[農化 第 37 卷, 第 12 号, p.729~734, 1963]

人乳蛋白質に関する研究 (第 7 報)*

赤色蛋白質の分離ならびにその性状について

前野 正久, 清 沢 功 (森永乳業株式会社中央研究所)

昭和 38 年 6 月 13 日 受 理

緒 言

牛乳の赤色蛋白質の存在は, 1939 年 Sörensen & Sörensen⁽¹⁾ が認めているが, 完全に純粋な状態で分離することができなかった。その後 Theorell & Åkeson⁽²⁾ および Morton⁽³⁾ は牛乳中の酵素の調製の際, この蛋白質の存在を確認した。さらに Polis & Shmukler⁽⁴⁾ は電気泳動的にほとんど均一な赤色蛋白質を調製し, 紫外吸収等の性質について観察した。最近, Groves⁽⁵⁾ は牛乳の酸カゼインより粗赤色蛋白質を抽出し, DEAE (diethylamino ethyl) セルロースによるカラムクロマトグラフィーにより電気泳動, 超遠心的に均一な蛋白質を調製することに成功した。

一方, 人乳では Schäfer⁽⁶⁾ が人乳に鉄を添加すると赤色を帯びることを示し, 鉄と蛋白質が複合体を形成するためであることを指摘した。ついで Johansson⁽⁷⁾ は人乳のアルブミン部分を燐酸カルシウムクロマトグラフィーにより分離した結果, 赤色蛋白質の存在することを認め, その後 Johansson⁽⁸⁾ および Montreuil et al.⁽⁹⁾ は電気泳動的, 超遠心的に均一な蛋白質を分離し, その性状について観察した。

本報では, 人乳乳清蛋白質を硫酸アンモニウムにより分画, DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによって純粋な赤色蛋白質を分離し, その物理化学的性状について観察するとともに, 既報の結果と比較, 検討したので報告する。

実 験 の 部

材料: 人乳は分娩後 10 日以上を経過した婦人より採取し, 直ちに凍結 ($-10^{\circ}\sim-15^{\circ}$) 保存した混合乳を用いた。使用に際して 30° において融解し, クリーム分離機 (Alpha Laval 製) によって脱脂した後, 蛋白質の調製に使用した。

硫酸アンモニウムによる分画: 脱脂乳 6.9 l は 1 N 塩酸により pH 4.7 に調節し, 1 昼夜冷蔵庫に保存した。ついで室温において再び 1 N 塩酸を添加して pH を調節した後, 20,000 r. p. m., 20 分間遠心分離 (Spinco L 型超遠心機, Rotor No. 30) してカゼインを沈殿した。透明な上澄液 (以下において乳清と記す) は, 注射器を用いて静かに採取した。乳清は 1 N 水酸化アンモニウムによって pH 7.0 に調節し, 0.5 飽和となるまで硫酸アンモニウムを添加し, 室温において 1 時間放置した。生じた沈殿物 (グロブリン画分) は濾別 (東洋濾紙 No. 2), 除去した。再び 1 N 塩酸を添加して pH 4.7 に調節し, 沈殿物を濾別, 除去した。濾液はさらに飽和となるまで硫酸アンモニウムを添加し, アルブミン画分を沈殿した。濾別により得た沈殿物は蒸留水約 200 ml に懸濁し, 1 昼夜冷蔵庫に放置すると, 1 部のラクトアルブミンは沈殿し, 赤色蛋白質は溶解して上澄液に移行するので, 4,000 r. p. m., 10 分間遠心分離してラクトアルブミンを沈殿, 除去した。上澄液はさらに濾過した後, 蒸留水に対して 4 日間透析を行った後 (2°), 凍結乾燥し, 粗赤色蛋白質を得た。粗赤色蛋白質の収量は 7.7 g であった。

カラムクロマトグラフィー: DEAE セルロース (Brown Company, Berlin, New Hampshire) はあらかじめ 0.5 N 塩酸, 0.5 N 水酸化ナトリウムおよび蒸留水で洗滌した後, 十分に 0.005 M 燐酸塩緩衝液 (pH 7.0) で洗滌した。セルロースは同緩衝液に懸濁し, 攪拌しつつ直径 2.5 cm のカラムに充填した後, さらに過剰の緩衝液を流出して静置した。カラムの長さ 40 cm とするのにより DEAE セルロース約 20 g を必要とした。溶出には三田村製フラクションコレクターおよび 300 ml の三角フラスコを付属する gradient 装置を用い, フラスコに

* Studies on the Proteins of Human Milk. Part VII. Isolation and its Properties of the Red Protein of Human Milk.

By Masahisa MAENO and Isao KIYOSAWA (Central Research Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

第1図 人乳乳清蛋白質のアルブミン画分の DEAE セルロースクロマトグラフィー

カラム: 2.5×40 cm, 蛋白質添加量 0.5 g, 溶出速度約 100 ml/時

(↓) は緩衝液の切換え点 (:) は溶出液の採取部分

●—● 280 mμ 吸光値 ○……○ 460 mμ 吸光値

第2図 赤色蛋白質 (第1図, A部分) のカラムクロマトグラフィー

カラム: 2.0×30 cm, 蛋白質添加量 0.1 g, その他は第1図と同様。

た。これらの図から明らかなように第1図A部分のクロマトグラフィーでは2個の主要な峰が得られ、最初に溶出された峰が赤色蛋白質であることは460 mμの吸光値から明らかである。0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 0.5 \text{ M NaCl}$ で溶出された峰は (B部分), 硫酸アンモニウムによって沈殿を生じなかった。この際の赤色蛋白質 (A部分) の収量は0.06 gであった。

第1図B部分の再クロマトグラフィーでは3個の主要な峰が現われ、2番目の峰は第2図では認められなかった。各峰のうち、460 mμに吸光値を示すのは最初の峰のみであった。従って第2の峰は赤色蛋白質と異なる蛋白質であると考えられる。A, B およびC部分の収量はそれぞれ0.02 g, <0.01 g および0.03 gであった。

化学的組成: 赤色蛋白質の化学的組成について分析した結果、第1表のとおりであった。窒素は Micro-

は常に100 mlの緩衝液が存在した。溶出速度は1時間70~100 mlとし、10 mlごと試験管に採取し、ベックマンDU型分光光度計を用いて280 mμにおける吸光値を測定して蛋白質濃度を観察した。また460 mμにおける吸光値^(b)を測定して赤色蛋白質の存在を確認した。溶出液のpHはベックマンH型pHメーターを用いて30 ml毎測定した (第2図および第3図の溶出液のpHの変化は、第1図とはほぼ同様であったので略した)。溶出に用いた緩衝液0.005 M, 0.02 M および0.05 Mの磷酸塩緩衝液 (pH 7.0), 0.05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 0.1 \text{ M NaCl}$, 0.01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 0.5 \text{ M NaCl}$ であった。

前述のとおり調製した粗赤色蛋白質0.5 gを0.005 M 磷酸塩緩衝液5 mlで溶解し、同緩衝液に対して1昼夜冷蔵庫において透析した後、カラムに吸着させて室温において溶出を開始した。

その結果、第1図のとおりであった。これにより5個の主要な峰が現われたが、460 mμの吸光値からAならびにB部分に赤色蛋白質の溶出が認められた。各溶出液は図に示した点線に従って採集し、硫酸アンモニウム飽和として蛋白質を沈殿した。沈殿物は濾別し、少量の蒸留水に溶解した後、蒸留水に対して前述のとおり透析して凍結乾燥した。各部分の収量は次のとおりであった。A 0.12 g, B 0.11 g, C <0.01 g, D 0.09 g, E 多少混濁する程度, F 0.02 g。

AおよびB部分は電気泳動および超遠心により不均一であった (第6図a) ので、再クロマトグラフィーを行なった。クロマトグラフィーには蛋白質0.1 g, 2.0×30 cmのカラムを使用した以外はすべて上述の方法と同様であった。

その結果、第2図および第3図が得られ

第 3 図 赤色蛋白質 (第 1 図 B 部分) のカラムクロマトグラフィー
第 2 図と同一条件

Kjeldahl 法, 燐は過塩素酸を蛋白分解剤とする Allen の方法⁽¹⁰⁾, 鉄は α, α' ジピリジルによる比色法⁽¹¹⁾ を用いて定量した. ヘキソースはガラクトースとマンノースの等モル溶液を標準にしてアンスロン試薬を発色剤とする Bartlett の方法⁽¹²⁾, ヘキソサミンはグルコサミンを標準物質とし, Ehrlich 試薬を用いる Svennerholm の方法⁽¹³⁾, シアル酸は標準物質として人血漿より結晶化した *n*-acetylneuraminic acid を用い, Warren の方法⁽¹⁴⁾ によりそれぞれ定量を行なった. なお, 定量に際して赤色蛋白質は五酸化燐を乾燥剤とするデシケーター中に 24 時間以上保存した.

電気泳動: 日立製 HTD-1 型電気泳動装置を用いて $1^\circ \pm 0.05^\circ$ のもとで泳動を行なった. 泳動電流 5 mA, 泳動時間 150 分とし, Miller & Golder による緩衝液⁽¹⁵⁾ を用いてイオン強度 0.1 とした. 易動度の算出は常法に従った.

赤色蛋白質の泳動図は各 pH において単一であり, pH 8.58 および pH 9.70 における易動度は -0.66 および $-1.76 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ であった. pH の相違による易動度の変化は第 4 図に示すとおりである. その結果, 赤色蛋白質の等電点は pH 6.1 であった.

また, 濾紙電気泳動実験には東洋濾紙 No. 51 A を用い, 5° のもとで泳動を行なった. 泳動後, 蛋白質は Amido black 10B を用いて染色した⁽¹⁶⁾. その結果, 第 5 図に示すとおり pH 8.5 における泳動図は単一であった.

沈降実験: 日立製 UCA-1 型超遠心機を用いて赤色蛋白質の沈降実験を行なった. 試料溶液はあらかじめ溶解した緩衝液に対して透析した後使用した. 粗赤色蛋白質のクロマトグラフィーによって得た A 部分 (第 1 図) の沈降状態を観察した結果, 遠心時間 11 分以内に沈降常数 17.8 S の成分が現われ, さらにそれ以後の遠心分離により沈降常数 13.1 S および 4.5 S の 2 つの成分を

第 1 表 人乳赤色蛋白質の化学的組成
g/蛋白質 100 g

窒素	14.92
燐	0.02
鉄	0.10
ヘキソース	2.50
ヘキソサミン	1.52
シアル酸	0.76
全炭水化物	4.78

第 4 図 赤色蛋白質の易動度 (0°C) および 460 mμ 吸光値の pH による変化

緩衝液: Miller & Golder による組成
イオン強度 0.10
蛋白質濃度: 1.0%

●—● 易動度 ○……○ 460 mμ 吸光値

第 5 図 赤色蛋白質の濾紙電気泳動図

(a) アルブミン画分 (b) 赤色蛋白質
ペロナル緩衝液 (pH 8.5, イオン強度 0.05)
泳動時間 5 時間, 泳動電流 0.3 mA/cm
泳動温度 5°

第 6 図 赤色蛋白質の沈降図

(a) 粗赤色蛋白質 (第 1 図 A 部分, 1.0 mgN/ml)
(b) 赤色蛋白質 (第 2 図 A 部分, 1.2 mgN/ml)
燐酸塩緩衝液 (pH 7.11, イオン強度 0.1)
55320 r.p.m., 14° , 41 分.

第 7 図 赤色蛋白質の吸収曲線
 燐酸塩緩衝液 (pH 7.0, イオン強度 0.1)
 — 紫外部吸収 (蛋白質濃度 0.1%)
 - - - 可視部吸収 (蛋白質濃度 1.0%)

第 8 図 赤色蛋白質のトリプシンによる
 分解状態

燐酸塩緩衝液 (pH 8.0, Sørensen & Palitzsch
 の組成)
 ●—● 分解率 ○—○ 吸光値減少率

50 ml の蒸留水に溶解) 4.0 ml を添加した。各時間後、反応液 2.0 ml に 0.44 M 三塩化酢酸 (T.C.A) 2.0 ml を添加、混和して 30 分間室温において放置した。ついで、遠心分離して (3,000 r.p.m., 15 分間) 沈殿物を除去し、上澄液中の窒素量を Micro-Kjeldahl 法で定量した。対照試験としてトリプシン溶液の代りに蒸留水を蛋白質溶液に添加して同様の実験を行なった。かようにして反応液と対照溶液の T.C.A. 可溶性窒素量の差より酵素によって遊離される窒素量を求めるとともに、460 mμ の吸光値を測定して未反応液との吸光値の差を減少率として示した結果、第 8 図のとおりであった。反応の経過に伴って T.C.A. 可溶性窒素の増加とともに 460 mμ の吸光値が減少した。なお、赤色蛋白質には 9.3% の T.C.A. 可溶性窒素が存在した。

考 察

乳汁中の赤色蛋白質は鉄および糖類を含有する蛋白質として注目されているが、血液中に存在するトランスフ

認めた。遠心時間 41 分の場合の沈降図を示すと第 6 図 (a) のごとくである。しかし、再クロマトグラフィーの結果、第 6 図 (b) に示すように完全に単一の沈降図が得られた。

pH 2 および pH 12 における沈降図は pH 7 と同様単一であったが、pH 12 における沈降常数は pH 2 および pH 7 と比較してやや低い値を示した。pH 7 の沈降図より沈降常数を求めた結果、蛋白質濃度 0.8% において 4.61 S であった。また、日立製 A 型電気泳動装置ならびに拡散セルを用いて蛋白質濃度 1.0% における赤色蛋白質の拡散常数 (燐酸塩緩衝液, pH 7.0, イオン強度 0.1) を求めた結果、 $D_{20,w}$ 4.27 であった。ピクノメーターを用いて同溶液の偏比容を測定したところ、 $V=0.723$ であった。以上の測定値から算出した赤色蛋白質の分子量は 94,000 であった。

吸収スペクトル：ベックマン DU 型分光光度計によって pH 7.0 の赤色蛋白質の可視部および紫外部の吸収スペクトルを測定した結果、第 7 図のとおりであった。なお、使用した石英セルの厚さは 10 mm であった。その結果、280 mμ および 460 mμ において極大吸収を示した。蛋白質 1.0% の赤色蛋白質の 280 mμ における吸光係数は pH 7.0 および 9.7 においてそれぞれ 11.24 および 10.82 であった。460 mμ の吸光値の pH の相違による変化を観察するために、各 pH の緩衝液 (Miller & Golder の組成, イオン強度 0.1) に濃度 1.0% となるよう赤色蛋白質を溶解し、1 時間後における吸光値を室温において測定した結果、第 4 図のとおりであった。これによると pH 2 における溶液の吸光値はきわめて低く 0.092 であった。しかし、pH 4 では pH 6, 8 および 10 よりやや低い程度であった。pH 10 における吸光値は 0.410 であった。pH 12 における吸光値には著しい変化は認められず、pH 10 と比較してやや低い値を示した。赤色蛋白質を 0.1 N 水酸化アンモニウム (pH 11.47) に上記のとおり溶解して 460 mμ における吸光値を測定した結果 0.439 であり、24 時間後における吸光値は約 5% の増加が認められた。

酵素作用：赤色蛋白質の酵素に対する作用について検討するため、次の実験を行なった。

赤色蛋白質は緩衝液 (Sørensen & Palitzsch の組成⁽¹⁷⁾, pH 8.0) に溶解し、蛋白質濃度 1.0% とする。蛋白質溶液 14.0 ml を 35° に加温後、トリプシン溶液 (NBC 製トリプシン 200 mg を 50 ml の蒸留水に溶解) 4.0 ml を添加した。各時間後、反応液 2.0 ml に 0.44 M 三塩化酢酸 (T.C.A) 2.0 ml を添加、混和して 30 分間室温において放置した。ついで、遠心分離して (3,000 r.p.m., 15 分間) 沈殿物を除去し、上澄液中の窒素量を Micro-Kjeldahl 法で定量した。対照試験としてトリプシン溶液の代りに蒸留水を蛋白質溶液に添加して同様の実験を行なった。かようにして反応液と対照溶液の T.C.A. 可溶性窒素量の差より酵素によって遊離される窒素量を求めるとともに、460 mμ の吸光値を測定して未反応液との吸光値の差を減少率として示した結果、第 8 図のとおりであった。反応の経過に伴って T.C.A. 可溶性窒素の増加とともに 460 mμ の吸光値が減少した。なお、赤色蛋白質には 9.3% の T.C.A. 可溶性窒素が存在した。

ェリンと同一蛋白質ではないことは、免疫電気泳動により確認されている⁽⁸⁾。最近 Derechin & Johnson⁽¹⁸⁾ は DEAE セルロースを用いて、牛乳乳清蛋白質のアルブミン画分のクロマトグラフィーを行なったところ、鮭肉色を呈する 2 部分が得られた。これら 2 つの部分の蛋白質は免疫的に異なり、1 部分は Groves⁽⁶⁾ が分離した赤色蛋白質であり、他の部分は血液中に存在するトランスフェリンであると述べている。

本実験でもアルブミン画分のクロマトグラフィーにより赤色を呈する 2 部分 (第 1 図 A および B 部分) が得られたが、再度のクロマトグラフィーにより赤色蛋白質の溶出の位置は第 1 図 A 部分の位置と一致した。したがって最初のクロマトグラフィーにより赤色蛋白質が 2 つの部分に溶出された原因は、B 部分 (第 1 図) の赤色蛋白質が他の蛋白質との相互作用により A 部分に溶出されなかったと考える方が正しいと推察される。

赤色蛋白質の糖類含量は Montreuil et al.⁽⁹⁾ の値より約 2% ほど低い値を示した。また、結合鉄量は Johansson⁽⁸⁾ および Montreuil et al.⁽⁹⁾ の値より低い。Johansson は人乳に乳酸鉄アンモニウムを添加した後、赤色蛋白質を分離し、0.13~0.15% の鉄を含有すると報告している。また Montreuil et al. は pH 7.0~7.5 における赤色蛋白質の鉄結合量を鉄添加実験により求めた結果、蛋白質 1 mg 当り 3.47 μ g の鉄を結合すると述べている。このように鉄結合量の差異は赤色蛋白質の調製法および測定法等の相違に基因するものと思われる。460 m μ の吸光値が蛋白質の調製によってかなり変動することが指摘されている点から考慮して、鉄結合量にも相当変動があることは容易に推察される。

赤色蛋白質の pH 12 における 460 m μ の吸光値に著しい減少が認められなかった点は Groves および Johansson の結果と相違する。Groves は牛乳赤色蛋白質の pH 12 における吸光値は pH 10 より約 70% 低い値を得、Johansson は人乳赤色蛋白質について約 80% の減少を認めている。この点に関して、これら研究者の測定法が詳細に記載されていないので検討できないが、溶媒の相違がその原因とも考えられる。著者らは 0.1 N 水酸化アンモニウムに溶解した赤色蛋白質の 460 m μ の吸光値を測定したところ、緩衝液の場合より高い値を示し、長時間室温放置しても吸光値の減少は認められず、むしろ増加する傾向にあった。

牛乳の赤色蛋白質との差異について Groves の得た牛乳中の赤色蛋白質の値と比較した結果、両者の吸光係数において顕著なる相違が認められた。また、等電点は牛乳の赤色蛋白質では pH 7.8 であり、人乳では pH 6.1 の酸性側に存在した。しかし、両乳汁の赤色蛋白質の性状は近似していると推察される。赤色蛋白質の乳汁中の量的検討はなされていないが、収量等から推して人乳中には牛乳より多量に存在するものと思われる。かような点については今後検討する。

要 約

人乳の乳清から硫酸アンモニウムによりアルブミン画分を分別し、DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによって赤色蛋白質を分離した。

赤色蛋白質は電気泳動図および沈降図ともに均一であり、pH による図の変化は認められなかった。電気泳動易動度は $-0.66 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ (pH 8.5) であり、等電点は pH 6.1 であった。ヘキサソス 2.50%、ヘキササミン 1.52% およびシアル酸 0.76% を含有し、TCA 可溶性窒素 9.3% が存在した。460 m μ の吸光値は pH 2 では 0.092, pH 10 では 0.410 であり、酵素作用によっても TCA 可溶性窒素の遊離に伴って減少した。

本研究について終始御鞭撻賜わった当社大野 勇社長ならびに超遠心および拡散実験について御指導賜わった垣内 (阪大蛋白研)、神名 (水産試験場) および安馬 (林業試験場) 各先生、*n*-アセチルノイラミン酸を御恵いただいた山川先生 (東大伝研) に深く感謝の意を表する。なお、本研究は昭和 36 年、38 年日本農芸化学会大会において発表した。

- (1) M. Sørensen, S. P. L. Sørensen : *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, **22**, 55 (1939).
- (2) H. Theorell, Å. Åkeson : *Archiv. Kemi. Mineral Geol.*, **18 A**, No. 7 (1943).
- (3) R. K. Morton : *Biochem. J.*, **55**, 795 (1953).
- (4) B. D. Polis, H. W. Shmukler : *J. Biol. Chem.*, **201**, 475 (1953).

- (5) M. L. Groves : *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3345 (1960).
- (6) K. H. Schäfer : "V. Kongress der Europäischen Gesellschaft für Hämatologie", Freiburg, p. 154 (1956).
- (7) B. Johansson : *Nature*, **181**, 996 (1958).
- (8) B. Johansson : *Acta. Chem. Scand.*, **14**,

- 510 (1960).
- (9) J. Montreuil, J. Tonnelat, S. Mullet : *Biochim. et Biophys. Acta*, **45**, 413 (1960).
- (10) R. J. L. Allen : *Biochem. J.*, **34**, 850 (1940).
- (11) S. Ventura, J. C. White : *Analyst*, **79**, 39 (1954).
- (12) G. R. Bartlett : *J. Biol. Chem.*, **234**, 459 (1959).
- (13) L. Svennerholm : *Acta Soc. Med. Upsaliensis*, **61**, 586 (1955).
- (14) L. Warren : *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971 (1959).
- (15) G. L. Miller, R. H. Golder : *Arch. Biochem.*, **29**, 420 (1950).
- (16) 杉本研究室編 : 電気泳動技術, 納谷書店, p. 69 (1955).
- (17) 赤堀四郎編 : 酵素研究法, 1巻, 朝倉書店, p. 271 (1955).
- (18) S. S. Derechin, P. Johnson : *Nature*, **194**, 474 (1962).
-