

大豆トリプシンインヒビター投与による小腸内プロテアーゼ活性の低下が経口投与たん白質抗原に対する免疫応答に及ぼす影響

山田千佳子・二宮憲子・松田 幹*

名古屋大学大学院生命農学研究科

Effect of the Intestinal Protease Inactivation by Soybean Trypsin Inhibitor on the Immune Response to Oral Protein Antigens

Chikako YAMADA, Noriko NINOMIYA and Tsukasa MATSUDA

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

ABSTRACT

The previous reports (Ninomiya *et al.*, *Soy Protein Research*, **1**, 75-80, 1998; **2**, 70-75, 1999) showed that the oral administration of Kunitz soybean trypsin inhibitor (KSTI) inhibited not only trypsin activity but also chymotrypsin and elastase activities in the small intestine of B10.A mice. In the present study, the effect of such decrease in intestinal protease activities on digestibility and oral immunogenicity of proteins co-administered with the inhibitor was investigated. The soybean trypsin inhibitor (KSTI) and chicken egg trypsin inhibitor (ovomucoid) were used as protease inhibitors, and chicken egg lysozyme as a co-administered protein. Both trypsin inhibitors, especially KSTI, were more resistant to the gastrointestinal digestion than lysozyme. KSTI inhibited intestinal trypsin activity almost completely, whereas ovomucoid did not. Western blot analysis using anti-lysozyme antibody demonstrated that intact lysozyme remained in small intestine when lysozyme was co-administered with KSTI but not when it was done with ovomucoid. The responses of serum IgG1 and IgE antibodies against the orally administered lysozyme were analyzed for B10.A mice by ELISA. The oral co-administration of KSTI, or ovomucoid with lysozyme did not enhance the antibody response to the lysozyme as an oral antigen. Some mice in the KSTI/lysozyme-administration group showed rather lower response than those of the lysozyme administration. These results suggested that inhibition of the intestinal protease activity did increase residual intact food proteins in small intestine, but did not enhance the antibody response to the proteins. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 73-78, 2000.

Key words : soybean trypsin inhibitor (KSTI), ovomucoid, digestibility, antibody response, food allergy

*〒 464-8601 名古屋市千種区不老町

これまでの研究により、大豆トリプシンインヒビター (KSTI) をマウス胃内に投与すると、小腸内に未分解の状態で検出され、小腸内トリプシン活性のみならず、キモトリプシン活性およびエラスターゼ活性も顕著に阻害されることを明らかにした¹⁾。今年度は、小腸内でのトリプシン活性および他のプロテアーゼ活性の阻害が、同時に経口投与したたん白質の消化性、およびその経口投与たん白質に対する抗体応答に及ぼす影響について解析した。また、卵白のトリプシンインヒビターであるオボムコイドについても同様に解析し比較検討した。これらの研究により、KSTI の同時投与は必ずしも経口抗原に対する抗体応答を増強しないという予想に反した結果が得られた。

方 法

実験材料

大豆トリプシンインヒビター (KSTI) は SIGMA より、卵白リゾチームは生化学工業より、B10.A マウスは日本 SLC より購入した。卵白オボムコイドは和光純薬より購入した。トリプシン活性測定用の合成基質として用いた α -N-benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide (BAPA) はペプチド研究所より購入した。

たん白質の経口投与と小腸内容物の調製

B10.A マウス (6~8 週齢、雌) を用いて、24 時間絶食させた後、たん白質をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解して (100 mg/mL)、一群 3 匹としてマウス 1 匹あたり 10 mg のトリプシンインヒビター (KSTI) あるいはオボムコイドと 10 mg のリゾチームを混合してゾンデで胃内投与した。また対照実験としてリゾチーム単独 (10 mg) で投与した。胃内投与 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プロテアーゼ活性の測定と抗原分析に用いた。

トリプシン活性の測定

合成基質 BAPA をトリス緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0 / 20 mM CaCl₂) に溶解し、2 mg/mL 溶液を基質溶液として用いた。96 穴プレートにトリス緩衝液を 150 μ L 加え、37℃ で 5 分間加温し、そこに基質溶液および小腸内容物上清をそれぞれ 25 μ L ずつ添加し、混合した後、37℃ で保温しながら 1 分ごとの 405 nm での吸光度を 10 分間測定した。吸光度の経時的測定にはマイクロプレート用分光高度計 SOFTmax PRO を用いて自

動記録した。単位時間あたりの吸光度の増加を酵素活性として表示した。

小腸内容物中に残存する胃内投与たん白質の検出

上述した小腸内容物溶液の 20 μ L を用いて、小腸内に残存するリゾチーム、KSTI、オボムコイドを SDS-PAGE²⁾ および Western blotting³⁾ により分析した。SDS-PAGE で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⁴⁾、小腸内に残存するたん白質およびその抗原性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と血清抗体の測定

B10.A マウスを用いて、マウス 1 匹あたり PBS 200 μ L に溶解したリゾチーム (10 mg)、リゾチーム (10 mg) と KSTI (10 mg)、あるいはリゾチーム (10 mg) とオボムコイド (10 mg) を、1 日 1 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た (一次応答)。その 3 週間後に、再度 7 日間の胃内投与を同様にを行い、その 7 日後に採血した (二次応答)。遠心分離により個体ごとに血清を分離し、血清抗体測定用のサンプルとした。胃内投与したリゾチーム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 (ELISA)⁵⁾ を用いて前報に従って測定した⁶⁾。二次抗体としてパーオキシダーゼ標識した抗マウス IgG1 および抗マウス IgE (ノルディック) を用いた。

結果と考察

KSTI, オボムコイドの胃内投与による小腸内トリプシン活性の変動

B10.A マウスの胃内にリゾチーム単独、KSTI とリゾチーム、あるいはオボムコイドとリゾチームを投与し、30 分後の小腸内のトリプシン活性を測定した結果を Fig. 1 に示す。リゾチームを投与した群では十二指腸部および回腸部に高い酵素活性が検出された。一方、KSTI とリゾチームを同時投与したマウスでは、小腸全域においてほとんどトリプシン活性は検出されず、KSTI により阻害を受けていると考えられた。ところが、オボムコイドとリゾチームを同時投与したマウスでは、リゾチーム単独投与群に匹敵する小腸内トリプシン活性が検出された。KSTI はオボムコイドよりも消化酵素に対する抵抗性が高く、小腸内においても阻害活性を保持した状態で多く残存するため、小腸内トリプシン活性がほとんど消失し、一方オボムコイドは分解され

て阻害活性を失ったためトリプシン活性が検出されたものと推定された。

KSTI およびオボムコイドのマウス消化管内での消化分解性

胃および小腸内容物中に残存するトリプシンインヒビターを各特異抗体を用いた Western blotting により解析した。Fig. 2 に示すように胃内投与された KSTI は、胃内および小腸内に未分解のたん白質として多量に残存した。一方、オボムコイドは胃内では多量の未分解のたん白質も検出されたが、同時に分解断片も多く検出され、さらに小腸内では大部分が分解断片として検

出された。このように、KSTI はオボムコイドよりも高い消化分解抵抗性を示すことが明らかとなった。この結果は、上記の KSTI による小腸内でのプロテアーゼ活性の阻害の結果とよく対応している。

KSTI の同時投与がリゾチームの消化に及ぼす影響

たん白質抗原としてのリゾチームをトリプシンインヒビター (KSTI あるいはオボムコイド) とともに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残存するリゾチーム抗原を分析することにより、小腸内消化酵素の活性低下がリゾチームの消化性に及ぼす影響を調べた。リゾチームと KSTI およびリゾチームと

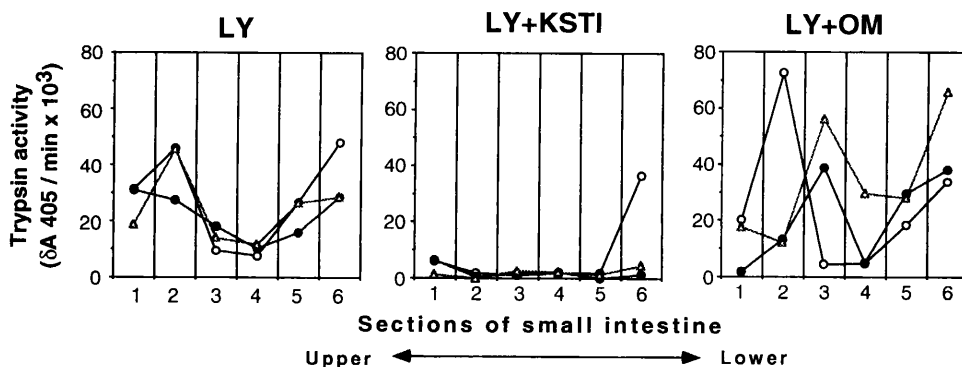


Fig. 1. Trypsin activity in the small intestine of mice after intrastomach administration of lysozyme (LY), lysozyme plus Kunitz soybean trypsin inhibitor (LY+KSTI), and lysozyme plus ovomucoid (LY+OM). The intestinal contents were recovered from 6 sections (the order is from duodenum to ileum) 30 min after administration. The trypsin activity was measured by using α -N-benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide (BAPA) as a substrate.

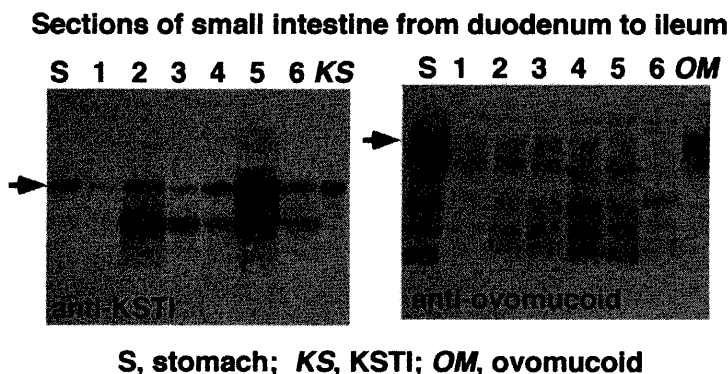


Fig. 2. Detection of KSTI, ovomucoid and their fragments in the stomach and small intestine of mice after the intrastomach administration. After the intrastomach administration of lysozyme plus KSTI (LY+KSTI) or lysozyme plus ovomucoid (LY+OM), the intestinal contents were recovered and separated by SDS-PAGE, followed by blotting onto a PVDF membrane. The KSTI and ovomucoid were detected by immunostaining with the specific antibodies. The arrowheads show the positions of each protein.

オボムコイドを投与したマウスについて、消化管内容物のSDS-PAGEおよびリゾチーム特異抗体を用いた免疫ブロット解析を行った。その典型的な例をFig. 3に示す。KSTIと同時投与した場合には、空腸から十二指腸上部付近に未分解リゾチームのバンドが明確に検出された。一方、オボムコイドと同時に投与した場合は、リゾチーム単独で投与した場合と同様に、空腸付近に低分子量の抗原性ペプチドが僅かに検出されるのみであった。このようなKSTIの同時投与による未分解リゾチームの残存量の増加は、小腸内プロテアーゼ活性の低下によるものと考えられ、KSTIの経口投与は、消化管内のたん白質分解活性を阻害することにより、同時に摂取された他のたん白質の消化率を低下させることが明らかとなった。

KSTIの同時投与がリゾチームに対する抗体応答に及ぼす影響

KSTIの同時投与により小腸内に残存する未分解リゾチームの量が増加した。このような未分解たん白質の増加により、消化管経由での免疫系に対する抗原刺激が増強されるであろうと考え、リゾチームをKSTIあるいはオボムコイドとともに7日間にわたって胃内投

与し、その後のリゾチーム特異的IgG1およびIgE抗体を測定した。Fig. 4およびFig. 5に示すように、リゾチームの胃内投与により、B10.Aマウスは抗原特異的IgG1およびIgE応答を示した。一次応答では個体間の変動が大きいが、2次応答では5個体全てにおいて血清IgG1のみならずIgE抗体レベルの上昇が観察された。また、卵白トリプシンインヒビターであるオボムコイドを同時に投与した場合も、ほぼ同様の抗体応答が観察され、オボムコイドの同時投与の影響はほとんど無いと推定された。オボムコイドの胃内投与によっては、小腸内プロテアーゼ活性の低下が見られず、未分解リゾチームの小腸内残存率にも大きな影響はなかったことと対応していると思われる。一方、KSTIとともにリゾチームを胃内投与されたマウスにおいても特に高い抗体応答が誘導されることはなかった。2次応答においても、リゾチーム単独投与群との顕著な差異は認められず、5個体中2個体では、リゾチーム単独で胃内投与された群のどのマウスよりもむしろ低い抗体レベルを示した。このように、今回行った実験条件下では、KSTIを同時に胃内投与してもリゾチームに対する抗体応答を増強しないことが明らかとなった。

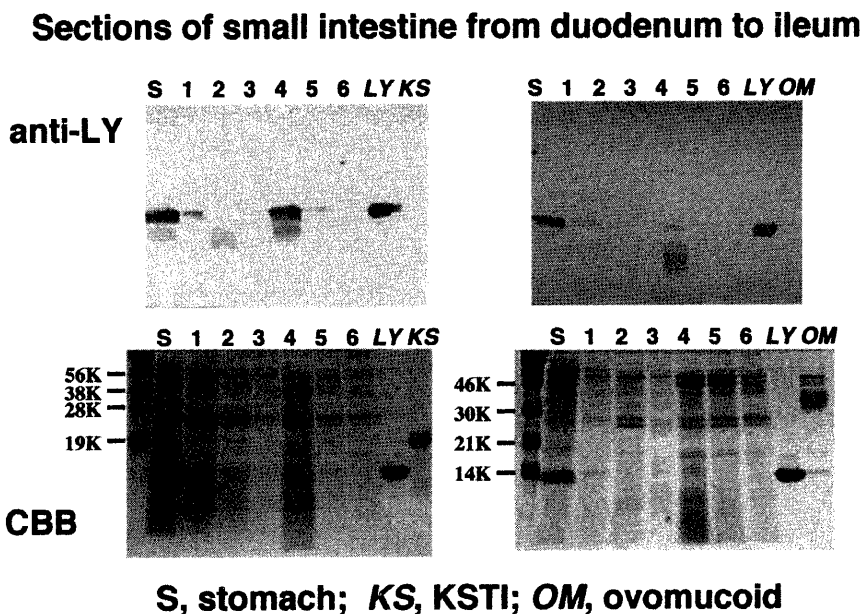


Fig. 3. Detection of lysozyme and its fragments in the small intestine of mice after the intrastomach administration together with KSTI or ovomucoid. After the intrastomach administration of lysozyme plus KSTI (LY+KSTI) or lysozyme plus ovomucoid (LY+OM), the intestinal contents were recovered and separated by SDS-PAGE and stained with CBB. Another sheet of the gel was subjected to Western blotting. The lysozyme and its fragments blotted onto a PVDF membrane were detected by immunostaining with the specific antibody (anti-LY).

以上の研究から、1) KSTI は消化管内での消化分解に対してオボムコイドよりも高い抵抗性を示し、2) 小腸内プロテアーゼ活性を顕著に阻害することにより KSTI 自身のみならず同時に摂取された他のたん白質の消化分解をも抑制し、3) 小腸内に残存する未分解たん白質抗原の量を増加させるが、4) その結果として必ずしもそのたん白質抗原に対する抗体応答を増強することはない、という結論が導かれる。これまでのたん

白質抗原の胃内投与実験により、投与量に依存した抗体応答の誘導が明らかにされているが、投与量が一定の値を越えるとむしろ抗体応答の低下傾向が見られたことから、KSTI の同時投与は消化管内の残存たん白質抗原を大きく増加させて抗体応答誘導の至適域を越えさせた可能性が考えられる。今回は、マウス1個体あたり 10 mg のリゾチームを投与したが、今後、さらに低投与量での KSTI 同時投与の影響を調べる必要がある。

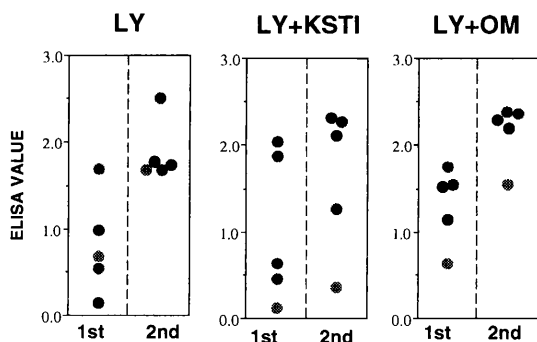


Fig. 4. The IgG1 antibody response to lysozyme of the mice after intrastomach administration of lysozyme (LY), lysozyme plus KSTI (LY+KSTI) or lysozyme plus ovomucoid (LY+OM). The blood was collected 7 days after each of the first 7 day-administration (1st) and the second 7 day-administration (2nd). The serum level of anti-lysozyme IgG1 was analyzed by ELISA for each mouse (n=5 per group).

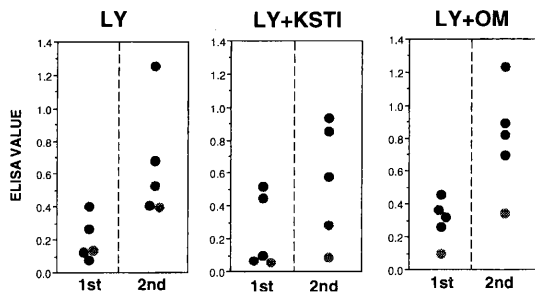


Fig. 5. The IgE antibody response to lysozyme of the mice after intrastomach administration of lysozyme (LY), lysozyme plus KSTI (LY+KSTI) or lysozyme plus ovomucoid (LY+OM). The blood was collected 7 days after each of the first 7 day-administration (1st) and the second 7 day-administration (2nd). The serum level of anti-lysozyme IgE was analyzed by ELISA for each mouse (n=5 per group).

要 約

昨年度までの研究により、大豆トリプシンインヒビター (KSTI) を経口投与すると、腸内トリプシン活性が顕著に阻害されるのみならず、トリプシンインヒビターでは直接阻害されないキモトリプシンおよびエラスターゼの活性も低下することが明らかとなった。これらの結果から、大豆トリプシンインヒビターを投与すると腸内のたん白質分解酵素活性が顕著に低下することにより未分解のたん白質抗原が多量に残存すると推定された。そこで今回は、このような KSTI による消化管内プロテアーゼ活性の低下が、同時に摂取されたたん白質抗原 (卵白リゾチームを用いた) の消化に及ぼす影響、さらにそのたん白質抗原に対する血清抗体応答に及ぼす影響について研究した。また、KSTI の比較対照として、卵白トリプシンインヒビターであるオボムコイドを用いて同様に調べた。KSTI、オボムコイドいずれもリゾチームに比べてマウス消化管内での消化に対して抵抗性を示した。しかし、消化管内トリプシン活性に関しては、KSTI / リゾチーム同時投与マウスではほとんど検出されなかったが、オボムコイド / リゾチーム同時投与マウスは LY 単独投与マウスに匹敵する活性を示した。さらに、消化管内に残存するリゾチームについては、KSTI / リゾチーム投与マウスで未分解のリゾチームが多く検出されたのに対して、KSTI / リゾチーム投与およびリゾチーム単独投与マウスでは低分子量のリゾチーム分解産物が僅かに検出されたのみであった。そこで、リゾチームを単独、あるいは KSTI、オボムコイドとともに一週間連続で経口投与し、さらに 3 週間後に再度同様

に経口投与し、その後のリゾチームに対する血清抗体応答を調べた。いずれの投与群においてもリゾチーム特異的な血清 IgG1 および IgE 抗体レベルの上昇が観察された。しかし、KSTI / リゾチーム同時投与群では、他の 2 群に比べて抗体応答が強く誘導されることはなく、むしろ応答を示さない個体が見られた。以上の結果から、KSTI による小腸内プロテアーゼ活性の低下は、必ずしも経口投与たん白質抗原に対する抗体応答を増強しないことが示唆された。

文 献

- 1) 二宮憲子, 山田千佳子, 松田 幹(1999):大豆トリプシンインヒビターがアレルゲンたん白質の *in vivo* 消化性と経口免疫原性に及ぼす影響. 大豆たん白質研究, **2**, 70-75.
- 2) Laemmli UK (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 3) Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 4350-4354.
- 4) 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.
- 5) Engval E and Perlmann P (1971) : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)—Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874.
- 6) 二宮憲子, 市場愛子, 松田 幹(1998):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. 大豆たん白質研究, **1**, 75-80.