

氏名(本籍)	津	村	義	彦	(福岡県)
学位の種類	農	学	博	士	
学位記番号	博	甲	第	515	号
学位授与年月日	昭和63年3月25日				
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当				
審査研究科	農学研究科				
学位論文題目	スギのアイソザイムの遺伝分析に関する研究				
主査	筑波大学教授	農学博士	大	庭	喜八郎
副査	筑波大学教授		海	上	道雄
副査	筑波大学教授	農学博士	菊	池	文雄
副査	筑波大学教授	理学博士	柳	沢	嘉一郎

## 論 文 の 要 旨

スギは我が国の重要な林業樹種であり、人工林面積の45.3%、439万haを占めている。スギの遺伝育種学的研究を促進する上で、クローン鑑定から集団遺伝まで広範囲の研究に利用が可能な標識遺伝子の検出は重要な基礎研究の一つである。

本研究は利用度が高いアイソザイムの標識遺伝子を検出する目的でスギの針葉を用いアイソザイムの遺伝分析をしたものである。また、アイソザイム遺伝子によるスギ精英樹クローンの類縁関係ならびにアイソザイム遺伝子間、アイソザイム遺伝子と針葉形質遺伝子との連鎖を研究した。

アイソザイム遺伝子の検出にはスギ36家系を用いた。その内19家系は冬期における針葉色の遺伝分析用、4家系は既知の標識遺伝子の連鎖検定用、9家系はその他の遺伝分析用に農林水産省林業試験場において育成したものである。残りの4家系はあらたに人工交配したものである。

電気泳動用の針葉試料は伸長した当年生の針葉とし、冬期に採取した。針葉試料はサンプル瓶に密封し、 $-25^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に保存し、随時実験に供した。なお、人工交配4家系は種子を発芽させ初生葉が展開したものを個体別に分析した。電気泳動の試料調整は、まず冷凍庫から取り出した針葉を100mg秤量採取し、あらかじめ $-4^{\circ}\text{C}$ に冷やしておいた乳鉢に入れ、これに液体窒素を注入しパウダー状になるまですりつぶした。これに抽出用緩衝液1mlとポリクラールAT100mgを加えてホモジネートした。この粗抽出物を遠沈チューブにとり $4^{\circ}\text{C}$ 、 $10,000\times g$ で10分間遠心分離をした。この上澄液 $10\mu\text{l}$ を電気泳動試料とした。

電気泳動はDavis (1964)、Ornstein (1964)の原法にほぼ従って、平板ポリアクリルアミドゲル

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。泳動条件は4℃、12.2mA/cm<sup>2</sup>の定温・定電流で約150分間泳動した。染色は次の18酵素種を対象とした。①シキミ酸脱水素酵素 (ShDH)、②グリセリン酸脱水素酵素 (G 2 DH)、③リンゴ酸脱水素酵素 (MDH)、④6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (6 PGD)、⑤グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G 6 PD)、⑥グルタミン酸脱水素酵素 (GDH)、⑦グルタチオンレダクターゼ (GR)、⑧ジアホラーゼ (DIA)、⑨メナジオンレダクターゼ (MNR)、⑩パーオキシターゼ (POD)、⑪テトラゾリウム酸化酵素 (TZO)、⑫アスパラギン酸アミノ転移酵素 (GOT)、⑬ホスホグルコムターゼ (PGM)、⑭非特異的エステラーゼ (EST)、⑮酸性ホスファターゼ (ACP)、⑯ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、⑰アラニンアミノペプチターゼ (AAP)、⑱グルコースリン酸イソメラーゼ (PGI)。

電気泳動の結果、ShDH、6PGD、DIA、MNR、POD、PGM、EST、LAP、AAPの9酵素種のアイソザイムでは鮮明な泳動像が得られ遺伝分離が確認された。GDH、ACP、GOTの3酵素種のアイソザイムは鮮明な泳動像が得られたが、遺伝分離は認められなかった。また、TZOのアイソザイムでは分離がみられたが、複雑な分離のため遺伝分析を持ち越した。

一方、G 2 DH、MDH、D 6 PD、GR、PGIの5酵素種では鮮明なザイモグラムが得られなかった。

ShDH アイソザイムの3本のバンドは2つの遺伝子座 (Shd-1, Shd-2) に支配され、Shd-2モノマー型であった。6 PGDアイソザイムは2つのゾーンで合計6本のバンドが検出された。これらは2つの遺伝子座 (6 Pg-1, 6 Pg-2) によって支配され、いずれもダイマー型の遺伝をした。DIA アイソザイムは3つのゾーンで5本のバンドがみられ、ゾーン1と同3で分離がみられた。ゾーン1では活性型と不活性型が3:1で分離し、ゾーン3では3種類の表現型が1:2:1に分離した。この結果、2つの遺伝子座 (Dia-1, Dia-3) を確認した。MNR アイソザイムは2つのゾーンでそれぞれ3本のバンドが分離した。自殖家系のゾーン1では3つの表現型が1:2:1の比に分離し、ダイマー型であった。POD アイソザイムは15本以上が検出されたが、遺伝分析ができたのはRf24とRf25の2本のバンドであり、これは1つの遺伝子座 (Px-1) の支配のモノマー型であった。

PGMアイソザイムは31家系で2つのゾーンに3本のバンドが検出され、その内 Rf55、Rf57の2本のバンドで分離がみられた。これは1遺伝子座 (Pgm-2) の2つの対立遺伝子に支配されていた。EST アイソザイムバンドは20本以上検出されたが、活性が高い10本のバンドについて分析した。分離が確認された Rf18~22の3本のバンド、Rf56のバンドはそれぞれ1つの遺伝子座 (Est-1, Est-3) の支配を受けていた。LAP アイソザイムは36家系の分析で合計4本のバンドが検出され、これらは1つの遺伝子座 (Lap) の4つの対立遺伝子の支配であった。AAP アイソザイムでは Rf37~48の間に7本のバンドを検出した。Rf37、38の2本のバンドは1つの遺伝子座 (Aap-1) の2つの対立遺伝子の支配であった。

以上、分離を確認した9酵素種のアイソザイムで合計14遺伝子座、28主働遺伝子を検出した。

スギ精英樹29クローンの類縁関係を6酵素種 (ShDH、6 PGD、DIA、POD、PGM、LAP) のアイソザイム7遺伝子座によって検討した。Pam-2遺伝子座は29クローンのすべてが同一遺伝子型で

あった。他の6遺伝子座では変異がみられ、特にLap遺伝子座では8つの表現型が認められた。これらの遺伝子組成を数量化理論第Ⅲ類及びクラスター分析によって解析し、類縁関係を明らかにした。その結果、今市2、水戸10、大月5の3クローン以外は第1、第2及び第3象限の原点付近に分布し、近縁性が高いと推定された。クラスター分析の結果もほぼ同じ結果であった。

アイソザイム遺伝子間の連鎖の検定は $\chi^2$ 検定及び赤池情報量基準(AIC)による検定を用いた。その結果、連鎖が確かめられた遺伝子座が2組あり、それらの組換え価は、Px-1とAap-1で $0.425 \pm 0.046$ 、Px-1と6Pg-1で $0.273 \pm 0.095$ と推定した。一方、アイソザイム遺伝子と針葉形態のヨレスギ遺伝子には連鎖が認められなかった。冬期針葉色遺伝子(R:アカ、r:ミドリ)と連鎖しているMNRアイソザイム遺伝子の配列はRF(Mnr<sup>b</sup>)/rs(Mnr<sup>a</sup>)であり、組換え価は $0.357 \pm 0.038$ と推定した。

## 審 査 の 要 旨

本研究はスギの遺伝育種学的研究に対して1つの基礎手段をあたえるアイソザイム標識遺伝子の探索、検出を目的としたものである。従来、林木についてのアイソザイムの研究はデンプンゲル電気泳動法によるパーオキシダーゼアイソザイムが主体であった。

本研究はポリアクリルアミドゲルを支持体とした電気泳動法を用い、さらに試料精製に際し液体窒素、ポリクラールAT、超遠心処理等を利用した。これにより泳動試料の純化精製を行い鮮明な泳動像を得ることに成功した。その結果、検出を試みた18酵素種の内13酵素種、すなわちShDH、6PGD、GDH、DIA、MNR、TZO、GOT、PGM、EST、ACP、LAP、AAPの鮮明な泳動像を得たことは特筆に値する。さらに分離がみられたアイソザイムバンドの詳細な研究によって、ShDH、6PGD、DIA、MNR、POD、PGM、EST、LAP、AAPの9酵素種で14遺伝子座、28主働遺伝子を検出した。これらについてモノマー型、ダイマー型等の遺伝を決定し、今後、標識遺伝子としての活用の道を開いた。

また、遺伝子組成の多変量解析によるスギ精英樹の類縁関係の解明の試行に成功し、連鎖の研究にもAIC利用を定式化した。

以上、本研究はスギ針葉についてポリアクリルアミド電気泳動法の適用のための技術開発、9酵素種で合計28個の標識遺伝子の検出、3対の連鎖の検出、標識遺伝子による類縁関係の判定等、基礎及び応用面において極めて重要な成果を得たものとして高く評価できる。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。