

# 大豆種子貯蔵糖たん白質に結合する糖鎖抗原と アレルギー疾患との相関解析

木村吉伸\*

岡山大学農学部

## Correlational Analysis of Allergy and Antigenic *N*-Glycans Linked to Soybean Storage Glycoproteins

Yoshinobu KIMURA

Faculty of Agriculture, Okayama University, Okayama 700-8530

### ABSTRACT

Recently many glycoproteinous allergens (glycoallergens) have been identified from plant food or pollens. In many cases, such glycoallergens bear plant complex type *N*-glycans, which have  $\beta$ 1-2 xylose and/or  $\alpha$ 1-3 fucose and show strong antigenicity against mammals. However, correlation of intakes of such antigenic *N*-glycans and allergy symptoms remains to be understood. In this report, the author describes (1) structural analysis of *N*-glycans linked to the storage glycoprotein in soybean, showing that the plant complex type *N*-glycans (Man3Xyl1Fuc1-0GlcNAc2; 5%) are linked to some soybean glycoproteins, (2) structural feature of free *N*-glycans in soybean seedlings, showing that the plant complex type free *N*-glycan occurs at the concentration of about 100 pmol/g of fresh weight of hypocotyl, and (3) allergenicity of the antigenic *N*-glycans prepared from soybean glycoproteins from the view point of IgE-binding to the *N*-glycans, showing that the plant complex type *N*-glycans can not be major epitope for IgE in sera of pollinosis patients. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 63-67, 2002.

Key words : soybean storage glycoprotein, soybean seedling, antigenic *N*-glycan, IgE binding, inhibition ELISA

近年、植物性食品や花粉から種々の糖たん白質性のアレルギーが同定されてきているが、それらのアレルギーには $\beta$ 1-2キシロースおよび $\alpha$ 1-3フコース含有のアスパラギン結合型糖鎖 (*N*-グリカン) が結合する場合が多い<sup>1)7)</sup>。そして、植物複合型構造とよばれるこれ

らのキシロース・フコース含有*N*-グリカンが強力な抗原性を有することも明らかになってきた。実際、植物複合型糖鎖に対するIgG抗体は容易に調製することが可能であり、このタイプの*N*-グリカンを有する糖たん白質に対して調製した抗血清が、ポリペプチド鎖構造は全く異なるものの同タイプの糖鎖を持つ糖たん白質を鋭敏に認識することは、植物複合型*N*-グリカンが強

\*〒700-8530 岡山市津島中1-1-1

力な抗原性を有することを物語っている<sup>8)</sup>。しかしながら、この抗原性N-グリカンとアレルギー疾患（花粉症・小麦粉喘息）発症との相関については未だ不明な点が多い。事実、小麦粉喘息患者あるいは花粉症患者のIgEが植物複合型N-グリカンを有する糖ペプチドに結合することから、その糖鎖抗原がアレルギー疾患の発症に関係すると主張する研究グループと<sup>2,3,5-7)</sup>、糖鎖自身はIgE結合に直接関与しないと主張する研究グループが存在し<sup>9,10)</sup>、糖鎖抗原とアレルギー疾患との相関には不確定要素が多分に残されている。それ故、抗原性N-グリカンの摂取とアレルギー疾患発症との因果関係を明らかにするためには、抗原性糖鎖部分の構造とアレルギー患者のIgEに対する結合性との詳細な相関解析がなお必要と思われる。

そこで本研究では、大豆種子貯蔵糖たん白質を始めとして、種々の糖たん白質性アレルゲンに結合する抗原性N-グリカンとアレルギー疾患との相関を明らかにする目的で、(1)植物種子糖たん白質に結合するN-グリカンあるいは大豆実生（大豆モヤシ）中に存在する遊離N-グリカンの構造特性、(2)糖たん白質性アレルゲンとIgEとの結合に対する抗原性N-グリカンの阻害活性について解析を行った。

## 方 法

### 大豆種子貯蔵糖たん白質および大豆実生胚軸からの蛍光標識N-グリカンの調製、精製、構造解析

大豆種子のアセトン脱脂粉末から、0.5 M NaClを含むトリス緩衝液（pH 8.5）により貯蔵糖たん白質を抽出し、遠心分離後、その上清から硫酸塩析（100%飽和）により糖たん白質を回収した。凍結乾燥標品からヒド

ラジン分解、N-アセチル化、ピリジリアミノ化により蛍光標識糖鎖を調製した<sup>11)</sup>。一方、大豆実生胚軸に存在する遊離型N-グリカンについては、N-グリカン遊離酵素が作用しないpH条件（トリス緩衝液、pH 8.5）で胚軸を破碎後、抽出液の透析外液から、イオン交換およびゲルろ過によりオリゴ糖鎖を調製した。得られたオリゴ糖鎖を2-アミノピリジンで蛍光標識した。蛍光標識糖鎖混合物から各々のPA-糖鎖を、逆相およびサイズ排阻クロマトグラフィーにより単一精製した<sup>12)</sup>。PA-糖鎖の構造については、ESI-MS、MS/MS、エキソグリコシダーゼ分解、部分アセトリシス、および500 MHz <sup>1</sup>H-NMRにより決定した。

### 植物複合型糖鎖（Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2）のIgE結合性

大豆種子アレルゲン（Gly m Bd 28K）に結合すると考えられる植物複合型糖鎖のアレルゲン性については、この植物複合型糖鎖がIgEエпитープとなりうるかについての観点から、スギ花粉アレルゲン（Cry j 1）、花粉症患者血清（Cry j 1特異的IgE抗体）および遊離型N-グリカンを使用したInhibition ELISA法によって解析した。

## 結果と考察

### 大豆種子貯蔵糖たん白質に結合するN-グリカンの構造特性

大豆種子貯蔵糖たん白質に結合するN-グリカンの95%以上が典型的なハイマンノース型構造（Man9-5GlcNAc2）を有しており、その中でもMan8GlcNAc2（28.8%）とMan6GlcNAc2（36.1%）が主要構造であった（Fig. 1）。これら一連のハイマンノース型糖鎖は、

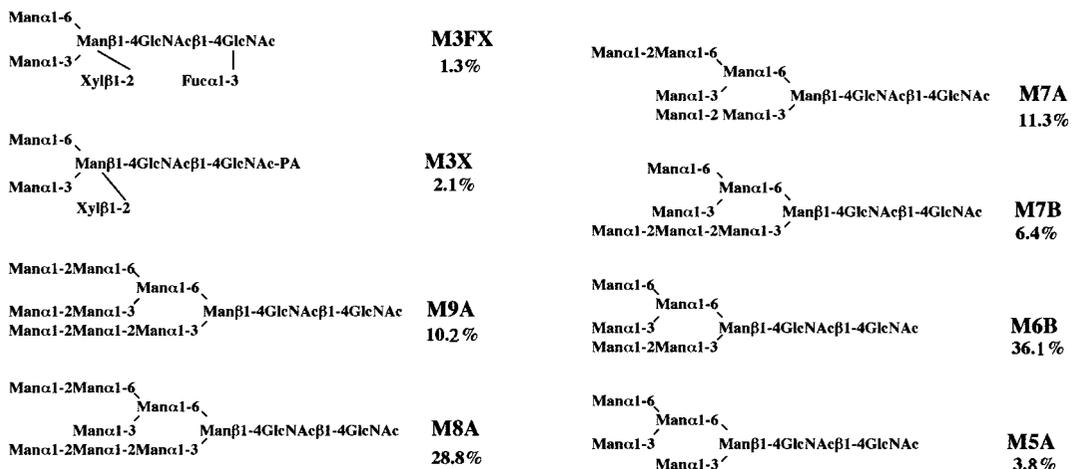


Fig. 1. Structures of N-glycans linked to storage glycoproteins in soybean seeds.

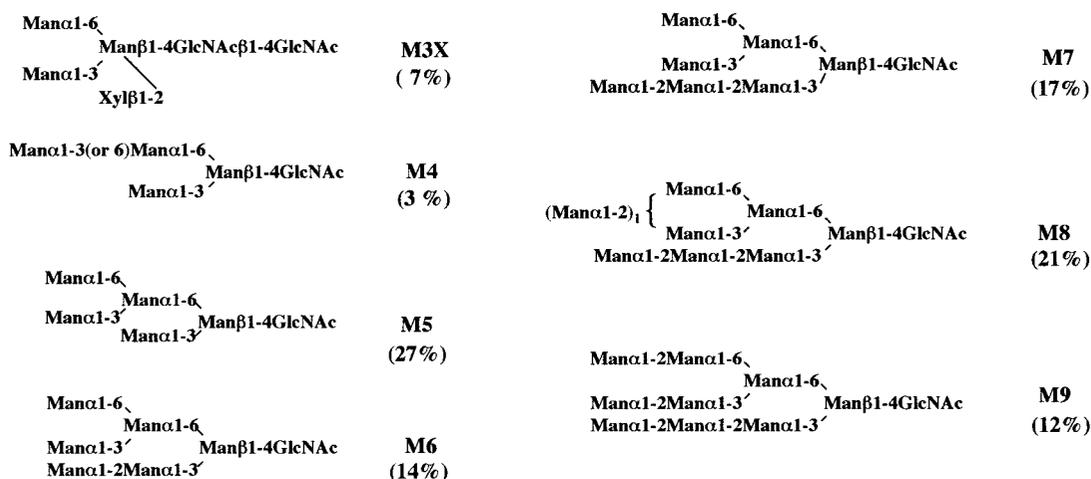


Fig. 2. Structures of free *N*-glycans in hypocotyl of soybean seedling.

大豆アグルチニン (SBA)<sup>13)</sup>あるいは7S大豆グロブリン<sup>13)</sup>に結合しているものと考えられる。一方、抗原性を示す植物複合型糖鎖については2種の構造 (Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2とMan3Xyl1GlcNAc2) が同定されたが、それらの存在量は全*N*-グリカンの5%程度を占めるに過ぎなかった。しかしながら、大豆種子たん白質の主要アレルゲンの一つであるGly m Bd 28Kは糖たん白質であり、そしてその組成分析データからキシロースおよびフコース含有の*N*-グリカンが結合することが推定されている<sup>4)</sup>。現在のところ、Gly m Bd 28Kに結合する*N*-グリカンの詳細な化学構造は不明であるが、今回の我々の分析結果を考え合わせると、大豆種子アレルゲンにはMan3Xyl1Fuc1GlcNAc2構造が結合すると思われる。

#### 大豆実生胚軸中存在する遊離*N*-グリカンの構造特性

既に筆者らは、エンドウ実生胚軸、登熟種子、伸長中の根茎等、分化・成長中の植物細胞中に遊離型*N*-グリカンが遍在することを報告しているが<sup>14)</sup>、大豆実生胚軸にもマイクロモル濃度で遊離型*N*-グリカンが存在することを明らかにした (Fig. 2)。大豆実生胚軸中に存在する遊離型*N*-グリカンの主要構造はハイマンノース型構造であるが、これらの遊離*N*-グリカンは還元末端側にGlcNAcを1残基のみ有する構造である。このことは、これらハイマンノース型遊離*N*-グリカンがエンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (エンドグリコシダーゼ) により生成したことを示唆しており、既に我々が大豆種子から精製・キャラクタライズしているエンドグリコシダーゼ (endo-GM) の基質特異性からも説明できる<sup>15)</sup>。一般に、植物細胞由来のエンドグリコシダーゼは、Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-3Man $\beta$ 1-構造ユニッ

トを有するハイマンノース型糖鎖に強い活性を示す。一方、大豆実生胚軸中に存在する植物複合型遊離*N*-グリカン (Man3Xyl1GlcNAc2) は、全遊離*N*-グリカンの7% (106 pmol/g fresh weight) を占めるに過ぎないが、食材である実生胚軸 (大豆モヤシ) にも抗原性*N*-グリカンが存在することを明らかにした。複合型遊離*N*-グリカンは還元末端にキトビオースユニット (GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc) を有するが、この構造特性は、このタイプの遊離糖鎖がグリコアミダーゼ (ペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase)) により生成したことを示唆するものである。大豆種子中に存在するグリコアミダーゼ (PNGase-GM) については、我々は既に本酵素を単一精製後、その基質特異性を明らかにしている<sup>16)</sup>。

以上のように、大豆実生胚軸中には2種類の遊離型*N*-グリカンが存在し、ハイマンノース型糖鎖はendo-GMにより、植物複合型糖鎖はPNGase-GMにより生成することが明らかとなった。

#### 植物複合型糖鎖 (Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2) のIgE結合性

近年、花粉・植物性食品中に存在する糖たん白質性アレルゲンに結合する*N*-グリカンが免疫系に対して多彩な作用を及ぼすことが知られるようになってきている。糖たん白質性アレルゲンを構成する糖鎖のなかにはIgE認識に関与するものが知られ、さらに糖鎖がCrossreactive Carbohydrate Determinant (CCD) として非病的な共通抗原性に関与することも報告されて来ている。そこで、大豆種子アレルゲン (Gly m Bd 28K) に結合すると考えられる糖鎖 (Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2; M3FX) あるいはスギ花粉アレルゲン (Cry j 1) に結

合する主要糖鎖 (GlcNAc2Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2; GN2M3FX) それ自身が、直接IgE認識に関与するか否かを解析した。大豆種子アレルゲン患者の血清が入手困難であったため、スギ花粉症患者 (40名) の血清を使用し、血清中のCry j 1特異的IgE抗体価をCaptured ELISAにより測定した後、大豆種子貯蔵糖たん白質等から調製した遊離型N-グリカンインヒビターとして用い、Inhibition ELISAによりIgE結合性を解析した。インヒビターとして遊離型糖鎖を30 nM, 300 nM, および3000 nM加えた場合、すなわち反応液におけるCry j 1構成糖鎖と遊離型糖鎖の比率が約1 : 1, 約1 : 10, 約1 : 100とした場合におけるIgEのCry j 1に対する結合性の変化をFig. 3に示す。いずれの濃度においても、非抗原性N-グリカンであるハイマンノース型糖鎖 (Man9GlcNAc2; M9A) での場合と比較して、Cry j 1構成糖鎖であるGN2M3FXおよびM3FXのいずれを添加しても結合性の低下は観察されなかった。この結果は、全体としてみればCry j 1あるいはGly m Bd 28Kを構成する植物複合型糖鎖はメジャーなIgEエピトープにはならないことを示唆するものであった。

しかしながら、個々の症例についてIgE結合性の変化を観察すると、多くの症例では抗原性糖鎖を添加してもM9Aを加えた場合と同様の結合性を示すが、症例によってはGN2M3FXとM3FXのどちらか一方あるいは両者の添加によって結合性が低下することが分かった。対照糖鎖であるM9Aに比較して20%以上結合性が低下した場合を抑制ありと仮定すると、9名 (22.5%) の患者でCry j 1構成糖鎖の添加によってIgEのCry j 1に対する結合が抑制された。即ち、これらの患者では糖鎖がマイナーなIgEエピトープとなっている可能性が示された。

## 要 約

大豆種子貯蔵糖たん白質に結合するN-グリカンの約95%がハイマンノース型構造を有しており、抗原性を示す植物複合型糖鎖 (Man3Xyl1Fuc1-0GlcNAc2) の存在量は5%程度であった。大豆種子主要アレルゲンの一つであるGly m Bd 28Kには、キシロース・フコースの存在が報告されていることから、Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2 (M3FX) 構造が結合すると考えられる。更に、大豆実生胚軸 (大豆モヤシ) 中にも、遊離型の糖鎖抗原 (Man3Xyl1GlcNAc2) の存在が確認された。次に、これら抗原性糖鎖がアレルギー患者IgEの直接のエピトープとなり得るか否かを明らかにするために、アレルギー患者IgEとアレルゲンとの結合に対する遊離型抗原性糖鎖の阻害活性について調べた。その結果、遊離型の植物複合型糖鎖は抗原性を有さない典型的なハイマンノース型糖鎖同様、アレルゲン (Cry j 1) -IgE 結合に対して顕著な阻害活性を示さないことが明らかになった。

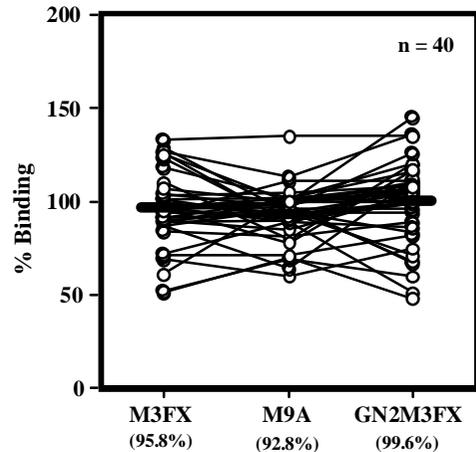


Fig. 3. Inhibition assay of free N-glycans against the specific binding of Japanese cedar pollen allergen (Cry j 1) to IgE of pollinosis patients. M3FX, Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2-PA; M9A, Man9GlcNAc2-PA; GN2M3FX, GlcNAc2Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2-PA. The numbers in parentheses show the average percentage of specific binding of Cry j 1 to IgE.

以上のように、大豆種子アレルゲンあるいはスギ花粉アレルゲンに結合する植物複合型 (抗原性) N-グリカンは、IgE結合に直接関与することによりアレルギー疾患を誘発する主要因子ではないと考えられる。

**謝辞** 遊離型N-グリカンを使用してのInhibition ELISA解析については、岡山大学 大学院医歯学総合研究科 岡野光博 博士との共同研究によるものである。

## 文 献

- 1) Yasuda H, Yui Y, Shimizu T and Shida T (1983) : Isolation and partial characterization of major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J Allergy Clin Immunol*, **71**, 77-86.
- 2) Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Chrispeels M J, Armentia A, Salcedo G and Gomez L (1996) : Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology*, **6**, 471-477.
- 3) Ohsuga H, Su S-N, Takahashi N, Yang S-Y, Nakagawa H, Shimada I, Arata Y and Lee Y C (1996) : The carbohydrate moiety of the bermuda grass antigen BG60. *J Biol Chem*, **271**, 26653-26658.
- 4) Tsuji H, Bando N, Hiemori M, Yamanishi R, Kimoto M, Nishikawa K and Ogawa T (1997) : Purification and characterization of soybean allergen Gly m Bd 28K. *Biosci Biotechnol Biochem*, **61**, 942-947.
- 5) Fötisch K, Altman F, Hausteiner D and Vieths S (1999) : Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*, **120**, 30-42.
- 6) Reindl J, Anliker MD, Karamloo F, Vieths S and Wüthrich B (2000) : Allergy caused by ingestion of zucchini (*Cucurbita pepo*) : Characterization of allergens and cross-reactivity to pollen and other foods. *J Allergy Clin Immunol*, **106**, 379-385.
- 7) van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkeraas J, Milazzo J-P, Loutelier-Bourhis C, Rayon C, Villalba M, Koppelman S, Aalberse R, Rodriguez R, Faye L and Lerouge P (2000) :  $\beta$ (1, 2)-Xylose and  $\alpha$ (1, 3) fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem*, **276**, 11451-11458.
- 8) Laurière M, Laurière C, Chrispeels MJ, Johnson KD and Sturm A (1989) : Characterization of a xylose-specific antiserum that reacts with the complex asparagine-linked glycans of extracellular and vacuolar glycoproteins. *Plant Physiol*, **90**, 1182-1188.
- 9) Hijikata A, Matsumoto I, Kojima K and Ogawa H (1994) : Antigenicity of the oligosaccharide moiety of the Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergen Cry j I. *Int Arch Allergy Immunol*, **105**, 198-202.
- 10) Ogawa H, Hijikata A, Amano M, Kojima K, Fukushima H, Ishizuka I, Kurihara Y and Matsumoto I (1996) : Structures and contribution of the antigenicity of oligosaccharides of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergen Cry j I : relationship between the structures of and antigenic epitopes of plant N-linked complex-type glycans. *Glycoconjugate J*, **13**, 555-566.
- 11) Kimura Y, Ohno A and Takagi S (1996) : Structural elucidation of N-linked sugar chains of storage glycoproteins in mature pea (*Pisum sativum*) seeds by ion-spray tandem mass spectrometry (IS-MS/MS). *Biosci Biotechnol Biochem*, **60**, 1841-1850.
- 12) Kimura Y, Takagi S and Shiraishi T (1997) : Occurrence of free N-glycans in pea (*Pisum sativum*. L) seedlings. *Biosci Biotechnol Biochem*, **61**, 924-926.
- 13) Neeser J-R, Vedovo SD, Mutsaers JHGM and Vliegenthart JFG (1985) : Structural analysis of the carbohydrate chains of legume storage proteins by 500-MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy. *Glycoconjugate J*, **2**, 355-364.
- 14) Kimura Y (2000) : Structural features of free N-glycans occurring in developing or growing plant cells and functional features of plant endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase. *Trends Glycosci Glycotechnol*, **12**, 103-112.
- 15) Kimura Y, Tokuda T, Ohno A, Tanaka H and Ishiguro Y (1998) : Enzymatic properties of endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from developing tomato fruits and soybean seeds : substrate specificity of plant origin endoglycosidase. *Biochim Biophys Acta*, **1381**, 27-36.
- 16) Kimura Y and Ohno A (1998) : A new peptide-N<sup>4</sup>-(acetyl- $\beta$ -glucosaminyl) asparagineamidase from soybean (*Glycine max*) seeds : Purification and substrate specificity. *Biosci Biotechnol Biochem*, **62**, 412-418.