

α_{s1} -I-k-케이스인 복합체의 칼슘에 의한 중합

尹 彰 焄

Polymerization of α_{s1} -I-k-casein Complex by Calcium Ions

Yoon Chang-hoon

Summary

α_{s1} -I-k-casein complex were dissolved in 0.05M cacodylate-HCl-0.07M KCl buffer containing 0.02% sodium azide (pH 7.1) and observed with the electron microscope. The shape of the complex in the absence of calcium ions was spherical particle and the mean length of these particles was 10nm. When the calcium concentration was more than 10mM, the particles polymerized into bent chains, although micelle-like aggregates were not observed even at 15mM calcium.

It is suggested from comparison of the frequency distributions of α_{s1} -I-k-casein complex at 0, 5, 10, and 15mM of calcium with the calculated probability distributions that α_{s1} -I-k-casein complex have two binding sites above 10mM of calcium, which are similar to the binding sites of α_{s1} -I-k-casein complex formed at the same concentration of calcium.

序 論

前報(Yoon, 1984 b)에서 칼슘의 존재에서 α_{s1} -I-케이스인과 他케이스인 성분과 相互作用에 대해서 檢討했지만, α_{s1} -I-케이스인은 k-케이스인과 複合體를 形成한다는 것을 確證할 수 없었다. α_{s1} -I-k-케이스인 複合體의 沈降係數 및 沈降패턴은 α_{s1} -k-케이스인 複合體의 沈降係數 및 沈降패턴과 類似했다. 이 事實로부터 分子量 등의 諸性質에 있어서 兩者間에 大差는 없을 것이라고 생각된다. 그러나 α_{s1} -I-케이스인과 α_{s1} -케이스인 사이에는 칼슘에 의한 性質이 다르기 때

문에 칼슘의 존재에서는 兩者間에 差異가 있으리라고 豫想된다. α_{s1} -k-케이스인 複合體와 칼슘과의 相互作用에 관해서 충분히 밝혀져 있지 않지만, 칼슘濃도가 增加함에 따라서 沈降係數가 增加한다던지 칼슘10mM附近에서 偏比容이 顯著하게 增大한다는 것이 알려져 있다(Kaminogawa 등, 1977). 그리고 최근에 Dosako等(1980)은 칼슘의 존재에서 重量比 1:1의 α_{s1} -k-케이스인 複合體의 形態를 電子顯微鏡을 사용하여서 觀察했다. 그 結果 칼슘20mM 존재에서도 마이셀(micellas)狀의 것은 觀察되지 않는다는 事實로부터 α_{s1} -케이스인에 存在하는 3個의 結合 site가 複合體에서는 2個밖에 생기지 않는다는

것을 示唆했다.

本實驗에서는 α_{s1} -I-k-케이스인 複合體의 칼슘에 의한 形態의變化를 電子顯微鏡을 使用해서 觀察했고 아울러 이들의 重合過程을 α_{s1} -k-케이스인 複合體의 그것과 比較考察했다.

材料 및 方法

1. 케이스인調製

α_{s1} -I-케이스인 및 k-케이스인의 調製方法은 前報(Yoon, 1984)와 같다.

2. 電子顯微鏡觀察用試料의 作製

0.2% α_{s1} -I 및 k-케이스인을 0.07M KCl과 0.02% N_3Na 를 포함하는 0.05M 카코딜레이트-HCl 緩衝液(pH 7.1)으로 溶解시켰다. 各케이스인 溶液을 同量씩 混合해서 25°C에서 1時間放置한 後 CaCl_2 를 포함하는 上記緩衝液을 適當量 加하여 칼슘濃도가 0, 5, 10, 15mM이 되도록 調整했다. 이들 溶液을 다시 1時間放置한 後 前報(Yoon, 1984a)와 같은 方法으로 네가티브染色을 하여 Hitachi HU-12A型 電子顯微鏡을 使用하여 寫眞撮影했다.

3. 粒度分析

粒子길이 및 粒子數의 測定은 前報(Yoon, 1984a)와 같다.

4. 超遠心分析

1% α_{s1} -I 및 k-케이스인을 上記 카코딜레이트緩衝液으로 溶解시켰다. 各케이스인溶液을 同量씩 混合하여 25°C에서 1時間放置한 後 CaCl_2 를 포함하는 上記緩衝液을 適當量 加하여 칼슘濃도가 0, 5, 10, 15mM이 되도록 調整했다. 이들 溶液을 다시 1時間放置한 後 Hitachi UCA-1A型 分析用超遠機를 使用하여 超遠心分析했다. 分析條件은 55,430rpm, 25°C 및 슈리렌(Schlieren) 光學系이었다.

結 果

1. 超遠心分析

Fig.1에 α_{s1} -I-k-케이스인 複合體의 칼슘에 의한 沈降係數의 變化를 나타냈다. 칼슘濃도가 增加함에 따라서 沈降係數가 增加했다. 이 事實은 칼슘濃도의 增加에 의해 α_{s1} -I-k-케이스인 複合體가 重合하고 있다는 것을 나타내는 것이다.

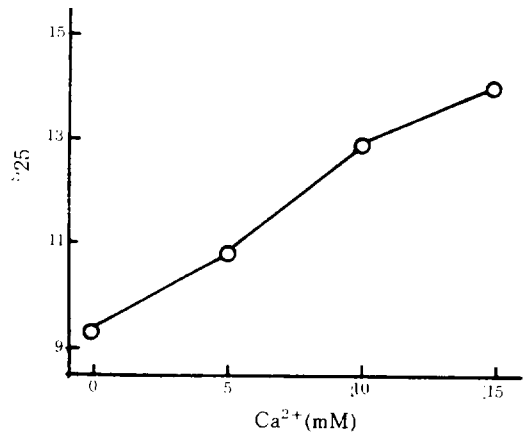


Fig. 1. Effect of calcium concentration on the sedimentation coefficient of α_{s1} -I-k-casein complex. 10mg of each casein component was dissolved in one ml of 0.05M cacodylate buffer containing 0.07M potassium chloride and 0.02% sodium azide (pH 7.1). Centrifugations were performed at 25°C

2. 電子顯微鏡觀察 및 粒度分布

電子顯微鏡寫眞을 觀察한 結果(Fig. 2) 칼슘의 不在時는 大部分의 粒子가 球形에 가까웠지만 칼슘濃도가 增加함에 따라서 球形의 것은 減少했고, 鎖狀으로 重合한 것이 增加했다. 그러나 칼슘을 15mM까지 加해도 마이셀狀의 것은 觀察되지 않았다.

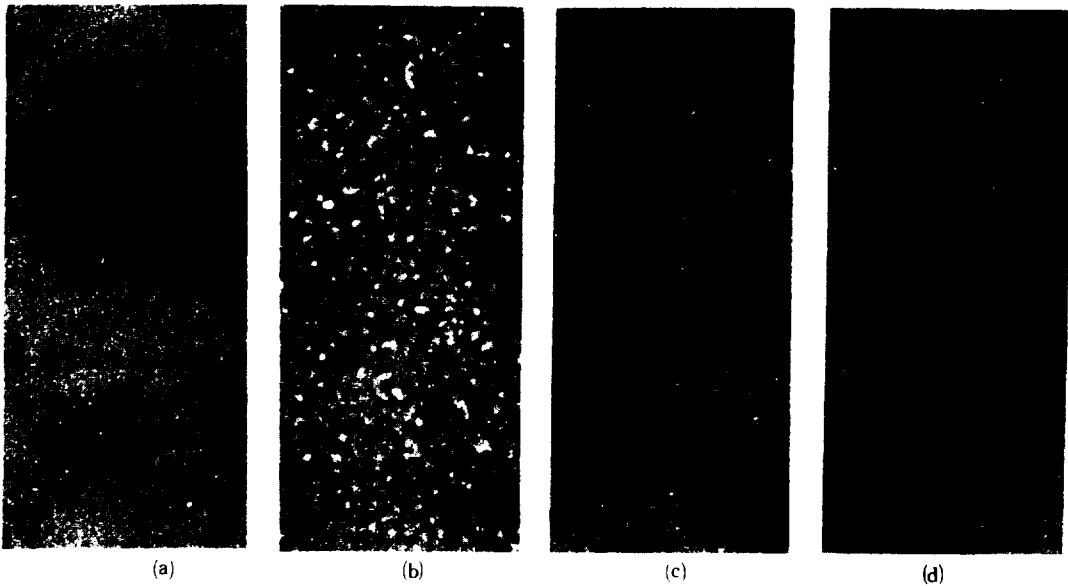


Fig. 2. Electron micrographs of α_{s1} -1-k-casein complex in the presence of 0mM(a), 5mM(b), 10mM(c) and 15mM calcium(d).
The scale bars represent 50nm.

α_{s1} -I-k케이스인 複合體에 칼슘 0~15mM을 加했 을 때 얻어진 粒度分布를 Fig. 3 (a)~(c)에 나타냈 다. 칼슘이 存在하지 않을 때는 9~12nm의 範圍에

分布하고 있는 粒子가 가장 많았으며, 30nm以上の 粒子는 觀察할 수 없었다.

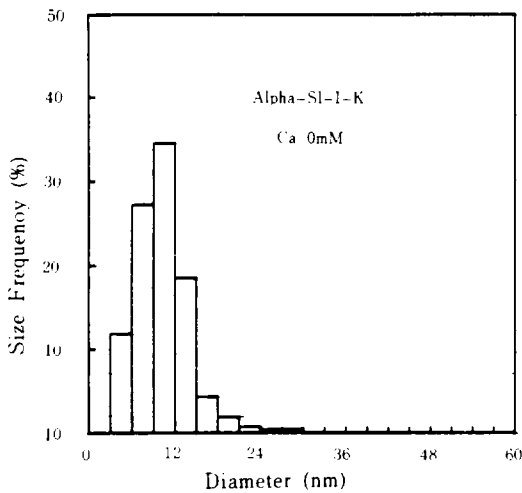


Fig. 3.(a) Size frequency distribution of α_{s1} -1-k-casein complex in the absence of calcium.

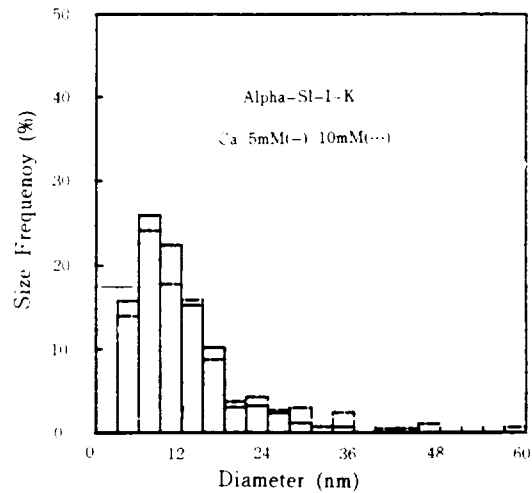


Fig. 3.(b) Size frequency distributions of α_{s1} -1-k-casein complex in the presence of 5 mM(—) and 10 mM(···) calcium.

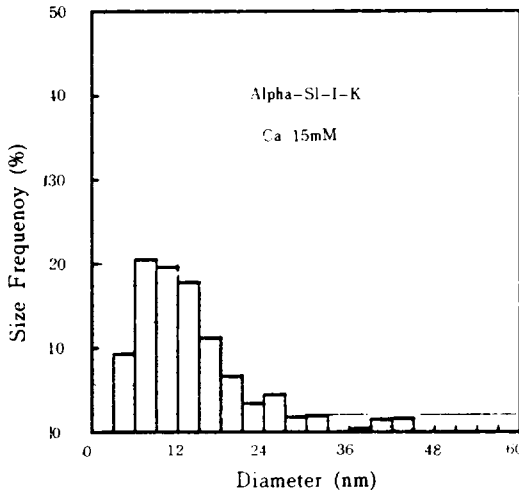


Fig. 3(c) Size frequency distribution of α_{s1} -1-k-casein complex in the presence of 15mM Calcium.

Fig. 4에 α_{s1} -I-k케이스인 복합체에 칼슘을 가했을 때의 평균길이의 변화를 나타냈다. 칼슘농도의 증가와 함께 평균길이가 증가했으며, 이것은沈降係數의 증가(Fig. 1)에 對應하는 것이다. 칼슘이 存在하지 않을 때의 평균길이는 10nm이며, Dosako 등이 報告한 k-케이스인 및 α_{s1} -k-케이스인 복합체의 평균길이 (各各 17nm 및 12nm) 보다 적은 값을 나타냈다.

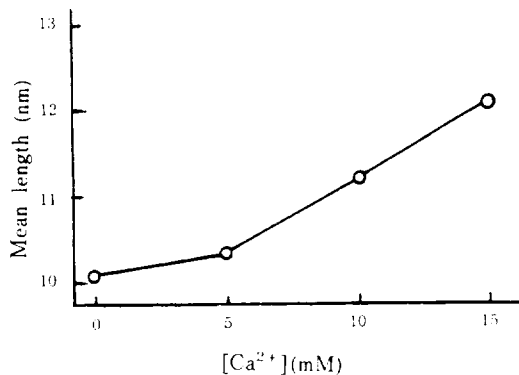


Fig. 4. Effect of calcium concentration on the mean length of α_{s1} -1-k-casein complex.

考 察

電子顯微鏡寫眞(Fig. 2)에서 α_{s1} -I-k케이스인 복합체는 칼슘不在時는 大部分의 粒子가 球形이었지만, 칼슘濃度の 증가와 함께 球形의 粒子가 減少하여 鎖狀으로 重合한 것이 增加했다는 것을 알 수 있었다.

Dosako等(1980)은 本實驗과 같은 方法으로 α_{s1} -k케이스인 복합체의 칼슘에 의한 重合過程을 調査한 바 있다. 그 結果 칼슘不在時는 거의 모든 粒子가 球形이었고, 鎖狀의 重合物은 極히 적었지만, 칼슘濃度の 증가와 함께 鎖狀의 重合物이 增加했으며, 특히 칼슘10mM以上에서 粒子의 平均길이가 顯著하게 增加했다고 報告했다.

그들은 또한 몇개의 假定을 設定하여서 電子顯微鏡寫眞로부터 얻어진 數頻度分布와 理論적으로 計算한 重合度i의 複合體가 出現할 수 있는 確率分布와를 比較했다. 그 結果 α_{s1} -k케이스인 복합체는 칼슘不在時는 結合 site를 가지지 않지만, 칼슘10mM이상에서는 2個의 結合 site를 通하여 重合한다고 報告했다. 그리고 이들 2個의 結合 site는 k-케이스인에 結合한 2分子의 α_{s1} -케이스인에 由來한다는 것을 示驗했다.

本 實驗에 있어서는 α_{s1} -I-k케이스인의 칼슘에 의한 重合過程을 Dosako等의 (1980)의 結果와 比較檢討할 目的에서 Dosako等(1980)의 設定한 假定을 α_{s1} -I-k케이스인 복합체에 適用시켰다.

〈假定〉

1. 칼슘不在時는 α_{s1} -I-k케이스인 복합체의 平均길이가 10nm(Fig. 4)이므로, Fig. 3(a)에서 9~12nm의 劃분에 分布하고 있는 粒子를 重合單位로 간주한다. 이후 이것을 C₁-UNIT라고 부른다(C₁으로 略稱).
2. C₁에 結合 site가 存在하지 않는 것(C₁₀), 1個의 結合 site가 存在하는 것(C₁₁) 및 2個의 結合 site가 存在하는 것(C₁₂)이 있으며, 이들의 出現率은 各各 S₀, S₁ 및 S₂로 한다(S₀+S₁+S₂=1).
3. C₁₀은 C₁와 會合하지 않기 때문에 C₁₁ 및 C₁₂

와 會合하는 確率을 A로 한다.

4. 簡單化하기 위하여 系가 平衡에 達하는 時間은 짧으며, 그 사이에 粒子는 1회밖에 衝突하지 않는다 (非復元抽出).

以上の 假定에 根據해서 Dosako(1980)은 重台度 i(Fig. 5에 模式圖를 나타냈다)가 形成되는 確率을 計算했다.

全粒子를 N으로 했을 경우, i=1의 粒子가 形成될 確率A(i)는

$$A(1) = 1 - A(S_1 + S_2)(NS_1 + NS_2)/(N-1)$$

2 ≤ i ≤ NS₂+2의 경우의 確率A(i)는

$$A(i) = \frac{(NS_2)!(N-i-1)!}{N!(NS_2-i+2)!} A^{i-1} (NS_1 + NS_2 - i + 1)$$

$$X [NS_1(N-i) + (NS_2-i+2) \{N-i-A(NS_1+NS_2-i)\}]$$

가 된다.

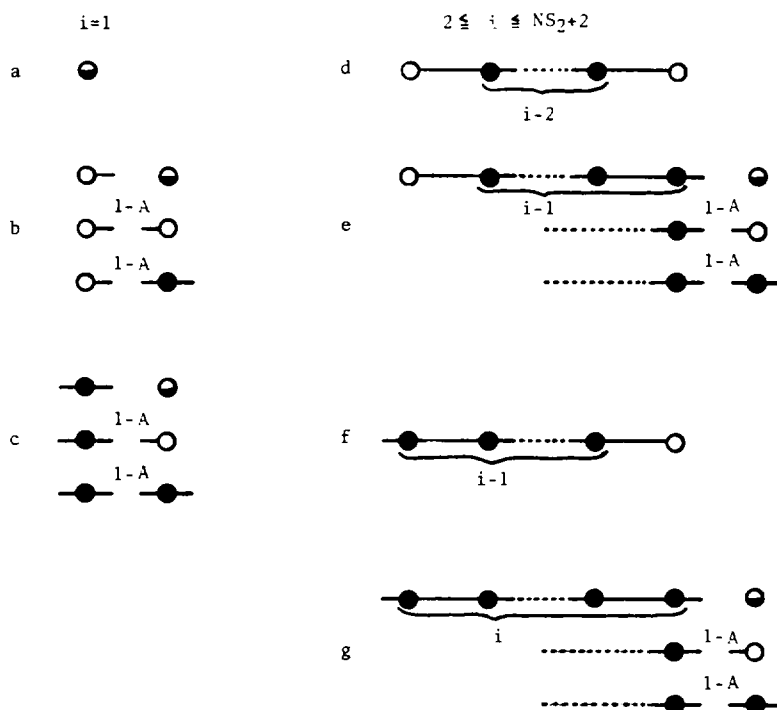


Fig. 5. Possible cases to form i-Mers of $\alpha_{s1}-1-k$ -Casein complex. A polymerizing unit having no binding site is represented as ●. units having one and two binding sites are represented as ○ and ●, respectively. A is the probability of association.

本實驗에 있어서도 上記式을 使用해서 S₁, S₂ 및 A를 파라미터로하여 칼슘 0, 5, 10 및 15mM을 加했을 때의 $\alpha_{s1}-1-k$ -케이스인 複合體의 電子顯微鏡寫眞으로부터 얻어진 數頻分布와 理論적으로 計算한 確率分布와를 比較했다. 그 結果 兩者가 가장 一致했

을 때의 것을 Fig. 6. (a)~(d)에 나타냈다.

Fig. 7은 S₀, S₁ 및 S₂值의 칼슘濃度에 의한 變化를 나타낸 것이다. S₀, S₁ 및 S₂值는 各칼슘濃度에서 칼슘10mM을 境界로 해서 急激히 變化했다. 즉 S₀ 및 S₁值는 減少했지만, S₂值는 顯著하게 增加했

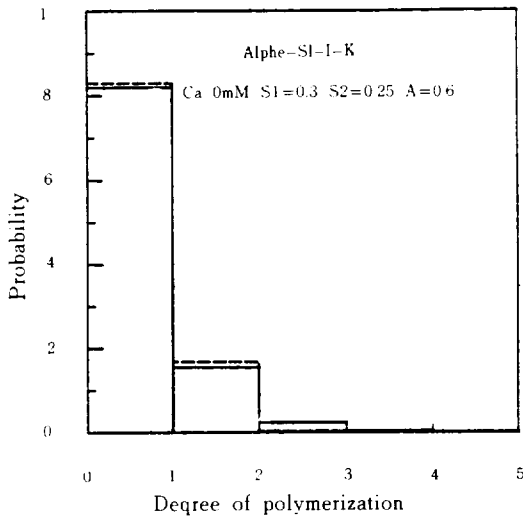


Fig. 6(a). Comparison between the theoretical and experimental frequency distribution of α_{s1} -1-k-casein i-Mers in the absence of calcium.
solid line; theoretical distribution
dotted line; experimental distribution

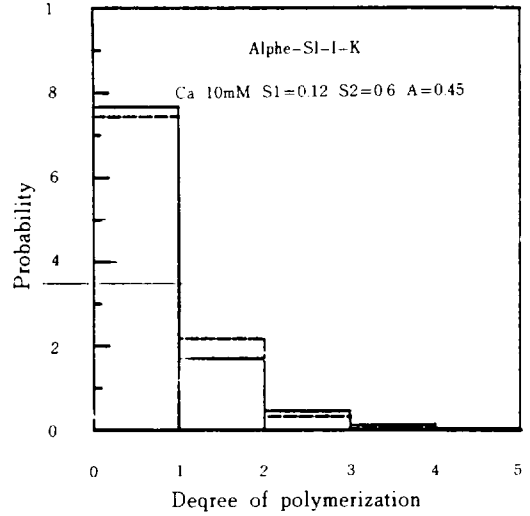


Fig. 6(c). Comparison between the theoretical and experimental frequency distribution of α_{s1} -1-k-casein i-Mers in the presence of 10mM calcium.
solid line; theoretical distribution
dotted line; experimental distribution

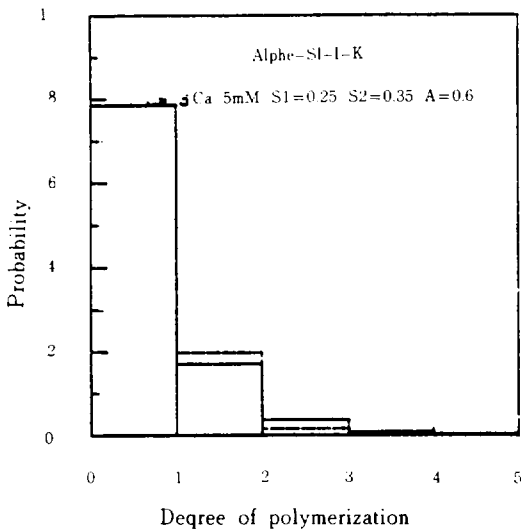


Fig. 6(b). Comparison between the theoretical and experimental frequency distribution of α_{s1} -1-k-casein i-Mers in the presence of 5 mM calcium.
solid line; theoretical distribution
dotted line; experimental distribution

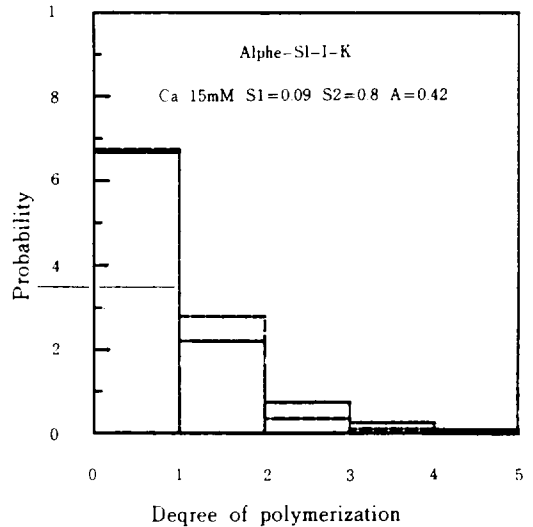


Fig. 6(d). Comparison between the theoretical and experimental frequency distribution of α_{s1} -1-k-casein i-Mers in the presence of 15 mM calcium.
solid line; theoretical distribution
dotted line; experimental distribution.

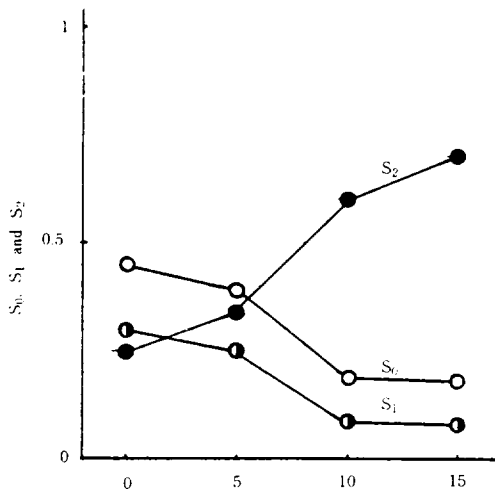


Fig. 7. Effect of calcium concentration on S_0 , S_1 and S_2 .

다. 이들파라미터의 변화로부터 다음과 같이推論할 수 있겠다. 즉 칼슘不在時는 1個 또는 2個의 結合 site를 가진 UNIT(C_1 및 C_2)는 적으며, 結合 site를 가지지 않은 UNIT(C_1O)가 約半(45%)를 차지하고 있다. 또 칼슘 10mM以上이 存在할 때는 結合 site를 가지지 않은 것이나 1個를 가진 것은 減少하는 反面에 結合 site 2個를 가진 것이 增加해서 60%以上이 된다. 前報(Yoon, 1984a)에서 記述한 바와 같이 α_{s1} -I-케이스인은 低칼슘濃度(0-10mM)에서는 1個의 結合 site를 가지지만, 10mM以上에서는 새로운 結合 site가 생겨서 모두 2個의 結合 site를 가진

다. 따라서 α_{s1} -I-k-케이스인 복합體에 있어서 k-케이스인이 結合 site를 가지지 않는다고 假定한다면 칼슘10mM 以上에서 생긴 2個의 結合 site는 α_{s1} -I-케이스인에 由來하는 것이라고 생각된다.

α_{s1} 및 α_{s1} -I-케이스인이 가지는 結合 site(Site I, II, III)와 Dosako等(1980)이 示唆한 α_{s1} -k-케이스인 복합體가 가지는 結合 site를 綜合해서 α_{s1} -k 및 α_{s1} -I-k-케이스인 복합體의 構成에 대해서 다음과 같이 示唆한다(Fig. 8에 模式圖). 즉 α_{s1} -케이스인은 3個의 結合 site를 가지고 있다. Site I은 α_{s1} 및 α_{s1} -I-케이스인이 k-케이스인等과 相互作用을 하는 部位이며, 칼슘不在時에도 存在한다. Site II는 칼슘濃度가 3mM以上이 되었을 때 나타나는데, 이 site는 칼슘에 의한 α_{s1} -케이스인의 沈殿에 直接的으로 影響을 미치고 있다. α_{s1} -I-케이스인은 α_{s1} -케이스인의 N末端領域이 欠落되어 있는 것으로서 칼슘에 의해 沈殿하지 않으므로 Site II는 α_{s1} -케이스인의 N末端領域에 該當되는 것이다. Site III은 칼슘濃度가 10mM以上이 되었을 때 나타난다. 그러나 이의 役割에 대해서는 現在 明白히 言及할 수 없으나, 케이스인마이크셀(casein micelles)의 構造를 維持시키는 役割을 하고 있다고 생각된다. 또한 칼슘濃度가 10mM以上이 되었을 때, α_{s1} -k 및 α_{s1} -I-k-케이스인 복합體는 모두 2個의 結合 site를 가진다는 事實은 α_{s1} -k-케이스인 복합體의 칼슘에 의한 重合過程과 α_{s1} -I-k-케이스인 복합體의 그것은 매우 類似하다는 것을 意味하는 것이다.

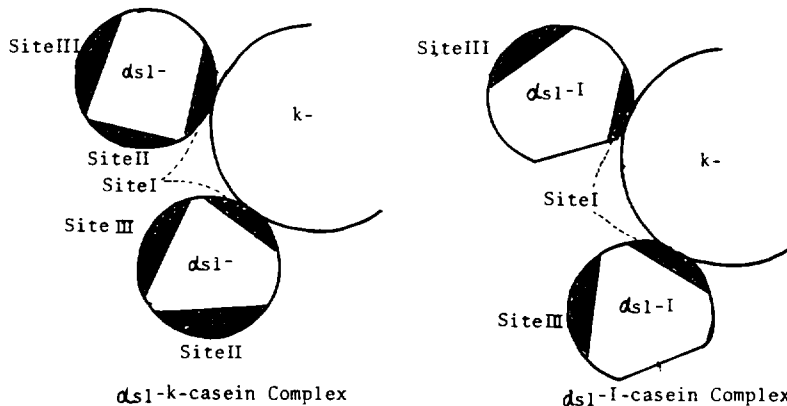


Fig. 8. Binding sites assumed in α_{s1} -I-k-casein complex and α_{s1} -k-casein complex.

摘 要

α_{s1} -I-케이스인 복합체의 칼슘에 의한 중합過程을 調査하기 위하여 電子顯微鏡을 使用하여 케이스인粒子を 觀察했으며, 이 結果에 케이스인粒子の 會合確率을 simulation시켰다.

電子顯微鏡觀察에서는 칼슘不在時에 大部分의 粒

子は 球形이었지만 칼슘 10mM以上에서는 球形의 것은 減少했고, 鎖狀으로 重合한 것이 增加했다. 그리고 simulation의 結果, α_{s1} -I-케이스인은 칼슘 10mM以上の 存在時 2個의 結合 site를 가진다는 것이 밝혀졌다. 이것은 α_{s1} -k케이스인 복합體의 칼슘에 의한 重合의 경우와 一致하는 것으로서 α_{s1} -I-케이스인의 칼슘에 의한 重合過程은 α_{s1} -k케이스인 복합體의 그것과 매우 類似하다는 것을 示唆하는 것이다.

參 考 文 獻

- Dosako S., Kimura T., Taneya S., Sone T., Kaminogawa S., Yamauchi K., 1980. Polymerization of α_{s1} -k-Casein Complex by calcium Ions. *Agr. Biol. Chem.*, 44, 2449.
- Kaminogawa S., Koide K., Yamauchi K., 1977, Interaction of α_{s1} -k-casein Complex with Alkaline-earth-metal Ions. *Agr. Biol. Chem.*, 41, 697.
- Yoon C. H., 1984a Polymerization of α_{s1} -I-casein by Calcium Ions. *Cheju Nat. Univ. J.*, 18, 57.
- Yoon C. H., 1984b, Interaction of α_{s1} -I-casein with other casein components. *Cheju Nat. Univ. J.*, 19, 95.