

## ヒノキのアスパラギン酸アミノ転移酵素アイソザイムの針葉と花粉でのパターンの違い

林業試験場九州支場 上 中 久 子  
 林業試験場造林部 白 石 進  
 九州林木育種場 西 村 慶 二

### 1. はじめに

アイソザイム手法を用いて、我が国でも、スギ、ヒノキ、マツ等のザイモグラムが調べられ、様々な林木の遺伝育種研究に利用されている。これらの研究は、全て、針葉中の酵素（主としてパーオキシダーゼ）を対象として行なわれたものである。一般的に、針葉中には、多量のフェノール様物質や樹脂成分等を含んでおり、多種類の酵素でアイソザイム分析する場合、これら物質の影響で失活され、その検出が困難な場合が多い。

今回は、これらの阻害物質の含有率が少ない花粉を供試対象組織として使用出来るかを検討するために、ヒノキ花粉のアスパラギン酸アミノ転移酵素アイソザイムについて調査した。また、あわせて、針葉のアイソザイムパターンとの比較を行なったので報告する。

### 2. 材料と方法

供試材料としては、九州林木育種場ヒノキ採種圃に植栽されている県阿蘇6号(ASO6)、県嘉穂5号(KAH5)、県南高来5号(MTA5)、県浮羽14号(UKI14)、県始良18号(AIR18)、県神埼6号(KAN6)の6クローンを使用した。

針葉の採取は、生長休止期の12月に行ない、 $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。針葉100mgに抽出用緩衝液1.5mlを加え、ホモゲナイズしたのち、 $0^{\circ}\text{C}$ 、 $40,000\times\text{g}$ で60分間と20分間の2回の遠心分離を行ない、その上清液を分析に用いた。

花粉は、前年7月にジベレリン処理をほどこした枝から採集し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存しておいたものを用いた。花粉約10mgに抽出用緩衝液0.25mlを加え、直径0.5mmのガラスビーズ0.5mlとともに激しく振動させて花粉粒を破壊したのち、 $0^{\circ}\text{C}$ 、 $40,000\times\text{g}$ で20分間遠心分離し、その上清液を用いた。

分析は、上記上清液10 $\mu\text{l}$ を平板アクリルアミドゲル垂直電気泳動法<sup>1)</sup>により行なった。アスパラギン酸アミノ転移酵素の検出に用いた染色液組成は、0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.5、3.8mMピロドキサル5'-リン酸、7.5mM L-アスパラギン酸、6.8mM  $\alpha$ -ケトグルタミン酸、0.15%ファーストブルーBB塩(W/V)である。

なお、抽出用緩衝液の組成は、3mMEDTAを含む0.1M トリス-塩酸緩衝液、pH 7.5を用い、針葉の抽出液には阻害物質による酵素の失活を減少させるために、さらに、10mM ディチオスレイトールと7%ポリクラールAT(W/V)を加えた。

### 3. 結果と考察

今回供試した6クローンの針葉(N)と花粉(P)のアスパラギン酸アミノ転移酵素アイソザイムを図-1に示した。(図中の数値は相対移動度(Rf))

針葉では、全部で、Rf40、Rf41、Rf43の3本のバンドが、一方、花粉では、Rf40、Rf43、Rf46の3バンドが出現した。両者で合せて4種類のバンドが観察されたが、Rf41とRf46の2バンドは、それぞれ、針葉と花粉に特異的なものであった。

針葉でRf40-43のゾーンに見られる3本のバンド群はダイマー型の単一遺伝子座にある2個の対立遺伝子(SとF)によって支配されており、表現型と遺伝子型の対応関係は図-2に示す通りである<sup>2)</sup>。供試した6クローンの遺伝子型は、AIR18がS/S、ASO6、KAH5、MTA5、UKI14の4クローンがS/F、KAN6がF/Fである。S/SとF/Fのホモ接合体では、それぞれ、Rf40とRf43のバンドのみしか出現しないが、S/Fのヘテロ接合体では、これらの2バンドの他に、それらの中間に雑種バンド(Rf41)が観察される。

しかし、花粉についてみると、このゾーンのアイソザイムバンドは、遺伝子型がS/SとF/Fのホモ接合体では、針葉のパターンと一致したが、S/Fのヘテロ接合体では、針葉で出現したRf41の雑種バンドは出現しなかった。ダイマーであるトウモロコシのAdh1遺伝子座においても雑種バンドは出現しない<sup>3)</sup>。この雑種バンドは蛋白質分子の相補性現象の結果生ずるバンドであり<sup>4)</sup>、*in vitro*では、容易に生じないと思われる。このことより、雑種バンドの出現しない花粉を用いることで、アイソザイムの遺伝様式の解明も、より容易に行なうことが出来るものと考えられる。

花粉のみで観察されたRf46のバンドは、花粉でのみ発現する他の遺伝子座の遺伝子によって支配されているものが、単に、人為的修飾によって二次的に生じた

ものかは明らかに出来なかった。

今回は、花粉を用いて、アスパラギン酸アミノ転移酵素アイソザイムを調べた。その結果、花粉も、針葉同様に、様々なアイソザイム研究へ利用可能なことが明らかとなった。また、花粉は、多種類の酵素を抽出する上で阻害となる成分の含有率も低く、アイソザイム手法を他の酵素種へ広げる上でも有効な組織であると思われる。

引用文献

- (1) Davis, B.:Ann. New York Acad. Sci., 121, 404~427, 1964
- (2) 白石 進:未発表
- (3) Sohwarz, D.:Genetics, 67, 411~425, 1971
- (4) 遠藤 徹:蛋白質核酸酵素, 19, 668~682, 1974

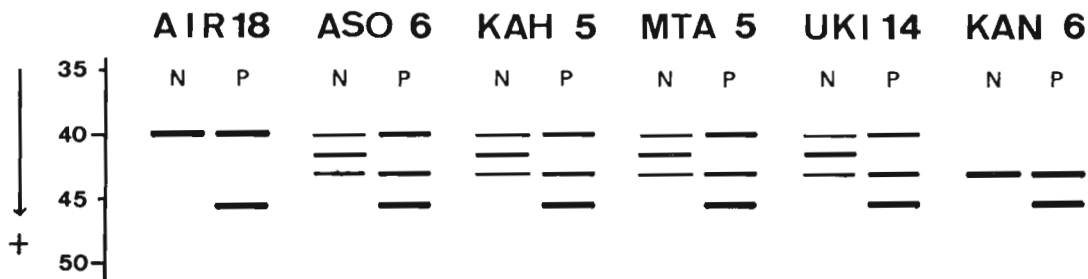


図-1 針葉と花粉におけるアスパラギン酸アミノ転移酵素のアイソザイムパターン  
N:針葉 P:花粉

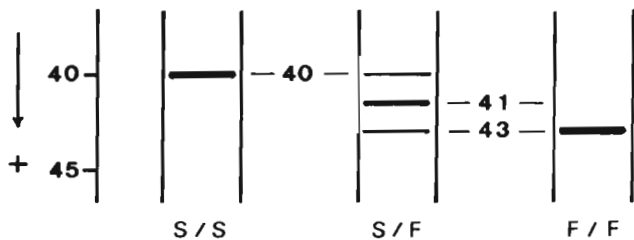


図-2 アスパラギン酸アミノ転移酵素アイソザイムの表現型と遺伝子型