

κ -カゼインを DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー によって分離した各画分の性質

牧 善 輔・堀 内 晶 子

The Properties of κ -Casein Fractions
Obtained by DEAE-Cellulose Column Chromatography

ZENSUKE MAKI and AKIKO HORIUCHI

還元した κ -カゼインを DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにより分画し、再クロマトにより精製したが、最後に溶出してくる区分はこれを再クロマトするとその一部は吸着されずに溶出し、パラ κ -カゼイン様の挙動を示した。その他の区分はポリアクリルアミド電気泳動による易動度、糖成分は異ったが、SDS 電気泳動における易動度、アミノ酸組成には大きな差は認められなかった。

結 言

ゾーン電気泳動において、 κ -カゼインが明瞭なバンドを示さないことはよく知られており、最近の κ -カゼインの不均一性に関する研究によってその詳細が明らかにされつつあるが、 κ -カゼインを還元すると、いくつかの成分に分れるので、DEAE セルロースクロマトグラフィーや焦点電気泳動によって還元成分の分離がなされている。¹⁾²⁾³⁾そこで、われわれは、DEAE セルロースクロマトグラフィーにより還元 κ -カゼインを分画し、再クロマトした各区分について、そのアミノ酸および糖の組成を比較し、アクリルアミド電気泳動、SDS 電気泳動により、分子電荷と分子の大きさについて検討し、更に κ -カゼインの α_s -カゼインに対する安定化能とシアル酸との関連について調べたので報告する。

実 験 方 法

1. κ -カゼインと α_s -カゼインの調製

本学農場の同一の乳牛より得た未処理牛乳より Zittle⁴⁾⁵⁾の方法に従って調製した。

2. DEAE セルロースクロマトグラフィー

Pujolle ら³⁾の方法に準じて κ -カゼイン 1.5g を 3.3 M の尿素を含む 0.02 M イミダゾール塩酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かし、2%メルカプトエタノールを 0.3%加えて密栓し、3時間、5°Cにおいて、 κ -カゼインを還元した。次に同じく 0.3%のメルカプトエタノールを含

むイミダゾール塩酸緩衝液 (3.3 M 尿素を含む) で平衡化した DEAE セルロースカラム (2.2×20) に還元した κ -カゼインを吸着させ、同じ緩衝液 300 ml で洗浄した後、0.02 M~0.25 M の NaCl 勾配 (1400 ml) によって溶出し、最後に 0.2 N の NaOH を用いて残っている成分を溶出し、フラクションコレクターで、10 ml 宛分取した。分画した成分は、透析、凍結乾燥して再クロマトを行った。

3. ポリアクリルアミド電気泳動

8 M 尿素を含む 0.076 M トリスクエン酸緩衝液 (pH 8.6) を用いてゲルを作り、ブリッジ液には、0.3 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.6) を、電解液として、0.1 M NaCl 溶液を用いた。

4. SDS ポリアクリルアミド電気泳動

Weber の方法⁶⁾に準じて 10% のゲルを作り、試料は蒸留水に溶かし、50%グリセロール-2% SDS-0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) と混合し、2%メルカプトエタノールを 0.3%加えて、50°Cに 2時間放置した後、ゲルの上面に重層して、8 mA/tube の定電流で 5時間低温室において泳動させた。

5. 化学分析

ヘキソースの定量は、フェノール硫酸法により行い、標準曲線としてガラクトースを用いた。シアル酸は、Aminoff のチオバルビツール酸法、ヘキソサミンは、Blix の法により、標準曲線として、ガラクトサミンを用いた。

6. アミノ酸分析

6 N 塩酸を加えて 110°C で 24 時間分解したのち、KLA-5 型日立アミノ酸自動分析機を用いて分析した。

7. κ -カゼインによる α_s -カゼインの安定化

α_s -カゼイン、 κ -カゼイン、および Ca によるミセルの形成は混合の仕方によってもかなり支配されるので、Zittle の方法⁷⁾ および千葉らの方法⁸⁾ に準じ、 α_s -カゼイン (最終濃度 2.4 mg/ml) と、それに対し、0.02~0.20 倍量の κ -カゼインを 0.07 M KCl を含む 0.01 M イミダゾール緩衝液 (pH 7.1) 中で、37°C に 20 分間保った後、0.1 M CaCl₂ 2 ml を混合しながら急速に加え、更に 37°C に 60 分間放置して、硬質ろ紙を用いてろ過、ろ液 2 ml を 0.05 N NaOH 10 ml で希釈した後、280 m μ で吸光度を測定した。

8. シアル酸の除去

κ -カゼイン 200 mg を 40 ml の水に溶解し、pH 5.7 に調節して、Neuraminidase (from Cl. Perfringens Type V Sigma) 3 mg を加え、50 ml にして、48 時間、37°C に保った後、pH 7.5 にして透析し、凍結乾燥した。

結果および考察

1. DEAE セルロースクロマトグラフィー

還元した κ -カゼインのクロマトグラムを図 1 に示す。得られた溶出パターンには、4 つのピークが認められたので、これを 4 区分に分けて集め、最初に溶出される区分即ちカラムに吸着されなかった区分以外の 3 区分の再クロマトグラフィーを行なった結果、図 2, 3, 4 に示すように、それぞれが更に 2 つのピークにわかれたので、それぞれの区分を集め透析、凍結乾燥して、これらを、2a, 2b, 3a, 3b とし区分 4 は、一部は吸着されないで、区分 1 と同様に溶出されるので、これを、1a、一部は、最後に NaOH により溶出されるので、これを 4a とした。

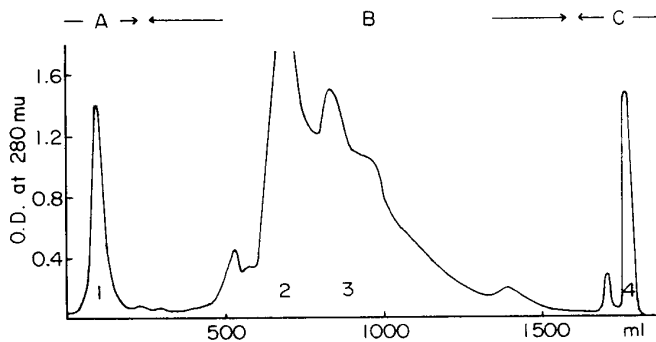


Fig. 1. DEAE cellulose column chromatography of κ -casein. Column was washed with imidazol-HCl buffer (A), eluted by NaCl gradiently (B) and 0.2 N NaOH (C).

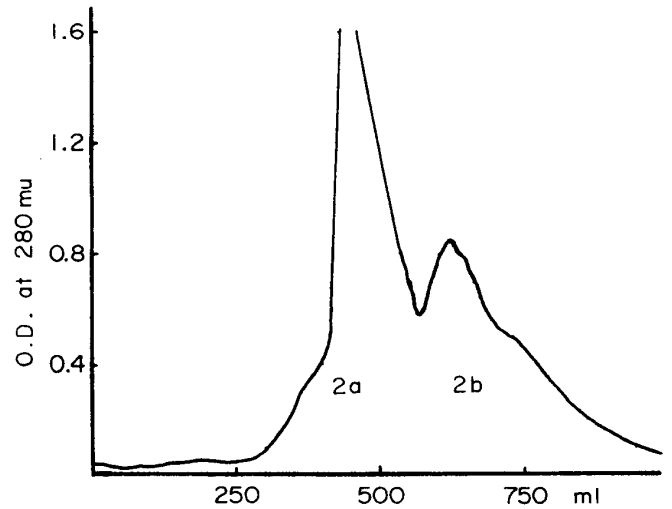


Fig. 2. DEAE cellulose column chromatography of fraction 2.

Column was washed with imidazol-HCl buffer and eluted by NaCl (0.02 M→0.14 M) gradiently.

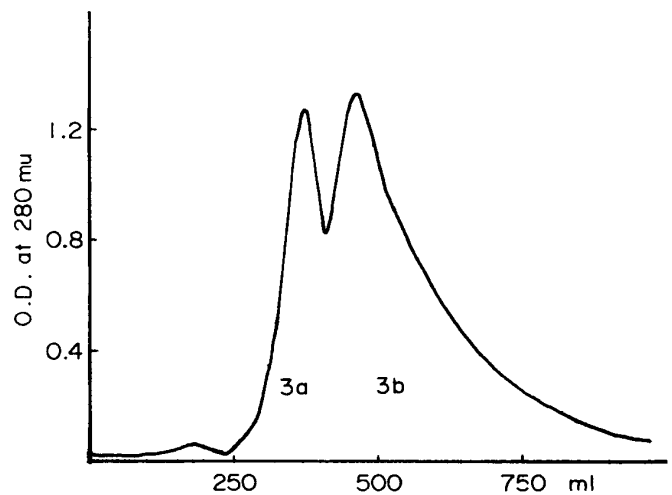


Fig. 3. DEAE cellulose column chromatography of fraction 3.

Column was washed with imidazol-HCl buffer and eluted by NaCl (0.05 M→0.18 M) gradiently.

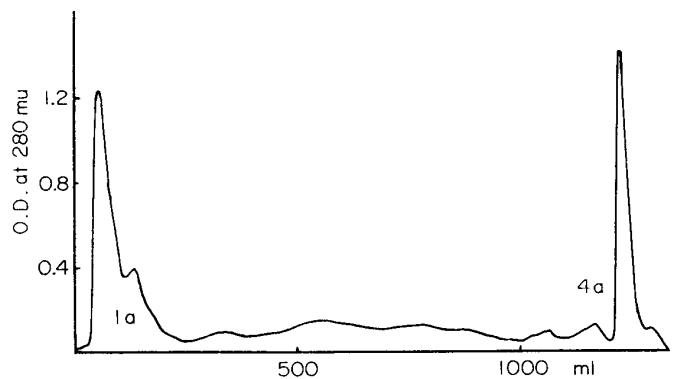


Fig. 4. DEAE cellulose column chromatography of fraction 4.

Column was washed with imidazol-HCl buffer, eluted by NaCl (0.02 M→0.20 M) gradiently and 0.2 N NaOH

2. ポリアクリルアミドおよび SDS 電気泳動

各区分について行ったポリアクリルアミド電気泳動図を図5に示す。各成分とも完全に単一な成分には分離されていないが、2aの区分が最も易動度が小で、ついで2b, 3a, 3bの順になり、1の区分は先に報告したりパラκ-カゼイン様成分であって陰極側に移動した。SDS ポリアクリルアミド電気泳動では、2a, 2b, 3a, 3b, 4の区分は少量の分子量の大きい(易動度の小さい)成分が混在しているが、その主成分はいずれも易動度が同じであって、之等の分子量は略等しいものと考えられるが、区分1は分子量が小さくしかも巾の広い泳動図が得られた。

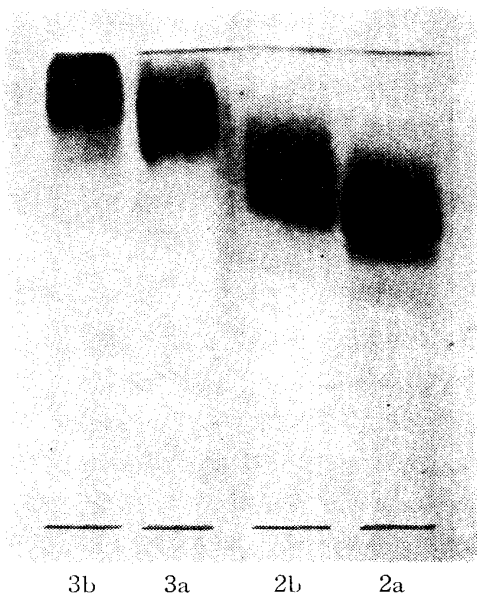


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of κ-caseins fractionated by DEAE cellulose column chromatography

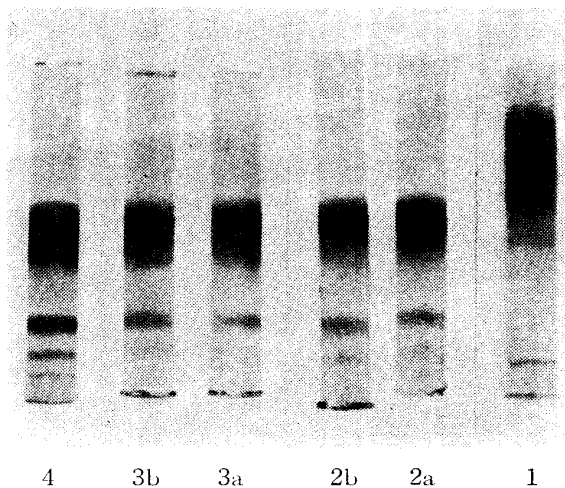


Fig. 6. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of κ-caseins fractionated by DEAE cellulose column chromatography

Table 1. Carbohydrate and Sialic acid content of κ-Casein fractions (%)

fraction	Hexose	Hexosamine	Sialic acid
1	0.40	0.28	0.46
1a	0.23	0.14	0.26
2	0.69	0.39	0.68
2a	0.54	0.24	0.28
2b	0.91	0.83	1.69
3	1.54	1.30	2.99
3a	1.25	1.18	2.35
3b	2.10	1.82	4.23
4	0.76	0.73	2.44
4a	1.10	0.91	2.77

3. 化学分析

還元したκ-カゼインを DEAE セルロースにより分析した各区分中のヘキソース, ヘキソサミン, シアル酸の量を表1に示した。

シアル酸, ヘキソサミン, ヘキソースともに, 3bが最も多く, ついで, 3a, 2b, 2aの順に少なくなり, 区分1では, ほぼ2aと等量である。区分4では, 3b, 3a, 2bよりもむしろ少い。然しながらこの区分を再クロマトすると, 吸着されない成分(1a)と強く吸着されて, 0.2N NaOHによりはじめて溶出する成分(4a)にわかれることは, 先に述べたが, この4aの区分は, 4の区分よりもシアル酸, ヘキソサミン, ヘキソースともに多くなり, このことは区分4を透析, 凍結乾燥して, 再クロマトする際に何らかの変化を分けて分子量の小さい, シアル酸等の少い部分が分離して区分1aとなったためであると考えられる。

4. アミノ酸分析

各区分のアミノ酸組成を表2に示す。

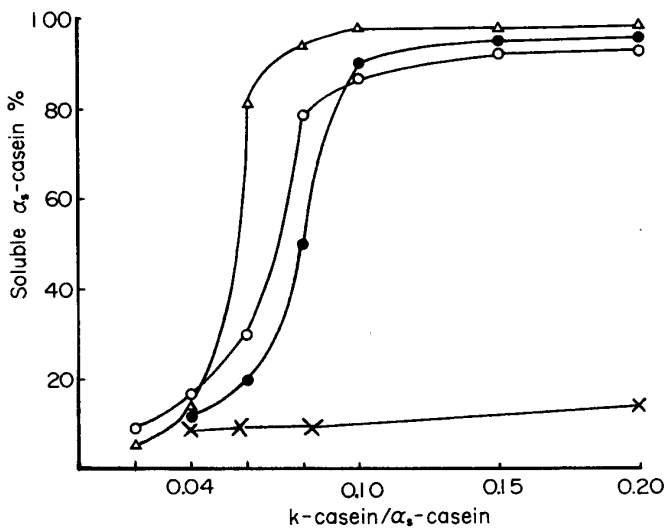
2a, 2b, 3a, 3bの間には殆んど差はみられなかったが, 区分1のパラκ-カゼインでは, Thr, Ileu. が特に少く, Leu, Tyr, Phe. が他の区分に比し多い。区分4では, Gly. が比較的多く, Thr. が少ない様であるがあまり大きな差はない。

5. κ-カゼインによる α_s-カゼインの安定化

κ-カゼインは, α_s-カゼインとミセル複合体を形成して, カルシウムの存在下においても, α_s-カゼインが沈澱し難いようにする作用を持っていることはよく知られている。図7に示すように2の区分は, 還元しない全κ-カゼインに比しむしろ安定化力は大である。3の区分についても実験したが2の区分と同じであった。このことは, 還元した成分は, 全κ-カゼインに比し, S-S結合が切れた為分子が小さくなり, 同量のκ-

Table 2. Amino acid content of κ -casein fractions (m mole per g)

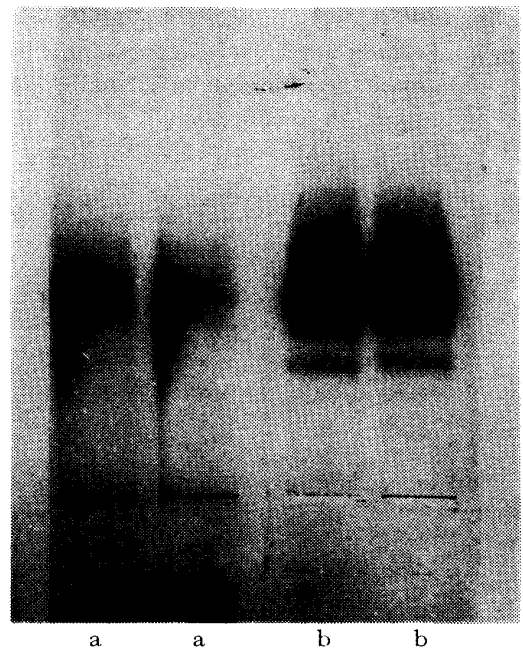
amino acid	1	2	2a	2b	3	3a	3b	4
Lysine	0.40	0.33	0.21	0.34	0.40	0.38	0.36	0.38
Histidine	0.12	0.11	0.10	0.12	0.13	0.12	0.14	0.13
Arginine	0.27	0.19	0.18	0.20	0.23	0.24	0.21	0.20
Aspartic acid	0.51	0.48	0.50	0.47	0.52	0.50	0.47	0.51
Threonine	0.26	0.60	0.57	0.63	0.64	0.58	0.62	0.53
Serine	0.42	0.45	0.50	0.33	0.55	0.51	0.51	0.52
Glutamic acid	1.07	1.17	1.23	1.06	1.32	1.33	1.20	1.19
Proline	0.87	0.99	0.94	0.77	0.85	0.79	0.81	0.98
Glycine	0.13	0.09	0.13	0.11	0.11	0.10	0.11	0.15
Alanine	0.60	0.65	0.65	0.66	0.70	0.64	0.62	0.62
Cystine	0.09	0.07	0.08	0.08	0.11	0.08	0.07	0.06
Valine	0.37	0.48	0.46	0.32	0.52	0.50	0.50	0.50
Methionine	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.09
Isoleucine	0.47	0.56	0.53	0.55	0.57	0.55	0.55	0.55
Leucine	0.48	0.34	0.33	0.35	0.38	0.35	0.34	0.40
Tyrosine	0.60	0.38	0.44	0.35	0.39	0.34	0.31	0.38
Phenylalanine	0.22	0.18	0.17	0.15	0.18	0.17	0.16	0.18

**Fig. 7.** Solubilization of α_s -casein in the presence of 0.02 M CaCl_2 by κ -casein and its components.

○... κ -casein (pH 7.1) ●... κ -casein (pH 8.0)
 △...component 2 ×...sialic acid-free
 κ -casein (pH 8.0)

カゼインを用いると、むしろ強い安定化作用を示すものと思われる。区分1は、pH 8.0 にしても完全に溶けないので、測定出来なかった。シアル酸含量の少ない2および3の区分に強い安定化作用のあることにより、ペプチド鎖の末端にあると考えられるシアル酸は、 α_s -カゼインの安定化には必ずしも必要と思えないので、Neuraminidaseにより κ -カゼインのシアル酸を除き、同様に試験したが、安定化作用は、全くな

かった。この場合 pH 7.1 のイミダゾール緩衝液に完全に溶けないので、pH 8.0 にして実験した。比較のため、 κ -カゼインについても pH 8.0 で行ったが、pH 7.1 の場合と殆んど差はなかった。ついで、Neuraminidaseにより、シアル酸を除いたものおよびもとの κ -カゼインをメルカプトエタノールで還元して、ポリアクリルアミドゲル、SDS ポリアクリルアミドゲルに

**Fig. 8.** polyacrylamide gel electrophoresis of reduced κ -caseins.
 a...Sialic acid-free κ -casein
 b... κ -casein

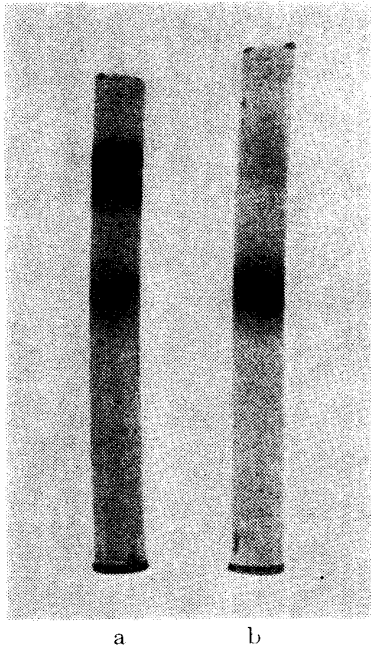


Fig. 9. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of reduced κ -caseins
a...Sialic acid-free κ -casein
b... κ -casein

より電気泳動を行ったが、図8に示したように同濃度の試料を用いてもシアル酸除去κ-カゼインは全体に薄くなり、特に易動度の大きい成分が少なくなっていた。SDS 電気泳動図では、図9にみられるように、あらたに分子の小さい成分が生じていた。各種の糖蛋白質におけるシアル酸の存在意義については未だ不明なことが多いが、κ-カゼインの α_s -カゼイン安定化作用には、シアル酸が必要なのか、Neuraminidaseにより、シアル酸を除去する際に構造的変化が生じた為に安定化作用が失われたのかについては、充分解明出来なかった。

要 約

還元したκ-カゼインを DEAE セルロースクロマト

グラフィーにより分割して、パラκ-カゼイン様物質を含めて、6つの区分に分けることが出来たが、最後に0.2N NaOHで溶出してくる区分は、これを再クロマトすると、2つの成分にわかれ、1つはパラκ-カゼイン様物質と同様にカラムに吸着されなくなった。尚これらの成分の化学組成、アミノ酸を定量したところ、最初および最後に溶出される区分を除き、ヘキソースヘキソサミン、シアル酸は、ともに早く溶出する区分程少なく、ポリアクリルアミド電気泳動による易動度も小さい。然しながら、SDS 電気泳動では、同一の動きを示し、アミノ酸組成も略々等しい。

α_s -カゼイン安定化作用もシアル酸等の糖成分の量にかかわらず認められたが、Neuraminidaseによりシアル酸を除いたκ-カゼインには安定化作用がなかった。然しながら電気泳動の結果よりみて、このことは、Neuraminidase を作用させることにより、κ-カゼインの構造に変化が、生じた為ではないかと考えられる。

(1973年7月30日受理)

文 献

- 1) 金森正雄, 三好正満, 伊吹文男, 牧 善輔: 栄養と食糧, 24, 96 (1971)
- 2) Kanamori M., Miyoshi M., Ibuki F., Maki Z.: Agr. Biol. Chem., 35, 1267 (1971).
- 3) Pujolle J., Ribadeal B., Garnier J., Pion R.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 25, 285 (1966).
- 4) Zittle C. A.: J. Dairy Sci., 42 1897 (1959).
- 5) Zittle C. A., Custer J. H.: ibid 46, 1183 (1963).
- 6) Weber K., Osborn M.: J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969).
- 7) Zittle C. A.: J. Dairy Sci., 44, 2101 (1961).
- 8) 千葉英雄, 巽 清, 佐々木隆造, 杉本悦郎: 農化, 44, 371 (1970)