

5-25

佐賀大学 農学彙報

第 27 号

目 次

ウリ科植物の系統類縁に関する血清学的研究

..... 宮崎貞巳 1

食用タール色素がトリプシンの蛋白質分解作用に及ぼす影響

..... 榎本則行・園田博正 55

国造干拓の潮遊池内における淡水化に関する実験

..... 渡辺 潔・黒田正治・長谷川紘一 61

重粘土の土壤亀裂に関する室内実験

—土壤亀裂と硬度について—

..... 生島芳雄・中島 明 111

佐賀大学農学彙報 総目次 第1～25号 (1952～1968) 123

佐賀大学農学部

昭和44年3月

昭和44年3月25日 印刷
昭和44年3月31日 発行

編集兼 佐賀大学農学部
発行者

印刷者 大里毅久夫

印刷所 大里印刷センター

福岡市警固一丁目1-23

電話 福岡 77-7911 (代表)

5-25

佐賀大学 農学彙報

第 27 号

目 次

ウリ科植物の系統類縁に関する血清学的研究

..... 宮崎貞巳 1

食用タール色素がトリプシンの蛋白質分解作用に及ぼす影響

..... 榎本則行・園田博正 55

国造干拓の潮遊池内における淡水化に関する実験

..... 渡辺 潔・黒田正治・長谷川紘一 61

重粘土の土壤亀裂に関する室内実験

—土壤亀裂と硬度について—

..... 生島芳雄・中島 明 111

佐賀大学農学彙報 総目次 第1～25号 (1952～1968) 123

佐賀大学農学部

昭和44年3月

AGRICULTURAL BULLETIN OF SAGA UNIVERSITY

Contents

- Serological Studies on the Taxonomic Relationships within
the *Cucurbitaceae* Sadami MIYAZAKI
- Influence of food-color-stuff upon protein digestive action
of trypsin Noriyuki ENOMOTO AND Hiromasa SONODA
- The Experimental Analysis on the Replacement of Sea Water by
Fresh Water in the Retarding Basin of KOKUZO KANTAKU
..... Kiyoshi WATANABE, Masaharu KURODA AND Koichi HASEGAWA
- Laboratory Investigation on the Soil Crack of Heavy Clay Soil
——on the Relation between Soil Crack and Soil Hardness ——
..... Yoshio IKUSHIMA AND Akira NAKAJIMA
- The Index of Agricultural Bulletin of SAGA University No. 1 — 25
(1952 — 1968)

published

by

FACULTY OF AGRICULTURE
SAGA UNIVERSITY
SAGA, JAPAN

ウリ科植物の系統類縁に関する
血清学的研究

宮 崎 貞 巳
(園芸学研究室)

Serological Studies on the Taxonomic Relationships
within the *Cucurbitaceae*

Sadami MIYAZAKI
(Laboratory of Horticulture)

目 次

I 緒 言	2
II 植物血清学研究小史	3
A 植物血清学発達史	3
B 植物血清学の方法論	5
C 血清学的方法の植物分類学への応用例	8
III カボチャ属植物の系統類縁に関する血清学的研究	8
A 緒 言	8
B 実験材料および方法	9
a 供試植物種子	9
b 基準抗血清について	9
c 比較抗原について	9
d 抗原抗体反応誘起の場としての寒天平板床	10
e 抗原抗体反応誘起処置	10
f 抗原抗体反応処置結果の判定について	10
g 抗原抗体反応に基づく類縁の親疎の判定について	11
h 対照実験について	11
C 実験結果および考案	12
a 対照実験	12
b 種内比較実験	12
c 種間比較実験	13

IV	ウリ科栽培植物の系統類縁に関する血清学的研究	13
A	緒言	13
B	実験材料および方法	13
a	供試植物種子	13
b	基準抗血清について	14
c	比較抗原について	14
d	抗原抗体反応誘起処置	14
e	抗原抗体反応処置結果の判定について	15
C	実験結果および考案	15
a	同一品種比較実験	15
b	種内比較実験	16
c	種間比較実験	16
d	属間比較実験	17
V	総合考察	21
A	ウリ科作物の系統類縁に関する研究について	21
a	形態学的研究について	21
b	細胞学的研究について	25
c	細胞遺伝学的研究について	26
B	血清学的種内比較について	30
C	血清学的種間比較について	31
D	血清学的属間比較について	33
	摘要	34
	引用文献	35
	写真	

I 緒言

ウリ科は87属、約 750種からなる巨大な科である。この科の植物は熱帯、亜熱帯、あるいは温帯の温暖な地方では、重要な作物として人類文化に極めて密接な関係を有している。すなわち、ウリ科作物は、主食の代用 (*Cucurbita*)、野菜 (*Cucumis*, *Cucurbita*, *Sechium*, *Benincasa*, *Momordica*, *Lagenaria*, *Luffa*)、果物 (*Cucumis*, *Citrullus*)、飼料 (*Cucurbita*)、薬用 (*Citrullus*, *Momordica*)、繊維 (*Luffa*)、容器 (*Lagenaria*)、愛玩用 (*Cucurbita*)、あるいは緑陰用 (*Luffa*, *Lagenaria*) として他の科には類を見ない程、その用途は多方面に亘っている。また、その栽培の歴史も小麦、大麦等に次いで極めて古く、栽培種内では品種の分化もすすみ、栽培品種は極めて多数にのぼり、多型化の傾向を示している。従って、ウリ科植物については、細胞学的にも系統学的にも極めて興味ある問題が多く、19世紀の中頃からこれらの問題についての研究が行われ、現在ではその報告も極めて多数にのぼっている。

しかしながら、その系統類縁関係についての研究においては、必ずしも十分といえる成果はあがっていないようである。その理由は一言でいえば、現在までのこの問題に対する approach の方法に求められよう。すなわち、従来の形態学的分類方法では、現存植物の祖型がすでに今

日絶滅に帰しているか、あるいは存在しても極めて稀で、形態的に不連続な場合が多いために、研究者の主観の介入が避け難い。また、細胞学的研究方法においても、染色体は小さく、その数は比較的によく、染色体と細胞質の染め分けが十分でないために核型分析には限界がある。さらにまた、細胞遺伝学的には、上述の染色体観察の困難性と相俟って、例えば、形態学的には明らかに近縁と見做されている *Cucumis* 属と *Citrullus* 属、あるいは *Cucumis sativus* と *C. melo* との間の様に種・属間交雑が成功していないので、ゲノム分析や遺伝子分析という方法が行使できない場合が多い。

重要な農作物として、その利用場面が多方面に亘っているウリ科植物について、その系統類縁の関係を明らかにすることは、ウリ科作物の品種改良・育種の基礎資料として、また、広くその栽培技術改善の基礎資料として、農学上、農業上必要且つ重要なことであると考えられる。

植物体内成分の質的・量的異同性の検討を通して、植物相互間の類縁関係を解明しようという努力も展開され、その前進の一分野として、抗原抗体反応に注目する血清学の手法を植物分野に導入した植物血清学も近年に至って、1930年代までの旧態を脱した新しい姿で登場している（この研究小史は後記）。

本報実験は、この植物血清学的手法を援用して、ウリ科植物の属、種、品種に亘っての類縁関係の追究を意図したものであり、本実験においては、抗原として用いる種子抽出物の抽出方法と抗血清を得るための動物免疫法とを異にした2種の実験を行っている。ここに実験結果を論述報告する次第である。

本研究を行うに当り、終始懇篤な指導を与えられ、論文校閲の労を煩わせた恩師九州大学名誉教授福島栄二博士ならびに助教授松井健博士に対して、ここに衷心より深厚の謝意を表す。また、論文校閲の労を煩わせた九州大学名誉教授永松土巳博士ならびに教授伊藤健次博士に心から感謝の辞を捧げる。さらに、佐賀大学教授島田恒治博士ならびに助教授山田嘉夫博士からも絶えず助言を戴いた、記して心から御礼を申し上げる。

II 植物血清学研究小史

A 植物血清学発達史

19世紀の中頃から、下等植物などの形態的性質の分化していない群の類縁関係を解明する方法として、また、高等植物でも、形態学的、細胞学的、あるいは細胞遺伝学的研究とあわせて、植物体内に含まれる物質についての分析結果を、分類学へ応用しようという試みがなされてきた。殊に最近では化学的・物理的分析方法の進歩に伴って、アルカロイド (Smith and Smith, '42; Smith and Abashian, '63), フラボノイド色素 (Bate-Smith, '56, '58; 有隅, '63, '64), リピッド (Kjaer and Rubinstein, '53; 福島, '64), さらに蛋白質 (Anfinsen, '58; Florkin, '66) などについて、「種」、「属」におけるその有無や差異をよりどころにして、従来の分類学の知見や理解を補って系統類縁の関係を明らかにしようという、いわゆる Chemical taxonomy がいよいよ盛んになりつつある。植物血清学的分類方法も上述の分類学の一方法である。

血清学的手法を植物の分類に導入して、種々の植物の系統類縁関係を解明しようという植物血清学的方法の理論的基礎は、次の点にある。

ある物質を非経口的に動物に投与すると、その動物の体内では、投与物質が異質の物質であるか否かの識別が行われ（小山，'64），その物質が異質で、低分子の場合は、直ちに白血球の働きで体外に排出する作用が生起し、高分子で、抗原となる性質（抗原性）を有する場合には、その物質に対応して、血清中に γ -グロブリンの一種である抗体の生成反応が起る。同一の抗原がさらに注入された場合は、生成されている抗体と反応（抗原抗体反応）を起し、結合物質を生じて、やがて体外に排出される。この抗原抗体反応に着目する血清学の手法が、異なる種々の植物の体内成分（主として蛋白質）の質的・量的比較に役立ち得るのは、以下に述べることから明らかであろう。

植物体内成分の植物間の比較をする場合には、同じ種類の器官ないし組織を採るのが必要である。例えば、種子を採って、この種子の抽出物（抽出を予想する抽出物によって、溶媒、その他の抽出法の検討が必要）を得る。これを抗原として、適当な濃度と注射法で動物（家兎など）に免疫して、抗血清を得る。この抗原と抗血清を遭遇させれば、抗原抗体反応が期待できる。ここで問題は、抗原抗体反応をどのような簡単な実験装置の下でおこさせ、その反応結果を具体的視覚的にとらえることにある。この抗原抗体反応誘起の場としての簡易な装置は、試験管寒天床から平板寒天床に発展している（後に詳記）。後者においては、平らな寒天上の離れた位置に置かれた抗原と抗体が寒天ゲル内を抗散し、遭遇した両者による抗原抗体反応に基づいて沈澱物が生じ、寒天床内沈降線として抗原抗体反応が視覚的にとらえられる。

抗原として用いる種子抽出物が単一物質であるならば、沈降線も単一であるが、抗原が混合物であると、抗体もその数に対応して生成され、沈降線も単一ではなくなるわけである。もっとも、複雑な抗原の場合、各構成要素の質的量的関係から沈降線が重なり合って、外見的にはその数が減る場合も予想される。

以下、植物血清学的手法を用いての植物構成物質の植物間の比較検討を行う手順、その記述に当っての用語について述べる。まず、比較の基準として、いくつかの「種」について、その種子抽出物を抗原（基準抗原とよぶ）用を選んで、これを家兎に注入してその抗体（基準抗血清とよぶ）を作った。つぎに、比較しようとする多数の「種」について、それぞれ、種子抽出物（比較抗原とよぶ）を作り、それぞれの比較抗原と上記いずれかの基準抗血清との間の抗原抗体反応の有無・様相を検討した。

比較植物の種子抽出物は基準植物の場合と同じ方法で調製する。これを比較抗原として、前述の基準抗血清と寒天床内で遭遇させて抗原抗体反応の誘起を試みる。

この場合にみられる比較抗原と基準抗血清との間の反応系（比較反応系とよぶ）における沈降線の出現様相を基準反応系（基準抗原と基準抗血清との反応系）の沈降線の出現様相と比較検討することによって（この比較を容易に行うために基準系と比較系の寒天床の並置位置関係については後述）、基準系植物の種子抽出物の構成物と比較にとった植物のそれとの異同が判定できることになる。基準植物に含まれるものと同じ物質が比較植物に存在する場合は、比較反応系の寒天床に、基準反応系と同じ位置の沈降線がみられ、基準系植物には在るが比較系植物には含まれていない物質の場合には、比較系寒天床にはその該当沈降線は認められないことになる。基準植物にも比較植物にも含まれているが、両者の含有量が異なる場合には、沈降線の出現位置関係が異なるという形で沈降線が現われる（拡散速度の差異や抗原の量と抗体の量の最適比の差異に基づくものと考えられる）。なお、具体的な沈降線出現様相については、抗原抗体反応誘起の場としての平板寒天床の作り方に関連して後に述べる。

血清学的方法の分類学への導入は、1901年に動物について行った Nuttall に始まるといわれ、植物分類学への最初の応用としては、Kowarski ('01) により、「熱に安定な小麦の種子抽出液が家兔に沈降素を生成せしめ、それは小麦の種子抽出液と最も強く作用し、ライ麦、燕麦、豌豆の種子抽出液との反応は弱い、あるいは全く反応しない」ことが報告されている。その後、各国の多くの研究者によって実験がすすめられ、ドイツでは Gohlke を先達とし、Mez, Ziegerspeck 等 Königsberg 学派は、Mez' reaction の方法（沈降反応を修飾した方法で、抗原と抗体の混合中物に、正常牛血清中に含まれる conglutinin を添加することによって沈降反応の感度を増す方法）を駆使し、1926年、全植物界を包含する serological phylogenetic tree, いわゆる Königsberg Stammbaum を確立した。しかし、一方ではその方法や業績に対する反論や批判も現われた。Von Wettstein, Diels, Stolley, Heintze 等の従来の分類学者の立場からの強い反対があり、また、Gilg, Schürhoff 等のいわゆる Berlin 学派の人々からの追試に基づく反論（もっとも、両学派で用いた方法は異っていた）、また、瀬瀬（'17）、小島（'21）を含む諸外国の多くの研究者の批判も発表された。また一方では、この血清学的方法は主観を混えることのない objective な実験的手法であるという優れた点を特に重視した人々も少なくなかった。当時の高名な分類学者 Diels は、この新しい方法が、やがて必ず分類学の有力な基準にまで成長するであろうと断言した。この間のことについては Janchen ('12, '13) や Chester ('37) の優れた総説に詳しく述べられている。

いわゆる phytoserology の研究は、植物類縁関係の研究に限らず、植物学の諸分野に亘り、1930年前半までは各国の多くの研究者によって注目され、盛んに行なわれたが、techniques の未熟な点が克服されずに、次第に衰退し、1950年代の phytoserology の再展開を待つに至った。

B 植物血清学の方法論

1930年代に最も用いられた血清学的方法としては、溶液内における抗原抗体反応であり、その中の輪環法（重層法）を例にとれば、この方法は、一定量の抗血清を数本の小試験管に入れ、系統的に稀釈した抗原液をこれらの小試験管中の抗血清の上に重層して、抗血清と抗原液の境界面に現われる抗原抗体反応の有無を調べ、その終価（dilution end point）を求める方法である。すなわち、この方法は、2種類以上の抗原が同時に関与している場合には、それらの反応の総計が反応の強さとして表わされ、反応の強弱によって、親疎の判定を行う方法であった。なお、本法においては、いわゆる正常家兔血清とも反応する（非特異的反応とよばれている）場合が多く、この非特異的反応が抗原抗体反応と重複して、抗原抗体反応そのものを不明瞭にすることが多かった。

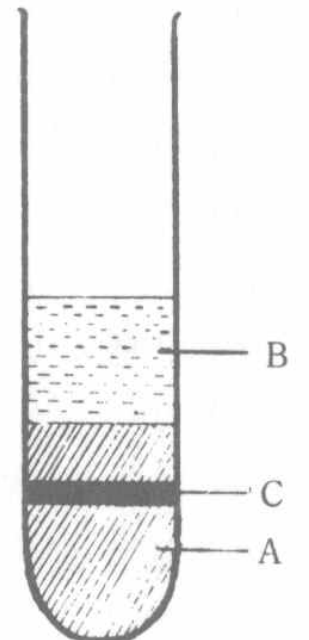
Landsteiner ('47) は、種々の既知の構造の化学基を蛋白質に結合させ（人工抗原）、これによって動物を免疫すると、導入された化学基に特異的に反応する抗体が生成されることを発見し、抗原の特異性を支配するものは、比較的低分子の物質の構造によることを明らかにし、特異性の概念がより明確に把握されるようになった。また、Heiderberger ('56) によって、沈降反応の定量的分析の方法と理論が提出されるに従って抗原の均一性、2種類以上の抗原の異同が可成り精密に解析できるようになった。

1946年には、Oudin が初めて寒天ゲル内抗原抗体反応（simple diffusion method）を報告し、引続いて1948年には Ouchterlony 等によって寒天ゲル平板拡散法（double diffusion method）が、また、1955年には Graber and Williams により、zone electrophoresis と double diffusion method を組合せた免疫電気泳動法（immunoelectrophoresis）が報告されるに及んで、Chester

が、彼の総説を終るに当って述べている植物血清学の限界性、すなはち techniques の未熟さは克服された。

上述のOudin 法は、第1図の如く、抗血清を混合した寒天溶液（A）を小試験管に流し込み、冷却凝固後、その上に比較的高濃度の抗原溶液（B）を重ね、一定温度に保つ方法である。この場合、抗原は寒天ゲル内に拡散し、抗原濃度が抗体に対して当量となった点で沈降帯が形成される。この場合2種類以上の抗原が同時に含まれていると、それらの抗原の濃度、当量比、拡散速度の何れかの相違により、沈降帯が分離する。植物抽出液のように応々にして質的に異なる複数の抗原性物質を含む場合には、その数に応じて沈降帯が生じるため、従来一般に用いられた沈降法では不可能に近かった抗原の分析が比較的容易にできるようになった。

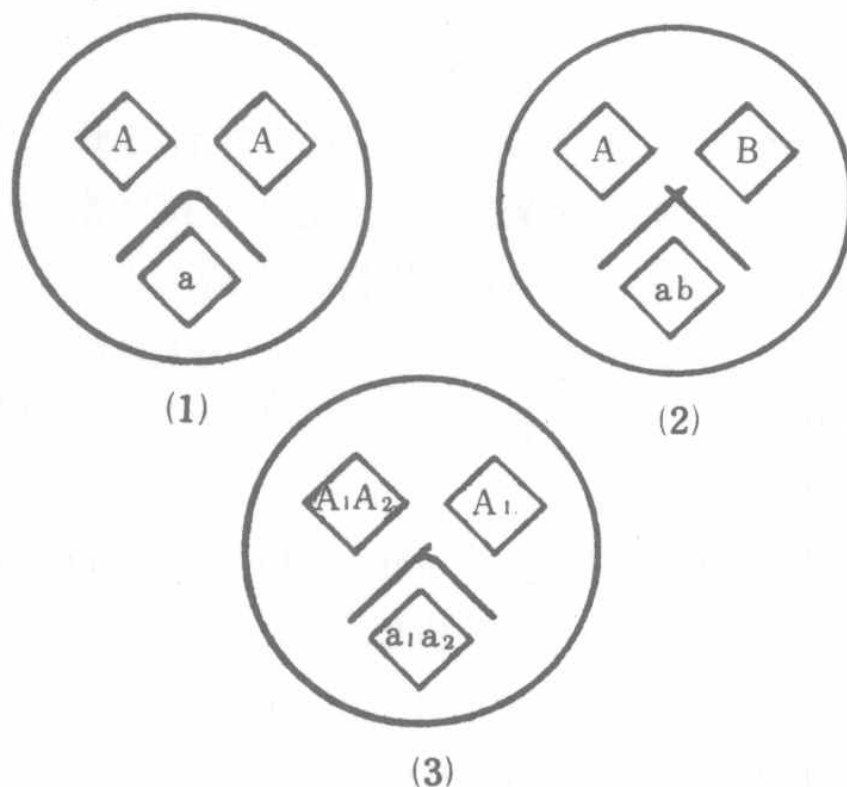
第1図 Oudin 法



A：寒天＋抗血清
B：抗原溶液
C：沈降帯

この Oudin の方法を一步進めたと見られるのがOuchterlong 法である。これは、平板法（plate test）とも名付けられるように、シャーレ中に薄く拡げた寒天層に3個のクボミを作り、そのクボミの1つに抗血清を、他の2つのクボミに抗原（抽出液）を入れると、クボミの周囲にそれらは次第に拡散して両者のクボミの中間で反応し、現われた沈降帯（線）の様相によって、抗原相互の関係を判別する方法である。第2図は、この方法における典型的反応を模式的に示したものである。Ouchterlong は沈降線の典型的なタイプを次の3種類に分けた。すなはち、2種類の抗原の関係は、（1）相同reaction of identity, （2）非相同reaction of non-identity, （3）部分相同reaction of partial identity である。すなわち、（1）のように2種類の沈降線が完全に融合すれば、それらの抗原は全く同じものであり、左右の沈降線が（2）のように交叉すれば、これら2種類の抗原は全く異種と見做される。（3）では、融合した沈降線の一部がいわゆるspurを形成した場合で、両者の抗原成分の間に共通的な成分の存在をも物語っているものと解される。以上のように、この方法は、一般に複雑で多数の抗原性物質を含む植物の抽出液については、その分析が極めて容易で効果的な方法である。

第2図 Ouchterlong 法



A, B：抗原A, 抗原B
a, b：抗A血清, 抗B血清
(1)：相同
(2)：非相同
(3)：部分相同

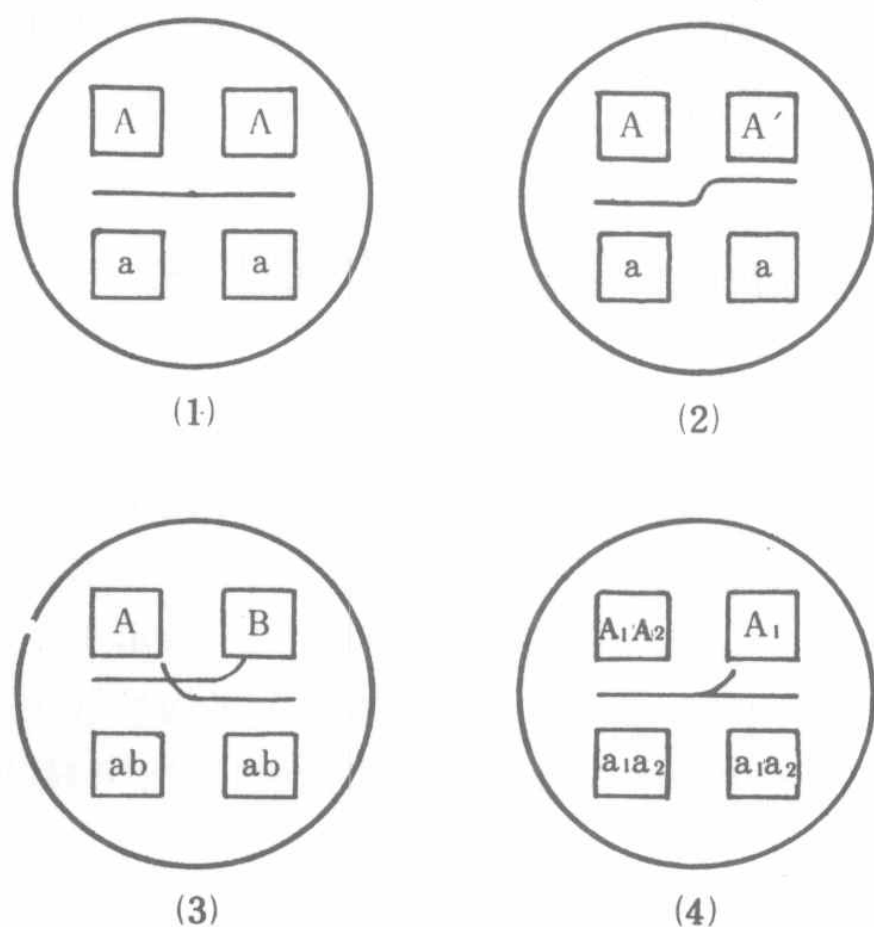
伊藤・福島・松井（'59）は、この方法を援用して小豆、落花生、蚕豆、ふじ豆の種子抽出物が菜豆のそれと異なることを識別し（菜豆品種間の識別には成功していない）、Oudin 法を用いた実験において抗原分析を困難にした非特異的反応が、Ouchterlong 法では抗原抗体反応を妨げないことを見出した。

さらに、福島・松井（'59）、松井（'63, '64）はOuchterlony 法を修飾しシャーレ中の寒天層に4個のクボミを第3図に示すように矩形の各頂端に位置するように作って、抗原抗体反応を行なわせ、現われる沈降線の様相から典型的な4つのタイプを示し、Ouchterlony の命名法にならい、2種類の抗原の関係を（1）完全相同reaction of perfect identity, （2）不完全相同reaction of imperfect identity, （3）非相同reaction of non-identity, （4）部分相同reaction of partial identity とした。すなわち、Ouchterlony の相同reaction of identity の概念を実験的に完全相同 reaction of perfect identity と不完全相同 reaction of imperfect identity にわけ、後者の場合は、2種類の抗原間に量的差異があることを物語っていると、複雑な生体抗原、あるいは抗体の比較を容易にした。この方法を用いて、彼等は、菜豆品種間の異同を識別し、血清学的に種間差異と種内差異の関係を明らかにした。

Graber and Williams によって考案された免疫電気泳動法は、複雑な抗原液を、寒天ゲルを支持体として電気泳動を行い、抗原を分別後、泳動方向に平行な細い溝を作り、これに抗血清を注入して拡散させ、現われる沈降線によって、抗原の分析を行う方法である。この方法は、拡散法で各沈降線間の距離が非常に接近している場合、すなわち、粗抽出液などの中に含まれる多数の抗原性物質を精度よく解析することができる。

福島等（'62）は、免疫電気泳動法を援用して、キウリ品種間のF₁の蛋白質組成と両親の蛋白質組成の質的量的差異を検討し、両親とF₁の蛋白質組成の間には質的差異は認めなかったが、F₁には両親よりもある蛋白質成分に関して量的に多いことを明らかにした。この結果は松井の変法を用いた実験（'62）とも一致すると述べている。

第3図 松井の変法



A, B: 抗原 A, 抗原 B
a, b: 抗 A 血清, 抗 B 血清
(1): 完全相同 (2): 不完全相同
(3): 非相同 (4): 部分相同

C 血清学的方法の植物分類学への応用例

上述の如く、血清学の急速な進歩に伴い、1950年代に至って再び植物への応用にも次第に関心が払われるようになった。その中で高等植物の分類に関する研究例としては、下記のようなものがある。

Baum ('54) は、カボチャ属作物3「種」(*C. moschata*, *C. pepo*, *C. maxima*) とウリ科作物の種子を用いて、種間、属間の血清学的差異を検討した。その結果、*C. moschata* は、*C. maxima* よりも *C. pepo* に近縁で、*C. moschata* と *C. maxima* の関係は、*C. pepo* と *C. maxima* のそれよりも近く、さらに、カボチャ属はスイカ属よりもヘチマ属に近縁であることを明らかにした。

Hammond ('55) は、ナス科に属する各「種」の種子のグロブリンを家兎に免疫し、沈降反応を比濁計で測定した。一般に *Physalis*, *Nicandra*, *Lycopersicum* のような漿果の属は、*Nicotiana* や *Petunia* のような蒴果の属よりも、互に近縁であることがわかった。また、分類学者は、*Hyosyamus* を蒴果にかかわらず漿果の属に入れているが、血清学的には *Hyosyamus* は、供試した蒴果の属と近縁であることを明らかにした。

Gell 等 ('60) は、馬鈴薯の塊茎汁の上澄液を抗原とし、Elek-Ouchterlony 法と Graber and Williams の免疫電気泳動法を用いて、*Solanum* 属の14のメキシコ種を5群に分けた。

福島等 ('62) は、金柑属、柑橘属(初生柑橘亜属、後生柑橘亜属)、枳殻属のそれぞれに属する多数の「種」を供用して、相互の類縁関係を検討した。さらに彼等 ('64) 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」(*B. nigra*) は、a ゲノム「種」およびc ゲノム「種」に較べて、蛋白質組成が異っていることを認めた。また、ゲノム構成がaabbである *B. juncea* と *B. cernua* の間には蛋白質組成に量的差異が認められ、*B. carinata* (bbcc) の蛋白質組成は、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 ゲノムとは可成り異っているのではないかと推論した。

Vaughan 等 ('65) は、*B. campestris*, *B. nigra*, *B. oleracea* の種子蛋白質をOuchterlony 法と免疫電気泳動法を用いて分析した結果、*B. campestris* は、*B. nigra* よりも *B. oleracea* に近く、この関係は従来の形態学的分類と一致すると報告している。

Ⅲ カボチャ属植物の系統類縁に関する血清学的研究

A 緒 言

本実験においては、カボチャ属(*Cucurbita*)植物の類縁関係の血清学的解明を目的とした。

カボチャ種子の蛋白質の質的量的比較を血清学的に行うことを企図し、あるカボチャ種子の生理的食塩水抽出液を免疫原として作った抗血清(基準抗血清)に対して、カボチャ属の「種」、「品種」の種子の生理的食塩水抽出液(比較抗原)を作り、これを寒天平板拡散法を用いて作用させ、そこに予想される抗原抗体反応の諸様相の解析を行い、供試植物間の類縁関係の論究を行った。

B 実験材料および方法

a 供試植物種子

類縁関係の検討材料に選んだカボチャ属植物は、第1表のように2「種」に亘る4「品種」と1「変種」である。

第1表 供 試 種 子

種名ならびに変種名

園芸品種名

Cucurbita pepo L.

Table Queen

Early Summer Crookneck

オモチャ

C. pepo L. var. *cucurbittella* Fiori & Paol (野生種)

C. moschata Duch.

日向14号

C. pepo L. “Early Summer Crookneck” ならびに *C. pepo* L. var. *Cucurbittella* Fiori & Paol の種子は京都府立大学高嶋四郎教授から供与を受け、九州大学農学部園芸学教室圃場で栽培して採種したものである。他のTable Queen, オモチャ, 日向14号の種子は市販のものを購入したものである。

b 基準抗血清について

比較検討しようとする種子抽出液（比較抗原）との間に期待する抗原抗体反応に用いる基準抗血清としては、本実験においては、抗Table Queen 家兔血清が供試された。

この基準抗血清は次のようにして作った。まず、Table Queen の種子を剥皮して乳鉢で磨碎し、ethyl ether で脱脂して粉末にして密栓貯蔵した。この種子粉末を、抗血清を得るための抗原（免疫原）として使用するに当っては、上述の脱脂粉末1 gr. に対して10 ml. の割合で0.9%食塩水を加え、攪拌後1夜冷蔵庫内に放置した後濾過し、この濾液を免疫原とした。

抗血清を得る免疫動物には家兔を供した。綿密な注意の下で飼育準備した体重2 kgの健康な家兔群（1組5頭）に対して、上述のTable Queen 種子の生理的食塩水抽出液を免疫原として毎週2回、8週間に亘って静脈内注射をした。その1頭当りの注射量は、初めの2週間は1回5 ml., 次の3週間は6 ml., 最後の3週間は7 ml. とした。

抗血清の採取保存は次のように行った。最終注射から1週間後に、大型試験管中に採血し、血球を凝固させるため37℃の恒温器中に1時間放置し、その後凝固血餅を試験管壁からはずして、さらに凝固を促進させるために冷蔵庫に入れた。24時間後、遠心機で血球と血清を分離し、透明な血清を得た。その血清を56℃、30分間water bath 中で温度処理し、非働化して、1% marzonin 液を0.1%の容量比になるように加えて保存した。

c 比較抗原について

基準抗血清に対応させてその抗原性の有無・程度（抗原抗体反応の様相）を調べる比較抗原は、供試カボチャ属植物のそれぞれの種子について作った。その調製方法は、上述のTable Queen について基準抗血清を得るために作った免疫原（基準抗原）の調製と全く同じであり、それぞれの種子の脱脂粉末の生理的食塩水抽出液として用意した。

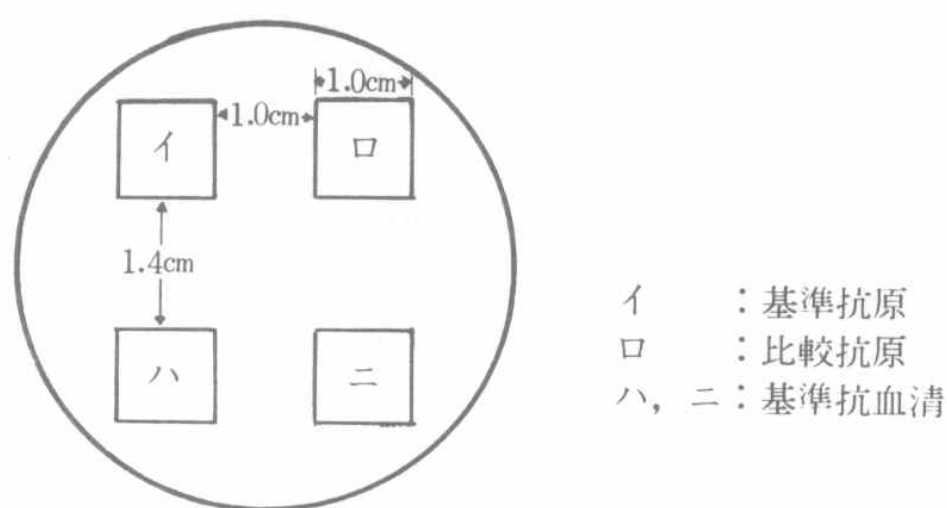
なお、この食塩水種子抽出液は、比較抗原として使用する時に、その都度常に新たに脱脂種子粉末から作った。

d 抗原抗体反応誘起の場としての寒天平板床

寒天ゲルとしては、0.1% sodium azide, 0.002% methyl orange, 0.9% NaCl を含む 1.5% 寒天液を加熱溶解して、濾過したものを用いた。

寒天平板床は次のようにして作った。まず、水平に並べた9cm直径のシャーレに、上述の濾過寒天液を6ml 入れ、10分間放置して固まらせた。次に、抗血清、抗原を入れる寒天クボミを作るために、松井の変法('59)に従って、4個の真鍮製ブロック(1×1×1cm)を第4図のように並べてから15ml の寒天液を静かに流し込み、室温下に放置して充分固まらせた後にブロックを丁寧に取り除いた。

第4図 寒天平板床模式図



e 抗原抗体反応誘起処置

抗血清、抗原の注入クボミ位置としては、第4図のように、①に基準抗原 (Table Queen 食塩水抽出液)、②に比較抗原 (比較対象植物の種子の食塩水抽出液) を入れ、これらに対応する③、④には基準抗血清 (抗Table Queen 家兔血清) を入れた。

各クボミの注入液量は0.2ml. であるが、抗原の蛋白質濃度は、すべて同じになるように生理的食塩水で調整した。

なお、抗原抗体反応は37℃の恒温器内で行わせ、1回のテストには3個のシャーレ (寒天床) を用いた。

f 抗原抗体反応処置結果の判定について

寒天クボミに入れた抗原 (基準抗原または比較抗原)、および基準抗血清は、時間経過と共に、クボミ周囲の寒天ゲル内に拡散して行くわけである。基準抗原 (Table Queen の食塩水抽出液) が基準抗血清と遭遇した場合には、そこに抗原抗体反応が行われて沈澱による沈降線が認められるわけである。基準抗血清と比較抗原が遭遇した場合には、比較抗原構成物質と基準抗原構成物質との質的量的異同に応じて、基準抗血清と基準抗原の遭遇の場合と同じ、または異なる沈降線がみられ、あるいは全く沈降線を欠く場合、また、位置その他が異なる場合も予想されるわけである。

基準抗血清と比較抗原との間の抗原抗体反応の有無、その程度の判定は、沈降線の有無、位置、その他沈降線に関する事項で行われたのであるが、寒天板の観察は、松橋 ('61) の方法に従って、沈降線が出現する前後から行い、その様相を記録し、沈降線が充分に出現した時に、そのシャーレの上方から撮影を行なった。

沈降線については、その位置（抗原注入クボミ，または抗血清注入クボミからの距離），濃淡，線の数，太さなどの観察が，基準反応系（基準抗原と基準抗血清との間の反応系）と比較反応系（比較抗原とそれに対応する基準抗血清との間の反応系）とのそれぞれについて行われると同時に，両反応系間の沈降線の連絡様相（直線連絡か屈曲連絡）も特に注目観察された。

g 抗原抗体反応に基づく類縁の親疎の判定について

供試した植物の類縁の親疎の判定は，第5図のように，基準抗原（①，Table Queen の食塩水種子抽出液）とその抗血清（②）との抗原抗体反応によって生じた沈降線と，比較するために用いた植物種子の食塩水抽出液（③，比較抗原）と抗血清（④，抗Table Queen 家兎血清）との反応によって生じた沈降線との比較によって行われた。すなわち，

1. ①，②間の沈降線と③，④間の沈降線とが一直線に連続している場合（第5-（1）図）は，比較対象となった植物種子は Table Queen の種子と共通の蛋白質をもっていることがうかがわれる。

2. ①，②間の沈降線が③，④間を一直線に伸びることなく，①，③寄りに曲り，③のクボミ中に伸び，消失している場合（第5-（2）図）は，比較対象となった植物種子は，Table Queen の種子とは共通の蛋白質を全く欠いていると考えられる。

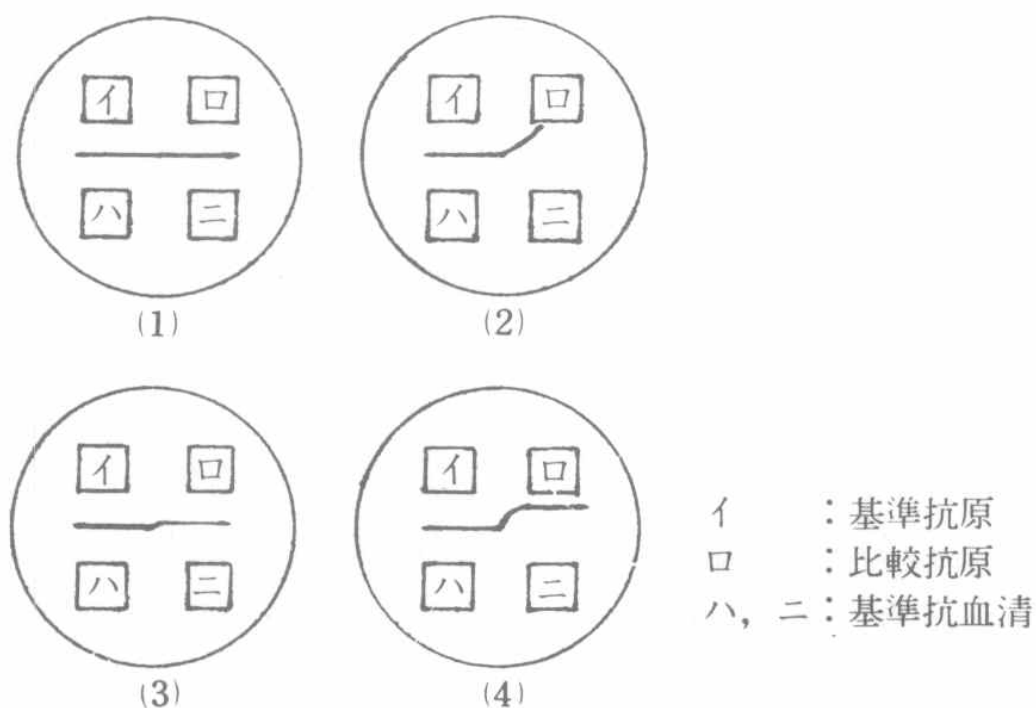
3. ①，②間の沈降線と③，④間の沈降線とが連続している場合でも，①，②間と③，④間との沈降線に濃淡差がある時（第5-（3）図）は，抗原構成物質の濃度差（共通蛋白質の濃度差に基づくものと考えられる。

4. ①，②間の沈降線と③，④間の沈降線とが連続してはいるが，①，②間のものと，③，④間のものが，位置が異っている場合（第5-（4）図）も濃度差に基づくものと考えられる。

h 対照実験について

なお，実験は，種々のカボチャ種子抽出液の基準抗血清に対する抗原性の有無，程度を明らかにする実験に主体がおかれたのであるが，その前提としての調査も行った。すなわち，① 免疫原の注射を行っていない，いわゆる正常家兎血清中に Table Queen 食塩水種子抽出液と抗原抗体反応を起す抗体が存在したかどうかの調査，② 抽出溶媒に用いた生理的食塩水に基準抗血清と抗原抗体反応を起す物質が存在したかどうかの調査および，③ 基準抗原に用いた種子抽出液（Table Queen 種子抽出液）と同じ液を比較抗原として用い，基準反応系と比較反応系との間の沈降線の出現の様相が同じであるかどうかの調査も行った。

第5図 沈降線出現様相模式図



C 実験結果および考案

a 対照実験

a) 正常家兎血清のTable Queen 食塩水種子抽出液に対する反応物質の有無調査：写真1
寒天平板床の上方左右のクボミには免疫原に用いたTable Queen 食塩水種子抽出液を、また、下方左右のクボミには正常家兎血清を注入して、反応の生起を調べたが、全く沈降線は認められなかった。すなわち、正常家兎血清中には、Table Queen 食塩水種子抽出液に対する抗体は全く存在しなかった。

b) 抗Table Queen 家兎血清に対する抽出溶媒（生理的食塩水）の抗原性の有無調査：写真2。

寒天平板床の上方左右クボミには、それぞれ基準抗原（Table Queen 食塩水種子抽出液）を、上方右クボミには抗原の抽出に用いた抽出溶媒（生理的食塩水）を、また、下方左右クボミには基準抗血清を注入して、基準反応系と比較反応系の様相を調べた。

比較反応系には全く沈降線が認められず、基準反応系の沈降線は比較反応系の抗原注入クボミに弯曲消失していた。すなわち、抽出溶媒（生理的食塩水）には、基準抗血清に対して抗原性を有する物質の含有はないことを示している。

c) 基準抗血清に対する同種類の基準抗原（同種類種子の食塩水抽出液）の抗原性の比較検討：写真3。

寒天平板床の上方左右クボミには、Table Queen の抽出液を、下方左右クボミには、基準抗血清を注入した。基準反応系の沈降線と比較反応系の沈降線とはその数において変化なく、また、等しい位置にある。すなわち、このことは期待されることであり、種子抽出液中の蛋白質が質的にも量的にも同じ場合は、基準反応系の沈降線と比較反応系の沈降線の様相は全く同じであることを示している。

b 種内比較血清実験

a) 基準抗血清作出カボチャ（Table Queen）とは同「種」（*C. pepo*）であるが、異品種のカボチャを比較抗原に選んだ場合。

イ. Early Summer Crookneck を比較抗原に採った場合：写真4。

基準反応系の沈降線と比較反応系のその数には変化がない。ただ比較反応系の沈降線の位置が、基準反応系のそれと比較して僅かに抗原側にある。すなわち、Early Summer Crookneck の食塩水抽出液中にはTable Queen のそれと、相同の蛋白質を含んでいるが、その量は少ないことがうかがわれる。

ロ. オモチャを比較抗原に採った場合：写真5。

基準反応系と比較反応系の沈降線が交叉しているが、各線とも連続していて、比較反応系の沈降線の一部は淡くなっていることが認められる。すなわち、オモチャの食塩水種子抽出液中にはTable Queen の食塩水種子抽出液と相同の蛋白質を含んでいるが、それらの蛋白質含量には可成りの相違が認められる。

b) 基準抗血清作出カボチャ（*C. pepo*）の変種（野生種）を比較抗原に採った場合

*C. pepo*の1変種 *cucurbittela* を比較抗原に採った場合：写真6。

基準反応系の数本の沈降線の中、1本が右側の比較反応系の方では可成り屈曲して比較抗原のクボミの方に伸びている。*cucurbittela* の食塩水種子抽出液中の蛋白質の一部の含量は、Table Queen のそれに比して、極めて少ないことが考えられる。

上述の如く、*C. pepo*の種内の食塩水種子抽出液を比較抗原として用いた場合は、比較反応系の沈降線はいずれも基準反応系の沈降線と連絡していて、比較系の抗原側で消失する基準反応系の沈降線は認められなかった。その連絡様相としては、直線連絡と屈曲連絡の両パターンが認められた。このことは、比較に用いた品種、変種の食塩水種子抽出液中には Table Queen のそのの蛋白質と質的に全く同じものを含んでいるが、その含量に異同があることを物語っている。

c 種間比較実験

C. moschata (日向14号) を比較抗原に採った場合：写真7.

基準反応系の数本の線が、比較反応系の方では欠除（弯曲消失）している。*C. pepo* L. “Table Queen” と「種」を異にする *C. moschata* 食塩水種子抽出液中には、Table Queen のそれに存在する蛋白質と質的に同じ蛋白質も含まれているが、また一方、ある種の蛋白質は全く含有されていないことがうかがわれる。

IV ウリ科栽培植物の系統類縁に関する血清学的研究

A 緒 言

本実験においては、カボチャ属作物の「品種」または、「種」を異にするものについてのみでなく、ひろくウリ科作物の「属」を異にするものについて、それぞれの種子蛋白質の質的、量的異同の検討を血清学的におこなった。

本実験においては、抗原用蛋白質の抽出の方法、および検定用の基準抗血清を得るための抗原（免疫原）の動物免疫の方法について、先記Ⅲの実験とは異なる方法を採用している。すなわち、種子抽出の溶媒として $\frac{1}{30}$ M, pH 8.5 の phosphate buffer を用い、抽出液は凍結乾燥して保存し免疫法としては Freund の complete adjuvant 法を採用した。その意図する点は、抽出蛋白質を量的・質的に増し、抗血清採取用家兎の斃死率を低下させ、抗体価の高い抗血清を得たいということにあった。なお、基準抗血清には、カボチャ属3「種」についての各1品種から作出した3種類を供試した。

B 実験材料および方法

a 供試植物種子

供試したウリ科作物の種子は第2表のように7「属」10「種」に亘る16「品種」である。これらの種子はすべて市販のものであった。

第2表 供 試 種 子

種 名	園芸品種名
<i>Cucurbita maxima</i> Duch.	デリシャス, マンモスポンキン 赤皮打木, 早生芳香
<i>C. pepo</i> L.	ラージポンキン, 糸南瓜
<i>C. moschata</i> Duch.	白皮砂糖菊座, 会津中型, 鶴首
<i>Cucumis sativus</i> L.	四葉
<i>C. melo</i> L.	沼目越瓜
<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad.	大丸大和