

平成22年 6月10日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19780050  
 研究課題名（和文） ダイズアレルゲンタンパク質の分解制御機構の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of mechanism which regulate degradation of soybean allergens  
 研究代表者  
 間崎 剛（MASAKI TAKESHI）  
 名古屋学芸大学・管理栄養学部・助教  
 研究者番号：10387912

研究成果の概要（和文）：大豆アレルゲン（ $\beta$ -コングリシニンの $\alpha$ -サブユニット、Gly m Bd 30K、Gly m Bd 28K）を分解するダイズ内在性プロテアーゼに関して研究を行った結果、 $\beta$ -コングリシニンの $\alpha$ -サブユニットは発芽後に合成されるプロテアーゼによって分解される可能性、Gly m Bd 30K と Gly m Bd 28K は乾燥種子に貯蔵されているアスパラギン酸プロテアーゼが発芽後に活性化もしくは局在が変化することによって分解される可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We researched the character of soybean proteases which degrade three major allergens ( $\alpha$ -subunit of  $\beta$ -conglycinin, Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K) as soybean germinates and grows. The results suggest that  $\alpha$ -subunit of  $\beta$ -conglycinin is degraded by protease which is synthesized after germination. In addition, it is likely that Gly m Bd 30K and Gly m Bd 28K are degraded by some kind of aspartic protease stored in dry seed, which are activated or altered of localization after germination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

研究分野：植物生理

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学

キーワード：ダイズ（大豆）・発芽・種子貯蔵タンパク質・タンパク質分解・プロテアーゼ・発現制御・植物生理・アレルゲン

## 1. 研究開始当初の背景

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り、これらの地域で主食とされているイネの種子（米）と比較すると、大豆にはリジン、必須脂肪酸、ミネラルが豊富に含まれることから、大豆はこれらの地域の人々にとって主食の欠点を補う理想的な副食であることがわかる。さらに、大豆タンパク質は加工特性においても優れていることから、近年では肉汁の分離防止、食感の改良などを目的として食肉加工品、冷凍食品やチルド食品などに幅広く利用されている。

しかし、大豆には食物アレルギーの原因抗原（アレルゲン）となるタンパク質も多種類含まれており、我が国における食物アレルギー患者の約 2%は大豆が原因食物となっていることも明らかにされている。食物アレルギーの治療の基本は原因食物を除去ないし低減した食事療法を数ヶ月から数年間は続け、耐性獲得の状況に合わせて徐々に緩和させていくことである。しかし、大豆の場合は先に述べた優れた加工特性を活かして種々の製品の製造に幅広く利用されていることから、多くの人々が無意識のうちに大豆タンパク質を口にしている。したがって、大豆アレルギー患者が安心できる食生活を送るために、大豆タンパク質の加工特性を損なうことなく大豆アレルゲンのみを効率よく完全に除去する方法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

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  $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha$ -サブユニット、Gly mBd 30K、Gly mBd 28K 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。これらのタンパク質は、他の食物アレルゲンの場合と同様に、一般の調理加工方法では変成しにくいいため、抗原性を保ったまま種々の大豆加工食品中に見いだされる。

変成しにくいために消化酵素によって分解されにくく、従って体内に吸収された後に異物として認識されやすい大豆アレルゲンを原材料から除去するための試みとして、油膜画分との親和性を利用して除去する方法、塩析により除去する方法の有効性が示されている。しかし、これらの方法は実験室外においては実施することが難しく、大豆アレルゲン以外の有用成分の損失や変性も懸念される。また、微生物由来のタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）による処理にて調製した大豆ペプチドはアレルゲン活性を有さない

との報告もあるが、その物性は大豆タンパク質とはかけ離れているため、従来のような加工食品への利用は難しくなる。さらに、育種改良によりいくつかの大豆アレルゲンを欠失したダイズ品種が得られたものの耐病性や収量に関して劣るとの報告もあり、大豆アレルゲンは種子の登熟や休眠維持、発芽、個体の生長において何らかの役割を担っているとも考えられる。

もし、これらの大豆アレルゲンはダイズの栄養生長期には不要なものであるならば、他の種子貯蔵タンパク質と同様に、ダイズの発芽、生長にともなって大豆アレルゲンは分解され、生じるアミノ酸は窒素源として芽生え個体の生長に利用されると考えられる。種子植物の発芽に関してこれまでになされてきた多くの研究から、植物の芽生え個体に含まれるプロテアーゼの多くは基質に対して高い特異性を示すエンドプロテアーゼであること、その発現時期や活性化方法、局在部位は多様性に富むことが示されている。したがって、植物は要求に応じて特定の種子貯蔵タンパク質を分解する方法を備えており、大豆アレルゲンに対しても特異性の高いプロテアーゼが存在すると考えられる。もし、そのプロテアーゼの発現調節機構や活性化機構、酵素学的諸性質を明らかにすることができれば、大豆タンパク質の物性を損なうことなく大豆アレルゲンのみを特異的に分解できる新奇の低減化方法の開発につながる。そこで我々は、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、さらにそのプロテアーゼの発現、活性化に影響を及ぼす因子を特定することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ダイズの発芽、生長に伴う大豆アレルゲンの挙動変化を調査するために 25°C、暗条件下に設定した人工気象器内で発芽、生育させた様々な生育日数のダイズ芽生え個体からタンパク質を抽出した。そして、得られたタンパク質を SDS-PAGE 法により分子量ごとに分離した後、大豆アレルゲン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大豆アレルゲンの減少が、ダイズの発芽、生長にともなって合成もしくは活性化されるダイズ内在性プロテアーゼによるものであることを確かめるために、様々な生育日数のダイ

ズ芽生え個体から調製したタンパク質溶液を様々な pH に調整して保持（インキュベート）したときの大豆アレルゲンの変動を調査した。

(3) 種子植物の発芽時には、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）が合成、活性化されて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 および、Gly m Bd 30K 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、ダイズ乾燥種子から調製した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溶液をインキュベートしたときの大豆アレルゲンの変動を調査した。

(4) 大豆アレルゲンを分解するプロテアーゼの発現や活性化、局在変化を制御する仕組みを明らかにすることが大豆アレルゲンのみを人為的に減らす方法の開発につながる。そこで、まずは植物ホルモンが大豆アレルゲンの分解機構に及ぼす影響を調査するために、アブジジン酸を与えて生育させた様々な生育日数のダイズ芽生え個体からタンパク質を抽出した。そして、得られたタンパク質を SDS-PAGE 法により分子量ごとに分離した後、大豆アレルゲン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。

#### 4. 研究成果

(1) 主な大豆アレルゲンのうち  $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha$ -サブユニットと Gly m Bd 28K は、ダイズを暗下にて水道水を与えて発芽、生育させることにより播種後 2 日目から減少しはじめ、6 日目の個体からは検出されなかった。その時期は発芽後のダイズ芽生え個体の重量が増加しはじめる時期であることから、これらのアレルゲンは、その他の多くの種子貯蔵タンパク質と同様に、発芽後の芽生え個体の生長を支えるための窒素源として種子に貯蔵されており、発芽後に活性化するプロテアーゼにより分解されると考えられた。

$\beta$ -コングリシニンの  $\alpha$ -サブユニットや Gly m Bd 28K は播種後 6 日目までに顕著に減少するのに対して、Gly m Bd 30K の減少は播種後 6 日目以降に観察された。さらに、その減少速度は  $\alpha$ -サブユニットや Gly m Bd 28K の減少速度に比べると緩やかなものであり、Gly m Bd 30K は播種後 14 日目のダイズ個体からも検出された。また、Gly m Bd 30K は播種後 2 日目から 6 日目にかけて若干低分子化することも明らかとなった。このように、Gly m Bd 30K は発芽後になんらかのプロセッシング

を受けることと、多くの種子貯蔵タンパク質のように急激に減少しないことから、Gly m Bd 30K はダイズの芽生え個体においてなんらかの機能を担っているタンパク質であると考えられた。

また、ダイズの発芽、生長にともなって観察されたこれらのアレルゲンの減少において、 $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha$ -サブユニットと Gly m Bd 28K の減少開始時期やその速度と、Gly m Bd 30K の減少開始時期やその速度には差異が見られたことから、 $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha$ -サブユニットと Gly m Bd 28K を分解するプロテアーゼと、Gly m Bd 30K を分解するプロテアーゼは異なる分子種のものであることが示唆された。

(2)  $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha$ -サブユニットは播種後 4 日目および、5 日目のダイズ芽生え個体から調製したタンパク質溶液の pH を 4 に変更してインキュベートすると減少することが明らかになった。しかし、播種後 3 日目までのダイズ芽生え個体から調製したタンパク質溶液の pH を 4 に変更してインキュベートしてもその減少は観察されなかった。したがって、 $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha$ -サブユニットは播種後 4 日目付近に合成もしくは活性化されるプロテアーゼにより分解される可能性が高いと考えられた。

一方、Gly m Bd 28K は、播種直後（0 日目）から播種後 5 日目までのどの生育日数のダイズ芽生え個体から調製したタンパク質溶液の場合でも、溶液の pH を 3 に調整してインキュベートすることで減少することがあきらかになった。したがって、発芽直後（播種後 2 日目付近）に、あらかじめ乾燥種子に貯蔵されていたプロテアーゼの活性状態もしくは局在部位が変化することにより、Gly m Bd 28K が分解されると考えられた。さらにこの結果から、ダイズの発芽、生長過程において  $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha$ -サブユニットと Gly m Bd 28K は同じ時期に、同じ速度で減少していくものの、それらを分解するプロテアーゼは異なる分子種であることが示唆された。

そして、Gly m Bd 30K は、播種直後（0 日目）から播種後 5 日目までのどの生育日数のダイズ芽生え個体から調製したタンパク質溶液の場合でも、溶液の pH を 4 に調整してインキュベートすることで減少することがあきらかになった。このことから、Gly m Bd 30K を分解するプロテアーゼは、Gly m Bd 28K を分解するプロテアーゼと同じく乾燥種子に貯蔵されており、ダイズ芽生え個体の生長にともなって活性状態や局在部位が変化することで Gly m Bd 30K の分解に寄与すると考えられた。しかし、ダイズ芽生え個体から調製したタンパク質溶液をインキュベート

したときに観察されるアレルゲンの減少において、Gly m Bd 28K と Gly m Bd 30K とでは減少に至適な pH が異なっていたことから、それらを分解するプロテアーゼは異なる分子種のものであることが示唆された。

(3) ダイズ乾燥種子から調製したタンパク質溶液を酸性条件にしてインキュベートを行った際に観察される Gly m Bd 28K および、Gly m Bd 30K の減少は、アスパラギン酸プロテアーゼの活性を阻害するペプスタチン A を添加することで顕著に阻害された。したがって、あらかじめ乾燥種子に貯蔵されており、ダイズの生長にともなって活性状態や局在部位が変化することで Gly m Bd 28K および、Gly m Bd 30K 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と考えられた。

(4) ダイズを 25℃ の暗下にて水道水を与えて生育させた場合、 $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha$ -サブユニットと Gly m Bd 28K は播種後 6 日目の個体からは検出されないのに対し、種子の休眠維持に作用する植物ホルモンであるアブシジン酸を与えて生育させた場合は播種後 8 日目の個体からも検出され、10 日目にして検出されなくなった。したがって、これらの大豆アレルゲンを分解するプロテアーゼの発現や活性化、局在変化はアブシジン酸により妨げられると考えられた。

また、ダイズを暗下にて水道水を与えて生育させた場合、Gly m Bd 30K は播種後 16 日目の個体からは検出されないのに対し、アブシジン酸を与えて生育させた場合は播種後 20 日目の個体からも検出された。したがって、Gly m Bd 30K を分解するプロテアーゼもまた、その発現や活性化、局在変化はアブシジン酸により妨げられると考えられた。

いずれのアレルゲンの場合においても、アブシジン酸を与えてダイズを生育させることにより、ダイズの生長にともなう大豆アレルゲンの減少が鈍化したことから、これらの大豆アレルゲンを分解するプロテアーゼの発現や活性化、局在変化は乾燥種子に含まれるアブシジン酸が種子の吸水にともなって不活性化されることにより誘導されることが考えられた。

## 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 1 件)

- ① 間崎剛、山田千佳子、和泉秀彦、大豆の発芽に伴うアレルゲンの分解機構、食生活研究、査読無、Vol. 28、No. 4、2008、pp. 21-28

[学会発表] (計 4 件)

- ① 間崎剛、ダイズの発芽時に活性化するプロテアーゼによるアレルゲンの分解、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 28 日、名城大学
- ② 山本美由紀、大豆の発芽に伴う貯蔵タンパク質 (アレルゲン) の分解に関する研究、日本家政学会中部支部 2007 年度家政学関連院生・学生研究発表会、2008 年 3 月 3 日、岐阜女子大学
- ③ 山本美由紀、大豆アレルゲンの分解を阻害するプロテアーゼインヒビターの探索、日本家政学会中部支部 2007 年度大会、2007 年 9 月 15 日、名古屋学芸大学
- ④ 間崎剛、ダイズ発芽時に活性化されるプロテアーゼによるアレルゲンの分解、日本調理科学会 2007 年度大会、2007 年 8 月 31 日、お茶の水女子大学

## 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・助教  
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：