

酵素免疫測定法による κ -カゼインと β -ラクトグロブリンの加熱形成複合体の検出

今出 保・片山英明・白川信彦・早川 茂

ELISA STUDY OF THE HEAT-INDUCED COMPLEXES BETWEEN κ -CASEIN AND β -LACTOGLOBULIN IN MILK AND BUFFER SOLUTIONS

Tamotsu IMADE, Hideaki KATAYAMA, Nobuhiko SHIRAKAWA,
and Shigeru HAYAKAWA

Heat-induced complexes between κ -casein and β -lactoglobulin (β -Lg) were investigated by gel filtration, SDS-PAGE, and ELISA. The results of gel filtration on a Toyoparl HW65-F column and SDS-PAGE patterns showed that the soluble complexes with large molecular size formed during heating at 75°C for 30 min. When protein fractions obtained by gel filtration were analysed by ELISA, β -LgA was detected in any fractions.

Casein micelles prepared from commercial pasturized milks (65°C for 30 min, 120°C for 2 sec and 140°C for 2 sec) were analysed by the competitive ELISA using anti- β -LgA antibody. The amount of β -LgA on heat-induced casein micelle complexes increased with increasing pasturized temperature.

κ -カゼインと β -ラクトグロブリンAの加熱により形成した複合体をゲルろ過法、電気泳動法および酵素免疫測定法を用いて検出することを試みた。

κ -カゼインと β -ラクトグロブリンAの混合溶液を75°C30分間加熱することにより可溶性の巨大複合体が形成されることがゲルろ過法(トヨパールHW65-F)と電気泳動法によって認められた。ゲルろ過によって得られた各ピークについて酵素免疫測定法を行った結果、全画分に β -ラクトグロブリンAの存在が認められた。

市販牛乳(65°C30分, 120°C2秒, 140°C2秒加熱処理)から調製したカゼインミセルに結合した β -ラクトグロブリンを酵素免疫測定法を用いて測定した結果、加熱温度が高くなるにしたがって加熱複合体の量が増加することが明らかとなった。

緒 言

牛乳中の主要蛋白質である α s-, β -, κ -カゼインはミセルを形成してコロイド状に分散し、 κ -カゼイン(κ -CN)はミセル表面にあってミセルの安定化に最も貢献している⁽¹⁾。一方、 β -ラクトグロブリン(β -Lg)は乳清蛋白質の約半分を占め、分子内に2本のSS結合と1個のSH基を有している⁽²⁾。 κ -CNと β -Lgとの相互作用がキモシンによる牛乳の凝固性あるいは乳製品の安定性に著しい影響を与えることはよく知られている。特に両者の加熱複合体については多くの研究者により研究されてきた^(3~10)。

最近、極く微量の試料でかつ特異的抗原抗体反応を利用した酵素免疫測定法(ELISA)⁽¹¹⁾が生化学の分野で広く用いられている。

本研究は κ -CNと β -Lgとを加熱することにより複合体が形成されていることを、ゲルろ過法お

よび電気泳動法に加えてELISAを用いることにより、より直接的な検出を行った。また、市販牛乳から調製したカゼインミセル画分に β -Lgが結合しているかどうかをELISAを用いて明らかにすることを試みた。

実験方法

1. 試料カゼインおよび β -LgAの分離・精製

β -Lgの遺伝的変異体として β -LgAのみを含む新鮮なホルスタイン種乳牛の個乳を用いた。W-カゼイン(W-CN)は常法により、 κ -CNはZittleらの方法^(12,13)により分離、精製した。 β -LgAはAschaffenburgらの方法⁽¹⁴⁾によって分離し、DEAEセルロース(ワットマン社, DE23)を用い0.05 Mイミダゾール・塩酸緩衝液(pH6.7, 以下標準緩衝液と呼ぶ)と0.5MNaClを含む標準緩衝液との直線濃度勾配クロマトグラフィーを用いて精製した。

2. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法(SDS-PAGE)はLaemmliの方法⁽¹⁵⁾にしたがって行った。0.1%SDSおよび12.5%アクリルアミドゲルを用い、染色にはクマーシーブリリアントブルーを用いた。

3. 牛乳蛋白質の加熱処理

W-CN, κ -CN, β -LgA, W-CN+ β -LgA(1:1)および κ -CN+ β -LgA(1:1)について加熱処理した。加熱条件は65°C30分, 75°C15秒, 75°C30分および135°C2秒とした。135°Cの場合は湯浴中で65°Cに温度を上げた後, 140°Cの恒温油槽中で振盪しながら加熱し, 135°Cに2秒保った後急冷した。室温から65°Cまでの加熱に約1分, 65°Cから135°Cに達するまでに約1分40秒を要した。試料蛋白質濃度は0.6%とした。

4. ゲルろ過

トヨパールHW65-Fのカラム(1.6×100cm)を用い, 70mMKClを含む10mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH7.0, 0.02%NaN₃を含む)で溶出した。流速は90ml/hr, トーヨーユビコンUV-750Lを用いて280nmの吸光度を測定した。ボイドボリューム(V₀)はブルーデキストランをしてトータルボリューム(V_t)はサッカロースの溶出量から求めた。

5. β -LgAに対する免疫グロブリンの調製

抗原の β -LgA溶液は0.9%NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に対して透析し, 濃度を0.2%に調整した。完全フロイントアジュバント(Difco Laboratories製)と等量混合しW/O型エマルジョンとした後, 白ウサギに数カ所に分けて皮下注射した。追加免疫として不完全フロイントアジュバント(Difco Laboratories製)と等量混合したものを2週間おきに7回皮下注射した。産生された免疫グロブリンは耳静脈より採血し, 室温に1時間静置後一夜冷蔵し, 10,000rpmで5分遠心分離して血清を得た。

6. 酵素免疫測定法(ELISA)

ELISAはEngvallとPealmanの方法⁽¹¹⁾により行った。すなわち, 抗原を0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈し, マイクロプレートウェルに各100 μ lずつ入れて室温に一夜静置し吸着させた。PBS-Tween(Tween20:0.5g, KH₂PO₄:0.2g, Na₂HPO₄·12H₂O:2.9g, NaCl:8g, KCl:0.2g, 蒸留水:11)で3回洗浄した。ブロッキング試薬(2%ポリビニルピロリドンK90と0.2%血清アルブミンを含むPBS-Tween)200 μ lを各ウェルに加えて37°Cで30分静置した。ブロッキング試薬を用いて10⁻⁴に希釈したウサギ抗血清100 μ lを加えて37°Cで30分静置した。PBS-Tweenで3回洗浄後, ブロッキング試薬で10⁻⁴に希釈したPOD結合抗ウサギ免疫グロブリン抗体100 μ lを加えて37°Cで3時間静置した。PBS-Tweenで3回洗浄後, 基質(0.05Mクエン酸緩衝液5mlに0-フェニレン

ジアミン 2 mg と 0.3% H_2O_2 50 μ l を加える) 100 μ l を各ウェルに加え、室温、暗所で 30 分反応させた。2.5M H_2SO_4 50 μ l で反応を止め、492nm の吸光度を測定した。競合 ELISA は 10^{-4} 倍に希釈した抗血清 100 μ l に $2^0 \sim 2^{-6}$ に希釈した試料を 1 μ l 加えてある程度中和した抗血清を用いることにより行った。

7. カゼインミセル結合 β -LgA の測定

市販の低温殺菌乳 (65 $^{\circ}$ C 30 分) あるいは超高温処理乳 (120 $^{\circ}$ C 2 秒および 140 $^{\circ}$ C 2 秒) を各々脱脂し、ゲルろ過 (トヨパール HW-65F, 溶出液: 0.9% NaCl および 0.02% NaN_3 を含む標準緩衝液) し、Vo に溶出するカゼインミセル画分を得た。蛋白質濃度は Lowry らの方法⁽¹⁶⁾ を用いて測定した。 10^{-4} に希釈したウサギ抗血清 100 μ l に上記カゼインミセルを $2^0 \sim 2^{-6}$ に希釈した液を 1 ml ずつ加え 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。1 μ g/ml の β -LgA を吸着させたウェルに上記抗血清を加え ELISA を行った。また、カゼインミセルの代わりに 0.064% の β -LgA を $2^0 \sim 2^{-6}$ に希釈した液 1 μ l と、 10^{-4} に希釈した抗血清 100 μ l を反応させたものについても同様の操作で ELISA を行った。阻害度は次式によって得られた値である。

$$\text{阻害度} = \frac{A - B}{A} \times 100 (\%)$$

A: 抗血清のみの吸光度

B: カゼインミセルを加えた吸光度

結果および考察

1. ゲルろ過

W-CN, κ -CN, β -LgA およびそれらの混合物を加熱処理した後ゲルろ過した。溶出図を図 1 に示した。W-CN は加熱処理による濁度の増加はなく、溶出図にも未加熱との違いはなく熱に対して安定であった。

κ -CN は 65 $^{\circ}$ C 30 分および 75 $^{\circ}$ C 15 秒の加熱では濁度の増加はなかったが、ゲルろ過溶出図の $k_d=0$ の可溶性巨大自己会合体のピークが未加熱に比べて大きくなっており、疎水の相互作用によるものと思われた。135 $^{\circ}$ C 2 秒では凝集沈殿物を生じ、ゲルろ過溶出図においても $k_d=0$ のピークが消失した。

β -LgA は 65 $^{\circ}$ C 30 分および 75 $^{\circ}$ C 15 秒では濁度の増加あるいは溶出図に未加熱と比べて違いはなかった。しかし、135 $^{\circ}$ C 2 秒ではゲルろ過溶出図の k_d 値に変化はなかったが不溶性凝集物を生じたためにピークの高さが約 1/4 になった。熱変性を受けた結果、可溶性巨大会合体を形成することなく約 3/4 の β -LgA が凝集沈殿物として失われた。

W-CN + β -LgA では 75 $^{\circ}$ C 30 分の加熱処理まで濁度の増加はなく、135 $^{\circ}$ C 2 秒の加熱によって凝集物を生じた。ゲルろ過溶出図は 75 $^{\circ}$ C 30 分の加熱により W-CN 由来の $k_d=0.55$ のピークが消失し、新たに $k_d=0.28$ の小ピークが現れ、可溶性複合体が生じていた。

κ -CN + β -LgA では 75 $^{\circ}$ C 30 分まで濁度の増加はなく 135 $^{\circ}$ C 2 秒の加熱で凝集物を生じた。ゲルろ過溶出図では 75 $^{\circ}$ C 15 秒の加熱処理までは未加熱との違いはなかった。しかし、75 $^{\circ}$ C 30 分では大きな変化を生じた。すなわち、 $k_d=0.80$ のピークが約 1/4 になり、 $k_d=0.48$ のピークが消失し、新たに $k_d=0.20$ のピークが生じた。そして、 $k_d=0$ のピークが未加熱の場合の約 4 倍になっていた。可溶性の巨大複合体が形成されていると思われた。変化の著しい 75 $^{\circ}$ C 30 分加熱処理後のゲルろ過における $k_d=0, 0.10, 0.27$ および 0.80 の各画分を SDS-PAGE で分析した。その結果を図 2 に示した。全ての画分に β -LgA のバンドが現れた。未加熱の場合に存在しなかった画分に β -LgA が存在しており、加熱により κ -CN との可溶性複合体の形成されていることが認められた。

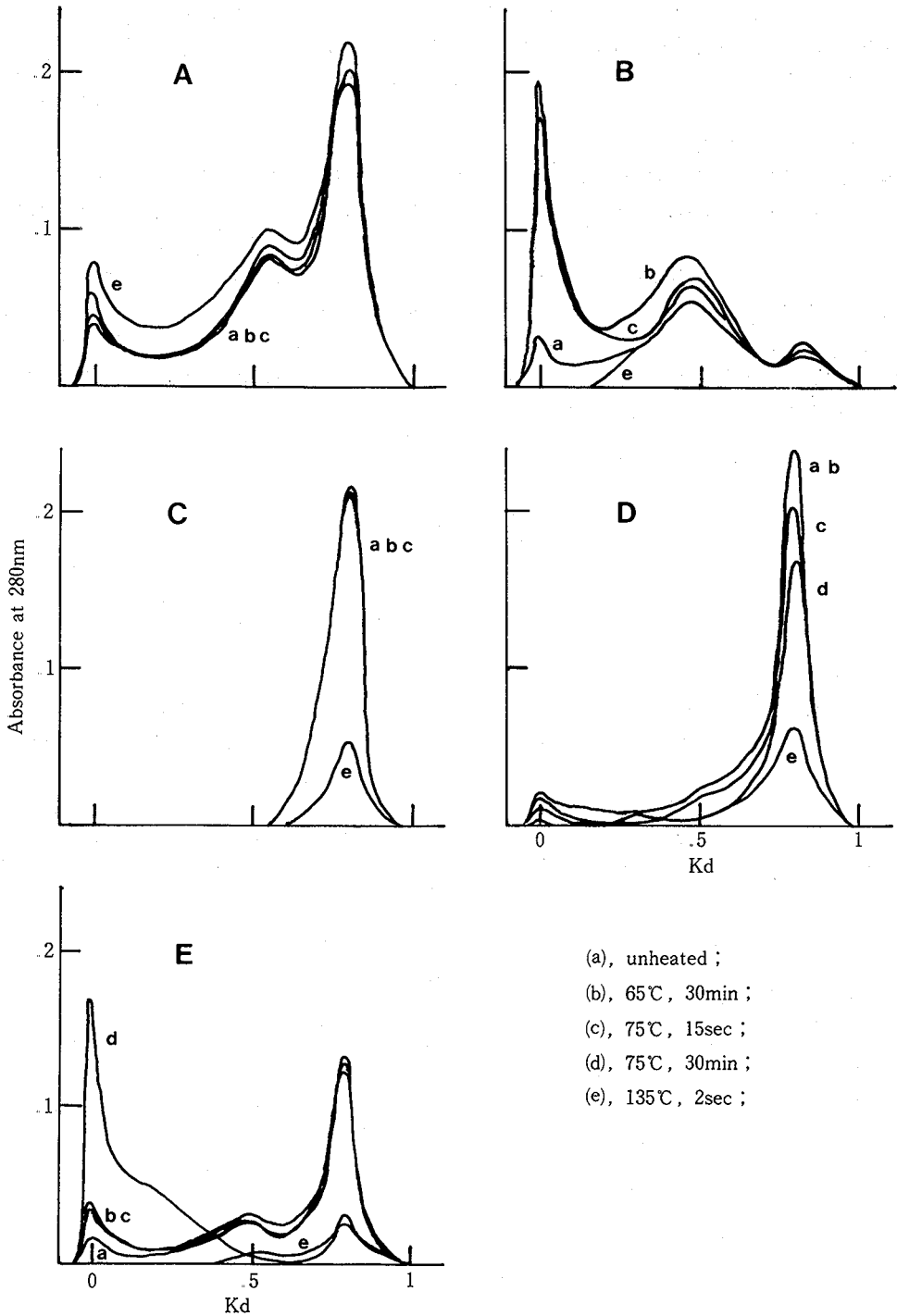


Fig 1 Elution patterns of the individual milk proteins and their mixtures in 10mM imidazole buffer (pH 7.0) containing 70mM KCl and 0.02% NaN₃ on a Toyopearl HW65-F column (1.6×100cm). (A) w-CN ; (B) κ-CN ; (C) β-LgA ; (D) W-CN + β-LgA ; (E) κ-CN + β-LgA.

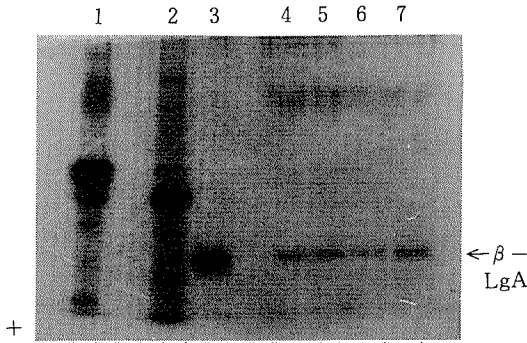


Fig.2 SDS-PAGE patterns of peak fractions obtained by the gel filtration of the heated mixture of κ -CN and β -LgA at 75°C for 30min.
 (1)w-CN; (2) κ -CN; (3) β -LgA;
 (4)peak fraction of Kd=0; (5)Kd=0.10;
 (6)Kd=0.27; (7)Kd=0.80.

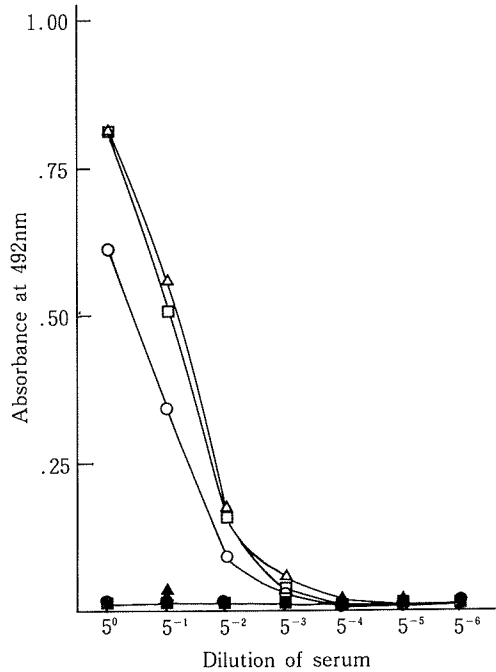


Fig.3 Titration of anti- β -LgA antibody in the rabbit serum.

- , β -LgA 0.1 μ g/ml in antiserum;
- △, β -LgA 1 μ g/ml in antiserum;
- , β -LgA 10 μ g/ml in antiserum;
- , β -LgA 0.1 μ g/ml in control serum;
- ▲, β -LgA 1 μ g/ml in control serum;
- , β -LgA 10 μ g/ml in control serum.

2. ELISAによる抗体産生の確認

6回目の追加免疫後に得られた血清の抗体産生をELISAによって調べた。その結果を図3に示した。血清濃度の上昇と共に吸光度の上昇が見られた。 β -LgAを注射していないウサギから得た対照血清のELISAの結果も図3に示した。対照血清は濃度に伴う吸光度の変化はなかった。これらの結果から β -LgAを抗原として注射したウサギから得た血清に抗体の産生されていることが確認出来た。また、図3の結果から測定に用いる抗血清の濃度は $\times 10^{-4}$ の希釈度が最適であると判断した。また、 β -LgAの吸着量については1 μ g/mlが適当であると判断した。

3. ELISAによる加熱複合体の確認

β -LgAを75°C15秒加熱処理後ゲルろ過して得たkd=0, 0.50および0.80の各画分についてELISAを行った。その結果を図4に示した。kd=0.80の画分は β -LgAのピークであるため吸光度が高い。また、希釈しても吸光度に余り変化がなく、免疫グロブリンに対して β -LgAが十分多いことがわかる。一方、kd=0の画分においては吸光度が低く、画分中に β -LgAの存在していないことが確認された。

κ -CN+ β -LgAを75°C30分加熱処理後ゲルろ過して得たkd=0, 0.10, 0.27および0.80の各画分についてELISAを行った。その結果を図5に示した。全画分に β -LgAの存在が認められたこと

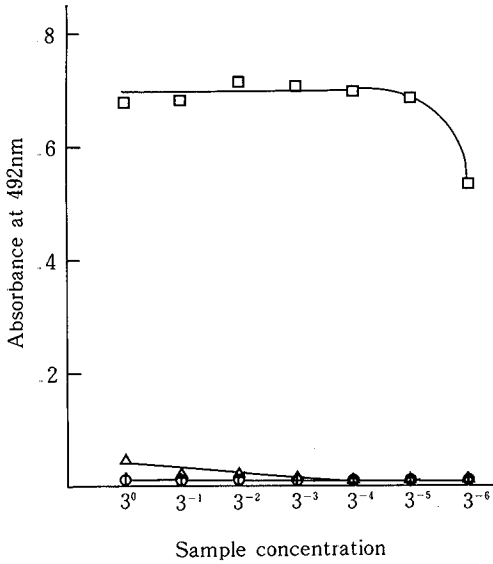


Fig 4 ELISA of the peak fractions obtained by the gel filtration of β -LgA heated at 75°C for 15 sec.

○, Kd = 0 ; △, Kd=0.50 ; □, Kd=0.80

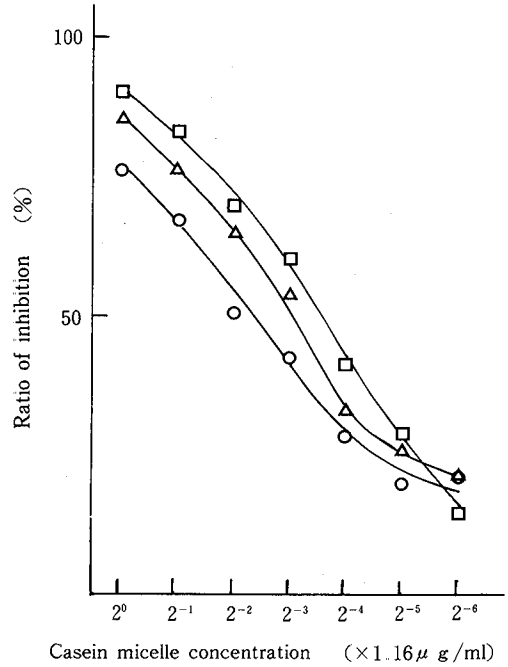


Fig 6 Inhibition of anti- β -LgA by heated casein micelles to ELISA, Ratio of inhibition

○, 65°C for 30min ; △, 120°C for 2sec ; □, 140°C for 2sec

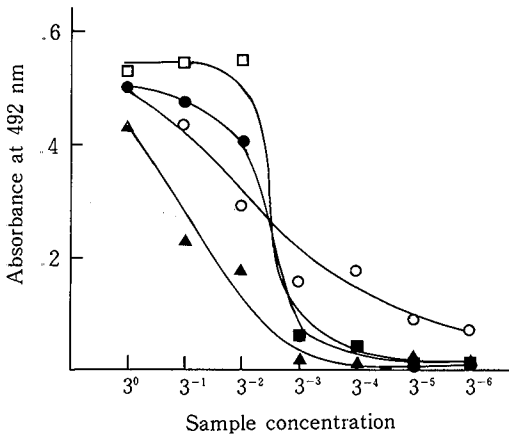


Fig 5 ELISA of the peak fractions obtained by the gel filtration of the mixture of κ -CN and β -LgA heated at 75°C for 30min.

○, Kd = 0 ; ●, Kd=0.10 ; ▲, Kd=0.27 ; □, Kd=0.80.

から κ -CN と β -LgA の加熱複合体形成が確認出来た。また、kd=0.80 の画分中の β -LgA は希釈により測定値が低下したことから考えると、含まれる量がかなり少ないと思われた。

4. ELISAによるカゼインミセル結合 β -LgAの測定

精製した κ -CNと β -LgAを1:1に混合したモデル実験で加熱複合体形成が認められたので、市販牛乳における加熱複合体形成の有無をELISAを用いて検討した。

市販牛乳は合乳を用いて製造され、 β -Lgの遺伝変異体としてはホルスタイン種乳牛の湯合 β -LgABが大半を占め、残りも β -LgAと β -LgBがほとんどである。したがって、 β -LgAの抗体を用いてさし支えないと判断した。

ゲルろ過によって市販牛乳から調製したカゼインミセルの濃度は、65°C30分:0.116%、120°C2秒:0.126%そして140°C2秒:0.118%であった。65°C30分の低温殺菌乳から調製したカゼインミセルの濃度が最も低かったので、他の二つのカゼインミセルを標準緩衝液で希釈し濃度を0.116%に調整した。

抗血清とカゼインミセルをあらかじめ反応させたものを用いてELISAを行った。カゼインミセル量と阻害度の関係を図6に示した。阻害度はカゼインミセル上の β -LgAと反応することによって結合した抗体がウェル上の β -LgAに対する結合を阻害された割合である。したがって、阻害度が大きい程カゼインミセル上に β -LgAが多く結合していることになる。図6より、カゼインミセル濃度の上昇に伴ってウェル上に吸着した β -LgAへの結合阻害度が大きくなっており、カゼインミセルに β -LgAが結合していることが認められた。また、140°C2秒の超高温処理乳の場合が阻害度が最も大きく、加熱温度が低くなるにしたがって阻害度が減少していた。加熱温度が高くなるにしたがってカゼインミセルに β -LgAが結合する量、すなわち、加熱複合体形成の増加することが認められた。

今後、モノクローナル抗体を用いた分析および加熱複合体形成における分子構造面からのアプローチや複合体形成に働く分子間力について検討しなければならない。

引用文献

- (1) SLATTERY, C.W. and EVARD, R. : *Biochim. Biophys. Acta*, 317, 529 (1973).
- (2) MCKENZIE, H.A., RALSTON, G.B. and SHAW, D.C. : *Biochemistry*, 11, 4539 (1972).
- (3) ZITTLE, C.A., THOMPSON, M.P., CUSTER, J.H. and CERBULIS, J. : *J. Dairy Sci.*, 45, 807 (1962).
- (4) 土井裕司, 井出野祥次, 伊吹文男, 金森正雄: 栄食誌, 34, 565 (1981).
- (5) DOI, H., IDENO, S., IBUKI, F. and KANAMORI, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 47, 407 (1983).
- (6) SINGH, H. and FOX, P.F. : *J. Dairy Res.*, 54, 509 (1987).
- (7) HAQUE, Z. and KINSELLA, J.E. : *J. Dairy Res.*, 55, 67 (1988).
- (8) NOH, B., RICHARDSON, T. and CREAMER, L.K. : *J. Food Sci.*, 54, 889 (1989).
- (9) McLEAN, D.M. and SCHAAR, J. : *J. Dairy Res.*, 56, 297 (1989).
- (10) REDDY, I.M. and KINSELLA, J.E. : *J. Agric. Food Chem.*, 38, 50 (1990).
- (11) ENGVALL, E. and PERLMAN, P. : *Immunochemistry*, 8, 871 (1971).
- (12) ZITTLE, C.A., CERBULIS, J., PEPPER, L. and DELIAMONICA, E.S. : *J. Dairy Sci.*, 42, 1897 (1959).
- (13) ZITTLE, C.A. and CUSTER, J.H. : *J. Dairy Sci.*, 46, 1183 (1963).
- (14) ASCHAFFENBURG, R. and DREWRY, J. : *Biochem. J.*, 65, 273 (1957).
- (15) LAEMMLI, U.K. : *Nature*, 227, 680 (1970).
- (16) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).

(1991年11月30日受理)