

牛 κ -カゼインの不均一性に関する研究

伊吹文男・田中春代・三好正満・金森正雄

FUMIO IBUKI, HARUYO TANAKA, MASAMITSU MIYOSHI
and MASAO KANAMORI

The studies on the heterogeneity of bovine κ -casein

要旨: 牛 κ -カゼインの不均一性を調べるため、Zittle-Custer法で調製した κ -カゼインを、 β -メルカプトエタノールで還元した後、0.02M イミダゾール・塩酸緩衝液 (pH 7.0), NaCl 濃度勾配 (0.02 M~0.2 M) を用いて、DEAE セルロースクロマトグラフィーをおこない、非吸着画分を含めて6画分を得た。(P-1~P-6)

澱粉ゲル電気泳動 (pH 8.6) において、P-1 は負極へ移動するが、他の5画分は、高い塩濃度で溶出する画分ほど、正極へより多く移動する傾向が見られた。

6画分の化学組成を調べた結果、シアル酸含有量に著しい差異が見られ、P-1 と P-2 には全くシアル酸が含まれず、P-3~P-6 では、高い塩濃度で溶出する画分ほど、シアル酸を多く含んでいた。アミノ酸組成は、どの画分もほぼ同じであった。

6画分のうち、P-1 以外は、 κ -カゼインの特徴である α_S -カゼイン安定化能を有している。

I 緒 論

カゼインはミルクタンパク質の代表的な成分である。Linderström-Lang¹⁾らによりカゼインの不均一性が報告されて以来、カゼインの分画に関する研究が種々おこなわれており、Mellander²⁾が電気泳動実験で移動度の異なる三種の成分に、 α -、 β -、 γ -カゼインと命名し、Waugh と von Hippel³⁾が α -カゼインとミセルコロイドを形成している κ -カゼインの存在を明らかにした。

ミセル構造に関する研究とともに、個々のカゼインの単離方法や化学組成についての研究も進み、近年、 α_S -カゼインと β -カゼインの genetic variants すべての完全なアミノ酸配列⁴⁾⁻⁷⁾が決定され、 γ -カゼインは β -カゼインの一部分を占める画分であることが判明した。⁸⁾

κ -カゼインについても研究がなされているが、その分子量は尿素溶液中では約 28000、アルカリ溶液中では 120000 と報告されており、澱粉ゲル電気泳動で示す帯状の広がりなど、 κ -カゼインの不均一性に起因する問題点が多い。

本報では、Zittle-Custer 法⁹⁾で調製した κ -カゼインのクロマトグラフィーによる分画をおこない、得られた画分の性質を検討して、 κ -カゼインの不均一性に関する研究をおこなった。

II 試料と実験方法

1 カゼインの調製法

1) 酸カゼインの調製法

原乳を遠心分離 (5000g 10分) により脱脂後、水で2倍に希釈し 2 N HCl を加えて pH 4.5 に調整し酸カゼインを沈殿させる。これを遠心分離 (5000g, 15分) で集め水に分散、2 N NaOH で pH 7.5 に調整して溶解し不溶物は濾別する。再び 2 N HCl で沈殿させ遠心分離で集めた酸カゼインをエタノール・エチルエーテル (1:1) で洗浄し脱水、脱脂後乾燥する。

2) α_S カゼインの調製法

酸カゼインを 6.6 M urea に溶解し水を加えて 4.6 M urea に希釈する。沈殿した α_S -カゼインを遠心分離 (6500g 0°C 15分) で集め再び 6.6 M urea に溶解する。この溶液に NaCl を 21.2 g/l の割合で加え、水で 3.3 M urea に希釈した後、3 N HCl で pH 4.8

に調整し、遠心分離により沈殿した α_S -カゼインを得る。エタノール・エチルエーテルで洗浄後、1N NaOHを用いてpH 7.2で水に溶解し、透析する。透析内液に等量のエタノールと、1M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -75%エタノール溶液を6% (V/V) 加え、生じた沈殿は除去する。濾液を3N HClでpH 5.0に調整して α_S -カゼインを沈殿させ、濾過して集め、アルカリを用いてpH 7.5で水に溶解する。透析後、凍結乾燥する。

3) κ -カゼインの調製法

酸カゼインを6.6M ureaに溶解し、2倍容量の水と、7N H_2SO_4 を加えてpH 1.5に調整し、2時間放置する。生じた沈殿を遠心分離(2500g 15分)で除き、上澄液に硫酸を132g/lの割合で加え、 κ -カゼインを沈殿させる。遠心分離で集めた沈殿をアルカリを用いてpH 7.5で水に溶解し透析をおこなう。透析内液に2倍容量のエタノールを加え、1M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ を滴下し κ -カゼインを沈殿させる。この沈殿の、水に溶解、透析、エタノールと酢酸による沈殿の操作を3回くり返して精製し、最後に十分透析して凍結乾燥をおこなう。

2 澱粉ゲル電気泳動¹⁰⁾

泳動ゲルは、加水分解バレイショデンプンと、0.076M tris-citrate buffer (pH 8.6)で、7M ureaを含むように作製する。泳動電極液は0.3M borate-NaOH buffer (pH 8.6)である。試料は、7M ureaを含む0.076M tris-citrate bufferに1%濃度で溶解する。180Vで12時間泳動した後、アミドブラック10Bの水溶液で20分間染色し、メタノール、水、酢酸(5:5:1)の混液で脱色する。

3 還元 κ -カゼインのDEAEセルロースクロマトグラフィー

凍結乾燥した κ -カゼイン500mgを0.02M imidazol-HCl buffer (pH 7.0) 20mlに溶解し、0.06mlの β -mercaptoethanolを加え、 N_2 ガス置換して2時間放置、還元する。DEAEセルロースカラム(3cm×20cm)は、予め、bufferで平衡化しておき、更に、3ml/lの割合で還元剤を含んだbuffer約300mlで平衡化する。還元された κ -カゼインのアルキル化はおこなわず、そのままカラムに吸着させ、溶出液も還元剤を添加しておく。

試料を吸着したカラムに200mlのbufferを流して、非吸着画分を溶出した後、NaClの、0.02Mから0.2Mまで直線的濃度勾配(1600ml)を用いて溶出する。流速は80ml/h、10mlずつ分画し、紫外部吸収を測定する。

溶出された画分は、それぞれ透析し、凍結乾燥する。

4 アミノ酸分析

κ -カゼインおよび6コ画分を、常法により、6N HClで110°C 24時間加水分解をおこない、アミノ酸自動分析機(日立KLA-5)を用いて分析した。

5 シアル酸の定量法

κ -カゼインと6コ画分は、それぞれ0.1N H_2SO_4 中で、80°Cで1時間加水分解し、シアル酸を遊離させた後、アルカリでpH 7に調整しておく。

試料溶液0.5mlに25mM periodate-0.125N H_2SO_4 を0.25ml加え、37°Cに30分間保つ。次に、4gのsodium arseniteを200mlの0.5N HClに溶かした液を0.2ml加え、黄色の液が退色するのを待ち、0.1M 2-thiobarbituric acid 2mlを加える。100°Cで7.5分間加熱後冷却し、HCl:ブタノール(1:19)混液を5ml加えてよく振とうする。遠心分離(2000rpm 10分)により赤色のブタノール層を取り、O. D. 549nmで比色定量する。

6 Ca^{++} に対する α_S -カゼイン安定化能の測定法¹¹⁾

α_S -カゼインは、 Ca^{++} の存在下で不溶性となるが、 κ -カゼインと共存すれば、複合体を形成し、 Ca^{++} に対して安定である。

α_S -カゼインと κ -カゼインの0.1M tris-HCl buffer (pH 6.7)溶液をそれぞれ作り、一定の割合で混合し、30°Cで15分間保って複合体を形成させる。これに、最終濃度0.02Mになるように、 CaCl_2 の0.1M tris-HCl buffer溶液を加え、遠心分離(3000rpm 10分)により沈殿を除く。上澄液のO. D. 280nmを測定し、溶液中に残っている α_S -カゼインの量を調べることにより、 κ -カゼインの Ca^{++} に対する α_S -カゼイン安定化能とする。

III 実験結果と考察

1 還元 κ -カゼインのDEAEセルロースクロマトグラフィー

β -mercaptoethanolで還元すると、Fig. 1に示す通り6コのピークが得られた。即ち、カラムに吸着されない画分を、Fraction P-1とし、NaClの濃度勾配で溶出した画分をそれぞれFraction P-2, Fraction P-3, Fraction P-4, Fraction P-5, Fraction P-6とするもので、このパターンは再現性を有していた。

分画に用いた κ -カゼインと、回収したP-1~P-6を試料として、澱粉ゲル電気泳動をおこない、Fig. 2の結果を得た。非吸着画分は、pH 8.6の条件で、負極へ移動しているが、 κ -カゼインに見られる数本の

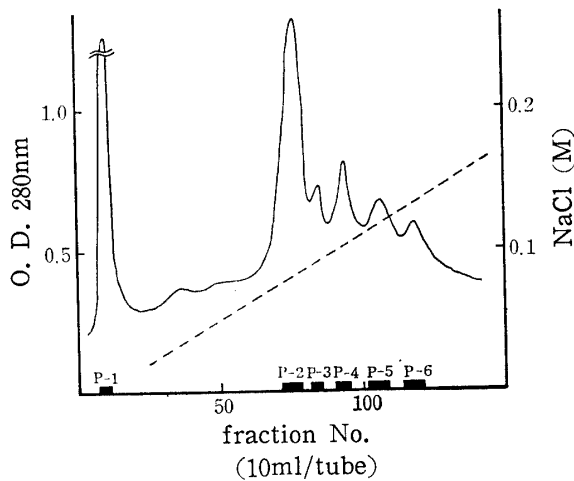


Fig. 1. DEAE cellulose column chromatography of reduced κ -casein (3 × 20cm)

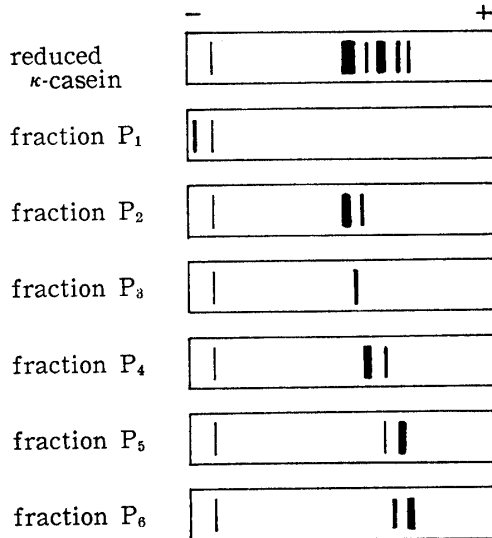


Fig. 2. Starch gel electrophoresis of each fraction

バンドが、クロマトグラフィーで P-2 ~ P-6 に分画され、高い塩濃度で溶出する画分ほど、正極への移動度が大きいという傾向を示している。しかし、各画分に、互いの混入が認められるので、精製の目的で、各試料を100mg ずつ Fig. 1 と同じ条件で還元し、再クロマトグラフィーをおこなった。尚、P-3 は、回収試料が少なく、再クロマトグラフィーはできず、不純のまま以下の実験試料とした。

非吸着画分 P-1 は、再クロマトグラフィーでも、カラムに吸着されずに流出していた。

P-2, P-4, P-5, P-6 の再クロマトグラフィーの結果は、Fig. 3 ~ Fig. 6 に示す通りで、それぞれ 0.08M, 0.1M, 0.12M, 0.13M の NaCl 濃度の位置に溶出し、再現性を有していた。ただ、1つ注目すべき現象の生じたのが、Fig. 6 で、P-6 の再クロマト

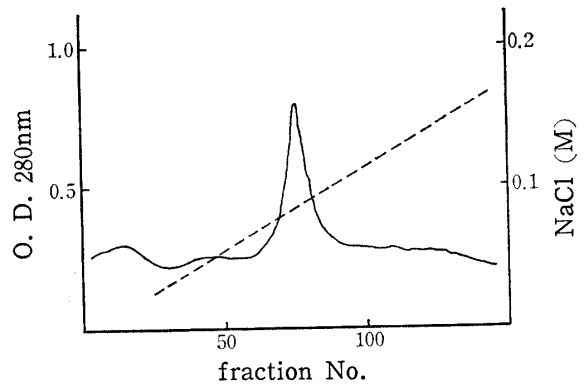


Fig. 3. Rechromatography of fraction P-2

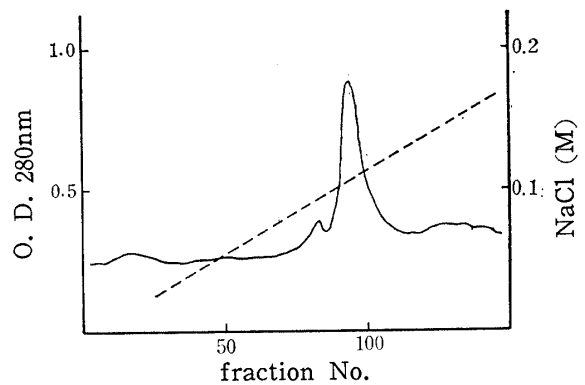


Fig. 4. Rechromatography of fraction P-4

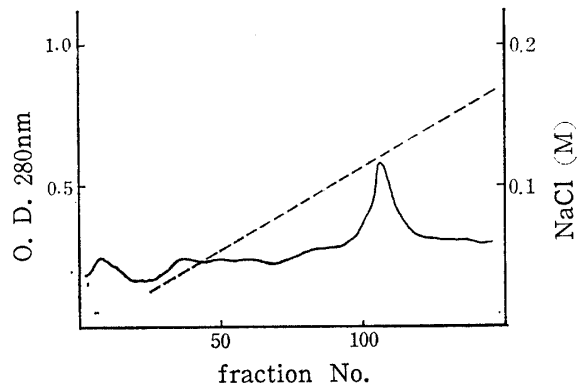


Fig. 5. Rechromatography of fraction P-5

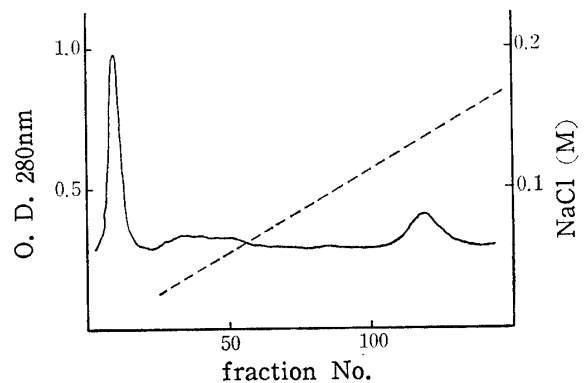


Fig. 6. Rechromatography of fraction P-6

Table 1. Amino acid composition and sialic acid content

	κ -casein	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6
Lys	10	9	9	9	9	8	9
His	3	2	3	3	3	3	3
Arg	5	6	5	6	4	5	4
Asp	13	12	13	13	12	12	13
Thr	13	7	16	15	15	14	19
Ser	11	9	13	12	13	12	14
Glu	31	26	31	29	29	28	30
Pro	22	19	22	21	21	20	22
Gly	3	2	2	3	3	3	3
Ala	14	13	16	15	15	14	15
Cys/2	2	2	2	2	2	2	2
Val	10	7	14	11	11	11	12
Met	2	2	2	2	2	2	2
Ile	11	11	13	10	12	11	12
Leu	9	9	9	8	8	8	9
Tyr	9	12	9	9	8	8	2
Phe	4	5	4	4	4	4	4
M. W.	22390	20330	23550	22410	21980	21330	22808
S. A. (%)	1.25	—	—	0.35	1.16	2.80	3.45

グラフィーの際にのみ、P-1 と類似の非吸着画分が出現し、後で述べるP-1 と同様、シアル酸を含んでいなかった。この非吸着画分が、本来別の画分でありながら、P-6 と複合体を形成して挙動を共にしていたものか、或いは再クロマトグラフィーでの処理により、切断されて遊離してきたものか、本実験では解明に到っていない。

次に、再クロマトグラフィー後、回収した各画分の澱粉ゲル電気泳動をおこなうと、それぞれ単一のバンドが得られたので、精製できたものとして以下の実験の試料とした。

2 各画分のアミノ酸組成とシアル酸含有量

24時間、6N HCl での加水分解後、アミノ酸分析の結果と、TBA 法によるシアル酸定量の結果が Table 1 に示してある。P-1 の Thr, Ser, Val, が、他の画分に比べて少ないが全体的にみて、アミノ酸組成が、クロマトグラフィーでのパターンに関与するとは思われない。尚、このアミノ酸組成から算出した最小分子量は21000~24000であった。

次に、各画分のシアル酸を定量してみると、P-1 と P-2 には全く含まれていないが、P-3~P-6へと順に含有量が増加して、溶出塩濃度と比例関係がみられる。このことは、電気泳動パターンとも一致し、明らかに、 κ -カゼイン画分の要因がシアル酸含有量にあ

ったといえる。

3 各画分の α_S カゼイン安定化能

各画分の κ -カゼインとしての特性を、 α_S カゼイン安定化能によって検討した。まず、 α_S カゼインと κ -カゼインの割合についてみると、Fig. 7 の関係を得、以下の実験には $\kappa/\alpha_S=1/10$ (重量比) を用いた。

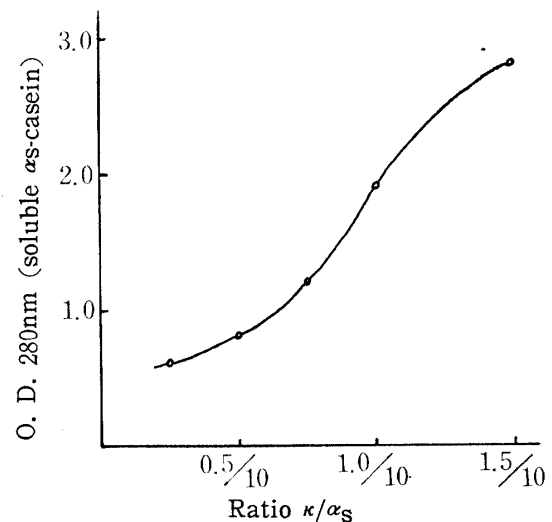


Fig. 7. Stabilizing curve on each weight ratio of κ/α_S

P-2~P-6 は、Ca⁺⁺ を加えてもかなりの α_S -カゼインを溶液中に存在させており、安定化能を有すると

判定した。

しかし、非吸着画分 P-1 は、全く安定化能を有さず、 α s-カゼインは、Ca²⁺の作用でほとんど沈殿してしまった。

最後に、P-2~P-6 について、シアル酸の有無が、 α s カゼイン安定化能に影響を及ぼすかどうかについて調べてみた。即ち、シアル酸定量法の項で述べたように、0.1N H₂SO₄ 中でシアル酸を遊離させた後、中和した溶液を、 α s-カゼイン安定化能測定に用いた。 κ -カゼインを試料として、0.1N H₂SO₄ 中での加水分解時間を変えて、 α s-カゼイン安定化能との関係を求めると Fig. 8 の通りであった。この結果、2時間加熱した後、シアル酸がほとんど遊離しても、まだ α s-カゼイン安定化能を有しており、その減少は、酸と共に加熱している間に、 κ -カゼインに変性が生じた為であって、シアル酸の除去の影響はないと考えられる。

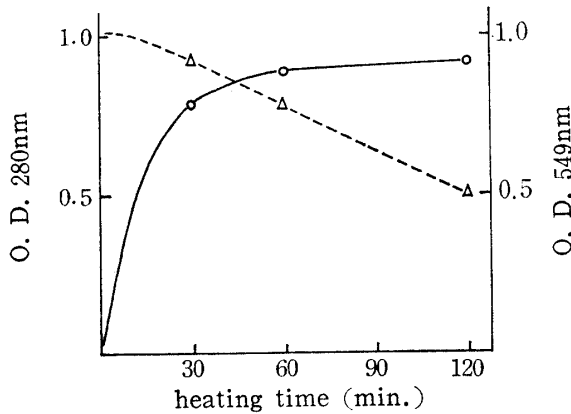


Fig. 8. The effect of desialo- κ -casein on stabilizing of α s-casein

○—○ the amounts of S. A. released
 △----△ α s-casein remaining in solution

各画分を、0.1N H₂SO₄ 中で1時間加熱する前と後とでの α s カゼイン安定化能の比較でも、Fig. 9 に示す通り、シアル酸を遊離させても α s-カゼインは、各画分によって安定化されており、先の κ -カゼインと同様の結果であった。

以上、K-カゼインを還元して、DEAE セルロースクロマトグラフィーをおこなうと、6コの画分を得たが、このうちP-1は、クロマトグラフィーでの挙動、澱粉ゲル電気泳動パターン、シアル酸含有量および α s-カゼイン安定化能のいずれを取っても、他の画分とは異質の成分と考えられる。 κ -カゼイン調製の際にみられるパラ κ -カゼイン様成分についての報告もなされているが、現段階では、その出現機構は明らかに

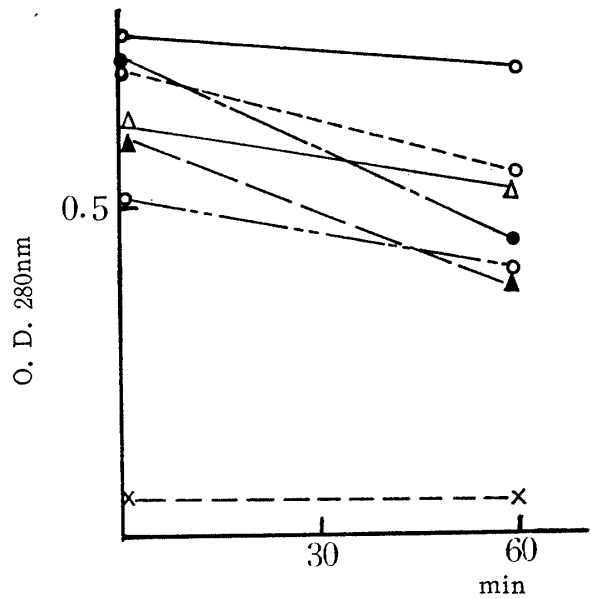


Fig. 9. The effect of desialo- κ -casein of each fraction on stabilizing of α s-casein

はされていない。ただ、P-1画分は、 κ -カゼインの特徴の一つである Cys を含有しており、 κ -カゼインの画分であることは確かである。

κ -カゼインについては、調製法をはじめ、不均一性を解明すべき種々の問題が残されており、ミセル構造での役割とともに、今後の研究成果が期待される分野である。

引用文献

- 1) Linderstrom-Lang, K.: C. R. Trav. Lab. Carlsberg. **17**, (1925)
- 2) Mellander, O.: Biochem. Z **300**, 240 (1939)
- 3) von Hippel, P. H. and Waugh, D. F.: J. Amer. Chem. Soc. **77**, 4311 (1955)
- 4) Grosclaude, F., Mercier, J. C. and Ribadeau Dumas, B.: Eur. J. Biochem. **14**, 98 (1970)
- 5) —•—•—•— Eur. J. Biochem. **16**, 439 (1970)
- 6) —•—•—•— Eur. J. Biochem. **23**, 41 (1971)
- 7) Ribadeau Dumas, B., Brignon, G., Grosclaude, F. and Mercier, J. C.: Eur. J. Biochem. **20** 264 (1971)
- 8) Mercier, J. C., Grosclaude, F. and Ribadeu

- Dumas, B. : *Milchwissenschaft* **27** 7 (1972)
- 9) Zittle, C. A., and Custer, J. H. : *J. Dairy Sci.* **46**, 1183 (1963)
- 10) Smithies, O. : *Adv. in. Protein Chem.* **14**, 65 (1959)
- 11) 中西武雄, 伊藤敏敏 : *農化* **44**, 118 (1970).

Summary

The heterogeneity of bovine κ -casein was studied. κ -Casein was prepared from fresh bovine milk by the method of Zittle and Custer. After the reduction of κ -casein with β -mercaptoethanol, it was fractionated by chromatography on a column of DEAE cellulose with linear gradient system of sodium chloride (0.02 M to 0.2 M) in imidazole-HCl buffer, pH 7.0. Six fractions (P-1 to P-6) were obtained including a non absorbed fraction to the column.

In the starch gel electrophoresis, the fractions migrated to anode except the fraction P-1 which was mobile to the cathode. The sequence

of mobilities in electrophoresis coincides exactly with the sequence of the elution on DEAE cellulose chromatography in the gradient system.

The amino acid compositions of these fractions are almost the same except the fraction P-1 but the sialic acid contents are different greatly. All these fractions (P-2 to P-6) had the ability of stabilizing α s-casein and the removal of sialic acid is of no effect on that stabilizing effect. It is concluded that the heterogeneity of κ -casein is attributed to the difference of the sialic acid contents.