

## スギのアスパラギン酸アミノ転移酵素アイソザムの遺伝

誌名	日本林學會誌 = Journal of the Japanese Forestry Society
ISSN	0021485X
著者	奥泉, 久人 大庭, 喜八郎 白石, 進
巻/号	72巻1号
掲載ページ	p. 58-61
発行年月	1990年1月

## 短 報

## スギのアスパラギン酸アミノ転移酵素アイソザイムの遺伝\*

奥泉久人\*\*・大庭喜八郎\*\*・白石 進\*\*\*

OKUIZUMI, Hisato, OHBA, Kihachiro, and SHIRAIISHI, Susumu: **Inheritance of glutamate oxaloacetate transaminase isozymes in sugi (*Cryptomeria japonica*)** J. Jpn. For. Soc. 72: 58~61, 1990 Inheritance of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) isozyme variations was investigated in sugi (*Cryptomeria japonica* D. DON). Four distinct bands, Rf31, Rf33, Rf35, and Rf41, were observed in needle tissues from adult trees and seedlings. Analysis of segregating progenies in families by self-pollination revealed that Zone-1 with the three bands, Rf31, Rf33, and Rf35, was controlled by two alleles, *Got-1<sup>a</sup>* and *Got-1<sup>b</sup>*, and Zone-2 with a single band, Rf41, was controlled by *Got-2<sup>a</sup>*.

## I. はじめに

現在までに、アイソザイムはさまざまな樹種で多くの遺伝子分析が行われ、遺伝的マーカーとして利用されている(9)。スギ(*Cryptomeria japonica* D. DON)におけるアイソザイムの遺伝子分析は、数種の酵素種で行われている(5, 16)。これらの中で比較的活性の高い泳動像を得ることができるのはパーオキシダーゼ(POD)であり、クローン同定などスギの遺伝育種的研究に、そのザイモグラムが利用されてきた(7)。しかし、1)パーオキシダーゼ(POD)のアイソザイム分析では、基質特異性が低いために、スギ成木の針葉では多数のバンドが出現し、バンドの正確な同定が困難である、2)また、スギのPODでは、ごく若いステージの葉を除いては、アイソザイムパターンは安定していると報告されている(7, 4)が、樹種や酵素によっては採取する季節、樹体中の部位の違いによって、バンドの発現が一定しないものも報告されている(1, 13, 15)。

今後スギにおいても有用な遺伝マーカーを増やすため、POD以外の酵素についても利用する必要があるので、本研究では、高い基質特異性を示し、鮮明な泳動像が得られるアスパラギン酸アミノ転移酵素(GOT)アイソザイムに着目し、その遺伝子分析を行った。

## II. 材料と方法

遺伝子分析のための供試材料としては、精英樹選抜育種事業で選抜された精英樹3クローン、西諸県1号、始良26号、浮羽7号と九州地域の在来品種2クロー

ン、エダナガ(個体番号1)、トサアカ(個体番号544)の計5クローンの自殖家系を用いた。交配は、1986年と1987年の2回行い、これによって得た種子を、低温湿層処理した後、0.8%寒天上にまき、30°C・明所(8時間)、20°C・暗所(16時間)の条件下で発芽させた。発芽後、幼根の長さが15mm程度になったものから逐次サンプリングし、実験に用いるまで-40°Cで保存した。

泳動用試料の調整は、冷凍保存した試料から種皮および胚乳を取り除き、子葉・胚軸・幼根など、胚から生じて間もない諸器官(以下単に「メバエ」と呼ぶ)を取り出し、90 $\mu$ lのメバエ用抽出液(II)でマイクロホモジナイザーを用いて磨砕したのち、7,000 $\times$ g, 0°Cで10分間遠心分離を行った。遠心後得られた上清を電気泳動に用いた。

また、針葉のGOTアイソザイムの分析のためには、上記のスギ5クローン(約20年生)から当年生針葉を採取し、ポリプロピレン製の袋に密封し、-40°Cで保存した。これらの針葉100mgを乳鉢を用いて液体窒素中で磨砕したのち、針葉用抽出液1mlとポリクラールAT75mgを加えて抽出し(II)、45,000 $\times$ g, 0°Cで10分間と30分間の2回の遠心分離を行い、その上清を泳動用試料とした。

アイソザイム分析のための電気泳動は、上記の上清10 $\mu$ lを平板ポリアクリルアミドゲル垂直電気泳動法により、4°C, 12.3mA/cm<sup>2</sup>の条件下で150分間行った(10)。アイソザイムの検出は、白石(14)に従って行った。

\* 本研究の要旨は、第99回日本林学会大会(1988)で口頭発表した。

\*\* 筑波大学農林学系 Inst. of Agric. and For., Univ. of Tsukuba, Ibaraki 305

\*\*\* 森林総合研究所 For. and Forest Prod. Res. Inst., Ibaraki 305

III. 結果と考察

針葉の GOT アイソザイムは、Rf31, Rf33, Rf35, Rf41 の 4 本のバンドが観察された (図-1)。このうち、移動度の最も早い Rf41 のバンドはすべてのクローンで出現し、また残りの 3 バンドはクローン間で出現パターンに違いがみられたことから、それぞれ別のゾーン (Zone-1, Zone-2) として考えた。Zone-1 では、図-1 に示すように、エダナガ、トサアカは活性の高い Rf35 のバンドのみを有し、西諸県 1 号、始良 26 号、浮羽 7 号は活性の低い Rf31, Rf35 の 2 本のバンドとその中間に比較的活性の高い Rf33 のバンドを合わせもっていた。そこで、これらのバンドパターンから、単一遺伝子座にある *Got-1<sup>a</sup>* と *Got-1<sup>b</sup>* の 2 個の対立遺伝子によって支配されるダイマー (2 量体) 型 (2) の遺伝様式を仮定し、これから期待される自殖家系の表現型 (遺伝子型) の分離比を調べた。この仮定のもとでは、遺伝子型が *Got-1<sup>a</sup>/Got-1<sup>a</sup>* であるホモ接合型個体は Rf31

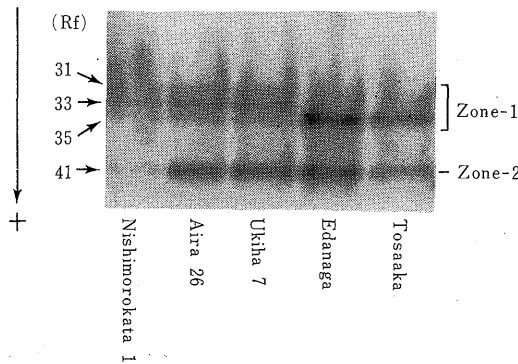


図-1. スギ針葉で観察された GOT アイソザイム Banding patterns of GOT isozymes from needles of sugi

のバンドをもつ表現型, *Got-1<sup>b</sup>/Got-1<sup>b</sup>* のホモ接合型個体は Rf35 のバンドをもつ表現型, また *Got-1<sup>a</sup>/Got-1<sup>b</sup>* のヘテロ接合型個体は、Rf31, Rf33, Rf35 の 3 バンドをもつ表現型を示すことになる (図-2)。

針葉とメバエを同一ゲル上で電気泳動を行ったところ、針葉に出現した 4 本のバンドは、メバエでも観察された (図-3)。また、メバエの Zone-2 に出現したバンドの活性はきわめて低かったが、針葉の Zone-2 のバンドとの間で移動度に違いがみられず、供試個体 (メバエ) はすべて *Got-2<sup>a</sup>/Got-2<sup>a</sup>* のホモ接合型であるものと思われる。

遺伝子分析において、親木のバンドパターン (表現型) から推定される遺伝子型が *Got-1<sup>a</sup>/Got-1<sup>a</sup>* であるクローンの自殖家系では、すべて *Got-1<sup>a</sup>/Got-1<sup>a</sup>* 型となり Rf31 のバンドのみが出現すると予想されるが、今回用いた材料中には、この遺伝子型と想定される自殖家系がなかったため調査できなかった。

親木のバンドパターンから推定される遺伝子型が *Got-1<sup>a</sup>/Got-1<sup>b</sup>* のヘテロ接合型クローンの自殖家系では、*Got-1<sup>a</sup>/Got-1<sup>a</sup>* (Rf31 のバンド 1 本をもつ表現型), *Got-1<sup>a</sup>/Got-1<sup>b</sup>* (Rf31, 33, 35 の 3 本のバンドをもつ表

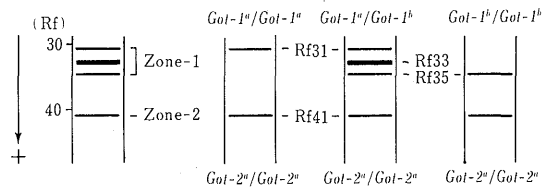


図-2. メバエの GOT アイソザイムで観察された表現型とその遺伝子型の対応

GOT isozymes recognized in needle tissues (left) and three kinds of banding patterns (phenotype) controlled by two loci (right)

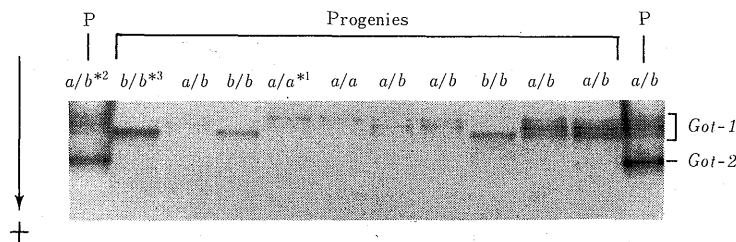


図-3. 西諸県 1 号の自殖家系の Zone-1 における表現型の分離 Segregation of banding patterns in progenies by self-pollination of Nishimorokata 1

\*1 *Got-1<sup>a</sup>/Got-1<sup>a</sup>*; \*2 *Got-1<sup>a</sup>/Got-1<sup>b</sup>*; \*3 *Got-1<sup>b</sup>/Got-1<sup>b</sup>*.

表-1. 各自殖家系における表現型(遺伝子型)の分離結果  
Segregation of genotypes in progenies of five families by self-pollination

Self-pollinated families		Sample size	Observed values			Expected values			$\chi^2(P)$
Parental trees	Genotype		a/a* <sup>1</sup>	a/b* <sup>2</sup>	b/b* <sup>3</sup>	a/a	a/b	b/b	
Nishimorokata 1	a/b×a/b	40	8	22	10	10	20	10	0.60(0.50~0.75)
Aira 26	a/b×a/b	40	12	19	9	10	20	10	0.55(0.75~0.90)
Ukiha 7	a/b×a/b	40	10	19	11	10	20	10	0.15(0.90~0.95)
Edanaga	b/b×b/b	40	0	0	40	0	0	40	—
Tosaaka	b/b×b/b	40	0	0	40	0	0	40	—

\*<sup>1</sup>Got-1<sup>a</sup>/Got-1<sup>a</sup>; \*<sup>2</sup>Got-1<sup>a</sup>/Got-1<sup>b</sup>; \*<sup>3</sup>Got-1<sup>b</sup>/Got-1<sup>b</sup>.

現型), Got-1<sup>b</sup>/Got-1<sup>b</sup> (Rf35 のバンド 1 本をもつ表現型) の 3 遺伝子型に相当する 3 表現型の分離比が 1:2:1 になることが期待される。供試した西諸県 1 号, 始良 26 号, 浮羽 7 号の 3 クローンの自殖家系における分離結果はほぼ 1:2:1 となり, メンデルの法則に従った分離を示した (図-3, 表-1)。

親木のバンドパターンから推定される遺伝子型が Got-1<sup>b</sup>/Got-1<sup>b</sup> のホモ接合型クローンの自殖家系では, Got-1<sup>b</sup>/Got-1<sup>b</sup> の遺伝子型に相当する Rf35 のバンド 1 本をもった個体のみが現れることが期待される。調査したエダナガ, トサアカの 2 クローンの自殖家系では, Got-1<sup>b</sup>/Got-1<sup>b</sup> 遺伝子型のみが出現した (表-1)。

また, ヘテロ接合型の個体ではホモ接合型の個体に見られない, ダイマー型の雑種酵素, すなわち Rf33 のバンドが観察された。これらのことから, 針葉とメバエ中の GOT アイソザイムの Zone-1 で観察される 3 種類の表現型は, ダイマー型の遺伝様式をもつ, Got-1<sup>a</sup> と Got-1<sup>b</sup> の一対の対立遺伝子によって支配されていることが確認された。

GOT アイソザイムに関して, 今回新たにスギで二つの遺伝子 (Got-1, Got-2) が確認されたが, *Chamaecyparis obtusa* (S. et Z.) ENDL. (14), *Pinus sylvestris* L. (8), *Pinus virginiana* MILL. (17) で二つの遺伝子がすでに確認されている。一方, *Pinus thunbergii* PARL. (12), *Picea abies* (L.) KARST. (6) では, 3 個の遺伝子によって支配されていることが報告されている。

スギの遺伝育種研究を進めるうえで必要となる標識として, 従来, 形態変異遺伝子 (5), 染色体変異 (3) やパーオキシダーゼアイソザイムのザイモグラム (7) が利用されてきた。また, 各種酵素のアイソザイムを用いてすでにいくつかの標識遺伝子が探索されている (5, 16) が, それらの遺伝子の発現は幼苗, 幼齡木の限られた発育段階でしか確認されていない。今回, ス

ギ成木の針葉とメバエの中に含まれる GOT アイソザイムの遺伝子分析を自殖家系を用いて試みた結果, 両者で発現し, しかも 2 個の対立遺伝子 (Got-1<sup>a</sup> と Got-1<sup>b</sup>) をもつ遺伝子が確認された。またこの遺伝子は, 幼苗, 幼齡木においても発現しており, 種子の発芽以降の成長段階でも使えるマーカーとして利用できるものと考えられる。今回確認された標識遺伝子は, スギ成木の針葉を用いた分類・同定技術をはじめとする遺伝育種的研究において, 遺伝的変異を対立遺伝子レベルでとらえるための有力な手段として利用できるものと考えられる。

森林総合研究所遺伝科長 齋藤 明博士には適切なお指導を賜った。また, 研究材料を提供していただいた, 同研究所企画調整部実験林室長 菊池秀夫氏に深く感謝する。

## 引用文献

- (1) CONKLE, M. T.: Isozyme specificity during germination and early growth of knobcone pine. For. Sci. 17: 494~498, 1971
- (2) 遠藤 徹: 植物酵素多型の遺伝子支配. 蛋白質 核酸 酵素 19: 668~682, 1974
- (3) 古越隆信: スギ採種圃の花粉管理に関する基礎的研究. 林試研報 300: 41~120, 1978
- (4) 黒丸 亮: スギ幼苗における初生葉のアイソザイムパターンの経時変化. 日林誌 65: 73~81, 1983
- (5) ———・河崎久男・大庭喜八郎: ヨレスギ自殖家系幼苗におけるパーオキシダーゼアイソザイムの遺伝子分析. 日林誌 65: 253~257, 1983
- (6) LUNDKVIST, K.: Allozyme frequency distributions in four swedish populations of norway spruce (*Picea abies* K.). Hereditas 90: 127~143, 1979
- (7) MIYAZAKI, Y., and SAKAI, K.I.: Use of zymography for identification of a clone in *Cryptomeria japonica* D. DON. J. Jpn. For. Soc. 51: 235~239, 1969
- (8) RUDIN, D.: Inheritance of glutamate-oxalate-transaminases (GOT) from needles and endo-

- sperms of *Pinus sylvestris*. *Hereditas* 80 : 296~300, 1975
- (9) ——— : Developmental trends in the field of biochemical genetics of forest trees. 18th IUFRO World Congress Division 2 : 577~588, 1986
- (10) 白石 進 : アイソザイム分析法(1). 林木の育種 142 : 23~25, 1987
- (11) ——— : 同上(2). 林木の育種 143 : 34~38, 1987
- (12) SHIRAISHI, S. : Inheritance of isozyme variations in Japanese black pine, *Pinus thunbergii* PARL. *Silvae Genet.* 37 : 93~100, 1988
- (13) 白石 進・上中久子 : スギおよびヒノキ針葉のアイソザイムパターンの変動変化. 日林九支論 33 : 189~190, 1986
- (14) ———・—————・西村慶二 : ヒノキ針葉及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
- (15) 津村義彦 : ウメ品種のアイソザイムによる分類方法について. 日林誌 69 : 105~108, 1987
- (16) ——— : スギのアイソザイムの遺伝変異に関する研究. 筑波大学学位論文. 113 pp, 1987
- (17) WITTER, M. S., and FERET, P. P. : Inheritance of glutamate oxalo-acetate transaminase isozyme in virginia pine megagametophytes. *Silvae Genet.* 27 : 129~134, 1978

(1989年4月27日受理)