

β-およびκ-カゼインのカルシウム結合, 自己会合 並びに安定化能に及ぼす脱りんの影響

今 出 保, 小 林 修, 宮 代 龍 次, 宮 辺 豊 紀

EFFECT OF DEPHOSPHORYLATION OF β-AND κ-CASEIN ON THE BINDING OF CALCIUM, SELF-ASSOCIATION, AND STABILIZING ABILITY

Tamotsu IMADE, Osamu KOBAYASHI, Ryuji MIYASHIRO and Toyoki MIYABE

When β-and κ-caseins were dephosphorylated, the effects on the binding of Ca, self-association, and stabilizing ability were investigated. We also studied on the relationship between the dephosphorylation and the secondary structure of κ-casein.

The results obtained were summarized as follows :

- 1) The amount of Ca²⁺ ion bound to β-and κ-caseins did not vary with temperature. In 35 percent of dephosphorylation rate, the amount of Ca²⁺ ion bound to dephosphorylated β-casein approximately reduced by half as compared with β-casein. In dephosphorylation rate above it, there was little change in Ca²⁺ ion bound to the same β-casein. While Ca²⁺ ion to κ-casein showed no change by dephosphorylation. From these results, it was presumed that the residue of phosphoric acid was not concerned with Ca²⁺ion combination.
- 2) There was no difference on the size of the self-association polymer of β-casein, in the range of 15°C to 25°C, regardless of the presence or the absence of Ca²⁺ ion. The polymer of the dephosphorylated β-casein dissociated with higher rate of dephosphorylation.
- 3) The stabilizing ability of κ-casein decreased with higher rate of dephosphorylation.
- 4) The secondary structure of κ-casein did not change by the dephosphorylation.

本研究はβ-およびκ-カゼインを脱りんした場合のカルシウムの結合, 自己会合および安定化能に及ぼす脱りんの影響, 並びに, κ-カゼインの脱りんと二次構造との関係について調べたものである。

- 1) β-およびκ-カゼインのCa²⁺イオン結合量の温度による変化は認められなかった。β-カゼインの脱りん率35%におけるCa²⁺イオンの結合量は未脱りんβ-カゼインに比べて約2分の1に減少した。それ以上脱りんしてもCa²⁺イオン結合量は殆ど変化しなかった。κ-カゼインは脱りんによってCa²⁺イオン結合量には殆ど変化がなかった。κ-カゼインのりん酸基はCa²⁺イオンとの結合に余り関与しないものと推定された。
- 2) β-カゼインの自己会合体の大きさは15°Cおよび25°Cの範囲において, Ca²⁺イオンの存否に関係なく差が認められなかった。脱りんβ-カゼインは脱りん率が大きくなるに伴って会合体は解離した。
- 3) κ-カゼインの脱りん率が大きくなるに伴って安定化能が低下した。
- 4) κ-カゼインの二次構造は脱りんによって変化なかった。

緒 言

牛乳中のβ-カゼインは5個, κ-カゼインは1個だけ分子中にホスホセリンとしてりん酸基を含有している。α_{s1}-およびβ-カゼインはCa²⁺イオンの存在下で凝集し, これらのカゼインはκ-カゼインによって安定化する。千葉ら¹⁾はカゼインミセルの安定化のためには, κ-カゼインの両親媒性構造とりん含量の低いことが必要であると報告した。

α_{s1}-及びβ-カゼインとCa²⁺イオンの結合はカゼインミセル形成の素反応の一つとして考えられている。Ca²⁺イオンに対するカゼインの結合サイトの一つとしてカゼイン中にりん酸基が含まれている。

本研究は β -および κ -カゼインを脱りんした場合の Ca^{2+} イオンの結合量, 自己会合および安定化能に及ぼす影響, 並びに κ -カゼインの脱りんと二次構造との関係について調べたので報告する。

実験方法

1. 試料カゼインの分離・精製

β -カゼインはHIPPら²⁾の方法, そして α_{SI} -および κ -カゼインはZITTLEら^{3,4)}の方法によりホルスタイン種の40頭の新鮮な混合乳から分離, 精製した。

2. ミネラルの分析

試料カゼインを450℃~500℃で灰化して灰分を測定した。得られた灰化物を1M HClで溶解し, 蒸留水で希釈したのち, 原子吸光法によってCa, Mg, KおよびNaを, ALLEN-中村変法⁵⁾によってPを測定した。

3. 脱りん β -および κ -カゼインの調製

吉川ら⁶⁾の方法に準じて行った。すなわち, β -あるいは κ -カゼイン100mgを試験管に入れ, 100mM酢酸緩衝液(pH 5.8, 10mMアルコールピロリン酸を含む) 5mlに溶解した。36℃の恒温槽中でホスファターゼ(Sigma社製, 酸性ホスファターゼ) 20mgを100mM酢酸緩衝液10mlで溶解した液A mlと, 100mM酢酸緩衝液B ml (A+B=1.5ml)を試料溶液に加えた。15~30分酵素反応させたのち, 0.1N NaOHを加えてpH 9.0として反応を停止した。この溶液を0.01M トリス-塩酸緩衝液(pH 7.0)で透析したのち, 同緩衝液で10ml定容としたものを脱りんカゼインとした。

4. カルシウム結合量の測定

β -, κ -, 脱りん β -および脱りん κ -カゼインに対する Ca^{2+} イオン結合量の測定は既報⁷⁾のゲル濾過法により行った。すなわち, ジャケット付PharmaciaカラムK 9/60にSephadex G-25 coarseを充填し, 溶出液には3 mM CaCl_2 および0.07MKClを含む0.01M トリス-塩酸緩衝液(pH 7.0)を用いた。試料として2%カゼイン溶液0.5gを用いた。流速は18ml/hrで2mlずつ分画し, 各分画物を上皿天秤で秤量した。 β -および κ -カゼインの分画は5℃, 15℃および25℃, 脱りん β -および脱りん κ -カゼインは25℃で行った。

5. 自己会合体の測定

トヨパールHW-55 FあるいはHW-75 Fを用いたゲル濾過法により行った。このゲルをジャケット付PharmaciaカラムK 16/100に充填し, 溶出液として0.07MKClを含む0.01M トリス-塩酸緩衝液(pH 7.0), あるいは3 mM CaCl_2 を含む緩衝液を用いた。溶出温度は, カゼインでは5℃, 15℃および25℃, 脱りんカゼインでは25℃とした。流速は5 ml/hr/cmとし, 各分画量はmgの桁まで秤量して正確な溶出量を求めた。溶出液はアトミニ紫外吸収モニター Iを用いて, 波長280nmでの吸光度を連続的に記録した。結果はkd値で示した。

6. ミセル安定化能の測定

ZITTLE⁸⁾の方法に準じて行った。すなわち, α_{SI} -カゼインおよび κ -あるいは脱りん κ -カゼインを混合溶液の濃度が0.5%になるように0.01M トリス-塩酸緩衝液(pH 7.0)中で混合し, 30℃, 10分放置した。 α_{SI} -カゼインおよび κ -あるいは脱りん κ -カゼインの量的比率(α_{SI} -casein/ κ -casein)は2, 5, 10および20の4段階に変化させた。これに100mM CaCl_2 溶液を加え最終濃度が10mMになるようにした。30℃で15分放置後, 2,000rpm, 15分遠心分離し, 上澄液に0.1N NaOHを加えて水で10倍に希釈し, 280nmにおける吸光度を測定した。盲検として, α_{SI} -カゼインの代りに0.01M トリス-塩酸緩衝液を加えた液について同様に測定した。両者の差から, α_{SI} -カゼインの吸光係数として, $E_{1\%}^{1\text{cm}}=10.0$ を用いて, 上澄液中の α_{SI} -カゼイン濃度を算出した。 κ -あるいは脱りん κ -カゼインの α_{SI} -カゼインに対する安定化能は, 全 α_{SI} -カゼインに対する上澄液中の残存 α_{SI} -カゼインを百分率で表わした。

7. CDおよびORD曲線

κ -および脱りん κ -カゼインの0.025%溶液を0.01M トリス-塩酸緩衝液(pH 7.0)を用いて調製した。セルの長

さ1 mmのセルを用い, 日本分光J-20C型自記分光分散計により, CDおよびORDを測定した。各波長における平均残基楕円率 $[\theta]$ および平均残基旋光度 $[\alpha]$ は, κ -カゼインの平均残基分子量を112.4として求めた⁹⁾。

結果および考察

1. カルシウム結合量

試料カゼイン中の灰分, Ca, Mg, K, NaおよびPの含量をTable1に示した。各カゼインのCa含量は約0.1mole/casein mole, Mg含量は約0.03mole/casein moleであった。試料カゼイン中のCaおよびMgの量は無視しうる程, 僅少であった。

Table 1. Ca, Mg, Na and P contents of caseins (mg/100 g)

| | Ash | Ca | Mg | K | Na | P |
|-----------------------|------|----|----|----|-----|------|
| α_{s1} -casein | 3742 | 18 | 3 | 39 | 961 | 1005 |
| β -casein | 4421 | 24 | 5 | 33 | 540 | 583 |
| κ -casein | 3096 | 21 | 4 | 20 | 460 | 229 |

PAYENS¹⁰⁾は β -カゼインが自己会合する際に温度依存性が大きいことが特徴であると指摘した。 β -および κ -カゼインの5℃, 15℃および25℃の各温度における Ca^{2+} イオン結合量の結果をFig.1に示した。この結果の通り, β -カゼインに対する Ca^{2+} イオン結合量の温度による変化は認められなかった。このことは温度によって会合体に変化が起らないか, あるいは Ca^{2+} イオンの結合が会合の際に影響を受けないことを意味する。

一方, κ -カゼインの Ca^{2+} イオン結合量は β -カゼインのそれに比べて少なく, また, 温度による変化も認められなかった。

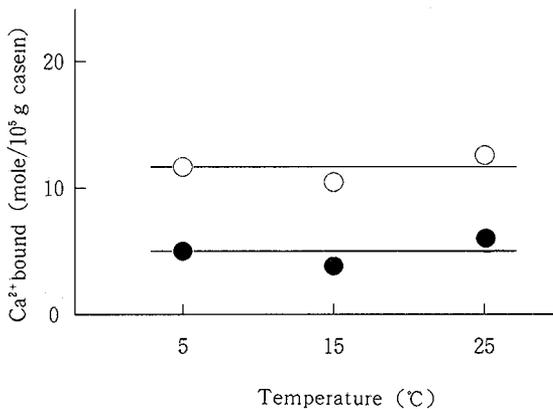


Fig 1. Effect of temperature on the Ca^{2+} ion bound to β -and κ -casein
 —○—: β -casein, —●—: κ -casein

25℃における β -および κ -カゼインの脱りん率と Ca^{2+} イオン結合量との関係について調べた結果はTable2に示した。

β -カゼインを脱りん(脱りん率35~95%)すると Ca^{2+} イオン結合量は著しく減少した。すなわち, 脱りん率35%では約2分の1の Ca^{2+} イオン結合量を示し, それ以上脱りん率が大きになっても Ca^{2+} イオン結合量は脱りん率35%の場合と殆ど同じであった。このことから, Ca^{2+} イオンは β -カゼインのりん酸基の35%に結合するものと思われる。これに比べて, κ -カゼインは脱りん率15%では Ca^{2+} イオン結合量に変化なく, 脱りん率35%以上でも僅かに減少したにすぎなかった。このことは, β -カゼインと異なり κ -カゼインのりん酸基は Ca^{2+} イオンとの結合に余り関与せず, Ca^{2+} イオンが κ -カゼインのカルボキシル基と結合したことを示している。

Table 2. Effect of dephosphorylation rate on the Ca²⁺ ion bound to β- and κ-casein.

| Dephosphorylation rate, % Bound Ca ²⁺ , mole/10 ³ g casein | β-casein | | | | κ-casein | | | |
|---|----------|------|------|------|----------|-------|------|------|
| | 0 | 35 | 85 | 95 | 0 | 15 | 35 | 75 |
| | 12 | 6.2 | 5.6 | 4.8 | 6.2 | 6.2 | 5.1 | 4.2 |
| | (100) | (52) | (47) | (40) | (100) | (100) | (82) | (68) |

(at 25°C)
The parenthesized figures show percentage of Ca²⁺ ion amount of dephosphorylated β- or κ-casein when that of β- or κ-casein is 100

2. 自己会合

β-カゼインの自己会合に及ぼす温度と脱りん率の影響について調べた結果をTable3に示した。β-カゼインのCa²⁺イオンの存在しない場合の自己会合については、温度による会合体の大きさの違いは殆ど認められなかった。しかし、温度の上昇に伴って僅かに会合した。PAYENS¹⁰⁾によると、低温で全て単量体となり、温度上昇に伴って会合するという。一般的にはゲル濾過において試料が溶出に伴って希釈される。会合に際しての濃度による影響、すなわち濃度依存性がある場合には、会合体の大きさが変化する。しかし、溶出図でシャープなピークが得られたので溶出中の濃度の影響はなかった。

Table 3. Effect of temperature and dephosphorylation rate on the self-association of β-casein.

| | β-casein | | 35% dephosphorylated β-casein 3mM Ca | 85% dephosphorylated β-casein 3mM Ca | 95% dephosphorylated β-casein 3mM Ca |
|------|----------|--------|---|---|---|
| | No Ca | 3mM Ca | | | |
| | kd | kd | kd | kd | kd |
| 5°C | 0.37 | 0.48 | — | — | — |
| 15°C | 0.35 | 0.33 | — | — | — |
| 25°C | 0.29 | 0.32 | 0.38 | 0.42 | 0.45 |

The values of kd show the coefficient of distribution obtained by gel filtration.

3 mM Ca存在下では5°Cのkd値は0.48、15°Cおよび25°Cでは0.33および0.32であった。すなわち、15°C以上では分子量がやや大となり、温度の上昇によって会合体が大きくなることを示した。Ca²⁺イオンが存在する場合は5°Cの低温で会合体が小さくなった (Table3)。また、15°Cと25°Cの場合では、Ca²⁺イオンに関係なく会合体の大きさに差がなかった。すなわち、Ca²⁺イオンが分子間架橋の担い手となって大きな会合体を形成することはないものと判断した。

25°CにおけるCa²⁺イオン存在下でのβ-カゼインの脱りん率と会合体形成の関係について調べた (Table3)。この結果、脱りん率が大きくなるに伴いkd値が大となった。すなわち、β-カゼインの脱りん率が大きくなる程、ポリマーが解離して分子量が小さくなり、所謂、自己会合体が小となった。要するに、ポリペプチド中のりん酸基はCa²⁺イオン存在下でポリマーの形成を大にする役割を果すことを意味する。

一方、κ-および脱りんκ-カゼインの場合は、トヨパールHW-75Fを用いたゲル濾過実験においてこれらのカゼインがVoに溶出された。このことは、これらのカゼインが極めて巨大な会合体であることを示す。Ca²⁺イオン存在下においても同じ結果を得た。したがって、この方法ではκ-カゼインの自己会合に及ぼすCa²⁺イオンおよび脱りんの影響について確かめることはできなかった。

3. ミセル安定化能

κ-および脱りんκ-カゼインのα_{s1}-カゼインに対する安定化能の測定結果をFig 2に示した。

κ-カゼインは1分子中に1個のりん酸基を含有する。κ-カゼインのりん酸基を脱りんした場合、脱りん率が大きくなるに伴ってα_{s1}-カゼインに対するκ-カゼインの安定化能が低下した。このことから、κ-カゼイン分子中のりんを脱りんすることによって、κ-カゼインの保護コロイドとしての役割が減退することが明らかになった。千葉ら¹¹⁾は脱りんβ-カゼインがα_{s1}-ミセル安定化能を有し、りん酸化κ-カゼインがミセル安定化能を著しく低下さ

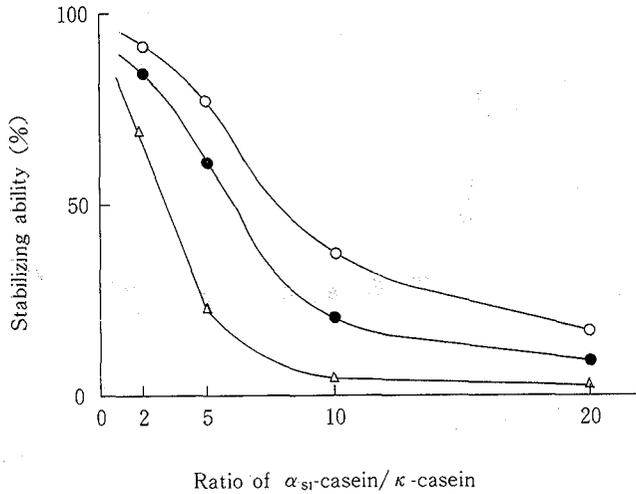


Fig 2 Stabilizing ability of κ -and dephosphorylated κ -casein to α_{S1} -casein

—○—: κ -casein, —●—: 40% dephosphorylated κ -casein, —△—: 85% dephosphorylated κ -casein

せ, さらにこのりん酸化 κ -カゼインを脱りんすると元の κ -カゼインと同じ安定化能を回復したことを報告している。

4. CDおよびORD曲線

κ -および脱りん κ -カゼインのCD曲線をFig 3に, ORD曲線をFig 4に示した。この結果, ポリLリシンのランダムコイルが示す曲線⁽¹¹⁾とほぼ一致したことから, κ -カゼインの二次構造は殆どランダムコイルであると思われた。小野ら⁽¹²⁾の結果と一致している。

一方, 脱りん κ -カゼインのCDおよびORD曲線は, κ -カゼインのそれぞれの曲線と殆ど重なった結果が得られた。このことは, 脱りんが κ -カゼインの構造に変化を与えないことを示すものである。

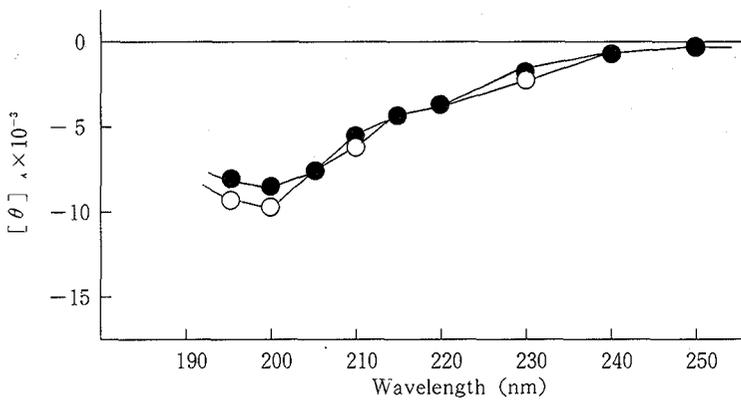


Fig 3. CD curve of κ -and 85% dephosphorylated κ -casein.

—○—: κ -casein, —●—: 85% dephosphorylated κ -casein.

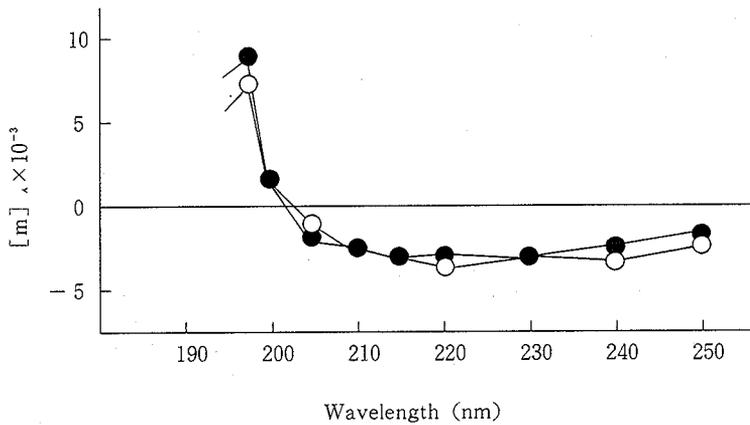


Fig. 4. ORD curve of κ - and 85% dephosphorylated κ -casein
 —○— : κ -casein, —●— : 85% dephosphorylated κ -casein.

引用文献

- (1) CHIBA, H and YOSHIKAWA, M. : *Mem. Coll. Agric., Kyoto Univ.*, No.110, 1 (1977).
- (2) HIPP, N J, GROVES, M L, CUSTER, J H and McMEEKIN, T L. : *J Dairy Sci*, 35, 272 (1952).
- (3) ZITTLE, C. A, CERBULIS, J, PEPPER, L and DELIAMONICA, E. S. : *J Dairy Sci*, 42, 1897 (1959).
- (4) ZITTLE, C. A. and CUSTER, J. H. : *J Dairy Sci*, 46, 1183 (1963).
- (5) 中村道徳 : 農化, 24, 1 (1950).
- (6) YOSHIKAWA, M, TAMAKI, M, SUGIMOTO, E. and CHIBA, H. : *Agric. Biol. Chem.*, 38, 2051 (1974).
- (7) IMADE, T, SATO, Y and NOGUCHI, H. : *Agric. Biol. Chem.*, 41, 2131 (1977).
- (8) ZITTLE, C. A. : *J. Dairy Sci*, 44, 2101 (1961).
- (9) 浜口浩三, 武貞啓子 : 蛋白質の施光性, 12, 東京, 学会出版センター (1971).
- (10) PAYENS, T. A. J. : *J. Dairy Sci*, 49, 1317 (1966).
- (11) 日本生化学会編 : 生化学実験講座 1 タンパク質の化学 III 高次構造研究法, 176, 東京, 東京化学同人 (1976).
- (12) ONO, T, YUTANI, K and ODAGIRI, S. : *Agric. Biol. Chem.*, 38, 1607 (1974).

(1986年10月31日 受理)