

## 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 :

## 摘 要

本研究は、マツ属の種子蛋白質の種属特異性による系統類縁関係その他に関して、血清学的手法で検討したもので、5部において論じた。

### 第1部 蛋白質の血清学的種属特異性とその応用

血清学的手法を植物分類学に応用したのは決して新しいものではなく、古く KOWARSKI (1901)をもってその最初とされ、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。

しかしながら、当時のテクニックは、抗血清に抗原を重層するといういわゆる沈降法で、まだまだ多くの欠点を有していたためにやがてはこの研究も衰退の一途をたどるに至った。

このような事情のなかで、それから約40年後の近年になって、1946年にフランスの OUDIN がはじめて彼の寒天ゲル内拡散法を発表し、翌1947年には OUCHTERLONY の二重拡散法が紹介されるに及んで、ここに数段の方法論上の進歩をとげ、新活路を開くに至った。

さらに、松井は1959年に、この OUCHTERLONY 法の改良を試み、彼のいわゆる松井の変法を発表し、これによって抗原蛋白質の相対的定量をも可能ならしめるに至った。各種抗原相互間の類縁関係の判別は、よりいっそう容易なものとなった。そのうち、この松井の変法は、植物の系統類縁関係に関する研究に適していることが多くの研究者によってたしかめられている。

なお、OUCHTERLONY 法など、あいついで発表された寒天ゲル平板法でおこなう反応(double diffusion)と、電気泳動とを組み合わせたいわゆる免疫電気泳動法の活用によって、蛋白質の量的質的差異の検定は、よりいっそう明瞭にできるようになった。

こういう寒天ゲル内抗原抗体反応法の発展のなかで、主要林木の系統類縁関係に関する研究は、従来の沈降法によった MEZ, GOHLKE (1913)の研究をもってその最初とされるが、寒天ゲル内抗原抗体反応による研究は、まだみあたらない。そこで、著者は、この改良されたテクニックを、マツ属の系統類縁関係の判別の目的に採用した。

著者はさきの報告において、この改良されたテクニックが、日本産有名松類の系統類縁関係に関する研究に適しており、かつ種子蛋白質がその研究材料としてふさわしいことを認めるに至った。

### 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 貯蔵に関する研究

種子の貯蔵によって、種子内では常に化学変化と物質の消耗がおこる。この消耗と変化とがある限界に達するとまったく発芽力は失われる。その際どの蛋白質成分から消耗がはじまるものかを検し、血清学的手法に採用される材料としての資格の有無についてしらべた。

材料は茂道松の種子で、1963年度結実種子を1965年5月まで貯蔵したもの、1964年度結実種子を1965年2月まで貯蔵したもの、1965年度結実種子を直ちに供試したものの3種類である。

各種子をミンチで細断、乳鉢で破碎、石油エーテルで12時間脱脂後、エーテルを除去、

粉末状とし、この一定量の粉末にリン酸緩衝液 (pH 7.5 1/30 M) を加えて一夜抽出濾過、その濾液を硫酸により逆透析、しかるのち上記抽出に用いたものと同じ緩衝液を外液にして48時間 Visking tube により透析をおこない、凍結乾燥した。この場合常に全操作は冷所でおこなった。この乾燥粉末に一定量の蒸留水を加えてこれを抗原液として用いた。各抗原液の総窒素量は、Micro-Kjeldahl 法によって測定され、各抗原液の総蛋白質量が決定され、供試される際に二つの抗原液はおたがいにその蛋白質量を等しくされた。

抗体産生用動物は家兎で、体重 2 kg を越える家兎5匹を用意した。免疫原は、上記材料のうち、1964年度結実種子の蛋白質とした。抗体の産生は、FREUND のアジュバント法によっておこなった。すなわち油中水エマルジョンの大腿部筋肉内注射によっておこなった。1回の注射で、その蛋白質にして 50mg とし、第1回の注射後、14日後にも注射し、第2回の注射後28日後にさらに1回の注射をおこない、それから10日後に全採血をおこなった。1回の注射液の量は 2 cc におさえた。全採血をしてから、その血液は凝固され、遠心分離され、純化された。血清は非動化され、1%窒化ソーダ液を 0.1%濃度になるように加えられ、冷所に貯えられた。これが供試抗血清である。

用いられた血清学的手法は、松井の変法による寒天ゲル内抗原抗体反応法である。抗原はすべてクボミに蛋白質量 3mg の液 0.2ml をあて、下の抗体用のクボミには抗血清 0.2 ml を入れて反応をおこなわせた。37°C 下におかれた。寒天プレートにセットしてから 19 日後に調査し検討した。

寒天ゲル内抗原抗体反応のパターンは、第4図に示すとおりで、貯蔵期間の長い方の材料においては、まず minor line において量的に減少をきたし、次いで major line に相当する成分の量的減少を伴うことが認められた。

## 2. 発芽過程に関する研究

供試材料は茂道松種子で、播種後2日目、4日目、8日目に1部ずつ回収し、それぞれ抗原液の作成をおこなった。2日目と4日目の回収分は、前実験と同様の操作で抗原液の作成をおこなったが、8日目のものはすでに子葉の展開がみられたので次のようにして抗原液の作成を試みた。回収後直ちに洗滌、凍結させ、破砕させ、リン酸緩衝液 (pH 7.5 1/30M) を加えながら磨砕、抽出、濾過、その濾液を超遠心分離 (25000g) し、その残基を捨て去り、その上澄液を凍結乾燥して抗原とした。

抗血清は、前実験において用いたものを使用した。

この抗原液と抗血清による寒天ゲル内抗原抗体反応のパターンは、第5図に示すとおりで、2日目と4日目においては、無処理と比較して、major line はおたがいに共有するが、minor line は量的に少なくなるものがあり、一方増加の認められるものもあった。8日目になると、major line, minor line とともに量的には少なくなり、質的には異なるものとなることがみとめられた。一方、minor line においてその本数が増加をきたした。これにより、種子に水分が与えられると、膨潤による吸水の結果、胚乳の蛋白質は酵素により分解を受けるが、その順序はいわゆる mine line に相当する蛋白質成分がまず分解消化され、次いで major line を形づくる蛋白質成分が分解されることがわかった。ただし、胚においては、寒天ゲル内反応で minor line に相当するものが急に増加をきたすことがわかった。

### 3. 放射線照射に関する研究

休眠マツ種子について、その放射線照射が、発芽率を低下させる事実を、蛋白質のレベルで検した。

材料は茂道松の種子で、放射線の照射は、30KR, 18KR, 12KR, 6KR, 2KRの5段階とした。照射時の含水率は11.2~12.8%であった。

これらの各抗原液は、前述の実験と同様な操作法によって作成された。抗血清は、すでに得られた茂道松の抗血清を用いた。

これらの抗原液と抗血清による寒天ゲル中での抗原抗体反応の各種パターンは、第7図に示したとおりである。すなわち2KR, 6KRにおいては無照射のものとは比べるとき蛋白質成分に量的質的差異はみとめられなかった。12KR, 18KRにおいてはminor lineの量的増加をきたすものが認められ、30KRになると、minor lineにおいては無照射のものと同様のパターンにもどり、major lineにおいて1部量的差異をきたすことが認められた。このことから、18KRまではこのminor lineにおける特異的成分の量的増加と発芽率とは逆相関のあることが認められた。

### 第3部 マツ属の種間差異に関する研究

#### 1. 種間雑種に関する研究

韓国の玄信圭は、*Pinus rigida* × *P. taeda* で、リギダマツの耐寒性とテーダマツの生長旺盛とをとり入れたF<sub>1</sub>を作り出し、これを*P. rigitaeda*と名づけたが、これを材料としてとりあげ、雑種種子の蛋白質の特異性によって、雑種強勢の特異性について検した。

材料としたものは、

*P. rigitaeda* : 産地 Osan, Kyunggido, Korea

採種 1965年9月24日

母樹 10年生

*P. taeda* : 産地 South Carolina, U.S.A.

採種 1964年9月

*P. rigida* : 産地 Osan, Kyunggido, Korea

採種 1965年9月25日

母樹 10年生

の種子である。

抗原液の作成および抗血清の産生は、すべて前実験の操作にしたがっておこなった。なお抗血清は*P. rigida*の抗血清が用意された。

これら抗原液と抗血清による寒天ゲル内抗原抗体反応のパターンは、第11図に示した。これによると、*Pinus rigitaeda*においては、そのmajor lineは*P. taeda*とすこぶる類似したものであり、*P. rigida*とは量的な増加をきたしたような様相を示し、*P. rigitaeda*には、その両親にはない特異的な成分の存在がみとめられた。

このことから、*P. rigitaeda*はその父親である*P. taeda*と蛋白質のレベルで相同性の高いものであって、比較的父親の形質を受けついでいることがわかった。

#### 2. マツ属の種間差異に関する研究

ここでは、マツ類のうちすべてその種を異にするもののみをあつめ、実験に供し、その

血清学的類縁関係のうち、種間差異をみるために実験をおこなった。

材料は、5葉松から6種、2葉松から12種をえらび、このうち抗血清の作成をおこなったのは、2葉松のなかで *Pinus ponderosa*, *P. Banksiana*, *P. sylvestris*, *P. densiflora*, *P. Thunbergii* の5種、5葉松のなかで *P. monticola*, *P. pumila* の2種であった。

これら各種の種子蛋白質による抗原液、抗血清の作成は、すべて前述のとおりとした。

各種抗原と抗血清とを松井の変法にしたがって、寒天プレートにセットしたところ、第14~20図に示したようなパターンが得られた。これらのパターンを解析した結果は、第1表に示すとおりであった。

マツ類の外部形態並びに内部形態の識別による分類方式は種々あるが、そのなかで特に W. DALLIMORE, A. B. JACKSON による分類方式、また W. M. Harlow による分類方式とよく一致する結果をえた。なかでも JAMES, W. HARDIN 等による Soft pine と Hard pine の分類とよく一致をみ、血清学的種属特異性による類縁関係は、その材質と高い相関があることが認められた。

総じて2針葉類、3針葉類、5針葉類といったグループ分けは、血清学的にもこれと類似の現象がみとめられたが、*P. Banksiana* のような例外もあった。

接木親和性との相関もある程度認められた。

#### 第4部 邦産2葉松の種間差異に関する研究

##### 1. アカマツ、アイマツ、クロマツについて

材料は、1963年の秋に長崎県の島原半島一帯で、個樹ごとに採種し、その種子蛋白質の種属特異性と外部形態との相関を検した。これら採種された母樹の形態学的判定は、第9表のとおりであった。このうち4番目のアカマツ、5番目のアイマツ、19番目のクロマツをえらんで供試した。

抗原液の作成法は、前述のとおりで、抗血清の作成は、クロマツとしての茂道松、アカマツとしての侍浜松の2種類について、やはり同じ操作によって作成した。

各種抗原抗体反応のパターンは、第24~27図のようになった。第24図の1~3図は茂道松の抗血清に対する反応図であり、第26図の1~3図は、侍浜松の抗血清に対する反応図である。第24図において、茂道松とアイマツの反応の比較で1本の spur がみとめられ、茂道松とアカマツの比較において、2本の spur を生じた。第26図においてはなんら差異は認められなかった。

この結果、各種マツ類の血清学的種属特異性による判別は、クロマツに対する血清学的類縁性は、その形態との相関が高く、アカマツに対するものは、相関性の低いことがわかった。

##### 2. 種と環境の差について

供試材料は、村井らによって提唱されたミヤマアカマツであって、むつ川内営林署管内矢立山国有林、35か林分(海拔高180m)より採集したものをを用いた。その母樹の外部形態的判定はアカマツであった。佐藤らの判定法によると2に相当し、比較に用いた侍浜松は5、東山松は4、津島松は3、滑松は0、茂道松は23であった。

抗原液の作成は、前述の実験におけるものと同じ方法でおこない、抗血清は前述の実験において用いられた茂道松と侍浜松の抗血清を用いた。

これらの抗原液と抗血清による寒天ゲル内抗原抗体反応のパターンは、第28図に示すとおりとなった。すなわち1図の茂道松とミヤマアカマツとの比較において、major lineを共有し、minor lineに量的質的差異のあることが認められた。これは後述の日本産有名松類の類縁関係に関する実験での各種パターンと比較して、日向松、東山松等の示すパターンと非常に似た形をとるものであることがわかった。したがって血清学的に純粋アカマツとは区別されるべきものである。

### 第5部 邦産2葉松の品種間差異に関する研究

以上の実験によって、マツ類の血清学的種属特異性による類縁関係と外部形態とは、比較的相関のあることがわかったので、ここでは、日本産有名松類（地方品種）の類縁関係について検した。

#### 1. 実験そのI

材料は、日本産有名松類13種類、それに韓国産2葉松2種類を用いた。

抗原液の作成は前述のとおりであり、抗血清は、前実験において得られた茂道松と待浜松の抗血清を用いた。

これら各種抗原液と抗血清によって、第30～31図に示したような抗原抗体反応のパターンが得られた。その分析結果は第13表のとおりである。

#### 2. 実験そのII

材料は、日本産有名松類のほか、酒田産のクロマツ、福岡産のクロマツ、大曲産のアカマツ、朝鮮5葉松等を用意した。このうち抗体産生をえたのは、酒田産のクロマツ、大曲産のアカマツ等であった。

抗原液の作成法、抗血清の作成法は、これまで述べてきた実験のものとは異なり、種子粉末の脱脂はエチルエーテルでおこない、抽出は0.9%生理的食塩水によっておこなった。免疫法は、上記食塩水抽出液の家兎の耳静脈注射によりおこなった。各抗原液は、0.9%生理的食塩水を外液にして72時間、Visking tubeによって透析された。

この方法によった抗原液と抗血清との反応のパターンは、第32～33図に示したとおりであった。これらのパターンの解析結果は第15表のとおりであった。

以上の二つの実験結果によって、抗体産生方式のちがいによっては、その結果になんらちがいがみとめられず、両者ともお互いにはぼ一致した結果がえられた。すなわちクロマツに近いものとして茂道松、穆佐松、日向松など、アカマツに近いものとして滑松、待浜松、大道松などをあげることができることがわかった。また、品種間差異などのように、すこぶる近縁関係にあるもの相互の類縁関係を検するには、耳静脈注射方式による方が有利であるようである。