

豆・穀類中のアレルゲンに関する研究

(平成13年度日本栄養・食糧学会学会賞受賞)

辻 英 明*

(2002年1月29日受付; 2002年3月14日受理)

要旨: 大豆におけるアレルゲンを詳細に検索し、16種類のアレルゲンを見出した。このうち、Gly m Bd 30 K, Gly m Bd 68 K および Gly m Bd 28 K が大豆における主要なアレルゲンであることを明らかにするとともに、Gly m Bd 30 K は 34-kDa oil-body-associated protein, Gly m Bd 68 K は β -conglycinin の α -subunit であると同定した。Gly m Bd 28 K は未同定のアスパラギン結合型糖タンパク質であることを明らかにした。さらに、これらの選択的な定量方法を確立して伝統的な発酵大豆食品が低アレルゲン化された食品であることならびに溶媒法により容易に主要アレルゲンを除去しうることを明らかにした。一方、小麦においては、15種類のアレルゲンを見いだした。このうち、27-, 31- と 37 kDa のタンパク質成分が主要なアレルゲンであることならびに Tri a Bd 17 K はすでに同定されているアスパラギン結合型糖鎖を有する α -amylase inhibitor CM 16 と CM 17 であることを明らかにした。また、本研究過程で、Gly m Bd 28 K と Tri a Bd 17 K の糖鎖が患者血清中の IgE 抗体と特異的に反応するという興味深い現象を見出した。

キーワード: 大豆アレルゲン, 小麦アレルゲン, アスパラギン結合型糖鎖, サンドイッチ ELISA, 低アレルゲン化

従来、わが国における主要なアレルギー食品は卵、牛乳、大豆であったが、平成10年度の厚生省食物アレルギー対策検討委員会による全国医療機関に対するアレルギー原因食品の調査結果によると、原因食品の検出頻度は卵、牛乳、小麦、ソバ、カニ、ピーナッツの順であることが明らかになった¹⁾。食物アレルギー患者に対する治療法としては最終的には除去食に頼らざるを得ないのが現状である。しかしながら、上述のように、アレルギー食品はいずれも重要なタンパク質の給源である。したがって、食物アレルギー患者が健全な食生活を営むためには、食物におけるアレルギーの原因物質(アレルゲン)の究明は避けて通れない課題である。

これまでに、動物性食品および植物性食品におけるアレルゲンは数多く見いだされ、現在も、次々に発見されている。動物性食品におけるアレルゲンは卵、牛乳を除けば一般にその数は少ない。一方、植物性食品において見いだされたアレルゲンの数は多く、きわめて複雑である。しかし、近年ラテックス・フルーツシンドロームなどの研究を通して、植物性アレルゲンは整理され、グループ化される傾向にある²⁾³⁾。すなわち、植物は、外部環境が悪化したとき自らを防御するために生体防御タンパク質を産生するが、植物において見いだされたアレルゲンの多くはこの生体防御タンパク質に関連し、とりわけ、農作物でよく研究されている14種類の感染特異

的(pathogenesis-related, PR)タンパク質のうち、6種類のPRタンパク質が密接に関係していることが明らかにされつつある⁴⁾。PRタンパク質のほかに、trypsin/ α -amylase inhibitor, 貯蔵タンパク質, チオールプロテアーゼなどに関連するアレルゲンも知られている⁴⁾。

著者らは、比較的研究が遅れていた大豆および小麦におけるアレルゲンについて詳細な研究を行った。本稿においては、得られた研究成果について述べる。

1. 大豆および小麦におけるアレルゲンの検索・同定

1983年, Moroz *et al.*⁵⁾ は trypsin inhibitor がアレルゲン性を有することを立証したが、この報告が大豆におけるアレルゲンを明らかにした最初の例である。それ以後、大豆におけるアレルゲンに関する研究は進展していなかった。著者ら⁶⁾ は、大豆に感受性を示す69名のアレルギー患者血清を用いるイムノプロット法により、大豆におけるIgE抗体結合性タンパク質を詳細に検討した。その結果、16種類のIgE抗体結合性タンパク質を見いだした(Table 1)。65%の患者の血清と反応した30 kDaのタンパク質成分(Gly m Bd 30 K)、25%の患者血清と反応した68 kDaタンパク質成分(Gly m Bd 68 K)および28 kDaのタンパク質成分(Gly m Bd 28 K)が主要なアレルゲンであることが明らかになった。

* 連絡・別刷請求先

岡山県立大学保健福祉学部栄養学科 (719-1197 岡山県総社市窪木 111)

Table 1 IgE-binding proteins in soybean.

Component	Fraction	Frequency (%) ^{*1}	
68	7S globulin	23	α -Subunit of β -conglycinin
63	7S	18	
52	7S	14	
47	7S	13	
45	7S	10	
41	7S	7	
38	7S	7	
35	11S	1	Acidic subunit
33	7S	16	
31	Whey	4	HMW fraction ^{*2}
30	7S	65	Gly m Bd 30 K
28	7S	23	Gly m Bd 28 K
21	Whey	7	LMW fraction ^{*3}
20	2S	3	Kunitz-type trypsin inhibitor
17	2S	1	
15	2S	3	

^{*1}Frequency expresses a percentage of the number of patients' sera specific for an IgE-binding protein to 69 patients' sera. ^{*2}HMW represents the high-molecular-weight fraction. ^{*3}LMW represents the low-molecular-weight fraction.

しかし、上述の trypsin inhibitor の検出頻度はさきわめて低いものであった。

Gly m Bd 30 K を単離・精製し、その N 末端アミノ酸配列分析により、本アレルゲンはすでに、それをコードする cDNA がクローニングされ、アミノ酸配列が明らかにされている 34-kDa oil-body-associated protein と同一タンパク質であることが明らかになった⁷⁾。ホモロジー検索の結果、本アレルゲンはパパイソファミリーに属するチオールプロテアーゼの一種であるダニの主要アレルゲン Der p 1 と相同性が示されたが、両者のアミノ酸配列における同一性は全体で 35% とそれほど高いものではなかった。また、Gly m Bd 68 K は単離・精製後、その N 末端アミノ酸配列分析より β -conglycinin の α -subunit であることが示された⁸⁾。

一方、著者らは Gly m Bd 28 K についても検討を行った。単離・精製後、その N 末端アミノ酸配列を決定し、ホモロジー検索により、本アレルゲンは従来未知のアスパラギン結合型糖タンパク質であることが明らかになった⁹⁾。登熟中の大豆種子より λ ZAPII を用いて調製した cDNA ライブラリーより本アレルゲンに対する cDNA のクローニングを行い、得られた cDNA クローンは 473 個のアミノ酸残基をコードする open reading frame と 148 bp からなる 3' 側非翻訳領域を含んでいたが、5' 側非翻訳領域と開始コドンは含まれていなかった¹⁰⁾。推定されたアミノ酸配列のうち、Phe 22 より 220 個のアミノ酸残基からなる配列が Gly m Bd 28 K に対

応していることが明らかになった¹⁰⁾。本アレルゲンの C 末端アミノ酸残基を特定していないので、この推定アミノ酸配列における本アレルゲンの正確な位置づけはできなかった。ホモロジー検索により、推定アミノ酸配列はカボチャ種子における MP 27/MP 32 とニンジングロブリン様タンパク質と高い相同性を示すことが明らかになった (Figure 1)。カボチャ種子の MP 27/MP 32 はプレプロプロテインとして生合成され、シグナルペプチドの除去によりプロプロテインに転換され、最終的に MP 27 と MP 32 に代謝されることが立証されている¹¹⁾が、Gly m Bd 28 K はカボチャ種子におけるこれらのタンパク質と高い相同性を示すことから、本アレルゲンはカボチャ種子タンパク質と同様な機構で代謝されることが強く示唆された (Figure 2)。この代謝過程で、生成すると思われる C 末端側の後半部の大豆種子における存在とそのアレルゲン性については現在検討しているところである。なお、Gly m Bd 28 K の前駆体型 (プレプロプロテイン) においては、3 カ所にアスパラギン結合型糖鎖の部位が推定される。このうち、Asn 27 残基に糖鎖が結合していることを立証している⁹⁾が、残りの部位における糖鎖の存在については未確認である。

小麦を摂取して異常反応する疾患としてセリアック病が知られているが、これはグルテンに起因し、基本的には免疫現象によるものでないと考えられている。西ヨーロッパの製パン業者間で多発している喘息患者の原因物質については活発に研究され、Gomez *et al.*¹²⁾ は数種の原因物質を単離し、そのうち 12-15 kDa のタンパク質成分を α -amylase inhibitor ファミリーに属するアレルゲンであることを明らかにした。また、渡辺ら¹³⁾ も小麦アレルゲンについて検討し、グルテン成分がアレルゲン性を示すことを報告している。さらに、Armentia *et al.*¹⁴⁾ により糖鎖を有する 4 量体型 α -amylase inhibitor CM 16 は糖鎖を有さないものより強いアレルゲン性を示すことを明らかにしている。上に述べた α -amylase inhibitor のアレルゲン性は気道感作によるものと思われるが、James *et al.*¹⁵⁾ および Amano *et al.*¹⁶⁾ は経口摂取した α -amylase inhibitor もアレルゲン性を示すことを報告している。また、田辺ら¹⁷⁾ はグルテンのアレルゲン性を詳細に検討し、Gln-Gln-Gln-Pro-Pro の配列が IgE 抗体と結合するエピトープであることを見いだしている。このように、小麦におけるアレルゲンについてはよく研究されているが、小麦に存在するアレルゲンの種類および存在量についての理解は依然として不十分であった。

著者らは、小麦に感受性を示す、65 名のアレルギー患者血清を集め、患者血清中の IgE 抗体と結合する小麦タンパク質について精査した。Table 2 に示しているように、15 種類の IgE 抗体結合性タンパク質を見いだした¹⁸⁾。このうち、17 kDa のタンパク質成分 (Tri a Bd 17 K) を精製し、N 末端アミノ酸配列分析により、

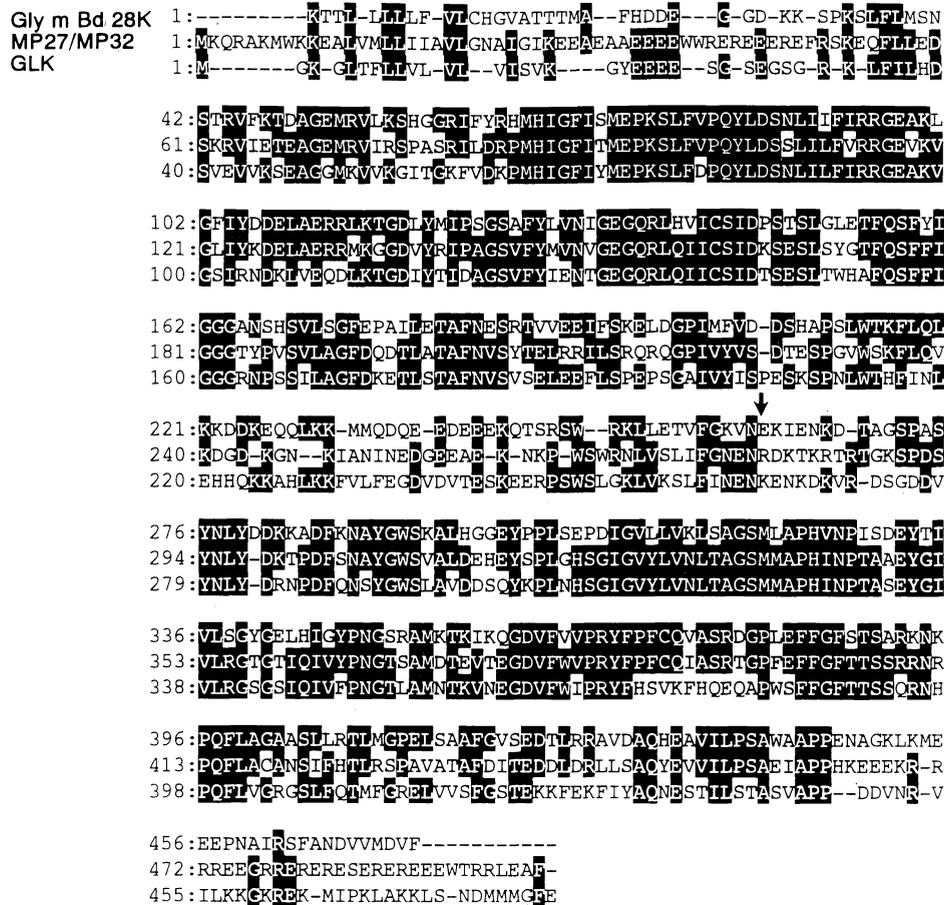


Figure 1 Alignment of the deduced amino acid sequence of the allergen (Gly m Bd 28 K) with those of the pumpkin MP27/MP32 (MP27/MP32) and the carrot globulin-like protein (GLK).

Shaded amino acid residues express the amino acid residues identical between two of the three proteins or among all of the proteins. The closed arrow shows a putative cleavage site by a vacuolar processing enzyme, which was suggested in the case of processing of the pumpkin preproprotein to the mature proteins MP27/MP32.¹¹⁾

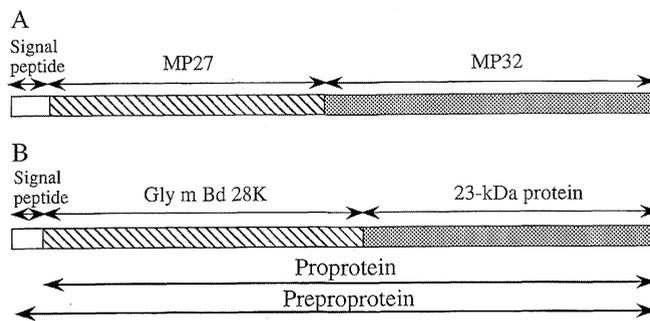


Figure 2 Illustration of schematic structure of the precursors of pumpkin MP27/MP32 (A) and Gly m Bd 28 K (B).

本アレルゲン成分は糖鎖を結合した α -amylase inhibitor CM 16 と CM 17 の混合物であることを明らかにした¹⁸⁾。これらはいずれもフコースを有するアスパラギン結合型糖タンパク質であり、フコースの存在が IgE 抗体との結合性に大きく関与していることが推定された。この他、著者らは 36 kDa のタンパク質成分を精製

して吟味した結果、本アレルゲンはすでに Sanchez-Monge *et al.*¹⁹⁾ により明らかにされている種子型 peroxidase であると同定した。最近、James *et al.*¹⁵⁾ は 20 kDa および 47 kDa のアレルゲンの存在を、Franken *et al.*²⁰⁾ は 17 kDa および 47 kDa のアレルゲンの存在を報告している。また、Weiss *et al.*²¹⁾ は二次元電気泳動法

Table 2 IgE-binding proteins in wheat.

Component	Fraction	Frequency (%) [*]	
88	—	14	
74	Albumin	32	
58	Albumin	31	
47	Albumin	41	
37	Albumin	58	Peroxidase
31	Prolamin	46	
29	—	20	
27	Albumin	70	
25	—	25	
23	—	31	
20	—	29	
18	—	18	
17	Albumin	29	Tri a Bd 17 K (α -amylase inhibitor with sugar chain)
16	Albumin	37	Tri a Bd 17K (α -amylase inhibitor without sugar chain)
15	Albumin	18	

^{*}Frequency expresses a percentage of the number of patients' sera specific for an IgE-binding protein to 65 patients' sera.

を用いて、精力的に小麦におけるアレルゲンを精査している。

2. 大豆および小麦におけるアレルゲンのアレルゲン性

上述のように、Gly m Bd 30 K はダニアレルゲン Der p 1 と相同性を示す。このことは、両者に共通エピトープ構造の存在を期待させるものであるが、著者らの研究によると、Der p 1 に感受性を示す患者の血清は Gly m Bd 30 K と反応性を示さなかった。また、最近、Helm *et al.*²²⁾ は Gly m Bd 30 K に特異的な IgE 抗体が認識するエピトープは Der p 1 上における対応する領域とは相同性がないことを報告している。これらの事実は、これら二つのアレルゲンの間には共通エピトープ構造は存在しないことを意味しているのかもしれない。

Gly m Bd 68 K は β -conglycinin の α -subunit であるが、その α' -subunit ときわめて高い相同性を有する。しかしながら、 α -subunit に感受性を示す患者血清は α' -subunit と免疫交差性は示さない。著者ら⁶⁾ は Gly m Bd 68 K におけるエピトープの検索を行った結果、エピトープは本アレルゲンにおける Tyr232-Met383 の領域に存在することが明らかになった。152 個のアミノ酸残基からなるこの領域とそれに対応する α' -subunit のそれとの間には 11 カ所のアミノ酸残基の違いしか存在しない (Figure 3)。このことは、Gly m Bd 68 K にお

A) 232 YVVPDNNENLRLITLAI PVNKPGRFESFFLSSTEAQQSYL
B) 268 YVVPDNNENLRMITLAI PVNKPGRFESFFLSSTQAQQSYL

QGF SRNILEASYDTKFEE - INKVLFSREEGQQQGEQRLQES
QGF SKNILEASYDTKFEE - INKVLFGREEGQQQGEERLQES

VIVEISKEQIRQLSKRAKSSSRKTISSEDKPFNLSRDPYI
VIVEISKEQIRQLSKHAKSSSRKTISSEDKPFNLSRDPYI

SNKLGKFFEITPEKNPQLRDLDFLSIVDM 383
SNKLGKLF EIT - QRNPQLRDLDFLSIVDM 417

Figure 3 Comparison of the epitope-containing region of α -subunit of β -conglycinin with its corresponding region of α' -subunit.

Bold amino acid residues on the sequence of α' -subunit of β -conglycinin express those different from the corresponding amino acid residues on the sequence of α -subunit. A, α -subunit of β -conglycinin; B, α' -subunit of β -conglycinin.

るエピトープは少数のアミノ酸の置換により IgE 抗体との反応性を失うという興味深い事例を示すものである。

Gly m Bd 28 K のアレルゲン性については、クローニングされた本アレルゲンをコードする cDNA を用いて、glutathione S-transferase との融合タンパク質として大腸菌にて発現させ、その発現タンパク質と患者血清との反応性を検討した¹⁰⁾。Figure 4 に示したように、大豆より精製した Gly m Bd 28 K は患者血清における IgE 抗体と強く反応したが、大腸菌で発現させた融合タンパク質はそれとはきわめて弱い結合性しか示さなかった。大腸菌で発現させたタンパク質では糖鎖の修飾反応は起こらないので、この両タンパク質の反応性の違いは糖鎖の存在に起因すること、換言すると、糖鎖が IgE 抗体との反応性に関与することを示唆している。そこで、大豆より精製した Gly m Bd 28 K を lysyl endopeptidase で処理し、糖ペプチドを HPLC で単離した。得られた糖ペプチドは患者血清における IgE 抗体と強く反応したが、glycopeptidase A で糖鎖を除去して得られたペプチドは IgE 抗体との結合性を失った (Figure 5)²³⁾。これらの結果は患者血清における Gly m Bd 28 K に特異的な IgE 抗体の大半が本アレルゲンの糖鎖と反応することを示すものである。最近、アスパラギン結合型糖鎖を有するアレルゲンにおける糖鎖部に特異的な IgE 抗体の存在を示唆する研究が幾つか報告されている²⁴⁾²⁵⁾。Salcedo *et al.*²⁴⁾ は小麦における糖鎖を有する α -amylase inhibitor CM16 および大麦における α -amylase inhibitor CMB の糖鎖部が IgE 抗体と反応することを報告している。著者ら¹⁸⁾ も Tri a Bd 17 K を精製して本アレルゲンが IgE 抗体と結合し、この反応にフコースが関与していることを観察している。これらの糖鎖と IgE 抗体との反応性は共通エピトープという観点から特に興味深い現象であり、アレルギーを理解する上でも一つの重要な課題ではあるけれども、現在のところ

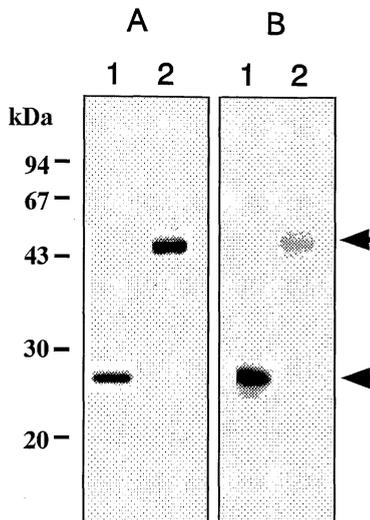


Figure 4 Immunoblotting patterns of the fusion protein of the protein fragment corresponding to the allergen with glutathione S-transferase.

E. coli JM109 harboring the expression vector for the peptide fragment including the allergen was cultured for 7 h in the presence of 1 mM IPTG. The purified fusion protein and the allergen purified from soybean were electrophoresed on a 12% polyacrylamide gel and the proteins on a part of the gel were stained with Coomassie brilliant blue R250 (A). The proteins on the other part were electroblotted onto a nitrocellulose membrane. The membrane was stained with a serum of soybean-sensitive patient (B). The upper and lower arrows express the positions of the fusion protein and the purified allergen, respectively. Lane 1, the allergen purified from soybean; lane 2, the purified fusion protein.

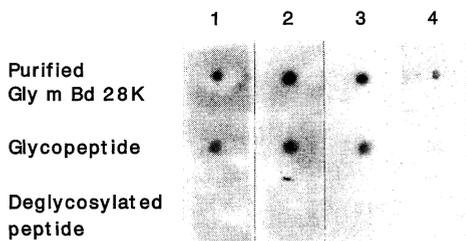


Figure 5 Immunoblotting of Gly m Bd 28 K, the glycopeptide and its deglycosylated peptide with the sera of soybean-sensitive patients.

Gly m Bd 28 K, the glycopeptide and the deglycosylated peptide blotted onto nitrocellulose membranes were treated with patients' sera. Lanes 1-3, immunoblots with patients' sera; lane 4, immunoblot with anti-HRP as a control.

る、その反応性に関する詳細な仕組みは未解明である。

3. アレルゲンの分析方法の開発

食物アレルギー患者にとって、自ら摂取する食物中どのようなアレルゲンがどの程度含まれているかを知っ

Table 3 Contents of Gly m Bd 30 K in soybean products.

Food	Gly m Bd 30 K content (mg/g fresh weight)
Soybean seed	7.292±0.663
Kori-tofu	5.535±0.694
Yuba	4.682±0.542
Kinako	1.819±0.107
Abura-age	1.453±0.113
Kinugoshi tofu	0.940±0.118
Momen-tofu	0.819±0.061
Soy milk	0.671±0.030
Miso	—*
Natto	—
Shoyu	—
Meat ball	0.304±0.111
Beef croquette	0.203±0.049
Fried chicken	0.115±0.170
Hamburg	0.120±0.115
Fish sausage	—

*Not detected.

ておくことは患者が安全な食生活を営む上で、きわめて重要なことである。著者らは、大豆アレルゲン Gly m Bd 30 K²⁶⁾ と Gly m Bd 28 K²⁷⁾ ならびに小麦アレルゲン Tri a Bd 17 K²⁸⁾ に対する選択的かつ高感度の定量法を確立した。Gly m Bd 30 K については、本アレルゲンに対する 2 種類のモノクローナル抗体を作製し、これらを用いるサンドイッチ ELISA を開発した²⁶⁾。同様に、Gly m Bd 28 K についても、2 種類のモノクローナル抗体を作製してサンドイッチ ELISA を確立した²⁷⁾。これらの方法を用いて、大豆利用食品におけるこれらアレルゲンの分布を吟味した。Table 3²⁹⁾ に示したように、Gly m Bd 30 K は豆腐、湯葉、きな粉などに高濃度に存在していたが、味噌、醤油および納豆などの発酵大豆食品にはまったく検出できなかった。また、ミートボールなどの加工食品にもその存在が示された。この事実は Gly m Bd 30 K に対する分析法は食品添加物として利用される大豆タンパク質の検出に有力な手段となることを示すものである。また、Gly m Bd 30 K と比べるときわめて低濃度しか存在しなかったが、Gly m Bd 28 K は、豆腐、湯葉などには存在した²⁷⁾。しかし、本アレルゲンは発酵大豆食品および加工食品にはまったく検出することはできなかった。Tri a Bd 17 K については、フコースを含む糖鎖を検出するレクチンと本アレルゲンのポリペプチド部分を認識するモノクローナル抗体を用いて、最近定量方法を確立した²⁸⁾。

4. 大豆の低アレルゲン化に関する研究

上述したように、発酵大豆食品には Gly m Bd 30 K と Gly m Bd 28 K をまったく検出することができなかった。著者らは、味噌製造過程における大豆主要アレ

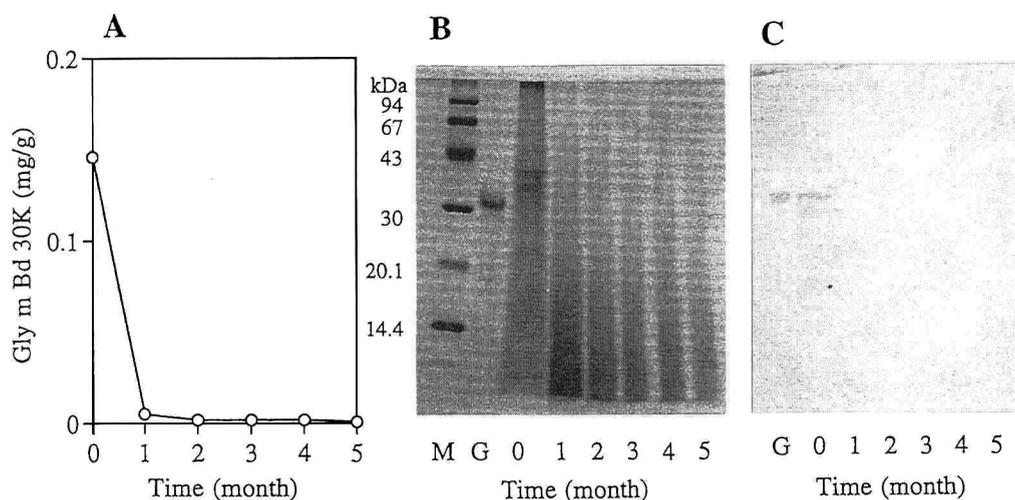


Figure 6 Fate of Gly m Bd 30K in rice-koji miso during fermentation.

A, changes in the Gly m Bd 30K contents of rice miso at various stages; B, the proteins stained with Coomassie brilliant blue R250; C, Gly m Bd 30K in the miso samples at various stages immunoblotted with F5, a monoclonal antibody against the allergen. M and G represent standard marker proteins and purified Gly m Bd 30K, respectively.

ルゲン Gly m Bd 30K の消長を検討した³⁰⁾。Figure 6 に示したように、仕込み直後には本アレルゲンの存在は示されたが、1カ月後にはすでにタンパク質は速やかに分解され、本アレルゲンに対するモノクローナル抗体および患者血清を用いるイムノブロットとサンドイッチ ELISA で分析した結果、本アレルゲンを検出できなかった。本図は米味噌の場合を示しているが、麦味噌および豆味噌においても同様な結果を示した³⁰⁾。また、蒸煮した納豆に納豆菌 (*Bacillus natto*) を接種して Gly m Bd 30K と患者血清における IgE 抗体との反応性についても詳細に検討を行い、本アレルゲンは速やかに分解され、24 時間後にはまったく検出されないことが明らかになった³¹⁾。さらに、患者を用いる負荷試験などを行い詳細に検討することが必要であるが、これらの成果は発酵大豆食品が低アレルゲン化された食品であることを強く示唆するものである。

最近、高橋らは β -conglycinin の α -subunit (Gly m Bd 68K) を欠失した東北 124 とよばれる品種の開発に成功している。佐本ら³²⁾ は、本品種は Gly m Bd 28K も含まないことを明らかにし、本品種には主要アレルゲンとして Gly m Bd 30K のみが存在することを示した。さらに、佐本ら³²⁾ は、本品種の種子よりタンパク質を抽出し、抽出液を 1 M Na₂SO₄ (pH 4.5) の条件下で処理し、Gly m Bd 30K の大半を遠心分離により除去する方法を開発した。本法により得られたタンパク質画分には Gly m Bd 68K および Gly m Bd 28K はまったく含まれず、99.8% 以上の Gly m Bd 30K が除去され、本画分は大豆特有の加工特性を有していることが明らかにされた。

以上のように、著者らは大豆および小麦におけるアレルゲンについて詳細な検討を行い、これら作物における

アレルゲンの全体像を明らかにした。また、アレルゲンの分析方法を確立して大豆の低アレルゲン化について幾つかの手法を開発した。これらの成果は今後の大豆および小麦におけるアレルゲンの研究に大きく貢献することが期待される。

本稿を終えるにあたり、食物アレルギー研究の方向づけおよび研究のご指導を賜りました徳島大学名誉教授 佐々岡啓先生および京都大学大学院教授 小川 正先生に深く感謝いたします。また、本研究は徳島大学医学部栄養学科食品学講座および岡山県立大学保健福祉学部栄養学科において、岡山県立大学保健福祉学部栄養学科木本眞順美教授、山下広美講師、比江森美樹先生ならびに徳島大学医学部栄養学科食品学講座山西倫太郎助教授と板東紀子先生との共同研究によって行われたものであり、これらの諸先生に深甚の謝意を表します。さらに、著者の研究生生活において終始ご支援を賜りました京都大学名誉教授 満田久輝先生、京都大学名誉教授 安本教傳先生ならびに京都府立大学教授 岩見公和先生に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 厚生省食物アレルギー対策検討委員会 (1998) 平成 10 年度報告書 (飯倉洋治編). 厚生省, 東京.
- 2) Brehler R, Theissen V, Luger T (1997) "Latex-fruit syndrome": Frequency of cross-reacting IgE antibodies. *Allergy* **52**: 404-10.
- 3) Tsuji H, Kimoto M, Natori Y (2001) Allergens in major crops. *Nutr Res* **21**: 925-34.
- 4) Breiteneder H, Ebner C (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* **106**: 27-36.

- 5) Moroz LA, Yang WH (1980) Kunitz soybean trypsin inhibitor: A specific allergen in food anaphylaxis. *New Engl J Med* **302** : 1126-8.
- 6) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Okajima H, Nishikawa K, Sasaoka K (1991) Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean sensitive patients with atopic dermatitis. *J Nutr Sci Vitaminol* **37** : 555-65.
- 7) Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Kitamura K, Zhu Y-I, Hirano H, Nishikawa K (1993) Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30 K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci Biotechnol Biochem* **57** : 1030-3.
- 8) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Nishikawa K, Kitamura K (1995) α -subunit of β -conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci Biotechnol Biochem* **59** : 831-3.
- 9) Tsuji H, Bando N, Hiemori M, Yamanishi R, Kimoto M, Nishikawa K, Ogawa T (1997) Purification and characterization of soybean allergen, Gly m Bd 28 K. *Biosci Biotechnol Biochem* **61** : 942-7.
- 10) Tsuji H, Hiemori M, Kimoto M, Yamashita H, Kobatake R, Adachi M, Fukuda T, Bando N, Okita M, Utsumi S (2001) Cloning of cDNA encoding a soybean allergen, Gly m Bd 28 K. *Biochim Biophys Acta* **1518** : 178-82.
- 11) Inoue K, Motozaki A, Takeuchi Y, Nishimura M, Nishimura I (1995) Molecular characterization of proteins in protein-body membrane that disappear most rapidly during transformation of protein bodies into vacuoles. *Plant J* **7** : 235-43.
- 12) Gomez L, Martin E, Hernandez D, Sanchez-Monge R, Barber D, del Pozo V, de Andres B, Armentia A, Lahoz C, Salcedo G, Palomino P (1990) Members of the α -amylase inhibitor family from wheat endosperm are major allergens associated with baker's asthma. *FEBS Lett* **261** : 85-8.
- 13) Watanabe M, Suzuki T, Ikezawa Z, Arai S (1994) Controlled enzymatic treatment of wheat proteins for production of hypoallergenic flour. *Biosci Biotechnol Biochem* **58** : 388-90.
- 14) Armentia A, Sanchez-Monge R, Gomez L, Barber D, Salcedo G (1993) *In vivo* allergenic activities of eleven purified members of a major allergen family from wheat and barley flour. *Clin Exp Allergy* **23** : 410-5.
- 15) James JM, Sixbey JP, Helm RM, Bannon GA, Burks AW (1997) Wheat α -amylase inhibitor: A second route of allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* **99** : 239-44.
- 16) Amano M, Ogawa H, Kojima K, Kamidaira T, Suetsugu S, Yoshikawa M, Satoh T, Samejima T, Matsumoto I (1998) Identification of the major allergens in wheat flour responsible for baker's asthma. *Biochem J* **330** : 1229-34.
- 17) Tanabe S, Arai S, Yanagihara Y, Mita H, Takahashi K, Watanabe M (1996) A major wheat allergen has a Gln-Gln-Gln-Pro-Pro motif identified as an IgE-binding epitope. *Biochem Biophys Res Commun* **219** : 290-3.
- 18) Kimoto M, Yoshikawa M, Takahashi K, Bando N, Okita M, Tsuji H (1998) Identification of allergens in cereals and their hypoallergenization. I. Screening of allergens in wheat and identification of an allergen, Tri a Bd 17 K. *Ann Rep Interdispl Res Inst Environ Sci* **17** : 53-60.
- 19) Sanchez-Monge R, Garcia-Casado G, Lopez-Otin C, Armentia A, Salcedo G (1997) Wheat flour peroxidase is a prominent allergen associated with baker's asthma. *Clin Exp Allergy* **27** : 1130-7.
- 20) Franken J, Stephan V, Meyer HE, Konig W (1994) Identification of alpha-amylase inhibitor as a major allergen of wheat flour. *Int Arch Allergy Immunol* **104** : 171-4.
- 21) Weiss W, Huber G, Engel K-H, Pethran A, Dunn MJ, Gooley AA, Gorg A (1997) Identification and characterization of wheat grain albumin/globulin allergens. *Electrophoresis* **18** : 826-33.
- 22) Helm RM, Cockrell G, Connaughton C, West M, Herman E, Sampson HA, Bannon GA, Burks AW (2000) Mutational analysis of the IgE-binding epitopes of P34/Gly m Bd 30 K. *J Allergy Clin Immunol* **105** : 378-84.
- 23) Hiemori M, Bando N, Ogawa T, Shimada H, Tsuji H, Yamanishi R, Terao J (2000) Occurrence of IgE antibody-recognizing N-linked glycan moiety of a soybean allergen, Gly m Bd 28 K. *Int Arch Allergy Immunol* **122** : 238-45.
- 24) Sanchez-Monge R, Gomez L, Barber D, Lopez-Otin C, Armentia A, Salcedo G (1992) Wheat and barley allergens associated with baker's asthma. Glycosylated subunits of the α -amylase inhibitor family have enhanced IgE-binding activity. *Biochem J* **281** : 401-5.
- 25) Batanero E, Villaba M, Monsalve RI, Rodriguez R (1996) Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: Evidence of an epitope in the glycan moiety in the allergen. *J Allergy Clin Immunol* **97** : 1264-71.
- 26) Tsuji H, Bando N, Kimoto M, Okada N, Ogawa T (1993) Preparation and application of monoclonal antibodies for a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay of the major soybean allergen, Gly m Bd 30 K. *J Nutr Sci Vitaminol* **39** : 389-97.
- 27) Bando N, Tsuji H, Hiemori M, Yoshizumi K, Yamanishi R, Kimoto M, Ogawa T (1998) Quantitative analysis of Gly m Bd 28 K in soybean products by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Nutr Sci Vitaminol* **44** : 655-64.

- 28) Yamashita H, Kimoto M, Hiemori M, Okita M, Suzuki K, Tsuji H (2001) Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay system for micro-detection of the wheat allergen, Tri a Bd 17 K. *Biosci Biotechnol Biochem* **65** : 2730-4.
- 29) Tsuji H, Okada N, Yamanishi R, Bando N, Kimoto M, Ogawa T (1995) Measurement of Gly m Bd 30 K, a major soybean allergen, in soybean products by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosci Biotechnol Biochem* **59** : 150-1.
- 30) Tsuji H, Okada N, Yamanishi R, Bando N, Ebine H, Ogawa T (1997) Fate of a major soybean allergen, Gly m Bd 30 K, in rice-, barley- and soybean-koji miso (fermented soybean paste) during fermentation. *Food Sci Technol Int Tokyo* **3** : 145-9.
- 31) Yamanishi R, Huang T, Tsuji H, Bando N, Ogawa T (1995) Reduction of the soybean allergenicity by the fermentation with *Bacillus natto*. *Food Sci Technol Int* **1** : 14-7.
- 32) Samoto M, Fukuda Y, Takahashi K, Tabuchi K, Hiemori M, Tsuji H, Ogawa T, Kawamura Y (1997) Substantially complete removal of three major allergenic soybean proteins (Gly m Bd 30 K, Gly m Bd 28 K and α -subunit of β -conglycinin) from soy protein by using a mutant soybean, Tohoku 124. *Biosci Biotechnol Biochem* **61** : 2148-50.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **55** : 191-198 (2002)

Studies on Allergens in Legumes and Cereals

(2001's JSNFS Award for Excellence in Research)

Hideaki Tsuji*

(Received January 29, 2002; Accepted March 14, 2002)

Summary : Using serum samples from soybean-sensitive patients, 16 allergens were found in soybeans. Among them, Gly m Bd 30 K, Gly m Bd 68 K and Gly m Bd 28 K were shown to be major allergens. Gly m Bd 30 K was identified as a 34-kDa oil-body-associated protein, and Gly m Bd 68 K as the α -subunit of β -conglycinin. Gly m Bd 28 K was shown to be an unknown Asn-linked glycoprotein and exhibited high homology with pumpkin MP27/MP32 and carrot globulin-like protein. Selective and highly sensitive methods for determination of Gly m Bd 30 K and Gly m Bd 28 K have been developed, and traditional fermented soybean foods were revealed to be hypoallergenic. Also, a simple method for the removal of major allergens has been established with a new solvent system. In wheat, 15 allergens have been detected using sera from wheat-sensitive patients. Among them, 27-, 31- and 37-kDa allergens were shown to be major allergens in wheat and a 17-kDa allergen (Tri a Bd 17 K) was identified as α -amylase inhibitor CM16 and CM17 with an Asn-linked sugar moiety. In the course of the allergenicities of Gly m Bd 28 K and Tri a Bd 17 K, their sugar moieties were shown to be involved in the binding of IgE antibodies specific for the allergens in the sera of patients. This finding confirms the idea that the sugar moieties may be a common epitope structure.

Key words : soybean allergen, wheat allergen, sandwich ELISA, Asn-linked sugar chain, hypoallergenicization.

* Corresponding author

Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja 719-1197, Japan