

酵素を用いるアレルゲン除去卵白の創製

山 本 憲 二 (京都大学農学部助教授)

1. はじめに

最近、食品に含まれる不適性な因子を何らかの方法で除去した食品を作り出そうとする試みがいくつかなされている。例えば、米のアレルギーの原因物質であるアルブミンをプロテアーゼによって分解し、低アレルゲン米を作り出すことは既に実用化されている。

アレルギーの原因となる食品としては鶏卵や牛乳、大豆などが良く知られている。なかでも鶏卵は安価で栄養価の高いタンパク食品であり、しかも乳化作用や卵白の泡立ちを利用する食品加工の素材として広範な食品に含まれているので、アレルギー患者にとっては最もやっかいな食品であ

る。鶏卵に対する、いわゆる卵アレルギーの原因物質（アレルゲン）の一つは卵白中のオボムコイドと呼ばれる糖タンパク質であり、患者の血清にはそれに対する抗原特異性が見られる¹⁾。

ニワトリの卵白オボムコイドは卵白タンパク質の約11%を占める分子量約28,000の糖タンパク質で、トリプシンインヒビターとしても知られている。その糖含量は約30%近くにも達し、一分子中には四ないし五本の糖鎖が結合している(図1)²⁾。タンパクのアスパラギン残基に結合している、これらのアスパラギン結合型糖鎖(N-グリコシド結合糖鎖)の構造は複雑かつ多様で、いわゆる複合型糖鎖(Complex type of sugar chain)がほとんどである(図2)。オボムコイドは100℃で60分

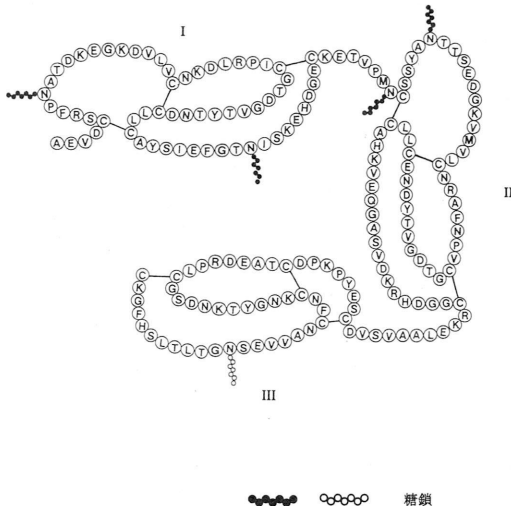


図1 オボムコイドの一次構造

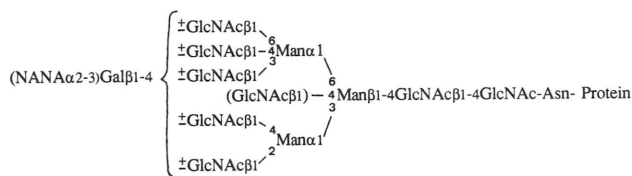


図2 オボムコイドの糖鎖構造

間加熱しても、粘度、電気泳動および超遠心分析では変性が認められないほど高い熱安定性を示し、これには糖鎖部分が寄与している可能性があり、アレルギーの発症とも何らかの関係があると考えられる³⁾。

オボムコイド中の糖鎖を含んでいる構造体のドメインⅢは卵アレルギー患者の血清中のIgE抗体と結合するが、糖鎖を含まない同じドメインにはほとんど結合せず、IgE抗体は糖鎖の有無をはっきりと識別することが報告されている⁴⁾。この様に、オボムコイドの糖鎖部分がアレルギー反応に関与していることが確かめられているが、糖鎖がこれら抗体の認識部位となっているのか、あるいは糖鎖の結合に伴うポリペプチド部分のコンフォメーションの変化が免疫反応に影響しているのかは明らかにされていない⁴⁾。

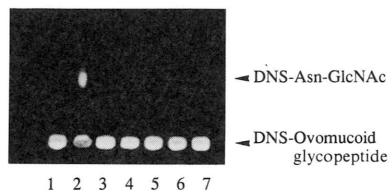
そこで、我々はオボムコイドの複雑な構造を持つ糖鎖を除去することができれば、その糖鎖と卵アレルギーとの関係を明らかにすることができるのと同時に、低アレルゲン卵白を創製することができるものと考えた。我々はその手段として、糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖のジアセチルキトビオース結合部分に作用して、糖鎖部分もタンパク質部分も傷つけることなく遊離することができるEndo- β -N-acetylglucosaminidase (Endo- β -GlcNAc-ase)に着目した。そして、オボムコイドの糖鎖に作用するEndo- β -GlcNAc-aseを生産する微生物を土壌より検索した。

2. 卵白オボムコイドの糖鎖に作用する

Endo- β -GlcNAc-ase

オボムコイドの糖鎖に作用するEndo- β -GlcNAc-aseを検索するための基質として、オボムコイド(トリプシンインヒビター)をプロナーゼで徹底消化し、得られたオボムコイド糖ペプチドをダンシルクロリドで蛍光ラベルしたDNS-ovomucoid glycopeptideを用いた。本基質は、Endo- β -GlcNAc-aseによりDNS-Asn-GlcNAcを生成するので、ペーパークロマトグラフィーによって生成物を分離し、酵素の活性を分析した。

ニワトリの卵白より調製したオボムコイドを培地として誘導培養することにより、培養液中に目的とするEndo- β -GlcNAc-aseを生産する微生物を検索した。その結果、土壌より分離した一菌株



- 1; Inactivated enzyme (*Bacillus* sp.)
- 2; Endo- β -GlcNAc-ase (*Bacillus* sp.)
- 3; Endo-H (*Streptomyces plicatus*)
- 4; Endo-M (*Mucor hiemalis*)
- 5; Endo-F (*Flavobacterium meningosepticum*)
- 6; Endo-D (*Diplococcus pneumoniae*)
- 7; Endo-FI (*Flavobacterium* sp.)

図3 オボムコイドの糖鎖に対する種々の微生物のEndo- β -GlcNAc-aseの作用

(SI-29株)の培養液より、目的の酵素活性を見出した(図3)。種々の糖タンパク質の糖鎖の構造や機能の解析のための有効な手段として、微生物の生産する幾つかのEndo- β -GlcNAc-aseが見出されているが⁵⁾、これらの酵素はオボムコイドの糖鎖にはほとんど作用しなかった(図3)。本土壌分離菌は種々の生理学のおよび菌学的試験より、*Bacillus* sp. と同定した。

3. 酵素の精製とその諸性質

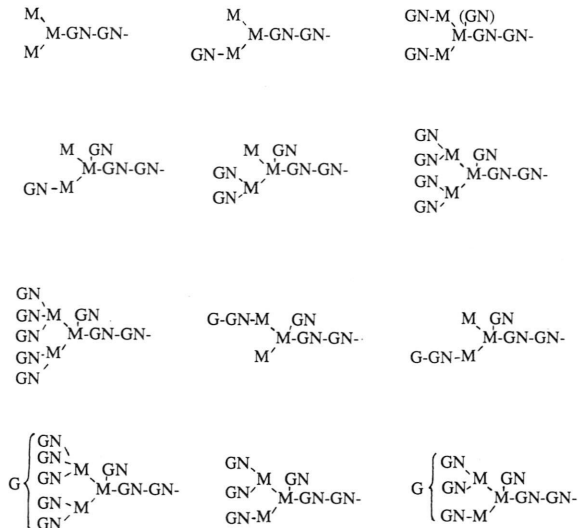
Bacillus sp. をグルコース培地で培養した後、生育した菌体を0.2%のオボムコイドのみを含む培地に移し、21時間、誘導培養を行った。培養液に硫酸アンモニウムを添加し(80%飽和)、生成した沈澱をリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に溶解した後、透析した。得られた酵素溶液について、順次、DEAE-cellulose, hydroxylapatite, Sepha-

dex G-200の各カラムクロマトグラフィーを行って部分精製した。

本酵素は分子量が約10万で、至適pHが5.5~6.5, 安定pHが4~8であった。本酵素は熱に極めて不安定であって、20℃で10分間インキュベートした場合には、活性は低下しなかったが、30℃で10分間インキュベートした場合には残存活性が60%にも低下し、37℃では20%に低下した。その他、SH試薬や金属イオンの添加によっては活性に何ら影響が見られなかった。

4. オボムコイド糖鎖に対する酵素の作用と構造の解析

オボムコイドの持つ多様な糖鎖の中で本酵素によって遊離される糖鎖を分析した。オボムコイドをプロナーゼ処理して得られたオボムコイド糖ペプチドを無水ヒドラジンによってタンパクから糖



M; mannose, GN; N-acetylglucosamine, G; galactose,

図4 酵素作用によりオボムコイドから遊離される糖鎖

鎖を外した後、アセチル化してもとの構造の糖鎖を得て、これを2-アミノピリジンによって蛍光標識した⁶⁾。得られたビリジリアミノ化(PA化)オボムコイド糖鎖に本酵素を作用させ、逆相カラムと順相カラムを用いたHPLC(高速液体クロマトグラフィー)によって分析した。本酵素が作用した糖鎖は二次元糖鎖マップ法によって構造を同定した⁷⁾。その結果、図4に示されるような糖鎖が酵素作用によって遊離されることが示された。本酵素標品中には微量のエキソ型のグリコシダーゼ(β -N-アセチルヘキサミニダーゼや β -ガラクトシダーゼなど)が混在するので、Endo- β -GlcNAc-aseとエキソグリコシダーゼの協同作用によってもオボムコイドの糖鎖が効率的に遊離されたと考えられる。

5. 脱糖鎖オボムコイドの調製

オボムコイドに本酵素の部分精製酵素標品を作用させて30℃で2日間反応した。反応液について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行ったところ、糖鎖が除かれたために、nativeなオボムコイドに比べて分子量が著しく低下した脱糖鎖オボムコイドが確認された。

脱糖鎖オボムコイドとnativeなオボムコイドについて、トリプシンインヒターの活性を調べたところ、その活性はほとんど変わらなかった。即ち、糖鎖はその生理活性に関与していないことが示唆された。一方、熱安定性について、トリプシンインヒターの残存活性を検討して調べたところ、nativeなオボムコイドでは90℃で90分間、加熱してもトリプシンを阻害する活性は全く低下しなかったが、脱糖鎖オボムコイドでは阻害活性が60%にまで低下した(図5)。この結果は糖鎖がオボムコイドの立体構造を保持していることを示唆するものである。

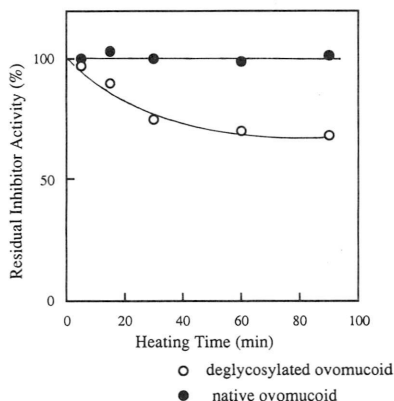


図5 脱糖鎖オボムコイドの熱変性によるトリプシンインヒター活性の低下

6. おわりに

高温でオボムコイドを長時間熱しても免疫反応性は失われないという報告から³⁾、卵白のアレルゲンはオボムコイドの糖鎖ではないかと考えられていた。本研究によって、オボムコイドの熱安定性が他のタンパク質に比べて異常に高いのは複雑な構造を持った糖鎖の存在によるものであることが示唆された。本研究において用いた脱糖鎖オボムコイドは糖鎖が完全に遊離したものではないが、電気泳動によってかなりの糖鎖が除かれていることは確認されている。これは土壤より分離した一菌株 *Bacillus* sp. のエンドグリコシダーゼとエキソグリコシダーゼを用いることによってオボムコイドの糖鎖を除くことができ、さらに、消化性の良い無糖卵白を作り出すこともできることを示したものである。この脱糖鎖オボムコイドについて、卵アレルギー患者の血清を用いた免疫反応は検討できなかったのではあるが、今後は糖鎖に対する抗原抗体反応の詳細な検討が必要である。

本研究を遂行するにあたり、研究助成金を賜り

ました浦上食品・食文化振興財団に心より感謝の意を表しますと共に貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。

文 献

- 1) J. Gu, T. Matsuda and R. Nakamura, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3029 (1988).
- 2) 加藤郁之進, 蛋白質・核酸・酵素, **24**, 667 (1979).
- 3) E. Fredericq and H.T. Duetsh, *J. Biol. Chem.*, **181**, 499 (1949).
- 4) 松田 幹, 日本農芸化学会誌, **67**, 129 (1993).
- 5) S. Kadowaki, K. Yamamoto, M. Fujisaki, H. Kumagai and T. Tochikura, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2389 (1988).
- 6) A. Kondo, J. Suzuki, N. Katayama, S. Hase, I. Kato and T. Ikenaka, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2169 (1990).
- 7) 高橋禮子, 富谷 昇, 蛋白質・核酸・酵素, **37**, 2117 (1992)

Creation of Egg White Removing Allergen by Using Enzymes

Kenji Yamamoto (Department of Food Science and Technology, Kyoto University)

Egg white is a common cause of allergic reactions for some patients allergic to eggs. Ovomucoid, the major skin-reactive allergen in hen's egg white, is a heat-stable glycoprotein, being stable even in hard-boiled eggs. The carbohydrate moiety has been suggested to contribute to its allergenic structure. In order to produce hypoallergenic egg white, I attempted to eliminate the carbohydrate moiety of ovomucoid by using microbial enzymes.

First, microorganisms in soil, were screened for the production of an endoglycosidase hydrolyzing carbohydrate moiety (sugar chains) of ovomucoid in its culture fluid. A bacterium identified as *Bacillus* sp. was found to produce a novel Endo- β -N-acetylglucosaminidase (Endo- β -GlcNAc-ase) which specifically liberated intact asparagine-linked sugar chains from hen ovomucoid when the bacteria were cultured in the medium containing ovomucoid. The enzyme was partially purified and characterized. Furthermore, the structures of the liberated sugar chains by the enzyme were determined by a combination method of pyridylamination and HPLC, and also by two-dimensional sugarmapping. The sugar chains of ovomucoid could be liberated by a cooperative action of Endo- β -GlcNAc-ase and contaminated exo-glycosidases such as β -N-acetylhexosaminidase and β -galactosidase. The deglycosylated ovomucoid obtained was less stable than the native one against heat-denaturation. These findings suggested the sugar chains of ovomucoid contributed to thermal stability, and also, immunoreactivity.