

ヒノキ針葉におけるアイソザイムの遺伝 および富士山天然林のアイソザイム変異

清 藤 城 宏

Inheritance of Isozymes in Leaf Tissues of Hinoki
(*Chamaecyparis obtusa*), and Isozyme Variation at
a Natural Stand, Mt. Fuji.

Kunihiro SEIDO

Summary : Inheritance of isozyme in leaf tissues of Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) was investigated by polyacrylamide vertical slab gel electrophoresis. 24 enzyme systems were analysed to detect marker genes in the present study. As a result, I found that fifteen of them were controlled by 32 alleles in 17 loci at least, and 18 alleles in 9 loci of which were newly estimated. The genetic variation were examined at the natural stand of the upper part of the species range on Mt. Fuji. The average proportion of polymorphic, average number of alleles per locus and mean expected heterozygosity were 64.6%, 1.88 and 0.221, respectively. The fixation index (FIS) was calculated. This represents the average deviation of the population's genotypic proportion from Hardy-Weinberg equilibrium. The FIS was 0.039. This indicates that the genetic variation is somewhat large and the natural stand does panmixis.

要旨 : ヒノキの標識遺伝子を検出するため、針葉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遺伝子座の推定をおこなった。本研究において24酵素種を調査した。その結果15酵素種は少なくとも17遺伝子座、32対立遺伝子によって支配されていることがわかった。今回新たに推定出来たのは9遺伝子座、18対立遺伝子である。これらの遺伝子座をもとに富士山1林分について遺伝変異を調べた。多型の遺伝子座(PI)64.7%、対立遺伝子数(Na)1.88、ヘテロ接合体率(He)0.221であった。近交係数(FIS)は0.039で任意交配集団を形成していることが推測された。

I は じ め に

ヒノキは、我国の主要建築材料として古くから広く用いられており、主要造林樹種のトップになっている。一方、ヒノキ林の天然分布をみるならば、南は屋久島から、北は福島県まで分布している。本県においては、富士山麓青木ヶ原樹海のヒノキ林は有名で、東西8 km、南北6 kmに広く分布している。また、秩父山地の鈴庫山には学術参考林としてヒノキの天然林が残されている。その他、韭

崎管内、鵜沢管内の奥地にも点在ではあるがヒノキ天然林をみることができる。

ヒノキの遺伝育種研究をすすめるためには、標識遺伝子の検出が重要な研究基盤となる。アイソザイムの遺伝研究において、標識遺伝子とした場合の利点をあげると次のとおり挙げることが出来る。①遺伝子(DNA)の一次産物であるので環境の影響を受けにくい。②自然選択に対して中立であるため消滅する機会は少ない。③高頻度に分布しているものから低頻度に分布しているものまで

遺伝子の利用が出来る。④対立遺伝子の間に優劣性がない(共優性)ためバンドパターンから直接遺伝子型を読み取ることが出来る(白石、1990)。また、⑤他の遺伝分析方法;染色体・形態、胚致死遺伝子、ジテルペン炭化水素の遺伝子等に比べて、比較的簡単に、短時間に、しかも多くのサンプルを分析することが出来、得られる情報量も多い長所を備えている。

これまでにおこなわれたヒノキの遺伝子分析は、パーオキシダーゼで先ず明らかにされ(田島ら、1977;白石、1983)、その後白石ら(白石ほか、1986)はアスパラギン酸アミノ転移酵素を加えた。さらに内田ら(Uchida et al.,1991)は、10酵素種において14遺伝子座に支配されていることを明らかにした。

ヒノキ林のアイソザイム変異の研究は、白石らが天然林および人口林の遺伝的差異と分化について、2つの遺伝子座を用いおこなったのが最初である(Shiraishi et al.,1987)。また、筆者は青木ヶ原において、集団内の遺伝的不均一性を対立遺伝子レベルで明らかにし(清藤ら、1987)、また、県内3ヶ所の集団を対象に対立遺伝子レベルで比較し、ほとんど差がなかったことを報告した(清藤、1989)。さらに繁殖構造についても解析をこころみた(清藤、1990)。

遺伝的変異の正確な推定のためには、多くの遺伝子座を用いる必要がある。ここでは、ヒノキの遺伝子座を増やすことを目的に、利用可能な酵素について分析をおこなった。遺伝子支配をあきらかにするためには、子供群で遺伝子型が分離するため、2nの場合は交配が必要である。しかし、ここでは遺伝子分析の簡便法として、出来るだけバンドの少ない酵素から遺伝様式の推定を試みた。そのバンド活性をまず調査し、これまで明らかにされているヒノキの遺伝子座と比較して確認した。さらに利用可能な遺伝子座の推定をおこなった。

さらに、富士山の北西斜面の上限ヒノキ林を対象に遺伝パラメーターの推定をおこない、若干の考察をおこなった。

II 材料と方法

材料採取場所は富士事業区24・25・28林班、標高1,600~1,700mにおいて分布するヒノキ林を対

象とした。本ヒノキ林は富士山上限に成立している林分で、平均樹高は12m、胸高直系25cm、コマツガも混成しているが比較的純林をなしている。針葉の採取は、1990年10月に、ha当たり25本とし、ランダムに100本を広い範囲でサンプリングした。1サンプル当たり5~10cmの針葉を密閉出来るビニール袋に入れ、クーラーボックスの中で冷却状態を保ち実験室に持ち帰った。それらのサンプルは試供するまで-80°Cの超低温フリーザーに貯蔵した。

冷凍庫からサンプルを取り出し、1サンプルにつき100mg秤量し、それを乳鉢にいれ、液体チッ素を注ぎパウダー状になるまで手早くすりつぶした。さらに1時間前に用意して冷蔵庫に入れておいた抽出液を0.95mlに加え、かくはんし、シャーベット状にとけはじめたらステープのうしろをへらに使用してエッペンドルチューブに入れ、氷中で冷却状態にして置き、順次20サンプル分同様に使用した。なお、抽出液は表-1のとおりである。抽出液は、水、1.EXT、2.EXT、3.EXTの順に加え、それにPVPPを1.2g加えラップして冷蔵庫に置き、4.EXTは冷凍庫から出し一緒に冷蔵庫に入れ、抽出時に1.0ml加えたものである。

表-1 抽出液の調整
Composition of extract solutions

1	EXT : 1 M Tris-HCl, pH7.5	
	H ₂ O	100 g
	present pH7.5 crystal	16.9 g
	Glycerol	12.6 g
2	EXT : 60% Glycerol	
	H ₂ O	40 g
	Glycerol	75.6 g
3	EXT : 15% Tween80	
	H ₂ O	85 g
	Tween80	15.7 g
4	EXT : 200mM Dithiothreitol	
	H ₂ O	10.5 g
	Dithiothreitol	330mg

30分前にスイッチを入れ冷却状態にしておいた遠心機にサンプルを入れる。遠心条件は、0℃、15,000rpmで15分、遠心後得られた上清だけを新たなエペンドルチューブにあけてさらに30分再遠心し、その上清液を泳動用試料として用いた。

電気泳動は上記試料10μlを平板ポリアクリルアミド垂直電気泳動法を用いた。ゲルは7.5%分離ゲル、3.75%濃縮ゲルを使用した。電気泳動は4℃、12.3mA/cm²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

1) ヒノキ針葉を用いアイソザイム遺伝子座の推定

分析に用いた酵素種はパーオキシダーゼ(POD)、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PG)、シキミ酸脱水素酵素(SHD)、リンゴ酸酵素(ME)、グルタミン酸脱水素酵素(GDH)、非特異的エステラーゼ(EST)、アスパラギン酸アミノ転移酵素(GOT)、ディアフォラーゼ(DIA)、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6P)、アルコール脱水素酵素(ADH)、アミラーゼ(AMY)、リンゴ酸脱水素酵素(MDH)、ロイシンアミノペプチターゼ(LAP)、グルコースリン酸イソメラーゼ(PGI)、グリセリン酸脱水素酵素(G2D)、ホスホグルコムターゼ(PGM)、

表-2 酵素種の欧文名及びそのE. C. 番号
Investigated enzymes, their abbreviation and
Enzyme Commission reference number(E.C.No.)

No	Enzymes	Abbrev.	E.C.No.
1	Peroxidase	POD	1.11.1.7
2	6-Phosphogluconate dehydrogenase	6PG	1.1.1.44
3	Shikimate dehydrogenase	SHD	1.1.1.25
4	Malate enzyme	ME	1.1.1.40
5	Glutamate dehydrogenase	GDH	1.4.1.2
6	Esterase	EST	3.1.1
7	Glutamate oxaloacetate transaminase	GOT	2.6.1.1
8	Diaphorase	DIA	1.6.4.3
9	Glucose-6-Phosphate dehydrogenase	G6P	1.1.1.49
10	Alcohol dehydrogenase	ADH	1.1.1.1
11	Amylase	AMY	3.2.1
12	Malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37
13	Leucine aminopeptidase	LAP	3.4.11.1
14	Glucose phosphate isomerase	PGI	5.3.1.9
15	Glycerate dehydrogenase	G2D	1.1.1.29
16	Phosphoglucomutase	PGM	2.7.5.1
17	Sorbitol dehydrogenase	SOD	1.1.1.14
18	Acid phosphatase	ACP	3.1.3.2
19	Glucokinase	GK	2.7.1.2
20	Isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.41
21	Glutathione reductase	GR	1.6.4.2
22	Menadione reductase	MR	1.6.99.2
23	Aconitase	ACO	4.2.1.3
24	Fumarase	FM	4.2.1.2

表-3 ヒノキ針葉における各酵素種の染色条件と固定液
Staining temperature, time and fixation solution of
each enzyme system in leaf tissues of Hinoki

No.	Enzyme	Temperature	Time	Fixation solution *
1	POD	Room Temp.	15min.	Fix A
2	6PG	37°C	15	Fix A
3	SHD	37°C	20	Fix A
4	ME	37°C	30	Fix A
5	GDH	37°C	30	Fix B
6	EST	pre.37°C	10min add 15min.	Fix A
7	GOT	Room Temp	15	D. W.
8	DIA	37°C	15	Fix A
9	G6P	37°C	15	Fix A
10	ADH	37°C	40	Fix A
11	AMY	pre.37°C	40min rinse, B 10min	Fix A
12	MDH	Room Temp	15	Fix B
13	LAP	37°C	25	Fix A
14	PGI	37°C	20	Fix A
15	G2D	37°C	40	Fix B
16	PGM	37°C	30	Fix A
17	SOD	37°C	40	Fix B
18	ACP	37°C	120	Fix A
19	GK	37°C	30	Fix A
20	IDH	37°C	30	Fix A
21	GR	37°C	15	Fix A
22	MR	37°C	15	Fix A
23	ACO	37°C	60	Fix A
24	FM	37°C	30	Fix B

* Fix A : 50% Ethanol
Fix B : 50% Ethanol-5% Acetic acid solution

ソルビトール脱水素酵素(SOD)、酸性ホスファターゼ(ACP)、グルコキナーゼ(GK)、イソクエン酸脱水素酵素(IDH)、グルタチオンレグクターゼ(GR)、メナディオレグクターゼ(MR)、アコニターゼ(ACO)、フマラーゼ(FM)、の24酵素種である(表-2)。各酵素の染色時間と固定方法を表-3に示した。調査の結果、表-2の酵素種のバンドの活性をとりまとめると表-4の次のとおりである。

活性が高く且つシャープなバンド像が得られたのは12酵素種で、バンドが読み取れるを加えると16酵素が分析可能であった。ACPは2本のバンド(Rf34、39)を持つものと1本のバンド(Rf53)

を持つ2つの遺伝子座が見られたが、変異が見られなかったため、今回は一応除外し、15酵素種を対象とした。遺伝子分析の結果に関しては、白石は11遺伝子座・23対立遺伝子(白石、1989)を明らかにし、また内田らは14遺伝子座・30対立遺伝子(Uchida et al., 1991)を明らかにしている。これらの既報と照らし合わせながら、また新たな遺伝子座の推定を試みた。以下結果について述べる。

(1) パーオキシダーゼ(POD)

パーオキシダーゼは10本以上のバンドが出現するが、Rf36とRf40、その両方のバンドをもつものが遺伝している(図-1)。すなわちモ

表-4 各酵素種におけるバンド活性
Activity of band patterns in each enzyme system

Activity	Enzymes
most clear	: POD, GOT, 6 PG, GDH, EST, D I A, AMY, LAP, P G I, GR, A C P, MR 12 Enzymes
clear	: SHD, PGM, ME, GK 4 Enzymes
a little unclear	: FM, I DH, SOD, G 2 D, MDH 5 Enzymes
unclear	: G 6 P, ADH, ACO 3 Enzymes

ノマー型の遺伝子座である。遺伝子型が Pod^a/Pod^a / Pod^b/Pod^b であるホモ接合型個体は、R f 36のバンドを持つ表現型、 Pod^a/Pod^b のホモ接合型個体はR f 40のバンドを持ち、 Pod^b/Pod^b のヘテロ接合型個体はRf36とRf40の2本のバンドを持つ表現型となる。

モ接合型個体は Rf43のバンドを持つ表現型で、 Pod^a/Pod^b のヘテロ接合型個体はRf40とRf43の2本のバンドと、その中間の位置 Rf41に比較的活性の高いバンドが出現し3本のバンドを持つ表現型となる。

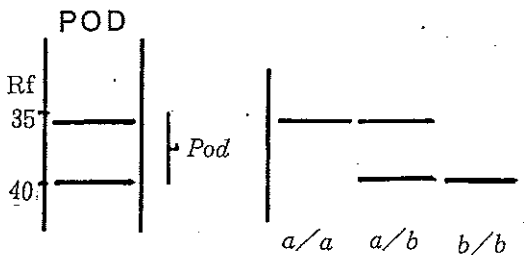


図-1 パーオキシダーゼ (POD) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for POD isozyme

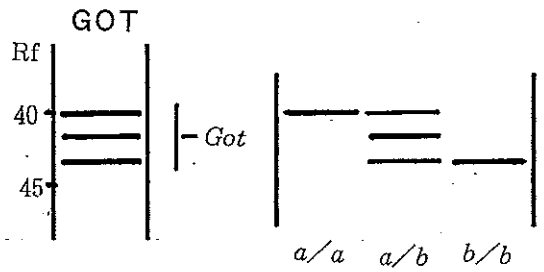


図-2 アスパラギン酸アミノ転移酵素 (GOT) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for GOT isozyme

(2) アスパラギン酸アミノ転移酵素 (GOT)

アスパラギン酸アミノ転移酵素は、針葉では3本のバンドが出現する。Rf40とRf41、そしてRf43をもつものが遺伝している (図-2)。ダイマー型の遺伝子座である。すなわち、遺伝子型が Pod^a/Pod^a であるホモ接合型個体は、Rf40のバンドを持つ表現型、 Pod^b/Pod^b のホ

(3) 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (6 PG)

6-ホスホグルコン酸脱水素酵素は4本のバンドが出現する (図-3)。この内最も移動度のおそい Rf29のバンドはすべて個体にみられるので、6Pg-1遺伝子座として6Pg-1^a/6Pg-1^bのホモ接合型のみとなる。Rf31とRf33、そしてRf36をもつものが6Pg-2遺伝子座でダイマー型を示す。すなわち、遺伝子型

が $6Pg-2^a/6Pg-2^a$ であるホモ接合型個体は、Rf31のバンドを持つ表現型、 $6Pg-2^b/6Pg-2^b$ のホモ接合型個体は Rf36のバンドを持つ表現型で、 $6Pg-2^a/6Pg-2^b$ のヘテロ接合型個体は Rf31と Rf36の2本のバンドと、その中間の位置 Rf33に比較的活性の高いバンドが出現し3本のバンドを持つ表現型となる。

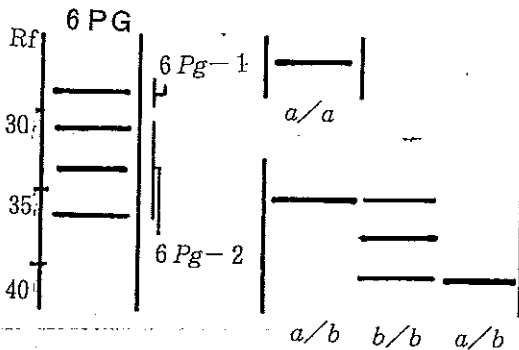


図-3 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PG)のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for 6PG. isozyme

(4) ディアフォラーゼ (DIA)

ディアフォラーゼは4本のバンドが出現するが、Rf41と Rf43、その両方のバンドをもつものが遺伝している。すなわちモノマー型の遺伝子座である。遺伝子型が $Dia-1^a/Dia-1^a$ であるホモ接合型個体は Rf41のバンドを持ち表現型、 $Dia-1^b/Dia-1^b$ のホモ接合型個体は Rf43のバンドを持ち、 $Dia-1^a/Dia-1^b$ のヘテロ接合型個体は Rf41と Rf43の2本のバンドを持つ表現型となる。

今回はさらに、移動度の早い Rf60と Rf64、そしてその両方のバンドをもつ比較的鮮明なバンドが見つかった。したがってモノマー型の $Dia-2$ 遺伝子座を推定した。遺伝子型が $Dia-2^a/Dia-2^a$ であるホモ接合型個体は Rf60のバンドを持つ表現型、 $Dia-2^b/Dia-2^b$ のホモ接合型個体は Rf64のバンドを持ち、 $Dia-2^a/Dia-2^b$ のヘテロ接合型個体は Rf60と Rf64の2本のバンドを持つ表現型となる(図-4)。

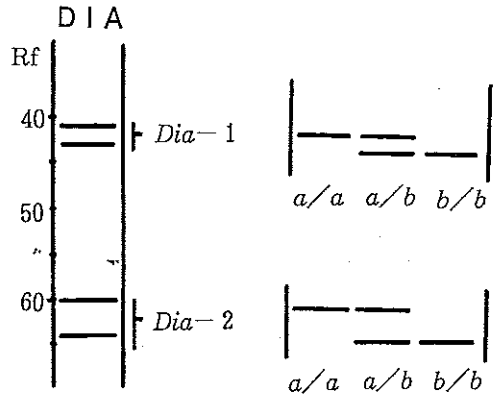


図-4 ディアフォラーゼ (DIA) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for Dia isozyme

(5) グルタミン酸脱水素酵素 (GDH)

グルタミン酸脱水素酵素はモミ属 (Neale and Adams 1981 ; 長坂ら、1990 ; 清藤、1991) やスギ (津村、1989) で単型をしめしたが、ヒノキにおいても同様で、既報と同じく (Uchida, 1991)、Rf14のバンド1本をもつ単型を示した。したがって、遺伝子型が Gdh^a/Gdh^a であるホモ接合型個体は Rf14のバンドを持つ表現となる (図-5)。

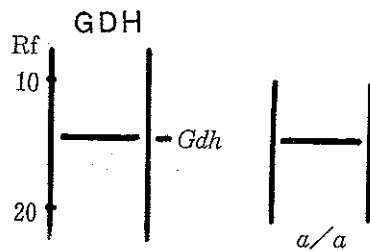


図-5 グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding Patterns and their allelic designation for GHD isozyme

(6) メナディンレグクターゼ (MR)

メナディンレグクターゼの遺伝子分析の報告はない。しかし今回は Rf38 と Rf42、そしてその両方のバンドをもつ鮮明なバンドが見つかった。したがってモノマー型の *Mr* 遺伝子座を推定した (図-6)。遺伝子型が *Mr^a/Mr^a* であるホモ接合型個体は Rf38 のバンドを持つ表現型、*Mr^b/Mr^b* のホモ接合型個体は Rf42 のバンドを持ち、*Mr^a/Mr^b* のヘテロ接合型個体は Rf38 と Rf42 の 2 本のバンドを持つ表現型となる。

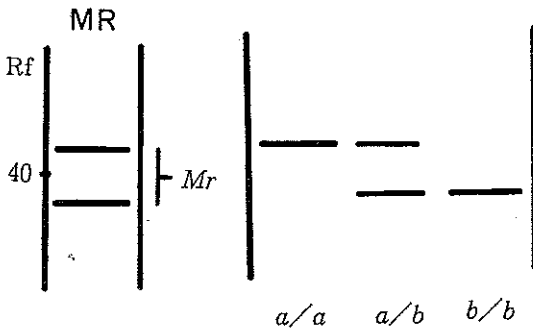


図-6 メナディンレグクターゼ (MR) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for MR isozyme

(7) ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)

ロイシンアミノペプチターゼの遺伝子分析の結果は内田ら (Uchidara et al., 1991) の報告がある。それによると Rf39 の位置に *Lap^a/Lap^a* と *Lap^b/Lap^b* のヌル遺伝子型となっているが、しかし、今回は Rf36 と Rf39 のバンドをもつ鮮明なバンドが見つかった。したがって、モノマー型の *Lap* 遺伝子座を推定した (図-7)。遺伝子型が *Lap^a/Lap^a* であるホモ接合型個体は Rf36 のバンドを持つ表現型、*Lap^b/Lap^b* のホモ接合型個体は Rf39 のバンドを持ち、*Lap^a/Lap^b* のヘテロ接合型個体は Rf36 と Rf39 の 2 本のバンドを持つ表現型となる。

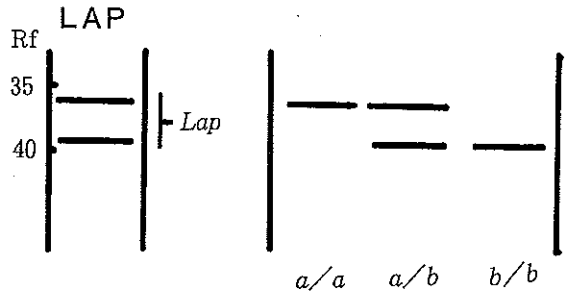


図-7 ロイシンアミノペプチターゼ (LAP) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for LAP isozyme

(8) グルタチオンレグクターゼ (GR)

グルタチオンレグクターゼの遺伝子分析の報告はない。しかし今回は Rf38 と Rf42、そしてその両方のバンドをもつ鮮明なバンドが見つかった。したがってモノマー型の *Gr* 遺伝子座を推定した (図-8)。遺伝子型が *Gr^a/Gr^a* であるホモ接合型個体は Rf38 のバンドを持つ表現型、*Gr^b/Gr^b* のホモ接合型個体は Rf42 のバンドを持ち、*Gr^a/Gr^b* のヘテロ接合型個体は Rf38 と Rf42 の 2 本のバンドを持つ表現型となる。

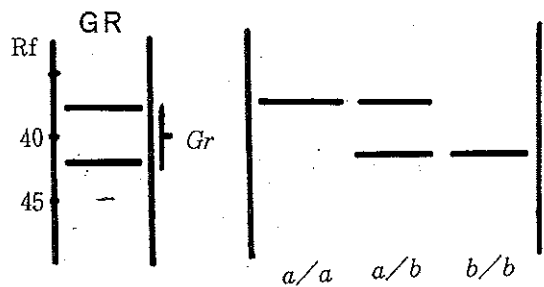


図-8 グルタチオンレグクターゼ (GR) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for GR isozyme

(9) 非特異的エステラーゼ (EST)

エステラーゼは10本以上のバンドが出現するが、Rf50とRf56、そしてバンドがないものが遺伝している(図-9)。すなわち遺伝子型が Est^a/Est^a であるホモ接合型個体は、Rf50とRf56のバンドを持つ表現型、そしてバンドのないヌルの Est^o/Est^o の表現型となる。

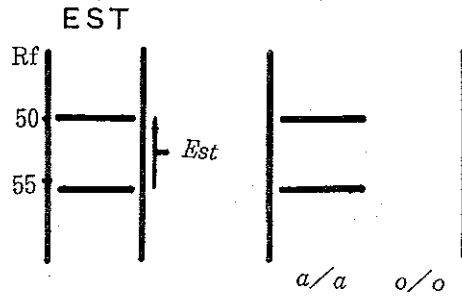


図-9 特異的エステラーゼ (EST) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for EST isozyme

(10) グルコキナーゼ (GK)

グルコキナーゼは2本のバンドが出現し、Rf50とRf53、そしてその両方のバンドをもつものが遺伝している(図-10)。すなわちモノマー型の遺伝子座である。遺伝子型が Gk^a/Gk^a であるホモ接合型個体は、Rf50のバンドを持つ表現型、 Gk^b/Gk^b のホモ接合型個体はRf53のバンドを持ち、 Gk^a/Gk^b のヘテロ接合型個体はRf50とRf53の2本のバンドを持つ表現型となる。

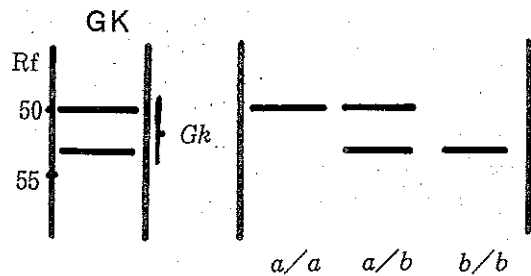


図-10 グルコキナーゼ (GK) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for GK isozyme

(11) シキミ酸脱水素酵素 (SHD)

シキミ酸脱水素酵素は2つの遺伝子座で合計6対立遺伝子が白石(白石, 1989)、内田ら(Uchida et al., 1991)で報告されているが、今回の分析では2本のバンドしか見られなかったため、新たに遺伝子座を推定した(図-11)。Rf30とRf34、そしてその両方のバンドをもつ。すなわちモノマー型の遺伝子座と考えられた。遺伝子型が Shd^a/Shd^a であるホモ接合型個体は、Rf30のバンドを持つ表現型、 Shd^b/Shd^b のホモ接合型個体はRf34のバンドを持ち、 Shd^a/Shd^b のヘテロ接合型個体はRf30とRf34の2本のバンドを持つ表現型となる。

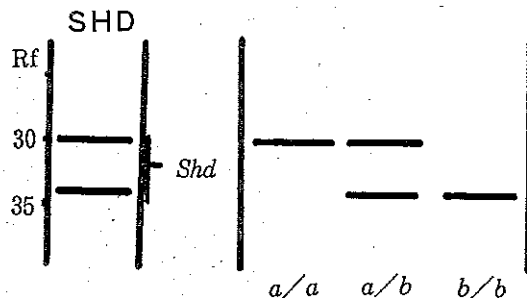


図-11 シキミ酸脱水素酵素 (SHD) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for SHD isozyme

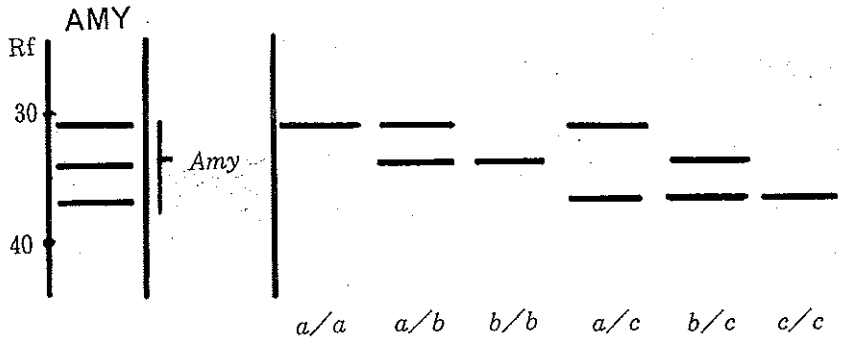


図-12 アミラーゼ (AMY) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for AMY isozyme

(12) アミラーゼ (AMY)

アミラーゼの遺伝子分析の報告はない。しかし今回は6つのバンドパターンが見つかった。したがってAmy遺伝子を推定した。遺伝子型が Amy^a/Amy^a であるホモ接合型個体は Rf31 のバンドを持つ表現型、 Amy^b/Amy^b のホモ接合型個体は Rf34のバンドを持ち、 Amy^c/Amy^c であるホモ接合型個体は Rf37のバンドを持つ表現型、また、ヘテロ接合型の Amy^a/Amy^b の個体は Rf31と Rf34の2本のバンドを持つ表現型、 Amy^b/Amy^c の個体は Rf34と Rf37の2本のバンドを持つ表現型となり、 Amy^a/Amy^c の個体は、Rf31と Rf37の2本のバンドを持つ表現型で3対立遺伝子支配を推定出来た(図-12)。

(13) ホスホグルコムターゼ (PGM)

ホスホグルコムターゼは2本のバンドが出現し、Rf49と Rf54、そしてその両方のバンドをもつものが遺伝している(図-13)。すなわちモノマー型の遺伝子座である。遺伝子型が Pgm^a/Pgm^a であるホモ接合型個体は、Rf49のバンドを持つ表現型、 Pgm^b/Pgm^b のホモ接合型個体は Rf54のバンドを持ち、 Pgm^a/Pgm^b のヘテロ接合型個体は Rf49と Rf54の2本のバンドを持つ表現型となる。

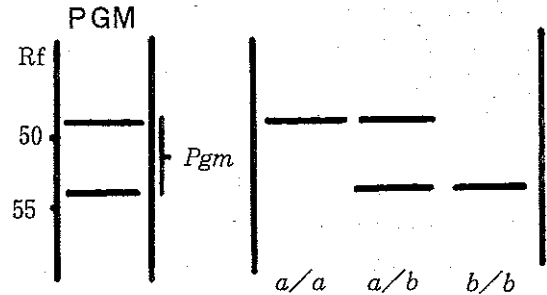


図-13 ホスホグルコムターゼ (PGM) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for PGM isozyme

(14) グルコースリン酸イソメラーゼ (PGI)

グリコースリン酸イソメラーゼの遺伝子分析の報告はない。しかし今回は非常に接近した位置、Rf26と Rf27、そしてその両方のバンドをもつ鮮明なバンドが見つかった。したがってモノマー型の Gr 遺伝子座を推定した(図-14)。遺伝子型が Pgi^a/Pgi^a であるホモ接合型個体は、Rf26のバンドを持つ表現型、 Pgi^b/Pgi^b のホモ接合型個体は Rf27のバンドを持ち、 Pgi^a/Pgi^b のヘテロ接合型個体は Rf26と Rf27の2本のバンドを持つ表現型となる。

以上の遺伝子座および対立遺伝子数をまとめ表-5に示す。調査した24酵素種の内、15酵素17遺伝子座が利用可能となった。この内9遺伝子座は今回新たに推定された遺伝子座である。遺伝子分析は、多くの個体を広い範囲から集めた材料により、新しい遺伝子座が明らかになる。今回の新たな遺伝子座も交配による確認が必要である。

表-5 分析により得られた遺伝子座および対立遺伝子数

Identified isozyme loci and their alleles for 15 enzyme systems

Enzyme	Locus	No. of alleles (Name)
POD	<i>Pod</i>	2 (<i>a, b</i>)
GOT	<i>Got</i>	2 (<i>a, b</i>)
6PG	<i>6Pg-1</i>	1 (<i>a</i>)
	<i>6Pg-2</i>	2 (<i>a, b</i>)
DIA	<i>Dia-1</i>	2 (<i>a, b</i>)
	<i>Dia-2*</i>	2 (<i>a, b</i>)
GDH	<i>Gdh</i>	1 (<i>a</i>)
MR	<i>Mr*</i>	2 (<i>a, b</i>)
LAP	<i>Lap*</i>	2 (<i>a, b</i>)
GR	<i>Gr*</i>	2 (<i>a, b</i>)
EST	<i>Est</i>	2 (<i>a, o</i>)
GK	<i>Gk</i>	2 (<i>a, b</i>)
SHD	<i>Shd*</i>	2 (<i>a, b</i>)
AMY	<i>Amy*</i>	3 (<i>a, b, c</i>)
PGM	<i>Pgm*</i>	2 (<i>a, b</i>)
PGI	<i>Pgi*</i>	2 (<i>a, b</i>)
ME	<i>Me*</i>	1 (<i>a</i>)
計	15	17
		32

* Estimated loci in this study

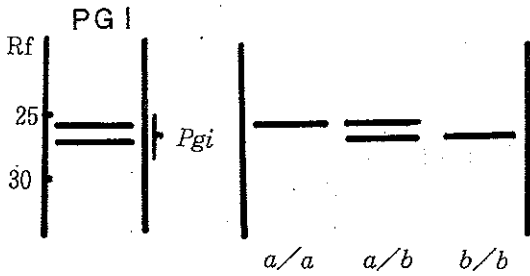


図-14 グルコースリン酸イソメラーゼ (PGI) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for PGI isozyme

(15) リンゴ酸酵素 (ME)

リンゴ酸酵素の分析報告はない。しかし、今回比較的鮮明な単型のバンドが見つかった。クロマツの遺伝子分析の報告と似ているので (Shiraishi, 1989)、今回は遺伝子座として取り上げた。すなわち遺伝子型が Me^a/Me^a であるホモ接合型個体は、Rf13のバンドを持つ表現型を示す。

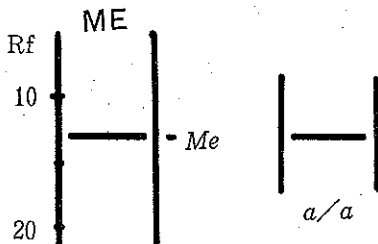


図-15 リンゴ酸酵素 (ME) のバンドパターンおよびそれらの遺伝子型
Banding patterns and their allelic designation for ME isozyme

2) 富士山北西斜面に生育するヒノキ天然林のアイソザイム変異

前項1) で得られたザイモグラムの結果をもとに、富士山北西斜面上限ヒノキ林分のデータ解析をおこなった。分析個体数は100個体であるが、その内、*Gdh*、*Me* 遺伝子座で40個体、他の各遺伝子座は100~60個体で平均遺伝子座当たりの分析数は75.3個体である。用いた酵素は15酵素種、遺伝子座は17遺伝子座である。

本林分の遺伝的多用性の評価をおこなった。遺伝子型を決定しているのは、遺伝子の組み合わせであるので、集団中の遺伝組成は遺伝子頻度で示す。結果は表-6に示す。*6Pg-1*、*Gdh*、*Gk*、*Me* の遺伝子座では単型であった。多型的遺伝子座とは最も多くみられる対立遺伝子の頻度が0.95以下である遺伝子座をいうが、本林分では12遺伝子座すなわち *Pod*、*Got*、*6Pg-2*、*Dia-2*、*Mr*、*Gr*、*Est*、*Shd*、*Amy*、*Pgm*、*Pgi* において多型的な遺伝子座をしめした。

次に各遺伝子座におけるヘテロ接合体率、近交係数を表-7に示す。さらに遺伝変異量を整理した(表-8)。すなわち、多型遺伝子座の割合(*P1*)、1遺伝子座当たりの対立遺伝子数(*Na*)、ヘテロ接合体率の観察値(*Ho*)、期待値(*He*)および近交係数(*FIS*)を求めた。*A*は推定遺伝子座を加えた17遺伝子座での値、*B*は既報の遺伝子解析の済んだ遺伝子座の内8遺伝子座で推定した値である。筆者の2遺伝子座から得た富士山青木ヶ原の *He* (清藤ほか、1987) は、0.28であった。内田ら (Uchida et al., 1991) の静岡県ヒノキ3集団の13遺伝子座平均では、*P1*、*Na*、*He* はそれぞれ56.4%、2.0、0.228で、*P1*は本林分の方が高く、*He*では多少低めの値であるが類似していると考えられる。スギでは屋久島の天然スギ林で、12遺伝子座では、*P1*、*Na*、*He* の平均はそれぞれ、40.9、2.45、0.153であり (津村、1990) それよりも高い値を示した。また、Hamrickら (Hamrick et al., 1981) は、針葉樹のアイソザイムで得られた遺伝変異が他の植物より高いことを指摘し、北アメリ

表-6 遺伝子座および対立遺伝子頻度
Allele frequencies of 17 loci

No	Enzyme	Locus	Allele			
			a	b	c	o
1	POD	<i>Pod</i>	0.845	0.155		
2	GOT	<i>Got</i>	0.135	0.865		
3	6PG	<i>6Pg-1</i>	1.000			
		<i>6Pg-2</i>	0.615	0.385		
4	DIA	<i>Dia-1</i>	0.080	0.920		
		<i>Dia-2*</i>	0.100	0.900		
5	GDH	<i>Gdh</i>	1.000			
6	MR	<i>Mr*</i>	0.325	0.675		
7	LAP	<i>Lap*</i>	0.013	0.988		
8	GR	<i>Gr*</i>	0.058	0.942		
9	EST	<i>Est</i>	0.567			0.433
10	GK	<i>Gk</i>	1.000	0.000		
11	SHD	<i>Shd*</i>	0.113	0.887		
12	AMY	<i>Amy*</i>	0.563	0.175	0.262	
13	PGM	<i>Pgm*</i>	0.892	0.108		
14	PGI	<i>Pgi*</i>	0.308	0.692		
15	ME	<i>Me*</i>	1.000			

* Estimated loci in this study

カの20種の針葉樹の平均遺伝座20.1で、それぞれの平均値は、 $67.7 \pm 4.9\%$ 、 2.29 ± 1.4 、 $.207 \pm 0.17$ であった。したがって今回のヘテロ接合体率の値は予想していたよりも比較的高い変異性をこの集団では保有していることが示唆された。ヘテロ接合体率を減少させる近親交配には、交配システムに由来する成分(FIS)と集団のサイズの有限性に由来する成分(FST)がある。てっとり早い近交係数(inbreeding coefficient)をだす式として、 $FIS=1-(Ho/He)$ をもちい、このパラメーターを計算した。各遺伝子座の平均値は接合する配偶子間の遺

伝的相関をあらわす量を意味している。すなわち、 $Ho=He$ で完全にランダム交配がおこなわれていることを示し、遺伝相関は0となり、 $HO=0$ ではすべてホモ接合で遺伝相関は1となる。今回の結果は0.039となった。近交係数が小さいことから、任意交配集団を形成していると推測された。

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-7 各遺伝子座のヘテロ接合体率および近交係数ヘテロ接合体率
Observed heterozygosity(Ho), expected heterozygosity(He)
and fixation index(FIS) of each locus

No	Locus	Obs.(Ho)	Exp.(He)	FIS
1	<i>Pod</i>	.270	.262	-0.031
2	<i>Got</i>	.250	.234	-0.068
3	<i>6Pg-1</i>	0.000	.000	-
4	<i>6Pg-2</i>	.470	.474	0.008
5	<i>Dia-1</i>	.160	.147	-0.884
6	<i>Dia-2*</i>	.160	.180	0.111
7	<i>Gdh</i>	0.000	.000	-
8	<i>Mr*</i>	.217	.439	0.506
9	<i>Lap*</i>	.025	.025	0.000
10	<i>Gr*</i>	.084	.109	0.229
11	<i>Est</i>	.433	.491	0.118
12	<i>Gk</i>	0.000	.000	-
13	<i>Shd*</i>	.225	.200	-0.125
14	<i>Amy*</i>	.363	.584	0.378
15	<i>Pgm*</i>	.117	.193	0.393
16	<i>Pgi*</i>	.483	.426	-0.134
17	<i>Me*</i>	0.000	.000	-

表-8 対象地の遺伝パラメーターの推定

Estimated Genetic parameter in the natural stand, the average proportion of polymorphic loci ($P1$), average number of alleles per locus (Na) and average observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He) and average inbreeding coefficient (FIS). A is average value from 17 loci and B is average value from 8 loci based on the previous report (Uchida et al., 1991).

	$P1$	Na	Ho	He	Fis
A	64.7%	1.88	0.195	0.221	0.039
B	62.5%	1.75	0.198	0.225	-0.113

引用文献

- Hamrick, J. L. et. : Level of genetic variation in trees : Influence of life history characteristics. In Proceedings of symposium on isozymes of North American forest trees and insects (M. T/Conkel ed.) USDA Gen. Tech. Rep. 1981
- 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
- HEALE, D. B., and W. T. ADAMUS : Inheritance of isozyme variants in seed tissues of balsam fir (*Abies balsamifera*). CAN. J. BOT. VO159, 1285-1291, 1981
- 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回日林論 : 287-288、1983
- 白石 進・上中久子・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
- 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143、34-38、1987
- 白石 進 : アイソザイム手法を利用した主要針葉樹における標識遺伝子の探索. 森林総合研成果選集、14-15、1989
- 清藤城宏・鈴木賢二・白石 進 : 富士山青木ヶ原におけるヒノキ天然林のアイソザイム変異. 日林誌69 (9) 379-361、1987
- 清藤城宏 : 山梨県関東山地におけるヒノキ天然林におけるアイソザイム変異. 100回日林講要旨、1990
- 清藤城宏 : アイソザイム遺伝子をマーカーにしたヒノキ天然林の繁殖構造の解析. 日林誌72 (5) 431-434、1990
- 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. 筑波第大学院修論、筑波、1-77、1988
- 田島正啓・宮島 寛・宮崎安貞 : ヒノキのパーオキシダーゼ・アイソザイムの遺伝子分析. 日林誌59 (5)、173-177、1977
- 津村義彦 : 森林集団遺伝構造のアイソザイムによる解析. 農業生物研究会、45-53、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