

発芽米胚芽からの粗プロテアーゼの抽出と 米アレルギータンパク質の分解

半谷 朗*¹

Extraction of the Crude Protease from Germinated Rice Embryos and its Use for Decomposition of Allergenic Proteins in Rice Grains

Akira HANYA*¹

Food Research Center, AITEC*¹

米胚芽を発芽させ、アミラーゼ活性が低くかつプロテアーゼ活性の高い粗酵素画分を抽出し、米粒中のアレルギータンパク質の分解除去を試みた。発芽米胚芽より水/エタノールによって抽出した粗酵素抽出液のアミラーゼ活性は、発芽玄米抽出液に比べて1/10~1/25に減少した。市販精白米を粗酵素抽出液で処理した結果、総米タンパク質は50%減少した。次に高水分化米を粗酵素溶液で処理した。アルブミン/グロブリン画分を抽出し、これを米主要アレルギーである16kDaアルブミンに対する特異抗体を用いて免疫染色した結果、16kDaアルブミンの残存が確認され、主要米アレルギーの完全除去は出来なかった。

1. はじめに

厚生労働省が1998年に発表した「食物アレルギーに関する調査報告」によると、調査人数19,734人中7.3%にあたる1,447人に食物摂取が原因と考えられるアレルギーが認められた。今や食物アレルギーは社会問題となっており、早急な対策が必要である。

近年さまざまな植物のsprout(芽)について、抗癌作用や高濃度のGABAに由来する機能性が注目され、一部で製品化されている。穀物種子のsprout、例えば麦芽では種子成分を分解する様々な酵素が発芽の過程で生産されている。発芽玄米においても様々な酵素が生産されており、でん粉を分解し米粒を崩壊させてしまうアミラーゼも多量に含まれていた¹⁾。

そこで本研究では、アレルギーの発症原因であるアレルギータンパク質を分解するプロテアーゼを高発現させた発芽玄米を得ることを目的として、アミラーゼの発現部位である胚乳を除去した玄米胚芽の発芽条件について検討した。さらにこの発芽胚芽から得られた酵素抽出液を用いた米アレルギータンパク質²⁾の分解除去についても検討を行った。

2. 実験方法

2.1 試料

米胚芽は平成17年愛知産「あさひの夢」を精米した際に排出された糠をふるい(60メッシュ)にかけて選別

した。タンパク質の分解試験には、市販精白米(あさひの夢)及び高水分化米(アサノ食品製)を試験米として用いた。

2.2 試験方法

2.2.1 米胚芽発芽条件の検討

糖源としてグルコース、マルトース、スクロースを使用し、糖濃度を2%とした発芽用寒天培地を調製した。0.04%次亜塩素酸ナトリウムで3分間殺菌処理した胚芽を寒天培地上に播種した。播種後の寒天培地は25℃で48時間保温し、発芽する胚芽数を計測した。

2.2.2 発芽米胚芽酵素抽出液の調製

2.2.1の結果に基づき、2%スクロース水溶液2,000mLを25℃に加温し、そこへ不織布の袋に入れた胚芽50gを投入し、15時間攪拌することで胚芽を発芽させた。なお、2%スクロース溶液をペリスタポンプによりUV照射下にある水槽へ循環することにより、発芽処理中に微生物が増殖することを防止した。得られた発芽米胚芽はアセトンで脱脂後、乾燥、粉碎して以後の試験に用いた。また脱脂に用いたアセトン中に移行した酵素は乾燥してアセトンを除去して、分解試験に用いた。粉碎した発芽米胚芽から蒸留水もしくはエタノール水溶液(エタノール濃度20~99%)により酵素を抽出し、発芽米胚芽酵素抽出液とした。対照として、市販玄米(あさひの夢)を発芽、粉碎、蒸留水で抽出し、発芽玄米酵素抽出液として用いた。

*¹ 食品工業技術センター 保蔵技術室

2.2.3 プロテアーゼ活性とアミラーゼ活性の測定

プロテアーゼ活性は Dubois ら³⁾によるパインの活性測定法に基づき、基質として Bz-Arg-pNA (シグマ製) を用いて測定した。15 分間あたり 1mol の p-ニトロアニリンを遊離させる酸素量を 1U とした。

アミラーゼ活性は - アミラーゼ分析キット (キッコーマン製) を使用して測定した。

2.2.4 米から抽出したタンパク質に対する分解試験

分解試験の方法は特公平 06-009472⁴⁾に基づいて行った。すなわち、粉碎した精白米 (100g) に 500mL の蒸留水、1M NaCl、99%エタノールを加えて 4 にて 20 時間静置後、遠心分離 (7,000 rpm、20 min) してその上清を凍結乾燥することによりアルブミン画分タンパク質、アルブミン/グロブリン画分タンパク質、プロラミン画分タンパク質を調製した。各タンパク質 10mg に対し、寒天培地で調製した発芽米胚芽 0.5g より蒸留水、20%、40%、60%、80%、99%エタノール水溶液で抽出した粗酵素液 0.5mL を添加して、25、2 時間培養して分解試験を行った。分解試験後の溶液に最終濃度 10%となるようにトリクロロ酢酸を加えることで未分解のタンパク質を析出させ、その乾燥重量を測定し分解率を求めた。米タンパク質に対し酵素を含まない試験溶液を加え 25、2 時間培養し、トリクロロ酢酸を加えることで未分解のタンパク質を析出させ、その乾燥重量を測定したものを対照とした。

2.2.5 試験米に対する分解試験

スクロース溶液により調製した発芽米胚芽 1g を蒸留水もしくは 20%エタノール水溶液 4mL に懸濁し、遠心分離 (12,000 rpm、5 min) した上清、及びアセトン抽出物 1g を蒸留水もしくは 20%エタノール水溶液 20mL に溶解し、遠心分離 (12,000 rpm、5 min) した上清を試験溶液とした。試験米 1g に対し酵素抽出液 2mL を加え、処理温度を 25、30、40、50、処理時間を 1、2、4、8 時間とし、タンパク質の分解試験を行った。分解試験後の試験米を粉碎し、10mL の 1M NaCl 水溶液で 4、20 時間浸漬することでアルブミン/グロブリン画分タンパク質を抽出し、プロテインアッセイ染色液 (BIO-RAD 製) を用いて定量した。抽出したタンパク質はさらに SDS-PAGE と抗米 16 kDa Alb モノクローナル抗体を使用して免疫染色を行った。

3. 実験結果及び考察

3.1 胚芽の発芽に対する糖源の影響

糖源にスクロースを用いた場合に、最も高い発芽率が得られた (表 1)。しかしながら発芽率は 25%と低かった。発芽率の低下の原因は胚芽の殺菌処理によるためと

推定された (データ省略)。そこでスクロース水溶液を UV 殺菌しつつ加温し、そこへ胚芽を投入して攪拌することで微生物の増殖を抑えて胚芽を発芽させる方法を考案した。これによりプロテアーゼ活性、アミラーゼ活性ともに寒天培地を用いた場合と変わらず、かつ 60%以上の発芽率を得ることができた (データ省略)。

表 1 発芽に対する炭素源の影響

糖源	発芽率 (発芽数 / 播種数)
グルコース	8 / 160
スクロース	42 / 160
マルトース	10 / 160
炭素源なし	5 / 160

3.2 発芽米胚芽酵素抽出液のプロテアーゼ活性とアミラーゼ活性

発芽米胚芽から蒸留水、20%、40%、60%、80%、99%のエタノール水溶液を用いた酵素抽出液についてプロテアーゼ活性とアミラーゼ活性を測定した。抽出した酵素液のプロテアーゼ活性を測定したところ、プロテアーゼ活性は発芽玄米とほぼ変わらなかった (図 1)。20%及び 40%でエタノール抽出した酵素液ではプロテアーゼ活性が低かったが、後述する結果よりこれは活性測定に用いた合成基質と酵素抽出液のプロテアーゼの基質特異性が一致していなかった可能性があるためと推測された。

一方、酵素抽出液のアミラーゼ活性を測定したところ、アミラーゼ活性は発芽玄米より水抽出で得た酵素抽出液に比較して 1/10~1/25 まで低下していた (図 2)。アミラーゼの発現部位である胚乳を除去し、胚芽のみを発芽させることにより、酵素抽出液のアミラーゼ活性を顕著に低下させることができた。

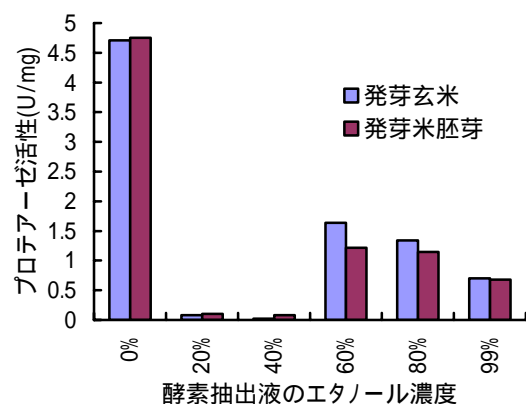


図 1 発芽玄米と発芽米胚芽のプロテアーゼ活性

3.3 米タンパク質画分の分解

図 3 に試験米より調製したタンパク質画分に対する

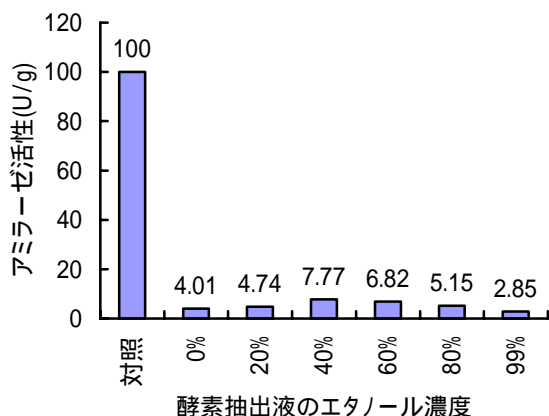


図2 発芽米胚芽のアミラーゼ活性
対照：発芽玄米酵素抽出液（エタノール0%）

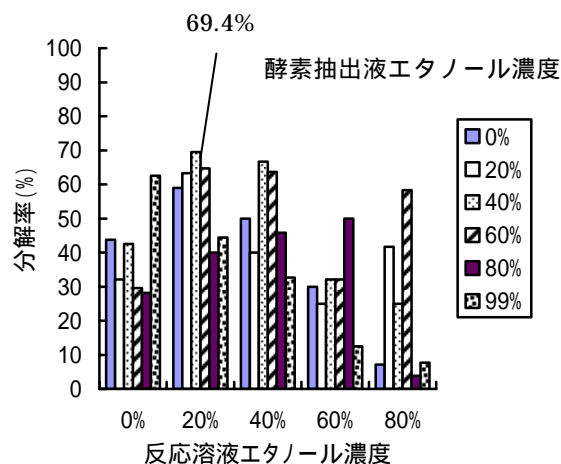


図3-c 発芽米胚芽酵素抽出液によるプロラミン画分タンパク質の分解

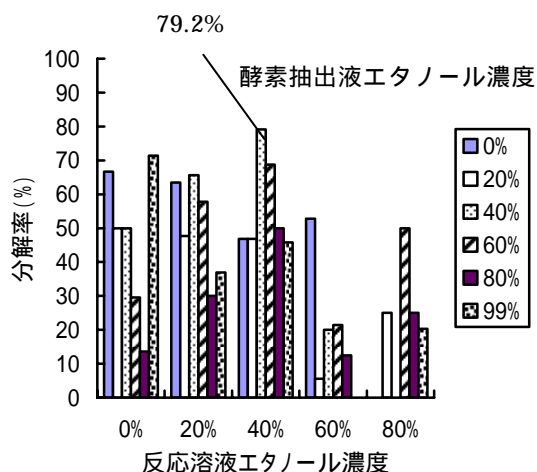


図3-a 発芽米胚芽酵素抽出液によるアルブミン画分タンパク質の分解

分解率： $\{1 - (\text{分解処理後のTCA析出タンパク量} / \text{対照のTCA析出タンパク質量})\} \times 100$

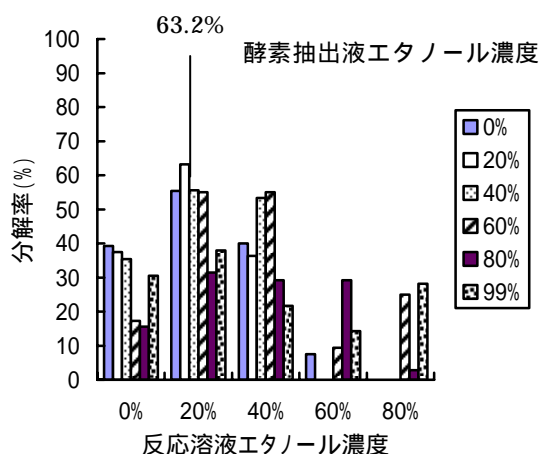


図3-b 発芽米胚芽酵素抽出液によるアルブミン/グロブリン画分タンパク質の分解

発芽米胚芽酵素抽出液による分解試験の結果を示した。アルブミン画分タンパク質に対しては、酵素抽出液のエタノール濃度が40%、分解処理時のエタノール水溶液濃度が40%の時最もタンパク質が分解した（図3-a）。アルブミン/グロブリン画分タンパク質に対しては、抽出液エタノール濃度が20%、反応液エタノール濃度が20%の時最もタンパク質が分解した（図3-b）。プロラミン画分タンパク質に対しては、抽出液エタノール濃度が40%、反応液エタノール濃度が20%の時最もタンパク質が分解した（図3-c）。主要米アレルギータンパク質がアルブミン/グロブリン画分に含まれることから、以後の実験ではアルブミン/グロブリン画分タンパク質を最も分解した20%エタノール水溶液を粗酵素の抽出及び分解反応溶液として用いることとした。

一般に、エタノールなどの有機溶媒濃度が高くなるとタンパク質の多くは変性し、酵素では失活することがある。しかしながら今回の結果においては、エタノールの存在によってタンパク質の分解が促進される現象が見られた。これは発芽米胚芽酵素抽出液中のプロテアーゼの活性がエタノールに阻害されにくいためと推定される。またエタノールが存在することによって、立体構造の変化によりタンパク質内部の疎水性領域が表面に引き出され、これがプロテアーゼによって分解されたと推察された。

20%及び40%でエタノール抽出した酵素液について、合成基質を用いてプロテアーゼ活性を測定した結果（図1）ではほとんど活性は見られなかったにもかかわらず、酵素液は米タンパク質画分を分解した。このことは合成基質を分解したプロテアーゼとは基質特異性が異なる他のプロテアーゼが存在する可能性を示している。したがって、プロテアーゼ活性測定においては、実際の米タン

パク質の分解状態を反映できる合成基質を再検討する必要があると思われた。

3.4 精白米中のタンパク質の分解

試験米として市販精白米、酵素抽出液として発芽米胚芽の2)20%エタノール酵素抽出液、3)蒸留水酵素抽出液、4)アセトン抽出物の20%エタノール酵素抽出液、5)アセトン抽出物の蒸留水酵素抽出液を用いて米粒中のアルブミン/グロブリン画分タンパク質の分解試験を行った。図4に25、2時間処理での試験米のアルブミン/グロブリンタンパク質量を示した。どの試験条件においてもアルブミン/グロブリン画分タンパク質が少なくなった。発芽米胚芽の20%エタノール酵素抽出液において、対照と比較して抽出されたアルブミン/グロブリン画分タンパク質が約50%となった。すなわち、約50%のタンパク質が分解されたものと考えられた。なお、アセトン抽出物では処理後の試験米に黄褐色の着色が見られた。アルブミン/グロブリン画分タンパク質の分解が不十分であった原因として、酵素が米粒内部まで完全に浸透することができなかつたためと推定された。そこで、一度加熱され、デンプンの一部が化している高水分化米を用いて分解試験を行った。

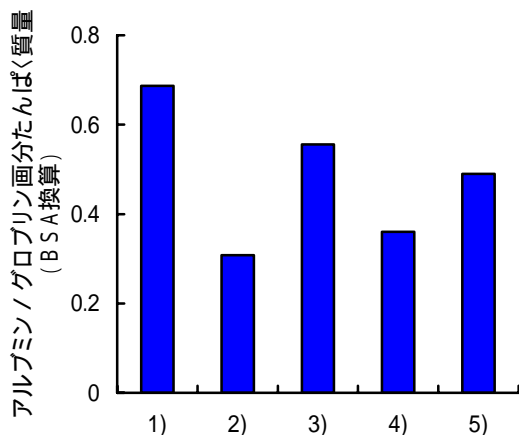


図4 分解試験後に抽出されたアルブミン/グロブリン画分タンパク質量。

1) 蒸留水のみで25/2時間処理、2) 発芽米胚芽の20%エタノール酵素抽出液で分解、3) 発芽米胚芽の蒸留水酵素抽出液で分解、4) アセトン抽出物の20%エタノール酵素抽出液で分解、5) アセトン抽出物の蒸留水酵素抽出液で分解

3.5 高水分化米の分解と免疫染色

試験米として高水分化米を用いて3.4と同じ酵素液で25、2時間分解試験を行った。分解後の試験米よりアルブミン/グロブリン画分タンパク質を抽出し、SDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後のタンパク質をPDVF膜に転写し、米アレルギーに対する抗体(坑米16kDa Albモノクローナル抗体)で免疫染色を行った結果、どの試験条件においても分子量16kDaのアレルゲンタンパク質が検出され、アレルゲンタンパク質の完全分解にはいたっていないことが判明した(データ省略)。

4. 結び

アレルゲンタンパク質分解のためにプロテアーゼのみを高発現させるため、アミラーゼの発現部位である胚乳を除去した胚芽の発芽を試みた。スクロースを糖源に用いた場合にのみ多くの発芽胚芽を得ることができた。得られた発芽胚芽よりエタノール抽出した酵素液のアミラーゼ活性は発芽玄米酵素抽出液と比較して1/10~1/25にまで低減することができた。一方、発芽米胚芽酵素抽出液はエタノール水溶液中で米主要アレルゲンタンパク質を含むアルブミン/グロブリン画分タンパク質の60~80%を分解した。

高水分化米に対し、アレルゲンタンパク質の完全分解を試みた。しかし、分子量16kDa付近に抗体に反応するタンパク質が残留しており、米アレルゲンタンパク質の完全分解はできなかった。抽出した米タンパク質に対しては60~80%分解可能であったが、形状が米粒の場合には分解率が低下していた。これらのことから低アレルギー化には米粒内部への酵素抽出液の浸透方法について更なる検討が必要である。

文献

- 1) 半谷朗, 日渡美世, 内藤茂三: 愛知県産業技術研究所研究報告, 4, 170 (2005)
- 2) T. Matsuda *et al.*: Rice-seed allergenic proteins and hypoallergenic rice. In: Y. Mine and F. Shahidi (Ed.). *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*. CRC press Taylor & Francis group, 493-508 (2006)
- 3) T. Dubois *et al.*: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 369, 733-740 (1988)
- 4) 渡辺 道子ほか: アレルゲンを低減させた穀類及びその製造方法, 特公平 6-9472