サバフグ属3亜種の電気泳動的鑑別

橋本周久・渡部終五・中川孝之・反田健児

(1983年4月27日受理)

Electrophoretic Identification of Three Subspecies of the Genus *Lagocephalus* PufferfishKanehisa HASHIMOTO,*¹ Shugo WATABE,*¹ Takayuki NAKAGAWA,*²
and Kenji SORITA*¹

Attempts were made to identify electrophoretically three subspecies of the genus *Lagocephalus* pufferfish: "kurosabafugu" *L. lunaris* subsp., "shirosabafugu" *L. lunaris spadiceus*, and "dokusabafugu" *L. lunaris lunaris*.

The extracts were prepared from the ordinary muscle of those three subspecies, and analyzed for patterns of sarcoplasmic protein and several enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis.

The three subspecies clearly differed from each other in sarcoplasmic protein pattern, though small individual variations were recognized in *L. lunaris spadiceus* and *L. lunaris lunaris*.

Of the enzymes tested, the most specific to the subspecies was malate dehydrogenase (MDH), followed by lactate dehydrogenase (LDH) and phosphoglucumutase (PGM).

クロサバフグ *Lagocephalus lunaris* subsp., シロサバフグ *L. lunaris spadiceus*, およびドクサバフグ *L. lunaris lunaris* の3亜種は現在、いずれもサバフグ属に分類されている。^{1,2)} この分類は主に背部における小棘の分布、尾びれの形状・色彩、など形態的特徴に基づいているが紛らわしい例もあるようである。さらに尾びれについては共食いなどのため欠損した個体も珍しくないという。

このような状況下にて、本研究では上記3亜種につきポリアクリルアミドゲル電気泳動法による普通筋の筋形質タンパク質の比較を行なった。さらに、いくつかの酵素についても同様に、3亜種間における比較を試みた。

その結果、3亜種は筋形質タンパク質、リンゴ酸脱水素酵素、などの電気泳動図型により容易に鑑別できることが示された。

材料と方法

材料 供試したサバフグ類は1981年3月より10月にかけて漁獲されたクロサバフグ *L. lunaris* subsp. 12個体、シロサバフグ *L. lunaris spadiceus* 32個体、およびドクサバフグ *L. lunaris lunaris* 18個体で、とく

に雌雄別には取扱わなかった。採取年月日・場所、体重などの明細をTable 1に示す。採取場所についてはFig. 1も参照されたい。魚体は入手後、実験に供するまで -80°C に凍結保管した。

電気泳動分析 魚体を半解凍後、背部普通筋を切りとり、これに5倍量の0.06Mペロナル緩衝液(pH 8.6)ーグリセリン等容混合液を加え、乳鉢中で十分に磨砕した。これを10,000 rpm, 10分間の遠心分離に付して上清を得、下記の電気泳動分析用試料とした。

電気泳動はポリアクリルアミドゲル(7%)を支持体とするスラブ法により、通常4時間行なった。緩衝液には5mm トリス-38mm グリシン緩衝液(pH 8.3)を用いた。³⁾ 一部の泳動は0.1% SDS存在下、10%ゲル中で実施した。⁴⁾ 泳動後、タンパク質染色をCoomassie brilliant blue R-250により行なった。また、リンゴ酸脱水素酵素(MDH, EC 1.1.1.37),⁵⁾ 乳酸脱水素酵素(LDH, EC 1.1.1.27),⁶⁾ ホスホグルコムターゼ(PGM, EC 2.7.5.1),⁷⁾ クレアチンキナーゼ(CK, EC 2.7.3.2),⁸⁾ アデニレートキナーゼ(AK, EC 2.7.4.3)⁹⁾ などの酵素類についてもほぼ常法にならって検出した。

*¹ 東京大学農学部水産化学研究室 (Laboratory of Marine Biochemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113, Japan).

*² 東京水産大学生物化学研究室 (Laboratory of Biochemistry, Tokyo University of Fisheries, Konan-4, Minato, Tokyo 108, Japan).

Table 1. Details of the genus *Lagocephalus* specimens

Subspecies	Date of sampling	Place of sampling*	No. of specimens	Body weight (g)
“Kurosabafugu” <i>L. lunaris</i> subsp.	Mar. 14, 1981	Tosashimizu, Kochi Pref. (a)	2	175–212
	Mar. 2, 1981	East China Sea (Area 258) (b)	2	240–486
	Mar. 2, 1981	East China Sea (Area 496) (c)	2	557–635
	Mar. 2, 1981	East China Sea (Area 535) (d)	2	177–225
	Mar. 2, 1981	East China Sea (Area 537) (e)	2	200–212
	Mar. 2, 1981	East China Sea (Area 546) (f)	2	182–245
“Shirosabafugu” <i>L. lunaris</i> <i>spadiceus</i>	Oct. 26, 1981	Senzaki Bay, Yamaguchi Pref. (g)	30	90–145
	Mar. 11, 1981	Ushibuka, Amakusa, Kumamoto Pref. (h)	2	180–189
“Dokusabafugu” <i>L. lunaris</i> <i>lunaris</i>	Oct. 22, 1981	East China Sea (Area 567) (i)	10	775–1400
	Oct. 22, 1981	East China Sea (Area 537) (e)	6	500–1200
	Oct. 26, 1981	East China Sea (Area 579) (j)	2	950–1100

* Signs in parenthesis correspond to the places of sampling in Fig. 1.

結 果

Fig. 1. Map showing sampling places of three subspecies of the genus *Lagocephalus* pufferfish. Refer to Table 1 for signs.

- ; *L. lunaris* subsp.
- ; *L. lunaris* *spadiceus*
- ▲; *L. lunaris* *lunaris*

筋形質タンパク質 3亜種中、シロサバフグおよびドクサバフグの場合に、筋形質タンパク質の泳動図型において若干の個体変異が認められた (Fig. 2)。すなわちシロサバフグでは3つのタイプ (1, 2, 3) がみられ、その出現比率はそれぞれ 9:17:6 であった。ドクサバフグの場合も同様に3つのタイプ (1, 2, 3) がみられ、それぞれ 2:12:4 の出現比率であった。両亜種ともに、泳動図型のタイプと採取地や体重の間にはとくに関連が認められなかった。さらに、これら2亜種の場合とも、SDS 存在下の泳動においては個体変異が不明瞭となった。両亜種と対照的に、クロサバフグでは、SDS の存否にかかわらず、個体変異が認められなかった。

以上のような亜種内変異にもかかわらず、3亜種には明確な相違が認められた。すなわち、Fig. 2 にみるように、泳動距離 1.5–3 cm のところに3亜種とも主要なバンドを示すが、その現われ方が互いに相違している。

MDH Fig. 3 に示すように、MDH の電気泳動図型はいずれも主要バンド1本のほか、副あるいは微弱なバンドが1本ないし数本認められた。しかし MDH の泳動図型は3亜種間で明確に相違している。個体変異はドクサバフグの場合に1個体認められただけである (図省略) が、これも基本的には Fig. 3 中の MDH 泳動図型 (C) と一致していた。

Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of the sarcoplasmic protein fraction from the muscle of *L. lunaris* subsp. (A), *L. lunaris spadiceus* (B), and *L. lunaris lunaris* (C).

■; dense, ▨; moderate, □; weak.

Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of MDH, LDH, and PGM from the muscle of *L. lunaris* subsp. (A), *L. lunaris spadiceus* (B), and *L. lunaris lunaris* (C).

■; dense, ▨; moderate, □; weak.

LDH Fig. 3 に示すように、LDH はともに2本のバンドから成るが、遅い方のバンドの易動度および両バンドの濃淡の関係において、3 亜種間に違いが認められた。個体変異は3 亜種を通じ、全くみられなかった。

PGM Fig. 3 にみられるように、シロサバフグとドクサバフグの PGM は2 本のバンドから成る同一の電気泳動図型を示した。対照的にクロサバフグの PGM は1 成分で、その易動度は前2 者のどのバンドとも異なっていた。この酵素の場合も、3 亜種を通じ個体変異はみられなかった。

その他の酵素 CK, AK などその他若干の酵素についても、同様の手法で3 亜種相互間の比較を試みたが、とくに相違を認めなかった。

考 察

以上のように、クロサバフグ、シロサバフグ、ドクサバフグの3 亜種は、普通筋抽出液の筋形質タンパク質、MDH, LDH の電気泳動図型において互いに相違し、このサバフグ類の現行の分類を支持する結果となっている。^{*}

現在、サバフグ属3 亜種は、尾びれの形状・色彩、背部における小棘の分布、といった形態的特徴から鑑別されている。^{8,9)} すなわち、クロサバフグでは尾びれは黒に近いが、先端部は白く、尾びれの中央部がやや突出しているのに対し、シロサバフグでは尾びれの上2/3が黄色、下1/3が白味を帯び、上下先端部は白く、尾びれ中央部の切れ込みは浅い。また、ドクサバフグは尾びれ上

* ごく最近、阿部はクロサバフグを新種として独立させることを提唱しているが、本研究の筋形質タンパク質や PGM の泳動分析結果も、クロサバフグが他の2 亜種とやや遠い関係にあることを示している。

部が黄味を帯び、下部は白色、先端部は白くない。尾びれ中央部は深く切れ込み、一般にその下葉の方が上葉より短い。また、背部の小棘についてみると、ドクサバフグでは背びれ基部まで達しているのに対し、他の2亜種ではともに達していない。

ところで、フグ類は一般に悪食きで共食いの習性があり、尾びれの一部が欠損するものもよくみられるという。他方、背部の小棘の分布についても、たとえば今回供試したシロサバフグ(32個体)の場合、背びれ基部近くに及ぶもの(5個体)、分布範囲がごく狭いもの(10個体)、両者の中間型(17個体)がみられるなど、かなり変異があるようである。

これらの理由により、外部形態による3亜種の鑑別が困難な場合、あるいはたまたまこれらの亜種の切身が流通にまぎれ込んでいるような場合に、本研究に示した体構成成分の電気泳動分析による鑑別技法は有用性を発揮するものと考えられる。

なお、3亜種間で相違がみられた筋形質タンパク質成分の易動度は、MDH, LDH, PGMのそれと明らかに異なっていた。その同定結果についてはあらためて報告する。

謝 辞

本研究に用いたサバフグ類を同定して頂いた阿部宗明博士、その入手に便宜をはかって頂いた国立予防衛生研究所河端俊治博士ならびに東京水産大学菊池武昭教授に厚く御礼申し上げる。

なお、本研究費の一部は厚生科学研究費補助金ならびに伊藤魚学研究助成金によった。ここに記して謝意を表する。

文 献

- 1) 河端俊治・戸田敦夫・松本恵子・原田禎顕：食品衛研，**31**，827-837 (1981)。
- 2) 塩見一雄・山中英明・菊池武昭・河端俊治・阿部宗明・北浜喜一：UO, No. 31, 21-26 (1980)。
- 3) P. AKROYD: *Anal. Biochem*, **19**, 399-410 (1967)。
- 4) U. K. LAEMMLI: *Nature*, **227**, 668-685 (1967)。
- 5) J. P. ROTMANS: *Exptl. Parasitol.*, **46**, 31-48 (1978)。
- 6) C. R. SHAW and R. PRASAD: *Biochem. Genet.*, **4**, 297-320 (1970)。
- 7) N. SPENCER, D. A. HOPKINSON, and H. HARRIS: *Nature*, **204**, 742-745 (1964)。
- 8) 田口博人：食品衛研，**32**，1049-1066 (1982)。
- 9) 原田禎顕：食品衛誌，**20**，437-441 (1979)。