Ikuo NAKAMURA, Norihiko KAIZUMA and Yuzo FUTSUHARA : Comparative Study of Kunitz Trypsin Inhibitor Like Proteins in the Subgenus *Glycine* (English summary on p. 176)

Glycine 亜属植物の Kunitz トリプシンインヒビター様タンパク質の比較

中村 郁郎¹⁾・海妻 矩彦²⁾・蓬原 雄三¹⁾

1) 名古屋大学農学部, 名古屋市 〒 464

2) 岩手大学, 農学部 〒 020

Glycine 亜属植物の類縁関係を解明するため野生種の種子に含まれる Kunitz トリプシンインヒビター様タンパク質 (KTILP) の電気泳動法により識別できる易動度, KTILP の 2 成分, S, F の量比及び分子量の変異を比較検討した。その結果, これら 3 つの特性のなかでは分子量の種内変異が最も小さく, 種間の類縁関係を反映すると思われた。2 次元電気泳動分析の結果, *Glycine* 亜属 4 種 21 系統の KTILP は分子量の差によって 7 タイプの泳動パターンに類別された。*G. latifolia* および *G. tabacina* はそれぞれ 2 および 3 タイプのパターンが出現し, 種内に変異が認められ, 一方, *G. clandestina* では種内変異が認められなかった。*G. latifolia*, *G. tabacina*, *G. canescens* の 3 種で同じタイプのパターンを示す系統が認められたことは *Glycine* 亜属植物の種分化を考慮する上で興味深い。また, *G. tabacina* において 2 組の S および F タンパク質を持つ 2 系統が認められたことは, *Glycine* 属において複二倍体化による進化の道筋があることを示唆している。

KTILP の易動度および S/F 量比の変異を比較した結果は, 分子量の変異を比較した結果と同じような種間の類似性を表した。

KEY WORDS : *Glycine*, wild soybeans, Kunitz trypsin inhibitor like protein, seed proteins, chemotaxonomy, gel electrophoresis.

緒 言

Glycine 亜属植物は, 現在, *G. latifolia*, *G. tabacina*, *G. clandestina*, *G. canescens*, *G. tomentella*, *G. falcata*, *G. latrobeana* の 7 種に分類されている (HERMANN 1962, VERDCOURT 1966, NEWELL and HYMOWITZ 1980)。これらは, ダイズ (*G. max* (L.) Merr.) と近縁な植物群であるので, ダイズを育種的に改良するための有望な遺伝子源として期待される。実際, *G. canescens* においてダイズの病害抵抗性遺伝子が見いだされている (BURDON and MARSHALL 1981)。これらの遺伝子源を利用するための基礎研究として類縁関係の解明が重要である。

Glycine 属植物の種子にはダイズの KTI (Kunitz Trypsin Inhibitor) と相同なタンパク質 (KTILP) が含まれている (中村ら 1984)。*Glycine* 亜属の KTILP は 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 f_1 および f_2 の 2 個のペプチドから構成されている。前報では, *Glycine* 亜属の KTILP には電気泳動的に検出可能な I) 易動度 (Rf 値) の変異 II) S タンパク質と F タンパク質との量比 (S/F 量比) III) f_2 ペプチドの分子量の変異が認められることを報告した (中村ら 1984)。本研究では, KTILP のこれら 3 つの電気泳動的特性について比較検討することにより *Glycine* 亜属植物の類縁関係について検討した。

材料および方法

1. 供試材料

1985 年 1 月 16 日受領

Table 1. The materials used, their chromosome numbers and electrophoretic characteristics in the subgenus *Glycine*.

Species Name and Line No.	Line Name	2 n	Rf value		S/F ratio	Subspecific Group
			S pr.	F pr.		
<i>G. latifolia</i>						
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
<i>G. tabacina</i>						
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
<i>G. clandestina</i>						
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
<i>G. canescens</i>						
21	PI. 399478	40	0.69	0.72	0.6	CAN
<i>G. tomentella</i>						
22	Eskdale	78				TOM

供試材料は Table 1 に示した *Glycine* 亜属 5 種 22 系統である。 *G. latifolia* の 3 系統は、 *G. tomentella* であるとされてきたが、 NEWELL and Hymowitz (1980) の改定後、新たに入手した *G. latifolia* の系統と形態形質、アイソザイムパターンなどが一致するので *G. latifolia* であると判断した系統である。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 KTILP 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 (0.5×10 cm) を用いて試料を 3-4 mA/tube の定電流で約 3.5 h 電気泳動を行った。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 10 B 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 KTILP の易動度および S/F 量比を求めた。易動度および 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 KTILP 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い、2次元目は、LAEMMLI (1970) の SDS-ゲル電気泳動法にしたがった。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 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 ($13 \times 13 \times 0.3$ 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% コマジーブリリアントブルー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. KTILP 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 KTILP の易動度は Table 1 に示したとおりである。*Glycine* 亜属のすべての供試系統の KTILP 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。供試系統間で見出される両タンパク質の易動度の差は 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. 248253, 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ため、易動度を測定できなかった (Fig. 1)。各種の KTILP 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、KTILP 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。

2. KTILP の S/F 量比の比較

Fig. 2 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 1 に示したとおりである。KTILP の易動度が測定できなかった 3 系統は S/F 量比の比較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*

Fig. 1. Densitograms of KTILP in the subgenus *Glycine*, showing more than three bands on PAGE-gel.

- A) *G. tomentella* (Eskdale),
- B) *G. tabacina* (PI. 248253),
- C) *G. tabacina* (Miles),
- D) *G. latifolia* (Inverelle, 2 bands).

Fig. 2. 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),

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. KTILP の分子量の比較

供試各系統の KTILP 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. 3 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。*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. 4 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タンパク質および f_1 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) では種内変異が認められなかった。このうち、LAT B, TAB

Fig. 3. Schematic diagram of KTILP migrating pattern by two dimensional gel electrophoresis.

Fig. 4. Seven types of KTILP patterns representing seven subspecific groups and two amphidiploids classified by two dimensional electrophoresis. type 1: LAT A subgroup (*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.

C および CAN の3つのサブグループはいずれもタイプ4の泳動パターンを示し、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次元電気泳動法で分析すると、Fig. 4 のタイプ6およびタイプ7に示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を重ね合わせ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同じパターンを示したので、上記の結果は他の種子が混入したためによるものではないと思われる。

考 察

前報において、*Glycine* 亜属各種の種子に含まれている KTILP には、ゲル電気泳動法により検出できる易動度 (R_f 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。本研究では、*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、KTILP のこれら3つの電気泳動的特性について5種 22 系統間で比較検討した。その結果、KTILP 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い、ついで、残りの2つの特性について考察を行いたい。

KTILP の S タンパク質および F タンパク質 (f_1 , f_2 ペプチド) の相対的分子量の比較結果から、*Glycine* 亜属の類縁関係を考察するために興味深い事柄は次のとおりである。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。また、このタイプのスポットパターンは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。c) 各種・系統の f_1 および f_2 ペプチドの相対的分子量から各種・サブグループの関係は Fig. 5 のようになる。d) *G. tabacina* の2組の KTILP 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こっていることのひとつの傍証になるとと思われる。

Fig. 6 は、各供試材料の KTILP の S タンパク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 1), 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

Fig. 5. Botanical relationships among seven subspecific groups in the subgenus *Glycine*, inferred from the similarity on mobility of f_1 and f_2 peptides of KTILP (Fig. 4) and chromosome number. Bars show the traditional taxonomic groups.

Fig. 6. Botanical relationships among four *Glycine* species, based on the differences of Rf value and S/F ratio. — : specific area, : subspecific area, the numbers represent the lines used (Table 1).

置関係にあった。これらのことは、前述した KTILP 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 KTILP を含んでいると思われる (Fig. 1, 5)。

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、KTILP の易動度には MIES and HYMOWITZ 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 KTILP 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 KTILP 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傍証であると思われる。今後、各種の KTILP の一次構造をさらに詳細に比較することができれば、*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と思われる。

なお、本研究は昭和 53 年度文部省科学研究費補助金 (課題番号 348025) によって行った。

引用文献

- BROUÉ, P., D. R. MARSHALL and W. J. MÜLLER 1977. Biosystematics of subgenus *Glycine* (Verdc.): Isoenzymatic data. *Aust. J. Bot.* **25**: 555~566.
 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.
 DAVIS, B. J. (1964): Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**: 404~427.
 HERMANN, F. J. (1962): A revision of the genus *Glycine* and its immediate allies. Unit. Seed Dept.

- Tech. Bull. 1268 : 1~79.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680~685.
- MIES, D. W. and T. HYMOWITZ 1973. Comparative electrophoretic studies of trypsin inhibitors in seed of the genus *Glycine*. *Bot. Gaz.* 134 : 121~125.
- 中村郁郎・喜多村啓介・海妻矩彦・蓬原雄三 1984. *Glycine* 属植物の糖分化 1. KTI 様タンパク質の電気泳動的特性. 育種 34 : 468~477.
- NEWELL, C. A. and T. HYMOWITZ 1980. A taxonomic revision in the genus *Glycine* subgenus *Glycine* (*Leguminosae*). *Brittonia* 32 : 63~69.
- ORNSTEIN, L. (1964) : Disc electrophoresis-I. Background and theory. *Ann New York Acad. Sci.* 121 : 321~349.
- VERDCOURT, B. 1966. A proposal concerning *Glycine* L. *Taxon* 15 : 34~36.

Summary

KTILPs (Kunitz trypsin inhibitor like proteins) of wild soybeans (*Glycine* subgenus *Glycine*) are the antigenic relatives with KTI's found in cultivated soybeans (*G. max*). Seeds of wild soybeans contain two different KTILPs (S and F proteins) which migrate slow and fast on polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), respectively. The S proteins are single protein like KTI but the F proteins are composed of two different peptides (f_1 and f_2). They exhibit considerable variances of mobility (Rf value) on PAGE (Table 1), the ratios of S to F protein (Fig. 1, Table 1) and the molecular sizes of S protein, f_1 and f_2 peptides on SDS-PAGE (Fig. 3, 4). These three characteristics of KTILPs were compared in 22 lines of the five *Glycine* species (*G. latifolia*, *G. tabacina*, *G. clandestina*, *G. canescens* and *G. tomentella*) listed in Table 1.

Seven migration patterns were distinguished by two dimensional gel electrophoresis consisting of PAGE and SDS-PAGE (Fig. 3, 4). As *G. latifolia* and *G. tabacina* were separated into two (LAT A, B) and three (TAB A, B, C) subspecific groups, whereas *G. clandestina* formed a homogenous entity.

It is interesting that in the speciation of the genus *Glycine* the subspecific groups of *G. latifolia* (LAT B), *G. tabacina* (TAB C) and *G. canescens* (CAN) shared an identical pattern (type 4 in Fig. 4). This suggests that these subspecific groups and species were involved in the speciation of the genus *Glycine*. Two lines of *G. tabacina* contained two sets of S and F proteins (Fig. 2, type 6 and 7 in Fig. 4). Thus, the process of speciation through amphidiploidizing most likely exists in this subgenus. Comparative analysis of Rf value and S/F ratio supports the results concerning molecular size as stated above (Fig. 6).

I. NAKAMURA

N. KAIZUMA¹⁾

Y. FUTSUHARA

Faculty of Agriculture, Nagoya University, Nagoya, 464

¹⁾ Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, 020