

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

誌名	日本食品科学工学会誌 : Nippon shokuhin kagaku kogaku kaishi = Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology
ISSN	1341027X
著者名	石川,伸一
発行元	日本食品科学工学会
巻/号	59巻5号
巻号補足	
掲載ページ	p. 231-235
発行年月	2012年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



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

石 川 伸 一

宮城大学食産業学部

Proteomic Analysis of Hen Egg for Improvement of Food Quality
and Functionality of Egg Products

Shin-ichi Ishikawa

School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University,
2-2-1 Hatatate, Taihaku-ku, Sendai, Miyagi 982-0215

Hen egg is a nutritious food and a major source of biologically active compounds that are beneficial for human health. Proteomic technology has the power to monitor the protein composition of foods and changes in protein composition during the production and storage processes. Molecular changes in egg white proteins during storage have been investigated using two-dimensional electrophoresis coupled with mass spectrometry. The appearance and degradation of protein spots and shifts in isoelectric points of protein spots were observed during storage at 40°C for 7 days. These results support the use of proteomic profiling as a valuable tool for understanding the properties of egg white.

(Accepted Feb. 17, 2012)

Keywords : hen egg, egg white, proteomic analysis, proteomics, food proteomics**キーワード :** 鶏卵, 卵白, プロテオーム解析, プロテオミクス, フードプロテオミクス

1. はじめに

鶏卵は、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。最近では、特に人の健康に役立つ食品が、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、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食品の創製が求められている。このような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の蓄積はまだ十分ではないのが現状である。

タンパク質の網羅的分析法であるプロテオーム解析 (proteomic analysis), またはプロテオミクス (proteomics) 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。食品科学の分野でも、プロテオミクスの手法を用いた研究がさかんに報告されはじめており、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。しかし、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、食品分野における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、一部を除いてまだ散発的な取り組みであるのが現状である。

私たちは、これまで乳・肉・卵などの畜産食品のプロテオーム解析を行ってきた。本解説では、鶏卵をはじめとするプロテオミクスの研究例を紹介するとともに、食品科学分野におけるプロテオミクス利用の今後の可能性について述べる。

2. プロテオミクスとは

プロテオミクスとは、ある生物やある対象に含まれるタンパク質を網羅的に分析する研究のことである¹⁾。もともと遺伝子の英語 gene に「～のすべて」を意味する接尾語

〒982-0215 宮城県仙台市太白区旗立 2-2-1

連絡先, ishikawa@myu.ac.jp



図1 omics研究の概略

の ome をつけたのがゲノム genome であり, gene に「～を網羅的に解析する研究・学問」を意味する omics をつけたのがゲノミクス genomics である。それに対応して, 遺伝子転写産物である mRNA の全体はトランスクリプトーム transcriptome, 翻訳産物であるタンパク質の全体はプロテオーム proteome であり, それらを研究する学問はそれぞれトランスクリプトミクス transcriptomics, プロテオミクス proteomics とよばれている (図1)。以上3つの基本的な omics だけでなく, 低分子の代謝産物の全体像を扱うメタボロミクス metabolomics も現在盛んに研究されている²⁾。

初期のプロテオミクスでは, 二次元電気泳動 (two-dimensional gel electrophoresis, 2D-PAGE) 法によって分離されたタンパク質をゲル内でトリプシン消化し, 得られたペプチド断片を質量分析し, ペプチドマスフィンガープリンティング法によってタンパク質の同定が行われた。複数のサンプルゲル間で比較解析 (ディファレンシャル解析) する場合は, 発現に違いが見られたタンパク質スポットをゲルから切り出し, 短時間で同定する分析法が実現された。

また, 2D-PAGE でタンパク質の分離を行わず, 先にサンプルのトリプシン消化を行い, 得られたペプチドを二次元 HPLC などによって分離して質量分析を行う, いわゆるショットガン方式が誕生した。さらに, ICAT (isotope coded affinity tag) 法などの安定同位体プレラベルによる定量的ディファレンシャル分析法も開発されている。また, 2D-PAGE に基づく方法でも, 2D-DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) 法のような多波長蛍光プレラベルによるディファレンシャル分析法も開発されるなど, プロテオミクス周辺の分析技術は飛躍的な進歩を遂げている。

3. 食品分野のプロテオミクス

食品分野におけるプロテオミクスは, 食品微量成分の解析, 食の安全性の評価, マーカータンパク質の検索, 食物

アレルギーの同定などで利用されている。具体的な研究例としては, 乳中の新規微量タンパク質の探索³⁾, 小麦アレルギーの網羅的解析⁴⁾, 遺伝子組換えトウモロコシのタンパク質発現の評価⁵⁾, 魚介類の鮮度判定のためのマーカータンパク質の探索⁶⁾, 有機および非有機栽培ジャガイモのタンパク質プロファイルの解析⁷⁾, モモの軟化・低温障害時のタンパク質代謝解析⁸⁾ などが報告されている (図2)。食品分野のプロテオミクスに関する総説も, いくつか報告されている^{9)~11)}。ここでは, 私たちが行った食肉プロテオミクスの例を挙げる。

食肉の熟成過程における味や香りの向上には各種のプロテアーゼやミネラルなどが関与しているといわれているが¹²⁾, その全体像については十分に明らかにされていない。現在広く用いられている牛肉熟成方法である真空パックによるウェットエージング (真空熟成) 中におけるタンパク質の変化と, 実験的な熟成方法である *in vitro* 系の牛肉ホモジネートの貯蔵中の変化をプロテオミクスの手法を用いて比較検討を行った。さらに, 食肉中の「熟成マーカー」を探索し利用することで, プロテアーゼやミネラルが熟成に及ぼす影響についても調べた。

実験方法は, と畜直後の日本短角牛種の大腿二頭筋を真空パックし, 4℃で1~30日間熟成を行った。また, と畜1日後の牛肉を中性バッファー中でホモジナイズし, 0~10日間, 4℃で貯蔵した。各試料から可溶性タンパク質を抽出し, SDS-PAGE, 2D-PAGE およびウェスタンブロッティングを行った。

真空熟成した牛肉試料の SDS-PAGE や 2D-PAGE の結果, 時間経過にともない分子量約 38 kDa, 等電点 7.8~9.5 のバンドが特異的に減少した (図3)。ペプチドマスフィンガープリンティングおよびウェスタンブロッティングにより, 減少したバンドはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) であることが示唆された。さらに, 牛肉ホモジネートも, 貯蔵中に真空熟成と同様に GAPDH のバンドが特異的に

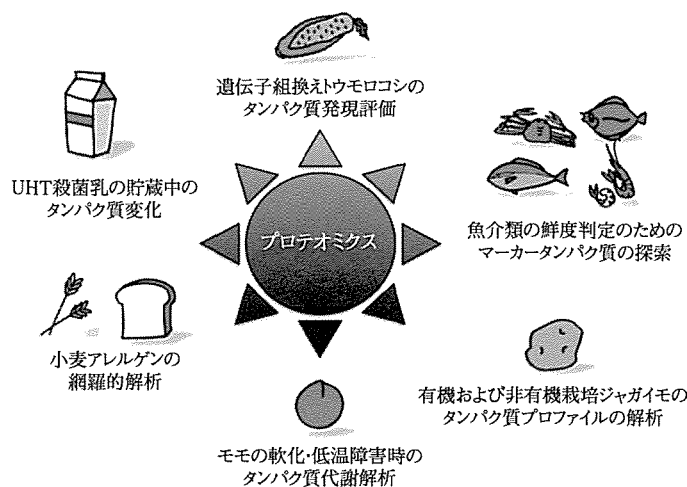


図 2 「食」に関わるプロテオミクス研究の例

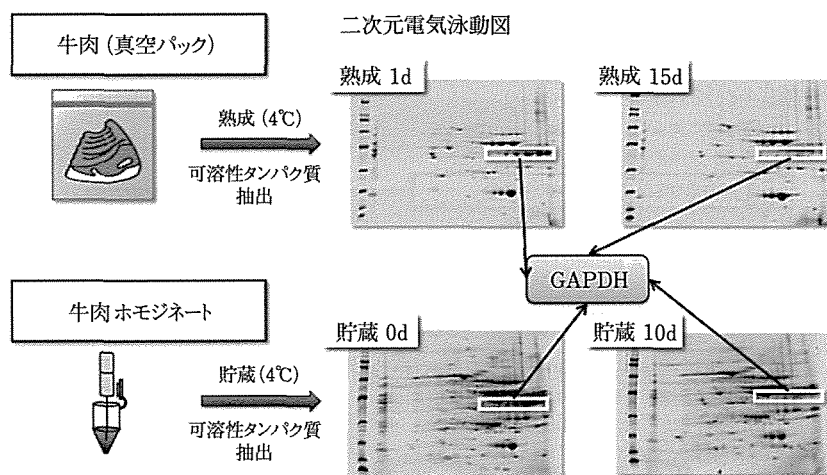


図 3 牛肉真空熟成と牛肉ホモジネート貯蔵との比較

減少した (図 3)。今回用いた牛肉ホモジネートの実験系は、牛肉の真空熟成と同様の反応が起こり、GAPDH を熟成マーカーとして用いることで牛肉熟成のモデルとして使用できることが示された。実際、その *in vitro* の熟成モデルを使ってプロテアーゼインヒビターやミネラル添加の影響に調べた結果、いくつかの知見を得ることができた¹³⁾。

4. 鶏卵のプロテオミクス

鶏卵には、ヒナが誕生するまでに必要な栄養や、精巧にプログラミングされた情報、細菌などの外敵に対する生体防御機能などが含まれている。しかし、鶏卵成分が孵化や貯蔵中にどのように変化するのか、その全体像については十分に解明されていないのが現状である。卵科学の分野においても、鶏卵の卵白タンパク質や卵黄タンパク質のプロテオミクスの報告があり、それぞれ 100 種類以上のタンパク質のスポットが検出されている^{14)~16)}。しかし、プロテオーム解析によって見つかったタンパク質等が胚発生にど

のように関与しているか、また、鶏卵が食品として貯蔵中にどのような変化を起こしているか、その全体像などについてはまだ十分に明らかにされていないのが現状であった。そこで、鶏卵の貯蔵中における卵白成分の変化を、網羅的かつ経時的に調べた。

実験方法は、産卵直後の鶏卵を、40℃のインキュベーター内で 0, 1, 3, 7 日間保存し、各サンプルから全タンパク質を抽出した。サンプル中のタンパク質を定量後、pH3-10 の固定化 pH 勾配ゲルと、10-20% グラジエントのポリアクリルアミドゲルを用いて 2D-PAGE を行った。全タンパク質を Flamingo (Bio-rad) により、リン酸化タンパク質を Pro-Q Diamond (Invitrogen) によりそれぞれ染色し、各スポットを検出した。

2D-PAGE の解析の結果、各貯蔵期間の卵白から 200 以上のスポットが検出された (図 4)。0~7 日間貯蔵した試料をディファレンシャル解析した結果、時間の経過とともに、オボアルブミンの等電点がよりアルカリ性側にシフト

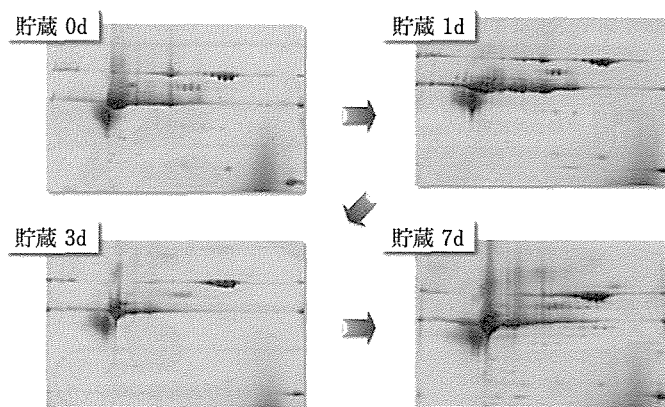


図4 貯蔵中の卵白タンパク質の二次元電気泳動図

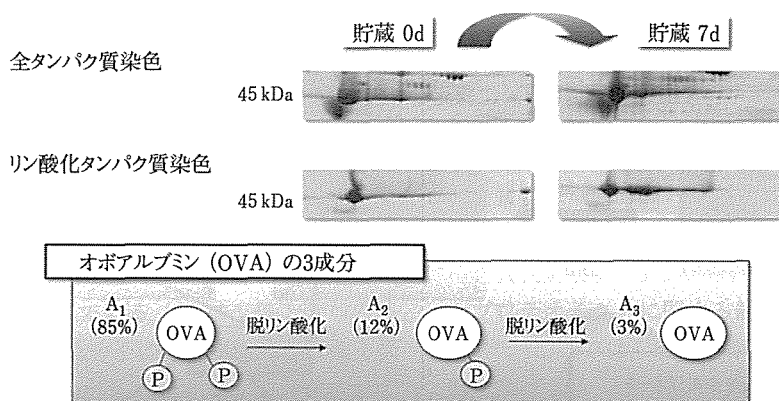


図5 オボアルブミンのリン酸化タンパク質染色

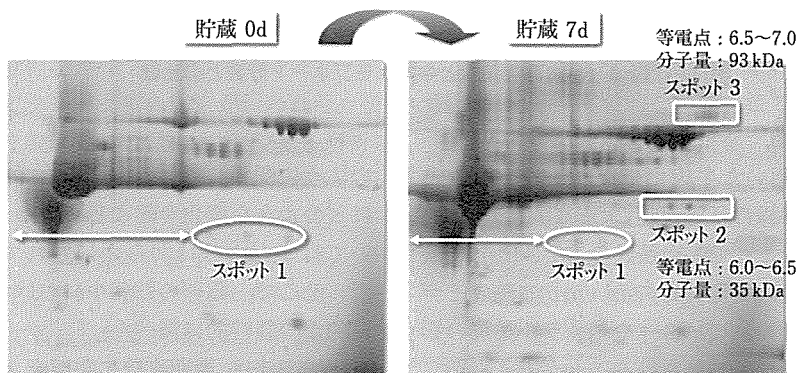


図6 貯蔵による卵白スポットの変化

することが明らかとなった。これは、リン酸化タンパク質の特異的な染色により、オボアルブミンの脱リン酸化によるものであることが示された(図5)。また、クラステリンと推定されるスポットが貯蔵により等電点が低くなる傾向や、等電点 6.5-7.0、分子量約 93 kDa のスポットおよび等電点 6.0-6.5、分子量約 35 kDa のスポットが時間の経過とともに出現した(図6)。この2つのスポットを LC/MS/MS とデータベース検索によりタンパク質の同定を行った結

果、等電点 6.0-6.5、分子量約 35 kDa のスポットはオボトランスフェリンの分解物であることが推定された。しかし、等電点 6.5-7.0、分子量約 93 kDa のスポットについては、信頼度の高いタンパク質は検索されなかったため、貯蔵により生成する新規タンパク質の可能性が示唆された¹⁷⁾。

プロテオミクスによる鶏卵卵白タンパク質の網羅的かつ経時的解析を行った結果、鶏卵の貯蔵中、新たに出現するスポットや、等電点などの性質が変化するスポットなどが

確認された。このようなタンパク質変動の全体像を捉え、そのメカニズムを解明することは、食品の貯蔵方法や加工方法の検討のための基礎的データとして大変重要である。

5. おわりに

プロテオミクス利用の可能性は、卵科学をはじめとした食品科学分野で年々増加している。その一例として、製品原材料のばらつきや加工・貯蔵によるタンパク質の違い・変化をプロテオミクスという手法を用いて解析することによって、変動するマーカータンパク質を同定できることがあげられる。最終的には、発見したマーカータンパク質を利用することより、品質評価方法の開発や品質の安定した食品の提供、さらには新しい機能性食品の開発などに寄与することができると考えられる。

プロテオミクスは食品科学および栄養学における新しい知見の集積を加速し、食品成分の複雑な成分変化の理解に役立つものとして今後ますますその発展が期待される。

本研究の一部は、財団法人旗影会の研究助成によって支援されたものであり、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L. and Humphrey-Smith, I., Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, **16**, 1090-1094 (1995).
- 2) Zivkovic, A.M. and German, J.B., Metabolomics for assessment of nutritional status. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **12**, 501-507 (2009).
- 3) Holland, J.W., Gupta, R., Deeth, H.C. and Alewood, P.F., Proteomic analysis of temperature-dependent changes in stored UHT milk. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 1837-1846 (2011).
- 4) Akagawa, M., Handoyo, T., Ishii, T., Kumazawa, S., Morita, N. and Suyama, K., Proteomic analysis of wheat flour allergens. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 6863-6870 (2007).
- 5) Zolla, L., Rinalducci, S., Antonioli, P. and Righetti, P.G., Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications. *J. Proteome Res.*, **7**, 1850-1861 (2008).
- 6) Piñeiro, C., Barros-Velázquez, J., Vázquez, J., Figueras, A. and Gallardo, J.M., Proteomics as a tool for the investigation of seafood and other marine products. *J. Proteome Res.*, **2**, 127-135 (2003).
- 7) Lehesranta, S.J., Koistinen, K.M., Massat, N., Davies, H.V., Shepherd, L.V., McNicol, J.W., Cakmak, I., Cooper, J., Lück, L., Kärenlampi, S.O. and Leifert, C., Effects of agricultural production systems and their components on protein profiles of potato tubers. *Proteomics*, **7**, 597-604 (2007).
- 8) Nilo, R., Saffie, C., Lilley, K., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos-Vargas, R., González, M., Meisel, L.A., Retamales, J., Silva, H. and Orellana, A., Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE). *BMC Genomics*, **11**, 1471-2164 (2010).
- 9) Carbonaro, M., Proteomics : present and future in food quality evaluation. *Trends Food Sci. Technol.*, **15**, 209-216 (2004).
- 10) Han, J.Z. and Wang, Y.B., Proteomics : present and future in food science and technology. *Trends Food Sci. Technol.*, **19**, 26-30 (2008).
- 11) Pischetsrieder, M. and Baeuerlein, R., Proteome research in food science. *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 2600-2608 (2009).
- 12) Spanier, A.M., Flores, M., Toldrá, F., Aristoy, M.C., Bett, K. L., Bystricky, P. and Bland, J.M., Meat flavor : contribution of proteins and peptides to the flavor of beef. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **542**, 33-49 (2004).
- 13) 石川伸一, 大畑素子, 有原圭三, 伊藤 良, 食肉の熟成に及ぼすミネラル塩の影響のプロテオーム解析, 平成 21 年度助成研究報告書 (公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団, 東京). pp. 89-96 (2011).
- 14) Guérin-Dubiard, C., Pasco, M., Mollé, D., Désert, C., Croguennec, T. and Nau, F., Proteomic analysis of hen egg white. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3901-3910 (2006).
- 15) Mann, K., The chicken egg white proteome. *Proteomics*, **7**, 3558-3568 (2007).
- 16) Mann, K. and Mann, M., The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics*, **8**, 178-191 (2008).
- 17) 石川伸一, プロテオーム解析による鶏卵成分の経時的変化に関する研究, 平成 20 年度研究報告概要集 (財団法人旗影会, 東京). pp. 52-56 (2009).

(平成 24 年 2 月 17 日受理)