

大豆たん白質の低アレルゲン化に関する研究

PREPARATION OF HYPOALLERGENIC SOYBEAN PRODUCTS— IDENTIFICATION OF ALLERGENIC PROTEINS IN SOYBEANS—

小川 正・辻 英明・板東紀子（徳島大学医学部）

Tadashi OGAWA, Hideaki TSUJI and Noriko BANDO

Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770.

ABSTRACT

A number of patients with atopic dermatitis are considered to be suffering from food allergy. Soybeans are known as one major allergenic foods and the allergenicity resides in protein fractions. It is of important to define the allergenic components in soybeans in order to develop hypoallergenic soybean products for soybean-sensitive patients. IgE-binding proteins (allergens) have been characterized by SDS-PAGE and immunoblot methods using sera of the patients with atopic dermatitis. About 15 components of soybean proteins were recognized by patient's sera and about two-thirds of them were assigned to the components in the 7S-globulin fraction. A unique protein with a molecular mass of about 30-kDa in the 7S-globulin fraction bound most strongly and frequently with the patient's IgEs, which was named as *Gly m Bd 30 k*, a major allergen in soybeans. α -Subunit of β -conglycinin was also found to be allergenic, while α' - and β -subunits were not reactive. Kunitz soybean trypsin inhibitor was scarcely recognized by the patient's sera. Sera of almost all patients were shown to lack the IgEs recognizing the proteins in the 11S-globulin fraction. This fact suggests that conglycinin may be less allergenic to the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 13, 86-91, 1992.

大豆たん白質は優れた栄養性、加工特性を有することから、食品加工に有効な助材として広く利用されている。一方、大豆たん白質に起因する食物アレルギー患者が少なからず存在することは良く知られている事実である。我々は、乳幼児におけるアトピー性皮膚炎患者の約20%が大豆たん白質に対して陽性であることを明らかにしている¹⁾。従って、大豆たん白質が多様な加工食品に利用されるに伴い、これらの患者では大豆たん白質を含まず、安全に利用できる加工食品の選択を非常に困難にしているのが現状である。本研究は、大豆たん白質中のアレルゲン成分を同定し、その性質を解明することにより、大豆たん白質加工食品の低アレルゲン化を実現することを目的に行っている

ものである。

実験方法

大豆アレルギー患者血清

国立香川小児病院外来にてアトピー性皮膚炎と診断された患者約500人の内、Pharmacia 製 soybean allergen disk を用いた radioallergosorbent test (RAST) 及び後述のイムノプロット法による検定で大豆たん白質陽性を示した患者より血清の提供を受け、本実験に使用した。

大豆たん白質の分画

不二製油株式会社にて調製されたアメリカ産大豆の脱脂大豆フレークより、30 mM Tris HCl buffer (pH

8.0) にて抽出した大豆全抽出たん白質 (whole extract) より Thanh and Shibasaki²⁾ の方法に従って 7S- 及び 11S-グロブリン画分を調製した。2S-グロブリン画分は Koshiyama ら³⁾の方法に従って調製した。2S-, 7S-, 11S-グロブリンを除去した画分をホエー画分とした。

β -Conglycinin の α' , α , β サブユニットの調製

Coates ら⁴⁾の方法にしたがって, 7S-グロブリン画分を尿素の存在下で DEAE-Sephacel によるクロマトグラフィーを行って β -conglycinin の主要サブユニットを単離した。

イムノブロット法による IgE 抗体結合性たん白質 (アレルゲン) の検出

大豆たん白質各画分を Laemmli⁵⁾ の方法に従って, 還元剤 (2-mercaptoethanol) の存在下 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel-electrophoresis (SDS-PAGE) を行なったたん白質を分離後, ニトロセルロース膜上に転写し, これを患者血清にて処理して, IgE 抗体と結合したたん白質を ¹²⁵I 標識抗ヒト IgE 抗体で免疫染色し, レントゲンフィルム上のオートラジオグラムにより IgE 抗体結合性たん白質を検出した¹⁾。

二次元ゲル電気泳動

大豆たん白質の微細な分離には, Hirano⁶⁾ の方法に

従い, 一次元に等電点電気泳動, 二次元に還元剤存在下での SDS-PAGE を用いる二次元ゲル電気泳動を用いた。

α サブユニットの BrCN, chymotrypsin による限定分解

単離した β -conglycinin の α サブユニット (73 kDa)⁷⁾ は BrCN によりペプチド鎖383番目の Met 残基の位置で2本のペプチド (54 kDa, 20 kDa) に切断⁸⁾した後, 54 kDa ペプチドをさらに Cleveland ら⁹⁾の方法に従い, SDS-PAGE 上で chymotrypsin による限定加水分解を行って 36 kDa 及び 18 kDa ペプチドに分解した。ペプチド断片のアレルゲン性は上述のイムノブロット法で検定した。

結 果 と 考 察

大豆の IgE 抗体結合性たん白質 (アレルゲン)

Fig. 1 は無作為抽出したアトピー性皮膚炎患者77人の血清によるイムノブロットのオートラジオグラムの結果を示したものである。いずれかの大豆たん白質に特異的な IgE 抗体を保有する患者は約22% (17/77) であり, 個々の患者の認識するたん白質は多様性を示した。これらのたん白質成分を分離した大豆たん白質の各画分を用いて精査し (Fig. 2), その帰属を行った結果を Table 1 に示した。また, Table 1 には, 既知

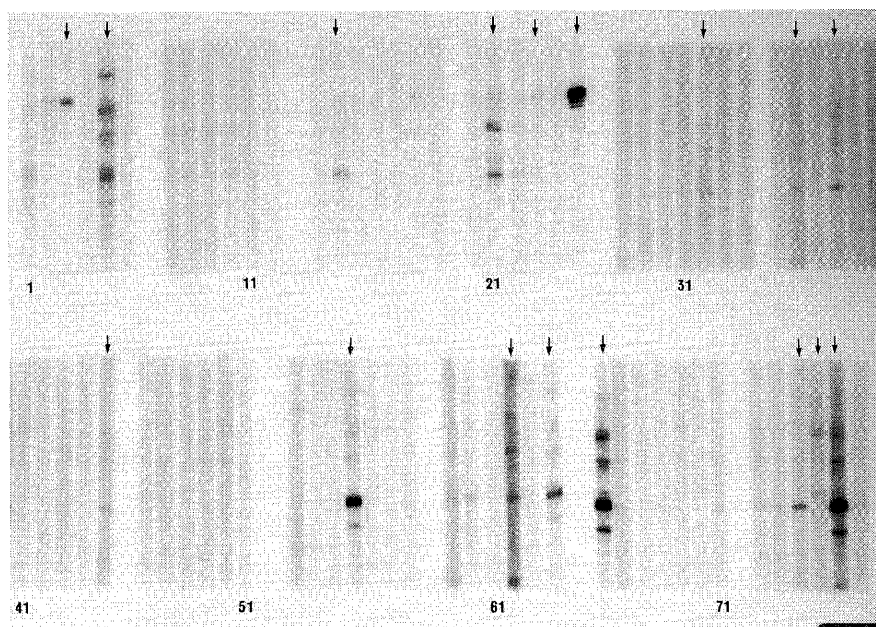


Fig. 1. Autoradiograms of whole soybean proteins after immunoblotting with the sera of 77 patients with atopic dermatitis. Arrows indicate the patients with IgE antibodies recognizing soybean proteins.

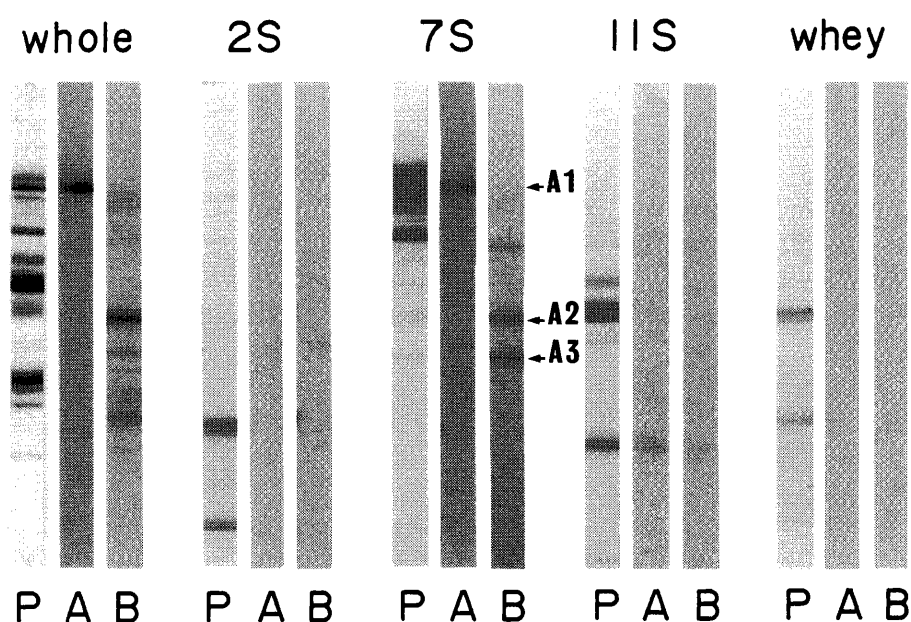


Fig. 2. Autoradiograms of the fractionated soybean proteins after immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients. P, proteins stained with coomassie brilliant blue; A, serum of patient A; B, serum of patient B. A1, A2 and A3 in the figure indicate the allergenic proteins of α subunit of β -conglycinin, *Gly m Bd* 30 k and 28 kDa protein, respectively (see Table 1).

Table 1. IgE-binding proteins in soybeans

Protein mass <i>kDa</i>	Assignment (Fraction)	Frequency ¹ %
70-68	7S (α subunit)	23.2
67-63	7S	18.8
55-52	7S	14.5
50-47	7S	13.0
45-43	7S (β subunit)	10.1
41-40	7S	7.2
38-35	7S	7.2
35	11S (acidic subunit)	1.4
35-33	7S	15.9
31-29	Whey (HMW) ²	4.3
30	7S (<i>Gly m Bd</i> 30 k)	65.2
28	7S	23.2
21-18	Whey (LMW) ²	7.2
20	2S (KSTI)	2.9
17	2S	1.4
15-14	2S	2.9

¹Among the 69 soybean-sensitive patients. ²HMW : high molecular weight; LMW : low molecular weight

成分に帰属し得たものは () 内に表示し、また、これらの抗体保有患者の出現する頻度を同時に示した。出現頻度10%以上の主要アレルゲンは、総て 7S-グロブリン画分に分画されるたん白質に帰属された。出現頻度65%の最も主要なアレルゲン成分をアレルゲン命名法¹⁰⁾に従い、*Gly m Bd 30 k* と名付けた。 β -conglycinin の α -サブユニットも主要なアレルゲンの一つであることを明らかにした。一方、アレルゲン

性が最も強いと疑われていた Kunitz soybean trypsin inhibitor (KSTI) はアトピー性皮膚炎患者血清によってほとんど認識されなかった。

主要アレルゲン *Gly m Bd 30 k* の単離・精製及び性質

粗 7S-グロブリン画分を30 mM K-リン酸 buffer, pH 7.6 で Sepharose 6B によるゲル濾過クロマトグラフィー (Fig. 3), 次いで ConA-Sepharose 4B によるアフィニティークロマトグラフィーを行って未変性のアレルゲンを調製した。Sepharose 6B における溶出位置は、11S-グロブリンの直前であり、*Gly m Bd 30 k* は少なくとも分子量30万以上の会合体として大豆中に存在することを示した。また、これを10% SDS, 10 mM 2-mercaptoethanol 処理して単量体とし、変性アレルゲンを調製した。変性アレルゲンはさらにその SH-基を carboxymethyl (RCM) 化し、HPLC にて純化した。未変性アレルゲンの二次元ゲル電気泳動の結果を Fig. 4 に示した。未変性アレルゲンは pH 4 付近に等電点を与え、SDS, 還元剤の存在下で、分子量約 30 000 の単量体に解離する。単離された RCM-アレルゲンは患者血清によって強く認識される。この 30 kDa の質量を与えるたん白質成分は、大豆中の既知の 30 kDa 成分であるレクチンや塩基性 7S-グロブリンのサブユニット成分とは異なる成分であり、これらは *Gly m Bd 30 k* を認識する抗体とは交叉性を示さない。

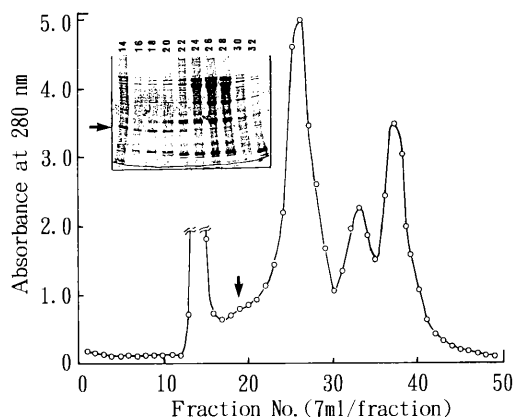


Fig. 3. Chromatogram of the crude 7S-globulin fraction on Sepharose 6B. Arrow indicates the elution position of *Gly m Bd 30 k* allergen.

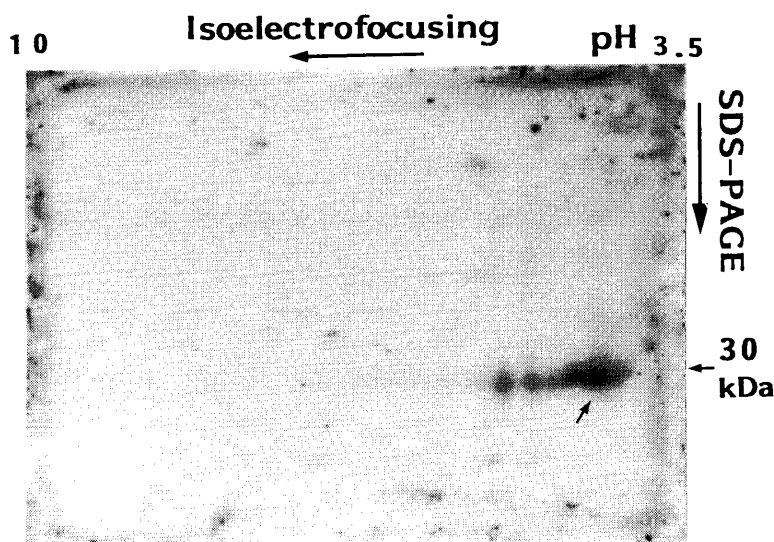


Fig. 4. Autoradiogram of native *Gly m Bd 30 k* allergen on two dimensional gel-electrophoresis after immunoblotting with the patient's serum. Arrow indicates *Gly m Bd 30 k*.

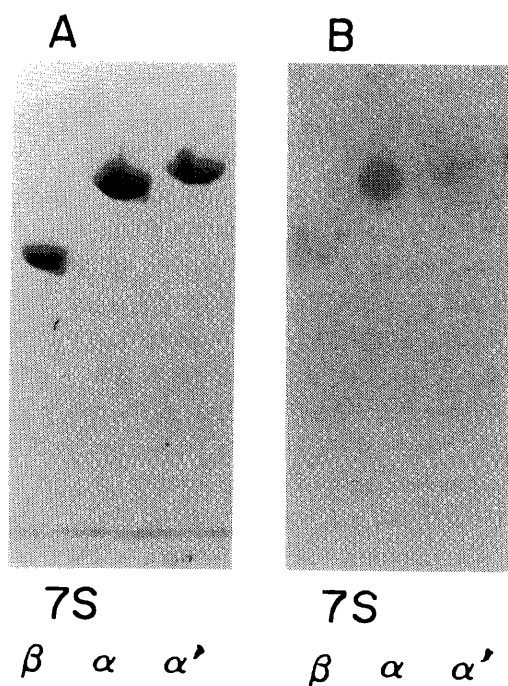


Fig. 5. Cross-reactivity of α subunit-specific IgE antibodies among α , α' and β subunits of β -conglycinin. A, proteins stained with amido black 10B; B, autoradiogram after immunoblotting with serum containing α subunit-specific IgE.

β -Conglycinin α -サブユニットの IgE 抗体認識部位 (エピトープ) の解析

α -サブユニットを認識する患者 IgE 抗体は単離した他の α' -, β -サブユニットと全く交叉性を示さないことを明らかにした (Fig. 5)。この事実は、 β -conglycinin のサブユニット間のアミノ酸配列に非常に高い相同性が存在すること⁶⁾を考慮すれば、そのエピトープ構造を解析し、サブユニット間の構造の差を比較することによって、タン白質の構造と IgE 抗体産生の相関関係を解明する糸口を見いだせる可能性を示すものである。実験方法の項で述べた手順による α -サブユニットのペプチド断片化によるエピトープ部位の解析経過を Fig. 6 に示した。この結果は、エピトープは α -サブユニットの N 末端から 232 番目の Tyr から 383 番目の Met 間の 18 kDa ペプチド上に存在することを示している。また、この部分には糖類を含んでおらず、 α -サブユニットの糖鎖部分は IgE 抗体との結合に関与しないことを明らかにした。大豆タン白質中の最も主要なアレルゲンと同定された Gly m Bd 30 k は、7S-グロブリン画分に分画されるタン白質成分であるが、既に報告のある大豆タン白質成分のいずれにも一致せず、その帰属、性質の解明を通してアレルゲン性の除去法の開発が急務である。従来、そのアレルゲン性の強さが疑われていた KSTI を認識する抗体を保有する患者は少数であった。また、大豆の主要貯蔵タン白質成分である 11S-グロブリン、即ち glycinin を認識する IgE 抗体を保有する患者はほとんど認められず、少なくとも大豆陽性のアトピー性皮膚炎患者に対しては最もアレルゲン性の低い大豆タン白質成分であることが示唆された。

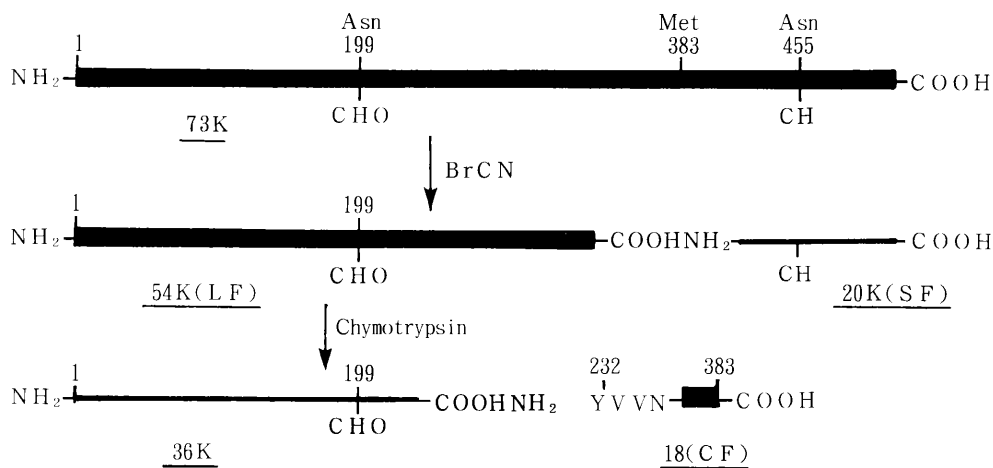


Fig. 6. Fragmentation of α subunit of β -conglycinin with BrCN and chymotrypsin.

文 献

- 1) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Okajima H, Nishikawa K and Sasaoka K (1991): Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J Nutr Sci Vitaminol*, **37**, 555-565.
- 2) Thanh VH and Shibasaki K (1976): Major proteins in soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J Agric Food Chem*, **24**, 1117-1121.
- 3) Koshiyama I, Kikuchi M, Harada K and Fukushima D (1981): 2S-Globulin of soybean seeds. I. Isolation and characterization of protein components. *J Agric Food Chem*, **29**, 336-340.
- 4) Coates JB, Medeiros JS, Thanh VH and Nielsen NC (1985): Characterization of the subunits of β -conglycinin. *Arch Biochem Biophys*, **248**, 184-194.
- 5) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-685.
- 6) Hirano H (1989): Microsequence analysis of winged bean seed protein electroblotted from two-dimensional gel. *J Protein Chem*, **8**, 115-130.
- 7) Sebastiani FL, Ferrell LB, Schuler MA and Beachy RN (1990): Complete sequence of a cDNA of α subunit of soybean β -conglycinin. *Plant Mol Biol*, **15**, 197-201.
- 8) Beeley JG (1976): Active fragment obtained by cyanogen bromide cleavage of ovomucoid. *Biochem J*, **155**, 345-351.
- 9) Cleveland WD, Fischer SG, Kirschner MW and Laemmli UK (1977): Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecylsulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem*, **252**, 1102-1106.
- 10) Marsh DG, Goodfriend I, King TP, Lowenstein H and Platts-Mills TAE (1987): Allergen nomenclature. *J Allergy Clin Immunol*, **80**, 639-645.