

低アレルゲン大豆たん白質利用食品の開発に関する研究

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*) in soybean has been identified as 34-kDa oil-body-associated protein. Prior to the development of hypoallergenic soybean products, we prepared first the allergen-specific paper disk for radioallergosorbent test and established the Sandwich-ELISA method for a quantitative analysis of the allergen in soybean products using two distinct monoclonal antibodies, F5 and H6. Moreover, in order to get the information about the active sites of allergen, the epitope sequence recognized by patient's sera was estimated using the enzyme-digested and CNBr-degraded allergen fragments. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 104-108, 1994.

牛乳、卵、大豆が日本人の三大アレルギー食品として認識されているが、近年、米、小麦等に対する患者も増加している。中でも、大豆は日本人にとって伝統的なたん白質食品であり、1日の平均摂取たん白質の約10%は大豆に依存していることが国民栄養調査の結果に示されている。大豆たん白質は優れた栄養性、加工特性によって種々の加工食品の製造に素材として利用されるようになり、大豆アレルギー患者にとっては大豆たん白質を含まない食品の選択が非常に困難になっている。大豆のアレルギー性は、ある特定のたん白質成分に依存するものと考えられる。我々は大豆アレルギーの患者血清をプローブとして解析を行い、主要アレルゲンたん白質成分を、*Gly m Bd 30K* と命名し、これを大豆 34-kDa oil-body-associated protein であると同定した¹⁾。本アレルゲン成分に特異的な IgE 抗体を保有する患者は、大豆感受性のあるアトピー性皮膚炎患者の約65%に達する。従って、これを除去することにより多くの患者に利用可能な低アレルゲン大豆食品の開発の可能性が示唆された。本研究では、開発プロジェクトに欠くことの出来ないアレルゲンの検出・定量法の確立、さらにはエピトープ構造の解明を

目的とした。

実験方法

実験材料及び試薬類

本研究では、大豆加工食品として、大豆種子（ナグユキハ）、豆乳、木綿豆腐、絹ごし豆腐、きな粉、湯葉、油揚げ、味噌、醤油、納豆、ミートボール、牛肉コロッケ、フライドチキン、魚肉ソーセージ、ハンバーグを用いた。*Gly m Bd 30K* に対するモノクローナル抗体（H6, F5）の作製方法は前報²⁾に述べた。また、*Gly m Bd 30K* は Herman らの方法³⁾を用いて、大豆種子より調製した。

試料の調製

大豆加工食品（5g）を1%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）及び20 mMメルカプトエタノールを含む50 mMリン酸緩衝液（pH 8.0, buffer A）50 mLと混合し、ポリトロンを用いてホモジナイズした。ホモジネート液を10,000×gで30分間遠心し、上澄液を得た。この上澄液を抽出液として用いた。なお、抽出液中のSDSは以下のサンドイッチELISAにおける抗原-抗体反応を著しく妨害するため、抽出液に過剰の1 M

KCl を添加し、生成したドデシル硫酸カリウムの結晶を遠心にて除去した。このようにして得られた上澄液をサンドイッチ ELISA に供した。

サンドイッチ ELISA

サンドイッチ ELISA は前報²⁾に準じて行った。

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 及びイムノブロット

SDS-PAGE は12%ポリアクリルアミドゲルにて、Laemmli の方法⁴⁾に準じて行った。イムノブロットは前報²⁾に従って行った。

CNBr およびキモトリプシンによる *Gly m Bd 30K* のフラグメンテーション

CNBr による Met 位でのペプチド結合の切断は Beely⁵⁾らの方法により、キモトリプシンによる限定加水分解は Cleveland⁶⁾らの方法に従って行った。

アレルゲンディスクの作製と RAST 法による特異的 IgE の測定

直径 5 mm にパンチしたセルローズ濾紙 (ADVANTEC No.6) を Ceska⁷⁾の方法により CNBr にて活性化し、これに RCM-*Gly m Bd 30K* を固定した。固定されたアレルゲンは濾紙 1 枚当たり約 10 μ g である。RAST 法は Pharmacia 製の Phadebas RAST のマニュアルに従って、市販の大豆

アレルゲンディスクと *Gly m Bd 30K* 特異的ディスクによる IgE 結合量を比較測定した。

結果及び考察

大豆加工食品における大豆アレルゲン, *Gly m Bd 30K* の分布

Buffer A を用いて得られた抽出液中の *Gly m Bd 30K* を既に確立したサンドイッチ ELISA により定量し、結果を Table 1 にまとめた。なお、大豆加工食品のうち、湯葉、ミートボール及び牛肉コロッケはサンドイッチ ELISA において抗原-抗体反応を著しく阻害する物質が存在するので、セファクリル S-200 カラムにて *Gly m Bd 30K* を分画してその定量を行った。

検討した大豆加工食品のうち、大豆種子を原料とする豆乳、木綿豆腐、絹ごし豆腐、凍り豆腐、湯葉、油揚げは高濃度の本アレルゲンを含むことが示された。しかしながら、きな粉中のアレルゲンは上記の食品に比べて、特に大豆種子より著しく少なかった。これはきな粉を製造する過程で、大豆を焙焼することにより変化を受けたことを示唆している。また味噌、醤油、納豆などの発酵食品におけるアレルゲンはほとんど無視しうるかまたは全く検出できなかった。この事実は微生物のプロテアーゼにより *Gly m Bd 30K* が分解

Table 1. Contents of *Gly m Bd 30K* in soybean products

Product	Amount of <i>Gly m Bd 30K</i>	
	mg/g fresh weight	mg/g nitrogen
Soybean seed	7.29 $\pm$ 0.66	126 $\pm$ 12
Soy milk	0.67 $\pm$ 0.03	108 $\pm$ 5
Tofu (kinugoshi)	0.94 $\pm$ 0.11	89 $\pm$ 5
Tofu (momen)	0.81 $\pm$ 0.06	65 $\pm$ 5
Kinako	1.82 $\pm$ 0.11	29 $\pm$ 2
Kori-dofu	5.54 $\pm$ 0.69	64 $\pm$ 8
Yuba	4.68 $\pm$ 0.54	66 $\pm$ 8
Abura-age	2.29 $\pm$ 0.11	50 $\pm$ 3
Miso	0.17 $\pm$ 0.10	10 $\pm$ 6
Shoyu	n. d. *1	n. d.
Natto	n. d.	n. d.
Meat ball	0.30 $\pm$ 0.11	17 $\pm$ 6
Beef croquette	0.20 $\pm$ 0.05	21 $\pm$ 5
Fried chicken	0.14 $\pm$ 0.17	9 $\pm$ 11
Hamburger	n. d.	n. d.
Fish sausage	n. d.	n. d.

*1: not detected.

されたことを示すものである。一方、大豆たん白質を加工工程において添加していると考えられるミートボール、牛肉コロッケ、フライドチキン、魚肉ソーセージ及びハンバーグを選び、本アレルゲンの含量を測定した。ミートボール、牛肉コロッケ及びフライドチキンには *Gly m Bd 30K* の存在が示されたが、ハンバーグ及び魚肉ソーセージには検出されなかった。これらの試料においては、ハンバーグ以外はすべて大豆たん白質が使用されていることを確認している。従って、魚肉ソーセージを除けば、上記の結果に矛盾はない。魚肉ソーセージ中に検出されなかったことは、製造工程中に何らかの理由で抗体との反応性を失ったことを示唆するものである。更に、上記の結果をイムノブロット分析を行って確認した。その結果を Fig. 1 に示したが、大豆種子、豆乳、豆腐、湯葉、油揚げ中には、*Gly m Bd 30K* に対する濃いバンドが認められ、きな粉では薄いバンドが示された。しかしながら、味噌、醤油、納豆、ハンバーグ及び魚肉ソーセージには、

本アレルゲンのバンドは観察されなかった。一方、ミートボール、牛肉コロッケ、フライドチキンには本アレルゲンの存在がはっきりと示された。これらの結果は、サンドイッチ ELISA の定量結果を支持するものである。大豆加工食品のうちで発酵操作を経た味噌、醤油、納豆及びハンバーグ、魚肉ソーセージ中には *Gly m Bd 30K* が極めて少量かまたは全く検出されなかった。これらが低アレルゲン化大豆加工食品として有望であることを示唆する。しかしながら、これらの食品の低アレルゲン性については更に患者によるチャレンジテストなど詳細な検討が必要である。

人 IgE 抗体の認識する *Gly m Bd 30K* のエピトープ構造の解析

本アレルゲンのエピトープは SDS 変性においてより強く認識されるようになることから sequential epitope であることが推定されている。Fig. 2 は CNBr およびキモトリプシン分解ペプチドの人 IgE 抗体による反応性を見たイムノブロットの結果である。それ

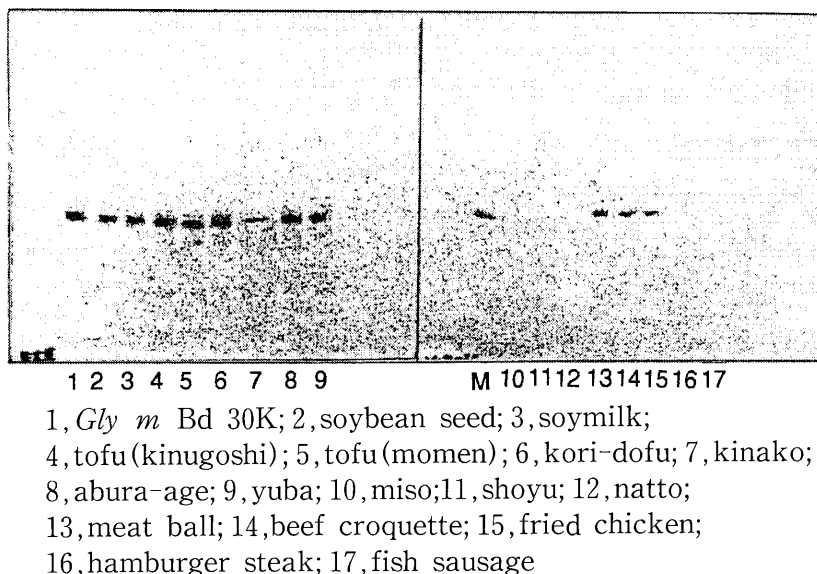


Fig. 1. Immunoblots of *Gly m Bd 30K* in soybean products. Proteins in the extracts of soybean products were separated by SDS-PAGE, and then the proteins on the gels were electrophoretically transferred on nitrocellulose membranes. The allergen on the membranes was detected with F5 as described in the text. Lane 1, authentic *Gly m Bd 30K*; lanes 2-17, soybean seed, soy milk, tofu (kinugoshi), tofu (momen), kori-dofu, kinako, abura-age, yuba, miso, shoyu, natto, meatball, beef croquette, fried chicken, hamburger, and fish sausage, respectively.

ぞれのペプチドは N-末端アミノ酸配列を決定し、どの位置のペプチドであるかを同定した。各ペプチド断片のたん白質中での位置関係は Fig. 2に示す通りであ

る。人の IgE 抗体は128～227番目の CNBr ペプチドと162番目以降のキモトリプシンペプチドを認識する。したがってその共通する部分、162～227番目のペプチ

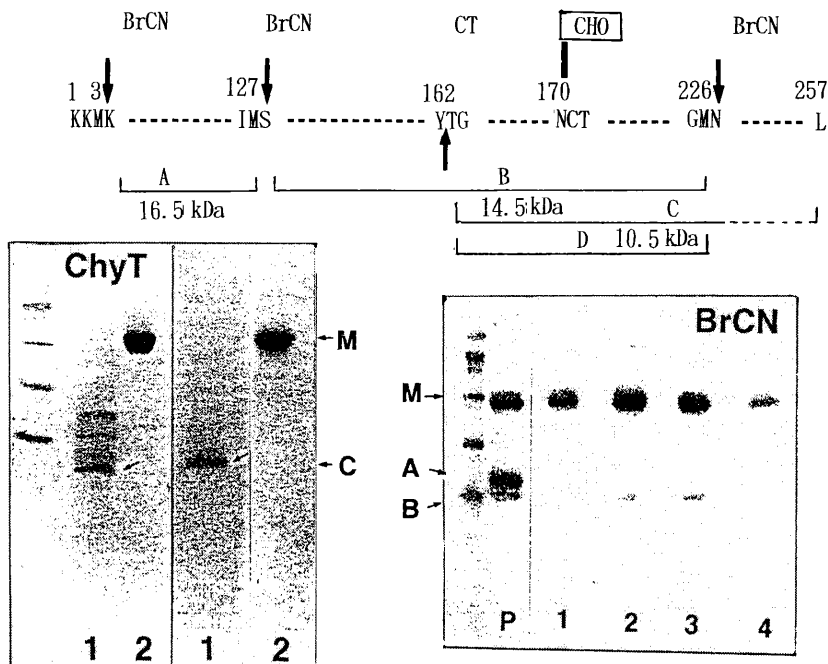


Fig. 2. Fragmentation of *Gly m* Bd 30K and site of epitope. A and B, BrCN fragments; C, chymotrypsin fragments; M, intact *Gly m* Bd 30K; BrCN, cyanogen bromide; ChyT, chymotrypsin; CHO, carbohydrate.

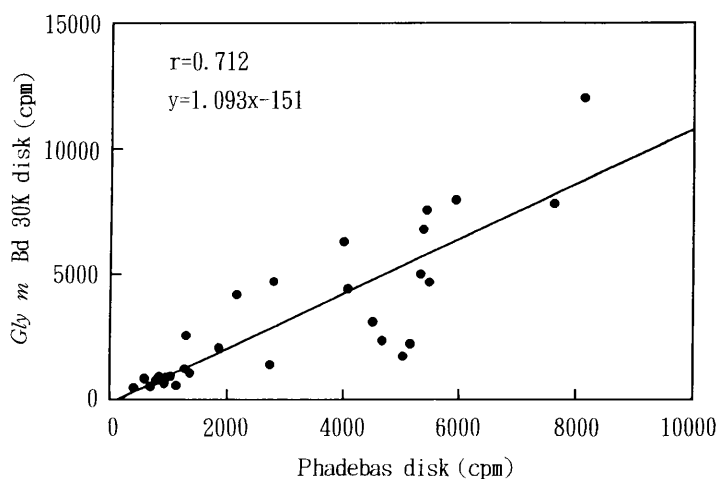


Fig. 3. Correlation between Phadebas soybean allergen-disk and RCM-*Gly m* Bd 30K-disk. RCM, reduced and carboxy-methylated.

ド上にエピトープの存在することが強く示唆された。
Gly m Bd 30K 特異的アレルゲンディスクによる患者のスクリーニング

アトピー性皮膚炎患者の内、大豆陽性でかつ *Gly m Bd 30K* に対する IgE 抗体を保有する患者の血清を用いて RAST を行い、大豆全抽出たん白質を固定したディスクと *Gly m Bd 30K* 特異的ディスクでの結合 IgE 抗体量を比較した。両者の測定値の相関関係を Fig. 3 に示した。 $r=0.712$, $y=1.093x-151$ (y , *Gly m Bd 30K* disk; x , Phadebas disk) の関係がなりたつ。これは選択した患者が *Gly m Bd 30K* 特異的 IgE 抗体を保有し、かつその抗体が大豆に対する最も主要な抗体であることによる。従って、*Gly m Bd 30K* ディスクは十分特異患者を選択的にスクリーニング出来ることを示すものである。図において市販ディスク側に高値を与える患者は、*Gly m Bd 30K* 以外のアレルゲン特異的 IgE 抗体を保有していることを示している。今後、*Gly m Bd 30K* 除去大豆食品のチャレンジテストの被検者をスクリーニングするに当たって本アレルゲンディスクが有効に使用出来る。

以上、本研究では、低アレルゲン大豆食品の開発に必要なアレルゲン検出法、定量法などの分析手段を、2種類の性質の異なるモノクローナル抗体の作製に成功することによって確立することできた。その有用性を、実際に大豆加工食品中のアレルゲンを定量することによって示した。また、エピトープ破壊によって低アレルゲン化を行うためのエピトープ位置の特定のための予備的検討を行った。また、チャレンジテストに備えて、患者をスクリーニングするための *Gly m Bd 30K* 特異的アレルゲンディスクの作製に成功した。

文 献

1) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Okazima K,

Nishikawa K and Sasaoka K. (1991): Identification 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) Tsuji H, Bando N, Kimoto M, Okada N and Ogawa T (1993): Preparation and application of monoclonal antibodies for a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay of the major soybean allergen, *Gly m Bd 30K*. *J Nutr Sci Vitaminol*, **39**, 389-397.
- 3) Kalinski A, Weisemann JM, Mathews BF and Herman EM (1990): Molecular cloning of a protein associated with soybean oil bodies that is similar to thiol proteases of papain family. *J Biol Chem*, **265**, 13843-13848.
- 4) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 5) Beely JG (1976): Active fragments obtained by cyanogen bromide cleavage of ovomucoid. *Biochem J*, **155**, 345-351.
- 6) Cleveland WD, Fischman SG, Kirschner MW and Laemmli UK (1977): Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis in gel electrophoresis. *J Biol Chem*, **252**, 1102-1106.
- 7) Ceska M, Eriksson R and Varga JM (1972): Radioimmunosorbent assay of allergens. *J Allergy Clin Immunol*, **49**, 1-9.