

ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦と その原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析

中村里香, 酒井信夫, 薮島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子[#]

Comprehensive analyses of hydrolyzed wheat protein using shotgun proteomics

Rika Nakamura, Shinobu Sakai, Yuji Haishima, Chie Fukui, Takayoshi Suzuki, Ryosuke Nakamura, Akiko Hachisuka, Reiko Adachi, Reiko Teshima[#]

Hydrolyzed wheat protein (HWP; hydrolyzed gluten) is used in various types of products worldwide. Several cases of wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis following exposure to HWP (Glupearl 19S) in cosmetics have been reported. Glupearl 19S was produced from the gluten after partial hydrolysis with hydrogen chloride, and its allergenicity is larger than that of gluten (Adachi R., *Allergy* 2012;67:1392-9). It is considered that provocation of allergic manifestations is caused by deamidated gluten in food and/or non-food products. Moreover, an increasing number of studies have shown that HWP can induce IgE-mediated hypersensitivity by skin contact and/or food ingestion. However, the essential molecular properties and profiles of HWP are still unknown. In this study, bioinformatic and multivariate analyses using shotgun proteomics have revealed that 27 proteins significantly decreased in Glupearl 19S compared with intact gluten as shown by the ratio of ion signal intensity of tryptic peptides. In contrast, a single protein significantly increased in HWP compared with intact gluten as shown by the ratio of ion signal intensity of tryptic peptides. Furthermore, we have identified six Glupearl 19S-specific peptides using shotgun proteomics, database searches on Mascot Sequence Query, and *de novo* sequencing. The six peptides were identified as the specific markers of Glupearl 19S.

Keywords: hydrolyzed wheat protein, shotgun proteomics, mass spectrometry, deamidation

緒言

近年, 加水分解小麦 (hydrolyzed wheat protein, HWP) を含有する洗顔用石鹸の長期使用において, 小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (Wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis; WDEIA) を発症した事例が数多く報告され, 本邦にて大きな社会問題となっている¹⁻²⁾. このアレルギー病態の特徴は, 当該石鹸の使用前には小麦アレルギーの既往症の無かった人が, 石鹸中に含まれるHWP (グルパール19S[®], Glupearl 19S) によって経皮・経粘膜的に感作され, その後の小麦の摂食

によりWDEIAを発症することにある.

小麦タンパク質の主成分であるグルテンは, 可溶性小麦タンパク質であるグロブリンを水で洗い流した後の残渣に含まれるエタノール可溶性画分に分画される. これを加水分解すると, タンパク質が部分的に切断されて可溶性が増大するため, 起泡性や手触りを良くする目的で, シャンプー等の化粧品・医薬部外品にHWPが使用されている. グルパール19Sは, 小麦グルテンを部分的に酸加水分解して製造された化粧品原料で, 比較的分子量の大きなペプチド断片が残存している¹⁾. 一般的にタンパク質を加水分解, 低分子化することによりその抗原性は減弱すると考えられているが, HWPにおいては, 酸加水分解によってグルテンよりも抗原性が増強することが明らかになっている¹⁻³⁾. 酸加水分解によりグルテンの抗原性が増強する理由としては, 可溶性の増大により生体内に侵入しやすくなっていること, 更に酸によりタンパク質の一次構造に物理化学的変化が生じ, 新たな

[#] To whom correspondence should be addressed:

Reiko Teshima; Division of Novel Foods and Immunochemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1349; Fax: +81-3-3700-7438; E-mail: rteshima@nihs.go.jp

エピトープが生じている可能性等が考えられている。グルテンタンパク質の物理化学的変化としては、セリアック病でグルタミン残基の脱アミド化が抗原性に寄与していることが報告されている⁴⁾。我々は、グルタミン酸残基及びアスパラギン酸残基を特異的に切断する酵素であるV8プロテアーゼを用いて、グルパール19Sのタンパク質に含まれるグルタミン残基及びアスパラギン残基が脱アミド化修飾されていることを明らかにしているが⁵⁾、ペプチドレベルでの研究は未だ行われていない。また我々は、グルテンを原料として酸加水分解を行ったHWPは、30分から1時間程度の部分的な分解によって抗原性が顕著に増強し、更に長時間分解を進めることにより、分子量の減少と共に抗原性が減弱することを明らかにしている⁶⁾。これらの知見から、ある特定の加水分解条件によって生成されたHWPのみが抗原性を有することが示唆されているが、分子量以外に抗原性の指標となるファクターは明らかにされていない。

そこで本研究は、強い抗原性を有するグルパール19Sに特徴的なペプチドの探索を目的とし、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)を用いた網羅的解析を行った。同時に、グルテンとHWPのペプチドプロファイリングを比較するショットガンプロテオミクスにより、酸加水分解によるHWPの一次構造の物理化学的変化を推察した。

実験方法

1. 試料

グルパール19S[®]は、株式会社片山化学工業研究所より入手した。グルテン(Sigma社)及びグルパール19S粉末に乾燥重量で100 mg/mLとなるよう1M Tris [tris(hydroxymethyl) aminomethane, pH 11.4]を加え、終夜室温で静置しストック懸濁液を調製した。また、抗原性が減弱したHWPとして、酸加水分解を24時間行った低分子化HWP(HWP24h)を調製した。酸加水分解は、0.1N塩酸中にグルテンスストック懸濁液を終濃度1 mg/mLとなるよう加え、100°Cのヒートブロック上で所定の時間(0-24h)加熱して行った。その後、経時的に0.1M水酸化ナトリウム水溶液で中和して酸加水分解反応を停止した。グルテン、グルパール19S、及び経時的な酸加水分解により調製した8種HWPのSDS電気泳動パターンをFig. 1に示す。

LC-MSサンプルの調製は、以下に示す方法で行った。グルテン及びグルパール19Sのストック懸濁液に細胞溶解液[7M urea, 2M thiourea, 30 mM Tris, 4% (w/w) CHAPS: pH 8.5]を加えてタンパク質を溶解させた後、2-D Quant Kit (GE Healthcare社)を用いてタンパク質量を定量し、その20 µgをトリプシン消化に供し

た。Dithiothreitolで還元、IodoacetamideでSH基のカルボキシメチル化を行った後、Trypsin Gold, Protease MAX (Promega社)を加えて37°Cで終夜インキュベートした。10% Trifluoroacetic acid (TFA)を終濃度0.5%となるよう加えて酵素反応を停止し、得られたペプチドをバリアン社製OMIX Tip (C18, 100 µL)にて脱塩し、0.1% TFA含有2%アセトニトリルに再溶解した。

2. 装置

・質量分析計

Thermo Scientific社製リニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析計LTQ Orbitrap XL
測定前にTyrosine-1,3,6-Standard (CS Bio Co.)を用いてチューニング及び質量校正を行った。

・Nano-LC

HTC-PALオートサンプラー (CTC Analytics)を装備したADVANCE nano UPLC (AMR)

・トラップカートリッジ

CERI社製L-Trap (0.3×5 mm, L-C18, 5 µm, 12 nm)

・分析用逆相カラム

CERI社製L-column Micro (L-C18, 0.1×150 mm, 3 µm, 12 nm)

LC-MS/MS条件

イオン源にはCaptive Ion Sprayシステムを使用し、試料のイオン化はESI positive ion mode (スプレー電圧1.6 kV)により行った。MSスペクトルはFT analyser (分解能30,000, 測定質量範囲m/z 300-1,400, Lock mass = フタル酸ジエチルヘキシル及びシロキサン, Profile mode)により取得し、XCalibur data dependent modeにより、スキャンにおけるイオン強度の高い3種のピークを順次選択してイオントラップによりMS/MSスペクトルを測定した (CID, Normalized collision energy 35 kV, Activation time 300 ms, Dynamic exclusion duration 60 s, Centroid mode)。測定時間は150分間とし、価数判別機能を利用して1価イオンのMS/MSスペクトルは測定しないように設定した。

Nano-LCの移動相には、A溶媒 (0.1%ギ酸含有2%アセトニトリル)とB溶媒 (100%アセトニトリル)を使用した。流速は300 nL/minとし、サンプル注入 (1.0 µg)はオートサンプラーを使用して行った。1分析あたりの溶出時間は150分とし、サンプル注入後、0-40% B/125 min → 40-55% B/130 min → 55-100% B/135 min → 100% B/145 min → 0% B/160 minのグラジエントプログラムで溶出した。

3. 試験操作

3.1. ショットガンプロテオミクスによる網羅的な構成タンパク質変動比較

グルテン及びグルパール19SのMSデータは各2回ずつ取得し、全データをi-RUBYソフトウェア（メディカルプロテオスコープ）にアップロードし、Mascot/UniProt/NCBI nr (Taxonomy; Green plants) データベースによるタンパク質同定、MS/MSスペクトル相同性に基づくピークマッチングと保持時間補正を行うことにより、タンパク質の比較定量解析を行った。

3.2. グルパール19Sのペプチド結合開裂及び脱アミド化の検討

ペプチド結合の開裂解析には、Proteome Discovererソフトウェア上でのMascot検索条件の消化酵素設定を“None”とし、同定されたペプチド配列のうち末端がトリプシン切断部位でない酸加水分解によるペプチド結合の切断の割合を算出した。

脱アミド化の分析には、Mascot検索条件のvariable modification設定に“deamidation (NQ)”を追加し、脱アミド化修飾されたペプチドを同定した。

3.3. 多変量解析によるグルパール19Sに特徴的なペプチドの探索

グルテン、グルパール19S及びHWP24hのMSデータをプロテオーム定量解析ソフトウェアProgenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics社) にアップロードし、Swiss-Prot (Taxonomy; Green plants) データベースによるタンパク質同定、イメージ解析によるピークマッチングと保持時間補正を行い、3サンプル間各ペプチドピークのシグナル強度を比較した。タンパク質の同定はProteome Discovererソフトウェア (Thermo Scientific社) を使用したMascot検索 (NCBI nrデータベース, Taxonomy; Green plants) を並行して行った。

3.4. *de novo* sequencingによるペプチド配列の推定

de novo sequencingにはPEAKS Studio v6.0 (インフォコム社) を使用した。消化酵素設定を“None”としてアミノ酸配列の推定を行った。TLC (Total Local Confidence) が60%以上のスコア値を示したアミノ酸配列を信頼度の高いデータと判断し、その配列をNCBI protein-protein BLAST (blastp) 検索 (Taxonomy; Green plants) に供した。

結果

1. SDS電気泳動による分子量の比較

グルテン、グルパール19S、及び経時的な酸加水分解

により調製した8種HWPのSDS電気泳動パターンをFig. 1に示す。グルテンでは構成タンパク質が明確なバンド状に現れるのに対し (lane G), グルパール19Sでは明確なバンドは認められず100 kDa以下にラダー状のパターンが認められた (lane 19S)。経時的な酸加水分解により調製したHWPでは、0.5h加水分解物がグルパール19Sと同様に高分子領域にラダー状のバンドを呈していた。加水分解の時間経過と共にラダーが低分子領域にシフトし、24h経過後には15 kDa以上の明瞭なバンドが完全に消失した。

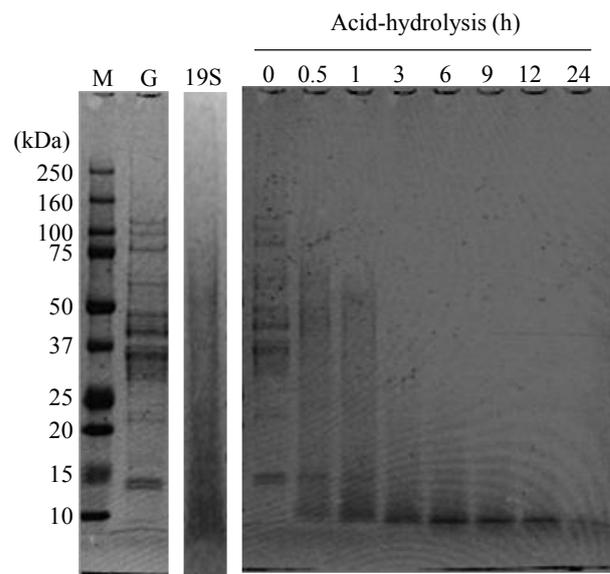


Fig. 1 SDS-PAGE pattern of gluten, Glupearl 19S and HWP

Gluten, Glupearl 19S, and HWP (2.5 µg protein/lane) were separated in a 10-20% acrylamide gel (D.R.C. Co., Ltd.) and the gel was stained with coomassie brilliant blue. Lane M, molecular weight marker; lane 19S, Glupearl 19S; lane G, native gluten

2. ショットガンプロテオミクスによるグルパール19Sとグルテンの網羅的な構成タンパク質変動比較

グルパール19Sとグルテンとの比較において、酸加水分解の過程でどのような構成タンパク質に変化が生じているかを明らかにするため、ショットガンプロテオーム解析を行った。グルテン及びグルパール19Sのトリプシン消化物より取得したMS/MSデータを、i-RUBYソフトウェアにてGreen plantsのタンパク質データベース内で検索したところ、発現比較の対象となるタンパク質の総数は5,074であった。そのうち変動比較の候補タンパク質をイネ科コムギ属 (*Triticum*) としたところ、954のタンパク質を絞り込むに至った。これら候補タンパク質のうち、グルテンとグルパール19Sとの間の発現比が5倍以上または1/5以下であるタンパク質は268 (28.1%)

であった。更に対象をコムギ (*Triticum aestivum*, common wheat) とし、候補タンパク質中の重複を除いた28タンパク質の発現比をTable 1 に示した。

グルテンと比較して、グルパール19Sにおけるシグナル比が1/5以下に減少しているタンパク質数は27であり、 γ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニン等の主要な小麦アレルゲンタンパク質が含まれていた。一方、グルテンと比較して、グルパール19Sにおけるシグナル比が5倍以上に増加したタンパク質数はわずか1であり、そのタンパク質はHistone H4であった。

3. グルパール19Sのペプチド結合開裂及び脱アミド化の分析

前項に示したショットガンプロテオーム解析では、グルテンにおいて検出されたトリプシン消化ペプチドの多くがグルパール19Sにおいては検出されなかった。この原因として、HWPはグルテンの酸加水分解過程において、ペプチド結合の非酵素的な開裂やグルタミン残基、アスパラギン残基の脱アミド化が生じている可能性が考えられた。そこでペプチド結合の開裂とグルタミン残基、アスパラギン残基の脱アミド化を分析するため、ト

リプシン消化ペプチドのMS/MS検索条件の消化酵素設定を“None”とし、NCBInrおよびSwiss-Protデータベース (Taxonomy; Green plants) 内でのデータベース検索を行った。その結果、グルパール19Sでは全911ペプチドがヒットし、そのうちペプチドの末端がトリプシン特異的残基 (Arginine, R; Lysine, K) 以外のアミノ酸残基、つまり非酵素的に切断されていたペプチドの総数は353 (38.7%) であった。一方、HWP 24hでは全496ペプチドがヒットし、そのうち299ペプチド (60.3%) の末端が非酵素的に切断されていることが明らかになった (データ示さず)。

また、グルタミン残基、アスパラギン残基の脱アミド化修飾を評価する目的で、データベース検索条件のvariable modification設定に“deamidation (NQ)”を追加し、グルタミンとアスパラギンの脱アミド化の解析を行った。その結果、Table 1に挙げられた小麦の主要アレルゲン (High molecular weight glutenin subunit, Gamma-gliadin, LMW-m glutenin subunit, alpha gliadin, Alpha/beta-gliadin) において、数種の脱アミド化修飾のバリエーションをもつ同一のペプチド配列が同定された (Table 2)。脱アミド化修飾部位をもたないペプチド

Table 1 Differences in the protein expression between gluten and Glupearl 19S

Hit Title	Description	Glupearl 19S/Gluten Ratio	Peptide Count	Max Protein Score
1	gi 32400748 seed storage protein [<i>Triticum aestivum</i>]	0.002	3	104.74
2	gi 147883548 alpha-gliadin [<i>Triticum aestivum</i>]	0.008	3	91.80
3	GDA9_WHEAT Alpha/beta-gliadin MM1 OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=1 SV=1	0.010	2	94.08
4	NLT2G_WHEAT Non-specific lipid-transfer protein 2G OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=1 SV=1	0.017	2	29.09
5	GDA7_WHEAT Alpha/beta-gliadin clone PW8142 OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=3 SV=1	0.024	5	130.97
6	gi 94315065 1Bx high molecular weight glutenin subunit [<i>Triticum aestivum</i>]	0.040	5	154.19
7	gi 32400762 AmiB [<i>Triticum aestivum</i>]	0.050	5	138.05
8	GDA2_WHEAT Alpha/beta-gliadin A-II OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=2 SV=1	0.053	3	103.12
9	GDA0_WHEAT Alpha/beta-gliadin OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=2 SV=2	0.077	2	93.49
10	GDB0_WHEAT Gamma-gliadin (Fragment) OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=2 SV=1	0.087	2	61.19
11	gi 209971843 gamma-gliadin [<i>Triticum aestivum</i>]	0.096	11	316.23
12	gi 110341796 Y-type HMW glutenin [<i>Triticum aestivum</i>]	0.098	8	136.29
13	gi 162415987 high molecular weight glutenin subunit [<i>Triticum aestivum</i>]	0.107	7	180.66
14	gi 21749 unnamed protein product [<i>Triticum aestivum</i>]	0.107	7	180.66
15	gi 4007846 beta purothionin [<i>Triticum aestivum</i>]	0.114	2	71.28
16	gi 170743 HMW glutenin subunit Ax2* [<i>Triticum aestivum</i>]	0.114	11	179.43
17	gi 133741924 gamma gliadin [<i>Triticum aestivum</i>]	0.136	6	348.99
18	gi 21743 high molecular weight glutenin subunit 1Ax1 [<i>Triticum aestivum</i>]	0.141	9	129.82
19	gi 32400760 unknown [<i>Triticum aestivum</i>]	0.141	2	66.43
20	gi 663263 15kDa grain softness protein [<i>Triticum aestivum</i>]	0.157	3	139.48
21	gi 238800252 low molecular weight glutenin [<i>Triticum aestivum</i>]	0.159	8	411.25
22	gi 164470672 LMW-m glutenin subunit 0877L13-M [<i>Triticum aestivum</i>]	0.162	7	390.57
23	GDBB_WHEAT Gamma-gliadin B OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=3 SV=1	0.162	5	254.97
24	gi 169788569 putative puroindoline-like protein [<i>Triticum aestivum</i>]	0.180	2	58.79
25	gi 221855615 gamma-gliadin [<i>Triticum aestivum</i> subsp. macha]	0.182	3	110.61
26	gi 148508784 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Triticum aestivum</i>]	0.195	3	129.82
27	GLT0_WHEAT Glutenin, high molecular weight subunit DY10 OS= <i>Triticum aestivum</i> GN=GLU-D1-2B PE=3 SV=1	0.198	18	391.19
28	H41_WHEAT Histone H4 variant TH011 OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=3 SV=2	5.700	5	100.12

はその90%以上がグルテンにおいて検出されたのに対し、脱アミド化修飾数が1つ以上のペプチドは主としてグルパール19Sにおいて検出された。

4. 多変量解析によるグルパール19Sに特徴的なペプチドの探索

次に、グルパール19Sのように強い抗原性を有するHWPに特徴的なペプチドを同定することを目的として、グルテン、グルパール19S、及び抗原性を示さないHWP24hから得られたペプチドのMSデータを多変量解析により比較し、グルパール19Sにのみ特徴的に発現するペプチドの探索を行った。

Progenesis LC-MSソフトウェアを用いて3サンプル間のMS¹のピーク強度を比較した。観測された32,749本の総ピークより、グルテン及びHWP24hのピーク強度がグルパール19Sのピーク強度の1%未満である179本のピークを抽出し、更にタンパク質消化物由来と考えられる10本のピークをグルパール19Sに特徴的なペプチドとして絞り込んだ (Table 3)。

Progenesis LC-MS上でMascot検索 (データベース: Swiss-Prot, Taxonomy: Green plants) を行ったところ、

2本のペプチドピークをPuroindoline A (#6) 及び α -gliadin clone PW1215 (#8) と同定した (Table 4)。

また、Proteome Discovererソフトウェアを用いたMascot検索 (データベース: NCBI, Taxonomy: Green plants) を行ったところ、更に2本のペプチドピークをHMW glutenin subunit (#1及び#5) と同定するに至った。これら4本のペプチド配列には、脱アミド化修飾が認められた。

残り6本の候補ピークについては、それらのMS/MSデータをPEAKS Studioソフトウェアにアップロードして*de novo* sequencingを試みた。TLCスコア60%以上を信頼度の高いデータと判断し、2本のペプチド配列 (#3及び#9) を予測するに至った (Fig. 2)。この予測配列をprotein-protein BLAST (blastp) 検索に供することにより、イネ科コムギ属 (*Triticum*) のタンパク質の部分配列であるNADP-dependent malic enzyme 1 (#3) 及びWIR1 (#9) がヒットした (Table 4)。残りの4本のピーク (#2, #4, #7, 及び#10) はMS/MSの取得情報が少なく、TLCスコア60%以上の信頼度において、それらのペプチド配列を予測することができなかった。

Table 2 List of representative deamidated peptides in the major wheat allergens

Peptide ID	Peptide sequence	Compositional ratio (%)		Count	Charge	m/z	Peak retention time
		Gluteparl 19S	Gluten				
High molecular weight glutenin subunit							
2426	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGIPALLR.R	3	97	33	3	1056.208	104.5
4225	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGIPALLR.R + 1 Deamidated (NQ)	91	9	33	3	1056.537	106.9
1055	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGIPALLR.R + 2 Deamidated (NQ)	95	5	33	3	1056.863	107.5
50	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGIPALLR.R + 3 Deamidated (NQ)	99	1	33	3	1057.192	111.3
3535	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGIPALLR.R + 4 Deamidated (NQ)	99	1	33	3	1057.522	114.3
Gamma-gliadin							
3671	R.RPLFQLVQGGIHPQQPAQLEVIR.S	2	98	14	3	952.8804	70.6
4406	R.RPLFQLVQGGIHPQQPAQLEVIR.S + 1 Deamidated (NQ)	87	13	14	3	953.2072	71.3
1397	R.RPLFQLVQGGIHPQQPAQLEVIR.S + 2 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	953.5348	72.6
36	R.RPLFQLVQGGIHPQQPAQLEVIR.S + 3 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	953.8628	73.8
6220	R.RPLFQLVQGGIHPQQPAQLEVIR.S + 4 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	954.1912	74.4
194	R.RPLFQLVQGGIHPQQPAQLEVIR.S + 5 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	954.5197	75.3
3200	R.RPLFQLVQGGIHPQQPAQLEVIR.S + 6 Deamidated (NQ)	83	17	14	3	954.8472	76.8
LMW-m glutenin subunit 0877L13-M							
1665	K.VFLQQQCSPVAMPQSLAR.S	9	91	81	3	687.3517	58.0
273	K.VFLQQQCSPVAMPQSLAR.S + 1 Deamidated (NQ)	98	2	81	3	687.6814	63.2
1456	K.VFLQQQCSPVAMPQSLAR.S + 3 Deamidated (NQ)	100	0	81	3	688.3355	62.2
345	K.VFLQQQCSPVAMPQSLAR.S + 4 Deamidated (NQ)	100	0	81	3	688.6638	63.6
Alpha gliadin							
3707	R.DVIVLQQHNIHESQVQLQSSYQVQLQLCCQQLR.L	0	100	4	4	1045.279	75.1
8911	R.DVIVLQQHNIHESQVQLQSSYQVQLQLCCQQLR.L + 2 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1045.765	73.7
5960	R.DVIVLQQHNIHESQVQLQSSYQVQLQLCCQQLR.L + 3 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1046.014	80.3
7138	R.DVIVLQQHNIHESQVQLQSSYQVQLQLCCQQLR.L + 4 Deamidated (NQ)	87	13	4	4	1046.260	82.9
2715	R.DVIVLQQHNIHESQVQLQSSYQVQLQLCCQQLR.L + 5 Deamidated (NQ)	37	63	4	4	1046.505	84.1
3776	R.DVIVLQQHNIHESQVQLQSSYQVQLQLCCQQLR.Q	0	100	4	4	1045.279	75.1
13628	R.DVIVLQQHNIHESQVQLQSSYQVQLQLCCQQLR.Q + 2 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1045.765	73.7
10675	R.DVIVLQQHNIHESQVQLQSSYQVQLQLCCQQLR.Q + 3 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1046.014	80.3
7256	R.DVIVLQQHNIHESQVQLQSSYQVQLQLCCQQLR.Q + 5 Deamidated (NQ)	37	63	4	4	1046.505	84.1
Alpha/beta-gliadin							
2402	R.NLALQTLPAMCNVYIPPYCTIAPFGIFGTN.-	0	100	3	3	1119.559	100.9
3825	R.NLALQTLPAMCNVYIPPYCTIAPFGIFGTN.- + 1 Deamidated (NQ)	90	10	3	3	1119.884	102.1
1257	R.NLALQTLPAMCNVYIPPYCTIAPFGIFGTN.- + 2 Deamidated (NQ)	97	3	3	3	1120.213	103.4
6282	R.NLALQTLPAMCNVYIPPYCTIAPFGIFGTN.- + 3 Deamidated (NQ)	99	1	3	3	1120.543	104.6

Table 3 The specific peptides in Glupearl 19S

peptide No.	m/z [Da]	charge	Retention time [min]	Normalized abundance		
				Glupearl 19S	HWP24h	Gluten
1	652.821	2	32.59	50890	297	191
2	652.821	2	34.24	45905	220	285
3	500.759	2	56.88	37989	309	9
4	324.121	2	50.77	32961	97	275
5	486.297	2	45.97	32003	134	176
6	763.804	2	40.89	27374	194	120
7	566.723	2	32.95	8217	30	17
8	513.800	2	53.25	5804	0	2
9	518.250	2	53.16	5119	0	50
10	446.245	2	88.20	2964	0	0

Table 4 Sequences of the specific peptides in Glupearl 19S identified by bioinformatics

peptide No.	method	Sequence	Ion Score	ΔM [ppm]	Accession	Description
1	MS/MS ion search	Q *YE Q QP V VPSK	32	-1.70	gi: 162415987	high molecular weight glutenin subunit [Triticum aestivum]
2	-	not identified	-	-	-	-
3	<i>de novo</i> sequencing	TMYKP V VY	65	-	ABY25986.1	NADP-dependent malic enzyme 1 [Triticum aestivum] 638 MYTPV 642 192 PVVY 195
4	-	not identified	-	-	-	-
5	MS/MS ion search	LVA V S Q V V R	33	-1.16	gi: 14329763	high molecular weight glutenin subunit y [Triticum aestivum]
6	MS/MS ion search	GG C Q E LLG E C CSR	47	-1.75	P33432	Puroindoline-A OS=Triticum aestivum GN=PINA PE=1 SV=2 - [PUIA_WHEAT]
7	-	not identified	-	-	-	-
8	MS/MS ion search	NLAL Q TLPR	41	-1.53	P04726	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1 - [GDA6_WHEAT]
		N LAL Q TLPR	25	-1.53	P04726	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1 - [GDA6_WHEAT]
9	<i>de novo</i> sequencing	YR C YA F R	70	-	CAA61018.1	WIR1 [Triticum aestivum] 70 YRCY 73 126 RCYA F R 131
10	-	not identified	-	-	-	-

* Modified residues are represented in Bold (**Q**, **N**: deamidation, **C**: carbamidomethylation).

考察

1. SDS電気泳動による分子量の比較

グルテンを酸加水分解して製造したグルパール19Sは、SDS電気泳動パターンがラダー状であった (Fig. 1)。これは、酸加水分解によりグルテン構成タンパク質のペプチド結合がランダムに切断されていることに加え、本来の小麦構成タンパク質よりも大きい分子量の重合体を形成していることに起因するものと考えられた。

グルテンを酸加水分解することにより調製したHWP5は経時的に低分子領域にラダーがシフトし、加水分解時

間が長くなるに従いランダムなペプチド結合の切断が進んでいることが示唆された。また、HWP24hにおいては15 kDa以上の明瞭なバンドが完全に消失していたことから、分子量が抗原性を予測するファクターであるとの既報⁶⁻⁸⁾の結果を裏付ける結果となった。

2. ショットガンプロテオミクスによるグルパール19Sとグルテンの網羅的な構成タンパク質変動比較

グルテンの酸加水分解では、ランダムなペプチド結合の開裂と共に、タンパク質のグルタミン残基またはアス

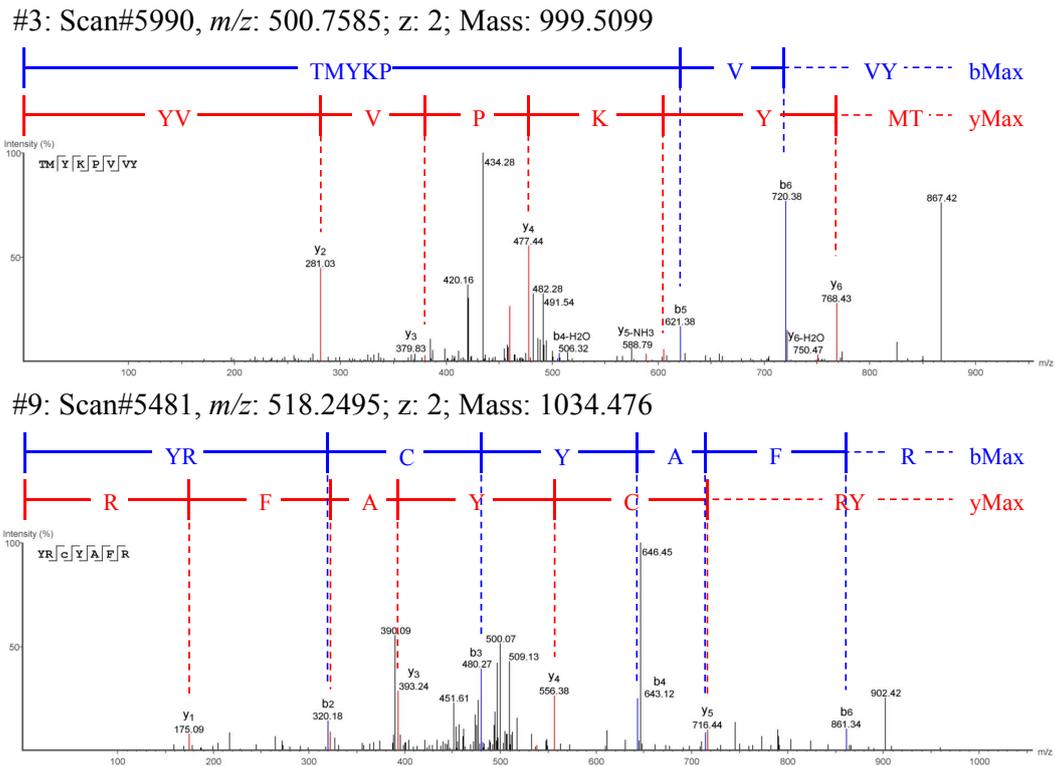


Fig. 2 Collision induced dissociation spectra of two *de novo* sequenced peptides from Glupearl 19S

The results of *de novo* sequencing of the peptides #3 and #9 using PEAKS software are shown.

The upper panel (#3) showing the fragmentation of TMYKPVVYamide and the lower panel (#9) showing the fragmentation of YRCYAFRamide. The b- and y-type fragment ions and the theoretical fragment ion masses found in the spectra are indicated in the spectra.

パラギン残基に脱アミド化を生じるものと考えられる。そのためグルパール19Sにおけるショットガンプロテオミクスでは、グルテンのトリプシン切断によって生じるペプチドピークが消失していることが予想された。グルパール19Sとグルテンの構成タンパク質の差異を比較解析した結果、実際に、データベースに収載されているペプチドのシグナル比はグルテンよりもグルパール19Sで減少し (Table 1), トリプシン消化によって生じるペプチドが非酵素的に切断され、脱アミド化修飾している可能性が考えられた。グルパール19Sでシグナルが减弱していたタンパク質として同定された γ -グリアジン, LMW-グルテニン, HMW-グルテニンは主要な小麦アレルゲンとして知られている。本研究の結果は、グルテンの酸加水分解が主要な小麦アレルゲンタンパク質の一次構造に影響を及ぼしていることを示唆しており、HWPアレルギーが従来の小麦アレルギーとは異なるアレルゲンが原因であると主張した既報の結果¹⁻²⁾を強く支持している。一方、グルテンと比較して5倍以上のシグナル比が得られたHistone H4に関しては、当該タンパク質が酸性条件下において抽出されやすく、グルパール19Sの製造過程で酸性溶液中に溶出してきた、または酸加水分

解によるペプチド結合の開裂に伴いトリプシンがアクセスしやすくなることに起因し、ペプチドピークが特異的に生じたものと考えられた。

3. データベース検索によるグルパール19Sのペプチド結合開裂及び脱アミド化の分析

酸加水分解によるグルテンの物理化学的变化について、MS/MSデータからペプチド結合の切断とグルタミン残基及びアスパラギン残基の脱アミド化を検討したところ、抗原性の強いグルパール19Sではランダムにペプチド結合が切断されたペプチドや、脱アミド化修飾のバリエーションをもったペプチドが多く検出された (Table 2)。更に、HWP24hにおいては、ペプチド結合が非酵素的に切断されているものが多く検出されていた。グルテンのトリプシン消化では、グルタミン残基の多い繰り返し配列部分は切断されず、ペプチドが得られなかったが、HWP24hでは繰り返し配列部分が非酵素的に切断されていたため、部分的なペプチド配列を検出することができた (データ示さず)。

これらの結果より、グルパール19Sにおいてはグルテン構成タンパク質のランダムなペプチド結合の切断と共

に、アミノ酸残基の脱アミド化修飾が生じ、これらタンパク質の物理化学的な構造変化は酸加水分解が進行することにより更に起こりやすくなることが示唆された。

4. 多変量解析によるグルパール19Sに特徴的なペプチドの探索

強い抗原性を有するグルパール19Sに特徴的に発現するペプチドを探索することを目的として、(1)グルテンを加水分解することにより新たに生じたペプチドであり、かつ(2)長時間の酸加水分解によって抗原性が消失したHWP24hにおいては発現していないペプチドを対象として多変量解析を行った。Table 3に示した10本のペプチドピークは、いずれもグルパール19Sにのみ十分なピーク強度が得られた。これら候補ペプチドピークのMS/MS相同性検索の結果、HMW-グルテニンや α/β -グリアジンといった小麦アレルゲンに由来する脱アミド化修飾されたペプチドが同定された (Table 4)。一方HWP24hでは、加水分解の進行に伴い脱アミド化修飾及びペプチド結合の開裂が進んだために、グルパール19Sにのみ特徴的に発現するペプチド由来のピークが消失したと考えられた。*de novo* sequencingはデータベースに因らずMS/MS取得データのみにより配列を予測するため、コムギ (*T. aestivum*) のようにプロテインデータベースが完全に整備されていないものや、グルパール19Sのように酸加水分解によるペプチドへの非酵素的な修飾が考えられる場合には、有用な情報を与えうる。本研究では、MS/MS取得データから断片的なペプチド配列を予測し、その配列をデータベース検索することで、タンパク質を予測するボトムアッププロテオミクスが有用であった。他方、*de novo* sequencingを用いても配列が予測できなかった4本のペプチドに関しては、MS¹ピーク強度としては十分なものもあったことから、ペプチドの特性により得られたMS/MSシグナルが少なかったものと考えられた。

本研究において、グルパール19Sに特徴的なペプチドとして10本の候補ペプチドを抽出した。これらのペプチドが抗原性を示すHWPのマーカーとなることを確認するためには、*in vivo*による皮膚感作性試験等との整合性を十分に検討した上で、加水分解条件(処理方法や時間)の異なるHWPを用いた確認試験を行う必要があると考えられた。

まとめ

グルテンのトリプシン消化ペプチド由来ピークの多くが、グルパール19Sでは減弱していた。グルパール19Sにおいては、グルテンのトリプシン消化ペプチドがランダムに切断されたものや、グルタミン残基の一部が脱ア

ミド化修飾されたペプチドが多く検出された。

強い抗原性を有するHWPに特徴的なペプチドの候補として10本のペプチドピークを抽出し、そのうち4本の配列をデータベース検索にて、2本の配列を*de novo* sequencingにて同定した。

引用文献

- 1) Fukutomi Y, Itagaki Y, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakazawa T, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K: *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:531-533.e 1-3.
- 2) Chinuki Y, Morita E: *Allergol Int.* 2012;61:529-37.
- 3) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Fukutomi Y, Teshima R: *Allergy* 2012;67:1392-9.
- 4) Mothes T: *Adv Clin Chem.* 2007;44:35-63.
- 5) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R: *J. Allergy Clin. Immunol., in press*
- 6) Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Itagaki Y, Fukutomi Y, Teshima R: *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;160:259-64.
- 7) 手島玲子: *ファルマシア* 2013;49:116-20.
- 8) Chinuki Y, Takahashi H, Dekio I, Kaneko S, Tokuda R, Nagao M, Fujisawa T, Morita E: *Contact Dermatitis* 2012;68:86-93