

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

七條喜一郎\*・竹内 崇\*・原田悦守\*・高野佳子\*\*・  
松岡佳奈\*\*\*・田中善蔵\*

平成7年6月23日受付

**Effects of Preservation of Sample and Tissue Specificity  
on Isoenzyme in Crucian Carps**

Kiitiro SITIZYO\*, Takashi TAKEUCHI, Etsumori HARADA\*,  
Yoshiko TAKANO\*\*, Kana MATSUOKA\*\*\* and Zenzou TANAKA\*

Lactate dehydrogenase(LDH) of liver and spleen in crucian carps was separated into 5 bands(LDH<sub>1</sub> ~ LDH<sub>5</sub>). LDH<sub>5</sub> of liver and LDH<sub>1</sub> of spleen showed strong clear band. LDH of kidney, muscle, erythrocyte, serum, heart and roe was separated into only 1 band (LDH<sub>1</sub>). Alkaline phosphatase (ALP) of liver, intestine and kidney in crucian carps showed high activities. ALP isoenzymes of these tissues were separated into 2 or 4 bands. Esterase(EST) of liver, spleen, kidney and intestine showed high activity. EST isoenzymes of these tissues were separated to 2 or 3 band. Influence of cold (4~8°C) and frozen storage (-20°C) on the isoenzyme pattern was investigated by celluloseacetate membrane electrophoresis. Zymogram of LDH were not observed significant change as a result of 5 days at cold and frozen storage. Mobility of each fraction band of ALP and EST changed after 2 days cold storage. These enzyme fractions did not change as a result of 5 days at frozen storage.

結 言

近年、動植物の育種技術の進歩は目ざましく、品種改良とともに多くの新品種が作出されている。しかし、科

学的な資源管理のためには系統群の範囲を明確にするとともに、育種素材の発掘、ホモ化の防止、遺伝形質の保存などが重要な課題となっている。このような観点から自然界に生息している魚類の集団解析が試みられている

\* 鳥取大学農学部獣医学科家畜生理学講座

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

\*\* 永原動物病院

\*\* *Nagahara Animal Hospital*

\*\*\* 神戸市役所

\*\*\* *Kobe Municipal Office*

が、未だ分類が明確にされていない魚種も多い。中でもフナは環境の違いによって形態が変化するため、分類に混乱がみられる。

フナ属は従来形態によって分類されたきたが<sup>7,14,17</sup>、筋漿タンパクの電気泳動分析<sup>4,8,9,16,18,19,21</sup>、アイソザイム分析<sup>5-7,15,16</sup>、ヘモグロビン<sup>13,26</sup>などによる生化学的な分類方法が用いられ、また近年はcDNAの塩基配列分析による遺伝的解析も試みられている<sup>23</sup>。しかし、フナをこの方法で明確に分類出来るまでには至っていない。

一方、自然保護の目的及び釣りの対象魚として全国の河川、湖沼にコイ及びフナの放流が盛んに行われており、これらの放流種と在来種との交雑種がみられ、一層分類は困難になっている。著者ら<sup>14</sup>は先の報告において、鳥取県の湖山池のフナの形態計測を行い、この湖にはいわゆる“地フナあるいはマルフナ”と呼ばれる在来種と放流種のフナ（カワチフナあるいはヘラフナと呼ばれる）が区別され、更に、この両者の交雑種と思われる数種のフナが多数生息していることを報告した。しかし、この湖に生息するフナの品種及び特性を明確にすることは出来なかった。

以上のことから本実験では、湖山池産フナの品種及び特性を明らかにする目的で、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、アルカリホスファターゼ(ALP)及びエステラーゼ(EST)のアイソザイム分析による検索を企図した。アイソザイム分析を行う場合、試料の保存条件によってザイモグラムが変化すること<sup>1,24</sup>、動物種によって酵素の組織特異性が異なることなどが知られている<sup>11,12</sup>。しかし、フナのLDH、ALP、及びESTについてはほとんど検討がなされていない<sup>25</sup>。そこで、フナのアイソザイム分析における基礎的な研究として、フナの各酵素の組織特異性及び5日間の試料保存がザイモグラムに及ぼす影響を検討したのでその結果を報告する。

#### 実験材料及び方法

実験には鳥取県の湖山池で捕獲した5例のフナを供試した。採血は心臓穿刺により行い、肝臓、脾臓、腎臓、腸管、心臓及び背鰭付け根前部の筋肉を約1g採取した。これら各組織の試料は直ちに冷却し、同量の生理食塩水を加えてホモジナイズし、4,000rpmで30分間冷却遠心して、その上清を測定用試料とした。なお、腸管については管内を生理食塩水で2~3回洗浄し、周囲の余分な組織を除き上部腸管約20cmを採取した。

アイソザイムの保存による影響については、肝臓のホモジナイズ上清をそれぞれ10本の試験管に分注し、その

うち5本を-20°Cで凍結保存し、残りの5本は4~8°Cに冷蔵保存した。測定は保存試験管を毎日1本ずつ取り出し、5日間の保存による影響を検討した。

LDH、ALP及びESTのアイソザイム分析はセパラックスSP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で膜幅1cm当たり0.8mAで電気泳動した。なお、ALP及びESTの泳動は45分間、LDHは90分間の通電とした。また、泳動中に生じるジュール熱による酵素活性の低下を避けるために、泳動槽及び緩衝液を水で冷却しながら泳動した。試料の塗布は膜の陰極側に行い、ALP及びEST分析用にはホモジナイズ上清をそのまま1cm当たり3 $\mu$ l塗布した。また、肝臓及び脾臓のLDH分析にはホモジナイズ上清を40倍及び10倍に希釈して、その1.6 $\mu$ lを塗布した。

LDHの発色は中山と北村<sup>10</sup>の方法に準じて行った。すなわち、蓋付き染色箱に濾紙を敷いて37°Cの恒温槽に加温しておき、使用直前に調製した染色液をこの濾紙に十分にしみ込ませ、その上に予備のセパラックス膜(富士フィルム社)を乗せ、泳動が終了したCA膜を気泡が入らないようにその上に静かに乗せ、暗所にて37°Cで30分間反応させた。反応の終了したCA膜を5%酢酸溶液に約5分浸して固定した。

ALPの発色はインジゴ系発色法による吉田<sup>20</sup>の方法に準じて行い、LDH染色と同様な手順で発色・固定した。

ESTの染色は基質溶液( $\beta$ -ナフチルアセテートのアセトン溶液)と発色試薬(ファストバイオレットBソルト0.05g/2ml)の混合溶液にリン酸緩衝液(pH6.8, イオン強度0.05)を混和し、この3/4を恒温槽で37°Cに保温しておいた染色箱の濾紙にしみ込ませた。この時、濾紙に沈殿物が付着するためこれを裏返し、その上に泳動の終了したCA膜を気泡が入らないように置いた。CA膜が黄変した時点でCA膜を裏返し、約1分後にCA膜を持ち上げ、残りの染色液を濾紙にしみ込ませ、CA膜の塗布面が上になるように置いて反応させた。各バンドが赤色に濃く染色された時点でCA膜を引き上げ、5%酢酸溶液で約1分間固定し、更に液を換えて2~3分間固定した。

#### 実験成績

1, LDH, ALP及びESTアイソザイムの組織特異性

1) LDHの組織特異性

Fig. 1にLDH、ALP及びESTのザイモグラムの模式図を示した。肝臓及び脾臓のLDHは4~5本のbandに分画された。これらのbandを便宜的に(+)側からLDH<sub>1</sub>~LDH<sub>5</sub>とした。その結果、肝臓のLDHはLDH<sub>5</sub>>LDH<sub>4</sub>>

LDH<sub>3</sub>>LDH<sub>1</sub>≧LDH<sub>2</sub>の順に明瞭な太いbandとして認められたが、LDH<sub>1</sub>とLDH<sub>2</sub>を欠く例がみられ、3種類の多型が認められた。

これに対して、脾臓のLDHは全例にLDH<sub>1</sub>が太い明確なbandとして出現し、5例中1例はこのbandのみであった。また、LDH<sub>2</sub>は全例に欠如していた。LDH<sub>3</sub>は5例中1例に、LDH<sub>4</sub>は5例中3例に、LDH<sub>5</sub>は5例中4例に細いbandとして認められた。これらのbandの出現状態により脾臓のLDHは4タイプに分類された。

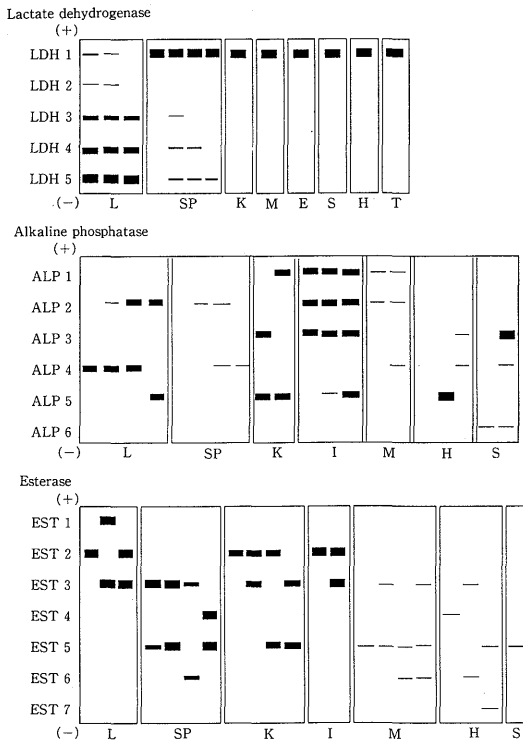


Fig. 1 Zymograms of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and esterase of some tissues in crucian carps. Polymorphic types were observed on the liver, spleen, intestine and kidney. L : liver, SP : spleen, K : kidney, M : muscle, E : erythrocyte, S : serum, H : heart, T : soft roe, I : intestine.

腎臓、骨格筋、赤血球、血清、心筋及び魚精のLDHは全てLDH<sub>1</sub>のみであり、他のbandは認められなかった。

## 2) ALPの組織特異性

ALPの泳動膜像では肝臓、腎臓及び腸管において鮮明な分画が得られたが、脾臓及び骨格筋では不明瞭なbandが数本みられる程度であった。また、心筋及び血清では

ALP<sub>5</sub>及びALP<sub>3</sub>が太い明瞭なbandとして分画された。これら各臓器の分画帯を総合するとFig. 1の中図のように6本のバンドが見られ、これらを便宜的に(+)側からALP<sub>1</sub>~ALP<sub>6</sub>とした。

明瞭なbandが複数みられた組織、すなわち肝臓ではALP<sub>4</sub>が主体であった(5例中4例)。しかし1例ではこのbandが認められず、ALP<sub>2</sub>とALP<sub>5</sub>のbandがほぼ同程度にみられた。腎臓のALPは全例にALP<sub>3</sub>が明瞭に認められ、このband以外にALP<sub>1</sub>またはALP<sub>5</sub>のいずれかがみられ、これらによって2タイプのアイソザイムパターンに分類された。

腸管ではALP<sub>1</sub>~ALP<sub>3</sub>のbandが全例に明瞭にみられたが、ALP<sub>4</sub>及びALP<sub>6</sub>は欠如しており、ALP<sub>5</sub>の出現状態は個体によって相違していた。

脾臓及び骨格筋では不明瞭ながらそれぞれ2~3本のbandがみられ、心筋及び血清ではALP<sub>5</sub>またはALP<sub>3</sub>が太いbandを示す例、分画帯が認められない例、あるいはLDH<sub>6</sub>の認められる例などがあったが、いずれも染色性が悪く不明瞭な分画帯であった。

## 3) ESTの組織特異性

肝臓、脾臓、腎臓及び腸管はESTの活性が強く、明瞭な分画帯が得られた。しかし、骨格筋、心筋及び血清のESTは活性が低く、不明瞭なbandであった(Fig. 4下図)。これら全ての組織のアイソザイムを総合すると7本のバンドがみられ、これを(+)側からEST<sub>1</sub>~EST<sub>7</sub>とした。肝臓のESTはEST<sub>2</sub>のみの例と、EST<sub>1</sub>とEST<sub>3</sub>の例、EST<sub>2</sub>とEST<sub>3</sub>の3タイプのザイモグラムがみられた。また、脾臓及び腎臓では4タイプがみられ、腸管は2タイプであった。

## 2, アイソザイム分析における試料の保存条件

先の実験において、肝臓はLDH、ALP及びESTの活性が強く、これらの酵素の明瞭なアイソザイムパターンが得られた。そこで、この肝臓試料を5日間保存した場合のザイモグラムに及ぼす影響を検討した。

### 1) LDH アイソザイム

新鮮な肝臓抽出液のLDHは5本のbandに分画されたが、LDH<sub>1</sub>とLDH<sub>2</sub>が細く不明瞭なbandであったため、分画値の測定に当たってはこの両者を合わせて算出した(Fig. 2)。その結果、冷蔵保存2日目のLDH<sub>1+2</sub>と凍結保存5日目のLDH<sub>5</sub>にわずかながら増減がみられた。しかし、その他の分画成分には有意な変動が認められず、また各バンドの易動度にも著明な変化はみられなかった。

### 2) ALPアイソザイム

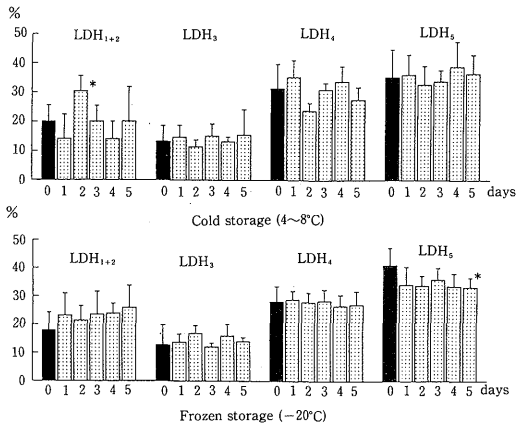


Fig. 2 Influence of cold and frozen storage on the concentration of lactate dehydrogenase isoenzyme. Lactate dehydrogenase of liver separated into 5 band (LDH<sub>1</sub>~LDH<sub>5</sub>). n=5, mean±SD. \* : p<0.05.

Fig. 3 に冷蔵及び凍結保存におけるALPのデンストグラムの全例を示した。冷蔵保存において、保存日数が進むにつれて分離が不明瞭になり、保存2日目目でALP<sub>2</sub>及びALP<sub>4</sub>の易動度が変化する例(No.2, No.4)がみられた。また、凍結保存においても2日目より分離が不明瞭になる例(No.3)がみられたが、その変化は冷蔵保存に比較して少ないものであった。

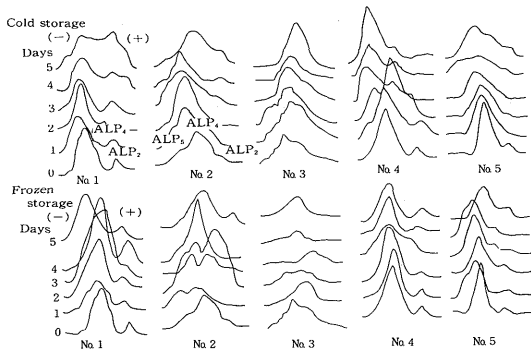


Fig. 3 Influence of cold and frozen storage on the electrophoretic patterns of alkaline phosphatase.

3) ESTアイソザイム

肝臓のESTは冷蔵保存において、保存1日目目すでにバンドの易動度が変化する例(No.4)がみられ、保存2日目にはEST<sub>1</sub>とEST<sub>2</sub>の濃度比が逆転する例(No.2, No.4)があった。しかし、凍結保存では5日目のザイモグラム

においても易動度及び相対濃度に明らかな変動がみられなかった。

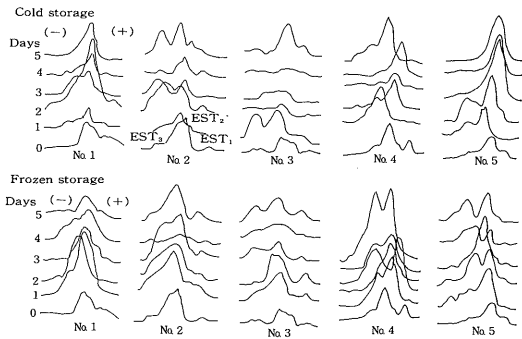


Fig. 4 Influence of cold and frozen storage on the electrophoretic patterns of esterase

考 察

1, 酵素の組織特異性

1) LDHの組織特異性

LDHは生体の全ての組織にみだされる酵素であるが、その濃度(活性度)やアイソザイムパターンは組織ごとに異なっている。また、この酵素は遺伝的に支配されている2種類のサブユニットによって構成されているため、各種動物の系統分類にしばしば応用されている<sup>2,11,16,20</sup>。

フナはLDHアイソザイムの組織特異性についての報告は少ないが、Valenta<sup>20</sup>はコイとフナの心筋、赤筋、白筋、脳、脾臓を澱粉ゲル電気泳動法で分析し、組織によってアイソザイムパターンが異なるばかりでなく、個体による多型がみられることを報告している。また、TakaiとOjima<sup>16</sup>は同じ澱粉ゲル電気泳動法でフナの筋肉を分析し、3タイプのアイソザイムパターンを認め、筋肉のLDH分析はフナの種類に応用できると述べている。

Kim & Park<sup>2)</sup>はセルロースアセテート膜電気泳動法で魚類、両生類、鳥類、哺乳類のLDHアイソザイムを比較し、コイおよびフナの脳と網膜のLDHはLDH<sub>1</sub>とLDH<sub>2</sub>部分に幅の広いbandがみられ、心臓、骨格筋、肝臓及び胃もほぼ同様なパターンであったと述べている。しかし、本実験のセルロースアセテート膜電気泳動法では脾臓と肝臓において、4~5本のbandがみられ、その分画像から肝臓では3タイプ、脾臓では4タイプの多型が認められた。また、血清、赤血球、精巣、腎臓、心筋及び骨格筋ではLDH<sub>1</sub>の一本のbandしか認められなかった。このよ

うに本実験の成績とKim & Park<sup>2)</sup>の報告が相違した原因については、Kim & Parkが電気浸透の強いセルロースアセテート膜(Cellotate, Millipore)を用いているために、分離が不明瞭になっているものと思われた。

以上のことから、LDHによるフナの種類には肝臓及び脾臓が適しているものと考えられる。

### 2) ALPの組織特異性

ALPは動物の生体内に広く分布する酵素であり、特に腎臓の尿細管、骨芽細胞、小腸粘膜、肝臓の毛細胆管、胎盤、哺乳期の乳腺などで活性が高く<sup>12)</sup>、ヒトのALPアイソザイムは肝臓型、小腸型及び胎盤型の3種類に大別されるが、フナのALPアイソザイムについてはほとんど報告がなされていない。

本実験において、フナのALPは肝臓、腎臓、腸管において活性が高く明瞭なザイモグラムが得られたが、脾臓、心筋、骨格筋では活性が低く、本実験の泳動条件では明瞭なアイソザイムのbandが認められなかった。このような結果はヒトの各組織におけるALP活性度<sup>12)</sup>に一致するものであった。また、フナのALPアイソザイムは肝臓と腸管で明瞭な数本のbandが得られ、そのザイモグラムには個体による多型がみられたことから、フナの種類を目的としたALP分析には肝臓及び腸管が適しているものと思われた。

### 3) ESTの組織特異性

ESTはカルボン酸ナフトールのエステル結合を分解する非特異的な酵素であり、カルボキシエステラーゼ、アリルエステラーゼ、アセチルエステラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、コリンエステラーゼ、トロピンエステラーゼ等と反応する。したがって、ESTは厳密な意味ではアイソザイムとは言えないが、この酵素は遺伝的に支配される数本のbandに分画されるため、古くから魚類の分類に応用され、コイ科魚類の多くがESTの多型を示し、少なくとも3種類のタイプが知られている<sup>3)</sup>。またギンブナの赤血球のESTには3対立遺伝子が関係することが明らかにされている<sup>3)</sup>。

本実験において、フナのESTの組織特異性を検討したところ、心筋及び骨格筋は活性が低く、また、腎臓のESTの活性は個体によるバラツキが大きく、安定した泳動像が得られなかった。これに対して、肝臓と脾臓のESTは活性が強く、電気泳動パターンに明瞭な数本のbandがみられ、肝臓で3タイプ、脾臓で4タイプの多型が認められた。このことから、ESTによるフナの種類には肝臓及び脾臓が適しているものと考えられた。

### 2, 試料の保存条件

アイソザイム分析は新鮮な試料で行うべきであるが、試料の採取場所が遠隔地であったり、検体数や測定項目が多い場合などには、やむおえず試料を保存して測定しなければならないことがある。酵素によっては凍結などを行わないと可溶にならないものもあるが、多くは保存によって失活したり、泳動像に乱れや人為的なbandを生じることがある。

Burch<sup>1)</sup>はフナの眼球、骨格筋及び心臓のホモジナイズ試料を $-20^{\circ}\text{C}$ と $-180^{\circ}\text{C}$ に凍結保存して、LDHとESTの活性及びアイソザイム分析における影響を検討し、LDH、ESTは凍結と融解を繰り返すことによって、急速に活性が低下すると報告している。また、等電点電気泳動によるLDHのザイモグラムには $-20^{\circ}\text{C}$ においても $-180^{\circ}\text{C}$ においても著明な変動を認めていない。しかし、與良<sup>2)</sup>はアフリカツメガエルの頭蓋骨のホモジナイズ試料を $-75^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した場合、新鮮なALPは一本のbandであるが、凍結と融解を繰り返すことによって、易動度の速いbandが出現すると述べている。

本実験では、短期間の保存について検討したが、LDHのザイモグラムには5日間の冷蔵( $4\sim 8^{\circ}\text{C}$ )及び凍結( $-20^{\circ}\text{C}$ )保存による影響はみられなかった。しかし、ALPは冷蔵2日目より易動度に変化がみられた。このことから、ALPの分析には新鮮な試料を用いる必要があり、少なくとも、冷蔵保存で2日以内に測定に供すべきであると思われた。また、ESTは本実験において5日間の冷凍保存が可能であったが、冷蔵保存では保存1日目ですでに変化がみられる例があった。したがって、ESTの分析は新鮮な試料で行い、やむをえない場合には凍結保存する必要がある。また、長期間の保存にはBurch<sup>1)</sup>、與良<sup>2)</sup>が述べたように凍結と融解を繰り返すことなく、 $-75^{\circ}\text{C}$ あるいは $-180^{\circ}\text{C}$ での保存が推奨される。

### 参 考 文 献

- 1) Burch, S. J., Lawson, R. and Davies, D. F. : The effects of freezing and thawing on lactate dehydrogenase and esterase isozyme patterns of the goldfish *Carassius auratus*, demonstrated by isoelectric focusing. *Electrophoresis*, 4 327-330 (1983)
- 2) Kim, S. O. and Pork, S. Y. : A comparison of the lactate dehydrogenases(LDH) isozyme patterns in vertebrate cerebrum and retina. *Korean J. Zoo.*, 22 1-10 (1979)

- 3) キルピチュコフ, B. C. : 魚類育種遺伝学. 山岸宏・高島雅映・中村 将・福渡淑子 訳, 恒星社厚生閣, 東京 (1983) pp 193-224
- 4) 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)
- 5) 數田行雄 : ゲル電気泳動法によるフグ種の鑑別. 生物物理化学, 37 319-323 (1993)
- 6) Liu, S.M., Sezaki, K., Hashimoto, K., Kobayasi, H. and Nakamura, M. : Simplified techniques for determination of polyploidy in ginbuna *Carassius auratus Langsdorfi*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44 601-606 (1978)
- 7) Liu, S.M., Sezaki, K., Hashimoto, K. and Nakamura, M. : Distribution of polyploids of "Ginbuna" *Carassius Auratus Langsdorfi* in Japan. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46 413-418 (1980)
- 8) Nakagawa, H. : Biochemical studies on carp plasma protein—III, Characterization of lipoproteins of globulin fraction. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 45 219-224 (1979)
- 9) Nakagawa, T., Watabe, S. and Hashimoto, K. : Electrophoretic analysis sarcoplasmic proteins from fish muscle on polyacrylamide gels. *Nippon Suisangakkaishi*, 54 993-998 (1988)
- 10) 中山年正・北村元任 : セルロースアセテート膜電気泳動法. 酵素. 新版電気泳動実験法, 電気泳動学会編, 文光堂, 東京, pp 66-69 (1989)
- 11) 大平一郎・小林宏・荻原正雄・松岡継明・岸野健児・山口陽・渡部忠彦・丸山寛迪・吉沢洋景・石垣哲男 : 哺乳動物の肝臓のLDHアイソザイムについて. 生物物理化学, 19 204-207 (1975)
- 12) 坂岸良克・井山迪子・恩田幸昌・小林晃・小野正道・金山正明・大島誠一 : 各種臓器中のアルカリ性フォスファターゼアイソザイムに関する研究. 生物物理化学, 11 91-92 (1965)
- 13) Sezaki, K., Watabe, S. and Hashimoto, K. : A comparison of chemical composition between diploids and triploids of "Ginbuna" *Carassius Auratus Langsdorfi*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 49 97-101 (1983)
- 14) 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)
- 15) Sumantadinata, K. and Taniguchi, N. : Biochemical genetic variations in black seabream. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 48 143-149 (1982)
- 16) Takai, A. and Ojima, Y. : Characteristics of chromosomes and electrophoretic patterns of muscle protein and lactate dehydrogenase in fish of genus *carassius* (Cypriniformes). *Cytologia*, 55 255 - 263 (1990)
- 17) 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ス・アセテート膜電気泳動. 鳥大教養部紀要, 25 109-118 (1991)
- 18) Taniguchi, N. and Ishiwatari, T. : Inter- and intraspecific variation of muscle protein in the Japanese crucian carp I, Cellulose-acetate electrophoretic pattern. *Jpn. J. Ichthyol.*, 19 217-222 (1972)
- 19) Taniguchi, N. and Sakata, K. : Interspecific and intraspecific variation of muscle protein in the Japanese crucian carp II, Starch-gel electrophoretic pattern. *Jpn. J. Ichthyol.*, 24 1-11 (1977)
- 20) Valenta, M., Slechta, V. Slechtova, V. and Kalal, L. : Genetic polymorphism and isoenzyme patterns of lactate dehydrogenase in tench (*Tinca tinca*), crucian carp (*Carassius carassius*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Anim. Blood Grps Biochem. Gent.*, 8 217-230 (1977)
- 21) 山田充阿弥・鈴木秋果 : 筋形質タンパク質の薄層等電点電気泳動法による魚種判別. 日水会誌, 生物 48 73-77 (1982)
- 22) Yamazoe, Y. : Comparative electropherograms of muscle proteins of amphibious fishes. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 47 1047-1047 (1981)
- 23) Yasuhira, S. and Yasui, A. : Visible light-inducible photolyase gene from the golffish *carassius auratus*. *J. Biol. Chem.*, 267 25644-25674 (1992)
- 24) 與良隆雄・新井京子・坂岸良克 : アフリカツメガエルの頭蓋骨ALPの保存状態による電気泳動パターンの変化. 生物物理化学, 27 275 (1983)
- 25) 吉田光孝 : アルカリホスファターゼ分画法. 新版電気泳動実験法. 電気泳動学会編, 文光堂, 東京 pp 140-146 (1989)
- 26) Yoshiyasu, K. : Starch-gel electrophoresis of hemoglobins of freshwater salmonid fishes in southwest Japan III, "Ayu" *plecoglossus alti-velis*,

a fish closely related to salmonidae. *Bull. Jpn.Soc.*  
*Sci. Fish*, 45 401-406 (1979)