鶏卵卵黄の電気泳動成分について(第一報)

新潟大学理学部化学教室

菅 野 浩

On the Electrophoretic Components of the Hen's Egg Yolk. I.

Hiroshi Sugano

(Department of Chemistry, Faculty of Science, Niigata University)

After an egg yolk suspension containing 10% NaCl was extracted with diethyl ether, resulting clear aqueous solution was dialyzed against the buffer of 0.05 M NaHCO_3 -0.05 M Na_2CO_3 (pH 10.0 and ionic strength 0.2) without forming any precipitate during dialysis, and then the electrophoretic pattern of the whole egg yolk was obtained. Both the extraction with ether at low salt concentration and the standing of the egg yolk solution after removing the ether layer used for extraction are found to form a small amount of precipitate. In this way, eight electrophoretic components in the whole egg yolk have been shown. But the possibility of the existence of more components was assumed from other results which will be discussed in later report.

The water-soluble fraction (livetins fraction) obtained by water-dialysis of the whole egg yolk consists at least of three main components. The influence of the ether extraction of the whole egg yolk on the relative concentrations of these components was investigated and the results agreed with the work of C. C. Shepard, et al. (1949).

The patterns of the whole egg yolk after extracting with ether four times and of the water-insoluble fraction (vitelline fraction) prepared therefrom were obtained. From these patterns and other results, the positions of the components of the water-soluble fraction in the electrophoretic pattern of whole egg yolk were decided.

I. ま え が き

或意味で Casein と同じ役割をしている卵黄の蛋白質成分に関する研究は、Casein のそれより遅れているように思える。卵黄蛋白質に関する綜説にも見られるように、卵黄に10%食鹽水を加えた後エーテルで lecithin 等の lipids を抽出除去後、水で稀釋或いは透析して得られる vitelline とその濾液を熱凝固して得られる livetins の二つは古くより知られている。vitelline は全體の80%を占め0.8~1.2%の磷を含む lipoprotein であり、livetins は残り20%を占め lipid も磷を含まれていないとゆう報告もあるが、磷蛋白であるとも述べられている。其後 lipovitelline は含磷量の違つた二つの部分に分けられ、その一つエーテルを飽和した10%食鹽水にのみ溶解性を示すを lipovitelline に對して lipovitellenine の名が與えられている。一方最近では、水溶性の livetins 部分が電気泳動的に三成分からなることが知られた。又10%の磷を含む phosphovitin 成分が分離され、この磷は卵黄の蛋白磷の少くも60%に相當する事が報告された。

このように次第に新たな成分が見出されてくるにつれて、欲しいのは全卵黄成分の電気泳動圖形である。然し

ながら從來これが見られなかつたのは、卵黄蛋白が鹽濃度の稀釋に對して沈澱し易い性質を持つていたためと思われろ。この研究ではまず全卵黄を電気泳動にかけ得る條件を見出し、その結果得られた圖形を示した。ついで水溶性、非水溶性部分に分けて、夫々の泳動圖形を求めた。又エーテル抽出の操作につれて、これらの成分の相對濃度に起る變化の模様を述べた。

II. 實 驗

1. 試 料

新鮮な白色レグホーンの卵黄を出来るだけ良く卵白から分け、ついで tap water で充分洗う。之を濾紙上にうけとり、ころがして卵黄膜上の附着物を取り除いた後、ピンセットで一端をつまみ上げ他端を剃刃で破く。内容物が充分得られたら、水溶性部分を得る時には2容の10%食鹽水を、又そうでない時には2容或いは約100 cc の10%食鹽水を加えて出發試料とした。エーテル抽出は等量の diethyl ether を加えて良く振り、以後も時々振つてつて室温(約10°C)で2晝夜經過を以て1回とした。層の分離には壓へ遠心分離をも用いた。このようにして得た溶液は電気泳動にかけ得る程度に充分透明

である。これから水溶性 livetin 部分を得るには水道流水で2日、蒸留水でとりかえながら1日透析を行い、沈澱 vitelline 部分を遠心分離した。沈澱 vielline 部分は蒸留水で数回洗って遠心分離し、10%食鹽水を適量蛋白濃度が得られるように加えてやると、ゆつくりと溶解して前と同様な透明溶液が得られる。エーテル抽出操作は各回全卵黄について行い、それから水溶性、非水溶性部分を分離した。

2. 測定

同筒レンズ使用のチセリウス型装置を用い全部長脚セルで實施した。電流 18~22mA, 電壓 130~180V, 1~2°C に於て 120分と 180分で撮影した。次に buffer であるが acetate PH 3.9 μ 0.1, phosphate PH 6.8 μ 0.13, 及び PH 7.8 μ 0.16 の三種を NaCl で夫々 μ 0.3 にした buffer で試料を透析したところ、何れの場合も沈澱を生ずるので不適当である事が分つた。そこで Menzel に従つて 0.05 M NaHCO₃—0.05 M Na₂CO₃, PH 10.0 μ 0.2 の buffer を調製し、之に對して透析を行つてみたところ全く沈澱を見出さなかつたので、この條件を用いて行つた。この buffer 800 cc に對して2晝夜氷冷蔵庫中で透析平衡を行つた後泳動にかけた。

III. 結 果

Fig. 1 に示した圖形は、卵黄1個に對し約100cc の10%食鹽水を加えて等量よりやや少ないエーテルで1回抽出操作を行つた試料について、蛋白濃度 1.8%, 160V, 21 mA で180分後に得た全卵黄の泳動圖形である。前述したようにこの間沈澱は全く生じていない。上昇下降兩圖形から8成分の存在が認められる。又兩圖形から比較するに中央の大きな主峰の非對稱性にはかなり特徴があるように見うけられる。

Fig. 2 に示した圖形は、卵黄に2容の10%食鹽水を加えエーテル抽出を行なうて直ちに流水透析つゞいて蒸留水透析にかけ、蛋白濃度 0.4%, 185V, 20 mA で120分後に得た水溶性部分の泳動圖形である。上昇下降兩圖形からは何れも3成分の存在が認められるが、180分後には第1の峰が少なくとも2成分に分れ、又第2と第3の峰の間に小さな1つの峰の存在するのが見うけられた。

Fig. 3 は4回エーテル抽出操作を行つた後の水溶性部分の、蛋白濃度 0.6%, 150 V, 16 mA で120分後に得た泳動圖形である。やはり3成分の存在には變りがないが、第2の成分の相對濃度が増加しているのが明瞭に認められる。

Fig. 4 は4回エーテル抽出操作を行つて、蛋白濃度 1.3%, 140 V, 18 mA で180分後に得た全卵黄の泳動圖形である。Fig. 1 の1回エーテル抽出全卵黄の圖形と比較

て見ると、白丸矢印の成分(假りにL成分と味ぶ)の相對濃度に減少が見られる。

Fig. 5 は Fig. 4 に得られた4回エーテル抽出全卵黄から得た非水溶性部分の泳動圖形で、蛋白濃度 0.8%, 130 V, 18 mA で120分後に得られたものである。兩圖形の比較並びに其他の圖形から検討して、水溶性部分の3成分は全卵黄圖形中の黒丸矢印のところに位置すると思われる。

Fig. 1 Whole egg yolk after extraction with ether one time.

Fig. 2 Water-soluble fraction (livet in fraction) without ether extraction.

Fig. 3 Water-soluble fraction (livet in fraction) prepared after extraction of whole egg yolk with ether four times.

Fig. 4 Whole egg yolk after extraction with ether four times.

Fig. 5 Water-insoluble fraction (vitelline fraction) prepared after extraction of whole egg yolk with ether four times.

IV. 考 察

先に Shepard 等が livetin 部分について得た圖形と、著者が以上の如くにして得た水溶性部分の圖形とを比較してみると、何れも卵黄の水溶性部分に3個の主な成分が存在している點で一致している。又彼が彼の Method-B に従つてエーテル抽出なしに得た livetin 部分と、著者が得たエーテル抽出なしの水溶性部分とは、略同一試料であることが推定されるのであるが、この事は彼の Fig. 4 と著者の Fig. 2 とを比較してみても一層明らかになる。更に彼はこのエーテル抽出なしの livetin

部分に對して、エーテル抽出操作を行つた後の圖形を Fig. 3 に掲げているが、これは著者が全卵黄に對して4回エーテル抽出操作を行つた後に透析分離して得た水溶性部分の圖形 Fig. 3 に見られると同様、3成分の中の中央の第2成分の相對濃度に増加が認められる。

全卵黄の泳動圖形に於て、L成分からその前方の裾にかけてあたりには、少なくとも數個の峰が重なつてゐる事が他の事實から推定されるのであるが、この事については後報に述べる豫定である。

V. 要 約

1. 10%食鹽水溶解、エーテル抽出後の全卵黄に對し 0.05 M NaHCO₃—0.05 M Na₂CO₃, PH 10.0 μ 0.2 の buffer を使用する事により全く沈澱を生ずる事なしに電気泳動を實施し得た。
2. その結果上昇下降兩圖形から少なくとも8個の峰の存在を認め得たが成分の數は更に多い事が推定された。
3. 水溶性部分として少なくとも3個の主な成分の存在する事、及び全卵黄に對するエーテル抽出操作がこれらの成分の相對濃度¹²⁾に與える影響が見られ、C. C. Shepard 等 (1949) と一致する結果が得られた。
4. エーテル抽出4回¹²⁾の全卵黄及び非水溶性部分の泳動圖形が示され、全卵黄中水溶性成分の位置が推定された。

文 献

- 1) Needham, "Chem. Embryology" Cambridge Press., Vol. I, 287—294 (1931).
- 2) Jukes, and Kay, J. Nutrition, Vol. 5, 81 (1932)
- 3) H. O. Calvery, and A. White, J. Biol. Chem., Vol. 94, 635 (1931)
- 4) H. P. Kay, and P. G. Marshall, Biochem. J., Vol. 22, 1264 (1930)
- 5) McFarlane, Biochem. J., Vol. 26, 1061 (1932)
- 6) Blackwood, and Wishart, Biochem. J., Vol. 28, 550 (1934)
- 7) Chargaff, J. Biol. Chem., Vol. 142, 491 (1942)
- 8) Kay, and Marshall, Biochem. J., Vol. 22, 1264 (1928)
- 9) F. Haurowitz, "Chemistry and Biology of Proteins," Chap. XI, 194 (1950)
- 10) G. Alderton, and H. L. Fevold, Arch. Biochem. Vol. 8, 415 (1945)
- 11) H. L. Fevold, and A. Lausten, Arch. Biochem. Vol. 11, 1 (1946)
- 12) C. C. Shepard, and G. A. Hottel, J. Biol. Chem. Vol. 179, 349 (1949)

- 13) D. K. Mecham, and H. S. Olcott, J. Am. Chem. Soc., Vol. 71, 3670 (1949)

(20頁より續く)

液の中に含まれる。抽出液を pH 4.5 とした濾液をアルコールによつて分割し、更に之を水によつて抽出すれば、この中へ抽出される。各分層を電気泳動及び泳動對流によつて處理することにより、磷酸酵素が易動度小なる Globulin 中に含まれることを推定し得た。

本研究は文部省科學研究費の補助を得てなされたものである。ここに厚く謝意を申しのべる。

文 献

- 1) 中村正二郎, 前田隆朗; 生化學, **22**, 268, (1950)-
- 2) Allen, R. J. L., Bioch. J., **34**, II, 888 (1940)-
- 3) 高橋基之, 未發表.
- 4) 赤松茂, 日本醫學會雜誌 (第12回) 69 (1946).
- 5) Cann, J. R. et al., J. Am. Chem. Soc., **71**, 1602 (1949).

*) 第23回日本生化學會總會に於て要旨を發表。

但し Nucleoprotein 沈澱の中には L₁ の中に存在した磷酸酵素の $\frac{2}{3}$ が共沈しているから、之を選擇的に溶出することも極めて望ましい。

※) 硫酸鹽析が再現性に乏しいのは透析によつて助酵素の失はれるためと考えられるが、我々は尙 Mg に對する考慮を怠つていたので之に對する検討も必要である。

(51頁より續く)

(結核性 N=24, 氣胸性 N=10, 濾出液 N=18) 尙 48 回日内學會に於て發表した滲出性肋膜炎の Alb の標本固體線式は誤である。

2. 腹腔滲濾液の場合も同様の傾向を認めた。

總蛋白濃度

結核性: $y = -1.15 + 0.74 x$, $r = 0.840$

Alb 濃度

結核性: $y = 0.15 + 0.68 x$, $r = 0.786$

濾出液: $y = -0.87 + 0.56 x$, $r = 0.818$

總 Glob. 濃度

結核性: $y = -0.22 + 0.67 x$, $r = 0.804$

r-Glob. 濃度

結核性: $y = 0.14 + 0.59 x$, $r = 0.754$

フィブリノーゲン濃度

結核性: $y = 0.17 + 0.21 x$, $r = 0.484$

糖 性: $y = 0.09 + 0.20 x$

(結核性 N=22, 癌性 N=10, 濾出液 N=11)

3. 心筋障礙の程度は (日内學會 46 回) 既に發表の如く A/G 商の低下 (Alb 濃度の低下) と電気泳動法によつても一定の相關のある事を認めた。(A/G: $r = -0.673$, Alb 濃度 $r = -0.656$, Glob 濃度 $r = 0.382$)

以上要するに滲濾出機轉はその毛細管の侵襲度に應じて透過性の亢進を來し Proteinuria より mehr albuminurie に至る迄の種々な程度の血漿蛋白質の透過を來すものと考えられる。