

# 大豆たん白質7Sおよび11Sグロブリン画分のズブチリシン・カールスベルグによる消化性と凝集性の比較およびアレルゲン *Gly m Bd 30K* の関与

井上國世\*

京都大学大学院農学研究科

## Comparison between Soyprotein 7S and 11S Globulins and Involvement of the Allergen *Gly m Bd 30K* in the Proteolysis and Coagulation of Soyprotein Induced by Subtilisin Carlsberg

Kuniyo INOUE

Graduate School of Agriculture, Kyoto University Kyoto 606-8502

### ABSTRACT

We have previously reported that coagula were formed uniquely during the hydrolysis of SPI (Fujipro R) by subtilisin Carlsberg, and examined the reaction mechanism of this coagulation. In this study, we found that the heat-treatment of SPI at 70-96°C for 30 min was needed for the coagulation. The highest coagulation rate and the highest amount of the coagula were obtained by the treatment at 80°C. 7S and 11S globulins also coagulate only when they were treated at > 70°C before the SC hydrolysis. It is suggested that 7S and 11S globulins (and/or their proteolytic fragments) are cooperatively involved in the SPI coagulation. The allergen *Gly m Bd 30K* must be hydrolyzed by SC promptly and completely into small peptides, and immunoreactive fragments of the allergen are not detected in the coagula and soluble fraction of the SC-treated SPI. Accordingly, it is considered that the allergen cannot be involved in the coagulation. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 58-61, 2006.

Key words : allergen, coagulation, proteolysis, soyprotein, subtilisin Carlsberg

われわれは、分離大豆たん白質 (SPI) を各種のプロテアーゼで処理すると、強固な凝集物が形成されることを報告した<sup>1)</sup>。この凝集物形成に伴う濁度変化 (OD<sub>660</sub>) は、反応液の遠心分離で得られた凝集物量変化によく対応した (Fig. 1, 2を参照)。このことから、濁度変化を用いる凝集物形成反応解析法を提案した<sup>1)</sup>。

濁度変化とSDS-PAGEを併用することにより、SPIの加水分解と凝集物形成との関係を解析できる<sup>2)</sup>。種々のプロテアーゼを検討したところ、ズブチリシン・カールスベルグ (subtilisin Carlsberg ; SCと略称) が、凝集物の形成速度と形成量とにおいて最も優れていた。SCにより引き起こされるSPIの濁度変化は、反応初期10~20分で観測される急速な減少 (第1相) と、それに続いて起こり60~80分で飽和に達する緩やかな増

\* 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

大(第2相)の2相からなる。第1相ではSPIは30 kDa以下にまで低分子化されるが、凝集物は形成されない。第2相では16 kDa以下の断片が生じ、これが凝集物を形成することが示された。

本研究の目的は、SPIのSCによる加水分解に伴う凝集物形成には7Sグロブリン(7SG)と11Sグロブリン(11SG)のいずれが関与するのか; 7SGと11SGの分解物は単独でも凝集するのか; 両者が共存しないと凝集しないのか; 凝集に支配的な役割を果たすペプチドはなにか; さらに、*Gly m Bd 30K*の分解は凝集に関与するのかについて検討し、プロテアーゼ処理に伴い生じるSPIの凝集物形成反応を分子レベルでより詳細に解析することである。

## 方 法

### SPI, 7Sグロブリン(7SG), 11Sグロブリン(11SG)およびプロテアーゼ

フジプロR(不二製油製)に標準緩衝液(0.05%  $\text{NaN}_3$ 含有20 mMリン酸緩衝液, pH 8.0)を40 mg/mLになるように加え、25°Cで3時間攪拌後、Whatman No. 41濾紙で濾過しSPI溶液とした。フジプロRは加熱処理されており、非加熱SPI(nSPI)と区別して、fSPIとよぶ。また、nSPIを加熱処理したものをhSPIとよぶ。nSPIは脱脂大豆粉(不二製油製)からTsumuraらの方法<sup>3)</sup>に従い調製した。SDS-PAGEから、nSPIとfSPIが同等のたん白質組成をもつことを確認した。7SGと11SGは脱脂大豆粉からNaganoらの方法<sup>4)</sup>に従い調製した。SDS-PAGEから、調製した7SGは主に $\beta$ -コングリシニン、11SGは主にグリシニンから構成されていることを確認した。これらをn7SGおよびn11SG、加熱処理したものをそれぞれh7SG、h11SGとよぶ。たん白質濃度はウシ血清アルブミンを標準たん白質としてLowry法で求めた。ズブチリシン・カールスベルグ(SC, Sigma Lot 112k1327)は、標準緩衝液で調製し、活性は、pH 8.0, 37°Cにおけるカゼイン分解活性より求めた<sup>5)</sup>。

### SDS-PAGEおよびイムノブロットング解析

SDS-PAGEはLaemmli法<sup>6)</sup>に従って実施した<sup>1,2)</sup>。泳動後、ゲルはたん白質のCBB染色またはPVDF膜に転写しイムノブロットングに使用した。イムノブロットングはOgawaらの方法<sup>7)</sup>に準じて行なった。抗*Gly m Bd 30K*マウスIgGモノクローナル抗体は小川 正教授から恵与された。PVDF膜をECL<sup>TM</sup> Western Blotting 検出試薬(Amersham)で処理後、X線フィルム上で感光させ*Gly m Bd 30K*を検出した。

### SPI, 7Sおよび11Sグロブリンの凝集物形成に対する加熱処理の効果

SPI, 7SGおよび11SGの10 mg/mL(各5 mL)溶液を標準緩衝液(pH 8.0, 37°C)で調製した。水中10分間保存後、50, 60, 70, 80, 90, 98°Cで30分間加熱し、ついで37°Cで10分間保存した。非加熱試料を水中10分間保存後、37°Cで10分間静置したものを対照とした。溶液を取り出し、分光光度計のセル内で、SC(最終濃度1.0  $\mu\text{M}$ )を加え、 $\text{OD}_{660}$ を連続測定した。また、酵素反応溶液を所定の反応時間後に分取し、SDS-PAGEに供した。また、遠心分離で上清と沈殿に分離し、それぞれSDS-PAGEに供した。

## 結果と考察

### SPIの凝集物形成に対するSPIの加熱処理の効果

fSPIのSC処理に伴い濁度変化と凝集物形成が観測された(Fig. 1, 2)。

一方、nSPIでは、fSPIとは全く異なる結果が得られた(Fig. 3)。nSPI溶液は、fSPI溶液と同様、固有の濁度( $\text{OD}_{660}=0.4$ )を有するが、これは反応時間5分以内に完全に消失し、それ以降120分間ゼロのままであった。すなわち、nSPIの反応は、fSPIの第1相のみで完了した。120分間酵素反応でも、nSPIはほとんど分解されないが、80 kDaと50 kDaの $\beta$ -コングリシニン、35 kDaと20 kDaのグリシニンは消失した。このことから、nSPIの固有の濁度( $\text{OD}_{660}=0.4$ )はこれらのたん白質が凝集したものであり、これらの加水分解により濁度が消失したと考えられる。一方、80°Cで30分間処

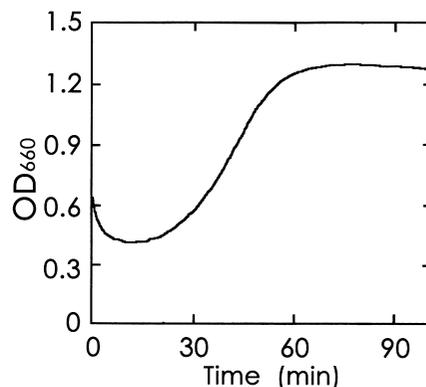


Fig. 1. Change in turbidity of Fujipro R SPI (fSPI) solution treated by subtilisin Carlsberg. [SPI] = 10 mg/mL and [subtilisin Carlsberg] = 1.0  $\mu\text{M}$  at pH 8.0 and 37°C. The turbidity change was measured by the change in  $\text{OD}_{660}$ .

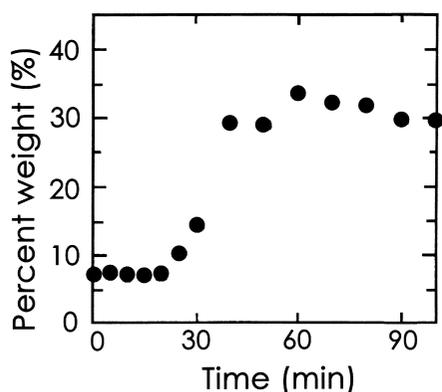


Fig. 2. Change of the amount of precipitates formed in the Fujipro R SPI (fSPI) solution in the reaction with subtilisin Carlsberg. The reaction conditions were the same as those described in Fig. 1. The precipitates were prepared by centrifugation (10,000 x g, 1 min) of the SPI solution taken out at the enzyme-reaction times indicated, and were dried *in vacuo* at 37°C with a centrifugal evaporator. The weight of the precipitates was measured by a chemical balance.

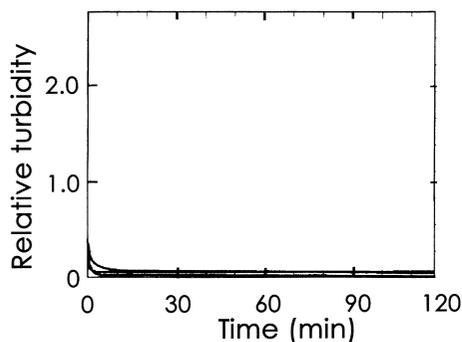


Fig. 3. Changes in turbidity of native (non-heat-treated) SPI, 7S globulin and 11S globulin in the reaction with subtilisin Carlsberg. The relative turbidity is drawn on the vertical axis. The maximum turbidity of the SPI solution obtained at 60 min is set to 1.0 of the relative turbidity (see Fig. 4). The reaction conditions are described in the experimental procedures. The three reaction curves are essentially the same by considering the errors in the measurement.

理したSPI (80hSPI) をSC処理するとfSPIの場合 (Fig. 1) と同様の濁度変化が観測された。第1相は20分、第2相は60分で終了し、最大濁度の1/2に到達する時間 ( $t_{1/2}$ ) は、35~40分であり、fSPIとほぼ同じ結果であった。fSPIでは最大濁度が1.1であったが、

80hSPIでは0.7であり、80hSPIの凝集物形成量はfSPIの場合の65%であった。SPIのSC処理に伴う凝集物形成には、脱脂大豆より水抽出した豆乳を酸性下で沈殿するたん白質を回収して加水中和した後、殺菌のため施される加熱処理が必須であることが示された。

#### 7SGおよび11SGの凝集物形成に対する加熱処理の効果

n7SGとn11SG (10 mg/mL) は、それぞれ固有の濁度 ( $OD_{660}=0.4$ ) をもつが、ともに酵素反応5分以内に完全に消失した (Fig. 3)。一方、80°Cで30分間処理した7SGと11SG (80h7SG, 80h11SG) では、特徴的な $OD_{660}$ の経時変化が観測された。80h7SGの濁度変化は、全体的に80hSPIの濁度変化に類似しているが、第1相および第2相への到達時間が遅くなった。80hSPIでは、第1相が20分、第2相が60分で終了するのに対し、80h7SGでは、第1相は40分、第2相は90分で終了した。 $t_{1/2}$ は、80hSPIでは35分、80h7SGでは55分であった。第2相終了時点での最大濁度 ( $OD_{max}$ =最大凝集物形成量) は、80hSPIでは0.7、80h7SGでは0.6であった。一方、80h11SGの濁度は、反応開始後5分以内に急速な増大 (バースト) が見られ、1.8まで増大した。その後、徐々に低下し、120分では0.6にまで減少した。SPI中に含まれる7SGと11SGの割合 (7SG:11SG) の混合比率は1:1ないし1:2であり、両者の濁度変化が相加的であれば80h11SGのバーストが80hSPIの第1相でも観測されるはずであるが、全く観測されなかった。このことから、80h11SGのバーストで生じた凝集物は、80h7SG (あるいはこれの分解物) の共存下に溶解することを意味している。反応時間30分以降のSPIの濁度変化はほぼ7SGと11SGの濁度変化の相和であり、80h7SGの第2相における凝集物形成は80h11SG (あるいはこれの分解物) により促進されることが示された。

#### SPI, 7SGおよび11SGの凝集物形成に対する加熱処理温度の効果

前記のとおり、SCによるSPI, 7SGおよび11SGの加水分解に伴う凝集物形成には予めたん白質を80°Cで30分間加熱することが必要である。ここでは各種加熱温度の凝集物形成に対する効果を比較した。SPI, 7SG, 11SGいずれも、50および60°Cで加熱処理したときの濁度経時変化は、非加熱SPI, 7SG, 11SGの場合と同様、第1相の濁度低下のみで完了した。70, 90, 96°Cで処理したときには、いずれのたん白質でも、80°C処理で観測されたのと同様の経時変化が観測された。SPIは、検討した温度のなかでは80°Cのときに最も早く第2相に到達し、最大濁度 ( $OD_{max}$ ) も最も大きかった。第2相に到達する時間は80, 90, 96, 70°Cの順

で増大し、この順でOD<sub>max</sub>は減少した。70℃では、凝集物形成速度は80℃に比べて1.5倍以上遅く、最大凝集物形成量は70%に低下した。7SGでは、第2相に到達する時間は80, 90, 70, 96℃の順で増大し、OD<sub>max</sub>は同じ順で減少した。96℃の凝集物形成速度は80℃に比べて3倍以上遅かった。11SGの場合、いずれの温度でも反応初期5分以内に濁度のバーストが観測された。濁度最大値は80, 96, 90, 70℃の順で減少し、70℃のときの値は80℃のときの値に比べて1/2であった。SPIの凝集物形成には、7SGと11SG、およびそれらの分解物が相互に関与すること、7SGと11SGから生じた断片が独立に凝集物を形成するのではないことが示唆された。

#### Gly m Bd 30Kの分解

80hSPIのイムノプロットングでは、30 kDaにGly m Bd 30Kが検出されたが、120分間の酵素処理により完全に消失した。この酵素処理SPIの上清画分および

沈殿画分にもGly m Bd 30Kは検出されなかった。本研究のGly m Bd 30K検出感度は5 ngすなわち8 nMである。出発のSPI溶液には全たん白質量の1%すなわち3 μMのGly m Bd 30Kが含まれていたと考えられ、ほぼ全てのGly m Bd 30Kが加水分解されたと考えられる。抗体のペプチド認識は、最低5～6アミノ酸の配列の認識でなされるが、Gly m Bd 30Kはこれ以下のサイズにまで分解されたと考えられる。抗体反応性の断片が凝集物中に見出せなかったことから、これらが凝集に直接関与する可能性は低い。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、小川正先生、森山達哉先生、井川清先生、中野幹生氏、浅岡浩平氏から多大の支援を得ました。御礼申し上げます。

## 要 約

SPI (フジプロR) をSCで処理すると加水分解に伴い凝集物が形成する。今回、この凝集物形成には、SPIを予め70℃以上で30分間加熱することが不可欠であることが示された。7SGおよび11SGも加熱処理した場合のみSC処理により凝集物が形成された。さらに、SPIの凝集物形成には、両グロブリンあるいはその分解断片の相互作用が関与する可能性が示唆された。Gly m Bd 30Kは速やかに分解され、凝集には関与しないと考えられた。

## 文 献

- 1) Inouye K, Nagai K and Takita T (2002): Coagulation of soy protein isolates induced by subtilisin Carlsberg. *J Agric Food Chem*, **50**, 1237-1242.
- 2) Nagai K, Inouye K (2004): Insights into the reaction mechanism of the coagulation of soy protein isolates induced by subtilisin Carlsberg. *J Agric Food Chem*, **52**, 4921-4927.
- 3) Tsumura K, Saito T, Kugimiya W and Inouye K (2004): Selective proteolysis of the glycinin and β-conglycinin fractions in a soy protein isolate by pepsin and papain with controlled pH and temperature. *J Food Sci*, **69**, C363-367.
- 4) Nagano T, Mori H and Nishinari K (1994): Relationship between rheological properties and conformational states of 7S globulin from soybeans at acidic pH. In: Food Hydrocolloids: Structure, Properties, and Functions. Nishinari K and Doi E, eds., Plenum Press, New York, pp. 355-360.
- 5) Markland FS Jr and Smith EL (1971): Subtilisins: primary structure, chemical and physical properties. In: The Enzymes, 3rd Edition. Boyer, PD, ed. Vol. III, Academic Press, New York, pp. 561-608.
- 6) Laemmli, UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 7) Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Kitamura K, Zhu Y, Hirano H and Nishikawa K (1993): Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci Biotechnol Biochem*, **57**, 1030-1033.