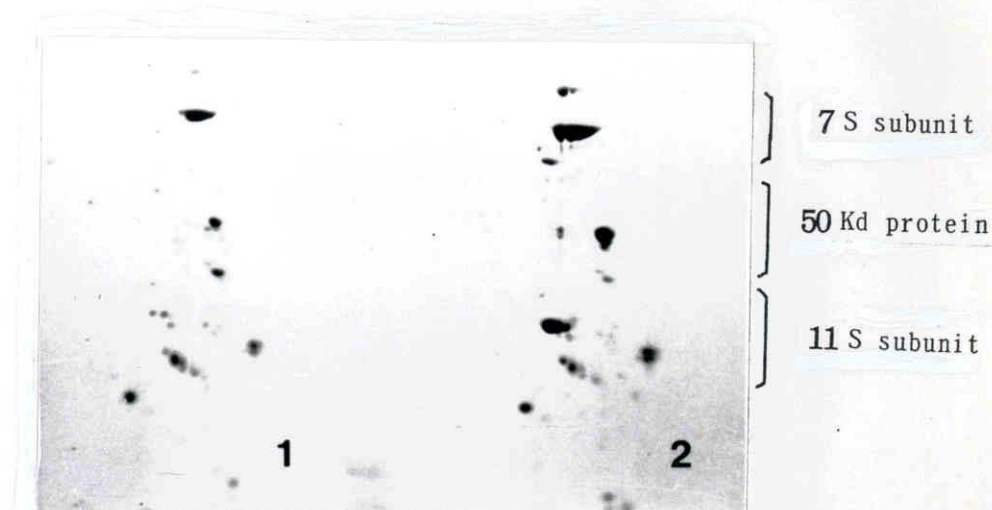


Fig. IV-10 Comparison of polypeptide maps on the total seed proteins extracted from *G. tabacina* Giken(1) and *G. latifolia* PI.245332(2).

Almost the same patterns appeared between two species except the differences in stainability of a few spots. These maps were yielded by two dimensional gel electrophoresis, 1st dim.: isoelectric focusing(pH 3.5 - 10.0) and 2nd dim.: SDS-gel electrophoresis.

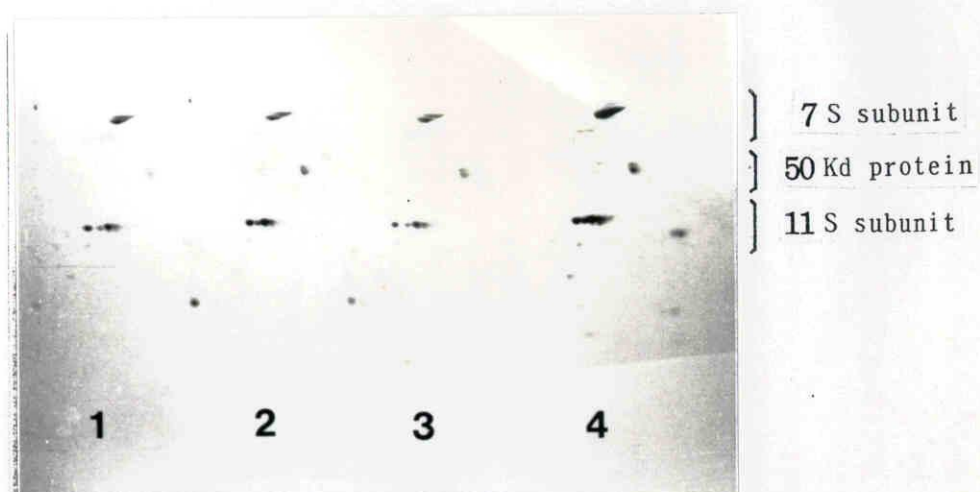


Fig. IV-11 Pattern identity in the maps yielded from four lines in *G. tabacina*.

1: Hutton, 2: Helidon, 3: PI.319697,
4: Taichung.

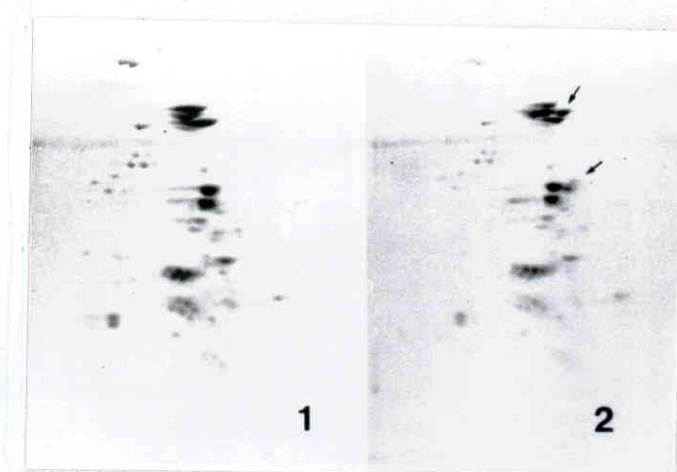


Fig. IV-12 Map synthesis analysis for *G.tomentella* Eskdale.

1: native map of seed proteins from *G.tomentella* Eskdale

2: synthetic map yielded by protein mixture(1:1) of
G.clandestina(PI.233138) and *G.canescens*(PI.399478).

Pattern identity was indicated between the two maps except in the
arrowed spots.

Glycine および Bracteata の両亜属において存在するかどうかを合成マップを作ることによって検討した。

Fig. IV-13 には、G.latifolia(PI.245332)と G.soja (E.1) との合成スポットパターンを示した。この結果、G.latifolia の α 成分は、G.soja の α' サブユニットと良く一致することがわかった。また、G.wightii の Tinaroo 系統と G.soja の E.1系統との合成マップにおいては、G.soja の α サブユニットとほとんど相同な成分が G.wightii の α 成分に存在することを認めた (Fig. IV-14)。また、両者の β 成分は、荷電量がわずかに異なっていたが、分子量は相同であった。試みに、G.latifolia と G.wightii との合成マップを作成して、それと G.soja のマップとを比較した (Fig. IV-15)。その結果、合成マップと G.soja の 7S サブユニットのスポットパターンは良く類似していたので、G.soja の α' サブユニットは G.latifolia の α 成分と、そして、G.soja の α および β サブユニットは G.wightii の α および β 成分とそれぞれ 2次元電気泳動法のレベルにおいて相同であると結論した。

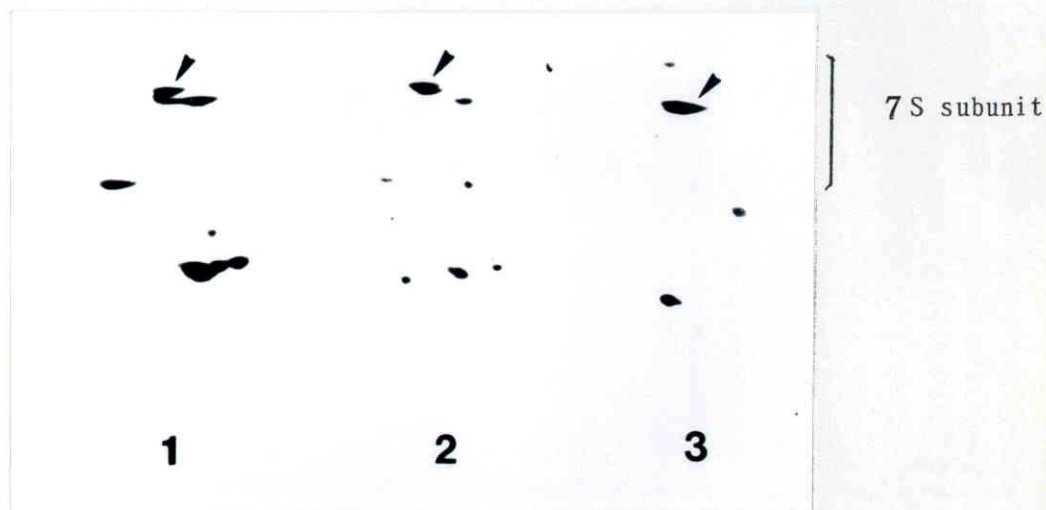


Fig. IV-13 Comparison of the spot patterns on 7S subunits between *G.latifolia* and *G.soja*.

1: *G.soja* E.1,

2: 1:1 mixture of the extracts from *G.latifolia* and *G.soja*,

3: *G.latifolia* PI.245332.

Two-dimensional electrophoretic homology between α type subunit in *G.latifolia* and α' subunit in *G.soja* was proved by consistency of the relative mobility of the two spots.

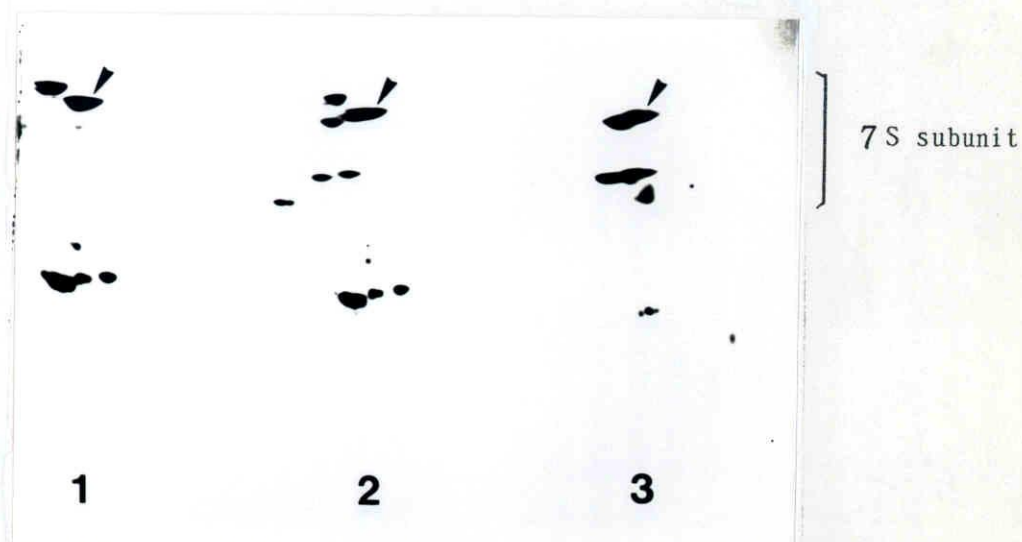


Fig. IV-14 Comparison of the spot patterns on 7S subunits from *G. wightii* and *G. soja*.

1: *G. soja* E.1,

2: 1:1 mixture of the extracts from *G. wightii*
G. soja,

3: *G. wightii* Tinaroo.

Two-dimensional electrophoretic homology was found between α type subunit in *G. wightii* and α subunit in *G. soja*.

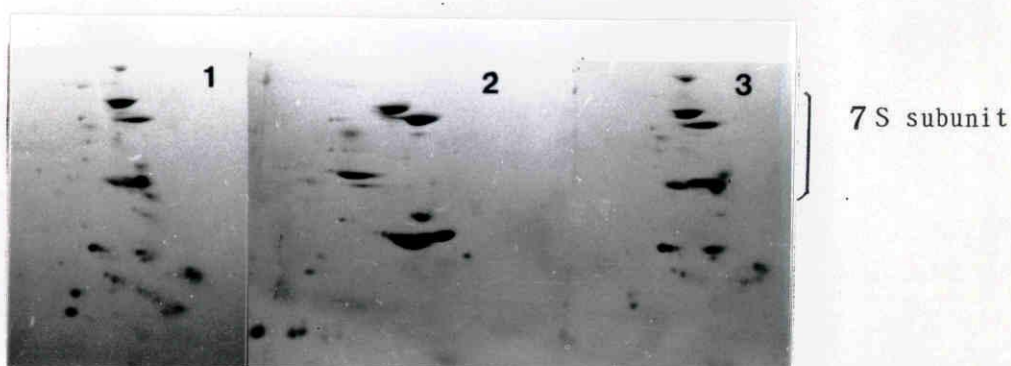


Fig. IV-15 Comparison of 7S spot patterns between *G. soja* map and the synthetic one from *G. latifolia* and *G. wightii*.

- 1: synthetic map yielded by protein mixture(1:1) of *G. latifolia* PI.245332 and *G. wightii* Miyasakashiro,
 2: native map of seed proteins from *G. soja* E.1,
 3: synthetic map yielded by protein mixture(1:1) of *G. latifolia* PI.245332 and *G. wightii* A₂.

Almost the same 7S spot pattern as in *G. soja* appeared in each of the synthetic map from the 1:1 mixture proteins of *G. latifolia* and *G. wightii*.

考 察

1. Glycine 属植物の類縁関係について

ポリペプチドマップ分析は前章の結果と同じく、Glycine 属の3亜属はそれぞれに特異的なスポットパターンを持ち、亜属内の種間の差異に較べてはるかに大きな差異で互いを明確に区別できることを明らかにした。これは、形態にもとづいた従来の分類とも良く一致している (HERMANN 1962, VERDCOURT 1966)。

Glycine 亜属各種では、一般に、それぞれの種内の系統間においてさえかなりの変異が認められた。しかし、それぞれの種に固有のパターンを特定することはできず、供試系統によっては種を越えたパターンの類似性がしばしば認められた。これは、従来の形態による種の分類に改定を要するところがあるかもしれないことを示している。しかし、どのように改定すべきかは、今後、他の側面からの研究成果とも併せて慎重に行なわれるべきであろう。

しかしながら、この点に関し、ここで特に指摘してお

きたいことは、G.tomentella(Eskdale) のスポットパターンが G.canescens と G.clandestina との合成スポットパターンに極めて良く類似したパターンを示したことである。このことは、前章の K T I 様タンパク質についての知見とともに、Glycine 属植物の種分化が、種間交雑およびその後の複二倍体化の過程を経て進む場合があることを示唆している新しい知見である。PALMER and HADLEY(1968) は、交配実験により G.tabacina が複二倍体であると報告した。また、PUTIEVSKY and BROUÉ(1979) は、G.tomentella($2n=80$) の一方のゲノムが G.canescens あるいは G.clandestina から導入されていると指摘した。そして、NEWELL and HYMOWITZ(1983) も G.tomentella が複二倍体であると報告している。本節の結果は、これらの報告を支持するものである。

また、Glycine 亜属の 7 S サブユニットに関して特徴的なことは、この亜属の供試したすべての系統において明瞭な β 成分が認められなかったことである。最近、STASWICK et al.(1983) は、SDS-電気泳動法によって同様なことを報告している。Glycine 亜属においてのみこの β 成分が欠失しているであろう事実は、他の亜属との

類縁関係や種分化を考える上で重要な手掛かりを与えるものといえよう。

Bracteata 亜属は、G. wightii が1種属するだけであるが、種内の系統間にみられるスポットパターンの差異は、Glycine 亜属において認められた差異と較べてもかなり大きいものであった。特に、7Sグロブリンの β 成分に認められた多様な変異は、この亜属に特有な変異であり、今後、詳しく研究する必要がある。G. wightii には3つの亜種があり、その中でさらに4変種があるとされている(VERDCOURT 1966)。また、染色体数においても $2n=22$ と 44 の倍数性変異がある(BOGDAN 1966, CHENG 1963)ので、まず、それらのことと β 成分のスポットパターンの変異との関係を明らかにすることが望ましと考える。

Soja 亜属は、ツルマメ(G. soja)とダイズ(G. max)を含むが、この2種はマップ全体のパターンが完全に一致していた。両種を同種とすべきだという主張は古くから存在する(HERMANN 1962)。本研究の結果からも、両者を分かつ根拠となるものは見いだせなかった。Soja 亜属内の種内変異がたいへんに小さいということは、この亜

属が他の2亜属と較べて進化的には最も後になって成立したことを示すものであろう。

2. Soja 亜属の起源について

3 亜属の 7 S サブユニットを比較したところ、ツルマメ (Soja 亜属) の α' サブユニットは、G. latifolia (Glycine 亜属) の α 成分と、そして、 α および β サブユニットは、G. wightii (Bracteata 亜属) の α および β 成分とそれぞれ相同であることが認められた。この結果は、G. latifolia および G. wightii がツルマメの起源種であることを断定するものではないが、少なくとも亜属のレベルの類縁関係を議論することはできると思われる。

Soja 亜属が Glycine 亜属と近縁であることは、これまでの形態形質あるいは生殖的隔離の程度の比較研究などからも数多くの報告がある (LACKEY 1977, BROUÉ 1982, NEWELL and HYMOWITZ 1980, 海妻 1981)。一方、これまでに Bracteata 亜属が Soja 亜属の起源に関与したことを認めた報告はない。しかしながら、喜多村ら (1982) は、ダイズの 7 S サブユニットの遺伝子分析を行ない、 α および β の両サブユニットを支配している遺伝子の間には弱い連鎖のあることを認めた。また、本実験において、Glycine 亜属各種は β サブユニットと相同

な主要成分を含まないことが認められた (Fig. IV -7)。

以上のことは、Soja 亜属が Glycine および Bracteata の両亜属に含まれる種の亜属間交配ならびにその雑種個体の複二倍体化によって起源したことを示唆していると思われる。

この考えをさらに証明するためには、まず第1に、ダイズの 7S サブユニットと Glycine 亜属各種の α' 相当サブユニットおよび Bracteata 亜属の α , β 相当サブユニットの一次構造を比較したり、それぞれをコードしている DNA あるいは mRNA を比較してより厳密にそれらの相同性を確認すること。第2に、他のタンパク質分子種について Glycine および Bracteata 亜属との相同性を調べること。第3に、実際に Glycine 亜属と Bracteata 亜属との間で交雑を試みることの3つが重要であると思われる。

第 V 章

種子に含まれる酵素の比較研究

酵素は、植物のすべての器官にあって、あらゆる生命現象に関与しているタンパク質である。ARKERT and MOLLER(1959)は、生物体内で同じ基質に作用する酵素の分子多型(Multiple form)にアイソザイム(isozyme)という名前を与えた。アイソザイムは遺伝的および構造的な2つの機構によって生産される。前者によって生じるものとしては、対立遺伝子支配のアイソザイム(allozyme)やアイソザイムの "fixed heterogeneity" があり、不等交叉や遺伝子重複などがその原因であると考えられる。また、後者に属するアイソザイムは、翻訳(translation)後の修飾によって生じるものと考えられる。これらのアイソザイムは、DAVIS(1964) - ORNSTEIN(1964)の開発したゲル電気泳動法により簡単に分析できるようになった。そして、種・系統間あるいは同一個体内においても組織、細胞内小器官および発育年齢などそれぞれに特異的なアイソザイムが存在することが認められた。したがって、アイソザイムを分析することは、a)生物の生長と分化、b)集団間の識別、c)類縁関係および種分化

などを解明するための有力な研究手段である。

第Ⅲ章では、K T IおよびK T I様タンパク質というひとつの遺伝子に支配されている特定のタンパク質分子種について、第Ⅳ章では、グリシニンおよびコングリシニンと呼ばれる多数の遺伝子にコードされているタンパク質分子種について比較を行なった。これらの貯蔵タンパク質は、生理活性を有していないので突然変異を許容しやすいと思われる。これに対して、酵素に起こる突然変異は、大部分がその酵素の作用を失わさせるので、貯蔵タンパク質よりも構造に変異が起こり難いと考えられる。以上のことをふまえて、本章では、種子に含まれる酵素の比較を試みた。

本章では、第1節においてダイズの β -アミラーゼを3種の分離方法の異なる電気泳動法にかけて分析し、認められた特性間の関係を調べた。本節を設けた理由としては、a)アイソザイムを荷電量 (charge) および分子量 (size) の両者で特徴づけることが必要であると考えたこと、b)一般に、アイソザイムの分子量は、荷電量よりも変異を受けにくいと言われているが、このことを確認することの2点が挙げられる。Glycine 属は、進化速度が

速い植物群であると思われるので、より変異を受けにくい形質を比較する方が望ましいと考えられる。第2節では、Glycine 属 38 系統の種子に含まれる β -アミラーゼおよびパーオキシダーゼの分子量を SDS-ゲル電気泳動法によって比較検討して、Glycine 属種間の類縁関係について考察した。また、本手法の系統分類の研究における有効性について議論した。

第 1 節 ダイズ β アミラーゼの 3 種の電気泳動 特性の関係

β アミラーゼ [α -1, 4 glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2.] は、多くの植物体に分布している。ダイズおよびサツマイモの酵素はすでに結晶化されており、その性質が調べられている (BALLS et al. 1946, MORITA et al. 1976)。そして、前者は単純タンパク質であるのに対して、後者は同じサブユニットの四量体から構成されていることが解明された (SPRADLIN and THOMA 1970)。

ダイズの β -アミラーゼには、ゲル電気泳動法において易動度の異なる 2 本のバンドが認められている (LARSEN and CALDWELL 1968)。この 2 つのバンドは一遺伝子座の共優性複対立遺伝子 (Sp_1^a , Sp_1^b) に支配されていることが明らかにされた (GORMAN and KIANG 1978, HILDEBRAND and HYMOWITZ 1980)。また、MIKAMI et al. (1982) は、ゲル等電点焦点法を用いて 7 つのアイソザイムを認め、品種によって 2 つの泳動パターンを示すことを見いだした。しかし、2 つの電気泳動システムにおける特性の間の関係はまだ明らかにされていない。

本節では、上記した2つの特性に加えて SDS-ゲル電気泳動法における易動度を比較することにより、ダイズの β -アミラーゼアイソザイムを荷電量、分子量および Sp_1 遺伝子の3者によって特徴づけようとした。

材料および方法

1) 供試材料

供試材料としては、ダイズ6品種およびツルマメ6系統の種子を用いた(Table V-1)。また、市販のダイズβ-アミラーゼ(和光)およびサツマイモ塊根のβ-アミラーゼをコントロールとして用いた。

2) 尿素系 SDS-ゲル電気泳動法

ダイズおよびツルマメの粉碎種子 10 mg とサツマイモ塊根の小片 100 mg を 2 ml の SDS-サンプルバッファ-中で摩砕し、摩砕液を 3000 rpm で 15 分間遠心して上清を得てこれを泳動試料とした。なお、本実験では SDS-サンプルバッファ-の組成について検討を行ない、0.03 M Tris-HCl(pH 8.0), 2 % SDS, 6 M urea, 18 % glycerol および 0.01 % 2-mercaptoethanol が最も良い結果を与えることがわかった。

SDS-ゲル電気泳動法は、10 - 15 % のアクリルアミド

Table V-1 Relationship among three β -amylase characteristics, Sp_1^b and Sp_1^b bands, high (H) and low (L) pI types and high mobility (HM) and low mobility (LM) groups, in soybean and wild soybean seeds

Species and Lines	Sp_1 band ¹⁾	pI type ²⁾	Mobility ³⁾
<i>Glycine max</i>			
Sakagami 2	Sp_1^b	L	HM
Raiden	Sp_1^b	L	HM
Mo-shi-dou	Sp_1^b	L	HM
Amsoy	Sp_1^a	H	LM
Ichigo-wase	Sp_1^b	L	HM
Keburi	Sp_1^b	L	HM
<i>Glycine soja</i>			
PI. 101404	Sp_1^b	L	HM
PI. 342618	Sp_1^b	L	HM
PI. 342622	Sp_1^a	H	LM
E 11	Sp_1^b	L	HM
K 38	Sp_1^b	L	HM
Morioka	Sp_1^a	H	LM

¹⁾ after HILDEBRAND and HYMOWITZ (1980), gel electrophoresis

²⁾ after MIKAMI *et al.* (1982), gel isoelectric focusing

³⁾ SDS-gel electrophoresis

の濃度勾配をつけたゲルを使用して、LAEMMLI(1970)の方法で行なった(IV-1)と同じ)。

3) ゲル電気泳動法

ゲル電気泳動法は、10%のポリアクリルアミドスラブゲルを用いて、DAVIS(1964) - ORNSTEIN(1964)の方法にしたがって行なった。泳動試料の調製法は LARSEN and CALDWELL(1968)によった。

4) ゲル等電点焦点法

β -アミラーゼのアイソザイムは、MIKAMI et al. (1982)のゲル等電点焦点法により調べた。ただし、両性担体としては、Pharmalyte に代えて Ampholine (pH 5 - 8)を 2% の濃度で用いた。

5) 2次元電気泳動法

2次元電気泳動法は上述したゲル等電点焦点法(1次

元目) および SDS-ゲル電気泳動法(2次元目) から構成して、O'FARRELL(1975)の方法に従って行なった。

6) SDS-ゲルからの酵素の再生

SDS-ゲル中では、酵素は SDS により変性を受けており、そのままでは活性をもたないので活性染色法により検出することはできない。最近、BLANK et al. (1982)は、酵素から SDS をある程度除去すると再び活性が現われることを見いだした。そこで本実験では、BLANK et al.の方法に若干の変更を加えて SDS-ゲル電気泳動法および2次元電気泳動法を行なった後のゲル中で酵素の再生処理を施した。泳動終了後のゲルを 200 ml の renaturation buffer(0.04 M Tris-HCl, 25 % isopropanol, 1.5 % NaCl, 2 % 2-mercaptoethanol, pH 7.5)に入れ、30 分間ゆっくりと振とうして SDS を除去した。ついで、0.04 M Tris-HCl(pH 7.5) および 1 % 2-mercaptoethanol を含む緩衝液中に 30 分間浸漬し、isopropanol および NaCl を除いた。この方法により短時間で β -アミラーゼの再活性化ができた。

7) β -アミラーゼの活性染色

3種の電気泳動法によってそれぞれ分離された β -アミラーゼは、LACKS and SPRINGTON(1980)の方法に従って検出した。この方法は、オートクレーブによって部分分解したでん粉溶液を用いてゲルを直接染色する方法で、前もってゲル中にでん粉を混入させる方法よりもシャープなバンドが得られ、反転法よりも簡便であった。

水溶性でん粉（和光）の1.1%水溶液を120℃で20分間オートクレーブにかけた。オートクレーブ処理後、このでん粉溶液を用いて基質溶液(0.1 M Tris-HCl, 0.5% starch, pH 7.5)を作成した。再生処理後のSDS-ゲルおよび2種の未変性ゲル（ゲル電気泳動法、等電点焦点法）を200 mlの基質溶液中で37℃、2 h インキュベートした。その後、ゲルを水洗して消化されていないバックグラウンドのでん粉を1.3%ヨウ素(I₂)および3%ヨウ化カリウム(KI)溶液で染色し、 β -アミラーゼを白色のバンドとして検出した。染色したゲルは、25%エタノール(ethanol)および5%トリクロロ酢

酸 (TCA) を含む溶液中でヨウ素を除去し、貯蔵した。

α - アミラーゼが β - アミラーゼとともに検出されている恐れがあるので次の3つの方法により確認した。a) 基質溶液中に Ca^{2+} を加えてみて活性の増加するバンドがあるかどうか。b) ゲルを 70°C 10 分間処理した後、活性のあるバンドがあるかどうか。c) α - アミラーゼに特異的な基質である β -limited dextrine をゲルに 1 % 濃度になるように混入してバンドが現われるかどうか (MIKAMI et al. 1982)。

結果および考察

1. 実験条件の検討

DAVIS(1964)-ORNSTEIN(1964)によって考案されたゲル電気泳動法は、酵素分子の荷電量(charge)および分子量(size)の両者の相互作用の結果としてその易動度が決定される。また、ゲル等電点焦点法(VESTERBERG and SVENSSON 1966, WRIGLEY 1968)は、酵素の荷電量によってのみ易動度が規定される。この2つの電気泳動法は、酵素分子を native な状態で泳動することができるので、crude なサンプルを泳動してもその酵素に特異的な反応を用いて易動度を特定することができる。このため、アイソザイム分析をはじめ多くの分野で有力な方法として利用されている。一方、SDS-ゲル電気泳動法(LAEMMLI 1970, WEBER and OSBORN 1969)は、酵素の分子量だけを易動度に反映させる方法であるが、酵素タンパク質を変性させてから泳動を行なうので、ゲル中で直接酵素活性を検出することができなかった。しかし、最近、SDS-ゲル中で酵素を再生させる方法(BLANK et al. 1982)が見

いだされたので、酵素を精製することなしにそれらのおおよその分子量を比較できるようになった。そこで、ダイズの β -アミラーゼアイソザイムにこの方法を適用して、その分子量的特性と他の特性との関連を調べた。

SDS-ゲル電気泳動法による分析法をダイズ酵素に適用する前に、つぎの2点について実験条件を検討した。すなわち、a) 重合体によるバンドなどアーティファクトを生じさせないようにするため、酵素分子が完全に解離して、泳動する条件を定める。b) 酵素の失活をできるだけ押さえ、再生率を向上させるための処理条件を検討する。前者については、四量体の酵素であるサツマイモの β -アミラーゼをスタンダードとして利用して、この酵素が完全に単量体として泳動し、再生される条件について検討した(Fig. V-1)。lane 1は、0.2% SDS, 6 M urea を含む SDS- サンプルバッファーで抽出して泳動したパターンであるが、サブユニットに解離後四量体に復帰したと思われるバンド(R)の他に、分離ゲルの上部に解離しなかったとおもわれるバンド(U)が認められた。これに対して、高濃度の SDS を含むサンプルバッファー(2% SDS, 6 M urea, 18% glycerol)で処理し

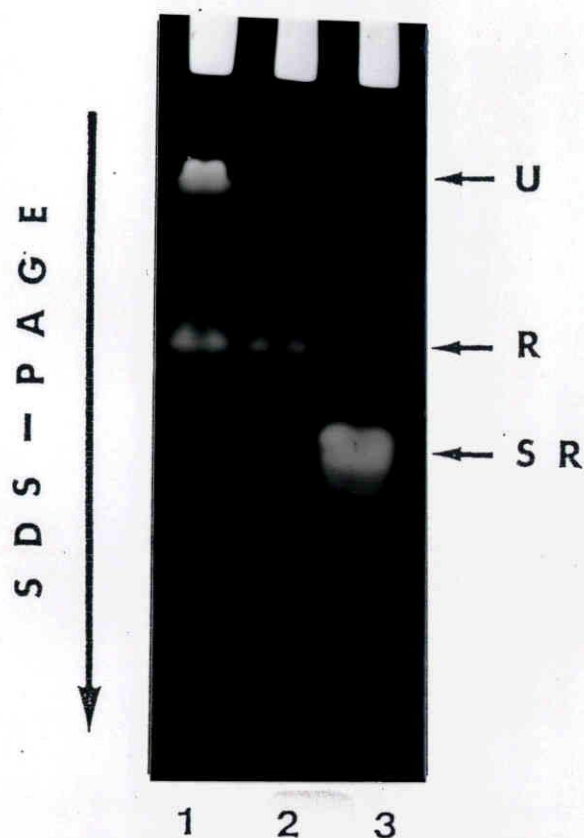


Fig. V-1

Patterns of β -amylase renatured after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

1, sweet potato β -amylase in 0.03 M Tris-HCl (pH 8.0), 6 M urea, 0.2% SDS and 0.01% 2-mercaptoethanol (2-ME); 2, sweet potato β -amylase in 0.03 M Tris-HCl (pH 9.0), 2% SDS, 18% glycerol and 0.01 M 2-ME; 3, soybean β -amylase in the same sample buffer as in lane 2. U, undissociated band of sweet potato β -amylase; R, renatured band of sweet potato β -amylase; SR, renatured band of soybean β -amylase.

たサンプルでは、未解離のバンドは現われず、完全に解離して泳動していると思われた(lane 2)。ダイズの β -アミラーゼは、同じ条件で1本の幅の広いバンド(SR)として現われた(lane 3)。また、後者については、十分な検討を行なわなかったが、SDS-サンプルバッファーにグリセロール(18%)を加えることおよび再生時に高濃度の2-メルカプトエタノール(2%)を用いることは、明らかに酵素の安定性と再生率を向上させた。

さらに、ダイズは α -アミラーゼを含んでいる(GORMAN and KIANG 1978, ADAMS et al. 1981)ので、 β -アミラーゼと一緒に検出される可能性があると思われる。そこで、次の3つの方法、a) Ca^{2+} の添加、b) 70°C 10分間処理、c) β -limited dextrine(1%)を混入させたゲルの使用によって調べたが、 α -アミラーゼのバンドを見いだすことができなかった(MIKAMI et al. 1982)。これは、両酵素の活性量に著しい差があるためであると考えられるので、本実験において α -アミラーゼについて考慮する必要がないと考える。

2. ダイズの β -アミラーゼの3種の特性間の関係

ダイズの β -アミラーゼには、ゲル電気泳動法における2本の Sp_1 バンド(Sp_1^a , Sp_1^b)およびゲル等電点焦点法における2種のアイソザイムパターン、high(H) pIタイプおよびlow(L) pIタイプが知られている。この2つの特性とSDS-ゲル電気泳動法における易動度を調べ、それらの関係について論じた。

Fig. V-2 は、SDS-ゲル電気泳動法によって得た β -アミラーゼのパターンを示している。ダイズの1系統(Amsoy)およびツルマメの2系統(PI. 342622, Morioka)は他の系統よりも易動度の小さい β -アミラーゼを含んでいた。このことからダイズおよびツルマメの β -アミラーゼには2種の易動度、高易動度(HM)および低易動度(LM)の異なる分子種が存在していると思われる。ダイズおよびツルマメにおいて両分子種の易動度は同じであった。しかし、品種・系統間でバンドの染色濃度には著しい差異が認められた。

ダイズおよびツルマメ 12 系統の β -アミラーゼの3つの特性を調べた結果は Table V-1 に示した。この結果



Fig. V-2

SDS-electrophoretic patterns of β -amylase from lines of wild soybean (lane 1-6) and soybean (lane 7-12). 1, PI.101404; 2, PI.342622; 3, PI.342618; 4, E 11; 5, K 38; 6, Morioka; 7, Amsoy; 8, Ichigo-wase; 9, Sakagami 2; 10, Mo-shidou; 11, Keburi; 12, Raiden.

から、 Sp_1^a バンドが H pI タイプおよび低易動度 (LM) の両特性と密接に関係していると考えられ、一方、 Sp_1^b バンドは L pI タイプで高易動度 (HM) のアイソザイムから構成されていると予想される。ダイズ β -アミラーゼの分子量については、MIKAMI et al. (1982) が 2 つの主要なアイソザイム (Component I、II) を精製し、両者は同じ分子量 (57 Kd) であると報告している。他方、GERTLER and BIRK (1965) は 1 つのアイソザイムに対して 61.5 Kd の値を与えている。SDS-ゲル電気泳動法はタンパク質のアミノ酸配列により易動度が影響を受けることがある (高木ら 1976, ROBINSON and TANFORD 1975) ので、本実験の結果からダイズ β -アミラーゼには 2 種類の分子量を持つアイソザイムが存在すると即断することはできない。しかしながら、 Sp_1^a および Sp_1^b バンドをそれぞれ構成しているアイソザイムの間には、分子量あるいはアミノ酸配列において差異があると思われる。

β -アミラーゼアイソザイムの等電点 (charge) と易動度 (size) の間の関係を調べることを目的として、 Sp_1^a および Sp_1^b 両系統から調製したサンプルを O'FARRELL

(1975)の2次元電気泳動法にかけて分析した (Fig. V-3) 。 その結果、スラブゲル上に2つのスポット群 (family) が現われ、それぞれ2個のメジャースポットと3個のマイナースポットから構成されていることを認めた。そして興味深いことは、この2つのファミリーが全く同じスポットパターンを持ち、それぞれのスポットが水平方向 (charge) および垂直方向 (size) に相互に平行移動の関係にあることである。

MIKAMI et al. (1982) は、ゲル等電点焦点法により7つの β -アミラーゼアイソザイムを検出した。しかし、本研究により、全部で10個のアイソザイムが存在し、おのおの5個が一部等電点のオーバーラップしている2つのファミリーを形成しているために7個と判断されていたことが明らかとなった。グイズの β -アミラーゼは、一遺伝子座の複対立遺伝子 (Sp_1^a , Sp_1^b) によりその発現が支配されている (GORMAN and KIANG 1978, HILDEBRAND and HYNOWITZ 1980) ので、 β -アミラーゼアイソザイムは、 Sp_1^a および Sp_1^b をシス (cis) に機能する調節遺伝子とする2つの小さな多重遺伝子族 (small multigene family) によってコードされていると考えられる。

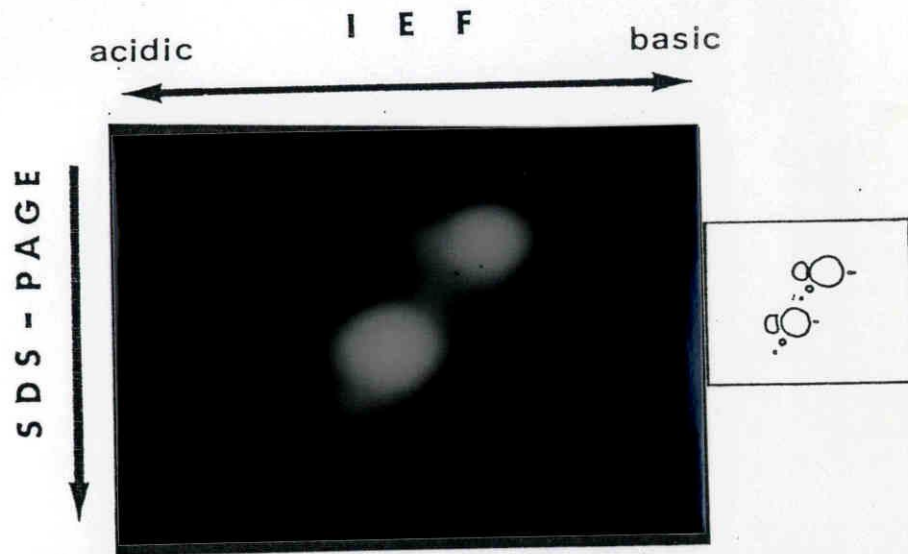


Fig. V-3

Two dimensional gel electrophoresis patterns of β -amylase isozymes involved in two different mobility groups as revealed by SDS-gel electrophoresis. The sample consisted of a mixture of extracts from *G. soja* Morioka (Sp_1^a) and K 38 (Sp_1^b).

本節の実験結果は、アイソザイムを荷電量のみではなく、荷電量および分子量の両者で特徴づけることの重要性を示唆している。したがって、特に複対立遺伝子によって支配されているアイソザイムを分析する場合、SDS-ゲル電気泳動法および2次元電気泳動法による分析が有効な方法となると思われる。また、ダイズの β -アミラーゼは、アイソザイムおよび貯蔵タンパク質の分子進化を理解する上で興味深い研究対象であると思われる。

第2節 Glycine 属植物の種子パーオキシダーゼ
およびアミラーゼの SDS-ゲル電気泳動法による比較

アイソザイム分析によって Glycine 属植物の類縁関係を解明しようとした研究例は少ない。わずかに、BROUÉ et al. (1977) が数種類の種子酵素のアイソザイムを分析し、Glycine 亜属4種の系統発生的関係を明らかにしようとした研究があるのみで、Glycine 属3亜属の類縁関係を明らかにしようとした試みは皆無である。この原因の一つは、Glycine 属植物の進化速度が速いことおよび従来のアイソザイム分析の方法では検出感度が高すぎることをために種内変異の幅が大きすぎて亜属間・種間の類縁関係を評価することができないためであると思われる。

前節の結果、SDS-ゲル電気泳動法によって酵素の分子量を比較するための手法が確立された。そして、この方法を用いてアイソザイムの分子量と荷電量との関係を調べたところ、アイソザイムの分子量は荷電量よりも変異の少ない特性であることが予想された。そこで、Gly-
cine 亜属各種系統の種子に含まれているパーオキシダ

ーゼ [EC 1.11.1.7.]および β -アミラーゼを SDS-
ゲル電気泳動法によって比較し、亜属間の類縁関係につ
いて検討を行なった。

材料および方法

1) 供試材料

本節で用いた供試材料は、Glycine 9 種 38 系統である (Table V-2)。いずれの系統も 1983 年に名古屋大学農学部ガラス室において栽培し、それぞれ成熟種子を採集して実験に供した。

2) 尿素系 SDS-ゲル電気泳動法および SDS-ゲル中の酵素の再生

各供試系統の粉碎種子 15 mg に 0.5 ml の SDS-サンプルバッファー (0.03 M Tris-HCl, 2 % SDS, 6 M urea, 18 % glycerol, 0.01 % 2-mercaptoethanol, pH 8.0) を加え、試験管中で酵素を抽出した。抽出物を 3000 rpm 15 分間遠心して上清を得て泳動試料とした。

SDS-ゲル電気泳動法およびその後の SDS-ゲル中の酵素の再生法は、前節で用いた方法と同じである。

Table V-2 Pattern classification of amylase and peroxidase banding patterns on SDS-gel electrophoresis in the genus *Glycine*

Pattern No.	Amy-1	Amy-2	Amy-3	Amy-4	Amy-5	Amy-6	Amy-7	Per-1	Per-2	Per-3	Per-4	Per-5	Per-6	Per-7	Species and line name
1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>G. latifolia</i> (PI.245332, Inverelle, PI.310696, Obtusa, G.1213, G.1343)
2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	<i>G. tabacina</i> (Giken)
3	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	(Hutton, Helidon)
4	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	(Taichung, PI.319697)
5	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	(PI.193232)
6	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	(PI.272099)
7	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	(Bouko-tsurumame)
8	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	(Chinchila)
9	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	(Miyakojima-tsurumame)
10	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	(Miles)
11	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	(PI.248253)
12	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>G. clandestina</i> (PI.233138, PI.246590)
13	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(PI.248252)
14	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	(Gandai)
15	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>G. canescens</i> (PI.399478)
16	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	(White cliff)
17	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	(G.1117)
18	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	(G.1301)
19	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	(G.1249)
20	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	<i>G. tomentella</i> (Eskdale)
21	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	(Lindeman)
22	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	(Moapitou)
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	<i>G. falcata</i> (Nagoya)
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	(G.1246)
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	(G.1155)
26	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	<i>G. wightii</i> (Tinaroo)
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	(Clarence, Cooper, Q7004)
28	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	<i>G. soja</i> and <i>G. max</i>

3) 酵素バンドの検出法

β -アミラーゼは、前節で用いたオートクレーブ処理でん粉溶液による方法により検出した。また、パーオキシダーゼは、DAB (diamino-benzidine) および TMBZ (tetramethyl-benzidine) 溶液 (THOMAS et al. 1976) によって検出した。再生処理を施したスラブゲルを 100 ml の DAB 溶液 (15 mg DAB/100 ml H₂O) または TMBZ 溶液 (30 mg TMBZ/100 ml 30 % methanol) に浸漬し、直ちに、0.5 ml 程度の過酸化水素水を加えて発色を観察した。DAB 溶液を用いると褐色のバンドが現われ、TMBZ 溶液ではブルーのバンドが認められた。TMBZ 溶液は DAB 溶液よりも鮮明なバンドを与えたが、短時間でバンドが消失するので、染色後すぐに記録しなければならなかった。

4) 統計学的処理による類縁関係の推定

本実験では β -アミラーゼおよびパーオキシダーゼの分析結果をもとにして Glycine 属植物の類縁関係につ

いて系統および種を単位とした2通りの推定を試みた。
両酵素を電気泳動法にかけて分析し、易動度の異なるすべてのバンドをひとつの質的な形質として扱い、そのバンドが認められた時、数値(1)を、認められなかった時、数値(0)を与えて1-0のデータマトリックスを作成した。このデータから類似比の計算手法によって系統間および種間の類似度を計算した。この類似性を表わすデータを数量化IV類およびクラスター分析にかけた。また、1-0のデータマトリックスから数量化III類の手法を用いて系統間・種間の類似性を調べた。計算は、PC 9801-F(NEC)マイクロコンピュータを用いて行ない、プログラムは、“多変量解析プログラム集”にもとづいて作成した。

結 果

1. アミラーゼおよびパーオキシダーゼの SDS- ゲル電気泳動法において認められた変異

Fig. V-4 は β -アミラーゼの SDS-ゲル電気泳動法における泳動パターンの模式図である。図中の数字はそれぞれの種において認められた各バンドの出現率（そのバンドを持っている系統数／供試系統数）を示している。

Glycine 属各種の種子に含まれている β -アミラーゼは分子量約 50 Kd - 100 Kd に相当する易動度を示した。この実験においても α -アミラーゼが混入して検出されている可能性があるので前節で行なった 3 つの方法、a) Ca^{2+} イオンの影響、b) 70 °C 10 分間処理に対する酵素の安定性、c) 1 % blue dextrine を含むゲルの使用、を用いて調べた。その結果いずれの方法によっても α 型アミラーゼを検出することはできなかった。 β -アミラーゼに関する分析結果で特に注目されることは、 (a) Glycine 亜属の G. canescens と Bracteata 亜属の G. wightii および (b) G. max (Soja 亜属) と G. tomen-

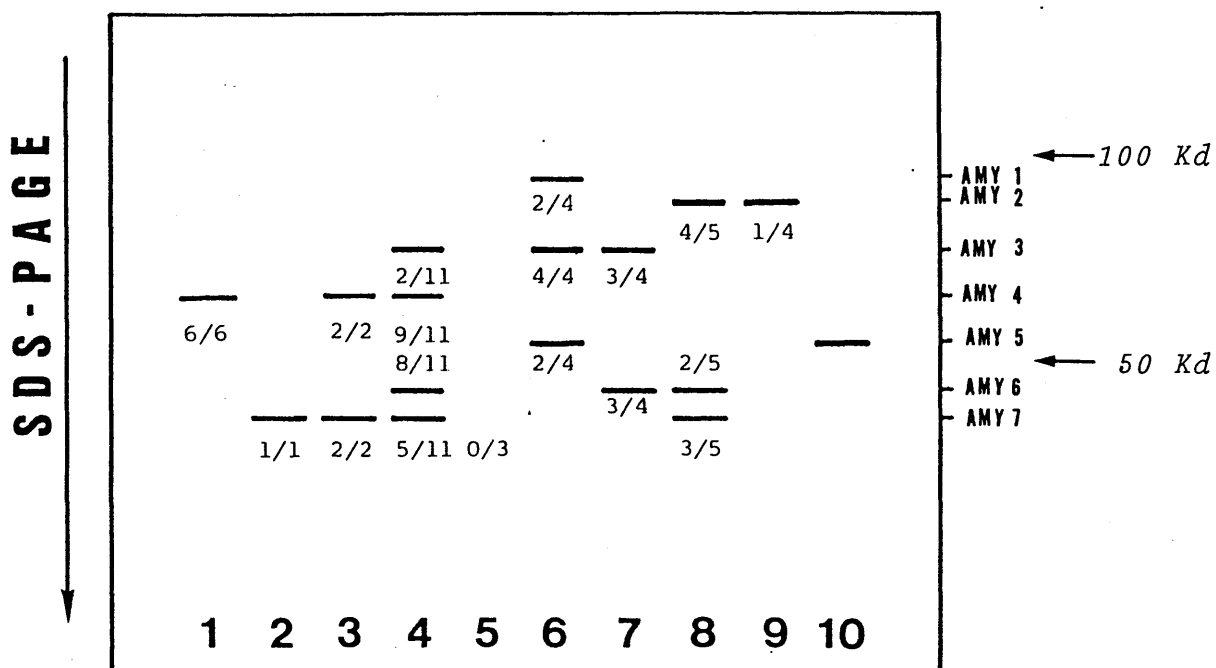


Fig. V-4 Amylase patterns of seed extract on SDS-gel electrophoresis in the genus *Glycine*.

1: *G. latifolia* (LAT A and LAT B), 2: *G. tabacina* (TAB A),
 3: *G. tabacina* (TAB B), 4: *G. tabacina* (TAB C), 5: *G. fal-*
cata, 6: *G. tomentella*, 7: *G. clandestina*, 8: *G. canescens*,
 9: *G. wightii*, 10: *G. soja* and *G. max*.

tella(Glycine 亜属) の亜属を越えた 2 組で易動度が等しいバンドが認められたことである。Glycine 亜属では、G.latifolia において供試した 6 系統がすべて同じバンドを持っていた以外は、多様な種内変異が認められた。また、G.falcata はアミラーゼバンドを現わさなかった。Bracteata 亜属では供試した 4 系統のうち 1 系統(Tinaroo)のみが前述したように G.canescens において認められたバンドのなかの 1 本と易動度の等しいバンドを有していた。前節で述べたようにダイズの β -アミラーゼには、 sp_1^a および sp_1^b の 2 つの多型が認められる。このうち、 sp_1^b タイプのアミラーゼは G.tomentella が含んでいるアミラーゼと等しい易動度を持っていた。また、詳しい比較を行なわなかったが、 sp_1^a タイプのアミラーゼの易動度は G.tomentella および G.clandestina において認められたバンドのそれと類似していた。

Glycine 属植物種子のパーオキシダーゼは、Buttery and Buzzell(1968) がダイズにおいて認めた知見と同じく種皮に局在していた(Fig. V-5)。そして、各種・各系統において認められた酵素はその易動度(分子量)に

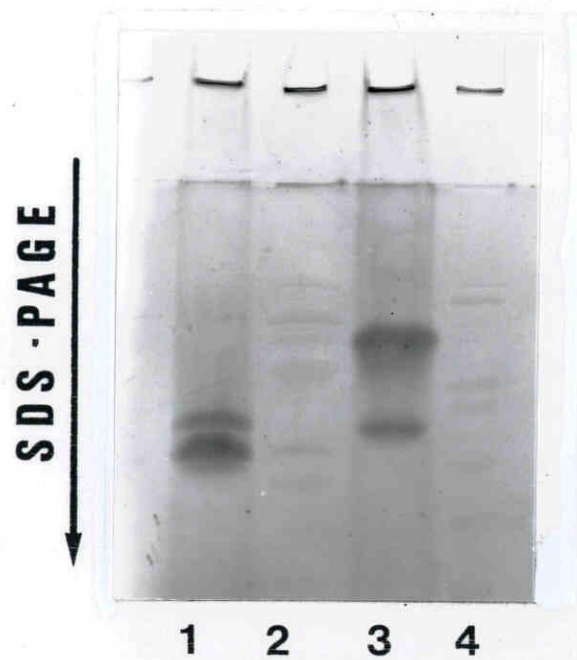


Fig. V-5

Most of seed peroxidases localized at seed coat in the genus *Glycine*.

1: *G.soja* seed coat, 2: *G.soja* seed,

3: *G.wightii* seed coat, 4: *G.wightii* seed.

もとづいてつぎの4つのクラス、class 1(ca. 57 Kd), class 2(ca. 48 Kd), class 3(ca. 45 Kd), class 4(ca. 37 Kd)に分けることができた(Fig. V-6)。 Glycine 亜属では G.latifolia および G.clandestina においてバンドが見いだせなかったが、class 1 および class 3 のバンドが認められ、 Bracteata 亜属では class 2 および class 4 のバンドが認められた。また、 Soja 亜属のダイズおよびツルマメの中には class 4 のバンドを持っている系統が存在していた。

SDS-ゲル電気泳動法を用いたこの分析法は、変性および再生という処理をとまなうために酵素の分子種によっては再生されない可能性がある。そこで、 β -アミラーゼについてすべてのアイソザイムが再生されているかどうか調べた。そこで各種から1系統を選び、blue starch 法により測定した活性値とバンドの濃度を比較したところ両者の間には平行関係が認められたので主要な β -アミラーゼ分子種は再生されていると思われた。

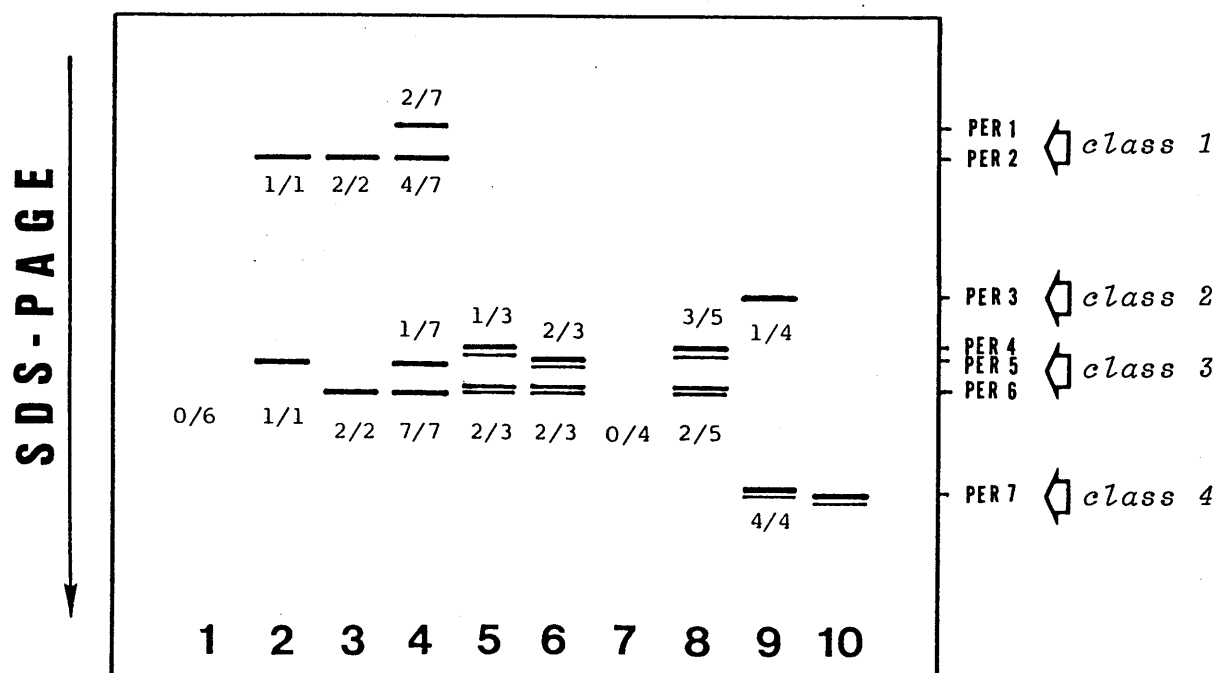


Fig. V-6 Peroxidase patterns of seed extract on SDS-gel electrophoresis in the genus *Glycine*.

1: *G. latifolia* (LAT A and LAT B), 2: *G. tabacina* (TAB A), 3: *G. tabacina* (TAB B), 4: *G. tabacina* (TAB C), 5: *G. falcata*, 6: *G. tomentella*, 7: *G. clandestina*, 8: *G. canescens*, 9: *G. wightii*, 10: *G. soja* and *G. max*.

2. 統計学的手法による類縁関係の推定

SDS-ゲル電気泳動法を用いて酵素を比較したところ、ひとつの系統がいくつかのバンドを含んでいるケース、また、ひとつのバンドが複数の種に共有されているケースが認められたので、3種の統計学的処理を行なって種間の類似性を客観的に推定しようとした。取り扱った形質（カテゴリー）は、アミラーゼ7形質およびパーオキシダーゼ7形質の計14形質である。まず、供試38系統をパターン分析にかけて同じパターンを持つ系統をまとめると28個のパターンに分けられた（Table V-2）。そこで、この28サンプルについて分析を行なった。

Fig. V-7 は、1-0 データを直接数量化理論Ⅲ類にかけて得られた結果である。また、Fig. V-8 および Fig. V-9 は、実験方法に記述した通り 1-0 データからサンプル間の類似性を表わすデータを求め、これを数量化Ⅳ類およびクラスター分析にかけて得られたものである。いずれの分析法によっても3亜属の区分が明瞭に認められ、Soja 亜属（パターン NO. 28）と Bracteata 亜属（パターン NO. 26, 27）の類似性が高く評価さ

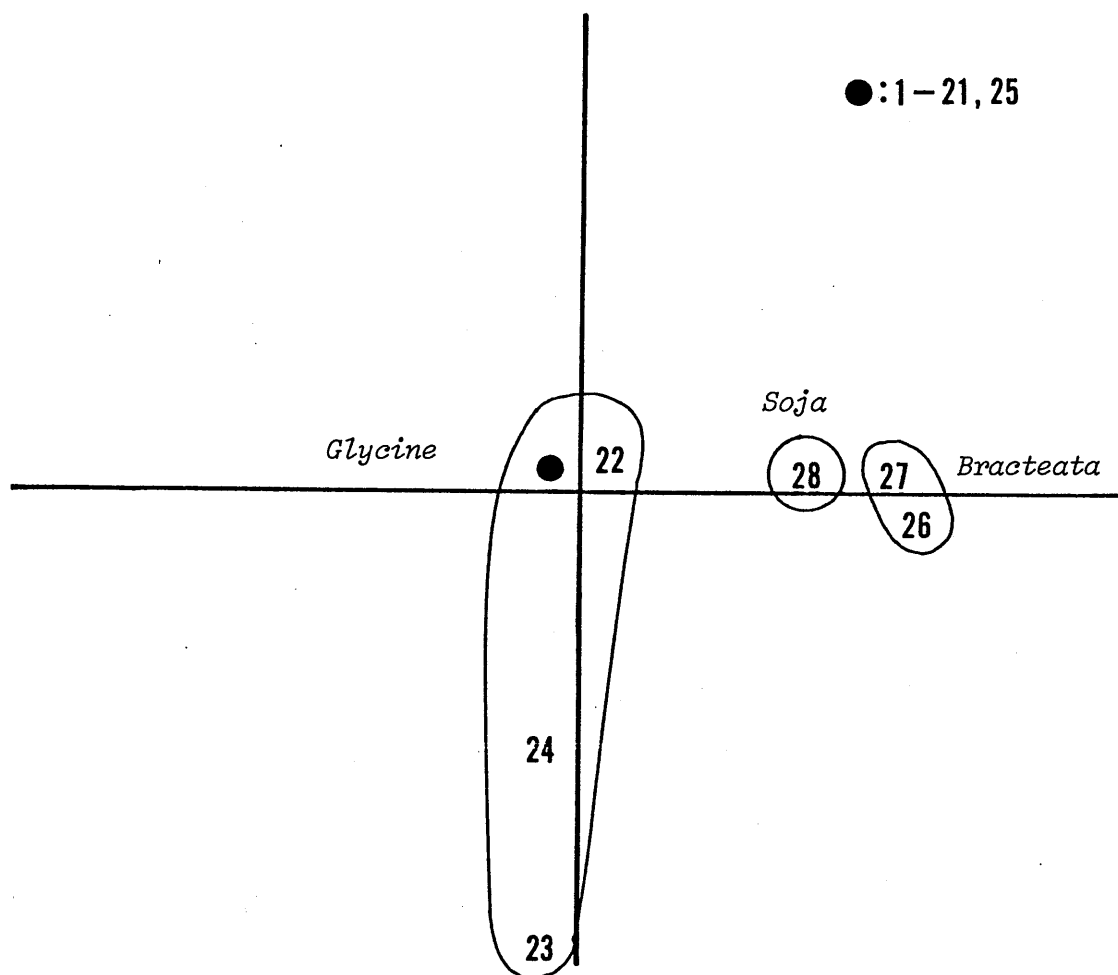


Fig. V-7 Relationships among 28 banding patterns of seed amylase and peroxidase in 38 *Glycine* lines analyzed by the quantification theory III.

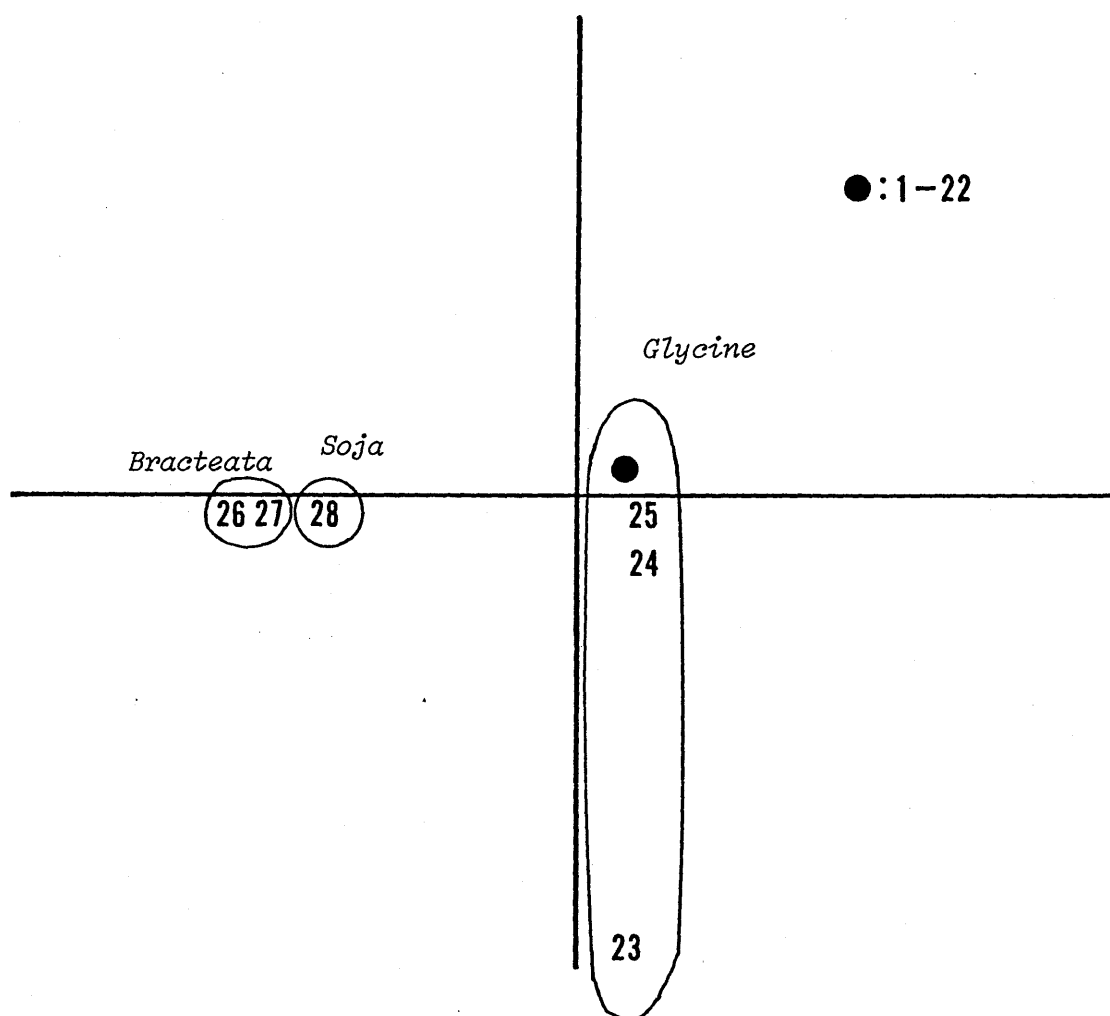


Fig. VI-8 Relationships among 28 banding patterns of seed amylase and peroxidase in 38 *Glycine* lines analyzed by the quantification theory IV.

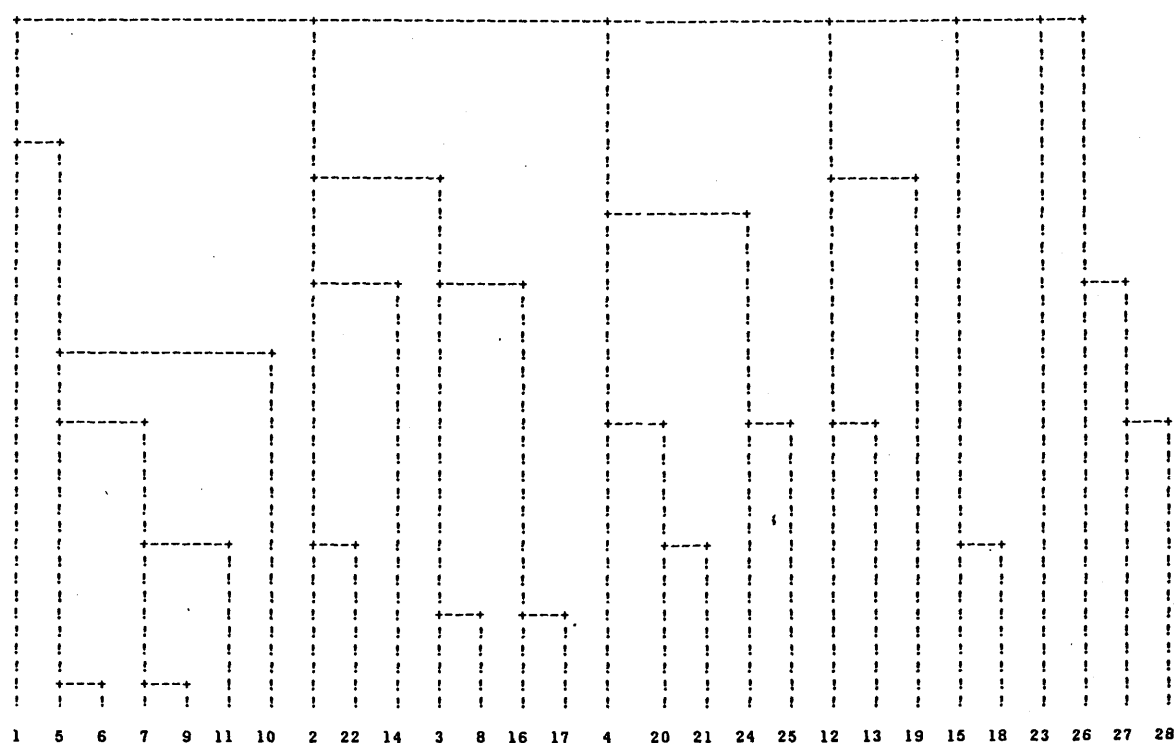


Fig. V-9 Relationships among 28 banding patterns of amylase and peroxidase in seed of 38 *Glycine* lines analyzed by the hierarchical cluster analysis.

The numbers represent pattern No. listed in Table V-2.

1 - 25: *Glycine*, 26 - 27: *Bracteata*, 28: *Soja*.

れていた。Glycine 亜属は、ひとつのまとまったグループを形成していたが、種内変異の幅が大きく G.latifolia をのぞいた他の5種は相互に重なり合って分布していた。しかしながら、Glycine 亜属に含まれる系統について数量化Ⅲ類を適用して得られた結果、分散が大きいながらも2倍体種 G.latifolia、G.falcata および G.canescens の3種が取り囲んでいる領域に G.clandestina、G.tabacina および G.tomentella が分布するというパターンが認められた (Fig. V-10)。

つぎに、それぞれの種に含まれているすべてのバンドに対して数値(1)を与え、種をひとつの単位として分析を試みた。Fig. V-11 および Fig. V-12 は、それぞれクラスター分析および数量化Ⅳ類によって得られた結果である。この種を基準とした分析においても上述した系統を基準とした分析と同じく3亜属が明瞭に区分されていた。そして、Soja 亜属と Bracteata 亜属の間の類似性が高かった。Glycine 亜属内の種間の関係について数量化Ⅳ類およびクラスター分析を用いて分析したところ、G.latifolia と G.canescens がはなれて存在し、両者の中間の G.canescens よりにも他の4種が位置して

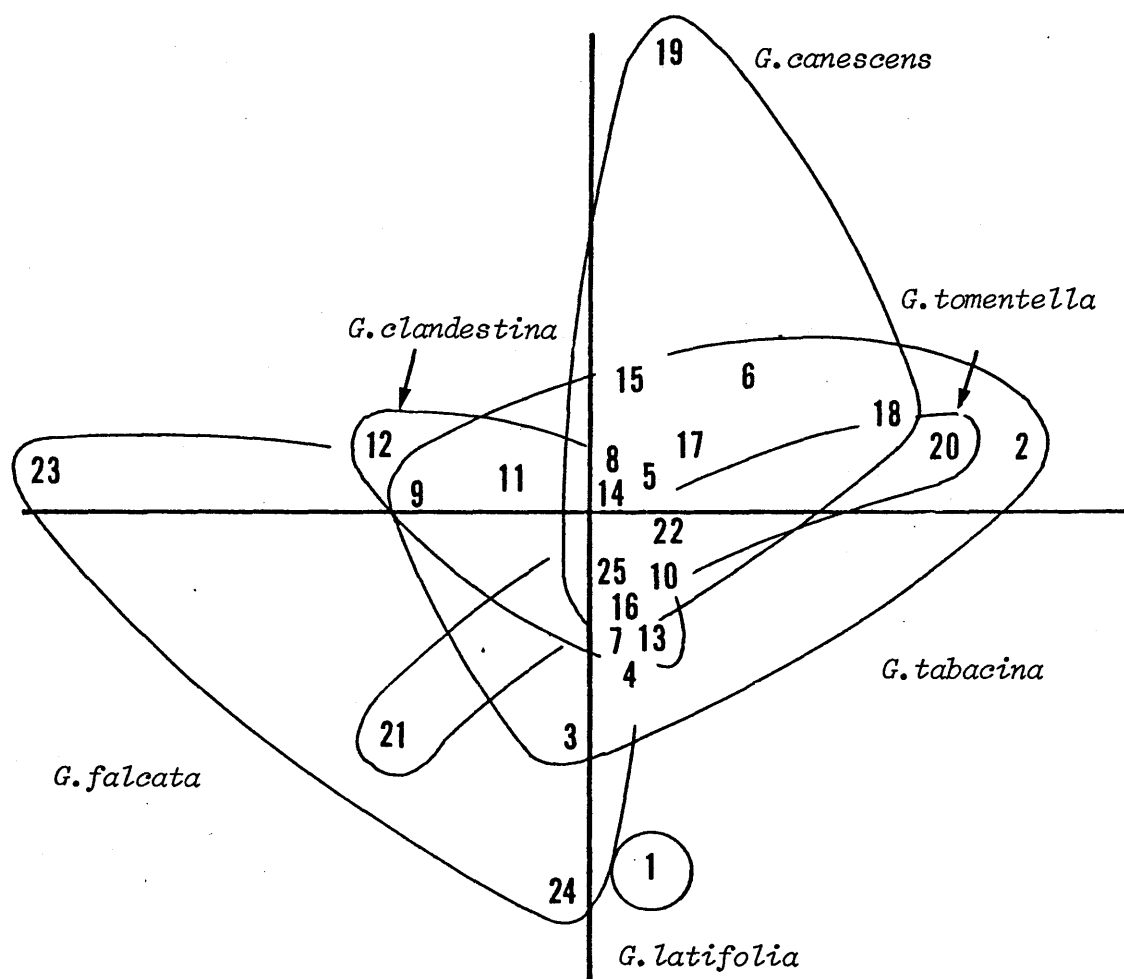


Fig. V-10 Relationships among 25 banding patterns of seed amylase and peroxidase in 33 lines of the subgenus *Glycine* analyzed by the quantification theory III.
 1: *G. latifolia*, 2-11: *G. tabacina*, 12-14: *G. clandestina*, 15-19: *G. canescens*, 20-22: *G. tomentella*, 23-25: *G. falcata*,

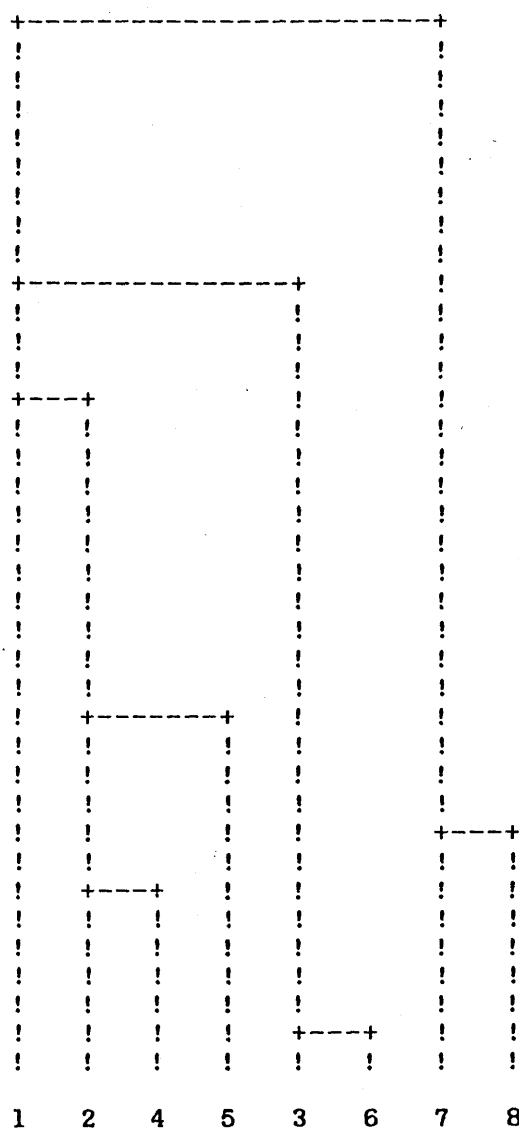


Fig. V-11 Relationships among eight banding patterns of seed amylase and peroxidase in *Glycine* species analyzed by the hierarchical cluster analysis.

1: *G. latifolia*, 2: *G. tabacina*, 3: *G. clandestina*, 4: *G. canescens*, 5: *G. tomentella*, 6: *G. falcata*, 7: *G. wightii*, 8: *G. soja*.

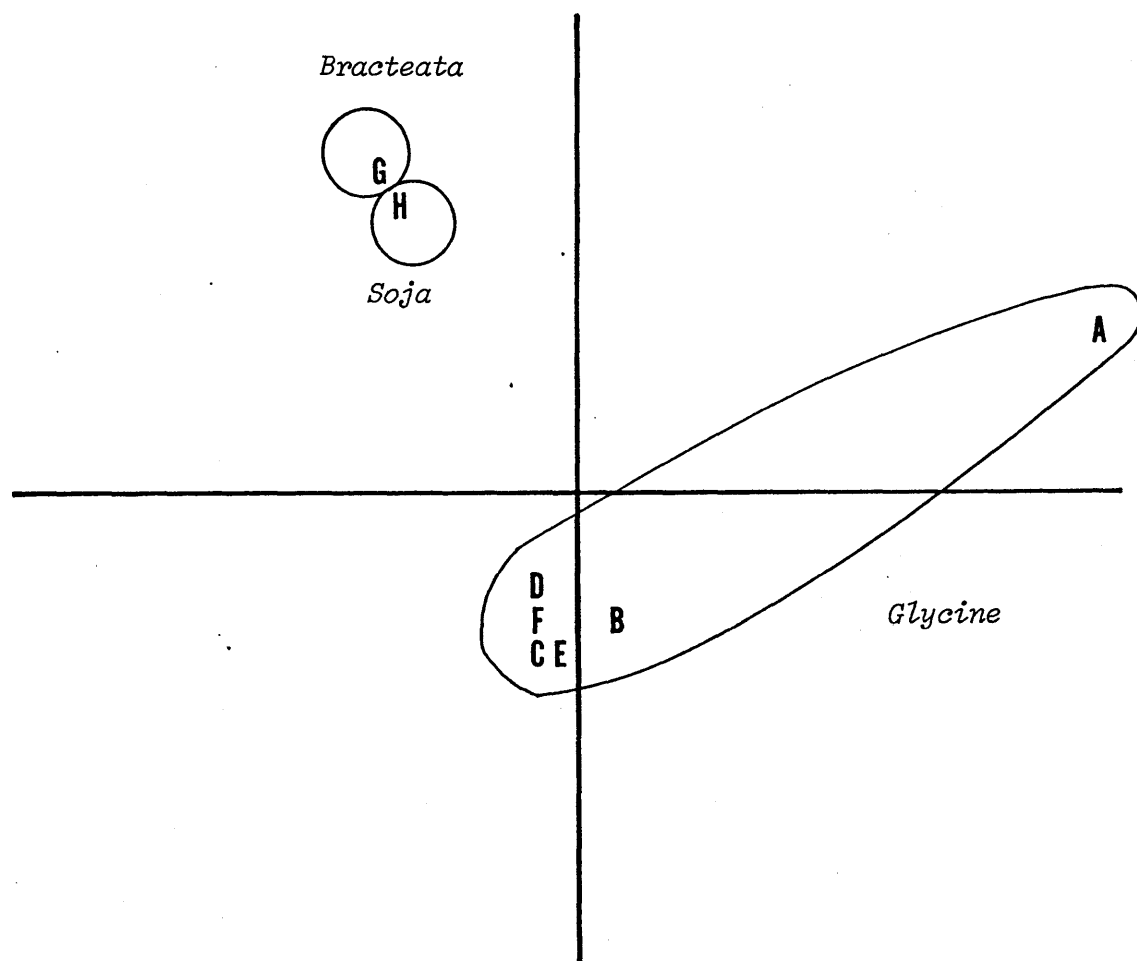


Fig. V-12 Relationships among eight banding patterns of seed amylase and peroxidase in *Glycine* species analyzed by the quantification theory IV.

A: *G. latifolia*, B: *G. tabacina*, C: *G. clandestina*, D: *G. canescens*, E: *G. tomentella*, F: *G. falcata*, G: *G. wightii*, H: *G. soja*.

いた。一方、数量化Ⅳ類を用いた分析ではこれと異なった結果が得られた。これは数量化Ⅲ類においては14本のバンドのうちいくつ含んでいるかがひとつの分類の基準となっているためであると考えられる。そこで、各バンドの出現率をデータとして数量化Ⅲ類にかけると数量化Ⅳ類およびクラスター分析と同様な結果が得られた(Fig V-13)。

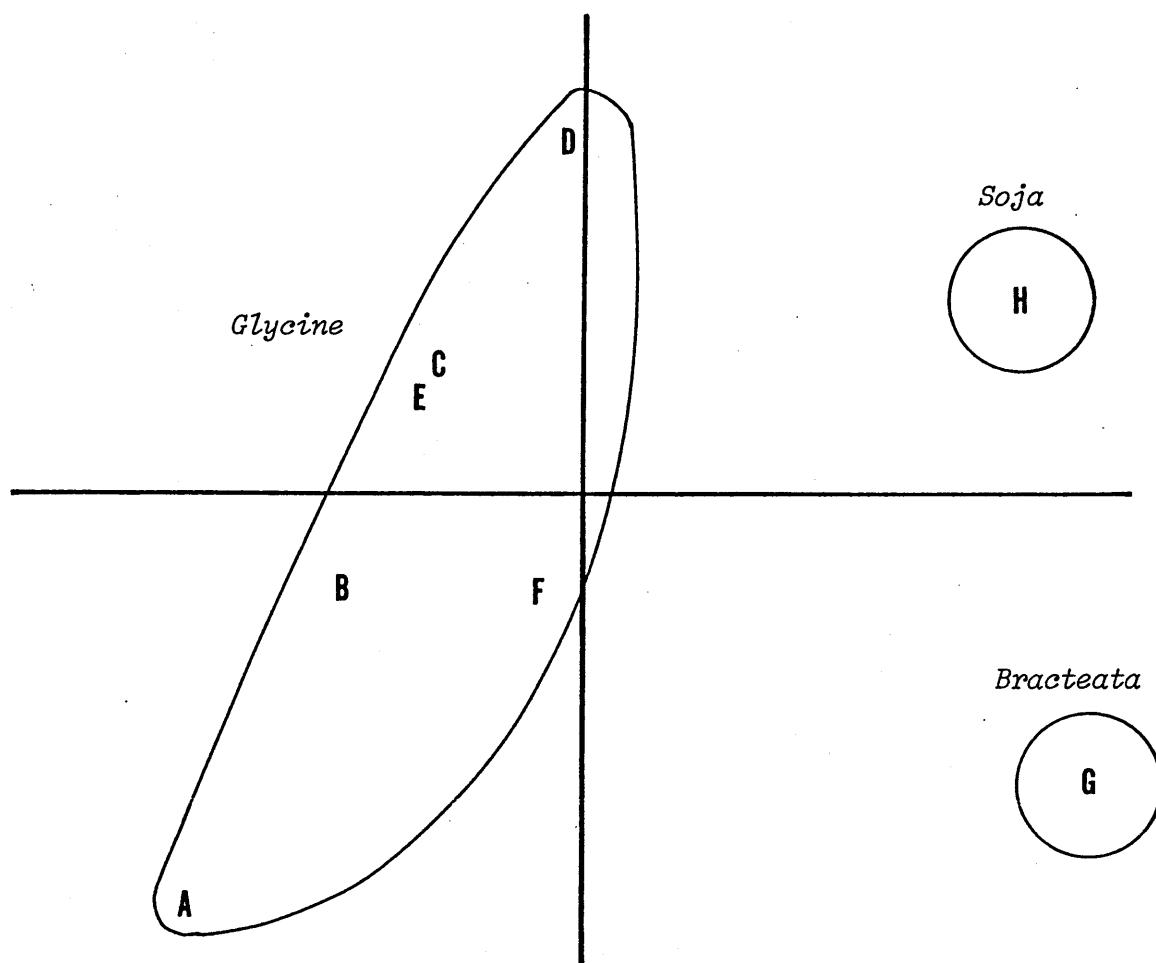


Fig. V-13 Relationships among eight banding patterns of seed amylase and peroxidase in *Glycine* species analyzed by the quantification theory III.

A: *G. latifolia*, B: *G. tabacina*, C: *G. clandestina*,
 D: *G. canescens*, E: *G. tomentella*, F: *G. falcata*,
 G: *G. wightii*, H: *G. soja*

考 察

1. Glycine 属植物の類縁関係について

本研究でダイズのパーオキシダーゼバンド(Per-7)と易動度に関して類似したバンドが Bracteata 亜属においてのみ認められ、Glycine 亜属において認められなかったことは注目すべき結果である(Fig. V-5)。このことは、第IV節における7Sグロブリンの β サブユニットについての知見と同じくこれらの遺伝子が Glycine 亜属に含まれる種を経由しないでダイズに導入された可能性のあることを示唆している。また、Glycine 亜属の G.tomentella (Eskdale)とダイズの β -アミラーゼのSDS-電気泳動法における易動度(分子量)が等しいこと(Fig. V-4)は、これまでの生殖的隔離の比較あるいは本研究におけるKTILPおよび7S α' サブユニットの類似性などの結果と一致しており、両種が近縁関係にあることを示していると思われる。しかし、このアミラーゼバンド(Amy-4)は G.tomentella 以外の Glycine 亜属の種において見いだすことができなかった。

G.tomentella は四倍体種であるので、このアミラーゼ分子種がどのようにして獲得されたのかについてはこの種の起源と関連して問題となると思われる。亜属間の類縁関係についてもうひとつ注目されたことは、G.canescens と G.wightii とが同じ易動度を持つアミラーゼ分子種を共有していたことである (Fig. V-4)。このことは、Glycine 亜属と Bracteata 亜属との間で遺伝的な交流があったことを示していると思われる。

系統間・種間の類似性を3種類の統計学的手法を用いて推定した結果を見ると、いずれの手法によっても、あるいは、系統および種のいずれを基準とした分析においても Soja 亜属と Bracteata 亜属の類似性が高く評価されていた (Fig. V-7, -8, -9)。この結果は、両者のパーオキシダーゼ (Per-7) の易動度がほとんど類似していることが大きく貢献しているためであると思われるが、ダイズ (Soja 亜属) の起源に Glycine 亜属と同様に Bracteata 亜属が関与したことを示唆していると考ええる。

3 亜属に含まれる種・系統を分析した結果、Glycine 亜属の種および系統はひとつの大きな集団となってしまう種間の類似性が分からなかった。そこで、Glycine 亜

属の系統について分析を行なった。その結果は、Fig. V-10に見られるように G. latifolia および G. canescens が両端に位置し、その間に他の4種が分布するような類似性があることを示していた。また、種を基準とした分析によっても同じ結果が得られた (Fig. V-11, -12, -13)。前述したように、G. canescens は、G. wightii と共通なアミラーゼバンド (Amy-2) を有していた。このことから、G. latifolia および Bracteata 亜属と遺伝子交流を行なって変異の幅を広げた G. canescens がまず成立し、この2種を基礎として他の4種が成立したと推定される。この結果は、第III章および第IV章で得た内容とほとんど一致していると思われる。

同一種内の系統間あるいは同一亜属内の種間でバンドパターンを比較すると、たとえば、G. tabacina において見られるようなバンドパターンの変異が認められる。これらの変異のいくつかは、本来所有していたバンドをなんらかの理由によって欠失したがために生じていると考えられる。そして、一本のバンドの欠失性のために誤った結果を導き出す可能性は高いと思われる。したがって、系統間・種間の類似性を正確に推定するためには、

欠失しているバンドを評価の対象としなければいけないと思われるので、今後、この点を解決するための方策の開発が望まれる。

最後に統計学的手法について少し述べたい。類縁関係をアイソザイム分析などによって得られたデータから推定するためには、統計学的手法を用いることが極めて有効である。本実験では、意識的にクラスター分析に加えて、数量化Ⅲ、Ⅳ類を用いて分析を行ない、3種類の分析結果を照合した。これは、結果の信頼性を向上させることの他に数量化Ⅲ、Ⅳ類がこのような類縁関係の解析に利用できるかどうか知りたかったからである。これら3種の方法によって得られた結果は、同様な内容を表わしていた。さらに、数量化の手法は2次元平面上で類縁関係を表わすことができるという点でクラスター分析よりも魅力ある方法であると思われる。

2. SDS-電気泳動法による酵素分析法の系統分類における有効性について

WATSON and CRICK(1953)以来、遺伝子発現のメカニズムに関する研究はめざましく進展している。それによると、構造遺伝子(DNA)から、mRNAを経てタンパク質に至る過程までには数回の加工(processing)が行なわれている。すなわち、遺伝子発現の制御は、情報を担う分子の長さを段階的に調節することによって行なわれている。また、タンパク質の長さ(分子量)は、その立体構造、機能、安定性および膜透過性などを規定している重要な要因である。そのため、分子量の変異を起こしたタンパク質は進化の過程で淘汰され易いと考えられる。一方、point mutationによるタンパク質の荷電量の変化は、突然変異を起こした領域(domain)がそのタンパク質の活性部位以外であればその影響は小さく、そのような変異タンパク質は保存されると考えられる。このことから、酵素など生体において重要な役割を果たしているタンパク質の分子量は、荷電量と較べて変化を許容し難く、結果として進化速度が遅いと思われる。し

たがって、進化速度が速い植物種の類縁関係を調べるためには、従来の主に荷電量の差にもとづいたアイソザイム分析よりも分子量にもとづいた分析を行なう方がより適していると考えられる。このような考えは、本章第1節の β -アミラーゼの分析結果においても伺い知ることができた。そして、本節においてもこれまで知られていなかった亜属間の類縁性に関するデータを得ることができた。本手法がどの程度有効であるかについては、今後、さらに検討されるべきであるが、系統分類学において従来のアイソザイム分析と共に重要な方法となると予想される。

以下に、本手法の長所および短所について要約する。

1. SDS-ゲル電気泳動法においては、易動度が分子量に対応するので、一度に多数の分子種の分子量を精製することなしに決めることができる。

2. 従来のアイソザイム分析と同じく酵素分子種の欠失をどう評価するかについては今後の検討課題である。

3. 目的とする酵素の構造がモノマーあるいはオリゴマー（一部）でなければ、適用できない。定量性はない

と考えられる。

第 VI 章

総合考察

第 1 節

Glycine 属植物の類縁関係と種分化

Glycine 属植物は、HERMANN(1962) および VERDCOURT (1966)によって Glycine、Bracteata、Soja の 3 亜属に分けられているが、この 3 亜属の区分は、本研究の K T I 様タンパク質（第 III 章）、ポリペプチドマップ（第 IV 章）および酵素の比較研究（第 V 章）からも妥当であるという一致した証拠が得られた。

本研究で行なった種子成分の比較結果をまとめると 3 亜属の関係は Fig. VI-1 のようになった。このように、3 亜属の差異は明瞭に認められたが、その反面、亜属相互がまったく異質ではなく相互にある程度の近縁性を尚保っていると思われる。LACKEY(1977) は、Bracteata 亜属を Neonotonia 属として独立させるよう提案しているが、本研究においても K T I 様タンパク質の免疫反応などからみて、3 亜属の中では Glycine 亜属と Soja 亜属の間が最も近縁であり、Bracteata 亜属は他の 2 亜属とは若干の距離があると思われる。そして、属を分か

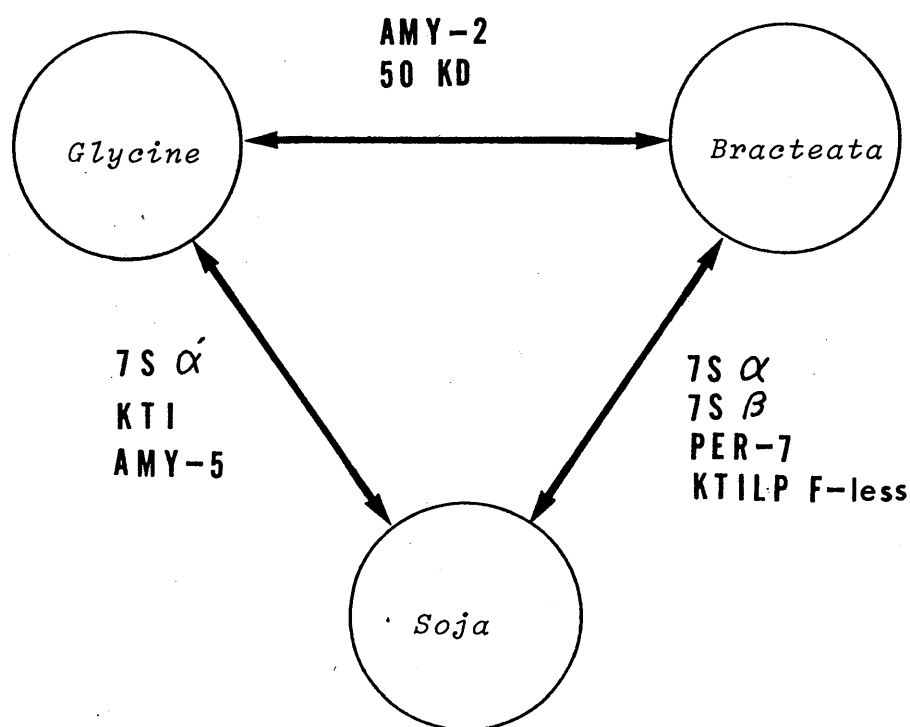


Fig. VI-1 Relationships between three subgenera in the genus *Glycine*, based on the similarity of seed proteins. 7S α' : 7S globulin α' subunit, 7S α : 7S globulin α subunit, 7S β : 7S globulin β subunit, 50 KD: 50 Kd protein (new 11S acidic subunit specific to wild soybean), KTI: Kunitz trypsin inhibitor, KTILP F-less: deletion of KTI like F protein, AMY-2 and AMY-5: Amylase band on SDS-gel electrophoresis, see Fig. V-4, PER-7: peroxidase band on SDS-gel electrophoresis, see Fig. V-6.

つべきであるとの積極的なデータは得られなかったが、これら3亜属は、共通な祖先から発生したと考えられるのに、それぞれ独立な方向に分化しており、今後それぞれ独立した属となるような進化をしてゆくものと思われる。

Glycine 亜属内の種間の類縁関係については、3つの章でそれぞれ考察を試みてきた。しかし、これらの分析から各種を明確に特徴づける特性を見いだして、種間の類縁関係や種分化を明瞭に推定することはできなかった。これは、Glycine 亜属各種の種内変異が多様であることがその主な原因であった。しかしながら、上述したようにポリペプチドマップ分析において、G.tomentella が G.canescens と G.clandestina との複二倍体であることを示唆するデータ (Fig. IV-12) を得ることができたことは Glycine 属の種分化を考察する上で興味深い知見である。この他に Glycine 亜属の類縁関係について興味ある知見としては、不定根を出して繁殖するグループとそうでないグループの2つに分けられること、および、原田ら (1983) が種子の 11 S グロブリンの冷沈性の程度を調べたところ、冷沈し易いグループとし難いグループ

の2つに分けられることを見いだしていることである。
各章で得られたデータと上述した知見を総合すると、
Glycine 亜属の種分化は、Fig. VI-2 に示したように、
G. latifolia および G. canescens の2種が中心となっ
て行なわれた可能性が高いと思われるが、今後、さらに
検討される必要があると思われる。

Glycine 属植物が、地理的にどのように分布範囲を広
げてきたのかおよび染色体数の基本数がいくつであるの
かについて考察することは、類縁関係や種分化を推定す
るための基礎的な資料となると思われる。

Glycine 属3亜属の現在の地理的な分布範囲は、Fig.
VI-3 に示したとおりである。ツルマメ (Soja 亜属) は、
中国 (貴州省以北) から台湾、日本、シベリア・アムー
ル河流域まで東アジア一帯に分布している。Glycine 亜
属7種は、オーストラリア大陸を中心として分布してお
り、少なくとも4種は、オーストラリア大陸に分布が限
定されている。残りの3種は、東南アジアおよびニュー
ギニア、フィリピンなどにも分布している。Bracteata
亜属は、アフリカ大陸を分布の中心としてインド、スリ
ランカ島およびジャワ島など東南アジアにまで分布範囲

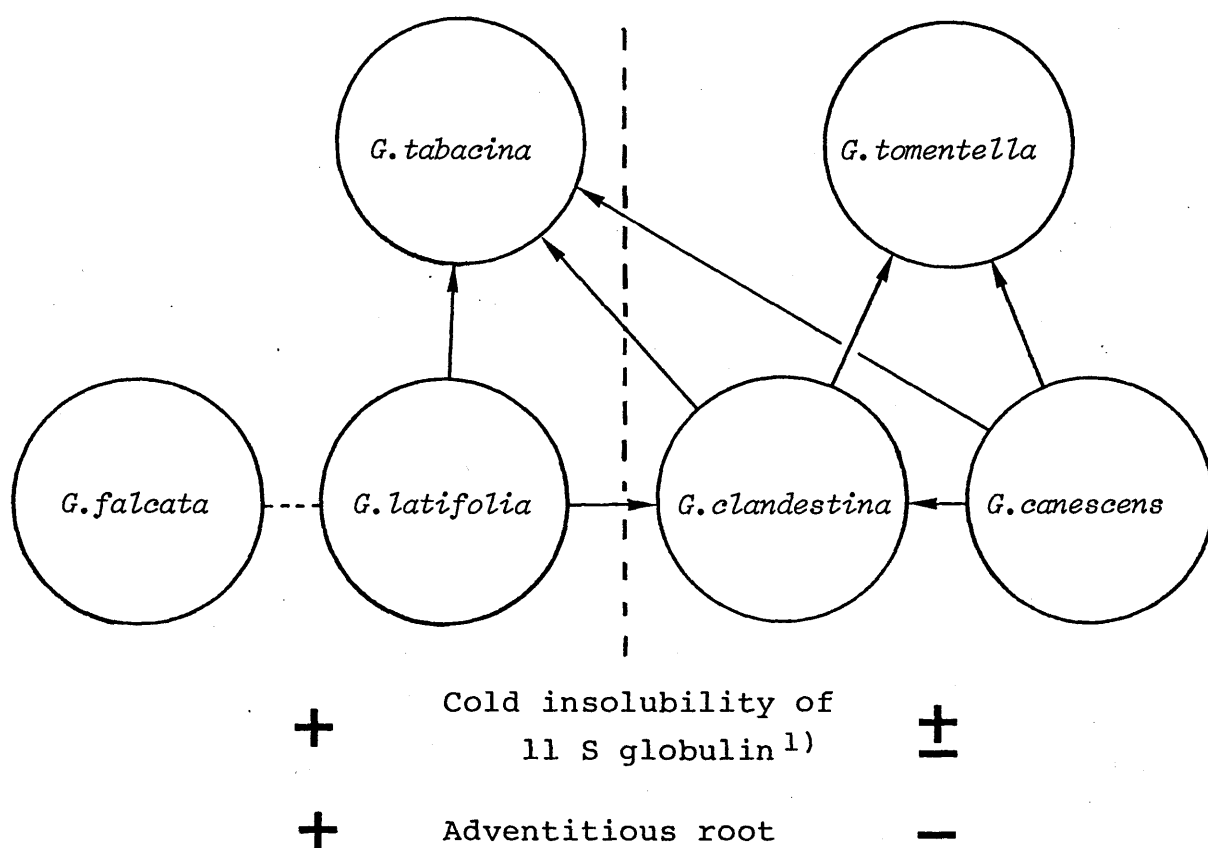


Fig. VI-2 Relationships among *Glycine* species, based on the similarity of seed proteins.

¹⁾ Harada *et al.* (1983)

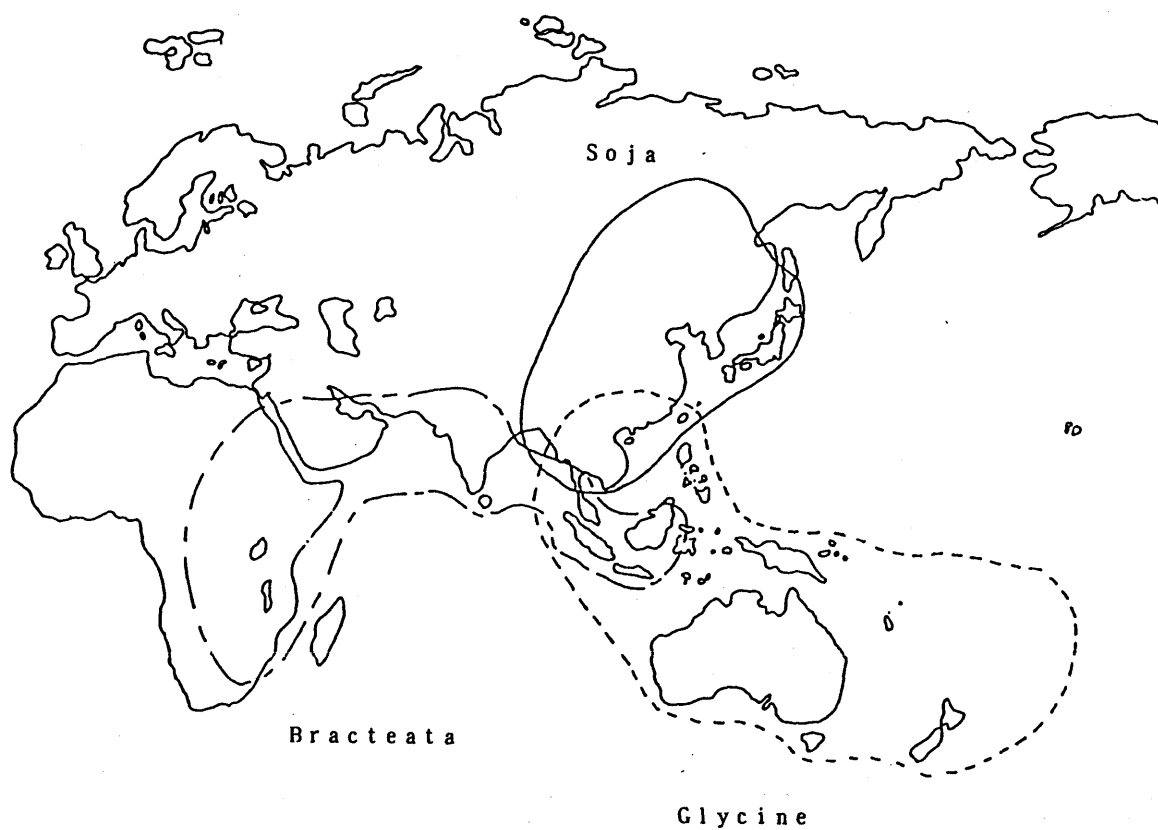


Fig. VI-3 Geographical distribution of three subgenera in the genus *Glycine*.

を拡大している。このように3亜属が東南アジアを中心としたそれぞれ3方向に広がる分布範囲を持っていることは、3亜属の起源と関連して注目される。

これら3亜属の分布範囲を大陸移動説(WEGENER 1912)にもとづく古地図と照合すると興味深いことがわかった(Fig. VI-4)。すなわち、中生代の三疊紀およびジュラ紀には、いわゆるゴンドワナ大陸が存在しており、アフリカ、インドおよびオーストラリアの各大陸が接合していたと考えられているので、この接合部において Glycine 属の祖先種から Glycine および Bracteata 亜属の祖先種が起源し、その後、Glycine 亜属はオーストラリアに、Bracteata 亜属はアフリカおよびインドにそれぞれ隔離されて分化したと考えられる。この Glycine 属祖先種が分化したと推定される地域がこの時代のイヌマキ科の Dacrycarpus 属および Dacridium 属および淡水生は虫類(Lystrosaurus, CORBERT 1971)の化石の分布と一致することは興味深い。また、この Glycine 属祖先種の推定起源地と Soja 亜属の分布地域である東アジア地域は中生代には隔離されていることから、Soja 亜属は Glycine および Bracteata 両亜属よりも遅れ

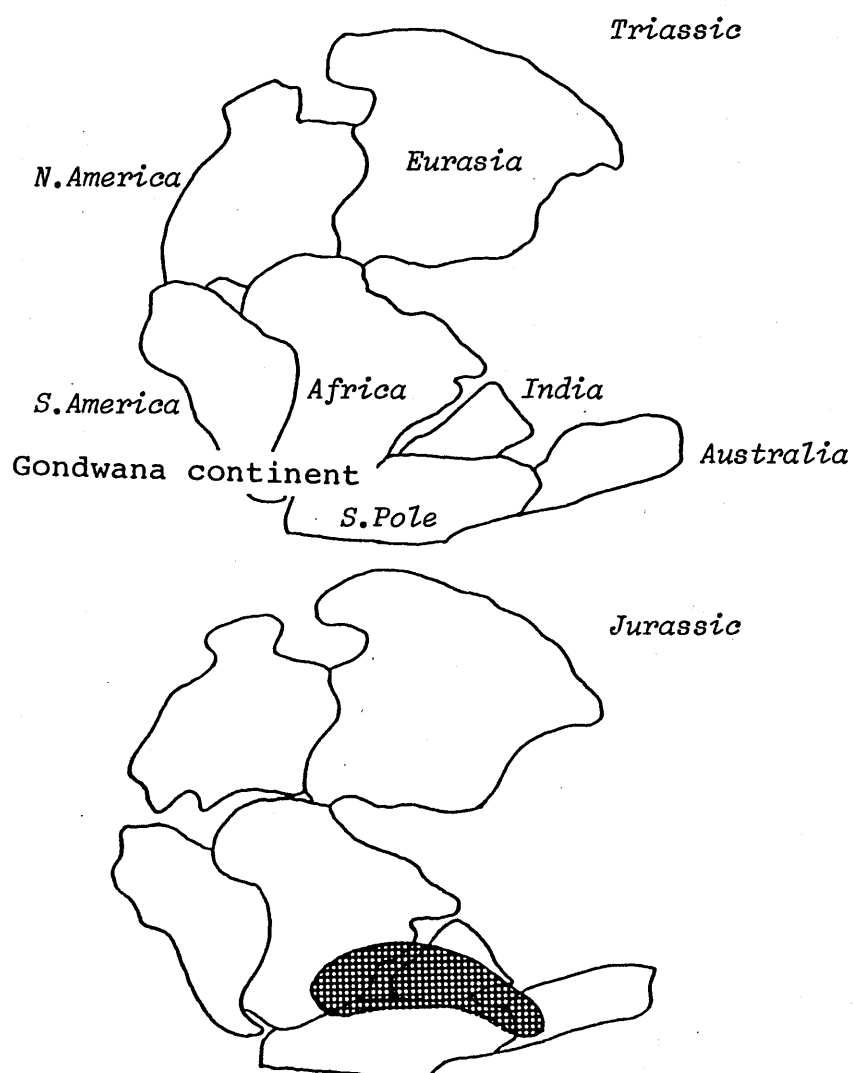


Fig. VI-4 Distribution of the fossil evidences on the genus *Dacrycarpus* and *Dacridium* in the geological age(***).

Glycine ancestor might have originated with these two genera at the junction of the ancient south Africa, India and Australia continents(center of Gondwana land) in the Triassic- Jurassic period of Mesozoic era.

て起源したと考えられる。

次に、Glycine 属の染色体数の基本数について考察を行ないたい。前川(1983)は、インゲンマメ族約 90 属のうち 39 属の染色体数を明らかにして、染色体数の進化について議論を行なった(Fig. VI-5)。これによると染色体数 11 本の属が 24 属と圧倒的に多く、これより 1 本多い 12 本が 8 属、1 本少ない 10 本が 9 属認められ、9 本が 2 属、8 本が 1 属である。一方、染色体数が 20 本以上の倍数性の属は、Glycine 属を含むわずかに 4 属が存在するのみである。このことは、前川が指摘しているように、インゲンマメ族の基本数が 11 本であり、この族においては染色体数の増数および減数が進化の基本であることを示唆していると思われる。以上のことから、Glycine 属の染色体数の基本数は 10 または 11 であり、インゲンマメ族の中では数少ない倍数性を主体とする進化を行なっている植物群であると考えられる。

コムギは、倍数性を主とした進化を行なっている典型的な植物であるが、SEARS(1969)は 5 B 染色体の短腕に染色体対合を支配する遺伝子(Ph)が存在し、倍数性の染色体を二倍体化する機能(OHNO 1970)を有していること

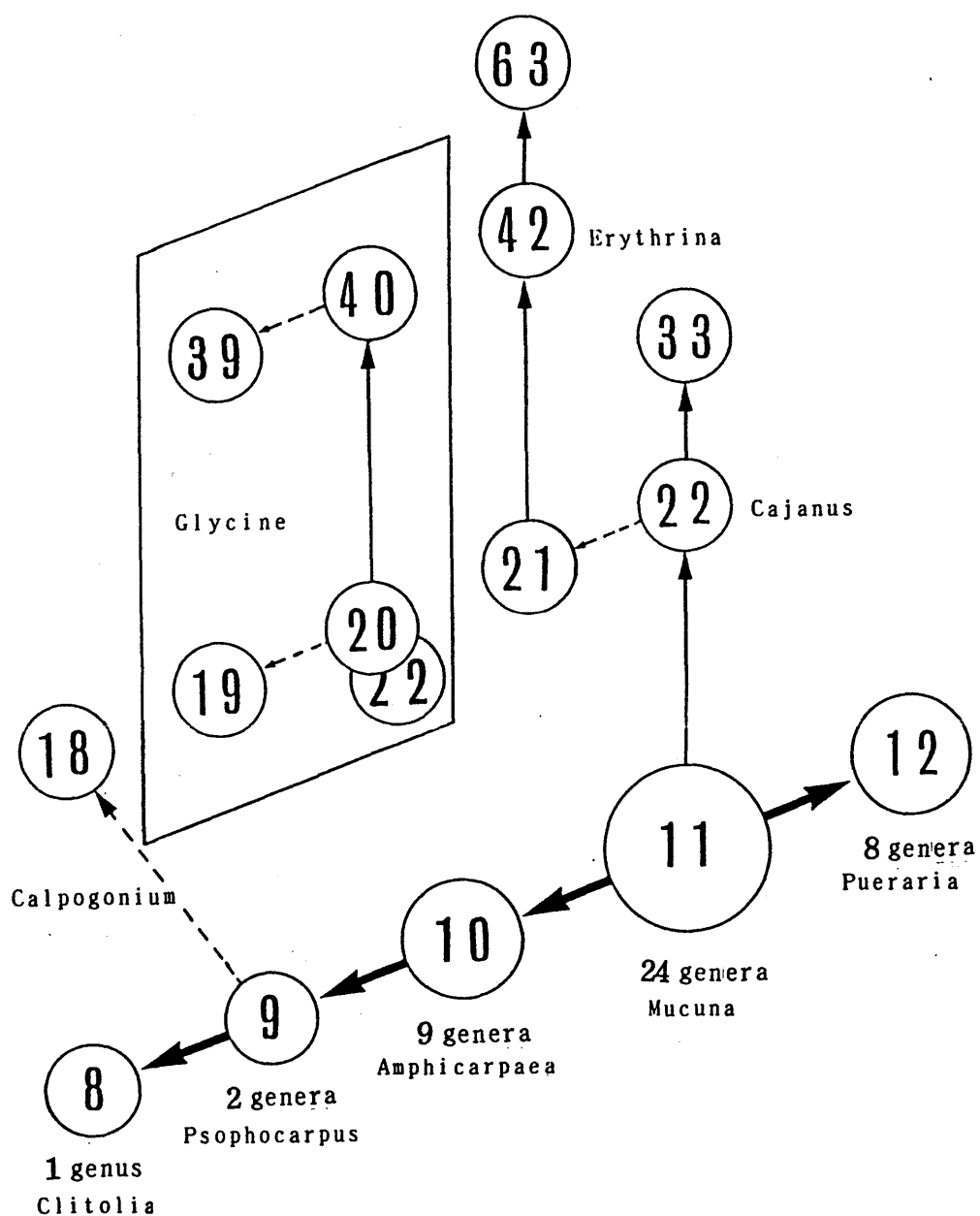


Fig. VI-5 Evolution of chromosome number of the tribe *Phaseoleae*.

(Maekawa 1983)

を明らかにした。Table VI -1 は、Glycine 亜属の種内種間の交雑実験の結果を示しているが、Glycine 属の基本数が 10 または 11 本であるとする染色体対合の頻度が低いことに気がつく。すなわち、種内・種間交配において、各種の染色体数が $2n=40$ または 80 であるのに、それらの雑種が二価染色体を形成する割合は 20 対以下であり、三価および四価の染色体はほとんど観察されていない。このことは、Glycine 属においても倍数性染色体の二倍体化のシステムが存在することを示唆していると思われる。

前述したように、Glycine 属の種分化において倍数化による進化が重要な役割を果たしたと考えられるが、本研究において複二倍体化による進化があったことを示す証拠が第 III 章の K T I 様タンパク質 (Fig. III -10) および第 IV 章のポリペプチドマップの比較 (Fig. IV -12) によって得られた。また、次に述べる例は複二倍体化を含んだ進化の例として興味深い。G. tabacina の 4 系統 (Hutton, Helidon および Taichung, PI. 319697) は、ポリペプチドマップ分析 (Fig. IV -11) およびアミラーゼの比較 (Fig. V -4) においてはまったく同じパターンを示すの

Table VI-1 Chromosome behavior at meiosis in intra- and interspecific *Glycine* crosses

Species cross	Chromosome association			
	I	II	III	IV
* intraspecific crosses				
<i>G. canescens</i> X <i>G. canescens</i> ¹⁾		20.0		
<i>G. tabacina</i> X <i>G. tabacina</i> ¹⁾		20.0		
<i>G. clandestina</i> X <i>G. clandestina</i> ²⁾	1.2	19.4		
<i>G. tomentella</i> X <i>G. tomentella</i> ²⁾ (within Australia)	39.1	20.2	0.1	0.0
<i>G. tomentella</i> X <i>G. tomentella</i> ²⁾ (Asian X Australian acces.)	50.3	14.2	0.1	0.0
* interspecific crosses				
<i>G. canescens</i> X <i>G. clandestina</i> ²⁾	2.5	18.8		
<i>G. canescens</i> X <i>G. clandestina</i> ¹⁾	2.8	18.6		
<i>G. tomentella</i> X <i>G. tabacina</i> ²⁾	74.0	2.8	0.1	0.0
<i>G. tomentella</i> X <i>G. tabacina</i> ¹⁾	73.2	3.1	0.2	
<i>G. tomentella</i> X <i>G. canescens</i> ¹⁾	24.0	17.9	0.1	0.0
<i>G. falcata</i> X <i>G. clandestina</i> ¹⁾	36.2	1.9	0.1	

¹⁾ Putievsky and Broué (1979), ²⁾ Newell and Hymowitz (1983).

に、K T I 様タンパク質の分析結果によると2つ (TAB B, TAB C) のサブグループに分けられ (Fig. III-10)、パーオキシダーゼの比較においてもやはり2つの異なったパターンを示した (Fig. V-6)。両者は、葉色やさやの色など形態的にも区別できる。これらの結果から、この4系統は、同じあるいは類似した組み合わせの両親の複二倍体化によって成立したのであるが、それぞれ一方の親のタイプの形質を欠失し、他方の親の形質を強く発現するようになったものと考えられる。

以上述べてきたとおり、Glycine 属植物の種分化の特徴としては、倍数性を機軸とした進化を行なっていることが挙げられると思われる。そして、倍数性進化を可能にするために染色体の二倍体化が起こっていると考えられる。また、生殖的隔離の程度が大きいことも特徴のひとつであるが、これをいかにして打破するかがこの属の類縁関係を明らかにして、ダイズ育種のための遺伝子源とするための問題である。しかし、最近、Glycine 亜属内の種間交雑研究がかなり進んだので (BROUÉ et al. 1979, NEWELL and HYNOWITZ 1983)、その手法と本研究で用いたような成分分類学的手法とを併用すれば、将来、

きわめて妥当性の高い類縁関係が推定でき、ダイズへ野生種の優良遺伝子を導入するための方策を考え出すことができると思われる。

第 2 節

ダイズ (Soja 亜属) の起源

Soja 亜属のツルマメ (G. soja) が Glycine 亜属型の祖先種 ($2n=20?$) と Bracteata 亜属型の祖先種 ($2n=22?$) との交雑およびその雑種個体の複二倍体化によって成立したとする考え方 (仮説 Fig. VI-6) は興味深い。この考え方は、G. soja の種子タンパク質が Glycine および Bracteata 両亜属の特性を補完したような特性を持つことから考え出されたが、ダイズと Glycine 亜属 (G. tomentella) が交雑できること (BROUÉ *et al.* 1983, NEWELL and HYNOWITZ 1983) およびダイズのフラクシオン・1・タンパク質の small subunit の分子量が Glycine 亜属のそれと類似していること (Fig. VI-7)、一方、ツルマメと Bracteata 亜属 (G. wightii) との間で形態的な類似性 (草型、茎の木質化) が認められることなどからみて、今後の検討に値するものと思われる。

この仮説には、つぎの4つの問題点があると考えられるので、これらの点について考察を試みた。

1. Soja 亜属が他の2亜属よりも後になって成立し

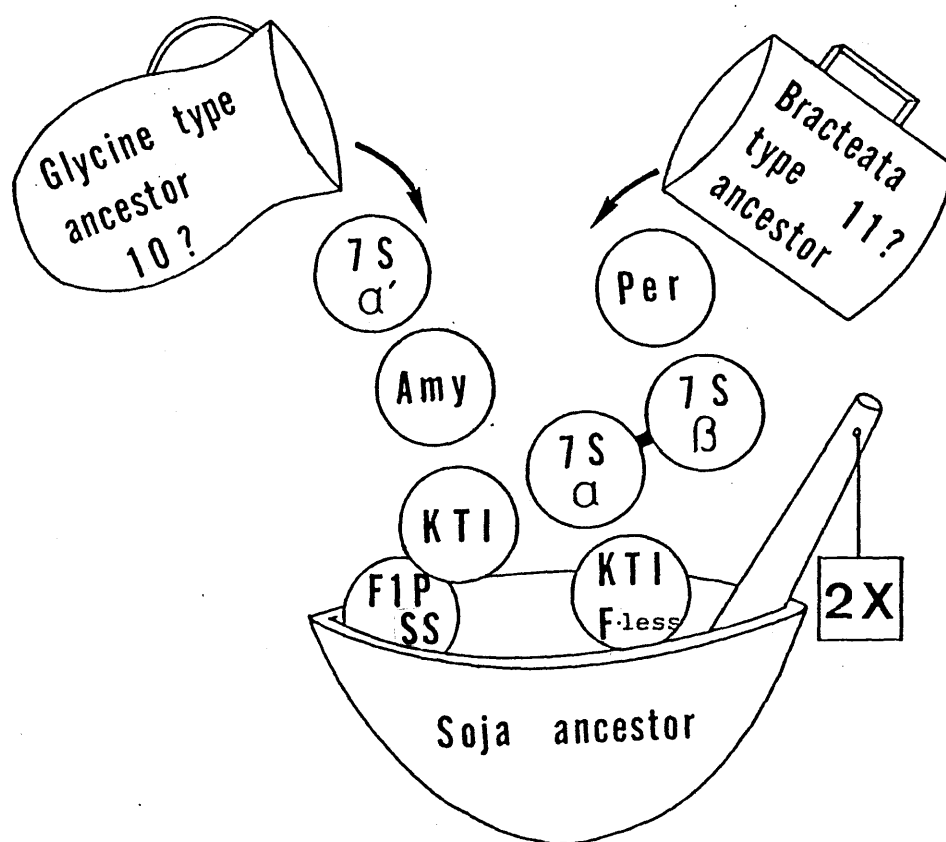


Fig. VI-6 Origin of soybean (subgenus *Soja*) - Hypothesis.

7S α' : 7S globulin α' subunit, 7S α : 7S globulin α subunit, 7S β : 7S globulin β subunit (the genetic linkage exists between α and β subunit genes)

KTI: Kunitz trypsin inhibitor, KTI F-less: deletion of KTI like F protein, Amy: Amylase band (Amy-2, Fig. V-4), Per: Peroxidase band (Per-7, Fig. V-6), F1P SS: Fraction 1 protein small subunit (Fig. VI-7).

Soja ancestor might have originated via crossing between Glycine and Bracteata prototype species and amphidiploidizing (2X) of the resultant hybrid.

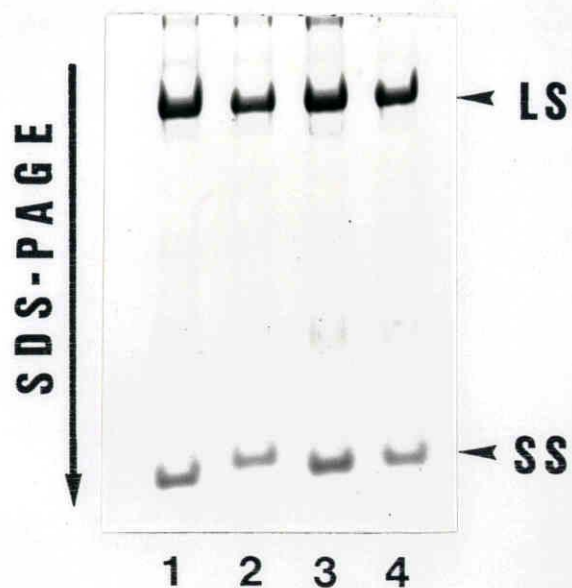


Fig. VI-7 SDS-gel electrophoretic patterns of fraction 1 proteins (FLP) from three subgenera in the genus *Glycine*.

Leaf proteins were extracted by the extraction buffer of 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 18 % glycerol, 0.02 % polyvinyl-pyrrolidone and 0.01 % 2-mercaptoethanol, and were separated by gel electrophoresis. After electrophoresis, gel strips containing FLP molecule were excised by a razor-blade and were subjected to SDS-gel electrophoresis.

1 and 4: *G. soja*, 2: *G. wightii*, 3: *G. latifolia*.

LS: FLP - large subunit, SS: FLP - small subunit.

たことの根拠。

Soja 亜属が Glycine および Bracteata 両亜属よりも後に分化したことの明確な証拠はない。しかし、第IV章のポリペプチドマップ分析の結果からも明らかなように、Soja 亜属が他の2亜属に較べて亜属内の変異が格段に小さいことは、Soja 亜属が最も新しく起源したことの根拠となると思われる。また、前節で述べた3亜属の地理的分布に関する考察からもそのように考えられる。

2. ダイズが複二倍体であることの根拠。

現在までにダイズが複二倍体であるとする説はいくつか見受けられるが (HADLEY and HYNOWITZ 1973)、実験的にこのことを明瞭に証明した報告はない。CRANE et al. (1982) は、ダイズの雄性不稔個体の半数体を作成し、一部の染色体が対合することを観察して、ダイズが複二倍体であることを示唆した。また、BERRY-LOWE et al.

(1982) は、ダイズのフラクシヨン・1・タンパク質の small subunit(SS) のひとつの遺伝子をクローニングしてエンドウ (Pea) のそれと塩基配列を比較したところ、

このダイズの遺伝子は、エンドウの遺伝子と配列の類似性が低く（30 アミノ残基置換）、両種の類縁関係およびDNAの進化速度から推定される両種のSS遺伝子の相同性とは矛盾するため、もうひとつのエンドウ型のSS遺伝子が存在することを予測している。

さらに、前節で述べたように Glycine 属の染色体数の基本数が10であると考えられること、および、Glycine 亜属において複二倍体の種・系統が見いだされたことからダイズが複二倍体である可能性が高いと思われる。

3. Glycine 亜属と Bracteata 亜属の間で交雑することが確認されていない。

Glycine 亜属と Bracteata 亜属との交配実験は、この仮説を証明するために必要であると思われる。この両亜属間の交配はこれまで若干試みられたことはあるが、成功例は知られていない。したがって、この交雑の成否について安易に予測することはできないが、G. soja と G. wightii との交雑がかつて成功したことがあったという経験（堀内私信）およびダイズと G. tomentella とが交雑できるという事実から Glycine 亜属と Bracte-

ata 亜属との間で交雑可能であることが期待できる。

4. Glycine 亜属において $2n=20$ の野生種が見いだされていない。

Glycine 亜属において染色体数が 20 の系統がまだ見いだされていないことが本仮説の最大の欠点である。しかし、インゲンマメ族および Bracteata 亜属の染色体数の基本数が 22 であるので、Glycine 亜属 においても染色体数が 20 である野生種が存在していた可能性が高いと思われる。

これまで記述してきたように、本研究で提出した Soja 亜属の起源に関する仮説にはまだまだ多くの問題点が山積みされている。しかしながら、Soja 亜属の起源についての考え方はこれまで提出されていないので、この仮説は、今後、Soja 亜属の起源に関する研究を進める上でひとつの指針となるものと考ええる。

つぎに、Soja 亜属の起源地について若干の考察を行ないたい。前節で触れたように、Glycine 亜属および Bracteata 亜属の地理的な分布範囲は東南アジアにおいて重なり合っていることが知られている (HERMANN 1962)。

G. soja の分布の南限はまだ確かめられていないが、中国南部の貴州省、湖南省および台湾には自生することが知られている。また、インドのヒマラヤ山麓に分布するという報告もある (SKVORTZOW 1927)。したがって、G. soja が上記した2亜属の分布が重なり合う地域で分化したという考え方は地理的分布の面からは受け入れ可能である (Fig. VI-8)。AXELROD (1966) は、すべての植物が気候変動の大きい赤道ぞいの山地で発生したという説を唱えている。これにしがって、起源地をより限定するならば、前川 (1969) がドクウツギの分布を根拠に古赤道が雲南地域を通過していたと指摘していること、および、ダイズが比較的冷涼な気候を好むところからこの古赤道よりも北の高度差の大きい熱帯山地を起源地とした可能性が高いと思われる。

VAVILOV (1926, 1940) は、栽培ダイズの発祥起源地として東アジア地域一帯 (Chinese Center) を想定したが、この考え方は、現在、つぎの3つの説に分けられている。FUKUDA (1933)、KARASAWA (1936) および星川 (1978) は、ダイズの変異が極めて大きいことから、中国東北部を起源地とした (満州起源地説)。また、NAGATA (1960) は、ダイ

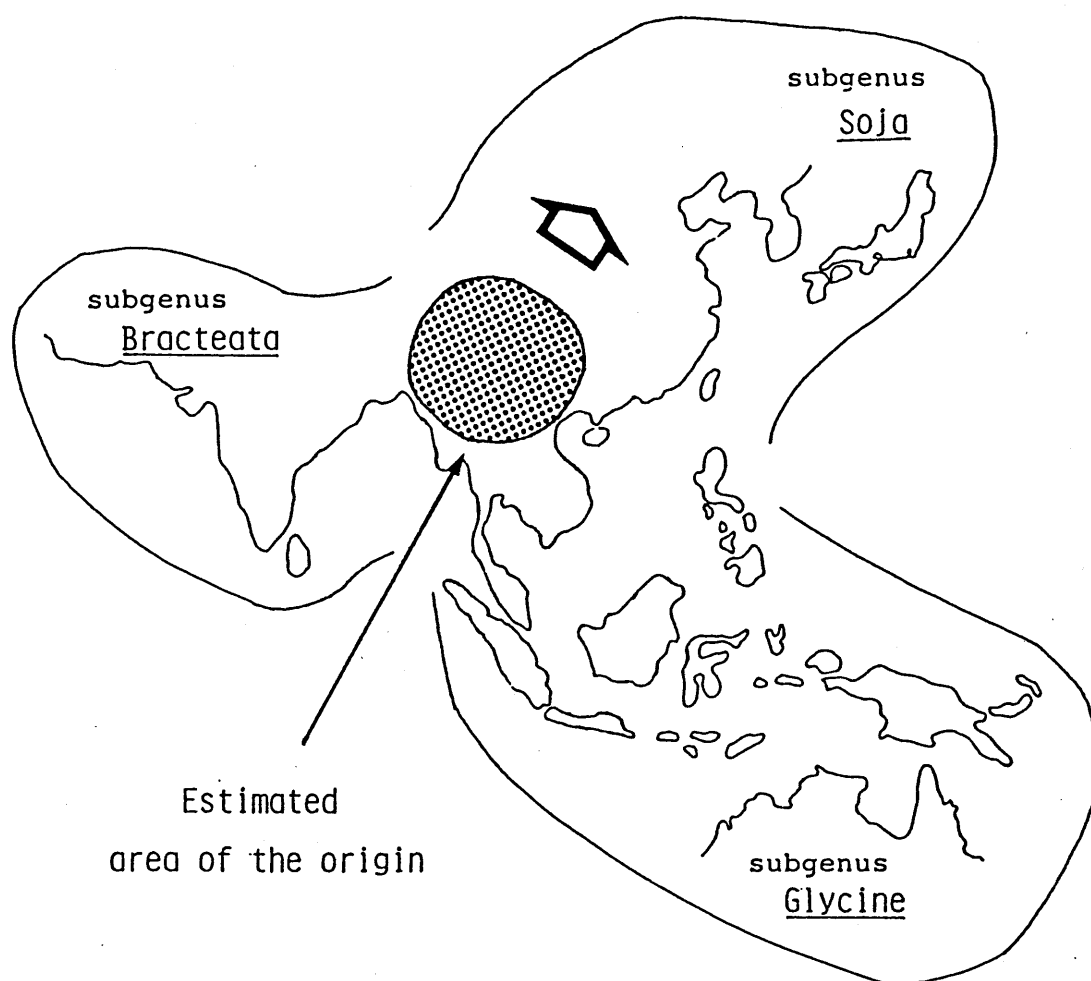


Fig. VI-8 Estimated area of the origin of soybean (subgenus *Soja*)
- Hypothesis.

The prototype species of soybean might have come as the amphidiploid between Glycine and Bracteata ancestral species in the area indicated above.

ズ品種の生態型分化、Cline(傾斜品種系)を検討して、HYMOWITZ(1970)は、考古学的資料を主な根拠として、ダイズが中国北部(山東省付近)で紀元前11世紀までに栽培化されたという主張を明らかにした(北シナ説)。一方、最近、照葉樹林文化論の中尾(1966)をはじめとしてダイズの起源地が中国南部ではないかとする説(南シナ説)が提出された(雲貴高原説-李璠 1979, 佐々木 1982) また、杉山(1985)も別の見地(作物進化の周縁説)から南シナ説を唱えた。そのおもな根拠はツルマメおよびダイズのK T I多型の変異頻度が南に行くほど高いこと(海婁ら 1980)およびNAGATA(1960)のダイズの伝播系とうまく適合することである。

本研究では、ツルマメの起源地が中国南部であると推定した。このことは栽培ダイズの一次起源地が、ツルマメが起源したと思われる中国南部地域であったことを示唆しており、上述した南シナ起源説を支持する。しかし、第三章のK T I多型の分析から、 Ti^a 型のツルマメから Ti^a 型のダイズが、 Ti^b 型のツルマメから Ti^b 型のダイズがそれぞれ分化したことを示唆する結果を得ているので、ダイズの起源した地域は複数あったと予想され、

杉山(1985)が指摘しているように、二次、三次センターを考える必要があると思われる。今後、中国大陸(特に中国南部)のツルマメとダイズのK T I多型の地理的分布頻度を詳しく調査することによってダイズの起源地さらにはダイズの伝播経路が明らかにできるとと思われる。

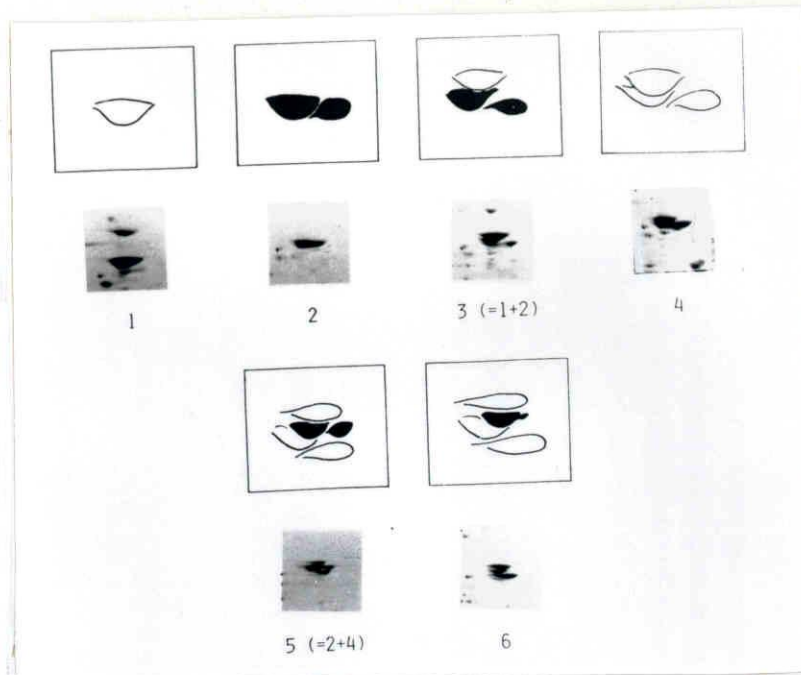
第 3 節 種子貯蔵タンパク質の分子進化と その育種学的意義

本研究では種子タンパク質を指標として Glycine 属の類縁関係について検討を試みたが、ここでは、この過程で得られたデータをもとに種子貯蔵タンパク質それ自体の進化について若干の考察を行ないたい。

Fig. VI -9 は、2次元電気泳動法レベルにおける相同性にもとづいて Glycine 亜属の 7S グロブリンの α タイプサブユニットの進化について考察を試みたものである。本論文には記述しなかったが、各種の 7S サブユニットの構造に相同性があることは CNBr 断片を比較した予備実験により確認できた。このレベルの分析では、この考え方が妥当であるかわからないので、将来、これらのタンパク質をコードしている遺伝子の DNA 配列を比較して確認する必要があると思われる。

ダイズの 11 S グロブリンは、含硫アミノ酸含量が高く、ダイズタンパク質が良質であるひとつの要因である。この 11 S グロブリンは、酸性および塩基性のサブユニットからなり、酸性サブユニットはさらに 7 種存在する

A



B

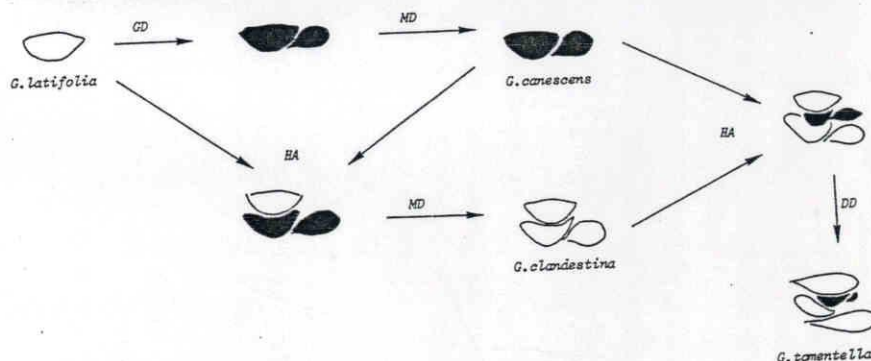


Fig. VI-9A Comparison between native and synthesized patterns for 7S subunits in the subgenus *Glycine*.

1: *G. latifolia*, 2: *G. canescens*, 3: *G. latifolia* + *G. canescens*,
4: *G. clandestina*, 5: *G. canescens* + *G. clandestina*,
6: *G. tomentella* (Eskdale).

G. clandestina (4) pattern was indistinguishable from the synthetic one (3) by *G. latifolia* (1) and *G. canescens* (2), likely *G. tomentella*'s pattern was alike to the synthetic one (5) from *G. canescens* (2) and *G. clandestina* (4).

B Hypothesis on the molecular evolution of 7S subunits in the genus *Glycine*.

GD: gene duplication, MD: molecular weight decreasing,
HA: hybridization and amphidiploidization,
DD: gene duplication and deletion.

ことが知られている。これらのサブユニットのアミノ酸配列には、相互に相同性があることが明らかになってきた（平野ら 1985）。また、Glycine 属野生種には 50 Kd タンパク質と呼ばれる高分子量の 11 S サブユニットが認められており（第 IV 章、原田ら 1983）、このうち、G. tomentella の 50 Kd タンパク質とダイズの 11 S サブユニットの N 末端配列が相同であることが報告されている（STASWICK et al. 1983）。以上の結果を考え合わせると、野生種の 50 Kd タンパク質の遺伝子からダイズの 11 S サブユニットの遺伝子が分化したのではないかと考えることができる（Fig. VI - 10）。試みに、2 次元電気泳動法を用いて、Damasia（ノササゲ）属、Glycine（G. falcata）亜属、Soja（ダイズ）亜属のマップを作成して比較したところ（Fig. VI - 11）、11 S サブユニットについて高分子量サブユニット（50 Kd タンパク質）と低分子量サブユニットとの量比に著しい相違が認められた。この知見は、今後、ダイズ 11 S 酸性サブユニットの分子進化を考える上で興味深いと思われる。

現在のダイズの種子成分の成分育種は、1. 含硫アミノ酸含量の増大、2. 栄養制限因子（K T I、B B I）

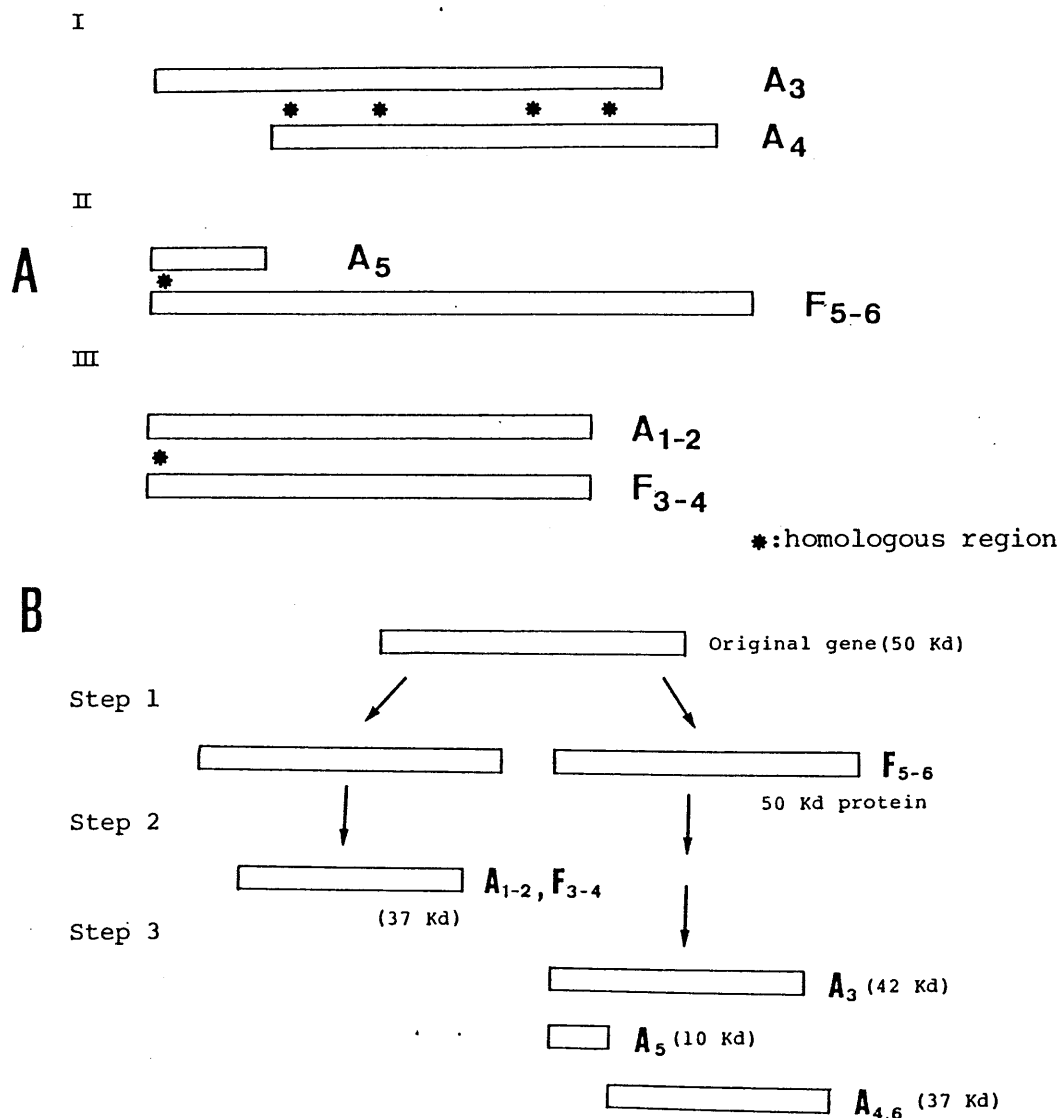


Fig. VI-10A Homology of amino acid sequences on 11S acidic subunits

I: Whole sequence homology between A_3 and A_4 subunits from soybean seed (Hirano *et al.* 1985).

II: Homology of N-terminal sequences between A_5 (soybean, 10 Kd) and F_{5-6} (*G.tomentella*, 50 Kd) subunits (Staswick *et al.* 1983).

III: Homology of N-terminal sequences between A_{1-2} (soybean, 37 Kd) and F_{3-4} (*G.tomentella*, 37 Kd) subunits (Staswick *et al.* 1983).

Fig. VI-10B Hypothesis on the molecular evolution of 11S acidic subunits in the genus *Glycine*.

Step 1: Duplication of the original gene coded for 11S acidic subunits with high molecular weight (50 Kd).

Step 2: Differentiation of A_{1-2} family as well as F_{3-4} subunits (37 Kd) from one original gene.

Step 3: Differentiation of various subunits (A_{3-6} , soybean) from the other original gene coded for 50 Kd proteins (F_{5-6} , *G.tomentella*).

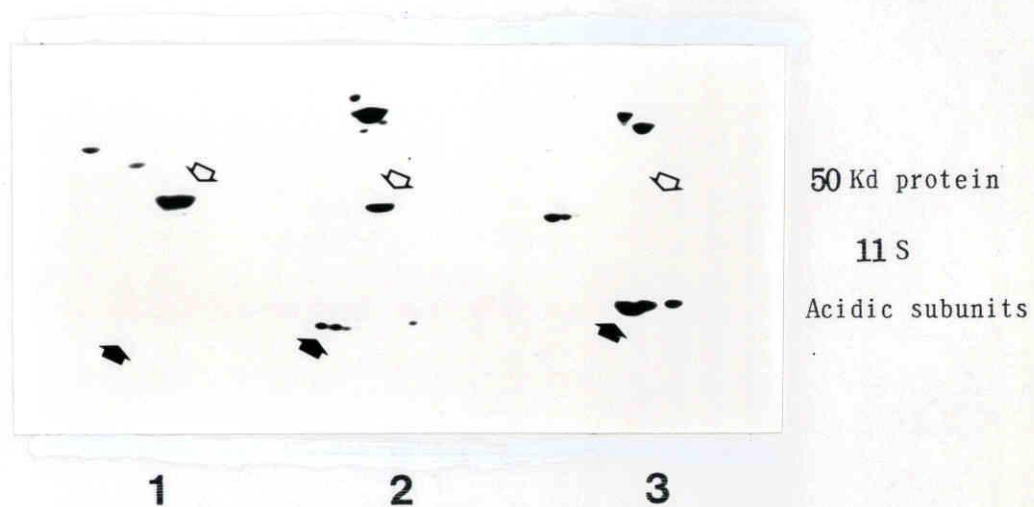


Fig. VI-11 Comparison of the spot patterns on 50 Kd proteins.
1: genus *Damasia*, 2: subgenus *Glycine*, 3: sub-
genus *Soja*.

Polypeptide maps were produced by the method described
in this Chapter II.

および品質低下因子（リポオキシダーゼなど）の除去、
3. タンパク質含量の増大の3点を目標として行なわれている（KAIZUMA 1979）。なかでも含硫アミノ酸含量の増大に対する要請は大きい。このための方策としては、1. 含硫アミノ酸含量の低いグロブリン分子種（7S）を低下させ、含硫アミノ酸含量の高いグロブリン分子種（11S）を増加させる（KITAMURA and KAIZUMA 1981）、2. 遺伝子工学の手法を用いてグロブリン遺伝子のコードを改変して、含硫アミノ酸含量の高いグロブリン遺伝子を作り出す、の2つが考えられる。これら2つのいずれの方法を用いるためにもグロブリン遺伝子の分子進化を解明することが重要であると思われる。

海妻（1977）は、ダイズから栄養阻害因子であるKTIを遺伝的に除去できることを示した。また、KITAMURA and KAIZUMA（1984）は、品質低下因子のリポキシダーゼ含量を大幅に低下させることに成功した。このように、有害成分の除去に関する方法論はすでに完成したと見て良いと思われる。今後は、野生種の優良な種子成分をダイズに取り込むための研究が望まれる。

また、タンパク質含量を高めることにも大きな期待が

寄せられているが、海妻(1975)の分析によれば、Soja 亜属の平均のタンパク質含量は 43 - 45 % であるのに対し、Glycine および Bracteata 亜属では 30 % 内外である。したがって、これらの野生種はダイズのタンパク質含量を増大させるための遺伝子源とはならない。しかしながら、ダイズがこの両亜属となんらかの関係を持ちながらその高タンパク質含量特性を獲得したことは確実であるので、ダイズのタンパク質含量をさらに高める育種を行なうためには、ダイズの起源と同時にその高タンパク化の仕組みを解明する必要があると思われる。

第4節

Glycine 属野生種の遺伝子源としての

有効性

Glycine 属野生種には、地上および地下の両方に種子を作る種 (G.falcata)、脂肪酸組成に大きな変異性を有している種 (G.clandestina CHAVEN et al. 1982)、熱帯の湿潤環境に適応している種 (G.wightii)、ダイズの病気抵抗性遺伝子を有している種 (G.canescens, BURDON and MARSHALL 1981) など多様な特性を示す種が含まれ、この他にもまだ同定されていない優良遺伝子がたくさん含まれていると思われる。

ダイズは病害を受けやすく、栽培上の大きな障害となっている。前述したように、G.canescens はダイズの病気抵抗性遺伝子を有していることが知られており、このような遺伝子を導入することが耐病性育種のひとつの目標である。また、ダイズは虫害を特に受けやすく、収量を大きく低下させる原因となっている。したがって、野生種の耐虫性遺伝子を探索して、導入することが急務であると考えられる。

ダイズの栽培適地を拡大することは大きな育種課題で

ある。現在、ダイズはおもに温帯地域で栽培されているが、感光性に関して著しい品種分化が認められている (NAGATA 1961) ので、いろいろな環境に適応して栽培できると考えられる。杉山 (1985) によれば、ブラジルのセラード地帯では、ダイズが熱帯の酸性土壌のラテライトにも適応することが明らかになった。今後、熱帯の高温多湿な気候に適応する品種を育成することが望まれる。また、アフリカの土壌にはダイズの根粒菌が定着できないためにダイズの栽培が難しいとされている。しかし、Bracteata 亜属の G.wightii はもともとアフリカに分布しているので、この種と共生している根粒菌をダイズと共生させることができるならば、アフリカでのダイズ栽培がより容易になると思われる。

ダイズと Glycine 亜属野生種との交雑は、1979 年の LADIZINSKY et al. の報告以来急速に進展している。最近の Soybean Genetic Newsletter によれば、NEWELL and HYNOWITZ (1984) が稔性のある雑種個体 ($2n=118$) を得ているので、この雑種個体には Glycine 亜属の優良遺伝子をダイズに導入するための中間母本として期待がかけられる。また、遺伝子の導入には、近年、長足の進歩

を見せている遺伝子工学（ベクターの利用）および細胞工学（細胞融合）などの方法も適用できる可能性がある。

本論文でたびたび指摘して来たように、ツルマメはダイズと同種と言って良いほど類似性が高く、ダイズを大きく改良するための遺伝子源にはならないと予想される。したがって、Glycine 属野生種の優良遺伝子を探索して整理しておくことはダイズを育種学的に改良するために重要であると考える。

VII. Summary

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), as one of the most promising plant protein and oil sources, is expected to be utilized by many people over the world. And many soybean breeders further devise the improvement of soybean on the productivity and nutritional value of the seed storage protein, *e.g.* increase of sulfur-containing amino acids and elimination of anti-nutritional trypsin inhibitors and other factors, and the progress of a wide utility for the food industry, *e.g.* elimination of unfavorable beany-taste causing components and alteration of seed storage components corresponding to the processing aims.

Glycine max and *G. soja* are different in their morphological traits but they belong to one biological species, whereby no difference but a subtle in protein composition is present in the seeds of the two species. Therefore, other wild soybeans in the genus *Glycine* are supposed candidates to expand the genetic diversity for the breeding of soybean seed storage protein. Though the breeders, to make a plan for soybean breeding, need the information about phylogenetic relationship existing among *Glycine* species and the origin of the soybean, yet most of this knowledge is not available. Therefore, the present study was made in order to reveal the botanical relationship in the genus *Glycine* by comparing three different protein species in seeds, *i.e.* Kunitz trypsin inhibitor like proteins, storage globulin subunits and seed enzymes, and to elaborate hypothesis concerning the origin of soybean. The results obtained are summarized as follows:

I. KTI (Kunitz trypsin inhibitor) in cultivated soybean and KTILP (KTI like protein) in wild soybean seeds were purified by DEAE-cellulose column chromatography, and immunological and electrophoretic properties of those proteins were studied. Seven species were used as materials including four species

of *G. latifolia*, *G. tabacina*, *G. clandestina* and *G. canescens* in the subgenus *Glycine*, and one species of *G. wightii* in the subgenus *Bracteata* (= genus *Neonotonia*) and two species of *G. max* and *G. soja* in the subgenus *Soja*. Chromatographical and inhibitory profiles of KTILP rich fraction from all four *Glycine* species were similar to those of KTI. Immunoreaction of KTILP rich fraction(s) to KTI antiserum were positive both in the subgenus *Soja* and *Glycine*, while undetectable or negative in the subgenus *Bracteata*.

Molecular weight of all identified KTILPs were the same as that of KTI by SDS(sodium dodecylsulfate)-gel electrophoresis. Two kinds of KTILP(S and F protein migrate slow and fast on gel electrophoresis, respectively) existed in all *Glycine* species. The quantitative ratios of S protein to F protein were different among species, ranging from 0.6 of *G. canescens* to 4.3 of *G. clandestina*. S protein was a simple protein like KTI, but F protein was made up of two(f_1 and f_2) polypeptides connected by disulfide bond. The mobility of f_1 peptides was almost constant on SDS-gel electrophoresis among the species(except *G. clandestina*), on the contrary, *G. canescens* showed the lowest mobility of f_2 peptides, followed by *G. clandestina*, *G. tabacina*, and *G. latifolia* had the highest mobility. Both *Soja* and *Bracteata* species contained single KTI or KTILP related to S protein, but the other KTILP like F protein was not detected.

II. KTILPs contained in the subgenus *Glycine* have considerable variabilities of mobility(Rf value), ratio of S to F protein on gel electrophoresis and molecular size of S protein, f_1 and f_2 peptides on SDS-gel electrophoresis. These three characteristics of KTILPs were compared in 22 lines representing four *Glycine* species(including *G. latifolia*, *G. tabacina*, *G. clandestina* and *G. canescens*). The variability of molecular size reflected the affinity among these species more distinctly than the other two characteristics.

Seven types of migrating pattern were distinguished by

two dimensional gel electrophoresis. As *G. latifolia* and *G. tabacina* were separated into two (LAT A, B) and three (TAB A, B, C) subspecific groups, these two species had a variance within each species. Whereas *G. clandestina* formed a homogenous entity. It is interesting in the speciation of the genus *Glycine* that the subspecific groups of *G. latifolia* (LAT B), *G. tabacina* (TAB C) and *G. canescens* (CAN) shared an identical pattern. This suggested that these subspecific groups and species were involved in the speciation of the subgenus *Glycine*. Two lines of *G. tabacina* contained two sets of S and F proteins and thus the process of speciation through amphidiploidizing likely existed in this subgenus.

Comparative study of Rf value and S/F ratio of KTILPs supports the results concerning molecular size as stated above.

III. Soybean likely originated from its putative progenitor *G. soja* but it is unknown how many paths it evolved through. Kunitz trypsin inhibitor is present in three variants (Ti^a , Ti^b , Ti^c) in soybean seeds and *G. soja* also has two variants (Ti^a , Ti^b). Ti^a -type KTI contains two methionine residues while Ti^b -type contains only one residue. Two common variants in both species were compared for amino acid composition and cleavage pattern by cyanogen bromide (CNBr). The amino acid composition and cleavage pattern of purified KTI from *G. soja* was identical to those of respective KTI type from *G. max*. These results suggest that two evolutionary paths of *G. max* from *G. soja* existed. Of course, this hypothesis remains to be confirmed on other components.

IV. Seed storage proteins of seven genera in the tribe *Phaseoleae* were compared by SDS-gel electrophoresis in order to characterize their seed storage protein. Six genera except *Glycine* have only globulin subunits with the molecular weight more than 50 Kd and do not contain low

molecular weight 11S acidic subunit as soybean and other *Glycine* species. As immunological and ultracentrifugal studies revealed that almost *Phaseoleae* genera contained two globulin species with 11S and 7S sedimentation coefficient, new 11S acidic subunits with high molecular weight seems to exist in the seed of these six genera.

V. To investigate the differences on subunit composition of conglycinin among soybean and wild soybean seeds, the polypeptide maps of seed extracts by O'Farrell system were compared. The subunit composition of major storage proteins (conglycinin and glycinin) differed in subgenera and species level. Conglycinin subunits are classified into two types (α and β) by their molecular weight and immunological criteria.

Soybean and its progenitor *G. soja* had identical conglycinin subunits which consisted of two α type (α' and α) and one β type (β) subunits. Conglycinin in *G. wightii* belonging to the subgenus *Bracteata* was composed of one or two α type and two to three β type subunits. Five *Glycine* species had one to five α type subunits, but β type subunit was seldom present.

The mobility of α type subunits of *G. latifolia* and *G. wightii* likely coincided with α' and α subunit of soybean on the synthetic map, respectively. These results suggest that soybean, that is the subgenus *Soja*, introduced its genome from the subgenus *Bracteata* as well as *Glycine*.

VI. β -amylases in soybean seeds can be separated by gel electrophoresis into two ($Sp1^a$, $Sp1^b$) variant bands which are controlled by two codominant alleles, and by gel isoelectric focusing into seven isozymes which belong to two zymogramatical types: high (H) and low (L) pI types. However the relationship between both characteristics is not clear. Therefore, crude seed extracts subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and

β -amylases were renatured and detected on SDS-gel in order to compare their molecular size.

Soybean and wild soybean β -amylases were separated into high mobility(HM) and low mobility(LM) groups by SDS-gel electrophoresis. Under these experimental conditions, sweet potato β -amylase used as standard was once dissociated into subunits and then renatured into the tetrameric active form. Twelve lines of soybean and wild soybean were examined for three electrophoretic characteristics of the enzyme. The results showed that the $Sp1^a$ variant band consisted of high(H) pI type isozymes with a low mobility(LM) and the $Sp1^b$ band was composed of low(L) pI type isozymes with a high mobility(HM).

VII. Changes of polypeptide length of enzymes must have a serious effects on their specific structure and activity and these deleterious mutated enzymes then would be abandoned, but isozymes with a mutated charge caused by the point mutation of the triplet are virtually present in almost all enzymes. This suggests that the enzyme molecular size, like the results in VI, should be changeable easier than its charge in order to study the relationship between species with a weak relatedness or with a rapid evolutionary speed.

Molecular size of seed peroxidase and β -amylase were compared among 38 populations representing nine species (*G.latifolia*, *G.tabacina*, *G.clandestina*, *G.canescens*, *G.tomentella*, *G.falcata*, *G.wightii*, *G.soja* and *G.max*). Amylase bands appeared on the region of SDS-gel corresponding to the molecular weight of ca. 40 to 100 kilodaltons. It is interesting that *G.canescens* had a common band to one line of *G.wightii* and only *G.tomentella* contained a comigrating band with *G.max*($Sp1^b$). Most peroxidase activity was localized in seed coat. Peroxidase(s) were separated by their molecular size into four classes, i.e. class 1(ca. 57 Kd), class 2(ca. 48 Kd), class 3(ca. 45 Kd) and class 4 (ca. 38 Kd) and the subgeneric criterium was distinguished

by the peroxidase banding pattern except *G.wightii* and *G.max* has a comigrating peroxidase band; subgenus *Glycine* (class 1 and 3), subgenus *Bracteata* (class 2 and 4) and subgenus *Soja* (class 4).

The results concerning these two enzymes suggest that soybean, *i.e.* the subgenus *Soja*, originated from both *Glycine* and *Bracteata* species, as stated in V.

In the present study, I stated that the base chromosome number for the subgenera *Glycine* and *Soja* may be $x=10$ or 11 , since some species in these two subgenera showed to have a relatedness with *G.wightii* ($n=11$) and that the present *Glycine* species evolved from a putative original species ($n=10$ or 11) with complicated gene exchanges and through auto- or amphidiploidization, and I also reported as hypothesis that soybean originated from the amphidiploidizing between the putative ancestors belonged both to the subgenera *Glycine* and *Bracteata*.

Finally, the following contents were discussed; (1) the phylogenic relationship in the genus *Glycine*, (2) a hypothesis for the origin of soybean, (3) the speciation of seed globulin subunits and its implication to seed protein improvement and (4) the possibility for wild soybean to play a role in the breeding of soybean in the future.

引用文献

- ADAMS, C.A., T.H. BROWN and R.W. RINNE (1981): Starch metabolism in developing and germinating soya bean seeds is independent of β -amylase activity. *Ann. Bot.* 48, 433-439.
- AHMAD, Q.N., E.J. BRITTON and D.E. BYTH (1977): Inversion bridges and meiotic behavior in species hybrids of soybeans. *J. Hered.* 68, 360-364.
- AQUADRO, C.F. and J.C. AVISE (1981): Genetic divergence between rodent species assessed using two-dimensional electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 3784-3788.
- AXELROD, D.I. (1966): Origin of the deciduous and evergreen habits in temperate forests. *Evolution* 20, 1-15.
- BALLS, A.K., R.R. THOMPSON and M.K. WALDEN (1946): A crystalline protein with β -amylase activity, prepared from sweet potatoes. *J. Biol. Chem.* 163, 571-572.
- BERRY-LOWE, S.L., T.C.M. KNIGHT, D.M. SHAH and R.B. MEAGHER (1982): The nucleotide sequence, expression, and evolution of one member of a multigene family encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in soybean. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 483-498.
- BIRK, Y. (1961): Purification and some properties of a highly active inhibitor of trypsin and α -chymotrypsin from soybeans. *Biochim. Biophys. Acta* 54, 376-378.
- BLANK, A., R.H. SUGIYAMA and C.A. DEKKER (1982): Activity staining of nucleolytic enzymes after SDS-PAGE. Use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels. *Anal. Biochem.* 120, 267-275.
- BOGDAN, A.V. (1966): Glycine javanica under experimental cultivation in Kenya. *Trop. Agric. Trin.* 43, 99-105.
- BOWMANN, D.E. (1946): Differentiation of soy bean antitryptic factors. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 63, 547-550.

- BROUÉ, P., D.R. MARSHALL and W.J. MULLER (1977): Biosystematics of subgenus Glycine (Verdc.): Isozymatic data. Aust. J. Bot. 25, 555-566.
- BROUÉ, P., D.R. MARSHALL and J.P. GRACE (1979): Hybridization among the Australian wild relatives of the soybean. J. Aust. Ins. Sci. 7, 256-257.
- BROUÉ, P., J. DOUGLASS, J.P. GRACE and D.R. MARSHALL (1982): Interspecific hybridization of soybeans and perennial Glycine species indigenous to Australia via embryo culture. Euphytica 31, 715-724.
- BURDON, J.J. and D.R. MARSHALL (1981): Evaluation of Australian native species of Glycine for resistance to soybean rust. Plant Disease 1, 44-45.
- BUTTERY, B.R. and R.I. BUZZELL (1968): Peroxidase activity in seeds of soybean varieties. Crop Sci. 8, 722-725.
- CATSIMPOOLAS, N., J.A. KENNEY, E.W. MEYER and B.F. SZUKAJ (1971): Molecular weight and amino acid composition of glycinin subunits. J. Sci. Food Agric. 22, 448-450.
- CHENG, Y.W. (1963): Studies on the characteristics and chromosome numbers of some Glycine spp. Agric. Res. (Taiwan) 12, 1-9.
- CORBET, E.H. (1971): Tetrapods and continents. Quart. Rev. Biol. 46, 250-269.
- CRANE, C.F., W.D. BEVERSDORF and E.T. BINGHAM (1982): chromosome pairing and association at meiosis in haploid soybean (Glycine max Merr.). Can. J. Genet. Cytol. 24, 293-300.
- 詹国達 (1969): 大豆属種間交雜不和合性及雜種不稔性克服方法之研究. 中華農学会報 新第66期 16-24.
- DANIELSSON, C.E. (1949): Plant proteins. Ann. Rev. Plant Physiol. 7, 215-236.
- DAVIS, B.J. (1964): Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. New York Acad. Sci. 121, 404-427.
- DERBYSHIRE, E., D.J. WRIGHT and D. BOULTER (1976): Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochemistry. 15, 3-24.

- DUDMAN, W.F. and A. MILLARD (1975): Immunochemical behavior of legumin and vicilin from Vicia faba: a survey of related proteins in the Leguminosae subfamily Faboideae. Biochem. Syst. Ecol. 3, 25-33.
- FUKUDA, Y. (1933): Cyto-genetical studies on the wild and cultivated Manchurian soy beans (Glycine max L.). Jap. J. Bot. 6, 489-506.
- GERTLER, A. and Y. BIRK (1965): Purification and characterization of a β -amylase from soya beans. Biochem. J. 95, 621-627.
- GORMAN, M.B. and Y.T. KIANG (1978): Models for the inheritance of several variant soybean electrophoretic zymograms. J. Hered. 69, 255-258.
- HADLEY, H.H. and T. HYMOWITZ (1973): Speciation and cytogenetics. in Soybeans : Improvement, Production and Uses. 97-116. Am. Soc. Agron. Madison.
- 原田久也・喜多村啓介・深沢親房・平野久 (1983): Glycine 属植物のグリシニン様タンパク質. 第4回種子生理生化学研究会講演要旨集 16-17.
- HERMANN, F.J. (1962): A revision of the genus Glycine and its immediate allies. UNIT. SEED Dept. Tech. Bull. 1268, 1-79.
- HILDEBRAND, D.F. and T. HYMOWITZ (1980): The Sp_1 locus in soybean codes for β -amylase. Crop Sci. 20, 165-168.
- HIRANO, H. (1982): Varietal differences of leaf protein profiles in mulberry. Phytochemistry 21, 1513-1518.
- 平野久・小林直恵・生井兵治・原田久也・香川裕之 (1985): ダイズグリシニン A3-A4 サブユニット間にみられるアミノ酸配列の相同性. 育雑 32, 別冊 1.
- 星川清親 (1978): 栽培植物の起源と伝播. 二宮書店
- 堀内慎一: (私信)
- 堀井正治・宮崎基嘉 (1973): ダイズの加工とトリプシンインヒビター (第1報) ダイズ等およびダイズ製品中のトリプシンインヒビター量. 食総研報告 28, 52-58.

HYMOWITZ, T. (1970): On the domestication of the soybean. *Econ. Bot.* 24, 408-421.

KAIZUMA, N. (1979): Fundamental studies on soybean (Glycine max (L.) Merr.) seed protein improvement. *JARQ* 13, 230-233.

KAIZUMA, N. and T. HYMOWITZ (1981): Soybean seed protein electrophoresis profiles from 15 asian countries or regions: Hypothesis on paths of dissemination of soybeans from china. *Econ. Bot.* 35, 10-13.

海妻矩彦 (1975): ダイズのタンパク質育種に関する基礎研究. 岩手大学農学部報 12(3), 155-264.

海妻矩彦 (1977): トリプシンインヒビターをもたないダイズ. 化学と生物 15, 296-297.

海妻矩彦・喜多村啓介 (1980): ダイズの起源と分化. 育種学最近の進歩 第 21 集 43-52.

海妻矩彦・及川一也・三浦正弘 (1980): ダイズの在来品種群における *Ti* 座対立遺伝子頻度分布の差異とその成因について. 岩手大学農学部報 15(2), 81-96.

KARASAWA, K. (1936): Crossing experiments with Glycine soja and G. ussuriensis. *Jap. J. Bot.* 8, 113-118.

金承高・原三郎・池中徳治・戸田弘子・喜多村啓介・海妻矩彦 (1984): 遺伝的に異なる三種の Kunitz 型 Trypsin Inhibitor の構造比較. 日本生化学会講演要旨集 (昭和 84 年)

KITAMURA, K. and K. SHIBASAKI (1975): Isolation and some physiological properties of the acidic subunits of soybean 11 S globulin. *Agric. Biol. Chem.* 39, 1837-1844.

喜多村啓介・塚田義弘 (私信)

KITAMURA, K. and N. KAIZUMA (1981): Mutant strains with low level of subunits of 7 S globulin in soybean (Glycine max Merr.) seed. *Japan J. Breed.* 31 353-359.

- 喜多村啓介(1983): 大豆種子リボオキシゲナーゼの遺伝育種的除去. 化学と生物 21, 221-223.
- KLOZOVÁ, E. and KLOZ, J. (1972): Distribution of the "Phaseolin" in some representatives of Viciaceae. Biol. Plant. 14, 379-384
- KOIDE, T., and T. IKENAKA (1973): Studies on soybean trypsin inhibitors. 3. Amino-acid sequence of the carboxyl-terminal region and the complete amino-acid sequence of soybean trypsin inhibitor(Kunitz).
- KORTT, A. A. (1979): Isolation and characterization of the trypsin inhibitors from winged bean seed(Psophocarpus tetragonolobus (L.) Dc.). Biochim. Biophys. Acta 577, 371-382.
- 越山育則(1976): ダイズ蛋白質. 植物酵素・蛋白質研究法 456-464. 共立出版
- 洪 殷建; 小島睦夫(1972): ダイズにおけるタンパク質増大に関する研究. 日作紀 41, 502-508.
- KUNITZ, M. (1945): Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. Science 101, 668.
- LACKEY, J. A. (1977): Neonotonia, a new generic name to include Glycine wightii (Arnot) Verdcourt. Phytologia, 37, 209-212.
- LADIZINSKY, G., C. A. NEWELL and T. HYMOWITZ (1979): Wide crosses in soybeans: Prospects and limitations. Euphytica 28, 421-423.
- LAEMMLI, L. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- LARSEN, A. L. and W. C. BENSON (1970): Variety-specific variants of oxidative enzymes from soybean seed. Crop Sci. 10, 493-495.
- LARKINS, B. A. (1980): Seed storage proteins: Characterization and biosynthesis. The biochemistry of plants 6, 449-489. Acad. Press
- LASKOWSKI, M. Jr. and I. KATO (1980): protein inhibitors of proteinases. Ann. Rev. Biochem. 49, 593-626.
- 前川文夫(1969): 植物の進化を探る. 岩波新書

前川文夫(1983): 高等植物の進化と染色体との関係について. 高知県の植物
5, 1-15

MARKERT, C.L. and F.MOLLER(1959): Multiple forms of enzymes: Tissue,
ontogenic, and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. 45,
753-763.

MERTZ, E.T., L.S.BATES and O.E.NELSON(1964): Mutant gene that changes
protein composition and increase lysine content of maize endosperm.
Science 145, 279-280.

MIES, D.W. and T.HYMOWITZ(1973): Comparative electrophoretic studies of
trypsin inhibitors in seed of the genus Glycine. Bot. Gaz. 134, 121-
125.

MIKAMI, B., S.AIHARA and Y.MORITA(1982): Distribution and properties of
soybean β -amylase isozymes. Agric. Biol. Chem. 46, 943-953.

MORITA, Y., F.YAGI, S.AIHARA and H.YAMASHITA(1976): Chemical composition
and properties of soybean β -amylase. J.Biochem. 79, 591-603.

NAGATA, T.(1960): Studies on the differentiation of soybeans in Japan and
the world. Mem. Hyogo Univ. Agric. 3, 63-102.

NAGATA, T.(1961): Studies on the differentiation of soybeans in the world,
with special regard to that in Southeast Asia. 3. Some photoperiodic
aspects of the nature of the tropical soybeans. Japan J. Crop Sci. 29,
267-272.

中尾佐助(1966): 栽培植物と農耕の起源. 岩波書店.

NEWELL, C.A. and T.HYMOWITZ(1977): A reappraisal of the subgenus Glycine.
Am. J. Bot. 65, 168-179.

NEWELL, C.A. and T.HYMOWITZ(1980): A taxonomic revision in the genus
Glycine subgenus Glycine(Leguminosae). Brittonia 32, 63-69.

NEWELL, C.A. and T.HYMOWITZ(1982): Successful wide hybridization between
the soybean and a wild perennial relative; G.tomentella Hayata. Crop
Sci. 22, 1062-1065.

- NEWELL, C.A. and T. HYMOWITZ (1983): Hybridization in the genus Glycine subgenus Glycine Willd. (Leguminosae Papilionodeae). Am. J. Bot. 70, 334-348.
- NEWELL, C.A. and T. HYMOWITZ (1984): A soybean X Glycine tomentella hybrid: progress and problems. Soybean Genetic Newsletter 11, 86.
- ODANI, S., S. ODANI, T. ONO and T. IKENAKA (1979): Proteinase inhibitors from a Mimosoideae legume. Albizia julibrissin. J. Biochem. 86, 1795-1805.
- ODANI, S. and T. IKENAKA (1976): The amino acid sequences of two soybean double headed proteinase inhibitors and evolutionary consideration on the legume proteinase inhibitors.
- O'FARRELL, P.H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.
- OHNO, S. (1970): Evolution by gene duplication. Springer-Verlag. N.Y.
- ORF, J.H. and T. HYMOWITZ (1977): Inheritance of a second trypsin inhibitor variant in seed protein of soybeans. Crop Sci. 17, 811-813.
- ORNSTEIN, L. (1964): Disc electrophoresis-I. Background and theory. Ann. New York Acad. Sci. 121, 321-349.
- OSBORNE, T.B. and CAMPBELL (1898): Proteids of the soy bean (Glycine hispida) J. Am. Chem. Soc. 20, 419-428.
- OUCHTERLONY, O. (1953): Antigen-antibody reactions in gels. IV. Type of reaction in coordinated systems of diffusion. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 32, 231-240.
- PALMER, R.G. and H.H. HADLEY (1968): Interspecific hybridization in Glycine, subgenus Leptocyanus. Crop Sci. 8, 557-563.
- PUTIEVSKY, E. and P. BROUÉ (1979): Cytogenetics of hybrids among perennial species of Glycine subgenus Glycine. Aust. J. Bot. 27, 713-723.
- 李璠 (1979): 生物史第五分册 科学出版社 北京

ROBINSON, N.C. and C. TANFORD (1975): The binding of deoxycholate, Triton X-100, sodium dodecylsulfate, and phosphatidylcholine vesicles to cytochrome b5. *Biochemistry* 14, 369-378.

佐々木高明(1982): 照葉樹林分化の道. 日本放送出版協会.

SEARS, E.R. (1969): Wheat cytogenetics. *Ann. Rev. Genet.* 3, 451-468.

SINGH, L., C.M. WILSON and H.H. HADLEY (1969): Genetic differences in soybean trypsin inhibitors separated by disc electrophoresis. *Crop Sci.* 9, 489-491.

SKVORTZOW, B.V. (1927): The soybean - wild and cultivated in eastern Asia. *Manchurian Res. Soc. Publ. Ser. A. Nat. Hist. Sec.* 22.

SPRADLIN, J. and J.A. THOMA (1970): β -amylase thiol groups. Possible regulator sites. *J. Biol. Chem.* 245, 117-127.

STASWICK, P.E., P. BROUE and N.C. NIELSEN (1983): Glycinin composition of several perennial species related to soybean. *Plant Physiol.* 72, 1114-1118.

杉山信太郎(1985): 大豆の起源と伝播について. 恵泉女学園短期大学研究紀要 18 123-142.

高木俊夫・白浜啓四郎・辻井薫・久保兼信(1976): SDS-蛋白質ポリペプチド複合体 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法と関連して 蛋白質・核酸・酵素 21, 811-828.

THANH, V.H. and K. SHIBASAKI (1976): Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J. Agric. Food. Chem.* 24, 1117-1121.

THANH, V.H. and K. SHIBASAKI (1977): Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunochemical and physico-chemical properties of the monomeric forms. *Biochim. Biophys. Acta* 490, 370-384.

THOMAS, P.E., D. RYAN and W. LEVIN (1976): An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on SDS-polyacrylamide gels.

- URIEL, J. and J. BERGES (1968): Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Nature* 218, 578-580.
- VAVILOV, N. I. (1926): 栽培植物の発祥中心地 (中村英司訳 1980 栽培植物発祥地の研究 19-191 八坂書房)
- VAVILOV, N. I. (1940): 栽培植物発祥に関する諸学説 (中村英司訳 1980 同上書 301-337)
- VERDCOURT, B. (1966): A proposal concerning Glycine L. *Taxon* 15, 34-36.
- VESTERBERG, O. and H. SVENSSON (1966): Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobin. *Acta Chem. Scand.* 20, 820-834.
- WATSON, J. D. and F. H. C. CRICK (1953): Genetical implication of the structure of deoxyribose nucleic acid. *Nature* 17, 964-966.
- WEBER, K. and M. OSBORN (1969): The reliability of molecular weight determination by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- WEGENER, A. (1929): The origin of continents and oceans. Dover N.Y.
- WILLIAMS, L. F. (1948): Inheritance in a species cross in the soybean. *Genetics* 33, 131-132.
- WOLF, W. J. and D. R. BRIGGS (1956): Ultracentrifugal investigation of the effect of natural salts on the extraction of soybean proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 63, 40-49.
- WRIGLEY, C. W. (1968): Gel electrofocusing. A technique for analyzing science tools. *LKB instrumental J.* 15, 17-23.

報文目録

1. 中村郁郎・喜多村啓介・海妻矩彦・蓬原雄三(1984): Glycine 属植物の種分化. 1. Kunitz Trypsin Inhibitor 様タンパク質の電気泳動的特性. 育種学雑誌. 30, 468-477.
2. Nakamura, I. and Y. Futsuhara(1985): Relationship among three electrophoretic characteristics of β -amylase in soybean and wild soybean seeds. Japan J. Breed. 35, 153-159.