

[短 報]

大豆のアイソザイム分析による遺伝資源評価

白井 滋久*¹ 白井 佳代*¹ 渡辺 喜芳*² 飯田 修三*³

大豆遺伝資源について子葉を用いアイソザイム分析を行うことにより、栽植することなく、識別及び既知品種との関連性推定のための絞り込みが可能であった。このことから、同分析法は大豆遺伝資源分類評価法としての実用性を有すると判断された。また、道内大豆交配育成品種親子間でのザイモグラム型の相同性は比較的高いことが示された。さらに、ザイモグラム頻度が北海道産在来種・道内育成系統と他地域との間で特異的に異なったことから、分子レベルからも本道適応性に関する遺伝変異・分化が示唆された。

緒 言

北海道における大豆遺伝資源の保有点数は4,219点(1994年度末:以下同じ)にのぼる。このうち植物遺伝資源センターでは、3,324点を保有しており、登録準備中の416点を除く、2,908点が登録・保存されている。登録・保存中の遺伝資源については、生態的あるいは形態的特性の調査とその分類及び評価を計画的に実施してきており、1,960点の調査を完了した。しかし、これらの特性の多くが複合形質であり、また環境変異を伴うことから、体系的な分類・区別が難しいことが多い。

同じ基質特異性を有するが、アミノ酸配列や等電点が異なる酵素群をアイソザイムと呼ぶ。アイソザイムを解析することは、遺伝子の直接産物である酵素を比較することであり、アイソザイムは遺伝子座間にエピスタシスが存在せず一般的に環境による影響も受けないとされ、分子レベルでの分類・評価に有効と考えられている。

そこで、道内で収集した大豆在来種及び植物遺伝資源センターで登録・保存中の大豆遺伝資源についてアイソザイム分析を行い、分子レベルから変異性・区別性に検討を加え、遺伝資源分類法、評価法としての有効性を探るとともに、有用形質との関連性の解析を試みた。

材料及び方法

1. 供試材料

(1) 道内在来種

植物遺伝資源センターで昭和60年4月から平成4年3月に道内から収集した大豆在来種 142点

植物遺伝資源センターで生態的、形態的特性を調査した登録・保存中の大豆道内比較品種 73点

(2) 登録遺伝資源

植物遺伝資源センターで登録・保存中の大豆品種 1,165点

原産地別の内訳は次のとおり

国内 613点	北海道 92, 道内育成系統 247, 東北 105, 北陸 13, 関東 108, 近畿 4, 中国 1, 九州 32, 不明 11
国外 552点	韓国 68, 北朝鮮 3, 中国 227, 台湾 1, トルコ 1, 旧ソ連 7, スウェーデン 3, イギリス 2, ベルギー 2, ドイツ 20, フランス 12, ポーランド 29, ハンガリー 29, ユーゴスラビア 22, 東欧 4, カナダ 3, アメリカ 76, 中南米 2, 不明 41

2. 分析方法

(1) 粗酵素液の抽出

発芽後2日目の子葉の一部を切り取り、5℃で冷やした0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)を加えて摩砕し、抽出した。1品種・系統当たり3個体を供試した。

(2) 調査した酵素と電気泳動、染色の方法

次の8つの酵素を調査した。

- ① ACO アコニターゼ
- ② APH 酸性フォスファターゼ

1996年12月24日受理

*1 北海道立植物遺伝資源センター, 073 滝川市

*2 同上(現新潟県北蒲原農業改良普及センター, 957 新潟県新発田市)

*3 同上(現北海道立北見農業試験場, 099-14 常呂郡訓子町)

- ③ DIA ダイアホラーゼ
- ④ ENP エンドペプチターゼ
- ⑤ EST エステラーゼ
- ⑥ IDH イソクエン酸脱水素酵素
- ⑦ PGM フォスフォグルコムターゼ
- ⑧ LAP ロイシンアミノペプチターゼ

電気泳動は、3%しょ糖を含む11%デンブングルを支持体として、2反復以上4℃冷蔵庫の中で6時間行った。緩衝液と電気条件は、ACO, APH, DIA, IDHについてはヒスチジン-クエン酸緩衝液、350V定電圧とし、ENP, EST, PGM, LAPについてはトリス-クエン酸緩衝液、35mA定電流とした。

染色方法はいずれも一般的方法で行った。

結果と考察

供試した8酵素中、LAPを除く7酵素で2種類以上のザイモグラムを検出した。一部に見られた不鮮明なバンドは対象から除き、ACOでは6つの型に、APH及びDIAでは3つの型に、ENP, EST及びPGMでは2つの型に、IDHでは4つの型に分類した(図1)。

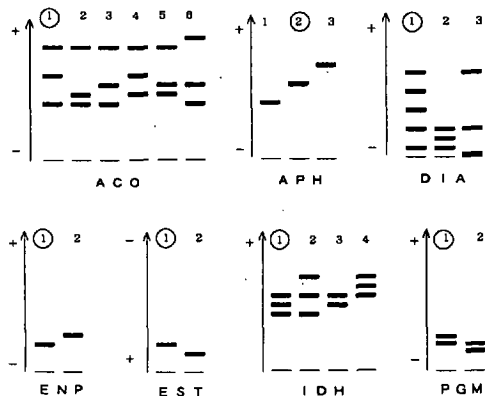


図1 供試酵素で観察されたザイモグラム
(○:「大谷地」のザイモグラム型)

1. 道内在来種

供試した在来種142点のうち明確なザイモグラムが認められた140点及び比較品種73点について以下の考察を行った。

(1) アイソザイム分析による遺伝資源の分類の有効性

7酵素のザイモグラムを組み合わせることにより、在来種140点を25系統群に分類することができた。最も大きな系統群は35点を含んでいた。140点のうち9点は、ザイモグラムの組み合わせによって、単独の系統として識別された。一方、この140点を種皮色、臍色、粒大の3形質で分類した場合、20系統群に分類された。ザイモグラムによる分類が種子の可視的形質による分類と同程度の分類能を有すると考えられた。さらに、このアイソザイムによる分類と種子

形質による分類を組み合わせた場合、140点を66系統群に分類することができ、80点の在来種については、栽植することなく既知の品種と同じグループとして分類し、関連性を推定するための絞り込みをすることができた。

(2) 道内育成・選抜品種とその親品種間のザイモグラムの関係

道内品種について、育成・選抜品種とその親品種のザイモグラム型を比較した(表1)。交配では、15品種中「白花大粒裸」のみ2酵素(ENP, PGM)のザイモグラム型が両親と異なったことを除いて、すべての酵素について両親いずれかのザイモグラム型を有した。純系選抜では、8品種中、すべての酵素で原品種のザイモグラム型を受け継いでいたのは、わずかに3品種であった。他の5品種は1~2の酵素で原品種とザイモグラム型が異なった。なお、「大谷地1号」「大谷地2号」「大谷地3号」は、原品種「大谷地」とはPGMのザイモグラム型が異なったが、3品種間では互いにザイモグラム型が一致していた。以上のことから、純系選抜品種親子間のザイモグラム型についての相同性は酵素によってはやや低かったが、交配育成品種親子間ではザイモグラム型についての相同性は比較的高いことが示された。

2. 登録遺伝資源

登録遺伝資源1,165点について、1点当たり3個体供試したが、3個体間のザイモグラム型が異なる場合が38点に見られた。また、ザイモグラムの部分的欠測が9点見られた。これらを除く1,118点で以下の考察を行った。

(1) アイソザイム分析による遺伝資源の分類

ザイモグラム多型頻度が低かったPGMを除く6酵素のザイモグラムを組み合わせることにより、登録遺伝資源1,118点を109の系統群に分類することができた。最も大きな系統群が149点を含んでいた。ザイモグラムの組み合わせにより1,118点のうち40点については単独の系統として識別された。

(2) 原産地とザイモグラムの関係

供試点数が少なかった中南米産及び原産地不明を除く1,077点についての原産地とザイモグラムの関係を表2にまとめた。

ACOでは全体として1型がほとんどであった。国内遺伝資源は外国産に比べ3型の頻度が低かった。その傾向は北海道産及び道内育成系統で顕著であった。2,4型は他府県、中国、アジア及び北米産で、5型は道内育成系統、他府県及び中国産で、わずかに検出された。6型は北海道産の「茶小粒」のみに観察された。APHでは2型が優勢であったが、他府県産で1型が比較的高頻度に検出され、北海道産及び道内育成

表1 道内大豆育成・選抜品種とその親品種間のザイモグラム型についての相同性

交配								純系選抜																											
相同性	品種名	酵素						相同性	品種名	酵素						相同性	品種名	酵素																	
		ACO	APH	DIA	ENP	EST	IDH			PGM	ACO	APH	DIA	ENP	EST			IDH	PGM	ACO	APH	DIA	ENP	EST	IDH	PGM									
○	*鈴成	1	2	2	2	1	2	1	○	*オシマシロメ	1	2	1	2	1	2	2	○	*霜不知1号	1	2	1	2	1	2	1	○	*霜不知	1	2	1	2	1	2	1
	十勝長葉	1	2	2	2	1	2	2		十勝長葉	1	2	2	2	1	2	2																		
	中生裸	1	2	2	2	1	1	1		黄宝珠	1	2	1	2	1	1	-																		
○	*イスズ	1	2	2	1	1	2	2	○	*キタコマチ	1	2	1	1	1	1	1	○	*蘭越1号	1	1	1	2	1	1	1	○	*蘭越	1	1	1	2	1	1	1
	十勝長葉	1	2	2	2	1	2	2		十育129号	1	2	1	1	1	1	-																		
	大谷地2号	1	2	1	1	1	1	2		情118号(トヨス)	1	2	1	1	1	2	1																		
○	*ホッカイハダカ	1	2	2	2	1	2	2	○	*トヨコマチ	1	2	1	1	1	2	2	△	*十勝裸	1	2	2	1	1	1	1									
	十勝長葉	1	2	2	2	1	2	2		樺太1号	1	2	1	1	1	1	2		中生裸	1	2	2	2	1	1	1									
	中生裸	1	2	2	2	1	1	1		トヨスズ	1	2	1	1	1	2	1																		
○	*スズヒメ	1	2	2	2	1	2	1	○	*キタホマレ	1	2	1	1	1	1	2	△	*大谷地1号	1	2	1	1	1	1	2	△	*大谷地2号	1	2	1	1	1	1	2
	PI 84751	3	2	2	2	1	2	-		十育114号	1	2	1	2	1	2	-																		
	コガネジロ	1	2	1	2	1	2	1		カリカチ	1	2	1	1	1	1	2																		
○	*スズマル	1	2	1	2	1	1	2	○	*ヒメユタカ	1	2	1	1	1	1	2	△	*早生鶴の子	1	2	1	1	1	1	1	△	*早生鶴の子	1	2	1	1	2	1	2
	十育153号	1	2	1	2	1	1	-		十育129号	1	2	1	1	1	1	-		白鶴の子	1	2	1	1	2	1	2									
	納豆小粒	1	2	1	2	1	1	-		カリカチ	1	2	1	1	1	1	2																		
○	*ナガハジロ	1	2	2	2	1	2	-	○	*ツルコガネ	1	2	1	2	1	1	2																		
	十勝長葉	1	2	2	2	1	2	2		中育1号	1	2	1	1	1	1	-																		
	黄宝珠	1	2	1	2	1	1	-		黄宝珠	1	2	1	2	1	1	-																		
○	*北見白	1	2	2	1	1	2	2	△	*白花大粒裸	1	2	2	1	1	1	2																		
	十勝長葉	1	2	2	2	1	2	2		蘭越	1	1	1	2	1	1	1																		
	大谷地2号	1	2	1	1	1	1	2		中生裸	1	2	2	1	1	1	1																		
○	*キタムスメ	1	2	1	1	1	1	2																											
	情118号(カリカチ)	1	2	1	1	1	1	2																											
	北見白	1	2	2	1	1	2	2																											

注1) *は育成・選抜品種を示す。

2) 相同性の判定

○：親品種のザイモグラム型を有する。

△：親品種と異なるザイモグラム型がある。

3) 育成・選抜品種のザイモグラム型に付したアンダーバーは親品種と相同性がない部分を示す。

表2 大豆登録遺伝資源の原産地とザイモグラムとの関係

原産地	点数	ACO						APH			DIA			ENP		EST		IDH			
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2	1	2	3	4
北海道	92	91					1	3	88	1	60	32		57	35	79	13	59	29	4	
前記	243	240		1		2		4	239		199	44		154	89	200	43	154	80	8	1
他府県	259	248	4	4	2	1		36	219	4	97	160	2	162	97	200	59	168	28	43	20
中国	216	183	4	23	3	3		9	177	30	80	136		20	196	212	4	61	59	70	26
アジア	68	56	3	7	2			4	57	7	20	48		12	56	66	2	25	19	13	11
旧ソ連	7	7							4	3	4	3			7	7			5	1	1
ヨーロッパ	114	87		27				1	77	36	44	69	1	36	78	111	3	39	36	20	19
北米	78	52	11	13	2			7	60	11	28	50		10	68	76	2	27	12	21	18
合計	1,077	964	22	75	9	6	1	64	921	92	532	542	3	451	626	951	126	533	268	180	96

注) 登録遺伝資源1,165点のうち、次の3項目に該当した88点を除く、1,077点について集計した。

①ザイモグラムの部分的欠測があったもの。

②同一品種・系統内で異なるザイモグラム型が検出されたもの。

③点数が少なかった中南米産及び原産地不明のもの。

系統にほとんど見られない3型は他府県産及び外国産で比較的多かった。DIAでは北海道産及び道内育成系統で1型が、他府県産及び外国産で2型が、また、ENPでは国内産で1型が、外国産で2型が顕著に見られた。ESTでは、国内産で2型の頻度が外国産に比べ高かった。IDHでは、国内産で1型が高頻度に見られ、北海道及び道内育成系統以外に3, 4型の頻度が比較的高かった。

すべての酵素で北海道産と道内育成系統のザイモグラム頻度分布が類似しており、一方、主にDIA, ENP, EST及びIDHにおけるザイモグラム頻度分布が、北海道産及び道内育成系統と他の地域産、特に外国産との間で異なった。このことは、分子レベルからも、本道適応性に関する遺伝変異・分化を示唆した。そこで、北海道産と道内育成系統で特徴的に検出されたDIA1型, ENP1型, EST2型, IDH1型を示した登録遺伝資源を1,077点から抽出したところ、49点(4.5%)認められた。その内訳は北海道産10点(表1北海道産92点の10.9%:以下同様)、道内育成系統25点(10.3%)、他府県産12点(4.6%)、外国産2点(0.4%)で、明らかに北海道産品種・育成系統の頻度が高かった。

総合考察

本研究では、子葉から抽出した粗酵素液を用いたアイソザイム分析を行い、鮮明なバンドのみを対象としたなか7つの酵素でザイモグラムの多型を検出した。これらのザイモグラム型によって、栽植することなく、大豆遺伝資源の識別や既知品種との関連性の推定のための絞り込みが可能であり、アイソザイム分析が大豆遺伝資源分類評価の一方法として有効であることを示した。また、道内大豆交配育成品種親子間でのザイモグラム型に高い相同性があることも確認した。

すでに、日本の大豆在来種のなかの北海道在来種²⁾あるいは東アジアのなかの日本の栽培大豆(特に沖縄、北海道)³⁾について、アイソザイム遺伝子型の地域的特異性が報告されている。本研究でも同様の傾向が追認され、北海道産及び道内育成系統で特徴的に検出されたDIA1型, ENP1型, EST2型, IDH1型は本道適応性(早晩性, 耐冷性など)との間に高い関連性があると思われる。

また、道内大豆在来種の早晩性や粒大とザイモグラム型との関連性が指摘されており¹⁾、大麦では縮萎縮病抵抗性遺伝子とESTザイモグラムとの間に高い連鎖関係が認められ、抵抗性育種への応用がはかられている⁴⁾。本試験でも、本道適応性はじめ有用形質と関連性の検討を試みたが、有用形質等のデータベ

ース構築が遅れており、十分検討できなかった。今後、有用形質とザイモグラムとのより詳細な関連性の解析を効率的に行うため、アイソザイム分析のデータの蓄積をはかるとともに、有用形質のデータベース化に努め、検討を深めたいと考える。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、北海道大学農学部生物資源学科植物遺伝資源学講座島本義也教授、阿部純助教授はじめ北海道立中央農業試験場畑作部畑作第一科及び北海道立十勝農業試験場研究部豆類第一科には多大なる御助言ならびに御指導をいただいた。また、本稿をとりまとめるにあたり、北海道立中央農業試験場畑作部大槌勝彦部長、北海道立植物遺伝資源センター佐々木宏場長および三浦豊雄研究部長には懇切な御指導、御校閲をいただいた。以上の各位に心から謝意を表す。

引用文献

- 1) 阿部 純, 島本義也. “北海道ダイズ品種におけるアイソザイム変異”. 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報. 30,42(1990).
- 2) 平田聡之, 阿部 純, 島本義也. “日本におけるダイズ在来種のアイソザイム変異”. 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報. 31,58(1991).
- 3) 平田聡之, 阿部 純, 島本義也. “日本およびその近隣諸国の栽培ダイズにおけるアロザイム変異”. 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報. 33,68-69(1992).
- 4) 早乙女和彦, 吉田 久, 小林俊一, 天谷正行. “エステラーゼ同位酵素遺伝子型によるオオムギ縮萎縮病抵抗性系統の選抜”. 栃木県農業試験場研究報告. 37,1-9(1990).

Evaluation of Soybean Genetic Resources by Isozyme Analysis

Shigehisa SHIRAI*, Kayo SHIRAI, Kiyoshi WATANABE and Shuzo IIDA

* Hokkaido Prefectural Plant Genetic Resources Center, Takikawa, Hokkaido, 073 Japan