

## シラベの雌性配偶体の遺伝子分析

清 藤 城 宏

Inheritance of Isozyme Variants in Megagametophyte  
Tissues of Shirabe (*Abies Vitchii* Lindle.)

Kunihiro SEIDO

Summary: Inheritance of isozyme in Megagametophyte (IN) tissues of Shirabe (*Abies Vitchii* Lindle.) was investigated by using polyacrylamide vertical slab gel electrophoresis. Sixteen enzyme systems were analysed to detect marker genes in this study. The results of the segregation of isozyme indicated that seven enzyme systems were controlled by at least 14 alleles in 7 loci. A single locus was detected in each of 7 enzyme systems, Glutamate dehydrogenase (GDH), Esterase (EST), Diaphorase (DIA), Leucine aminopeptidase (LAP), Malate dehydrogenase (MDH), Phosphoglucomutase (PGM) and Fumarase (FM).

要旨: シラベの標識遺伝子を検出するため、雌性配偶体(IN)を用いて平板ポリアクリルアミド垂直電気泳動法によりアイソザイムの遺伝様式を分析した。本研究において16酵素種を調査した。その結果7酵素種は少なくとも7遺伝子座、14対立遺伝子によって支配されていることがわかった。すなわち、グルタミン酸脱水素酵素(GDH)、非特異的エステラーゼ(EST)、ディアフォラーゼ(DIA)、ロイシアミノペプチターゼ(LAP)、リンゴ酸脱水素酵素(MDH)、ホスホグルコムターゼ(PGM)および、フマラーゼ(FM)の7酵素種それぞれ1遺伝子座を解明した。

## I はじめに

山梨におけるシラベの天然分布は、県の全域の亜高山地帯に分布する主要な樹種であり、山梨県の亜高山帯造林樹種としても重要な一樹種である。モミ属の中でもシラベに関しては、遺伝育種的な研究はかならずしも多くない(長田、1970; 清藤ら、1969; 清藤、1979; 清藤、1979)。

近年、遺伝的解析にアイソザイム手法が多く用いられるようになった。わが国においても、スギ(津村、1989; 奥泉、1982; 奥泉ら、1990)、ヒノキ(白石ら、1983, 1986; Uhida et al., 1991)アカマツ(Na'iem et al., 1989)、クロマツ(Shiraishi, 1988; Shiraishi, 1989)、ゴヨウマツ(戸丸ら、1990)、トドマツ(長坂ら、1990)等の樹種において多くの酵素種で遺伝子座が見いだされ、

諸外国のアイソザイム研究と肩をならべるに至っている。

これまでにマツ属で多くの遺伝子分析が進み、遺伝子マーカーとして用いられている(Conkle, 1971; Conkle, 1981; Mitton et al., 1979; Rudin, 1977)。その理由は、種子が比較的大型で、母親由来の半数体組織(n)の雌性配偶体(胚乳)を用いることが容易なことによる。その個体の遺伝子型がヘテロ接合型であれば、アイソザイムが1:1のメンデル比に分離するため、わざわざ交配という手段を経なくても比較的短時間に容易に分析出来るからである。

モミ属ではバルサムモミ(*Abies balsamea*) (NEALE, D. B., and W. T. ADAMUS, 1981)、トドマツ(*Abies sachalinensis*) (長坂ら、1990)、アオモリトドマツ(*Abies Mareiasii*) (陶山、1988)

等の報告がある。しかし、シラベ (*Abies veitchii*) の遺伝子分析の報告は見あたらない。本樹種は、モミ属の中では比較的小型種子であるが、しかし雌性配偶体を用いて十分遺伝子分析が可能である。

本研究では、シラベの遺伝変異、繁殖構造等を分析するための遺伝的マーカーを探索するため、雌性配偶体を用いて遺伝子分析を試みた。

## II 材料と技法

1990年10月、富士山五合目(標高2,350m)付近においてシラベ天然木15個体より、球果を採取した。採取した球果は直ちに自然乾燥させ、種子を取り出し、精選した。精選した種子は、実験開始まで $-40^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に保存した。実験に際しては、種子を1時間流水にさらした後、3%過酸化水素水に24時間浸し、0.8%寒天を流したバットに蒔きつけ、 $4^{\circ}\text{C}$ で約1ヶ月間、低温湿層処理をおこなった。低温湿層処理後インキュベーターに移し、 $25^{\circ}\text{C}$ ・暗所の条件下で発芽させた。発芽は

早いものでは10日目から始まった。発根が1~10mm程度のもを順次取り出し、3%グリセリン溶液のエッペンドル・チューブに、1個体あたり種子を5ないし10個入れ、分析開始まで $-40^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。材料の保存手順を図-1に示す。泳動用の試料に、解冻後直ちに芽ばえ種子の外皮・内皮・胚を取り除き、雌性胚偶体を取り出し順次実験に用いた。110 $\mu\text{l}$ の抽出液を入れたマイクロ・ホモゲナイザー内で摩砕した。抽出液は0.1Mトリス-塩酸緩衝液pH7.5、8mM DTT、8mM NADP、8mM NADTPを加えたものである。摩砕後、 $0^{\circ}\text{C}$ 4,000rpm、30分の条件で遠心分離をおこない、遠心分離後、上清液を電気泳動試料として用いた。電気泳動は上記試料12 $\mu\text{l}$ を平板ポリアクリルアミド垂直電気泳動法を用い7.5%分離ゲル、3.75%濃縮ゲルを使用した。電気泳動は $4^{\circ}\text{C}$ 、12.3mA/cm<sup>2</sup>の条件で約150分間おこなった。染色は白石の方法(白石、1987)に従っておこなった。

## III 結果と考察

分析に用いた酵素種は酸脱水素酵素(SHD)、ディアフォラーゼ(DIA)、ロイシニアミノペプチターゼ(LAP)、エステラーゼ(EST)、グリコースリン酸イソメラーゼ(PGI)、ホスホグルコムターゼ(PGM)、リンゴ酸脱水素酵素(MDH)、グルコキナーゼ(GK)、グルタチオンレダクターゼ(GR)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)、メナディオレダクターゼ(MR)、グルタミン酸脱水素酵素(GDH)、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(GP)、アスパラギン酸アミノ転移酵素(GOT)、フマラーゼ(FM)、6ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PG)の16酵素種である(表-1)。各酵素の染色時間と固定方法を表-2に示した。

今回用いた酵素種では、雌性配偶体を用いた場合ほとんどの酵素で明らかにバンドが読み取れる泳動像が得られた。しかし、今回は15個体と個体数が少なかったため、バンドに変異がなく遺伝子座を確定できる酵素は少なかった。ここでは一応、分析に用いた全部の酵素種について触れておく。

### 1) シキニ酸脱水素酵素(SHD)

RF32と39の位置に活性の高いバンドが検出

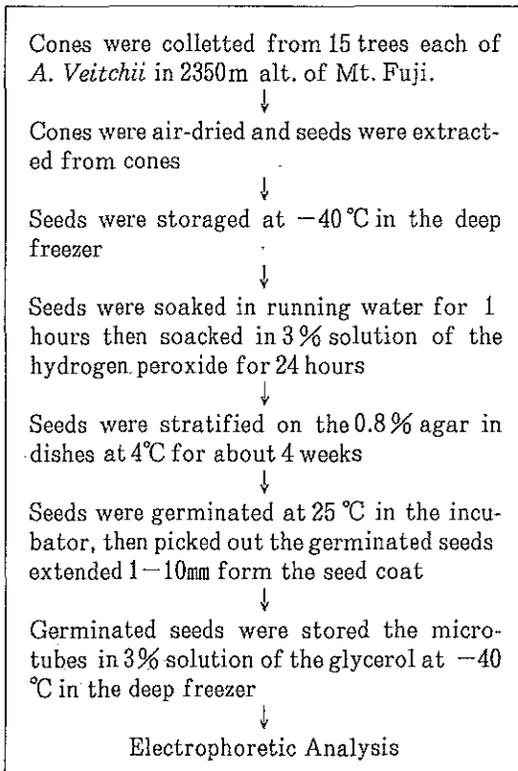


図-1 分析材料の調整手順  
Procedure of the making materials in *A. Veitchii*

表-1 実験に用いた酵素種の欧文名及びその E.C.番号  
Investigated enzyme systems, their abbreviation and  
Enzyme Commission reference number(E.C.no)

No.	Enzyme	Abbrev.	E.C.no
1	Shikimate dehydrogenase	SHD	1.1.1.25
2	Glutamate dehydrogenase	GDH	1.4.1.22
3	Esterase	EST	3.1.1
4	Glutamate oxaloacetate transaminase	GOT	2.6.1.1
5	Diaphorase	DIA	1.6.4.3
6	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6P	1.1.1.49
7	Malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37
8	Leucine aminopeptidase	LAP	3.4.11.1
9	Glucose phosphate isomerase	PGI	5.3.1.9
10	Phosphoglucomutase	PGM	2.7.5.1
11	Glucokinase	GK	2.7.1.2
12	Glutathione reductase	GR	1.6.4.2
13	Menadione reductase	MR	1.6.99.2
14	Isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.41
15	Fumarase	FM	4.2.1.2
16	6-Phosphogluconate dehydrogenase	6PG	1.1.1.44

表-2 シラベ雌偶体における各酵素種の染色条件と固定液  
Staining condition and fixation solution in *Abies Veitchii*

No.	Enzyme	Temperature	Time(min.)	Fixation solution
1	SHD	37°C	25	Fix A
2	GDH	37°C	10	Fix B
3	EST	Pre. 37°C	10 add 15	Fix A
4	GOT	Room Temp	12	D. W.
5	DIA	37°C	12	Fix A
6	G6P	37°C	20	Fix A
7	MDH	Room Temp	10	Fix B
8	LAP	37°C	25	Fix A
9	PGI	37°C	45	Fix A
10	PGM	37°C	40	Fix A
11	GK	37°C	50	Fix A
12	GR	37°C	15	Fix A
13	MR	37°C	10	Fix A
14	IDH	37°C	40	Fix A
15	FM	37°C	30	Fix B
16	6PG	37°C	10	Fix A

Fix A : 50% Ethanol, Fix B : 50% Ethanol-5% Acetic acid

された。すべて同じ位置にバンドがあり分離は見られなかった。陶山(1988)のアオモリトドマツの分析結果によれば3本のバンドが検出され、3つの対立遺伝子に支配されている遺伝子座であることが確認されているが、今回の結果からは明らかに出来なかった。

2) ディアフォラーゼ(DIA)

Rf24から50のあいだに10本のバンドがみられた。Rf24の位置でバンドが有る・無しで分離が認められたのでそのゾーンを検定した。分離しても各個体で分析数の少ないものも多く(最低5雌性配偶体)、 $\chi^2$ 検定ができない固体も出現してくるので、ここでは合計値を検定した。 $\chi^2$ の自由度、1の値3.84より小さい場合は、期待値に観察値が一致するが、ここでも1:1の分離比に適合することが認められた。したがって、Diaの遺伝子座で活性なa遺伝子と不活性なo(ヌル)遺伝子の2対立遺伝子が支配していることがわかった(図-2)。

表-3 Dia 遺伝子座における各遺伝子型の分離 Segregation of isozyme variants in Dia locus

Tree No	Genotype		$\chi^2$
	a	o	
5	5	5	0.06
14	2	3	
Total	7	8	

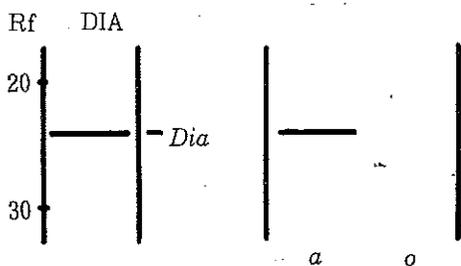


図-2 ディアフォラーゼアイソザイム(DIA)のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型 Megagametophte isozyme banding patterns and their allelic designation for DIA isozyme

3) ロイシンアミノペプチターゼ(LAP)

Rf38から54の間に7本のバンドがみられた。Rf38と40の接近した位置で遺伝子座が有るように思えたが今回は省略し、Rf50の位置でLap-2が予想されたので検定した。

1:1の分離比に適合することが認められた。したがってLapの遺伝子座で活発なa遺伝子と不活性なo(ヌル)遺伝子の2対立遺伝子が支配していることがわかった(図-3)。

表-4 Lap 遺伝子座における各遺伝子型の分離 Segregation of isozyme variants in Lap locus

Tree No	Genotype		$\chi^2$
	a	o	
11	2	3	0.0
12	3	2	
Total	5	5	

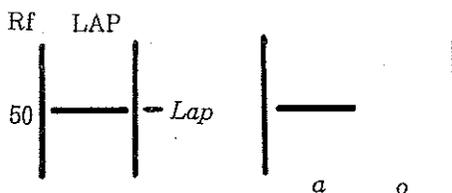


図-3 ロイシンアミノペプチターゼ(LAP)のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型 Megagametophte isozyme banding patterns and their allelic designation for LAP isozyme

4) 非特異的エステラーゼ(EST)

Rf24から72の間に10本以上のバンドが検出されたバンドが多く、不安定なザイモグラムの酵素と考えられ、Rf39と42の位置に出現したバンドのみの分離を検定した。

1:1の分離比に適合することが認められた。したがってEstの遺伝子座で活性なa遺伝子と

b遺伝子の2対立遺伝子が支配していることがわかった(図-4)。

表-5 *Est* 遺伝子座における各遺伝子型の分離  
Segregation of isozyme variants in *Est* locus

Tree No.	Genotype		$\chi^2$
	a	o	
7	3	2	1.181
8	2	3	
4	1	3	
Total	6	8	

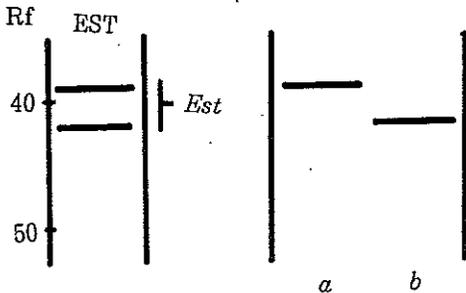


図-4 非特異性的エステラーゼ (EST) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型  
Megagametophte isozyme banding patterns and their allelic designation for EST isozyme

5) グルコースリン酸イソメラーゼ(PGI)

Rf16から32の間で5本以上のバンドがみられたが、すべて変異は認められず、遺伝子座は検出来なかった。

6) ホスホグルコムターゼ(PGM)

Rf49、52、54の位置にそれぞれ2本を1組に認められた。このことから3つの対立遺伝子の支配している遺伝子座を予想し、分離比を検定した。

表-6に示したようにa/cとb/cの分離はそれぞれ1:1の分離比に適合することが認められた。したがってPgmの遺伝子座では活性なa遺伝子、b遺伝子、c遺伝子の3対立遺伝子が支配していることがわかった(図-5)。

表-6 *Pgm* 遺伝子座における各遺伝子型の分離  
Segregation of isozyme variants in *Pgm* locus

Tree No.	Genotype			$\chi^2$
	a	b	c	
6	6		4	0.429
15	6		5	
Total	12		9	
5		7	8	0.04
8		2	3	
12		3	2	
Total		12	13	

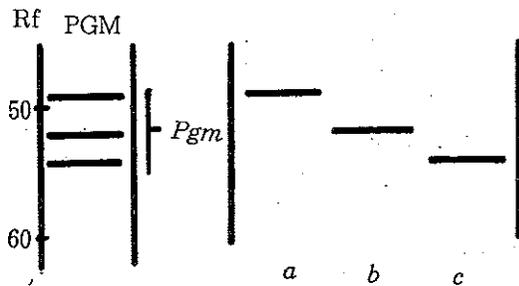


図-5 ホスホグルコムターゼ (PGM) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型  
Megagametophte isozyme banding patterns and their allelic designation for PGM isozyme

7) リンゴ酸脱水素酵素(MDH)

Rf27から40の間に6本のバンドがみられた。その中で分離の見られたのはRf27の位置で遺伝子座が予想されたので検定した。

1:1の分離比に適合することが認められた。したがってMdh遺伝子座で活性なa遺伝子と不活性なo(ヌル)遺伝子の2対立遺伝子が支配していることがわかった(図-6)。

表-7 *Mdh* 遺伝子座における各遺伝子型の分離  
Segregation of isozyme variants in *Mdh* locus

Tree No.	Genotype		$\chi^2$
	<i>a</i>	<i>o</i>	
2	3	7	1.28
7	3	5	
8	3	2	
14	2	3	
Total	11	17	

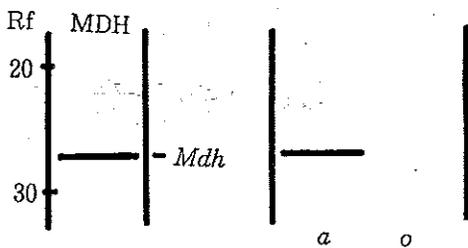


図-6 リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型

Megagametophte isozyme banding patterns and their allelic designation for MDH isozyme

11) メナディオソレダクターゼ(MR)

Rf36から66の間に少なくとも8本のバンドがみられた。上部のバンドに変異がみられたが、分離比の検定をするだけの数はなかったので遺伝子座の確定は出来なかった。

12) グルタミン酸脱水素酵素(GDH)

Rf12の位置に非常にシャープなバンドがいずれの個体においてシャープな泳動像で検出された。バルサムモミ (Neale and ADAMUS, 1981)、トドマツ (長坂ら、1990) で分析して得た結果、1本のバンドであることが判っており、ここでも同様の結果であったので単型的遺伝子座・*Gdh* によって支配されていると考えた (図-7)。

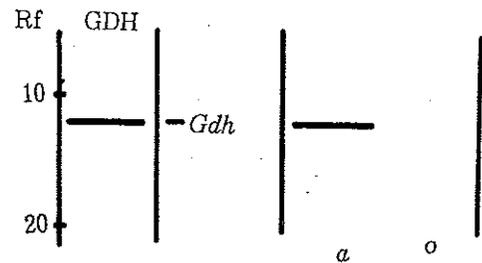


図-7 グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型

Megagametophte isozyme banding patterns and their allelic designation for GDH isozyme

8) グルコキナーゼ(GK)

Rf24と27の間に3本の細いバンドが出現し、Rf41から46の間で、太いバンド2本が出現した。各ゾーンでバンドの変異が見られなかったので遺伝子座は確認できなかった。

9) グルタチオンレダクターゼ(GR)

Rf22から54の間で7から8本のバンドがみられたが変異はなく遺伝子座の確定はできなかった。

10) イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)

Rf38付近に活性の高いバンドがすべてに現れ、その上に活性の弱いバンドが見られた。しかし遺伝子座の確定はできなかった。

13) グルコース-6-酸脱水素酵素(G6P)

Rf15と25に活性の高いバンドがすべてに現れ、Rf10に若干活性の弱いバンドが見られたが、しかし遺伝子座の確定はできなかった。

14) アスパラギン酸アミノ転移酵素(GOT)

Rf13と17、Rf34と40に明瞭な活性の高いバンドがみられた。いずれの個体においても変異が認められず、遺伝子座の特定は出来なかった。

15) フマラーゼ(FM)

Rf17と19の位置でバンドが分離していた。

1 : 1 の期待値に適合するので、Fm 遺伝子座は、a、bの2つの対立遺伝子によって支配されていることがわかった(図-8)。

表-8 Fm 遺伝子座における各遺伝子型の分離 Segregation of isozyme variants in Fm locus

Tree No.	Genotype		$\chi^2$
	a	o	
2	4	6	0.4

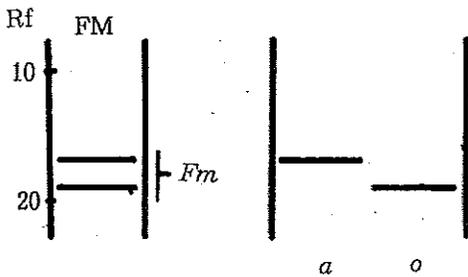


図-8 フマラーゼ (FM) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型

Megagametophyte isozyme banding patterns and their allelic designation for FM isozyme

16) 6 ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PG)

Rf25、26、27で非常にクリアーな3本のバンドが見られ、1つのゾーンと思われた。今回は4個体しか分析出来なかったため遺伝子座の確定できないが、今後確認したい。

以上今回の雌性配偶体のアイソザイム分析の結果、16酵素種の内、7酵素7遺伝子座14対立遺伝子が明らかになった。これらを取りまとめ、表-9に示した。モミ属のこれまでの報告では、バルサムモミで8酵素種、14遺伝子座(Neale and Adams, 1981)、アオモリトドマツで9酵素種、16遺伝子座(陶山、1988)、トドマツ10酵素種、14遺伝子座(長坂ら、1990)である。矢原(1988)

によると、高等2倍体植物において代謝系の酵素種を支配する遺伝子座の最小数は一定であることが解明されている。今回もちいた酵素種では、すでに述べたとおり、泳動像はかなりシャープにできている。したがって、今後多くの個体の種子を材料にして分析をおこなうことによって、新たな遺伝子座が明らかになると考えられる。

ご指導賜った森林総合研究所、生態遺伝学研究室・北村系子嬢、また、惜しまず御協力くださった山梨県林業技術センター・長田十九三氏、神戸陽一氏、田中格氏、相沢武夫氏には心からお礼申し上げます。

表-9 確認されたシラベの遺伝子座と対立遺伝子 Identified isozyme loci and their alleles in 7 enzyme systems

Enzyme	Locus	No. of alleles (Name of thies)
GDH	<i>Gdh</i>	1 (a)
EST	<i>Est</i>	2 (a,b)
DIA	<i>Dia</i>	2 (a,o)
LAP	<i>Lap</i>	2 (a,o)
MDH	<i>Mdh</i>	2 (a,o)
PGM	<i>Pgm</i>	3 (a,b,c)
FM	<i>Fm</i>	2 (a,b)
7	7	14

o : null allele

引用文献

- Conkle, M. T. : Inheritance of Alcohol dehydrogenase and Leucine Aminopeptidase Isozymes in Knobcone pine, For. Sci. 17, 190-194, 1971
- Conkle, M. T. : Isozyme variation and Linkage in six conifer species, USDA Gen. Tech. Rep. PSW-48, 11-17, 1981
- Mitton, J. B., Y. B. Linhart, K. B. Sturgen, and J. L. Hamrick : Allozyme Polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. J. of Hered. 70, 86-89, 1979
- 長坂寿俊・河野耕蔵 : トドマツ交配種子によるアイソザイム遺伝様式. 林育研報No.8、169-179、1990
- NEALE, D. B., and W. T. ADAMUS : Inheritance of isozyme variants in seed tissues of balsam fir (*Abies balsames*). CAN. J. BOT. Vol.59, 1285-1291, 1981
- Na'iem Mohammad, T. Yoshihiko, K. Uchida, T. Nakamura and K. Ohba : Inheritance of Isozyme Variants of Megagametophyte of Japanese Red Pine Plus Tree Clones in Eastern Japan, Tsukuba Univ. For. No.5, 49-140, 1989
- 奥泉久人 : アイソザイムによるスギさし木在来品種の系統分類. 1987年度農学修士論文、筑波大学大学院、144pp、茨城、1987
- 奥泉久人・大庭喜八郎 : アイソザイムの4遺伝子座の遺伝子型による集積されたオビスギ系14品種. ヤブクグリおよびメアサのさし木品種内クローン数の推定、日林誌72(6)、501-507、1990
- 長田十九三 : ウラジロモミ・シラベ種子の標高による変異. 81回日林講、1970
- Rudin, D. : The isozyme technique. Thesis, University of Umea, 1977
- 陶山佳久 : アイソザイムによる八幡平と吾妻山におけるオオシラビソの遺伝学的研究. 筑波大学院修論、筑波、1-77、1988
- 清藤城宏・長田十九三 : シラベ雌花の外部形態の発達. 山梨県林試報、No.15、1-9、1979
- 清藤城宏 : シラベ花粉の形成と発育ならびに花粉の採集方法. 山梨県林試報、No.15、10-20、1979
- 清藤城宏・長田十九三・古越隆信 : シラベ種子の採取適期. 80回日林講、1969
- 白石 進・上中久子 : ヒノキ針葉パーオキシダーゼ・アイソザイムの遺伝. 94回日林講 : 287-288、1983
- 西村慶二 : ヒノキ針葉および花粉のアスパラギン酸アミノ転移酵素アイソザイムの遺伝. 日林誌68 : 499-504、1986.
- Shiraishi, S. : Inheritance of isozyme variations in Japanese black pine, *Pinus thunbergii* Parl. Silvae Genet. 37 : 93-100, 1988
- : Linkage relationships among allozyme loci in Japanese black pine, *Pinus thunbergii* Pari. Silvae Genet. 37 : 93-100, 1988
- 白石 進 : アイソザイムの遺伝子分析とその利用. 林木の育種140、1987
- 白石 進 : アイソザイム分析法—その実験と林木育種への利用—  
(1) 林木の育種142、23-25、1987
- 白石 進 : アイソザイム分析法—その実験と林木育種への利用—  
(1) 林木の育種143、34-38、1987
- 白石 進 : アイソザイム分析法—その実験と林木育種への利用—  
(1) 林木の育種145、29-32、1987
- 津村義彦 : スギのアイソザイムの遺伝分析に関する研究. 筑波農林学研、1-63、1989
- 戸丸信弘・津村義彦・大庭喜八郎 : チョウセンゴヨウのアイソザイムの遺伝. 日林誌72(3)、194-200、1990

Uchida Kouji, Y. Tsumura, and k. Ooba : Inheritance of Isozyme Variants in Leaf Tissues of Hinoki, *Chamaecyparis obtusa*, and Allozyme Diversity of two Natural Forest. Japan, J. Breed. 41, 11-24, 1991

矢原 徹一 : 酵素多型を用いた高等植物の進化学的研究 — 最近の進歩. 種生物学研究 12, 26-55, 1988