

野生アズキ集団における遺伝的変異

黒田 浩一*・平石 純子*・高原 美規*・山元 皓二*

Genetic polymorphism of seed storage proteins in wild adzuki bean

Koichi KURODA, Junko HIRAISHI, Yoshinori TAKAHARA and Koji YAMAMOTO

Genetic polymorphism among the local community around our university was investigated by SDS-PAGE analysis of seed storage proteins in wild adzuki bean *Vigna angulalis* var. *nipponensis*. We collected seeds from five independent populations. Population I has phenotypic polymorphism in seed color, that is, black, brown, light brown, green and russet. The other four populations have only black seed color. Two polymorphic bands were detected by SDS-PAGE analysis of seed storage proteins. One was around 70kD and the other was around 60kD. Black colored seeds in population I involved six types that showed different band patterns and should be mixed lines. Seeds of each color except black in population I showed no polymorphism within the color so that they should be a pure line, respectively. But each band pattern of them were identical with one of six types of black seeds. Each of the other four population was a pure line and two populations showed one of six types of black seeds in population I. But the rest two showed different patterns. In short, two polymorphic bands and eight different band patterns were detected by SDS-PAGE analysis of seed storage proteins.

Key words: Genetic polymorphism/SDS-PAGE/wild adzuki bean/*Vigna angulalis* var. *nipponensis*

1. 緒 言

マメ科植物には熱帯気候から寒帯気候に至るあらゆる気候に適したものが存在し、現在世界各地で栽培されている。その乾燥した完熟種子は油脂、蛋白質を豊富に含み、また貯蔵性に優れていることから、食品としての価値が高い。種子貯蔵蛋白質含量について見ると、他の植物と比較しても圧倒的に高く、植物性蛋白質源としての重要性は今後ますます高くなっていくものと考えられる。

本実験に用いたヤブツルアズキ (*Vigna angulalis* var. *nipponensis*) は、アズキと同じササゲ属 (*Vigna*) アズキ亜属 (*Ceratotropis*) に属し、アジアに広く分布する蔓性一年生の野生種である。このヤブツルアズキは交雑親和性、種子蛋白質等の共通点から、栽培アズキの野生祖先種であるとされている。また、ヤブツルアズキと栽培アズキの中間的形態を示すノラアズキと呼ばれる野生種も存在するが、これらの野生種は近年の世界的な環境問題によって減少しており、早急な対応が要求されている。しかしながら、今だ調査も十分に行われていないのが現実である。

本報告では、本学周辺および大学内に自生するヤブツルアズキおよびノラアズキを「野生アズキ」と称し、それら野生アズキの遺伝的変異の多様性を、多様な種

皮色を基準に分類することによって調査を行い得られた知見を報告する。

2. 材料と方法

2.1 植物材料

材料には、本学周辺に自生する野生アズキを用いた。これらの野生アズキは図1に示す5つの採取場から採取した。これらの採取場で採取された野生アズキの形態的特徴を表1に示す。集団Iは多様な種皮色を有している集団であり、採取した種子は種皮色により黒色 (BL-type)、緑色 (Gr-type)、薄茶色 (LB-type)、褐色 (Br-type)、アズキ色 (Ru-type) に分類し

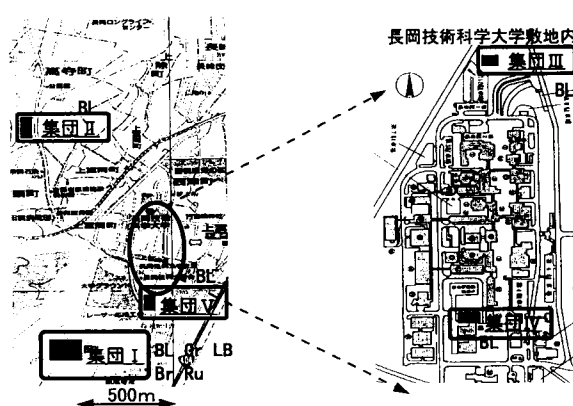


図1 試料採取場所

原稿受付：平成11年5月25日

長岡技術科学大学生物系

た。他の4集団(集団II～V)はすべて黒色のヤブツルアズキのみからなる集団であった。また、コントロールとして栽培アズキを用いた。

集団	採集地	種皮色	形態	茎色	莢色
I	採石場	BL	蔓性	赤紫	黒
		Gr	蔓性	緑	黒
		LB	蔓性	緑	黒
		Br	蔓性	緑	黒
		Ru	蔓性	緑	薄黄色
II	田宮病院	BL	蔓性	赤紫	黒
III	駐車場	BL	蔓性	赤紫	黒
IV	高圧ガス	BL	蔓性	赤紫	黒
V	宿舎	BL	蔓性	赤紫	黒

表1 本実験に用いた植物材料及びその形態的特徴

2. 2 種子貯蔵蛋白質の抽出と電気泳動試料の調整

種子の種皮に穿孔後、蒸留水に浸漬し低温下(～4℃)で8時間吸水させた。SDS(ラウリル硫酸ナトリウム)を0.4%含むpH6.8の0.5M Tris-HCl緩衝液を抽出用バッファに用い、吸水させた種子1粒(乾燥重量0.03～0.04g)に400μl加えて乳鉢で摩砕した。摩砕液をマイクロテストチューブにマイクロピペットで移し、4℃、14000rpmで15分遠心した。上清を新しいチューブに移し、蒸留水を200μl(総量約600μl)、10%SDS溶液100μl、グリセリン200μl、2-メルカプトエタノール10μlを加えた。それらをよく混合し90℃の温浴で2分間熱処理したものを泳動試料とした。なお、熱処理までの作業は低温下で行い、マイクロテストチューブ、ピペットチップはオートクレーブ滅菌したものを用いた。

2. 3 ラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

抽出したサンプルはLaemmli(1970)の方法によるSDS-PAGEを行った。電気泳動装置はATTO株式会社製AE-6200型スラブゲル電気泳動装置、電源制御装置として同AE-8400(CROSS POWER1000)及びAE-8450(POWER STATION 1000VC)、スラブゲル作製としてAE-6210型を用いた。電気泳動用ゲルとして厚さ1mm、濃縮ゲルはpH6.8ゲル濃度4.5%、分離ゲルはpH8.8ゲル濃度10%及び7.5%のものを作製し、一定電流25mAで約150分泳動した。

泳動後、2.5%クマジーブリリアントブルー溶液中に1時間浸漬・振盪させて染色し、その後7%酢酸溶液中に浸漬・振盪させて脱色した。脱色の終了したゲルは蒸留水による洗浄、不要部分の切除の後、乾燥機を使用して2時間程度乾燥させた。

2. 4 集団I内の同一種皮色内及び種皮色間における変異

集団I内の同一種皮色の種子(BL, Gr, LB, Br, Ru)を供試試料として、種子貯蔵蛋白質の電気泳動を行い、同一種皮色内及び種皮色間における泳動パターンを調査し、それぞれの特徴や傾向を比較した。

2. 5 集団間における変異

集団I～Vで採取された野生アズキを供試試料とし、種子貯蔵蛋白質の電気泳動を行い、その泳動パターンを調査し、それぞれの集団における特徴や傾向を比較した。

3. 結 果

3. 1 集団Iの同一種皮色内及び種皮色間における変異

集団I BL-typeの種子貯蔵蛋白質の電気泳動像を図2に示す。この泳動像では2つの主たる変異が認められた。1つが70kD付近のバンド(以後Aバンド)で、A, Jでは上側にシフトしているのに対して、D, F, Gでは下側にシフトしていた。残りのB, C, E, Hは上側と下側の両方のバンドを有していた。もうひとつが60kD付近のバンド(以後Bバンド)で、Dのみが下側にシフトしている以外は同じバンドを有していた。

そこで、BL-typeに分類された種子をさらに調べてみると、黒色度合いにばらつきがあり、その度合いによって大きく3つに分類することができた。一般的にみられる黒色種子(BL-type)、黒色であるが黒色の斑が少なく全体的に黒灰色をしている種子(thin BL-type)、及びその中間的な黒色を有している種子(intermediate BL-type)である。集団IのBL-typeをこれら3つに分類し、SDS-PAGEを行った結果を図3に示す。この結果から、BL-type及びintermediate BL-typeではAバンドには変異は認められないが、Bバンドには変異が認められた。thin BL-typeは、Aバンド及びBバンドに変異が認められた。この結果より、Bバンドについては種皮色の黒色度合いとは何ら関係がないと思われる。

また、集団Iの他の種皮色を有する個体では、Ru, Br, LB, Grのどの種皮色においても同一種皮色内ではAバンド、Bバンド共に変異は認められなかった。

これまでに得られた結果から、各種皮色におけるバンドパターンのモデル図を図4に示す。集団IのBL-typeはAバンド及びBバンドに基づいてType 1～

Type 6 の計 6 種類に分類することができた。コントロールとして用いた栽培アズキは type 5 に分類された。他の種皮色 (BL, Gr, LB, Br, Ru) を有している個体は, Br, LB-type は Type 2 に, Ru-type は Type 3 に, Gr-type は Type 5 にそれぞれ分類された。

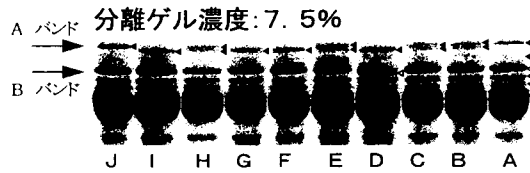


図2 集団 I BL-type の SDS-PAGE パターン

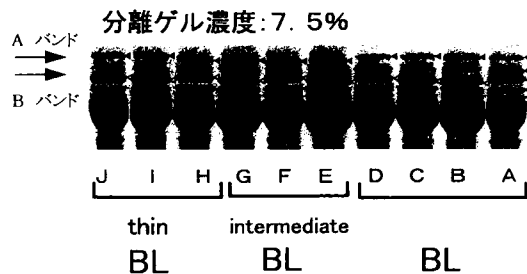


図3 集団 I BL-type の黒色差による SDS-PAGE パターンの比較

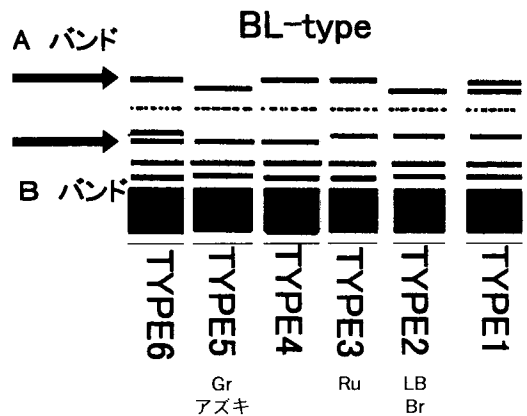


図4 集団 I 内の種皮色間でのバンドの変異
BL: TYPE1~TYPE5 LB, Br: TYPE2
Ru: TYPE3 Gr・アズキ: TYPE5

3. 2 集団間における変異

多様な種皮色を有する集団 I 内の BL-type には種子貯蔵蛋白質における変異が認められたことから, BL-type のみから成る集団 II~V についても同様に調査した。調査の結果より, 集団 II~V のいずれの集団

においても集団内の変異は認められなかった。

集団 I~V の集団内における変異の調査に引き続き, 集団 I~V の集団間変異の調査を行った。集団 I~V における野生アズキの電気泳動像を図 5 に示す。また, 集団 I で認められたバンド Type と各集団を比較したモデル図を図 6 に示す。多様な種皮色を有する集団 I の BL-type と集団 II~V の A バンド及び B バンドのバンドパターンを比較すると, A バンド及び B バンド

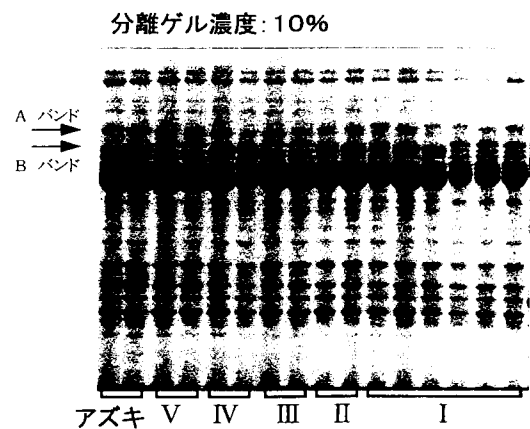


図5 集団間 (集団 I~V) におけるヤブツルアズキの SDS-PAGE パターン

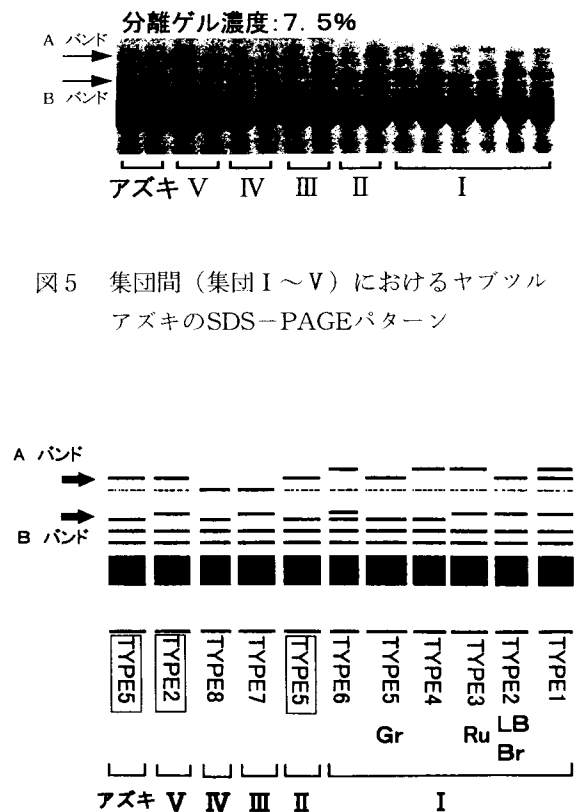


図6 集団 I 及び集団 II~V 間でのバンドの変異の比較

の変異から、集団Ⅱは集団ⅠのType 5と集団Ⅴは集団ⅠのType 2と一致した。しかしながら、集団Ⅲと集団Ⅳのバンドパターンは集団Ⅰのどのタイプとも一致しなかった。集団Ⅲ及び集団Ⅳのバンドパターンは、Aバンドが集団Ⅰで認められた多型とまったく異なった多型を示しており、それぞれ集団ⅢのバンドパターンをType 7、集団ⅣのバンドパターンをType 8とした。

4. 考 察

本研究では、栽培アズキの祖先種であると言われている野生アズキの種子貯蔵蛋白質を抽出し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動することによって、その電気泳動パターンに同一種皮色内及び集団間の変異が確認できた。

種子貯蔵蛋白質とは、発芽の際に幼植物の窒素源となるために種子中に貯蔵されている蛋白質の総称で、種子の胚乳あるいは子葉の細胞内に在る蛋白質顆粒中に含まれている。この種子貯蔵蛋白質の分析方法として、本実験では蛋白質変性剤にSDSを使用するポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）を採用した。電気泳動の結果から、集団Ⅰの同一種皮色内においてはBL-typeでのみ多型が認められ、6種類のバンドパターンが確認された。変異が起きているバンドは70kD付近のバンドと60kD付近のバンドの2つであった。BL-type以外の種皮色内では、同一種皮色内の多型は確認されなかった。他集団においては、集団ⅠのBL-typeで確認された6種類のバンドパターン以外に新たに2種類のバンドパターンが確認され、計8種類の多型を確認することができた。

BL-typeの集団間変異についてみると、多様な種皮色を有する集団ⅠのBL-typeはAバンド及びBバンドに多様な多型が認められたが、BL-typeのみの集団Ⅱ～Ⅴ内においては、多型は認められなかった。これらのことから、BL-typeのみからなる集団では、集団間でAバンド及びBバンドに多様な変異を示すが、各々の集団内では純系となっていることが示唆される。また、集団ⅠにおけるBL-type以外の種皮色を有する個体はそれぞれ純系になっているが、BL-typeは純系になっていないことが示唆される。

以上の結果から、多様な種皮色を有する集団Ⅰ内では、集団内で交配が起こり、BL-typeにバンドの変異が生じていると考えた。一般的に野生アズキは自家受精であるため他殖はあまり起らないと思われる。しかしながら、Type 1及びType 6のAバンドに見られ

る2本のバンドは、上側にシフトしているバンドと下側にシフトしているバンドを有している個体同士の交配により生じたものであると考えられる。すなわち、集団Ⅰ内では、少ないながらも交配が起っているものとするのが妥当である。

また、上記の事柄から、交配によってType 1となる可能性がある組み合わせは、Type 2とType 3であり、また、Type 6となる可能性がある組み合わせは、Type 3とType 4である。

しかしながら、Aバンド及びBバンドと種皮色との直接的な関係は明確にはできなかった。今後、他の多様な種皮色を有する集団を調査することで、明確になるものと示唆される。

5. ま と め

本研究に用いたマメ科植物は、現在分類学的研究が進められており、RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）やRAPD（Randomly Amplified Polymorphic DNAs）を用いた直接的分析が試みられている。その分類学的研究法のひとつとしての種子貯蔵蛋白質を利用した分析は、広範囲の種を簡便かつ標準化した方法で調査することができるため、マメ科植物の分子生物学的分類の手法として欠かせないものであると考えられる。

今回の報告では、種子貯蔵蛋白質分析による変異検出の可能性と野生アズキにおける遺伝的変異の一部が示された。今後、野生アズキを遺伝資源として利用していく上でこの結果は有効に活用され、有用形質が導入された栽培種を育種する上の指標となるであろう。

参考文献

- 1) 関口建二, 高原美規, 山元皓二, 長岡技術科学大学研究報告, 19, 77-82, 1997
- 2) Laemmli, U. K., Nature, 227, 680-685, 1970
- 3) Yamaguchi, H., Y. Nikuma, Biometric Analysis on Classification of Weed, Wild and Cultivated azuki Beans. Weed research, 41, 55-62, 1996
- 4) 山口裕文, 野生アズキの分類評価3. 雑草アズキの地理的分布と変異. 育種学雑誌, 43(別冊1), 242, 1993
- 5) 北村四郎, 村田源, 原色日本植物図鑑草本編(Ⅱ) 離弁花類. p116. 保育社