

大豆たん白質利用食品の低アレルゲン化に関する研究

PREPARATION OF HYPOALLERGENIC SOYBEAN PRODUCTS

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 major allergenic protein (*Gly m Bd 30K*) purified from defatted soybean flakes was identified as soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein or P34 vacuolar protein. This protein was shown to have about 30% sequence homology with *Der p I*, a house dust mite allergen originated from *Dermatophagoides pteronyssius*. The monoclonal antibodies against *Gly m Bd 30K* were prepared from mice. Using two distinct monoclonal antibodies, the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay system was developed for the selective determination of *Gly m Bd 30K*. It was shown that the allergen was measured in a range of 5-500 ng/mL in this method. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **14**, 14-20, 1993.

大豆や大豆加工食品にアレルギーを示す患者の血清をプローブとして大豆たん白質アレルゲンのスクリーニングを行った結果、約15種類のIgE抗体結合性たん白質を見いだしたが、その内最も主要なアレルゲンとして *Gly m Bd 30K* を特定した¹⁾。このアレルゲンは7S-グロブリン画分に分画されてくるたん白質として単離されるが、そのたん白質化学的性質から、既に報告のある soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein あるいは P34 vacuolar protein であることが示唆された。また、大豆アレルギー患者の内、約70%の患者血清中に本アレルゲンに対するIgE抗体が検出されることから、本アレルゲンの除去によって大豆の低アレルゲン化が期待出来ると考えられた。本研究では、*Gly m Bd 30K* の同定、性質の検討、さらにモノクローナル抗体の作製と本抗体を利用した食品中のアレルゲンの検出・定量法の開発を主要な研究課題とした。

実験方法

大豆アレルギー患者血清

国立療養所香川小児病院にてアトピー性皮膚炎と診

断され、RAST によって大豆陽性と判定された患者のうち、さらにイムノプロット法¹⁾によって *Gly m Bd 30K* 特異的IgE抗体の存在が確認された患者より提供を受けた血清を使用した。

大豆及び大豆たん白質試料

本実験では、農林水産省農業研究センター筑波園場にて1992年に収穫された品種「スズタカ」を用いた。本試料より前報¹⁾に従って大豆たん白質の各画分を調製した。

たん白質の還元カルボキシメチル化とN-末端アミノ酸配列の解析

ジスルフィド結合の還元カルボキシメチル化(RCM化)はHermanら²⁾の方法によった。またN-末端アミノ酸配列はApplied Bioscience 477A sequence analyzerを用いてHirano³⁾の方法に従って行った。

モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体はBALA/cマウスを用い前報⁴⁾で示した方法にて調製した。

Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

アレルゲンの定量には上述の方法で作製した2種の

性質の異なるモノクローナル抗体(F5, H6)を用いる sandwich ELISA 法を応用した。H6 を1次抗体として用い、2次抗体として用いた peroxidase 標識 F5 は Nakane と Kawaoi⁵⁾ の方法によって調製した。Sandwich ELISA は 96-well microplate に1次抗体 H6 を coating し、1% gelatin にて block した後、アレルゲンを含む試料と37℃にて1時間反応後、H6 に結合したアレルゲンを peroxidase 標識 F5 抗体にて免疫、*o*-phenylenediamine, H₂O₂ にて発色、定量した。

Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel-electrophoresis (SDS-PAGE) およびイムノブロット

SDS-PAGE, イムノブロットによるアレルゲンたん白質の検出は前報¹⁾に従って行った。

結果と考察

Gly m Bd 30K の単離・精製

粗 7S-グロブリン画分を35 mM リン酸 buffer (pH 7.6, 0.4 M NaCl)にて抽出し、抽出液を40%硫酸アンモニウムで塩析した後、沈澱を同上 buffer にて溶解し、

Sephacrose 6B にてゲル濾過を行った。目的のアレルゲンは 11S-, 7S-グロブリン画分に先立って、分子量約30万以上の大きな会合体(オリゴマー)として溶出された。たん白質のアレルゲン性を患者血清を用いるイムノブロットで確認し、アレルゲン画分をプールして Con A Sepharose 4B カラムにて処理して 11S-グロブリンを素通りさせ、吸着したアレルゲンのみを20 mM α -methylmannose にて溶出し、混入した 7S-グロブリンと分離した。溶出したアレルゲンは40%硫酸アンモニウムにて塩析した後、4% SDS, 10% mercaptoethanol にて加熱処理し、モノマーとして Sephacryl S-200 にて分画した。アレルゲン画分をプールした後、50 mM リン酸 buffer (pH 7.6, 10 mM mercaptoethanol)で透析し、Herman ら²⁾の方法にて RCM 化した。RCM-アレルゲンはさらに TSK gel DEAE-SPW カラムを用いる HPLC にて SDS-PAGE において単一にまで精製した(Fig. 1)。

アレルゲン, Gly m Bd 30K のたん白質化学的性質

Gly m Bd 30K は2次元電気泳動において等電点

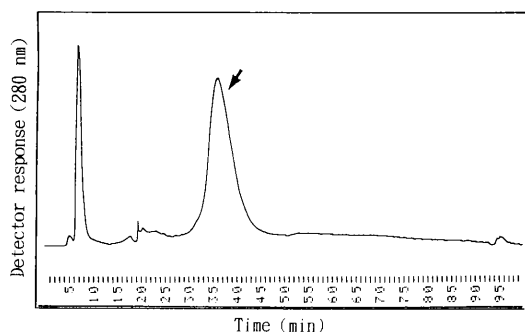


Fig. 1. Chromatogram of the RCM-allergen on HPLC. About 200 μ g of the RCM-allergen was applied on a TSK gel DEAE-5PW column (7.5 mm ID $\times$ 7.5 cm) and eluted with 90 mL of a linear gradient (0.1-1.0 M) of NaCl in 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 at a flow rate of 1.0 mL/min. Arrow indicates the elution peak of the RCM-allergen.

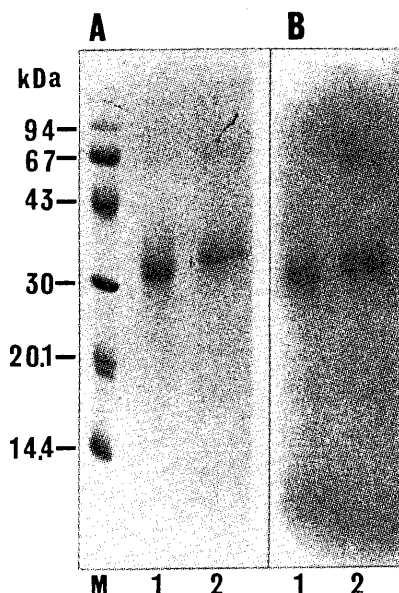


Fig. 2. SDS-PAGE and immunoblot of the purified monomeric allergen and the RCM-allergen. A, Proteins stained with Amido Black 10B as a reference. B, Immunoblot with the patient's serum (autoradiogram). M, molecular weight marker proteins; lane 1, monomeric allergen purified by Sephacryl S-200; lane 2, RCM-allergen purified by HPLC.

4.5を示し、還元剤の存在下 SDS-PAGE にて分子量 32,000を与えた。RCM 化によってその分子量は約 34,000を示すようになる (Fig. 2)。この2,000の差は、Allore and Barber⁶⁾ が指摘しているように、たん白質内部のジスルフィド結合でコンパクトに安定化されていたドメイン構造が大きく変化を起こしたものと考えられ、それに伴って分子量が見掛け上大きくなったものであると解釈される。Table 1 には *Gly m Bd 30K* の *N*-末端アミノ酸配列の解析結果を示したがアミノ酸残基15番までの配列は Karinski ら⁷⁾によって既に報告されている soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein あるいは Herman ら²⁾によって P34 vacuolar protein として報告されているたん白質に完全に一致することを示した。さらにアミノ酸組成も一致することが示された。この同一性はさらに免疫化学的手法によって確認された。

Gly m Bd 30K の免疫化学的性質

Fig. 2 は単離した native *Gly m Bd 30K* とその RCM 化した試料の SDS-PAGE 及び患者血清によるイムノブロットを示している。IgE 抗体は両者を認識することが示された。また、34-kDa oil-body-associated protein を免疫して作製された家兎血清と *Gly m Bd 30K* に対して作製されたモノクローナル抗体を用いて両者の免疫交叉性を見たものが Fig. 3 である。いずれの抗体も互いに相手のたん白質を認識することが示され、両者が免疫学的にもお互いに同一たん白質であることが確認された。

Gly m Bd 30K に対するモノクローナル抗体の作製と sandwich ELISA による定量法の確立

マウスを用いて2種の抗体(F5, H6)が作製された。F5 は IgG, H6 は IgM である。両抗体のアレルゲンに対する親和性を測定した結果、*Gly m Bd 30K* に対

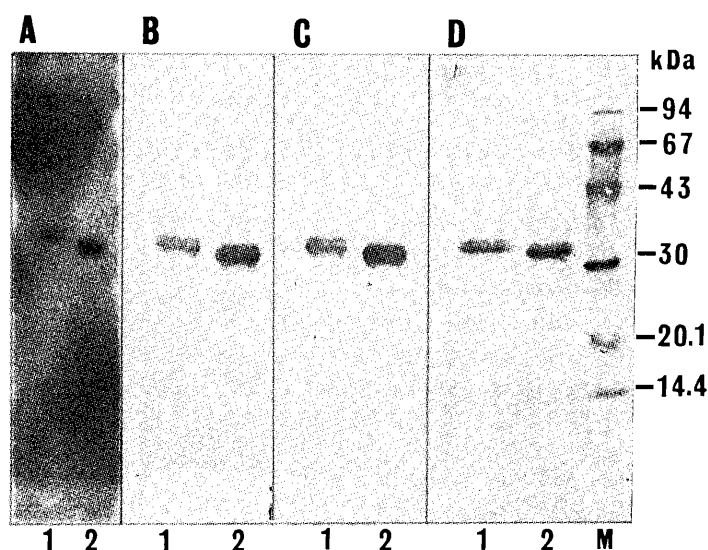


Fig. 3. Cross-reactivity of the RCM-allergen and the 34-kDa oil-body-associated protein to each of the antibodies produced against the RCM-allergen and the 34-kDa oil-body-associated protein. A, Immunoblot with the patient's serum (autoradiogram). B, Immunoblot with the mouse monoclonal antibody produced against the RCM-allergen. C, Immunoblot with the rabbit polyclonal antibodies produced against the 34-kDa oil-body-associated protein. D, Protein stained with Amido Black 10B as a reference. M, molecular weight marker proteins; lane 1, RCM-allergen; lane 2, 34-kDa oil-body-associated protein.

Table 1. *N*-Terminal amino acid sequence of *Gly m* Bd 30K

<i>Gly m</i> Bd 30K
K-K-M-K-K-E-Q-Y-S-C-D-H-P-P-A-
34-kDa oil-body-associated protein ^{a)}
K-K-M-K-K-E-Q-Y-S-C-D-H-P-P-A-(S-W-D-W-R-K-K-)

^{a)} from Ref (7).

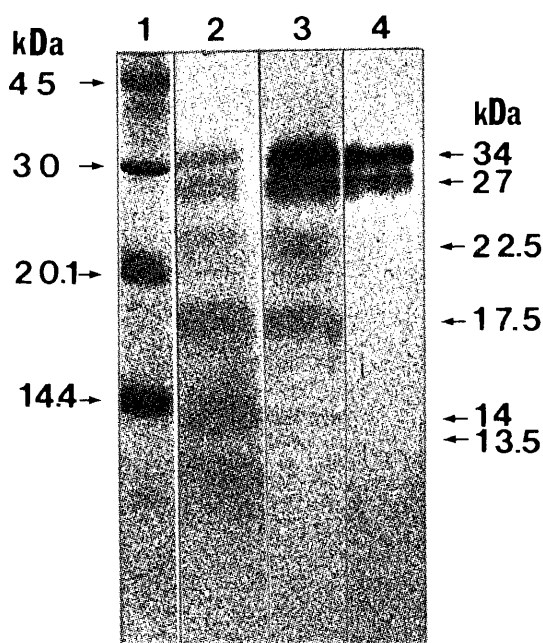


Fig. 4. Immunoblotting patterns of the proteolytic products derived from the intact allergen with lysyl endopeptidase. The intact allergen (40 mg) was digested at 37°C with lysyl endopeptidase (1 : 200 lysyl endopeptidase to the allergen, weight ratio) as described in a previous paper⁴⁾. After a 5-min incubation, the mixture was mixed with an equal volume of the sample buffer and heated for 5 min in a boiling water bath. The samples prepared were subjected to SDS-PAGE. The peptides separated on the gels were electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane and immunoblotted with F5 and H6. 1, standard proteins; 2, the peptides stained with Amido Black 10B; 3 and 4, peptides immunoblotted with F5 and H6, respectively.

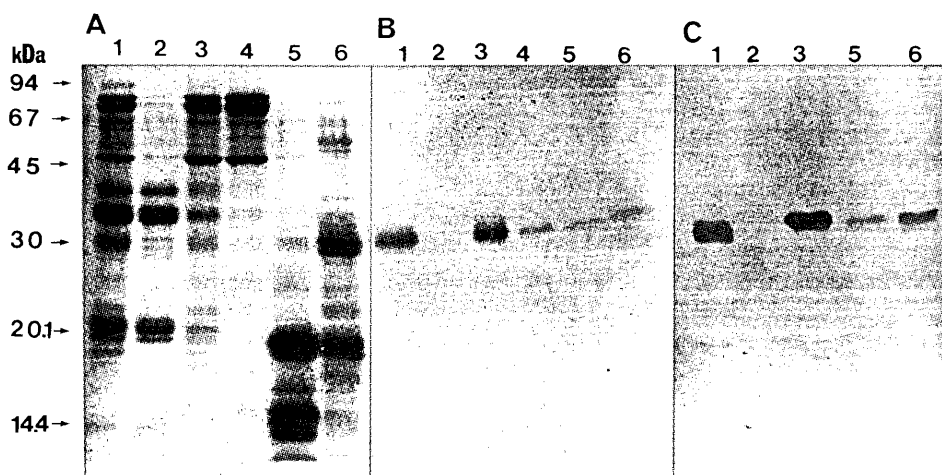


Fig. 5. Immunoblotting analyses of the fractions of soybean proteins with F5 (B) and H6 (C). Each fraction of soybean proteins was prepared in the same manner as described earlier¹⁾. The crude 7S-globulin fraction corresponds to the 7S-globulin fraction obtained in the previous work¹⁾. The crude 7S-globulin proteins were further fractionated by ultracentrifugation at $233,000\times g$ for 20 hr with a linear gradient of sucrose (10 to 30%) in 35 mM potassium phosphate buffer (pH 7.6) and this fraction is designated the purified 7S-globulin fraction. A, the proteins stained with Amido Black 10B; B and C, the proteins immunoblotted with F5 and H6, respectively. 1, whole extract; 2, 11S-globulin fraction; 3, crude 7S-globulin fraction; 4, purified 7S-globulin fraction; 5, 2S-globulin fraction; 6, whey fraction.

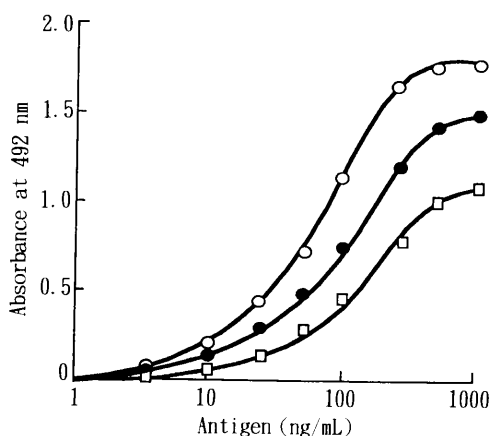


Fig. 6. Dose response curves for the RCM-allergen, the intact allergen, and the SDS/mercaptoethanol-denatured allergen in the sandwich ELISA. The sandwich ELISA was done as described in the text. The intact allergen was incubated at room temperature for 4 hr in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 1% SDS and 10 mM mercaptoethanol and then dialyzed against PBS overnight. The dialysate was used as the SDS/mercaptoethanol-denatured allergen. $\circ$, the RCM-allergen; $\bullet$, the SDS/mercaptoethanol-denatured allergen; $\square$, the intact allergen.

```

Alignment number : 1
Homology score : 313
(31.1% / 212aa)

1'  KKKMKKEQYSCDHPASWDWRKKGVITQVKYGGGCGRGWAFSATGAIEPAHAIAITGDLVSL
1"  TNACSIGNAPAEIDLQMRVTPIRMGGGCGSCWAFSGVAATESAYLAHRNQSIDL
61'  SEQELVDCVEESEGCGYNGWHYQSFEWVLEHGGIATDDDPYRAKEGRCKANKIQDKVTID
58"  AEQELVDCASQ-HGCHGDTIPRGIEYI-QHNGVVQESYRYVAREQSCRPRNAQ-RFGIS
121' GYETVIMSDESTESETEQAFLSAILEQPISVSIDAKDFHLYTG-GIYDGENCTSPYGINH
115" NYCQIYPPNANKIREALAQ--PQRYCRHYWTIKDLDAFRHYDGRITIIQRDNGYQP--NYH
180' FVLLVGYGSADGVVDYWIAKNSWQEDWGEDGYIWIQRNTGNLLGVCGMNYFASYPYTKEESE
171" AVNIVGYSNAGQVDYWIVRNSWDTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVL
240' TLVSARVKGHRRVDHSPL

```

Fig. 7. Amino acid sequence homology between *Gly m* Bd 30K and *Der p* I.
1': *Gly m* Bd 30K, 1": *Der p* I

する Kd 値は F5 が 2.3×10^{-9} M, H6 が 1.3×10^{-8} M であった。Fig. 4 に lysyl endopeptidase によって消化されたアレルゲンたん白質の各ペプチドフラグメントに対する F5, H6 の結合性を示した。この結果から両抗体はそれぞれ異なるエピトープを認識することが示された。この事実は両抗体が sandwich ELISA によるアレルゲンの定量に応用可能なことを示している。モノクローナル抗体を用いる sandwich ELISA によるアレルゲンの定量

Fig. 5 は各種大豆たん白質抽出画分中のアレルゲンを F5, H6 を用いるイムノブロットで検出した結果を示している。抗体は *Gly m* Bd 30K に特異的であることを示すと同時に, 11S-グロブリン画分以外は総てアレルゲンたん白質の混入が観察されている。Fig. 6 に ELISA による定量の検量線の dose response curve を示した。native 及び RCM- 又は SDS- 変性アレルゲンを用いた場合, F5 抗体は RCM-アレルゲンに対して最も高い感度を示し, 定量は 5-500 ng のアレルゲンたん白質の範囲で可能であることが示された。

本研究によって得られた最も興味ある事実は, 本アレルゲンが Karinski ら⁷⁾によって明らかにされているように, papain-like thiolproteinase superfamily に属するたん白質の 1 種であり, Chua ら⁸⁾によって明らかにされた thiolproteinase であるダニアレルゲン (*Der p* I) とアミノ酸配列において非常に相同性の高いたん白質であるということである⁹⁾(Fig. 7)。このことはアレルゲンたん白質の構造と人体における IgE 産生能との関係を理解する上で示唆深いものがある。

文 献

- 1) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Okajima K,

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) Herman EM, Melroy DL and Buckhout TJ (1990): Apparent processing of a soybean oil body associated protein accompanies the onset of oil mobilization. *Plant Physiol*, **94**, 341-349.
- 3) Hirano H (1989): Microsequence analysis of winged bean seed protein electroblotted from two-dimensional gel. *J Protein Chem*, **8**, 115-130.
- 4) Tsuji H, Ogawa T, Bando N, Kimoto M and Sasaoka K (1990): A monoclonal antibodies recognizing the FAD-binding site of 4-aminobenzoate hydroxylase from *Agaricus bisporus*. *J Biol Chem*, **265**, 16064-16067.
- 5) Nakane PK and Kawaoi A (1974): Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*, **22**, 1084-1091.
- 6) Allore RJ and Barber BH (1984): A recommendation for visualizing disulfide bonding by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **137**, 523-527.
- 7) Karinski A, Weisemann JM, Matthews BF and Herman EM (1990): Molecular cloning of a protien associated with soybean seed oil-bodies that is similar to thiol proteinases of the papain family. *J Biol Chem*, **265**, 13843-13848.

- 8) Chua KY, Stewart GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM and Turner KJ (1988): Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, *Der p I*. Homology with cysteine proteinases. *J Exp Med*, **167**, 175-182.
- 9) SDC-GENETYX ver. 8.0 program, SDC, Tokyo.