

コイ血漿アルブミンの季節的変動

中川平介・鹿山 光・生田 薫

広島大学水畜産学部水産学科

1977年4月12日 受理

Electrophoretic Evidence of Seasonal Variation of Carp Plasma Albumin

Heisuke NAKAGAWA, Mitsu KAYAMA, and Kaoru IKUTA

*Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,
Hiroshima University, Fukuyama*

(Figs. 1-3, Tables 1-5)

魚類血清タンパク質の電気泳動的研究はチセリウス電気泳動法を用いた DEUTSCH & GOODLOE¹⁾, DEUTSCH & MCSHAN²⁾および MOORE³⁾に始まり、電気泳動技術の進歩にともない多くの魚種について研究が進められてきた。しかしながら、特定のタンパク質と魚類の生理との関係について述べた報告は少なく、養殖魚の生理状態を把握する一手段としての血清成分に関する基礎的知見が不足している。一般に、魚類血清成分は環境、栄養、生理および季節的要因等に敏感に反応し、著しく変化することが知られている⁴⁾。また魚類は本質的に哺乳類とは異なるため、魚類血清タンパク質を論ずる際、安易に哺乳類の血清タンパク質に対する命名法および生理機構をそのまま適用することには問題が多い。

前報⁵⁾において、コイ血漿からアルブミン性タンパク質を単離し、その性状を報告した。このタンパク質は血漿中最も多い成分であって、ヒト血清アルブミンの物理化学的定義とは一致しない点があるが、生理機能からみて、哺乳類血清アルブミンに相当する成分と考えられる⁶⁾。魚類血清タンパク質のアルブミン、グロブリンを電気泳動易動度から同定した報告は多く見受けられる。しかしながら、アルブミンと同定されたタンパク質について生理的・物理化学的に追求した報告はほとんど見当たらない。

本報では、コイ、*Cyprinus carpio*、血漿タンパク質を溶解度の差を利用した古典的な分画方法でアルブミンとグロブリンに分離し、電気泳動像上の両者を同定し、それぞれの季節的変動を検討した。また、前報⁵⁾で報告した、物質代謝に重要な役割を果たすと考えられるアルブミン性タンパク質の季節的変動についても検討し、養殖魚の生理学的観察方法の一手段として、電気泳動法利用の可能性についても論ずる。

材料および方法

実験材料 1975年5月、広島県庄原市の広島県淡水指導所より入手した2年生のマゴイ、*Cyprinus carpio*、を本学部熊野淡水実験所の養魚池で、養鯉用ペレット（日本配合飼料株式会社製No.5P）を1日1回投与して飼育したものを試料魚とした。夏期および冬期は養魚池への流入量を加減して極端な水温の変動を出来るだけ調節した。

採血方法 同一水槽内で飼育した魚を年4回無作為に抽出し、ヘパリン処理した注射器を用い、心臓から穿刺採血した。血漿は直ちにヘマトクリット管に取り、ヘマトクリット値を測定した後、残部を3,000 rpm、10分間遠心分離して血漿を得た。

血漿成分の分析 血漿総タンパク質量はビウレット法、血漿総脂質量はリン酸バニリン法⁷⁾、血糖値はオルトトルイジン法⁸⁾を用いて測定した。

アルブミン、グロブリンの分離 血漿に等量の飽和硫酸アンモニウムを加え一夜4℃に放置した。塩析された成分を10,000 rpmで10分間遠心分離し、沈澱部を50%飽和硫酸アンモニウム溶液で洗じょうした。得られた沈澱部を粗グロブリン画分、可溶部を粗アルブミン画分とした。アルブミン画分はセロフェンチューブに入れ、透析により脱塩後、濃縮剤として約40%のポリエチレングリコール6,000を用いて濃縮した⁹⁾。

セルロースアセテート電気泳動 巾1.5 cm長さ7 cmのセルロースアセテート膜 (Sartorius-Membran filter) にペロナール緩衝液 (pH 8.6, イオン強度 0.06) に溶解した試料を塗布し、0.5 mA/cm²で60分間通電した。泳動終了後、タンパク質のバンドをPonceau 3Rで染色して検出した。各タンパク質成分の比率は、染色したセルロースアセテート膜をデカリンで透明化後、オズマーデンシトメーター82で測定した。

ディスク電気泳動 7.5%ポリアクリルアミドを用い、試料を濃縮ゲル上に蔗糖溶液と共に重層し、ゲル管1本当たり2.5 mAを通電した。タンパク質のバンドはCoomassie blueで染色して検出した。タンパク質組成はデンシトメーターを用いて測定した。

結 果

飼育期間における水槽の水温変動を第1図に示した。採血は1975年6月9日、9月4日、11月6日および1976年1月20日の4回行った。第1表に採血した試料魚の体重、体長および肥満度を示した。肥満度の算出には(体重/体長³)×100を用いた。飼育経過とともに、体重、体長は増加したが、肥満度は夏期に最低値を示した。第2表に血液の分析結果を示した。ヘマトクリット値は11月採血時に、血漿総タンパク質は9月、血漿総脂質量は11月採血時にそれぞれ最高値を示した。一方血糖値は1月採血時に最高値を示した。

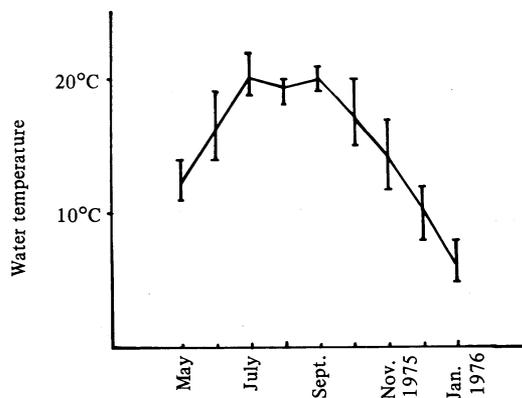


Fig. 1. Water temperature of a out-door pond. Vertical lines represent range of temperature in a month.

Table 1. Experimental material

Date of sampling	1975 Jun. 9	1975 Sept. 4	1975 Nov. 6	1976 Jan. 20
No. of sample	19	13	15	17
Body weight (g)	188±66	219±67	319±111	322±126
Body length (cm)	18.4±4.6	21.0±2.2	23.1±3.1	23.7±3.4
Fatness*	29.1±2.5	22.9±1.1	25.1±2.1	23.2±2.2

$$* \frac{\text{body weight}}{\text{body length}} \times 100$$

Table 2. Seasonal variation of carp blood properties

Date of sampling	1975 June. 9	1975 Sept. 4	1975 Nov. 6	1976 Jan. 20
Hematocrit value (%)	29.1±5.0	34.3±3.5	35.6±2.1	34.8±2.9
Plasma protein (g/100ml)	2.74±0.39	2.99±0.48	2.67±0.42	2.50±0.31
Plasma lipid (mg/100ml)	437±106	455±71	550±113	476±89
Plasma sugar (mg/100ml)	110±26	125±25	123±36	201±120

硫酸アンモニウム塩析法を用いて、血漿タンパク質をアルブミン、グロブリンに分離し、それぞれをペロナル緩衝液に対して透析後、セルロースアセテート電気泳動を行なった。Ponceau 3R によるタンパク質染色像を第 2 図に示した。セルロースアセテート膜上に現われた血漿タンパク質のバンドを図の様に 6 成分に分類し、アルブミンおよびグロブリン画分の泳動像と比較すると、アルブミン画分は Fr. II が圧倒的に多く、次に Fr. V が明瞭に認められた。また、不明瞭ながら Fr. I および IV も認められた。グロブリン画分には、Fr. V が最も多く含まれており、他に、分離状態は悪いが、Fr. VI, IV および III が含まれ、わずかに Fr. II も認められた。以上のことから、Fr. I および II はアルブミン性タンパク質、ならびに Fr. VI および III はグロブリン性と考えられるが、Fr. IV および V にはアルブミン、グロブリンが共存すると考えられる。

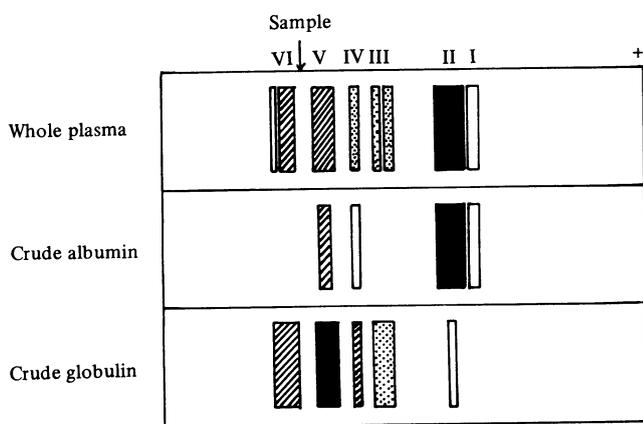


Fig. 2. Cellulose acetate electrophoretic diagrams of the crude albumin and globulin separated by ammonium sulfate fractionation. The electrophoresis was carried out in a field strength of 0.5 mA per cm width, in veronal buffer of pH 8.6 and ionic strength of 0.06. The film was stained with Ponceau 3R. Solid bands show intense staining, diagonal lines the second, dots faint intensity, and blank bands trace.

に分類し、アルブミンおよびグロブリン画分の泳動像と比較すると、アルブミン画分は Fr. II が圧倒的に多く、次に Fr. V が明瞭に認められた。また、不明瞭ながら Fr. I および IV も認められた。グロブリン画分には、Fr. V が最も多く含まれており、他に、分離状態は悪いが、Fr. VI, IV および III が含まれ、わずかに Fr. II も認められた。以上のことから、Fr. I および II はアルブミン性タンパク質、ならびに Fr. VI および III はグロブリン性と考えられるが、Fr. IV および V にはアルブミン、グロブリンが共存すると考えられる。

第 3 図はセルロースアセテート電気泳動像とそのフラクションならびにそれらとディスク電気泳動像との

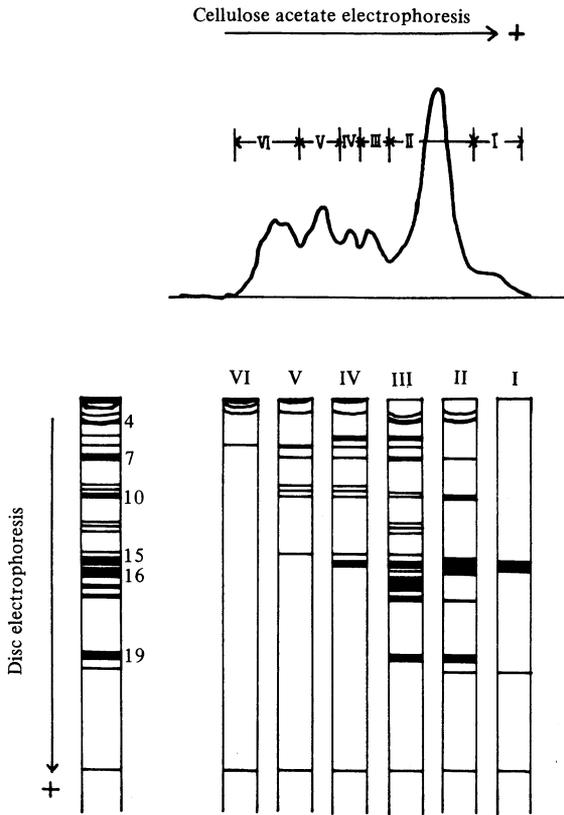


Fig. 3. Two dimensional electrophoresis of carp plasma protein. The migrated proteins on a cellulose acetate film were extracted with veronal buffer and applied on 7.5% polyacrylamide disc gel. The disc gel was stained by Coomassie blue.

関係を示したものである。セルロースアセテート膜に血漿を帯状に塗布し、通電後、膜の一部を Ponceau 3R で染色し Fr. I ~ VI の位置を確認し、各バンドを切り取り、各フラクションのタンパク質をペロナル緩衝液で抽出した。それらを試料として、それぞれについてディスク電気泳動を行った。前報⁵⁾ でみられたように、アルブミン画分はディスク電気泳動においても易動度の速い成分から構成されていた。総じて易動度の速い成分はセルロースアセテート電気泳動像においても速い易動度を示したが、セルロースアセテート膜上の Fr. II のように、ディスクゲルにおいて遅い易動度の成分を包含するものもある。また、ヒゴイ血漿タンパク質から単離したアルブミン性タンパク質の易動度に相当する成分は、本実験では第 3 図の Fr. 15 および 16 の成分であり、不完全ながら 2 成分に分離した。

セルロースアセテート電気泳動において 7 ~ 9 成分のタンパク質のバンドを検出したが、それらを 6 成分に分類し、比率をパーセンテージで示し、季節間のちがいをみた結果を第 3 表に示した。Fr. I および II は分離が不完全で、かつ Fr. I は量的に少ないので両者を合せて計算した。第 2 図に示した結果に基づき、6 画分のうち Fr. I および II をアルブミン、他をグロブリンと

Table 3. Seasonal variation of carp plasma protein composition by cellulose acetate electrophoresis

Fraction	1975	1975	1975	1976
	Jun. 9	Sept. 4	Nov. 6	Jan. 20
I & II	41.4 ± 5.0%	50.0 ± 3.8%	52.5 ± 3.3%	45.4 ± 4.7%
III	11.3 ± 2.6	9.5 ± 1.9	10.0 ± 2.5	11.7 ± 3.2
IV	6.1 ± 2.9	5.3 ± 2.2	11.2 ± 5.4	7.8 ± 2.6
V	21.8 ± 6.0	20.5 ± 2.8	11.6 ± 4.7	18.6 ± 4.3
VI	19.5 ± 7.7	14.7 ± 2.6	14.7 ± 3.2	16.4 ± 4.0
A/G*	0.85	1.00	1.11	1.02

*Calculated from the electrophoretic diagram.

Fraction I and II were regarded as albumin and the others were globulin.

仮定してA/C比を求めると、11月採血のものが1.11と最高値を示し、6月採血のものが0.85と最低値を示した。

第3図のディスク電気泳動像のFr. 15および16は前報で同定したアルブミン性タンパク質と易動度および脂質の存在から判断して、いわゆる多型の可能性がある。第4表にこの2つのアルブミン性タンパク質の総タンパク質中で占める割合をディスク電気泳動像から算出して季節的変動を示した。また、第5表に、血漿総タンパク質量と電気泳動像から求めたアルブミン性タンパク質の絶対値を示した。Fr. 15および16の血漿タンパク質中に占める割合は9月採血のコイで最高値を示したが、これを血漿中の絶対量として示した場合、第5表に示したように1.26g/100mlと、他の時期のものより高い値を示した。血漿タンパク質中のアルブミン画分の比率は11月採血時に最高値を示したが、血漿中の絶対値でみると9月採血時に高い結果を得た。アルブミン性タンパク質は寒冷期に少なく、代謝の活発な暖期になるに従い増加する傾向を示した。

Table 4. Seasonal variation of lipid-containing albumin components

	1975 Jun. 9	1975 Sept. 4	1975 Nov. 6	1976 Jan. 20
Fraction 15	13.2±3.5%	21.6±6.8%	19.6±4.1%	15.3±2.7%
Fraction 16	15.0±3.8%	20.7±4.5%	13.9±2.5%	16.6±2.8%

Table 5. Seasonal variation of carp plasma albumin content

	1975 Jan. 9	1975 Sept. 4	1975 Nov. 6	1976 Jan. 20
Crude albumin*	1.13g/100ml	1.50g/100ml	1.40g/100ml	1.14g/100ml
Crude globulin*	1.61g/100ml	1.49g/100ml	1.27g/100ml	1.36g/100ml
Fraction 15&16**	0.77g/100ml	1.26g/100ml	0.89g/100ml	0.80g/100ml
Other proteins**	1.97g/100ml	1.73g/100ml	1.78g/100ml	1.70g/100ml

* Calculated from the results of plasma total protein and cellulose acetate electrophoretic diagram.

** Calculated from the results of plasma total protein and disc electrophoretic diagram.

考 察

コイの血液成分の季節的変動についてはSORVACHEV¹⁰⁾、斎藤¹¹⁾およびMURACHI¹²⁾によって、ヘマトクリット値およびヘモグロビンは寒冷期に低く、血清総タンパク質量も低い値を示すことが報告されている。魚類血清成分の化学的性状については種属間に著しい差異のあることが報告されており、コイを他の魚種と同一視するには難点があるが、ニジマス、*Salmo gairdneri*、では、血液成分の変動は水温の変化に基づくものではなく、主として季節に起因する生理学的機能によると考えられている¹³⁾。本実験においては、雌雄、成長度、肥満度、性成熟度等の要因を考慮せずに、それぞれの季節の終りに採血し、季節変動の有無を考察したが、この結果が明らかに季節的要因に由来するのかどうかについてはさらに検討すべき問題であろう。

斎藤¹¹⁾は2月と5月に採血したコイ血清タンパク質をチセリウス電気泳動法で分析し、易動度の速い成分をアルブミンとして、寒冷期にアルブミンの少ないこと、および血清タンパク質の増減にはアルブミン画分の増減がグロブリン画分よりも大きく影響することを報告している。本研究では、セルロースアセテート膜を用いて血漿中のA/G比の季節的変動を測定し、斎藤の結果¹¹⁾と同様、暖期に高く寒冷期に低い傾向

をみた。しかし、セルロースアセテート電気泳動法でコイ血清のA/G比を算出する場合、それぞれのタンパク質画分にアルブミン、グロブリンが混合して存在することを考慮に入れるべきである。

コイ血清アルブミンを易動度から同定した研究によれば、アルブミン画分はタンパク質中で占める割合が、非健康魚^{14,15)}、飢餓魚¹⁰⁾において著しく減少し、血清総タンパク質量の減少の要因の一つとなっている。ディスク電気泳動像に現われたFr. 15 および 16 はマゴイ血漿タンパク質の主成分であるが、ヒゴイで行った場合、これらのタンパク質に相当する易動度をもつ成分は単一のバンドとして認められた⁵⁾。Fr. 15 および 16 は易動度がわずかに異なる点を除けば、脂質および炭水化物の呈色反応等でヒゴイから分離したアルブミンと同様の成分と考えられる。本研究の結果から、脂質を含んだアルブミン性タンパク質の血中における含量は季節的に変動することが明らかとなった。コイ類の血清アルブミン画分には脂質の存在することが定性的に確かめられており^{16,17,18)}、血漿脂質の50%以上がアルブミンと結合して存在する。血漿総脂質量とアルブミン量との季節的変動の傾向は全く一致しないことから、アルブミンと結合する脂質量に変動のあることが考えられる。

ZADVOROCHNOV & SORVACHEV¹⁹⁾によると、コイ血清タンパク質のうち、最も易動度の遅い画分、すなわち、ヒト血清 γ -グロブリンの易動度に等しいタンパク質画分は、免疫によって明らかに増加するという。この画分が成長にともない免疫を得て増加する可能性は充分考えられ、ひいてはアルブミン画分の比率にも影響するであろう。

魚類の血清性状およびタンパク質の生理的役割等について種属間に著しい差異のあることが考えられ、特に、アルブミンに相当する成分が認められない魚種もある²⁰⁻²³⁾。魚類における血清アルブミンの存在については、系統発生的観点からも種々論議があり²⁴⁾、魚類と哺乳類では本質的に異なるため、今まで哺乳類に用いられてきた命名法、定義等を魚類血清タンパク質に適用するにはなお充分な検討が必要であろう。

要 約

同一養魚池で飼育したマゴイから年4回採血し、血漿成分の季節的変動を測定した。血漿タンパク質は、50%飽和硫酸アンモニウム溶液に対する溶解度の差を利用して、アルブミンおよびグロブリン画分に分離し、両者の電気泳動的挙動を調べた。

セルロースアセテート電気泳動像に現われたタンパク質成分をアルブミンおよびグロブリン画分にわけ、両者の比の季節的変動をみると、暖期にアルブミン画分が多く、寒冷期に少ない。また、アルブミン性タンパク質のうち脂質を含むアルブミンの動向をディスク電気泳動で観察すると、暖期に多く、寒冷期に少なく、その変動は血漿タンパク質の増減をも支配する。しかしながら、血漿総脂質量と脂質を含むアルブミン量の季節的変動の傾向とは一致しない。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、御指導賜わった本学部浅川末三教授に深謝致します。

引 用 文 献

- 1) DEUTSCH, H. F. and GOODLOE, M. B.: *J. Biol. Chem.*, **161**, 1-20(1945).
- 2) DEUTSCH, H. F. and MCSHAN, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **180**, 219-234 (1949).
- 3) MOORE, D. H.: *Biol. Chem.*, **161**, 21-32 (1945).
- 4) 尾崎久雄: 魚類生理学講座, 第1巻血液・循環 第4版, P 50-100, 緑書房, 東京 (1975) .
- 5) NAKAGAWA, H., KAYAMA, M., and ASAKAWA, S.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **42**, 677-685 (1976).

- 6) NAKAGAWA, H. and KAYAMA, M.: *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, **15**, 199–206 (1976).
- 7) FRINGS, C. S. and DUNN, R. T.: *Amer. J. Clin. Pathol.*, **53**, 89–91 (1970).
- 8) 佐々木匠秀: 臨床病理, **12**, 434–437 (1964).
- 9) 河合 忠, 青木紀生: セルロースアセテート電気泳動法による血清蛋白分画, 第1版, P 75–76. 宇宙堂八木書店, 東京 (1972).
- 10) SOLVACHEV, K. F.: *Biochem. N. Y.*, **22**, 822–827 (1957).
- 11) 斎藤 要: 日本水産学会誌, **22**, 768–772 (1957).
- 12) MURACHI, S.: *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, **2**, 241–247 (1959).
- 13) DENTON, J. E. and YOUSEF, M. K.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **51A**, 151–153 (1975).
- 14) LIEBMAN, VON H., OFFHAUSE, K., and RIEDMÜLLER, S.: *Schweiz. Z. Hydrol.*, **XXIII**, 507–517 (1960).
- 15) RIEDMÜLLER, S.: *Bull. Off. int. Epiz.*, **65**, 745–750 (1966).
- 16) 斎藤 要: 日本水産学会誌, **24**, 531–534 (1958).
- 17) OLLENSCHLÄGER, B.: *Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flußbiologie*, **20**, 90–100 (1971).
- 18) HARRIS, J. E.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **48B**, 389–399 (1974).
- 19) ZADOVOROCHNOV, S.F. and SORVACHEV, K.F.: *Biochem. N. Y.*, **24**, 746–750 (1959).
- 20) IRISAWA, H. and IRISAWA, A. F.: *Science*, **120**, 849–851 (1954).
- 21) DRILHON, A. and FINE, J.-M.: *Compt. rend. Séan. Acad. Sci.*, **245**, 1676–1679 (1957).
- 22) 斎藤 要: 日本水産学会誌, **22**, 752–759 (1957).
- 23) GUNTER, G., SULTA, L. L., and BOX, B. E.: *Biol. Bull.*, **121**, 302–306 (1961).
- 24) 長野 弘: 医学のあゆみ, **83**, 629–630 (1972).

SUMMARY

Heisuke NAKAGAWA, Mitsu KAYAMA, and Kaoru IKUTA.

Two-year old carp, *Cyprinus carpio*, were kept in a out-door pond between May of 1975 and January of 1976. Blood samples were collected at the end of every seasons by cardiac puncture with a heparinized syringe. The seasonal variation of hematocrit value, plasma total lipid, and plasma sugar levels were measured.

The main 6 fractions were separated from the plasma protein by cellulose acetate electrophoresis. The localization of albumin and globulin fractions on the cellulose acetate electrophoretic diagram was estimated by the preliminary fractionation of the plasma protein by a 50% saturated ammonium sulfate solution. The cellulose acetate electrophoretic analysis showed that the plasma total albumin content was higher in the warm than the cold season.

The main albumin component in red carp has been identified as a kind of lipoprotein in a previous study. However now, in this study, the lipid-containing albumin was separated into 2 components in a disc electrophoresis. The amount of lipid-containing albumins was high in the warm season. The total protein content was also high in the same

season. Therefore the fluctuation of carp plasma albumin seems to be connected to the seasonal factor. It was suggested that the variation of lipid-containing albumin had an influence on the plasma total protein level. However, no correlation was observed between the variations of the lipid-containing albumin and plasma total lipid.

(Received April 12, 1977)