カゼインの分割に関する研究

I 化学的分割に就いて

志賀 勝 治

(北海道大学農学部)

Studies on the fractionation of casein

I On chemical fractionation of casein

KATSUJI SHIGA

(Inst. of Dairy Sci. Fac. of Agric. Hokkaido University)

以前には単一と考へられていたカゼインは1930年頃より2〜3種の蛋白の混合物である事が解り多くの人によりカゼインの分割が試られて来た。しかしその各々の成分の確認方法が不確実であつたため実際分離されていたものは殆んどなかつたのである。所がチセリウスの電気泳動装置が発見されカゼインの各成分の確認に此の装置が用いられて以来此の研究が急激に進んで来たのである。それで著者も各種の方法を用ひカゼインを化学的に分割しその性質を究明しようと試したのである。

実 験

実験材料として HAMMERSTEN のカゼインを用いた。

1 原料カゼイン電気泳動図 原料カゼインの電気泳動を行つた結果2ヶの峰(初界面以外)が現れ3つの成分の中 α 、 β -カゼインの存在を示している。 γ -カゼインは小量であり又 HAMMERSTEN のカゼインはアルコールを用ひるため流出したものと思われる。

(Fig. 1 electrophoretic patterns of hammerstein's casein.
(ionic strength, 0.11, pH 6.98)

2 WARNER 法による分離 次に2°Cに於てpH4.5で α -カゼインが沈澱し β -カゼインは沈澱しない性質を利用した WARNER 法を用ひ α 、 β -カゼインを単離して見た結果第2図の如くなつた。(a), (b), は3回精製, (c),

(d), は6回精製である。 β -カゼインの方は未だ多少 α が混在してるが大体純粹である。

3 Aceton による分離 蛋白のCOOH基を aceton で抑へHClを加へて行き分別沈澱を行つたなら α 、 β -カゼインが分離されないかと考へた。カゼインを dil. NaOH で溶解し pH. 6.4 附近となし之に aceton を加へ60% aceton 溶液となす, (この液のカゼイン濃度は2%となす)。此の溶液に激しく攪拌しながら N/10 HCl を少量宛加へて分別沈澱を行い, その初沈澱と終沈澱を比較した結果第3図の如くなり, α 、 β -カゼインの混合割合は変らなかつた。

4 Ethanol による分離 カゼインをdil HClでpH3.8となし之に ethanol を加へ80% ethanol 性溶液とする。(カゼイン濃度は1%とする) 之に ethanol 性 N/10 NaOH を攪拌の下に滴下し分別沈澱し, その初及終沈澱を比較したのが第4図であり, 初沈澱は α 、 β -カゼインの比が原料カゼインと異り α -カゼインが β -カゼインに比し増加している, 終沈澱は初沈澱と反対の状態にあり幾分分別された事を示している。

5 Pyridin による分離 collidin, pyridin は paper chromatography に用いられている様にアミノ酸に対する分配係数が大であると云う事より pyridin 溶液からカゼインを分別する事を試た, カゼインを dil pyridin と ethanol で溶し5%カゼイン溶液とし之に N/10 HCl を少量宛加へて分別沈澱した結果第5図の如くなつた。初沈澱は原料カゼインと殆んど変わらず終沈澱は α -カゼインが増加し β -カゼインは減少している。

考 察

以上の実験では WARNER の方法に匹敵する分離結果は得られず酸性側から沈澱する ethanol 法及, pyridin 法が幾分分離性を示した程度であつた, 此等の分離法が低能率に終つたのは温度の因子を取れなかつた

からではないかと考へられるので更に温度の因子を取れた方法を考察すべきである。又 WARNER 方により分離した α , β -カゼインのカゼインミセルを電子顕微鏡で観察したのであるが酸, アルカリの操作を繰り返したためかミセルが破壊されて居り観察不能であつた。

要 約

- 1 HAMMERSTEN のカゼインは2つの蛋白の存在を示した。
- 2 WARNER の方法により α , β -カゼインを単離した。
- 3 Aceton による分離方法では殆んど分離出来なかつた。
- 4 ethanol 及 pyridin による方法では多少の分離が出来たが, WARNER 法に比し能率は悪かつた。

(1953.8.11.受付)

文 献

- GROH, J., KAVOS, E., DENES, K. und SERENYI, V., (1934): Z. Physiol. Chem., 226, 32,
 WARNER R. C. (1944): J. Am. Chem. Soc., Vol. 66, 1725.
 MELLANDER, O., (1938): Biochem. Z. Vol 300.

Résumé

- 1 HAMMERSTEN's casein consists of about two proteins.
- 2 α and β -casein are obtained by the WARNER's method.
- 3 The electrophoretic components of casein is not separate by the aceton method. We obtained some crude α - and β -casein.

Fig 2 electrophoretic patterns of α -, and β -casein

Fig. 3 electrophoretic patterns of precipitated casein from acetone solution.

Fig. 4 electrophoretic patterns of precipitated casein from ethanol solution.

Fig. 5 electrophoretic patterns of precipitated casein from pyridin solution.

Ionic strength ; 0.147 protein conc. ; 2%

a. first ppt. : 6,000 sec. 15.5 mA. 120V.

b. last ppt. : 5,400 sec. 15.5 mA. 130V.

Ionic strength ; 0.11

c. first ppt. : 4,800 sec. 11.5 mA. protein conc. 1.4%

d. last ppt. : 6,000 sec. 12.0 mA. protein conc. 0.4

Ionic strength ; 0.147 protein conc. ; 2%

e. first ppt. : 6,000 sec. 16 mA. 120V.

f. last ppt. : 6,000 sec. 17 mA. 120V.

外国文献抄録

The action of thrombin on fibrinogen

L. LORAND et al. (1952) : Biochem. J., 52, 196-203

従来血液凝固作用中フィブリノーゲンのフィブリンへの変化を蛋白分解作用の言葉で説明しようとする見解が多く、パパイインや二三の蛇毒が凝固を生ぜしめる事実を以てこの見解を支持しようとする報告もある。だが他の酵素からの類推よりもトロンビンが同じように働く事を直接証明する事の方が望ましい。この為にフィブリノーゲンとフィブリンの遊離アミノ基を系統的に比較した。含有アミノ酸の検証には鋭敏で有効なサンガー氏法* (1945) を用いた。即ち牛のフィブリノーゲンとフィブリンをダイニトロフエノール法により処理して N-末端基を定量した。フィブリノーゲン分子内では2個の鎖がチロシンで終り1個がグルタミン酸で終っている。同じ単位量のフィブリンは2つのチロシン N-末端基と4つのグリシン末端基とを有している。トロンビンのフィブリノーゲンに及ぼす作用としてはフィブリノーゲン分子内にあるグリシルペプチド結合を開裂せしめてフィブリンを形成する事が判った。同時にペプチドの部分たる N-末端基のグルタミン酸が放れる事が想像される。なおフィブリノーゲンもフィブリンも共に同じ数の遊離の e-N 基を持つリジン含有している。

* SANGER, F. (1945) Biochem. J. 39, 507 (神谷 誠)

Sequence of histological changes in the uterus and vagina of the rat during prolongation of pseudopregnancy associated with the presence

of deciduomata

J. T. VELARDS, A. B. DAWSON, A. G. OLSON & HISAW (1953) : Am. J. Anat., 93 (2), 273-305.

著者は先に Rat で decidual reaction によつて偽妊娠を延長せしめ、その延長度は大体 reaction の程度に比例することを知つたが、その際に生殖道の組織学的研究は行わなかつたので、今回はその点を追究した。先ず intact rat で日を追つて子宮、膣の変化をしらべ、次に早でこの現象を起させるホルモン及びその量を決定するために、Progesterone, Progesterone + Estradiol の種々の量を注射して、その時の生殖道の変化を見た。decidual development 中の現象には一定の順序があり、先ず antimesometrial region に decidual modification が起り、次いで mesometrial deciduoma が出来る。前者では初期変化は損傷後24時間で起り、8日で最大となり、組織の遺残は17日まで存在する。後者では发育のピークは11~13日である。hormone test では Progesterone 1.5~4.5mg/day 投与により intact と同程度の decidual を生ずる。少量の場合には Estradiol 添加の有無に拘らず intact 程にはならぬ。膣では典型的偽妊娠は第20日まで続き、18~20日まで大量の粘液があり、21日で preproestrus 開始とともに減少し始め、上皮が完全に角化する22日で完全に粘液もなくなる。Progesterone のみの投与では粘液量は少いが、少量の Estradiol を添加すれば intact と同様になる。(西田司一)