

分離大豆たん白質のグリコシド鎖部のアレルゲン性とペプチド製品化による改善について

ALLERGENICITY OF GLYCOSIDE RESIDUES IN SOYBEAN PROTEIN ISOLATE AND ITS IMPROVEMENT BY DEGRADATION INTO PEPTIDES

谷口已佐子・藤田 守・房野たかみ・小松あかね・矢野千奈美（中村学園大学食物栄養学科）

森田紳平（不二製油株式会社つくば中央研究所）

Misako TANIGUCHI¹, Mamoru FUJITA¹, Takami FUSANO¹, Akane KOMATSU¹, Chinami YANO¹ and Shinpei MORITA²

¹Department of Food and Nutrition, Nakamura Gakuen College, Fukuoka 814-01

²Central Research Institute, Fuji Oil Company, Tsukuba 300-24

ABSTRACT

To suckling rats, soybean protein (SPI) or soybean peptide (PM) mixed with Freund's adjuvant was intraperitoneally injected, or SPI mixed with corn oil was orally administered three times every other day starting from 10 days after birth. After weaning, the rats were fed a SPI diet for 5 weeks and IgG specific for SPI in the serum was determined by ELISA. A large quantity of anti-SPI-IgG was produced when SPI was given to rats intraperitoneally, while no SPI specific IgG was detected by administration of PM. In contrast, anti-SPI-IgG was produced only in a small quantity when SPI was administered orally. After separating by SDS-PAGE, each subfraction of soybean protein was blotted on nitrocellulose membrane. Then, the membrane was incubated with the serum, and anti-IgG specific for respective subfraction was analyzed by immunostaining. It was found that 7S γ and β , 11S acidic and basic, and 2S produced a large quantity of anti-IgG specific for each protein when SPI was intraperitoneally injected. On the other hand, 7S γ , 11S basic, and 2S were strong antigens when SPI was administered orally. Using electron microscopy, it was found that peroxidase-labeled 7S β was taken up by coated pit of microvillous membrane, then transferred by vesicle, and further released to the basolateral surface. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 99-103, 1994.

食物抗原の多くは、分子量が70,000以下の熱や酸に抵抗性のある糖たん白質である¹⁾。大豆たん白質には糖たん白質が多く含まれており、卵白、牛乳と共に大豆によるアレルギーの発症頻度は高い²⁾。小川らは大豆たん白質 7S 画分（糖たん白質）中に、大豆に感受性のある皮膚炎患者の血清 IgE と強く結合する画分

を見出し、Gly m Bd 30K と命名した^{3,4)}。

乳児期の経口感作による食物アレルギーはアトピー性皮膚炎の発症の成因の一つと考えられている。ヒトの免疫系では糖鎖の有無を認識し、糖たん白質特異抗体が産生されるが、実験動物では腹腔または皮下投与では糖たん白質に特異的抗体は産生されず、経口投与

のような自然感作に近い投与条件で糖鎖の有無の認識がおこることが松田により報告されている⁵⁾。本研究は吸収上皮細胞の未熟な乳児期に大豆たん白質を経口投与し、糖と非糖たん白質画分のアレルギー性の強さを比較すると共に、糖たん白質の消化管からの侵入経路について検討した。乳飲期シロネズミに分離大豆たん白質 (SPI) を腹腔内、または経口投与した時、経口投与によって生成する血清の SPI に特異的な IgG は腹腔投与に比べ著しく低いが、SPI 各画分のアレルギー性の強さは腹腔投与のものと異なることが示された。ペプチド化によるアレルギー性の低減についての検討は、SPI を酵素分解したペプチド製品 (PM: 不二製油 株式会社) を用いて行った。一方、糖たん白質の空腸吸収上皮細胞への侵入経路および通過経路については光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡を用い形態学的な検索を行った。

実験方法

抗血清の作成

シロネズミ (Wistar 系, 雄性) を用い乳飲期 (10 日齢) より SPI を抗原として投与を始めた。抗原の投与は前回の報告と同様⁶⁾, SPI または PM を Freund の完全 adjuvant と混合し, 隔日おき 3 回腹腔に注入し感作させた。経口投与による実験は, SPI 1 g/蒸留水 5 mL/コーン油 0.5 mL を超音波処理で乳化させたものを用い, 14 日齢より隔日に計 3 回, 胃底部に達するシリンジを用い 0.3 mL ずつ強制投与した。21 日齢で離乳後, これらのラットは 0.3% メチオニンを添加した 20% SPI 飼料で飼育した。離乳 5 週後に心臓から全採血し, この血清を抗体血清試料として使用した。

IgG 抗体の定量

血清の IgG は酵素免疫抗体法 (ELISA) で定量した。抗 SPI-IgG の定量は Burks らの方法に準じて行った⁷⁾。SPI を Tris 緩衝液 (10 mM, pH 10) に懸濁させメルカプトエタノールを最終濃度 1% に加え可溶化し抗原として使用した。well に抗原 (SPI 5 μ g/mL) を加え, 希釈した血清と反応させ, ビオチン標識-抗ラット IgG 抗体 (Immunotech S. A., France) と, 1,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識-ストレプトアビジン (Kirkegaard & Perry Lab, Inc., USA) を用い, SPI 特異性 IgG を定量した。IgG の標準は rat IgG (Inter-Cell Technologies, Inc., USA) を用いた。

SPI たん白質画分の IgG 抗体産生の比較

SPI はアルカリ性で可溶化し, メルカプトエタノールを加え加熱し, Laemmli の方法に準じ, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel-electrophoresis

(SDS-PAGE) でたん白質画分を分離した。ニトロセルロース膜にたん白質画分を転写し, 抗 SPI-IgG を含むラット血清とインキュベートし, たん白質と結合した抗 IgG をペルオキシダーゼ標識-抗 rat-IgG と反応させ, コニカイムノステイン (コニカ (株)) で免疫染色し検出した。大豆たん白質画分は SDS-PAGE 後, ニトロセルロース膜に転写し, アミドブラックで染色した。

SPI の各画分に結合した抗体 IgG の産生の強さは, ニトロセルロース膜上の抗体染色された濃度をデンストメトリー (島津フライングスポットスキャナー CS-9000) の反射光測定モード 560 nm を使用し, チャートのピーク area から求めた。

空腸の形態学的観察

大豆糖たん白質画分の 7S β を過ヨウ素酸酸化法により horseradish peroxidase (HRP, Behringer Mannheim 社) で標識し, peroxidase 標識試料を作成した。乳飲シロネズミ (14 日齢) の空腸管腔内に直接投与し, 経時的に空腸を採取した。前報に準じ光学顕微鏡用切片を作成し, 光学顕微鏡で観察した。また, 電顕用超薄切片を作成, クエン酸鉛で染色し電子顕微鏡で観察した⁶⁾。

結果と考察

腹腔内投与と強制経口投与における感作の比較

SPI を腹腔内または強制経口投与し, 離乳 5 週後の血清中の抗 SPI-IgG の生成を比較した。腹腔内投与で

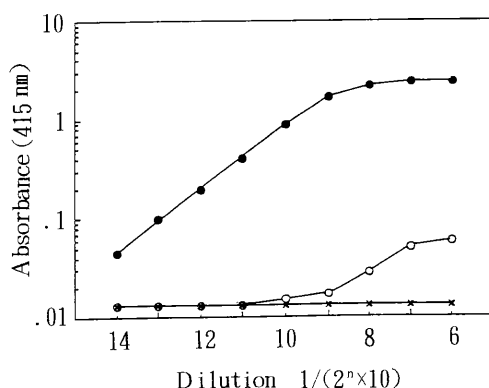


Fig. 1. Comparison of anti-IgG production when soybean protein was administered intraperitoneally or orally to suckling rats. ●, intraperitoneal administration; ○, oral administration; ×, without SPI administration.

は強い感作が見られた。強制経口投与では、無処理の対照に対して明らかに SPI-IgG が生成されていることが認められたが、腹腔投与に比べ感作は1/50以下であった (Fig. 1)。

腹腔内投与後、強制経口投与を行い生成する SPI 特異性 IgG を測定し、腹腔内投与のみと比較した結果、両者間に有意差はなかった。なお、この比較は同一母ラットから出生した雌雄合わせた4匹ずつを用いて行

った。
ペプチド (PM) 投与による SPI 特異性 IgG の生成
SPI の腹腔および強制経口投与の併用と同様に PM を投与し、SPI 特異性 IgG を測定した。PM の投与では無投与の対照と変わらず、SPI 特異性 IgG は殆ど検出されなかった。PM のようにペプチド鎖3-7になったものではアレルゲンとしてのエピトープ部は失われていることが分かった。これは前報⁶⁾のニトロセル

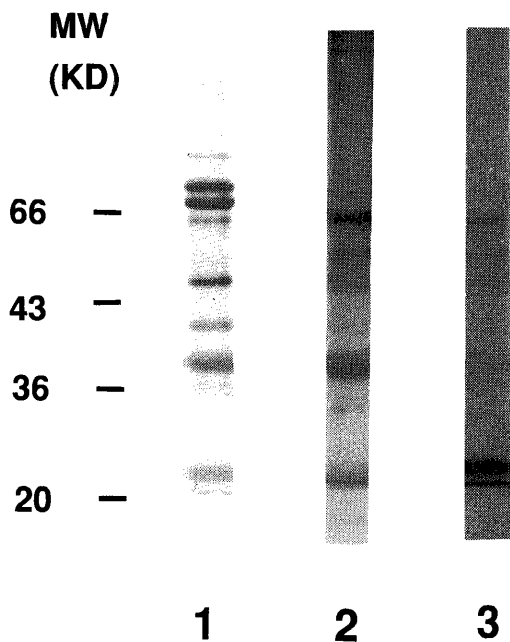


Fig. 2. IgG-binding specific for subfractions of soybean protein. Rats were injected intraperitoneally or orally with soybean protein 3 times every other day starting at 10 days or 14 days after birth. Five weeks after weaning, serum was collected from respective rat. To detect IgG specific for SPI subfraction, SPI was separated by SDS-PAGE, blotted on nitrocellulose membrane, and immunostained after incubating with the serum. Lane 1, Amido Black staining; lane 2, immunostained after incubated with the serum from the rat given SPI intraperitoneally; lane 3, incubated with serum from the rat given orally. Molecular weight standard proteins were bovine serum albumin (6.6 kDa), ovalbumin (4.3 kDa), LHD (3.6 kDa) and soybean trypsin inhibitor (2.0 kDa).

Table 1. Comparison of allergenic intensity when given SPI intraperitoneally or orally

Subfractions	Amido Black (%)	1		2	
		IS (%)	I/A	IS (%)	I/A
1	3.3	-	-	3.8	1.15
2 (7 S α')	13.4	3.1	0.23	-	-
3 (7 S α)	12.7	5.1	0.40	-	-
4 (7 S γ)	5.2	17.0	3.27	17.8	3.42
5	3.4	0.9	0.26	9.5	2.79
6 (7 S β)	12.9	10.5	0.81	10.8	0.83
7	9.6	1.9	0.19	-	0.38
8 (11 S -acidic)	17.8	29.1	1.63	6.7	0.38
9	4.8	-	-	-	-
10	2.2	3.0	1.36	-	-
11	1.1	-	-	-	-
12 (11 S -basic)	11.2	26.3	2.34	37.8	3.38
13 (2 S)	2.4	3.1	1.29	13.6	5.66

IS; Immunostain 1; Intraperitoneal injection
A; Amido Black-stain 2; Oral injection

ロース膜での免疫抗体染色法で比較した結果と同様であった。
大豆たん白質サブフラクションの IgG 抗体産生の比

較

SPI 投与により生じた抗血清と SPI をプロットしたニトロセルロース膜をインキュベートし、酵素免疫

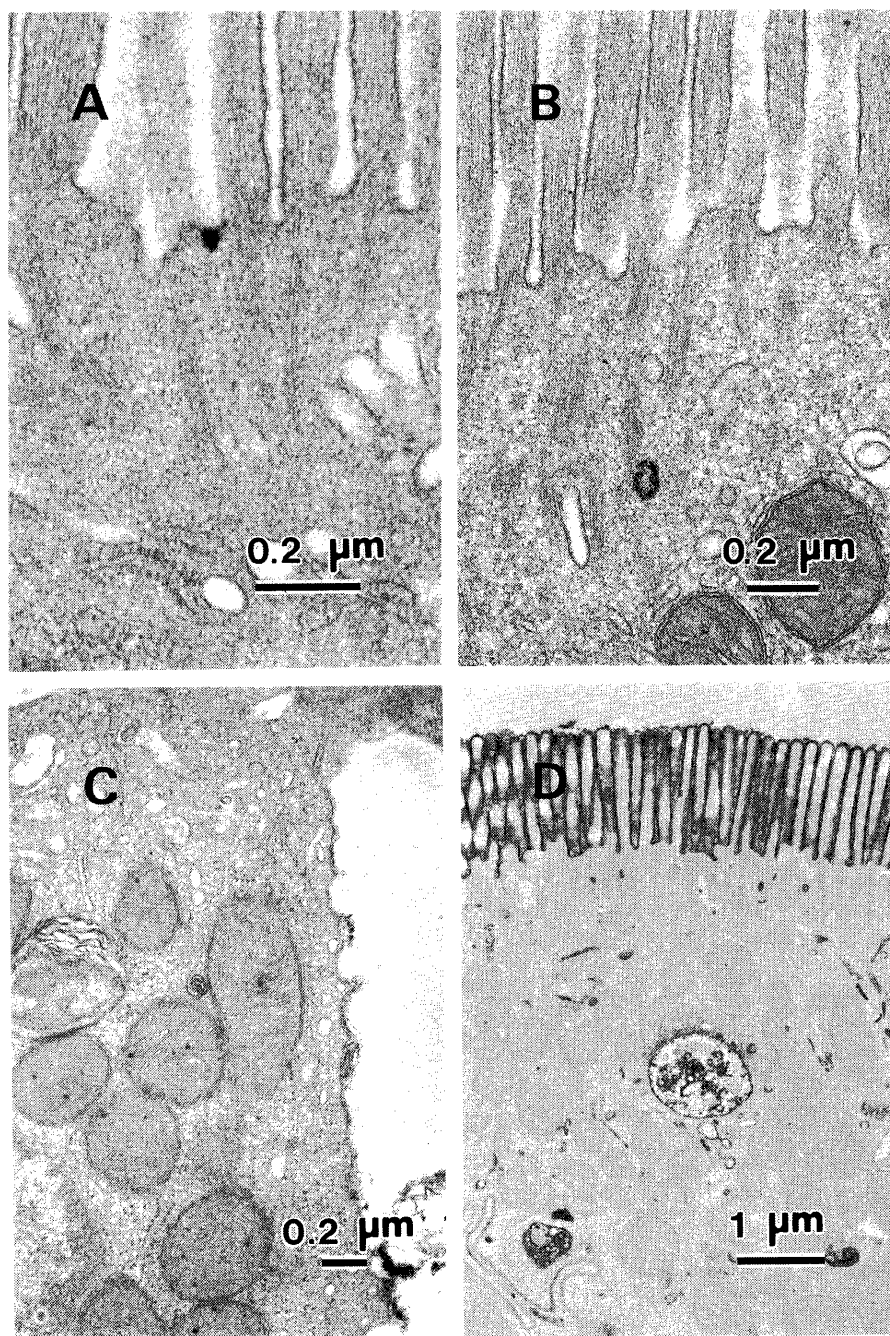


Fig. 3. Electron micrographs of a jejunal absorptive cell 30 min after injection of 7S β -HRP (A, B and C) or HRP (D). A and B, the apical pole; C, the basolateral pole; D, lower magnification of a jejunal absorptive cell.

法を用い、SPI 画分の抗原性の強さを測定した。腹腔内投与後の血清とインキュベートした場合、分子量 60~62 kDa の γ サブユニットに相当する画分に強い抗原性が示され、7S β は γ に次いで強く、 α' 、 α サブユニットは弱いことが示された (Fig. 2, Table 1)。11S 酸性、塩基性画分および 2S には強い抗体生成が認められた。11S 酸性と塩基性画分の間に検出された分子量 30 kDa のバンドは IgE と強く結合する 7S 画分の Gly m Bd 30 K と推定される。

強制経口投与のみを行った血清と SPI 画分を反応させたものでは、2S, 7S γ , 11S の塩基性画分が強い抗原性をもつことが認められたが、7S α' , α , 11S の酸性画分の抗原性は弱く、腹腔投与の場合とは著しく異なることが分かった (Fig. 2, Table 1)。大豆たん白質を腹腔投与した場合、11S, 7S, 2S ともに IgG が生成したことから、糖鎖の有無よりはたん白質の構造ならびに糖鎖構造の違いもしくは物理化学的特性に依存していることが推定された。一方、口腔投与では限られた画分に強いアレルギー性のあることが分かった。これら物性、消化性の比較と共に吸収上皮細胞からの侵入経路を明らかにすることで、乳幼児期の大豆由来のアレルギー発症の低減が期待される。

Burks らはアトピー性皮膚炎の患者に大豆を与えた時、血清中に大豆たん白質 7S に特異的な IgE が増加し、11S に特異的な IgG の増加していることを見出した⁷⁾。しかし、イムノプロットの結果、大豆たん白質のサブフラクションの多くが IgE または IgG 抗体となり、アレルギー性の強さにおいて特定のフラクションを検出することはできなかった。彼らはヒトの血清中の大豆たん白質抗体を分析していることから、抗原と抗体産生の機構は単純ではない。ヒト消化管からの大豆アレルギーの侵入経路ならびに侵入の容易さが発育段階によって異なっていること、抗体産生細胞における抗原たん白質の構造特異性があること、母体の抗体の有無や、その侵入経路などの複雑な諸原因によりアレルギーが特定されなかったと推定される。

食物アレルギーでは、IgG あるいは IgE 特異抗体により免疫複合体が過剰に生成され、これらの複合体は補体と結合する。過剰な免疫複合体や補体成分は好中球、好塩基球、肥満細胞や血小板を活性化し、結果として血管透過性の亢進や炎症反応の進展がみられることが知られている。本実験では IgE の定量を行っていないが、大豆たん白質の 11S 塩基画分、2S, 7S γ は経口投与により抗 IgG を産生し、アレルギーとなりやすいことが分かった。乳飲期の消化管細胞の未発達の段階でのこれらたん白質の摂取はその後のアレルギー発

症の誘因となることが推察された。

乳飲期シロネズミ空腸における超微形態学的検索

HRP で標識した 7S β 投与群では、空腸吸収上皮細胞の微絨毛間細胞膜の陥入部 (Fig. 3A)、細胞頂部領域の小胞内 (Fig. 3B)、および細胞間隙 (Fig. 3C) に反応産物が認められた。しかし、核上部のエンドソーム内には反応産物は観察されなかった。一方、標識に用いた HRP のみを投与した群では、吸収上皮細胞の微絨毛表面、微絨毛細胞膜の陥入部内、細胞頂部領域の小胞内、小管状構造内およびエンドソーム内に反応産物が見られた。さらに細胞間隙にも反応産物が認められた。従って、7S β の空腸吸収上皮細胞への侵入は、HPR の細胞内通過経路とは異なり、糖たん白質である大豆レクチンの侵入経路⁹⁾と共通した経路で取り込まれていることが示唆された。

文 献

- 1) 笹井敬子, 古川 斬 (1989): 消化器アレルギーの発症機序. アレルギーの臨床, **9**, 16-21.
- 2) Giampietro PG, Ragno V, Daniele S, Canti A, Ferrara M and Businoc L (1992): Soy hypersensitivity in children with food allergy. *Ann Allergy*, **69**, 143-146.
- 3) 小川 正, 辻 英明, 板東紀子 (1992): 大豆たん白質の低アレルギー化に関する研究. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **13**, 86-91.
- 4) Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Kitamura K, Zhu Y, 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.
- 5) 松田 幹 (1993): アレルギー糖タンパク質の抗原構造と免疫系による認識. 農化, **67**, 129-135.
- 6) 谷口巳佐子, 藤田 守, 房野たかみ, 矢野千奈美 (1993): 分離大豆たん白質のメチオニン利用効率の改善と低食物アレルギー食品としての大豆ペプチドの利用について. 大豆たん白質研究会会誌, **14**, 28-33.
- 7) Burks AW Jr, Brooks JR and Simpson HA (1988): Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. *J Allergy Clin Immunol*, **81**, 1135-1142.