

リンタンパク質およびホスホペプチドの食品機能

青木孝良 (鹿児島大学農学部助教授)

1. はじめに

カルシウムは日本人に不足している唯一の栄養素であり、カルシウム不足は子供や妊婦、閉経後の高齢女性では重大な問題になっている。この問題解決のためにはカルシウムの摂取量を増すことは勿論であるが、カルシウムの吸収を良くする必要がある。

牛乳中のカルシウムは他の食品に比べてその吸収性が優れていることが知られているが、牛乳中には溶解度以上のカルシウムと無機リン酸が含まれており、これらはカゼインに結合してカゼインミセルの構成成分として存在している^{1,2)}。このリン酸カルシウムはカゼインのリン酸基に結合して、カゼイン成分間に分子間架橋を形成している^{3,4)}。即ち、牛乳中ではカルシウムと無機リン酸はカゼインのリン酸基に結合して、カゼインによって可溶化されている。牛乳を摂取したときには消化管内で生ずるホスホペプチドがリン酸カルシウムの沈殿ができるのを阻止し、カルシウム濃度を高め、カルシウムの吸収を促進するものと考えられている⁵⁾。したがって、カゼイン以外のリンタンパク質やリン酸化を施したタンパク質の中にもカルシウム吸収促進効果を期待できる。一方、同じリンタンパク質でも卵黄ホスビチンはカゼインの10倍以上の約10%のリンを含んでいるが、カルシウムの吸収をむしろ阻害する。これは、タンパク質の構造やリン含量の違いによるものと思われるが、詳細は不明である。

そこで、本研究では、卵白リポフラビン結合タンパク質 (RfBP)、化学的リン酸化牛血清アルブ

ミン (BSA)、部分的に脱リンした卵黄ホスビチンについて、まずカルシウムの吸収と密接に関係すると思われるリン酸カルシウムの可溶性および沈殿阻止作用、リン酸カルシウムによる架橋形成性を調べた。次いで、動物実験でカルシウム吸収促進作用を調べ、ホスホペプチドの小腸上皮細胞増殖活性について検討した。

2. 実験方法

RfBP は日高と松岡の方法⁶⁾で調製した。化学的リン酸化 BSA は、オキシ塩化リン : BSA のモル比を 1 : 3000 として Hirotsuka らの方法で行なった⁷⁾。得られたリン酸化 BSA のリン含量は 1.44% であった。ホスビチンの脱リンは馬鈴薯酸性ホスファターゼおよびアルカリ処理により行なった。得られた脱リンホスビチンのリン含量はそれぞれ 3.14% および 2.27% であった。ホスホペプチドは、RfBP と β -カゼインにはトリプシンを作用させた後 Manson ら⁸⁾の方法で調製した。また、ホスビチンにはアクチナーゼを作用させた後、セファデックス G-25 のカラムで分離した。

リン酸カルシウムの可溶性のための試料調製は、最終リンタンパク質濃度が 2% になるように人工カゼインミセルの調製法⁹⁾に従って行なった。飽和リン酸カルシウムからのリン酸カルシウム沈殿阻止作用は Hay らの方法¹⁰⁾で行なった。リン酸カルシウムによるリンタンパク質の分子間架橋形成は、TSK-GEL G3000SW カラム、溶離液として人工乳清を用いて高速液体ゲルクロマトグラフィ (GPC) 法¹¹⁾で調べた。

カルシウムの吸収実験は 27 週齢の Wister 系雄

ラットを用いて行なった。まず7日間のミールフィーディング後、タンパク質の異なる飼料を1.5時間与え、ネブタール麻酔下で開腹し、腸管を取り出し、回腸部の合流点から12cmと20cmのところでは結紮し、⁴⁵Caを0.2m/l注入した。注入1時間後、結紮した腸管を切り取って、生理食塩水3mlで内容物を試験管に洗い流し、放射能を測定し、カルシウムの吸収率を求めた。また、カルシウムの吸収率はポリエチレングリコール(PGE)を消化インデックスとした方法でも求めた。即ち、腸管内容物と飼料中のカルシウム量と、消化率のインデックスとして入れたPGE量とを測定し、カルシウムの吸収率を求めた。腸管内のカルシウムの溶解度は腸管内容物を遠心分離して、上清の放射能を測定して求めた。

ホスホペプチドの細胞増殖活性はラット小腸上皮株細胞(IEC-18, 大日本製薬)を用いて行なった。

3. 結果および考察

RfBPは鶏卵白タンパク質中に約1%含まれ、219個のアミノ酸から構成され、分子中にSS結合が9個存在する¹²⁾(Fig. 1)。C端側に α_{s1} -カゼインと同数の8個のリン酸基を有している。 α_{s1} -カゼインのリン酸基も極在しているが、そのリン酸基は46番目から115番目までの比較的広い範囲に亘っている。RfBPのリン酸基は187番目から197番目までの11残基の中に極在していて、カゼインのリン酸基よりさらに極在している。アスパラギン酸とグルタミン酸が合わせて55残基もあり、極めて酸性のタンパク質である。RfBPは自己会合性を示さないし、カルシウムイオンの存在下でも会合しないで、リン酸カルシウムとの相互作用を調べるのにも適している。

カルシウムとリン酸を含む溶液を混合するとリン酸カルシウムの沈殿が生成する。しかし、RfBPが2%存在していると、牛乳中とほぼ同じ濃度の30mMカルシウム、22mM無機リン酸、10mMクエン酸溶液中でもリン酸カルシウムの沈殿は全く生成せず、RfBPにはリン酸カルシウム可溶化能

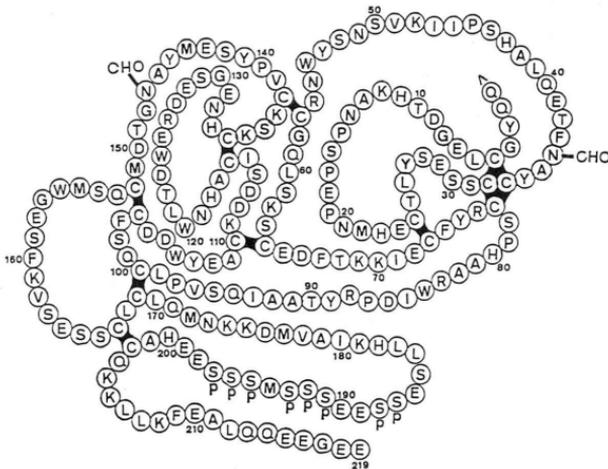


Fig. 1 Covalent structure of hen egg-white ribofavin-binding protein (RfBP). <Q represents pyroglutamate residues; CHO, carbohydrate chains; P, phosphate groups.

Table 1 Effect of various phosphoproteins on the precipitation of calcium phosphate.

Sample		Precipitated calcium phosphate							
Ca (mM)	Pi (mM)	No protein		RfBP		OVA		Chemically phosphorylated BSA	
		Ca (mM)	Pi (mM)	Ca (mM)	Pi (mM)	Ca (mM)	Pi (mM)	Ca (mM)	Pi (mM)
20	17	14.4	9.5	0	0	13.0	8.1	0	0
30	22	24.5	15.7	0	0	24.7	15.0	0	0

The protein concentration was 2% and all samples contained 10 mM citrate.

RfBP: riboflavin-binding protein; BAS: bovine serum albumin; OVA: ovalbumin;

Pi: inorganic phosphate.

があることが分かった (Table 1)。RfBPを脱リンすると沈殿が生じ、リン酸カルシウムの可溶性は全く失われた。オボアルブミンも1分子中に2個のリン酸基を持っているがリン酸カルシウムの可溶性はほとんど示さなかった。リン酸カルシウムの可溶性を発現するためには1分子中2個程度のリン酸基では効果がなく、相当数のリン酸基が必要であることが示唆された。リン酸基を全く持たないBSAも化学的にリン酸化し、リン含量をカゼイン以上にするとリン酸カルシウムを可溶化した (Table 1)。一方、酵素あるいはアルカリ処理により脱リンした卵黄ホスピチンにはリン酸カルシウムの可溶性が認められなかった。

リン酸カルシウムに関して飽和の溶液を静置するとリン酸カルシウムが沈殿してくる (Fig. 2)。これに0.05%のRfBPを添加すると、リン酸カルシウムの沈殿生成が阻止された。これを同じ濃度のカゼインの場合と比較すると24時間後の沈殿阻止作用はRfBPの方が優れていた。また、化学的リン酸化BSAにもリン酸カルシウム沈殿阻止が認められたが (Fig. 2)、脱リンホスピチンには阻止効果が認められなかった。

可溶化されたリン酸カルシウムによるリントンパク質の架橋形成を高速液体ゲルクロマトグラフィ (GPC) で調べた。RfBP溶液にカルシウム、無機リン酸およびクエン酸を添加して、溶離液とし

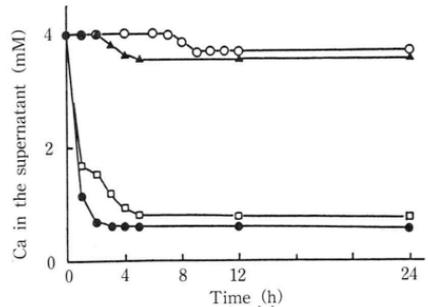


Fig. 2 Inhibition of the spontaneous precipitation of calcium phosphate. The assay system contained 4 mM calcium, 10 mM phosphate, 40 mM KCl and 3 mM sodium azide at pH 6.7. Inhibition was measured at a concentration of 0.05% phosphoprotein. (●), no protein; (○), RfBP; (▲), chemically phosphorylated bovine serum albumin; (□), Enzymatically dephosphorylated phosphitin.

て人工乳清を用いてGPCを行なうと、架橋会合体の形成が認められた¹¹⁾ (Fig. 3 a-c)。RfBPを脱リンすると架橋は形成されなくなったことから (Fig. 3d)、RfBPもリン酸基を介して架橋が形成されることが確認された。架橋会合体の形成は超遠心沈降分析でも確認された。RfBPはカゼインに比べて低濃度のカルシウムと無機リン酸で形成された¹³⁾ (Fig. 4)。架橋会合体の重合度を調べるために、グルセルアルデヒドで架橋したRfBPを

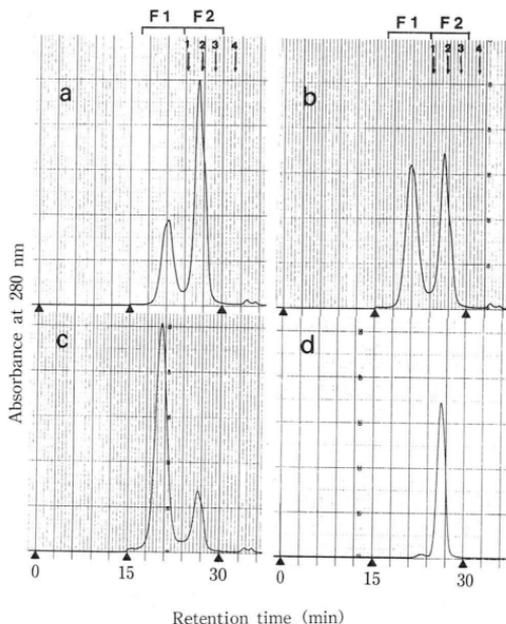


Fig. 3 High performance gel chromatographic patterns of RfBP and dephosphorylated RfBP solutions containing calcium (Ca), phosphate (Pi) and citrate. Column, TSK-GEL G3000SW column; flow rate, 0.7 ml/min; effluent, simulated milk ultrafiltrate. All samples contained 10 mM citrate. (a), RfBP (12 mM Ca, 13 mM Pi); (b), RfBP (14 mM Ca, 14 mM Pi); (c), RfBP (18 mM Ca, 16 mM Pi); (d), dephosphorylated RfBP (Ca 20 mM, Pi 17 mM). Arrows show the elution of marker proteins: (1), bovine serum albumin (67,000); (2), ovalbumin (43,000); (3), β -lactoglobulin (18,000); α -lactalbumin (14,400).

調製した。これを SDS 電気泳動にかけ分子量の推定を行なったところ、RfBP 単量体の分子量は 35,000、グリセルアルデヒドで架橋された RfBP の分子量は 74,000 で、2 量体が形成されたことが分かった。この RfBP 2 量体とリン酸カルシウムで架橋された RfBP の GPC の溶出位置が一致したので、RfBP はリン酸カルシウムによりまず 2 量体が形成されるものと考えられた。RfBP 1 モルに結合したカルシウムと無機リン酸のモル数

は Table 2 に示す通りである。カルシウムは直接 RfBP 分子に結合するものとリン酸カルシウムとして結合するものがあるので、無機リン酸に注目した。RfBP に結合した無機リン酸がすべて架橋形成会合体画分に含まれるものとして、その結合量を算出してみると、RfBP 1 分子当たり最小 3 個程度で 2 量体が形成されることになる。カゼインミセルにおいてカゼインを架橋しているリン酸カルシウムについてこれまでにいくつかのモデ

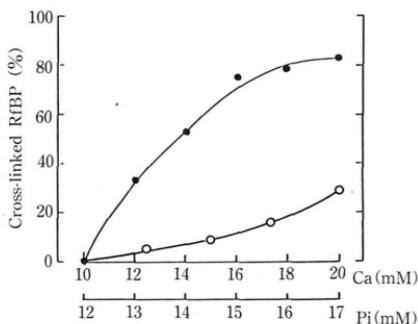


Fig. 4 Changes in the contents of RfBP and casein cross-linked by calcium phosphate by addition of calcium and phosphate. (●), RfBP; (○), casein;

ルが提案されているが、本実験結果はイオンクラスターモデル⁵⁾を支持している。化学的リン酸化BSAについても分子間架橋形成を調べたところ架橋形成は確認されたが、副反応によると思われる

Table 2 Amounts of calcium and Pi bound to RfBP

Sample		Bound Ca	Bound Pi
Ca (mM)	Pi (mM)	(mole/more RfBP)	(mole/mole RfBP)
10	12	4.2	0.5
12	13	6.3	1.2
14	14	7.7	1.5
16	15	8.8	2.5
18	16	11.8	4.1
20	17	14.7	5.0

Table 3 Calcium absorption and solubilized calcium in the small intestine in the rats fed selected protein source.

Diet	⁴⁵ Ca absorption (Ligated loop method) (%)	Ca absorption (PEG method) (%)	Soluble Ca (%)
<Experiment 1>			
Soy protein	45.0 ± 12.2	45.1 ± 26.7 ^a	43.2 ± 8.7 ^a
Casein	58.5 ± 8.3	76.5 ± 23.7 ^b	72.7 ± 8.0 ^b
<Experiment 2>			
Soy protein	48.4 ± 6.4	62.4 ± 16.6 ^b	52.0 ± 3.4 ^a
RfBP	51.0 ± 13.5	81.5 ± 7.7 ^b	84.7 ± 4.2 ^b

Each value represents the mean ± SE for 6 rats. Means with different superscripts in a column are significantly different from each other (P < 0.05).

る重合や分解が起きていて、架橋形成の定量的な取り扱いにはできなかった。

カゼイン同様にリン酸カルシウムの可溶化、沈殿阻止能および分子間架橋形成性の認められたRfBPについて、そのカルシウム吸収促進作用をラットを使って調べた。Table 3に示すように、RfBPやカゼインを食べさせたときには、小腸における可溶化カルシウムの割合は大豆タンパク質に比べて有意に高かった。また、PEGをインデックスとしたカルシウムの吸収率もRfBPおよびカゼイン摂取群で有意に高かった。しかし、結紮ループ法における⁴⁵Ca吸収率からみると有意差はなかった。内藤らは結紮ループ法でカゼイン摂取群の方が大豆タンパク質摂取群よりカルシウムの吸収率が有意に高いと報告している¹⁴⁾。本実験においてカゼイン摂取群においても結紮ループ法では有意差が認められなかったため、この点については更に検討する必要がある。

リンタンパク質由来のホスホペプチドの小腸上皮細胞の増殖に及ぼす影響をラット小腸上皮細胞株細胞(IEC-18)を使って調べた。血清添加培地および無血清培地両方においてβ-カゼイン、RfBPおよびホスピチン由来ペプチドの細胞増殖効果は認められなかった。

本研究に対して、多大な研究助成を賜った浦上

食品・食文化振興財団に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) 青木孝良：酪農科学・食品の研究，**35**，A-316(1986)。
- 2) 青木孝良：乳技協資料，**41**，27 (1991)。
- 3) 青木孝良：酪農科学・食品の研究，**41**，A-181(1992)。
- 4) T. Aoki: Interactions of Food proteins, ed by N. Paris and R. Barford, American Chemical Society, Washington, DC, 991.
- 5) 内藤博：栄養誌，**39**，433 (1986)。
- 6) 日高義雄，松岡芳隆：農化，**51**，40 (1977)。
- 7) M. Hirotsuka, H. Taniguchi, H. Narita and M. Kito: *Agric. Biol. Chem.*, **48**，93 (1984)。
- 8) W. Manson and W.D. Annan: *Arch. Biochem. Biophys.*, **45**，16 (1971)。
- 9) T. Aoki, A. Kawahara and Y. Kako: *Agric. Biol. Chem.*, **51**，817 (1987)。
- 10) D.I. Hay, E.C. Moreno and D.H. Schlesinger: *Inorg. Perspect. Biol. Med.*, **2**，27 (1979)。
- 11) T. Aoki, Y. Yamao, E. Yonemasu, Y. Kumasaki and Y. Kako: *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**，242 (1993)。
- 12) Y. Hamazume, T. Mega and T. Ikenaka, *J. Biochem.*, **101**，217 (1987)。
- 13) T. Aoki: *J. Dairy Res.*, **56**，613 (1989)。
- 14) Y.S. Lee, T. Noguchi and H. Naito, *Agric. Biol. Chem.*, **43**，2009 (1979)。

Food functions of phosphoproteins and phosphopeptides

Takayoshi Aoki (Department of Biochemical Science and Technology,
Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

Since egg white riboflavin-binding protein (RfBP) has 8 phosphate groups, interactions with calcium phosphate were examined. When calcium, phosphate and citrate were added to RfBP solution, no precipitate was formed and cross-linked RfBP appeared in high performance gel chromatography which was carried out using simulated milk ultrafiltrate as the eluent. RfBP inhibited the precipitation of calcium phosphate from the solution supersaturated with respect to dicalcium phosphate. Bovine serum albumin phosphorylated by phosphorous oxychloride also inhibited the precipitation of calcium phosphate. However, dephosphorylated phosvitin did not inhibit the precipitation of calcium phosphate. When rats were fed the diet containing 20% RfBP, calcium and phosphate were solubilized in the small intestine and calcium absorption from small intestine, which was measured using polyethylene glycol as an absorption index, was higher than when rats were fed soy protein. Almost no effects of phosphopeptides from RfBP, casein and phosvitin on the growth of small intestine epithelial cells were observed.