魚類血液の生化学的研究—XIII. 血清中のリポ蛋白質と糖蛋白質の電気泳動的特性*

斎 藤 要

(鹿児島大学水産学部)

Biochemical Studies on the Fish Blood—XIII.

On the Electrophoretic Specificity of Serum Lipoprotein and Glucoprotein

Kaname Saitō

Serum protein was isolated from a few fishes by the paper electrophoresis. The protein contained glucoprotein as well as lipoprotein, which were detected by the periodic acid SCHIFF reaction and sudan black-B reaction, respectively. The electrophoretic patterns obtained indicate that, not to mention the contrast between fish and other animals, the relative mobility of serum protein is possible to greatly differ even within the realm of fish as it is the case between elasmobranchs and teleosts.

The lipoprotein- and glucoprotein-reactions were positively found in the case of serum protein of teleosts such as carp, gray mullet or red snapper in an albuminlike fraction (component F or 1) judged as such from its large relative mobility, while albumin fraction of human serum or rabbit serum, both used as contrast, showed only negative ones. With elasmobranchs like shark and ray, on the other hand, these reactions were particularly distinct rather in a fraction of lower mobility (component 4) as compared with the faster fraction (component 2).

These results might allow to assume that such animals having marked difference in taxological status are generally attached also by a profound difference in protein composition without connection to the apparent similarity their serum protein shows in electrophoretic mobility.

著者は前報で硬骨魚と軟骨魚とは血清蛋白質の電気泳動の性質にかなり差異のあることを報告した^{1,2)}。ところで単に血清蛋白質と称しても人間等ではそのなかにリポ蛋白質とか糖蛋白質の如き複合蛋白質の混在することが明らかにされているから^{3,4,5,6)}、前述の種属特異性を更に究明するには引続いて血清複合蛋白質に関する検討も必要と思われる。しかるに魚類の該蛋白質に関する研究としては僅に DRILHON⁷⁾ がコイとウナギのリポ蛋白質について検討した報告を知る程度である。そこで著者は沝紙電気泳動法の長所、即ち TISELIUS 法では実施不可能な複合蛋白質の分析をも同時に行えることを利用し、海産魚を主とした数種の軟骨魚と硬骨魚について血清中のリポ蛋白質のみならず新たに糖蛋白質をも各々 sudan black B (SBB と略す) 反応と periodic acid SCHIFF (PAS と略す) 反応にて検出したところ、対照動物(人間、家兎)と魚類間とは勿論魚類中でも軟骨魚と硬骨魚とは両蛋白質の泳動の性質がかなり異なるという結果を得たので報告する。

実 験 の 部

実験材料: 実験に供した魚種と各々の平均体重を示すと次の如くである。コイ *Cyprinus carpio* LINNÉ, (650 g), ボラ *Mugil cephalus* LINNÉ (530 g), マダイ *Chrysophrys major* T. et S. (790 g), シロザメ *Mustelus griseus* PIETSCHMANN (1.25 kg), ツマジロ *Carcharhinus albimarginatus* RÜPPELL (13.87 kg), オオセ *Orectolobus japonicus* REGAN (21.74 kg), アカエイ *Dasyatis akajei* M. et H. (980 g), はかに人間及び家兎を対照動物として用いた。供試海産魚は 1956 年 12 月から 1957 年 3 月までの間に鹿児島湾及びその近海で採集したもので、当時の水温は表層で 16~19°C, 100 米層で 13~14°C を示した。

1958 年 7 月 21 日受理

* 1958 年 4 月, 日本水産学会年次大会で発表。

コイは本学部養魚池より同時期に求めたもので当時の水温は 9~13°C であった。なお実験材料からの血清分離法はⅧ報¹⁾と同様である。

泳動装置及び泳動条件: これらは IX 報²⁾とはほぼ同様であるが本実験では血清の蛋白質量を同報の場合の約 2 倍 (0.5~0.6mg/cm) にして泳動した。これは単位蛋白質量に対する SBB 反応と PAS 反応の呈色度 (吸光度) が amidoschwarz-10B (AS 10-B) 反応の場合より小さいためである。

リボ蛋白質と糖蛋白質の検出法: これらは各々 FELDMAN 法³⁾ (SBB 反応) と HOTCHKISS-Mc MANUS 法⁴⁾ (PAS 反応) に準じて行つたが、両法共に元来細胞化学の分野で組織を対象とした方式であるから本実験では種々検討のうえ濾紙に吸着した両蛋白質の検出に適するように反応時間とか使用薬品の一部を改変して実施した。その大要は次記の如くである。

SBB 反応。泳動後の乾燥濾紙を 55% アルコール液に 5 分間入れた後 SBB 試薬を 20 分間反応させ、先ず同アルコール液で次に蒸留水で洗滌し乾燥後パラフィンに封入した。

PAS 反応。泳動後の乾燥濾紙を過ヨード酸液に 5 分間入れた後蒸留水で洗滌し次に SCHIFF 試薬を 20 分間反応させ亜硫酸水で洗滌し乾燥後パラフィンに封入した。なお HOTCHKISS の原法では過ヨード酸液で処理後ヨードカリとチオ硫酸塩を含む還元剤で洗滌しているが本実験ではその必要が認められなかつたので省略した。

実験結果及び考察

供試血清蛋白質の各区分の濃度比と相対易動度: 所定条件下で泳動し、常法²⁾ (AS-10B 染色) により求めた各血清蛋白質の分析値を Table 1 に示した。これらの分析値より供試した硬骨魚類、軟骨魚類及び対照動物の三者間では血清蛋白質の泳動的性質にかなり差異のあることが認められるが、この点については前報^{1,2)}で詳細に報告しているから省略する。なお Table 中の区分 F は人血清の albumin より易動度の

Table 1. Paper electrophoretic analyses of serum proteins of various fishes

Species	No. of serum examined	Total protein (g./dl.)	Component				
			F. or 1.	2.	3.	4.	5.
Teleost							
<i>Cyprinus carpio</i>	9	4.8	{ 43.4 95.7	{ 10.5 70.8	{ 27.1 53.2	{ 10.3 38.8	{ 8.7 27.1
<i>Mugil cephalus</i>	8	5.3	{ 41.8 106.2	{ 7.2 93.7	{ 33.3 78.9	{ 9.4 56.3	{ 8.3 31.2
<i>Chrysophrys major</i>	6	5.7	{ 28.2 111.6	{ 26.4 94.7	{ 28.2 80.3	{ 10.6 54.7	{ 6.6 32.1
Elasmobranch							
<i>Mustelus griseus</i>	8	3.7	{ 35.6 86.2	{ 19.7 51.7	{ 32.9 32.2	{ 11.8 9.9	
<i>Carcharhinus albimarginatus</i>	6	3.8	{ 34.1 84.6	{ 24.5 48.7	{ 30.9 34.5	{ 11.5 11.1	
<i>Orectolobus japonicus</i>	4	3.5	{ 37.7 89.5	{ 18.3 54.2	{ 29.2 37.6	{ 14.8 12.4	
<i>Dasyatis akajei</i>	6	3.3	{ 25.9 91.5	{ 22.2 64.6	{ 32.9 31.4	{ 19.0 12.7	
Control							
(Human)	8	7.8	{ Alb. 53.6 100.0	{ α_1 - 4.6 83.6	{ α_2 - 6.2 68.7	{ β - 13.9 49.1	{ γ -Glob. 21.7 18.7
(Rabbit)	6	6.9	{ 52.1 102.7	{ 4.7 79.2	{ 7.6 70.4	{ 16.3 51.8	{ 19.3 21.5

For each component, the value for the first reading is given in per cent of total protein; for the second reading in relative mobility. The relative mobility are expressed as 100 in the case of human serum albumin. Veronal buffer solution, pH 8.9, μ 0.1; intensity of current, 0.32mA./cm.; temp., 7~10°C; duration of electrophoresis, 20 hrs.

きい成分であるが通常区分1と共に albumin 区分に入れている⁹⁾。又軟骨魚類の血清では多く原点附近に微小区分が認められたが、その濃度比は測定誤差(±2%)内に入ることが多いため本 Table では省略した。

Fig. 1. Paper electrophoretic diagrams of serum lipoprotein and glucoprotein of various fishes

--- Lipoprotein (Sudan black B reaction).

..... Glucoprotein (Periodic acid SCHIFF reaction).

— Serum protein (Amidoschwarz-10B reaction).

A; -Log T obtained from the paper stained with sudan black B and Amidoschwarz-10B reagent.

B; -Log T obtained from the paper stained with periodic acid SCHIFF reagent.

血清リボ蛋白質と糖蛋白質の泳動曲線：前述の条件で求めた供試血清の両蛋白質の泳動曲線を常法³⁾(AS-10B 染色)で求めた血清全蛋白質の泳動曲線と共に Fig. 1 に示した。

これらのリボ蛋白質と糖蛋白質の泳動曲線より各々の相対易動度を知り得るが、正確な濃度比を求めるにはなお検討すべき問題があると考えられるので、濃度については定性的に論ずることにした。図によるとコイ、ボラ及びマダイの如き硬骨魚の血清蛋白質ではリボ蛋白質と糖蛋白質の反応が易動度の最も高い区分F或いは区分1に顕著で、ほかに区分2及び3にも認められる。これらに対しシロザメ、ツマジロ、オオセ及びアカエイの如き軟骨魚では易動度の最も高い区分2よりも区分4附近に両反応が顕著であつて、特に両区分のリボ蛋白質の呈色度に著しい差がみられる。次に対照とした人間及び家兎の血清では糖蛋白質の反応は α_2 -, α_1 -, β -globulin 区分に又リボ蛋白質の反応は α_1 -, β - と γ 間及び γ -globulin 区分の順に強く認められたが易動度の最も高い albumin 区分には両反応が殆んど認められなかつた*。なお人間の血清では家兎の場合より前記各区分のリボ蛋白質の反応が強く認められた。

以上の結果から魚類でも哺乳類と同じく血清蛋白質中にリボ蛋白質と糖蛋白質の存在することは明らかであるが、相対易動度からみた両蛋白質の性質にはかなりの種属的差異があるものと解される。又前報^{1,2)}で述べた血清全蛋白質の泳動的性質と本報で述べた血清複合蛋白質の泳動結果とを関連づけて検討すると魚類の血清蛋白質組成にみられる特異性がより良く理解されると共に分類学上の位置がかなり異なる動物間では例え近似した相対移動度を示す血清蛋白質区分でも、リボ蛋白質と糖蛋白質の反応からみた相互の組成が著しく異なる場合のあることが諒解される。従つて相対易動度のみで異種動物間の血清蛋白質を区分して、その同定を云々することは危険であると推論される。

血清リボ蛋白質と糖蛋白質の生理的機能の重要性については最近人間を対象として明らかにされつつあるが¹⁰⁾、両蛋白質の泳動的性質に前述の如き種属特異性の認められることは比較生化学的な立場からも極めて興味深い現象である。

要 約

所定条件のワット電気泳動法により区分した魚類の血清蛋白質について、PAS 反応にて糖蛋白質又 SBB 反応にてリボ蛋白質を検出したところ、対照動物(人間及び家兎)と魚類間は無論、魚類中でも軟骨魚と硬骨魚とでは両蛋白質の泳動的性質、特に相対易動度にかなり差異のあることを明らかにした。

1. 対照動物の血清蛋白質では相対易動度の最も高い albumin 区分にリボ蛋白質と糖蛋白質の反応が殆んど認められないのに対し、コイ、ボラ及びマダイの如き硬骨魚類では相対易動度からみれば albumin に相当する区分F或いは区分1に両反応が顕著に認められた。一方サメとかエイの如き軟骨魚類の血清蛋白質では相対易動度の最も高い区分2よりも低易動度の区分4附近に両反応が顕著であつた。
2. 以上の結果から分類学上の位置がかなり異なる動物間では、例え近似した相対易動度を示す血清蛋白質区分でも、リボ蛋白質と糖蛋白質の反応からみた相互の組成が著しく異なる場合のあることが諒解された。

終りに本研究を行うに当り御指導を賜つた本学高田幸二教授に深謝する。又本研究費の一部は文部省科学研究費の支出に仰いだ。記して謝意を表する。

文 献

- 1) 斎藤 要: 日水会誌, **22**, 752~759 (1957).
- 2) 斎藤 要: 日水会誌, **22**, 760~767 (1957).
- 3) M. A. MACHEBEUF: *Compt. rend.*, **188**, 109~111 (1929).
- 4) G. BLIX, A. TISELIUS and H. SVENSSON: *J. Biol. Chem.*, **137**, 485~494 (1941).
- 5) L. F. HEWITT: *Biochem. J.*, **33**, 1496~1505 (1939).
- 6) C. RIMINGTON: *Biochem. J.*, **34**, 931~940 (1940).
- 7) A. DRILHON: *Compt. rend.*, **238**, 940~942 (1954).
- 8) 市川 収: “細胞化学”, 本田書店, 東京, (1953), pp. 124, 177.
- 9) H. F. DEUTSCH and M. B. GOODLOE: *J. Biol. Chem.*, **161**, 1~20 (1945).
- 10) 赤堀四郎・水島三一郎編: “蛋白質化学”, 3巻, 共立出版, 東京, (1955), pp. 154, 244.

* 人血清では泳動条件が悪いと albumin と α_1 -globulin との分離が不充分となる。この場合 albumin 区分が両反応を呈することがあるから注意を要する。