

## ガラクトシルトランスフェラーゼの-カゼイン吸着

誌名	日本獣医畜産大学研究報告 = The bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College
ISSN	03738361
著者	大石, 一二三 横山, 健吉
巻/号	31号
掲載ページ	p. 218-221
発行年月	1982年12月

ガラクトシルトランスフェラーゼの  $\kappa$ -カゼイン吸着

大石 一二三・横山 健吉

日本獣医畜産大学 乳学教室

Adsorption of Galactosyltransferase to  $\kappa$ -Casein

Hifumi OHISHI and Kenkichi YOKOYAMA

Department of Dairy Science

Nippon Veterinary and Zootechnical College

既報<sup>9)</sup>で、著者らは  $\kappa$ -カゼインがガラクトシルトランスフェラーゼ (A 蛋白質) 様活性を有することを報告した。

しかしなお、 $\kappa$ -カゼインの示す A 蛋白質様活性は  $\kappa$ -カゼイン独自の性質であるのか、それとも、A 蛋白質は泌乳中の乳腺組織内では膜構成成分に結合し、不溶性であるが、乳中では 99% が可溶性として存在している<sup>1, 3, 4)</sup> ので、A 蛋白質がカゼインに吸着した結果生ずる見掛け上の活性であるのか確認する必要がある。

本報告は、 $\kappa$ -カゼインの示す A 蛋白質様作用がガラクトシルトランスフェラーゼの吸着によるものでないことを明らかにしたものである。

## 材料および方法

## 材 料

$\alpha_s$ -カゼインの調製: ZITTLE ら<sup>13)</sup> の方法に準じた。

$\beta$ -および  $\gamma$ -カゼインの調製: HIPP ら<sup>6)</sup> の方法に準じた。

$\kappa$ -カゼインの調製: ZITTLE ら<sup>13)</sup> および YAGUCHI ら<sup>12)</sup> の方法に準じた。

結晶性  $\kappa$ -カゼイン: 大條の方法<sup>11)</sup> に準じたが、3 N 硫酸は 0.04 ml, アセトンは 0.7 ml を用いて結晶化した。

A 蛋白質,  $\alpha$ -ラクトアルブミン (B 蛋白質), UDP-ガラクトース, ピルベイトキナーゼ (タイプ 1), NADH ナトリウム塩,  $\alpha$ -D-グルコース, ホスホエノールピルベイトおよびその他の試薬はすべて既報<sup>9)</sup> と同じものを用いた。

$\kappa$ -カゼイン-A 蛋白質混合溶液: 0.01 M トリス・グリシン緩衝液 (pH 8.5) で調製した  $\kappa$ -カゼイン溶液 (8

mg/ml) に A 蛋白質が 0.02 unit/ml になるように加えた。

## 方 法

A 蛋白質活性測定法: 既報<sup>9)</sup> に記述した BRODBECK ら<sup>2)</sup> の方法で行った。

各カゼイン画分の A 蛋白質様活性:  $\kappa$ -カゼイン独自の性状であるのか否かを調べるために、酸カゼインを  $\alpha_s$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - および  $\kappa$ -カゼインに分画し、各カゼイン溶液 (8 mg/ml) を反応混合液中に 1 ml 加え、それぞれの A 蛋白質活性を測定した。

各  $\kappa$ -カゼイン画分の A 蛋白質様活性: 前報<sup>9)</sup> の方法で  $\kappa$ -カゼインを DEAE セフアデックス A-25 カラムクロマトグラフィーで分画し、得られた 7 画分の A 蛋白質活性を測定した。

A 蛋白質の  $\kappa$ -カゼイン吸着: 次の (1) と (2) の条件下で調べた。

(1)  $\kappa$ -カゼイン-A 蛋白質溶液を 0°C に 0, 1, 3 および 13 時間、また室温に 0, 1 および 3 時間放置した後、0.1 N 酢酸を加え、pH 4.3 に調製した。凝集した  $\kappa$ -カゼインを遠心分離 (900 × g, 10 分間) で集め、脱イオン水に溶解し、脱イオン水に対して一夜透析した後、凍結乾燥して試料とした。

(2) 0°C に 3 時間保持した  $\kappa$ -カゼイン-A 蛋白質溶液を pH 4.3 で沈殿させ、これを脱イオン水に溶解し、等電点で再沈させることで洗浄し、各沈殿物を脱イオン水に対して 1 夜透析した後、凍結乾燥して試料とした。各試料の A 蛋白質活性を測定し、A 蛋白質の除去率を次式により求めた。

$$\text{除去率(\%)} = \frac{\kappa\text{-カゼインに残存している A蛋白質活性}}{\text{全A蛋白質活性}} \times 100$$

ただし、κ-カゼインの示す A蛋白質様活性は 0 とし  
て計算した。

結果および考察

1. 各カゼイン画分の A 蛋白質活性

酸カゼインを各種のカゼインに分画し、それぞれの A  
蛋白質活性を測定した結果を Table 1 に示す。

また、YAGUCHI ら<sup>12)</sup> の方法でゲル透過して得た κ-カ  
ゼインの 2つの画分 (F<sub>1</sub> と F<sub>2</sub>) の A 蛋白質活性を Ta-  
ble 2 に示した。

Table 1 に示したように、α<sub>s</sub>-、β- および γ-カゼ  
イン画分に A蛋白質活性は認められず、κ-カゼイン画分に  
のみその活性が認められた。

さらに、κ-カゼイン画分をセファデックス G-150 で  
ゲル透過して得た F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 画分と結晶性 κ-カゼインの A  
蛋白質活性を測定すると、Table 2 に示したように、F<sub>1</sub>  
画分と結晶性 κ-カゼインは 同程度の A 蛋白質活性を示  
した。

乳中に存在する A 蛋白質の分子量は 40,000~44,000<sup>5)</sup>、  
<sup>11)</sup> であり、約 19,000 の分子量を有する κ-カゼインと  
共に溶出されるとは考えられず、また、他のカゼイン画  
分に A 蛋白質活性が認められないことから、κ-カゼ  
インの示す A 蛋白質様活は、κ-カガイン独自の有する性質  
であると考えられた。

2. 各 κ-カゼイン画分の A 蛋白質様活性

κ-カゼインを DEAE セファデックス A-25 カラムク  
ロマトグラフィーで分画すると、7 画分に分画された。  
この各画分の A 蛋白質様活性を測定した結果を Table 3  
に示す。

Table 3 に示したように、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub> および P<sub>5</sub> 画分に  
A 蛋白質活性が認められた。P<sub>6</sub> 画分はホール κ-カゼ  
インの 3 倍の活性を示した。また、シアル酸を含まない  
P<sub>1</sub> 画分は A 蛋白質活性を示さなかったが、P<sub>4</sub>、P<sub>6</sub> およ  
び P<sub>7</sub> 画分にも A 蛋白質様活性は認められなかった。

3) κ-カゼインの A 蛋白質吸着

0°C と室温での κ-カゼインの A 蛋白質吸着状態を 調  
べた。結果を Table 4 と 5 に示す。

また、吸着した A 蛋白質の等電沈殿による洗浄除去率  
を Fig. 1 に示す。

Table 4 と 5 に示したように、0°C と 室温ともに、  
κ-カゼインに吸着する A 蛋白質は保持時間に比例して増  
加した。

伊藤<sup>7)</sup> はホールカゼインへのカタラーゼの吸着を検討  
し、その吸着は時間に比例して 増加したと 報告しており、  
本実験の A 蛋白質も同様な傾向を示した。

しかし、これは カゼインの 表面吸着性<sup>10)</sup> に起因する  
と考えられ、Fig. 1 に示したように、1 回目の洗洗で  
64.86%、2 回目 92.97%、そして 3 回目ではほとんど  
総ての A 蛋白質が除去されており、κ-カゼインに強く会  
合しているものではなかった。BRODBECK ら<sup>2)</sup> も乳から  
A 蛋白質を精製する際、大部分は ホエー中に 移行する

Table 1. Galactosyltransferase-like activity of each casein fractions.

Casein fractions	α <sub>s</sub> -	β-	γ-	κ-
Galactosyltransferase-like activity (unit)	0	0	0	3.6 × 10 <sup>-3</sup>

A unit of enzyme is defined as the amount of enzyme causing the formation of 1 nM of UDP per min.

Table 2. Galactosyltransferase-like activity of κ-casein from sephadex G-150 column.

κ-casein fractions	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	crystalline
Galactosyltransferase-like activity (specific activity)	2.15 × 10 <sup>-3</sup>	9.22 × 10 <sup>-4</sup>	3.38 × 10 <sup>-3</sup>

Table 3. Galactosyltransferase-like activity of each fractions of κ-casein from DEAE Sephadex A-25 column, SAF κ- and intakt κ-casein.

Fractions	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>6</sub>	P <sub>7</sub>	K*
Galactosyltransferase-like activity	0	87	230	0	300	0	0	100

Galactosyltransferase-like activity expressed as percentage activity obtained with intact κ-casein.  
K: intact κ-casein.

Table 4. Galactosyltransferase activity in  $\kappa$ -casein precipitated after kept 0-13 hours at 0°C.

Enzyme source	0	1	3	13
Precipitated $\kappa$ -casein	1.21	4.99	8.87	11.44
Supernatant	98.79	95.01	91.13	88.56

Galactosyltransferase activity (%) were expressed as activity in  $\kappa$ -casein/total activity 100.

Table 5. Galactosyltransferase activity in  $\kappa$ -casein precipitated after kept 0-3 hours at room temperature.

Enzyme source	keeping time (hr.)		
	0	1	3
Precipitated $\kappa$ -casein	1.21	7.77	15.80
Supernatant	98.79	92.23	84.20

Galactosyltransferase activity (%) were expressed as activity in  $\kappa$ -casein/total activity 100.

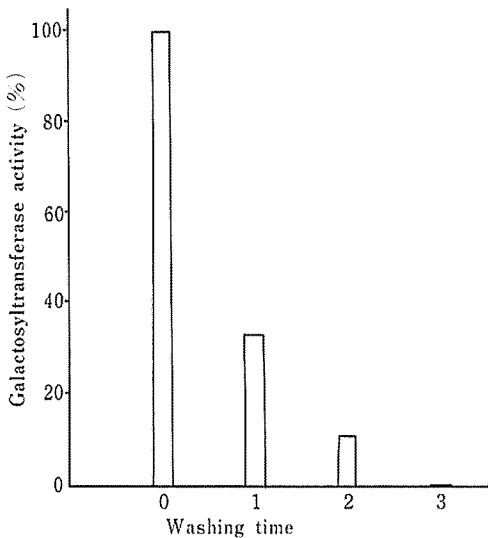


Fig. 1. Ratio of removal galactosyltransferase from  $\kappa$ -casein by washing.

が、カゼイン画分中に残留しているA蛋白質活性は2~3回目の洗浄で認められなくなったと報告している。

したがって、 $\kappa$ -カゼインはA蛋白質をある程度吸着するが、それはカゼインの表面吸着性<sup>10)</sup>によるものであり、その吸着力は弱く、カゼイン画分中に含まれていたA蛋白質は $\kappa$ -カゼイン調製中に除去されることが確認された。

## 要 約

(1) 酸カゼインを $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -および $\kappa$ -カゼインに分画して、A蛋白質活性を測定したところ、 $\kappa$ -カゼイン画分のみその活性が認められた。また、 $\kappa$ -カゼインのセファデックスG-150ゲル濾過物のF<sub>1</sub>とF<sub>2</sub>画分および結晶性 $\kappa$ -カゼインのA蛋白質様活性はF<sub>1</sub>画分と結晶性 $\kappa$ -カゼインと同程度のA蛋白質活性であった。また、DEAEセファデックスA-25カラムクロマトグラフィーにより7画分に分画した $\kappa$ -カゼインではP<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>およびP<sub>5</sub>画分にA蛋白質様活性が認められた。

(2) A蛋白質の $\kappa$ -カゼインへの吸着は保持時間に比例して増加した。しかし、 $\kappa$ -カゼインに吸着したA蛋白質は、 $\kappa$ -カゼインを等電点で沈殿をくり返すことにより除去された。その除去率は、1回目64.86%、2回目92.97%、3回目で約100%であった。このことは、A蛋白質は $\kappa$ -カゼインにある程度吸着するが、その吸着力が弱いために $\kappa$ -カゼイン調製中に除去されることを示し、 $\kappa$ -カゼインの示すガラクトシルトランスフェラーゼ様活性は $\kappa$ -カゼイン独自の性質であることが裏づけられた。

## 文 献

- 1) BRODBECK, U. and EBNER, E. K. (1966). The subcellular distribution of the A and B proteins of lactose synthetase in bovine and rat mammary tissue. *J. Biol. Chem.*, **241**, 5526-5532.
- 2) BRODBECK, U., DENTON, L. W., TANAHASHI, N. and EBNER, E. K. (1967). The isolation and identification of the B protein of lactose synthetase as  $\alpha$ -lactalbumin. *J. Biol. Chem.*, **242**, 1391-1397.
- 3) COFFEY, R. G. and REITHEL, F. J. (1968). The lactose synthetase particles of lactating bovine mammary gland. Preparation on particles with intact lactose synthetase. *Biochem. J.*, **109**, 169-176.
- 4) COFFEY, R. G. and REITHEL, F. J. (1968). The lactose synthetase particles of lactating bovine mammary gland. Characteristics of the particles. *Biochem. J.*, **109**, 177-183.
- 5) DIXON, M. and WEBB, E. C. (1979). *Enzymes*, p. 552, Academic Press inc., New York.
- 6) HIPP, N. J., GROVES, M. L., CUSTER, J. H. and McMEEKIN, T. L. (1952). Separation of  $\alpha$ -、 $\beta$ - and  $\gamma$ -casein. *J. Dairy Sci.*, **35**, 277-281.
- 7) 伊藤 整 (1971). 牛乳中のカタラーゼの研究 5. カゼインのカタラーゼ吸着. *日獣畜大紀要*, **20**, 62-66.
- 8) 大石一二三・横山健吉 (1980).  $\kappa$ -Casein の

Galactosyltransferase 様活性. 日獣畜大研究報告, 29, 107-111.

- 9) 大石一二三・横山健吉 (1982).  $\kappa$ -カゼインにおよぼすシアル酸残基の影響. 日獣畜大研究報告, 31, 213-217.
- 10) 緒方幸雄・一言 広・善養寺浩 (1965). 物理化学機器操作法, 東京, 一成堂. P. 243.
- 11) 大条方義 (1976).  $\kappa$ -カゲインの結晶化.  $\kappa$ -カゼインの硫酸塩結晶. 日獣畜大紀要, 25, 1-8.
- 12) TRAYER, P. I. and HILL, R. L. (1971). The purification and properties of the A protein of lactose synthetase. J. Biol. Chem., 246, 6666-6675.
- 13) YAGUCHI, M., DAVIES, D. T. and KIM, Y. K. (1968). Preparation of  $\kappa$ -casein by gel filtration. J. Dairy Sci., 51, 473-477.
- 14) ZITTLE, C. A. and CUSTER, J. H. (1963). Purification and some of the properties of  $\alpha_s$ -casein and  $\kappa$ -casein. J. Dairy Sci., 44, 2101-2103.

## SUMMARY

There was something to be clarified about the galactosyltransferase-like activity of  $\kappa$ -casein. It was necessary to determine whether galactosyltransferase was adsorbed to  $\kappa$ -casein or not, because about 99 per cent of galactosyltransferase is soluble in milk.

The adsorption of galactosyltransferase to  $\kappa$ -casein was examined. This enzyme was adsorbed to  $\kappa$ -casein, but could be removed by washing. The percentage of removal ratio was 64.86 and 92.97 per cent by washing once and twice, respectively, and at three times completely. Therefore, it was confirmed that the galactosyltransferase adsorbed to  $\kappa$ -casein was removed completely during the preparation of  $\kappa$ -casein.