

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580126

研究課題名（和文） 可食性バイオハイブリッド創出による食品タンパク質の低アレルゲン化

研究課題名（英文） Reduction of allergenicity of food protein by preparing edible bioconjugate

研究代表者

服部 誠 (HATTORI MAKOTO)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：40221501

研究成果の概要（和文）：牛乳中の主要な乳清タンパク質であるβ-ラクトグロブリン（BLG）の機能改変を目的として、トランスグルタミナーゼ（MTGase）を用いて、ポリリシン（PL）とのバイオハイブリッドを作出した。得られたハイブリッド分子の組成はBLG：PL=1：1.2であり、ネイティブBLGの全体的な高次構造がほぼ維持されていた。ハイブリッド化により、乳化性の改善、免疫原性の低減化を達成できた。さらに、デキストラン（Dex）を伸長したハイブリッドを調製することにより、より効果的な免疫原性の低減化を認めた。

研究成果の概要（英文）：Major whey protein beta-lactoglobulin (BLG) was conjugated with epsilon-polylysine (PL) by using microbial transglutaminase (MTGase) to improve the function of BLG. The molar ratio of BLG to PL in the conjugate was 1:1.2. Native conformation of BLG was almost maintained after conjugation with PL. By conjugation with PL, the improvement in the emulsifying ability and the reduction of the immunogenicity were achieved. Further conjugation with dextran (Dex) led to the effective reduction of the immunogenicity of BLG.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2012年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：バイオハイブリッド、食品タンパク質、低アレルゲン化、機能改変、高機能化

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、生命に直接関与するだけでなく、重要な食品素材として幅広く利用されてきた。しかし、近年、食品素材としてのタンパク質に求められる特性は、高度化、多様化してきており、新たな機能の開発、改変、高機能化が強く望まれている。このような食

品タンパク質の高機能化あるいは機能改変のためには、天然には存在しない、新規の糖質結合型バイオハイブリッドの創出が有効な方策となると考えられる。

本研究においては、トランスグルタミナーゼを用いた酵素反応とメイラード反応を組み合わせ、実際の食品に応用可能な、糖鎖を

導入した高機能化バイオハイブリッドを創製し、低アレルギー化を達成し、さらに、同時に乳化性などの機能特性の向上を達成すること、これら多面的な機能改変の根源となるバイオハイブリッド分子の構造機能相関を明らかにすることを目的としている。

本研究においては、食品タンパク質として、牛乳中の主要な乳清タンパク質であるβ-ラクトグロブリン (BLG) を機能改変のターゲットとして用いる。BLG は、栄養学的には必須アミノ酸をバランスよく含む良質のタンパク質であり、また、レチノール、脂肪酸などの有用な疎水性生理活性物質の結合機能、優れた機能特性 (乳化性、気泡性、ゲル化性)、抗酸化性を有することから、優れた食品素材となる可能性を有している。しかしながら、BLG は最も強力なアレルギーの1つであり、その利用には大きな制限がある。近年、アレルギー症状に苦しむ人の数は急増中であり、症状の軽いアレルギーまで含めると日本人の3人に1人がアレルギー症状を示す、と発表されるような重大な問題となっており、その解決策の確立が、社会的にも強く望まれている。したがって、BLG を人為的に機能改変し、機能特性の改善を図るとともに、低アレルギー化を達成することには重大な意義があると考えられる。

## 2. 研究の目的

食品アレルギー、とりわけ、牛乳アレルギーは、ヒトが生まれて初めて罹患するアレルギーという点で大きな問題であり、低アレルギー化法の確立が社会的にも強く望まれている。このような背景の下、本研究では、食品タンパク質のうち、牛乳中の主要乳清タンパク質であるβ-ラクトグロブリン (BLG) をターゲットとして用い、低抗原性・免疫原性のポリリンならびに多糖を、トランスグルタミナーゼの反応ならびにメイラード反応により結合し、可食性のハイブリッドを創出することにより、免疫原性の低減化、BLG の機能特性の改善、抗菌性の付与といった多岐にわたる機能改変を達成することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) BLG の単離 :

BLG は、生脱脂乳より Armstrong らの方法により単離し、DEAE-Sepharose Fast Flow を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製を行った。

### (2) BLG-PL ハイブリッドの調製 :

MTGase は、味の素株式会社製のアクティブ TG-K を用いた。BLG-PL ハイブリッドの調製条件を検討し、BLG : PL のモル比が 1 : 9 になるように、混合し、2,000 unit/g protein と

なる条件で MTGase を加え、37°C で 48 時間反応させることにより、ハイブリッド分子の調製を行った。ハイブリッド分子の精製は、複数回の CM Sepharose Fast Flow を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー、および透析を組み合わせるにより行った。

### (3) BLG-PL ハイブリッドの化学分析 :

ハイブリッド生成の確認は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動ならびに等電点電気泳動により行った。得られたハイブリッド分子の組成をアミノ酸分析により行った。

### (4) BLG-PL ハイブリッドの構造解析 :

BLG-PL ハイブリッド分子の構造について、自然蛍光測定、CD スペクトル測定、レチノール結合能測定、抗 BLG モノクローナル抗体を用いた ELISA により、詳細な解析を行った。

### (5) BLG-PL ハイブリッドの乳化性の評価 :

BLG-PL ハイブリッド、BLG、PL、BLG と PL の混合物の各試料を、タンパク質濃度が 0.1% (w/v) になるように McIlvaine 緩衝液に溶解した。これらの溶液 2 ml を水相として 15 ml のねじ口試験管に分注し、さらにコーン油 0.5 ml を油相として添加したのち、ホモジナイズし水中油滴型 (O/W) エマルションを調製した。

乳化性の評価は Pearce と Kinsella の濁度法により行った。すなわち調製したエマルションの水相底部から試料を 50 μl ずつ経時的に (乳化後 0、30、60、120 分) サンプルングし、0.1% SDS 溶液で 100 倍希釈した溶液の 500 nm の吸光度を測定した。乳化安定性については、乳化後 30 分の A500 から評価した。また、乳化直後の乳化活性は乳化活性指数 (emulsifying activity index; EAI) を算出して評価した。

### (6) BLG-PL ハイブリッドの免疫原性の評価 :

1 群 7 頭の BALB/c (5 週齢、雌) を周囲の環境に順応させるために 1 週間予備飼育した。BLG 2 mg/ml 相当の抗原 (BLG、BLG-PL ハイブリッド) /滅菌 PBS (pH 7.0) 溶液を同量のフロイント完全アジュバント (FCA; Freund's complete adjuvant) とともに乳化することでエマルションを調製し、初回免疫として 1 頭あたり 100 μl を腹腔内投与した。初回免疫より 2 週間後、同一抗原溶液を同量のフロイント不完全アジュバント (FIA; Freund's incomplete adjuvant) とともに乳化してエマルションを調製し、追加免疫として 1 頭あたり 100 μl を同様に腹腔内投与した。追加免疫より 1 週間後、心臓より採血を行った。血液試料は、血餅を形成させるために室温で 30 分間静置後、さらに 4°C で一晚静置した。その後、遠心分離 (1,000 rpm、

20 分間、4°C) を行い、抗血清を得た。

免疫原性の評価は非競合法 ELISA により行った。すなわち、固相に吸着させた抗原 (BLG、BLG-PL ハイブリッド) と結合する抗血清試料中の特異抗体を酵素標識二次抗体で検出した。

(7) ピンペプチドを用いた B 細胞エピトープの解析:

BLG の一次構造に基づいて N 末端から 1 残基ずつずらしながらさせて合成した 15 残基のピンペプチド (148 個) を解析に用いた。ピンペプチドは、ギアに固定されたタイプのもを用いた。1 群 7 頭のマウスからの抗血清を等量ずつ混合し、その抗血清とピンペプチドとの反応性を測定し、B 細胞エピトープの解析を行った。

(8) BLG-PL-Dex ハイブリッドの調製:

メイラード反応により、BLG-PL ハイブリッドとデキストラン (Dex, 分子量約 10,000 Da) のハイブリッド化を行った。BLG-PL と Dex の反応比は BLG-PL : Dex = 1 : 5 (モル比) とし、BLG-PL 80 mg、Dex 180 mg を蒸留水 20 ml に溶解した。試料をシャーレ (100×20 mm) に移し、凍結乾燥した後、飽和 KBr で相対湿度 79% に調整したデシケーター中で、50°C で 24 時間メイラード反応を行った。反応生成物は 0.1 M イミダゾール緩衝液 (pH 7.0) に溶解後、不溶物を遠心分離 (18,000 rpm、20°C、20 分間) で除去し、上清を凍結乾燥した。得られたメイラード反応生成物は、未反応の BLG-PL ハイブリッドおよび Dex を含むと考えられた。そこで、これらを除くために、陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。カラムは CM Sepharose Fast Flow を用いた。

(9) BLG-PL-Dex ハイブリッドの化学分析:

BLG-PL-Dex ハイブリッドのタンパク質含量の定量は、280 nm の吸光度により作成した検量線を用いて算出した。糖含量の定量は、フェノール-硫酸法により 490 nm の吸光度を測定することにより行った。実験は 5 連で行った。また、検量線はあらかじめデキストランを用いて作成した

(10) BLG-PL-Dex ハイブリッドの免疫原性の評価:

(6) と同様の方法で BLG-PL-Dex ハイブリッドの免疫原性の評価を行った。

#### 4. 研究成果

(1) BLG-PL ハイブリッドの構造:

BLG-PL ハイブリッド分子の組成をアミノ酸分析により行った結果、BLG : PL = 1 : 1.2 であることが明らかとなった。このハイブリッド分子の等電点を等電点電気泳動により

調べた結果、ハイブリッドでは等電点が塩基性側へ大きくシフトし、BLG と PL が共有結合したことが明らかとなった。さらに、ハイブリッド分子の構造について、自然蛍光測定、CD スペクトル測定、レチノール結合能測定、抗 BLG モノクローナル抗体を用いた ELISA により、ハイブリッドの詳細な解析を行った結果、ハイブリッドでは PL の結合による若干の構造変化が認められたが、ネイティブ BLG の全体的な高次構造はほぼ維持していると考えられた。

(2) BLG-PL ハイブリッドの乳化性:

BLG-PL ハイブリッドの乳化性は濁度法によって評価した。その結果、ハイブリッドでは、BLG の乳化に不利な酸性条件下および塩存在下においても高い乳化性を持つことが明らかとなった (図 1、図 2)。

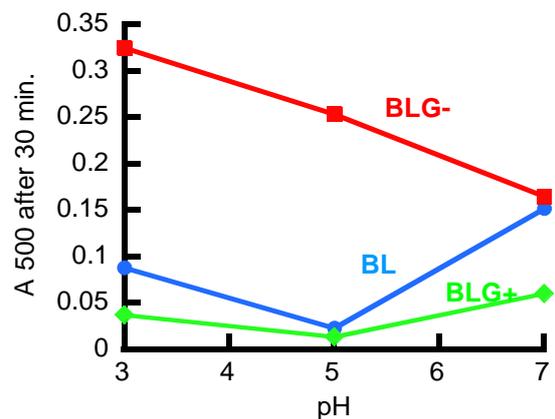


図 1 BLG-PL の乳化性に対する pH の影響

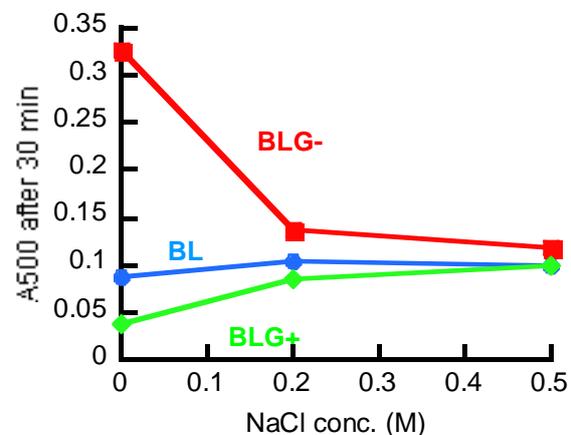


図 2 BLG-PL の乳化性に対する塩濃度の影響

(3) BLG-PL ハイブリッドの免疫原性：

BLG-PL ハイブリッドの免疫原性については、BALB/c マウスを免疫し、得られた血清を非競合法 ELISA に供して特異抗体量を測定することで評価した。いずれの系統においても、ハイブリッド投与時は抗 BLG 抗体産生性が有意に低下した(図 3)。

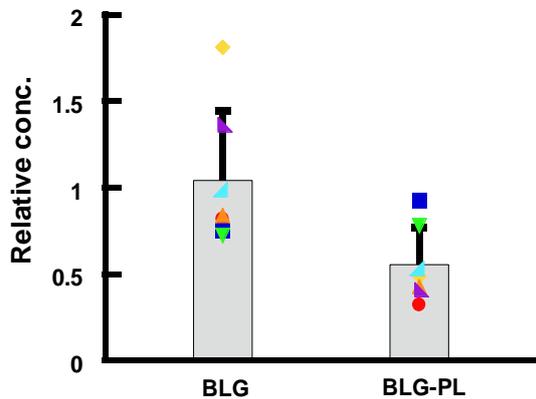


図 3 BALB/c マウスにおける BLG-PL の免疫原性

次に、ピンペプチドを用いて抗血清の反応性を調べ、BLG-PL ハイブリッドの B 細胞エпитオプの解析を行ったところ、33Asp-40Arg 付近の応答性が低下しており、35Gln に PL が結合したことが示唆された。

(4) BLG-PL-Dex ハイブリッドの組成：

さらに、メイラード反応を介して、BLG-PL にデキストラン(Dex, 分子量 10,000)を結合した可食性 BLG-塩基性多糖ハイブリッド(BLG-PL-Dex ハイブリッド)を得た。得られたハイブリッドの組成は、BLG-PL:Dex=1:2.0 であった。

(5) BLG-PL-Dex ハイブリッドの免疫原性：

BALB/c マウスを用いて BLG-PL-Dex ハイブリッドの免疫原性を調べたところ、ハイブリッド化による有意な免疫原性の低減化が認

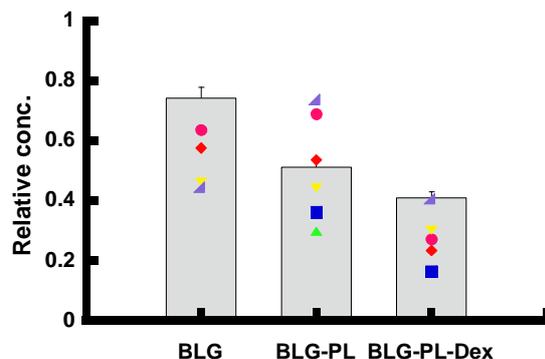


図 4 BALB/c マウスにおける BLG-PL-Dex の免疫原性

められ、特に、BLG-PL ハイブリッドの場合よりもさらに効果的であった(図 4)。

(7)まとめ

本研究では、架橋剤を用いずに、食品への応用が可能な MTGase を用いた方法により BLG と食品添加物として用いられる PL をハイブリッド化させることにより、BLG の乳化性を改善すると同時に免疫原性を低減化することができた。さらに、本研究では明らかにできなかったが、得られたハイブリッド分子は抗菌性を有することが予想される。本研究で得られたハイブリッド分子は極めて有用なものであり、本研究は材料と方法共に食品への応用が可能な方法をとっていることから、本研究の成果は、BLG およびホエータンパク質の更なる有効利用のための有用な手法の確立に貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① 松尾 悠歩、好田 正、高橋 幸資、服部 誠 “可食性バイオハイブリッド創出による  $\beta$ -ラクトグロブリンの機能改変”日本農芸化学会、2013 年 03 月 25 日、仙台
- ② 清水 麻美、好田 正、高橋 幸資、服部 誠 “ $\epsilon$ -ポリリシンとの複合体化による  $\beta$ -ラクトグロブリンの機能改変”日本農芸化学会、2012 年 3 月 23 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 誠 (HATTORI MAKOTO)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：40221501