精白米の塩溶液浸漬による低アレルギー化

山田千佳子, 鍋田早希子, 山本美由紀, 和泉秀彦[§],
松田 幹*, 加藤保子**

名古屋学芸大学管理栄養学部

* 名古屋大学大学院生命農学研究科

** 川崎医療福祉大学臨床栄養学科

Decrease in Rice Allergens by Soaking
in NaCl SolutionChikako Yamada, Sakiko Nabeta, Miyuki Yamamoto,
Hidehiko Izumi[§], Tsukasa Matsuda*
and Yasuko Kato**School of Nutritional Sciences, Nagoya University
of Arts and Sciences, 57 Takenoyama,
Iwasaki-cho, Nissin, Aichi 470-0196* Graduate School of Bioagricultural Sciences,
Nagoya University, Furo-cho, Chikusa,
Nagoya, Aichi 464-8601** Department of Clinical Nutrition, Kawasaki
University of Medical Welfare, 288 Matsushima,
Kurashiki, Okayama 701-0193

As most rice allergens are proteins belonging to the albumin or globulin fraction, it can be expected that soaking uncooked rice in NaCl solution will cause a decrease in the amount of allergens present. Rice grains were soaked in NaCl solutions of different concentrations and temperatures for 24 hours, after which the soluble proteins and total proteins were extracted with 0.5 M NaCl and 1% SDS solution, respectively. The proteins, particularly allergens, in each extract were analyzed by SDS-PAGE, immunoblot analysis and ELISA. Allergens of 14-16 kDa and 26 kDa were removed by dissolution to the greatest extent when the rice grains were soaked in 0.5 M NaCl solution at 50°C, with the result that the amount of allergens in the rice grains decreased. The present results provide a useful method for producing hypoallergenic rice.

(Received Feb. 14, 2006 ; Accepted Aug. 8, 2006)

米はそれを主食にする人々にとってエネルギー源であるばかりでなく、リジンが制限アミノ酸となっているものの、他の穀類と比較してアミノ酸スコアは高く、タンパク質源としても重要である。しかし、近年、米を含む穀類が食物アレルギーを引き起こし、卵や牛乳に比べると頻度は少ないものの、成人における重篤なアトピー性皮膚炎の原

因であることが報告されている¹⁾。

これまでに我々は、米タンパク質抽出溶液と米アレルギー患者血清中のIgEとの反応性を指標にして、米の主要アレルギーを単離・精製し、その構造と性質を明らかにしてきた^{2)~4)}。26 kDaの α -グロブリン⁵⁾や14-16 kDaのアルブミンがアレルギーとして同定されているが、特に14-16 kDaのアルブミンは患者血清中のIgEと最も強く反応し、一次構造において穀物に広く分布する α -アミラーゼあるいはトリプシンに対するインヒビターの構造と相同性を示すことが分かっている³⁾。これらのタンパク質は米の胚乳部に広く分布しているが、米の主要タンパク質であるプロラミンやグルテリンとは異なり、プロテインボディには存在していない。

米の低アレルギー化については荒井らのグループにより、微生物由来の酵素と界面活性剤を用いた方法による主要アレルギーの除去が報告されている。また我々も、味噌溶液に精白米を浸漬することで、麴由来の酵素によるアレルギータンパク質が減少することを報告している。このように、外部から添加した酵素による米アレルギーの低減化についてはいくつかの報告がある⁶⁾⁷⁾。

一方、米の主要アレルギーはアルブミン・グロブリン画分に属する可溶性タンパク質であり、塩溶液に溶ける性質を持つ。一般に、米は炊飯する前に浸漬させることから、本研究では、米を一定条件下で浸漬することにより可溶性タンパク質が溶出することに期待し、これを利用した浸漬による米アレルギーの低減化を目的とした。さらに、得られた成果の加工への応用について考察した。

1. 実験方法

(1) 試料

平成16年度三重県産コシヒカリの精白米を使用した。

(2) 米の塩溶液浸漬および米残存タンパク質の抽出

精白米1gを0, 0.1, 0.5 MのNaCl溶液2 mlに浸漬させ、4°C, 30°C, 50°Cの各温度で24時間浸漬した。予備実験として、0-24時間浸漬した場合に米粒より溶出するタンパク質量を測定し、最も溶出量の多かった24時間浸漬で検討を行った。その後、浸漬溶液を回収し、さらに米粒を蒸留水1 mlで4回洗浄した溶液を合わせて浸漬溶液とした。また米粒中に残存したタンパク質を抽出するために、米粒は洗浄後に粉碎した。可溶性タンパク質の抽出には0.5 M NaCl溶液を用い、粉碎後の浸漬米にそれぞれ5 mlずつ加え、4°Cで24時間振とう抽出を行った。遠心により抽出溶液を回収後、さらに0.5 M NaCl溶液3 mlで超音波抽出(100 W, 30分)を2回行った。これら振とう抽出溶液と超音波抽出溶液とを合わせて、フィルターろ過(pore size: 5 μ m FUJIFILM)したものを米粒残存可溶性タンパク質抽出溶液とした。総タンパク質の抽出には1% SDS溶液を用い、5 mlで振とう抽出を行った後、さらに5 mlで超音波抽出を2回行った。これら振とう抽出溶液と超音波抽

〒470-0196 愛知県日進市岩崎町竹の山 57

* 〒464-8601 名古屋市千種区不老町

** 〒701-0193 岡山県倉敷市松島 288

[§] 連絡先 (Corresponding author), izumi@nuas.ac.jp

出溶液とを合わせて、フィルターを通したものを米粒残存総タンパク質抽出溶液とした。以上、浸漬溶液、米粒残存可溶性タンパク質抽出溶液および米粒残存総タンパク質抽出溶液について、タンパク質量を Lowry 法で、タンパク質組成を SDS-PAGE により解析した。さらに、主要アレルゲンに対する抗体を用いたイムノブロットと阻害 ELISA を行い、アレルゲン残存量を調べた。

(3) タンパク質の定量

各試料溶液中のタンパク質量は、Lowry⁸⁾の方法に従い定量した。BSA (Bovine serum albumin) を標準タンパク質として検量線を作成し、各試料溶液中のタンパク質濃度を求めた後、精白米 100 g あたりの各タンパク質量を算出した。

(4) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびイムノブロット

各試料溶液中のタンパク質組成については、Laemmli⁹⁾の方法に従い SDS-PAGE により解析した。ゲルは 15% 均一ゲルを用い、電気泳動後にクマシーブリリアントブルー (CBB) で染色し泳動パターンを観察した。また、もう一方のゲルは定電流 ($2.0 \text{ mA/cm}^2 \times \text{ゲル面積}$) で 30 分通電し、分離タンパク質をウェスタンブロッティング法¹⁰⁾により PVDF 膜に転写させた。転写後の PVDF 膜は 1% BSA/TBS (Tris-buffered saline) を用いて 4°C で 24 時間ブロッキング後、14-16 kDa アレルゲンの検出にはモノクローナル抗体 25B9¹¹⁾を、26 kDa アレルゲンの検出には抗マウス血清を用いて抗原抗体反応を行った。2次抗体には、抗マウス IgG・ヤギポリクローナル抗体パーオキシターゼ標識 (Jackson immuno Research) を用いた。発色は、過酸化水素/TBS と 4-クロロ-1-ナフトール/メタノール溶液を使用直前に混合し、PVDF 膜の転写面に反応させ、暗所にて行った。

(5) 阻害 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法による米アレルゲンの定量

米粒残存可溶性タンパク質抽出溶液に含まれる 14-16 kDa アレルゲンを阻害 ELISA 法により定量した。96 穴マイクロプレート (NUNC) に、14-16 kDa アレルゲンを $1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ PBS/well となるように加え、4°C で 24 時間放置後、1% BSA/PBS (phosphate-buffered saline) を用いて 37°C で 2 時間ブロッキングを行った。これとは別に、1.5 ml チューブに、試料溶液および検量線作成のための標準溶液と一定希釈した 25B9 の混合溶液を作成し、4°C で 24 時間、抗原抗体反応させた。これをブロッキング後のプレートに加え、試料溶液および標準溶液中の 14-16 kDa アレルゲンと反応しなかった過剰量の抗体と、プレートにコーティングされた 14-16 kDa アレルゲンとを反応させた。イムノブロットと同様の 2 次抗体を反応させた後、*o*-フェニレンジアミンを含むクエン酸緩衝液に過酸化水素水を加えた溶液で発色させ、1 M の硫酸で反応を停止させた後、492 nm の

図 1 精白米を塩溶液に浸漬することにより溶出された可溶性タンパク質の解析

A: Lowry 法によるタンパク質の定量. B: SDS-PAGE およびイムノブロットによるアレルゲンの検出.

吸光度からアレルゲンタンパク質を定量した。

2. 実験結果および考察

(1) 浸漬による溶出タンパク質量および組成の解析

各条件により 24 時間浸漬させた米粒中から溶出したタンパク質量を Lowry 法で定量した結果を図 1-A に示した。これより、浸漬 NaCl 濃度、浸漬温度依存的にタンパク質の溶出量は増加していた。また、50°C、0.5 M の NaCl 溶液に浸漬した場合に最も溶出しており、0.63 g/100 g であった。さらに、溶出タンパク質の組成を SDS-PAGE により解析し、14-16 kDa および 26 kDa アレルゲンに対する特異抗体を用いたイムノブロットにより溶出アレルゲン量の解析を行った結果を図 1-B に示した。その結果、米主要アレルゲンである 14-16 kDa および 26 kDa アレルゲンについても浸漬 NaCl 濃度、浸漬温度依存的にタンパク質の溶出量は増加していた。26 kDa アレルゲンの溶出量は NaCl 濃度に大きく依存していたが、これは 26 kDa アレルゲンが塩溶液に可溶なグロブリンに属するためと考えられた。以上より、50°C、0.5 M の NaCl 溶液に浸漬した場合に米主要アレルゲンが最も溶出されていることが明らかとなった。

(2) 米粒残存可溶性タンパク質量および組成の解析

次に、浸漬後の精白米を洗浄後、0.5 M の NaCl 溶液で抽出した米粒残存可溶性タンパク質量を Lowry 法で定量した結果を図 2-A に示した。浸漬により可溶性タンパク質が溶出した結果、米粒残存可溶性タンパク質は浸漬 NaCl 濃度、浸漬温度依存的にタンパク質の残存量が減少してい

図 2 塩溶液浸漬後の米粒残存可溶性タンパク質の解析
塩溶液浸漬後に精白米を粉碎し、0.5 M NaCl 溶液で抽出した。
A: Lowry 法によるタンパク質の定量。
B: SDS-PAGE およびイムノブロットによるアレルギーの検出。
M: 分子量マーカー, C: 浸漬せずタンパク質を抽出したもの。

た。また 50°C、0.5 M の NaCl 溶液に浸漬した場合に最も残存量が少なく、0.17 g/100 g であった。さらに、米粒残存可溶性タンパク質の組成を SDS-PAGE により解析し、14-16 kDa および 26 kDa アレルゲン量をイムノブロットにより解析した結果を図 2-B に示した。その結果、50°C、0.5 M の NaCl 溶液に浸漬時に 14-16 kDa および 26 kDa アレルゲンが顕著に減少していることが明らかとなった。

(3) 米粒残存米アレルゲン (14-16 kDa) の定量

実際には米粒の方を炊飯して食すことになるため、米粒残存可溶性タンパク質抽出溶液中の 14-16 kDa アレルゲンを阻害 ELISA 法にて定量した (図 3)。その結果、50°C、0.5 M NaCl 溶液に浸漬した場合が最もアレルゲン残存量が少なく、浸漬前の精白米中のアレルゲン量と比較して、約 45% に減少していた。これより、この条件での浸漬は米の低アレルギー化に大いに貢献することが示唆された。

(4) 米粒残存総タンパク質量および組成の解析

さらに、浸漬後の精白米を洗浄後、1% SDS 溶液で抽出した米粒残存総タンパク質量を Lowry 法で定量した結果を図 4-A に示した。浸漬温度、NaCl 濃度依存的にタンパ

図 3 塩溶液浸漬後の米粒残存アレルゲン (14-16 kDa) の定量
塩溶液浸漬後に精白米を粉碎し、0.5 M NaCl 溶液で抽出した溶液中の 14-16 kDa アレルゲンを阻害 ELISA 法にて定量した。
C: 浸漬せずタンパク質を抽出したもの。

ク質量が減少する傾向が見られた。これについては、浸漬させることでもともと精白米中に存在するプロテアーゼによって、多少分解された可能性も考えられた。この溶液中のタンパク質組成を SDS-PAGE により解析した結果を図 4-B に示した。50°C、0.5 M の NaCl 溶液浸漬において、14-16 kDa のタンパク質が減少していたが、主要貯蔵タンパク質であるグルテリンの減少は見られなかった。

以上の結果より、精白米を NaCl 溶液に一定時間浸漬することで、タンパク質源としての栄養価はある程度保持したまま、主要アレルゲンの低減化が可能であることが明らかとなった。米の主要貯蔵タンパク質であるグルテリンやプロラミンは、プロテインボティ内に存在している。しかし、米アレルゲンであるアルブミンやグロブリンは、プロテインボティ内には存在しておらず塩溶液に可溶であることから、浸漬により容易に溶出したと考えられる。また、炊飯前の浸漬は通常水で行うが、今回使用した塩溶液は最も高濃度のもので 0.5 M の NaCl 溶液であるが、このような塩溶液に浸漬した場合でも、洗浄すればある程度の塩は除去でき、普通に炊飯しても食することが可能であった。さらに、50°C の溶液に浸漬させた場合でも糊化しておらず、米粒の形状はその他の温度に浸漬させたものと違いはなかった。つまり、家庭でも精白米の浸漬時に塩濃度と温度を工夫することで、容易に低アレルギー化が可能になると考えられる。

これまでに、アレルゲンの同定や機能解明と併行していくつかの低アレルギー食品が開発された。これらは臨床試験において効果や安全性が確認され、患者の食生活に不可欠なものとなっている。患者の安全性確保の見地から考えると、アレルゲン性を出来るだけゼロに近づける努力が必要である。しかし、どの程度の低アレルギー化度なのかを明示するシステムが整えば、完全にゼロではなくても一定

図 4 塩溶液浸漬後の米粒残存総タンパク質

塩溶液浸漬後に精白米を粉碎し、1% SDS 溶液で抽出した。

A: Lowry 法によるタンパク質の定量。

B: SDS-PAGE によるタンパク質組成の解析。

M: 分子量マーカー。

C: 浸漬せずタンパク質を抽出したもの。

の評価をして消費者に供給できるようになるかもしれない。重症患者への適用は不可能であるとしても、アレルギー症状が寛解した患者や、アレルギー予防の観点から妊娠・授乳期の母親層や離乳初期の乳児などには、塩溶液に浸漬してアレルギーが45%に減少した精白米も、利用される可能性は十分に考えられる。

3. 要 約

米の主要アレルギーはアルブミン・グロブリン画分に属する可溶性タンパク質であり、塩溶液に溶ける性質を持つ。一般に、米は炊飯する前に浸漬させることから、本研究では、米を一定条件下で浸漬することにより可溶性タンパク質が溶出することに期待し、これを利用した浸漬による米アレルギーの低減化を目的とした。精白米を0, 0.1, 0.5 M の NaCl 溶液に浸漬し、4°C, 30°C, 50°C で24時間置いた後の米粒中から溶出したタンパク質について、またこのとき米粒中に残存したタンパク質を0.5 M の NaCl 溶液で抽出した可溶性タンパク質、および1% SDS 溶液で抽出した総タンパク質について、それぞれの溶液に含まれるタンパク質量をLowry法で、タンパク質組成をSDS-PAGEにより解析した。さらに、主要アレルギーに対する抗体を用いたイムノブロットと阻害ELISAを行い、アレルギー残存量を調べた。その結果、浸漬塩濃度、温度依存的にタンパク質の溶出量は増加した。これにともない、米

粒残存可溶性タンパク質は浸漬塩濃度、温度依存的に減少しており、50°C, 0.5 M の NaCl 溶液に浸漬した場合に14-16 kDa および26 kDa アレルゲンが顕著に減少していた。このときの14-16 kDa アレルゲンをELISA法で定量した結果、浸漬前と比較して約45%に減少していた。米粒残存総タンパク質についても解析を行った結果、米主要貯蔵タンパク質であるグルテリンの減少は見られず、栄養価はある程度保持されていることが確認された。以上の結果より、炊飯前の浸漬時に塩濃度と温度を工夫することで、容易に低アレルギー化が可能であることが示唆された。

文 献

- 1) 山田一恵, 岸本真知子, 稲垣義彰, 稲本 真, 駒田英勝, 山田攻功, 鳥居新平, アトピー性皮膚炎における食餌性アレルギーの検討—とくに穀物アレルギーについて—, 小児科臨床, **38**, 2545 (1985).
- 2) Matsuda, T., Sugiyama, M., Nakamura, R. and Torii, S., Purification and properties of an allergenic protein in rice grain. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1465-1470 (1988).
- 3) Izumi, H., Adachi, T., Fujii, N., Matsuda, T., Nakamura, R., Tanaka, K., Urisu, A. and Kurosawa, Y., Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a major allergenic protein in rice seeds. Homology of the deduced amino acid sequence with members of alpha-amylase/trypsin inhibitor family. *FEBS Lett.*, **302**, 213-216 (1992).
- 4) Izumi, H., Sugiyama, M., Matsuda, T. and Nakamura, R., Structural characterization of the 16-kDa allergen, RA 17, in rice seeds. Prediction of the secondary structure and identification of intramolecular disulfide bridges. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 2059-2063 (1999).
- 5) Limas, G.G., Salinas, M., Moneo, I., Fischer, S., Wittmann-Liebold, B. and Mendez, E., Purification and characterization of ten new rice NaCl-soluble proteins: identification of four protein-synthesis inhibitors and two immunoglobulin-binding proteins. *Planta*, **181**, 1-9 (1990).
- 6) Watanabe, M., Miyakawa, J., Ikezawa, Z., Suzuki, Y., Hirano, T., Yoshizawa, T. and Arai, S., Production of hypoallergenic rice by enzymatic decomposition of constituent proteins. *J. Food Sci.*, **55**, 781-783 (1990).
- 7) Izumi, H., Kondo, S., Kashio, H., Matsuda, T. and Nakamura, R., Decrease in rice allergenic proteins of polished rice grains by incubating with a miso solution. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 2250-2253 (2000).
- 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 9) Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 10) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4350-4354 (1979).
- 11) Matsuda, T., Nomura, R., Sugiyama, M. and Nakamura, R., Immunochemical studies on rice allergenic proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 509-513 (1991).

(平成 18 年 2 月 14 日受付, 平成 18 年 8 月 8 日受理)