

登熟中の大豆種子における大豆主要アレルゲン Gly m Bd 28Kの前駆たん白質の代謝に関する研究

辻 英明*¹・比江森美樹¹・木本眞順美¹・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

Metabolism of the Precursor of Gly m Bd 28K, a Major Soybean Allergen in Growing Soybean Seeds

Hideaki TSUJI, Miki HIEMORI, Masumi KIMOTO and Shigeru UTSUMI

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

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

ABSTRACT

Gly m Bd 28K is biosynthesized as a preproprotein, which is suggested to be metabolized to form Gly m Bd 28K and its C-terminal peptide (23 kDa peptide) during the growth of soybean seeds. In the present study, Gly m Bd 28K and the tentative 23 kDa peptide were examined in order to elucidate the metabolism of the precursor of Gly m Bd 28K in growing soybean seeds. Monoclonal antibodies (mAbs) recognizing the 23 kDa peptide were prepared. The 23 kDa peptide was detected using an immunoblotting technique with one of the mAbs. N-terminal amino acid sequence of the peptide was shown to be KDTAGSPASYNLYDDKADF. This result shows that the 23 kDa peptide corresponds to sequence 267-473 on the amino acid sequence of the precursor of Gly m Bd 28K. Furthermore, Gly m Bd 28K and the 23 kDa peptide were shown to be localized in the protein bodies in growing soybean seeds by gold colloidal method with the mAb. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 17-20, 2002.

Key words : soybean allergen, Gly m Bd 28K, preproprotein, allergenicity

今日、食物アレルギーは解決すべき社会的な問題になっている。私たちはこれまで、大豆におけるアレルゲンについて詳細に検討してきた。その結果、Gly m Bd 68K, Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28Kが主要なアレルゲンであることを明らかにした。前二者は β -conglycininの α -subunitおよび34-kDa oil body-associated proteinで

あると同定した¹⁾。

Gly m Bd 28Kは従来未知のたん白質で、カボチャ種子中のMP27/MP32およびニンジンのグロブリン様たん白質と高い相同性を示すことが明らかになった²⁾。さらに、Gly m Bd 28Kは前駆たん白質であるプレプロテインとして合成され、シグナルペプチドが除去されてプロプロテインに転換後、本アレルゲンとC末端ペプチド(23 kDaペプチド)に遊離されることが

*〒719-1197 総社市窪木111番地

強く示唆された²⁾。

本研究では、大豆の登熟過程におけるGly m Bd 28Kの前駆たん白質の代謝、すなわちGly m Bd 28Kおよび23 kDaペプチドがその過程で生成することならびにこれらの代謝物の組織内分布を検討した。

方 法

23 kDaペプチドに対するモノクローナル抗体の作製

Gly m Bd 28Kの前駆たん白質をコードするcDNAを用いてPCR法により、23 kDaペプチドをコードするDNAを作製し、定法によりpET-21d (+)にて発現ベクターを構築した³⁾。この発現ベクターを大腸菌BL21 (DE3)に形質転換し、IPTGの存在下で23 kDaペプチドを発現させた。発現たん白質は完全アジュバンドとのエマルジョンとしてBALB/cマウスに腹腔注入して免疫した。目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製した。

イムノブロット

イムノブロットは辻らの方法³⁾で行った。なお、大豆に感受性を示す患者の血清は岡山県下のアレルギー専門医の協力で集め、RAST値が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。

N-末端アミノ酸配列分析

たん白質を2次元電気泳動で分離し、PVDF膜に電気泳動的に転写後、イムノブロットにより染色される位置に対応するPVDF膜上のたん白質のN末端アミノ酸配列分析を行った。分析はApplied Biosystem 473型アミノ酸シーケンサーを用いて行った。

結果と考察

23 kDaペプチドに対するモノクローナル抗体の作製

23 kDaペプチドを大腸菌で発現させ、これをマウスに腹腔内免疫し、2種類のハイブリドーマを作製した。それらのハイブリドーマから産生する抗体の重鎖はいずれも γ 1に属していた。また、それらの軽鎖は κ であった。

登熟中の大豆種子において発現するGly m Bd 28Kおよび23 kDaペプチドの同定

登熟中の大豆種子（白獅子，タキイ種苗株式会社，京都市）を採取し、20 mM Tris-bufferにて種子中のたん白質を抽出した。抽出たん白質をImmobiline pH 3.0~10を用いて等電点電気泳動を行い、次いでSDS-PAGEにて2次元的に電気泳動を行った。Fig. 1Aに示したように、大豆たん白質の分離について、2次元電

気泳動は良好な分離パターンを示した。同様にして、2次元電気泳動後、ゲル上のたん白質をニトロセルロース膜に転写し、23 kDaペプチドおよびGly m Bd 28Kに対するモノクローナル抗体、それぞれ1G4とC5を用いてイムノブロットを行った。

Fig. 1BとCに示したように、23 kDaペプチドおよびGly m Bd 28Kに対するたん白質バンドは互いに異なる位置に認められた。前報⁴⁾で報告したように、Gly m Bd 28Kは2次元電気泳動において複数のバンドを与えることが示された。また、23 kDaペプチドに対するイムノブロットのパターンも複数のバンドが出現した。これらのたん白質バンドを切り出し、N末端アミノ酸配列分析した結果、Fig. 2に示したように、いずれもKDTAGSPASYNLYDDKKADFの配列を示し、これら複数のバンドは同じたん白質から生成したartifactであることが示唆される⁴⁾。すなわち、電気泳動中に、lysineなどのアミノ基のcarbamylationか、または、asparagineおよびglutamineの脱アミド化に伴う等電点の変化によるためと考えられる。

Fig. 3に示したように、決定されたアミノ酸配列はGly m Bd 28Kの前駆たん白質におけるLys267-Phe473の配列に相当することが明らかになった。この事実は前駆たん白質のシグナルペプチドが除去された後、そのプロプロテインがAsn266のカルボキシル側で切断を受け、Gly m Bd 28Kと23 kDaペプチドが生成することを示すものである。

登熟大豆種子におけるGly m Bd 28Kおよび23 kDaペプチドの局在

Gly m Bd 28Kおよび23 kDaペプチドが大豆種子のどの部位に存在するのかを明らかにする目的で、登熟中の大豆種子の組織切片を作製し、金コロイド法にて組織におけるこれらのたん白質の分布について検討した。その結果、Fig. 4に示したように、Gly m Bd 28Kはプロテインボディーの内部に局在することが明らかになった。また、23 kDaペプチドもGly m Bd 28Kと同様な分布パターンを示した。これらの結果は、Gly m Bd 28Kのプレプロプロテインと高い相同性を示すカボチャ種子におけるMP27/MP32がプロテインボディーの膜たん白質として膜上に存在するという事実と異なるものである⁵⁾。このことは、これらアレルゲンがカボチャ種子におけるたん白質とは異なる生理機能を有していること、すなわち、貯蔵たん白質として機能していることを示唆するものと思われる。しかし、これらたん白質の生理機能については、さらに詳細に検討しなければならない。

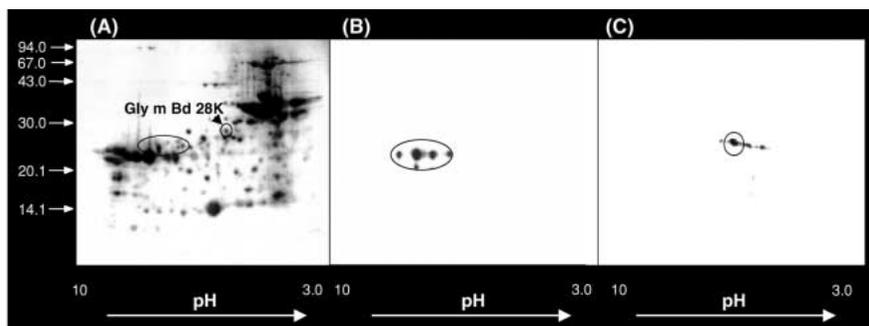


Fig. 1. SDS-PAGE of proteins in growing soybean seeds (A) and its immunoblots with the mAbs against the 23 kDa peptide (B) and Gly m Bd 28K (C). Proteins in growing soybean seeds were subjected to SDS-PAGE as described in the text. The proteins on the gel were electroblotted onto nitrocellulose membranes. The membranes were immunoblotted with the mAb (1G4) against the 23 kDa peptide and the mAb (C5) against Gly m Bd 28K.

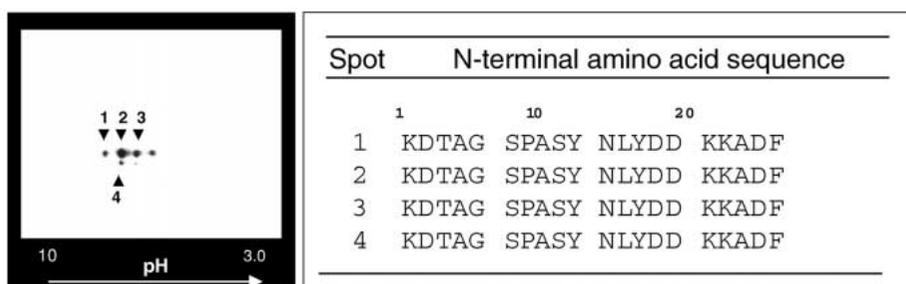


Fig. 2. N-terminal amino acid sequencing of the proteins immunoblotted with the mAb (1G4) against the 23 kDa peptide. The left panel shows an immunoblotting pattern obtained in the same manner as described in the footnote of Fig. 1B. The proteins electroblotted onto a PVDF membrane corresponding to the bands numbered in the panel were cut out and subjected to N-terminal amino acid sequencing. The right panel represents the N-terminal amino acid sequences of the proteins.

```

1: 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 K S P K S L F L M S
-----
41: N S T R V F K T D A G E M R V L K S H G G R I F Y R H M H I G F I S M E P K S L
81: F V P Q Y L D S N L 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
121: 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 L G L E T F Q S F Y
161: I G G G A N S H S V L S G F E P A I L E T A F N E S R T V V E E I F S K E L D G
201: P I M F V D D S H A 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
241: 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 G S P A S Y N L Y D
281: D K K A D F K N A Y G W S K A L H G G E Y P P L S E P D I G V L L V K L S A G S
321: M L A P H V N P I S 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
361: 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 P S T S A R K N K P Q F L A
401: G A A S L L R T L M G P E L S A A F G V S E D T L R R A V D A Q H E A V I L P S
441: A W A A P P E N A G K L K M E E E P N A I R S F A N D V V M D V F

```

Fig. 3. Amino acid sequence of the precursor of Gly m Bd 28K. The dotted line represents a signal peptide. The underlined sequence shows the sequence determined as described in the footnote of Fig. 2.

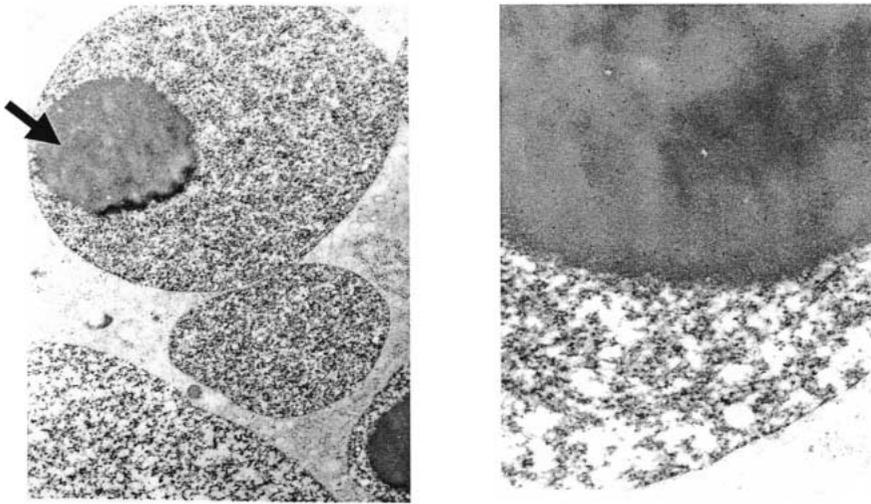


Fig. 4. Immunogold labelling analysis for Gly m Bd 28K in growing soybean seeds. The analysis was done in the same manner as described in Ref. 5. The arrow represents a protein body in a cell of growing soybean seeds. Left panel, 10,500-fold magnification; right panel, 30,000-fold magnification.

要 約

大豆主要アレルゲンGly m Bd 28KのプレプロプロテインがGly m Bd 28Kおよび23 kDaペプチドに代謝されることについて検討した。23 kDaペプチドを検出するために、それをコードするDNAを組み込んだ発現ベクターを構築して、大腸菌にて本たん白質を発現させ、マウスにて免疫して、本たん白質に特異的なモノクローナル抗体を作製した。本抗体ならびにGly m Bd 28Kに対するモノクローナル抗体を用いて、登熟中の大豆種子にGly m Bd 28Kと23 kDaペプチドが存在することを認めた。さらに、これらのたん白質はプロテインボディーの内部に局在することが明らかになった。

文 献

- 1) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Okajima H, Nishikawa K and Sasaoka K (1991) : Investigation of the IgE-binding proteins in soybean by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J Nutr Sci Vitaminol*, **37**, 555-565.
- 2) Tsuji H, Hiemori M, Kimoto M, Yamashita H, Kobatake R, Adachi T, Fukuda T, Bando N, Okita M and Utsumi S (2001) : Cloning of cDNA encoding a soybean allergen, Gly m Bd 28K. *Biochim Biophys Acta*, **1518**, 178-182.
- 3) 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.
- 4) Tsuji H, Bando N, Hiemori M, Yamanishi R, Kimoto M, Nishikawa K and Ogawa T (1997) : Purification and characterization of a soybean allergen, Gly m Bd 28K. *Biosci Biotech Biochem*, **61**, 942-947.
- 5) 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.