

研究課題名 (研究項目名)	アレルギー誘発性を有する植物に由来するタンパク質の網羅的消化性評価（課題番号：JPCAFSC20232304）
主任研究者	研究者名：児玉 浩明 所属機関：国立大学法人 千葉大学

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

令和5年度～令和6年度（2年間）

2 研究目的

遺伝子組換え食品の安全性評価は義務化されており、特に新規組換えタンパク質 (Newly expressed proteins: NEPs) のアレルギー誘発性のリスク評価は重要である。評価の一環として、現在の評価指針では組換えタンパク質の人工胃腸液処理試験(消化性テスト)が課されている。この試験項目は、代表的なアレルゲンであるピーナッツの Ara h 1 などが消化抵抗性を示すことから、腸管免疫機構への暴露量を考える上でのリスク評価として扱われている。しかし、非アレルゲンタンパク質でも消化抵抗性を示す例があること、ナッツ由来アレルゲンとは異なり、果実由来アレルゲンでは消化抵抗性が低い例があることから、組換えタンパク質のアレルギー誘発性のハザードを決定する試験ではないと考えられ、国際的に消化性テストの妥当性・必要性について議論されている。その議論の中では、組換えタンパク質のアレルギー誘発性の評価ではアレルゲンデータベースを用いた相同性検索が有効であり、同検索で安全性が確保できない場合に消化性テストを課することが提案されている。一方で、アレルギー誘発性を有する作物のアレルゲンタンパク質、非アレルゲンタンパク質の消化抵抗性を網羅的に調べた例はなく、加えて、植物の主要アレルゲンタンパク質の消化抵抗性を相互に比較した例もない。本研究では、アレルギー誘発性を有する主要作物4種(ピーナッツ、ダイズ、コムギ、キウイ)の可食部からタンパク質を抽出し、質量分析を中心とした方法により、ペプシン、トリプシン等の消化酵素への抵抗性を網羅的に調べ、可食部に含まれる主要タンパク質の消化抵抗性を数値化することを目標とした。この数値化したデータをまとめたリファレンスデータは、アレルギー誘発性を有する作物のアレルゲンタンパク質の特性のより深い理解につながる。本研究で構築するリファレンスデータを基に、消化性テストの評価項目の妥当性、および遺伝子組換え食品で発現する新規組換えタンパク質のリスク評価における消化性テストの位置づけについての提案を行うことを目的とする。加えて、消化性テストには、遺伝子組換え作物から精製された組換えタンパク質を用いることが求められるが、精製には多くの労力がかかることから異種発現系を用いて調製された組換えタンパク質が用いられることが多い。本研究では、異種発現系を用いて調製された組換えタンパク質と植物材料から精製されたタンパク質の消化について解析を行い、異種発現系を用いて調製された組換えタンパク質を消化性テストに用いる場合の特徴や注意すべき点についても考察する。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
アレルギー誘発性を有する植物に由来するタンパク質の網羅的消化性評価	評価方法の確立	児玉 浩明（千葉大学）
		宮原 平（千葉大学）
	作物ごとの消化性比較	西内 巧（金沢大学）
		宮原 平（千葉大学）
	アレルギータンパク質の消化抵抗性の種間比較	児玉 浩明（千葉大学）
		宮原 平（千葉大学）
		西内 巧（金沢大学）

4 倫理面への配慮について

本研究に含まれるすべての組換え DNA 実験については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 16 年 2 月 19 日施行)およびこの法に基づく政省令および告示、および千葉大学における遺伝子組換え生物安全管理規程に則り、当該学内規程による学内委員会の了承を得て研究を実施する。また、研究に用いる材料は植物であり倫理上の配慮すべき問題はない。

II 研究内容及び成果等

1 研究項目：アレルギー誘発性を有する植物に由来するタンパク質の網羅的消化性評価

(1) 個別課題：評価方法の確立 (児玉 浩明、宮原 平 (千葉大学))

【研究内容】

ペプシン・トリプシンを用いた消化試験と質量分析による消化断片の定量化方法を確立する。

【研究方法】

(1-1) 組換えタンパク質の消化における特性評価

ピーナッツアレルゲンタンパク質である Ara h 1・Ara h 2 について、ピーナッツから精製して得られた天然由来タンパク質 (Natural Ara h 1 (nAra h 1)、Natural Ara h 2 (nAra h 2)) と大腸菌および酵母を用いた異種発現タンパク質の精製物 (Recombinant Ara h 1 (rAra h 1)、Recombinant Ara h 2 (rAra h 2)) の消化性の違いについて、ペプシン処理 (5 分間または 60 分間)、トリプシン処理 (60 分間または 120 分間) による部分分解物を電気泳動 (SDS-PAGE) で確認し、さらに分解によって生じるペプチド断片を LC-MS/MS 解析によって確認した。ペプシン処理については、市販されているペプシンにより比活性が 2 倍近く異なるものがあるため、2 種類のペプシン (S-pepsin (低比活性ペプシン、Sigma 社製)、P-pepsin (高比活性ペプシン、Promega 社製)) を使用して消化状況を確認した。また、消化処理を行ったタンパク質溶液を 3 kDa のサイズ排除を行う限外ろ過膜に供し、3 kDa 以下のペプチドを分離した。3 kDa 以下のペプチドは個別課題 (2) の LC-MS/MS 解析に供した。

(1-2) 消化性抵抗性の数値化のための条件設定 (ピーナッツ、コムギ、ダイズ)

タンパク質ごとの消化抵抗性の数値化 (消化抵抗性スコア) に向けた消化方法の検討を行った。スコアの算出には、消化促進条件と通常消化条件で生じたペプチド数を比較する。ピーナッツ、コムギ、ダイズの粗抽出タンパク質について、タンパク質変性剤のウレアおよび塩酸グアニジンまた還元剤 (ジチオトレイトール: DTT) の影響によるペプシンおよびトリプシンの消化性の違いについて確認した。変性したタンパク質の消化反応時に変性剤の影響がないようにするため、消化テスト時には、未変性タンパク質、変性タンパク質の両方の反応溶液の組成が同等となるように考えた。そのために、変性処理後に G-25 脱塩カラムを通すこととした。消化処理を行なったタンパク質溶液は SDS-PAGE に供することで、タンパク質消化状態を確認した。消化処理を行なったタンパク質溶液を 3 kDa のサイズ排除を行う限外ろ過膜に供し、3 kDa 以下のペプチドを分離した。3 kDa 以下のペプチドは個別課題 (2) の LC-MS/MS 解析に供した。

(1-3) 消化性抵抗性の数値化のための条件設定 (キウイ)

グリーンキウイ果肉からの粗抽出タンパク質についてもペプシン消化、トリプシン消化について検討した。キウイタンパク質の消化試験では、上記 (1-2) の方法の塩酸グアニジンによる変性処理および G-25 脱塩カラムの使用が難しいことが判明したため、ペプシン消化では 2 M ウレア存在下、トリプシン消化では 6 M ウレア存在下で消化試験を実施した。さらに、トリプシンインヒビター様タンパク質の存在が考えられたことから、トリプシンを追加で添加することとした。消化抵抗性の数値化では、ペプシンおよびトリプシンともにウレア非存在下で 1 時間の消化処理を行なったものを通常消化条件とした。消化処理を行なったタンパク質溶液を 3 kDa のサイズ排除を行う限外ろ過膜に供し、3 kDa 以下のペプチドを分離した。3 kDa 以下のペプチドは個別課題 (2) の LC-MS/MS 解析に供した。キウイタンパク質はペプシン消化では非常に分解されやすいが、ペプチドは検出可能だったため、上記の方法で消化性を評価することが可能となった。

【研究成果】

(1-1) 組換えタンパク質の消化における特性評価

遺伝子組換え食品における新規発現タンパク質 (Newly expressed proteins: NEPs) の人工胃腸液試験では、多くの場合、大腸菌等で発現、精製した recombinant protein を用いることが多い。nAra h 1 および rAra h 1 のペプシン消化性の違いについて、比活性が低い S-pepsin により消化時間 5 分間と 60 分間の結果を比較した。SDS-PAGE の結果では、nAra h 1 と rAra h 1 でタンパク質の部分分解物は同じ分子量を示すものが多く消化状況に明確な違いは確認されなかった (図 1A)。また、S-pepsin よりも比活性の高い P-pepsin (図 2) を使用して同様に消化状況を確認したところ、S-pepsin よりも消化性が改善し、nAra h 1 と rAra h 1 とともに SDS-PAGE 上では部分断片が検出されず完全に消化された (図 3)。トリプシン消化では rAra h 1 において nAra h 1 にはみられない 18 kDa 程度のペプチド断片が確認された (図 4A)。

Ara h 2 についても同様に消化性を検討した。まず、rAra h 2 には nAra h 2 には存在しない 13.5 kDa 程度のペプチドがはじめから存在しており、ペプチド A と呼称した (図 5)。比活性の高い P-pepsin による消化では、ペプチド A 以外の完全長 Ara h 2 タンパク質の断片化は rAra h 2 と nAra h 2 に違いは確認されなかった。P-pepsin と Ara h 2 タンパク質の比率を変化させても同様であることが確認された (図 5A~C)。また、ペプチド A は還元剤 DTT によりジスルフィド結合を解離させることでペプシン消化が可能であることが確認された (図 5D)。トリプシン消化では、完全長の rAra h 2 と nAra h 2 タンパク質からトリプシン消化によってペプチド A と同様な 13.5 kDa の断片が生じることが確認された (図 6)。

(1-2) 消化性抵抗性の数値化のための条件設定 (ピーナッツ、コムギ、ダイズ)

消化抵抗性スコア導入に向け、ピーナッツ・コムギ・ダイズの粗抽出タンパク質についてペプシン消化とトリプシン消化を行った。消化抵抗性の数値化では変性剤処理による消化促進条件と通常消化条件におけるタンパク質の消化状況を比較するため、変性剤 (ウレアまたは塩酸グアニジン) と還元剤 (DTT) による消化への影響を調査した。コムギの粗抽出タンパク質を使用して消化促進条件を検討したところ、5 M 塩酸グアニジンと 10 mM DTT により 50°C、60 分間変性処理を行ったのちに、G-25脱塩カラムにより変性剤と還元剤の除去、その後、ペプシンを 60 分間することで十分に消化が促進されることが示された (図7)。同様にトリプシン消化においても 5 M 塩酸グアニジンと 10 mM DTT による変性処理が消化促進に有効であることが確認された (図8)。変性剤は消化酵素の活性を抑制するため、G-25脱塩カラムにより十分に除去できているかどうか、確認した。変性剤を含む緩衝液をG-25脱塩カラムに通し、溶出液に消化酵素を添加してペプシン、パンクレアチンの酵素活性を測定したところ、変性剤を含まない緩衝液での酵素活性と、変性剤を除去した緩衝液での酵素活性は同等である一方、変性剤を含む緩衝液中では消化酵素の活性が低下した (図9)。この消化促進条件はダイズとピーナッツにおいても有効であることが確認された (図10, 11)。これにより、ピーナッツ、コムギ、ダイズにおけるタンパク質の消化抵抗性スコアの導入方法が確立された (図12)。詳細は、個別課題 (2) に示した。

(1-3) 消化性抵抗性の数値化のための条件設定 (キウイ)

グリーンキウイの粗抽出タンパク質についての消化性の調査では、ペプシン消化 5 分間で SDS-PAGE 上ではほとんど何も検出されなくなることが示された (図13)。一方で、トリプシン消化については

、60分間の消化処理でも複数のペプチド断片が検出されることがわかった。消化促進条件では、5 M 塩酸グアニジンによる消化促進がうまく働かなかったため、6 M ウレアの存在下で消化することとした。また、キウイ粗抽出タンパク質にはトリプシンインヒビター様タンパク質の存在が考えられたため、トリプシン量を(1-2)で使用している量の10倍使用することとした(図14)。グリーンキウイの粗抽出タンパク質はペプシンで容易に分解されることが示され、SDS-PAGE でバンドが検出されないものの、消化処理後のタンパク質溶液を LC-MS/MS 解析にかけるとペプチド断片を検出できることがわかった。このため、消化抵抗性の数値化についてはペプシンの消化についてもトリプシンでの消化条件と同様に1時間の消化処理および消化促進条件では 2 M ウレア存在下にて1時間の消化処理を行なった。

(2) 個別課題：作物ごとの消化性比較(西内 巧(金沢大学)、宮原 平(千葉大学))

【研究内容】

(1) 個別課題で検討した評価方法について、消化後のペプチド断片をサンプルとして LC-MS/MS 解析により消化により生じるペプチドを検出することで、組換えタンパク質の消化状態をモニターするとともに、消化性テストの評価方法を確立した。

【研究方法】

(2-1) 組換えタンパク質の消化における特性評価

天然由来のタンパク質と組換えタンパク質の消化性の違いを検討するため、(1-1)で実施した Ara h 1 と Ara h 2 を用いて、消化処理を行なった 3 kDa 以下の低分子量タンパク質について LC-MS/MS 解析を実施した。検出されたペプチド断片は、Ara h 1 (Uniprot accession: P43237)、Ara h 2 (Q6PSU2) の配列データにマッピングすることで、どの部位のペプチド断片が検出されているか調査した。検出されたペプチドを配列の上にはりつけ、N 末端の 1 アミノ酸上流のアミノ酸を消化酵素による切断部位として標的タンパク質のアミノ酸配列の下に示した(図 15)。

(2-2) 消化性抵抗性の数値化のための条件設定

粗抽出タンパク質の消化処理サンプルは、タンパク質データベース Uniprot に登録されているピーナッツ (*Arachis hypogaea*), コムギ (*Triticum aestivum*), ダイズ (*Glycine max*), キウイ (*Actinidia deliciosa*) のタンパク質データを使用した。消化抵抗性スコアは下記の方法で数値化した。①変性剤および還元剤未添加時における粗抽出タンパク質についてペプシン消化を行い、3 kDa 以下のタンパク質をショットガンプロテオーム解析により検出。②5 M 塩酸グアニジンと 10 mM DTT によって変性したタンパク質について ①と同条件でのペプシン消化でのペプチド断片をショットガンプロテオーム解析により検出。③ 上記 ①を通常の消化状態 A、上記 ②を十分に消化された状態 B として、「 $100 - (A/B \times 100)$ 」とすることで、消化抵抗性スコアを算出する。トリプシン消化においても同様な方法でスコアを算出する。④得られたペプシン、トリプシンに対する消化抵抗性スコアを用いて、タンパク質間で比較する。消化抵抗性スコアに応じ、タンパク質を以下の 4 つのグループに分類することができる(図 12)。

(消化抵抗性レベル 1) 超易消化性：通常消化では消化断片ペプチドが検出される。消化促進時は、消化がより進み、LC-MS/MS で検出可能なペプチド以下にまで断片化が進むことで、消化断片ペプチドが検出されなくなるタンパク質。

(消化抵抗性レベル 2) 易消化性：通常消化では消化断片ペプチドが検出される。消化促進時は、消化がより進み、LC-MS/MS で検出可能なペプチド以下にまで断片化が進むことで、検出断片ペプチ

ド数が減少するタンパク質。

(消化抵抗性レベル 3) 難消化性：通常消化でも消化断片ペプチドが検出される。消化促進時は、消化がより進み、検出される断片ペプチド数が増加するタンパク質。

(消化抵抗性レベル 4) 超難消化性：通常消化時には、断片ペプチドが検出されないが、消化促進時のみ消化断片ペプチドが検出されるタンパク質。

【研究成果】

(2-1) 組換えタンパク質の消化における特性評価

Ara h 1 の低比活性ペプシン (S-pepsin) による消化性では、nAra h 1 と rAra h 1 に共通して R79-E151、P172-Q201、N441-Y495/A497 の 3 つの領域に対応するペプチド断片が検出されないことが示された。

(図 1BC)。一方で、ペプシン消化後にパンクレアチンにより連続消化した場合には R79-E151、P172-Q201 の 2 つの領域にはペプチド断片が検出されることが示された (図 1D)。したがって、この 2 つの領域は、S-pepsin に対して消化抵抗性があると考えられる。次に高比活性ペプシン (P-pepsin) についても同様に試験したところ、SDS-PAGE 分析からは完全に分解されたことが示されたが、その条件下でも M445-A497 の領域に相当するペプチド断片が検出されなかった。これらの結果より、R79-E151 および P172-Q201 の領域はペプシンに対して消化抵抗性があると考えられた。N441-Y495/A497 の領域は分子量 6 kDa 程度であるが、SDS-PAGE の結果からは該当するバンドが得られていないことから (図 3A)、N441-Y495/A497 の領域は S-pepsin および P-pepsin に対して非常に分解されやすい構造であると考えられた。nAra h 1 と rAra h 1 の消化性の違いとして、rAra h 1 では C 末端領域に特異的な消化酵素による加水分解部位が存在していた (図 1, 2)。Ara h 1 のペプシンに対する消化抵抗性の領域である、R79-E151 の領域はトリプシン消化では分解された (図 4BC)。また、トリプシンに対する抵抗性が考えられる領域として、E161-R238、L406-K554、L566-K603 の 3 つの領域が示唆された。nAra h 1 と rAra h 1 の比較では、rAra h 1 では約 18 kDa のペプチド断片が生じることが SDS-PAGE から示されており、これは L406 から K554 に相当するペプチドである可能性が考えられた。nAra h 1 ではこの領域は N415-K452 と K464-R535 に分断されることが示されている。このため、nAra h 1 と rAra h 1 では K452-K464 の領域の構造が異なっている可能性が考えられた。

Ara h 2 のペプシンに対する消化性の調査では、nAra h 2 に特徴的に C 末端領域が消化抵抗性を示す領域として推定された (図 5E)。Ara h 2 のトリプシンに対する消化性では、nAra h 2 および rAra h 2 のどちらにおいても 13.5 kDa 程度のペプチド断片が生じた。rAra h 2 製品には元々ペプチド A と呼称した 13.5 kDa 程度のペプチド断片が含まれており、N 末端配列のアミノ酸シーケンスから Ara h 2 の G93 から下流の配列であることが判明している。SDS-PAGE 上でトリプシン消化により nAra h 2 から生じるペプチド断片はペプチド A と同等の分子量であった。Ara h 2 からトリプシン消化抵抗性ペプチドとしてペプチド A と同じ部位から C 末端までの部分が報告されている (Apostolovic et al., 2016)。これらのことから Ara h 2 はトリプシン消化によって R92 から下流の配列が消化されずに残存すると示唆された (図 6)。

以上の結果より、天然タンパク質と組換えタンパク質での消化性の違いについてまとめた。Ara h 1 については大部分の消化性については nAra h 1 と rAra h 1 において類似していた。R79-L203 領域がペプシン消化に対する抵抗性があり、この部分にパブリックエピトープと呼ばれるアレルギー誘発頻度が高い配列が含まれていた。トリプシン消化においても、nAra h 1 と rAra h 1 では類似した消化断片を生じることが確認され、E161 から C 末までの領域に消化抵抗性領域が確認された (図 16)。また、Ara h 2 では、nAra h 2 と rAra h 2 とともに R22-L49 の領域がペプシンに対して消化抵抗性をみせ

た（図 17）。一方で、S73-Q114 および Q137 から C 末領域では nAra h 1 と rAra h 2 で異なる抵抗性を示した。rAra h 2 ではタンパク質精製用にヒスチジンタグが C 末に付加していることから、構造に影響を与え、rAra h 2 の C 末端領域のペプシン消化性が低下している可能性が考えられた。トリプシン消化については、nAra h 2 と rAra h 2 では類似した消化性を示していた。SDS-PAGE からトリプシン消化ではペプチド A に類似したペプチドが nAra h 2 より生じることが示されている。ペプチド A は還元剤処理の後にトリプシン消化することで、完全に分解されることから、ペプチド A の強固な構造はジスルフィド結合によるものと考えられた。

（2-2）消化性抵抗性の数値化のための条件設定

上記、（1-2）の方法により、ピーナッツ、コムギ、ダイズ、キウイの粗抽出タンパク質の消化性について LC-MS/MS 解析を実施した。消化抵抗性レベルを 4 段階に区分したところ（表 1）、ピーナッツではペプシンによる消化時はレベル 1 : 4、レベル 2 : 34、レベル 3 : 22、レベル 4 : 33 タンパク質が分類された。ピーナッツのトリプシン消化時はレベル 1 : 7、レベル 2 : 25、レベル 3 : 12、レベル 4 : 9 タンパク質が分類された。コムギではペプシンによる消化時はレベル 1 : 5、レベル 2 : 8、レベル 3 : 51、レベル 4 : 11 タンパク質が分類された。コムギのトリプシン消化時はレベル 1 : 52、レベル 2 : 149、レベル 3 : 110、レベル 4 : 54 タンパク質が分類された。ダイズではペプシンによる消化時はレベル 1 : 4、レベル 2 : 5、レベル 3 : 13、レベル 4 : 12 タンパク質が分類された。ダイズのトリプシン消化時はレベル 1 : 31、レベル 2 : 39、レベル 3 : 62、レベル 4 : 139 タンパク質が分類された。キウイではペプシンによる消化時はレベル 1 : 11、レベル 2 : 16、レベル 3 : 14、レベル 4 : 5 タンパク質が分類された。キウイのトリプシン消化時はレベル 1 : 49、レベル 2 : 15、レベル 3 : 36、レベル 4 : 27 タンパク質が分類された。

（3）個別課題：アレルギータンパク質の消化抵抗性の種間比較（西内 巧（金沢大学）、児玉 浩明、宮原 平（千葉大学））

【研究内容】

（2）の LC-MS/MS 解析から得られたデータについて、各レベルに分類されたタンパク質についてアレルギータンパク質との相同性を求め、食品影響評価指針に基づいてアレルギー誘発性の可能性があるタンパク質の占める割合を求めた。この割合について種間比較を行った。

【研究方法】

ピーナッツ、コムギ、ダイズ、キウイの消化抵抗性スコアおよび消化抵抗性レベルが得られた各植物種のタンパク質のアレルギー誘発可能性について、アレルギーのデータベースサイト Allergen Database for Food Safety (<https://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>) のアレルギー予測ツールを使用して、インフォマティクス解析を実施した。

【研究成果】

ここではデータベースとの照合によりアレルギー誘発可能性ありと判定されたタンパク質をアレルギー性タンパク質と表記する。ピーナッツのペプシン消化時における消化抵抗性レベル 1 のアレルギー性タンパク質の割合は 75%、非アレルギー性タンパク質の割合は 25%であった。同様に、レベル 2 では、アレルギー性タンパク質 62%と非アレルギー性タンパク質 38%であった。レベル 3 では、アレルギー性タンパク質 64%と非アレルギー性タンパク質 36%であった。レベル 4 では、アレルギー性タンパク質 67%と非アレルギー性タンパク質 33%であった。ピーナッツのトリプシン消化時における消化

抵抗性レベル1のアレルゲン性タンパク質 29%と非アレルゲン性タンパク質 71%であった。同様に、レベル2では、アレルゲン性タンパク質 40%と非アレルゲン性タンパク質 60%であった。レベル3では、アレルゲン性タンパク質 50%と非アレルゲン性タンパク質 50%であった。レベル4では、アレルゲン性タンパク質 56%と非アレルゲン性タンパク質 44%であった。ピーナッツに加えて、コムギ、ダイズ、キウイについての各消化抵抗性レベルにおけるアレルゲン性タンパク質と非アレルゲン性タンパク質の割合は図 18 にまとめた。その結果、ペプシン消化における消化抵抗性レベルとアレルゲン性タンパク質の相関係数は -0.20 であり弱い逆相関の関係性が認められた。一方で、トリプシン消化とアレルゲン性タンパク質の消化抵抗性レベルの相関係数は 0.84 であり、消化抵抗性レベルが高いほどアレルゲン性タンパク質の割合が増加する強い傾向があることが示された。

2 研究全体の成果、考察及び結論

(1) 組換えタンパク質の消化における特性評価

遺伝子組換え食品に含まれる新規発現タンパク質 (NEPs) のアレルギー誘発性の評価においては、本来、遺伝子組換え食品から精製された NEPs を用いて、人工胃腸液試験を実施するのが望ましい。しかし、現実的には遺伝子組換え食品からの精製には多大な労力が必要なために、異種発現系を用いた組換えタンパク質 (recombinant protein) を用いて試験を実施することが多い。しかし recombinant protein を用いた場合には、精製に用いるタグ配列が付加していることも多く、recombinant protein を用いることによる消化性への影響について詳細に調べた例はなかった。本研究では、ピーナッツのアレルゲンタンパク質である Ara h 1 と Ara h 2 について、ピーナッツから精製された nAra h 1 と nAra h 2 および、異種発現系によって得られた rAra h 1 と rAra h 2 の消化性について詳細に比較検討した。その結果、大枠においてペプシン、トリプシンの消化部位は共通していたものの、詳細にみると、recombinant protein に特有、もしくはピーナッツ種子由来タンパク質特有の消化部位が存在することが示された。遺伝子組換え食品のリスク評価の観点から見た場合には、大枠において消化部位が共通していたことは recombinant protein を用いる試験方法は、妥当であると判断できる。注意すべき点としては、peptide A に見られるように、異種発現系において全長のタンパク質とは異なる断片については、本来のタンパク質での構造とは異なる構造をとることが示された。このような異なる部分断片は、異種発現系によって得られたタンパク質画分でも比較的良好に見られるものであり、評価において、議論となることも多い。今回の試験結果は、異種発現系を用いた試験においては、全長のタンパク質の消化性を評価すべきであり、このような部分断片についての消化性については、評価の対象とすべきではない、ということを示している。逆に遺伝子組換え食品中にこのような部分断片が蓄積している場合には、それに応じた異種発現タンパク質を用いた試験が望まれることを示している。

(2) 消化抵抗性スコアから見た、NEPs の消化性テストの位置づけ

遺伝子組換え食品に含まれる NEPs については、人工胃液と人工腸液での試験が課されている。評価においては人工胃液での試験により完全に分解されることが必要であり、その場合には人工腸液において消化抵抗性を示す断片があってもアレルギー誘発性のリスクは少ないと評価されている。そのため、海外のリスク評価においては人工胃液で分解された場合には、人工腸液試験は必要とされていないケースもあり、人工腸液試験の必要性について疑問視されていることもある。

人工胃腸液試験が必要である、もしくはアレルギー誘発性の評価において意味がある、とするのであれば、人工胃腸液試験による消化抵抗性の結果と、アレルギー誘発性の評価においてより意味があるとされているアミノ酸配列でのアレルゲンタンパク質との相同性を見るバイオインフォマティクス試験の結果との間には、相関が認められるはずである。今回は、このような考えからコムギ、ダイズ、

ピーナッツ、キウイのタンパク質について、網羅的に消化抵抗性スコアによって4つレベルに分類した。各レベルに分類されたタンパク質についてデータベース照合によるバイオインフォマティクス解析を行った結果、4つの植物種から検出されたタンパク質について、共通する特徴が認められた。すなわち、人工胃液での消化抵抗性とバイオインフォマティクスによるアレルギー誘発可能性との間には相関が弱く、人工腸液での消化抵抗性との間に相関が認められた。この結果は、一見、これまでの科学的知見と矛盾するよう見える。研究グループとしては以下のように考えている。すなわち、胃を通過して腸に native な状態でタンパク質が届いた場合、腸液での分解性が低いタンパク質であるほど、アレルギーを誘発する可能性が高いと考えられる。したがって、ピーナッツのように固い物性の食品を食する場合、もしくは、まだ日本での市販例はないが精密発酵によって得られたタンパク質を一度に多量に摂取するような場合には、タンパク質の一部が未消化の状態で腸に届く可能性があるため、腸液によってすみやかに分解されることが望まれる。今回の結果は、人工腸液試験のリスク評価における位置づけについて、非常に suggestive な結果であり、多くのリスク評価に関わる方々への周知が望まれる結果であると言える。

Ⅲ 本研究を基にした論文等

1 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト

Digestibility of natural and recombinant allergenic peanut proteins in artificial gastrointestinal fluids.

Mizuho Terashima, Rina Matsuoka, Takumi Nishiuchi, Hiroaki Kodama, Taira Miyahara.

Food Safety (Tokyo) 投稿中

2 本研究を基にした学会発表の実績

Taira Miyahara, Mizuho Terashima, Takumi Nishiuchi, Hiroaki Kodama, Assessment of digestive resistance of the peanut allergen protein Ara h1, The 15th International Association for Plant Biotechnology Congress (Daejeon, Korea), August 6-11, 2023.

寺島瑞歩, 西内巧, 宮原平, 児玉浩明, 人工腸液試験におけるピーナッツタンパク質の消化抵抗性の数値化, 第41回 日本植物バイオテクノロジー学会(仙台)大会 2024年9月1日

松岡里奈, 宮原平, 西内巧, 児玉浩明, 小麦タンパク質のペプシン消化抵抗性の数値化, 日本農芸化学会 2025年度大会 2025年3月5日

3 特許権等の出願・申請等の状況

該当なし

4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物

該当なし

5 その他(各種受賞、プレスリリース等)

該当なし

表1 ピーナッツ、コムギ、ダイズの消化抵抗性レベルごとのタンパク質数および推定アレルゲン数

Peanut	Pepsin digestion		Trypsin digestion	
	Proteins	Allergens	Proteins	Allergens
Level 1	4	3	7	2
Level 2	34	21	25	10
Level 3	22	14	12	6
Level 4	33	22	9	5
Wheat	Pepsin digestion		Trypsin digestion	
	Proteins	Allergens	Proteins	Allergens
Level 1	5	3	52	6
Level 2	8	5	149	33
Level 3	51	19	110	61
Level 4	11	3	54	31
Soy beans	Pepsin digestion		Trypsin digestion	
	Proteins	Allergens	Proteins	Allergens
Level 1	4	3	139	30
Level 2	5	4	62	22
Level 3	13	9	39	20
Level 4	12	9	31	14
Kiwi	Pepsin digestion		Trypsin digestion	
	Proteins	Allergens	Proteins	Allergens
Level 1	11	3	49	16
Level 2	16	9	15	3
Level 3	14	8	36	13
Level 4	5	2	27	15

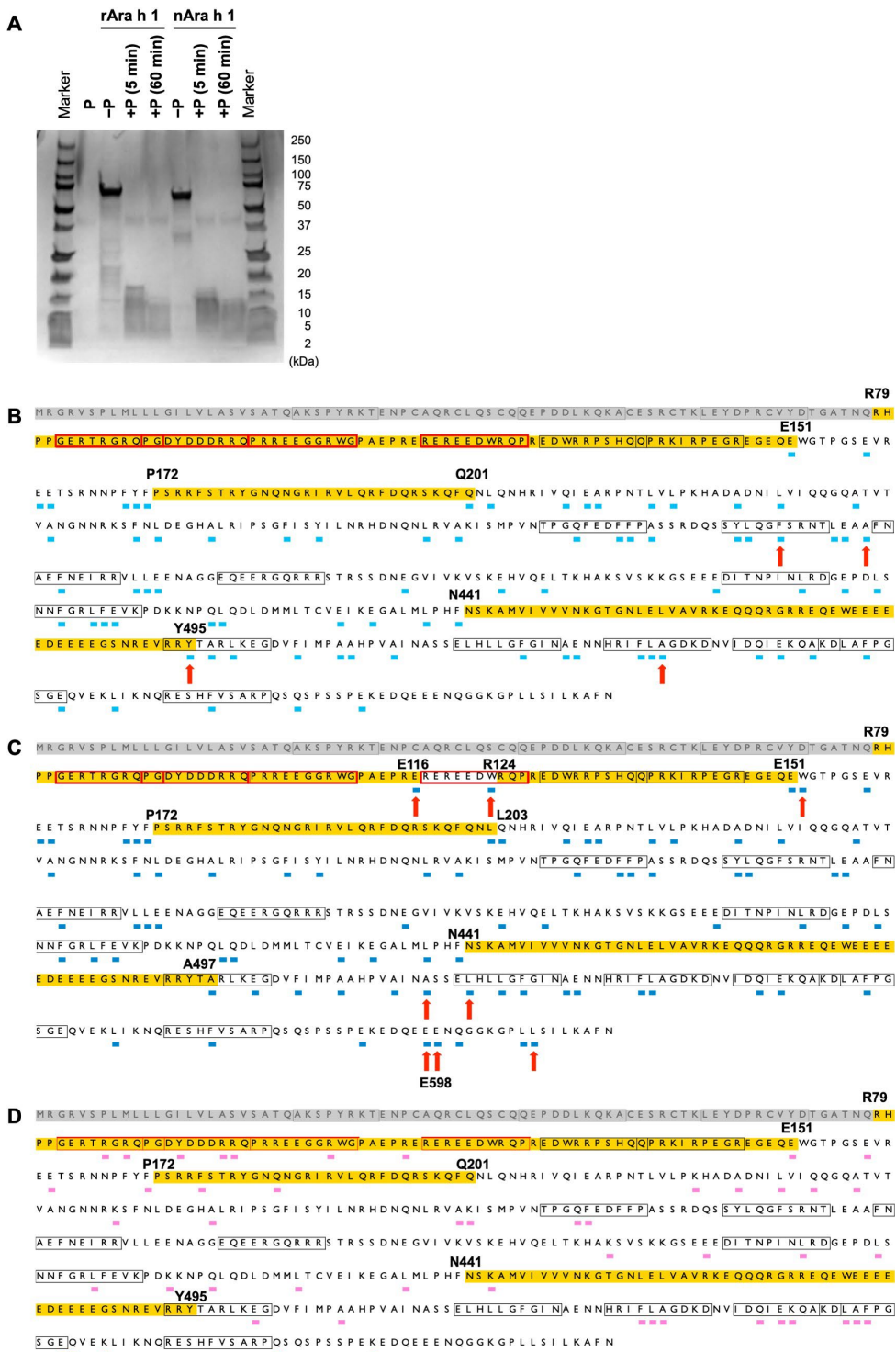


図1 低比活性ペプシン (S-pepsin) によるAra h 1の消化状況

A: S-pepsin により nAra h 1 と rAra h 1 を 5 分間と 60 分間消化したときの SDS-PAGE。P はペプシンを示している。B: nAra h 1 を S-pepsin により 60 分間消化したときに検出されたペプチド断片の末端をマッピングしたもの。C: rAra h 1 を S-pepsin により 60 分間消化したときに検出されたペプチド断片の末端をマッピングしたもの。D: nAra h 1 を S-pepsin により 5 分間消化したのち、パンクレアチンにより 120 分間消化したときのペプチド断片をマッピングしたもの。黄色マーカーの配列は 28 アミノ酸残基以上の長さでペプチド鎖が残存していると考えられる部分。推定切断末端は配列の下の青またはピンクのバーで表示した。赤い矢印は nAra h 1 または rAra h 1 のどちらか一方でのみ検出された

切断末端の位置。N末端側のグレーマーカーの配列は本研究では対象としていない領域。配列上の赤い枠はアレルギー誘発頻度が高いとされるパブリックエピトープ、黒い枠はエピトープの配列を示している。

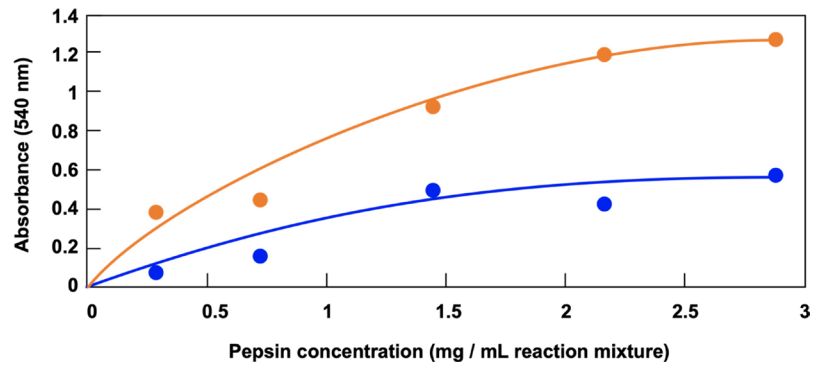


図2 ペプシン濃度とプロテアーゼ活性の関係

基質にアゾコールを使用して、低比活性ペプシン（S-pepsin: 青）と高比活性ペプシン（P-pepsin: オレンジ）の活性を比較した。アゾコールはアゾ色素含有コラーゲンであり、ペプシンにより消化が進むとアゾ色素が遊離するため、遊離したアゾ色素を540 nmの吸光で計測することでプロテアーゼ活性を計測できる。

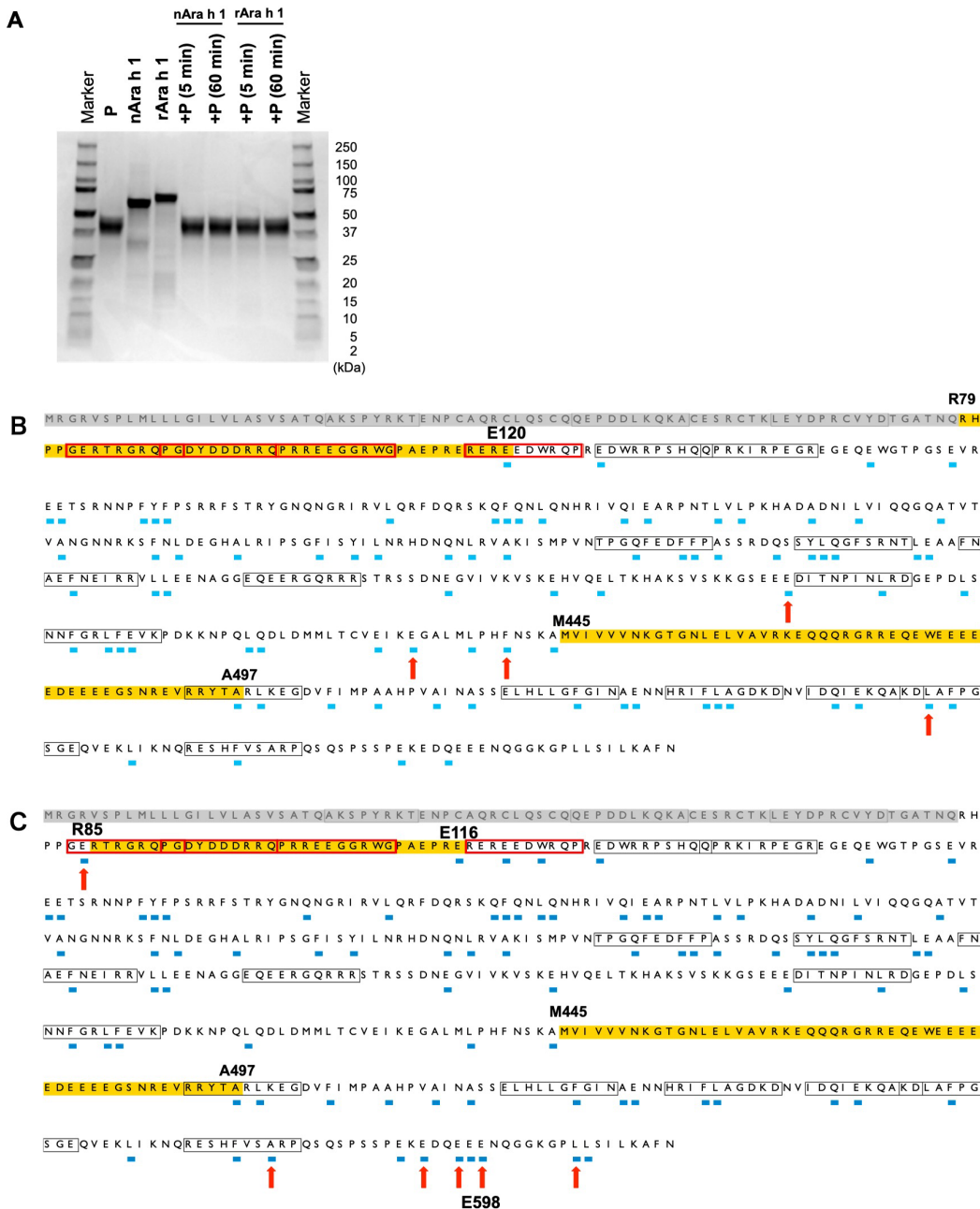


図3 高比活性ペプシン (P-pepsin) による Ara h 1 の消化状況

A: P-pepsin により nAra h 1 と rAra h 1 を 5 分間と 60 分間消化したときの SDS-PAGE。P はペプシンを示している。B: nAra h 1 を P-pepsin により 5 分間消化したときに検出されたペプチド断片の末端をマッピングしたもの。C: rAra h 1 を P-pepsin により 5 分間消化したときに検出されたペプチド断片の末端をマッピングしたもの。黄色マーカーの配列は 28 アミノ酸残基以上の長さでペプチド鎖が残存していると考えられる部分。推定切断末端は配列の下の青のバーで表示した。赤い矢印は nAra h 1 または rAra h 1 のどちらか一方でのみ検出された切断末端の位置。N 末端側のグレーマーカーの配列は本研究では対象としていない領域。配列上の赤い枠はアレルゲン誘発頻度が高いとされるパブリックエпитープ、黒い枠はエピトープの配列を示している。

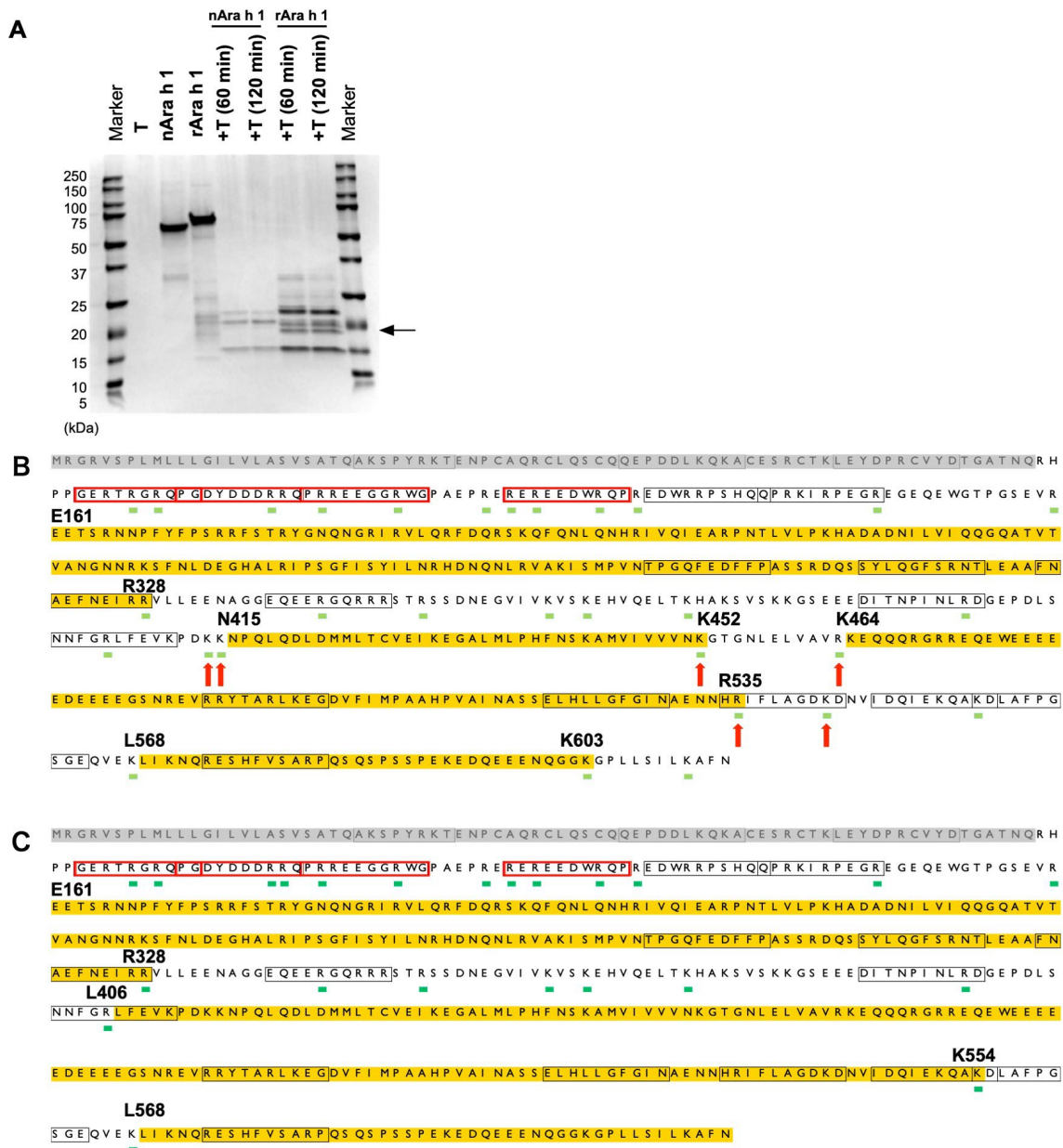


図4 トリプシンによる Ara h 1の消化状況

A: トリプシンにより nAra h 1 と rAra h 1 を 60分間と 120 分間消化したときのSDS-PAGE。Tはトリプシンを示している。矢印はrAra h 1 で見られた 18 kDa 程度の消化産物。 B: nAra h 1 をトリプシンにより 120 分間消化したときに検出されたペプチド断片の末端をマッピングしたもの。 C: rAra h 1 をトリプシンにより 120分間消化したときに検出されたペプチド断片の末端をマッピングしたもの。黄色マーカーの配列は28アミノ酸残基以上の長さでペプチド鎖が残存していると考えられる部分。推定切断末端は配列の下の緑のバーで表示した。赤い矢印はnAra h1 または rAra h 1 のどちらか一方でのみ検出された切断末端の位置。N末端側のグレーマーカーの配列は本研究では対象としていない領域。配列上の赤い枠はアレルゲン誘発頻度が高いとされるパブリックエпитープ、黒い枠はエピトープの配列を示している。

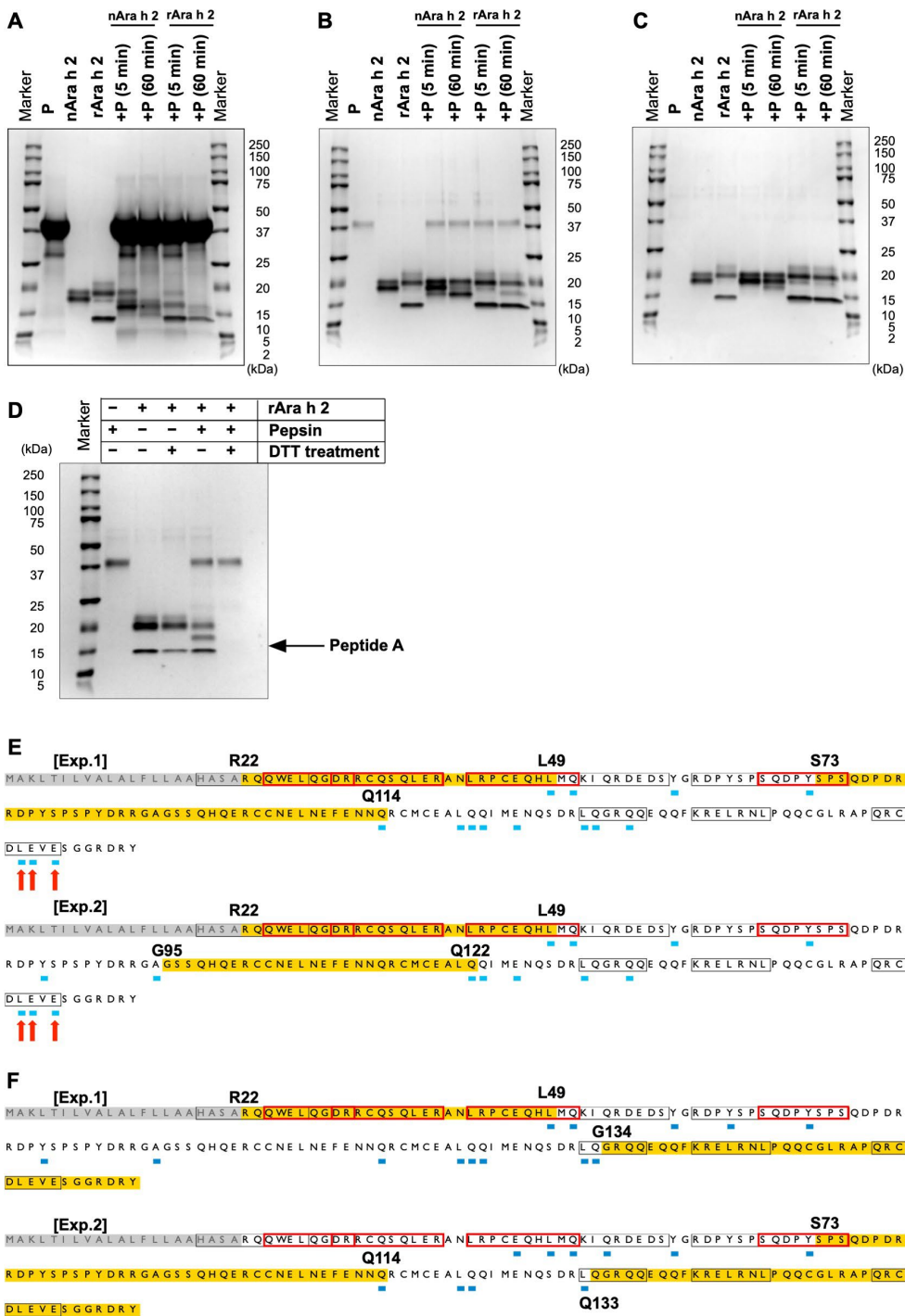


図5 高比活性ペプシン (P-pepsin) による Ara h 2の消化状況

A: 質量比がP-pepsin: Ara h 2 = 0.052 : 1 として Ara h 2 を5分間と 60 分間消化したときのSDS-PAGE。Pはペプシンを示している。B: 質量比がP-pepsin: Ara h 2 = 5.2 : 1 として Ara h 2 を5分間と 60 分間消化したときのSDS-PAGE。C: 質量比がP-pepsin: Ara h 2 = 52 : 1 として Ara h 2 を5分間と 60 分間消化したときのSDS-PAGE。D: 還元剤 DTT により還元処理の後にP-pepsin で rAra h 2 消化したときのSDS-PAGE。E: nAra h 2 をP-pepsinにより 5 分間消化したときに検出されたペプチド断片の末端をマッピングしたもの (P-pepsin: Ara h 1 = 0.052 : 1)。F: rAra h 2 をP-pepsinにより 5 分間消化したときに検出されたペプチド断片の末端をマッピングしたもの (P-pepsin: Ara h 1 = 0.052 : 1)。E, F ともに2回の独立した実験結果を示している。黄色マーカーの配列は28アミノ酸残基以上

の長さでペプチド鎖が残存していると考えられる部分。推定切断末端は配列の下の緑のバーで表示した。赤い矢印は **nAra h2** または **rAra h 2** のどちらか一方でのみ検出された切断末端の位置。N末端側のグレーマーカーの配列は本研究では対象としていない領域。配列上の赤い枠はアレルギー誘発頻度が高いとされるパブリックエピトープ、黒い枠はエピトープの配列を示している。

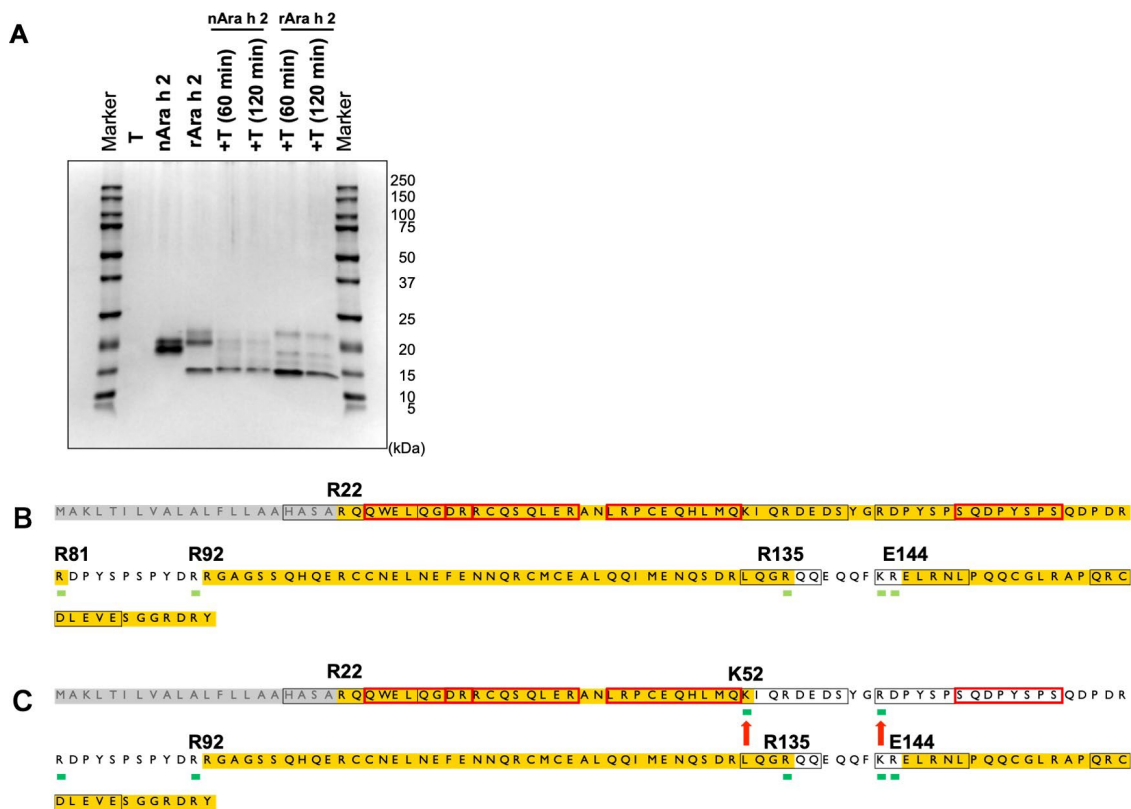


図6 トリプシンによる Ara h 2の消化状況

A: トリプシンにより nAra h 2 と rAra h 2 を 60分間と 120 分間消化したときのSDS-PAGE。T はトリプシンを示している。B: nAra h 1 をトリプシンにより 120 分間消化したときに検出されたペプチド断片の末端をマッピングしたもの。C: rAra h 1 をトリプシンにより 120分間消化したときに検出されたペプチド断片の末端をマッピングしたもの。黄色マーカの配列は28アミノ酸残基以上の長さでペプチド鎖が残存していると考えられる部分。推定切断末端は配列の下の緑のバーで表示した。赤い矢印はnAra h2 または rAra h 2 のどちらか一方でのみ検出された切断末端の位置。N末端側のグレーマーカの配列は本研究では対象としていない領域。配列上の赤い枠はアレルゲン誘発頻度が高いとされるパブリックエпитープ、黒い枠はエピトープの配列を示している。

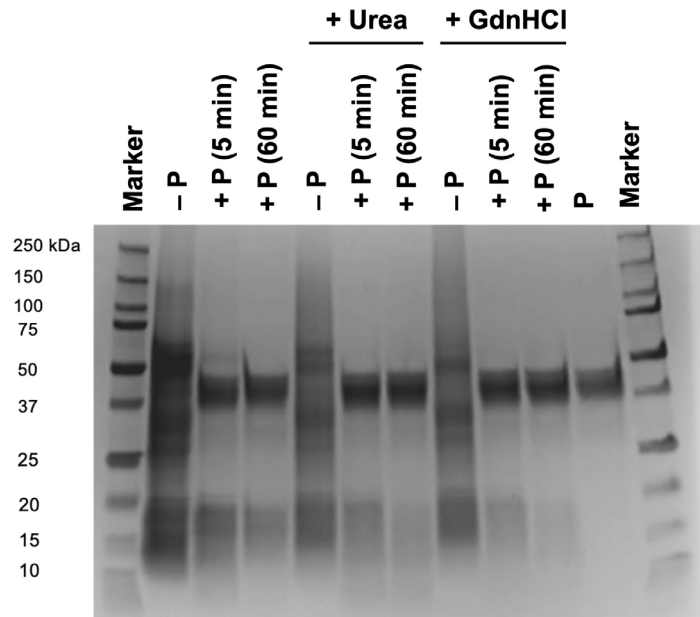


図7 コムギ粗抽出タンパク質に対する変性剤ウレアと塩酸グアニジン（GdnHCl）処理によるペプシン（P-pepsin）消化への影響

6 M ウレア+ 10 mM DTTまたは 5 M 塩酸グアニジン+ 10 mM DTTにより50°C、60 分間変性させG-25脱塩カラムで変性剤を取り除いた後、P-pepsin により5分間または60分間消化処理をおこなった。Pはペプシンを示している。-Pは変性処理後G25脱塩カラムを通した消化処理をしていない粗抽出タンパク質。

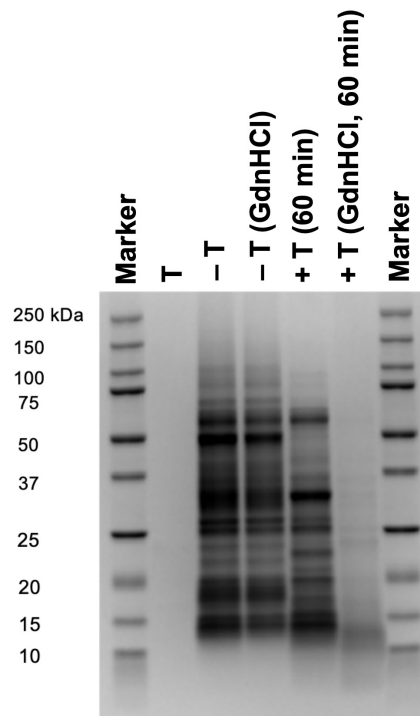


図8 コムギ粗抽出タンパク質に対する変性剤塩酸グアニジン (GdnHCl+ 10 mM DTT) 処理によるトリプシン消化
 Tはトリプシンを示している。-Tはトリプシン消化をしていないもの。変性剤は変性処理後G-25脱塩カラムにより除去した後にトリプシン消化を行なった。

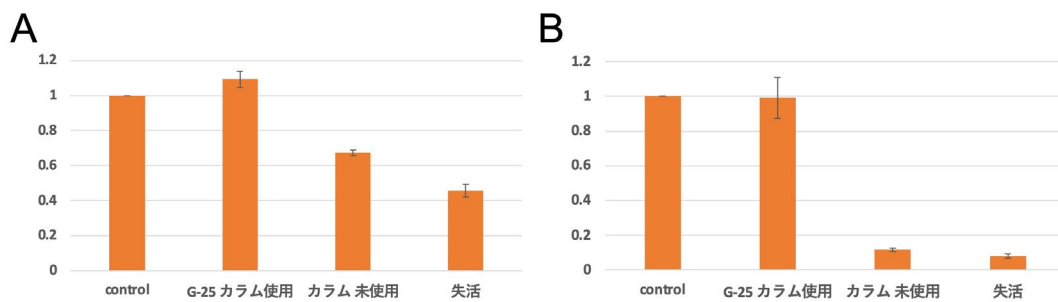


図9 塩酸グアニジン処理およびG25脱塩カラムによる変性剤除去がもたらす消化酵素の活性への影響

5 M 塩酸グアニジン + 10 mM DTT による変性処理ののち、(A) ペプシン消化 5 分間または (B) パンクレアチン消化を60分間おこなった。Control は変性処理およびG25カラムを使用せずに活性を測定。G25カラム使用：変性処理後G25カラムにより変性剤を除去してから活性を測定。カラム未使用：変性処理後そのまま活性測定。失活：95°C、10分間の熱処理後に活性を測定。

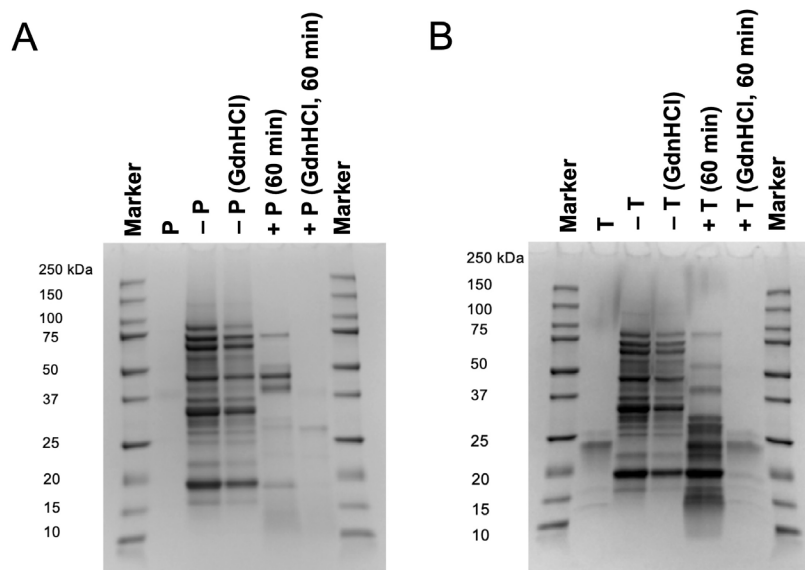


図10 ダイズ粗抽出タンパク質に対する変性剤塩酸グアニジン (GdnHCl+ 10 mM DTT) 処理による (A) ペプシン (P-pepsin) 消化と (B) トリプシン消化

Pはペプシンを示している。-Pはペプシン消化をしていないもの。Tはトリプシンを示している。-Tはトリプシン消化をしていないもの。変性剤は変性処理後G-25脱塩カラムにより除去した後に消化酵素による消化を行なった。

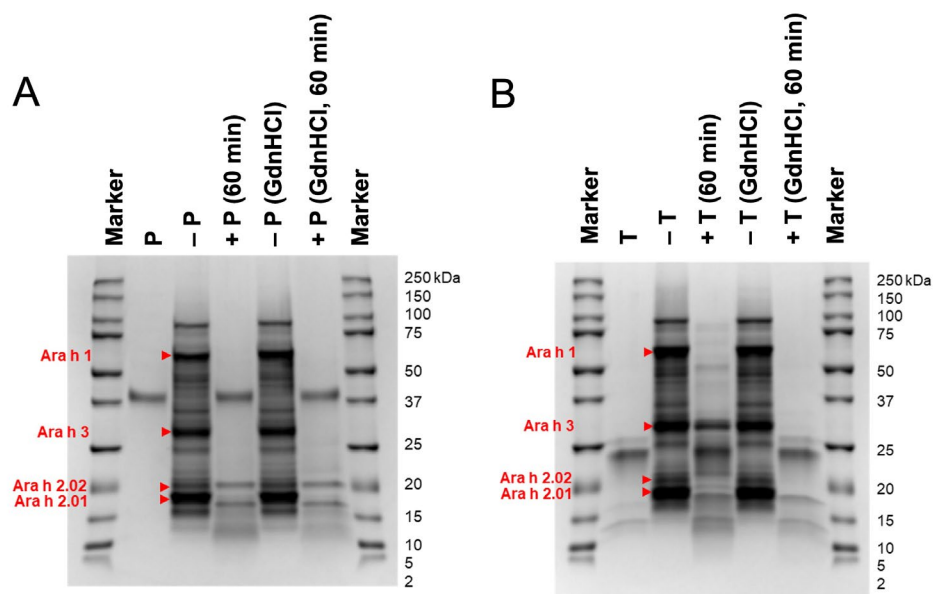
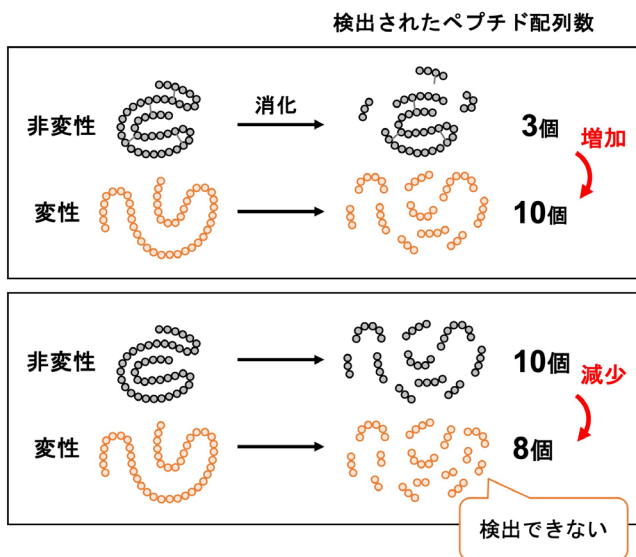
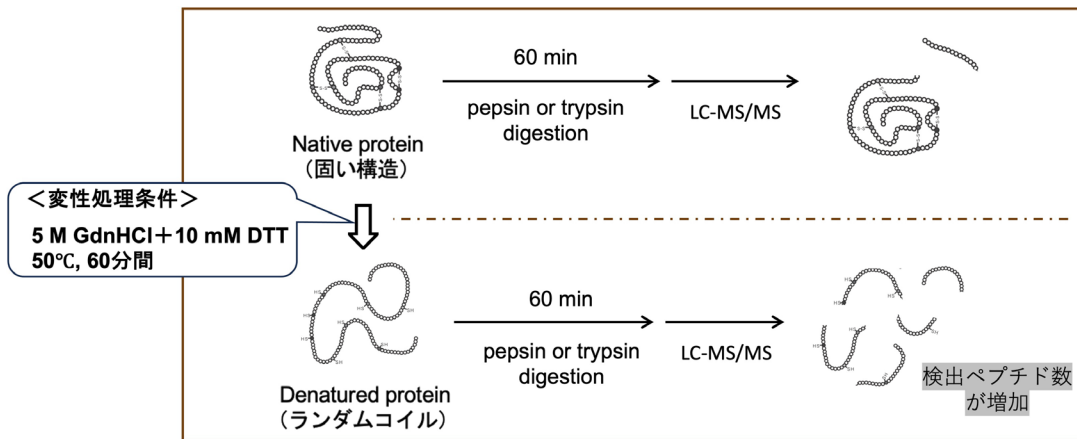


図11 ピーナッツ粗抽出タンパク質に対する変性剤塩酸グアニジン (GdnHCl+ 10 mM DTT) 処理による (A) ペプシン (P-pepsin) 消化および (B) トリプシン消化
 図中の Ara h 1, Ara h 2.01, Ara h 2.02, Ara h 3 は主要なピーナッツアレルゲンと思われるバンドの位置を示している。変性剤は変性処理後G-25脱塩カラムにより除去した後に消化酵素による消化を行った。



消化抵抗性スコア

$$= 100 - (A/B) \times 100$$

A = 通常消化時のペプチド配列数
 B = 消化促進条件時のペプチド配列数

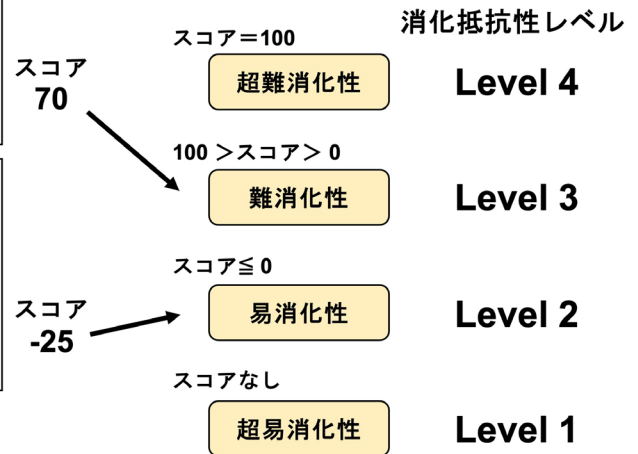


図12 消化抵抗性の数値化の概要

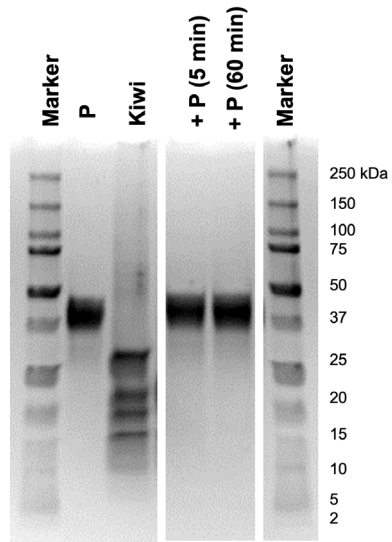


図13 キウイ果肉の粗抽出タンパク質のペプシン (P-pepsin) 消化状況
Pはペプシンを示している。Kiwi はキウイ果肉の粗抽出タンパク質のみを泳動した。

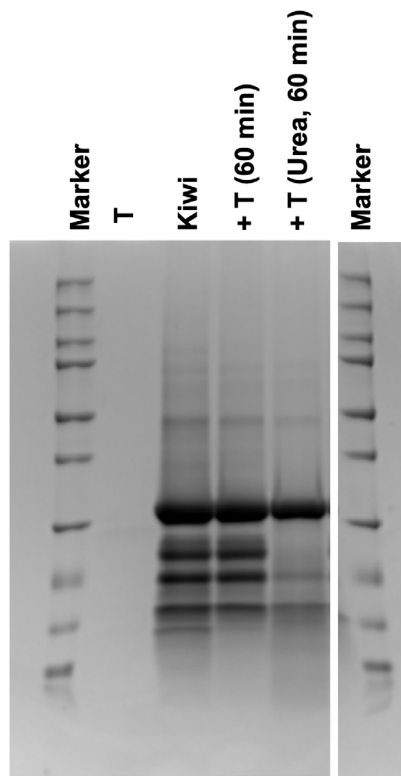


図14 キウイ果肉の粗抽出タンパク質の変性剤（6M ウレア + 10 mM DTT）によるトリプシン消化への影響

Tはトリプシンを示している。Kiwi はキウイ果肉の粗抽出タンパク質のみを泳動した。キウイ果肉の粗抽出タンパク質中にトリプシンインヒター様タンパク質の存在が考えられたことから、トリプシンは通常の10倍の濃度で使用している。6M ウレア + 10 mM DTT による変性剤存在下でトリプシン消化を行なった。

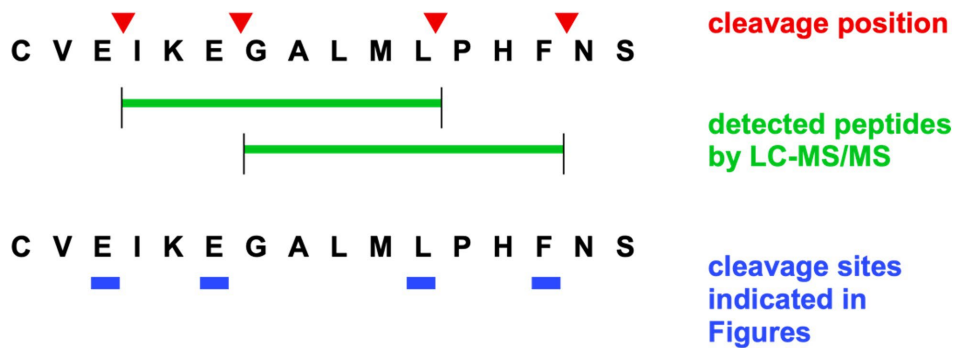


図15 LC-MS/MSによるタンパク質の消化酵素切断部位の表記方法

Ara h 1 または Ara h 2 のアミノ酸配列上で消化酵素により切断された箇所（赤矢尻）とその断片ペプチドが緑のバーのように検出されたとき、マッピングの図では断片化されたペプチドの末端のアミノ酸残基の下に短いバーを表記した。

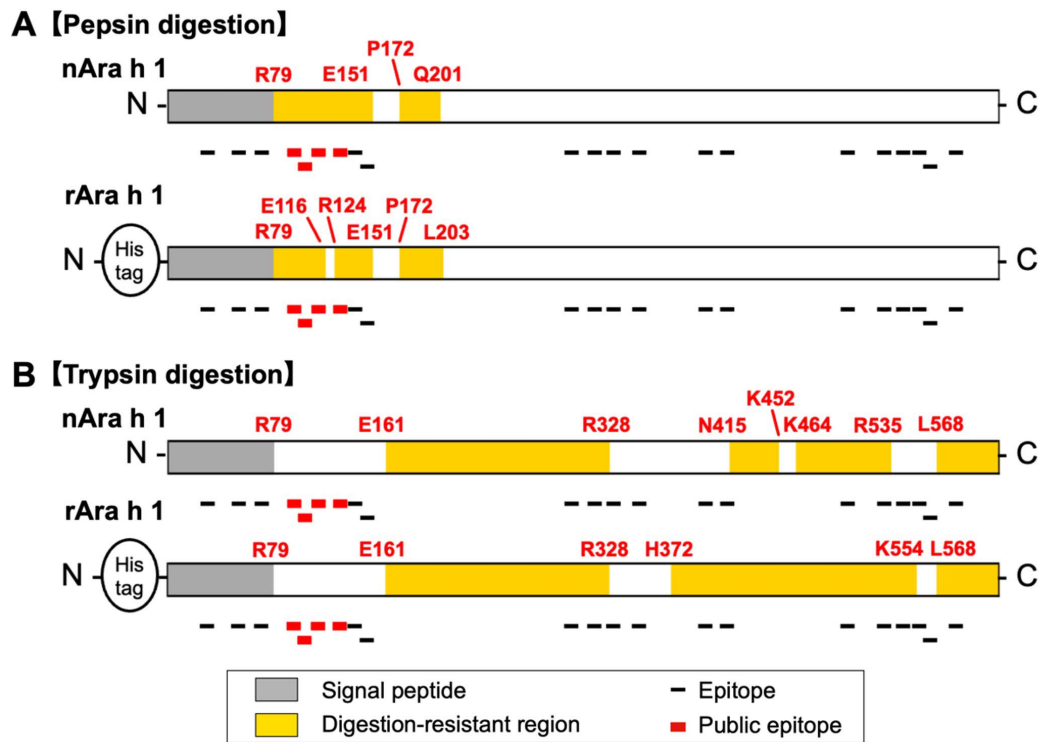
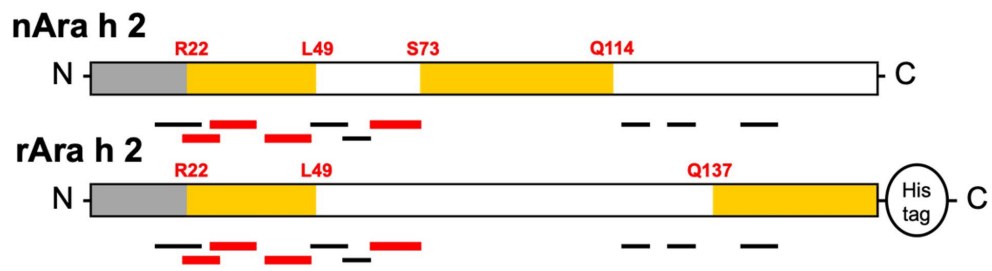


図16 nAra h 1と rAra h 1のペプシンおよびトリプシンによる消化状況の比較

A [Pepsin digestion]



B [Trypsin digestion]

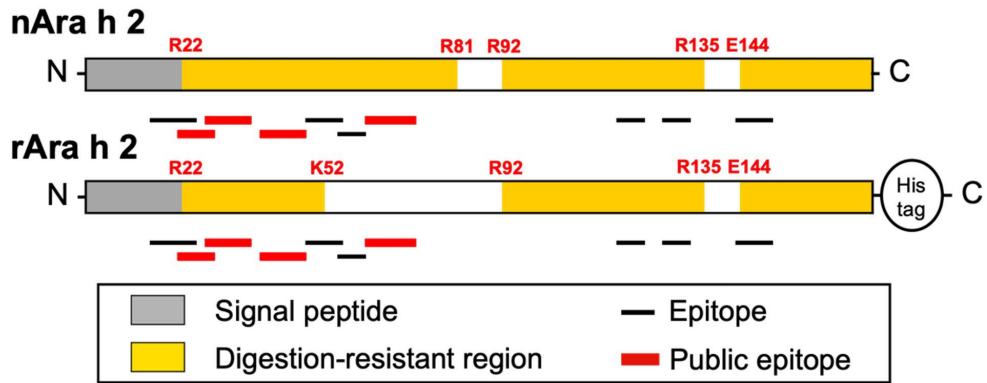


図17 nAra h 2と rAra h 2のペプシンおよびトリプシンによる消化状況の比較

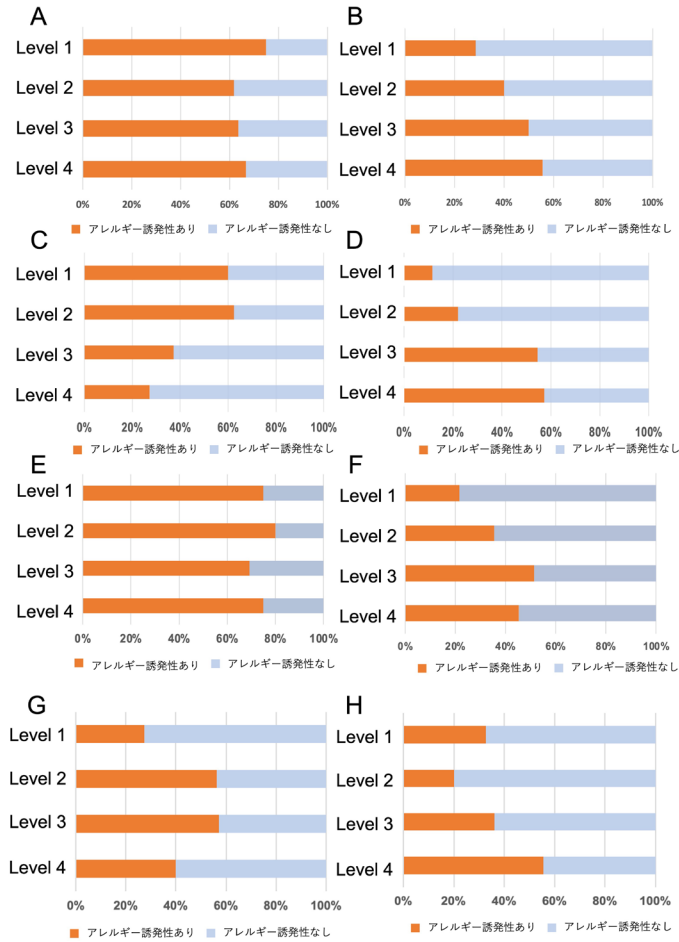


図18 ピーナッツ、コムギ、ダイズ、およびキウイの粗抽出タンパク質におけるペプシンまたはトリプシン消化時のアレルゲン性タンパク質と非アレルゲン性タンパク質の比率

A: ピーナッツ粗抽出タンパク質のペプシン消化、B: ピーナッツ粗抽出タンパク質のトリプシン消化、C: コムギ粗抽出タンパク質のペプシン消化、D: コムギ粗抽出タンパク質のトリプシン消化、E: ダイズ粗抽出タンパク質のペプシン消化、F: ダイズ粗抽出タンパク質のトリプシン消化、G: キウイ粗抽出タンパク質のペプシン消化、H: キウイ粗抽出タンパク質のトリプシン消化。ペプシン消化時の消化抵抗性レベル（Level 1~4, 数字が大きくなるほど難消化性）とアレルゲン性タンパク質の割合の相関係数は -0.20 、トリプシン消化時の消化抵抗性レベルとアレルゲン性タンパク質の割合の相関係数は 0.84 であった。

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価（委託研究実施計画書に記載した達成目標を転記し、その自己評価を記載する。）

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 評価方法の確立	5	人工胃腸液試験における消化抵抗性スコアを得るために必要となる評価方法を確立した。
(2) 作物ごとの消化性比較	4	コムギ、ピーナッツ、ダイズ、キウイについては消化性の比較を実施できた。
(3) アレルゲンタンパク質の消化抵抗性の種間比較	5	コムギ、ダイズ、ピーナッツ、キウイについての、ペプシン消化、トリプシン消化とアレルギー誘発性について比較した。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	今回の研究の目標は、NEPsのアレルギー誘発性のリスク評価における人工胃腸液試験の位置づけについて新しい視点からの提言を行うものであり、これまで重要ではないののではないかと指摘されてきた人工腸液試験に新たな意味付けを行うことができた。
(2) 研究成果の有用性	5	これまで、人工胃腸液試験についてはその有用性について議論が交わされてきた。本研究は NEPs の人工胃腸液試験とバイオインフォマティクス解析によるリスク評価との相関が一部認められたことから、改めて人工胃腸液試験の有用性、またはどのような場合にこの試験が有用なのか、提言を行うことができた。

総合コメント

遺伝子組換え食品のリスク評価において NEPs のアレルギー誘発可能性のリスク評価が最も重要である。このリスク評価においては異種発現系タンパク質を人工胃腸液試験に用いることが多く、本研究においてその妥当性と注意点について改めて提言できた。さらに、人工胃腸液試験が NEPs のリスク評価における妥当性について議論があるが、本研究から腸管に **native** な NEPs が届く可能性がある場合には、人工腸液によって容易に分解されることが重要であることが示唆された。このような研究事例はこれまでに報告例がなく、リスク評価に関わる研究者にとって重要な知見と言える。

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。

本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。

(別添1)

研究成果の概要 (和文)

遺伝子組換え食品の安全性評価は義務化されており、特に新規組換えタンパク質 (Newly expressed proteins: NEPs) のアレルギー誘発性のリスク評価は重要である。現在の評価指針では NEPs の人工胃腸液処理試験(以後、消化性テスト)とバイオインフォマティクス解析によるアレルゲンタンパク質とのアミノ酸配列相同性検索 (以後、バイオインフォマティクス検索) が課されている。しかし、これまで消化性テストとバイオインフォマティクス検索との間で相関性が果たしてあるのか、調べられた事例はない。そこで、本研究ではアレルギー誘発性を有する主要作物 4 種(ピーナッツ、ダイズ、コムギおよびキウイ)の可食部からタンパク質を抽出し、質量分析を用いて、ペプシン、トリプシン等の消化酵素への消化抵抗性の数値化を行った。この数値をもとに各タンパク質について、消化性を4つのクラス (超易消化性、易消化性、難消化性、超難消化性) に分類し、さらにバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、ペプシン消化抵抗性とバイオインフォマティクス解析からは弱い逆相関の関係性が見られた。一方で、トリプシン消化抵抗性との間には強い相関が認められた。この結果は、腸管に native な状態でタンパク質が届いた場合に、腸液で分解されにくいタンパク質がアレルギーを誘発する可能性が相対的に高いことを示している。予測される事例としては固い物性で胃を通過しやすい場合、NEPs として一度に大量に摂取する場合には、人工腸液試験において速やかに分解されることが必要であることを示している。

(別添2)

研究成果の概要 (英文)

Title of research project	A comprehensive digestibility analysis of proteins derived from allergenic crops
Research project number	(JPCAFSC20232304)
Research period	FY 2023 – 2024
Name of principal research investigator (PI)	Dr. Hiroaki Kodama

Abstract/Summary

Genetically modified foods undergo mandatory safety assessments, with a particular emphasis on risk assessment of allergenicity of newly expressed proteins (NEPs). Current assessment guidelines mandate the artificial gastrointestinal fluid treatment test (digestibility test) and bioinformatics analysis to identify amino acid sequence homology with allergen proteins (bioinformatics search). However, there has been no prior study examining the correlation between digestibility test and bioinformatics search.

In this study, proteins were extracted from the edible parts of four major allergenic crops: peanut, soybean, wheat, and kiwi. The susceptibilities of these proteins to digestive enzymes such as pepsin and trypsin were quantified with a method using mass spectrometry. Based on this quantified value, the digestibility of each protein was categorized into four classes: highly digestion-susceptible, digestion-susceptible, digestion-resistant, and highly digestion-resistant proteins. Subsequently, bioinformatics analysis of each protein was conducted.

The findings revealed a very weak inverse correlation between pepsin digestibility and bioinformatics analysis. Conversely, a strong correlation was observed between trypsin digestibility and bioinformatics analysis. This suggests that when proteins reach the intestinal tract in their native state, those that exhibit high resistance to intestinal fluid degradation are more likely to induce allergies. These results suggest that NEPs have to be degraded easily with intestinal fluid when they are included in foods with a hard texture that pass through the stomach easily without being digested, or when a large quantity of NEPs is included in the food.

(和訳)

遺伝子組換え食品の安全性評価は義務化されており、特に新規組換えタンパク質 (Newly expressed proteins: NEPs) のアレルギー誘発性のリスク評価は重要である。現在の評価指針では NEPs の人工胃腸液処理試験 (以後、消化性テスト) とバイオインフォマティクス解析によるアレルギータンパク質とのアミノ酸配列相同性検索 (以後、バイオインフォマティクス検索) が課されている。しかし、これまで消化性テストとバイオインフォマティクス検索との間で相関性が果たしてあるのか、調べられた事例はない。そこで、本研究ではアレルギー誘発性を有する主要作物4種 (ピーナッツ、ダイズ、コムギおよびキウイ) の可食部からタンパク質を抽出し、質量分析を用いて、ペプシン、トリプシン等の消化酵素への消化抵抗性の数値化を行った。この数値をもとに各タンパク質について、消化性を4つのクラス (超易消化性、易消化性、難消化性、超難消化性) に分類し、さらにバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、ペプシン消化抵抗性とバイオインフォマティクス解析からは弱い逆相関の関係性が見られた。一方で、トリプシン消化抵抗性との間には強い相関が認められた。この結果は、腸管に native な状態でタンパク質が届いた場合に、腸液で分解されにくいタンパク質がアレルギーを誘発する可能性が相対的に高いことを示している。予測される事例としては固い物性で胃を通過しやすい場合、NEPs として一度に大量に摂取する場合には、人工腸液試験において速やかに分解されることが必要であることを

示している。

This report provides outcome of the captioned research programme funded by Food Safety Commission Japan (FSCJ).
This is not a formal publication of FSCJ and is neither for sale nor for use in conjunction with commercial purpose.
All rights are reserved by FSCJ. The view expressed in this report does not imply any opinion on the part of FSCJ.

1. List of papers published on the basis of this research

Mizuho Terashima, Rina Matsuoka, Takumi Nishiuchi, Hiroaki Kodama, Taira Miyahara.

Digestibility of peanut natural and recombinant allergenic proteins in artificial gastrointestinal fluids.
(submitted)

2. List of presentations based on this research

Taira Miyahara, Mizuho Terashima, Takumi Nishiuchi, Hiroaki Kodama.

Assessment of digestive resistance of the peanut allergen protein Ara h1.

The 15th International Association for Plant Biotechnology Congress (Daejeon, Korea), August 6-11, 2023.

Mizuho Terashima, Takumi Nishiuchi, Taira Miyahara, Hiroaki Kodama.

Quantification of the digestibility of peanut protein in artificial intestinal fluid testing

The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Biotechnology (Sendai, Japan) 1st Sep. 2024 (in Japanese)

Rina Matsuoka, Taira Miyahara, Takumi Nishiuchi, Hiroaki Kodama.

Quantification of pepsin digestion resistance of wheat protein.

JSBBA Annual Meeting 2025 Sapporo, 5th Mar. 2025 (in Japanese)

3. The number and summary of patents and patent applications

None

4. Others (awards, press releases, software and database construction)

None