

## ダイズ種子タンパクにみられるトリプシンインヒビターの 地理的多型

高 木 胖

(育種学教室)

昭和51年9月30日 受理

### Geographical Polymorphism of Trypsin Inhibitor in Seed Proteins of Soybean Varieties

Yutaka TAKAGI

(Laboratory of Plant Breeding)

Received September 30, 1976

#### Summary

Trypsin inhibitor proteins of soybean varieties collected from various districts of Japan and Korea were analyzed by disc electrophoresis. Geographical polymorphic nature was found in the distribution of the soybean trypsin inhibitor which showed two electrophoretic bands with Rf values of 0.92 and 0.95.

Out of the 234 varieties sampled, 106 had the Rf 0.92 band and the remaining 128 did the Rf 0.95 band. The distribution patterns of the bands were different in the districts and in the maturity groups which are classified into five groups from the standpoint of the days from germination to blooming. Most of the varieties with the Rf 0.92 band were included in the maturity group II, and the varieties with the Rf 0.95 band belonged predominantly to the other maturity groups.

The Rf 0.92 band appeared in a half of varieties cultivated in northern parts of Japan, except Hokkaido where were grown early varieties belonging to the group I which had largely the Rf 0.95 band. In Kyushu, there are two types, group II and V. In the group II, 84% of the varieties had the Rf 0.92 band, whereas in the group V the same band was observed only in 30%. The varieties in Korea belong to the group II and III, and 30% of the varieties had the Rf 0.92 band. This is remarkably lower than the percentage in the Japanese varieties of the same group.

#### 緒 言

タンパク質分解酵素の活性を阻害する能力を持ったタンパク性プロテナーゼインヒビターは動植物の組織中に広く存在し、特に各種マメ類の種子中に多く見いだされている。ダイズ種子中のプロテナーゼインヒビターに関しては、Bowman<sup>1)</sup>によってトリプシンの活性を阻害する物質、トリプシンインヒビターとしてはじめて見いだされ、その後多くの研究者によって幾種類ものトリプシンインヒビターがダイズ種子中に含まれると報告されている<sup>5,6,8,10,12)</sup>。

Singhら<sup>11)</sup>はポリアクリルアミドゲル電気泳動により、ダイズのトリプシンインヒビターを分

画した結果、供試した品種が Rf 0.92 (Rf=relative mobility to the dye front) の泳動バンドを持つ品種と Rf 0.95 の泳動バンドを持つ品種とに分れることを認め、さらに Rf 0.92 と Rf 0.95 のバンドを持つ品種の交雑実験から、2つの泳動バンドは一对の共優性遺伝子に支配されていることを明らかにした。Clark ら<sup>2)</sup> は、これらダイズ品種のトリプシンインヒビターについて検討を行ない、アメリカ産のダイズはすべて Rf 0.95 の泳動バンドを持ち、また、アメリカに導入された品種のうち、中国産品種はすべて Rf 0.95 の泳動バンドを持つこと、朝鮮産には Rf 0.92 の品種が9%、日本産には Rf 0.92 の品種が29%あることを報告している。

著者は、日本産ならびに朝鮮産のダイズ品種に含まれるトリプシンインヒビターについて、Rf 0.92 と Rf 0.95 の泳動バンドを持つ品種に分類し、供試した品種のトリプシンインヒビターの種類による地理的多型を認めるとともに、品種の生態型との関係を明らかにし得たのでここに報告する。

本実験に用いた品種の種子は、農業技術研究所および九州農業試験場より分譲されたものである。ここに厚く謝意を表する。

#### 実験材料および方法

供試したダイズ品種は、北海道から九州に至る日本各地から収集された生態型 I から V までの215品種と朝鮮産の19品種とを合わせた234品種である。

ダイズ種子タンパクとしての試料は、各品種の種子を20粒程度粉碎し、その粉末0.5gをとり、これにpH 8.3のトリス-グリシン緩衝液(0.025M トリスアミノメタン, 0.192M グリシン)10mlを加えて充分すりつぶし、その磨砕液を、2000×gで10分間遠心分離(0-5°C)して、その上澄を採取して用いた。試料はゲル1本当たり、注射器で1滴を加え、この試料中のトリプシンインヒビターの分画は、Davis<sup>3)</sup>によるポリアクリルアミドを用いたデスク電気泳動法に従った。泳動用緩衝液はpH 8.3のトリス-グリシン緩衝液を用い、ゲル1本当たり4mAの定電流で50分間、15°Cで泳動した。泳動後のゲルは12.5%トリクロール酢酸液で30分間固定したのち、0.25%コマジー ブリリアント ブルーで20分間染色し、過剰の色素は5%酢酸液で脱色し保存した<sup>4)</sup>。なお、ゲルならびに緩衝液の組成、電流の強度のわずかな変化によっても分離像に変化がみられたので、試料の泳動にあたっては、Rf 0.92の泳動バンドを持つタチスズナリ、Rf 0.95の泳動バンドを持つシンメジロから調製した試料を標準として同時に泳動を行ない、これを供試品種の泳動像と比較した。

#### 結 果

2つの標準品種、タチスズナルとシンメジロに含まれるトリプシンインヒビターの泳動像は、第1図に示すようにそれぞれRf 0.92とRf 0.95の泳動バンドを示した。また、両品種のF<sub>1</sub>ではRf 0.92とRf 0.95の泳動バンドが同時に観察され、F<sub>2</sub>ではRf 0.92:Rf 0.92とRf 0.95:Rf 0.95の泳動バンドを持つ種子が4:10:7(P=0.90~0.75)の比に分離し、一对の共優性遺伝子に支配されると報告したSinghら<sup>1)</sup>の結果と一致した。

ダイズは栽培される地域によって品種の生態型を異にする<sup>7)</sup>。すなわち、北海道、東北、北陸および関東の一部には、生態型I, IIに属する早生種が栽培され、また、関東、東山には生態型III, 東海、近畿、中国、四国では生態型III, IVに属する中生種が栽培され、九州では、夏ダイズと呼ばれる生態型IIに属する早生種と秋ダイズと呼ばれる生態型Vに属する晩生種とが栽培



されている。

日本産と朝鮮産の234品種を Rf 0.92 と Rf 0.95 の泳動バンドの品種に分類し、品種の栽培される地域とその生態型との関係を第1表に示した。日本産では、215品種中約45%が Rf 0.92 の泳動バンドを持つ品種であり、一般的に、生態型 II の早生種に Rf 0.92 の泳動バンドを持つ品種が多く、生態型 IV, V に属する晩生種ほど Rf 0.92 の泳動バンドを持つ品種は少なかった。

地域別には、北海道に栽培される生態型 I の品種では、Rf 0.92 の泳動バンドを持つ品種は少なく、供試16品種のうち3品種の約20%であった。東北、北陸、関東、東山の生態型 II, III の各品種については、約半数の品種が Rf 0.92 の泳動バンドを持ち、東海、近畿、中国、四国の生態型 IV の品種では、Rf 0.95 の泳動バンドを持つ品種は少なかった。九州では、生態型 II と V の品種が併存して栽培されており、それぞれの生態型の品種群で、Rf 0.92 と Rf 0.95 の泳動バンドの頻度を異にした。すなわち生態型 II の夏ダイズでは、38品種中約84%が Rf 0.92 の泳動バンドを持ち、生態型 V の秋ダイズでは Rf 0.95 の品種が大半を占め、Rf 0.92 の品種は供試13品種の約30%に当る4品種に過ぎなかった。朝鮮産品種は、生態型 II と III に属するが、その約30%が Rf 0.92 の泳動バンドを持ち、これは同じ生態型に属する日本産品種の Rf 0.92 を持つものの頻度に比べて低い傾向が見いだされた。このように、ダイズには、品種の地域生態型と密接に関係したトリプシンインヒビターの分布が認められた。

## 考 察

生のダイズを家畜に摂取させるとき、その種子に含まれているトリプシンインヒビターは、タンパクを分解するトリプシンの活性を阻害するので、ダイズに含まれる非栄養物質と考えられている。間宮ら<sup>9)</sup>は、ダイズより抽出された市販の Kunitz トリプシンインヒビターが、2量体の混合物であると考え、これを不均一成分 STI-1 と主成分 STI-2 とに分画し、STI-1 のトリプシン阻害活性の程度は STI-2 の65%であると報告している。Rf 0.92 は STI-1 に相当し、Rf 0.95 は STI-2 とみなされるので、Rf 0.92 の泳動バンドを持つ品種は、トリプシンインヒビターとしての活性が低いと考えられる。

トリプシンインヒビターの地理的分布に関して、本実験結果と Clark ら<sup>2)</sup>の知見と比較すると、Rf 0.92 の泳動バンドを持つ品種は、朝鮮産の方が日本産より少ない点では一致したが、本実験に用いた日本産、朝鮮産には Rf 0.92 の泳動バンドを持つ品種が Clark らの場合よりもかなり多くみられている。これは、Rf 0.92 の泳動バンドが生態型 II に多く分布しており、早生性と関連があることから説明できよう。つまり、著者の供試した品種集団には早生品種が多く、Clark らが用いた品種集団には晩生種を多く含んでいた。すなわち両者の主要生態型の差に基づくものと考えられる。

地域生態型以外の他の品種特性と泳動バンドとの関係は見いだせなかった。Clark ら<sup>2)</sup>は、ダイズを利用群 (utilization group) に従って分類し、Rf 0.92 の泳動バンドの品種には蔬菜用 (vegetable group) が多いことを報告している。これは、早生種が一般に蔬菜用として用いられることを思えば首肯できる。他の種実用、飼料用品種についてもあわせて検討を加えたが、泳動バンドの種類と特定な関係は認められなかった。

Rf 0.92 の泳動バンドは、中国産品種に認められず、日本産と朝鮮産の品種に認められている<sup>2)</sup>。本実験の、日本産の生態型 II に属する品種では、Rf 0.92 のものが Rf 0.95 のものより優位を占め、特に九州の生態型 II に属する夏ダイズでは、Rf 0.92 のバンドを持つ品種の頻度が他のいずれの地域よりも著しく高かった。これらのことから、Rf 0.92 の泳動バンドは、日本

を中心に分布していると考えられ、生態型 II に属する品種に起源するものと推定される。この Rf 0.92 と Rf 0.95 のトリプシンインヒビターに関する地理的変異の消長は、ダイズの生態型の分化あるいは品種の類縁関係を知るうえの手がかりになるものと考えられる。

### 摘 要

日本産と朝鮮産のダイズ 234 品種を、ポリアクリルアミドを用いたデスク電気泳動法により、トリプシンインヒビターについて、Rf 0.92 と Rf 0.95 の泳動バンドを持つ品種に分類し、品種の栽培されている地域と品種の生態型との関係を調べた。

Rf 0.92 の泳動バンドを持つ品種は、東北、北陸、九州の生態型 II の品種に多く、特に九州では、生態型 II に属する夏ダイズに84%の高頻度で分布していた。一方 Rf 0.95 の泳動バンドを持つ品種は、北海道の生態型 I の早生種に、また関東以南に栽培される生態型 III, IV, V の中生から晩生の品種群に多く分布していた。朝鮮産では、日本産の同等の生態型に属する品種群に比較して Rf 0.92 の泳動バンドを持つ品種は少なかった。また中国産は Rf 0.92 の泳動バンドを持つ品種が認められないことから<sup>2)</sup>、この Rf 0.92 のトリプシンインヒビターは日本の早生品種を中心として地理的に分布していると考えられた。

### 引 用 文 献

- 1) Bowman, D. E. 1944. Fractions derived from soybeans and navy beans which retard tryptic digestion of casein. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **57**: 139-140.
- 2) Clark, R. W., D. W. Mies, and T. Hymowitz. 1970. Distribution of a trypsin inhibitor variant in seed proteins of soybean varieties. *Crop Sci.* **10**: 486-487.
- 3) Davis, B. J. 1964. Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404-427.
- 4) Diezel, W., G. Kopperschläger, and E. Hofmann. 1972. An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of coomassie brilliant blue. *Anal. Biochem.* **48**: 617-620.
- 5) Eldridge, A. C., R. L. Anderson, and W. J. Wolf. 1966. Polyacrylamide gel electrophoresis of soybean whey proteins and trypsin inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* **115**: 495-504.
- 6) Frattali, V. and R. F. Steiner. 1968. Soybean Inhibitors. I. Separation and some properties of three inhibitors from commercial crude soybean trypsin inhibitor. *Biochem.* **7**: 521-530.
- 7) 福井重郎・荒井正雄 1951. 日本に於ける大豆品種の生態学的研究 I. 開花日数と結実日数による品種分類とその地理的分布に就いて, *育種*. **1**: 27-39.
- 8) Kunitz, M. 1945. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science* **101**: 668-669.
- 9) 間宮米二・戸塚耕二・庄司圭吾・麻生和衛 1973. 市販大豆トリプシンインヒビター (Kunitz) に含まれる高分子量インヒビターの分離と性質 *農化* **47**: 655-657.
- 10) 中村博治・谷村和八郎・小原哲二郎・伊藤敏雄 1972. 焦点電気泳動法による品種別ダイズトリプシンインヒビターについて *日本農芸化学会 昭和47年度大会講演要旨集* 321.
- 11) Singh, L., C. M. Wilson, and H. H. Hadlay. 1969. Genetic differences in soybean trypsin inhibitors by disc electrophoresis. *Crop Sci.* **9**: 489-491.
- 12) Yamamoto, M. and T. Ikenaka. 1967. Studies on soybean trypsin inhibitors I. Purification and characterization of two soybean trypsin inhibitors. *J. Biochem. (Tokyo)* **52**: 141-149.