未発芽小麦種子由来ペプチダーゼによる 小麦グリアジンエピトープの分解

老 田 茂[§]

(独)農研機構・東北農業研究センター

Degradation of Wheat Gliadin Epitopes by Peptidase
from Dormant Wheat Seeds (*Triticum aestivum*)

Shigeru Oita[§]

National Agricultural Research Centre for Tohoku
Region, NARO, Shimokuriyagawa, Morioka 020-0198

A peptidase that hydrolyzes benzyloxycarbonyl(Z)-Gly-Gly-Arg-4-methylcoumaryl-7-amide (MCA) was purified from dormant wheat seeds (*Triticum aestivum*). The activity of the peptidase was optimum at pH 7.5 and was inhibited by serine protease inhibitors. The peptidase degraded wheat gliadin epitopes, PQQPF and QQPFP, which were recognized in sera from patients with atopic dermatitis. In contrast, the wheat glutenin epitope, QQQPP, was not degraded by the peptidase.

(Received Sep. 8, 2008 ; Accepted Mar. 18, 2009)

Keywords : *Triticum aestivum*, peptidase, gliadin, epitope degradation, atopic dermatitis

キーワード : コムギ, ペプチダーゼ, グリアジン, エピトープ分解, アトピー性皮膚炎

小麦アレルギーはアトピー性皮膚炎や喘息等の症状を呈し¹⁾, アレルゲンタンパク質として, グリアジンやグルテニンなどが報告されている¹⁾²⁾. 小麦アレルギー回避法の一つとして, 小麦粉を微生物由来のプロテアーゼで前処理することにより, アレルゲンを分解してから食品加工する方法が考案されている¹⁾. また, 発芽小麦種子由来のシステインプロテアーゼは, グリアジンやグルテニンを分解し³⁾⁴⁾, 未発芽小麦種子由来のアスパラギン酸プロテアーゼやカルボキシペプチダーゼも, これらのタンパク質を僅かに分解することが報告されている^{5)~7)}.

一方, 小麦によるアトピー性皮膚炎に関連する免疫グロブリン (Ig) E のエピトープが, グリアジンでは QQPFP と PQQPF²⁾, グルテニンでは QQQPP⁸⁾ であることが, いずれも Tanabe らによって見出されている. しかし, これらエピトープの酵素による分解は, 未だに報告されていない. また, 未発芽小麦種子から, 既報⁷⁾ のカルボキシペプチダーゼとは異なるペプチダーゼ活性が認められたため, その酵素を精製して, 特性を明らかにするとともに, これらエ

ピトープに対する分解性を明らかにしたので, 報告する.

1. 実験方法

ペプチダーゼ活性は, 基質 4-methylcoumaryl-7-amide (MCA) を結合した蛍光ペプチドを用い, 遊離した MCA の蛍光強度により測定した. Benzyloxycarbonyl(Z)-Gly (G)-G-Arg (R)-MCA は Sigma 製を用い, 他の蛍光ペプチド基質はペプチド研究所製を用いた. 96 穴ブラックマイクロプレートに, 0.1 mmol/L の蛍光ペプチド基質と 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) を含む 50 mmol/L のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5, 以後単にトリス塩酸緩衝液) 40 μ L に, ペプチダーゼ 5 μ L (0.5 μ g) および 10 倍濃度の阻害剤 5 μ L を添加・混合し, 37°C で 1 時間反応させた後, 蛍光マイクロプレートリーダーを用いて測定した (励起波長: 340 nm, 蛍光波長: 460 nm). この条件で 1 μ mole の MCA が遊離する酵素量を 1 U とし, 比活性は U/mg タンパク質で表示した. なお, 基質特異性では, Z-G-G-R-MCA に対する相対活性で表示し, 阻害剤効果では, 無添加に対する相対活性で表示した. タンパク質の定量は, DC プロテインアッセイ (Lowry 法, BioRad) 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.

小麦「ゆきちから」全粒粉 10 g をトリス塩酸緩衝液に懸濁し, 4°C で 2 時間抽出後, 遠心上清を脱塩用カラム PD-10 (GE ヘルスケアバイオサイエンス) にかけて, 低分子物質を除去した. 次に, イオン交換 (トヨパール DEAE-650, 東ソー, NaCl 濃度 0→0.2 mol/L), およびゲルろ過 (Superdex 200HR, GE ヘルスケアバイオサイエンス) カラムクロマトグラフィーにより, ペプチダーゼを精製した. 比較用の小麦カルボキシペプチダーゼは, 和光純薬製を用いた.

グリアジンと低分子量 (LMW) グルテニンの酵素分解の有無は, 酵素反応試料のドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により判定した. グリアジンと LMW グルテニン混合物は, 小麦「ゆきちから」全粒粉の 70% エタノール抽出物⁹⁾ 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 容キャップ付低吸着性チューブに, トリス塩酸緩衝液, 10 μ g のグリアジン・LMW グルテニン混合物, および 1 μ g のペプチダーゼを加え (反応液量 50 μ L), 37°C で 16 時間反応させた後, うち 10 μ L を用いて SDS-PAGE と銀染色を前報¹⁰⁾ と同様に行った.

エピトープペプチドの分解は, トリス塩酸緩衝液, 20 μ g の合成エピトープペプチド, 2 μ g のペプチダーゼを含む反応液 (液量 50 μ L) を, 37°C で 16 時間反応により行った. 反応液の 10 μ L を高速液体クロマトグラフィー (HPLC, カラム: 和光 5C4-200, 溶媒: アセトニトリル 5→20% + 0.2% ギ酸, 吸収波長: 214 nm) で分析し, 基質ペプチドの残量から, 分解率を算出した.

2. 実験結果および考察

小麦種子の粗酵素液から, 各種カラムクロマトグラ

〒020-0198 盛岡市下厨川字赤平 4

[§] 連絡先 (Corresponding author), oita@affrc.go.jp

Fig. 1 SDS-PAGE of reaction mixture containing wheat gliadins, LMW glutenin and peptidase

a, gliadins and LMW glutenin (2 μg); b, incubated (16 h at 37°C) mixture of a+c; c, purified peptidase (0.2 μg). Proteins were detected by silver-staining.

Table 1 Peptidase purification from wheat seeds

Purification step	Protein (mg)	Activity	
		(U)	(U/mg)
Extract	200	23.84	0.12
PD-10	114	15.87	0.14
Toyopearl DEAE	5.6	6.91	1.23
Superdex 200HR	0.3	0.79	3.16

Proteins were extracted from 10 g of whole seed powder. One unit (U) was defined as release of 1 μmole of MCA from Z-G-G-R-MCA after 1 h of incubation at 37°C.

フィーにより、Z-G-G-R-MCA 分解比活性が 26 倍に高まり (Table 1), SDS-PAGE では、約 66 kDa の位置に、ほぼ単一のバンドが認められた (Fig. 1c). 本酵素は、セリンプロテアーゼの一種であるトリプシン用の基質¹¹⁾である Z-G-G-R-MCA の他に、Z-G-Pro(P)-R-MCA や Z-R-R-MCA も分解したが、システインプロテアーゼの基質である Z-Phe (F)-R-MCA⁴⁾や、アスパラギン酸プロテアーゼの基質である Z-Ala (A)-A-Asn (N)-MCA⁴⁾はほとんど分解せず、R-MCA や F-MCA に対する活性も低かった (Table 2). また、Z-G-G-R-MCA 分解活性の至適 pH は 7.0~7.5 で、至適反応温度は 40°C であった。一方、既報の小麦カルボキシペプチダーゼは、Z-G-G-R-MCA をまったく分解せず、反応至適 pH も 4.0⁷⁾と低いことから、今回精製したペプチダーゼとは明らかに異なる。なお、本酵素の N-端アミノ酸配列は解読できなかった。

各種プロテアーゼ阻害剤のうち、セリンプロテアーゼ阻害剤の 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride (AEBSF) で強く阻害されたが、phenyl methane sulfonyl fluoride (PMSF) による阻害は比較的弱かった。また、システイン

Table 2 Substrate specificity of peptidase

Substrate	Relative Activity (%)
Z-G-G-R-MCA	100
Z-G-P-R-MCA	89.0
Z-R-R-MCA	20.4
Z-F-R-MCA	3.1
Z-A-A-N-MCA	0.2
R-MCA	5.9
F-MCA	5.2

The activity is displayed relative to that measured with Z-G-G-R-MCA.

Table 3 Effect of inhibitors on peptidase activity

Inhibitor	mmol/L	Relative activity (%)
None		100
AEBSF	0.1	30.4
	0.5	0.4
PMSF	2	73.4
E-64	0.01	110
EDTA	2	107
Pepstatin A	0.025	96.5

The activity is measured with Z-G-G-R-MCA and displayed relative to that measured without inhibitors.

プロテアーゼ阻害剤の *trans*-epoxysuccinyl-Leu-cylamide (4-guanidinobutane) (E-64), アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤の pepstatin A, および金属プロテアーゼ阻害剤の ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) では、いずれもほとんど阻害されなかった (Table 3).

本ペプチダーゼは、小麦グリアジンや LMW グルテニンそのものはほとんど分解しなかったが (Fig. 1b), アトピー性皮膚炎に関わるグリアジンのエピトープとして、Tanabe²⁾によって報告されている PQQPF や QQPFP, およびこれらがオーバーラップした PQQPFP を、いずれも 73~74% 分解した。PQQPF の分解では、QQPF と同じ溶出時間に大きな副生ピークが認められ、また PQQPFP の分解では、QQPFP と同じ溶出時間に大きな副生ピークが認められたため (Fig. 2), P↓QQPFP の箇所が比較的切断しやすいと考えられた。一方、グルテニンのエピトープとして報告されている QQQPP⁸⁾は、同条件でまったく分解されなかった。

小麦の発芽により誘導合成されるシステインプロテアーゼは、グリアジンやグルテニンを分解することから³⁾⁴⁾, それらの酵素を組合せた場合のエピトープ分解パターンを、鎖長の長いペプチドを用いて今後解析する必要がある。

3. 要 約

未発芽小麦種子から、Z-G-G-R-MCA 分解活性を指標に精製したペプチダーゼは、反応至適 pH が 7.5 で、セリンプロテアーゼ阻害剤で阻害された。本ペプチダーゼは、アトピー性皮膚炎に関わる小麦グリアジンの IgE エピトープ

Fig. 2 Degradation of gliadin epitope peptides by wheat peptidase

The reaction mixtures were analyzed by HPLC. A, peptide standards (4 μg); B, reaction mixtures of peptides and the peptidase (0.4 μg) after 16 h at 37°C.

プである PQQPF や QQPFP を分解したが、小麦グルテニンのエピトープである QQQPP は分解しなかった。

文 献

- 1) 田辺創一, 渡辺 純, 園山 慶, 渡辺道子, 難治性の小麦アレルギーに挑む, 化学と生物, **39**, 440-447 (2001).
- 2) Tanabe, S., IgE-binding abilities of pentapeptides, QQPFP and PQQPF, in wheat gliadin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **50**, 367-370 (2004).
- 3) Bottari, A., Capocchi, A., Fontanini, D. and Galleschi, L.,

Major proteinase hydrolyzing gliadin during wheat germination. *Phytochemistry*, **43**, 39-44 (1996).

- 4) Sutoh, K., Kato, H. and Minamikawa, T., Identification and possible roles of three types of endopeptidase from germinated wheat seeds. *J. Biochem.*, **126**, 700-707 (1999).
 - 5) Kawamura, Y. and Yonezawa, D., Wheat flour proteases and their action on gluten proteins in dilute acetic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 767-773 (1982).
 - 6) Belozersky, M.A., Sarbakanova, S.H. and Dunaevsky, Y.E., Aspartic proteinase from wheat seeds: isolation, properties and action on gliadin. *Planta*, **177**, 321-326 (1989).
 - 7) Dunaevsky, Y.E., Sarbakanova, S.T. and Belozersky, M.A., Wheat seed carboxypeptidase and joint action on gliadin of proteases from dry and germinating seeds. *J. Exp. Botany*, **40**, 1323-1329 (1989).
 - 8) Tanabe, S., Arai, S., Yanagihara, Y., Mita, H., Takahashi, K. and Watanabe, M., A major wheat allergen has a Gln-Gln-Gln-Pro-Pro motif identified as an IgE-binding epitope. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**, 290-293 (1996).
 - 9) Sandiford, C.P., Tatham, A.S., Fido, R., Welch, J.A., Jones, M.G., Tee, R.D., Shewry, P.R. and Newman Taylor A.J., Identification of the major water/salt insoluble wheat proteins involved in cereal hypersensitivity. *Clin. Exp. Allergy*, **27**, 1120-1129 (1997).
 - 10) 老田 茂, 横田 聡, コムギ nonspecific lipid transfer protein 1 抗ペプチド抗体の特性, 食科工, **55**, 137-142 (2008).
 - 11) Mancinelli, L., Panara, F., Rutili, D., Maras, B. and Gianfranceschi, G.L., The CM2 and CM3 types of α-amylase inhibitor are associated with *Triticum aestivum* seed chromatin. *Plant Physiol. Biochem.*, **41**, 705-710 (2003).
- (平成 20 年 9 月 8 日受付, 平成 21 年 3 月 18 日受理)