鶏の産卵生理に関する研究

卵黄中の蛋白分解酵素 (Proteinase) について

細田 達雄・森 純一・阿部 恒夫

農林省畜産試験場 千葉市

著者¹⁾らは産卵中の鶏をキガの状態におくと卵巣の濾胞 (卵黄) に濾胞萎縮 (Atresia) がおこり、またキガにすると同時に GTH 製剤を適量投与すると卵黄における濾胞萎縮の発現が阻止されることを報告した。この実験から、キガによって脳下垂体からの GTH の分泌が減少し、その結果として濾胞萎縮がおきたことは明らかである。然し GTH が減少するとなぜ濾胞萎縮になるのか、その機構は全く判っていない。REICHERT²⁾は健康ラットの卵巣中には pH4 及び pH8 において最も高い活性値を示す蛋白分解酵素が存在し、これらは羊 FSH 及び人 HCG を投与すると酸性の蛋白分解酵素値は減少しアルカリ性の蛋白分解酵素値が増加することを認め、さらに REICHERT³⁾は各種臓器中に存在する蛋白分解酵素の生理的意義は判らないが、ラットの性周期及び妊娠に伴う卵巣の蛋白分解酵素活性値を測定したところ、発情期及び発情休止期の卵巣中に酸性及びアルカリ性蛋白分解酵素活性値が共に高く、妊娠期或は偽妊娠期には共に低いことを明らかにした。森及び檜垣⁴⁾は牛卵巣中の蛋白分解酵素活性値について測定し、牛卵巣の蛋白分解酵素は pH4 と pH8 に至適値をもつ 2 つの酵素からなり、卵巣実質に比較し、黄体は pH4 に至適値をもつ蛋白分解酵素活性値が、卵胞膜は pH8 に至適値をもつ蛋白分解酵素活性値がそれぞれ高く、また卵胞囊腫液は正常卵胞液よりも低い値を示したと報告した。このほかに動物の各種臓器中に蛋白分解酵素の存在することを報告した例は多くあるが、その生理的な意義については明らかにされていない。

これらの成績から、鶏の濾胞 (卵黄) 中にも蛋白分解酵素が存在し、これが脳下垂体から分泌される GTH によって影響されることが当然考えられ、従って濾胞萎縮の発生と何等かの関係をもつものと予想される。然るに著者らは鶏卵黄中に蛋白分解酵素が存在するか否か或は卵黄が濾胞萎縮になるときその値が如何に変化するのかについて報告されたものを知らない。よってこれらの点を明らかにするために放卵された卵黄並びに卵白、及び卵巣において発育中の大小各種の卵黄の蛋白分解酵素活性

値について測定を行った。

実験材料並びに方法

実験鶏: 産卵中の白色レグホン種を用い、殺処分後直ちに卵巣を取り出し、秤量後実験に供した。萎縮濾胞を得るための鶏は産卵中のものを給水しながら 4 日ないし 5 日間絶食させた。その間毎日翼下静脈より採血して血清ビテリンの消長を調べ濾胞萎縮の発現の程度を推測した。

卵黄及び卵白: 正常卵黄は放卵後 2 日以内の卵より卵白を完全に分離したものである。卵白は卵黄より分離後ピーカーの中で充分攪拌した後ガーゼで濾過し、pH 7.12 の磷酸緩衝液で 5 倍量に稀釈した。

蛋白分解酵素活性値の測定: 基質は変性ヘモグロビン 20 g, 尿素 324 g, 醋酸ソーダ 24.5 g, 醋酸 0.3 g に蒸溜水を加えて 1 l とし、pH を HCl 及び NaOH によりそれぞれ pH4 と pH8.2 の 2 種類に規正した。

試料: 卵黄 2 g (卵白は 2 cc) に 8 cc の蒸溜水 (卵白の場合は磷酸緩衝液) を加え十分攪拌した後試験管内に 1 cc とり、これを氷水中に保ちながら 1 cc の基質液と混合し 40°C の恒温槽中に 20 分間保った。除蛋白のためには恒温槽から取り出した試験管を直ちに氷水中に移し、これに 10% TCA 溶液 2 cc を加え 1 時間 40°C の恒温槽中に静置後濾過した。各試料の対照は 40°C の恒温槽に保つ前に 10% TCA 2 cc を加えて反応を阻止した後ほかの試料と同様の処置をした。また各試料はすべて 2 例ずつ平行的に行い、両者の誤差の少ないことを確かめ、その平均値をそれぞれの試料の値とした。

蛋白分解酵素活性値の表示: 以上の如くして得た濾液 1 cc を蒸溜水で 4 倍に稀釈し、光電分光光度計 (島津製作所 Model QV-50) により 280 mμ の波長の吸光度を測定し、その吸光度の増加を酵素活性値とした。

実験成績

1. 卵黄の蛋白分解酵素活性値

鶏の卵黄に蛋白分解酵素があるか否かを知るために数羽の卵について行った成績を示すと第 1 表の如くであ

第 1 表 卵黄中の蛋白分解酵素活性値
Table 1. Proteinase activity of egg yolk

ニワトリ番号 Bird No.	酵 素 活 性 値* Proteinase activity	
	pH 4	pH 8.2
639	0.019	-0.006
"	0.018	-0.009
"	0.014	-0.015
"	0.007	-0.010
"	0.012	-0.005
620	0.014	—
192	0.016	—
73	0.011	—
30	0.016	—
200	0.014	—
平 均 Average	0.014	-0.009

* 280 m μ の吸光度の増加で表わす。
Expressed as optical density increment

る。即ち pH 4 の吸光度は 0.007 より 0.019 の値を示し平均 0.014 であった。この成績は試料が 5 倍に稀釈してあることを考慮に入れると森らの報告した牛卵胞の蛋白分解酵素活性値の 2 倍位に相当する。然るに pH 8.2 においては吸光度の増加は全くみられなかった。即ちこの成績から鶏卵黄中には pH 4 に至適値をもつ蛋白分解酵素の存在することが明らかにされた。

2. 同一個体における卵黄の蛋白分解酵素活性値
卵黄中に存在する蛋白分解酵素活性値が続いて放卵される同一個体の卵のそれぞれによって一定の値を示すか否かを知るために測ったのが第 2 表の成績である。

前述の如く pH 8.2 の蛋白分解酵素活性値は陰性であったため以後の実験には省略した。

連日産卵する鶏をうることはできなかったが、ここに示した 3 例の如く、各個体の 3~5 ケの卵の実験例においては著るしい変動はなかった。

つぎに同じ鶏個体の卵巣で发育中の大小各様の卵黄について調べた。その成績は第 3 表の如くである。

第 2 表 同一個体における卵黄の蛋白分解酵素活性値 (pH 4)
Table 2. Fluctuation of proteinase activity of egg yolk in individuals.

No. 639		No. 663		No. 620	
月 日 Date	活 性 値 Activity	月 日 Date	活 性 値 Activity	月 日 Date	活 性 値 Activity
5. 26	0.019	9. 29	0.016	10. 7	0.014
27	0.018	10. 4	0.017	11	0.014
31	0.014	5	0.015	19	0.016
6. 1	0.007	7	0.014	—	—
2	0.012	—	—	—	—
平 均 Average	0.014	平 均 Average	0.016	平 均 Average	0.015

第 3 表 同一個体における发育中の卵黄の蛋白分解酵素活性値 (pH 4)
Table 3. Proteinase activity of growing follicles.

No. 1		No. 2		No. 3	
濾胞重量 Weight of follicle	活 性 値 Activity	濾胞重量 Weight of follicle	活 性 値 Activity	濾胞重量 Weight of follicle	活 性 値 Activity
16.8 g	0.016	16.0 g	0.013	16.6g*	0.014
13.7	0.015	13.0	0.016	10.0	0.016
8.9	0.014	9.1	0.016	—	—
5.1	0.013	4.4	0.019	—	—
平 均 Average	0.015	平 均 Average	0.016	平 均 Average	0.015

* 排卵直後
Just after ovulation

即ち卵黄重量は 16.8 g のものから 4.4 g のものまで色々であったが発育の程度（重さ）と蛋白分解酵素活性値の間に一定の関係はなかった。また No. 3 の鶏では排卵直後とも思われる卵黄が輸卵管中より得られたが表の成績の如くほかのものと変りがなかった。

3. 卵白の蛋白分解酵素活性値

以上の如く卵黄には明らかに蛋白分解酵素が存在するのでつぎに卵白の蛋白分解酵素の有無について調べた。その成績は第 4 表の如くである。

即ちこの成績において卵白の pH 4 における蛋白分解酵素活性値は -0.007 の低いものから 0.009 まであり、平均 0.003 で殆んど陰性に近かった。これに対し pH 8.2 の活性値は 0.001 より 0.016 で平均 0.013 とむしろ pH 4 の値よりも高い値を示した。一般に卵白の蛋白分解酵素活性値は個体によりかなりの差異が認められ

た。その原因については明らかにされなかった。

4. 萎縮濾胞の蛋白分解酵素活性値

キガにより鶏卵巣に誘起される萎縮濾胞には、大きさの違い、出血の有無及びその程度、或は内容物の溶解の程度などにより色々な型が認められる。然しながら、ここには各個体ごとに萎縮濾胞の重量の順に蛋白分解酵素活性値を示した。その成績は第 5 表である。

即ち正常卵黄の蛋白分解酵素活性値は平均 0.014 であったが萎縮濾胞のそれは 0.130 と殆んど正常値の 9 倍の値にまで増加していた。同じ萎縮濾胞を 5 g 以上のものとそれ以下のものに区別して蛋白分解酵素活性値を比較したところ、前者は平均 0.075 (4 例) であるのに対し、後者は 0.149 (12 例) と著しい差異がみられ後者は正常値の 10 倍以上の値であった。また萎縮濾胞の重さの大小にかかわらず、一般に出血性の強いものは出血のない濾胞に対し高い値を示した。然し血清の蛋白分解酵素活性値を pH 4 の基質により測定したところ陰性であった。

正常卵黄には pH 8.2 の至適値の蛋白分解酵素は認められず、また萎縮濾胞についても矢張り陰性であった(表略)。

考 察

産卵中の鶏において何等か外的な刺激或は生理的な変化によって脳下垂体からの GTH の分泌が中止されると発育中の卵黄に濾胞萎縮のおこることは既にのべた通りであるが、この場合卵黄ピテリンがそのままの抗原性をもって血液中に大量に流入するならば血清ピテリンの水準は一時的にでもかなり増加して良い筈であるが、むしろ血清ピテリンの水準は急速に減少していくから、卵黄

第 4 表 卵白中の蛋白分解酵素活性値
Table 4. Proteinase activity of egg white

ニワトリ番号 Bird No.	酵 素 活 性 値 Proteinase activity	
	pH 4	pH 8.2
1692	0.003	0.008
1737	0.005	0.015
1881	-0.001	0.001
1891	0.004	0.013
1846	-0.007	0.004
1871	0.005	0.015
1883	0.009	0.016
平 均 Average	0.003	0.013

第 5 表 萎縮濾胞中の蛋白分解酵素活性値 (pH 4)
Table 5. Proteinase activity of the contents of atretic follicles.

ニワトリ番号 Bird No.	Atretic 1		Atretic 2		Atretic 3		対照卵黄 Control
	濾胞重量 Weight of follicle	活 性 値 Activity	濾胞重量 Weight of follicle	活 性 値 Activity	濾胞重量 Weight of follicle	活 性 値 Activity	
620	6.1 g	0.093	1.7 g	0.216	— g	—	0.014
192	9.9	0.083	2.4	0.070	1.9	0.097	0.016
73	1.8	0.173	1.7	0.142	—	—	0.011
30	8.5	0.045	—	—	—	—	0.016
200	5.5	0.079	3.6	0.127	0.8	0.189	0.014
52	4.2	0.073	2.3	0.119	1.7	0.154	0.014
48	2.2	0.201	0.7	0.220	—	—	0.014

全平均 (Average value of atretic follicles)=0.130

5 g 以上の萎縮濾胞の平均 (Average value of atretic follicles over 5 g)=0.075

4.9 g 以下の萎縮濾胞の平均 (Average value of atretic follicles less than 4.9 g)=0.149

ビテリンが何等かの形に変化し毛細血管を通し血液中に流出しその結果として卵黄が収縮すると考えざるを得ない。同様のからくりが孵卵中の鶏胚が卵黄を吸収利用する場合にも考えられる。即ち發育中の鶏胚体内には卵黄ビテリンの血清学的性質は全く証明されないから吸収される前に何等かの変化をうけることが予想される。この点については別に報告する予定である。

本実験において鶏の卵黄中に pH 4 に至適値をもつ蛋白分解酵素が存在し、しかもこれが萎縮濾胞の卵黄において著るしく高い活性値に達することが明らかにされた。ADAMS AND SMITH⁵⁾ は、細胞にあるこの酵素は特殊な生理的役割よりも代謝作用に一般的な役割を演じているだけと結論し、TODD AND TRIKOJUS⁶⁾ は甲状腺、副腎及び卵巣中の蛋白分解酵素の役割について同様に考え、KORITZ AND PERON⁷⁾ は、副腎皮質に存在する蛋白分解酵素はステロイド合成に必要な何等かの因子の放出と関係していると予想した。REICHERT²⁾ は内分泌腺にある蛋白分解酵素の真の意義は判っていないと報告している。著者らのこの実験結果から、萎縮濾胞における蛋白分解酵素の著しい増加が卵黄の予想される変化と直接的な関係をもつか否かを即断することはできないが何か重要な意義のあることは想像できる。

正常卵の卵白には、蛋白分解酵素が僅かにしか証明されなかったが、元来孵卵中の鶏胚は孵卵開始から孵化が終るまで卵黄を血管を介して吸収利用しており、一方、卵白は孵化の後期から経口的に利用しているといわれている。従って鶏胚が卵黄を血管から吸収するのに蛋白分解酵素の作用を必要とするためにその値が高いと考えた場合でも、卵白中の蛋白分解酵素は必要性が少いので、その作用が弱くても理論的におかしくない。

萎縮濾胞は正常卵黄に比較し著るしく高い蛋白分解酵素活性値を示したが特に小さい萎縮濾胞が大きいものより高い蛋白分解酵素活性値を示した。その原因は、萎縮の進行度によるか、卵黄の濃縮の割合か或は小さい萎縮濾胞から必要量の卵黄をとるとき卵胞膜を圧出するため膜中の蛋白分解酵素が機械的に卵黄中に圧出されるのか判っていない。また出血性萎縮濾胞の蛋白分解酵素活性値が出血のないものより高い傾向にあったが、その原因が蛋白分解酵素活性値が高いために出血したのか或は出血したために高くなったのかということも判っていない。血清には蛋白分解酵素の作用が認められないから卵

黄中に混在した血液そのものに原因のないことは明らかである。これら不明な点については更に実験を行なう必要がある。

要 約

著者らは鶏卵黄及び卵白中に蛋白分解酵素が存在するか否か、また萎縮濾胞中の蛋白分解酵素が如何に変動するかを知る目的で本実験を行った。実験に用いたのはいづれも白色レグホン種のもので、放卵された卵黄および卵白、卵巣において發育中の大小各種の卵黄である。又萎縮濾胞は産卵鶏を 4~5 日間絶食させることによって作り出した。蛋白分解酵素の測定法は変性ヘモグロビンを基質とし、その分解産物を 280 m μ の波長で測定して吸光度の増加を酵素活性値とした。

得られた結果は次の通りである。

1. 鶏の卵黄中には pH 4 において至適値をもつ蛋白分解酵素作用が認められた。その活性値は平均 0.014 であった。pH 8.2 の蛋白分解酵素作用は本実験においては陰性であった。
2. 同一個体が産卵した卵黄或は同一個体の卵巣において發育中の卵黄の蛋白分解酵素活性値は卵黄の大きさにかかわらずほぼ一定の値を示した。然し個体間には或る程度の差異がみられた。
3. 卵白には pH 8.2 の至適値において極めて低く、pH 4 においては陰性の蛋白分解酵素の作用であった。
4. 産卵鶏を絶食させて卵巣に実験的に誘起した萎縮濾胞の卵黄における蛋白分解酵素活性値は正常に産卵された卵の卵黄に比較し著るしく高く平均 0.130 で、特に出血性のもの及び小さい萎縮濾胞ほどその値は大であった。

引 用 文 献

- 1) HOSODA, T., T. KANEKO, K. MOGI AND T. ABE: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **92**, 360, 1956.
- 2) REICHERT, L. E.: Endocrinology **70**, 690, 1962.
- 3) REICHERT, L. E.: *ibid* **71**, 838, 1962.
- 4) 森 純一・楡垣繁光: 日畜会報, **36**(別), 1965.
- 5) ADAMS, E. AND E. L. SMITH: J. Biol. Chem. **191**, 651, 1951.
- 6) TODD, P. E. E. AND V. M. TRIKOJUS: Biochem. Biophys. Acta **45**, 234, 1960.
- 7) KORITZ, S. B. AND F. G. PERON: J. Biol. Chem. **234**, 3122, 1959.

Physiology of Egg Production in the Fowl

Presence of Proteolytic Enzymes in Egg Yolks and Atretic Follicles of Chickens.

TATSUO HOSODA, Junichi MORI AND TSUNEO ABE

National Institute of Animal Industry, Chiba-shi

Proteolytic enzymes are known to exist in a wide variety of tissues. ADAMS AND SMITH demonstrated the existence of two distinct proteinases having pH optima at 3.8 and 8.2 in the anterior lobes of bovine and porcine pituitaries.

This experiment was undertaken to elucidate the existence of proteinases in normal yolks of chickens and in atretic follicles induced in laying hens by starvation. Samples used for the analysis of the enzymes were diluted 5 times by distilled water or by phosphate buffer of pH at 7.12. In this experiment, the increase of absorbancy at 280 m μ by spectro-photometer was defined to be the proteinase activity of the samples. Following are the results we obtained:

- 1) Normal egg yolks showed the proteinase activity of the absorbancy of 0.014 in average at pH 4. The enzymatic activity at pH 8.2, however, was negative in our diluted samples of egg yolks.
- 2) Egg yolks laid by each hen and follicles maturing in her ovary showed relatively constant level of proteolytic activity.
- 3) Proteolytic activity was weak in egg white and negative in blood serum at pH 8.2 and pH 4, respectively.
- 4) An accererated activity of proteolytic enzyme was elucidated in atretic follicles, which showed the absorbancy of 0.130 at pH 4. But, the activity at pH 8.2 was negative in these follicles. (Japan. Poultry Sci., **3**, 139, 1966)