

# Electrophoretic Patterns of Muscle Proteins of Ninespine Sticklebacks, *Pungitius pungitius* and *P. sinensis*, in Honshu, Japan

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/20485">http://hdl.handle.net/2297/20485</a>

# 本州産トミヨ属魚類の筋肉蛋白電気泳動像

平井賢一\*

## Electrophoretic Patterns of Muscle Proteins of Ninespine Sticklebacks, *Pungitius pungitius* and *P. sinensis*, in Honshu, Japan

Ken-ichi HIRAI\*

Muscle proteins of two species of ninespine sticklebacks, *Pungitius pungitius* and *P. sinensis*, collected from the waters of various localities in the northern part of Honshu were examined by the acrylamide-gel electrophoresis. The number of clear band observed in the electrophoregrams was twelve in both species. Four bands out of them were supposed to be controlled by two pairs of two codominant alleles, and were classified into two patterns termed Sp-1 and Sp-2. Although the distinct phenotypic polymorphisms were recognized in the muscle protein patterns, no species specificity was found for the patterns of materials among the local populations examined here. Interspecific differentiation in a couple of bands of electrophoretic patterns was observed for some coexisting populations of the two species of fishes, which morphological characters were different from each other. On the other hand, significant differences in the electropherograms and or the allele frequencies could not be observed between two sympatric species, which morphological characters, except lateral plate row morph, had little differences. The present studies would suggest the possibility that interbreeding occurs in some sympatric populations.

### はじめに

日本列島に生息するトミヨ属魚類の類縁関係を解明しようとする試みは、池田(1933, 1950)の先駆的な研究以来、多くの地域の魚についてさまざまな観点から行われてきた(小林, 1957; 五十嵐, 1962, 1963, 1969; 石城, 1967; ほか)。それらの多くは、外部形態の変異に注目したもので、その比較という方法が用いられている。そして、積極的、消極的を問わずイバラトミヨ(*P. pungitius*)とトミヨ(*P. sinensis*)は互いに異なる種であるという考えを支持したものとなっている。

一方、混生地のイバラトミヨとトミヨの形態についても、いくつかの興味ある現象が見つかっている。それは、トゲウオ科魚類の分類の基本形質とされる鱗板以外の形質に、2種の間でほとんど差の見られない場合(平井, 1984; 高田ほか, 1984)と多くの形質に差がある場合(田中, 1982)の、2つの異なった同所的個体群が存在することである。また、中間型と思える形質を示す個体の出現する場合も多く報告されている(池田, 1933; 小林, 1957; 田中, 1982; 平井, 1984)。これらの事実は、鱗板の配列状態が異なれば即別の種であるといえる程、類縁関

昭和62年9月16日受理

\* 金沢大学教育学部生物学教室

Biological Institute, Faculty of Education, Kanazawa University

係が単純なものでないことを示しているように思われる。

伝統的な形態の比較と並行して、トゲウオ類でもアイソザイムや筋肉蛋白などの電気泳動による遺伝学的な解析が行われている (Hagen, 1967; Muramoto and Igarashi, 1969; Narita, 1970; Hudon and Guderley, 1984; Withler and McPhail, 1984)。そして、近縁種の確認や識別、類縁関係の解明に手がかりを与えている。最近では特にアイソザイムによる遺伝学的な解明が進んでいるが、類縁関係の解析に筋肉蛋白の電気泳動像のパターンも一定の役割を果たしてきた。筋肉蛋白像のパターンに見られる特徴は、その種に特有な遺伝的性格を持ち、種の判別指

標として有効といわれている (谷口, 1974; Taniguchi, 1977)。そこで、鱗板を主とする形態的特徴によって分類されている 2 種について、筋肉蛋白の電気泳動像という観点から、類縁関係に若干の検討を加えてみた。

#### 材料と方法

試料として用いた魚は Fig. 1 に示した地点で 1981 年と 1987 年に採集したものである。魚は生きたまま持ち帰り、筋肉蛋白の抽出直前まで水槽に蓄養した。供試魚はすべて成魚で体長 40 mm 以上のものを用いた。体側筋に微量のメルチオレートナトリウムを加えた同重量のグリセリン緩衝液 (tris-glycine buffer solution pH 8.3)



Fig. 1 Distribution map of the localities collecting samples used in the present study. Solid circles and open circles represent populations of *Pungitius pungitius* and *P. sinensis* respectively, half solid circles designate coexisting populations of both species. Localities are as follows: A-1, Fukazawa; A-2, Icchoda; A-3, Maeda; A-4, Toyama; A-5, Katosawanuma; A-6, Shinanoki; A-7, Aranuma; A-8, Tsutanuma; Ak-1, Oodate; Ak-2, Momokawa; Ak-3, Jindai; Ak-4, Kanba; Ak-5, Noda; Ak-6, Rokugo; Ak-7, Hiraga; Ak-8, Matsuoka; Y-1, Yuza; Y-2, Kushihihi; Y-3, Shinjo; Y-4, Tendo; N-1, Murakami; N-2, Nakajo; N-3, Gosen; I-1, Tedori.

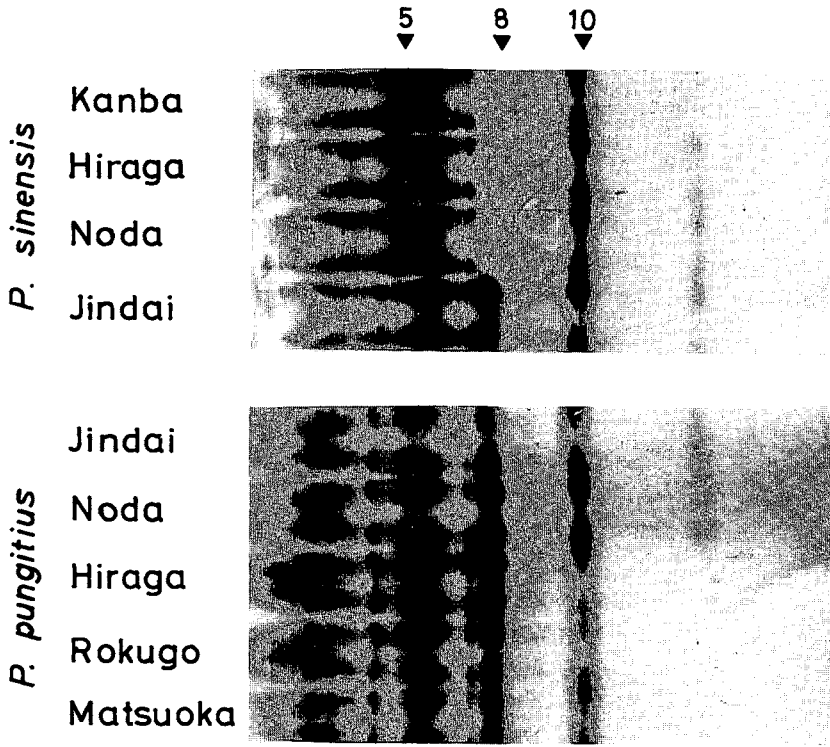


Fig. 2 Electrophoretic patterns of muscle protein of *Pungitius pungitius* and *P. sinensis* collected from streamlets of Omono River system. Numbers indicate main bands.

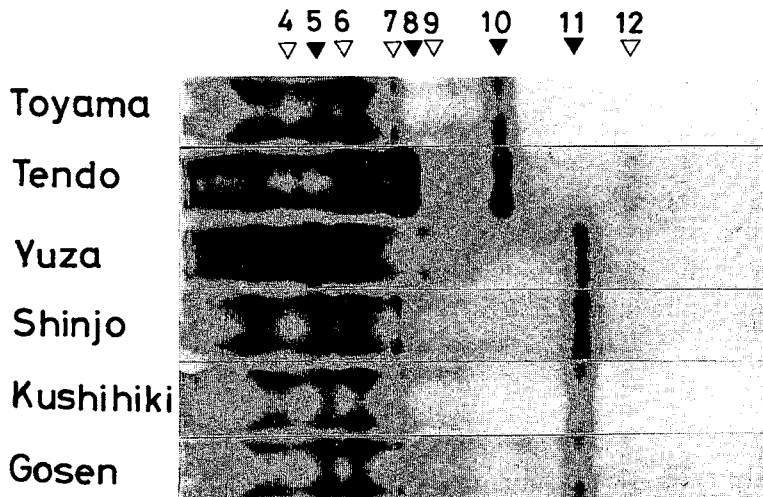


Fig. 3 Electrophoretic patterns of muscle protein for allopatric populations of *P. pungitius* in Honshu.

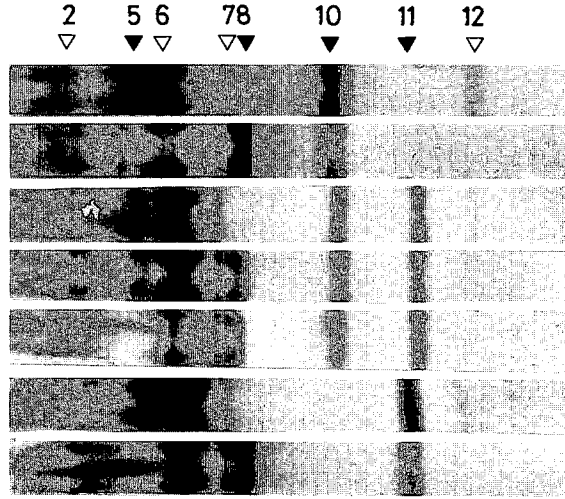


Fig. 4 Muscle protein variations of *P. pugnatus* and *P. sinensis* for sympatric population collected from a streamlet in Aomori Prefecture.

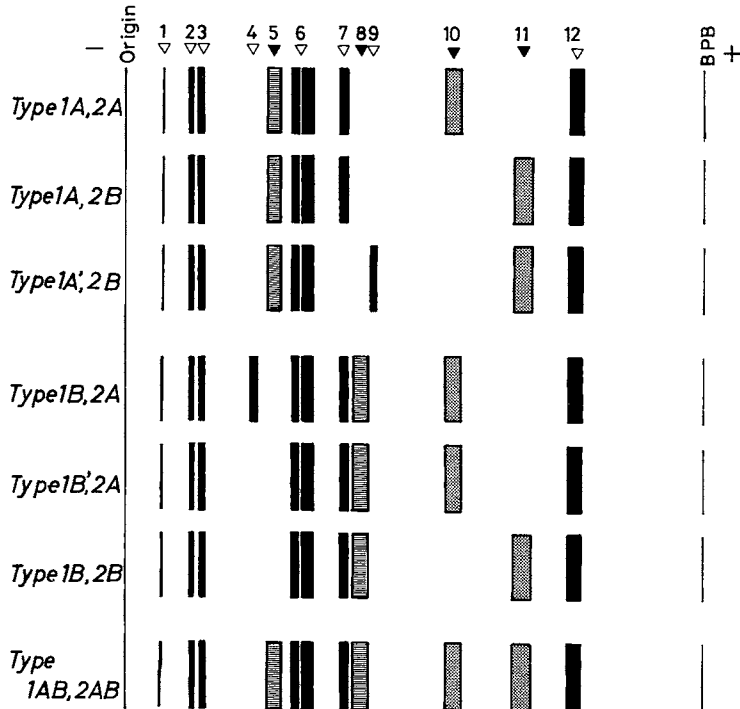


Fig. 5 The schematic figure of muscle protein patterns of ninespine sticklebacks (*Pungilius*). Numbers (1-12) show the bands from the cathode side.

を加え、海砂と共に乳鉢ですりつぶし、遠心分離 (10,000 rpm, 60分, 10°C) して抽出したものを試料とした。

電気泳動は垂直平板法を採用したが、基本的には Ornstein (1964) と Davis (1964) の方法によった。支持体は7.5%アクリルアミドゲル(140 mm × 2 mm × 110 mm) で幅 8 mm を12検体分とった。1検体につき抽出液 5  $\mu$ l を用いた。電流は全体で18mAを流し、指示薬 BPB のバンドが80mmに達した段階を終点とした。染色はアミドブラック10Bの7%酢酸溶液に約60分間入れて行かない、弁色は7%酢酸で行った。出現したバンドの濃度は、デンスイトロール(東洋科学, DMU-33C) を用いて測定した。

## 結 果

### 筋肉蛋白像のパターン

本州の各地から得たイバラトミヨとトミヨの筋肉蛋白泳動像の中から代表的な場所のものを選り、Fig. 2 から Fig. 4 に示した。濃度の淡いバンドは再現性が必ずしもよくないので、再現性のすぐれた濃度の高いバンド (主バンド) の位置と数に注目し、模式的に示したのが Fig. 5 である。主バンドの数は生息地あるいは個体によって差はあるが、両種について全地点で一応12本とみなし、陰極に近い側から1~12の番号を付けて示した。なお、標本によっては6本目のバンドが2本に分かれて見えるが、とりあえずひとまとめにして扱ってある。

12本のバンドのうち、1, 2, 3, 6, 12の5本は全標本に出現し、残りの7本は標本によって現れ方に違いが見られた。第4バンドの出現したのは雄物川流域の全イバラトミヨと一部の地点のトミヨ、および天童のイバラトミヨのみである。第7バンドの出現しなかったのは、遊佐のイバラトミヨと村上の一部のトミヨのみである。同様に、第9バンドが出現したのは、遊佐のイバラトミヨと村上の一部のトミヨのみである。

第5と8のバンドが共に出現した場合には、

それぞれが単独で出現したときに比べ、約1/2の濃度となっている (Fig. 6)。したがって、この2つは Sp-1 の対立遺伝子 A, B の支配下にある可能性が高い。第10と11のバンドについても同様に、Sp-2 の対立遺伝子 A, B の支配下にあると考える。

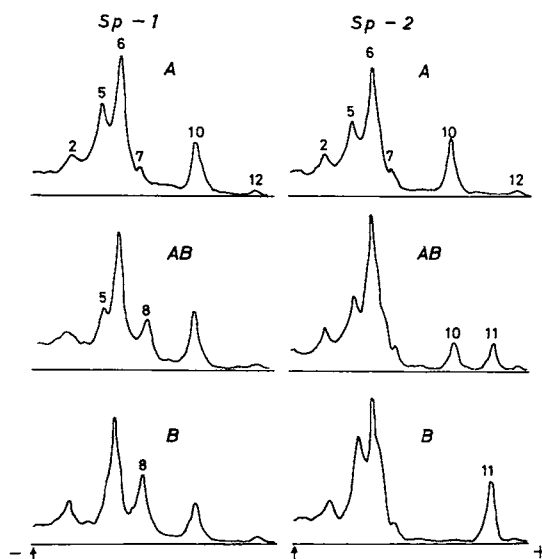


Fig. 6 Densitometric patterns of muscle protein for six phenotypes of *Pungitius pungitius* and *P. sinensis* in Fukazawa, Aomori Prefecture. Arrows show the origin.

### イバラトミヨとトミヨの筋肉蛋白像の比較

本州の24地点から得た両種の筋肉蛋白 Sp-1 および Sp-2 のそれぞれについて、その表現型の分布を Table 1 に示した。Sp-1 および Sp-2 のいずれの場合についても、一つの種が対立遺伝子 A, B を共有する個体群は少なく、24地点中18地点では A または B のいずれか一方を有するだけであった。ただ、試料数が十分でない地点も多いので、試料数を増せばさらに18地点より少なくなる可能性は残されている。

雄物川水系とその周辺部 (Ak-2 から Ak-8) に生息する個体群では、Sp-1 についてはイバラトミヨはすべて B (第8バンド) を、それに対してトミヨは A (第5バンド) を有するというよ

Table 1 Comparison of types of muscle protein patterns for populatins of ninespine sticklebacks in 24 localities.

Locality	Species		N	Phenotypes			Frequency of MuA gene	Phenotypes			Frequency of MuA gene
				Sp 1				Sp 2			
				A	AB	B		A	AB	B	
A-1 Fukazawa	P. p.	Obs.	21	8	10	3	0.62	1	10	10	0.29
		Exp.		8.1	9.9	3.0		1.7	8.5	10.7	
	P. s.	Obs.	4	2	2	0	0.75	0	1	3	0.12
		Exp.		2.2	1.5	0.2		0.1	0.9	3.0	
	Total	Obs.	25	10	12	3	0.64	1	11	13	0.26
		Exp.		10.2	11.5	3.2		1.7	9.6	13.7	
A-2 Icchoda	P. p.	Obs.	45	29	13	3	0.79	4	18	23	0.29
		Exp.		28.0	15.0	2.0		3.8	18.5	22.8	
A-3 Maeda	P. s.	Obs.	8	8				8			
A-4 Toyama	P. p.	Obs.	29	29				29			
	P. s.	Obs.	26	26				26			
A-5 Katosawanuma	P. s.	Obs.	26	26				26			
A-6 Shinanoki	P. s.	Obs.	11	10		1		11			
A-7 Aranuma	P. p.	Obs.	46	0	13	33	0.14	46			
		Exp.		0.9	11.2	33.9					
	P. s.	Obs.	40	0	9	31	0.11	40			
		Exp.		0.5	8.0	31.5					
Total	Obs.	86	0	22	64	0.13	86				
	Exp.		1.4	19.2	65.4						
A-8 Tsutanuma	P. p.	Obs.	5			5		5			
Ak-1 Oodate	P. s.	Obs.	16	16					16		
Ak-2 Momokawa	P. s.	Obs.	6	6				6			
Ak-3 Jindai	P. p.	Obs.	5			5		5			
		Obs.	28			28		28			
		inter. Obs.	3			3		3			
Ak-4 Kanba	P. s.	Obs.	30	30				30			
Ak-5 Noda	P. p.	Obs.	10			10		10			
	P. s.	Obs.	8	8				8			
Ak-6 Rokugo	P. p.	Obs.	6			6		6			
Ak-7 Hiraga	P. p.	Obs.	19			19		19			
		Obs.	30	30				30			
		inter. Obs.	3		3			3			
Ak-8 Matsuoka	P. p.	Obs.	8			8		8			
Y-1 Yuza	P. p.	Obs.	6	6					6		
Y-2 Kushihiki	P. p.	Obs.	16	16					16		
Y-3 Shinjo	P. p.	Obs.	18	18					18		
Y-4 Tendo	P. p.	Obs.	10			10		10			

N-1	Murakami	P. s.	Obs.	40	40	30	10	0	0.88
			Exp.			30.4	8.8	0.8	
N-2	Nakajo	P. p.	Obs.	13	13	0	4	9	0.15
			Exp.			0.3	3.4	9.3	
N-3	Gosen	P. p.	Obs.	11	11			11	
I-1	Tedori	P. s.	Obs.	20	20	20			

P. p. : *Pungitius pungitius*, P. s. : *P. sinensis*, inter. : intermediate

Obs. : Observed, Exp. : Expected N : Number of specimens

うに、種によって特徴的なバンドが現れている。ただ、神代 (Ak-3) のトミヨのみは、B を有する点で他のトミヨと異なる。なお、両種の間中間的な外部形態を持つ個体が出現する平鹿 (Ak-7) では、それらの個体はA, B 両バンドを有している。Sp-2 については両種ともA を有しており、2 種の間には差は見られない。

雄物川水系のものと同じパターンのイバラトミヨは、蔦沼 (A-8) と天童 (Y-4) に生息する。一方、遊佐 (Y-1), 櫛引 (Y-2), 新庄 (Y-3) および五泉 (N-3) のイバラトミヨは Sp-1 についてはA を、Sp-2 についてはB を有しており、雄物川水系のものとは逆になっている。そして、そのパターンは大館 (Ak-1) のトミヨと同じである。雄物川水系のトミヨのものと同じパターンを持つトミヨは戸山 (A-4), 手取 (I-1) ほかでも見られる。

#### 混生地における遺伝子頻度

同所的個体群のうち、野田 (Ak-5) と平鹿 (Ak-7) ではイバラトミヨとトミヨの Sp-1 の頻度に明かに差が見られる。一方、戸山と神代では Sp-1, Sp-2 のいずれにも頻度に差は見られない。荒沼 (A-7) では、Sp-1 の実測値と期待値の差の検定の結果、イバラトミヨでは  $\chi^2=1.213$ , トミヨでは  $\chi^2=0.633$  であり、両種共に両値が一致している ( $P<0.05$ ) と判断した。また、両種の Sp-1 の遺伝子頻度はほぼ等しいものと考えられる。深沢 (A-1) ではトミヨの標本数が少ないので、両者の関係についてはなんともいえない。

#### 考 察

第5と8および第10と11バンド (Sp-1 のA, B と Sp-2 のA, B) は、両種にいろいろな組み合わせで現れる。その出現状態をパターンとして見れば、フナ (谷口, 1977) やタビラ (Fujikawa et al., 1984) などで見られるような種に特異的な特徴は現れていない。つまり、本州といった広い範囲のイバラトミヨとトミヨについては、筋肉蛋白像のパターンは種の判別指標としては有効ではない。しかし、同一水系あるいは混生地では、種に特異的な泳動像のパターンを示すこともある。雄物川水系 (Ak-3~Ak-8) ではイバラトミヨが第8バンドを、そしてほとんどのトミヨが第5バンドをそれぞれ有しているのがその例である。混生地である野田や平鹿でも、この2つのバンド、つまり Sp-1 のA とB の遺伝子頻度は2種の間で明かな差があった。これは、この2種の諸形態に差がある (池田, 1950; 田中, 1982; 平井, 1984) という現象とも一致する。また、ここでは雑種と思われる中間的な形態を持つ個体が時折得られるが、その場合は筋肉蛋白像においても、それぞれの濃度が約1/2になった両バンドが出現する。この両種由来の対立遺伝子A, B を異型接合的に持つと推定されるものが、中間的な形態をした小数の個体に限られていることは、通常はイバラトミヨとトミヨの間に遺伝子の交換が行われていないことを示唆するものであろう。つまり、筋肉蛋白像から見ても、形態の比較に基づいた田中 (1982) の見解と同様に、ここの2種は互いに異なる繁殖集団と考える方が都合がよい。

一方、同じ雄物川水系の混生地であっても、



神代では若干事情が異なる。ここでは両種および中間型のいずれもが同じ筋肉蛋白像のパターンを示す。しかも、そのパターンは雄物川水系の他の地点に生息するイバラトミヨのものと同じである。したがって、ここで注目されることは、雄物川水系には、少なくとも 2 つの異なった筋肉蛋白像のパターンを持つトミヨが存在していることである。一つは平鹿に代表される第 5 バンドを持つグループ、そしてもう一つはイバラトミヨと同じ第 8 バンドを持つグループである。後者のトミヨが同所的に生息するイバラトミヨとの間で鱗板以外の諸形質に差がみられない（平井, 1984 および平井未発表資料より）ことを合わせて考えると、神代では両種が同一の任意交配集団である可能性が高い。

青森県の混生地である戸山についても、両種は同一の筋肉蛋白像を示し、荒沼でも Sp-1 の対立遺伝子 A, B の表現型の比は似ていた。もう一つの混生地である深沢では、イバラトミヨ、トミヨともに Sp-1, Sp-2 のそれぞれに対立遺伝子 A, B を共有している。トミヨの試料数が少ないので、比較は難しいが、両種の表現型の比には大きな差はないように見える。そして、これら 3 地点でも神代と同様、両種の鱗板以外の形質に差がみられない（平井, 未発表）。丹羽（1982）や高田ほか（1984）は北海道の混生地において、両種のアイズラムや形態に有意な差がないことから、イバラトミヨとトミヨは同種とするか、あるいは少なくとも別種とするほど分化を遂げていないと考えているが、これら 4 地点についても同様のことがいえるのではないかと思われる。

本州に生息するイバラトミヨとトミヨの形態的形質を地理的に比較したものによれば、多くの形質で種内の生息地間の差が種間の差と区別出来ない程度に変異している（田中, 1982；平井, 1984）。そして、筋肉蛋白のパターンについても地理的変異があり、鱗板列以外の形態的特徴と同様に、両者を判別する指標とはならなかった。つまり、今回の筋肉蛋白像を加えても、

両者を区別することの出来る形質といえ、両者を異種と見なすおもな根拠となった鱗板の配列状態の違いだけということになる。

ところで、前述のように同じ雄物川水系で、神代に生息する 2 種を同一繁殖集団と見なし、平鹿に生息する 2 種を異なる繁殖集団と見なせば、両地域の個体群が混生し得たとしても、少なくとも一方の種は互いに異なる繁殖集団を形成する可能性が高い。この場合、泳動像や形態から見てトミヨがこれに該当する。イバラトミヨについてはなんともいえないが、雄物川水系の地点間で二つの繁殖集団があるという積極的な証拠は得られていない。

このように、ある同所的個体群で 2 種の間生殖隔離があり、別の同所的個体群で遺伝子の交換が行われているということであれば、鱗板列によって 2 種に類別したことが適当でないということになる。鱗板の配列状態の差が同一種個体群の多型現象であるのか、種の違いを現す一つの特徴であるのかは、更に諸形態の比較やアイソザイム等による類縁関係の解析に待たれるが、今回の結果は前者を支持するものとなった。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、電気泳動法について御指導を賜った滋賀大学教育学部の鈴木紀雄教授、筋肉蛋白泳動像の解析の仕方に有益な助言を下された高知大学水産学部の谷口順彦助教授に心から感謝の意を表します。また、本報原稿の校閲をお願いし、適切な御意見を賜った富山大学教育学部の田中晋教授に深く感謝の意を表します。

## 要 約

- 1 本州の各地から得たイバラトミヨとトミヨの筋肉蛋白像をアクリルアミドゲル電気泳動法で調べた。
- 2 12本の鮮明なバンドが出現したが、のうち 4 本を、2 組の対立遺伝子によって支配さ

れているバンドと考えた。

- 3 本州全域といった広い範囲で見た場合、イバラトミヨとトミヨのそれぞれに、種の特徴を示すようなバンドは見られなかった。
- 4 同所的個体群のうち、2種の形態的形質に差があるとされている個体群では、それぞれの種に特徴的なバンドが出現した。一方、鱗板以外の形態的形質にほとんど差がみられないとされる個体群では、種間で筋肉蛋白像あるいは遺伝子頻度に明かな差は認められなかった。
- 5 雄物川水系では、2つの異なる筋肉蛋白像を持つトミヨの個体群が存在するが、一方の個体群の筋肉蛋白像は同水系のイバラトミヨのものと同一であった。
- 6 同一繁殖集団を形成する同所的個体群の存在の可能性について論じた。

#### 参 考 文 献

- Davis, G. M. 1964. Disc electrophoresis, II Method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121 : 404-427.
- Fujikawa, H., Y. Nagata and S. Atumi. 1984. Electrophoretic patterns of isozymes in the tissue extracts of three subspecies of *Acheilognathus tabira* (Cyprinidae). *Mem. Osaka Kyouiku Univ. Ser. III.*, 33(1) : 53-61.
- Hagen, D. W. 1967. Isolating mechanisms in three-spine sticklebacks (*Gasterosteus*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 24(8) : 1637-1692.
- 平井賢一. 1984. 本州東北部におけるトミヨ属魚類の分布. 水野寿彦教授退官記念誌 : 186-192.
- Hudon, J. and H. Guderley. 1984. An electrophoretic study of the phylogenetic relationships among four species of sticklebacks (Pisces : Gasterosteidae). *Can. J. Zool.*, 62 : 2313-2316.
- 五十嵐清. 1962. トミヨ *Pungitius sinensis* (GUICHENOT) の稜鱗の発達について. *日水誌*, 24(4) : 393-398.
- 五十嵐清. 1963. イバラトミヨ *Pungitius pungitius* (LINNAEUS) の稜鱗の発達について. *日水誌*, 24(4) : 393-398.
- 五十嵐清. 1969. 最上川流域におけるイバラトミヨ *Pungitius pungitius* (LINNAEUS) の分布と変異 特に鱗板上の変異について. *動物学雑誌*, 78(9) : 340-350.
- 池田嘉平. 1933. トゲウオの分布とその変異. *動物学雑誌*, 45 : 141-173.
- 池田嘉平. 1950. 雄物川流域に於ける富魚属の分布形態. *細胞学遺伝学論文集 (小熊記念集)* : 29-37.
- 石城謙吉. 1967. 北海道根釧地域におけるトミヨ属魚類の分布と形態. *動物学雑誌*, 76 : 249-254.
- 小林 弘. 1957. 北海道の棘魚に認められた2, 3の新事実に就て. *北海道学芸大学紀要 (第二部)*, 10(29) : 44-51.
- Muramoto, J. and K. Igarashi. 1969. A preliminary note on the chromosomes and enzymatic patterns of three forms of sticklebacks. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool.*, 17 : 266-270.
- Narita, T. 1970. Physiological, ecological and morphological differences between two forms of nine-spine stickleback, *Pungitius pungitius*, in North America. Ph. D. Thesis, University of Manitoba, Winnipeg, viii+90pp. 28 figs.
- 丹羽卓朗. 1983. 北海道産トミヨ属魚類の生殖的隔離. *日本魚類学会年会講演要旨*, 16.
- Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis, I Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121 : 321-349.
- 高田啓介・後藤 晃・浜田啓吉. 1984. 北海道におけるトミヨ属魚類3種の地理的分布と形態変異. *魚類学雑誌*, 31(3) : 312-326.
- 田中 晋. 1982. 東北・北陸地方におけるイバラトミヨとトミヨの形態の変異. *魚類学雑誌*, 29(2) : 203-212.
- 谷口順彦. 1974. 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報告*, (1) : 1-145, Plates XXII.
- Taniguchi, N. 1977. Interspecific and intraspecific variations of muscle protein in the Japanese crucian carp-II Starch-gel electrophoretic pattern. *Japan. J. Ichthyol.*, 24(19) : 1-11.
- Withler, R. E. and J. D. McPhail. 1985. Genetic variability in freshwater and anadromous sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) of southern British Columbia. *Can. J. Zool.*, 65 : 528-533.