

酵素電気泳動法による ミクリとナガエミクリの同定手法について

津久井 公 昭*・山 崎 正 夫*

Takaaki Tsukui and Masao Yamazaki: Classification of
Sparganium erectum and *S. japonicum* by Banding Patterns of Isozymes

1. はじめに

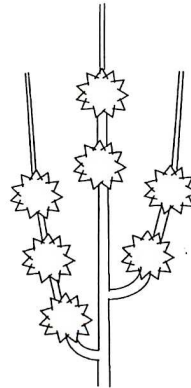
筆者らは、東京都内の河川を調査して、約40種の水草が生育していることを報告した(山崎・津久井, 1995)。この中で、ミクリ科植物はミクリ (*Sparganium erectum*) とナガエミクリ (*S. japonicum*) の2種類が確認されており、ともに絶滅危惧種に指定されていて、その点からの関心も強い。これらは、都内河川の所々で見出されており、時には大群落をなして生育していて、絶滅危惧の言葉から感じられる存続の脆弱さが認められないと指摘されることも多い。しかしながら、実際は限られた条件下での生育であり、一部の地域に多量に繁茂していても、環境が変化すれば、消滅する可能性が常に存在すると思われる。都内河川で、ミクリとナガエミクリを確実に保護し、維持していくためには、それぞれについて、生育状況、存在量、生育環境等を十分に把握しておく必要がある。これらの調査における第一の問題は、種の同定である。

ミクリ科植物の種の同定は、花序の形態等から行なわれる(角野, 1994; 北村, 1979)(図1参照)。したがって、調査は花期・果実期に行う必要がある。この時期に花序が見られない場合、あるいは時期をはずした場合は、その個体の形状、周辺の状況・履歴等によってある程度の推定はできるが、同定の正確さは保証されない。また、沈水形しか存在しない場合は、原則として種の同定はできない。現状においては、ミクリ科植物と判明しても、花序のないそれぞれの個体については、その種類を正確に判断することができず、このことが、確実に、短期間に、正確な調査を行うことを困難にしている。

そこで、酵素を用いた種の同定の可能性を検討した。酵素は、触媒作用を持つ生体内物質で、その特徴としては、①酵素は、DNAの情報から直接生成されており、

ミクリ

(花茎は分枝し、
枝は3本以上)



ナガエミクリ

(花茎は分枝しない)
(下側の頭花は柄を持つ)

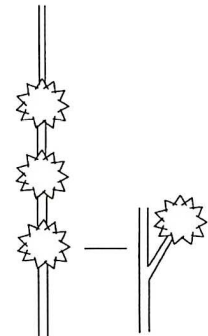


図1 ミクリとナガエミクリの花序による同定

その種の遺伝情報を調査するのに適切である、②酵素には、多数の種類があり、選択の幅が広い、③酵素の反応は、それぞれの酵素で非常に特異的であり、検出上有利である、等が挙げられる。酵素電気泳動法は、酵素の変異、即ち酵素多型を用いた種分化の研究等で種内変異の検出に広く利用されており、ミクリとナガエミクリのような、種間レベルでは差異が出やすく、同定が容易であることが期待できる。そこで、花序によらない、ミクリとナガエミクリの同定法として、酵素電気泳動法を検討した。その結果、都内河川については、それぞれを容易に同定できる見通しが得られた。

2. 調査方法

都内の各河川から採取した、典型的な形態の花序を持ち、花序からミクリ、あるいはナガエミクリと同定でき

*東京都環境科学研究所基盤研究部



図2 ミクリ科植物の生育する東京都内の主要河川

る個体を標準として、これらについて、電気泳動分析を行い、それぞれのバンドパターンを明らかにした。同時に、沈水形、あるいは成育途中で花序がなく、外形から種の同定のできない個体、及び花序があっても、非典型的で花序から種が同定できない個体についても、電気泳動分析を行い、そのバンドパターンを調査した。これらの結果から、電気泳動分析のバンドパターンから種の同定が可能かどうかを検討した。

(1) 調査時期

1995年10月～1996年9月

(2) 調査河川と分析試料数

調査河川は、下記のとおりである(図2参照。ただし、図中の程久保川にはミクリが生育するが、酵素電気泳動法による分析はまだ行っていない)。

- ① 落合川（全域）
- ② 白子川（最上流部）
- ③ 神田川（最上流部）
- ④ 仙 川（中流部）
- ⑤ 野 川（最上流部）
- ⑥ 矢 川（最上流部，下流部）
- ⑦ 多摩川（中流部）
- ⑧ 浅 川（中流部）
- ⑨ その他（豊田用水、府中用水、ママ下湧水等）

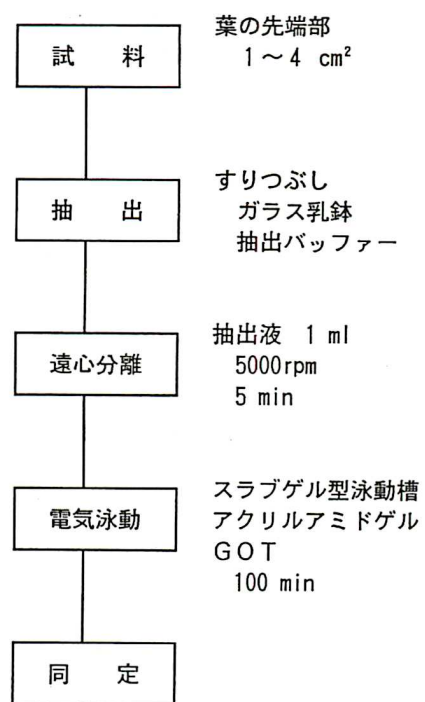


図3 分析フロー

(3) 電気泳動の分析条件

分析のフローを図3に示す(渡辺, 1995)。分析は、葉について行い、原則としてその先端部分を採り、その1~4 cm程度を試料とした。電気泳動分析の操作条件は、次のとおりである。

表1 分析試料数

調 査 河 川	ミ ク リ				ナ ガ エ ミ ク リ			
	花序から 同定	花序からは同定不能			花序から 同定	花序からは同定不能		
		花序あり	抽水形	沈水形		花序あり	抽水形	沈水形
落合川	5		1		9	1	6	2 6
白子川	1		1		3			3
神田川	2 1		2 3	7	1 2	4	9	2 5
仙 川					7	1		2
野 川					2	1		2
矢 川					2		1	2
多摩川	1 0		8	1				1
浅 川	3		2					
その他			1				5	1 1
合 計	4 0		3 6	8	3 5	7	2 1	7 2

①分析酵素：GOT（グルタミン酸オキサロ酢酸転移酵素）

②ゲル：アクリルアミド

③泳動槽：6連式スラブゲル型（冷却型）

④電圧，電流：800V，130mA（クロスオーバー方式）

⑤泳動時間：約100分

3. 結果

都内各河川で採取した花序からミクリ，または，ナガエミクリと判断できる個体で電気泳動分析を行い，出現するバンドを調査した（表1に分析試料数を示す）。その結果，GOTでは，基本的に，ミクリについては3本のバンドを，ナガエミクリについては2本のバンドを示した。それぞれをミクリとナガエミクリの特有のバンドパターンであると考え，ミクリのバンドパターンをEタイプ，ナガエミクリのそれをJタイプとした（図4参照）。

また，花序のない個体を分析した結果も，例外なく，Eタイプ，または，Jタイプのバンドパターンのどちらかを示した。Eタイプを示した個体はミクリ，Jタイプを示した個体はナガエミクリと同定した。

なお，これらのバンドの中で，ナガエミクリの№2バンドについては，2本の極く近接したバンドからなる試

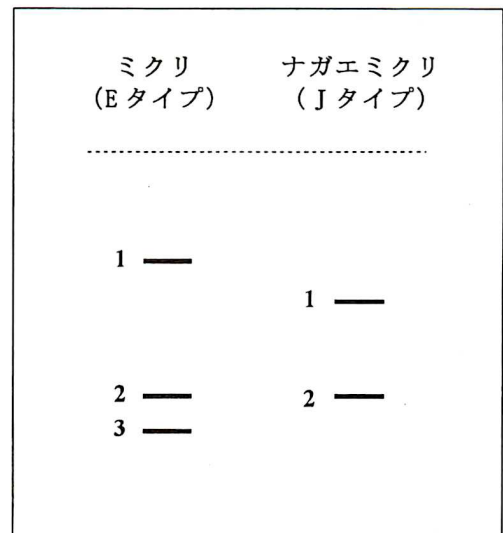


図4 ミクリとナガエミクリのバンドパターン(GOT)

料もあったが，ここでは，一つのバンドとして扱った。また，ミクリもナガエミクリも，まれにバンドの1本が欠けることがあったが，本質的な欠落でなく，試料の鮮度あるいは抽出操作が原因ではないかと考えている。

以上をまとめると，次の結果になる。

①花序から正しくミクリまたはナガエミクリと同定できる個体について電気泳動分析を行い、GOTのバンドパターンで、それぞれEタイプとJタイプを得た。

②花序からは同定できない個体について電気泳動分析を行い、EタイプまたはJタイプのバンドパターンを得た。

③EタイプとJタイプ以外のバンドパターンは出現しなかった。従って、分析した個体について、それぞれ、Eタイプを示せばミクリ、Jタイプを示せばナガエミクリと確定できた。

上述の結果、都内河川に生育するミクリとナガエミクリについては、花序の有無にかかわらず、葉の少量を電気泳動分析し、GOTのバンドを調査することで、それぞれを同定できることが明らかになった。

なお、ここでは、GOTを利用したが、他の酵素として、ADH（アルコール脱水素酵素）とSKD（シキミ酸脱水素酵素）でも、ミクリとナガエミクリについて、明らかに異なったバンドが得られており、利用可能であった。

4. おわりに

酵素電気泳動法によるミクリとナガエミクリの同定は、分析試料として少量の葉が入手できれば、時期、生育状況、その他諸々の条件を問わず、個々の個体毎に可能である。この方法を更に確実なものとするためには、今後、次の2点を検討する必要がある。

①都内のミクリとナガエミクリについては、それぞれ、単一のバンドパターンとみなせたが、国内の他の地域のミクリとナガエミクリも同一のバンドパターンを示すかどうか。

②国内には、10種のミクリ科植物がある（角野，1994）が、これらがどのようなバンドパターンを持つか。ここでは、GOTだけで同定を行ったが、他のミクリ科植物の存在を考えた場合、複数の酵素を利用する必要が出てくると思われる。

謝 辞

酵素電気泳動法の実施にあたり、詳細にわたる御教示と多大な御協力を頂いた愛知教育大学生物学教室の渡辺幹男博士に厚く感謝申し上げます。

引用文献

角野康郎：日本水草図鑑，文一総合出版，1994。

北村四郎ら：原色日本植物図鑑 草本編（Ⅲ）単子葉類（38刷），北隆館，1979。

山崎正夫，津久井公昭：東京都内における水生植物の生育概況（第3報），東京都環境科学研究所年報1995，p. 143～148。

渡辺幹男：私信，1995。

追記

第17回全国集会（富山）のエキスカッションで、何種かのミクリ科植物を入手しました。分析は終了していませんが、GOTのバンドパターンは、都内のナガエミクリと比較して、次のとおりでした。

（種 類）	（バンドパターン）
・ナガエミクリ	同一
同じ場所の沈水形	同一
・エゾミクリ	明らかに異なる
・ヒメミクリ	同一

エゾミクリのバンドパターンは、都内のミクリのバンドパターンとも異なります。ナガエミクリとヒメミクリは、GOTでは同一のバンドパターンで、両者を判別できませんが、他の酵素で判別できるようになると考えています。この点は、これから検討する予定です。

現地で、快く、教えて、試料を採取して、あるいは、譲渡して下さいの方々に、お礼を申し上げます。