福井大学リポジトリ
UNIVERSITY OF FUKUI
REPOSITORY

Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis(2D-DIGE) of lens crystallin-proteins of striped bitterling (Acheilognathus cyanostigma)

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2015-05-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 川内, 一憲, 川崎, 隆徳, 田中, 幸枝, 小鍛, 冶優, 木元, 久, 藤井, 豊 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/8808

福井大学地域環境研究教育センター研究紀要
「日本海地域の自然と環境」
No.21, 7-11, 2014

イチモンジタナゴ(*Acheilognathus cyanostigma*)の水晶体クリスタリン・タンパク質蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動※

2 Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis(2D–DIGE) of lens crystallin–proteins of striped bitterling(*Acheilognathus cyanostigma*)

川内　一憲*
（福井県両生爬虫類研究会）
川崎　隆徳**
（ヘラクレスワールド）
田中　幸枝***
（福井大学医学部分子生命化学）
小鍛冶　優****
（永平寺町立吉野小学校）
木元　　久*****
（福井県立大学生物資源学部微生物機能学）
藤井　　豊***コレスポンディングオーサー
（福井大学医学部分子生命化学）

１．まえがき

環境省絶滅危惧ⅠA（CR）イチモンジタナゴの自然分布は，琵琶湖，三方湖，由良川，紀ノ川および濃尾平野である。近年，生息環境の悪化に伴い急速に生息数を減らしている(1)。三方湖では，専門機関によるミトコンドリアシトクロムｂの遺伝子解析により琵琶湖グループに属していることが判明したため，三方湖固有種であるとは断言できていない(2)。

（キーワード：イチモンジタナゴ，三方湖，クリスタリン，水晶体）

* Kazunori Kawauchi
(Fukui Amphibians Reptiles Society, Misunoo 7-17, Awara, Fukui 919-0747)
** Takanori Kawasaki
(Heracles World Co., Takagi-chuo 1-506, fukui-city, Fukui 910-0804)
*** Yukie Tanaka, Yutaka Fujii(Corresponding Author)
(Department of Molecular Biology and Chemistry, Faculty of Medicine, University of Fukui, Matsuoka Shimoaizuki 23-3, Eiheiji-cho, Yoshida-gun, Fukui 910-1193)
**** Masaru Kokaji
(Yoshino Elementary School, Yoshino 26-3, Eiheiji-cho, Yoshida-gun, Fukui 910-1121)
***** Hisashi Kimoto
(Department of Bioscience, Faculty of Biotechnology, Fukui Prefectural University, Matsuoka kenjojima 4-1-1, Eiheiji-cho, Yoshida-gun, Fukui 910-1195)

※この研究は，福井大学・地域環境研究教育センター・平成 26 年度研究支援経費，福井大学・H25 年度 COC 事業，科研費（26505002, 26924016）および住友財団研究助成(123340)の助成を受けて実施した。

過去に琵琶湖産稚アユの放流に交じって全国の河川に流入したとされるので[1,3]，福井市自然史博物館所蔵の五十嵐氏三方湖産標本からのDNA鑑定を試みたが，標本からのDNAの回収ができずここでも結論がでていない。ただし，過去に三方湖にアユの放流があったかどうかは不明である。そこで，三方湖産固有の形質を検索する目的で，生涯ターンオーバーされることのない眼の水晶体タンパク質クリスタリン[4,5]の発現パターンを解析したのでその結果を報告すると共に，今後を展望する。

２．実験材料と方法

イチモンジタナゴは，琵琶湖産の移入種である熊本県緑川産♂個体(全長 64.0 mm，体重 2.05g，水晶体 2 個分 5.4 mg：**写真 1**)と同産♀個体(全長 73.6 mm，体重 3.70g，水晶体 2 個分 7.4 mg：**写真 2**)および三方湖産♀個体(全長 55.0 mm，体重 1.94g，水晶体 2 個分 2.8 mg：**写真３**）を用いた。摘出した水晶体 1 個を，40 μL の 7M urea，2M thiourea，4%CHAPS，1%TritonX-100 (buffer A)でホモジナイズしてクリスタリンを可溶化し，タンパク質濃度が 2 μg/μL となるよう buffer A で希釈した。タンパク質濃度は，Pierce® 660nm Protein Assay Kit を用いて定量した。3 つのサンプルは，Ettan DIGE 専用蛍光試薬（GE 社製）を用いて，それぞれ Cy2（青），Cy3（緑）および Cy5（赤）で蛍光ラベルし等量ずつ混合した。その後，1 次元目に Immobiline DryStrip pH 4-7 を用いて等電点電気泳動し，2 次元目にドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）(5-20%) を行った。泳動後のゲルを蛍光イメージスキャナーTyphoon（GE 社製）で蛍光検出した。

写真 1　熊本県緑川産♂個体(Cy2)

写真 2　熊本県緑川産♀個体(Cy3)

写真 3 三方湖産♀個体(Cy5)

３．結果

2D-DIGE の蛍光イメージングは，高感度（**図 1**）と低感度（**図 2**）で画像化した。3 色の蛍光が同程度に重なると白くイメージングされる。即ち，3 個体に共通し同程度に発現しているクリスタリン・タンパク質スポットは白色として認識される。一方，熊本産♂，熊本産♀および三方湖産♀個体に特有なクリスタリン・タンパク質は，それぞれ青，緑および赤色のスポットとして観察される。高感度イメージングでは，多数のスポット・領域が観察された。分子サイズで 33～17kDa の領域は白い領域が広がっている。感度を下げてみても，この領域には発現量の多いクリスタリン・タンパク質が検出された。この分子サイズは，脊椎動物に共通なクリスタリン（common crystallin：α-，β-，γ-クリスタリン）として知られている[4-9]。

高感度イメージングでは，特に熊本産♂に固有の青色のエリアが目立った。他の♀個体とは異なる特有のタンパク質が発現している。熊本産♀個体に特異性の比較的高い緑(G)スポットは，G1～G11 が認識できた（**図 1**，**表 1**)。一方，三方湖産♀個体に特異性の比較的高い赤(R)スポットは，R1～R12 が認識できた(**図 1**，**表 2**)。

低感度イメージングでは，熊本産♀個体に特異性の比較的高い緑(g)スポットは，g1～g6 が認識できた（**図 2**，**表 3**)。一方，三方湖産♀個体に特異性の比較的高い赤(r)スポットは，r1～r5 が認識できた(**図 2**，**表 4**)。

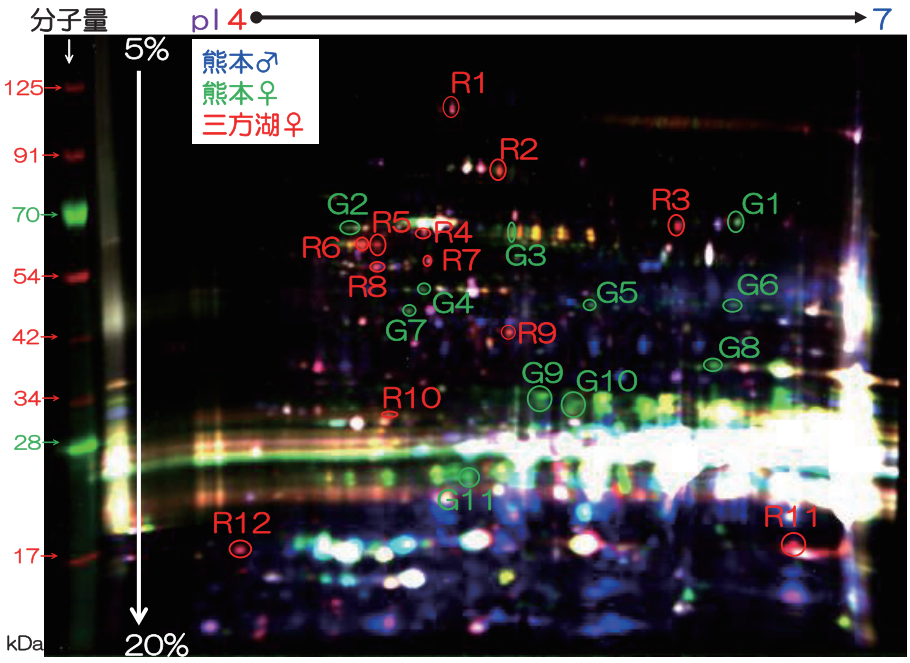

図 1　DIGE 高感度蛍光イメージング

青（熊本♂)、緑（熊本♀)、赤（三方♀)、青＋緑＝水色、緑＋赤＝黄、赤＋青＝紫、青＋緑＋赤＝白

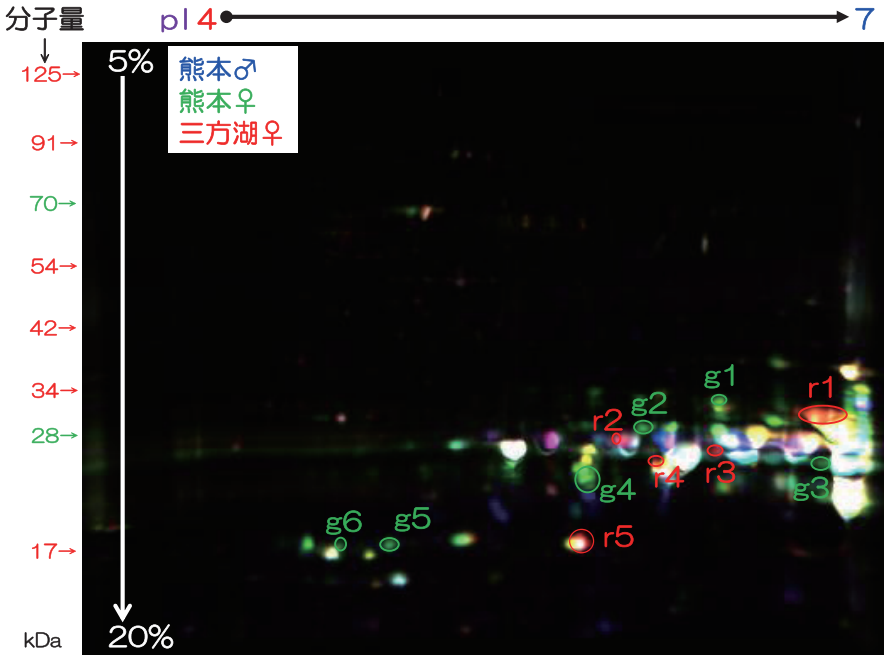

図 2 DIGE 低感度蛍光イメージング

表 1　高感度イメージングにおける熊本産♀特異的スポット

G No.	1	2	3	4	5	6	7	8
分子量：kDa	68	66	65	50	48	46	45	39
等電点 pI	6.3	4.6	5.3	4.9	5.7	6.3	4.8	6.2
G No.	9	10	11					
分子量：kDa	33	31	24					
等電点 pI	5.5	5.6	5.1					

表 2　高感度イメージングにおける三方湖産♀特異的スポット

R No.	1	2	3	4	5	6	7	8
分子量：kDa	115	88	69	66	60	60	56	55
等電点 pI	5.1	5.3	6.1	4.9	4.7	4.6	5.0	4.7
R No.	9	10	11	12				
分子量：kDa	42	31	18	17				
等電点 pI	5.3	4.8	6.6	4.2				

表 3　低感度イメージングにおける熊本産♀特異的スポット

g No.	1	2	3	4	5	6
分子量：kDa	33	29	25	23	18	18
等電点 pI	6.2	5.9	6.8	5.8	4.8	4.5

表 4　低感度イメージングにおける三方湖産♀特異的スポット

r No.	1	2	3	4	5
分子量：kDa	31	27	26	25	18
等電点 pI	6.9	5.8	6.2	6.0	5.7

４．考察

2D-DIGE 法では，同一ゲルで一度に 3 サンプルしか分析できない。目的とする三方湖産の中で最も大きな個体の♀のみを 1 サンプルめとした。残る 2 サンプルは，琵琶湖産（基準種）の国内移入種である熊本県緑川産の雌雄を用いた。高感度イメージングで熊本産♂特有のスポットが非常に多く観察されたことより，♀との発現タンパク質の種類および発現量に相当の相違があるものと考えられる。即ち，♂と♀の比較では，性差を見ることになる恐れがある。三方湖産の特有な形質の同定のため三方湖産♀を用いたので，♀同士の比較から検討するのが妥当である。そこで，三方湖産♀と熊本産♀の特有なタンパク質スポットを検出すると，それぞれ G1～G11 および R1～R12 が認められた。このうち，G1～G8 および R1～R9 までは，分子量が 33kDa を超えるサイズなので脊椎動物特異的な共通クリスタリンではない。おそらく通常のハウスキーピング酵素と思われる。これらのタンパク質がそれぞれの地域個体群の特異形質となる可能性は非常に高い。さらに，低感度イメージングでも共通クリスタリン領域にそれぞれに地域産に特有なスポット・領域が観察されたことより，遺伝子変異を伴う固有の形質の存在がうかがえる。これらのことから，三方湖産と熊本産（琵琶湖産）との間にそれぞれ固有の形質があるものと考えられる。しかし，統計的な処理による検定を行う必要があるため，検体数を増やしてさらなる検証に努めるこ

とが重要である。

５．要約

環境省絶滅危惧ⅠA（CR）イチモンジタナゴの自然分布は，琵琶湖，三方湖，由良川，紀ノ川および濃尾平野である。しかし，ミトコンドリアシトクロムｂの遺伝子解析では，三方湖固有種と断定できていない。そこで，三方湖固有の形質の検索のため，2D-DIGE 法を用いて水晶体構造タンパク質クリスタリンの分析を行った。その結果，熊本産（琵琶湖産）および三方湖産に固有の形質がそれぞれ観察された。

1) 福井県. 2002. 福井県の絶滅のおそれのある野生動物 2002, *福井県レッドデータブック (動物編)*. 97. 福井県.

2) Kitazima J., Matsuda M., Mori S., Kokita T. and Watanabe K., Population structure and cryptic replacement of local populations in the endangered bitterling *Acheilognathus cyanostigma*, *Ichthyol Res.*, DOI 10.1007/s10228-014-0412-0, 2014.

3) 大畑剛史・乾隆帝・中島淳・大浦晴彦・鬼倉徳雄，熊本県緑川水系におけるイチモンジタナゴ *Acheilognathus cyanostigma* の分布パターン，*魚類学会誌*, 59(1), p1-9, 2012.

4) 藤井豊，田中幸枝，木元久，川内一憲，アカメアマガエル水晶体クリスタリンの性質，*爬虫両棲類学会報*, 2010, 1, 68. 2010.

5) Y.Fujii, K.Watanabe, H.Hayashi, Y.Urade, S.Kuramitsu, H.Kagamiyama, O.Hayaishi, Purification and characterization of rho-crystallin from Japanese common bullfrog lens, *J Biol Chem.*, 265, 9914-23, 1990.

6) 藤井豊，カエル水晶体 ρ-クリスタリンの cDNA クローニングとタンパク質発現，*福井医科大学一般教育紀要*, 14, 28-37, 1994.

7) 藤井豊，籐博幸，中井昇,アルド･ケトレダクターゼスーパーファミリー,*生体の科学*,46,479-480, 1995.

8) 藤井豊，木元久，川内一憲，長谷川巌，トノサマガエル（*Rana nigromaculata*）とダルマガエル（*Rana porosa brevipoda*）水晶体に発現する構造タンパク質：クリスタリンの比較－γ27 による識別法－，Ciconia（福井県自然保護センター研究報告），11，39－43，2006.

9) Y.Fujii, H.Kimoto, H.Ishikawa, K.Watanabe, K.Yokota, N.Nakai, A.Taketo, Taxon-specific ζ-crystallin in Japanese Tree Frog (*Hyla Japonica*) Lens. J. Biol. Chem. 276, 28134-39, 2001.