

# 微生物プロテア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 Microbial Proteases

Shigeru OITA

(National Agriculture Research Center for Tohoku Region, NARO)

## 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。小麦のアレルゲンタンパク質には、グリアジンやグルテニン、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター(AI)や脂質輸送タンパク質(LTP)などが報告されている。発芽小麦種子のプロテアーゼがグリアジンやグルテニンを分解することは知られているが<sup>1)</sup>、AIやLTPはほとんど分解しなかった<sup>2)</sup>。また、微生物由来プロテアーゼもグリアジンやグルテニンを分解するが、AIやLTPの分解は未だ報告されていない。そこで、食品加工用の微生物由来プロテアーゼによるAIやLTPの分解性を明らかにした。

## 2 試験方法

### (1) 小麦アレルゲンタンパク質の調製

小麦AIの一種であるCM16の精製は、Sanchez-Mongeらの方法<sup>3)</sup>を参考に、小麦種子の0.5 mol/L食塩水抽出物の50%硫酸塩析画分を、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーおよび逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にかけて行った。小麦LTPの精製は、老田と横田の方法により<sup>4)</sup>、小麦種子の水抽出物をイオン交換カラムクロマトグラフィーにかけた後、HPLCにより行った。グリアジン・低分子量(LMW)グルテニン混合物は、Sandifordらの方法<sup>5)</sup>により、小麦種子の食塩水抽出残渣を70%エタノールで抽出して調製した。

### (2) プロテアーゼ活性測定

3%アゾカゼイン(Sigma) 50  $\mu$ L、プロテアーゼ(0.2~2 mg/mL) 2  $\mu$ L、0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液(pH 7.5) 但しP2143の場合はクエン酸緩衝液(pH 4.0)を100  $\mu$ L含む液(200  $\mu$ L)を37°Cで1時間反応させた後、20%トリクロ酢酸50  $\mu$ Lを添加・混合して、その遠心(12,000 rpm、5分)上清の吸光度(波長:366 nm)を測定し、酵素タンパク質1  $\mu$ gあたりの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、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。

### (3) アレルゲンタンパク質の酵素分解

CM16とLTPは0.1 mg/mL、グリアジン・LMWグルテニン

混合物は1 mg/mLを4  $\mu$ Lずつ、プロテアーゼ(0.1または0.5 mg/mL) 4  $\mu$ L、前出の緩衝液10  $\mu$ Lを含む液20  $\mu$ Lを37°Cで16時間反応させた後、半量をポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)に供し、銀染色キット(コスモバイオ)により判定した。微生物プロテアーゼは、すべてSigma製市販品を用いた(表)。

表 供試した微生物プロテアーゼ

Sigma Cat. #	起源	アゾカゼイン分解活性(%)
P5147	<i>Streptomyces griseus</i>	100
P4860	<i>Bacillus licheniformis</i>	27
P5985	<i>Bacillus sp.</i>	18
P1236	<i>Bacillus amyloliquefasiens</i>	16
P6110	<i>Aspergillus oryzae</i>	15
P2143	<i>Aspergillus saitoi</i>	1

## 3 試験結果及び考察

### (1) 微生物プロテアーゼによる小麦AIの分解

小麦AIには、約13 kDaサブユニットの単量体、2量体、4量体があり、4量体にもCM1~3、16、17の5種類が報告されている。アレルゲンとしての報告例が多いCM16の精製品は、等量のプロテアーゼ反応により、P4860やP5985、P2143でほとんど分解され、P6110やP5147でもかなり分解されたが、P1236ではあまり分解されなかった(図1)。

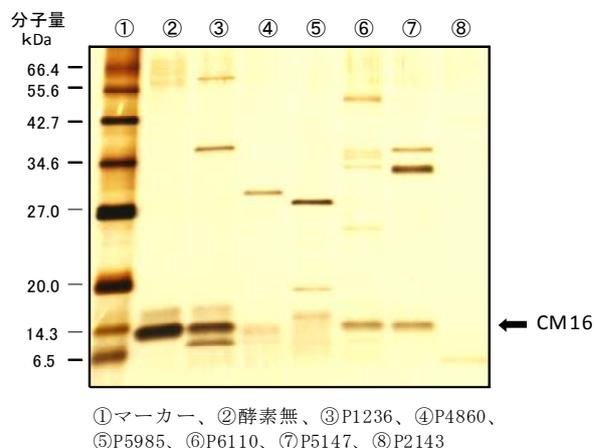
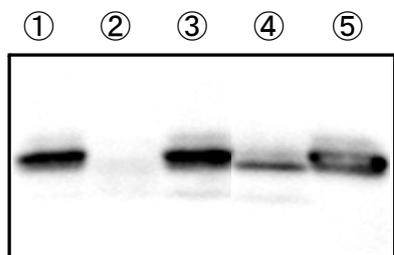


図1. 微生物プロテアーゼによるCM16の分解

※CM16とプロテアーゼの量はいずれも0.2  $\mu$ g

次に、小麦種子タンパク質混合物に微生物プロテアーゼを作用させた結果、CM16はP4860とP5147によって良好に分解されたが、P1236やP6110ではあまり分解されなかった（図2）。



①P1236、②P4860、③P6110、④P5147  
⑤酵素無、①～③1  $\mu\text{g}$ 、④0.1  $\mu\text{g}$

図2. プロテアーゼ処理した小麦タンパク質のウエスタンブロッティング ※抗CM16抗体使用

#### (2) 微生物プロテアーゼによる小麦LTPの分解

小麦アレルゲンとして報告されているLTP（約9kDa）は、等量のプロテアーゼ反応により、P4860やP5147で少し分解されたが、他のプロテアーゼではほとんど分解しなかったため、プロテアーゼ量を5倍にした結果、P4860やP5985、P5147でほとんど分解された（図3）。

小麦アレルギー患者が反応する小麦アレルゲンタンパク質は患者により異なり、グリアジンやグルテニンには反応しないが、AIやLTPに反応する患者の場合は、AIやLTPを選択的に分解した小麦食品を提供することで、

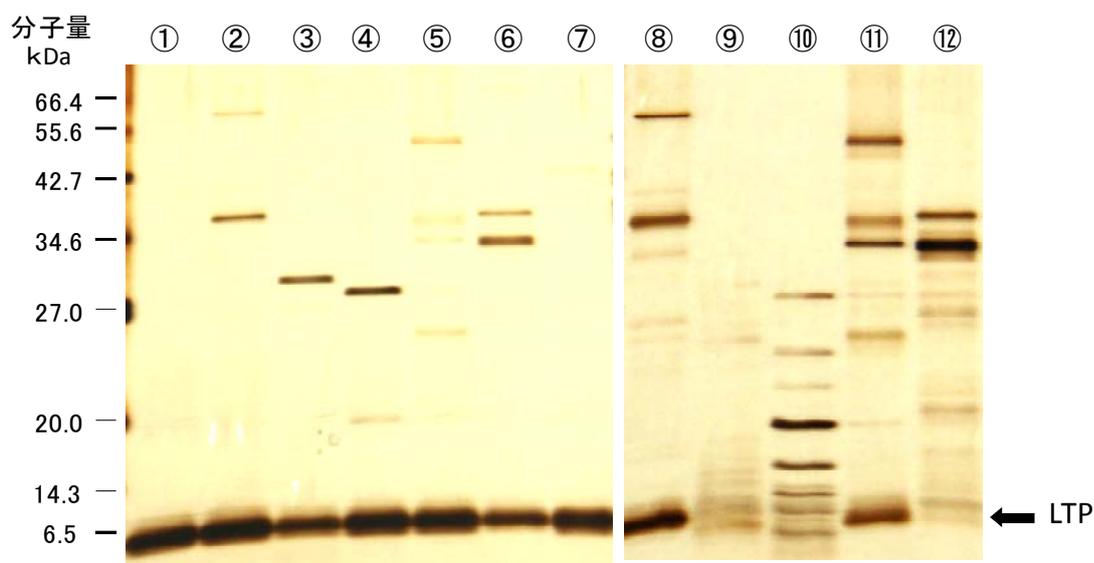
小麦アレルギーの発症回避が可能である。また、AIやLTPとパン・麺特性の関係はこれまで報告がないことから、AIやLTPが分解されても、グリアジンやグルテニンが分解されていないければ、パン・麺の品質に悪影響は及ぼさないと考えられる。今回の各種微生物プロテアーゼによる反応では、AIやLTPの分解は認められたが、グリアジンやグルテニンも同等以上分解されるため、微生物由来プロテアーゼ処理により、パン・麺の品質に影響を与えずに、AIやLTPを分解するのは難しいと思われる。

#### 4 まとめ

微生物*Bacillus licheniformis* や*Streptomyces griseus*、*Aspergillus oryzae* 由来のプロテアーゼは、小麦アレルゲンタンパク質であるグリアジンや低分子量グルテニンだけでなく、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターや脂質輸送タンパク質も分解した。

#### 引用文献

- 1) Bigiarini et al. 1995. J. Plant physiol., 147, 161-167.
- 2) 老田 2007. 東北農業研究, 60, 229-230.
- 3) Sanchez-Monge et al. 1992. Biochem. J., 281, 401-405.
- 4) 老田、横田 2008. 食科工, 55, 137-142.
- 5) Sandiford et al. 1997. Clin. Exp. Allergy, 27, 1120-1129.



①酵素無、②～⑦酵素量0.2  $\mu\text{g}$ 、⑧～⑫酵素量1  $\mu\text{g}$ 、②⑧P1236、③⑨P4860、④⑩P5985、⑤⑪P6110、⑥⑫P5147、⑦P2143

図3. 微生物プロテアーゼによるLTPの分解

※LTPはいずれも0.2  $\mu\text{g}$