

新大豆アレルゲン成分 (Gly m Bd 28K) の単離とたん白質化学的性質

小川 正*・板東紀子・山西倫太郎

徳島大学医学部

Purification and Characterization of Soybean Allergen Gly m Bd 28K

Tadashi OGAWA, Noriko BANDO and Rintaro YAMANISHI

School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770

ABSTRACT

Gly m Bd 28K (Gm28K) is one of the major allergens of soybean. In the present study, a monoclonal antibody (mAb) against Gm28K was prepared and Gm28K was purified from defatted soybean flakes by using immunoaffinity chromatography with the mAb as a ligand. The purified allergen was found to be a glycoprotein with molecular mass of 26 kDa and pI 6.1. During the purification, the allergen gave more acidic protein species with the same molecular mass, suggesting that the allergen is unstable. From the N-terminal amino acid sequence of Gm28K (FHDDEGGDKKSPKSLFLMS-STR-) and the sugar composition it was shown that Gm28K is a new glycoprotein with an Asn-linked sugar moiety at the 20th residue (Asn) from the N-terminal. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **18**, 62-67, 1997.

Key words: soybean, allergen, monoclonal antibody, glycoprotein, Gly m Bd 28K

分離大豆たん白質 (SPI) は魚肉ソーセージ、ハンバーガーやミートボールといった種々の魚肉、鳥獣鶏肉加工食品の良好な加工素材として広く利用され、その需要はますます拡大している。しかし一方で日本人にとって大豆は三大アレルゲン食品としても知られていることから、アレルギー患者にとって大豆及び SPI のより安全で健康な利用のためにはアレルゲンたん白質の検索とその低減化が大きな課題となっている。

我々は大豆アレルギー患者の血清を用いて約15種類のアレルゲン性たん白質成分を特定し、その中で β -conglycinin の α -subunit, 34 kDa oil-body-associated protein (Gly m Bd 30K) および Gly m Bd 28K (Gm28K) と命名した3種の成分が主要アレルゲンで

あることを明らかにした^{1,2)}。前2者は既知の大豆たん白質成分として帰属し、特に Gly m Bd 30K はダニアレルゲンとして知られる Der p 1 と同じバパイナスーパーファミリーに属するたん白質であることを立証した。Gm28K は完全には精製されておらず、その性質も不明である。本研究では、未精製ながら少量単離された Gm28K を用いてまずモノクローナル抗体の作成を試み、次いでこの抗体を固定したアフィニティーカラムによるクトマトグラフィーでアレルゲンを精製することに成功し、その性質の一端を明らかにした。

実験方法

実験材料及び試薬

脱脂大豆 (フレーク状, IMO 品種) 及び SPI は不

*〒770 徳島市蔵本町3丁目18-15

二製油株式会社より入手した、2-fluoro-1-methylpyridinium toluene 4-sulfonate (FMP)-活性化 Cellulofine は生化学工業より購入した。 ^{125}I 標識抗ヒト IgE 抗体 (1.63×10^5 Bq/5 mL) は Pharmacia Diagnostics (Uppsala, Sweden) より購入した。Horse Radish Peroxidase 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体は Organon Teknika (West Chester CA, USA) より入手した。7S グロブリン画分は Thahn and Shibasaki³⁾ の方法で調製した。その他使用した試薬類は前報^{1,2)} に述べた通りである。

患者血清

Radioallergosorbent test (RAST) によって大豆たん白質に陽性 (RAST score > 2) と判定され、さらに大豆総たん白質のイムノブロットで Gly m Bd 28K に反応する IgE 抗体保有患者より提供された血清¹⁾ を使用した。

モノクローナル抗体の作製

Gm28K に対するモノクローナル抗体作製のため Gm28K の部分精製標品を予め調製した。7S グロブリン画分から、DEAE-Sephacryl S-200, CM-Cellulofine によるクロマトグラフィー、さらに等電点電気泳動法により sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ゲル電気泳動的においてほぼ均一な Gm28K の部分精製標品を得た。この Gm28K 標品を用いて免疫したマ

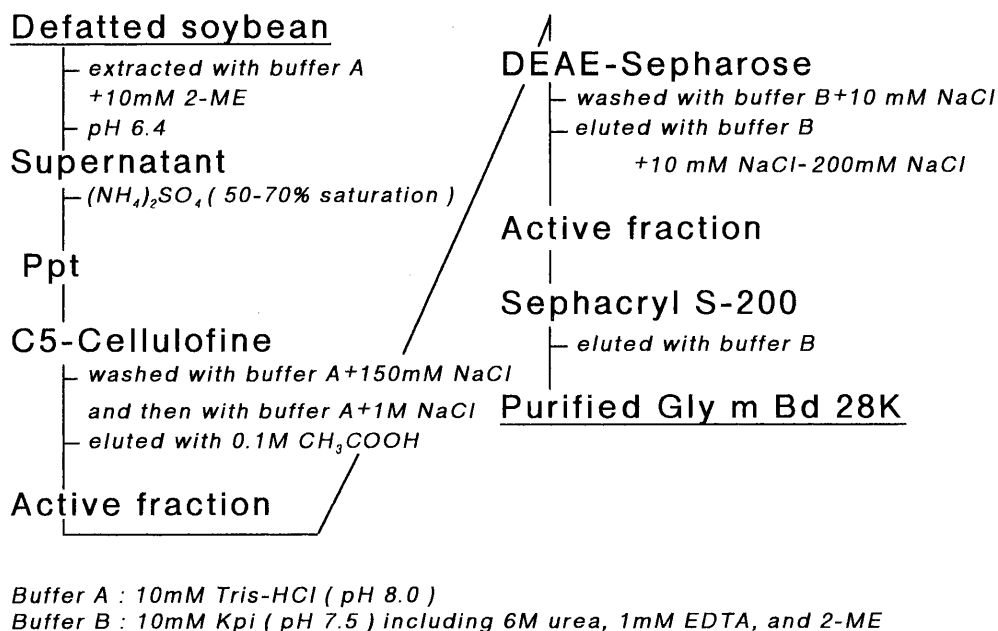
ウスより前報⁴⁾ で示した方法によりモノクローナル抗体 C5 を産生するハイブリドーマを得た。このハイブリドーマを腹腔に接種したマウスの腹水より protein A によるクロマトグラフィーを用いて精製抗 Gm28K 抗体 C5 を得た。

モノクローナル抗体 C5 固定化アフィニティーカラムの作製

FMP-活性化 Cellulofine を 50 mM NaHCO₃ 21.6 mL 中で 87 mg の C5 モノクローナル抗体と反応させた。過剰の FMP 活性基を monoethanolamine でブロックし、C5-Cellulofine カラムを得た。

Gm28K の精製

精製過程は Scheme 1 に示した。脱脂大豆フレークより調製した 7S グロブリン画分から、50~70% 硫酸アンモニウム飽和で沈澱するたん白質画分に Gm28K は回収される。沈澱は 1 mM EDTA, 10 mM mercaptoethanol, 6 M 尿素を含む 10 mM リン酸カリ緩衝液 (pH 7.5; 緩衝液 B) に溶解した後、10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0; 緩衝液 A) で透析した。透析液は C5-Cellulofine カラム (1.4 × 13 cm) にかけて、0.15 M NaCl および 1 M NaCl を含む同様の Tris-HCl 緩衝液にて順次洗浄した後、吸着した Gm28K を 0.1 M 酢酸で溶出した。Gm28K を含む画分を集め、Diaflo YM1 を用いて限外ろ過により濃縮した。濃縮液は緩衝液 A に対して透析した後、緩衝液 A で平衡化した



Scheme 1. Purification procedure of Gm28K.

DEAE-Sepharose CL-6B カラム (0.65×15 cm) にてクロマトグラフィーを行った。10 mM NaCl を含む緩衝液 B で洗浄後、緩衝液 B (10 mM から 150 mM の NaCl の直線濃度勾配) で Gm28K を溶出した。Gm28K 画分は上述の限外ろ過法で濃縮し、緩衝液 B で平衡化した Sephacryl S-200 によりゲルろ過を行って、ほぼ完全に精製することが出来た。Gm28K の検出はイムノプロットによって行った。

SDS-PAGE とイムノプロット

SDS-PAGE は Laemmli⁵⁾ の方法に従って、15% polyacrylamide ゲルを用いて行った。イムノプロットは前述^{1,2)}の方法に従って行った。検出は C5 抗体を用いる場合はペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体による酵素反応で、患者血清を用いる場合は、¹²⁵I 標識抗ヒト IgE 抗体で免疫染色後、ラジオオートグラフ法により検出した。

アミノ酸分析

Gm28K を 6 M HCl にて 115°C、24 時間加水分解を行い、Hitachi L8500A アミノ酸自動分析計を用いてアミノ酸組成を分析した。システインは過ギ酸酸化法⁶⁾、トリプトファンは Edelhoch⁷⁾ の分光学的方法に従って測定した。

糖組成の分析

Gm28K の糖鎖の構成糖組成分析は Gm28K を 4 M

HCl と 4 M トリフルオロ酢酸を 1 : 1 の混合溶液で加水分解し、遊離した糖をアセチル化した後さらにピリジルアミノ化し、PALPAK Type A カラムを用いて高速液体クロマトグラフィーにて分析した。

N-末端アミノ酸配列の分析

Gm28K は二次元電気泳動にて分離し、PVDF 膜上に転写後、Coomassie Brilliant Blue で染色、たん白質部分を切りとり、Hewlett Packard G1005A 自動アミノ酸配列分析機にて分析した。

結 果

マウス抗 Gm28K IgG モノクローナル抗体の作製

Gm28K を免疫感作したマウスより得た脾細胞とミエローマ細胞の融合細胞より 2 種の異なる特異抗体産生細胞を選択した。産生されるモノクローナル抗体は C5 および D4 と命名した。C4 の軽鎖は κ 、重鎖は γ_{2a} を持つ IgG₁ であり、D4 はそれぞれ κ および μ であり IgM に属する。Gm28K に対する解離定数はそれぞれ 4.8×10^{-10} M および 1.4×10^{-8} M を示した。

Gm28K の精製

Fig. 1 (A), (B) には 7S グロブリン画分の二次元電気泳動の図を示した。3 種の大豆主要アレルゲンたん白質成分は本画分に回収されることが示されている。本実

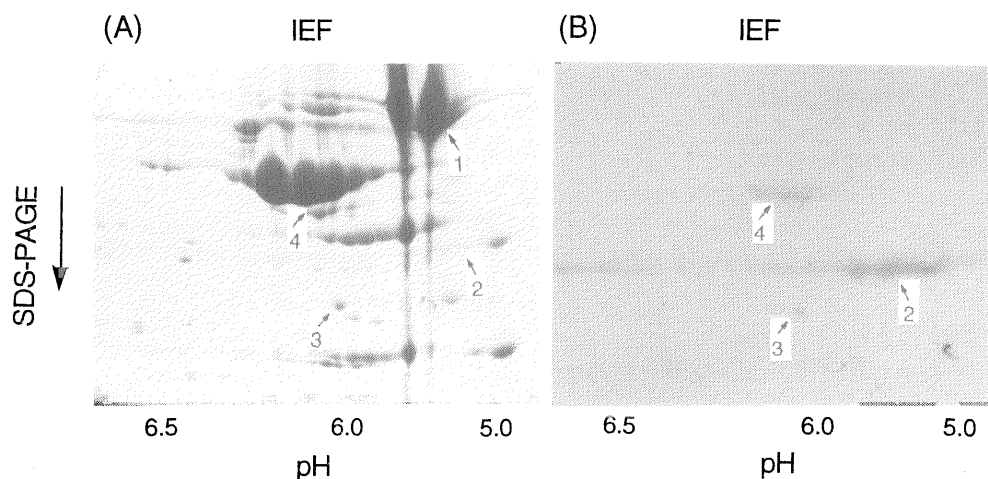


Fig. 1. Two dimensional electrophoresis of the 7S globulin fraction.

(A) Proteins on the gel were stained with Coomassie Brilliant Blue R250.

(B) The proteins on the other gel were electroblotted onto a nitrocellulose membrane and immunoblotted with patients' sera. Arrows 1, 2, 3, and 4 represent the spot corresponding to α -subunit of β -conglycinin, Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K, and β -subunit of β -conglycinin.

験に用いた患者血清は Fig. 1 (B) のイムノプロットに示されるように Gly m Bd 30K 及び Gm28K を認識する抗体を保有するが、 β -conglycinin の α -subunit には反応しないことを示している。Fig. 2 は C5 固定化カラムによる親和クロマトグラフィーの結果を示している。図より明らかなように Gm28K は固定化カラムより 0.1 M 酢酸溶液によって溶出された。この画分はさらに DEAE-Sephacryl S-200 によるクロマトグラフィーで精製された。精製標品の SDS-PAGE を Fig. 3 に示した。最終標品は電気泳動的に均一であり、モノクローナル抗体、患者血清中の特異抗体と反応した。また、Fig. 3 の D に示されるよ

うに、PAS 染色陽性であり、糖たん白質であることを示した。

N-末端アミノ酸配列

Gm28K たん白質を直接分析機にて測定したアミノ酸の配列は、FHDDEGGDKKSPKSLFMS-STR- である。第20番目残基は検出されない。

糖鎖組成分析、アミノ酸組成分析

Gm28K のアミノ酸組成は Table 1 に、Gm28K から加水分解によって遊離される糖の組成分析結果は Table 2 にそれぞれ示されている。

大豆加工食品における Gm28K の分布

モノクローナル抗体 C5 を用いたイムノプロット法

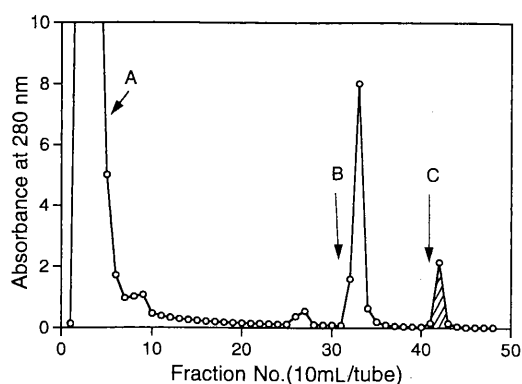


Fig. 2. Immunoaffinity chromatography of Gly m Bd 28K on C5-Cellulofine column. A, washed with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.15 M NaCl; B, washed with Tris buffer containing 1 M NaCl; C, eluted with 0.1 M acetic acid.

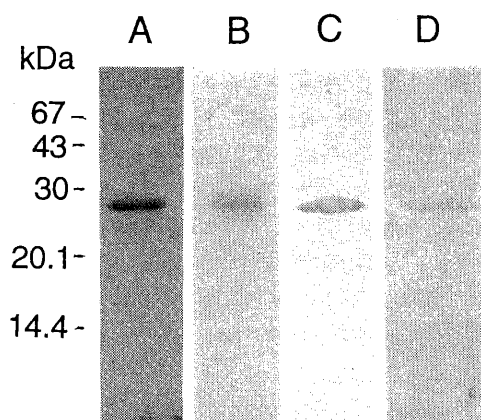


Fig. 3. SDS-PAGE and immunoblot of the purified allergen, Gly m Bd 28K. A, stained with Amide Black 10B; B, immunostained with patients' sera; C, immunostained with C5; D, stained with the PAS reagent.

Table 1. Amino acid composition of purified Gm28K

Amino acid	mol%	Residues/mol ^{a)}
Asp ^{b)}	9.09	20
Thr	3.63	8
Ser	10.00	22
Glu ^{b)}	10.00	22
Pro	4.09	9
Gly	10.00	22
Ala	4.55	10
Val	4.55	10
Met	1.82	4
Ile	7.27	16
Leu	9.09	20
Tyr	2.73	6
Phe	7.73	17
Lys	5.00	11
His	3.64	8
Arg	5.45	12
Half-Cys ^{c)}	0.45	1
Trp	0.9	2

a) The nearest integral number calculated on the basis of a molecular mass of 26 kDa.

b) The Asp and Glu include Asn and Gln, respectively.

c) Determined as cysteic acid.

Table 2. Sugar composition of Gm28K

Monosaccharide	Molar ratio
Mannose	3
N-Acetylglucosamine	2
Fucose	1
Xylose	1
N-Acetylgalactosamine	n.d.
Glucose	n.d.

n. d. : not detected.

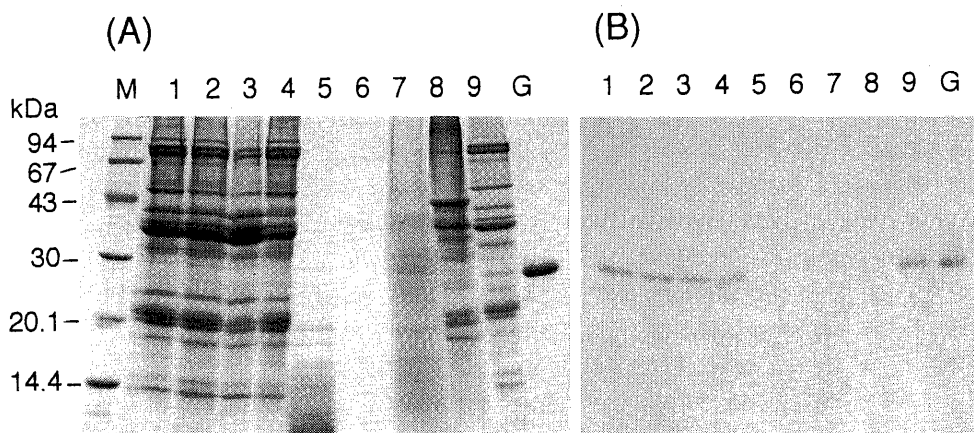


Fig. 4. SDS-PAGE and immunoblotting pattern of Gly m Bd 28K in soybean products. (A) proteins stained with Coomassie Brilliant Blue R250; (B) immunostained with C5. M, marker proteins; 1, tofu; 2, yuba; 3, abura-age; 4, soy-milk; 5, natto; 6, soy sauce; 7, meat ball; 8, fish sausage; 9, SPI; G, the purified allergen.

を用いて大豆加工食品抽出液中の Gm28K の存在を検討したのが Fig. 4 である。大豆発酵食品、SPI を使用した畜肉、魚肉加工品には Gm28K は検出されなかった。

考 察

特異的モノクローナル抗体 (C5) の利用によって大豆アレルゲン Gm28K を単離・精製することに成功した。1 kg の脱脂大豆フレークより約18 mg のアレルゲンたん白質を得た。この事実は本アレルゲンたん白質が最も主要なアレルゲン Gly m Bd 30K に比較して2～3桁少ない微量たん白質成分であることを示唆している。本アレルゲンは分子量26,000, 等電点6.1, N-末端から第20番目のアミノ酸残基に典型的な Asn 結合型糖鎖⁸⁻¹⁰⁾を持ち、その N-末端アミノ酸配列のコンピューターによるホモロジー検索からも、未だ大豆において報告のない新規たん白質成分であることを明らかにした。アミノ酸分析の結果は Asp, Ser, Glu, Gly, Leu が多く26 kDa 当たり1個の Cys 残基を有するこ

とが示された。Cys 残基を1個として得られた最小分子量は25,304である。特に、花粉症の原因となっているオリーブ花粉アレルゲン Ole e 1 の糖鎖組成と類似し、しかも Ole e 1 のエピトープが糖鎖である可能性が示唆されている事実を考慮すれば¹¹⁾、本アレルゲンについても糖鎖の持つアレルゲン性について更に検討する必要がある。Gm28K の精製過程で分子量には変化が無いが、等電点がより酸性な分子種を生じることが示された。原因として精製過程で大豆貯蔵たん白質の凝集防止に使用した高濃度の尿素溶液が Lys 残基等をカルバミル化する結果、陽電荷を減少し、見かけ上酸性側へシフトするものと考えられた。一方、大豆加工食品中の Gm28K をイムノプロットでスクリーニングすると、SPI を使用している加工食品において Gly m Bd 30K ははっきりと検出されるが、Gm28K は検出されなかった。その原因として SPI での Gm28K の含量が低下しているか、酵素法でのイムノプロットでは検出限界以下である可能性が考えられる。また、畜肉、魚肉中では加工時に容易に分解 (消化) されることも考えられる。

要 約

大豆陽性アトピー性皮膚炎患者血清をプローブとして特定した主要大豆アレルゲンたん白質 Gly m Bd 28K (Gm28K) について、単離・精製を行うとともにたん白質化学的性質を明らかにすることを目的に本研究を行った。予め部分精製した少量の Gm28K を用いて免疫したマウ

スより作製したモノクローナル抗体 (C5) を固定化したイムノアフィニティーカラムにより Gm28K を精製した。アミノ酸組成, N-末端アミノ酸配列, 結合糖鎖の糖組成の解析, C5 抗体を利用した Gm28K の大豆加工食品中の分布について検討した。Gm28K は分子量26,000, pI 6.1の糖たん白質である。精製過程で等電点のより酸性な複数の分子種を与える不安定性を示した。N-末端アミノ酸配列は FHDDEGGDKKSPKSLFLMS-STR- であり同定出来ない第20番目アミノ酸残基に典型的な Asn 結合型糖鎖を持つことが推定された。本アミノ酸配列に相同性を示す既知たん白質の報告は見当たらない新規なたん白質である。Gm28K は大豆加工食品に広く検出されるが, SPI を利用添加した畜肉・魚肉加工食品には検出されなかった。

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) Thahn VH and Shibasaki K (1976) : Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J Agric Food Chem*, **24**, 1117-1121.
- 4) 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.
- 5) Laemmli UK (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 6) Moore S (1963) : On the determination of cysteine as cysteic acid. *J Biol Chem*, **238**, 235-237.
- 7) Edelhoch H (1967) : Spectrometric determination of tryptophan. *Biochemistry*, **6**, 1948-1954.
- 8) Van Kuik JA, Hoffmann RA, Mutsaers JHGM, Van Halbeek H, Kamerling JP and Vliegthart JFG (1986) : A 500-MHz ¹H-NMR study on the N-linked carbohydrate chain of bromelain. *Glycoconjugate J*, **3**, 27-34.
- 9) McManus MT, McKeatig J and Secher DS (1988) : Identification of a monoclonal antibody to abscissin tissue that recognizes xylose/fucose-containing N-linked oligosaccharides from higher plants. *Planta*, **175**, 506-512.
- 10) D'Andrea G, Bouwstrra JB, Kamerling JP and Vliegthart JFG (1988) : Primary structure of the xylose-containing N-linked carbohydrate moiety from ascorbic acid oxidase of *Cucubita pepo* medullosa. *Glycoconjugate J*, **5**, 151-157.
- 11) Batanero E, Villalba M, Monsalve R and Rodriguez R (1996) : Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins; Evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen. *J Allergy Clin Immunol*, **97**, 1264-1271.