

# 大豆を中心とする植物性食品素材のアレルゲン性はストレス負荷に依存するか

小川 正\*<sup>1</sup>・森山達哉<sup>1</sup>・野村紀子<sup>2</sup>・高橋浩司<sup>3</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院農学研究科 <sup>2</sup>太陽化学株式会社中央研究所

<sup>3</sup>独立行政法人農業技術研究機構豆類育種学研究室

## Chemical Treatment of Plants May Activate Defense Mechanisms and Increase Allergenicity

Tadashi OGAWA<sup>1</sup>, Tatsuya MORIYAMA<sup>1</sup>, Noriko NOMURA<sup>2</sup>  
and Koji TAKAHASHI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 611-0011

<sup>2</sup>Taiyo Chemical Co., Mie 510-0844

<sup>3</sup>National Agriculture Research Center, Ibaraki 305-8517

### ABSTRACT

Many plant allergenic proteins have been isolated and identified as pathogenesis-related proteins. They are produced when biological, chemical, and physical stresses activate defense mechanisms of plants. These defense proteins are thought to play an important role in pathogen resistance, and some defense-related proteins are significant cross-reactive allergens. Accordingly, the allergenicity of plant foods may depend on the growth conditions of plants or given stress activating defense mechanisms. Using turnips and soybeans, we measured the allergenicity of these model food plants after treatments activating their defense mechanisms to determine whether the allergen content of these plants increase. On immunoblotting profiles, IgE-binding protein bands were found to increase in both turnip and soybean treated chemically, and the allergenicity given as total ELISA values were also increased in the stress-given plant samples. These results demonstrated that activating defense mechanism of plants may increase their allergenicity. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 22-28, 2003.

Key words : plant, soybean, allergen, allergenicity, pathogenesis-related proteins, chemical stress

---

\*〒611-0011 宇治市五ヶ庄

ここ数年の食物アレルギーに関する厚生労働省の調査の結果を観察すると、国民の食生活習慣の変化を反映して、アレルギー惹起食品の種類が欧米化に向かっていることが伺えると同時に、事実、ピーナッツ、果物、野菜などの食品によるアレルギー患者の増加が注目されるようになった<sup>1)</sup>。また、医療・食品加工、給食業務の関係者の間で深刻な職業病として問題となっている「ラテックス（ゴム手袋）アレルギー患者がアボガドやリンゴやバナナなどの果物に対してアレルギーを起こす「天然ゴム-果物症候群（Latex-fruits syndrome）」に陥ることや、野菜類のジャガイモ、トマト、ニンジンのアレルゲンたん白質とも交差反応することが明らかにされ関心をよんでいる<sup>2)</sup>。また、シラカバの花粉が原因の花粉症を惹起するアレルゲンたん白質（Bet v 1）も多くの果物アレルゲンたん白質と高い相同性を有することが立証され、免疫交差性を有する共通アレルゲンが広く植物界に分布することは明白な事実となりつつある。また一方では、植物病理学研究者によって、植物界に普遍的に存在あるいは誘導されることが知られるようになった「感染特異的たん白質（病原抵抗応答性あるいはストレス応答性たん白質）：pathogenesis related proteins (PR-P) あるいは defence protein (DP)」（Table 1）の仲間にアレルゲンたん白質分子と相同たん白質が次々と見いだされ、植物由来アレルゲンたん白質間に共通点の存在がうかがい上げてきた<sup>3)</sup>。このようにPR-Pがアレルゲンの有力な候補になるということは、野菜や果物を傷つけ、腐らせたり、化学薬品で処理したり、物理的なストレスを与えた環境で栽培した後、収穫した場合アレルゲン性、すなわちアレルゲンたん白質成分の含量が増加することを意味している。最近、野菜や果物を自然な環境で農薬や化学肥料を与えないで栽培する自然有機農法が推奨されている。この場合、ストレスの少ない従来の温室栽培による野菜と、ストレスに晒される露地栽培物とはアレルゲン性と言う観点からは、従来の健全性の概念とは異なる複雑な問題を提起することに

なる。従って、本研究では、二十日大根と大豆をモデル植物として、人為的にストレスを負荷したときのアレルゲン性に対する影響を検討した。大豆の場合、主要アレルゲンGly m Bd 30Kは、Jiらによって、大豆特異的感染微生物、*Pseudomonas syringae*の産生するエリシター、syringolideのレセプターとして機能していることが報告されている<sup>4)</sup>。また最近では、レセプターとして第二メッセンジャー的に植物の光呼吸に関与するNADH依存性ヒドロキシピルビン酸還元酵素の活性を制御する働きがあることが見いだされ、本たん白質の発現はストレス依存性PR-Pとの関連の可能性が強く示唆されている<sup>5)</sup>。本実験では化学物質（微生物感染時のエリシター効果を持つ物質あるいは除草剤など）の投与による化学ストレスを負荷し、アレルゲンたん白質の変動を検討した。

## 方 法

### 実験材料

二十日大根 (*Brassica rapa*) は品種赤丸二十日大根を北海道アタリヤ農園より購入したもの、大豆 (*Glycine max*) は (独) 農業技術研究機構より恵与された5品種タチユタカ、ズズカリ、ズズユタカ、タチナガハ、ユメミノリを実験に供した。

### 患者血清

患者血清は、インフォームドコンセントの実施された成人患者の血清を国際試薬（東京）より購入したものおよび大豆にてアナフラキシーを経験した幼児より提供された血清を使用した。成人患者のアレルギー履歴は、RAST法による診断で大豆をはじめコムギ、ジャガイモ、トマト、パセリなど多くの植物性食品素材に反応することが知られているもののなかから、二十日大根、大豆のたん白質成分を認識するIgE抗体を保有する血清を実験に供した。

Table 1. Pathogenesis-related protein and related allergens

| Class | Mol. mass (kDa) | Characteristics/Assignment                       | Plants                      |
|-------|-----------------|--|-----------------------------|
| PR-2  | 25-35           | Anti-fungi/class I II III $\beta$ -1,3-glucanase | Banana                      |
| PR-3  | 25-35           | Anti-fungi/class I II IV chitinase               | Avocado, banana             |
| PR-4  | 13-19           | Anti-fungi/class I II chitinase                  | Latex                       |
| PR-5  | 22-24           | Anti-fungi/thaumatococin-like protein            | Cherry, pepper              |
| PR-8  | 28              | Class III chitinase                              | Latex, hevamin              |
| PR-9  | 39-40           | Peroxidase isoenzymes                            | Tomato                      |
| PR-10 | 17-18           | RNase/Bet v 1 homologue                          | Birch pollen, celery, apple |
| PR-14 | 10-12           | Lipid transfer proteins (nsLTP)                  | Apple, soybean, wheat       |

## 大豆アレルゲンGly m Bd 30K特異的単クローン抗体 (F5 mAb)

抗体は、マウス由来F5 mAb産生ハイブリドーマを用いて前報<sup>6)</sup>に従って調製した。

### 二十日大根の栽培とストレス負荷

**栽培条件** 二十日大根は大学構内温室において、予めオートクレーブ殺菌したパーミキュライト：パーライト＝1：1の混合土を培地とするプランターを用い、オスバン殺菌した種子を直播きし、シロイズナズナの室内栽培法<sup>7)</sup>に準じて栽培した。養分として1,000倍希釈ハイポネックスを週一度の割合で施肥した。温室内栽培温度：27℃～8℃（平均18℃）日照：167時間（30日間）

**ストレス負荷条件** ストレス負荷は化学物質、サリチル酸（salicylic acid: SA）の葉面塗布により行った。栽培70日後の成熟結球した二十日大根葉に、それぞれ1 mMおよび25 mMサリチル酸溶液を、一日一回、一週間にわたり本葉の両面にスプレー塗布し、80日目に収穫した。

### 大豆の栽培条件とストレス負荷

大豆各種子は、Scheme 1に示す栽培計画に従って（独）農業技術研究機構実験圃場に直播し、完全登熟まで栽培して収穫した。ストレス負荷はScheme 1に示す登熟過程で化学物質として除草剤、ペンタゾンの葉面散布法にて実施した。ストレス負荷栽培実験は2区画において同一条件で実施した（Exp. 1およびExp. 2）。

#### Scheme 1

播種：平成15年7月4日（8月10～11日開花）

ストレス処理化学物質：ペンタゾン/市販除草剤ザバグラン溶液（ペンタゾン濃度40%）

ストレス処理条件：

- ・実験1 (T-1) 8月21日（開花後1週間）2,000倍希釈液・30リットル/a；9月5日（開花後3週間再散布）1,000倍希釈液・30リットル/a（2度散布）
- ・実験2 (T-2) 9月5日（開花後3週間）500倍希釈液・30リットル/a（1度散布）

### 分析試料の調製

**二十日大根** 収穫した二十日大根は葉部・根部とも水洗後新鮮重の4倍量の抽出Buffer A（30 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 mM EDTA）にて、ポリトロンホモゲナイザー（レベル3）により3分間ホモゲナイズした後、2重のコットンガーゼで濾過後、12,000 rpm, 4℃, 20分遠心分離を行って上澄みを回収し、70%硫酸沈殿画分を同上の遠心分離条件で回収した。これを抽出Buffer Aに溶解し、同bufferで透析後SDS-PAGE用サ

ンプルとした。

**大豆** 一夜水浸漬した大豆種子を5倍量の抽出Buffer Aでポリトロンホモゲナイザーにてホモゲナイズしたのち、二重ガーゼで濾過し、濾液の少量（100～200 mL）を2倍濃度SDS-PAGEサンプルBufferと等量混合し、加熱（100℃）後、不溶物は遠心除去し、後述のSDS-PAGEに用いた。

### ソディウム・ドデシル硫酸-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGEはLaemmliらの改良法<sup>8)</sup>にしたがって実施した。二十日大根試料の場合1レーン20 μg、大豆の場合は1レーン当たり1 μgを泳動後、分離したたん白質の染色は、Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) により実施した。

### イムノプロット

イムノプロットは既報<sup>9)</sup>に従い実施した。SDS-PAGE後のサンプルをニトロセルロース膜上に転写し、患者血清を用いた免疫染色では、HRP標識抗ヒトIgE抗体により、F5マウスmAbではHRP標識抗マウスIgG抗体でそれぞれ発色検出を実施し、膜をAmersham Pharmacia社製のECL Westernblotting Detection Reagentsで処理し、オートラディオグラフィ用X線フィルムに露光感光させ検出した。

### ELISAによる総アレルゲンの測定

96穴マイクロタイタープレートの各ウエルに、大豆の場合総たん白質量2.5 μg/well（100 μL Buffer A）を、二十日大根の場合1 μg/wellを4℃1晩放置でコートした。これに患者血清、あるいはF5抗体を処理し、結合した抗体をHRP標識抗ヒトIgE抗体、あるいは抗マウスIgG抗体を用いて免疫染色した後、TMB Micro Well Peroxidase Substrate Systemを用いて一定時間発色した後、マイクロプレートリーダーにて450 nmの吸光度を測定した。

### デンストグラムによるアレルゲンたん白質の定量的測定

イムノプロットによりX線フィルム上に得られた免疫染色されたたん白質バンドの強弱は、それぞれのバンドを画像解析ソフトにより正確に切り出し、積分してIDV (integrated density value) として数値化した後、バンドの変動を比較した。また、NIH Image 1.61によりデンストグラムを作製し、各ピークの面積を、クロマトグラフィーで汎用される半値幅法 $S=1/2 hw$ により算出し、数値化した（S, 面積；h, ピーク高；w, ピーク高1/2におけるピーク幅）。

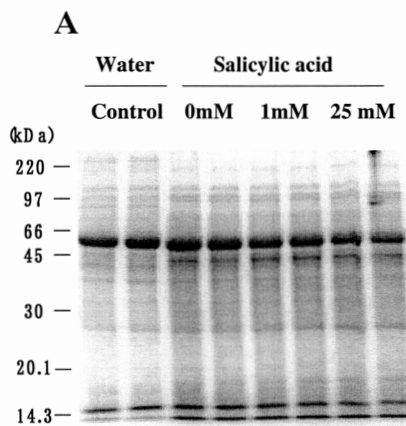


Fig. 1A. Changes in protein contents by treatment activating defense mechanism. Experimental details for SDS-PAGE and the stress-treatment are described in the text.

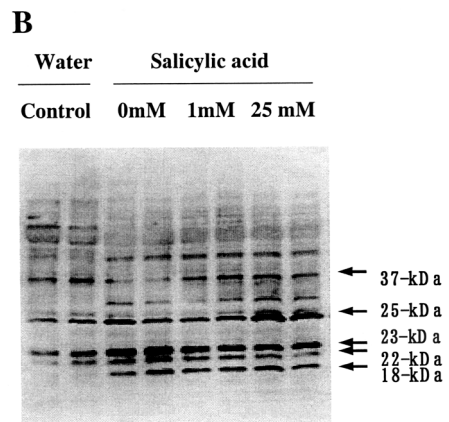


Fig. 1B. Changes in allergenicity by treatment activating defense mechanism. Experimental details for immunoblot are described in the Materials and Methods. Allergenicity is defined to be allergen contents as described in the text.

## 結果と考察

### 二十日大根におけるIgE結合性たん白質とストレス負荷による変動

二十日大根はSAストレス処理前後において見かけ上成育状況における差は観察されなかった。Fig. 1Aに示されるSDS-PAGEの結果より、ストレス処理によるたん白質成分の増減は見かけ上観察されなかった。しかし、Fig. 1Bが示すように、患者血清は18, 22, 23, 25, 37 kDa付近の各たん白質バンドを強く認識し、更に、SA負荷後の免疫染色の各バンドの挙動は、デンストグラムにより解析した結果、25および37 kDaたん白質において染色強度が増加、即ちアレルゲンたん白質の増加を、一方、18, 22および23 kDa各成分に関して減少する傾向が観察された。SA非処理のコントロールのバンド強度を1として、増減をそれとの比で示した結果がTable 2である。25および37 kDaたん白質成分は、25 mMのSA処理で、アレルゲン含量に約2倍の増加が観察された。同様に、ELISAによってIgE結合たん白質量の総量の変化を測定したのがFig. 2である。本患者にとって、コントロール（非ストレス栽培）に比べて1および25 mM SAストレス負荷二十日大根中のたん白質のIgE結合量、すなわち総アレルゲン性は増加したことを意味している。実際は、免疫プロットで示されたように、ストレス負荷によって一部で増加、一部で減少するアレルゲン成分もあり、ELISAでの反応性の強弱は必ずしも真のアレルゲン性を反映しているとは言い難い。患者によって認識する

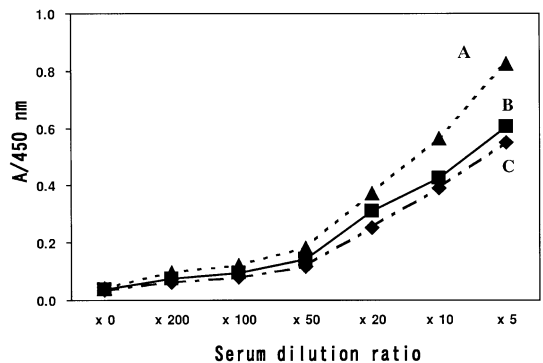


Fig. 2. Changes in allergenicity of Tachiyutaka by treatment activating defense mechanism. Allergenicity measured by ELISA using patient's serum. Experimental details for ELISA are described in the Materials and Methods A, in the case of chemical stress with 25 mM SA; B, in the case of chemical stress with 1 mM SA; C, in the case of chemical stress without SA as a control.

Table 2. Changes in allergenicity by treatment activating defense mechanism

| IgE-binding protein (kDa) | Changes in allergenicity |           |
|---------------------------|--------------------------|-----------|
|                           | 1 mM SA*                 | 25 mM SA* |
| 37                        | 1.98                     | 2.09 ↑    |
| 25                        | 1.11                     | 2.24 ↑    |
| 23                        | 0.68                     | 0.63 ↓    |
| 22                        | 0.53                     | 0.39 ↓    |
| 18                        | 0.62                     | 0.78 ↓    |

\*Stress was given by salicylic acid (SA) administration. Values are represented by a ratio to control as 1.

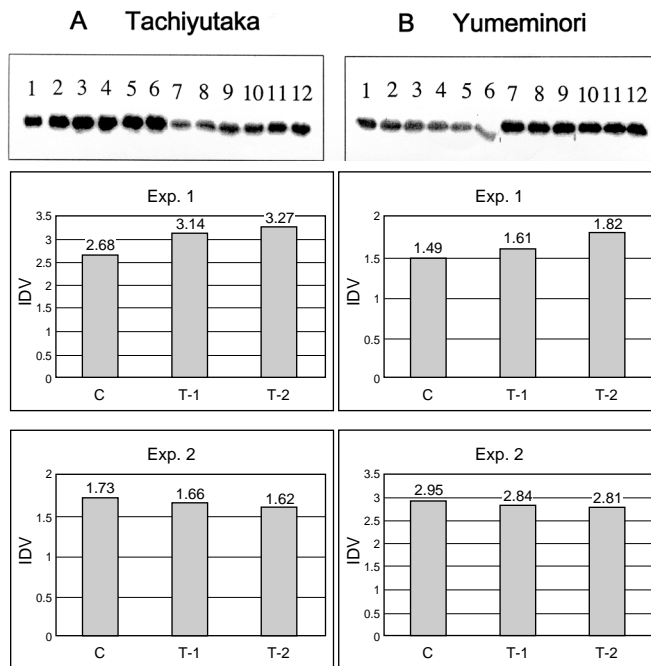


Fig. 3. Immunoblot patterns and densitograms measured with F5 mAb raised against Gly m Bd 30K. Experimental details for immunoblot are described in the Materials and Methods. A, Tachiyutaka; B, Yumeminori; Lane 1-6, Experiment 1; lane 7-12, Experiment 2; Lane 1·4·7·10, control; lane 2·5·8·11, T-1; lane 3·6·9·12, T-2.

たん白質が異なることから、それぞれの患者に対するアレルギー性は、イムプロットによる免疫染色レーンの認識たん白質の個々のデントグラムのプロフィールによって判定されなければならない。同様な結果はA-R. Haenninenら<sup>10)</sup>によっても二十日大根について報告されており、ストレス負荷によるアレルギーたん白質の増加は立証されたといえる。また、ストレス負荷前に既に認識たん白質が存在するのは、これらの多くが一般に構成たん白質として植物体に発現しているからである。予備的に37 kDaたん白質はSDS-PAGE後のイムプロットのコリアウトを切り出し、前報<sup>11)</sup>で示したN-末端アミノ酸配列解析法を用いて決定した結果を、コンピューターによるデータベース検索を行ったところ、37 kDaたん白質は植物において広く分布するグルタチオンS-トランスフェラーゼと相同たん白質と推定された(未発表データ)。

#### 大豆における主要アレルギーGly m Bd 30K (Gm30K) および総アレルギー量のストレス負荷による変動

**F5モノクローナル抗体を用いたGm30Kの変動解析** 除草剤散布によるストレス負荷に伴う大豆抽出液中のGm30Kの変動をF5抗体を用いたイムプロットで追跡した。Fig. 3はタチユタカおよびユメミノリに関するイムプロットのパターンを示し、Table 3はそれ

Table 3. Changes in allergenicity by treatment with chemical stress

| Allergen     | Changes in allergenicity (Protein contents) |      |        |      |
|--------------|---|------|--------|------|
|              | Exp. 1                                      |      | Exp. 2 |      |
|              | T-1   | T-2  | T-1    | T-2  |
| Gly m Bd 30K |   |      |        |      |
| Tachiyutaka  | 1.17  | 1.22 | 1.08   | 1.21 |
| Yumeminori   | 0.95  | 0.93 | 0.96   | 0.98 |

Values are represented by a ratio to control as 1. Experimental conditions of T-1 and T-2 were described in the Materials and Methods.

Table 4. Changes in allergenicity by treatment activating defense mechanism

| Allergen     | Changes in allergenicity (Protein contents) |
|--------------|---|
|              | T-1 (Exp. 1)                                |
| Gly m Bd 30K |   |
| Tachiyutaka  | 1.11  |
| Suzukari     | 1.15  |
| Suzuyutaka   | 2.05  |
| Tachinagaha  | 1.16  |

Values are represented by a ratio to control as 1. Experimental conditions are described in the Materials and Methods.

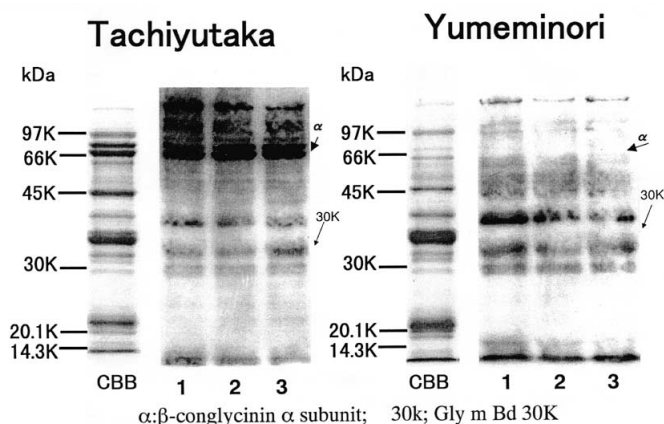


Fig. 4. Changes in allergenicity by treatment activating defense mechanism. Immunoblot was obtained using patient's serum. A, Tachiyutaka; B, Yumeminori. Lane CBB, protein stained by CBB; lane 2, T-1; lane 3, T-2.

らをIDV数値化した結果を示している。SAによるストレス負荷で、タチユタカの子葉中のGm30Kは少しではあるが増加する傾向を示した。一方でβ-コングリシニンのα-サブユニットを欠失する低アレルゲン品種ユメミノリにおいてはGm30Kアレルゲンが減少することが観察された。Table 4はユメミノリ以外の大豆制品種についてELISAによるアレルゲン性の増加を検討した結果である。イムノプロットの結果を裏付ける様にアレルゲン性の増加する傾向を示した。

**患者血清により評価したアレルゲン性の変動** Fig. 4は、大豆加工食品の摂取によってアナフィラキシーを経験した患者の血清を用いたイムノプロットの結果である。多くのたん白質成分が血清中のIgE抗体により認識されている。デンストグラムにより解析すると、Table 5に明らかなごとくタチユタカにおいてβ-コングリシニンのαサブユニットおよびGm30Kがコントロールに比して増加していることを示した。特にGm30Kの変動は、F5抗体によって測定した結果と一

Table 5. Changes in allegenicity by treatment activating defense mechanism

| IgE-binding protein (allergen) | Changes in allergenicity (protein contents) |      |
|--------------------------------|---|------|
|                                | T-1   | T-2  |
| β-Conglycinin α subunit        | 1.08  | 1.16 |
| Gly m Bd 30K                   | 1.19  | 1.48 |

Values are represented by a ratio to control as 1. Experimental conditions, T-1 and T-2 are described in Materials and methods.

致する。一方、ユメミノリのイムノプロットはβ-コングリシニンのαサブユニットの欠失を示し、患者血清によるバンドの免疫染色像は全く観察されない。一般に既成概念として、子葉などの貯蔵組織におけるたん白質成分の含量のストレス依存性は一般的に認められないとされているが、今回の実験において増加が観察された。

## 要 約

大豆をはじめ植物性食品素材中のアレルゲンたん白質成分が単離・同定され、その多くが植物の防御機構として知られる、感染特異的たん白質に属するたん白質であることが明らかにされている。従って、植物性食品素材のアレルゲン性は、これら感染特異的たん白質の増減する栽培条件、すなわちストレス負荷の大小に依存する可能性が示唆される。本実験では、モデル植物として二十日大根と大豆を用い、化学的ストレス負荷によって患者血清中のIgE抗体結合性たん白質の含量が変化するかどうかをELISA法とイムノプロット法を用いて検討した。その結果、二十日大根においては2, 3の成分(25kDa, 37kDaたん白質成分)が、大豆においては主要アレルゲン、Gly m Bd 30Kが、ストレス負荷によって増加する事実を立証し、ストレス負荷がアレルゲン性の強弱に影響を及ぼすことを明らかにした。

## 文 献

- 1) 飯倉 他 (1998): 平成9年度厚生省食物アレルギー対策委員会報告.
- 2) Sicherer SH (2000): Clinical implications of cross reactive food allergens. *Allergy*, **108**, 881-890.
- 3) Hoffman-Sommergruber K (2000): Plant allergens and pathogenesis-related proteins. *Int Arch Allergy Immunol*, **122**, 155-166.
- 4) Ji C, Boyd C, Slaymaker D, Okinaka Y, Takeuchi Y, Midland SL, Sims JJ, Herman E and Keen N (1998): Characterization of a 34-kDa soybean binding protein for the syringolide elicitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 3306-3311.
- 5) Okinaka Y, Yang CC, Herman E, Kinney A and Keen NT (2002): The P34 syringolide elicitor interacts with a soybean photorespiration enzyme NADH-dependent hydroxypyruvate reductase, *Mol Plant Microb Interact*, **15**, 1213-1218.
- 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 Vitamoinol*, **39**, 389-397.
- 7) 島本 巧, 岡田清孝監修 (1998): 新版モデル植物の実験プロトコールー遺伝学的手法からゲノム解析までー, 植物細胞工学シリーズ, 細胞工学別冊 秀潤社 (東京)
- 8) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 9) Hiemori M, Bando N, Ogawa T, Shimada H, Tsuji H, Yamanishi R and Terao J (2000): Occurrence of IgE antibody-recognizing N-linked glycan moiety of a soybean allergen, Gly m Bd 28K. *Int Arch Allergy Immunol*, **122**, 238-245.
- 10) Haenninen A-R, Mikkola J, Kalkkinen N, Turjanmaa K, Ylitaro L, Reunala T and Palosuo T (1999): Increased allergen production in turnip (*Brassica rapa*) by treatment activating defense mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*, **104**, 194-201.
- 11) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Nishikawa K and Kitamura K (1996): Identification of soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34kDa oil-body associated protein. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 1030-1033.