

各種大豆製品のもつアレルギー反応誘導活性の検討 —培養細胞を用いたアレルゲン性の分析—

山西倫太郎・辻 英明・板東紀子・小川 正*

徳島大学医学部

Studies on the Allergenicity of Soy Products — Assay Method Using Cultured Cell Line —

Rintaro YAMANISHI, Hideaki TSUJI, Noriko BANDO and
Tadashi OGAWA

School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770

ABSTRACT

Soybeans treated with proteases were investigated on their antigenicity and allergenicity. Based on the ability to proteolyze *Gly m* Bd 30K, a major soybean allergenic protein, two of eight proteases tested, Proleather and Protease N, were selected to produce the hypoallergenic soybean. When more than 250 units Proleather or 5,000 units Protease N for 1 g soybean were used, not only the anitgenicity for a mouse anti-*Gly m* Bd 30K monoclonal antibody but also the allergenicity for patients' sera were significantly attenuated. In *in vitro* assay system to measure the allergenicity attributable to *Gly m* Bd 30K, extracts from protease-treated soybeans showed significantly weaker allergenicity than that from intact soybeans. These results suggest that soybeans treated with an adequate protease could be supplied for soybean-sensitive patients as a hypoallergenic foodstuff. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **17**, 59-65, 1996.

Key words : soybean, allergenicity, *Gly m* Bd 30K, protease

大豆は、栄養学的見地から良質たん白質源として高く評価されているが、日本人の三大アレルギー食品の一つでもあり、その恩恵を享受できない者も少なくない。我々は、この点を重視し、大豆のアレルゲン性を担う分子の解明、さらには、その低アレルゲン化を課題として研究を進め、大豆に感受性のあるアレルギー患者血清に含まれるIgEが結合する16種類の大豆ア

レルゲンたん白質を同定している¹⁾。その中で患者血清の約3分の2が反応を示す分子量約3万のたん白質を主要アレルゲンたん白質と認め、*Gly m* Bd 30Kと命名した。我々は、これまでに本アレルゲンたん白質が、ダニアレルゲン *Der p* I と相同性を有すること等の知見を得²⁾、また、二種類のマウスモノクローナル抗体を開発し、これらを用いたサンドイッチELISA法により、種々の食品に含まれる *Gly m* Bd 30K量の定量に成功している^{3,4)}。さらに、前年度の

*〒770 徳島市蔵本町3丁目18-15

本研究会において、マウス免疫血清とラット好塩基球系白血球細胞 RBL-2H3 を用いて、*Gly m Bd 30K* に応答する *in vitro* アレルギー再構成実験系を確立したことを報告した⁵⁾。

本年度は、たん白質分解酵素処理により、大豆の低アレルギー化を図り、その低アレルギー化の程度について、マウスモノクローナル抗体を用いたイムノブロット法および RBL-2H3 細胞実験系を用いて検討した。また、大豆に対してアレルギーであると診断された患者の血清を用いたイムノブロット法により、それらたん白質分解酵素処理大豆のヒトに対するアレルギー性低減度についても検討した。

方 法

実験材料及び試薬類

たん白質分解酵素処理大豆の調製には、市販の食品加工用たん白質分解酵素、即ちニュラーゼ F、パンクレアチン、プロテアーゼ A、プロテアーゼ M、プロテアーゼ N、プロテアーゼ P、プロテアーゼ S、プロレザー（天野製薬製）を用いた。

マウスの感作に用いる *Gly m Bd 30K* は、Kalinski らの方法⁶⁾を用いて、大豆種子より調製した。

たん白質分解酵素による大豆処理

大豆を一晩水に浸漬した後、オートクレーブ処理した。続いて、大豆に乾燥時の重量 1 g に対して、10 mL の酵素液（フィルター滅菌済み）を加え、無菌状態を保ったまま、37°C で 20 時間インキュベートした。処理に用いる酵素量は、説明書に記載されている酵素比活性（ユニット/g）に基づき算出した。

大豆たん白質の抽出

大豆または大豆製品は、3.75%メルカプトエタノール、4%SDS を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.0 で加熱抽出し、30,000 × *g* の遠心分離を行った。沈澱に対して再び抽出操作を繰り返し、二回の遠心分離によって得られた上清を合わせて、ケルダール法により窒素含量を算出し、大豆の窒素換算係数 5.71 を乗すことにより、たん白質含量とした（従って、たん白質分解酵素によりペプチド、さらにはアミノ酸にまで分解されていたとしてもたん白質とみなしている）。なお、抽出液を RBL-2H3 細胞実験系に供する際には、塩化カリウムを加えることにより、ドデシル硫酸イオンをカリウム塩の沈澱として遠心除去した。

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

SDS-PAGE は、Laemmli らの方法⁷⁾に準じて行った。患者血清またはマウス抗体によるイムノブロットの手順は、前報^{1,4)}に従って行った。

マウス抗 *Gly m Bd 30K* 血清の作製

既報⁸⁾の方法に従い、水酸化アルミニウムアジュバントとともに、*Gly m Bd 30K* を Balb/c マウス（大豆を含まない飼料で二世代以上飼育）の皮下に 2 週間間隔で 4～5 回投与し、感作を行った。最終投与 1 週間後に、下大静脈より全血採血した。

培養細胞刺激実験によるアレルギー性の評価

96 ウェルプレートに、RBL-2H3 細胞を 1.25×10^6 個/mL の細胞密度で、1 ウェルあたり 80 μ L ずつ播種した。一晩インキュベート後、20 μ L の抗原液を加え、37°C で、1 時間インキュベートした。上清を吸引除去、ウェルを冷 HBS で洗浄後、100 μ L の抗原含有液を加え、37°C で、1 時間インキュベートし、分泌される β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性を測定した⁹⁾。

結 果

種々のたん白質分解酵素による大豆処理

水に浸漬した大豆を種々のたん白質分解酵素液で処理したが、*Gly m Bd 30K* の分解に著しく効果を発揮するものはなかった。そこで、水に浸漬後、オートクレーブにかけた大豆にこれらの酵素を作用させ、処理後の大豆抽出物を SDS-PAGE ならびに抗 *Gly m Bd 30K* モノクローナル抗体によるイムノブロットにより解析した。その結果を Fig. 1 に示す。レーン 1 は、プロテアーゼ処理していないコントロール、2～9 は、大豆の乾燥重量 1 g に対して、種々のたん白質分解酵素を 100 ユニット作用させたものである。プロレザー（レーン 9）により、大豆たん白質全般が効果的に分解されていることが判明し、それに伴い、*Gly m Bd 30K* も分解されていることが示された。また、プロテアーゼ N（レーン 5）は、この使用量では、完全に *Gly m Bd 30K* を分解するには至らなかったが、分解する傾向が見られた。よって、検討した 8 種類の酵素の中から、大豆の低アレルギー化に適したものとしてプロレザー、プロテアーゼ N の 2 種類を選択した。

Gly m Bd 30K 分解に適したたん白質分解酵素使用量の検討

プロレザー、プロテアーゼ N について、それらの酵

素使用量と *Gly m Bd 30K* の分解程度との関係について、Fig. 1と同じく SDS-PAGE およびモノクローナル抗体を用いるイムノブロット法により検討し

た。プロレザーについては、大豆 1 g に対して、2~5,000ユニットの範囲で作用させてみたが、250ユニット以上を用いた場合に、たん白質全般の分解が進

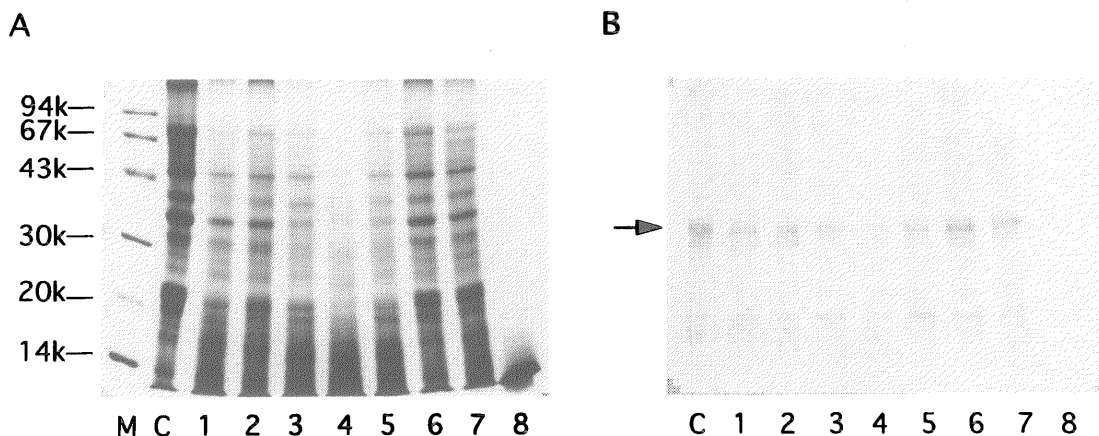


Fig. 1. Hydrolysis of soybean proteins by various proteases. M, molecular weight marker proteins ; C, non-hydrolyzed (control) ; 1, Newlase F ; 2, Protease M ; 3, Protease A ; 4, Protease N ; 5, Protease P ; 6, Protease S ; 7, Pancreatin ; 8, Proleather.

A, stained with Coomassie brilliant blue ; B, stained with anti-*Gly m Bd 30K* monoclonal antibody (F5) and HRP-conjugated anti mouse IgG. An arrow indicates *Gly m Bd 30K*.

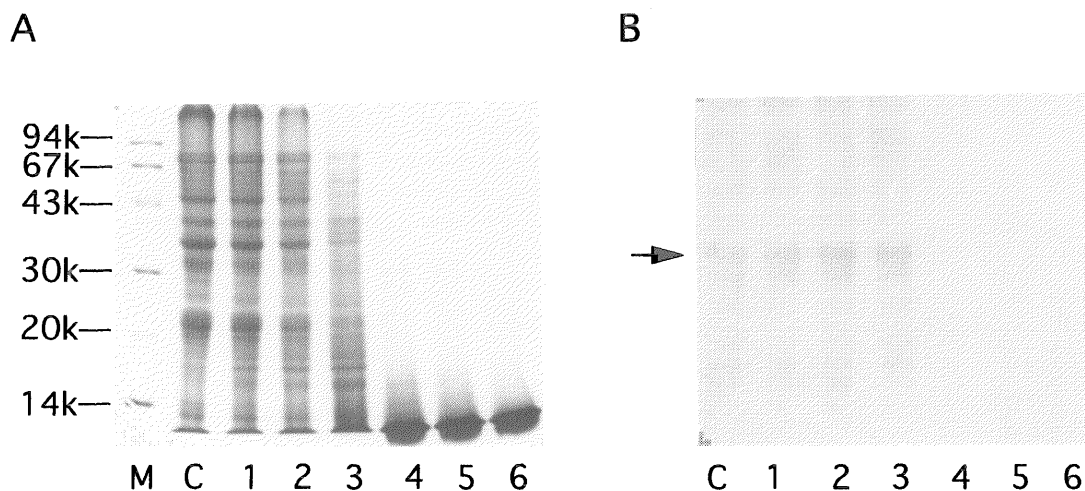


Fig. 2. Hydrolysis of soybean proteins by various ratios of Proleather. M, molecular weight marker proteins ; C, non-hydrolyzed (control) ; 1, 2 units ; 2, 10 units ; 3, 50 units ; 4, 250 units ; 5, 1,000 units ; 6, 5,000 units Proleather per 1 g of soybean.

A, stained with Coomassie brilliant blue ; B, stained with anti-*Gly m Bd 30K* monoclonal antibody (F5) and HRP-conjugated anti mouse IgG. An arrow indicates *Gly m Bd 30K*.

行し (Fig. 2A), *Gly m* Bd 30K も分解された (Fig. 2B). また, プロテアーゼNについては, 大豆 1 g に対して, 1,000~125,000ユニットの範囲で作用させてみたが, 5,000ユニット以上を用いた場合に, たん白質全般の分解が進行し (Fig. 3A), *Gly m* Bd 30K も分解された (Fig. 3B). このように, プロレザーならびにプロテアーゼNによる *Gly m* Bd 30K の分解は, 特異性の高いものではなく, 大豆

たん白質全般の分解に同調して進行することが明らかとなった。

たん白質分解酵素処理大豆のRBL-2H3細胞実験系による評価

マウス抗血清とRBL-2H3細胞を用いるアレルギー検出実験系により, たん白質分解酵素処理大豆に残存する *Gly m* Bd 30K 由来のアレルゲン性について検討した. たん白質分解酵素を作用させなかったコント

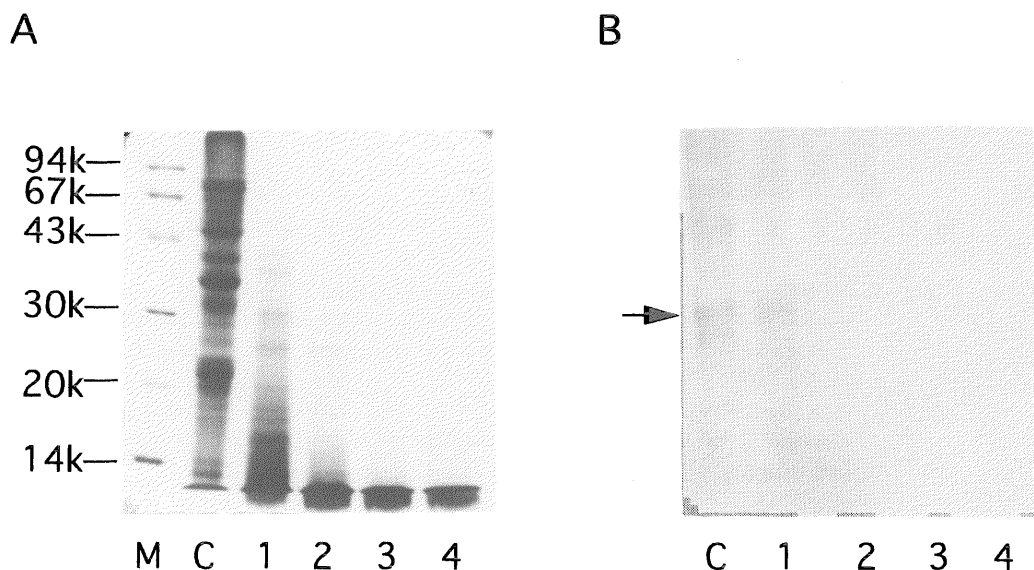


Fig. 3. Hydrolysis of soybean proteins by various ratios of Protease N. M, molecular weight marker proteins; C, non-hydrolyzed (control); 1, 1,000 units; 2, 5,000 units; 3, 25,000 units; 4, 125,000 units Protease N per 1 g of soybean. A, stained with Coomassie brilliant blue; B, stained with anti *Gly m* Bd 30K monoclonal antibody (F5) and HRP-conjugated anti mouse IgG. An arrow indicates *Gly m* Bd 30K.

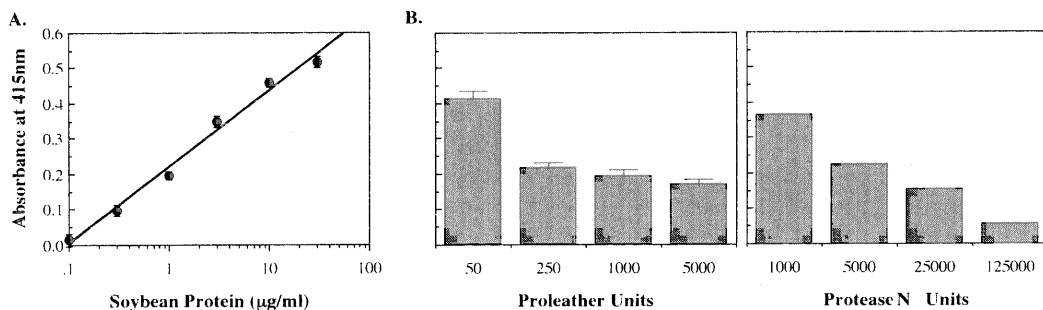


Fig. 4. β -N-acetylhexosaminidase release evoked by soybean-extracts from RBL-2 H3 cells pre-incubated with mouse anti-*Gly m* Bd 30K sera. A, stimulated by extracts of non-hydrolyzed soybeans; B, stimulated by extracts of soybeans treated with Proleather or Protease N.

Table 1. Residual allergenicity in hydrolyzed soybeans by proteases

Treatment	Absorbance ^{a)} at 415 nm	Control equivalent ^{b)} μg/mL	Residual allergenicity ^{c)} %
Proleather			
50 units ^{d)}	0.413	7.84	26.1
250 units	0.215	0.94	3.1
1,000 units	0.194	0.75	2.5
5,000 units	0.169	0.58	1.9
Protease N			
1,000 units	0.366	4.74	15.8
5,000 units	0.225	1.05	3.6
25,000 units	0.151	0.47	1.6
125,000 units	0.053	0.17	0.6

a) The absorbance when 30 μg/mL of hydrolyzed soybean protein was assayed.

b) The concentration of the non-hydrolyzed (control) soybean protein equivalent was calculated from the absorbance based on the calibration curve (Fig. 5A).

c) Each value is calculated from the equation shown below;

$$\text{Residual allergenicity (\%)} = 100 \times \text{Control equivalent } [\mu\text{g/mL}] / 30 [\mu\text{g/mL}].$$

d) Amounts of protease activity used for 1 g of soybean.

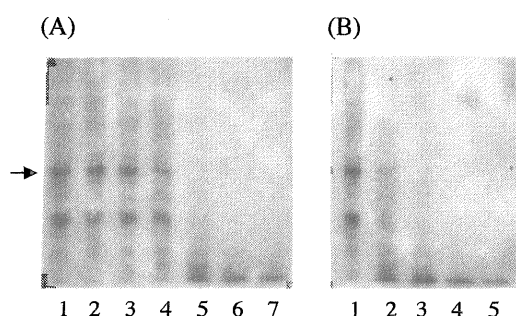


Fig. 5. Immunoblottings of hydrolyzed soybean proteins by Proleather or Protease N with the serum of a soybean-sensitive patient. An arrow indicates *Gly m Bd 30K*. Panel A: 1, non-hydrolyzed (control); 2, 2 units; 3, 10 units; 4, 50 units; 5, 250 units; 6, 1,000 units; 7, 5,000 units of Proleather per 1 g of soybean. Panel B: 1, non-hydrolyzed (control); 2, 1,000 units; 3, 5,000 units; 4, 25,000 units; 5, 125,000 units of Protease N per 1 g of soybean.

ロール大豆サンプルについて、その抽出たん白質用量 (0.1~30 μg/mL) と細胞からのヘキソサミニダーゼ活性 (*p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-β-D-glucosaminide の分解に起因する 415 nm での吸光度) との関係を図 4A に示した。本図に見られるようにコントロール大豆抽出たん白質の濃度の上昇に伴って、細胞応答も亢進した。一方、各たん白質分解酵素処理大豆の抽出たん白質 30 μg/mL (ケルダール窒素量から換算したもので、分解物も含む) で刺激し

た場合に、細胞から放出されるヘキソサミニダーゼ活性を測定したところ、用いたたん白質分解酵素量の増大に従って、吸光度の値によって示されるヘキソサミニダーゼ活性が低下した (Fig. 4B, Table 1)。各たん白質分解酵素処理大豆の抽出たん白質についてのヘキソサミニダーゼ活性に基づき、それと等しいヘキソサミニダーゼ活性を示すコントロール大豆抽出物のたん白質濃度を Fig. 4A を検量線として算出し、さらにそれらの数値の実際のたん白質濃度 (30 μg/mL) に対するパーセンテージを残存するアレルゲン性として示した (Table 1)。どちらのたん白質分解酵素に関しても、用いた酵素量とアレルゲン性残存度とは逆相関の関係にあり、このことは、*Gly m Bd 30K* 分子中におそらく複数箇所存在すると思われるエピトープ部位 (もしくはエピトープの立体構造に影響を及ぼす部位) が、これらの酵素処理により効果的に分解されることを意味している。

たん白質分解酵素処理大豆と患者血清との反応

大豆 1 g に対してプロレザ-250 または 1,000 ユニット、プロテアーゼ N 5,000 または 25,000 ユニットの用いて処理した大豆の抽出物を、大豆アレルギー患者血清を用いてイムノプロットした。その結果、Fig. 5 に見られるように、*Gly m Bd 30K* は勿論のこと、その他の IgE 結合性たん白質も使用する酵素量の増大に従って、検出されなくなった。

考 察

一般に、食物アレルギーを診断する場合には、ラジオアレルゴソルベントテストやイムノプロットなどIgE抗体の結合を検出する方法、末梢血からのヒスタミン遊離測定、皮膚テスト、経口（食物除去・負荷）テストが適用される。低アレルゲン化大豆を開発する場合においても、大豆アレルギーと診断されている患者に対して、これらの実験を実施し、その結果を評価することにより、その安全性を確認する必要があると思われるが、その開発過程においては、患者の応答性を検討する前に、動物免疫血清・抗体などを用いたモデル実験系において、低アレルゲン化の程度についての見当をつけておく必要がある。

アレルゲンに対するモノクローナル抗体（マウスIgG）を用いる方法は、インタクトなアレルゲンの残存を検知する場合に、有用である。しかし、ポリクローナルである患者IgE抗体に対しては、おそらく複数箇所のエпитープ部位が存在すると思われることから、モノクローナル抗体によりアレルゲンが検出されなくなったからといって、そのレベルで患者に対しての安全性が確保されたと安心することはできない。今回我々が行ったRBL-2H3細胞を用いる方法は、ヒトのアレルギー応答に対するシミュレーションであり、マウスポリクローナル血清を用いて、実際に好塩基球におけるIgE介在性の細胞応答を指標として低アレルゲン化の程度を評価する。この方法は、精製したGly m Bd 30Kを用いた実験において検出感度が十分に高いことが証明されており、一方で、細胞表面の複数の高親和性IgE受容体間が、IgEとアレルゲンとの結合を介して架橋された場合にのみ細胞応答がおこることから、エпитープを一ヶ所しか有していない一価のフラグメントペプチドのように、アレルギーを惹起しないものは検出しないという特徴を持つ。この点は、イムノプロットなどと大きく異なる点であり、低アレルゲン化食品を作製するための指標として、より实际的といえる。

今回、検討した8種類のたん白質分解酵素の中では、水に浸漬しただけの大豆を低アレルゲン化するのに適したものではなく、オートクレーブで前処理した大豆については、プロレザー、プロテアーゼNのみが効果を示した。プロレザーやプロテアーゼNは、いずれも*B. subtilis*由来のたん白質分解酵素である。我々は、以前、マウス抗Gly m Bd 30Kモノクローナル抗体を用いるサンドイッチELISA法により、納豆にはGly m Bd 30Kが検出されないことを報告し⁴⁾、また、納豆抽出物に対して、患者血清に含まれるIgEがほとんど結合しないことを明らかにしている¹⁰⁾。納豆製造に用いられるいわゆる納豆菌は、*B. subtilis*に分類される。このように、*B. subtilis*が産生するたん白質分解酵素は、大豆たん白質を分解する上で、適していると考えられる。

抗Gly m Bd 30Kモノクローナル抗体を用いたイムノプロットにおいて、どちらの酵素を用いた場合も、その使用量が多くなるほどアレルゲン性の低減化が見られ、大豆1gに対して、プロレザーでは250ユニット以上用いた場合、プロテアーゼNでは5,000ユニット以上用いた場合に、Gly m Bd 30Kが検出されなくなった。この傾向は、RBL-2H3細胞実験においても認められ、たん白質分解酵素処理しない場合の大豆と比較して、プロレザーを最高濃度（大豆1gに対して、5,000ユニット）で用いた場合には約1.9%、プロテアーゼNを最高の濃度（大豆1gに対して、125,000ユニット）で用いた場合には、約0.6%にまでアレルゲン性が減少していた。また、大豆アレルギー患者の血清を用いたイムノプロットにおいても、多量のたん白質分解酵素を用いて処理した場合には、大豆のアレルゲン性は著しく減少していることが示された。

今回の実験結果から、オートクレーブ処理とたん白質分解酵素処理との組み合わせによる大豆の低アレルゲン化に、ある程度の見通しがついたということができるだろう。今後は、これら処理大豆の安全性について皮膚テストや経口テストによりさらに詳しく検討していく予定である。

要 約

市販のたん白質分解酵素で処理することにより大豆の低アレルゲン化を試み、その測定法について検討した。低アレルゲン化を検討する試料としてオートクレーブ処理した大豆を用い、大豆主要アレルゲンGly m Bd 30Kに対するモノクローナル抗体によるイムノプロットで検出した結果より、テストした8種類の酵素（天野製薬社製）の中で、いずれも*B. subtilis*

起源であるプロレザー、プロテアーゼ N が大豆の低アレルゲン化に適していると判断した。プロレザーまたは、プロテアーゼ N で処理した大豆について検討を進めたところ、RBL-2H3細胞を用いた *in vitro* アレルギー応答再構成実験においても、これらのたん白質分解酵素で処理した大豆のアレルゲン性は、著しく低減化されていることが示された。さらに大豆に感受性のあるアトピー性皮膚炎患者の血清によるイムノプロットにおいて、アレルゲン性の低減化されていることが示された。以上の結果は、オートクレープ処理とたん白質分解酵素処理を組み合わせることにより、大豆アレルギー患者が利用できる低アレルゲン化大豆食品を開発できる可能性を示唆している。

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) Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Kitamura K, Zhu Y-L, 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.
- 3) 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.
- 4) Tsuji H, Okada N, Yamanishi R, Bando N, Kimoto M and Ogawa T (1995) : Measurement of *Gly m* Bd 30K, a major soybean allergen, in soybean products by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosci Biotech Biochem*, **59**, 150-151.
- 5) 小川 正, 山西倫太郎, 辻 英明, 板東紀子 (1995) : 大豆たん白質の低アレルゲン化の検討 : モデル実験系による解析. 大豆たん白質研究会会誌, **16**, 62-66.
- 6) Kalinski A, Weisemann JM, Matthews BF and Herman EM (1990) : Molecular cloning of a protein associated with soybean seed oil bodies that is similar to thiol proteases of the papain family. *J Biol Chem*, **265**, 13843-13848.
- 7) Laemmli UK (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 8) Ogawa T, Tsuji H, Bando N and Sasaoka K (1992) : Identification of a soybean proteins producing IgE antibodies in Balb/c mice. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 978-979.
- 9) Yamanishi R, Kondo K, Tsuji H and Ogawa T (1995) : Micro-assay to measure the allergenicity of Kunitz-type soybean trypsin inhibitor toward Balb/c mice by using RBL-2H3 cells. *Biosci Biotech Biochem*, **59**, 1272-1275.
- 10) Yamanishi R, Huang T, Tsuji H, Bando N and Ogawa T (1995) : Reduction of the soybean allergenicity by the fermentation with *Bacillus natto*. *Food Sci Technol Int*, **1**, 14-17.