

# 卵黄蛋白質に関する研究 (第1報)

## ウズラ卵黄蛋白質の分別について

田口邦子・河端 信・林 義男

Studies on egg yolk proteins

I. The fractionation of quail egg yolk proteins

KUNIKO TAGUCHI, MAKOTO KAWABATA and YOSHIO HAYASHI

卵黄蛋白質の大部分は、リポイドと結合したリポ蛋白質複合体として存在している。したがって、取り扱いが困難で、いまだ完全に分離・精製されていない。

われわれは、ウズラの卵黄蛋白質を、鶏卵の卵黄蛋白質について行なわれた方法に従って分別し、その蛋白質の諸性質を比較検討した。

その結果、ウズラ卵黄成分蛋白質の混合比は、従来分別された鶏卵黄蛋白質の場合と異なるが、電気泳動的には大体同じ挙動を示し、7種の蛋白質の存在を確認した。さらに、窒素・リン含量やヒドコキシアパタイトを用いたカラムクロマトグラフィーにおいて、鶏卵の場合と異なることを明らかにした。

### I 緒 言

卵黄は卵白と同様に、その高い栄養価値、熱による凝固性、さらに、そのあざやかな色、および乳化力があることで、広く食品製造、調理の原料に、特有の食品価値あるものとして賞用され、これについての研究が数多く行なわれている。

卵黄蛋白質に関する最初の報告は、卵黄中の熱凝固性蛋白質の存在を認めた Bence-Jones (1841)<sup>1)</sup> の報告である。それ以来、幾多の研究がなされ Evans および Bandemer (1957)<sup>2)</sup> による口紙電気泳動法による検討では、少なくとも8種の蛋白成分に相当する泳動図が得られている。

卵黄はその固形分の約2/3がリポイドであり、残りの1/3が蛋白質であって、わずかながら水溶性蛋白質を含むが、多くはリポイドと結合したリポ蛋白質複合体として存在するため、取り扱いが困難で、蛋白質の分析技術の進歩した今日においても、すべてを分離・精製することは困難であり、知られていない部分が多い。

Chargaff (1942)<sup>3)</sup> によってリポ蛋白質の分離が行なわれ、その一部がリポビテリン (Lipovitellin) と呼ばれた。

Fevold および Lausten (1946)<sup>4)</sup> により前者と種々の点で異なるリポ蛋白質が分離され、これと大体同じものが、Shephard および Hottle (1949)<sup>5)</sup> によっても分

離されて、リポビテレン (Lipovitellenin) と命名された。

これら2種のリポ蛋白質以外には、水溶性蛋白質として、Mecham および Olcott (1949)<sup>6)</sup> により、燐蛋白質としてのホスビチン (Phosvitin), Valenciennes および Fremy (1854)<sup>7)</sup> により3種類の成分よりなるリベチン (Livetin) の存在が確認されている。

その後、Vandeger (1956)<sup>8)</sup> らは、卵黄のリポ蛋白質に対して、エーテルが有害であることを認め、エーテルを用いない方法を考案した。同じく、Burley および Cook (1961)<sup>9)</sup>, Bernardi および Cook (1960)<sup>10)</sup>, Martin, Tittrick および Cook (1963)<sup>11)</sup>, の方法がそれである。

鶏卵以外にはわずかに Young および Phinney (1951)<sup>12)</sup> のサケ卵黄のリポ蛋白質についての報告があるくらいである。

われわれは、「濃厚で味が良い」と言われているウズラ卵の卵黄蛋白質について、鶏卵の卵黄蛋白質について行なわれた方法に従って分別し、その蛋白質の諸性質を窒素・リンの定量、口紙電気泳動法・ディスク電気泳動法による泳動図の観察と紫外外部吸収スペクトルの測定により比較検討を行なったので報告する。

### II 実 験

#### 1) 試料の調製

ウズラ卵は京都西賀茂の養鶏場の Japanese quail 種

鶏卵は本学農学部附属農場の White leghorn 種を産卵後 2 日以内に実験に使用した。

#### ① リポビテリンの調製<sup>13)</sup>

注意深く割卵して卵白を取り分けたのち、1%食塩液・蒸留水で洗浄し、さらに口紙上を反転しながら水分を除き、つぎに、卵黄膜の一端を破り、卵黄を流し出して集める。

これに、同量の0.16M食塩液を加えてマグネチックスターラーでよく攪拌したのち、ガーゼで口過しついで久保田製冷却遠心分離機 KR-66 型を用いて、0°C, 24,400×g, 30 分間遠心分離し、沈殿した卵黄顆粒体を集める。

上部の卵黄清は低密度画分 (Low Density Fraction) と水溶性画分 (Water Soluble Fraction) であるから、のちにその分別方法は述べる。

顆粒体は、さらに 2 倍量の0.16M食塩液に懸濁し、よく攪拌して遠心分離 (0°C, 24,400×g, 30 分間) し、上清は卵黄清に加え、沈殿を集めて 0.8M 食塩液に完全に溶解し、溶解したものを0.16M食塩液、5°C で 1 昼夜透析し、沈殿を遠心分離して集める。

ふたたび 0.8M 食塩液に溶解し、0.16M食塩液に透析し、ここに集められた沈殿がリポビテリン (LV) である。

上述のようにして得たリポビテリンを 1.0M 酢酸ソーダによく溶解し、最終塩濃度を 0.7M 酢酸ソーダに調整する。ついで、あらかじめ 0.7M 酢酸ソーダで緩衝化された Dowex-1×2 のカラムに通す (1 ml/min) ことによりホスビチンを除き、蒸留水 (5°C) にて透析して沈殿を遠心分離して集め、凍結乾燥して精製したリポビテリンを得る。

#### ② 低密度画分 (Low Density Fraction=LDF) の分別

上述のようにして得た卵黄清を分液ロートにとり、2 倍容のエチルエーテルを加えてよく混合し、エーテルを飽和させ、2 昼夜静置する。

すると黄色透明な上・下 2 層とその間に不透明な中間層の 3 層に分けられる。

上層は卵黄中の油が移行したエーテル層であり、下層の透明な部分を注意して集め、飽和したエーテルを除くため、蒸留水に対して透析を行ない、沈殿を遠心分離して集め、さらに 10% 食塩液に溶解して、溶解した部分を透析し、沈殿を集める。

これを少量の水に懸濁して凍結乾燥して得たものがリポビテレン (LVL=LDF<sub>1</sub>) である。

中間層についても、LDF<sub>1</sub> と同じ操作を行なって集めたものが LDF<sub>2</sub> である。

#### ③ 水溶性画分 (Water Soluble Fraction=WSF) の分別

② においてエーテル飽和後の下層を透析して沈殿しない透析膜内液が水溶性蛋白質である。

これを集めて硫酸 1/2 飽和で沈殿するものと、飽和でないと沈殿しないものに分別してそれぞれ沈殿を集め、水に対して完全に透析したのち、濃縮・凍結乾燥して WSF<sub>1</sub> と WSF<sub>2</sub> とを得る。

#### 2) 分析

全卵黄および分別した 5 種の成分蛋白質について、鶏卵と比較しつつ、以下の実験を行なった。

##### ① 水分の定量

熱風乾燥機を使用し、常圧乾燥法 (105°C) により求めた。

##### ② 窒素の定量

マイクロケルダール法により、全卵・卵白・卵黄および分別した 5 種の成分蛋白質について求めた。

##### ③ リンの定量

乾燥試料 10~20 mg (液体試料 50~100 mg) を分解瓶に入れ、5N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml を加え、加熱する。

ついで、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 1 滴ずつ加え、無色になるまで同様の操作を繰り返す。

1 時間以内で分解を終了し、冷却後、約 3 ml の水を加え、沸騰浴中に 10 分間つけ、冷却後メスフラスコで 20 ml とし、これを供試液とする。

Fiske-Subbarow の微量正リン酸法<sup>14)</sup>にて標準液 (1~5 γ/ml) と比較して求めた。

##### ④ リポイドの定量

試料よりクロロホルムとアルコール (1:1) の混合液にて充分抽出した液を秤量瓶にとり、溶媒を蒸発させて秤量して求めた。

#### 3) 口紙電気泳動

全卵黄および分別した 5 種の成分蛋白質について、それぞれの溶解状態のものを試料として、アタゴ光学器械製口紙電気泳動装置を使用し、東洋口紙 No. 50, バルビタール緩衝液 (pH 8.6, μ=0.05), 電圧 6.5V/cm, 電流 0.5 mA/cm, 10°C, 4 時間泳動を行なった。

同時に 2 つずつ同じ試料を泳動し、一方は B.P.B. 液 (B.P.B. 0.05g, HgCl<sub>2</sub> 1.0g, 氷酢酸 2ml をとりこれに蒸留水を加えて 100 ml とする.), 他方は Sudan III (Sudan III 1g を 50% エタノールに溶かし、1 夜放置後口過する.) にて染色し、リポ蛋白質を検出した。

#### 4) ディスク電気泳動

全卵黄および分別した 5 種の成分蛋白質についてエムエス機器製・ディスク電気泳動装置 8 型を使用して、ト

リス・グリシン緩衝液 (pH 8.3), 電流カラム 1 本当たり 2 mA で約 1 時間泳動を行なった。

同じ試料につき 2 本ずつ泳動を行ない, 一方は Amido Black で他方は Sudan Black (0.01 %の割に40%エタノール液に, 65°Cに加熱して溶解させ, 4 時間放置後, 口過して使用する.) を用いて染色し, リポ蛋白質を検出した。

5) リポビテリンのヒドロキシアパタイトによるカラムクロマトグラフィー

リポビテリン 50 mg を 0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) 10 ml に溶解し, 1 昼夜充分透析し, 上記緩衝液で緩衝化したヒドロキシアパタイト (Tiselius 法<sup>10)</sup>にて調製) のカラム (1.5×15 cm) に試料を添加後, 上記緩衝液でカラムを充分洗浄して残っている  $\alpha, \beta, \gamma$ -リベチンなどの不純物を除く。

ついで 0.6M, 1.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) および 0.5M NaOH で約 20 ml/hr の速度で溶出し, 5 ml ずつフラクションコレクターで分画し, 各画分につき 280 $\mu$ m における吸光度を測定した。

6) 紫外外部吸収スペクトルの測定

リポビテリン 10mg を 10ml の 0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) に溶解し, 紫外外部吸収スペクトルを測定した。

その後, 試料の N 量をマイクロケルダール法により測定し N 1 mg に対する吸光度を計算して吸収曲線を描いた。

同時に, ヒドロキシアパタイトを用いたカラムクロマ

トグラフィーで分画された 0.6M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) および 0.5M NaOH 溶出画分についても, 紫外外部吸収スペクトルを測定した。

III 結果および考察

ウズラ卵黄の化学組成を鶏卵黄と比較した結果を Table 1 に示す。

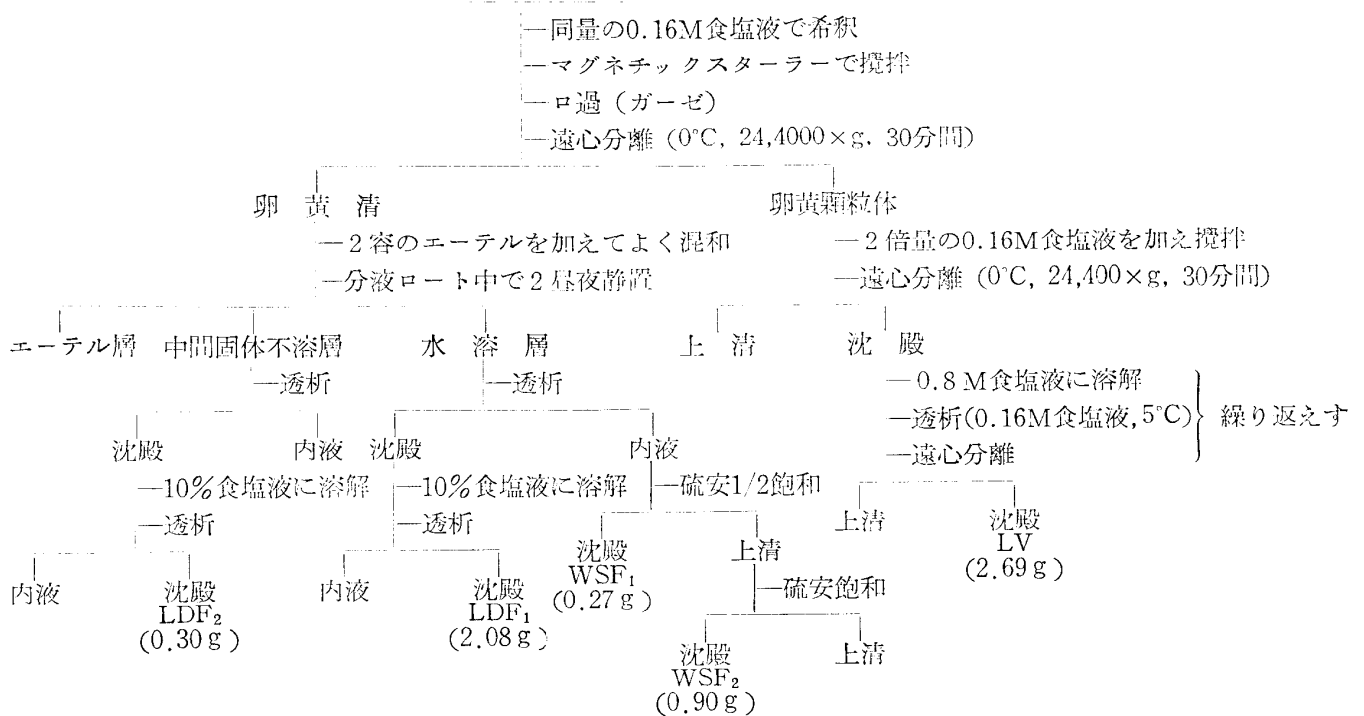
Table 1. ウズラ卵と鶏卵の化学組成

	ウズラ卵	鶏卵	
卵重 (g)	8.6~11.2	52.4~67.2	
卵黄/卵白 (W/W)	0.53	0.51	
卵黄/全卵×100 (%)	31.1	29.7	
卵黄中の	固形物 (%)	53.0	51.1
	水分 (%)	47.0	48.9
	脂質 (%)	30.7	32.0
	窒素 (%)	3.06	2.56
乾燥卵黄中の窒素 (%)	5.77	5.02	
pH	5.98	5.93	

Table 2. ウズラ卵の各部位の窒素の形態

	全卵	卵黄	卵白
全 N (%)	2.42	3.06	1.98
水溶性 N (%)	1.34	0.36	1.76
アルブミン態 N (%)	0.88	0.08	1.44
水不溶性/水可溶性	0.45	0.89	0.11

Table 3. ウズラ卵黄蛋白質の分別方法と収量  
卵黄 (50 g)



これによると、卵重が約1/6であることを除けば、窒素含量がやや多い程度で、ほとんど近い値を示している。

つぎに卵の各部位の窒素含量をそれぞれの窒素形態別に定量した結果を Table 2 に示す。

これにより、卵黄蛋白質中の約89%が水不溶性蛋白質であることがわかった。

Table 3 にはウズラ 卵黄蛋白質を分別する方法と分別した5種の成分蛋白質の収量を示す。

Table 4 には収量にもとずき、卵黄中の成分蛋白質の混合比をウズラ卵と鶏卵と比較して示した。

Table 4. 卵黄中の成分蛋白質の混合比

	Quail	Chicken
Lipovitellin	43.15%	37.60%
Lipovitellenin (Low Density Fraction I)	33.31	45.12
Lipovitellenin (Low Density Fraction II)	4.81	1.19
Water Soluble Fraction I	4.32	4.28
Water Soluble Fraction II	14.41	11.81

リポ蛋白質が82%であることは、Table 2 の結果とあわせて、リポ蛋白質が大部分を占めることがわかった。

また、ウズラ卵ではリポビテリンがリポビテレンンより多く、鶏卵の場合と逆になっている。

なお分別の際は、特に遠心分離の条件(回転数、時間)により、リポビテリンとリポビテレンン(LDF<sub>1</sub>, LDF<sub>2</sub>)の割合がかなり不安定であり、回転数の低い場合はリポビテリンの収量が低くなり、沈殿せずに浮遊したものがLDF<sub>2</sub>に出てくる。

従って、均一な試料を求めるためには、分別中の遠心分離の条件を厳密に一定とする必要がある。

あわせて、卵黄の希釈度、希釈溶液中のエーテル飽和度、分離中の温度についても注意しなければならない。

Table 5 に分別した5種の蛋白質の窒素・リン含量を定量した結果を示す。

これにより、リポビテリンとリポビテレンンは、窒素・リン量ともに異なる蛋白質であり、低密度画分のLDF<sub>2</sub>はLDF<sub>1</sub>に比較して窒素含量はほぼ同じ値であるが、リン含量の点において、その他の蛋白質を含むと思われる。水溶性蛋白質のWSF<sub>1</sub>とWSF<sub>2</sub>ではリン含量を著しく異なる蛋白質である。

口紙電気泳動

Fig. 1 には全卵黄と分別された5種の成分蛋白質を

Table 5. 分別した5種の成分蛋白質の窒素・リン含量

	N		P	
	Quail	Chicken	Quail	Chicken
LV	13.0%	12.0%	0.060%	0.081%
LVL (LDF <sub>1</sub> )	8.0	9.9	0.135	0.169
LVL (LDF <sub>2</sub> )	8.0	10.0	0.150	0.211
WSF <sub>1</sub>	15.4	13.6	0.017	0.032
WSF <sub>2</sub>	11.6	10.5	0.079	0.108

LV .....Lipovitellin  
LVL .....Lipovitellenin  
LDF<sub>1</sub> .....Low Density Fraction I  
LDF<sub>2</sub> .....Low Density Fraction II  
WSF<sub>1</sub> .....Water Soluble Fraction I  
WSF<sub>2</sub> .....Water Soluble Fraction II

口紙電気泳動した結果の泳動図を模式図で示す。

ウズラ卵黄においては鶏卵と大体同じ挙動を示すが、水溶性画分(WSF<sub>1</sub>, WSF<sub>2</sub>)において、硫酸1/2飽和で沈殿するものとしなないものの差が鶏卵黄では表われていないので、さらに細かい塩濃度での分別が必要である。

従って、水溶性蛋白質としては、WSF<sub>1</sub>で2種、WSF<sub>2</sub>で3種の存在を確認したが、その内1つは同じものと思われる。

リポビテリンおよびリポビテレンン(LDF<sub>1</sub>, LDF<sub>2</sub>)については Sudan III にて染色された赤いバンドをリポ蛋白質として検出した。

リポビテリンはほとんど原点を動かさず、リポビテレンンは少し移動して、はつきりと区別できる。

しかし、LDF<sub>1</sub>とLDF<sub>2</sub>とはほとんど重なって区別できない。

以上の結果より、リポ蛋白質2種・水溶性蛋白質4種の存在を確認した。

ディスク電気泳動

Fig. 2 に全卵黄と分別した5種の成分蛋白質のディスク電気泳動の結果を模式図で示す。

Sudan Black によって淡い灰色のゾーンに染色されたものをリポ蛋白質として検出すると、ほとんど移動しないゾーンと少し移動するものの2種の存在が認められた。

水溶性蛋白質(WSF<sub>1</sub>, WSF<sub>2</sub>)においては、口紙電気泳動に示されたと同じ結果で、ウズラ卵黄においては、それぞれの主要部が硫酸1/2飽和によって完全に分別されていることがわかった。

硫酸1/2飽和で沈殿するWSF<sub>1</sub>は口紙電気泳動では分離されなかったが、単一ではなく、4種に分離された。

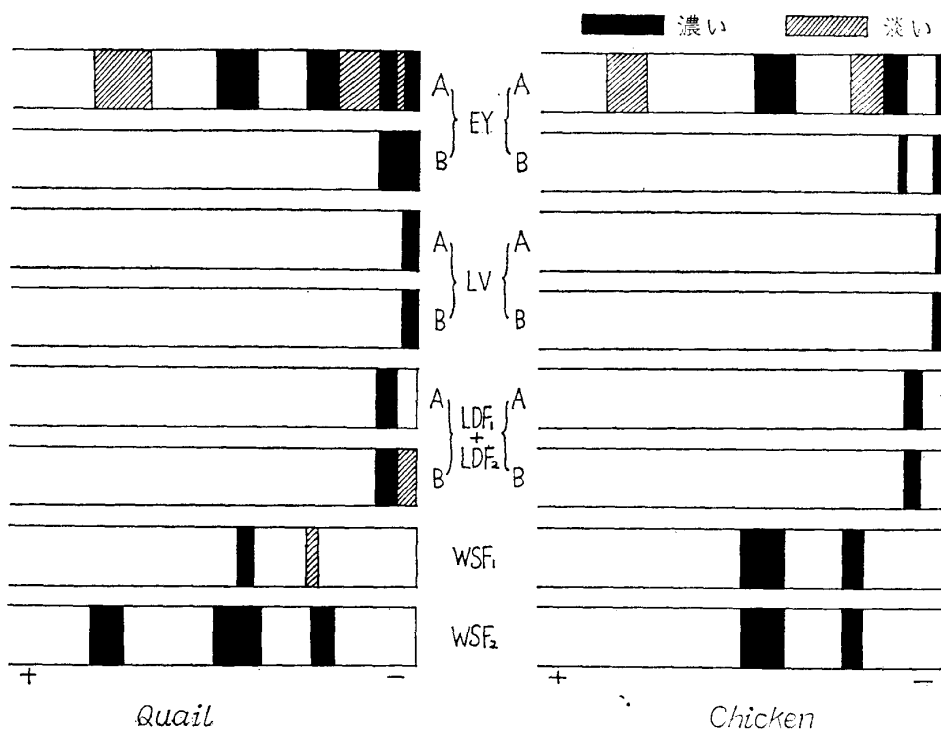


Fig. 1. 全卵黄および分別した卵黄蛋白質の口紙電気泳動図  
 A) 染色液 : B.P.B.  
 B) 染色液 : Sudan III

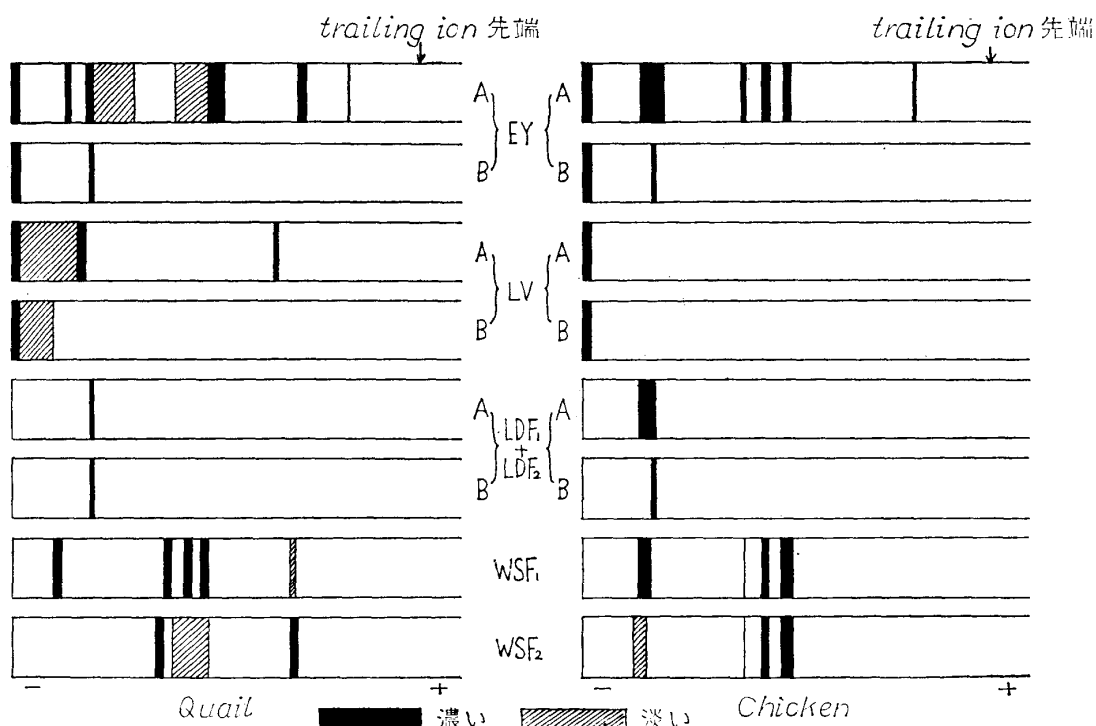
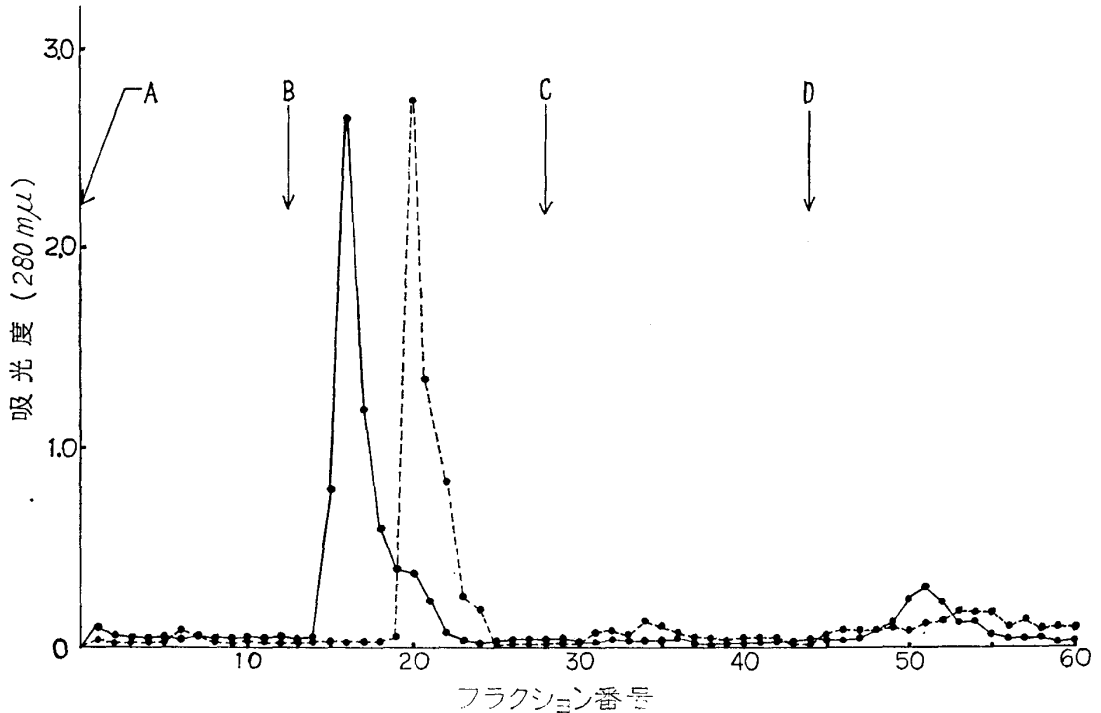


Fig. 2. 全卵黄および分別した卵黄蛋白質のディスク電気泳動図  
 A) 染色液 : Amido Black  
 B) 染色液 : Sudan Black



**Fig. 3. 卵黄リポビテリンの分離**  
 ●——●——● ウズラ卵黄リポビテリン  
 ●---●---● 鶏卵黄リポビテリン  
 カラム：ヒドロキシアパタイト 1.5×15 cm  
 展開液：A) 0.2Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8)  
 B) 0.6Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8)  
 C) 1.2Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8)  
 D) 0.5M NaOH  
 試料：リポビテリン 50mg 含む0.2Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) 10ml

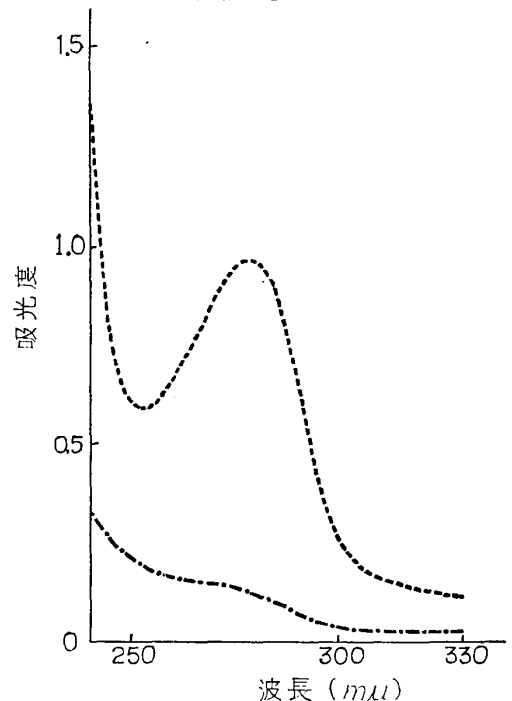
これは、主要な酵素類を含む  $\alpha$ ,  $\beta$  および  $\gamma$  の3成分よりなるリベチンや、その他の卵黄蛋白質を含むと思われる Shephard および Hottle<sup>5)</sup> の結果と一致している。

ヒドロキシアパタイト—カラムクロマトグラフィー  
 分別したウズラ卵黄と鶏卵黄のリポビテリンをそれぞれ0.2Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) に透析して、ヒドロキシアパタイトのカラムを用いて、0.6M, 1.2Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) について0.5M NaOHで溶出した結果を Fig. 3 に示す。

ウズラ卵黄リポビテリンと鶏卵黄リポビテリンとでは、大体同じ形を示すが、0.6Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) で溶出される時間が、少し鶏卵の方がずれて遅くなっている。

0.6Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) で溶出された画分を、水に透析してのち凍結乾燥して得た量は、カラムに添加した量に対して、ウズラ卵で95%、鶏卵で86%であり、リポビテリンの主要部がここに溶出されることがわかった。

0.2Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) では、完全に除かれなかったリベチンの一部が溶出したものと思われ



**Fig. 4. ヒドロキシアパタイト—カラムクロマトグラフィーで分画したウズラ卵黄リポビテリンの吸収曲線**  
 ----- 0.6Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) 溶出画分  
 -●-●- 0.5M NaOH 溶出画分

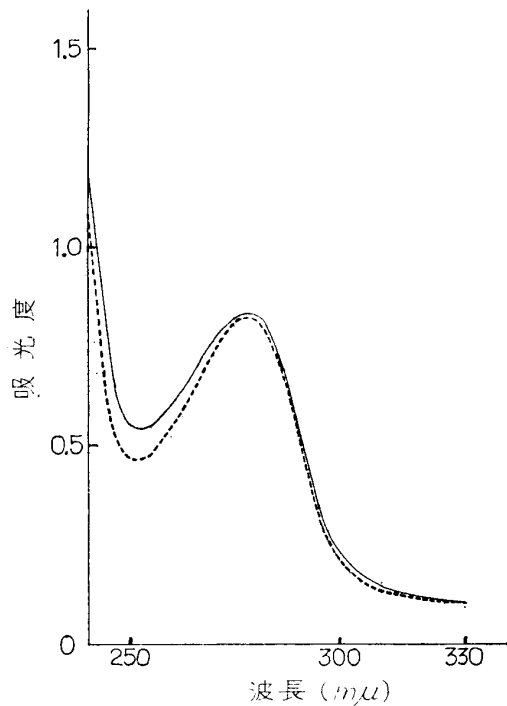


Fig. 5. 卵黄リポビテリンの吸収曲線  
 ——— ウズラ卵黄のリポビテリン  
 - - - - - 鶏卵黄のリポビテリン

れ, 1.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) および 0.5 M NaOH 溶出画分にわずかに不純物蛋白質と思われるピークを認めた。

これは, つぎの Fig. 4 に示す 0.6M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) 溶出画分と 0.5M NaOH 溶出画分の紫外部吸収スペクトルを比較すればわかるように, 明らかにアミノ酸組成を異にする蛋白質である。

Fig. 5 にはウズラ卵黄リポビテリンおよび鶏卵黄リポビテリンの紫外部吸収スペクトルを示すが, 大体同じ結果を示している。

#### IV 要 約

1. ウズラ卵の卵黄蛋白質をリポビテリン (LV), リポビテレン (LDF<sub>1</sub>, LDF<sub>2</sub>), 水溶性蛋白質 (WSF<sub>1</sub>, WSF<sub>2</sub>) の5種に分別した。
2. 卵黄蛋白質中の重量百分率は, ウズラ卵では 43, 33, 5, 4, 15%, 鶏卵では 38, 45, 1, 4, 12% であった。
3. ウズラ卵では, リポビテリンがリポビテレンより

多く, 鶏卵の場合と逆である。

4. ロ紙電気泳動およびディスク電気泳動による分別により, リポ蛋白質2種と水溶性蛋白質5種の存在を確認した。
5. リポビテリンは, ロ紙電気泳動およびディスク電気泳動では単一であり, ヒドロキシアパタイトを用いたカラムクロマトグラフィーでは, 0.6M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) で溶出された。

(1969年8月30日受理)

#### V 文 献

- 1) H. Bence-Jones : Liebig's Ann. **40**, 65 (1841).
- 2) R. J. Evans and S. L. Bandemer : J. Agr. Food Chem. **5**, 868 (1957).
- 3) E. Chargaff : J. Biol. Chem. **142**, 191 (1942).
- 4) H. L. Fevold and A. Lausten : Arch. Biochem. Biophys. **11**, 1 (1946).
- 5) C. S. Shephard and G. A. Hottle : J. Biol. Chem. **179**, 349 (1949).
- 6) D. K. Mecham and H. S. Olcott : J. Am. Chem. Soc. **71**, 3670 (1949).
- 7) A. Valenciennes and E. Fremy : Compt. rend. soc. biol. **38**, 469, 525 (1854).
- 8) J. Vandeger et al. : Arch. Biochem. Biophys. **62**, 328 (1956).
- 9) R. W. Burley, W. H. Cook : Can. J. Biochem. Physiol. **39**, 1295 (1961).
- 10) G. Bernardi and W. H. Cook : Biochem. Biophys. acta **44**, 96 (1960).
- 11) W. G. Martin, N. H. Tattrie and W. H. Cook : Can. J. Biochem. Physiol. **41**, 657 (1963).
- 12) R. J. Evans et al. : Biochemistry **7**, 3095 (1968).
- 13) G. Young and J. F. Phinney : J. Biol. Chem. **193**, 73 (1951).
- 14) C. H. Fiske and Y. Subbarow : J. Biol. Chem. **66**, 375 (1925), **81**, 629 (1929).
- 15) A. Tiselius, S. Hyertein and O. Levin : Arch. Biochem. Biophys. **65**, 132 (1956).