

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：21301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780268

研究課題名（和文） 畜産食品の品質・機能向上を目的としたプロテオミクスによるバイオマーカー探索

研究課題名（英文） Biomarker Analysis by Proteomics for Improvement in Food Quality and Function of Animal Foods Products

研究代表者

石川 伸一（SHIN-ICHI ISHIKAWA）

宮城大学・食産業学部・准教授

研究者番号：00327462

研究成果の概要（和文）：本研究では、卵白製品の品質・機能向上を目的としてプロテオミクス分析を用いた卵白からのバイオマーカーの探索を行った。鶏卵卵白タンパク質の i) 品種間の違い、ii) 貯蔵による変化、および iii) 加工による変化を蛍光二次元電気泳動法による調べた。コントロールと比較を行い卵白からのバイオマーカー候補分子を明らかにした。明らかにされたマーカーを用いることで、鶏卵の食品科学の発展に寄与することができると思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to detect biomarkers from egg white using proteomic analysis for improvement in food quality and function of the products. Molecular changes in egg white proteins i) among different egg varieties, ii) during storage and iii) production processes have been investigated using 2-Dimensional Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE). We revealed the specific biomarkers from egg white proteins compared with control. These results support the use of biomarkers as a valuable tool towards understanding the food science of egg white.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：畜産食品、プロテオミクス、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

乳・肉・卵の畜産食品は、栄養価が高く、おいしいだけではなく、生体調節機能を有する食品として、その重要性がますます増加している。近年では、特に人の健康に役立つ畜産食品が、生活習慣病や老化を予防する観点から強く求められている。また、畜産食品の製造加工技術の進展はめざましいものがあるが、社会のニーズに対応したより高品質、高機能を有する食品の開発にむけた新しい

畜産食品の創製が求められている。このような畜産食品のさらなる高品質化・高機能化のためには、原材料のばらつきや加工・貯蔵による成分変化を網羅的に把握し、食品としての基礎的な知見を集積しておくことがきわめて大切であるが、これらに関するデータは非常に少ないのが現状である。

ポストゲノム時代といわれる昨今、細胞や組織、個体で発現しているタンパク質を網羅的に解析する「プロテオーム（Proteome）解

析」すなわち「プロテオミクス (Proteomics)」は、生命科学、医学、薬学の分野で、遺伝子レベルではわからない生命の「リアルなふるまい」を知るのに大いに役立っている。おもに二次元電気泳動法と質量分析を組み合わせたこの解析方法は、基礎生命科学への利用だけではなく、医学における疾病診断、副作用、予後バイオマーカーの開発や、薬学における創薬の薬剤標的分子の探索において広く利用されており、年々このプロテオミクスが果たす役割は大きくなっている。さらに、質量分析機器の発達や超高感度の蛍光染色色素の開発など、プロテオミクスを支える技術は飛躍的に発展し続けており、これまで検出できなかった微量成分の同定やそれらの構造・機能解析が急速に可能となっている。

食品分野におけるプロテオミクスとして、食品の品質向上、新規機能性食品の開発、食の安全性の確保等への利用が期待されている。ここ数年、各種食品タンパク質のプロテオミクス解析が急激に行われはじめ、従来の分析方法では検出できなかった微量食品成分の分離・同定などが行われている。医学・薬学のプロテオミクス研究が、国内外を問わず、大規模かつ戦略的に展開されているのに対し、食品のプロテオミクス研究は、その応用の範囲や期待は大きいにもかかわらず、一部を除いてはまだ散発的な取り組みであるのが現状である。

私たちは、畜産食品分野におけるプロテオミクス利用の可能性に注目し、2008年度から乳・肉・卵のプロテオミクス解析を積極的に行ってきた。具体的には、「ウシ初乳、移行乳および常乳のプロテオーム解析」、「牛肉の真空熟成および牛肉ホモジネート貯蔵におけるプロテオーム解析」、「鶏卵卵白タンパク質の貯蔵中のプロテオーム解析」、「食品科学へ応用した経時的プロテオーム解析」などである。特に、食肉タンパク質のプロテオミクス研究において、私たちは熟成マーカーとなるタンパク質を見出した。牛肉ホモジネートを用いた *in vitro* の熟成モデル系において、そのバイオマーカーを指標とした各種プロテアーゼインヒビターおよびミネラル塩添加の影響について調べた結果、熟成メカニズムの一端を明らかにすることができた。

本研究では、乳・肉・卵の3つの畜産食品を研究対象とし、タンパク質の i) 品種間の違い、ii) 加工による変化、および iii) 貯蔵による変化を、質的・量的な観点で網羅的に解析する。最終的には、集積したデータを比較解析し、顕著に変化するバイオマーカーを見つけることが本研究の目的である。

私たちはこれまで、通常のプロテオミクス (二次元的分析) に加え、修飾タンパク質 (リン酸化、糖タンパク質) のプロテオミクス (Phosphoproteomics, Glycoproteomics) や

還元剤を使わないネイティブのプロテオミクス (Native proteomics) を行ってきた。本研究の特色・独創的な点は、三次元的プロテオミクスの経時的変化を調べることによって、「四次元的」分析を行うことである。本研究により、食品タンパク質の総合的な変化を解析する「フードプロテオミクス」の一つのモデルを提案したいと考えている。

本研究により明らかにされたバイオマーカーを用いることで、そのマーカーを指標とした食品の品質評価や安全性評価方法の開発、品質向上技術への活用、さらに新規機能性食品の開発などに大きく寄与することができる。また、畜産食品は、生命体が産生したものの (乳)、生命体であったもの (肉)、生命体そのもの (卵) であるため、これらの動物性タンパク質を網羅的かつ経時的に解析する本研究の成果は、動物の生命科学の発展にも貢献することができる。

2. 研究の目的

鶏卵の加工特性として凝固性、気泡性および乳化性があげられる。このような特性により、スポンジケーキやマヨネーズなど多種多様な卵製品を作ることができる。しかし、鶏卵の品種や貯蔵期間、加熱殺菌条件が気泡性や乳化性に影響し、最終製品の品質にばらつきが生じることが明らかとなっている。卵製品の品質の安定化、さらに品質や機能向上のためには、原材料のばらつき、貯蔵による成分の変化、加工による成分の変化を網羅的に把握し、食品としての基礎的な知見を集積しておくことが大切である。そのため本研究では、医学・薬学分野で疾病診断や創薬に利用され、ある時点での細胞、組織などの中に発現している全タンパク質を網羅的に解析する「プロテオーム解析」を用いて分析を行う。今回は特に、鶏卵卵白を研究対象とし、タンパク質の i) 品種間の違い、ii) 貯蔵による変化、および iii) 加工による変化を質的・量的な観点で網羅的に解析するとともに、変化する要因を解明することを目的とした。最終的には集積したデータを比較解析し、顕著に変化する「マーカー」タンパク質を探索することを目標とする。

3. 研究の方法

蛍光二次元電気泳動 (2D-DIGE : 2-Dimensional Difference Gel Electrophoresis) 法を用いてマーカーの探索を行った。産卵当日に採卵した白色ジュリア種の生卵白から卵白タンパク質を抽出し、均質化・定量後、蛍光色素である Cy3 (蛍光波長 580nm) を用いて標識した。i) 品種間の違いの比較としてアローカナ種および名

古屋コーチン種の卵白タンパク質、ii) 貯蔵による変化の比較として40°Cで7日間貯蔵した卵白タンパク質、およびiii) 加工による変化の比較として54°C、68°Cおよび85°Cで10分間加熱処理した卵白タンパク質試料をそれぞれ蛍光色素であるCy5（蛍光波長670nm）を用いて標識した。その後、実験条件ごとに2D-DIGEを行い、蛍光波長ごとにレーザーキャンした画像を重ね合わせ、比較解析を行った。

加熱条件は、54°C、68°C、85°Cで温度ごとに10分、20分、30分間加熱したサンプルも作製した。その後、タンパク質抽出、定量後、二次元電気泳動を行った。二次元電気泳動は、一次元目にpH3~10のIPGストリップを使用し、等電点電気泳動を行い、二次元目に15%のポリアクリルアミドゲルを使用し、SDS-PAGEを行った。画像解析には、画像解析ソフト「Image J」を使用し、各スポットの濃度を数値化し、加熱により変化したスポットの比較を行った。

4. 研究成果

全ての条件で共通して検出されたタンパク質のメジャースポットは、オボアルブミン、オボムコイド、オボトランスフェリン、オボインヒビターであった。i) 白色ジュリア種とアローカナ種および名古屋コーチン種間の2D-DIGEの電気泳動図に明確なスポットの違いは確認されなかった。ii) 産卵後0日目と産卵後7日目間では、タンパク質のメジャースポットに大きな違いは見られなかったが、貯蔵によって等電点6.0-6.5、分子量約35-40kDa付近で新しいスポットが出現した。iii) 生卵白と54°Cおよび68°C間の電気泳動図に明確なスポットの変動は確認されなかった。生卵白と85°Cの2D-DIGEの結果、オボムコイドおよびオボトランスフェリンのスポットの等電点が低くなる傾向が観察された。

i) 鶏卵の品種間ではメジャータンパク質の大きな違いはないことが示唆された。ii) 貯蔵によって生じたスポットの等電点がオボトランスフェリンと同じであることから、オボトランスフェリンの部分分解物である可能性が示された。iii) オボムコイドおよびオボトランスフェリンの等電点が低くなる要因として、タンパク質の翻訳後修飾の変化が考えられる。高温での加熱処理によりアミノ酸残基の側鎖の構造が変化すると推測される。

加熱により卵白タンパク質中のオボトランスフェリンのスポットの等電点に違いが見られた。pI 0.2間隔で並んでいる7つのスポットをpI6.2~6.7、6.8~7.2、7.3~7.8と3等分し、画像解析でスポットの濃度を数

値化した。pI6.2~6.7のオボトランスフェリンにおいて、未加熱のものと比較して68°C10分、20分、30分、85°C10分、20分、30分において加熱処理によりオボトランスフェリンの割合が増加していた。また、各加熱温度の時間の差によるオボトランスフェリンの等電点に明確な違いは確認されなかった。

等電点が低下した要因としては、オボトランスフェリンの脱アミド化が考えられた。脱アミド化は、タンパク質中のアミド基をカルボキシル基に変換するタンパク質の化学修飾で、脱アミド化することによって、タンパク質の負電荷が増加し、等電点が低下する。加熱処理によってオボトランスフェリン中の酸性アミノ酸アミドであるグルタミンやアスパラギンで脱アミド化が起これ、酸性アミノ酸であるグルタミン酸やアスパラギン酸に変化し、その結果、等電点が低下したということが考えられた。また、オボトランスフェリン中のひとつのアスパラギンまたはグルタミンがアスパラギン酸またはグルタミン酸に脱アミド化されると、理論上等電点が0.2低下する。これは、オボトランスフェリンの各スポットの等電点の間隔と一致しており、このことから脱アミド化の可能性が考えられる。

今後は、微量タンパク質にも着目した解析を行い、新たなマーカーの探索を行うことが研究課題である。また今後の課題として、加熱処理中に脱アミド化が起きているかの確認や、脱アミド化された卵白タンパク質の加工特性への影響について詳しく研究していく必要がある。これにより明らかにされたマーカーを用いることで、食品の品質評価や安全性評価の開発、品質向上技術への活用、さらに、新規機能性食品の開発などに大きく寄与することができると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) 石川伸一、卵製品の品質・機能向上を目的とした鶏卵のプロテオーム解析、日本食品科学工学会誌、査読無、Vol. 59、No. 5、2012、231-235

DOI : 10.3136/nskkk.59.231

〔学会発表〕(計2件)

(1) 石川伸一、橋ヶ谷晃史、半田明弘、蛍光二次元電気泳動による鶏卵卵白タンパク質のプロテオーム解析、日本食品科学工学会第59回大会、2012.8.31、藤女子大学(札幌)

(2) Shin-ichi Ishikawa、Ran Nakamura、Saori

Miyagawa、Disulfide proteomics of wheat and soybean proteins in food processing、16th IUFOST (International Union of Food Science and Technology、2012. 8. 5-9、Foz do Iguaçu (Brazil)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://molecular.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 伸一 (SHIN-ICHI ISHIKAWA)

宮城大学・食産業学部・准教授

研究者番号：00327462

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：