小麦の単量体・二量体 α -アミラーゼ インヒビターの微生物プロテアーゼ による分解

老 田 茂[§]

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・
東北農業研究センター

Degradation of Monomeric and Dimeric α -amylase
Inhibitors of Wheat by Microbial Proteases

Shigeru Oita[§]

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

A 13-mer peptide including AVL RDC, which was one of the epitopes of monomeric and dimeric α -amylase inhibitors (AI) of wheat was designed for the antigen. The antibody to the peptide indicated high specificity to these wheat α -AIs. It was confirmed that the wheat monomeric and dimeric α -AIs and the α -AI epitopes were degraded by proteases derived from *Bacillus licheniformis* and *Streptomyces griseus* using the antibody.

(Received Jun. 16, 2010 ; Accepted Jul. 27, 2010)

Keywords: *Triticum aestivum*, amylase inhibitor, protease, epitope, antibody

キーワード: コムギ, アミラーゼインヒビター, プロテアーゼ, エピトープ, 抗体

小麦アレルギーは、深刻な食品および吸入アレルギーの一つであり、小麦のアレルゲンタンパク質として、これまでにグリアジンやグルテニン、 α -アミラーゼインヒビター(AI)等が知られている^{1)~4)}。小麦粉を微生物や植物由来のプロテアーゼで処理すると、様々な小麦タンパク質が分解され、小麦アレルギー患者血清に対する免疫反応も低下することが報告されている⁵⁾⁶⁾。しかし、部分分解物の生成により、電気泳動ゲル上で、 α -AI位置のバンドが逆に濃くなるため⁵⁾⁶⁾、 α -AI分解の有無はこれまで不明であった。

小麦 α -AIには、分子量が約13~15 kDaの配列が異なるサブユニットでそれぞれ構成される単量体(0.28型)、二量体(0.19型、0.53型など)、および四量体(CM1~3, CM16, CM17型など)が知られている¹⁾⁷⁾⁸⁾。単量体と二量体を構成するサブユニット間、CM1~3を構成するサブユニット間、およびCM16とCM17を構成するサブユニット間で、相同配列が比較的多い⁸⁾⁹⁾。また、これらの小麦 α -AIは、いずれもアレルゲンとして報告されている¹⁾²⁾¹⁰⁾。

小麦種子抽出物に含まれる α -AIの量を見積もるには、抗体を用いる方法がある。これまでに、0.53型二量体小麦 α -AIに対するモノクローナル抗体は報告されていたが、その単量体および0.19型二量体の小麦 α -AIに対する結合性は示されていない¹¹⁾。

一般に、アレルギー反応に関わるヒトの免疫グロブリンEは、アレルゲンタンパク質のうち、特定のアミノ酸配列部分(エピトープ)に結合することが知られている。そこで、単量体および二量体の小麦 α -AIのエピトープに対する抗ペプチド抗体を作製し、それを用いて、微生物プロテアーゼによる小麦 α -AI、およびそのエピトープの分解を明らかにしたので、報告する。

1. 実験方法

小麦単量体 α -AIのパン屋喘息に関係するエピトープの一つがAVLRDC(37~42番アミノ酸)と報告されており¹⁰⁾、しかもこの配列が二量体 α -AIに共通であることから⁸⁾、このエピトープを含む13merペプチドNGSQVPEAVLRDC(Table 1)を合成し、それを抗原とする抗ペプチド抗体を作製した。合成ペプチドとキャリアタンパク質の二枚貝ヘモシアニン(MBS法¹²⁾)で結合後、ウサギ1頭に6回に分けて注射し、初回注射から42日後に全採血したものをプロテイン-AカラムでIgGを精製した。抗原ペプチドの合成から抗体生成は、スクラム社により行われた。

酵素免疫測定法(ELISA)は、96穴イムノプレート各ウェルへの試料の添加量を50 μ Lとし、抗 α -AI抗体を200倍希釈で用い、発色反応にTMBキットHYPER(ナカライテスク)を用いた以外は、前報¹³⁾と同様に行った。合成ペプチドのAVLRDC(インビトロジェン)は、純度90%以上のものを用いた。

小麦二量体 α -AI画分の調製は、Sanchez-Mongeらの方法⁸⁾を参考に、以下のとおりに行った。前述の小麦全粒粉の抽出上清に50%飽和硫酸を加えて、室温に1時間静置後の遠心(10 000 $\times$ g, 5分間)沈殿物を、0.1 mol/L酢酸アンモニウムに溶解し、脱塩カラムPD-10(GEヘルスケアバイオサイエンス)で脱塩した。タンパク質画分を、セントリプレッスYM-10(日本ミリポア社、限外分子量10 kDa)により濃縮後、ゲルろ過カラムSuperdex 200HR(GEヘルスケアバイオサイエンス)で分画し、二量体の α -AIに相当する分子量の画分を回収した。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)を用いて行った。

小麦「ゆきちから」全粒粉の0.5 mol/L NaCl抽出(4 $^{\circ}$ C, 1時間)液の遠心(10 000 $\times$ g, 5分間)上清を用いて、イムノブロッティングを行った。ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)は、銀染色キットをコスモバイオ製に変更し、分子量マーカーにSeeBlue Plus2 Pre-stained standard(インビトロジェン)を用いた以外は、前報¹³⁾と同様に行った。イムノブロッティングは、ブロッキング反応に

〒020-0198 岩手県盛岡市下厨川字赤平4

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

Table 1 Alignment of amino acid sequence among wheat α -AIs⁸⁾⁹⁾

Amino acid No. Type		30 ↓	42 ↓
0.28	Monomeric	V G S Q V P E A V L R D C	
0.19	Dimeric	N * * * * * * * * * *	
0.53	Dimeric	N * * * * * * * * * *	
CM3	Tetrameric	G T F T P G S K L P E W M	
CM16	Tetrameric	R I E T P G S P Y * A K Q	

* : same amino acids as monomeric α -AI.

Amino acid numbers are based on the monomeric 0.28 type.

EzBlock (アトール)を用いた以外は、前報¹³⁾と同様に行い、化学発光により検出した。

小麦粉中の単量体・二量体 α -AI の分解確認は、「ゆきちから」市販小麦粉 0.1 g に、1 mg/mL の微生物由来プロテアーゼを含む 50 mmol/L トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) を 1 mL 混合し、37°C で 1 時間反応後の遠心上清各 2 μ L ずつを用い、イムノブロットングにより行った。微生物由来プロテアーゼは、細菌 *Bacillus licheniformis* 由来 (Sigma P4860)、放線菌 *Streptomyces griseus* 由来 (Sigma P5147)、糸状菌 *Aspergillus oryzae* 由来 (Sigma P6110) を用いた。単量体・二量体 α -AI のエピトープの分解は、前述のプロテアーゼ反応液を 95°C で 5 分間処理後、40 倍希釈してから、ELISA により確認した。

2. 実験結果および考察

小麦単量体および二量体の α -AI エピトープ抗体の作製では、ウサギ 1 頭の全血から、Protein-A カラム精製した IgG が 3.88 mg/mL 濃度で 47 mL 得られた。小麦二量体 α -AI 画分、およびそのエピトープペプチド AVL RDC をイムノプレートに固定化して ELISA を行った結果、本抗体と二量体 α -AI やエピトープとの結合が確認された (Table 2)。なお、抗原に用いた 13 mer ペプチドについて、単量体では N 末端の 30 番アミノ酸が N ではなく V であるが (Table 1)、エピトープの AVL RDC は共通配列であるため、本抗体は単量体の α -AI にも結合すると考えられる。なお、各種四量体 α -AI の全配列中に、抗原ペプチドと相同な配列も認められないことから⁹⁾、本抗体は四量体 α -AI には結合しないと考えられる。

本抗体と小麦全粒抽出物を用いて、イムノブロットングを行った結果、約 13 kDa の位置にバンドが 2 本認められた (Fig. 1)。Gómez らの報告¹⁾ から、2 本のバンドのうち、やや高分子のバンドが二量体 α -AI、やや低分子のバンドが単量体 α -AI と推定された。また、小麦全粒粉から食塩水で抽出される他のタンパク質は、本抗体とほとんど結合しなかったことから (Fig. 1)、本抗体の高い特異性が確認された。

Table 2 ELISA with antibody to the α -AI epitope

Samples	OD ₄₅₀
Dimeric α -AI, 0.5 μ g/mL	0.138
AVLRDC, 0.1 μ g/mL	0.123
Wheat flour(WF), no protease	0.066
WF+B. <i>licheniformis</i> protease	0.000
WF+A. <i>oryzae</i> protease	0.044
WF+S. <i>griseus</i> protease	0.008

Fig. 1 Specificity of anti-peptide antibody

A, silver-staining ; B, immunoblotting ; a, protein markers ; b, 5 μ g (as protein amount) of 0.5 mol/L NaCl extract of wheat whole grains.

次に、市販小麦粉を各種微生物プロテアーゼで処理した場合に、反応上清に残存する単量体および二量体 α -AI を、イムノブロットングで検出した。銀染色では、プロテアーゼ処理による α -AI の分解は判然としなかったが (Fig. 2 A)、*B. licheniformis* や *S. griseus* 由来のプロテアーゼで処理した場合に、 α -AI やその部分分解物のバンドは認められなかった。また、*A. oryzae* 由来プロテアーゼで処理した場合は、 α -AI の位置に薄いバンドと、低分子側に薄いバンドが 2 本認められた (Fig. 2B)。

さらに、同じプロテアーゼ処理試料と抗体を用いて ELISA を行った結果、*B. licheniformis* プロテアーゼ処理試料では、発色が認められなかったことから (Table 2)、単量体および二量体 α -AI のエピトープが完全に分解されたと考えられた。同様に、*S. griseus* プロテアーゼ処理試料でも、エピトープの残存量は約 1/8 に低下したが、*A. oryzae* プロテアーゼ処理試料では、エピトープは約 2/3 が残存した (Table 2)。

小麦粉を微生物由来のプロテアーゼで処理すると、グルテンが形成され難くなるが⁶⁾、菓子類の製造は可能と報告されている¹⁴⁾。本抗体を用いることにより、単量体および二量体 α -AI が、エピトープレベルで完全に分解された小麦食品の開発が、今後期待される。四量体の小麦 α -AI に対

Fig. 2 Degradation of wheat flour proteins by microbial proteases

A, silver-staining ; B, immunoblotting ; 1, no protease ; 2-5, treatment with proteases ; 2, *B. licheniformis* protease ; 3, *A. oryzae* protease ; 4, *S. griseus* protease.

する抗体についても、今後検討を進める。

3. 要 約

小麦単量体および二量体 α -AIのエピトープの一つであるAVLRDCを含む13-merのペプチドを合成し、それを抗原とする抗ペプチド抗体を作製した。本抗体は、小麦単量体および二量体 α -AIに対し、高い特異性を有した。小麦単量体・二量体 α -AI、およびそれらのエピトープが、細菌*B. licheniformis*や放線菌*S. griseus*由来プロテアーゼによって分解されることが、イムノブロットングとELISAで確認された。

文 献

- Gómez, L., Martín, E., Hernández, D., Sánchez-Monge, R., Barber, D., del Poso, V., de Andrés, B., Armentia, A., Lahoz, C., Salcedo, G. and Palomino, P., Members of the α -amylase inhibitors family from wheat endosperm are major allergens associated with baker's asthma. *FEBS Lett.*, **261**, 85-88 (1990).
- Armentia, A., Sánchez-Monge, R., Gómez, L., Barber, D. and Salcedo, G., *In vivo* allergenic activities of eleven purified members of a major allergen family from wheat and barley flour. *Clin. Exp. Allergy*, **23**, 410-415 (1993).
- 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).
- Palosuo, K., Update on wheat hypersensitivity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **3**, 205-209 (2003).
- Watanabe, M., Suzuki, T., Ikezawa, Z. and Arai, S., Controlled enzymatic treatment of wheat proteins for production of hypoallergenic flour. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 388-390 (1994).
- Tanabe, S., Arai, S. and Watanabe, M., Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1269-1272 (1996).
- Sánchez-Monge, R., Barber, D., Mendez, E., García-Olmedo, F. and Salcedo, G., Genes encoding α -amylase inhibitors are located in the short arms of chromosomes 3B, 3D and 6D of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **72**, 108-113 (1986).
- Sánchez-Monge, R., Gomez, L., García-Olmedo, F. and Salcedo, G., New dimeric inhibitor of heterologous α -amylase inhibitor by a duplicated gene in the short arm of chromosome 3B of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Eur. J. Biochem.*, **183**, 37-40 (1989).
- Medina, J., Hueros, G. and Carbonero, P., Cloning of cDNA, expression, and chromosomal location of genes encoding the three types of subunits of the barley tetrameric inhibitor of insect α -amylase. *Plant Mol. Biol.*, **23**, 535-542 (1993).
- Walsh, B.J. and Howden, M.E.H., A method for the detection of IgE binding sequences of allergens based on a modification of epitope mapping. *J. Immunol. Methods*, **121**, 275-280 (1989).
- 前田幸次, α -アミラーゼ阻害物質に対するモノクローナル抗体, 特公平5-32034 (1993).
- Liu, F., Zinnecker, M. and Katz, D.H., New procedures for preparation and isolation of conjugates of proteins and a synthetic copolymer of D-amino acids and immunochemical characterization of such conjugates. *Biochemistry*, **18**, 690-697 (1979).
- 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).
- Watanabe, M., Watanabe, J., Sonoyama, K. and Tanabe, S., Novel method for production hypoallergenic wheat flour by enzymatic fragmentation of the constituent allergens and its application to food processing. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 2663-2667 (2000).

(平成22年6月16日受付, 平成22年7月27日受理)