

## トラフグ組織抽出液のタンパク質及びLDHアイソザイムの電気泳動法による分析

山口県衛生公害研究センター (所長: 宮村恵宣)

数田行雄・河村 章・板垣国昭\*  
森重徹洋・遠藤隆二・宮村恵宣

### Electrophoretic Analysis of Proteins and LDH Isozymes in Tissue Extracts of *Fugu rubripes rubripes*

Ikuo KAZUTA, Akira KAWAMURA, Kuniaki ITAGAKI

Tetsuhiro MORISHIGE, Ryuji ENDO, Shigenori MIYAMURA

Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health (Director: Dr. Shigenori MIYAMURA)

#### はじめに

魚類の骨格筋抽出液の水溶性タンパク質及び諸種の酵素が種特異的な電気泳動像を示すことから、電気泳動法がフグの種類鑑別に応用され<sup>1-3)</sup>、著者ら<sup>4-7)</sup>も、各種フグを用いて本法の有用性を報告してきた。

今回は、トラフグ各種組織の水溶性タンパク質とL-乳酸脱水素酵素(LDH: EC.1.1.1.27)の組織分布について検討した。

#### 材料及び方法

検査材料は、生きたトラフグ3個体(雌2個体、雄1個体)を用いた。各個体は心臓からできるだけ採血した後、各組織(図1参照)を摘出し、心筋は血液を、腸は内容物を除くために、冷Youngの生理的塩類溶液で洗浄し、他の組織は濾紙で周囲の体液を除いた。眼球硝子体液(硝子体液)は、滅菌注射器で強膜辺縁部を穿刺して片眼から採取し、室温、3000回転で10分間遠心分離した上清を用いた。各組織は、分析に供するまで-80℃で保存した。

分析に用いた組織抽出液は、組織を細切後、冷1mM EDTA溶液(pH7.4)を組織重量の倍量加え、ステンレス製ホモナイザーでホモナイズし、4℃、12000回転で40分間遠心分離した上清を用いた。

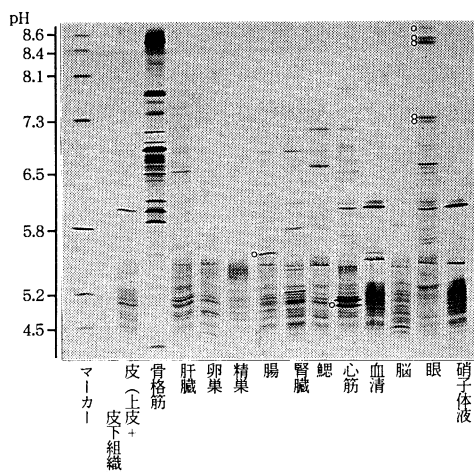


図1 トラフグ組織抽出液のタンパク質分画パターン

\* 山口県徳山環境保健所: 徳山市毛利町2-38

タンパク質の分離分析は、既報<sup>4)</sup>に準じポリアクリルアミドゲル薄層等電点分画法を用いた。

LDHの分離分析は、アガロース電気泳動法による。泳動は、1%濃度の薄層ゲル(0.5mm厚)で、ベローナル緩衝液( $\mu = 0.05$ , pH8.6)を用い、15°C、340Vで20分間行った。

LDHの活性染色は、竹尾<sup>9)</sup>のディスク電気泳動法用の染色液のうち、Phenazine methosulfate (PMS)を1-methoxy-PMSに替えて調製したものを用い、37°C、暗所で行った。LDHの活性測定は、乳酸リチウムを基質、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)を補酵素として、LDHの酵素反応(30°C)によるNADの還元に伴う339nmの吸光度の増加( $\Delta E \lambda 339$ )を測定し<sup>9)</sup>、抽出液タンパク質1mg当たり( $\Delta E$ /mgタンパク質)に換算した。

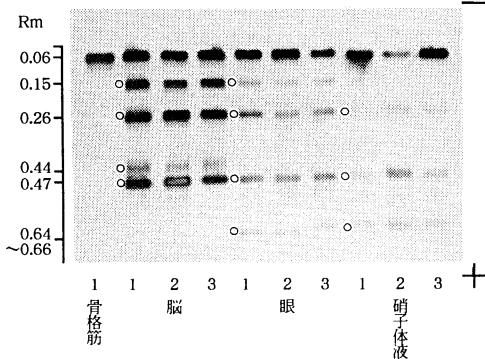


図2 トラフグ骨格筋、脳、眼及び硝子体液のLDHザイモグラム

### 結果及び考察

図1に組織抽出液のタンパク質分画パターンを示した。皮、肝臓、腸、腎臓、鰓及び心筋は、pH4からpH5.5の領域に微細なバンドとpH5.8からpH7.8の領域に複数のバンドが見られた。また、腸はpH5.6、心筋はpH4.9の位置(○印)に1本他組織と比べて濃いバンドが見られた。しかし、pH4及びpH5.8からpH8.6の領域に濃い多くのバンドを示す骨格筋と比べて、これらの組織を明確に特徴づける分画パターンは認められなかった。

卵巣、精巣は、pH4からpH5.5付近の領域に集中する微細なバンドと、pH6.6付近に痕跡程度のバンドが見られ、両組織のバンドには濃淡差はあるものの、類似した分画パターンであった。

脳は、pH4からpH5.5の領域に集中する微細なバンドと、pH5.8からpH7.8の領域に痕跡程度のバンドが見られた。血清及び硝子体液は、pH4からpH5.5の領域に濃染され分別できないバンドと、pH6.0に濃い1本のバンドが見られた。

眼は、pH4からpH7.3、pH8.4からpH8.7と広い領域にバンドが見られた。このうち、pH7.2、7.3、8.4、8.5及び8.7の濃いバンド(○印)は、他組織では認められず、眼に特異的なタンパク質と考えられた。また、これらのバンドは、硝子体液では見られないことから、硝子体液以外の眼組織に存在するタンパク質と考えられた。

次に、3個体の組織抽出液のLDH活性測定結果を表1に示した。個体による活性値の差は各組織と

表1 トラフグ組織抽出液のLDH活性測定値 ( $\Delta E \lambda 339$  /mgタンパク質)

個体	皮	骨格筋	肝臓	生殖巣	腸	腎臓	鰓	心筋	血清	脳	眼	硝子体液
1(♀)	3.0 (7.7)	31 (24.3)	0.07 (14.0)	0.04 (13.3)	0.33 (16.7)	0.64 (13.7)	1.2 (15.1)	6.1 (11.5)	0.02 (39.5)	2.8 (10.0)	0.56 (15.3)	0.12 (16.8)
2(♀)	2.4 (5.4)	33 (21.9)	0.05 (11.0)	0.05 (21.8)	0.34 (20.8)	0.47 (22.8)	1.7 (19.1)	5.4 (14.5)	0.01 (38.5)	2.7 (9.9)	0.45 (17.0)	0.05 (9.8)
3(♂)	2.4 (8.2)	25 (23.3)	0.07 (11.2)	0.20 (12.9)	-	0.50 (17.6)	1.1 (12.4)	5.5 (15.0)	0.02 (54.0)	2.5 (9.1)	0.36 (17.9)	0.09 (21.9)

( ): タンパク質濃度 (mg/ml)

- : 未実施

も殆どみられなかった。ただ、硝子体液では、NO.2の個体が他2個体より低値を示し、タンパク質濃度も低値を示したが、この理由は不明であった。

組織別にみたLDH活性の強さは、骨格筋が最も強く、次いで心筋、脳、皮、鰓の順で他の組織は、1.0以下であった。なお、精巣は、1個体であるが、卵巣より高く、血清は最も低い値を示した。

LDH活性染色像(サイモグラム)は、皮、骨格筋、卵巣、腸、腎臓、鰓、心筋及び血清では、相対移動度Rm(色素BPBの移動度を1.0としたときのバンドの移動度)0.06の位置に1本のバンドがみられた。

肝臓及び精巣は、Rm0.06のバンドに加えて、Rm0.24付近に弱い染色帯が見られた。この染色帯については、LDHアイソザイムかあるいは、抽出液中の成分の影響が考えられるが、詳細な検討は行っていない。

脳、眼及び硝子体液のLDHサイモグラムは、上記の組織と比較して、非常に特徴的なパターンを示した(図2)。各組織共骨格筋に一致するバンドに加え、脳で4本、眼で4本、硝子体液で3本の主バンド(O印)が見られた。また、眼と硝子体液では、最も泳動速度の速いバンドと次に速いバンドの間に弱いバンドが見られた。眼と硝子体液で見られた最も泳動速度の速いバンドは、個体によって泳動速度にわずかな差が認められた(Rm0.64~0.66)。他の主バンドには個体による差は認められなかった。

硬骨魚類のLDHは、眼あるいは肝臓に特異的なアイソザイムが存在し、哺乳類と異なることが報告<sup>11-15)</sup>されている。Fujioら<sup>14)</sup>は、105魚種についてLDHの組織特異的の分布を検索し、フグ7種(シマフグ、トラフグ、カラス、クサフグ、ショウサイフグ、マフグ、ヒガンフグ)の眼及び脳で優勢的に合成されるアイソザイムの存在を報告している。

今回のトラフグの実験結果でも、脳及び眼では他組織と全く異なったサイモグラムが認められ、一致した成績であった。

更に、今回試料として用いた硝子体液は、眼で

見られた主バンドのうち、Rm0.15のバンド以外の4本の主バンドは明確に認められることが示された。硝子体液は、今回用いた方法で容易に採取することが可能であり、LDHアイソザイム研究の有用な試料と考えられた。

#### まとめ

トラフグを材料として各組織抽出液のタンパク質及びLDHの分析を行い、次の結果を得た。

1. 眼に特異的なタンパク質の存在が示唆され、このタンパク質は、硝子体液以外の眼組織由来の成分と考えられた。

2. 組織抽出液のLDH活性は、骨格筋、脳、皮、鰓、肝臓、眼、腸の順に低下し、これらの組織では個体差もみられなかった。硝子体液、肝臓、卵巣は、ほぼ同程度であった。

3. 脳及び眼では、それぞれの組織に特異的なLDHサイモグラムが認められた。硝子体液においても眼同様特異的なLDHサイモグラムが認められた。

#### 謝辞

終わりに臨み、ご懇篤なるご指導を賜りました山口大学医学部名誉教授竹尾和典博士、並びに第一生化学教室中村和行教授、ご助言頂いた第一生化学教室の方々に感謝申し上げます。

#### 文献

- 1) 橋本周久ほか：日水誌.50, 115~118(1984)
- 2) Nakagawa, T. et al: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 50, 543(1984)
- 3) 落合芳博ほか：食衛誌. 25, 440~444(1984)
- 4) 数田行雄ほか：山口衛公研業報.(11), 29~31 (1990)
- 5) 長 淳子ほか：生物物理化学. 34, 274(1990)
- 6) 数田行雄ほか：第38回山口県公衆衛生学会研究発表要旨集. 83~84(1991)
- 7) 数田行雄ほか：第37回中国地区公衆衛生学会発表集. 86~87(1991)
- 8) 竹尾和典：生物物理化学, 16, 1~7(1971)

- 9) August, W. W. :Methods of Enzymatic Analysis, Third Edition. vol. III. Verlag Chemie GmbH(1983) 171, 85~103(1969)
- 10) Markert, C. L., Faulhaber, I. :J. Exp. Zool., 159, 319~332(1965)
- 11) Holmes, R. S., Markert, C. L. :Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64, 205~210(1969)
- 12) Markert, C. L. Holmes, R. S. :J. Exp. Zool., 185, 217~240(1973)
- 13) Shaklee, J. B. et al.:J. Exp. zool., 185, 217~240(1973)
- 14) Fujio, Y., Kaneko, S. :Tohoku J. Agr. Res., 31, (2), 61~73(1980)
- 15) 木島明博, 藤尾芳久 :蛋白質核酸酵素, 34, 205~213(1989)