

平成 29 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 29 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 29 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、ゲノム編集並びに野生型じゃがいも塊茎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、ゲノム編集での形質転換型 (TG-P) 並びに野生型 (NT-P) じゃがいも各 3 サンプルについて、タンパク質を抽出し、2D-DIGE を行った。約 5500 のスポットのうち、TG-P 群と NT-P 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 13 個 (増加 5 個、減少 8 個) 観察され、それらのスポットのうち 10 個について MS 解析にて同定を行った。その結果、TG-P で上昇のみられたタンパク質として、Heat shock 70kDa protein, patatin-11 が同定された。なお、TG-P, NT-P 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットは 4 倍に増加のみられた 1 スポット以外にはなく、全体として両者間の変動幅は小さく、GT-P 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、野生型とゲノム編集群の間で統計解析に十分なサンプル（本年度の研究では 3 サンプル）以上提供される場合の網羅的プロテオーム解析の有用性が示された。また、発現の比較的大きいタンパク質を同定することで、ターゲットを絞ったオミクス解析を行うことも可能であることが示された。

研究協力者

佐藤里絵（独）農研機構 食品総合研究所  
酒井信夫 国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部

### 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。またゲノム編集という新しい技術による動植物のバイオテクノロジー応用食品も開発され、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。バイオテクノロジー技術による安全性を考えるうえで、バイオテクノロジー技術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バイオテクノロジー技術生産品と野生型を用いて 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、バイオテクノロジー技術応用生物として、TALEN 法でゲノム編集 (TG-P) されグリコアルカロイドの含量の大きく減少した形質転換系統じゃがいも塊茎を用い、野生型 (NT-P) (品種サッシー) じゃがいも塊茎由来の、各 3 サンプルのタンパク質抽出液につき、プロテオーム解析を行った。具体的には、2D-DIGE を用い、TG-P と NT-P 群のタンパク質の発現の定量的網羅的解析を行い、差異のあったタンパク質を選択し、変動の大きかったタンパク質につき nanoLC-MS/MS にて同定を行った。

### B. 研究方法

(1) じゃがいも塊茎タンパク質のプロテオーム解析

(i) 供与試料

ゲノム編集(TG-P)及び野生型(NT-P)じゃがいも塊茎それぞれ約1gからなる3サンプルを理化学研究所環境資源科学研究センター統合メタボロミクス研究グループの梅基直行先生より供与いただいた(サンプルTG; TG-P1, TG-P2, TG-P NT; NT-P1, NT-P2, NT-P3)。供与いただいたサンプルは、-80℃ディープフリーザー内に保管した。

#### (ii) じゃがいも塊茎を用いたタンパク質網羅的比較解析

じゃがいも塊茎試料に Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、7M 尿素、2M チオ尿素、5 mM 酢酸マグネシウム、4%(w/v)CHAPS、1錠/50mL Complete Inhibitor Cocktail Tablets) 2mL を加えて混和した。混和後に超音波処理(0.2秒間 ON + 0.3秒間 OFF のサイクルで20秒間 x2回)を実施した。超音波処理後の試料を Amicon Ultra-0.5 に添加して微量高速冷却遠心機を用いて 20,000xg で10分間遠心限外ろ過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  $\mu$ mol/L DMF 溶液、1  $\mu$ L) 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  $\mu$ mol/LDMF 溶液、1  $\mu$ L) 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  $\mu$ L) 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 kVh (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、30 W (15℃) 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. 1845, 2566, 2618, 2630, 2657, 2901, 2054, 4851, 5401, 5648)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。ピックアップした各ゲルプラグを50%メタノール溶液で洗浄した後に、100  $\mu$ L 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  $\mu$ L を添加して57℃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  $\mu$ L 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  $\mu$ L を加えた後に、50 mM 炭酸水素アンモニウム10  $\mu$ L を加えた。チューブを30℃に設定したドライバス上で一晚インキュベートして消化した。消化後のゲルから消化ペプチドを抽出液(50%アセトニトリル、5%ぎ酸)で10分間超音波処理して抽出した液を遠心濃縮機で、乾燥後、LC-MS/MS 測定用の溶媒(0.1%蟻酸)30  $\mu$ L に溶解しLC-MS/MS 分析試料とし、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の、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 NCBIInr の最新版に対

して、*Solanum tuberosum* (Potato)を指定して検索を行った。

### C. 研究結果

#### (1) ジャがいも塊茎を用いたタンパク質網羅的比較解析

TG-P, NT-P ジャがいも塊茎 6 サンプルから抽出されたタンパク質としてそれぞれ約 5500 のスポットが 2D-DIGE で検出された。NT-P と TG-P 各 3 サンプルにつき、群間の差を検出する目的で、 $n=3$  で比較解析した。図 1 に NT-P と TG-P 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、TG-P 群と NT-P 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 13 個観察された。そのうち、5 個が TG-P 群で NT-P 群に比べ上昇がみられたスポットで、8 個が TG-P 群で NT-P 群に比べ減少がみられたスポットであった。結果を表 1 に示す。それらのスポットのうち発現変動の大きかった 10 個のスポットについて、MS 解析を実施することを計画した。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 に示す。

TG で上昇のみられたタンパク質として、ヒートショック 70kDa (Hsp70) タンパク質、液胞貯蔵タンパク質である patatin -11 タンパク質が同定された (表 1(a))。また、No. 4851 は、probable inactive patatin-3-Kuras 1 (PT3K1) と推定された。ヒートショックタンパク質、パタチンともにストレスに応答して変動するタンパク質と思われるが、変動幅は、同定されたタンパク質では 3 倍以下の発現の差がみられたのみであった。また、発現の減少したタンパク質として、表 1(b) に示すようにアミノ酸代謝にかかわる glutamate-glyoxalate amino-transferase-2-like, 澱粉の代謝にかかわる Granule-bound starch synthase 1, ミトコンドリアでの ATP 合成に関与する ATP synthase subunit beta 等が同定されたが、いずれも 3 倍以下の発現の差しかみられなかった。以上より、TG-P 群において NT-P 群に比して安全性上

の問題となるタンパク質の変動は引き起こされていないものと思われた。

なお、今回有意に TG 群で上昇の見られたストレスに応答すると思われる Hsp70 タンパク質は、形質転換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。

### D. 考察

#### ジャがいも塊茎を用いたタンパク質網羅的比較解析

今年度は、バイオテクノロジーを応用した形質転換体として TALEN 法でゲノム編集されグリコアルカロイドの含量の大きく減少した系統のジャがいも塊茎を用いてプロテオーム解析を行った。具体的には、ゲノム編集 (TG-P) ジャがいもと野生型 (NT-P) ジャがいも塊茎由来の、各 3 サンプルのタンパク質抽出液につき、2D-DIGE を用い、TG-P と NT-P 群のタンパク質の発現の定量的網羅的解析を行い、差異のあったタンパク質を選択し、変動の大きかったタンパク質につき nanoLC-MS/MS にて同定を行った。

その結果、TG-P で上昇のみられたタンパク質として、Hsp70 タンパク質、patatin -11 タンパク質が同定された。なお、TG-P, NT-P 間で 3 倍以上の発現の差のみられたスポットは上昇のみられた 1 スポット以外になく、全体として両者間の変動幅は小さく、ゲノム編集で、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、形質転換体の野生株に対する変動幅は、以前プロテオーム解析を行った DREB1A 転写因子を遺伝子導入したジャがいも塊茎の野生株に対する変動幅と比較して、同等以下であることも確認された<sup>1)</sup>。

### E. 結論

#### ジャがいも塊茎を用いたタンパク質網羅的比較解析

ゲノム編集されたジャがいも (TG-P) 及び野生株ジャがいも (NT-P) 各 3 サンプルから、タンパク質を抽出し、TG-P 及び NT-P 群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。各サンプルからタンパク質として約 5500 スポットが観察されたが、そのうち、TG-P, NT-P 群間で、3 倍以上の発現の差異のみられたスポットは TG-P で上昇のみられた 1 スポットのみであった。1.5 倍以上の変動の見られたスポット 13 個のうち、変動の大きかった 10 個のスポットを選択し、タンパク質の同定を MS

解析で行った。全体として、じゃがいも塊茎タンパク質の発現量に TG-P, NT-P 群間でほとんど差がみられなかったため、ゲノム編集で安全性上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、またバイオマーカーの探索のためにも有用な手法であることが示された。

#### F. 参考論文

1) Nakamura R., Satoh R., Nakamura R., Shimazaki T., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Kikuchi A., Watanabe K.N., Teshima R. “Immunoproteomic and two-dimensional difference gel electrophoresis analysis of *Arabidopsis dehydration response element-binding protein 1A (DREB1A)*-transgenic potato” *Biol. Pharm. Bull.* 33(8), 1418-1425 (2010)

#### G. 健康危険情報

なし

#### H. 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) 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)

4) Tranquet O, Gaudin JC, Patil S, Steinbrecher J, Matsunaga K, Teshima R, Sakai S, Larré C, Denery-Papini S., “A chimeric IgE that mimics IgE from patients allergic to acid-hydrolyzed wheat proteins is a novel tool for in vitro allergenicity assessment of functionalized glutens.” *PLoS One.* 12(11):e0187415 (2017)

#### I. 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

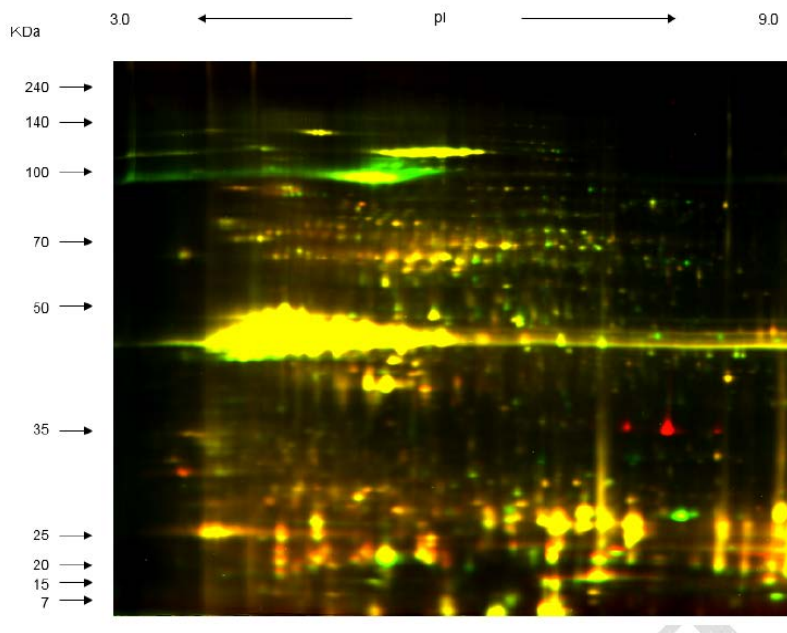


図1 NT-P-1 と TG-P-1 の重ね合わせ 2D-DIGE-gel イメージ  
Cy3: 緑- NT-P-1 , Cy5: 赤-TG-P-1 (両サンプルに同程度含まれるスポットは黄色で表示される.)

表1 NT-P 試料に対して TG-P 試料で、1.5倍以上の上昇 (a) または 1.5倍以下の減少 (b) が検出されたスポット

(a) TG で増加したスポット

No.	Master No.	T-test	Av. Ratio (TG / NT)	1-ANOVA
1	2054	0.0094	1.90	0.0094
2	4136	0.0082	2.87	0.0082
3	4851	0.011	4.06	0.011
4	5401	0.023	1.62	0.023
5	5648	0.042	1.66	0.042

(b) TG で減少したスポット

No.	Master No.	T-test	Av. Ratio (TG / NT)	1-ANOVA
1	1845	0.049	-1.53	0.049
2	2566	0.0038	-1.72	0.0038
3	2618	0.015	-1.65	0.015
4	2630	0.014	-1.58	0.014
5	2657	0.042	-1.57	0.042
6	2901	0.031	-1.83	0.031
7	3854	0.00099	-1.61	0.00099
8	5828	0.043	-1.95	0.043

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。

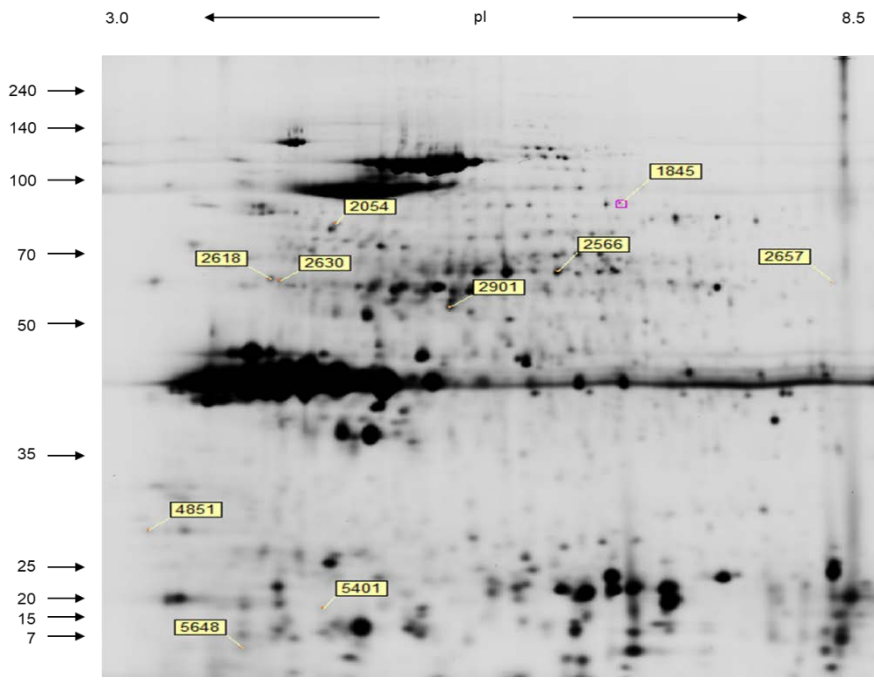


図2 ジャがいも塊茎のMS解析を実施したスポットの二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

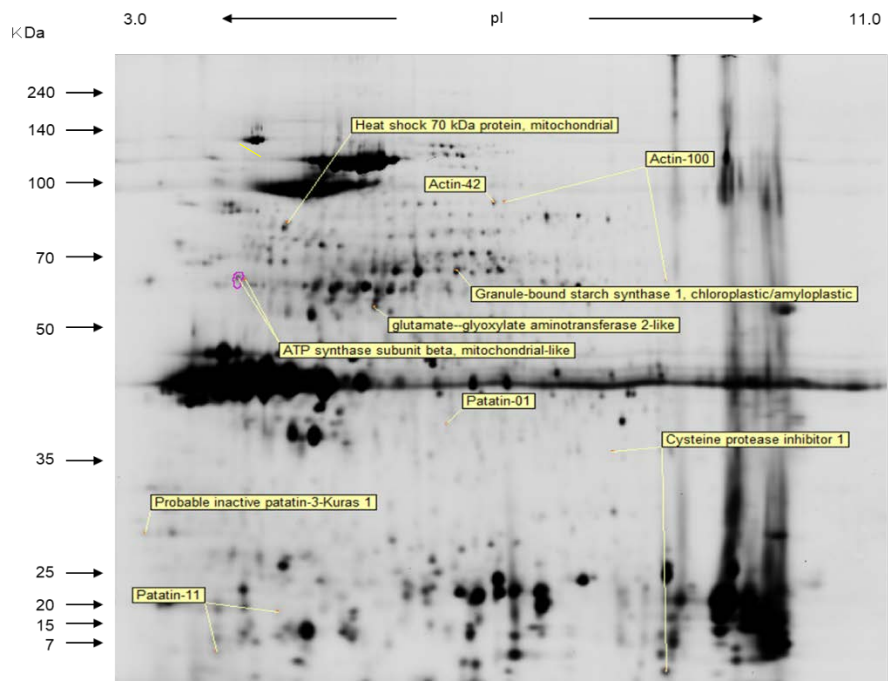


図3. ジャがいも塊茎のMS解析を実施したスポットの同定結果並びに二次元電気泳動ゲルイメージ上の位置

表2 ジャがいも塊茎のMS解析を実施したスポットの同定結果

(a) 発現の上昇したスポット

No.	Master No.	T-test	Av. Ratio	Protein Name	Mw	Score
1	4851	0.011	4.06	Probable inactive patatin-3-Kuras 1	41224	538
2	2054	0.0094	1.9	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	73317	4708
3	5648	0.042	1.66	Patatin-11	42528	432
4	5401	0.023	1.62	Patatin-11	42528	521

(b) 発現の減少したスポット

No.	Master No.	T-test	Av. Ratio	Protein Name	Mw	Score
1	2901	0.031	-1.83	glutamate--glyoxylate aminotransferase 2-like	53058	847
2	2566	0.0038	-1.72	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	67160	869
3	2618	0.015	-1.65	ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like	59646	1123
4	2630	0.014	-1.58	ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like	59646	607
5	2657	0.042	-1.57	Actin-100	39756	257
6	1845	0.049	-1.53	Actin-100	39756	210

Av.Ratio: TG / NT

