

マツ属の系統類縁関係に関する血清学的研究

斎藤, 明

<https://doi.org/10.15017/14781>

出版情報 : 九州大学農学部演習林報告. 42, pp.235-340, 1968-01-31. 九州大学農学部附属演習林
バージョン :
権利関係 :

った諸氏の芳名を記し深甚の謝意を表する次第である。

小川保喜博士（前福岡学芸大学助教授）、辻木達郎博士（九大助教授）、永野正造氏（岩手大学助教授）、塚原初男博士（林試九州支場）、中村義司博士（教育大学）、室屋法暁氏（福岡農高教諭）、江口弘美氏（久留米園芸試験場）、村井正文氏（九大大学院学生）、野上寛五郎氏（九大教官）

また放射線照射に際しては、放射線育種場の大庭喜八郎博士に多大のご援助をいただいた。さらに可溶性蛋白質の抽出に対しては菅原淳博士（九大理学部）に多大のご援助、ご指導を賜ったので、ここにあわせてお礼を申し上げる。

第 1 部 蛋白質の血清学的種属特異性とその応用

1. 血清学的方法

動物または人間にその生体に外来のある物質（たとえば異種生物由来の蛋白質、細菌、ウイルス）を注射すると、生体の血清中には投与された材料と特異的に結合する能力のある一種の血清グロブリンすなわち抗体が産生される。この抗体の産生を促し、あるいはこの抗体と特異的に反応する性質を有する物質を抗原とよぶ。

(1) 抗原

抗原 (antigen) とは、抗体 (antibody) が作られる「きっかけ」となり、そしてこれと特異的に反応する物質のことをいう。この抗原を血清学的性質から分類すると次のようになる¹⁶⁹⁾。

完全抗原

不完全抗原 { ハプテン
単純ハプテン

このうち完全抗原は、抗原として完全な働きを発揮する。すなわち生体内では抗体の形成をうながし、試験管内では抗体と反応を呈する。ハプテンとは、この物質単独では抗体を作る能力がなく、抗体と抗原抗体反応を呈するが、単独では抗体を作りえないもの。単純ハプテンとは、ハプテンよりは更に抗原としての物質を欠き、単独では抗体と普通にいわれる抗原抗体反応を呈することがない。多くは比較的簡単な化合物で、完全抗原の性能を有する物質（蛋白質）と結びつくと、この単純ハプテンと特異的に結びつく抗体ができるようになる。

ある物質の投与が、抗体の産生をうながし、いわゆる抗原の免疫原性が示されるためには、次のような条件が必要である。第1に、腸管外の体内（たとえば家兎などの）にもちこまれうること、第2に溶解性であること、第3に当該動物に対して異種のものであること、すなわち類縁関係の遠いものであること、第4に、主として生物由来の高分子性物質であること。分子量が大きいものであること。すなわち蛋白質はその分子がしだいに分解されて分子量が小さくなるにしたがって抗原性を失ってゆくものであるからである。分子量 10,000~15,000 以上が好都合であること。第5に、抗原の投与は非経口的であることなどの条件をあげることができる。これらの条件を満足するような次のものがいわゆる抗原としてみとめられることになる¹⁴³⁾。

完全抗原

- a. 単純蛋白質 (single protein)
 - アルブミン (albumin)
 - グロブリン (globulin)
 - グルテリン (glutelin)
 - プロラミン (prolamin)
 - 硬蛋白質 (albuminoid, scleroprotein)
 - ヒストン (histon)
 - プロタミン (protamin)
- b. 複合蛋白質 (conjugated protein)
 - 核蛋白質 (nucleoprotein)
 - 糖蛋白質 (glycoprotein)
 - 燐蛋白質 (phosphoprotein)
 - 色素蛋白質 (chromoprotein)
 - 原形質, 細胞膜蛋白質 (lecithoprotein)
- c. 細菌蛋白質
- d. 誘導蛋白質 (derived protein)

ハプテン

- a. 類脂肪
- b. 含水炭素 (多糖類)
 - 肺炎球菌の多糖類

これらの抗原で免疫する場合、抗原物質を単独でなしに、ある物質を加えてある種の混合物として注射すると抗体の産生がいちじるしく促進されることがある¹⁶⁹⁾。このように抗原と混合させて免疫せしめたときに抗体産生などの免疫反応 (immunologic response) を増大せしめる効果のある物質を免疫助成剤 (immunologic adjuvant) とよび、抗原を単独で免疫した場合に比べて、このアジュバント免疫法をおこなうと、同じ抗原に対して、ときに抗体の産生量は数百、数千倍にもおよぶこともあるといわれる。従来、抗体の産生のみられなかったものがアジュバント免疫法により立派な抗体の産生をみ、その他の免疫現象の成立を証明しえた例は多い。これがいわゆる「アジュバントによる抗体産生の促進」といわれるものである。なお、免疫助成剤を加えると抗体の産生期間が長くなるといわれる。すなわち、血清の抗体価はかなりのレベルを保って比較的長期間存続する。

よってアジュバントによる抗体の産生は、抗体産生量の増加をきたしたり、抗体産生期間を延長したり、抗原の量が少なくてよいことなど、また免疫回数が少なくてよいことなど、いろいろの利点がある。それで、単に抗体産生の効率を上げるといような目的の場合には、よく用いられる。

このアジュバントの種類には、いろいろあるが、一般には油中水エマルジョン (water in oil emulsion) で、油成分として流動パラフィン (Bayol F)、表面活性剤に Arlacel A. これに抗原液を加えて油中水エマルジョンとする。この型式のものは、いわゆる Freund の不完全アジュバント (incomplete adjuvant) とよばれるものである。なお、これに結核菌 (死菌で十分の効果がある) を加えると、アジュバントの効果は一層強まるとされて

いる。

なお、ここで蛋白質一般の特徴ある反応として、変性¹⁵⁾⁴⁾があるので十分な注意が必要である。変性によって、可溶性蛋白は不溶性と化する。これは、高温(40~75℃)、強酸、強アルカリ、紫外線、重金属イオンによる沈殿等によっておこるもので、普通はその酵素的性質とか免疫学的特異性といった生物学的機能の消失をとまなう。また蛋白分子の形および配置の変化を生ずる。したがってこの変性回避のために低温で抽出操作をすみやかにおこなわなければならない。変性は、分子のペプチド鎖の結晶学的配位の変化、そして変性以前には存在しなかった遊離-SH基の出現をとまなうといわれる。また蛋白質は等電点ではすこぶる不安定となり、変性が容易となり、その速さも最大で溶解度は最少となることなど、十分にこれらのことを考慮した上で実験することが肝要となる。

(2) 抗体

抗体とは、抗原と特異的に反応する物質の総称であって、その抗体の由来によって次の2種のものがある。

免疫抗体 (immune antibody)

生体にはいった抗原がきっかけとなって作られる抗体

正常抗体 (normal antibody)

生体が生まれながらに有している抗体

また、抗体と結合する抗原の由来により次のものがある。

異種抗体 (heteroantibody)

抗体を有する動物の種 (species) と異なるものに由来した抗原と作用するもの

異好抗体 (heterophile antibody)

抗体が作られるきっかけとなった抗原と全く由来のことなる抗原と結合する抗体

同種抗体 (isoantibody)

抗体を有する動物の種と同じものに由来した抗原と作用するもの

自己抗体 (autoantibody)

抗体を保有する動物自身に由来する抗原と作用するもの

などさまざまなものがある。

一般に正常家兎血清は、電気泳動による実験によってその陽極への泳動のすみやかなものから列記すると、アルブミン、 α グロブリン、 β グロブリン、 γ グロブリンとなるが、それが抗血清のものとなると、この γ グロブリンの分画が正常血清より一段と多くなる。また、抗原によって吸収させたのちには、正常血清のそれのようになるといわれる。すなわちこれによってあきらかなように、抗体は抗原により一定の修飾をうけたグロブリン自身であるとされている。抗体 γ グロブリンの産生、あるいは抗体分子の特異的構造の決定ということが、どのような生物学ないし生化学的過程でおこなわれるかは、諸説のあるところで、まだ十分あきらかではない。しかし一般に、抗体は細網内皮細胞系から作り出されるグロブリンが、抗原の極性原子団の作用によってアミノ酸の配列に変化を受けて生ずる。

抗体は、一般に物理的・化学的性状からみて、正常 γ グロブリンと区別することはむずかしく、対応抗原に対する反応、すなわち抗原との特異結合部をもつことにより特質づけ

られる³⁾。

免疫化学的研究の応用に際して注意を要する点として次のことがあげられる。一種の均一な蛋白質を抗原として用いた場合にも、産生される抗体は決して均一ではない^{33) 147)}。これは、免疫期間にもよるが、同一血清中で、あるいは異なる血清間で抗体グロブリンの溶解度、電気泳動、超遠心的性状など物理化学的性質に差があったり、抗原との沈降能などの免疫学的性状に差がみとめられることもある。したがって抗体とは、抗原に対する特異的作用の点で共通の反応を示す一群のグロブリン分子であって、通常われわれの扱う免疫血清は、厳密には、性状のちがう抗体群を種々の割合に含むものであると解すべきである³⁾。

最近の報告 (1965)¹⁴⁸⁾によると、アゾ化蛋白などのように構造式のあきらかな人工抗原を作り、これで免疫すると、その免疫血清はどの種類の蛋白質のアゾ化したものとも沈降反応を呈する。すなわち、抗原が特異的に抗体と結合する部位は、蛋白質の部分ではなくて、導入されたアゾ原子団で、これを特異原子団 (決定基) とよばれる。アゾ化合物のほかハロゲン原子、アルキル基、アシル基にも類似現象があり、また決定基の蛋白質に導入される部位によっても反応に特異性があらわれるという。

G. NOSSAL (1965)²⁵⁾ は、細胞が抗体を作る過程を詳細にのべている。実際に抗体を産生するのは原形質細胞 (plasma cell) とよばれる分化した細胞であり、実験動物に静脈注射すると、2・3日後にその動物の脾 (白血球の源) に形質芽細胞 (plasmablast) が出現する。この若い形質細胞はすみやかに分裂し、数日後にはその子孫は一層分化したものになり、細胞内の核は縮小し、まわりの細胞質はひろがる。この形質細胞が蛋白合成を支配するリボ核酸 (RNA) に富んでいるという事実は、形質細胞が抗体蛋白を積極的に産生している強力な指標であるという。この形質細胞には実際に抗体が保有されている。G. NOSSAL は、これらの細胞が実際に抗体を産生していることを確実に証明した²⁵⁾。単個の形質細胞の懸滴培養法によって、この抗体産生過程を追跡した。これによって生細胞にある抗体産生を測定し、産生された抗体の質、純度、化学的性状をしらべることが可能となる。

原形質細胞の特異性については、ある一つの形質細胞は一種の抗体をつくるように制限されている。すなわち同時に二種類の抗体をつくることがなく、分業性であり、一細胞一抗体の原則によっているという²⁵⁾。

哺乳動物では、免疫反応の進行中に若干性質の異なった特異抗体が産生される。動物は、反応の初期に各細胞で分子量約 100 万の抗体分子 (=19S) を産生するが、そののち約 16 万の分子量の同じ特異性を有する抗体分子 (=7S) をつくるように切り代わるという。この小さい抗体 (7S ガンマグロブリン) の分子は 4 つの部分に分解でき、この鎖の 4 つの部分は SS 結合と水素結合によって連結されて、一つの完全分子を構成する。これらは二つの対となり、すなわち分子量 50,000 から 60,000 の二つの鎖 (A 鎖) からなる重い鎖の 1 対と、分子量 20,000 の二つの鎖 (B 鎖) からなる軽い方の 1 対である。ともかくも抗体が抗原にくっつくとその抗原は中和されるが、それではこの 4 部分の構造のどこに抗原をはめこむ活性な結合部分があるかといえ、A 鎖という説と、A と B 鎖の間にまたがるという説とがある。

従来、免疫についての学説に2つあり、1つは、鑄型説で、抗原が形質細胞に入り込むと、それ自身を鑄型として相補的に抗体がつくられるという説、いま1つは、クローン選択説で一定の抗原はそれに対応する特定の形質細胞に単に接するだけで、細胞核内の DNA に抗体産生の指令を出されるという説で、後者の説があらゆる現象と矛盾がないといわれる。

つぎに、免疫学的記憶という現象があるが、これは感染後回復した患者は、同一抗原の二度目の侵入に対して非常に早く抗体を多量に放出することをいう。より多数の形質細胞が出現し、各細胞あたりの抗体産生量も多くなるという。

(3) 抗原抗体反応

以上のような抗原粒子と抗体分子とが出合うとき、抗原粒子の表面へ抗体分子が附着する。そしてこのいわゆる抗原抗体複合体は抗原粒子単独のものとは異なる物理化学的並びに血清学的性質を示すに至る。

この複合体の水との親和性は少なく、疎水性であって、互いに附着してより大きな集合体となる。このとき、集合体のどこかにまだ抗体と結びつく部分（抗体の表面に結びつく部分）がのこっていると、別の複合体に結合している抗体の活性な部分がそこにつくこととなる。すなわち格子状となる。この場合、抗原と抗体の量的関係の差によって種々の構造の「格子」を生じ、この性状によって沈殿物を生じたり、生じなかったりするといわれる。さらに、特異性を決定する物質（分子群）を血清学的には「決定群」といっているが、いわゆるここで言うところの抗原抗体反応の特異性は、この抗原の決定群と抗体の反応群との間の分子構造的な結びつきによるものである。

この免疫反応の特異性については、LANDSTEINER により、あきらかにされたものである⁸²⁾。そこで自然抗原の示す特徴ある特異性には次のようなものがある。

a. 種特異性（種属特異性、近親反応）

同一の動物種属に由来する異なった蛋白質が共通の特異性を有する場合

b. 臓器特異性（生体構成成分）

種に関係なく、ある臓器にのみ共通な特異性

c. 型特異性（群特異性）

同一種の一一定の個体群の同名の構成成分にのみ共通な特異性。血液型など。

d. 異原系統

種属にも、臓器にも関係なく、共通抗原の不規則な分布による特異性。

以上、簡単に抗原、抗体そして抗原抗体反応の概略をかいつまんでのべたのであるが、これらを要約すると次のようになる。すなわち異種蛋白質溶液を動物体内に注射すると、動物体免疫の原理によりこれと特異的に反応する物質すなわち抗体が産生されるに至る。この抗体は高度の血清学的特異性を有するものであって、類縁関係の近い抗原に対してはより強い反応を有するものであり、遠いものに対してはより弱く反応する。この抗体は単に動物体内においてその独得の作用を呈するのみではなく、これを動物体外にとり出して、その免疫原（抗原）に作用させるときも、よくその作用を発揮し、抗原とそれに対応する抗体との間に生ずる特異的な結合反応は、凝集反応 (agglutination)（細菌、赤血球などの細胞性抗原の凝集）、沈降反応 (precipitation)（蛋白質のような可溶性抗原と抗体の溶

液を適当にまぜると可視的沈降物をつくる), 溶血反応 (hemolysis), 溶菌反応 (bacteriolysis) など, 諸免疫反応を現わす。また抗原と抗体との結合反応にもとづくものとして, 毒素やウイルス活性の中和, 病原細菌に対する感染防御, あるいはアナフィラキシーなどの医学生物学的に重要な諸反応がある。

この抗体を含む血清, すなわち抗血清と各種抗原とを反応させて生ずるパターンにより, それぞれの抗原分析をおこなって生物の親疎関係を推定しうる理である。これがわれわれの初期の目的, すなわち蛋白質並びに生物の類縁関係を研究するに際しての基本となるものである。

ただ, 抗原用, 免疫原用蛋白質液には, 植物の各組織の蛋白質が用いられるが, 植物体の抽出物, すなわち抗原は, 常に複雑な構成をなすものであるから, 上記の特異性がいつもあきらかにとらえられるとはかぎらない。換言すると, 植物体からの抽出液には, 抗原性ある物質のほかに, 非特異的な反応をおこす物質が含まれているものがある。ときには, 抗原抗体反応そのものを阻害するような物質まで含まれていることもある。したがって, この抗原抗体反応を一般の高等植物, 栽培植物にまで応用しようとする場合に, それはそのままではおこないえないものがある。

結局のところ, 蛋白質の抽出の段階, 精製の段階においていろいろな困難な点が内在することであって, これが解決されれば, 結合反応にもとづいて抗原あるいは抗体の同定, その微量の検出, 定量 (免疫化学分析) などその他いろいろな実験に広く活用が期待されることになる。

2. 植物の系統分化に関する血清学的研究とその歴史的背景

(1) 沈降法 (precipitation test)

1879年に KRAUS⁷⁶⁾ によって, 沈降反応が報告されてのち, 血清学的手法を植物分類学に応用した (高等植物のいろいろな「種」を分類したり, またはその生成物の異同を究明するために血清学的手法, すなわち抗原抗体反応を応用すること) のは決して新しいものではなく, この研究は古く KOWARSKI (1901) をもってその最初とされる⁷⁷⁾。のち, この研究は 1910 年代から 1930 年代にわたってひろく世界各地で試みられてきた。

その理論的根拠とされるものは, まず第 1 に, 蛋白質の種属特異性 (species-specificity) に求めるとされた。すなわち, 近縁種ほどおたがいに強い反応を呈するのであるが, 他の遠い関係にあるものとは弱い反応を呈するにすぎないか, あるいはまったく反応がマイナスであるという性質によっている。第 2 には, 生物学上一般に近縁の関係にある「種」に属する個体の諸成分は, その抗原性からいっても, やはりおたがいに親近の関係を示し, これを近縁反応または類属反応とよぶ。この二つが根拠となっている。

KOWARSKI (1901) は, 小麦粉の生理的食塩水抽出液を, 温浴法によりアルブミンを凝固沈殿させたあとの濾過液をアルブミン溶液として家兎の耳静脈に 8~10cc ずつ 3~4 日おきに 6~8 時間の注射をおこない, 抗血清を生ぜしめ, コムギ, オオムギ, エンドウなどいろいろな抗原と反応させた (沈降法で) ところが, すべての抗原と大なり小なりの反応をみるに至った。よって彼は, 植物性蛋白質はそれほど種属特異性が明瞭ではないと結論した⁷⁷⁾。

BERTARELLI (1904) は、マメ類 (シロダイズ, エンドウ その他) の類縁関係を究明, 判別が可能であるとした¹³⁾。

次いで MAGNUS, FRIEDENTHAL (1906) は、酵母, 松露菌およびハラタケの類縁関係を研究, 酵母はハラタケよりも松露菌に近縁であるとした。また同氏らは、KOWARSKI の研究を綿密に追試した。その結果, その特異性を立証し, 彼は、植物性蛋白質の一層特異的であることを主張している⁸⁴⁾。

RENDER (1907)¹²⁷⁾ も 2 種のエンドウと 8 種のオオムギの亜種について、GASIS (1908)²¹⁾ は、ハダカムギ, マメ, コメ種子について、WEDELSTADT, FELLMER (1910)¹⁶⁴⁾ もマメ類について、それぞれその種属特異性をあきらかにするに至った。

MAGNUS, FRIEDENTHAL (1907)⁸⁵⁾ は、植物の組織特異性について検したが、差異はみとめられなかった。しかし、DUNBAR (1910) は、高等植物の花粉蛋白質は他の組織の蛋白質とその性質を異にするものであることをみとめた¹⁹⁾。しかるのち、MAGNUS, FRIEDENTHAL は、この研究を繰り返すことによって DUNBAR の結果の正しいことをみとめるに至った。

K. STRUM (1910) は、*Adoxa* と *Sambucus* との類縁関係を証明しようとしたが、失敗に終わっている¹⁴⁵⁾。LAKE, OSBORN, WELLS (1906) は、家兎に長時間かつ何回も免疫させるほど強い抗血清をうるとした⁸⁰⁾。UHLENHUTH, JÜNG (1905) は、ケシ, アサおよびハタンキョウの種子蛋白で、その類縁関係をしらべた¹⁵⁶⁾。AZUMA, T. (1910) は、胚蛋白から沈降素を産生せしめた⁹⁾。MEZ, GOHLKE (1913) は、裸子植物の類縁関係を検した¹⁹⁾。GOHLKE (1915) は、沈降反応, 補体結合反応, 過敏症反応によって、これを追証している²⁶⁾。ZADE (1914) は、マメ科植物およびコムギの種間差異をあきらかにした。それは当時の分類学者のたてた形態学的分類概念ともよく一致をみたらうえ、罹病性の難易にもとづく分類結果とも、よく符合することを示した¹⁷¹⁾。THÖNI, THYSEN (1915) は、ハダカムギ, オオムギについて、その蛋白質の一部硫酸分画物による抗体のすぐれていることをみとめた¹⁴⁹⁾。瀧瀬 (1917) は、裸子, 被子植物について⁷³⁾、小島 (1921) は、裸子, 双子葉植物について研究し、植物分類学の所説とほぼ一致することをみとめた⁷²⁾。比企 (1922) は、THÖNI, THAYSEN 両氏の方法を追試した⁸⁵⁾。

BALDWIN, FRED, HASTINGS (1927)¹¹⁾、小松原 (1922)⁷⁴⁾ は、マメ科植物について、その血清学的類縁関係は根瘤菌の寄生力と一致することをみた。RIVES (1923) は、ブドウの多数品種について、そのツギキの難易性と血清学的類縁性との間に高い相関のあることをあきらかにした。GREEN (1926) も、ミカン類, バラ科, ナス科植物について同様の結果をみとめた。

一方、MOSCHMEIER (1927) は、バレイシヨの品種分類を試みて、失敗に終わっている。当時は、品種間のようにいちじるしい近縁の関係にある品種相互間の血清学的区分は、むしろむづかしいというのが通説であった。しかしながら、例外的なケースも決してなかったのである。わが国の加藤, 丸山 (1928) の研究⁶²⁾ は、その 1 例としてあげることができる。氏らは、いわゆる吸収法を採用して、ある程度までの成功をおさめるに至った。ここにいう吸収法とは、A 抗原と B 抗原とを比較するために、まず抗 A 血清と B 抗原とを働かせて、抗 A 血清中からあらかじめ B 抗原と作用する抗体区分を沈殿除去してのち、

この吸収A血清とA抗原とを作用させて、A抗原特有の抗原（B抗原とは共通的でない抗原）の強さを判定する方法である。福島、丸山（1929）も、この吸収法を用いてアブラナ属作物8「種」の血清学的分類を試み、血清学的 affinity の強弱によって8「種」を次の4群に分類しうることをあきらかにした⁸⁸⁾。第1群 (*B. japonica*, *B. rapa*, *B. pekinensis*, *B. chinensis* の10染色体群), 第2群 (*B. napella*, n=19), 第3群 (*B. junca*, n=18), 第4群 (*B. oleracea*, n=19) がそれで、核遺伝学的研究の成果ともよく符合することを示した。なお、その際、福島、丸山両氏は、*B. chinensis* × *A. nepella* の F₁ 種間雑種が血清学的にもあたかも両親の中間に位するものであることをあきらかにした。

NELSON および DWORAK (1926) は、アマ品種の青枯病の耐病性の優劣を血清学的に分析しようとした。NELSON, BIRKELAND (1929) および EDGECOMBE (1931) は、コムギ品種の stem rust 耐病性や生産力の遺伝的優劣との相関をみた。

MORITZ (1929¹⁰⁸⁾, 31¹⁰⁹⁾, 32¹¹⁰⁾, 33¹¹¹⁾, 34¹¹²⁾¹¹³⁾, 35¹¹⁴⁾) は、血清遺伝学の問題を詳細にのべ、*Berberis Stenophylla*, *Aegilotriticum*, *Triticale*, *Linswicke* の血清学的雑種分析をおこない、血清学的方法で両親の区別ができるとした。

増田 (1930)⁸⁷⁾, 尾山 (1932)¹²⁵⁾ はウルチマイとモチゴメとは血清学的に判別できないとした。しかし北条 (1931)³⁷⁾ は、蔬菜類の葉の圧搾液を用いて血清学的類別に成功した。青木 (1941)⁵⁾ は、樹木および草木の花粉の加重曹食塩水抽出液により、過敏症反応を検した。さらに、ハンノキ、アカマツの花粉抽出液により沈降素をえた。O. MORITZ (1957) は、モルモットのメスの腹腔中に注射すると、約3~4週間後には、抗原として用いた材料に感作性があるが、この感作性によって *Larix curilensis* と *Larix leptolepis* が血清学的に区別できることを証明、*L. leptolepis* は、*L. curilensis* と抗原の特徴が一部共通しており、なお *L. curilensis* にはなく *L. leptolepis* だけに属する抗原物質をもっていること、雑種は *L. leptolepis* とは血清学的に区別されえないこと、そして *Berberis empetrifolia* と *B. darwinii* との雑種 F₁ をその両親より区別した¹⁰⁷⁾。今井 (1932) は、ギンナン種子について、その抗体を産生せしめた⁵²⁾。また、足立 (1936)¹⁾ は、マメ科、イネ科その他の植物の種子蛋白質によって類縁関係を検したところ、植物分類学上の所説と一致することをみた。

玄信圭 (1949)²³⁾ は、*Quercus* 属および *Castanea* 属樹木の種子蛋白質の生理的食塩水抽出液によって家兎の耳静脈注射をおこない、抗体を産生せしめ、沈降法により各相互間の類縁関係を検し、その植物分類学上の分類結果とほぼ一致することをみとめた。LEWIS (1952) は、*Oenothera organensis* のいろいろの品種に関連ある少数の対立因子でも区別する血清学的識別を研究した⁸³⁾。また CHESTER (1937) は、近縁植物の血清学的判別に関する研究を総括して報告している¹⁷⁾。

浦野 (1955) は、沈降反応によるトウモロコシ類縁関係判別法に関する研究と題し、トウモロコシ自殖系統における沈降反応について検した。材料は花粉で、抗原液の調整は、花粉 5g に 0.85% 生理的食塩水を 50 cc 加え、95~96°C の湯煎に 50分間浸し沸騰、3000回で 20分間遠沈、その上澄液に 0.5% の石炭酸を含有させている。これにより、トウモロコシ自殖世代 10年位に分離された系統間には、とくにあきらかな沈降反応を示したが、自殖世代の比較的早期に分離された系統間では、ある程度の沈降反応を示す場合と、示さな

い場合とがあることをみとめた^{157) 158)}。

浦野, 荒井 (1956) は, トウモロコシの花粉を用いて, その自殖系統間におけるヘテロシスと沈降反応の程度について検し, トウモロコシは, 従来, 両親の遠縁なほど, ヘテロシスの程度が高いとされることから, それを花粉蛋白質によって追究し, 沈降反応法によって, 雑種強勢の予察をおこなうとしている^{161) 159) 160)}。

このように, 各国の多くの研究者によって, 各種植物の類縁関係の研究, その他植物体やその生成物の検定, 植物性諸毒の分析, 植物性病原体や有毒物に関する医学上の諸検討, 植物体内における蛋白質の代謝, 雑種植物の構成成分, ウイルスの検定並びに分類などが血清学的方法を用いて研究されてきた。この間のことは, CHESTER (1937) によって, くわしくのべられているところである¹⁷⁾。

(2) 寒天ゲル内抗原抗体反応法

このように世界各地で広く, かつ広範囲な研究が重ねられ, 高等植物のみでなく, 菌類やビールス等をも含めた多数の「種」について, 品種, 系統に関する血清学的分類の仕事は, 1930年代までは多方面にわたってきわめて盛んな実施をみてきたのである。しかしながら, 当時のテクニックは, 抗血清に抗原(抽出蛋白質懸濁液)を重ねるという沈降法で, まだまだ多くの欠点を伴っていた^{60) 16) 17) 103) 104)}。すなわちその方法は反応の強弱のみによってその判定の基準とするものであったから, 非特異的反応を含むほか, 反応の強弱のみによってその親疎を判定するからその抗原蛋白質の分析は不可能であった¹⁵³⁾。

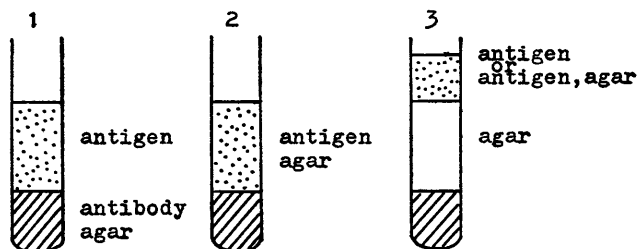
この非特異的反応をのぞくために, 各種の方法がおこなわれたが¹⁷⁾, かならずしもその除去が容易でなく, 大きな成果は期待できなかったのである。したがって, やがてはこの研究も衰退の一途をたどるに至った。LANDSTEINER (1947) は, 動物ほど植物は容易でないとのべ, 植物においてはアナフィラキシーを用いることをすすめているが, 抗原分析はむずかしいようである⁸¹⁾。

もっとも, HEIDERBERGER 一派 (1939) により沈降反応の定量的分析の方法と理論が提出され³⁴⁾, 抗原の均一性, 2つ以上の抗原の異同等をかなり精密に解析できるようになったが, その解析は相当な手間を必要としたのである。

このような事情のなかで, 抗原と抗体がゼラチンや寒天のようなゲルの中でも反応することは, 古く BECHHOLD (1905) によってみとめられていたが⁸²⁾, 当時は抗原抗体反応に関する基礎的知見が不十分であったために, 正しい解釈がなされず, かつ一般の注目をひくには至らなかったようである^{59) 142)}。

ところが, それから約40年後の近年に至り, 1946年にフランスの OUDIN^{122) 123)} がはじめて彼の寒天ゲル内抗原抗体反応を発表し, 翌1947年には OUCHTERLONY 法が紹介されるにおよんで, ここに数段の方法論上における進歩をとげ, 新活路を開くに至った。このことに関する概説は, 福島, 松井 (1960)³⁹⁾ によって詳しくのべられている。

ここにいう OUDIN 法とは一名「寒天試験管法」または「一元拡散法」ともいわれるもので, 小試験管内に抗血清をまぜた寒天ゲルを入れて固まらせたあと, その上に抗原液を重ねせしめる方法である。すると, 反応帯が血清ゲルの中に形成され, 時間の経過するにつれてそれは寒天中をしだいに下降移動する。第1図は, OUDIN の方法を模式的に示したものである。



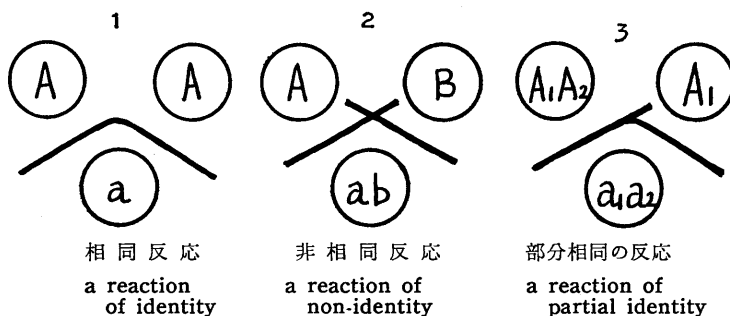
第 1 図 OUDIN 法の模式図

Fig. 1. Diagrammatic representation of the OUDIN's method

Immunodiffusion の原則は、第 1 に、単一の抗原抗体系では 1 本の沈降帯を生じること、第 2 には互いに交叉反応のない多元系の場合には抗原抗体系の数に応じた数の沈降帯がえられること（各系の抗原、抗原の濃度、当量比、抗原の拡散速度のいずれかの相異により沈降帯が分離する）、第 3 に交叉反応のみとめられる系では、抗原の濃度、拡散速度が沈降帯の数に変化を与えることなどである。ただし、ゲル内沈降反応で生ずる沈降帯の数はその反応系に含まれる沈降系の最少の数を示すものであることに注意を要する。

これによる類縁関係の判別は、非特異的反應の発現による妨害もはるかに少なく、また容易にのぞきうるという利点がある。また、必要とする試料の微量化、操作の簡易さ、分析の感度や精度などの点ですぐれた方法として、抗原の同定や均一性の判定に広く利用されるようになった。

つぎに、OUCHTERLONY^{119) 120) 121) 117) 118)} 法は、一名二重拡散法 (double diffusion gradient test), 平板法 (plate test) ともいわれ、シャーレ中の寒天層に四角のクボミを 3 個作り、適当な濃度の抗原や抗血清をみたすと、しだいに拡散し、その中間に反応帯（いわゆる抗原抗体反應の反応帯）を形成する。この方法は、クボミの数だけの異種抗原を一つの抗血清に同時に反応させることによって、異種抗原相互間の類縁関係を知りうるという特徴を有している。この方法を模式的に示したのが、第 2 図である。1 は 2 種の抗原



第 2 図 OUCHTERLONY 法による沈降線の模式図

Fig. 2. Diagrammatic representation of the precipitate patterns resulted from the OUCHTERLONY's method

A, B, A₁, A₂: 抗原 (antigens)

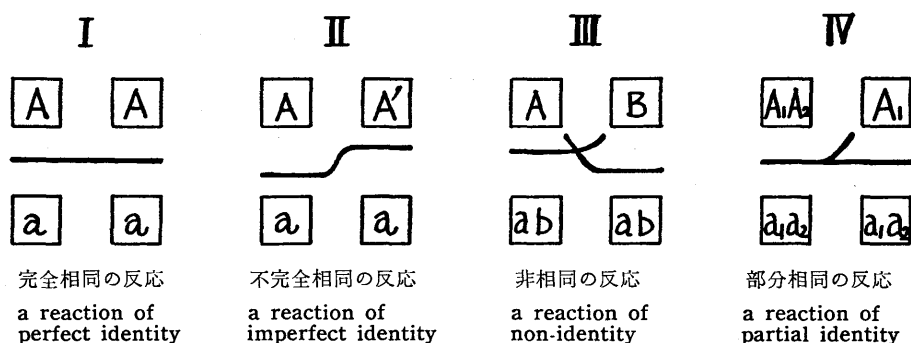
a, b, a₁, a₂: 抗体 (antibodies)

がまったく同じ場合であり、interference phenomenon, looping または、coalescence

などによばれる。2は2種の抗原がまったく異なる抗原の場合であって、3は両者の抗原成分の間に共通的な成分の存在がある場合であるとされる。spurを生じている。すなわち抗原の部分相同の場合である。これらの方法、理論および応用に関しては、すぐれた総説や著書がある^{124) 12) 167) 29) 18)}。

しかしながら、これら新しいテクニックを用いても必ずしもその抗原の分析が容易であるというのではなく、吸収法の併用、電気泳動によるその援用を試みるなどのいろいろな手段も必要な部分がある。

この方法によって、福島、松井 (1959) は、はじめてインゲン類、カボチャ類、柑キツ類の種間並びに種内差異の血清学的定義づけに成功し³⁹⁾、松井 (1959) は、この OCHTERLONY 法の改良を試み、彼のいわゆる松井の変法を発表し^{153) 154)}、これにより抗原蛋白質の相対的定量をも可能ならしめるに至った。また、電気泳動 (zone-electrophoresis) の作用と二重拡散法とを組み合わせた方法 (immuno-electrophoresis) によって、分析能の一層の向上をはかっている。ここにおよんで、各種抗原相互間の類縁関係の判別は、より一層容易なものとなったのである。



第 3 図 松井の変法による沈降線の模式図

Fig. 3. Diagrammatic representation of the precipitate patterns according to the T. Matsui's method (modified Ouchterlony's)

A, A', A_1, A_2, B : 抗原 (antigens), a, b, a_1, a_2 : 抗体 (antibodies)

松井の変法 (第 3 図) は、シャーレ中の寒天ゲル層のクボミの数を 4 個にし、相同を完全相同と不完全相同とに分けている。第 3 図は、上部に各抗原 A, B, 下部にそのいずれかの抗血清を入れた場合の松井の変法の模式図である。1 は、二重の沈降線が一つに合している。したがって質量共に相等しい場合で、相同を示す。2 は沈降線が曲っている場合であって、成分の量的差異を意味し、不完全相同の場合である。3 はお互いに交叉した場合で、質的にことなることを意味し、非相同の場合である。4 は一方の反応帯に他が入り込むような場合で、両者に共通の成分があることを意味し、部分相同の場合である。松井は、この 4 つの判別法を基本として、各種抗原抗体反応による類縁関係の判別をおこなっている。かくしてこの二重拡散法は、すべて、あまりその分析能の感度や精度を落とすことなく小型化されるに至り、微量の試料で分析ができるようになり、その応用はますます広められた¹⁶⁹⁾。

以上、寒天ゲル内拡散法には、いろいろのものがあることをのべたが、これらを次のよ

うに分類することができるようである。

まず、拡散する因子が幾つかという立場からすると、

単純拡散法 (simple diffusion)

抗原か抗体のどちらかがゲルと共存しているところへ他の因子が拡散してゆく場合

二重拡散法 (double diffusion)

抗原と抗体が共にこれらの反応因子を含まないゲル内を拡散して行って反応する形式

反応因子が直線的 (一次元的) に拡散するか、平面的 (二次元的) に拡散するかで、

一次元拡散 (diffusion in one dimension)

二次元拡散 (diffusion in two dimension)

拡散容器の種類によると、

試験管法 (一次元拡散)

平板法

となる。したがって、OUDIN 法は、一次元単純拡散法 (試験管法)、OUCHTERLONY 法は二次元あるいは一次元二重拡散法 (平板法) となり、松井の変法は、二次元二重拡散法 (平板法) ということになる。

伊藤、福島、松井 (1959)⁵⁵⁾ は、松井の変法を用いて、*Phaseolus vulgaris L.* の各品種、異種の *P. chrysanthos Savi.* 異属の *Arachis hypogaea L.*, *vicia faba L.* を用いて品種分化の検討をおこなった。抗原は各脱脂種子粉末の生理的食塩水抽出液を用い、その蛋白質濃度は一定、抗血清は家兎耳静脈注射によっている。その結果、抗 *P. vulgaris L.* 家兎血清に対する *P. vulgaris L.*, *P. chrysanthos* 各抗原の沈降線図は、種特有の major line を現わさないが、かすかに 2 本の minor line を共有する。すなわち *P. vulgaris L.* の抗原と *P. chrysanthos Savi.* の抗原は、major line を生じる蛋白質 (major component) を共有しないで、属のことなるものとの比較においても同様のことをみとめている。

また、伊藤、福島、松井 (1959)⁵⁶⁾ は、抗金時家兎血清を用いて、金時 (*P. vulgaris var. "Kintoki"*) 抗原とアメリカ (*P. vulgaris var. "America"*) 抗原の松井の変法による実験をおこない、金時抗原とアメリカ抗原はその種に特有な major line を共有し、minor line も共有しているが、3 本の minor line のうちの 1 本の沈降線が不完全相同の反応をあきらかに示して、この沈降線を生じる蛋白質をアメリカ抗原が金時抗原よりも多く含んでいることをみとめた。その他の品種間の比較においても同様に、major component (種特有の major line を現はす蛋白質) を共有し、minor c. (minor line を現わす蛋白質) も共有するが、量的差異がみとめられた。よって、この変法を用いることにより、これらの各品種を識別することが可能であるという。

ここに至って、はじめて種間差異と種内差異との血清学的差異をあきらかにすることができたのである。

次いで、福島、松井、宮崎 (1960)⁴⁰⁾ は、この松井の変法、定義の追試をカボチャの *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, *C. maxima* の 3 種と *C. pepo* の 3 品種を用いておこない、彼の説の正しいことをみとめるに至っている。

さらに、福島、松井、宮崎 (1965) は、*Cucurbita pepo*, *C. moschata* および *C. maxima* の脱脂種子粉末の pH8.5 リン酸緩衝液抽出液を免疫原として、アジュバント法によりこれら3種の家兎抗血清を作り、抗原にはウリ科作物の各属 *Benincasa hispida*, *Citrullus vulgaris*, *Cucumis melo*, *C. sativus*, *Legenaria vulgaris*, *Luffa cylindrica*, *Momordica Charantia* のおのおのの脱脂種子粉末の pH8.5 リン酸緩衝液の抽出液を用いて松井の変法により寒天ゲル内沈降反応をおこない、カボチャ属に対するウリ科各属の類縁関係をしらべた⁴⁵⁾。その結果、カボチャ属種子の蛋白質組成にはウリ科の他属に見いだされない特有の蛋白質成分の存在をみとめている。また属が異なれば、蛋白質組成にあきらかな質的差異をみとめている。

福島、松井、森本 (1963)⁴¹⁾ は、ミカン類において実験をおこない、これらの類縁関係をあきらかにした。このミカン類は、各属共に自由に交配することから、林学におけるマツ類の場合と同様、むずかしい問題が内在する。

福島、松井、江口 (1963) は、分化の様相をあきらかにする一段階として F₁ 雑種植物における種子の蛋白質組成が両親に比し、いかに変化するかを血清学的にしらべた⁴⁴⁾。材料は、キュウリの品種、山東×落合1号の F₁ で、その脱脂種子粉末のリン酸緩衝液 (pH 8.51/30M) の抽出液を濃縮、凍結乾燥したものを抗原とし、F₁ 抗血清を作り検した。その結果、F₁ 抗原の蛋白質組成は両親の抗原の蛋白質組成と比較して、ある蛋白成分に関してかなりの量的差異が生じていることをみとめた。なお、吸収法を用いて、F₁ 抗原には新しい蛋白成分が生じていないことをみとめている。

さらに、福島、松井、江口 (1963) は、免疫電気泳動法を用いて上記の結果をたしかめた⁴²⁾。すなわち、山東抗原、F₁ 抗原、落合抗原を並べて泳動し、泳動後各溝に抗 F₁ 家兎血清を入れて反応させると、沈降線を生じて、両親の抗原と F₁ の抗原との間に、ある蛋白成分に関して量的差異が存在することがあきらかになった。また、吸収法を用いて F₁ 抗原に新しい蛋白成分が生じていないことをみとめた。以上、彼らは雑種 (種内) F₁ においては、両親と種子の蛋白質の組成が、ある蛋白成分に関して量的にことなることをみとめているが、一方、IRWIN ら (1936)⁵¹⁾ は、ハトの種間雑種を用いて、雑種 F₁ に両親には存在しない Hybrid substance と称する抗原成分の生じることを報告している。以上のことについての詳述は、福島 (1965)⁴⁹⁾ および松井 (1963)¹⁵⁴⁾ の報告がある。

G.A.H. ELTON と J.A.D. EWART (1963) は、次のような各種穀類の粉末の蛋白抽出液を比較している²⁰⁾。

Wheat (*Triticum vulgare*)

Bison, Conley, Jufy, Red Chief, Rescue, Wichta, Manitoba No. 2, *durum*

Barley

Maize

Oat

Rye

まず、粉末を 0.1% 塩化ナトリウム液でこね、高速攪拌器で 10 分、0.01N 酢酸で離散、遠心分離、上澄を一夜放置、そののち 20,000 g で 1 時間遠沈、再び 23,000 g で遠沈、凍結乾燥という過程を経てグルテリンを用意し、抗血清は Manitoba No. 2 のグルテンに

対して産生された。これにより、*Triticum vulgare* の Bison, Conley, Jufy, Red chief, Rescue, Wichita および Manitoba No. 2 そして *Triticum durum* にはそれぞれ少なくとも 4 種類の免疫学的に類似したグルテン蛋白質を有すること。Rye には少なくとも 3 種類と、より小さなグルテン成分が含まれていること。Barley には二つの蛋白成分があること。Maize と Oat には、ある Wheat 蛋白と共通の構造上の特徴を有する一つの蛋白質を有し、なお反応はするが、その程度は低く、これは構造的に小さいためのようで、焼きにくいことと関係があるようだという。

福島、松井、江口、宮崎 (1964) は、アブラナ属の各「種」の葉蛋白質を血清学的方法によって比較し、基本ゲノム a, b および c の間では、b ゲノム「種」(*Brassica nigra*) は a ゲノム「種」および c ゲノム「種」に比較して、蛋白質成分が異なっていることをみとめている。ゲノム構成がともに aabb である *B. juncea* と *B. cernua* の間には蛋白質組成に量的差異があり、*B. carinata* (bbcc) の蛋白組成は b ゲノム「種」の *B. nigra* よりも c ゲノム「種」の *B. oleracea* に近く、*B. carinata* の構成ゲノムの b は *B. nigra* の b ゲノムとはかなりことなっているようであり、*B. tournefortii* は a ゲノムのものに含まれない蛋白質成分を含んでいることをみとめている⁴⁹⁾。

金子、阿部、細田 (1964) は、鶏血清蛋白質と卵黄蛋白質を OUCHTERLONY 法の寒天拡散法により比較検討し、産卵鶏血清およびエストロジェン処理鶏の血清中には雄鶏血清中に存在しない少なくとも 2 種の抗原性成分が含まれていることをあきらかにし、産卵鶏血清中の特異成分は卵黄中にも含まれることをあきらかにした⁶¹⁾。

坂口進 (1965) は、次のような報告をしている。アジュバント法により、トウモロコシの抗血清を得、アール当り子実量は戻し交雑が進むにつれて減少し、一方抗原抗体反応の沈殿物量は、戻し交雑が進むほど増加する傾向にあり、これは戻し交雑が進むほど、その交雑に用いられた親の因子が多くなり、系統間の類縁関係が近くなって、アール当り子実量は減少するが、抗原抗体反応の沈殿物量は増加することを示し、この場合アール当り子実量の減少程度は雑種強勢度の減少程度を示すものであって、抗原抗体反応の沈殿量の測定によって雑種強勢度を推定しうるものの可能性を示すものであるという。これは、浦野によってもたしかめられている。なお、また彼は OUCHTERLONY 法によって抗原分析をおこなっている。すなわち材料は母親として系統 191、父親として系統 189、その F₁、B₂、B₃、B₅ の 6 種類で、その各種組み合わせによって、次のような抗原分析をしている。

	抗原 189	抗原 191	抗原 F ₁
191	ABCEF	ABC	ABC
F ₁	ABCEF	ABCH	ABCJK
B ₂	ABC	ABCHI	ABCL
B ₃	ABC	ABCH	ABCLM
B ₅	ABCDG	ABC	ABCL
189	ABCDG	ABC	ABCLJK

すなわち、DG (L) は 189 系統に特有のものであり、E(J), F(K) は 191 に特有のものであるとし、M は両親にみられない新しい線であると考えられるとしている¹³³⁾。

以上の事実によって、従来非特異的の反応をも含むほか、反応の強弱のみによってその親

疎を判別し、抗原分析などまったく不可能であったものが可能となり、実用の域にまで発展をみるに至っている。

この新しいテクニックの活用、援用により、従来不明とされていた、あるいは単なる推定の域を出なかった多数の農林作物についても、その系統類縁関係を解明することが期待される。これからは、育種学的にみて、新品種造成のうえに、近縁野生種の有する有用遺伝子の導入が活潑に実施せられるであろうし、生産性の飛躍的な増大が期待され、その改良を通じて、この研究の成果が期待されている。

なおここで注意を要する点として、木村 (1964) は、二重拡散法による反応に及ぼす各種の因子の影響について論じている⁶⁵⁾。

a. クボミ間の距離について

短いと感度はよいが、複雑な系では不鮮明となるので、10~15mm が普通である。

b. 寒天濃度、pH、抗原と抗血清の濃度、温度について

抗原の pH、塩濃度がいちじるしくことなると、反応の結果が乱れたり、非特異的な輪状の白線をクボミの周囲に作るので、この場合は、抗原をあらかじめ透析するか、緩衝液に寒天をとかしたものをを用いる。著者の実験においても輪状の白線をクボミの周囲に作り、これがやはり抗原の pH、塩濃度のちがいによるものであるかを検したところ、これによるものではなかった。

c. 緩衝液の種類

リン酸緩衝液がとくにすぐれている。鮮明であり、分離能がよい。緩衝液がちがえば、沈降線のパターンもちがってくる。

d. Cd^{2+} , Ni^{2+} , La^{3+} .

これらを約 1/1000M寒天中に加えるか、反応後これらの液に寒天層を 5~10 分浸すと抗原と抗体の結合が促進され、感度は 4 倍上がる。このイオンは抗体側に作用するといわれる。

実験に際しては、以上の点を考慮する必要がある。

(3) 免疫電気泳動^{3) 60) 4) 169)} (immuno-electrophoresis)

溶液中に存在する荷電粒子に電場をかけると、その泳動がおこるという基礎的観察から、蛋白質その他の特徴をつかむのに有力な手段が発達し、また蛋白質の純度を定める物理化学的な基準の一つが生まれるに至った。すなわち、1937年に TISELIUS が彼の新しい電気泳動装置を完成し、血清がアルブミン、 α グロブリン、 β グロブリン、 γ グロブリンからなることを示した。わが国では、戦後 1947 年頃よりこの TISELIUS の装置が作られ、商品化をみるに至っている。この TISELIUS の装置その他に関する解説書は多数あり、R. A. ALBERTY (ed. H. NEURATH, K. BAILEY) (1953)¹²⁶⁾, M. BIER (1959)⁹⁰⁾, 渡辺, 宇井 (1954)¹⁶²⁾, 平井, 島尾 (1955)⁹⁶⁾ 等その他がある。

電気泳動には、次の三通りのものがある。

a. Schlieren optical system を利用する移動界面法, moving boundary method.

b. microscopic electrophoresis.

c. zone electrophoresis

これらのうち、TISELIUS のものは、a に相当し、c はその支持媒質が濾紙、デンブレンゲ

ル、デンプン粒、寒天ゲル、セルロースアセテート膜等さまざまである。血清学的研究に用いられるのは、このうち寒天ゲル、セルロースアセテートの二種類がその主体となっている。

特定の酵素蛋白質に注目して電気泳動的に解析をおこなった報告^{46) 47) 48)}があるが、これについての詳述は、福島(1965)⁴⁹⁾の報告がある。それによると、pH 7.0 のリン酸緩衝液(0.05 μ)およびP.V.P.を含む寒天ゲルを支持媒質とする方法¹⁰⁵⁾で、20V/cmの定電圧で120分間泳動している。

前述した拡散法では、各沈降線間の距離が非常に接近している場合には、その多数の抗原性物質を同定することが比較的むずかしい。そこで、GRABAR, WILLIAMS(1953)^{27) 28)}が、GORDON(1949)²⁾が考え出したゲルの中でおこなうzone electrophoresisとOUC-HTERLONYなどあいついで発表された寒天平板法でおこなう沈降反応とを組み合わせた方法、すなわち免疫電気泳動を導入してから、その解析の精度はいちじるしく高められるに至っている。各種蛋白質の異同をたしかめる手段として用いられ、いろいろの分野で実験が重ねられている⁸⁹⁾。この免疫電気泳動に関する詳述は、青木(1964)⁷⁾、木村(1964)⁶⁵⁾、八木(1960)¹⁶⁷⁾、山口(1963)¹⁶⁸⁾、電気泳動実験法(学会編)、松橋、白井(1964)⁸⁸⁾、SABCO Journal^{130) 129) 128)}の各刊等その他がある。

以上、電気泳動について、その概略を記したが、これは松井の変法による抗原抗体反応において鮮明な観察のできえなかったものにこれを適用することによって、より一層明瞭な判別をうることができると考えられる。

3. 主要林木の系統分化に関する血清学的研究

(1) 育林学的意義

前述したように、血清学的手法の林学の領域への導入は、沈降法によったMez, GOHLKE(1913)⁹¹⁾の研究をもって最初とされるようで、のち額額(1917)⁷³⁾、青木(1941)^{5) 6)}、MORITZ, 今井(1932)⁵²⁾、足立(1936)¹⁾、玄(1949)²³⁾等の研究をあげることができるが、これらはすべて従来の沈降法によったものであった。

寒天ゲル内抗原抗体反応による研究は、まだ林学の領域ではみあたらない。そこで著者は、松井の変法により、マツ類の種子蛋白質を材料として、その生理的食塩水抽出蛋白質液の家兎耳静脈注射により抗体をつくり、各種抗原、すなわち各種系統間の類縁関係の判別を試みてみた¹³¹⁾。その結果、あきらかにアカマツとクロマツ、およびアイノコマツは血清学的に異なるものであり、各種有名松のうち、茂道松がクロマツの最右翼であり、滑松がアカマツの最左翼であることを知った。これにより、寒天法の導入のきわめて有益かつ便利なものであるという結論をえたのである。

林業においては、主要林木(スギ、マツ類)には、多くのクローンや地方品種と称せられるものが知られているが、それらの類縁関係、ことに相互の系統関係については、ほとんど知られていない状態である。したがって、著者はこの主要林木たるスギ、マツについて松井の変法、電気泳動の活用により、その類縁関係をあきらかにすると共に、各樹種内における品種(気候品種、雑種を含む)相互間の関係を究明して分化の様相を知り、あわせて林木育種上の諸問題追究の際の参考に供したいというのが初期の目的である。

(2) 歴史的研究と応用の可能性

林木の場合には、他のソサイ類と比べて、その材料の面からいうならば、ことにスギの葉の場合、その組織に多量に含まれているポリフェノール類酸化酵素のために蛋白質の抽出がむずかしいこと、またマツ種子中にはその種子粉末食塩水抽出液中に低分子物質が多量に含まれており、これは透析によってとりのぞくことに成功はしたものの、一方透析によって蛋白質の変性を招来したり、そこに非常な困難な点が内在することを知った。しかしながら、蛋白質の抽出の段階で、これらの問題すなわち変性の回避、濃縮などのむずかしい問題が加わるが、これらを解決することができれば、各種林業樹種の場合においても、この寒天ゲル内抗原抗体反応の応用は可能であるといつてよいようである。

林木の領域においては、上記のようないろいろなむずかしい問題のほかに、各組織に油脂分が多く含まれていること、さらには材料とする組織、たとえば葉、種子、根端細胞など各組織においてそれぞれその油脂分および他の成分、水分含量などにおいてことなるものであるし、おのずと組織ごとに蛋白質の抽出の過程でことなつた方法を採用しなければならない。すなわち一様な操作では蛋白質の抽出が不可能であることなどを考慮しなければならない。したがって、この血清学的手法を樹木類に應用する際には、その材料とする蛋白質の所属する組織の面からすれば、その應用の可能性にもいろいろのものがあるわけで、その組織ごとの應用限界、應用の可否といったものについて著者の予備實驗を通して少しふれてみたい。

a. 花粉を用いる場合

MAGNUS, FRIEDENTHAL (1907)⁸⁵⁾, DUNBAR, W. P. (1910)¹⁹⁾, 青木 (1941)⁵⁾⁶⁾ などの研究がある。マツ類の花粉を用いて、その加重曹食塩水による抽出液によって抗体を産生させた例がある。

著者は、アカマツ、アイアカマツ、アイマツ、アイグロマツ、クロマツといった一連のマツ類の花粉をあつめ、その花粉採集木の外部形態並びに顕微鏡による識別と血清学的手法による判別とが、はたして相関性の高いものであるのかどうかを検しようとし、考えられるあらゆる方法をもって、その蛋白質の抽出につとめたが、親木一本からえられる花粉から抽出された蛋白質の量は非常に少なく、實驗をおこないえなかつた。そこで、実際に花粉にはどの程度の窒素量が含まれているかをしらべたところ、花粉 1g あたり、窒素量 19.4 mg もの多量の窒素を含んでいることがわかつた。すなわち著者の實驗においては、これらのうち一部しか抽出できなかつたことになる。ことにマツ類の花粉はスギのそれに比べて、その破碎がむずかしく、著者は花粉を生理的食塩水に一夜浸し、凍結融解を3回繰り返して、さらに海砂と共に乳鉢で破碎して、濾過抽出をしたり、またリン酸緩衝液 (pH 8.0, 1/10~1/30 M) によるホモギナイザー、乳鉢、凍結融解の援用による抽出をおこなつたりしてみたが、破碎の段階でまだ十分に磨碎されていないことがみとめられ、所期の1/2~1/3量の蛋白質の抽出しか可能でなかつた。マツは、1本の木からの花粉の量には限りがあり、当然、花粉を材料とするならば多数の親木からあつめた花粉を合して供試するしかないことになり、むしろ種子蛋白質の抽出容易であるところから、花粉を材料としての實驗を中止するに至つた。

b. 葉を用いる場合

ソサイ類に関しては、北条氏 (1931)³⁷⁾ その他多数の報告があるが、林木の葉の蛋白質

に関する研究は皆無である。林木の葉、ことに針葉樹の葉組織は、周知のとおり油脂分が多量に含まれ、その他多数の蛋白質以外の高分子物質が内在する。一般に葉蛋白質には細胞質蛋白質 (cytoplasmic protein) と葉緑体蛋白質 (chloroplasmic protein) と核蛋白質 (Nucleoprotein) とがあり、このうち葉緑体蛋白質は、リピドと結合して、色素 (クロロフィル) とも強く結合している。したがって、この蛋白質はリピドと色素との結合を切ってとり出すことはむずかしいものとされている。しかしながら、窒素の定量はできる (アルカリ性エタノールで煮沸して可溶にしたもの)。したがって、著者はこの細胞質蛋白質の抽出に目的をおき諸種の実験を試みてみたが、葉組織からの蛋白質の抽出は不可能である。

まず第一に考えられるのは、葉組織中に多量に存在するポリフェノール類酸化酵素が試料の調整の当初において酸化作用をおこし、組織が褐色化あるいは黒変化する現象がみとめられる。これは、リンゴの果実とかジャガイモなどにもみとめられるものであって、これが可溶性蛋白質の抽出を困難なものにしているといえるようである。蛋白質の変性の原因ともなり、また酵素活性の低下をきたす原因ともなる¹⁴³⁾。

この酸化酵素の作用を阻害するために、試料の調製の過程で、Cyanide, thiourea, dithiocarbamate といったポリフェノール酸化酵素阻害剤を加えたり、アスコルビン酸を加えたりするが、これは蛋白質の変性を招来することがあるといわれる¹⁴³⁾。

近年、タバコ葉中の蛋白質を窒素気流中で嫌氣的に処理して分離する報告が出されている⁷¹⁾。また、葉中のセンイ、珪酸質その他の高分子物質は蛋白質の抽出自体をいちじるしく困難にするといわれる。

これらのことから、葉組織中の蛋白質の抽出は、その抽出操作をすべて嫌氣的におこなうならば、あるいはのぞみがあるのかもしれない。しかし実際問題として、最後まで嫌氣的におこなうことはできないことであって、蛋白質の抽出は断念せざるをえなかった。

マツ、スギの葉組織でなく、他の広葉樹類の葉組織の蛋白質なら抽出は割合に容易であろうと考えられる。

c. 根を用いる場合

葉組織に対しておこなった諸種の予備実験を、根端細胞 (スギの) の細胞質蛋白質を抽出する目的で、同じように実験をおこなってみた。しかし葉と同様、蛋白質の抽出は不可能であった。むしろ、蛋白質の検出ができなかったということである。

一般に、根には蛋白質はわずかしき含まれていないものと考えられる。

なお、GELL ら (1960)²²⁾ は、バレイショの根茎ジュースを抗原として、メキシコおよび南アメリカ産バレイショの多数の種の分類に寒天ゲルを用い、ある蛋白成分は、同じ属内のすべての種に共通であり、ある蛋白成分は一つの種、あるいはごく近縁な種のみにも共通であることを報告している。これは、根茎ジュースの蛋白組成の比較である。

d. 形成層を用いる場合

これについては実験をおこなっていない。

なお、木材の蛋白質を直接定量した報告はみられないし、まして酵素量などを測定したものはみあたらないようである。一般には、材中の窒素を定量し、これに一定の係数を掛

けて総蛋白量として推定されているにすぎない。これによって、マツについて測定された報告⁷⁶⁾によると、その横断面における蛋白質の分布は、呼吸作用の旺盛な形成層附近で蛋白質の含量が高く、心材に向かって減少し、心材中央でまた若干の増加をみている。同様な傾向を NICKEL も認めているようである¹⁴⁴⁾。

したがって、形成層においてはあるいは可能性があるのかもしれない。

なお、近藤⁷⁶⁾によると、有機物質抽出時のその不溶性化の原因について推論し、これは可溶性蛋白質が処理時に不溶化すると共に、もともと細胞壁に固着した酵素蛋白のためと考えられるとしている。見いだされるアミノ酸は、そのほとんどがすべて蛋白質の構成アミノ酸であるといわれる。

e. 種子蛋白質を材料とする場合

Mez, C. (1913)⁹¹⁾, GOHLKE, 纈纈 (1917)⁷³⁾, 小島 (1921)⁷²⁾, MORITZ, 今井 (1932)⁵²⁾; 玄 (1949)^{23), 138)} など、沈降法その他によった研究がある。玄信圭 (1949) は、日本におけるクリの栽培大果種品種 (*Castanea crenata* S. et Z. forma *gigantea*) たるバンセキおよびシモカツギの2種、野生シバグリ (*Castanea crenata* var. *Kusakuri Nakai*) およびシナグリ (*C. Bungeana* Bl.) の4種を免疫原用として、その果実の生理的食塩水抽出液をもって家兎の耳静脈注射により抗体を産生させ、そのえられた抗血清について、上記4種のほか、オサヤ、ギンヨセ、ケナガ、カノツメ、ガンネ、スズナリ、チョウコウジ等の大果種クリ品種およびカンジュウグリ (*C. Bungeana* Bl.) 並びにチョウセングリ (*C. crenata* var. *dulcis* Nakai) の合計13種の果実の生理的食塩水抽出液を抗原として反応させ、沈降法および抗血清の試験管内飽和吸収法による沈降試験により、それら相互間の類縁関係を研究した。その結果、沈降試験では判然たる区別がなかったが、試験用抽出液の稀釈度を細分して試験することによりやや類縁反応に差異を生じ、さらに抗血清に飽和吸収処理を施すことによって、その特異性を増し、よって品種間の識別をある程度あきらかにすることができた。

元来、種子にあっては、他の組織たとえば葉などと比べて、その蛋白質の含量は非常に多く、かつ可溶性蛋白質の抽出も比較的容易であるわけで、ことにクリとかマツにおいては、そのサイズも大であることから便利である。

ここで、マツ類種子の蛋白質に関する研究は、従来ほとんどみあたらない。勝田 (1959) によって、マツ類種子の成熟ならびに発芽過程に関する生理学的研究と題する種子蛋白質の変遷についての報告⁶³⁾がある。

材料は *P. Thunbergii* と *P. densiflora* の種子で、種子の成熟過程における蛋白質の変遷と発芽過程における蛋白質の変遷とに分けて、その両者についてのべてある。

イ. マツ類の種子蛋白質について

クロマツ、アカマツの成熟した種子の蛋白質構成は、両者ともきわめて似ている。その共通の特色は、まずグルテリンの含量が大であること、プロラミンはほとんどないこと。グルテリンの含量はアルブミンのそれよりも大きく、グルテリンの総蛋白質乾重あたりの重量パーセント 23.7% (アカマツ), 18.3% (クロマツ) に対して、アルブミンは 8.1% (アカマツ), 5.1% (クロマツ) となっている。グロブリンは 5.7% (アカマツ), 3.4% (クロマツ) であり、アカマツ、クロマツ共にその胚乳の蛋白質構成をみると、グルテリ

ン、グロブリンの大部分が胚乳に存在している（発芽の初期において）。

一方、アルブミンは胚の全蛋白質の80%以上を占めている。ただし、種子全体に含まれるアルブミンの28%強で、胚乳にももちろん相当量含まれている。

ロ．発芽過程における蛋白質の変遷について

（胚の蛋白質）

総蛋白質

発芽と共にいちじるしく増大する。乾物量に対する比率は、発芽過程を通じて、ほぼ一定の値（25～30%）をとる。

アルブミン

発芽過程の種子の胚では、アルブミンがその主要蛋白質である。発芽過程を通じて増大する。

グルテリン

成熟種子の胚で、微量だったものが、幼植物となると急に形成される。これは、蛋白質の再合成が、まずグルテリンの形をとるのであろう。

（胚乳の蛋白質）

総蛋白質

発芽後、急に減少分解される。

アルブミン

発芽後、減少をみる。

グロブリン

ほぼ一定であるが、終期に大部分が分解をみるに至る。

グルテリン

総蛋白質の68%弱を占めるが、発芽後急に減少をきたすようになり、その96%強が分解されるようになる。

（種子全体の総蛋白質）

初期に一定、発芽後減少（胚乳の分解と、胚における再合成のともなわないことによる）、のち再び一定（分解、合成の平行）となるといわれる。

これによって、マツ類種子は、グルテリン、アルブミン、グロブリンを完全に共有し、そのおのおのの含有量は、アカマツ、クロマツにおいて大差がみとめられないことがわかる。ことに抗体産生の立場からすれば、アルブミン、グロブリンを含んでいることで満足されることになる。

裸子植物では、胚乳ではなく胚だけがその雑種の特性を有するので、交雑でとれた種子全体では、雑種の特性を表わすことが比較的弱まる。すなわち、雑種々子は、母親の形質をより多く有していることに注意を要するが、マツ類のように、種子の比較的小さいものにおいては、胚と胚乳の分離がむずかしい。したがって本実験では、胚と胚乳との区別はしていない。雑種性の検討をしたいときには、発芽処理種子を材料とするのが合理的かつ必要条件であると考えられる。MORITZ (1957) もこのことをみとめ¹⁰⁷⁾ ているし、また佐藤¹⁸⁶⁾ もみとめている。

あるいは雑種性の問題を追究するには、その F₁ を育苗育成することによって、F₂ 種

子を用いて遺伝学的に検討するのも一法である。すなわち、この際には発芽処理といった手間は必要でない。

以上、いろいろな歴史的研究並びに著者の予備実験を通して、血清学的研究の応用の可能性についてその材料の点からのべてきたが、マツ等にあつてはその種子が材料としてすぐれているようである。

第 2 部 種子の貯蔵、発芽過程ならびに放射線照射における 蛋白質の質的量的変化に関する研究

1. 育林学的意義

休眠中の種子でも、わずかながら絶えず呼吸がおこなわれており、そのために常に種子内では化学変化と物質の消耗がおこなわれている。消耗と変質とがある限界に達すると、ついには全く発芽力を失うようになる。その限界が種子の寿命である。種子の貯蔵条件は発芽力に影響を与えるもので、一般に高温多湿は種子の呼吸消耗を早める。周知のように、林業においては、普通採種後翌春までのタネの貯蔵が必要であるし、また多くの樹種は毎年同じように品質の良いタネが生産されるというわけのものでもないこと、豊作年に採種したタネを貯蔵してその後数年間における需要にそなえる要があることなどにより貯蔵の必要性がある。貯蔵すると発芽率の低下を招来するが、それが蛋白質的にはどうなのか。

また、種子に水分が与えられると、種子の胚内部や胚乳組織内または子葉内の栄養物質が動き出すようになる。この吸水によって起こる種子内の化学反応は、酵素の関与するところの諸物質の分解と再合成とであるとされ、膨潤による吸水の結果、各種の酵素が活性化し、増加をきたし、澱粉、蛋白質、脂肪、セニ素などの分解が起こることとなる。たとえば、蛋白質はプロテアーゼ類によって分解され、発芽に用いられるに至る。マツは、置床後1～2日間にいちじるしい重量の増加をきたす。これと同時に、諸種の蛋白質の変遷がおこるが、それがどの成分においてもっともすみやかに起こるのか。かつ量的な変化、質的な変化など、生理学的に興味のある問題である。

次に、種子に Co^{60} から出る強いガンマー線を照射すると、その種子は発芽率の低下をきたすことが従来多くの研究者によってみとめられてきた。この Co^{60} の照射によっていかなる変化が種子蛋白質におこるものか。これに関する研究はまだみあたらないようだ。

こういったさまざまなマツ種子に関する問題を、その蛋白質のレベルで究明してみた。

2. 貯蔵に関する研究

(1) 貯蔵種子の特性

小山 (1920) は、スギ、アカマツなどのタネを冷蔵庫 (2℃内外) 並びに室内貯蔵して、かつ密封したものと綿栓したものとに分けて、種子発芽力保存年限を比較し、低温貯蔵 (2℃内外) が有効であり、密封貯蔵が有利であることを報告している⁷⁸⁾。

近藤 (1936) は、種子を布袋に入れて室内につるしておき、毎年定期的に発芽試験をおこない、しだいに発芽率は低下をしながらも、5年後にもなお若干の発芽率を示すことをみとめ、またガラスビンに入れて密封した場合には、さらに寿命の伸ばしうることをあきらかにしている⁷⁵⁾。

小山は、種子の乾燥度も種子の寿命に影響し、4～7%の水分を除去する程度が最適で