

発芽小麦プロテアーゼによる小麦プロテアーゼインヒビター分解の有無

老田 茂

(東北農業研究センター)

Catalysis of wheat amylase inhibitors by proteases from germinated wheat

Shigeru OITA

(National Agriculture 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。小麦アレルギータンパク質として、これまでにアミラーゼインヒビター(AI)やグリアジン等が報告されている¹⁾。一方、小麦は発芽するとシステインプロテアーゼが誘導合成され、小麦グリアジンを分解することが報告されている²⁾。そこで、発芽小麦プロテアーゼによる小麦AI分解の有無を明らかにした。

2 試験方法

(1) 発芽小麦プロテアーゼの調製

Dominguezらの方法³⁾を参考に3%次亜塩素酸ナトリウムで殺菌した小麦「ゆきちから」種子50 gを滅菌水に25°Cで4日間浸して発芽させた後、ミキサーで粥状にした。遠心上清を脱塩カラム (GEヘルスケア、PD-10) にかけて低分子物質を除去し、さらにイオン交換 (東ソー、DEAE-トヨパール) および疎水性 (東ソー、ブチルトヨパール650) カラムクロマトグラフィーによりプロテアーゼを濃縮した。

(2) プロテアーゼ活性測定

プロテアーゼ活性測定は、蛍光ペプチド基質のbenzyl oxycarbonyl (Z)-Phe-Arg-4-methylcoumaryl-7-amido (MCA) (ペプチド研究所、3095-V、カテプシンB測定用⁴⁾) およびZ-Gly-Gly-Arg-MCA (Sigma、C9396、トリプシン測定用⁴⁾) の切断により生じるMCAの蛍光測定 (EX:340nm、EM:460nm) により行った。96穴ブラックプレートに5%ジメチルスルホキシド(DMSO)、0.1mmol/Lの蛍光ペプチド基質および1mmol/Lジチオスレイトールを含む50mmol/Lクエン酸緩衝液(pH 4.5、Z-Phe-Arg-MCAの場合)またはトリス塩酸緩衝液(pH 7.5、Z-Gly-Gly-Arg-MCAの場合) 45 μ Lと酵素液5 μ Lを添加・混合し、37°Cで1時間インキュベートした後、蛍光検出器(Berthold、Mithras LB940)で蛍光強度を測定した。この反応測定条件で1 μ molのMCAを生じる酵素量を1uとした。

(3) タンパク質分解試験

基質タンパク質に小麦AI Type I (Sigma A1520)、小麦AI Type III (Sigma A3535)、および対照としてウシ

ヘモグロビン (Sigma H2625) を用いた。1.5 ml容キャップ付チューブに1 mmol/Lジチオスレイトールを含む50 mmol/Lのクエン酸緩衝液(pH 4.5)またはトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)、基質タンパク質5 μ g、および小麦プロテアーゼ濃縮画分12.5 μ gを加え (反応液量0.1 mL)、37°Cで16時間反応させた。プロテアーゼ添加前に小麦AIを熱処理する場合は、95°Cで5分間処理した。反応液10 μ Lを等量のトリスSDS β -MEサンプル処理液 (第一化学薬品) と混合し、95°Cで5分間処理後、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) とSDS-トリス-グリシンバッファー (第一化学薬品) を用い、30mAで電気泳動した。タンパク質のバンドは銀染色試薬 (第一化学薬品) により検出した。

3 試験結果及び考察

(1) 発芽小麦プロテアーゼの濃縮と特性

発芽小麦の水抽出遠心上清から、イオン交換および疎水クロマトグラフィーにより、Z-Phe-Arg-MCA分解活性が14.7倍、Z-Gly-Gly-Arg-MCA分解活性が17.4倍に濃縮された画分を得た(表)。なお、Z-Phe-Arg-MCA分解活性はE-64 (1 μ mol/L) で98%阻害され、Z-Gly-Gly-Arg-MCA分解活性はフェナントロリン (10mmol/L) で73%、フェニルメチルスルフォニルフルオリド (5mmol/L) で31%阻害されたことから、前者は主としてシステインプロテアーゼ活性を示し、後者は金属プロテアーゼとセリンプロテアーゼの活性を示している。

次に、小麦プロテアーゼ濃縮画分とヘモグロビンを反応させたところ、pH 4.5ではヘモグロビンがほとんど分解したが、pH 7.5では分解しなかった (図1)。したがって、ヘモグロビンは小麦システインプロテアーゼによって分解されるが、小麦セリンプロテアーゼや金属プロテアーゼでは分解されないことが示された。

(2) 小麦AIに対する発芽小麦プロテアーゼの作用

2種類の小麦AIに対し、反応pHを変えて発芽小麦プロテアーゼを作用させたが、いずれも分解はほとんど認められなかった (図2)。なお、小麦食品は通常は加熱調理されてから食されるため、小麦AIを熱処理してから同様に小麦プロテアーゼを作用させたが、分解はほとんど認められなかった (図2)。一方、発芽小麦のシステインプロテアーゼとセリンプロテアーゼはそれぞれグルテ

ニンやグリアジンを分解することが報告されており²⁾、今回濃縮した小麦プロテアーゼでもグルテニンやグリアジンを分解することを別途確認している。

されなかった。

4 まとめ

小麦アレルゲンタンパク質の一つとして報告されているアミラーゼインヒビターに対して発芽小麦プロテアーゼを反応させたが、熱処理の有無に関わらずほとんど分解

引用文献

- 1) 田辺ら 2001. 化学と生物 39:440-447
- 2) Sutoh et al. 1999. J. Biochem. 126:700-707
- 3) Dominguez et al. 1995. Physiol. Plant. 95:253-259
- 4) Zimmerman et al. 1978. ProNAS. 75:750-753

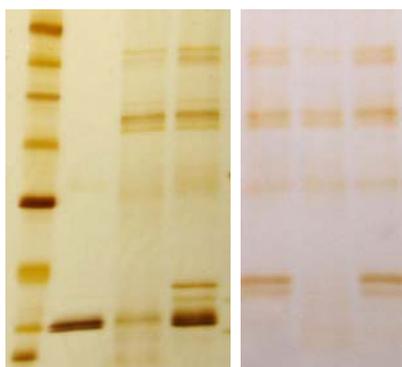
表 発芽小麦プロテアーゼの濃縮

試料	タンパク質 (mg)	Z-Phe-Arg-MCA分解		Z-Gly-Gly-Arg-MCA	
		活性(u)	比活性(u/mg)	活性(u)	比活性(u/mg)
水抽出上清	1,365	715	0.52	1,234	0.9
疎水クロマト画分	1.8	27.0	14.7	32.0	17.4

分子量 (kDa)

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦

66.4 —
55.6 —
42.7 —
34.6 —
27.0 —
20.0 —
14.3 —
6.5 —



←ヘモグロビン

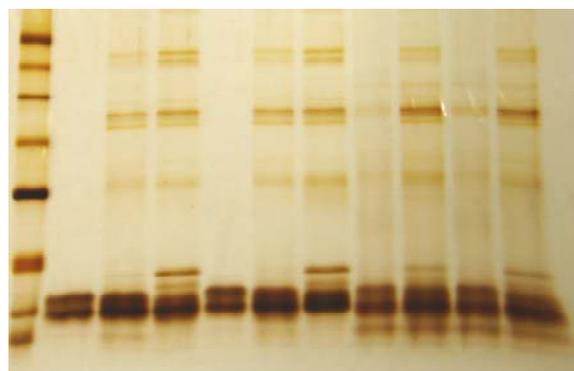
- ① : 分子量マーカー
- ② : ヘモグロビン (HG)のみ (pH 4.5)
- ③ : HG+プロテアーゼ (pH 4.5)
- ④ : HG+プロテアーゼ (pH 7.5)
- ⑤⑥ : プロテアーゼのみ (pH 4.5)
- ⑦ : プロテアーゼのみ (pH 7.5)
- ⑤ : インキュベートなし
- ⑤以外 : 37℃、16時間インキュベート

図1 発芽小麦プロテアーゼによるヘモグロビンの分解

分子量 (kDa)

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪

66.4 —
55.6 —
42.7 —
34.6 —
27.0 —
20.0 —
14.3 —
6.5 —



- ① : 分子量マーカー、② : AI (A3535)
- ③④ : ②+プロテアーゼ、⑤ : 熱処理AI (A3535)
- ⑥⑦ : ⑤+プロテアーゼ、⑧ : AI (A1520)
- ⑨ : ⑧+プロテアーゼ⑩ : 熱処理AI (A1520)
- ⑪ : ⑩+プロテアーゼ
- ②③⑤⑥⑧~⑪ : pH 4.5、④⑦ : pH 7.5
- ②⑤⑧⑩ : インキュベートなし
- ②⑤⑧⑩以外 : 37℃、16時間インキュベート

← AI

図2 発芽小麦プロテアーゼによる小麦AIの分解