

# 大豆たん白質の *in vitro* および *in vivo* 酵素分解性と経口免疫原性

二宮憲子・市場愛子・松田 幹\*

名古屋大学大学院生命農学研究科

## *In vitro/in vivo* Digestibility and Oral Immunogenicity of Soybean Protein

Noriko NINOMIYA, Aiko ICHIBA and Tsukasa MATSUDA

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601

### ABSTRACT

Digestibility and oral immunogenicity of Kunitz soybean trypsin inhibitor (KSTI) were investigated, and compared with those of several other food proteins. Soy protein isolate (SPI) was digested with simulated gastric fluid, and the protein digestibility was analyzed by SDS-PAGE and Western blot using anti-KSTI antibody. To analyze the digestibility of KSTI more in detail, purified KSTI was digested *in vitro* with pepsin, chymotrypsin and trypsin, or administered intragastrically to mice, and the *in vitro* and *in vivo* digested samples recovered from the test tubes and the digestive tract of mice were analyzed by SDS-PAGE and Western blot analyses. The results showed that KSTI was markedly stable and resistant against protease digestion even *in vivo*, as compared with some other proteins. However, repetitive intragastric administration of KSTI to mice did not induce serum antibody response against KSTI, suggesting that digestion-resistance of KSTI was not necessarily correlated to the ability for oral sensitization. Effect of the digestion-resistance on the ability for provocation of allergic symptoms remains to be investigated. *Soy Protein Research, Japan* 1, 75-80, 1998.

Key words : soybean trypsin inhibitor, food allergy, digestibility

これまでの食品たん白質の経口免疫原性に関する一連の研究において、分離大豆たん白質 (SPI) は他の食品たん白質 (牛乳, 卵, 米) に比べて, マウスにおける消化管経由での免疫応答, すなわち血清抗体応答を誘導しにくいことが明らかとなった<sup>1,2)</sup>。一方, 大豆に含まれるトリプシンインヒビターは, アナフィラキシーを伴うような即時型アレルギーの原因となること

があると報告されている<sup>3)</sup>。一般に, 酵素インヒビター活性を持つたん白質はたん白質分解酵素に対して抵抗性を示すと考えられ, その消化管内での酵素分解の難易度とアレルゲン性との関連が示唆されているが<sup>4)</sup>, 未だ十分には実証されていない。また, アトピー性皮膚炎に代表されるような慢性的な症状を示す食品アレルギーに加えて, 最近ではアナフィラキシーのような即時型アレルギーの症例が増加傾向にある。低分子ペプチドは免疫原性やアレルギー反応を惹起する能力が

\*〒 464-8601 名古屋市千種区不老町

低いため、食品たん白質の経口免疫原性やアレルゲン性には、消化管内での酵素分解性が関与している可能性がある。本研究ではSPIを含むいくつかの食品たん白質の *in vitro* および *in vivo* における酵素分解性を明らかにするとともに、酵素分解性と経口免疫原性との相関を明らかにすることを目的とした。

## 方 法

### たん白質の *in vitro* 消化性

1) SPI, カゼイン, 卵白の疑似胃液による消化性

既報<sup>4)</sup>に従い、ブタペプシン (SIGMA) 水溶液を予め 37℃ に加温し、そこにたん白質溶液を添加し、一定時間反応させた後、炭酸ナトリウムで中和して酵素反応を停止した。この反応溶液を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および免疫ブロット分析に用いた。

2) 精製たん白質のペプシン, キモトリプシン, トリプシンによる消化性

オボアルブミン (OVA) は卵白より硫酸分画および結晶化により精製した。リゾチーム (LY) は生化学工業より、また大豆トリプシンインヒビター (KSTI) は、SIGMA より購入した。各たん白質をそれぞれの酵素に至適な緩衝液に溶解し (10 mg/mL), 酵素:基質 = 1:10 (w/w) になるように、ペプシン, キモトリプシン, またはトリプシンを添加し, 37℃ で一定時間 (30, 60, 180 分間) 反応させたのち, SDS-PAGE サンプル処理液を加えて加熱することにより酵素反応を停止した。この溶液をそのまま SDS-PAGE 用ゲルに添加した。

### たん白質の *in vivo* 消化性

B10. A マウス (6~8 週齢, 雌) を用いて, 24 時間絶食させた後, KSTI, OVA, LY を生理食塩水に溶解して (100 mg/mL) マウス一匹あたり 20 mg をゾンデで胃内投与した。30 分後に屠殺し, 胃, 小腸を摘出した後, 小腸は全体を 6 等分し, 十二指腸から順に小腸断片 1~6 とした。胃および小腸管腔内容物をそれぞれの組織あたり 1 mL の PBS で洗浄・回収した。回収された溶液を 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し, その上清を小腸内容物溶液として以下の SDS-PAGE と免疫ブロット分析によるたん白質消化性分析に用いた。

### SDS-PAGE と免疫ブロット分析

胃および小腸内容物溶液 20 mL を用いて, 小腸内に残存するたん白質を SDS-PAGE<sup>5)</sup> で分析した。さらに, 分離したたん白質をゲルからニトロセルロース膜に転写し, 各たん白質抗原に対するウサギ抗血清とパーオキシダーゼで標識した抗ウサギ IgG 抗体を用いて免疫

染色し<sup>6)</sup>, 小腸内に残存する経口投与たん白質抗原およびその抗原ペプチドを検出した。

### たん白質の胃内投与による血清抗体応答の誘導

*In vivo* 消化性に用いたものと同系統 (B10. A) のマウスを用いて, マウス一匹あたり生理食塩水 200 mL に溶解した KSTI, OVA, LY (10 mg) を, 一日一回, ゾンデで胃内投与した。胃内投与を 7 日間行い, 最終投与の 7 日後に静脈より採血し, 遠心分離により個体ごとに血清を分離し, 血清抗体測定用の標品とした。

### 血清抗体の測定

胃内投与したたん白質抗原 (KSTI, OVA, LY) に対する血清中の特異抗体の検出には, 100 倍希釈したマウス血清について酵素免疫測定法 (ELIZA)<sup>7)</sup> を用いて前報に従って測定した<sup>12)</sup>。二次抗体としてパーオキシダーゼ標識した抗マウス IgG (ノルディック) を用いた。

## 結果と考察

### たん白質の *in vitro* 消化性

1) 疑似胃液による消化性: 種々のたん白質を疑似胃液で消化すると, 食品アレルゲンと同定されているたん白質のほとんどが, 分解されるのに“分”から“時間”の単位での反応時間を必要とするのに対して, 非アレルゲンたん白質はほとんど瞬時 (30 秒以内) に低分子のペプチドやアミノ酸に分解されることが報告されている<sup>4)</sup>。そこで, SPI, 卵白, カゼインを疑似胃液で短時間消化し, SDS-PAGE および免疫ブロット法で分析した。SPI (KSTI) と卵白 (OVA) に関する実験結果を Fig. 1 に示す。酵素反応液中ではペプシンが大過剰であるため, いずれのたん白質についても, ペプシンが, 各レーンに共通に最も濃く染色されているバンドとして検出された。卵白たん白質では, 60 秒後でも OVA と LY のバンドが検出され, ペプシン分解に対して抵抗性を持つと推定された。一方, オボトランスフェリンのバンドは 30 秒後には検出されたが, 60 秒後にはほとんど消失した。OVA のペプシンに対する抵抗性は免疫ブロットによっても確認された。SPI に関しては, 主要たん白質である 7S および 11S グロブリンのバンドが 30 秒後では確認できたが, 60 秒後では消失した。KSTI については, たん白質染色では確認できなかったが免疫ブロット分析により 60 秒反応後も明確に検出され, SPI に含まれる KSTI もペプシン分解に対して抵抗性があることが明らかとなった。結果は示されていないが, カゼインについては,  $\kappa$ -カゼインは速やかに分解されたが, 60 秒反応後も  $\alpha$ s1 および  $\beta$ カ

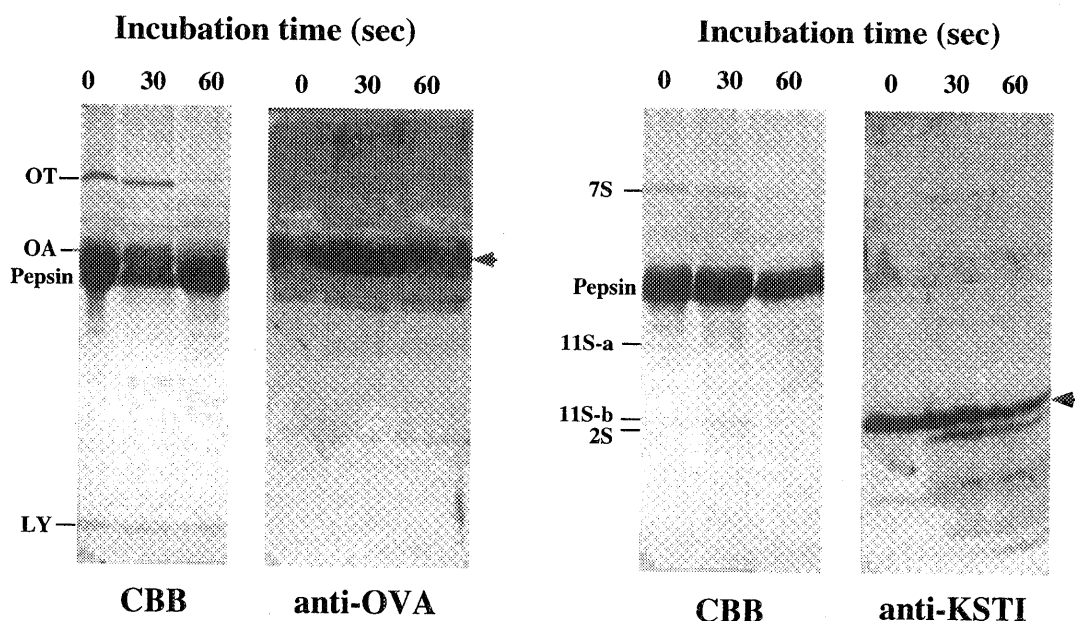


Fig. 1. SDS-PAGE and immunoblot analyses of egg white and SPI digested with simulated gastric fluid. Egg white (left two panels) and SPI (right two panels) were digested for 30 and 60 sec and analyzed by SDS-PAGE with CBB staining and by immunoblot with anti-OVA and anti-KSTI antibodies as a probe. The major proteins in each sample are indicated on the left: OT, ovotransferrin; OA, ovalbumin; LY, lysozyme; 7S and 2S, 7S and 2S globulins; 11S-a and b, 11S globulin acidic and basic subunits. The protein bands immunostained with anti-OVA and anti-KSTI are shown as an arrowhead.

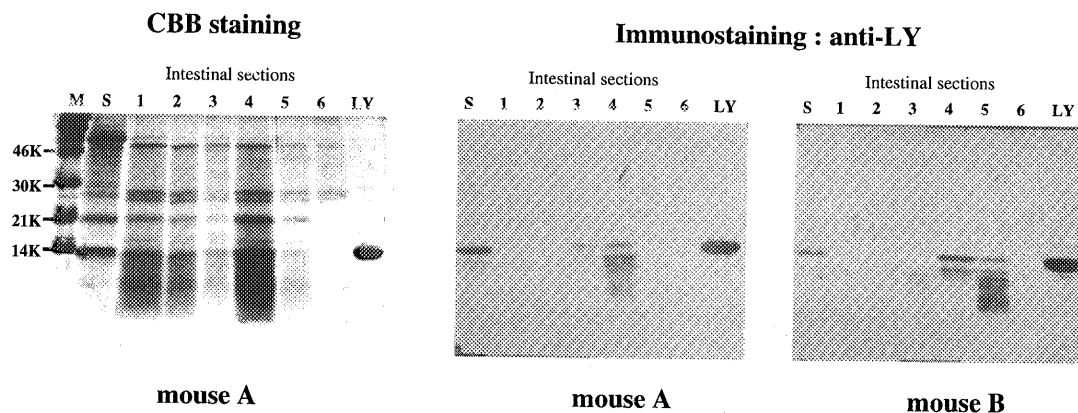


Fig. 2. SDS-PAGE (mouse A) and immunoblot analyses (mice A and B) of lysozyme (LY) administered intra-gastrically to mice. Twenty milligrams of LY were administered intra-gastrically to B10. A mice, and 30 min later the mice were killed and the stomach (S) and small intestine were excised. The small intestine was cut into 6 sections (No. 1 to 6 from duodenum to ileum). The intestinal contents were recovered from each section and analyzed by SDS-PAGE and immunoblot analysis using rabbit anti-LY antibody.

ゼインのバンドが検出された。これらの結果から、既に報告されているように、疑似胃液中での分解性はたん白質の種類によって異なっており、SPIに関しては、主要成分であるグロブリン類は分解されやすいが、微量成分である KSTI は抵抗性を持つことが明らかとな

った。

2) ペプシン, キモトリプシン, トリプシンによる消化性: 3 種類の精製たん白質 (KSTI, OVA, LY) を用いて上記各酵素による *in vitro* 消化性を比較研究した。結果は示さないが, OVA, LY は疑似胃液による

消化性実験と同様、ペプシン分解に対しては抵抗性を示したが、キモトリプシン、トリプシンにより分解を受け、3時間後には未分解のたん白質は検出されなかった。消化管内では、胃液による変性と分解を受けたあとで膵プロテアーゼの分解を受けるため、さらに消化性は高くなると推定される。一方、KSTIはいずれの酵素にもほとんど分解されず、阻害活性を示すトリプシンのみならずペプシン、キモトリプシンに対しても抵抗性を示すことが明らかとなった。このように、KSTIはOVAやLYのような食品たん白質に比べて酵素分解を受けにくいと考えられる。

### たん白質の *in vivo* 消化性

精製LY、OVA、KSTIをゾンデでマウス胃内に投与し、消化管内容物を回収して分析することにより、*in vivo*での消化性を調べた。各たん白質について、消化管内容物のSDS-PAGEおよび各特異抗体を用いた免疫ブロット分析の典型的な例をFig.2～4に示す。LYおよびOVAでは小腸中下部（空腸から回腸）にかけて、たん白質およびその分解断片と思われるバンドがはっきりと確認された。さらに特異抗体を用いた免疫ブロット分析により、未分解のたん白質と抗原性を保持した分解断片がはっきりと検出された。一方、KSTIで

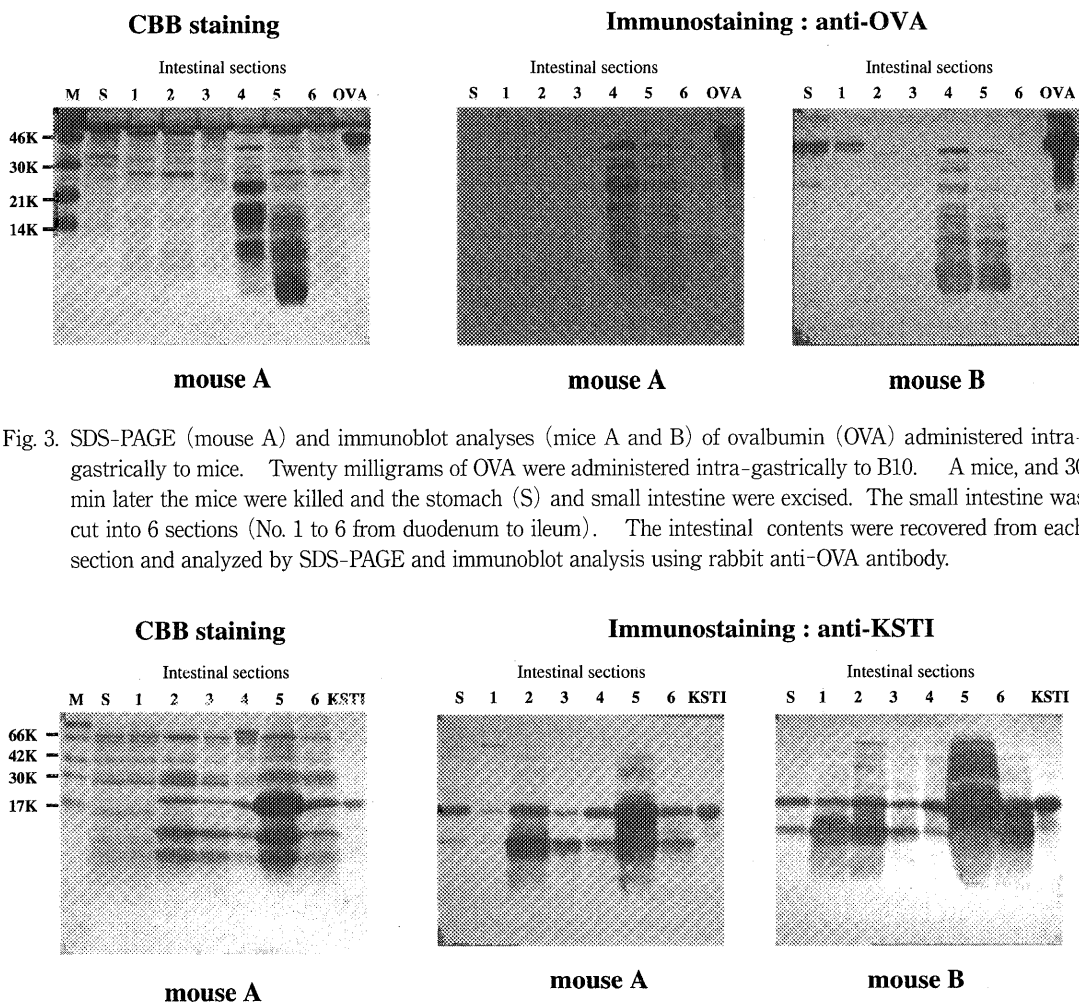


Fig. 3. SDS-PAGE (mouse A) and immunoblot analyses (mice A and B) of ovalbumin (OVA) administered intra-gastrically to mice. Twenty milligrams of OVA were administered intra-gastrically to B10. A mice, and 30 min later the mice were killed and the stomach (S) and small intestine were excised. The small intestine was cut into 6 sections (No. 1 to 6 from duodenum to ileum). The intestinal contents were recovered from each section and analyzed by SDS-PAGE and immunoblot analysis using rabbit anti-OVA antibody.

Fig. 4. SDS-PAGE (mouse A) and immunoblot analyses (mice A and B) of Kunitz soybean trypsin inhibitor (KSTI) administered intra-gastrically to mice. Twenty milligrams of LY were administered intra-gastrically to B10. A mice, and 30 min later the mice were killed and the stomach (S) and small intestine were excised. The small intestine was cut into 6 sections (No. 1 to 6 from duodenum to ileum). The intestinal contents were recovered from each section and analyzed by SDS-PAGE and immunoblot analysis using rabbit anti-KSTI antibody.

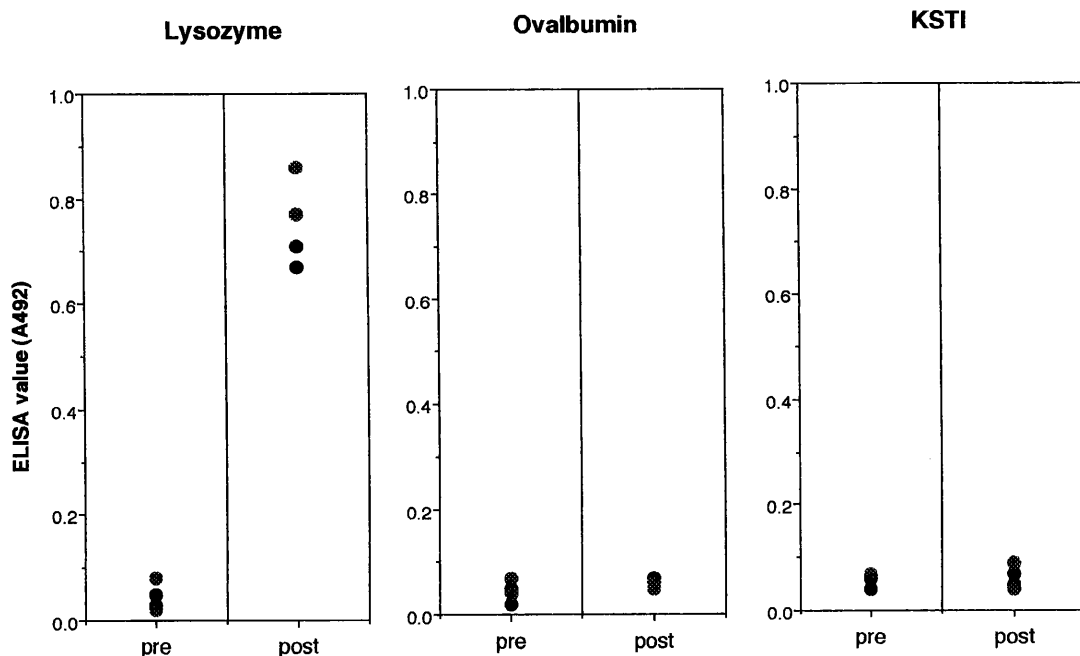


Fig. 5. Serum antibody (IgG) response of B10.A mice to lysozyme (LY), ovalbumin (OVA) and Kunitz soybean trypsin inhibitor (KSTI) administered intra-gastrically. Before the protein administration (pre) and 7 days after the last administration (post), blood was collected separately from each mouse. The serum IgG antibody specific for each protein was analyzed by ELISA using peroxidase-labeled secondary antibody. Apparent antibody concentration was shown as ELISA value (absorbance at 492 nm). Each point represents the value for each mouse.

は、たん白質染色によっても小腸全域から未分解の KSTI に相当するバンドが明瞭に確認され、多量の未分解たん白質が残存すると推定された。胃、小腸全域にわたって未分解 KSTI が残存することは、免疫プロットによりさらにはっきりと確認された。また、抗原性を保持した分子量約 1 万の限定分解断片も小腸の広い領域で検出された。このようなマウスを用いた KSTI の *in vivo* 酵素分解性に対する抵抗性は *in vitro* の消化性実験の結果にはほぼ対応するものであった。これらの結果から、KSTI は、酵素分解に対して抵抗性を持ち、抗原性を保持した未分解のたん白質分子が消化管内に残存し、残存量は他の食品たん白質に比べて多いことが明らかとなった。KSTI によりアナフィラキシー性の即時型アレルギーが引き起こされた症例が報告されている<sup>3)</sup>。全身性の即時型症状が引き起こされる場合には、比較的多量の抗原たん白質が血流中に入ることが予想され、本研究で得られた KSTI が未分解のまま小腸内に残存しやすいという結果との関連に興味を持たれる。たん白質の種類によって小腸管腔内から体内へ取り込まれる効率に差があるか否かを明ら

かにすることが今後の研究課題である。

#### たん白質の胃内投与による血清抗体応答の誘導

OVA, LY に比べて KSTI は酵素分解に対する抵抗性を示し、消化管内に残存する量も多いことが明らかになった。そこで、これらの差異が各たん白質の経口免疫原性に反映されるか否かを明らかにするために、各たん白質のマウスへの経口投与による血清特異抗体の応答を調べた。種々の経口投与たん白質に対して高頻度に抗体応答が誘導される系統である B10.A マウスを用いた。Fig. 5 に示すように LY は全てのマウスに対して抗体 (IgG) の応答が誘導されたが、OVA, KSTI に対しては同じ投与条件にもかかわらず、抗体応答は観察されなかった。KSTI は小腸内に多量に残存したにもかかわらず、抗体応答を誘導しなかったことから、必ずしも小腸管腔内に残存する抗原量と免疫感作の成立は単純には関連しないことが明らかとなった。消化管経由での免疫感作においては、条件によって免疫寛容が成立することが知られており、たん白質の投与量、投与回数などの投与条件を変えてさらに詳しく調べる必要がある。

## 要 約

即時型アレルギー誘発の報告がある大豆トリプシンインヒビター (KSTI) を中心にしていくつかの食品たん白質の酵素分解性と経口免疫原性について調べた。カゼイン, 卵白, 分離大豆たん白質 (SPI) を高濃度ペプシン溶液 (疑似胃液) で分解し, SDS-PAGE で解析した。また, 卵アルブミン, リゾチーム, カゼイン, KSTI などを用いて, ペプシン, トリプシン, キモトリプシンと反応させることにより *in vitro* 酵素分解性を, マウス胃内に投与した後に消化管内容物を回収して解析することにより *in vivo* 消化性を調べた。その結果, 胃内で速やかに分解されるもの, 胃内では分解されにくい小腸で分解されるもの, さらに小腸内でも分解されずに残存するものに分類された。KSTI は *in vitro*, *in vivo* いずれにおいても酵素分解に抵抗性を示し, 小腸内に未分解の状態で残存した。さらに, これらのたん白質をマウスの胃内に投与して血清抗体応答を調べたが, 酵素分解性と経口免疫原性とは必ずしも対応しなかった。酵素分解性とアレルギー症状誘発との関連性については今後の研究課題である。

## 文 献

- 1) 松田 幹, 石井哲也, 青木直人, 中村 良(1994): 大豆たん白質の経口摂取による免疫応答と免疫寛容の誘導. 大豆たん白質研究会会誌, **15**, 109-114.
- 2) 松田 幹, 青木直人, 安達貴弘, 中村 良(1995): 大豆たん白質の経口摂取による免疫応答と免疫寛容の誘導(第2報). 大豆たん白質研究会会誌, **16**, 87-93.
- 3) Moroz LA and Yang WH (1980): Kunitz soybean trypsin inhibitor—a specific allergen in food anaphylaxis. *N Engl J Med*, **302**, 1126-1128.
- 4) Astwood JD, Leach JN and Fuchs RL (1996): Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotech*, **14**, 1269-1273.
- 5) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 6) Aoki N, Kuroda H, Urabe M, Taniguti Y, Adachi T, Nakamura R and Matsuda T (1994): Production and characterization of monoclonal antibodies directed against bovine milk fat globule membrane (MFGM). *Biochim Biophys Acta*, **1199**, 87-95.
- 7) Engval E and Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)—Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874.