

植物種子に存在する塩可溶性タンパク質のアレルゲン性の検証

丸山 伸之

京都大学大学院農学研究科

概要 <研究目的> 食物アレルギーを発症する患者は増加の一途をたどっている。植物種子は広く食品として利用されているが、種子に含まれるタンパク質(種子タンパク質)はアレルギーの原因物質(アレルゲン)となるものが多い。大豆は日常の食生活に欠かせない食品素材であり、食物アレルギーの主要な原因物質の一つとなっている。本研究では、食塩を含む緩衝液に可溶であるグロブリンなどの大豆種子タンパク質に対する患者血清中の特異的 IgE 抗体(アレルギーに関与する抗体)との反応性を解析することにより、グロブリンのアレルゲン性を明確にするとともに、他の成分についてもアレルゲン性を明らかにすることを目的とする。

<研究方法> 大豆種子より 7S および 11S グロブリンを調製した。また、防御タンパク質およびトリプシンインヒビターなどについて大腸菌発現系を構築し、クロマトグラフィーにより組換えタンパク質を調製した。調製した大豆タンパク質について ELISA 法により大豆に対してアレルギー症状を示す患者の血清に含まれる特異的 IgE 抗体量を測定した。

<結果の概要> 解析したすべての患者において 7S および 11S グロブリンに対して高い特異的 IgE 抗体値を示した。両グロブリンに対する平均値は大豆抽出液に対する特異的 IgE 抗体値と良く相関しており、食塩を含む緩衝液に可溶であるグロブリンが主要なアレルゲンであることが示唆された。一方、防御タンパク質やトリプシンインヒビターに対して特異的 IgE 抗体値を示す検体はグロブリンと比較すると少ないが、ある程度の比率で両タンパク質に感作されている患者が存在することが明らかになった。

<今後の方向> 本研究により食塩を含む緩衝液に可溶であるグロブリンがアレルギー症状を引き起こす主要な原因物質であることを示した。グロブリンのサブユニット構成は複雑であり、今後、組換えタンパク質などを利用してサブユニットレベルでのアレルゲン性について解明することが望まれる。また、食品の安全性の面から食素材に含まれる量の少ない成分についてもアレルゲン性について明確にする必要性が示唆された。

1. 研究目的

食物アレルギーを発症する患者は増加の一途をたどっている。植物種子は広く食品として利用されているが、種子に含まれるタンパク質(種子タンパク質)はアレルギーの原因物質(アレルゲン)となるものが多い。場合によっては死に至るような重篤な症状となることが多いためその要因の解明が急務とされている。大豆は日常の食生活に欠かせない食素材であり、食物アレルギーの主要な原因物質の一つとなっている。大豆にはグロブリンと呼ばれる食塩を含む緩衝液に可溶であるタンパク質が多く含まれており、アレルゲンと報告されている^{1,2)}。また、水に可溶性のタン

パク質の中には防御タンパク質など多くの植物種においてアレルゲンとして報告されているものがある。一方、種子の油脂を蓄積する構造体(オイルボディ)の構成タンパク質であるオレオシンは水に溶けにくいタンパク質であり、大豆などの油糧種子では比較的多く含まれている。このように大豆には多様な溶解性をもつ種子タンパク質が存在しているが、これらのタンパク質についてどのようなタンパク質がアレルゲンであるかについては明確ではない。本研究では、食塩を含む緩衝液に可溶であるタンパク質であるグロブリンのアレルゲン性について明確にするとともに、水可溶性および不溶性タンパク質についても大豆に

対してアレルギー症状を示す患者の血清に含まれる特異的 IgE 抗体量(アレルギー症状を引き起こす抗体)を解析することにより、大豆に含まれるアレルゲンを明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

2.1 材料

大豆に対してアレルギー症状を示すことが臨床的に確定診断された患者血清について国立相模原病院より分与していただいた。主に、小児の患者血清を用いて本実験を行った。

2.2 大豆種子からの食塩を含む緩衝液に可溶であるグロブリンの調製

大豆種子をヘキササンで脱脂した後、トリス緩衝液(pH 8.0)でタンパク質を抽出した。抽出液の pH とイオン強度を調製することにより 7S および 11S グロブリンを調製した³⁾。調製した 7S および 11S グロブリンについて SDS-PAGE によって純度を確認した。

2.3 防御タンパク質およびインヒビターに対する組換えタンパク質の調製

植物種間で広くアレルゲンとなっている防御タンパク質について大腸菌発現系により組換えタンパク質を調製した。また、植物種子の中にはインヒビター類がアレルゲンとして報告されているため、大豆種子に多く含まれるトリプシンインヒビターについても組換えタンパク質を調製した。

ダイズ登熟期種子より調製した RNA を用いて逆転写ポリメラーゼ連鎖反応により防御タンパク質およびトリプシンインヒビターに対する cDNA を取得し⁴⁾、ヒスチジンタグを付加して大腸菌発現用プラスミドを構築した。発現用の大腸菌ホストに形質転換し、培養後、発現誘導を行ったところ高レベルでの発現に成功した。超音波破碎後、アフィニティーカラムで部分精製したのちゲル濾過クロマトグラフィーで精製することにより組換えタンパク質を調製した。防御タンパク質については発現レベルおよび可溶化率も高く、最終的にはニッケルセファロースカラムによる精製過程は省いて精製条件を確立した。

2.4 オレオシンに対する組み換えタンパク質の調製

落花生やゴマなどにおいてアレルゲンとして報告されているオレオシンは種子中でオイルボディの表層に存在している疎水性の高い膜結合性タンパク質である。こ

のような場合に大腸菌発現系を適用できない可能性が高いため、昆虫細胞を用いた発現系により大豆オレオシンの組換えタンパク質を調製した。まず、昆虫細胞を用いてオレオシンを高レベルで発現する組換えウィルスを作製した。ウィルスを感染させることにより昆虫細胞にオレオシンを発現させた後、膜結合性であるオレオシンを可溶化するために最適な界面活性剤について検討した。C 末端部に 6 残基のヒスチジン残基(ヒスチジンタグ)を導入し、培養後の細胞に界面活性剤を加えた緩衝液中で破碎し、遠心分離した上清に対してニッケルセファロースカラムを用いて精製した。

2.5 特異的 IgE 抗体量の測定

調製したアレルゲンタンパク質を ELISA プレートに吸着させた。ウェルをリン酸緩衝液により洗浄後、患者血清と反応させた。数時間インキュベートしたのち、リン酸緩衝液で洗浄し、酵素標識した抗ヒト IgE 抗体を用いて各画分に結合したヒト IgE 抗体量をマイクロプレートリーダーにより測定した。それぞれのタンパク質に対して結合した特異的 IgE 量を定量した。測定値は臨床に用いられている大豆に対するイムノキャップ値に基づく検量線に対して補正し、特異的 IgE 抗体値を求めた。

3. 研究結果

3.1 グロブリンのアレルゲン性について

大豆アレルギーと診断された患者血清 28 検体について 7S グロブリンおよび 11S グロブリンに対する特異的 IgE 抗体量を測定した。まず、大豆の抽出液を用いて測定し、臨床に用いられているイムノキャップ値と比較した。両データは非常に良い相関を示し、ELISA 法での測定値として 1.8~86.9(平均値 31.2)を示した。イムノキャップにおける特異的 IgE 抗体価は 0.7 以上で陽性と判定されるため、その値を本研究における ELISA 法に適用するとすべて患者において陽性を示す値であることを確認した(**Table 1**)。このことから本研究に用いた ELISA 法において特異的 IgE 抗体量を感度良く測定できることを示している。次に、大豆種子より調製し 7S グロブリンについて同様の測定を行った。特異的 IgE 抗体値は 0.9-55.5 を示し、平均値は 22.2 であった。大豆抽出液に対する測定値と 7S グロブリンに対する測定値では非常に高い相関がみられた(相関定数 0.91; **Figure 1**)。一方、11S グロブリンに対する特異

Table 1. Specific IgE values for salt-soluble seed proteins

Patient	Extract	Native 7S globulin	Native 11S globulin
P1	17.8	4.1	36.9
P2	30.5	27.3	12.0
P3	9.3	6.9	9.6
P4	24.8	23.8	12.7
P5	12.9	14.0	3.0
P6	12.4	1.2	4.5
P7	6.1	6.8	2.0
P8	55.9	37.9	51.8
P9	37.2	5.6	3.0
P10	14.6	2.3	18.5
P11	17.9	16.7	10.3
P12	32.8	30.0	3.5
P13	40.5	24.5	31.8
P14	1.8	0.9	1.0
P15	13.6	22.4	7.6
P16	67.7	49.3	61.4
P17	32.3	15.3	32.7
P18	44.5	39.3	36.9
P19	15.9	6.9	10.5
P20	67.7	54.3	58.0
P21	34.5	34.8	27.8
P22	17.5	11.1	10.3
P23	59.5	42.8	42.2
P24	70.6	51.4	56.3
P25	86.9	55.5	65.9
P26	18.0	8.2	6.8
P27	12.6	12.9	1.7
P28	17.4	15.5	15.5

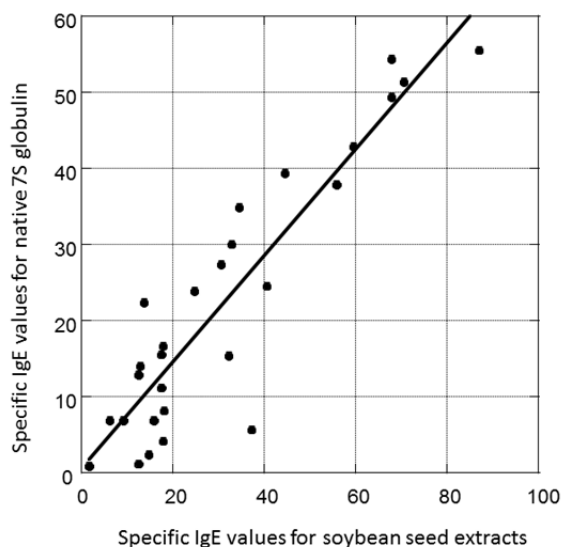


Figure 1. Correlation of specific IgE values between soybean extract and native 7S globulin

的 IgE 抗体値は 1.0-65.9 であり、平均値は 22.6 であった。11S グロブリンの場合にも 7S グロブリンと同様に大豆抽出液に対する特異的 IgE 値と高い相関がみられた(相関定数 0.90; **Figure 2**)。7S グロブリンと 11S グロブリンに対する特異的 IgE 値を比較すると、約半数が 11S グロブリンの方が高い値を示した。大豆種子中には両グロブリンともに同程度多く含まれている。そこで、7S グロブリンと 11S グロブリンの平均値に対して大豆抽出液に対する特異的 IgE 抗体値と比較したところ、各グロブリン単独との比較よりも高い相関を示した(相関定数 0.95; **Figure 3**)。このことは大豆抽出液に対する特異的 IgE 抗体値は、7S および 11S グロブリンの両方に対する特異的 IgE 量を強く反映していることを示唆している。また、今回測定したすべての患者血清において 7S グロブリンおよび 11S グロブリンに対して高い特異的 IgE 抗体値を示した。このことは食塩を含む緩衝液に可溶であるタンパク質であるグロブリンが大豆アレルギーの主要な原因タンパク質であることを示唆している。

3. 2 防御タンパク質およびインヒビターのアレルゲン性について

防御タンパク質およびトリプシンインヒビターに対する特異的 IgE 抗体値を測定した。防御タンパク質に対する特異的 IgE 抗体値は 0.05-32.27 であり、平均値は 1.5 であった。28 名中 5 名 (17.8%) の患者血清において陽性を示

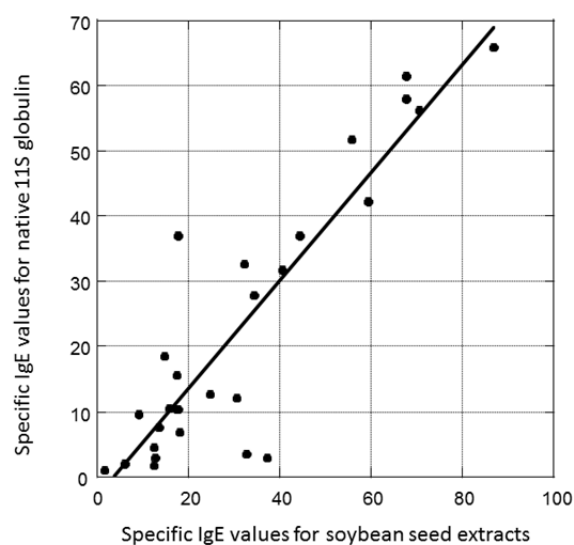


Figure 2. Correlation of specific IgE values between soybean extract and native 11S globulin

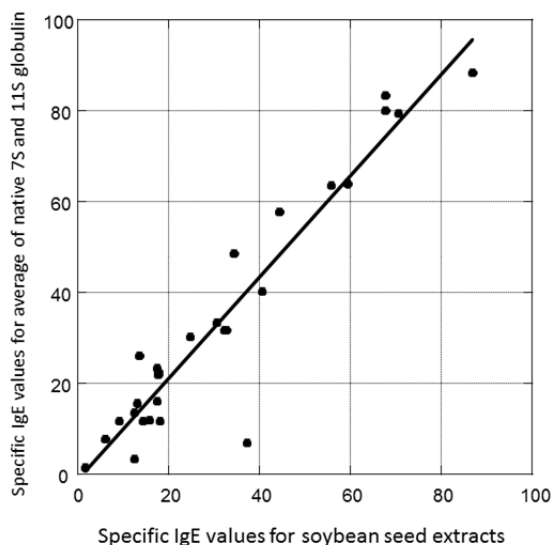
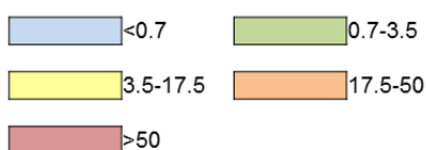


Figure 3. Correlation of specific IgE values between native 7S globulin and native 11S globulin

Table 2. Specific IgE values for water-soluble seed proteins

Patient	Extract	Defence-related Protein	Trypsin Inhibitor
P1	17.8	0.1	3.1
P2	30.5	0.3	0.2
P3	9.3	0.1	0.1
P4	24.8	0.1	0.1
P5	12.9	0.1	0.1
P6	12.4	0.8	0.3
P7	6.1	1.2	0.1
P8	55.9	1.9	0.5
P9	37.2	0.5	0.2
P10	14.6	0.2	0.2
P11	17.9	0.5	0.3
P12	32.8	0.1	0.1
P13	40.5	0.5	0.1
P14	1.8	0.1	1.1
P15	13.6	0.7	1.1
P16	67.7	1.1	1.7
P17	32.3	0.1	0.1
P18	44.5	0.1	0.1
P19	15.9	0.1	0.1
P20	67.7	32.3	1.2
P21	34.5	0.1	0.1
P22	17.5	0.1	0.1
P23	59.5	0.1	0.1
P24	70.6	0.2	0.2
P25	86.9	0.2	0.2
P26	18.0	0.1	1.2
P27	12.6	0.1	0.1
P28	17.4	0.1	0.1



す値を示した (Cut off 0.7)。その中の 1 名 (Table 2, 検体 P28) において非常に高い抗体値を示した。防御タンパク質は成人の大豆アレルギー患者において特異的 IgE 抗体が検出されることが報告されている⁵⁾。また、防御タンパク質は花粉に含まれる主要なアレルゲンにもなっている。そのため、本研究において防御タンパク質に対して高い特異的 IgE 抗体値を示した検体については、花粉に対して感作された可能性が考えられる。一方、トリプシンインヒビターに対する特異的 IgE 抗体の測定では 6 名の患者において陽性を示す抗体量が検出されたが、その値はいずれも低かった。これらの結果は、防御タンパク質およびトリプシンインヒビターともに特異的 IgE が検出される患者は 20%程度含まれるが、塩可溶性タンパク質と比較すると比率は低いことが明らかとなった。

3.3 オレオシンのアレルゲン性について

オレオシンはこれまでゴマや落花生においてアレルゲンとして報告されている^{6,7)}。しかし、大豆においてオレオシンがアレルゲンであるという報告はない。また、オレオシンはタンパク質の中央部に脂質膜に陥入するドメインをもつために組換えタンパク質の調製が難しい。我々は落花生のオレオシンについて昆虫細胞の発現系が適していることを報告している⁸⁾。そこで、本研究において昆虫細胞の発現系を用いて大豆オレオシンを調製し、特異的 IgE 抗体量の測定に用いた。28 名の患者血清の解析において、0.09-9.01 の特異的 IgE 抗体値を示し、平均値は 1.07 であった。8 名 (28.5%) の患者血清において陽性を示す値を示した。3 名の患者血清においては 5-10 程度の高い特異的 IgE 値を示した。これまで組換えタンパク質の調製が難しいことからオレオシンのアレルゲン性については十分に解析されていなかったが、本研究により大豆アレルギー患者においてオレオシンはアレルゲンとなる可能性が比較的高い大豆タンパク質であることが示唆された。

4. 考察

大豆アレルギーであることが正確に診断されている患者血清を用いることによって食塩を含む緩衝液に可溶であるタンパク質であるグロブリンが大豆アレルギーに対する主要な原因タンパク質であることを示した。一方、防御タンパク質、トリプシンインヒビターやオレオシンに対して特異的 IgE 抗体をもつ患者はグロブリンと比較すると少ない

が、ある程度の比率で感作されている患者が存在することが明らかになった。今後、食品の安全性の面から食素材に含まれる多くの成分についてアレルギー性について明確にする必要性が示唆された。

5. 今後の課題

本研究により食塩を含む緩衝液に可溶であるグロブリンがアレルギー症状を引き起こす主要な原因物質であることを示した。グロブリンは多種類のサブユニットから構成されている。今後、組換えタンパク質などを利用してサブユニットレベルでのアレルギー性について解明することが望まれる。また、大豆に含まれる多くの成分についてもアレルギーとなる可能性が示されたため、大豆タンパク質についてより広範にアレルギー性を解析する必要がある。

謝 辞

本研究を遂行する上で、多大な研究助成金を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に心より感謝の意を表します。

文 献

- 1) Ito K, Sjölander S, Sato S, Movérare R, Tanaka A, Söderström L, Borres M, Poorafshar M, Ebisawa M. IgE to Gly m 5 and Gly m 6 is associated with severe allergic reactions to soybean in Japanese children. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 128(3): 673-5.
- 2) Holzhauser T, Wackermann O, Ballmer-Weber BK, Bindslev-Jensen C, Scibilia J, Perono-Garoffo L, Utsumi S, Poulsen LK, Vieths S. Soybean (*Glycine max*) allergy in Europe: Gly m 5 (beta-conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 123(2): 452-8.
- 3) Nagano, T, Hirotsuka, M, Mori, H, Kohyama, K, Nishinari, K. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybean. *J. Agric. Food. Chem.* 1992, 40, 941-944
- 4) Shirzadegan M, Christie P and Seemann JR. An efficient method for isolation of RNA from tissue cultured plant cells. *Nuc Acids Res*, 1991; 19, 6055.
- 5) Fukutomi Y, Sjölander S, Nakazawa T, Borres MP, Ishii T, Nakayama S, Tanaka A, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakamura H, Akiyama K. Clinical relevance of IgE to recombinant Gly m 4 in the diagnosis of adult soybean allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 129: 860-863.
- 6) Leduc V, Moneret-Vautrin DA, Tzen JT, Morisset M, Guerin L, Kanny G. Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients. *Allergy.* 2006; 61(3): 349-56.
- 7) Pons L, Chery C, Romano A, Namour F, Artesani MC, Guéant JL. The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts. *Allergy.* 2002; 57 Suppl 72: 88-93.
- 8) Cabanos C, Katayama H, Tanaka A, Utsumi S, Maruyama N. Expression and purification of peanut oleosins in insect cells. *Protein J.* 2011(7): 457-63.

Evaluation of Allergenicity of Salt-Soluble Proteins in Plant Seeds

Nobuyuki Maruyama

Kyoto University, Undergraduate School of Agriculture

Summary

Soybean is an important food in many countries. However, it is one of major foods causing food allergy in childhood. Soybean seeds contain a lot of salt-soluble proteins, which named as globulin. In this study, we evaluated the allergenicity of soybean globulin. We purified two types of globulins, 7S and 11S globulins, from soybean seeds. In addition to salt-soluble proteins, we purified recombinant proteins of soybean defense-related protein, trypsin inhibitor, and oleosin (a structural protein for a storage lipid droplet). Sera of 28 patients who were confirmed clinically as soybean allergy were used. IgE antibody values specific for these proteins were measured by ELISA methods. Sera from all patients exhibited relatively high values for both 7S and 11S globulins. The average specific IgE values calculated from 7S and 11S globulins is highly correlated to that for soybean extracts. This means that IgE antibody value specific for soybean extract in patient sera account for those for globulin. On the other hand, IgE antibody specific for defense-related protein, trypsin inhibitor and oleosin were detected in sera of several patients. These results suggest that globulins are a major allergen in soybean allergy and many kinds of soybean proteins are potential to be an allergen. In the future, the analysis of an allergenicity of globulins at subunit level is expected, because a subunit composition of soybean globulins is complicated.