

α_{S1} -Iカゼインのカルシウムによる重合

尹 彰 焄

Polymerization of α_{S1} -I Casein by Calcium Ions

Yoon Chang-hoon

Summary

Polymerizations of α_{S1} -I casein by calcium ions were investigated by using electron microscope. The particles of α_{S1} -I casein in the absence of calcium were spherical, but they polymerized into bent chains by the addition of calcium. The mean length of α_{S1} -I casein increased slightly with the increase in calcium concentration. Based on these results, it was assumed that the smallest particle (polymerizing unit) has one (U_1) or two (U_2) binding sites and the probability to form i-mers of unit was calculated by using their parameters such as the ratio of U_2 in all units and the association probabilities of U_1 and U_2 . These results were compared with the frequency distributions obtained from electron micrographs. It was suggested from the comparisons that α_{S1} -I casein has one binding site over the range of calcium 0-10 mM and it has two binding sites above 10mM calcium because of lacking of one binding site among three binding sites in α_{S1} -casein.

緒 言

前報で¹⁾ α_{S1} -Iカゼインと α_{S1} -カゼインの諸性質を調べたところ、物理化学的性質、例えば高次構造、イオン強度依存會合性およびカルシウム結合力等において、 α_{S1} -Iカゼインは α_{S1} -カゼインと似た性質をもっていたが、カルシウムによる沈殿性においては異なり、 α_{S1} -Iカゼインはカルシウムにより沈殿しなかつた。 α_{S1} -Iカゼインは α_{S1} -カゼインのN-末端側が脱落していることから^{2,3)} α_{S1} -カゼインのカルシウムによる沈殿にはN-末端側が結合サイトとして重要な役割を果していることが示唆された。

しかしながら、 α_{S1} -Iカゼインはカルシウム10mM以上

の添加によりその沈降係数が増加することも同時に認められている。このようにある程度まで重合する機能は保持しながらなぜ沈殿機能を失つたかについて詳細に調べることが、 α_{S1} -カゼインのカルシウムによる沈殿機構を解明するのに役立つと思われる。

そこで、本研究では、カルシウムを添加したときの α_{S1} -Iカゼインの形態を電子顕微鏡を用いて観察し、その重合過程を結合サイトとの関連で考察した。

材料および方法

a) α_{S1} -Iカゼインの調製

α_{S1} -I ケゼインは前報¹⁾と同様に調製した。

b) 試料の作製および電子顕微鏡観察

0.2% α_{S1} -I ケゼインを0.07 M 鹽化カリウムと0.02% アジ化ナトリウムを含む0.05 M カコジレート-鹽酸緩衝液 (pH7.1) に溶解した。この溶液を25℃で1時間放置した後、あらかじめ25℃に保つた上記緩衝液および40 mM 鹽化カルシウムを含む同緩衝液を用いてカルシウム濃度0.5, 10, 15 および20 mM になるように調製した。この際、 α_{S1} -I ケゼインの最終濃度は0.1%であった。さらに25℃で1時間放置した後、電子顕微鏡観察用の試料とした。試料の作製は飽和酢酸ウラニルを用いて滴加法²⁾によりネガタイプ染色を行い、観察にはHitachi HU-12A型電子顕微鏡を用いた。この際、ビーム電流は20 mA以下、電子顕微鏡寫眞は70,000倍で撮影し、同寫眞を最終倍率336,000倍に擴大した。

c) 粒度分布

α_{S1} -I ケゼイン粒子の長さを擴大した電子顕微鏡寫眞

を用いShimazu Frequency Analyzerにより測定した。

長さは粒子の長軸および短軸の平均で表わした。測定した全粒子は3 nm間隔で20等分した。粒度分布は $N_i \bar{l}_i / \sum N_i \bar{l}_i \times 100$ (%)により求めた。ここで \bar{l}_i は粒子の長さ、 N_i は長さ \bar{l}_i の粒子数である。平均長さ \bar{l} は $\sum N_i \bar{l}_i / \sum N_i$ により求めた。計算はYHP 45S Personal Computerを用いて行った。

結 果

a) 電子顕微鏡観察

α_{S1} -I ケゼインに0~20 mMカルシウムを添加し、電子顕微鏡寫眞を撮影したが、その中で典型的なものをFig. 1に示した。カルシウムが存在しない時は、ほとんどの α_{S1} -I ケゼインは球状に近かったが、鎖状につながっているものもあつた。しかし、カルシウム濃度の増加とともに球状のものは減少し、鎖状に重合しているものが増加した。カルシウム20 mMにおいてもミセル状のものは存在しなかつた。

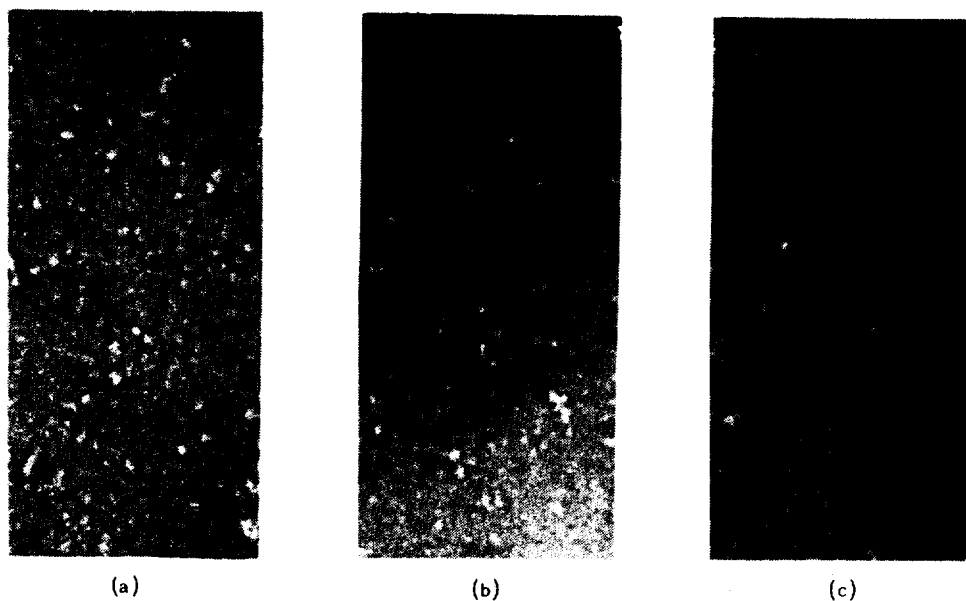


Fig.1. Electron micrographs of α_{S1} -I casein in the presence of 0 mM(a), 10 mM(b) and 20 mM calcium(c). The scale bars represent 50 nm.

b) 粒度分布

Fig. 2 a)~c)に0~20 mMカルシウムを添加した時の α_{S1} -I ケゼインの粒度分布を示した。カルシウム10 mMまでは、 α_{S1} -I ケゼインの粒度分布にあまり変化が認められなかつたが、カルシウム10 mM以上では、長さ3~6 nmの粒子の頻度が減少し、長さの大きい粒子が増加した。

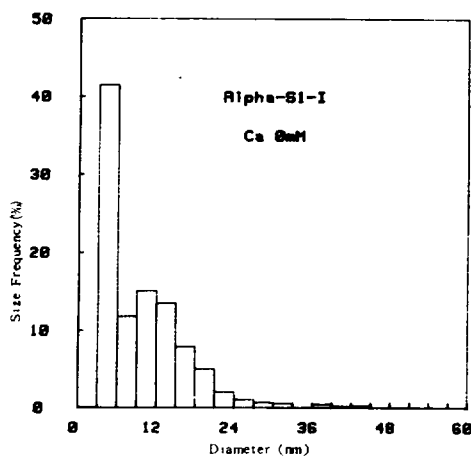


Fig. 2(a) Size frequency distribution of α_{S1} -I casein in the absence of calcium.

Fig. 3 にはカルシウム濃度の増加に伴う α_{S1} -I ケゼインの平均長の變化を示した。カルシウムが存在しない時の平均長さは9 nmであり、 α_{S1} -I ケゼインのそれと差はなかつた。⁵⁾カルシウム濃度が増加するに伴い平均長さが増加したことは沈降分析の結果¹⁾すなわちカルシウム濃度の増加に伴い沈降係数が増加したこととよく一致した。

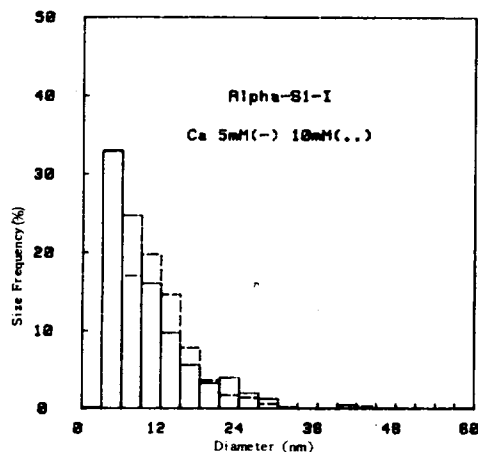


Fig. 2(b) Size frequency distributions of α_{S1} -I casein in the Presence of 5 mM(—) and 10 mM Calcium(.....).

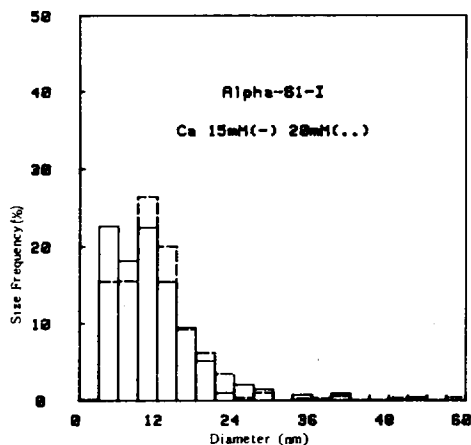


Fig. 2(c) Size frequency distributions of α_{S1} -I casein in the Presence of 15 mM(—) and 20 mM calcium(.....).

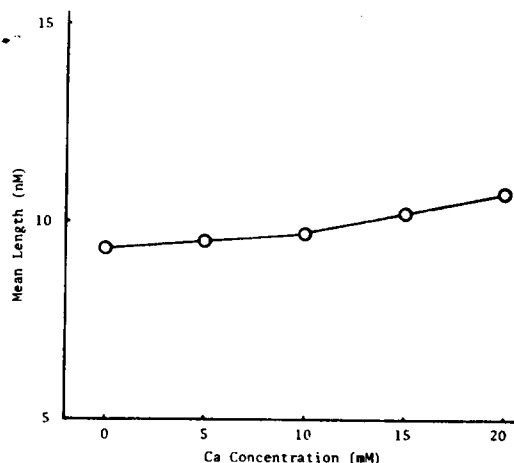


Fig. 3 Effect of Ca^{2+} concentration on the mean length of α_{S1} -I Casein.

考 察

電子顕微鏡写真 (Fig. 1) で見られるようにカルシウムが存在しない時の α_{S1} -I カゼイン粒子は大部分が球状であるが、カルシウム濃度が増加するに伴い鎖状に重合している粒子が増加している。このことは α_{S1} -I カゼインは2個の結合サイト通じて重合していることを示唆する。

Dosako⁵⁾らは α_{S1} -I カゼインのカルシウムによる重合過程を電子顕微鏡により観察し、 α_{S1} -I カゼインは、カルシウムが存在しない時は大部分が球状であるが、カルシウム濃度の増加とともに鎖状に重合したと述べている。また、彼らは α_{S1} -I カゼインがカルシウムにより鎖状に重合していることは α_{S1} -I カゼインの両端に他の粒子との結合に携わる1個あるいは2個の結合サイトが存在するためであると考えて、いくつかの仮定のもとに重合の基本単位となる粒子が重合する際、重合度 i の重合体が形成される確率分布を電子計算機を用いて計算し、電子顕微鏡写真より得られた数値分布にシミュレーションさせた。両者が最も一致した時のパラメーターから、 α_{S1} -I カゼインのカルシウムによる重合過程について結合サイトを考慮して新しい解析を試みている。この実験はカルシウム濃度0~3mMで行わ

れたものであるが、重合過程そのものの解析については本研究においても適応可能である。

そこで、次に述べる、Dosako⁵⁾が立てた仮定および方法に準じ、 α_{S1} -I カゼインのカルシウムによる重合過程の解析を試みた。

〔 仮 定 〕

1. α_{S1} -I カゼインの最小粒子は3~6nm (Fig. 1) であるため、これらを“UNIT₁”と呼ぶ。UNIT₁は結合サイトを1個あるいは2個持つ。以後結合サイトを1個持つUNIT₁をU₁1、結合サイトを2個持つUNIT₁をU₁2と呼ぶ。全粒子中に占めるU₁2の割合をQとする。

2. U₁1 同士が衝突した時は、それらが會合する確率をP₁、U₁2が他の粒子(U₁1 あるいはU₁2)と衝突した時は、それらが會合する確率をP₂とする。

3. 簡単化のために一つの粒子は1回しか衝突しないとする。すなわち、ある粒子に他の粒子が衝突した場合、もし會合しなければその粒子はもはやそれ以上他の粒子と衝突しない(非復元抽出とする)。

以上の仮定に基づいて、Dosako⁵⁾は重合度 i の重合体 (Fig. 4 に模式的に示した) が形成される確率を次のような式を用いて計算している。

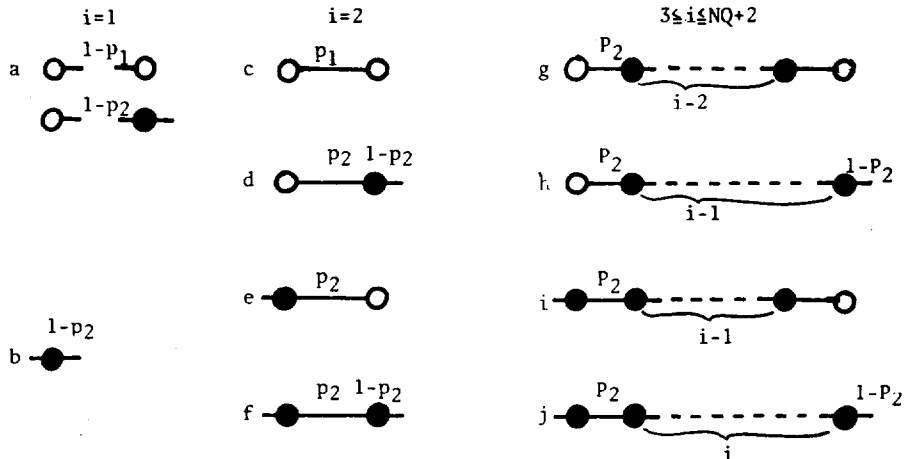


Fig. 4 Possible cases to form i -Mers of α_{S1} -I casein. Polymerizing units having one and two binding sites are represented as ○ and ●, respectively. P₁ is the probability that a unit having one binding site associates with another same unit. P₂ is the probability that a unit having two binding sites associates with other units having one or two binding sites.

全粒子数を N とした場合、 $i = 1$ の粒子が形成される確率 $P(1)$ は

$$P(1) = \frac{1-Q}{N-1} \{ N-1 - P_1(N-NQ-1) - NQP_2 \} + Q(1-P_2)$$

$i = 2$ の場合の確率 $P(2)$ は

$$P(2) = \frac{1-Q}{N-1} \{ N-NQ-1 \} P_1 + NQP_2(1-P_2) + \frac{QP_2}{N-1} \{ N-1 - P_2(NQ-1) \}$$

$3 \leq i \leq NQ + 2$ の場合の確率 $P(i)$ は

$$P(i) = \frac{(NQ)! (N-i)!}{N! (NQ-i+2)!} P_2^{i-1} (N-i+1) \{ (N-i+2) - P_2(NQ-i+2) \}$$

となる

本実験においてもこの計算式を適用し、 Q , P_1 および P_2 をパラメータとして UNIT₁ の重合度 i の重合體が形成される確率を電子計算機 (YHP45S 型) により計算した。

Fig. 5) a) ~ e) には計算した確率分布と実験的に得られた数頻度分布とが最も一致した時のものを示した。

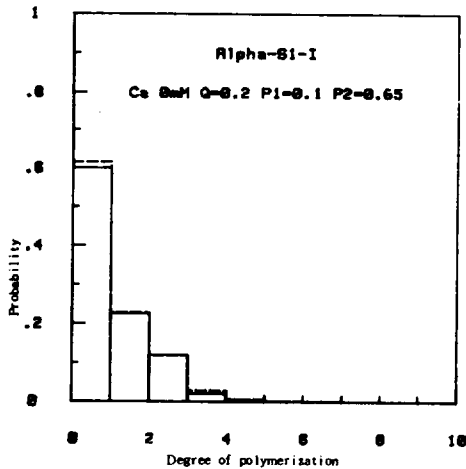


Fig. 5(a) Comparison between the theoretical and experimental frequency distribution of α_{S1} -I casein i-mers in the absence of calcium. solid line; theoretical distribution dotted line; experimental distribution

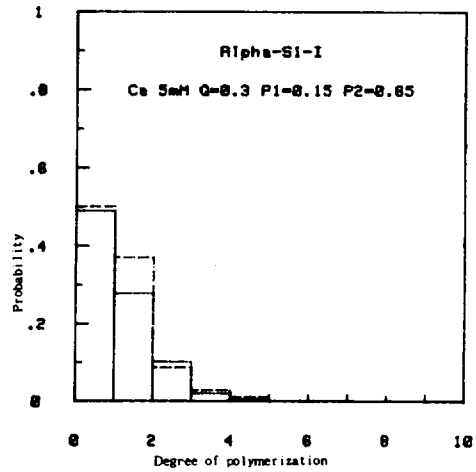


Fig. 5(b) Comparison between the theoretical and experimental frequency distribution of α_{S1} -I casein i-mers in the presence of 5 mM calcium. solid line; theoretical distribution dotted line; experimental distribution

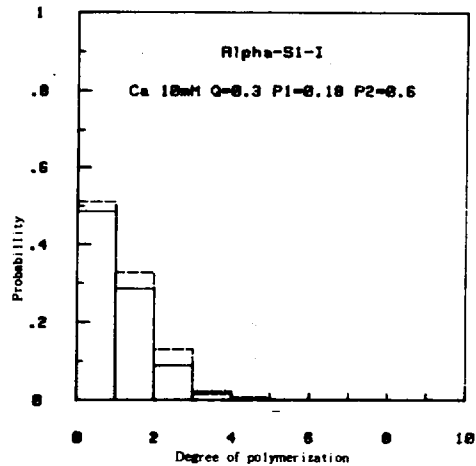


Fig. 5(c) Comparison between the theoretical and experimental frequency distribution of α_{S1} -I casein i-mers in the presence of 10 mM calcium. solid line; theoretical distribution dotted line; experimental distribution

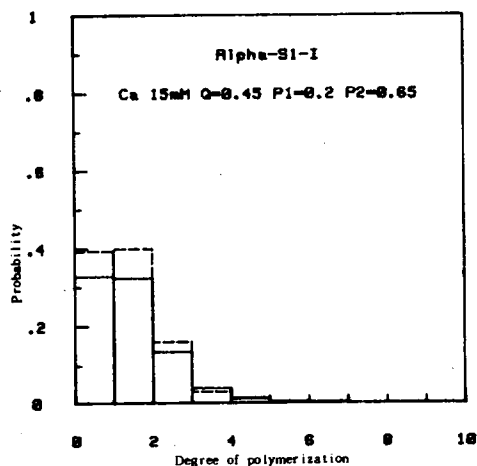


Fig.5(d) Comparison between the theoretical and experimental frequency distribution of α_{S1} -I casein i-mers in the presence of 15mM calcium.
solid line; theoretical distribution
dotted line; experimental distribution

P_1 および P_2 値はいずれのカルシウム濃度においてもほぼ一定であつたが、 P_1 値は小さく 0.1~0.2, P_2 値は 0.6~0.65 であつた。

しかし、Fig.6 に示したように Q 値はカルシウム濃度の増加に伴い増加した。特にカルシウム濃度 10mM 以上で著しく増加した。これは沈降係数および平均長さ (Fig. 3) がカルシウム濃度 10mM を境にして増加しているのと對

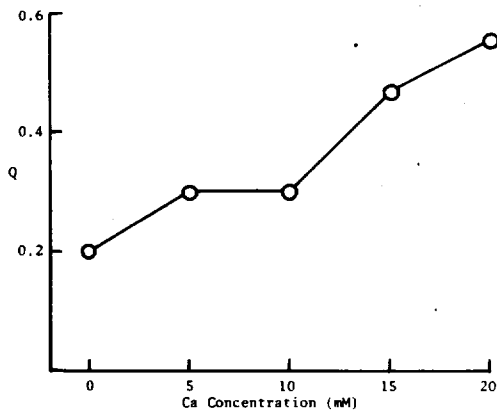


Fig.6 Effect of calcium concentration on Q.

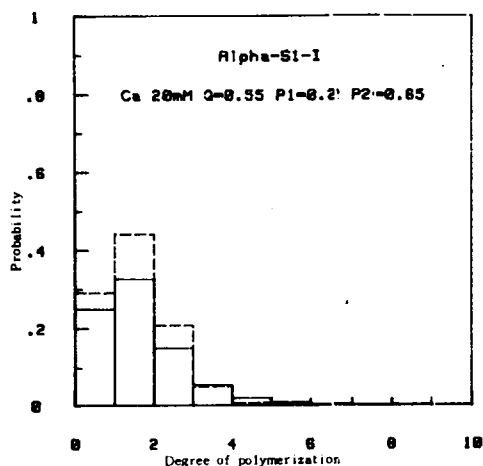


Fig.5(e) Comparison between the theoretical and experimental frequency distribution of α_{S1} -I casein i-mers in the presence of calcium 20mM.
solid line; theoretical distribution
dotted line; experimental distribution

應するものである。このように Q 値がカルシウム濃度 10mM を境にして大きく変化することはカルシウム濃度 0~10mM では大部分の α_{S1} -I ケーシン粒子は 1 個の結合サイトを持つが、カルシウム 10mM 以上では新たな結合サイトが生成され、2 個の結合サイトを持つことを示唆するものと思われる。

ここで、Dasako ら⁵⁾による、 α_{S1} -カゼインについて同様の方法で行われた実験結果と比較してみる。彼らの結果では α_{S1} -カゼインに 0~3mM のカルシウムを添加した場合、カルシウム濃度 3mM において $Q = 0.46$, $P_1 = 0.01$, $P_2 = 0.90$ であつた。彼らはこの結果から、 α_{S1} -カゼインは 3mM において新しく結合サイトが生じ、0mM において α_{S1} -カルシウムが持っている本来の結合サイトに加えて合計 2 つの結合サイトを有すると結論している。

これに對し、前述のように α_{S1} -I ケーシンの場合は、カルシウム 10mM 以上添加してはじめて結合サイトを 2 個持つようになる。では、 α_{S1} -カゼインでは 3mM 以上、 α_{S1} -I ケーシンでは 10mM 以上で新しく生成してくる結合サイトは同じ種類のものであろうか。もし、両者が同

じものであるならば、 P_2 値はほぼ似た値をもつて然るべきと考えるが、両者の間に差があることから(α_{S1} - ケゼイン; $P_2 = 0.9$, α_{S1} -I ケゼイン: $0.60 \sim 0.65$)この考えは妥當ではないと思われる。もう一つの可能性は α_{S1} - ケゼインにおいて 3mM カルシウムの添加により新しく生 成する結合サイトは α_{S1} -I ケゼインで 10 mM 以上のカルシ ウムによつて生じる結合サイトとは別であり、 α_{S1} -I ケゼ インには存在しないとするのである。すでに述べたよう に、 α_{S1} -I ケゼインにおいては α_{S1} -ケゼインの N 末端側の アミノ酸残基が脱落しており、この部分が實は α_{S1} - ケゼ インに 3mM 以上のカルシウムを加えた時に生じる結合サイトに 該當すると考えれば以上の結果を矛盾なく説明できるもの と思われる。以下に、これまでの結果および他の研究者 によつて報告されている結果を基盤にして、 α_{S1} - ケゼ インのカルシウム添加によつて生じる結合サイトおよびカルシ ウムによる沈殿現象についで整理してみたい。(Fig. 7 に 模型を示した)

(a) α_{S1} -ケゼイン本来持つ結合サイト(Site I)..... α_{S1} - ケゼインは、カルシウム非存在下、中性条件下で通常 4 量體として存在し、4 量體間の會合は疎水結合であろう といわれている。^{6,7)}

α_{S1} -ケゼインはやはり、中性条件下で κ -ケゼインと複 合體を形成する能力を持つている。この複合體の形 成は、疎水性の結合を通して行われるものと考えられてい る⁸⁻¹¹⁾ α_{S1} -ケゼイン分子間および κ -ケゼインとの複合體 の形成にあずかる結合サイトが同一のものであるかどうか については現在のところ證據はない。

⑥ カルシウム 3 mM 以上の添加で生じる結合サイト (Site II)..... 前述した α_{S1} -I ケゼインを用いた本實驗 結果から、 α_{S1} -ケゼインの N 末端疎水性アミノ酸残基を 主とする領域がこれに相當するものと思われる。

⑦ カルシウム 10 mM 以上の添加により生じる結合サイ ト(Site III)..... α_{S1} -I ケゼインを用いた本實驗からその 存在は明らかである。以上の獨立した α_{S1} -ケゼインの結合 サイトを Fig. 7 に圖示した。

次にこれら結合サイトの α_{S1} -ケゼインのカルシウム 沈殿 における役割を述べる。Site I は、カルシウムが α_{S1} - ケゼインに添加される以前にはそれ單獨では沈殿に至る ような α_{S1} -ケゼイン分子の連鎖的の重合を起す能力は持たな い。 κ -ケゼインと複合體を形成するか、あるいは、今の ところ不明確であるが、 α_{S1} -ケゼインの分子間の重合にあ ずかるのみである。カルシウムの添加により Site II が出

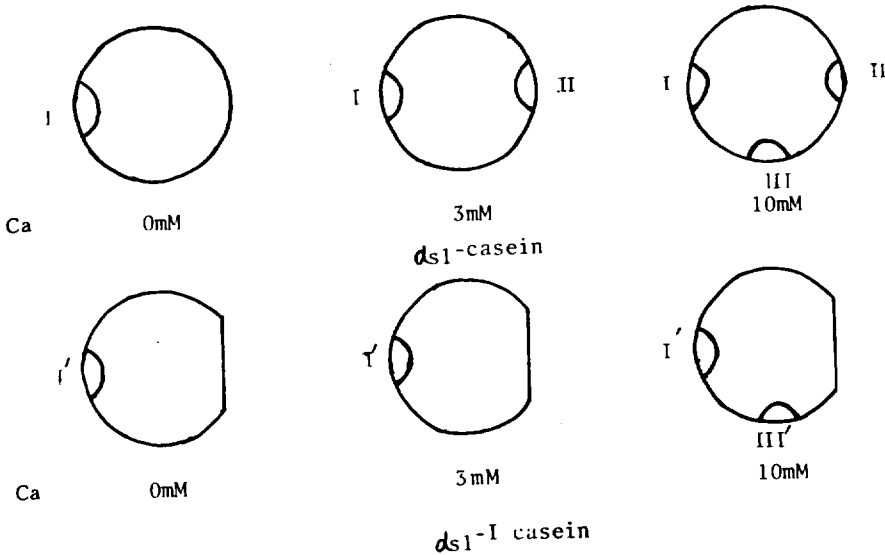


Fig. 7 Binding sites appeared by the additon of calcium.

現すると、Site I (この結合サイトの會合能力もカルシウムによつて増大されているかも知れない) の助けをかりて直鎖状に重合、沈殿に至るものと思われる。ここで疑問として残るのは、中性条件下では、 α_{S1} -カゼインは4量體として存在している譯であるが、カルシウム添加後も α_{S1} -カゼインは4量體として挙動するの否か、にという点である。もし、4量體單位で挙動すると、すべてのSite I、IIなどの結合サイトも4倍の數存在する譯でその數學的處理は複雑となる。しかし、すでに述べたように、 α_{S1} -カゼイン1分子を1 UNITとの前提のもとに處理を行い、得られたデータはその前提と何ら矛盾するものではなかつた。すなわち α_{S1} -カゼイン、 α_{S1} -Iカゼインは重合の際に單分子として挙動すると考えても

差支えないと思われる。 α_{S1} -カゼインは低イオン強度においては單量體として存在するが、この状態の α_{S1} -カゼインもカルシウムによつて沈殿する。したがつて4量體の α_{S1} -カゼインはカルシウムにより單量體として挙動する方向へ何らかの變化を受けていると考えるべきであろう。

Site IIIの α_{S1} -カゼインのカルシウム沈殿における役割は、今のところ明らかではない。10 mM以上にないこの結合サイトは出現しないから、おそらく無關係と思われる。

α_{S1} -IカゼインがこのSite IIIを持つていながら沈殿に至らないのはSite III自體の會合定數が低いため、 α_{S1} -カゼインの重合はある一定のところまで止つてしまうためであろう。

引用文献

- 1) S. Kaminogawa, K. Yamauchi and C. H. Yoon, *J. Dairy Sci.* 63, 223 (1980)
- 2) L. K. Creamer and B. C. Richardson, *N.Z.J. Dairy Sci. Tech.*, 9, 9 (1974)
- 3) R. D. Hill, E. Lahar and D. Givol, *J. Dairy Res.*, 41, 147 (1974)
- 4) 野々村誠昭, 代謝 8, 778 (1971)
- 5) S. Dosako, T. Kimura, S. Taneya, T. Sone, S. Kaminogawa, K. Yamauchi, *Agr. Biol. Chem.*, 44, 2443 (1980)
- 6) T. A. J. Payens and D. G. Schmidt, *Biochim. Biochim. Biophys. Acta*, 109, 214 (1965)
- 7) T. A. J. Payens *J. Dairy Sci.*, 49, 1317 (1966)
- 8) R. Clarke and S. Nakai, *Biochemistry*, 10, 335 (1971)
- 9) S. Dosako, S. Kaminogawa and K. Yamauchi, *Agr. Biol. Chem.*, 39, 2347 (1975)
- 10) S. Dosako, s. Kaminogawa and K. Yamauchi, *Agr. Biol. Chem.*, 43, 1037 (1979)
- 11) S. Dosako, S. Kaminogawa, S. Taneya and K. Yamauchi, *J. Dairy Res.*, 47, 123 (1980)