

数種カニ類の Disc 電気泳動像ならびに Ouchterlony 法による検討

伴 田 聡・橋 口 義 久
(高知大学教育学部生物学教室)

Electrophoretic patterns of several blackish water crabs and their antigenic features

Satoshi BANDA and Yoshihisa HASHIGUCHI

Biological Laboratory, Faculty of Education, Kochi University

Abstract

For the basic study on the classification and systematics of Sesarminae and Varuninae by biochemical and/or immunological techniques, such as disc electrophoresis and Ouchterlony methods, several blackish water crabs were examined. The crabs used were as follows: *Sesarma* (*Holometopus*) *haematocheir*, *S. (H.) dehaani*, *S. (Parasesarma) pictum*, *S. (P.) erythrodactyla*, *S. (P.) plicatum*, *S. (Chiromantes) bidens*, *Helice tridens tridens*, *Chasmagnathus convexus*, *Sesarmops intermedium*, and *Eriocheir japonicus*. By disc electrophoresis, specific fractions were found in the genus, *Sesarma*, *Chasmagnathus*, *Eriocheir* and in the subgenus, *Parasesarma* and also in the species, *S. (P.) pictum*. Several common fractions were also recognized between the genus *Parasesarma* and *Chiromantes* and between the genus *Sesarma* and *Sesarmops*. These findings would be referable to the understanding on intergeneric situations in the genus mentioned above. In order to obtain antisera against each species of the crabs used, whole muscle proteins of the legs of crabs were injected intraperitoneally in albino rats. The precipitin bands appeared in agar gel double diffusion were observed and recorded in the reactions between antisera and antigens (whole muscle protein of crab legs). No species specific precipitin bands were recognized, while many common bands were found between each antigen and anti-serum. From the results obtained in the present experiment, we conclude that it is necessary to purify the protein extracts employed in both disc electrophoresis and agar gel double diffusions; the purification of the materials would give more specific reactions for each species of the crabs used.

近年、セルロース・アセテート膜電気泳動、デンプンゲル電気泳動、Disc 電気泳動などの生化学的手法を用いた分類が、動・植物学の分野で試みられつつある。セルロース・アセテート膜電気泳動法は、1957年にイギリスの Kohn によって開発されたもので、これによる分類が、魚類における種の同定に有効であるということが認められた (Hess and Smith, 1967; Taniguchi, 1969; Taniguchi and Nakamura, 1970; Taniguchi and Ishiwatari, 1972)。またデンプンゲル電気泳動法は、カナダの Smithies によって1955年に確立され、やはり魚類の分類学における分野で有用とされている (Tsuyuki and Roberts, 1963, 1965)。Disc 電気泳動法は、1959年 Raymond によって、合成高分子ポリアクリルアミドゲルが、電気泳動法の支持体として導入されたものであり、いわゆるポリアクリルアミドゲル電気泳動法がそれである。Ornstein and Davis (1964) は、その特徴を生しながら新しい泳動法を開発した。Davis and Lindsay (1967) および Davis (1968) は、*Helix pomatia* という一種のカイの体液 haemolymph と、腹足筋 foot muscle の抽出液を、Disc 電気泳動法によって分画した。その結果、種々の条件によって、その構成蛋白が量的にも変動しにくい、すなわち安定度の高い試料は、腹足筋抽出液であったとし、これを用いてカイ類の分類を試みた。一方、Yoshimura (1968, 1969a, b) および Yoshimura *et al.* (1970) は

Schistosoma japonicum と *S. mansoni* の2種の住血吸虫および *Paragonimus kellicotti*, *P. westermani*, *P. ohirai*, *P. iloktsuenensis*, *P. miyazakii*, *P. sadoensis* など6種の肺吸虫について、Disc 電気泳動を行ない、体構成蛋白パターンによって、容易にこれらの種の判別が可能であるとした。また吉田・栗本(1969)は *Ancylostoma ceylanicum* と *A. braziliense* の体構成蛋白を泳動し、その泳動像から、種 species の異同について論じている。さらに栗本(1974)は、Disc 電気泳動によりヒト蛔虫 *Ascaris lumbricoides* とブタ蛔虫 *A. suum* の異同について調べたところ、両者間に顕著な差異がみられたという。

一方、最近では免疫学的手法も動物の分類学に応用されるようになり、その主なものが免疫電気泳動 immunoelectrophoresis である。これは、まず寒天ゲル電気泳動で抗原 antigen を分離し、同じ寒天ゲル中で、抗原と抗体 antibody を拡散させ、沈降線 precipitin band をつくらせる方法である。Martinetto *et al.* (1968)は、蛔虫類において *A. suum* の全虫体 whole worm, 筋層 muscle layer, 腸 intestine, 体液 haemolymph, 受精卵 fertilized egg, 幼虫 larvae 等の抽出抗原を用いて、また Williams and Soulsby (1970)が *A. suum* の全虫体, 卵, 幼虫等の抽出抗原を用いて実験を行ない、その沈降線の形、位置、数を観察した。また Imperato *et al.* (1968)や辻ら(1969)は、ヒトおよびブタ蛔虫の体構成蛋白を用いて、免疫電気泳動を行ない、その泳動像から両種蛔虫には、抗原性の面で差異があるとした。このように、従来、生化学的ならびに免疫学的手法が、いくつかの動物の分類に応用されてきた。

本報では、河口あるいは河川に生息する カニ類 10 種を用い、蛋白組成あるいは抗原・抗体系 antigen-antibody system の面から種間の類縁、親疎について検討した。つまり Disc 電気泳動および Ouchterlony 法(二重拡散法)を用い、形態によってなされてきた分類の裏付け、ひいては再検討が可能かどうかについて調べた。とくに属 Genus あるいは亜属 Subgenus の特徴が泳動像や沈降線に現われるかどうか注目した。甲殻類 Crustacea におけるこの種の研究は皆無であり、今回が最初の試みといえるが、形態的には分類不可能な種についても、上述した手法により、それらの カニ類の判別が可能かどうかを追究した。なお用いられた カニ 類の現在の分類学的位置づけは、酒井(1976)および Sakai(1976)によると、以下のとおりである。

| | | |
|------------|------------------|---|
| 節足動物門 | Phylum : | Arthropoda |
| 甲 殻 綱 | Class : | Crustacea |
| 十 脚 目 | Order : | Decapoda |
| 爬 行 亜 目 | Suborder : | Reptantia |
| 短 尾 区 | Section : | Brachyura |
| 方 頭 亜 区 | Subsection : | Brachyrhyncha |
| イワガニ科 | Family : | Sesarmidae |
| ベンケイガニ亜科 | Subfamily : | Sesarminae |
| アカテガニ属 | Genus : | <i>Sesarma</i> |
| アカテガニ亜属 | Subgenus : | <i>Holometopus</i> |
| アカテガニ | | <i>Sesarma (Holometopus) haematocheir</i> |
| クロベンケイガニ | S. (H.) | <i>dehaani</i> |
| カクベンケイガニ亜属 | Subgenus : | <i>Parasesarma</i> |
| カクベンケイガニ | S. (Parasesarma) | <i>pictum</i> |
| ユビアカベンケイ | S. (P.) | <i>erythrodactyla</i> |
| オオユビアカベンケイ | S. (P.) | <i>plicatum</i> |
| フタバカクガニ亜属 | Subgenus : | <i>Chiromantes</i> |
| フタバカクガニ | S. (Chiromantes) | <i>bidens</i> |

| | |
|---------|--------------------------------|
| アシハラガニ属 | Genus : <i>Helice</i> |
| アシハラガニ | <i>Helice tridens tridens</i> |
| ハマガニ属 | Genus : <i>Chathmagnathus</i> |
| ハマガニ | <i>Chathmagnathus convexus</i> |
| ベンケイガニ属 | Genus <i>Sesarmops</i> |
| ベンケイガニ | <i>Sesarmops intermedium</i> |
| モクズガニ亜科 | Subfamily : <i>Varuninae</i> |
| モクズガニ属 | Genus : <i>Eriocheir</i> |
| モクズガニ | <i>Eriocheir japonicus</i> |

材料および方法

1. カニ類

使用されたカニの種類と採集場所は、次に示したとおりである。

アカテガニ：高知県仁淀川河口および春野町高殿。

クロベンケイガニ：高知県仁淀川河口。

カクベンケイガニ：高知県須崎市灰方。

ユビアカベンケイガニ：高知県須崎市灰方，仁淀川河口および松田川河口。

オオユビアカベンケイ：高知県松田川河口。

フタバカクガニ：高知県須崎市灰方および仁淀川河口。

アシハラガニ：高知県仁淀川河口。

ハマガニ：高知県松田川河口。

ベンケイガニ：高知県春野町高殿。

モクズガニ：高知市朝倉鏡川支流。

2. 筋肉蛋白の抽出方法

抽出に際しては、原則として、それぞれのカニの脚の筋肉を用いることとした。しかし、小型のユビアカベンケイガニにおいては、脚の筋肉だけでは不充分であったため、体部筋肉をも含めて使用した。採取した筋肉に生理食塩水 (0.85%) を加え、1,000 r.p.m. 5 分間ホモジナイズした。これらのホモジネートを、1 昼夜冷凍庫で凍結 (-20°C) したのち、解凍して 3,500 r.p.m. で 15 分間遠心分離し、その上清を蛋白抽出液として実験に用いた。

3. Disc 電気泳動法

この電気泳動は、アクリルアミドの重合体を支持体としている。アクリルアミドに *N*, *N'*-Methylenebisacrylamide (加橋剤) を加え、ゲル化促進剤である TEMED を加えて気密状態におき、無色透明なゲルにして用いた。ゲルとしては内径 5 mm × 長さ 80 mm の小ガラス管 (カラム) に 3 層のゲル、すなわち分離用ゲル (separation gel), 濃縮用ゲル (spacer gel) および試量用ゲル (sample gel) を重ねて作成した。試料用ゲルの半量は試料、すなわち筋肉蛋白であり、今回の実験においては 500 μg を使用した。このようにして調製したカラムを、上下の緩衝液槽に接続し、緩衝液にはトリス・グリシン緩衝液 (pH 8.3) を用いた。上槽には 10⁻⁵% 程度のブロムフェノールブルー (B.P.B.) 水溶液を加えた。上部が陰極、下部を陽極として定電圧定電流電源に接続し、カラム 1 本あたり 3 mA の電流を流した。通電後 10~20 分経過すると、B.P.B. の極めて濃縮された青いバンドが陽極へ移動していくのが観察される。このバンドがカラム底面より 5 mm 程度に達した時点で通電を止めた。次に冷水中でカラムからゲルを取り出し、アミドブラック 10 B で 60 分間染

色, 7%酢酸で脱色したのち, デンシトメーター (東洋化学 DMU-2) により各分画を定量した。

4. 実験動物

感作血清を採取するため, Wistar King 株のダイコクネズミ *Rattus norvegicus albinus* を用いた。このネズミは本学部生物学教室で飼育・繁殖させたもので, ネズミにはオリエンタル社の固型飼料 (MF) と, 水を常時与えるようにした。

5. 感作血清

それぞれのカニから採取した筋肉蛋白の抽出液 (抗原) を, 1週間おきに4回ダイコクネズミの腹腔内に投与した。それぞれの場合について, 1回の投与蛋白量を6mgとし, 抽出液0.5mlと同量の Freund's complete adjuvant を混合して注射した。抗原の投与開始後4週間目に, これらのダイコクネズミの尾部を切断して採血し, 感作血清を得た。なお, 本実験での蛋白量の測定は, すべてアタゴ卓上蛋白計によってなされた。

6. Ouchterlony 法

pH8.2 ベロナール緩衝液 (バルビタール・ナトリウム 160g を 7l の蒸留水に溶かし, これに 220ml の 0.1N HCl 液を加え, さらに蒸留水を補充して全量を10lとしたもの) にアガロース (三光純薬株式会社製) を0.9%の割合になるように加え, 85~90°Cで加熱溶解したものを支持体とした。この加熱カンテンを60°Cまで下げたのち, 11×5cm のガラス板上にメスピペットで9.5mlのせ, 水平板上でカンテン板を作成した (辻, 1974)。このカンテン板上に, 直径5mmの血清孔 (6個) と抗原孔 (1個) を, 両者の間隔が5mmになるように開け, 底部をカンテンで封じたのち, 抗原孔には, カニの筋肉蛋白 (蛋白濃度 1.2g/dl), 血清孔にはダイコクネズミから採取した感作血清を入れ, 室温・湿状態で12時間静置し, 抗血清と抗原を追添加後, 4°Cの氷室に24時間静置した。その後, 再度, 両者を追添加して, さらに24時間静置した。反応終了後, カンテン板をベロナール加生理食塩水で洗浄, 乾燥後アミドブラック10Bで染色, 2%の酢酸で脱色して沈降線を観察した。

結 果

Disc 電気泳動による蛋白分画を, デンシトメーターにより解析した結果は, Fig. 1 A-J に示されたとおりである。この図では右側が陰極, 左側が陽極を示す。また図中の矢印は, 泳動カラムを肉眼的に観察し, バンドが認められたことを示している。泳動によって最も多くのバンドがみられたカクベンケイがこの分画に, 陰極側から番号を付し, 他種のカニの分画をそれと対応させた。対応しないものについては, 「A」の記号により区別した。それぞれの種の分画数についてみると, 10~20本と, かなりの変動が認められた。すなわち, それぞれのカニのバンド数は, アカテガニとユビアカベンケイガニの2種は10本, クロベンケイガニは11本, アシハラガニは13本, オオユビアカベンケイガニ, モクズガニ, ハマガニおよびベンケイガニの4種が15本, フタバカクガニ16本, カクベンケイガニ20本であった。これらのバンドのうち, 極めて高い吸光度を示したのについてみると, アカテガニ (Fig. 1 A), クロベンケイガニ (Fig. 1 B), カクベンケイガニ (Fig. 1 D), オオユビアカベンケイガニ (Fig. 1 F), フタバカクガニ (Fig. 1 C), ハマガニ (Fig. 1 H) では, 1, 2, 7 のバンドが高い吸光度を示した。ところがユビアカベンケイガニ (Fig. 1 E), アシハラガニ (Fig. 1 G), ベンケイガニ (Fig. 1 I) においては, 1, 2 の2本のバンドだけが強く, またモクズガニ (Fig. 1 J) については, 1, 1A, 2 の3本で高い吸光度が得られた。

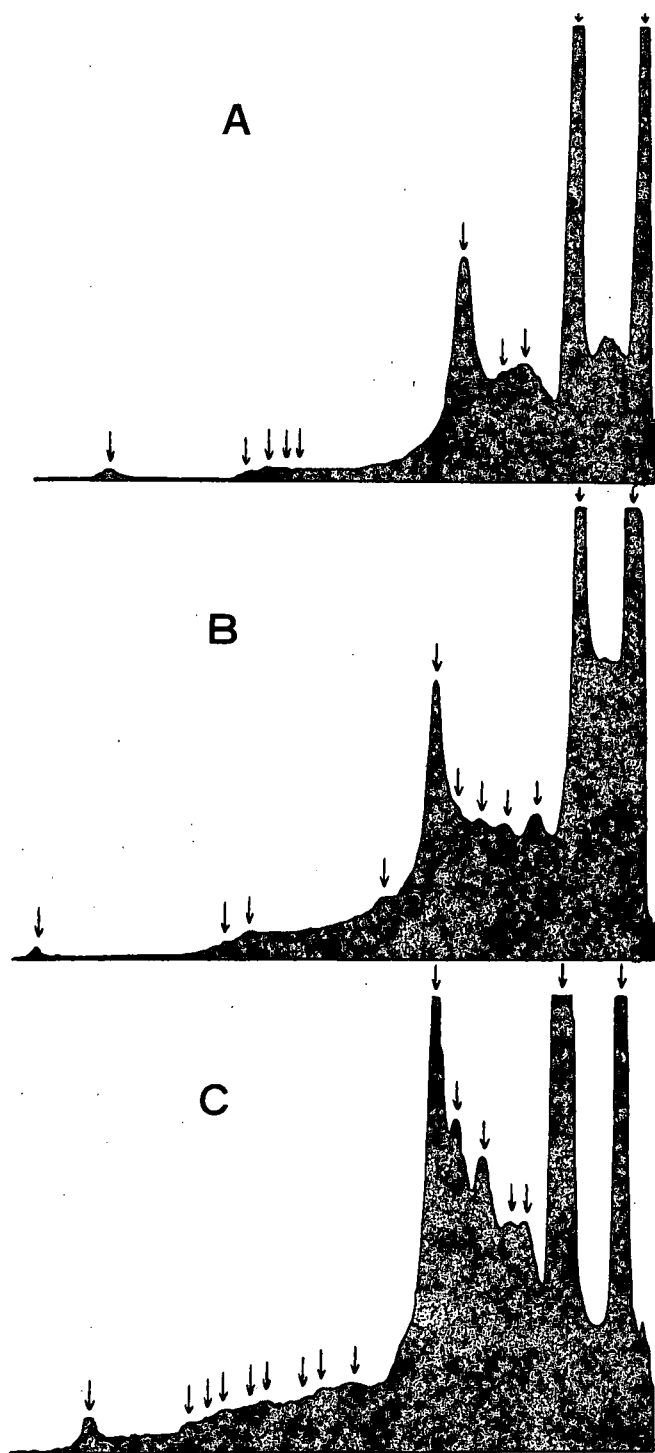


Fig. 1a Densitometric tracing of the electrophoretic patterns of the muscular protein obtained from each species of crabs. Arrow shows the clear bands recognized without the aid of densitometry.
 A: *Sesarma (Holometopus) haematocheir*, B: *S. (H.) dehaani*,
 C: *S. (Chiromantes) bidens*.

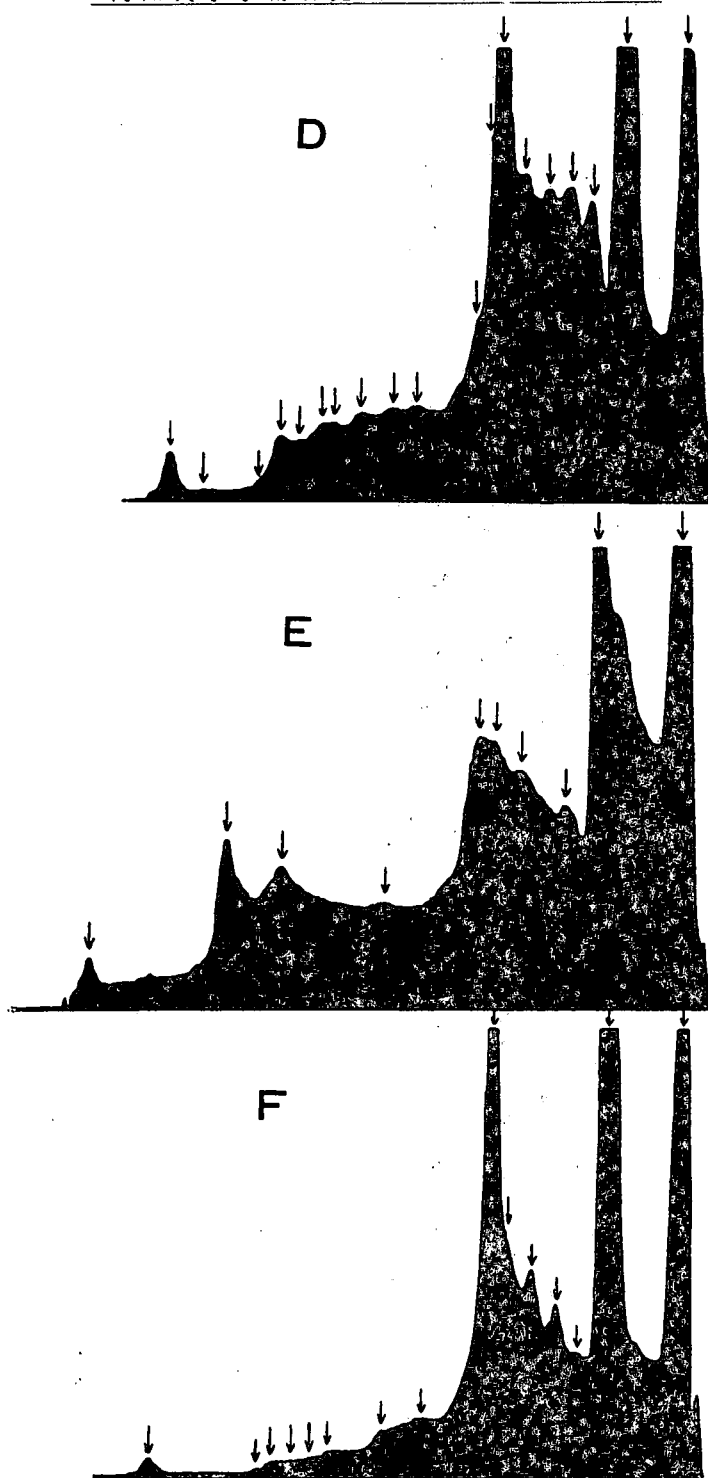


Fig. 1b Densitometric tracing of the electrophoretic patterns of the muscular protein obtained from each species of crabs. Arrow shows the clear bands recognized without the aid of densitometry.
 D: *S. (Parasesarma) pictum*, E: *S. (P.) erythroductyla*,
 F: *S. (P.) plicatum*.

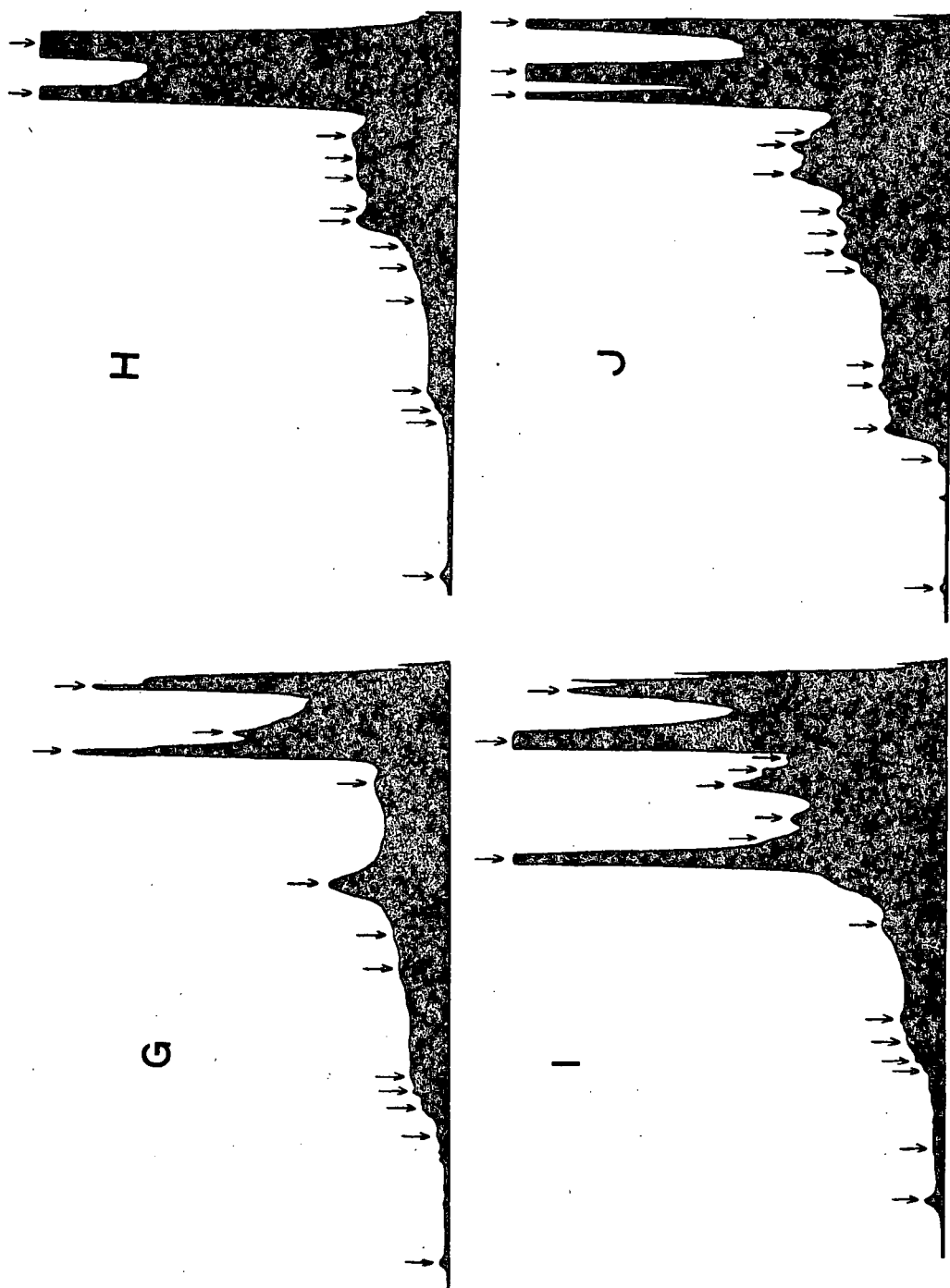


Fig 1c. Densitometric tracing of the electrophoretic patterns of the muscular protein obtained from each species of crabs. Arrow shows the clear bands recognized without the aid of densitometry. G: *Helice tridens tridens*, H: *Chasmagnathus convexus*, I: *Sesamnops intermedium*, J: *Eriocheir japonicus*.

Table 1 Mean Rf values of the muscular protein fractions

| Protein fraction number | <i>Sesarma</i> (<i>Parasesarma</i>) <i>pictum</i> | <i>S. (P.)</i> <i>erythrodactyla</i> | <i>S. (P.)</i> <i>plicatum</i> | <i>S.</i> (<i>Holometopus</i>) <i>dehaani</i> | <i>S. (H.)</i> <i>haematocheir</i> |
|-------------------------|---|---|-----------------------------------|---|---------------------------------------|
| 1 | 0.060 | 0.045 | 0.040 | 0.050 | 0.029 |
| 1 A | — | — | — | — | — |
| 2 | 0.170 | 0.176 | 0.168 | 0.142 | 0.150 |
| 2 A | — | — | — | — | — |
| 3 | 0.230 | 0.237 | 0.227 | 0.205 | — |
| 3 A | — | — | — | — | — |
| 4 | 0.267 | 0.282 | 0.266 | 0.256 | 0.245 |
| 5 | 0.305 | 0.306 | 0.308 | 0.295 | 0.286 |
| 6 | 0.351 | 0.353 | 0.355 | 0.332 | — |
| 7 | 0.392 | 0.385 | 0.379 | 0.364 | 0.357 |
| 7 A | — | — | — | — | — |
| 8 | 0.413 | — | — | — | — |
| 9 | 0.438 | — | — | 0.447 | — |
| 10 | 0.487 | — | 0.507 | — | — |
| 11 | 0.546 | 0.526 | 0.561 | — | — |
| 12 | 0.594 | — | — | — | — |
| 12 A | — | — | — | — | — |
| 13 | 0.649 | — | 0.671 | 0.661 | 0.656 |
| 13 A | — | — | — | — | 0.675 |
| 14 | 0.700 | 0.695 | 0.702 | 0.703 | — |
| 15 | 0.721 | — | 0.734 | — | 0.710 |
| 16 | 0.764 | 0.755 | 0.777 | — | 0.751 |
| 16 A | — | — | — | — | — |
| 17 | 0.796 | — | 0.806 | — | — |
| 18 | 0.838 | — | — | — | — |
| 18 A | — | — | — | — | — |
| 19 | 0.939 | — | — | — | — |
| 20 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Table 1 には各々の分画の Rf 値 (Rate of flow) が示されている。これによると、10種のすべてのカニに共通なバンドとして、1, 2, 5, 7 および 20 の 5 本がみられた。またバンド 1A は、アシハラガニとモクズガニの 2 種に共通して認められた。バンド 2A, 16A, 18A の 3 本は *Chasmagnathus* 属であるハマガニだけに出現した。一方、バンド 3 はアカテガニ以外のすべてのカニにみられ、3A についてはモクズガニとハマガニだけでみられた。バンド 4 は *Sesarma* 属の 6 種と、以前は *Sesarma* 属とされていたベンケイガニに認められた。また、バンド 6 はアカテガニ、アシハラガニ、モクズガニ以外の 7 種に現われた。バンド 7A はモクズガニ亜科、*Eriocheir* 属のモクズガニだけでみられた。またバンド 16 は、クロベンケイガニ以外の全ての種でみられたのに対し、19 のバンドはカクベンケイガニだけで観察された。

Ouchterlony 法によりカニの筋蛋白抗原と同種または異種のカニ抗血清との間に形成された沈降線 precipitin band —抗原・抗体反応— の出現状況は Table 2 に示されたとおりである。こ

obtained from each species of crabs

| <i>S.</i> (<i>Chiromantes</i>) <i>bidens</i> | <i>Helice</i> <i>tridens</i> <i>tridens</i> | <i>Eriocheir</i> <i>japonicus</i> | <i>Chasmagnathus</i> <i>covexus</i> | <i>Sesarmops</i> <i>intermedium</i> |
|--|---|--------------------------------------|--|--|
| 0.065 | 0.003 | 0.025 | 0.059 | 0.067 |
| — | 0.113 | 0.107 | — | — |
| 0.169 | 0.142 | 0.148 | 0.149 | 0.151 |
| — | — | — | 0.181 | — |
| 0.230 | 0.200 | 0.215 | 0.204 | 0.226 |
| — | — | 0.241 | 0.231 | — |
| 0.254 | — | — | — | 0.257 |
| 0.306 | 0.294 | 0.284 | 0.296 | 0.294 |
| 0.355 | — | — | 0.338 | 0.356 |
| 0.391 | 0.365 | 0.351 | 0.354 | 0.375 |
| — | — | 0.358 | — | — |
| — | — | 0.420 | — | 0.421 |
| — | 0.439 | 0.455 | — | 0.448 |
| — | 0.507 | — | 0.498 | 0.514 |
| 0.536 | — | — | — | — |
| 0.593 | — | — | — | — |
| 0.621 | — | 0.614 | — | — |
| — | — | 0.650 | — | — |
| — | — | — | 0.675 | 0.673 |
| 0.690 | 0.692 | — | — | 0.706 |
| 0.718 | 0.717 | 0.727 | 0.714 | 0.735 |
| 0.766 | 0.738 | 0.777 | 0.742 | 0.767 |
| — | — | — | 0.776 | — |
| 0.794 | 0.785 | — | — | — |
| 0.819 | — | — | — | — |
| — | — | — | 0.899 | — |
| — | — | — | — | — |
| 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

れによると、全ての反応系において、沈降線が1～6本出現しており、使用されたカニ類においては、お互いに広い共通抗原性の存在することが示唆された。しかし、同種抗原に対して、より強い反応を示すという例は少なく、種に特異的なバンドを見出すことも困難であった。同様な傾向は、予備的に試みられた第3週目の抗血清についても認められた。

Table 2 Number of the precipitin bands by the agar double diffusion between the antiserum the antigen (extracts) obtained from each muscular protein of the species

| Crab species used as antigen | No. of bands appeared | Antiserum (crab species) |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| <i>S. (H.) haematocheir</i> | 3, 4, 2 | <i>S. (H.) haematocheir</i> |
| | 1, 2, 2 | <i>S. (H.) dehaani</i> |
| | 2, 3, 2 | <i>S. (P.) pictum</i> |
| | 1 | <i>S. (P.) erythroductyla</i> |
| | 1, 4 | <i>S. (P.) plicatum</i> |
| | 2, 3, 2 | <i>S. (C.) bidens</i> |
| | 2, 1, 1 | <i>H. tridens tridens</i> |
| | 2, 1, 1 | <i>C. convexus</i> |
| | 3, 4, 1 | <i>S. intermedium</i> |
| | 1, 1, 1 | <i>E. japonicus</i> |
| <i>S. (H.) dehaani</i> | 1, 1, 2 | <i>S. (H.) haematocheir</i> |
| | 2, 2, 3 | <i>S. (H.) dehaani</i> |
| | 2, 1, 3 | <i>S. (P.) pictum</i> |
| | 1 | <i>S. (P.) erythroductyla</i> |
| | 2, 2 | <i>S. (P.) plicatum</i> |
| | 1, 3, 3 | <i>S. (C.) bidens</i> |
| | 2, 2, 1 | <i>H. tridens tridens</i> |
| | 2, 2, 2 | <i>C. convexus</i> |
| | 6, 3, 2 | <i>S. intermedium</i> |
| | 2, 2, 2 | <i>E. japonicus</i> |
| <i>S. (P.) pictum</i> | 2, 2, 1 | <i>S. (H.) haematocheir</i> |
| | 1, 1, 1 | <i>S. (H.) dehaani</i> |
| | 2, 4, 3 | <i>S. (P.) pictum</i> |
| | 2 | <i>S. (P.) erythroductyla</i> |
| | 3, 2 | <i>S. (P.) plicatum</i> |
| | 5, 4, 2 | <i>S. (C.) bidens</i> |
| | 3, 3, 1 | <i>H. tridens tridens</i> |
| | 4, 3, 2 | <i>C. convexus</i> |
| | 4, 6, 2 | <i>S. intermedium</i> |
| | 3, 3, 1 | <i>E. japonicus</i> |
| <i>H. tridens tridens</i> | 1, 2, 2 | <i>S. (H.) haematocheir</i> |
| | 1, 1, 2 | <i>S. (H.) dehaani</i> |
| | 2, 2, 2 | <i>S. (P.) pictum</i> |
| | 1 | <i>S. (P.) erythroductyla</i> |
| | 3, 1 | <i>S. (P.) plicatum</i> |
| | 3, 3, 2 | <i>S. (C.) bidens</i> |
| | 3, 2, 2 | <i>H. tridens tridens</i> |
| | 3, 1, 3 | <i>C. convexus</i> |
| | 2, 2, 2 | <i>S. intermedium</i> |
| | 2, 2, 3 | <i>E. japonicus</i> |
| <i>C. convexus</i> | 2, 2, 1 | <i>S. (H.) haematocheir</i> |
| | 2, 2, 2 | <i>S. (H.) dehaani</i> |
| | 4, 2, 3 | <i>S. (P.) pictum</i> |
| | 1 | <i>S. (P.) erythroductyla</i> |
| | 3, 1 | <i>S. (P.) plicatum</i> |
| | 3, 3, 3 | <i>S. (C.) bidens</i> |
| | 1, 4, 1 | <i>H. tridens tridens</i> |
| | 2, 2, 6 | <i>C. convexus</i> |
| | 2, 4, 2 | <i>S. intermedium</i> |
| | 2, 2, 3 | <i>E. japonicus</i> |

from the rats injected with extracts of muscular proteins of each species of crabs and

| Crab species used as antigen | No. of bands appeared | Antiserum (crab species) |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| <i>S. (P.) erythrodactyla</i> | 1, 1, 2 | <i>S. (H.) haematocheir</i> |
| | 1, 3, 1 | <i>S. (H.) dehaani</i> |
| | 2, 1, 1 | <i>S. (P.) pictum</i> |
| | 2 | <i>S. (P.) erythrodactyla</i> |
| | 3, 3 | <i>S. (P.) plicatum</i> |
| | 3, 2, 3 | <i>S. (C.) bidens</i> |
| | 2, 2, 2 | <i>H. tridens tridens</i> |
| | 1, 1, 2 | <i>C. convexus</i> |
| | 2, 2, 1 | <i>S. intermedium</i> |
| | 1, 1, 2 | <i>E. japonicus</i> |
| <i>S. (P.) plicatum</i> | 1, 2, 2 | <i>S. (H.) haematocheir</i> |
| | 1, 1, 2 | <i>S. (H.) dehaani</i> |
| | 1, 3, 3 | <i>S. (P.) pictum</i> |
| | 1 | <i>S. (P.) erythrodactyla</i> |
| | 4, 5 | <i>S. (P.) plicatum</i> |
| | 2, 5, 4 | <i>S. (C.) bidens</i> |
| | 2, 2, 2 | <i>H. tridens tridens</i> |
| | 2, 1, 1 | <i>C. convexus</i> |
| | 2, 2, 3 | <i>S. intermedium</i> |
| | 2, 1, 3 | <i>E. japonicus</i> |
| <i>S. (C.) bidens</i> | 1, 1, 1 | <i>S. (H.) haematocheir</i> |
| | 1, 1, 2 | <i>S. (H.) dehaani</i> |
| | 2, 1, 3 | <i>S. (P.) pictum</i> |
| | 1 | <i>S. (P.) erythrodactyla</i> |
| | 3, 6 | <i>S. (P.) plicatum</i> |
| | 4, 4, 3 | <i>S. (C.) bidens</i> |
| | 2, 2, 2 | <i>H. tridens tridens</i> |
| | 2, 2, 2 | <i>C. convexus</i> |
| | 2, 3, 2 | <i>S. intermedium</i> |
| | 1, 2, 1 | <i>E. japonicus</i> |
| <i>S. intermedium</i> | 2, 3, 2 | <i>S. (H.) haematocheir</i> |
| | 1, 3, 4 | <i>S. (H.) dehaani</i> |
| | 2, 2, 3 | <i>S. (P.) pictum</i> |
| | 1 | <i>S. (P.) erythrodactyla</i> |
| | 4, 4 | <i>S. (P.) plicatum</i> |
| | 3, 4, 4 | <i>S. (C.) bidens</i> |
| | 3, 3, 2 | <i>H. tridens tridens</i> |
| | 2, 3, 2 | <i>C. convexus</i> |
| | 2, 4, 1 | <i>S. intermedium</i> |
| | 2, 3, 2 | <i>E. japonicus</i> |
| <i>E. japonicus</i> | 1, 1, 1 | <i>S. (H.) haematocheir</i> |
| | 1, 1, 2 | <i>S. (H.) dehaani</i> |
| | 2, 1, 2 | <i>S. (P.) pictum</i> |
| | 1 | <i>S. (P.) erythrodactyla</i> |
| | 4, 3 | <i>S. (P.) plicatum</i> |
| | 3, 2, 2 | <i>S. (C.) bidens</i> |
| | 2, 3, 2 | <i>H. tridens tridens</i> |
| | 2, 3, 2 | <i>C. convexus</i> |
| | 2, 4, 3 | <i>S. intermedium</i> |
| | 1, 3, 6 | <i>E. japonicus</i> |

考 察

本実験では、主として河口域に生息する10種のカニ類について、その筋肉蛋白を用いて、Disc 電気泳動法による蛋白分画、あるいは Ouchterlony 法による沈降線形成について調べた。これにより、従来、形態によってなされてきた分類学の裏付け、ひいては再検討を試みようとしたものであり、この種の研究に向けての基礎的な資料を提供しようとするものである。まず Disc 電気泳動による結果についてみると、使用された10種カニ類においては、Fig. 1 の像や Table 1 の Rf 値から明らかなように、各種カニの筋蛋白分画には、かなりの「バラツキ」が認められた。したがって、これらのバンド中に種 species に特異なものを見出すことは、将来、可能であることが示唆された。ポリアクリルアミドゲルを支持体としたカラムには、全体として28本のバンドが認められた。このうち、バンド Nos. 1, 2 および 7 は、その吸光度の強さから、河口産のカニ類に共通したものであろうと考えられる。一方、モクズガニにおいては、他のカニ類と違って Nos. 1, 1A および 2 の3本のバンドの吸光度が高くなっている。すなわち、このカニの場合には、他の9種の河口産カニ類（ベンケイガニ亜科）とは、全く違った泳動パターンであり、モクズガニ亜科として Subfamily を異にしていることを示している。一方、使用された10種のカニすべてに共通なバンドとして、Nos. 1, 2, 5, 7 および 20 の5本が認められた。これらのバンドは、今回のベンケイガニ亜科ならびにモクズガニ亜科のカニ類すべてに共通なものかどうか明らかでない。この点については、今後、海産のカニ類をも含めた材料により検討されるべきである。バンド No. 4 は *Sesarma* 属のカニと *Sesarmops* 属のカニで見出され、アシハラガニ、ハマガニ、モクズガニではみられなかった。このことは、両属のカニが近縁にあることと関係するものといえる。すなわち、*Sesarmops* 属は最近になって Serène and Soh (1970) により *Sesarma* 属から分離・独立した属である。バンド No. 11 についてみると、これは *Sesarma* 属の *Parasesarma* 亜属と *Chiromantes* 亜属のカニだけで認められた。両亜属の形態学的な差異は、*Parasesarma* 亜属のものでは、前側縁に歯がなく、左右完全に平行しているのに対し、*Chiromantes* 亜属のものでは、前側縁の眠窩外歯の後方に明瞭な1歯があり、甲は前方に広がっているという点である。このように、両亜属は形態的には、はっきり区別されるが、蛋白分画の面では類似性を示す傾向がみられ、両亜属の関係が注目された。

カニ抗原と抗血清による沈降線の形式についてみると、まず同種抗原との反応が最も強かったカニ抗血清の種類は、フタバカクガニ、ハマガニおよびベンケイガニの3種である。このことは、これらの3種カニ類での抗原特異性が、比較的に高いことを示している。しかし、今回の成績によると、いずれの組み合わせにおいても、沈降線が出現し、種に特異なバンドを見出すことは出来なかった。これは、本実験の感作に用いたカニの蛋白抗原に帰因するものと考えられ、今後は、さらに精製した抗原を用いることにより、特異反応を見出すことは可能といえる。

今回のカニ類についての研究から、従来の形態による分類学に対し、多くの結論的なことを引き出すことは困難であった。しかし、この実験の結果から、属間あるいは亜属間の関係について、興味ある知見が得られた。今後は、Disc 電気泳動用の試料蛋白や抗原用蛋白の抽出法を検討することにより、特異性を見出し、種間の類縁・親疎を明らかにしていく必要がある。

要 約

河口および河川に生息するカニ類を用い、Disc 電気泳動や Ouchterlony 法を試み、これらの生化学的、免疫学的手法により、カニ類の分類、ひいてはその類縁を追究するための基礎的な実験を行なった。使用されたカニ類は、アカテガニ、クロベンケイガニ、カクベンケイガニ、ユビアカ

ベンケイガニ, オオユビアカベンケイガニ, フタバカクガニ, アシハラガニ, ハマガニ, ベンケイガニおよびモクズガニの10種である。Disc 電気泳動によると, *Sesarma* 属, *Chasmagnathus* 属, *Eriocheir* 属, *Parasesarma* 亜属およびカクベンケイガニでは, それぞれに特有なバンドが見出された。また *Parasesarma* 亜属と *Chiromantes* 亜属および *Sesarma* 属と *Sesarmops* 属の それぞれの間には, 共通バンドが出現し, 両亜属ならびに両属間の関係が注目された。Ouchterlony 法によっては, 同種抗原と抗血清の反応が特に強いということではなく, 筋蛋白の粗抗原では広い共通抗原性の存在が明らかにされた。したがって, 今後は, Disc 電気泳動, Ouchterlony 法ともに, その実施に当っては, 試料としての筋蛋白の精製が必要である。カニ類におけるこの種の研究は, これまでに皆無といえるが, 今後は多くの種類について, 同様なデータを蓄積し, 詳細な検討が望まれる。

文 献

- Davis, G. M. (1968): A systematic study of *Oncomelania hupensis chiui* (Gastropoda, Hydrobiidae). *Malacologia*, 7, 17-70.
- Davis, G. M., and Lindsay, G. K. (1967): Disc electrophoretic analysis of molluscan individuals and populations. *Malacologia*, 5, 311-334.
- Hess, P. W., and Smith, R. A. (1967): Electrophoresis of Elasmobranch serum proteins with cellulose acetate. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 96, 131-133.
- Imperato, S., Foresi, C., and Martinetto, P. (1968): Comparative analysis of antigenic constitution of *Ascaris lumbricoides* var. *hominis* and var. *suum*. *Riv. Ist. Sieroter. Italiano*, 43, 235-240.
- 栗本 浩 (1974): 人蛔虫と豚蛔虫の異同に関する形態学的, 生化学的ならびに免疫学的研究. *寄生虫誌*, 23, 251-267.
- Ornstein, L., and Davis, B. J. (1960): Disc Electrophoresis. Preprint, Distillation Products Ind., Rochester (1962); *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121-404.
- Martinetto, P., Cappuccinelli, P., and Negro, P. A. (1989): Analisi Immunoelettroferetica degli antigeni di *Ascaris lumbricoides* var. *suum*. I. Composizione antigenica di differenti strutture e del parassita in toto. *Ig. Mod.*, 61, 870-879.
- 酒井 恒 (1976): 日本産蟹類. 講談社, 東京
- Sakai, T. (1976): Crabs of Japan and the adjacent seas. Kodansha Ltd., No. 21 Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.
- Serène, R., and Soh, C. L. (1970): New Indo-Pacific genera allied to *Sesarma* Say 1817 (Brachyura, Decapoda, Crustacea). *Treubia*, 27, 387-416.
- Taniguchi, N. (1969): Comparative electropherograms of muscle proteins of three species of lizard fishes referable to the genus *Saurida*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 35, 885-890.
- Taniguchi, N., and Nakamura, I. (1970): Comparative electropherograms of muscle proteins of two species of frigate mackerel. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 36, 173-176.
- Taniguchi, N., and Ishiwatari, T. (1972): Inter- and intraspecific variations of muscle proteins in the Japanese crucian carp-I. Cellulose-acetate electrophoretic pattern. *Jap. J. Ichthyol.*, 19, 217-222.
- 辻 守康 (1974): 寄生蠕虫症の免疫学的診断法. 検査と技術, 2(2), 33-36.
- 辻 守康・横川宗雄・キャブロン, アンドレー (1969): 免疫電気泳動法による Host parasite relationship 検討の試み(1). *寄生虫誌*, 18, 387.
- Tsuyuki, H., and Roberts, E. (1963): Species differences of some members of Salmonidae based on their muscle myogen patterns. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 20, 101-104.
- Tsuyuki, H., and Roberts, E. (1965): The species specificity and constancy of muscle myogen and hemoglobin electropherograms of *Oncorhynchus*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 22, 215-216.
- Williams, J. F., and Soulsby, E. J. L. (1970): Antigenic analysis of developmental stage of

- Ascaris suum*. I. Comparison of eggs, larvae and adults. Exp. Parasit., 27, 150-162.
- 吉田幸雄・栗本 浩 (1999) : ブラジル鉤虫とセイロン鉤虫の成虫の Disc 電気泳動像について. 寄生虫誌, 18, 673.
- Yoshimura, K. (1968): Disc electrophoretic comparison between *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* adult worms. Jap. J. Parasit., 17, 382-394.
- Yoshimura, K. (1969a): *Paragonimus westermani*, *P. ohirai* and *P. miyazakii*: Electrophoretic comparison of whole body proteins. Exp. Parasit., 25, 118-130.
- Yoshimura, K. (1969b): *Paragonimus*: Electrophoretic fractionation of whole body proteins as an aid specific identification of a species from Sado Island, Japan. Exp. Parasit., 25, 107-117.
- Yoshimura, K., Hishinuma, Y., and Sato, M. (1970): A preliminary study on the Disc electrophoretic patterns of *Paragonimus kellicotti* Ward, 1908 adult worms. Bull. Megro Parasit. Mus., 3, 12-17.

(昭和54年9月25日受理)

(昭和55年1月17日発行)