

牛乳脂肪球膜物質によるカルシウムの生体における吸収促進作用

宇都宮大学・農学部 菅野長右エ門

要 約

試験管内におけるカルシウムとリン酸ナトリウムの存在下において、乳脂肪球膜タンパク質 (MFGM、1.28mg/g protein) はカゼインホスホペプチド (CPP、1.51mg/g protein) に匹敵するカルシウム結合能をもつことを初めて明らかにした。またパンクレアチンでの消化後におけるMFGM及びCPPのカルシウム結合力は、それぞれ0.974mg/g protein及び1.373mg/g proteinであり、未消化でのカルシウム結合量とそれほど変化はなかった。このことは、MFGMが、CPPと同様に、小腸においてカルシウムの可溶化を保持できることを示している。

キーワード：乳脂肪球膜、カゼインホスホペプチド、カルシウム

調査・研究の目的

乳幼児期に母乳を摂取した人は、調製粉乳を摂取した人よりも骨密度が高いことが広田らにより報告されている¹⁾。調製粉乳では、母乳との大きな相違点として、乳脂肪球膜 (MFGM) が除かれていることを考慮するとカルシウムの吸収にMFGMの成分が関与している可能性が高いことが考えられる。

MFGMは乳腺頂端細胞膜に由来し、約45%の蛋白質と55%の脂質から構成される構造リポ蛋白質であり^{2, 3)}、その構成タンパク質はカゼインと類似したセリン-リン酸をもつことから、MFGMはカルシウムの吸収に関与することが期待される。

そこで本研究では、試験管内実験においてMFGMにカルシウムが結合すること及び消化試験においてもMFGMにカルシウムが結合していることを明らかにする。最終的には、動物実験において吸収されたカルシウムが門脈血に検出されること、MFGMを含む飼料で飼養したラットの骨強度および骨形態を測定することによって、MFGMが生体へのカルシウム吸収促進効果をもつことを明らかにする。

1. 方法

本年度は、小腸内でカルシウムが吸収されるためには可溶化状態であることが必須であることから、MFGMによるリン酸カルシウムの沈殿生成の阻害効果を確認するために、試験管内実験においてMFGMにカルシウムが結合すること及び消化試験においてもMFGMにカルシウムが結合していること

を明らかにする研究を行う。

1) 乳脂肪球膜 (MFGM) の調製

超遠心分離法によるMFGMの調製は生乳からKanno and Kimの方法⁴⁾に従って次のように行った。生乳は宇都宮大学附属農場の乳牛(ホルスタイン種)から搾乳したものをを用いた。新鮮な生乳を37°Cの湯浴内で加温し、これをクリームセパレーター (Elecrem/Vanves, France) にかけて、クリームと脱脂乳に分離した。クリームに4倍容積の脱イオン水(37°C)を加え、再びクリームセパレーターを使用して3回繰り返して洗浄した。この時、クリームセパレーターが冷えて脂肪球が凝固して付着するのを防止するため、あらかじめ約40°Cの温湯(脱イオン水)で加温した。

脂肪含量が約30%の分散液にするために必要な脱イオン水(5°C)を量り、その内の2/3を加え、約12°Cになるまで氷水浴中で冷却した。冷却後、残りの1/3の脱イオン水(12°C)を使用して、冷却したクリームをメタルチャーン (Elecrem/Vanves, France) に移し、常温でチャーニングを行った。

チャーニングによりバターミルクとバター粒に分離し、バターミルクはガーゼを通して回収し、バター粒は45°Cの湯浴内で溶解し、加温したクリームセパレーターを使用してバターオイルとバターセーラムに分離した。バターセーラムはバターミルクと混合した。バターミルクとバターセーラムの混合溶液は、4°C、3000×gで15分間遠心分離し、最上層のクリームを除去し、上清画分を粗MFGMとした。

得られた粗MFGMを4°C、100,000×gで60分間遠心分離し、沈殿画分を少量の脱イオン水に分散させ、これをMFGM試料として以下の実験に用いた。

2) 蛋白質の定量

調製したMFGM分散液を蒸留水で1,000倍に希釈し、蛋白質濃度を測定した。蛋白質濃度は、Petersonの方法⁵⁾で妨害物質を除去し、Lowryらの方法を改良したMarkwellらの方法⁶⁾で、U-2000形ダブルビーム分光光度計(HITACHI)により750nmの吸光値を測定して定量した。標準物質としてウシ血清アルブミンを使用した。MFGMの蛋白質濃度は、41.54mg/mlであり、このMFGMは、蛋白質含量が20mg/mlになるよう調整して使用した。また、LaemmliのSDS-PAGE⁷⁾により15%分離ゲル(5%濃縮ゲル)においてMFGMを構成する蛋白質のパターンを確認した(図1)。

3) タンパク質分散液の調製

(1) 分散液A: タンパク質分散液(混合液)(分量4.0ml)

MFGMあるいはCPP分散液(蛋白質含量20mg/分散液1ml) 1ml、5mM CaCl₂ 1ml、20mM Na₂HPO₄ 2mlを混合し、これを分散液Aとした。5mM CaCl₂溶液、20mM Na₂HPO₄溶液は、そのCaおよびPの濃度が理論値に近似していることをICPによる測定で確認してから使用した。

(2) 分散液B: ブランク(分量4.0ml)

分散液Aのブランクとして、5mM CaCl₂ 1ml、20mM Na₂HPO₄ 2mlにタンパク質分散液の代りに超純水1mlを加え混合し、これを分散液Bとした。

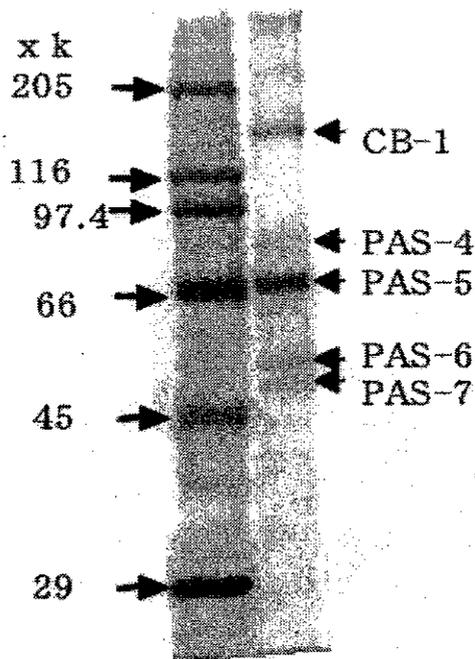


図1 調製したMFGMのSDS-PAGE (CB染色)
サンプルチャージ50 μ g。レーン1 : marker、レーン2 : MFGM

(3) 分散液C : タンパク質分散液 (単独液) (分量4.0ml)

リン酸カルシウムの沈殿を生じない分散液として、タンパク質分散液 (蛋白質含量20mg/分散液1 ml) 1 mlに超純水3 mlを加えて調製した。

これらの試験液A、B及びCを37°Cで2時間インキュベートした後、それぞれ2000 \times gで5分間の遠心分離を行い、それぞれの上清から1 mlを採取して湿式分解を行った。カルシウム及びリンはICP (誘導結合プラズマ) 発光分光分析装置を用いて測定した。

さらに、試験液A、B及びCのpHを調整後、ペプシン及び/あるいはパンクレアチンを用いて37°Cで1時間消化し、カルシウム及びリンをICPにより測定し、カルシウム可溶化量、カルシウム結合力及びMFGMあるいはCPPPにおけるリンの含量を算出した。

4) 湿式分解

分散液は十分に攪拌した状態で、硝酸処理した試験管に1 ml採取し、ドライサーモユニット (タイヨウTAH-2) を使用して、100°Cで水分を蒸発乾固させた。次に硝酸1 mlを加えて100°Cで約6時間、そして過塩素酸 (HClO_4) 0.6 mlを加えて約6時間、更に過酸化水素水を2~3時間の間隔で1 mlずつ加え湿式分解した。この後、210°Cで硝酸、過塩素酸、過酸化水素水を蒸発させ、再び硝酸1 mlを加えてから20倍に希釈し、分析まで常温で保存した。

5) カルシウムの定量

Caの含量はICP (誘導結合プラズマ) 発光分光分析装置 (SPS1200A、AR、V、FR、セイコー) を用いて、ICP-AESのプログラム (S分析) に従って測定した。検量線は標準溶液 (Ca 10ppm) を用い2点検量法によって作製し、ICP-AESマニュアルに従って分析した。元素はICP測定によって得られた値

に希釈倍率を考慮して20を乗じて表示した。

6) MFGMあるいはCPPとカルシウムとの結合性

(1) 遠心分離条件

分散液Aおよび分散液Bを0~3,000rpmで遠心分離し、分散液Aの蛋白質濃度および分散液Bのカルシウムを測定した。なお、各分散液を調製して攪拌直後の溶液をインキュベーション前（遠心分離していない）とし、37℃、2時間振盪後それぞれを常温で5分間、遠心分離した。各遠心分離条件の内、MFGMとカルシウムの結合性の試験のために最適な条件を選定した。最適な条件とはリン酸カルシウムは全て沈殿し、MFGMの沈殿を最小限にする条件である。

(2) MFGMに結合したカルシウムの測定

各分散液3 mlを37℃、2時間振盪した後、常温において3,000rpm、5分間遠心分離した。この上清を取り、よく攪拌した後、1 mlを採取し、湿式分解し、各々のカルシウム量を測定した。3つの条件の異なる分散液の遠心分離上清中のカルシウム量からMFGMと結合し、溶液中に分散しているカルシウム量を算出した。算出は分散液Aの遠心分離上清中のカルシウム量から、分散液Bの遠心分離上清中および分散液Cの遠心分離上清中のカルシウム量を減じて求めた。

7) 消化酵素処理によるカルシウム結合試験

各分散液にパンクレアチン（Sigma, Porcine pancreas）を加え、消化されたタンパク質のカルシウム結合試験を行った。

分散液A、B及びCを60分間インキュベート後にパンクレアチン溶液（4 mg/ml）を分散液4 mlの0.5%濃度になるように20 μ l添加し、さらに60分間インキュベートした。

また分散液A、B及びCのpHを1.5に調整後、ペプシン（Sigma, Porcine stomach mucosa, 2690 unit）溶液（0.25mg/ml）を分散液4 mlの2%濃度になるように100 μ l加え、37℃で1時間インキュベートした。さらにpH6.8に調整後、パンクレアチン溶液（4 mg/ml）を分散液4 mlの0.5%濃度になるように20 μ l加え、37℃で1時間振盪した。

2. 結果及び考察

1) MFGMのカルシウム結合性

(1) 遠心分離の条件

腸内でのカルシウムの可溶化を維持するためには、カルシウムがリン酸カルシウムとして沈殿するのを阻止する必要がある。よって、MFGMが、 Na_2HPO_4 の存在下において、リン酸カルシウムの沈殿形成を阻害するかどうかを確認するために、3種の分散液を調製して実験を行った。図2には各分散液の遠心分離後の状態のイメージを図示した。

MFGM分散液に CaCl_2 溶液と Na_2HPO_4 溶液を混合し、遠心分離して沈殿物を除去した後、上清中にMFGMと共に可溶化状態で存在するCaを測定することにより、 Na_2HPO_4 の存在下におけるMFGMの

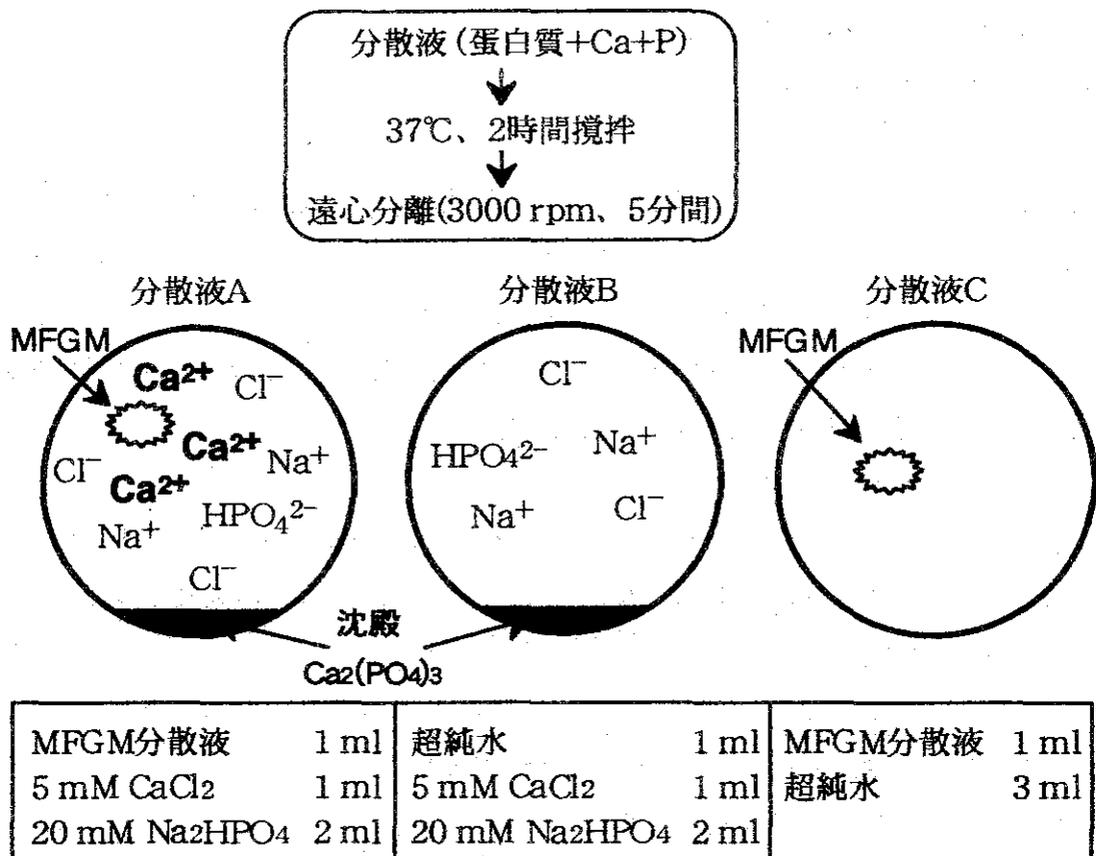


図2 MFGMとCaの結合実験のための分散液の組成と遠心後の状態
※MFGM分散液=5.0mg蛋白質/ml

カルシウム結合能力を試験した。

MFGMを含む分散液Aを0~3,000rpmで遠心分離したときの上清の蛋白質濃度の変化を図3-Aに示す。遠心分離の回転数の増加とともに、分散液Aの上清におけるタンパク質は徐々に減少し、2,000rpmでは約7%の蛋白質量が沈殿し、3,000rpmでは遠心分離前の溶液の約10%が沈殿した。

MFGMを含まない分散液Bについても同様な試験を行い、上清のカルシウム濃度を測定した(図3-B)。分散液Bではリン酸カルシウムとして沈殿すれば、上清にカルシウムは残らないはずであるが、3,000rpmで約0.28ppmのカルシウムが残存していた。しかし、遠心分離前に比べて、2,000rpmで約88%、3,000rpmで約91%のカルシウムが沈殿しており、これらは、インキュベーション前の濃度に比べれば、それぞれ約99%および99.4%が沈殿したことになる。

3,000rpmの遠心分離により、MFGM蛋白質の約10%が沈殿したが、リン酸カルシウムはほぼ定量的に沈殿できることから、MFGMとカルシウムの結合実験には3,000rpmで遠心分離することにした。

(2) MFGMへのカルシウムの結合

各分散液を3,000rpmで遠心分離した後の上清のカルシウムを測定し、MFGMと結合しているカルシウム量を算出した。その結果を表1に示す。MFGMと結合しているカルシウム量は、分散液Aの上清に含まれるカルシウムから、分散液BとMFGM単独溶液の上清に含まれるカルシウムを減じて算出し

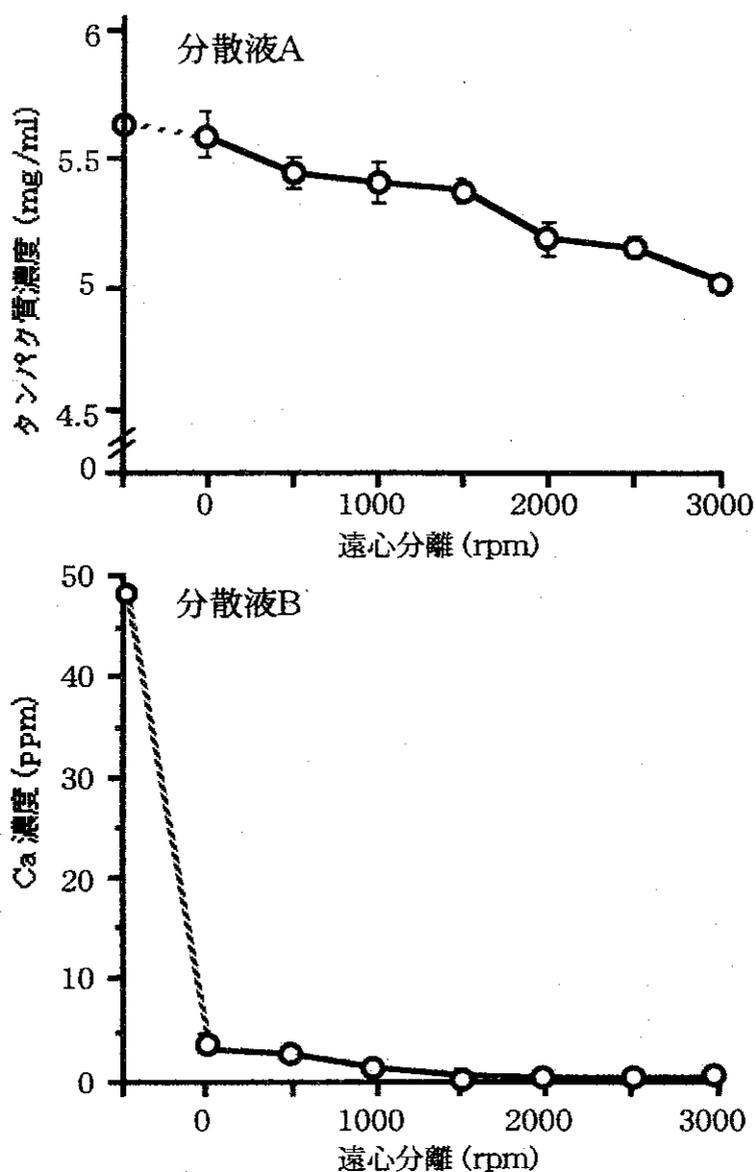


図3 分散液A及びBの遠心分離による上清の蛋白質及びCa濃度の変化。分散液は37°Cで2時間インキュベーション後、分散液4 ml中の1 ml、を20倍に希釈して測定。(n=5)

表1 MFGMおよびカゼインホスホペプチドへのカルシウム結合量。

分散液A、B、Cを37°Cで2時間インキュベーション後、3000rpmで遠心分離した。MFGM分散液は1 ml当たり5.0mgの蛋白質を含む。(n=7)

	分散液A	分散液B ($\mu\text{g/ml}$)	分散液C 平均 \pm SD	Ca結合量
MFGM	51.1 ± 2.0	0.9 ± 0.3	43.8 ± 1.1	6.39
カゼインホス フォペプチド	0.56 ± 0.02	0.162 ± 0.004	0.03 ± 0.01	0.376

た。MFGMは $43.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ (= 5 mg protein) のカルシウムを結合しており、さらに約 $6.40 \mu\text{g}$ のカルシウムを結合することができた。この結果は、MFGMは、リン酸カルシウムとして沈殿するはずであった遊離のカルシウムを、約 $6.40 \mu\text{g}/\text{ml}$ も可溶化状態に留める能力を有することを示す。MFGMの結合カルシウム量は $6.40 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、MFGMタンパク質1g当たり約1.28mg (約0.13%) のカルシウムを結合することができたと考えられる。

同様に、カゼインホスホペプチドは、 $0.376 \mu\text{g}/\text{ml}$ (= 5 mg protein) のカルシウムを結合することができた。従って、カゼインホスホペプチド1g当たり1.51mgのカルシウムを結合することができたと考えられる。このように、MFGMはカゼインホスホペプチドに匹敵するカルシウムを結合することが見出された。

また、MFGM全体では、タンパク質1g当たり約10mgのカルシウムを結合することができることを示唆している。従って、MFGMは小腸内においてカルシウムを可溶状態に保持することができ、カルシウムの吸収を助ける作用をもつことが期待できる。

2) in vitroにおけるMFGM及びCPPのカルシウム結合能

一般にミネラルが吸収されるには可溶性状態で小腸管腔内に存在することが必須であるが、小腸管腔内ではpHが中性からアルカリ性側に傾いており、ミネラルの沈殿、不溶化が進行しやすい環境にある。カルシウムの場合も同様であり小腸内を移行するに従って可溶性カルシウムの割合は減少する⁸⁾。

カルシウムは小腸上部で能動輸送、小腸下部で濃度勾配に従い受動輸送される。小腸の各部位におけるカルシウムの吸収率はカルシウムの滞留時間であり、回腸でのカルシウム吸収率は全カルシウムの62~88%に達する⁹⁾。これらのことからカルシウムを多く含み、かつカルシウムを可溶化状態に保つ食品の摂取が望まれる。

まず、MFGMとカルシウムの小腸内での吸収機構に焦点を当て、各タンパク質のカルシウム保持量を明らかにするために、小腸粘膜からカルシウムが吸収されるためには小腸内で可溶化状態であることが必須であることから、小腸内での実験モデルとしてパンクレアチン存在下におけるカルシウム結合能を測定した。パンクレアチンによる消化後のカルシウム可溶化量は、MFGMで $0.244 \text{mg}/\text{ml}$ 及びCPPで $0.343 \text{mg}/\text{ml}$ であった。MFGM及びCPPのカルシウム結合力は、それぞれ $0.974 \text{mg}/\text{g protein}$ 及び $1.373 \text{mg}/\text{g protein}$ であり、未消化でのカルシウム結合量とそれほど変化はなかった。

続いて、ペプシン・パンクレアチン消化による加水分解後のカルシウム結合能を測定した。カルシウム可溶化量は、MFGMで $0.026 \text{mg}/\text{ml}$ 及びCPPで $0.040 \text{mg}/\text{ml}$ であった。また、乳タンパク質1gに対するカルシウム結合力は、MFGMで $0.10 \text{mg}/\text{g protein}$ 及びCPPで $0.16 \text{mg}/\text{g protein}$ でありパンクレアチン消化群と比較して、MFGMでは90%、CPPでは88%のカルシウム結合力が減少した。パンクレアチンによる消化を受けたペプチド断片が、ペプシンによりさらに断片化され、カルシウムを結合する部位が大幅に減少したと推測される。

食物が食道から胃内に入った時、少量の液状食物を除いて均一になりにくく、pHもペプシンの活性化に必要なレベルまで容易に低下しないと推測されており、胃内のタンパク質消化は10%~20%程度

表3 ペプシン及び/あるいはパンクレアチンの存在下におけるMFGM及びCPPのカルシウム結合カ

蛋白質	消化酵素	A液Ca平均	C液Ca平均 ($\mu\text{g/ml}$)	Ca可溶化量	Ca結合カ (mg/g protein)
MFGM	なし	0.59 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.30 ± 0.01	1.28 ± 0.04
	パンクレアチン	0.82 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.97 ± 0.05
	ペプシン+ パンクレアチン	1.06 ± 0.02	0.11 ± 0.003	0.026 ± 0.02	0.10 ± 0.10
CPP	なし	0.64 ± 0.04	0.04 ± 0.02	0.37 ± 0.02	1.51 ± 0.08
	パンクレアチン	1.03 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.34 ± 0.01	1.37 ± 0.07
	ペプシン+ パンクレアチン	1.00 ± 0.01	0.04 ± 0.001	0.04 ± 0.03	0.16 ± 0.07

± 標準誤差 (n=4)

である考えられている¹⁰⁾。この実験ではタンパク質が均一に分散されており、またpHもペプチダーゼの活性化に最適な状態に調整してあるために、通常の生体内での機能よりも分解能が高くなり、タンパク質の分解が促進したと考えられる。その結果としてタンパク質のカルシウム結合部位が切断され、カルシウム結合性が低下したものと考えられる。

この試験管内における消化実験は、実際の生体内における作用とは異なっていると推測されるために、さらにin vivoでのカルシウム吸収試験をおこなう必要があることを示唆している。

3. 引用文献

- 1) 広田孝子、真砂江美、松下正子、平野和子、橋本和弘、山田喜八、広田憲二、ヤングエイジとジルバーエイジに求められる健康のための食生活とメニュー、食に関する助成研究報告書1、53-57 (1990)
- 2) 菅野長右エ門、牛乳脂肪球皮膜に関する最近の研究—特に構成蛋白質を中心に—、日本畜産学会報、51、75-88 (1980)
- 3) Kanno, C., Secretory membranes of the lactating mammary gland. *Protoplasma*, 159: 184-208 (1990)
- 4) Kanno, C. and T.-H. Kim. Simple procedure for preparation of bovine milk fat globule membrane and a comparison of its composition, enzymatic activities and electrophoretic properties with those prepared by other methods. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2845-2854 (1990)
- 5) Peterson, G. L., A simplification of the protein assay method of Lowly et al. which is more generally applicable, *Anal. Biochem.*, 83, 346-356 (1977)
- 6) Makwell, M. A. K., Hass, S. M., Bieberand, L. L. and Tolbert, N. E., A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples, *Anal. Biochem.*, 87, 206-210 (1978)

- 7) Laemmli, U., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- 8) Lee, Y. S., T. Noguchi, and H. Naito, Intestinal absorption of calcium in rats given diets containing casein or amino acid mixture. *Br. J. Nutr.*, 43, 457 (1983)
- 9) Murcus, C. S. and Lengemann F. W., *J. Nutr.*, 77, 155 (1962)
- 10) 内藤博、カゼインの消化時に形成するホスホペプチドのカルシウム吸収 促進機構、*日本栄養・食糧学会誌*、39、433-439 (1986)