〈平成17年度〉

通電処理による牛乳アレルゲン活性低減化に関連する蛋白高次構造の研究

松　本　知　明
（熊本大学大学院医学薬学研究部）

1.　は じ め に

牛乳は乳幼児にとって基本となる栄養源であるが，そのアレルゲン活性は高く，わが国の食物アレルギーの原因食品としては２番目に多く報告される。また食物蛋白誘発性小腸結腸炎や好酸球性胃腸炎の原因にもなっている。これら患者には従来から加水分解ミルクが供与されているが，用いるブタ膵臓ないし微生物由来蛋白分解酵素の混入は避けられず，乳児への長期飲用は好ましくない。さらには食品としての風味もなくなっている。そこで申請者らは酵素などの異物を添加して化学的反応を行うのではなく，物理的方法によって乳成分の免疫原性低減化を得るための広範な研究を行ってきた。その結果，牛乳蛋白の中でも最もアレルゲン活性が強いβ－ラクトグロブリンに通電処理を行うと，その陰極側においてアレルゲン活性が著しく減弱化することを発見した（特願2005-020909,PCT/JP2006/301291）。ここでの研究目的は，このアレルゲン活性減弱化の機序を生化学的に解析することにある。この研究は電気エネルギーを用いた食品加工という画期的着想に基づいており，発展させることで，医療に限らず，わが国に新規産業を形成する可能性を与えると考える。

2.　実 験 方 法

2.1　β－ラクトグロブリン蛋白への通電

β－ラクトグロブリン蛋白への通電は，次のようにして行った。長さ300mm，口径30mmのガラス管を２本用意し，中央部を長さ40mm，口径25mmのガラス管で連結してＨ型とし，台座に設置した。左右二本の管口の下方は各々白金電極板および液体採取用ガラスコックを装着したゴムで栓をした。この装置に１％β－ラクトグロブリン蛋白溶解液250mlを満たし，１％になるように食塩を加えた。二本の白金電極を直列に接続した回路にして通電した。１％β－ラクトグロブリン蛋白溶解液に電圧80V前後で通電した場合の至適電流値は0.6A，電気抵抗は約130オームであった。この条件で10分間，全電気エネルギー約28.8キロジュールまで通電した。通電中はペーパータオルでガラス管を包み，冷水を常時浸して溶解液を55℃以下に保った。試料は管口下方にある液体採取用ガラスコックをひねり50ml採取し蛋白分析に用いた。なおアレルゲン活性評価には，さらに20分間通電し，全電気エネルギー90キロジュールまで印加して用いた。**写真１**にβ－ラクトグロブリン蛋白へ通電中の装置の全体写真を示す。

2.2　皮膚プリックテスト

β－ラクトグロブリン蛋白のアレルゲン活性の評価は牛乳アレルギー患者に対する皮膚アレルギー反応で行った。この検査実施に当たっては，熊本大学倫理委員会の臨床研究に関する審査を受けている。熊本大学附属病院発達小児科アレルギー外来を受診した牛乳アレルギー患者の中から，患者本人ないし患者両親に研究内容等についてよく説明し，同意を得て検査を施行した。β

－ラクトグロブリン蛋白溶解液，それに通電して陽極側，陰極側で採取された溶液，さらには陰性反応対照として生理食塩液，陽性反応対照としてヒスタミン1,000倍液を用いた。各々を前腕内側皮膚に20μl滴下して，小児用プリック針（米国リンコリン社製）で穿刺し，20分後に表面に出現する膨疹の最大直径を測定した。**写真 2** に，牛乳アレルギー患者の前腕内側皮膚面で生じたアレルギー反応の典型例を示す。（－）と皮膚に描記した陰極側採取液に対する反応が，（βLG）と皮膚に描記した処理を加える前の液，あるいは（＋）と描記した陽極側採取液に対する反応に比べ，著しく減弱していることが分かる。

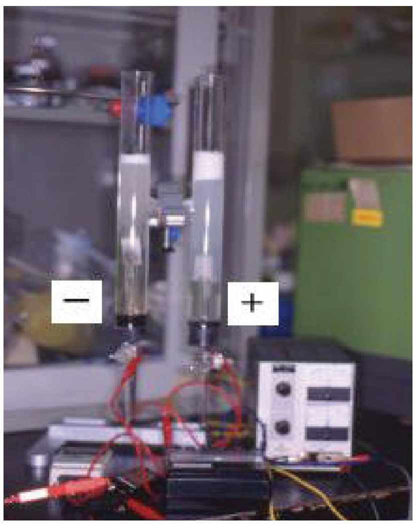

写真 1　電気分解装置

写真 2　皮膚プリックテスト結果

2.3　SDS-PAGE，ゲル濾過クロマトグラフィー，ペプチドマッピング

β－ラクトグロブリンに生じる分子量の変化をSDS-PAGEによって調べた。各溶液に還元作用をもつ緩衝液（１%2ME，１%SDS，10%グリセロール，BPB，100mM Tris-HCl　pH6.8）を加え，蛋白濃度をそろえてSDS-PAGEに供した。泳動後の染色はクマシーブリリアントブルー（CBB）により行った。また陰極側採取液での分子量の変化を非変性状態で観察するため，ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。ゲル濾過クロマトグラフィーは，GEヘルスケア社のSuperdex200を用い，カラムを150mM NaClを含む20mM Tris-HCl（pH8.0）で平衡化した。

通電前のβ－ラクトグロブリンおよび陰極側採取液からゲル濾過クロマトグラフィーによって得られた画分のペプチドマッピングを行った。高純度の蛋白を得るため陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。精製条件は，50mM　NaClを含む20mM　Tris-HCl（pH8.0）で平衡化したResouceQ（GEヘルスケア）に試料を添加した後，20分間かけてNaCl濃度を500mMまで直線的に上昇させた。変性剤および還元剤非存在下で蛋白にリジルエンドペプチターゼを反応させ，反応液中の蛋白をペプチドに分解した。反応液中のペプチドを逆相クロマトグラフィー（YMC　AP-202　C8）に吸着させ，アセトニトリルの直線濃度勾配（0.1%　TFAを含むアセトニトリルを60分間かけて０%から60%まで上昇）により疎水性の低いペプチドから順にカラムから遊離させることによってペプチドを単離し，クロマトグラム（ペプチドマップ）を得た。

2.4　二次元電気泳動

β－ラクトグロブリンに生じる分子量の変化を二次元電気泳動法でも調べた。各々のβ－ラクトグロブリン溶液を脱塩し，還元作用をもたない

溶媒（7M 尿素，2M チオ尿素，2％ CHAPS）を加えて 2mg/ml の蛋白濃度にした。その200mlを等電点電気泳動ゲル pI 3 −10に添加し，35,000Vhになるまで等電点電気泳動を行った。その後引き続いてポリアクリルアミドゲル電気泳動法を定電圧200V，60分間行った。染色はクマシーブリリアントブルーを用いた。

一方，各々のβ－ラクトグロブリン溶液に緩衝液（7M 尿素，2M チオ尿素，2％ CHAPS，40mM Tris）を加え，5mM TBPおよび10mMアクリルアミドを用いて室温で90分間還元/アルキル化も行った。その後，9倍量（容量）のアセトンを加え室温で1時間蛋白を沈殿させ，アセトンを除去後溶媒（7M 尿素，2M チオ尿素，2％ CHAPS）を加えて2mg/ml の蛋白濃度にし，同様に施行した。

2.5　マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析

各々のβ－ラクトグロブリン溶液の還元/アルキル化実施後の二次元電気泳動像から単量体および多量体のスポットを切り出し，そこにトリプシン溶液を直接添加してゲル内での酵素消化を37℃で一晩行った。ゲルから消化されたペプチドを抽出し，マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法を用いて，ペプチドの解析を行った。マトリックスはCHCAを用い，レーザーは波長337nmの窒素レーザーを使用して正イオンモードで測定を行った。

3.　結果と考察

3.1　SDS-PASGE

通電前のβ−ラクトグロブリン溶液に，還元作用をもつ緩衝液（1％2ME，1％SDS，10％ グリセロール，BPB，100mM Tris-HCl　pH6.8）を加えてSDS-PAGE行うと18Kの単一蛋白として検出された。10分間通電処理を行い，陽極側で採取

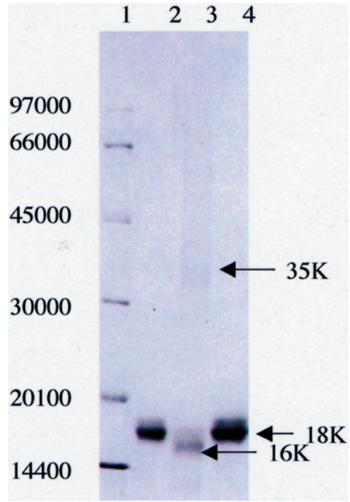

図1　通電によるβ－ラクトグロブリン蛋白分子量の変化
（1：分子量マーカー，2：通電前のβ－ラクトグロブリン，3：通電10分後の陰極側採取液，4：同10分後の陽極側採取液）

した溶液にも通電前と同様な18K蛋白のみが検出された。しかしながら陰極側採取液を用いた分析では35K蛋白と16K蛋白の2つが観察された。陰極側の蛋白質組成は特徴的であることが分かった（**図1**）。

3.2　ゲル濾過クロマトグラフィー

分子量の変化を非変性状態で観察するため，ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。ゲル濾過クロマトグラフィーは，GEヘルスケア社のSuperdex200を用い，カラムを150mM NaClを含む20mM Tris-HCl（pH8.0）で平衡化した。

通電前のβ－ラクトグロブリン溶液を分析すると34Kの単一蛋白として検出された。還元状態下のSDS-PAGEでは18Kの蛋白として検出されたことから，天然状態においては，β−ラクトグロブリンはジスルフィド結合を介した2量体として存在していることが明らかとなった（**図2a**）。

陰性側採取液に対しても，同様に変性処理を行わずゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ，70Kおよび34Kと思われる蛋白が溶出された。ここで得られた画分を各々SDS-PAGEに供したところ，各々35Kと16Kの蛋白から形成されていることが分かった（**図2b**）。つまり陰性側採取液

では，35Kおよび16K蛋白が各々70K，34Kの２量体蛋白となって溶出していた。SDS-PAGEは強い還元状態で実施しているため，これらの２量体はジスルフィド結合によって形成されたものでないことが示唆された（**図２c**）。

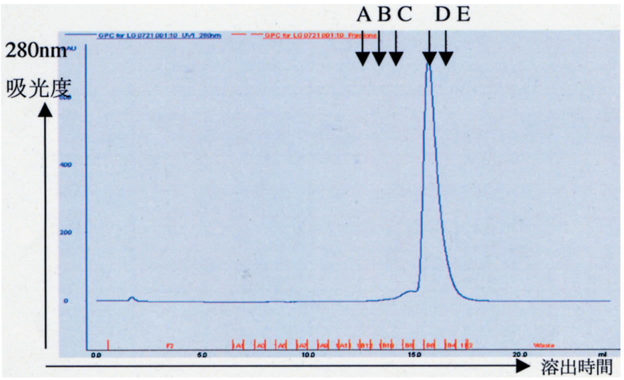

図２a　通電前のβ－ラクトグロブリンのゲル濾過クロマトグラフィー（クロマトグラム中の矢印　は標準蛋白の溶出時間，標準蛋白の分子量A：290000，B：140000，C：67000，D：34000，E：12800）

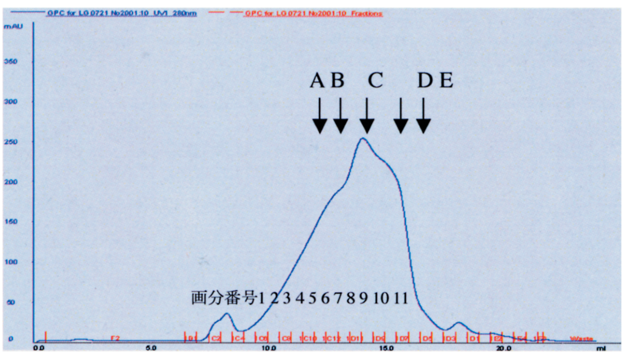

図２b　陰極側採取液のゲル濾過クロマトグラフィー（クロマトグラム中の矢印は標準蛋白の溶出時間，標準蛋白の分子量A：290000，B：140000，C：67000，D：34000，E：12800）

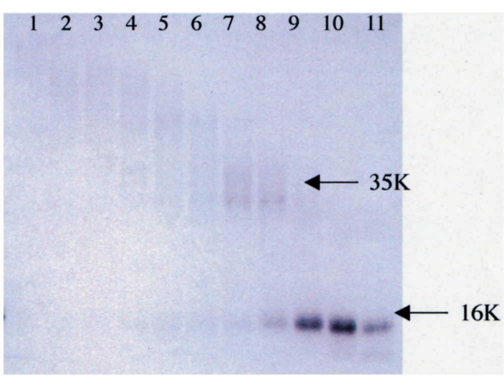

図２c　陰極側採取液のゲル濾過クロマトグラフィーで得た画分のSDS-PAGE

3.3　陰イオン交換クロマトグラフィー

陰極側採取液の35K，16K蛋白および通電前溶液から得られた18K蛋白画分を陰イオン交換クロマトグラフィー法によって精製した。精製条件は，50mMNaClを含む20mM　Tris-HCl（pH8.0）で平衡化したResouceQ（GEヘルスケア）に試料を添加した後，20分間かけてNaCl濃度を500mMまで直線的に上昇させて行った。

陰イオン交換クロマトグラフィーによって，陰極側採取液の35Kおよび16K蛋白は，それぞれ**図３a**および**図３b**に示すようにメインピークの前後に小さなピークとして観察された。これは目的蛋白とその他の蛋白が分離されたことを示す。また通電前溶液から得られた18K蛋白画分には２本のピークがみられた（**図３c**）。各ピークを質量分析（装置：アプライドバイオシステムズ社QSTAR　pulsarI型，イオン化方法：ナノESI，検出方法：Q-TOF）で分子量を測定すると，前半ピークが18277，後半が18364であり，β－ラクトグロブリンのバリアントBおよびAの分子量に合致した。

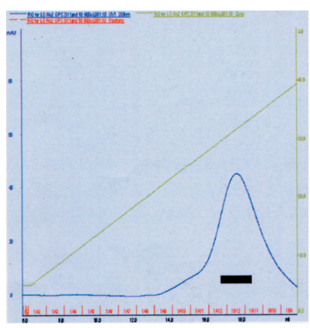

図３a

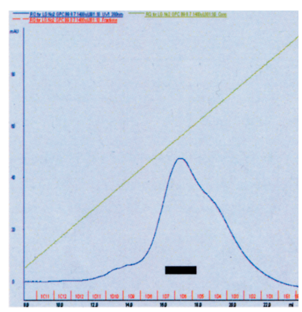

図３b

陰極側採取液からゲル濾過クロマトグラフィーによって得られた35K蛋白（**図３a**）および16K蛋白（**図３b**）を多く含む画分の陰イオン交換クロマトグラフィー

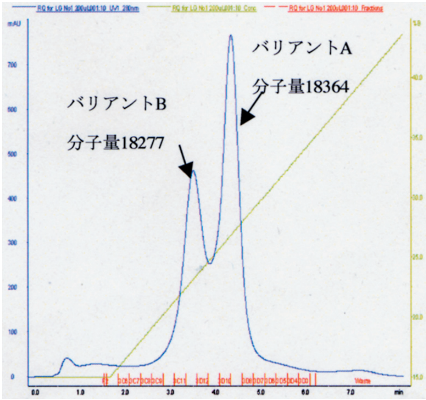

図3c　通電前のβ－ラクトグロブリンの陰イオン交換クロマトグラフィー

3.4　ペプチドマッピング

陰極側採取液から精製した35Kおよび16K蛋白画分および通電前のβ－ラクトグロブリン溶液から精製したバリアントBのペプチドマッピングを行った。変性剤および還元剤非存在下で蛋白にリジルエンドペプチターゼを反応させ，反応液中の蛋白をペプチドに分解した。反応液中のペプチドを逆相クロマトグラフィー（YMC　AP-202　C8）に吸着させ，アセトニトリルの直線濃度勾配（0.1％　TFAを含むアセトニトリルを60分間かけて０％から60％まで上昇）により疎水性の低いペプチドから順にカラムから遊離させることによってペプチドを単離した。

マップ左半分に示されている溶出時間が早いピークのうち，ほぼすべてのピークの溶出時間は3つの蛋白で完全に一致した。これは，ペプチドのアミノ酸配列が同じであることを示す。35Kおよび16K蛋白はβ－ラクトグロブリン・バリアントBとアミノ酸配列が同じであり，35Kおよび16K蛋白はβ－ラクトグロブリンであると考えられた。ペプチドマップ後半は，35Kと16K蛋白の間ではほとんど同じであったが，通電前のβ－ラクトグロブリン・バリアントBのパターンとは大きく異なっていた。35Kおよび16K蛋白のマップ後半ピークが幅の広いものであることから，アミノ酸配列の違いによるパターンの違いというより，35Kおよび16K蛋白が受けた化学修飾もしくはアグリゲーションによるパターンの違いであると示唆された（**図4a～図4c**）。

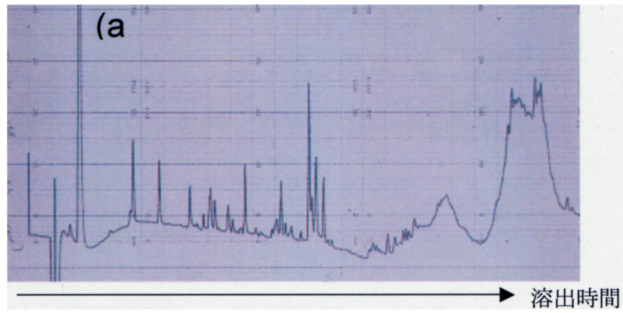

図4a　陰極側採取液から精製した16K蛋白のペプチドマップ

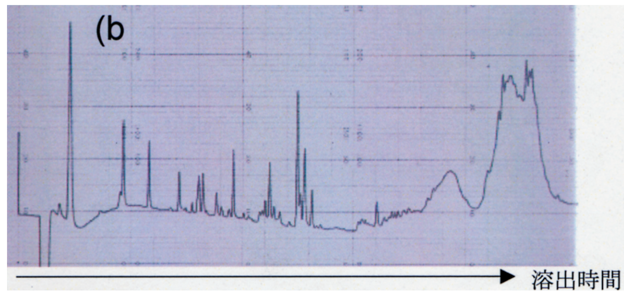

図4b　陰極側採取液から精製した35K蛋白のペプチドマップ

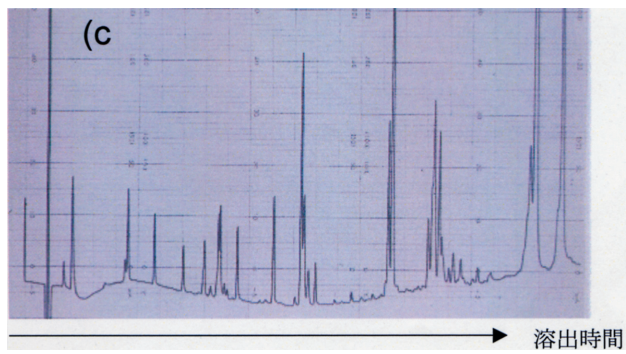

図4c　通電前溶液から精製したβ－ラクトグロブリン・バリアントBのペプチドマップ

3.5　二次元電気泳動

β－ラクトグロブリンに生じる分子量の変化を二次元電気泳動法で調べた。通電前および通電後に陽極側，陰極側で得られたβ－ラクトグロブリン溶液を各々脱塩し，還元作用をもたない溶媒（７Ｍ 尿素，２Ｍ チオ尿素，２％ CHAPS）を加えて２mg/m*l*の蛋白濃度にした。その200m*l*を等電点電気泳動ゲルpI３－10に添加し，35,000Vhに

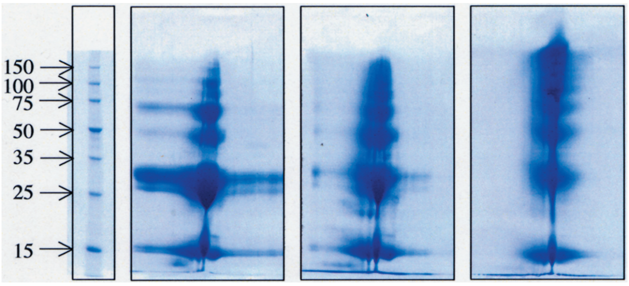

図 5 a　還元/アルキル化未実施のβ－ラクトグロブリン溶液の二次元電気泳動像
１：分子量マーカー，２：通電前溶液，
３：陽極側採取液，４：陰極側採取液

なるまで等電点電気泳動を行った。その後引き続いてポリアクリルアミドゲル電気泳動法を定電圧200V，60分間行った。染色はクマシーブリリアントブルーを用いた（**図 5 a**）。通電前および通電後に陽極側，陰極側で得られた各々のβ−ラクトグロブリン溶液すべてに多量体と考えられるスポットが観察された。

一方，各々のβ－ラクトグロブリン溶液に還元作用をもつ緩衝液（７M 尿素，２M チオ尿素，２％ CHAPS，40mM Tris）を加え，さらに５mM TBPおよび10mMアクリルアミドを用いて室温で90分間還元/アルキル化を行った。その後，９倍量（容量）のアセトンを加え室温で１時間蛋白を沈殿させ，アセトンを除去後溶媒（７M 尿素，２M チオ尿素，２％ CHAPS）を加えて2mg/m*l*の蛋白濃度にし，同様に施行した（**図 5 b**）。通電前溶液および陽極側採取液では，単量体および２量体と思われるスポットが強く検出されたが，陰極側採取液では多量体と考えられるスポットも依然として強く検出された。

3.6　マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析

各々のβ－ラクトグロブリン溶液の還元/アルキル化実施後の二次元電気泳動像から，単量体および多量体と思われるスポット７ヶ所（**図 5 b**の＃１～＃７）を切り出し，そこにトリプシン溶液を直接添加してゲル内での酵素消化を37℃で一晩行った。ゲルから消化されたペプチドを抽出し，マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法を用いて，ペプチドの解析を行った。マトリックスはCHCAを用い，レーザーは波長337nmの窒素レーザーを使用して正イオンモードで測定を行った

通電前および陽極側の２量体と思われる部分（＃１および＃３）は同様な質量分析ピークパターンを示した。また通電前，陽極側採取液，陰極側採取液の単量体と思われる部分（＃２，＃４，＃７），陰極側採取液の２量体と思われる部分（＃６），および多量体部分（＃５）は同様な質量分析ピークパターンを示した（**図 6**）。すなわち，陰極側では単量体の構造を保ったまま，２量体，

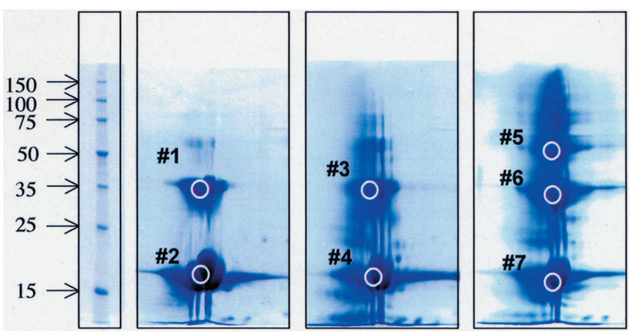

図 5 b　還元/アルキル化実施後のβ－ラクトグロブリン溶液の二次元電気泳動像
１：分子量マーカー，２：通電前溶液，
３：陽極側採取液，４：陰極側採取液
＃１～＃７：ペプチド解析用に切り出したスポット部分を示す

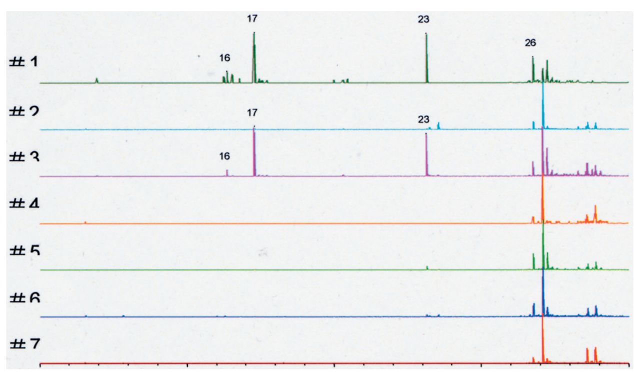

図 6　マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析スペクトル
＃～#7：還元/アルキル化実施後のβ－ラクトグロブリン溶液の二次元電気泳動像からペプチド解析用に切り出したスポット部分を示す

多量体化していることが示唆された。陽極側の2量体は通電前と同じようにジスルフィド結合によるものと考えられた。

4. まとめ

β－ラクトグロブリン蛋白に通電処理を行うと，陰極側において，β－ラクトグロブリン蛋白はその単量体の構造を保ったまま多量体化していくことが分かった。この構造変化がアレルゲン性減弱化をもたらしていると考えられた。通電する前の溶液および陽極側で採取された溶液にある2量体はジスルフィド結合によって形成されていると思われ，ジスルフィド結合による2量体構造がβ－ラクトグロブリンのアレルゲン活性に関連していると推測される。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり，由緒ある浦上食品・食文化振興財団から研究助成を賜ることができました。ここに厚く御礼申し上げます。また貴財団の益々のご発展を心より祈念いたしております。

文　献

1）松本知明（著)。わかりやすい小児のアレルギー疾患。金芳堂（2003）

2）Rosendal A., Barkholt V. Detection of potentially material in 12 hydrolyzed milk formulas. J Dairy Sci 83: 2200-2210（2000）.

3）Del Val G, Yee BC, Lozano RM, et al. Thioredoxin treatment increases digestibility and lowers allergenicity of milk. J Allergy Clin Immunol 103: 690-697（1999）.

4）Matsumoto T. Mitigation of the action of wheat allergen by acidic oxidative potential water. Allergy 57: 926-930（2002）.

Structural changes accompanying mitigation of the allergic action of cow's milk after passing an electric current

Tomoaki Matsumoto

(Department of Child Development, Graduate School of Medical Sciences, School of Medicine, Kumamoto University)

β −lactoglobulin (BLG) is not only the main whey protein without any counterpart in human milk, but a major cow's milk allergen. I previously observed mitigation of the allergic action of BLG in the cathode side after passing an electric current (PCT/JP2006/301291) .By the grant from Urakami Foundation, I advanced the research on the physicochemical mechanisms related to the mitigation of the allergic action of BLG.

The gel electrophoresis, run under reducing conditions, revealed an 18 KDa band both in the untreated BLG solution and in the anode side solution after passing an electric current. On the contrary, two bands showing 16KDa and 35 KDa were observed in the cathode side solution. The gel filtration, run under non-denaturing conditions, revealed a single 34 KDa fraction in the untreated BLG solution and two fractions with 34 KDa and 70 KDa in the cathode side solution after passing an electric current. Since the gel electrophoresis has been performed under reducing conditions, natural BLG seems to form dimer structures with disulfide bonding. The multimers such as 34 KDa or 70 KDa obtained from the cathode side were formed without disulfide bonding fashion. The examinations with two dimensional gel electrophoresis, run under non-denaturing or reduced/alkylated conditions, and the analysis of peptides from the gel spots using MALDI-TOF-MS also confirmed the findings as described above. In addition, the multimers in the cathode side solution seemed to retain the monomer structure of BLG.

It is postulated by this study that the dimer structures of BLG with disulfide bonding are closely associated with the allergic action of cow's milk, and formation of the BLG multimers retaining the monomer structure in the cathode side may contribute to mitigate the allergic action of BLG after passing an electric current.