

## エステラーゼのアイソザイム分析による雲南 栽培稲遺伝子の品種群分類と地理的分布

熊 建 華 その他

### 摘 要

雲南稲品種の多様性に関する研究をととして品種群を分類するため、エステラーゼアイソザイム多型性分析を行い、次のような結果を得た。

1. エステラーゼ遺伝子は *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4* の4遺伝子座を指標としたが、雲南稲のエステラーゼはすべての遺伝子座の対立遺伝子においていずれも変異が認められ、かつ新しい変異も認められた(2 A酵素バンド)。
2. 雲南省内を7地区に分け、その遺伝子頻度を比較して見ると、北部地区の頻度には偏りがあるのに対して、南部地区にはいろいろな対立遺伝子が見られた。
3. 地理的変異を詳しく調べることによって品種分類の標準を推定するため、4遺伝子座の組合せ型すなわち遺伝子型を基準として、地区別の頻度を計算して見たところ、南、北方向を軸として明瞭な地理的傾斜のあることを明らかにした。すなわち、南部地区には変異が多様であるが、北部地区への推移にともない変異が単純になっていった。
4. 以上の結果から、エステラーゼ遺伝子を基準として雲南稲品種群を分類すると、北部地区の品種はともかくとして、南部地区の品種についてみると簡単には分類の結論を出し得ないと考える。
5. 以上の結果は雲南南部地区が世界各地稲品種の多様性を包括していることを示し、またこれまでの推測を実証したことになった。今後、この地区と環境及び耐冷性などの農業形質との関係をいっそう深く研究する必要があると思われる。

### 緒 言

作物品種の分類、同定及び品種群変異などについては、酵素遺伝子の多型現象を利用することによって明確な解析が得られている。栽培稲についてもアイソザイムに関する研究は内外の多くの学者によって行われている。世界各地における栽培稲品種の分布と変異の多様性を検討した場合、遺伝子中心地は雲南省を含む東アジア丘陵地帯だといわれている(中川原, 1985)。

雲南において行われている中日共同研究は、雲南省の将来における品種改良と育種の立場から、品種群変異と分類に関する研究を深化させる必要性が生じた。この課題は品種改良と育種分野の研究を推進し、中日共同研究の最終目的に達するための基盤を確立するためにきわめて重要な意義をもっている。

本試験はエステラーゼ・アイソザイムを指標として、これまで推測されてきた雲南在来品種における種類の多様性を実証し、かつ本地区と隣接地区の関係を明らかにするとともに、将来の育種素材を蓄積し、そして、雲南品種の品種群分類を進めることを目指したものである。

## 材料と方法

### 1. 供試材料

供試品種はおもに雲南の在来品種である。一方、アイソザイム分析指標として国内の省外品種と日本品種及び他の国の品種も用いた。合せて426種の供試品種のうち、雲南品種が392種、そのうち49種の改良品種を除いて、すべて在来品種であった。また、省外品種は13種、日本品種15種、他の国の品種6種をそれぞれ含んでいる。また、雲南品種の地区特徴と地理的分布を調べるため、雲南の地理気象特性によって雲南を7地区に分けた(表1)。なお、品種と地理的関係の分析にはすべての在来品種を用いた。

### 2. 材料の調整

供試品種を10粒ずつ育成箱に播種して、4～5葉の時に強い施肥を行った後、品種当り2～3株の地上部分を採取し、直ちに分析材料として-15℃で凍結貯蔵した。凍結材料は低温下で茎葉磨率装置を用いて、蒸留水や緩衝液を加えないでサンプルを摩砕し、電気泳動に用いる粗抽出液をつくった(中川原, 1976)。この方法は細胞を強く摩砕し摩砕液の濃度を高く保ちエステラーゼの活性をできるだけ高めるために有効な方法である。

### 3. アイソザイム分析

電気泳動：2%寒天と5%ポリビニールピロリドン(K-90)をゲルとする平板薄層電気泳動法を用いた。ゲル作製にはペロナール緩衝液(バルビタールナトリウム+塩酸, イオン強度0.045, PH6.8)を用い、泳動槽には磷酸緩衝液(イオン強度0.05, PH6.8)を用いた。電圧300V, 電流2 mA/cmでゲルを60分間泳動した。この条件は泳動速度が早く、短時間に多くのサンプルを測定するのに好都合であった。

アイソザイム：これまでの成績によると以上の方法を利用すれば、エステラーゼが容易に解析され、かつ各種の稲においてすでに確認されている遺伝子の中で4遺伝子が同時に検出され、容易に多くの情報が得られる。また、各遺伝子の距離位置は十分に離れていると推定されていること、およびこれらには対立遺伝子の多型が多いことを考慮にいと、多種の遺伝子組合せ型が容易に発見されることが期待されるものである。

活性染色：1% $\alpha$ -ナフチル酢酸および $\beta$ -酢酸ナフチル酢酸を基質として、37℃の保温恒温器中で15分間反応させた後、ナフタニールジアゾブルーB塩で染色した。検出したエステラーゼ酵素の泳動像は遺伝子及び遺伝子型の同定を行い、地区別に見られる遺伝子と遺伝子型頻度を計算した。

## 結 果

### 1. エステラーゼ酵素の遺伝変異

遺伝変異をもっと詳しく示すため、すでに同定されている *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4* を指標として供試品種の変異を調べた。図 1 には *Est-1* (対立遺伝子数 2), *Est-2* (同 3), *Est-3* (同 2) など 3 座位の対立遺伝子の組合せによって生じる変異を示したものであるが、同時に理論的に推定されるすべての変異モデルを示すものでもある。写真 1 は雲南供試品種に見られた変異であるが、理論的に推定される 12 種の遺伝子型全部が雲南に存在することが明らかになった。したがって、雲南は特殊な地区であることが示唆された。

雲南省におけるアイソザイムの変異は以上だけではない。写真 2, 3 は始めて発見された 2A 酵素バンドである。このアイソザイムの泳動速度は 1A よりやや早く、活性染色をすると  $\beta$ -ナフチル酢酸に対して特異的に強い活性を示し、1A によく似ていることから 1A を規定する *Est-1* 座位の対立遺伝子である可能性も推定される。しかし、現在までに遺伝子の同定はまだ完了していないため、ここでは別の変異体とみることにする。供試 343 種品種の中 2A を持つのは 9 品種であった。

写真 4, 5 は 10A 酵素バンドに変異をもつ品種の分析結果である。このバンドの活性が強い時期は幼苗期の強度の施肥条件下であって、 $\alpha$ -ナフチル酢酸に対して特異的に反応する酵素である。

以上から、供試品種はアイソザイムの多様性と多型性が見られ、かつ雲南在来品種が多様な遺伝子型をもっていることがわかる。

### 2. エステラーゼの遺伝子頻度とその地理的変異

供試品種の変異性の程度と地理的特徴を調べるため、遺伝子の頻度を計算した。稲は自家受精植物であるので、雲南の在来品種といえども、大部分は純系品種とみてもさしつかえないので、遺伝子頻度と個体頻度は一致すると仮定して算出した。あらゆる供試品種に見られる異なる対立遺伝子の頻度を表 2 に示した。それぞれ *Est-1* は 90.8%, *Est-1*<sup>0</sup> は 9.2%, *Est-2*<sup>s</sup> は 10.5%, *Est-2*<sup>F</sup> は 14.5%, *Est-2*<sup>0</sup> は 75.0%, *Est-3*<sup>s</sup> は 57.7%, *Est-3*<sup>F</sup> は 42.3%, *Est-4*<sup>F</sup> は 67.1% であった。したがってこれらは雲南省内にはすべての対立遺伝子があることを明瞭に示している。

品種の地理上の比較を行うため、供試品種から雲南在来品種を選んで、表 1 のように地区別に分類した後、各地区の遺伝子頻度を計った。(表 3, 図 4)。その結果、雲南北部地区の対立遺伝子の頻度分布は単純であるのに対し、南部地区においては多様であって、この地区にはいろいろなエステラーゼ遺伝子の変異があることが証明された。

### 3. エステラーゼの遺伝子型頻度及び地理変異

供試品種の地理上の変異を一層具体的に明らかにするため、供試品種のエステラーゼの遺伝子

型を調べた。各品種の遺伝子型を調べると、その遺伝子型は従来の品種群の分類とよく一致することが経験的にわかっている。

ここでの解析方法も従来の方法にしたがい、*Est-1*、*Est-2*、*Est-3*の3遺伝子について、まず述べる。全供試品種のエステラーゼ遺伝子型を表4に示した。このうち、雲南在来品種に限っては、それぞれの地理的分布を表5および図5に示した。これらに見られるように雲南南部と西南部はすべての遺伝子型を含んでおり、かついずれの遺伝子型も優占しては見られず、遺伝子変異が極めて高いことが明らかである。また、北部地区へ推移するにともなって、遺伝子型の種類が減り、西北部と中北部においては遺伝子型6が優占し、品種の変異も単純となった。

#### 4. *Est-4*を加えた後の遺伝子型結果

本試験を通じて幼苗期において特異的な10Aバンドすなわち *Est-4* 遺伝子座が明確に解析されたため、これまでの遺伝子分析よりいっそう詳しい結果が得られた。図6は *Est-4*を加えて組合せた、推定される全泳動像である。

これまでの試験においては四つの遺伝子のうちで *Est-3* 遺伝子座即ち12Aと13A酵素バンドの異同によって籼と粳をおおまかに分類できるという結果をえているが、*Est-4*を加えた後の酵素泳動像の配列は、これを考慮して順序を組換えたものである。いままでの12種の遺伝子型に二つの対立遺伝子が増えて、理論的には24種の遺伝子型が存在する。表6に雲南省における4遺伝子座にもとづく遺伝子型頻度を地区別に示した。この結果によると雲南省には、理論的に推定された遺伝子型の大部分が存在することがわかる。図7にその地理的分布を示した。この遺伝的変異の多様性から雲南南部と西南部は遺伝的変異の中心として注目すべき特異地域であることを示すものであった。また、北部地区へ推移するにともなって遺伝的多様性が連続的に減少し、品種変異の単純化が明らかになった。

### 考 察

#### 1. 雲南省稲品種の変異

東アジア山間地区と丘陵地区は稲の遺伝的変異の多様性中心地帯といわれるが、今回の試験でこのことが改めて実証された。雲南省の南部地区はこの中心地帯の北部地域に位置しており、この地区におけるアイソザイムの変異は現在国内外の研究者に大きく注目されている。

今回の試験に用いられた大多数の在来品種の来歴と採集地はきわめて明確なため、エステラーゼアイソザイムの地区分布について貴重な結果が得られた。世界各地から収集した3000種以上の品種から認められた酵素バンドの全変異が、雲南南部におけるそれほど多くない品種のなかにすべて含まれていることが示された。

一方これまで報告されていない2A酵素バンドが発見され、かつ、理論上存在が推定されていたが、実際にいままで発見されていない遺伝子型が確認されたことなどは特記すべきである。このことは、ラオスとビルマに隣接している雲南南部と西南部即ち雲南省南部地区はアイソザイムの

遺伝的変異が多様な地区であることを実証するものである。以上の結果に見られるように、栽培稲を単純に粳と粳に区分する前に、なお残された問題が多いことが示唆されたといえよう。

## 2. 酵素分析からみた雲南稲の地理的変異

緯度と標高の双方からみると雲南省の地理変化は複雑である。今回は単純に7地区に区分した後、各地区とアイソザイム変異との関係を調べた結果、南北を軸に著しい地理的変異があり、南部から本部へ行くほど変異が単純になった。このような傾向は標高の高さとも関係があると思われるが、この問題については今後一層深く検討することが期待される。

雲南省はその地域はあまり広くないものの、世界各地の様々な稲品種が栽培されている。一方、遺伝変異の多様性と単純性も地理的に明瞭な傾斜があり、連続的変異の推移が観察できる。このような問題については、今後それぞれの品種の地区分布と諸形質との関係及び異なる環境要因などの解明に力を入れることによって、さらに詳細な結果が浮きぼりにされることが期待される。

## 3. 酵素遺伝子型による稲の分類

稲品種群分類の歴史を顧みると、インディカ（粳）とジャポニカ（粳）の二つの品種群に分けられたのにはじまり、近年品種群の数がだんだん増加している（加藤ら 1928, Terao and Midusima 1939, 松尾 1952, 岡 1958, 丁穎 1957, Morinaga 1968, Nakagahra 1978, 程侃声 1982, Glaszmann 1986）。

本試験によると、図7で見られるように異なる品種のエステラーゼ遺伝子の変異は豊富で、連続的であるため、多くの品種ではどの品種群に属するかについてははっきりした答えが得られないと言ふべきであった。供試品種の圃場特性の検定結果と他の質的変異とは対応させていないので、単にエステラーゼ遺伝子変異だけによって品種群を推定することは難しい。しかしながら、雲南南部地区にはこれまでの分類基準によっては分類し得ない、いわゆる中間型品種群がある可能性は、さらに深まったといえよう。

今後の研究方向としては、具体的に個別の品種について総合的な形質による分類を行うとともにエステラーゼ遺伝子型と比較しつつ、さらに詳細な分類を行う必要がある。

## 4. 農業形態形質とエステラーゼ遺伝子の関係

エステラーゼ遺伝子と他の農業形態形質との関係を解明するのは最も重要な課題である。アイソザイムと耐冷性及び環境適応性との関係については何らかの関係があるとの報告がある（高橋、管原 1981）。一方、第6染色体にある *Est-2* 遺伝子座とイモチ病抵抗性遺伝子座 *PI-Z*、稈先色決定遺伝子座 *C*、出穂抑制遺伝子座 *Lm* とは密接な連鎖関係があるが、このためこれらの農業形質はあたかも *Est-2* と同じかのような遺伝行動をとる。しかし、これらが別の遺伝子であることは、すでに知られていることである（Nakagahra 1984）。

中日共同研究を実施した雲南省昆明地区は海拔1916mにあり、稲の生長発育にとってやや特殊

な環境の地区である。環境と農業形質との関係を明確にして、栽培稲品種群分化についていっそう詳しい分類を行うことをとおして、新品種の開発と育成に必要な知見を提供するのが今後の中日合同研究の重要な課題であり、本研究は、そのなかで必須の新知識を提供することが期待できる。

## 討 論

加藤肇（農研センター）：本研究の分類基準として、雲南省では「陸稲」という分類基準は意味がなく、加味されていないと思うが、①変異幅の少ない北部地域、変異幅の大きい南部地域で「陸稲」として栽培されていた材料はどの程度含まれているか、②なにかバンドに特徴はみられるか、③もし、両地域の材料に相当数の「陸稲」が入っているならば、本研究は雲南では「陸稲」という分類基準は栽培上の用語として以外意味がないことを明白に示したものと考えられるのではないか。

回答：雲南省の陸稲は85%以上が南部及び西南部に分布している。品種が非常に複雑で、標高によっても栽培される品種が全く違う。標高500～1600mの地域に栽培されているが、1600mを越えると非常に少なくなり、水稻品種が殆どとなる。

中川原捷洋（生資研）コメント：本実験の結果と水陸稲など生態的品種群とは、今回は厳密な区別はできていない。しかしながら、西南、南部地区の品種群は、多数の陸稲が含まれ、かつそれらが豊富な酵素多型を示すことは、事実である。したがって、加藤氏の説のとおり、生態群としての「陸稲」という基準は、雲南品種の生物学的な分類とは直接的な関連は認めにくいと考える方が自然である。

志村英二（農研センター）：サンプリングの方法に問題がある。雲南品種を頻度から実験材料にするのは良くない。品種特性を考慮した取扱いが重要と思われるが、中川原氏の意見を合せお尋ねしたい。

回答：稲の品種分類については世界中大勢の学者、先輩により、広く研究されたが、エステラーゼでの研究結果から見ると、従来の方法で分類された種類と一致しない中間型の品種が存在するかもしれない。なお、同じインディカの品種でもインド型の品種と中国型の品種とはまた違うところがある。

中川原：サンプリングの方法は大切である。今回の試験は雲南農科院の保存品種を用いたのでホモ個体が多いと考えられる。したがって2～3個体でその品種のアイソザイム型を判定しても、大きな誤差はないと思う。しかし、供試品種の中にはヘテロの泳動像が少数見られるので、品種の混合または集団内の変異があるかもしれない。いずれにしても、雲南農科院の稲品種群分類の新たな発展は今後の研究がその成功を約束すると思う。

清沢茂久（生資研）：エステラーゼの地理的分布の差と陸稲の作付面積率との関係はみられるか。

回答：雲南省南部、西南部地域では今でも水、陸稲兼用の品種が農家に利用されている。このこ

とから見ると、すべての水稻と陸稻をはっきりと分けるのは難しいと思う。勿論大部分の水、陸稻品種がはっきり区別できる。大まかな区別なら、農業形質によってもできる。たとえば、陸稻は分けつが少なく、草丈が高い。しかし、耐倒伏性が強い。

**金田忠吉**（農研センター）コメント：日本では水稻と陸稻は明確に区別できるが、外国では雲南南部でも熊氏の話のように、栽培の状況によって水稻になったり陸稻になり、明確に分けられない場合が多い。