

## はちみつの外来アミラーゼ検査法

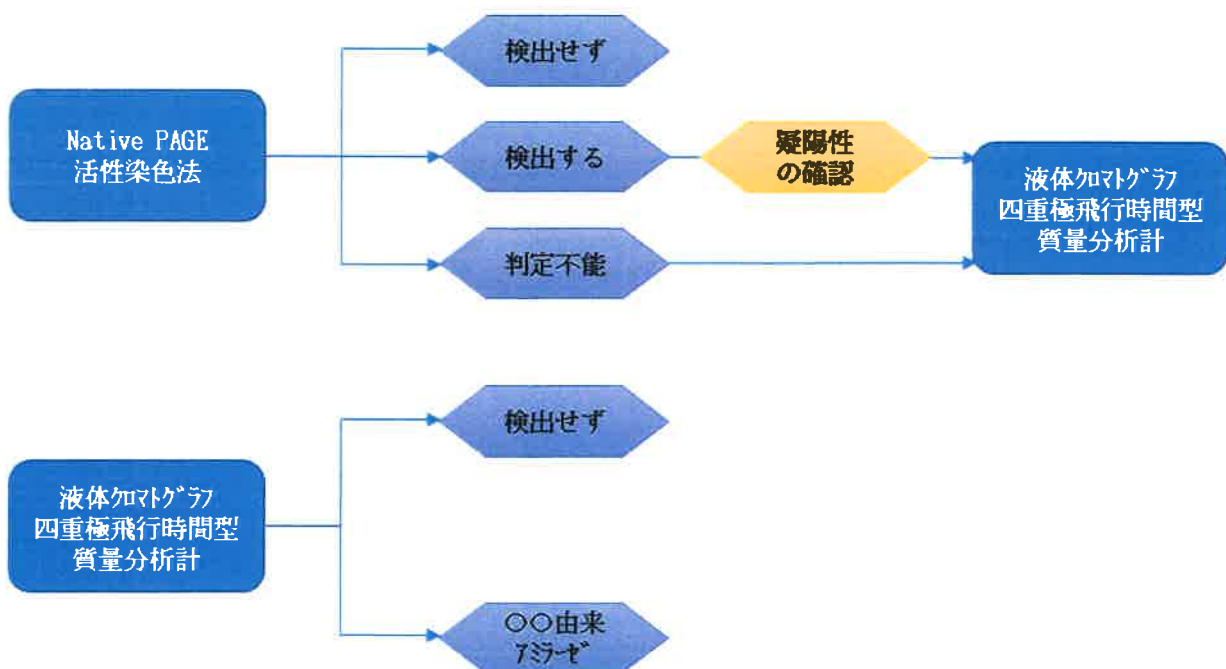
### 1 概要

はちみつは、偽装されやすい食品の一つとして知られており、シロップなどが添加された商品が表示なく国内外で流通していると報告されています。また、はちみつの鮮度や過熱の指標となるジアスターゼ(アミラーゼ)活性値がシロップ添加により低下するため、後から別由来のアミラーゼ(外来アミラーゼ)を添加し、品質を偽装するといった事例も報告されています。当財団では、はちみつ中の外来アミラーゼに関する試験を行っています。

### 2 試験の流れ

はじめにNative PAGE-活性染色法により、外来アミラーゼの有無を確認します。外来アミラーゼを検出しなかった場合はここで試験終了となりますが、疑陽性を示す可能性があるため、検出した場合は液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計(LC-QTOF/MS)による測定を行い、タンパク質解析ソフトウェアを用いて解析し、疑陽性の確認及び外来アミラーゼの由来を特定します。また、Native PAGE-活性染色法で判定できなかった場合においてもLC-QTOF/MSにより確認します。

なお、蜜源がマヌカ、ソバ、ジャラ、サクラ、ナツメである場合、Native PAGE-活性染色法では偽陽性を示すことがわかっているため行わず、LC-QTOF/MSにより外来アミラーゼを確認します。



### 3 試験結果

#### ①Native PAGE-活性染色法

「検出せず」, 「検出する」又は「判定不能」

- \* 外来アミラーゼの由来は判明いたしません。
- \* 定性試験であるため, 検出しても添加量は得られません。

#### ②LC-QTOF/MS

「検出せず」又は「〇〇由来アミラーゼ」

- \* 検出しても添加量は得られません。

### 4 試験料金

#### ①Native PAGE-活性染色法

30,000円(税別)

- \* 「検出する」又「判定不能」となった場合,  
「外来アミラーゼの検索(LC-QTOF/MS)」(50,000円)が追加となります。

#### ②LC-QTOF/MS

50,000円(税別)

- \* Native PAGE-活性染色法を実施後に追加した場合となります。
- \* お客様の試験室においてNative PAGE-活性染色法を行い, 「検出する」又は  
「判定不能」となった場合も抽出液を検体として送付いただければ承ります。

80,000円(税別)

- \* Native PAGE-活性染色法を実施せず, 単独で実施した場合となります。

以 上



## タンパク質の検索 ～LC-QTOF/MS による異物検査への活用～

### はじめに

タンパク質の構造や機能を総合的に研究する学問分野をプロテオミクス（プロテオーム解析）と言います。プロテオミクスのなかでも頻繁に用いられる手法のひとつにショットガンプロテオミクスがあります。この手法ではタンパク質の抽出液にトリプシンなどのタンパク質分解酵素を添加し、得られたペプチド断片について LC-QTOF/MS（液体クロマトグラフ-四重極/飛行時間型質量分析計）などの高分解能質量分析装置を用いて計測をします。こうして検出されたペプチド情報をタンパク質解析ソフトで解析し、試料中のタンパク質を網羅的に同定することが可能となります。さらに、このショットガンプロテオミクスの手法は異物検査にも応用が可能です。

今回は、LC-QTOF/MS を用いた「タンパク質の検索」の異物検査への活用について紹介します。



図-1 ショットガンプロテオミクスのイメージ

### LC-QTOF/MS の特徴

LC-QTOF/MS の質量分析部は、四重極（Quadrupole）と高分解能な飛行時間型（TOF：Time of Flight）を組み合わせた装置で以下の特徴があります。

- ① データ取得の高速化により多くの化合物の同定が可能
- ② 連続的な MS/MS スペクトル取得により同定精度が高い
- ③ 網羅的に存在量の少ない化合物の検出が可能

これらの特徴から、タンパク質解析に必要な数多くのペプチドを迅速かつ精密に測定することができます。



写真-1 LC-QTOF/MS の外観



異物検査への活用

製品から異物が発見され、異物検査を行った結果、動物組織であることはわかったものの、何の動物由来であるかや、どこの組織に由来するものかが特定できずに困ったことはありませんか。また、FT-IR（フーリエ変換赤外分光分析）の結果から「異物はタンパク質を主成分とするもの」と判明したものの、何由来のタンパク質なのか、それ以上の情報が得られずに異物の鑑定やその後の対策に悩まれるケースもあるかと思います。顕微鏡観察やFT-IRといった既存の異物検査の手法では異物がタンパク質を主成分とするものであった場合、タンパク質の由来までを調べることは困難なことでした。そこで、当財団ではショットガンプロテオミクスを応用し、タンパク質を主成分とする異物の生物種及び組織の同定試験（異物のタンパク質の検索）を確立しました。

当財団にて作成した模擬異物の試験結果の一例を示します。

模擬異物の試験結果の一例

既存の異物検査（外観観察、顕微鏡観察、FT-IR）

異物は顕微鏡観察にて横紋筋が確認され、動物組織であることがわかりました。

しかし、何の動物由来であるかや、どこの組織に由来するものかはわかりません。



写真-2 異物の外観

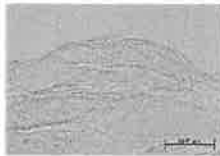


写真-3 異物の顕微鏡写真

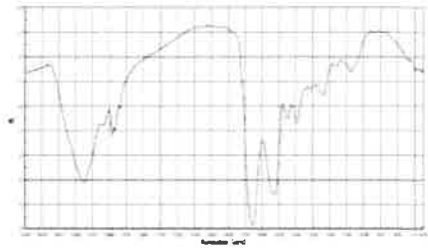


図-2 異物の赤外吸収スペクトル



異物のタンパク質の検索（LC-QTOF/MS）

表-2 異物のタンパク質の検索結果<sup>2)</sup>

| Protein | Representative Accession | Species             | Name                                                                                 | Unused ProtScore |
|---------|--------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 1       | sp P02467 CO1A2_CHICK    | CHICK <sup>*1</sup> | Collagen alpha-2(I) chain OS=Gallus gallus OX=9031 GN=COL1A2 PE=1 SV=3 <sup>*2</sup> | 40.03            |
| 2       | sp P02457 CO1A1_CHICK    | CHICK               | Collagen alpha-1(I) chain OS=Gallus gallus OX=9031 GN=COL1A1 PE=1 SV=3               | 31.5             |
| 3       | sp P04268 TPM1_CHICK     | CHICK               | Tropomyosin alpha-1 chain OS=Gallus gallus OX=9031 GN=TPM1 PE=1 SV=2                 | 19.55            |
| 4       | sp P02606 MLEC_CHICK     | CHICK               | Myosin light chain 1, cardiac muscle OS=Gallus gallus OX=9031 PE=1 SV=3              | 14.12            |
| 5       | sp P68139 ACTS_CHICK     | CHICK               | Actin, alpha skeletal muscle OS=Gallus gallus OX=9031 GN=ACTA1 PE=1 SV=1             | 14.05            |

\*1 生物種の検索結果が表示されます。

今回の異物は「CHICK」（ニワトリ）に由来するものとわかります。

\*2 同定されたタンパク質の名称などの情報が表示されます。

例えば、Protein 1 は Gallus gallus（ニワトリ）の Collagen（コラーゲン）であることがわかります。



結果

異物はニワトリに由来するもので、コラーゲン、ミオシン、アクチンなどの筋組織に関する成分を検出していることから、ニワトリの筋繊維であると考えられました。

### 「タンパク質の検索」の強み

模擬異物の試験結果の一例で試験した模擬異物は、鶏の手羽先を 180℃の高温の油で揚げたものでした。ショットガンプロテオミクスを用いた「タンパク質の検索」ではタンパク質中のペプチド断片をターゲットとしていますので、加熱や加工による影響を受けにくく、異物のタンパク質の由来推定が可能となります。

加熱や加工が結果に与える影響を鶏の手羽先以外にも模擬異物を作製して検証しました。その結果、チーズを焦がしたものからはウシ由来のカゼイン、豚のもつ煮込みからはブタ由来のアルブミンやヘモグロビン、目玉焼きの白身部分からはニワトリ由来のオボアルブミン、オボトランスフェリン及びオボムコイドを同定することができました。

加熱を受けた異物や加工食品から発見された異物についてタンパク質の由来推定ができる点は本法の大きな強みと言えます。

表-3 既存の異物検査に付随して実施可能なオプション試験の新旧比較

| 従来のオプション試験                                                             |
|------------------------------------------------------------------------|
| <u>DNA 塩基配列解析試験</u>                                                    |
| 問題点：DNA は加熱や加工の影響を受けやすいため、異物の状態によっては由来の推定はできない                         |
| <u>組織標本の作製</u>                                                         |
| 問題点：異物の組織標本を作製し、特徴的な形態を顕微鏡観察することで組織を推定するため、タンパク質の由来まではわからない            |
| 新規オプション試験                                                              |
| <u>異物のタンパク質の検索</u>                                                     |
| 長所①：DNA ではなくタンパク質のペプチド断片をターゲットとしているため、加熱や加工による影響を受けにくく、タンパク質の由来の推定が可能。 |
| 長所②：生物種及び組織（機能）の両方についての推定が可能                                           |

### おわりに

プロテオミクスの進歩は食品安全や品質管理においても重要な役割を果たしています。特にショットガンプロテオミクスを用いた「タンパク質の検索」は、試料中のタンパク質を網羅的に同定する際に有用です。特定の生物種や組織に由来するタンパク質の識別が可能となることから、今後ますますの利用が期待されます。当財団はこうした最新技術を注視しつつ、受託検査を通じて皆様の安心・安全のお役に立てるように努めてまいります。

### 参考文献(参考資料)

- 1) Takahashi, Y. et al. Investigation of foreign amylase adulteration in honey distributed in Japan by rapid and improved native PAGE activity staining method. *Journal of Applied Glycoscience*. 2023, 70, p. 67-73.
- 2) UniProt Consortium. "UniProt:The Universal Protein Resource". UniProt. <https://www.uniprot.org/>, (参照 2024-08-23) .