

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2009

課題番号：18604008

研究課題名（和文）通電処理による牛乳アレルギー活性低減化に関連する蛋白高次構造の研究  
 研究課題名（英文）Structural changes accompanying mitigation of the allergic action of cow's milk after passing an electric current

研究代表者

松本 知明（MATSUMOTO TOMOAKI）

熊本大学・医学薬学研究部・講師

研究者番号：30128318

研究成果の概要：乳清蛋白に通電すると、その陰極側でアレルギー活性が低減化する現象を発見した。とくに乳清中の主なアレルギーであるβ-ラクトグロブリン蛋白において著しい低アレルギー化がみられた。β-ラクトグロブリン蛋白はS-S結合を介した2量体でアレルギー性を発揮すること、陰極側ではS-S結合に因らない2量体が形成され、この蛋白のIgE抗体結合領域として知られる<sup>41</sup>Val-<sup>60</sup>Lysと<sup>149</sup>Leu-<sup>162</sup>Ile部分がトリプシン耐性領域に移行することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	480,000	3,980,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：アレルギー

キーワード：牛乳アレルギー、牛乳アレルギー、低アレルギー化、β-ラクトグロブリン、直流通電、プロテオミクス、蛋白高次構造

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 牛乳は乳幼児にとって基本となる栄養源である。しかしながらそのアレルギー活性は高く、わが国の食物アレルギーの原因食品としては2番目に多く報告され、乳児の2%に認められる。これらの乳幼児では乳製品を摂取することによって、皮膚にじんま疹やアトピー性皮膚炎が生じたり、呼吸困難や下痢、嘔吐がおこったり、まれに意識障害がみられる。長期にわたって乳製品が摂取できないために、乳幼児においては栄養障害が生じる。牛乳は牛乳アレルギーの原因ばかりではな

く、乳製品摂取後に激しい胃腸症状を呈する乳児例も報告されるようになり、この場合は乳製品による食物蛋白誘発性小腸結腸炎と呼ばれている。また好酸球性胃腸炎の原因にもなっている。

(2) 乳成分のアレルギー性を失活させる方法としては、ブタ膵臓ないし微生物由来蛋白分解酵素を用いて牛乳蛋白のペプチド結合を加水分解によって切断し、アレルギー抗体（IgE抗体）が結合できない分子量（1,000 Da）以下に低分子化することが広く行われている。この技術によって製造された乳製品は、

牛乳アレルギー患者治療用あるいは牛乳アレルギー発症予防用ミルクとして市販されている。最近イヌを用いた実験において、レドックス制御低分子蛋白であるチオレドキシンを用いて、乳清成分中でもアレルギー活性が最も高い $\beta$ -ラクトグロブリン蛋白のジスルフィド(S-S)結合を開裂し、この蛋白のアレルギー性減弱化が得られたという報告がある。

(3) しかしこれらの方法によって作製される乳製品には、長期飲用を考える上でいくつかの問題点がある。まず低アレルギー化反応に用いたこれらの物質が、乳製品内に残存する点である。これら加水分解ミルクは乳児に長期にわたり飲用されるため、ブタ腺臓ないし微生物由来蛋白分解酵素がアレルギー素因をもつ乳児への新たなアレルギーとなることが心配される。さらにこれらの物質は飲用された後においても生物学的活性を保っているため、器官発達が未熟な乳児での継続的摂取では、その副反応が危惧されることである。

(4) またこれらの方法は牛乳蛋白の一次構造を変化させることで低アレルギー化を得ており、食品としての乳固有の風味はなくなっている。とくに酵素分解によって牛乳蛋白の10~60%は遊離アミノ酸まで分解されているが、この遊離アミノ酸に由来する苦みが強く感じられるため、ミルク飲用に際して大きな障害となっている。さらには、乳清蛋白のもつ消化管での働き、たとえばビタミンAや鉄分の吸収作用、粘膜保護、溶菌、ウイルス中和作用なども消失している。実際、加水分解ミルク長期飲用によって、成長障害、低蛋白血症、貧血がみられており、苦みによる哺乳量低下や味覚発達障害の報告もある。

(5) このように、従来の乳成分低アレルギー化製法には、上記した様々な問題点があるため、新しい低アレルギー化製法を求める医療界のニーズがあった。

(6) 本報告者らは、牛乳蛋白の中でもアレルギー活性が最も高い $\beta$ -ラクトグロブリン蛋白が、典型的な球状蛋白であり、その高次構造がアレルギーとして認識される点に着目した。一般に蛋白質の高次構造は物理的、化学的方法で変化させることができるが、 $\beta$ -ラクトグロブリン蛋白は熱に安定であり、90°Cで1時間処理でもアレルギー性はなくなる。また食品であるため、酸アルカリ液を用いた化学的処理を行うこともできない。そこで報告者らは、乳清や単離した $\beta$ -ラクトグロブリン蛋白に直流電流で通電処理したところ、陰極側において、それらのアレルギー活性が著しく減弱化することを発見した。

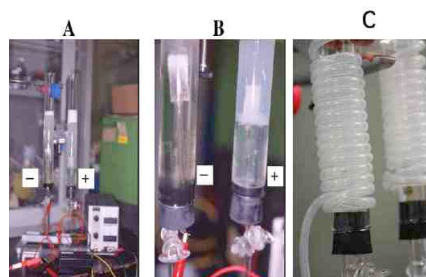
## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、乳清成分、とくにその中で最もアレルギー活性の高い $\beta$ -ラクトグロブリン蛋白が、通電処理によって、アレルギー活性が陰極側で著しく低減化される現象を蛋白生化学的に解明することにある。(2) さらにこの低アレルギー化法による食品としての安全性、官能性を確かめることも目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) A に大型電気分解装置の全体像、B に白金電極板周囲の拡大像を示す。さらにCに示すように、内径5ミリ、外径6ミリのシリコンチューブを装置全体に巻き付け、恒温低温水槽で-5°Cに冷却した水道水を循環させることによって装置全体を冷却した。通電時間を通して、装置周囲を循環するシリコンチューブ内温度はほぼ0.2°Cであり、通電中の装置内溶液温度が16~17°Cに保たれるため、ジュール熱に伴う蛋白変性が防止できる。

写真1：大型電気分解装置



(2) 1%  $\beta$ -ラクトグロブリン蛋白を通電処理(120V, 0.6A, 30分)し、その前後のジスルフィド(S-S)結合の解裂を、エールマン法でチオール基(-SH)量を測定することによって評価した。また還元試薬を用いない条件下でポリアクリルドアミノゲル電気泳動を施行して分子量変化を観察し、さらに等電点分離して二次元電気泳動を行った。得られたスポット蛋白をトリプシン処理し、各々のペプチドをマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析(MDLDI)によって解析し、そのペプチド指紋を蛋白データベースと照合した。

(3) 一方、通電前後の蛋白をゲル濾過クロマトグラフィーにかけ、改めて分子量変化を測定するとともに、リジルエンドペプチダーゼで分解し、逆相クロマトグラフィーに吸接させた後、カラムから溶出されるペプチドのパターンも解析した(ペプチドマッピング)。

(4)  $\beta$ -ラクトグロブリンを、陰イオン交換クロマトグラフィーにより高度精製する。 $\beta$ -ラクトグロブリンをNaClを含むTris-HCl(pH8.0)で平衡化しカラムに添加し、カラムをTris-HClで洗浄後、NaCl濃度を270mMまで直線的に上昇させる。この操作

を 120 回繰り返し、バリエーション A および B を取得する。SDS-PAGE を用いて、精製蛋白が目的蛋白以外の蛋白をほとんど含まない状態であることを確認した後、結晶化検討に用いる。蛋白濃度を 10mg/mL 程度に濃縮した後、結晶化用プレートの上でさまざまな蛋白質結晶化スクリーニング溶液（200 条件程度）と混和し、5~20°C に静置し結晶析出を最長 2 ヶ月、観察する。結晶析出が早く、また大きな結晶を得られる条件を見つけ出し、その条件で結晶化を実施し、結晶を成長させる。

(5) 通電処理による乳清の食材としての風味の変化を盲検法で調べた。無脂肪乳から酸処理によってカゼイン蛋白を沈殿して除き、得られた乳清に通電処理（内容の公表見合わせ）を施行した。通電前後で得られた乳清、それに牛乳アレルギー用に市販されている乳清加水分解ミルクの各々をポリスチレンチューブに入れ、外側をアルミ箔で覆って溶液外観が分からないようにした。この 3 種類を無作為に、医療従事者、専業主婦、および高校生に試飲させた。なおこの一連の研究に先立っては、当大学生命科学系倫理委員会の許可を各々得ている。

#### 4. 研究成果

##### (1) 電気分解による β-ラクトグロブリン低アレルギー効果

通電前後の β-ラクトグロブリン溶液、各々を前腕内側皮膚に滴下して、小児用ブリック針（米国リンコリン社製）で穿刺して、20 分後に表面に出現する膨疹の最大直径を測定した。対照として生理食塩液とヒスタミン液も滴下した。

写真 2：皮膚ブリックテスト



BLG:通電前溶液  
(+):陽極側溶液  
(-):陰極側溶液

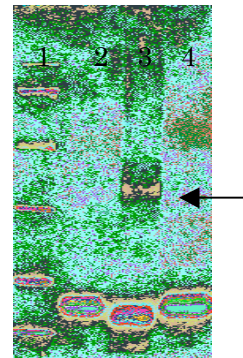
写真 1 に示すように、通電前溶液や通電後に陽極側で得られた溶液に比べ、陰極側で得られた溶液で著しい即時型反応の低下を認める。

##### (2) 電気分解による β-ラクトグロブリンの生化学的変化

β-ラクトグロブリンを加水分解すると、陽極側、陰極側ともにチオール基数はほぼ同様に減少する結果を示し、ジスルフィド結合はむしろ両極で増加した。すなわち、β-ラクトグロブリンの陰極側の低アレルギー化

図 1：  
(Da)

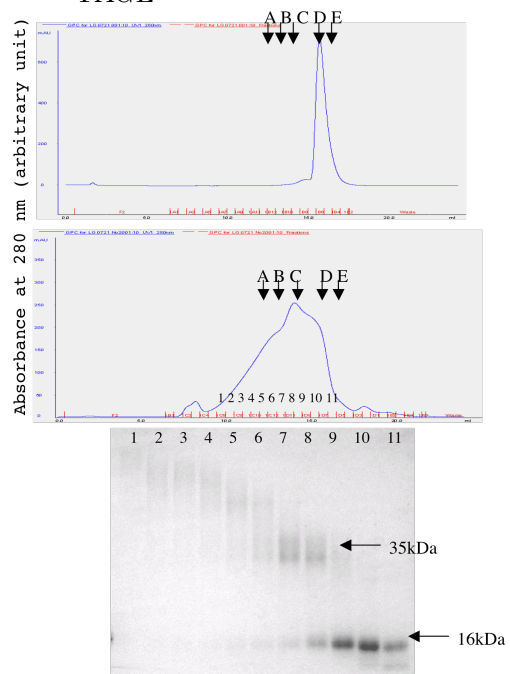
97000  
66000  
45000  
30000  
20100  
14400



(1:分子量、2:通電前、3:陰極側、4:陽極側) は少なくともジスルフィド結合開裂に起因しない。

図 1 に 2-メルカプトエタノールを用いた還元活性下での電気泳動像 (SDS-PAGE) を示す。通電前および通電後の陽極側では分子量約 18,000 の単量体と思われる 1 本のバンドのみ観察される。しかしながら、陰極側では矢印で示したように、2 量体と思われるバンドが見られる。ジスルフィド結合に因らない 2 量体が形成されている。

図 2：ゲル濾過クロマトグラフィーと SDS-PAGE



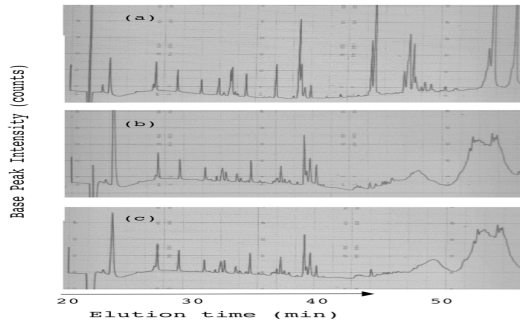
(標準蛋白 A:290,000, B:140,000, C:67,000, D:34,000, E:12,800)

図 2 の上段は通電前溶液のゲル濾過クロマト、中段は陰極側溶液のゲル濾過クロマトで、下段はその電気泳動 (SDS-PAGE) である。通電前では分子量 34,000 の単一蛋白として検出される。図 1 の還元下での SDS-PAGE では分子量 18,000 の蛋白として検出されるので、β-ラクトグロブリンは天然状態において、ジスルフィド結合を介した 2 量体で存

在していることが分かった。

陰極側液では幅広い蛋白が得られる。とくに分子量 700,000 と 340,000 とと思われる蛋白が採取された。各々の分画を SDS-PAGE で分析すると、分子量 35,000 および 16,000 の蛋白から形成されていることが分かった。この SDS-PAGE も強い還元状態で実施しており、ここでも図 1 と同様にジスルフィド結合に因らない 2 量体と思われる分子量 35,000 蛋白が採取された。

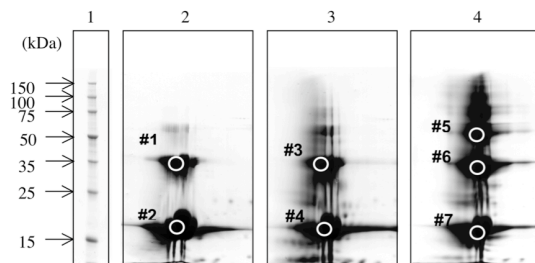
図 3：ペプチドマッピング



(a:通電前、b:陰極側 16kDa、c:同 35kda)

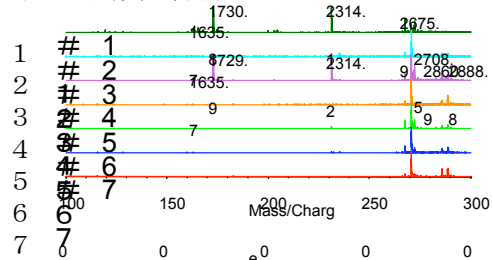
そこで、陰極側で得られた 2 種類の蛋白のペプチドマッピングを行った。ゲル濾過によって得られた通電前の β-ラクトグロブリン溶液と、通電後に陰極側で得られた 2 種類の蛋白に、変性剤や還元剤非存在下でリゾエンドペプチダーゼを反応させてペプチドに分解した。これらを逆相クロマトグラフィーに吸着させ、アセトニトリルの直線濃度勾配により疎水性の低いペプチドから順にカラムより遊離させた。その結果、ほぼすべてのピークの溶出時間は 3 つの蛋白で完全に一致した。これは、ペプチドのアミノ酸配列が同じであることを示す。すなわち、陰極側で得られた 2 種類の蛋白は、ともに β-ラクトグロブリンであると考えられる。

図 4：二次元電気泳動像



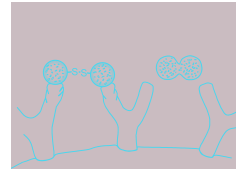
さらに二次元電気泳動で蛋白の変化を調べた (図 4)。ここでは還元作用をもたない溶媒を用いて泳動した。通電前と陽極側採取液では単量体と 2 量体がみられ、陰極側採取液には、さらに 4 量体と思われるバンドがみられた。

図 5：マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析



各々のスポットを切り取り、トリプシン処理した後、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法を用いて、ペプチド解析を行った (図 5)。その結果、通電前と陽極側から得られた、各々 2 量体と思われる部分 (#1,#3) の質量分析パターンが一致した。また各々の単量体と思われる部分 (#2,#4,#7) と、陰極側の 2 量体、4 量体と思われる部分 (#5,#6) の質量分析パターンが一致した。すなわち、陰極側で β-ラクトグロブリン蛋白は、単量体としての構造を保ったまま 2 量体、4 量体になっていることが分かった。

図 6：β-ラクトグロブリンと IgE の結合



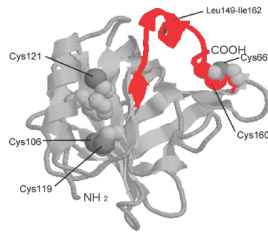
すなわち、天然の β-ラクトグロブリンはジスルフィド結合を介した 2 量体の形で牛乳中に存在し、その形でもってアレルギー性を発揮していると思われる。陰極側で得られた 2 量体はジスルフィド結合を介する結合でなく、単量体の構造を保ったままであるため、アレルギー性が発揮されないと推測した (図 6)。

二次元電気泳動のスポット #1、#3 のマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法から特徴的に得られた 2 種類のペプチド断片を検索エンジンによって解析したところ、β-ラクトグロブリン蛋白指紋として図 7 に朱書きしたペプチド部分であることが分かった。この部分 (<sup>41</sup>Val-<sup>60</sup>Lys と <sup>149</sup>Leu-<sup>162</sup>Ile 残基) は図 8 に示した蛋白立体構造の上では 2 量体形成に関連している。さらに過去の研究 (Takahashi T. et al. *Agril Biol Chem* 1990; 54: 691-697) から IgE 抗体と結合する部位であることも分かっている。

図 7：β-ラクトグロブリンのアミノ酸組成



図 8 :  $\beta$ -ラクトグロブリンの立体構造



### (3) 通電処理による乳清の低アレルゲン化と食としての官能評価

通電処理による乳清蛋白アレルゲン性低減化を確認するため、牛乳アレルギー患者に皮膚ブリックテストを行った。テスト液として以下の3種類を作成した。

①ミルク-A 液: 牛乳カゼイン蛋白の加水分解ミルク (商品名: ペプディエット、大塚製薬 KK) の 15% 溶液 0.5ml に、乳清蛋白の加水分解ミルク (商品名: ミルフィー、明治乳業 KK) の 15% 溶液 0.5ml を混じた溶液

②ミルク-B 液: 牛乳カゼイン蛋白の加水分解ミルク (商品名: ペプディエット、大塚製薬 KK) の 15% 溶液 0.5ml に、通電処理し、陰極側で採取した乳清溶液を 0.5ml 混じた溶液

③ミルク-C 液: 牛乳カゼイン蛋白の加水分解ミルク (商品名: ペプディエット、大塚製薬 KK) の 15% 溶液 0.5ml に、通電していない乳清溶液 0.5ml を混じた溶液

写真 3 には、牛乳アレルギー患者皮膚面で生じたアレルギー反応の典型例を示す。ミルク-A ないしミルク-B に対する反応が、ミルク-C に対する反応に比べて著しく弱いことが分かる。乳清蛋白の加水分解ミルク (商品名: ミルフィー、明治乳業 KK) には劣るものの、通電処理後に陰極側で採取された乳清も強く低アレルゲン化されていることが分かった。

写真 3 : 乳清の皮膚反応



通電処理による乳清の食品としての官能性変化を調べた。上記のミルク-A、ミルク-B、ミルク-C の各々 1 ml を、5 ml ポリスチレンチューブに入れ、外側をアルミ箔で覆って溶液外観が分からないようにした。この3本を無作為に、医療従事者、専業主婦、および高校生に試飲させた。

質問は、ミルクとしての風味および飲みやすさ (苦みのなさ) の 2 項目で、各々優れた方から順位をつけさせた。この順位の数合計し、最も低い数値であったミルクを、その

項目で最も優れていると判定した。

医療従事者 10 名、専業主婦 4 名、および高校生 6 名が試飲した。その結果、ミルクとしての風味ではミルク-C が最も合計点が少なく、飲みやすさ (苦みのなさ) に関してはミルク-B が最も合計点が少なかった。風味は通電前の乳清が最も優れているという結果であったが、通電後に陰極側で採取した溶液との差はほとんどない。飲みやすさ (苦みのなさ) では通電処理後に陰極側で採取された乳清の方が圧倒的に優れていた。

### 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松本知明。通電処理による牛乳アレルゲン活性低減化に関連する蛋白高次構造の研究。浦上財団研究報告書、15 : 1-8, 2007。(査読無し)

[学会発表] (計 1 件)

①Matsumoto T. Mitigation of the allergic action of  $\beta$ -lactoglobulin with electrical energy. 第 27 回ヨーロッパアレルギー臨床免疫学会。2008 年 6 月 8 日 (バルセロナ、スペイン)。

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件) 風味を向上させたアレルゲン低減化乳組成物及びその製造方法、発明者: 松本知明、吉岡毅、権利者: 熊本大学、特許、出願番号: 特願 2009-114319、出願日: 2009 年 5 月 11 日、国内出願

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本知明 (MATSUMOTO TOMOAKI)

熊本大学・医学薬学研究部・講師

研究者番号: 30128318

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

井上 勲 (INOUE KAORU) (2007 年度は研究分担者)

八代工業高等学校・教授

研究者番号: 00106113