

ウズラ卵黄のリパーゼに関する研究

一般性質および部分精製について

藤井 信・古賀克也・浜口隆博*

(昭和51年8月31日 受理)

Studies on the Japanese Quail's Egg Yolk Lipase On the General Properties and Partial Purification

Makoto FUJII, Katsuya KOGA and Takahiro HAMAGUCHI
(Laboratory of Animal Biochemistry)

緒 言

鳥類の卵では卵黄がかなりの部分を占め、ウズラ卵においては、卵黄は全卵中28% (新鮮物当り) であり、さらに卵黄中の脂質は卵黄中30%も存在し¹⁾、孵卵の際重要な役割をになっていると考えられる。鳥類の孵卵についての生化学的研究はほとんど行なわれておらず、わずかに孵卵の際の卵黄中の脂質および脂肪を構成する脂肪酸の変化について報告²⁾があるが、脂質分解酵素 (リパーゼ) の面からの研究は全く行なわれていない。リパーゼ (3・1・1・3) は脂肪酸のグリセリンエステルを加水分解する酵素で、低級脂肪酸と1価アルコールのエステルを加水分解する酵素である carboxylic-ester hydrolase (3・1・1・1) とは区別されている。リパーゼに関する研究は、水溶性基質に作用する他の酵素にくらべてかなり遅れていたが、近年高等動物の脾臓、腸、血清、乳、脂肪組織、および微生物のリパーゼの研究^{3) 4) 5) 6)} が広く行なわれている。植物に関してはヒマ種子、米ヌカ^{7) 8)} のリパーゼについて研究されている。リパーゼの構造については apoenzyme と cofactor の結合体であるといわれていたが、School⁹⁾ らは脂質は活性発現そのものに必要なのではなく、酵素の安定化に必要であることを示した。

それに対して Fujii¹⁰⁾ らはラット脂肪組織のリパーゼとエステラーゼが脂質の関与により相互に変換できることを示し、脂質の重要性を示した。一方微生物からは、単純蛋白からなり脂質を含まないリパーゼが単離された¹¹⁾。基質特異性についても研究が行なわれつつあるが、リパーゼの本態についての系統的な解明がなされるに到っていない。これらの点から著者は孵卵

時において重要な作用をもつと思われる卵黄リパーゼについて実験を行った。

実験方法

実験材料 当学部家畜育種学教室から分譲された日本ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) より得た受精卵、および鹿児島県隼人町のウズラ業者から購入した受精卵を材料とし、孵卵器 (東洋孵卵器製造 KK) を用い 37~38°C で所定の期間孵卵した後、卵黄を取り出して実験に供した。

粗酵素液の抽出 孵卵12日目の卵黄に5倍量の冷アセトンを加えてホモゲナイズし脱水脱脂した後さらに、エチルエーテル-メタノール (1:1) を用いて脱脂操作を4回行い、脱脂粉末を得た。この脱脂粉末に10倍量 (W/V) の 0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0, $\text{Ca}^{++} 10^{-3} \text{M}$) を加え Potter-Elvehjem 型ホモゲナイザーを用いて懸濁液とし5時間抽出を行う。この抽出液を 7500 r.p.m. で30分間遠心分離し残渣にさらに2回同様の抽出操作を行い上清を合わせる。得られた抽出液に固形硫酸を加え0.6飽和とし、生じた沈殿を集め水透析、脱塩後粗酵素液とした。

酵素活性測定法 リパーゼ活性の測定法としてはアルカリ滴定法、比色法、検圧法、などが報告されている。最近ローダミン6G比色法^{12) 13)} が報告され、著者も比較検討した結果簡便で微量分析に適していることを認めたのでこの方法により活性測定を行った。pH スタット (ラジオメーター社製) を用いるアルカリ滴定法も適宜行った。さらに β -ナフチルブチレート

1) **ローダミン6G比色法** 遊離する脂肪酸を抽出しローダミン6G試薬を加え、515 nm における吸光度を測定する。

* 千成ヤクルト販売(株)

Dole 抽出液：ヘプタン-イソプロピルアルコール-1*N* 硫酸 (10:40:1)

ローダミン 6 G 試薬：ローダミン 6 G, 30 mg を 0.1 *M* トリソー塩酸緩衝液 (pH 9.5) 25 ml に溶かし、ベンゼン 500 ml を加え激しく振盪後、ベンゼン層を取り粒状 NaOH を 4 粒加え暗所に保存する。

標準曲線：遊離する脂肪酸を Dole 抽出液で抽出する際、脂肪酸の炭素鎖数により抽出率がかなり異なる。Fig. 1 に示したように、酪酸 (C_4) では抽出率 20% であるのに対し、パルミチン酸 (C_{16}) では 80% の抽出率であった。したがって基質として用いられたトリグリセライド (T. G.) を構成する脂肪酸の標準曲線を用い、抽出率の補正を行った。

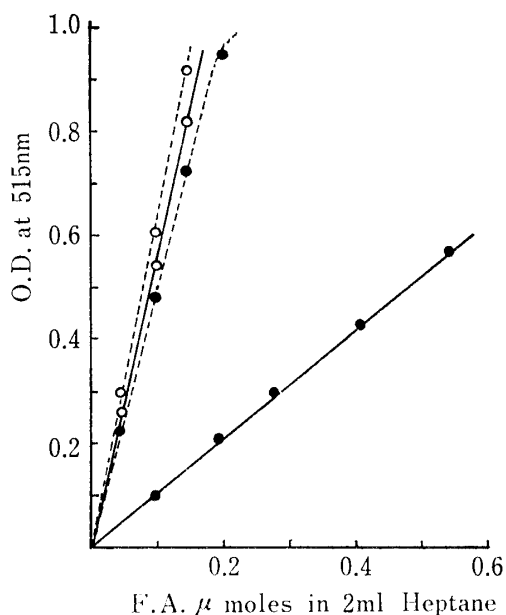


Fig. 1. Standard curve of fatty acids

- Butyric acid (C_4)
- Butyric acid extracted with Dole's soln.
- Palmitic acid (C_{16})
- Palmitic acid extracted with Dole's soln.

基質の精製法：市販の T. G. にはかなりの量の遊離脂肪酸が存在する。ローダミン 6 G 比色法においてはこのために blank 値が高くなり測定が困難であった。従って Carroll らの方法¹⁴⁾ に準じて、フロリシル (ケイ酸マグネシウム, Floridin 社製) を用いて基質の精製を行った。フロリシル 110g を 110°C で 5 時間加熱し冷却した後、3.5 cm × 25 cm のガラスカラムにヘキサンと共に充填する。基質 (トリブチリン, トリパルミチン, オリーブ油等) 10 g を少量のヘキサンに溶かして吸着させた。溶出液としてヘキサ

ン 300 ml, 25% エチルエーテル/ヘキサン 500 ml, 50% エチルエーテル/ヘキサン 500 ml を順次流す。25% エーテル画分を集め減圧濃縮して T. G. 画分を得る。得られた T. G. はシリカゲル薄層クロマトグラフィを用いて確認した。

シリカゲル薄層クロマトグラフィ：シリカゲル G (Merk 社製) 30 g を 60 ml の水に懸濁し 20 × 20 cm のガラスプレートに厚さ 250 μ の薄層とした。30 分間放置した後、110°C で 2 時間加熱し活性化した。冷却後試料を少量のエーテルに溶かしてスポットする。展開溶媒としては石油エーテル-エチルエーテル-氷酢酸 (80:30:1) を用いた。検出は乾燥後 50% 硫酸を噴霧して 110°C で 30 分間加熱することにより行った。その結果を Fig. 2 示す。

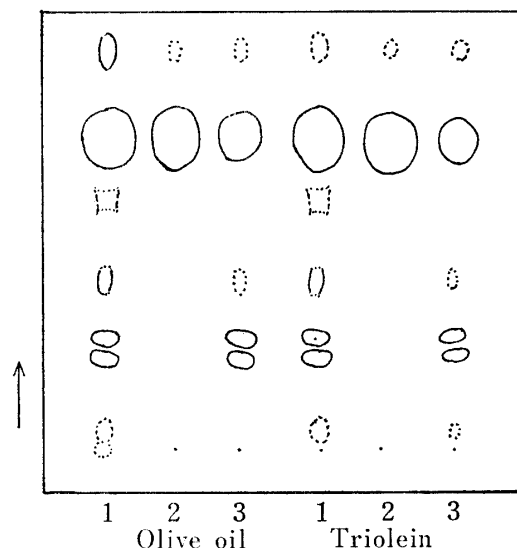


Fig. 2. Thin-layer chromatography of commercial and purified triglycerides

Plate: Silica gel G

Sample: 1) Commercial substance

2) Eluate with 25% ethyl ether

3) Eluate with 50% ethyl ether

Detection; 50% H_2SO_4 , 110°C

基質乳化液の作成：精製した T. G. 5 ml を Tween 60 の 1% 水溶液 95 ml に加えて超音波処理 (20 Kc, 10 分間) によって乳化させ基質溶液とした。

酵素活性の測定：基質乳化液 0.1 ml, 酵素液 0.2 ml, 0.1 *M* トリソー塩酸緩衝液 (pH 8.0) 0.4 ml, 10^{-2} *M* $CaCl_2$ 0.1 ml に水 0.2 ml を加えて計 1 ml とし 37°C で 30 分間反応させた。反応停止液として Dole 抽出液 3 ml を加え攪拌した後水 2 ml, ヘプタン 3 ml を加え激しく振盪し 1500 r.p.m. で 5 分間遠心分離を行う。上層 (ヘプタン層) 2 ml にローダミン 6 G 試薬 1 ml を加え 30 分間放置した後、515 nm の吸光度

を測定した。文中とくに断らない限り基質としてトリブチリンを用いた。

2) β -ナフチルブチレートを用いる活性測定法 非特異的エステラーゼ活性の測定法として、 β -ナフチルアセテートを用いる方法が広く行なわれている。この方法は活性測定が簡便にできる点、および disc 電気泳動した後の活性バンドの検出が容易であるなどの利点がある。トリブチリンを用いる関連から β -ナフチルブチレートを基質として活性を測定した結果、卵黄リパーゼはこの基質をも強く分解することを認めた。従ってリパーゼの基質としては適当とはいえないが、この方法によっても活性を測定した。

基質溶液：アセトン 1 ml に 2 mg の β -ナフチルブチレートを溶かし使用直前に 0.1 M トリブス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 40 ml に加える。

発色液：Fast violet B salt (Sigma 製) 2 mg を 100 ml の水に溶かす。

活性測定：基質溶液 1.4 ml に酵素液 0.04 ml 加え 37°C で 20 分間反応を行う。発色液 0.5 ml 加え 5 分後に 20% トリクロロ酢酸 0.5 ml を加える。酢酸エチル 4 ml を加え激しく振盪し 540 nm における吸光度を測定する。

Disc 電気泳動後の活性バンドの検出：リパーゼ標品を disc 電気泳動した後 β -ナフチルブチレートを用いて活性バンドの検出を行った。上記の基質溶液と発色液を混ぜ、これに泳動後のゲルを浸し 37°C で 5 分間反応させると赤色の活性バンドが検出された。

酵素活性の表示 酵素活性の単位は 37°C で 30 分間に 1 μ mole の脂肪酸を生じる酵素量を 1 単位とし、蛋白 (O. D.₂₈₀) 当りの unit 数を比活性とした。

酵素蛋白量の測定：蛋白量の測定は 280 nm における吸光度により測定した。

Disc 電気泳動：アクリルアミドゲル電気泳動はゲル濃度 10% (Bis 0.33%) を用い、pH 8.3 で BPB をマーカーとして行った。

DEAE セルロース：陰イオン交換セルロースとして DEAE セルロース (Brawn 社製) を用いた。

Sephadex G-75: ゲルろ過剤として Sephadex G-75 (Pharmacia 社製) を用いた。

Hydroxyl apatite: Bernardi¹⁵⁾ の方法に従って Hydroxyl apatite を調製した。

ゲルろ過法による分子量の推定 Andrews¹⁶⁾ らの方法に従って分子量の推定を行った。

分子量概知の蛋白として牛血清アルブミン (Fraction V, 分子量 67000), 卵アルブミン (分子量

47000), 馬チトクローム C (分子量 12400) を使用した。各蛋白質 4 mg を 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 1 ml に溶かし、同緩衝液で緩衝化した Sephadex G-75 のカラムにのせ溶出を行い、ブルーデキストランに対する相対的溶出位置から分子量を推定した。

実験結果

孵卵に伴う卵黄、卵黄脂質、胚の重量変化とリパーゼ活性の出現 孵卵日数 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 の胚と卵黄の重量を測定した。各孵卵日数の卵黄からアセトンついでエチルエーテル—メタノール (1:1) で脂質を抽出し、溶媒除去後脂質の重量を測定した。リパーゼの抽出は卵黄の脱脂粉末から行った。(方法の項参照) その結果を Fig. 3 に示す。卵黄重量は 6

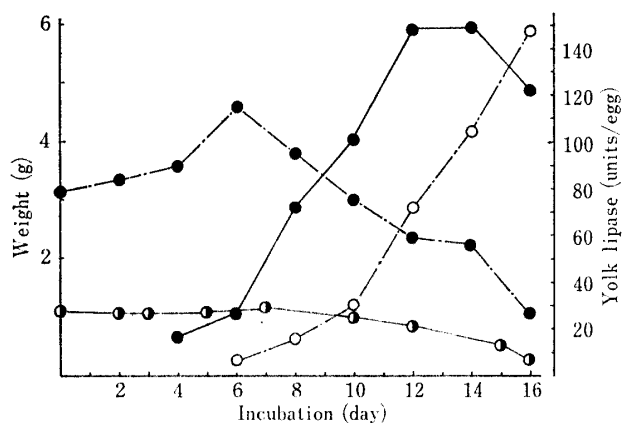


Fig. 3. Variation of the weight of each part in egg and appearance of yolk lipase activity during incubation

- Residual yolk
- Total lipid
- Embryo
- Lipase activity

日目頃までは卵白の水分が卵黄に移行するため増量するが、それ以降は漸減した。卵黄脂質量は孵卵 8 日目頃までは減少量が小さいが、胚が著しく大きくなる 10 日目頃から減少量が増加した。リパーゼ活性はこれらの変化に対応するように、孵卵 8 日目から強く現われ 12 日目頃にピークに達することが認められた。従ってリパーゼ精製の材料としては、孵卵 12 日目の卵黄を用いた。

粗酵素の一般性質

pH の影響: Fig. 4 に示されるように反応の至適 pH は 8 であり pH 4.5~9.0 で安定であった。緩衝液としては pH 2.5~7.5 は 0.1 M クエン酸—リン酸塩緩衝液、pH 5.5~8.0 は 0.1 M リン酸塩緩衝

液, pH 7.5~9.0 は 0.1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 9~11 は 0.1 M 炭酸塩緩衝液を用いた. 方法としては, 各緩衝液で 4°C で 24 時間処理した後 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で充分透析し, 残存活性を測定した.

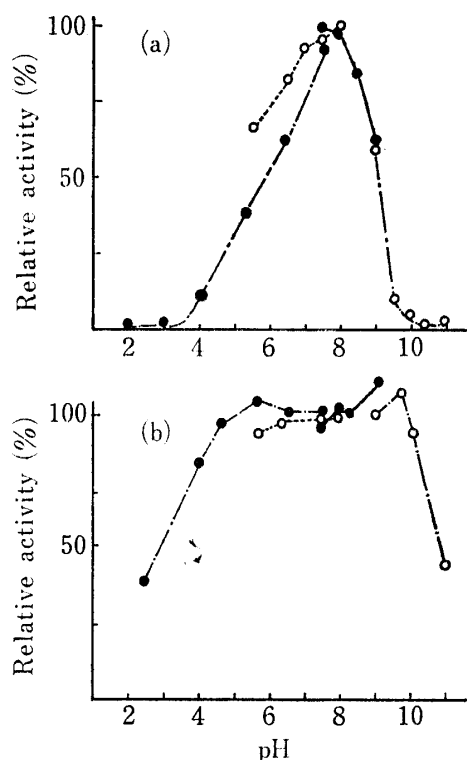


Fig. 4. Effect of pH on activity and stability of crude lipase

- (a) Effect on activity
(b) Effect on stability (treating time: 24hr)
●—● Citric A.-phosphate buffer
○····○ Phosphate buffer
●——● Tris-HCl buffer
○—○ Carbonate buffer

温度の影響: Fig. 5 に示されるように至適温度は 37~40°C であり, 60°C 以上で失活することが認められた. なお温度安定性の検討は, 各温度で 30 分間処理した後残存活性を測定することにより行った.

反応速度の時間依存性: pH 8.0, 37°C の条件下で活性測定を行ったところ, 30 分までは反応の直線性が得られた. (Fig. 6) 従って活性測定のための反応時間としては 30 分間とした.

卵黄リパーゼの精製

DEAE セルロースクロマトグラフィー: 粗酵素液を 0.01 M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0, CaCl_2 1×10^{-3} M, で充分緩衝化した後, 同緩衝液で平衡化した DEAE セルロースのカラム (1.8×20 cm) に吸着させ, 食塩濃度を 0.05 M, 0.15 M, 1.0 M と上昇させ溶出を行

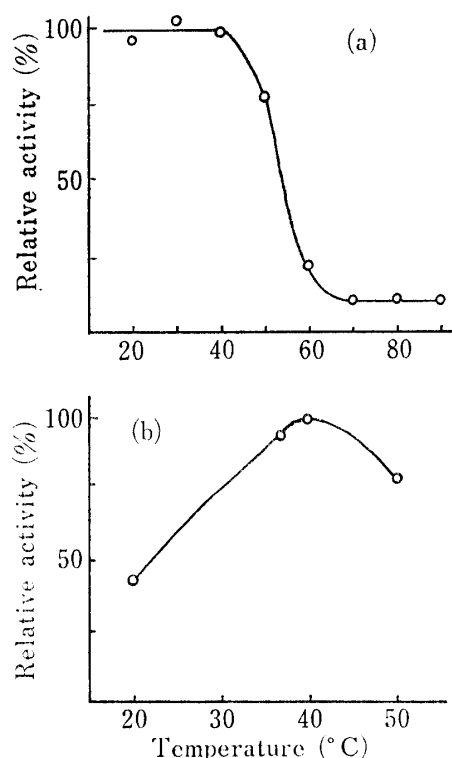


Fig. 5. Effect of temperature on activity and stability of crude lipase

- (a) Effect on stability (treating time: 30min)
(b) Effect on activity

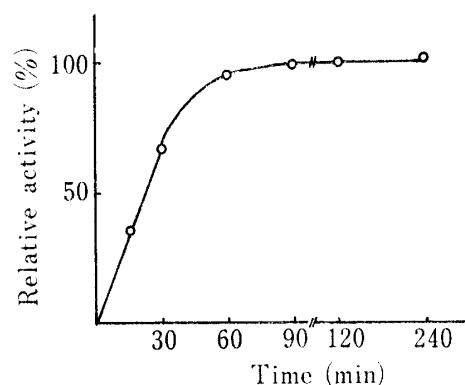


Fig. 6. Time-course of lipase activity

った. (Fig. 7) リパーゼ活性は食塩 0.15 M の画分に溶出された. 蛋白回収率 35% で活性回収率は 63.5% であった.

Hydroxyl apatite カラムクロマトグラフィー: DE-AE セルロースクロマトグラフィーで得られた活性画分を硫酸で逆透析し, 生じた沈殿を pH 6.5 の 0.01 M リン酸塩緩衝液に透析した後, 同緩衝液で平衡化した Hydroxyl apatite カラムに吸着させた. 溶出はリン酸緩衝液濃度を 0.05 M, 0.15 M, 0.2 M と段階的に

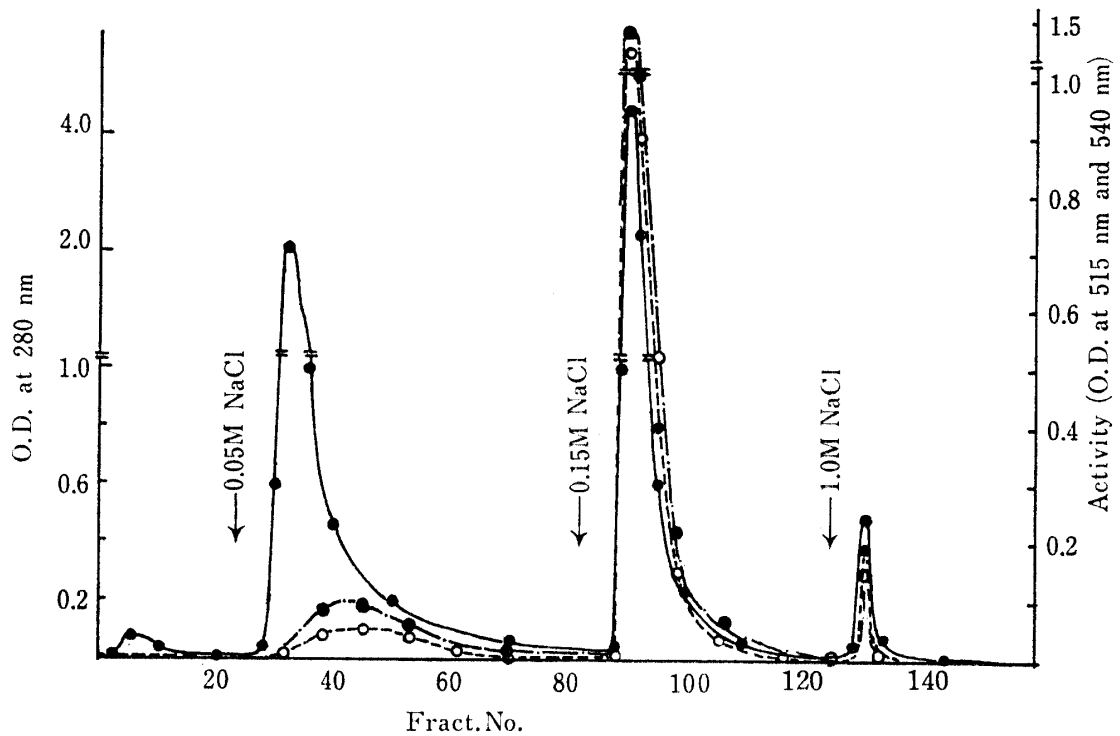


Fig. 7. DEAE-cellulose column chromatography of crude lipase
Column size: 1.8×20 cm, Flow rate: 102ml/hr, Fract. size: 10ml

●—● Protein, ○—○ Tributyrin hydrolase activity (O. D. at 515nm)
●—● β -Naphthyl butyrate hydrolase activity (O. D. at 540nm)

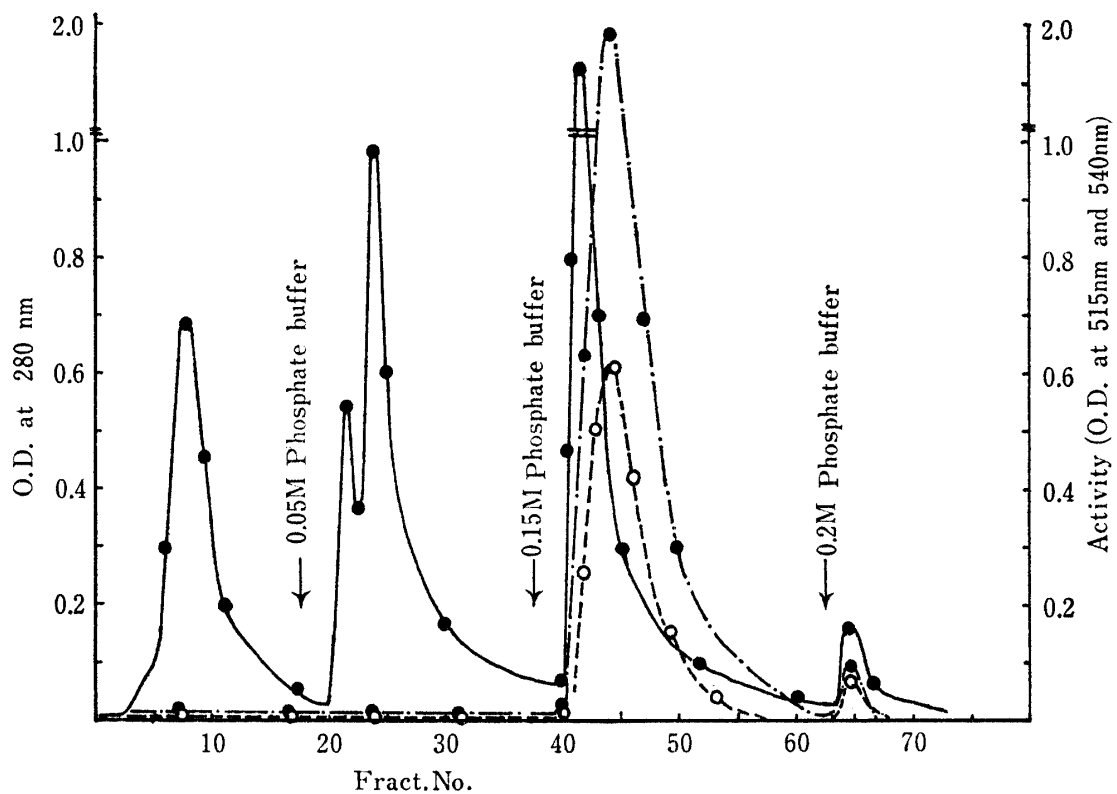


Fig. 8. Hydroxyl apatite column chromatography

Column size: 2×17 cm, Flow rate: 60ml/hr, Fract. size: 8ml

●—● Protein (O. D. 280nm) ○—○ Tributyrin hydrolase activity (O. D. at 515 nm)
○—○ β -Naphthyl butyrate hydrolase activity (O. D. at 540 nm)

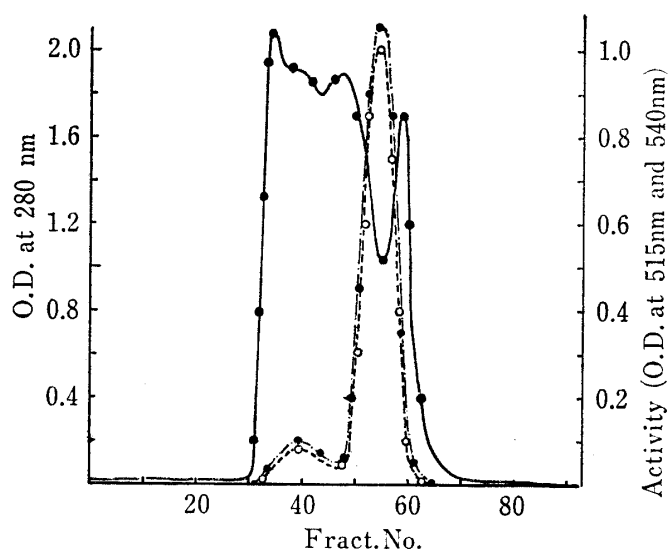


Fig. 9. Sephadex G-75 gel filtration of yolk lipase

Column size: $3 \times 108 \text{ cm}$ Flow rate: 32 ml/hr Fract. size: 4.6 ml

- Protein (O. D. 280 nm)
- Tributyrin hydrolase activity (O.D. 515 nm)
- β -Naphthyl butyrate hydrolase activity (O.D. 540 nm)

上昇させて行った。この結果を Fig. 8 に示す。リパーゼ活性は 0.15 M の画分に溶出された。この操作での蛋白回収率は 25% で活性回収率は 64.5% であった。この画分を硫酸逆透析し次の実験に供した。

Sephadex G-75 ゲルろ過: 上記で得られた画分を、 0.01 M トリス塩酸緩衝液 $\text{pH } 8.0$, $\text{CaCl}_2 10^{-3} \text{ M}$ で平衡化した Sephadex G-75 カラムにのせ、同緩衝液で溶出を行った。その結果 Fig. 9 に示すようにリパーゼ活性は大部分が1つのピークとして溶出された。この操作での蛋白回収率は 24% で活性回収率は 78.7% となった。以上の各精製過程における蛋白収量、活性収量を Table 1 にまとめた。また、Sephadex G-75 ゲルろ過で得られた活性画分の disc 電気泳動のパターンを Fig. 10 に模式図的に示した。図からわかるように蛋白のバンドが5本認められた。

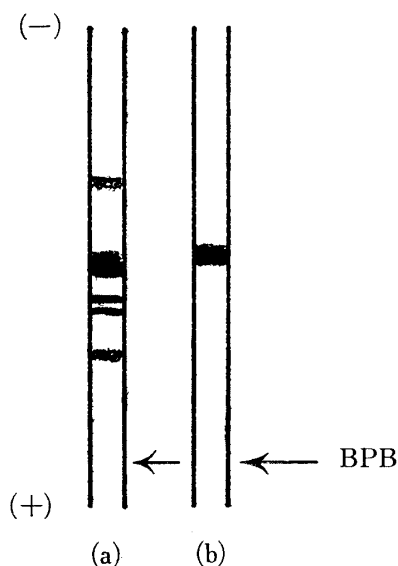


Fig. 10. Schematic diagrams of acrylamide gel electrophoresis

- (a) Protein
- (b) β -Naphthyl butyrate hydrolase activity

リパーゼの一般性質: ゲルろ過で得られたリパーゼ標品について一般性質を検討した。方法は粗酵素に対して行ったやり方に準じた。その結果 Fig. 11 に示されるように反応至適 pH は 8 であり、 $\text{pH } 4.5 \sim 9.5$ で安定であった。また至適温度は $37 \sim 40^\circ \text{C}$ であり 60°C で失活した。(Fig. 12)

血清アルブミンおよび Ca^{++} イオンの影響: アルブミン、 Ca^{++} イオンはリパーゼの賦活剤として一般的に有効であるので、これらの卵黄リパーゼに対する効果を検討した。牛血清アルブミン (Fract. V) は反応液中 0.5% になるように加えた。また Ca^{++} イオンは反応液中 10^{-3} M とした。その結果 Table 2 に示すようにアルブミンで 28% の賦活作用があり、 Ca^{++} イオンによっては 50% の賦活作用が認められた。

基質親和性の検討: リパーゼの T. G. に対する親

Table 1. Summary of purification

| Step of purification | Total protein (O. D. 280) | Protein yield (%) | Total activity (units) | Specific activity (units/O.D. 280) | Activity yield (%) |
|--|------------------------------|----------------------|---------------------------|---|-----------------------|
| Extract from defatted powder | 126112 | 100 | 75700 | 0.6 | 100 |
| Crude lipase | 26860 | 21 | 45700 | 1.7 | 60.4 |
| DEAE-cellulose column chromatography | 9360 | 7.4 | 29016 | 3.1 | 38.3 |
| Hydroxyl apatite column chromatography | 2340 | 1.9 | 18720 | 8.0 | 24.7 |
| Sephadex G-75 gel filtration | 562 | 0.4 | 14724 | 26.2 | 19.5 |

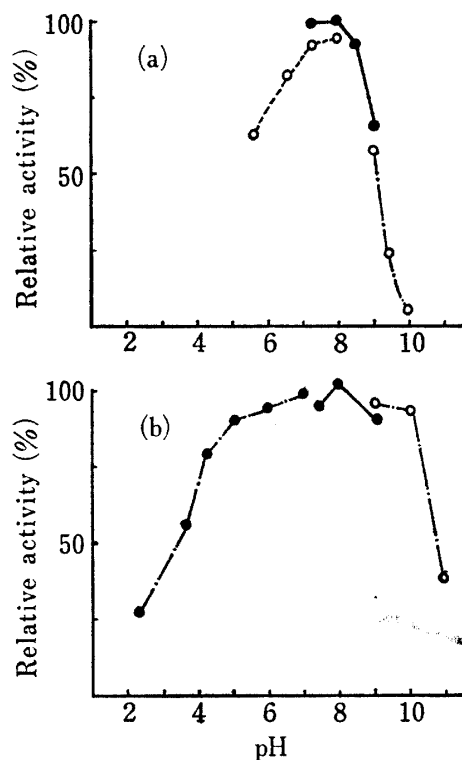


Fig. 11. Effect of pH on activity and stability of partially purified lipase

- (a) Effect on activity
 (b) Effect on stability
 ●—● Citric A.-phosphate buffer
 ○····○ Phosphate buffer
 ●—● Tris-HCl buffer
 ○—○ Carbonate buffer

和性を検討した。Table 3 に示すように、卵黄リパーゼは短鎖脂肪酸の T. G. に対する強い親和性が認められた。

Sephadex G-75 ゲルろ過による分子量の推定：リパーゼは蛋白として精製が不充分であるが、活性が1つのピークとして溶出されることから分子量の推定を

Table 2. Effect of activators

| | Relative activity |
|---|-------------------|
| Control | 100 |
| 0.5% Bovine serum albumin | 128 |
| 10 ⁻³ M CaCl ₂ (with pH-stat) | 150 |

Table 3. Activity of egg yolk lipase on different substrates

| Triglycerides | Relative activity |
|--------------------------------|-------------------|
| Tributyrin (C ₄) | 100 |
| Tricaproin (C ₆) | 83 |
| Trimilistin (C ₁₄) | 14 |

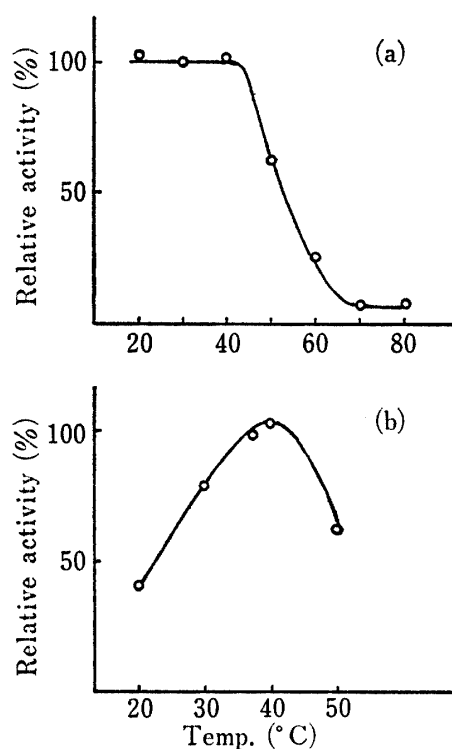


Fig. 12. Effect of temperature on activity and stability of partially purified lipase

- (a) Effect on stability (treating time: 30min)
 (b) Effect on activity

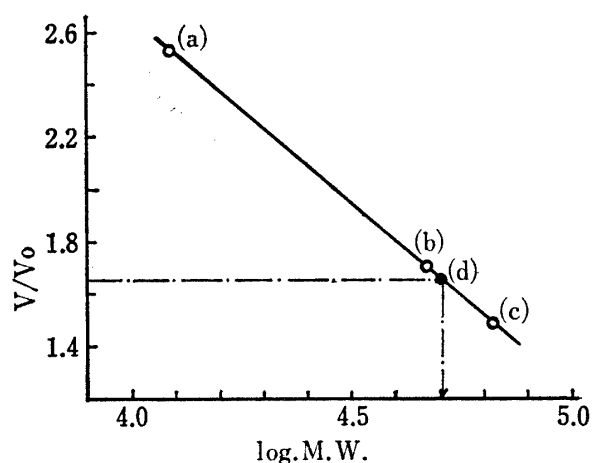


Fig. 13. Estimation of molecular weight of lipase by gel filtration

Column size: 2.5×100cm, Flow rate: 30ml/hr, Fract. size: 4ml

- a) Horse chytochrome C b) Ovalbumin
 c) Bovine serum albumin d) Yolk lipase

行った。Fig. 13 に示すように、リパーゼの分子量は 51000 と推定された。

考 察

ウズラ卵は孵卵 17 日で 孵化するが、その過程で卵黄重量および卵黄脂質量は孵卵 10 日目より減少量が増加した。これは孵卵の後期において脂質の利用が盛んになるためと推察された。これを裏づけるように、孵卵 9 日目頃から卵黄リパーゼ活性の増加が著しく認められ、12 日目でピークに達することが認められた。またリパーゼ活性の出現と並行するように酸性プロテアーゼ活性の出現も認められている¹⁷⁾¹⁸⁾ことから、孵卵過程後半において卵黄中の種々の酵素活性は著しく増大し、代謝が盛んに行なわれていると考えられる。脂質含量の高い材料から酵素を抽出する際、通常あらかじめ脱脂を行う。リパーゼに関しては脂質が酵素本体の構成成分であるという説が古くからあり、Fujii¹⁹⁾らは脂質の関与によりエステラーゼとリパーゼが相互に変換するという報告¹⁰⁾をしている。一方脂質はリパーゼそのものに関与していないという報告もあり、脂質のリパーゼ分子への関与は興味ある問題である。従って、脱脂操作によってリパーゼの基質親和性に変化が生じる可能性があったので、脱脂前後の比較を行った。表示はしていないが、native なリパーゼではトリブチリンに対する活性とトリオレインに対する活性の比は 100 : 9 であり、脱脂、精製後のリパーゼのトリブチリンに対する活性とトリミリスチンに対する活性の比は Table に示すごとく 100 : 14 であった。この結果、卵黄リパーゼは脱脂操作によって、活性発現上での重大な変化をうけなかったと考えられる。基質親和性についてみるとこのリパーゼは、高級脂肪酸の T. G. よりも低級脂肪酸の T. G. を強く分解することが認められた。リパーゼが低級脂肪酸の T. G. を強く分解する点に関しては、膵臓、胃のリパーゼについても報告され、又植物の米ヌカ、ヒマ種子のリパーゼについても同様の報告がある。

精製法として DEAE セルロース、Hydroxyl apatite, Sephadex G-75 を用いたが、まだ disc 電泳によると 5 本の蛋白バンドが存在する。CM-セルロースおよび CM-Sephadex C-50 を用いて精製を試みたがリパーゼ活性が著しく低下したので使用できなかった。この原因は不明である。基質としてトリブチリンと β -ナフチルブチレートを用いてリパーゼ活性を測定した。この 2 つの基質に対するリパーゼ活性のクロマト上のパターンは全く同一であり、1 つの酵素がこの 2 つの基質に対して強い親和性をもっていると考えられる。リパーゼの賦活剤の中から血清アルブミ

ンと Ca^{++} イオンについて検討した。 Ca^{++} イオンは生じる脂肪酸と塩を作り、アルブミンは遊離される脂肪酸を捕捉するといわれている。

卵黄リパーゼも他の一般のリパーゼと同様、アルブミン (0.5%) および Ca^{++} イオン ($10^{-3}M$) により賦活された。従って反応液中に Ca^{++} イオンを $10^{-3}M$ となるように加えたが、pH stat 法で測定する場合を考慮してアルブミンは反応系に加えなかった。

卵黄リパーゼの分子量をゲルろ過法により約 51000 と推定したが、蛋白化学的に均一に精製された段階で他の方法と合わせて測定を行い、再検討する必要がある。

得られた卵黄リパーゼ標品の比活性は 26.2 units/O. D.₂₈₀ であり、活性回収率は 19.5% となったがこの数値はかなり低い値と思われる。この点に関しては今後検討すべき問題であると思われる。

要 約

1. ウズラ卵黄のリパーゼ活性は孵卵 8 日目より増加し 12 日目でピークに達する。
2. 孵卵 12 日目の卵黄から脱脂後リパーゼを抽出し、硫酸分画後粗酵素液を得た。粗酵素液は pH 4.5 ~ 9 で安定で、反応至適 pH は 8 であった。反応至適温度は 37~40°C であり、60°C 以上ではほぼ完全に失活した。反応は 30 分まで直線的に進行した。
3. 卵黄リパーゼを DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィ、Hydroxyl apatite カラムクロマトグラフィ、ついで Sephadex G-75 ゲルろ過により精製を行った。
4. 精製したリパーゼの一般性質は pH 4.5~9.5 で安定であり、反応至適 pH は 8 であった。反応至適温度は 37~40°C であり、60°C ではほぼ完全に失活した。
5. このリパーゼは牛血アルブミンで 28% 賦活された。また Ca^{++} イオンで 50% 賦活された。
6. 基質親和性についてはトリブチリンを強く分解するが、トリカブリンおよびトリミリスチンも分解する。
7. ゲルろ過法により卵黄リパーゼの分子量は 51000 と推定された。

謝 辞

この実験の御指導と pH-stat 使用について便宜をはかって下さった九州大学農学部船津勝教授、相蘭泰生博士に深く感謝します。

文 献

- 1) 古賀克也・福永隆生・村尾 実：鹿大農学術報告, **23**, 241-247 (1973)
- 2) 高橋敏夫・中村孝雄：日本畜産学会昭和43年大会要旨集, 111
- 3) DiNell, R. R., Meng, H. C. and Park, C. R.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 3076-3081 (1960)
- 4) Mahadevan, S. and Tappel, A. L.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 2849-2854 (1968)
- 5) Tomizuka, N., Ota, Y. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 576-584 (1966)
- 6) Nagaoka, K. and Yamada, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2791-2796 (1973)
- 7) Funatsu, M., Aizono, Y., Hayashi, K., Watanabe, M. and Eto, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 734-742 (1971)
- 8) Aizono, Y., Funatsu, M., Fujiki, Y. and Watanabe, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 317-324 (1976)
- 9) School, W. P. and Melivs, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 186-192 (1969)
- 10) Okuda, H. and Fujii, S.: *J. Biochem.*, **61**, 313-319 (1967), *ibid.*, **64**, 377-385 (1968)
- 11) Tomizuka, N., Ota, Y. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1090-1096 (1966)
- 12) Anderson, M. M. and Mccarty, R. E.: *Anal. Biochem.*, **45**, 260-270 (1972)
- 13) Hirayama, O. and Matsuda, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1831-1833 (1972)
- 14) Carroll, K. K.: *J. Lipid Research*, **2**, 135-141 (1961)
- 15) Bernardi, G.: "Methods in Enzymology", Ed. by Jakoby W. B., Academic Press, New York, **22**, 325-339 (1971)
- 16) Andrews, P.: *Biochem. J.*, **91**, 222-233 (1964)
- 17) 藤井 信：未発表
- 18) 杉元康志：私的通信

Summary

1). The action of lipase in Japanese quail yolk appeared strongly at the 9th day after incubation and became strongest at the 12th day.

2). Lipase was extracted from the defatted egg yolk with 0.01M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 10^{-3} M calcium chloride, and fractionated with ammonium sulfate.

3). The crude lipase had optimum pH near 8 and optimum temperature around 37°C. It was stable over the pH range from 4.5 to 9 and below 40°C.

4). The lipase was purified, up to relatively high grade, by the successive chromatographies on DEAE-cellulose, Hydroxyl apatite and Sephadex G-75.

5). The enzyme showed the optimum pH between 7.5 and 8.0, and the optimum temperature between 37 and 40°C. It was stable over the pH range from 4.5 to 9.5 and below 40°C.

6). In substrate specificity, the enzyme exhibited a high specificity both toward triglycerides having short-carbon chain fatty acids and to β -Naphthyl butyrate, although it was capable of hydrolyzing trimilistin.

7). By using the gel filtration method with Sephadex G-75, the molecular weight of the enzyme was evaluated to be 51000.