

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：33939

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560047

研究課題名(和文)大豆アレルゲン(Gly m Bd 30K)分解酵素の同定と、改変型酵素の開発

研究課題名(英文)Identification of protease which degrade soy allergic protein Gly m Bd 30K

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、発芽・生育させたダイズ個体から調製した総タンパク質溶液を用いた免疫学的手法により、主要な大豆アレルゲンであるGly m Bd 30Kが他の大豆タンパク質とは異なる生育時期に減少・消失することを明らかにした。さらに、播種後15日間生育させたダイズ個体から温和な条件で調製した可溶性タンパク質溶液に、Gly m Bd 30Kを分解する活性があることを見出した。また、その分解活性は腐敗やユビキチン・プロテアソーム系が関与するものではなく、内在性のアスパラギン酸プロテアーゼが関与するものであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research, major allergic protein, Gly m Bd 30K contained in soybean etiolated seedlings started to decrease at 14 days after imbibition although most of seed storage protein disappeared until 5 days. It shows that Gly m Bd 30K plays a different role from other seed protein stored as source of nitrogen, carbon, energy. In addition, it is likely that Gly m Bd 30K is degraded by another protease from that degrade seed storage protein. And we revealed that Gly m Bd 30K in solution prepared from soybean 15 days seedlings decreased when it was incubated under 30℃. Such in vitro decrease of Gly m Bd 30K was disrupted by aspartic protease inhibitor but not antiseptic agent and proteasome inhibitor. It indicates that some kind of aspartic protease is activated for degradation of Gly m Bd 30K.

研究分野：植物分子・生理科学

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) 大豆タンパク質は、以下のような特徴を持つため、人類にとって有用な食品素材である。必須アミノ酸をバランス良く豊富に含むため、栄養価値が高い。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。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や、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・冷蔵食品の製造に頻用されている。

(2) しかし、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り、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。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頻用されているために、極めて困難な食生活を強いられている。

(3) 大豆に含まれるアレルゲンタンパク質のうち、約 65% の大豆アレルギー患者の血中にそれを特異的に認識する IgE 抗体が見いだされる Gly m Bd 30K とよばれるタンパク質が、最もアレルゲン性の強いタンパク質であると考えられている。Gly m Bd 30K は加熱処理や消化酵素に対する抵抗性が高いため、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。それを除去(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たいくつかの方法(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。

(4) 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タンパク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、いまだに開発されていない。

(5) Gly m Bd 30K は、ダイズ種子貯蔵タンパク質(大豆タンパク質)の 1% にも満たない微量成分であることに加え、そのアミノ酸配列と他の主要な大豆タンパク質のアミノ酸配列との間に、有意な相同性は見られない。このことから私は『種子に貯蔵されている主要な大豆タンパク質は芽生え個体の成長を支える窒素源としての役割を担っているが、Gly m Bd 30K はそれらとは異なる役割をもつ』と考えた。

(6) 役割が異なるタンパク質同士は、それぞれ異なる生育時期に不要となり、個別に分解されても不思議はない。以上のことから私は『主要な大豆タンパク質を分解するタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)とは異なるプロテアーゼが Gly m Bd 30K を分解する』という仮説を考案した。

(7) この仮説を検証するために私はこれまでに、発芽・生育させたダイズ個体に含まれるアレルゲンの解析を行い、主要な大豆タンパク質が分解する時期には Gly m Bd 30K はなら量的な変動を示さない一方で、播種後 18 日目の個体からは Gly m Bd 30K が検出されないことを明らかにした。したがって、主要な大豆タンパク質を分解するプロテアーゼとは異なる時期に、Gly m Bd 30K を特異的に分解するプロテアーゼが発現・活性化すると示唆された。

(8) Gly m Bd 30K を特異的に分解するプロテアーゼを単離・精製して大豆タンパク質に添加すれば、Gly m Bd 30K だけを選択的に除去できるであろう。それは他の大豆タンパク質も同時に低分化させてしまう従来の低アレルゲン化法とは異なり、栄養価値や生理機能、加工特性を損なうことのない低アレルゲン化方法といえる。さらにこの方法は、従来の物理化学的な低アレルゲン化法において必要とされた試薬の投入や pH の変更、遠心分離、透析といった工程が不要となるため、非常に簡便な方法となる。

(9) 以上のことから、Gly m Bd 30K を特異的に分解するプロテアーゼの単離・精製と遺伝子の同定、その cDNA を利用した組換えタンパク質の作成に成功することが当面の課題とみなされる。

## 2. 研究の目的

(1) Gly m Bd 30K を特異的に分解するプロテアーゼの単離・精製に成功するためには、それが活発に合成され、豊富に存在するダイズの生育時期を特定する必要がある。Gly m Bd 30K が減少しつつある生育時期には、それを分解するプロテアーゼが豊富に含まれていると考えられる。そこで本研究では、播種後 1 日おきに回収したダイズ個体の Gly m Bd 30K 含量をイムノプロット法にて解析して、Gly m Bd 30K が減少しつつある生育時期を特定することとした。

(2) ダイズの生育に伴う Gly m Bd 30K の分解が、確かにプロテアーゼによるものかどうかを確かめる必要がある。そこで、Gly m Bd 30K が減少しつつある生育時期のダイズ個体から調製した可溶性タンパク質溶液を試験管内(*in vitro*)にて保持した際の、Gly m Bd 30K の継時的変化を観察することとした。

(3) プロテアーゼは、その活性発現機構に  
応じて4つの種類(セリンプロテアーゼ、シ  
ステインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロ  
テアーゼ、金属プロテアーゼ)に分類される。  
それぞれのプロテアーゼは、特定の阻害剤  
(インヒビター)によって活性が阻害される。  
どのインヒビターが Gly m Bd 30K を分解する  
プロテアーゼの活性を阻害するのかという  
情報は、後に行うプロテアーゼの単離・精製  
において、非常に有用な情報となる。そこで  
本研究では、Gly m Bd 30K を分解するプロテ  
アーゼが豊富に含まれている生育時期のダ  
イズ個体より調製した可溶性タンパク質溶  
液に市販の種々のプロテアーゼ阻害剤を添  
加した際の Gly m Bd 30K の *in vitro* における  
分解を観察することで、Gly m Bd 30K を分解  
するプロテアーゼの活性を阻害するインヒ  
ビターを特定することとした。

### 3. 研究の方法

(1) 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、播  
種後1日おきにダイズ個体を回収した。次に、  
それらのダイズ個体から総タンパク質を抽  
出した。得られた総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、Gly m Bd 30K に対する特異  
抗体を用いたイムノプロット法にて、Gly m  
Bd 30K を検出した。

(2) (1)の研究にて明らかになった、Gly  
m Bd 30K を特異的に分解するプロテアーゼ  
が含まれる生育時期のダイズ個体から、温  
和な条件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 30K を SDS-PAGE 法  
と特異抗体を用いたイムノプロット法にて  
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 30K の量と  
比較することで、溶液中に Gly m Bd 30K  
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) Gly m Bd 30K を特異的に分解するプロ  
テアーゼが含まれる生育時期のダイズ個  
体から温和な条件で調製した可溶性タン  
パク質溶液に市販の種々のプロテアーゼ  
阻害剤(インヒビター)を加え、その混合  
溶液を 30℃ に保持(インキュベート)し  
た。インキュベート後の溶液に含まれる  
Gly m Bd 30K を SDS-PAGE 法と特異抗  
体を用いたイムノプロット法にて検出し  
た。その結果を、阻害剤を加えずに同  
じ温度で同じ時間インキュベートした溶  
液に含まれる Gly m Bd 30K の量と比  
較することで、どういった阻害剤が Gly  
m Bd 30K を分解するプロテアーゼの活  
性を阻害するのかを調査した。

### 4. 研究成果

(1) Gly m Bd 30K は播種後13日目から減

少し始め、播種後17日間生育させたダイ  
ズ個体からは検出されなかった。このこと  
から、播種後14日目から16日目のダイ  
ズ個体には Gly m Bd 30K を特異的に分  
解するプロテアーゼが含まれていると考  
えられた。

(2) 播種後15日経過したダイズ芽生え  
個体から温和な条件で調製した可溶性タ  
ンパク質溶液を 30℃ に保持したところ、  
Gly m Bd 30K 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 30K  
の経時的な減少が観察されたことから、  
Gly m Bd 30K 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 30K の  
経時的な減少が観察されなかったことか  
ら、Gly m Bd 30K 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15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 30K の経時的な減少は観察さ  
れた。このことから、Gly m Bd 30K 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 30K の減少が観察されなかった。  
このことから、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1件)

Takeshi Masaki, Mako Aoyama, Shiho  
Obayashi, Mayu Okamoto  
Degradation of phytic acid during soybean  
seedling growth.  
Nagoya Journal of Nutritional Sciences  
Volume 1, p81-87, 2015 (査読あり)

[学会発表](計1件)

間崎 剛、荻野 祐梨、富田 絢子、三輪 紋  
子、森 菜月、山口 菜摘  
ダイズの発芽と生育に伴う、各種栄養素  
の変動解析  
日本分子生物学会日本生化学会 2015 年度  
合同大会、2015 年 12 月 1 日、神戸ポ  
ートアイランド(神戸市)

〔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：