大豆水溶性低分子画分中の銅結合成分^{*1}

(昭和 56 年 7 月 22 日受理)

吉田 精作^{*2} 田中 涼一^{*2} 檜 本 隆^{*2}

Copper-binding Components in the Water-soluble Low Molecular Weight Fraction of Soybeans

(Chemical Form of Copper in Soybeans. III)

Seisaku YOSHIDA, Ryoichi TANAKA and Takashi KASHIMOTO

(Osaka Prefectural Institute of Public Health: 3-69, Nakamichi 1-chome, Higashinari-ku, Osaka)

The water-soluble fraction of soybeans was extracted with 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.4). The low molecular weight fraction (F-II, MW. <10,000) was separated from the soluble fraction by gel filtration on Sephadex G-50. The chemical forms of copper (Cu) in F-II were studied.

F-II was chromatographed over Sephadex G-25 (1.5×90 cm) and Sephadex G-10 (2.0×80 cm). Cu in F-II showed only one peak on the chromatogram. The elution volume of Cu in F-II was approximately one-half of that of inorganic copper (CuSO₄). The molecular weight of Cu in F-II was approximately 500~1,500.

Upon addition of Cu to F-II, two new peaks appeared. One (F-IIA) was eluted before the native peak (F-IIB) and the other (F-IIC) after. The molecular weights of F-IIA and F-IIC were 1,500~5,000 and less than 500, respectively. These three components in F-II had different binding affinities for Cu (F-IIB>F-IIC>F-IIA).

All three Cu complexes in F-II were eluted together with nitrogen-containing materials, which were all ninhydrin-positive, but they were not eluted with sugars or phosphorus compounds.

Amino acid analyses of the three Cu complexes in F-II were carried out. The amino acid composition of F-IIA was similar to that of F-IIB, but differed from that of F-IIC. Approximately 35% of the amino acid residues in F-IIC were found to be arginine.

Both F-IIA and F-IIB showed ninhydrin-positive spots on a paper chromatogram. The R_f values of the spots from F-IIA and F-IIB were different, and both were less than those of free amino acids. F-IIC showed several ninhydrin-positive peaks on a Sephadex G-10 chromatogram. Cu in F-IIC was eluted with ninhydrin-positive materials having an R_f value similar to that of arginine.

(Received July 22, 1981)

Key words: 大豆 soybean; 重金属 heavy metal; 化学形態 chemical form; 銅 copper; ゲルろ過 gel filtration

緒 言

大豆は古くから金属の供給源となる食品として知られ

ているが、大豆中の金属がどのような化学形態をとって存在しているかは不明である。タンパク質には重金属を含むもの、あるいは、重金属を多く含む能力のあるものが存在するが、低分子物質においては、重金属を多く含んだ天然の食品成分というものはあまり知られてい

^{*1} 大豆中銅の化学形態 (第3報)

^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所: 大阪市東成区中道 1-3-69

い。

我々は、大豆中の銅に着目し研究を進め、先に、大豆中の銅の約6割が水溶性画分に抽出され、Sephadex G-50 カラムを用いたゲルろ過において、銅は高分子量タンパク質画分のみならず、分子量1万以下の低分子量画分にも約半分量が分布していることを報告して来た^{1),2)}。しかも、この低分子画分中の銅は、紫外吸収とは一致せず、低分子窒素化合物と一致して溶出されることがわかった。この大豆低分子画分中の銅が、遊離の形で存在しているのか、あるいは、何らかの複合体を形成しているのかは興味深い問題である。

本報告では、Sephadex G-50 で分画した低分子画分中の銅を、さらにゲルろ過を用いて細く分画し、その存在形態について検討した結果を示す。

実験方法

1. 試料、試薬及び装置

大豆は蒸留水で洗浄後、水分を拭き取りよく乾燥し、粉砕器を用いて粉末として使用した。

銅標準溶液は和光純薬工業(株)製原子吸光分析用標準液を用いた。硫酸銅、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、各種アミノ酸は和光純薬工業(株)製特級を用いた。ゲルろ過には Pharmacia 社製 Sephadex G-50, G-25, G-10 を用いた。その他の試薬はすべて特級及び超特級を用いた。

原子吸光分光光度計: Varian Techtron AA5 形。低温灰化装置: International Plasma Corporation 1101 B 形。超遠心分離機: (株)日立製作所製分離用超遠心機 55P-2 形。デジタル窒素分析装置: ANTEK 771 形。分光光度計: (株)日立製作所製 124 形, 139 形, 200 形。アミノ酸分析計: (株)日立製作所製高速アミノ酸分析計 835 形。

2. 水溶性画分の抽出²⁾

大豆粉末を10倍量の0.01 M トリス塩酸緩衝液, pH 7.4 (以下緩衝液と略す)に懸濁し、3時間かくはんする。超遠心分離(105,000 G, 60分)により脂肪層と残渣を除き粗抽出液を得る。

3. ゲルろ過

Sephadex G-50: 2.5×20 cm, 流量 60 ml/hr, 5 ml/tube. Sephadex G-25: 1.5×90 cm, 流量 15 ml/hr, 3 ml/tube. Sephadex G-10: 2.0×80 cm, 流量 25 ml/hr, 5 ml/tube. 溶出はすべて緩衝液で行った。各画分は280 nm または 260 nm における吸光度を測定後銅を定量し、ペプチド(アミノ酸)、糖、総窒素、リンなどの定量、定性を行った。分子量の指標として bacitracin (PL Biochemical 社製, 分子量 1411)を用いた。

4. 銅の定量

試料はサンプルポットに精秤し、乾燥試料はそのまま、液状試料は水浴上で乾固させた後低温灰化(R. F. Power; 200 W, O₂; 200 ml/min)し、0.5 N 硝酸を用い

て定容とし、原子吸光分析に供する。ゲルろ過画分は直接原子吸光分析を行った。

5. 窒素、アミノ酸の定量およびアミノ酸分析

総窒素量はデジタル窒素分析装置を用いて、化学発光法により Bovine Serum Albumin を標準として測定した¹⁾。アミノ酸(ペプチド)はニンヒドリン反応により、570 nm における吸光度を測定しロイシンを標準として定量した。アミノ酸組成は試料を6 N 塩酸で110°, 22時間加水分解後アミノ酸分析計を用いて求めた。

6. 糖の定量

糖はフェノール・硫酸法により、490 nm における吸光度を測定し、グルコースを標準として定量した。

7. リンの定量

試料を低温灰化後0.5 N 硝酸 3.3 ml を用いて溶解し、Bartlett 法³⁾により830 nm の吸光度を測定し、リン酸一カリウムを標準として定量した。

8. ペーパークロマトグラフィー

ろ紙は TOYO No. 51A (14×60 cm) を用いた。展開溶媒には *n*-ブタノール: ピリジン: 酢酸: 水, (75:50:15:60) を用い、下降法により展開した。検出には0.2% ニンヒドリン・アセトン液を用いた。

結 果

1. Sephadex G-25 カラムによるゲルろ過クロマトグラフィー

大豆水溶性画分を Sephadex G-50 により分画すると、銅は分子量約1万を境に、高分子量画分 F-I と低分子量画分 F-II の両画分に溶出されることを前報²⁾で報告した。この F-II をさらに Sephadex G-25 を用いてゲルろ過したときの溶出パターンを Fig. 1 に示す。F-II 中の銅は、Fig. 1A においてフラクション番号36に単一のピークとして溶出した。無機態の銅として硫酸銅を Sephadex G-25 カラムで分画すると、銅イオンはフラクション番号80~90に溶出され、F-II 中の銅とはまったく溶出位置が異なることがわかった。銅イオンはカラム内において Sephadex に吸着されて溶出が遅くなるのに対し、F-II 中の銅は何らかの配位子との複合体であるため、すみやかに溶出されたと考えられる。

F-II に銅を添加した後に溶出を行うと、もとの銅ピークも増加すると同時に、その前と後に一つずつ新しい銅ピークが出現した(Fig. 1A)。これらの銅ピークのうち、もとのものを F-IIB, その前に溶出するものを F-II A, 後を F-IIC とする。大豆の水溶性低分子物質の中には、アミノ酸、ペプチド、糖、塩基、リン成分や有機酸などが多種類含まれ、それらの多くが重金属とキレート化合物を形成する能力を有しており、F-II に銅を添加することにより、それらの成分のいずれかと銅が結合したと考えられる。このことは、F-II 中の銅濃度(大豆中の銅濃度)の多少により、銅ピークがいくつか出現する可能性を示すものである。

Fig. 1. Séphadex G-25 gel filtration chromatograms of F-II from soybeans

A) Cu (Δ — Δ ; native and $\triangle$ — $\triangle$; added), B) sugar ($\bullet$ — $\bullet$; OD₄₉₀) and phosphorus (—; OD₈₈₀), C) nitrogen $\times$ — $\times$ and ninhydrin reaction positive ($\circ$ — $\circ$; OD₅₇₀)

All other conditions are described in the text.

F-II に銅を種々の濃度で添加した後に分画すると、F-II 中の3成分に対する銅の結合比が異なることがわかった。これは、各成分と銅の親和性や最大結合量が異なるためと考えられた。そこで、銅の添加量を増加することにより親和性の強さを推定すると、F-IIB>F-IIC>F-IIA となり、銅の結合量に関しては、F-IIA>F-IIB>F-IIC の順に多いことが観察された。また、F-II に添加する銅量をもともと含まれる量の50倍にした場合でも、そのほとんどが F-II 中の成分に結合し、F-II の銅結合能が非常に高いことがわかった。

F-II 中の銅成分の分子量を、溶出位置からバシトラシン (分子量 1,411) やグルコース (分子量 180) と比較して算出すると、F-IIA は約 5,000~1,500、F-IIB は 1,500~500 となるが、F-IIA と F-IIB では分子量にあまり差はないと考えられた。又、F-IIC は分子量 500 以下でグルコースと同程度の小さな分子量であろうと推測された。

F-II 中の銅のリガンドを推定するために、F-II 中に含まれる成分のうち、糖、リン、窒素の定量及びニンヒ

ドリン反応を各溶出画分について行った。

F-II 中の成分のうち、糖類は非常に多く含まれる成分であるが、その大部分は Séphadex G-25 カラムにおいて F-IIB と F-IIC のちょうど中間部分のグルコースと同じ溶出位置に溶出され、一部分が高分子量側に肩を示すパターンであった (Fig. 1B)。大豆中の糖^{4),5)}で、最も多く含まれるものはシヨ糖であり、次に4糖類のスタキオースが多く、その次に3糖類のラフィノースである。F-II 中の糖画分についてシリカゲルを用いた薄層クロマトグラフィーを行うと、F-IIB と重なる部分はスタキオースであり、F-IIC に近い糖の主ピークがシヨ糖であることがわかった。F-II 中の銅は多く含まれるシヨ糖とは相互作用を示していないことがわかる。

リン成分もシヨ糖と同様に F-IIB と F-IIC の中間に溶出された (Fig. 1B)。大豆中のリン成分は、その約4分の3がフィチン態であることが報告されている⁶⁾。フィチン酸は金属とのキレート能が強く、大豆中においても、フィチン酸・金属あるいは、タンパク質・フィチン酸・金属という複合錯体を形成していることが考えられる。しかし、F-II 中の低分子リン成分は銅の溶出ピークと一致せずに溶出され、銅とキレート化合物を形成していないと考えられた。

各フラクションについてニンヒドリン反応を行うと、F-IIC と同じ溶出位置に多くのニンヒドリン陽性物質が存在することが明らかになった (Fig. 1C)。また、F-IIA, F-IIB 部分にもニンヒドリン陽性物質の存在が認められた。各フラクション中の窒素量を測定すると、ニンヒドリン陽性物質の溶出パターンと同様に、F-IIC 部分に多くの窒素が存在し、F-IIA, F-IIB にも窒素化合物が存在することがわかった。ニンヒドリン陽性の窒素化合物としては、アミノ酸やペプチドが考えられる。アミノ酸やペプチドは銅やその他の重金属を結合する能力を有しており、大豆中でこれらが複合体を形成している可能性は大きい。

Séphadex G-25 カラムにおいて、遊離のアミノ酸としてアルギニン、ヒスチジン及びシステインを分画すると、すべて F-IIC 部分に溶出された。又、ヒスチジンとシステインについて、それぞれの銅複合体を調製して分画すると、やはり F-IIC 部分に溶出された。このことは、F-IIC 部分には多くのアミノ酸が存在し、F-IIC 中の銅がアミノ酸と結合している可能性を示すものである。

2. F-II 中銅溶出画分のアミノ酸分析

Séphadex G-25 カラムで分画した F-II 中の銅溶出3画分のアミノ酸組成を Table 1 に示す。F-IIA と F-IIB はやや類似したアミノ酸組成を示し、アスパラギン酸やグルタミン酸が他のアミノ酸より多く含まれていた。F-IIA には測定した17種すべてのアミノ酸が含まれていたが、F-IIB にはプロリン、チロシン、フェニルアラ

Table 1. Amino Acid Compositions of F-IIA, F-IIB and F-IIC

	F-IIA	F-IIB	F-IIC
Asp	12.2	14.7	8.4
Thr	4.9	3.8	3.0
Ser	8.4	5.5	4.4
Glu	10.3	13.4	8.9
Pro	5.1	ND.	ND.
Gly	8.4	8.4	5.4
Ala	7.2	6.9	6.5
Cys	4.1	4.9	ND.
Val	6.8	8.0	3.9
Met	1.8	7.5	2.0
Ile	5.0	5.9	2.5
Leu	6.8	5.6	3.5
Try	2.0	ND.	4.6
Phe	6.4	ND.	4.5
Lys	4.4	5.6	3.3
His	2.5	5.1	5.5
Arg	3.8	4.4	33.5

(Residues/100)

ニンがなく、F-IIA と比較し塩基性アミノ酸とメチオニンが多く含まれていた。F-IIC においては、プロリン、システイン以外のアミノ酸が検出されたが、F-IIA、F-IIB と異なり特徴的なことは、全体のアミノ酸の約 3 分の 1 残基がアルギニンで占められていることであった。Table 1 のアミノ酸組成から F-IIA、F-IIB の分子量を推測すると、どちらも約 3,000 以上となった。この値はゲルろ過における溶出位置から算出される分子量約 1,500 前後に比べ約 2 倍大きい。この原因は、Sephadex G-25 で分画した画分中にはペプチドの他に遊離のアミノ酸が混入しているためかもしれない。また、F-IIC 中に検出されたアミノ酸はすべて遊離で存在していると考えられ

る。

3. F-IIA および F-IIB の Sephadex G-10 カラムによるゲルろ過クロマトグラフィー

Fig. 2 に Sephadex G-25 により分画分取した F-IIA および F-IIB を Sephadex G-10 カラムでゲルろ過したときのクロマトグラムを示す。F-IIA 中の銅は Void Volume (フラクション番号 22) にニンヒドリン陽性物質とともに溶出された。F-IIB 中の銅は F-IIA のものより少しうしろのフラクション番号 24 に溶出され、F-IIA と同様にニンヒドリン陽性であった。Sephadex G-25 カラムにおいては F-IIB 中の銅と同じ位置に溶出された糖 (スタキオース) も Sephadex G-10 カラムでは完全に分離されていないが、少し後ろに溶出され、銅との結合はないと考えられた。

紫外外部吸収スペクトルをそれぞれの銅画分について測定すると、両者でかなり異なったパターンを示した。F-IIA のものは 215 nm にピークを有し、260 nm 前後にもわずかながらピークが存在するようであったが、F-IIB のスペクトルでは 257 nm にピークを示し、F-IIA と異なり 215 nm 付近にはピークは認められなかった。F-IIA の 215 nm における吸収ピークはペプチド結合の吸収によると考えられるが、F-IIA も F-IIB も完全に精製されてはおらず、不純物によるスペクトルの妨害もあるかもしれない。

4. F-IIA および F-IIB 中銅画分のペーパークロマトグラフィー

Sephadex G-10 で分画した F-IIA および F-IIB 中の銅画分をペーパークロマトグラフィーに供すると、Fig. 3 のようなニンヒドリン陽性スポットを示した。F-IIA、F-IIB ともに遊離のアミノ酸の R_f 値より小さな所にスポットが認められたが、両者のスポットの R_f 値は異なっていた。これらのスポットはどちらもペプチドによるものと考えられるが、これらのスポットの他に F-IIA、

Fig. 2. Sephadex G-10 gel filtration chromatograms and UV spectra of F-IIA and F-IIB

Conditions are described in the text.

Fig. 3. Paper chromatogram of Cu fractions of F-IIA and F-IIB separated by Sephadex G-10

F-IIA; fr. 22, F-IIB; fr. 24

All other conditions are described in the text.

F-IIB のどちらにも遊離のアミノ酸と考えられるスポットが二つずつ認められた。このことは、F-IIA, F-IIB がまだ未精製で、アミノ酸が不純物として混入して来たのか、あるいは、銅がペプチドのみではなく、アミノ酸とも同時に結合していることを示唆するものである。

5. F-IIC の Sephadex G-10 カラムによるゲル過クロマトグラフィー

F-IIC を Sephadex G-10 を用いてさらに分画すると、銅は単一のピークとして溶出したが、ニンヒドリン陽性物質はフラクション番号 31, 33, 35, 47 などに分割されて溶出した (Fig. 4)。銅と一致したニンヒドリン陽性画分はフラクション番号 35 であった。遊離のアミノ酸が多種類含まれているため、このようにニンヒドリン陽性画分が分割されたと考えられる。アミノ酸の対照として、銅と結合能の高いヒスチジンを単品及び銅との人工的複合体を調製し Sephadex G-10 カラムに供すると、どちらも共にフラクション番号 33 に溶出され、F-IIC 中の銅の溶出位置とは一致しなかった。又、F-IIC のアミノ酸組成 (Table 1) は、F-IIC 中のアミノ酸の約 3 分の 1 がアルギニンであることを示したが、遊離のアルギニン (pH 7.4 ではアルギニンと銅の複合体は形成されなかった) を Sephadex G-10 カラムに供すると、それはフラクション番号 42 に溶出された。F-IIC のクロマトグラムには、この位置にニンヒドリン陽性ピークはなく、F-IIC 中には、遊離の形でのアルギニンは存在しないと考えられた。

Fig. 4. Gel filtration profile of F-IIC on Sephadex G-10

○—○; OD₅₇₀ (ninhhydrin positive),
△—△; Cu

All other conditions are described in the text.

6. F-IIC 中銅画分のペーパークロマトグラフィー

Sephadex G-10 で分画した F-IIC 中の画分のうち、ニンヒドリン陽性物質が多く含まれ、銅が溶出するフラクション番号 33, 34, 35 について、それぞれペーパークロマトグラフィーでその中の成分を分離した (Fig. 5)。銅ピーク直前のフラクション番号 33 からは六つのニンヒドリン陽性スポットが現れ、多種の遊離アミノ酸が含まれていることがわかる。ところが、銅ピークに近づくにつれてスポット数は減少し、フラクション番号 34 からは三つのスポット、フラクション番号 35 では二つのスポットが見られたのみであった。しかも、IV の位置のスポットは呈色と Rf 値から緩衝液に使用したトリスのスポットであると考えられ、フラクション番号 35 からは II の位置のスポットのみがアミノ酸と考えられた。この II の位置のスポットの Rf 値は約 0.38 であり、アルギニンの Rf 値と一致し、F-IIC 中に多く含まれるアルギニンが、この位置に溶出していると考えられた。このように、アルギニンがその溶出位置を移動し、銅と同じ画分に溶出したことは、アルギニンと銅が何らかの形で結合していることを示唆する。ところが、アルギニンに銅を加えた (pH 7.4) 後に Sephadex G-10 カラムに供しても複合体は形成されず、アルギニンのみがフラクション番号 42 に溶出した。このことより考えると、F-IIC 中の銅がアルギニンと結合しているならば、そのアルギニンは遊離の場合 (pH 7.4 における) とは異なった状

Fig. 5. Paper chromatogram of three fractions in F-IIC separated by Sephadex G-10

Conditions are described in the text.

態にあるのか、あるいは、ニンヒドリン陰性であるシステインなどの他の物質と共に銅と複合体を形成しているのであろう。

考 察

大豆水溶性低分子画分 (F-II) 中に存在する銅は、Sephadex G-25 によるゲルろ過クロマトグラフィーで単一のピーク (F-IIB) を示し、何らかの配位子と複合体を形成していることが推察された (Fig. 1)。また、F-II 中には少なくとも3種類の銅配位子が存在 (F-IIA, B, C) し、銅を結合する能力は高く、銅を添加することにより、もとの50倍量をも結合することがわかった。

Sephadex G-25 及び G-10 によるゲルろ過分画で、F-II 中の銅結合成分は糖ヤリンではなく、ニンヒドリン陽性成分、つまりアミノ酸やペプチドであることが示唆された。分子量約 1,500 前後の F-IIA と F-IIB は、ペーパークロマトグラム (Fig. 3) やアミノ酸分析 (Table 1) からペプチドと考えられたが、UV スペクトル (Fig. 2) からは塩基などが含まれている可能性を残し、さらに精製が必要である。F-IIA と F-IIB のアミノ酸組成はやや類似していたが、ペーパークロマトグラムでの Rf 値には差があり、同一成分ではないと考えられた。これらのアミノ酸組成がすべてペプチドからのものであるとすると、どちらもかなり酸性のペプチドであろう。ただし、ゲルろ過からの推定分子量やペーパークロ

マトグラムの結果からは、アミノ酸分析により示された組成には、ペプチドからのもののみではなく、数種の単一アミノ酸も含まれていると考えられた。この単一アミノ酸が、ペプチドとともに銅と結合しているかどうかについては、さらに検討を進める必要がある。F-IIC 中の銅複合体の成分には、アルギニンが含まれていることが示されたが、この複合体がアルギニンのみと銅によるものか、あるいは、他の物質との相互作用が存在するかは不明であった。

これらの配位子が、大豆中で銅のみでなく亜鉛などの他の重金属に対しても、同様の複合体を形成していることは十分に考えられることである。これらの配位子と種々の重金属の複合体形成、並びに重金属間の相互作用などについても更に検討を進めるつもりである。

近年、種々のキレート剤が重金属の有効利用⁷⁾のため吸収促進剤として使用されたり、あるいは逆に、重金属の毒性の緩和^{8)~10)}に使用されて来っており、食品として大豆を利用する上で、水溶性で分子量 1,500 前後という非常に小さな重金属複合体が、重金属の吸収や排泄にどのような役割を示すかは、大変興味深いことである。

謝 辞

本研究を行うに当たり、多くの御助言を戴きました大阪大学薬学部近藤雅臣博士、国立衛生試験所内山 充博士に深謝致します。本研究の一部は環境庁環境保全研究助成金の援助を受けたものであり感謝の意を表します。

文 献

- 1) 田中涼一, 吉田精作, 榎本 隆: 食衛誌. **21**, 243~246 (1980).
- 2) 吉田精作, 田中涼一, 榎本 隆: 同上, **21**, 247~251 (1980).
- 3) 京都大学農学部食品工学教室編: “食品工学実験書” (下巻), p. 402 (1970) 養賢堂.
- 4) 渡辺篤二, 海老根英雄, 太田輝夫 共著: “大豆食品”, p. 36~37 (1980) 光琳.
- 5) Smith, A. K., Circle, S. J. 編: “大豆タンパク質”, p. 26~32 (1979) 建帛社.
- 6) Smith, A. K., Circle, S. J. 編: 同上, p. 20~23 (1979) 建帛社.
- 7) Smith, A. K., Circle, S. J. 編: 同上, p. 161 (1979) 建帛社.
- 8) Jones, M. M., Basinger, M. A., Tarka, M. P.: Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm., **27**, 571~577 (1980).
- 9) Borthwick, T. R., Benson, G. D., Schugar, H. J.: J. Lab. Clin. Med., **95**, 575~580 (1980).
- 10) Planas-Bohne, F.: Experientia, **36**, 1001~1002 (1980).