

牛 β -ラクトグロブリン, α -ラクトアルブミンの カラムクロマトグラフィー

田代 操・牧 善 輔

The Column Chromatography of Bovine β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin

MISAO TASHIRO and ZENSUKE MAKI

A study has been made of the column chromatography of bovine β -lactoglobulin and α -lactalbumin.

The β -lactoglobulin and α -lactalbumin fractions fractionated by the Method I-a and II-a of Armstrong et al. were purified by gel filtration on Sephadex G-100. Further purification was effected on DEAE-Sephadex A-50 ion-exchange chromatography at pH 6.3. β -Lactoglobulin could be separated into two protein peaks by the DEAE-Sephadex column chromatography. Amino acid analyses and Cellogel electrophoreses indicated that these protein peaks correspond to A and B variants of β -lactoglobulin, respectively. On the other hand, α -lactalbumin exhibited the complex behaviour on the DEAE-Sephadex chromatography. This is believed to be due to the irreversible conformational changes or the self-association which may result in the changes of charge.

緒 言

牛乳蛋白質はカゼインと乳清蛋白質とに大別される。乳清蛋白質はさらに、 β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、血清アルブミン、免疫グロブリン、プロテオース、ペプトン等から成り、その内特に β -ラクトグロブリンと α -ラクトアルブミンは大部分を占める。これら両主成分を乳清から分画する方法は Armstrong¹⁾ らにより報告されており、彼らは硫酸濃度、pH、温度等を適切に選択すれば β -ラクトグロブリンや α -ラクトアルブミンに富む画分を容易に得られるとしている。しかしながらこの方法では、 β -ラクトグロブリンの異型体から遺伝的変異体を分離することは不可能であり、又高純度の α -ラクトアルブミンを調製することも容易ではない。これらの点から、Armstrong²⁾ らは、さらに直接乳清蛋白質をカラムクロマトグラフィーで分画することを試みている。

本報では、Armstrong³⁾ らの分別法で調製した β -ラクトグロブリンと α -ラクトアルブミン画分より、 β -ラクトグロブリンの遺伝的変異体の分離、及び高純度 α -ラクトアルブミンの調製を目的とし、精製にカラムクロマトグラフィーを適用した結果を報告する。

実験材料及び方法

1) 供試料

京都府立大学農場のホルスタイン種の乳牛から搾乳した牛乳(無殺菌、冷蔵庫保存)を試料として用いた。

2) β -ラクトグロブリン及び α -ラクトアルブミン画分の分別法

調製は Armstrong²⁾ らの方法に準じて行なった。全乳に、264 g/l の割合で硫酸を余々に攪拌しながら加え、添加後さらに2時間攪拌した。室温で一晩放置後、生じた沈澱を濾過で取り除き乳清を得た。これを Method I-a と II-a で分別した。

a) Method I-a

乳清を1M塩酸でpH 3.5に調整、一晩室温で放置後濾過し、沈澱と上清とを分離した。沈澱は乳清の1/10量の0.005 Mアンモニア水に溶かされ、1Mアンモニア水でpH 7.0に調整後水に対して透析され、さらに凍結乾燥された。これを α -ラクトアルブミン画分とした。一方、上清は1Mアンモニア水でpH 6.0に調整され、さらに262 g/lの割合で硫酸が加えられた。一晩放置後濾過され、得られた沈澱は0.12 M酢酸緩衝液(pH 5.2)の少量に溶解され緩衝液に対して透析された。透析

内液はそれから濾過され、濾液はさらに水に対して透析され、凍結乾燥された。これを β -ラクトグロブリンとした。

b) Method II-a

乳清に 262 g/l の割合で硫酸を加え、一晚室温で放置後遠心分離 (5000 g, 15分) し沈澱を得た。これを乳清の1/10量の水に溶かし、1M 塩酸で pH 3.5 に調整、一晚放置後遠心分離し沈澱と上清とを分離した。沈澱は乳清の1/10量の 0.005 M アンモニア水に溶解され、1 M アンモニア水で pH 7.0 に調整後水に対して透析され、凍結乾燥された。これを α -ラクトアルブミン画分とした。一方、上清は 1 M アンモニア水で pH 6.0 に調整され、さらに硫酸が 500 g/l の割合で加えられた。一晚放置後遠心分離で沈澱を集め、これを少量の 0.12 M 酢酸緩衝液 (pH 5.2) に溶解し、緩衝液に対して透析した。透析内液はさらに濾過され、濾液が水に対して透析され、凍結乾燥された。これを β -ラクトグロブリンとした。

3) β -ラクトグロブリン及び α -ラクトアルブミンのカラムクロマトグラフィー

a) Sephadex G-100 によるゲル濾過

試料約 500 mg を 10 ml の 0.025 M イミダゾール・0.021 M 塩酸緩衝液 (pH 6.3) に溶解、遠心分離後上清を同じ緩衝液で充分平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.5×90 cm) に添加しゲル濾過を行なった。溶出液には上述のイミダゾール・塩酸緩衝液を用い、流速は 21.2 ml/h, 5 ml ずつ分画し 280 nm での吸収を測定した。

b) DEAE-Sephadex A-50 によるイオン交換クロマトグラフィー

0.05 M イミダゾール・0.043 M 塩酸緩衝液 (pH 6.3) で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム (1.5×30 cm) に、同じ緩衝液に溶解あるいはそれに対して透析された試料を吸着させ緩衝液で充分カラムを洗浄し非吸着画分を溶出した後、食塩の直線的濃度勾配を用いて溶出した。流速は 21.2 ml/h, 3 ml ずつ分画し 280 nm での吸収を測定した。

4) Cellogel 電気泳動

市販の Cellogel (セルロースアセテート膜, ケメロン社製) を 3×6 cm に切断、0.05 M ペロナル緩衝液 (pH 8.6) に浸し平衡化させる。余分の緩衝液を紙で吸い取った後、緩衝液に 0.1% 濃度となるよう溶解した試料をこの Cellogel 表面に塗布する。泳動電極液として同じペロナル緩衝液を用い、200 V の定電圧で 60 分間室温で泳動させた。染色には、メタノール : 水 : 酢酸 (45 : 45 : 10) の混液に 0.5% になる

ようアミドブラックを溶かした液、脱色には、メタノール : 水 : 酢酸 (475 : 475 : 50) の混液を用いた。

5) アミノ酸分析

常法により、試料を 6N 塩酸で 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 K L A5型) を用いて分析した。

実験結果及び考察

1) β -ラクトグロブリン及び α -ラクトアルブミン画分の分別

原乳 8 l から Method I-a では、 β -ラクトグロブリン 5.57 g, α -ラクトアルブミン画分 7.65 g, Method II-a では、 β -ラクトグロブリン 11.1 g, α -ラクトアルブミン画分 5.21 g が得られた。乳清及び最終分別画分の Cellogel 電気泳動図を Fig. 1 に示す。各図中央の太いバンドは α -ラクトアルブミンであり、陽極側の太い二本のバンドは β -ラクトグロブリンである。又、陽極端のバンドは血清アルブミンを示している。この泳動図から明らかに β -ラクトグロブリン及び α -ラクトアルブミン画分共、多くの別種蛋白質を有していることがわかる。しかしながら、Method I-a による β -ラクトグロブリンのみは他は比べ比較的純度が高いと言える。

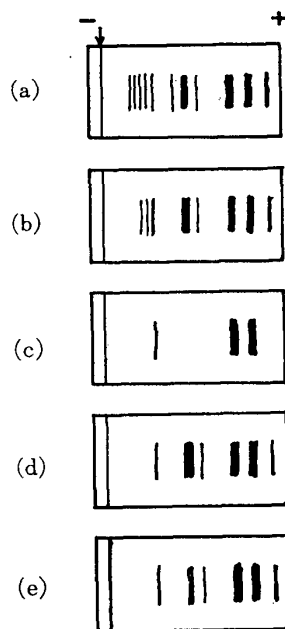


Fig. 1.

Cellogel electrophoretic patterns of bovine whey proteins. (a) whey (b) α -lactalbumin fraction by the Method I-a (c) β -lactoglobulin by the Method I-a (d) α -lactalbumin fraction by the Method II-a (e) β -lactoglobulin by the Method II-a.

2) β -ラクトグロブリン及び α -ラクトアルブミンのカラムクロマトグラフィー

a) Sephadex G-100 によるゲル濾過

Figs. 2~5 に Method I-a 及び II-a により得られた β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン画分の Sephadex G-100 でのゲル濾過パターン及び分画された各蛋白質ピークの Cellogel 電気泳動図を

示す。ゲル濾過により分画された蛋白質ピークはその溶出位置の早いものから順に P-1, P-2, P-3 とされたが, 各々の溶出位置及び電気泳動の結果から P-1 は数種の高分子量蛋白質あるいはそれらと血清アルブミンとの共存物であり, P-2 は明らかに β -ラクトグロブリン (Fig. 3 及び 5 の P-2 では血清アルブミンも存在している), そして P-3 は α -ラクトアルブミンであると結論できる。したがって Armstrong らの Method I-a 及び II-a により分別された β -ラクトグロブリン, α -ラクトアルブミン画分は, この Sephadex ゲル濾過によりほぼ精製されていると言えるが, α -ラクトアルブミン (P-3) ではその泳動図において主バンド前後に副バンドが認められ, 未だ若干の他種蛋白質が存在していると思われる。一方 β -ラクトグロブリン (P-2) ではその泳動図に明瞭な二本の主バンドが示されており, これはこの β -ラクトグロブリンがその遺伝的変異体である A 及び B 型から成る異型体であることを示していると共にこれら変異体が分離せず同時に溶出されてくることをも示している。又 Figs. 2~5 に示された結果から,

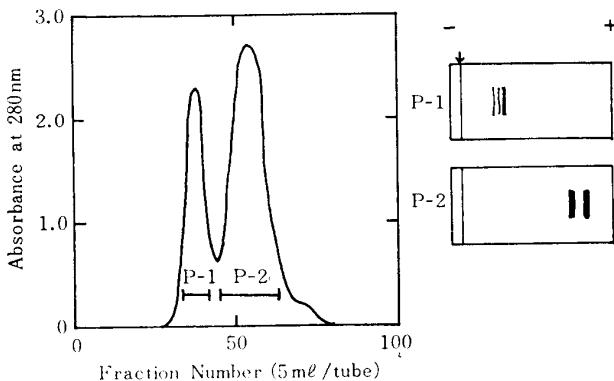


Fig. 2. Sephadex G-100 gel filtration of β -lactoglobulin fractionated by the Method I-a.

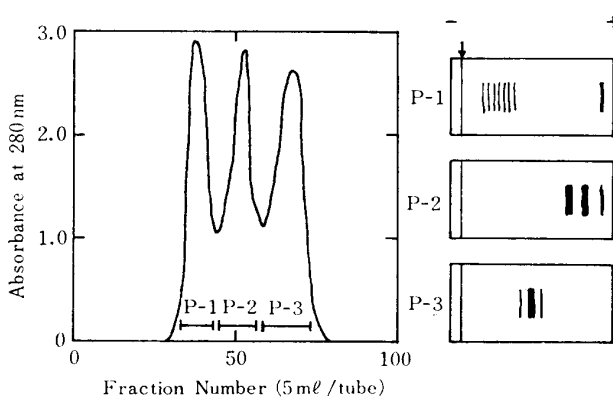


Fig. 3. Sephadex G-100 gel filtration of α -lactalbumin fractionated by the Method I-a.

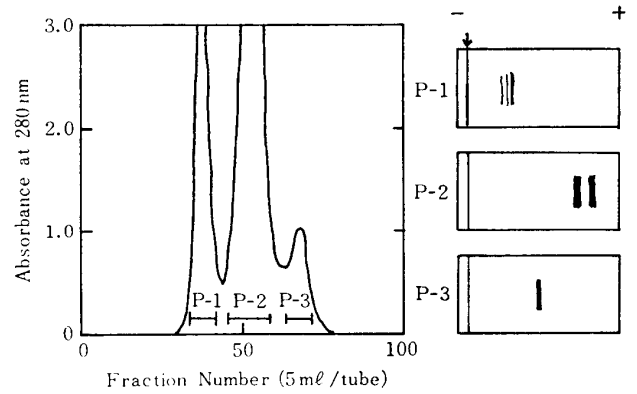


Fig. 4. Sephadex G-100 gel filtration of β -lactoglobulin fractionated by the Method II-a.

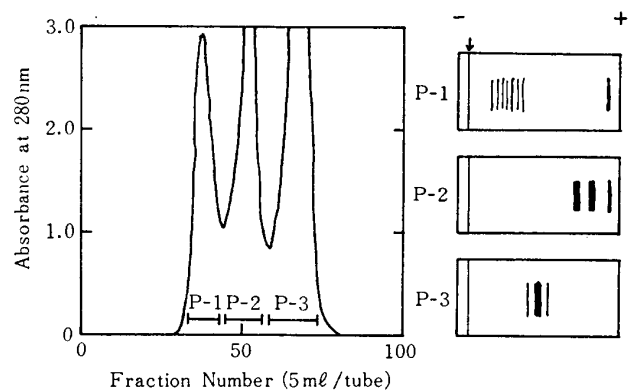


Fig. 5. Sephadex G-100 gel filtration of α -lactalbumin fractionated by the Method II-a.

β -ラクトグロブリン調製においては純度の点で Method II-a より I-a の方が, 一方 α -ラクトアルブミンにおいては Method I-a よりも II-a の方が収量及び純度の点でもやや優れていると言えよう。

b) DEAE-Sephadex A-50 によるイオン交換クロマトグラフィー

Sephadex G-100 により精製された β -ラクトグロブリンの DEAE-Sephadex A-50 によるカラムクロマトグラフィーの結果を Fig. 6 に, その再クロマトグラフィーの結果を Fig. 7 に示す。 β -ラクトグロブリン異型体は, Fig. 6 に示されるように pH 6.3 でのこのイオン交換クロマトグラフィーによりほぼ同じ大きさの二つの蛋白質ピークに分離された。それぞれのピークの泳動パターンは両者が混在他種蛋白質を全く含んでいないことを示しており又, 移動度の違いから P-1 は変異体 B 型 P-2 は A 型に相当すると考えられる。さらにこれら両ピークの収量が等しいことから AB 型は Kiddy⁵⁾ も指摘しているように, A 型と B 型の等量から成り立っていると言える。 P-1, P-2 を再クロマトグラフィーすると Fig. 7 に示されるように明らかに両者は単一の蛋白質ピークとなり, この操作

により完全に分離された。

Sephadex G-100 ゲル濾過により得られた α -ラクトアルブミンの DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーの結果は Fig. 8 に示される。 α -ラクトアルブミンは三つの蛋白質ピークに分離され、それぞれ図に示すように P-1, P-2, P-3 とされた。ゲル濾過により分画された α -ラクトアルブミンの Cellogel 電気泳動図 (Fig. 3 及び 5) は中央の主バンドとその前後の副バンドの存在を示しているが DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィーの結果はその泳動パターンと深い相関があるように思われる。すなわち P-1 は主バンドの陰極側の副バンドに相当し、P-2 は主バンド、そして P-3 は主バンドの陽極側副バンドに相当すると思われる。実際 P-1 の電気泳動は先の仮定を肯定する結果を与えた。従って P-1 は混在する他種蛋白質と考えられる。しかしながら P-2, P-3 の電気泳動の結果は、両者が全く同一の泳動パターンを有するという点で明らかに先の仮定と矛盾している。電気泳動的には P-2 と P-3 は同一の蛋白質であると言える。この点を明らかにするために P-2 を同じ条件で再クロマトグラフィーした。結果を Fig. 9 に示す。期待した単一ピークは得られず、Fig. 8 の P-2, P-3 に相当する A-1, A-2 のピークが得られた。A-1 と A-2 の量比は Fig. 8 の P-2 と P-3 の量比とほぼ同じであり、泳動パターンも又 A-1 と A-2 は同一であった。確認のため再度 A-1 及び A-2 を別々に再クロマトグラフィーすると、A-1 はやはり Fig. 9 と同じ溶出パターンとなった。一方 A-2 は二ピークにはならず元のままであった。以上の結果から、先に述べたように Fig. 8 における P-1 は混在蛋白質であると結論できるが P-2, P-3 は α -ラクトアルブミンそのものであるといえる。そして A-1 が一定比で不可逆的に

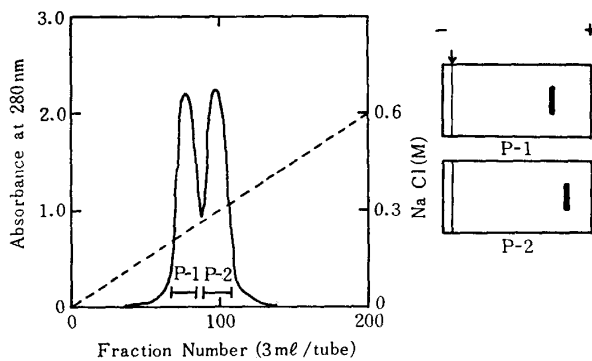


Fig. 6. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of β -lactoglobulin purified by Sephadex G-100 gel filtration.

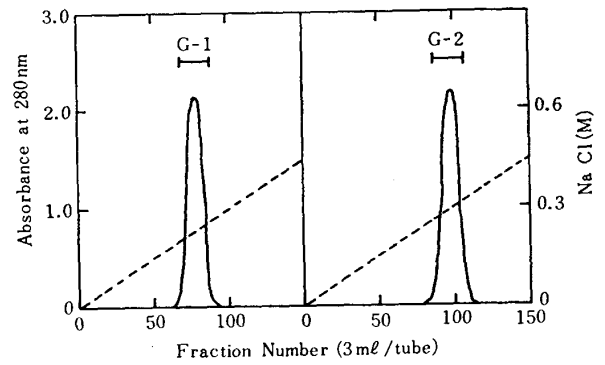


Fig. 7. Rechromatography of P-1 and P-2 in Fig. 6.

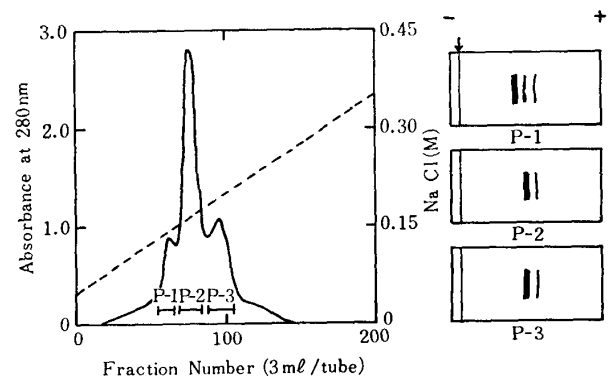


Fig. 8. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of α -lactalbumin purified by Sephadex G-100 gel filtration.

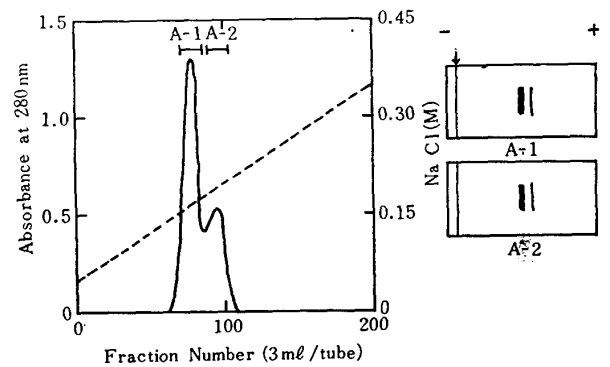


Fig. 9. Rechromatography of P-2 in Fig. 8

A-2 へ変化するという事実から示されるように、明らかに α -ラクトアルブミンはこのクロマトグラフィーにおいて不均一性を与える。これは恐らく α -ラクトアルブミンの透析あるいはクロマトグラフィーの間その立体構造に変動が生じるか、又は自己会合するかして荷電に変化を来たしたものが一定比で生じるためであると思われる。

3) アミノ酸分析

DEAE-Sephadex A-50 イオン交換カラムクロマ

トグラフィーで分画されたβ-ラクトグロブリンの G-1, G-2, α-ラクトアルブミンの A-1, A-2 のアミノ酸分析の結果を, Table I に示す. β-ラクトグロブリンにおいては, その分子量を18000として, 又α-ラクトアルブミンにおいては, その分子量を16000としてそれぞれ一分子当りの各アミノ酸残基数を求めた. なお, トリプトファンについては定量をおこなわなかった. Table I に示されるアミノ酸組成から明らかに, G-1, と G-2 はそれぞれ遺伝的変異体 B 型と A 型に対応する. すなわち, A 型は B 型よりアスパラギン酸とバリンが一個ずつ多く, グリシンとアラニンが一個ずつ少ないという報告とよく一致した. 一方 A-1 と A-2 はそのアミノ酸組成においてほとんど異りが見られず, これは両者が同一蛋白質であるという先の結論をさらに支持する. 又このアミノ酸組成は他に報告されている値ともよく一致していた.

Table 1. Amino acid composition of β-lactoglobulin and α-lactalbumin.

Amino acid	G-1	G-2	A-1	A-2
Lysine	14	14	12	12
Histidine	2	2	3	3
Ammonia	13	12	15	13
Arginine	3	3	1	1
Aspartic acid	15	16	23	23
Threonine	8	8	7	8
Serine	7	7	7	7
Glutamic acid	26	26	15	15
Proline	9	8	2	2
Glycine	4	3	7	7
Alanine	14	14	4	3
Half-cystine	3	4	6	8
Valine	9	10	6	6
Methionine	4	4	1	1
Isoleucine	10	10	9	9
Leucine	21	21	13	14
Tyrosine	3	4	4	4
Phenylalanine	4	4	5	5

要 約

京都府立大学農場ホルスタイン種乳牛より得られた牛乳より, Armstrong らの分別法に従いβ-ラクトグ

ロブリン, α-ラクトアルブミン画分を分別し, それぞれを Sephadex G-100 でのゲル透過及び DEAE-Sephadex A-50 でのイオン交換クロマトグラフィーにより精製した. Armstrong らの方法により得られたβ-ラクトグロブリン及びα-ラクトアルブミン画分は Cellogel 電気泳動の結果から, 多くの他種蛋白質を含んでいることが示されたが, ゲル透過によりかなり精製され, さらにイオン交換クロマトグラフィーによりほとんど純粋にされることが電気泳動及びアミノ酸分析の結果から明らかとなった. 又β-ラクトグロブリン異型体は pH 6.3 での DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィーで完全に遺伝的変異体 A 及び B 型に分離されうる. α-ラクトアルブミンは DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィーにおいて非常に複雑な挙動を示したが, これは透析あるいはクロマトグラフィーの間, 分子の一部に不可逆的な立体構造の変動か自己会合が生じ荷電が変化した結果であると考察した.

この研究を進めるにあたって多大の仕事を分担されました長浜圭子氏に深謝します. (1976年7月31日受理)

引用文献

- 1) H. A. McKenzie: in "Milk Proteins", H. A. McKenzie ed., vol. 2, Academic Press, New York, 1971, p. 255.
- 2) J. McD. Armstrong, H. A. McKenzie and W. H. Sawyer: Biochim. Biophys. Acta, **147**, 60(1967)
- 3) J. McD. Armstrong, K. E. Hopper, H. A. McKenzie and W. H. Murphy: Biochim. Biophys. Acta, **214**, 419(1970)
- 4) R. Aschaffenburg and J. Drewry: Biochem. J., **65**, 273(1957)
- 5) C. A. Kiddy: J. Dairy Res., **32**, 209(1965)
- 6) D. W. Green and R. Aschaffenburg: J. Mol. Biol., **1**, 54(1959)
- 7) M. J. Kronman and R. Andreotti: Biochemistry **3**, 1145(1964)
- 8) H. A. McKenzie: Advan. Protein Chem., **22**, 55(1967)