

令和2年度畜産関係学術研究委託調査報告書（詳細版）
メタボローム解析による「あか牛」牛肉特性の解明
中山統雄¹⁾・林田雄大¹⁾・北浦日出世¹⁾・守田智¹⁾・原公庸¹⁾・鶴田勉¹⁾
古田雅子²⁾・行部浩²⁾・富澤一仁³⁾

- 1) 熊本県農業研究センター畜産研究所
- 2) 熊本県農業研究センター草地畜産研究所
- 3) 熊本大学大学院生命科学研究部

【要約】

熊本県を中心に改良、飼養されている「あか牛」（以下「褐毛和種」）牛肉の特性解明を目的として、試験1として、アミノ酸、脂肪酸等の絶対定量法を用いて、試験2としてメタボローム解析による相対定量法を用いて、それぞれ褐毛和種牛肉と黒毛和種牛肉の対比を行った。

試験1では、褐毛和種で「うま味」、「特定機能」を有するアミノ酸、「必須脂肪酸」が多い可能性があり、黒毛和種で「風味・苦味」を有するアミノ酸、「一価不飽和脂肪酸」が多い可能性が示されたが、結果的にそれらが品種間差を決定づける要因と断定することは困難であった。

試験2では、GC-MSを用いたメタボローム解析を行ったところ、171の代謝物が定量された。主成分分析により代謝物を比較検討したところ、褐毛和種と黒毛和種が明確に区分され、糖類、有機酸関連代謝物、脂肪酸に分類される数種類の代謝物によって、褐毛和種と黒毛和種の差異を特徴づけている可能性が示唆された。

1 はじめに

熊本県特産の褐毛和種は、古くから本県で改良を重ねてきた肉用牛である。他の和牛3種と比べ増体に優れるなどの生育特性があり、その牛肉は脂肪交雑が適度でうま味成分を多く含む赤身肉が特徴である。しかしながら、脂肪交雑重視の枝肉格付で価格評価され流通していることから、生産頭数は大きく落ち込んでいる。褐毛和種の生産振興には、消費者、生産者双方にとっての新たな魅力の創出が不可欠である。

脂肪交雑とは違った視点で、褐毛和種本来の赤身の特徴的な味わいの魅力をつまびらかにし、消費者に明確に提示することが可能であれば、褐毛和種の需要拡大に資することができると思われる。

そこで本研究では、試験1として、これまで肉用牛研究の中で多く採用されてきたアミノ酸、脂肪酸等の絶対定量法を用いて、試験2としてメタボローム解析による相対定量法を用いて、それぞれ褐毛和種牛肉と黒毛和種牛肉の対比を行い、「あか牛」牛肉の特性解明に取り組んだ。

2 試験1：絶対定量（慣行的な分析手法）を用いた枝肉の評価

（1）材料および方法

慣行的な分析手法を用いた枝肉評価の検討には、褐毛和種牛肉（n=3）および黒毛和種牛肉（n=3）を用いた。一般的に市場に流通される牛肉を想定して評価を行うため、飼養条件や出荷月齢には一定の基準を設けず、牛肉サンプルを収集した。分析に用いた牛肉は、いずれもリブローズを供試することとした。供試したサンプルの概要（個体番号、枝肉格付時のBMS No.、枝肉総重量）は表1に示した。

表1 絶対定量試験に用いた牛肉サンプルの概要

種類	番号	枝肉総重量(kg)	BMS No.
褐毛和種	R1	609.7	5
〃	R2	448.7	3
〃	R3	448.7	3
黒毛和種	B1	406.5	2
〃	B2	389.9	9
〃	B3	406	7

○分析項目

枝肉評価の分析においては、食品分野における評価で一般的に分析されるアミノ酸類、脂肪酸類などを分析した。

アミノ酸類分析では、①うま味および酸味を呈するアスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミンおよびアスパラギン、②甘み・微甘みを呈するグリシン、アラニン、トレオニン、セリンならびにプロリン、③風味・苦味を呈するメチオニン、リジン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、バリン、ヒスチジン、アルギニンおよびシステイン、④特定機能性を有するタウリン、オルニチンならびにGABA（ γ -アミノ酪酸）を測定し、①から④のそれぞれの総量（mg/100g）を定量した。

脂肪酸類分析では、⑤飽和脂肪酸に分類される酪酸（C4：0、炭素数：二重結合数）、ヘキサ酸（C6：0）、オクタン酸（C8：0）、デカン酸（C10：0）、ラウリン酸（C12：0）、ミリスチン酸（C14：0）、ペンタデカン酸（C15：0）、パルミチン酸（C16：0）、ヘプタデカン酸（C17：0）、ステアリン酸（C18：0）、アラキジン酸（C20：0）、ベヘン酸（C22：0）およびリグノセリン酸（C24：0）、不飽和脂肪酸のうち、⑥一価不飽和脂肪酸に分類されるミリストレイン酸（C14：1）、パルミトレイン酸（C16：1）、ヘプタデセン酸（C17：1）、オレイン酸（C18：1）cis-バクセン酸（C18：1）、trans-バクセン酸（C18：1）、イコセン酸（C20：1）、ドコセン酸（C22：1）ならびにテトラコセン酸（C24：1）、多価不飽和脂肪酸のうち⑦ ω （オメガ）6脂肪酸に分類されるリノール酸（C18：2（n-6））、 γ リノレン酸（C18：3（n-6））、イコサジエン酸（C20：2（n-6））、

イコサトリエン酸 (C20 : 3 (n-6))、アラキドン酸 (C20 : 4 (n-6)) およびドコサテトラエン酸 (C22 : 4 (n-6))、⑧ ω 3 脂肪酸に分類される α リノレン酸 (C18 : 3 (n-3))、イコサテトラエン酸 (C20 : 4 (n-3))、EPA (C20 : 5 (n-3))、ドコサペンタエン酸 (C22 : 5 (n-3)) ならびに DHA (C22 : 5 (n-3)) の割合を分析し、⑤から⑧それぞれの組成割合 (%) を分析した。また、⑨赤身中に占める総脂質量 (g/100g) を測定するとともに、脂溶性ビタミンの一種であり、抗酸化作用など機能性を有する⑩ α トコフェロール (ビタミン E) 含有量 (mg/100g) を調査した。

①～④、⑩の分析は高速液体クロマトグラフ法、⑤～⑨はガスクロマトグラフ法、により調査した。

○統計処理

統計処理は、統計処理用フリーソフト「Metabo Analyst」を用いて実施した。褐毛和種牛肉、黒毛和種牛肉を各処理区分とし、①～⑩の各調査項目を変数として、主成分分析 (以下、PCA 分析) を実施し、各牛肉における特徴を探索した。

なお、各調査項目 (変数) は量的データ、質的データが混在し単位系が異なっており、各数値が保持する意味が異なるため、オートスケーリング (同一変数内の各数値の合計を 0、分散を 1 に再計算する操作) を行い、データ全体の様子を容易に可視化できるようにした。

(2) 結果および考察

Metabo Analyst を用いて各調査項目で一斉に PCA 分析し、以下の結果を得た。まず、各主成分における寄与率および累積寄与率のスクリープロットを図 1 に示した。第 1 主成分の寄与率は 40.2%、第 2 主成分の寄与率は 24.4%となっていた。累積寄与率 (第 n 主成分までの寄与率の和) でみると、第 2 主成分までの累積寄与率は 64.6%となっており、第 1 主成分および第 2 主成分までのデータを用いることで、前述した調査項目に対する黒毛和種牛肉および褐毛和種牛肉の特徴を十分に説明可能であると判断した。

次に、各主成分における各調査項目の因子負荷量 (factor loading) を示す。第 1 主成分における各調査項目の因子負荷量を表 2、第 2 主成分における各調査項目の因子負荷量を表 3 に示した。

第 1 主成分では、一価不飽和脂肪酸および総脂質 (赤身) の因子負荷量が正方向に高く、甘み・微甘み呈味アミノ酸、飽和脂肪酸、特定機能性アミノ酸、 ω 6 脂肪酸ならびにうま味呈味アミノ酸の因子負荷量が負方向に高くなった。第 2 主成分では、 ω 3 脂肪酸および特定機能性アミノ酸の因子負荷量が正方向に高く、 α トコフェロールならびに風味・苦味呈味アミノ酸の因子負荷量が負方向に高くなっていた。

第 1 主成分および第 2 主成分の主成分得点と因子負荷量から描画した biplot 図^{*}を図 2 に示した。biplot 図は、PCA 分析結果のサンプルと各調査項目の関連性を図示する際によ

く用いられる描画手法である。

※biplot 図の見方

矢印の長さ：長いほどバラツキ（差）が大きいことを表す。

矢印の向き：向きが近いほど項目間の関連性が強いことを示す。

サンプル（点）のプロット位置：各調査項目（変数）から算出した主成分得点に基づきプロット位置が決定される。類似度の高いサンプルが近い位置にプロットされる。

図2の biplot 図では、黒毛和種牛肉は第1主成分軸（以下、PC1 軸）の正方向および第2主成分軸の負の方向にプロットされた。褐毛和種牛肉は、PC1 軸の負方向、PC2 軸の正負の方向にプロットされていた。矢印の向きおよび長さは表1、表2で示した因子負荷量から描画したものである。PC1 軸をみると正方向に総脂質（赤身中）があり、負方向にアミノ酸類が集中している。このことから、PC1 軸はアミノ酸類および脂質を量的に表現しているものと推察される。PC2 軸では、正方向に一価不飽和脂肪酸、 ω 3 脂肪酸、 ω 6 脂肪酸などの不飽和脂肪酸類、うま味呈味アミノ酸や特定機能性アミノ酸が集中しており、負方向には飽和脂肪酸、抗酸化作用を有する α -トコフェロール、甘み・微甘味呈味アミノ酸および風味・苦味呈味アミノ酸などがプロットされていた。アミノ酸類、脂肪酸類は人間が知覚する「味」を形成するとともに、併せて健康への影響など「機能性」への影響もあることから、PC2 軸は「味」、「機能性」を主に表現しているものと推察された。

これらのことを勘案して、図2の biplot 図を考察する。サンプルのプロット位置と因子負荷量から、今回調査に用いた褐毛和種牛肉にはうま味呈味アミノ酸、特定機能性アミノ酸、 ω 3 脂肪酸および ω 6 脂肪酸が比較的多く、黒毛和種牛肉では総脂質（赤身中）および一価不飽和脂肪酸ならびに風味・苦味呈味アミノ酸が比較的多いという傾向が biplot 図からは確認された。

これまでに得られた黒毛和種牛肉および褐毛和種牛肉の特徴なども考慮しながら

「Metabo analyst」で主成分スコアプロットを作成し、褐毛和種牛肉および黒毛和種牛肉をグルーピングしたところ、図3のような結果が得られた。図2の biplot 図において、褐毛和種牛肉、黒毛和種牛肉にそれぞれ特徴的な成分が存在する可能性を指摘していたが、それらを総合的に勘案して主成分スコアプロット図を作成すると、褐毛和種牛肉と黒毛和種牛肉のグルーピングは一部に重複がみられており、褐毛和種牛肉と黒毛和種牛肉の肉質に明瞭な差は確認できなかった。

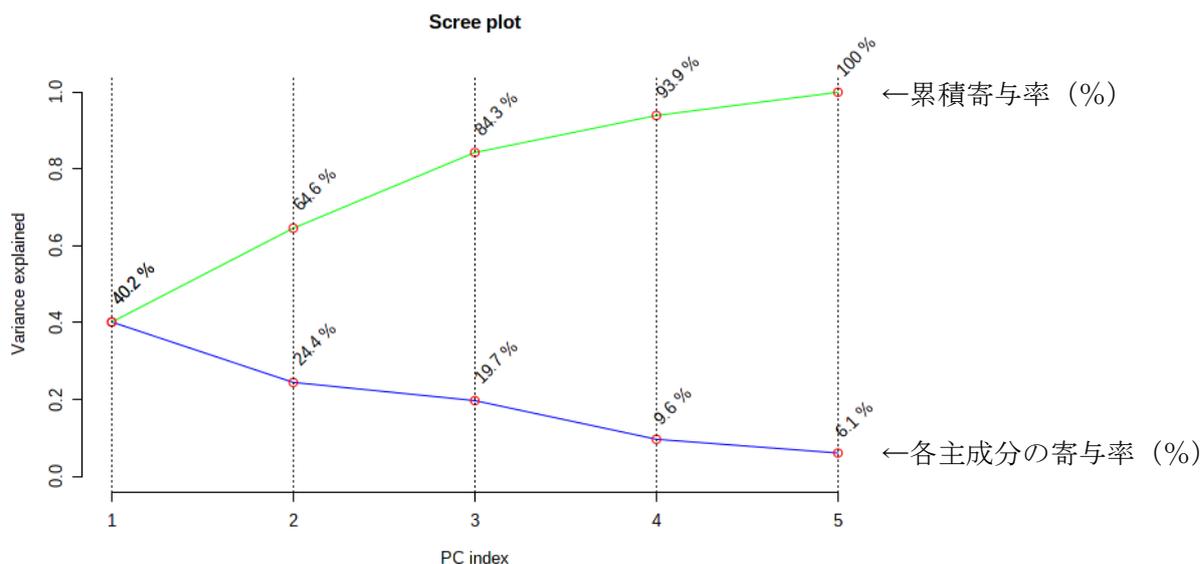


図1 各主成分の寄与率 (%) と各主成分までの累積寄与率 (%) の推移

表2 第1主成分における各調査項目の因子負荷量 (%)

調査項目	PC1
	因子負荷量 (%)
一価不飽和脂肪酸	36.1
総脂質(赤身中)	31.6
風味・苦味呈味アミノ酸	-5.0
ω3脂肪酸	-7.0
α-トコフェロール	-26.8
甘み・微甘み呈味アミノ酸	-32.1
飽和脂肪酸	-33.1
特定機能性アミノ酸	-37.9
ω6脂肪酸	-39.4
うま味呈味アミノ酸	-42.3

表3 第2主成分における各調査項目の因子負荷量 (%)

調査項目	PC2
	因子負荷量 (%)
ω3脂肪酸	47.3
特定機能性アミノ酸	32.0
ω6脂肪酸	28.5
うま味呈味アミノ酸	20.5
一価不飽和脂肪酸	17.3
総脂質(赤身中)	13.4
甘み・微甘み呈味アミノ酸	-16.0
飽和脂肪酸	-21.3
α-トコフェロール	-37.2
風味・苦味呈味アミノ酸	-54.2

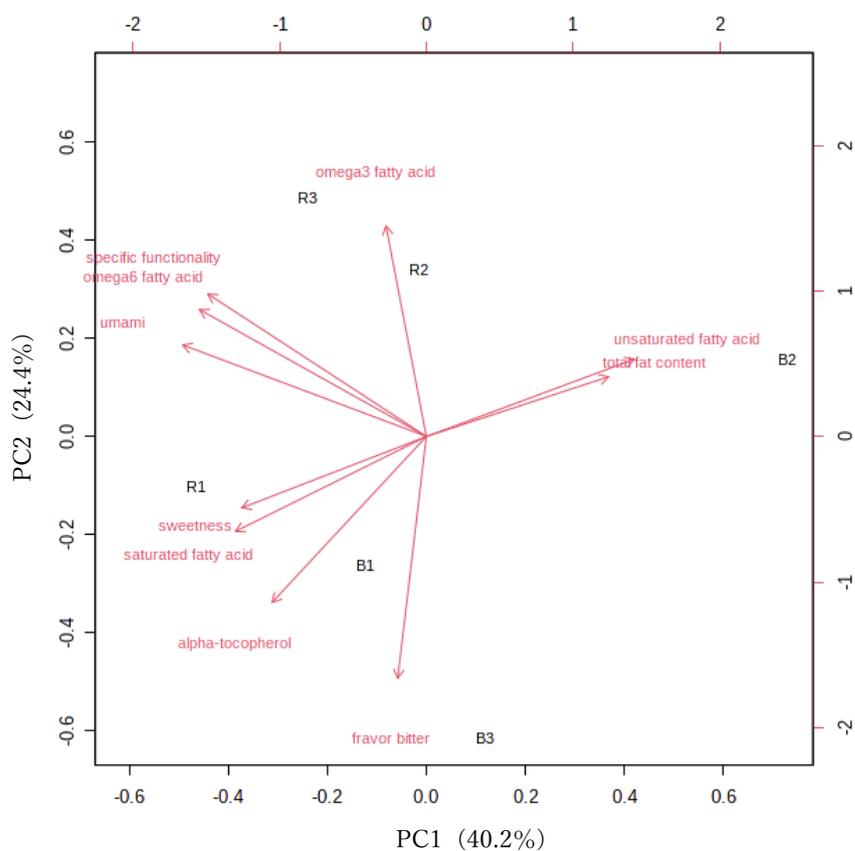


図2 第1主成分および第2主成分の主成分得点ならびに各代謝物の因子負荷量から作成された biplot 図

- ※umami：うま味呈味アミノ酸
- sweetness：甘み・微甘み呈味アミノ酸
- fravor bitter：風味・苦味呈味アミノ酸
- specific functionality：特定機能性アミノ酸
- saturated fatty acid：飽和脂肪酸
- unsaturated fatty acid：一価不飽和脂肪酸
- omega6 fatty acid： ω 6 脂肪酸
- omega3 fatty acid： ω 3 脂肪酸
- alpha-tocopherol： α -トコフェロール

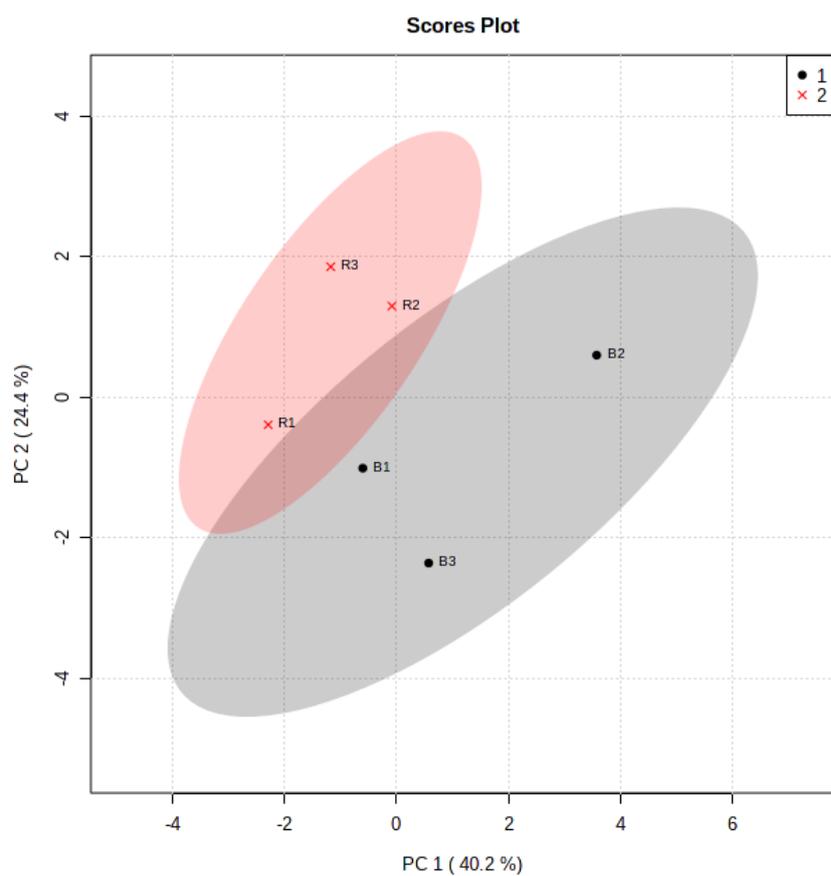


図3 第1主成分および第2主成分における主成分スコアプロット図
(1: 黒毛和種牛肉、2: 褐毛和種牛肉)

3 相対定量（メタボローム解析）を用いた枝肉の評価

（1）材料および方法

○供試牛

供試牛として、褐毛和種肥育牛（n=3）と黒毛和種肥育牛（n=4）を用いた。供試牛は熊本県農業研究センター畜産研究所で肥育し、肥育期間中、濃厚飼料は市販配合飼料、粗飼料は稲 WCS を給与した。褐毛和種は 23 ヶ月齢、黒毛和種は 26 ヶ月齢まで肥育し、その後と畜を実施した。供試したサンプルの概要（番号、枝肉格付時の BMS No.、枝肉総重量）は表 4 に示した。と畜後に胸最長筋（リブロース）サンプルを採取した。採取した胸最長筋サンプルは、 -30°C 以下のディープフリーザーに保管し、分析直前に冷凍庫から取り出しミンチ処理した。ミンチ後の牛肉サンプルは分析時まで再度ディープフリーザーにて保管した。

表 4 GC-MS による一斉定量試験に用いた牛肉サンプルの概要

種類	番号	反復数	枝肉総重量(kg)	BMS No.
褐毛和種	1-A,B,C	3	477.7	5
〃	2-A,B,C	3	489.7	3
〃	3-A,B,C	3	499.5	5
黒毛和種	6-A,B	2	488.8	12
〃	7-A,B	2	504.9	11
〃	8-A,B,C	3	502.9	12
〃	9-A,B,C	3	398.7	7

○メタボローム解析前処理

・除タンパクおよび濃縮乾固処理

GC-MS を用いてメタボローム解析する牛肉サンプルは、サンプリングサイトによる誤差を極力排除できるよう、各個体 2 反復または 3 反復で分析を実施することとした。

メタボローム解析実施のため、保存した胸最長筋サンプル（ミンチ処理）100mg に 99.8%メタノールおよび超純水を 1 : 1 で混合した溶液（内部標準物質として 2-イソプロピルマリン酸 $1\mu\text{g/mL}$ を $10\mu\text{L}$ 添加）を $1,000\mu\text{L}$ 添加して 4°C 条件下で 30min 攪拌し、除タンパクを実施した。その後、遠心分離（15,000rpm、 4°C 、10min）を行った後に上清を $500\mu\text{L}$ 回収し、一体型遠心濃縮システム（SPD1010、Thermo 社）を用いて、濃縮乾固処理を行った。

・誘導体化処理

標的代謝物の中には無処理では気化せず、ガスクロマトグラフで検出不可能な物質も存

在し、それらの物質は気化しやすくするため、誘導体化処理を行った。

メトキシアミン 20mg/mL ピリジン溶液 80 μ L を添加し、90min メトキシ化処理を行った。次に、これらのサンプルに N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MSTFA) を 40 μ L 添加し、37°C 30min 誘導体化処理を行った。これら誘導化サンプルを用い、熊本大学医学部総合研究施設にある GC-MS (TQ-8050、株式会社島津製作所、写真 1) を用いて代謝物の網羅的解析を実施した。

写真 1 代謝物の一斉定量に用いた GC-MS の外観



・ GC-MS による分析

装置への試料注入量は、1 μ L とした。分析条件は、GC 部はカラム DB-5 (30m 0.250mm 1.00 μ m, Agilent 社、写真 1) を用い、ヘリウムをキャリアガスとして流速 1.1mL/分、注入口温度は 280°C、オープン昇温プログラムは 100°C で 4min 保持後、毎分 4°C で 320°C まで昇温し、8min 保持とした。質量分析部はイオン源温度 200°C、イオン化法は EI、計測質量範囲を $m/z=45-600$ で実施した。時間補正には C7-C33 アルカン混合標準試料を分析し、各代謝物ピークの検出時間から保持指標を算出し、補正を適用した。データ解析では、GC-MS 用データベースソフトウェア Smart Metabolites Database (検出可能化合物数：467 成分) を用いて化合物推定を行った。

なお、用いた Smart Metabolites Database では、解糖系/糖新生に関与する代謝物、TCA サイクルに関与する代謝物、ペントースリン酸経路に関与する代謝物、アミノ酸、アミノ酸関連代謝物、アミン類、ジペプチド、脂肪酸、有機酸関連代謝物、糖類関連代謝物、糖リン酸関連代謝物、核酸代謝物、その他の代謝物および安定同位体などデータベースに幅広い代謝物が登録されており、食品分野における呈味性ならびに機能性の評価基準に用いられる代謝物も多く登録されていることから、本データベースを採用した。

・ データ解析

データ解析は、質量分析データ解析ソフトウェア TraverseMS (ライフイクス株式会社) を用いてデータ解析した。各サンプルにおいて、GC-MS 分析によって得られた波形

を解析し、Smart Metabolites Database の各代謝物の保持時間を参考に、代謝物を同定し各代謝物の波形から面積（強度値）を算出し代謝物を同定した。

各代謝物の波形から算出した強度値は、内部標準物質の強度値に従って各サンプルの各代謝物の強度値を平準化した後に、統計解析に供試した。

なお、供試した 7 個体（述べ 18 検体）の GC-MS 分析において、全ての検体で未検出であった代謝物、多くの検体でサチュレーション（検出上限以上）がみられた代謝物および代謝物の安定同位体については、強度値の算出が困難であるため、データを除外することとした。

また、同一代謝物であっても、官能基がトリメチルシリル基（TMS 基）に変換された数の違いにより異なる代謝物（例：Lysine-3TMS と Lysine-4TMS）として検出される場合もあるため、その場合は波形が明瞭な方の代謝物のみを選択し、統計解析に用いた。

統計処理は、統計処理用フリーソフト「Metabo Analyst」を用いて実施した。褐毛和種牛肉、黒毛和種牛肉を各処理区分とし、牛肉サンプルから得られた代謝物の強度値を変数として、主成分分析（以下、PCA 分析）を実施し、各牛肉における特徴を探索した。

なお、得られた代謝物強度値は、オートスケールリング（同一変数内の各数値の合計を 0、分散を 1 に再計算する操作）を行った。

（2）結果および考察

褐毛和種牛肉および黒毛和種牛肉の GC-MS 解析を行った結果、様々な 171 の代謝産物が検出された。得られた代謝物は、①解糖系/糖新生に関与する代謝物、②TCA サイクルに関与する代謝物、③ペントースリン酸経路に関与する代謝物、④アミノ酸、⑤アミノ酸関連代謝物、⑥アミン類、⑦脂肪酸、⑧有機酸関連代謝物、⑨糖類関連代謝物、⑩糖リン酸関連代謝物、⑪核酸代謝物および⑫その他の代謝物に大別された。

得られたこれらの各代謝物を Metabo analyst を用いて一斉に PCA 分析を行ったところ、以下のような結果が得られた。まず、各主成分における寄与率および累積寄与率のスクリープロットを図 4 に示した。第 1 主成分の寄与率は 34.2%、第 2 主成分の寄与率は 21.0%となっていた。累積寄与率では、第 2 主成分までの累積寄与率は 55.2%となっており、第 1 主成分および第 2 主成分までのデータを用いることで、得られた 171 の代謝物に対する褐毛和種牛肉および黒毛和種牛肉の特徴を縮約出来ているものと判断した。

次に、各主成分における各代謝物の因子負荷量（factor loading）を示す。ただし、今回は得られた 171 の代謝物のうち、第 1 主成分および第 2 主成分において因子負荷量が正負の方向に高い（影響度の高い）代謝物をそれぞれ上位ならびに下位 30 物質ずつ順番に抽出して示すこととした。第 1 主成分における代謝物の因子負荷量上位 30 成分を表 5、下位 30 成分を表 6、第 2 主成分における代謝物の因子負荷量上位 30 成分を表 7、下位 30 成分を表 8 に示した。

第 1 主成分の正方向における因子負荷量上位 30 物質には、アミノ酸（12 種）、アミノ酸

関連代謝物（3種）、アミン類代謝物（3種）の順に多く位置づけされた。第1主成分の負方向における因子負荷量下位30物質には、糖類（9種）、アミノ酸関連代謝物（5種）、有機酸関連代謝物（4種）、脂肪酸（4種）の順に多く位置づけされた。第2主成分の正方向における因子負荷量上位30物質には、糖類（14種）、糖リン酸（3種）、有機酸関連代謝物（3種）の順に多く位置づけされた。第2主成分における因子負荷量下位30物質には、有機酸関連代謝物（7種）、糖類（6種）、脂肪酸（5種）の順に多く位置づけされた。

主成分得点と各代謝物の関連性を検証するため、第1主成分および第2主成分の主成分得点と因子負荷量から描画した biplot 図を図5に示した。biplot 図には171の代謝物群すべてが描画されており、それらの代謝物群は全方向に位置していた。第1主成分における因子負荷量で上位に位置する代謝物、下位に位置する代謝物の分類はやや異なっているものの、biplot 図で PC1 軸では同一品種の主成分得点が広く分布していることから、PC1 軸は同一品種内における代謝物の差異を示しているものと推察された。また、アミノ酸類、糖類、有機酸類、脂肪酸類に関連する代謝物は個体間での差が大きいことも示唆された。第2主成分における因子負荷量で上位に位置する代謝物、下位に位置する代謝物には特に糖類が多く、その他にも脂肪酸やアミノ酸が多く含まれていた。また、biplot 図では PC2 軸では品種差がみられる結果となった。このことから、PC2 軸は褐毛和種、黒毛和種の品種間差を示しているものと推察された。また、それらの代謝物は「甘み」、「風味」、「酸味」、「うま味」など、呈味性を示す代謝物である可能性が推察された。

次に、第1主成分および第2主成分から各サンプルの主成分得点を算出し、平面図にプロットしたスコアプロット図を図6に示した。供試した牛肉サンプルは、PC1 軸では褐毛和種牛肉、黒毛和種牛肉いずれも正負の方向に広く分布していた。PC2 軸では、褐毛和種牛肉が正方向に分布し、黒毛和種牛肉は負方向に分布していた。また、PC1 軸においては黒毛和種の方がバラツキは大きく、PC2 軸においては褐毛和種の方が大きなバラツキが生じることが推察された。このことから、牛肉中の代謝物の観点からは、差の大きさなど言及は難しいものの、同一品種内における代謝物の個体間のバラツキは褐毛和種よりも黒毛和種の方が大きい可能性が推察された。

以上の結果から、ガスクロマトグラフを用いた牛肉中代謝物の一斉定量では、褐毛和種と黒毛和種に差異がみられる可能性が推察された。

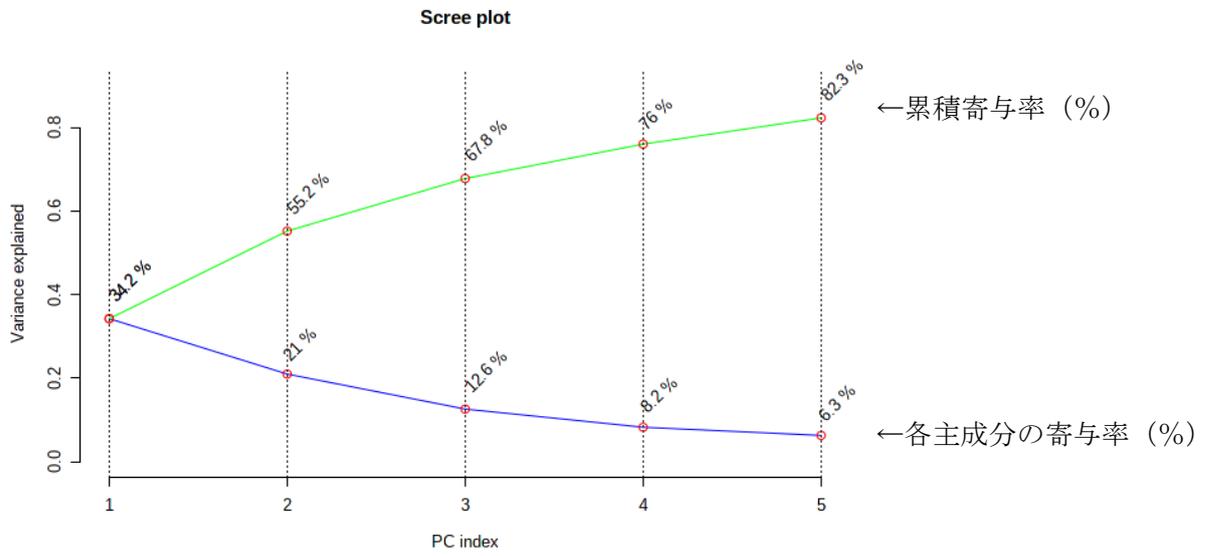


図4 各主成分の寄与率 (%) と各主成分までの累積寄与率の推移

表 5 第 1 主成分における各代謝物の因子負荷量上位 30 物質

化合物No.	順位	化合物名	分類	PC1
				因子負荷量(%)
113	1	Methionine-2TMS	④アミノ酸	12.4
95	2	Isoleucine-2TMS	④アミノ酸	12.2
159	3	Threonine-3TMS	④アミノ酸	12.1
93	4	Isobutyrylglycine-TMS	⑤アミノ酸関連	11.9
134	5	Phenylalanine-2TMS	④アミノ酸	11.8
43	6	Aspartic acid-3TMS	④アミノ酸	11.6
15	7	2-Phosphoglyceric acid-4TMS	①解糖系/糖新生	11.4
126	8	Octopamine-4TMS	⑥アミン類	11.2
101	9	Leucine-2TMS	④アミノ酸	11.2
82	10	Glycine-3TMS	④アミノ酸	11.2
168	11	Valine-2TMS	④アミノ酸	11.0
14	12	2-Keto-isovaleric acid-meto-TMS	⑧有機酸関連	10.9
70	13	Glucaric acid-6TMS	⑨糖類	10.8
88	14	Hypotaurine-3TMS	⑤アミノ酸関連	10.8
151	15	Serine-3TMS	④アミノ酸	10.7
5	16	2-Aminoethanol-2TMS	⑥アミン類	10.6
40	17	Arginine-3TMS	④アミノ酸	10.5
125	18	Norvaline-TMS	⑤アミノ酸関連	10.5
60	19	Dopamine-3TMS	⑥アミン類	10.3
149	20	Sarcosine-2TMS	⑤アミノ酸関連	10.2
42	21	Asparagine-3TMS	④アミノ酸	10.2
128	22	O-Phosphoethanolamine-4TMS	⑫その他代謝物	10.0
35	23	Aconitic acid-3TMS	②TCAサイクル	9.9
26	24	3-Phosphoglyceric acid-4TMS	①解糖系/糖新生	9.9
129	25	Ornithine-3TMS	⑤アミノ酸関連	9.8
135	26	Proline-2TMS	④アミノ酸	9.8
85	27	Homocysteine-3TMS	⑤アミノ酸関連	9.6
33	28	Acetoacetic acid-2TMS	⑧有機酸関連	9.5
28	29	4-Hydroxyproline-3TMS	⑤アミノ酸関連	9.3
145	30	Ribose 5-phosphate-meto-5TMS	③ペントースリン酸経路	9.2

表 6 第 1 主成分における各代謝物の因子負荷量下位 30 物質

化合物No.	順位	化合物名	分類	PC1
				因子負荷量(%)
118	171	N-Acetylglutamine-2TMS	⑤アミノ酸関連	-11.8
73	170	Glucosamine-5TMS	⑨糖類	-11.7
19	169	3-Hydroxybutyric acid-2TMS	⑧有機酸関連	-11.5
6	168	2-Aminooctanoic acid-2TMS	⑤アミノ酸関連	-11.5
116	167	N6-Acetyllysine-2TMS	⑤アミノ酸関連	-11.4
160	166	Thymidine-2TMS	⑪核酸	-11.3
167	165	Uridine-3TMS	⑪核酸	-11.3
114	164	Monostearin-2TMS	⑦脂肪酸	-11.2
72	163	Glucono-1,5-lactone-4TMS	⑨糖類	-11.1
109	162	Mannitol-6TMS	⑨糖類	-11.0
18	161	3-Hydroxy-3-methylglutaric acid-3TMS	⑧有機酸関連	-10.9
90	160	Indol-3-acetic acid-TMS	⑤アミノ酸関連	-10.8
152	159	Sorbitol-6TMS	⑨糖類	-10.8
55	158	Decanoic acid-TMS	⑦脂肪酸	-10.7
47	157	Caproic acid-TMS	⑦脂肪酸	-10.6
58	156	Dimethylglycine-TMS	⑤アミノ酸関連	-10.5
138	155	Pyridoxine-3TMS	⑫その他代謝物	-10.3
67	154	Fumaric acid-2TMS	②TCAサイクル	-10.2
91	153	Inosine monophosphate-5TMS	⑪核酸	-10.2
68	152	Galactitol-6TMS	⑨糖類	-10.0
32	151	6-Phosphogluconic acid-7TMS	③ペントースリン酸経路	-9.8
25	150	3-Phenyllactic acid-2TMS	⑧有機酸関連	-9.4
65	149	Fructose-meto-5TMS	⑨糖類	-9.4
124	148	Nonanoic acid-TMS	⑦脂肪酸	-9.3
77	147	Glutamine-4TMS	④アミノ酸	-9.2
83	146	Glycolic acid-2TMS	⑧有機酸関連	-9.1
146	145	Ribose-meto-4TMS	⑨糖類	-9.0
144	144	Ribonolactone-3TMS	⑨糖類	-8.8
140	143	Pyruvic acid-meto-TMS	①解糖系/糖新生	-8.8
142	142	Ribitol-5TMS	⑨糖類	-8.2

表7 第2主成分における各代謝物の因子負荷量上位30物質

化合物No.	順位	分類	PC2
			因子負荷量(%)
80	1	Glycerol 2-phosphate-4TMS	⑩糖リン酸 15.9
56	2	Dihydroxyacetone phosphate-meto-3TMS	①解糖系/糖新生 14.7
71	3	Gluconic acid-6TMS	⑨糖類 14.7
81	4	Glycerol 3-phosphate-4TMS	⑩糖リン酸 14.7
24	5	3-Methoxy-4-hydroxybenzoic acid-2TMS	⑧有機酸関連 14.7
12	6	2-Ketoadipic acid-meto-2TMS	⑧有機酸関連 14.5
123	7	Nicotinic acid-TMS	⑫その他代謝物 14.2
38	8	Arabinose-meto-4TMS	⑨糖類 14.1
170	9	Xylose-meto-4TMS	⑨糖類 14.1
104	10	Lyxose-meto-4TMS	⑨糖類 14.0
41	11	Ascorbic acid-4TMS	⑫その他代謝物 13.6
22	12	3-Hydroxypropionic acid-2TMS	⑧有機酸関連 13.6
143	13	Ribonic acid-5TMS	⑨糖類 13.4
163	14	Tryptamine-2TMS	⑥アミン類 13.4
112	15	meso-Erythritol-4TMS	⑨糖類 13.2
110	16	Mannose 6-phosphate-meto-6TMS	⑩糖リン酸 13.1
102	17	Linoleic acid-TMS	⑦脂肪酸 13.1
156	18	Tagatose-meto-5TMS	⑨糖類 13.1
75	19	Glucuronic acid-meto-5TMS	⑨糖類 12.7
69	20	Galacturonic acid-meto-5TMS	⑨糖類 12.4
169	21	Xylitol-5TMS	⑨糖類 12.0
122	22	Niacinamide-TMS	⑫その他代謝物 11.8
94	23	Isocitric acid-4TMS	②TCAサイクル 11.6
2	24	1,6-Anhydroglucose-3TMS	⑨糖類 11.5
157	25	Threitol-4TMS	⑨糖類 11.2
86	26	Hydroquinone-2TMS	⑫その他代謝物 11.1
107	27	Maltitol-9TMS	⑨糖類 10.9
141	28	Rhamnose-meto-4TMS	⑨糖類 10.7
13	29	2-Ketoglutaric acid-meto-2TMS	②TCAサイクル 10.7
120	30	N-Acetyl-Ornithine-4TMS	⑤アミノ酸関連 10.6

表 8 第 2 主成分における各代謝物の因子負荷量下位 30 物質

化合物No.	順位	化合物名	分類	PC2
				因子負荷量(%)
42	171	Glutaric acid-2TMS	⑧有機酸関連	-14.2
16	170	Succinic acid-2TMS	②TCAサイクル	-13.8
55	169	2-Hydroxybutyric acid-2TMS	⑫その他代謝物	-13.0
49	168	Oxalic acid-2TMS	⑧有機酸関連	-12.0
103	167	2-Hydroxyisovaleric acid-2TMS	⑧有機酸関連	-10.1
101	166	Psicose-meto-5TMS	⑨糖類	-8.9
153	165	2-Hydroxyglutaric acid-3TMS	⑧有機酸関連	-8.6
137	164	Fructose-meto-5TMS	⑨糖類	-7.9
164	163	Ribulose-meto-4TMS	⑨糖類	-7.6
67	162	3-Hydroxyglutaric acid-3TMS	⑧有機酸関連	-7.6
146	161	2-Amino adipic acid-3TMS	⑤アミノ酸関連	-7.5
144	160	1-Hexadecanol-TMS	⑫その他代謝物	-7.4
132	159	Oleic acid-TMS	⑦脂肪酸	-7.0
48	158	Elaidic acid-TMS	⑦脂肪酸	-6.8
25	157	Xylulose-meto-4TMS	⑨糖類	-6.8
171	156	3-Phenyllactic acid-2TMS	⑧有機酸関連	-6.8
62	155	Cholesterol-TMS	⑫その他代謝物	-6.7
127	154	Palmitoleic acid-TMS	⑦脂肪酸	-6.7
3	153	Ribonolactone-3TMS	⑨糖類	-6.6
4	152	Ribose-meto-4TMS	⑨糖類	-6.4
20	151	Fumaric acid-2TMS	②TCAサイクル	-6.3
148	150	Tyramine-3TMS	⑥アミン類	-5.2
65	149	Putrescine-4TMS	⑥アミン類	-4.9
9	148	Stearic acid-TMS	⑦脂肪酸	-4.7
136	147	Leucine-2TMS	④アミノ酸	-4.6
11	146	Lysine-4TMS	④アミノ酸	-4.5
130	145	Citramalic acid-3TMS	⑧有機酸関連	-4.4
8	144	Decanoic acid-TMS	⑦脂肪酸	-4.4
154	143	3-Aminoglutaric acid-3TMS	⑤アミノ酸関連	-4.2
78	142	Asparagine-3TMS	④アミノ酸	-4.0

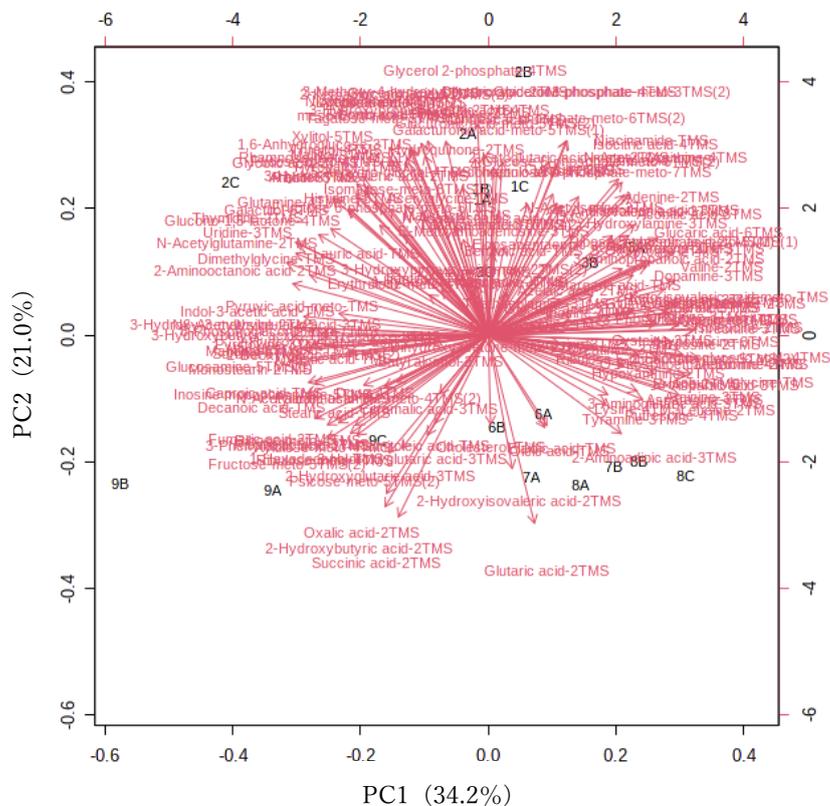


図5 第1主成分および第2主成分の主成分得点ならびに各代謝物の因子負荷量から作成された biplot 図

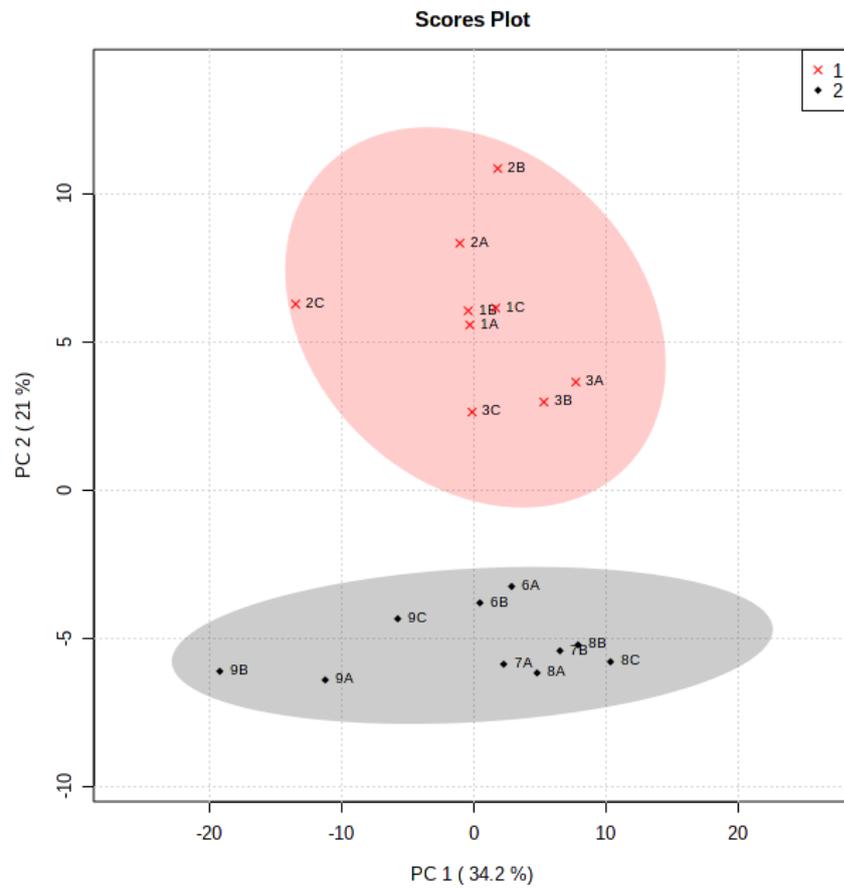


図6 第1主成分および第2主成分の主成分得点から描画したスコアプロット図

4 総合考察

今回、褐毛和種と黒毛和種の牛肉（リブローズ）に代謝物の観点から特徴的な差異が確認されるか、以下の2つの試験を通して検証した。

試験Ⅰ：アミノ酸（呈味性で分類）、脂肪酸（構造で分類）、ビタミン（ α -トコフェロール）、脂肪量（赤身中）を分析項目として主成分分析により比較検討したところ、褐毛和種で「うま味」、「特定機能」を有するアミノ酸、「必須脂肪酸」が多い可能性があり、黒毛和種で「風味・苦味」を有するアミノ酸、「一価不飽和脂肪酸」が多い可能性が推察されたが、結果的にそれらが品種間差を決定づける要因と断定することは困難であった。

試験Ⅱ：牛肉中の代謝物をGC-MSを用いて一斉定量したところ、171の代謝物が定量可能であった。各代謝物から得られ強度値をもとに主成分分析により代謝物を比較検討したところ、糖類、有機酸関連代謝物、脂肪酸に分類される数種類の代謝物によって、褐毛和種と黒毛和種の差異を特徴づけている可能性が示唆された。

以上の結果から、褐毛和種と黒毛和種を代謝物という観点から比較すると、いくらかの差がみられたものの品種間差を決定づけるような代謝物ならびに代謝物群を同定することは今回の試験からは困難であった。

しかしながら、褐毛和種と黒毛和種にいくつかの代謝物で差異がある可能性が推察された。また、試験Ⅱからは同一品種内における代謝物の差は、褐毛和種よりも黒毛和種で大きい可能性が推察された。また、褐毛和種には「うま味」、「特定機能性」に関する代謝物が多く含まれている可能性があること、黒毛和種においては「風味」、また近年注目されるオレイン酸などが含まれる「一価不飽和脂肪酸」が多く含まれる可能性があること、また褐毛和種および黒毛和種いずれも、「甘み」に係る糖類が多く含まれる可能性があることを今回の試験で明らかにした。

今回の試験からは、同一の飼養条件であれば、牛肉中の代謝物は個体差がみられることから遺伝的な要因に左右される可能性が高いことが推察された。また、黒毛和種で代謝物のバラツキが褐毛和種よりも大きい傾向がみられたことは、黒毛和種は全国各地で肉量・肉質を向上させるため、また他地域との肉質の差別化を図るための遺伝的改良や選抜が行われており、対して褐毛和種は飼養される地域が限られており、遺伝的改良、選抜の規模が小さいためにこのような結果になったと推測した。しかし、褐毛和種、黒毛和種が持つ特徴を全体的に捉えることができ、それらに着目した牛肉生産、販売を図れる可能性が推察された。

以上の結果から、質量分析機器を用いて牛肉中の代謝物を一斉解析（メタボローム解析）し、それらを多変量解析することで、肉質をこれまでより幅広い側面から比較検討することが可能であった。

最後に、今回の試験についてもサンプルの供試数を増やしさらに検証を進めていくとともに、今後はメタボローム解析を用いて飼養管理的側面からの肉質の検討、遺伝的側面からの肉質の検討、消費者が実際に口にするような加熱調理後の肉質の検討など、様々な観

点から代謝物というファクターに焦点をあてて調査を進めていく必要がある。