カゼインに対するレンニン作用に関する研究

κ -カゼインからのグリコマクロペプチドについて

桑田 有, 仁木良哉, 有馬俊六郎

(北海道大学酪農科学研究施設)

昭和 43 年 9 月 20 日 受 理

Studies on the Action of Rennin on Casein Compositions and Properties of Glyco-macropeptides from κ -Casein

By Tamotsu KUWATA, Ryoya NIKI and Shunrokuro ARIMA

Institute for Dairy Science, Hokkaido University

Composition and properties of glyco-macropeptides (GMP) released from κ -casein A by rennin, were studied. GMP soluble in 2% or 12% trichloro-acetic acid were fractionated to five portions on DEAE-cellulose column chromatography. Each fraction was rechromatographed, lyophilized, and analyzed for contents of sugars and amino acid compositions. Contents of sugars in the fractions increased with the increasing concentration of buffer and molar ratio of galactose : galactosamine : sialic acid in each fraction was approximately 2 : 1 : 1. The first fraction consisted of only four kinds of amino acids and other four fractions consisted of eleven kinds of amino acids, but molar ratios of amino acid residues in each fraction were different.

(Received September 20, 1968)

緒 言

カゼインに対するレンニンの作用機構は、 κ -カゼインの発見から著しく解明されたが、最近の κ -カゼインの不均一性に関する研究によって、さらにその詳細が明らかにされつつある。Beeby と Nitchmann⁽¹⁾ が κ -カゼインをシアル酸含量の異なる 3 つのサブユニットに分けて以後、高濃度の尿素と S-S 還元剤存在下でのでんぶんゲル電気泳動 (SGE) の研究が進み、現在 κ -カゼインは遺伝的変異体を含み、S-S 結合で結ばれた 6~7 のサブユニットから成ると考えられている^(2~4)。したがってレンニンが κ -カゼインに作用して 12% 三塩化酢酸 (TCA) 可溶のグリコマクロペプチド (GMP) を遊離するとき、これらサブユニットにいかん作用するかの解明が必要となる。筆者らの一連のレンニン作用に関する研究のうち、本実験は GMP が従来考えられていたような均一なものかどうかを明らかにするため、GMP の性状を追究したものである。

実 験 方 法

1. κ -カゼインの調製 : 北大付属農場ホルスタイン個乳から得た脱脂乳を、5 回等電点沈澱させて酸カゼインをとり、Zittle らの尿素-硫酸法⁽⁵⁾で κ -カゼインを分離、さらに Mackenzie らの方法⁽⁶⁾で分画して凍結乾燥後、SGE で純度を検討した (Fig. 2)。

2. レンニンの調製 : ハンセン社のレンネットから Ernstrom の方法⁽⁷⁾で抽出し、吉野らの方法⁽⁸⁾で力価を測定、実験には 4 RU (21 μ g レンニン/ml) の活性を使用した。

3. GMP の調製 : pH 6.3, 1% κ -カゼイン溶液にレンニンを作用させて後、セファデックス G 25 で濾過し、それに TCA を処理して得たが、その詳細は Fig. 1 のとおりである。

4. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー : いろいろな吸着剤を用いた予備実験の結果、0.5N NaOH と 0.5N HCl で賦活化したセルロースを、0.1M ピリジン-ギ酸緩衝液 pH 5.1 で 1.0 $\times$ 75 cm のカラムに充填

Fig. 1. Fractionation of the Soluble Products released from Rennin-treated κ -Casein A.

し、抽出は同緩衝液の濃度を 0.1 M から 0.9 M まで上昇させる Exponential gradient elution を採用した。そして溶出液 0.2 ml を分取、アルカリ加水分解⁽⁹⁾後ニンヒドリンで発色定量した。なお GMP を含む区分を集め、凍結乾燥して重量測定で回収率を求めた。

5. セファデックス G 25 による濾過 : Porath の方法⁽¹⁰⁾で精製し、2.5×80 cm のカラムに充填した。試料は蒸留水で展開し、5 ml ずつに分画後ニンヒドリンでペプチドを調べた。

6. でんぷんゲル電気泳動(SGE) : Wake と Baldwin の方法⁽¹¹⁾にしたがった。なお、参考として分画された GMP をさらに検討するため、2.5% ピリジン-酢酸緩衝液 pH 4.7 を用い、19 V/cm で 2 時間濾紙電気泳動(PE)を行なった。

7. 糖の定量 : ガラクトースはフェノール硫酸法⁽¹²⁾、ガラクトサミンは Blix の方法⁽¹³⁾を用い、前者は 1 N HCl、後者は 2 N HCl で 100°C 3 時間封管中で試料を加水分解した後、HCl 濃度を 0.3 N 以下に下げて測定した。シアル酸は Kim らの方法⁽¹⁴⁾で行ない、0.1 N H₂SO₄ 80°C 60 分加水分解後定量した。

8. アミノ酸分析 : 2 度蒸溜した 6 N HCl で試料を

110°C 18 時間封管中で加水分解し、塩酸を除去後、日立アミノ酸自動分析計(KLA-3 B 型)で分析を行なった。

実験結果

1. 供試カゼインの SGE の結果

実験に用いた κ -カゼインは Fig. 2 の (4) に示すごとくで、Woychick の法⁽⁴⁾によれば、 κ -カゼイン A に相当する。(4) と (5) に示されるように、レンニンを作用させると陽極に移動するバンドが消失し、陰極に移動する 2~4 のパラ κ -カゼイン誘導体が出現する。なお比較のために行なった κ -カゼイン A, AB, B 型の個乳全カゼインの SGE も Fig. 2 に示した。

2. GMP のセファデックス G 25 による濾過の結果

レンニン処理で遊離された可溶性産物をゲル濾過した図は Fig. 3 である。a は全カゼインの場合で、処理時間が長くなると小さな区分が増大する。b は κ -カゼインの場合で 2 区分が得られ、可溶性の大部分がセファデックスの性質から分子量 5000 以上と考えられる。

3. GMP の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーの結果

一般に GMP の調製に 12% TCA が使用されているが、糖含量の低い GMP を考慮して、2% TCA 可溶性区

Fig. 2. Starch-gel Electrophoresis Pattern in Tris-citrate-borate Buffer (pH 8.6) in the Presence of 7 M Urea and 0.04 M 2-Mercaptoethanol.

- (1) whole casein type κ -AB
- (2) whole casein type κ -B
- (3) whole casein type κ -A
- (4) κ -casein A
- (5) para- κ -casein A

Fig. 3. Filtration on Sephadex G-25 of the Soluble Products at pH 4.7 from Rennin-treated κ -Casein A and Whole Casein.

The peptides were developed with the distilled water. Elutes of 5.0 ml were collected and 0.2 ml was analyzed with ninhydrin method after alkaline hydrolysis.

分も検討した。結果は Fig. 4 のごとくで、図のように峯を中心に6つの区分 (F) に分けた。なお F1 は凍結乾燥したところ、極めて微量であった。F3 から F6 までは F2 ほど分離がよくなかった。分画された F2 から F6 までを同一条件で再びクロマトグラフィーを行なった

Fig. 4. Fractionation of the Macropeptides Soluble in 2% TCA released from Rennin-treated κ -Casein A on DEAE-cellulose Column.

110mg of the peptides was loaded on a column (1×55 cm) of DEAE-cellulose (0.71 meq./g), which was previously equilibrated with 0.1 M pyridine-formate buffer at pH 5.1. The peptides were developed with the same buffer by increasing buffer concentration (Exponential gradient). Elutes of 2.0 ml were collected and 0.2 ml aliquot from alternate tubes was analyzed with ninhydrin method after alkaline hydrolysis.

Fig. 5. Rechromatography on DEAE-cellulose of the Fractions obtained from Fig. 4.

Fractions were concentrated, dialyzed and applied to a column of DEAE-cellulose. Exponential gradient elution was carried out with the same system in Fig. 4. Elutes of 2.0 ml were collected and 0.2 ml aliquot from alternate tubes was analyzed with ninhydrin method after alkaline hydrolysis.

Fig. 6. Fractionation of the Macropeptides Soluble in 12% TCA released from Rennin-treated κ -Casein A on DEAE-Cellulose Column.

55mg of the peptides were loaded on a column (1×55cm) of DEAE-cellulose (0.71 meq./g), which was previously equilibrated with 0.1 M pyridine-formate buffer at pH 5.1. The peptides were developed with the same buffer by increasing buffer concentration (Exponential gradient). Elutes of 2.0ml were collected and 0.2ml aliquot from alternate tubes was analyzed after alkaline hydrolysis.

Table I. Yield of Each Fraction on Fig. 4 and 6

Fraction	2% TCA (mg)	Soluble GMP (%)	12% TCA (mg)	Soluble GMP (%)
F-2	5.1	(5.1)	—	—
F-3	37.0	(37.1)	13.5	(27.3)
F-4	10.2	(10.2)	7.5	(15.2)
F-5	21.4	(21.4)	16.2	(32.8)
F-6	26.0	(26.0)	12.1	(26.1)
Total	99.7	(100.0)	49.3	(100.0)

結果が Fig. 5 で, 図のように峯を中心に採取, 凍結乾燥して糖とアミノ酸分析を行なった. つぎに 12% TCA 可溶性 GMP の展開図は Fig. 6 のとおりである. 2% TCA のときにくらべ F2 はほとんど認められなかった. なお参考までに行なった Fig. 4 と Fig. 6 の分画区分の凍結乾燥後の PE 図はいずれもバンドが 1 個であった. 2% TCA と 12% TCA の場合の各分画ごとに凍結乾燥して求めた乾物量の回収率は Table I のごとくで, 後者の F2, F3 の減少が著しい. 先述のように, F1 は凍結乾燥後きわめて微量で, 緩衝液の pH を調整しても樹脂に吸着されなかった.

4. GMP の糖含量の結果

Fig. 5 で得られた再クロマトグラフィー画分の糖定量結果は Table II の示すように, セルロースに強く吸着される区分ほど糖の含量が大で, F6 で糖の合計が約

Table II. Carbohydrate Analysis of the Fractions eluted on DEAE-cellulose Column

Fraction	Galactose	Galactosamine	Sialic acid	Total carbohydrate
F-2	3.27* (18.15)**	1.53 (7.09)	2.04 (6.58)	6.84
F-3	3.22 (17.87)	1.03 (4.77)	2.24 (7.22)	6.49
F-4	5.60 (31.08)	2.80 (13.04)	4.72 (15.22)	13.12
F-5	7.08 (39.29)	3.41 (15.81)	4.90 (15.80)	15.49
F-6	9.45 (52.45)	4.51 (21.09)	7.61 (24.54)	21.57

* per cent dry weight of GMP.

** 10^{-2} μ mole of sugar per milligram of GMP.

22% となり, 一般にガラクトース, ガラクトサミン, シアル酸のモル比は大よそ 2:1:1 であった.

5. GMP のアミノ酸分析結果

上記各画分のアミノ酸のモル比をグリシン, ロイシンを 1 モルとして計算した. Table III の F3 から F6 までは約 11 種のアミノ酸を含み, F4 から F6 までは非常に類似している. F2 はほかと異なり, 4 種のアミノ酸しか認められなかった. ただし酸分解をうけやすいトリプトファンについては検討を行なわなかった. また, Table III で示される以外のアミノ酸は認められなかった. なお Table III には他の発表者の値も比較のため示した.

Table III. Amino acid Compositions of the Fractions eluted on DEAE-cellulose Column

Amino acid	Fraction					GMP (references)			
	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6	a	b	c	d
Asp	—	4	4	4	5	4	4	4	3
Thr	4	8	11	9	11	9	11	8	7
Ser	—	4	5	4	5	6	6	5	3
Glu	—	4	7	6	9	9	9	8	9
Pro	—	4	6	5	6	7	8	8	5
Gly	—	1	1	1	1	1	1	1	1
Ala	—	3	5	4	5	5	4	3	4
Val	2	3	5	5	5	5	4	3	4
Ileu	—	3	5	5	5	5	4	3	5
Leu	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lys	1	2	3	3	3	3	3	3	2-3

Value based on molar ratio.

a: P. Jolles *et al.* ⁽²⁹⁾, b and c: C. Alais *et al.* ⁽³⁰⁾, d: E. B. Kalan and J. H. Woychik ⁽³¹⁾

考 察

レンニン作用の際、全カゼインから遊離される GMP が、 κ -カゼインからのものとほぼ一致することを Jolles ら⁽¹⁵⁾は報告しているが、このことは Fig. 2 から推測される。Beeby ら⁽¹⁾は、この GMP が 12% TCA に可溶性で、非透析性であり、そのアミノ酸組成はリジンを除く塩基性アミノ酸、芳香族アミノ酸を欠き、約 11 種のアミノ酸から成って、GMP 1 分子あたり 57 のアミノ酸残基を有すること、およびガラクトース 15.2%、ガラクトミン 4.3%、シアル酸 11.4%、計 30.9% の糖を含むことを報告している。Table II, Table III の 2% TCA 可溶性 GMP の F 6 が上記の報告に示された GMP と性質が類似している。パラ κ -カゼインの C 末端はフェニルアラニンといわれるが、GMP の N 末端は定かでない。Table III の結果にメチオニンは記していないが、本実験で常に痕跡量が認められた。この点 Delfour ら⁽¹⁶⁾は加水分解時間を短縮して、従来の条件で認められなかったメチオニンが N 末端であることを発見している。パラ κ -カゼインと GMP の結合は強くなく、 κ -カゼイン調製の際、尿素処理時間が長くなると、レンニン作用を受けたときのような物質が遊離することを Beeby ら⁽¹⁾が示唆している。また尿素を高温で長く放置しているとシアン化物が蓄積され、これがリジン残基と反応して Homocitrullins を生ずることを Sakai ら⁽¹⁶⁾や Marier ら⁽¹⁷⁾が報告し、Waugh⁽¹⁸⁾も α -カゼイン調製時にこの現象を報じている。さらに尿素を含む SGE においてもこの影響が現われることを Cole ら⁽¹⁹⁾が発表している。筆者らはこの点を考慮して、 κ -カゼインの調製には温度と尿素の純度に意を用いた。Fig. 4 と Fig. 6 の F 1 は吸着されにくい塩基性の強いペプチドと思われるが、Alais ら⁽²⁰⁾も同様のものを見出している。一方、 κ -カゼインはヒドロキシラミン稀薄アルカリ処理や⁽²¹⁾ 120°C 20 分の加熱⁽²⁰⁾で GMP 様物質を遊離するので、Garnier ら⁽²²⁾は GMP との結合をエステル結合と考えているが、詳細は今後に待たねばならない。

GMP の不均一性については Jolles ら⁽²³⁾は Dowex 50X-2 を用い、3 区分に分け、そのアミノ酸組成は類似し、糖含量はガラクトース、ガラクトサミン、シアル酸ともかなり低い値を報告しているが、筆者らの予備実験で、同一条件で同じ Dowex を用いて試みたが、よい結果は得られなかった。そのほか Dowex 1X-2, Ecteola-セルロース, CM セルロースなどで、緩衝液をいろいろ

変えて予備実験を行なったが、本実験の DEAE-セルロース処理がもっとも良かった。大体 5 つの区分に分画され、吸着の強いものほど糖含量が多かった。最近 Wake ら⁽²⁴⁾は SGE の研究で κ -カゼインを 1~2 の主要部分と 5~6 の小区分に分け、前者には糖がなく、移動の早いものほど糖含量の多いことを報告しているが、本実験結果において、セルロースに強く吸着されるものが糖含量の多いことからこのことが推察される。なお、本実験の各 GMP 区分が他の区分の分解産物でないことは、筆者らが別に行なっているレンニン作用の経時的実験からも明らかであるが、このことは Armstrong ら⁽²⁵⁾も述べている。Table III のアミノ酸分析値から考えて、GMP の不均一性はその糖含量ばかりでなく、アミノ酸組成の相違にもよっていることがうかがえる。Woychick ら⁽²⁶⁾は各サブユニットのアミノ酸組成を比較して、セリン、グルタミン酸、プロリン、スレオニンの含量だけが異なり、しかも各サブユニットのパラ κ -カゼインが同一であることから、サブユニット間の相異は GMP にあると考察している。Table III においても、スレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリンのモル比に相違が認められる。

Table II の糖含量においてガラクトース、ガラクトサミン、シアル酸の量比がほぼ 2:1:1 であることから、つぎの考察を試みた。すなわち糖たんぱく質のペプチドと糖の結合に acetyl-D-hexosamine が多く関与していること⁽²¹⁾、セリン、スレオニンの β 位の炭素が N-acetylhexosamine と結合している様式が GMP 中に認められたこと⁽²⁷⁾、GMP を過ヨウ素酸で処理すると、シアル酸の大部分、ガラクトースの 50% が破壊され、ガラクトサミンはほとんど破壊されないことが報ぜられていること⁽²¹⁾、および GMP を neuraminidase で作用させるとシアル酸だけが遊離されることなど⁽²⁸⁾の報告から、ガラクトサミン-ガラクトース-シアル酸の順序で、1:2:1 に並び、これが 1 単位となってペプチド部分に結合し、この単位が何個結合するかによって、TCA に対する溶解性や樹脂の吸着性や SGE の易動度の違いが、アミノ酸組成の差と併せて説明され得るのではないかと思考する。

しかし本実験の分画 GMP が完全に均一な状態にとり出されていないことを考えれば、的確な考察は今後の研究に待たねばならない。

要 約

レンニンを κ -カゼイン A に作用させ、生じた GMP の性質を追究した。この GMP は均一なものではなく、DEAE-セルロースクロマトグラフィーによる分割で、5 つの区分に分け得た。遅く溶出される区分ほど糖含量が多く、一般にガラクトース、ガラクトサミン、シアル酸の量比はほぼ 2:1:1 であった。アミノ酸分析の結果、遅く溶出される 4 区分はいずれも 11 種のアミノ酸を含有していたが、そのモル比はかなり異なっていた。

本報の要旨は昭和 43 年度日本農芸化学会大会で講演報告した。なお、本研究の一部は昭和 42 年度文部省科学研究費（機関研究）の補助を受けた。

- (1) R. Beeby and H. Nitchmann : *J. Dairy Res.*, **30**, 7 (1963).
- (2) D. G. Schmidt : *Biochem. Biophys. Acta*, **90**, 411 (1964).
- (3) J. H. Woychick : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 267 (1964).
- (4) M. Yaguchi : *J. Dairy Sci.*, **50**, 940 (1967).
- (5) C. A. Zittle and J. H. Custer : *J. Dairy Sci.*, **46**, 1182 (1963).
- (6) H. A. Mackenzie and R. G. Wake : *Biochem. Biophys. Acta*, **47**, 240 (1961).
- (7) C. A. Ernstrom : *J. Dairy Sci.*, **41**, 1663 (1958).
- (8) 吉野梅夫, 中谷延二, 所 洋, 山内邦男 : 農化, **40**, 52 (1966).
- (9) A. M. Crestfield, W. H. Stein and S. G. Moore : *J. Biol. Chem.*, **238**, 618 (1963).
- (10) J. Porath : *Biochem. Biophys. Acta*, **39**, 193 (1960).
- (11) R. G. Wake and R. L. Baldwin : *Biochem. Biophys. Acta*, **47**, 225 (1961).
- (12) M. Dubois, K. Gilles and T. K. Hamilton : *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- (13) G. Blix : *Acta Chem. Scand.*, **2**, 467 (1948).
- (14) Y. K. Kim, S. Arima and Y. Hashimoto : *Jap. J. Zootech. Sci.*, **36**, 17 (1965).
- (15) A. Delfour, J. Jolles, C. Alais and P. Jolles : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 452 (1965).
- (16) G. R. Stark, H. W. Stein and S. Moore : *J. Biol. Chem.*, **235**, 3177 (1960).
- (17) J. R. Marier and R. Dyson : *Anal. Biochem.*, **7**, 304 (1964).
- (18) D. F. Waugh, M. L. Ludwig, J. M. Gillespie, B. Melton and E. Kiener : *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4929 (1962).
- (19) E. G. Cole and D. K. Mecham : *Anal. Biochem.*, **14**, 215 (1966).
- (20) C. Alais, N. Kiger and P. Jolles : *J. Dairy Sci.*, **50**, 1738 (1967).
- (21) A. Gottschalk : "Glycoproteins", Amsterdam Elsevier Publish. Co., (1966).
- (22) J. Garnier, G. Mocquot and G. Brignon : *C. R. Acad. Sci. Paris*, **254**, 372 (1962).
- (23) P. Jolles and C. Alais : *Biochem. Biophys. Acta*, **34**, 565 (1959).
- (24) A. G. Mackinlay and R. G. Wake : *Biochem. Biophys. Acta*, **115**, 103 (1966).
- (25) C. E. Armstrong, A. G. Mackinlay, J. R. Hill and R. G. Wake : *Biochem. Biophys. Acta*, **140**, 123 (1967).
- (26) H. J. Woychick, E. B. Kalan and M. E. Noelken : *Biochemistry*, **5**, 2276 (1966).
- (27) F. H. Malpress and S. Akhavan : *Biochem. J.*, **101**, 764 (1966).
- (28) R. A. Gibbons and G. C. Cheeseman : *Biochem. Biophys. Acta*, **56**, 354 (1962).
- (29) P. Jolles, C. Alais and J. Jolles : *ibid.*, **51**, 309 (1961).
- (30) C. Alais, J. Blondel-Querox and P. Jolles : *Bull. Soc. Chem. Biol.*, **46**, 973 (1964).
- (31) E. B. Kalan and J. H. Woychick : *J. Dairy Sci.*, **48**, 1423 (1965).