

シリンゴライド(大豆特異的感染病原体産生エリシター)結合たん白質としての Gly m Bd 30K の未知機能の解明とアレルギー性との関係について

小川 正*・森山達哉・藤田千鶴子・上杉太郎

京都大学食糧科学研究所

Immunochemical Characterization of Soybean Allergen, Gly m Bd 30K as a Syringolide Receptor

Tadashi OGAWA, Tatsuya MORIYAMA, Chizuko FUJITA and Taro UESUGI

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

ABSTRACT

A major soybean allergen, Gly m Bd 30K is known as a protein classified into a member of papain (thiol protease) super family, a homologue of a house dust mite allergen, Der p(f) 1, and a receptor of an elicitor, syringolide, produced by *Pseudomonas syringae*. Gly m Bd 30K was shown to occur in the vegetative plant (leaves) by immunoblotting with anti-Gly m Bd 30K monoclonal antibody, F5. Isolated native Gly m Bd 30K showed no hydrolytic activity like papain and bromelain. Syringolide was prepared from the culture medium of the plasmid (*avrD*)-transformed *E. coli*. Syringolide treatment elicited the hypersensitive response on leaves of the strain with disease resistance gene *Rpg4*(+). Both the allergen and the syringolide-treated allergen gave the same molecular mass by a TOF-MASS analysis. The syringolide-treated allergen was dot-blotted on the nitrocellulose membrane and immunostained with F5 mAb and patient's serum. The syringolide treatment of the allergen enhanced the binding activity between immunoglobulins and the allergen, indicating that syringolide binding site (receptor site) seems to be different from the epitope site. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 67-72, 2000.

Key words : allergen, syringolide , Gly m Bd 30K, receptor, *Pseudomonas syringae*, elicitor

大豆は米を主食とする日本型食生活を構築する上で不可欠な食品素材であるが、一方で、そのたん白質成分をアレルギーとする食物アレルギー疾患の患者が存在する。特に乳幼児においてアトピー性皮膚炎に代表

される患者の多くが大豆を含む複合食物アレルギー疾患と診断されている。有効な治療法が無く、除去食等の治療が行われているが、若年者において栄養所要量を充足しうる健全な食生活を維持することができないことが問題となっている。大豆アレルギーを惹起するたん白質成分の解析により、主要な3種のアレルゲン

*〒611-0011 宇治市五ヶ庄官有地

が同定され、その除去により、患者の約 80% 程度が安全に大豆食品を摂取しうる可能性が示唆されている。この内、最も感作率の高いアレルゲンを単離・同定し、Gly m Bd 30K と命名した¹⁾。本アレルゲンはパパインスーパーファミリーに属するチオールプロテアーゼの一種で、ダニアレルゲン Der p 1 と高い相同性を持つが、活性中心と考えられるシステインがグリシンに変化しているのが特徴である。分子育種による欠失種の選抜を目的として約 5,000 に及ぶ大豆品種についてその分布を検討したが、欠失種は検出されず、未だその生理機能が未知のたん白質である。近年、カリフォルニア大学 (Riverside) の Keen ら²⁾ のグループにより、大豆特異的感染病原菌 *Pseudomonas syringae* が産生するエリシターとしてのシリングライド (syringolide) のレセプターである可能性を示唆する報告が出された。そこでこのエリシターがアレルゲンたん白質と反応することによって抗原抗体反応に何らかの影響を与えないかを解析し、アレルゲン性低減化に関する情報を得ることを目的に本研究を行った。

方 法

シリングライドの調製

シリングライドの大腸菌による大量発現 *aveD* gene を導入したプラスミド pAVED12/602 を組み込んだ大腸菌 DH5 α を M9 最少培地で培養し IPTG で誘導発現させた³⁾。培地を HCl 酸性とし、30℃ で 48 時間培養した後、等量の酢酸エチルで抽出し、濃縮後 HPLC により分画精製した。

精製および同定 Dynamax Microsorb (Silica) column (4 mm $\times$ 25 cm) を使い、Hexane/Ethylacetate/Isopropanol = 55 : 43.5 : 1.5 (by vol.) の展開溶媒 (流速: 1.0 mL/min) でクロマトした³⁾。シリングライドは示差屈折検出計で検出した。溶出画分を集め、濃縮後 Fab-Mass により同定した。シリングライドは HPLC において 2 つのピークを与え (Fig. 1)、質量分析の結果ピーク 1 とピーク 2 では質量数 28 の差が認められ、ピーク 1 を質量数 300 のシリングライド 2、ピーク 2 を質量数 272 のシリングライド 1 と同定した (Fig. 2)。

シリングライドの生物活性検定 (バイオアッセイ)

シリングライドのエリシターとしての生物活性は、*Pseudomonas* 感染感受性大豆品種 (*Rpg4+*) および非感受性品種 (*Rpg4-*) を栽培し、若葉上にシリングライドを塗布し、アポトーシスの出現の有無を判定した²⁾。

プロテアーゼ活性の測定

チオールプロテアーゼの合成基質として Z-Arg-

Arg-MCA 及び Z-Phe-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc., Osaka), たん白質基質としてカゼインを用いて Baret and Kirschke の方法⁴⁾ に準じて測定した。

SDS-PAGE およびイムノブロット

大豆たん白質の Na-ドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は前報⁵⁾ に従って行った。泳動後のたん白質はニトロセルロース膜上に転写し、大豆アレルギー患者血清あるいはマウス抗 Gly m Bd 30K 抗体 (F5 mAb)⁶⁾ による免疫染色後、ECL 法により検出した⁵⁾。また、ドットブロットによる免疫染色検出は Yamanishi らの方法⁷⁾ により行った。

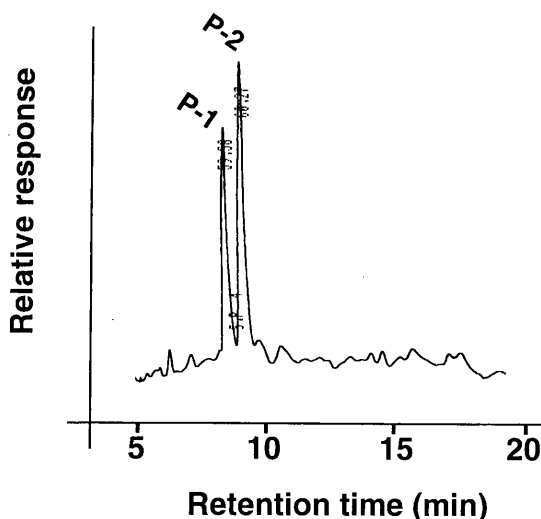


Fig. 1. HPLC chromatogram of syringolides prepared from *E. coli*. p-1, syringolide 2; p-2, syringolide 1.

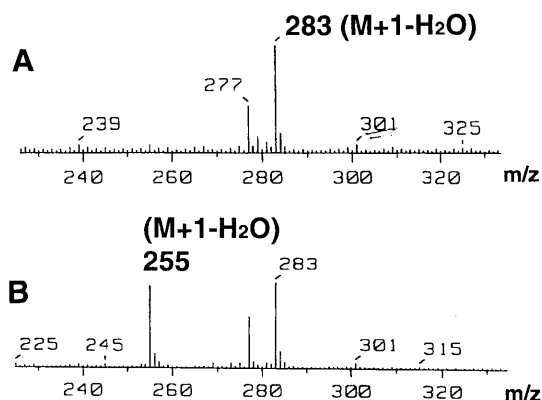


Fig. 2. Fab mass spectrograms of syringolide 1 and 2. A. P-1; syringolide 2; B. P-2; syringolide 1

結 果

シリングライドの単離・同定

大腸菌により大量生産させたシリングライドは、HPLC クロマトのパターンに示されるようにシリングライド1および2のほぼ1:1の混合物であった。Fab-Mass では分子イオンは検出されず、水1分子が脱離したフラグメントピーク [シリングライド1: $m/z:283 = M(2)+1-H_2O$], [シリングライド2: $m/z:255 = M(1)+1-H_2O$] を与えた (Fig. 2)。両者の保持時間が近接し、完全に分離することが困難なため両者の混合試料をシリングライド画分として実験に用いた。

シリングライドの生物活性

大豆品種のシリングライド感受性株 (*Rpg4+*) および非感受性株 (*Rpg4-*) の幼若葉にシリングライド溶液を塗布し、その反応を観察した。感受性株では塗布部分における組織のアポトーシスが観察され、シリングライドの生物活性が確認された。

Gly m Bd 30K の植物体における存在

上記の大豆両品種の若葉を採取し、Tris/HCl Buffer, pH 8.0 にて磨砕抽出したたん白質を SDS-PAGE 後、転写し、モノクローナル抗体 F5 でイムノプロットした。*Rpg4+* および *Rpg4-* 両者においてともに Gly m Bd

30K の存在が観察された (Fig. 3)。シリングライドの感受性は、レセプター結合後のシグナル伝達系欠損によるものとされており、本たん白質、即ちレセプターの存否が感受性とは一致しないことが示された。

酵素活性

Gly m Bd 30K がパパインなどのチオールプロテアーゼスーパーファミリーに属するたん白質であることが一次構造のコンピューターホモロジー検索により明らかにされている。チオールプロテアーゼの合成基質およびたん白質 (カゼイン) を基質にして分解活性を測定した。Fig. 4 に示すとおり、すべての基質において分解活性は検出されなかった。

シリングライドと Gly m Bd 30K の結合

Hirata らの方法⁸⁾ に準じて TOF-Mass により、Gly m Bd 30K のシリングライド結合による質量増加の検出を試みた。Fig. 5 に示されるようにシリングライド処理前後での質量数の差は検出されなかった。

シリングライドの結合が抗原抗体反応に及ぼす影響

シリングライドを反応させた Gly m Bd 30K をニトロセルロース膜にドットプロットし、F5 mAb, および大豆 Gly m Bd 30K 特異的 IgE 抗体保有患者血清にてイムノプロットを行った。Fig. 6 A, B に示されるとおり、シリングライド処理を行ったアレルゲンは、F5 (IgG), および患者 (IgE) 両抗体に対してその結合を増強する

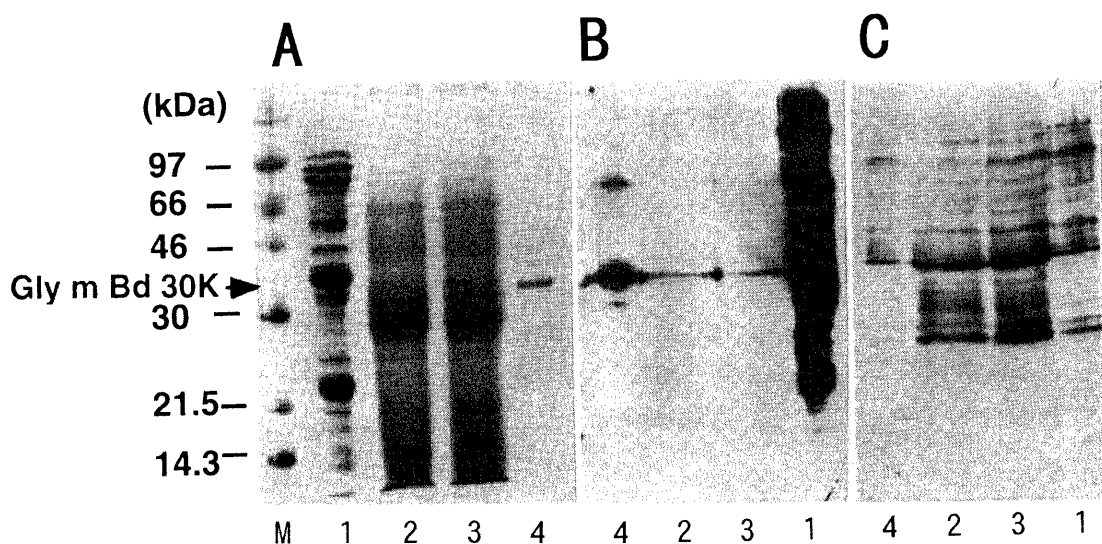


Fig. 3. Immunochemical determination of Gly m Bd 30K in soybean plant. A, protein staining; B, immunostaining with F5 mAb; C, immunostaining with patient's serum; M, marker proteins; 1, soybean crude extract; 2, leaves (*Rpg4+*); 3, leaves (*Rpg4-*); 4, Gly m Bd 30K.

ことを示唆する染色パターンを与えた。

考 察

最も強い大豆アレルゲンである Gly m Bd 30K は、大豆種子液胞中に蓄積される貯蔵たん白質とされ、本たん白質を欠失した変異種は約 5,000 種の大豆品種におけるスクリーニングによっても見つかっていない。従って、大豆におけるその生物学的意義は興味を持たれる所以である。一次構造は、パパインを代表とする

チオールプロテアーゼのパパインスーパーファミリーに分類される。事実、乳幼児が最も広く感作されているダニのアレルゲンであるチオールプロテアーゼ、Der p 1 あるいは Der f 1 と高い相同性を示し、ダニアレルゲンはプロテアーゼ活性を持つことが知られている。今回、チオールプロテアーゼの基質を用いブロメラインと同一条件下でその分解活性を測定したが、全く活性は認められなかった。その理由として、活性発現に必要と考えられるチオールプロテアーゼに共通の保存領域 (Fig. 7) 中の 1 個のシステイン残基が、グリ

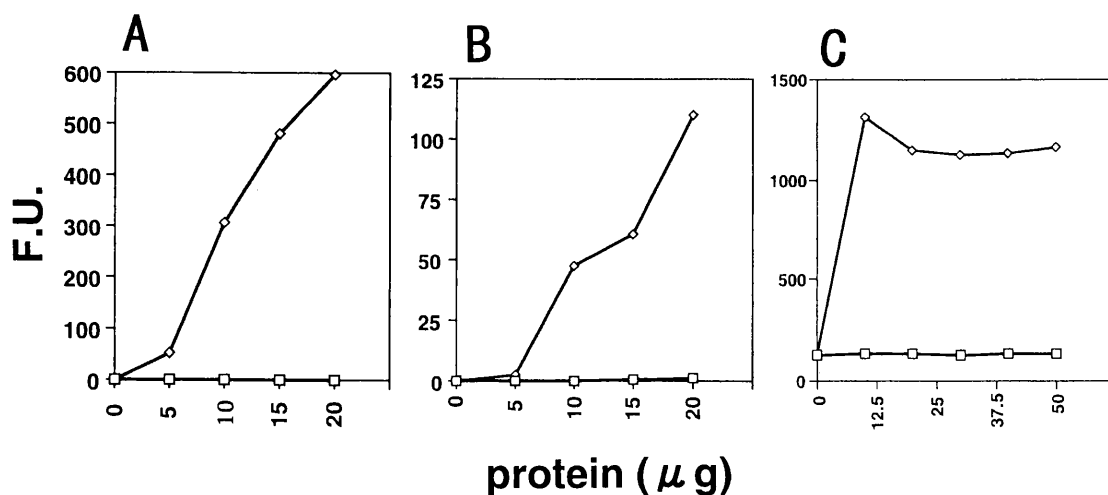


Fig. 4. Enzyme activity of Gly m Bd 30K. A, Z-Arg-Arg-MCA; B, Z-Phe-Arg-MCA; C, casein. F.U., fluorescence unit. —□—, Gly m Bd 30K; —◇—, Bromelain.

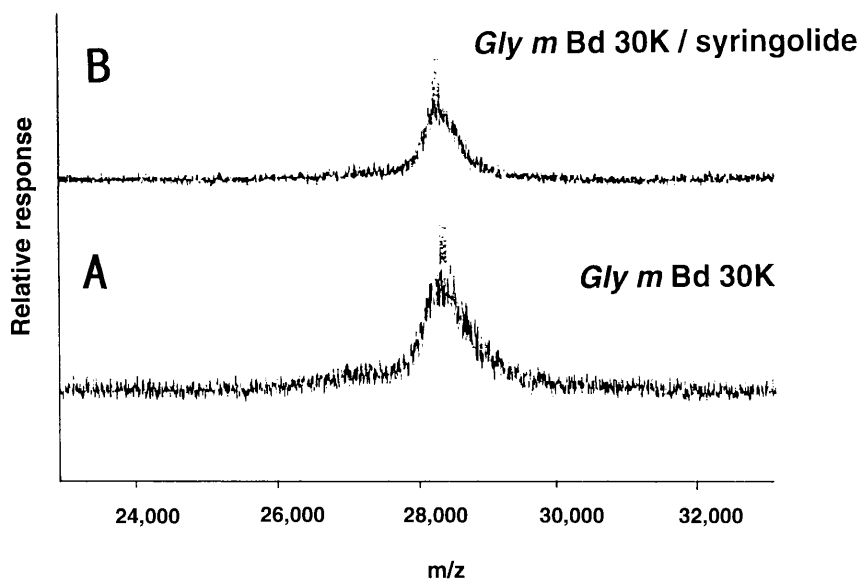


Fig. 5. TOF mass spectrogram of Gly m Bd 30K and the conjugate with syringolide 1 and 2.

シンに置換していることが考えられる。現在このグリシンをシステインに戻した組換え体によるプロテアーゼ活性の回復を検討中である。

Gly m Bd 30K アレルゲンたん白質が *Pseudomonas syringae* のエリシターであるシリングライドのレセプターとした場合、もしシリングライド結合部位が、本アレルゲンの抗体認識部位（エピトープ）と同一または非常に近接した位置にあると仮定すると、抗体の結合に対して何らかの影響を与えることが期待される。シリングライドの結合による分子量の増加は、TOF-Mass の測定では識別されなかった。この理由は、約3万の質量数のアレルゲンたん白質に対して質量数300のシリングライドの付加による1%の質量増加を検出できなかったか、あるいはレーザーによるたん白質の励起イオン化時にシリングライドが離脱した可能性が

考えられる。ちなみにシリングライドの Gly m Bd 30K レセプターに対する Kd は 10 nM 程度とされている²⁾。一方、Gly m Bd 30K へのシリングライドの結合による抗原抗体反応への影響をドットプロット法で観察した結果は、シリングライド処理した試料における抗体結合反応の増強が、F5 抗体（マウス IgG）およびヒト IgE 抗体において認められた。この事実は少なくとも、シリングライドのレセプターは抗体結合部位（エピトープ）あるいは極めて近接する部位に結合しているのでは無いことを示している。逆に、レセプターへのシリングライドの結合がアレルゲンたん白質の立体構造の変化を引き起こし、エピトープの露出を促したとも理解できるが、詳細についてはさらに実験が必要である。

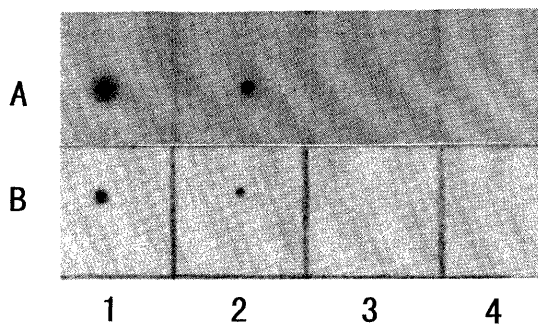


Fig. 6. Effect of syringolide binding to Gly m Bd 30K on the immunoreactivity of F5 and patient's serum. A, F5 mAb; B, patient's serum. 1, Gly m Bd 30 and syringolide; 2, Gly mBd 30K; 3, syringolide; 4, 5% ethanol (solvent blank).

Origin	Amino acid sequence
Gly m Bd 30K	QGGCGSGWAF
Der p 1	QGGCGSCWAF
<i>Dictiostelium</i> CPI	QGQCGSCWSF
Rat cathepsin H	QAQCGSCWAF
Aleurain (barley)	QAHCGSCWAF

* active site thiol; ↑ disulfide bond

Fig. 7. Comparison of the active site amino acid sequences of Gly m Bd 30K and thiol proteases.

要 約

大豆アレルゲン Gly m Bd 30K は、パバインスーパーファミリーに分類されるたん白質で、大豆特異的病原体 *Pseudomonas syringae* の産生するシリングライドのレセプターでもある。本アレルゲンの未知生物機能を解析する目的で、大豆植物体における分布、チオールプロテアーゼ様酵素活性の有無、シリングライド結合活性、シリングライド結合時のアレルゲン性の変化について検討した。Gly m Bd 30K は大豆植物体葉部にも分布した。プロメラインを基準に類似酵素活性の有無を検討したが、活性は検出されなかった。シリングライドで処理した本アレルゲンのマウス F5 モノクローナル抗体、ヒト IgE 抗体に対する結合反応は、ドットプロットによる解析では増強される傾向が認められた。従って、少なくともシリングライド結合部位（レセプター部位）と抗体認識部位（エピトープ）は異なる位置にあると考えられる。

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) Ji C, Boyd C, Slymaker D, Okinaka Y, Takeuchi Y, Midland SL, Sims JJ, Herman E and Keen NT (1998): Characterization of a 34-kDa soybean binding protein for the syringolide elicitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 3306-3311.
- 3) Midland SL, Keen NT, Sima JJ, Midland MM, Stayton MM, Burton V, Smith MJ, Mazzola EP, Garaham KJ and Clardy J (1993) The structure of syringolides 1 and 2, novel C-glycoside elicitors from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *J Org Chem*, **58**, 2940-2945.
- 4) Barrett AJ and Kirschke H (1981): Proteolytic enzymes Part C. In: *Methods in Enzymology*. Lorand L, ed., Academic Press, New York, Vol. 80, pp. 535-561.
- 5) Samoto M, Fukuda Y, Takahashi K, Tabuchi K, Hiemori M, Tsuji H, Ogawa T and Kawamura K (1997): Substantially complete removal of three major allergenic soybean proteins (Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K, and the α -subunit of conglycinin) from soy protein by using a mutant soybean, Tohoku 124. *Biosci Biotech Biochem*, **61**, 2148-2150.
- 6) Tsuji H, Bando N, Kimoto M, Okada N and Ogawa T (1993): Preparation and application of monoclonal antibodies for a sandwich ELISA of the major soybean allergen, Gly m Bd 30K. *J Nutr Sci Vitaminol*, **39**, 389-397.
- 7) 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.
- 8) Hirata T, Izumi S and Tsuji S (1999): A 20-kDa protein with the GTP-binding trypsin inhibitor activities from *Glycine max*. *Biosci Biotech Biochem*, **63**, 1816-1818.