〔報 告〕

セルロースアセテート膜電気泳動法における
産卵鶏血清の波形帯に関する研究

七條喜一郎・竹内 崇・鈴木 實

はじめに

産卵鶏の血清をセルロースアセテート膜（セ・ア膜）電気泳動法で分画した場合、 γ -glob 領域に特徴的な波形帯がみられる¹⁻³⁾。この波形帯はニワトリの成長発育期や雄の血清には認められておらず^{4,5)}、産卵期特有のいわゆる血清 Viterin であり、順調に産卵を続けているニワトリ血清に著明に出現することが知られている^{1,2)}。しかし、その波形帯の形状およびその分画位置は必ずしも一定していない。また、産卵鶏の血清が波形帯を形成する原因には電気泳動時の血清塗布量や LDL 濃度などが関与するとの報告もあるが³⁾、いまだ明確にされていない点も多い。

そこで、産卵鶏血清の波形帯の成因およびその易動度に影響を及ぼす要因を明らかにする目的で、電気泳動条件について検討するとともに、波形帯成分と同じ易動度を持つ孵卵前の卵黄を雄血清に加えて泳動し、波形帯の形成状態およびその易動度の変化についても検索した。

実験材料および方法

実験には白色レグホン種の雄および産卵継続中の雌血清を供試した。

1. 泳動条件

(1) CA 膜の種類

実験には Sartorius, Separax, Serecta および Separax-EF 膜を用い、電気泳動学会標準操作法で泳動した。

(2) 緩衝液のイオン強度および pH

ペロナール緩衝液のイオン強度を 0.08μ から 0.04μ の範囲に変化させ、Separax 膜で泳動するとともに、緩

衝液の pH を 7.0~9.0 まで変えてその影響を検索した。

(3) 血清塗布量の影響

産卵鶏の血清を生理食塩水で倍数希釈し、その一定量を Separax 膜に塗布して検討した。

2. 卵黄成分と波形帯の関係

孵卵前の卵黄を生理食塩水で希釈して泳動すると、その成分の 90% が γ -glob 位置に分画されて波形帯を形成したことから、成鶏雄血清に卵黄を添加し、添加量と波形帯形成およびその易動度との関係を検討した。

実験成績

1. 電気泳動条件

(1) CA 膜の種類および緩衝液のイオン強度と pH
産卵鶏の血清を電気浸透の異なる 4 種類の CA 膜で泳動し、波形帯形成の違いを検討した。Fig. 1-A に示したように CA 膜の種類によって明らかな相違が見られた。すなわち、波形帯の形成は Separax>Separax-EF>Sartorius=Selecta の順であった。また、血清塗布位置から測定した波形帯の移動距離もこの順であった。Sartorius と Selecta は波形帯成分がほぼ血清塗布位置に留まり、波形帯を形成せず細いシャープなバンドを示した。

そこで、Sartorius と Selecta に波形帯の形成されない原因に、その成分の移動距離が関係するかどうかを検討するために、Sartorius 膜で 1 時間および 3 時間泳動してその変化を検討した。Fig. 1-B に示したように、3 時間の泳動でも波形帯成分の移動距離はきわめてわずであり、波形帯の形成もみられなかった。

Studies on the wavy band of laying hens on cellulose acetate electrophoresis.

Kiitiro Sitizyo, Takashi Takeuchi and Minoru Suzuki; 鳥取大学農学部家畜生理学教室

Correspondence address: Kiitiro Sitizyo, Department of Veterinary Physiology, Faculty of Agriculture, Tottori University, Koyama-cho, Tottori 680, Japan.

(受付 1989 年 10 月 2 日, 受理 1989 年 11 月 6 日)

(44) 生物物理化学

次に、緩衝液のイオン強度を変えて Separax 膜で泳動した。イオン強度に応じて泳動時間を調節し、Alb から γ -glob までの距離が約 3.7 cm になるように泳動した場合、いずれのイオン強度においても同様な分画像を示し、波形帯を形成した (Fig. 1-C)。しかし、泳動時間が短く、分画幅が短い場合には波形帯成分は細い縞状のバンドとなり、波形帯を形成しなかった。また、緩衝液の pH による影響も認められなかった。

(2) 血清塗布量

血清を Separax 膜に 0.8, 1.6, 2.4, 3.2 μ l ずつ塗布して波形帯の形成状態を検索した。塗布量が多くなるにつれて波形帯成分は陰極側へ移動し、塗布量が多いほど明瞭な波形帯を形成する傾向にあった。しかし、微量の血清を段階的に増量して塗布することは技術的に一定せず、塗布量と波形帯形成との間に相関性のみられない例があった。そこで、産卵鶏血清を生理食塩水で倍数希釈

し、その一定量 (0.8 μ l) を塗布した。Fig. 2 にみられるように、希釈しない血清では γ -glob 領域に波形帯が形成される。しかし、2 倍希釈血清では波形帯は形成されず、その成分は細い縞状のバンドを示し、電気泳動的に均一な成分であることが伺われた。希釈倍数をさらに大きくすると縞状のバンドは順次陽極側へ移動して分画された。8 倍希釈ではその成分は β -glob 位置に分離し、これ以上希釈しても陽極側へ移動することはなかった。

2. 卵黄成分と波形帯との関係

Fig. 3 に示したように、卵黄を生理食塩水で希釈してセ・ア膜で泳動すると、血清タンパク分画像の γ -glob 位置に波形帯がみられデンストメトリー図ではシャープなピークを示した。また、この波形帯成分は卵黄タンパク分画値の約 90% を占め、脂質染色 (オゾン化シッフ染色) によってリポタンパク質であることが確認された。

そこで、雄の血清にこの卵黄を加えて泳動すると、血

Fig. 1 Cellulose acetate electrophoretic patterns of laying hens.

A: Patterns of wavy band on the various cellulose acetate membrane.

B: Formation of wavy band for one and three hours migration. C: In-

fluence of ionic strength on the wavy band formation.

Fig. 2. Mobility of wavy band component of serum diluted with physiological saline.

Fig. 3. Densitograms of cellulose acetate analyzing laying hens serum protein, egg yolk protein and egg yolk lipoproteins. Mobility of wavy band of egg yolk was corresponded with that of γ -globulin fraction of serum protein.

清に 50% 相当量の卵黄を添加した場合、 γ -glob 領域にわずかな波形帯が出現した (Fig. 4-A). しかし、20% 以下の添加では波形帯成分が細い縞状のバンドとなり、その分画位置は添加量を少なくするにつれて陽極側へ移動した。Fig. 4-B は波形帯成分の血清塗布位置からの移動距離と卵黄添加量との関係を示したもので、卵黄添加量と波形帯成分の移動距離には明らかな相関性がみられた。このような結果は、産卵鶏血清を希釈して泳動した成績 (Fig. 2) に一致しており、波形帯成分は卵黄添加量に応じて易動度が変化し、一定以上の濃度になると波形帯を形成することが明らかになった。

Fig. 4. Effect of added yolk on the wavy band mobility.

A: Electrophoretic patterns of yolk added cock serum. B: Correlation of migrated distance of wavy band with volume of added yolk.

考 察

産卵鶏血清のセ・ア膜電気泳動でみられる γ -glob 領域の波形帯はヒトの骨髄腫やマクログロブリン血症で認められる Monoclonal な免疫 Glob (Mタンパク質) の波形帯⁶⁻⁸⁾に類似する分画像である。河合⁸⁾はヒトのMタンパク質がセ・ア膜電気泳動で波形帯を形成するには、電気泳動的に均一な M タンパク質が多量に存在すること、CA 膜の網目構造が大小不同であること、波形帯成分が一定の距離を移動することなどが必要条件であると報告している。

著者ら³⁾は先の実験において、産卵鶏の波形帯はニワトリの産卵期に特有なリボタンパク質であることを認め、また、石原¹⁾は卵黄 LDL の前駆物質であると報告している。したがって、産卵鶏の波形帯はヒトで報告されている M タンパク質⁶⁻⁸⁾とは質的に異なった成分である。しかし、本実験において、この波形帯は電気泳動的にかなり均一な成分であることが認められ、この点においては M タンパク質と共通な性質を有している。

産卵鶏血清が波形帯を形成する要因について、石原¹⁾は超速心法で分離したニワトリ血清の LDL をセ・ア膜

(46) 生物物理化学

で泳動し、その塗布量を多くすると波形帯が出現すると報告した。今回の実験においても、血清塗布量あるいは卵黄添加量を多くすると波形帯が形成された。これに対して、血清塗布量を少なくするか、あるいは血清を希釈して泳動すると、波形帯成分は β -glob 位置に細い縞状のバンドとして分画された。これら先人の報告および本実験の結果から、産卵鶏血清の γ -glob 領域にみられる波形帯は β -リポタンパク質であり、ニワトリの産卵期にその成分が増量するために易動度が変化して波形帯を形成するように思われた。

また、波形帯を形成する要因にはセ・ア膜の特性が関係し、網目構造の大小不同が著しい Separax 膜が波形帯を形成しやすいことが知られている^{8,9)}。本実験においても Separax 膜が最も著明に波形帯を形成した。今回は CA 膜の網目構造については検索していないが、上述の成績から CA 膜の電気浸透の違いによる波形帯成分の移動距離が大きく関与するように思われた。すなわち、波形帯成分がほとんど移動しない Sartorius 膜および Selecta 膜は波形帯を形成しなかった。

以上述べたように、産卵鶏血清の波形帯成分は産卵期

の雌血清中に増量するリポタンパク質であり、卵黄の β -リポタンパク質に類似する成分であった。この成分が波形帯を形成するためには、波形帯成分が電気泳動的に均一であり、CA 膜上に一定以上の濃度を有し、一定以上の距離を移動する必要があると思われる。また、河合^{8,9)}が述べたように CA 膜の網目構造の大小不同およびその大きさも関係しているものと推測される。

文 献

- 1) 石原勝也：岐阜大農研報，37：1，1974.
- 2) 鈴木 實，他：鳥大農研報，30：66，1978.
- 3) 七條喜一郎，他：鳥大農研報，42：161，1989.
- 4) Torres-Medina, A. et al. : Poult. Sci., 50 : 1115, 1971.
- 5) Washburn, K. W. and Eidson, C. S. : Poult. Sci., 49 : 784, 1970.
- 6) 青木紀生：臨床病理，特，42：118，1980.
- 7) 河合 忠：医学のあゆみ，62：121，1969.
- 8) 河合 忠：生物物理化学，13：307，1968.
- 9) 河合 忠，河合式子：新版電気泳動実験法，初版，文光堂，東京，1989，p. 21.