

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、 $\gamma$ -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 087L13-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MS<sup>1</sup>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すると考えられる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 $\alpha$ -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 nr, 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
		Glupearl 19S	Gluten				
<b>High molecular weight glutenin subunit</b>							
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
<b>Gamma-gliadin</b>							
3671	R.RPLFQLVQGGQGIHQPPQPAQLEEVIR.S	2	98	14	3	952.8804	70.6
4406	R.RPLFQLVQGGQGIHQPPQPAQLEEVIR.S + 1 Deamidated (NQ)	87	13	14	3	953.2072	71.3
1397	R.RPLFQLVQGGQGIHQPPQPAQLEEVIR.S + 2 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	953.5348	72.6
36	R.RPLFQLVQGGQGIHQPPQPAQLEEVIR.S + 3 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	953.8628	73.8
6220	R.RPLFQLVQGGQGIHQPPQPAQLEEVIR.S + 4 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	954.1912	74.4
194	R.RPLFQLVQGGQGIHQPPQPAQLEEVIR.S + 5 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	954.5197	75.3
3200	R.RPLFQLVQGGQGIHQPPQPAQLEEVIR.S + 6 Deamidated (NQ)	83	17	14	3	954.8472	76.8
<b>LMW-m glutenin subunit 0877L I3-M</b>							
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
<b>Alpha gliadin</b>							
3707	R.DVIVLQQHIAHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.L	0	100	4	4	1045.279	75.1
8911	R.DVIVLQQHIAHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.L + 2 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1045.765	73.7
5960	R.DVIVLQQHIAHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.L + 3 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1046.014	80.3
7138	R.DVIVLQQHIAHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.L + 4 Deamidated (NQ)	87	13	4	4	1046.260	82.9
2715	R.DVIVLQQHIAHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.L + 5 Deamidated (NQ)	37	63	4	4	1046.505	84.1
3776	R.DVIVLQQHIAHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.Q	0	100	4	4	1045.279	75.1
13628	R.DVIVLQQHIAHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.Q + 2 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1045.765	73.7
10675	R.DVIVLQQHIAHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.Q + 3 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1046.014	80.3
7256	R.DVIVLQQHIAHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.Q + 5 Deamidated (NQ)	37	63	4	4	1046.505	84.1
<b>Alpha/beta-gliadin</b>							
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	$\Delta M$ [ppm]	Accession	Description
1	MS/MS ion search	<b>Q</b> *YE <b>Q</b> QP <b>V</b> PSK	32	-1.70	gi: 162415987	high molecular weight glutenin subunit [Triticum aestivum]
2	-	not identified	-	-	-	-
3	de novo sequencing	TMYKP <b>V</b> 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 <b>V</b> S <b>Q</b> V <b>V</b> R	33	-1.16	gi: 14329763	high molecular weight glutenin subunit y [Triticum aestivum]
6	MS/MS ion search	GG <b>C</b> Q <b>E</b> LLG <b>E</b> CCSR	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 <b>Q</b> TLPR	41	-1.53	P04726	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1 - [GDA6_WHEAT]
		NLAL <b>Q</b> TLPR	25	-1.53	P04726	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1 - [GDA6_WHEAT]
9	de novo sequencing	YR <b>C</b> YAFR	70	-	CAA61018.1	WIR1 [Triticum aestivum] 70 YRCY 73 126 RCYAFR 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HWP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<sup>6-8)</sup>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

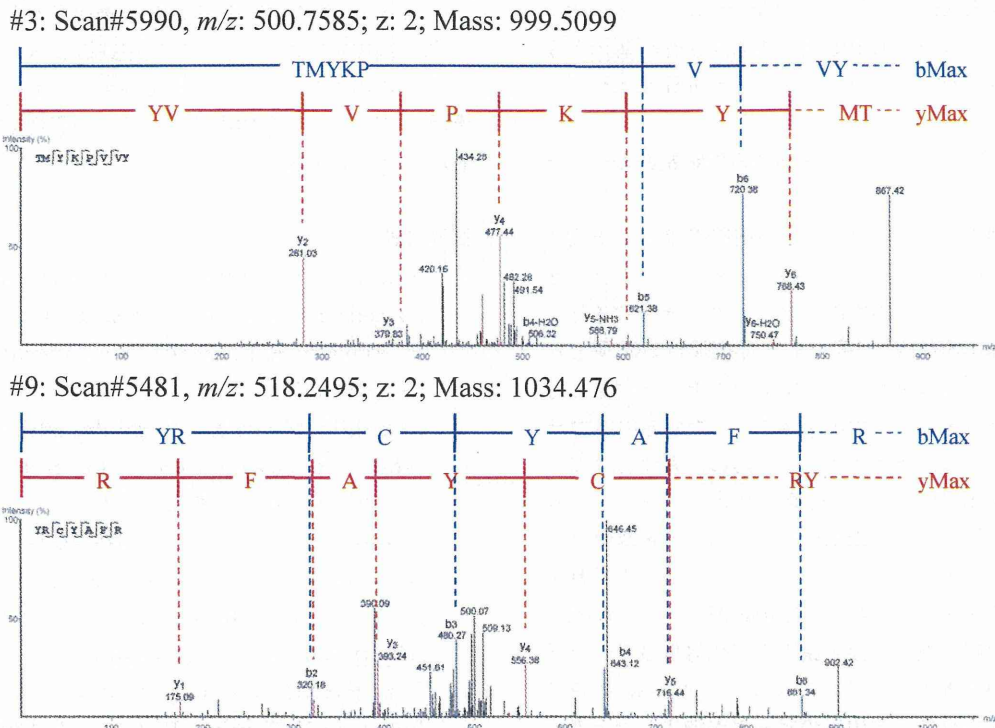


Fig. 2 Collision induced dissociation spectra of two *de novo* sequenced peptides from Glupearl 19S

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 TMYKPVVamide and the lower panel (#9) showing the fragmentation of YRCYAFamide. 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 $\gamma$ -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アレルギーが従来的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<sup>1-2)</sup>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変化について、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 $\alpha$ / $\beta$ -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、MS<sup>1</sup>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

