

大豆 β -コングリシニンおよびその構成サブユニット (α' , α , β)間の たん白質化学的構造特異性が生体に及ぼす免疫学的活性の解析

小川 正^{*1}・室田佳恵子²・板東紀子²

¹ 京都大学食糧科学研究所 ² 徳島大学医学部

Effect of the Protein Chemical Nature of β -Conglycinin Subunits (α' , α and β) on Their Immunological Activity

Tadashi OGAWA¹, Kaeko MUROTA² and Noriko BANDO²

¹Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611-0011

²School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770-8503

ABSTRACT

IgE antibodies from soybean-sensitive patients with atopic dermatitis are shown to recognize only α -subunit of β -conglycinin, while the primary structure of these subunits (α' , α and β) is highly homologous to each other. Present work was carried out to examine the relationship between the protein structure of these subunits and their immunological activities. First, we tried to prepare the monoclonal antibodies against each subunit to establish a way for selective and quantitative determination of subunits. However, all the monoclonal antibodies raised against α' -, α - or β -subunit were shown to be cross-reactive to each other. We also examined the susceptibility of three subunits to various proteinases as an index to evaluate the antigenicity. α' - and α -Subunits were rapidly hydrolyzed by both pepsin and pancreatin. β -Subunit was shown to be resistant against pepsin digestion, but not to pancreatin. These findings indicate that the susceptibility of the subunits to proteinase digestion does not correspond to their immunological activity. *Soy Protein Research, Japan* 1, 69-74, 1998.

Key words : β -conglycinin, α -subunit, allergen, digestion, stability

大豆は栄養学的に重要な植物性のたん白質源である一方、日本人にとっては三大アレルギー食品としても知られている。我々は大豆中のアレルギー成分を大豆陽性アトピー性皮膚炎患者血清を用いて検索し、主要

アレルゲンとして β -conglycinin の α -subunit, Gly m Bd 30K (34-kDa oil-body-associated protein) および Gly m Bd 28K を同定した¹⁾。これらのうち、 β -conglycinin の α -subunit は大豆の種子貯蔵たん白質である β -conglycinin の3つの主要なサブユニット (α' , α , β) の一つである。これらサブユニットは一次構造上非常

* 〒611-0011 宇治市五ヶ庄

に高い相同性を持つことが知られており、特に α' -と α -subunit との間には90%を超える相同性がある。それにもかかわらず、 α -subunit のみが患者血清中の IgE 抗体によって特異的に認識される²⁾。このことから α -subunit には高次構造上の特徴、すなわち消化管における分解抵抗性やその未分解ペプチドの小腸粘膜通過能などが備わっている可能性が示唆される。

本研究では、 β -conglycinin、あるいはその3種のサブユニットに対するモノクローナル抗体の作製を試みるとともに、たん白質分解酵素に対する消化抵抗性を比較検討した。

方 法

実験材料及び試薬

脱脂大豆（フレック状、IMO 品種）は不二製油株式会社より入手した。ConA-Sepharose 及び DEAE-Sepharose CL-6B は Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) より購入した。pepsin および pancreatin は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) より購入した。

β -conglycinin 及び各サブユニットの調製

β -conglycinin の各サブユニットの部分精製標品を調製した。Thanh and Shibasaki³⁾の方法で調製した粗 7S グロブリン画分から、ConA-Sepharose、DEAE-Sepharose CL-6B によるクロマトグラフィーにより、各サブユニットの粗精製標品を調製した⁴⁾。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)⁵⁾により、

得られた標品がそれぞれのサブユニットを主成分として含むことを確認した。

モノクローナル抗体の作製

得られた粗精製サブユニットを Balb/c マウスに腹腔内免疫し、常法通りモノクローナル抗体を作製した。ミエローマ細胞との融合により得られたハイブリドーマを、ELISA 法による 7S グロブリン画分と抗体の反応およびイムノブロットによりスクリーニングした。

酵素消化

浸漬した大豆のホモジネートより抽出したたん白質（全大豆抽出たん白質）、粗 7S グロブリン画分および粗精製サブユニットを酵素消化し、分解抵抗性を調べた。胃内消化モデルとして simulated gastric fluid (SGF; 0.32% pepsin, 0.03 M NaCl を含む約 0.08 M 塩酸溶液, pH 1.2)、小腸内消化モデルとして simulated intestinal fluid (SIF; 0.32% pancreatin を含む 0.05 M KH_2PO_4 -NaOH, pH 7.4 ~ 7.5)⁶⁾を基に、上記酵素濃度を 1,000 倍まで希釈して実験に用いた。最終濃度が 1 mg/mL となるようにたん白質を溶解した SGF あるいは SIF 混合液を 37°C で振とうしながら反応させ、1 ~ 60 min の範囲で一定時間後に pH を変化させて反応を停止した。

結 果

モノクローナル抗体の作製

各サブユニットの挙動の追跡や消化産物の微量かつ高感度検出法を確立するために、マウスモノクローナ

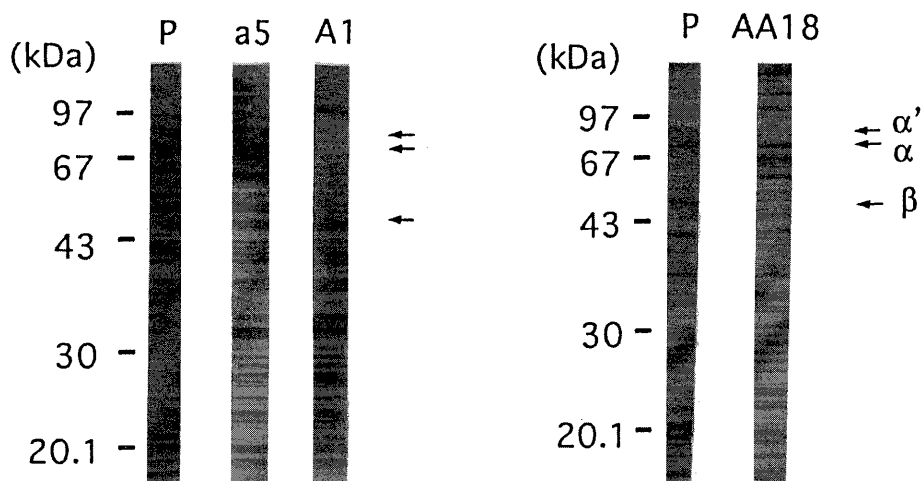


Fig. 1. SDS-PAGE and immunoblot of the β -conglycinin. P, stained with Amido Black 10B; a5, immunostained with the mouse monoclonal antibody (mAb) a5; A1, immunostained with mAb A1; AA18, immunostained with mAb AA18. Arrows represent the α' -, α - and β -subunits of β -conglycinin, respectively.

ル抗体の作製を試みた。7S グロブリン画分と反応するものをスクリーニングし、陽性クローン (A1, a5, AA18) を得た。Fig. 1 に示すようにそれらのハイブリドーマが産生する抗体は β -conglycinin の各サブユニットを認識した。しかしながら、A1 は β -subunit を認識するが非特異的と思われる吸着が多く見られた。また a5 は α' と α (β)、AA18 は α と β (α') と 2 つ以上のサブユニットを同時に認識しており、いずれかのサブユニットに特異的な抗体は得られなかった。

酵素消化

胃内消化モデル 全大豆抽出たん白質および粗 7S グロブリン画分たん白質溶液を、pepsin 濃度を変化させた SGF とインキュベートしたものについて、 β -conglycinin の消化度を解析した。Fig. 2 は SGF 中の pepsin 濃度の 1 ~ 1,000 倍希釈 (大豆たん白質比 1 : 3.2 ~ 1 : 0.0032) で 60 min 反応させたときの SDS-PAGE の結果である。 α' - および α -subunit は比較的低濃度でもすみやかに分解された。それと比較して、酵素濃度が高い場合でも β -subunit は消化抵抗性を示した。さらに単離した α -subunit について、消化度を段階を追ってみられる濃度として SGF 中の pepsin 濃度の 500 倍希釈

液 (たん白質比 1 : 0.0064) を用い、反応開始後、1, 5, 15, 30, 60 min の時点で反応を停止させたものを SDS-PAGE で解析した。コントロールは酵素を含まない SGF 反応液中で 60 min インキュベートしたものとした。その結果、時間とともに α -subunit の分解は進むが、それに伴い分子量約 34,000 および 23,000 ~ 26,000 のペプチドフラグメントの一過性の蓄積が認められた (Fig. 3)。

小腸内消化モデル 全大豆抽出たん白質および粗 7S グロブリン画分たん白質について、pepsin の場合と同様に pancreatin の濃度を変化させて β -conglycinin の消化について検討した。pancreatin 処理においては全てのサブユニットが分子量 30,000 以下のフラグメントに分解されることが示された (Fig. 4)。また、SIF 中の pancreatin 濃度の 10 倍希釈液 (たん白質比 1 : 0.032) を用いた α -subunit 単独処理の場合、分子量約 27,000 と 25,000 の 2 つのフラグメントが認められた (Fig. 5)。これらのフラグメントは、上記酵素濃度においては 60 min のインキュベートにおいても消失せず、幾分消化抵抗性を示した。

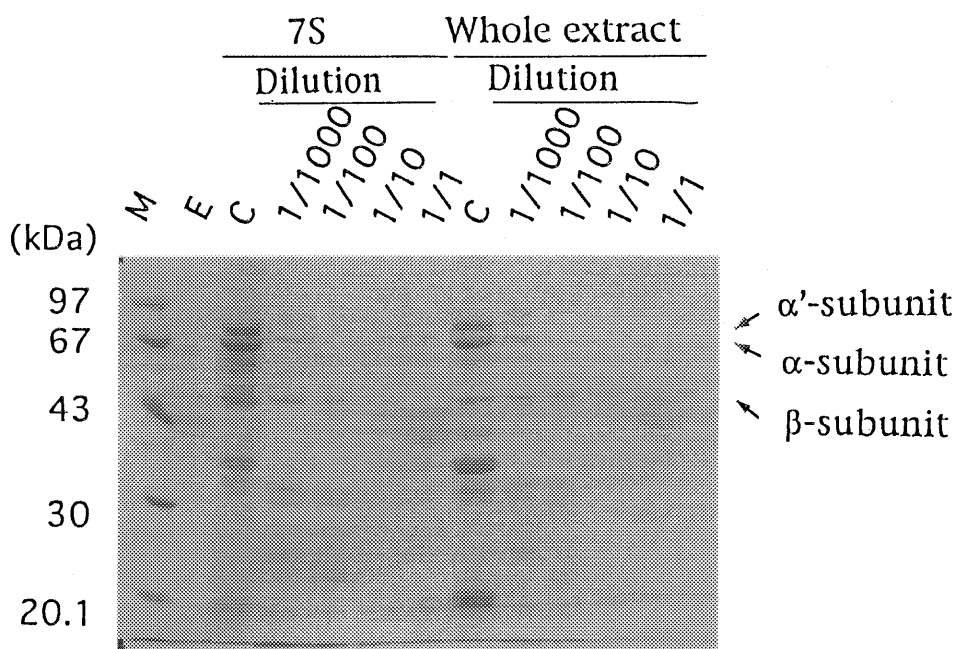


Fig. 2. SDS-PAGE of β -conglycinin in simulated gastric fluid (SGF). Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R250. 7S globulin fraction and whole extract of soybean protein were incubated in SGF containing 0.32-0.00032% pepsin for 60 min. M, molecular mass marker; E, pepsin alone; C, protein in SGF without pepsin. Arrows represent the α' -, α - and β -subunits of β -conglycinin, respectively.

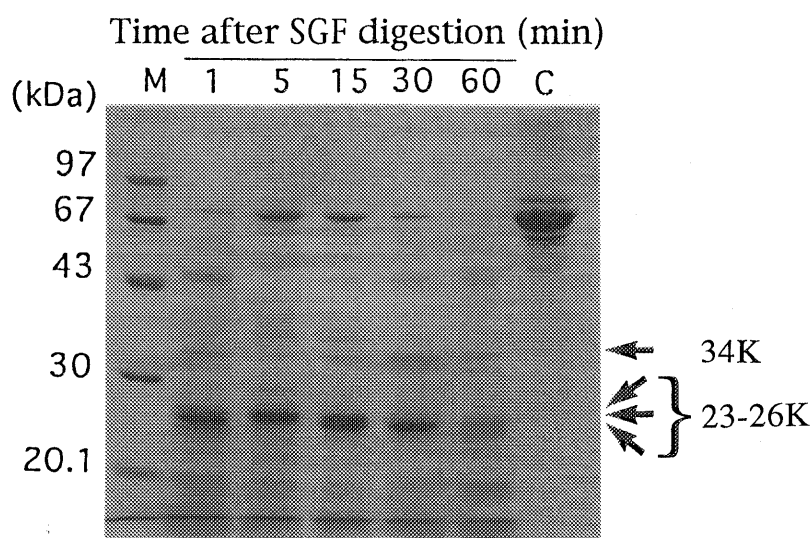


Fig. 3. SDS-PAGE of α -subunit in SGF containing 0.00064% pepsin. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R250. α -Subunit was incubated in SGF for the times indicated in the figure. M, molecular mass marker; C, protein incubated without pepsin. Arrows represent peptide fragments formed by pepsin digestion.

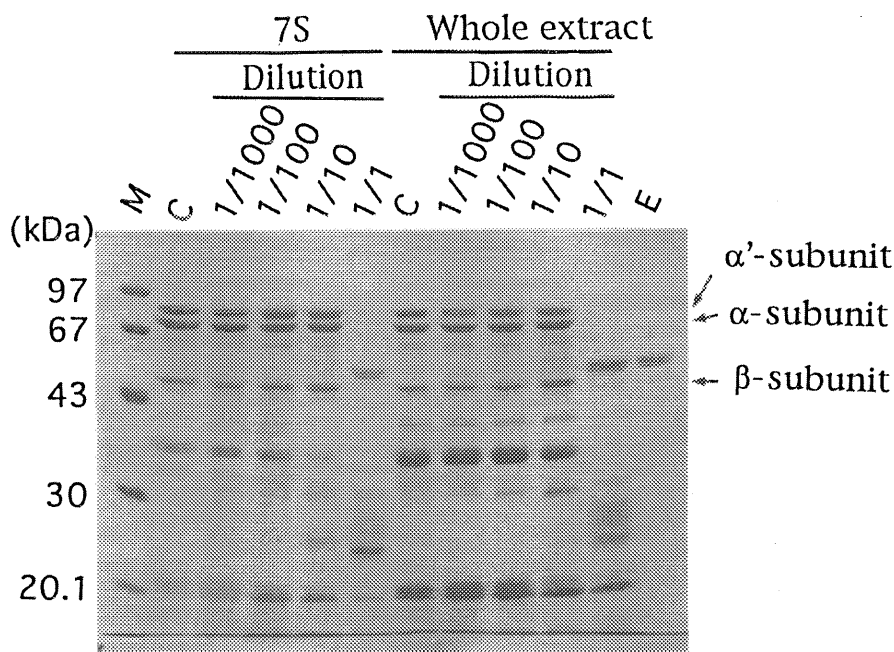


Fig. 4. SDS-PAGE of β -conglycinin in simulated intestinal fluid (SIF). Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R250. 7S globulin fraction and whole extract of soybean protein were incubated in SIF containing 0.32-0.00032% pancreatin for 60 min. M, molecular mass marker; E, pancreatin alone; C, protein in SIF without pancreatin. Arrows represent the α' -, α - and β -subunits of β -conglycinin, respectively.

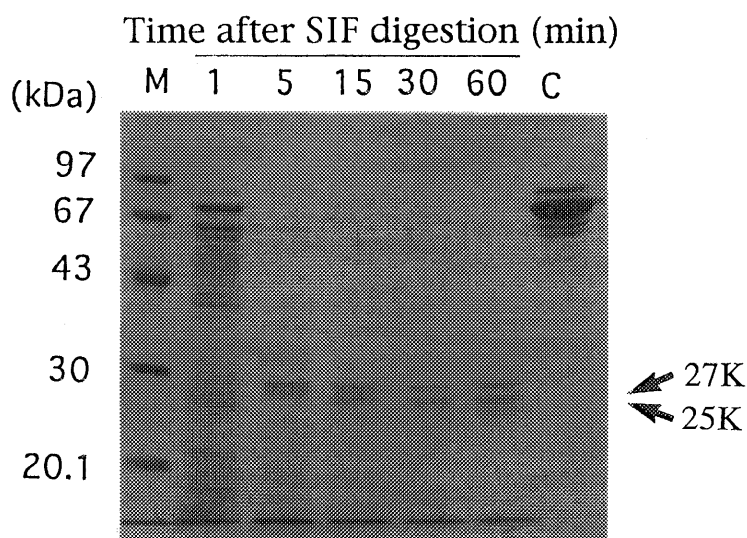


Fig. 5. SDS-PAGE of α -subunit in SIF containing 0.032% pancreatin. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R250. α -Subunit was incubated in SIF for the times indicated in the figure. M, molecular mass marker; C, protein incubated without pancreatin. Arrows represent the peptide fragments formed by pancreatin digestion.

考 察

β -conglycinin の3つの主要サブユニットのアレルゲン性の違いを考える上で、消化管での安定性が一つの要因であると予想された。そこで、胃での消化のモデルとして pepsin による消化を行ったところ、 α' - および α -subunit は容易に分解されたが、 β -subunit は分解抵抗性を示した。この結果は、アレルゲンたん白質の消化酵素に対する安定性を調べた Astwood ら⁷⁾の報告とも一致した。一方、小腸でのモデルとして pancreatin による消化実験を行った結果、 β -subunit を含めて全てのサブユニットがペプチドフラグメントに分解されることが示された。従って、胃のみならず小腸での消化過程を経ることによって、 β -conglycinin の各サブユニットは全て低分子量ペプチドに分解されることが明らかとなった。 α -subunit 単独の場合に関しては、pepsin, pancreatin 両酵素分解の初期において分子量 20,000 ~ 35,000 程度の消化抵抗性ペプチドフラグメントが一過性に蓄積することが示された。今後このフラグメントの免疫原性についての詳細な検討が必要である。

一方、 α' - および α -subunit は相同性が非常に高い上に分子量もかなり近く、この2つを別個に認識する抗体が作製できれば、消化管内における挙動の追跡、サ

ブユニットの同定や検出に非常に有用である。3種のサブユニットに対するモノクローナル抗体の作製を試みた結果得られた抗体は、これらのサブユニットを認識したが、いずれか1種にのみ反応するものではなく、全ての抗体に交叉性がみられた。粗精製のサブユニットを用いて免疫を行ったことも原因であるが、通常の腹腔内免疫においては相同性の高いこれらのサブユニットに対して特異性の高い抗体を得ることは困難であると考えられる。

このように、 β -conglycinin の α -subunit のみがアレルゲン性を有することは単に一次構造上の違いだけではないと考えられるが、たん白質消化酵素による分解抵抗性に関しては、消化管において pepsin あるいは pancreatin のいずれでも消化されないサブユニットはなく、 α -subunit のアレルゲン性は、消化抵抗性以外の要因、例えば大豆摂取時の他の食事由来共存たん白質、あるいは脂質などとの相互作用がかかわっていると考えられる。今後のアプローチとして消化過程に一過性に蓄積する α -subunit のフラグメントの免疫原性や、食物摂取時を想定した複雑系における消化抵抗性ととも小腸粘膜通過能等についての検討を行う必要がある。

要 約

大豆 β -conglycinin の主要な 3 つのサブユニット (α' , α , β) は一次構造の相同性が非常に高いにもかかわらず、大豆陽性アトピー性皮膚炎患者血清中の IgE 抗体は α -subunit のみを認識する。本研究では、アレルゲン性と、各たん白質の性質、特に消化抵抗性との関連について検討した。全大豆抽出たん白質、脱脂大豆より調製した 7S グロブリン画分、および精製サブユニットをたん白質の消化モデルシステムにて消化し SDS-PAGE にて解析した。その結果、pepsin 分解 (胃内消化モデル) に対しては β -subunit が抵抗を示したものの、 α' , α は容易に分解された。pancreatin (小腸内モデル) では全てのサブユニットがペプチドフラグメントに分解されることが示された。どちらの系でも α -subunit に関しては分子量約 30,000 のペプチドフラグメントが一過性に蓄積することが示された。一方、消化による分解産物を特異的かつ高感度に検出するために、各サブユニットに対するモノクローナル抗体の作製を試みたところ、陽性クローンはいくつか得られたものの、全ての抗体が 2 種以上のサブユニットに交叉性を示した。通常の腹腔内免疫においてはいずれか一つのサブユニットに特異的な抗体の産生は困難と考えられる。

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, Bando N, Tsuji H, Nishikawa K and Kitamura K (1995): α -Subunit of β -conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci Biotech Biochem*, **59**, 831-833.
- 3) Thanh VH and Shibasaki K (1976): Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J Agric Food Chem*, **24**, 1117-1121.
- 4) Coates JB, Medeiros JS, Thanh VH and Nielsen NC (1985): Characterization of the subunits of β -conglycinin. *Arch Biochem Biophys*, **243**, 148-152.
- 5) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 6) U.S. Pharmacopeial Convention (1990): Test Solutions. *In: The United States Pharmacopeia* Vol. XXII. U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, pp. 1788-1789.
- 7) Astwood JD, Leach HL and Fuchs RL (1996): Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotech*, **14**, 1269-1273.