

## フナの血清タンパク質に関する研究

七條喜一郎\*・高野佳子\*\*・竹内 崇\*・原田悦守\*・  
福西克弘\*\*\*・鈴木 實\*・田中善蔵\*

平成8年6月24日受付

## Studies of Serum Protein in Crucian Carps

Kiitiro SITIZYO\*, Yoshiko TAKANO\*\*, Takashi TAKEUCHI\*, Etsumori HARADA\*,  
Katsuhiko FUKUNISHI\*\*\*, Minoru SUZUKI\* and Zenzou TANAKA\*

Crucian carps from Lake Koyama were used in this experiment. Crucian carps were classified into three types (A type : *C. auratus buergeri* or *C. auratus* subsp. 1, B type: *C. auratus langsdorfii*, C type : *C. auratus cuvieri*) by morphological parameters. The components of serum protein were analyzed by using cellulose acetate electrophoresis and isoelectric focusing. There was no significant difference in serum protein fraction between 3 types of crucian carps in an experiment by using cellulose acetate electrophoresis. However,  $\beta$ -globulin components in a female showed a significantly higher concentration than that of a male crucian carp. The serum protein components of crucian carps on the isoelectric focusing were classified approximately into 7 components (fraction I ~ VII), and fraction V components were separated into 7 bands (number 1~7). The fifth, sixth and seventh bands of fraction V were observed in all C type crucian carps, but, these bands were not recognized in some A and B types of crucian carps.

### 緒 言

著者らは先に家畜哺乳動物及び鳥類(ニワトリ)の成長過程における血液性状の変動を比較検討し、ウシ、ブタ、イヌなどの哺乳類であっても、動物種によって血球及び血清成分の成長に伴う変動様式が大きく異なることを報告した<sup>13,16-18</sup>)。またニワトリの血球及び血清成分

は哺乳類と異なり、産卵状況によって大きく変動することを報告した<sup>8-10,14,15</sup>)。

そこで比較血液学的な立場から更に下等な動物(魚類)の血液性状の検索を企図し、前報<sup>11</sup>)において、フナの赤血球数、白血球数、並びにこれらの形状について検索し、フナの赤血球はニワトリの赤血球に類似する形状であるが、ニワトリのそれよりも大きく、血球数が少ない

\*鳥取大学農学部獣医学科家畜生理学教室

\*Department of Veterinary Physiology, Faculty of Agriculture, Tottori University

\*\*永原動物病院

\*\*Nagahara Animal Hospital

\*\*\*鐘紡株

\*\*\*Kanebo Co. Ltd.

ことを明らかにした。またフナの白血球は哺乳類及び鳥類に比較して単球が多い傾向にあった。

本実験では供試フナを体型によって3種類に分類し、それぞれのフナの血清タンパク質をセルローズアセテート膜電気泳動法(CA膜法)及び等電点電気泳動法(IEF法)で分画し、種及び性による違いを検討したのでその結果を報告する。

### 材料及び方法

実験には鳥取市の湖山池で捕獲したフナ42尾を供試し、鰓耙数(左側最前列の鰓)、体高比(体高/体長)及び腸長比(腸の長さ/体長)を測定し、これらの測定値によってフナを3群に分類した。

フナからの採血は心臓穿刺により行い、採取した血液を室温に30分間静置した後、2,000rpmで20分間遠心分離して血清を採取した。

血清総タンパク質量の測定はビウレット法で行い、血清タンパク質の分画はCA膜法とIEF法で行った。

CA膜法にはセパラックス-S P膜(富士フィルム社)を用い、pH8.6イオン強度0.06のバルビタール緩衝液を用いて、膜幅1cm当たり0.8mAで35分間通電した。染色はボンソー3Rで行い、脱色は1%酢酸で行った。

IEF法はpI3~10のアンフォライン(LKB社)を用い、5%ポリアクリルアミドゲルで行った。泳動にはアタゴ製のCA膜IEF用泳動槽を用い、10℃以下に冷却しながら200V、400V、600V、800Vで各30分間ずつ順次電圧を変えて通電した。固定はメタノール酢酸溶液で20分間行い、アシッドバイオレット17(ナカライテスク社)の0.25%溶液で染色した。

### 実験成績

#### 1. 供試フナの形態による分類

供試したフナを、Table 1に示した鰓耙数、体高比、腸長比の各係数によってA、B、Cの3群に分類した。すなわち、A群は鰓耙数が少なく、体高が低く、腸が短いフナである。B群は鰓耙数が50~69、体高比が0.35~0.39、腸長比が2.0~3.9とやや体高が高く、A群とC群

Table 1 Morphological parameters of crucian carps.

Type	No. of gill rakers	Ratio of body depth	Ratio of intestine
A	30~49	0.30~0.34	1.8~1.9
B	50~69	0.35~0.39	2.0~3.9
C	70~	0.40~	4.0~

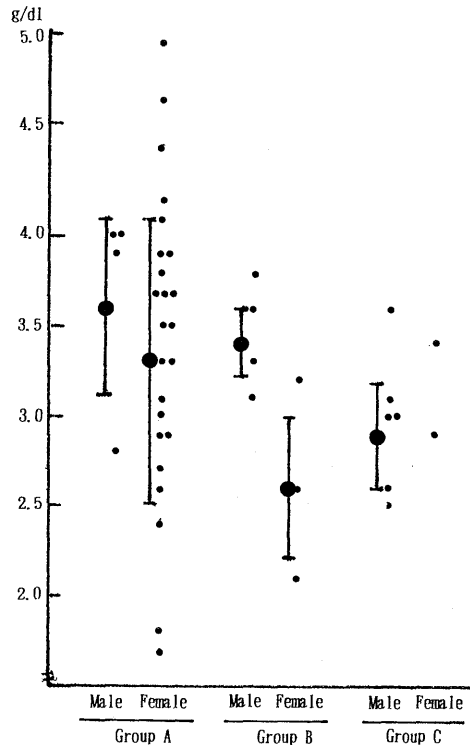


Fig.1 Total serum proteins in crucian carps

の中間型である。C群は鰓耙数が多く、体高が高く、腸が長いフナで、ゲンゴロウフナである。

#### 2. 性及び血清総タンパク量

Fig. 1に各群の血清総タンパク量の測定値とその標準偏差を雌雄別に示した。

A群は85%(23尾)が雌で雄はわずか15%(4尾)であったが、B群は雌雄がほぼ同数で(雄4尾、雌3尾)、C群は75%(6尾)が雄で25%(2尾)が雌であった。

また、フナの血清総タンパク質量は平均値において2.9~3.6 g/dlであり、A群及びC群では明らかな性差がみられなかった。しかし、B群の雌は雄より明らかに低値を示した。また、A群の雌には個体による大きなバラツキがみられた。

#### 3. CA膜法による血清タンパク質分画

Fig. 2にCA膜法によるフナの血清タンパク分画像の代表例をイヌ血清のそれに対比して示した。

フナの血清タンパク質の相対易動度はイヌに比べて遅く、フナのAlbumin(Alb)はイヌの $\alpha$ -globulin(glob)位置に分画され、その易動度は個体ごとに少しずつ異なっていた。また、 $\alpha$ -globもイヌ血清のそれよりわずかに

陰極側に分画された。しかし、 $\beta$ -glob 及び  $\gamma$ -glob の分画位置はイヌ血清にはほぼ近似していた。

各 band の染色性をみると、Alb はイヌ血清に比べて淡い Band であり、個体によっては  $\alpha$ -glob との分離が不明瞭な例もみられた。したがって、このような例においては Alb +  $\alpha$ -glob として分画値を算出した。また、Alb は全例とも陽極側にテーリングしており、分画値の算出にあたっては、このテーリング部分を Pre-Alb として算出した。

フナの血清タンパク質の分画値は Fig. 3 に示したように、明らかな性差がみられた。すなわち平均値において、雄の血清タンパク質は各群とも Alb +  $\alpha$ -glob が 53 ~ 61% を占め、 $\beta$ -glob と  $\gamma$ -glob がいずれも 16 ~ 21% であった。これに対して、雌の分画値は Alb +  $\alpha$ -glob が 39 ~ 42% と雄に比べて低く、 $\beta$ -glob が 37 ~ 43% と雄よりも優位に高い値を示した。

一方、A、B、C 各群による血清タンパク質分画値の明らかな差は認められなかった。

4. IEF 法による血清タンパク質分画

Fig. 4 に IEF 法によるフナの血清タンパク分画像とその模式図を示した。pI4.0 ~ 7.5 の間に約 26 本の band がみられた。そこで、これらを pI4.5、5.5、6.0 付近に

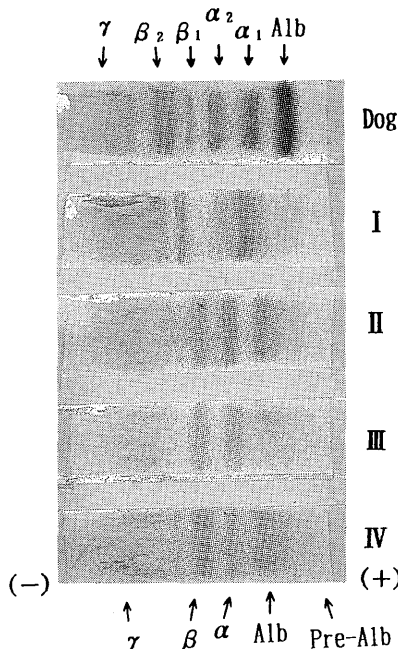


Fig. 2 Cellulose acetate electrophoretic patterns of serum protein in crucian carps

みられる 3 本の濃い明瞭な band を基準にして、大きく I ~ VII の成分に区分した。

その結果、VI の band は雌のみに認められ、雄にはみられなかった。また、分画 V の領域には基本的には 7 本の band が認められたが、その出現状態が個体によって異なっていた。そこで、この分画 V 領域の band に陽極側から 1 ~ 7 とラベルして検討したところ、5、6、7 の band に個体差が見られた。

Fig. 5 はこの 3 本の出現状態によって型分けしたも

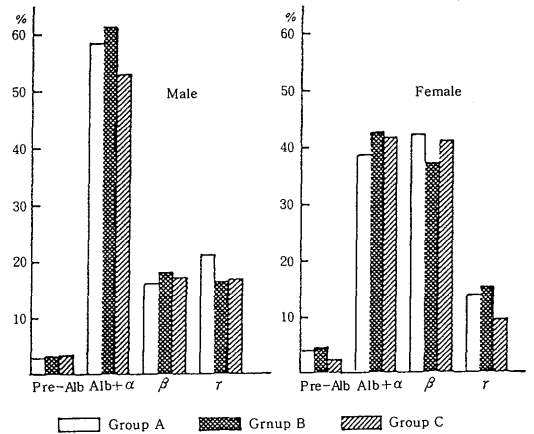


Fig. 3. Concentration of serum protein in crucian carps

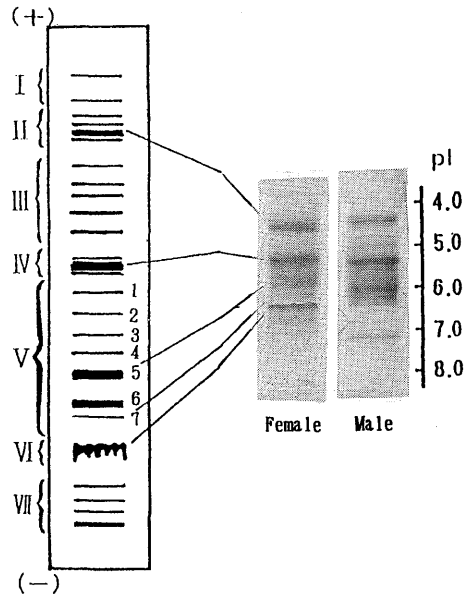


Fig. 4. Isoelectric focusing patterns of serum protein in crucian carps



Fig.5 Drawing of fraction V of isoelectric focusing in crucian carps serum

のである。すなわちタイプ1は全てのbandがみられるもの、タイプ2は5のbandを欠くもの、タイプ3は6のbandを欠くもの、タイプ4は6と7のbandを欠くもの、タイプ5は7のbandを欠くもの、タイプ6は全てのbandを欠くものである。これらの各タイプと魚種との関係を検討したところ、C群のフナは全例がタイプ1の分画像を示した。これに対して、A群のフナはタイプ1とタイプ3がほぼ同数(10例, 11例)で、タイプ5が2例、タイプ2, 4, 6が各1例ずつみられた。また、B群のフナはタイプ1が5例、タイプ3が2例であり、いずれも性との関係は認められなかった。

## 考 察

### 1. 供試フナの形態による分類

フナは魚類のなかでも分類が困難なグループとされており、従来の形態的な分類法<sup>4-6)</sup>に加えて、種々な酵素のアイソザイム分析による生化学的な手法<sup>5,12,20-22)</sup>あるいはDNA解析による遺伝学的な手法<sup>7)</sup>などによって分類が試みられている。しかし、フナ属は生息環境によって形態が変化すること、また自然界では種々な交雑種が多数存在するため、現在でも明確な分類方法が確立されていない。

本実験では前報<sup>11)</sup>で報告した方法(鰓耙数、腸長比、体高比)によって大きく3群に分類した。すなわちA群は鳥取県の湖山池に生息するフナのなかで最も多い種類で、その形態から推測すると、谷口<sup>20,21)</sup>が報告したオオキンブナ *Carassius auratus buergeri*、小林<sup>4)</sup>の分類によるナガブナ *Carassius auratus subsp.1* あるいは裏日本型ギンブナ(黄色を帯びたギンブナ)に属するものと考えられたが、琵琶湖のニゴロブナ *Carassius auratus grargocutis* に近似したフナも散見された。

B群は体高がゲンゴロウブナ *Carassius cuvieri* ほどではないが、A群に比べて高く、ギンブナ *Carassius auratus langsdorffii* 系に属するフナであろうと考えられる。しかし、ゲンゴロウブナと他のフナとの交雑種も含

まれているものと思われた。

C群のフナは体高が高く、腸が長く、鰓耙数が多い特徴をもっており、ゲンゴロウブナであることは明らかである。また、湖山池では毎年ゲンゴロウブナの改良種であるカワチブナ(Kawachi-buna)を放流しており、本実験の形態計測値がカワチブナのそれに一致したことから、放流種のカワチブナであるといえる。

### 2. 供試フナの性比

先人の報告<sup>4)</sup>によると、キンブナ、ゲンゴロウブナ、ニゴロブナの性比は雌雄ほぼ同数であるが、ギンブナは雌が雄より多く、その性比は場所によって異なり、関東地方では全て雌で、雄は発見されないことが知られている。谷口<sup>21)</sup>は西日本のフナの性比について検索し、ギンブナには雄がほとんど見られないが、オオキンブナは雌雄1対1であったと述べている。また従来ギンブナの性比が場所によって異なるといわれてきた原因はオオキンブナをギンブナと混同したためであると考察している。

本実験のA群の性比は82%が雌で雄はわずか15%であった。この性比からみると、このA群はやはりギンブナ系であろうと考えられ、小林<sup>4)</sup>の分類によるナガブナ、あるいは裏日本型ギンブナであろうと考えられる。また、B群は例数が少ないため明らかではないが、雌雄がほぼ同数であり、その形態から推測すると、オオキンブナあるいは放流種のカワチブナと他のフナとの交雑が疑われる。C群は3対1の比率で雄が多くみられた。このフナは形態が他のフナと明らかに異なっていることから、容易にカワチブナと判定できるが、前述したように、カワチブナすなわちゲンゴロウブナの性比は1対1と報告されており、本実験の成績と異なっていた。この相違については例数が少なかったためと考えられるが、このことについては更に例数を増やして検討する必要がある。

### 3. 血清タンパク質

魚類の血清総タンパク質量は魚種によって差がみられ、淡水魚であっても、カワマス及びコイはそれぞれ3.46g/dl、4.15g/dlと低く、ウナギは8.00g/dlと高い値を示すことが知られている<sup>3)</sup>。本実験におけるフナの血清総タンパク質量はカワマスに近似しており、全平均値は3.2g/dlであった。また、わずかながら種差がみられ、C群(カワチブナ)はA群(ギンブナ系)に比べてやや低い傾向にあった。

魚類の血清タンパク質に関する電気泳動法による解析は濾紙、ポリアクリルアミドゲルなどを支持体とする各種電気泳動法で行われている<sup>1,2,19)</sup>。原ら<sup>1)</sup>はセルロゲルで魚類血清タンパク質を分画すると、サケ科魚類の

Albはヒト血清のAlb分画位置に明瞭な1~2本のbandとして分画されるが、コイ科魚類及びウナギのAlbは幅の広い不明瞭なbandを示すと報告している。また、 $\gamma$ -globはヒトのそれに比べて少なく、 $\alpha$ 及び $\beta$ -globは種間あるいは種内差が大きく、性差もみられることが知られている。田中<sup>19)</sup>は湖山池産フナの血清タンパク質をCA膜法で分画し、哺乳動物と異なり、Alb及び $\alpha_1$ -glob成分が少なく、 $\beta$ -glob及び $\gamma$ -globが多いと報告した。また血清タンパク質の電気泳動像が個体によって異なることから、この分画像の違いをフナの種別判定に適用できることを示唆した。

本実験のCA膜法でも田中<sup>19)</sup>の報告と同様な分画像が得られ、Albの分画位置が個体によって少しずつ異なっていた。しかし、このAlbの分画位置の違いとA、B、C各群との関連性は明らかでなかった。また、血清タンパク質の分画値も群による差は認められなかった。したがって、血清タンパク質分画にみられる個体差はフナの生理的・病的要因によるものと考えられ、種別判定には応用できないものと思われる。むしろ、血清タンパク質の生理的変動及び正常値を明確にすることにより、フナの病態検査に適用できるものと考えられる。

また、本実験において、 $\beta$ -globの分画値は雌が雄よりも有為に高く、その分画像は雌が濃い明瞭なbandを示したのに対して雄は不明瞭な幅の広いbandであった。同様な雌の $\beta$ -globの高値については、原ら<sup>2)</sup>がマス血清で認めており、卵黄に関係するリポタンパク質であろうと報告した。また、著者ら<sup>8-10)</sup>もニワトリ血清において同様な $\beta$ -globの性差を認め、産卵期のニワトリ血清には卵黄の前駆物質である血清ビテリンが多量に含まれており、この成分がCA膜法では $\beta$ -glob位置に分画されることを明らかにした。これらの報告から推察すると、本実験の雌血清の $\beta$ -globが高値であることは、リポタンパク質によるものであると考えられる。また、このような結果は、成魚の性別判定が困難な場合の雌雄判別法として、血清タンパク質の電気泳動分析が応用できることを示唆するものであった。

IEF法は他の各種電気泳動法に比べて得られるband数が多く、しかも泳動像が明瞭で、再現性も優れている。フナの血清をこのIEF法で分画した報告はみられないが、ニワトリ血清のIEF法ではpI 3.0~8.0の間に11本のbandがみられ産卵鶏では血清塗布位置に特有のリポタンパク質が泳動されずに残ることが知られている<sup>10)</sup>。

本実験におけるフナ血清のIEF法では約26本のbandがみられ、雌には雄にみられないband(分画VI)が認

められた。このbandは前述の卵黄前駆物質であろうと考えられる。また、分画V領域のband数に個体差がみられ、C群のフナ(カワチブナ)が全て一定のタイプ(タイプ1)を示したことは、遺伝的にかなり同一な集団である可能性が考えられる。また、A群及びB群には複数のタイプがみられ、数種のフナの混在が示唆された。しかし、血清タンパク質は遺伝的に支配されているタンパク質ばかりでなく、代謝過程において産生される種々のタンパク質が多数含まれていることを考慮しなければならず、このことについては更に詳細な検討が必要である。

## 文 献

- 1) 原 彰彦・平井秀松：魚類血清タンパク質の電気泳動. 生物物理化学, 19 23-25 (1974)
- 2) 原 彰彦・平井秀松：ニジマス雌特異血清蛋白の分子構造モデルの推定. 生物物理化学, 23 233-233 (1979)
- 3) 板沢靖男：新版魚類生理学概論, 田村 保 編, 恒星社厚生閣 東京 (1992) pp.34-62
- 4) 小林 弘：フナの種類と、ギンブナにみられる雌原発生の細胞遺伝学的検討. 遺伝, 32 28-38 (1978)
- 5) 小島吉雄：魚類雑種の細胞遺伝学. 遺伝, 32 11-21 (1978)
- 6) 中坊徹次 編：日本魚類検索——全種の同定——. 初版 東海大学出版会, 東京 (1993) pp.212-213
- 7) Shen, J. B., Fan, Z., Li, S. W., Cheng, R. X. and Xue, S. : Comparative studies on the somatic cejj and spermatozoon DNA contents and ploidy of Fangzheng Crucian carp and Zha-long Lakegoldfish. *Acta Zoologica. Sinica.*, 30 7-13(1984)
- 8) 七條喜一郎・竹内 崇・鈴木 實：ニワトリの産卵期における血清タンパク質, リポタンパク質及び糖タンパク質に関する研究. 鳥大農研報, 42 161-168 (1989)
- 9) 七條喜一郎・竹内 崇・鈴木 實：セルロースアセテート膜電気泳動法における産卵鶏血清の波形帯に関する研究. 生物物理化学, 34 43-46 (1990)
- 10) 七條喜一郎・竹内 崇・鈴木 實・斉藤俊之：ニワトリの血清タンパク質およびリポタンパク質の等電点電気泳動法による分析. 生物物理化学, 35 453-458 (1991)
- 11) 七條喜一郎・竹内 崇・鈴木 實・福西克弘・斎藤

- 俊之・田中善蔵：湖山池産フナの形態学的・血液学的研究. 鳥大農研報, 47 175-181 (1994)
- 12) 七條喜一郎・竹内 崇・原田悦守・高野佳子・松岡佳奈・田中善蔵：フナのアイソザイム分析における試料の保存及び組織特異性について, 鳥大農研報, 48 137-143 (1995)
- 13) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎・榊原隆夫・上田昭夫：ブタの成長過程における血球動態及び血清タンパクに関する研究. 鳥大農研報 30 51-59 (1978)
- 14) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎・吉田好正：ニワトリの成長過程における血球動態及び血清タンパクに関する研究. I. 血球動態について. 鳥大農研報 30 60-65 (1978)
- 15) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎・岡本 健：ニワトリの成長過程における血清リポタンパク及び糖タンパクに関する研究. 鳥大農研報 31 105-111 (1979)
- 16) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎・林 茂：ウシの成長過程における血球動態及び血清無機物質に関する研究. 鳥大農研報 31 118-124 (1979)
- 17) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎：イヌの成長過程における血清タンパクの変動. 鳥大農研報, 32 16-22 (1980)
- 18) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎：イヌの成長過程における血球動態. 鳥大農研報, 32 23-29 (1980)
- 19) 田中善蔵：湖山池産フナに関する研究. I. 形態及び血清タンパク質のセルローズアセテート膜電気泳動. 鳥大教養部紀要, 25 109-118 (1991)
- 20) Taniguchi, N. and Sakata, K. : Interspecific and intraspecific variations of muscle protein in the Japanese crucian carp - II. Starch-gel electrophoretic pattern. *J. J. Ichthyol.*, 24 1-11 (1977)
- 21) 谷口順彦：西日本のフナ属魚類——オオキンブナをめぐって——淡水魚. 8 59-68 (1982)
- 22) Zhang, F., Oshiro, T. and Takashima, F. : Chromosome synapsis and recombination during meiotic triploid ginbuna, *Carassius auratus langsdorfii*. *J. J. Ichthyol.*, 39 151-155 (1992)