

福岡県農業総合試験場特別報告

第24号

カゼインミセルのミセル性リン酸カルシウム 架橋とミセルの特性に関する研究

平成19年3月

福岡県農業総合試験場

(福岡県筑紫野市大字吉木)

SPECIAL BULLETIN
OF
THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESSERCH CENTER
No. 24

Stadies on micellar calcium phosphate-cross-linkage in
casein micelles and these properties.

by UMEDA Taketoshi

THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESEACHR CENTER
Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan

カゼインミセルのミセル性リン酸カルシウム
架橋とミセルの特性に関する研究

梅 田 剛 利

2006

* 九州大学審査学位論文

牛乳はカルシウムやタンパク質といった栄養成分を多く含む、栄養価の高い食品である。しかしながら、食生活の多様化に伴い牛乳消費量は低迷しており、これまで以上に栄養食品としての価値を高める知見が求められている。

本県では、牛乳の栄養成分として重要な、乳中タンパク質に関する飼養管理技術に取り組んできたところである。牛乳タンパク質はカゼインが80%を占め、カゼインが主要なタンパク質であり、カゼインミセルと呼ばれるコロイド粒子として存在している。カゼインミセルはミセル性リン酸カルシウム架橋によりミセル構造を維持していることが解明されてきたが、ミセル性リン酸カルシウム架橋に関しては不明な点が多い。

本研究は、カゼインミセルの構造を解き明かすことを目的に、ミセル性リン酸カルシウム架橋とミセルの特性について得られた知見をとりまとめたものである。得られた成果は牛乳タンパク質を探る情報として参考になり、牛乳が栄養食品としての価値を高める情報として参考になると考えられたことから、ここに特別報告として公表することとした。皆様に広くご活用いただければ幸いである。

なお、本研究の遂行にあたり、ご指導、ご協力を頂いた関係各位に感謝の意を表する

平成19年3月

福岡県農業総合試験場長

野村 泰夫

カゼインミセルのミセル性リン酸カルシウム 架橋とミセルの特性に関する研究

目次

第1章	序論	1
第2章	ミセル性リン酸カルシウムによるカゼインの架橋に必要な 最少リン酸基数	10
第3章	ミセル性リン酸カルシウムによる架橋形成に及ぼすカゼイン のリン酸基数の影響	18
第4章	ミセル性リン酸カルシウム架橋とミセルサイズとの関係	22
第5章	ブタ乳カゼインミセルのミセル性リン酸カルシウム架橋と ミセルの特性	28
第6章	ブタ人工カゼインミセルにおけるミセルの形成とミセル性 リン酸カルシウム架橋形成	34
第7章	ヒツジカゼインミセルのミセル性リン酸カルシウム架橋と ミセルの特性	40
第8章	高温加熱によるミセル性リン酸カルシウム架橋の解裂	46
第9章	総括	52
	謝辞	54
	引用文献	55
	SUMMARY	60

略 語

HPLC (High performance liquid chromatography) : 高速液体

クロマトグラフィ

MCP (Micellar calcium phosphate) : ミセル性リン酸カルシウム

SMUF (Simulated milk ultrafiltrate) : 人工乳清

USMUF (6M urea-simulated milk ultrafiltrate) : 尿素人工乳清

WPF 乳 (Whey protein-free milk) : 乳清タンパク質除去脱脂乳

第1章 序 論

乳中には、新生仔に必要な栄養成分全てが含まれている。中でも乳タンパク質は栄養学的にも量的にも重要な構成成分の1つである。乳タンパク質は乳清タンパク質とカゼインに大別され、その構成比は動物種によって異なり、ウシの場合はカゼインが全タンパク質の約80%を占める。

ウシカゼインは最初単一の成分と考えられていたが、自由界面電気泳動法によりその不均一性が明らかとなり、現在では α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -および κ -カゼインの主要成分と γ -カゼイン等の微量成分から構成されることが明らかになっている。さらにウシカゼイン成分の組成割合は $\alpha_{s1}:\alpha_{s2}:\beta:\kappa$ -カゼインがおおよそ3:0.8:3:1であり、それぞれの一次構造も明らかにされている(Schmidt, 1982)。

α_{s1} -カゼインは分子量24,000で199個のアミノ酸から成っており、分子中に含まれる8個のリン酸基が主要なカルシウム結合サイトとなっている。すなわち8個のリン酸基のうち7個は43~79番目の残基に局在しており、しかもこの領域に酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸が合わせて10個局在している。この領域の両側は疎水性残基を比較的多く含む疎水性領域となっており、分子全体としては両親媒的な構造を持っている(Fig. 1-1)。 α_{s2} -カゼインは分子量約25,000で207個のアミノ酸残基から構成されている。アミノ酸組成の特徴は主要カゼインの中で最も多い11個のリン酸基を持ち、かつ κ -カゼインと同様に2個の-SH基を有する点である(Fig. 1-2)。Fig. 1-2から明らかなように、 α_{s2} -カゼインは極性残基が他のカゼインと比べると比較的分子全体に分散して存在している。11個のリン酸基のうち8個は、8~10、16番目の領域と56~58、61番目の領域に4個ずつのクラスターを形成しているが、他のカゼインのように典型的な両親媒性を持たない。 β -カゼインは3.3M尿素に可溶であるが、pH4.6で1.7M尿素には不溶性のカゼインと定義されており、分子量は約24,000で209個のアミノ酸残基から成っている(Fig. 1-3)。 β -カゼインは疎水性のアミノ酸を非常に多く含み全てのカゼインの中で最も高い疎水性を示す。一次構造から明らかなように、 β -カゼインのN末端50残基に25個の極性残基が集中し、逆にC末端50残基には7個の極性残基が存在するのみで疎水性が高く、親水性の領域と疎水性の領域が局在する典型的な両親媒性の分子構造を有している。 κ -カゼインは6.6M尿素には可溶で、4.6M尿素には不溶性の成分とされた α -カゼインを、さらにカルシウム感受性の違いから、0.4M塩化カルシウム、pH7.0、0~4℃で沈殿しない成分として定義されている。 κ -カゼインは分子量約19,000で169個のアミノ酸残基から構成されており、その分子中にはリン酸基を1つしか含まない(Fig. 1-4)。このため κ -カゼインは他のカゼインのようにリン酸基のクラスターがなく、カルシウムに対する極めて低い感受性の原因となっている。一次構造をみると、 κ -カゼインは β -カゼインとは逆にN末端側に疎水性基を持ち、C末端側には糖鎖を含めて親水性の領域が存在している(Fig. 1-3, 1-4)。糖鎖を構成する糖はガラクトース、N-アセチルノイラミン酸、N-アセチルガラクトサミンで、3糖または4糖の形で131、132、133番目のスレオニンの位置に結合している。これらの糖は全ての κ -カゼインに存在するのではなく、糖を結合しない κ -カゼインも存在し、加えて含有量にも差があり κ -カゼインの不均一性の原因となっている。

カゼイン各成分は自己会合しやすく、また成分間の相互作用もしやすい。そのため牛乳中ではカゼイン各成分は単独では存在せず、相互作用により直径が20 nm~600 nmで平均150 nmの巨大な複合体、カゼインミセルと呼ばれる安定なコロイド粒子として懸濁

1
 Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-
 21
 Leu-Arg-Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Gln-Val-Phe-Gly-Lys-Glu-Lys-Val-Asn-Glu-Leu-
 41
 Ser-Lys-Asp-Ile-Gly-SeP-Glu-SeP-Thr-Glu-Asp-Gln-Ala-Met-Glu-Asp-Ile-Lys-Gln-Met-
 61
 Glu-Ala-Glu-SeP-Ile-SeP-SeP-SeP-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-SeP-Val-Glu-Gln-Lys-His-
 81
 Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-
 101
 Leu-Lys-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-SeP-Ala-Glu-Glu-Arg-Leu-
 121
 His-Ser-Met-Lys-Glu-Gly-Ile-His-Ala-Gln-Gln-Lys-Glu-Pro-Met-Ile-Gly-Val-Asn-Gln-
 141
 Glu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu-Phe-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gln-Leu-Asp-Ala-Tyr-Pro-
 161
 Ser-Gly-Ala-Trp-Tyr-Tyr-Val-Pro-Leu-Gly-Thr-Gln-Tyr-Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-
 181
 Asp-Ile-Pro-Asn-Pro-Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Glu-Lys-Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp. 199

Figure 1-1. Primary structure of α_{S1} -casein-B

1
 Lys-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-SePSePSeP-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile-SeP-Gln-Glu-Thr-Tyr-
 21
 Lys-Gln-Glu-Lys-Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys-Glu-Asn-Leu-Cys-Ser-Thr-Phe-Cys-
 41
 Lys-Glu-Val-Val-Arg-Asn-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-SePSePSeP-Glu-Glu-
 61
SeP-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys-Ile-Thr-Val-Asp-Asp-Lys-His-Tyr-Gln-Lys-
 81
 Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Glu-Phe-Tyr-Gln-Lys-Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr-Leu-Tyr-
 101
 Gln-Gly-Pro-Ile-Val-Leu-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Val-Lys-Arg-Asn-Ala-Val-Pro-Ile-Thr-
 121
 Pro-Thr-Leu-Asn-Arg-Glu-Gln-Leu-SeP-Thr-SeP-Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-Lys-Thr-Val-Asp-
 141
 Met-Glu-SeP-Thr-Glu-Val-Phe-Thr-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu-Thr-Glu-Glu-Glu-Lys-Asn-Arg-
 161
 Leu-Asn-Phe-Leu-Lys-Lys-Ile-Ser-Gln-Arg-Tyr-Gln-Lys-Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-
 181
 Lys-Thr-Val-Tyr-Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro-Lys-Thr-Lys-Val-
 201
 207
 Ile-Pro-Tyr-Val-Arg-Tyr-Leu.

Figure 1-2. Primary structure of α_{S2} -casein-A

1
 Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-SeP-Leu-SeP-SeP-SeP-Glu-
 21
 Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Ile-Asn-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Gln-SeP-Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-
 41
 Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-
 61
 Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-
 81
 Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-
 101
 Ala-Met-Ala-Pro-Lys-His-Lys-Glu-Met-Pro-Phe-Pro-Lys-Tyr-Pro-Val-Glu-Pro-Phe-Thr-
 121
 Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Val-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro-Leu-Leu-
 141
 Gln-Ser-Trp-Met-His-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Thr-Val-Met-Phe-Pro-Pro-Gln-
 161
 Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Lys-Ala-Val-Pro-Tyr-
 181
 Pro-Gln-Arg-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-
 201
 Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val.

Figure 1-3. Primary structure of β -casein-A²

している(小野, 1989; 仁木と有馬, 1984)。主要なカゼインの自己会合性は結合力として静電的相互作用、水素結合、疎水結合、S-S 結合によることが知られている。すなわち、 α_{s1} -カゼインはpHおよびイオン強度によって会合性が著しく影響を受けることから、静電的な相互作用も解離会合の大きな要因と考えられている。 β -カゼインは温度上昇とともに会合体を形成するという特異的な性質をもっていることから、疎水性相互作用の関与が考えられている。実際に疎水性相互作用の形成を妨げる sodium dodecyl sulfate (SDS) の存在下では会合体の形成が抑制される。会合体の形は直径 10 nm の球状であり、約 50 個のカゼイン分子から成る。 κ -カゼインはN末端側に疎水性残基を多く含むことから疎水性相互作用の関与が考えられるが、S-S 結合による相互作用の不規則性や糖鎖の不均一性等、不明な点が多いことから複雑な会合を形成していると考えられている(青木, 1986)。

カゼインのうち、カルシウム感受性カゼインである α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -カゼインはカルシウムと相互作用し、5 mM 以上のカルシウム濃度で溶解性が失われ沈殿が始まる。この沈殿は、カゼイン分子にカルシウムイオンが結合することによりカゼイン分子のマイナスチャージが減少し、その結果カゼイン分子間疎水性相互作用が誘起されて無制限な会合が起きることによるものと考えられている(Aoki *et al.*, 1984)。しかし、牛乳中では、カルシウム濃度が 30 mM あるにもかかわらず κ -カゼインの保護作用(Waugh, 1971)により沈殿しない。すなわち、カルシウム感受性の α_s -カゼインおよび β -カゼインが会合したミセルのコアを κ -カゼインのコートが取り囲んでいる。相互作用により会合したカゼインはサブミセルをつくり、サブミセルはさらに大きなカゼインミセルと呼ばれるコロイド粒子として懸濁している(Morr, 1967)。ミセルの成分組成は93%がカゼインで7%が無機塩類である。無機塩類の主要成分はカルシウムと無機リン酸で、それにマグネシウム、カリウムおよびクエン酸を含んでいる。カゼインミセルの構造は複雑で不明な点が多いため様々なモデルが提唱されている(上野川, 1978; 青木, 1995, 1997)。Slattery and Evard(1973)はカゼイン成分組成の異なるサブミセルから構成されるモデルを提案した(Fig. 1-5)。このモデルでは、ミセル内部は α_s -カゼインと β -カゼインからなる疎水性のサブミセル(図中白い部分)から成り、ミセル表面は κ -カゼインに富むサブミセル(図中黒い部分)から成っている。サブミセルの直径はおおよそ 10 nm で、このサブミセルは疎水性の領域を通して重合することを示している。ところが、サブミセルはキレート剤を用いてミセルからカルシウムを除去すると得られることから、カルシウムやミセル性リン酸カルシウム(MCP) (あるいはコロイド状リン酸カルシウム: CCP) の架橋がサブミセル間の結合に関与しており、MCP がカゼインミセルの構造を維持する重要な役割を担っていると考えられている(McGann *et al.*, 1960; Morr *et al.*, 1971; Schmidt, 1982)。しかしながら、このモデルではMCPの役割が示されていないことから、Schmidt(1982)はカゼインのモノマーが直接ミセルを構成しているのではなく、中間の大きさのサブミセル粒子が構成単位となり、それらがMCPを介して結合しミセルが構成されるモデルを提唱している(Fig. 1-6)。このモデルでは、サブミセルの組成は均一ではなく、 κ -カゼインの少ないサブミセルがミセル内部に存在し、 κ -カゼインの多いサブミセルは表面に位置している。Warstra(1999a, 1999b)は、MCPは必ずしもサブミセル間の架橋形成に関わっているというわけではなく、サブミセルに存在するモデルを提唱している(Fig. 1-7)。一方、Holt(1992)はサブミセルの存在を否定しており、ミセル内に毛状(hairy)のsubstructureが存在しているとするモデルを提唱している(Fig. 1-8)。このモデルは、高度に水和した開放構造となっており、MCPは微粒子としてタンパク質マトリックスの中に埋め込まれている。このようにカゼインミセルの構造に関して一致した見解は得ら

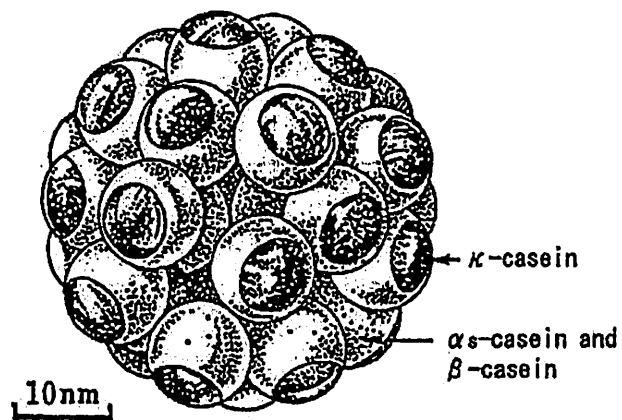


Figure 1-5. A model of casein micelles proposed by Slattery (1973)

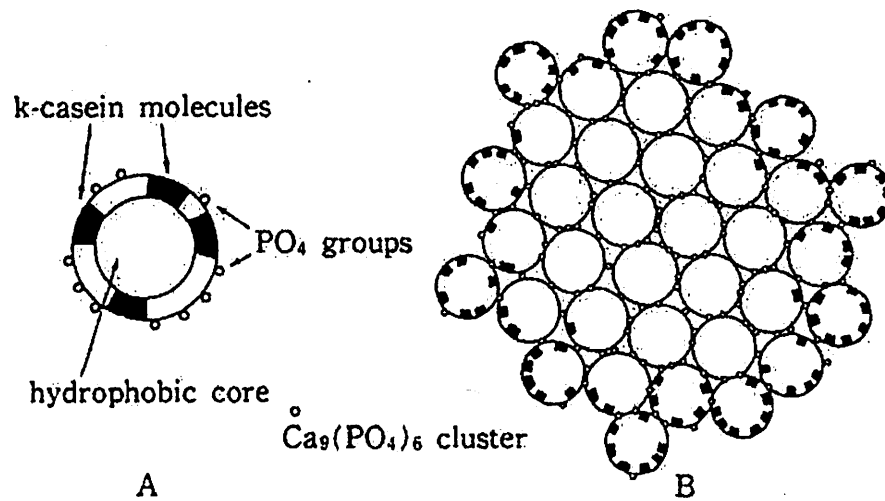


Figure 1-6. A model for casein micelle structure proposed by Schmidt (1982).

A, Submicelle ; B, a casein micelle composed of submicelles.

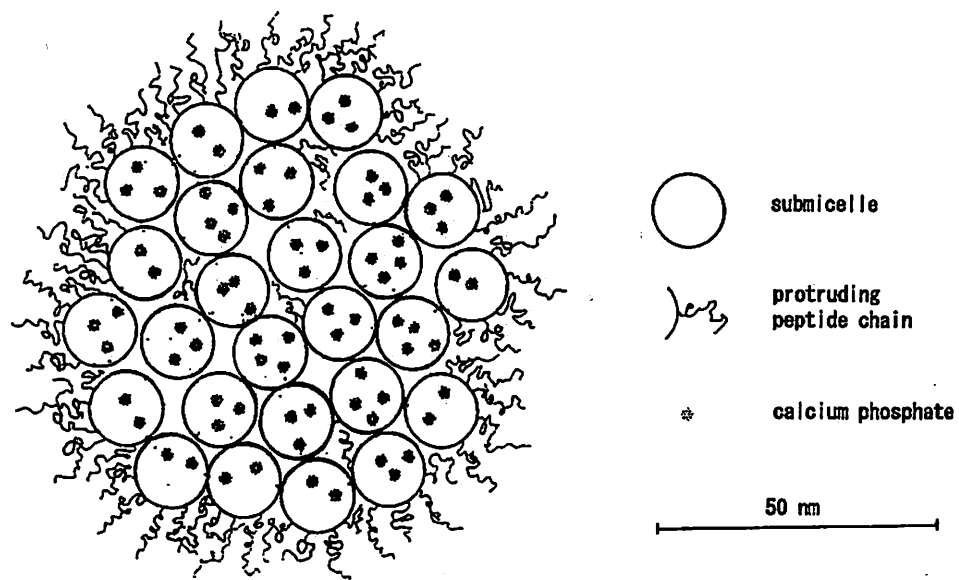


Figure 1-7. A model of casein micelle structure proposed by Warstra (1999)



Figure 1-8. A model of casein micelle structure proposed by Holt (1992)

れておらず、MCP 架橋に関しては未だ不明な点が多い。

カゼインミセルの構造を解き明かすことは、カゼインミセルの特性を生かしたチーズやヨーグルトなどの乳製品の改良に対して有用な情報となり、アルコール不安定乳の原因がカゼインミセルの不安定性による凝集であることから、その対策を講ずる場合に有用である。カゼインミセルの構造を解き明かすためには、MCP 架橋の実体を明らかにすることが極めて重要であると考えられる。

Chan and Yamauchi (1971)は、6.6M 尿素溶液中で解離させたカゼインミセルをゲル濾過法で2画分に分離している。このうち高分子画分にはMCP 架橋カゼイン会合体が含まれると推察されるが、この画分にはS-S結合で重合した κ -カゼインと α_{s2} -カゼインが含まれると考えられ、併せて尿素溶液中ではMCP が一部可溶化していることが考えられた。Aoki and Kako (1986a)は、カゼインミセルを、MCP の可溶化を防ぐために6 M 尿素を含む人工乳清中で解離させ2-メルカプトエタノールで還元してS-S結合を切断し、ゲル濾過モード HPLC で MCP 架橋カゼイン会合体と単量体を分離した。さらに Aoki *et al.* (1986b)はイオン交換モード HPLC でカゼイン各成分の分別定量法を確立している。これらの方法を用いて脱リンしたカゼインで調製した人工ミセルを調べると、MCP による架橋が形成されないことから、MCP がカゼインのリン酸基を介して架橋していることが解明された(Aoki *et al.*, 1987a)。さらに、カゼインの MCP 架橋会合体を構成する各カゼイン成分の割合は、全カゼインに比べ α_{s1} -および α_{s2} -カゼインが多く、 β -カゼインは少なく、 κ -カゼインが全く含まれない(Aoki, 1989)。これら各カゼインが持つリン酸基数は、 α_{s1} -カゼインが8~9個、 α_{s2} -カゼインが10個~13個、 β -カゼインは4~5個、 κ -カゼインは1個である。したがって上述の結果は、リン酸基数の多いカゼイン成分ほど架橋されやすく、リン酸基を1個しか持たない κ -カゼインは架橋されないことを示唆している。

そこで本研究では、第2章において、1分子中に0~5個のリン酸基を持つヒト β -カゼインを用いて人工ミセルを調製し、ゲル濾過モード HPLC を行いカゼインミセル中の MCP 架橋カゼイン会合体含量を測定して、MCP の架橋形成に必要な最少リン酸基数を明らかにした。第3章では、ヒト β -カゼイン-3P、4P 成分と α_{s1} -カゼイン-8P、9P 成分および α_{s2} -カゼイン-10P~13P 成分を用いて人工ミセルを調製し、MCP 架橋カゼイン会合体を構成するカゼインの成分組成を調べることで MCP の架橋形成におよぼすリン酸基数の影響を調べた。第4章では、ウシカゼインミセルの大、中および小ミセルと MCP を増加させた小ミセル中の MCP 架橋カゼイン会合体含量を調べ、ミセルサイズと MCP 含量あるいは MCP 架橋カゼイン会合体含量との関係を検討した。第5章から第7章ではウシ以外のカゼインミセルを取り上げ、種が異なる哺乳動物のカゼインミセルにおける MCP 架橋形成の実体を調べた。すなわち、第5章と6章ではブタカゼインミセルを、第7章ではヒツジカゼインミセルを用いて、MCP 架橋カゼイン会合体含量を測定し、ブタカゼインミセルとヒツジカゼインミセルの MCP 架橋とミセルの特性について調べた。最後に第8章では、高温加熱処理によるウシカゼインミセルの MCP 架橋カゼイン会合体含量の変化を同様に HPLC で調べ、高温加熱により MCP 架橋が解裂することを明らかにした。

第2章 ミセル性リン酸カルシウムによる カゼインの架橋に必要な最少リン酸基数

第1節 緒言

人乳は牛乳と比べ様々な点で異なっている。人乳と牛乳のそれぞれのタンパク質含量は、人乳が1.1%で牛乳が2.9%程度であり、このうちカゼイン含量は、全タンパク質含量に対して人乳が約20%程度、牛乳が80%程度といわれている。カゼインの各成分についてみると、ウシカゼインの主な成分は α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -、 κ -カゼインであるのに対し、ヒトカゼインの主成分はヒト β -カゼインとヒト κ -カゼインであり、ヒト β -カゼインはヒト全カゼインの60%を占めている(片岡と中江, 1972, 山内, 1979)。

Greenberg *et al.* (1984) はヒト β -カゼインの一次構造を解明し、ヒト β -カゼインの一次構造がウシ β -カゼインのそれとよく似ているが、ウシ β -カゼインがリン酸基を分子中に5個持つ1種類であるのに対し、ヒト β -カゼインはN-末端から10残基までの間にリン酸基を1個、2個、3個、4個および5個を持つ5種類とリン酸基を全く持たない合計6種類の成分があることを報告している。ヒト β -カゼインの1次構造をFig. 2-1に示した。リン酸基を1個持つヒト β -カゼインはN-末端から9番目あるいは10番目のいずれかにリン酸基が位置し、リン酸基を2つ持つヒト β -カゼインはN-末端から9番目と10番目にリン酸基が位置する。以下、3個、4個、5個のリン酸基はFig. 2-1に示したアミノ酸残基に位置する。一方、カゼインミセル中のMCP架橋はカゼインのリン酸基を介して形成され(Aoki *et al.*, 1987a)、リン酸基数が多いカゼインほど架橋されやすいことは先に述べた(Aoki, 1989)。しかしながら、MCP架橋形成に必要な最少リン酸基数は明らかにされていない。そこで、リン酸基数が1個から5個のそれぞれリン酸基数が異なるヒト β -カゼインを分離調製した後、人工ミセルを調製してMCP架橋カゼイン会合体が形成されるか否かを調べることで、MCP架橋に必要な最少リン酸基数を調べた。

第2節 試料調製および方法

1. ヒト全カゼインの調製

ヒト全カゼインの調製はGroves and Gordon (1970)の方法で行った。すなわち、健康なボランティアから得られた人乳1Lを用い、酵素分解を抑制するため大豆トリプシンインヒビター1mgを添加した後、3,000 rpmで15分の遠心分離により脱脂した。脱脂乳は5Lの蒸留水に対して一昼夜透析を行い、25℃に加温した後、1Nの塩酸でpHを4.6に調整してカゼインを沈殿させた。これを30℃の温槽中で30分間保持した後、5,000 rpmで30分遠心分離した。沈殿は200 mLの蒸留水で3回洗浄し、総量を400 mLにして1N水酸化ナトリウム溶液をpHが7.0を越えないように加えて溶解させ、再び1N塩酸で再沈させた。沈殿は3回蒸留水で洗浄後、エタノール150 mLで3回、アセトン150 mLで2回洗浄し、デシケーターで減圧乾燥してヒト全カゼインとした。

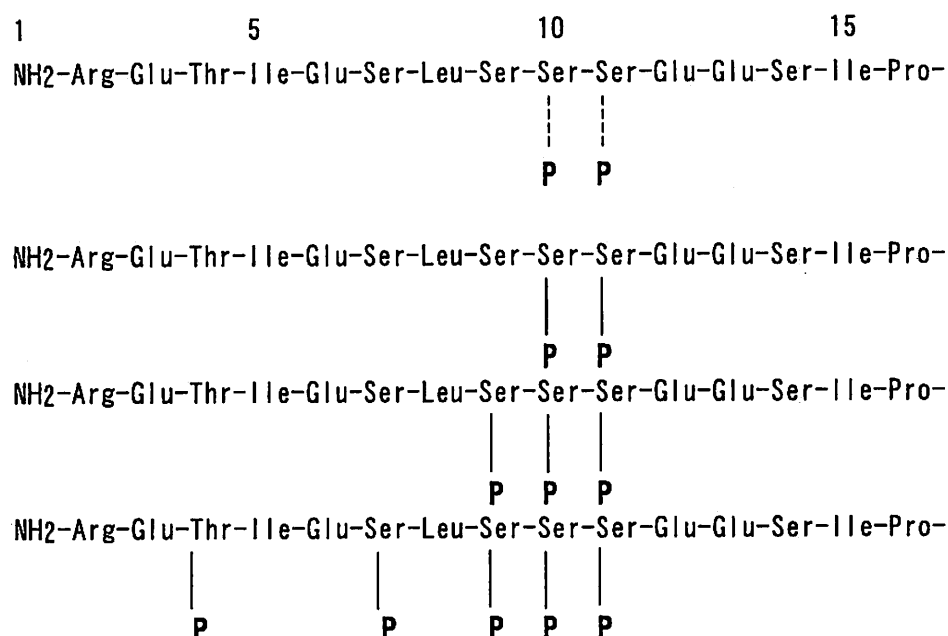


Figure 2-1. Location of phosphate groups on the 1-P to 5-P forms of human β -casein.

2. ヒト β -カゼインの精製

ヒト β -カゼインの精製は Nagasawa *et al.* (1967) の方法で行った。すなわち、0.75 g のヒト全カゼインを 20 mL の蒸留水で溶解し、プロテアーゼ活性が強い場合があるので酵素分解を抑制するため 95℃で 5 分間加熱処理を行った。このカゼイン溶液を 0.02 M リン酸緩衝液に対し一晩透析し、イオン交換クロマトグラフィを用いてヒト β -カゼインを分離分取した。イオン交換クロマトグラフィは DEAE-セルロース DE52 (Whatman) をアミコンカラム (2.2×60 cm) に充填し、溶離液として 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用い、0 M~0.3 M の塩化ナトリウムによる直線濃度勾配法で溶出を行った。流速は 120 mL/hr、温度は 5℃で行った。分離分取したそれぞれのヒト β -カゼイン溶液は 70% 飽和になるように硫酸を加え、35℃の温槽中に保持した後 10,000 rpm で 30 分遠心分離した。沈殿物として得られたヒト β -カゼインは最少の蒸留水で溶解し、5 L の水に対して 2 日間の透析を行った後、凍結乾燥した。

3. ウシ κ -カゼインの精製

ウシ κ -カゼインはホルスタイン種の合乳を遠心分離し、得られた脱脂乳から酸沈殿法により得た全カゼインを用いて、Zittle and Caster (1963) の方法で調製した。さらにこの κ -カゼインを Aoki *et al.* (1985) の方法で精製した。すなわち、10 mL の 10% ウシ全カゼイン溶液を pharmacia 製の Sephacryl S-300 カラム (3.2×90 cm) を用いて 6 M 尿素を含む 0.05 M リン酸緩衝液で溶出し、200 mL~250 mL に溶出される κ -カゼイン画分を分取した。このカゼイン溶液を透析および凍結乾燥してウシ κ -カゼインとした。得られた κ -カゼインを、4.5 M 尿素存在下のポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動に供し純度の確認を行った (Aoki *et al.*, 1986a)。

4. 人工カゼインミセルの調製

ヒト β -カゼインとウシ κ -カゼインを用いた人工カゼインミセルの調製は Knoop *et al.* (1979) の方法で行った (Aoki, 1987b)。すなわち、まずカゼイン溶液を調製するため、ヒト β -カゼインとウシ κ -カゼインの比が 9:1 で全量が 10 mg となるように、あらかじめスターラー用のマグネットバーを入れ風袋を測定した試験管に秤量し、これに 0.3 mL の水を加え、1 N 水酸化ナトリウムを pH が 7.0 を越えないように加えた後、冷蔵庫内で 1 晩攪拌して溶解した。このカゼイン溶液に 0.2 M 塩化カルシウムと 0.2 M リン酸水素カリウムおよび 1 M クエン酸 3 カリウムをそれぞれ 25 μ L と 30 μ L および 1.5 μ L 加えた。次に MCP による架橋を形成させるため、0.2 M 塩化カルシウム 6.25 μ L と 0.2 M リン酸水素カリウム 3.125 μ L を、15 分間隔で合計 4 回添加した。このとき添加は 1 N 塩酸で pH を 6.7 に調整しながら行った。最後に電子天秤上で溶液の総量が 0.5 g になるように水を加え、クエン酸とカルシウムおよびリン酸濃度がそれぞれ 10 mM、20 mM および 17 mM の人工 2% カゼイン溶液を調製した。

5. 尿素人工乳清 (USMUF) の調製

DEAE-セルロースカラムを通して不純物を除去した 8 M 尿素溶液 750 mL に蒸留水 190 mL と Jenness and Koop (1962) の方法により調製した保存溶液 I および II (Table 2-1) をそれぞれ 20 mL と炭酸カリウムを 300 mg 添加し、1 N 水酸化カリウムで pH を 7.06 (尿素を含まない人工乳清を調製するとき pH を 6.7 に調整するために必要な 1 N 水酸化カリウムの添加量を添加したときの値とした) に調整した後、全量を 1000 mL とした (Aoki *et al.*, 1986a)。

Table 2-1 Composition of STOCK I and STOCK II.

STOCK I	500	mL
K ₂ HPO ₄	39.5	g
Kcitrate	21.3	g
Na · citrate · 2H ₂ O	44.7	g
K ₂ SO ₄	4.5	g
NaN ₃	100	mg
STOCK II	500	mL
CaCl ₂ · 2H ₂ O	33.0	g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	16.2	g
NaN ₃	100	mg

6. ゲル濾過モード HPLC

HPLC は島津 LC-5A (島津) を使い、カラムは TSK-GEL G4000SW (7.5 mm $\times$ 60 cm、東ソー)

に TSK-GEL ガードカラム (7.5 mm×7.5 cm、東ソー) を装着した。溶離液は USMF を用い流速 0.5 mL/分 で 4 時間以上流してカラムを安定させた。サンプルはカゼイン溶液 1 mL に 0.5 g の生化学用尿素を加え 10 mM 2-メルカプトエタノールを加えて 25℃ で 1 晩静置して還元させ、メンブランフィルター (ポアサイズ 0.45 μm) で濾過したものを注入した。サンプル注入量は分析の場合には 25 μL とし、分取用の場合には 200 μL とした (Aoki *et al.*, 1986a)。

7. イオン交換モード HPLC

HPLC は東ソーの CCPE 型ポンプおよび東ソー UV-8000 検出器を用い、カラムは TSK-Gel DEAE 5PW (7.5 mm×7.5 cm、東ソー) を装着した。ゲル濾過モード HPLC で分離した F1 画分はコロジオンバック (Sartorius SM13200, Sartorius) でカゼイン濃度が約 1% になるまで濃縮し、20 mM 2-メルカプトエタノール、3.3 M 尿素および 0.08 M 塩化ナトリウムを含む 20 mM イミダゾール緩衝液 (pH8.0) に対して透析した。サンプル溶液 80 μL を HPLC に供し、溶出は上述のイミダゾール緩衝液を用いて塩化ナトリウムの直線濃度勾配法で行った。このときの分析条件はサンプル注入後 70 分で、塩化ナトリウム濃度を 0.08 M から 0.28 M まで直線で増加させ、流速は 0.5 mL/分 とした。

8. ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動

ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動は 4.5 M 尿素を含む 7% アクリルアミドゲルを用いて行った (Aoki *et al.*, 1986a)。8 M 尿素と 20% グリセリンおよび 1% メルカプトエタノールを含む 0.125 M トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl buffer) (pH6.8) に溶解した 1.5% のヒト全カゼイン溶液を 4 μL に供した。泳動は 5 mA/プレートで行い、約 2 時間～4 時間で終了した。染色は 0.5% アミドブラック 10B で 1 時間行い、その後 7% 酢酸溶液で洗浄し脱色した。

第 3 節 結果および考察

人工ミセルはカゼイン濃度が 2% で、塩濃度がカルシウム 20 mM、リン酸 17 mM およびクエン酸 10 mM になるように調製した。カゼインミセル中の MCP 架橋カゼイン会合体を分離するため、6 M 尿素と 2-メルカプトエタノールで解離させた後、TSK-GEL G4000SW カラムを用いたゲル濾過モード HPLC を行った。Fig. 2-2A に 6M 尿素と 2-メルカプトエタノールで解離させたカゼインミセルの溶出像を示した。EDTA を添加すると F1 画分がほとんど消失したことから (Fig. 2-2B)、Aoki *et al.* (1986a) の報告のように、F1 画分は MCP 架橋カゼイン会合体であり、F2 画分はカゼインの単量体であると考えられた。F1 画分の最初に溶出されたピークはカラムのボイドボリュームであり、ウシカゼインミセルの場合には EDTA を加えることによって消失したが (Aoki *et al.*, 1986a)、ヒト人工カゼインミセルでは部分的に消失したのみであった。これは、Groves and Gordon (1970) の方法によって得られた人乳カゼイン画分に含まれる高分子のタンパク質が F1 画分に溶出されたものと推察された。したがって、Fig. 2-2 A において MCP 架橋カゼイン会合体が溶出された F1 画分から Fig. 2-2 B の EDTA を加えて溶出された F1 画分をさし引いた面積は全体の 19.8% であり、これが MCP 架橋カゼイン会合体であると考えられた (Aoki *et al.*, 1986a)。

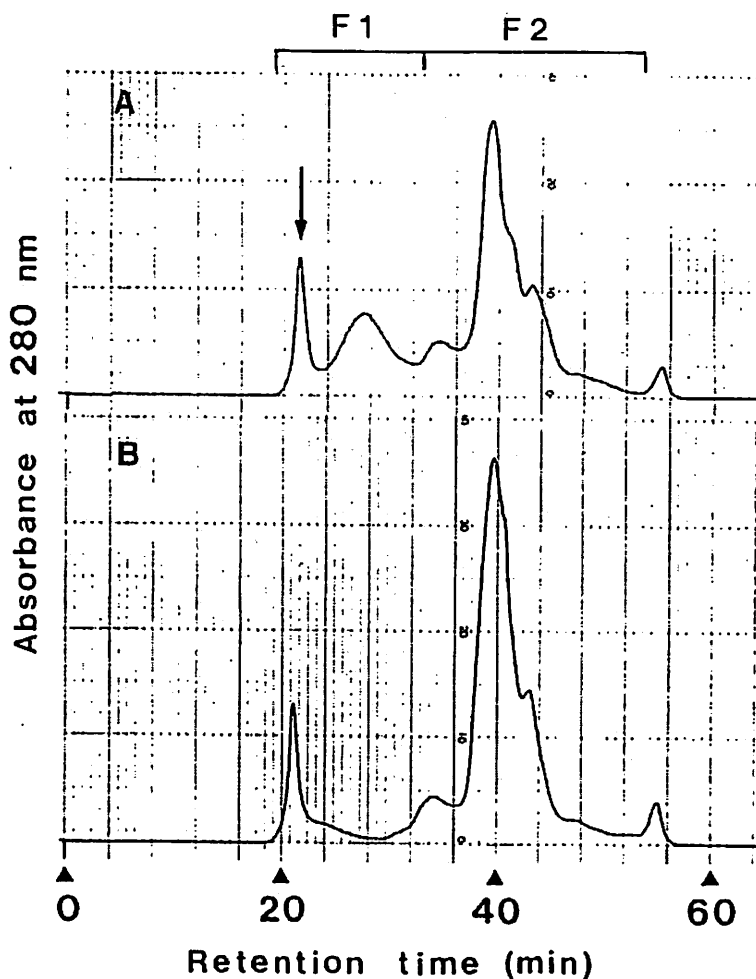


Figure 2-2. High performance gel chromatographic patterns of artificial whole human casein micelles disaggregated in 6 M urea. A) Casein micelles, B) EDTA-added casein micelles. Column, TSK-GEL G4000SW (7.5 mm×60 cm); flow rate, 0.5 mL/min; effluent, 6 M urea-simulated milk ultrafiltrate.

カゼインミセル中のMCP架橋カゼイン会合体の組成を同定するため、Fig. 2-2AのF1画分をTSK-GEL DEAE 5PWカラムを装着したイオン交換モードHPLCに供した結果 (Fig. 2-3B)、ヒト β -カゼイン-4Pと5P成分の明瞭なピークと3P成分のわずかなピークが溶出された。ヒト β -カゼインの組成をスラブゲル電気泳動で同定したところ、ヒト β -カゼインの多くは4P成分であり、1P成分と3P成分はわずかであった。また、ヒト β -カゼインの溶出像はAzuma *et al.* (1989)のポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果と類似していた。このように、ヒト β -カゼインの多くが4P成分であるにもかかわらず、MCP架橋カゼイン会合体を構成するヒト β -カゼインが4P成分に比べ5P成分で比較的多かったことは、4P成分に比べ5P成分の方がより架橋されやすいためと考えられた。しかしながら、1Pと2P成分は溶出されなかった。加えて、EDTAを添加したヒトカゼインミセルではゲル濾過モードHPLCで得られたF1画分をイオン交換モードHPLC

に供したとき (Fig2-3C) 3P、4P および 5P 成分が溶出されなかった。これらの結果から、ヒト β -カゼインの 3P、4P および 5P 成分は架橋されるが 1P と 2P 成分は架橋されないことが推察された。このことを確認するため、ヒト β -カゼイン-1P~4P 成分のそれぞれとウシ κ -カゼインとを用いて人工カゼインミセルを調製して、MCP 架橋カゼイン会合体が形成するか否かをゲル濾過モード HPLC で調べた。1P と 2P 成分を用いた人工ミセルは F1 画分が溶出されなかったが (Fig2-4A と B)、3P と 4P 成分のミセルでは F1 画分が溶出された (Fig2-4C と D)。3P 成分を用いた人工ミセルに尿素を添加するとリン酸カルシウムの沈殿が観察された。3P と 4P 成分を用いた人工カゼインミセルの MCP 架橋カゼイン会合体含量はそれぞれ 17.2% と 40.9% であった。MCP による架橋カゼイン会合体含量は 3P 成分が 4P 成分に比べ非常に少なかったものの、3P と 4P 成分は架橋されるが、1P と 2P 成分は架橋されないことが示された。

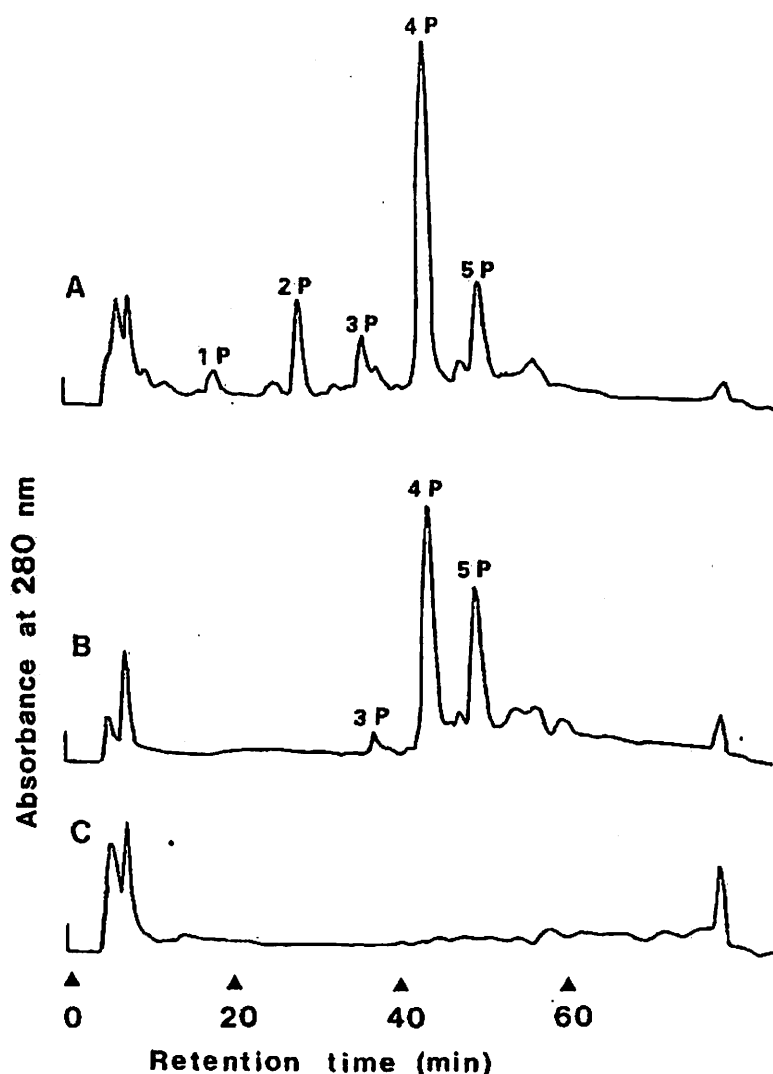


Figure 2-3. High performance ion-exchange chromatographic patterns of whole human casein and the fractions separated by high performance gel chromatography of whole human casein micelles. A) Whole human casein, B) fraction 1 of Figure 2-2A, C) fraction 1 of Figure 2-2B. The letters of 1P to 5P indicate the components of human β -casein. Column, TSK-GEL DEAE-5PW (7.5 mm $\times$ 7.5 cm); flow rate, 0.5 mL/min; buffer, 20 mM imidazole (pH 8.0), 3.3 M urea, 0.08 M NaCl; gradient, 0.08 to 0.28 M NaCl for 70 min.

ヒト β -カゼインの5つのリン酸基はアミノ酸3~11残基に集中し、特に3つのリン酸基は連続する。この8、9および10番目のリン酸基がMCPによる架橋に不可欠であるものと思われる。もし、ポリペプチド鎖上でリン酸基が離れて位置する場合はより多くのリン酸基が必要とされる可能性があるが、これについてはさらに研究が必要である。

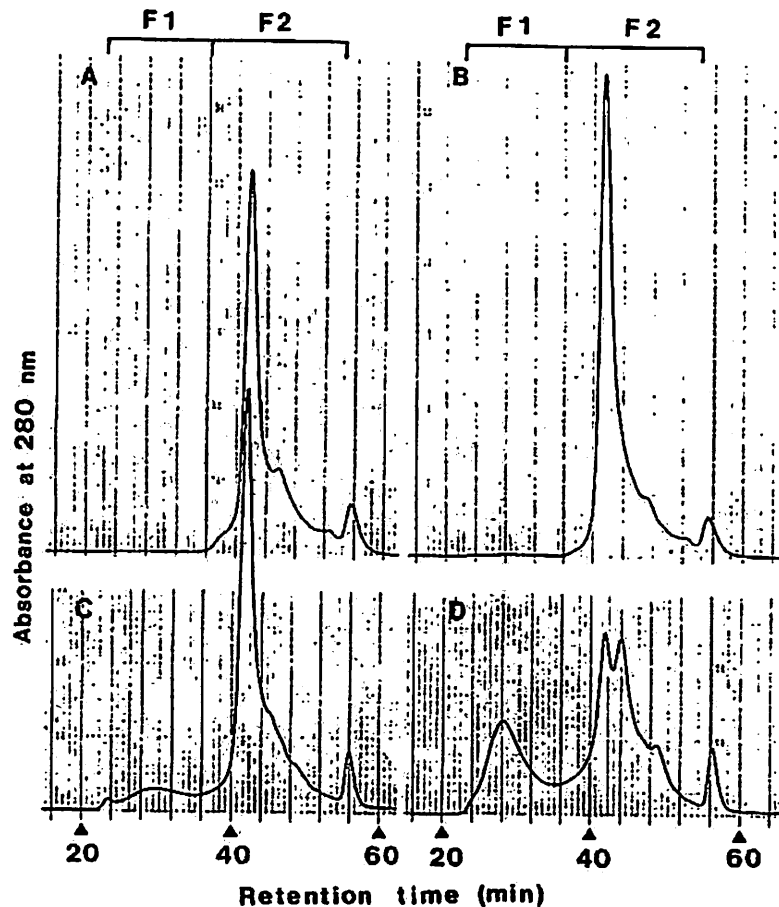


Figure 2-4. High performance gel chromatographic patterns of artificial casein micelles of individual human β -casein and bovine κ -casein. The weight ratio of human β -casein and bovine κ -casein was 9:1. A) Micelles of human β -casein-1P and bovine κ -casein ; B) micelles of human β -casein-2P and bovine κ -casein ; C) micelles of human β -casein-3P and bovine κ -casein ; D) micelles of human β -casein-4P and bovine κ -casein. Column, TSK-GEL G4000SW (7.5 mm $\times$ 60 cm) ; flow rate, 0.5 mL/min; effluent, urea-simulated milk ultrafiltrate.

van Dijk(1989a, 1989b)は、2個のリン酸基と4個の無機リン酸にカルシウムを主とする8個の陽イオンが加わったMCPのイオンクラスターモデルを提唱している。彼のモデルによると、十分なカルシウムとリン酸がカゼインの架橋に必要であり、沈殿することなく可溶化してカゼインと結合していなければならないとしている。自然に起こるリン酸カルシウムの沈殿におけるカゼインの阻害効果はリン酸残基含量に比例す

る(Holt, 1989b)。このことから、ヒト β -カゼインの 1P と 2P 成分は安定した複合体形成のために十分なリン酸カルシウムを可溶化できないため、ヒト β -カゼインの 1P と 2P 成分の人工ミセルではリン酸カルシウムが沈殿したものと考えられた。これらの結果からカゼインの MCP による架橋形成には少なくとも 3 個のリン酸基が必要であることが明らかになった。

第 4 節 小括

ウシ全カゼインを用いた人工カゼインミセルの MCP による架橋のされやすさは α_{s2} 、 α_{s1} 、 β -カゼインの順で、 κ -カゼインは架橋されない。このことは分子中に含まれるリン酸基数が多い方が MCP により架橋を形成されやすく、 κ -カゼインはリン酸基を 1 個しか持たないために MCP 架橋が形成されないことを示唆している。一方、一次構造が解明されているヒト β -カゼインは分子中にリン酸基を 1~5 個持つものと、リン酸基を持たないものが存在することが明らかとなっている。そこで、ヒト β -カゼインとウシ κ -カゼインを用いてカゼイン濃度が 2%で、カルシウム 20 mM、リン酸 17 mM およびクエン酸 10 mM になるように人工ミセルを調製し、TSK-GEL G4000SW カラムを用いたゲル濾過モード HPLC によりカゼインミセル中の MCP 架橋カゼイン会合体を分離した。次にイオン交換モード HPLC で MCP 架橋カゼイン会合体を構成するカゼイン成分を調べたところ、ヒト β -カゼイン 4P と 5P 成分の明瞭なピークと 3P 成分のわずかなピークが溶出された。次にヒト β -カゼインの 1P 成分から 4P 成分を用いてそれぞれウシ κ -カゼインとで人工ミセルを調製し、ゲル濾過モード HPLC で MCP 架橋カゼイン会合体ができるか否か調べたところ、ヒト β -カゼインの 3P と 4P 成分では MCP による架橋が形成されたが 1P と 2P 成分では架橋が形成されなかった。以上の結果から、MCP による架橋形成にはカゼイン分子中に 3 個以上のリン酸基が必要であると結論した。

第3章 ミセル性リン酸カルシウムによる架橋形成に 及ぼすカゼインのリン酸基数の影響

第1節 緒言

第2章においてカゼインのMCPによる架橋には少なくとも3個のリン酸基が必要であることが明らかとなった。しかしながら、リン酸基以外の側鎖がMCPによる架橋形成に影響する可能性が残っている。このことを明らかにするためには、一次構造が同じでリン酸化レベルが異なるカゼインを用いて、MCPによる架橋形成に及ぼすリン酸基数の影響を調べる必要がある。

ウシカゼインのうち、 α_{s1} -カゼインには一次構造が同じでリン酸基数のみが異なる α_{s1} -カゼイン-8Pと9P成分が存在し、 α_{s2} -カゼインも同様に α_{s2} -カゼイン-10P～13P成分が存在する。 α_{s1} -カゼインは8個のリン酸基が比較的局在して結合しており、 α_{s1} -カゼイン-9P成分が持っているもう1個のリン酸基は、N末端から41番目のセリン残基に結合している(Fig. 1-1)。 α_{s2} -カゼイン-11P成分の11個のリン酸基は α_{s1} -カゼインと同様に比較的集中して結合している(Fig. 1-2)。しかしながら、 α_{s2} -カゼイン-10Pと12Pおよび13P成分のリン酸基が分子中のどのアミノ酸に結合しているかは解明されていない。 α_{s2} -カゼインの電気泳動の結果では α_{s2} -カゼイン-10P成分が薄いバンドとして現れ、 α_{s2} -カゼイン-11P～13P成分は比較的太いバンドとして現れる。このことから、 α_{s2} -カゼイン-10P成分は α_{s2} -カゼイン-11P～13P成分に比べ少量であると思われる。

そこで、ヒト β -カゼイン-3Pと4P成分、ウシ α_{s1} -カゼイン-8Pと9P成分およびウシ α_{s2} -カゼイン-11P～13P成分をイオン交換モードHPLCで分離分取して、それぞれ一次構造が同じでリン酸基数のみが異なるカゼインの人工ミセルを調製し、MCP架橋カゼイン会合体を構成する各カゼインの成分組成を調べることにより、同一の一次構造で、リン酸化の違いがMCPによる架橋形成に及ぼす影響を検討した。

第2節 試料調製および方法

1. ヒト β -カゼインとウシ κ -カゼインの精製

ヒト β -カゼイン-3Pと4P成分およびウシ κ -カゼインの精製は第2章第2節と同様の方法で行った。

2. ウシ α_{s1} -カゼイン-8Pと9P成分およびウシ α_{s2} -カゼイン-11P～13P成分の精製

ウシ α_{s1} -カゼインとウシ α_{s2} -カゼインは酸沈殿法によって得られたウシ全カゼインから分取用カラムを装着したイオン交換モードHPLCを用いて精製した。すなわち、分取用カラムはTSK-GEL DEAE5PWカラム(21.5×150 mm)を装着し、溶離液は3.3 M尿素を含む20 mM イミダゾール緩衝液(pH 8.0)、流速は4 mL/分、注入量は2%全カゼイン溶液を2 mL、溶出は塩化ナトリウムによる2段階の塩勾配(0.08 Mから0.17 Mまでが15分、0.17 Mから0.20 Mまでが105分)で行った。各カゼインは分取した溶出液を濃縮後、100倍量の水に対して2日間透析した後、凍結乾燥して得た。

3. 人工カゼインミセルの調製

人工カゼインミセルは第2章第2節と同様に行い、目的とするカゼインとウシ κ -カゼインが9:1になるように調製した。なお、ヒト β -カゼインを用いた人工ミセルはヒト β -カゼイン-3Pと4P成分をそれぞれ22.5 mgとウシ κ -カゼイン5.0 mgを秤量して調製し、ウシ α_{s1} -カゼインを用いた人工ミセルはウシ α_{s1} -カゼイン-8Pと-9Pをそれぞれ22.5 mgとウシ κ -カゼイン5.0 mgを秤量して調製した。ウシ α_{s2} -カゼインを用いた人工ミセルはウシ α_{s2} -カゼイン-11P~13Pを45 mgとウシ κ -カゼイン5.0 mgを秤量して調製した。

4. HPLC

ゲル濾過モード HPLC は第2章第2節と同様に行った。カゼイン成分を定量するために行ったイオン交換モード HPLC も第2章第2節と同様の方法で行い、濃度勾配はヒト β -カゼインでは塩化ナトリウムによる直線勾配(70分で0.08 M~0.23 M)とし、ウシ α_{s1} -、 α_{s2} -カゼインでは塩化ナトリウムによる2段階の直線勾配(10分で0.08~0.17 M、50分で0.17~0.22 M)とした。

第3節 結果および考察

ヒト β -カゼイン-3P および 4P 成分とウシ κ -カゼインの人工ミセルは、塩濃度がカルシウム 20 mM、リン酸 17 mM、クエン酸 10 mM となるように調製した。ゲル濾過モード HPLC を行った結果、F1 画分と F2 画分とに分けられた。前章で記述したように F1 画分は MCP による架橋カゼイン会合体で構成され、F2 画分はカゼインの単量体である。ヒト β -カゼインの 3P および 4P 成分とウシ κ -カゼインとで作ったカゼインミセルの MCP による架橋カゼイン会合体含量は 22.3%であった。この F1 画分のヒト β -カゼイン-3P と 4P 成分の構成比をイオン交換モード HPLC で測定した。F1 画分の 4P 成分は 84.0%と 3P 成分の 16.0%に比べ著しく多かった(Table 3-1)。MCP によって架橋された 3P と 4P 成分のそれぞれの全量に対する割合は F1 画分の含量とミセルのカゼイン組成割合から算出した。このとき 3P 成分の割合は 3.57%であった。ミセル中の全カゼインに対する 3P と 4P 成分の割合はそれぞれ 45.9%と 44.1%であった。したがって、架橋された 3P 成分は 3P 成分全体の 7.8%、4P 成分は 4P 成分全体の 42.4%となり、架橋された 4P 成分は架橋された 3P 成分の 5.44 倍であった。

ウシ α_{s1} -カゼイン-8P および 9P 成分とウシ κ -カゼインとの人工ミセルは、塩濃度がカルシウム 30 mM、リン酸 22 mM、クエン酸 10 mM となるように調製した。ミセルの F1 画分は 53.2%であった。Table 3-1 に示したように、MCP によって架橋された 9P 成分の 9P 成分全体に対する割合は 65.9%であり、架橋された 8P 成分の割合の 1.25 倍であった。

3 個以上のリン酸基が MCP によるカゼインの架橋形成に必要であることは前章で述べた。本章では、カゼインのリン酸基数 1 個の違いが MCP によるカゼインの架橋形成に及ぼす影響を検討した。ヒト β -カゼイン-3P 成分は 4P 成分と比較するとわずかにしか架橋されなかった。MCP によるカゼインの架橋形成におけるリン酸基 1 個の違いによる影響は α_{s1} -カゼイン-8P と 9P 成分、 α_{s2} -カゼイン-11P~13P 成分でかなり小さかった。ヒト β -カゼインの 3P 成分のリン酸基は 8 番目 9 番目 10 番目のアミノ酸残基に位置し、4P 成分ではもう 1 個のリン酸基が 6 番目のアミノ酸残基に

結合する (Greenberg, 1984)。ウシ α_{s1} -、 α_{s2} -カゼインのリン酸基はヒト β -カゼインと比べ離れて位置しており、 α_{s1} -カゼイン-8P 成分のリン酸基は 46 番目から 115 番目のアミノ酸残基に位置し、9P 成分のもう 1 個のリン酸基は 41 番目に位置する (Eigel, 1984)。これらリン酸化の部位は MCP による架橋形成に影響していると思われるが、カゼインのリン酸基 1 個の違いが及ぼす影響は、カゼインに結合するリン酸基数が多くなると、小さくなると考えられた。

Table 3-1 Relative casein composition of artificial casein micelles and the MCP-cross-linked fraction (F1)

Type of Micelles	Component	Composition of Micelles ^a (%)	Composition of F1 (%)	Cross-linked Proportion ^b (%)
Human β -casein	3P	45.9	16.0	7.8
	4P	44.1	84.0	42.4
Bovine α_{s1} -casein	8P	46.6	46.2	52.7
	9P	43.4	53.8	65.9
Bovine α_{s2} -casein	11P	29.2	29.9	55.6
	12P	34.2	40.0	63.5
	13P	26.6	30.1	61.4

Data shows the mean values of two determinations.

^a Composition of casein mixtures in the prepared micelles. The κ -casein content of all the micelle samples was 10%.

^b The percentage of each component cross-linked by MCP to its total content of micelles.

第 4 節 小括

ウシカゼインの中で α_{s2} -> α_{s1} -> β -カゼインの順で MCP により架橋されやすいことは、その分子中にリン酸基を多く持つカゼインほど MCP により架橋されやすいことを示唆している。さらに、第 2 章においてカゼインの MCP による架橋形成には少なくとも 3 個のリン酸基が必要であることが明らかになった。しかしながら、リン酸基以外の側鎖が MCP によるカゼインの架橋形成に影響する可能性がある。そこで、ヒト β -カゼイン-3P と 4P 成分、ウシ α_{s1} -カゼイン-8P と 9P およびウシ α_{s2} -カゼイン-11P~13P 成分を分離分取して人工ミセルを調製し、ゲル濾過モード HPLC とイオン交換モード HPLC を行って MCP 架橋カゼイン会合体を構成する各カゼインの成分組成を調べることで、一次構造が同じでリン酸化の違いが MCP による架橋形成に及ぼす影響を検討した。MCP によるカゼインの架橋形成に及ぼすリン酸基 1 個の違いによる影響はヒト β -カゼイン-3P と 4P 成分で著しく大きく、 α_{s1} -カゼイン-8P と 9P 成分、 α_{s2} -カゼイン-11P~13P 成分でかなり小さかった。これらのことから、カゼインが持つリン酸基 1 個の違いが MCP による架橋形成に及ぼす影響は、分子中のリ

ン酸基数が3個から4個のように少ない場合は大きく、10個以上のようにリン酸化のレベルが上がると小さくなると考えられた。

第4章 ミセル性リン酸カルシウム架橋と ミセルサイズとの関係

第1節 緒言

カゼイン各成分は自己会合しやすくかつ成分間相互作用もしやすいため、牛乳中ではカゼインミセルとして直径20から600 nmのコロイド粒子として存在している。カゼインミセルの組成はミセルサイズに関して不均一であり、一般にミセル性カルシウムと無機リン含量はミセルサイズが大きくなるのに伴い増加し (Aoki and Kako, 1983; Ono *et al.*, 1975; Sabarwal *et al.*, 1969)、 κ -カゼイン含量は小さなミセルサイズのものの多い (Davies and White, 1983 ; Ekstrand *et al.*, 1978 ; McGann *et al.*, 1980)。これらのことから、 κ -カゼインはミセルサイズを支配する主な要因と考えられた。しかしながら、MCP 含量がミセルサイズに影響する可能性がある。そこで、ウシカゼインミセルのミセルサイズと MCP 含量あるいは MCP 架橋カゼイン会合体との間に関係があるか否かを検討するために、遠心分離の条件を変えてミセルサイズを大、中および小ミセルに分け、それぞれのカゼイン組成と MCP 架橋カゼイン会合体を構成するカゼイン組成を調べるとともに、MCP を増加させた小ミセルのサイズ分布を Sephacryl S-1000 カラムを用いたゲルクロマトグラフィで調べた。

第2節 試料調製および方法

1. カゼインミセル分散液と MCP 増加小ミセルの調製

カゼインミセルは遠心分離の条件の違いにより3種のミセルサイズに分けた。すなわち、ホルスタイン種の合乳から調製した脱脂乳を、8,000 $\times$ g、19,000 $\times$ g および 77,000 $\times$ g の順で 25℃1 時間、連続的に遠心分離を行った。ペレット状の沈殿物として得られた3種のミセル画分をそれぞれ大、中および小ミセルとした。これらのミセルサイズは、Aoki *et al.* (1983) の電子顕微鏡による報告から、大、中および小ミセルの直径がそれぞれ主に 150 nm 以上、120-150 nm、90 nm 以下の粒子から構成されているものと推察される。

3つのミセル画分はそれぞれ、Jenness and Koop (1962) の方法により調製した人工乳清 (SMUF) に対し 9 kHz で 30 分の超音波処理を行って分散させた。カゼインミセル分散液のカゼイン濃度は SMUF を加えて 2.5% に調整した。

MCP を増加させた小ミセルの調製は、10 mL の小ミセル分散液を攪拌しながら 1.5 M 塩化カルシウム 25 μ L と 1 M のリン酸カリウム 25 μ L をマイクロピペットで添加して行った。pH は 1 M 水酸化カリウム溶液で 6.7 に調整した。

2. HPLC

各ミセルサイズの相対的なカゼイン成分組成を測定するため、イオン交換モード HPLC を用いて第2章第2節と同様に行った。MCP 架橋カゼイン会合体含量の測定は、ゲル濾過モード HPLC を用いて第2章第2節と同様に行った。

3. ミセル性カゼインとカルシウムおよび無機リンの定量

ミセル性カゼインとカルシウムおよび無機リン含量は、カゼインミセル分散液を25℃、100,000xgで1時間超遠心分離して乳清相を分け、乳清相中のカゼインとカルシウムおよびリン含量を測定し、この値を分散液全量中の含量から差し引いて求めた (Aoki, 1989)。

カゼイン含量の測定はマイクロケルダール法 (Aoki *et al.*, 1983) で行った。カルシウムは 170-30 原子吸光光度計 (日立) を用いて定量した。 (Aoki *et al.*, 1983)。無機リンは Allen 法 (1940) で定量した。

4. Sephacryl カラムクロマトグラフィー

Sephacryl S-1000 カラムクロマトグラフィーは、2.2×85 cm のカラムを用い、溶離液として SMUF を用いて、温度は常温 (22-25℃) で行った。流速はペリスタポンプを用いて 35 mL/分とした。クロマトグラフィー実施中に SMUF 中にリン酸カルシウムの沈殿が生じる場合があるため、Reynolds *et al.* (1994) の方法で全カゼインから調製したカルシウムホスホペプチドを 0.02% 濃度になるように SMUF に加え、さらにリン酸カルシウムの沈殿を防ぐため SMUF の容器を氷槽中にて冷却した。防腐剤としてアジ化ナトリウムを SMUF に 0.05% 添加した。

カラムにカゼインミセル分散液を 5 mL 供し、5 mL づつフラクションを集めた後、同量の 0.2 M クエン酸 3 ナトリウム溶液を加えて 280 nm の吸光度を測定した。

第3節 結果および考察

ミセル性カルシウムとリン含量がミセルサイズに伴って増加することは良く知られている (Aoki *et al.*, 1983 ; Ono *et al.*, 1975 ; Sabarwal *et al.*, 1969)。今回の実験結果も Table 4-1 に示したように、ミセル中のミセル性カルシウムと無機リン含量は大>中>小ミセルの順に多かった。

Table 4-1 The contents of micellar Ca and inorganic phosphate (Pi) and MCP-cross-linked casein in large (L), medium (M), small (S) and MCP-increased micelles.

Sample	Ca (mg/g casein)	Pi	MCP-cross-linked Casein (%)
L micelles	36.6	16.2	56.8
M micelles	34.1	15.0	53.1
S micelles	31.2	12.6	46.7
MCP-increased S micelles	36.5	16.1	55.5

カゼインの MCP 架橋カゼイン会合体含量を測定するため、6 M 尿素で解離させたカゼインミセルはゲル濾過モード HPLC を用いて、溶離液として 6 M 尿素を含む SMUF で溶出した。Fig. 4-1 に 6 M 尿素で解離させた大、中および小ミセルの溶出パター

ンを示した。第2章で記述したように、F1画分はカゼインのMCP架橋会合体で、F2画分はそれぞれのカゼイン単量体で構成される。

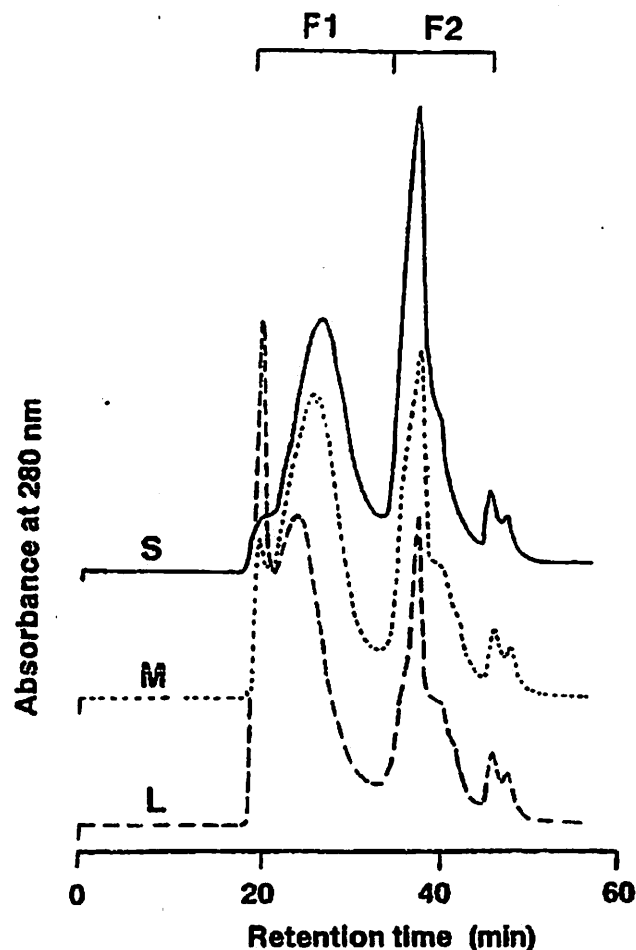


Figure 4-1. Elution patterns of L, M, and S micelles disaggregated in 6 M urea from a TSK-GEL G4000SW column. Flow rate, 0.5 mL/min ; eluent, 6 M urea-simulated milk ultrafiltrate.

相対的なカゼイン組成はイオン交換モード HPLC を用いて測定した。Table 4-2 に示したように、 κ -カゼイン含量はミセルサイズが小さくなるのに伴い増加したが、 α_{s1} -、 α_{s2} -および β -カゼイン間の違いは、大、中および小ミセル間で小さかった。先に述べたように MCP によって架橋されるカゼインは α_{s2} - α_{s1} - β -カゼインの順で多く、 κ -カゼインは MCP によって架橋されない (Aoki, 1989)。MCP 架橋カゼイン会合体中の α_{s1} -カゼインと α_{s2} -カゼイン含量は、対応するカゼインミセル中のそれより多く、 β -カゼインは少なかった (Table 4-2、4-3)。しかしながら、大、中および小ミセル間において MCP 架橋カゼイン会合体中の α_{s1} -、と α_{s2} -、および β -カゼイン含量の差はわずかであった。

Table 4-2 Casein composition of large (L), medium (M), and small (S) micelles.

Sample	Casein (%)				
	α_{s1}	α_{s2}	β	κ	γ
L micelles	38.7	11.2	38.4	7.8	3.9
M micelles	36.1	10.7	37.3	11.4	4.5
S micelles	36.2	9.0	34.2	15.3	5.3

Table 4-3 Casein composition of MCP-cross-linked casein in L, M, and S micelles.

Sample	α_{s1} -casein (%)	α_{s2} -casein (%)	β -casein (%)	κ -casein (%)
L micelles	50.5	16.4	33.1	0
M micelles	50.3	16.5	33.8	0
S micelles	49.7	15.7	34.6	0

カゼインミセル中のMCP架橋カゼイン会合体含量はクロマトグラフのピーク面積と個々のカゼインの吸光度係数から算出した。大、中および小ミセルにおけるMCP架橋カゼイン会合体含量はそれぞれ56.8、53.1 および46.7%であった。さらに、リテンションタイム 20 分のボイドボリュームに溶出されたピークは中ミセルより大ミセルで大きかった。このことから、MCP 架橋カゼイン会合体の会合度は、ミセルサイズが大きいほど高いと考えられた。

ミセルサイズに及ぼすMCPレベルの影響を調べるため、MCPを増加させた小ミセルを調製して実験を行った。MCPを増加させた小ミセルに含まれるミセル性のカルシウムと無機リン含量は大ミセルと非常に近い値であった (Table 4-1)。MCPを増加させたカゼインミセルのMCP架橋カゼイン会合体含量もまた大ミセルと非常に近い値であった。カゼインミセルのサイズの分布を調べるため Sephacryl S-1000 カラムを用いたクロマトグラフィを行った。Creamer *et al.* (1984) の報告と同様、脱脂乳のカゼインミセルはボイドボリュームから始まる幅広い画分として溶出された (Fig. 4-2)。大ミセルの溶出パターンは小ミセルとは明らかに異なっていた。MCPを増加させた小ミセルの溶出パターンは小ミセルと著しく似ていた。これらの結果から、小ミセルのMCPレベルを大ミセルと同等に増加させたときミセルサイズが変化しないことから、ミセルサイズをコントロールする主な要因は κ -カゼインであることが裏付けられた。

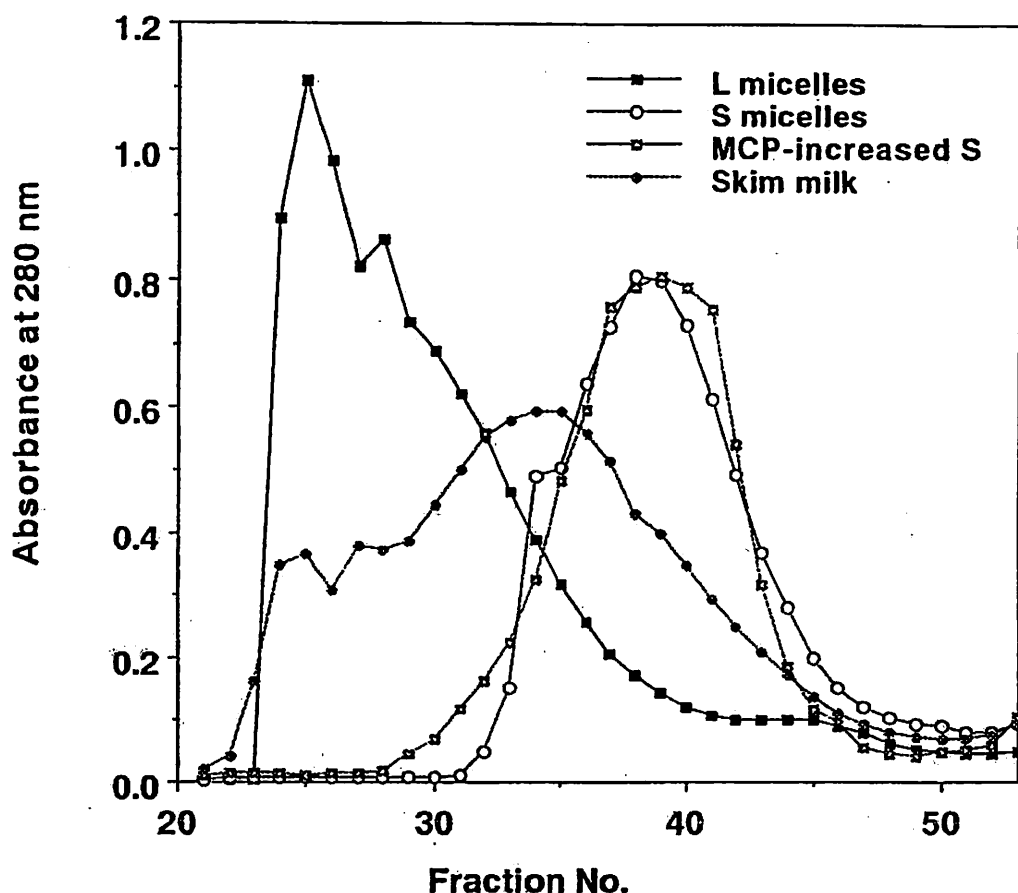


Figure 4-2. Elution patterns of L, M, S, MCP-increased S micelles and skim from a Sephacryl S-1000 column. Flow rate, 35 mL/h ; eluent, simulated milk ultrafiltrate.

乳タンパク質の生合成は乳腺上皮細胞で行われる。乳腺におけるカゼインミセルの形成は以下のように簡潔に要約される。すなわち、新しく形成されたゴルジ小胞（ゴルジ体を起源とした分泌小胞）に存在するカゼインが集まってサブミセルとなり、サブミセルは会合し、カルシウムと無機リンによって架橋され、さらに無機成分が付加される。サブミセルはカゼイン成分組成が不均一である。カゼインがMCPによってカゼイン分子中のリン酸基を介し架橋されるとき、ゴルジ小胞内で合同したカルシウムと無機リンを伴う相互作用は主にカゼインのリン酸基によると考えられている(青木, 1993)。上述したように、大ミセルのカルシウムと無機リン含量は小ミセルより多かった。そこで、MCPにより架橋を形成すると考えられる α_{s1} - α_{s2} -および β -カゼイン当たりのカルシウムと無機リン含量を算出すると、大ミセルの無機リン含量は18.3 mg/g カゼインであり ($16.2 / (0.387 + 0.112 + 0.384)$)、同様に小ミセルは15.8 mg/g カゼイン ($12.6 / (0.362 + 0.090 + 0.342)$) となった。このことは、カルシウムと無機リンが κ -カゼインの多いサブミセルと比べ κ -カゼインが少ないサブミセルでより高い親和力を持つことを意味する。Van Dijk(1989b)は彼の論文の中で、以下のように記述している。MCPのイオンクラスターの数がある一定値に到達したときMCPの追加形成が自己触媒的に行われ、 κ -カゼインが少ないサ

ブミセルにカルシウムと無機リンが取り込まれると、 κ -カゼインが多いサブミセルに比べより大きな粒子に凝集する。これらのことから、 κ -カゼインが少ないサブミセルの凝集はカルシウムと無機リンへの高い親和力をより向上させると推察された。

第4節 小括

牛乳中でカゼインはカゼインミセルとして直径 20 から 600 nm のコロイド粒子として存在している。ミセル性カルシウムと無機リン含量はミセルが大きくなるのに伴い増加し、 κ -カゼイン含量は小さなミセルの方が多いため、 κ -カゼインはミセルサイズを調整する主要因と考えられている。しかしながら、MCP 含量がミセルサイズに影響を及ぼす可能性がある。そこで、ウシカゼインミセルのミセルサイズと MCP 含量あるいは MCP 架橋カゼイン会合体含量との間に関係があるか否かを検討するため、遠心分離の条件を変えてミセルを大、中および小ミセルに分け、カゼイン組成と MCP 架橋カゼイン会合体のカゼイン組成を調べるとともに、MCP を増加させた小ミセルのサイズ分布を Sephacryl S-1000 クロマトグラフィで調べた。

κ -カゼイン含量はミセルサイズが小さくなるのに伴い増加したが、 α_{s1} -、 α_{s2} -および β -カゼインはわずかに減少した。大、中および小ミセルにおけるカゼインの MCP 架橋カゼイン会合体含量はそれぞれ 56.8、53.1 および 46.7%であった。MCP を増加させた小ミセルはミセル性カルシウムと無機リン含量が大ミセルと非常に近い値であり、MCP 架橋カゼイン会合体含量もまた大ミセルと非常に近い値であった。カゼインミセルのサイズの分布を調べるために行った Sephacryl S-1000 カラムを用いたクロマトグラフィの結果は、大ミセルの溶出パターンと小ミセルのパターンが明らかに異なっており、MCP を増加させた小ミセルの溶出パターンは小ミセルと著しく似ていた。以上、小ミセルの MCP レベルを大ミセルと同じレベルにまで増加させたときミセルサイズが変化しなかったことから、ミセルサイズをコントロールする主要因は κ -カゼインであることが裏付けられた。

第5章 ブタ乳カゼインミセルのミセル性リン酸 カルシウム架橋とミセルの特性

第1節 緒言

牛乳の成分組成と物理化学的特性に関する研究は数十年にわたって報告されてきたが、ブタ乳に関する報告は極めて少ない。ブタのミセル性カゼイン1gあたりに含まれるカルシウムと無機リン含量はそれぞれ45.7 mgと19.4 mgと報告されており、この値はウシのミセル性カゼイン1g当たりのカルシウムと無機リン含量がそれぞれ31.0 mgと11.1 mgであることと比べると著しく多い(Irlam *et al.*, 1985)。ブタ乳におけるミセル相と乳清相間の塩類の分布は O'Connor and Fox (1977) と Holt and Jenness (1984) によって報告されているが、彼らの結果は正確に一致するものではない。そこで、6 M 尿素存在下におけるゲル濾過モード HPLC を用い、ブタカゼインミセルから MCP 架橋カゼイン会合体を分離し、カルシウムと無機リンの含量を調べた。また、MCP 架橋はカゼインミセルの構造維持に重要な役割を果たしており、ミセルの特性、特にミセルの低温解離に大きな影響を及ぼすので、ブタカゼインミセルの低温解離性についても調べた。

第2節 試料調製および方法

1. 試料乳

ブタ乳は2頭の大ヨークシャー種と1頭の3元雑種(大ヨークシャー種とランドレース種)から得た分娩後3週間後の個乳を用いた。牛乳はホルスタイン種20頭の生乳が入ったバルク乳から採取した。採乳した乳試料50 mLには、プラスミンによる蛋白質分解を抑えるため0.1 mgのトリプシンインヒビターを添加した。

2. カゼインミセルの分離

カゼインミセルは乳試料を25℃で4時間保持した後、超遠心分離機を用いて100,000xgで1時間超遠心分離して得た。得られたカゼインミセルペレットは第2章第2節と同様に調製したUSMUFにただちに溶解した。カゼイン濃度を2.4%に調整した後、還元カゼインミセルを得るため、10 mMになるように2-メルカプトエタノールをカゼイン溶液に加えて25℃で一晩保持した。ウシカゼインミセルのMCP架橋カゼイン会合体を解離させるため、EDTA・2ナトリウム5 mgとEDTA・4ナトリウム8 mgをウシカゼインミセル溶液1 mLに加えた。一方、ブタカゼインミセルのMCP架橋カゼイン会合体を解離させるため、EDTA・2ナトリウム15 mgとEDTA・4ナトリウム24 mgをブタカゼインミセル溶液1 mLに加えた。

3. ゲル濾過モード HPLC

ゲル濾過モード HPLC は第2章第2節と同様に行った。なお、装置はJusco Gulliver SeriesのPU-980型ポンプとUV-970型検出器で構成され、カラムはTSKガードカラムW_{XL}(6.0 mm×4.0 cm)を装着したTSK-GEL G4000SW_{XL}(7.8 mm×30 cm: 東ソー)を用い、溶出は25℃で行った。サンプルの分析前に、USMUFを流速0.5 mL

／分で4時間以上流した。カゼインミセル溶液1 mL に対し精製した尿素0.5 g と2-メルカプトエタノール2 μ L (10mM)を加えた。サンプル液は25℃で一晩保持し、注入前にメンブランフィルター(ポアサイズ0.45 μ m)に通し、25 μ L を注入した。MCP 架橋カゼイン会合体含量はクロマトグラフのピーク面積から算出した。

4. 全カゼインの分離

全カゼインはブタとウシの生乳を用い1 M 塩酸でpH 4.6 に調整して酸沈殿させ、水洗後水を加えて0.1 M 水酸化ナトリウム溶液をpH が7.0 を越えないように注意深く徐々に加えて溶解し、再び1 M 塩酸でpH を4.6 にして再沈させた。沈殿した全カゼインは水で洗浄した後適量のエタノールとアセトンで洗浄した。

5. 冷却によって解離した乳清中カゼインの定量

乳試料は5℃で2, 4, 8, 24 時間処理した後、100,000 $\times$ g、5℃で1時間、超遠心分離を行った。得られた乳清(上清)中の全窒素含量をケルダール法で測定し、第4章第2節と同様に非カゼイン態窒素含量を差し引いて乳清中のカゼイン態窒素とし、これにタンパク質換算係数6.38 を乗じて乳清中のカゼイン含量とした。

6. 化学分析

窒素含量の定量とカルシウムおよび無機リン含量の定量は第4章第2節と同様に行った。なお、カルシウムの定量にはAA-855 型原子吸光分光光度計(ジャーレルアッシュ)を用いた。

第3節 結果および考察

Table 5-1 にブタとウシ乳中の全およびミセル性のカゼイン、カルシウムおよび無機リン含量を示した。ブタ乳の全カゼイン含量はウシ乳のそれより多かった。ブタ乳のミセル性カゼイン含量は3.47~4.07%であり、この値は牛乳より多く1.48~1.73 倍であった。全カルシウム、無機リン含量とミセル性のカルシウム、無機リン含量もまたブタ乳が牛乳より多く、ミセル性のカルシウム含量は2.21~2.62 倍であった。ブタカゼインミセルのカルシウム含量は、ウシカゼインミセルのカルシウムが31.9 mg/g カゼインであったのに対し、47.8~56.7 mg/g カゼインであった。

カゼインミセル中のMCP 架橋カゼイン会合体含量を定量するため、6 M 尿素と2-メルカプトエタノールで還元解離したブタカゼインミセルをゲル濾過モードHPLCによりUSMUFで溶出した。溶出像はFig. 5-1に示したようにF1画分とF2画分に分画された。ブタカゼインミセルにEDTAを加えるとウシカゼインと同様に(Fig. 5-1 Bovine b) F1画分が消失した(Fig. 5-1 Porcine No. 1b と Porcine No. 3b)。このことから前章で述べたようにF1画分はカゼインミセルのMCP 架橋カゼイン会合体である。F1画分はカラムのポイドボリュームに溶出される構成成分を含み、その含量は、ウシと比べてブタで多いことからブタカゼインミセルのMCP 架橋カゼイン会合体の会合度がウシのそれより高いものと考えられた。MCP 架橋カゼイン会合体含量をクロマトグラフのピーク面積から求めると、ブタカゼインミセルのMCP 架橋カゼイン会合体含量は76.0~80.4%であり(Table 5-2)、ウシの場合の56%程度と比べて著しく多かった。

Table 5-1 Distribution of casein, calcium and inorganic phosphorus in porcine and bovine skim milk.

Milk Sample	Total Casein — (g/100mL) —		Micellar Casein / Total Casein (%)		Total Ca		Micellar Ca		Total Pi		Micellar Pi	
Porcine (No.1)	4.20	4.07	96.9	276	197	75	58					
Porcine (No.2)	3.78	3.61	95.5	295	205	86	69					
Porcine (No.3)	3.53	3.47	98.3	230	166	68	52					
Bovine	2.63	2.35	89.4	105	75	68	35					

Pi : Inorganic phosphorus.

Porcine milk (No. 1 and 2) : from Large Yorkshire sows.

Porcine milk (No. 3) : from a hybrid sow (a cross between Large Yorkshire and Landrace swine).

Bovine milk : from 20 Holstein cows.

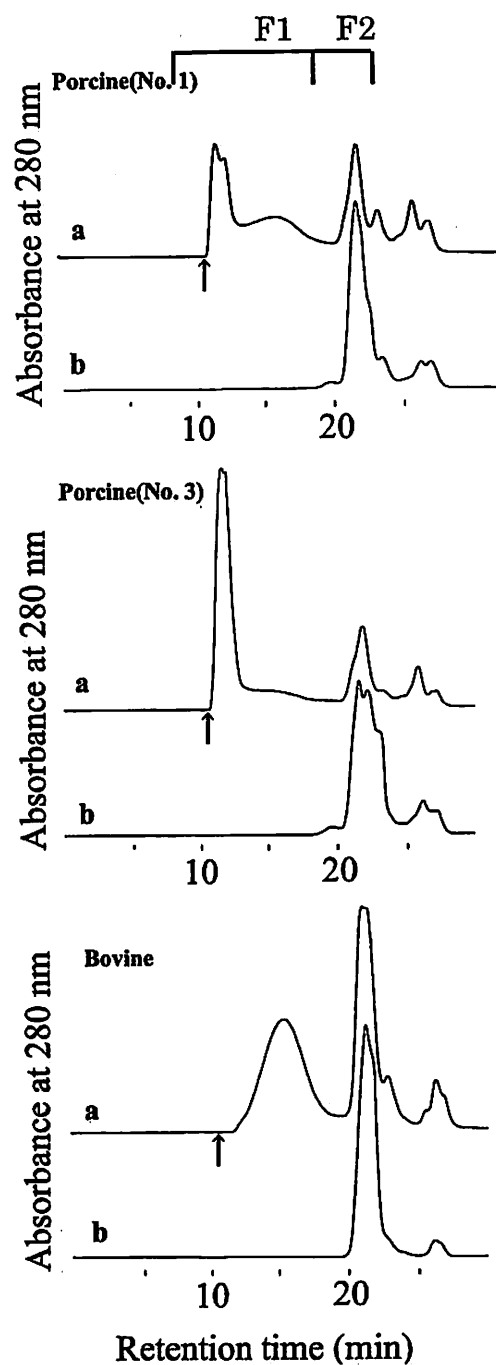


Figure 5-1. Elution patterns of porcine and bovine casein micelles disaggregated in 6 M urea-simulated milk ultrafiltrate (USMUF) from a TSK-GEL G4000SW XL column. a : reduced casein micelles ; b : EDTA - treated reduced casein micelles. Flow rate was 0.5 mL/min and USMUF was used as the eluent.

Table 5-2 The contents of MCP-cross-linked casein and casein monomer separated by high-performance gel chromatography from porcine and bovine casein micelles.

Sample of casein micelles	MCP-cross-linked casein (%)	Casein monomer (%)
Porcine (No.1)	76.0	24.0
Porcine (No.2)	80.4	19.6
Porcine (No.3)	78.6	21.4
Bovine	56.0	44.0

Porcine milk (No. 1 and 2) : Casein micelles from porcine milk of Large Yorkshire sows (see Table 5-1).

Porcine milk (No. 3) : Casein micelles from porcine milk of a hybrid sow (a cross between Large Yorkshire and Landrace swine) (see Table 5-1).

Bovine milk : Casein micelles from bovine milk of 20 Holstein cows.

ブタカゼインミセルのミセル性カルシウムと無機リン含量が多かったことは、MCP 含量を多くしたウシ人工カゼインミセルを調製したときミセル性のカルシウムと無機リン含量が多かったことと一致した (Aoki *et al.*, 1996)。したがって、ブタカゼインミセルのMCP架橋カゼイン会合体含量が多いことはミセル性のカルシウムと無機リン含量が多いことによるものと考えられた。また、ブタカゼインにはリン酸基数が多いことも要因の一つと考えられる。Gallagher *et al.* (1997) はウシカゼイン 1 モルあたりのリン酸基が 5 個であるのに対しブタカゼインでは 6~8 個であると報告している。ブタ β -カゼインはカゼイン 1 モル中にリン酸基を 6 個あるいは 8 個持つ (Alexander *et al.*, 1992b; Mullvihill and Fox, 1979) が、ウシ β -カゼインは 5 個である。ブタ α_{s2} -カゼインは 1 モル中 15~17 個のリン酸基を持つ (Brignon, 1977; Alexander, 1992a) のに対し、ウシ α_{s2} -カゼインでは 1 モル中 10~13 個である。本研究で大ヨークシャー種の生乳から得られたカゼインに含まれるリン酸含量を定量したところ 1.17% であった。この値はウシカゼイン中のリン酸含量が 0.80% であったことと比べて明らかに高かった。加えて、前章で述べたように個々のウシカゼイン成分が MCP により架橋される順序は α_{s2} -> α_{s1} -> β -カゼインの順 (Aoki *et al.*, 1989) であり、この順序はそれぞれのカゼインに含まれるリン酸基数が多い順となっている。このことから、ブタカゼインはウシカゼインに比べてより MCP により架橋されやすいものと考えられた。

MCP 架橋カゼイン会合体含量がカゼインミセルの挙動に及ぼす影響は、特に冷却によるウシカゼインの解離にみられる (Aoki *et al.*, 1996, 1990, 1996)。そこで、ブタ乳におけるカゼインミセルの冷却解離について実験を行った。ブタ乳の乳清カゼイン含量は 25℃において非常に少なかった。Fig. 5-2 に示したように、ブタ乳およびウシ乳を 5℃で 2~24 時間冷却すると、ウシの乳清カゼイン含量は冷却時間依存的に増加したのに対し、ブタ乳ではわずかな増加しか認められなかった。ウシ乳

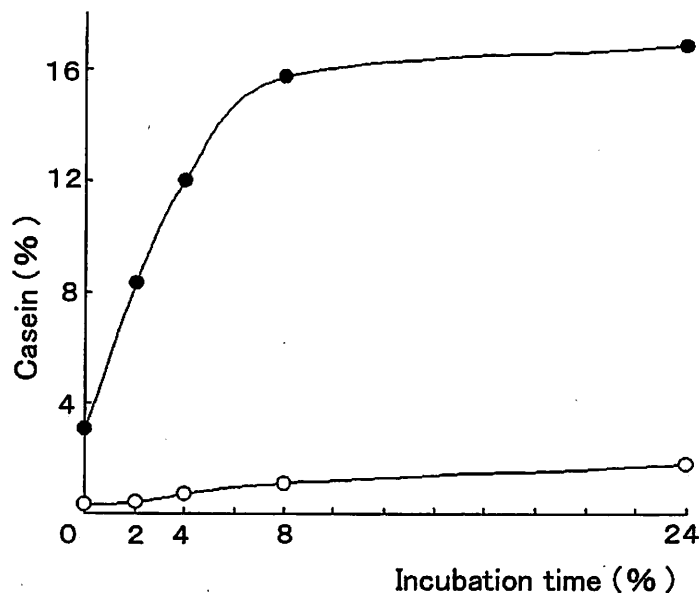


Figure 5-2. The serum casein content in porcine and bovine skim milk incubated at 5°C for 2-24 h. ○, porcine; ●, bovine.

の場合、冷却によりカゼインミセルから解離する乳清中カゼインは MCP 含量が多いと減少する(Aoki, 1990)。したがって、カゼインの MCP 架橋カゼイン会合体含量が多いことがブタカゼインの冷却解離を抑制しているものと考えられた。

第4章 小括

ブタカゼインミセルの成分組成と MCP 架橋カゼイン会合体含量を調べた。ブタ乳のミセル性カゼイン含量は 3.47~4.07%と牛乳中のそれより多く、ウシの 1.48~1.73 倍であった。ブタ乳の全カルシウム、無機リンとミセル性のカルシウム、無機リン含量もまたウシ乳のそれと比べて多く、ミセル性の無機リン含量はウシ乳の 1.53~2.03 倍であった。5°Cで 2~24 時間の冷却により解離するブタカゼイン量はわずかであった。ブタカゼインの MCP 架橋カゼイン会合体含量を TSK-GEL G4000SW_{XL} カラムを用い、溶離液として USMUF を用いたゲル濾過モード HPLC で分離して定量した。ブタカゼインミセル中の MCP 架橋カゼイン会合体含量は 76.0~80.4%とウシカゼインミセルの 56%に比べ多かった。また、ブタ乳のカゼイン含量も牛乳に比べて多かった。ブタカゼインはウシカゼインと比べて MCP により容易に架橋されやすく、また、MCP 架橋カゼイン会合体含量が多いことが冷却によるカゼインの解離を抑制している原因であると推察された。

第6章 ブタ人工カゼインミセルにおけるミセルの 形成とミセル性リン酸カルシウム架橋形成

第1節 緒言

最近 Kruif and Holt (2003) は、カゼインの栄養学的機能がアミノ酸を供給するだけでなく、乳腺細胞で行われるカゼイン生成の初期段階からカルシウム輸送に関係していると推察している。すなわち、カゼインミセルは、新生仔にカルシウムとリン酸を供給するための担体として機能していると考えられる。哺乳動物の乳は、さまざまな種においてカゼイン含量とカルシウムおよび無機リン含量との間に高い正の相関がある (Holt, 1984)。成長が速いラットとウサギの乳はカゼイン、カルシウムおよび無機リン濃度が高く、一方、成長が遅いヒトやウマでは低い。前章において、MCP 架橋カゼイン会合体含量がウシカゼインミセルよりブタカゼインミセルで著しく多いことを明らかにした (Umeda, 2005)。ウシカゼインの人工ミセルにおいて、カルシウムと無機リン含量を多くしたとき、カルシウムと無機リンはカゼインミセル内に多く取り込まれる (Aoki, 1989; Aoki, *et al.*, 1996)。リン酸化の程度が高いカゼインでは、リン酸化の程度が低い場合より MCP により架橋されやすい (Aoki *et al.*, 1987a; 1988; Aoki, 1989)。ブタカゼインはリン酸化の程度がウシカゼインと比べて高く、乳中カルシウムとリン酸含量も多い。また、ブタカゼインミセルはウシカゼインミセルと比べてカルシウムとリン含量が多い (片岡と中江, 1972; Gallagher *et al.*, 1997)。これら 2 つのことがブタカゼインミセル中の MCP 架橋カゼイン会合体含量が多い理由と推察される。そこで、ブタカゼインミセルの MCP 架橋カゼイン会合体含量が多いのは、カゼインのリン酸化の程度が高いことによるか、カルシウム、無機リン含量が寄与しているのかを明らかにするため、ブタカゼインとウシカゼイン濃度をまったく同じにして、カルシウムと無機リン酸濃度が異なる人工ミセルを調製し、ミセル性カゼインと MCP 架橋カゼイン会合体含量を測定した。

第2節 試料調製および方法

1. 全カゼインの調製

大ヨークシャー種の豚乳から、前章と同様にしてブタカゼインを調製した。

2. 人工カゼインミセルの調製

人工カゼインミセルの調製は第2章第2節と同様に行った。すなわち、全カゼインを濃度が5%になるように1 M 水酸化ナトリウムを少しずつ加えて溶解した。このとき pH が7を越えないようにし、溶解後 pH を6.7に調整した。全カゼインミセルは室温で全カゼイン溶液にマイクロピペットを用いて塩溶液を滴下させて加えることにより形成させた。全カゼイン溶液5 mL に100 μ L の1 M クエン酸3カリウム、500 μ L の0.2 M 塩化カルシウム、600 μ L の0.2 M リン酸水素カリウムを、スターラー上で攪拌しながら加えた。次に250 μ L の0.2 M 塩化カルシウムと125 μ L の0.2 M リン酸水素カリウムを最終濃度が Table 6-1 に示した値となるように15分間隔で加えた。pH を6.7に調整した後カゼイン溶液を10 mL にし、カゼイン、カ

ルシウム、無機リン酸およびクエン酸の最終濃度がそれぞれ 2.5%、10~40 mM、12~27 mM および 10 mM とした。

Table 6-1 Calcium, phosphate and citrate concentrations in artificial casein micelle solutions

Sample No.	Ca (mM)	Pi (mM)	Citrate (mM)
1	10	12	10
2	15	14.5	10
3	20	17	10
4	30	22	10
5	40	27	10

3. ミセル性カゼインの定量

ミセル性カゼインの定量は第 4 章第 2 節と同様に行った。すなわち、ミセル性カゼイン含量は全カゼインと乳清相カゼイン含量の差をもって算出した。乳清相のカゼイン含量は人工カゼインミセル溶液を 100,000 x g で 1 時間 25℃ にて超遠心分離を行い、超遠心上清中すなわち乳清相の窒素含量をマイクロケルダール法で測定後、これにタンパク質換算係数 6.38 を乗じて求めた。

4. ゲル濾過モード HPLC

カゼインミセル中の MCP 架橋カゼイン会合体含量は第 2 章第 2 節と同様にゲル濾過モード HPLC を用いて測定した。なお、HPLC は Jasco Gulliver Series の PU-980 型ポンプと UV-970 型検出器で構成され、カラムは TSK-GEL G4000SW_{XL} カラム (7.8mm × 25cm : 東ソー) を用いた。

5. ミセル性カゼインのカルシウムとリンの定量

人工カゼインミセルを 100,000xg、25℃ で 1 時間超遠心分離して乳清相を分けた。カゼイン、カルシウムおよび無機リンはそれぞれ第 4 章第 2 節と同様に定量した。

第 3 節 結果および考察

人工カゼインミセルはカゼイン溶液に塩化カルシウム溶液とリン酸水素カリウム溶液を加えて形成させた。ミセルを形成させるとき、牛乳の乳清相ときわめて近い濃度である 10 mM カルシウム、12 mM リンおよび 10 mM クエン酸にしても、ミセルはほとんど形成されなかった。Fig. 6-1 に示したように、ミセル性カゼイン含量は、ブタカゼインおよびウシカゼインとも、カルシウム濃度が 10 mM から 20 mM、無機リン濃度が 12 mM から 17 mM に増加するにしたがって明らかに増加した。さらに、牛乳中の濃度ときわめて近い、カルシウムが 30 mM、無機リン酸が 22 mM となるように人工ミセルを調製したとき、ブタカゼインおよびウシカゼインとも 90% 以

上のカゼインがミセルを形成した。ブタ人工カゼインミセルとウシ人工カゼインミセル間でミセル性カゼイン含量の違いはほとんどなかった。

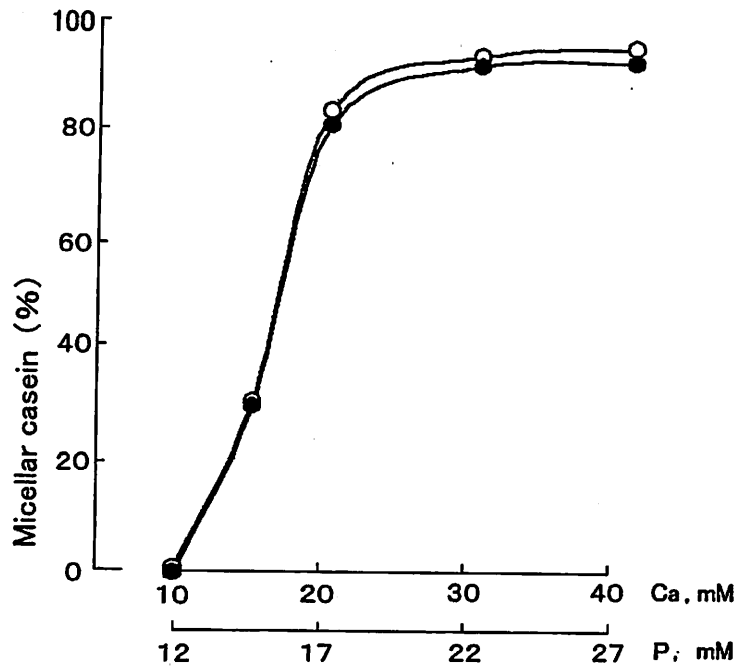


Figure 6-1. Micellar casein concentration in artificial porcine and bovine casein micelles solution. ○, porcine micelles; ●, bovine micelles.

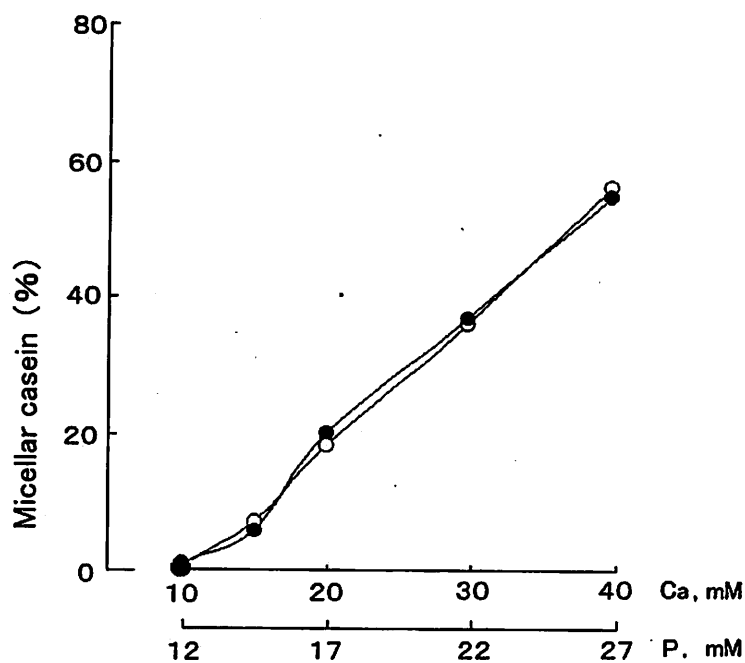


Figure 6-2. Micellar calcium concentrations in artificial porcine and bovine casein micelles solutions. ○, porcine micelles; ●, bovine micelles.

ミセル性のカルシウム含量はブタ人工カゼインミセルとウシ人工カゼインミセルともカルシウムと無機リン酸濃度の上昇に伴い増加した。Fig. 6-2 に示したように、ミセル性のカルシウム濃度はどのカルシウムとリン含量においてもブタ人工カゼインミセルとウシ人工カゼインミセル間でほとんど違いが観察されなかった。

MCP 架橋カゼイン会合体含量を測定するため、6 M 尿素と 2-メルカプトエタノールで還元解離させたブタ人工カゼインミセルとウシ人工カゼインミセルのゲル濾過モード HPLC を、溶離液として USMUF を用いて行った。この溶出像を Fig. 6-3 に示した。前章で述べたように F1 画分は MCP 架橋カゼイン会合体で構成され、一方 F2 画分は個々のカゼイン成分の単量体で構成される。ブタ人工カゼインミセルのサンプル No. 2、3、4 および 5 の MCP 架橋カゼイン会合体含量はそれぞれ 26.3、44.9、66.6 および 68.7% であり、この値はウシ人工カゼインと比べて著しく多かった (Fig. 6-3)。

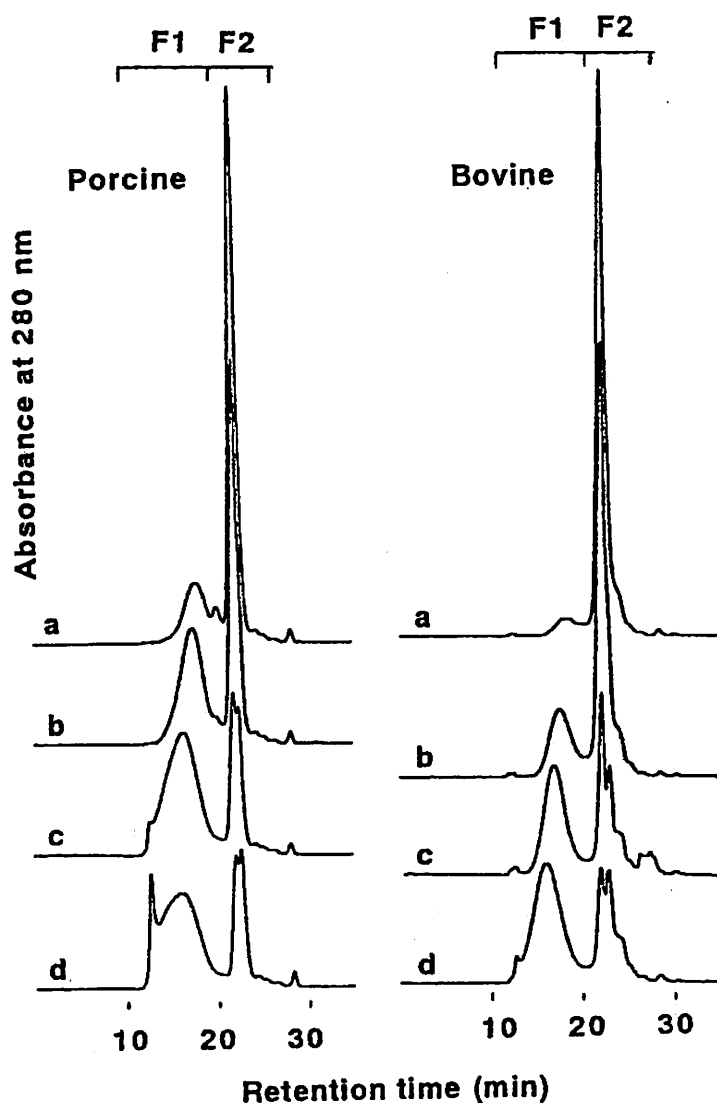


Figure 6-3. Elution patterns of artificial porcine and bovine micelles disaggregated in 6 M urea from a TSK-GEL G4000SW column (7.5 mm × 60 cm). Flow rate, 0.5 mL/min ; eluent, 6 M urea-simulated milk ultrafiltrate. a, sample 2 (15 mM Ca, 14.5 mM Pi) ; b, sample 3 (20 mM Ca, 17 mM Pi) ; c, sample 4 (30 mM Ca, 22 mM Pi) ; d, sample 5 (40 mM Ca, 27 mM Pi).

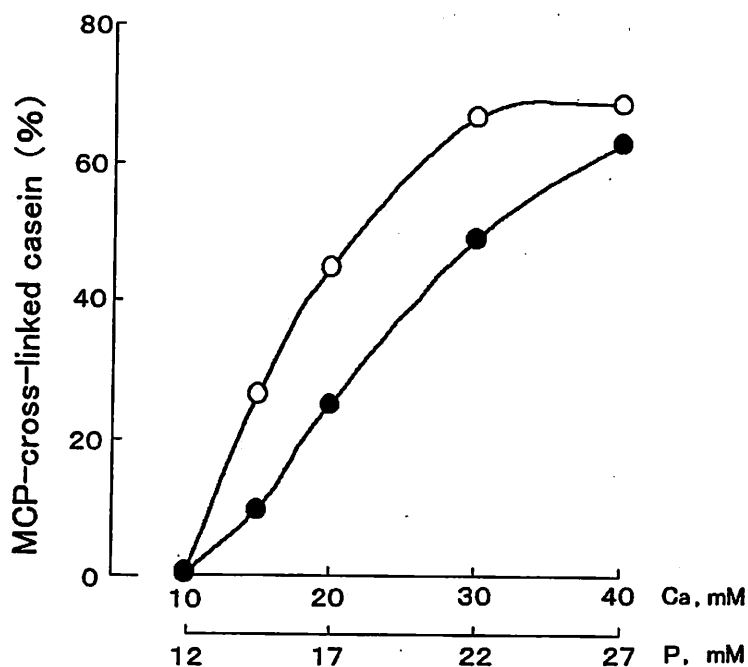


Figure 6-4 MCP-cross-linked casein contents of artificial porcine and bovine casein micelles. ○, porcine micelles; ●, bovine micelles. MCP-cross-linked casein contents are represented as the percent of total casein.

ブタカゼインは α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -および κ -カゼインで構成され、 α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -カゼインはリン酸基をそれぞれ 8、15~16、8 個持ち、 κ -カゼインはリン酸基を持たない(Gallagher *et al.*, 1997)。ウシ α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -および κ -カゼインはリン酸基をそれぞれ 8、10~13、5 および 1 個持つ(Eigel *et al.*, 1984)。このようにブタカゼインの各成分はウシカゼインと比べてリン酸基を多く持っており、特にブタ β -カゼインのリン酸基数は多い。実際に、本研究で用いたブタカゼインの有機リン含量は 1.18%で、ウシカゼインの 1.43 倍であった。ウシカゼインミセルで、MCP によって架橋されやすいカゼインは α_{s2} -> α_{s1} -> β -カゼインの順であり、 κ -カゼインは架橋されない(Aoki, 1989)。一方、透析による解離のしやすさの順序はこの逆である(Aoki *et al.*, 1988)。これらのことから、リン酸基が多いとカゼインと MCP 間の相互作用がより強固になると考えられる。

前節において、ブタ脱脂乳から得たカゼインミセルの MCP 架橋カゼイン会合体含量は 76.0~80.4%で、ウシカゼインと比べ著しく多かった。ブタカゼインミセルのカルシウムと無機リン含量が多いことと、ブタカゼインに結合したリン酸基数が多いことが MCP 架橋カゼイン会合体含量の多い理由であると考えられた。本研究において、MCP 架橋カゼイン会合体含量はカルシウムと無機リン濃度が同じであるとき、ウシ人工カゼインミセルよりブタ人工カゼインミセルの方が多かった(Fig. 6-3、6-4)。このことからブタカゼインはリン酸基を多く結合しているのでウシカゼインミセルに比べ MCP によってより多く架橋されるものと考えられた。前章で述べたように、ブタ乳の場合、冷却によってカゼインミセルから解離する乳清カゼイン量は

極めて少なかった。このことは、ブタカゼインミセルでは MCP 架橋カゼイン会合体含量が多く、カゼインミセルがより強固な構造であることを示唆している。本実験の結果もこれを支持している。

第4節 小括

カルシウム、無機リン酸およびクエン酸濃度がそれぞれ 10~40、12~27 および 10 mM でブタ人工カゼインミセルを pH 6.7 で調製し、ミセル形成と MCP による架橋形成について調べ、ウシ人工カゼインミセルのそれと比較した。ブタ人工カゼインミセルとウシ人工カゼインミセル間においてミセル性カゼインおよびミセル性カルシウム含量にほとんど差がなかった。ブタの MCP 架橋カゼイン会合体含量はカルシウム 20 mM、無機リン酸 17 mM で 44.9%、カルシウム 30 mM、無機リン 22 mM で 66.6%であった。これらの値は対応するウシ人工カゼインミセルのそれと比べ著しく多かった。また、ブタカゼインとウシカゼインが持つリン含量はそれぞれ 1.18% と 0.82%であった。ブタカゼインが MCP によって架橋されやすいのは、ブタカゼインがウシカゼインよりリン酸基を多く持つことがその理由の 1 つと考えられた。

第7章 ヒツジカゼインミセルのミセル性リン酸 カルシウム架橋とミセルの特性

第1節 緒言

前章において、ブタカゼインミセルの MCP 架橋カゼイン会合体含量はウシカゼインミセルのそれと比べて多く、冷却によって乳清中へ遊離するカゼイン含量は極めてわずかであることを述べた。カゼイン、カルシウムおよび無機リン含量は動物の種類によって異なり (Holt, 1984)、種々のほ乳類から得られた乳中のカゼイン含量とカルシウムおよびリン含量との間には正の相関関係があると言われている。ヒツジ乳は牛乳と比べて多くのカゼイン、カルシウムおよびリンを含む。そこでヒツジカゼインミセルから MCP 架橋カゼイン会合体を分離するとともに、冷却によって遊離する乳清カゼイン含量を測定した。

第2節 試料調製および方法

1. 試料乳

試料乳はコリデール種のヒツジから得た分娩後 2 週間の新鮮乳を用いた。ウシの生乳は約 20 頭のホルスタイン種の合乳を用いた。プラスミンを不活性化するため脱脂乳 50 mL に対し 0.1 mg のトリプシンインヒビターを加えた。

2. カゼインミセルの分離

カゼインミセルは第4章第2節と同様に分離した。MCP 架橋カゼイン会合体含量を測定するため、得られたカゼインミセルをカゼイン濃度が 2.4% になるように USMUF に溶解した後、10 mM 2-メルカプトエタノールを添加して、ゲル濾過モード HPLC に供した。MCP 架橋カゼイン会合体を解離させるためカゼインミセル溶液 1 mL に EDTA・2 ナトリウム 5 mg と EDTA・4 ナトリウム 8 mg を加えた。

3. 全カゼインの分離

第4章第2節と同様に行った。

4. ゲル濾過モード HPLC

ゲル濾過モード HPLC は第2章第2節と同様に行った。なお HPLC は Jasco Gulliver Series の PU-980 型ポンプと UV-970 型ディテクターで構成され、カラムは TSK-GEL BioAssist SW_{XL} (6.0 mm×4.0 cm) を装着した TSK-GEL G4000SW_{XL} (7.8 mm×30 cm : 東ソー) を用いた。

5. 冷却によって乳清中に遊離するカゼインの定量

乳試料を 5℃ で 20 時間保持した後、5℃ で 1 時間 100,000xg の超遠心分離を行った。乳清カゼイン含量は超遠心上清中の全窒素と非カゼイン態窒素含量の差に係数タンパク質換算係数 6.38 を乗じて求めた。

6. ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動

第2章第2節と同様に行った。

7. 化学分析

カゼイン、カルシウムおよび無機リンの定量は第3章第2節と同様に行った。

第3節 結果および考察

Table 7-1 に2頭のヒツジ脱脂乳中の全カゼイン、カルシウムおよび無機リン含量とミセル性カゼイン、カルシウムおよび無機リン含量を示した。ヒツジ脱脂乳 100 mL 中の全カゼイン含量は No.1 が 4.46 g、No.2 が 4.86 g と、ウシ脱脂乳中のその約2倍であった。ミセル性カゼイン含量はそれぞれ 4.38 g と 4.76 g であり、全カゼインに対するミセル性カゼインの割合はそれぞれ 98.2% と 97.9% であった。全カルシウムおよび無機リン含量と、ミセル性のカルシウムおよび無機リン含量もまた牛乳のその約2倍であった。カゼイン中のリン酸含量はヒツジの No.1 が 0.87%、No.2 が 0.86% で、牛乳カゼインのそれは 0.82% であった。

6 M 尿素で解離させ 2-メルカプトエタノールで還元させたカゼインミセルを、ゲル濾過モード HPLC に供し、USMUF で溶出した。溶出パターンは Fig. 7-1a に示した。還元解離されたカゼインミセルは F1 画分と F2 画分に分画され、EDTA を加えると F1 画分は消失した (Fig. 7-1b)。したがって、ウシカゼインミセルの場合と同じように (Aoki and Kako, 1986a)、F1 画分は MCP 架橋カゼイン会合体で構成され、F2 画分はカゼインの単量体であると考えられる。MCP 架橋カゼイン会合体含量をクロマトグラフのピーク面積から算出したところ、ヒツジの No.1 が 57.5%、No.2 が 58.4% であった。この値はウシカゼインのそれと非常に近似していた。

カゼインはリン酸基を介して MCP によって架橋され、少なくとも3個のカゼインのリン酸基が MCP による架橋形成に必要であることは第2章で述べた通りである。ウシカゼインは MCP によって α_{s2} - α_{s1} - β -カゼインの順に架橋されやく、MCP による架橋形成のされやすさの程度は個々のカゼインのリン酸基数に対応している (Aoki *et al.*, 1988)。MCP 架橋カゼイン会合体含量は人工カゼインミセルを形成させたときミセル性カルシウムと無機リン酸濃度が高いときほど多くなり、カゼインミセル分散液にカルシウムと無機リンを添加すると MCP 架橋カゼイン会合体含量は増加することから (Aoki, 1989)、乳中のカルシウムと無機リン含量は MCP によるカゼインの架橋形成に影響するといえる。

トカラヤギ乳のカゼインミセル中の MCP 架橋カゼイン会合体含量は 65% で、ホルスタイン種の牛乳より著しく多い。これはトカラヤギ乳のカゼインミセルにはカルシウムと無機リン含量が多いことに起因していた (Aoki *et al.*, 1993)。ブタ乳は、第5章で示したようにカゼイン、カルシウムおよび無機リン含量が牛乳と比べて著しく多く、MCP 架橋カゼイン会合体含量が 76.0% ~ 80.4% であった。これらのことから、ブタ乳の MCP 架橋カゼイン会合体含量が比較的多いのは、ブタカゼインミセルにカルシウムと無機リン酸が多く含まれ、ブタカゼインに結合したリン酸基が多いためと考えられた。ヒツジ乳ではカゼイン、カルシウムおよび無機リン含量が牛乳と比べ約2倍であったにもかかわらず (Table 7-1)、カゼインミセル中の MCP 架橋カゼイン会合体含量がウシカゼインミセルのそれとほぼ同程度であった (Fig. 7-1)。Trujillo *et al.* (2000) の報告によると、HPLC とフローインジェクショ

Table 7-1 Contents of total and micellar casein, calcium and inorganic phosphorus (Pi) in ovine skim milk

Ewe No.	Total casein (g/100 mL)	Micellar casein (g/100 mL)	Total Ca (mg/100 mL)	Micellar Ca (mg/100 mL)	Total Pi (mg/100 mL)	Micellar Pi (mg/100 mL)
1	4.46	4.38	198.8	167.4	111.0	67.2
2	4.86	4.76	192.5	162.4	117.8	74.4
Ewe : Corriedale ewes						

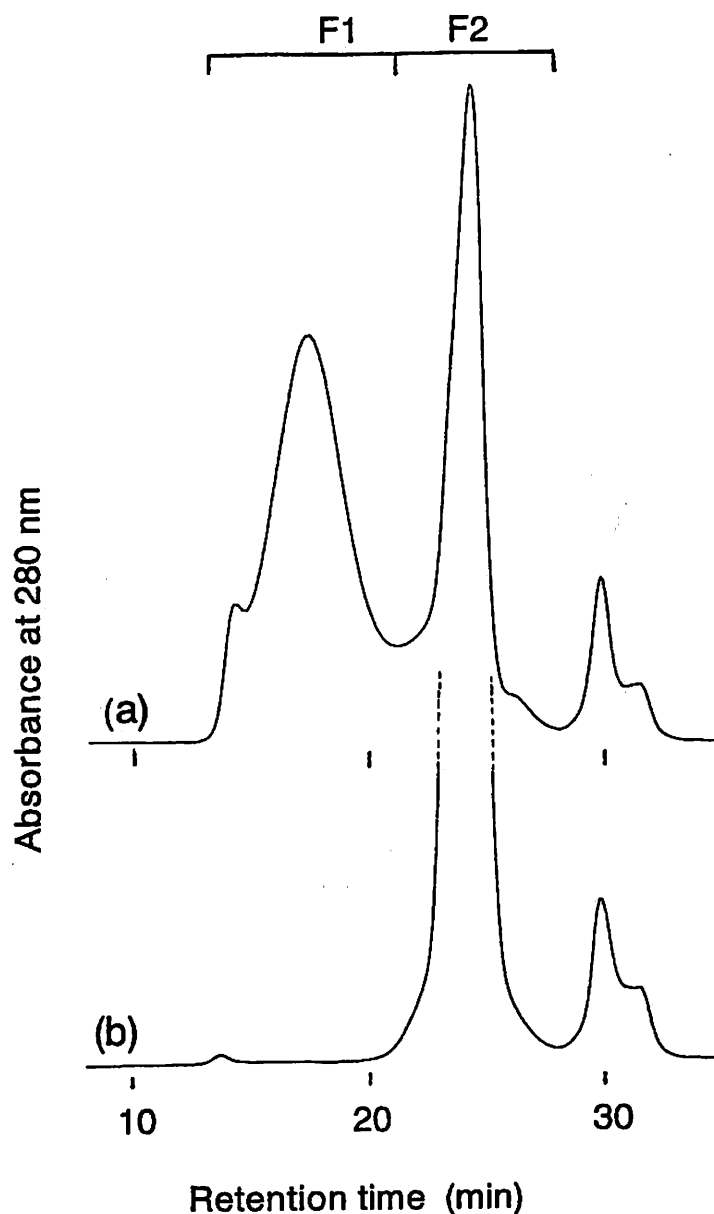


Figure 7-1. Elution patterns of ovine casein micelles disaggregated in 0 M urea-simulated milk ultrafiltrate (USMUF) from a TSK-GEL G4000SW XL column. a : reduced casein micelles ; b : EDTA- treated reduced casein micelles. Flow rate was 0.5 mL/min and USMUF was used as the eluent.

ン分析法によるエレクトロスプレーイオン化質量分析計を用いた結果から、ヒツジカゼインの主な成分は α_{s1} -カゼイン-8P 成分、 α_{s2} -カゼイン-10P 成分、 β -カゼイン-5P 成分および κ -カゼイン-3P 成分であり、ウシの κ -カゼインが 1P であることを除けば他のカゼインはウシカゼインと近似する。しかも、ヒツジカゼインのリン含量はウシカゼインのそれとほぼ同じであった。このようにヒツジカゼインが持つリン酸基数が同程度で、ヒツジ乳のミセル性カゼイン、カルシウムおよび無機リン濃度

がそれぞれウシのほぼ2倍であったことから、ヒツジ乳と牛乳では、ミセル中のカゼイン：カルシウム比およびカゼイン：無機リン比が同程度となり (Table 7-1)、このため、ヒツジカゼインミセルのMCP 架橋カゼイン会合体含量がウシカゼインミセルのそれと同程度であったと思われた。

Table 7-2 に 25℃ と 5℃ で 20 時間冷却したときのヒツジ乳の乳清カゼイン含量を示した。冷却により遊離したヒツジの乳清カゼインは No.1 が乳中 50 mg/100 mL で No.2 が 73 mg/100 mL であり、全カゼインに対する割合は No.1 が 11.2% で No.2 が 14.4% であった。Downey and Murphy (1970) は 30℃ から 5℃ へ冷却した 11 頭のウシ乳において、乳清に遊離したカゼインの割合は 0.4~12.6% で平均値が 9.0% と報告している。これらのことから、冷却によって遊離する乳清カゼイン量には牛乳とヒツジ乳間で違いはほとんどないと考えられた。

Table 7-2 Serum casein content in ovine milk at 25℃ and 5℃.

Ewe No.	Serum casein (g/100 mL)		Increase upon cooling (% of total casein)
	25℃	5℃	
1	0.08	0.58	11.2
2	0.10	0.83	14.4

Ewe : Corriedale ewes

Fig. 7-2 にヒツジ乳の全カゼインおよび冷却乳から得られた乳清カゼインをポリアクリルアミド電気泳動に供したときの泳動図を示した。ヒツジカゼインは α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -および κ -カゼインで構成され (Izco *et al.*, 1999)、それぞれの電気泳動バンドの同定は Kaminarides and Anifatakisthe (1993) の方法で行った。なお、彼らの報告においても α_{s1} -と α_{s2} -カゼインのバンドの区別は行われていなかった。ヒツジ乳では α_s -カゼインとして表わされる1つのバンドが検出され、ウシカゼインのように別々のバンドとして見分けることができなかった。5℃で冷却されたヒツジ乳の乳清カゼインは電気泳動の結果からほとんど β -カゼインであることが分かった。冷却によって乳清中に遊離するカゼインの主成分が β -カゼインであることはウシカゼインミセルと同じであった。(Table 7-2、Fig. 7-2)。冷却によって乳清中に遊離するヒツジカゼインの割合もまたウシとほぼ同じであった。

以上の結果から、ヒツジ乳のカゼイン、カルシウムおよびリン含量がウシより多いにもかかわらず、ヒツジカゼインミセルのMCP 架橋カゼイン会合体含量と冷却に対する挙動は、ウシカゼインミセルのそれに似ていることが示唆された。

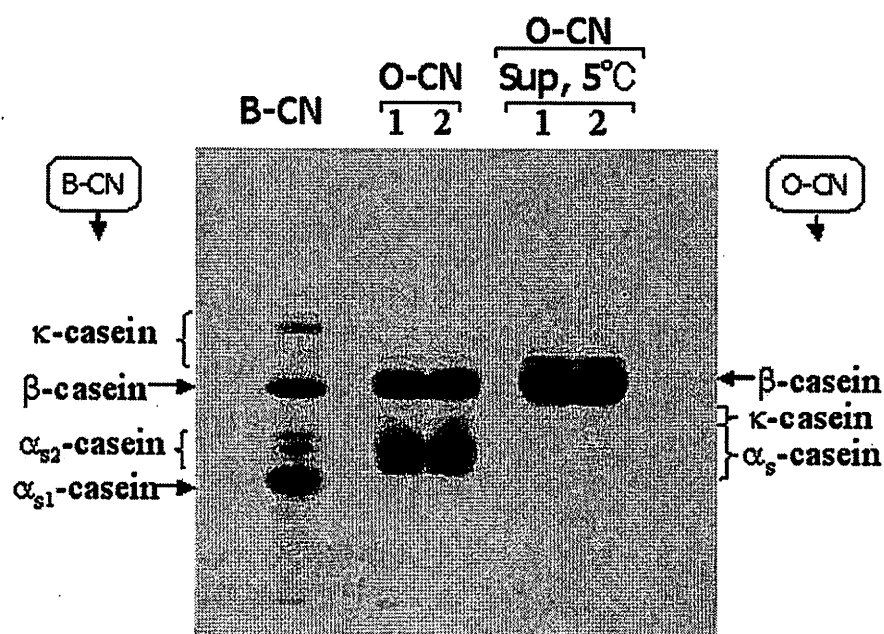


Figure 7-2. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of ovine whole casein and serum casein obtained from ovine skim cooled at 5 °C for 20 h. B-CN, bovine casein; O-CN, ovine casein. 1 and 2 in the figure show the sample from No. 1 and 2 ewes, respectively. The running gel used contained 7 % acrylamide and 4.5 M urea.

第4節 小括

コリデル種の2頭のヒツジから分娩後2週間後の新鮮乳を個乳で得、成分組成とカゼインミセルのMCP架橋カゼイン会合体について調べた。全カゼイン、カルシウムおよび無機リン含量は100mLの脱脂乳中それぞれヒツジNo.1で4.46 g、198.8 mgおよび111.0 mg、No.2で4.86 g、192.5 mgおよび117.8 mgで、それぞれ牛乳の約2倍であった。6 M 尿素存在下におけるゲル濾過モード HPLC で測定した MCP 架橋カゼイン会合体含量はそれぞれ 57.5%と 58.4%であり、ウシカゼインミセルのそれと非常に近似していた。5℃で20時間の冷却によるカゼインミセルから解離したカゼイン含量はそれぞれ全カゼインの11.2%と14.4%であり、この値も牛乳の値と近似していた。冷却によって遊離するカゼイン成分が最も多かったのはウシカゼインミセルと同様にβ-カゼインであった。ヒツジ乳のカゼイン、カルシウムおよび無機リン含量が牛乳に比べて多いにもかかわらず、ヒツジカゼインミセルのMCP架橋カゼイン会合体含量がウシと近似していたのは、ヒツジ乳と牛乳では、ミセル中のカゼイン：カルシウム比およびカゼイン：無機リン比が同程度であったためと考えられた。

第8章 高温加熱によるミセル性リン酸

カルシウム架橋の解裂

第1節 緒言

乳中の塩類は乳清相とカゼインミセル相間において平衡状態で存在している (Pyne, 1962 ; Holt, 1985)。乳を冷却あるいは加温すると乳塩類の状態は変化し、この変化は緩やかな温度変化であれば可逆的である。たとえば、乳を冷却すると MCP の一部は可溶化するが、加温すると MCP レベルはもとに戻る。しかしながら、過度な加熱条件では不可逆的で、しかも MCP は別の形態に変化するものと考えられている (Nelson *et al.*, 1989b)。

乳を高温加熱処理するとカゼインミセルが解離し、 κ -カゼインを主成分とする乳清カゼイン量が増大する。このカゼインミセルの解離は乳の濃縮によって促進される (Aoki and Imamura, 1974b, 1975ab; Aoki *et al.*, 1983)。高温で加熱処理したあと、冷却すると乳清相に遊離するカゼイン含量は、加熱処理せずに冷却した場合に比べて多くなる (Aoki and Imamura, 1975bcd)。これらのことから、MCP とカゼイン間の相互作用は加熱によって弱くなることが推察される。そこで、本章では高温加熱による MCP 架橋カゼイン会合体含量の変化を調べ、高温加熱によって MCP 架橋の解裂が起きるか否かを明らかにすることを目的として実験を行った。

第2節 材料と方法

1. 試料乳の調製

乳清タンパク質除去脱脂乳 (WPF 乳) は次のように調製した。まず約 20 頭のホルスタイン種新鮮乳の合乳を 1,700xg、5℃で 20 分遠心分離して脱脂乳を得た。この脱脂乳を 25℃で 2 時間保持しカゼインミセルを分離するため 77,000xg、25℃で 1 時間の超遠心分離を行った。得られたカゼインミセルを生脱脂乳の平衡透析液に 9 kHz、20℃で 18 分間の超音波処理をすることによって分散させ、カゼイン濃度を 2.5%に調整して WPF 乳とした。また、ロータリーエバポレーターを用いて WPF 乳を 40℃以下で元の 1/2.5 の容積まで濃縮して濃縮 WPF 乳を調製した。

2. 加熱処理

加熱処理は試料乳を内径 4 mm、厚さ 1 mm のガラス管に封入して行った。60~90℃の加熱処理はウォーターバスを用い、高温加熱処理はオイルバスを用いて行った。ガラス管を 140℃で 1、1.5、2 分間浸したときの加熱処理条件では、ガラス管内の試料乳は 135-140℃でそれぞれ 15、45、75 秒の加熱処理とした (Aoki and Imamura, 1974a)。

3. 化学分析

カルシウムと無機リン含量の測定は第4章第2節と同様に行った。なお、カルシウムの定量は 208 型原子吸光分光光度計 (日立) を用いて行った。乳清相の分離は試料乳を 25℃で 4 時間保持した後 77,000xg で 1 時間の超遠心分離を用いて行った。

ミセル性のカルシウムと無機リン含量は全体と乳清相の含量から算出した。全リン含量は過塩素酸で湿式灰化後に定量した。

4. MCP 架橋カゼイン会合体含量の測定

MCP 架橋カゼイン会合体含量の測定はゲル濾過モード HPLC を用い第 2 章第 2 節と同様に行った。なお、HPLC は LC-5A クロマトグラフ、SPD-2A 型検出器（島津）を用い、カラムは TSK-GEL G4000SW (7.5 mm×60 cm; 東ソー) に TSK SW ガードカラム (7.5 mm×7.5 cm) を装着して用いた。

MCP 架橋カゼイン会合体含量はクロマトグラフのピーク面積と Swaisgood *et al.* (1982) らによって報告された 280nm における吸光度係数およびカゼイン組成から計算した。加熱試料乳での計算は、280 nm における各カゼイン成分の吸光度係数が加熱によっても変化しない（中西と伊藤, 1969）と仮定して行った。

第 3 節 結果および考察

WPF 乳を 60～90℃で 10 分間の加熱処理をすると、温度の上昇に伴ってミセル性のカルシウムと無機リン含量が増加した (Table 8-1)。6 M 尿素存在下で解離させたカゼインミセルをゲル濾過モード HPLC を用いて USMUF で溶出し、MCP 架橋カゼイン会合体を分離した。溶出パターンを Fig. 8-1ab に示した。第 7 章で述べたように、F1 画分は MCP 架橋カゼイン会合体から構成され、F2 画分はそれぞれのカゼイン単量体から構成される。F2 画分の後に溶出された画分は非タンパク質である。WPF 乳の 60～90℃10 分加熱によって F1 画分と F2 画分両方のピーク面積がわずかに増加し、溶出パターンが変化した。これはカゼインの発色団の変化が加熱によって引き起こされたためではないかと考えられた。MCP 架橋カゼイン会合体含量は未加熱と 90℃で 10 分の加熱処理とでそれぞれ 51.6%と 51.9%とほとんど変化がなかった。

Table 8-1 Changes in micellar Ca and Pi on heating WPF milk

Heating temperature ℃	Ca (mM)	Pi (mM)
Unheated	20.6	9.7
60	20.8	10.3
70	21.4	10.5
80	21.8	10.5
90	22.1	10.6

Table 8-2 に示したように、WPF 乳と濃縮 WPF 乳を 135-140℃で 15、45、および 75 秒間加熱処理すると、ミセル性のカルシウムと無機リン含量はわずかに増加した。加熱によってもたらされるミセル性のカルシウムと無機リン含量の増加率は濃縮 WPF 乳の方が WPF 乳に比べてより大きかった。濃縮 WPF 乳を 135-140℃で 15 秒あるいは 75 秒で加熱処理した試料の HPLC の溶出パターンを Fig. 8-1c, d にそれぞれ実

線で示した。濃縮 WPF 乳の HPLC は元の WPF 乳と同じ濃度になるように希釈して行っていることから、未加熱試料では濃縮による溶出パターンに及ぼす影響がほとんど認められなかったものと思われる (Fig. 8-1a)。WPF 乳を濃縮して 135-140℃で 15 秒および 75 秒間加熱したときの溶出パターンは、ボイドボリュームで溶出したものが大きくなり、F1 画分のピークのリテンションタイムが未加熱試料では 30.8 分であったのがそれぞれ 29.2 分および 27.6 分と短くなった。

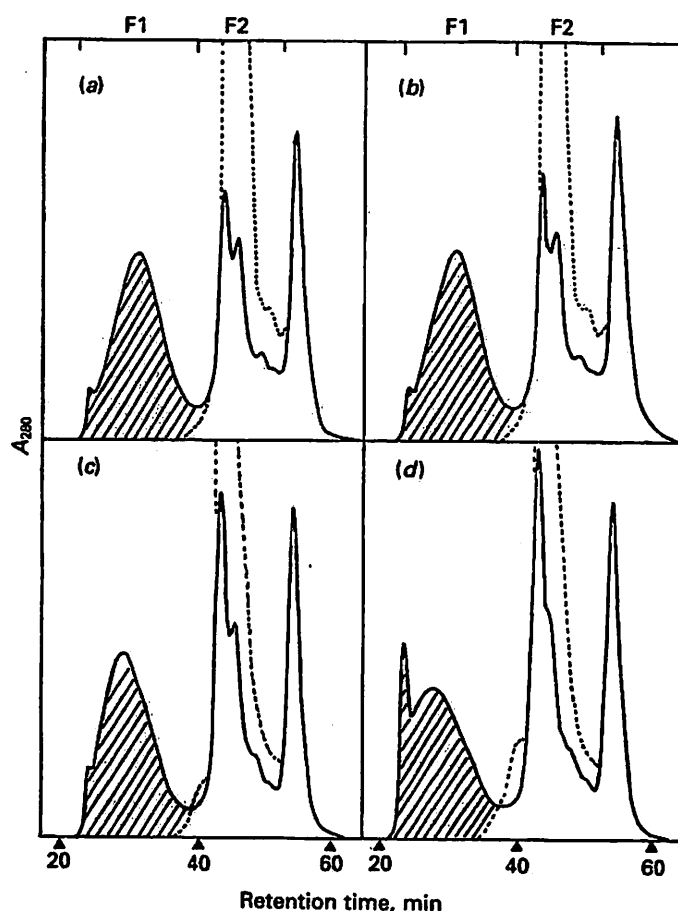


Figure 8-1 Elution patterns of casein micelles disaggregated in 6 M urea from a TSK-GEL G4000SW column. (a) Unheated whey protein-free (WPF) milk ; (b) WPF milk heated at 90°C for 10 min ; (c) concentrated WPF milk heated at 135-140°C for 15 s ; (d) concentrated WPF milk heated at 135-140°C for 75 s. Flow rate, 0.5 mL/min ; effluent, 6 M-urea simulated milk ultrafiltrate ; detector gain, 0.32. Dashed line shows the elution patterns of EDTA-added samples. Shaded fraction consists of casein aggregates cross-linked by colloidal Ca phosphate.

Table 8-2 Changes in micellar Ca and Pi on heating WPF milk and concentrated WPF milk at 135-140 °C

Heating Time sec	WPF milk		Concentrated WPF milk	
	Ca (mM)	Pi (mM)	Ca (mM)	Pi (mM)
0	20.6	9.8	53.5	28.2
15	20.7	10.1	55.3	28.2
45	20.9	10.1	56.0	29.5
75	21.1	10.3	56.3	30.3

135-140℃で15秒および75秒間加熱処理すると、カゼインは分子間重合を起こすことが推察される。そこで、加熱処理によってカゼインの分子間に共有結合による架橋重合体が形成されるか否か調べるため、DETAを加えてMCPを可溶化した後、ゲル濾過モードHPLCを行った。溶出パターンはFig. 8-1に波線で示した。重合体が15秒間加熱処理濃縮WPF乳でわずかに見られ(Fig. 8-1c)、75秒間加熱処理で明らかに観察された(Fig. 8-1d)。したがって、斜線で示した部分をMCP架橋カゼイン会合体含量とした。Table 8-3にWPF乳と濃縮WPF乳のMCP架橋カゼイン会合体含量を示した。両方とも加熱処理によりMCP架橋カゼイン会合体含量が減少した。この減少量は濃縮WPF乳がWPF乳に比べて大きく、WPF乳と濃縮WPF乳の135-140℃で75秒間の加熱処理によるMCP架橋カゼイン会合体含量はそれぞれ5.8%および8.6%減少した。このことは、乳を高温加熱処理するとMCPとカゼインの結合が弱くなるものと推察したAoki *et al.* (1975b)の報告を支持するものである。

Table 8-3 Changes in the content of casein aggregates cross-linked by MCP on heating WPF milk and concentrated WPF milk at 135-140 °C

Heating time sec	WPF milk	Concentrated WPF milk
	%	%
0	51.9	52.3
15	49.4	47.6
45	48.5	46.6
75	46.1	43.7

カゼインはそのリン酸基を介してMCPにより架橋される(Aoki *et al.*, 1987a)。乳が高温で加熱処理されると、リン酸基の遊離が起きる(Fox, 1981)。このことはMCPとカゼイン間における結合を解裂させる1つの原因であることが考えられる。本研究においてリン酸基が高温加熱によりカゼインから遊離するかどうか確認するため、135-140℃で加熱処理したWPF乳と濃縮WPF乳のカゼイン中のリン含量を測定した。カゼイン中のリン含量が加熱処理により減少したことから、135-140℃

の加熱処理でリン酸基の遊離が確認されたものの、15 秒間の加熱処理では極めてわずかであった (Table 8-4)。したがって、加熱による MCP とカゼイン間の結合の解裂はリン酸基の遊離がなくても起きたと考えられた。

Table 8-4 The P content of acid casein from WPF milk and concentrated WPF milk heated at 135-140°C

Heating time sec	WPF milk %	Concentrated WPF milk %
0	0.79	0.79
15	0.76	0.77
45	0.74	0.72
75	0.72	0.68

これまで MCP の構造に関してはいくつかの報告がされてきた。最初に提案された MCP の構造は X 線回析によってハイドロキシアパタイトと報告されたが (Rose, 1966)、現在では疑問視されている (Holt, 1982 ; Irlam *et al.*, 1985)。Schmidt (1982) は MCP が $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_4$ クラスターで構成される非結晶性のリン酸カルシウムであると報告しており、MCP とカゼイン間の結合は MCP のプラス荷電とカゼインのマイナス荷電による静電的な相互作用によるものであると報告している。これに対して、Holt (1982) は X 線吸収微細スペクトル分析) と溶解度積の実験を基に、MCP は密集したブルシト ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) に類似したものであると報告している。

乳清を過飽和化するとブルシト、リン酸オクタカルシウム、リン酸トリカルシウムおよびハイドロキシアパタイトが生成される (Schmidt, 1987)。カゼインは、リン酸基を介した結合によって、ブルシト、リン酸オクタカルシウムおよびハイドロキシアパタイトへの成長を強く抑制する (van Kemenade, 1989)。したがって、MCP の形態変化はカゼインによって妨げられている可能性が考えられる。カルシウムとリン酸を含む溶液において、加熱処理はリン酸カルシウムのハイドロキシアパタイトへの変化を加速させることから、高温加熱乳は MCP を他の形へ形態変化させる可能性がある。Nelson *et al.* (1989a) は X 線粉末回析を用い、120°C、15 分の加熱によって熱力学的に安定な結晶状の β -リン酸三カルシウムが形成されることを見いだした。したがって、高温加熱処理によって MCP の一部が架橋形成能を持たない他の形態へ変化したものと推察された。

第4節 小括

加熱処理がカゼインミセル中の MCP 架橋に及ぼす影響を調べるため、溶離液として USMUF を用いたゲル濾過モード HPLC を行い、加熱処理したカゼインミセルの MCP 架橋カゼイン会合体を分離した。乳清タンパク質除去脱脂乳を 60°C から 90°C で 10 分間加熱処理すると、ミセル性のカルシウムと無機リン酸含量は増加したが、MCP 架橋カゼイン会合体含量はほとんど変化しなかった。WPF 乳を 135-140°C で 75 秒間加熱処理すると、MCP 架橋カゼイン会合体含量は 51.9% から 46.1% に減少し、濃縮

した WPF 乳では 52.3%から 43.6%へ減少した。このことは高温加熱処理によってカゼイン成分間の MCP 架橋が解裂することを示唆するものである。この加熱処理による MCP 架橋の解裂はカゼインのリン酸基が加熱により遊離しなくても起きるものと考えられた。高温加熱処理により、カゼイン成分間を架橋している MCP が別の形態へ変化することが推察された。

第9章 総括

乳タンパク質は乳清タンパク質とカゼインに大別され、その構成比は動物種によって異なり、牛乳ではカゼインが全タンパク質の約80%を占める。カゼインは乳中でカルシウムや無機リン酸を結合してカゼインミセルと呼ばれる直径20-600 nmのコロイド粒子として存在している。乳中には溶解度以上のカルシウムと無機リン酸が存在しており、これらはミセル性リン酸カルシウム(MCP)としてカゼインのリン酸基を介して結合している。キレート剤を用いてカゼインミセルからカルシウムを除去するとサブミセルと呼ばれる小粒子に分かれることから、カルシウムやMCPがサブミセル間の結合に関与しており、MCPがカゼインミセルの構造を維持するための重要な役割を担っていると考えられている。しかしながら、カゼインミセルの構造に関して一致した見解は得られておらず、MCP架橋に関して不明な点が多い。カゼインミセルのMCP架橋とそれにとまなうミセルの特性を解き明かすことは、チーズ等のカゼインミセルの特性を生かした乳製品の改良に役立つだけでなく、牛乳生産に支障をきたしているアルコール不安定乳の原因がカゼインミセルの不安定性によるものと考えられていることから、その対策を講ずる場合に重要な情報となろう。そこで本研究は、カゼインミセル中のMCP架橋とカゼインミセルの特性を明らかにすることを目的として行った。

これまでの研究で、MCPはカゼインのリン酸基を介してカゼイン成分間に架橋を形成し、ミセル構造の維持に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。しかし、MCPによる架橋形成に対してカゼインに何個のリン酸基が必要であるか、あるいはリン酸基数の違いがMCPによる架橋形成にどの程度影響するのかということは未だ明らかではない。そこでまず、MCPの架橋形成におけるリン酸基の役割について検討した。第2章ではヒトカゼインのMCP架橋カゼイン会合体をゲル濾過モードHPLCで分離し、MCP架橋カゼイン会合体を構成するカゼイン組成を調べたところ、ヒト β -カゼイン-0P~2Pは含まれず、ヒト β -カゼイン-3P~5Pが含まれていた。さらに、このヒト β -カゼイン-1P~4Pのそれぞれとウシ κ -カゼインとを用いて人工ミセルを調製したところ、MCP架橋カゼイン会合体はヒト β -カゼイン-1Pと2Pでは形成されず、ヒト β -カゼイン-3Pと4Pで形成されたことから、MCP架橋カゼイン会合体に必要な最少リン酸基数は3個であることを明らかにした。

さらに第3章では、ヒト β -カゼイン-3Pと4P、 α_{s1} -カゼイン-8P、9P、および α_{s2} -カゼイン-10P~13Pを用いて人工ミセルを調製し、MCP架橋カゼイン会合体を構成するカゼインの成分組成を調べることでMCPによる架橋形成に及ぼすリン酸基数の影響を調べた。カゼインのリン酸基1つの違いがMCPによる架橋形成に及ぼす影響は、リン酸基数が3個から4個のように少ない場合は大きく、10個以上のようにリン酸化のレベルが上がると小さくなった。

第4章ではMCP架橋とミセルサイズの関係について検討した。高速遠心分離の条件を変えてウシカゼインミセルのサイズが大、中および小ミセルを得た。小ミセルにカルシウムとリン酸を添加してMCP架橋カゼイン会合体含量を大ミセルと同程度に増加させたとき、ミセルサイズは大きくなり、ミセルサイズの分布は小ミセルと非常に類似していた。このことから、MCP架橋を一定程度増大させてもミセルサイズに影響を及ぼさないことが示唆された。

次に第5章では、ブタカゼインミセルを用いて MCP 架橋とミセルの特性との関係について検討した。ブタ乳中のカゼイン含量とカルシウムおよび無機リン含量は牛乳のそれと比べて多く、MCP 架橋カゼイン会合体含量はウシで 56% 程度であるのに対して 76.0~80.4% と著しく多かった。このため冷却により解離するブタカゼイン含量はわずかであり、ブタカゼインミセルはウシカゼインミセルと比べて構造が強固であると考えられた。これは、カルシウムとリン含量が多いことと、ブタカゼイン分子が持つリン酸基数が多いことが要因と考えられた。

このことを確かめるため、第6章では、ブタカゼインとウシカゼインの濃度を同じにして、カルシウムと無機リン酸濃度を変えて人工ミセルを調製したところ、ブタカゼインの方がウシカゼインより MCP 架橋が形成されやすく、人工ミセル中の MCP 架橋カゼイン会合体含量が多かった。ウシカゼインのリン含量が 0.82% でブタカゼインが 1.18% であったことから、カゼイン分子中のリン含量が多いことが MCP によって架橋されやすくなる要因の1つであることが確認された。

第7章ではヒツジカゼインミセルの MCP 架橋について検討した。ヒツジの全カゼイン、カルシウムおよび無機リン含量が、いずれも牛乳のその約2倍であったにもかかわらず、MCP 架橋カゼイン会合体含量はウシカゼインと非常に類似していた。これは、ミセルを形成するカゼイン：カルシウム比およびカゼイン：無機リン比が同程度であったことによるものと考えられた。

第8章では高温加熱による MCP 架橋の解裂について検討した。乳清タンパク質除去脱脂乳（WPF 乳）を 60℃ から 90℃ で 10 分間加熱処理するとミセル性のカルシウムと無機リン含量は増加したが、MCP 架橋カゼイン会合体含量はほとんど変化しなかった。WPF 乳を 135-140℃ で 75 秒間加熱処理すると MCP 架橋カゼイン会合体含量は減少した。これは高温加熱処理によりカゼインと MCP 間の結合が解裂したためで、この解裂は高温によって起きるカゼインのリン酸基の遊離がなくても起きるものと考えられた。

以上の結果をまとめると次のようになる。(1) MCP 架橋カゼイン会合体形成には、カゼイン分子中に少なくとも3個以上のリン酸基が含まれている必要がある。(2) MCP による架橋形成には、カゼインのリン酸基数が関係し、MCP による架橋形成に及ぼす影響は、リン酸基数が少数の場合は大きく、リン酸基数が多くなるとその影響は小さくなる。(3) 乳のカゼインミセル構造の強さは、MCP 架橋カゼイン会合体含量に依存する。(4) ミセルサイズを決めるのは κ -カゼイン含量であり、MCP 架橋カゼイン会合体含量とは関係ない。(5) 乳の高温処理は MCP の解裂を引き起こすが、カゼインからリン酸基が遊離しなくても起こる。これらの結果のうち、(1)~(4)の結果は、ヒト、ウシ、ブタ、ヒツジのカゼインミセルおよびその人工ミセルの特性を比較することによって明らかとなった。

本研究により得られた知見は、カゼインミセルの構造に重要な役割を持つ MCP 架橋に関する基礎的な情報となるだけでなく、カゼインミセルの特性が密接に関係するチーズやヨーグルトなどの乳製品の改良に対して有用な情報を提供することになる。

謝 辞

本論文のとりまとめから作成にあたって、終始、懇切な指導と心からの激励を賜った九州大学大学院農学研究院池内義秀教授に衷心から感謝し、厚くお礼を申し上げます。

本論文の作成にあたって、終始、懇切な指導と心からの激励を賜った九州大学大学院農学研究院下田満哉教授、辰巳隆一助教授に衷心から感謝し、厚くお礼を申し上げます。

本研究の遂行、論文の学会誌投稿、そして本論文のとりまとめから作成にあたって、終始、懇切な指導と心からの激励を賜った鹿児島大学農学部青木孝良教授に衷心から感謝し、厚くお礼を申し上げます。

研究の実施にあたっては、福岡県農業総合試験場の同僚諸氏から多大の援助を賜った。また、温情ある激励を今林惣一郎場長 (H14.4～H17.3)、江崎正副場長 (H15.4～)、長野勉之畜産研究所長 (H5.4～H11.3)、藤島直樹畜産研究所長 (H13.4～H15.3)、上田充祥飼料部長 (H9.4～H11.3)、田口清實家畜部長 (H14.4～)、各位から頂いた。ここに記して皆様に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Allen, R.J.L. (1940) The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, 34, 858-865.
- Alexander, L.J., Das Gupta, N.A. and Beattie, C.W. (1992a) The sequence of porcine α_{s2} -casein cDNA. *Animal Genetics* 23, 365-367.
- Alexander, L.J. and Beattie, C.W. (1992b): The sequence of porcine α_{s1} -casein cDNA. *Animal Genetics* 23, 369-371.
- Aoki, T. (1989) Incorporation of individual casein constituents into casein aggregates cross-linked by colloidal calcium phosphate in artificial casein micelles. *J. Dairy Res.*, 56, 613-618.
- Aoki, T. and Imamura, T. (1974a) Changes of the casein complex in sterilized concentrated skim milk during storage. *Agric. Biol. Chem.*, 38, 309-314.
- Aoki, T. and Imamura, T. (1974b) Changes of casein complex during storage of sterilized skim milk. *Agric. Biol. Chem.*, 38, 1929-1934.
- Aoki, T. and Imamura, T. (1975a) Increase of soluble casein during storage of sterilized concentrated skim milk. *Agric. Biol. Chem.*, 39, 1155-1156.
- Aoki, T. and Imamura, T. (1975b) Cold-disaggregation of the casein micelles in heated concentrated whey protein-free milk. *Agric. Biol. Chem.*, 39, 2107-2113.
- Aoki, T. and Kako, Y. (1983) Relation between micelle size and formation of soluble casein on heating concentration milk. *J. Dairy Res.*, 50, 207-213.
- Aoki, T. and Kako, Y. (1985) The soluble and micellar κ -casein in heated concentrated whey protein-free milk. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 56, 347-352.
- Aoki, T. and Kako, Y. (1986a) Separation of casein aggregates cross-linked by colloidal calcium phosphate from bovine casein micelles by high performance gel chromatography in the presence of urea. *J. Dairy Res.*, 53, 53-59.
- Aoki, T., Kawahara, A., Kako, A. and Imamura, T. (1987b) Role of individual calcium phosphate in artificial casein micelles. *Agric. Biol. Chem.* 53, 817-821.
- Aoki, T., Suzuki, H. and Imamura, T. (1974c) Formation of soluble casein in whey protein-free milk heated at high temperature. *Milchwissenschaft*, 29, 589-594.
- Aoki, T., Suzuki, H. and Imamura, T. (1974d) Some properties of soluble casein in heated concentrated whey protein-free milk. *Milchwissenschaft*, 30, 30-35.
- Aoki, T., Toyooka, K. and Kako, Y. (1984) Role of phosphate groups in the calcium sensitivity of α_{s2} -casein. *J. Dairy Sci.*, 68, 1624-1629.
- Aoki, T., Uehara, T., Yonemasu, A. and Zin El-Din, M. (1996) Response surface analyses of the effects of calcium and phosphate on the formation and properties of casein micelles in artificial casein micelle systems. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1230-1234.
- Aoki, T., Yamada, N., Kako, Y. and Kuwata, T. (1986b) Quantitative determination of casein mixture by high-performance ion-exchange chromatography. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 57, 614-627.
- Aoki, T., Yamada, N., Tomita, I., Kako, Y. and Imamura, T. (1987a) Caseins are cross-linked through their ester phosphate groups by colloidal calcium

- phosphate. *Biochim. Biophys. Acta*, 911, 238-243.
- Aoki, T., Yamada, N., Kako, Y. and Imamura, T. (1988) Dissociation during dialysis of casein aggregates cross-linking by colloidal calcium phosphate in bovine casein micelles. *J. Dairy Res.*, 55, 189-195.
- Aoki, T. Yamada, N. and Kako, Y. (1990) Relation between colloidal calcium phosphate cross-linkage and release of β -casein from bovine casein micelles on cooling. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2287-2292.
- Aoki, T., Zin El-Din, M., Zang, Z.P. and Kako Y. (1993) Micellar calcium phosphate cross-linkage in goat casein micelles. *Jpn. J. Dairy Food Sci.*, 42, A-140-144.
- Azuma, N., Aizawa, M. and Yamauchi, K. (1989) Effect of bound phosphate on calcium binding ability and calcium-dependent precipitability of human β -casein. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1037-1041.
- Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B., Mercier, J.C., Pelissier, J.P. and Das B.C. (1977) Complete amino acid sequence of bovine α_{s2} -casein. *FEBS Letters* 76, 274-279.
- Chen, C.-M. and Yamauchi, K. (1971) Gel filtration of casein micelles from milk destabilized by frozen storage. *Agric. Biol. Chem.*, 35, 637-643.
- Creamer, L.K. (1984) Fractionation of casein micelles and whey protein aggregates on Sephacryl S-1000. *J. Chromatogr.* 291, 460-463.
- Davies, D.T., and White, J.C.D. (1983) Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micellar size and milk temperature. *J. Dairy Res.* 50, 67-75.
- De Kruif, C.G. and Holt, C. (2003) Casein micelle structure, functions and interactions. In *Advance Dairy Chemsitr 3rd Edition Vol. 1, Proteins A*. P.F. Fox and P.L.H. McSweeney ed. Kulwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 233-276.
- Downey, W.K. and Murphy, R.F. (1970) The temperature-dependent dissociation of β -casein from bovine casein micelles and complexes. *J. Dairy Res.*, 37, 361-372.
- Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell, H.M. Jr., Harwalkar, V.R., Jenness, R. and Whitney, R. McL. (1984) Nomenclature of proteins of cow' milk : Fifth revision. *J. Dairy Sci.*, 67, 1599-1631.
- Ekstrand, B. and Larsson-Raznikiiewicz, M. (1978) The monomeric casein composition of different size bovine casein micelles. *Biochem. Biophys. Acta*, 536, 1-9.
- Fox, P.F. (1981) Heat-induced changes in milk preceding coagulation. *J. Dairy Sci.* 64 2127-2137.
- Gallagher, D.P., Cotter, P.F. and Mulvihill, D.M. (1997) Porcine milk proteins. *Int. Dairy J.*, 7, 99-118.
- Greenberg, R.M., Groves, L. and Dower, H. (1984) Human β -casein. Amino acid sequence and identification of phosphrylation site. *J. Biol. Chem.*, 259, 5132-5138.
- Groves, M.L. and Gordon, W.G. (1970) The major component of human casein: a protein

- phosphorylated at different levels. *Arch. Biochem. Biophys.* 140:47-51.
- Holt, C. (1982) Inorganic constituents of milk. III. The colloidal calcium phosphate of cow's milk. *J. Dairy Res.*, 49, 29-38.
- Holt, C. (1985) The milk salts: their secretion, concentration and physical chemistry. In *Development in Dairy Chemistry-3. Lactose and minor constituents.* (P.F.Fox) Elsevier Applied Science Publishers, London: pp143-181.
- Holt, C. (1992) Structure and stability of bovine casein micelles. *Adv. Protein Chem.*, 43, 63-151.
- Holt, C. and Jenness, R. (1984) Interrelationships of constituents and partition of salts in milk samples from eight species. *Comp. Biochem. Physiol.* 77A, 275-282.
- Holt, C. and van Kemenade, M.J.J.M. (1989b) The interaction of phosphoproteins with calcium phosphate. In *Calcified tissue.* D.W.L. Hukins, ed. MacMillan Press, London, Engl. pp. 175-213.
- Irlam, J.C., Holt, C., Hansein, S.S. and Hukins, D.W.L. (1985) Comparison of the structure of micellar calcium phosphate in milk from six species by extended X-ray absorption fine structure spectroscopy. *J. Dairy Res.* 52, 267-273.
- Izco, J.M., Ordonez, A.I., Torre, P. and Barcina. (1999) Variation of capillary electrophoresis in the analysis of ewe's milk casein. *J. Chromat.*, 832, 239-246.
- Jenness, R. and Koops, J. (1962) Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Neth. Milk Dairy J.*, 16, 153-164.
- Kaminarides, S.E. and Anifantakis, E.M. (1993) Comparative study of the separation of bovine, ovine and caprine milks using HPLC. *J. Dairy Res.*, 60, 495-504.
- Knoop, A. M., Knoop, E. and Whiechen, A. (1979) Sub-structure of synthetic casein micelles. *J. Dairy Res.*, 46, 347-350.
- MaGann, T.C.A., and Pyne, G.T (1960) The colloidal phosphate of milk. III. Nature of its association with casein. *J. Dairy Res.*, 27, 403-407.
- MaGann, T.C.A., Donnelly, W.J., Kearney, R.D. and Buchheim, W. (1980) Composition and size distribution of bovine casein micelles. *Biochem. Biophys. Acta*, 630, 261-270.
- Morr, C.V. (1967) Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 50, 1744-1751.
- Morr, C.V., Josephson, R.V., Jenness, R. and Manning, P.B. (1971) Composition and properties of submicellar casein complexes in colloidal phosphate-free skim milk. *J. Dairy Sci.*, 54, 1555-1563.
- Mulvihill, D.M. and Fox, P.F. (1979) Isolation and characterization of porcine β -casein. *Biochi. Biophys. Acta* 578, 317-324.
- Nagasawa, T., Ryoki, T. Kiyosawa, T. and Kuwahara, K. (1967) Studies on human casein. 1. Fraction of human casein by diethylaminoethyl cellulose column chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.* 121:502-507.

- Nelson, L.S. Jr., Holt, C. and Hukins, D.W.L. (1989a) The EXAFS spectra of poorly crystalline calcium phosphate preparation from heated milk. *Physica B* 158, 103-104.
- Nelson, L.S. Jr., Holt, C. and Hukins, D.W.L. (1989b) The EXAFS spectra of poorly crystalline calcium phosphate in heated milk. *Physica B*, 158, 105-106.
- O' Connor, P. and Fox, P. F. (1977) The proteins and salts of some non-bovine milks. *J. Dairy Res.* 44, 607-609.
- Ono, T., Hayakawa, Y. and Odagiri, S. (1975) The changes of the constituents of bovine casein micelles by calcium complexing agents. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 50, 99-104.
- Pyne, G. T. (1962) Reviews of the progress of dairy science. C. Dairy chemistry. Some aspects of the physical chemistry of the salts of milk. *J. Dairy Res.*, 29, 101-130.
- Reynolds, E.C., Riley, P.F. and Adamson, N.J. (1994) A selection precipitation purification procedure for multiple phosphoserine-containing peptides and method for their identification. *Anal. Biochem.*, 217, 277-284.
- Rose, D. and Colvin, J. R. (1966) Internal structure of casein micelles from bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 49 351-355.
- Sabarwal, P.K., Oommen, S. and Ganguli, N.C., (1969) Inorganic constituents of casein micelles from cow and buffalo milk. *J. Food Sci. Tech.* 9, 144-146.
- Schmidt, D.G. (1982) Association of caseins and casein micelle structure. In *Developments in Dairy Chemistry-1. Proteins*. P. F. Fox ed. Applied Science Publishers, London, pp. 61-86.
- Schmidt, D.G. and Both, P. (1987) Studies on the precipitation of calcium phosphate. I. Experiments in the pH range 5.3 to 6.8 at 25 °C and 50 °C in the absence of additives. *Neth. Milk Dairy J.*, 41 101-120.
- Slattery, C.W. and Evard, R. (1973) A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochem. Biophys. Acta* 317, 529.
- Swaigood, H.E. (1982) Chemistry of milk protein. In *Developments in Dairy Chemistry-1. Proteins*. P.F. Fox ed. Applied Science Publishers, London, pp. 1-59.
- Trujillo, A.J., Casals, I. and Guamis, B. (2000) Analysis of major ovine milk proteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography and flow injection analysis with electrospray mass spectrometry. *J. Chromat.*, 870, 371-380.
- van Dijk, H. J.M. (1989a) The properties of casein micelles. 1. The nature of the micellar calcium phosphate. *Neth. Milk Dairy J.*, 44, 65-81.
- van Dijk, H. J.M. (1989b) The properties of casein micelles. 2. The formation and properties of micellar calcium phosphate. *Neth. Milk Dairy J.*, 44, 111-124.
- Van Kemenade, M. J. J.M and De Bruyn, P.L. (1989) The influence of casein on the kinetics of hydroxyapatite precipitation. *J. Colloid and Interface Sci.*, 129,

1-14.

- Walstra, P. (1999a) Casein sub-micelles: do they exist? *Int. Dairy J.*, 9, 189-192.
- Walstra, P. (1999b) Colloidal particules of milk: casein micelles. In *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes*. P. Walstra, T.J. Geurts, A. Noomen, A. Jellema and M.A.J.S. van Boekel ed. Dekker Inc.: New York, pp. 125-147.
- Waugh, D.F. (1971) Formation and structure of casein micelles. In *Milk protein II*. H.A. McKenzie ed. Academic Press: New York, pp. 3-85.
- Zittle, C.A. and Custer, J.H. (1963) Purification and the properties of α_s -casein and κ -casein. *J. Dairy Sci.*, 46, 1183-1188.
- 青木孝良(1986) カゼインミセル：特にコロイド状リン酸カルシウム架橋について. 酪農科学・食品の研究, 35, A315-320.
- 青木孝良(1993) ミルク成分の合成. *New Food Industry*, 35, 37-52.
- 青木孝良(1995) カゼインミセル中のミセル性リン酸カルシウム架橋. 酪農科学・食品の研究, 44, A1-7.
- 青木孝良(1997) カゼインミセルの構造・特性—ミセル中のカルシウムとリン酸の挙動. *ミルクサイエンス*, 46, 227-232.
- 片岡啓・中江利孝(1972) わが国における各種哺乳動物の乳汁組成に関する研究Ⅲ非反芻動物乳汁の蛋白質組成の比較. 酪農科学・食品の研究, 21, A27-341.
- 中西武雄・伊藤尚敏(1969) 各種処理による牛乳カゼインの変化に関する研究(第6報) カゼイン溶液の加熱によるゲル濾過溶出曲線とシアル酸含量の変化. 日本農芸化学会誌, 43, 306-310
- 仁木良哉・有馬俊六郎(1984) 牛乳カゼイン—その構造的特徴を中心として—. 化学と生物, 22, 219-227.
- 小野伴忠(1989) 分子集合としての乳蛋白質カゼイン. 蛋白質 核酸 酵素, 34, 1351-1358.
- 上野川修一(1978) カゼインミセル—その構造と構成成分間の相互作用—. 化学と生物, 16, 556-564.
- 山内邦男(1979) 人乳成分の化学—牛乳成分とどう違うか. I. 蛋白質. 日本農芸化学会誌, 53, R37-R47.

Studies on micellar calcium phosphate-cross-linkage in casein micelles and these properties.

by

Umeda Taketoshi

Summary

In milk, casein micelles 20 to 600 nm in diameter exist as colloidal particles. Casein micelles are highly hydrated and contain 6.6% of inorganic materials, the main constituents of which are calcium phosphate. Calcium and inorganic phosphate are present in excess of their solubilities and — as a result of their interactions with casein — are not precipitated as calcium phosphate. Thus, the mammary secretory cells are considered to be protected from the injury caused by the precipitate of calcium phosphate. Calcium phosphate in casein micelles, which is associated with casein, is called colloidal calcium phosphate (CCP) or micellar calcium phosphate (MCP). It is now recognized that casein micelles acts as carriers of calcium phosphate instead of a sole nutritive function as source of amino acids, calcium and phosphorous. The MCP plays an important role in maintaining the structure of casein micelles because casein micelles are disaggregated into submicelles when MCP is removed. However, there is no agreed option for the structure of casein micelle, and also the mechanism of linkage between MCP and casein molecules has been unsolved until now. In particular, to clarify the latter is very useful for the development of the milk products such as cheese making use of the characteristics of casein micelles.

The objective of this study was to obtain the fundamental information about the structural stability of MCP, considering from such a view point of the integrity of casein micelles through the cross-linkage. The following studies were conducted and the results were summarized as follows:

(1) The author investigated the least number of phosphate groups necessary for cross-linking of casein by MCP.

Artificial casein micelles were formed with whole human casein at 20 mM calcium, 17 mM phosphate and 10 mM citrate. The casein micelles disaggregated by 6 M urea were separated by high performance gel chromatography on a TSK-GEL G4000SW column into cross-linked and monomeric fractions. When the cross-linked casein fraction was analyzed by high performance ion-exchange chromatography on a TSK-GEL DEAE-5PW column, a small peak, representing the 3-P component of human β -casein, and distinct peaks of the 4-P and 5-P components were found. Artificial casein micelles were formed from mixtures of each purified component of human β -casein and bovine κ -casein, disaggregated by urea, and separated on a TSK-GEL G4000SW column. The casein aggregates cross-linked by MCP were formed in artificial casein micelles of the 3-P and 4-P components. In contrast, no cross-linkage was formed in artificial micelles

of the 1-P and 2-P components. The results indicate that at least three phosphate groups are needed for cross-linking of casein by MCP.

(2) As described above, at least three phosphate groups were needed for the cross-linking of casein by MCP. However, the possibility remained that a side chain other than phosphate groups may have affected the cross-linking of casein by MCP. Accordingly, the effect of the number of phosphate groups on the cross-linking of casein by MCP needed to be examined for caseins with the same amino acid sequence but differing in their phosphorylation level. Then, the author prepared artificial casein micelles with human β -casein, and bovine α_{s1} - and α_{s2} -casein, and examined the cross-linking of the casein by MCP.

Artificial micelles were formed with the 3-P and 4-P components of human β -casein and bovine κ -casein with 20 mM calcium, 17 mM phosphate and 10 mM citrate. To separate the casein aggregates cross-linked by MCP, high-performance gel chromatography was carried out, and the elute was divided into fraction 1 and 2. Fraction 1 consisted of casein aggregates cross-linked by MCP, while fraction 2 consists of "monomeric" casein. The fraction 1 content of micelles of the 3-P and 4-P components of human β -casein and bovine κ -casein was 22.3 %. The content of the 4-P component in fraction 1 was much higher than that of the 3-P component. The percentages of the 3-P and 4-P components to the total casein in the micelles were 45.9 and 44.1 %, respectively. Accordingly, the cross-linked 3-P component was calculated as 7.8 % of the total 3-P component. The cross-linked 4-P component was 42.4% of the total 4-P component, this being 5.44 times that of the 3-P component. Artificial micelles were prepared with the 8-P and 9-P components of bovine α_{s1} -casein and κ -casein. The proportion of the 9-P component cross-linked by MCP to its total content was 65.9 % and 1.25 times that of the 8-P component. Artificial micelles were also formed with the 11-P to 13-P components of bovine α_{s2} -casein and κ -casein. The difference among the proportions of the components cross-linked by MCP was small, as compared with that of the human β -casein micelles and bovine α_{s1} -casein micelles. In the present study, it was shown that a difference of one phosphate group of casein affected the cross-linking of casein by MCP, especially the cross-linking of human β -casein. The 3-P component of human β -casein was hardly cross-linked when compared with the 4-P component. The effect of the difference of one phosphate group on the cross-linking of casein by MCP was rather small in the micelles with the 8-P and 9-P components of α_{s1} -casein, and with the 11-P to 13-P components of α_{s2} -casein. The phosphate groups of the 3-P component of human β -casein are located at residues 8 to 10, and the additional one phosphate group is bound to residue 6 in the 4-P component. The phosphate groups of bovine α_{s1} - and α_{s2} -casein are located further apart than that of human β -casein. The phosphorylation sites of the 8-P component of α_{s1} -casein are at residues 46 to 115, and an additional phosphate group of the 9-P component is at residue 41. These phosphorylation sites may affect the cross-linking of casein by MCP. However, it is probable that the effect of the difference of one phosphate group in casein becomes

smaller with increasing phosphorylation level.

(3) The author investigated the relation between micelle size and MCP content or MCP-cross-linkage in bovine casein micelles.

Bovine casein micelles were separated into large, medium, and small micelles by differential centrifugation. It was confirmed that the calcium and inorganic phosphate (Pi) contents increased with micelle size, while κ -casein content decreased. The MCP-cross-linked casein contents, which were determined by the gel permeation HPLC in the presence of 6 M urea, were 56.8, 53.1 and 46.7 % in large, medium, and small micelles, respectively. There were only small differences in composition in MCP-cross-linked casein among large, medium, and small micelles. The MCP-increased small micelles, of which micellar calcium and Pi, and MCP-cross-linked casein contents were very close to that of large micelles, were prepared. In Sephacryl S-1000 chromatography, the elution pattern of the MCP increased small micelles was very similar to that of small micelles, indicating that the level of MCP does not affect the difference of the micelle size between large and small micelles but κ -casein content controls the micelle size. The bioassembly of casein micelles was also discussed, considering the interaction between submicelles and MCP.

(4) The author investigated the composition of porcine casein micelles and physico-chemical properties of MCP-cross-linked casein in porcine casein micelles.

The micellar casein content was 3.47–4.07 % in porcine skim milk; this value was 1.48–1.73 times higher than that of bovine skim milk. The total calcium, micellar calcium and inorganic phosphorus contents were also higher in porcine milk than in bovine milk. The micellar Pi inorganic phosphorus content was 1.52–3.29 times higher in porcine milk than in bovine milk. The MCP-cross-linked casein was separated from porcine casein micelles by high-performance gel chromatography on a TSK-GEL G4000SW_{XL} column using 6 M urea-simulated milk ultrafiltrate as the eluent. The MCP-cross-linked casein in porcine casein micelles was 66.6–69.2 % of total casein. These values are higher than those in corresponding casein micelles of Holstein cow milk, which were 52–57 %. The total casein content of porcine milk was higher than that of bovine milk. The little increase in serum casein was observed when porcine skim milk was cooled for 2 to 24 h at 5°C. This suggested that porcine casein was more easily cross-linked by MCP than bovine casein, and that a high content of MCP-cross-linked casein might depress the dissociation of porcine casein micelles on cooling.

(5) To clarify which of organic phosphorous and MCP contents contributes to higher MCP-cross-linked casein content in porcine casein micelles, the experiments were conducted

Artificial porcine casein micelles, in which calcium, inorganic phosphate (Pi) and citrate concentrations were 10–40, 12–27 and 10 mM, respectively, were prepared at pH 6.7, and the formation of micelles and MCP-cross-linkage was examined. The

results were compared with those of artificial bovine micelles. There were almost no differences in the micellar casein and calcium contents between artificial porcine and bovine casein micelles. The contents of MCP-cross-linked casein were 44.9 and 66.6% for the porcine micelles formed at 20 mM calcium and 17 mM Pi, and 30 mM calcium and 22 mM Pi, respectively. These values were much higher than those of corresponding bovine casein micelles. The organic phosphorus contents of porcine and bovine casein used were 1.18 and 0.82 %. The higher organic phosphorus content of porcine casein is considered to be one of the reasons why more porcine than bovine caseins are cross-linked by MCP.

(6) The author investigated the composition of ovine casein micelles and its physico-chemical properties of MCP-cross-linked casein and compared with the data of porcine casein micelle.

Individual ovine milk samples were obtained from 2 Corriedal ewes 2 weeks after parturition. The contents of casein, calcium and inorganic phosphorus were 4.46 and 4.86 g, 198.8 and 192.5 mg, and 111.0 and 117.8 mg, respectively, in two 100 mL samples of ovine skim milk. The content of MCP-cross-linked casein in ovine casein micelles, which were determined by high-performance gel permeation chromatography in the presence of 6 M urea, was 57.5 % and 58.4 % for the two ovine milk samples. The released casein upon cooling at 5° C for 20 h from casein micelles was 11.2 % and 14.4 % of total casein in 2 ovine skim milk samples. Most of the released casein from ovine casein micelles upon cooling was β -casein similar to that found in bovine casein micelles. It was considered from the above results that the MCP-cross-linked casein content and behavior of ovine casein micelles were similar to those of bovine casein micelles, although ovine milk was higher in concentrations of casein, calcium and inorganic phosphorus than in bovine milk.

(7) The study was conducted to elucidate the cleavage of the linkage between MCP and casein which apparently occurs on heating milk at high temperature.

In order to examine the effect of heating on the changes in the linkage between MCP and casein, high performance gel chromatography of casein micelles disaggregated by 6 M-urea was carried out using 6 M-urea simulated milk ultrafiltrate as the effluent. Although the MCP content increased when whey protein-free (WPF) milk was heated at 60-90°C for 10 min, almost no changes in the content of casein aggregates cross-linked by MCP were observed. The content of casein aggregates cross-linked by MCP decreased from 51.9 to 46.1 % in WPF milk and from 52.3 to 43.6 % in concentrated WPF milk on heating at 135-140°C for 75 s, indicating the cleavage of the linkage between MCP and casein. The cleavage of the linkage between MCP and casein on heating was considered to occur without liberation of ester phosphate groups. It was suggested that the transformation of MCP to another form was responsible for the cleavage between MCP and casein on heating milk at high temperature.

The author made it clear that the characteristic of MCP-cross-linkage related with

the number of phosphate group in casein molecule played an important role in the stability of casein micelle. The author was also convinced that these results from this series experiments would contribute to give the useful information in manufacturing milk products.

福岡県農業総合試験場特別研究報告

第24号

「カゼインミセルのミセル性リン酸カルシウム架橋と
ミセルのミセルの特性に関する研究」

平成19年3月発行

発行者 福岡県農業総合試験場

〒818-8549 福岡県筑紫野市大字吉木587

TEL 092-924-2971

著者 梅田剛利

印刷 社会福祉法人 福岡コロニー

〒811-0119 福岡県粕屋郡新宮町緑ヶ浜1丁目11番1号

TEL (092) 962-0764 FAX (092) 962-0768
