

パーオキシダーゼアイソザイムの検出方法 の検討Ⅱ) アクリルアミドゲルによる検出

林業試験場九州支場 白石 進

1. まえがき

アイソザイム分析は種々の分野において、遺伝学的研究の有力な手法として近年注目されており、林木でも1970年代に入って遺伝育種学的研究に盛んに用いられるようになった。筆者も、現在、この手法を使用している「ヒノキの系統分類」に関する研究で、ヒノキの系統変異を明らかにするために、各地の集団の遺伝的組成を調べている。

林木のアイソザイムに関する多数の研究が、デンブングルを支持体とする電気泳動法¹⁾を用いている。支持体には、他に、口紙、セルローズアセテート膜、寒天、アクリルアミドゲル等がある。デンブングルには分子篩作用があり、分離能も良く、多くの酵素の多型はこの方法で見つけられた²⁾。しかし、この方法は、加水分解デンブンの調整のつど、バンドの移動度および分離能が異なる結果を示すため、一連の分析には、同時に加水分解したものを用いなければならず³⁾、この点から、デンブングルは、分析数が多数ある場合や長期間にわたる研究には適さないように思われる。

そこで、再現性が高く、分離能も良好であるアクリルアミドゲルを用いるディスク電気泳動のパーオキシダーゼアイソザイムの分離能と葉中の酵素抽出に用いるホモゲナイズ液の影響について調べた。

2. 材料と方法

1) アクリルアミドゲルとデンブングルの分離能の比較：実験材料としてヒノキ3個体の針葉を使用した。ディスク電気泳動法の場合は、針葉0.5gに0.1M トリシュー塩酸緩衝液pH8.0を2.5ml 加えてホモゲナイズしたものを0℃、3,000×gで15分間遠心分離し、その上清液をさらに0℃、30,000×g,60分間行なった後、上清液を-15℃で冷凍保存し、翌日、10μlをゲル上端に加えて泳動を行なった。泳動は、分離ゲルに7.7%アクリルアミドゲル、濃縮ゲルに3.0%アクリルアミドゲルを用い、Davisの原法⁴⁾にしたがった。またデンブングル電気泳動法の場合は、針葉0.2gを水0.6mlの中でホモゲナイズし、その粗抽出液を口紙にしませゲル中に挿入した。泳動は、一般に使用されている連続ホウ酸緩衝液系⁵⁾の他に、連続トリシューエン酸緩

衝液系⁶⁾、Fergusonの不連続緩衝液系⁷⁾を用いて行なった。

2) ホモゲナイズ液の違いによる検出バンド数：実験材料としてヒノキ2個体、スギ2個体を使用した。酵素抽出時のホモゲナイズ液として、0.1M トリシュー塩酸緩衝液pH8.0、0.1M トリシューグリシン緩衝液pH8.3、0.066Mリン酸緩衝液pH7.3と水を用い、これらに0.5Mスクロースを加えた場合(記号Ⅰ)と0.5Mスクロース、6mMシステイン、6mMアスコルビン酸、1% Tween 80を加えた場合(記号Ⅱ)について実験した。冷凍保存した抽出液は、保存後1日目、5日目、10日目の3回、上記と同様の方法でディスク電気泳動を行なった。

3. 結果および検討

アクリルアミドゲルとデンブングルを用いてヒノキ3個体(A, B, C)のパーオキシダーゼアイソザイム分析の結果検出されたバンド数を表-1に示した。デンブングルでは、検出されたバンド数が十側6~8本、一側1~3本であるのに対し、アクリルアミドゲルは、十側のみにもかかわらず10~11本あり、今回の実験の結果からも、分離能の良いことが認められた。また、アクリルアミドゲルでは、各バンドが非常に鋭く現われ、バンドの判読も容易であった。

ホモゲナイズ液の違いによる検出バンド数の変化を表-2に示した。また、今回実験に用いたうちで、ヒノキ1個体について、抽出液保存1日後の各ホモゲナイズ液のバンド出現状況を活性の程度の強い順に「3」「2」「1」「t」の記号を用いて示した。供試した4個体とも、各バンドの相対移動度(Rm)に緩衝液間で違いはなかった。しかし、活性の比較的高いバンドでは、各緩衝液とも、同様に出現したが、活性の低いバンドでは差が見られ、その結果、出現バンド数において、緩衝液間で違いがあった。今回実験したなかで水とトリシュー塩酸緩衝液を用いた場合にバンド数が多く現れた。一般にホモゲナイズ液として緩衝液が使用されているが、単にスクロースを添加した水でも、パーオキシダーゼの抽出に良い結果を示した報告⁸⁾もあり、ヒノキ、スギのパーオキシダーゼの抽出には水を用いても十分行なえるものと思われる。

また、酵素の安定剤を加えた場合、緩衝液の種類により、程度は異なるが、スギではバンド数が増したがヒノキでは逆に減少する傾向が見られた。今回の実験では、安定剤として、システイン、アスコルビン酸、Tween 80を用いた場合しか調べなかったが、今後は、抽出する材料の種類、酵素種により安定剤を使い分ける必要があると思われる。

冷凍保存期間が長くなるとバンド数が急速に減少した。消失したバンドは、活性の低いバンドであった。このことから、抽出し冷凍保存した試料は、できるだけ短期間のうちに電気泳動を行わなければならない。

以上の結果、ディスク電気泳動法によりパーオキシダーゼアインザイムの分析を行なう場合は、スクロースを加えた水もしくはトリス-塩酸緩衝液で酵素を抽出し、その後短期間のうちに泳動を行う必要がある。

引用文献

- (1)遠藤 徹：SABCO J, 2, 120~126,1966
- (2)井上 勤：科学の実験, 43, 1101~1114, 1973
- (3)Shaw, C. R. & Prasad, R. : Biochem. Genet. 4, 297~ 320, 1970

表-1 電気泳動方法による出現バンド数の比較 (単位：本)

ゲル	連続	ホウ酸	A		B		C	
			+	-	+	-	+	-
			デンブ	7	2	7	2	7
ンゲル	トリス-クエン酸	6	1	7	1	6	1	
	不連続 Ferguson	7	3	6	2	8	2	
アクリルアミドゲル			10	-	11	-	10	-

- (4)Davis, B.: Ann. New York Acad. Sci. 121, 404~ 427, 1964
- (5)九州林木育種場：九育業務資料No. 4, 28~35, 1976
- (6)Siciliano, M. J. & Shaw, C. R. : Chromatographic and Electrophoretic Techniques, 185~ 209, London, Heinemann, 1976
- (7)堀 襄二：最新電気泳動法, 313~ 369, 広川書店, 東京, 1978
- (8)Feret. P. P. & Bergmann. F. : Modern Methods in Forest Genetics, 49~77, Berlin, Springer - Verlag, 1976

表-3 抽出液精製後1日目の各バンドの出現状況 ヒノキ-A

出現バンド	緩衝液		水		トリス-塩酸		トリス-グリシン		リン酸	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Rf										
82	t	1	t	1	1	1	1	1	1	1
80	-	t	-	t	-	t	-	t	-	-
67	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
60	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
53	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
49	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
45	1	1	1	1	t	t	t	t	1	t
43	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
41	t	t	t	t	-	-	-	-	t	t
37	1	1	1	1	t	t	t	t	t	t
30	-	t	-	t	-	-	-	-	-	t
28	t	1	t	1	-	-	-	-	t	t
	9	11	9	12	7	8	9	10		

表-2 酵素抽出液の冷凍保存による出現バンド数の変化

		ヒノキ-A			ヒノキ-B			スギ-A			スギ-B		
		1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10 day
水	I	10	9	8	11	9	8	9	6	6	9	9	6
	II	10	9	8	11	9	8	9	6	6	11	11	6
トリス-塩酸緩衝液	I	10	9	8	11	9	8	9	6	6	9	9	6
	II	10	9	8	10	8	8	9	7	6	12	12	7
トリス-グリシン緩衝液	I	9	7	7	8	6	5	9	6	3	7	5	4
	II	9	7	7	8	5	4	7	7	3	8	5	4
リン酸緩衝液	I	9	8	8	11	8	6	9	6	5	9	8	5
	II	9	8	8	9	8	5	7	6	5	10	7	4

(単位：本)