

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450163

研究課題名(和文) 可食性バイオハイブリッド創出による大豆タンパク質の低アレルギー化

研究課題名(英文) Reduced allergenicity of soy proteins by preparing edible bioconjugates

研究代表者

服部 誠 (Hattori, Makoto)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40221501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大豆中の主要なものである β -コングリシニン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 β -コングリシニン：PL=1：18であった。ハイブリッド化により、pH依存的溶解性に改善、乳化性の改善、免疫原性の低減化を達成できた。さらに、デキストランを伸長したハイブリッドの調製を行うことができ、より効果的な免疫原性の低減化が期待される。

研究成果の概要(英文)：Major soy protein β -conglycinin was conjugated with epsilon-polylysine (PL) by using microbial transglutaminase (MTGase) to improve the function of β -conglycinin. The molar ratio of β -conglycinin to PL in the conjugate was 1:18. By conjugation with PL, the improvement in solubility at various pHs, the improvement in the emulsifying ability and the reduction of the immunogenicity were achieved. Further conjugation with dextran was achieved which would lead to the effective reduction of the immunogenicity of β -conglycinin.

研究分野：農学

キーワード： β -コングリシニン ポリリシン デキストラン タンパク質ハイブリッド バイオハイブリッド 機能改変 低アレルギー化

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、主要な大豆タンパク質である β -コングリシニンを機能改変のターゲットとして用いる。

β -コングリシニンは、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、乳化性・気泡性・ゲル化性などの機能特性や、血中コレステロール低下作用、血圧上昇抑制、抗酸化作用、肥満防止効果などの生理機能を持つ有用な食品素材である。一方で、このタンパク質は酸性条件下で機能特性が低下するため、食品の調理・加工・保存における大豆タンパク質の利用の障害となっている。また、大豆アレルギーの原因物質であることが問題となっている。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きており、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、 β -コングリシニン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

食品アレルギーは大きな問題であり、低アレルギー化法の確立が社会的に強く望まれている。このような背景の下、本研究では、食品タンパク質のうち、主要な大豆タンパク質である β -コングリシニンをターゲットとして用い、低抗原性・免疫原性のポリリシンならびに多糖を、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、 β -コングリシニンの機能特性の改善、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) β -コングリシニンの単離：

β -コングリシニンは、等電点沈殿と Q-Sepharose Fast Flow (2.5 ID×50 cm, GE Healthcare Bio-Science AB) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより、脱脂大豆粉末から抽出・精製した。

(2) β -コングリシニン-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。 β -コングリシニン-PL ハイブリッドの調製条件を検討し、 β -コングリシニン：PL のモル比が 1：1 になるように、混合し、200 unit/g protein となる条件で MTGase を加え、pH 7.6、37℃ で 1 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、分画分子量 100,000 の透析膜を用いて、ハイブリッドと酵素および PL を分離・精製した。

(3) β -コングリシニン-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) β -コングリシニン-PL ハイブリッドの乳化性の評価：

β -コングリシニン-PL ハイブリッド、 β -コングリシニン、PL、 β -コングリシニンと 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 μ l 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。

(5) β -コングリシニン-PL ハイブリッドの溶解性の評価：

β -コングリシニン-PL 複合体の pH 依存的溶解性の評価を行った。評価は、pH 2.0～8.0 の 0.1 M イミダゾール緩衝液を用いて行った。試料濃度が 0.8 mg/ml となるように緩衝液と混合した。試料溶液は室温で 1 時間攪拌し、1,8000 rpm (約 35,000 \times g)、10 分、20 分で遠心分離した。分離した上清を濾紙で濾過し、280 nm で吸光度を測定した。

(6) β -コングリシニン-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(β -コングリシニン、 β -コングリシニン-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 μ l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 μ l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℃で一晩静置した。その後、遠心分離(1,000 rpm、20分間、4℃)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(β -コングリシニン、 β -コングリシニン-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) β -コングリシニン-PL-Dex ハイブリッドの調製：

メイラード反応により、 β -コングリシニン-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。 β -コングリシニン-PLとDexをモル比1:18となるように蒸留水中で混合し、凍結乾燥した。その後60℃、相対湿度79%で混合物を反応させた。反応時間は0、12、24、48、72、96、120、168時間で検討した。得られた試料をSDS-PAGEに供した。

4. 研究成果

(1) β -コングリシニン-PL ハイブリッドの構造：

MTGase反応により、高分子の β -コングリシニン-PL ハイブリッドが得られたことをSDS-PAGEにより確認した。ハイブリッド分子の組成をアミノ酸分析により行った結果、BLG:PL=1:18であることが明らかとなった。

(2) β -コングリシニン-PL ハイブリッドの溶解性：

溶解性測定により、ハイブリッドの中性～酸性の条件下での溶解性の改善が認められた(図1)。これは塩基性ポリペプチドであるPLの結合により、複合体の等電点が塩基性側にシフトしたためであると考えられた。

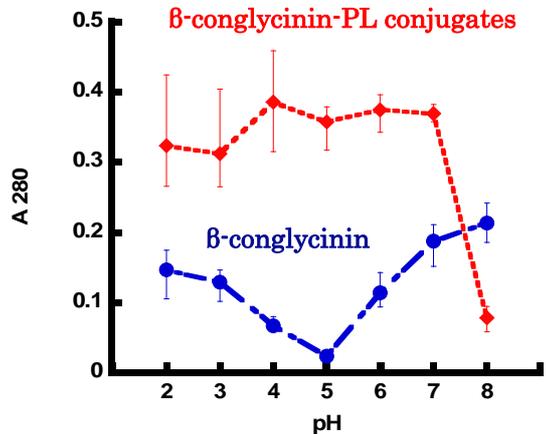


図1 β -コングリシニン-PL の溶解性

(3) β -コングリシニン-PL ハイブリッドの乳化性：

β -コングリシニン-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、 β -コングリシニン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2)。これはPLの結合により親水基が付与され、またPLの強い正電荷により界面が安定化したためによると考えられた。

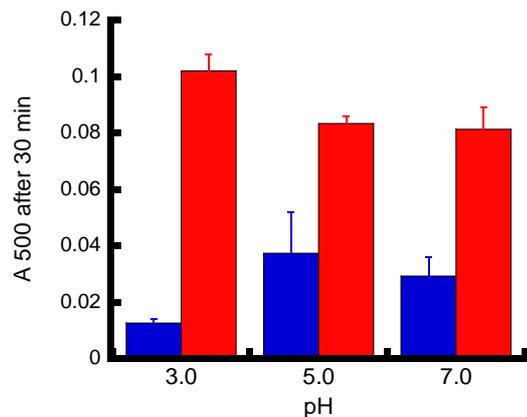


図2 β -コングリシニン-PL の乳化性

(4) β -コングリシニン-PL ハイブリッドの免疫原性：

β -コングリシニン-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 β -コングリシニン抗体産生性が有意に低下した(図3)。

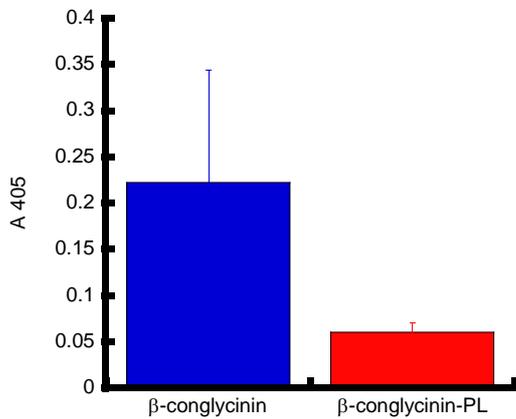


図3 β-コングリシニン-PLの免疫原性

(5) β-コングリシニン-PL-Dex ハイブリッドの創出：

メイラード反応産物に褐色変化が見られたことから、β-コングリシニン-PLとDexの間で結合反応が起こったと考えられた。このDexを伸長したハイブリッド分子においては、β-コングリシニン表面がより効果的に遮蔽されていることが推測でき、さらなる免疫原性の低下が期待できる。

(6)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β-コングリシニン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、β-コングリシニンの、溶解性、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、β-コングリシニンおよび大豆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)

橋本 健史、好田 正、服部 誠 “β-ポリリシニンとの複合体化によるβ-コングリシニンの機能改変” 日本農芸化学会、2014年3月28日、明治大学(神奈川県・川崎市)

濱路 育美、橋本 健史、好田 正、高橋 幸資、服部 誠 “β-ポリリシニンとの複合体化によるβ-コングリシニンの機能改変” 日本農芸化学会、2013年3月25日、東北大学(宮城県・仙台市)

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