あり, また安価な試薬のみで収量よく分離することができ, 得られるアラニンの純度も高いので, 天然物からの L-アラニンの分離法としては最もすぐれた方法と思われる。

要 約

- (1) 種属を異にする 10 種類の家蚕及び野蚕フィブロインの構成アミノ酸量を明らかにした。
- (2) 絹フィブロインは構成アミノ酸の含量の特徴から家蚕系, アナフェ蚕系, ヤママユガ系の 3 系統に分類することができ, ヤママユガ系フィブロインはさらにエリ蚕群, 柞蚕群, 樟蚕群の 3 群に分類することができる。
- (3) ヤママユガ系フィブロインの主要構造は, その 3N 塩酸不溶部分がほとんど L-アラニンから形成されていることから, 本質的にはポリ-L-アラニンに近い構造をとることが実証された。
- (4) ヤママユガ系フィブロインの 3N 塩酸不溶部分の特性を利用した L-アラニンの新分離方法が見出された。

本研究に対し御指導を賜った東京大学坂口謹一郎名誉教授, 有馬啓教授, 田村学造助教授の諸先生に厚く謝意を表す。また有益な御助言, 試料の蒐集に助力を賜った當場横山忠雄場長, 清水正徳部長, 実験に終始助力された橋本嘉男, 斎藤美枝子氏に対し感謝の意を表す。

(1) E. Abderhalden et al.: <i>Z. physiol. Chem.</i> , 58 , 337 (1909); 61 , 256 (1909); 62 , 131 (1909); 64 , 462 (1910); 80 , 198 (1912).	(9) O. Kratky, S. Kuriyama: <i>Z. physik. Chem.</i> , B 11 , 363 (1931).
(2) 井上柳梧, 岩岡末彦, 平沢 勝: 東化, 41 , 876 (1920).	(10) C. Trogus, K. Hess: <i>Biochem. Z.</i> , 260 , 376 (1933).
(3) J. Roche et al.: <i>Compt. rend. soc. biol.</i> , 144 , 100 (1950).	(11) 清水正徳: X 線繊維構造論 (呉祐吉編), 工学出版, p. 102 (1944).
(4) E. P. Tsintsevich, M. M. Botvinick: <i>J. Applied Chem. U. S. S. R.</i> , 23 , 750 (1950).	(12) J. O. Warwicker: <i>Trans. Faraday Soc.</i> , 52 , 554 (1956).
(5) W. A. Schroeder, L. M. Kay: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77 , 3901 (1955).	(13) C. H. Bamford et al.: <i>Nature</i> , 173 , 27 (1954).
(6) F. Lucas et al.: <i>Shirley Institute Memoirs</i> , 28 , 77 (1955).	(14) L. M. Kay et al.: <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> , 78 , 2430 (1956).
(7) 桐村二郎, 鈴木直雄: 本誌, 36 , 265 (1962).	(15) F. Lucas et al.: <i>Biochem. J.</i> , 66 , 468 (1957).
(8) M. S. Dunn et al.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 151 , 241 (1943).	

〔農化 第 36 卷, 第 4 号, p. 340~345, 1962〕

カゼイン複化合物の沈降性と α -, β -カゼイン比との関係

山内邦男, 津郷友吉 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 36 年 9 月 5 日 受 理

牛乳中においてはカゼインは複化合物を形成し, その大部分は直径 40~200 $m\mu$ にわたる球状粒子として存在する⁽¹⁾。したがって牛乳中のカゼインの大部分は超遠心分離により沈降するが, その数パーセントは可溶性 (soluble) カゼインとして存在し, 長時間の超遠心分離によっても沈降しない^(2,3)。粒子の大きさによって α -, β -カゼイン比がどのように相違するかについては超遠心分離法によりすでいくつかの研究が行われている。Hostettler ら⁽⁴⁾によれば粒子の大きさによって α -, β -カゼイン比 (α : β 比と略記する) は変化しないといわれるが, Heyndrickx⁽⁵⁾, Horst⁽⁶⁾ によれば変化すると報告されている。Heckman ら⁽⁷⁾は Heyndrickx の結果は,

* On the Relation between Sedimentability and α - to β - Casein Ratio of Casein Complex in Milk.
By Kunio YAMAUCHI and Tomokichi TSUGO (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

上澄液全体について電気泳動分析した結果, 共存する乳清蛋白質の影響が現れてそのような結果を導いたとした。最近 Annibaldi⁽⁹⁾ は超遠心分離した沈殿のカゼインを上層の比較的透明な沈殿部と下層の白濁した沈殿部とに分けて上層の沈殿部では $\alpha : \beta$ 比が下層の沈殿部より僅かながら大であるとのべている。Heckman ら⁽⁹⁾ は $\alpha : \beta$ 比は大差なくとも沈降図特にカルシウムイオン存在下における沈降性は, 牛乳中に存在した最初の粒子の大きさによって相違することを認めている。さらに最近では小さい粒子ほど κ -カゼイン含量が大であることが推定されている^(10, 11)。

著者らは脱脂乳中のカゼイン複化合物をその大きさに従って分割し, 電気泳動的に分析することによって, 粒子の大きさと $\alpha : \beta$ 比の関係をしらべ, 同様の実験を加熱脱脂乳についても行い, 加熱の影響を検討した。また超遠心分離によっても沈降しにくいカゼイン fraction の組成が, 冷却によってどのような影響をうけるかをしらべ, 低温においては β -カゼインが可溶化 (solubilize) しやすいことを確認した。

I. 実験方法

1. 実験材料 新鮮な未殺菌混合脱脂乳を使用した。加熱脱脂乳としては, 未殺菌脱脂乳を 500 ml 容三角フラスコに入れ, よく攪拌しながら 85° , 30 分加熱したものを用いた。

2. カゼインの調製 カゼインは Spinco L 型超遠心器 (Rotar No. 30 を使用) を用いて第1図の如く粒子の大きさに従って分割した (超遠心器による処理条件の異なる場合もこれに準ずる)。沈殿 I ~ III は水に懸濁せしめ稀酢酸で pH 4.6 としてカゼインを沈殿させ, よく水洗した後これを稀 NaOH に溶解して pH 7.0 とし実験に供した。場合によっては (第1表 A, 第2表 a) 等電沈殿カゼインをアルコール及びエーテルで洗滌し, 一旦乾燥貯蔵したものを溶解して分析した。なお第2表における実験ではカゼインを 60 分間超遠心して沈殿する fraction (第1図 fraction I ~ III の合計に相当) と沈殿しない fraction (第1図 fraction IV に相当) とに分けたが, 沈殿及び上澄液からのカゼイン fraction の調製は第1図と全く同じである。

第1図 超遠心分離によるカゼイン fraction の分別

3. 電気泳動分析 カゼインは約 1% の溶液とし pH 7.0 の磷酸緩衝液 (イオン強度 0.1) に対し約 4° で 2 昼夜透析した後電気泳動を行った。ただし第1表 IV 及び第2表 NS の fraction はかなり混濁しており, 透析後少量の沈殿が生成するので, 透析後 2,000 r. p. m. 遠心分離してその上澄液を用いた。しかしこの操作により失われる窒素は fraction IV (または NS) の 2% 以下であった。電気泳動は日立 A 型ゼリウス装置 (マクロセル使用) により水槽温度 $4^{\circ} \sim 6^{\circ}$ で 12 mA の電流を通じ行い, 70 分泳動後の図形を撮影した。 $\alpha : \beta$ 比は泳動図を引延して厚紙上にトレースし, 各成分に相当する峰の面積を重量法で求め算出した。

窒素, 磷の分析は前報⁽¹²⁾と同様である。

II. 実験結果及び考察

1. 粒子の大きさと $\alpha : \beta$ 比の関係及び加熱の影響 第1図に従って分割した各 fraction の電気泳動図を第2図及び第3図に示した。また各 fraction の全カゼインに対する百分率, その磷 : 窒素比及び第2図, 第3図より求めた $\alpha : \beta$ 比を第1表中 B に示した。第1表には別の脱脂乳で行った一連の実験も併記した (A)。

第1表によると I ~ III の fraction については未加熱乳及び加熱乳ともに $\alpha : \beta$ 比に著しい変化は認められな

第2図 各 fraction の電気泳動図
(未加熱脱脂乳より調製)

1. Fraction I
2. Fraction II
3. Fraction III
4. Fraction IV

(第1図参照)

pH 7.0, イオン強度 0.1, 磷酸緩衝液, 蛋白濃度約 1%, 泳動温度 4~6°

第3図 各 fraction の電気泳動図
(加熱脱脂乳より調製)

1. Fraction I
2. Fraction II
3. Fraction III
4. Fraction IV

(第1図参照)

電気泳動条件第2図に同じ。

第1表 分別カゼイン fraction のカゼイン成分組成

脱脂乳	Fraction名	超遠心 条件	全カゼイン中の fraction 割合 (%)	カゼイン 有機 磷 (P/N)	カゼイン成分比 (%)						
					上昇			下降			
					α	$\times$	β	α	$\times$	β	
A*未加熱	25,000 r. p. m.										
		約 25°									
	I	0~1 分	12.7		66		34	80		20	
	II	1~8 分	46.9		72		28	79		21	
	III	8~60 分	36.6		73		27	84		16	
	IV	60 分上澄液中カゼイン	3.8		63	12	25	74	9	17	
B*	20,000 r. p. m.										
		約 19°									
	未加熱	I	0~5 分	23.8	0.060	63		37	82		18
		II	5~20 分	26.2	0.054	66		34	82		18
		III	20~60 分	37.2	0.055	67		33	84		16
		IV	60 分上澄液中カゼイン	12.8	0.048	61	14	25	75	7	18
	加熱	I	0~5 分	24.9	0.054	64		36	82		18
		II	5~20 分	25.8	0.059	68		32	84		16
		III	20~60分	33.7	0.048	71		29	85		15
		IV	60分上澄液中カゼイン	15.6	0.036	78	10	12	83	6	11

* Aの試料は電気泳動分析の前に一旦乾燥貯蔵してある。Bの試料は乾燥貯蔵せずに直ちに分析した。A, Bは異なる脱脂乳。

い。ただ I, II, III となるにつれて僅かながら $\alpha:\beta$ 比が大になることが認められた。これは沈殿を上層透明部と下層乳濁部に分けて分析した前述の Annibaldi の結果⁽⁸⁾と同様の傾向である。IV の fraction においては α -, β -カゼイン間に I~III の fraction にみられない成分 X (第2図4)が存在した。これを除外して考えればIVの $\alpha:\beta$ 比は I~III と著しい相違はない。この成分についてはなお検討してみたいと考えているが、著者らの用いた4つの脱脂乳試料のいずれにも認められたので、おそらく牛乳の常成分と考えられる*。McKenzie ら⁽¹³⁾はカゼインの濾紙電気泳動により α -, β -カゼイン間に未同定の成分を検出している。また Kenyon ら⁽¹⁴⁾は脂肪球の

* 乾燥貯蔵した試料 (第1表 A IV, 第2表 a.1, 1') ではこの成分の分離が悪い。

凝集に關与する蛋白成分として α -, β -カゼインの中間の易動度を有する蛋白質を分離している。成分 X はこれに相当するものかもしれない。なお fraction IV はかなり混濁しているので泳動図には明暗が現れる。しかしこの明暗は常に成分 X の峰を境にして現れることが観察されたので*、この成分 X が混濁の原因になっていると推定される。カゼインの P : N 比も粒子の大きさによって大差ない。これは Ford らの結果⁽¹⁵⁾に一致する。ただし fraction IV ではやや低い値となる。

加熱乳の場合も未加熱乳と同様沈降しにくい fraction ほど α : β 比はやや増加している。しかし第 3 図を第 2 図と比較すると加熱乳の α -カゼイン峰はやや不均一となる。すなわち上昇の α -峰には肩が生じ、下降の α -峰は非対称的となる。これは変性乳清蛋白質の共存を示すものである⁽¹⁶⁾。従ってこのことは変性乳清蛋白質の少くとも一部は超遠心分離の際カゼインとともに沈降するという説^(17,18)をうらづけるものである。加熱乳の場合は fraction IV の α : β 比がかなり増加する。燐含量の高い α -カゼインの割合が高いにかかわらず fraction IV の P : N 比はかなり減少する。これはおそらく超遠心によっても沈降しなかった変性乳清蛋白質が等電沈殿の際カゼインに含まれたためと考えられる。

2. 非沈降性カゼイン fraction の α : β 比に及ぼす低温の影響 未加熱及び加熱脱脂乳について 20,000 r. p. m. (または 25,000 r. p. m.) で超遠心したときのカゼインの沈降量及びこの際上澄液にカゼイン (ここではこれを非沈降性カゼインとよぶ。表中 NS と略記) の α : β 比に及ぼす冷却の影響をしらべた。この際冷却後 1 昼夜放置した場合についても同時に分析した。低温で超遠心分離するときは脱脂乳及びローターをあらかじめ冷却しておき低温で試料を充填した。結果は第 2 表に示す通りである。

第 2 表 非沈降性カゼイン fraction のカゼイン成分組成に及ぼす冷却の影響

脱脂乳	超遠心条件	試料 No.	Fraction 名*	全カゼイン中の fraction 割合 (%)	カゼイン成分比 (%)					
					上 昇			下 降		
					α	$\times$	β	α	$\times$	β
a ** 未加熱	25,000 r. p. m.									
	室温 (25~27°) 分離	1	NS	3.7	69	9	22	77	10	13
	同 上	1'	S	96.3	69		31	81		19
	約 4°, 20 時間放置後低温 (4~7°) で分離	2	NS	11.0	46	9	45	57	5	38
b **	同 上	2'	S	89.0	70		30	82		18
	20,000 r. p. m.									
	室温 (18~20°) 分離	3	NS	5.9	60	12	28	75	7	18
	約 4° に冷却後直ちに低温 (4~7°) で分離	4	NS	14.5	50	12	38	62	7	31
	約 4°, 18 時間放置後低温 (4~7°) で分離	5	NS	17.4	48	11	41	61	6	33
	3 に 同 じ	6	NS	7.6	77	11	12	83	8	9
	4 に 同 じ	7	NS	15.4	66	9	25	72	6	22
	5 に 同 じ	8	NS	16.6	55	10	35	66	6	28
	加熱									

* S は 60 分超遠心分離で沈降するカゼイン fraction (沈降性カゼイン fraction), NS は沈降しないカゼイン fraction (非沈降性カゼイン fraction)

** a の試料は電気泳動分析の前に一旦乾燥貯蔵してある。b の試料は乾燥貯蔵せずに直ちに分析した。a, b は異なる脱脂乳。

第 2 表から明らかな通り、低温ではカゼインが沈降しにくくなるが、その一部は β -カゼインの可溶化によることがしられる。この可溶性となる β -カゼインの量は全体のカゼイン量からみるときは僅かであるので沈殿 (沈降性カゼインとよぶ。表中 S と略記) の α : β 比にはほとんど反映されない (第 2 表中試料 1' 及び 2')。さらに第 2 表中試料 4, 5 にみられる通り、低温で放置するときは、未放置の場合に比して β -カゼインがよりいっそう可溶性になることが認められる。この傾向は加熱乳の場合^(6~8)にいっそう顕著である。加熱脱脂乳の非沈降性カゼイン fraction 中の α : β 比は未加熱脱脂乳のそれより大である。この関係は低温で 1 昼夜放置後も変りない。これは前述の通り、変性乳清蛋白質特に変性 β -ラクトグロブリンが加熱脱脂乳の非沈降性カゼイン fraction における見掛けの α -カゼイン峰に混在するためと考えられる。

冷却による非沈降性カゼインの増加の一部は β -カゼインの可溶化によることは明らかであるが、そのすべてを β -カゼインの可溶化で説明することはできない。たとえば第 2 表試料 4 と 3 の沈降量の差 $14.5 - 5.9 = 8.6\%$ のすべてが β -カゼインの可溶化によるとすれば、試料 4 の非沈降性カゼイン fraction 中の β -カゼインの割合

* 加熱乳の場合は α -カゼイン峰も暗くなる。変性乳清蛋白質の混在によると思われる。

は上昇で $\{(5.9 \times 0.28 + 8.6) / 14.5\} \times 100 = 77\%$ となるはずである。これは実際の実験値 38% をいちじるしく上回るものである。低温においては溶媒の粘度及び比重が増加するので、 β -カゼイン以外のカゼイン成分も沈降しにくくなるのは当然と思われる。さらに β -カゼイン以外のカゼイン成分も、多少はミセル状から非ミセル状に移行するものかもしれない。

従来カルシウムイオンを含まないカゼイン溶液では冷却により、すべての β -カゼインが polymer の状態から monomer の状態に移行することが、沈降分析により確かめられている^(8,19)。低温における β -カゼインの可溶化はこのような β -カゼインの性質によるものと思われる。Sullivan ら⁽¹⁸⁾は低温では牛乳中の β -カゼインが一部可溶性になることを示唆しているが、その直接的証明は与えられていない。本報の結果はこの点を確認するものである。しかして牛乳中においては冷却による β -カゼインの可溶化は部分的に起るにすぎないので、大部分の β -カゼインは低温において沈降することは前述の通りである。これはおそらくカルシウム及び磷酸カルシウムの存在が、他のカゼイン成分とともに大部分の β -カゼインを低温においてもミセル中に保持し、その monomer への解離を抑制しているためと思われる。

3. 沈降性カゼイン fraction のレンネットによる変化及び加熱の影響 加熱脱脂乳から沈降するカゼインは、未加熱脱脂乳から沈降するカゼインと前述のように泳動図が多少相違するが、この差はレンネットを作用さ

第 4 図 沈降性カゼイン fraction のレンネットによる変化

1. 未加熱脱脂乳沈降性カゼイン fraction (レンネット未処理)
2. 加熱脱脂乳沈降性カゼイン fraction (レンネット未処理)
3. 1 にレンネット処理を行ったもの。
4. 2 にレンネット処理を行ったもの。

電気泳動条件第 2 図に同じ。

図を観察することはできなかった。従って非沈降性カゼイン fraction についての比較結果は得られなかった。

第 4 図未加熱の場合 (3) ではレンネット作用後も α -カゼイン峰の開裂が認められなかった。これは全カゼインに比して沈降性カゼイン中には κ -カゼインが少ないためかもしれない。カゼインから κ -カゼインを除くとレンネットによる α -峰の開裂が認められなくなることが知られている⁽²⁰⁾。第 4 図によるとレンネットにより β -カゼイン峰が変化している。これはレンネット作用を止めなかったので透析中もその作用が続行したことによると思われる。レンネットが長時間作用すると β -カゼインが電気泳動的に変化することが知られている⁽²¹⁾。いずれにしろ上述の結果は加熱した脱脂乳より沈降するカゼインには変性乳清蛋白質が含まれることをうらづけるもので、さらに牛乳を加熱した時のレンネットカードの性質の変化には蛋白質自体の物理化学的性質の変化も関与していることを示唆するものである。変性乳清蛋白質がカゼインとともに沈降するのは、カゼインとの相互作用によって会合した結果によるものと思われる。最近カゼインと変性乳清蛋白質との相互作用が加熱による牛乳のレンネット凝固性の変化の要因となりうるということが指摘されている⁽²²⁾。

要 約

脱脂乳中のカゼイン複合物をその沈降性に従って超遠心分離し各 fraction の α -、 β -カゼイン比 ($\alpha : \beta$ 比)

を電気泳動法により比較した。

沈降しにくい fraction ほどわずかながら α : β 比が増加した。この傾向は加熱乳 (85°, 30 分加熱) でも同様であったが、加熱乳から分離した各 fraction は α -カゼイン峰が非対称的な形を示す点で未加熱乳と相違した。これは変性乳清蛋白質がカゼインとともに沈降したためと考えられる。さらに未加熱乳及び加熱乳から沈降するカゼイン間の差異がレンネット処理によっていっそう顕著になることが示された。すなわち加熱乳より沈降するカゼインは α -カゼイン峰において明瞭な開裂を示すが、未加熱乳より沈降するカゼインではこのようなことはない。

60 分の超遠心によって沈降しにくいカゼイン fraction 中には、 α -, β -カゼインの他にその中間の易動度をする成分が認められた。沈降しにくいカゼイン fraction に認められる混濁はこの成分に起因することが推定された。

低温で超遠心分離すると非沈降性カゼイン fraction 中の α : β 比が減少する。これは低温における β -カゼインの可溶化によるものと考えられる。この可溶化は低温で 1 昼夜放置中にさらに進行する。この傾向は加熱乳中においていっそう顕著であった。

本研究は文部省科学研究費によることを附記する。

なお本論文投稿後、一部分同様な結論に達した次の研究報告の発表されたことを知ったから、ここに附記する。

H. U. Bohren, V. R. Wenner: *J. Dairy Sci.*, **44**, 1213(1961).

(1) H. Nitschmann: <i>Helv. Chim. Acta</i> , 32 , 1258 (1949).	<i>Res.</i> , 27 , 403(1960).
(2) T. F. Ford, G. A. Ramsdell, S. G. Landsman: <i>J. Dairy Sci.</i> , 38 , 843(1955).	(12) 津郷友吉, 山内邦男, 吉川純夫: 日畜会報, 33 (1962) 掲載の予定.
(3) P. H. von Hippel, D. F. Waugh: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77 , 4311(1955).	(13) H. A. McKenzie, R. G. Wake: <i>Aust. J. Chem.</i> , 12 , 712(1960).
(4) H. Hostettler, E. Rychener, L. Künzle: <i>Landw. Jahrb. Schweiz</i> , 62 , 31(1949); <i>Chem. Abst.</i> , 43 , 7598(1949).	(14) A. Kenyon, R. Jenness: <i>J. Dairy Sci.</i> , 41 , 716(1958).
(5) G. A. Heyndrickx, A. De Vleeschauwer: <i>Experientia</i> , 8 , 317(1952).	(15) T. F. Ford, J. Martinez-Mateo: <i>ibid.</i> , 41 , 1286(1958).
(6) M. G. Horst: <i>Neth. Milk Dairy J.</i> , 4 , 246(1950).	(16) 山内邦男, 津郷友吉: 日畜会報, 32 , 311(1961).
(7) F. A. Heckman, W. L. Choate, T. F. Ford: <i>J. Dairy Sci.</i> , 41 , 715(1958).	(17) L. F. Edmondson: <i>J. Dairy Sci.</i> , 41 , 553(1958).
(8) S. Annibaldi: <i>Lait</i> , 40 , 593(1960).	(18) R. A. Sullivan, R. A. Hollis, E. K. Stanton: <i>ibid.</i> , 40 , 830(1957).
(9) W. L. Choate, F. A. Heckman, T. F. Ford: <i>J. Dairy Sci.</i> , 42 , 761(1959).	(19) R. A. Sullivan et al.: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 55 , 455(1955).
(10) R. A. Sullivan, M. M. Fitzpatrick, E. K. Stanton: <i>Nature</i> , 183 , 616(1959).	(20) T. A. L. Payens: <i>Nature</i> , 181 , 114(1958).
(11) T. C. A. McGann, G. T. Ryne: <i>J. Dairy</i>	(21) J. Cerbulis, J. H. Custer, C. A. Zittle: <i>J. Dairy Sci.</i> , 43 , 1725(1960).
	(22) A. Kannan, R. Jenness: <i>ibid.</i> , 44 , 808(1961).