〔原 著〕

ゲル電気泳動法によるフグ種の鑑別

數 田 行 雄

SUMMARY

Four species of the genus *Lagocephalus* pufferfish: *L. gloveri* ("kurosabafugu"), *L. wheeleri* ("shirosabafugu"), *L. inermis* ("kanafugu") and *L. lunaris* ("dokusabafugu") were discerned by the comparison of electrophoretic patterns of proteins and of L-Lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) isozymes in skeletal muscle and vitreous humor. The proteins of skeletal muscle and vitreous humor were separated by polyacrylamide gel isoelectric focusing (PAG-IEF), and LDH isozymes were separated by agarose gel electrophoresis. The electrophoretograms of proteins of skeletal muscle and vitreous humor were significantly different from each other among the three species except for *L. inermis*. LDH zymograms in vitreous humor showed species specific patterns among the four species. Furthermore, a puncture of an eye ball of pufferfish enabled us to yield enough amount of sample to obtain the LDH zymograms not to give any damage to the fish. From these results, the comparison of LDH zymograms in vitreous humor is a useful method for distinction of these pufferfishes without making them unmarketable.

Key words: distinction, pufferfish, skeletal muscle, vitreous humor, LDH.

はじめに

フグの種類は、主として体長の色彩、小棘の分布、尾鰭など外観の特徴から区別されるが、一見して鑑別の困難なサバフグ種や肉片・剥皮した“身欠きフグ”では外観からの鑑別は困難で、種名を偽って販売する事例や有毒種が無毒種と誤認されて発生したフグ中毒例¹⁻⁴⁾もあり、外観以外でのフグ種鑑別の確立が望まれている。

魚類の骨格筋の水溶性タンパク質および諸種酵素が種特異の電気泳動像を示す⁵⁻⁸⁾ことから、電気泳動法を応用したフグ種の鑑別法が報告⁹⁻¹¹⁾されている。著者¹²⁻¹⁵⁾も本法を応用し 17 種のフグ種を鑑別してきた。

今回、形態的に類似したクロサバフグ、シロサバフグ、ドクサバフグの 3 種にカナフグを加えたサバフグ属 4 種を対象として、骨格筋および硝子体液のタンパク質と LDH の分析による種の鑑別を検討した。

実験材料および方法

1. 実験材料

クロサバフグ (*Lagocephalus gloveri*) 3 個体、シロサバフグ (*L. wheeleri*) 11 個体およびカナフグ (*L. inermis*) 2 個体は、市場で購入し、ドクサバフグ (*L. lunaris*) 12 個体は、門司検疫所食品監視課下関分室から供与を受け、それぞれ分析するまで 2~6 ヶ月間 -20℃で保存した。また、LDH アイソザイムの比較試料として新鮮なトラフグ (*Fugu rubripes rubripes*) 1 個体を用いた。

2. 試料の調製

骨格筋の抽出液は、4℃ に冷却した 1 mM EDTA 溶液 (pH 7.4) を細切した組織重量の 2 倍量加え乳鉢中で十分すりつぶした後、4℃、16,300×g で 40 分間遠心分離した上清を用いた。硝子体液は、滅菌済注射器を用

Distinction of pufferfish species by gel electrophoresis.

Ikuro Kazuta; 山口県衛生公害研究センター

Correspondence address: Ikuro Kazuta, Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health, 2-5-67 Aoi, Yamaguchi 753, Japan.

(受付 1993 年 2 月 5 日, 受理 1993 年 3 月 22 日)

(320) 生物物理化学

い、強膜周囲に穿刺して採取し、そのままあるいは浮遊物の認められたものは、室温、 $1,600 \times g$ で 10 分間遠心分離した上清を用いた。各試料中のタンパク質濃度は、牛血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry ら¹⁶⁾の方法により測定した。

3. 試薬および電気泳動法

LDH 分析用の nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) は、Sigma 社の製品を用い、他は国産の特級および生化学用試薬を用いた。タンパク質の分離は、ポリアクリルアミドゲル薄層等電点分画法 (PAG-IEF) で行った。泳動は、Pharmacia 社製の Ampholine PAG plate (pH 3.5~9.5, T=5%, C=3%, Ampholine=2.4%, $245 \times 110 \times 1$ mm) を用い、同社製の Multiphor II で行った。試料およびマーカータンパク質 (Pharmacia 社製 Broad pI Calibration Kit) は、試料添加用紙で陽極から 3 cm の位置に添加 (タンパク質量: $50 \mu\text{g}$) し、 10°C 、30 W の定電力で 1,000 V に上昇するまで前泳動 (30~40 分) の後、 10°C 、30 W の定電力で 90 分間行った。泳動終了後、11.5% トリクロロ酢酸-3.5% スルホサリチル酸混液でタンパク質を固定し、Coomassie Brilliant Blue R 250 で染色した。タンパク質バンドの等電点 (pI) は、マーカータンパク質の位置を規準として求めた。

LDH の分離は、アガロースゲル電気泳動法で行った。泳動は、アガロース M (Pharmacia 社) の 1% 濃度のゲル ($11.5 \times 11.0 \times 0.5$ mm) を用い、Biomate 社製のアー

チ型冷却式電気泳動装置 ACE 21 (冷却温度: $15 \pm 1^\circ\text{C}$) で行った。ゲル作成および泳動槽用ともにペロナール緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.05$) を用いた。泳動時間は、骨格筋抽出液については 340 V、40 分間、他は 340 V、20 分間行った。活性染色は、竹尾¹⁷⁾のディスク電気泳動法用の染色液を用い、 37°C 、暗所で行った。ただし、phenazine methosulfate (PMS) の代りに 1-methoxy-PMS を使用した。

結 果

1. 骨格筋抽出液のタンパク質泳動像

Fig. 1 に骨格筋抽出液のタンパク質泳動像を示した。サバフグ属 4 種の分画バンドは、等電点 (pI) 5.8~8.4 の領域に多数の濃いバンドと、pI 4.5~5.2 の領域に数本のバンドが認められた。泳動像は、種によってかなり異なっていた。pI 6.8 付近の濃いバンド (▶印) はすべてのシロサバフグに共通して認められ、他 3 種のサバフグには認められなかった。クロサバフグに認められる pI 7.1 付近の濃いバンド (►印) は、シロサバフグにはほとんど認められず、カナフグ、ドクサバフグにはまったく認められなかった。カナフグでは pI 5.6~5.7 に 3 本の鮮鋭なバンド (*印) と pI 4.6 に 1 本の明瞭なバンド (○印) が認められた。これら酸性領域に認められたバンドは、ドクサバフグにも認められた。

同種間における泳動像の差異はほとんど認められなかった。ただ、シロサバフグは pI 6.4 付近に 1 本の鮮

Fig. 1. PAG-IEF patterns of proteins in the extracts of skeletal muscle obtained from 4 species of the genus *Lagocephalus* pufferfish.

L. gl: *L. gloveri* ("kurosabafugu"), L. wh: *L. wheeleri* ("shirosabafugu"), L. in: *L. inermis* ("kanafugu"), L. lu: *L. lunaris* ("dokusabafugu"). St: pI marker protein. The symbols (▶, ►, ○, *, →) indicate the protein bands for the distinction of pufferfish species.

Fig. 2. PAG-IEF patterns of proteins in the vitreous humor obtained from 4 species of the genus *Lagocephalus* pufferfish.

Abbreviations and symbols are the same as those in Fig. 1.

鋭な主分画と2～3本のやや不鮮明な副分画とよりなるバンド群(▷印)が認められ、その主分画の位置は個体によってわずかな差異が認められた。ドクサバフグはpI 4.5～5.2の領域(→印)に3本のバンドが認められたが、それぞれのバンドの濃さは個体によって異なっていた。

2. 硝子体液のタンパク質泳動像

Fig. 2に硝子体液のタンパク質泳動像を示した。硝子体液のタンパク質バンドは、骨格筋と比較してより広いpI範囲にみられた。クロサバフグに認められるpI 6.8の明瞭なバンド(▷印)は、シロサバフグには認められず、カナフグやドクサバフグには認められた。カナフグに認められるpI 7.6の鮮鋭なバンド(▶印)は、クロサバフグやシロサバフグにはほとんど認められず、ドクサバフグにはまったく認められなかった。一方、ドクサバフグに認められるpI 7.8の鮮鋭なバンド(○印)は、カナフグ、クロサバフグあるいはシロサバフグには認められなかった。

3. 骨格筋抽出液および硝子体液のLDH ザイモグラム

Fig. 3に骨格筋抽出液(M)および硝子体液(V)のLDH ザイモグラムを示した。比較のためトラフグのザイモグラムを併置した。骨格筋では、トラフグおよびサバフグ属4種のいずれにおいても1本の主要なバンド(○印)が認められ、サバフグ4種には、もう1本の泳動速度の速い薄いバンドが認められた。主要なLDHバンドの泳動速度は種によって異なっており、その泳動速度

はドクサバフグが最も速く、シロサバフグ、カナフグ、クロサバフグ、トラフグの順に遅くなった。

硝子体液では、トラフグおよびサバフグ属4種にはそれぞれ泳動速度の異なる数本のLDHバンドが認められた。クロサバフグ、カナフグでは4本のバンド(○印)が認められた。シロサバフグおよびドクサバフグでは4本の主要なバンド(○印)の他に数本の薄いバンドが認められたが、4本の主要なバンドは個体によって濃淡はあるものの同じ泳動位置に認められた。

考 察

橋本ら⁹⁾は、サバフグ属3種(クロサバフグ、シロサバフグ、ドクサバフグ)の骨格筋タンパク質および3種の酵素(LDH, MDH, PGM)について、Masudaら¹⁰⁾は、クロサバフグおよびシロサバフグの骨格筋および肝臓の12種の酵素について電気泳動法による分析を行い、種に特異的な泳動像を報告している。

今回著者は、サバフグ属4種(クロサバフグ、シロサバフグ、カナフグおよびドクサバフグ)を対象としてPAG-IEFによる骨格筋タンパク質の分析およびアガロースゲル電気泳動法による骨格筋のLDHの分析を行ったところ、クロサバフグやシロサバフグと有毒のドクサバフグとの鑑別は可能であった。しかし、カナフグはドクサバフグと類似の泳動像を示し(Fig. 1)、LDH ザイモグラムの比較を行っても、カナフグとドクサバフグとの判別は容易でない(Fig. 3 M)。

一方、硝子体液のタンパク質泳動像では、サバフグ属

Fig. 3. LDH zymograms in the extracts of skeletal muscle (M) and vitreous humor (V) obtained from 4 species of the genus *Lagocephalus* pufferfish and *Fugu rubripes rubripes*.

F. ru: *Fugu rubripes rubripes* ("torafugu"). Other abbreviations are the same as those in Fig. 1. ○ indicates the LDH bands for the distinction of pufferfish species. ▶ indicates the position of sample application.

4種の鑑別に pI 6.8 のバンド (Fig. 2, ▶印), pI 7.6 のバンド (▶印) および pI 7.8 のバンド (○印) が良い指標となる。ドクサバフグと他の3種サバフグとの鑑別には pI 7.8 のバンドが指標として有用であるが、カナフグとドクサバフグの泳動像はきわめて類似しており、他の鑑別法が必要であった。

そこで、硝子体液の LDH ザイモグラムの比較を行ったところ、サバフグ属4種ではそれぞれの種で泳動速度の異なる数本の明瞭なバンドが認められ (Fig. 3 V), それぞれの種で個体差は認められず、トラフグとの鑑別も容易であった。

以上の結果から、硝子体液の LDH ザイモグラムの比較により形態的に類似したサバフグの鑑別は可能である。硝子体液による種の鑑別は魚体に大きな損傷を与えず、商品価値の低下をきたさず有用な方法といえる。さらに、LDH ザイモグラムを得るには、泳動から染色まで 30~40 分間程度であり、タンパク質の等電点電気泳動法による分析が2日程度要すのに比べて短時間で判定できることから、迅速な検査が可能である。

しかし、肉片や“身欠きフグ”の場合、骨格筋タンパク質の等電点電気泳動あるいは LDH のアガロースゲル

電気泳動による分析のみでクロサバフグやシロサバフグとドクサバフグとの鑑別は可能であるが、ドクサバフグとカナフグとの鑑別に問題を残しており、今後の検討が必要である。

稿を終えるに臨み、ご懇篤なるご指導・ご校閲を賜りました山口大学医学部名誉教授竹尾和典博士ならびに山口大学医学部第一生化学教室中村和行教授に深く感謝申し上げます。貴重なご助言をいただいた同第一生化学教室の方々に感謝申し上げます。

また、本稿の執筆にあたり、終始ご指導・ご教示をいただいた当所生物学部遠藤隆二博士、山口県徳山環境保健所板垣国昭博士、ご助力をいただいた当所生物学部河村章研究員に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 河端俊治. ふぐ中毒. 食品衛生研究 1960; 10: 71-80.
- 2) Abe T. Taxonomic studies on the puffers from Japan and adjacent regions—Corrigenda and addenda Part II. Jpn J Ichthyol 1960; 8: 3-6.

- 3) 多部田修, 熊谷 洋. サバフグ (*Lagocephalus lunaris spadiceus*) とドクサバフグ (*L. lunaris lunaris*) の形態的差異. 食衛誌 1980; 21: 404-7.
- 4) 多部田修. ドクサバフグについて, 食品衛生研究 1983; 33: 565-75.
- 5) Connell JJ. Studies on the proteins of fish skeletal muscle 2. Electrophoretic analysis of low ionic strength extracts of several species of fish. Biochem J 1953; 55: 378-88.
- 6) Tsuyuki H, Roberts E, Gadd REA. Muscle proteins of pacific salmon (*Oncorhynchus*) III. The separation of muscle proteins soluble in low ionic strength salt solutions by starch gel electrophoresis. Can J Biochem Physiol 1962; 40: 929-36.
- 7) Cowie WP. Identification of fish species by thin-slab polyacrylamide gel electrophoresis of the muscle myogens. J Sci Food Agric 1968; 19: 226-9.
- 8) 橋本周久. 魚類種族の生化学的判別 (日本水産学会編) 水産学シリーズ9. 東京: 恒星社厚生閣, 1975: 32-48.
- 9) 橋本周久, 渡部終五, 中川孝之, 反田健児. サバフグ属3亜種の電気泳動的鑑別. 日水誌 1984; 50: 115-8.
- 10) Nakagawa T, Watabe S, Hashimoto K. Sarco-plasmic proteins useful for electrophoretic identification of the genus *Lagocephalus* pufferfish. Bull Jpn Soc Sci Fish 1984; 50: 543.
- 11) 落合芳博, 加納碩雄, 橋本周久. 電気泳動法によるフグ類の鑑別. 食衛誌 1984; 25: 440-4.
- 12) 数田行雄, 板垣国昭, 河村 章, 遠藤隆二, 田中一成. 電気泳動法によるフグの種類鑑別. 山口衛公研業報 1990; 11: 29-31.
- 13) 長 淳子, 広橋 憲, 板垣国昭, 数田行雄, 今井利夫. 冷却式アーチ式アガロースゲル電気泳動法を用いたアイソザイムの分析 (第2報 魚類のアイソザイム). 生物物理化学 1990; 34: 274.
- 14) 数田行雄, 板垣国昭, 河村 章, 遠藤隆二, 田中一成. 電気泳動によるフグ筋肉タンパク質の分析. 第38回山口県公衆衛生学会研究発表要旨集 1991; 83-84.
- 15) 数田行雄, 板垣国昭, 河村 章, 遠藤隆二, 宮村恵宣, 田中一成. 電気泳動法によるフグ筋肉タンパク質の分析. 第37回中国地区公衆衛生学会発表集 1991; 86-87.
- 16) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-75.
- 17) 竹尾和典. ディスク泳動法による酵素の検出法. 生物物理化学 1971; 16: 1-7.
- 18) Masuda Y, Takeoka S, Tabeta O, Dotsu Y. Genetic differences between two newly described swellfishes of the genus *Lagocephalus* from southern Kyushu, Japan. Nippon Suisan Gakkaishi 1987; 53: 767-72.

要 旨

骨格筋および硝子体液のタンパク質とLDHの電気泳動像を比較することにより, サバフグ属4種(クロサバフグ, シロサバフグ, カナフグ, ドクサバフグ)の種の鑑別を行った. 骨格筋および硝子体液のタンパク質はPAG-IEFにより分離し, LDHアイソザイムはアガロースゲル電気泳動法により分離した. 骨格筋および硝子体液のタンパク質泳動像は, カナフグを除く3種では互いに異なっていた. 硝子体液のLDHザイモグラムは, 4種に特異的であった. さらに, 硝子体液は, 魚に損傷を与えることなく容易に採取可能であった.

以上の結果から, 硝子体液のLDHザイモグラムの比較は, 魚の商品価値を損うことなく, これらサバフグ属4種を鑑別するのに有用な方法である.