

アメリカミズアブの昆虫タンパク質の潜在的アレルギースクリーニングのワークフロー

Li Yan Chan, Lee A. Gethings, Sarah Lennon, Cameron S. Richards

Waters Corporation, AgriProtein

本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

要約

持続可能な食糧源に対する需要により、代替タンパク質が新たなトピックとなっています。しかし、このような新しい食品および関連する原材料の安全性や、これらを食べることで生じるアレルギー反応が健康に及ぼす危険性などが、重要な懸念事項として残されています。このアプリケーションブリーフでは、アメリカミズアブの昆虫タンパク質中の潜在のアレルゲンをスクリーニングするための、LC-MS（ACQUITY UPLC M-Class および SYNAPT XS 質量分析計）に Progenesis QI インフォマティクスを組み合わせたシンプルなワークフローを実証しています。検出された 47 種のタンパク質のうち、潜在のアレルゲン性に関して 21 種には強いエビデンス、9 種には弱いエビデンスがそれぞれあり、17 種にはエビデンスがないことがわかりました。このワークフローは、直感的で、アレルゲン性に関するリスク評価が必要な他の種類の新規食品にも適用できます。

アプリケーションのメリット

- フォローしやすいワークフローで昆虫タンパク質中のアレルゲンをスクリーニング
- ProteinWorks により、タンパク質消化向けの簡素化したキットベースのアプローチが提供される
- Progenesis QI for Proteomics のガイド付きメニューにより、データ解析の複数のステージ間をシームレスに移動

はじめに

世界人口が増加し、持続可能な食糧源が求められる中で、代替タンパク質のソースとして、昆虫に期待が寄せられています。動物性食品の世界的な生産レベルは、空気、水、土壌の汚染や、生産に伴う自然資源の使用により環境に重大な圧力を負荷しています。2050年には主要なタンパク質生産のニーズが50%増加すると予測されています。一方、現時点で耕作可能な土地の85%が既に使用されています。昆虫の飼育に必要な土地は、一般的な動物性食品と比較すると大幅に少なく済みます。更に昆虫は、人類が食べられない、もしくは食べたがらないバイオマスから栄養分を回収し、食物のバリューチェーンに戻すことで、循環型経済に貢献します¹。アメリカミズアブ（BSF）などの昆虫は、大規模な飼育に適しており、廃棄物の価値化における最善の選択肢の1つでもあります。更に、BSFのタンパク質には高レベルの必須アミノ酸が含まれており、牛肉と同等の鉄分、カルシウム、亜鉛などの微量栄養素のバイオアベイラビリティがあることが知られています²。一方で、新規食品の安全性や、それらを食べることで生じるアレルギー反応が健康に及ぼす危険性などが、重要な懸念として残されています。食品アレルゲンの大半はタンパク質です。昆虫と、甲殻類や軟体動物などの他の無脊椎動物は、密接に関連しているため、それらの間に交差反応が発生する可能性があります。トロポミオシン、ミオシン、アルギニンキナーゼは、甲殻類と昆虫の間で交差反応を起こす主要アレルゲンであることがわかっています³。そのため、貝類を食べるとアレルギーが出る消費者は、昆虫を食べてもアレルギーが出る可能性が非常に高いです。したがって、このような懸念に対処し、代替タンパク質の摂取に対する消費者の信頼を高めることが重要になります⁴。タンパク質を含む新規食品を評価する際、それらにアレルゲン性があると既定で想定します。新規食品のアレルゲン性を検討する際には、特にタンパク質、その由来（分類上の関連性を含む）などの組成、製造工程、交差反応についての情報を含む実験データおよびヒトデータの利用可能性を考慮する必要があります。これは、感作についての入手可能な情報、アレルギー反応の症例報告を集めるための包括的文献レビューからなり、新規タンパク質のアレルギー成分を特性解析するための分析化学によるサポートが必要とされます。

このアプリケーションブリーフでは、BSF タンパク質のサンプルをケーススタディーとして用いて、分析ワークフローを使用し、非ターゲットの方式で新規タンパク質中の潜在的アレルゲンをスクリーニングする方法を実証しています。

結果および考察

BSF タンパク質の2つの異なるバッチを、図1に示す概略ワークフローを使用して3回繰り返して分析しました。

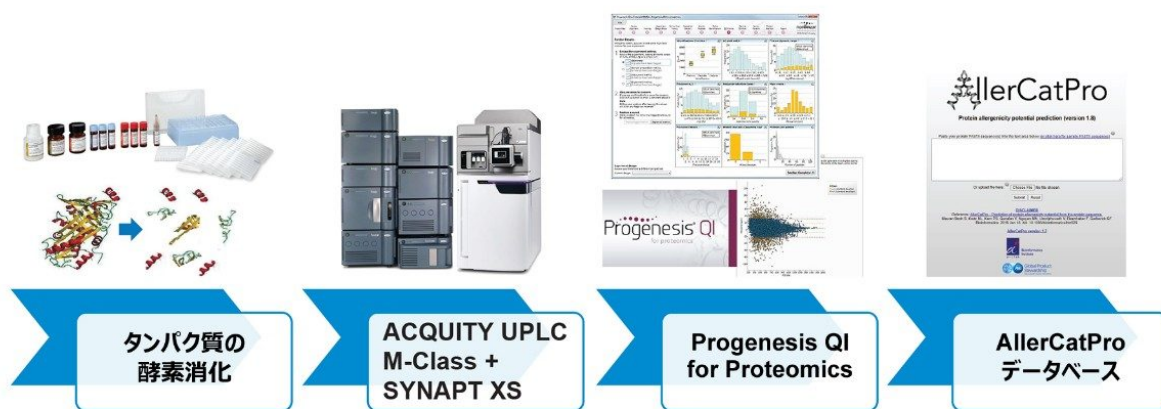


図 1. BSF 中のアレルゲンをスクリーニングするためのワークフローの概略

抽出した BSF タンパク質溶液を ProteinWorks Auto-eXpress Low Digest キット（製品番号: 176004078 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/176004078-proteinworks-auto-express-low-5-digest-kit.html>>）の 5 ステップのプロトコルで処理しました。この際、トリプシン消化を ProteinWorks が推奨している 45 °C で 2 時間の代わりに、37 °C で一晩行いました。次に、上清を UDMS^E 取り込み用の 97/3/0.1 H₂O/ACN/FA で 10 倍希釈しました。

分析は、nanoEase M/Z HSS T3 カラム、100 Å、1.8 µm、75 µm × 250 mm（製品番号: 186008818 <<https://www.waters.com/nextgen/global/search.html?keyword=186008818&sort=most-relevant>>）を搭載した ACQUITY UPLC M-Class および SYNAPT XS 質量分析計を用いて行いました。データは、ポジティブイオン化モードで、UDMS^E 取り込みモードを用いて取り込みました。代表的な抽出クロマトグラムを図 2 に示します。

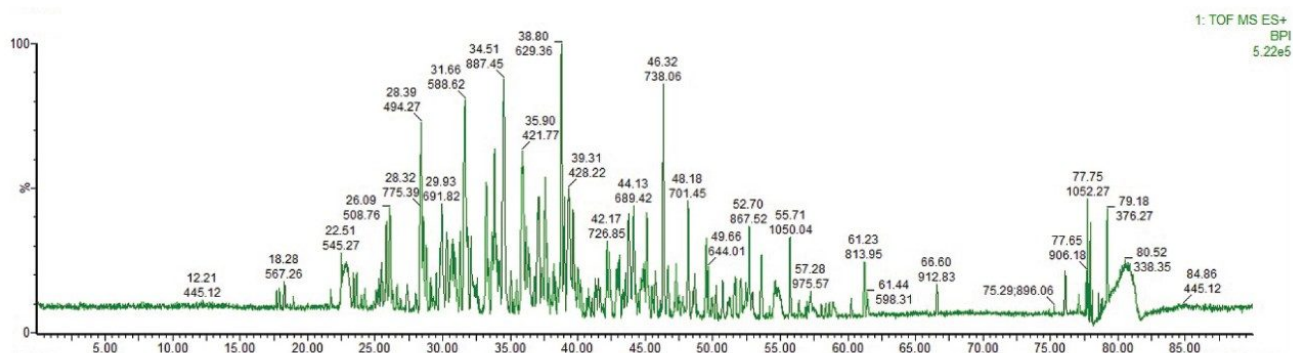


図 2. 消化済み BSF タンパク質の代表的な BPI クロマトグラム

生データを Progenesis Q1 for Proteomics にインポートし、クロマトグラフィーアライメント、データの正規化、ピーク選択を自動的に行いました。計 2,473 種のペプチドが、FDR 1% 未満、固定修飾（システインのカルバミドメチル化）、可変修飾（メチオニンの酸化）に設定したイオンアカウンティング同定ワークフローを用い、レビュー済みの *Insecta* および *Hermetia illucens* UniProt データベースを使用して同定されました。

Progenesis Q1 for Proteomics では、同定したペプチドに基づいて、選択したタンパク質のレビューが直感的かつ容易に行えます。例えば、トロポニンの個別のペプチドイオンの特性を図 3 に示します。ここでは、外れ値にタグ付けすることで、同定を更に絞り込むことができます。レビューの後、47 種のタンパク質が最終候補リストに残りました。

Accession: [P47949](#)

Description: Troponin C_ isoform 3 OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=TpnC73F PE=2 SV=2

No filter applied [Create...](#)

Abundance	m/z	Charge	Retention Time (mins)	Mass error (ppm)	Drift time (ms)	Peptide Sequence	Modifications
372.9	705.3345	2	39.865	-0.04	6.39	FIVEEDAEAMQK	
1395	937.4725	2	51.096	-0.66	8.18	ILEELIEEVEDKSGR	
5330	676.3671	2	55.782	0.94	6.48	LEFGFVQLAAK	
3504	787.3967	2	54.531	1.13	7.16	ILEELIEEVEDK	
3067	713.3338	2	39.162	2.58	6.56	FIVEEDAEAMQK	[10] Oxidation M
2669	468.2381	2	36.321	3.77	4.77	LMGQPFDK	
3052	625.3208	3	51.096	4.80	5.80	ILEELIEEVEDKSGR	

図 3. ペプチド測定に基づくタンパク質のレビュー（トロポニンを例に）

AllerCatPro⁵ は、無料でオンライン利用できる包括的なモデルで、5 つの主要データベース（IUIS、UniProtKB、Allergome、COMPARE、FARRP）を統合することで、タンパク質の潜在のアレルゲン性を予測できます。最終候補リストに残った 47 種のタンパク質は、FASTA 型式で提示され、タンパク質ごとにアレルゲン性に関して強いエビデンス、弱いエビデンス、エビデンスなしというランク付けをした結果の表が出力されます。検出された 47 種のタンパク質のうち、潜在のアレルゲン性に関して 21 種には強いエビデンス、9 種には弱いエビデンスがそれぞれあり、17 種にはエビデンスがないことがわかりました。

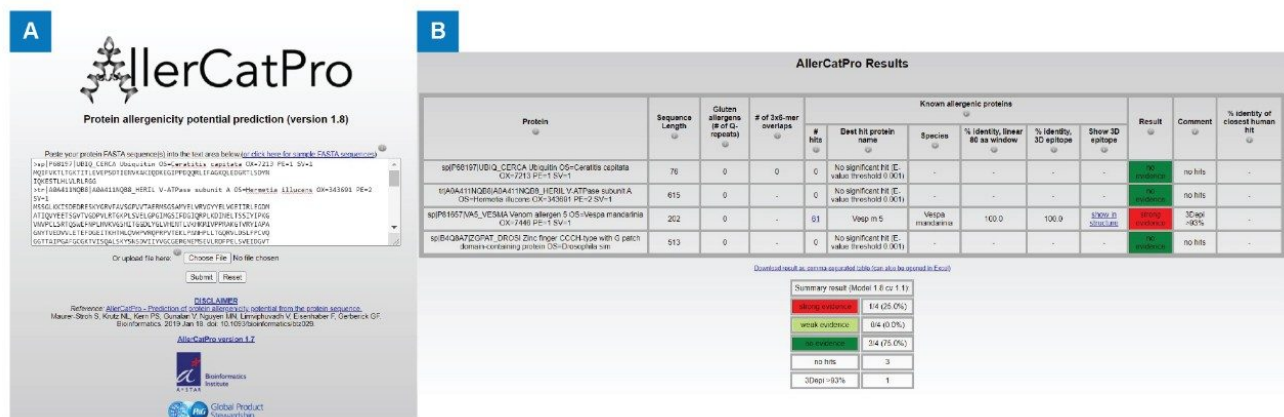


図 4. AllerCatPro のインターフェース。A. 対象タンパク質を FASTA 型式で提示、B. 結果の出力テーブル

表 1 にアレルゲン性に関して強いエビデンス、弱いエビデンス、エビデンスなしのタンパク質のリストをまとめています。BSF タンパク質中に検出されたトロポミオシン、ミオシン、アルギニンキナーゼはすべて、甲殻類と昆虫の間で交差反応を起こす主要アレルゲンとして知られています⁵。潜在のアレルゲン性の危険性が同定された場合、新規食品および原料をそれらについて *in vitro* アレルゲン性試験で更に調査する必要があります。

S/N	タンパク質のアクセッション番号	タンパク質識別子	結果
1	P92177	I433E_DROME	エビデンスなし
2	Q9W334	RS28_DROME	エビデンスなし
3	Q11212	ACT_SPOLI	強いエビデンス
4	P45891	ACTY_DROME	強いエビデンス
5	Q7PQV7	ADT2_ANOGA	エビデンスなし
6	P39674	MAG29_DERFA	強いエビデンス
7	O61367	KARG_APIME	強いエビデンス
8	P14296	ARYA_MANSE	弱いエビデンス
9	P35381	ATPA_DROME	エビデンスなし
10	A0A411NQA0	A0A411NQA0_HERIL	強いエビデンス
11	P62154	CALM_LOCFI	弱いエビデンス
12	P45594	CADF_DROME	強いエビデンス
13	Q9V4N3	CYB5_DROME	エビデンスなし
14	W5U4X3	W5U4X3_HERIL	エビデンスなし
15	Q9W1C9	PEB3_DROME	弱いエビデンス
16	P84315	EF1A_HELVI	エビデンスなし
17	P29844	BIP_DROME	強いエビデンス
18	P07764	ALF_DROME	強いエビデンス
19	K7YXZ5	K7YXZ5_HERIL	エビデンスなし
20	O18598	GST1_BLAGI	強いエビデンス
21	A0A411NQF0	A0A411NQF0_HERIL	弱いエビデンス
22	A0A1Z2RU94	A0A1Z2RU94_HERIL	強いエビデンス
23	P21896	H2A_CHITH	エビデンスなし
24	B4HSL3	LIS1_DROSE	弱いエビデンス
25	P02825	HSP71_DROME	強いエビデンス
26	Q24400	MLP2_DROME	エビデンスなし
27	P14318	MP20_DROME	エビデンスなし
28	P05661	MYS4_DROME	強いエビデンス
29	B4NSP6	PYM_DROSI	強いエビデンス
30	P54399	PDI_DROME	弱いエビデンス
31	Q9W141	ATPK_DROME	エビデンスなし
32	A0A5Q0TX36	A0A5Q0TX36_HERIL	エビデンスなし
33	P51123	TAF1_DROME	強いエビデンス
34	Q06DK3	TMA7_ANOFN	エビデンスなし
35	K7Z7M5	K7Z7M5_HERIL	弱いエビデンス
36	P31816	TPM_LOCFI	強いエビデンス
37	C5J049	TPM03_PERAM	強いエビデンス
38	Q1HPU0	TPM1_BOMMO	強いエビデンス
39	Q1HPQ0	TPM2_BOMMO	強いエビデンス
40	P47949	TNRC3_DROME	強いエビデンス
41	E5LCR8	E5LCR8_HERIL	弱いエビデンス
42	Q8WQ47	TBA_LEPDS	強いエビデンス
43	A0A411NQC2	A0A411NQC2_HERIL	弱いエビデンス
44	P68197	UBIQ_CERCA	エビデンスなし
45	A0A411NQB8	A0A411NQB8_HERIL	エビデンスなし
46	P81657	VA5_VESMA	強いエビデンス
47	B4Q8A7	ZGPAT_DROSI	エビデンスなし

表 1. AllerCatPro に提示された 47 種のタンパク質の結果の概要

結論

結論として、分析ワークフローを使用して、BSF タンパク質中に存在する潜在的アレルゲンのスクリーニングを行う方法を実証しました。新規食品および原材料の食品安全性評価は、多くの地域における規制要件であるだけでなく、消費者の懸念に対処して、代替タンパク質の消費における信頼関係を構築するための重要なステップです。このワークフローは直感的で、その他の種類の新しい新規代替タンパク質にも適用できます。

謝辞

これは Waters International Food と Water Research Centre (IFWRC、シンガポール) および AgriProtein Singapore による連携プロジェクトの一環です。BSF のサンプルを提供して頂き、昆虫タンパク質の分野の専門知識を供与して頂いた Insect Technology Group に感謝いたします。

参考文献

1. Parodi A, Leip A, De Boer I J M, Slegers P M, Ziegler F, Temme E H M, Herrero M, Tuomisto H, Valin H, Van Middelaar C E, Van Loon J J A, Van Zanten H H E. The Potential of Future Foods for Sustainable and Healthy Diets. *Nat Sustain*, 2018, 1, 782–789.
2. Wang Y-S, Shelomi M. Review of Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) As Animal Feed and Human Food. *Foods*, 2017, 6, 91.
3. Romero M R, Claydon A J, Fitches E C, Wakefield M E, Charlton A J. Sequence Homology of the Fly Proteins Tropomyosin, Arginine Kinase and Myosin Light Chain with Known Allergens in Invertebrates. *J Insects as Food Feed*, 2016, 2, 69–81.
4. Pali-Schöell I, Verhoeckx K, Mafra I, Bavaro S L Mills E N C, Monaci L. Allergenic and Novel Food Proteins: State of the Art and Challenges in the Allergenicity Assessment. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 84, 45–48.
5. Maurer-Stroh S, Krutz N L, Kern P S, Gunalan V, Nguyen M N, Limvipuvadh V, Eisenhaber F, Gerberick G F. Allercatpro-Prediction of Protein Allergenicity Potential from the Protein Sequence. *Bioinformatics*, 2019, 35, 3020–3027.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC M-Class システム <<https://www.waters.com/134776759>>

SYNAPT XS 高分解能質量分析計 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135020928>>

Progenesis QI for Proteomics <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134790665>>

720007491JA、2022 年 1 月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)