

未利用資源を活用した卵の低アレルゲン化方法の 確立とメカニズムの検証

島根大学人間科学部人間科学科・教授 鶴永 陽子

■ 緒言

日本の消費者庁が2011年に実施した「即時型食物アレルギーに関する全国調査」によると、食物アレルギーの原因食物の1位は鶏卵で、その割合は39.0%であった。食物アレルギーの発症は0~1歳児が多くを占めているが、0歳児の57.6%、1歳児の39.1%は鶏卵によるものであり¹⁾、多くの人に影響を与えている。また、鶏卵の特徴として、料理への汎用性が高いことが挙げられる。経済的かつ完全栄養食といわれるほど栄養価が高く、便利な食材と言える。さらに、パン、菓子類、ハムなどの加工肉、マヨネーズなどの調味料などにも広く含まれている。現在、鶏卵アレルギーの治療法は、食事において一部または完全なアレルゲン除去が一般的だが、鶏卵を除去することは日常生活における大きな制限となってしまう。さらに、気づかずに暴露する可能性も高く、アナフィラキシー反応の発生にもつながりかねない。これまでに鶏卵アレルギー性の低減化に関する研究はいくつか行われている。主要な鶏卵アレルゲンは卵白中に含まれているオボムコイドとオボアルブミンであり、卵白たんぱく質の約11%、54%を占めている²⁾。オボアルブミンは加熱によりタンパク質が変性し、アレルゲン性が低下かつ分解されやすいことが明らかにされている³⁾。一方で、オボムコイドは熱安定性があり、アレルゲン活性が失われない⁴⁾。以上のように、鶏卵アレルギーは多くの人に、多大な影響を与えており、鶏卵のアレルゲン性の低減化は重要かつ喫緊な課題である。それに関する研究は行われているものの、現在、鶏卵アレルギーを避ける主な方法は除去食療法である⁵⁾。しかし、これは患者本人や家族等の周囲への負担が大きい。本研究では、鶏卵アレルギーの新たな低アレルゲン化の方法を開発することを目指した。我々は、以前から食品加工時に廃棄される栗の皮(chestnut inner skin, CIS)⁶⁾や、柿栽培時の摘果工程や規格外品として廃棄される柿の幼果(young persimmon fruit, YPF)⁷⁾、ヤマモモ葉(bayberry leaf, BBL)⁸⁾に関する研究を行ってきた。その中で、これらには多量の縮合型タンニンが含まれていることを確認している。タンニンはタンパク質との結合性が高く⁹⁾、抗酸化作用が高いことで知られている。これまでの研究において、我々はタンニンが有するタンパク質の結合作用を活用して、小麦にタンニンを添加することで、小麦加工品のアレルゲン性を低下できる技術を開発した(特願2022-129816)。また、CIS、YPF、BBLに含まれるタンニンの性質を利用して、卵白のアレルゲンタンパク質を低減化できることについても明らかにできた¹⁰⁾。さらに、タンニン素材の添加は、卵白ゲルの硬さを向上させる効果があることも報告した¹⁰⁾。本研究では、ELISAで明らかにできていなかった卵白タンパク質への影響を明らかにするためSDS-PAGEによる解析を行った。また、タンニンとタンパク質の結合を検証するためFT-IR(フーリエ変換赤外分光法)での解析も行った。さらに、我々はこれまでにタンニン添加が卵白ゲルを硬くすることを明らかにしているが¹⁰⁾、その微細構造に及ぼす影響についてSEM(走査電子顕微鏡)を用いて観察した。

■ 方法

1) 供試材料

卵は乾燥卵白Wタイプ(キューピータマゴ株式会社製、52870)を使用した。購入したものを100gずつに小分けにし、試料調製まで冷凍庫(-25℃)で保管した。タンニンエキス製造には、栗渋皮、渋柿幼果、ヤマモモ葉を用いた。これらの素材を凍結乾燥後に粉末にして熱水抽出し、タンニンエキスとした。熱水抽出の方法は、蒸留水300 mlに乾燥粉末45 gを添加し、オートクレーブ(株式会社トミー精工、LSX-300)で120℃・20分処理し抽出した。その後、遠心機(株式会社トミー精工、LCX-100)に3分かけ、上澄みをエキスとした。

2) 卵白ゲル製造方法

卵白粉末5.5 gを蒸留水94.5 gに混和、溶解後15分間静置し、卵白液をステンレスシャーレ(40×15 mm)に、気泡が入らないよう注意しながらピペットで15 gずつ分注した。次にスチームオーブンレンジ(パナソニック株式会社、NE-BS1600-K)に入れ、90℃・15分間の加熱処理後、余熱3分間でゲルさせた。これを冷蔵庫で1時間冷却して分析試料とした。この方法によって得られた卵白ゲルをControl区(タンニンエキス添加無し)とした。また、タンニンエキス添加区については、乾燥卵白粉末

に加える蒸留水 94.5 g のうち、10 g もしくは 50 g 分をタンニンエキスに置換した処理区を設定した。それぞれをタンニンエキス 10%、50%置換区とした。

3)電気泳動(SDS-PAGE)

タンニン-卵白タンパク質複合体の結合様式を調べるために、尿素の有無による 2 種類のサンプルバッファーを使用した。タンニンとタンパク質複合体は、水素結合と疎水結合によって結合することが報告されている¹¹⁾。そこで、水素結合を切断する効果のある尿素を添加した場合と、添加しない場合の違いを調べた。尿素を含まないサンプルバッファーはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-PAGE は、Laemmli(1970)¹²⁾の方法に若干の修正を加えて、どちらの場合も行った。尿素を含むサンプルバッファーの組成は、8M 尿素、60%グリセロール、3%SDS、50mM ジチオスレイトール、0.01%ブロモフェノールブルーを含む 60.6mM Tris-HCl(HCl) (pH6.8)で、タンパク質溶液の半分と混合し、20°Cで 24 時間放置した¹³⁾。尿素添加なしのサンプルバッファーは 2x Laemmli Sample Buffer(BIO RAD# 161-0737)に 2-メルカプトエタノールを加えて、これをタンパク質溶液に等量加え、95°Cで 5 分間加熱した。電気泳動は、分子量マーカー(アプロサイエンス株式会社、XL-lader broad)と 10-20% e-PAGEL(ATTO 株式会社)を用いて行った。ゲル染色には One-step Coomassie Brilliant Blue(CBB)(アプロサイエンス株式会社)を用いた。

4)フーリエ変換赤外分光法(FT-IR)

FT-IR 測定には、水分の影響を排除するために凍結乾燥した卵白ゲル粉末を利用した。FT-IR スペクトルは、A-Cary 630 FT-IR spectrometer(Agilent Technologies)を用い、波数範囲は 4000-400 cm^{-1} 、分解能精度は 2 cm^{-1} で記録した。試料のスペクトル測定には、水平減衰全反射装置(ATR)を使用した。

5)SEM

SEM 顕微鏡を用いて、卵白ゲルの表面の構造を観察した。試料は、卵白ゲルを立方体(5×5×5 mm)に切断し、2.5% (v/v)グルタルアルデヒド水溶液(0.1 M、pH7.2 のリン酸緩衝液で調製)で 24 時間固定した。その後、リン酸緩衝液で 3 回洗浄し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、試料を SEM 用試料台(日新 EM 株式会社、Type-HM)に両面カーボンテープ(日新 EM 株式会社、8 mm×20 m)で固定した。蒸着を行い、SEM(日本電子株式会社、JSM-IT800SHL)で加速電圧 10kV、倍率 600 倍で観察した。

■ 結果

1)電気泳動

卵白タンパク質とタンニンの相互作用を評価するために、還元 SDS-PAGE 分析を行った。卵白溶液はオボトランスフェリン(OVT)、オボアルブミン(OVA)、オボムコイド(OVM)、リゾチーム(LYZ)、および分子量 80~250 kDa の凝集体のバンドを示した(Figure1AB)。タンニン抽出物の有無にかかわらず、卵白タンパク質のバンドパターンに明らかな違いは観察されなかった。また、8M 尿素有無による違いも観察されなかった。

卵白ゲルのバンドパターンは、タンニン抽出物の濃度と種類によって変化した(Figure2AB)。OVT のバンド強度は、タンニンエキス 10%置換区の卵白ゲルでは、Control 区よりもはるかに低かった。50%置換区の卵白ゲルでは、OVT のバンドはほとんど観察されなかった(Figure2AB)。OVA、OVM、LYZ のバンド強度は、CIS50%置換区および BBL50%置換区では、Control 区、または YPF50%置換区よりも低下した。尿素添加(Figure2A)と尿素なし(Figure2B)では、OVA で若干の違いが見られた。尿素添加では CIS50%置換区と BBL50%置換区において単量体のバンドが見られたが(Figure2A)、尿素無しではそのバンドは著しく薄くなっていた(Figure2B)。

2)SEM

卵白ゲルの外観を Figure3 に、SEM による微細構造を Figure4 に示した。Control 区では、約 20~40 μm の緻密で規則的な網目構造が観察され、薄い膜で区切られていた(Figure4)。10%置換区と Control 区を比較すると、CIS では Control 区よりも網目構造が大きく、大きさも様々であったが、YPF と BBL では Control 区と同様の網目構造が観察された。一方、50%置換区は、Control 区や 10%置換区と比較して顕著な違いが見られた。ネットワークを形成する膜状部分は、CIS、YPF、BBL とともに 50%置換区の方が、Control 区や 10%置換区よりも厚かった。

■ 考察

1)電気泳動

本実験の SDS-PAGE の条件では、非共有結合とジスルフィド結合のほとんどがサンプルバッファーに含まれる試薬によって切断される。つまり、バンドの減衰は、ジスルフィド結合以外の別の共有結

合を介した凝集に起因すると考えられる^{13,14}。タンパク質とタンニン間に共有結合が形成されることを報告した研究もある^{15,16}。一般的に、この反応は、アルカリまたはポリフェノールオキシダーゼ処理によってタンニンのフェノール性水酸基がキノンに変換され、次いでタンパク質のアミノ酸残基に付加されることによって起こる¹⁵。Pizzi(2021)¹⁶によれば、タンニンとタンパク質加水分解物は中性溶液中で80°C、60分間加熱することにより共有結合する。FT-IRの解析により、フェノールがキノン-フェノラート構造へ転移する際に観察されるスペクトル¹⁷と非常に類似したデータが得られていることから(データ省略)、タンニンと卵白タンパク質の結合が、共有結合に起因している可能性があると推察できる。特に、BBLはOVAを含むほとんどの卵白タンパク質を効果的に凝集させる架橋剤の役割を果たした(Figure2AB)。サンプルバッファの8M尿素添加(Figure2A)と尿素なし(Figure2B)では、OVAで若干の違いが見られた。これは、尿素によってタンニンと卵白タンパク質との水素結合が切断したと考えられた。

2)SEM

SEM観察より、添加するタンニン抽出物によって卵白ゲルの微細構造が異なることが示された。また密な微細構造を持つゲルは硬くなるため、本実験においても卵白ゲルの微細構造の緻密さがゲル硬度に影響を与えた可能性が考えられた。

■ 要 約

我々は、これまでに栗の渋皮や、柿栽培時の摘果工程や規格外品として廃棄される柿の幼果、剪定時に廃棄されるヤマモモ葉から得られるエキスが、卵白アレルギーであるOVA含量を低減することを明らかにしてきた。本研究では、SDS-PAGEにより、タンニン抽出物が、OVAやその他の卵白タンパク質に及ぼす影響を検討した。タンニンエキス50%置換区ではOVTバンドは観察されなかった。さらに、OVA、OVM、LYZのバンド強度は、CIS50%置換区およびBBL50%置換区で特に低いことを明らかにした。また、タンニンエキスを添加すると卵白ゲルが硬くなることもこれまでに明らかにしていたが、SEMを用いて微細構造を観察し、その要因を考察した。

■ 文 献

- 1) Ebisawa M., Ito K., Fujisawa T., and Allergology J.S.o.(2017). Japanese guidelines for food allergy. *Allergology International*, 66, 248-264.
- 2) Mine Y. and Yang M.(2008). Recent advances in the understanding of egg allergens: basic, industrial, and clinical perspectives. *J Agr Food Chem*, 56, 4874-4900.
- 3) Golias J., Schwarzer M., Wallner M., Kverka M., Kozakova H., Srutkova D., Klimesova K., Sotkovsky P., Palova-Jelinkova L., and Ferreira F.(2012). Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *PLoS one*, 7, e37156.
- 4) Gu J., Matsuda T., and Nakamura R.(1986). Antigenicity of ovomucoid remaining in boiled shell eggs. *Journal of Food Science*, 51, 1448-1450.
- 5) Burks A.W., Tang M., Sicherer S., Muraro A., Eigenmann P.A., Ebisawa M., Fiocchi A., Chiang W., Beyer K., and Wood R.(2012). ICON : food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129, 906-920.
- 6) Tsurunaga Y. and Takahashi T.(2021). Evaluation of the antioxidant activity, deodorizing effect, and antibacterial activity of 'Porotan'chestnut by-products and establishment of a compound paper. *Foods*, 10, 1141.
- 7) Tsurunaga Y., Takahashi T., Kanou M., Onda M., and Ishigaki M.(2022). Removal of astringency from persimmon paste via polysaccharide treatment. *Heliyon*, 8, e10716.
- 8) 鶴永陽子, 松崎一, 松本敏一, 富川康之, 板村裕之.(2006). 製造工程がヤマモモ葉茶のアスコルビン酸含量, ポリフェノール含量およびラジカル捕捉活性に与える影響. *日本食品保蔵科学会誌*, 32, 221-227.
- 9) Tsurunaga Y. and Onda M.(2022). Effects of soy milk and condensed milk on astringency removal, astringency recurrence, appearance, and syneresis in persimmon paste. *Acta Horticulturae*, 365-374.
- 10) 鶴永陽子.(2023). 新しい手法を用いた卵の低アレルギー化方法の開発. *2022年度旗影会研究報告概要集*, 87-941.
- 11) Simon.C., Barathieu, K., Laguerre, M., Schmitter, J. M., Fouquet, E., Pianet, ., Dufourc, E. J.,(2003). Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin – saliva protein complexes. A

- multitechnique approach. *Biochemistry*, 42, 10385-10395.
- 12) Laemmli U.K.(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
 - 13) Koyama S., Kodama D., Tsujii Y., and Handa A.(2023). Soluble-protein-aggregate-assisted improvements in heat-induced gel prop-erties : Effect of genipin-mediated crosslinks on egg white protein. *LWT*, 184, 115079.
 - 14) Koyama S., Oka D., Tsujii Y., Takano K., Handa A.(2020). Effects of lanthionine and lysinoalanine on heat-induced gelation of egg white. *Food Sci. Technol. Res*, 26, 789-795.
 - 15) Le Bourvellec C., Renard C.M.(2012). Interactions between polyphenols and macromolecules : Quantification methods and mechanisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 52, 213-248.
 - 16) Pizzi A.(2021). Covalent and Ionic Bonding between Tannin and Collagen in Leather making and shrinking : A MALDI-ToF study. *J. Renew. Mater*, 9, 1345-1364.
 - 17) Machida K., Lee H., and Uno T.(1979). Resonance Raman spectra of sulfophthalein dyes in aqueous solutions. *J Raman Spectrosc*, 8, 172-176.

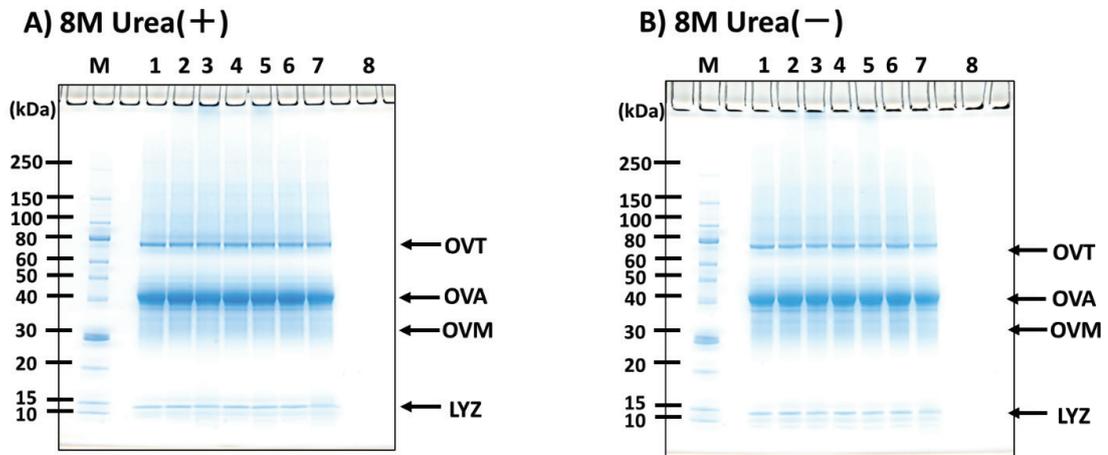


Figure 1. SDS-PAGE patterns of tannin-treated egg white solution proteins. M, Molecular mass standards. 1, control ; 2, 10% CIS ; 3, 50% CIS ; 4, 10% YPF ; 5, 50% YPF ; 6, 10% BBL ; 7, 50% BBL. EW, egg white ; EWS, egg white solution ; EWG ; egg white gel ; CIS, chestnut inner skin ; YPF, young persimmon fruit ; BBL, bayberry leaf. OVT, ovotransferrin ; OVA, Ovalbumin ; OVM, ovomucoid ; LYZ, lysozyme

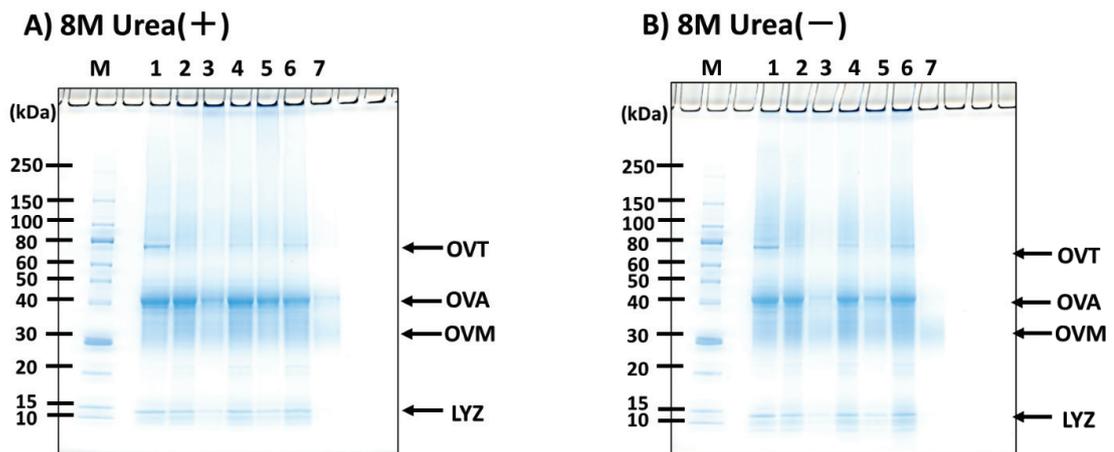
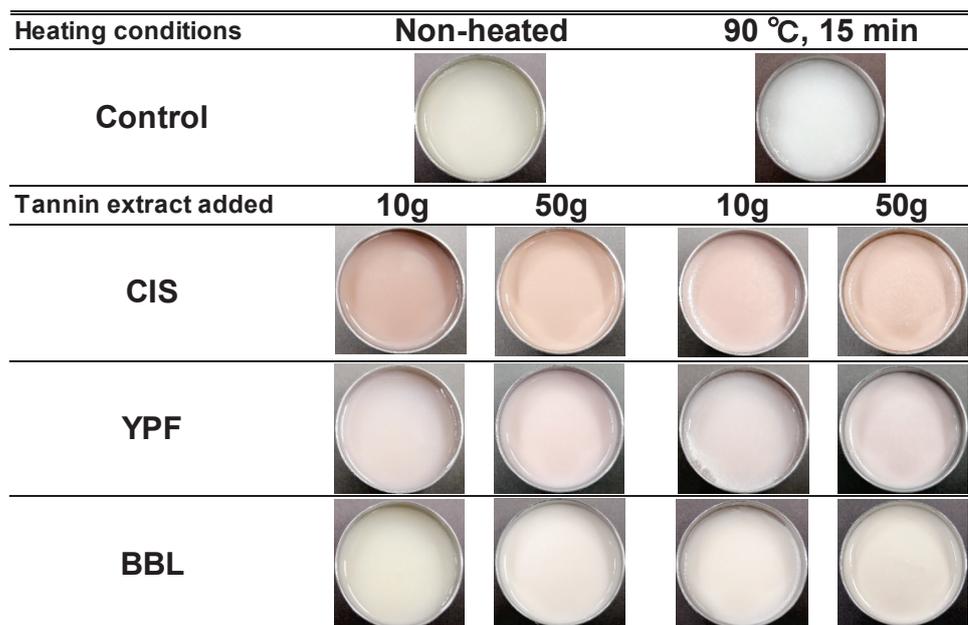


Figure 2. SDS-PAGE patterns of tannin-treated egg white gels proteins. M, Molecular mass standards. 1, control ; 2, 10% CIS ; 3, 50% CIS ; 4, 10% YPF ; 5, 50% YPF ; 6, 10% BBL ; 7, 50% BBL. EW, egg white ; EWS, egg white solution ; EWG ; egg white gel ; CIS, chestnut inner skin ; YPF, young persimmon fruit ; BBL, bayberry leaf. OVT, ovotransferrin ; OVA, Ovalbumin ; OVM, ovomucoid ; LYZ, lysozyme



gel; CIS, chestnut inner skin; YPF, young persimmon fruit; BBL, bayberry leaf.

Figure 3. Images of tannin-treated EWS and EWG. EWS, egg white solution ; EWG, egg white gel ; CIS, chestnut inner skin ; YPF, young persimmon fruit ; BBL, bayberry leaf.

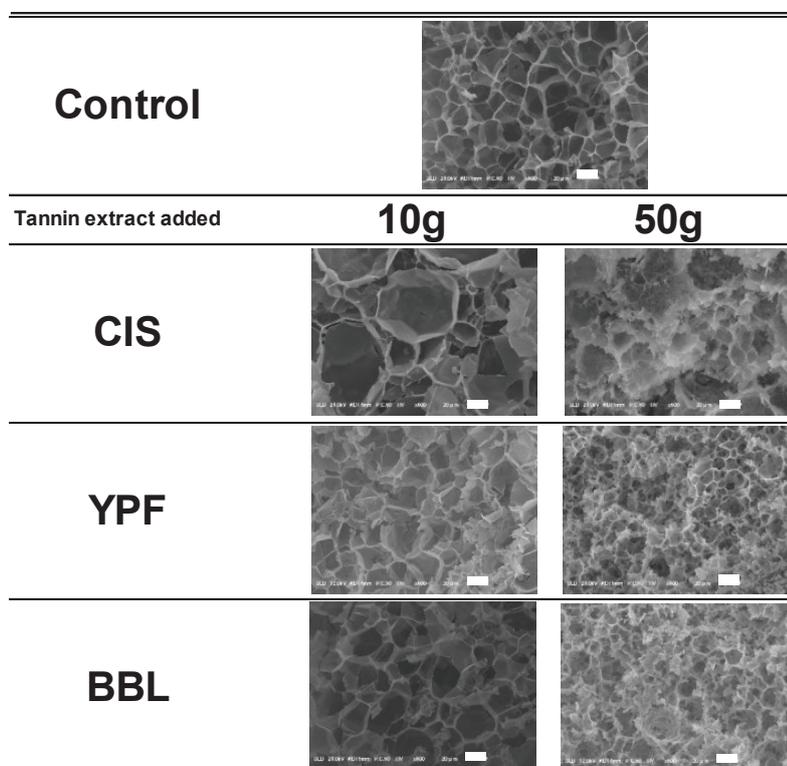


Figure 4. SEM image of tannin-treated EWG. SEM, scanning electron microscopy. EWG ; egg white gel ; CIS, chestnut inner skin ; YPF, young persimmon fruit ; BBL, bayberry leaf.