

卵蛋白に関する研究 V

孵卵中の卵白組成蛋白質の変化について

河 端 信・金 森 正 雄

M. KAWABATA, M. KANAMORI: Studies on egg protein (V)
Chromatographic behavior of egg white proteins
during the course of incubation.

摘 要 孵卵中に起る卵白組成蛋白質の消長を C. M. C. カラムマトグラフィーにより追跡し以下の結果を得た。

卵白は孵卵中胚に吸収されてその量を減じて行き、孵卵開始後15日目位で分離不可能となる。孵卵6日目頃から、それまで卵白中に存在しなかつた Anionic

protein が出現する。Ovomucoid fraction は6日目頃から全卵白蛋白量に対する比率が増加する。Ovalbumin は孵卵の進行と共に A_1 に対する A_2+A_3 の比率が増加する。Conalbumin は孵卵の進行と共に減少し lysozyme は増加する。

結 言

蛋白質の Chromatography は近年優れた吸着剤の研究が進むにつれて急速の進歩をとげ、特に PETERSON & SOBER (1956)¹⁾ によるセルロースイオン交換体の研究により、今まで分離困難であつた個々の組成蛋白質をも簡単に大量を、しかも mild な条件で分離精製出来る様になつた。

CMC (Carboxymethyl cellulose) による卵白蛋白質の分離は FEENEY等 (1958)²⁾ によつて行はれたが、本報では前報³⁾ に報告した如く、本研究室独特の方法で調製したセンイ状 C. M. C. を用い、孵卵過程における卵白組成蛋白質の変化をクロマトグラフ的に追求した。

孵卵の進行と共に卵白は胚に吸収されてその絶対量を減じて行くが、各々の組成蛋白質がどのような割合で、又どの蛋白質が優先的に吸収されるか等については全く不明である。筆者等はこれを究明するために以下実験を行つたのでその詳細を報告する。

実 験 の 部

〔I〕 試 料

(A) センイ状 C. M. C. : 前報³⁾ に求べた方法により調製しエーテル化度 $DS=0.122$ のものを用いた。

(B) 卵白 : 白色レグホン種の授精卵を 38°C に in-

cubate し、毎日2ヶづつ取り出して、卵の先端に径 5 mm の穴をあけ卵白を採取する。これに等量の水を加え沈澱する mucin を遠心分離で除き、上澄を凍結乾燥し乾燥粉末とし貯える。かくして14日目まで卵白を採取することが出来た。卵白粉末 200mg を starting buffer (Acetate buffer pH 4.0 $\mu=0.025$) 50 ml に溶解し、更に2日間、同 buffer に対して 2°C で透析した後 column に吸着させる。

(C) Buffer: pH 4.0~5.6 までは acetate, pH 5.8~8.0 までは phosphate を、いづれもイオン強度 0.025 のものを用い pH 10 は Carbonate buffer でイオン強度は 0.09 である。

〔II〕 装置並びに方法

column は 2×20 cm で下端には流速調節のコックがあり、上端は 200 ml の分液漏斗に連結する。センイ状 CMC 4g を starting buffer 約 200ml に suspend し、homogenizer でかゆ状としたのち column に充填し、同 buffer で洗滌し、流速を 3ml/min に調節する。次に buffer に透析してあつた卵白を分液漏斗から溶出と同じ流速で column に吸着させる。

溶出に用いた buffer は各 200 ml づつでイオン強度を一定 (0.025) のまま pH を 4.0, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.6, 7.0, 8.0, 10.0* と順次変える Stepwise elution を行つた。溶出液は fraction size 6 ml の Fraction collector で集め、そ

京都府立大学農学部栄養化学研究室

* pH 10.0 に限り Carbonate buffer を用い、イオン強度は $\mu=0.09$ である。

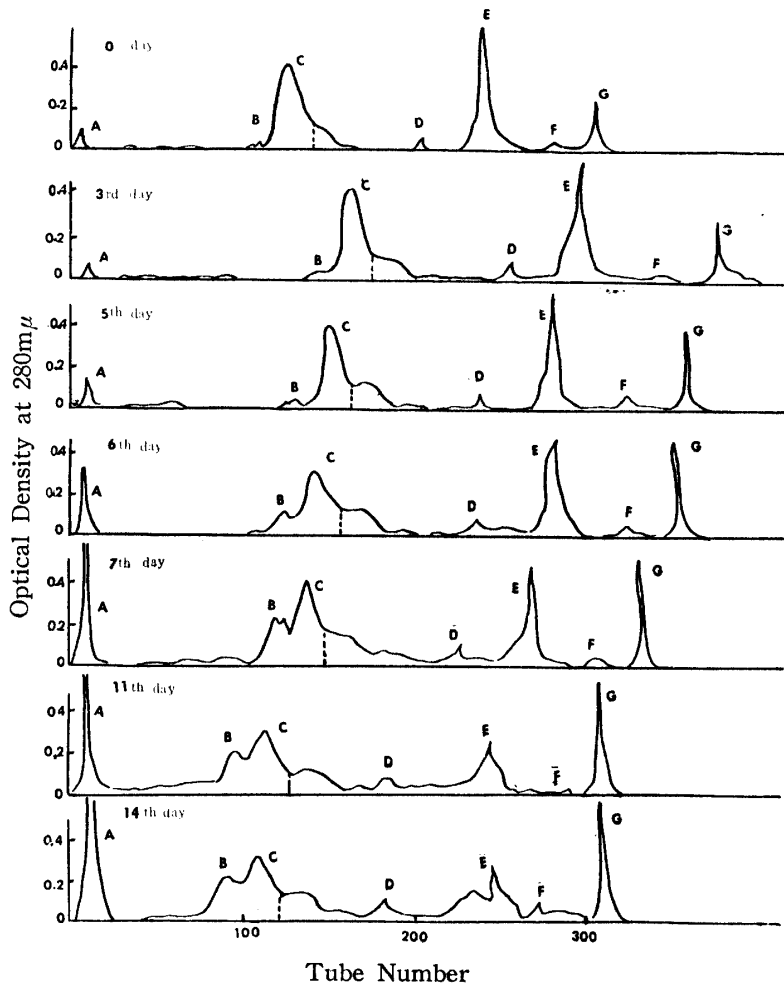


Fig. 1 Chromatographic Behavior of Egg white proteins during Incubation

の蛋白濃度は島津製 spectrophotometer で 280 mμ における吸光度により測定した

(III) 実験結果及考察

孵卵過程における卵白組成蛋白質の CMC Column chromatogram を Fig. 1 に示した。

各 fraction の蛋白質は電気泳動の結果及び等電点から判断すれば Table 1 に示す如くであり、孵卵中の各成分の百分率をグラフから求めると Table II に示す様な結果となる。

pH 4.0 で CMC に吸着されずに溶出してくる fraction A は、さきに筆者らが報告した³⁾ ovomucoid fraction の flavoprotein から解離して出てくる riboflavin であつて、孵卵 4 日目まではこの fraction に蛋白は認められない。ところが 5 日目あたりからこの fraction に蛋白が現れ始め、日を経るに従つてその量を増してくる。即ち、この頃から CMC に吸着されない anionic protein が現れてくることを示しており、血漿蛋白の生成または混入が想像される。

Fraction B の ovomucoid も孵化の進むにつれて全卵白量に対する比率を増加し、殊に 5 日目頃からの変化が著しい。この Fraction は、先に著者等⁴⁾ が報告した如く、Trypsin 阻害作用を持つ成分と riboflavin を結合する成分から成つているが、特に flavin と結合する成分の増加が目立ち、孵化の進行と共に卵白の黄色が濃厚となることから、この flavoprotein が最後まで卵黄に吸収されずに残ることを示している。

Fraction C は ovalbumin A₁, A₂, A₃ に相当するが、Perlmann (1950)⁵⁾

によれば、その磷含量は 1 グラム分子 45,000 あたり A₁ では 2 原子の磷、A₂ では 1 原子の磷を含み、A₃ には含まれないことを報告している。Fraction C において、pH 5.0 で elute される部分が A₁ pH 5.2 で溶出する部分が A₂、5.4 で溶出する部分が A₃ に相当する。今、クロマトグラムの Fraction C において ovalbumin A₁ を含む部分を C_I とし、A₂ 及び A₃ を含む部分を C_{II} として C_{II} の C_I に対する百分率を求めて図示すれば Fig. 2 の様になる。

Table I Isolated Protein Fraction of Egg White

Fraction	A	B	C	D	E	F	G
Protein in Fraction	Anionic protein	Ovomucoid	Ovalbumin A ₁ A ₂ A ₃	"Glabulin"	Conalbumin	"Globulin"	Lysozyme
pI*	—	3.9—4.3	4.58 4.65 4.75	—	5.8—6.0	—	10.7—11.3
pH of Eluting Buffer	4.0	4.8	5.0 5.2 5.4	5.8	6.0 6.6	8.0	10.0 (μ=0.09)

* According to Feeney et al²⁾ and H.L. Fevold⁶⁾

Table II Distribution of Proteins in Fraction during the various Stages of Incubation

Fraction	Protein	Time of incubation at 38°C (days)						
		0	3	5	6	7	11	14
		Distribution of Protein (%)						
A	Anionic protein	(1.4)	(1.3)	3.2	5.3	8.1	10.9	12.8
B	Ovomucoid	1.4	2.6	3.2	7.1	14.0	16.6	16.0
C	Ovalbumin	57.5	50.0	52.3	44.2	49.3	43.1	36.1
D	"Globulin"	1.4	1.9	1.4	4.7	1.8	2.7	3.2
E	Conalbumin	30.1	34.4	28.8	25.6	16.0	14.8	19.6
F	"Globulin"	1.8	1.9	2.8	2.6	1.4	1.0	2.6
G	Lysozyme	6.4	7.9	8.3	10.5	9.4	10.9	9.7

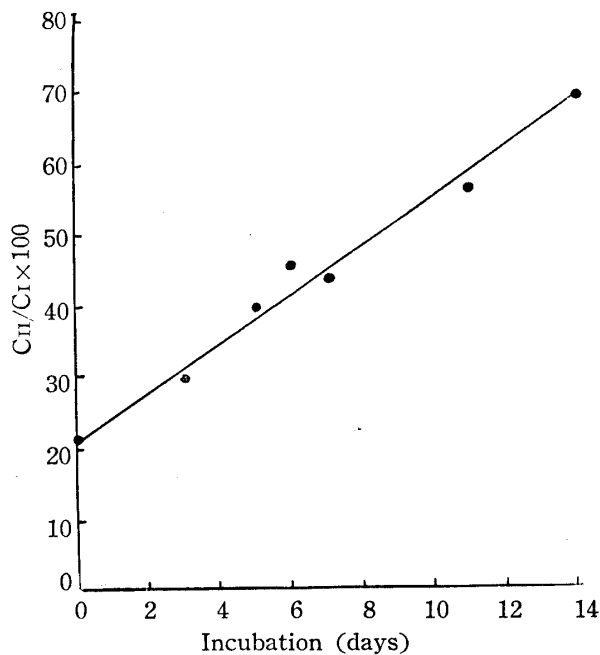


Fig. 2 Changes in Ovalbumin Fraction

これによれば incubation が進行するに従い C_{II} の C_I に対する比が高くなり、磷含量の多い A_1 の含量比が減少している。これは、 A_5 が優先的に吸収されて行くためか、或は A_1 が酵素的に脱磷酸されて A_2 及び A_3 となるための比率が増加して行くのであるか

Summary

By means of fibrous CMC-Column chromatography the relative changes in individual egg white proteins of fertilized hen's egg during the course of incubation, were studied.

The results summarized were as follows.

1. The egg white was absorbed by embryo and decreasing its quantity during incubation. Finally after two weeks of incubation, the most of egg white was absorbed and could not separate it.

2. On the 6th day from the start of incubation,

この両方が考えられる。

Fraction E は卵白第二の成分である conalbumin であり incubation の初期 (5日目頃まで) には pH 6.6 で溶出する成分が大部分であるが、6日目以後では pH 6.0 で溶出する部分が増加し pH 6.6 で溶出する部分の割合が小となり、しかも全体として減少して行く。Fraction G 即ち pH 10.0 で溶出される lysozyme は日を経るに従って全卵白蛋白量に対する比率を増加している。これは胚を細菌から保護するのに役立つのでありと考えられる。

引用文献

- 1) E. A. PETERSON and H. A. SOBER (1956) : J. Am. Chem. Soc. **78**, 751.
- 2) M. B. RHODES, P. R. AZARI and R. E. FEENEY (1957) : J. Biol. Chem. **230**, 399.
- 3) 金森正雄・河端 信 (1959) : 京都府立大学学術報告・農学, No. 11, 182.
- 4) 金森正雄・河端 信 (1960) : 京都府立大学学術報告・農学, No. 12, 145.
- 5) G. E. PERLMANN (1949) : Nature, **164**, 961.
- 6) H. L. FEVOLD (1951) : Adv. Prot. Chem. **6**, 188.

the anionic protein was appeared which has not been existed in the egg white originally.

3. Ovomuroid fraction was increased after 6th day of incubation

4. Ratio of $A_2 + A_3 / A_1$ in the ovalbumin fraction was increased along with the proceeding of incubation.

5. Conalbumin was decreased and lysozyme was increased during the incubation.