

課題番号 : F-19-AB-0177
利用形態 : 技術代行、技術補助
利用課題名(日本語) : 食糧タンパク質の品質に関する研究
Program Title (English) : Characterization of Food Proteins
利用者名(日本語) : 丸山伸之, 前田紘夢
Username (English) : Nobuyuki Maruyama, Hiromu Maeda
所属名(日本語) : 京都大学農学研究科
Affiliation (English) : Graduate School of Agriculture, Kyoto University
キーワード/Keyword : 形状・形態観察、分析、ダイズ、アレルゲン、分子構造

1. 概要(Summary)

ダイズは良質タンパク源であり、日々の食事に取り入れることで健康への効果も期待される。しかし、主要なアレルギー食品であることも知られ、食品表示法により加工食品における使用表示が推奨される品目に数えられている。したがって、アレルゲンの低減化を実現するために、アレルゲン性の構造的要因の解明は重要である。

8種のダイズタンパク質(Gly m 1 から Gly m 8)がアレルゲンとして登録されている。Gly m 1 は種子に含まれる疎水性タンパク質で、Gly m 2 はディフェンシンと呼ばれる抗菌タンパク質の一種である。これらはスペインで発生した喘息の原因抗原として同定された。Gly m 3 はプロフィリン、Gly m 4 は PR-10 という防御タンパク質に対応し、それぞれシラカバ花粉の主要アレルゲンである Bet v 2 および Bet v 1 のホモログである。Gly m 5 と Gly m 6 は種子貯蔵タンパク質の 7S グロブリンと 11S グロブリンであり、Gly m 7 はビオチン化タンパク質、Gly m 8 は 2S アルブミンに対応する。Gly m 5 は 3 種のサブユニット(α 、 α' 、 β)からなり、三量体として存在する。 α と α' サブユニットはプロペプチド、エクステンション領域およびコア領域で構成されるが β サブユニットはコア領域のみである。

ダイズアレルギー患者を対象にした原因抗原の解析によって種子貯蔵タンパク質である 7S グロブリン(Gly m 5) および 11S グロブリン(Gly m 6)が主要なアレルゲンであることが明らかになっている。また 7S グロブリンの各サブユニットに対する特異的 IgE 抗体の定量解析の結果、 β サブユニットより α および α' サブユニットに対する感作率が高いことが明らかになっている。したがってエクステンション領域にエピトープが存在すると考えられる。そこで、本課題では、7S グロブリン α' サブユニットのエクステンション領域の構造およびエピトープの解析を行った。

2. 実験(Experimental)

【利用した主な装置】

C14 (ダイナミック光散乱光度計 DLS-8000DH)

【実験方法】

1) 組換えタンパク質の調製

大腸菌により発現させた 7S グロブリン α' サブユニットのエクステンション領域について、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーに供して組換えタンパク質を精製した。

2) 精製タンパク質を濃縮し(数 mg/ml)、光散乱光度計により測定した。

3. 結果と考察(Results and Discussion)

エクステンション領域の示差走査熱量測定では、明瞭な変性ピークが観察されず、立体構造を持たないことが示唆された。円偏向2色性スペクトル解析では、スペクトルはランダムコイルに特有のパターンを示した。二次元 NMR 解析の結果、主鎖由来の相関ピークが非常に狭い範囲に集中しディスオーダーの特徴を示した。さらに、粒子径および分布についての知見を得るため、光散乱測定を行ったが、強度不足のためデータを得ることはできなかった。実験結果からエクステンション領域はディスオーダー構造であることが明らかになった。ペプチドマイクロアレイムノアッセイを行い、エクステンション領域の N 末端付近の 2 つの領域に IgE 抗体が結合する患者が多いという結果になった。

4. その他・特記事項(Others)

なし。

5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

前田 紘夢, 佐藤 さくら, 海老澤 元宏, 丸山 伸之, 日本農芸化学会2019年度大会, 大豆 7S グロブリンの α' サブユニットのエクステンション領域におけるエピトープ構造の解析

6. 関連特許(Patent) なし。