

技術専門職員

清水 裕

共同研究者

佐伯 宏樹

1996年 4月～2000年 3月：弘前大学理学部化学科(卒業)

2000年 4月～2002年 3月：弘前大学大学院理学研究科修士課程(修了)

2002年 4月～2002年 7月：日本原燃株式会社(退職)

2003年 10月～現在：北海道大学に勤務

2008年 10月～2011年 9月：北海道大学大学院水産科学院博士後期課程(単位取得退学)

2011年 12月：博士(水産学)学位取得

加工処理中に起こるメイラード反応がエビ・カニ筋肉の 消化性とアレルギー性におよぼす影響

・緒言

エビ・カニをはじめとする水産甲殻類は、我が国における主要な食物アレルギー原因食品であり、アレルギー表示制度における表示義務品目に指定されている。水産甲殻類の主要なアレルギータンパク質は、筋肉タンパク質の一種であるトロポミオシン(以下、TM)である。TMは非常に耐熱性が高く、数十分の煮沸によっても沈殿せずに、水溶性を保つことが知られている。さらに、その構造中にリジンを多く含み、タンパク質と還元糖の縮合反応、いわゆるメイラード反応を起こしやすいという性質を持つ。

メイラード反応は、食品加工工程、特に乾燥や発酵の過程で頻繁に起きており、味噌や醤油などの色調や風味の醸成に寄与している。また、この反応は高温処理中にも起きるため、煮熟やレトルト加熱の最中にも起こりうる。そして、乾燥品やエキス成分を煮熟した調味液など、多岐に渡って利用される水産甲殻類は、その調理加工過程においてメイラード反応が頻繁に起こり、その反応生成物が喫食されていると考えられる。

メイラード反応の進行により、食品のアレルギー性が変化することは、既に知られており、ホタテ、ピーナッツ、ソバなどで報告されている(文献1,2,3)。このように食品加工におけるメイラード反応は、食物アレルギーを議論する上でも重要な成分間反応である。しかしそれらの研究では、メイラード反応させたアレルギータンパク質を研究試料としており、メイラード反応を起こしたアレルギーの消化とその後のアレルギー性に関しては、ほとんど議論していない。

花粉症などと異なり、消化器官を介したアレルギーの吸収が大部分を占める食物アレルギーにおいて、「消化」という要素は極めて重要な位置を占めている。かねてより当研究

グループでは、消化性の変化とアレルギー性に関する検討を行っており、イカの TM に対してメイラード反応によって糖を結合させた場合、消化前だけでなく、消化後も IgE 結合能の変化が継続する事を報告している（文献 4）。また、鶏卵アレルギーについても同様の報告がなされている（文献 5）。しかし、鶏卵のように、加工原料として頻繁に使用されているにもかかわらず、甲殻類 TM のアレルギー性がメイラード反応から受ける影響について、消化も含めた検討を行なった例はない。

そこで本研究では、メイラード反応が甲殻類筋肉のアレルギー性に与える影響を解明するため、単糖であるグルコースと多糖であるアルギン酸オリゴ糖（以下、AO）という性状の異なる二種類の糖をズワイガニ TM に作用させ、そのメイラード反応精製物を用いた検討を行なった。

・実験手法

実験試料：

本研究では、利用頻度や使用価値、そして生鮮試料の入手の容易さを考慮し、筋肉試料にはズワイガニを用いた。ズワイガニは、当日に漁獲されたものを市場にて購入し、実験に供した。また、メイラード反応に用いた AO はアルギン酸ナトリウム（食品添加物グレード、株式会社キミカ社）及びアルギン酸分解酵素リアーゼ S（EC 4.2.2.11，ナガセケムテックス社）を用いて調製した平均重合度 6～7 のものを用いた。

アレルギー患者血清：

魚肉アレルギーと診断された患者の血清を実験に用いた。血清の提供にあたっては、主治医から本人または保護者に対して研究の趣旨を説明し、文書による了解を得た。また、血清の使用については、日本栄養・食糧学会の倫理審査を受け、承認を得た。

粗 TM 抽出物およびメイラード反応物およびその消化物の調製：

まず、ズワイガニ筋肉からアセトン脱脂粉末を調製した。この粉末から 1 M KCl および 10 mM 2-メルカプトエタノールを含んだ 20 mM Tris-HCl バッファーによって抽出したタンパク質成分を、沸騰水中で 20 分間加熱し、生じた沈殿を再度遠心分離によって除去した。その上清を 10 mM NaCl で透析し、TM 粗精製物（以降、TM-N）として実験に用いた。

得られた TM-N の溶液に、グルコースを終濃度 0.3 M となるように溶解し、凍結乾燥した。また、それとは別に分取した TM-N の溶液に AO およびソルビトールを、TM 溶液に含まれる総タンパク質重量の半量ずつ添加し、凍結乾燥した。このタンパク質-糖混合物をインキュベータで 1～24 時間インキュベートし、メイラード反応を進行させた後、20 mM Tris-HCl（pH 7.5）を含む生理食塩水に溶解して反応を停止させ、その溶液をメイラード反応物として次の実験に供した。インキュベート条件は、グルコースでは温度 60°C、相対湿

度 35%、AO の場合は温度 60°C、相対湿度 65%とした。以後、調製されたメイラード反応物のうち、グルコースを使用したものを TM-G、AO を使用したものを TM-A と略し、後ろに反応時間の数字をつけて示す（例えば、グルコース 1 時間反応物は TM-G1 と称する）。

調製した各メイラード反応物を、ペプシン（総タンパク質に対し 1%量、pH 2.0、3 h）とした後、トリプシン（総タンパク質に対し 1%量、pH 8.0、3 h）で連続消化し、その消化物を各種の測定に供した。また、メイラード反応および消化の進行度の確認には、SDS-PAGE と抗マダラ PA 抗体を用いたイムノブロッティング（以下、IB）を用いた。

IgE 結合能の測定：

各処理後の PA 試料の IgE 結合能の測定には、魚肉アレルギー患者血清を用いた阻害 ELISA 法を用いた。

・結果

メイラード反応の進行：

メイラード反応を介してタンパク質が糖類と結合すると、SDS-PAGE における移動度の低下が起きる（文献 6）。そこで、グルコースおよび AO とのメイラード反応進行を SDS-PAGE によって調査した。結果を Fig. 1 に示す。これによると、インキュベーション時間の経過に伴う TM の移動度の低下が、グルコースと AO の両方で確認された。しかし、移動度の変化はグルコースの方がやや大きくなる傾向が見られ、加えて AO は、メイラード反応では、TM のバンドが反応時間の上昇に伴ってブロード化していた。また、いずれの糖であっても、インキュベーション時間の経過に伴って色調の変化が見られ、反応 24 時間の時点で、共に明らかな褐色を呈していた。さらに、各試料に含まれる有効性リジン含量を測定したところ、インキュベーション前を 100%とした場合、グルコース試料では、インキュベーション 1 時間および 24 時間の値が 67%と 33%となった。一方 AO 試料では、1 時間で 91%、24 時間で 78%であり、両試料において有効性リジンの減少が見られた。

以上の現象は、メイラード反応の進行によって観察される典型的な変化であり、TM と両糖の間でメイラード反応が進行したことを示すものである。また、移動度および有効性

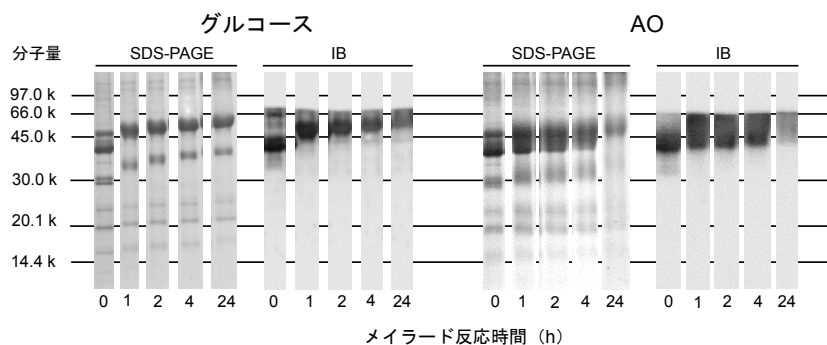


Fig. 1 メイラード反応の進行に伴うTMの変化

SDS-PAGE : レムリー法 12.5%ゲルを使用
IB : 抗ズワイガニTM抗体を使用

リジン含量の変化から、AO よりもグルコースの方が、より多くの分子数が、TM に結合したと推測できる。

メイラード反応物の消化性：

TM-N、TM-G1、TM-G24、TM-A1 および TM-A24 を、ペプシンおよびトリプシンを使用した連続消化に供試した。それら消化物の SDS-PAGE および IB の結果を Fig. 2 に示す。

まず TM-N では、ペプシン消化によってインタクトな TM が消失している事が、SDS-PAGE で確認された。しかし IB では、インタクトに近い分子量の TM の反応が確認されており、少量ではあるが、インタクトに近い分子量の TM の残存が見られた。また IB では、分子量が約 26,000 および 20,000 の消化断片も確認され、ペプシン消化後も大きな TM 消化断片が残存することが示された。一方、ペプシン消化後のトリプシン消化において、SDS-PAGE 上では、ほぼ全ての成分が分解されていたが、IB 上では、インタクトに近い分子量の TM のバンドが確認できた。以上の結果は TM がペプシンに対して、ある程度の消化耐性を持っていることを示すと同時に、トリプシン消化によって大部分の TM が速やかに分解されることを示している。

次に、TM-G1 と TM-G24 を見ると、TM-N と同様に、ペプシン消化後は分子量 20,000 程度の消化断片が残存し、トリプシン消化後では、そのバンドは消失していた。ただし、TM-N では確認されたトリプシン消化後に残存するインタクトに近い分子量の成分は、TM-G1 および TM-G24 ではトリプシン消化の時点で明らかに TM-N よりも減少しており、メイラード反応に伴う消化性の変化が見られた。また、TM-G1 と TM-G24 の間に、大きな変化は見られず、メイラード反応の進行が消化性に及ぼす影響は確認できなかった。

続いて、TM-A1 および TM-A24 を見ると、まず TM-A1 では、消化に伴う変化は TM-N や TM-G 群と大きな差異は無かった。一方 TM-A24 では、ペプシン消化の段階で、インタクトに近い分子量の残存量が TM-G 群や TM-A1 よりも多くなっていた。しかし、トリプシン消化後では、他の試料と同様に多くバンドが消失していた。

以上の結果より、用いる

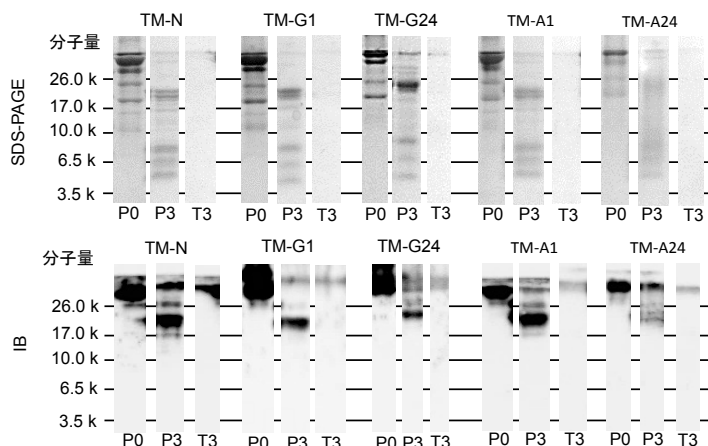


Fig. 2 ペプシン・トリプシン消化に伴うTM-N、TM-GおよびTM-Aの変化

SDS-PAGE：レムリー法 12.5%ゲルによる電気泳動
IB：抗ズワイガニTM抗体を用いたイムノブロッティング
P：ペプシン3時間消化
T：ペプシン後、トリプシン3時間消化

糖の種類によらず、メイラード反応がある程度進行すると、ペプシンでの消化パターンが変化することが示された。しかし一方で、メイラード反応の進行度に関わりなく、ペプシン消化後にトリプシンで消化することにより、大部分が本実験系で確認可能な下限値である分子量 3,500 より小さなペプチドにまで分解されていた。それゆえ、少なくとも本実験系では、メイラード反応の進行に伴う消化器管内での消化性に対する影響は、僅かなものであると推測された。

IgE 結合能：

各 TM 試料の IgE 結合能を、甲殻類アレルギー患者 5 名分の血清を用いて調べた結果を Fig. 3 に示す。まず TM-N の結果を見ると、いずれの患者血清においても未消化では阻害率が 90-100%と高い値を示した。また、ペプシン消化後でも、患者 P4 でやや低下した患者は見られたが、それでも概ね 90%程度の阻害率が確認された。しかし、トリプシン消化では、1 時間消化の時点で阻害率の大きな低下が見られた。この傾向は TM-G1 でも同様であり、ペプシン消化では見られなかった阻害率の低下がトリプシン消化で確認された。一方 TM-G24 では、消化による阻害率の低下、特にトリプシン消化による低下が大きく抑制されていた。例えば、トリプシン消化 3 時間で比較すると、患者による個人差はあるが、TM-N よりも概ね 20~60%の差が確認された。TM-G1 でも同様の低下抑制は見られたが、その度合いは TM-G24 よりも小さく、特に、P2 では TM-N との差がほとんどなかった。次に TM-A24 の結果を見ると、P2 を除き、TM-G24 と同様にトリプシン消化に伴う阻害率の低下が TM-N と比べて抑制されていた。

以上の結果より、TM が単糖、多糖のいずれとメイラード反応を起こしても、未消化の

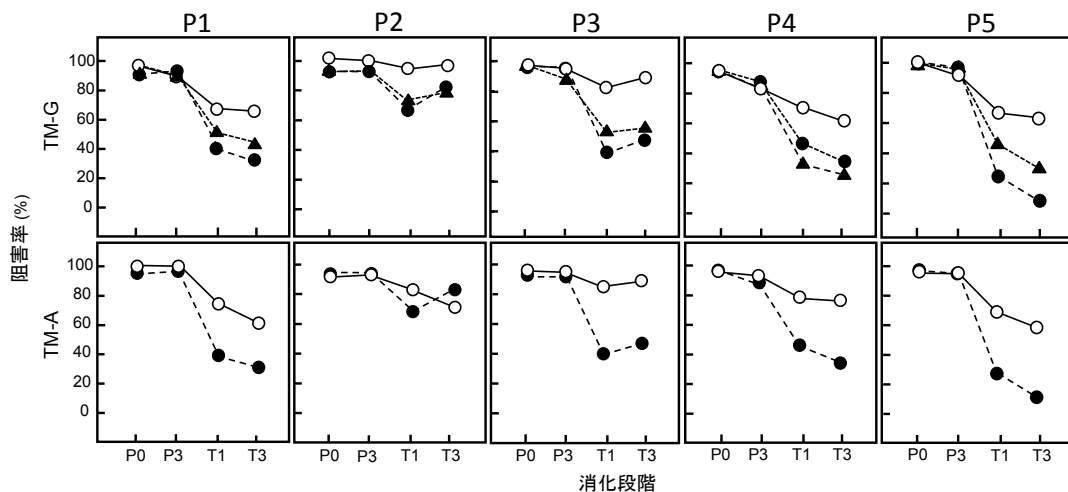


Fig. 3 ペプシン・トリプシン消化に伴うTMのIgE反応性の変化

一次抗体：カニアレルギー患者の血中IgE (P1~5の5名分)

固相抗原：TM-Nの未消化物

阻害抗原：上段 (●) TM-N、(▲) TM-G1、(○) TM-G24の消化物、 下段 (●) TM-N、(○) TM-A24

P0：未消化物、P3：ペプシン3時間消化物、T1：ペプシン後トリプシン1時間消化物

T3：ペプシン後トリプシン3時間消化物

段階では IgE 結合能は大きく変化しないが、消化に伴う IgE 結合能の低下はメイラード反応の進行に伴って抑制されることが明らかとなった。すなわち、メイラード反応したカニ TM は、喫食後の体内消化による IgE 結合能の低下を抑制されるため、結果としてアレルギー性が増強される可能性がある。

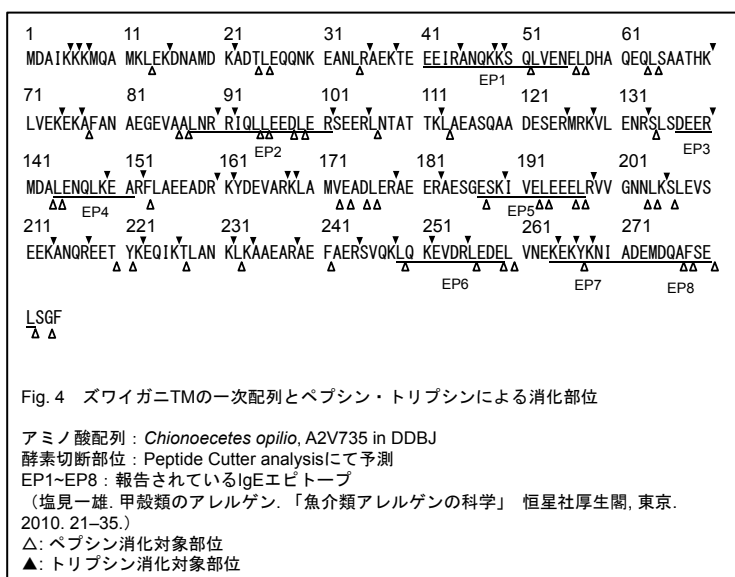
・考察

TM の IgE 結合能に及ぼすメイラード反応の影響に関する研究は、前述のように、軟体動物を対象とした報告があり、ホタテ TM はメイラード反応によりその IgE 結合能が増強される（文献 1）が、イカ TM では逆に減少することが報告されている（文献 4）。そしてその機序として、IgE 結合能の減少については「糖鎖の結合によって TM の高次構造が変化し、エピトープへの IgE 結合を阻害していた立体障害が減少した」、増強については「エピトープまたはその周辺部位に対する糖鎖の結合に伴って IgE 結合が阻害された」と推測されている。一方、本研究で確認された現象は上記の様に TM の IgE 結合能が変化したのではなく、メイラード反応の進行に伴う消化性の変化が主因であると推測した。

Fig. 2 に示した様に、カニ TM-N はペプシン消化後のトリプシン消化によって分子量 3,500 以下にまで分解された。その一方で、トリプシン消化後の IgE 結合能は低下したものの、消失はしなかった（Fig. 3）。この結果より、トリプシン消化物中にはエピトープを保持した分子量 3,500 以下のペプチドが含まれていると推測される。Fig. 4 にズワイガニ TM のアミノ酸配列とペプシンおよびトリプシンの切断部位を示す。図中の下線部は報告されているエピトープを示しているが、これによればエピトープ中には切断部位が複数存在している。しかし実際の消化では、エピトープが残存し、IgE 結合能が保持されていた。このようなエピトープの消化耐性は、鶏卵や魚卵などのアレルギーでも報告されているが（文献 7, 8）、本研究の結果は、メイラード

反応が TM エピトープ部位の消化耐性を向上させる可能性を示している。

メイラード反応はリジンやアルギニンの様に反応性の高いアミノ基と還元性カルボニル化合物（この場合は還元糖）との間で起こり易い。そして、Fig. 4 に示すようにトリプシンの切断部位の一つはリジンの N 末端側である。



それゆえ、メイラード反応を介してリジン残基に糖が結合し、その物理的障壁の形成がペプシンの接近を妨げた可能性がある。その結果として、トリプシン消化後も、エピトープを保持したペプチドが多く残存したと考えられる。さらに、単糖であるグルコースよりも、より大きな空間を占有する多糖である AOの方が、結合分子数が少ないにも関わらず、同等の効果を発揮した事実も、結合糖鎖によるエピトープと IgE 間の物理的阻害と言う仮説を支持する。TM の構造は種間で極めて相同性が高いので、この現象は甲殻類全般で起こると推測される。

以上の結果は、カニは刺身やボイルなどで喫食するよりも、乾燥品や煮熟エキスなど、メイラード反応を伴う調理加工品として喫食された際により強いアレルギー性を発揮することを示す。加えて、より抗原性の高い消化ペプチドを形成するという事は、健常者への感作能が向上することに繋がるため、本知見は患者の感作経路調査においても重要な知見である。

今後は、LC-MS 等を用いた消化ペプチド解析をすすめ、メイラード反応が消化性に与える影響と IgE 結合能変化の関連性に関する検証を進めていきたい。

・参考文献

- 1) Nakamura A, Watanabe K, Ojima T, Ahn DH, Saeki H. Effect of Maillard Reaction on Allergenicity of Scallop Tropomyosin. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53 (19), 7559–7564.
- 2) Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, 106(4), 763-768.
- 3) Nakamura S, Suzuki Y, Ishikawa E, Yakushi T, Jing H, Miyamoto T, Hashizume K. Reduction of in vitro allergenicity of buckwheat Fag e 1 through the Maillard-type glycosylation with polysaccharides. *Food Chem.*, 2008, 109 , 538–545.
- 4) Nakamura A, Sasaki F, Watanabe K, Ojima T, Ahn DH, Saeki H. Changes in allergenicity and digestibility of squid tropomyosin during the Maillard reaction with ribose. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54(25), 9529-9534.
- 5) Jimenez-Saiz R, Belloque J, Molina E, Lopez-Fandino R. Human Immunoglobulin E (IgE) Binding to Heated and Glycated Ovalbumin and Ovomucoid before and after in Vitro Digestion. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 10044-10051.
- 6) Sato R, Sawabe T, Kishimura H, Hayashi K, Saeki H. Preparation of neoglycoprotein from carp

myofibrillar protein and alginate oligosaccharide: improved solubility in low ionic strength medium. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48(1), 17-21.

- 7) Fujita S, Shimizu Y, Kishimura H, Watanabe K, Hara A, Saeki H. In vitro digestion of major allergen in salmon roe and its peptide portion with proteolytic resistance. *Food Chem.*, 2012, 130(3), 644-650.
- 8) Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Itoh S, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T, Kohno Y, Urisu A, Sawada J. Kinetic analysis of pepsin digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential of pepsin fragments. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2005, 136(1), 23-32.