

## 報 文

## 低アレルギー米品種ゆきひかりにおけるタンパク質組成の特徴

門間美千子

## Characteristics of protein profile of low-allergenic rice variety, "Yukihikari"

Michiko MOMMA

## Abstract

Protein profile of refined rice grain including low-allergenic variety, "Yukihikari", was analyzed by two-dimensional electrophoresis and mBBF fluorescence labeling. No significant difference in salt-soluble protein composition was observed among the three varieties. SDS-PAGE pattern of water-soluble proteins from Yukihikari and Kirara397 were similar, while Koshihikari contained less high-molecular weight proteins (25~80-kDa). Further analysis by two-dimensional electrophoresis revealed that water-soluble protein fraction of Yukihikari contained higher amount of 32-kDa and 70~90-kDa polypeptides and less of 28, 25, and 20-kDa polypeptides comparing to Kirara397. In the result of fluorescence labeling test, disulfide bonds in two major allergen proteins of rice,  $\gamma$ -globulin and  $\alpha$ -amylase inhibitor were found to be resistant to chemical or enzymatic moderate reduction. Content of these disulfide proteins dissolved in water-soluble fraction were lower in the two varieties from Hokkaido area, Yukihikari and Kirara397 than Koshihikari. These results implied the solubility of disulfide allergens in refined rice grains were different among the rice varieties.

平成13~14年に行われた厚生労働省の調査において、鶏卵、乳製品、小麦が我が国における三大アレルギーとされ、その他に果物、ソバ、魚類、落花生等様々な食品が食物アレルギーの原因となっていることが示された<sup>1)</sup>。それらの食品の中で、米は日本人の主食であることから食生活への影響が大きく、アレルギータンパク質の同定<sup>2-5)</sup>やアレルギー性緩和技術の開発<sup>6-9)</sup>が行われてきた。

近年、北海道で生産される品種ゆきひかりが、米アレルギー症状の緩和効果があることが見出され注目されている。柳原ら<sup>10)</sup>は、この低アレルギー米ゆきひかりの臨床効果や塩可溶性タンパク質の分布等について検討し、ゆきひかりのタンパク質が他の品種と同程度に患者血清抗体と反応し、現在のところタンパク質成分の特徴は見出されないと報告している。

我々はこれまでに、米に含まれる耐熱性タンパク質等の解析を行い、その特性を明らかにしてきた<sup>11,12)</sup>。本研究では、低アレルギー米であるゆきひかりを含む3品種の米について、二次元電気泳動パターンならびに、アレルギー性に関与するとされる<sup>13-16)</sup>ジスルフィドタンパク質の分布について検討し、その水溶性タンパク質にいくつかの特徴を見出した。

## 実験方法

## 1. 実験材料

ゆきひかりおよびきらら397の玄米は北海道立中央農業試験場、こしひかり玄米は食品総合研究所穀類特性研究室より供与された。玄米1kgを試験用精米機(ヤマト)で90%まで精白して精米を調製した。玄米およ

び精米を実験用小型ミル (Sicer Type I, 柴田) で粉碎後, 60メッシュの篩にかけたものを試料粉末とし, 粉末試料は使用時まで -20 °C で保存した。

## 2. タンパク質の抽出

粉末試料 1 g を 5 倍量 (v/w) の抽出用緩衝液 (20 mM トリス塩酸 pH8, 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル, 0.02% アジ化ナトリウム) とともに乳鉢中で磨碎混合し, 10,000 × g で 20 分間遠心後, 上清を水溶性タンパク質抽出液とした。また, 上記緩衝液に 0.5 M 塩化ナトリウムを加えたものを用いて同様に抽出を行い, 塩可溶性タンパク質抽出液を得た。試料溶液のタンパク質含量を, プロテインアッセイ試薬 (バイオラッド) を用いて, ミクロアッセイ法により定量した。

## 3. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) および二次元電気泳動

SDS-PAGEはLaemmliの方法<sup>17)</sup>に従い, 5-20% アクリルアミドゲル(e-T520L, アトー)を用いて行った。泳動後のゲルをクーマジーブリアントブルー-R-250により染色した。

二次元電気泳動は, 前報<sup>11)</sup>と同様に, マルチホアシステム (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて機器説明書に準じて行った。すなわち試料溶液に等量の膨潤用溶液 (8 M 尿素, 2 % CHAPS, 2.8 mg/ml ジチオスレイトール (DTT), 痕跡量のプロモフェノールブルー, 20 μl/ml Immobilized pH Gradient (IPG) 3-10 NL緩衝液) を加え, この溶液 125 μl を IPG ストリップ (pH 3-10NL, 7 cm) に膨潤させた。IPG ストリップを機器に装着し 200 ~ 3500V で 90 分間, 3500V で 65 分間泳動し, SDS 平衡化後, 縦型電気泳動装置 (AE6450, アトー) で 2 次元目の泳動を行った。泳動後のゲルを SYPRO Ruby (バイオラッド) により染色し画像解析装置 (Typhoon 9000, アマシャムバイオテック) でタンパク質スポットを検出した。

## 4. 蛍光色素標識によるジスルフィド結合の解析

試料タンパク質 (100 μg) のジスルフィド結合を緩衝液 (30 mM トリス塩酸, pH 7.9) 中で, 還元処理し, 蛍光色素モノプロモバイメイン (mBBBr) で標識することにより, ジスルフィドタンパク質の解析を行った。還元方法としては, 0.5 mM DTT を加え室温で 20 分, 5 mM DTT を加え 100 °C で 5 分間, 0.16 mg/ml チオレドキシン h (203-13041 ワコー), 0.14 mg/ml チオレドキシン還元酵素 (american diagnostica), 2.5 mM NADPH

からなるチオレドキシン酵素系中において室温で 20 分の 3 種類の処理を行った。還元処理した試料溶液に, 20 mM mBBBr を 5 μl 加え, 室温で 15 分間放置した。その後 100 mM β-メルカプトエタノールを 10 μl, 20% SDS を 5 μl 加え反応を停止し, さらに 80% グリセロールと 0.005% プロモフェノールを含む SDS-PAGE 試料液を添加した。コントロールとして, 還元処理をしていない試料を同様に mBBBr で標識した。得られた標識試料を, 上記 SDS-PAGE と同様に電気泳動した。泳動後のゲルを 40% (v/v) メタノール, 10% (v/v) 酢酸中で 2 時間浸とうし, 過剰な mBBBr を除いた後, 365 nm のトランスイルミネータ上で蛍光標識されたタンパク質を検出し, 黄色フィルターを装着したポラロイドカメラで写真撮影した。また, 同様に 365 nm で検出したバンドの蛍光強度を, 画像解析装置 (バイオラッド ゲルドック 1000, モレキュラーイメージャー) で計測した。

## 実験結果および考察

### 1. SDS-PAGE 分析

ゆきひかり, きらら 397, こしひかりの 3 品種の塩可溶性ならびに水溶性タンパク質画分の SDS-PAGE パターンを Fig. 1 に示した。アレルゲンタンパク質は一般に塩可溶性画分に含まれるとされている。これら 3 品種の精米に含まれる塩可溶性タンパク質の SDS-PAGE パターンに顕著な違いはなく, いずれの品種でも 20 kDa および 15 kDa に主要なバンドが見られた。文献値から, 20 kDa タンパク質は α-グロブリン, 15 kDa タンパク質は主と

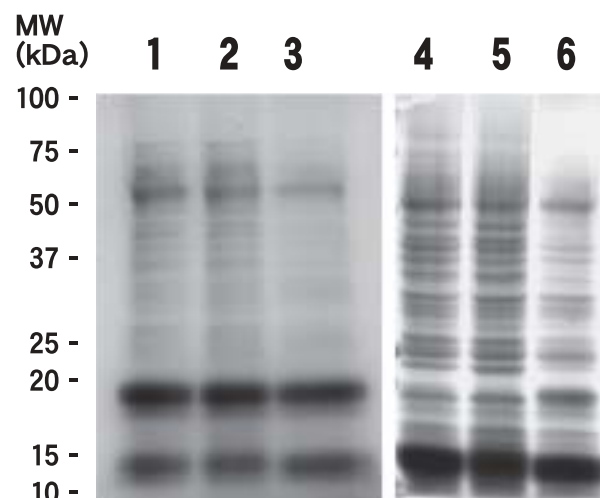


Fig. 1 SDS-PAGE pattern of salt/ water-soluble protein from refined rice grains

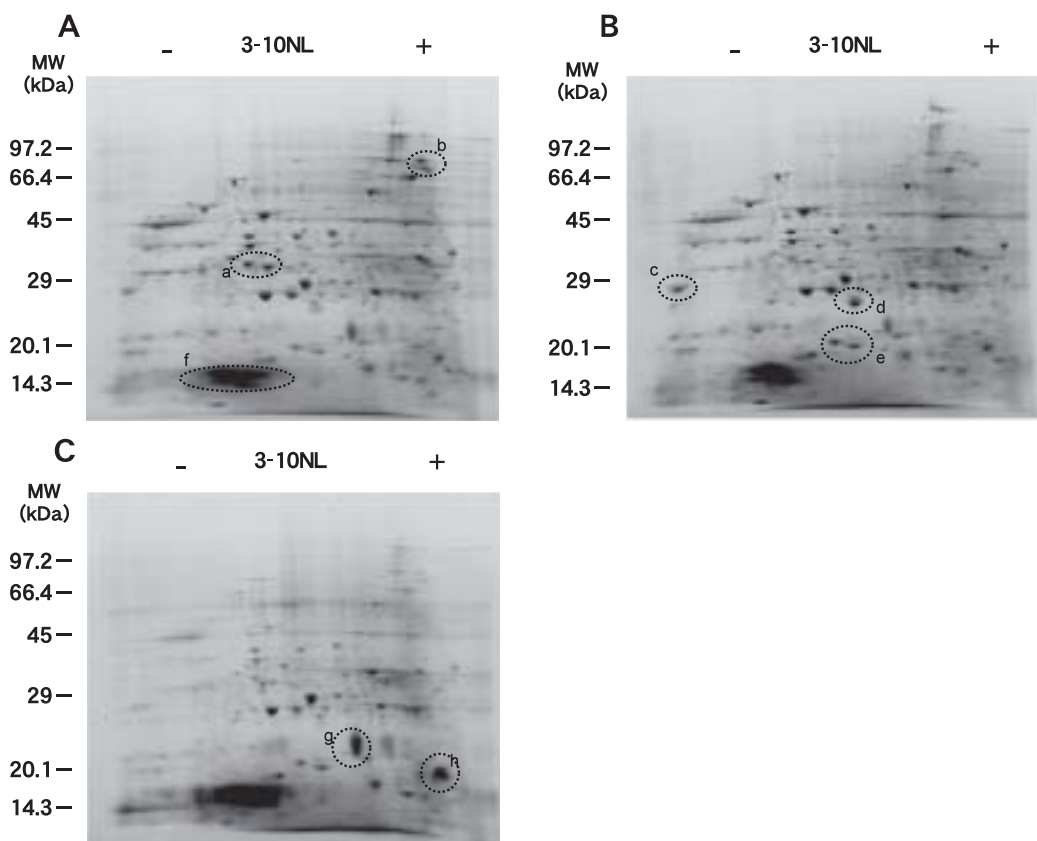


Fig.2 Two-dimensional electrophoresis of water-soluble proteins from refined rice grains  
A, Yukihikari; B, Kirara397; C, Koshihikari

して  $\alpha$ -アミラーゼインヒビターに由来するものと推定された<sup>2,4)</sup>。ゆきひかりときらら397の塩可溶性タンパク質の組成は類似しており、こしひかりでは25~80kDaの領域に含まれるタンパク質バンド数がやや少なかった。水溶性タンパク質では、塩可溶性タンパク質に比べ多くのバンドが検出されたが、ゆきひかりときらら397の泳動パターンに25~80kDaの領域でほとんど違いはなかった。こしひかりでは、この分子量領域のタンパク質バンドは少なかった。水溶性タンパク質画分ではいずれの品種でも15kDaタンパク質が最も主要なタンパク質として検出された。20kDaタンパク質のバンド濃度には品種間で相違が見られ、こしひかり、きらら397、ゆきひかりの順でバンドが濃かった。15kDaのバンドは米の主アレルゲンである  $\alpha$ -アミラーゼインヒビターと考えられるが、今回分析した3品種で大きな違いは見られず、低アレルゲン米とされるゆきひかりでもほぼ同程度のバンド濃度で検出された。柳原ら<sup>10)</sup>は、ゆきひかりと他の品種では塩可溶性タンパク質および貯蔵タンパク質のポリペプチド組成に違いは認められず、

ゆきひかりにも主要アレルゲンとされるポリペプチドが他品種と同程度存在するとしている。また、患者血清に対する抗体結合活性についても品種間差は認められないと報告している。今回の実験結果でも、ゆきひかりと他に2品種で塩可溶性タンパク質組成に差は見られなかったが、水溶性タンパク質組成で比較すると、ゆきひかりおよびきらら397の北海道産2品種はこしひかりに比べて多数のバンドが見られ、多様な水溶性タンパク質を含むこと、またアレルゲンの一つである  $\alpha$ -グロブリンのバンド濃度が薄いという違いが見られた。水溶性画分において  $\alpha$ -グロブリンの一部が可溶化しているものと考えられるが、ゆきひかりやきらら397の  $\alpha$ -グロブリンはこしひかりのものに比べてやや水溶性が低いものと推察される。

## 2. 水溶性タンパク質の二次元電気泳動

Fig. 2 に、水溶性タンパク質の二次元電気泳動プロファイルを示した。ゆきひかりときらら397の泳動パターンはよく類似しており、検出されたスポットはほぼ同

じだったが、各スポットの濃度には若干の差が見られた。ゆきひかりでは、分子量約32kDa (a), 約70~90kDaのスポット (b) の濃度が高く、きらら397では分子量約28kDa (c), 約25kDa (d) および約20kDa (e) のスポットの濃度が高かった。

米の主要なアレルゲンである  $\alpha$ -アミラーゼインヒビターは多様な成分からなることが知られているが、本実験でも14~16kDa付近に幅広いスポット群 (f) が見られた。今回の二次元電気泳動においてはタンパク質濃度がやや高く、それぞれのスポットの識別はできないが、その形状からタンパク質成分がゆきひかりときらら397で成分組成が多少異なるものと推察された。以上の結果から、二次元電気泳動プロファイルでは、ゆきひかりときらら397の水溶性タンパク質は、アレルゲンタンパク質に相当する分子量領域を含め相違が見られることが明らかとなった。一方、こしひかりではゆきひかりやきらら397に比べてスポット数が少なく、約23kDa (g), および約20kDa (h) のスポットが濃く検出された。分子量から、h が  $\beta$ -グロブリンに相当するスポットと考えられる。また  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター

のスポット群 (f) の分布領域はゆきひかりやきらら397に比べ大きかった。ゆきひかりの水溶性タンパク質成分には若干の特徴が認められたが、これまでのところアレルゲン性との関連は不明である。Poschら<sup>18)</sup>は二次元電気泳動を用いて、小麦タンパク質の患者血清との反応性を調べ、抗体結合性の高い  $\alpha$ -アミラーゼインヒビターのスポットを同定している。今後、詳細なアレルゲン性の検討が進められれば、ゆきひかりのタンパク質プロファイルに何らかの意味が見出されるかもしれない。

### 3. 蛍光色素標識によるジスルフィド結合の検出

アレルゲンとされるタンパク質の多くがジスルフィドタンパク質であり、タンパク質分子内架橋結合による構造安定化のアレルゲン性への関与が報告されている<sup>13-15)</sup>。そこで、これら3品種の米の塩可溶性および水溶性タンパク質について、タンパク質のジスルフィド結合を解析した。ジスルフィド結合に対する還元処理をしないコントロール、5 mM DTTとともに煮沸処理しジスルフィド結合を完全に還元処理した試料、

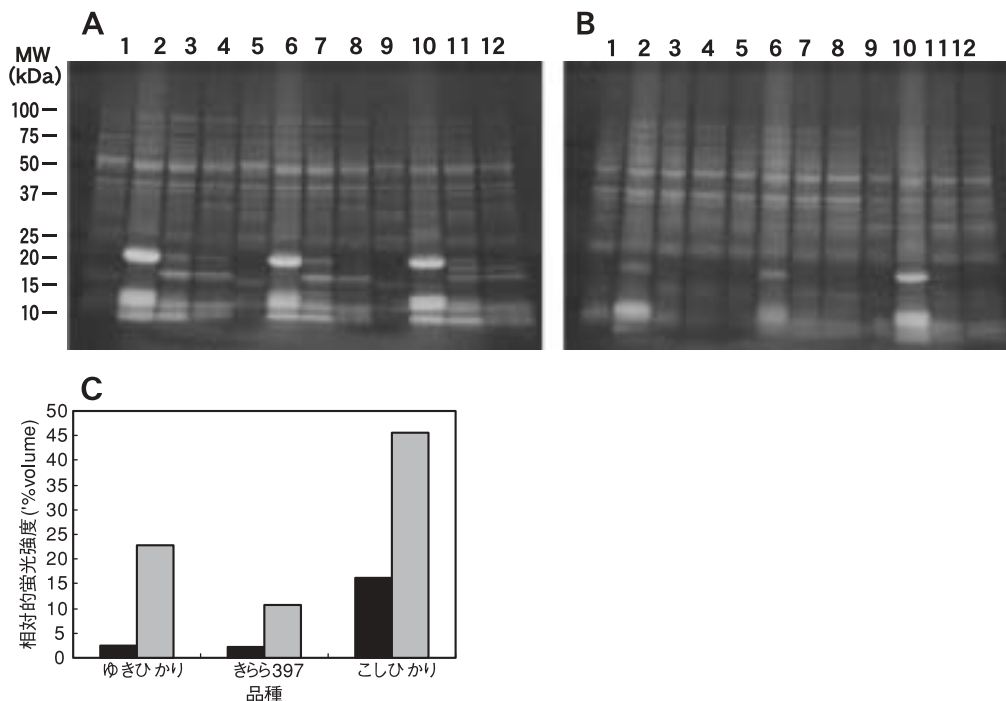


Fig. 3 mBBR labeling of disulfide bonds in rice proteins

A, salt-soluble protein, B, water-soluble protein lane 1-4, Yukihikari; 5-8, Kirara397; 9-12, Koshihikari; 1, 5 and 7, control; 2, 6 and 10, 5 mM DTT and heated; 3, 7 and 11, 0.5 mM DTT, 4, 8 and 12, Thioredoxin-enzyme complex C, Relative fluorescence intensity of  $\alpha$ -globulin and  $\alpha$ -amylase inhibitor in lanes 2, 6, and 10 of Fig. 3B

■,  $\alpha$ -globulin; □,  $\alpha$ -amylase inhibitor

0.5mM DTTまたはチオレドキシソ酵素系による室温での還元処理をした試料を、チオール基に特異的な蛍光色素モノプロモバイメインで標識し電気泳動した (Fig. 3). 塩可溶性タンパク質については、完全に還元処理した場合、いずれの品種でも20kDaと15kDaに主要バンドが検出された。これらは米の主要アレルゲンである  $\gamma$ -グロブリンおよび  $\beta$ -アミラーゼインヒビターと推定され、米の塩可溶性ジスルフィドタンパク質の大部分を占めることが示された。 $\beta$ -アミラーゼインヒビターは5個の分子内ジスルフィド結合をもつ構造が報告されている<sup>16)</sup>。 $\gamma$ -グロブリンの詳細な構造は不明であるが、完全に還元した試料以外ではほとんど検出されないことから堅固なジスルフィド架橋結合で構造が保持されているものと推察された。水溶性タンパク質の完全還元処理試料 (Fig. 3 B, lanes 2, 6, 10) について、これらのバンドの蛍光強度をデンストメーターで測定したところ (Fig. 3 C), こしひかりで  $\gamma$ -グロブリンに由来するバンドの蛍光強度が高く、ゆきひかりやきらら397では低かった。15kDaの  $\beta$ -アミラーゼインヒビターのバンドにも品種間差が見られ、こしひかり、ゆきひかり、きらら397の順で蛍光強度が高かった。水溶性画分には、これら2種類のアレルゲンタンパク質の他に多数のジスルフィドタンパク質のバンドが検出された。しかし、他のバンドは還元条件による濃度の差はほとんど見られなかった。 $\gamma$ -グロブリンと  $\beta$ -アミラーゼインヒビターのジスルフィド結合が還元されにくく構造が保持されることがアレルゲン性に関与する可能性が考えられた。

以上に述べたように、低アレルゲン米であるゆきひかり精米から抽出した塩可溶性タンパク質は、こしひかりや近縁種のきらら397と非常に類似していたが、水溶性タンパク質では成分組成に若干の相違が認められた。既知の主要アレルゲンである  $\beta$ -アミラーゼインヒビターや  $\gamma$ -グロブリンは堅固なジスルフィド結合を持つことが示された。また  $\gamma$ -グロブリンの溶解性に品種間差がある可能性が示唆された。

## 要 約

低アレルゲン米ゆきひかりのタンパク質組成を、こしひかり、ならびに近縁品種であるきらら397のものと比較した。精米の塩可溶性タンパク質をSDS-PAGEで分析したところ、これら3品種の電気泳動パターンに顕著な差は見られなかった。水溶性タンパク質では、ゆきひかりと、きらら397は類似したパターンを示したが、

米主要アレルゲンである  $\gamma$ -グロブリン、 $\beta$ -アミラーゼインヒビターのバンド濃度に差異が認められた。こしひかりでは分子量25~80kDaの領域のタンパク質が少なかった。タンパク質組成の差異をさらに詳細に検討するため、二次元電気泳動による解析を行った。ゆきひかりでは、分子量約32kDa、約70~90kDaのスポットの濃度が高く、きらら397では分子量約28kDa、約25kDaおよび約20kDaのスポットの濃度が高かった。ジスルフィド結合について、蛍光色素標識法で分析したところ、米の主要アレルゲンとされる  $\gamma$ -グロブリンおよび  $\beta$ -アミラーゼインヒビターに由来すると見られるバンドに強い蛍光標識が見られた。これら2種のタンパク質は、温和な条件で還元したときには標識されないことから、堅固なジスルフィド結合を持つものと推測された。塩可溶性タンパク質では蛍光標識バンドに顕著な品種間差異はなかったが、水溶性タンパク質では、こしひかりの  $\gamma$ -グロブリンに相当するバンドが顕著に検出され、ゆきひかりやきらら397ではやや蛍光強度が低かった。また、 $\beta$ -アミラーゼインヒビターでも、こしひかりの蛍光標識強度がやや高かった。以上の結果から、米の品種間で、ジスルフィドタンパク質の溶解性や構造特性に相違があることが示唆された。

## 謝 辞

試料を供与いただきました、北海道立中央農業試験場の柳原哲司博士ならびに食品総合研究所大坪研一穀類特性研究室長に深謝します。実験を御支援いただいた関友子氏に感謝します。本研究の一部は、農林水産省食品総合プロジェクト「健全な食生活による生活習慣病予防のための研究開発」(1-705)により実施されたものであり、ここに謝意を表します。

## 文 献

- 1) 堀口逸子, アレルギー表示の現状と課題, 食品と科学, **46**(10), 73-76 (2004).
- 2) Urisu, A., Yamada, K., Masuda, S., Komada, H., Wada, E., Kondo, Y., Horiba, F., Tsuruta, M., Yasaki, T., Yamada, M., Torii, S., Nakamura, R., 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).
- 3) Matsuda, T., Nomura, R., Sugiyama, M., Nakamura, R.,

- Immunochemical Studies on Rice Allergenic Proteins, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 509-513 (1991).
- 4) Limas, G.G., Salinas, M., Moneo, I., Fischer, S., Wittmann-Liebold, B., Mendez, E., Purification and Characterization of New Rice NaCl-soluble Proteins: Identification of Four Protein-synthesis Inhibitors and Two Immunoglobulin-binding Proteins, *Planta*, **181**, 1-9 (1990).
  - 5) Usui, Y., Nakase, M., Hotta, H., Urisu, A., Aoki, N., Kitajima, K., Matsuda, T., A 33-kDa Allergen from Rice (*Oryza sativa* L. Japonica), *J. Biol. Chem.*, **276**, 11376-11381(2001).
  - 6) Watanabe, M., Miyakawa, J., Ikezawa, Z., Suzuki, Y., Hirao, T., Yoshizawa, T., Arai, S., Production of Hypoallergenic Rice by Enzymatic Decomposition of Constituent Proteins, *J. Food Sci.*, **55**, 781-783 (1990).
  - 7) Kato, T., Katayama, E., Matsubara, S., Omi, Y., Matsuda, T., Release of Allergenic Proteins from Rice Grains Induced by High Hydrostatic Pressure, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3124-3129 (2000).
  - 8) 長谷川浩, 徳永善也, 三浦清之, 柳原哲司, 後木建一, 米アレルギーの臨床調査第2報 高度精白米の効果について, 日本アレルギー学会第35同抄録集, p.192 (1998).
  - 9) 池澤義郎, 椿和文, 大砂博之, 嶋田禎祐, 茂木和之, 杉山宏, 勝俣和子, 安西弘行, 天野三郎, アレルゲン低減化米(AFT-R1)の有用性と塩不溶性米アレルギー分子の解析, *アレルギー*, **48**, 40-49 (1999).
  - 10) 柳原哲司, 北海道米の食味向上と用途別品質の高度化に関する研究, 北海道立中央農業試験場報告101号(2002).
  - 11) 門間美千子, 米糠に含まれるグループ2 LEAタンパク質(デハイドリン)の二次元電気泳動解析と乳酸脱水素酵素に対する凍結変性保護活性, *食総研報*, **67**, 15-20 (2003).
  - 12) 門間美千子, 塩ストレスによるイネ芽生えタンパク質の変動, *食総研報*, **68**, 39-42 (2004).
  - 13) Buchanan, B. B., Adamidi, C., Lozano, R. M., Yee, B. C., Momma, M., Kobrehel, K., Ermel, R., Frick O.L., Thioredoxin-linked Mitigation of Allergic Responses to Wheat., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5372-5377 (1997).
  - 14) del Val, G., Yee, B. C., Lozano, R. M., Buchanan, B.B., Ermel, R. W., Lee, Y.- M., Frick, O. L., Thioredoxin Treatment Increases Digestibility and Lowers Allergenicity of Milk, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 690-697 (1999).
  - 15) Yano, H. and Kuroda, S., Identification of Disulfide Proteins in the Salt Soluble Fraction of Rice (*Oryza sativa*) Seed., *Cereal Chem.*, **80**, 172-174 (2003).
  - 16) Izumi, H., Sugiyama, M., Matsuda, T., Nakamura, R., Structural Characterization of the 16-kDa Allergen, RA17, in Rice Seeds, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 2059-2063 (1999).
  - 17) Leammli, U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**,680-685 (1970).
  - 18) Posch, A., Weiss, W., Wheeler, C., Dunn, M. J, Gorg, A., Sequence Analysis of Wheat Grain Allergens Separated by Two-dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients, *Electrophoresis*, **16**, 1115-1119 (1995).