

2,3 の魚血清蛋白のセルローズ

アセテート膜電気泳動法的研究

小泉 貞明・千葉 靖子*

近年、種の血清学的類縁関係については、Boyden¹⁾らによってくわしく報告されてきている。しかし、魚類に関してはあまりくわしい研究が行なわれていない。O'Rourke²⁾は、Sebastes 属および Gadus 属などのスズキ魚群について血清学のおよび電気泳動法の研究を行っており、小泉³⁾らは、数種のマスについて血清学的類縁関係を明らかにしている。

最近、電気泳動法の改良に伴ない、同法を用い種の血清蛋白構成からその類縁を明らかにしようとする研究が試みられてきた。Beckman⁴⁾らは、十数種の鳥類を用い、Starch gel 法によって血清蛋白分画を明らかにし、雑種の血清には両親の蛋白分画がみいだされることを報告し注目された。また、Crenschar⁵⁾は、かめ属について濾紙電気泳動法を試み5つの血清蛋白分画を分離し、人間の血清蛋白分画との比較考察を行っている。O'Rourke⁴⁾は、濾紙およびセルローズアセテート膜を用い、スズキ血清は5つの分画に分離することを報告している。

この研究は、魚の種間、品種間あるいは雑種などの血清蛋白を比較検討するために、セルローズアセテート膜電気泳動法を応用するのに必要な基礎的研究を試みたものである。特に、サケおよびマスに重点的研究を行なったのは、小泉³⁾らの Oudin 法を用いた血清学的研究結果と比較検討を試みようとしたためである。

材料および方法

本研究に使用した材料は次の通りである。

ニジマス (Salmon inideus); 一年魚および二年魚、体長 15~50cm. コイ (Cyprinus carpio), ヒゴイおよびマゴイ; 体長 30~50cm. シロサケ (Oncorhynchus keta); 養殖魚および天然魚、体長 30~70cm.

上記材料については、ニジマスは太洋漁業(岩手県玉山村)および大坪養鱒場(岩手県繋)から 20 個体を、シロサケは大槌川および今野養鮭場(岩手県大槌町)から 5 個体を、コイは岩手県養鯉場(岩手県紫波町)および太洋漁業(岩手県玉山村)から 15 個体をそれぞれ入手した。

採血は尾部背大静脈より行ない、凝固させた後浸出した血清を 3000r. p. m 15 分間遠心し、1/10,000 マーブニンを滴下し、個体別ごとに冷蔵庫に保存した。この際、とくに溶血しないよう留意した。

血清蛋白量は血清蛋白計で測定し、ニジマスは 2.2~4.0%, シロサケは 3.0~5.0%, コイでは 2.8~4.8% であった。

電気泳動は、定電圧定電流装置 (50mA, 500V) および微量分析泳動装置 (常光産業, 東京) によった。支持体は主として英国製オキシド膜を用いた。

泳動条件, その他は小川^{6,7)}の方法によった。すなわち、緩衝液; ペロナール緩衝液 (pH

* 現岩手県門馬小学校勤務

8.6 イオン強度 0.05). 塗付量; 膜巾 1cm 当り約 0.001—0.0015ml を標準とした. 通電量; 膜巾 1cm 当り 0.8mA, 40~60 分. 電極は使用の都度切りかえた. 染色; ポンソー 3 R を用い, 1 分 30 秒染色後, 1% 氷酢酸溶液で弁色した. 透化; 乾燥後流動パラフィンで透化しポリエチレン袋に密封し保存した.

各バンドについては陰極側, 陽極側についてそれぞれ相対移動度を求めた.

結果および論議

各種血清の泳動分画像を 1 図に示した.

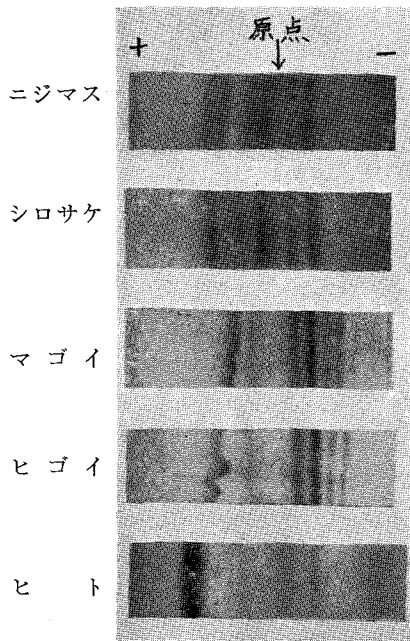


図1 泳動像

泳動条件: ペロナル緩衝液;
pH=8.6, イオン強度 0.05.

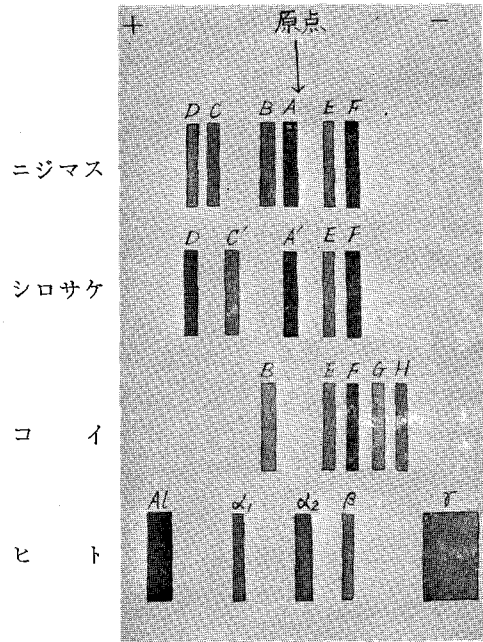


図2 泳動分画模型

表1 泳動分画の移動度

分 度	原 点												
	+	原 点											-
	Al	D	C	C'	α_1	B	A	α_2	E	F(β)	G	H	γ
原点からの距離 (mm)	15	11	9	8	7	3	1	1	4	6	8	11	17
相 対 値 (%)	100	73	60	53	47	20	7	6	24	35	47	65	100
相 対 移 動 度	14.3	10.4	8.6	7.6	6.7	2.9	1	1	4.0	5.8	7.8	10.8	16.6

図1から表1に示すような各分画の移動度を求め, 図2に示すような泳動分画模型を得た. これらの結果から明らかなように, ニジマスについては20個体中1個体を除きA, B, C, D, E, Fの6種類の典型的バンドが得られた. この典型的バンドは, 雌雄差および年齢差に関して全く差異が認められなかった. 特に成長を抑制した一年魚および普通一年魚について比較検討した

が、全くその差異は認められず、これらの6種の分画は生育条件に支配されないかなり安定したものである。例外的な1例についてはD分画の分離がみられず、C分画に著しい蛋白量を示した。シロサケについては、A, C', D, E, Fの5分画が分離した。これらの分画は、養殖一年魚および天然成魚とも全く差異が認められず、シロサケの血清蛋白分画像は生育環境条件の影響をうけないことが明らかである。ニジマスと比較して、B分画の分離が認められなかった。また、C分画の位置が多少陰極側でありニジマスのC分画とシロサケのC'分画が異なるものであるかもしれない。コイは、ニジマスおよびシロサケと著しく異った泳動像を示した。すなわち、この泳動条件に於てはほとんどの蛋白は陰極側に移動した。B, E, F, G, Hの典型的な5つの分画が分離したが、EおよびFがニジマスおよびシロサケと共通であった。この実験に用いたコイは主としてマゴイであったが、それらの個体差は全く認められなかった。また、ヒゴイとの品種間の差異も全く示さなかった。このことから、品種間の血清蛋白分画像の差異は認められないように思われる。千葉(未発表)は、数品種のニワトリ(Garus garus)の血清蛋白分画像を比較検討したが、それら品種間の差異は全く現われなかった。このことから血清蛋白構成は種特異的であろうと思われる。

これら魚類の蛋白分画についてはまだ不明なものが多く、今後の研究によらなければならない。しかし表1および図2から明らかのように、人間血清分画と比較してFは β -globulinに類似した分画と思われる。

O'Rourke²⁾はスズキ血清で5種の分画を分離しているが、本研究で得たサケおよびマスについての5-6個の分画はこれらとかなり共通したものであった。また、小泉³⁾らはニジマスおよびサクラマス血清において、Oudin法により2-5個の沈降帯を観察している。この事実からセルローズアセテート膜を支持体とする電気泳動法は、血清構成蛋白の分離において高い精度を示しているように思われる。

近年、セルローズアセテート膜電気泳動法は臨床的血清蛋白の研究⁴⁾にしばしば用いられるようになった。そして種々の疾患について蛋白分画の欠除例および分離不十分な例などが報告されている。先に述べたように、ニジマスの1例に類似の現象が認められたが、その原因は不明である。

以上述べたように、魚類の血清蛋白構成は一般に種については、極めて安定しており、セルローズアセテート膜電気泳動法は、種の類縁関係、遺伝学的研究および発生学的研究などに有用な手段であろうと思われる。

要 約

セルローズアセテート膜電気泳動法により、ニジマス、シロサケおよびコイを材料としてこれらの血清蛋白構成の研究を行なった。ニジマスは6種類の分画を示し、その多くはpH 8.2において陽極側に移動した。シロサケは5種の分画を示し、ニジマスにみられた6種のうち4種が認められ、1種は極めて類似していた。また、コイは5種類の分画を示したが、ニジマスおよびシロサケと比較してそれらの蛋白分画はかなり異っていた。一般にこれらの構成蛋白は、種により極めて安定しており品種差は認められず、生育環境条件の影響を受けなかった。

謝辞 本研究の材料の入手に際して、御協力をいただいた太平洋漁業玉山養鱒場、岩手県繁養鱒場、大槌町今野養鱒場および岩手県養鱒場の皆様に厚く御礼申し上げます。

引 用 文 献

- 1) The serological museum Bulletin (Ed. A. Boyden). Rutgers Univ., U.S.A. No. 11-33.

- 2) O'Rourke, J. 1960. Observations on the serum proteins of the bass. Proc. R.L.A., **61**, sect. B. 167-176.
- 3) Koizumi, S. & I. Hatakeyama 1961. The antigenic relationship of some salmon. Sci. Rep. Tohoku Univ. ser. 4, **27**, 1-6.
- 4) Bechman, L., F. Conterio & D. Mainardi 1963. Serum protein variations in bird species and hybrids. Serol. Museum Bull., No. 29.
- 5) Crenshar, J. W. 1957 Differentiation of species by paper electrophoresis of serum proteins of pseudemys turtles. Science **126**; 1065-1066.
- 6) 小川恕人 : 1963, セルローズアセテート膜による電気泳動法. 医学のあゆみ, **45** (3); 1128-131.
- 7) ——— : 1963, セルローズアセテート膜による血清蛋白の電気泳動. 日本臨床, **21** (12); 9-17.
- 8) 門馬和夫 : 1964, セルローズアセテート膜電気泳動と血清蛋白質. 最新医学, **19** (4); 815-820.