

9 Native-PAGE法による絶滅危惧植物分類の試み

1 はじめに

本校生物部では、絶滅危惧植物の保護を目標に掲げ、絶滅危惧植物の詳しい分布状況や、生育環境の調査を実施してきた。しかし、絶滅危惧種に指定されている植物には分類学的研究が遅れているものが多く、特に水生植物は一般に形態学的変異が陸生植物よりも大きいため、野外で植物調査にあたる時に花が咲く時期を外してしまうと植物種の同定が難しい、ということを感じていた。そうした中で、東京都立環境科学研究所の科学者の方の論文に、形態的特徴以外の方法でも植物、しかも我々が以前から調べてきたミクリ類の分類が可能である、ということが報告されているのを見つけ、この方法に基づいた研究を試み、その可能性を確信できる結果を得たので報告する。

2 研究の目的

野外での絶滅危惧植物の調査において、形態的特徴による種の同定方法はもちろん、それに加えて形態の比較以外の方法でも植物の同定を可能にし、さらにそれらの植物の分類を確定したい。これが可能になれば、絶滅危惧植物とわからないために開発の波に吞まれて絶滅に追いやられていく、多くの水草を絶滅の危機から救っていくことができるようになる。

3 研究の方法

植物種の同定では、一般に DNA分子の塩基配列を比較するのがもっとも厳密な方法と考えられるが、高校に備えられた実験設備、高校生の実験技術を考えてみれば、実行することは困難である。このため、DNA情報が反映されている様々な形質を比較する方法によることにした。ここでは東京都環境研の研究者の示唆により、酵素電気泳動法でアイソザイムを分離し、酵素の多型を比較する方法を利用することにした。

酵素の主成分はタンパク質であり、酵素分子の科学構造はDNAの情報により決まってしまう。ほとんどすべての酵素にはアイソザイムと呼ばれる、

同一の生体内で同じ生体反応の触媒となる異なる酵素が存在することが知られている。そのアイソザイムは種によって固有な分布をしているため、電気泳動で分離することによりアイソザイムを比較することで、植物種の分類ができる。

酵素分子の帯電の様子は溶液のpHによって変わり、酸性側では正、アルカリ性側では負に帯電する。電気泳動においては、酵素分子の立体形、帯電の程度によって酵素分子を固有の速さで移動させるため、泳動する速さの違いによってアイソザイムを分離することができる。泳動の媒質としてはポリアクリルアミド・ゲル (Poly-AcrylamideGel) を用いた。電気泳動 (Electrophoresis)の方法としては、一般に良く用いられている、強く変性させたタンパク質を用いるSDS-PAGE法での検出が容易で精密であり、分子量さえ測定可能である。しかしながら、この方法をタンパク質混合物に適用すると、目的の酵素がどのスポットに対応するのか、の確認が難しい。今回の研究ではタンパク質を未変性 (Native)のまま分離し、活性染色法を用いて特定の酵素のみを検出するNative-PAGE法を利用することにした。

(1) 実験方法

以下の実験捜査で用いる器具は、使用に際して可能な限り95%エタノールを含ませたペーパータオルで拭いてから使用した。また、保存容器の多くは光を避けるため褐色瓶を利用し、予め水道水・イオン交換水で洗浄した後、オートクレーブで殺菌した。使用した薬品は、生化学グレード、あるいは電気泳動用と明記されたものを用いたが、その多くは、電気泳動実験で多用されているSigma-Aldrich社の製品である。薬品による被害を避けるためと、試料のタンパク質汚染を防止するため、操作するときには必ずポリエチレン製の使い捨て手袋、またはゴム手袋を着用した。

ア pHを実験中一定に保つため、電気泳動実験でよく用いられている、以下の10数種類のトリス塩酸系の緩衝液などをつくり、

冷蔵庫内で4 程度に保って保管する。以下、体積モル濃度 (mol/l)の単位をMと略記することにして、主な水溶液を紹介する。

[すり潰し用緩衝液]

4倍濃度の濃縮 [stacking] ゲルbuffer(50ml)

[アクリルアミド・ゲル調整用の保存溶液]

A 1M HC1 48ml
Trizabase 36.6g
TEMED 0.23ml

イオン交換水を加えて100mlにする。

B 1M HC1 48ml
Trizabase 5.98g

イオン交換水を加えて100mlにする。

C アクリルアミド 29.2g
BIS 0.8g

イオン交換水を加えて100mlにする。

F 電極槽緩衝液
Trizabase 6.0g
グリシン 28.8g

イオン交換水を加えて1000mlにする。
(pH8.3となっているはずである)

G 過硫酸アンモニウム 0.14g

イオン交換水を加えて100mlにする。

(使用直前に調製することが望ましい)

G' 10%過硫酸アンモニウム水溶液過硫酸アンモニウム 1gにイオン交換水9mlを加える。使用直前に調製することが望ましい。

電極バッファー (1000ml)

貯液槽 [reservoir] bufferともいう

[アミノペプチダーゼ緩衝溶液 pH4.3]

[リン酸緩衝液 (0.2M PHospHate bufferpH 7.5)]

[0.1M Tris-HCl pH8.0]

[0.2M Tris-HCl pH8.0]

[0.1M Tris-HCl pH7.0]

[0.2M L-アスパラギン酸L-Asparticacid]

[2M KOH]

[4.0% L-leucyl-B-napHthylamide水溶液]

[1M DL-リンゴ酸水溶液]

[2M NaOH]

[1.0%塩化マグネシウム Magnesium chloride 6水和物]

[0.1%マーカー色素 (BPB)液]

[0.2M Tris-0.2M Maleate,pH3.8]

[NAD混液]

褐色ビンに入れ、冷蔵保存する

[NADP混液]

褐色ビンに入れ、冷蔵保存する

イ 可能な限り若くて新鮮な芽を採集し、すり潰し緩衝液を加えて氷冷状態ですり潰す。

[実験で使用した植物]

ミクリ科植物

・ミクリ (準絶滅危惧)

・オオミクリ (準絶滅危惧)

・ナガエミクリ (準絶滅危惧)

・ヤマトミクリ (絶滅危惧種 類)

ゴマノハグサ科植物

・カワヂシャ (準絶滅危惧)

・オオカワヂシャ

・イヌノフグリ (絶滅危惧 類)

・タチイヌノフグリ

・フラサバソウ

ガマ科植物

・ガマ

・コガマ

・ヒメガマ

ミズアオイ科植物

・ミズアオイ

・コナギ

ミズワラビ科植物

・ミズワラビ

試料のホモジェネートにはタンパク質を分解する酵素、プロテアーゼが含まれているため、実験中は氷冷するか、冷蔵庫に入れるなどして5 以下に保つ。 - 20 以下 (急速冷凍) に保たないと、翌日以降の実験では酵素の活性が極端に低下する。

ウ すり潰した試料を冷蔵庫で冷却しながら遠心分離する。分離された試料のうわずみ液15 ~ 30 μ lを電気泳動に用い、残りは氷冷保存する。

エ ポリアクリルアミド・ゲルを作製する。

専用のゲル作製器を2台組み立てる。

分離ゲルを注入する。

空気に触れていると凝固しないので、ゲル上部に静かにイオン交換水を入れる。

凝固するまで1時間以上待つ。凝固が完了したら、上層の水を捨てる。

濃縮ゲルを注入する。

注入したら試料を入れる溝を作るための櫛を挿入する。濃縮ゲルはすぐに凝固するので、櫛を入れる操作は速やかに行う。再び1時間待ってゲルが完全に凝固した後、櫛を注意深く外し、電解槽バッファーで2～3回溝を濯ぐ。その後染料マーカーと試料をマイクロピペットで注入する。ウェルと呼ばれる溝に注入したばかりの試料にはまだ1cm程度の幅があり、このままでは明瞭なバンドの分離ができない。そこで、二層になっているゲルのうち上部にある濃縮(stacking)ゲルは、下部にある分離ゲルに入る直前までに試料を細いバンド状に圧縮して、分離が鮮やかになるようにする。タンパク質は常にマイナスに帯電しているため、正極である下部に引き寄せられるようにして、それぞれの酵素固有の速度で下方に移動する。

オ ポリアクリルミド・ゲルを電気泳動槽へ入れる。電気泳動槽にゲル2枚をセットした後、泳動槽用緩衝液を注入し、冷蔵庫に入れて冷やしながらか通電を開始する。濃縮ゲル中では1枚あたり定電流10mAで約1時間30分、分離ゲル中では20mAで約1時間電気泳動を行い、泳動の先端が下端近くまで来たら泳動を終了する。

カ 泳動槽からゲル板を取り出す。ゲルを活性染色液に入れ、適度に発色するまで恒温槽中で揺り動かす。温度は恒温槽の中で37℃に保つ。光で分解してしまう色素が多いため、なるべく暗くして染色する。発色してバンドが現れたら、停止液と定着液に浸け、記録した後保存する。

(2) 同定に利用した酵素群と活性染色液

- ア GOT (グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素)
- イ LAP (ロイシンアミノペプチダーゼ)
- ウ SKDH (シキミ酸デヒドロゲナーゼ)
- エ ADH (アルコール脱水素酵素)
- オ LDH (乳酸脱水素酵素)
- カ MDH (リンゴ酸脱水素酵素)

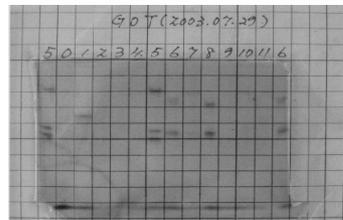
- キ G6PDH (グルコース 6 リン酸 デヒドロゲナーゼ)
- ク FDH (ギ酸デヒドロゲナーゼ)
- ケ GDH (グルタミン酸デヒドロゲナーゼ)

4 結果と考察

電気泳動に用いた試料の濃さの違いなどによって、発色の程度や分離の度合いが異なるゲルが得られた。昨年度に実施した予備的な電気泳動実験の結果(2002夏)をも加味して、以下各酵素ごとに結果を示し、考察を加えていく。

染色されたバンドの分析は、通常泳動比(Rm値)でなされる。

$Rm = (\text{基線からあるスポットまでの距離}) / (\text{基線から泳動フロントまでの距離})$



(1) GOT 今回の実験で得られたGOT染色されたゲルを、写真.1に示す。ここで、今回得られた泳動ゲルのレーン番号と用いた試料との対応は、図.A～図.Cの通りであるが、このレーン番号については、以下に示す写真でも全て共通である。

2002 summer				
5	6	7	8	9
マーカー	グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素	グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素	グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素	グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素
ミクリ類			ゴマノハグサ類	

図.A 2002年夏実験のレーン番号と植物対応

2003 summer									
4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素									
ゴマノハグサ類					ミクリ類				

図.B 2003年春実験のレーン番号と植物対応

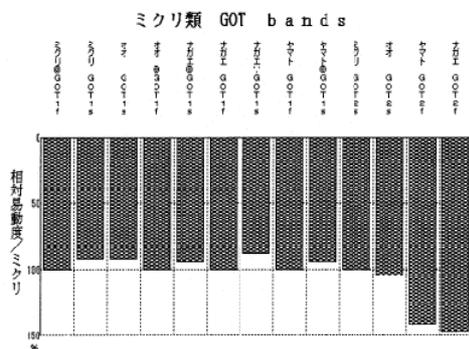
2003 summer									
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素									
ミクリ類		ゴマノハグサ類		ミクリ類		ミズアオイ類		ミズウラボシ類	

図.C 2003年夏実験のレーン番号と植物対応

ミクリ類のGOTスポットについて、易動度に変換して示したものが図.Dである、この図において、ミクリGOTIのf(=fast)バンド

が再現性良く染色できるので、アイソザイムバンドの基準(ε易動度100)とした。また、GOT 2はこれらの植物では1種しか確認できないが、ここでもミクリのGOT 2を基準とした。

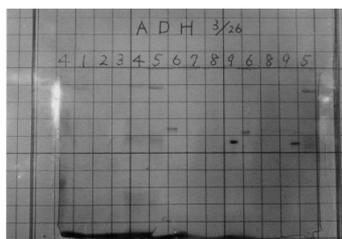
GOT 1やGOT 2の分子は植物の種によって少しずつ異なり、形態的に良く似ているミクリとオオミクリ、あるいはナガエミクリとヤマトミクリのアイソザイム分布は、互いによく似ているが、この2グループ間、あるいはこの2グループと形態的にも遠く隔たった他の植物との間には、分布の差が大きく表れる。



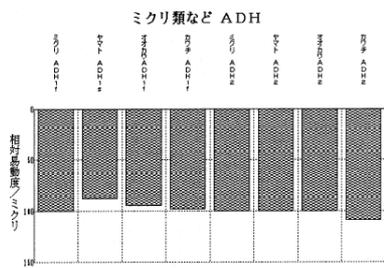
(2) ADH

ADHについては、数回染色を試みたが、きれいな泳動スポットを得られたのは1回のみであった。

今回の実験で得られたADH染色されたゲルを写真・2に示す。



写真・2 今春のADH

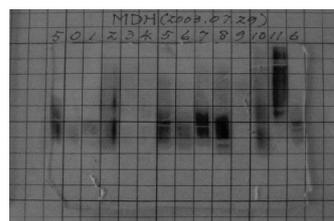


図・E ミクリ類などのADH分布

これらの泳動スポットを移動度で表したものが図・Eである。ADH1に関しては、ミクリ・オオ

ミクリのような移動度の大きいfast-F型バンドと、ヤマトミクリ・ナガエミクリのような移動の遅い

slow-S型バンドの2種類が確認されたが、ADH2についてはアロザイムの存在は確認できなかった。



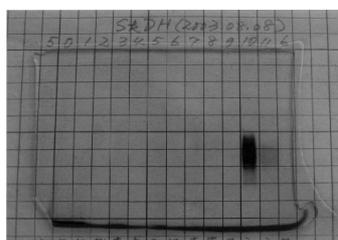
写真・3 今夏のMDH

(3) MDH

MDHについては、常に染色に成功してきた。MDHは複雑なバンド構造を持つゲルが何枚も得られている。これらのゲルを写真・3に示す。種により、かなりバンドパターンに差が認められる。今回の植物については、MDHバンド構造が複雑すぎて、GOTほどはっきりとバンドが分析できなかったが、染色には成功しており、分離できる可能性がかなり高いので、実験方法を改善して分離ができるようにしていきたい。

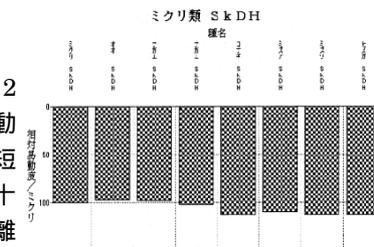
(4) SKDH

SKDHについては、1種類、アロザイムにF型とS型が存在しているようである。(写真・4) 易動度の解析例を図・Fに示す。



(5) GDH

GDH 2は、泳動距離が短いため十分に分離できなかったが、1種類のみしか確認できない。GDH1も不十分ではあるが2種類以上確認できた。



図・F ミクリ類のSKDH

(6) LAP

LAPにおいては、染色時にゲルのバックグラウンドが強く、活性染色が難しかったが、2003年夏実験では、少しずつスポットが現れ始めた。

(7) G6PDH、FDH、LDH

G6PDH、FDH、LDHではなかなか染色がうまくいかなかった。これらの酵素については、まず、確実に染色できるように実験条件を工夫していきたい。

(8) 結果のまとめ

アイソザイムはNative - PAGE法で分離でき、その変異は形態的に差があればあるほど大きいということが明らかになった。また、酵素の種類によりアイソザイム変異の程度が異なるため、いくつかの酵素を総合して比較を行えば、より確実に分類や同定ができることも確認できた。

(4) 形態的特徴の比較、核型分析、アイソザイム分析などを総合して、絶滅危惧植物の同定・分類を確実にできるようにする。

5 実験の感想と今後の課題

進んだ内容の実験であり、生物の授業で学んだ実験方法を実際に行って確認することができた。実験では危険な薬品も使用していて、常に手袋を着用しながら慎重に行わなければならなかった。使用した酵素は実験条件にきわめて繊細な影響を受けるため、少しのことで実験結果に差がでてしまうこともあった。また、一回の実験に長い時間がかかり途中で止めることができず、長期休暇中にしかできないため、少ししか実験ができなかった。この実験では、生命科学の研究でよく用いられる実験手段を用いており、今後生物を学んでいく上で発展性が見込める実験、という印象を受けた。

これからの課題として、以下のようなものが挙げられる。

- (1) 実験方法に習熟し、活性染色法を改良することにより、精度の高い検出法を見つける。
- (2) 今回の実験では分離が難しかったMDHやGDHのバンドがうまく分離できる実験条件の検討。
- (3) うまく分離できて、危惧種をはっきりと分類できる酵素を選別する。