電気泳動法によるフグ類の鑑別

(昭和 59 年 5 月 24 日受理)

落合 芳博^{*1} 加納 碩雄^{*2} 橋本 周久^{*1}

Electrophoretic Identification of Puffers

Yoshihiro OCHIAI^{*1}, Sekio KANOH^{*2} and Kanehisa HASHIMOTO^{*1}

(^{*1} Laboratory of Marine Biochemistry, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo: 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan;

^{*2} Tokyo Metropolitan Wholesale Market Sanitation Inspection Station: 5-2-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, Japan)

Attempts were made to identify sixteen species of puffers electrophoretically. The myogen fractions were prepared from the ordinary muscle of the puffers, and subjected to polyacrylamide gel electrophoresis. After the runs, the gels were stained for protein with Coomassie brilliant blue, and for some enzymes such as malate dehydrogenase (MDH) and phosphoglucumutase (PGM) with specific reagents. The results obtained showed that the protein patterns are species-specific enough to permit identification of most of the puffers. The MDH and PGM isozyme patterns were less species-specific. The puffers were hardly distinguishable from each other when the myogen fractions were subjected to cellulose acetate membrane electrophoresis. On the other hand, the myogen fractions of most puffers exhibited species-specific protein patterns when subjected to isoelectric focusing, followed by Coomassie brilliant blue staining.

It was concluded from the above results that puffers can be practically identified by the above electrophoretic techniques except cellulose acetate membrane electrophoresis, and that a more reliable identification can be attained by the combined use of these techniques.

(Received May 24, 1984)

Key words: フグ pufferfish; 魚種鑑別 species identification of Fugu; ミオゲン myogen; ポリアクリルアミドゲル電気泳動 polyacrylamide gel electrophoresis; リンゴ酸脱水素酵素 malate dehydrogenase; ホスホグルコムターゼ phosphoglucumutase; 等電点電気泳動 isoelectric focusing

昭和 48~57 年までの 10 年間におけるフグ中毒患者は 714 名, うち死者は 200 名 (致死率 28%) に達している¹⁾。この死者数は同期間中の食中毒による死者総数 (305 名) の約 2/3 を占める。

我が国におけるフグの需要は, 近年, 着実に増大し, 漁場の拡大もさることながら, 輸入量も 1981 年には 646 トンにのぼっている。輸入フグのかかなりの部分が東シナ海産のもので占められるが, 時にドクサバフグ *Lagocephalus lunaris lunaris* のような筋肉自体が有毒なもの

が混入し, 市場に流通して中毒事件も発生している²⁾。また, ドクサバフグの干物がアンコウなどと偽って輸入された事例もある^{3), 4)}。

フグ中毒を防止するためには, その鑑別法の確立が急務と考えられる。フグ類の鑑別は通常, 外観, 頭蓋骨の形態などによっているが^{5)~7)}, 皮を除去した“身欠き”や肉片では鑑別が不可能ないし困難である。

著者らは先に, 魚種特異性が高いとされている筋肉のミオゲン (水溶性タンパク質) 画分に着目し, ドクサバフグなど 3 種のサバフグ類を対象に, ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって, ミオゲン画分のタンパク質やアイソザイムパターンを比較し, 相互に鑑別できることを報告した⁸⁾。今回は対象をフグ類 16 種に拡大すると

^{*1} 東京大学農学部水産化学研究室: 東京都文京区弥生 1-1-1

^{*2} 東京都市市場衛生検査所: 東京都中央区築地 5-2-1

Table 1. Japanese and Scientific Names of the Puffer Specimens Used

Specimen No.	Japanese name	Scientific name
1	Mafugu	<i>Fugu vermicularis porphyreus</i>
2	Torafugu	<i>F. rubripes rubripes</i>
3	Karasu	<i>F. rubripes chinensis</i>
4	Higanfugu	<i>F. pardalis</i>
5	Kusafugu	<i>F. niphobles</i>
6	Shosaifugu	<i>F. vermicularis vermicularis</i>
7	Komonfugu	<i>F. poecilonotus</i>
8	Gomafugu	<i>F. stictonotus</i>
9	Kurosabafugu	<i>Lagocephalus</i> subsp.
10	Senninfugu	<i>Pleuranacanthus sceleratus</i>
11	Mefugu	<i>F. ocellatus obscurus</i>
12	Takifugu	<i>F. oblongus</i>
13	Shimafugu	<i>F. xanthopterus</i>
14	—*	<i>F. bimaculatus</i>
15	Yoritofugu	<i>Liosaccus cutaneus</i>
16	Sansaifugu	<i>F. flavidus</i>

* No Japanese name is available.

ともに、等電点電気泳動法等も導入して同様な検討を加えたものである。

試料及び方法

試料

1983年夏から秋にかけて東京中央卸売市場で入手した計16種のフグを供試した。それらの和名及び学名をTable 1に示す。いずれも鮮魚あるいは貯蔵状態の良好な凍結品であった。供試個体数は各魚種につき、原則として1個体とした。

方法

試料液の調製 以下の操作はとくに断わらない限り、2~4°で実施した。背部から切り出した普通筋1gに、氷冷した5mlの0.05Mバルビタール緩衝液(pH 8.6)-グリセリン等容混液を加え、乳鉢中で十分に磨砕した。次いで、3,000 rpm, 10分間の遠心分離に付し、上清を得た。この上清に対し、電気泳動用のマーカーとして1/4量の0.001%のBromophenol blue (BPB)を加え、分析用試料とした。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) Akroyd⁹⁾の方法に準じて行った。スラブゲルの厚さは2mmとし、また分離ゲル及び濃縮ゲルのアクリルアミド濃度はそれぞれ、7.5%及び3%とした。電解液には5mM Tris-38mM グリシン緩衝液(pH 8.3)を用い、濃縮ゲルでは20mA、分離ゲルでは40mAの定電流下、通常約4時間泳動を行った。泳動終了後、Coomassie brilliant blue R-250によりタンパク質染色を施した。また、リンゴ酸脱水素酵素(MDH, E. C. 1. 1. 1. 37)¹⁰⁾、ホスホグルコムターゼ(PGM, E. C. 2. 7. 5. 1.)¹¹⁾、及び乳酸脱水素酵素(LDH, E. C. 1. 1. 1. 27)¹²⁾

の各活性染色をも試みた。

セルロースアセテート膜電気泳動 (CAME) 小川¹³⁾の方法に準じて行った。膜にはSeparax (フジフィルム)を用い、電解液には0.05Mバルビタール緩衝液(pH 8.6)を用い、0.4mA/cmの定電流下、室温で50分間泳動した。泳動終了後、Ponceau 3Rでタンパク質を染色した。

等電点電気泳動 (IEF) 3%のAmpholine (LKB, pH 3.5~10)を含む5%アクリルアミドの薄層ゲル(厚さ0.5mm)を用いた。電解液には1Mリン酸(陽極)及び0.1N水酸化ナトリウム液(陰極)を用い、1,500Wの定電力下、10°にて90分間泳動を行った。泳動終了後、表面電極を用いてゲル表面のpHを測定した。次いで、3.5%スルホサリチル酸-12%トリクロル酢酸で固定後、Coomassie brilliant blue R-250によりタンパク質を染色した。

結果及び考察

PAGEにおける16種のフグのタンパク質の泳動パターンをFig. 1に示す。全魚種を通じ、Rm (BPBの移動距離を1としたときの相対移動度) 0.3前後の濃厚なバンドが見られたが、センニンフグ(No. 10)の当該バンドのRm値は他魚種に比べ、明らかに小さかった。Rm 0.4~0.8の数本のバンドには顕著な種特異性がみられ、フグ類相互の鑑別上、有用と認められた。また、Rm 0.2付近のバンドにも若干の種特異性が認められた。

ただし、トラフグ(No. 2)とカラス(No. 3)の場合、またショウサイフグ(No. 6)とコモンフグ(No. 7)の場合には、少なくとも定性的にはパターンには差がみられず、判別は困難と認められた。メフグ(No. 11)、タ

Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of the myogen fractions prepared from the ordinary muscle of puffers
Coomassie brilliant blue staining. 7.5%gel.
Refer to Table 1 for the specimens No. 1-16.

Fig. 2. Isozyme patterns of malate dehydrogenase from the ordinary muscle of puffers on 7.5% polyacrylamide gel
Refer to Table 1 for the specimens No. 1-16.

Fig. 3. Isozyme patterns of phosphoglucose mutase from the ordinary muscle of puffers on 7.5% polyacrylamide gel
Refer to Table 1 for the specimens No. 1-16.

Fig. 4. Isoelectric focusing of the myogen fractions prepared from the ordinary muscle of puffers
Coomassie brilliant blue staining
Refer to Table 1 for the specimens No. 1-16.

キフグ (No. 12), シマフグ (No. 13), *F. bimaculatus* (No. 14), サンサイフグ (No. 16) ではパターンがかな

り似るが, Rm 0.2 付近及び 0.4~0.8 の数本のバンドにより, 相互の鑑別は一応可能であった.

次に, Fig. 2 に示すように, MDH のアイソザイムパターンについても, かなりの種特異性が認められた. マフグ (No. 1) 及びヒガンフグ (No. 4) の相互間, トラフグ (No. 2), カラス (No. 3) 及びクサフグ (No. 5) の3者間, あるいはメフグ (No. 11), タキフグ (No. 12), シマフグ (No. 13), *F. bimaculatus* (No. 14) 及びサンサイフグ (No. 16) の5者間では, それぞれパターンがよく似ていた. クロサバフグ (No. 9), センニンフグ (No. 10), ヨリトフグ (No. 15) では, それぞれに特徴的なパターンが見られた. また, 前記のタンパク質パターンでは相互鑑別が難しかったショウサイフグ (No. 6) とコモフグ (No. 7) も明確に判別できた.

PGM のアイソザイムパターン (Fig. 3) は, 各魚種ともバンド数は少ないものの有意の種特異性を示し, とくにトラフグ (No. 2) とカラス (No. 3) で明確な相違が認められた. ショウサイフグ (No. 6) とコモフグ (No. 7) の判別も容易であった.

LDH のアイソザイムパターンについても検討したが, Rm 0.2 付近の1本のバンドしか認められない場合が多く, フグ類の鑑別への応用は不適當と考えられた.

CAME におけるミオゲンのパターンについては、各魚種で 1~3 本の, Rm が接近したバンドが認められたのみで、本法によるフグ類の鑑別は困難であった。

次に、Fig. 4 に示すように、IEF では PAGE や CAME に比べて、はるかに多数の、かつシャープなバンドが得られ、魚種相互間の鑑別は総じて容易であった。トラフグ (No. 2) とカラス (No. 3) についても、pH 7~8 のバンドの有無において明確な差が見られ、本法が近縁種や雑種などの鑑定に有用であることを示唆した。

最後に補足的ながら、個体差の有無につき、ヒガンフグ (20 個体) 及びヨリトフグ (4 個体) の両魚種を用いて、若干の検討を行った。図は省略するが、まずヒガンフグの場合には、PAGE におけるタンパク質パターン (Fig. 1, No. 4 参照) 中、Rm 0.50 のバンドのほか、試料によっては、その前後に弱い数本のバンドを示すなどの個体差がみられたが、鑑別に支障をきたすほどではなかった。MDH や PGM のアイソザイムパターンに関しては、個体差が全く認められなかった。他方、ヨリトフグについても、IEF を含む全電気泳動において、個体差は全くみられなかった。

以上の諸結果から、フグ類の鑑別には、CAME を除く前記の諸種の電気泳動法によるタンパク質やアイソザイムパターンの分析が有用であること、それらの方法の併用はさらに鑑定の確実度を増すことなどが示された。

谷口¹⁴⁾はデンブングル電気泳動法によって数種のフグのミオゲン画分のタンパク質パターンを調べ、種特異的なことをみた。また、ごく最近、増田ら^{*1}はフグ雑種の遺伝的研究の中で、諸種のフグ類につき、同じ技法でタンパク質パターンなどの比較を試みている。本研究で用いた IEF は分離能においてより優れており、ここに供試した 16 魚種の鑑別も一応可能なことが示された。しかし、アクリルアミドを支持体とするこれらの電気泳動においては、泳動パターンはゲルのでき具合等の関係で完全に再現性があるとはいえず、常に既知試料を同時に泳動にかけることが望ましい。

今後、これらの方法のより一層の改善をはかるとともに、干物など加工品の鑑別法についても検討する予定である。

要 約

16 種のフグにつき、普通筋のミオゲン画分の電気泳動

分析による相互鑑別の可能性を調べた。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動におけるタンパク質パターンは総じて顕著な種特異性を示し、一部のものを除き、相互鑑別が可能であった。MDH や PGM のパターンにも有意の種特異性が認められ、タンパク質パターンとの併用は、鑑別をより確実にするものと考えられた。

他方、等電点電気泳動におけるタンパク質パターンは、検出バンド数も多く、著しく種特異的で、近縁種等の鑑別上、有用と認められた。

謝 辞

本研究の実施にあたり、供試フグの同定をして頂いた東京大学総合研究資料館 阿部宗明博士に深謝する。なお、本研究費の一部は、厚生科学研究費補助金により支弁した。ここに記して謝意を表する。

文 献

- 1) 田口博人：食品衛生研究, **34**, 113~137 (1984).
- 2) 多部田 修：同上, **33**, 565~575 (1983).
- 3) 原田禎顕, 田原迫洋一：同上, **31**, 313~318 (1981).
- 4) 河端俊治, 戸田敦夫, 松本恵子, 原田禎顕：同上, **31**, 827~837 (1981).
- 5) 古沢陽一：同上, **21**, 144~147 (1971).
- 6) 田口博人：同上, **32**, 1049~1066 (1982).
- 7) 原田禎顕：食衛誌, **20**, 437~441 (1979).
- 8) 橋本周久, 渡部終五, 中川孝之, 反田健児：日本水誌, **50**, 115~118 (1984).
- 9) Akroyd, P.: Anal. Biochem. **19**, 399~410 (1967).
- 10) Rotmans, J. P.: Exptl. Parasitol. **46**, 31~48 (1978).
- 11) Spencer, N., Hopkinson, D. A., Harris, H.: Nature. **204**, 742~745 (1964).
- 12) Shaw, C. R., Prasad, R.: Biochem. Genet. **4**, 297~320 (1970).
- 13) 小川恕人：臨床病理, 臨時増刊 11 号, 46~66 (1970).
- 14) 谷口順彦：高知大学水産実験所報告第 1 号, p. 145 (1974).

*1 増田育司, 竹岡昇一郎, 多部田 修：昭和 59 年度日本水産学会 春季大会講演要旨集, p. 110 (1984).