

貯蔵蛋白質分析によるヤマノイモ類の識別*

荒井 滋・浅尾浩史・小島博文・平井正志**

Identification of Japanese Yam Cultivars by a Storage Protein Analysis with Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE).

Shigeru ARAI, Hiroshi ASAO, Hirofumi KOBATAKE and Masashi HIRAI

Summary

Identification of Japanese yam cultivars were investigated by a storage protein analysis using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

1. Satisfactory purification of high mobile protein for PAGE was achieved with the use of anion exchange chromatography (DEAE cellulose), but low mobile protein was extracted by homogenizing in a phosphate buffer.

2. The selectional line of Japanese yam cultivars was different from *Dioscorea japonica* and *D. opposita* (cv. Nagaimo) with the protein pattern of PAGE. This line was considered most probably to represent a genetic variant.

Key Words : Japanese yam, *Dioscorea*, storage protein, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

緒 言

ヤマノイモの仲間は、トロロ、煮物や食品添加物として幅広く利用されている。そのため、芋の形状だけでなく、成分などの品質面も重要視され、高品質、高収量性品種の育成が望まれ、これまでは選抜により新品種や系統が育成されてきた^{4,9)}。しかしながら、雄株しか栽培されていなかったナガイモ (*Dioscorea opposita* Thunb.) で雌株が見つかった⁷⁾ことや、ナガイモとジネンジョ (*D. japonica* Thunb.) の交雑による種間雑種が育成された⁷⁾ことなどにより、今後は品種改良の速度が増すものと考えられる。

著者らは、ヤマノイモの中では品質が最も良いとされているジネンジョを山野から67系統収集し、主に収量性と品質などの流通適性、さらに栽培の難易性などを基準に選抜し、それらの中から有望と思われる1系統を見いだした。この系統はトロロにした時の粘性はナガイモとジネンジョの中間的な特性を示し、また、地上部の形質はむしろナガイモに近い諸特性を有している。

本研究では、選抜系統の遺伝的識別を目的に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて塊茎内貯蔵蛋白質の

分析を行ったのでその結果を報告する。

材料および方法

1. 供試材料

選抜系統の他に対照として、奈良農試および野菜茶業試験場保存のジネンジョ5系統、ナガイモ9系統(品種)、計15系統の塊茎を供試し、貯蔵蛋白質を抽出した。供試系統は第1表のとおりである。

2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動用試料の調整

塊茎試料に0.2% TritonX-100加用0.1Mリン酸緩衝液(pH7)、またはTris NaClアスコルビン酸加用緩衝液(Tris 14.6g、NaCl 2.4g、TritonX-100 8.0g/100mlを原液とし、使用時に原液5mlにアスコルビン酸0.7gを加え、水で20mlに希釈)を加えて乳鉢中で磨砕し、遠心して上清を得た。手順は第1図のとおりである。また、試料4については、DEAEセルロースカ

* 本研究は農林水産省依頼研究員として野菜茶業試験場野菜育種部育種第一研究室において実施した。

** 野菜茶業試験場野菜育種部

第1表 供試ヤマノイモの系統

Table 1. The line of Japanese yam tubers (*Dioscorea*).

系統(品種)	保存場所
1. ジネンジョ (I 1号)	野菜茶試
2. ジネンジョ (M 1号)	野菜茶試
3. ジネンジョ (M 2号)	野菜茶試
4. ジネンジョ (M 3号)	野菜茶試
5. ジネンジョ	奈良農試
6. 選抜ヤマノイモ	奈良農試
7. ナガイモ	野菜茶試
8. ナガイモ	野菜茶試
9. ナガイモ (大栄-黒)	野菜茶試
10. ナガイモ (大栄-白)	野菜茶試
11. ナガイモ (砂研 5号)	野菜茶試
12. ナガイモ (夕張改良 1号)	野菜茶試
13. ナガイモ (ガンクミジカ)	野菜茶試
14. ナガイモ	野菜茶試
15. ナガイモ (田布施)	野菜茶試

ラムで蛋白質を精製した。その方法は、DEAEセルロースを0.02M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.2) で平衡化し、5 mlのシリンジに2 mlずつ分注してカラムを作成し、このカラムに1 mlの上記の上清をのせ、0.2M Tris-HCl 緩衝液で洗浄した後、0.02M Tris (0.5M KCl 加用) 緩衝液で溶出 (0.5ml/フラクション) した (第1図)。

3. 蛋白質の定量

Bradford²⁾の方法に従い、3 mlのProtein reagent に100 μ lの試料を加え、発色後595nmの吸光度を測定し、牛血清アルブミンを標準とし、定量した。

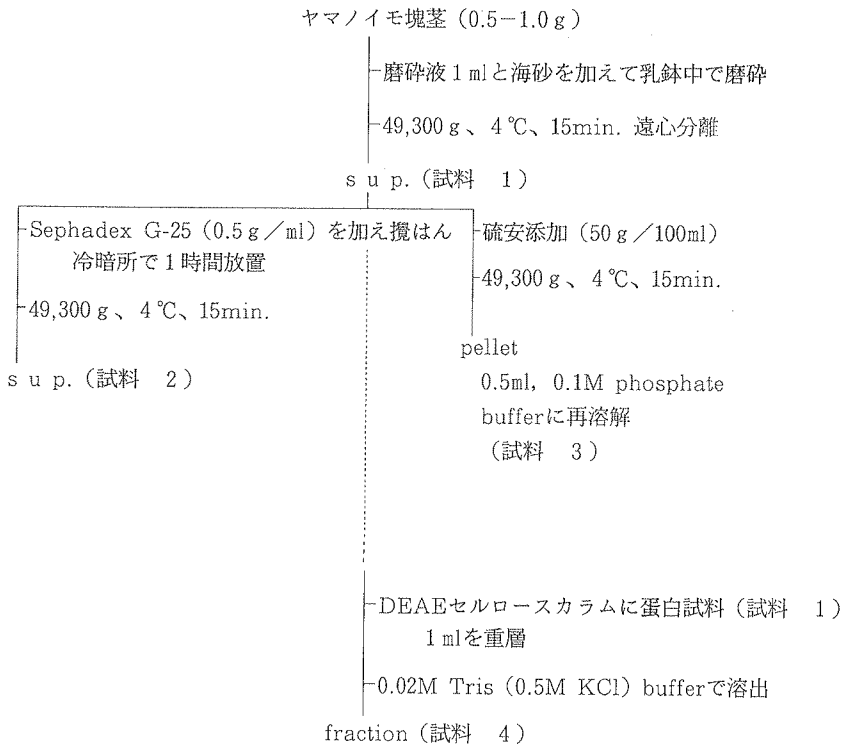
4. ポリアクリルアミドゲル電気泳動条件

分離ゲル: 14%アクリルアミド

濃縮ゲル: 5%アクリルアミド

電導緩衝液: Tris-グリシン緩衝液 (Tris 0.06 g, グリシン2.88 g/l)

荷電流: 15mA/ゲルプレート



第1図 ポリアクリルアミドゲル電気泳動試料の調整

Fig. 1 Preparation of Japanese yam tuber protein for polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

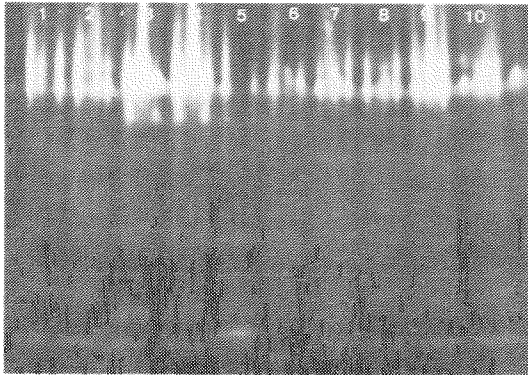
染色液：クマシーブリリアントブルー (CBB 0.2

%、酢酸 10%、メタノール 50%)

試料：10-40 μ l/レーン

結果および考察

電気泳動用試料1では、磨砕液 1ml 当たり供試材料 (塊茎組織) が 0.1g 以上の場合、移動度 (Rf) が 0.7~0.9 の領域では蛋白質の明瞭なバンドが得られたが、Rf 値が低い領域ではバンドが不鮮明であった (第2図)。この原因は、塊茎組織に多量に含まれる高分子多糖類の影



第2図 ヤマノイモ蛋白質のポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン

Fig. 2 Electrophoretic pattern of unpurified storage protein of yam tuber.

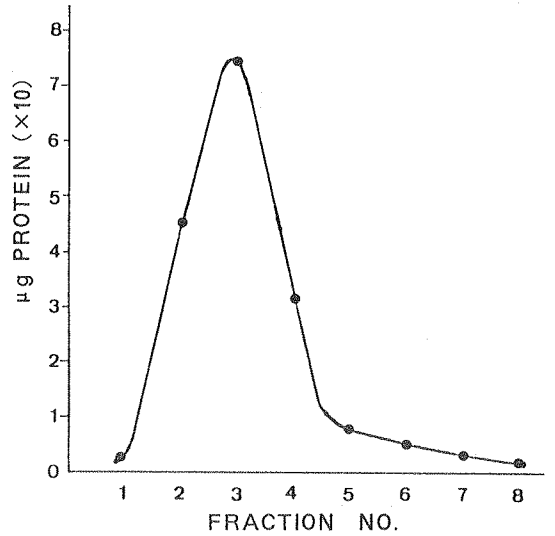
Lane 1~5 *D. japonica*;

Lane 6 selectional line

Lane 7~10 *D. opposita* (cv. Nagaimo)

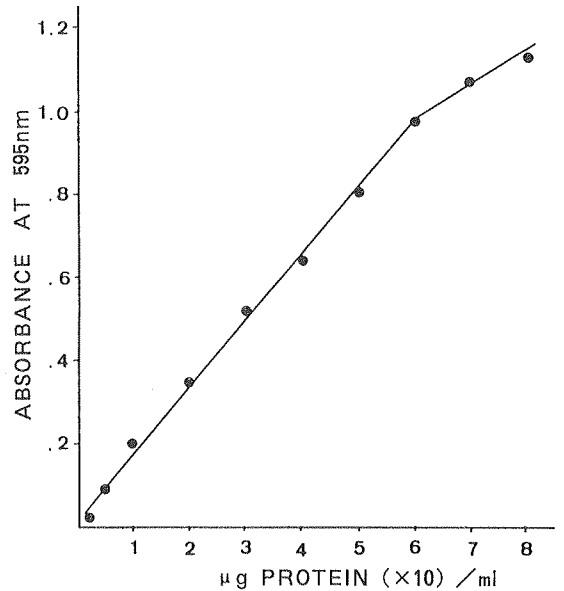
響ではないかと考え、それを取り除くため試料1に Sephadex G-25 を加えた (試料2) が、明瞭なバンドは得られなかった。また、硫酸塩析による蛋白質の純化を試みた (試料3) が、蛋白質の回収率が低く所期の目的は達せられなかった。

そこで、DEAEセルロースカラムに試料を重層し、Tris buffer で溶出して蛋白質の精製を試みた (試料4)。精製された蛋白質は、1つのピークを持つ溶出曲線を表わし (第3図)、その含量は牛血清アルブミン標準吸光度曲線 (第4図) から換算すると、ピークのフラクションで約 75 μ g/ml であり、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で検出できる十分な量であった。この精製された蛋白質を泳動試料とした場合、10~15 μ l と少量で高分子と考えられる Rf 値の低い領域で比較的明瞭なバンドが得られた (第5図)。このことは、Harvey



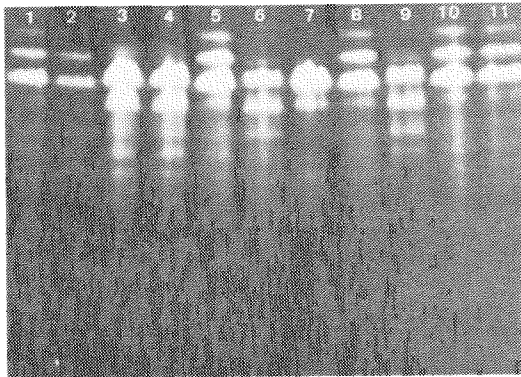
第3図 DEAEセルロースカラムによるヤマノイモ貯蔵蛋白質の精製

Fig. 3 Purification of storage yam tuber protein with DEAE cellulose chromatography.



第4図 Protein dye bindingによるBSA (Bovine serum albumin) の標準吸光度パターン

Fig. 4 Protein dye binding response pattern for BSA (Bovine serum albumin).



第5図 DEAEセルロースで精製したヤマノイモ蛋白質のポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン

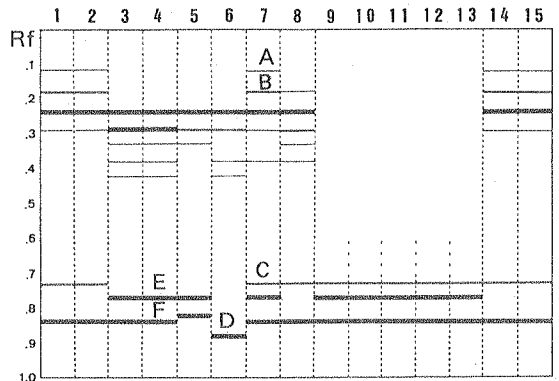
Fig. 5 Electrophoretic pattern of storage protein in yam tuber purified with DEAE cellulose column chromatography.

Lane 1~6 *D. japonica*
 Lane 7 selectional line
 Lane 8~11 *D. opposita* (cv. Nagaimo)

ら³⁾が *Dioscorea rotundata* の貯蔵蛋白質の精製において同様の結果を得たように、陰イオン交換樹脂 (DEAEセルロース) が高分子蛋白質の泳動を阻害していた多糖類を吸着し、試料蛋白質がある程度純化されたことを意味している。

以上の2種の方法を用いて、供試ヤマノイモ貯蔵蛋白質の電気泳動パターンを比較した。その結果、ジネンジョ群 (*D. japonica*)、ナガイモ群 (*D. opposita*) および選抜系統の間で異なるバンドが検出された (第6図)。レーンNo.1およびNo.2のジネンジョは、PAGE泳動パターンや塊茎の形状、品質、さらに地上部の諸特性などからナガイモ群に入るべき系統と考えられた。ナガイモ群ではA (Rf 0.12)、B (Rf 0.18) およびC (Rf 0.73) のバンドを持っていたが、ジネンジョ群や選抜系統では検出されなかった。また、選抜系統はジネンジョやナガイモの多くの系統が持っているE (Rf 0.77) やF (Rf 0.84) のバンドを持たず、逆に両者が持っていないD (Rf 0.88) のバンドを持っており、貯蔵蛋白質でジネンジョやナガイモのそれとは明らかに違っていた。

この選抜系統について寺内⁶⁾は、塊茎組織からミトコンドリアを分画し、抽出したミトコンドリアDNAを制限酵素 (Hind III) で処理したDNA断片を、ナガイモと同じ *D. opposita* の仲間に含まれるイチョウイモやツクネイモと比較した。その結果、イチョウイモやツクネイモは同じ断片を示したが、選抜系統のそれは両者と



第6図 ヤマノイモ貯蔵蛋白質のポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン

Fig. 6 Storage protein pattern of Japanese yam tubers with polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

Lane 1~5 *D. japonica*
 Lane 6 selectional line
 Lane 7~15 *D. opposita* (cv. Nagaimo)

かなりの断片で異なるバンドパターンを示した。すなわち、選抜系統は *D. opposita* (イチョウイモ、ツクネイモ) と異なるミトコンドリアを持っていることを明らかにしている。

以上のことから、供試した選抜系統は *D. japonica* や *D. opposita* と遺伝的に違っていることが判明した。ところで、Araki⁷⁾は人工交雑ではあるが、ジネンジョとナガイモとの種間雑種を育成していることから、供試した選抜系統は自然条件の中で交雑を受けた雑種の可能性も残っているが、今後、染色体数の確認やアイソザイム分析などで分類的位置づけを明らかにする必要がある。

摘 要

ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた貯蔵蛋白質の分析により、選抜したヤマノイモの識別を行った。

1. ポリアクリルアミドゲル電気泳動用のRf値の高い領域の蛋白質試料はリン酸緩衝液で抽出できたが、Rf値の低い領域の試料は陰イオン交換クロマトグラフィーを使うことで精製できた。
2. 選抜系統はジネンジョ (*Dioscorea japonica*) やナガイモ (*D. opposita*) と蛋白質の電気泳動パターンが異なっており、両者とは遺伝的に違っていた。

謝 辞

本研究を行うにあたり御助言と御指導をいただいた農林水産省野菜茶業試験場野菜育種部長（現茶栽培部長）高柳謙治博士、実験材料を心よく提供していただいた育種第1研究室佐藤隆徳研究員、また、御援助をいただいた奈良県農業試験場技術開発課長小玉孝司博士に深く感謝の意を表す。

引用文献

1. ARAKI, H. , T. HARADA and T. YAKUWA. 1983. Some characteristics of interspecific hybrids between *Dioscorea japonica* Thunb. and *Dioscorea opposita* Thunb. J. Japan Soc. Hort. Sci. 52 : 153—158.
2. BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Protein assay by dye binding. Academic Press. Inc. 248—254.
3. HARVEY, P. J. and D. BOULTER. 1983. Isolation and characterization of the storage protein of yam tubers (*Dioscorea rotundata*). Phytochemistry. 22 : 1687—1693.
4. KAWAKAMI, K. , M. YAMAKAWA. , T. SASAKI and A. , TAKAYAMA. 1955. Variation in tuberous root in Chinese yam plants (*Dioscorea batatas* Dence). Proc. Crop Sci. Soc. Japan 23 : 309—310.
5. ———. 1965. Studies on the clonal selection of Chinese yam (*Dioscorea batatas* Dence). 3. Breeding history and characteristics of some new varieties. Jap. J. Breeding 15 : 38.
6. 寺内良平. 1988. 私信
7. 八鍬利郎・原田隆・笠井登・奥山功・荒木肇. 1981. ヤマノイモ属 (*Dioscorea*) の性状に関する基礎的研究 (第1報) ながいも雌株に着生した花、果実および種子の構造と発芽過程. 北大農邦文紀. 12 : 271—280.