

大豆の組成各たん白質のCa²⁺ およびκ-カゼインとの相互作用

INTERACTIONS OF SOYBEAN PROTEINS WITH
CALCIUM ION AND κ-CASEIN

金森正雄・土井裕司（京都府立大学農学部）

Masao KANAMORI and Hiroshi DOI

Department of Agricultural Chemistry, Kyoto Prefectural University
Kyoto 606

ABSTRACT

Proteins were extracted with 35 mM potassium phosphate buffer, pH 7.6, containing 0.4 M NaCl (Buffer C) from defatted soybean flour. Extracted proteins were fractionated on a Sephacryl S-200 column with Buffer C to RSP-I, II, III, IV, V and VI. The result of sedimentation experiment suggested that RSP-I, II and IV corresponded to 11 S, 7 S and 2 S proteins, respectively. In fact, RSP-IV had a trypsin inhibitory activity. Precipitation of each fraction by heat treatment and/or calcium ion in the absence and presence of κ-casein was examined. RSP-I, IV, V and VI were heat stable fractions. Sixty-five% of RSP-II were precipitated by heating at 100 °C for 20 min, while the presence of κ-casein suppressed the precipitation of RSP-II by heating and only 25.3% of RSP-II were precipitated. In any case, calcium ion precipitated about 50% of each fraction. Heat treatment of protein fractions in prior to the addition of calcium ion made more precipitates. When κ-casein was present in soybean protein solutions, the formation of precipitates by the addition of calcium ion decreased. Precipitation of soybean proteins by the addition of calcium ion after heat treatment in the presence of κ-casein was lower than that in the absence of κ-casein. RSP-I, II and IV formed complexes with κ-casein by heat treatment. Those protein fractions contained two types of subunits. One formed the complex with κ-casein without heat treatment and the other did complex by heating.

本研究は各種の機能特性を持ったたん白質である大豆たん白質各成分たん白質と動物性たん白質である牛乳κ-カゼインとの相互作用について検討したものである。たん白質相互反応を検討することにより、これに関与する要因について興味ある知見が得られ、それによって食品化学的にはたん白質食品の品質改良および合理的利用、さらには、新しい機能特性をもった食品たん白質素材の開発が可能になるものと考えられるので実験を企画した。

材料と方法

1. 抽出大豆たん白質画分の調製

試料大豆としてたん白質含量41%の1980年淡路島産の玉錦を用いた。試料大豆を粉碎後エーテルで20時間脱脂した後、0.4M NaClを含む35mM リン酸カリ緩衝液 pH7.6 (以下 Buffer C) を用いて、4 °C、72時間たん白質を抽出した。抽出液は28,000rpm、1時間遠沈し、その上澄はSephacryl S-200カラムにより分画した。その結果、6つの画分が得られ、溶出順に RSP-

I, RSP-II, RSP-III, RSP-IV, RSP-V, RSP-VIとした¹⁾。

2. 牛乳 κ -カゼインの調製

牛乳 κ -カゼインは著者ら²⁾により改良された尿素硫酸法の改良法によって新鮮乳から調製した。

3. 抽出大豆たん白質画分の加熱による沈殿性

2.5mgの抽出大豆たん白質画分を1.0mlの70 mM KClを含む10mM イミダゾール塩酸緩衝液 (pH 7.1)(以下 St buffer)に溶解し, 80または100°Cで20分間加熱した後, 2,000rpm, 10分間遠心した。元のたん白質含量に対する上澄中のたん白質含量の比率を, 280 nmでの吸光度を測定することにより求めた。

4. 抽出大豆たん白質画分の Ca^{2+} による沈殿性

2.5mgの抽出大豆たん白質画分を0.9mlの St. bufferに溶解し, 37°C, 10分間または80°C, 20分間加熱した後, 200mM CaCl_2 を含む St. bufferを添加して37°C, 30分間インキュベートする。反応液を2,000 rpm, 1分間遠心し, 上澄液を50mM クエン酸カリウム液で希釈した後, 280nmでの吸光度を測定する。対照には CaCl_2 を添加しなかった。

5. κ -カゼイン共存下での加熱による抽出大豆たん白質画分の沈殿性

2.5mgの抽出大豆たん白質画分と1.0mgの κ -カゼインとの混合物を1.0mlの St. bufferに溶解し, 100°C, 20分間加熱し, さらに37°C, 30分間インキュベートした後, 2,000rpm, 1分間遠心した上澄の280nmでの吸光度を測定する。 κ -カゼイン単独ではこの操作で沈殿しないので, 得られた吸光度から κ -カゼインによる分を差し引いて大豆たん白質量を求めた。

6. κ -カゼイン共存下での抽出大豆たん白質画分の Ca^{2+} による沈殿性

2.5mgの抽出大豆たん白質と1.0mgの κ -カゼインと

の混合物を0.9mlの St. bufferに溶解し, 37°C, 20分, または100°C, 20分間加熱した後, 200mM CaCl_2 を含む St. bufferを加え37°C, 30分間インキュベートした。以後の操作は上記4.と同じで, 本実験条件では κ -カゼインは沈殿しないので, その分を差し引いた。

7. 抽出大豆たん白質と κ -カゼインとの複合体形成

抽出大豆たん白質と κ -カゼインの各10mgを7 mlの St. bufferに溶かした。2 mlは2,000rpm, 20分間遠心した後, 4.5Mになるよう尿素を加えて, Sephacryl S-200カラムにアプライする(Sample A)。2 mlは100°C, 20分間加熱した後, 前者と同様遠心, 尿素添加ののち, Sephacryl S-200カラムにアプライする(Sample B)。 κ -カゼインは St. buffer 中では分子量65万ダルトンのポリマーとして存在している²⁾ため, 抽出大豆たん白質と κ -カゼインとの複合体と κ -カゼインポリマーとは St. buffer での溶出では区別できなくなる。従って, κ -カゼインをモノマーで溶出させるため, 4.5M尿素を含む St. bufferを溶出液とした。溶出パターンはアトー製ミニ UVモニター IIで追跡した。

8. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS (Sodiumdodecylsulfate) -ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Weber と Osborn の方法に従って行われた³⁾。サンプルの調製時には2-メルカプトエタノールが共存していた。

結 果

1. 抽出大豆たん白質各画分の沈殿性

RSP-I から RSP-VIを2.5mg / mlの濃度で St. bufferに溶解した後, 80°C, または100°Cに加熱した時の沈殿率を Table 1に示す。RSP-I, IV, V, VIでは, いずれの温度でも沈殿の形成は全く認められな

Table 1. Precipitation of raw soybean proteins by heat treatment at 80 or 100 °C for 40 min

	RSP- I	RSP- II	RSP-III	RSP- IV	RSP- V	RSP- VI
Heating						
80°C	0	48.2	6.2	0	0	0
100°C	0	65.5	15.8	0	0	0

Table 2. Precipitation of raw soybean proteins by the addition of 20 mM CaCl_2 at 37 °C.

	RSP- I	RSP- II	RSP-III	RSP- IV	RSP- V	RSP- VI
Precipitate	48.4	50.9	53.8	49.8	51.8	50.0

Table 3. Precipitation of raw soybean proteins by the addition of 20 mM CaCl_2 after heat treatment at 80 °C for 20 min (g)

	RSP- I	RSP- II	RSP- III	RSP- IV	RSP- V	RSP- VI
Precip-itate	61.8	71.0	59.3	61.0	54.4	49.0

Table 4. Solubilization of raw soybean proteins by heat treatment in the presence of κ -casein (g)

	RSP- I	RSP- II	RSP- III	RSP- IV	RSP- V	RSP- VI
Soybean protein in the super.	100	74.7	100	100	100	100

Table 5. Precipitation of raw soybean proteins by the addition of 20 mM CaCl_2 in the presence of κ -casein at 37°C (g)

	RSP- I	RSP- II	RSP- III	RSP- IV	RSP- V	RSP- VI
Precip-itate	0	17.5	45.4	7.4	6.0	21.1

った。一方、RSP-IIは80°Cで約50%、100°Cでは約66%のたん白質が沈殿し、RSP-IIIもわずかなが加熱により沈殿形成が認められた。

2. 抽出大豆たん白質画分の Ca^{2+} による沈殿性

抽出大豆たん白質溶液に37°Cで Ca^{2+} を添加した時の沈殿率を Table 2 に示した。37°Cで20mM の Ca^{2+} 添加では、いずれの画分も約50%のたん白質が沈殿した。

また、80°C、20分間加熱処理した後、20mM Ca^{2+} 添加した時の沈殿率を Table 3 に示した。RSP-V, VIでは加熱しても Ca^{2+} による沈殿性には変化がなかった。RSP-IIIではごくわずかなが、加熱により沈殿率の上昇が認められた。主要画分である RSP- I, II, IVについては、加熱処理の結果、 Ca^{2+} による沈殿性は10~20%上昇した。RSP- I, IVは加熱処理だけでは沈殿しなかった (Table 1) ことから、この上昇は加熱処理によって Ca^{2+} への感受性が高まったためと考えられる。RSP-IIは加熱のみで約50%が沈殿し、未加熱での Ca^{2+} 添加でも約50%が沈殿した。さらに、加熱 Ca^{2+} 添加では71%が沈殿した。

3. κ -カゼイン共存下での抽出大豆たん白質各画分の加熱による沈殿性

抽出大豆たん白質各画分と κ -カゼインとの重量比

が5:2の混合物を100°Cで加熱した時の大豆たん白質の溶解性を検討した。その結果を Table 4 に示す。RSP- I, IV, V, VIは Table 1 に示すごとく、加熱によっても沈殿を形成しなかった画分であるため、ここでの結果は予想されたものである。他方、RSP- II, IIIについては加熱により沈殿を形成した画分であるが、 κ -カゼインとの共存により、加熱沈殿率が小さくなって、RSP-IIでは65.5%から25.3%へ、RSP-IIIでは15.8%から0%となった。この結果はRSP-IIまたはRSP-IIIと κ -カゼインとの間に複合体が形成されたことを示唆するものである。

4. κ -カゼイン共存下での抽出大豆たん白質各画分の Ca^{2+} による沈殿性

抽出大豆たん白質と κ -カゼインとの重量比が5:2の混合物を37°Cでインキュベートした後、 Ca^{2+} を添加した時の大豆たん白質の沈殿率が Table 5 に示されている。RSP- Iは κ -カゼインが共存していると、 Ca^{2+} を添加しても沈殿を形成しなくなり、RSP-II, III, IV, V, VIについても沈殿率はそれぞれ、17.5%、45.4%、7.4%、6.0%、21.1%であり、RSP-III, VIを除いて沈殿性が極めて乏しくなった。

また、100°Cで加熱した後の Ca^{2+} 添加による沈殿性を検討した。その結果を Table 6 に示す。沈殿率は

Table 6. Precipitation of raw soybean proteins by the addition of 20 mM CaCl_2 after heat treatment at 100 °C for 20 min in the presence of κ -casein (%)

	RSP-I	RSP-II	RSP-III	RSP-IV	RSP-V	RSP-VI
Precipitate of soybean protein	7.2	14.6	55.8	12.6	22.1	48.0

The calculation of the amount of soybean precipitate was carried out postulating that κ -casein did not precipitate by the addition of calcium ion.

7.2～56%で、RSP-I～VIのいずれの画分についても、加熱後 Ca^{2+} 添加時 (Table 3) に比べて、 κ -カゼインの共存により沈殿率は小さくなった。

5. 抽出大豆たん白質と κ -カゼインとの加熱混合物のゲルろ過クロマトグラフィー

Table 1 と Table 4 の結果から、RSP-II および RSP-III には κ -カゼインとの加熱によって複合体を形成する成分の存在することが示唆された。

また、Table 3 と Table 6 の結果からも、加熱時に κ -カゼインを共存させることが、大豆たん白質の Ca^{2+} による沈殿性を低下させるという結果を得た。

そこで、主要画分である RSP-I, II, IV について、 κ -カゼインと重量比 1 : 1 の混合物を作り加熱した

後、Sephacryl S-200 カラムによるゲルろ過を行い、加熱複合体の形成を検討した。

5-a. RSP-I と κ -カゼインとの複合体

RSP-I と κ -カゼインとの混合物の未加熱および加熱物の Sephacryl S-200 ゲルろ過クロマトグラムを Fig. 1 に示す。未加熱混合物のゲルろ過ではボイドボリュームに溶出される I-1 と、少し遅れて I-1 の肩のように溶出される I-2 および κ -カゼインである I-3 の 3 画分が得られた。また、加熱混合物の場合、ボイドボリュームに溶出される I-4 のみのピークが認められた。このことは加熱複合体の形成を示すものである。

Fig. 2 にゲルろ過で得られた各ピークの SDS 電気泳動のデンストメーター図を示した。I-4 は言うに及ばず、I-1, I-2 にも κ -カゼインが含まれており、RSP

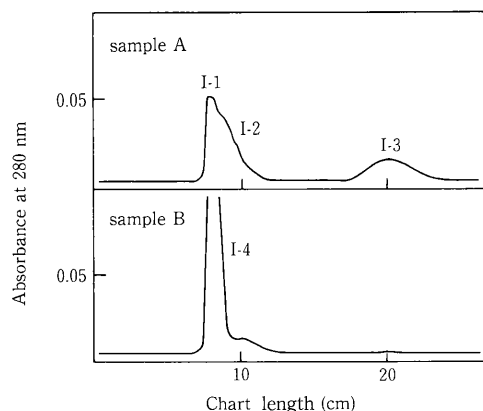


Fig. 1 Sephacryl S-200 gel filtration profiles of the mixtures of RSP-I and κ -casein
Absorbance at 280 nm was determined by an Atto mini UV monitor, model II.

sample: 1.8 ml
column: 1.75 × 130 cm
flow rate: 26 ml/hr
chart speed: 2 cm/hr
eluent: the standard buffer containing 4.5 M urea

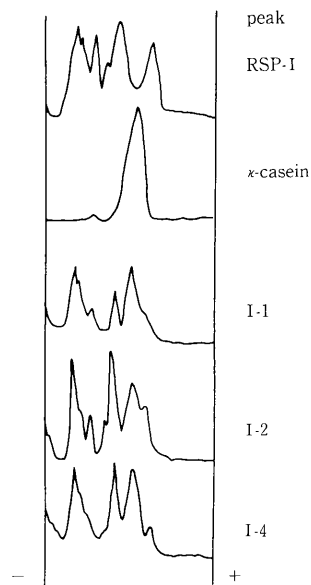


Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoretogram of peaks eluted from Sephacryl S-200 column

-I は常温で κ -カゼインと複合体を形成する成分と、加熱によって κ -カゼインと複合体を形成する成分の両者を含んでいたことがわかった。

5-b. RSP-II と κ -カゼインとの複合体

RSP-I と κ -カゼインとの混合物を処理した場合と全く同じ方法で、RSP-II と κ -カゼインとの混合物についても実験を行った。その結果を Fig. 3 に示した。未加熱混合物の場合には 3 つのピークが加熱によって 1 つのピークとなり、RSP-I と κ -カゼインとの混合物の場合と極めてよく似た結果が得られ、RSP-II と κ -カゼインとの加熱複合体の形成が確認された。

5-c. RSP-IV と κ -カゼインとの複合体

本研究で得られた RSP-IV はトリプシン阻害活性を有する画分であり、本画分が κ -カゼインとの共存によってどのような挙動をとるかは興味深い問題である。

RSP-IV と κ -カゼインとの未加熱混合物のゲル透過では 3 つのピークが得られ、加熱することによって 1 ピークとなった (Fig. 4)。すなわち、前述の RSP-I, II と同様、RSP-IV も未加熱で κ -カゼインと複合体を形成する成分と、加熱によって複合体を形成する成分との両方を含んでいるものと考えられる。このことを確認するため、各ピークの SDS 電気泳動を行った。各ピークの電気泳動図を Fig. 5 に

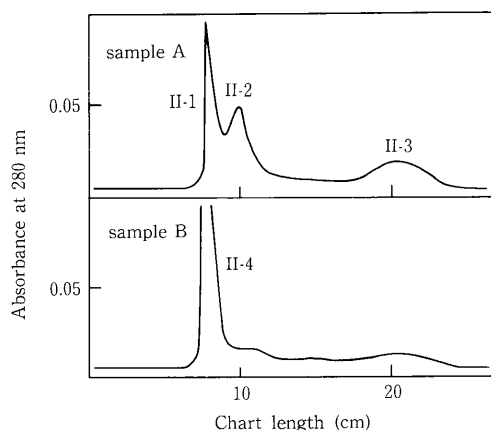


Fig. 3 Sephacryl S-200 gel filtration profiles of mixture of RSP-II and κ -casein

Absorbance at 280 nm was determined by an Atto mini UV monitor, model II.

sample: 1.8 ml
column: 1.75 × 130 cm
flow rate: 26 ml/hr
chart speed: 2 cm/hr
eluent: the standard buffer containing 4.5 M urea

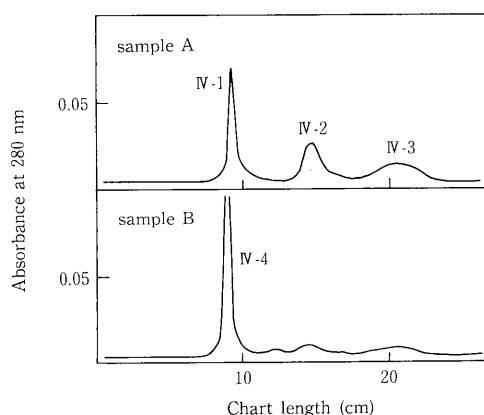


Fig. 4 Sephacryl S-200 gel filtration profiles of mixture of RSP-IV and κ -casein

Absorbance at 280 nm was determined by an Atto mini UV monitor, model II.

sample: 1.8 ml
column: 1.75 × 130 cm
flow rate: 26 ml/hr
chart speed: 2 cm/hr
eluent: the standard buffer containing 4.5 M urea

示す。電気泳動図で RSP-IV は低分子量の 2 つの大きな成分と、高分子量の小さな 2 つの成分よりなってい

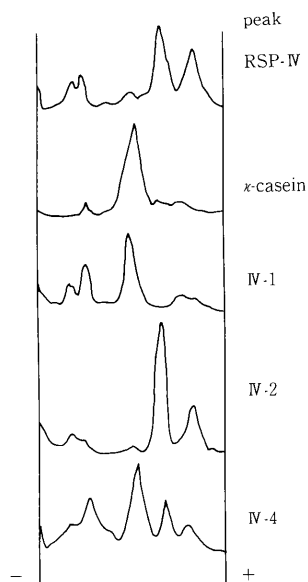


Fig. 5 SDS-polyacrylamide gel electrophoretogram of peaks eluted from Sephacryl S-200 column.

ることがわかり、ピークはIV-1の電気泳動図から、 κ -カゼインは未加熱で、高分子量の2つの成分と複合体を形成することが明らかとなった。ピークIV-2は低分子量の2つの成分であった。また、加熱によってRSP-IVと κ -カゼインは複合体を形成することも確認された。

考 察

前報¹⁾で、抽出大豆たん白質はSephacryl S-200ゲルクロマトグラフィーによって6つの画分に分離されることを報告した。得られた6つの画分のうち、RSP-I, RSP-II, RSP-IVは超遠心分析の結果から、それぞれいわゆる11S, 7S, 2Sたん白質に相当するものと考えられた。事実、RSP-IVはトリプシンインヒビター活性を有していた。しかし、RSP-Iはフェノール硫酸反応陽性であったことから考慮すると、糖たん白質であると言われている7Sたん白質⁴⁾の会合体をも含んでいることが考えられる。また、RSP-VおよびRSP-VIは溶出位置から考慮すると小さな分子量(1万以下)のたん白質またはペプチド、またはそれらの混合物と考えられ、電気泳動の染色では染まらなかった。

抽出大豆たん白質画分RSP-I, IV, V, VIは熱安定性を有していた(Table 1)。

また、RSP-IIおよびRSP-IIIは加熱により沈殿する成分を含んでいるが、 κ -カゼインと共存させると加熱しても沈殿の生成が抑制された(Tables 1, 4)。このことはRSP-IIおよびRSP-IIIの熱不安定成分に κ -カゼインと複合体を形成する成分が含まれていることを示唆するものである。

また、 Ca^{2+} の添加でいずれの画分も約50%が沈殿し(Table 2)、加熱することによって、 Ca^{2+} による沈殿率は大きくなった(Table 3)。特にRSP-IIでは、 Ca^{2+} による沈殿率が未加熱で50.9%であったのが、加熱により71%となり、その傾向が顕著であった。このことは加熱処理により、 Ca^{2+} 感受性が増大させられることを意味している。すなわち、常温で Ca^{2+} と反応する成分、加熱によって Ca^{2+} と反応するようになる成分および Ca^{2+} と反応しない成分の少なくとも3成分が存在することを示唆するものである。

Ca^{2+} 添加による沈殿性が加熱処理によって高められる事実は、 κ -カゼインを共存させた時にも観察された(Tables 5, 6)。ここでRSP-IIIはRSP-I, II, IVと比べてその差の大きかったことは注目されるべきである。

Table 2とTable 5の結果、 κ -カゼインが共存する

と、大豆たん白質の Ca^{2+} による沈殿性が抑制されることがわかる。ただし、RSP-IIIの場合には他の画分に比べて κ -カゼインの共存による Ca^{2+} による沈殿形成に対する抑制は小さかった。牛乳中の α_{S1} -カゼインや β -カゼインは Ca^{2+} によって沈殿するが、 κ -カゼインの共存によりミセルを形成して沈殿しなくなることとはよく知られている。大豆たん白質と κ -カゼインとの関係もそれとよく似たものと考えられる。

さらに、加熱時に κ -カゼインを共存させてやると、 Ca^{2+} による沈殿性は小さくなった(Tables 3, 6)。すなわち、RSP-I, II, IVの場合、加熱後 Ca^{2+} を添加すると、60%以上が沈殿したにもかかわらず、加熱時に κ -カゼインが共存していた場合には、7.2~14.6%が沈殿したにすぎない。このことは加熱によってRSP-I, II, IVと κ -カゼインとの間の複合体形成が促進されたことを推察させるものである。ただ、RSP-IIIは κ -カゼイン共存の効果が小さかった。

κ -カゼインはRSP-I, II, IVのいずれの画分とも、加熱によって複合体を形成することができた(Figs. 1, 3, 4)。すなわち、沈殿性の実験結果から推察されたことがゲルクロマトグラフィーによって確認された。

大豆たん白質は多種類の成分からなっており、熱安定な成分、 Ca^{2+} により沈殿する成分、加熱によって Ca^{2+} と結合する成分、 κ -カゼインと複合体を形成する成分、加熱によって κ -カゼインと結合する成分およびそれらの反対の性質をもった成分の存在が示された。しかも、これらの成分はお互いにその性質を重複しあうて保持しているものと考えられる。これらの性質をうまく利用して新しい食品素材が開発される可能性があるだろう。

文 献

- 1) 金森正雄, 土井裕司(1981): 分離大豆たん白質からの水解物製品の精製. 大豆たん白質栄養研究会会誌, 2, 8-13.
- 2) Doi, H., Ibuki, F. and Kanamori, M. (1979): Heterogeneity of reduced bovine κ -casein. *J. Dairy Sci.*, 62, 195-203.
- 3) Weber, K. and Osborn, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412.
- 4) 山内文男(1979): 大豆タンパク質の構造と食品物性. 日食工誌, 26, 266-275.