

ウズラのエステラーゼ活性に関する電気泳動的研究

橋口 勉・岡本 悟・武富萬治郎

Electrophoretic Studies on the Esterase Activity in the Japanese Quail, *Coturnix coturnix japonica*

Tsutomu HASHIGUCHI, Satoru OKAMOTO
and Manjiro TAKETOMI

(Laboratory of Animal Breeding)

緒 言

近年、電気泳動法の改良が行なわれた結果種々の酵素の検出が容易になり、しかも酵素のいわゆる量的な検定だけでなく質的な差異、たとえば isozyme¹⁾ の検出が可能になった。そして isozyme の遺伝生化学的研究に関する報告が多くなるにつれて、isozyme の遺伝的支配様式はかなり明らかにされつつある。

しかし、これらの研究に供試された材料はそのほとんどが哺乳動物や昆虫であり、鳥類を用いての研究はまだ少ないのが現状である。

著者らは、鳥類の実験動物として、種々のすぐれた特質を有するウズラを用いて、これの esterase zymogram に関する遺伝的調節機構を明らかにする目的で、薄層寒天ゲル電気泳動法²⁾ (Thin layer electrophoresis in agar gel) によって、まず各種臓器、組織、血清あるいは発育段階の違いによる esterase zymogram の差異について分析を行なった。その結果、2, 3 の知見を得たので報告する。

本研究の電気泳動一般について種々ご助言をいただいた東京大学農学部吉武成美助教授および大阪大学医学部荻田善一助教授に謹んで感謝の意を表す。

材料および方法

材料には、本学部家畜育種学教室で飼養中のウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) を用い、これらの各臓器および組織、すなわち脳、下垂体、肺臓、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胆嚢、副腎、腺胃、筋胃、卵巣または精巣、卵管、筋肉、脂肪、舌、皮膚および血清を供試した。

酵素の抽出：上記器官の全体かあるいは、筋肉、脂肪、舌および皮膚については組織の一部を採取し生体重の2倍量の蒸溜水とともに乳鉢中で十分磨砕し、氷冷しながら 10,000 r.p.m. で30分間遠心した上清を試料とした。

血清の採取は、孵化後 30 日齢までの個体は屠殺時に、またそれ以後の日齢のものは翼下静脈より採血後、直ちに小型試験管 (8 cc) に入れて傾斜して凝固せしめ、20°C の恒温器に 12 時間静置した。分離した血清は、3,000 r.p.m. で 10 分間遠心して混入している血球を分離した。

寒天ゲルフィルム：寒天ゲルは 1.5 g の粉末寒天と polyvinylpyrrolidone (分子量 70 万) 4 g に 100 ml の蒸溜水を加え、オートクレーブで加熱し溶解せしめた後、100 ml のリン酸緩衝液 (pH 6.8 イオン強度 0.05 μ) を加えたものである。緩衝液にはベロナール緩衝液 (pH 8.6, イオン強度 0.05 μ) を使った方がより鮮明な zymogram が得られるので、リン酸緩衝液を入れた組成と併用して実験を行なった。このような寒天ゲルを 18 ml ずつ大型試験管に分注しておき、使用するさいに温水中で加熱溶解せしめ、水平に保った 16×12cm のガラス板に一樣に流して寒天ゲルフィルムを作成した。

電気泳動：木線のレース糸（18番）を適當の長さに切り，これに試料を吸収せしめて寒天ゲルフィルム上におき，上からピンセットで軽くおさえてゲル内にめりこませる．このようにして試料をつけた寒天ゲルフィルムの両端に緩衝液でしめられたろ紙をのせてそのろ紙の両端を緩衝液層に入れて泳動した．泳動に用いる緩衝液はペロナル緩衝液（ pH 8.6 イオン強度 0.05μ ）， $16 mA$ の定電流で120分間泳動を行なった．

エステラーゼの識別：non-specific esterase 検出のための基質としては， α -，あるいは β -naphthyl acetate（0.5%アセトン溶液）を，また dye coupler としては naphthanil diazo blue B（0.25%水溶液）を用いた．一方，specific esterase については荻田・笠井¹⁴⁾の確立した下記の反応液による pH -indicator 法によって分離，検出を行なった．

反 応 液	
基 質	0.2~1 g
NaHCO ₃	21 mg (M/400)
1% BTB エタノール溶液	2 ml

上記反応液を蒸留水に溶解して全量を 100 ml とする．本実験では基質として，acetylcholine と phenyl acetate を用いたが，acetylcholine は 0.2g，phenyl acetate は 1g とした．

泳動が終ったのち，寒天ゲルフィルムを上記の溶液中に約 30分間浸漬し， $37^{\circ}C$ 温室孵卵器内に incubate した．

阻害剤： $10^{-3}M$ の eserine sulfate 水溶液か，あるいは $10^{-4}M$ paraoxon (O, O-diethyl O-*p*-nitrophenyl phosphate) 水溶液を寒天ゲル中にあらかじめ添加するかまたは泳動後ただちに噴霧して約 1時間放置後両者とも基質と dye coupler を加えると，エステラーゼ活性帯の一部は抑圧される．

去勢：35日齢の雌，雄各個体について体の左側の第6~7肋骨間を切開し，腹膜を破り卵巣または精巣を絞断し，特に卵巣の場合は残留組織を電熱焼灼針をもって焼き割去の完全を期した．さらに卵巣については剔出後7日目に体の両側を切開して摘出の効果を確かめた．

雄性ホルモンあるいは雌性ホルモンの注射：雄性ホルモンには，エンルモン Enarmon（帝国臓器 KK製 Testosterone）を，また雌性ホルモンとして合成女性ホルモン，オイベスチン Euvestin（武田薬品 KK製，Stilboestrol）を用いてこれらの両ホルモンをそれぞれ連日3週間にわたり胸部の筋肉内に注射した．処理個体はホルモン注射の効果をみるためにあらかじめ胸羽の旧羽をむしりとり注射後の再生羽の形状および色状を観察した．これらの方法の詳細は実験結果のところでのべることにする．

実験結果ならびに考察

1. 肝臓，脾臓，腎臓，筋胃および血清における esterase zymogram

本実験では，脳，下垂体，肺臓，心臓，肝臓，腎臓，脾臓，膵臓，胆嚢，副腎，腺胃，筋胃，卵巣または精巣，卵管，筋肉，脂肪，舌，皮膚および血清について，基質に先ず α -naphthyl acetate を用いて esterase の分離，検出をおこなった．基質である naphthyl acetate は esterase が存在すると直ちに加水分解され，naphthol が遊離する．この時 dye coupler として発色剤である diazonium 塩（naphthanil diazo blue B）が加わることにより，するどい酵素活性泳動帯が検出される．

上記の各器官，組織および血清には，それぞれ陽極側へ移動する活性泳動帯が検出されたが，全般的にその活性帯の数には個体による変異が認められた．そして，肝臓，脾臓，腎臓および筋胃の esterase 活性は，他の器官，組織のそれらにくらべて極めて強く，しかも活性帯の数が非常に多いので個体間の esterase 型の相違について研究するには好都合である．上記の種々の器官，組織のうち

臓器特異性を示す活性帯は図1に模式的に示したように、肝臓、膵臓、腎臓および筋胃において検出されたが、他の器官、組織では明瞭な差異は認められなかった。さらに肝臓、膵臓では、臓器特有の活性帯は発育の段階によって異なって発現することが観察された。

一方、ここで用いた *naphthyl acetate* は基質として幅の広い特異性を有するために、分離、検出された活性帯は種々のエステル加水分解酵素群が同時に検出される可能性があり、したがってこれらはすべて同一の *isozyme* 群ではなく種々の異なった基質特異性をもつ酵素群が、共通の基質である *naphthyl acetate* を加水分解した結果、外見上すべて同じ *isozyme* 群のようにみえている可能性がある。そこで、*isozyme* であることを確かめるためには、これらの酵素活性泳動帯の種々の基質に対する特異性、賦活剤や阻害剤に対する態度および細胞内における局在性などによって酵素群を分類し、さらに遺伝学的な解析をおこなって *isozyme* 群を決定する必要がある。

これらの理由から、本実験では荻田ら¹⁴⁾の確立した *pH-indicator* 法などを用いて *specific esterase* の分離、検出を行なった。この方法は基質の種類によって *esterase* の存在するところが生成する酸によって *pH* が変化し青緑色の *background* の中に黄色の活性帯として酵素活性が検出されるものである。

本報では、上記の数多くの器官、組織のうち肝臓、膵臓、腎臓、筋胃および血清のエステラーゼ活性についてのべる。

a) 肝臓における *esterase* 活性

60日齢の雌、雄各 20 個体について基質に α -*naphthyl acetate* を用い肝臓のエステラーゼ活性を調べた結果、図1に示したように非常に多数のエステラーゼ活性帯が存在することが明らかになった。これらの活性帯はいずれも原点から陽極側へ移動したもので、陰極方向へ移動する活性帯は検出されなかった。便宜上これらの活性帯の中で明瞭なものに、その移動性のもっとも大きいバンドから順次番号をつけた。これらのうち、バンド1は肝臓特有のもので雌、雄の区別なく全個体において検出された(以下L-活性帯とよぶ)。バンド2~12は個体によっては、そのうちのいくつかが存在しないもの、あるいはこれよりも多く発現するものもあり個体間の変異が著しかった。これらのバンドは、一見すべて同じ *esterase* 群に属するかのように思われるが、阻害剤として $10^{-3}M$ *eserine sulfate* 水溶液を用いると、バンド12はその活性が抑圧されることが判明した。*eserine* は泳動後基質と *dye coupler* を加える前に噴霧するか、あるいはあらかじめ寒天ゲルに添加したものをを用いたが、後者の方がよい再現性が得られた。

以上のべた *eserine sensitive* 活性帯は $10^{-4}M$ *paraoxon* によっても阻害され、基質に *acetylcholine* および *phenyl acetate* などを用いた *pH-indicator* 法によっても検出されたことから、この活性帯は多分 *cholinesterase* と考えられる。

また、L-活性帯は *phenyl acetate* を基質とした *pH-indicator* 法によっても検出されたが、この活性帯は $10^{-4}M$ *paraoxon* によっても阻害をうけた。

他の家畜および家禽における各種臓器、組織のエステラーゼ活性に関しては、いまだ多くの報告はなく、わずかに富田ら¹⁸⁾によって鶏、豚および牛の肝臓 *esterase* について寒天ゲル電気泳動法により、鶏では約 10 本の活性帯を、牛では約 5 本が、そして豚では約 3 本の活性帯を認め、それぞれの動物の品種内で数型の変異型が認められている。

本実験でもウズラの肝臓 *esterase* について約 12 本の活性帯が検出され、これらの *esterase* の性質を知るために基質特異性と阻害剤に対する態度から *esterase* の分類を試みたが、今後は *esterase*

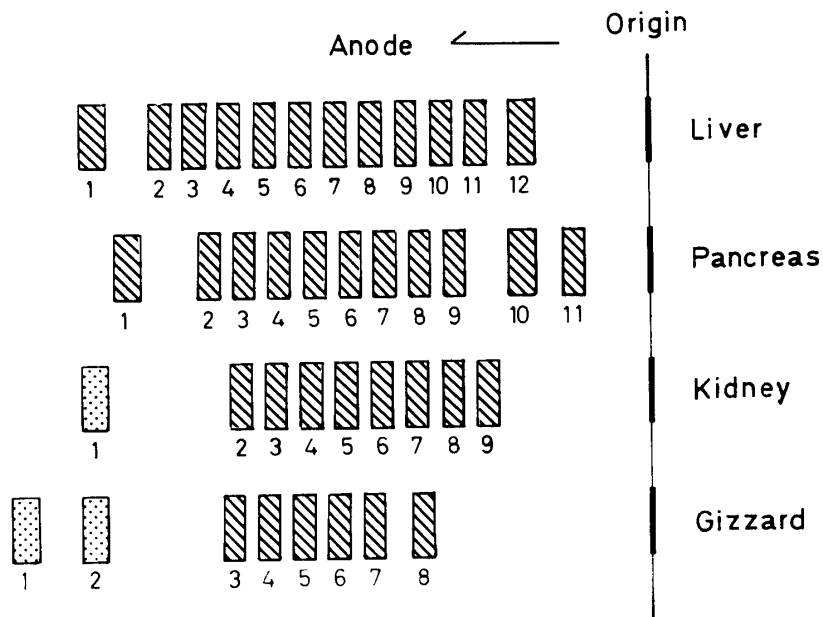


Fig. 1. Diagram of the bands exhibiting esterase activities in the various organs of the Japanese quail. Esterase activities were detected with α -naphthyl acetate as the substrate and naphthanil diazo blue B as dye coupler.

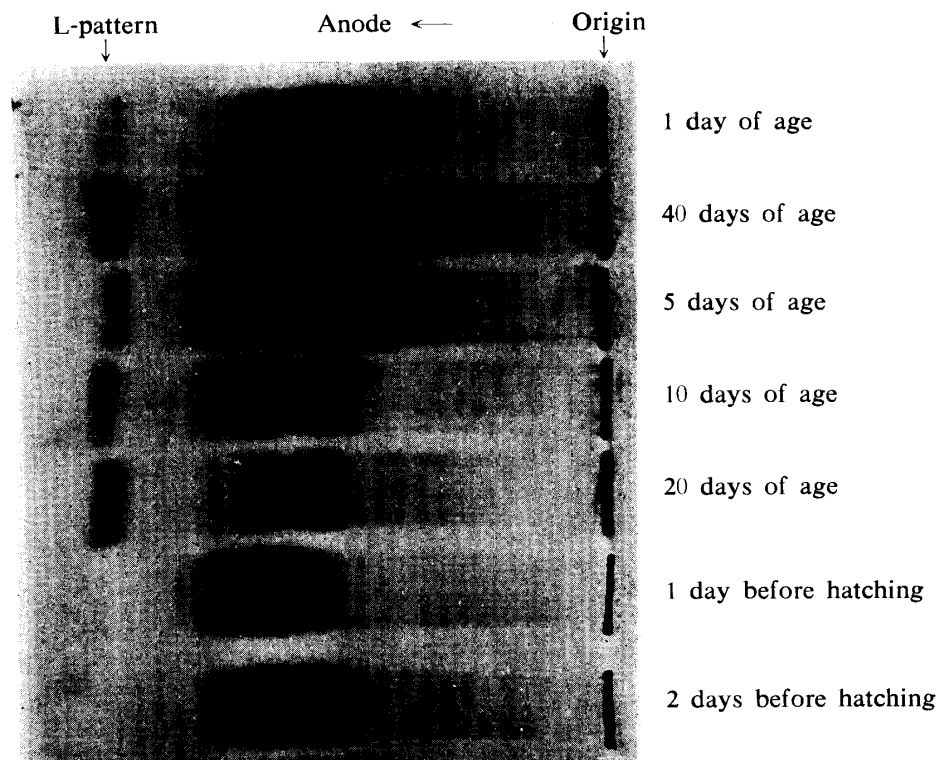


Fig. 2. Photograph of esterase zymograms of the liver. Esterase activities were detected with α -naphthyl acetate and naphthanil diazo blue B.

活性の遺伝的変異を明確にする必要があり、現在その解析をすすめつつある。

つぎに発育段階の違いと esterase zymogram の差異との関連についてしらべるために、孵化前 2 日、1 日、孵化当日、5 日齢、10 日齢、15 日齢、20 日齢、25 日齢、30 日齢、35 日齢、40 日齢および 45 日

齡の雌，雄各5個体の肝臓についてその esterase 活性をしらべた。その結果，肝臓特有の L-活性帯は孵化前2日，1日のものでは雌雄の区別なく全個体に認められず孵化当日になってはじめてそのバンドが認められたが，活性は40日齢以後のものにくらべて極めて弱かった。そして5日齢になると，L-活性帯は全個体において認められその活性も40日齢個体に近い強さで発現し，また10日齢以後では40日齢個体の活性と同程度にすべての個体において観察された (Fig. 2)。

他方，2から12にかけてのバンドにおいては，発育の違いによるエステラーゼ活性の顕著な差異は認められなかった。

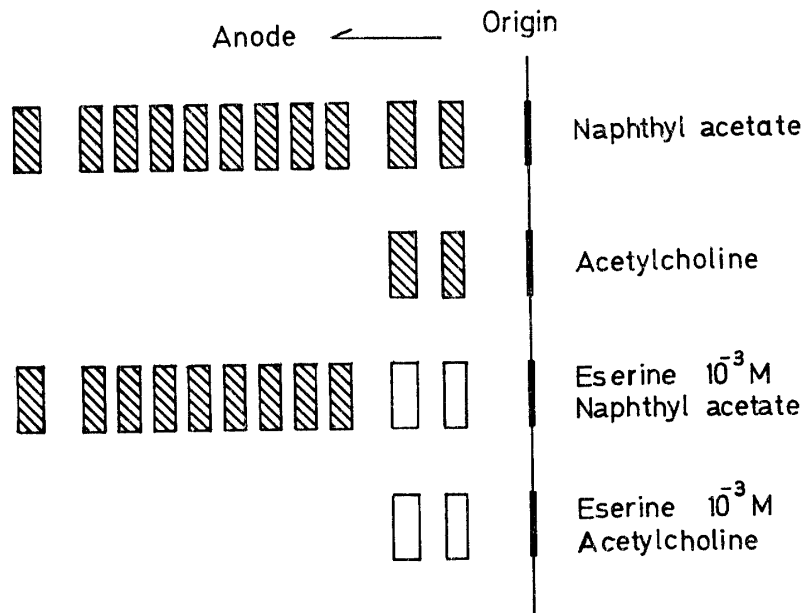


Fig. 3. Zymograms of non-specific esterases and specific esterases from pancreas extracts of the Japanese quail. Non-specific esterases were detected with α -naphthyl acetate and naphthanyl diazo blue B, while the specific esterase hydrolysing acetylcholine was detected by the pH-indicator method. $10^{-3}M$ eserine sulfate treated before esterase stain.

b) 膵臓における esterase 活性

膵臓についても60日齢の雌，雄各個体について検討を行なった結果，図1に示したように陽極側へ移動する多くの活性泳動帯が観察された。そして移動性の大きいものから順次分類した結果，1から11にいたるバンドが得られたが，膵臓においても前述した肝臓の場合と同様にこれらのバンドの現われ方には個体による変異が認められた。しかし，バンド1は他の臓器，組織においては認められず，膵臓にのみ存在するものであり，肝臓特有のバンドと同様に強い活性を示した。そしてこの膵臓にのみ出現する活性帯（以下 P-活性帯とよぶ）は，すべての個体において認められるものではないが，雌，雄各々50個体について観察した結果では雌の個体に多く発現する傾向が認められた。

また，バンド10と11も個体により，これらのうち1本しか現われぬもの，あるいは3本発現する個体も観察されたが，これらのバンドは肝臓におけるバンド12と同様に $10^{-3}M$ eserine によってその活性は抑制され，また pH-indicator 法による検出結果からもこの活性帯は，cholinesterase であると考えられる。そして，膵臓におけるこの活性帯は上記した種々の器官や組織のうちでは最も強い活性を示した。さらに P-活性帯は phenyl acetate を基質とした pH-indicator 法によって検出されたが，L-活性帯と異なり $10^{-4}M$ paraoxon によっては阻害されないことが明らかとなった (Fig. 3,

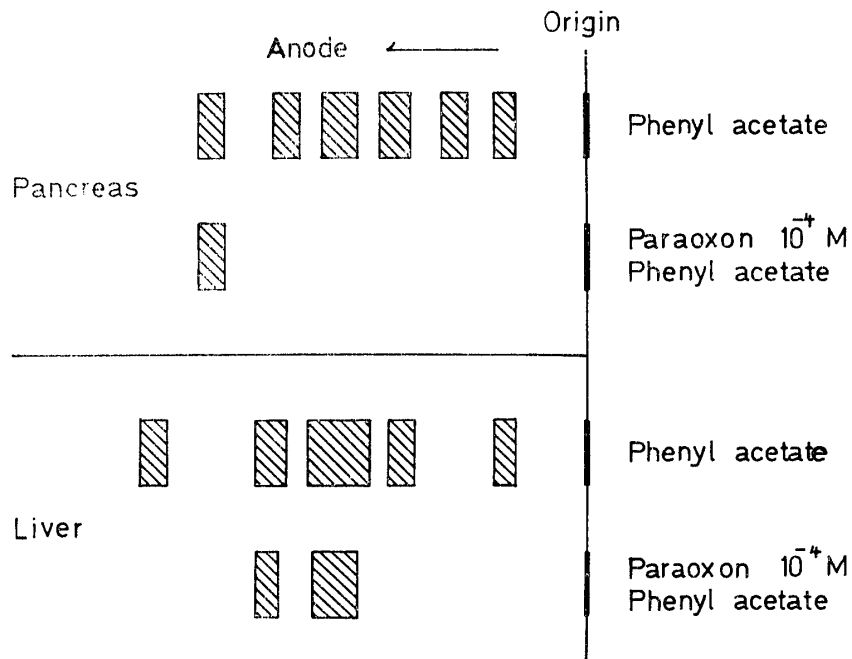


Fig. 4. Diagrams showing zymogram patterns of phenyl acetate splitting enzymes and the inhibitory effect by $10^{-4}M$ paraoxon.

Fig. 4).

つぎに、発育時期の違いと esterase 活性の差異との関連についてしらべた結果、肝臓の場合とほぼ似た結果が得られたが、孵化前2日、1日、孵化当日および5日齢のものでも、膵臓特有の P-活性帯は認められず10日齢以後においてはじめて発現する個体を得られた。しかしながら、他のバンドではこのような現象は観察されなかった。

以上のべたような発育段階の違いによって esterase 活性が異なるという現象がいかなる原因にもとづくものであるかを知るために、膵臓特有のバンドが雌の個体に多く発現するという先の結果とともに、現在種々の見地から検討を行なっている。

c) 腎臓および筋胃における esterase 活性

腎臓および筋胃における esterase 活性は、前述した肝臓や膵臓の場合と比較してその活性帯の数は幾分少なく、かつ肝臓や膵臓において観察された移動性の遅いバンド、すなわち eserine sensitive esterase に相当する活性帯は両者ともその存在ははっきり認められなかった。

さらに、pH-indicator 法により基質に acetylcholine を用いて acetylcholine 加水分解酵素の分離、検出を行なった結果、肝臓あるいは膵臓の場合のようにはっきりした活性帯は検出されないことから、腎臓や筋胃における cholinesterase 活性は極めて弱いものと考えられる。

筋胃では少数の個体において各種臓器、組織のうちで移動性のもっとも早い筋胃特有のバンド (G-活性帯) が存在することが確かめられた。さらに腎臓と筋胃では肝臓にみられる L-活性帯と同じ活性帯がともに少数の個体において観察された。しかしながら、これらの活性帯は雌、雄いずれかに片よって発現することもなく、また発育時期の違いによる活性帯の差異も認められなかった。

d) 血清における esterase 活性

血清における non-specific esterase をしらべた結果は、図5に模式的に示したとおりである、

すなわち、現在までに 60 日齢の雌、雄各 100 個体についてしらべたところ、そのエステラーゼ活性を 5 つの基本型に大別することができた。そしてこれらの 5 つの基本型を示す活性帯以外にも、図 5 に示したように他の活性帯が検出されたが、この活性帯の発現する場所および活性帯の数には個体による変異が著しく、しかもこれらの活性帯は 5 つの基本型の各活性帯にくらべてその活性は弱かった。

さらに、雄においては移動度の極めて早い活性泳動帯が 1 本全個体に認められたが、雌ではこのような活性帯は認められず、この活性帯の発現に関しては明瞭な雌雄差が観察された。このように雌雄によって発現が異なる活性帯は性ホルモンの支配をうけていることが確認されたが、これらの詳細は後節でのべる。

5 つの各型のうち、それぞれ共通に存在する移動性の最も遅い活性帯と雄にのみ強く発現する移動度の極めて早い活性帯は、 $10^{-3}M$ eserine によって阻害をうけ、また後節でのべるように acetylcholine を基質として用いた pH-indicator 法によって検討した結果、この活性帯は cholinesterase 活性泳動帯であることが判明した。

以上のべたように、血清の naphthyl acetate 加水分解酵素には、活性帯の発現する位置によって 5 つの型に大別することができたが、現在さらに多くの材料を供試してこれらの基本型とその各型の出現頻度を確かめるとともに、エステラーゼ活性の遺伝的支配を明らかにするために、基本型の異なる個体間で交雑をおこない、その遺伝様式を検討中である。

2. 血清において性ホルモンの支配をうけるエステラーゼ活性帯

本実験では、60 日齢の性成熟に達したウズラの雌雄各個体から血清を採取したのち、acetylcholine を基質として pH-indicator 法による血清中の cholinesterase の分離、検出を行なった。その結果は図 6 のとおりである。すなわち、雌雄各個体ともに原点から陽極側へ移動性の極めて遅い位置に例外なく活性帯（以下 S-s 活性帯とよぶ）が認められた。この S-s 活性帯には 1 本発現するものと、移動性の多少異なる 2 つないし 3 つのバンドの出現するものとが観察されたが、これらの変異は雌雄差では

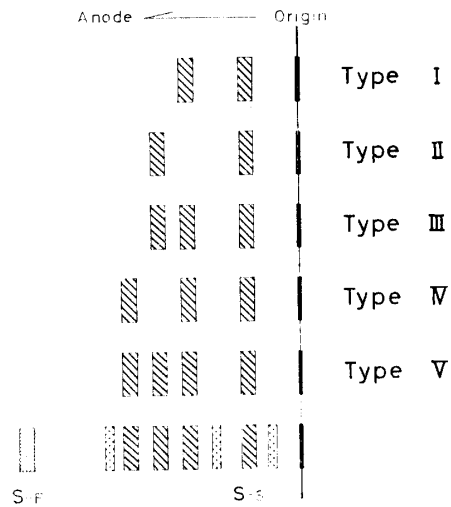


Fig. 5. Schematic presentation of variations in enzyme pattern of the serum. Esterase activities were detected with α -naphthyl acetate as the substrate and naphthanil diazoblue B as dye coupler.

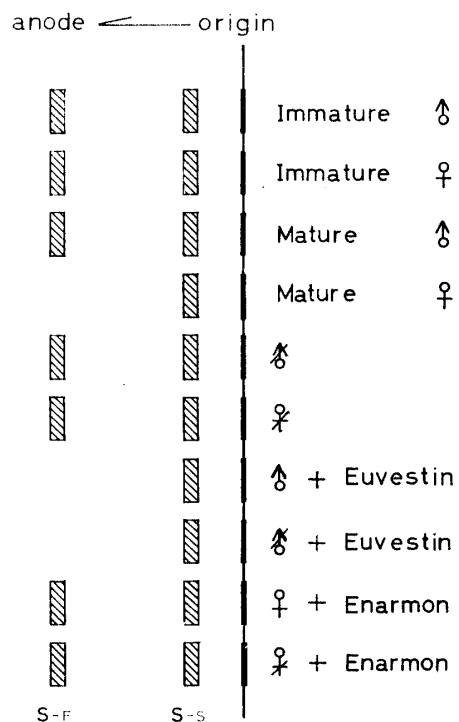


Fig. 6. Diagrams showing sex-associated quantitative difference in the serum cholinesterase of Japanese quail. Esterase hydrolysing acetylcholine was detected by pH-indicator method.

なく個体差であることが確認された。一方、S-s 活性帯のほかに移動度のもっとも高い活性帯（以下 S-F 活性帯とよぶ）が雄にのみ例外なく強い活性として認められたが、雌ではこのようなバンドは本実験に用いたすべての個体において認められず、この S-F 活性帯の活性の強弱に関しては明瞭な雌雄差が認められた。

S-F 活性帯について、雄にのみ強く発現し雌においてはその発現が抑えられるという現象が、いかなる理由にもとづくものであるかを検討するために更に下記のような処理区をつくり、これらの個体の cholinesterase 活性をしらべた（各区 5 羽供試）

1. 精巣摘出：35日齢にて去勢
2. 卵巢割去：35日齢にて去勢
3. 精巣摘出後合成女性ホルモン（オイベスチン）を注射：去勢後7日目からオイベスチン 0.1 mg 1,000 単位を 21日間連続投与
4. 卵巢割去後雄性ホルモン（エナルモン）を注射：去勢後7日目からエナルモン 0.1 mg を21日間連続投与
5. 42日齢正常雄にオイベスチン注射：0.1 mg 1,000 単位 21日間連続投与
6. 42日齢正常雌にエナルモン注射：0.1 mg を 21日間連続投与
7. 孵化当日，5日齢，10日齢，15日齢，20日齢，25日齢，30日齢，35日齢，40日齢，45日齢および50日齢の雌，雄を供試

その結果は図6，図7および第1表のとおりである。すなわち、すべての区において S-s 活性帯は雌雄の差なく発現したが、S-F 活性帯については、無処理区の孵化当日，5日齢，10日齢，15日齢，20日齢，25日齢および30日齢の血清でも雌雄の区別なく存在した。しかし、35日齢になると雄では S-F 活性帯はあいかわらず強い活性を示したが、雌ではその活性が低下し、S-F 活性帯の活性の強弱に関して雌雄間に顕著な差異が認められた。そしておそらく性成熟に達したと思われる40日齢を含めて以後45日齢，50日齢などの成熟ウズラにおいても雌では S-F 活性帯はその存在が認められなかった。一方、雄個体では40日齢以後45日齢および50日齢においても S-F 活性帯は強く発現した。また精巣，卵巢割去区では、それぞれ S-F，S-s 両活性帯が認められるが、精巣摘出区あるいは雄42日齢個体に各々オイベスチンを注射したものでは、S-F 活性帯の活性は無処理の性成熟に達した雌と同様に認められなかった。一方、卵巢割去区あるいは雌42日齢個体にそれぞれ、エナルモンを投与した個体では、無処理の性成熟に達した雄と同じように S-F 活性帯は全処理個体において強い活性で発現した。

以上の結果は、血清中における cholinesterase の S-F 活性帯の活性の強弱が、性ホルモンすなわち雄性ホルモンか雌性ホルモンの完全な支配をうけていることを暗示するものと思われる。そして、雄においては孵化当日を含め未性成熟期，性成熟期，さらに精巣摘出区においても S-F 活性帯は強い活性で発現したのに対し、雌では性成熟期に達する以前の35日齢頃から以後 S-F 活性帯の発現は抑えられ、さらに雄あるいは雌個体に雌性あるいは雄性ホルモンを注射すると、注射前の性本来の S-F 活性帯の発現が逆転することから、この S-F 活性帯の発現に関しては、雄性ホルモンは積極的に関与するものとは思われず、むしろ性成熟期に達する前の35日齢頃から以後における雌性ホルモンの分泌がこの活性帯の発現を抑える作用を有しているものと考えられる。なお、雌の卵巢割去区において S-F 活性帯が発現したが、これは恐らく雌性ホルモンの抑止作用が卵巢割去により失われた結果にもとづくものと思われ、たとえ残された副腎皮質から雌性ホルモンが分泌されても、S-F 活性帯の抑制に必要な閾値には十分達し得なかったものと考えられる。

isozyme の生合成がホルモンの影響により左右される例として、ALLEN¹⁾ は卵巢剔出マウスの乳腺

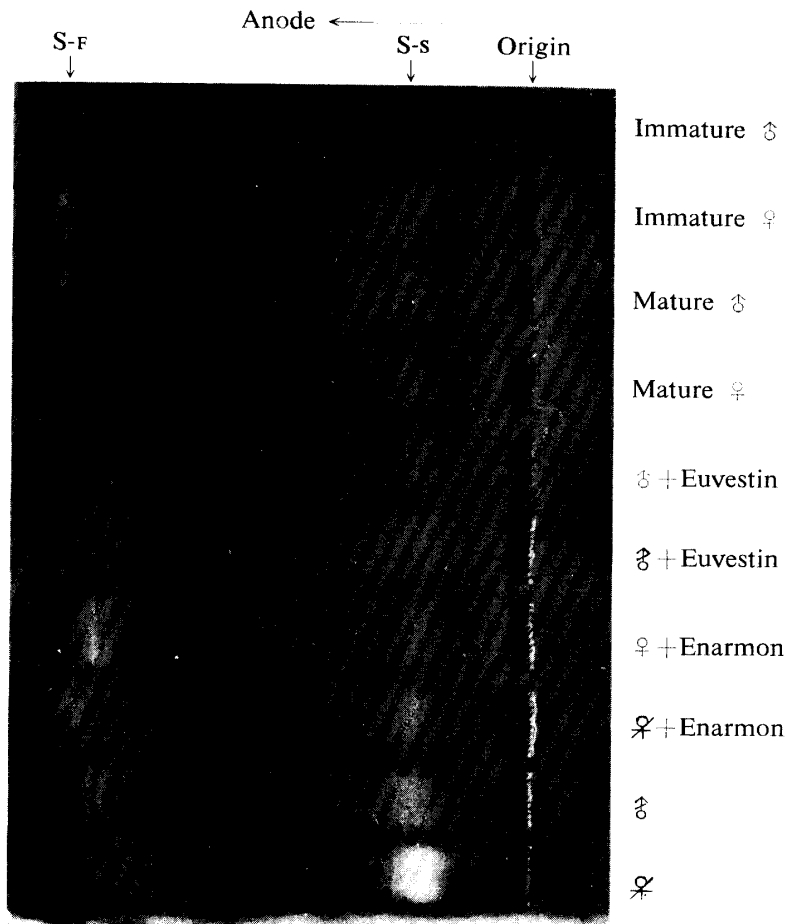


Fig. 7. Photograph of cholinesterase zymograms of the serum. The specific esterase hydrolysing acetylcholine was detected by the pH-indicator method.

Table 1. Sex-associated quantitative difference in the serum cholinesterase of Japanese quail.

Sex	Days of age at treated stage	Treatment	Zymogram bands	
			S-F	S-s
Male	0 - 50	Control	+	+
Female	0 - 30	Control	+	+
Female	35 - 50	Control	-	+
Male	35	Castration	+	+
Female	35	Ovariectomy	+	+
Male	42*	{ Castration	-	+
Female	42*	{ + Stilboestrol	+	+
		{ + Testosterone	+	+
Male	42	{ Normal	-	+
Female	42	{ + Stilboestrol	+	+
		{ + Testosterone	+	+

* : Injections of hormones were initiated at the 7th day after the castration or ovariectomy.

では、乳酸脱水素酵素 LDH-5 isozyme が高まるのに対し、乳汁分泌中の乳腺では移動度の高い LDH-1 isozyme の活性が強くなることを報じている。また esterase に関しては、SHAW ら⁸⁾ は成熟雄マウスの腎臓にのみ出現する esterase 活性帯が、性ホルモンの支配をうけていることを明らかにし、成熟雄マウスを去勢すると 6 週間後にこの泳動帯の活性が低下すること、さらに成熟雌マウスに 0.5 mg/1日の Testosterone を 1 週間続けて注射すると、雄マウスに見られるのと同じのエステラーゼ活性帯が出現することを報告した。また、荻田ら¹⁵⁾ は遺伝的糖尿マウス KK 系統の肝臓 esterase の分離像は他の系統マウスと非常に異なっているが、KK 系統以外のマウスに Insulin を皮下注射すると KK 系統によく似た分離像がもたらされることを見出した。最近 ALLEN²⁾ らはマウスの血漿 esterase について雌雄間に量的な差異があり、この esterase 活性帯は Testosterone により支配されていることを明らかにし、さらに Estradiol の Testosterone 様の効果も活性帯の 1 つにおいて見出されることを報じている。大木ら¹⁶⁾ はマウス血清の cholinesterase isozyme において、成熟雌は成熟雄および幼若マウスより若干高い活性を示し、ホルモン投与の実験から本酵素の活性は少なくとも Testosterone により抑制され、Estradiol により促進されることを明らかにした。

他方、ブタの血漿中の arylesterase 活性の程度は因子型によって決定されるが、雄性ホルモンによって酵素活性は影響をうけるという (AUGUSTINSSON ら⁵⁾⁶⁾⁷⁾。

以上のべた isozyme の生合成とホルモン支配との関係についての研究は、マウス、ブタなど哺乳動物における知見であるが、哺乳動物以外の生物においてはこれらの現象はまだ認められておらず、本実験により鳥類であるウズラにおいて性ホルモンの支配をうける活性帯が認められ、しかも哺乳動物では雄性ホルモンの作用が esterase 活性を支配しているのに対し鳥類であるウズラにおいては逆に雌性ホルモンがその活性を支配していることは極めて興味あることであるといえる。

ウズラの第 2 次性徴として明らかにされているものは、まず胸羽 (Breast) の羽色であり雌ではメラニン系色素による黒い斑点が現われるが、雄では出現しないことが知られている。この羽色による性的な差異は、個体によっては 3 週齢頃から識別でき 4 週齢になると羽色による雌雄鑑別が極めて確実になる。他方、性成熟に達するのは 6 週齢頃だとされており、この時期になると雌は産卵を開始し、雄では尾根部が暗赤色に膨大して cloacal gland から白色泡沫様液を排出するようになる。本実験で雌の血清 cholinesterase の S-F 活性泳動帯の発現が抑えられるのは、性成熟期に達する前の 5 週齢以後であり、胸羽の羽色が性的に異なって発現する時期においては、雌は雄同様 S-F 活性帯が発現することから、これらの結果は、S-F 活性帯の発現を抑える作用を有する雌性ホルモンの分泌が、3~4 週齢時ではまだ十分でなく性成熟期に達する前の 5 週齢以後においてはじめて抑止に必要な閾値に達することを意味するものと思われる。

以上の結果は、雌の血清 cholinesterase における S-F 活性帯の活性の低下を指標として、雌における性成熟に達する時期の個体間変異を識別することが可能であることを暗示するものであり、現在、これらの点について詳細な検討を行なっている。

武富ら¹⁷⁾ は雌に現われる胸羽のメラニン系色素は、卵巣機能の支配下にあることを明らかにしているが、本実験でも雄または雌に雌性あるいは雄性ホルモンを注射した場合の胸羽の羽色を観察したところ、これと同様の結果が得られた。

摘 要

ウズラの脳、下垂体、肺臓、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胆嚢、副腎、腺胃、筋胃、卵巣または精巣、卵管、筋肉、脂肪、舌、皮膚および血清における esterase zymogram の差異について寒天

ゲル電気泳動法を用いて研究をおこなった。その結果の大要はつぎのとおりである。

1) 基質に α -naphthyl acetate を用い 60 日齢の雌、雄各個体について、先ず non-specific esterase の分離、検出を行なった結果、上記の各器官、組織および血清とも陽極側へ移動する活性泳動帯が検出されたが、全般的にその活性帯の数には個体による変異が著しかった。そして臓器特異性を示す活性帯は、肝臓、膵臓、腎臓および筋胃において検出されたが、他の器官、組織では明瞭な差異は認められなかった。

2) 肝臓では陽極へ移動する 12 本の活性泳動帯が検出され、便宜上移動性のもっとも大きい活性帯から順次番号をつけて分類した。これらのうち、移動性のもっとも早いバンド 1 は、肝臓特有の活性帯 (L-活性帯) で雌、雄の区別なく全個体において検出された。バンド 2~12 は個体によってはそのうちのいくつかが存在しないもの、あるいはこれよりも多く発現するものもあり個体間の変異が著しかった。つぎに $10^{-3} M$ eserine sulfate 水溶液を用いて阻害剤に対する態度を検討した結果、移動性のもっとも遅いバンドはその活性が抑えられたが、この eserine sensitive 活性帯は $10^{-4} M$ paraoxon によっても阻害され、さらに基質に acetylcholine および phenyl acetate などを用いた pH-indicator 法によっても検出されるところから、この活性帯はおそらく cholinesterase であると考へた。

一方、発育段階の違いと esterase zymogram の差異との関連についてしらべた結果、肝臓特有の L-活性帯は孵化前 2 日、1 日のものでは雌雄の区別なくすべての個体において認められず、孵化当日になってはじめて現われたが、その活性は極めて弱く 10 日齢以後ではじめて 40 日齢以後の成熟個体の活性と同程度にすべての個体において観察された。

3) 膵臓では 11 本の活性帯が検出されたが、これらの活性帯の現われ方にも個体による変異が認められた。そして、移動度のもっとも早いバンド 1 は、膵臓にのみ存在する活性帯 (P-活性帯) であることが判明したが、この活性帯はすべての個体に存在するものではなく、少数個体では存在しないものも観察された。つぎに $10^{-3} M$ eserine によっては、移動度のもっとも遅いバンド 10 と 11 のみその活性が抑えられ、また pH-indicator 法による検出結果からも、この活性帯は cholinesterase であることが推察された。

さらに、発育時期の違いと esterase 活性の差異との関連についてしらべた結果、膵臓においては孵化前 2 日、1 日、孵化当日 および 5 日齢のものでは、膵臓特有の P-活性帯は認められず 10 日齢以後において発現する個体が得られた。

4) 腎臓および筋胃におけるエステラーゼ活性は、前述した肝臓や膵臓の場合と比較してその活性帯の数は幾分少なく、かつ肝臓や膵臓において観察された cholinesterase に相当する活性帯は、両者ともその存在ははっきり認められなかった。しかし、筋胃では少数の個体において各種臓器、組織のうちでは移動性のもっとも早い筋胃特有の活性帯 (G-活性帯) が存在することが確かめられた。さらに腎臓と筋胃では、肝臓にみられる L-活性帯と同じ活性帯がともに少数の個体において観察された。そしてこれらの活性帯の発現に関しては雌雄差は認められなかった。

5) 成熟雌、雄各 100 個体の血清における non-specific esterase をしらべた結果、そのエステラーゼ活性を 5 つの基本型に大別することができた。そしてこれら 5 つの基本型を示す活性帯以外にも、他の活性帯が検出されたが、この活性帯の発現する場所および活性帯の数には個体による変異が著しく、しかもこれらの活性帯は基本型の各活性帯にくらべてその活性は弱かった。さらに雄では移動度の極めて高い活性泳動帯 (S-F 活性帯) が 1 本全個体において認められたが、雌ではこのような活性帯は存在せず、この活性帯に関しては明瞭な雌雄差が認められた。つぎに 5 つの各型のうちそれぞれ

共通に存在する移動性のもっとも遅い活性帯と雄にのみ強く発現する移動度の極めて高い活性帯は、 $10^{-3}M$ eserine によって阻害をうけるところから、この活性帯はおそらく cholinesterase であると推察した。

6) S-F 活性帯の発現に関する雌雄差について更に検討するために、60日齢の雌雄各個体の血清について、acetylcholine を基質として pH-indicator 法により cholinesterase の分離、検出をおこなった結果、血清には陽極側に移動する移動度の極めて高い活性帯 (S-F 活性帯) と移動度の低い活性帯 (S-s 活性帯) とが存在することが判明し、しかもこの S-F 活性帯は雄にのみ強く発現し、雌ではその活性が弱いことが確かめられ、cholinesterase 活性の強弱に関して明瞭な雌雄差があることが明らかとなった。さらに、精巢あるいは卵巣の割去とこれら去勢した雌雄各個体および無処理雌雄各個体に、雌性あるいは雄性ホルモンを注射した実験結果などから、この S-F 活性帯の発現に関しては雄性ホルモンは積極的に関与しているとは考えられず、むしろ雌性ホルモンの分泌がこの活性帯の発現を抑える作用を有しているものと考えた。

文 献

- 1) ALLEN, J. M. : *Ann. New York Acad. Sci.*, **94**, 937 (1961)
- 2) ALLEN, R. C. and D. J. MOORE : *Endocrinology.*, **78**, 655~658 (1966)
- 3) ALDRIDGE, W. N. : *Biochem. J.*, **53**, 110~117 (1953)
- 4) AUGUSTINSSON, K-B : *Ann. New York Acad. Sci.*, **94**, 844~860 (1961)
- 5) AUGUSTINSSON, K-B and B. OLSSON : *Biochem. J.*, **71**, 477, 484 (1959)
- 6) ----- : *Nature.*, **187**, 4741 (1960)
- 7) ----- : *Hereditas.*, **47**, 1 (1961)
- 8) SHAW, C. R. and A. L. KOEN : *Science*, **140**, 70~71 (1963)
- 9) SHAW, C. R. : *Science.*, **149**, 936~943 (1965)
- 10) 吉川秀男・荻田善一 : 化学, **18**, 110~119 (1963)
- 11) MARKERT, C. L. and F. MØLLER : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **45**, 753~763 (1959)
- 12) OGITA, Z : *Jap. J. Genet.*, **37**, 518~521 (1962)
- 13) 荻田善一 : 日本臨床, **22**, 6~17 (1964)
- 14) 荻田善一・笠井勉 : *SABCO Jour*, **1**, 37~41 (1964)
- 15) 荻田善一・荻田幸雄・富田武 : 遺難 (要旨), **40**, 412 (1965)
- 16) 大木与志雄・武田満・萬田正治・西田周作 : 日畜会報 (要旨), **37**, 別号, 4 (1966)
- 17) 武富萬治郎・大西靖彦・加藤義一 : 日畜会報 (要旨), **22**, 別号, 6 (1951)
- 18) 富田 武・棚瀬久雄・近藤恭司 : 日畜会報 (要旨), **36**, 別号, 42 (1965)

Summary

The types and the distributions of the esterase activity in the zymograms of various organs, tissues and sera of the Japanese quail were summarized in this paper with the execution of the thin layer electrophoresis in agar gel.

Agar gel electrophoresis was carried out by the method described by OGITA (1962) with the ascertainment that in the medium for enzyme separation was contained 1.5 g of agar and 4.0 g of polyvinylpyrrolidone (Luviscol K 90 powder, molecular weight ca. 700,000) per 200 ml of veronal-sodium acetate buffer (pH 8.6, ionic strength 0.025) or per the same amount of phosphate buffer (pH 6.8, ionic strength 0.025).

A sort of agar gel, very smooth in surface and 0.7-0.9 mm in thickness, was spread over the plate. Cotton thread soaked with the serum and the crude extracts from the several tissues and organs were dipped on to the line of the agar gel plate. Then the plate was con-

nected with the buffer solution in the electrode vessels by means of the filter paper. Throughout this study was used the discontinuous buffer system described by POULIK (1957). Only after 90-120 minutes an electrophoretic run took place at 1.0-1.5 mA/cm in an ice box kept at 5°C.

After the electrophoresis, the gels were stained for the determination of the non-specific esterase, using the staining solutions prepared with the following compositions and procedure.

Buffer: pH 6.8 phosphate buffer (ionic strength 0.025)

Substrate: 0.5% disodiumnaphthyl acetate

Dye coupler: 0.25% naphthanil diazo blue B

Incubation: 37°C, 30 minutes

In order to assort the multiple molecular forms of esterase in various organs and sera revealable by such non-specific substrate as α -naphthyl acetate in agar-gel electrophoresis, the substrate-specificity and the susceptibility to the selective inhibitors, such as eserine and paraoxon (O, O-diethyl O-*p*-nitrophenyl phosphate) were examined.

After the electrophoresis, the revelation of the specific esterases was executed by immersing the agar-gel plate into the following substrate pH-indicator-solution (OGITA and KASAI, 1964) for 30 minutes at room temperature.

Components of reaction mixture

Substrate	0.2-1 g
Sodium bicarbonate	21 mg (M/400)
1% bromothymol blue in ethanol	2 ml
Distilled water	100 ml

After the acetylcholine substrate (0.2 g per 100 ml) and phenyl acetate (1.0 g per 100 ml) were applied respectively, the agar gel plate was preserved at 37°C under the saturated moisture for about 30-120 minutes, till the esterase activities were revealed as yellow bands in the greenish-blue background by the action of the acid produced.

Using α -naphthyl acetate as substrate, twelve different esterase bands were detected in the liver. Band 12 was inhibited completely by 10^{-3} M eserine sulfate, and was assumed to be a cholinesterase. Band 1 was observable only in the liver of mature quails. This band, denominated L-pattern, appeared faintly in the kidney and the gizzard extracts, too. But the L-pattern in the kidney and the gizzard was not to be seen regularly in all individuals. No sexual difference was observable.

The zymograms developed from the pancreas extracts showed eleven distinct bands active in esterase. Judging from the response to the eserine sulfate, 10 and 11 bands were assorted into cholinesterase. Zymogram patterns of the esterase which splits acetylcholine revealable by the pH-indicator method are shown in Fig. 4. The mobility of these bands is corresponsive with that of bands 10-11 which are to be inhibited by eserine and paraoxon. In the pancreas, band 1 was observable only in the mature quail. This band, denominated P-pattern, was absent in other organs and tissues.

Subsequently, the changes in esterase zymograms during the development were investigated for the liver and pancreas. It was assumed that during the development the synthesis of L-pattern took place in the liver and that of P-pattern, in the pancreas.

Thin layer electrophoretic separations were carried out on the esterase which splits naphthyl acetate in the serum. As shown in Fig. 5 the non-specific esterase in the serum was to be assorted into five types.

By the pH-indicator method marked quantitative difference was shown to be existing between the sexes in the cholinesterase in the serum of the mature quail.

With the use of pH-indicator method, it was possible to resolve the cholinesterase of the serum into two zymograms S-F and S-S. These zymograms were perceived to have been

migrated toward the anode at *pH* 8.6, but they differed from each other with respect to their rates of migration. It was ascertained that the migration rate of S-F zymogram was fast, while that of S-s zymogram was slow.

S-s zymogram was observable in all individuals, while S-F zymogram was to be found in the serum of males (both immature and mature) and in that of immature females, while this was absent in mature females.

Male and female quails were castrated and ovariectomized at the 35th day of age, respectively. In the normal quails, hormone treatments consisting of the muscular injection of 0.2 mg of testosterone (Enarmon) in aqueous solution or of that of 1,000 units of stilboestrol (Euvestin) in oil, were held on for 3 weeks. Injections of hormones in the castrated or ovariectomized individuals were initiated at the 7th day after the castration or ovariectomy, being held on for 3 weeks.

Both quantitatively and qualitatively, the esterase profile of the ovariectomized females was indistinguishable from that of the normal males. The esterase zymogram was normal through all castrated males. The females (both normal and ovariectomized) given testosterone showed a shift toward the male esterase profile.

On the other hand, in case of stilboestrol injection, no S-F pattern in the serum was to be detected from the males (both normal and castrated).

It might reasonably be assumed that the absence of the activity in the normal females was due to the inhibitory effects of stilboestrol. S-F pattern of the cholinesterase zymograms in the serum was controlled by stilboestrol; and it seems that the pattern was manipulated by hormone treatment, castration; or by the combination of the both.