

## 9854 食品タンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用に対する食塩の増強効果

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)

カルシウムの生体での利用を考える場合、食品中のカルシウム含有量や摂取量だけでなく、吸収効率を考慮する必要がある。そのための方策の一つが、腸管でのカルシウム塩の沈殿形成を防ぎ腸管での受動輸送を高めることである。本研究では、昨年度の大豆タンパク質に加えて、米糠タンパク質、小麦グルテン、卵白アルブミンから調製した各種プロテアーゼ分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用、ならびに阻害作用に対する食塩、クエン酸および糖の増強効果を調べた。さらにタンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害の機構についても検討した。

タンパク質を各種プロテアーゼで1時間から24時間加水分解し、0.125%における炭酸カルシウム結晶化阻害作用を調べた。いずれのタンパク質も大豆タンパク質のときと同様に、未分解物は弱い作用しか持っておらず、加水分解によって阻害作用が増強し、さらに長時間の加水分解では作用の強さが弱まった。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。

食品タンパク質分解物にラクトースやクエン酸を共存させると阻害作用が増強した。ラクトースのみでは阻害作用が全くなく、また、ラクトースを構成するガラクトースおよびグルコースには増強作用がまったくみられなかった。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、0.025%大豆タンパク質分解物または0.125%卵白アルブミン分解物に食塩を添加すると0.5%以上で大きく阻害作用が増強した。食塩とラクトースには阻害の相乗作用は認められなかった。

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。グルタミナーゼ処理によって脱アミド化率が増加し、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。グルタミナーゼ処理したタンパク質分解物の阻害活性は、ペプシンで消化してもわずかしき低下せず、ペプチドの脱アミド化によりペプシン耐性が向上したと判断される。

タンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用の機構を解析するために、阻害作用測定において分解物の添加実験を行ったところ、タンパク質の分解物はカルシウム塩の結晶核の生成だけでなく結晶の成長を妨げていることが明らかになった。



## 9 8 5 4 食品タンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用に対する食塩の増強効果

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

カルシウムの生体での利用を考える場合、食品中のカルシウム含有量や摂取量だけでなく、吸収効率を考慮する必要がある。牛乳カゼインを酵素消化して生成す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ぐことによって腸管での受動輸送を高めるためと理解されている(1)。大豆に含まれる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。昨年度の研究では、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、バイオリア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とともに、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調べた。

本研究ではこれまでの研究結果を基に、米糠タンパク質、小麦グルテン、卵白アルブミンから調製した各種プロテアーゼ分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用、ならびに阻害作用に対する食塩、クエン酸および糖の増強効果を調べた。さらにタンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害の機構についても検討した。

### 2. 研究方法

#### 2.1. タンパク質の酵素分解

小麦グルテンと卵白アルブミンは市販品を使用した。米糠タンパク質は、脱脂米糠(ササニシキ)の0.1 M NaOH抽出液を、等電点沈殿後、沈殿物を蒸留水とエタノールで抽出洗浄して調製した。それぞれのタンパク質2gを蒸留水100mLに懸濁し、各種プロテアーゼ(天野製薬)の至適条件で1, 2, 4, 8, 24時間攪拌しながら加水分解した(S/E=100/1)(2)。プロテアーゼM(分解条件(以下同): *Aspergillus oryzae*, pH3.0, 50℃), プロテアーゼN(*Bacillus subtilis*, pH7.0, 55℃), プロテアーゼP(*Aspergillus melleus*, pH8.0, 70℃), プロテアーゼS(*Bacillus sp.*, pH8.0, 45℃), アルカリプロテアーゼ(*Bacillus subtilis*, pH10.0, 55℃), スミチームLP50(*Aspergillus oryzae*, pH6.0, 50℃), 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。

## 2.2. 酵素分解物の組成分析

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(3)。加水分解にともなう増加するアミノ基をオルトフタルアルデヒド法(4)で測定し、加水分解率を求めた。

## 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(5)。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<sup>+</sup>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。

## 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。変換率は、グルタミナーゼ処理で生じた遊離アンモニア量をコンウエーの微量拡散法で定量して計算した。

## 3. 研究結果

タンパク質を各プロテアーゼで1時間から24時間加水分解し、0.125%における炭酸カルシウム結晶化阻害作用を調べた(Fig. 1)。いずれのタンパク質も大豆タンパク質のときと同様に、未分解物は弱い作用しか持っておらず、加水分解によって阻害作用が増強した。4種類のプロテアーゼで調製した米糠タンパク質分解物では、プロテアーゼNの8時間分解物とペプシンの2時間分解物が最も強い作用を示した。卵白アルブミンでは、プロテアーゼNとM, およびスミチームの分解物が強い作用を持っていた。小麦グルテンにおいては、パパイン分解物が最も強い作用を示した。これらの作用は、加水分解時間の増加によって変化し、多くの場合、長時間の加水分解で

作用の強さが弱まった。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。また、これらのタンパク質分解物は、炭酸カルシウムだけでなくリン酸カルシウムの結晶化も阻害した。

食品タンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用に対する共存物質の影響を調べた。まず0.025%大豆タンパク質分解物に4種類の糖を加えて阻害作用の変化をみたところ、0.25%以上でラクトースは阻害作用を増強した(Fig. 2)。ラクトースのみでは阻害作用が全くなく、また、ラクトースを構成するガラクトースおよびグルコースは増強作用を持たなかった。ラクトースは卵白アルブミン分解物に対しても同様な効果を示した。クエン酸は金属イオンとのキレート形成作用を持っており、高濃度ではカルシウム塩の結晶化をわずかに阻害した。しかし、低濃度でもタンパク質分解物が共存すると濃度依存的に結晶化阻害の増強が観察された(Fig. 3)。

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、0.025%大豆タンパク質分解物または0.125%卵白アルブミン分解物に食塩を添加すると0.5%以上で阻害作用が大きく増強した(Fig. 3)。阻害作用の増強に効果があった食塩とラクトースを同時にタンパク質分解物に加えて相乗作用の有無を判定した。大豆タンパク質分解物が0.0125%以下ではいずれの組み合わせでも顕著な阻害作用はみられなかった(Fig. 4)。0.025%では食塩とラクトースは阻害作用を増強したが、両者には相乗作用は認められなかった。

タンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用は、ペプチドに含まれるグルタミン酸またはアスパラギン酸とカルシウムとの相互作用によるものと考えられるが、ペプチドにはそれらのアミド態も多く含まれる。そこでこれらのアミド基をグルタミナーゼで加水分解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。30分のグルタミナーゼ処理によって脱アミド化率が4%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. 5)。2時間の処理で脱アミド化率は一定になったが、処理時間を4時間にすることによって最大5倍程度の増強を観察した。グルタミナーゼ処理前後のタンパク質分解物の阻害作用に対するペプシン消化(E/S=1/100, 37°C)の影響を測定した(Fig. 6)。グルタミナーゼ処理したタンパク質分解物の阻害活性は、ペプシンで消化してもわずかしこ低下せず、ペプチドのグルタミン酸含有量が増加することによりペプシンの作用を受け難くなったと判断される。

タンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用の機構を解析するために、阻害作用測定において分解物の添加実験を行った(Fig. 7)。炭酸カルシウムの過飽和溶液を放置するとカルシウム塩が析出し、pHが低下するので自動滴定装置で0.1M NaOHを

滴下してpHを8.5に維持する。従って、カルシウム塩の結晶化阻害があれば0.1M NaOHの滴下量の減少が観察される。実際、大豆タンパク質分解物を0.0125%加えると(b)や(d)のように0.1M NaOHの滴下量が減少した。そこで(c)や(e)のように結晶化が開始した状態で、0.125%になるように加水分解物を添加すると、それ以上の結晶化が完全に阻害された。添加量が少量の場合には、引き続き結晶化がみられた(d)。これらの結果から、タンパク質の分解物はカルシウム塩の結晶核の生成だけでなく結晶の成長を妨げていることが明らかになった。

#### 4. 考察および今後の課題

本研究では、昨年度の大豆タンパク質に引き続き、小麦グルテン、米糠タンパク質、卵白アルブミンの酵素分解物を調製し、炭酸カルシウムの結晶化に対する阻害作用とその機構、ならびに共存物質の影響を調べた。これらのタンパク質のいずれにおいても、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を再確認した。しかし、50%以上のグルタミン酸とグルタミンを含む小麦グルテンがとくに強い阻害作用を示す結果をまだ得てはならず、酸性アミノ酸の立体構造における配置が非常に重要であると推測され、今後検討する必要がある。

タンパク質分解物の阻害作用が食塩などによって増強された知見は、カルシウムの腸管からの吸収効率を向上させる上で重要である。食塩やラクトースはペプチドを介してカルシウム塩の結晶化を阻害すると考えられ、現在、動物実験による実証を計画している。また、阻害作用を増強する目的で行ったグルタミナーゼ処理により、タンパク質分解物がペプシン耐性を獲得したことは、経口投与において有利に働くことが予想できる。

阻害作用測定における添加実験によって、タンパク質分解物がカルシウム塩の結晶核の生成だけでなく、成長も阻害していることが分かった。今後、走査型電子顕微鏡を使った生成結晶の観察により、これらの結果を確認すると共に、結晶構造への影響を検討する必要がある。

#### 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) 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.

- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) 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.

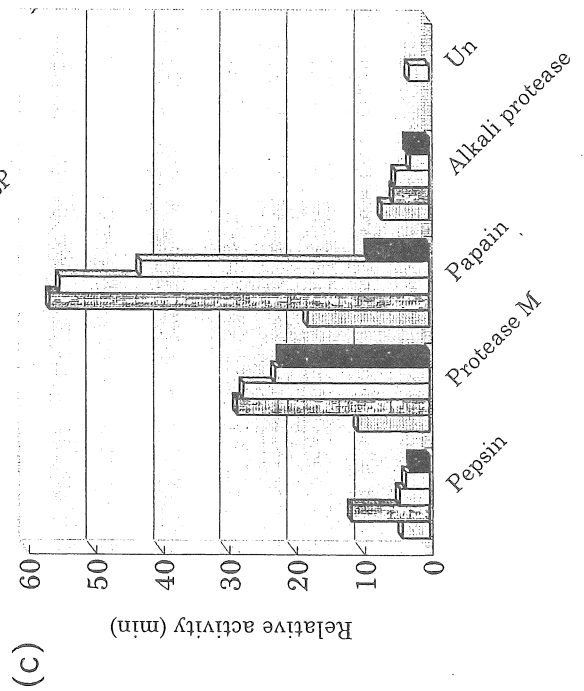
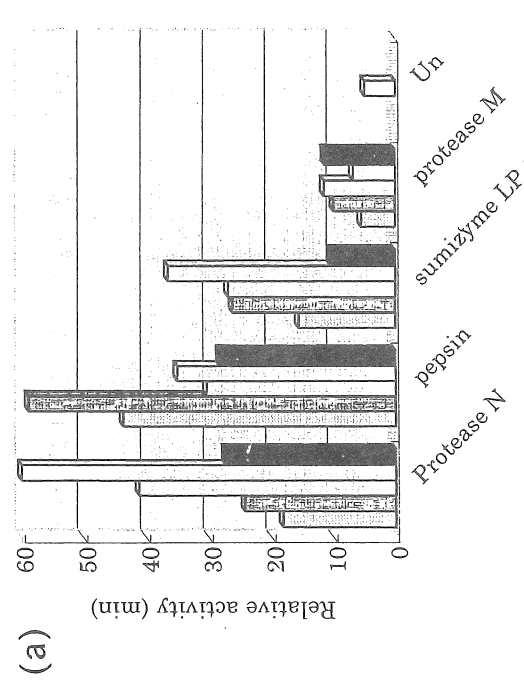
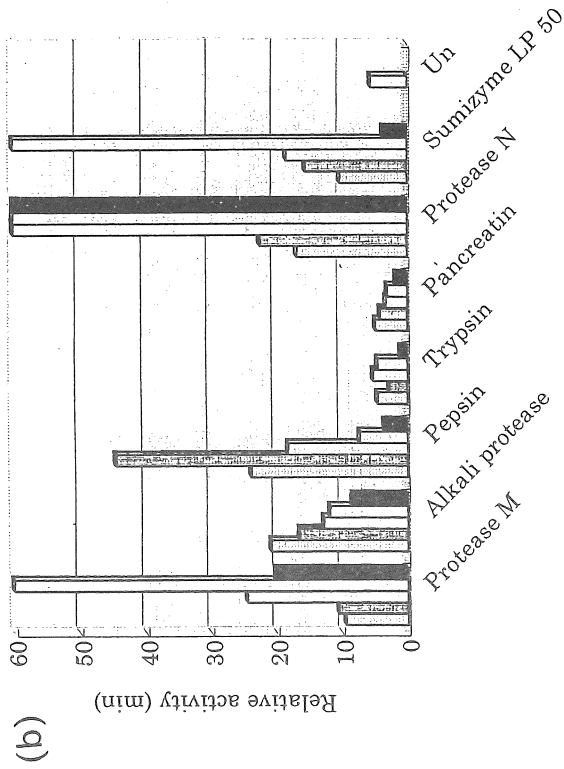


Fig.1 Inhibition of calcium carbonate crystallization by protein hydrolysates. Rice bran protein (a), egg white albumin (b) and wheat gluten (c) were hydrolyzed with various kinds of proteases for 1~24 h (left to right bars).  
Un: Unhydrolyzed proteins.



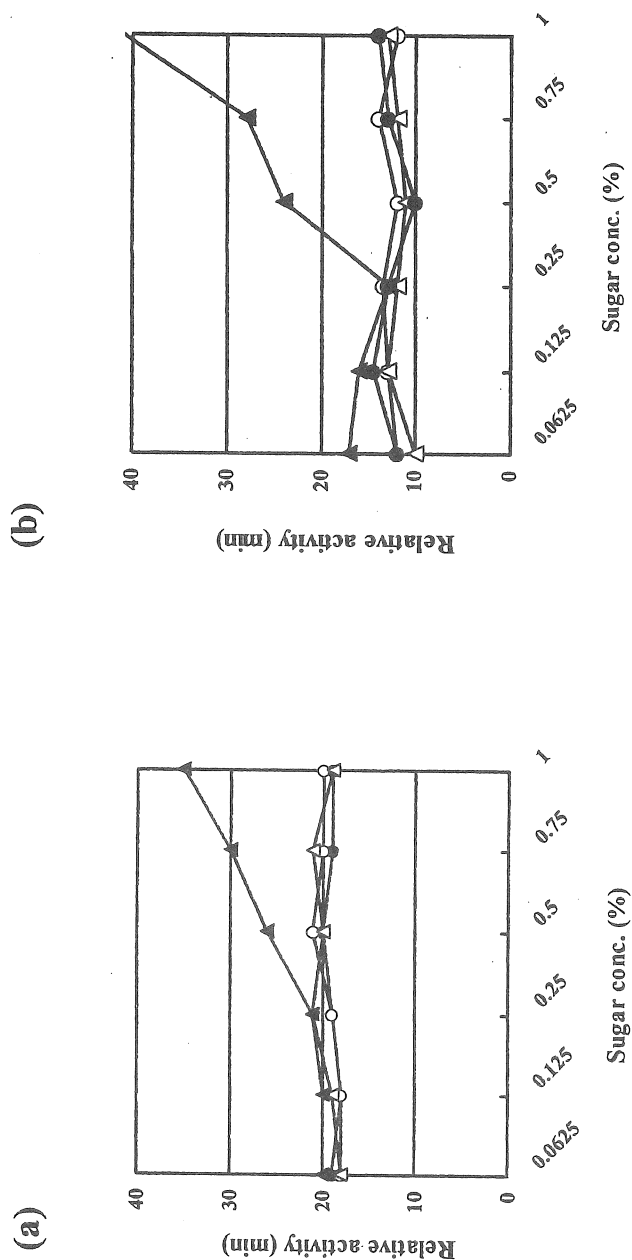


Fig. 2 Effects of sugars on the inhibitory activities of (a) soybean protein (final conc.: 0.025%) and (b) egg-white albumin (0.125%) hydrolysates against the calcium carbonate crystallization.  
 ○: Galactose, ●: sucrose, △: glucose, ▲: lactose.

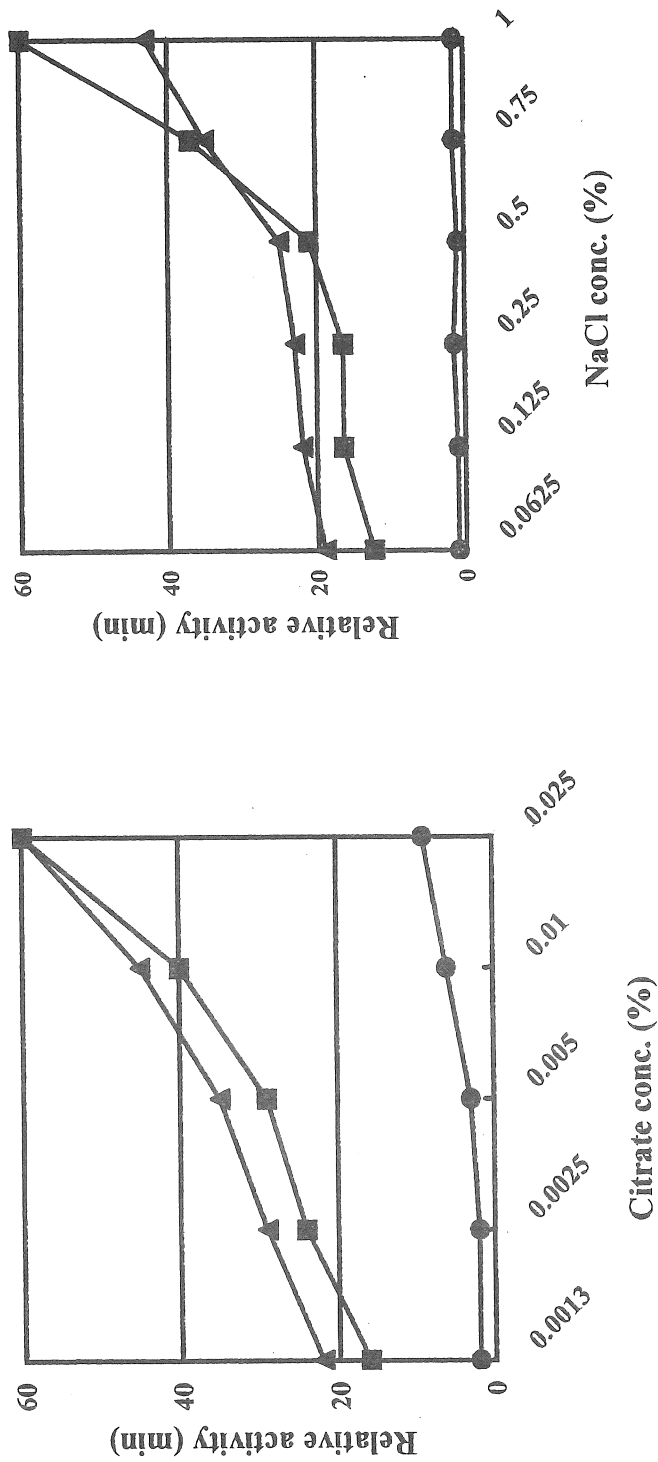


Fig. 3 Effects of citrate and NaCl on the inhibitory activities of soybean protein (final conc.: 0.025%) (▲) and egg-white albumin (0.125%) (■) hydrolysates against the calcium carbonate crystallization. ●: Citrate or NaCl alone.

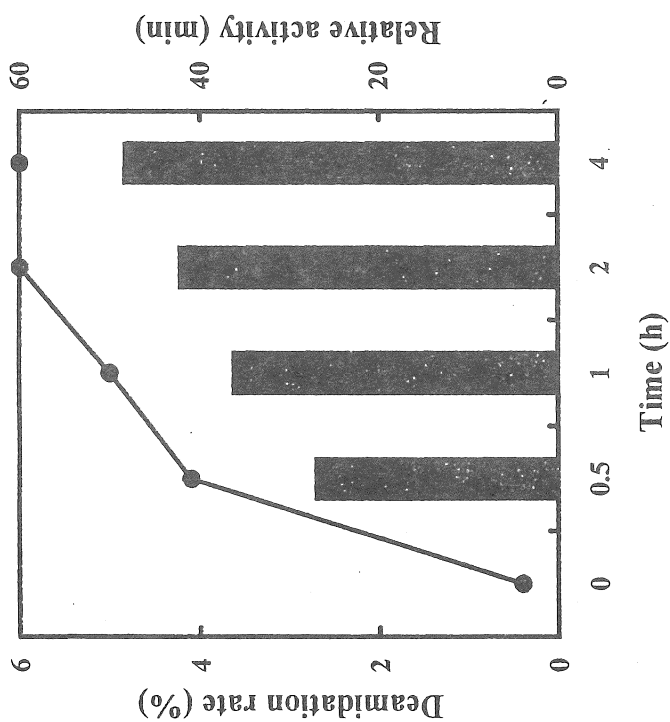


Fig. 5 Effect of deamidation of soybean protein hydrolysates on the inhibitory activity against the calcium carbonate crystallization. The hydrolysate (2%) was treated with glutaminase (E/S=1/50, pH7.0, 50°C) for indicated periods. The hydrolysate concentration was adjusted to 0.005%. ■: Deamidationrate, ●: relative activity.

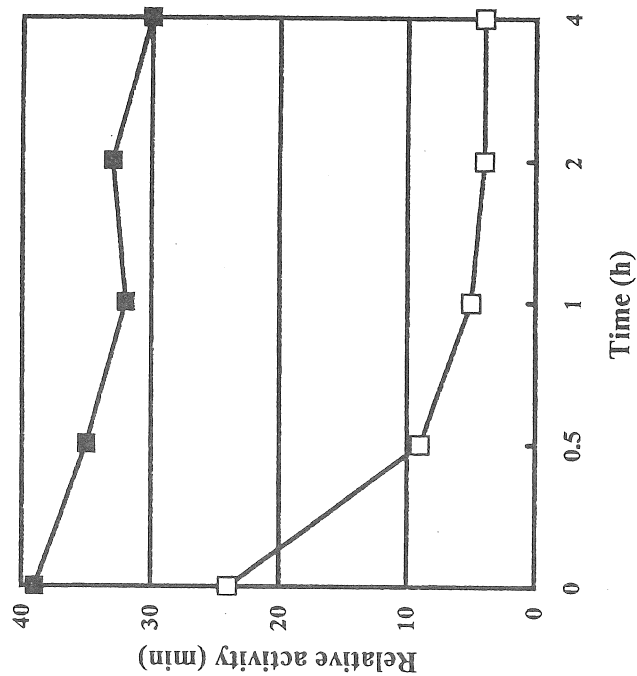


Fig. 6 Effect of peptic digestion on the inhibitory activity of soybean protein hydrolysate with or without glutaminase treatment. ■: Soybean protein hydrolysate (0.005%) with glutaminase treatment, □: soybean protein hydrolysate (0.025%) without glutaminase treatment.

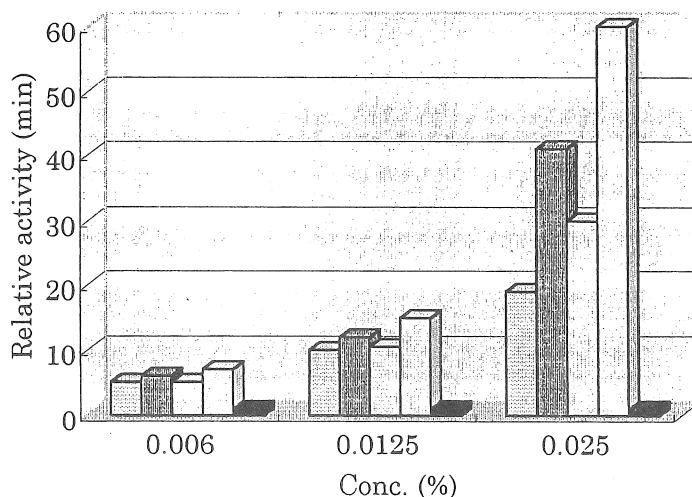


Fig. 4 Effects of NaCl and lactose on the inhibitory activities of soybean protein hydrolysate against the calcium carbonate crystallization. The hydrolysate was prepared by protease M and assayed at various concentrations as indicated. NaCl and/or lactose were added to the assay mixtures to a final concentration of 0.5%. □: Soybean protein hydrolysate alone, ▒: hydrolysate + NaCl, □: hydrolysate + lactose, □: hydrolysate + NaCl + lactose, ■: NaCl + lactose.

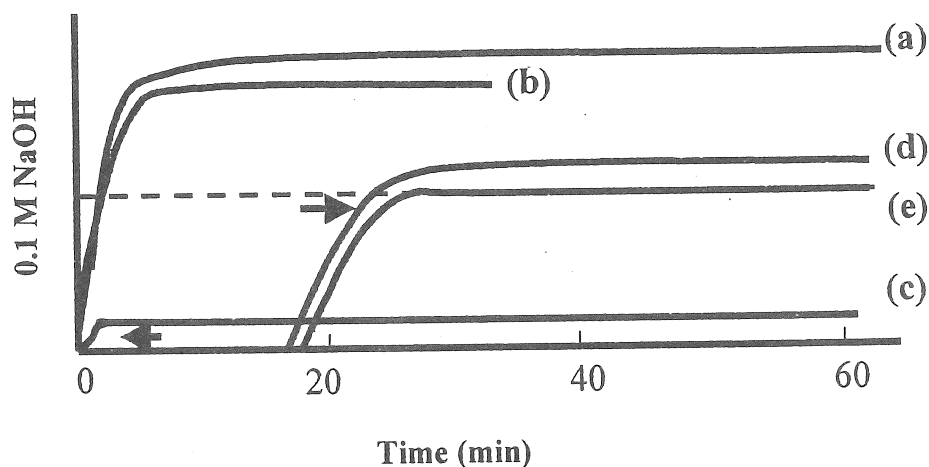


Fig. 7 Effect of the addition of soybean protein hydrolysate to the reaction mixture on the calcium carbonate crystallization. (a) No hydrolysate, (b) 0.0125% hydrolysate, (c) 0% + 0.125% hydrolysate, (d) 0.025% + 0.0125% hydrolysate, (e) 0.025% + 0.125% hydrolysate.

## Enhancement of the inhibitory activity of food protein hydrolysates by sodium chloride on calcium carbonate crystallization

Koji Muramoto, Tomohisa Ogawa and Takako Naganuma

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

### Summary

Some acidic peptides have been shown to improve the passive calcium absorption from the small intestine by inhibiting the precipitation of calcium salts and increasing the concentration of soluble calcium. In this study, we hydrolyzed soybean protein, wheat gluten, rice bran protein and egg white albumin, under different conditions with various proteases, and investigated their inhibitory activities of the hydrolysates on the crystal growth of calcium carbonate. Each hydrolysate showed different strength of the activity, suggesting the key role of the structure of peptides for the activity. The activities increased by treating the protein hydrolysates with glutaminase accompanying an increase of the resistance against peptic digestion.

The inhibitory activities of protein hydrolysates on the calcium carbonate crystallization were enhanced by the addition of lactose or citrate into the reaction mixtures. Although sodium chloride itself had no effect on the inhibitory activity, the activity increased in the presence of protein hydrolysates by increasing the concentration of sodium chloride over 0.5%. Sodium chloride and lactose were not synergistic in the activity.

The molecular interactions, which take place at the interface between peptide molecules and calcium ions on the crystal surface, must be important for the inhibition of crystal growth. A direct effect of peptides was demonstrated by suppressing the pH decrease by the addition of protein hydrolysates after the nucleation had started and crystal growth was in progress.