

クモの電気泳動分析

池 田 博 明

はじめに

クモには種と変異に関する問題の解決に役立つと思われる例が山積しているにもかかわらず、飼育が面倒なため、その遺伝様式はほとんど判明していない。また、電気泳動技術は遺伝的変異の研究に成果をあげるにも関わらず、日本のクモでの研究例は少ない。知り得た限りでは杉田博昭・関口晃一(1975)がナガコガネグモの体液で4本のヘモシアニンのバンドを見いだしているほか、杉田の研究室で若井千明がクモ数種のヘモシアニンを調査し、近縁種での類似を示し、動物学会で口頭発表している(若井、私信)だけであった。

1988年度に私は神奈川県立教育センターでの研修の機会を得た。私は泳動技術を会得するとともに、クモのエステラーゼを泳動し、種によってどのような泳動パターンを示すのかを調査した。まだ研究は予備調査の域を出ていないが、現在電気泳動はそれ自身が研究の主題ではなく、研究手段のひとつとして利用されているので、クモに即して電気泳動法をまとめておきたい。

泳動技術や泳動装置については高橋孝行氏(東京大学理学部)に御教示いただいた。米沢敏氏(北海道大学理学部)は泳動に関する資料を送ってくださった。系統分析と電気泳動について日本語で書かれた良書はなく、片倉晴雄氏(北海道大学理学部)に“Allozyme Electrophoresis”(Richardson et al. 1986)を御教示いただいた。この本には理論

から実際例、計画の立て方までが詳述されており、たいへんに有用である。長戸康和氏(東海大学医学部)には文献を入手していただいた。また、実験に当っては神奈川県立教育センター生物教室の高橋節郎・似内克郎・和田仁・常盤博各氏、化学教室の京野勝・遠藤知克各氏、湯河原高校の菅原恭一氏、城山高校の若井千明氏に便宜を計っていただいた。記して感謝申しあげる。

1. 電気泳動の方法と理論

目的や用途に応じた様々なゲルが利用され、泳動の方法も多様であるが、今回は試料が微量で分析可能なポリアクリルアミドによる不連続スラブゲル電気泳動法を採用した。

スラブ(平板 slab)はロッド(管 rod)に対応する言葉である。不連続スラブゲル法は現在最も広く応用されている方法である(泉ほか、1985)。

泳動装置はミニゲルスラブ電気泳動装置 N A-1010型(日本エイドー社製)を使用した。ゲル(gel)の厚さは1 mmである。

(1) ゲルの作成

試薬の組成は表1に示した。

① ガラス板2枚を組み立てて、垂直に立てる。ガラス板の表面、特にゲル側はきれいにふくこと。使用後は洗剤につけ、十分に流水で洗ってから、蒸留水にいった後、乾燥すること。

② lower gel を調整して脱気した後、

ガラス板の間に適当量を流しこむ。液状のアクリルアミドは神経毒であるため、誤って手についたら十分な水で洗い流すこと。Stock Acrylamide は冷蔵しておいて、使用直前に湯浴して37~40℃に温める。室温程度の温度では固化するまで数時間かかる。gel は試験管に作るのが脱気に便利である。脱気しないと酸素が gel の固化を妨げる。 μl 単位の微量液を採るにはピペットマン (ギルソン社) が便利である。

③ ゲルの上面に注射器で水をゆっくりと加える。1 mm 程度でよい。この水は酸素を遮断するためである。

④ ゲルが固化するのを待つ。このゲル (細孔ゲルともいう) が分子ふるいの役をする泳動ゲルである。主にゲル濃度を7.5%にした。一般にゲル濃度が増大すると泳動帯は鮮明になるが、移動は遅くなる。

⑤ ゲルが固化したら、板を逆さにして上面の水を捨てる。その後、ろ紙を細く切って水をできる限りのぞいた方がよい。

⑥ upper gel を調整して脱気した後、あふれるまで流し込む。

⑦ すぐにコームを挿入する。コームの先端から1 cm 下に upper gel と lower gel の境界面が来るのがよい。

⑧ ゲルが固化するのを待つ。3%以下のゲルではふるいの作用はない。このゲル (粗孔ゲルともいう) はタンパク質の濃縮作用をする。

⑨ コームをまっすぐ上に引き抜き、外わくゴムを外して泳動槽を組み立てる。

⑩ Reservoir Buffer 4 倍希釈液を十槽、一槽に入れる。ほぼ280 ml ほど使う。泡は完全に除くこと。使い捨て注射器の先を曲げたもので空気を噴射して泡を追いつくとよ

い。

Buffer の pH がタンパク質の等電点よりもアルカリ性であるため、すべてのタンパク質は負に荷電し、陽極に移動する。

(2) 試料の泳動

① ゲルのスロットに試料をのせる。試料はのせる直前に Sample Solvent と1:1 にまぜ、このまぜたものをマイクロ・シリンジでのせる。1 スロットで2 μl 程度泳動できる。

② 通電して電気泳動を開始する。最初は4 mA で、サンプルが lower gel に入る直前に10 mA にして泳動する。4 mA と10 mA は室温でも不都合なほどの熱を発生しない電流量であるが、冷蔵庫内で泳動した。

③ サンプルの BPB の青をマーカーとして、泳動が終了したら、通電をやめ、ゲルをスパチュラなどを利用してガラス板から外し、染色液に入れる。一度使用した緩衝液は捨てる。

(3) 染色操作とザイモグラムの記録

エステラーゼの活性染色法は荻田 (1965 a) による。

① 染色トレーに基質・染色液を入れておき、この中に泳動の終わったゲルを入れる。基質・染色液の組成は表2参照。

② トレーを恒温水槽で湯浴する。20分程でエステラーゼ活性のあるバンドが青黒く染色される。アゾ色素塩はエステラーゼ活性を若干阻害するため、酵素活性が弱い場合は基質液と染色液を分けて作用させる必要があるが、クモでは基質・染色剤混液で充分発色した。

③ トレー内の液をリン酸緩衝液に置き換えてゲルを洗い、ゲルをライトボックスに載せて撮影・記録する。

④ 乾熱複写器でゲル・コピー用紙にコピーするか、ゲル乾燥器でゲルを乾燥させると、後でデンストメトリーも可能になる。今回はそれらの機器がなかったため、次の染色を行い、酢酸液中に保存した。

(4) アミド・ブラック染色（非特異的なタンパク質の染色）

① アミド・ブラック染色液にゲルを約30分浸す（全面真っ黒に染まる。染色液は繰り返し使用できる）。

② ゲルを脱色液（10%酢酸水溶液）に移し脱色する。脱色液を30分毎に5～6回置き換える。

③ ゲルをライトボックスに載せて撮影・記録する。

(5) 試料の作成

① クモ1個体を丸ごと0.2mlの水を加えてガラス・ホモジェナイザーですりつぶす（流水で外側を冷却しながら30回～40回ピストン運動をした）。この後に試料の精製のため、遠心して上澄み液を採るのだが、超遠心器がないので、省略した。

荻田（1965a）によると、組織と等量、あるいはその半量の脱イオン水を加えてすりつぶし、冷却遠心分離器で約12000Gで30～60分間分離し、上澄み液を用いる。ショウジョウバエ1頭のように微量組織を用いる場合にはスライド・ガラス上に水を1滴落とし、その中にハエを入れ、スパチュラで充分つぶして、遠心せずにそのまま用いる。

② ホモジェネートにSample Solventを0.3ml加え、再びつぶす。よくかき回す。

③ マイクロ・シリンジに試料を吸い上げる。

以上の操作にかかる時間はほぼ図1のようであった。

2. 実験結果および考察

：クモのサイモグラムについて

(1) イシサワオニグモ、ジョロウグモ、コアシダカグモの体液

イシサワオニグモは山地性の大型のクモである。雌成体の脚を取ってにじみ出る体液を泳動したが、エステラーゼ（以下ESTと示す）バンドは表れなかった。タンパク質バンドは4本表れ（図2A）、冷蔵試料をゲル濃度を下げて泳動すると（7%）5本表れた（図2B）。貯蔵によってhomologousなdimerのポリペプチドが一時的に二つに分離することがあるという（Richardson et al, 1986）。日本産のカブトガニでは体液の中から容易に検出されるタンパク質がすべてヘモシアニンであり、バンド数が4本であることを考えると（Sekiguchi, 1988）、イシサワオニグモのこのバンドもヘモシアニンである可能性があらう。ジョロウグモの体液からはタンパク質のバンドが検出されなかったが（図2C）、これは試料の量が少なかったためである。イシサワオニグモよりずっと大型のコアシダカグモ雄垂成体の体液をイシサワオニグモの3倍量ほど用いても弱い活性しか表れなかったことから、（図2Q）、体液中のESTは他の組織に比べて、ずっと少ないようである。

(2) ヒラタグモの組織

ヒラタグモは雨戸や壁面に平べったい住居を作る世界共通種である。

神奈川県平塚市上吉沢産のヒラタグモ雌成体の組織からは5個（図2D）、雌垂成体の組織からは4個（図2E）のESTバンドが表れた。成体では最も移動度の早いESTが付け加わった。最も移動度の遅い部分のESTバンドは広がっているが、どのスロットでも同じ結果になるので、これは複数の酵素に

よるものではなく、ひとつの酵素のゲル内拡散 (diffusion) のためであろう。非 EST バンドは4個だった (図2 F)

神奈川県足柄上郡大井町産の雌亜成体は4個の EST バンドを示した (図2 G)。同時に泳動した冷蔵 (4℃) 平塚産の試料では活性の弱かった部分の EST バンドが検出されなかった (図2 H) が、ほかのバンドの移動度には差が認められなかった。冷蔵前の平塚産の試料のデータはゲル濃度が低く、バンドの移動度が大きかった (図2 I)。

タンパク質バンドはすべて EST バンドより前に7個が表れた。試料の量が少ない場合には4個であった (図2 g・h・i)。

(3) アズマキシダグモの組織

アズマキシダグモは山地を徘徊する種類で色彩変異が多い。東京都町田市野津田公園で採取した2個体の幼体は各々異なった EST バンドを示した (図2 J・j・K・k)。A は雌幼体、B (A に比べてわずかに黒い) は雄幼体であったのかもしれないし、A に比べてバンドの数が多い B は遺伝子をヘテロに保有している個体なのかもしれない。非 EST 部分のバンドにはサプル量の差から来ると思われるバンドの有無はあっても、本質的な差はないので、この2個体の EST 部分は共通部分が大変に少ないことになる。確実なことを言えるのにはもっとたくさんの個体を分析してみる必要があらう。非 EST 部分は EST に比べて移動度が小さい。

(4) ジグモ、ネコハエトリ、アサヒエビグモ、ハナグモ各組織、ジョロウグモ卵、コアシダカグモ体液

EST 部分は、ジグモ雌幼体 (野津田産、図2 L) で10個、徘徊性種ネコハエトリ雌幼体 (野津田産、図2 M) で4個 (染色が弱

い)、徘徊性種アサヒエビグモ幼体5個体 (神奈川県秦野市大倉産、図2 N) で7個、コアシダカグモ体液 (野津田産、図2 Q) で4個が表れた。ジグモには強く染色される大きく移動度の異なる4本のバンドがあり、他とは際だった違いを見せている。ネコハエトリは小形であるため、試料が過少であった。アサヒエビグモは5個体まとめてホモジェネートしたものはあるが、ヒラタグモ・アズマキシダグモ・ネコハエトリと比較して移動度が遅いのが特徴である。

非 EST 部分はアサヒエビグモで6個、ネコハエトリで9個、ジグモで4個であった。移動度の小さい領域には共通なバンドが多い。ジグモには EST よりも移動度の早いバンドが1本検出された。ハナグモ幼体組織とジョロウグモ卵では EST バンドは得られず、非 EST 部分にそれぞれ4個、6個であった (図2 o、図2 p)。

(5) サンプル量と EST バンドについて

クモの生重を測定し、サンプル量とバンド数の関係を図3に示した。サンプル量をクモ生重 (mg) $\times$ スロット注入量 (μ l) / (ホモジェネート時に加えた純水 + Sample Solvent) (ml) で算出すると、サンプルが 100×10^{-3} mg 以下では EST バンドをほとんど検出できなかった。スロット注入量を2 μ l、ホモジェネート時に加える純水0.1 ml、Sample Solvent 0.1 ml とすると、クモ生重が10 mg 以上でないと検出できないことになる。

(6) クモのエステラーゼについて

体液では EST はほとんど検出できず、全身をホモジェネートした液で検出できた。一般に EST 部分は移動が早かった。これは EST の分子量が比較的小さいことの反映である

う。ジグモでは遅いバンドがあった。

マーカーとなるタンパク質を流していないので、絶対的な比較はできないが、調査した7種で種間での変異は明瞭であった。ESTバンドは4個～10個が表れた。ヒラタグモでは県西の2カ所の個体を分析したが、変異はなかった。同所に生息するアズマキシグモ幼体で大きな変異が見られたが、個体変異なのか、性差なのかは明かではない。

非EST部分には共通部分が多いようである。しかし、EST部分と重なって隠れてしまった所に非ESTバンドがあるかもしれない。

今後は小形個体をスライド・ガラス上でつぶす方法も試してみたい。

3. 今後の課題

(1) 電気泳動を応用した研究

アロザイム電気泳動での分析可能分野は、遺伝学的同定、集団の遺伝的分析、種の境界決定、系統の再構成などに大別されよう。

種によるバンド・パターンの違いが把握できれば、形態的には不完全な試料であっても(例えば幼体、組織断片など)、同定することができる。父親に二型以上の遺伝的に異なるバンドが見られる時には、親子関係を判別できるので、精子優先問題に応用することも出来る。ダニのESTを応用して精子優先機構を研究した例があった(Yasui, 1988)。

(2) ポリアクリルアミドゲルの問題点

ポリアクリルアミドの長所は試料が微量でも分析できること、バンドの分離がよいこと、デンプン・ゲルに比べゲル作成時の失敗が少ないこと、成分が均一なため再現性が高いこと、広く応用されているため比較がしやすいことなどである。短所はゲルの作成に時間と技術を要すること、液状のポリアクリルアミ

ドは神経毒であること、セルロース・アセテート膜と比較すると破れやすいことなどである。

<参考文献>

電気泳動学会、1976. 電気泳動実験法. 503p. 文光堂. 東京. (1989年に改訂新版が出版された)

泉美治・中川八郎・三輪谷俊夫(編)、1985. 生物化学実験のてびき2 タンパク質の分離・分析法. p104. 化学同人. 京都市.

荻田善一、1965 a. 薄層電気泳動法 1. 代謝. 2 : 78-87.

荻田善一、1965 b. 薄層電気泳動法 2. 代謝. 2 : 246-257.

荻田善一、1965 c. ヒトにおける isozyme の遺伝生化学的研究に関する方法論的考察. 代謝. 2 : 624-636.

Richardson, B. J., P.R. Baverstock and M. Adams, 1986. Allozyme Electrophoresis. p410. Academy press Australia. North Ryde.

Sekiguchi, K. 1988. Biology of Horseshoe Crabs. Science House., Ltd. Tokyo.

Sugita, H. and K. Sekiguchi, 1975. Heterogeneity of the minimum functional unit of hemocyanins from the spider (*Argiope bruennichi*), the scorpion (*Heterometrus* sp.), and the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). J. Biochem., 78 : 713-718.

Yasui, Y., 1988. Sperm competition *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli) (Acarina : Macrochelidae), with special reference to precopulatory mate guarding behaviour. J. Ethol. 6 : 83-90.

《表1》 ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動 試薬

Lower Gel	10%	7.5%
Stock Acrylamide (30%)	3.3 ml	2.5 ml
Water	4.2 ml	5.0 ml
Stock Lower Gel Buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)	2.5 ml	2.5 ml
Stock Ammonium Persulfate (10%)	30 μ l	30 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l

Total = 10 ml

Stock Acrylamide (30%)

30 g Acrylamide

0.8 g Bis acrylamide Water to 100 ml

Upper Gel, 4.5%

Stock Acrylamide (30%) 0.75 ml same as in "lower gel"

Water 3.0 ml

Stock Upper Gel Buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) 1.25 ml

Stock Ammonium Persulfate (10%) 15 μ l

TEMED 10 μ l

Total = 5 ml

Reservoir Buffer, 4 x

This 48 g

Glycine 230 g to 4 ℓ , pH 8.5 (w/HCl)

Sample Solvent, 2 x

Glycerol 2 ml

Tris 0.15 g

Bromophenol Blue 2 mg to 20 ml, pH 6.8 (w/HCl)

Big acrylamide はポリアクリルアミドをゲル化する架橋剤であり、Ammonium Persulfate は重合開始剤、TEMED は重合促進剤である。過硫酸アンモニウム溶液はその都度作る。他は冷蔵しておけば、1ヶ月以上使える。

《表2》 染色試薬

基質・染色液

リン酸緩衝液 (イオン強度 0.1, pH 6.8) 20 ml

1% 酢酸 α ナフチル・アセトン溶液 1 ml

Fast Blue BB Salt 25 mg

リン酸緩衝液の組成 (pH は 6.8, イオン強度は 0.05. 荻田 1965 b による)

0.3 M KH_2PO_4 溶液 250 ml

0.3 M K_2HPO_4 溶液 250 ml

脱イオン水で 6 l に希釈する。

(リン酸カリウム緩衝液 4.2 g K_2HPO_4 / 50 ml

3.3 g KH_2PO_4 / 50 ml

脱イオン水で 1.2 l に希釈して pH 6.8 となる)

アミド・ブラック染色液

amido black 10B 1 g

氷酢酸 100 ml

メタノール 500 ml 水を加えて、1 リットルとする

図 1 実験にかかる時間

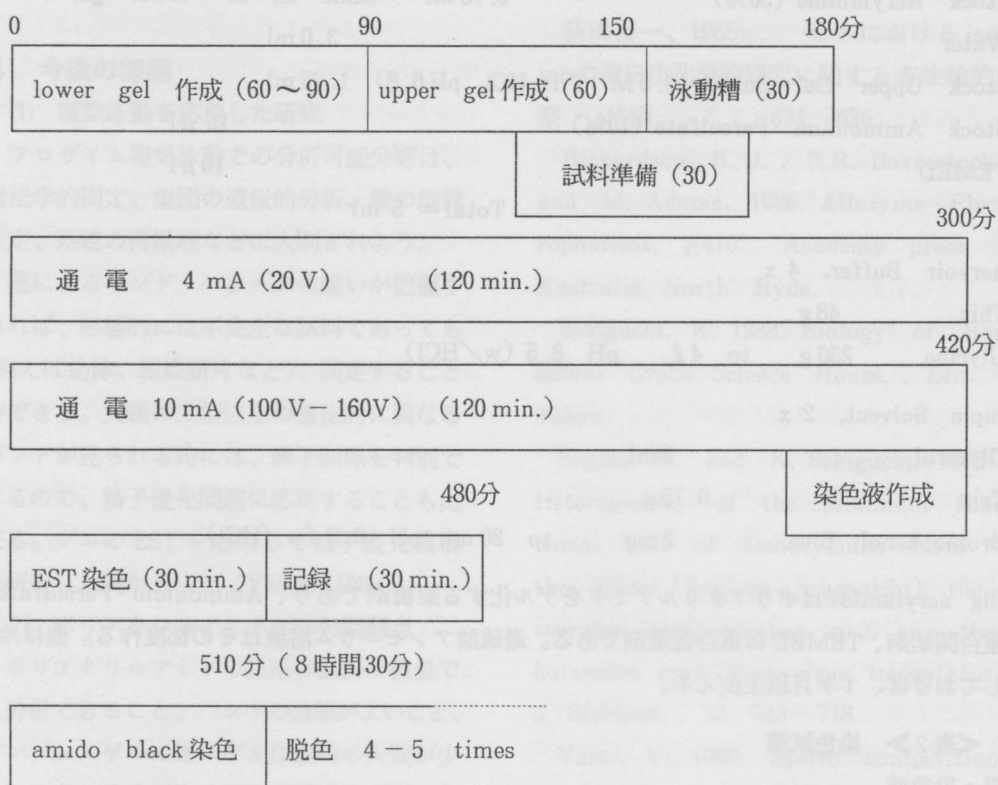
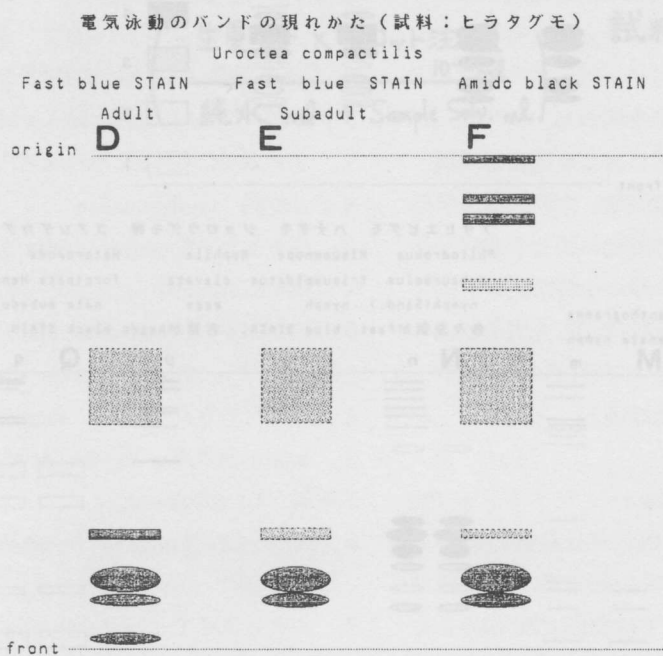
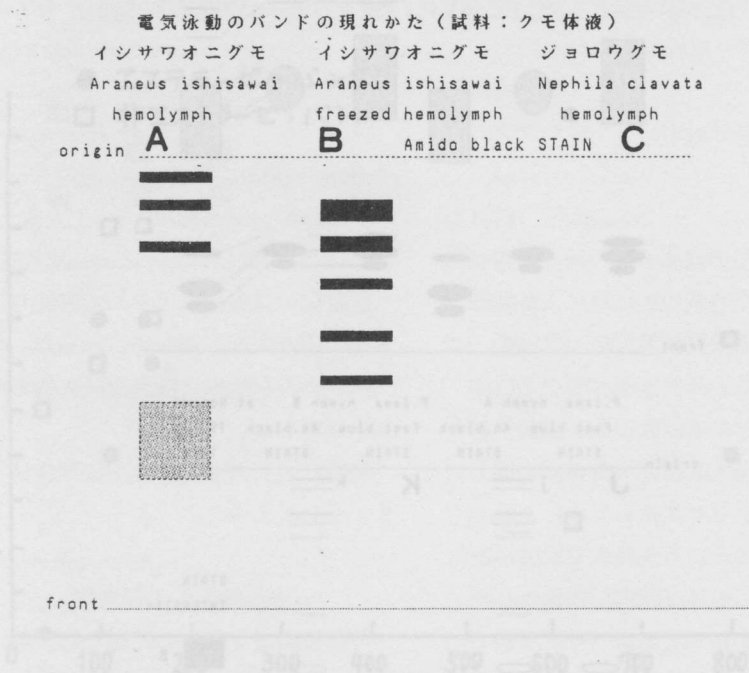


図2 電気泳動のバンドの現れかた



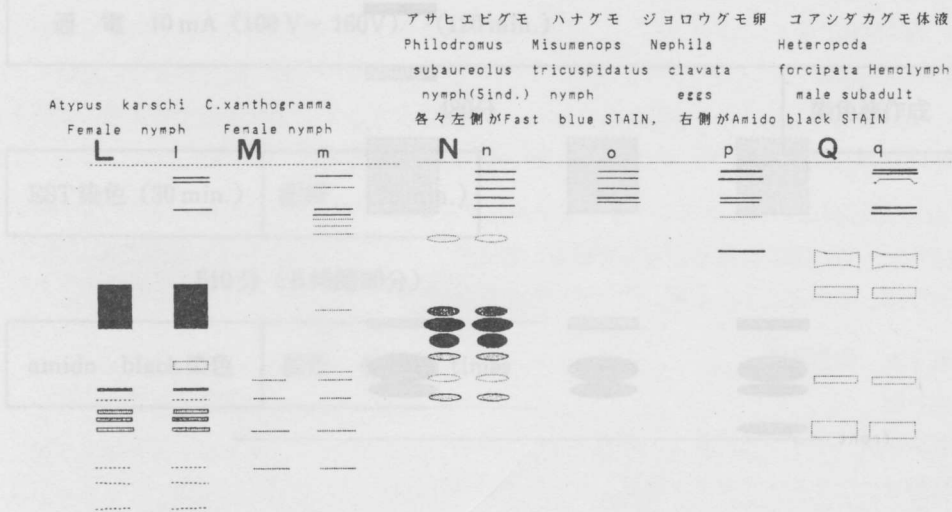
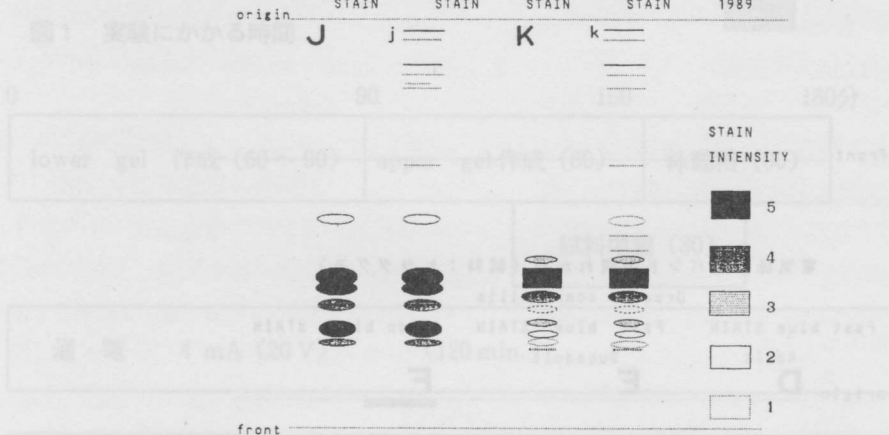
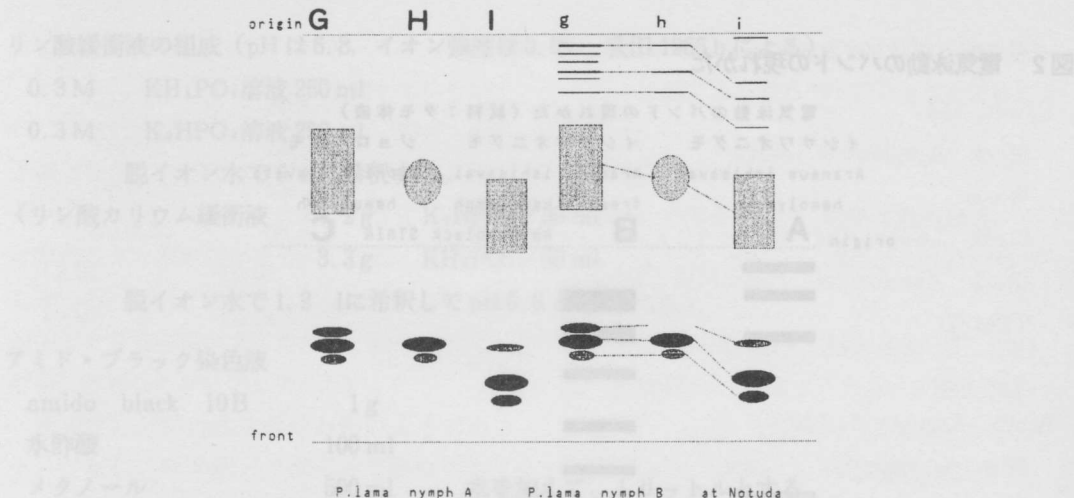
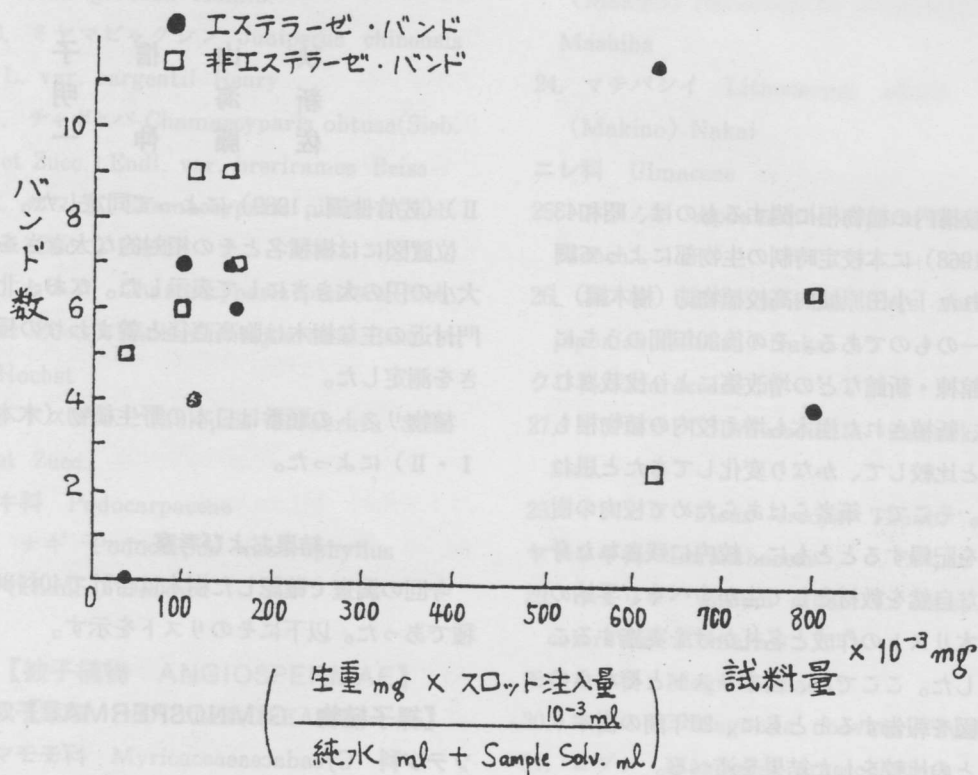


図3 バンド数と試料量



小田原城内高等学校

図書館紀要 第12号

1990年1月31日発行

神奈川県立小田原城内高等学校図書館