

## カゼインに対するレンニン作用

### 第4報 3次相における $\alpha_s$ - および $\beta$ -カゼインの変化

加 藤 勲\*

(化 学 研 究 室)

安 藤 功 一\*\*

(乳製品製造学研究室)

#### Action of Rennin on Casein

#### IV Changes of $\alpha_s$ - and $\beta$ -casein on the tertiary phase

Isao KATO\* and Kouichi ANDO\*\*

(April, 1978)

#### 緒 論

レンニンが $\kappa$ -カゼインに特異的に作用してパラ $\kappa$ -カゼインとシアル酸を含むグリコマクロペプチド (GMP) に解裂するという性質は衆知の如くである<sup>8),10)</sup>。 $\kappa$ -カゼインは、全カゼイン中にわずか15%程度存在し、これがレンニンの初期反応で大部分が分解され、更に共存する $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインに酵素作用が持続的に働くものである。レンニンが $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインに作用するという研究は、1955年 Nitschmann ら<sup>14)</sup> によって初めて行なわれ、その結果この反応は General Proteolysis であると報告されている。しかし、当時の実験に供されたカゼインやレンニンは、今日のような均一性の高いものとは考えられず、現在供されているこれら試料を用いての実験結果とは比較の参考にならない。1963年の Lindquist の Review<sup>9)</sup> によると、レンニンは3次相 (Tertiary Phases) において General Proteolysis 作用を示すと報告された。その後、現在まで2~3の研究者<sup>2),3),5)</sup> により3次相についての研究が進められてきた。チーズ製造工程における、特に熟成期間を通し、チーズカードに取り込められたレンニンおよび乳酸菌がカゼインの分解作用に関与していることは従来より知られているが、その詳細については未だ不明な点が非常に多いのでそれを解明すべく下記の実験を行なった。

\* Laboratory of Chemistry, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido, Japan.

\*\* Laboratory of Milk Research, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido, Japan.

## 実試材料および方法

### 1. 酸カゼインの調製

酪農学園大学附属農場で得た新鮮乳を直ちに 3,000 rpm でクリーム層を除き脱脂乳を調製した。得られた脱脂乳を脱イオン水で3倍に希釈し 0.1 N HCl で pH 4.6 に調整し等電点沈殿させ約 1 時間静置後上澄液を除き、前と同量の脱イオン水を加え 0.1 N NaOH で pH 7.5 に保ちながら完全にカゼインを溶解した。この操作を 4 回繰り返して行い、酸カゼインを調製した。最後に得られた酸カゼインに 98% エチルアルコールを加えて脱水し、次にエチルエーテルで乾燥を行った。

#### a. $\kappa$ -カゼインの調製

前記で得た酸カゼインを用いて Zittle and Custer 法<sup>20)</sup>で精製した。

#### b. $\alpha_s$ -カゼインの調製

$\kappa$ -カゼインを精製する際に尿素と硫酸を加えて粗  $\kappa$ -カゼインを分離し、同時に  $\alpha_s$ -カゼインと  $\beta$ -カゼインの複合体を得た。この複合体を材料として 1 N NaOH で完全に溶解後透析により共存する尿素と塩類を完全に除去した。その後の操作は Zittle and Custer の方法<sup>20)</sup>と同様に行った。

#### c. $\beta$ -カゼインの調製

前記で得たカゼインを材料として Hipp の尿素法<sup>6)</sup>で粗  $\beta$ -カゼインを調製後、Payens and Markwizk 法<sup>16)</sup>により精製した。以上の精製した  $\kappa$ -,  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインは透析後凍結乾燥処理を行い保存した。

### 2. レンニンの調製

Hansen 社の粉末レンネットを脱イオン水に溶解し、0.1 N NaOH で pH 5.5 に調整した。その後、不溶解物を濾紙 (東洋濾紙 No. 2) で濾過し、その濾液を Foltmann の方法<sup>4)</sup>と同様に低温で塩析を 3 回繰り返して粗レンニンを得た。次にその粗レンニンを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析後、吉野ら<sup>10)</sup>が行った DEAE セルローズクロマトグラフィーにより精製した。得られたレンニンの活性は Berridge の方法<sup>1)</sup>に従って測定した。レンニン溶液はアンプルに分注封入の後、凍結保存した。

### 3. $\alpha_s$ - および $\beta$ -カゼインに対するレンニン反応

$\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインをタンパク濃度 0.55% になるように 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。レンニン反応は、 $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインの各反応液 50 ml に対し 10 RU のレンニン溶液 0.5 ml を添加した。反応の停止は 90°C で 5 分間の加熱によった。

#### 4. セファデックス G-200 によるゲルクロマトグラフィー

セファデックス G-200 を充填したガラスカラム (3×150 cm) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡にしたのち、反応後の試料をゲル濾過した。条件は 5 ml/min の流速で流下させ 5 ml づつフラクションコレクターで分取し、日立 101 型分光光度計 280 m $\mu$  で吸光度を測定した。

#### 5. ポリアクリルアミドディスク電気泳動法

精製カゼインの純度検定およびレンニン反応終了後の  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインの分解過程の変化は、ポリアクリルアミドを担体としたディスク電気泳動法 (Orinstein and Davies の方法<sup>15)</sup>) によって行った。ポリアクリルアミドは、最終濃度 4.5 M 尿素を含む 7.5% 濃度のものを用いた。なお、泳動条件は、ゲル 1 本当り 3 mA の電流を通し約 1 時間室温で行った。泳動終了後直ちにアミドブラック 10 B で 20 分間染色しその後 7% 酢酸で自然脱色した。

#### 6. Calcium-sensitivity (Ca-sensitivity) の測定

本測定は、Noble らの方法<sup>13)</sup> によって行った。方法の概略は反応後の試料を 0.01 M イミダゾール-KCl 緩衝液 (pH 7.0) に 1 昼夜透析をした後、その試料に Ca 濃度を 0~25 mM まで変えて添加し、その後 10 分間静置して 3,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い上澄液中の窒素量をマイクロケールダール法で定量した。

#### 7. 非タンパク態窒素 (NPN) の定量

$\alpha_s$ -,  $\beta$ - および  $\kappa$ -カゼインを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にタンパク濃度 0.5% になるように溶解しその各々の反応液 50 ml を 30°C に保持した。次に 10 RU のレンニン溶液を 0.5 ml 添加して 1 時間毎に反応液の 4 ml を分取し、15% トリクロール酢酸 (TCA) を直ちに加えて酵素反応を停止させた。なお、 $\kappa$ -カゼインの溶液については反応開始から 1 分間毎に酵素反応を停止した。その後の処理方法は前報<sup>8)</sup> と同様に行い、全窒素 (TN) に対する最終濃度 3% TCA 可溶性 NPN 含量の比率を算出した。

### 実験結果および考察

Fig. 1 および 2 に示すようにレンニンを  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインに反応させると反応直後から 7 時間に至る反応の経過にともない未反応の  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインより陽極側に速く移動するレンニン変性カゼインと推測される新たなバンドの出現が認められた。一方同一反応時間との比較において変性  $\alpha_s$ - カゼインが  $\beta$ -カゼインより陽極に速く移動するバンドが多く認められ、しかも反応 7 時間では  $\alpha_s$ -カゼインのほとんどは変性  $\alpha_s$ -カゼインに変化した。

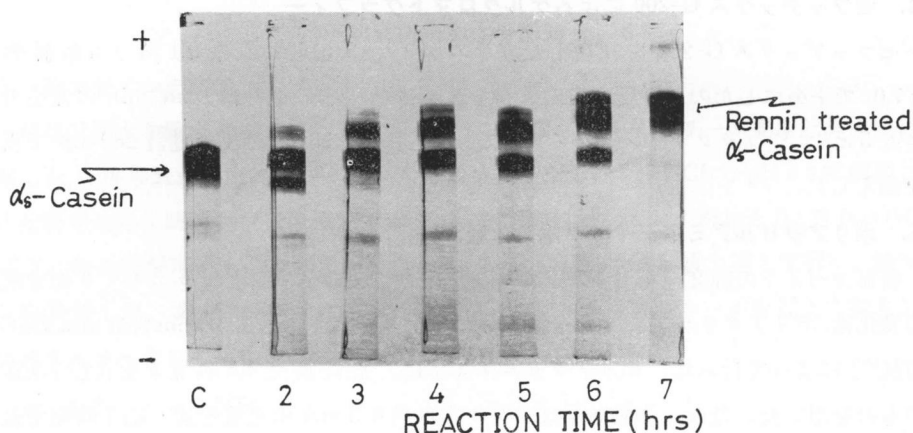


Fig. 1. Disc gel electrophoretic pattern of the degradation products of bovine  $\alpha_s$ -casein, at different time intervals, by rennin at 30°C and pH 7.0.

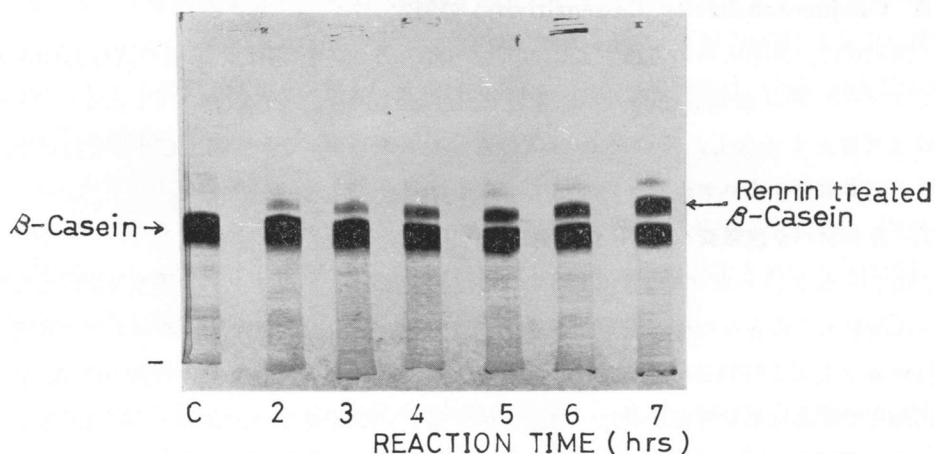


Fig. 2. Disc gel electrophoretic pattern of the degradation products of bovine  $\beta$ -casein, at different time intervals, by rennin at 30°C and pH 7.0.

Fig. 1 および 2 の電気泳動図から完全にレンニン変性した  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインは染色の状態から見ると未反応の  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインとほぼ同じ単一のバンドを呈しているが、しかし、移動度は異なった。このことは、レンニンが未変性  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインより小さい分子量のカゼインフラグメントに切断したものと考えられる。一方、レンニンを各々のカゼインに作用させて経時的に 3% TCA 可溶性の NPN 遊離変化をとらえた結果を Fig. 3 に示した。これによると反応 7 時間においても TN に対する比率は  $\alpha_s$ -カゼインで約 2%,  $\beta$ -カゼインでは約 1% にすぎず、 $\kappa$ -カゼインの変化と比較するとその反応速度

や遊離する NPN の量が極めて低く、 $\alpha_s$ -および  $\beta$ -カゼインはレンニンの基質として非常に反応し難いものと考えられるがしかし、レンニン以外のタンパク質分解酵素が容易にこれらのカゼインを分解するという報告<sup>12)</sup>から見てこの推測は該当しない。このことからレンニンの非常に強い特異性を持つ作用、すなわちレンニンが作用する Phe-Met あるいは Phe-Phe 結合<sup>5)</sup>の数が極めて少ないものと考えられる。また Fig. 1 および 2 の電気泳動図の結果からレンニンが  $\alpha_s$ - および

$\beta$ -カゼインを比較較均一なカゼインフラグメントに解裂するとの推測から一定時間反応をうけた  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインをセファデックス G-200 によりゲルクロマトグラフィーを行いレンニン変性カゼインと未変性カゼインとの分離を行い Fig. 4 および 5 に示した。

Fig. 4 は  $\alpha_s$ -カゼインにレンニンを3時間、5時間および7時間反応させたあとセファデックス G-200 によりゲルクロマトグラフィーを行った結果を示したが、反応時間が長くなるにともない Void Volume より僅かに遅れて流出する未変性  $\alpha_s$ -カゼインが減少し、それとは対照的に遅れて流出するレンニン変性  $\alpha_s$ -カゼインは経時的に増加の傾向が認められた。一方、Fig. 5 の  $\beta$ -カゼインのゲルクロマトグラフィーの結果を見ると、 $\alpha_s$ -カゼインとほぼ同じ傾向を示してはいるもののただ Fig. 2 から明らかなように  $\alpha_s$ -カゼインと比較しレンニンに分解され難いことから反応時間を更に遅延することにより、 $\beta$ -カゼインは完全にレンニン変性  $\beta$ -カゼインに変化することがゲルクロマトグラフィーから認め

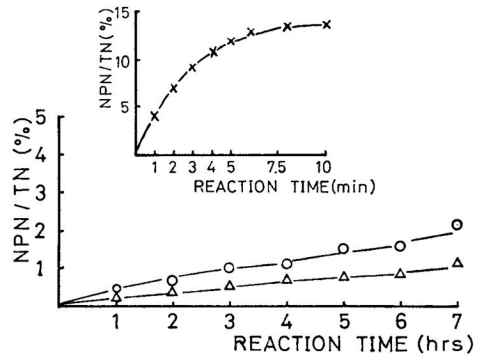


Fig. 3. Comparison of 3% TCA soluble NPN of  $\kappa$ -,  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein by rennin action.

× :  $\kappa$ -casein    ○ :  $\alpha_s$ -casein    △ :  $\beta$ -casein

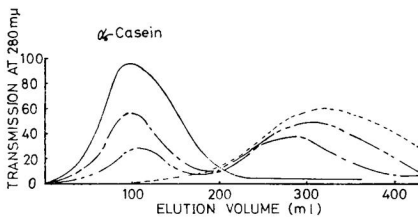


Fig. 4. Effluent diagram of  $\alpha_s$ -casein and rennin treated  $\alpha_s$ -casein obtained from Sephadex G-200 column.

— : control    - - - : 3 hrs  
- . - . : 5 hrs    ..... : 7 hrs

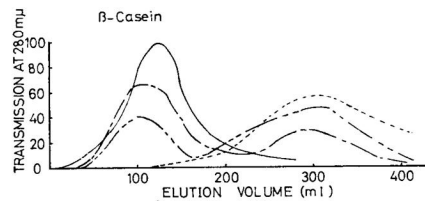


Fig. 5. Effluent diagram of  $\beta$ -casein and rennin treated  $\beta$ -casein obtained from Sephadex G-200 column.

— : control    - - - : 7 hrs  
- . - . : 10 hrs    ..... : 18 hrs

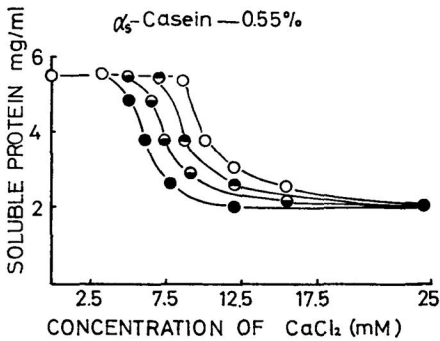


Fig. 6. Effect of calcium concentration of  $\alpha_s$ -casein and rennin treated  $\alpha_s$ -casein.

○ : control      ● : 3 hrs  
● : 5 hrs      ● : 7 hrs

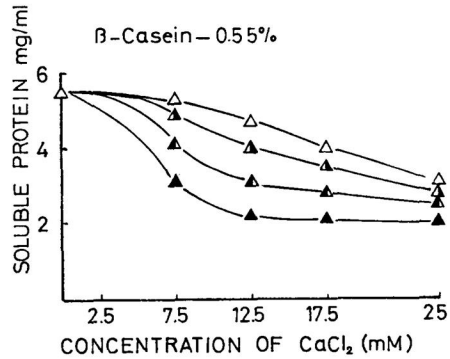


Fig. 7. Effect of calcium concentration of  $\beta$ -casein and rennin treated  $\beta$ -casein.

△ : control      ▲ : 7 hrs  
▲ : 10 hrs      ▲ : 18 hrs

られた。現在、 $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインの分子量は、共に  $25,000^{11)}$  前後と報告されているが、セファデックス G-200 の粒子内に拡散する最大分子量は  $200,000$  までであるところからレンニン作用により生成されたカゼインフラグメントの分子量は Fig. 4 および 5 にあらわれているピークの流出位置を未変性の  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインのピークの流出位置と比較し推測して最大の分子量で  $15,000$  前後と考えられるが、ピークの幅を考慮に入れると分子量の異なるカゼインフラグメントが多数存在しているものと考えられる。更にこのカゼインフラグメントは反応時間が長くなると更に小さい分子量のものに分解される傾向を Fig. 4 および 5 は示している。

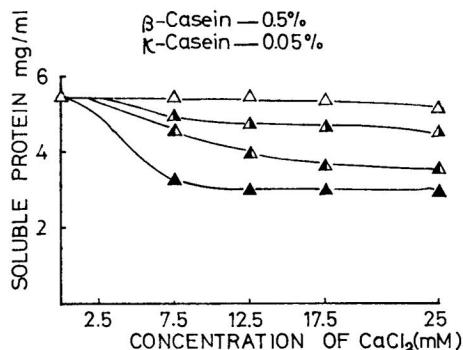
$\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインは共に 2 価の金属イオンに対して結合し易い性質を有しているが中でも特に  $\alpha_s$ -カゼインは著しい。これらカゼインがレンニン処理によって変性した時の Ca との結合性の変化を Fig. 6 および 7 に示した。

Fig. 6 は一定時間レンニン処理した  $\alpha_s$ - カゼインの Ca-sensitivity の変化を示している。これによると、未変性  $\alpha_s$ -カゼインでは Ca 濃度を  $10$  mM まで添加しても沈殿は認められなかった。しかし、反応時間の経過と共に  $10$  mM 以下の Ca 濃度でも容易に沈殿した。 $\alpha_s$ -カゼインが全て変性すると考えられる反応  $7$  時間では Ca 濃度  $2.5$  mM まで沈殿は認められなかった。一般に  $\beta$ -カゼインは  $\alpha_s$ -カゼインと比較し Ca-sensitivity が弱い。Fig. 7 を見ると Ca 濃度差による Ca-sensitivity の変化は  $\alpha_s$ -カゼインほど顕著ではないが、しかしレンニン反応時間の増加にともない Ca-sensitivity の増加が認められた。

EL-Negoumy<sup>3)</sup> は、レンニンを  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインに作用させた時に 2 種類のカゼインフラグメント (Ca-sensitivity product および Ca-Insensitivity product) を分離し、

$$\begin{array}{ccccc} \text{rennin action} & & & \text{rennin action} & \\ \text{native } \alpha_s, \beta\text{-casein} \longrightarrow & \text{Ca-insensitive } \alpha_s, \beta\text{-casein} & \longrightarrow & \text{Ca-insensitive } \alpha_s, \beta\text{-casein} & \\ & (\text{Ca-sensitivity product}) & & (\text{Ca-insensitivity product}) & \\ & & \uparrow & & \\ & & \text{critical point} & & \end{array}$$

Fig. 8 では電気泳動およびセファデックスゲルクロマトグラフィーで確認された変性  $\alpha_s$ -カゼインに  $\kappa$ -カゼインを添加することによって Ca による沈殿が妨げられて安定性が増加した。また, Fig. 9 において, 変性  $\beta$ -カゼインに  $\kappa$ -カゼインを添加した場合の Ca に対する安定性は僅かに増加した。このことは, 牛乳あるいは各種調整カゼインにレンニンを作用させ得られた変性カゼインに  $\kappa$ -カゼインを加えた時の相互作用に関する研究報告<sup>7), 17), 18)</sup> においても明らかである。以上の実験結果から総合的に考察するとタンパク分解作用の弱いレンニンにより作用を受けた  $\alpha_s$ -および  $\beta$ -カゼインは, 前の模式図でも示した



Symbols are the same as in Fig. 6.

Symbols are the same as in Fig. 7.

ように、Ca-sensitivity を有するカゼインフラグメントが critical point を経過すると Ca-insensitivity のカゼインフラグメントに変化してゆくものと考えられる。一方、critical point に達しないカゼインフラグメントに  $\kappa$ -カゼインを添加すると相互作用を起こし、Ca に対する安定性が、未変性の  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインと同様に増大することが明らかとなりこれは、レンニン変性  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインの Ca 結合部位に  $\kappa$ -カゼインが結合し複合体を形成することによるものと考えられる。

## 要 約

1. レンニンを  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインに反応させその経時的な変化をポリアクリルアミドディスク電気泳動により観察を行った結果、変性  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインは未変性  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインより速く陽極に移動し、しかも未変性  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインと同様に単一なバンドを呈した。また分解の程度は、 $\alpha_s$ -カゼインの方が  $\beta$ -カゼインより早く分解された。

2. セファデックス G-200 ゲルクロマトグラフィーにより変性  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインと未変性  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインとを分離することができた。また変性  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインはレンニンの反応時間を長くするにつれて更に小さなカゼインフラグメントに解裂する傾向を示した。

3. Ca-sensitivity においては、変性  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインの方が未変性  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインより Ca-sensitivity が増加した。また  $\kappa$ -カゼインの添加により変性  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインの Ca-sensitivity は未変性の  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインと同様に Ca に対する安定性が増加した。

4. 項目 3 から、レンニンにより完全に変性した変性  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインは未変性の  $\alpha_s$ - および  $\beta$ -カゼインの性質の一部を未だ有しているものと考えられる。

## 謝 辞

最後に本論文の御校閲を賜った本学遊佐孝五教授に感謝致します。

## 文 献

- 1) Berridge, N. J., 1945. The purification and crystallization of rennin. *Biochem. J.* **39**: 179-186.
- 2) Creamer, L. K. and O. E. Mills., 1971. The action of rennets on the caseins. 1. Rennin action on  $\beta$ -casein B in solution. *J. Dairy Res.* **38**: 269-281.
- 3) EL-Negoumy, A. M., 1970. The tertiary phase of rennin action on  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -caseins. *J. Dairy Res.* **37**: 437-444.



- 4) Foltmann, B., 1959. On the crystallization, stability and proteolytic activity of rennin. *Acta Chem. Scand.* **13**: 1927-1935.
- 5) Hill, R. D., E. Lahav and D. Givol, 1974. A rennin-sensitive bond in  $\alpha_s$ -B-casein. *J. Dairy Res.* **41**: 147-153.
- 6) Hipp, N. J., M. L. Groves, J. H. Custer and T. L. McMeekin, 1952. Separation of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -casein. *J. Dairy Sci.* **35**: 272-281.
- 7) Hoagland, P. D., 1968. Acylated  $\beta$ -casein. Effect of alkyl group size on calcium ion sensitivity and on aggregation. *Biochemistry* **7**: 2542-2546.
- 8) 加藤 勲・三河勝彦・金 栄 教・安井 勉, 1970. カゼインに対するレンニン作用 第1報 レンニン反応の一次相に及ぼす塩類の影響. 北海道大学農学部邦文紀要 **7**: 477-481.
- 9) Lindquist, B., 1963. Casein and the action of rennin. part I, II *Dairy Sci. Abstr.* **7**: 257-308.
- 10) 三河勝彦・加藤 勲・安井 勉, 1973. カゼインに対するレンニン作用 第2報 レンニン反応の一次相に及ぼす  $\alpha_s$ -および  $\beta$ -カゼインの影響. 北海道大学農学部邦文紀要 **9**: 110-115.
- 11) McKenzie, H. A. and R. G. Wake, 1959. Studies on casein. III The molecular size of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein. *Aust. J. Chem.* **12**: 734-742.
- 12) Mullin, W. J. and F. H. Wolfe, 1974. Disc gel electrophoresis of caseins treated with proteolytic and glycolytic enzymes. *J. Dairy Sci.* **57**: 9-14.
- 13) Noble, R. W. and D. F. Waugh, 1965. Casein micelles. Formation and structure I. *J. Am. Chem. Soc.* **12**: 734-742.
- 14) Nitschmann, Hs. and W. Keller, 1955. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. Über die Abspaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (NPN) aus isoliertem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein durch Lab. *Helv. Chim. Acta*, **38**: 942-946.
- 15) Ornstein, L. and B. J. Davis, 1964. Disc electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 321-404.
- 16) Payens, T. A. J. and B. W. van Markwijk, 1963. Some features of the association of Beta-casein. *Biochim. Biophys. Acta* **71**: 517-530.
- 17) Pepper, L., N. J. Hipp and W. G. Gordon, 1970. Effects of modification of  $\epsilon$ -amino groups on the interaction of  $\kappa$ - and  $\alpha_s$ -caseins. *Biochim. Biophys. Acta* **207**: 340-349.
- 18) Woychik, J. H., E. B. Kalan and M. E. Noelken, 1966. Chromatographic isolation and partial characterization of reduced  $\kappa$ -casein components. *Biochemistry* **5**: 2276-2282.
- 19) 吉野梅夫・中谷延二・所 洋・山内邦男, 1966. DEAE-セルローズクロマトグラフィーによるレンニットの精製. 日農化会誌 **40**: 52-57.
- 20) Zittle, C. A. and J. H. Custer, 1963. Purification and some of the properties of  $\kappa$ - and  $\alpha_s$ -casein. *J. Dairy Sci.* **46**: 1183-1188.

### Summary

The coagulation of milk by the action of rennin may be conveniently observed by two phases (primary phase and secondary phase). In the primary phase the rennin hydrolyzes  $\kappa$ -casein and then para  $\kappa$ -casein aggregates itself in the secondary phase. At presently, it is known that  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein are gradually degraded over a long time. This is called the tertiary phase. This paper is a report on the properties of rennin treated  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein and the results are summarized as follows.

1. The rennin treated  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein produced from  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein by the action of rennin exhibited a single band as shown in disc gel electrophoresis.
2. Both of the treated  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein were separated by Sephadex G-200 gel filtration.
3. Rennin degraded  $\alpha_s$ -casein more rapidly than  $\beta$ -casein.
4. Calcium sensitive ability of the treated  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein became lower by an addition of  $\kappa$ -casein. This indicates that there may exist some interaction between the treated  $\alpha_s$ - or  $\beta$ -casein and  $\kappa$ -casein.
5. From the fact of item 4, it was concluded that the  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein thoroughly treated by rennin still retains properties of the untreated  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein.