

〈原著〉

## 食用ペポカボチャ種子たんぱく質のペプシン消化性

法 村 美 幸 (藤女子大学 人間生活学部 食物栄養学科)

吉 田 訓 子 (藤女子大学 人間生活学部 食物栄養学科<sup>†</sup>)

江 原 清 (地方独立行政法人 北海道立総合研究機構 農業研究本部上川農業試験場)

嘉 見 大 助 (国立研究開発法人 農研機構 北海道農業研究センター)

知 地 英 征 (札幌幌アンチエイジングラボラトリー・藤女子大学名誉教授)

中河原 俊 治 (藤女子大学 人間生活学部 食物栄養学科)

<sup>†</sup>現酪農学園大学

近年、ナッツ用のペポカボチャ品種 (ストライプペポ *Cucurbita pepo* L. cultivar 'Stripe pepo') が開発され、道産食材として製菓用等加工食品への利用が期待されている。しかしながらナッツ類には食物アレルギーを有するものが多く、そこで、ストライプペポ種子の食物アレルギー誘発性に関する情報を得るために種子たんぱく質のペプシン消化性を検討した。ストライプペポ種子より抽出した粗たんぱく質画分についてブタ胃粘膜由来ペプシンを用いた人工胃液で消化試験を行い、電気泳動法によりたんぱく質を確認した。その結果、ストライプペポ種子たんぱく質は人工胃液によりほぼ消化されたが、市販カボチャ種子たんぱく質、および落花生や大豆たんぱく質では消化されないたんぱく質が残存した。すなわちストライプペポ種子たんぱく質は、他のナッツ類と比較してペプシン消化性が高いことが分かった。このことからストライプペポ種子たんぱく質が食物アレルギーとなるリスクは比較的低いことが示唆された。

キーワード：種子たんぱく質、ペポカボチャ、食物アレルギー、人工胃液消化試験

### 1. はじめに

南北アメリカ大陸原産の緑黄色野菜であるウリ科カボチャ属 (*Cucurbita*) 植物は、セイヨウカボチャ (*C. maxima* Duch.)、ニホンカボチャ (*C. moschata* Duch.)、ペポカボチャ (*C. pepo* L.) 等に大別される。ペポカボチャはドングリカボチャやキンシウリ、ズッキーニを含み、観賞用、飼料用、食用などさまざまな種類がある。ペポカボチャの種子はヨーロッパにおいて古くから食用として利用され、また乏尿、残尿感、頻尿等の排尿障害や前立腺肥大に効果がある<sup>1)</sup>ことが知られており、予防や治療に用いられてきた。

近年、国立研究開発法人農研機構北海道農業研究センターにおいて食用ペポカボチャ種子用新品種である 'ストライプペポ' が開発され<sup>2)</sup>、その栽培が北海道和寒町を中心に広がっており、また、その生体調節機能が注目されている。

しかしながら食品表示法において食物アレルギーに関し重篤度、症例数の多いことにより落花生が特定原材料として指定されており、あるいはそれに準ずるものとして大豆が記載されている<sup>3)</sup>ことから、種子を食用とする場合、食物アレルギー誘発性について調べることが重要である。

大豆の食物アレルギーについてはよく研究されており、その主たる原因物質は大豆たんぱく質である。IgE 抗体と結合する頻度が高い大豆たんぱく質として Gly m Bd 30 K (質量 30 kDa)、 $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha$ -サブユニットである Gly m Bd 60 K (60 kDa)、Gly m Bd 28 K (28 kDa) の三種が主要アレルギーとされ、これらはすべて 7S グロブリンである<sup>4,5)</sup>。また、落花生の主要アレルギーは Peanut 1 (質量 20~30 kDa、pI 5.25~5.75)、Con A-reactive Glycoprotein (65 kDa、pI 4.6)、Ara h 1 (63.5 kDa、pI 4.55)、Ara h 2 (17 kDa、pI 5.2) とされている<sup>5)</sup>。

しかしながら、食物アレルギーを同定するアプローチは、一般に食物アレルギー患者の血清を用いた免疫反応試験や患者本人による経口負荷試験など臨床的試験による方法が行われており、食物に対する直接的な同定方法は確立されていない。このため感作される機会が少ない、すなわちアレルギー患者の少ない新規食物のアレルギーリスクを予見することは容易ではないと考えられる。そこで、我々は「遺伝子組み換え食品における安全性評価基準<sup>3)</sup>」に示されているアレルギー誘発性に関する検討項目の応用を試みた。

本研究では、ストライプペポの栄養機能性のうち、食物アレルギー誘発性に関する情報を得ることを目的とし、ストライプペポ種子と市販カボチャ種子、落花生、および大豆を試料として、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により各々のたんぱく質のプロファイルを明らかにした。また、アレルギーになるリスクの大きい 7S 画分を大豆と比較した。そして「遺伝子組換え食品 (種子植物) の安全性評価基準」を参考に人工胃液としてペプシン処理による種子たんぱく質の消化性を SDS-PAGE を用いて解析し、ストライプペポ種子たんぱく質の食物アレルギー誘発性について調べた。

## 2. 材料と方法

### (1) 材料

ストライプペポ、落花生 (*Arachis hypogaea* L. ‘ナカテユタカ’)、大豆 (*Glycine max* Merrill ‘ツルムスメ’) はそれぞれ栽培条件を同じにするため北海道農業研究センターの同じ土壌にて栽培し、収穫後、30℃で3~6日間風乾したものをを用いた。カボチャ種子は市販品 (中国産) をを用いた。対照として七面鳥たんぱく質とほうれん草たんぱく質 (Greer Laboratories, Lenoir, NC, USA) を使用した<sup>6)</sup>。

### (2) 粗たんぱく質抽出<sup>5)</sup>

粗たんぱく質の抽出は森田の方法<sup>7)</sup>を用いた。種子を粗く粉碎した後、*n*-ヘキサンを加えて16時間、25℃で脱脂した。抽出残渣を真空乾燥機 (EYELA FD-5N、東京理化工機、東京) で7.5時間乾燥し脱脂粉末を得た。

脱脂粉末をさらに細かく粉碎し、30 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)-HCl 緩衝液 (pH 8.0)、10 mM 2-mercaptoethanol を加えて1時間室温で粗たんぱく質抽出を行った。抽出液を遠心分離 (15,600×*g*、20℃、20分、Himac CR-20 F、日立工機、東京) した。上清の一部を脱塩した (4℃、20時間)。

得られた粗たんぱく質抽出液を凍結乾燥し、粗たんぱく質乾燥試料とした。試料は使用まで-80℃で保存した。

### (3) 7S 画分および 11S 画分の分画

7S 画分および 11S 画分の分画は森田の方法<sup>7)</sup>を用いた。脱脂種子を粉碎後、その20倍量の抽出緩衝液 (30 mM Tris-HCl、10 mM dithiothreitol、pH 8.0) を加え、室温 (20~22℃) で1時間抽出した。これを15,600×*g*、20℃、20分間遠心分離し、上清を粗たんぱく質画分とした。この粗たんぱく質画分を2M HCl で pH6.4 に調整し、15,600×*g*、4℃、20分間遠心分離し、その沈殿を粗 11S 画分とした。さらにその上清を2M HCl で pH 4.8 に調整し、15,600×*g*、4℃、20分間遠心分離して、その沈殿を粗 7S 画分とした。

### (4) たんぱく質定量

たんぱく質は Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) により Bradford 法で定量した。吸光度は紫外可視分光光度計 (UV-1800、島津製作所、京都) を用いて 595 nm で測定し、検量線は BSA (Sigma) で作成した。

### (5) 人工胃液消化試験

人工胃液消化試験は Takagi らの方法<sup>4)</sup>、および Astwood らの方法<sup>8)</sup> にしたがって行った。人工胃液 (simulated gastric fluid, SGF) は、0.2% NaCl 溶液を塩酸で pH 2 に調整し、オートクレーブ (121℃、15分) した後、ブタ胃粘膜由来 Pepsin (421 U/mg、Sigma) を 320 U/ml になるように溶解し調製した。試料たんぱく質溶液はたんぱく質濃度が 10 mg/ml となるように粗たんぱく質乾燥試料を 0.2% NaCl 溶液に溶解した。

37℃で2分間予熱した SGF 1,520 μL に、200 μL のたんぱく質溶液を加えて反応を開始し、0.5、2、5、10、20、30、60分後に200 μL の反応液を採取し、140 μL の 200 mM 炭酸ナトリウムを含む Leamli 緩衝液 (40% Glycerol、5% 2-mercaptoethanol、10% sodium dodesylsulfate (SDS)、0.33 M Tris、0.05% Bromophenol blue) に加えて反応を停止させた。その後100℃で3分間加熱し、SDS-PAGE に供した<sup>7)</sup>。

一方、加熱変性した試料たんぱく質についても調べた。粗たんぱく質溶液を100℃、20分で加熱処理し、10分間の SGF 消化試験および SDS-PAGE に供した。

### (6) 電気泳動解析

SGF 試験で得られた反応液を SDS-ポリアクリルア

Table 1 ストライプペポとカボチャ種子の栄養成分

可食部 100 g 当り

	エネルギー	水分	たんぱく質	脂質	炭水化物	灰分
	kcal			g		
ストライプペポ*	567	5.5	25.2	50.9	13.1	5.3
かぼちゃ、いり、味付け**	574	4.5	26.5	51.8	12.0	5.2

\* 財) 日本食品分析センターの分析 \*\* 日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂)

Table 2 試料中のたんぱく質量  
乾燥試料 1 g 中のたんぱく質量 (g)

ストライプペポ種子	0.16
市販カボチャ種子	0.14
落花生	0.20
大豆	0.32

ミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で解析を行った。10% アクリルアミドゲルを作製 (Bio-Rad プレキャストゲルキット) し、泳動バッファーとして Tris-Tricine 緩衝液 (pH 8.3)、または Tris-glycine 緩衝液 (pH 8.3) を使用した。マーカーには Bionexus Nexus Pointer Mid Range MultiColor Prestained Protein Marker を使用した。

二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2D-PAGE) は次のように行った。長さ 10 cm ガラス管に等電点電気泳動用ゲルを作成し、十分に重合させた。泳動槽にセットし、上層に 20 mM 炭酸ナトリウム溶液を入れ、下層に 10 mM リン酸溶液を入れて、ゲル 1 本あたり 0.25 mA、40 分間でプレ電気泳動を行った。300 V で 210 分間等電点電気泳動を行った。次に 10% アクリルアミドゲルを作製し (Bio Rad プレキャストゲルキット)、泳動バッファーに Tris-glycine buffer を使用して二次元目の電気泳動を行った。たんぱく質の検出は銀染色法<sup>9)</sup>で行った。

### 3. 結果

#### (1) 粗たんぱく質のたんぱく質量

ストライプペポ種子の栄養成分について日本食品分析センターに分析を依頼して調べたところ、日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂) 記載のカボチャ種子と比較してたんぱく質、脂質がやや少なく、炭水化物がやや多かった (Table 1)。

ストライプペポ種子より粗たんぱく質を抽出して、そのたんぱく質量を Bradford 法にて測定したところ、0.16 g/gDW であった (Table 2)。この結果をもとに、0.2% NaCl 溶液に溶解する、各種子の粗たんぱく質量

を決定した。

#### (2) ストライプペポ種子と大豆の 11S および 7S 画分量

ストライプペポ種子と大豆の 11S および 7S 画分を抽出し、Bradford 法によりたんぱく質量を測定した。11S 画分はストライプペポ種子 57 mg/g DW、大豆 107 mg/g DW、7S 画分はストライプペポ種子 4 mg/g DW、大豆 74 mg/g DW であった。大豆の主なアレルゲンが含まれる 7S 画分の量はストライプペポ種子では大豆の 10 分の 1 以下であった。

#### (3) 七面鳥たんぱく質とほうれん草たんぱく質の SGF 消化試験

七面鳥たんぱく質とほうれん草たんぱく質はペプシン消化性が高く、対照として用いた。各々について SGF 消化試験を行い、SDS-PAGE によって解析した (Fig. 1)。七面鳥やほうれん草たんぱく質はそれぞれ多数検出された (lane 0 min) が、ペプシン処理 2 分後までに分解が始まり、たんぱく質を示すバンドの発色が低下してきた。そして高分子画分は 60 分以内にほとんど消失した。35 kDa 付近ではほぼ一定に観察されるバンドはブタ胃粘膜由来ペプシン (分子量約 34,600) を示す。Bowman らによれば、七面鳥たんぱく質とほうれん草たんぱく質は 15 分で完全に消化し、アレルゲンにはならないと結論づけている<sup>6)</sup> が、本実験では 60 分後には大部分のたんぱく質は消失したものの七面鳥たんぱく質では 25~30 kDa 付近 (Fig. 1a)、ほうれん草たんぱく質では 20~25 kDa 付近 (Fig. 1b) にバンドが残り、完全に消化したとは言えなかった。この差異は Bowman らがたんぱく質の検出を CBB 染色法で行っているのに対し、本実験ではより感度の高い銀染色法で行ったため、より微量でも検出されたものと考えられた。

#### (4) ストライプペポ種子、市販カボチャ種子、落花生、および大豆のたんぱく質の SGF 消化試験

ストライプペポ種子、カボチャ種子、落花生、および大豆より粗たんぱく質を抽出し、SGF 消化試験に供

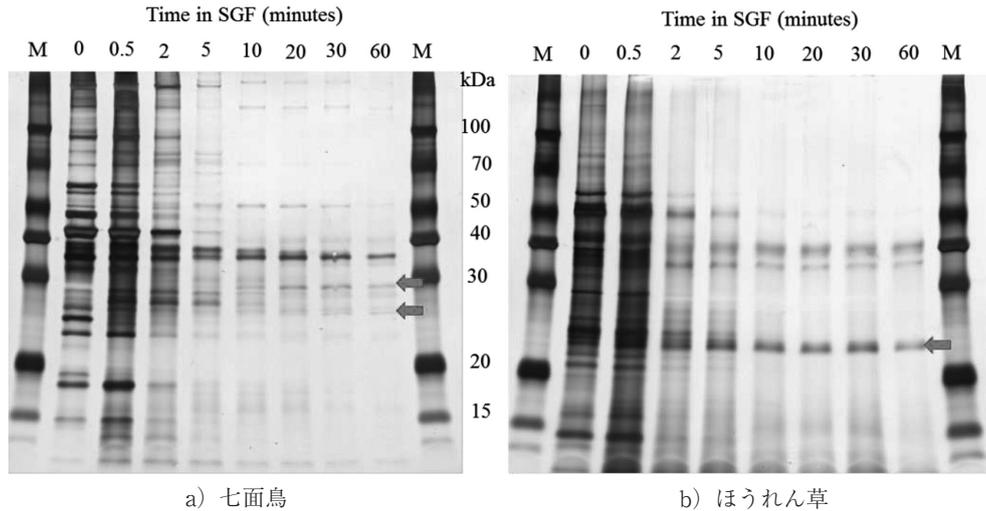


Fig. 1 人工胃液 (SGF) 消化試験を行った七面鳥とほうれん草のたんぱく質の SDS-PAGE 解析  
M: 分子量マーカー

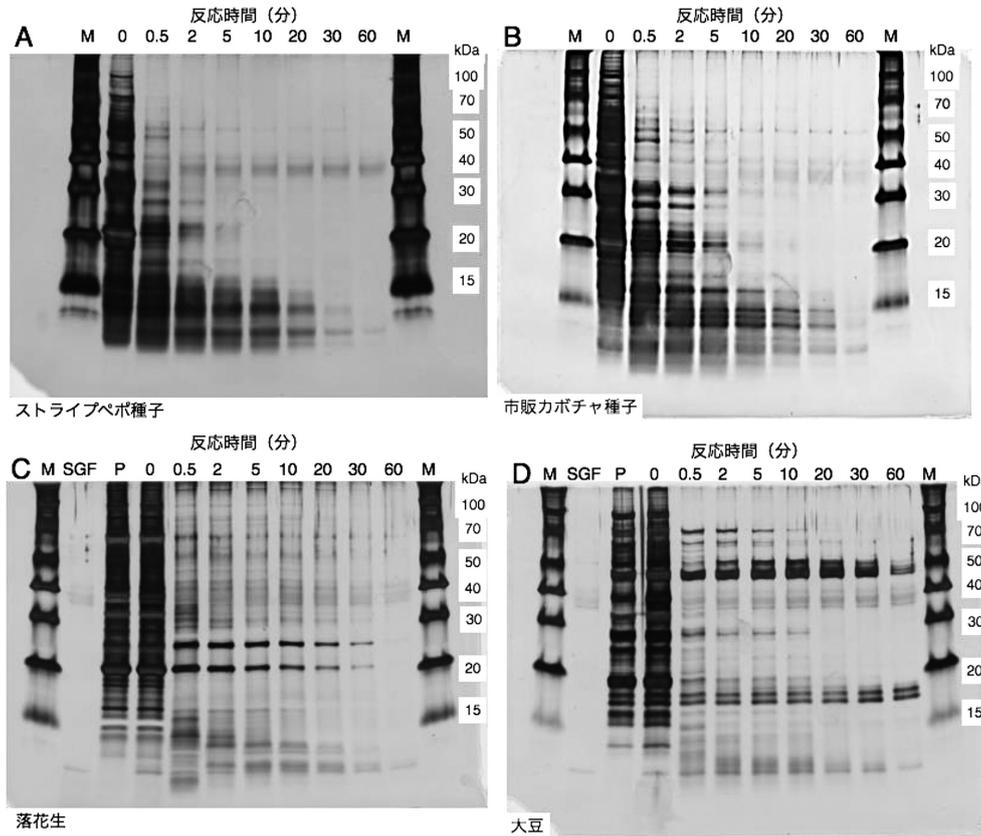


Fig. 2 人工胃液による種子たんぱく質の消化試験  
A: ストライプペボ種子、B: 市販カボチャ種子、C: 落花生、D: 大豆  
M: 分子量マーカー、SGF: 人工胃液、P: SGF を含まないたんぱく質抽出液

した。処理時間ごとに消化液を採取し、反応を停止させた後、電気泳動分析を行った (Fig. 2)。0 分のレーンは消化の始まる前であり、それぞれの種子たんぱく質の特徴を表している。ストライプペボ種子たんぱく

質では市販カボチャ種子たんぱく質に対して 50 kDa 以上のバンドが少ないことと、18 kDa 付近の濃いバンドが見られないことが大きな差異である。35 kDa 付近ではほぼ一定に観察されるバンドは消化反応に用い

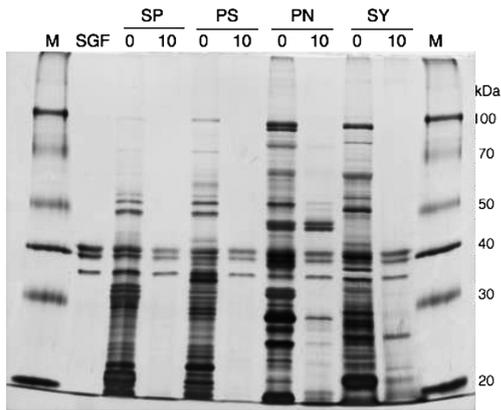


Fig. 3 人工胃液による種子たんぱく質の消化試験 (10 分間反応)

SP: ストライプペポ種子、PS: 市販カボチャ種子、PN: 落花生、SY: 大豆、M: 分子量マーカー、SGF: 人工胃液  
0: 消化前 10: 10分間消化後

たブタ胃粘膜由来ペプシンである。ストライプペポ種子たんぱく質の消化性をみるとペプシン未反応(0分)では 100 kDa を越える大きなたんぱく質も認められるが、反応開始後 5~10 分には高分子量たんぱく質はほぼ消失し、15 kDa 以下のたんぱく質も 30 分後にはほとんど消化されることが分かった。市販カボチャ種子では、10 分後に 16、20、35 kDa 付近にバンドが残り、30 分後でも低分子量たんぱく質の残存が認められた。一方、落花生たんぱく質試料では 30 分以降 20、および 25 kDa にバンドが観察され、大豆たんぱく質試料においては 30 分以降 17.5、18、48 kDa 付近の複数のはっきりしたバンドが観察された。

各たんぱく質試料について SGF 消化試験 0 分と 10 分後の反応液を、改めて同時に電気泳動を行って消化様式の違いを比較した (Fig. 3)。その結果、ストライプペポ種子タンパク質はペプシンによって比較的容易

に消化されることが明らかとなった。

(5) ストライプペポ種子たんぱく質 (非加熱) SGF 消化試験の 2D-PAGE 解析

ストライプペポ種子たんぱく質のペプシン消化性が高いことが示されたが、これをより詳細に検討するため二次元電気泳動を行った。Figure 4 A はペプシン消化開始前のストライプペポ種子たんぱく質のプロファイルを示している。30 kDa、pI5.3~5.7 付近のたんぱく質はブタ胃粘膜由来ペプシンであるものと考えられる。10 分後の泳動像 (Fig. 4 B) に示した矢印は、0 分の画像と比較して、たんぱく質のスポットが薄くなり、または消失が見られた箇所である。また、15 kDa 付近、pI 6.5 付近の円で囲んだスポットは、0 分の画像では見られなかったものであり、消化と共に分子量が小さくなって現れたと考えられる。30 分後には、大部分のスポットが消失した (Fig. 4 C)。

(6) 加熱処理たんぱく質の SGF 消化試験

カボチャ種子には一般にトリプシンインヒビターが存在するため、これを失活させるために加工時に加熱する必要がある。そこでストライプペポと市販カボチャ種子たんぱく質溶液を 100℃、20 分で加熱した後、SGF 消化試験を 30 分間行った (Fig. 5~7)。加熱したストライプペポ種子では、30 kDa 以下の低分子にスポットが多く見られ、pI は 4 から 7 まで広く分布していた (Fig. 5 A)。市販のカボチャ種子では 30 kDa から 60 kDa 付近のやや高分子にスポットが多く見られた (Fig. 5 B)。Figure 5 A はストライプペポ種子の市販カボチャ種子では観察されなかったたんぱく質 (矢印) が存在していることを示しており、Fig. 5 B は市販のカボチャ種子にストライプペポ種子では観察されなかったたんぱく質 (矢印) が存在することを示

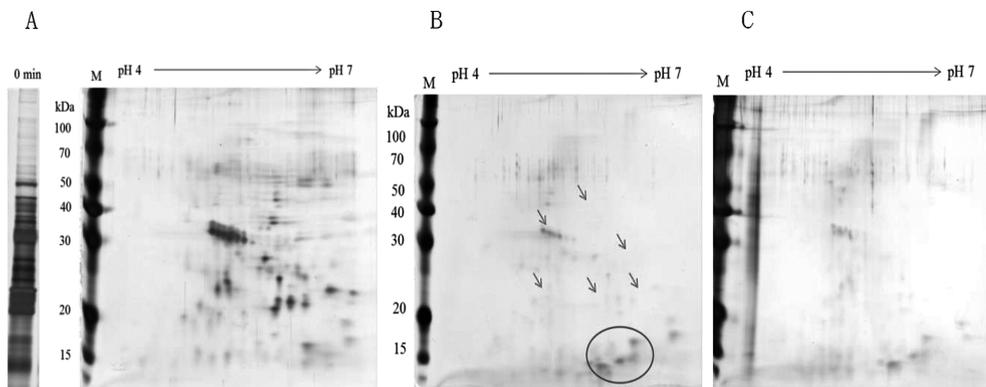


Fig. 4 人工胃液消化試験を行った、ストライプペポ種子たんぱく質 (非加熱) の 2D-PAGE 解析  
A: 消化開始前、B: 10 分間消化後、C: 30 分間消化後

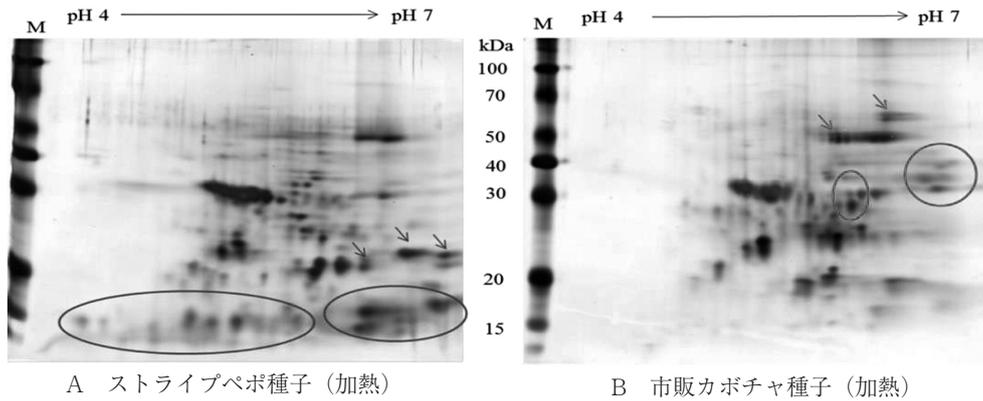


Fig. 5 加熱試料の人工胃液消化試験（反応開始前）

A：ストライプペポ種子たんぱく質、B：市販カボチャ種子たんぱく質（加熱）の2D-PAGE解析（0分後）

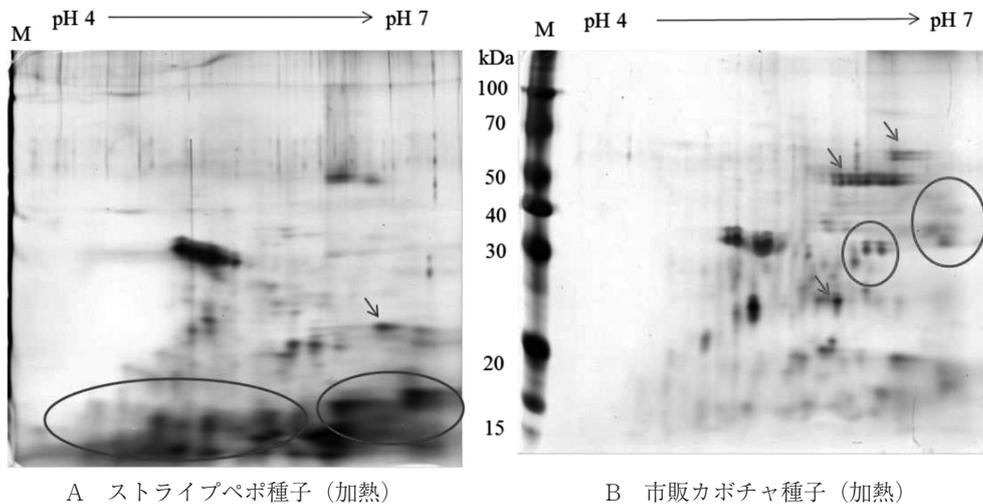


Fig. 6 加熱試料の人工胃液消化試験（反応10分後）

A：ストライプペポ種子たんぱく質、B：市販カボチャ種子たんぱく質

している。10分後の比較では、ストライプペポ種子ではスポットの消失が見られ、分解されたたんぱく質が、より低分子側の15 kDa付近にシフトしていく様子が見られた (Fig. 6 A)。しかしながら市販カボチャ種子では、30 kDaより大きいたんぱく質が多く残存している (Fig. 6 B)。30分後の比較では、ストライプペポ種子では、特徴的なスポットが残っているが、他のスポットは薄くなり、または消失した (Fig. 7 A)。市販のカボチャ種子においてストライプペポ種子には観察されなかったが残存したスポットを矢印で示した (Fig. 7 B)。これらのことからストライプペポ種子たんぱく質は市販カボチャ種子たんぱく質と比較し、ペプシンによる消化を受けやすいことが明らかとなった。

#### 4. 考察

日本食品標準成分表2015年版(七訂)によると種実類のたんぱく質量は乾燥種子100gあたり落花生(乾、大粒種)25.4g、大豆(国産、黄大豆、乾)33.8g、かぼちゃ(いり、味付け)26.5gである。また、一般財団法人日本食品分析センターの分析結果によるとストライプペポ種子たんぱく質量は乾燥種子100gあたり25.2gであった。今回のたんぱく質抽出による収量は乾燥種子1gあたりで比較すると落花生0.20g、大豆0.32g、市販カボチャ種子0.14g、そしてストライプペポ種子0.16gであった (Table 2)。日本食品標準成分表2015年版(七訂)および日本食品分析センターの分析結果よりもたんぱく質量は少ない値となったが、これは十分に抽出されなかったか、あるいは成分表および日本食品分析センターの分析方法がケルダール法で行われており、その分析方法の違いによるもの

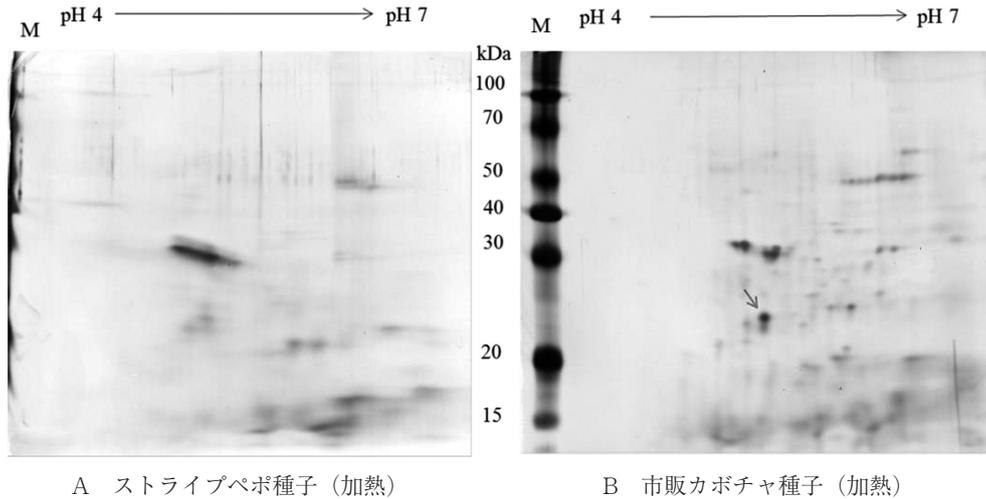


Fig. 7 加熱試料の人工胃液消化試験（反応 30 分後）  
A：ストライプペポ種子たんぱく質、B：市販カボチャ種子

と考えられた。

また、7S および 11S 画分を定量した結果、ストライプペポ種子たんぱく質には大豆よりも 7S 画分が少ないことが示唆された。しかし、このことがアレルギー誘発性の低さに直結するとは言えないだろう。大豆以外の種子たんぱく質は 11S 画分と 7S 画分のバンドの位置に明確な違いは見られず、確実に分離できていたとは言い切れない。本研究における 11S と 7S たんぱく質の分画方法は大豆に適用された方法にしたがったものであるため、沈殿する等電点が異なるであろうから、より精密な分画方法を確立することが必要である。

ペポカボチャ種子による食物アレルギーに関する最初の報告は比較的新しく 1997 年に Fritsch らによって示された<sup>10)</sup>。すなわち釣り餌原料として用いられたペポカボチャ種子粉末の吸入によってかゆみやぜんそく症状などのアレルギー反応が発症したという症例に関する報告であり、他の症例も数例報告されている<sup>11,12)</sup>。

本研究では食品安全委員会の「遺伝子組み換え食品の安全性評価基準」を参考にストライプペポ種子たんぱく質のアレルギー誘発性を調べるため、人工胃液によるペプシン処理を行った。「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」は、2004 年に遺伝子組換え食品及び食品添加物の安全性評価を行う内閣府食品安全委員会において遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性を評価するために必要とされる原則等が国内外のガイドラインなどを基本に評価基準としてまとめられたものである。この評価基準には、1. 遺伝子産物（たんぱく質）が一日たんぱく質摂取量の有意な量を

占めるか否かに関する事項、2. 遺伝子産物（たんぱく質）のアレルギー誘発性に関する事項、3. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項、4. 遺伝子産物（たんぱく質）の代謝経路への影響に関する事項、5. 宿主との差異に関する事項、6. 諸外国における認可、食用等に関する事項、7. 栽培方法に関する事項、8. 種子の精製法及び管理方法に関する事項等がある。このうちの 2. 遺伝子産物（たんぱく質）のアレルギー誘発性に関する事項には、(1)挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見が明らかにされていること、(2)遺伝子産物（たんぱく質）についてそのアレルギー誘発性に関する知見が明らかにされていること、(3)遺伝子産物（たんぱく質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項、(4)遺伝子産物（たんぱく質）と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項、(5)遺伝子産物（たんぱく質）の IgE 結合能の検討が示されている。ここで(3)の遺伝子産物（たんぱく質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項には (i) 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理、(ii) 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理、(iii) 加熱処理；加熱条件は人が経口摂取する際に処理される場合と同等の条件によって、遺伝子産物（たんぱく質）の分子量、酵素活性、免疫反応性等が変化するかどうか明らかにされていることと記述されており、また分子量は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって示されていること、免疫反応性は処理前の遺伝子産物（たんぱく質）に対するポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロット法及び ELISA 法あるいはこれらと同等の方法によって示されていることとされている。この

ようにアレルギー誘発性を確認するためには多くの実験的根拠を示す必要があるが、本研究ではその中のひとつを適用した。

各種子の非加熱サンプルの消化性の変化を経時的にみると、ストライプペポ種子たんぱく質は特定原材料、またはそれに準ずるものに指定される落花生、および大豆のたんぱく質よりも速やかにバンドが消失することから人工胃液によって消化されやすいと考えられる (Fig. 2)。さらに、アレルゲンになりにくい食物とされている七面鳥、ほうれん草のたんぱく質についても調べたが、30分以上のペプシン処理でも消化されず残存するバンド (Fig. 1) が確認されたけれども、ストライプペポ種子たんぱく質ではほぼ完全に消失し (Fig. 2)、人工胃液による消化性が高いことが明らかとなった。このことによりペポカボチャ種子たんぱく質は七面鳥やほうれん草などアレルゲンになりにくいとされる食物よりもさらに消化されやすく、アレルギー誘発リスクが低いことが示唆された。また、人工胃液消化への耐性を持つたんぱく質のうち、落花生で残存したたんぱく質は Ara h2 (17 kDa)、あるいは大豆で残存したたんぱく質は Gly m Bd 30 K (30 kDa)、Gly m Bd 28 K (28 kDa) と命名されるアレルゲンであると推測され、さらに大豆で残存した 68~70 kDa、および 33~35 kDa のたんぱく質 (Fig. 2) もアレルゲンになりうるのではないかと推測できる。このことから、人工胃液消化への耐性を持つたんぱく質の存在は食物アレルギー誘発性と強く関与すると考えられる。

ペプシンによる消化性とアレルゲン性に関する研究は今までに数多くなされており、Astwood らはペプシンの消化に対する安定性は非アレルゲンから食物アレルゲンを見分ける際の重大で有効なパラメータであるとしている<sup>8)</sup>。Bowman らはマウスにおいて、経口経路を経由する食物のペプシンに対する易消化性と IgE 抗体が産生されにくいことの間には相関関係があるとしている<sup>6)</sup>。ここではアレルギー誘発頻度の少ない食品としてほうれん草と七面鳥の肉を使用している。ほうれん草の主要なたんぱく質は試験管内の消化において、30秒で完全に分解される消化されやすいたんぱく質であり、経口経路でマウスに投与した場合ごく少量の IgE 抗体やいくつかの抗体を産生する程度であった。また、七面鳥肉でも 15分の消化後にはたんぱく質の断片は全く観察されず、IgE 抗体の産生は起こらなかった。それに対してピーナッツ、ブラジルナッツ、卵白はすべて同条件のペプシン処理の後に安定で未分解のたんぱく質、またはその断片を有し、それらのマウスにおける経口感作によって IgE 抗体の産生が起こった<sup>6)</sup>。生体内で産生された IgE 抗体はマスト細胞

に結合する。そして再び抗原と接触したとき、抗原がマスト細胞表面の IgE 抗体と結合した刺激によりマスト細胞からヒスタミンなどの化学伝達物質を放出されてアレルギー症状を引き起こす。つまり、IgE 抗体の産生されやすいことは再び抗原と接触した際のアレルギー誘発性と関連するといえる。

一方、100℃、20分間で加熱したたんぱく質は変性した状態で体内に摂取されることになる。非加熱、および 100℃、20分間加熱後の各種子たんぱく質の試料を用い、電気泳動、および人工胃液条件を完全に同じにして人工胃液消化試験を行ったところ、ストライプペポ種子たんぱく質の消化性は加熱による変化が認められなかった (Fig. 6、7)。しかしながら市販カボチャ種子では非加熱たんぱく質とは異なる位置にバンドが確認された (Fig. 6、7)。ストライプペポ種子と市販カボチャ種子の2種類のカボチャ種子たんぱく質間で比較すると、非加熱たんぱく質では10分間の消化後にどちらもバンドが消えた (Fig. 3) ことに対し、100℃、20分間の加熱をすると市販カボチャ種子のみ、10分間の消化後にバンドが残存した (Fig. 6)。30分のペプシン処理でも残存が認められ (Fig. 7)、市販カボチャ種子には加熱によって人工胃液消化に対する耐性を持つように変性するたんぱく質の存在が示唆された。これに対しストライプペポ種子たんぱく質は加熱変性後も非加熱の場合と同様に消化性が高いままであり、市販カボチャ種子たんぱく質よりも消化されやすいことが明らかとなった。すなわちカボチャ種子たんぱく質では市販カボチャ種子よりもストライプペポ種子たんぱく質の方がアレルギー誘発リスクが低いと考えられた。

食品素材としてカボチャ種子が使用される際にはトリプシンインヒビターが存在するため加熱加工されるものがほとんどである。したがって加熱による胃液消化耐性たんぱく質が出現しにくいストライプペポ種子はその活用が期待される。

しかしながら、今回の結果からペポカボチャ種子たんぱく質がアレルゲンにならないとは断言することはできない。ストライプペポ種子のアレルギー患者が出現する可能性や感受性の高い患者で交差反応が起こる可能性は大いにある。したがって今後さらに「遺伝子組換え食品の安全性評価基準」に示されている人工腸液による消化試験、アレルゲン食物とのアミノ酸配列相同性や ELISA 法および Western blot 法による免疫反応性、動物モデルによる安全性評価試験などによってストライプペポ種子たんぱく質のアレルギー誘発リスクの低さを実証していく必要があると考えられた。

本研究は北海道道立総合研究機構 H 24～26 年度重点研究課題「道北地域における食用かぼちゃ種子の安定生産体制の確立」の一環として行われたものである。

#### 引用文献

- 1) Widy-Tyszkiewicz, E.: Assessment report on *Cucurbita pepo* L., semen. EMA/HMPC/136022, 2012
- 2) Kami, D., Ito, K., Sugiyama, K., Muro, T. Morishita, M. and Noguchi, Y.: A new pumpkin cultivar 'Stripe pepo' with hull-less seed and short internodes. *Acta Hort.* 1127. 415-420, 2016
- 3) 食品表示基準, 平成二十七年内閣府令第 10 号, 2015
- 4) Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H. and Sawada, J.: Comparative Study of *in Vitro* Digestibility of Food Proteins and Effect of Preheating on the Digestion. *Biol. Pharm. Bull.*, 26(7), 969-973, 2003
- 5) 中村晋, 飯倉洋治: 最新食物アレルギー, 永井書店, 大阪, pp235-239, 2002
- 6) Bowman, C. C. and Selgrade, M. K.: Differences in Allergenic Potential of Food Extracts following Oral Exposure in Mice Reflect Differences in Digestibility: Potential Approaches to Safety Assessment. *Toxicological Sciences*, 102 (1), 100-109, 2008
- 7) 森田雄平: 大豆蛋白質, 光琳, 東京, pp16-18, 2006
- 8) Astwood, J. D., Leach, J. N. and Fuchs, R. L.: Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology* 14, 1269-1273, 1996
- 9) 岡田雅人・宮崎香: 改訂タンパク質実験ノート下, 羊土社, pp15-24, pp36-47, 2011
- 10) Fritsch R., Ebner H., Kraft D. and Ebner C.: Food allergy to pumpkinseed- characterization of allergens, *ALLERGY*, 52, 335-337, 1997
- 11) Figueredo, E., Cuesta-Herranz, J., Minguez, A., Vidarte, L., Pastor, C., de las Heras, M., Vivanco F. and Lahoz L: Allergy to pumpkin and cross-reactivity to other Cucurbitaceae fruits. *J. Allergy Clin. Immunol*, 106(2), 402-403, 2000
- 12) Miralles, J. C., Negro, J. M., Sánchez-Gascón, F., García, M. and Pascual, A.: Occupational rhinitis/asthma to courgette. *Allergy*, 55: 407-408, 2000

## The *in vitro* pepsin digestibility of the seed proteins in a summer squash (*Cucurbita pepo* L.) cultivar ‘Stripe pepo’

Miyuki NORIMURA

(Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Human Life Sciences, Fuji Women's University)

Kuniko YOSHIDA

(Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Human Life Sciences, Fuji Women's University †)

Kiyoshi EHARA

(HRO Kamikawa Agricultural Experiment Station)

Daisuke KAMI

(NARO Hokkaido Agricultural Research Center)

Hideyuki CHIJI

(Sapporo Anti-Aging Laboratory Co., Ltd./Emeritus Professor of Fuji Women's University)

Shunji NAKAGAWARA

(Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Human Life Sciences, Fuji Women's University)

† Present affiliation: Rakuno Gakuen University

A new pumpkin cultivar ‘Stripe pepo’ (*Cucurbita pepo* L.) with hull-less seeds was recently produced by the NARO Hokkaido Agricultural Research Center for use in sweets and snacks. The crop has been spread especially as a distinctive food material made in Wassamu town, Hokkaido, Japan. However, nuts, including pumpkin seeds, are often deemed a major source of food allergy on a par with peanuts and soybeans. Therefore, it is essential to ascertain that proteins of the ‘Stripe pepo’ seed would break down with digestive enzymes to avoid such food allergy. Crude protein fractions extracted from ‘Stripe pepo’ seeds were examined *in vitro* for their digestibility with simulated gastric fluid (SGF) including a porcine stomach mucosa pepsin and were compared with the crude protein fractions of commercial pumpkin seeds, peanuts and soybeans, respectively. Crude proteins from ‘Stripe pepo’ seeds were almost fully digested by the SGF treatment within 30-60 min as shown by SDS-PAGE analysis, whereas some proteins from other seeds remained intact without breaking down through the SGF treatment. These results suggest that the risks of ‘Stripe pepo’ seed proteins are relatively low, as compared with peanuts and soybeans, and that ‘Stripe pepo’ seeds that are heat-treated to deactivate trypsin-inhibitors contained in the seeds can be ingested safely.

**Key words:** seed proteins, summer squash, food allergens, simulated gastric fluid test