

## 大豆たん白質と油脂の酸化物の関与によるアレルギー活性の検討

STUDIES ON ALLERGENICITY OF SOYBEAN PROTEIN MODIFIED WITH OXIDIZED LIPID

松田 幹・石井哲也・山本佳津恵・中村 良(名古屋大学農学部)

Tsukasa MATSUDA, Tetsuya ISHII, Kazue YAMAMOTO and Ryo NAKAMURA

School of Agriculture, Nagoya University, Nagoya 464-01

### ABSTRACT

IgG and IgE antibodies specific for soybean proteins were measured by ELISA for sera collected from several strains of mice fed commercially available non-purified diet, in which soy protein antigens were detected immunologically. Significantly high level of IgG anti-soybean protein was detected in sera of several mice, whereas specific IgE antibody was not; IgG specific for 7S and 11S globulins were detected in the sera of ddY mice, IgG anti-2S globulin was in these of BALB/c and B10.D2 mice, and IgG anti-7S globulin was in that of B10.A mouse. To examine effect of heating with soybean oil on immunological properties of soybean proteins, soybean protein was mixed with soybean oil and heated at 50 °C for 9 days, and reactivity of the mouse serum IgG to the heated protein/oil mixture was measured. Reactivity to the soybean antigens of IgG in the sera of some mice was significantly increased by the heating with soybean oil, suggesting that some new antigenic structures of antigenic compound were formed by reaction of soybean proteins with soybean oil. Therefore, effect of protein modification with lipid peroxidation products was examined on immunological properties of soybean proteins. 4-Hydroxynon-2-enal (HNE), a major degradation product formed by lipid peroxidation was used as a model compound. Soybean 2S, 7S and 11S proteins were incubated with HNE, and HNE-modified proteins were detected by immunoblotting using HNE-specific antibody. HNE-modified 7S and 11S globulins were clearly detected with the specific antibody, whereas no modified protein was detected in 2S globulin. The HNE-modified 7S and 11S proteins mixed with aluminium hydroxide gel (Alum) were intraperitoneally injected into ddY mice, and specific IgG and IgE responses were measured by ELISA. Intact soybean proteins were also injected into another group of mice as a control experiment. Both IgG and IgE antibody responses to HNE-modified 7S globulin were significantly lower than those of intact 7S globulin, suggesting that HNE-modification decreased immunogenicity of soybean 7S globulin. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **14**, 21-27, 1993.

大豆は牛乳、鶏卵と並んで食物アレルギーにおける主要な原因食品の1つである。大豆アレルギーの原因

抗原に関しては、これまでにいくつかの報告があり、2S グロブリン、7S グロブリン、30 kDa のたん白質

などの複数のたん白質が大豆アレルギー患者血清中のIgE抗体と結合することが知られている<sup>1-3)</sup>。一方、大豆油の酸化分解物との反応に伴う大豆たん白質のアレルゲン活性の上昇が示唆されている<sup>4)</sup>。油脂の酸化分解物とたん白質との成分間反応はたん白質抗原の分子構造を修飾し、変化させるため、それに伴いたん白質の免疫学的性質が変化すると予想される<sup>5)</sup>。

本研究では、大豆たん白質を含む飼料で飼育したマウスの血清中に含まれる大豆たん白質に対する特異抗体を測定し、さらに、油脂との反応に伴う大豆たん白質の抗体との反応性の変化を調べた。また、油脂の酸化分解物の1つである4-ヒドロキシノン-2-エナール(HNE)と反応した大豆たん白質を調製し、HNEとの反応に伴う免疫学的性質の変化についても検討した。

## 実験方法

### 実験動物および血液の採取

6～8週齢のクロズドコロニー(ddY), および近

交系(A/J, BALB/c, C3H/He, C57BL/6) 雌マウスを用いた。市販非精製飼料(CE-2, 日本クレア)で飼育し、7～9週齢で眼窩静脈叢より採血し、個体ごとに血液を遠心分離し、得られた血清を抗体価の測定まで-20℃で保存した。

### 大豆たん白質の分画

脱脂大豆粉末(Sigma)からたん白質を63 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.8で抽出し、これを大豆たん白質として用いた。さらに、この抽出たん白質よりいくつかの沈澱法およびSephacryl S-400のカラムクロマトグラフィーにより、7S および 11S, さらに 2S グロブリン画分を調製した<sup>6,7)</sup>。

### 免疫化学的測定

血清中の特異抗体は酵素免疫測定法(ELISA)<sup>8)</sup>を用いて測定した<sup>9)</sup>。ポリスチレン製96穴マイクロタイタプレート(コースター)をたん白質濃度50 μg/mLの抗原溶液でコートし、100～1000倍希釈したマウス血清を加え反応させた。抗原に結合した特異IgG およびIgE

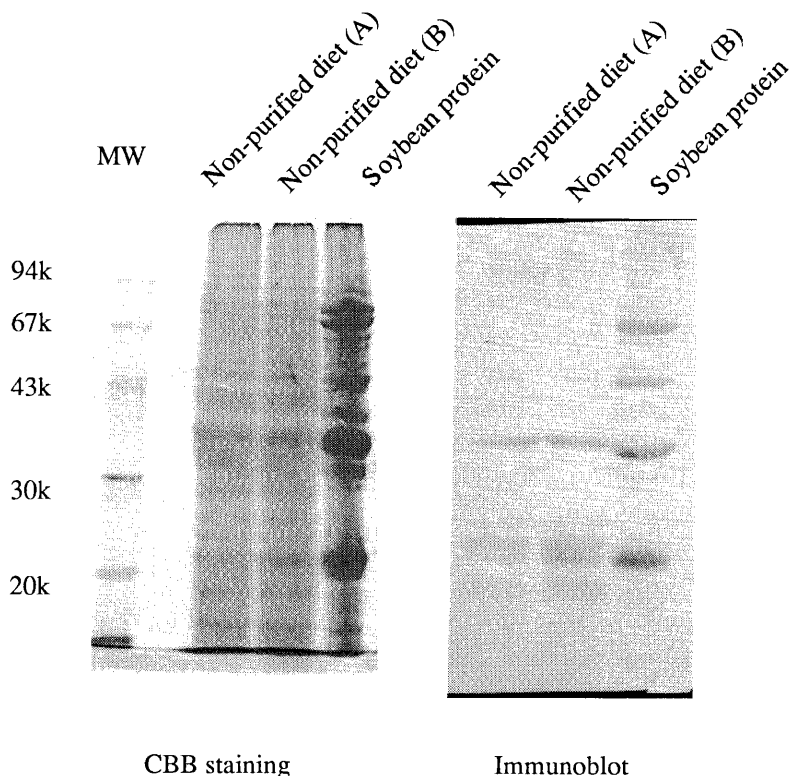


Fig. 1. Detection of soybean protein antigen in commercially available non-purified diet by immunoblotting analysis. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred on PVDF membrane. Soybean protein antigens were immunologically stained with rabbit antiserum raised against total soybean proteins.

抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ(POD)で標識した抗マウス  $\gamma$  鎖および抗マウス  $\epsilon$  鎖抗体で検出した。酵素反応開始後30分での492 nm の吸光度( $A_{492}$ )を見かけの抗体価として示した。

市販非精製飼料中の大豆たん白質抗原の検出および4-hydroxynon-2-enal (HNE) 付加大豆たん白質の検出は、immunoblotting により行った<sup>10)</sup>。試料をLaemmli の系の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動<sup>11)</sup>で分離した後、分離されたたん白質を電気的にPVDF膜に転写した<sup>10)</sup>。膜上の抗原たん白質をウサギ抗大豆たん白質あるいはウサギ抗 HNE 血清、およびPOD で標識した抗ウサギ IgG を用いて検出した。

#### 大豆たん白質と大豆油との反応

大豆粉末(Sigma, Type I) 100 mg と大豆油100  $\mu$ L を混合し、50℃で9日間保持した。大豆粉末のみを50℃、9日間保持したもの、および大豆粉末と大豆油を混合したものを対照として用いた。

#### 大豆たん白質と HNE との反応

HNE ジエチルアセタールの酸処理によって得られる HNE 溶液<sup>12,13)</sup>は名古屋大学農学部の内田浩二博士から分与された。大豆たん白質 2S, 7S, 11S 画分およびウシ血清アルブミン(BSA)のPBS溶液(1 mg/mL) 900  $\mu$ L に100  $\mu$ L の10 mM HNE 水溶液を加え、37℃で2時間反応させた。反応終了後、PBS に対して透析し使用するまで-20℃で保持した。

#### 結果と考察

##### 大豆たん白質を含む飼料で飼育されたマウスの血清特異抗体

市販のマウス、ラット用非精製飼料にはたん白質源として魚肉、脱脂粉乳等と共に大豆粕が用いられており、このような非精製飼料で飼育されたマウスは経口的に大豆たん白質の抗原刺激を受け、抗原特異的な免疫応答を誘導していると考えられる。

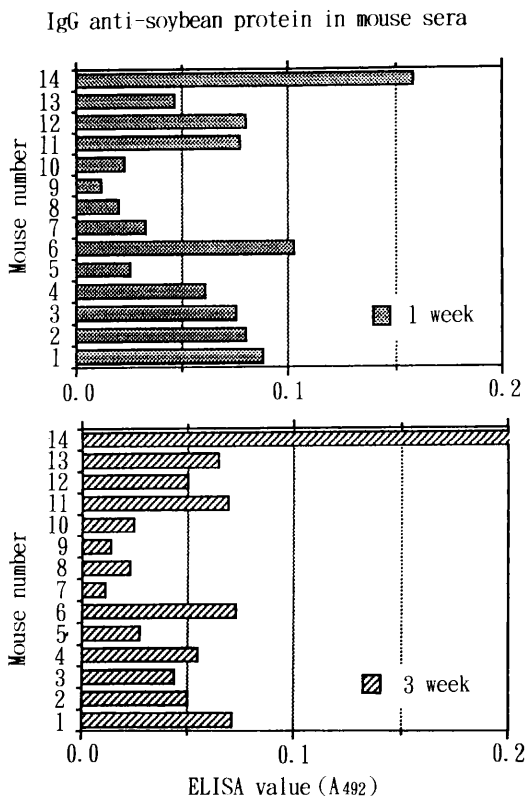
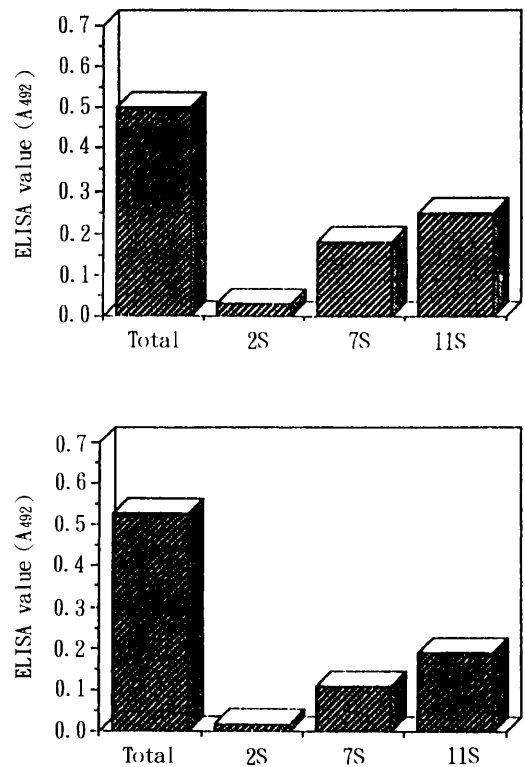


Fig. 2. IgG antibody specific for soybean protein in the sera of ddY mice fed commercially available non-purified diet. Blood was collected from individual mice 1 and 3 weeks after beginning of the feeding. IgG to soybean protein was measured by ELISA.



IgG anti-soybean protein in sera of ddY mouse

Fig. 3. Specificity of IgG of ddY mice raised against fed soy protein antigen. Reactivity of IgG anti-soybean protein was measured by ELISA with purified 2S, 7S and 11S globulins.

そこでまず市販の非精製飼料に含まれる大豆たん白質抗原を特異抗体を用いた immunoblotting で検出した。A 社及び B 社の非精製飼料を粉末にし、SDS-PAGE 用サンプル緩衝液で抽出し SDS-PAGE で分離し CBB で染色した(Fig. 1-A)。多くの染色バンドの中に大豆主要たん白質に対応するバンドが検出された。同様に SDS-PAGE で分離したたん白質を PVDF 膜に電氣的に転写し、膜上の大豆たん白質抗原を特異抗体で染色した(Fig. 1-B)。11S 及び 2S グロブリンが検出され、市販の非精製飼料には大豆たん白質抗原が含まれていることが明らかとなった。

次に、ddY 系のマウスと数種の近交系マウス(BALB/c, DBA/2, B10. A, B10. D2)の血液に含まれる大豆たん白質に対する特異 IgG 及び IgE 抗体を ELISA で測定した。14匹の ddY マウスについて飼育開始後 1 週間及び 3 週間目に採血し、個体ごとに血清抗体を調べた。8 匹のマウスに大豆たん白質に対する特異 IgG 抗体が検出され、それらの抗体濃度には個体差が見られた(Fig. 2)。一方、大豆たん白質に対する IgE 抗体はいずれのマウスにおいても検出されなかった。さらに 3 週間後に同様に調べた結果、血清抗体に大きな変動はないことが明らかとなった。特に高い抗体価を示した 2 匹の ddY マウスについて、大豆主要たん白質、2S, 7S, 11S グロブリンに対する反応特異性を調べた(Fig. 3)。いずれの個体も 7S, 及び 11S に対して IgG 抗体を産生しており、2S グロブリンに対する特異抗体はほとんど検出されなかった。

次に、近交系のマウスについて同様に調べた結果、各々の系統において特定の個体が大豆たん白質に対して IgG 抗体を産生していた(Fig. 4)。d ハプロタイプの H-2 を持つ BALB/c と B10. D2 系マウスのいくつかの個体が 2S グロブリンに対して抗体応答を示したことは、このような抗体応答に対するマウスの遺伝的素因の関与を示唆している。

#### 大豆油と加熱された大豆たん白質に特異的な抗体

食餌性大豆たん白質に対する特異抗体を含むマウスの血清を用いて、大豆たん白質と大豆油を混合し長時間、高温に保持して調製した標品(Pro/Oil/Heat)に対して特異的に結合する抗体について調べた。数個体の ddY マウスと 1 個体の DBA/2 マウスが Pro/Oil/Heat に対して有意に高い抗体価を示した(Fig. 5)。大豆たん白質と油を混合した場合、あるいは大豆たん白質のみを加熱した場合には、このような抗体価の上昇は見られないことから、たん白質と油の混合物中に加熱に伴い新たな抗原物質あるいは抗原構造が生成したものと考えられる。

#### 4-ヒドロキシノン-2-エナール(HNE)との反応に伴う大豆たん白質の免疫原性の変化

脂質の過酸化における主要な分解産物である4-ヒドロキシノン-2-エナール(HNE)はたん白質のシステイン残基のスルフヒドリル基やヒスチジン残基のイミダゾール基と容易に反応し、その結果 HNE 修飾たん白質を生成する(Fig. 6)。そこで、HNE 修飾に伴う大豆たん白質の免疫学的性質を調べるために、HNE 修飾

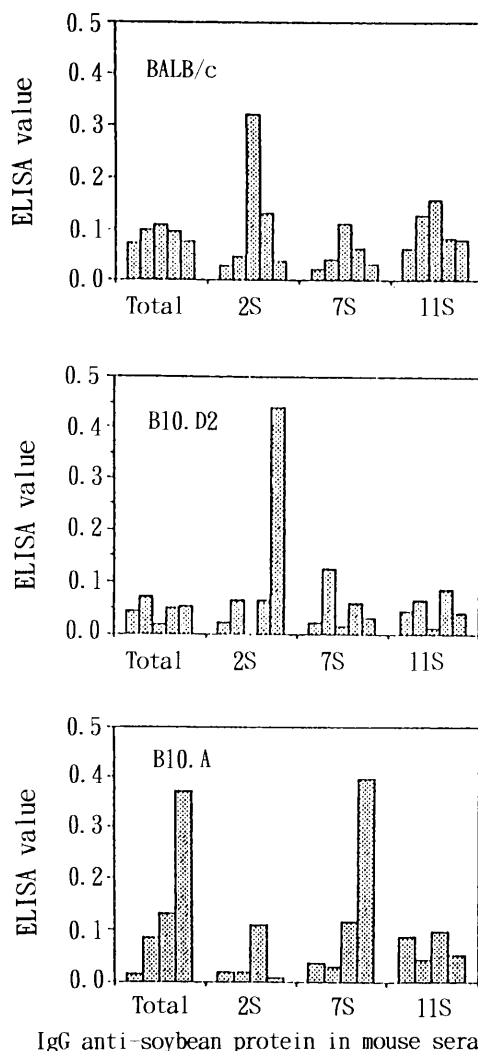


Fig. 4. IgG antibody specific for soybean proteins in the sera of several inbred mice (4 or 8 mice per strain) fed commercially available non-purified diet. Blood was collected from individual mice 1 week after beginning of the feeding. IgG to total and purified soybean proteins was measured by ELISA.

大豆たん白質を調製し、水酸化アルミニウムゲル (Alum) とともにマウス腹腔内に投与し、IgG および IgE 抗体応答を調べた。

まず、大豆 2S, 7S, 11S たん白質を HNE と反応させ、修飾の程度を HNE に対する特異抗体を用いた immunoblotting により調べた。修飾及び非修飾たん白質を SDS-PAGE で調べた結果、HNE との反応に伴う重合や断片化は認められなかった。次に SDS-PAGE で分離した HNE-修飾大豆たん白質を PVDF 膜に転写し、抗-HNE 抗体で染色した。Fig. 7 に見ら

れるように 7S 及び 11S グロブリンが HNE により修飾されていることが明らかとなった。

これらの HNE 修飾大豆たん白質と比較対照として非修飾たん白質を各々 ddY マウスの腹腔内に投与した。各々の抗原に対する特異 IgG および IgE 抗体を測定した。11S グロブリンでは有意な差は見られなかったが、7S グロブリンでは IgG, IgE いずれも HNE 修飾大豆たん白質に対する抗体応答はほとんど検出されず、HNE 修飾に伴う免疫原性の低下が認められた (Fig. 8)。さらにデータは示さないが、HNE に特異的

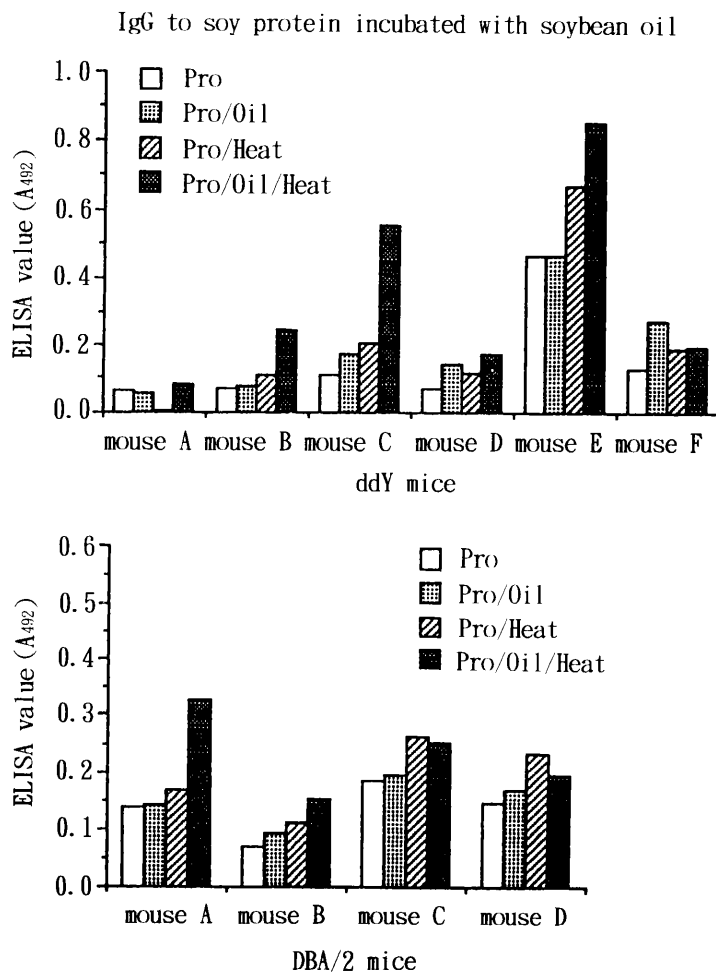


Fig. 5. IgG antibody specific for soybean protein heated with soybean oil. Soybean protein was mixed with soybean oil and heated at 50 °C for 9 days. Sera collected from ddY (A), DBA/2 (B) and BALB/c (C) mice were examined for reactivity to heated protein/oil mixture (Pro/Oil/Heat). Reactivity to soybean protein (Pro), protein/oil mixture (Pro/Oil) and heated soybean protein (Pro/Heat) was also measured for comparison.

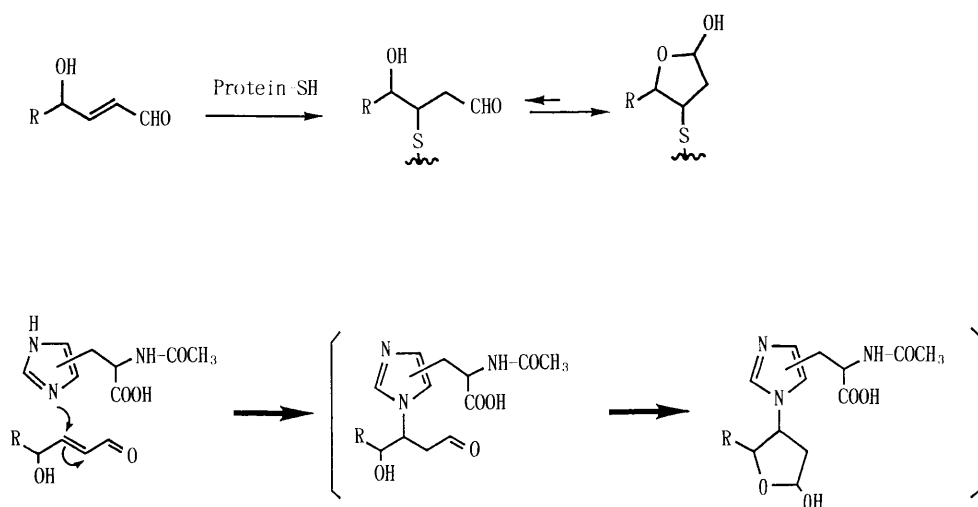


Fig. 6. Structure of HNE-cysteine adduct (upper) and proposed mechanism for formation of HNE-histidine adducts.<sup>12,13)</sup>

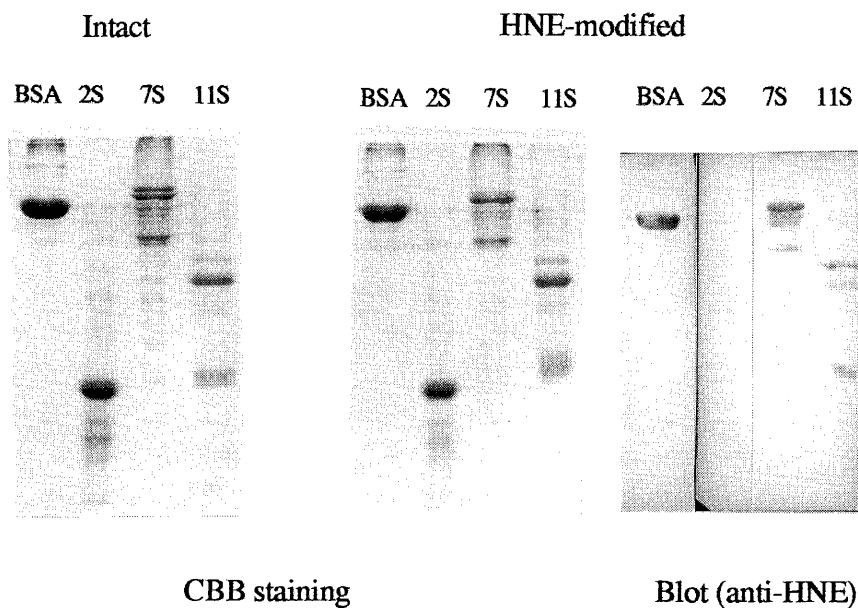


Fig. 7. SDS-PAGE of HNE-modified soybean proteins and immunological detection of HNE-modified proteins. Soybean proteins and bovine serum albumin were modified with HNE, separated by SDS-PAGE (A), and immunoblotted with HNE-specific antibody (B)

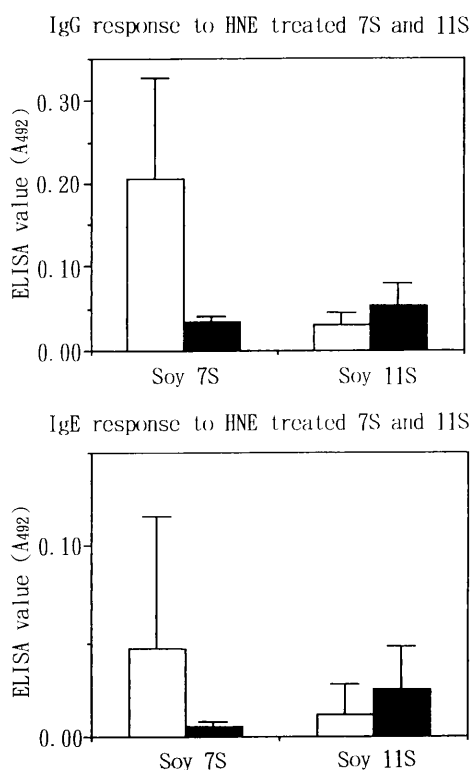


Fig. 8. IgG response of ddY mice to HNE-modified soybean proteins. Intact and modified proteins were i.p. injected into ddY mice. Serum IgG (left) and IgE (right) specific for each injected antigen were measured by ELISA. The ELISA values were represented as mean  $\pm$  SD for 5 mice.

な抗体応答もほとんど検出されなかった。このように、HNE に関しては大豆たん白質との反応によるアレルギー性の増強への寄与は少ないと考えられる。

## 文 献

- Burks AW, Brooks JR and Sampson HA (1988): Allergenicity of major component proteins of soybean determined by ELISA and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. *J Allergy Clin Immunol*, **81**, 1135-1142.
- Herian AM, Taylor SL and Bush RK (1990): Identification of soybean allergens by immunoblotting with sera from soy-allergic adults. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **92**, 193-198.
- Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Kitamura K, Zhu YL, Hirano H and Nishikawa K (1993): Identification of the soybean allergenic protein, *Gly m Bd 30K*, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 1030-1033.
- Doke S, Nakamura R and Torii S (1989): Allergenicity of food protein interacted with oxidized lipids in soybean-sensitive individuals. *Agric Biol Chem*, **53**, 1231-1235.
- 松田 幹, 加藤保子, 中村 良 (1992): 食物アレルギーと成分間反応. *食品工業*, **35**, 42-52.
- Thanh VH and Sibasaki K (1976): Major proteins in soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J Agric Food Chem*, **24**, 1117-1121.
- 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.
- Engval E and Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)—Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874.
- Matusda T, Nakamura R, Nakashima I, Hasegawa Y and Shimokata K (1985): Human IgE antibody to the carbohydrate-containing third domain of chicken ovomucoid. *Biochem Biophys Res Commun*, **129**, 505-510.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 4350-4354.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Uchida K and Stadtman ER (1992): Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 4544-4548.
- Uchida K and Stadtman ER (1992): Selective cleavage of a thioether linkage in proteins modified with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 5611-5615.