

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00939

研究課題名(和文) ターゲット・プロテオミクスによる核果類アレルゲンタンパク質の一斉定量法の開発

研究課題名(英文) Development of quantification method for allergenic proteins in peach and sweet cherry by targeted proteomics

研究代表者

一法師 克成 (Ippoushi, Katsunari)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：30355606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：LC/MS/MSと安定同位体標識内部標準ペプチドLVASPSGGSIK* (K*：安定同位体標識K) およびISASTNC[CAM]ATVK* (C[CAM]：カルバミドメチル化C)を用いて、モモの主要なアレルゲンタンパク質であるPru p 1およびPru p 3の定量法を開発した。さらに、モモアレルゲンタンパク質の定量法の開発と同様の手法で、オウトウの主要なアレルゲンタンパク質であるPru av 1、Pru av 3およびPru av 4の定量法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で開発された定量法は、低・無アレルゲンモモやオウトウ品種の育成および栽培技術の研究開発への利用が期待される。

食品表示法では、モモを原材料として含む加工食品については、モモを原材料として含む旨を可能な限り表示するよう努めることとされている。さらなる研究開発を行うことにより、本定量法はモモのアレルギー食品表示の検証などへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Pru p 1 and Pru p 3 are the main allergenic proteins of peach. In this study, we developed a quantitative method for these proteins based on protein absolute quantification with LC/MS/MS, and LVASPSGGSIK* (K*: stable isotope-labelled K) and ISASTNC[CAM]ATVK* (C[CAM]: carbamidomethyl-modified C), internal standard peptides. Using the same methodology used for peach allergens, we developed a quantitative method for Pru av 1, Pru av 3, and Pru av 4, main allergenic proteins contained in sweet cherry.

研究分野：食品分析

キーワード：ターゲット・プロテオミクス モモ オウトウ アレルゲン LC/MS/MS 安定同位体標識内部標準ペプチド 核果類 定量

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔アレルギー症候群は、口腔などのかゆみ、まれに、蕁麻疹や下痢等の消化器症状、さらには、アナフィラキシーショックや重篤な全身症状を呈する。口腔アレルギー症候群の原因食物の一つに核果類のモモやオウトウがあり、口腔アレルギー症候群に關与する複数のアレルゲンタンパク質が同定されている。モモの Pru p 1 およびオウトウの Pru av 1 は、シラカバ花粉の主要抗原 Bet v 1 のホモログ群 pathogenesis related-protein 10 (PR-10)に属するタンパク質で、このタンパク質族は相同性が高く、シラカバの Bet v 1 に反応する IgE が、Pru p 1 や Pru av 1 にも反応し、モモやオウトウの摂食時に口腔アレルギー症候群を誘発する。pathogenesis related-protein 5 (PR-5)に属する Pru p 2 および Pru av 2 は、thaumatin-like protein と呼ばれるアレルゲンタンパク質である。Pru p 3 および Pru av 3 は、lipid transfer protein (LTP)タンパク質族に属し、このタンパク質族は pollen-food syndrome として発症させることもあるが、花粉に感作されなくても口腔アレルギー症候群を引き起こす。Pru p 4 および Pru av 4 は、profilin タンパク質族に属しており、多種花粉の重複感作患者に profilin 陽性者が多い(日本耳鼻咽喉科学会会報, 117, 702-703, 2014)。

食品表示法では、特定のアレルギー体質をもつ消費者の健康危害の発生を防止する観点から、モモは、特定原材料に準ずるものとして、モモを原材料として含む加工食品については、モモを原材料として含む旨を可能な限り表示するよう努めることとされている。

2. 研究の目的

本研究課題では、LC/MS/MS を用いたターゲット・プロテオミクスによるモモのアレルゲンタンパク質 Pru p 1、Pru p 2、Pru p 3 および Pru p 4 ならびにオウトウのアレルゲンタンパク質 Pru av 1、Pru av 2、Pru av 3 および Pru av 4 の一斉定量法を開発し、低・無アレルゲンモモやオウトウ品種の育成等に活用される分析法を提供する。

3. 研究の方法

UniProtKB に登録されている Pru p 1、Pru p 2、Pru p 3 および Pru p 4 ならびに Pru av 1、Pru av 2、Pru av 3 および Pru av 4 のアミノ酸配列情報を用いて、トリプシン消化により各アレルゲンタンパク質から生じるペプチド群の中から、PeptideCutter による *in silico*でのトリプシン消化効率、ペプチドの鎖長、翻訳後修飾の有無や安定性などを考慮し、安定同位体標識内部標準ペプチド(AQUA ペプチド)に適した配列を持つ、各アレルゲンタンパク質に対応したペプチド(8種類)を選定した。選定したペプチド中のC末端のアミノ酸を安定同位体(¹³C、¹⁵N)で標識したアミノ酸に置換した AQUA ペプチドを合成した。

LC/MS/MS の質量分析部へ AQUA ペプチドをインフージョンし、フルスキャン測定およびプロダクトイオン測定を行い、これらペプチドのMRM トランジションを決定した。さらに、検出感度の向上のため、LC/MS/MS のコーン電圧やコリジョンエネルギー値を最適化した。AQUA ペプチド、モモおよびオウトウタンパク質トリプシン消化物を用いて、オクタデシルシリル(C₁₈)基を有した逆相クロマトグラフィー(LC)条件を検討し、定量に適した LC 条件を決定した。さらに、開発した定量法の直線性や精度を確認した後、アレルゲンタンパク質の分布を調べた。

4. 研究成果

(1) モモアレルゲンタンパク質 Pru p 1、Pru p 2、Pru p 3 および Pru p 4 の定量法

Pru p 1 および Pru p 3 (図1)について定量法を開発した。Pru p 2 および Pru p 4 については、トリプシン消化により生成する、AQUA ペプチドに対応した内生のペプチドを検出できなかった。

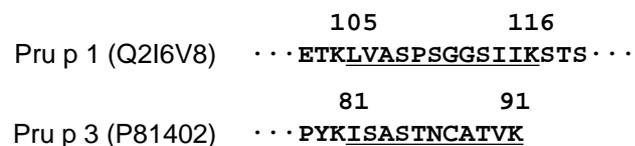


図1 Pru p 1とPru p 3のアミノ酸配列

プロテオタイプックペプチドとして、図1の下線で示したアミノ酸配列

を有するペプチドを選択し、AQUA ペプチド LVASPSGGSIK[¹³C₆, ¹⁵N₂] および ISASTNC[CAM]ATVK[¹³C₆, ¹⁵N₂] (C[CAM]: carbamidomethyl-modified C) を合成した。定量に用いるプロテオタイプックペプチドおよび AQUA ペプチドのMRM トランジション、コーン電圧およびコリジョン電圧を表1に示す。また、LC 条件を以下のように決定した。

インジェクション量: 1 μL、カラム: ACQUITY UPLC CSH130 C₁₈ column (150mm×1mm、1.7 μm、Waters)、カラム温度: 40 °C、流速: 70 μL/分、移動相 A: 水+0.1%ギ酸、移動相 B: アセトニトリル+0.1%ギ酸、グラジエント: 2%B(0分)-2%B(0.5分)-55%B(2分)-70%B(9分)-98%B(9.2分)-98%B(9.5分)-2%B(10分)

図2にもモモ品種‘あかつき’果皮から抽出したタンパク質のトリプシン消化物のMRM クロマトグラムを示す。Pru p 1 の定量に用いる LVASPSGGSIK および Pru p 3 の定量に用いる ISASTNC[CAM]ATVK (内生のトリプシン消化ペプチドおよび AQUA ペプチド) のピークが保持時間 7.0 分および 6.5 分に明瞭に確認された。

本定量法の妥当性を確認した。LVASPSGGSIK[¹³C₆, ¹⁵N₂]については 3.1~200 fmol/μL の濃度範囲で、ISASTNC[CAM]ATVK[¹³C₆, ¹⁵N₂]については、13~200 fmol/μL の濃度範囲で直線性 (r²>0.97)

を示した。また、日間変動(5日)を調べたところ、その変動係数は、11.6%~30.1%であった(表2)。

モモ品種‘あかつき’、‘浅間白桃’および‘川中島白桃’の Pru p 1 および Pru p 3 の分布を調べたところ、果肉より果皮に多く含まれていることが分かった(Pru p 3 は、果肉では検出されなかった)。表2は、‘あかつき’の Pru p 1 および Pru p 3 の分布を示している。

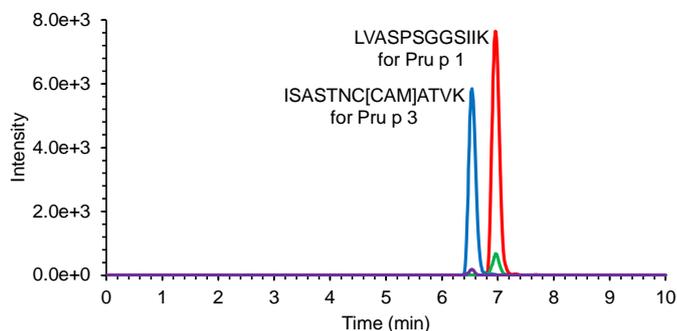


図2 ‘あかつき’果皮のトリプシン消化物のMRMクロマトグラム
青線と赤線: 内生ペプチド、紫線と緑線: AQUAペプチド

表1 LVASPSGGSIK、ISASTNC[CAM]ATVK およびこれらの AQUA ペプチドの MRM トランジション、コーン電圧およびコリジョン電圧

Peptide	m/z		Cone voltage (V)	Collision Energy (V)
	Precursor ion (z = +2)	Product ion (z = +1)		
LVASPSGGSIK	564.8	916.5 (y10)	38	26
	564.8	758.4 (y8)		
	564.8	845.5 (y9)		
LVASPSGGSIK [¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂]	568.8	924.5 (y10)	38	26
	568.8	766.5 (y8)		
	568.8	853.5 (y9)		
ISASTNC[CAM]ATVK	576.3	951.5 (y9)	40	30
	576.3	793.4 (y7)		
	576.3	1038.5 (y10)		
ISASTNC[CAM]ATVK [¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂]	580.3	959.5 (y9)	40	30
	580.3	801.4 (y7)		
	580.3	1046.5 (y10)		

斜体および太字のトランジションは定量用で、他のトランジションは同定用。

表2 Pru p 1 および Pru p 3 の定量法の日内・日間変動

Day	Concentration (nmol/g fresh weight)			Coefficient of variation (%)			n
	Pulp ^a		Skin	Pulp		Skin	
	Pru p 1	Pru p 1		Pru p 1	Pru p 1		
1	0.68	4.3	22	7.9	5.8	9.7	5
2	0.64	4.9	20	6.5	4.6	6.9	5
3	0.36	5.4	23	13.1	3.8	15.8	5
4	0.33	6.9	21	9.2	4.1	8.9	5
5	0.57	6.1	24	12.7	5.6	6.3	5
1-5	0.52	5.5	22	30.1	17.3	11.6	25

‘あかつき’を分析。^a 果肉の Pru p 3 は検出されなかった。

(2) オウトウアレルゲンタンパク質 Pru av 1、Pru av 2、Pru av 3 および Pru av 4 の定量法

モモのアレルゲンタンパク質の定量法の開発と同様の手法で、Pru av 1、Pru av 3 および Pru av 4 の定量法を開発した。Pru av 2 については、トリプシン消化により生成する内生ペプチドおよび AQUA ペプチドに適した LC 条件を見出せなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ippoushi Katsunari, Tanaka Yoshimi, Wakagi Manabu, Hashimoto Naoto, Takano-Ishikawa Yuko	4. 巻 80
2. 論文標題 Assessment of Pru p 1 and Pru p 3 in peach fruit by liquid chromatography-tandem mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Food Composition and Analysis	6. 最初と最後の頁 10～15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jfca.2019.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 一法師克成、田中良美、若木学、橋本直人、石川(高野) 祐子
2. 発表標題 LC/MS/MSと安定同位体標識ペプチドを用いたモモアレルギータンパク質の定量法
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsunari Ippoushi, Yoshimi Tanaka, Manabu Wakagi, Naoto Hashimoto, Yuko Takano-Ishikawa
2. 発表標題 Quantification method of peach allergens by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with the use of stable isotope-labelled peptides
3. 学会等名 31st EFFoST International Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katsunari Ippoushi, Yoshimi Tanaka, Manabu Wakagi, Naoto Hashimoto, Yuko Takano-Ishikawa
2. 発表標題 Analysis of cherry allergens by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using stable isotope-labelled peptides
3. 学会等名 48TH International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----