〔農化 第 37 卷, 第 5 号, p. 296~301, 1963〕

乳蛋白質のポーラログラフ的研究 (第2報)*

人乳 α -カゼイン並びに牛乳 α -カゼインの差異について

前野正久, 両木岱造, 清沢 功, 桑原邦介 (森永乳業株式会社中央研究所)

昭和 38 年 1 月 16 日 受 理

緒 言

人乳蛋白質と牛乳蛋白質とは免疫学的に明瞭な種族特異性が認められ⁽¹⁾, 両者蛋白質は明らかに相違するが, その物理化学的性質の差異を明確にすることもまた乳幼児栄養の立場から極めて意義深いものと考えられる。

前報⁽²⁾において, 著者らはポーラログラフ蛋白波を一つの指標として, 乳汁の主要蛋白質である両者全カゼインについて比較検討した結果, 特に蛋白質濃度-波高曲線に著しい差異が認められることを報告した。

人乳全カゼインが β -ラクトグロブリンや卵白アルブミンと同様, 等温吸着曲線様の蛋白質濃度-波高曲線を示すのは水銀滴表面における蛋白質の吸着によって説明可能であるが, 牛乳全カゼインのように蛋白質濃度 0.0135 mgN/ml において極大を示す特異な挙動については説明できない。従って両者全カゼインの差異を明確とするには各カゼインを構成する蛋白質成分について, さらにそのポーラログラフ蛋白波の挙動を観察する必要が認められた。

本報では, 人乳 α -, β -, 並びに牛乳 α -, 粗 κ -カゼインについて検討した結果を報告する。

実 験 方 法

I. 実験装置 前報⁽²⁾と同様な実験装置を使用した。ただし, シスチン, システインの比色定量にはベックマン製分光光度計 (DU 型) を使用した。

II. 試料並びに試料溶液 人乳 α -, β -カゼインは前野, 清沢による尿素法⁽³⁾, 牛乳 α -カゼインは Hipp らの尿素法⁽⁴⁾, 牛乳粗 κ -カゼインは津郷, 山内の方法⁽⁵⁾に準じて調製し, 得た各カゼインは低温 (-5° 以下) においてエタノールおよびエーテルで洗滌乾燥した。各カゼインは前報⁽²⁾と同様な方法で溶解し, 1/25 N 塩酸で pH 7.0 に調整した後, 最終濃度が蛋白窒素として 0.270 mgN/ml となるように蒸留水で希釈し, 試料溶液とした。

III. 蛋白波の記録 電解液の基準組成並びに蛋白波の記録は前報⁽²⁾と同様であるが, 波高は μA として表示した。

IV. 分析法 窒素の定量法はマイクロケルダール法, 燐は Allen 氏法⁽⁶⁾, シスチン, システインは燐タングステン酸による比色定量法⁽⁷⁾によった。カゼインの加水分解条件は 3 N 塩酸, $118^{\circ}\sim 120^{\circ}$, 4 時間である。

実 験 結 果

1) 各カゼインの化学組成並びに蛋白波の比較 各カゼインの窒素, 燐およびシスチン, システインの定量結果を第1表に, また同一条件下における各カゼインの蛋白波を第1図に示した。

人乳 α -カゼインの燐含量は牛乳 α -カゼインの約 1/2 で, 牛乳粗 κ -カゼインに近い値を示した。シスチン, システイン含量は人乳 α -カゼインが最も高く, 牛乳粗 κ -カゼイン, 牛乳 α -カゼインの順に低くなり, 人乳 β -

第1表 各カゼインの化学組成

蛋白質	窒素 (%)	燐 (%)	シスチン, システイン (%)
人乳 α -カゼイン	14.3	0.43	2.4
人乳 β -カゼイン	15.4	0.34	0.0
牛乳 α -カゼイン	14.5	0.97	0.5
牛乳粗 κ -カゼイン	15.2	0.44	1.3

カゼインは最も低かった。この順位には同一条件下における各カゼインの蛋白波高と同様な傾向が見られた。すなわち人乳 α -カゼインの蛋白波高が最も高く, 人乳 β -カゼインでは蛋白波が認められなかった。

2) 蛋白波に対する蛋白質濃度の影響 他の条件を一定とし, 蛋白質濃度のみ 0.0027~0.027 mgN/ml の範囲に変化させると,

* Polarographic Investigation on the Proteins of Milk. Part II. The Differences of Human α - and Cow's α -Casein.

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

第1図 各カゼインの蛋白波の比較

I: 人乳 α -カゼイン II: 牛乳粗 κ -カゼイン III: 人乳全カゼイン IV: 牛乳 α -カゼイン
 V: 牛乳全カゼイン VI: 人乳 β -カゼイン
 蛋白質濃度: 0.0135 mgN/ml, 塩化アンモニウム濃度: 0.10 M, 塩化コバルト濃度: 2.0×10^{-3} M,
 アンモニア濃度: 0.50 M, 電解温度: 20°

第2図 蛋白波に対する蛋白質濃度の影響

蛋白質濃度 (mgN/ml): 1) 0.0270, 2) 0.0203, 3) 0.0135, 4) 0.0068, 5) 0.0027
 塩化アンモニウム濃度: 0.10M, 塩化コバルト濃度: 2.0×10^{-3} M, アンモニア濃度: 0.50 M, 電解温度: 20°

各カゼインの蛋白波は第2図のような挙動を示す。人乳 α -カゼインの蛋白波は蛋白質濃度の増加にともなって、波高も増加し、等温吸着曲線様を示すが、牛乳 α -カゼインの蛋白波高は蛋白質濃度 0.0135 mgN/ml で最も高く、それ以上の濃度では波高はかえって低下している。かような牛乳 α -カゼインの特異な蛋白質濃度-波高曲線は牛乳全カゼインと同様であるが、人乳 α -カゼインとは全く異なる。人乳 α -カゼインの蛋白波の挙動は牛乳粗 κ -カゼインに近い。また各カゼインの蛋白波はいずれの蛋白質濃度においても第2波が第1波よりも高く、Tropp らのいう交叉効果⁽⁸⁾は認められず、人乳全カゼイン、牛乳全カゼインの場合と同様であった。

3) 蛋白波に対するアンモニア濃度の影響 蛋白波の発生には二価コバルト錯イオン $[Co(NH_3)_6]^{++}$ の存在が必要であると考えられている。電解緩衝液中の二価コバルト錯イオン濃度はアンモニア濃度に左右される。他の条件を一定としてアンモニア濃度のみ 0.10~1.00 M の範囲に変化させると各カゼインの蛋白波は第3図のように変化する。

人乳 α -カゼイン、牛乳 α -カゼイン並びに牛乳粗 κ -カゼインのいずれの蛋白波高もアンモニア濃度の増加に従って高くなっている。また人乳 α -カゼイン並びに牛乳粗 κ -カゼインではアンモニア濃度の増加にともなって第1波の電位が第2波の電位に近づき、第1波と第2波との区別が不明瞭となる。

第3図 蛋白波に対するアンモニア濃度の影響

蛋白質濃度: 0.0135 mgN/ml, 塩化アンモニウム濃度: 0.10 M, 塩化コバルト濃度: 2.0×10^{-3} M
アンモニア濃度 (M): 1) 1.00, 2) 0.75, 3) 0.50, 4) 0.25, 5) 0.10 電解温度: 20°

第 4 図 蛋白波に対する電解温度の影響

蛋白質濃度: 0.0135 mgN/ml, 塩化アンモニウム濃度: 0.10 M, 塩化コバルト濃度: 2.0×10^{-3} M
 アンモニア濃度: 0.50 M, 電解温度: 1) 10°, 2) 15°, 3) 20°, 4) 30°, 5) 40°

4) 蛋白波に対する電解温度の影響 蛋白波の波高の温度係数は蛋白質の種類によって異なるが, 第 2 波の温度係数より第 1 波の方が大きいといわれる⁽⁹⁾. 電解液成分濃度を基準組成として電解温度のみ 10~40° の範囲に変化させると各カゼインの蛋白波は第 4 図のように変化する.

いずれのカゼインも第 1 波の波高/第 2 波の波高の値が温度の上昇にともなって大きくなっていることは全カゼインの場合と同様であり, 40° における波形には著しい類似性が認められる. 第 1 波の温度係数は大きい, 第 2 波の波高は温度の上昇にともなってかえって低下している. また 40° においては第 2 波の頂点は不明瞭である.

5) 人乳 α -, β -カゼイン混合物の蛋白波 人乳全カゼインの主構成蛋白質として α -, β -カゼインの存在が電気泳動的に認められているが⁽¹²⁾, その割合は試料によってかなりの変動を示す⁽¹⁰⁾.

第 5 図は人乳 α -, β -両カゼインを種々の割合に混合し, 最終濃度を 0.0135 mgN/ml として記録した蛋白波を比較したものである. 明らかに α -カゼインの割合が大きいほど波高は高くなっており, 波形は人乳全カゼインと酷似している.

第5図 人乳 α -、 β -カゼイン混合物の蛋白波

蛋白質濃度: 0.0135 mgN/ml, 塩化アンモニウム濃度: 0.10 M, 塩化コバルト濃度: 2.0×10^{-3} M,
 アンモニア濃度: 0.50 M, 電解温度: 20°
 α -、 β -カゼインの混合割合: 1) 100:0, 2) 75:25, 3) 50:50, 4) 25:75, 5) 0:100

考 察

人乳 α -カゼインの蛋白波高が人乳全カゼインと比較して著しく高く、人乳 β -カゼインが蛋白波をあらわさないという事実は、秦の報告⁽¹¹⁾に見られる牛乳カゼインとの類似性を示すと同時に、前報⁽²⁾において指摘したように各カゼインのシスチン、システイン含量と蛋白波高とは密接な関係があり、蛋白波の発生がシスチン、システインに基因することを示唆するものである。また人乳 α -カゼインと β -カゼインとを一定の割合に混合して蛋白波を記録した場合には、人乳全カゼインと同様な蛋白波が認められ、その波高は α -カゼインの割合が大きいほど高くなる。このような関係に基づき、人乳全カゼインの蛋白波高から α -、 β -カゼインの割合を求めることも可能である。

人乳全カゼインが等電点において沈澱しにくいという事実から、種々の調製法が考案された⁽¹²⁾。Mellander⁽¹²⁾は Sandelin の方法で得た人乳全カゼインの硫黄含量が 1.2% であるのに、Engel の方法では 0.6% であることを指摘し、その原因をメチオニンもしくはシスチンのカゼイン分子からの損失にあるとしたが、そのような損失が容易におこるかどうか疑問である。それよりもむしろ α -、 β -カゼインの割合の差異に原因があると考えるのが妥当である。すなわち、含硫アミノ酸であるシスチン、システインが α -カゼインに偏在することから考えて Sandelin の方法で得た全カゼインでは α -カゼインの割合が大きく、Engel の方法では小さいと考えられる。しかしながら Sandelin の方法では硫黄含量の多い蛋白質がカゼインと共沈することも考えられる。

牛乳 α -カゼインを構成する蛋白質のうち pH 7.0, 0.20~0.25 M 塩化カルシウム溶液中において可溶な粗 κ -カゼインの蛋白質濃度-波高曲線が人乳 α -カゼインと同様、等温吸着曲線様を示すのに、牛乳 α -カゼインが特異な挙動を示すのは、牛乳 α -カゼインの主構成蛋白質である 0.20~0.25 M 塩化カルシウム溶液中において不溶の α_R -カゼインの作用によることを示唆するものである。また同時に、以上の事実は人乳 α -カゼインにおいてはかように燐含量が多く、カルシウムイオンに敏感な画分が存在しないか、もしくはその含量が著しく少ないことを示唆するものであると考えられる。

Mellander⁽¹²⁾はまた人乳 α -カゼインの電気泳動易動度(磷酸塩緩衝液, pH 7.57, イオン強度 0.15)が $-4.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ であり、牛乳 α - および β -カゼインの易動度はそれぞれ -7.9 , $-4.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ (pH 7.61) であると報告しており、人乳 α -カゼインと牛乳 β -カゼインとは同じ易動度を示すが、ポーラログラフ的には両者カゼインは全く別の蛋白質である⁽¹¹⁾。

ポーラログラフ的に近似した蛋白波の挙動を示す人乳 α -カゼインと牛乳粗 κ -カゼインは、燐含量がほぼ等しいにもかかわらず電気泳動易動度が異なるのは、燐の結合様式、あるいはアミノ酸組成、糖含量などの差異に基因するものと考えられる。人乳 α -カゼインの均一性並びに牛乳粗 κ -カゼインの各成分に関する問題については今後さらに検討する。

(1) 同一条件下において各カゼインの蛋白波を比較した結果, 人乳 α -カゼインの蛋白波高がもっとも高く, 牛乳粗 κ -, 牛乳 α -カゼインの順に低くなり, 人乳 β -カゼインでは蛋白波は認められなかった.

(2) 人乳 α -, 牛乳粗 κ -カゼインの蛋白質濃度-波高曲線は等温吸着曲線様を示すが, 牛乳 α -カゼインでは蛋白質濃度 0.0135 mgN/ml で極大を示した.

(3) 人乳 α -, 牛乳 α -および牛乳粗 κ -カゼインのアンモニアの濃度, 並びに電解温度の変化に対する蛋白波挙動は同様な傾向が認められた.

(4) 人乳 α -, β -カゼインの混合物の蛋白波は, 人乳全カゼインの蛋白波と酷似した.

終りに臨み本研究に対し終始御鞭撻を賜った当社大野勇社長に深甚の謝意を表します.

- (1) 前野正久, 有馬俊六郎, 永江純孝 : 日畜会報, **21**, 145 (1949).
- (2) 前野正久, 清沢 功, 桑原邦介 : 本誌, **36**, 710 (1962).
- (3) 前野正久, 清沢 功 : 未発表.
- (4) N. J. Hipp, M. L. Groves, T. H. Custer, T. L. McMeekin : *J. Dairy. Sci.*, **35**, 272 (1952).
- (5) 津郷友吉, 山内邦男 : 本誌, **33**, 35 (1959).
- (6) R. J. L. Allen : *Biochem. J.*, **34**, 858 (1940).
- (7) B. Kassell, E. Brand : *J. Biol. Chem.*,

125, 115 (1938).

- (8) C. Tropp, L. Jühling, F. Geiger : *z. physiol. chem.*, **262**, 225 (1939).
- (9) 館 勇 : ポーログラフイー, 岩波書店, p. 397 (1954).
- (10) 前野正久, 清沢 功, 津田端生 : 日農化大会講演要旨, p. 166 (1962).
- (11) 秦 忠夫 : 京都大学食糧科学研究所報告, **6**, 45 (1951).
- (12) O. Mellander : *Upsa Lakere fören*, p. 107 (1947).