

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：33939

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700810

研究課題名(和文)大豆アレルゲンを特異的に分解する酵素の開発

研究課題名(英文)Researches in enzymes which digest allergic proteins of soybean

研究代表者

間崎 剛 (MASAKI, Takeshi)

名古屋学芸大学・管理栄養学部・講師

研究者番号：10387912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ダイズの主要なアレルゲンタンパク質(β-コングリシニンのα-サブユニット、Gly m Bd 28K、Gly m Bd 30K)がダイズの発芽・生育にともなって減少することを明らかにした。さらに、ダイズの芽生え個体から調製した可溶性タンパク質溶液を一定の環境に保持することで、Gly m Bd 28Kが試験管内においても減少することを発見した。また、その可溶性タンパク質溶液にアスパラギン酸プロテアーゼに対する阻害剤を添加するとGly m Bd 28Kの減少が見られなかったことから、Gly m Bd 28Kの分解にはアスパラギン酸プロテアーゼが関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We revealed that three major allergic proteins (alpha-subunit of beta-conglycinin, Gly m Bd 28K, Gly m Bd 30K) of soybean decrease remarkably under soybean seed germination or soybean seedling growth. Although alpha-subunit of beta-conglycinin and Gly m Bd 28K have disappeared until 5days after imbibition, Gly m Bd 30K started to decrease since 14days after imbibition. It shows that Gly m Bd 30K is degraded by another protease from that degrade alpha-subunit of beta-conglycinin and Gly m Bd 28K. In addition, Gly m Bd 28K in solution prepared from soybean seedlings decreased when its solution was incubated. Such in vitro decrease of Gly m Bd 28K was disturbed by addition of aspartic protease inhibitor. It indicates that some kind of aspartic protease degrade Gly m Bd 28K.

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：アレルギー・ぜんそく 蛋白質 酵素 植物 食品 ダイズ 発芽 プロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ダイズ種子(大豆)は、東アジア諸国において古くから食されている子実食糧である。これらの地域で主食とされているイネの種子(米)と大豆とを比較すると、大豆にはリジン、必須脂肪酸、ミネラルが豊富に含まれていることがわかる。したがって、これらの地域の人々にとって大豆は、主食の欠点を補う理想的な副食であることがわかる。

(2) ダイズ種子に含まれる物質の約 35% (乾燥重量あたり) を占める大豆タンパク質は、血中脂質の低下作用や脂肪燃焼作用、血圧降下作用といった有用な生理機能を持つ。そのため、大豆タンパク質は生活習慣病の予防や改善を目的とした特定保健用食品の製造に用いられている。さらに、大豆タンパク質は保水性や加熱ゲル形成性、乳化性といった優れた加工特性も示す。このことから、大豆タンパク質は品質の向上や安定化が求められる食肉・水産物加工食品および冷凍・冷蔵食品の製造にも頻用されている。

(3) 一部の大豆タンパク質は、食物アレルギーを誘発するアレルゲンである。実際に、大豆タンパク質にアレルギー反応を示す大豆アレルギー患者は、日本人の三千人に一人におよぶと概算されている。それらの大豆アレルギー患者は、大豆タンパク質の栄養価値や生理機能の恩恵に浴することができないだけでなく、大豆タンパク質が多岐にわたる加工食品の製造に用いられていることから、極めて困難な食生活を強いられている。

(4) 大豆アレルギー患者の血清を用いた免疫学的調査の結果、ダイズ種子に含まれる -コングリシニンの -サブユニット、Gly m Bd 28K、Gly m Bd 30K といったタンパク質が主要な大豆アレルゲンであることが明らかとなった。これら大豆アレルゲンは、加熱処理や消化酵素に対する抵抗性が高い。そのため、大豆アレルゲンは豆腐や湯葉、きなこといった加工食品中にも残存している。それらを除く(低減化)する方法としてこれまでに、その物理化学的な性質を利用して除去するいくつかの方法(アルカリ・酸処理、塩析、高圧滅菌、限外濾過)が開発されている。しかし、それらの方法を実際の食品製造の現場に適用するためには、大規模な設備投資が要求され、煩雑な作業工程も必要となる。また、枯草菌に由来するプロテアーゼを用いた低アレルゲン化方法も報告されているが、その方法ではアレルゲン以外の蛋白質の低分子化も招くため、大豆タンパク質の生理機能や加工特性が損なわれてしまう。以上のように、大豆アレルゲンだけを簡便に除去する方法は、未だに開発されていない。

## 2. 研究の目的

(1) 植物種子に貯蔵されているタンパク質

は、発芽時に発現・活性化するプロテアーゼにより分解され、それにより生成するアミノ酸が芽生えの生長に必要なタンパク質や窒素化合物の原材料となる。マメ科種子の貯蔵タンパク質を分解するプロテアーゼとしてこれまでに、多くのものが単離・精製されている。そして、それらは種子の発芽時に活性化して、グロブリン類を主とする主要な種子貯蔵タンパク質を分解することも、明らかにされている。

(2) 大豆タンパク質の 90% 以上を占めるグロブリン類に対して、Gly m Bd 28K や Gly m Bd 30K といった大豆アレルゲンは 1% にも満たない微量成分である。また、それらのアレルゲンとグロブリン類のアミノ酸配列には、相同性も見られない。したがって、グロブリン類が芽生え個体の生長を支える窒素源として種子に蓄えられているのに対して、アレルゲンは単なる窒素源以外の役割を果たしているものと考えられる。このことから、Gly m Bd 28K や Gly m Bd 30K といったアレルゲンには、これまでに報告されているグロブリン類を基質とするプロテアーゼとは異なる未知のプロテアーゼが作用する可能性が高いと考えられた。

(3) 以上のことから、Gly m Bd 28K や Gly m Bd 30K といったアレルゲンに作用するであろうダイズ内在性のプロテアーゼは、グロブリン類には作用しないと予測される。したがって、このプロテアーゼを実用化して食品の製造・加工過程に適用することで、大豆タンパク質の有用性を保持したままアレルゲンだけが選択的に除去できるようになると考えられた。そこで我々は、Gly m Bd 28K や Gly m Bd 30K を特異的に分解するダイズ内在性プロテアーゼの単離・精製と遺伝子の同定を目指すこととした。本研究では、ダイズの発芽・生長にともなって大豆アレルゲンがどのような内在性プロテアーゼにより分解されるのかを明らかにすることとした。

## 3. 研究の方法

(1) ダイズの発芽・生長にともなうアレルゲンの挙動変化を調査するために、25℃、暗条件下に設定した人工気象機内でダイズを発芽・生育させた。そして、様々な生育日数のダイズ芽生え個体を回収して、それらの個体からタンパク質を抽出した。得られたタンパク質溶液に含まれるタンパク質を SDS-PAGE 法により分子量ごとに分離した後、3つの主要な大豆アレルゲン(-コングリシニンの -サブユニット、Gly m Bd 28K、Gly m Bd 30K) に対する特異抗体を用いたイムノブロット法にて、大豆アレルゲンを検出した。

(2) (1) の実験において観察されたダイズの発芽・生長にともなう Gly m Bd 28K の

減少が、ダイズ内在性プロテアーゼが触媒する酵素反応によるものであることを確かめるために、以下の実験を行った。まず、播種後4日目のダイズ芽生え個体から温和な条件下で可溶性タンパク質溶液を調製した。そして、その溶液を30℃に保持(インキュベート)して、インキュベート後の溶液に含まれるGly m Bd 28KをSDS-PAGE法と特異抗体を用いたイムノブロット法にて検出した。その結果を、インキュベートする前の溶液に含まれるGly m Bd 28Kの量と比較することで、溶液中にGly m Bd 28Kを分解するプロテアーゼが存在するかどうかを確認した。

(3) 植物種子が発芽する際には、様々なタイプのプロテアーゼ(アスパラギン酸プロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ)が貯蔵タンパク質の分解に寄与することが知られている。本実験では、Gly m Bd 28Kを分解するプロテアーゼがどのタイプに属するものであるかを特定するために、ダイズ芽生え個体から調製した可溶性タンパク質溶液に種々のプロテアーゼ阻害剤を添加して、インキュベートを行った。この実験により、インキュベートの最中に観察されるGly m Bd 28Kの減少に影響を及ぼすプロテアーゼ阻害剤を特定することとした。

#### 4. 研究成果

(1) ダイズの主要なアレルゲンのうち、 $\beta$ -コングリシニンの $\beta$ -サブユニットとGly m Bd 28Kは、ダイズの播種後3日目から5日目にかけて顕著に減少することが明らかとなった。このことから、それらのアレルゲンを分解するプロテアーゼを単離・精製する際には、播種後3日目から5日目のダイズ芽生え個体を用いることが最良であると示唆された。

一方、Gly m Bd 30Kは播種後14日目から16日目にかけて顕著に減少していた。したがって、Gly m Bd 30Kを分解するプロテアーゼを単離・精製する際には、播種後14日目から16日目のダイズ芽生え個体を用いるべきであると考えられた。

また、上記の結果から、 $\beta$ -コングリシニンの $\beta$ -サブユニットやGly m Bd 28Kを分解するプロテアーゼとは異なるプロテアーゼがGly m Bd 30Kの分解を担っていると示唆された。

(2) 播種後4日経過したダイズ芽生え個体から調製した可溶性タンパク質溶液を30℃に保持したところ、Gly m Bd 28Kの経時的な減少が観察された。

また、その可溶性タンパク質溶液にアジ化ナトリウムを添加してもGly m Bd 28Kの経

時的な減少が観察されたことから、Gly m Bd 28Kの分解は腐敗によるものではないと考えられた。

さらに、その可溶性タンパク質溶液を100℃に加熱した後はGly m Bd 28Kの経時的な減少が観察されなかったことから、Gly m Bd 28Kの分解は酵素触媒反応によるものであると示唆された。

(3) 播種後4日経過したダイズ芽生え個体から調製した可溶性タンパク質溶液にプロテアソーム系のタンパク質分解を阻害する薬剤(MG-132)を添加しても、Gly m Bd 28Kの経時的な減少は観察された。このことから、Gly m Bd 28Kの分解はプロテアソームによるものではなく、プロテアーゼによるものであると示唆された。

そこで次に、ダイズ芽生え個体から調製した可溶性タンパク質溶液に種々のプロテアーゼ阻害剤(ペプスタチンA、ヨード酢酸、EDTA、DFP)を添加して30℃に保持したところ、アスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤であるペプスタチンAを加えた溶液でのみGly m Bd 28Kの減少が観察されなかった。このことから、Gly m Bd 28Kを分解するプロテアーゼはアスパラギン酸プロテアーゼの一種であることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間崎 剛 (MASAKI, Takeshi)  
名古屋学芸大学・管理栄養学部・講師  
研究者番号：10387912

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：