

Point

細胞中のタンパク質の二次元マッピングを行う大型二次元電気泳動と、抗体を用いて特定のタンパク質を検出するウエスタンブロットを組み合わせた「二次元ウエスタンブロット」でアレルギー原因物質(以下、アレルゲン)を特定する手法を、他社に先駆けて分析メニューに加えました。

二次元ウエスタンブロットによる未知アレルゲンの特定

食品・生命科学研究所 池庄司 博文、山縣 彰、角井 良太、大房 健

はじめに

アレルゲンを含む加工食品・添加物は、食品表示法(2013年6月公示)にもとづくルールに従って表示されています。えび、かに、小麦、そば、卵等8品目の特定原材料は表示義務があり、アーモンド、いか等20品目は特定原材料に準ずるものとして表示が推奨されています(2023年4月時点)。












しかし、これらの原材料に含まれているアレルゲンは、全てが特定されているわけではありません。加えて、28品目以外にもアレルゲンを持つ食品が存在し、これらは食生活の移り変わりとともに変化していくと考えられています。そこで、未知のアレルゲンを特定する技術が必要となります。

アレルゲン分析方法の比較

アレルゲンの分析方法はさまざまです(表1)。コロナ禍でよく目にするようになった抗原検査キットは、抗原の有無を簡単に判定する商品です。

ウエスタンブロットは、SDS-PAGEによりタンパク質を大きさ(分子量)で分離して抗原を特定する分析法です。しかし、同じ大きさのタンパク質も多数存在しており、分離は不十分です。

表1 アレルゲン分析方法の比較

			
	抗原検査	ウエスタンブロット	2Dウエスタンブロット
時間	 数分	 2日	 5日
コスト	 低	 中	 高
使用場面	簡易検査キット・臨床検査	臨床検査・研究	研究
抗原の分離方法 (分離可能な種類数)	なし	 分子量 (数百種類)	 電気的性質 分子量 (数千種類)
検査1回の処理数	多	約12	2
未知のアレルゲンの特定	× (適さない)	△ (成功率が低い)	○ (可能)

これらに対し、二次元ウエスタンブロット(以下、2Dウエスタンブロット)は、電気的性質(等電点)と分子量の二つを組み合わせることで細胞中のタンパク質を分離し、高解像度に二次元マッピングして、抗原抗体反応でアレルゲンを特定します。

2Dウエスタンブロットの手順

2Dウエスタンブロットの手順イメージを図1に示します。具体的な手順はYouTube上のいであ株式会社[IDEA Consultants, Inc.]公式チャンネルにアニメーションと実写で解説しておりますので、以下に掲載のURLまたはQRコードからご覧ください。

<https://youtu.be/37k-gcjglo4>

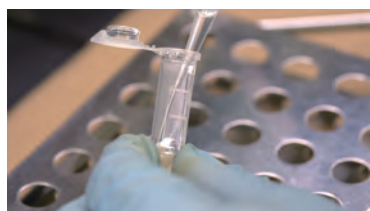


2Dウエスタンブロットの分析メニュー化

2Dウエスタンブロットを用いた論文は継続的に発表されていますが、数は多くありません。その理由として

- ・二次元電気泳動に習熟が必要
 - ・ウエスタンブロットに習熟が必要
 - ・サンプルごとに適切な前処理が必要
 - ・市販の全自動ウエスタンブロットの機械が2Dウエスタンブロット用の大型の規格に対応していない
 - ・試薬が多量・高額になる(特に1次抗体)
 - ・設備が高額になる(特に質量分析計)
- 等があります。

当研究所で分析メニュー化できたのは、20年来のタンパク質分析の経験と設備によります。



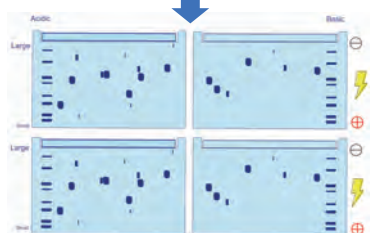
【前処理】
サンプルを可溶化



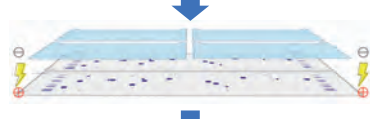
【IEF】
通電し分離(一次元)



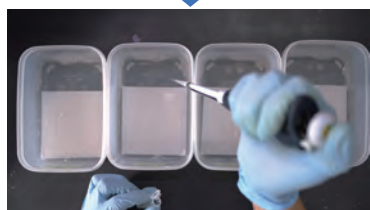
【SDS-PAGE】
IEFで分離した結果を
分子量の違いにより
さらに分離
(二次元)



【2D-PAGE】
等電点、分子量の
二軸でタンパク質を
マッピング



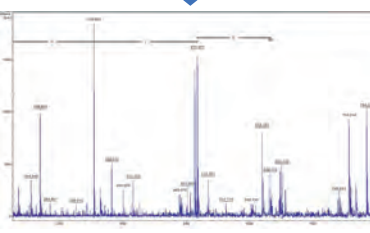
【膜転写】
マッピングされた
タンパク質を膜に
転写



【抗原抗体反応】
膜に抗体を加え
抗原と反応させる



【露光】
反応したタンパク質
を撮影・検出



【質量分析】
検出されたタンパク質を
質量分析計で同定

図1 2Dウエスタンブロットの手順イメージ

2Dウエスタンブロットによる実績

いずれも依頼分析のため、当記事では詳細を伏せますが、下記の実績があります。

- ・アルツハイマーの原因となるタンパク質の特定*
- ・ヒト粘膜組織に対するアレルゲンの特定
- ・根菜Aに存在するアレルゲンの特定
- ・果実Bに存在するアレルゲンの特定

※京都大学医学部中神由香子先生ご依頼の研究成果として
Nature Scientific Report (DOI:10.1038/s41598-020-63776-0)
に掲載され、謝辞に社名を記載していただきました。

おわりに

2Dウエスタンブロットは、アレルギー分野以外に下記のお客様に対してサービスを提供できると考えています。

- ・加工食品を扱う食品会社
- ・製薬会社
- ・生化学分野の研究機関

さらに、当研究所はタンパク質だけでなく遺伝子や化学関連の分析も行っており、総合的な分析プランの提案も行っていきたいと考えています。

【用語】

免疫反応：食品、ウイルス、花粉等が体内に入ってきたときに排除する反応

アレルギー反応：免疫反応の一部で、自分の体を傷つけてしまう反応

抗原：食品、ウイルス、花粉等体内に侵入してきた異物
アレルゲン：抗原のなかでアレルギーの原因になるタンパク質

抗体：抗原に特異的に結合して体内から除去する、免疫グロブリンと呼ばれるタンパク質。本記事の場合はアレルギー症状を患う人の血清を指す

IEF(等電点電気泳動)：タンパク質の電氣的性質を利用して分離する分析方法

SDS-PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)：タンパク質の分子量差を利用して分離する分析方法

2D-PAGE(二次元電気泳動)：IEFとSDS-PAGEを組み合わせる二次元的分離する分析方法

ウエスタンブロット：電気泳動の分離能と、抗原抗体反応の高い特異性を組み合わせる、特定の抗原を検出する分析方法

二次元ウエスタンブロット：二次元電気泳動とウエスタンブロットを組み合わせる、特定の抗原をより高精度に検出する分析方法