

第 1 章 α -アミラーゼインヒビター (α AI) とアルセリンの遺伝様式ならびに遺伝的關係

アズキゾウムシ (*Callosobruchus chinensis* (L.)) は、アズキ (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi) やササゲ (*V. unguiculata* (L.) Walp.) などのササゲ属作物の種子を食害する貯蔵害虫であるが、ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.)、ソラマメ (*Vicia faba* L.)、そしてエンドウマメ (*Pisum sativum* (L.)) などのササゲ属作物以外の種子も食害することが可能である。しかしながら、ササゲ属作物と比較的近縁なインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) の種子を、食害することはできない (石井 1952)。Ishimoto and Kitamura (1988) は、インゲンマメのアズキゾウムシ抵抗性の物質的原因の解明に取り組み、 α -アミラーゼインヒビター (α AI) - 1 を生育阻害物質として同定した。 α AI - 1 は、アズキゾウムシとこれに近縁のヨツモンマメゾウムシ (*C. maculatus* (F.)) の幼虫の α -アミラーゼ活性を阻害し、両マメゾウムシの生育を強く阻害した (0.4 ~ 0.5 % 濃度)。しかしながら、インゲンマメを寄主とするブラジルマメゾウムシ (*Zabrotes subfasciatus* (BOHEMAN)) は、 α AI - 1 のもつ α -アミラーゼ活性と生育に対する阻害性に耐性を有していた (Ishimoto and Kitamura 1989)。

ブラジルマメゾウムシは、寄主であるインゲンマメ以外にも、アズキやササゲなどを食害する主要な貯蔵害虫である。本虫に対する抵抗性は、インゲンマメ栽培種には認められていなかったが (Schoonhoven and Cardona 1982)、1983年、国際熱帯農業センター (CIAT) において、野生種に抵抗性を示す系統が確認された (Schoonhoven et al. 1983)。抵抗性系統の種子には、栽培種には含まれないタンパク質アルセリン (arcelin) が存在した (Romero et al. 1986)。人

工豆を用いた飼育試験において、アルセリンは、ブラジルマメゾウムシの生育を強く阻害し（7～10%濃度）、本抵抗性に関与することが示唆された（Osborn et al. 1988, Minney et al. 1990）。アルセリンは、電気泳動パターンにより6種類に分類され（石本 1992）、野生系統は、含有するアルセリンのタイプにより、抵抗性程度が異なっていた（Cardona et al. 1990, Toro et al. 1990）。また、本抵抗性を示すいくつかの系統から、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を阻害する新たな α AI（ α AI-2）が見いだされ、抵抗性との関連が推測された（Gatehouse et al. 1987）。このため、Ishimoto et al.（1995）は、野生種を含めたインゲンマメ種子に α AIの変異が存在すると考え、ブタすい臓とブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性に対する種子抽出液の阻害性を分析し、 α AIを以下の4つに分類した。

- 1、 α AI-1：ブタすい臓の α -アミラーゼ活性を阻害するもの
- 2、 α AI-2：ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼの活性を阻害するもの
- 3、 α AI-3：上記2種類の α -アミラーゼ活性を両方とも阻害するもの
- 4、 α AI-0：上記2種類の α -アミラーゼ活性を両方とも阻害しないもの

これらの変異は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で判別することができ、さらに、泳動パターンの違いにより、 α AI-1はa、b、c、dの4つに、 α AI-0はa、bの2つに分類された。

ブラジルマメゾウムシ抵抗性の野生系統 G12953 は、 α AI-2とアルセリン4をとともに含んでいる（Minney et al. 1990）。これら2種類のタンパク質は、遺伝的に強連鎖

関係にあり、共同してブラジルマメゾウムシ抵抗性に関与している可能性が指摘されている (Ishimoto and Kitamura 1993)。

このように、 α A I とアルセリンは、インゲンマメの有望なマメゾウムシ類生育阻害物質で、抵抗性に関与していると考えられる。しかしながら、 α A I とアルセリンの変異の中で、 α A I - 1 d、2、0 b とアルセリン 1、2、3、4 以外の変異については、遺伝様式が解明されておらず、また、 α A I とアルセリンの遺伝的関係も不明なところが多い。

そこで本章では、インゲンマメ種内に見いだされた α A I とアルセリンの変異について、遺伝様式と相互の遺伝的関係について調査し、インゲンマメのマメゾウムシ類抵抗性との関連性について考察する (Suzuki et al. 1995)。

第 1 節 α A I の遺伝様式

総計約 1,800 系統のインゲンマメ栽培種及び野生種について、種子の α -アミラーゼインヒビター (α A I) 活性と電気泳動パターンの分析から、 α A I は、8 つの変異型に分類された (図 2) (Ishimoto et al. 1995)。調査系統のうち、野生種では全ての変異が存在していたが、栽培種では、 α A I - 1 a、1 d、3 及び、 α A I - 0 a のみが認められ、野生種での変異が大きかった。

Ishimoto and Kitamura (1991, 1993) は、 α A I を欠失したインゲンマメの栽培品種 (α A I - 0 b) と α A I - 1 d を有する栽培品種との交配試験から、 α A I - 1 d が単一の優性遺伝子に支配されることを示した。また、 α A I - 2 についても、1 遺伝子支配であることを明らかにした。しかしながら、ブタすい臓とブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を阻害する α A I - 3 をはじめ、他の α A I については、遺伝様式の報告はない。

そこで本節では、栽培品種の大正金時 (α A I - 1 d) または大福 - 5 (α A I - 0 b) を、 α A I - 1 b、1 c、2、3 または、 α A I - 0 a を示すインゲンマメと交配し、遺伝様式を調査した。

材料および方法

1. 種子および交配

国際熱帯農業センター (C I A T) から分譲されたインゲンマメのうち、 α A I - 1 b、1 c、2、3 または α A I - 0 a を示す系統を交配に用いた (表 1)。栽培

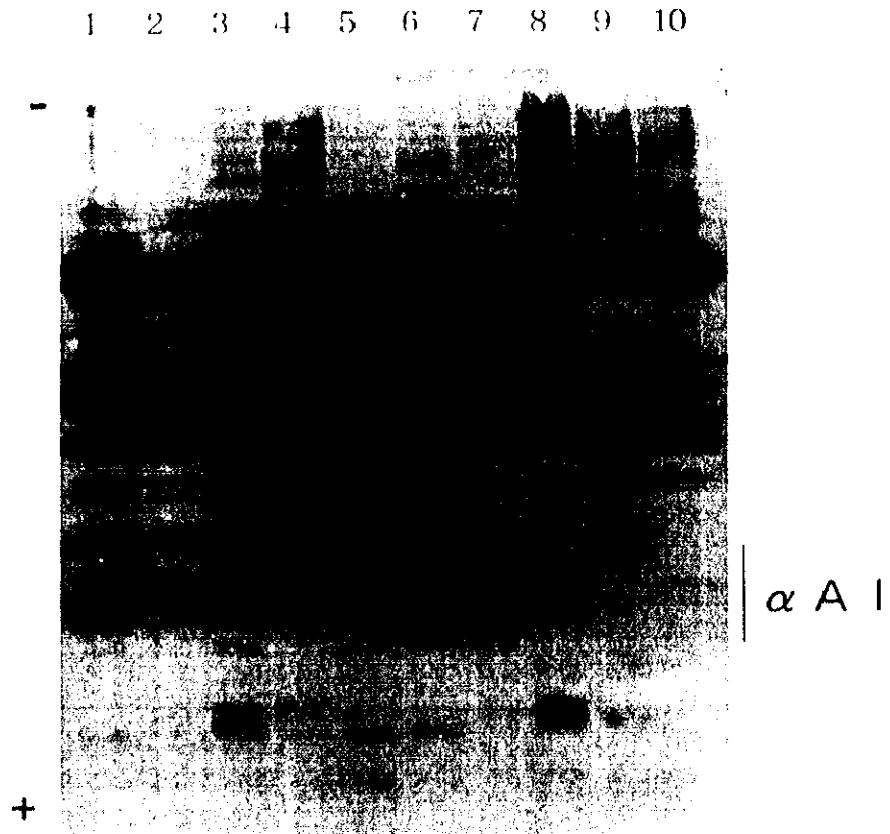


図2. インゲンマメ種子タンパク質のウエスタンブロッティング分析

1, Taishou-kintoki (α AI-1d); 2, G10025A (α AI-1a); 3, G10009 (α AI-1b); 4, G12915 (α AI-1c); 5, G23456A (α AI-1d); 6, G12652 (α AI-2); 7, G13026 (α AI-3); 8, G12898 (α AI-0a); 9, G12882B (α AI-0b); 10, Ofuku-5 (α AI-0b). SDS-ゲル電気泳動後、peroxidase-Con A により糖タンパク質を検出した。

表1. インゲンマメ種子の α -アミラーゼインヒビター(α AI)とアルセリン(arcelin)の変異

α AI 変異	品種・ 系統数 ¹⁾	アルセリン (Arc) 変異 ²⁾	交配試験に供試した 品種・系統 ³⁾
α AI-1a	1115	—	
α AI-1b	3	—	G12851
α AI-1c	6	—	G12915A
α AI-1d	610	—	Taishou-kintoki
α AI-2	41	Arc3(25), Arc4(15) Arc6(1)	G12922(Arc3), G12953(Arc4) G20513(Arc6)
α AI-3	52	—	G10018, G1221
α AI-Oa	39	Arc5(2)	G2771A(Arc5)
α AI-Ob	14	Arc1(2), Arc2(4)	Ofuku-5, G12882(Arc1) G12866(Arc2)

1) Ishimoto et al. (1995)による調査.

2) 括弧内は、アルセリンを含む品種・系統数.

3) 括弧内は、アルセリンの変異を示す.

品種大正金時 ($\alpha A I - 1 d$) 及び大福 - 5 ($\alpha A I - 0 b$) は、北海道立中央農業試験場から分譲されたものを用いた。大正金時または大福 - 5 を種子親とした交配を行い、得られた F_1 種子を電気泳動分析の後に播種し、 F_1 個体毎に自殖 F_2 種子を収穫した。栽培は、全て温室内で行った。

2. 種子タンパク質溶液の調製

種子タンパク質を SDS (sodium dodecyl sulfate) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分析するため、半粒法により種子粉 5mg を 0.5ml の SDS サンプル緩衝液 (5M urea; 0.2% (w/v) SDS; 2% (v/v) 2-mercaptoethanol; 0.05M Tris-HCl, pH8.0) に溶解し、60 分間、室温でタンパク質を抽出した。

3. SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動

1) 分離ゲル及び濃縮ゲルの調整

分離ゲルの調整 (1mm 厚ゲル 2 枚分)

- ・ 2.0g ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、
181.5g トリス ((tris (hydroxymethyl)
aminomethane)、240ml 1N 塩酸を水で
500ml にメスアップした緩衝液 10ml
- ・ 30% アクリルアミド、0.8% N,N' -
メチレンビスアクリルアミド (BIS) 18ml
- ・ 1.5% 過硫酸アンモニウム 2ml
- ・ 水 10ml
- ・ N,N,N',N' -テトラメチルエチレンジアミン
(TEMED) 20 μ l

濃縮ゲルの調整（1mm厚ゲル2枚分）

- ・ 2.0g SDS、240ml 1N 塩酸、トリスで
pH7.0 に調整後、水で 500ml にメスアップ
した緩衝液 5ml
- ・ 30% アクリルアミド、0.8% BIS 3ml
- ・ 0.004% リボフラビン 4ml
- ・ 1.5% 過硫酸アンモニウム 0.5ml
- ・ 水 7.5ml
- ・ TEMED 5 μ l

2) 電気泳動の方法

電気泳動装置に泳動用緩衝液（0.025M Tris; 0.125% (w/v) SDS; 0.192M glycine）を満たし、作成したゲル板をセットした。上部緩衝液槽にプロモフェノールブルー（BPB）を分子量マーカーとして加え、20 μ lの種子タンパク質溶液を添加後、100V定電圧で電気泳動を開始した。BPBが分離ゲルを通過した後、電圧を150V定電圧に変換し、ゲル下部に達した後、泳動を停止した。

4. ウェスタンブロッティングによる糖タンパク質の検出

種子タンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離した後、ポリビニリデンジフルオリド（PVDF）Immobilon 膜（Millipore, USA）に電氣的に転写した（Towbin et al. 1979）。転写された PVDF 膜を peroxidase-Con A（Honen, Japan）と反応させ、膜上の糖タンパク質を検出した（Kijimoto-Ochiai et al. 1985）。

- 1) メタノールで前処理した PVDF 膜と 6 枚のワットマン 3MM ろ紙をブロッティング用緩衝液 (0.04M glycine; 0.0375% (w/v) SDS; 0.05M Tris-HCl, pH9.2; 20% (v/v) methanol) に浸し、5 分間以上振とうする。
- 2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動が終了したら、ゲルを取り出し、セミドライブロッティング装置 (Sartorius, Germany) の陽極側から順に、ろ紙-PVDF 膜-ゲル-ろ紙になるように重ねる。
- 3) 定電流 (2.5mA/cm²) で 20 分間通電し、タンパク質を PVDF 膜上に転写する。
- 4) 転写後の PVDF 膜を TBS1 緩衝液 (0.02M Tris-HCl, pH7.5; 0.05% (v/v) tween-20; 0.15M NaCl) で 15 分間洗浄する (3 反復)。
- 5) 50 μ l peroxidase-Con A / 15ml TBS1 で PVDF 膜を覆い、室温において 3 時間振とう反応する。
- 6) TBS1 で PVDF 膜を 15 分間洗浄する (3 反復)。
- 7) TBS2 緩衝液 (0.15M NaCl; 0.02M Tris-HCl, pH7.5) で PVDF 膜を 15 分間洗浄する (3 反復)。
- 8) パーオキシダーゼ発色液 (60mg 4-chloro-1-naphthol / 20ml methanol; 100ml TBS2; 60 μ l 3% (v/v) H₂O₂) に PVDF 膜を浸し、発色反応を行う。
- 9) 糖タンパク質の発色後、PVDF 膜を水で洗い 4 °C で保存する。

結果

種子親に大正金時 (α A I - 1 d) を用いた交配において、F₁ 種子は全て、花粉親の α A I と α A I - 1 d

をほぼ 1 : 1 の割合で重ね合わせた泳動パターンを示した。一方、種子親に $\alpha A I$ に相当するバンドを欠失した大福 - 5 ($\alpha A I - 0 b$) を用いた場合、 F_1 種子は全て、花粉親の $\alpha A I$ のバンドパターンを示した。分析後、 F_1 種子を播種し、得られた F_2 種子のタンパク質を分析したところ、いずれの F_2 種子集団も $\alpha A I$ のバンドパターンに関して分離した (図 3)。 $\alpha A I$ に関する F_2 種子の分離比は、交配 No. 1 - 3、6 - 9 において 1 : 3 の期待分離比に、交配 No. 4、5 においては 1 : 2 : 1 の期待分離比に、それぞれよく適合した (表 2)。

以上の遺伝分析の結果から、今回調査した $\alpha A I$ の各変異型は、全て同一遺伝子座により支配される形質であると判断した。そこで、 $\alpha A I$ の各変異型を支配する遺伝子記号を以下のように提唱する。 $\alpha A I - 1 b : Ai^{1b}$ 、 $\alpha A I - 1 c : Ai^{1c}$ 、 $\alpha A I - 1 d : Ai^{1d}$ 、 $\alpha A I - 2 : Ai^2$ 、 $\alpha A I - 3 : Ai^3$ 、また、 $\alpha A I - 0 a$ 及び $\alpha A I - 0 b$ は、 $\alpha A I$ 欠失型なので、遺伝子記号は統一して ai とした (表 2)。

考察

インゲンマメ種子の $\alpha A I$ は、種子の α -アミラーゼ活性阻害性と SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のバンドパターンにより、8 つの変異に分類できる (Ishimoto et al. 1995)。本節では、電気泳動分析により、既報のものを含めた $\alpha A I$ 各変異の遺伝様式について調査した。

交配試験において、 $\alpha A I - 1 b$ 、 $1 c$ 及び $\alpha A I - 3$ に関する F_2 種子の分離比は、1 : 3 または 1 : 2 :

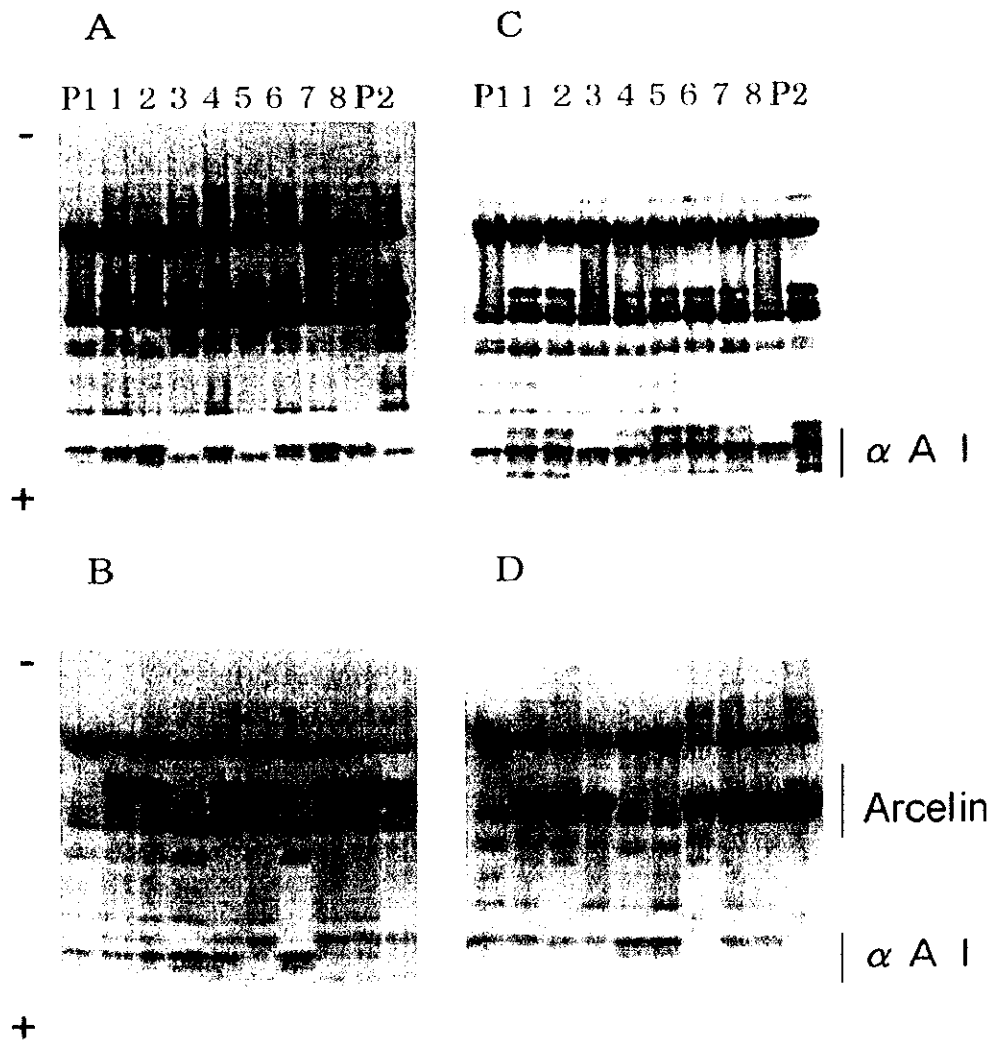


図3. 両親及びF₂種子タンパク質のウエスタンブロッティング分析

A, 交配4, 'Taishou-kintoki (α AI-1d) \times G12915A (α AI-1e)'; B, 交配5, 'Taishou-kintoki \times G12922 (α AI-2, arcelin3)'; C, 交配7, 'Taishou-kintoki \times G10018 (α AI-3)'; D, 交配10, 'Taishou-kintoki \times G12882 (α AI-0b, arcelin1)'. P1, 種子親; P2, 花粉親; 1-8, F₂種子. SDS-ゲル電気泳動後、peroxidase-Con Aにより糖タンパク質を検出した.

表2. インゲンマメの交配試験から得たF₂種子のα A Iに関する分離

交配	両親及び α A I 変異型	F ₂ 種子の分離と α A I 遺伝子型	χ ²	P
1	Ofuku-5 × G12851 αAI-0b αAI-1b	ai/ai Ai ^{i b} /-	0.23 (1:3)	>0.5
2	Taishou-kintoki × G2771A αAI-1d αAI-0a	Ai ^{i d} /- ai/ai	0.70 (1:3)	>0.3
3 ¹⁾	Ofuku-5 × Taishou-kintoki αAI-0b αAI-1d	ai/ai Ai ^{i d} /-	1.60 (1:3)	>0.2
4	Taishou-kintoki × G12915A αAI-1d αAI-1c	Ai ^{i d} /Ai ^{i d} Ai ^{i c} /Ai ^{i c}	0.39 (1:2:1)	>0.8
5	Taishou-kintoki × G12922 αAI-1d αAI-2	Ai ^{i d} /Ai ^{i d} Ai ^{i d} /Ai ^{i 2}	0.90 (1:2:1)	>0.5
6	Ofuku-5 × G12922 αAI-0b αAI-2	ai/ai Ai ^{i 2} /-	0.30 (1:3)	>0.5
7	Taishou-kintoki × G10018 αAI-1d αAI-3	Ai ^{i d} /Ai ^{i d} Ai ^{i 3} /-	0.88 (1:3)	>0.3
8	Ofuku-5 × G10018 αAI-0b αAI-3	ai/ai Ai ^{i 3} /-	3.41 (1:3)	>0.05
9	Taishou-kintoki × G1221 αAI-1d αAI-3	Ai ^{i d} /Ai ^{i d} Ai ^{i 3} /-	0.00 (1:3)	>0.99

1) Ishimoto and Kitamura (1991) のデータによる。

1 の期待分離比によく適合し ($P > 0.05$)、既報のものも含め ($\alpha A I - 1 d$ と $\alpha A I - 2$)、 $\alpha A I$ の変異型が単一優性遺伝子、 $A I^{1(b, c, d)}$ 、 $A I^2$ 、 $A I^3$ に支配されることを明らかにした。Ishimoto et al. (1995) は、 α -アミラーゼ活性阻害性の認められない変異型を $\alpha A I - 0$ とし、さらに、電気泳動分析で $\alpha A I$ に相当するバンドを欠失しているものを $\alpha A I - 0 b$ 、バンドが見られるものを $\alpha A I - 0 a$ とした。 $\alpha A I - 0 a$ に認められるバンドは、阻害活性を消失した $\alpha A I$ であるのか、それとも全く別種の種子タンパク質であるのかは不明である。しかしながら、 $\alpha A I - 0 a$ は $\alpha A I - 0 b$ と同様に、1 遺伝子支配を受けるため、 $\alpha A I$ 欠失を支配する遺伝子記号を統一して ai とした。

交配試験では、種子親に大正金時 ($\alpha A I - 1 d$) と大福 - 5 ($\alpha A I - 0 b$) のみを用い、 $\alpha A I$ の各変異型について、総交配は行わなかった。しかしながら、 $\alpha A I - 1 d$ と $\alpha A I - 0 b$ は対立形質であるため、 $\alpha A I - 1 b$ 、 $1 c$ 、 $1 d$ 、 2 、 3 、 $0 a$ 及び $\alpha A I - 0 b$ は、全て遺伝的に対立的で共優性関係にあると考えられた。今回、遺伝分析を行わなかった $\alpha A I - 1 a$ についても、同様な結果が期待された。

$\alpha A I$ のような糖タンパク質では、ポリペプチド内の糖鎖の種類と結合数の違いによって、電気泳動の移動度に差が生じると報告されている (Moreno et al. 1989, Yamaguchi 1991)。 $\alpha A I - 1$ は電気泳動分析により a 、 b 、 c 、 d に分類されるが、これらの差は単に結合している糖鎖あるいはアミノ酸組成の違いによるもので、 α -アミラーゼ活性阻害性に差はないと推測された。

インゲンマメ栽培種から精製した $\alpha A I - 1 d$ は、0.5% 濃度でアズキゾウムシとヨツモンマメゾウムシの生育

を強く阻害した (Ishimoto and Kitamura 1989)。そのため、 $\alpha A I - 1 d$ と同様な α -アミラーゼ活性阻害性を示す $\alpha A I - 1 a$ 、 $1 b$ 、 $1 c$ も、マメゾウムシ類に対して生育阻害活性を示すものと考えられた。また、 $\alpha A I - 2$ と $\alpha A I - 3$ は、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を特異的に阻害するため、その生育に阻害性を示す可能性がある。特に、 $\alpha A I - 3$ は、 $\alpha A I - 1$ と $\alpha A I - 2$ の両 α -アミラーゼ活性阻害性を示すため、 $\alpha A I$ 変異の中で、最も生育阻害対象が多いタンパク質と考えられた。本節において、 $\alpha A I - 3$ が優性の1遺伝子に支配されることを示した。しかしながら、 $\alpha A I - 3$ の電気泳動パターンは、 $\alpha A I - 1$ と $\alpha A I - 2$ を重ね合わせたようなバンドパターンであったため(図4)、 $\alpha A I - 3$ を示す種子に $\alpha A I - 1$ と $\alpha A I - 2$ が共存している可能性が考えられた。 $\alpha A I - 3$ が1分子種であるか否かについては、単離・精製の作業が必要である。これについては、第3章で検討する。

以上、本節の研究により、インゲンマメ種子の $\alpha A I$ 各変異は共優性の1遺伝子により支配され、欠失型は1劣性遺伝子支配であることがわかった。 $\alpha A I$ は、インゲンマメのマメゾウムシ類抵抗性の1因子を担っていると考えられるため、インゲンマメは、 $\alpha A I$ の変異を拡大することで、マメゾウムシ類への防御手段を増やしてきたものと推察された。

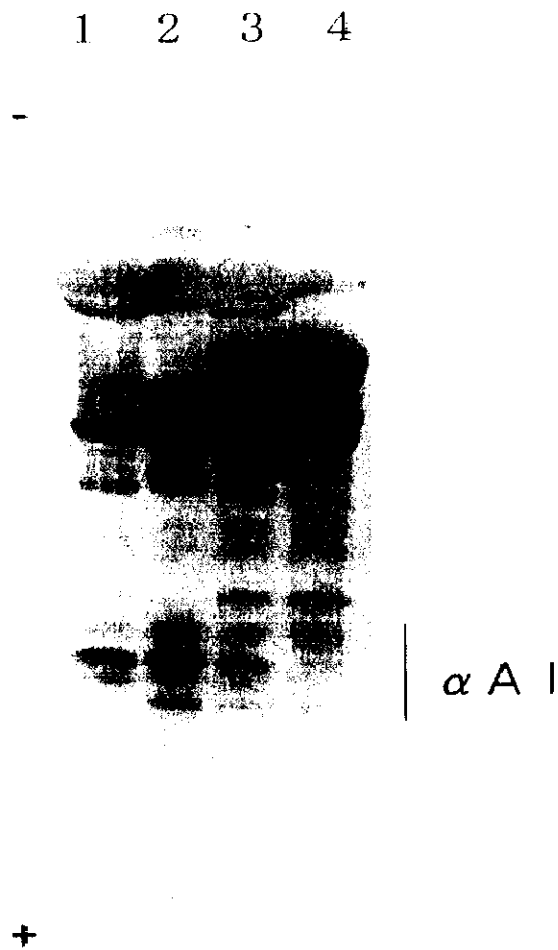


図4. インゲンマメ種子タンパク質のウエスタンブロットティング分析

1, G7469 (α AI-1d); 2, G9998 (α AI-3); 3, G7469 と G12952 (α AI-2)の種子タンパク質の混合物 (1:1 の割合); 4, G12952. SDS-ゲル電気泳動後、peroxidase-Con A により糖タンパク質を検出した.

第2節 アルセリンの遺伝様式ならびに α AIとの遺伝的関係

南米のコロンビアに所在する国際熱帯農業センター(CIAT)では、インゲンマメの収集系統について、ブラジルマメゾウムシ抵抗性を調査し、いくつかの野生系統に抵抗性を見いだした(Schoonhoven et al. 1983)。抵抗性系統の種子には、栽培種には認められていないタンパク質アルセリン(arcelin)が含まれていた(Romero et al. 1986)。アルセリンは、電気泳動のバンドパターンから5種類に分類され、これらのうち、アルセリン1、2、3及び4は、複対立遺伝子により支配されることが報告されている(Osborn et al. 1986, Cardona et al. 1990)。ブラジルマメゾウムシに対する抵抗性程度は、高い方からアルセリン5、4、1、2を含む系統の順で、アルセリン3を含む系統は感受性であった(Cardona et al. 1990)。最近、行本(1992)により6番目のアルセリンが見いだされたが(図5)、これを含む系統は、ブラジルマメゾウムシに抵抗性ではなかった(Toro et al. 1990)。抵抗性系統の種子には、アルセリンが約7~10%含まれるが、その反面、感受性系統に比べ、主要な貯蔵タンパク質であるファセオリン(phaseolin)の含有量が約3分の1に低下していた(Osborn et al. 1988, Minney et al. 1990)。ブラジルマメゾウムシは、ファセオリンに比べアルセリンを分解しにくいことから、栄養欠乏に陥り、生育が阻害されると推測されている(Minney et al. 1990)。

ブラジルマメゾウムシ抵抗性のいくつかの系統は、アルセリンとともに、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を阻害する α -アミラーゼインヒビター(α AI)-2を含んでいる(Gatchouse et al. 1987)。 α AI

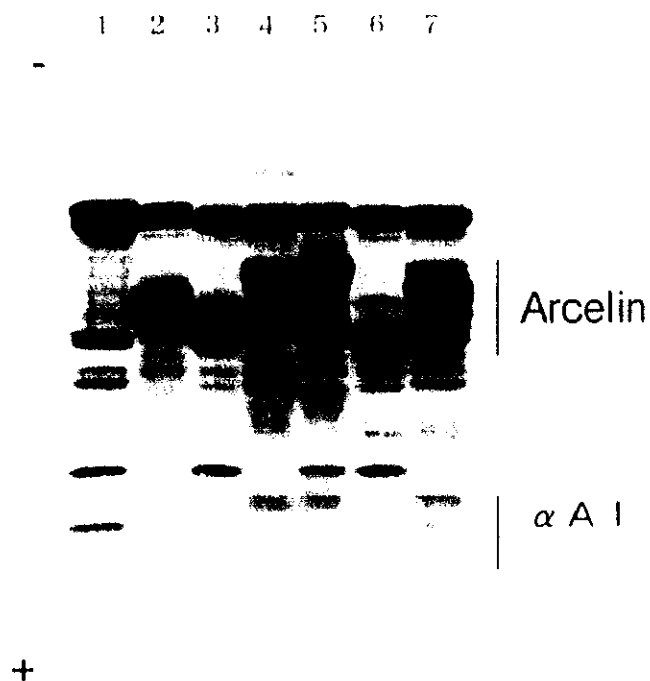


図5. インゲンマメ種子タンパク質のウエスタンブロッティング分析

1, Taihou-kintoki (α AI-1d); 2, G12882 (α AI-0b, arcelin1); 3, G12866 (α AI-0b, arcelin2); 4, G12922 (α AI-2, arcelin3); 5, G12953 (α AI-2, arcelin4); 6, G2771A (α AI-0a, arcelin5); 7, G20513 (α AI-2, arcelin6). SDS-ゲル電気泳動後、peroxidase-Con Aにより糖タンパク質を検出した。

- 2 は、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を阻害することで、生育に阻害影響を与えると推測されている。Ishimoto and Kitamura (1993) は、 α A I - 2 とアルセリン 4 が遺伝的に強連鎖関係にあることを明らかにし、これらが共同してブラジルマメゾウムシ抵抗性に関与する可能性を示唆した。

そこで本節では、遺伝様式が明らかにされていないアルセリン 5 と 6 の遺伝分析を実施するとともに、アルセリンと α A I の各変異間の遺伝的な関係を調査し、これらとマメゾウムシ類抵抗性との関連を検討した。

材料および方法

1. 種子および交配

国際熱帯農業センター (C I A T) から分譲されたインゲンマメ野生種のうち、アルセリンを含む系統 G12882、G12866、G12922、G12953、G2771A、G20513 を交配の花粉親に用いた (表 1)。交配の種子親には前節と同じく、栽培品種でアルセリンを含まない大正金時 (α A I - 1 d) と大福 - 5 (α A I - 0 b) を用いた。大正金時または大福 - 5 とアルセリンを有する野生系統との交配から得た F_1 種子を電気泳動分析の後に播種し、 F_1 個体ごとに自殖 F_2 種子を収穫した。栽培は、全て温室内で行った。

2. 種子タンパク質溶液の調製

前節と同じく、半粒法により削った 5mg の種子粉に 0.5ml の SDS サンプル緩衝液を加え、60 分間、タンパク質

の抽出を行った。

3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンプロッティングによる糖タンパク質の検出

前節と同様に、13.5%のアクリルアミドゲルにより種子タンパク質を分離し、PVDF膜に転写後、peroxidase-ConAとの反応で糖タンパク質を検出した。

結果

各交配組み合わせにおいて、F₁種子は全て、アルセリンを有していた。F₁個体ごとに得たF₂種子は、全ての交配組み合わせにおいて、アルセリンの有無に関して分離を示した(図3, 図6)。アルセリンの有無に関するF₂種子の分離比は、(アルセリン):(アルセリン欠失)が3:1の期待分離比によく適合した(表3)。このため、これらアルセリンの変異型は全て、単一優性遺伝子支配を受けることが明らかになった。

α AI-2を含む系統は、アルセリン3、4あるいはアルセリン6を有している(表1)。これまでに、 α AI-2とアルセリン4の遺伝子に強連鎖関係が報告されている(Ishimoto and Kitamura 1993)。大正金時(α AI-1d)とG12922(α AI-2、アルセリン3)の交配において、F₁種子は、 α AI-1dと α AI-2をともに有し、 α AI-3のような電気泳動パターンを示した。同時に、F₁種子はアルセリン3を含み、自殖F₂種子は α AI及びアルセリンに関して分離を示した(図3)。F₂種子で、アルセリン3あるいは α AI-2の一方のみを有す

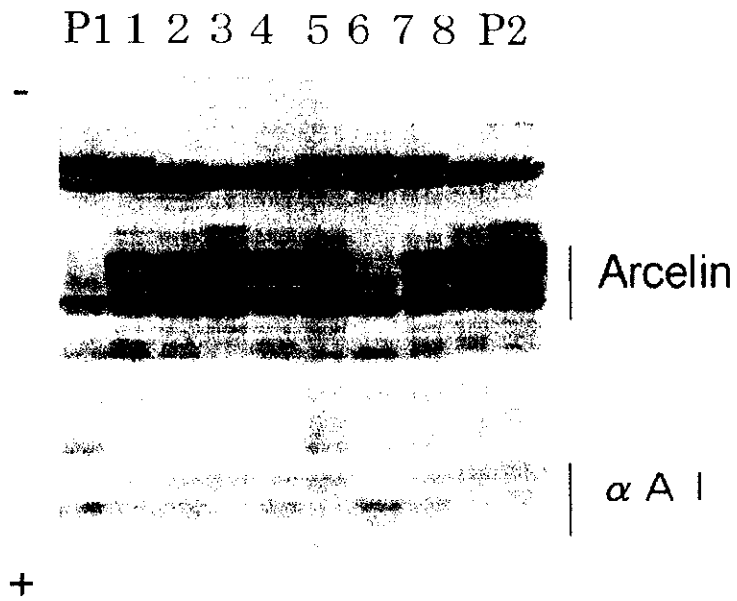


図6. 両親及びF₂種子タンパク質のウエスタンブロッティング分析

P1, 種子親, Taishou-kintoki (α AI-1d); P2, 花粉親, G20513 (α AI-2, arcelin6); 1-8, P1 と P2 の交配より得た F₂ 種子. SDS-ゲル電気泳動後、peroxidase-Con A により糖タンパク質を検出した.

表3. インゲンマンメの交配試験から得たF₂種子のα A Iとアルセリンに関する分離

交配	両親及び 種子タンパク質の遺伝子型	F ₂ 種子の分離			α A Iとアルセリンの 連鎖に関する χ ² 値 ²⁾
		α A I 遺伝子型	アルセリン Arc/-	アルセリン遺伝子型 arc/arc	
10	Taishou-kintoki × G12882 A ⁱ 1 ^d /A ⁱ 1 ^d ai/ai arc/arc Arc 1/Arc 1	A ⁱ 1 ^d /-	67	35	17.16 (<0.001)
11	Taishou-kintoki × G12866 A ⁱ 1 ^d /A ⁱ 1 ^d ai/ai arc/arc Arc 2/Arc 2	A ⁱ 1 ^d /-	69	43	16.46 (<0.001)
5	Taishou-kintoki × G12922 A ⁱ 1 ^d /A ⁱ 1 ^d ai/ai arc/arc Arc 3/Arc 3	A ⁱ 1 ^d /A ⁱ 1 ^d	115	0	187.78 (<0.001)
6	Ofuku-5 × G12922 ai/ai A ⁱ 2/A ⁱ 2 arc/arc Arc 3/Arc 3	A ⁱ 2/-	123	0	144.4 (<0.001)
12 ¹⁾	Taishou-kintoki × G12953 A ⁱ 1 ^d /A ⁱ 1 ^d A ⁱ 2/A ⁱ 2 arc/arc Arc 4/Arc 4	A ⁱ 2/-	92	0	109.57 (<0.001)
13 ¹⁾	Ofuku-5 × G12953 ai/ai A ⁱ 2/A ⁱ 2 arc/arc Arc 4/Arc 4	A ⁱ 2/-	64	0	131.86 (<0.001)
2	Taishou-kintoki × G2771A A ⁱ 1 ^d /A ⁱ 1 ^d ai/ai arc/arc Arc 5/Arc 5	A ⁱ 1 ^d /-	73	30	11.48 (<0.001)
14	Taishou-kintoki × G20513 A ⁱ 1 ^d /A ⁱ 1 ^d Ai 2/Ai 2 arc/arc Arc 6/Arc 6	A ⁱ 2/-	62	0	69.69 (<0.001)

1) Ishimoto and Kitamura (1998) のデータによる。

2) α A I とアルセリンの連鎖に関するχ² 値は、Mather (1951) より決定した。

る種子は、認められなかった。交配親に大福-5 ($\alpha AI-0b$) を用いた場合も同様で、アルセリン3あるいは $\alpha AI-2$ のみを有する種子は、得られなかった(表3)。また、 $\alpha AI-2$ とアルセリン6を有する系統を用いた交配においても、後代種子にアルセリン6または $\alpha AI-2$ のみを有する種子は、認められなかった(図6, 表3)。

アルセリン1、2及びアルセリン5を有する系統は、 αAI を欠失しており(アルセリン1と2の系統は $\alpha AI-0b$ 、アルセリン5の系統は $\alpha AI-0a$ を示す)、大正金時との交配後代からは、アルセリンと $\alpha AI-1d$ をともに欠失した種子は、得られなかった(図2, 表1, 表3)。

以上の結果により、 $\alpha AI-2$ (Ai^2) はアルセリン3 (Arc^3)、4 (Arc^4) または6 (Arc^6) と、また、 αAI 欠失 (ai) はアルセリン1 (Arc^1)、2 (Arc^2) または5 (Arc^5) と、それぞれ同一遺伝子座に支配されることが明らかになった。交配試験において、 αAI とアルセリンに関する組換えの現象は認められなかったが、 αAI とアルセリンの遺伝的関係は、強連鎖関係にあると考えられた。

考察

本節では、アルセリン各変異の遺伝様式を明らかにするとともに、アルセリンと αAI の各変異間の遺伝的な関係を調査した。

交配試験において、アルセリンの変異型は、全て3:1の期待分離比で遺伝した。これは既報のアルセリン1、

2、3及び4の結果 (Romero et al. 1986, Osborn et al. 1986) と同様であり、また、アルセリン5と6に関しては新しい知見である。そのため、これらアルセリンの全ての変異型は、単一優性遺伝することが明らかになった。また、アルセリン1、2、3及び4は遺伝的に対立的であること (Romero et al. 1986, Osborn et al. 1986)、さらに、アルセリンと α A I は強連鎖していること (本試験) から、アルセリン5、6を含めた全てのアルセリンが対立形質であることが示された。

アルセリンは、ブラジルマメゾウムシ抵抗性のインゲンマメ野生系統に見いだされ、アルセリン1と4については、本虫に対する生育阻害性が確認されている (Osborn et al. 1988, Minney et al. 1990)。しかしながら、アルセリンを有する系統が必ずしも抵抗性を示すわけではなく、抵抗性の程度は、種子に含まれるアルセリンの変異型と濃度によって異なっていた。野生系統の抵抗性は、アルセリン5を有する系統が最も高く、アルセリン4 > 1 > 2の順で弱くなり、アルセリン3または6を含む系統は、感受性であった (Cardona et al. 1990, Toro et al. 1990)。また、アルセリンを高濃度を含む系統ほど、抵抗性程度が高いと報告されている (Minney et al. 1990)。

P H A (phytohemagglutinin) は、血球凝集作用を有し、哺乳類、鳥類に対して毒性を示すインゲンマメのレクチンタンパク質である (Evans et al. 1973, Jayne-Williams and Burgess 1974)。アルセリン1、2、3及びアルセリン4は、P H A と遺伝的に強連鎖関係にあり、そのアミノ酸配列は相同性が高い (Osborn et al. 1986, Hartweck et al. 1991)。また、ブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を阻害する α A I - 2は、アルセリン4と強連鎖している (Ishimoto and Kitamura 1993)。本節において、 α A I - 2がアルセリン3また

は 6 と、 α A I 欠失がアルセリン 1、2 または 5 と、それぞれ強連鎖していることを明らかにした。 α A I - 1 d と P H A についても、連鎖関係が報告されている (Ishimoto and Kitamura 1991) ことから、 α A I、アルセリン、P H A は、すべての変異型について、同一遺伝子座に支配され、強連鎖関係にあることが明らかになった。

以上、本節において、アルセリンの各変異が共優性の 1 遺伝子に支配され、 α A I、アルセリン、P H A が遺伝的に強連鎖関係にあることがわかった。本交配試験と、これまでの報告において、 α A I、アルセリン、P H A に関する組換え体は得られていない。また、これらのタンパク質は、哺乳類、鳥類、昆虫などに対して、種々の作用機構で毒性を示す (Evans et al. 1973, Jayne-Williams and Burgess 1974, Ishimoto and Kitamura 1988, Osborn et al. 1988, Minney et al. 1990)。それ故、これらの遺伝子は、ゲノム上で非常に近接して位置し、連鎖して遺伝することで、単独または共同してインゲンマメの防御機構を担っているものと推察された。

第 3 節 要約

インゲンマメ種子には、マメゾウムシ類生育阻害物質と考えられる 2 種類のタンパク質、 α -アミラーゼインヒビター (α AI) とアルセリン (arclin) の変異が存在する。 α AI は、マメゾウムシ類の α -アミラーゼ活性を阻害することで生育を阻害すると考えられ、 α -アミラーゼ活性阻害性と電気泳動パターンの違いから、8 つの変異型に分類される。 α AI-1 (a, b, c, d) はブタすい臓の α -アミラーゼ活性を、 α AI-2 はブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼ活性を、そして α AI-3 は両 α -アミラーゼ活性を阻害する。 α AI-0 (a, b) は、 α -アミラーゼ活性に対して阻害性を示さない欠失型である。アルセリンは、ブラジルマメゾウムシに対する生育阻害性を示し、電気泳動パターンから 6 種類に分類される。本章では、これまでに遺伝分析のされていない α AI-1 b, 1 c, 3, 0 a、また、アルセリン 5, 6 について、遺伝様式の解明を試みた。さらに、 α AI とアルセリンの各変異間について、遺伝的関係を調査した。

α AI の各変異型を示す系統を花粉親とし、栽培品種大正金時 (α AI-1 d) または大福-5 (α AI-0 b) を種子親にして交配を行った。雑種後代 F_1 と F_2 種子の分析から、既報の α AI-1 d (Ai^{1d}) と α AI-2 (Ai^2) と同様に、 α AI-1 b (Ai^{1b})、1 c (Ai^{1c}) 及び α AI-3 (Ai^3) が単一の優性遺伝子に支配され、 α AI 欠失型の α AI-0 a は α AI-0 b と同じく、1 つの劣性遺伝子 (ai) 支配であることを明らかにした。本試験では、種子親に α AI-1 d または α AI-0 b を示す栽培品種のみを用いたが、これらの α AI が対立

形質にあることから、 α A I - 1 b、1 c、1 d、2、3、0 a 及び 0 b が全て対立的で、共優性関係にあることが示された。今回、遺伝分析を行わなかった α A I - 1 a についても同様な遺伝様式が期待される。

アルセリンに関する交配試験において、アルセリンの全ての変異は、単一の優性遺伝子に支配されることが確認された。これまでにアルセリン 4 と α A I - 2 に強連鎖関係が報告され、これらが共同してインゲンマメのブラジルマメゾウムシ抵抗性に関与することが推察されている。本章では、 α A I とアルセリンの各変異間の遺伝的關係を調査し、 α A I - 2 がアルセリン 3、4 あるいは 6 と強連鎖していること、さらに、アルセリン 1、2 及び 5 が α A I 欠失と強連鎖関係にあることを見いだした。すでに、アルセリン 1、2、3 及び 4 がインゲンマメのレクチンである P H A (phytohemagglutinin) と、また、 α A I - 1 d が P H A と強連鎖関係にあることが報告されていることから、 α A I、アルセリン、P H A は、すべての変異型について、同一遺伝子座に支配され、強連鎖関係にあることが示された。

以上、本章において、 α A I の各変異が共優性の 1 遺伝子に支配されることが、また、アルセリンの各変異も共優性の 1 遺伝子支配であることを明らかにした。さらに、 α A I とアルセリンの各変異間に強連鎖関係が存在し、これらが P H A と連鎖していることがわかった。P H A は、血球凝集作用を有し、哺乳類、鳥類に対して毒性を示すタンパク質である。 α A I とアルセリンは、一部の変異型について、マメゾウムシ類への生育阻害性が確認されている。それ故、 α A I、アルセリン及び P H A の遺伝子は、ゲノム上で非常に近接して位置し、連鎖して遺伝することで、単独または共同してインゲンマメの防

御機構を担っているものと考えられた。