

# マルチアレルゲンの検出: Accurate-Mass Q-TOF LC/MS による ナッツおよびツリーナッツの 特異的ペプチドマーカの決定

## アプリケーションノート

食品

### 著者

Jennifer Sealey-Voyksner  
ImmungenX, Durham,  
North Carolina, USA

Robert Voyksner  
LCMS Limited,  
Durham, North Carolina, USA

Jerry Zweigenbaum  
Agilent Technologies, Inc.,  
Wilmington, Delaware, USA

### 概要

ナッツおよびツリーナッツアレルゲンは、重大な健康被害につながるおそれがあります。このような危険から消費者を守るため、微量濃度で存在するこれらのアレルゲンを 1 回の分析で確実に検出して定量できるメソッドが求められています。食品中に特定のナッツが存在するかどうかを判定するための特異的ペプチドマーカを見つけるため、11 種類のツリーナッツ (アーモンド、ペカン、カシュー、クルミ、ヘーゼルナッツ、松の実、ブラジルナッツ、マカダミアナッツ、ピスタチオ、クリ、およびココナッツ) とピーナッツに特有のタンパク質を酵素消化処理し、Accurate-Mass Q-TOF LC/MS で分析しました。各ナッツのマーカペプチドを選択する際は、生のナッツとローストナッツおよび加工食品と未加工食品に存在すること、そのアバンダンス (感度)、配列サイズ、特定のナッツに特異的であることを基準としました。分析結果を米国国立生物工学情報センター (NCBI) nr データベースで検索してペプチドの同一性を確認しました。また、選択したマーカペプチドが他のナッツや、大麦、トウモロコシ、米、大豆、小麦など一般的な食品原材料中に存在しないことを確認しました。各ツリーナッツについては 2 種類のマーカペプチドを、ピーナッツについては 4 種類のマーカペプチドを選択しました。大麦、トウモロコシ、米、キノア、大豆、小麦などの穀物のペプチド消化物を分析したところ、これらのマーカペプチドへの干渉は見られませんでした。さらに、選択したペプチドマーカが、一般的な食品中に ppm 以下の濃度で存在する 11 種類のツリーナッツおよびピーナッツのスクリーニングに有効かどうかを判断するために、各マーカの試験を実施しました。ナッツの含有が原材料表示ラベルに明記されている食品では、表記どおりのナッツに対するレスポンスが得られました。他のツリーナッツやピーナッツと同じ製造ラインで加工された食品のなかには、これらのナッツの混入が判明したものもありました。



Agilent Technologies

## はじめに

ナッツ類は食材として広く用いられています。その一方、ツリーナッツなどのナッツ類にアレルギー反応を起こす人の割合は、米国および英国で人口の約 1% にのぼります。他の地域では、食事の好みやナッツの加工法によって、その割合は大きく異なります [1]。食物のアレルゲン成分の正体はタンパク質です。アレルゲンタンパク質は、アレルギー反応の主因であり、通常は熱や消化に対して安定です [2]。一般に、ナッツアレルゲンは、7S ビシリン、プロフィリン、グリシニン、および 2S アルブミンなどの種子貯蔵タンパク質です [1]。特に、ピーナッツアレルゲンは、アナフィラキシーショック死の最大要因となっています [3]。食物アレルギーの予防は、その食品を避けることです。製造上の過失や非意図的な混入によるアレルゲンの混入は、重大な健康被害につながるおそれがあります。このような危険から消費者を守るため、微量濃度で存在するマルチアレルゲンを 1 回の分析で確実に検出して定量できるメソッドが求められています。

食物アレルゲンの検出に現在用いられている手法が改めて検討されました [4]。そして、これらの手法に伴う課題も明確に示されています [5]。このような分析法には、リアルタイム PCR、放射性アレルゲン吸着試験 (RAST)、酵素アレルゲン吸着試験 (EAST)、ロケット免疫電気泳動法、酵素免疫測定法 (ELISA) などがあります。ELISA は、定量メソッドとして最も広く利用されていますが、複数のアレルゲンを測定する場合は、コストが高くなる可能性があります。また、非アレルギー性食物中のタンパク質による交差反応から、偽陽性の判定が下されることもあります。ELISA では、加工によるナッツタンパク質の変化も擬陽性の原因となります。一方、リアルタイム PCR による DNA 分析は間接的な手法であり、サンプル中に DNA がないことが問題となる場合があります。使用する試験に対する食品加工の影響も懸念材料です。例えば、メイラード反応によるタンパク質の変化は、クッキー中のヘーゼルナッツタンパク質の検出可能性に影響をおよぼすことがわかっています [6]。タンパク質自体と、アレルギー反応を誘発する特定のタンパク質を表すマーカのどちらを検出すべきかについての議論も交わされています。

LC-MS/MS を用いたプロテオミクス研究により、食物アレルゲンマーカの発見、検出、および定量が可能になりました。2011 年に発表された 2 つの論文では、タンパク質のトップダウン (インタクトプロテイン分析) およびボトムアップ (ペプチドマッピング) による (1) エピトープ (アレルギー反応の原因となるタンパク質成分) または (2) アレルギー性食物の存在の特異的判断に使用可能なタンパク質の同定など、アレルゲノミクスについて考察しています [7、8]。Faeste 他による論文では、タンパク質または食物アレルゲンを

ターゲットとした LC/MS および MALDI-MS の研究に広く言及し、多数の食物アレルゲンターゲットおよびマーカペプチドを示しています。ただし、これまでに、ほとんど (11 種類のツリーナッツとピーナッツ) を 1 回の分析で検出する包括的なメソッドは報告されていません。他のプロテオミクス手法では、最終食品の製造に用いられる生のナッツと原材料の両方にマーカペプチドが存在することを検証できていません。

このアプリケーションノートでは、11 種類のツリーナッツおよびピーナッツアレルゲンを高い特異性で 1 回の分析により確実に検出するメソッドを開発するための LC-MS/MS プロテオミクス手法を紹介します。この手法に従って、ナッツタンパク質をトリプシンで消化処理し、Accurate-Mass Q-TOF LC/MS で分析しました。分析結果をデータベースで検索して、既知のナッツタンパク質を表すペプチドを同定しました。この作業では独自に、加工ナッツと調理前のナッツの両方に保持されているペプチドを発見し、各ペプチドマーカが特定のナッツのみに含まれる特異的なものであることを確認しました。「Discovery of Highly Conserved Unique Nut and Tree Nut Peptides by LC/MS/MS for Multi-Allergen Detection」 [9] の参考文献で、このメソッドの詳細と結果をご覧ください。

## 実験

試薬と溶媒の入手先および実験手順の詳細については、「Food Chemistry」に掲載の参考文献 [9] をご参照ください。

## サンプル前処理

生およびローストしたピーナッツ、アーモンド、ペカン、カシュー、クルミ、ヘーゼルナッツ、松の実、ブラジルナッツ、マカダミアナッツ、ピスタチオ、クリ、およびココナッツを食料品店から入手しました。生のナッツは、176.7℃ のオーブンで 30 分間ローストし、すりつぶして細粉にしました。30 mg のサンプルを 1 mL の 50 mM トリス-HCl (pH 7.5) に入れ、50℃ で 2 時間抽出しました。他の抽出溶媒についても評価しましたが、分子量の大きいタンパク質の抽出には Tris-HCl が最も効果的でした。サンプルを 8,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を LC/MS で分析してインタクトタンパク質を調べました。

参考文献 [9] に記載されている手順に従って、Tris-HCl 抽出液をトリプシン (#T8003-500 mg, Sigma 社) で酵素消化処理しました。消化反応は 2 時間後に停止しました。消化後の抽出液を 8,000 rpm で 10 分間遠心分離しました。その上清を LC-MS/MS によるペプチド分析に使用しました。

## Q-TOF LC/MS 分析

トリプシン消化により遊離したナッツペプチドの LC/MS 分析には、Agilent 1290 Infinity LC システムと、Agilent Jet Stream デュアルエレクトロスプレーイオン源を装着した Agilent 6530 Accurate-Mass 四重極飛行時間型 (Q-TOF) LC/MS システムを組み合わせて使用しました。タンパク質およびペプチドの分析に使用した HPLC および Q-TOF LC/MS のパラメータを表 1 および 2 に示します。

Q-TOF LC/MS システムは、Agilent チューニング溶液 (部品番号 G1969-85000) を使用して、質量範囲にわたるキャリブレーションを実行しました。Jet Stream デュアルエレクトロスプレーイオン源の第 2 ネブライザにアイソクラティックポンプでリファレンスマスを導入しました。このとき、流量 0.7 mL/min、スプリット 1:100 でポンプを動作

させることにより、エレクトロスプレーイオン源への流量を 7  $\mu$ L/min にしました。リファレンスマスには、Agilent ESI-TOF バイオポリマーリファレンスマス (部品番号 G1969-85003) の  $m/z$  322.04812 および 2421.9140 を使用しました。

ペプチド分析に自動 MS/MS を使用することにより、質量範囲 300~2,800  $m/z$  で最も強度の高い最大 3 つのプリカーサイオン (強度が 15,000 カウント以上) の MS/MS スペクトルを採取しました。以下の式を使用し、プリカーサイオンの  $m/z$  にもとづいてコリジョンエネルギー (CE) を求めました。

一価プリカーサイオン:  $CE = m/z * 0.04$

二価プリカーサイオン:  $CE = m/z * 0.025$

三価プリカーサイオン:  $CE = m/z * 0.022$

表 1. HPLC パラメータ

	タンパク質分析	ペプチド分析
機器	Agilent 1290 Infinity LC システム	Agilent 1290 Infinity LC システム
カラム	Agilent Poroshell 300 C18、2.1 $\times$ 75 mm、2.7 $\mu$ m カラム (部品番号 660750-902)	Agilent Poroshell 120 C18、2.1 $\times$ 50 mm、2.7 $\mu$ m カラム (部品番号 699775-902)
移動相	(A) 水 95%、アセトニトリル 5%、TFA 0.025 % (B) 水 5%、アセトニトリル 95%、TFA 0.025 %	(A) 水 95%、アセトニトリル 5%、TFA 0.025 % (B) 水 5%、アセトニトリル 95%、TFA 0.025 %
グラジエント	30 分で B を 0% から 60% に増加、その後 3 分で B を 90% に増加	70 分で B を 0% から 40% に増加、その後 80 分で B を 40% から 60% に増加
流量	0.3 mL/min	0.25 mL/min
ポストランカラム平衡化	6 分	6 分
カラム温度	30 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C
注入量	5.0 $\mu$ L	20 $\mu$ L

表 2. Q-TOF LC/MS パラメータ

	タンパク質分析	ペプチド分析
機器	Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システム	Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システム
イオン化モード	Agilent Jet Stream 技術搭載ポジティブイオンエレクトロスプレー	Agilent Jet Stream 技術搭載ポジティブイオンエレクトロスプレー
機器モード	2 GHz 拡張ダイナミックレンジ	2 GHz 拡張ダイナミックレンジおよび自動 MS/MS
質量範囲	0.5 秒で 300~2,800 $m/z$	MS: 0.5 秒で 300~2,800 $m/z$ MS/MS: 3 スペクトル/秒で 60~2,000 $m/z$
コリジョンガス	N/A	窒素
乾燥ガス	350 $^{\circ}$ C、9 L/min	350 $^{\circ}$ C、9 L/min
シースガス	350 $^{\circ}$ C、11 L/min	350 $^{\circ}$ C、11 L/min
ネブライザガス	30 psi	30 psi
フラグメンタ	160 V	160 V
キャピラリ	4,000 V	4,000 V
ノズル	1,000 V	1,000 V

## データ解析

データの採取および処理には、Agilent MassHunter Workstation ソフトウェア (データ取込バージョン B.05.01、データ解析バージョン B.06.00) を使用しました。

MassHunter Workstation 用 Agilent Spectrum Mill (バージョン B.04.00.127) を使用して、緑色植物データベース (green plant database) で LC-MS/MS トリプシン消化データを検索し、LC/MS 分析で得られた主要ピークのペプチド配列を同定し、それを特異的なタンパク質と照合しました。緑色植物データベース (green plant database) は、完全な NCBI nr データベースをもとに作成されており、194,606 件のデータが登録されています。検索は、プリカーサイオンについては質量許容差を測定  $m/z$  の  $\pm 20$  ppm、プロダクトイオンについては  $\pm 50$  ppm としました。

Spectrum Mill の MS Edman コーティリテイツールでも緑色植物データベース (green plant database) を検索し、MS/MS アミノ酸配列の確認と、その配列が分析対象のナッツに特有で、他のナッツや緑色植物にはないことを確認しました。

## ペプチド標準

同定したペプチドの確認および食品中のナッツ含有量の推定には、Thermo Scientific Pierce Protein Research (イリノイ州ロックフォード) のペプチド標準と同位体標識ペプチドを使用しました。これらのペプチドを 80/20 水/アセトニトリル溶液に溶解して 1 mg/mL 原液を調製し、これを希釈して 0.1 ppm のスレッショールド標準を調製しました。

## 結果と考察

### ローストナッツと生のナッツ: タンパク質プロファイルの違い

ナッツタンパク質、および酵素消化処理によって遊離するペプチドは、加工により変化するものと考えられます。そのため、各ナッツの存在を表すペプチドマーカには、生の状態のナッツおよび調理または加工された状態のナッツの両方に存在するものを選択する必要があります。加工によってタンパク質がどの程度変化するのかを調べるために、生のナッツと調理済みナッツのタンパク質を分析し、分子量の変化を測定しました。

図 1A は、LC/MS によるローストピーナッツおよび非ローストピーナッツのタンパク質の全イオンクロマトグラム (TIC) です。非ローストピーナッツ抽出物の分子量は 12~62 kDa の範囲で、イオン電流の大部分が 50~62 kDa の範囲に含まれています。また、ロースト加工によって TIC が変化し、50~62 kDa のタンパク質の強度が減少しています。ローストピーナッツの質量スペクトル (図 1B) には、多数のピークが現れています。これは不均一性を表し、シグナル強度は非ローストピーナッツ (図 1C) の 1/10 です。このように非常に多くのピークが生じているのは、メイラード反応によってタンパク質がグリコシル化されたためと考えられます。これらのピークは、デコンポリュートできないため、タンパク質の分子量を個々に測定することができませんでした。同じリテンションタイムで溶出した非ローストピーナッツの質量スペクトル (図 1C) はより均一で、弁別可能な多価イオンが現れています。これらのピークをデコンポリュートすることにより、その分子量を測定することができました。表 3 から、分析した支配的なタンパク質の分子量がローストにより 1,000 Da 以上増加していることがわかります。

これは、ローストによりタンパク質が変化したためで、その一部はグリコシル化によるものと考えられます。以上から、マーカペプチドには、調理や加工により変化しないものを選択する必要があります。

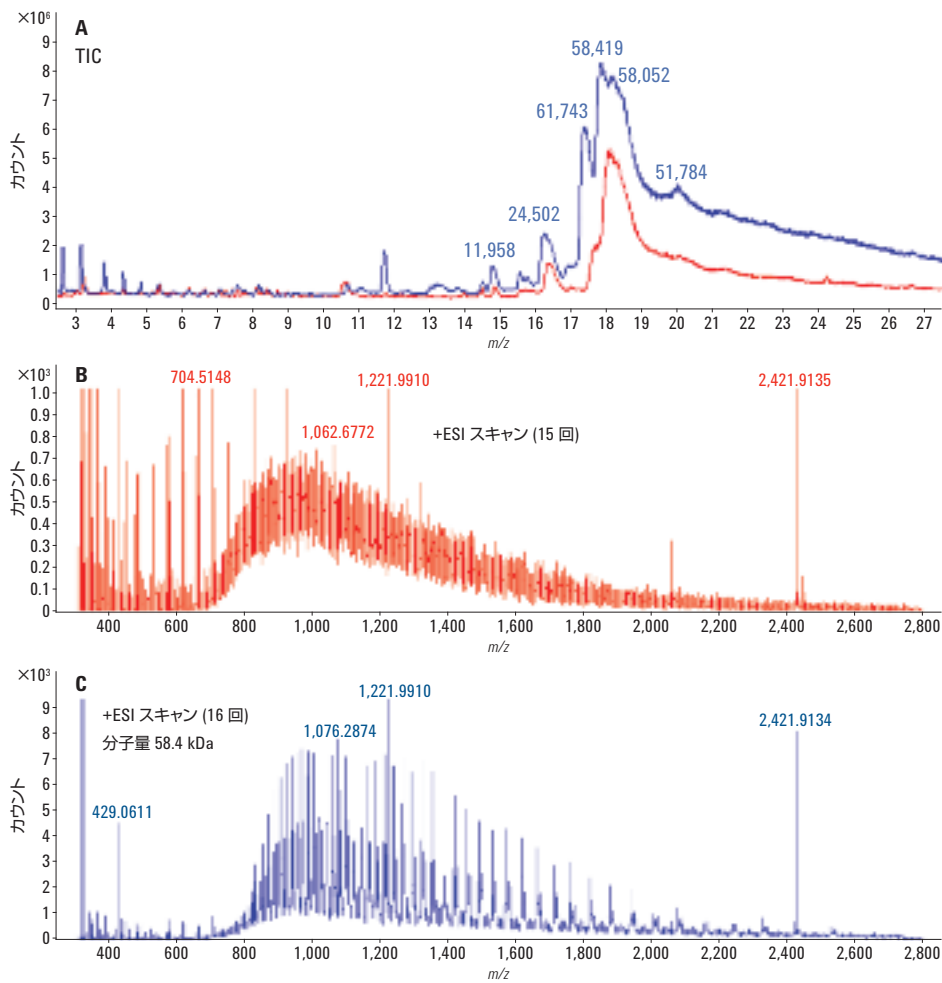


図 1. Q-TOF LC/MS によりローストピーナッツ (赤) と非ローストピーナッツ (青) で検出されたタンパク質の比較。  
 A) LC-MS によるピーナッツの TIC タンパク質プロファイルがロースト後に変化しています。B) 17.9 分に  
 溶出したローストピーナッツタンパク質の質量スペクトル。ピークが未分離のため、分子量が得られ  
 ませんでした。(C) 17.9 分に溶出した非ローストピーナッツタンパク質の質量スペクトル。分子量は  
 58,419 Da です。

表 3. ローストによるナッツの顕著な  
 タンパク質の分子量の変化

ナッツ	ロースト (Da)	未加工 (Da)
アーモンド	60225*	53298
ブラジル	51011	49732
カシュー	62293*	50192
ヘーゼルナッツ	52741*	51601
マカダミア	79383*	57996
ピーナッツ	60536*	58419
ペカン	58069*	51228
松の実	70319*	48012
クルミ	61979*	33093

\* 分子量の分布が 1,000 Da 未満

## ペプチドマーカの発見

各ナッツタンパク質を特異的に表すペプチドマーカを選択するには、形成されるペプチドの体系的評価が必要です。マーカペプチドを選択するために用いたワークフローは以下のとおりです。

1. トリプシンによる消化、Q-TOF LC/MS による検出、および Spectrum Mill による NCBI nr データベースの検索により、ナッツタンパク質を表すペプチド配列を同定しました。選択したペプチドについて、アスパラギン酸の加水分解、メチオニンの酸化、塩基性条件下でのグルタミンの脱アミド化など、安定性に潜在的な問題がないかスクリーニングしました。
2. (A) ナッツタンパク質を表す、アバundanceが最も高いペプチドで、かつ (B) ローストサンプルと非ローストサンプルの差異が 20% 未満のペプチドを選択しました。
3. NCBI nr データベースでの配列の検索により、配列が分析対象のナッツに特有であり、他のどのナッツや緑色植物にも含まれていないことを確認しました。
4. 同定したマーカペプチド候補を、合成ペプチド標準を使用して確認しました。

手順 1 では、最初に選択するペプチドを、Spectrum Mill による NCBI nr 植物データベース (plant database) での Q-TOF LC/MS データの検索から同定した、トリプシン消化によって生成されたペプチドに限定しました。Q-TOF LC/MS 機器の質量精度の高さが、最初のデータベース検索時に非常に有利に働きました。質量許容差を、プリカーサイオンについては 1 Da から 20 ppm 未満に、プロダクトイオンについては 50 ppm に引き下げることにより、データベース検索により得られる誤ったヒット件数が大幅に減少しました。例えば、検索時の許容差を 1 Da から 20 ppm に引き下げることにより、ピーナッツペプチドの検索により得られる合計ヒット件数を 1,190 件 (ピーナッツタンパク質に関連するペプチドは 22%) から 339 件 (ピーナッツタンパク質に関連するペプチドは 72%) に絞り込むことができました。プリカーサイオンについて測定された質量精度は、正確な質量の 2 mmu 以内でした。

手順 2 で、採取した、ローストナッツおよび非ローストナッツに含まれる 10 種類のピーナッツペプチドの抽出イオンクロマトグラムを図 2 に示します。40.4 分に溶出したペプチドを除くすべてのペプチドが 20% 以上の面積再現性を示しました。22.2 分および 40.4 分に溶出している、強度が最も低い 2 種類のペプチドは、ローストピーナッツと非ローストピーナッツで強度がほとんど、またはまったく一致していなかったため、候補から除外しました。アミノ酸残基が 20 個を超えるペプチドも、合成コストが高く、より多くの多価イオンにわたってイオン電流が分散する傾向があるため除外しました。アミノ酸残基が 6 個未満のペプチドは、特異性に欠けるため、選択しませんでした。また、タンパク質を幅広くカバーするために、可能な場合は、1 つのタンパク質から複数のペプチドを選択するのではなく、異なるアレルゲンタンパク質から 1 種類または 2 種類のペプチドを選択しました。

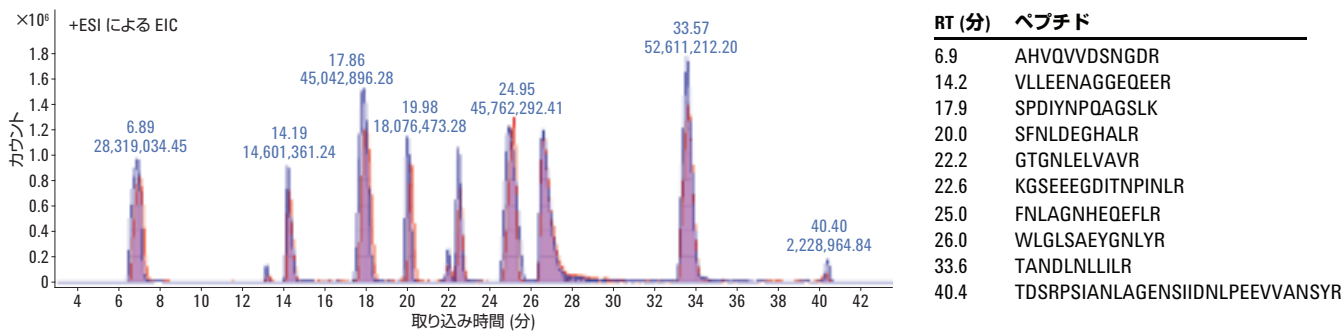


図 2. ローストピーナッツ (赤) および非ローストピーナッツ (青) で検出されたトリプシンペプチドマーカの強度の比較

図 3 にも、ペプチドマーカの選択プロセスを示します。矢印は、ローストアーモンドおよび非ローストアーモンドで検出されたペプチドの絶対強度と一致度をもとに選択した 4 種類のマーカペプチドです。ローストアーモンドで発見された多数の新たなペプチドは、非ローストアーモンドでは検出されませんでした。これは、ローストにより変化が起きていることを示します。分析したその他のナッツでも同様の変化が見られました。一般に、ローストナッツに特有の新たなペプチドは 40~90 種類でした。

ナッツは、調理中に他のナッツや穀物と混合される可能性があるため、分析の有効性を確保するには、食物マトリックス中で干渉が生じないようにしなければなりません。そこで、手順 3 では、ペプチドマーカがトリプシン消化後に他のナッツや穀物には存在しないことを確認します。この例では、4 種類のピーナッツペプチドマーカの抽出イオンクロマトグラム (赤) と、列挙した他のナッツおよび穀

物の分解物の、同じ質量の抽出イオンクロマトグラム (黒) を重ね合わせています (図 4)。すべてのクロマトグラムは、縦軸の強度が同じになるよう正規化されています。ピーナッツ消化物と重ね合わせたクロマトグラムには、ナッツとしてアーモンド、ブラジルナッツ、カシュー、ヘーゼルナッツ、マカダミアナッツ、ペカン、松の実、ピスタチオ、およびクルミ、穀物として大麦、トウモロコシ、米、キノア、大豆、および小麦が含まれています。各サンプルでは、ピーナッツペプチドマーカが検出されなかったため、このメソッドはピーナッツに特異的で、交差反応がなく、他のナッツや穀物製品による干渉を受けません。

さらに特異性を確認するために、各ターゲットペプチド配列を NCBI nr 植物データベースで検索しました。参考文献 [9] には、各ナッツ用に選択したペプチドマーカがリテンションタイム、プリカーサイオン、および 2 つの確認プロダクトイオンとともに示されています。各ツリーナッツについては 2 種類のペプチドマーカを、ピーナッツについては 4 種類のペプチドマーカを選択しました。

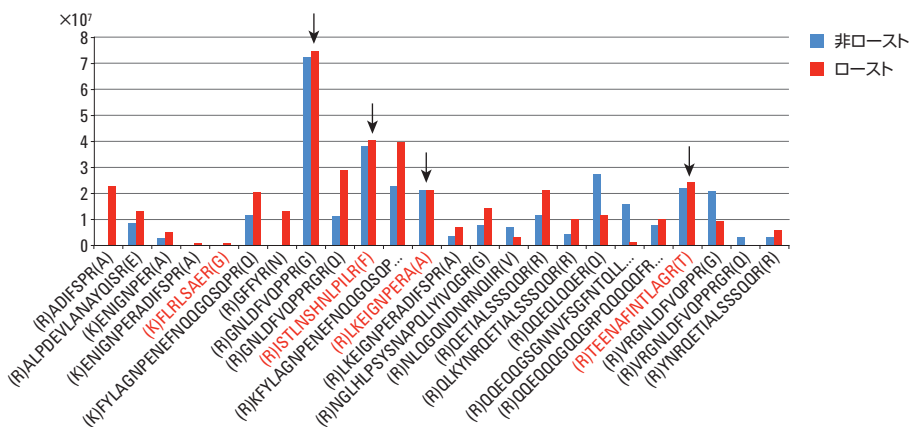


図 3. ローストおよび非ローストアーモンドタンパク質のトリプシンペプチドのレスポンス強度。選択したペプチド (矢印) は、アレルギー性タンパク質 Pru du 6 (分子量 63,016) または prunin (ブルーナスダルシス) (分子量 62,979) を表します。

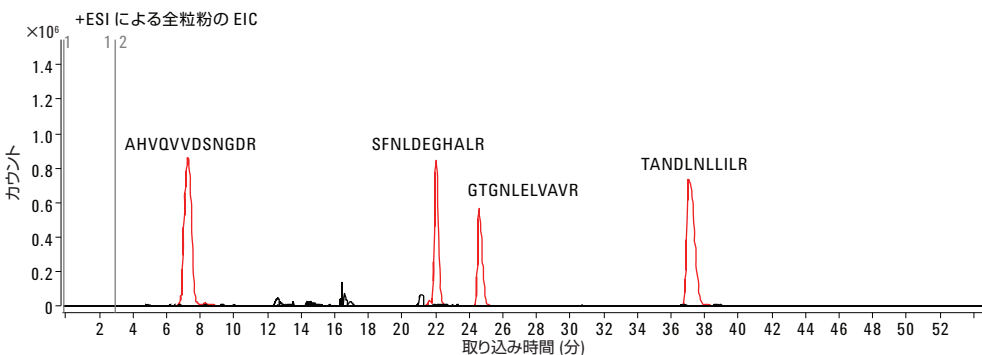


図 4. 4 種類のピーナッツペプチドマーカの抽出イオンクロマトグラム (10 ppm の許容差) (赤) と、同じ質量のナッツ (アーモンド、ブラジルナッツ、カシュー、ヘーゼルナッツ、マカダミア、ペカン、松の実、ピスタチオ、およびクルミ) と穀物 (大麦、トウモロコシ、米、キノア、大豆、および小麦) の抽出イオンクロマトグラム (黒) の重ね合わせ表示。すべてのクロマトグラムは、縦軸の強度が同じになるよう正規化されています。抽出イオンクロマトグラムから、選択したピーナッツペプチドに干渉する共通のイオンがないことがわかります。

## 食品中のナッツペプチドマーカの検出

選択したペプチドマーカにより、食品中に 12 種類のナッツが存在するかどうかを 1 回の分析ですばやくスクリーニングおよび定量できるかどうかを判断するために、各マーカの試験を実施しました。マーカペプチドの検出は、リテンションタイム、10 ppm の許容差内での精密質量、および 2 種類の確認 MS/MS プロダクトイオンにもとづいて行いました。

ナッツ含有の食品、ナッツ非含有の食品、およびナッツが含まれている可能性のある食品 (ナッツ製品の加工施設で製造) を分析しました。結果を図 5 に示します。ピーナッツマーカペプチドは、非ローストピーナッツ、ピーナッツクッキー、およびプロテインバーで検出されましたが、未加工トウモロコシでは検出されませんでした。

参考文献 [9] には、分析した食品と各食品で検出されたナッツの完全なリストが掲載されています。ナッツが含まれていないはずの穀物およびその他の食品では、偽陽性のレスポンスが生成されませんでした。ナッツが含まれていることを原材料表示ラベルに表記している食品では、表記どおりのナッツに対する陽性レスポンスが得られました。多くの食品は、ツリーナッツが含まれる食品と同じ施設で加工されているため、ラベル表記以外のナッツが検出されたものもありました。

最も重要な結果は、原材料表示ラベルには特定のナッツが表記されていませんが、他のナッツの加工に使用された装置で製品が加工または製造されたことを伝える注意書きがある食品の分析から得られたものでした (表 4)。マカダミアナッツクッキーでは、マカダミアナッツのマーカペプチドの強いピークに加え、アーモンド、ペカン、およびクルミのマーカペプチドの弱いピークが現れました。バナナクリームケーキは、原材料表示ラベルに他のツリーナッツと同じ装置で加工または製造されていることが表記されていましたが、ナッツマーカは検出されなかった例です。ピーナッツバタープレッツェルには、表記どおりピーナッツが含まれていましたが、クルミの存在を示す弱いシグナルも得られました。クルミは原材料表示ラベルに表記されておらず、他のナッツと同じ装置で加工されたことも表記されていませんでした。

表 4. 選択した食品および原材料の分析結果。ナッツマーカペプチドが 0.1 ppm 以上の濃度で検出されたものを強調表示しています。

食品または原材料	ピーナッツ	アーモンド	ペカン	松の実	カシュー	ブラジルナッツ	ヘーゼルナッツ	クルミ	マカダミアナッツ	ピスタチオ	クリ	ココナッツ
バナナナッツマフィン												
ペカンクッキー												
バナナクリームケーキ												
ピーナッツバタープレッツェル												
グルテンフリークラッカー												
ピーナッツクッキー												
マカダミアナッツクッキー												
ナッツクリスプ												

## 結論

食品中のピーナッツおよびツリーナッツアレルゲンは、重大な健康被害につながるおそれがあります。また、他のツリーナッツやピーナッツと同じ製造ラインで加工された食品には、これらのナッツが混入することもあります。さまざまな食品中のナッツを検出するために使用できるペプチドマーカには、(1) マーカペプチド配列が調理やその他の加工後も維持されること、(2) 配列が同じ食品で使用されている他のナッツや穀物では検出されないことが要求されます。

特異的なナッツタンパク質をトリプシン酵素消化処理し、Accurate-Mass Q-TOF LC/MS による分析、および NCBI nr データベースの検索から発見したマーカペプチドで、生のナッツとローストナッツ、加工食品と未加工食品のサンプルで 12 種類のナッツの存在を 1 回の分析でスクリーニングできるメソッドが開発できました。マーカペプチドの発見により、交差反応や、一般的な ELISA メソッドに伴う偽陽性または陰性レスポンスの可能性を非常に低く抑えることができました。今回紹介した Q-TOF LC/MS メソッドは、食品の特性解析やラベリング、微量濃度で存在する食物アレルゲンの検出の改善に役立つ有効なツールであることがわかります。



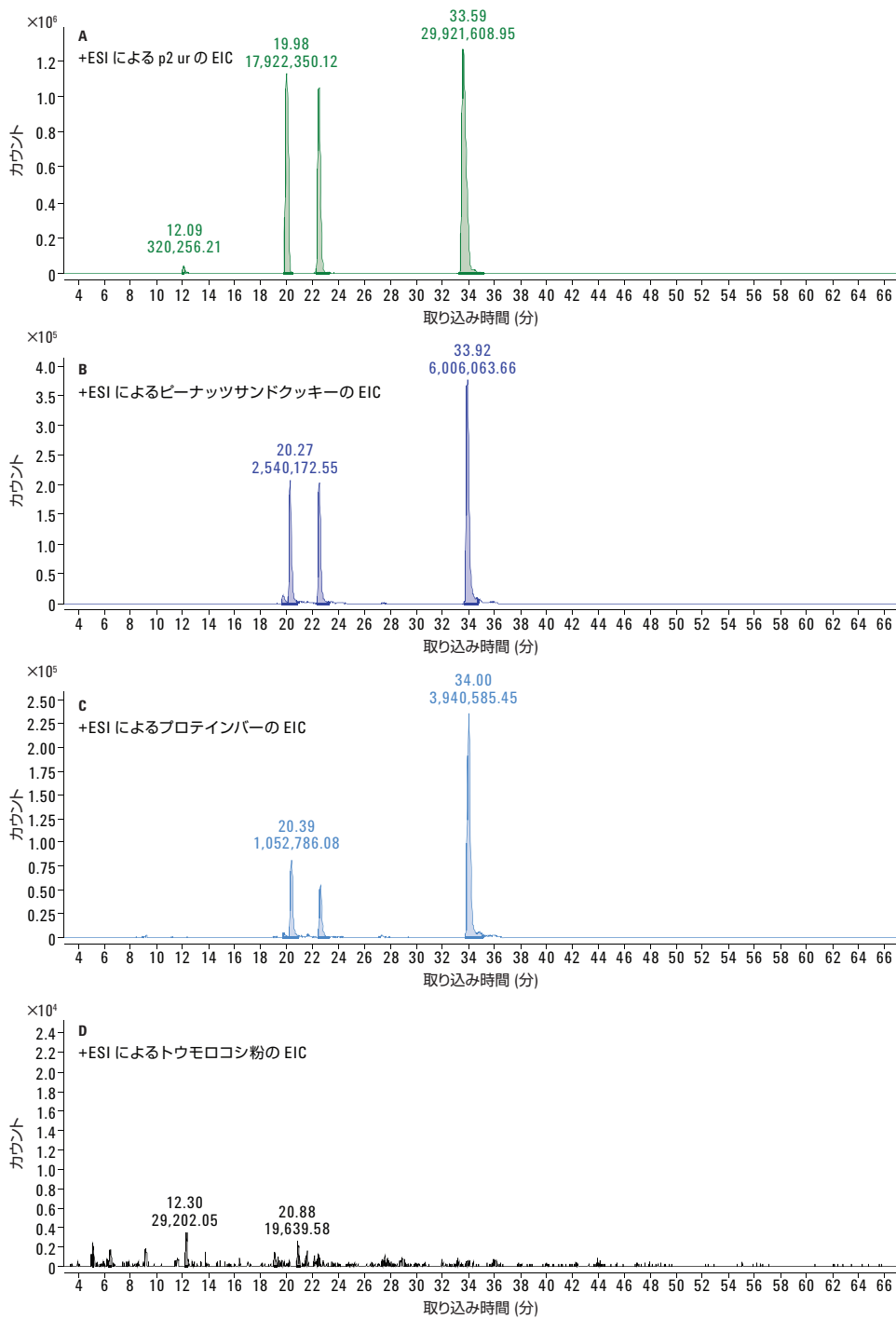


図5. 食品中のピーナッツマーカペプチド3種類の抽出イオンクロマトグラム。A) 非ローストピーナッツ、B) ピーナッツサンドクッキー、C) プロテインバー、D) 未加工トウモロコシ。マーカペプチドは、リテンションタイム20分のSFNLDEGHALR、リテンションタイム22.4分のGTGNLELVAVR、およびリテンションタイム33.8分のTANDLNLILRです。

## 参考文献

1. J. F. Crespo, *et al.* Food allergy: nuts and tree nuts. *British Journal of Nutrition*, **96(S2)**, S95 (2007).
2. S. H. Sicherer, H. A. Sampson. Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125(2)** Suppl S116-125 (2010).
3. S. A. Bock, A. Muñoz-Furlong, H. A. Sampson. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **119(4)**, 1016-1018 (2007).
4. R. E. Poms, C. L. Klein, E. Anklam. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.*, **21(1)**, 1-31 (2004).
5. A. J. van Hengel. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal. Bioanal. Chem.*, **389(1)**, 111-118 (2007).
6. T. Cucu, *et al.* Detection of Hazelnut in Foods Using ELISA: Challenges Related to the Detectability in Processed Foodstuffs. *Journal of AOAC International*, **95(1)**, 149-156 (2012).
7. C. K. Faeste, *et al.* Liquid chromatography and mass spectrometry in food allergen detection. *J. Food Prot.*, **74(2)**, 316-345 (2011).
8. G. Picariello, *et al.* The frontiers of mass spectrometry-based techniques in food allergenomics. *J. Chromatogr. A*, **1218(42)**, 7386-7398 (2011).
9. J. Sealey-Voyksner, J. Zweigenbaum, R. Voyksner. Discovery of Highly Conserved Unique Nut and Tree Nut Peptides by LC/MS/MS for Multi-Allergen Detection. *Food Chemistry* (2015) DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.043.

## 詳細

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト ([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)) をご覧ください。

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Printed in Japan

August 4, 2015

5991-6095JAJP



**Agilent Technologies**