

[成果情報名] 抗ペプチド抗体を用いる主要な小麦 α -アミラーゼインヒビターの検出法

[要約] 小麦アレルゲンの一種である小麦 α -アミラーゼインヒビターについて、エピトープを含む部分ペプチドに対する抗体を作製することにより、種類が異なる α -アミラーゼインヒビターやそのエピトープを検出できる。

[キーワード] アレルギー、酵素免疫測定、イムノブロッティング、エピトープ、コムギ

[担当] 東北農研・パン用小麦研究東北サブチーム

[代表連絡先] 電話 019-643-3414

[区分] 東北農業・基盤技術、作物

[分類] 研究・普及

[背景・ねらい]

小麦アレルゲンタンパク質の一種である α -アミラーゼインヒビター (α -AI) には、分子量が 13~15kDa のサブユニットで構成される単量体、二量体、四量体があり、それぞれアミノ酸配列が異なるため、小麦アレルギー患者により、反応する α -AI の種類が異なることが知られている。一方、単量体や二量体の小麦 α -AI には、唾液や膣液の α -アミラーゼを阻害することから、血糖値上昇抑制効果が期待されている。しかし、種類が異なる α -AI の分別定量は容易でなく、さらに α -AI のエピトープ（ヒト IgE 抗体が結合する部位）を検出する方法も未だないため、 α -AI のアレルギー・代謝研究は進んでいない。

そこで、小麦 α -AI のエピトープを含み、かつアミノ酸配列が異なる箇所のペプチドを複数合成して、それに対する抗体を作製することにより、単量体と二量体の小麦 α -AI やそのエピトープ、および四量体の小麦 α -AI を別々に検出する方法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. 単量体（0.28 型）および二量体（0.19 型、0.53 型）の小麦 α -AI のエピトープである AVRDC を含む 13-mer の抗原ペプチド NGSQVPEAVLRDC を合成し、キャリアタンパク質に結合後、ウサギに投与することにより、抗 0.19 型抗体が得られる。同様に、四量体小麦 α -AI のうち、主要なアレルゲンである CM16 の 15-mer 部分ペプチド CRIETPGSPYLAQQ から、抗 CM16 抗体が得られる（表 1）。
2. 抗 0.19 型抗体は単量体と二量体の α -AI に結合するが、四量体の CM16 には結合せず、抗 CM16 は単量体と二量体の α -AI には結合しない（表 1）。
3. 本抗体を用いるイムノブロッティング法（図）や酵素免疫測定法（エライザ）により、異なる品種・系統の小麦種子に含まれる α -AI 量を比較できる。
4. 小麦 α -AI がプロテアーゼによって分解されても、そのエピトープが未分解の場合は、アレルギー反応性が残る。抗 0.19 型抗体は、単量体・二量体 α -AI エピトープのみのペプチド AVRDC にも結合するため、エピトープの分解を酵素免疫測定法で確認できる（表 2）。

[成果の活用面・留意点]

1. 本抗体の検査法を用いることにより、 α -AI 含有量が少ない、または逆に α -AI 含有量が多い小麦品種・系統のスクリーニングに活用できる。
2. 本抗体を用いることにより、純度が高い単量体・二量体 α -AI や CM16 の調製が容易になる。
3. 消化管内における α -AI やそのエピトープの分解過程の解析が可能になるため、 α -AI のアレルギー・代謝研究に活用できる。

[具体的データ]

表 1 主要な小麦 α -AI のアミノ酸配列（抜粋）と得られた抗体の結合性

α -AI の種類	25 ↓	アミノ酸番号 45 ↓	抗体結合性 抗 0.19 型 抗 CM16
0.19 型 二量体	LRLQCNGSQVPEAVLRDCCQQ	○	×
0.53 型 二量体	*K*****	○	×
0.28 型 単量体	VK***V*****	○	×
CM16 四量体	EQQA*RIETPGSPY*AKQQCC	×	○

*: 0.19 型二量体と同じアミノ酸、下線：抗原ペプチド、二重下線：エピトープ

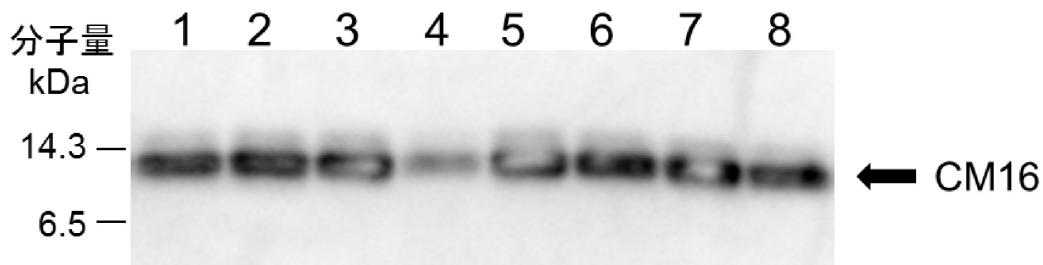


図 小麦種子の α -AI 含有量比較例（イムノブロッティング）

1～8：異なる小麦品種・系統の種子抽出物、抗体 2,000 倍希釈で使用

表 2. 抗 0.19 型抗体による α -AI エピトープ分解の確認（酵素免疫測定法）

試料	吸光度 (450nm)	使用微生物プロテアーゼ
エピトープ AVRDC 0.15 μ M	0.123	A: <i>Bacillus licheniformis</i> 由来
小麦粉抽出物	0.066	B: <i>Streptomyces griseus</i> 由来
プロテアーゼ処理小麦粉抽出物 A	0.000	抗体 200 倍希釈で使用
プロテアーゼ処理小麦粉抽出物 B	0.008	※エピトープが分解すると吸光度が低下する

（老田 茂）

[その他]

研究課題名：実需者ニーズに対応したパン・中華めん用等小麦品種の育成と加工・利用技術の開発

中課題整理番号：311c

予算区分：基盤

研究期間：2006～2010 年度

研究担当者：老田 茂

発表論文等：老田(2010)、日本食品科学工学会誌、57(11), 489-491.

老田(2010)、特願 2010-121244.