

プロテオーム解析による食品機能の研究

榎原 陽一^{1*}・中原 幸太¹・森永 浩通²
山崎 正夫¹・西山 和夫¹・水光 正仁¹

近年、食品に含まれる機能性成分が注目されており、以前から行われてきた抗酸化作用の評価などに加えて、プロテオミクスやメタボロミクスを基盤とした最先端の試験法により食品の機能性が評価されるようになった。筆者らは宮崎県地域結集型共同研究事業（平成15年度～20年度）による産学官共同研究を通じて、ウイルス発がんに予防効果がある機能性食品開発を目指した研究の一環として、プロテオミクスを基盤に二次元電気泳動法によるプロテオーム解析を用いた食品機能性評価法の確立を目的に研究を実施した^{1,2)}。そのために、まず手軽にできる蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法の確立を行った。二次元電気泳動は、プロテオームの全体像を比較的簡単に高い定量性で俯瞰できる技術である³⁾。ついで、この方法を用いて培養細胞に与える食品機能性成分の影響を解析し、食品機能性評価に有効なバイオマーカータンパク質の探索を実施した。最後に、より多くの食品成分の機能性をまとめて情報科学的に解析することを目的に、プロテオームの発現データをもとにクラスター解析による、食品機能性成分の系統的解析を試みた。

蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法

蛍光ディファレンシャル解析は、蛍光色素として同仁化学研究所のIC3-OSu (ex = 550 nm, em = 570 nm) およびIC5-OSu (ex = 640 nm, em = 660 nm) の2種類のインドシアニン化合物 (IC-Dye) を用いた⁴⁾。これらの蛍光色素はスクシニミド活性エステルを持ち、タンパク質中のリジン残基の側鎖アミノ基を標識する。これらの波長の異なる2つの蛍光色素を用いて、プレレベルにて2種類の試料タンパク質を蛍光標識し、その後混合した分析用試料を二次元電気泳動にて分離し、それぞれの蛍光波長でゲルイメージを取得し、IC3 スキャンイメージを赤、IC5 スキャンイメージを緑で表示し、ソフトウェア上で重ね合わせることで、発現量の変化を色の違いから視覚的に捉えることができる技術である (図1)。蛍光スキャナは、パーキンエルマー社のProXPRESS 2Dを使用し、得られたゲルイメージデータの解析にはProgenesisを使用した。

この蛍光ディファレンシャル解析の特徴として、タン

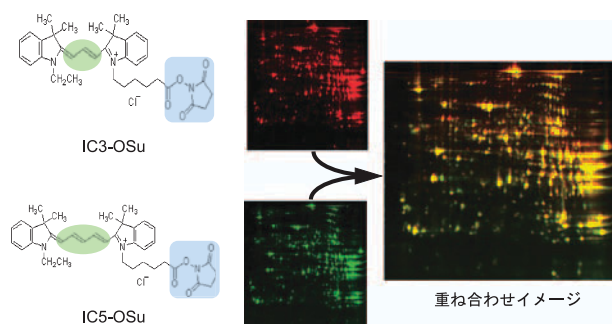


図1. IC-Dyeを用いた蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動のイメージ

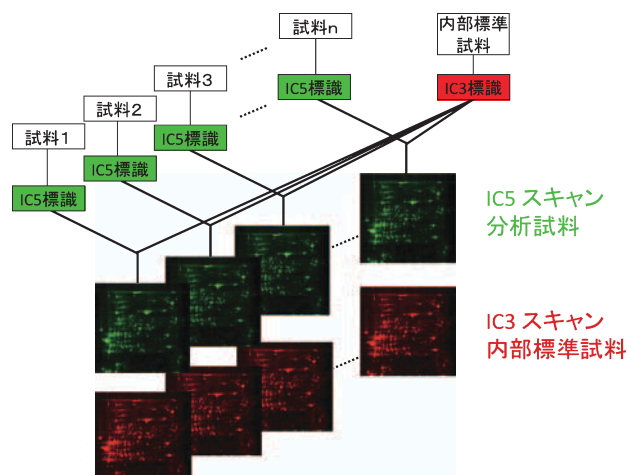


図2. 内部標準法を用いた蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動

*著者紹介 宮崎大学農学部応用生物科学科 (准教授) E-mail:ysakaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

¹宮崎大学農学部応用生物科学科, ²雲海酒造株式会社

パク質の検出限界は、両蛍光色素共に0.2 ng以下であり、また1 ng～125 ng以上の範囲で高い定量性が確認できた。よって、IC-Dyeを用いてプレレベルでタンパク質を標識し、その後に電気泳動による分離と蛍光イメージャーによる画像解析を組み合わせることで、高感度に定量性の高いデータを取得できることが確認できた。

さらに筆者らは、多数のサンプルで統計解析可能な定量性の高い二次元電気泳動解析結果を得るために、図2に示した内部標準法を用いた蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法を開発した。この方法では、 n 個の解析したい試料があるときに、すべての試料をそれぞれ個別にIC5-OSuで標識し、同時に内部標準試料として、 n 個全ての試料を混合した試料を調製しIC3-OSuで標識した。IPGストリップゲルを用いて二次元電気泳動を実施し、二種類の蛍光色素に適した蛍光ゲルイメージを同時に取得し、解析ソフトProgenesisを使用してIC3ゲルイメージは内部標準試料として補正に用いて定量解析を実施した。この方法の大きな特徴は、分析機器メーカーから提供されている蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動技術と比較して、既存の共通機器などが使用でき、タンパク質標識キットなどの大幅なランニングコストの削減を可能にしたことにある。

二次元電気泳動

タンパク質スポットの同定とバイオマーカータンパク質の探索

タンパク質スポットの同定は、MALDI-TOF型質量分析装置を用いてペプチドマスフィンガープリント法により行った⁵⁾。操作を簡単に説明すると、まずHepG2細胞などの培養細胞を種々の食品機能性成分で処理し、24時間後に細胞を回収し、得られたタンパク質をIC-Dyeを用いた蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動により解析した。解析後、泳動ゲルをクマリーブルーにより染色し、食品成分の作用で発現量が増減する興味のあるタンパク質スポットを切り出して、トリプシンによるインゲル消化を実施した。得られた消化ペプチド混合物をAutoflex II TOF/TOFにて解析し、マススペクトルを取得し、ペプチド混合物のマスリスト情報を用いてMascot検索によりタンパク質を同定した(図3)。

代表的な実験結果としては、HepG2細胞に食品機能性成分としてスルフォラファンを処理し、タンパク質を抽出した後に蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動解析とタンパク質同定を実施した。その結果、チオレドキシシレダクターゼ1、アルド-ケトレダクターゼ1C1、アルド-ケトレダクターゼ1B10などのタンパク質の発現量が変化し、バイオマーカー候補タンパク質として同定された。

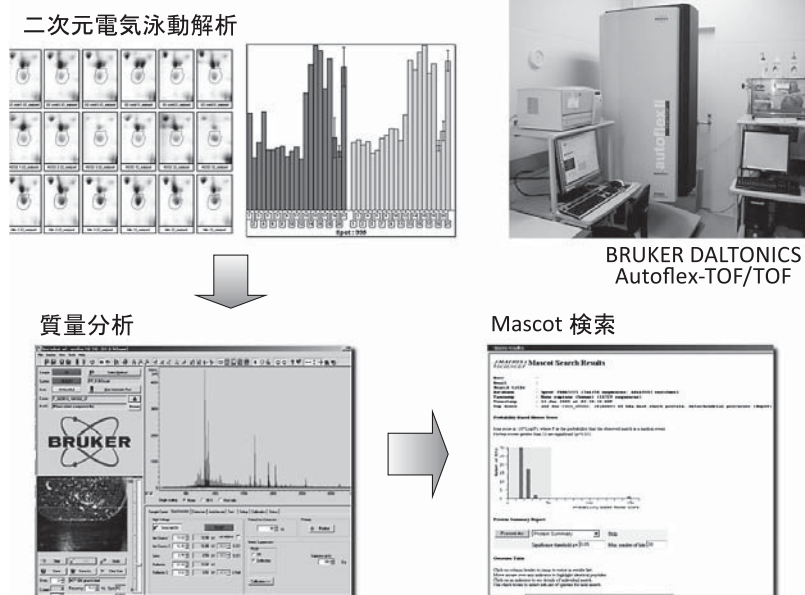


図3. 二次元電気泳動からタンパク質同定までの流れ

これらのバイオマーカー候補タンパク質は、抗原抗体反応を基盤にしたハイスループット食品機能性評価試験開発のためのマーカータンパク質候補とした。また、過酸化水素により酸化ストレスを与えたHepG2細胞を解析した結果、発現パターンが変化したタンパク質として、ペルオキシレドキシン-1とペルオキシレドキシン-6が見いだされた。これらのタンパク質を詳細に解析した結果、酸化型と還元型のタンパク質スポットが確認され、システイン残基の酸化還元によりスポット位置が変化することがMS解析の結果、判明した。これらの結果より、ペルオキシレドキシンは酸化ストレスのバイオマーカーとして、細胞の酸化傷害や食品の抗酸化ストレス作用の評価に有効なバイオマーカー候補と考えられた。

多種の食品成分の培養細胞に与える影響のクラスター解析 我々が開発したIC-Dyeを用いて内部標準法で蛍光ディファレンシャル解析をする方法（図1）は、多種類の試料におけるタンパク質発現量の比較と、統計解析に有効な方法である。そこで、50種の食品成分がHepG2細胞のタンパク質発現に与える影響を比較解析

した。HepG2細胞を食品成分の存在下で24時間培養を行い、その後細胞ライゼートを抽出してタンパク質試料とした。IC3-OSuおよびIC5-OSuを用いた蛍光ディファレンシャル解析を内部標準法で行い、解析ソフトProgenesisを用いて各食品成分における556スポットのタンパク質発現データを抽出し、発現解析ソフトGeneSpring GXによりクラスター解析した結果を図4に示した。

図中では、各スポットのタンパク質発現量がコントロールと比較して増加している場合は赤色が強く、減少している場合は緑色が強く表示され、556スポットの発現データを色の付いたバーとして縦に重ねて食品成分毎に50種類が並列して表示してある。そして、その上にタンパク質発現パターンの比較から得られたクラスター解析による食品成分の違いによる系統樹が表示されている。その結果、食品成分が細胞に作用しタンパク質発現パターンに与える影響が比較的近いもの同士のサブクラスターが見出された。解析結果を詳細に検討した結果いくつかの興味深い点として、リモネンのように2種類の

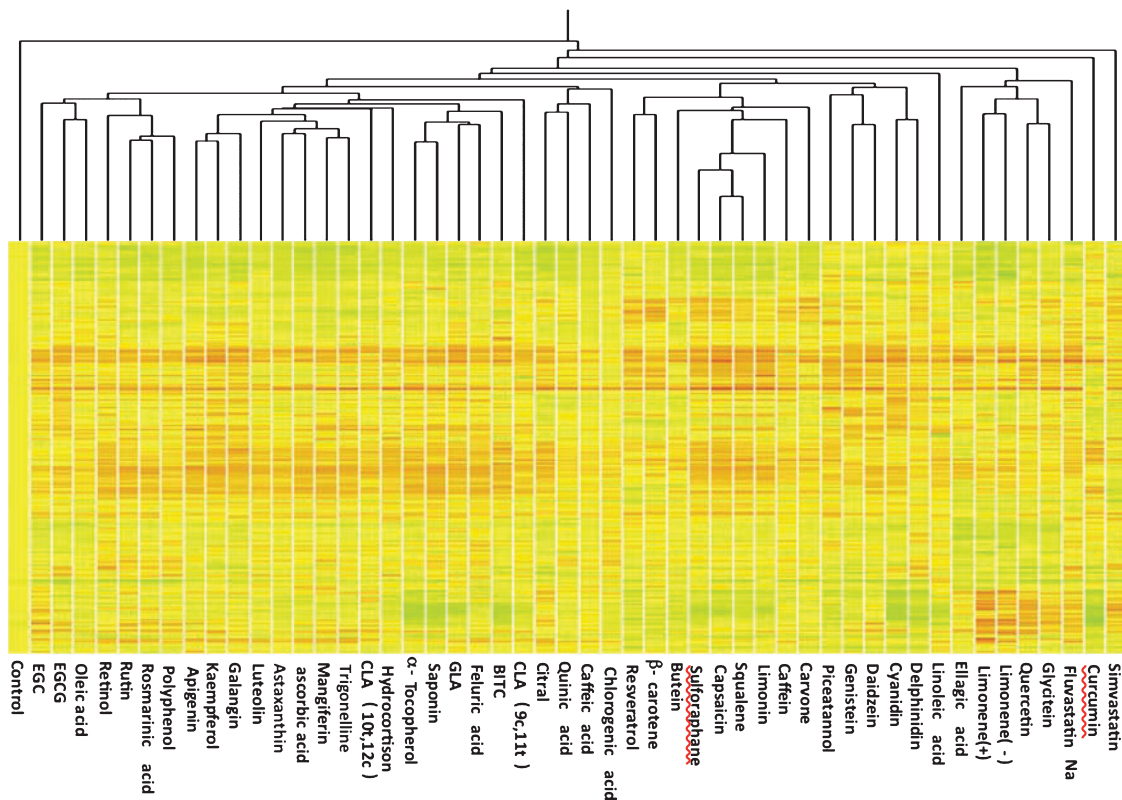


図4. 食品成分処理したHepG2細胞タンパク質発現量のクラスター解析
(本学会HPでのオンライン公開はカラー掲載、2012年1月公開予定)

異性体が隣同士に配置され類似構造がクラスターに反映されているものもあれば、2種のCLA（共役リノール酸）とリノール酸のように、二重結合の位置が異なる異性体間で異なるサブクラスターに位置するものも見られた。リノール酸と2種類のCLAに関して言えば、構造は類似しているにもかかわらず、それぞれ生理機能が大きく異なることが報告されており、ここで見いだされているサブクラスターは、構造との相関だけでなく機能性との相関も反映していると考えられた^{6,7)}。これら結果から、プロテオーム解析は食品成分の機能性に関連するバイオマーカーの探索のみでなく、食品成分の構造・機能の相関などの解析が可能であることが示唆された。このことから、タンパク質発現量と相関の得られた食品成分の機能性分析値を個別に評価した結果をクラスターの上に落とし込むことにより、機能性が不明な食品成分に関しても、プロテオーム解析結果から得られたクラスター上の配置から機能性を推定できる可能性が示唆された。

まとめ

現在、食品の機能性に関する研究が注目され、抗酸化作用や抗アレルギー作用などの従来研究されてきた機能

性に加えて、抗老化作用や抗ストレス作用など種々の機能性評価技術が求められている。プロテオミクスやメタボロミクスを基盤とした分析技術と、バイオインフォマティクスによる情報科学的解析技術を融合することで、直接評価することが困難な機能性を的確に推定できる次世代の評価技術が確立できる可能性が考えられる。

さらに、ここで紹介した蛍光ディフュージョン二次元電気泳動を用いた食品機能性評価法は、食品の安全性評価などへの応用も可能であり、トレーサビリティや偽装鑑定を視野に研究をすすめている。

この研究は、科学技術振興機構（JST）の「地域結集型共同研究事業」および「シーズ発掘試験」の資金援助によってなされた。この場を借りて謝意を表します。

文 献

- 1) 水光正仁：生物工学会誌, **85**, 200 (2007).
- 2) <http://www.i-port.or.jp/jm/vol224/toku224.html>
- 3) 平野 久：生化学, **76**, 1320 (2004).
- 4) 榊原陽一，森永浩通：特開 2008-025991
- 5) Henzel, W. J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5011 (1993).
- 6) Yamasaki, M. *et al.*: *Cancer Lett.*, **188**, 171 (2002).
- 7) Yamasaki, M. *et al.*: *J. Nutrition*, **133**, 784 (2003).