

研究報文

醤油醸造における大豆アレルゲンの分解・除去機構

真岸範浩, 結川直哉, 古林万木夫, 谷内昇一郎*
(ヒガシマル醤油株式会社・研究所, *高槻病院・小児科)

(平成29年11月14日受理)

Degradation and removal of soybean allergen in the brewing of soy sauce

Norihiro Magishi, Naoya Yuikawa, Makio Kobayashi, *Shoichiro Taniuchi

Research Laboratory of Higashimaru Shoyu Co., Ltd
**Department of Pediatrics, Takatsuki General Hospital*

醤油醸造における大豆アレルゲンの分解・除去機構を明らかにするため、大豆アレルギー患者の血清を用いたウエスタン解析により醤油醸造工程での大豆アレルゲンの残存を解析した。その結果、大豆アレルゲンは諸味中で完全には分解されず生揚げ中に残存していた。生揚げに残存する大豆アレルゲンは火入れにより熱変性を受けて火入れオリとして不溶化し、おり下げ・ろ過の清澄工程を経て除去された。また、市販醤油中の大豆アレルゲンの残存を調べたところ、火入れ醤油では大豆アレルゲンは検出されなかったが、一部の生醤油製品で大豆アレルゲンが検出された。これらの結果より、大豆アレルゲンの分解除去には麹菌酵素による分解と共に、火入れかつ清澄工程が重要であることが示唆された。

緒言

醤油原料の1つである大豆は主要な食物アレルゲンの1つであり、16種類のアレルゲンが同定されている¹⁾。これらのアレルゲンのうち主要な大豆アレルゲンと考えられるGly m Bd 30K, Gly m Bd 28Kはマウスのモノクローナル抗体を用いたウエスタン解析により醤油製品には残存しないことが報告されているが^{2~5)}、我々のウサギ由来大豆特異的抗体を用いた研究により大豆由来のたんぱく質は麹菌酵素による分解を受けるものの諸味中では完全には分解されず生揚げに残存すること、生揚げに残存する大豆たんぱく質は火入れにより除去されることを報告している⁶⁾。昔から醤油づくりでは「一麹、二糶、三火入」と言われ、これらの工程は醤油の品質を左右する重要

な工程であり、火入れ工程には殺菌だけでなく、酵素の失活や色、香りを整える役割があるが、火入れは大豆アレルゲンの分解・除去の観点からも重要な工程であることが考えられる。

大豆については省令で定める特定原材料に準ずる20品目の一つとしてアレルゲンの表示が推奨されているが、2014年に発行された厚生労働科学研究班による「食物アレルギーの診療の手引2014」では、「醤油」について大豆アレルギーは「ほぼ除去不要」⁷⁾、平成27年3月に発行された文部科学省による「学校給食における食物アレルギー対応指針」においても「醤油」は除去する必要のない調味料と記載されている⁸⁾。しかし、これまで醤油醸造における大豆アレルゲンの分解・除去については主要な大豆アレルゲンのモノクローナ

ル抗体や大豆たんぱく質特異的抗体を用いた解析が行われているが、大豆アレルギー患者の血清を用いた大豆アレルギーの解析は行われていない。そこで本研究では、醤油製造工程における大豆アレルギーの分解・除去機構を大豆アレルギー患者の血清を用いたウエスタン解析により明らかにした。

実験方法

1. 試料調製⁹⁾

自社の諸味を各醸造過程（初期諸味；仕込み後2週、中期諸味；2か月、後期諸味；6か月）で採取後、ろ過し、生揚げを得た。生揚げは85℃達温で加熱し、55℃12時間オリ下げ後、21,500×gで10分遠心し、得られた上清（塩可溶性画分）を火入れ画分とした（図1）。さらに遠心後の沈殿部（塩不溶性画分）は18%（w/v）食塩水で2回洗浄後、4 M尿素/0.1 M Tris-HCl（pH 8.6）で可溶化し、オリ画分とした。市販醤油は醤油そのものを塩可溶性画分とした。

2. 大豆アレルギー抗体⁹⁾

大豆アレルギーの検出には大豆アレルギー患者のヒト血清を用いたウエスタン解析を行った。ヒト血清は、関西医科大学小児科の大豆アレルギー患者2名（A抗体；11歳、大豆特異的IgE 1.01 Ua/ml, RAST値2, B抗体；9歳、特異的IgE抗体10.9 Ua/ml, 大豆

RAST値3）よりご提供頂いた。ヒト血清は滅菌水で50倍希釈し、諸味中に残存する大豆アレルギーのウエスタン解析にはA抗体、B抗体をそれぞれ単独で使用し、市販醤油中に残存する大豆アレルギーのウエスタン解析にはA抗体とB抗体を等量混合して使用した。

3. SDS-PAGE及びウエスタン解析⁹⁾

14%（w/v）ポリアクリルアミドゲルを使用してSDS-PAGEを行った。生揚げおよび生醤油製品を含む各試料80 μ lにSDSサンプルバッファー（62.5mM Tris-HCl（pH6.8）、1%（w/v）SDS、10%（w/v）グリセロール、5%（w/v）メルカプトエタノール、0.01%（w/v）BPB）20 μ lを添加後、37℃で一晩インキュベートしてSDS変性させ、各ウェルに10 μ lずつ添加して電気泳動を行った。分子量マーカーはProtein Molecular Weight Marker（Low）（3450、タカラバイオ社）を使用した。泳動後、分離タンパク質をPVDF膜（AE-6666、ATTO社）に100mA/cm²で1時間転写した。転写PVDF膜を1%（w/v）BSA-PBS-0.1%（w/v）Tween20で一晩ブロッキングした後、0.1%（w/v）Tween-PBSで軽く洗浄し、ヒト血清と25℃で3時間反応させた。次に、PVDF膜を0.1%（w/v）Tween-PBSで10分間3回洗浄後、ヒト由来ビオチン化二次抗体（Anti-IgE（ ϵ ）、Human, Goat-Poly, Biotin, BA-3040, Vector社）と室温で1時間反応させた。続いて、PVDF膜を0.1%（w/v）Tween-PBSで

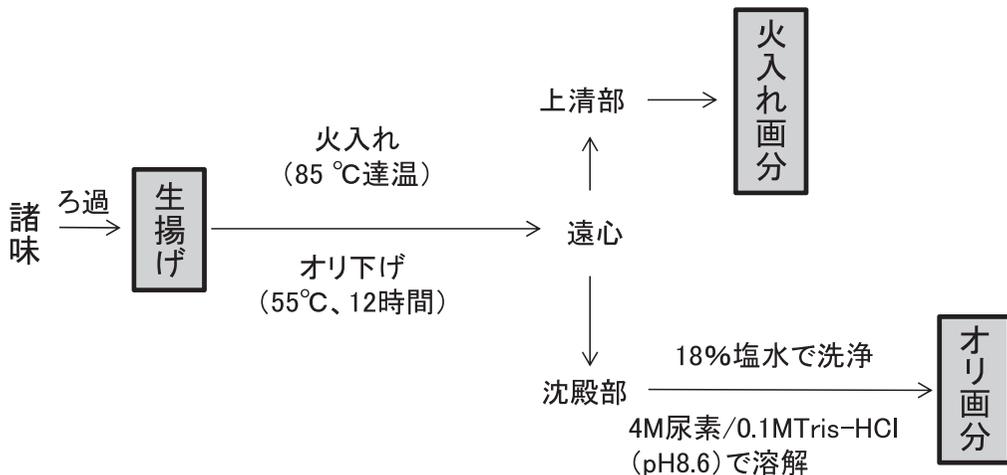


図1 生揚げ、火入れ画分、オリ画分の調製方法

10分間 3 回洗浄後, アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (VECTASTAIN ABC Kit, PK-4000, Vector社) と室温で30分反応させ, 0.1% (w/v) Tween-PBS で10分間 3 回洗浄後, DAB基質溶液 (SK-4100, Vector社) 中に室温で20分振とうし, 蒸留水で 5 分間洗浄後, 乾燥させて大豆アレルギーを検出した。

結果 および 考察

(i) 諸味中での大豆アレルギーの残存

諸味中での大豆アレルギーの分解を解析するため, 初期諸味, 中期諸味, 後期諸味より調製した生揚げについて大豆アレルギー患者のヒト血清を用いたウエスタン解析を行った。通常のSDS-PAGEでは試料にサンプルバッファーを加えた後に行う変性・可溶化のための加熱処理が火入れに相当すると考えられたため, 本実験では試料にサンプルバッファーを加えた後に加熱処理をせず37°C一晩インキュベートすることにより, 変性・可溶化を行わせた。その結果, 全ての生揚げで30kDa付近と23~24kDa付近にバンドが検出され, 2種類の大豆アレルギーが残存していた(図2)。A抗体, B抗体で検出された大豆アレルギーの違いはみられなかった。これらの結果から, 大豆アレルギーは諸味中では完全に分解されず, 生揚げに残存することが示唆

された。また, 検出された大豆アレルギーは分子量からGly m Bd 30K^{11, 10)} とオレオシン¹¹⁻¹⁶⁾ であると推測された。

(ii) 生揚げの加熱, 清澄処理による大豆アレルギーの変性・除去

各生揚げを加熱, 遠心処理した火入れ画分には大豆アレルギーが検出されなかった(図2)。一方で, 加熱処理で生じた沈殿部のオリ画分にはスメアなバンドが検出された。スメアなバンドが検出された要因として, 生揚げに残存する大豆アレルギーが加熱処理により熱変性を受けたことが考えられた(図3)。これらの結果から生揚げに残存する大豆アレルギーは火入れにより熱変性を受けて不溶化しオリとして除去され, 火入れ醤油には大豆アレルギーが残存しないことが示唆された。

(iii) 市販醤油に残存する大豆アレルギーのウエスタン解析

自社品含む「生醤油とラベルに記載していない」市販醤油 8 品(濃口 3 品, たまり 2 品, 再仕込 2 品, 淡口 1 品)について大豆アレルギー患者のヒト血清(A抗体, B抗体のプール血清)を用いたウエスタン解析を

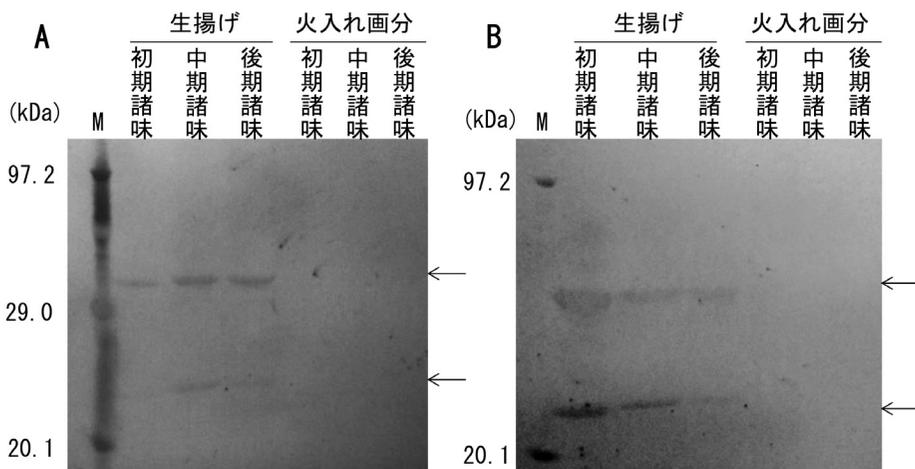


図2 ウエスタン解析による諸味中での大豆アレルギーの検出(生揚げ, 火入れ画分)

大豆アレルギー患者の血清はそれぞれ単独で使用した。左図: A抗体, 右図: B抗体
M: 分子量マーカー, 矢印は分子量から推定された大豆アレルギー(Gly m Bd30K (34 kDa), オレオシン(23-24kDa))。

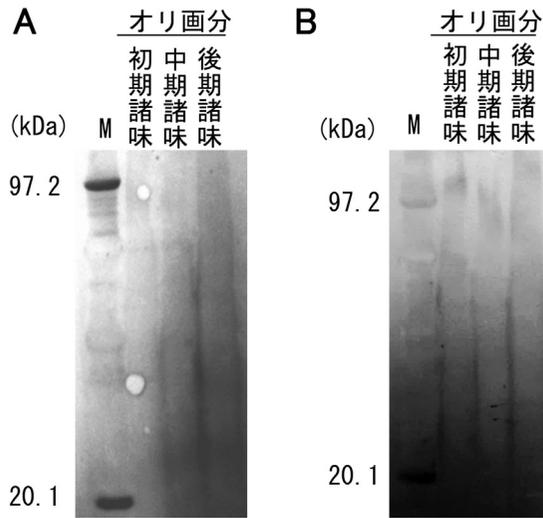


図3 ウエスタン解析による諸味中の大豆アレルゲンの検出(オリ画分)

大豆アレルギー患者の血清はそれぞれ単独で使用した。左図：A抗体，右図：B抗体。M：分子量マーカー

行った結果，8品すべて大豆アレルゲンは検出されなかった(図4A)。一方，「生醤油とラベルに記載している」市販醤油7品(濃口4品，再仕込1品，たまり1品，淡口1品)について同様のウエスタン解析を行った結

果，濃口2品と再仕込1品，たまり1品で約50kDa付近にバンドが検出され，たまり1品と淡口1品で23~24kDa付近にバンドが検出され，生醤油製品7品中5品で大豆アレルゲンが残存することを確認し

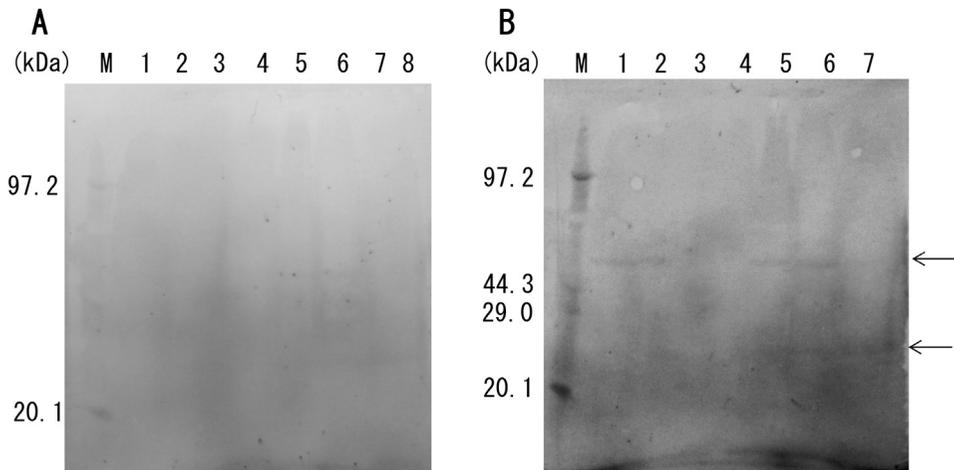


図4 ウエスタン解析による市販醤油中に残存する大豆アレルゲンの検出

大豆アレルギー患者のヒト血清はA抗体とB抗体を混合した抗体を使用した。

A：「ラベルに生醤油と記載していない」市販醤油の大豆アレルゲンの検出

レーン1~3：濃口醤油，4~5：たまり醤油，6~7：再仕込醤油，No.8：淡口醤油，M：分子量マーカー

B：市販生醤油の大豆アレルゲンの検出

1~4：濃口醤油，5：再仕込醤油，6：たまり醤油，7：淡口醤油，M：分子量マーカー

矢印は分子量から推定された大豆アレルゲン(β -コングリシニン β サブユニット(50 kDa)，オレオシン(23-24 kDa))。

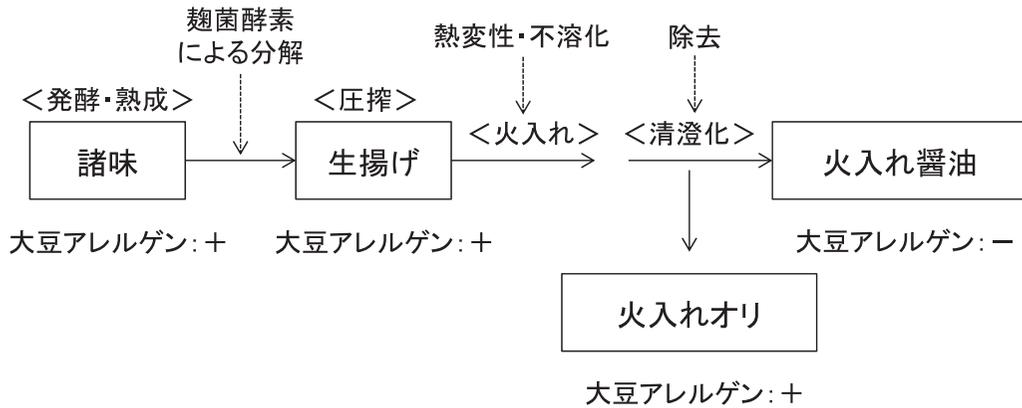


図5 醤油醸造における大豆アレルギーの分解・除去機構
 +: 大豆アレルギー検出, -: 大豆アレルギー不検出

た(図4B)。また、検出された大豆アレルギーは分子量からβ-コングリシニンβサブユニット¹⁷⁾と、オレオシン¹¹⁻¹⁶⁾であることが推測された。これらの結果より、火入れ、清澄工程がないと考えられる生醤油には大豆アレルギーが残存する可能性があることが示唆された。大豆アレルギーが検出されなかった生醤油製品は、限外ろ過等の精密ろ過を行い、大豆アレルギーが除去されたのではないかと考えられた。

今回の解析では主要な大豆アレルギーと考えられるGly m Bd 30K以外にオレオシンやβ-コングリシニンβサブユニットが検出された。オレオシンはオイルボディ膜たんぱく質であり、アナフィラキシーを起こすゴマやピーナッツの主要なアレルギーであることが報告されている¹¹⁻¹⁶⁾。またβ-コングリシニンβサブユニットは主要大豆アレルギーであるGly m Bd 68K(β-コングリシニンαサブユニット)と高い相同性をもつことが報告されており¹⁷⁾、いずれもアレルギー症状を引き起こす恐れのあるアレルギーである。以上の結果より、醤油醸造での大豆アレルギーの分解・除去機構を図5に示したが、火入れは醤油の品質だけでなく、醤油の低アレルギー性にとっても重要であることが示唆された。

要 約

- 大豆アレルギー患者の血清を用いたウエスタン解析を行った結果、初期、中期、後期諸味すべ

ての生揚げで大豆アレルギーが残存しており、諸味中では大豆アレルギーは完全には分解されないことを明らかにした。

- 生揚げに残存する大豆アレルギーは火入れにより不溶化し、その後の清澄工程で除去され、火入れ醤油には大豆アレルギーが残存しないことを明らかにした。
- 生醤油であることを明記していない市販醤油8品(濃口3品, たまり2品, 再仕込2品, 淡口1品)からは大豆アレルギーは検出されなかった。一方、市販生醤油製品7品(濃口4品, 再仕込1品, たまり1品, 淡口1品)には大豆アレルギーが残存している可能性があった。
- 火入れは大豆アレルギーを除去する上でも重要な工程であり、醤油の品質だけでなく醤油の低アレルギー性においても重要工程であることが示唆された。

参 考 文 献

- Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Nishikawa K and Sasaoka K: *J Nutr Sci Vitaminol.*, 37, 555 (1991).
- Tsuji H, Okada N, Yamanishi R, Bando N, Kimoto M and Ogawa T: *Biosci Biotechnol Biochem.*, 59, 150 (1995).
- Ogawa T, Sakamoto M and Takahashi K: *J Nutr Sci Vitaminol.*, 46, 271 (2000).

- 4) Bando N, Tsuji H, Hiemori M, Yoshimizu K, Yamanishi R, Kimoto M and Ogawa T : *J Nutr Sci Vitaminol.*, **44**, 655 (1998).
- 5) Tsuji H, Bando N, Hiemori M, Yamanishi R, Kimoto M, Nishikawa K and Ogawa T : *Biosci Biotechnol Biochem.*, **61**, 942 (1997).
- 6) 橋本裕一郎, 古林万木夫, 宮澤いづみ, 高畑能久, 田辺創一, 谷内昇一郎 : 本誌, **31**, 217 (2005).
- 7) 食物アレルギー研究会 HP : <http://www.foodallergy.jp/>
- 8) 文部科学省 HP : http://www.mext.go.jp/a_menu/sports/syokuiku/1355536.htm
- 9) Magishi N, Yuikawa N, Kobayashi M and Taniuchi S : *Mol Med Rep.*, **16**, 2264 (2017).
- 10) Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Kitamura K, Yue-Lin Zhu, Hirano H and Nishikawa K : *Biosci Biotechnol Biochem.*, **57**, 1030 (1993).
- 11) Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Guenard L, Beaudouin E, Flabbee J and Hatahet R : *Clin Exp Allergy*, **33**, 1046 (2003).
- 12) Chen JC, Lin RH, Huang HC and Tzen JT : *J Biochem.*, **122**, 819 (1997).
- 13) Leduc V, Moneret-Vautrin DA, Tzen JT, Morisset M, Guerin L and Kanny G : *Allergy*, **61**, 349 (2006).
- 14) Pons L, Olszewski A and Guéant JL : *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, **706**, 131 (1998).
- 15) Huang AHC : *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, **43**, 177 (1992).
- 16) Pons L, Chery C, Romano A, Namour F, Artesani MC. and Guéant JL. : *Allergy*, **57**, 88 (2002).
- 17) Krishnan HB, Kim WS, Jang S and Kerley MS : *J Agric Food Chem.*, **3**, 938 (2009).
- 15) Kobayashi M, Hashimoto Y, Taniuchi S and Tanabe S : *Int J Mol Med.*, **13**, 821 (2004).
- 16) 橋本裕一郎, 古林万木夫, 谷内昇一郎, 田辺創一 : 本誌, **30**, 213 (2004).