

大豆11S グロブリンのサブユニット中のペプチドフラグメントを抗原とする免疫学的手法による加熱変性大豆たん白質の検出，定量法の開発

STUDY ON QUANTITATION OF HEAT DENATURED SOY PROTEIN: DEVELOPMENT OF A NOVEL METHOD FOR QUANTITATION OF HEAT DENATURED SOY PROTEIN BY UTILIZING PEPTIDE FRAGMENT FROM SUBUNIT OF SOY 11S GLOBULIN AS ANTIGEN IN ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

安本教傳・須戸 幹・鈴木鐵也（京都大学食糧科学研究所）

Kyoden YASUMOTO, Miki SUDO and Tetsuya SUZUKI

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

ABSTRACT

A high specificity and sensitivity of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was availed to work out a quantitative procedure for heat denatured soy protein at microgram level. The procedure is based on the immunoreactivity of peptide fragment(s) to anti-11S globulin antibody. Anti-11S globulin antibody was raised in rabbits. The peptide fragment(s) which was reactive against rabbit anti-11S globulin antibody was prepared by a combination of ion exchange, gel permeation, and reversed-phase chromatographies subsequent to heat treatment and tryptic digestion of 11S globulin. An immunoreactive fraction thus obtained was used for calibration in ELISA. Food samples were autoclaved, digested with trypsin and then subjected to ELISA for quantitation of added soy protein. A quantitative difference was observed in immunoreactivity against anti-11S globulin antibody among soybean varieties. However, food proteins other than soy bean showed little, if any, immunoreactivity in present system. This novel method appears to be a useful technique in quantitating heat denatured soy protein in various processed foods. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 8, 25-30, 1987.

植物性たん白質の機能には、ゲル化性、乳化性、保水性、結着性などの特性がある。最近、これらの有用性に着目して単に増量を意図するだけでなく、バインダーや乳化安定剤として、あるいはテクスチャーの改善などの目的で、むしろ積極的に動物性食品に混和されている。このような食品は、加工過程で高温、高圧、強酸、強アルカリなどの過酷な条件下で処理されるため、たん白質は変性や部分的分解を受ける。これまでに、加工食品中に混和された植物性たん白質を定量的に検出するための試みが多くなされているが^{1~14)}、いづれも定量的検出に限界があり、実用化されていない。

前報において、著者らは、大豆 11S グロブリンの塩基性サブユニットに含まれる特異的なペプチド SP-1 に着目して加工食品に混和された大豆たん白質を定量的に検出することを試みた。本研究では、SPI からトリプシン消化によって得られる SP-1 とは異なる、ペプチド断片を免疫化学的に検出し定量する方法を検討したので、以下にその概要を報告する。

実験方法

抗大豆 11S グロブリン抗体の調製と精製

大豆 11S グロブリンは、Thanh & Shibasaki の方法¹⁵⁾

により SPI から単離し、DEAE-TOYOPEARL 650S を用いて精製した。抗 11S グロブリン抗血清はウサギを用いて調製した。抗血清を30～40%硫酸で分画し、つづいて 11S グロブリンをリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィーにより精製して、ウサギ抗 11S グロブリン抗体標品（以下抗 11S 抗体）を得た。以下の実験には、この抗 11S 抗体を用いた。

実 験 試 料

酵素免疫抗体法 (ELISA) による、加熱大豆たん白質の定量実験に用いた材料を以下に示す。

検量線作成には SPI を、非大豆たん白質性の食品素材との反応性の検討には、牛赤身肉、豚赤身肉、ニワトリ全卵、牛乳カゼイン、小麦グルテンを用いた。また、品種を異にする大豆との反応性の検討には、ライデン、マツウラ、シロツルノコ、ヨーク、ヒルの 5 品種を用いた。本法の実用性を評価するために、大豆たん白質を混和した加工食品のモデルとして、Table 1 に示すような基本配合からなるポークソーセージと、これに Table 2 で示すような増量剤を加え、ポークソーセージのたん白質を SPI で10%、20%置換したもの 3 種類を調製した。

Table 1. Recipe for pork sausage

Ingredient	Weight (g)
Pork ham	30
Pork belly	50
Ice water	20
Sodium pyrophosphate	0.7
NaCl	1.7
Sodium nitrite	0.01
Spice mixture	0.4
Flavour mixture	0.2
Total	103.01

Table 2. Recipe for extender

Ingredient	Weight (g)
SPI	16.7
Lard	16.7
Water	66.7
Total	100.1

ELISA 分析のための試料の前処理

試料約10g を10倍量の酸性エタノール（エタノール：0.1N HCl=75：25）および、10倍量のアセトンで3回処理してアセトンパウダーを調製した。ただし、生大豆は10倍量の酸性エタノールに1晩浸漬してから処理した。また、SPI、牛乳カゼイン、小麦グルテンではこの前処理を省略した。各試料のたん白質は、Kjeldahl 法（窒素換算係数6.25、ただし牛乳カゼインは6.38）により求めた。

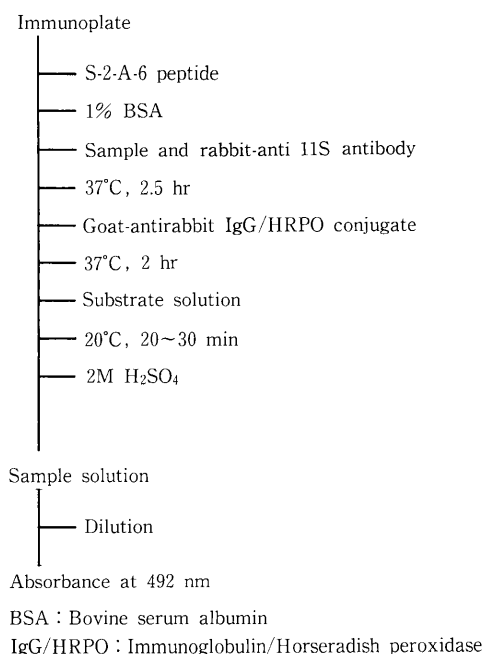
たん白質として250 mg の試料を0.5 M NaCl、0.01 M CaCl₂を含む0.03 M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.1) 5 ml に懸濁させ、120℃、3時間オートクレーブ処理したのち、たん白質に対して1%になるようにトリプシン溶液を加え、37℃、24時間の限定加水分解を行った。反応停止後、0.15 M NaCl を含む0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 8 ml を加えて遠心分離し、沈澱にさらに1%酢酸 2 ml を加えて懸濁、遠心分離し、両者の上澄を集めて、0.15 M NaCl を含む0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) で20 ml とした。

11S グロブリンのトリプシン消化物からの抗 11S 抗体反応性ペプチドの精製

11S グロブリン画分をトリプシンで消化したのち、遠心分離して沈澱を除き、上澄画分を SP-TOYOPEARL 650S (2.2 φ×20 cm) による陽イオン交換クロマトグラフィー、TOYOPEARL HW-40S (1.6 φ×55 cm) によるゲル濾過及び Pep-RPC HR 5/5 による逆相カラムクロマトグラフィー (0.5 φ×5.0 cm) を用いて、抗 11S 抗体と反応するペプチド画分を精製した。抗 11S 抗体との反応性は、11S グロブリンのトリプシン消化物を不溶性抗原とし、クロマトグラフィーにより分画した画分を抗原溶液とした ELISA で検討した。

ELISA によるトリプシン消化物の抗 11S 抗体との反応性の検討

ELISA の手順は、Scheme 1 に示したとおりである。検量線作成には、2 倍ごとに段階希釈した SPI のトリプシン消化溶液を抗原溶液とした。また、ポークソーセージについては2倍希釈、他の試料は4倍希釈して抗原溶液とした。抗 11S 抗体は、500倍希釈して用いた。固相の抗原と結合した抗 11S 抗体は、5000倍希釈した抗ウサギ IgG 抗体-ペルオキシダーゼ複合体を用いて検出した。抗 11S 抗体と、非大豆たん白質性の食品素材、および品種を異にする大豆たん白質との反応性は、4 倍希釈した SPI のトリプシン消化溶液の吸光度を 100% として表した。ポークソーセージ中の SPI の量は検量線より求めた。



Scheme 1. ELISA procedure

結 果

抗 11S 抗体に反応性を示すペプチドの精製

11S グロブリンのトリプシン消化物を SP-TOYOPEARL に供したところ、Fig. 1 に示すように 2 つの画分(S-1, S-2)で高い反応性が認められた。S-1, S-2, それぞれを TOYOPEARL HW-40 を用いたゲル濾過に供したところ、S-1 は排除限界付近に溶出した。一方、S-2 は Fig. 2 に示すように、さらに 2 つの反応性のある画分(S-2-A, S-2-B)に分離した。S-2-A の分子量は約 7000 であった。S-2-A をさらに Pep RPC HR 5/5 で分画したところ、Fig. 3 に示すように、S-2-A-6 の画分が抗 11S 抗体と反応性を示した。以下の ELISA には、S-2 の画分のうち、反応性の高い S-2-A-6 ペプチド画分を不溶性抗原として用いた。S-1 も高い反応性を示したが、盲検値が高く、定量には利用し得なかった。

SPI の定量に用いる検量線の作成

検量線は、2 倍系列の段階希釈をした SPI トリプシン消化物に対して作成した。Fig. 4 に示すように本実験で用いた抗体では、SPI 量が 2.4~312.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ の範囲内で定量的検出が可能であった。

抗 11S 抗体に対する非大豆たんぱく質性の食品素材の反応性の有無の検討

抗 11S 抗体と牛赤身肉、豚赤身肉、ニワトリ全卵、小麦グルテン、牛乳カゼインとの反応性を検討したと

ころ、Table 3 に示すように、いずれも抗 11S 抗体に対して有意の反応性を示さなかった。

SPI から調製した抗 11S 抗体と代表的品種のたん白質のトリプシン消化物との反応性

ライデン、マツウラ、シロツルノコ、ヨーク、ヒルの大豆 5 品種について、SPI から調製した抗 11S 抗体との反応性を検討した。Table 4 に示すように、品種により反応性が異なっていた。即ち、抗体調製に用いた SPI を基準にして比較すると、マツウラの反応性が SPI とほぼ同じ、ライデン、シロツルノコ、ヨークは 79~66%、これに対し、ヒルの反応性は 49% であった。ポークソーセージの中の大豆たん白質の定量

たん白質の 10.4, 20.8% を SPI で置換したモデルポークソーセージ中の SPI 含量を、SPI の検量線を用いて定量した。Table 5 に示すように、検量線から上記モデル中の SPI 含量は、それぞれ 10.7 ± 0.6 , $20.9 \pm 1.0\%$ との値を得た。また、SPI を含まないポークソーセージでは抗 11S 抗体に対する反応性は認められなかった。

考 察

トリプシン消化によって生じるペプチド断片を不溶性抗原とした ELISA により 2.4~312.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ の範囲で SPI の定量が可能であることが判った。本法では抗 11S 抗体を用いたため、トリプシン消化物に対する親和性は 11S グロブリン に対するほど高くないが、食品中に混和された SPI を定量するには本法の感度で十分実用性がある。

一方、大豆たん白質以外の食品たん白質素材は、抗 11S 抗体に対する反応性を示さなかった (Table 3)。また、Table 5 に示すようにモデルポークソーセージ中の SPI を本法で定量したところ、配合量とよく一致した。

これらのことから本法は、加熱加工食品中に混和されている SPI の特異的な検出、定量法としての利用が可能であることが明かとなった。

Table 4 に示したように、大豆品種間で抗 11S 抗体に対する反応性が異なっていた。最近得られた大豆 11S グロブリン の一次構造に関する知見によると^{16,17)}、11S グロブリンの酸性サブユニットの C 末端付近で一次構造の変異が起こりやすく、この部位の違いが各サブユニットを特徴づけている要素であると推定されている。本実験で抗 11S 抗体の調製に用いた SPI の品種が明かでないが、Table 4 の結果は、各品種中の 11S 含量や、11S グロブリン中のサブユニット組成、あるいは品種間での一次構造の相違が影響して

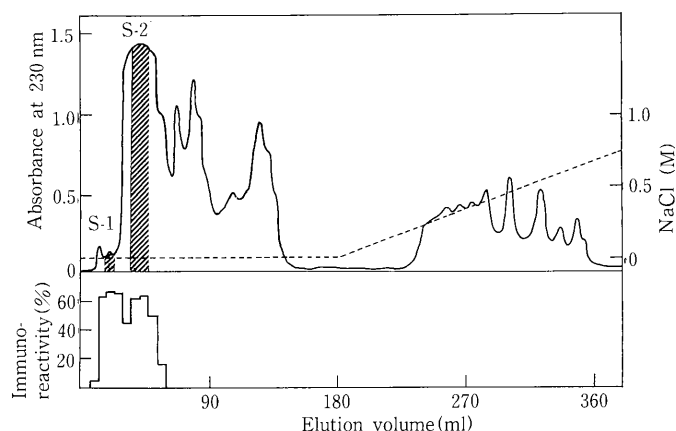


Fig. 1. Soybean 11S globulin¹⁴) was chromatographed on SP-TOYOPEARL column (2.2 cm ϕ 20 cm). Immuno-reactivity of the eluates to anti-rabbit 11S antibody was examined by ELISA. Solid line in the upper frame shows elution pattern monitored at 230 nm, and dotted line NaCl concentration in the gradient elution. Solid line in the bottom frame shows the extent of immunoreactivity to anti-rabbit 11S antibody in ELISA represented as relative percent to SPI. The fraction referred as "S-2" was collected and provided for further subfractionation by gel permeation chromatography.

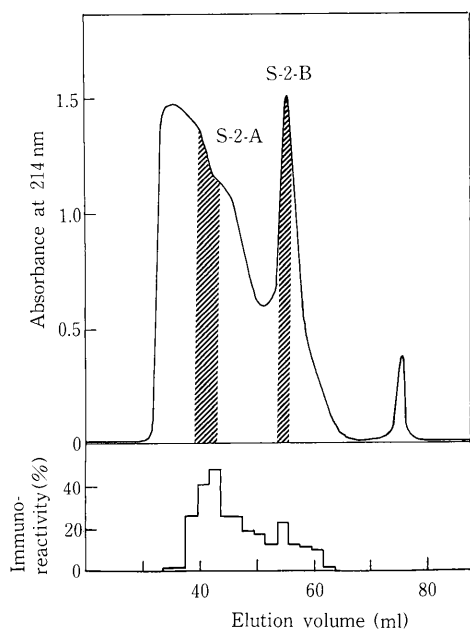


Fig. 2. An immunoreactive fragment, "S-2", fractionated by the cation exchange chromatography (Fig. 1) was fractionated on gel permeation chromatography using TOYOPEARL HW-40S column (1.6 cm ϕ $\times$ 55 cm). Ammonium carbonate (50 mM) was used as mobile phase at the flow rate of 1 ml/min. Eluate was monitored at 214 nm (upper frame). The fraction, "S-2-A" (slant line) was collected and provided for further purification by a reversed-phase column chromatography.

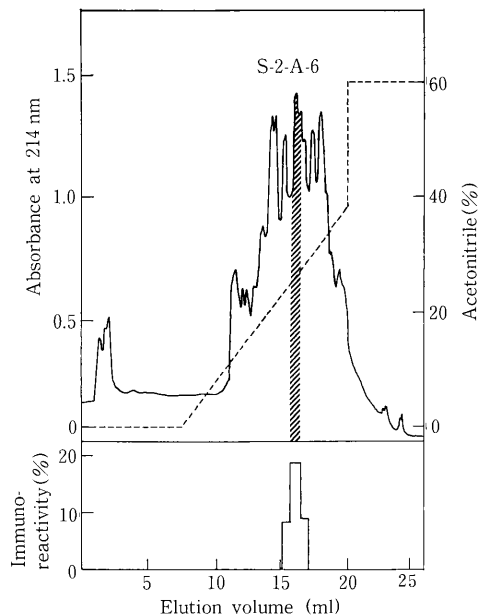


Fig. 3. The subfraction "S-2-A" in gel permeation chromatography (Fig. 2) was purified on a reversed-phase chromatography using PEP-PC HR 5/5 column (0.5 cm ϕ $\times$ 5 cm) on HPLC system (Pharmacia Fine Chemicals) with gradient elution of acetonitrile concentration from 0 to 60% in 0.1% trifluoroacetic acid (dotted line). Elution profile was recorded by monitoring absorption at 214 nm. Immuno-reactivity was detected at 15 to 17 ml denoted by "S-2-A-6" fraction (slant line). The "S-2-A-6" fraction was used as the standard immunoreactive fragment throughout the present experiments.

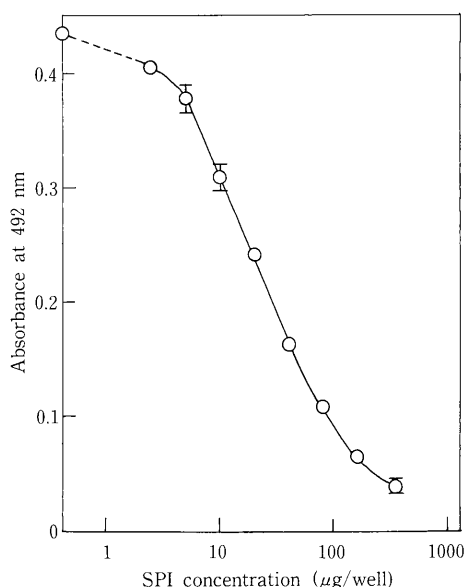


Fig. 4. Calibration curve was made by using SPI, the same material used for preparation of rabbit anti-11S antibody. Details were given in Scheme 1.

Table 3. Response of food materials to ELISA

Sample	Response
SPI	100.0
Beef	0.0
Pork	0.9
Egg	0.0
Gluten	1.5
Casein	0.0

Samples (250 mg as protein content) were subjected to ELISA after pretreatment with acetone, acidic ethanol and trypsin digestion. Values represent immunoreactivity expressed in percent to that of SPI.

Table 4. Response to ELISA of defatted soy bean of different varieties

Variety	Response
Raiden	79.1
Matsuura	102.9
Shiotsurunoko	72.8
York	66.1
Hill	49.1

Experimental condition was essentially the same as described in Table 3.

Table 5. Determination by ELISA of soy protein content in pork sausage

SPI added	Soy protein detected by ELISA
0.0	0.0±0.0
10.4	10.7±0.6
20.8	20.9±1.0

Experimental procedures were basically the same as described in Table 3. Values in the left column represent soy protein levels as determined by Kjeldahl's method, and those in the right column are values obtained by ELISA method. All values were expressed by mean±S. E. M. for 3 samples.

いるたではないかと考えられた。本法で用いた S-2-A-6 ペプチド画分の抗原決定基を明らかにすることで、品種間で生じる反応性の差異の要因が解明できるものと思われる。

大豆の品種間で一次構造相同性の高いペプチドを抗原として調製した抗体を用いれば、さらに高感度で、品種による影響を受けない大豆たん白質の定量が可能であると考えられる。

文 献

- 1) 安本教傳, 和辻 徹, 須戸 幹, 等々力博志, 鈴木鐵也(1986): 動物性たん白質食品中に混和された植物性たん白質の定量的検出(その2) 酵素標識免疫定量法(ELISA)による加工大豆たん白質の定量的検出. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **7**, 18-21.
- 2) Parsons, A. L. and Lawrie, R. A. (1972): Quantitative identification of soya protein in fresh and heated meat products. *J. Food Technol.*, **7**, 455-492.
- 3) Guy, R. C. E., Jayaram, R. and Willcon, C. J. (1973): Analysis of commercial soya additives in meat products. *J. Sci. Food Agric.*, **24**, 1551-1563.
- 4) 橋詰和宗, 野口明徳(1978): 動物蛋白食品に加えられた植物蛋白質の鑑別法として SDS ゲル電気泳動法の検討. 日本食品工業学会誌, **25**, 628-634.
- 5) 橋詰和宗, 小原忠彦, 安藤洋子(1978): 尿素系ポリアクリルアミドゲル電気泳動による動物蛋白食品に加えられた植物蛋白質の鑑別. 日本食品工業学会誌, **25**, 635-640.
- 6) Lee, Y. B., Rickansrud, D. A., Hagberg, E. C. and Briskey, E. J. (1975): Quantitative determination of soya protein in fresh and cooked meat

- soy-blends. *J. Food Sci.*, **40**, 380-383.
- 7) Armstrong, D. J., Richerrt, S. H. and Rieman, S. M. (1982): The determination of isolated soya protein in raw and pasteurized meat products. *J. Food Technol.*, **17**, 327-337.
 - 8) Kamm, L. (1970): Immunochemical quantitation of soybean protein in raw and cooked meat products. *J. A. O. A. C.*, **53**, 1248-1252.
 - 9) Koh, T. Y. (1978): Immunochemical method for the identification and quantitation of cooked or uncooked beef and soya protein in mixture. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, **11**, 124-128.
 - 10) Hitchcock, C. H. S., Bailey, F. J., Crimes, A. A., Dean, B. A. G. and Davis, P. J. (1981): Determination of soya protein in food using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *J. Sci. Food Agric.*, **32**, 157-165.
 - 11) Griffiths, N. M., Billington, M. J., Crimes, A. A. and Hitchcock, C. H. S. (1984): An assessment of commercially available reagents for an enzyme-linked immunosorbent assay of soya protein in meat products. *J. Sci. Food Agric.*, **35**, 1255-1260.
 - 12) Llewellyn, J. W., Dean, A. C., Sawyer, R., Bailey, F. J. and Hitchcock, C. H. S. (1978): The determination of meat and soya protein in meat products by peptide analysis. *J. Food Technol.*, **13**, 249-252.
 - 13) Coomarasamy, M. and Flint, F. O. (1973): The histochemical detection of soya "Novel Proteins" in comminuted meat products. *Analyst*, **98**, 542-545.
 - 14) Flint, F. O. and Meech, M. V. (1978): Quantitative determination of texturized soya protein by a sterological technique. *Analyst*, **103**, 252-258.
 - 15) Thanh, V. H. and Shibasaki, K. (1976): Major proteins of soybean seeds. A straightforward fraction and their characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1117-1121.
 - 16) Nielsen, N. C. (1985): The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **62**, 1680-1686.
 - 17) Utsumi, S., Kohno, M., Mori, T. and Kito, M. (1987): An alternate cDNA encoding glycinin A_{1a}B_a subunit. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 210-214.