

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
「バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び国民受容に関する研究」
分担研究報告書（平成 28 年度）

バイオテクノロジー応用食品のプロテオーム解析

研究分担者 手島玲子 徳島文理大学香川薬学部 特任教授

研究要旨：平成 28 年度は、バイオテクノロジー応用食品のプロテオーム解析に関する調査研究として、にわとり血清より抽出した各タンパク質溶液を Cy3 または Cy5 で標識し、さらに Cy2 で標識した内部標準サンプルを加えて 2D-DIGE (蛍光二次元電気泳動) を行った。蛍光画像は Typhoon に取り込み比較定量解析し、差のみられたスポットにつき、タンパク質の同定を nanoLC-MS/MS 分析で行った。具体的には、EGFP タンパク質遺伝子組換え (GM) 並びに非組換え (non-GM) 雌にわとりそれぞれ 3 匹ずつの血清について、タンパク質を抽出し、2D-DIGE を行った。約 2000 のスポットのうち、GM 群と non-GM 群の比較で、有意差 (p 値 < 0.05) があり、1.5 以上の発現の差異のみられるスポットが 18 個観察され、それらのスポットのうち 6 個について、発現の差異が 1.3 程度であるが $P < 0.005$ の 4 スポットについて MS 解析にて同定を行った。その結果、GM で上昇のみられたタンパク質として、補体因子 B 及び H タンパク質並びに C-reactive protein が同定された。なお、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットはなく、全体として両者間の変動幅は小さく、GM で安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。

プロテオミクス解析は、作用機作を知る観点から有用であるとともに、安全性評価への応用に関しても、組換え動物においても non-GM 及び GM 生物の間の比較情報が蓄積されてきている現状に鑑みて、有用な手法になり得ると思われた。

研究協力者

西島正弘 国立医薬品食品衛生研究所客員研究員

酒井信夫 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生
化学部

佐藤里絵 (独) 農研機構 食品総合研究所

秋山晴代 神奈川衛生研究所

A. 研究目的

生産性の向上や栄養付加を目的として、現在様々な遺伝子組換え食品が開発されている。宿主としては、植物に限らず、遺伝子組換えニワトリやサーモン等の遺伝子組換え動物も開発され実用化されつつある。これらはこれまで存在していなかったものであり、安全性評価の方法等について検討しておく必要があると考えられる。遺伝子組換え技術による安全性を考えるうえで、遺伝子組換えによる非意図的な影響を明らかにすることが必要であり、プロテオミクス等の網羅的解析法も一つの有用な方法になると考えられる。そこで本分担研究では組換え体と非組換え体を用いて 2D-DIGE を用いてプロテオミクスによる網羅的解析を行い、両者の比較を行うこと及び発現に差違のあったタンパク質の同定を行って、Mode of action (MOA) を知る

こと、また安全性評価への応用について検討することを目的とする。以下、今年度の概要を記す。

今年度は、組換え体として、EGFP タンパク質組換え (GM) ニワトリのプロテオーム解析として、1 か月令の GM 雌ニワトリ 3 匹と非組換え (NGM) ニワトリ 3 匹ずつの血清について 2D-DIGE を行い、GM と NGM 群のタンパク質発現の網羅的差異について解析を行った。

B. 研究方法

(1) ニワトリ血清のプロテオーム解析

(i) 供与試料

1 か月令の雌 GM, NGM それぞれ 3 匹ずつの組換えニワトリ血清約 0.5ml を広島大学大学院堀内教授より供与いただいた (動物 No: GM; T45, T53, T54, Non-GM; W43, W51, W55)。供与いただいた血清は、 -80°C ディープフリーザー内に保管した。

(ii) ニワトリ血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

ニワトリ血清試料各 32 μL に Buffer A (Equil load wash, Agilent cat No. 5185-5987) 368 μL を添加して攪拌し、Spin Filters (0.22

μm) でろ過した後、Multi Affinity Removal Spin Cartridge MARS Hu-6HC で試料中のアルブミン等を除去した。除去後の試料を Amicon Ultra-0.5 により濃縮した試料を評価用試料とした。

全評価用試料を等量ずつ混合したプール試料に対して200 pmol のCy2 (200 $\mu\text{mol/L}$ DMF 溶液、1 μL) を添加した。また、各評価用試料に対して表3 に従って200 pmol のCy3 及びCy5 (200 $\mu\text{mol/LDMF}$ 溶液、1 μL) を添加した。添加後氷上にて30 分間静置してラベリング反応を実施した。反応液に過剰量のリジン溶液 (10 mmol/L 溶液、1 μL) を添加して10 分間保持し反応を終了した。反応終了後に反応液総量と等量の2 \times サンプルバッファー (8 mol/L 尿素、4%(w/v) CHAPS、20 mg/mL DTT、2vol% IPG buffer pH3-11 NL) を添加してさらに10 分間氷上に保持したものを2D-DIGE 解析用の試料とした。

二次元電気泳動の操作、装置及び条件について以下に記す。

(a)一次元目電気泳動条件：一次元目電気泳動は、装置にMultiphoreII (GEヘルスケア) を、ゲルストリップにImmobiline™ DryStrip pH3-11 NL 24cmを用い、試料はカップローディングホルダーから添加した。フォーカシングは、トータルで44.2 kWh (300 V; 4 hr, 300-3500 V; 5 hr, 3500 V; 10 hr) 行った。泳動後、平衡化溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH8.8, 6 mol/L 尿素、30vol%グリセロール、2%(w/v) SDS) に0.25%(w/v) DTTを添加したA液及び同様に4.5%(w/v) IAAを添加したB液に対して各々10分間ずつ平衡化を行った。

(b)二次元目電気泳動条件:平衡化終了後、Ettan DALT IIシステム (GEヘルスケア バイオサイエンス) 及び12%(w/v) 均一ポリアクリルアミドゲル (自作) を用いて二次元目のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動は、3 W (15 $^{\circ}\text{C}$) 一定で泳動先端が完全に溶出するまで (約15時間) 行った。

ゲル画像取り込みは、Typhoon9400 (GE ヘルスケア社) を使用して行い、二次元電気泳動ゲルイメージは、Dycyber Ver7.0 (GE ヘルスケア社) を用い、画像品質確認及び定量比較解析を行った。

発現量の変動のみられたタンパク質については、質量分析用のRuby 染色後に取得した二次元電気泳動ゲルイメージと定量比較解析のゲルイ

メージをDecyder BVA ソフトを用いてマッチングして、個体間で発現変動の大きかった10 スポット (No. 279, 613, 646, 724, 1327, 1360, 1366, 1594, 1779, 1783) のうち、昨年同定の終わった3 スポット (No. 1366, 1360, 1594) を除いた7 スポットをスポットピッカー (GE ヘルスケア) を用いてピックアップした。ピックアップしたゲルプラグを50%メタノール溶液で洗浄した後に、100 μl の100 mM 炭酸水素アンモニウム及び還元処理液 (1.5 mg の DTT を1 ml の100 mM 炭酸水素アンモニウムに溶解) 10 μL を添加して57 $^{\circ}\text{C}$ で30 分間静置した。さらに、アルキル化処理液 (10 mg のヨードアセトアミドを1 ml の100 mM 炭酸水素アンモニウムに溶解) 10 μL を添加して室温で30 分間静置した。還元アルキル化処理後の試料に対してトリプシン消化液2 μL を加えた後に、50 mM 炭酸水素アンモニウム10 μL を加えた。チューブを30 $^{\circ}\text{C}$ に設定したドライバス上で一晩インキュベートして消化した。消化後の液を含むチューブを遠心乾燥機に入れて乾燥した。乾燥後に LC-MS/MS 測定用の溶媒 (1%蟻酸) 20 μL を加えた。チューブをVortex した後に MS 解析用 Total recovery tube (ウォーターズ社) に移した。

回収したペプチド溶液は、nanoLC-MS/MS 分析は、LC 部分に UltiMateR 3000 HPLC (ダイオネクス社)、質量分析装置に Q-Exactive Plus (サーモサイエンティフィック社) を用い Xcalibur (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) で LC 及び MS を制御して測定を実施した。LC、MS の分析条件を以下に示した。データベースは検索は Mascot (マトリックスサイエンス社) を使用し NCBI Inr の最新版に対して、Gallus gallus を指定して検索を行った。

C. 研究結果

(1) ニワトリ血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

GM, non-GM 雌にわとり6 個体ともに血清のアルブミン除去タンパク質としてそれぞれ約2000 のスポットが2D-DIGE で検出された。non-GM と GM 各3 匹につき、個体差を検出する目的で、n=3 で解析した。図1 に non-GM と GM の画像を重ね合わせて表示した例を示す。9 種の定量比較画像画像の各スポットの蛍光強度データについて変動の大きさにつき解析を行ったところ、GM 群と non-GM 群の比較で、有意差 (p 値 < 0.05) があり、1.5 以上の発現の差異のみられ

るスポットが 18 個観察された。結果を表 1 に示す。それらのスポットのうち 6 個について、MS 解析を実施することを計画した。なお、6 個のうち 3 個のスポットについては、昨年の non-GM のにわたりの雌雄の血清の個体差を調べる予備検討でタンパク質を同定済みであったので、今年度は残りの 3 個につき、新たに MS 解析を行った。また、発現の差異が 1.3 程度であるが $P < 0.005$ の 4 スポットについても MS 解析にて同定を行った。スポット解析したスポットの二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置を図 2 に、MS 解析によるタンパク質の同定結果を表 2 に、また、MS 解析により今年度新たに同定したタンパク質の名前を記した同定結果を二次元電気泳動ゲルイメージ上に記したものを図 3 に示した。

GM で上昇のみられたタンパク質として、補体因子 B 及び H タンパク質並びに C-reactive protein が同定された。なお、表 1 に示すように、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットとして、スポット 1778 が唯一該当したが、このスポットの appearance (出現率) が 6/29 と低く、再現性が低いスポットであった。従って、再現性の確認されたスポットの中で、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットはなく、全体として両者間の変動幅は小さく、GM で安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。

また、今回有意差の見られた血清タンパク質は、前年度に雌雄も含めた個体間での変動があまり大きくないことが調べられており、遺伝子組換えによる非意図的影響を調べるためのよいマーカーにもなり得ると思われた。

なお、今回 EGFP タンパク質を遺伝子導入しているため、血清中で EGFP タンパク質の検出が可能ではないかと考え、EGFP タンパクの分子量及び等電点の近いスポットとして、スポット 1779, 1783 を選び、タンパク質の同定を行ったが、EGFP タンパク質を検出することはできなかった。これは、GM 動物の血清中の EGFP タンパク質の濃度上昇が他臓器に比べ低いことが一因と考えられた。

D. 考察

組換えニワトリ血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

今年度は、組換え体として、EGFP タンパク質組換え (GM) ニワトリのプロテオーム解析をお行った。具体的には、1 か月令の GM 雌ニワトリ 3

匹と非組換え (NGM) ニワトリ 3 匹ずつの血清について 2D-DIGE を行い、GM と NGM 群の血清中タンパク質発現の網羅的差異について解析を行った。

その結果、GM で上昇のみられたタンパク質として、補体因子 B 及び H タンパク質並びに C-reactive protein が同定された。なお、GM, non-GM 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットはなく、全体として両者間の変動幅は小さく、GM で安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。

E. 結論

ニワトリ血清を用いたタンパク質網羅的比較解析

1 か月令の雌の組換え個体、及び非組換え個体それぞれ 3 匹ずつから、血清を採取し、GM 及び non-GM 個体のタンパク質発現の差を網羅的に調べるために 2D-PAGE を行った。各個体血清タンパク質として約 2000 スポットが観察されたが、そのうち、GM, non-GM 間で、3 倍以上の発現の差異のみられたスポットは観察されなかった。変動の見られたタンパク質のうち、10 個のタンパク質を MS 解析から新たに同定した。全体として、血清タンパク質の発現量に GM, non-GM 群で差もほとんどみられなかったため、GM で安全性上の問題となる変動は引き起こされていないものと思われた。

プロテオーム解析は、安全性評価ばかりでなく、組換え体の作用機作 (Mode of Action) を知るうえでも有用であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

なし

2. 論文発表

1) Ogawa T., Sasaki T., Okazawa A., Teshima R., Misawa N., Ohta D. "Metabolite profiling and proteome analysis of genetically modified lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) that produce astaxanthin and its esterified derivatives" *Jap.J.Food Chem. Safety* 23, 9-19 (2016)

2) Yuki Y, Kurokawa S, Kozuka-Hata H, Tokuhara D, Mejima M, Kuroda M, Oyama M, Nishimaki-Mogami T, Teshima R, Kiyono H. “Differential analyses of major allergen proteins in wild-type rice and rice producing a fragment of anti-rotavirus antibody”.*Regul Toxicol Pharmacol.*76, 128-136 (2016)

3) Takabatake R., Masubuchi T., Futo S., Minegishi Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Kurashima T, Mano J., Kitta K. “Selection of suitable DNA extraction methods for genetically modified maize 3272, and development and evaluation of an event-specific quantitative PCR method for 3272”*Food Hyg.Saf.Sci.* 57, 1-6 (2016)

4) Satoh R, Teshima R, Kitta K, Lang GH, Schegg K, Blumenthal K, Hicks L, Labory-Carcenac B, Rouquié D, Herman RA, Herouet-Guicheney C, Ladics GS, McClain S, Poulsen LK, Privalle L, Ward JM, Doerrler N, Rasclé JB. “Inter-laboratory optimization of protein extraction, separation, and

fluorescent detection of endogenous rice allergens”*Biosci Biotechnol Biochem.* 80, 2198–2207 (2016).

5) Mano J., Nishitsuji Y., Kikuchi Y., Fukudome S., Hayashida S., Kawakami H., Kurimoto Y., Noguchi A., Kondo K., Teshima R., Takabatake R., Kitta K. “Quantification of DNA fragmentation in processed foods using real-time PCR”*Food Chemistry* 226, 149-155 (2017)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

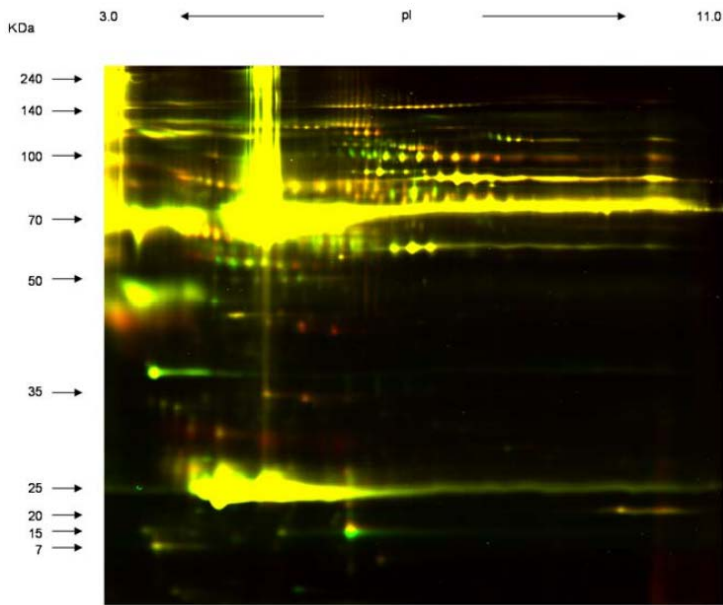


図1 Non-GMとGMの重ね合わせ2D-DIGE-gelイメージ
 Cy3: 緑-non-GM, Cy5: 赤-GM (両サンプルに同程度含まれるスポットは黄色で表示される.)

表1 Non-GM 試料に対して GM 試料で、1.5 倍以上の上昇
 並びに 1.5 倍以下の減少が検出されたスポット

No.	Master No.	Appearance	P-value	Av. Ratio ^{*1}
1	1778	6(29)	0.023	5.98
2	1783	28(29)	0.0012	2.85
3	1366	22(29)	0.0025	2.03
4	1589	18(29)	0.00079	1.96
5	1779	29(29)	0.0003	1.83
6	1768	29(29)	0.00088	1.82
7	1360	22(29)	0.0026	1.74
8	1575	18(29)	0.002	1.67
9	1514	18(29)	0.012	1.67
10	1599	24(29)	0.012	1.67
11	1327	25(29)	0.00025	1.66
12	1594	28(29)	0.01	1.64
13	1578	21(29)	0.0033	1.57
14	1362	12(29)	0.0059	1.57
15	726	18(29)	0.0076	1.57
16	1586	15(29)	0.013	1.56
17	665	18(29)	0.023	1.56
18	1208	12(29)	0.018	1.53
	646	29(29)	0.0012	1.31
	279	28(29)	0.0049	1.27
	724	29(29)	0.00031	1.24
	613	26(29)	0.0011	-1.36

* MS解析を行ったスポットは、マスターNo.の部分を赤で示した。
 また、昨年同定したものは、マスターNo.の部分を緑で示した。

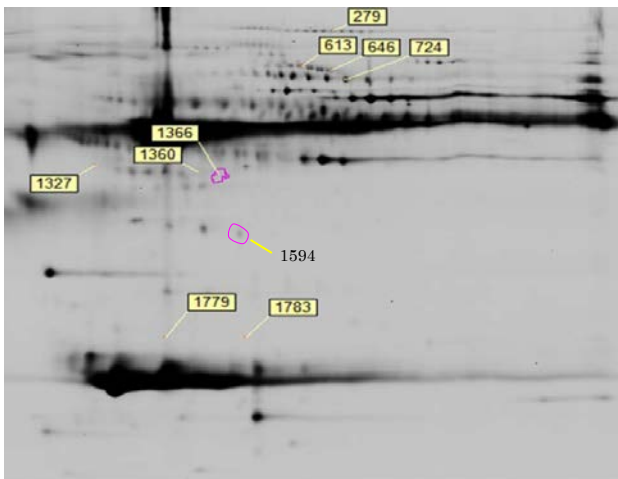


図 2 ニワトリ血清の MS 解析を実施したスポットの二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

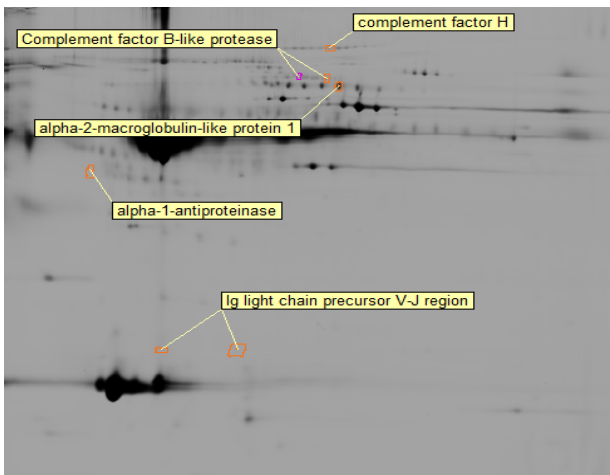


図 3. ニワトリ血清の MS 解析を実施したスポットの同定結果並びに二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

表 2 ニワトリ血清の MS 解析を実施したスポットの同定結果

Spot No.	Ac.No.	Protein Name	Score	MW
1327	gi 971400187	alpha-1-antiproteinase	339	48006
1779	gi 104728	Ig light chain precursor V-J region	456	22769
724	gi 971434955	alpha-2-macroglobulin-like protein 1	3204	164547
613	CFBL_CHICK	Complement factor B-like protease	310	27719
646	CFBL_CHICK	Complement factor B-like protease	314	27719
1783	gi 104728	Ig light chain precursor V-J region	291	22769
1366	gi 478246985	alpha-1-antiproteinase , antitrypsin	200	48854
1360	gi 478246985	alpha-1-antiproteinase , antitrypsin	297	48854
279	gi 363736454	complement factor H [Gallus gallus]	730	152721
1594	gi 922959946	C-reactive protein, pentraxin-related precursor [Gallus gallus]	148	35307