

Ⅳ 食品研究における蛋白質レドックス制御 ～解析技術からグルテンフリー米粉パンまで～

1. はじめに

蛋白質は私たちの体で重要な役割を果たす。体を動かす筋肉だけではない。眼球水晶体にある透明な蛋白質、髪の毛、爪、骨など特徴的な構造を形づくる蛋白質、食べ物を消化する酵素、免疫に関わる抗体、酸素を運ぶヘモグロビンも蛋白質だ。その働きには枚挙にいとまがない。

蛋白質の基本構造は非常に単純で、数十から数百個におよぶアミノ酸が直線状につながっただけである。それでもアミノ酸は20種類あり、それぞれがユニークな構造をしているため、例えば5個つながっただけでも $20^5 = 320$ 万種類のバラエティに富んだものができることになる。一本鎖の蛋白質は酸・塩基性、親水・疎水性など、様々なアミノ酸を含むため、それぞれが相互作用しあって一つひとつの蛋白質に特有の立体構造を形成し、多様な役割を果たすことを可能にする。蛋白質の構造や機能については解説書等¹⁾でわかりやすく解説されているので参考にされたい。

一方、基本的には1本鎖の蛋白質も特定の部分で架橋（ジスルフィド結合）を形成する場合がある（図1）。この架橋はシステインという、SH基をもつアミノ酸同士の間で可逆的に生じるが、架橋が切断される場合は水素（H）が付加するため還元（Reduction）反応になり、逆に、架橋される場合には水素が除去されるため酸化（Oxidation）反応になる。そこで、この反応をレドックス（Redox）反応と呼ぶ。

生体では主にプロテインジスルフィドイソメラーゼ酵素（PDI）が酸化反応を触媒し、チオレドキシニン酵素や、3つのアミノ酸がつながったペプチドであるグルタチオンが還元反応を触媒する。例えば種子貯蔵蛋白質はPDIの作用で分子内ジスルフィド結合を形成し、折りたたまれた（フォールディング）状態で貯蔵器官であるプロテインボディにコンパクトに収納される。一方、種子が発芽する際には、チオレドキシニンなどの還元酵素がジスルフィド結合を切断し、アンフォールドすることでその後のプロテアーゼによる分解を容易にする。

架橋形成により蛋白質はその構造が大きく変化する。また、架橋、切断で蛋白質の機能が変化する場合があります、生体が環境から刺激を受けてから反応するまでの情報伝達にも用いられる。こうしたレドックス制御による生理機能の調節は、植物では光合成、発芽、高温・乾燥耐性、耐病性などに、また、動物では様々な病態やストレスに関係することが報告されている²⁾。地球温暖化などの自然環境の変化、社会環境におけるストレスの増加などから、レドックス研究の重要性はますます高まりつつある。網羅的な解析手法があれば未知の重要なレドックス機

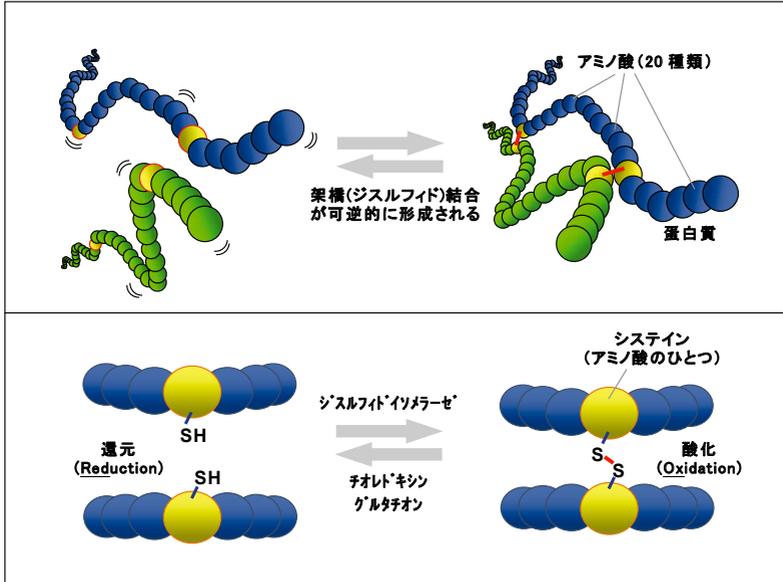


図 1. 蛋白質ジスルフィド結合の架橋・切断によるレドックス変化

構を解明することができ、さらにその制御による有用な植物・食品の開発が期待できる。本稿では著者らがこれまで実施した研究を中心に、内外の研究事例も併せ、植物・食品分野における蛋白質レドックス機構の解析・制御に関する研究を紹介する。

2. レドックスプロテオミクスの開発

筆者らはカリフォルニア大学と共同で蛋白質レドックス変化を包括的に解析する方法を開発した(図2)³⁾。原理は極めて単純で、細胞から蛋白質を抽出する際に遊離のSH基を蛍光修飾し、二次元電気泳動で蛋白質を分離するだけである。落花生種子に含まれるチオレドキシンの標的蛋白質(ターゲット)を *in vitro* 反応で検出した例について図2を用いて紹介する。まず、様々な蛋白質を含む抽出物に還元酵素チオレドキシンを作用させるとターゲット蛋白質のジスルフィド結合が切断される(A)。ターゲットでない蛋白質のジスルフィド結合は切断されず架橋したまま残る。続いて、ジスルフィド結合を形成していない遊離のSH基を特異的に蛍光標識するモノプロモビマン(mBBr)を作用させると、チオレドキシンのことによって露出したSH基に反応するため、細胞抽出物中のターゲット蛋白質が選択的に蛍光標識される。

これを1次元目は非還元状態で、2次元目は還元状態で行う対角線二次元電

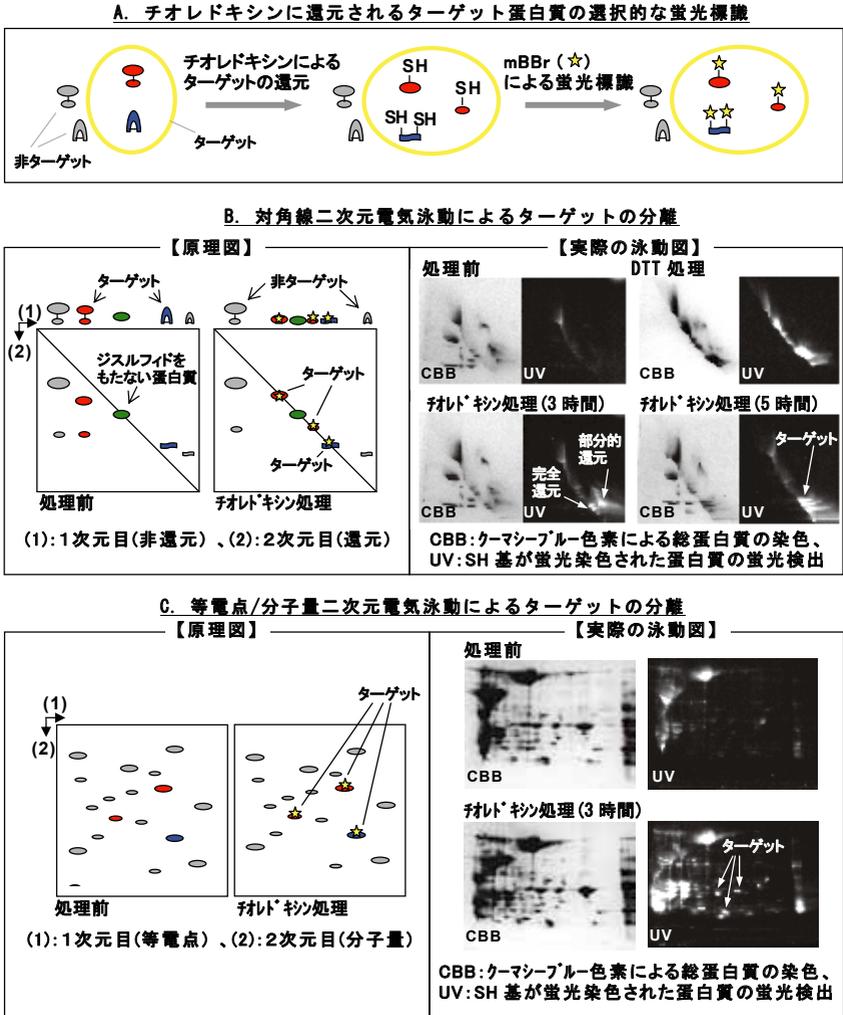


図2. レドックスプロテオミクスの原理

文献3より許可を得て転載

気泳動で分離する (B)。この電気泳動では界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) によって負に帯電した蛋白質がアクリルアミドの網の目の中を通過しながら陽極に泳動するため、一般的に分子量が大きいものほど泳動距離が短く、分子量が小さいものほど泳動距離が長くなる。ジスルフィド結合をもたない蛋白質は1次元目と2次元目で大きさが同じであるため泳動距離が等しく、対角線上に

泳動する (B【原理図】「処理前」緑色のスポット)。分子間ジスルフィド結合をもつ蛋白質は、1次元目では複数の蛋白質が結合したままひとつのかたまりとして泳動する。これを還元剤で処理した2次元目では結合が切断されるため、ばらばらになった蛋白質がそれぞれ単独で泳動する。このため2次元目では分子量が小さく、泳動距離が長くなるため、対角線の下側に泳動する (赤色のスポット)。逆に、分子内ジスルフィド結合をもつ蛋白質は1次元目ではコンパクトな状態、2次元目ではアンフォールドされた状態で泳動するため後者の方がみかけの分子量が大きく、対角線の上側に泳動する (青色のスポット)。一方、チオレドキシンの処理を行うと、ターゲットは泳動前にジスルフィド結合が切断され、mBBrにより蛍光標識されるので、365nmの紫外線イルミネータ上で対角線上の蛍光スポットとして検出される (B【原理図】「チオレドキシンの処理」)。その後、総蛋白質をクーマシーブルー (CBB) で染色する。

実際の泳動図を右側に示した。細胞抽出物をジチオスレイトール (DTT) のような強力な還元剤で処理すると、全ての蛋白質においてジスルフィド結合が還元され、mBBrによる蛍光標識を受けるため、蛍光スポットとして対角線上に並ぶ (「DTT 処理」)。一方、チオレドキシンの処理した場合にはジスルフィド結合が切断されたターゲットだけが対角線上に泳動し、蛍光スポットとして検出される (「チオレドキシンの処理 (5時間)」)。目的のスポットから蛋白質を抽出し、アミノ酸配列を決定することでターゲットを同定する。ひとつの蛋白質が複数のジスルフィド結合をもつ場合には、反応条件によってそのうちいくつかは切断されずに残ることがある。その場合は対角線の上 (分子内ジスルフィドの場合) または下 (分子間の場合) に蛍光スポットとして検出される (同 (3時間)「部分的還元」)。

一方、一般的に用いられる等電点 / 分子量二次元電気泳動では、1次元目を蛋白質の等電点により、2次元目を分子量の大きさにより分離するが、チオレドキシンの処理前と処理後で蛍光強度を比較することでターゲットを検出できる (図 2C)。本例では、落花生種子に含まれる2種類の機能蛋白質と3種類のアレルゲンがチオレドキシンのターゲットとして同定された。チオレドキシンの依存的に起こる植物生理機構の解明や、後述するようにアレルゲンの低減化技術の開発につながる知見が得られている³⁾。

対角線二次元電気泳動を用いるとチオレドキシンの作用したのが分子内、分子間ジスルフィド結合のいずれであるかが判別できる。等電点・分子量二次元電気泳動を用いるとスポットの解像度が高い。実験の目的に応じていずれかを選択できる。図 2 では *in vitro* 反応を例に手法の原理を紹介したが、環境変化によってレドックス状態が変化する蛋白質を *in vivo* で調べるのにも利用されている^{4,5)}。

また、レドックスプロテオミクスは生化学の汎用機器を用いて簡便に実施できる。筆者らは、二次元電気泳動装置以外に UV サンプル撮影装置 FAS (東洋紡社製)

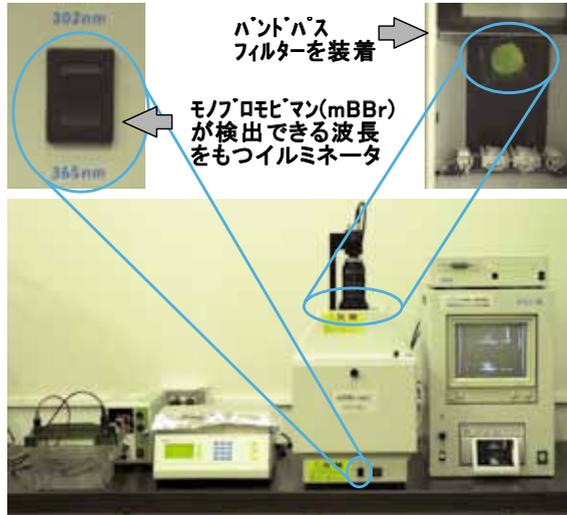


図3. レドックスプロテオミクスに使用する機器

と、302/365nmの切り替えができるイルミネータ FAS-2512M（同社製）、バンドパスフィルター（Kodak Gelatin Filter No.8）を使用しているだけである（図3）。

本手法は、同時期に開発された原理の異なる東工大・久堀徹教授らの手法⁶⁾と併せ内外の研究機関で広く活用され、2009年時点で植物チオレドキシンの400以上のターゲットを同定し、その生理メカニズムの解明に貢献してきた。フランス国立農業研究所（INRA）のMontrichardらが両手法とその改良法などにより同定されたターゲットを整理・要約し、リストを公開している⁷⁾。今後も内外の研究機関で利用が進み、レドックス研究進展の一助となることを期待している。

3. 種子貯蔵蛋白質の消化機構の解明

筆者らはレドックスプロテオミクス手法を用いて種子発芽における貯蔵蛋白質の分解機構を解析した。詳細は原著^{4,8)}に譲るが、分子内ジスルフィド結合によりプロテインボディにコンパクトに収納された貯蔵蛋白質をチオレドキシニンがアンフォールドし、同時にそれを消化するプロテアーゼを活性化することで効率よく分解する機構を明らかにしている。図4はイネ種子糠層からの抽出物にチオレドキシニンを作用させたものである。黄色い丸で囲んだスポット1, 2, 3は多数の分子内ジスルフィド結合によりコンパクトな形状をもつ Embryo-specific protein (EPR) であるが（図4A）、これにチオレドキシニンを作用させると EPR のスポットが消失する（同B）。一方、システインプロテアーゼの阻害剤ロイペプチン存在下でチオレドキシニンを作用させると EPR は消失せず、蛍光標識されたスポッ

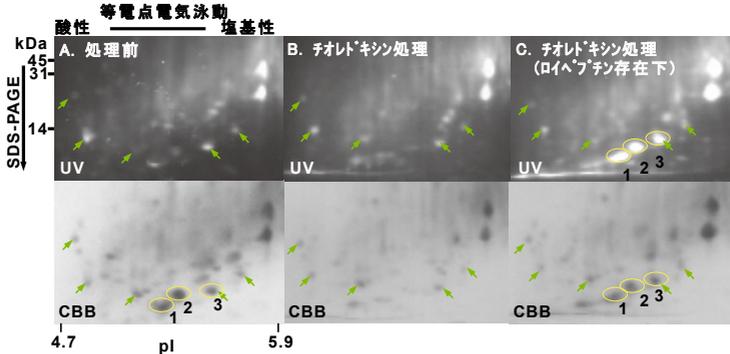


図 4. イネ種子糠蛋白質へのチオレドキシンの作用

CBB：クーマシーブルー色素による総蛋白質の染色

UV：SH 基が蛍光染色された蛋白質の検出

文献 4 より許可を得て転載

トとして検出される（同 C）。以上のことからチオレドキシンは EPR の分子間ジスルフィド結合を切断してアンフォールドし、これを消化するシステインプロテアーゼを活性化することが推察された。基質と酵素の両者に働きかけることで迅速に貯蔵蛋白質を分解するメカニズムが明らかになった。*In vivo* でも同様の現象が観察されることを確認している⁴⁾。

4. アレルゲン性との関連について

こうした植物に特徴的な貯蔵蛋白質の分解機構は、動物が種子を食物として摂取した際の、蛋白質のアレルゲン性に関連する（図 5）。前述のように、植物種子ではジスルフィド結合を架橋することで貯蔵蛋白質がコンパクトな形状で収納されている（A）が、発芽の際にはチオレドキシンなどの働きで貯蔵蛋白質のジスルフィド結合が切断され、蛋白質の分子構造をアンフォールドすることで消化しやすくする。片や動物が食物として種子（穀物）を食べる際には、ジスルフィド結合が架橋したまま消化しようとする（B）。蛋白質のなかでもジスルフィド結合が架橋した領域はプロテアーゼ消化されにくく、切れ残りの断片が生じ、これがアレルゲンになる可能性があることが示唆されている⁹⁾。前述のレッドクスプロテオミクス手法を改変し、ジスルフィド架橋を特異的に蛍光標識する¹⁰⁾と、ソバ種子の塩可溶性蛋白質ではプロテアーゼ耐性をもつペプチド断片がジスルフィド結合をもつことが示された¹¹⁾（C）。アレルゲン蛋白質が必ずしもジスルフィド結合をもつとは限らず、その逆に、ジスルフィド結合をもつ蛋白質がアレルゲンであるとは限らないが、蛋白質のジスルフィド架橋とプロテアーゼ耐性、アレルゲン性には興味深い関連があることは明らかである。

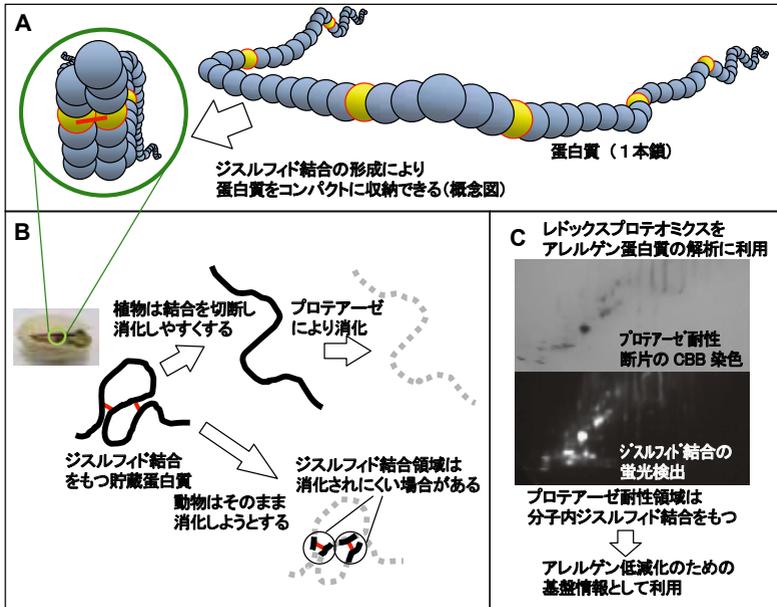


図 5. 動・植物における蛋白質消化機構の比較

文献 11, 16 より許可を得て転載

5. レドックス制御の植物・食品への応用

1) チオレドキシンを利用した研究

ジスルフィド結合とアレルギー性に関する知見を活かして食品を低アレルギー化する試みが進行している。カリフォルニア大学は小麦抽出物¹²⁾や牛乳¹³⁾にチオレドキシンを作用させると、プロテアーゼ消化性が向上すること、また、イヌを用いた実験からアレルギー性が低下することを報告している。遺伝子組換え体を用いた研究も実施され、大麦胚乳でチオレドキシンを最大で30倍に過剰発現させたところ、種子貯蔵蛋白質の可溶性が高まり、発芽が促進されることが見出された¹⁴⁾。これら一連の研究成果は、チオレドキシンを用いて食品を加工したり、植物を改変したりすることで低アレルギー食品素材として利用できる可能性を示唆する。最近では京都大学からのベンチャー企業レドックス・バイオサイエンス社がチオレドキシンを利用した低アレルギー食品の実用化研究を進めている。淀井らのグループは酵母から高濃度のチオレドキシンを含む抽出物を得、これを乳アレルギーの β -ラクトグロブリンや卵アレルギーのオボムコイドに作用させたところプロテアーゼ消化性が向上し、動物実験によりアレルギー性が低下することを実証した¹⁵⁾。

一方、チオレドキシンの食品利用には克服すべき課題がある。チオレドキシンは還元状態で働くが、これには還元力のもととなるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリド酸 (NADPH) と、NADPH の還元力のもとにチオレドキシンを還元するチオレドキシンレダクターゼを要する。今後は、食品原料だけでチオレドキシンを活性化 (還元) する技術を確立できるかどうかは食品利用の実用化への重要な鍵になる。

チオレドキシンの利用は低アレルゲン化にとどまらない。詳細は拙著総説¹⁶⁾で紹介しているが、チオレドキシンを過剰発現させたタバコ葉ではデンプンの蓄積量が7倍、発酵に利用できる糖が5倍に増加することが報告された¹⁷⁾。葉1トンあたりから40Lのバイオエタノールが得られる計算になり、野生型から得られる量の10倍に相当する。チオレドキシンを高発現させたタバコがバイオ燃料生産の有効な資源となる可能性を示唆し、レドックス制御が幅広い産業分野で応用できることを示す研究成果である。反対に、チオレドキシンの発現を抑制することにより白色小麦では穂発芽が抑制されること¹⁸⁾、ジャガイモでは低温貯蔵による糖蓄積が低下しフライドポテトのアクリルアミド抑制につながること¹⁹⁾などが報告されている。まだ基礎研究の段階ではあるが、チオレドキシンによる植物生理機構の制御を利用した新規植物の開発、さらにそれらの食品改良への応用に関する興味深い知見である。

2) グルタチオンを利用した研究

同様にグルタチオンの利用も進んでいる。グルタチオンは酵母エキスから精製して得ることができ、世界の年間消費量100トンのうち、日本のメーカー2社がその8割を工業生産する。酵母エキスは内外で食品として利用でき、これから精製したグルタチオンは米国や東南アジア、台湾などで食品として、日本では医薬品として利用されている。次に著者らが行っている、グルタチオンを利用したグルテンフリーパンの研究について簡単に紹介する。

近年、途上国における急激な人口増加、肉食中心の食生活へのシフトなどにより、世界の穀物需要は逼迫しつつある。2012年末には、世界最大の小麦輸出国である米国が深刻な干ばつ被害にあったことでトウモロコシや大豆の価格が高騰し、これに伴って小麦の価格が上昇した。国内で消費される小麦の86%を海外からの輸入に頼る日本はその影響が避けられない。我が国の食料自給率はカロリーベースで39%、生産額ベースで68% (いずれも平成24年度調査) であり、先進国のなかでも際だって低く、食料の確保は輸入先の政治・経済的な影響を受けやすい。そこで、自給率を向上し、国内における食糧の安定な供給を諮ることは我が国の重要な課題である。一方、米は古来より日本人の主食であり、日本の農地で完全自給が可能な数少ない農産物の一つである。このため米粉を主原料としたパンを開発すれば自給体制の向上に貢献できる。また、小麦、甲殻類、果物類が成人の

食物アレルギーの上位3主因であり²⁰⁾、小麦依存性運動誘発アナフィラキシーなど重篤な症状を引き起こす場合も報告されているため²¹⁾、小麦アレルギーは特に注意が必要とされるものの一つである。自給率の向上と、小麦アレルギーの回避を目的とし、筆者らは小麦粉を使わずにパンを作る研究を開始した。

まず、米粉からグルテンのような粘り気のある蛋白質をつくることができないか検討した。小麦粉に水を加えて練ると、粘り気のある、つながった生地ができる。これは、小麦粉に含まれる蛋白質が分子間ジスルフィド結合によるネットワーク（グルテン）を形成したことを示す。この構造により小麦粉の生地は発酵の際、酵母が出す炭酸ガスを閉じこめることができ、生地が膨らむ。一方、米粉の場合はグルテンのもとになる蛋白質がないため、小麦粉やグルテンを使わずに米粉からパンを作るのは容易ではない。

著者らは当初、米粉に含まれる蛋白質の構造を変化させ、グルテンのような蛋白質のネットワークを形成させることで発酵ガスを閉じこめ、米粉パンを膨らませることができるのではと考えた。そこで分子内ジスルフィド結合が多い米の蛋白質を分子間型に変換するよう、米粉生地に還元型や酸化型のグルタチオン（図6）を添加し、発酵・焼成などの条件検討を行ったところ、いずれを用いても生地が膨らむことがわかった^{22, 23)}。

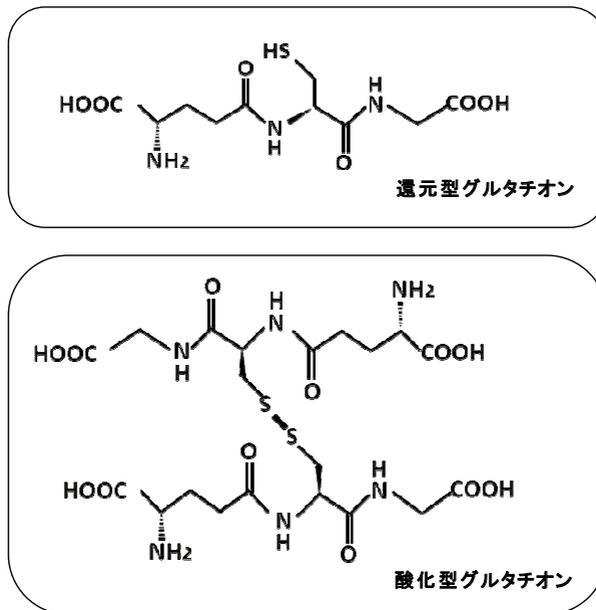


図6. 還元型および酸化型グルタチオンの構造

しかし、グルタチオンを添加した米粉生地は、小麦粉の生地のように粘り気のあるつながったものではなく、液状である（図7A, B）。また、発酵中の生地はメレンゲのようにふわふわしたもので、スコップで一部をすくい取ることができる（C）。小麦粉の生地の場合はスコップですくおうとすると餅のように全体がくっついてくる（D）。こうした性状の違いから、グルタチオン米粉生地の場合には、グルテンのような蛋白質のネットワークとは異なったメカニズムで発酵ガスが閉じこめられているようである。

生地が膨らむメカニズムはまだ不明であるが、パデュー大学の Hamaker 教授らは穀物種子澱粉粒にジスルフィドで高分子化した蛋白質が作用し、これが澱粉粒の吸水を妨げるバリアとして働く可能性を報告している²⁴⁾。著者らは、グルタチオンを添加して作ったパンや生地の微細構造解析等の結果から、グルタチオンがこの高分子バリアに作用し、そのジスルフィド結合を切断することで澱粉の吸水が促進され、均一性と粘度がともに高い生地ができ、パンが膨らむのではないかと推察している。この仮説の検証は今後の課題であるが、いずれにせよ、グルタチオンがまだ構造や働きがよくわかっていない未知のメカニズムに作用し、グルテンフリーのパン生地を膨らませたと考えられる。

前述のように精製したグルタチオンは日本では医薬品に分類されるため、食品には利用できないが、精製前の酵母エキスを用いてもパンを膨らませることができる。グルタチオンパンの場合には、チオレドキシンのように他の還元剤や酵素の添加を必要としないので、添加物を一切用いず、「食品」だけでグルテンフリーパンをつくることできる（特許出願中）。現在、民間企業と共同でパンの品質向上など、実用化を進めている。

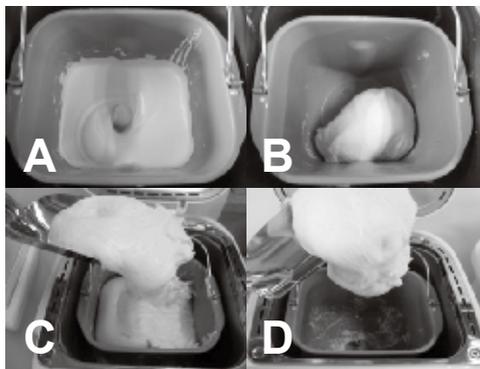


図7. グルタチオンを添加した米粉生地，小麦粉生地の比較

上：攪拌中の生地：A. グルタチオン添加米粉生地，B. 小麦粉生地，
下：発酵中の生地：C. グルタチオン添加米粉生地，D. 小麦粉生地

この知見は、穀類に限らず、ジスルフィド結合の改変により様々な食品素材から新しい食品を開発できる可能性を示唆するものである。上述の高分子バリアが *in vivo* でどのような役割を果たしているのか、また、稲の種子発芽時にどのような変化を受けているのかは不明であるが、米に限らず植物・動物など、食品原料には食品の物性・機能性などの品質に影響を与える未利用の微細構造や生理メカニズムが存在すると考えられる。それらがジスルフィド結合により維持されている、あるいはレドックス反応依存的に機能する場合には、チオレドキシンやグルタチオンによりその構造や機能を改変することで様々な食品の開発が可能であることが示唆される。

食品だけではない。小川健一ら岡山県農林水産総合センター・植物レドックス制御研究グループは、グルタチオンを用いた植物生理の制御や、作物の収穫量・品質を向上させる研究に取り組んでいる。例えばトルコギキョウが栄養生長から生殖生長に切り替わるには春化（低温処理）が必須であるが、同グループはグルタチオンや、グルタチオン合成の原料であるシステインを培地に添加すると春化处理しなくても転換が生じることを見出した。この効果はグルタチオン合成の阻害剤であるブチオニンスルフォキシミン（BSO）により妨げられ、グルタチオンの添加により回復するが、グルタチオン合成の原料であるシステインでは回復しない。これらのことから、春化により誘導される栄養成長から生殖成長への転換にはグルタチオン合成が関与し、グルタチオン特異的に制御されると推察される²⁵⁾。また、グルタチオンの合成に関与する GSH1 遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現させると、春化と同じ効果が遺伝子発現や表現系で観察されることが示された。グルタチオンの投与や植物体での発現制御により植物生理をコントロールできることを示す成果である。

こうした知見は春化に限らない。グルタチオン溶液を作物の葉に噴霧したり、培地に加えたりすることで、トウモロコシの収穫量が増加するなど、作物の収量性の向上に寄与する可能性が期待されている。小川らはこれを“グルタチオン農業”²⁶⁾と名付け、光合成効率を飛躍的に高めた作物の開発について実用化を進めている。また、葉緑体ストロマの肥大など、グルタチオンの作用による微細構造の変化も確認されており、どうして収量が増大するのか、そのメカニズムの解明も並行して進められている。

6. 今後の展望

チオレドキシンやグルタチオンを利用したレドックス制御による植物機能の向上や食品の開発研究は急速に発展しつつある。未知の、あるいはまだ利用されていない植物や食品素材のメカニズムにレドックス刺激を与えることで、新規植物や食品の開発に有効に利用されることが期待できる（図8）。

一例として、最近純粋培養が可能になったユーグレナ²⁷⁾の培養条件を変化さ

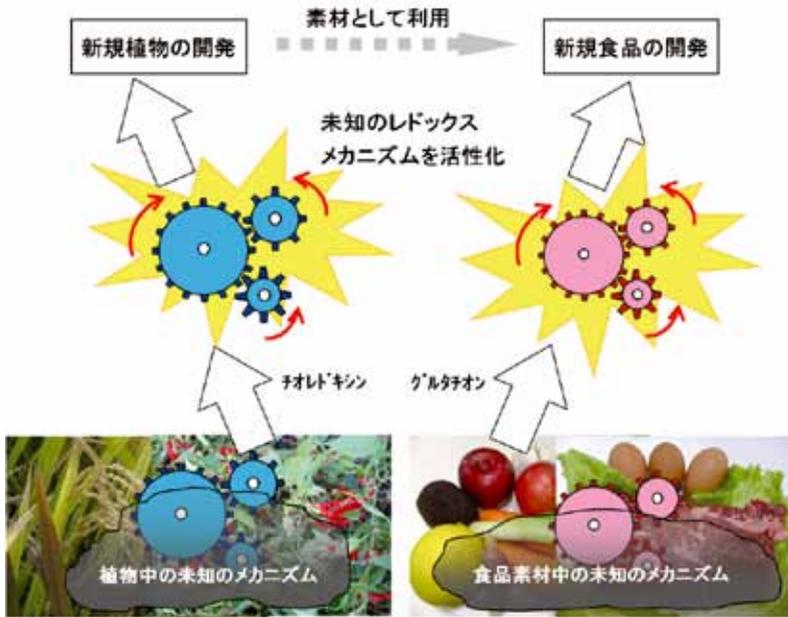


図 8. 概念図：レドックス改変による新規植物・食品の開発

せることで光合成効率を向上させたり、新規栄養物質を生産させたりできるかもしれない²⁸⁾。また、培養液にグルタチオンやチオレドキシンの精製物を与えなくても、それらを産生する酵母との共培養によって作用させることも可能かも知れない。他にも、最近食品としての活用が目される昆虫や、土壌改良剤・化粧品・再生医療素材としての研究が進んでいるエチゼンクラゲなど、食品として活用できる素材はほぼ無限にある。今後、レドックス研究の実用化に向けて幅広い分野にチャレンジしたいと考えている。

(謝辞)

本研究の推進に協力いただいている蛋白質素材ユニット福井明子氏に感謝する。本研究は JSPS 科研費 22500752,25450193 の助成を受けた。

(食品素材科学研究領域 蛋白質素材ユニット 矢野 裕之)

引用文献

1. 武村政春, (2011). たんぱく質入門～どう作られ, どうはたらくのか～. 講談社文庫ブルーバックス.

2. 江口裕伸, 藤原範子, 大河原知水, 鈴木敬一郎, 谷口直之. 酸化ストレスと健康. (2009). 生物試料分析. **32**, 247-256.
3. Yano, H., Wong, J.H., Lee, Y.M., Cho M.J., Buchanan, B.B. (2010). A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. **98**, 4794-4799.
4. Yano, H. & Kuroda, M. (2006). Disulfide proteome yields a detailed understanding of redox regulations: a model study of thioredoxin-linked reactions in seed germination. Proteomics. **6**, 294-300.
5. Alkhalfioui, F., Renard, M., Vensel, W.H., Wong, J., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Buchanan, B.B., Montrichard, F. (2007). Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. Plant Physiol. **144**, 1559-1579.
6. Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M.T., Hisabori, T. (2001). Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. **98**, 11224-11229.
7. Montrichard, F., Alkhalfioui, F., Yano, H., Vensel, W.H., Hurkman, W.J., Buchanan, B.B. (2009). Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. J. Proteomics. **72**, 452-474.
8. Yano, H., Wong, J.H., Cho, M.J., Buchanan, B.B. (2001) Redox changes accompanying the degradation of seed storage proteins in germinating rice. Plant Cell Physiol. **42**, 879-883.
9. Sen, M., Kopper, R., Pons, L., Abraham, E.C., Burks, A.W., Bannon, G.A. (2002). Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. J. Immunol. **169**, 882-887.
10. Yano, H. (2003) Fluorescent labeling of disulfide proteins on 2D gel for screening allergens: a preliminary study. Anal. Chem. **75**, 4682-4685.
11. Yano, H., Kusada, O., Kuroda, S., Kato-Emori, S. (2006) Disulfide Proteome analysis of buckwheat seeds to screen putative allergens. Cereal Chem., **83**, 132-135.
12. Buchanan, B.B., Adamidi, C., Lozano, R.M., Yee, B.C., Momma, M., Kobrehel, K., Ermel, R., Frick, O.L. (1997). Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**, 5372-5377.
13. del Val, G., Yee, B.C., Lozano, R.M., Buchanan, B.B., Ermel, R.W., Lee, Y.M., Frick, O.L. (1999). Thioredoxin treatment increases digestibility and lowers allergenicity of milk. J. Allergy Clin. Immunol. **103**, 690-697.
14. Cho, M.J., Wong, J.H., Marx, C., Jiang, W., Lemaux, P.G., Buchanan, B.B. (1999) Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch

- debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96**, 14641-14646.
15. Taketani, Y., Kinugasa, K., Furukawa, S., Nakamura, H., Otsuki, R., Yasuda, H., Fujita, T., Kanzaki, K., Masutani, H., Yodoi, J. (2011). Yeast thioredoxin-enriched extracts for mitigating the allergenicity of foods. Biosci. Biotechnol. Biochem. **75**, 1872-1879.
 16. Yano, H. (2014) Ongoing applicative studies of plant thioredoxins. Mol. Plant, in press.
 17. Sanz-Barrio, R., Corral-Martinez, P., Ancin, M., Segui-Simarro, J.M., and Farran, I. (2013). Overexpression of plastidial thioredoxin f leads to enhanced starch accumulation in tobacco leaves. Plant Biotechnol. J. **11**, 618-627.
 18. Li, Y.C., Ren, J.P., Cho, M.J., Zhou, S.M., Kim, Y.B., Guo, H.X., Wong, J.H., Niu, H.B., Kim, H.K., Morigasaki, S., Lemaux, P.G., Frick, O.L., Yin, J., and Buchanan, B.B. (2009). The level of expression of thioredoxin is linked to fundamental properties and applications of wheat seeds. Mol. Plant. **2**, 430-441.
 19. He, T., Song, B., Liu, J., Chen, X., Ou, Y., Lin, Y., Zhang, H., and Xie, C. (2012). A new isoform of thioredoxin h group in potato, SbTRXH1, regulates cold-induced sweetening of potato tubers by adjusting sucrose content. Plant Cell Rep. **31**, 1463-1471.
 20. 海老澤元宏. (2011). 食物アレルギーの診療の手引き. 厚生労働省研究班.
 21. 相原雄幸. (2012). 食物依存性運動誘発アナフィラキシーの最近の傾向と進歩. 日本小児アレルギー学会誌. **26**, 138-145.
 22. Yano, H. (2010). Improvements in the bread-making quality of gluten-free rice batter by glutathione. J. Agric. Food Chem. **58**, 7949-7954.
 23. Yano, H. (2012). Comparison of oxidized and reduced glutathione in the bread-making qualities of rice batter. J. Food Sci. **77**, C182-C188.
 24. Hamaker, B.R. & Griffin, V.K. (1993). Effect of disulfide bond-containing protein on rice starch gelatinization and pasting. Cereal Chem. **70**, 377-380.
 25. Yanagida, M., Mino, M., Iwabuchi, M., and Ogawa, K. (2004). Reduced glutathione is a novel regulator of vernalization-induced bolting in the rosette plant *Eustoma grandiflorum*. Plant Cell Physiol. **45**, 129-137.
 26. 小川健一. (2012). グルタチオン農業. 植物の生長調節. **47**, 17-23.
 27. 出雲充. (2012). 僕はミドリムシで世界を救うことに決めました. ダイアモンド社.
 28. 矢野裕之. (2013). チオレドキシシン, グルタチオンを利用した植物・食品蛋白質レドックス研究. 第 29 回ユウグレナ研究会講演要旨.