

ニッポンハム食の未来財団 2019 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	LC-MS/MS を用いた特定原材料のアレルゲンおよび品種判別同時分析法に関する研究
フリガナ	ナガイ ヒロユキ
代表者名	永井 宏幸
所属機関 (機関名) (機関名)	岐阜県保健環境研究所 専門研究員 ※2020 年 3 月 31 日時点
本助成金による 発表論文, 学会発表	第 56 回全国衛生化学技術協議会年会 「安定同位体標識合成ペプチドを活用したアレルギー物質の LC-MS 分析法の開発」

研究結果要約

甲殻類アレルゲンについて、甲殻類トロポミオシンに共有して存在する ADTLEQQNK、SLSDEER、FLAEEADR らをマーカーペプチドとして LC-MS/MS で分析したところ、ほぼ全ての甲殻類でピークを検出することができた。また、食物アレルゲン検査法としての確立を目指して、感度が高く安定して検出される FLAEEADR の合成ペプチドと比較して分析したところ、抽出タンパク質と同じリテンションタイムにピークが検出され、食物アレルゲンについて合成ペプチドを標準品とした分析法が可能であることが示唆された。また、食物アレルゲンの規制対象にないシャコに特異的なペプチド A、ペプチド B、食材偽装に使われたクルマエビに特異的なペプチド C を見出し、合成品を標準として、各種甲殻類抽出液を比較分析したところ、ペプチド A についてはシャコとオキアミ、ペプチド B についてはシャコと同じ配列を有するイセエビのみ、ペプチド C について

はクルマエビおよびシバエビから検出され、オキアミとシバエビ以外はデータベース配列の理論通りに検出できることが分かった。同様の手法でアーモンド、カシューナッツ、ブラジルナッツなど種実類についても特異的ペプチドを見出し、合成ペプチドを標準品とした分析手法を作成した。

研究目的

食物アレルギー患者が年々増加し、我が国において表示による食品アレルギーについての情報提供の必要性が高まってきたため、2002 年 4 月よりアレルギー物質を含む食品の表示が本格的に義務付けられた。現在では、「卵、乳、小麦、えび、かに、そば、落花生（ピーナッツ）」の計 7 品目が、食物アレルギーの“特定原材料”として位置づけられている。検査法としては、2010 年（平成 22 年）9 月 10 日消食表第 286 号「アレルギー物質を含む食品の検査法について」により、定量検査法として ELISA 法、定性検査法としてウェスタンブロット法や PCR 法が定められている。特定原材料は 7 品目でも、実際に対象となる原材料は多種にわたり、偽陰性、偽陽性の発生が問題となっている。

そこで、申請者らは、特定原材料である甲殻類、蕎麦、牛乳、卵等アレルゲンに特異的なペプチドを見出し、質量分析器で検出する手法について研究を進めており、偽陽性、偽陰性が少なく有望な分析法であることを明らかとしてきた¹⁻³⁾。さらに、本手法がアレルゲンの検出だけでなく、生物種の判別にも適応できることを見出した。甲殻類で言えば、主要アレルゲンであるトロポミオシンやアルギニンキナーゼのアミノ酸配列は、種ごとに一部に違いがあり、その差を質量分析で検出することが理論的に可能である。すでに申請者は甲殻類に共通なペプチドおよび一部の甲殻類に特異的なペプチドが存在することを見出し、質量分析器で分離検出できることを確認している。しかしながら、公定法など試験検査で採用されるためには、純度の高い標準品を作製し、精度、感度、真度などの妥当性を確認する必要がある。そこで、本研究では、甲殻類から抽出精製したタンパク質溶液およびアレルゲンの合成ペプチドを標準品の候補として用い、信頼性の高いアレルゲン網羅的分析法の開発を試みた。

研究計画及び研究手法

(1) 特定原材料のペプチド網羅的分析

クルマエビ、シバエビ、オキアミ（クリル）、イセエビ、シャコ、サクラエビなどの甲殻類について 1g 採取し、2 M 尿素を含む 50 mM トリス緩衝液(pH10)を 30 mL 加え、60 分振とう抽出し、3500 rpm 15 分の遠心分離により、上澄み液を得た。上澄み液 6 mL を 1 M Dithiothreitol を 200 μ L 添加し、37°C で 60 分反応させた後、0.5 M Iodoacetamide を 2.0 mL 添加し、タンパク質を還元、アルキル化した。続いて、トリプシンを終濃度 700 nM 程度になるように添加、一晩消化させた後、ギ酸を 0.5% になるように添加し、反応を停止させた。アセトニトリルおよび 0.5% トリフルオロ酢酸でコンディショニングされた Strata X SPE カラムに反応液を負荷し、0.5% ギ酸で洗浄後、70% アセトニトリルで溶出させた。これを LC-MS/MS で m/z 400-1400 の Information data acquisition (IDA) 分析を行い、得られたクロマトグラムを Protein Pilot Software 4.0（エービー・サイエックス社製）で解析し、ペプチドシーケンス情報を得た。

(1) -2 特異的ペプチドの探索と分析条件

得られたペプチドシーケンス情報とプロテインデータベース (UniProt <https://www.uniprot.org/>) を照らし合わせ、それぞれの検体に特異的なペプチドを探索し、Skyline software を用いて、多重反応モニタリング(MRM)条件について設定した。

(2) 実証分析

既に報告済みの甲殻類共通ペプチドについて表 1 のように分析条件を設定し¹⁾、合成ペプチドおよび甲殻類検体から同一ピークが検出されるかについて検討した。

(3) 種実類への応用

海外で規制が厳しく、対象食品が多岐に渡る種実類について同様に検討した。落花生、ブラジルナッツ、アーモンド、カシューナッツについてアレルゲンデータベースから特異的ペプチドにつ

いて探索し、分析条件を設定した。

結果と考察

(1) 甲殻類共通ペプチドの分析について

クルマエビ、シバエビ、イセエビ、シャコ、サクラエビ、オキアミ（クリル）で、5 つ全てのペプチドピークが検出でき、甲殻類アレルギー検査法として活用できることが期待できた。しかしながら、表示義務規制外であるシャコについても予想通り同様に 5 つのペプチドが検出され、ELISA 法同様、擬陽性検体となった。一方、オキアミについても他の甲殻類同様にピークが検出された。データベースに記載のオキアミは、*Euphausia superba* (Antarctic krill)と *Euphausia pacifica* (North Pacific krill)の 2 種だけであり、ともに SLSDEER、FLAEEADR は存在していないものの、今回採取したオキアミと種類が違っていたことが原因の可能性もあり、今後はさらに種類を増やすことで妥当性について検証する必要がある。

次に、検査用として前述の中で最も感度が高く安定的に検出される FLAEEADR ペプチドについて合成品を購入し、メタノールで $310\mu\text{g/mL}$ になるように可溶化した後、0.1%ギ酸メタノール 50%で $10\mu\text{g/mL}$ を作製し、標準溶液とした。この標準液から得られるピークと、甲殻類抽出溶液から検出されるピークを比較したところ、図 1（非公開）のように、ほぼ全ての甲殻類から FLAEEADR 合成ペプチドと同じリテンションタイムにピークが検出できたことから、合成ペプチドをアレルギー物質の検査用標準として活用できることが分かった。

(2) 甲殻類共通ペプチドの分析について

次に偽陽性となったシャコについて IDA 分析の結果から、シャコだけに存在するペプチドを探索したところ、トロポミオシンのペプチド A およびペプチド B を候補として見出した。プロテインデータベースからペプチド A はシャコに特異的であることを確認したが、ペプチド B については、シャコだけでなく、イセエビにも存在していることが分かった。また、アルギニンキナーゼのペプチド C についてもクルマエビだけに存在することがわかった。そこで、これら 3 つについ

て、合成ペプチドを購入し、IDA 分析を試みたところ、図 2～4（非公開）のようにペプチド A はプレカーサーイオン **D** m/z プロダクトイオン **E** (y **C**) , **F** (y **G**) m/z などが検出できた。同様に、ペプチド B は、プレカーサーイオン **H** m/z プロダクトイオン **I** (y **J**) , **K** (y **L**) m/z、ペプチド C はプレカーサーイオン **M** m/z プロダクトイオン **N** (y **O**) , **P** (y **Q**) m/z を検出し、分析条件を設定し（表 2（非公開））、実際に各種甲殻類について分析を行った。その結果、図 5（非公開）のようにペプチド A についてはシャコで強く検出され、オキアミについても若干検出された。ペプチド B については、シャコ、イセエビのみから検出された（図 6（非公開））。また、ペプチド C については、クルマエビおよびシバエビから検出された（図 7（非公開））。シバエビはクルマエビと同じくクルマエビ科であり、アルギニンキナーゼのデータベースがなかったが、近縁種であることからクルマエビのアルギニンキナーゼと同様のアミノ酸配列を有している可能性が考えられた。

(3)種実類への応用

ペプチド D(ブラジルナッツ)、ペプチド E(カシューナッツ)、ペプチド F,G(アーモンド)、ペプチド H(落花生)を候補として選択し、分析条件を設定し（表 3（非公開））、合成ペプチド等について分析したところ、図 8（非公開）のように種実類の一斉分析が可能であることが示された。

本研究の成果は

- ・ 第 56 回全国衛生化学技術協議会年会にて発表した。現在、英文誌に投稿準備中である。

今後の研究活動について

今回、合成ペプチドを標準品として、甲殻類から抽出精製したタンパク質を酵素分解し、分析したところ、概ね理論通り標的のペプチドを検出することができた。一方、シバエビのペプチド C やオキアミのペプチド A については、想定してないピークも検出されてしまった。目的のタンパク質のデータベースが欠如している場合や、誤って記載されていることも考えられる。また、甲殻類に

については、エビだけでも数千種類、食用に限っても 50 種類以上存在するとされることから、特異的なペプチドについては、さらにサンプル数を増やして実験を行い、再現性、妥当性を明らかにする必要がある。種実類についても、アメリカ、EU の規制ではピスタチオ、クルミ、銀杏など十数品目が規制対象であり、さらに詳しく検討する必要がある。一方、甲殻類の FLAEEADR については、今回全ての甲殻類から検出され、甲殻類間のトロポミオシン相同性が 90% 程度あり、他の論文でも報告されていることから⁴⁾、甲殻類の共通マーカーペプチドとして活用できることが期待できた。定量性に関しては、まだ信頼性の高いデータが少ない状況ではあるが、安定同位体を内部標準として活用する手法で一定の成果も得られており、この手法を元に妥当性評価試験を実施していく予定である。

参考文献

- 1) Hiroyuki Nagai, Tomiaki Minatani, Kotaro Goto Development of a Method for Crustacean Allergens Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. J AOAC Int. 2015, 98, 1355-65.
- 2) Hiroyuki Nagai Development of a Method for Determination of Buckwheat Allergens Using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry., J. AOAC Int. 2017, 100, 1051-1057.
- 3) Hiroyuki Nagai, Kotaro Goto. Development of analytical method for egg and milk allergens in processed foods by LC-MS/MS Report of Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences. 2014, 22, 1-5.
- 4) Anas M., Abdel Rahman, Sandip Kamath, Andreas L. Lopata, Robert J. Helleur. Analysis of the allergenic proteins in black tiger prawn(Penaeus monodon) and characterization of the major allergen tropomyosin using mass spectrometry Rapid Commun. Mass Spectrom. 2011, 24, 2462-2470.

以上