

ホタテ貝殻からのカルシウム塩結晶化抑制物質の精製

山 出 和 弘, 赤 岡 慎 太 郎, 吉 田 宗 弘
(関西大学工学部生物工学科*)

Purification of crystallization inhibitory material of calcium salt from a scallop shell

Kazuhiro YAMADE, Shintaro AKAOKA and Munehiro YOSHIDA
*Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kansai University
Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan*

A crystallization inhibitory material of calcium carbonate was purified from the crude extract of a scallop shell. The inhibition pattern of this inhibition material was the same as that of lithostathine, could inhibit the growth of calcium carbonate crystal. This inhibitory material was purified by ethanol fractionation and column chromatographies on both of DEAE-TOYOPEARL 650M and DEAE-TOYOPEARL HW-55F. The molecular weight of purified crystallization inhibitory material of calcium carbonate was estimated to be approximately 2.7×10^3 according to gel filtration chromatography.

多くのサプリメントが市販されているが、ほとんどの栄養素は日常生活で十分に摂取されている。しかし、日本人が恒常的に不足している栄養素に、骨粗鬆症などの原因とされるカルシウムがあり、それを補強するためにいくつかの製品がある。カルシウムは人の生体内に存在する金属としては最も量が多く、吸収されたカルシウムは骨や歯の形成、代謝などに関与している。カゼインを酵素であるトリプシンで加水分解したカゼインホスホペプチドはカルシウム塩の沈殿生成を抑制し、カルシウムの溶液中の濃度を高くすることが出来、結果的にカルシウム吸収を促進するという報告¹⁾がある。*Bacillus*属の微生物が生産するポリ- γ -グルタミン酸もカルシウム吸収を促進するという報告²⁾がある。

人間の生体液のいくつかはカルシウムが過飽和状態で存在しているといわれていて、それを制御しているタンパク質に膵管内結石から分離されたLithostathine³⁾があり、炭酸カルシウムの結晶化を抑制している。他に、歯の再石灰化に関与している唾液に含まれるStatherin⁴⁾や尿管結石の原因とされるシュウ酸カルシウムの結晶化を抑制しているNephrocalcin⁵⁾などがある。これらのタンパク質やペプチドが何らかの影響を受けることにより、カルシウム塩の結晶化が起こり、骨や歯の形成には有用であるが、結石症などへの進行やカルシウム吸収低下といった有害な結果を生じさせ骨粗鬆症、骨軟化症や動脈硬化などのさらなる疾病を招く恐れがある。

そこで、本研究では食品廃棄物であり年間約21万トンが廃棄されているホタテ貝殻に含まれる物質に炭酸カルシウムの結晶化を抑制する機能を見出し、その機能を解明すると共に応用面について検討を行った。

実験方法

1. ホタテ貝殻：カワイ株式会社から供与された未焼成のホタテ貝殻粉末を用いた。
2. 炭酸カルシウム結晶化抑制活性の測定方法：炭酸カルシウム結晶化抑制活性はWheelerら⁴⁾の方法である NaHCO_3

*所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

水溶液とCaCl₂水溶液の反応によりCaCO₃の析出反応 ($\text{NaHCO}_3 + \text{CaCl}_2 \rightarrow \text{CaCO}_3 \downarrow + \text{HCl} + \text{NaCl}$) を基にして行った。CaCO₃の析出反応が進行すれば生成するHClで反応液のpHが低下する。20 mmol/l NaHCO₃水溶液 (pH 8.5) 25 mlにホタテ貝殻からの抽出液を500 μ l添加し、十分に攪拌する。その後、20 mmol/l CaCl₂水溶液 (pH 8.5) 25 mlを加え、pHの経時変化を測定した。また、コントロールとしては抽出液の代わりに蒸留水を用いた。完全にpHの低下を抑制した場合を100%として、またコントロールとして用いた蒸留水の場合を0%として50%のpHの値を示す時のタンパク質濃度をIC₅₀として活性の比較を行った。温度は25℃である。

3. 粗抽出物：ホタテ貝殻粉末1 gに対して脱ミネラル化のために2 mlの0.5 mol/l EDTA-2Na水溶液 (pH 8.0) を加え、さらに抽出効率を上昇させるために氷冷下で超音波を用いて破碎 (4℃, Duty cycle 40%, out put control 3, 8 min) した。その後、破碎液を遠心分離 (4℃, 27,700 $\times g$, 10 min) し、得られた上澄み液を10 mmol/l Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5) に対して透析した。透析膜としてはDialysis Membrane, Size 36 (Wako Chemical USA, Inc.) を用いた。また、濃縮は透析膜に入れた試料をPolyethylene glycol 20000で脱水することにより行った。タンパク質濃度の調整は10 mmol/l Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5) を用いて行った。

4. カルシウム塩結晶化抑制物質の精製

エタノール沈殿分画以外のカラムクロマトグラフィーは4℃で行った。

4-1. エタノール分画：粗抽出物のエタノール沈殿分画を氷冷下で行った。エタノール濃度が0-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80%以上の画分で得られた抽出物を10 mmol/l Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5) に対して透析し活性の比較を行った。

4-2. 陰イオン交換クロマトグラフィー：エタノール分画で活性の高かった画分をDEAE-TOYOPEARL 650M を担体としたカラム (2.5 $\times$ 7.0 cm) で分画を行った。10 mmol/l Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5) で平衡化 (1.0 ml/min, 160 min) し試料を注入した。溶出は0-1.0 mol/l NaCl, 流速1.0 ml/minのリニアグラジエントで行った。各フラクションは4.0 mlとした。280 nmで検出されたタンパク質のピークを集め、10 mmol/l Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5) に対して透析し、濃縮後活性の測定を行った。

次に、高い活性を示した画分を0.1-0.5 mol/l NaCl, 流速1.0 ml/minのステップワイズグラジエントで行った。各フラクション (4.0 ml) から280 nmで検出されたタンパク質のピークを集め、10 mmol/l Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5) に対して透析し、濃縮後活性の測定を行った。

4-3. ゲルろ過クロマトグラフィー：陰イオンクロマトグラフィーで得られた活性の高かった画分をDEAE-TOYOPEARL HW-55Fを担体としたカラム (1.5 $\times$ 99 cm) で分画を行った。0.15 mol/l NaClを含む10 mmol/l Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5) で平衡化 (0.15 ml/min, 83.3 h) し試料を注入した。溶出は0.15 mol/l NaClを含む10 mmol/l Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5), 流速0.15 ml/min で行い、各フラクション (4.0 ml) から280 nmで検出されたタンパク質のピークを集め、10 mmol/l Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5) に対して透析し、濃縮後活性の測定を行った。また、既知の分子量の物質の溶出パターンと比較することにより試料の分子量を推定した。標準物質として、Rabbit muscle phosphorylase B (*Mr.* 97.4 k), Bovine serum albumin (*Mr.* 66.2 k), Hen egg white ovalbumin (*Mr.* 45 k) と Soybean trypsin inhibitor (*Mr.* 21.5 k) を用いた。

5. 結晶観察：活性測定により得られたCaCO₃の結晶は反応液を0.45 μ mのメンブランフィルター (ミリポア製) でろ過することにより取り出し乾燥させ、それを試料台に乗せイオンスプッター (E 101, 日立製) で金蒸着した。得られた試料を走査電子顕微鏡 (S-2400, 日立製) で結晶状態を観察した。

6. タンパク質の定量：抽出液中のタンパク質の定量は標準タンパク質としてはBovine serum albuminを用いてLowry法⁷⁾で行った。

結果と考察

炭酸カルシウムの結晶化反応を行った場合のpHの経時変化をFig. 1に示した。コントロールとして用いた蒸留水の

場合は反応に伴いpHが低下し、炭酸カルシウムの白い結晶が観察され、約15 min後に反応がプラトーに達した。しかし、ホタテ貝殻から得られた粗抽出物（最終タンパク質濃度として、 $1.5 \mu\text{g/ml}$ ）を添加した場合は反応初期にはpHの低下が起こるが、その後完全にpHの低下を抑制し、炭酸カルシウムの白い結晶も確認できなかった。

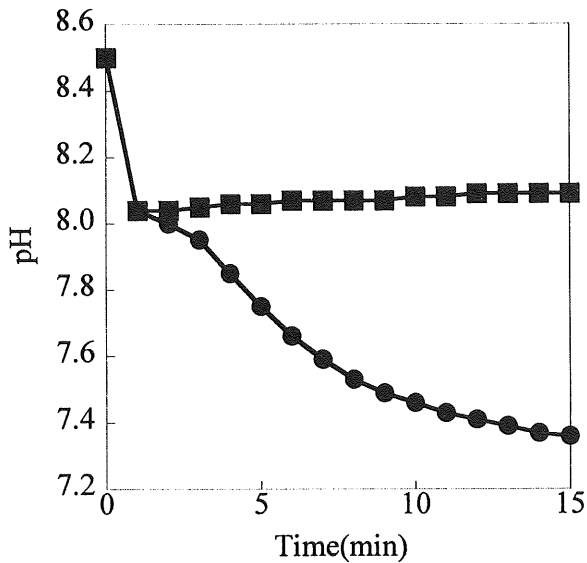


Fig. 1 Effect of the crude extract on calcium carbonate crystallization. Activity was measured by monitoring pH in the course of reaction. The calcium carbonate crystallization was performed by mixing 25 ml of 20 mmol/l NaHCO_3 (pH 8.5) containing 500 μl of sample with 25 ml of 20 mmol/l CaCl_2 (pH 8.5). Symbols: ● Control (distilled water), ■ Crude extract (final protein concentration was $1.5 \mu\text{g/ml}$)

次に、Fig. 2に示したように、コントロールの場合のpHが急激に低下している反応開始5 min後に粗抽出物（最終タンパク質濃度として、 $1.5 \mu\text{g/ml}$ ）を添加すると、その後のpHの低下を停止させ結晶化抑制作用を示すことが確認できた。この時の炭酸カルシウムの結晶を走査型電子顕微鏡で観察した。炭酸カルシウムの結晶はAragonite, VateriteとCalciteの多形を示すことが知られているが、Fig. 3に示したように本反応開始15 min後まではほとんどがVateriteであり、一部Aragoniteが観察できた。反応開始5 min後に粗抽出物を添加し、その後10 min後の結晶は、コントロールの5 min後の結晶粒径とほぼ同じであり、コントロール15 min後の結晶粒径と比較して、得られたカルシウム塩結晶化抑制物質は炭酸カルシウムの結晶成長を抑制していると考えられた。また、一昼夜放置してもほとんどがVateriteであり、一部凝集があるものの粒径の変化もほとんどなかった。一般的には結晶形はVateriteからCalciteへ進むがカルシウム塩結晶化抑制物質の添加の影響で、その進行が抑制されたものと考えられる。なお、コントロールの場合に反応液を一昼夜放置するとCalciteの結晶が観察できた。

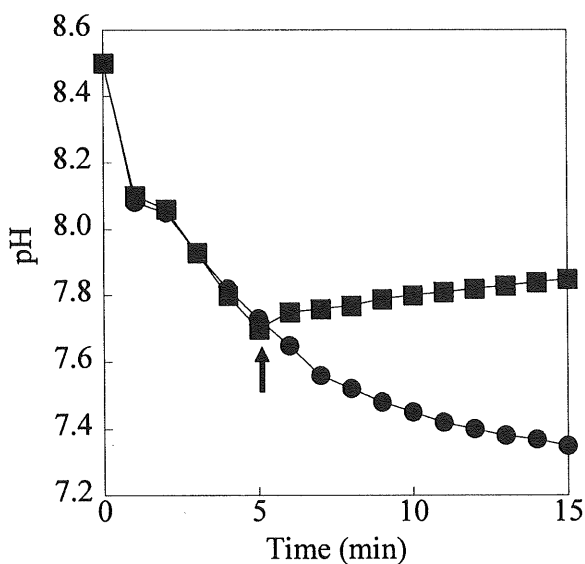


Fig. 2 Inhibitory activity of extract on calcium carbonate crystallization. The calcium carbonate crystallization was performed by mixing 25 ml of 20 mmol/l NaHCO_3 (pH 8.5) containing 500 μl of sample with 25 ml of 20 mmol/l CaCl_2 (pH 8.5). Symbols: ● Control (Distilled water), ■ Crude extract (final protein concentration was $1.5 \mu\text{g/ml}$) was added when crystallization started at 5 min (arrow)

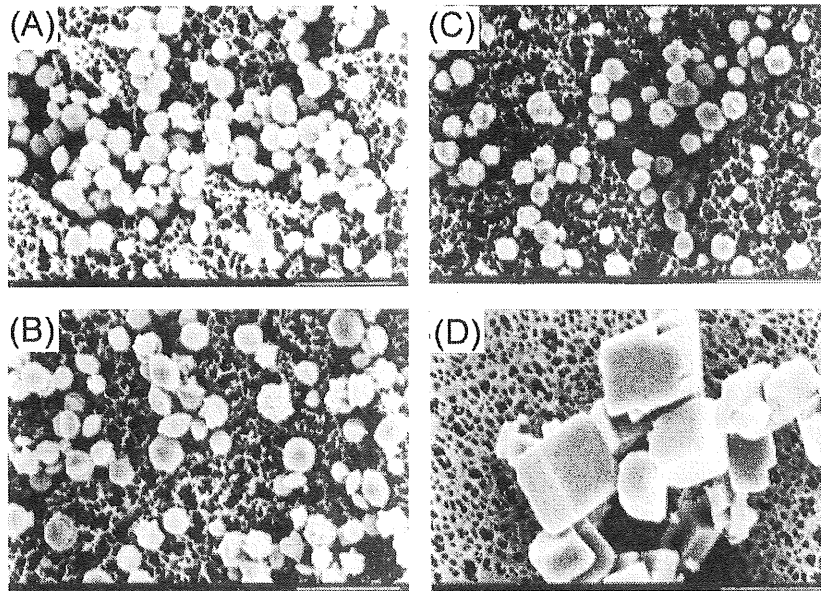


Fig. 3 Scanning electron microscopes of CaCO_3 crystal obtained from Fig. 2 results. The bar indicates $10 \mu\text{m}$.
(A): Control (after 5 min), (B): Control (after 15 min), (C): Crude extract (after 10 min at time of the crude extract added), (D): Control (over night)

ホタテ貝殻粉末から得られた粗抽出物のエタノール沈殿分画を行った結果、エタノール濃度が60-70%の画分において高い活性が得られ、続いて50-60%の画分であった。以下の精製過程を考慮し、50-70%画分のタンパク質を次の精製に用いた。

エタノール沈殿分画により得られた試料を、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製を行った結果をFig. 4に示した。NaClの濃度勾配をリニアグラジエントで行った場合の結果をFig. 4-(A)に示した。大きな一つのピークが得られ、これをさらに分離するためにNaCl濃度のステップワイズグラジエントで、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った結果をFig. 4-(B)に示した。3つのピークが得られ、それぞれにおいて活性を測定した結果、0.2 mol/l NaClのところで得られたタンパク質に高い結晶化抑制活性が見られた。さらに、得られた試料を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果をFig. 5に示した。高い一つピークが得られ、高い結晶化抑制活性が見られた。

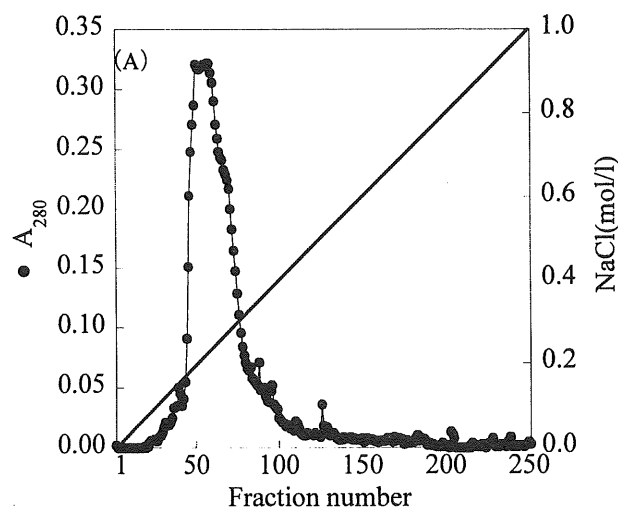


Fig. 4-(A) Anion-exchange chromatography on DEAE-TOYOPEARL 650M (Liner gradient). The ethanol fraction (50 to 70% saturation) was placed on column (2.5 by 7.0 cm) equilibrated with 10 mmol/l Tris-HCl buffer (pH 8.5) solution. The adsorption proteins were eluted with a liner gradient of NaCl (0.0-1.0 mol/l). Each fractions was 4.0 ml. Flow rate was 1.0 ml/min. — NaCl concentration

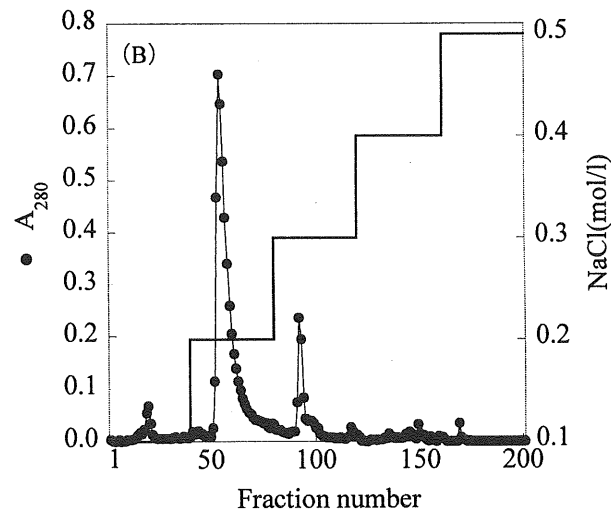


Fig. 4-(B) Anion-exchange chromatography on DEAE-TOYOPEARL 650M (Stepwise gradient). The ethanol fraction (50 to 70% saturation) was placed on column (2.5 by 7.0 cm) equilibrated with 10 mmol/l Tris-HCl buffer (pH 8.5) solution. The adsorption proteins were eluted with a stepwise gradient of NaCl (0.1-0.5 mol/l). Each fractions was 4.0 ml. Flow rate was 1.0 ml/min. — NaCl concentration

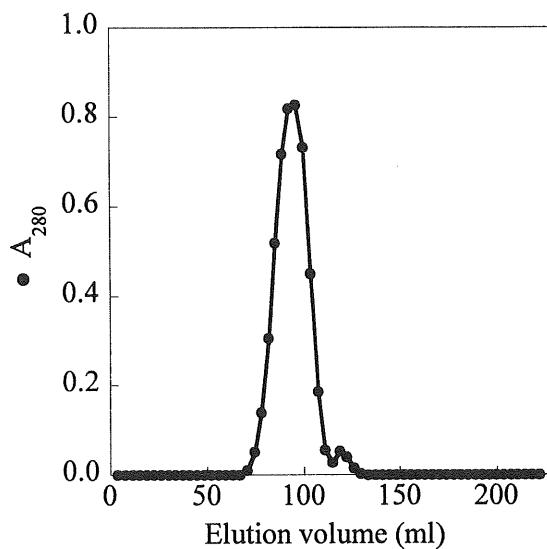


Fig. 5 Gel-filtration chromatography on DEAE-TOYOPERAL HW-55F. The partially purified extract after anion-exchange chromatography was placed on column (1.5 by 99 cm) equilibrated with 10 mmol/l Tris-HCl buffer (pH 8.5) solution containing 0.15 mol/l NaCl. Each fractions was 4.0 ml. Flow rate was 0.15 ml/min.

Table 1にホタテ貝殻粉末1 kgを原料とし、各精製段階より得られたタンパク質濃度ならびに IC_{50} を示した。各段階で IC_{50} の値が小さくなり、結晶化抑制活性が高くなっていることが確認できた。また、Fig. 6に示したように既知の分子量のタンパク質と溶出パターンを比較することにより、本実験で得られたカルシウム塩結晶化抑制物質の分子量は約27 kと推定できた。

炭酸カルシウムの結晶化ならびに結晶成長を抑制することにより、溶液中のカルシウムイオン濃度の上昇が計られ、生体内でのカルシウム吸収促進剤として期待できる。また、今回得られたカルシウム塩結晶化抑制物質は、生体内のカルシウム塩制御物質であるLithostathine (M_r : 14 k)、Statherin (M_r : 8.0 k)やNephrocalcin (M_r : 14 k)と比較すると分

Table 1 Summary of purification of CaCO₃ crystallization inhibitory material from a scallop shell

Step	Volume (ml)	Protein concentration (mg/ml)	Total protein (mg)	IC ₅₀ (μg/ml)	relative activity
Crude	260.0	0.529	137.54	0.065	0.477
Ethanol fractionation	65.0	0.890	57.85	0.062	0.500
Anion-exchange chromatography	102.5	0.423	43.36	0.048	0.646
Gel-filtration chromatography	30.0	0.700	21.00	0.031	1.00

A scallop shell powder used was 1 kg.

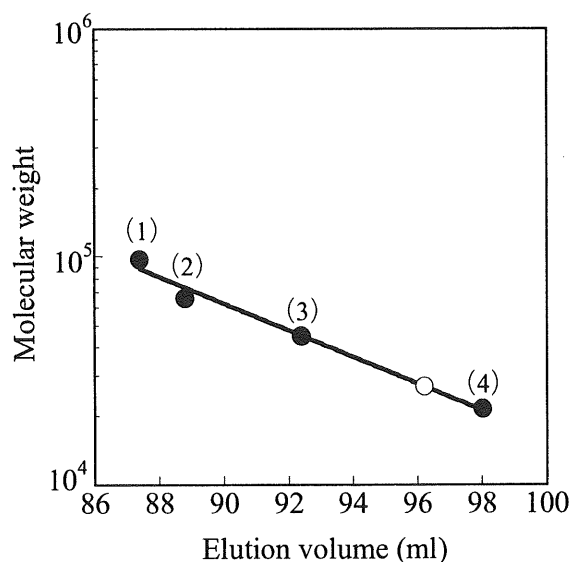


Fig. 6 Estimation of molecular weight of CaCO₃ crystallization inhibitory materials
 Symbols: ● Standard materials: (1) Rabbit muscle phosphorylase B (*Mr.* 97.4 k),
 (2) Bovine serum albumin (*Mr.* 66.2 k), (3) Hen egg white ovalbumin (*Mr.* 45 k),
 (4) Soybean trypsin inhibitor (*Mr.* 21.5 k), ○ Sample

子量が大きく、体内での吸収機構の解明が不明瞭ではあるが、炭酸カルシウムの結晶化を抑制している Lithostathine と同様の機能³⁾を有することから、結石予防薬としての利用も考えられる。

参考文献

- 1) Sato R, Noguchi T, Naito H (1986) J Nutr Sci Vitaminol 32: 67-76.
- 2) 谷本浩之, 野沢浩子, 岡田享子, 宮野玲子, 秀崎百恵, 常松基子, 伊藤和子 (2003) 日本農芸化学会誌 77: 504-507.
- 3) Multigner L, De Caro A, Lombardo D, Campese D, Sarles (1983) Biochem Biophys Res Comm 110: 69-74.
- 4) Moreno EC, Kresak M, Hay DI (1984) Calcif Tissue Int 36: 48-59.
- 5) Robertson WG, Peacock M, Marshall RW, Marshall DH, Nordin BE (1976) N Engl J Med 294: 249-252.
- 6) Wheeler AP, George JW, Evans CA (1981). Science 212: 1397-1398.
- 7) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) J Biol Chem 193: 265-275.