κ -カゼインと β -ラクトグロブリンとの加熱による複合体形成

土井 裕 司, 井手野 祥 次

伊 吹 文 男, 金 森 正 雄

京都府立大学農学部農芸化学科

Heat Induced Complex Formation between κ -Casein and β -Lactoglobulin

Hiroshi DOI, Shoji IDENO, Fumio IBUKI, Masao KANAMORI

Department of Agricultural Chemistry,

Kyoto Prefectural University, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

κ -Casein can form the complex with β -lactoglobulin by means of heating at 90°C for 10 min in 10 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.1, containing 70 mM KCl. The complex was dissociated by the addition of 2-mercaptoethanol, while the addition of urea did not affect on the behavior on Sephacryl S-300 gel filtration of the complex. Therefore, the complex formation was confirmed by the Sephacryl S-300 gel filtration with 10 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.1, containing 70 mM KCl and 4.6 M urea, and by the sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of 2-mercaptoethanol. Effect of carbohydrate moiety of κ -casein was examined by heating at 70°C on the complex formation of β -lactoglobulin with κ -casein components having different sugar contents. It was shown that κ -casein component containing much more carbohydrates formed the complex with β -lactoglobulin easily. This finding may give much information to make clear the function of carbohydrate portion of κ -casein and the mechanism of gelation in long life milk and the utilization of whey proteins in milk industry.

(Received July 25, 1981)

牛乳たん白質は、約 80% のカゼインと約 20% の乳清たん白質から成っている¹⁾。カゼイン画分はカゼインミセルを形成してコロイド状に分散しており、このカゼインミセルを形成するため、 κ -カゼインは最も重要な役割を果たしている²⁾。一方、乳清たん白質の約半分は β -ラクトグロブリンであり、このたん白質は栄養供給源として以外に牛乳中ではなんら機能していないと考えられている³⁾。

近年のように、ロングライフミルクなど各種乳製品が開発、製品化され、そこから、たとえばロングライフミルク貯蔵中のゲル化や沈殿形成など新たな問題点も生じてきているときにはあらためて乳たん白質間相互作用の検討および考察が必要となってきたものと考えられる。

そこで本研究は、牛乳および乳製品のレンニンによる凝固性や熱安定性などを左右するといわれる⁴⁾⁵⁾ 重要な因子である κ -カゼインと β -ラクトグロブリンとの加熱

による相互作用をとりあげ、その諸性質を検討するための端緒となるものであり、さらには、現在のところ不明である κ -カゼインの糖鎖機能についても、 β -ラクトグロブリンとの相互作用を検討することによって考察を深めようとするものである。

乳たん白質の加熱による影響が、Tobias ら⁶⁾や Slater and Van Winkle⁷⁾ によって検討され、移動界面電気泳動上で、 β -ラクトグロブリンと α -カゼインのいずれのピークもが減少することが報告されて以来、同様な実験が電気泳動法を用いて数多く行なわれ^{8)~14)}、加熱した牛乳中での β -ラクトグロブリンと α -カゼインとの複合体形成を検討しようと試みられた。しかし、電気泳動実験では、Sawyer¹⁵⁾ や McKenzie¹⁶⁾ の指摘するように、原理および泳動パターンの複雑さのため解釈が非常に困難である。 κ -カゼインと β -ラクトグロブリンとの加熱による複合体の証明は、超遠心法によってようやく達せられた¹⁷⁾が、これらの方法は、設備面、操作面、さらには生成複合体の調製による諸性質の解明という面から、実験を非常に困難なものにしている。

そこで本研究においては、簡便で再現性があり、試料調製の容易なゲル濾過法によって κ -カゼイン- β -ラクトグロブリン複合体形成の証明を検討し、しかも、短時間でのゲル濾過を可能にするため強固なゲルを用い、 κ -カゼインと β -ラクトグロブリンの加熱による相互作用に関する研究の遂行を試みた。

実験方法

1. κ -カゼインの調製

κ -カゼインは、尿素硫酸法¹⁸⁾を一部改良した著者らの方法でもって調製され、さらに、DEAE-セルロースにより糖含量の差によって分画された¹⁹⁾。

2. β -ラクトグロブリン

使用された β -ラクトグロブリンは、シグマ社より購入されたものであった。

3. κ -カゼイン- β -ラクトグロブリン複合体形成

κ -カゼインと β -ラクトグロブリンとの複合体は、加熱によって形成されるが、加熱条件は各実験者によって異なっており、また、65°C以下では複合体は形成されないという¹⁵⁾。そこで本研究では、複合体形成確認のためのゲル濾過用試料調製には、90°C 10分間の加熱とした。この加熱条件下で β -ラクトグロブリンを単独で加熱すると、大部分沈殿してしまった。また、Buffer系には、カゼインなど乳たん白質の研究時に最もよく用いられる70 mM KClを含む10 mM イミダゾール塩酸緩衝液 pH 7.1 (以下、標準緩衝液とよぶ)を用いた。 κ -カゼインと β -ラクトグロブリンとの重量比は、1であった。

4. ゲル

ゲル濾過用充てん剤としては、ファルマシア社製セファクリル S-300₂が用いられた。

5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Weber and Osbornの方法²⁰⁾に従って行なわれた。

6. 還元カルボキシメチル化

たん白質中のシステイン残基のカルボキシメチル化は、Crestfield らの方法²¹⁾に従って行なわれた。

実験結果と考察

1. κ -カゼイン- β -ラクトグロブリン複合体のセファクリル S-300 ゲル濾過

Fig. 1 は、 κ -カゼインと β -ラクトグロブリンとの混合物を標準緩衝液中で 90°C 10 分間加熱した試料および未加熱の試料の標準緩衝液を用いて溶出したときのセファクリル S-300 ゲル濾過パターンである。未加熱のときは、二つのピークが認められ、それぞれの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動より κ -カゼイン (peak a) と β -ラクトグロブリン (peak b) であったが、加熱

Fig. 1. Sephacryl S-300 gel filtration profiles eluted with the standard buffer of unheated and heated mixtures of κ -casein and β -lactoglobulin.

A: not heated, B: heated

Each 1 mg of κ -casein and β -lactoglobulin was dissolved in 1 ml of the standard buffer. The mixture was heated at 90°C for 10 min or not. The solution was applied to a Sephacryl S-300 gel column (1.6×90 cm) and eluted with the standard buffer. A flow rate was 40 ml per hr. One tube contained 2.5 ml.

Fig. 2. SDS-Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of κ -casein, β -lactoglobulin and complex between κ -casein and β -lactoglobulin.

処理によってピークが一つとなり、電気泳動の結果、 κ -カゼインと β -ラクトグロブリンの混合物であった (Fig. 2)。 κ -カゼインは、標準緩衝液中常温では、分子量 650,000 のポリマーとして存在しており¹⁹⁾、 β -ラクトグロブリンは、pH 7.0 以上では分子量 18,000 のモノマーとして存在している²²⁾。Fig. 1 で示されたように、加熱処理によって β -ラクトグロブリンのピークが消失したことから、複合体の形成が示唆された。しかし加熱試料と κ -カゼインの溶出位置がほぼ同じであることから、複合体形成を結論することはできず、 κ -カゼインと複合体の判別も不可能である。 κ -カゼインは、尿素存在下では、モノマーとして存在し²³⁾、 β -ラクトグロブリンも会合していない²⁴⁾ことから、尿素を含む標準緩衝

Fig. 3. Sephacryl S-300 gel filtration profiles eluted with the standard buffer containing 4.6 M urea of unheated and heated mixtures of κ -casein and β -lactoglobulin.

A : not heated, B : heated

The mixture was prepared as described in Fig. 1. Urea was added to the solution prior to application to a Sephacryl S-300 column. Elution was carried out with the standard buffer containing 4.6 M urea.

液での溶出を行なった (Fig. 3, 4). κ -カゼイン, β -ラクトグロブリンおよび両者の混合物の加熱および未加熱試料は, 4.6 M 尿素を含む標準緩衝液での溶出によって, それぞれ異なった溶出パターンを示した (Fig. 3). さらに, κ -カゼインと β -ラクトグロブリンとの混合物を加熱処理し, 冷却した後, 新たに κ -カゼインまたは β -ラクトグロブリンを添加し, 同じく尿素を含む標準緩衝液で溶出したときのゲル濾過パターンが Fig. 4 に示されている. Fig. 4 において, 後のピークから回収された κ -カゼインおよび β -ラクトグロブリン量は, 加熱処理後添加されたそれぞれのたん白質量にはほぼ等しかった. 以上の結果から, κ -カゼインと β -ラクトグロブリンの混合物を標準緩衝液中 90°C 10 分間加熱することによって複合体が形成されることが示され, さらに, 複合体形成の確認および複合体の調製には, 4.6 M 尿素を含む標準緩衝液を用いて, セファクリル S-300 ゲル濾過を行なうことが有効であることが明らかにされた.

また, メルカプトエタノール存在下での加熱処理では, 複合体は形成されなかったし, 標準緩衝液中加熱処理によって形成された複合体への SDS 添加および透析処理は, ゲル濾過パターンをなんら変化させなかった. さらに, κ -カゼインまたは β -ラクトグロブリンのいずれか

Fig. 4. Sephacryl S-300 gel filtration profiles of complex between κ -casein and β -lactoglobulin and mixture of complex and κ -casein or β -lactoglobulin.

A : complex, B : complex + κ -casein, C : complex + β -lactoglobulin.

Complex was prepared as described in Fig. 1. 2 mg of κ -casein or β -lactoglobulin was added to the complex. Elution was carried out with the standard buffer containing 4.6 M urea.

を還元カルボキシメチル化したときも, 複合体形成は認められなかった.

2. 複合体形成への κ -カゼイン糖鎖の影響

メルカプトエタノール存在下での加熱処理によっては複合体形成が認められず, メルカプトエタノール存在下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって, 複合体が解離すること, さらには, システイン残基のカルボキシメチル化によっても複合体が形成されなかったことは, 複合体形成に $-SH \rightleftharpoons -S-S-$ 交換反応が関与していることを示唆するものであり, 同様な結果が, Sawyer ら²⁵⁾や, Purkayastha ら²⁶⁾によっても報告されている.

しかしながら, 加熱時の溶液によって複合体形成の度合が異なるという結果¹⁴⁾や, スルフィドリル基以外の結合が複合体形成に関与していることを示唆する結果²⁷⁾があり, Wilson, Wheelock は, 加熱前にカルシウムを添加すると生乳からのと同程度の凝集性が得られることを

Fig. 5. Sephacryl S-300 gel filtration profiles of mixtures between κ -casein components and β -lactoglobulin heated at 70°C for 20 min.

A: P-2 + β -lactoglobulin, B: P-4 + β -lactoglobulin, C: P-6 + β -lactoglobulin.

Each 1 mg of κ -casein component (P-2, P-4 or P-6) and β -lactoglobulin was dissolved in 1 ml of the standard buffer. κ -Casein component P-2 is carbohydrate-free, and P-6 contains much more carbohydrate.¹⁹⁾ The solution was heated at 70°C for 20 min and urea was added.

報告しており²⁰⁾, さらに, Dziuba は, 相互作用にはチロシンやアルギニン残基が重要な役割を果たしていると報告している²¹⁾。したがって, κ -カゼイン- β -ラクトグロブリン複合体の形成には, -SH $\rightleftharpoons$ -S-S- 交換反応以外に, さまざまな結合や因子が関与しているものと考えられる。

そこで本研究では, 糖鎖部分のみを異にする κ -カゼイン画分を用いて, β -ラクトグロブリンとの複合体形成を検討することにした。Long らは, 加熱温度 68°C 以上で複合体が形成されることを示唆している³⁰⁾。そこで, κ -カゼインと β -ラクトグロブリンとの複合体形成における糖鎖の影響を検討するため, 加熱条件を標準緩衝液中 70°C 20 分間とした。この加熱条件では, β -ラクトグロブリン単独加熱でも沈殿は生じなかった。加熱試料

のゲル濾過パターンが, Fig. 5 に示されている。 κ -カゼイン画分 P-2 は糖を含まず, P-4, P-6 の順に多くの糖を含んでいる¹⁹⁾。複合体によるピークは, 糖含量の大きい κ -カゼイン画分を用いたときのほうが大きく, 複合体を形成していない κ -カゼイン画分および β -ラクトグロブリンによるピークは, 糖含量の少ない κ -カゼイン画分を用いたときのほうが大きかった。このことは, 糖含量の大きい κ -カゼイン画分ほど β -ラクトグロブリンと複合体を形成しやすいことを意味しており, 複合体形成において糖鎖がなんらかの関与をしていることを示している。 κ -カゼインと β -ラクトグロブリンとの複合体形成において, κ -カゼインの糖鎖がどのような役割を果たしているかは, 今後の興味ある研究対象となるであろう。

また, ここでの結果は, ロングライフミルクのゲル化機構の解明や乳清たん白質の利用に向けて, 糖含量の大きい κ -カゼイン画分を利用することの有用性を示唆するものである。糖含量の大きい κ -カゼインを調製するためには, 現在まったく未利用である初乳を用いることが適当である³¹⁾。

要 約

κ -カゼインは, 70 mM KCl を含む 10 mM イミダゾール塩酸緩衝液 pH 7.1 中, 90°C 10 分間 β -ラクトグロブリンと加熱することによって複合体を形成することができる。複合体の形成は, 4.6 M 尿素を含む上記緩衝液を用いてのセファクリル S-300 ゲル濾過と SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって確認された。 κ -カゼイン中 糖鎖の複合体形成への影響が, 70°C での加熱によって検討された結果, 糖含量大の κ -カゼイン画分ほど, 複合体形成能の大きいことが示された。この知見は, κ -カゼイン糖鎖の機能やロングライフミルクのゲル化機構の解明, さらに, 乳清たん白質の利用に役立つであろう。

本研究の一部は, 文部省科学研究費補助金 (試験研究 56860032) によった。ここに記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Thompson, M.P. and Kiddy, C.A.: *J. Dairy Sci.*, 47, 626 (1964)
- 2) Mackinlay, A.G. and Wake, R.G.: *Milk Proteins II* (McKenzie, H.A., ed.) 175 (1971), Academic Press (New York)
- 3) Evans, M.T.A. and Gordon, J.F.: *Applied Protein Chemistry* (Grant, R.A., ed.), 31 (1980), Applied Science Publishers (Essex)
- 4) Kannan, A. and Jenness, R.: *J. Dairy Sci.*, 44, 808 (1961)
- 5) Morr, C.V. and Josephson, R.V.: *J. Dairy Sci.*, 51, 1349 (1968)

- 6) Tobias, J., Whitney, R.McL. and Tracy, P.H. : *J. Dairy Sci.*, **35**, 1036 (1952)
- 7) Slatter, W.L. and Van Winkle, Q. : *J. Dairy Sci.*, **35**, 1083 (1952)
- 8) McGugan, W.A., Zehren, V.F., Zehren, V.L. and Swanson, A.M. : *Science*, **120**, 435 (1954)
- 9) Della Monica, E.C., Custer, J.H. and Zittle, C.A. : *J. Dairy Sci.*, **41**, 465 (1958)
- 10) Sawyer, W.H., Coulter, S.T. and Jeness, R. : *J. Dairy Sci.*, **46**, 564 (1963)
- 11) Hartman, G.H., Jr. and Swanson, A.M. : *J. Dairy Sci.*, **48**, 1161 (1965)
- 12) Grindrod, J. and Nickerson, T.A. : *J. Dairy Sci.*, **50**, 142 (1967)
- 13) Fish, N.L. and Mickelsen, R. : *J. Dairy Sci.*, **50**, 1360 (1967)
- 14) El-Negoumy, A.M. : *J. Dairy Sci.*, **57**, 1302 (1974)
- 15) Sawyer, W.H. : *J. Dairy Sci.*, **52**, 1347 (1967)
- 16) McKenzie, H.A. : Milk Proteins II (McKenzie, H.A., ed.), 257 (1971), Academic Press (New York)
- 17) Zittle, C.A., Thompson, M.P., Custer, J.H. and Cerbulis, J. : *J. Dairy Sci.*, **45**, 807 (1962)
- 18) Zittle, C.A. and Custer, J.H. : *J. Dairy Sci.*, **46**, 1183 (1963)
- 19) Doi, H., Ibuki, F. and Kanamori, M. : *J. Dairy Sci.*, **62**, 195 (1979)
- 20) Weber, K. and Osborn, M. : *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
- 21) Crestfield, A.M., Moore, S. and Stein, W.H. : *J. Biol. Chem.*, **238**, 622 (1963)
- 22) 山内邦男 : 牛乳の化学 (津郷友吉, 山内邦男共著), 7, (1975), 地球社 (東京)
- 23) Swaisgood, H.E. and Brunner, J.R. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 148 (1963)
- 24) Morr, C.V. : *J. Dairy Sci.*, **50**, 1752 (1967)
- 25) Sawyer, W.H., Coulter, S.T. and Jenness, R. : *J. Dairy Sci.*, **46**, 564 (1963)
- 26) Purkayastha, R., Tessier, H. and Rose, D. : *J. Dairy Sci.*, **50**, 764 (1967)
- 27) Sedmerova, V., Helesicova, H. and Sicho, V. : *Milchwissenschaft*, **27**, 481 (1972)
- 28) Wilson, G.A. and Wheelock, J.V. : *J. Dairy Res.*, **39**, 413 (1972)
- 29) Dziuba, J. : *Acta Aliment. Pol.*, **5**, 97 (1979)
- 30) Long, J.E., Van Winkle, Q. and Gould, J.A. : *J. Dairy Sci.*, **46**, 1329 (1963)
- 31) Doi, H., Park, B., Ibuki, F. and Kanamori, M. : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 813 (1980)

(昭和56年7月25日受理)