

報 文

米澱粉の糊化における蛋白質の溶解性変化に関する解析

矢野 裕之^{1,2§}, 竹内 正彦³, 加藤(江森)澄恵⁴, 我妻 義則⁵,
佐藤 里絵¹, 田口 計哉⁶, 岡澤 由晃⁶, 西澤 賢一³, 黒田 秧^{2,7}

Analyses on the solubility of rice protein in the gelatinization of rice starch

Hiroyuki Yano^{1,2§}, Masahiko Takeuchi³, Sumie Kato-Emori⁴, Yoshinori Wagatsuma⁵,
Rie Satoh¹, Keiya Taguchi⁶, Yoshiaki Okazawa⁶, Kenichi Nishizawa³, Shigeru Kuroda^{2,7}

¹ National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki 305-8642 Japan; ² National Institute of Crop Science, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki 305-8518, Japan; ³ Agriculture and Technology Institute of Nagano Farmers, Suzaka, Nagano 382-0084, Japan; ⁴ Research Station, Tokita Seed Co., Ltd., Otone, Saitama 349-1144, Japan; ⁵ Wagatsuma Pediatric and Allergy Clinic, Sapporo, Hokkaido 005-0804, Japan; ⁶ Nagano Kono Co., Ltd., Nagano 380-0948, Japan; ⁷ Bio-oriented Technology Research Advancement Institution (BRAIN), Minato-Ku, Tokyo 105-0001, Japan

1) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所, 2) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所, 3) 社団法人長野県農村工業研究所, 4) トキタ種苗株式会社, 5) わがつまこどもクリニック, 6) 長野興農株式会社, 7) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター

Abstract

The allergenic fraction of rice seed extract contained many kinds of putative allergens. Western-blot analysis of the fraction with sera from rice allergy patients showed a significant inter-individual variation of IgE-binding patterns. Two-dimensional SDS-PAGE has shown that after centrifugation, the supernatant of gelatinized and liquefied rice slurry contained almost no protein. So the solution should be useful as a basic ingredient for less-allergenic or low protein beverage, which is beneficial for rice-allergic patients as well as renal patients.

Keywords : アレルゲン , 糊化 , 米 , 蛋白質 , 糖化液

緒 言

厚生労働科学研究班による「食物アレルギーの診療の手引き2008」によると、わが国における食物アレルギー有病率は乳児が約10%、3歳児で約5%、学童以降が13.26%程度であり、全年齢を通して推定12%程度の有病率とされる。食物アレルギーは最近増加傾向にあることが指摘されており、アトピー性皮膚炎やアナフィラキシーなど重篤な症状を誘発することもあることから、早急に対応すべき課題である。

アレルギー症状の発症には、食生活を含む環境要因とともに、免疫の反応性を決定する遺伝子（免疫応答遺伝子）や、免疫反応を抑制する遺伝子（免疫抑制遺伝子）が関与し、アレルギーの起こしやすさは遺伝的にある程度決定されていることが明らかになりつつある。こうしたゲノム研究の成果が将来的には食物アレルギーやアトピー性皮膚炎の根本的な治療に貢献すると期待されるが、現在のところはアレルギーの原因物質であるアレルゲンの除去と、薬物によるアレルギー症状の緩和（対症療法）が現実的な対応策である。

アレルゲンの分解・変性による低アレルゲン食品の開発は、治療や対症療法によらずアレルギー発症の抑制・回避が期待できることから重要な研究課題の一つである。Chungら^{1,2)}は、ピーナツの主要なアレルゲン Ara h1や Ara h2をフィチン酸やフェノール化合物と反応させることで不溶化し、除去する手法を開発しているが、全ての種類のアレルゲンが除去されるのではない。穀物からほぼ全てのアレルゲンを除去する加工技術が開発できれば、低アレルゲン食品の原料提供に利用できる可能性がある。

米粉に加水し、オートクレーブ中で加熱しながら熱安定性の α アミラーゼで液化すると、不溶化した蛋白質をその後の濾過により回収できることが知られており、これは蛋白質の熱凝固によると考えられている³⁾。また、米粉に還元剤 DTT を添加すると糊化時に澱粉の吸水が促進されることや、RVA で測定した際の粘度上昇開始温度が低下することなどから、分子間ジスルフィド結合により高分子化した蛋白質がバリアとなって澱粉の吸水を妨げている可能性が示唆されている⁴⁾。このバリアをプロテアーゼで破壊することで米澱粉の吸水を促進し、グルテンフリー米粉パンの膨らみを改良する試みがなされているが、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察により、生地にプロテアーゼを添加したパンでは澱粉に結合した蛋白質の集合体が

分散することが観察されている⁵⁾。これらの知見は、澱粉が糊化する際に蛋白質の溶解性が変化すること、また、この現象を利用して蛋白質を除去できる可能性を示唆するが、米に含まれる多種類の蛋白質のうち、どの蛋白質がどの程度不溶化するのかなど、詳しい解析はなされておらず、そのメカニズムについても検証されていない。そこで本研究では、糊化における蛋白質の溶解性の変化についての解析と、それを利用した低蛋白質・アレルゲン食品の加工技術の可能性について検討することとした。

実験材料及び方法

1. 米アレルゲン画分の調製および二次元電気泳動による蛋白質の分離

抽出法は文献6を参考に室温で実施した。精白米（長野県産コシヒカリ）1gをコーヒーマルで破碎し、その粉末を10mLの1M食塩水に懸濁して室温で16時間攪拌した。懸濁液を5,000×gで10分間遠心した後、上清を遠心カラム CL4（ミリポア製）で濾過し、アレルゲン抽出液を得た。これを遠心カラム YM 10（ミリポア製）で14,000×gで30分程度処理して脱塩し、二次元電気泳動用サンプルバッファーに溶解し、二次元電気泳動装置 Protean IEF Cell（Bio-Rad 製）により蛋白質を分離した。

泳動後のゲルを20%のメタノールを含む25mM トリス 20mM グリシンバッファー中で振とうした後、セミドライプロットング装置（Bio-Rad 製）を用いて PVDF 膜に 1 mA/cm² で30分間転写した。5%の脱脂粉乳を含む TBS T バッファー（137mM の食塩と0.1%の Tween20を含む20mM Tris 塩酸、pH7.6）に転写後の PVDF 膜を32℃で2時間浸漬した後、50倍に希釈したアレルギー患者血清を含む TBS T バッファー中で32℃、2時間浸漬した。これを、二次抗体（1/500に希釈した HRP 結合マウス抗体）で30分間処理し、TBS T バッファーで洗浄した後、ECL 検出キット（GEヘルスケア製）で検出した。

2. 米糊化液の調製と電気泳動による蛋白質の解析

精白米に3倍量の水を加え、多管式第一種圧力容器（有限会社アトラスエンジニアリング製、型式 BEM）中で121℃、6分間加熱し、糊化させた後、その糊化物を45℃まで冷却した。これにアミラーゼ N KT 2（協和化成株式会社製、グルコアミラーゼ、 α アミラーゼ及びプロテアーゼ活性を有する複合酵素剤）を0.2%

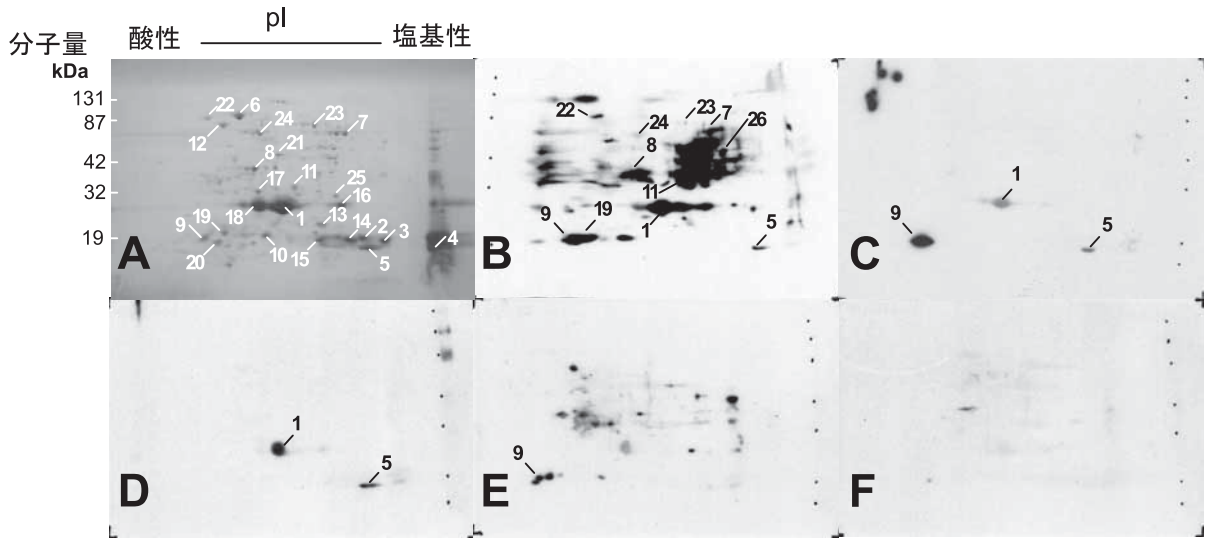


図1．米塩溶性画分の二次元電気泳動（A）とウェスタンブロットティング（B～F）
 B～D：アレルギー患者血清； E，F：非アレルギー者の血清．

(w/w) 添加し、45 に保温したままホモジナイザー処理を10分間行って十分に攪拌・混合して液化した．液温を96 に上昇させて酵素を失活させ 振動篩 (80メッシュ) で処理して米の糖化液を得た．

糖化液に等量 (w/w) の2倍濃縮 SDS サンプルバッファー (6 M 尿素, 4 % SDS, 20%グリセロールを含む125mM トリス/塩酸) を加えて混合し、一晩室温で保存した．サンプルバッファーは還元剤として100 mM DTT を含むものと含まないものを用いた．これを 5,000 × g で10分間遠心し、上清を SDS-PAGE に供した．

3．蛋白質の熱変性による沈殿の可能性の検討

アレルギー抽出液をオートクレーブで121 , 15分間加熱した．これを遠心カラム CL4 (5 μm 以上の粒子を排除, ミリポア製) の上部カラムに添加し、添加した液が上部カラムから下部カラムに移行するまで遠心した．次いでその下部カラムから溶液を回収して遠心カラム YM 100(排除限界分子量10万, ミリポア製) の上部カラムに添加し、添加した液が上部カラムから下部カラムに移行するまで遠心した．さらにこの下部カラムから溶液を回収して YM 10 (排除限界分子量1万, ミリポア製) の上部カラムに添加し、添加した液が上部カラムから下部カラムに移行するまで遠心した．それぞれの上部カラムから100mM の DTT, 6 M 尿素を含む SDS サンプルバッファー (62.5mM トリス/塩酸バッファー, 2 % SDS, 20%グリセロールを

含む) で蛋白質を抽出した．抽出液を10,000 × g で10分間遠心して夾雑物を取り除き、上清を SDS-PAGE で分析した．

実験結果および考察

1．米アレルギー画分に含まれる蛋白質の内部アミノ酸配列分析による同定およびアレルギー患者血清との反応性の解析

まず、米に含まれるアレルギーの同定を試みた．米アレルギーはそのほとんどが塩可溶性であることが知られている^{6,7)} .そこで白米から得た塩溶性画分を脱塩・濃縮し、含まれる蛋白質を二次元電気泳動により分離した (図1 A) .また、主要なスポットをゲルから切り出し、内部アミノ酸配列分析による蛋白質の同定を行った (表1) .これまで米アレルギー画分で報告されている26kDa グロブリンや α アミラーゼ/トリプシンインヒビター、ラクトグルタチオンリアーゼ以外に、熱ショック蛋白質やキューピン、ジスルフィドイソメラーゼやトリオースリン酸イソメラーゼ、マレートデヒドロゲナーゼやエノラーゼ等、他の植物で報告されているアレルギーが新たに同定された．

次に、臨床的所見から米アレルギーと診断された患者の血清との反応性を調べたところ、患者によって反応するアレルギーが異なることが示唆された (図1 B～D . E, F は非アレルギー者の血清) .ウェスタンブロットティングにおけるこうした“ inter-individual vari-

表 1 . 米塩溶性画分に含まれる蛋白質の内部アミノ酸配列分析

| 内部アミノ酸配列 | ホモロジーサーチによる同定 | アレルゲンファミリー | アレルゲン性 (報告されているものは Y) |
|---|--------------------------------------|--|--------------------------|
| 1. VEPQQCSIFAAGDHH | 26kDa globulin | 2S seed storage albumin family | Y |
| 2. DHHQVYSPGEC | Seed allergenic protein RAG1 | Alpha-amylase trypsin inhibitor family | Y |
| 3. ELGATDVGHXMA, CQPGMGYPMSL | Allergenic protein | Alpha-amylase trypsin inhibitor family | Y |
| 4. ELGAPDVGHPMS | Allergenic protein | Alpha-amylase trypsin inhibitor family | Y |
| 5. ELGATDVGHPMA CQPGMGYPMSL QLAAVDDSWCR | Seed allergenic protein RAG2 | Alpha-amylase trypsin inhibitor family | Y |
| 6. INDAVVTVPAYF, ERIDARNQLETY | HSP70precursor(barley) | HSP70family | Y |
| 7. NGXEGGRPYHLXE | Putative globulin | Cupin family | Y |
| 8. VVLVDNADFLK | lactoylglutathione lyase | Glyoxalase I family | Y |
| 9. VEPQQCSIFAAG, QYAAQLPSMCRV | 26kDa globulin | 2S seed storage albumin family | Y |
| 10. GAMAAIAEGLPG | Hypothetical protein OJ1116-C08.106 | Alpha-amylase trypsin inhibitor family | Y |
| 11. VSFGENFSPAR, LRSPAAEALGPT | Hypothetical protein OSJNB0024A20.12 | | - |
| 12. SVYYGAAEEF | Protein disulfide isomerase | | Y |
| 13. FRRPGALGLR | 26kDa globulin | 2S seed storage albumin family | Y |
| 14. ELGATEAGHPMA | Seed allergen RA17 | Alpha-amylase trypsin inhibitor family | Y |
| 17. VATPDQAQEV | Triosephosphate isomerase | | Y |
| 19. QYAAQLPSM, ARQYAAQLPSM | 26kDa globulin | 2S seed storage albumin family | Y |
| 20. VEPQQCS, YGGEG, QYAAQLP, ARQYAAQ | 26kDa globulin | 2S seed storage albumin family | Y |
| 21. VLVVANPANTNA | Malate dehydrogenase | | Y |
| 22. LTPFYK LAPGVQXITTV | Putative protein disulfide isomerase | | Y |
| 23. EALQAEAGLPV | Granule-bound starch synthase I | | - |
| 24. FRAPVEPY TYDLNFK | Enolase | | Y |

ation” は、小麦⁸やゴマ⁹でも報告されており、交配や遺伝子組換えによってどのアレルゲンを除去すべきか絞り込むことが容易でない原因の一つである。本研究からも、米で多くのアレルゲンを一度に除去できる加工技術の開発の重要性が再確認された。

2 . 澱粉糊化前後での蛋白質の溶解性の変化

米粉に加水しただけの未加熱の懸濁液からは、グルテリンやグロブリン、トリブシンインヒビターが SDS により抽出された (図 2 A a)。対照的に、米粉に加水後加熱し、澱粉が糊化した後に α アミラーゼを添加して液化させると、ほとんどの蛋白質が SDS では抽出されなくなった (図 2 A b)。一方、還元剤を添加した SDS バッファーで抽出すると、両者から蛋白質が回収された (図 2 B)。本研究は食品原料の開発を目的とするため、実験に食品添加用のアミラーゼを用いたが、プロテアーゼを含まない精製アミラーゼを用いても同様の結果が得られている (未発表)。

以上の実験結果より、米澱粉が糊化すると SDS 可溶性のほとんどの蛋白質が SDS に対して不溶化すること、また、還元剤を添加すると再び溶出されることから、不溶化にはジスルフィド結合の形成が関与する

ことが裏付けられた。

3 . 不溶化は蛋白質の熱変性によるのか？

澱粉が糊化する際に蛋白質が不溶化する原因は熱変性によると一般的に考えられている³⁾。これを検証するため、米から得た塩溶性画分をオートクレーブで処理し、不溶化するか調べた。塩溶性画分と、これをオートクレーブ処理したのものについてそれぞれを遠心カラム CL4 の上部カラムに添加し、添加した液が上部カラムから下部カラムに移行するまで遠心した。ここで添加液に沈殿が含まればこのカラムに捕捉されるはずである。次いでその下部カラムから溶液を回収して遠心カラム YM 100 および YM 10 に順次アプライした。この添加液中で複数の分子が結合して高分子化していれば前者、分子量が変化していない蛋白質は後者のカラムに捕捉されるはずである。それぞれの上部カラムから蛋白質を抽出し、SDS-PAGE で分析したところ、塩溶性画分に含まれる蛋白質は加熱の有無にかかわらずそのほとんどが分子量 1 万の分子ふるいで捕捉されていた (図 3)。この結果から、アレルゲン蛋白質自体は熱処理では沈殿や高分子化することはなく、熱凝固しないことが示唆された。

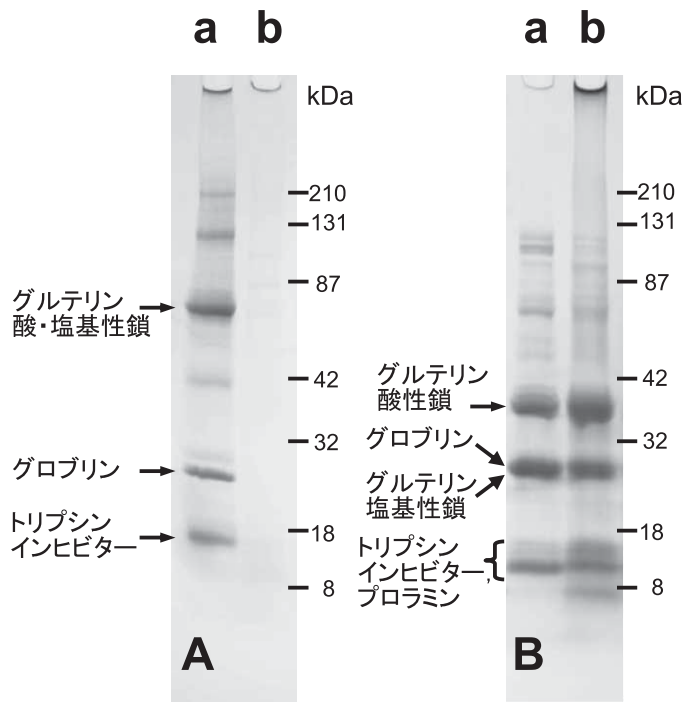


図2 . デンプン糊化前後での主要な蛋白質の溶解性の変化

A : 還元剤無添加の SDS バッファーによる抽出 ;
 B : 還元剤を添加した SDS バッファーによる抽出 .
 a : 糊化前 ; b : 糊化後 .

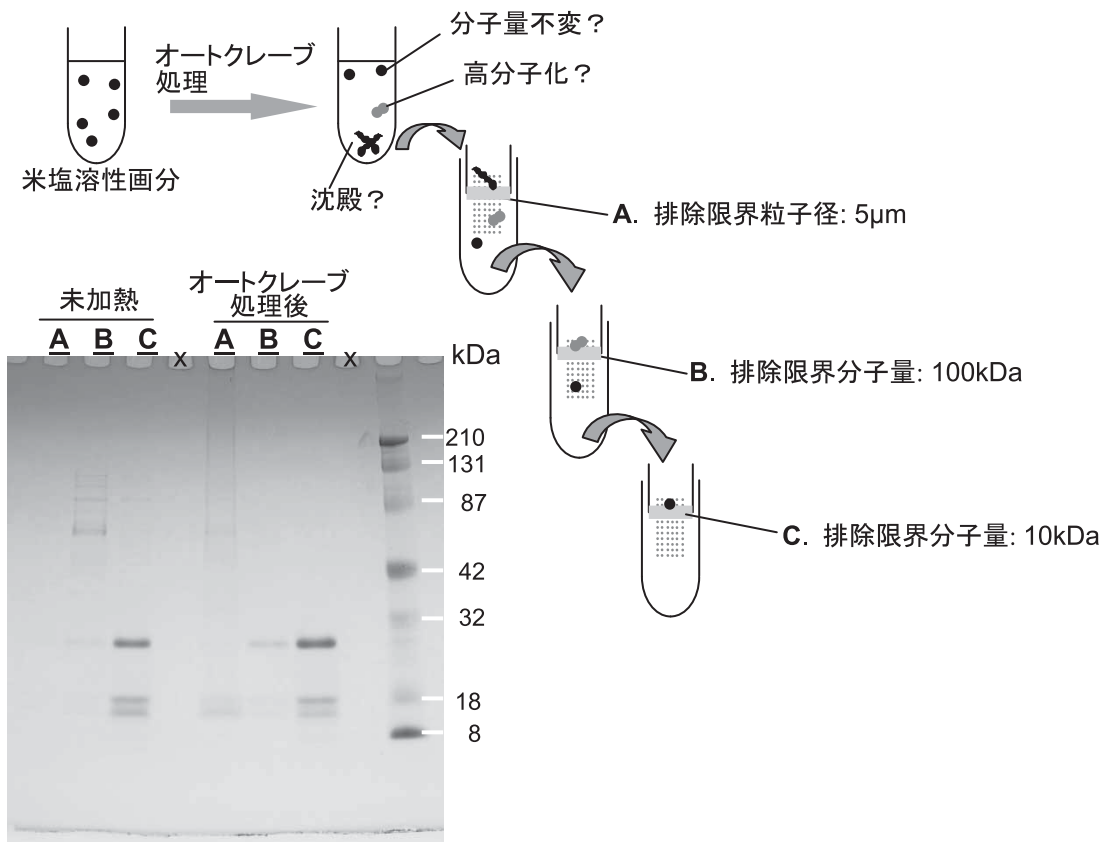


図3 . 米塩溶性画分の熱処理による沈殿の生成の解析

x : 試料をロードしていないレーン .

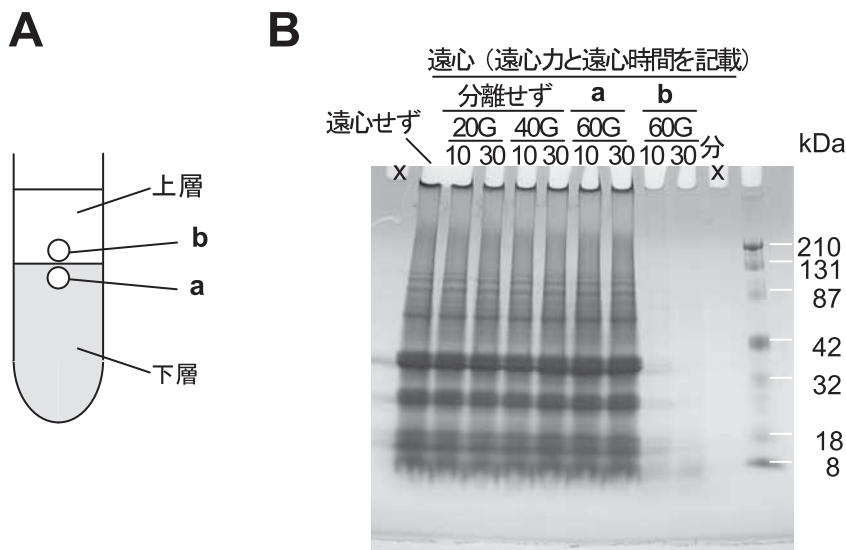


図4．米糖化液の遠心による上・下層への分離と、それぞれに含まれる蛋白質の解析

A：分離のモデル図； B：上・下層に含まれる蛋白質の組成。
x：試料をロードしていないレーン。

また、米粉に加水せず、そのままオープンで加熱しても蛋白質の不溶化は起こらない(未発表)ことから、不溶化には水の存在下での加熱、すなわち糊化、が必須であると推測される。

4．蛋白質・アレルギーの除去について

糊化における蛋白質の不溶化を利用して糖化液から蛋白質の除去が可能か調べた。米粉に加水して糊化温度以上に加熱し、放冷後にアミラーゼを添加して液化した糖化液は、60×g程度の弱い遠心力で透明な上層と白濁した下層に分けることができた。上・下層の界面付近(図4a, b)からそれぞれ少量の溶液をサンプリングしSDS-PAGEで分析すると、ほとんどの蛋白質は下層に存在し、上層には含まれなかった(図4)。

一般的に、熱変性した蛋白質を遠心により分離する際には10,000×g程度の遠心力を要することから、この実験結果は不溶化が単純な熱変性によるものではないことを支持する。また、Chungらが開発したピーナツアレルギーの除去法¹²⁾が8,000×g程度の遠心力を要するのに対し、本法は分離に要する施設の簡素化や消費エネルギーの低減などの点で有益であると考えられる。

上・下層に含まれる蛋白質を二次元電気泳動により詳細に解析しても(図5)、図1で同定されたアレルギーは上層には確認されず、蛋白質がほとんど含まれないことがわかった。グルテリン・プロラミン等、米

貯蔵蛋白質は本来水に不溶性のものが大半であるが、糊化後の糖化液を遠心することで可溶性画分を含めたほぼ全ての蛋白質が除去されることが明らかになった。また、糊化前にはSDS可溶性のグルテリンが糊化後には不溶化するなど、糊化の前後で多くの蛋白質の溶解性が変化を受けると考えられる。遠心後の糖化液の上層には白米100グラムあたりブドウ糖、麦芽糖がそれぞれ64.8グラム、14.2グラム含まれており(食品分析センター調べ)、白米からほぼ定量的に単糖が回収されていることから、本知見を蛋白質やアレルギーを穀物から除去し、アレルギー患者・腎臓病患者用の飲料、あるいは低蛋白・低アレルギー食品原料として利用するための簡便な加工技術に応用できる可能性がある。

蛋白質が不溶化するメカニズムは不明である。図2から、ジスルフィド結合の形成が関与すること、図3から、単純な熱変成による沈殿ではないことが示唆される。米粉を脱脂後、SDSにより抽出した画分は、分子間ジスルフィド結合により高分子化したグルテリン集合体を含み、これが他の蛋白質も巻き込んでいること、また、これらが還元剤存在下で遊離することが報告されている¹⁰⁾。今回のように、加熱によるジスルフィド交換反応によってグルテリンの高分子化が生じた場合でも、ポリペプチド間での疎水性相互作用や水素結合、分子間ジスルフィド結合等により他の蛋白質をトラップした可能性がある。

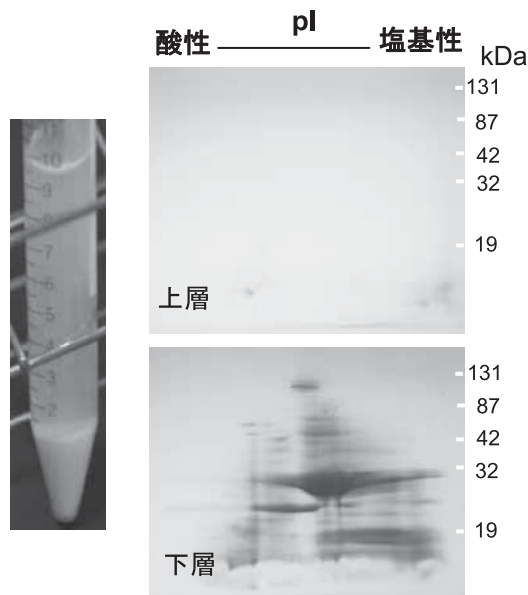


図5．上・下層に含まれる蛋白質の二次元電気泳動図

還元剤の存在・非存在下における米粉のRVAデータや吸水量の比較などから、「糊化における吸水を妨げる」蛋白質のバリアは米胚乳にはじめから存在する、あるいは調理過程や玄米をパーボイリングする過程で生成する⁴⁾ことが推測され、生成した高分子集合体が澱粉と相互作用する可能性も示唆されるが、分子的な証明はなされていない。糖化液を弱い遠心力で分離した際、界面の上下で蛋白質の組成が全く異なっていた(図4)ことから、不溶化が単純な熱変性によるものではないことが示唆されるが、不溶化が分子間ジスルフィド結合による高分子化とそれに引き続く澱粉との相互作用によるのか、あるいは澱粉の糊化と蛋白質の動態変化が全く独立して起こるのかは現時点では不明である。メカニズムの解明には今後さらに研究を進めることが重要である。

プロテアーゼの作用により食品アレルギーを消化・低減化することも試みられているが、蛋白質が十分に消化されない場合があり、生成したプロテアーゼ耐性フラグメントがアレルギーになる危険性がある¹¹⁾。一方、糊化後の糖化液上清には二次元電気泳動を用いた分析からも蛋白質は検出されず、蛋白質やアレルギーが残留する可能性が低い米を原料とした糖化液には、抗ピロリ菌作用が報告されている(既報:平成18年度産学官連携による食料産業等活性化のための新技術開発事業(農林水産省事業)ことから、アレルギーを含まない機能性食品素材の開発への応用も期待できる。

一方、低アレルギー製品の実用化には、医療機関の監督下でのアレルギー性の評価や、生産ラインにおけるコンタミの制限など、クリアすべき問題点が数多くある。現在実用化に向けた研究を進めている。

謝 辞

本研究は農林水産省アグリバイオ実用化・産業化研究および科研費(22500752)の助成を受けたものである。

要 約

米アレルギー画分には多くの種類のアレルギーが含まれ、米アレルギー患者血清を用いたウェスタンブロットティングにより、反応するアレルギーが血清によって異なることが確認された。米粉に加水・加熱し糊化させた後、アミラーゼ処理で液化した糖化液を遠心すると、二次元電気泳動による解析からも上清には蛋白質やアレルギーがほとんど含まれないことから、アレルギー患者・腎臓病患者用の飲料、あるいは低蛋白・低アレルギー食品原料として利用できる可能性がある。

文 献

- 1) Chung, S. Y. and Champagne, E. T. Reducing the allergenic capacity of peanut extracts and liquid peanut butter by phenolic compounds. *Food Chemistry*, **115**, 1345-1349 (2009).
- 2) Chung, S. Y. and Champagne, E. T. Effects of phytic acid on peanut allergens and allergenic properties of extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9054-9058 (2007).
- 3) Akoh C. C., Chang S. W., Lee, G. C., Shaw J. F. Biocatalysis for the production of industrial products and functional foods from rice and other agricultural produce. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 10445-10451 (2007).
- 4) Derycke, V., Veraverbeke, W. S., Vandeputte, G. E., De Man, W., Hoseney, R. C., Delcour, J. A. Impact of proteins on pasting and cooking properties of nonparboiled and parboiled rice. *Cereal Chem.* **82**, 468-474 (2005).
- 5)Renzetti, S., Arendt, E. K. Effect of protease treatment on the baking quality of brown rice bread: From textural and rheological properties to biochemistry and microstructure. *J. Cereal Sci.* **50**, 22-28 (2009).
- 6) Urisu A, Yamada K, Masuda S, Komada H, Wada E, Kondo Y, Horiba F, Tsuruta M, Yasaki T, Yamada M, et al. 16-kilodalton rice protein is one of the major allergens in rice grain extract and responsible for cross-allergenicity between cereal grains in the Poaceae family. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **96**, 244-252 (1991).
- 7) 山田千佳子, 和泉秀彦, 加藤保子. 米アレルギー蛋白質とその低減化. 川崎医療福祉学会誌, 16, 21-29 (2006).
- 8) Sander, I., Flagge, A., Merget, R., Halder, T. M., Meyer, H. E., Baur, X. Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting. *J. Aller. Clin. Immunol.*, **107**, 907-913 (2001).
- 9) Beyer, K., Bardina, L., Grishina, G., Sampson, H. A. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: Seed storage proteins as common food allergens. *J. Aller. Clin. Immunol.*, **110**, 154-159 (2001).
- 10) Van Der Borght, A., Vandeputte, G. E., Derycke, V., Brijs, K., Daenen, G., Delcour, J. A. J. Extractability and chromatographic separation of rice endosperm proteins. *J. Cereal Sci.* **44**, 68-74 (2006).
- 11) Yano H. Disulfide-related proteomic studies on food allergens. *Expert Rev. Proteomics*, **6**, 563-571 (2009).