

電気泳動法による生化学的系群分類の試み

藤川裕司・岩本宗昭

水産資源の変動を解明するに当って、種族や系群を判別することは重要な作業の一つである。従来、これら種族、系群の判別は、標識放流や形態学的測定によって行われてきた。しかし、最近、生体構成成分であるタンパク、酵素などについて、その遺伝形質を電気泳動像により検出し、集団遺伝学の理論を用いて生化学的に種族の判別が行われるようになり、生物学的手法を補足するものとして注目されつつある。⁽¹⁾⁽²⁾

当場の資源研究においても、イカ類の稚仔段階における種の判別や魚類の系群分類にこの手法を導入し、研究の発展を図りたいと考える。

そこで、電気泳動の方法など実験技法の習得を兼ねて、ウマズラハギの瀬つき魚群と沖合の回游性魚群の系群関係を検討した。なお、実験方法および泳動像の解析について懇切な御指導を賜った高知大の谷口順彦助教授に厚くお礼申し上げる。

材 料 と 方 法

図-1に標本の採取地点を示す。St.①、St.②の標本は、昭和54年12月に試験船島根丸が離底曳によって採取したものであり、St.③の標本は11月に定置網で採取したものである。

電気泳動は澱粉ゲルを支持体として行い、泳動ゲルの染色は、酵素PGM(Phosphoglucomutase)の検出を目的として行った。⁽³⁾⁽⁴⁾

以下に電気泳動の実験手順を記す。

1. 澱粉ゲルの作製

表-1に示す処方調整したゲル化剤を大型フラスコに入れ、よく振とうしながら加温して透明化させる。少し冷却したのち、アスピレーターで脱気して、型枠に流し込む。常温で5時間ぐらい放置すればゲル化する。

2. 試料の添加(図-2)

魚体筋肉をハサミで細片とし、滲出してくる体液を濾紙小片に吸着させ、ゲル中央の切断面にはりつける。試料のほかに、インディケーターとしてアミドブラックBBを吸着させた濾紙小片をゲルの両端にはりつけておく。

3. 泳動(図-3)

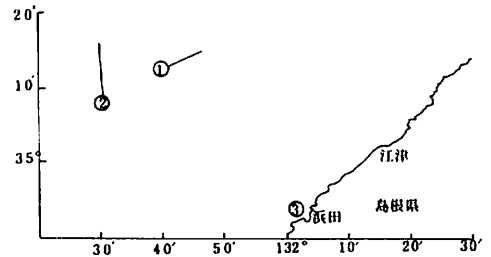


図-1 標本採取地点

表 - 1 ゲル化剤の調合

薬 剤 名	配合量
加水分解澱粉 (カナダ, コンノート医学 研究所製)	28 g
澱粉 (ホクレン製)	20 g
1 M MgCl ₂	2 ml
0.1 M MaCN	10 ml
緩衝液 (PH6.0) C-APM Citric acid 21 g と Aminopropylmorphorine 24ml をH ₂ Oを加えて1ℓとする。	8 ml
H ₂ O	380ml
合 計	400ml

表 - 2 染色液の調合

薬 剤 名	配合量
Glucose - 1 - phosphate	60mg
1 M MgCl ₂	0.2ml
0.2 M Tris (pH 8.0)	1.0ml
NADP (Nicotinamide adenine dinu- cleotide phosphate)	6mg
PMS (Phenazin methosulfate)	1mg
H ₂ O	8ml
NBT (Nitroblue tetrazolium)	
100mg	2ml
H ₂ O	100ml

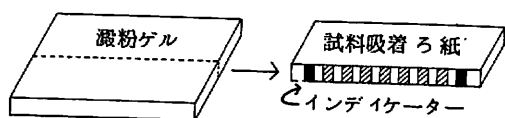


図 - 2 試料の添加

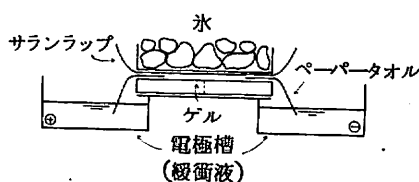


図 - 3 電気泳動装置

ゲルをもとどおりに接合して枠にはめ込み、サララップをかぶせる。氷を入れた冷却槽をゲルの上のせ、冷却しながらゲル幅1cm当り4mAの電流を約4.5時間通電する。

4. ゲル板の作製

泳動を終了したゲルを型枠からはずして、試料吸着濾紙を取り除き、再び枠にもどす。枠の下部に下敷(厚さ1mm程度)を入れ、ゲルを上部に押し出し、はみ出したゲル(厚さ1mm程度)をマンダリンの弦で水平に切り取りゲル板を得る。同様な作業を行えば数枚のゲル板ができる。

5. 染 色

ゲル板1組(⊕側と⊖側)を角型シャーレにとり、表-2に示す染色液を加えて、37°Cで数時間放置する。充分発色した時点で染色液を捨て、7%酢酸液を加えて固定する。固定したゲルを10%グリセリン液中に浸漬して脱色し、セロハンに包んで乾燥すると、透明で柔軟性のあるゲル板となり酵素PGMの泳動像が検出される。

結 果 と 考 察

酵素PGMの電気泳動によって検出された泳動像を図-4に示す。全標本ともバンドが一本のも

表 - 3 遺伝子型観察値の χ^2 検定

標本区分	遺伝子型	観察数	期待数	差	χ^2
St.①	A A	22	22.02	-0.02	0.000
	A B	2	1.93	0.07	0.002
	B B	0	0.04	-0.04	0.040
	計	24	23.99	0.01	0.042 0.8 < P < 0.9 (df=1)
St.②	A A	31	31.14	-0.14	0.000
	A B	4	3.75	0.25	0.017
	B B	0	0.11	-0.11	0.110
	A C	1	0.94	0.06	0.004
	B C	0	0.06	0.06	0.060
	C C	0	0.01	-0.01	0.010
	計	36	36.01	-0.01	0.201 P > 0.99 (df=4)
St.③	A A	84	84.26	-0.26	0.001
	A B	8	7.57	0.43	0.024
	B B	0	0.17	-0.17	0.170
	計	92	92.00	0	0.195 0.5 < P < 0.7 (df=1)

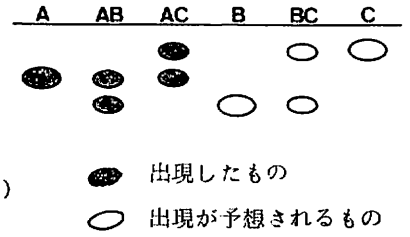


図 - 4 PGMの泳動像

表 - 4 標本の遺伝子頻度と χ^2 検定

標本区分	a	b	c
St.①	0.958	0.042	0
St.②	0.930	0.056	0.014
St.③	0.957	0.043	0
総合	0.951	0.046	0.003
χ^2	0.891	0.227	3.667
	0.5 < P < 0.7 (df=2)	0.8 < P < 0.9	0.1 < P < 0.2

のと2本のものに分類され、表現型としては同型接合体1種、異型接合体2種が出現しており、泳動像の位置や大きさなどから3種の対立遺伝子をもつことが推察される。従って、表現型も6種あることになるが、採取した標本では残りの3種は出現していない。これら表現型の出現度数（遺伝子型頻度）が、ハーディー・ワインベルグの法則にもとづく標本としての期待値に合致するかどうかを、 χ^2 検定により確かめた。その結果は表-3に示すとおりで、各定点の観察値と期待値は、いずれも有意な差がなく、3種の対立遺伝子をもつ単量体の遺伝子型モデルとしての妥当性をもつと判定される。

また、各遺伝子の定点間における出現頻度の差を χ^2 検定した結果、表-4に示すように定点間での遺伝子頻度に有意な差は認められず、各定点の標本は同じ集団と考えられる。

以上の検定結果から、ウマズラハギ筋肉中のPGMから検出された多分子型が遺伝的要因で生じたとすれば、浜田沿岸の瀬つきウマズラハギと沖合で漁獲された回游性のものとは同一系群であるとみなされる。なお、本格的な解析を行う場合は、数種の酵素についてその多分子型の出現状態を観察するほか標本の季節的変動なども考慮する必要があるが、ここでは省略している。

この試験により、澱粉ゲル電気泳動法と酵素の特異的染色法を併用して、酵素の多分子型を検出するに至る一連の技法の概要を習得した。この手法は、生体構成成分の系群特異性を検証するもの

であり、系群分類の妥当性の判定のほか魚肉製品の肉種鑑別などにも応用が可能とされており、水産の試験・研究において魅力ある手法である。しかし、実験作業に時間と熟練を要し、用いる試葉類が比較的高価であるなどの難点がある。

文 献

- (1) 日本水産学会編：魚類種族の生化学的判別，恒星社厚生閣（1975）
- (2) 沼知健一：集団の遺伝学的特性，海洋学講座18巻 資源生物論 PP5～36
東大出版会（1974）
- (3) 電気泳動学会編：電気泳動実験法，文光堂（1976）
- (4) 谷口順彦：電気泳動法による魚類の種分化および系群分析に関する研究
高知大学水産実験所研究報告 Ⅱ1.（1974）