

## 9748 大豆タンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用とカルシウム吸収促進作用

助成研究者：村本 光二 (東北大学 大学院農学研究科)

共同研究者：小川 智久 (東北大学 大学院農学研究科)

永沼 孝子 (東北大学 大学院農学研究科)

摂食時のカルシウム吸収率を増加させるには小腸下部の受動輸送を高める必要があるといわれている。カゼインフォスホペプチド(CPP)はカルシウムの小腸からの吸収率を増すことが知られているが、これはCPPのリン酸化セリン残基がカルシウム塩の沈殿形成を防ぎ受動輸送を促進するためと理解されている。本研究では、大豆タンパク質に35%も含まれる酸性アミノ酸及びそのアミド体に着目し、カルシウム塩結晶化に対する強い阻害作用をもつ分解物を、バイオリクターによる限定分解と脱アミド化反応によって大豆タンパク質から作り出すことを目的とした。

酸沈殿分離大豆タンパク質を5種類のプロテアーゼで加水分解し、各分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用をpH自動滴定装置を用いて測定した。大豆タンパク質のままでは阻害作用は小さく、プロテアーゼの種類によって差があるものの、酵素分解時間の増加によって作用が増強し、分解を続けると阻害作用が減少した。この結果から、ペプチドのカルシウム塩結晶化阻害作用には、プロテアーゼの基質特異性に基づく構造的要因が強く影響していることが明らかになった。

大豆タンパク質のプロテアーゼMの1時間分解物と、カゼインのトリプシン分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用を比較したところ、後者は10倍以上強い作用を示した。しかし、大豆タンパク質分解物をグルタミナーゼで処理して経時的にグルタミン酸の増加量と阻害作用の変化を調べたところ、グルタミン酸の増加にともないカルシウム塩結晶化阻害作用が4倍以上に強化された。また、食塩には単独では全く阻害作用はみられなかったが、0.1%大豆タンパク質分解物に添加すると、その濃度に比例して阻害作用が増強した。

7週齢のWistar系雄ラットを1群5匹として4群に分け、それぞれ大豆タンパク質食、大豆タンパク質とその分解物の混合食、及び大豆タンパク質分解物食を与え、食餌中のカルシウム量と糞中に排泄されたカルシウム量を原子吸光分析法により定量し、カルシウムの吸収率を求めた。大豆タンパク質100%の群でカルシウムの吸収率が最も高く、次いで大豆タンパク質とその分解物を1:1に混合して与えた群のカルシウム吸収率がコントロール食(全卵粉)群よりも有意に高値を示した。しかし、今回調製した大豆タンパク質分解物100%群では試験開始前後でカルシウムの吸収に有意な差はみられなかった。



## 9748 大豆タンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用とカルシウム吸収促進作用

助成研究者：村本 光二 (東北大学 大学院農学研究科)  
共同研究者：小川 智久 (東北大学 大学院農学研究科)  
永沼 孝子 (東北大学 大学院農学研究科)

### 1. 研究目的

わが国では国民のカルシウム摂取量が栄養所要量に達しておらず、カルシウム不足による問題が指摘されている。カルシウムの腸管吸収には小腸上部の能動輸送と下部の受動輸送があるが、食事摂取時のカルシウム吸収率を向上させるには受動輸送における吸収率を増加させる必要があるといわれている。カゼインフォスホペプチド(CPP)はカルシウムの小腸からの吸収率を高めることが知られているが、これはCPPのリン酸化セリン残基がカルシウム塩の沈殿形成を防ぎ受動輸送を高めるためと理解されている(1)。

一方、筆者らがカルシウム結合性レクチンのカルシウム塩結晶化阻害作用を調べたところ、リン酸化セリン残基が存在しない場合でも酸性アミノ酸が適切に配置されていれば結晶化阻害作用をもつことが分かった(2)。また、重要なタンパク資源である大豆タンパク質がカルシウムやマグネシウムイオンと結合して沈殿することは昔から知られ、豆腐の製造に利用されてきたが、大豆タンパク質分解物とカルシウムイオンとの相互作用についての知見は少ない。そこで本研究では、大豆タンパク質に35%も含まれる酸性アミノ酸及びそのアミド態に着目、カルシウム塩結晶化に対する強い阻害作用をもつ分解物を、バイオリクターによる限定分解と脱アミド化反応によって大豆タンパク質から作り出すこと、及び実験動物を使ってその分解物のカルシウム吸収促進作用を確認することを目的にした。

### 2. 研究方法

#### 2.1. 大豆タンパク質の酵素分解

酸沈殿分離大豆タンパク質2gを蒸留水100mLに懸濁し、次の5種類のタンパク質分解酵素(天野製薬)で15分から4時間攪拌しながら加水分解した(S/E=100/1)(3)。プロテアーゼM(分解条件(以下同): *Aspergillus oryzae*, pH3.0, 50°C), プロテアーゼN(*Bacillus subtilis*, pH7.0, 55°C), プロテアーゼP(*Aspergillus melleus*, pH8.0, 45°C), プロテアーゼS(*Bacillus sp.*, pH8.0, 70°C), ペプシン(ブタ胃, pH2.0,

37℃)。酵素分解液を20mLずつ分取し、3分間煮沸処理して酵素を失活させた。分解液のpHを7に調整した後、凍結乾燥した。

比較のために、牛乳カゼイン2gを50mM炭酸水素アンモニウム100mLに懸濁、トリプシン(S/E=100/1)で37℃、24時間加水分解した後、可溶画分を凍結乾燥して用いた。

## 2.2. 酵素分解物の組成分析

大豆タンパク質分解物をアクチナーゼE(科研製薬)およびペプチダーゼR(天野製薬)で徹底分解後、ダブシルクロライドによるプレカラムラベル法でアミノ酸組成分析を行った(4)。分解物の分子量分布を、6M尿素を含む50 mM トリス塩酸緩衝液(pH7.5)で平衡化したSuperdex 75 HR10/30(Pharmacia, 10x300mm)を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで測定した。

## 2.3. カルシウム塩結晶化阻害作用の測定

pH自動滴定装置(東亜電波工業)を用い、以下の手順でカルシウム塩結晶化阻害作用を測定した(Fig. 1)(2)。反応セルに40mM塩化カルシウム水溶液1.0mL, 蒸留水1.2mL, 試料液1.0mLを加え、37℃で10分間攪拌した。これに、37℃に加温しておいた0.4mMの炭酸水素ナトリウム水溶液0.8mを加え入れ(全量4.0mL), 同時にpHスタットを作動させた。反応セルを循環恒温水で37℃に保持して60分間の反応を追跡した。カルシウム塩の結晶化にともないH+が放出されてpHが低下するので、0.1M NaOHを滴下してpHを8.5に保持した。この時、コントロールにおける炭酸カルシウムの結晶生成量が最大となったときの0.1M NaOH消費量の1/2量に相当するまでの時間を誘導時間と定め、誘導時間の長さから阻害活性の強さを比較した。

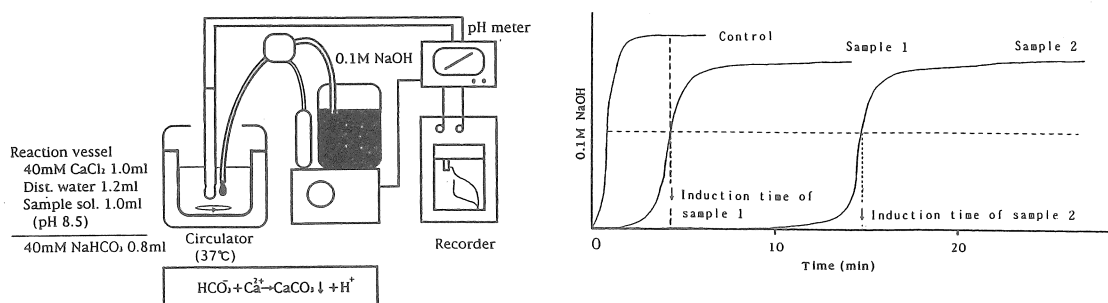


Fig.1 Inhibition test for calcium carbonate crystallization by using a pH stat meter.

## 2.4. グルタミンの脱アミド化

大豆タンパク質分解物の3%水溶液にグルタミナーゼ(天野製薬)(S/E=50/1)を加え

てpH7, 50℃で反応させ、ペプチド中のグルタミンをグルタミン酸に変換した。

## 2.5. 回転膜型バイオリアクターによる分解

回転限外濾過膜装置 (Membrex社) に排除限界50kDaの膜カートリッジ (膜面積400cm<sup>2</sup>) を装着して、大豆タンパク質を酵素分解した (5)。透過流速1.5~2.0mL/minで得られた透過液と循環液を採取し、それぞれを凍結乾燥してカルシウム塩結晶化阻害作用を測定した。

## 2.6. ラットにおけるカルシウム吸収促進作用

分離大豆タンパク質フジプロR, 及びそのプロテアーゼM1時間加水分解物を実験試料として用いた。タンパク質源が食餌中の14%となるように設定した。予備飼育用食餌, コントロール食として全卵粉末を用い, 試験食としては大豆タンパク質100%, 大豆タンパク質/酵素分解物=50/50, 大豆タンパク質分解物100%となるように調整したものを用いた。その他の食餌組成は, AIN-93M飼料組成に準拠して調製した。また試験食にはメチオニンを食餌中の0.3%になるように添加した。

7週齢のWistar系雄ラットを1群5匹として4群に分け, コントロール食を与えて予備飼育を行った。1週間の予備飼育の後, 第2~4群のラットに, それぞれ大豆タンパク質食, 大豆タンパク質とその分解物の混合食, および大豆タンパク質分解物食を与え, 第1群にはそのままコントロール食を継続して与えた。食餌中のカルシウム量と糞中に排泄されたカルシウム量を原子吸光分析法により定量し, カルシウムの吸収率を求めた。

## 3. 研究結果

大豆タンパク質を各プロテアーゼで1時間酵素分解し, ゲル濾過クロマトグラフィーで分子量分布を調べた (Fig. 2)。プロテアーゼ M, N, P, S 分解物では18kDa前後に2つの溶出ピークがみられ, 互いに異なる分子量のペプチドの生成が観察された。またペプシン分解物では13~18kDaに溶出ピークがみられた。これらの分解物の0.1%濃度におけるカルシウム塩結晶化阻害作用を比較したところ, プロテアーゼMで1時間分解したものに最も強いカルシウム塩結晶化阻害作用がみられた (Fig. 3)。大豆タンパク質のままでは阻害作用は小さく, プロテアーゼによって差があるものの, 酵素分解の時間増加によって作用が増強し, さらに分解を続けると阻害作用が減少した。また, どの酵素分解物でも濃度の増加にともない阻害作用が増強した (Fig. 4)。これらの結果から, ペプチドのカルシウム塩結晶化阻害作用には, プロテアーゼの基質特異性に基づく構造的要因が強く影響していることが明らかに

なった。

大豆タンパク質のプロテアーゼ M1時間分解物と、カゼインのトリプシン分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用を比較したところ、後者は数10倍以上強い作用を示した(Fig. 5)。両分解物には、共存によるカルシウム塩結晶化阻害作用への影響はみられなかった。ところが、代表的な食品成分である食塩、しょ糖、そして有機酸を共存させるとカルシウム塩結晶化阻害作用の大きな増加が観察された。食塩には単独では全くカルシウム塩結晶化阻害作用はみられなかったが、0.1%大豆タンパク質分解物に食塩を添加すると量に応じて阻害作用が増強した。

大豆タンパク質には数10%のグルタミンが含まれることが知られており、これをグルタミン酸に変換することができれば、カルシウム塩結晶化阻害作用を増強することが期待された。そこで大豆タンパク質のプロテアーゼM分解物をグルタミナーゼで処理して経時的にグルタミン酸の増加量と阻害作用の変化を調べた。2時間までは処理時間に比例してグルタミン酸の濃度は増加し、それにともないカルシウム塩結晶化阻害作用が強まった(Fig. 6)。1時間処理で阻害作用は2.5倍に増強、処理時間を4時間にすることによってさらに2倍程度の増強を観察した。

回転膜型バイオリアクターを用いた大豆タンパク質の酵素分解では、プロテアーゼMによる連続処理で13kDa~18kDaに分子量分布をもつカルシウム塩結晶化阻害作用を持つ大豆タンパク質分解物の効率的生成が可能であった。

4群に分けたラットの1日当たりの食餌摂取量は16~17gであり、体重増加量とともに群間に顕著な差は認められなかった(Fig. 7)。給餌試験開始後3~5日目では、大豆タンパク質100%を与えた群でコントロール食群に対して高いカルシウムの吸収率がみられた(Fig. 8)。10~12日目においても大豆タンパク質100%の群でカルシウムの吸収率が最も高く、次いで大豆タンパク質とその分解物を1:1に混合して与えた群のカルシウム吸収率がコントロール食群よりも有意に高値を示した。しかし、今回調製した大豆タンパク質分解物100%群では試験開始前後でカルシウムの吸収に有意な差はみられなかった。

#### 4. 考察および今後の課題

牛乳や乳製品を摂取したときのカルシウムの吸収率や生体利用性は良好であることが広く知られており、これには小腸管腔表面のカルシウム濃度勾配の上昇に働く乳糖やカゼインの分解で生じたCPPが寄与していると考えられている。有力な食品タンパク質である大豆タンパク質およびCPPと同サイズの大豆タンパク質由来のペプチドにはCPP様の作用はないとする報告(1)がある一方、豆乳に含まれるペプチドには小腸からのカルシウム吸収促進作用と骨密度の増加に効果をもつものがあるとも報

告(6)されており、カルシウムの生体利用性における大豆タンパク質の評価は定まっていな。本研究では、大豆タンパク質には酸性アミノ酸が約30%含まれること、そして、その大部分はアミド態で存在していること、さらに酸性アミノ酸を多く含むタンパク質やペプチドにはCPPと同様なカルシウム塩結晶化阻害作用がみられるという知見に基づき、大豆タンパク質の酵素分解物をカルシウム吸収促進作用の観点から検討した。

大豆タンパク質の酵素分解に用いたプロテアーゼの種類および分解時間により、カルシウム塩結晶化阻害作用の強さが変化したことから、カルシウムとの相互作用には酸性アミノ酸を含むペプチドの構造が重要な要因であることが明らかになった。また、グルタミンナーゼ処理によるグルタミンからグルタミン酸残基への変換によって阻害作用の増強が可能であり、さらに食塩などの食品関連成分が阻害作用を強めるという新たな知見を併せて考慮すると、大豆タンパク質ペプチドが小腸管内でCPPと同様にカルシウム塩の沈殿を妨げ、カルシウムの腸管からの受動輸送を高めることは十分に期待できる。ラットを使ったカルシウム吸収率の測定では、グルタミンナーゼ処理および共存物質の効果を検討しておらず、今後、この点について研究を進める計画である。

## 5. 文献

- (1) R. Sato, T. Noguchi and H. Naito (1986) Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 32, 67-76.
- (2) K. Muramoto, H. Yako, K. Murakami, S. Odo and H. Kamiya (1994) Inhibition of the growth of calcium carbonate crystals by multiple lectins in the coelomic fluid of the acorn barnacle *Megabalanus rosa*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B, 401-409.
- (3) H.-M. Chen, K. Muramoto and F. Yamauchi (1995) Structural analysis of antioxidative peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 574-578.
- (4) K. Muramoto and H. Kamiya (1990) Recovery of tryptophan in peptides and proteins by high-temperature and short-term acid hydrolysis in the presence of phenol, *Anal. Biochem.*, 189, 223-230.
- (5) Y. Zhang, K. Muramoto and F. Yamauchi (1996) Hydrolysis of soybean proteins by a vortex flow filtration membrane reactor with *Aspergillus oryzae* proteases, *J. Food Sci.*, 61, 928-931.
- (6) N. Omi, S. Aoi, K. Murata and I. Ezawa (1994) Evaluation of the effect of soybean milk and soybean milk peptide on bone metabolism in the rat model with ovariectomized osteoporosis, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 40, 201-211.

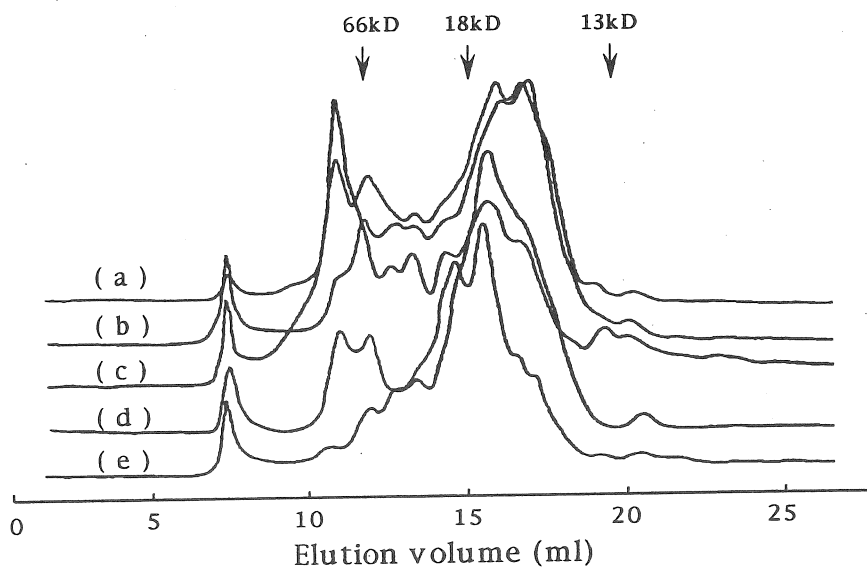


Fig.2 High-performance gel filtration chromatograms of soybean protein hydrolysates on Superdex 75 (1x30cm) eluted with 5M urea in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5). (a) Protease M; (b) protease N; (c) protease P; (d) protease S; (e) pepsin.

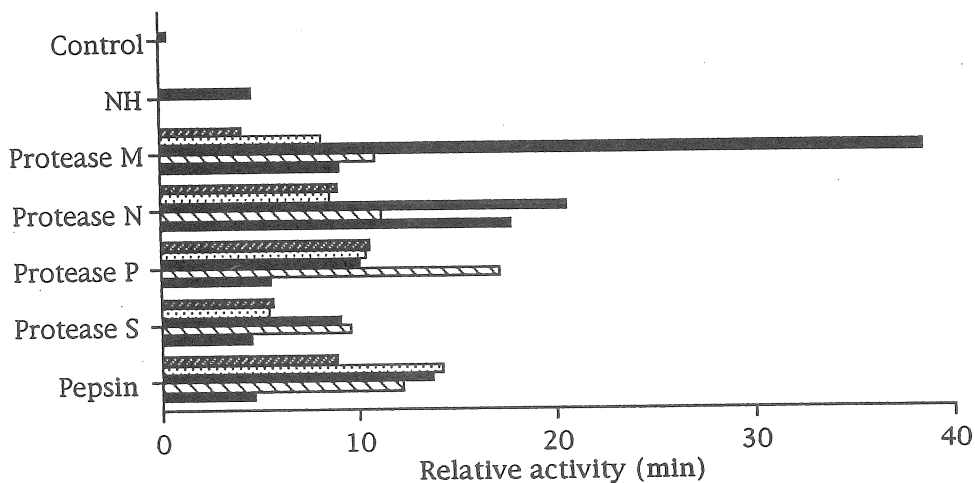


Fig.3 Inhibition of calcium carbonate crystallization by soybean protein hydrolysates prepared with various kinds of proteases. The concentration of the hydrolysates was 0.1%.

Hydrolysis time :15min (▨), 30min (▩), 1h (■), 2h (□), 4h (◻). NH: not hydrolyzed soybean protein.



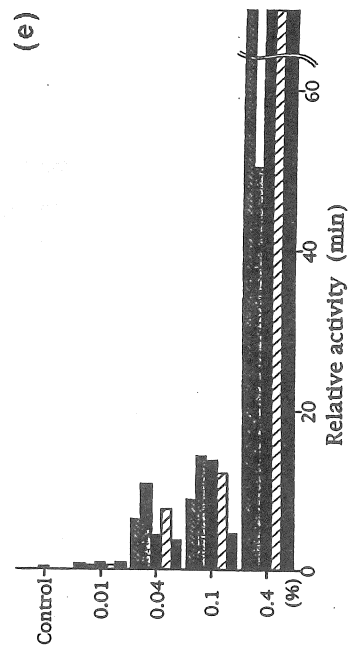
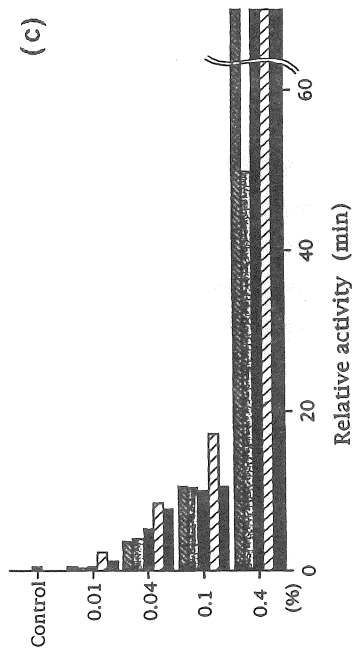
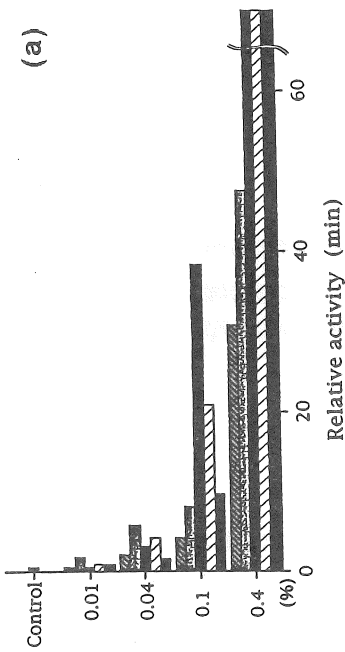
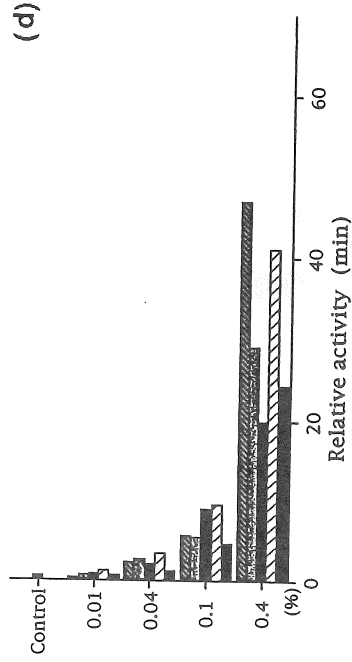
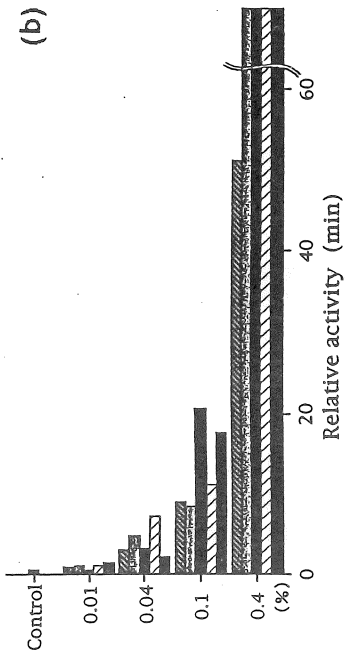


Fig.4 Effects of the concentration and the hydrolysis time on the inhibition of calcium carbonate crystallization by soybean protein hydrolysates. (a) Protease M; (b) protease N; (c) protease P; (d) protease S; (e) pepsin. Hydrolysis time: ■ 15min; □ 30min; ■ 1h; □ 2h; ■ 4h.

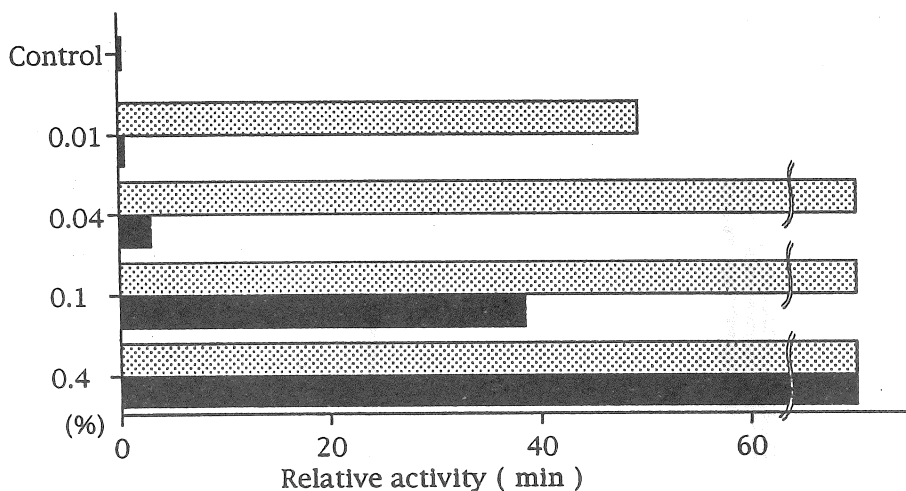


Fig.5 Inhibition of calcium carbonate crystallization by various concentrations of soybean protein hydrolysates obtained from protease M digestion and milk casein hydrolysate obtained from trypsin digestion.

▨ : milk casein hydrolysate ; ■ : soybean protein hydrolysate

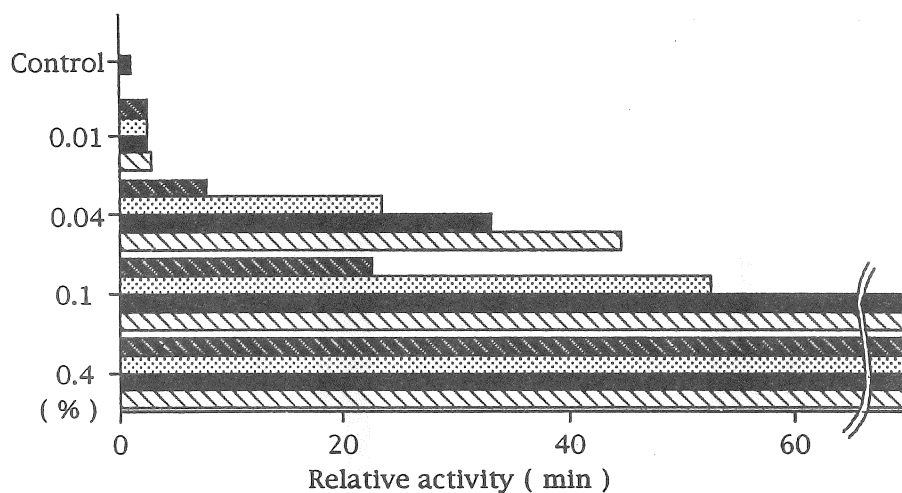


Fig.6 Inhibition of calcium carbonate crystallization by various concentrations of soybean protein hydrolysates treated with glutaminase for different periods.

■ : 0 ; ▨ : 1h ; ■ : 2h ; ▨ : 4h

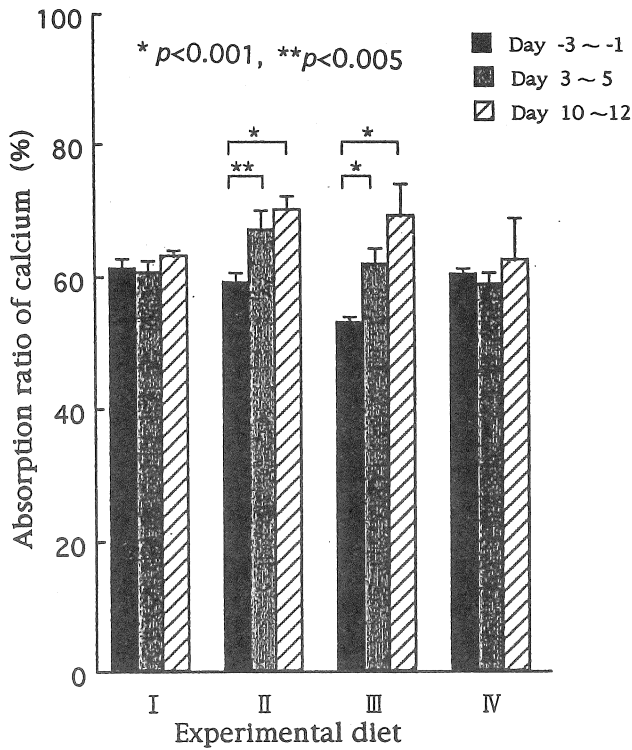


Fig.7 The rate of the intestinal calcium absorption. Values are mean  $\pm$  SE of five rats. I: Control diet; II: soybean protein diet; III: soybean protein/ soybean protein hydrolysate mix. diet; IV: soybean protein hydrolysate diet.

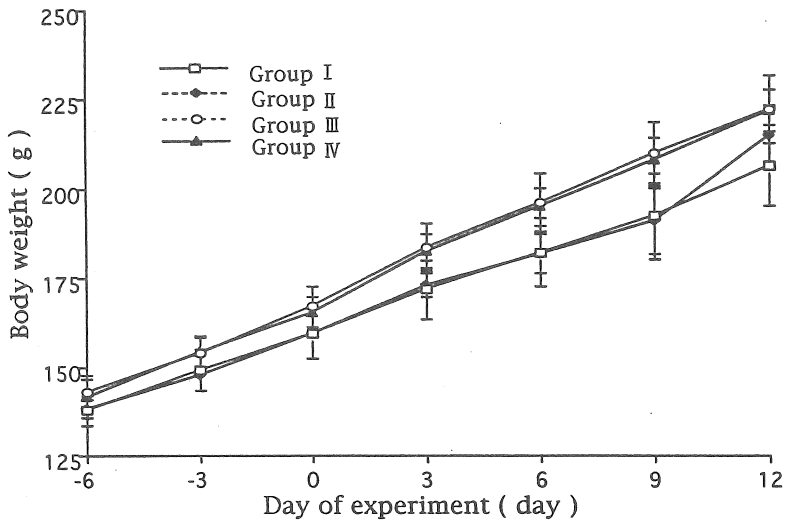


Fig.8 Body weights of rats fed on experimental diets.

No. 9748

## Inhibition of calcium carbonate crystallization by soybean protein hydrolysate and its promotion effect on calcium absorption

Koji Muramoto, Tomohisa Ogawa and Takako Naganuma

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

### Summary

Many investigations into mineral bioavailability are concerned with improving the dietary supply of minerals. Casein phosphopeptide (CPP) is known to enhance the passive calcium absorption from the small intestine by inhibiting the precipitation of calcium phosphate and increasing the concentration of soluble calcium. We found that acidic peptides could also inhibit the crystal growth of supersaturated calcium carbonate solution. In this study, we hydrolyzed soybean protein, in which Glu/Gln and Asp/Asn comprise 35% of total amino acid residues, using several proteases and investigated the inhibitory activity of the hydrolysates on the crystal growth. Each hydrolysates showed different strength of the activity, suggesting the key role of the structure of peptides for the activity. The potency of a soybean protein hydrolysate was less than one tenth of that of a tryptic digest of casein, however, it increased over four fold by treating the soybean protein hydrolysate with glutaminase. The magnitude corresponded to the conversion rate of Gln residues to Glu residues. Furthermore, the potency increased by the addition of sodium chloride into the reaction mixture.

We examined the absorption rate of calcium in wister rats by feeding four different diets; egg proteins as a control diet, soybean protein, soybean protein/ hydrolysate mixture and soybean protein hydrolysate. Soybean protein diet and soybean protein/ hydrolysate mixture diet improved the absorption rate compared with the control diet. On the other hand, soybean protein hydrolysate alone did not change the absorption rate under this experimental condition.