

小麦カルボキシペプチダーゼによる小麦アレルゲンタンパク質の分解

老田 茂

(東北農業研究センター)

Degradation of wheat allergen proteins by wheat carboxypeptidase

Shigeru OITA

(National Agricultural Research Center for Tohoku Region)

1 はじめに

日本の食物アレルギー患者の約10%が小麦アレルギーである。小麦のグリアジンや低分子量 (LMW) グルテニンによってアトピー症状などが引き起こされ、そのエピトープ (IgE抗体が特異的に結合するアミノ酸配列) も特定されている^{1,2)}。一方、小麦種子に含まれるカルボキシペプチダーゼ (CPase)³⁾は小麦のグリアジンを分解する⁴⁾が、LMWグルテニンの分解や、これらタンパク質のエピトープ分解については報告されていない。そこで、小麦のグリアジンやLMWグルテニン、およびこれらのエピトープに対する小麦CPaseの分解特性を明らかにする。

2 試験方法

(1) CPaseおよびエンドペプチダーゼ活性測定

小麦種子由来CPase (和光純薬) を用い、1.5 mL容キャップ付チューブに、Benzyloxycarbonyl (Z)-Glu-Tyr (ペプチド研究所) を0.5 mmol/L含むクエン酸緩衝液 (50 mmol/L, pH 4.5) 95 μ L、およびCPase (1 mg/mL) 5 μ Lを混合して37°Cで1時間反応させた後、0.4%ギ酸100 μ Lを混合してから、全量を逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC、カラム: 和光純薬5C4-200、溶媒: アセトニトリル30 \rightarrow 70%+0.2%ギ酸、吸収波長: 214 nm) に供して、基質の減少を定量することによりCPase活性を測定した。この反応測定条件で1 nmolのZ-Glu-Tyrを分解する酵素量を1 uとし、比活性はu/ μ gタンパク質で表示した。タンパク質の定量は、DCプロテインアッセイ (Lowry法、バイオラッド) を用い、牛血清アルブミン (Sigma) を標準タンパク質として行った。

エンドペプチダーゼ活性は、1.5 mL容キャップ付チューブに、3%アズカゼイン (Sigma) 50 μ L、CPase (2 mg/mL) 10 μ L、100 mmol/Lクエン酸緩衝液 (pH 4.5) 100 μ L、ジメチルスルフォキシド (DMSO) 10 μ L、阻害剤を添加混合し (反応液量200 μ L)、37°Cで1時間反応後、20%トリクロロ酢酸50 μ Lを添加・混合して、その遠心 (12,000 rpm、5 m) 上清の吸光度 (OD₃₆₆) を測定した。

(2) 小麦グリアジンおよびLMWグルテニンの分解

小麦のグリアジンとLMWグルテニンは、Sandifordの方法⁵⁾を基に、「ゆきちから」全粒粉の70%エタノール抽出

物を遠心濃縮で乾固させた後、10%DMSOに再溶解したものをを用いた。

1.5 mL容キャップ付チューブに50 mmol/Lのクエン酸緩衝液 (pH 4.5)、グリアジン・LMWグルテニン混合物20 μ g、および小麦CPase 20 μ gを加え (反応液量0.1 mL)、37°Cで16時間反応させた。反応液10 μ Lを、アクリルアミド (10~20%) グラジエントゲル (オリエンタルインスツルメンツ) で電気泳動し、タンパク質のバンドは2D銀染色試薬 (コスモバイオ) により検出した。

イムノプロットでは、セミドライ転写装置 (アトー、AE-6678) を用いて、ゲル中のタンパク質をPVDF膜へ転写させた後、1次抗体に抗小麦グリアジン抗体 (Sigma)、2次抗体にペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG (GEヘルスケアバイオサイエンス)、発光基質にSuperSignal West Femto (PIERCE) を用い、クールセーバー (アトー、AE-6955) で発光バンドを検出した。

(3) エピトープペプチドの分解

小麦グリアジンおよびLMWグルテニンのエピトープを含む5~8 merの合成オリゴペプチド (Invitrogen) を基質に用いた。1.5 mL容キャップ付チューブに、クエン酸ナトリウム緩衝液 (50 mmol/L, pH 4.5) 80 μ L、オリゴペプチド (10 mmol/L) 10 μ LとCPase (1 mg/mL) 10 μ Lを混合して37°Cで16時間反応させた後、0.4%ギ酸100 μ Lを添加して、全量をHPLC (カラム: 和光純薬5C4-200、溶媒: アセトニトリル0 \rightarrow 50%+0.2%ギ酸、吸収波長: 214 nm) に供することにより、基質ペプチドの残量を定量した。

3 試験結果及び考察

(1) 市販小麦CPaseの特性

市販小麦CPaseのZ-Glu-Tyr分解活性は6.4 u/ μ gであった。なお、小麦種子にはCPaseの他に、アスパラギン酸プロテアーゼも含まれることが報告されている⁴⁾。市販小麦CPaseの精製度が低く (図③、約60 kDaのバンドがCPase)、またエンドペプチダーゼ活性が認められ、しかもアスパラギン酸プロテアーゼの特異的阻害剤であるペプスタチンAによって49%阻害されたことから、市販小麦CPaseはアスパラギン酸プロテアーゼを含む可能性がある。

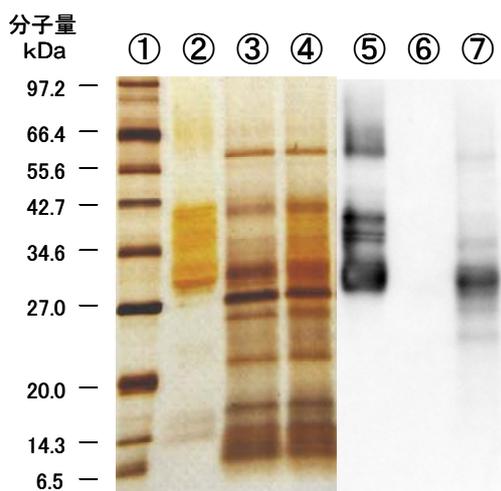


図 小麦CPaseによるグリアジンとLMWグルテニンの分解

①～④：銀染色、⑤～⑦：イムノブロット、①：タンパク質マーカー、②⑤：グリアジン+LMWグルテニン、③⑥：小麦CPase、④⑦：②+③反応

(2) CPaseによるグリアジンとLMWグルテニンの分解

小麦種子の70%エタノール抽出タンパク質は、分子量が30～42 kDaと60～70 kDaの範囲に認められ（図②）、いずれも抗グリアジン抗体に結合した（図⑤）。この70%エタノール抽出タンパク質と小麦CPaseを反応させると、銀染色では判然としなかったが（図④）、イムノブロットでは30～32 kDaのタンパク質が半量程度残留した以外は、他のタンパク質はほとんど分解された（図⑦）。なお、小麦CPaseと抗グリアジン抗体の結合は認められなかった（図⑥）。

Sandifordら⁵⁾は、小麦種子70%エタノール抽出物のうち、分子量約30～45kDaが α 、 β 、 γ -グリアジンおよびLMWグルテニン、約45～65 kDaが ω -グリアジンと報告している。Dunaevskyら⁴⁾は、小麦CPaseが小麦グリアジンを少し分解することを報告しているが、その分解パターンは示していなかった。また、小麦CPaseによってLMWグルテニンも分解されることが示唆された。

(3) CPaseによるエピトープペプチドの分解

小麦のグリアジンエピトープ (PQQPF、QQPFP)¹⁾およびLMWグルテニンエピトープ (QQQPP)²⁾を含む5～8 merの合成ペプチドに小麦CPaseを作用させた結果、表に示すとおり、グリアジンエピトープのみの5 merペプチドはある程度（19%、31%）分解されたが、ペプチドのC末端が「PQ」のペプチドはほとんど分解されなかった。一方、LMWグルテニンのエピトープのみの5 merペプチド (QQQPP) がまったく分解されなかったのに対し、エピトープの両端にアミノ酸が1～2残基結合したペプチドやエピトープとエピトープの間の配列 (QFPFQS) を含むペプチドではある程度分解された（表）ことから、エピトープの外側のアミノ結合は切断されやすいが、エピト

表 CPaseによるエピトープペプチドの分解

由来	ペプチド	残量 %
グリアジン	PQQPFP	60
	PQQPF	81
	QQPFPQ	98
	QQPFP	69
	QFPFQ	100
LMWグルテニン	SQQQQPFP	83
	SQQQPPF	71
	QQQPP	100
	QPPFS	46
	QPPFSQ	75

ープ内部は切断され難いと考えられる。

一般に、アレルギータンパク質が部分分解されても、エピトープが分解されていなければ、IgEを介したアレルギーとマスト細胞の結合、およびそれに伴うマスト細胞からのヒスタミンなどの脱顆粒は抑制されないため、アレルギー反応性が低下し難いと考えられている。小麦CPaseはグリアジンエピトープをある程度分解したが、LMWグルテニンエピトープは分解しなかったことから、今後は、発芽小麦に含まれるセリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼとの相乗分解効果について、さらに検討する必要がある。

4 ま と め

小麦種子CPaseは、アトピー症状を引き起こす小麦アレルギータンパク質のグリアジンとLMWグルテニンを分解し、グリアジンのエピトープペプチドも分解したが、LMWグルテニンのエピトープペプチドは分解しなかった。

引 用 文 献

- 1) Tanabe et al. 1996. Biochem. Biophys. Res. Commun., 219: 290-293.
- 2) Tanabe 2004. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 50: 367-370.
- 3) Umetsu et al. 1981. Food Chem., 7: 125-138.
- 4) Dunaevsky et al. 1989. J. Exp. Botany, 40: 1323-1330.
- 5) Sandiford et al. 1997. Clin. Exp. Allergy, 27: 1120-1129.