

大豆主要アレルゲン Gly m Bd 28K のアレルゲン性に関する研究

辻 英明^{*1}・比江森美樹¹・木本眞順美¹・山下広美¹・小川 正²・内海 成²

¹岡山県立大学保健福祉学部 ²京都大学大学院農学研究科

Allergenicity of a Soybean Allergen, Gly m Bd 28K

Hideaki TSUJI¹, Miki HIEMORI¹, Masumi KIMOTO¹, Hiromi YAMASHITA¹,
Tadashi OGAWA² and Shigeru UTSUMI²

¹ Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, Soja 719-1197

² Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji 611-0011

ABSTRACT

A soybean allergen, Gly m Bd 28K has been purified by various chromatographic techniques. The purified allergen was shown to be an Asn-linked glycoprotein with a molecular mass of 26 kDa. A cDNA encoding the allergen has been cloned using a λ ZAP cDNA library prepared from mRNA in developing soybean cotyledons. The cDNA contained 1567 bp with an open reading frame encoding 473-amino acid sequence. Homology analysis shows that the product for the cDNA exhibits high homology with MP27/MP32 in pumpkin seeds and a carrot globulin-like protein and that the product may be a preproprotein. The allergen was shown to locate in the former half part of the preproprotein and might be biosynthesized in the same manner as pumpkin MP27/MP32 is. Interestingly, the recombinant allergen expressed in *E. coli* using a pGEX vector showed weak responses in reactions with the sera of several soybean-sensitive patients, whereas the native allergen showed strong responses. The glycopeptide isolated reacted strongly with the above sera and the deglycosylated peptide showed no reactivity. These observations demonstrate that the sugar moiety of the allergen binds to IgE antibodies in the sera of the patients. *Soy Protein Research, Japan* 4, 39-44, 2001.

Key words : soybean allergen, Gly m Bd 28K, cDNA, pumpkin MP27/MP32,
carrot globulin-like protein

今日、食物アレルギーは大きな社会問題になっている。従って、食品の低アレルゲン化は極めて緊急性を要する課題である。このためには、食品におけるアレ

ルゲンを十分理解することが重要である。わが国においては、代表的なアレルギー食品は卵、牛乳、小麦などであり、大豆はアレルギー食品としての地位は高くない。しかしながら、大豆は主要なたん白質の供給源であるので、そのアレルゲンを究明することは重要な

*〒719-1197 総社市窪木 111 番地

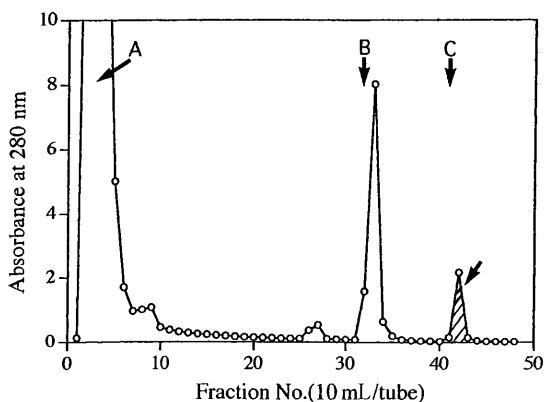


Fig. 1. Immunoaffinity chromatography of Gly m Bd 28K on mAb C5-cellulofine column. The fraction containing Gly m Bd 28K was obtained from 7S-globulin fraction of soybean flakes. A, washed with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.15 M NaCl; B, washed with Tris buffer containing 1 M NaCl; C, eluted with 0.1 M acetic acid. The hatched peak represents the allergen fraction.

課題である。わたしたちは大豆におけるアレルゲンを詳細に検討し、Gly m Bd 68K, Gly m Bd 30K および Gly m Bd 28K が重要なアレルゲンであることを明らかにした¹⁾。このうち、前二者は α -conglycinin の α -subunit と 34-kDa oil body-associated protein であることを明らかにした。しかし、後者の Gly m Bd 28K は未だにその性質は明らかにされていない未同定のたん白質である。

本研究では、Gly m Bd 28K を単離・精製し、その性質を明らかにした上で、本アレルゲンをコードする cDNA をクローニングし、その発現を行った。さらに、発現たん白質のアレルゲン性を検討した。

方 法

Gly m Bd 28K の精製

脱脂大豆粉より 10 mM Tris-buffer (pH 8.0) でたん白質を抽出し、定法に従って 7S グロブリンを調製した。ついで、本アレルゲンに対するモノクローナル抗体 C5 を ligand とするアフィニティクロマトグラフィー、DEAE-Sephacryl クロマトグラフィーならびに Sephacryl S-200 におけるゲル濾過により本アレルゲンを精製した。

PCR

本アレルゲンをクローニングするにあたり、プローブの作成を行うために、既知のアミノ酸配列に基づい

てプライマーを作成し polymerase chain reaction (PCR) を行った。最終的に選ばれたプライマーは後述されているプライマー 1 と 2 を用いて、下に示した登熟中の大豆種子より調製した mRNA より得られた cDNA を鋳型にして、94℃ で 1 分、63℃ で 1 分、72℃ で 3 分行い、これを 42 回繰り返して PCR を行った。クローニング

λ ZAPII を用いて、登熟中の大豆種子の mRNA より調製した cDNA ライブラリーより上述の PCR 生成物をプローブとしてプラークハイブリダイゼーションにより目的とする cDNA を含むクローンを検索した。得られたファージクローンを pBluescript ファージミッドに転換した。さらに、本アレルゲンに相当する Phe22-Lys259 のペプチド断片を発現ベクター pGEX-6p-1 に組み込み、大腸菌 JM109 に形質転換した後、IPTG の存在下で、glutathione S-transferase との融合たん白質として発現させた。発現たん白質は SDS-PAGE 後、辻らの方法²⁾で精製した。

イムノブロット

イムノブロットは辻らの方法²⁾で行った。なお、用いた大豆に感受性を示す患者血清は岡山県下のアレルギー専門医の協力で集め、RAST 値 2 以上の患者血清を用いた。患者からはインフォームドコンセントを得ている。

アレルゲン由来の糖ペプチドの精製

本アレルゲンの糖ペプチドを単離するために、まず本アレルゲンを BrCN, lysyl endopeptidase および chymotrypsin を用いて消化し、辻らの方法²⁾により、得られたペプチドのうち、5 つのペプチドを C4 カラムにおいて 0.05% trifluoroacetic acid 中で 0~64% の acetonitrile の直線的濃度勾配により精製した。本アレルゲンおよび精製したペプチドの N 末端アミノ酸配列は Hewlett Packard G1005A 型の自動アミノ酸シーケンサーを用いて決定した。

結果と考察

脱脂大豆より Gly m Bd 28K を精製するために、まず脱脂大豆より 7S グロブリン画分を調製し、次いで本アレルゲンに対するモノクローナル抗体 C5 を ligand とするアフィニティクロマトグラフを行った。Fig. 1 に示すように、本アレルゲンは 0.1 M 酢酸により選択的に溶出された。少量の夾雑物は DEAE-Sephacryl カラムと Sephacryl S-200 カラムを用いて除去した。精製されたたん白質成分は患者血清中の IgE 抗体ならびに上述の C5 抗体と特異的に反応し、目的とする本アレ

1 AAAATACCCTTTTGCTTTTGGCTCTTTGTTCTTTGCCATGGAGTGGCCACACAACAATGGCCCTCCATGATGATGAGGGTGGTGATAAA
 K T T L L L L L F V L C H G V A T T T M A F H D D E G G D K
 91 AAGTACCAAAAAGTTTGGTTTTGATGAGCAACTCCACGAGGGTTTTCAAGACTGATGCAGGGGAAATGCGTGTGCTGAAAAGCCATGGT
 K S P K S L F L M S N S T R V F K T D A G E M R V L K S H G
 181 GGTAGGATATTTATAGGCACATGCACATTGCCTTCATCTCTATGGAACCAAAGTCCTTGTTTGTCTCAGTACCTCGACTCCAATCTC
 G R I F Y R H M H I G F I S M E P K S L F V P Q Y L D S N L
 241 ATCATATTATCCGTAGAGGGGAAGCTGGGATTCATATATGATGACTAGCGAAAGGAGATTGAAGACAGGGGACTTGTAC
 I I F I R R G E A K L G F I Y D D E L A E R R L K T G D L Y
 361 ATGATTCATCTGGTTCAGCATTCTATTTGGTGAACATAGGAGAAGGTCAGAGACTTACGTTATCTGCAGCATTGACCCCTCTACAAGC
 M I P S G S A F Y L V N I G E G Q R L H V I C S I D P S T S
 421 TTGGGATTAGAGACCTTCCAGTCCCTTATATTGGGGGAGGACCAATTCGCACCTCGGTGCTTTCTGGATTGCAACCTGCCATCCTTGAA
 L G L E T F Q S F Y I G G G A N S H S V L S G F E P A I L E
 541 ACTGCATTTAATGAATCAAGAACGGTGGTAGAGAAATCTTCTCCAAGGAAGTGTAGGGCAATATGTTTCGTGGATGATTCTCATGCA
 T A F N E S R T V V E E I F S K E L D G P I M F V D D S H A
 601 CCTAGCTTATGGACTAAATTCCTTCAACTGAAGAAGGATGACAAAGACCAACAGCTGAAGAAAATGATGCAAGACCAAGAGGAGGATGAG
 P S L W T K F L Q L K K D D K E Q Q L K K M M Q D Q E E D E
 721 GAGGAGAAGCAAAAGTAGGTCATGGAGGAAGCTCTTGGAAACCGTATTTGGGAAGGTGAATGAGAAGATAGAGAACAAGACACTGCCT
 E E K Q T S R S W R K L L E T V F G K V N E K I E N K D T A
 811 GGTCCCCCTGCCTCTTACAACCTCTACGATGACAAAAAGCCGATTTCAAACACGCTTATGGTTGGAGCAAGGCCTGCATGGAGGCGGAG
 G S P A S Y N L Y D D K K A D F K N A Y G W S K A L H G G E
 901 TATCTCCACTCAGCGAACCGGATATTGGAGTTTACTTGTCAAACCTCTCAGCGGATCCATGTTGGCACCTCATGTGAATCCAATATCA
 Y P P L S E P D I G V L L V K L S A G S M L A P H V N P I S
 991 GATGAGTATACCATAGTCTGAGTGGTTATGGTGAATGCATATAGGATATCCAAACGGAAGCAGAGCAATGAAACATAAAATCAAAACA
 D E Y T I V L S G Y G E L H I G Y P N G S R A M K T K I K Q
 1081 GGGACGTGTTTGTGTGCCAAGATACTTCCCTTCTGTCAAGTAGCATCAAGGGATGGACCCCTAGAGTCTTCTGGCTTCTCCACTTCT
 G D V F V V P R Y F P F C Q V A S R D G P L E F F G F S T S
 1171 GCAAGGAAGAACAAGCCACAGTTTCTGGCTGGTGTGCTCCCTTCTAAGGACCTTGATGGGGCCGGAGCTTTCGGCGCGTTCGGAGTG
 A R K N K P Q F L A G A A S L L R T L M G P E L S A A F G V
 1261 AGCGAGGACAGTTGCGGCGCGCTGTTGATGCTCAGCATGAGGCTGTGATACTGCCATCAGCATGGGCTGCACCACCGAAAATGCAGGG
 S E D T L R R A V D A Q H E A V I L P S A W A A P P E N A G
 1351 AAGCTGAAGATGGAAGAAGAGCCAAATGCTATTAGAAGCTTTCGCAATGATGTTGGTTATGGATGTTTTTAAATTTGAACACTTGATTGG
 K L K M E E E P N A I R S F A N D V V M D V F ***
 1441 AATAGGGGTTATTTGGTAGTGTAGTGCCTAGTGGAAATCTGTGTGTGAGTTTTTTGTTCTTTATATTTAGTTGAGATGTGTGTTGTGTTT
 1531 TTGAGTTGTGAATAAAAATCTACTTTCTTTTGTGCATT 1567

Fig. 2. Nucleotide sequence of cDNA encoding Gly m Bd 28K and its deduced amino acid sequence. The deduced amino acid sequence is shown under the nucleotide sequence of the cDNA. Normal underlines under the amino acid sequence represent the amino acid residues determined by automated Edman degradation. Two bold underlines (P1 and P2) express primers 1 and 2 used in PCR, respectively. Asterisks show the stop codon of the cDNA. Three arrows express the putative asparagine residues to be glycosylated. A signal for polyadenylation of the transcript is shown by a dotted underline.

ルゲンであることが示された。本アレルゲンはPAS染色により糖たん白質であることが明らかになった。そこで、糖組成分析を行った結果、糖鎖におけるmannose, N-acetylglucosamine, fucoseおよびxyloseの比率が3:2:1:1であり、本アレルゲンはアスパラギン結合型糖たん白質であることが示唆された。

また、本アレルゲンは220個のアミノ酸残基からなることが示された。

本アレルゲンの諸性質を明らかにするために、本アレルゲンをコードするcDNAのクローニングを行った。得られたcDNAはFig. 2に示すように、1567bpからなり、473個のアミノ酸残基をコードする1419bp

Gm28K
MP27/MP32
GLK

```

1 -----KTTL-LLLLF-VLCHGVATTMA--FHDDE---G-GD-KK-SPKSLFLMSN
1 MKQRAKMWKKEALVMLLI IAVLGNAGITKEEAEEAEWWREREREFRSKEQFLLED
1 M-----GK-GLTFLLVL-VL--VISVK----GYEEEE--SG-SGGG-R-K-LFLLED

42 STRVFKTDAGEMRVLKSHGGRIFVREMHIGFISMEPKSLFVPOYLDSNLII FIRRGEAKL
61 SKRVIEETEAGEMRVIRSPASRIIDRPMHIGFITMEPKSLFVPOYLDSSLILFVRRGEVNV
40 SVEVVKSEAGGMKVVKGITCKFVDPKPMHIGFIYMEPKSLFDPOYLDNSLILFIRRGEAKV

102 GFIVDELAERRLKTDGLVMIPSGSAFYLVNIGEGORLHVICSIDPSTSLGLETFQSFYI
121 GLIYKDELAERRMKCGDVYRIPAGSVFYMNVVGEQORLOIICSIDKSELSYCTFQSFYI
100 GSIRNDKLVQDLKTDIYITIDAGSVFYIENITGEGORLOIICSIDTSESLTWHAFQSFYI

162 GGGANSHSVLSGEPALLETAFNESTRIVVEEIFSKELDGPIMFVD--DSHAPSLWTKFLQL
181 GGGTYEVSVLAGFDQDITLATAFNVSYTELRRILSRQRQGPVIVVS--DTESPGVWSKFLQV
160 GGGRNPSILAGFDKELTSTAFNVSVSELEEFLEPSPGCAIVYISPEKSPNLWTFHFINL

221 KKDDKEQQLKK--MMQDQE--EDEEKQTSRSH--RKILETVFGKVNKIKENKD--TAGSPAS
240 KDGD-KGN--KIANINEGEEAE-K-NKP-WSWRNLVSLIFGNENRDKTKRTRTKGKSPDS
220 EHHQKKAHLKKFVLFEGDVDVTESKERPSWSLGLKLVKSLFINENKKNKDKVR--DSGDDV

276 YNLVDDKKAADFKNAYGWSKALHGGFYPPLEPDIQVLLVKL SAGSMLAPHVNI SDEYTI
294 YNLY--DKTPDFSNAYGWSVALDEHEYSPLGHSGIGVYLVNLTAGSMMAPHINPTAAEYGI
279 YNLY--DRNPDFONSYGWSLAVDSDQYKPLNHSGIGVYLVNLTAGSMMAPHINPTASEYGI

336 VLSGYGELHIGYPNGSRAMKTKIKQGDVFWVPYRYPFCQVASRDGPLEFFGFSTTSARKNK
353 VLRGTETIQIVYPNGTSAMDTEVTEGDVFWVPYRYPFCQIASRTGPEFFFGFTTSSRRNR
338 VLRGSGSIQIVFPNGTLAMNTKVNREGDVFWLPRYFHSVKFHQEQAPWSFFFGFTTSSORNH

396 POFLAGAASLLRILMGPELSAAGVSEDTLERRAVDAQHEAVILPSAWAAPPENAGKCLKME
413 POFLAGANSIFHTLRSAPAVATAFDITPEDDLRLLSAQYEVVILPSAETIAPPKKEEKR-R
398 POFLVGRGSLFQIMFGREL VVSFGSTEKKFEKFIYAQNESTILSTASVAPP--DDVNR-V

456 EEPNAIRSFANDVVMDFV
472 RREEGRERERERESEEREREWTRLEAF
455 ILKKCKREK-MIPKLAKKLS-NDMMMGEE

```

Fig. 3. Alignment of the deduced amino acid sequence of the allergen (Gm28K) with those of the pumpkin MP27/MP32 (MP27/MP32) and the carrot globulin-like protein (GLK). Shaded amino acid residues express the amino acid residues identical between two of the three proteins or among all of the proteins. The closed arrow shows a putative cleavage site by a vacuolar processing enzyme, which was suggested in the case of processing of the pumpkin preproprotein to the mature proteins MP27/MP32. The sequences of MP27/MP32 and GLK were from *Cucurbita* sp. C. v. Kurokawa Amakuri Nankin³⁾ and *Daucus carota* c.v. Danvers Half-long⁴⁾, respectively.

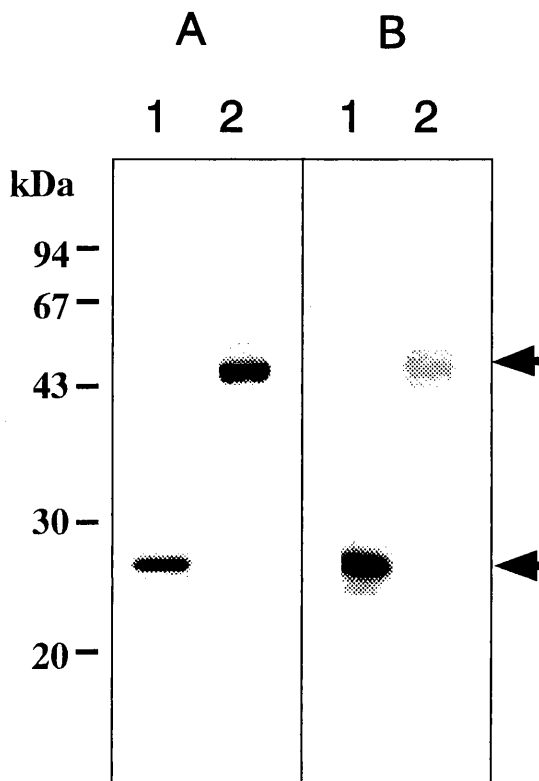


Fig. 4. Immunoblotting patterns of the fusion protein of the protein fragment corresponding to the allergen with glutathione S-transferase. *E. coli* JM109 harboring the expression vector for the peptide fragment including the allergen was cultured for 7 h in the presence of 1 mM IPTG. The fusion protein was purified as described in the previous paper²⁾. The proteins were electrophoresed on a 12% polyacrylamide gel and the proteins on a part of gel were stained with Coomassie brilliant blue R250 (A). The proteins on the other part of the gel were electroblotted onto a nitrocellulose membrane. The membrane was subjected to staining with a serum of soybean-sensitive patient (B). Lane 1, the allergen purified from soybean flakes (the lower arrow); lane 2, the recombinant fusion protein (the upper arrow).

の open reading frame および 3' 側の非翻訳領域 148 bp を含み、その後 Poly A が続くことが明らかになった。推定されたアミノ酸配列は本アレルゲンから直接求めたアミノ酸配列を含み、しかも完全に一致した (Fig. 2)。このことは得られたクローンは本アレルゲンをコードする cDNA であること示している。また、

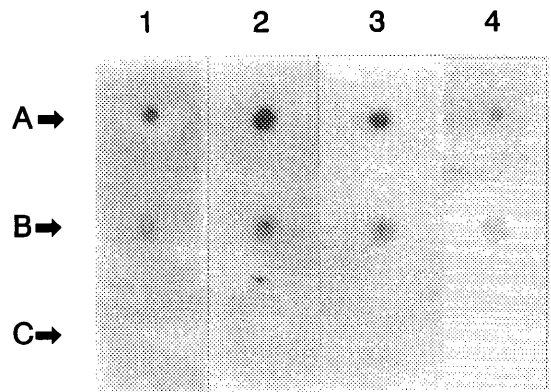


Fig. 5. Immunoblotting patterns of Gly m Bd 28K, the glycopeptide and its deglycosylated peptide with the sera of soybean-sensitive patients. The protein and peptides blotted onto nitrocellulose membranes were treated with patients' sera and anti-HRP. A, Gly m Bd 28K ; B, the glycopeptide ; C, the deglycosylated peptide. Lanes 1-3, immunoblotted with patients' sera ; lane 4, immunoblotted with anti-HRP.

本アレルゲンの N 末端は推定されたアミノ酸配列の Phe22 から始まり、その前半部が本アレルゲンに対応していた。さらに、推定アミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行った結果、Fig. 3 に示したようにカボチャの種子におけるプロテイン体の膜たん白質成分である MP27/MP32 の前駆体たん白質³⁾ならびにニンジンにおけるグロブリン様たん白質⁴⁾と高い相同性があることが示された。本アレルゲンの前駆体たん白質はカボチャたん白質およびニンジンたん白質とそれぞれ 45.9% と 37.9% の同一性を示した。カボチャ MP27/MP32 はまず preproprotein として合成され、シグナルペプチドの除去後、Asn278 で切断され、MP27 と MP32 を遊離することがすでに明らかにされている。本アレルゲンがカボチャ MP27/MP32 と高い相同性を示すということは本アレルゲンも同様な仕組みで生合成されることを示唆するものである。

次に、発現ベクターに本アレルゲンに対応する cDNA 断片を組み込み、大腸菌にて発現を試み、得られた発現たん白質と患者血清中の IgE 抗体との反応性を検討した。Fig. 4 に示したように、大豆から精製した Gly m Bd 28K は患者血清中の IgE 抗体と強く反応したが、組換え型の反応性はきわめて弱いものであった。このことは患者血清における本アレルゲンと反応する IgE 抗体の大半が本アレルゲンの糖鎖と反応することを示唆している。さらに、本アレルゲンより糖ペ

プチドを単離し、そのアレルゲン性を検討した。その結果、Fig. 5 に示したように、糖ペプチドは強く患者血清中の IgE 抗体と反応したが、糖鎖を除去したペプチドはその反応性は失われた。このことは、本アレル

ゲンの糖鎖は確かに患者血清における IgE 抗体と結合することを明示するものである。現在、さらに糖鎖と IgE 抗体との反応性を詳細に検討する計画を行っている。

要 約

大豆主要アレルゲン Gly m Bd 28K を脱脂大豆粉より精製し、アスパラギン結合型糖たん白質であることを明らかにした。本アレルゲンをコードする cDNA をクローニングし、それから推定されたアミノ酸配列に基づいてホモロジー検索を行った結果、カボチャ種子のプロテイン体の膜成分 MP27/MP32 の前駆体とニンジンシのグロブリン様たん白質と高い相同性を示し、本アレルゲンもカボチャたん白質と同様に preproprotein, proprotein を経て生合成されることが示された。さらに、大腸菌にて発現させた組換え型は天然型と比べて患者血清中の IgE 抗体とは弱い反応しか示さず、このことは天然型から単離・精製した糖ペプチドを用いた実験により裏付けられた。これらの結果は本アレルゲンの糖鎖はアレルゲン性に深く関わっていることを示すものである。

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) Tsuji H, Kimoto M, Watanabe H, Sasagawa T, Oka T, Yamashita H and Okita M (1998): Epitope mapping of monoclonal antibodies against 4-aminobenzoate hydroxylase from *Agaricus bisporus*. *Biochim Biophys Acta*, **1425**, 628-631.
- 3) Inoue K, Motozaki A, Takeuchi Y, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1995): Molecular characterization of proteins in protein-body membrane that disappear most rapidly during transformation of protein bodies into vacuoles. *Plant J*, **7**, 235-243.
- 4) Lin X and Zimmerman JL (1998): Identification of a novel globulin-like protein gene, GEA8 (Accession No. U47078) from carrot somatic embryos. *Plant Physiol*, **116**, 1603.