

イワナ属魚類におけるタンパク質型の 多型座位の検索

石井康太*・今枝龍介**・和田健太**・横濱道成**

(平成13年2月13日受付/平成13年6月14日受理)

要約: 現在, 日本のイワナ属魚類はオシヨロコマ (*Salverinus malma*), アメマス (*S. leucomaenis*) およびアメマスの亜種のごき (*S.l. imbricus*) の2種1亜種に分類する説と, オシヨロコマをオシヨロコマ (*S. malma malma*) およびミヤベイワナ (*S.m. miyabei*) の2亜種とし, アメマスとアメマスの亜種のごきをまとめ, 単にアメマス [地方名: エゾイワナ] (*S.l.f. leucomaenis*), ニッコウイワナ [地方名: イワナ] (*S.l.f. pluvius*), ヤマトイワナ (*S.l.f. japonica*) およびごき (*S.l.f. imbricus*) の4タイプに分ける説もあり, 分類には議論が絶えず統一化されていない。また, 日本においてイワナ属魚類はまだ形態学的特性による分類法では今のところ定説はない。

そこで我々は, 既に検出法が確立されているアイソザイムや mt-DNA およびゲノム DNA の多型に加え, 新たに生化学的手法による標識因子を開発するために北海道産のイワナ属魚類を用いて, 血液タンパク質および筋肉タンパク質の多型座位の検索を試みた。

1) 血液タンパク質型の検索

イワナ属魚類において, 血清トランスフェリン (Tf) 型, 血清エステラーゼ (Es) 型, ヘモグロビン (Hb) 型および血球膜タンパク質 (Cell X) 型について検索し, Tf 型 [基本バンド D, F, H, L および不顕性 (-)] は9種類のうち, F型が出現頻度 0.712 でオシヨロコマに特徴的な表現型であり, J型が出現頻度 0.917 でアメマス類に特徴的な表現型であった。Es 型では3つの領域のうちオシヨロコマには Es-II 領域 [基本バンド A, B および不顕性タイプ (-)] および Es-III 領域 [基本バンド F, I, S および不顕性 (-)] が, アメマス類には Es-III 領域 [基本バンド D₁, D₂ および不顕性 (-)] がそれぞれ特徴的な領域であった。Hb 型では2つの領域 (I および II 領域) に分けることができ, そのうち I 領域 (基本バンド A, B) に多型が認められ, アメマス類は A 型に, オシヨロコマには B 型に偏った出現頻度を示した。Cell X 型 (基本バンド A, B) には明確な種間の差異が検出されなかったが3つの表現型に分類することができた。また, オシヨロコマにおいて Tf 型 Es 型 (II および III 領域), Hb-I および Cell X 型に, アメマス類においては Es 型の I 領域に地域的差異と考えられる表現型が検出された。

2) 筋肉タンパク質 (Mu) 型の検索

イワナ属魚類において, Mu 型 (基本バンド A, B) ではオシヨロコマは A 型に, アメマス類は B 型に偏った出現頻度を示した。

以上のことから, Tf 型, Es 型 (I, II および III 領域), Hb-I 領域および Mu 型においてオシヨロコマとアメマス類の2グループに分けることができる差異が検出され, アイソザイムや mt-DNA などと同様に種間や種内の差異を明らかにできる座位の検出法が確立された。

3) 種間雑種個体の確認

丸瀬布町武利川で採取されたエゾイワナの1個体は, 斑紋および形態的にはエゾイワナタイプであったが, Tf 型および Mu 型でオシヨロコマとアメマス類のヘテロ型と思われる表現型が検出され, オシヨロコマとエゾイワナの交雑した個体と考えられた。

キーワード: イワナ属魚類, タンパク質多型座位, 分類, 生化学的標識因子, 地域的変異

サケ科 (Salmonidae) イワナ属 (*Salvelinus*) に属するイワナ属魚類には, 体各部の比率, 筋節数, 鱗の形態, 筋肉の色および斑紋の色や形などの形態学的変異が認められ

ている¹⁻³⁾。またイワナ属魚類は, それぞれの生息環境に対して順応し, 地域によっては異なった生態を持つ集団も多い⁴⁾。そのため日本には多くの地方名があり, あたかも別

* 東京農大大学生物産業学研究科生物産業学専攻

** 東京農大大学生物産業学部生物生産学科

種のように名付けられたイワナも多い⁵⁾。

現在日本のイワナ属魚類はオシヨロコマ (*Salvelinus malma*), アメマス (*Salvelinus leucomaenis*) およびアメマスの亜種のごき (*Salvelinus leucomaenis imbricus*) の2種1亜種に分類する今西説 (1996) と、オシヨロコマをオシヨロコマ (*Salvelinus malma malma*) およびミヤベイワナ (*Salvelinus malma miyabei*) の2亜種とし、アメマスとアメマスの亜種のごきをまとめ、単にアメマス [地方名: エソイワナ] (*Salvelinus leucomaenis f. leucomaenis*), ニッコウイワナ [地方名: イワナ] (*Salvelinus leucomaenis f. pluvius*), ヤマトイワナ (*Salvelinus leucomaenis f. japonica*) およびごき (*Salvelinus leucomaenis f. imbricus*) の4タイプに分ける説 (川那部浩哉: 1989) もあり、形態学的特性による分類法では今のところ定説はない。

一方、生化学的遺伝形質では、アイソザイム^{8,9,10,11)} やミトコンドリア DNA (mt-DNA)^{12,13)} およびゲノム DNA¹⁴⁾ による分類が行われており、個体変異や地域の変異が確認され、採取地などによるグループ化が行われてきた。しかし、グループ化されたイワナ集団と形態学的特性によりタイプ分けされたイワナ集団間ではまだ整合性が見出されていない。その原因として、形態学的にはタイプ分けされたイワナの中間的変異も多く、生化学的に明確な地域種の存在やそれを区別できるまでには至っていないことがあげられる。それは、種間や種内の変異を判別できる遺伝子座位が少ないためであり、今後さらに多くの座位が必要であると考えられる。

そこで我々は、既に検出法が確立されているアイソザイムや mt-DNA およびゲノム DNA の多型に加え、新たに生化学的手法による標識因子を開発するために北海道産のイワナ属魚類を用いて、血液タンパク質および筋肉タンパク質の多型座位の検索を試みた。

材料および方法

1) 試料

供試材料は、網走管内、根室管内、十勝管内、上川管内、知床半島および利尻・礼文島の河川で釣獲によって採取されたオシヨロコマ (*Salvelinus malma*) 164 個体、アメマス (*Salvelinus leucomaenis*) 計 76 個体 (うち、降海型: アメマス 44 個体および河川残留型: エソイワナ 32 個体)、他に青森県等で採取されたニッコウイワナ (*Salvelinus pluvius*) 6 個体、計 164 個体の成魚を用いた。また、アメマスとエソイワナ区別については、スマルト化しているか否かで区別した。

供試サンプルのうち、血清、血球膜およびヘモグロビン (Hb) サンプルは、魚の尾静脈から血液を採取し、8,000 rpm, 10 分間遠心分離を行い、血清と血球に分離した後、血球と等量の蒸留水を加え -20°C で凍結し溶血させ、3,000 rpm, 10 分間遠心分離を行い、上清を Hb サンプル、沈殿物を血球膜サンプルとしてそれぞれ -20°C で凍結保存した。また、筋肉組織サンプルは、 -80°C で凍結保存した。

2) 検出方法

① 血清タンパク質型 [血清トランスフェリン (Tf) 型および血清エステラーゼ (Es) 型]

血清 Tf 型および血清 Es 型の検出法は、水平式ポリアクリルアミドグラジェントゲル電気泳動法 (HPAGE) を用いて横濱 (1990) の方法¹⁵⁾ に従い以下のように行った。

ゲル調整は、ゲルが $240 \times 200 \times 1 \text{ mm}$ となるように作製し、12% 溶液、4% 溶液および 8% 溶液の順にゲル化させた。また、4% ゲルの中間に血清試料を浸した $3.5 \times 2 \text{ mm}$ の濾紙 (厚さ約 0.3 mm) を直線になるように密着させた。

泳動条件は、泳動中のゲルの温度を一定にするため循環冷却水利用型の電気泳動装置にセットして 30 mA 定電流で約 5 時間泳動した。

② Hb 型

Hb 型の検出は、YOKOHAMA (1991) の方法¹⁶⁾ のアンフォライトの分量を一部改変した等電点電気泳動法 (IEF) を用いて行った。

ゲル調整は、29.1% ポリアクリルアミド 2 ml, 0.9% N, N'-メチレンビス (ビス) 2 ml, 87% グリセリン 1.4 ml, 1% 過硫酸アンモニウム 0.3 ml, アンフォライトおよび蒸留水 30 ml を混合しよく溶かした。アンフォライトは、pH 6~8 (LKB) 0.75 ml および pH 7~9 (LKB) 2.25 ml を用いた。次いで減圧脱気をした後、ゲルが $160 \times 120 \times 0.4 \text{ mm}$ となる大きさのゲル枠に注ぎ重合を行った。

試料調整は、Hb サンプルを蒸留水で適当な濃度 (75%) に希釈し調整した。厚手濾紙 ($8 \times 160 \text{ mm}$: ADVANTEC No. 526) を電極として使用し、+極には 5% アンフォライト pH 4.0-6.0 (LKB) 液、-極には 4% NaOH 液を用いた。サンプルを陽極側から 1.5 cm の位置に濾紙片 ($3 \times 5 \text{ mm}$) に染み込ませてのせ、1,200 V, 4 W の泳動条件で約 4 時間、バンドのフォーカスが定まるまで行った。

③ 血球膜タンパク質 (Cell X) 型

Cell X 型の検出は、15% SDS (sodium dodecyl sulfate) ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) によって行った¹⁷⁾。

試料調整は、凍結した血球膜試料をミクロスパーテル 1/3 程度かき出し、1.5 ml エッペンチューブに移し、蒸留水 $620 \mu\text{l}$, 10% SDS 溶液 $100 \mu\text{l}$, 2-メルカプトエタノール $10 \mu\text{l}$, 0.4% SDS を含む 0.5 M Tris 緩衝液 (pH 6.8) $20 \mu\text{l}$ およびグリセリン $200 \mu\text{l}$ を加え、水浴で徐々に加熱し、 100°C で 5 分間沸騰させた後、1% ブロムフェノールブルー (BPB) 溶液を加えた後で用いた。

それぞれの試料溝に試料を $5 \mu\text{l}$ ずつ添加し、泳動条件は 15 mA の定電流で約 2 時間行った。

染色は 0.1% (W/V) コマシーブリリアントブルー R, 50% (V/V) メタノール, 7% (V/V) 酢酸を含む溶液で 30 分間行い、脱色は 20% (V/V) メタノール, 7% (V/V) 酢酸を含む溶液で行った。

④ 筋肉タンパク質 (Mu) 型

Mu 型の検出は、Cell X 型の検出と同様の方法を用いて行った。

試料調整は、 -20°C で凍結保存してあった筋肉組織サン

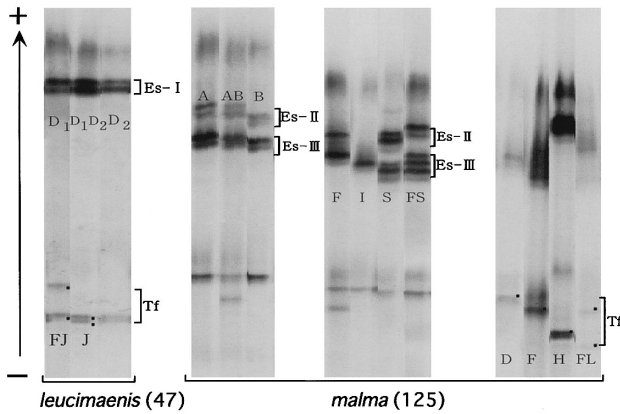


Fig. 1 Electrophoretic patterns and nomenclature of serum transferrin (Tf) type and serum esterase (Es) type in charr fish, genus *Salvelinus* (by H-PAGE method)

Remarks ; Tf type was composed of five bands (D, F, H, J and L). Es types were classified into 3 loci (*Es-I*, *Es-II* and *Es-III*). Number in the brackets is examined specimens in all collections. Each set of band patterns was representative of each locus.

プル 0.2 g を、眼科用ハサミで時計皿上生理食塩水 100 μ l 中でペースト状に細切し、ポッター型マイクロホモジェナイザーに流し込み生理食塩水を 1 ml 加え、ホモジェナイズした。その後試料を 1.5 ml エッペンチューブに移し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清 50 μ l を別のエッペンチューブに移し、蒸留水 620 μ l, 10% SDS 溶液 100 μ l, 2-メルカプトエタノール 10 μ l, 0.4% SDS を含む 0.5 M Tris 緩衝液 (pH 6.8) 20 μ l およびグリセリン 200 μ l を加え、水浴で徐々に加熱し、100°C で 5 分間沸騰させた後、1% ブロムフェノールブルー (BPB) 溶液を加えた後で用いた。

それぞれの試料溝に試料を 10 μ l ずつ添加し、泳動条件は 15 mA の定電流で約 2 時間行った。染色は、血球膜タンパク質型の検出に用いた方法と同様に行った。

結果および考察

1. 血清 Tf 型および血清 Es 型の検索

リバノール沈殿法および塩析法によって Tf 成分を分離し、H-PAGE 法によってバンドが確認された領域を Tf 領域とし、移動の早いものから順に Tf 型の基本バンドを D, F, H, J および L バンドと命名した。また、バンドが確認されなかったものは不顕性として (-) と命名した (図 1, 2)。

Tf 型では、4 種類の魚種のうちオシヨロコマが最も変異性が高く、5 つの基本バンドのうち J バンドを除く 4 つ (D, F, H および L) が検出され、また不顕性タイプ (-) も認められた。検出された表現型のうち F 型が 0.712 で最も高い出現頻度を示し、次いで FH 型が 0.120 であった (表 1)。また知床地区で検出された FL 型および HL 型や十勝地区で検出された不顕性型など地域に特徴的な表現型

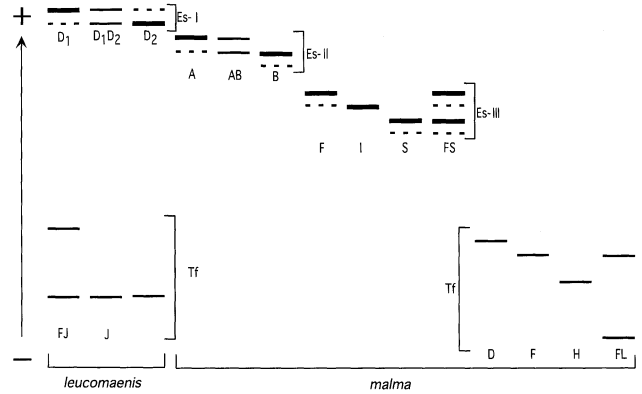


Fig. 2 Schematic electrophoretic patterns of serum transferrin (Tf) type and serum Esterase (Es) type in charr fish, genus *Salvelinus* (by H-PAGE method)

Remarks ; Tf type was composed of five bands (D, F, H, J and L). Es types were classified into 3 loci (*Es-I*, *Es-II* and *Es-III*). Each set of band patterns was basic and representative of bands in each locus.

が検出された (表 2)。

アメマス、エゾイワナおよびニッコウイワナ (アメマス類) では、ほとんど多型が検出されず J 型に偏り、それぞれの出現頻度は 1.000, 0.917 および 1.000 であった (表 1)。したがって、オシヨロコマとアメマス類の間において、明確な差異が Tf 型に認められた。

Es 型は α -ナフチルアセテートに基質特異性を示し発色した領域を Es 成分として 3 つの領域に分けた。それぞれの領域の基本バンドは、Es-I 領域では D₁, D₂ および不顕性タイプ (-) が、Es-II 領域では A, B および不顕性のタイプ (-) が、Es-III 領域では F, I, S および不顕性タイプ (-) が確認された (図 1, 2)。

Es-I 領域では、オシヨロコマにおいて全て不顕性タイプ (-) であった。

一方、アメマス類においては 2 つの基本バンド (D₁ および D₂) が検出され、アメマスでは D₁D₂ 型が 0.655 で最も出現頻度が高く、エゾイワナおよびニッコウイワナでは D₂ 型が最も出現頻度が高くそれぞれ 0.667 および 0.500 であった。したがって、この Es-I 領域ではアメマス類に変異が多く認められた (表 3)。また、網走地区で検出された D₁D₂ 型の出現頻度は他の地区と比べ著しく高く、地域的な変異であると考えられる出現頻度の差異が検出された (表 4)。

Es-II 領域では、オシヨロコマにおいて 2 つの基本バンド (A および B) が検出され、不顕性タイプ (-) も認められた。検出された表現型のうち (-) 型が 0.544 と出現頻度が最も高く、次いで A 型が 0.336 であった (表 5)。また、上川地区で採取されたオシヨロコマは (-) 型の出現頻度が他の地区と比べ著しく低く、地域的な変異であると考えられた (表 6)。

一方、アメマス類には変異は認められず、Es-I 領域と

Table 1 Appearance frequency of transferrin (Tf) types

Species	Tf									
	D	F	FH	FL	H	HL	J	FJ	-	
<i>S. malma</i> (125)	0.016 (2)	0.712 (89)	0.120 (15)	0.032 (4)	0.088 (11)	0.008 (1)	0	0	0.024 (3)	
<i>S. leucomaenis</i> :sea-run type (29)	0	0	0	0	0	0	1.000 (29)	0	0	
<i>S. leucomaenis</i> :stream-resident type (12)	0	0	0	0	0	0	0.917 (11)	0.083 (1)	0	
<i>S. leucomaenis</i> f. <i>pluvius</i> (6)	0	0	0	0	0	0	1.000 (6)	0	0	
Average(172)	0.012 (2)	0.529 (91)	0.076 (13)	0.023 (4)	0.064 (11)	0.006 (1)	0.267 (46)	0.006 (1)	0.017 (3)	

() : Number of specimens examined in all collections.

Table 2 Appearance frequency of transferrin (Tf) types among places of catch in Hokkaido (*Salvelinus malma*)

Place of catch	Tf									
	D	F	FH	FL	H	HL	J	FJ	-	
Siretoko (57)	0.018 (1)	0.771 (44)	0.123 (7)	0.070 (4)	0	0.018 (1)	0	0	0	
Abashiri (20)	0	0.950 (19)	0.050 (1)	0	0	0	0	0	0	
Nemuro (15)	0.067 (1)	0.200 (3)	0.267 (4)	0	0.466 (7)	0	0	0	0	
Tokachi (19)	0	0.473 (9)	0.158 (3)	0	0.211 (4)	0	0	0	0.158 (3)	
Kamikawa (14)	0	1.000 (14)	0	0	0	0	0	0	0	
Average(125)	0.016 (2)	0.712 (89)	0.120 (15)	0.032 (4)	0.088 (11)	0.008 (1)	0	0	0.024 (3)	

() : Number of specimens examined in all collections.

Table 3 Appearance frequency of esterase (Es) types

Species	Es-I			
	D ₁	D ₁ D ₂	D ₂	-
<i>S. malma</i> (125)	0	0	0	1.000 (125)
<i>S. leucomaenis</i> :sea-run type (29)	0.104 (3)	0.655 (19)	0.241 (7)	0
<i>S. leucomaenis</i> :stream-resident type (12)	0.083 (1)	0.250 (3)	0.667 (8)	0
<i>S. leucomaenis</i> f. <i>pluvius</i> (6)	0.167 (1)	0.333 (2)	0.500 (3)	0
Average(172)	0.029 (5)	0.140 (24)	0.105 (18)	0.726 (125)

(): Number of specimens examined in all collections.

Table 4 Appearance frequency of esterase-I (Es-I) types among places of catch in Hokkaido (*Salvelinus leucomaenis*)

Place of catch	Es-I			
	D ₁	D ₁ D ₂	D ₂	-
Rishiri・Rebun islands (22)	0.090 (2)	0.455 (10)	0.455 (10)	0
Abashiri (12)	0.167 (2)	0.750 (9)	0.083 (1)	0
Nemuro (7)	0	0.571 (4)	0.429 (3)	0
Aomori (6) ※	0.167 (1)	0.333 (2)	0.500 (3)	0
Average(47)	0.106 (5)	0.532 (25)	0.362 (17)	0

(): Number of specimens examined in all collections. ※Aomori prefecture.

Table 5 Appearance frequency of esterase-II (Es-II) types

Species	Es-II			
	A	AB	B	-
<i>S. malma</i> (125)	0.336 (42)	0.040 (5)	0.080 (10)	0.544 (68)
<i>S. leucomaenis</i> :sea-run type (29)	0	0	0	1.000 (29)
<i>S. leucomaenis</i> :stream-resident type (12)	0	0	0	1.000 (12)
<i>S. leucomaenis</i> f. <i>pluvius</i> (6)	0	0	0	1.000 (6)
Average(172)	0.244 (42)	0.029 (5)	0.058 (10)	0.669 (115)

(): Number of specimens examined in all collections.

Table 6 Appearance frequency of esterase-II (Es-II) types among places of catch in Hokkaido (*Salvelinus malma*)

Place of catch	Es-II			
	A	AB	B	-
Siretoko (57)	0.438 (25)	0.035 (2)	0.018 (1)	0.509 (29)
Abashiri (20)	0.050 (1)	0.100 (2)	0.150 (3)	0.700 (14)
Nemuro (15)	0.333 (5)	0	0	0.667 (10)
Tokachi (19)	0.105 (2)	0	0.158 (3)	0.737 (14)
Kamikawa (14)	0.643 (9)	0.071 (1)	0.214 (3)	0.072 (1)
Average(125)	0.336 (42)	0.040 (5)	0.080 (10)	0.544 (68)

(): Number of specimens examined in all collections.

は逆に全て不顕性タイプ (-) であった (表5)。このことから Es-I 領域および Es-II 領域はオシヨロコマとアメマス類を分ける座位で、相互に別々の遺伝情報によって支配されているものと考えられた。

Es-III 領域では、オシヨロコマにおいて3つの基本バンド F, I および S が検出され、また不顕性タイプ (-) も検出された。検出された表現型のうち IS 型および I 型の出現頻度が高くそれぞれ 0.4 および 0.272 であった (表7)。また、オシヨロコマにおいて Es-III 領域は IS 型の出現頻度が最も高く次いで I 型であるが、網走地区では S 型の出現頻度が最も高く、また根室地区では他の地区と比べて F 型の出現頻度が高いというような地域の変異が確認された (表8)。

アメマス類において殆どバンドは確認されず不顕性タイ

プ (-) であった。また、その出現頻度はそれぞれ 1.000, 0.917 および 1.000 であった (表7)。この領域には、エゾイワナの1個体にオシヨロコマに特徴的な FS 型が検出されていることから、両種間では同一の遺伝子情報に支配されていると考えられた。

2. Hb 型の検索

Hb 型においては、IEF 法によってフォーカスの定まったバンドから I および II 領域に分けることができた。それぞれの領域の基本バンドは、Hb-I 領域では、移動の早いものから順に A および B バンドとし、Hb-II 領域では、試料全体の位置から陰極に移動したもので移動の早いものから順に F および S バンドとした (図3)。

Hb-I 領域では、オシヨロコマにおいて2つの基本バン

Table 7 Appearance frequency of esterase-III (Es-III) types

Species	Es-III							-
	F	FI	I	IS	S	FS		
<i>S. malma</i> (125)	0.096 (12)	0.048 (6)	0.272 (34)	0.400 (50)	0.088 (11)	0.064 (8)	0.032 (4)	
<i>S. leucomaenis</i> : sea-run type (29)	0	0	0	0	0	0	1.000 (29)	
<i>S. leucomaenis</i> : stream-resident type (12)	0	0	0	0	0	0.083 (1)	0.917 (11)	
<i>S. leucomaenis</i> f. <i>pluvius</i> (6)	0	0	0	0	0	0	1.000 (6)	
Average(172)	0.070 (12)	0.034 (6)	0.198 (34)	0.291 (50)	0.064 (11)	0.052 (9)	0.291 (50)	

() : Number of specimens examined in all collections.

Table 8 Appearance frequency of esterase-III (Es-III) types among places of catch in Hokkaido (*Salvelinus malma*)

Place of catch	Es-III							-
	F	FS	FI	I	IS	S		
Shretoko (57)	0.053 (3)	0.105 (6)	0.018 (1)	0.351 (20)	0.420 (24)	0	0.053 (3)	
Abashiri (20)	0.100 (2)	0	0.150 (3)	0.100 (2)	0.150 (3)	0.500 (10)	0	
Nemuro (15)	0.400 (6)	0	0	0.067 (1)	0.533 (8)	0	0	
Tokachi (19)	0.053 (1)	0	0.105 (2)	0.368 (7)	0.474 (9)	0	0	
Kamikawa (14)	0	0.143 (2)	0	0.286 (4)	0.429 (6)	0.071 (1)	0.071 (1)	
Average(125)	0.096 (12)	0.064 (8)	0.048 (6)	0.272 (34)	0.400 (50)	0.088 (11)	0.032 (4)	

() : Number of specimens examined in all collections.

ド (A および B) が検出され、検出された表現型のうち AB 型および B 型の出現頻度はそれぞれ 0.293 および 0.707 であった (表 9)。また、上川地区は他の地域と異なり B 型のみが検出され、地域の変異と考えられた (表 10)。アメマス類において殆どが基本バンド A が検出され、3 つの魚種の表現型 A 型の出現頻度はそれぞれ 1.000, 0.952 および 1.000 であった (表 9)。

Hb-II 領域では、イワナ属魚類 (オシヨロコマ, アメマス, エゾイワナおよびニッコウイワナ) の全ての種において基本バンド F が検出されたが、試料 No. 25 (網走川: アメマス) の 1 個体には基本バンド S が検出された。アメマスにおいては、検出された表現型の F 型および FS 型の出現頻度はそれぞれ 0.952 および 0.048 であった (表 9)。

IEF 法によって検出された Hb-I 領域および II 領域は、それぞれデン粉ゲル電気泳動 (SGE) 法¹⁸⁾ で検出された陽極側および陰極側のバンドに相当した。サケ・マス類における Hb 泳動像 (山口克巳: 1975) では、種内に明確に差異が検出されなかったが、IEF 法では Hb-I 領域に多型が検

出された。また Hb-II 領域には、ミヤベイワナ (鹿追町より譲渡) に多型が検出されている (未発表)。すなわち、SGE 法による分類では泳動バンドパターンを用いたものであったが、本報告では等電点特性の質的変異により多型を検出することができた。

3. Cell X 型の検索

Cell X 型においては、SDS-PAGE 法で確認されたバンドのうち分子質量 17,201 Da 付近の Hb 成分以外のバンドを Cell X 領域とし、基本バンドを移動の早いものから順に A および B バンドとした (図 4)。

Cell X 型では、オシヨロコマ, アメマスおよびニッコウイワナにおいて 2 つの基本バンド (A および B) が検出されたが、エゾイワナにおいて B バンドのみが検出された。また、本研究で行ったイワナ属魚類のオシヨロコマ, アメマス, エゾイワナおよびニッコウイワナの全ての種において表現型 B 型の出現頻度が高く、それぞれ 0.848, 0.892, 1.000 および 0.667 であった (表 11)。

Cell X 型では、オシヨロコマとアメマス類の表現型の出現頻度が類似し、血清 Tf 型および Es 型とは異なっていた。しかし、知床地区のオシヨロコマや網走地区のアメマス類には他の地域で検出されていない A バンドが検出されるという地域的差異が認められた (表 12, 13)。

4. 筋肉タンパク質型の検索

筋肉タンパク質型 (Mu) 型においては、分子質量 42,400 kDa と 66,267 kDa の間の領域に多型が検出され、その領域で移動の早い順に Mu 型の基本バンドを A および B バンドと命名した (図 4)。

Mu 型では、オシヨロコマにおいて 2 つの基本バンド (A および B バンド) のうち A バンドのみが検出され、A 型の出現頻度は 1.000 であった。アメマス類では主に B バンドが検出され、B 型の出現頻度はそれぞれ 1.000, 0.952 および 1.000 であった (表 14)。

また、Mu 型の表現型から、オシヨロコマとアメマス類

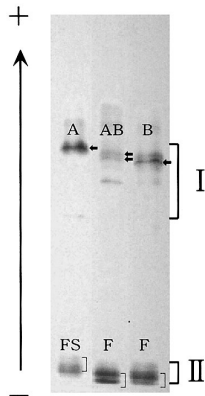


Fig. 3 Electrophoretic patterns of Hemoglobin (Hb) type in charr fish, genus *Salvelinus* (by IEF)
Remarks ; Hb-I type was classified into 3 types (A, AB and B). Hb-II type was composed of 2 banes (F and S).

Table 9 Apperance frequency of hemoglobin (Hb) types

Species	Hb- I			Hb- II		
	A	AB	B	F	FS	S
<i>S. malma</i> (150)	0	0.293 (44)	0.707 (106)	1.000 (150)	0	0
<i>S. leucomaenis</i> :sea-run type (21)	1.000 (21)	0	0	0.952 (20)	0.048 (1)	0
<i>S. leucomaenis</i> :stream-resident type (21)	0.952 (20)	0	0.048 (1)	1.000 (21)	0	0
<i>S. leucomaenis</i> f. <i>pluvius</i> (6)	1.000 (6)	0	0	1.000 (6)	0	0
Average(198)	0.238 (47)	0.222 (44)	0.540 (107)	0.995 (197)	0.005 (1)	0

(): Number of specimens examined in all collections.

Table 10 Apperance frequency of hemoglobin (Hb) types among places of catch in Hokkaido (*Salvelinus malma*)

Place of catch	Hb- I			Hb- II		
	A	AB	B	F	FS	S
Siretoko (74)	0	0.365 (27)	0.635 (47)	1.000 (74)	0	0
Abashiri (28)	0	0.250 (7)	0.750 (21)	1.000 (28)	0	0
Nemuro (15)	0	0.533 (8)	0.467 (7)	1.000 (15)	0	0
Tokachi (19)	0	0.105 (2)	0.895 (17)	1.000 (19)	0	0
Kamikawa (14)	0	0	1.000 (14)	1.000 (14)	0	0
Average (150)	0	0.293 (44)	0.707 (106)	1.000 (150)	0	0

(): Number of specimens examined in all collections.

において種を明確に区別できることが明らかとなった。この2種間の雑種タイプのAB型が検出されていることから、両種間では同一の遺伝子情報に支配されていると考え

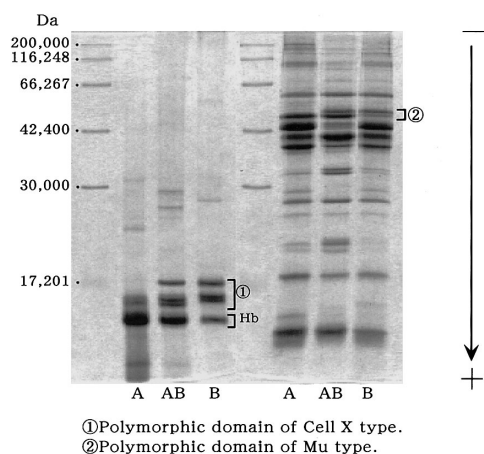


Fig. 4 Electrophoretic patterns of blood cell membrane protein (Cell X) type and muscular protein (Mu) type in charr fish, genus *Salvelinus* (by 15% SDS-PAGE)

Remarks ; Mu type was classified into 3 types (A, AB and B). Cell X type was classified into 3 types (A, AB and B).

られた。

以上のことから、Tf型、Es型（I、IIおよびIII領域）、Hb-I領域およびMu型においてオシヨロコマとアメマス類の2グループに分けることができる差異が検出され、アイソザイムやmt-DNAなど同様に種間や種内の差異を明らかにできるような座位の検出法が確立できた。

5. オシヨロコマとアメマスの交雑個体の確認

丸瀬布町武利川で採取されたエゾイワナの1個体は、斑紋および形態については完全にエゾイワナタイプであったが、Tf型においてオシヨロコマ（表現型F型）とアメマス類（表現型J型）のヘテロ型のFJ型が検出され、Es-III領域はオシヨロコマのみに特徴的な領域であるにもかかわらず、FS型バンドが検出され、Hb-I領域ではオシヨロコマに特徴的なB型が検出され、Mu型においては、オシヨロコマ（表現型A型）とアメマス類（表現型B型）のヘテロ型のAB型であった。また、この個体がオシヨロコマとエゾイワナの混棲ポイントで採取されたことからオシヨロコマとエゾイワナの交雑した個体と考えられた。またこのような個体は、アメマスタイプの個体でも検出されている（未発表）。

Table 11 Apperance frequency of blood cell protein (Cell X) types

Species	Cell X		
	A	AB	B
<i>S. malma</i> (145)	0.055 (8)	0.097 (14)	0.848 (123)
<i>S. leucomaenis</i> :sea-run type (37)	0.054 (2)	0.054 (2)	0.892 (33)
<i>S. leucomaenis</i> :stream-resident type (21)	0	0	1.000 (21)
<i>S. leucomaenis</i> f. <i>pluvius</i> (6)	0	0.333 (2)	0.667 (4)
Average(209)	0.048 (10)	0.086 (18)	0.866 (181)

(): Number of specimens examined in all collections.

Table 12 Apperance frequency of blood cell protein (Cell X) types among places of catch in Hokkaido (*Salvelinus malma*)

Place of catch	Cell X		
	A	AB	B
Siretoko (69)	0.116 (8)	0.145 (10)	0.739 (51)
Abashiri (28)	0	0.107 (3)	0.893 (25)
Nemuro (15)	0	0	1.000 (15)
Tokachi (19)	0	0	1.000 (19)
Kamikawa (14)	0	0.071 (1)	0.929 (13)
Average (145)	0.055 (8)	0.097 (14)	0.848 (123)

(): Number of specimens examined in all collections.

Table 13 Apperance frequency of blood cell protein (Cell X) types among places of catch in Hokkaido (*Salvelinus leucomaenis*)

Place of catch	Cell X		
	A	AB	B
Rishiri · Rebun islands (22)	0	0	1.000 (22)
Abashiri (27)	0.074 (2)	0.074 (2)	0.852 (23)
Nemuro (7)	0	0	1.000 (7)
Aomori (6) ※	0	0.033 (2)	0.667 (4)
Average (62)	0.032 (2)	0.065 (4)	0.903 (56)

(): Number of specimens examined in all collections. ※Aomori prefecture.

Table 14 Appearance frequency of muscular protein (Mu) types

Species	Mu		
	A	AB	B
<i>S. malma</i> (145)	1.000 (145)	0	0
<i>S. leucomaenis</i> :sea-run type (37)	0	0	1.000 (37)
<i>S. leucomaenis</i> :stream-resident type (21)	0	0.048 (1)	0.952 (20)
<i>S. leucomaenis</i> f. <i>pluvius</i> (6)	0	0	1.000 (6)
Average(209)	0.694 (145)	0.005 (1)	0.301 (63)

(): Number of specimens examined in all collections.

文献

- 1) 稲村彰郎・中村守純, 1962. 日本産イワナ属魚類の分布と変異. 資源研彙報, 58-59, 65-78.
- 2) 前川光司, 1977. 然別湖産イワナの変異性に関する研究, III. オシロコマ *Salvelinus malma* の地理的変異と然別湖産イワナの形態的特徴. 魚類学雑誌, 24, 49-56.
- 3) 鷹見達也・木下哲一郎, 1990. 北海道支笏湖及び茂辺地川産アメモスの形態比較. 北大水産彙報, 41 (3), 121-130.
- 4) 前川光司, 1973. 知床地方で採集した降海期の銀毛オシロコマについて. 魚類学雑誌, 20, 245-247.
- 5) 吉安克彦, 1996. イワナ草紙. 朔風社, 東京, 5-26.
- 6) 今西錦司, 1996. イワナとヤマメ. 平凡社, 東京, 49-130, 153-192.
- 7) 川那部浩哉, 1989. 日本の淡水魚. 山と溪谷社, 東京, 100-130.
- 8) GOTO, A., TAKAHASHI, M. and YAMAZAKI, F., 1989. White-spotted and red-spotted morphs as a phenotypic variation of the Japanese Char *Salvelinus leucomaenis* in the river of southern Hokkaido, Japan. *Physiol. Ecol. Jap.*, 1, 421-428.
- 9) MITSUBOSI, T., GOTO, A. and YAMAZAKI, F., 1992. Genetic differentiation of the Dolly Varden *Salvelinus malma* in Hokkaido, Japan. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 43(4), 153-161.
- 10) NAKAJIMA, M. and FUJIO, Y., 1995. Genetic Differentiation among Local Populations of Japanese Char *Salvelinus leucomaenis*. *Fisheries Science*, 61(1), 11-15.
- 11) 後藤裕康・前田泰宏・木島明博, 1998. アイソザイムからみた大井川源流域におけるイワナ 2 河川集団の遺伝的差異. 水産育種, 26, 41-48.
- 12) McVEIGH, H.P. and DAVIDSON, W.S., 1991. A salmonid phylogeny inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Journal of Fish Biology*, 39, (Supplement A), 227-282.
- 13) WILLIAM, J. Berg and FERRIS, S.D., 1984. Restriction Endonuclease Analysis of Salmonid Mitochondrial DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41, 1041-1047.
- 14) 菊地美保・池田 実・藤尾芳久, 1997. アイソザイムおよび RAPD 分析によるイワナ集団の遺伝的変異性と遺伝的分化. 水産育種, 25, 27-36.
- 15) 横濱道成, 1990. ウマ血清タンパク質・酵素型 (5 座位) 同時検出用水平式ポリアクリルアミドグラジェントゲル電気泳動法. 家畜生化研報, 25, 1-9.
- 16) YOKOHAMA, M., 1991. An additional classification for equine Hb- α type. *Japanese Journal of Electrophoresis*, 35 (1), 39-43.
- 17) 芝紀代子ら, 1991. MEDICAL TECHNOLOGY 別冊 電気泳動法のすべて. 医歯薬出版, 東京, 23-34.
- 18) YOSHIYASU, K. and HUMOTO, Y., 1972. Starch-gel Electrophoresis of Freshwater Salmonid Fishes in Southwest Japan-I. Genus *Salvelinus* (Char). *Bulletin of the Society of Scientific Fisheries*, 38(7), 779-788.
- 19) 山口克巳, 1975. ヘモグロビンの泳動像からみたサケ・マス類の分類. 恒星社厚生閣, 東京.

Detection of Protein Polymorphism of Charr Fishes in the Genus *Salvelinus*.

By

Kouta ISHII*, Ryusuke IMAEDA**, Kenta WADA** and Michinari YOKOHAMA**

(Received February 13, 2001/Accepted June 14, 2001)

Summary : The classification of *Salvelinus* in Japan has been controversial and has not been established. According to one theory, *Salvelinus* is classified into two species (*S. malma* and *S. leucomaenis*) and 1 subspecies (*S. leucomaenis imbrius*). According to another theory, *S. malma* is classified into two subspecies (*S. malma malma* and *S.m. miyabei*), and *S. leucomaenis*, together with *Salvelinus l. f. pluvius*, *S.l. f. japonica*, and *S.l. f. imbrius*. There is no established classification of *Salvelinus* according to morphological characteristics in Japan.

To develop new biochemical markers in addition to isozymes and mt-DNA and genomic DNA polymorphism, the detection methods of which have already been established, we examined polymorphic loci of blood proteins and muscular proteins using *Salvelinus* caught in Hokkaido.

1) Examination of blood protein types

In *Salvelinus*, the serum transferrin (Tf) type, serum esterase (Es) type, hemoglobin (Hb) type, and blood cell membrane protein (Cell X) type were examined. Concerning the Tf type [basic bands ; D, F, H, L ; inapparent type (-)], the F type among 9 phenotypes was a characteristic phenotype in *S. malma* (incidence, 0.712) while the J type was a characteristic phenotype in *S. leucomaenis* (incidence, 0.917). Among the 3 domains of the Es type, the Es-II domain [basic bands ; A, B ; inapparent type (-)] and the Es-III domain [basic bands ; F, I, S ; inapparent type (-)] were characteristic of *S. leucomaenis*. Concerning the Hb type, there were two domains (I and II), and polymorphism was observed in the I domain (basic bands ; A and B). The incidence of A was high in *S. leucomaenis*, and that of B incidence was high in *S. malma*. The Cell X type (basic bands ; A and B) did not differ among the species but could be classified into 3 phenotypes. The appearance frequencies among local populations differed in *S. malma*, Tf type, Es type (II and III domain), Hb-I type and Cell X type, and in *S. leucomaenis*, Es-I domain.

2) Examination of the muscular protein (Mu) type

In *Salvelinus*, concerning the Mu type (basic bands A and B), the incidence of the A type was high in *S. malma*, and that of the B type was high in *S. leucomaenis*.

Thus, there were differences according to the Tf type, Es type (I, II and III domains), Hb-I domain, and the Mu type that allow classification into two groups (*S. malma* and *S. leucomaenis*). The same as for isozymes and mt-DNA, a locus detection method that can clarify inter- and intra-species difference was established.

3) Confirmation of inter-species hybrids

In a *S. leucomaenis* individual collected in Murii River, Tf and Mu phenotypes that appear to be heterotypes of *S. malma* and *S. leucomaenis* were detected. This individual was *S. leucomaenis* by appearance, showing no characteristics of *S. malma*, and therefore, may have resulted from crossing between *S. malma* and *S. leucomaenis*.

Key Words : charr fish, protein polymorphism loci, classification, biochemical markers, local variation

* Graduate School of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture

** Laboratory of Animal Resources, Department of Bioproduction, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture