α_s -カゼインならびに κ -カゼインの Ca^{2+} による変化*

千葉英雄, 巽 清, 佐々木隆造**, 杉本悦郎

(京都大学農学部食品工学教室)

昭和 45 年 2 月 16 日 受 理

Effect of Calcium on α_s - and κ -Caseins

By Hideo CHIBA, Kiyoshi TATSUMI, Ryuzo SASAKI** and Etsuro SUGIMOTO

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture,

*Kyoto University, Kyoto; **Kyoto Women's University*

The physicochemical properties of α_s - and κ -caseins in the presence of calcium ion have been investigated by ultracentrifugal analysis, ultraviolet spectra, optical rotatory dispersion and chemical modification techniques.

The polymerization of α_s -casein took place prior to the precipitation by the addition of calcium ion. When α_s -casein polymerized in the presence of calcium ion, aromatic amino acid residues of α_s -casein were buried in the inner portions inaccessible to a solvent.

Effects of concentration of α_s -casein, temperature, ionic strength and pH on precipitation of α_s -casein in the presence of calcium ion have been investigated. The results and red shift in the ultraviolet absorption spectra of α_s -casein in the presence of calcium ion suggested that tyrosine residues of α_s -casein played an important role on the polymerization and precipitation of calcium α_s -caseinate. Although potassium ion polymerized α_s -casein, the monovalent cation did not precipitate α_s -casein and inhibited the formation of the calcium α_s -caseinate precipitate.

Decrease of sedimentation coefficient and a blue shift in the ultraviolet absorption spectra of κ -casein appeared in the presence of calcium ion. These changes of κ -casein caused the decrease of the α_s -casein stabilizing ability. (Received February 16, 1970)

緒 言

カゼインに Ca^{2+} を加えるとミセルが形成される。カゼインは多くの成分を含みミセル形成の機構はきわめて複雑であるが、カゼインミセル形成に最少限必要な組成は α_s -カゼイン、 κ -カゼインおよび Ca^{2+} である。 α_s -カゼインは Ca^{2+} の存在で凝固沈殿する性質をもち、 κ -カゼインは Ca^{2+} によって凝固せず Ca^{2+} の共存下において α_s -カゼインをミセル状に安定化する能力をもつ。したがってミセル形成の機構あるいは逆に貯蔵中や各種の処理によるミセルの不安定化の機構などを理解するため

には、まずこの三者間の相互作用を明らかにせねばならない。 α_s -カゼインは pH, イオン強度, それ自身の濃度などにより複雑な解離会合をおこす⁽¹⁻⁵⁾。 K^+ のごとき 1 価のカチオンによっても α_s -カゼインの分子の状態は変化するが凝固沈殿することはなく、 Ca^{2+} を代表とする 2 価のカチオン⁽⁶⁾ によって特異的に凝固沈殿をおこすものである。一方、 κ -カゼインは Ca^{2+} により凝固沈殿はしないが何らかの状態変化がおこっていると考えられる。そこでミセル形成機構を解明せんとする試みの一環として、まずその素反応と考えられる Ca^{2+} と α_s -カゼイン、 Ca^{2+} と κ -カゼインとの相互作用を明らかにする必要がある、両蛋白の高次構造を反映する 2, 3 の物理化学的性質におよぼす Ca^{2+} の影響, ならびに Ca^{2+} による α_s -カゼインの凝固沈殿に影響する諸因子について

* 本研究は昭和 42 年度ならびに昭和 43 年度日本農芸化学会大会において発表されたものである。

** 京都女子大学

検討した。

実験方法

1. 試料の調製 α_s -カゼインは Zittle らの尿素沈澱法⁽⁷⁾ およびエタノール沈澱法⁽⁸⁾ で調製した。 κ -カゼインは Zittle らの尿素-硫酸法⁽⁸⁾ を一部改良して調製した。

すなわち、酸カゼインを 6.6 M 尿素溶液に溶解し、硫酸にて pH 1.4 に調節後、尿素濃度が 2 M になるまで水にて希釈すると同時に 20°C に 2 時間保ち、遠心して沈澱を除去する。上清 1 l 当り 66 g の硫酸を加え生ずる沈澱を遠心にて除去し、硫酸を上清 1 l 当りさらに 66 g 加えて生ずる沈澱を集める。沈澱の水けん濁液を NaOH にて pH 7.5 として溶解し、1 夜水にて透析したのち蛋白質濃度を 1% に調節する。以後 Zittle らの方法⁽⁸⁾ にしたがってエタノール、酢酸アンモン処理し、透析後凍結乾燥して κ -カゼインをえた。

2. Ca^{2+} による α_s -カゼインの凝固沈澱能の測定

凝固沈澱形成実験の標準溶媒としては、ことわらぬ限り牛乳中の状態に近いものとして、0.07 M KCl を含む pH 7.1, 0.01 M イミダゾール緩衝液 (以下標準緩衝液とよぶ) を用いた。 α_s -カゼイン溶液に対する Ca^{2+} の添加はかくはんしながらすみやかに加えた。 Ca^{2+} の濃度を変える実験は各々別個におこなった。

A 法: 所定濃度 (通常最終濃度として 5 mg/ml) の α_s -カゼインに CaCl_2 を加え、25°C で 20 分間放置後 1500 rpm で 1 分間遠心分離をし、上清の蛋白を 0.05 M クエン酸カリウム液で希釈したのち 280 m μ の吸光度によって測定した。 α_s -カゼインおよび κ -カゼインの吸光係数 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (280 m μ) は 10.0 を採用した⁽⁹⁾。

B 法: Ca^{2+} による凝固沈澱能を低濃度の α_s -カゼインを用いて簡易に測定するために以下の方法を用いた。すなわち、 α_s -カゼインの最終濃度が 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにして CaCl_2 と共存せしめ、25°C で保った場合には凝固した α_s -カゼインは均一な分散状態に保たれる。20 分後に濁度を 320 m μ で測定することによって凝固した α_s -カゼイン量を定量することができる。

A, B 両法における α_s -カゼイン濃度の差によって Ca^{2+} による凝固沈澱形成の様相は Fig. 1 に示すようになる。

3. その他 紫外吸収スペクトルはベックマン DU 型分光光度計、旋光分散は JASCO ORD/UV-5 型自記

Fig. 1. Precipitation of α_s -Casein in the Presence of CaCl_2 .

Incubations were made at 25°C for 20 min in the standard buffer (pH 7.1, 0.01 M imidazole buffer containing 0.07 M KCl).

—●— α_s -Casein : 5 mg per ml
—○— α_s -Casein : 75 μg per ml

旋光分散計、超遠心分析はスピコン E 型分析用超遠心機にておこなった。

実験結果

1. Ca^{2+} による α_s -カゼインの変化

α_s -カゼインに沈澱が生ずる直前の濃度にまで種々の濃度に Ca^{2+} を添加し、高次構造を反映する物理化学的性質の変化を検討した。

pH 7.1, 0.01 M イミダゾール緩衝液を基準状態とし、 CaCl_2 , KCl, 尿素などによる沈澱定数の変化を検討した結果が Table 1 である。

Ho らによる浸透圧の実験⁽⁵⁾ ですでに示唆されている

Table 1. Sedimentation Constants of α_s -Casein in Various Conditions

Condition	$S_{20, w}$
Buffer*	1.2
Buffer*+0.01 M KCl	1.9
Buffer*+0.07 M KCl	4.2
Buffer*+0.002 M CaCl_2	1.5
Buffer*+0.005 M CaCl_2	2.6
Buffer*+0.07 M KCl+0.002 M CaCl_2	5.4
Buffer*+0.07 M KCl+0.004 M CaCl_2	6.8**
Buffer*+0.07 M KCl+0.005 M CaCl_2	8.1**
Buffer*+0.07 M KCl+1 M Urea	3.2
Buffer*+0.07 M KCl+4 M Urea	1.5

Concentration of α_s -casein was about 10 mg per ml. Centrifugations were performed at about 20°C.

* 0.01 M Imidazole buffer, pH 7.1.

** Sedimentation constant of main peak.

ごとく, 低いイオン強度においては α_s -カゼインは 1.2 S のモノマーと思われる状態で存在するが, ミルク中のイオン強度に相当する 0.07 M KCl の存在では 4.2 S のものに会合をする。しかし K^+ の添加によっては α_s -カゼインの凝固沈澱はおこらない。また K^+ により会合した状態の α_s -カゼインに尿素を加えれば再び解離するし, アルカリ性でも解離することが知られている⁽¹⁾。一方, K^+ の存在するしないにかかわらず, 沈澱が形成しない限界の高濃度に Ca^{2+} が添加された場合には $s_{20,w}$ が約 2 倍増加し, それ以上の Ca^{2+} の添加では急激な凝固沈澱形成をきたす。したがって Ca^{2+} による凝固前におこる会合の機構は K^+ による会合の機構とは異なった独特のものである可能性が高い。

Herskovits⁽¹⁰⁾ と Ho ら⁽⁵⁾ は α_s -カゼインの旋光分散にかなり異なった結果をえている。そこで, その点を検討したところ Table II に示した結果がえられた。その結果は規則的な二次構造をほとんど含まないことを示した。また Ca^{2+} の添加によっても旋光分散パラメーターがほとんど変化しないことから, Ca^{2+} によって特別な規則的な構造が導かれることはないことを知った。

しかしながら, 25°C の標準緩衝液中での固有粘度が 7.0~7.8 ml/g であることや, Fig. 2 に示されるように尿素中で変性, unfolding に特有な blue shift が観察されたことなどから, 元来 α_s -カゼインは規則的な二次構造はほとんど持たないが, そのペプチド鎖は折りたたまれてある程度 globular な構造ではなかろうかと考えられる。

一般に, 蛋白質の高次構造が変化すればアミノ酸残基の状態が変化するために化学修飾剤に対する反応速度が変化するはずである。TNBS (trinitrobenzenesulfonate) はアミノ基に作用する* ので, 蛋白質中の末端アミノ基カリジン残基の ϵ -アミノ基にのみ特異的に反応するも

Table II. Optical Rotatory Dispersion Parameters

Added	a_0	b_0	λ_0 (m μ)
None	-511	-41	221
0.002 M $CaCl_2$	-503	-42	221
0.005 M $CaCl_2$	-477	-64	224

Determinations were performed in the standard buffer at 25°C. Concentrations of α_s -casein were 7.99 mg per ml. Mean amino acid residue weight of α_s -casein (119.5) and λ_0 (212 m μ) were used for calculations.

Fig. 2. Difference Spectra of α_s -Casein Produced by Urea.

The sample solutions were the α_s -casein solutions in the standard buffer and urea. The reference solutions were the α_s -casein solutions in the standard buffer. 1.59 mg per ml (5.9×10^{-5} M as monomer) of the α_s -casein solutions were used. Determinations were performed at about 20°C.

Fig. 3. Effect of $CaCl_2$ on Trinitrophenylation of α_s -Casein.

Reaction mixtures consisted of 0.27 mg per ml (10^{-5} M as monomer), 5 mM TNBS and standard buffer. Incubation were made at 20°C.

—○— no $CaCl_2$ —●— 5 mM $CaCl_2$

のである。そして反応速度および修飾されたアミノ基の数は 345 m μ における ϵ -TNP-リジンのモル吸光係数 13,300 より求めることができる⁽¹¹⁾。そこで TNBS を用いて α_s -カゼインに対する反応速度を測定し Ca^{2+} の影

* SH 基にも作用するが, α_s -カゼインには SH 基はない。

響を検討した結果, Fig. 3 に示すごとく 5 mM の Ca^{2+} の存在により α_s -カゼイン 27,000 g (モノマーの分子量に相当する⁽¹⁾) 当り約 1 個のアミノ基が TNBS に対して反応しやすい形に変化したことが判明した. この事実は Ca^{2+} により α_s -カゼインが unfolding をおこしたか, あるいは Ca^{2+} が α_s -カゼイン中の負荷電残基に結合したため, それに対置していたリジン残基が自由な状態になって反応性が増加したのか, どちらかの原因によるものと考えられる. なお, TNP 化された α_s -カゼインの Ca^{2+} による凝固能はわずかな影響をうけるのみで, ほんちよな変化は認められなかった⁽¹²⁾.

Fig. 4 は Ca^{2+} による α_s -カゼインの紫外吸収スペクトルの変化を示したもので, 明らかに red shift を示した. このことは α_s -カゼイン分子において芳香族アミノ酸残基が埋まり込んだことを示すものである. このようなアミノ酸残基の埋没は folding によるものと考えるのが普通であるが, 旋光分散 (Table II) ならびに TNBS との反応性の結果 (Fig. 3) が示すように, Ca^{2+} による α_s -カゼインの folding の傾向は認められない. したがって, Ca^{2+} によっておこる α_s -カゼインの会合において, チロシン残基のような芳香族アミノ酸が α_s -カゼイン分子間の結合部位に関係しているため red shift が認められたと考えられる.

なお 3 M 以上の尿素中では α_s -カゼインは Ca^{2+} によ

Fig. 4. Difference Spectra of α_s -Casein Produced by CaCl_2 .

The sample solutions were the α_s -casein solutions in the standard buffer and CaCl_2 . The reference solutions were the α_s -casein solutions in the standard buffer. 1.63 mg per ml (6.1×10^{-5} M as monomer) of α_s -casein solutions were used. Determinations were performed at about 20°C.

り会合凝固をおこさず, また Fig. 4 において使用された最高濃度に相当する 5 mM の Ca^{2+} の添加によっても明確な差スペクトルは認められなかった. この事実は Fig. 4 の差スペクトルは会合に由来するものであることを支持するものである.

2. α_s -カゼインの Ca^{2+} による凝固沈澱に対する環境の影響

Ca^{2+} によって α_s -カゼインは凝固沈澱するが, その凝固沈澱能は α_s -カゼイン自身の濃度 (Fig. 1), pH (Fig. 5), 温度 (Fig. 6), KCl の濃度 (Fig. 7) などにより著しく影響をうけた.

pH による影響は Fig. 5 のごとく, pH が高くなるほど凝固性が低下し, pH 10 をこえると急激に低下し, pH 11 ではほとんど凝固沈澱しなくなるに至った. pH の上昇による沈澱能の減少は一つには等電点から遠ざかることにより静電的反撥力が增大するためと考えられるが, チロシン残基の pK (pH 10.5) をこえると急激に凝固沈澱性を失うことは, チロシン残基の解離が凝固沈澱に関係が深いことを示唆するものである.

Fig. 6 に示すごとく, 高温になるほど凝固沈澱性は増加するが, 25°C 以下では特に温度の影響は大であり, 0°C ではほとんど凝固沈澱しなかった. したがって, 凝固沈澱形成において疎水結合力も寄与していることも考慮せねばならない.

Fig. 7 のごとく K^+ の濃度を高めた場合には凝固沈澱性が低下し, 低いイオン強度で沈澱性が大きいこと

Fig. 5. Effect of pH on Precipitation of α_s -Casein in the Presence of CaCl_2 .

Insoluble α_s -casein was determined by the method B except that pH was changed.

Fig. 6. Effect of Temperature on Precipitation of α_s -Casein in the Presence of CaCl_2 .

Insoluble α_s -casein was determined by the method B except that temperature was adjusted at the values indicated.

Fig. 7. Effect of KCl on Precipitation of α_s -Casein in the Presence of CaCl_2 .

Insoluble α_s -casein was determined by the method B except that the concentration of KCl was changed.

—○— at 25°C —●— at 15°C

は興味深い事実である。なぜならば、Table I で示されるように、低イオン強度ではモノマーとして存在するからである。Table I および Fig. 7 の結果は Ca^{2+} による会合を経ての凝固沈澱形成の過程と、 K^+ による会合とは別の機構であって、しかも K^+ は Ca^{2+} に対して拮抗的に作用しているかもしれないということを暗示する。

3. Ca^{2+} による κ -カゼインの変化

κ -カゼインと Ca^{2+} との相互作用を超遠心分析ならびに紫外吸収スペクトルにより検討した結果が Table III

Table III. Sedimentation Constants of κ -Casein

Concentration of CaCl_2 (M)	$S_{20,w}$
0	13.1
0.02	10.7
0.04	8.7

Concentration of κ -casein was 5 mg per ml. Centrifugations were performed at 18°C in the standard buffer.

Fig. 8. Difference Spectra of κ -Casein Produced by CaCl_2 .

The sample solutions were the κ -casein solutions in the standard buffer and CaCl_2 . The reference solutions were the κ -casein solutions in the standard buffer. 1.56 mg per ml (7.8×10^{-5} M as monomer) of κ -casein solutions were used. Determinations were performed at about 20°C.

と Fig. 8 である。その結果、沈降定数は減少し^{*}、紫外吸収スペクトルには blue shift が認められ、解離と unfolding の方向に高次構造が変化していることを知った。

κ -カゼインは Ca^{2+} を加えても沈澱せず、 Ca^{2+} の存在で重量として 15 倍以上の α_s -カゼインをミセル状に安定化する能力を持っている。 α_s -カゼインと κ -カゼインの混合液に Ca^{2+} を加えてミセルを形成させた場合に比べて、あらかじめ κ -カゼインと Ca^{2+} を混合したものに α_s -カゼインを加えた場合には明らかにミセル形成能が阻害されることが認められた。また、すでに一度形成されたミセルでさえも過剰の Ca^{2+} により破壊されることも認められている⁽¹³⁾。これらのミセル形成妨害作用は κ -カゼインの Ca^{2+} による解離または unfolding をとも

* なお K^+ の添加によっては沈降定数は増加した。

なった解離に起因するものと考えられる。

考 察

α_s -カゼインは Ca^{2+} の添加によってまず会合をおこすが、 Ca^{2+} がある程度以上になると急激に凝固沈澱する。したがって Ca^{2+} による α_s -カゼインの会合は凝固沈澱がおこるために必須な第一段階として理解されるべきであろう。 Ca^{2+} による会合は超遠心図形⁽¹²⁾ から判明することくシャープな単一のピークではなく、なだらかに分散した図形を示すので種々の会合度のものが共存していると思われる。沈降分析実験 (Table 1) が示すように、 K^+ によっても会合は起こるが沈澱形成に至らないのに反し、 Ca^{2+} の添加においては K^+ の存在のいかんにかかわらずある一定の会合の後に凝固沈澱をおこす。しかも K^+ の濃度をあげると Ca^{2+} による α_s -カゼインの沈澱形成は阻害されることなどもあわせ考えると、 K^+ による会合と Ca^{2+} による会合、およびそれに続いておこる凝固沈澱とは異なった機構であろうと考えられる。このような独特な Ca^{2+} による会合において α_s -カゼインの二次、三次構造が変化するかどうかが問題となるが、旋光分散パラメーターに著しい変化が認められず、またリジン残基の ϵ -アミノ基の反応性もむしろ増大する傾向にあることは folding する傾向には変化しないことを示唆する。しかしながら、 α_s -カゼインの紫外吸収スペクトルは Ca^{2+} により red shift を示し、会合によって芳香族アミノ酸が埋まり込む方向に変化することを示した。ここで会合により folding がおこらないこと、および会合とそれにひきつづいておこる凝固沈澱形成とが同様な機構であると考え、さらに凝固能の pH 10.5 付近での急激な減少という事実をも考えあわせると、 Ca^{2+} による α_s -カゼインの会合ならびに凝固においてチロシン残基の解離が関係していることが考えられる。すなわち、チロシンの関与した水素結合を介しての会合凝固の可能性を暗示する。

κ -カゼインは直接 Ca^{2+} と相互作用しミセル安定化能が低下することを認めた。同様な事実は中西らによっても認められている⁽¹⁴⁾。 κ -カゼインは単独で Ca^{2+} と共存させた場合には α_s -カゼインの場合とは反対に沈澱定数は低下し、紫外吸収スペクトルは blue shift した。このような変化が、なぜミセル形成安定化能を低下させるかということはミセルの不安定化の原因を考える上においても興味ある今後の問題であろう。

α_s -カゼインの Ca^{2+} による凝固反応は α_s -カゼイン自身の濃度、pH、温度、 K^+ の濃度などにより影響を受けた。ミセル形成に最適な Ca^{2+} の濃度 (標準緩衝液中 37°C で 0.02 M の Ca^{2+} が最適である⁽¹³⁾) が、 α_s -カゼインを凝固せしめる濃度 (Fig. 1) よりも大であることや、影響する因子がきわめて多いため直接比較するのは困難であるが、ミセル形成もまた pH、温度、 K^+ 濃度などにより α_s -カゼインの Ca^{2+} による凝固におけると類似した影響を受けた。したがって α_s -カゼインと Ca^{2+} との相互作用はカゼインミセル形成反応に必須の素反応であると考えられる。

要 約

ミセル形成機構解明の一環として、 α_s -カゼインならびに κ -カゼインの高次構造を反映する 2, 3 の物理化学的性質の Ca^{2+} による変化を超遠心分析、紫外吸収差スペクトル、旋光分散および化学修飾によって検討し、さらに α_s -カゼインの Ca^{2+} による凝固沈澱形成におよぼす環境因子の影響をも検討した。

α_s -カゼインは Ca^{2+} の添加により旋光分散は変化せず、リジン残基の反応性が増加し folding の傾向は認められなかった。しかし会合をおこし、その会合にともなう紫外吸収スペクトルに red shift がみられ、会合に際して芳香族アミノ酸残基が埋まり込んだことを示唆した。この会合は K^+ による会合とは異なった特異な機構であって、さらに高濃度の Ca^{2+} により生ずる凝固沈澱の機構の前段階であると考えられる。 Ca^{2+} による凝固沈澱性は低蛋白濃度、低温、 K^+ 濃度の上昇、pH の上昇により低下し、とくに pH の影響や紫外吸収差スペクトルの結果から会合凝固にチロシン残基が関与していることが示唆された。

κ -カゼインは Ca^{2+} により沈澱定数の低下と紫外吸収スペクトルの blue shift をおこした。すなわち解離と unfolding の方向への変化がおこっていることを意味する。そしてこの変化によりミセル安定化能は低下した。

- (1) P. Dreizen, R. W. Noble and D. F. Waugh: *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4938 (1962).
- (2) T. A. J. Payens and D. G. Schmidt: *Biochim. Biophys. Acta*, **109**, 214 (1965).
- (3) D. G. Schmidt, T. A. J. Payens, B. W. Van Markwijk and J. A. Brinkhuis: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **27**, 448 (1967).
- (4) D. G. Schmidt and B. W. Van Markwijk: *Biochim. Biophys. Acta*, **154**, 613 (1968).

- (5) C. Ho and A. H. Chen : *J. Biol. Chem.*, **242**, 551 (1967).
 - (6) 山内邦男 : 農化, **33**, 1134 (1959).
 - (7) C. A. Zittle, J. Cerbulis, L. Pepper and E. S. Della Monica : *J. Dairy Sci.*, **42**, 1897 (1959).
 - (8) C. A. Zittle, J. H. Custer : *ibid.*, **46**, 1183 (1963).
 - (9) R. W. Noble Jr. and D. F. Waugh : *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2236 (1965).
 - (10) T. T. Herskovits : *Biochemistry*, **5**, 1018 (1966).
 - (11) S. Kubo, S. Tokura and Y. Tonomura : *J. Biol. Chem.*, **235**, 2835 (1960).
 - (12) 千葉英雄, 巽 清, 佐々木隆造, 杉本悦郎 : 農化, 投稿中.
 - (13) D. F. Waugh and R. W. Noble Jr. : *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2246 (1965).
 - (14) 中西武雄, 伊藤敏敏 : 農化, **43**, 725 (1969).
-