



# メタボローム解析による「あか牛」 牛肉特性の解明

熊本県農業研究センター 畜産研究所 飼料研究室長 中山 統雄  
 研究員 林田 雄大  
 研究参事 北浦日出世  
 大家畜研究室長 鶴田 勉  
 研究参事 守田 智  
 研究員 原 公庸  
 草地畜産研究所 研究参事 古田 雅子  
 研究員 行部 浩  
 熊本大学大学院 生命科学部 教授 富澤 一仁

## 【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」）牛肉の特性を解明することを目的として、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付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付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（以下「あか牛」という）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成育特性があり、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。平成30年9月には、赤身の特徴的な味わい、ヘルシーさを兼ね備え、牛肉

らしいうま味や香りに富むといった特性を有すると認められ、ブランド「くまもとあか牛」が地理的表示（GI）保護制度に登録されたところである。

しかしながら、脂肪交雑が黒毛和種に比べ総じて低い「あか牛」は、販売価格面で大変厳しい状況にあり、子牛価格や枝肉価格差に

より、飼養頭数は大幅に減少し、飼養農家の高齢化も相まって「あか牛」の存続が危ぶまれている状況にある。肉質の新たな評価としては、口溶けのよいオレイン酸などの不飽和脂肪酸含量が重視されているが、赤身の味わいが特徴の「あか牛」にとって追い風とはなっていない。

全肉専用種におけるA-5評価比率は、7年の6.2%から23年の7.7%までほぼ横ばいであったが、近年、育種改良の進展を背景に急激に上昇し、令和元年は19.5%となっている<sup>1)</sup>。

一方で、東京市場においてA-5枝肉の価格は28年をピークに下落しており<sup>2)</sup>、消費者ニーズの変容も感じられる。健康志向の高まりや味・食感の良さなどを理由に、一部の消費者は適度な脂肪交雑の牛肉を求める傾向にあるとも考えられる。脂肪交雑とは違った視点で、「あか牛」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、「あか牛」の需要拡大に資することができると思われる。

人が肉の味わいを評価する場合、口腔内で

の食感、味覚、香りなどの複雑な組み合わせを総合的に瞬時に判別し、脳内のこれまでの情報とリンクさせて評価している。食感、味覚、香りなどを決定付けている物質の解明は、肉の味わいを客観的に評価するためには極めて重要であるが、それぞれが多数の物質によって複雑な構成の上組み合わさっていることから、一つのマーカー物質の解析では、肉の味わいについて表現、評価することは困難である。

近年、食肉をはじめとした食品の総合的な解析方法として、定性、定量解析機器を用いたメタボローム解析が注目されている。詳細は後述するが、メタボローム解析は、対象物質に含まれる代謝物質について、一斉に定性、定量する解析方法であり、肉の味わいを数値化して評価する解析方法として優れた解析手法であると考えられる。

そこで、本調査研究では、「あか牛」牛肉の特色を明確にする一助とするため、メタボローム解析を用いた「あか牛」牛肉の解析を試みたので報告する。

## 2 メタボローム解析について

メタボローム解析 (Metabolomic analysis) は、生物の代謝物質 (メタボライト) の総体を対象とした解析法である。遺伝子を対象としたゲノム解析、mRNAを対象としたトランスクリプトーム解析、タンパク質を対象としたプロテオーム解析などと同じ、生物中にある分子全体の変動を探索し、生命現象を網羅的に解析するオミクス解析の一つである。

代謝物は、糖、アミノ酸、脂肪酸や有機酸などの分子量1000以下の低分子化合物で、約3000種ほどと言われており、その解析は、

生体内の活動や表原型を把握する解析として、以下のような長所が挙げられている。

- (1) 遺伝子 (約2万種)、タンパク質 (約3万種) に比べ種類が少なく、網羅的に解析しやすいこと。
- (2) 分子量が少なく検出方法が確立しており、タンパク質より測定しやすいこと。
- (3) 代謝物は、ヒトから微生物までの生物が含有し、その働きもある程度共通しているため、技術の汎用性が高いこと。
- (4) 代謝物はタンパク質 (酵素) により産

生されるため、タンパク質の活性を観察できること。

代謝物の物理化学的特性は、特定溶媒への溶解性（極性）、イオンの電荷（電離度）、揮発性（沸点）および分子量などの多様な要素を持つ。メタボローム解析に用いる分離検出・定量機器は、GC(ガスクロマトグラフ)、LC(液体クロマトグラフ)、CE(キャピラリー電気泳動)などの分離検出部と、MS(質量分析器)の定量部で構成されているが、これらの分離検出方法は代謝物の特性に対してそれぞれ適性があるため、実際の解析においては、目標代謝物の性質に応じて分析方法を使い分ける必要がある。

これまでの代謝物質に関する研究の多くはすでにデータベース化されており、代謝物質の同定に関するデータベースやその特性を明らかにしたプロファイルデータベース、生体内の代謝回路の中での遺伝子や酵素と代謝物との反応を整理したパスウェイデータベースなどが構築され、さまざまな研究に利用が可能である。

メタボローム解析では、1サンプルから100を超える代謝物のデータを得ることが可能である。このため、特定代謝回路上の関連代謝物の変動を解析するなど、はじめから特定の代謝物に焦点を当てた解析にも活用されているが、得られた代謝物データ全てを使用し多変量解析することにより、全体の傾向

を視覚的に表し、サンプル特性を明確にする解析にも活用されている。

多変量解析で一般的に採用される主成分分析は、多次元データの持つ情報をできるだけ損わずに低次元空間に情報を縮約する分析方法である。メタボローム解析における主成分分析では、各サンプルにおける測定値データを基に、各サンプルのデータセットの分布を最もよく説明する合成変数(=主成分)を計算によって導き出し、主成分と各サンプルおよび各代謝物との関係について計算し作成した二つのグラフ(スコアプロットとパイロット)を読み解くことで解析を行う。

メタボローム解析は、主に医学を中心に発展してきたが、近年では食品、農業の分野の研究にも応用が進んでいる<sup>3)</sup>。食品分野では公益財団法人かずさDNA研究所を中心にデータベース「食品メタボロームレポジトリ」が構築されている<sup>4)</sup>。また、畜産分野においては、黒毛和種牛肉のおいしさに関わる指標の探求<sup>5)</sup>や黒毛和種牛肉とホルスタイン種牛肉の比較研究<sup>6)</sup>などに活用した事例がある。

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、脂肪酸など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「あか牛」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。

### 3 試験1：絶対定量法（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

試験1では褐毛和種牛肉(n=3)および黒毛和種牛肉(n=3)を用い、概要を表1に示した。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、いずれもリブロースを供試することとした。

表 1 試験 1 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

資料：熊本県農業研究センター作成

分析項目は、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、脂肪酸類などとし、概要を表 2 に示した。

アミノ酸類分析では、高速液体クロマトグラフ法により分析して得られた各成分の定量結果から、(1)うま味および酸味、(2)甘み・微甘み、(3)風味・苦味および、(4)特定機能性物質の各総量 (mg/100g) を算出した。

脂肪酸類分析では、ガスクロマトグラフ法により分析して得られた各成分の割合から、(5)飽和脂肪酸、(6)一価不飽和脂肪酸、(7)オメガ 6 脂肪酸、(8)オメガ 3 脂肪酸のそれぞれの組成割合 (%) を算出した。また、(9)赤身中に占める総脂質量 (g/100g) を併せて測定した。

また、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) を高速液体クロマトグラフ法により定量した。

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、(1)～(10)の各調査項目を変数として、主成分分析 (以下「PCA 分析」という) 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、オートスケール (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。

表 2 試験 1 の分析項目

アミノ酸	①うま味・酸味 (mg/100g)	アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン	
	②甘み・微甘み (mg/100g)	グリシン、アラニン、トレオニン、セリン、プロリン	
	③風味・苦味 (mg/100g)	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、システイン	
	④特定機能性アミノ酸 (mg/100g)	タウリン、オルニチン、GABA (γ-アミノ酪酸)	
脂肪酸	⑤飽和脂肪酸 (%)	酪酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、ヘプタデカン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸	
	不飽和脂肪酸	⑥一価不飽和脂肪酸 (%)	ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、ヘプタデセン酸、オレイン酸、cis-バクセン酸、trans-バクセン酸、イコセン酸、ドコセン酸、テトラコセン酸
		⑦オメガ 6 脂肪酸 (%)	リノール酸、γリノレン酸、イコサジエン酸、イコサトリエン酸、アラキドン酸、トコサテトラエン酸
		⑧オメガ 3 脂肪酸 (%)	αリノレン酸、イコサテトラエン酸、EPA、ドコサペンタエン酸、DHA
総脂質 (g/100g)			
ビタミン類 (mg/100g)		α-トコフェロール	

資料：熊本県農業研究センター作成

## (2) 結果および考察

PCA分析の結果、得られた第1主成分における各調査項目の因子負荷量を表3、第2主成分における各調査項目の因子負荷量を表4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、オメガ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、オメガ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、 $\alpha$ -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。

表3 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
オメガ3脂肪酸	-7.0
$\alpha$ -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
オメガ6脂肪酸	-39.4
うま味呈味アミノ酸	-42.3

資料：熊本県農業研究センター作成

表4 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 (%)
オメガ3脂肪酸	47.3
特定機能性アミノ酸	32.0
オメガ6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
$\alpha$ -トコフェロール	-37.2
風味・苦味呈味アミノ酸	-54.2

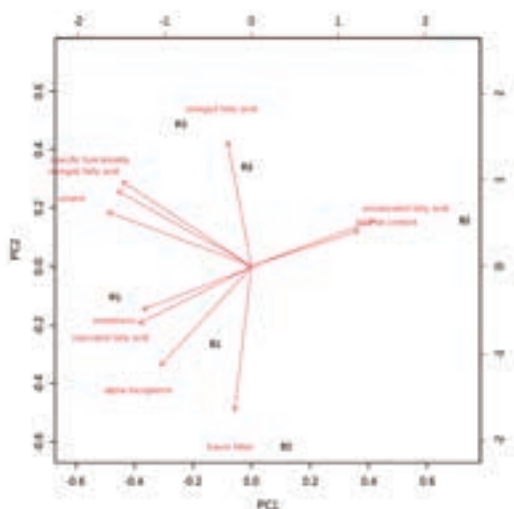
資料：熊本県農業研究センター作成

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バイプロット図を図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。累積寄与率で見ると、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。

バイプロット図では黒毛和種牛肉は第1主成分軸（以下「PC1軸」という）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。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た。PC2軸では、正方向に一価不飽和脂肪酸、オメガ3脂肪酸、オメガ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、 $\alpha$ -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、オメガ3脂肪酸およびオメガ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認められた。

図1 試験1の主成分得点ならびに因子負荷量から作成されたバイプロット図

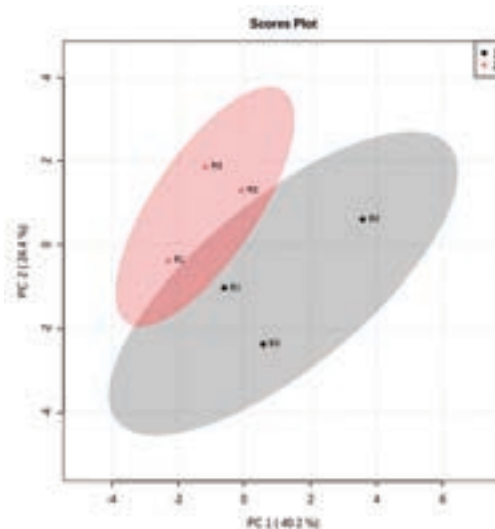


※umami：うま味呈味アミノ酸  
 sweetness：甘み・微甘み呈味アミノ酸  
 fravor bitter：風味・苦味呈味アミノ酸  
 specific functionally：特定機能性アミノ酸  
 saturated fatty acid：飽和脂肪酸  
 unsaturated fatty acid：一価不飽和脂肪酸  
 omega 6 fatty acid： $\omega$ 6脂肪酸  
 omega 3 fatty acid： $\omega$ 3脂肪酸  
 alpha-tocopherol： $\alpha$ -トコフェロール

資料：熊本県農業研究センター作成

次に、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2のような結果が得られた。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見られており、褐毛和種牛肉と黒毛和種牛肉の肉質に明らかな差は確認できなかった。

図2 試験1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)



資料：熊本県農業研究センター作成

## 4 試験2：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

#### ア 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カ月齢、黒毛和種は26カ月齢まで肥育し、と畜を実施した。供試したサンプルの概要を表5に示した。

表5 試験2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

資料：熊本県農業研究センター作成

## イ メタボローム解析前処理

本研究でのメタボローム解析については、代謝物の網羅的な解析を目的としていることから、代謝物を幅広く解析できるGC-MSを用いた解析法を採用した。

### ・除タンパクおよび濃縮乾固処理

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 µg/mLを10 µL添加）を1000 µL添加して4度条件下で30分間攪拌し、除タンパクを実施した。その後、遠心分離（15000rpm、4度、10分間）を行った後に上清を500 µL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

次に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 µLを添加し、90分間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（MST-FA）を40 µL添加し、37度30分間誘導体化処理を行った。

## ウ GC-MSによる分析

GC-MSによる分析はGC-MS(TQ-8050、株式会社島津製作所、写真)を用いて代謝物の網羅的な解析を実施した

装置への試料注入量は、1 µLとした。分析条件は、GC部はカラムDB-5（30m 0.250mm 1.00µm、Agilent社）を用い、ヘリウムをキャリアガスとして流速1.1mL/

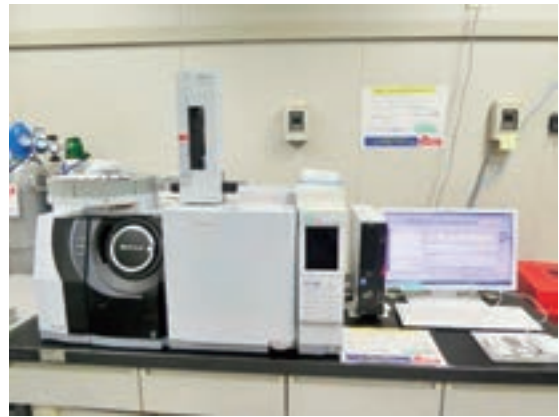


写真 代謝物の一斉定量に用いたGC-MSの外観

分、注入口温度は280度、オーブン昇温プログラムは100度で4分間保持後、毎分4度で320度まで昇温し、8min保持とした。質量分析部はイオン源温度200度、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。

## エ 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。

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」

という)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、さまざまな171の代謝物が検出された。得られた代謝物は、(1)

解糖系/糖新生に関与する代謝物、(2)TCA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。

PCA分析により得られた各主成分における各代謝物の因子負荷量(factor loading)について、第1主成分における代謝物の因子

表6 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	② TCA 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

資料：熊本県農業研究センター作成



表7 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

資料：熊本県農業研究センター作成

負荷量上位30成分を表6に、下位30成分を表7に、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8に、下位30成分を表9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(7種)、アミン類代謝物(3種)の順に多く位置付けされた。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)

の順に多く位置付けされた。

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)の順に多く位置付けされた。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)の順に多く位置付けされた。

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バイプロット

表 8 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	化合物名	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	② TCA 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	② TCA サイクル	10.7
120	30	N-Acetyl-Ornithine-4TMS	⑤アミノ酸関連	10.6

資料：熊本県農業研究センター作成

図を図3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できているものと判断した。

バイプロット図には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。PC 1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、PC 1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、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が示唆された。

PC 2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、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。

表 9 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	② TCA 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-Aminoadipic 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	② TCA 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

資料：熊本県農業研究センター作成

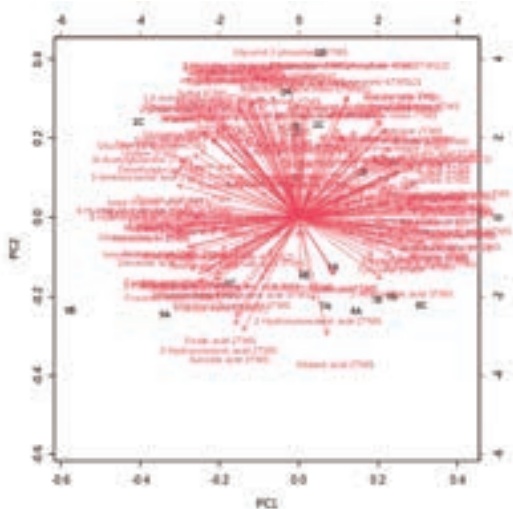
次に、第 1 主成分および第 2 主成分から各サンプルの主成分得点を算出し、平面図にプロットしたスコアプロット図を図 4 に示した。供試した牛肉サンプルは、PC 1 軸では褐毛和種牛肉、黒毛和種牛肉いずれも正負の方向に広く分布していた。PC 2 軸では、褐毛和種牛肉が正方向に分布し、黒毛和種牛肉は負方向に分布していた。

また、PC 1 軸においては黒毛和種の方がばらつきは大きく、PC 2 軸においては褐毛和種の方が大きなばらつきが生じていること

が認められた。また、同一品種内における代謝物の個体間のばらつき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。

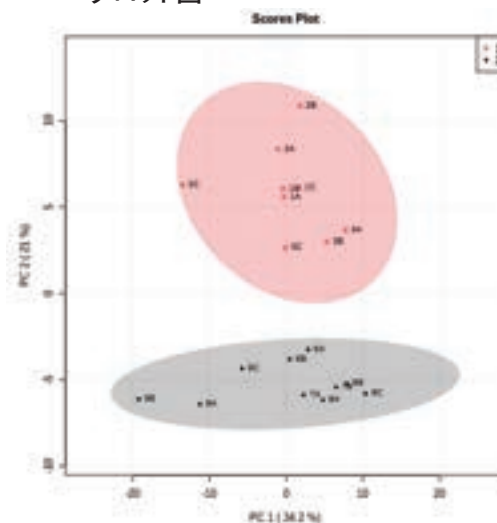
以上の結果から、ガスクロマトグラフを用いた牛肉中代謝物の一斉定量では、褐毛和種と黒毛和種に差異が見られる可能性が推察された。

図3 試験2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バイプロット図



資料：熊本県農業研究センター作成

図4 試験2の主成分得点から描画したスコアプロット図



資料：熊本県農業研究センター作成

## 5 総合考察

今回の二つの試験を通して、慣行的に行われているアミノ酸、脂肪酸などの絶対定量法による分析よりも、糖類やその他の中間代謝物を含めた総体としての代謝物が比較できるメタボローム解析による相対定量法による分析の方が、褐毛和種と黒毛和種のそれぞれの牛肉の特徴についてより鮮明に区分が可能であることが示唆された。また、試験1では試験2ほど明確には区分できなかったが、褐毛和種は「うま味」、「特定機能性」に関する代謝物が多く含まれ、黒毛和種は「風味」、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が示された。試験2では、褐毛和種と黒毛和種牛肉の違いを、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説明が可能であることが示された。

山田（2019）は、ホルスタイン種と黒毛和種の牛肉を用いたメタボローム解析を行い、ホルスタイン種の牛肉中主成分はアミノ酸、アミノ化合物、核酸関連代謝生産物によって、黒毛和種の牛肉は糖、糖リン酸、脂肪酸

によって特徴付けられるとしている<sup>6)</sup>。また、山田（2020）は、輸入牛肉（アンガス牛）と黒毛和種の牛肉を用いたメタボローム解析を行い、輸入牛肉中主成分はアミノ酸によって、黒毛和種の牛肉は糖リン酸、核酸代謝産物によって特徴付けられるとしている<sup>7)</sup>。黒毛和種の牛肉との違いを糖類、有機酸関連代謝物、脂肪酸によって説明可能な褐毛和種の牛肉は、ホルスタイン種や輸入牛肉とも異なる肉質特性を備えていると推察できる。

また、本研究によって、同一品種内における代謝物の個体間のばらつきについては、アミノ酸やアミノ酸関連代謝物を中心に、黒毛和種が褐毛和種よりも大きい傾向が認められた。このことは、黒毛和種は全国各地で肉量・肉質を向上させるため遺伝的改良や選抜が行われてきたことが背景にあると推察された。

以上の結果から、褐毛和種牛肉について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し黒毛和種牛肉と対比することで、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。

しかしながら、今回、褐毛和種牛肉の特徴として明らかとなった代謝物などについては、実際の消費者の食味官能評価とは関連付

けることができておらず、本試験研究をもって、「あか牛」牛肉の味わいの魅力を提示することはできなかった。

## 6 おわりに

本調査研究では、「あか牛」牛肉は黒毛和種牛肉と比較して特徴ある糖類が含まれる可能性があることが示されるなど、一定の特徴を捉えることはできたものの、「あか牛」牛肉の特色を明確にするまでには至らなかった。しかしながら、肉用牛研究の手法としてメタボローム解析を導入することにより「あか牛」牛肉の魅力を示すためのアプローチとし

ては一步前進することができたと考える。

今後、さらに例数を重ね、黒毛和種と傾向の違いが認められた代謝物質群について特色を明らかにしていくとともに、食味官能試験とも連動した解析を行っていききたい。また、遺伝的側面や飼養管理的側面からその特色を鮮明にする技術の開発について検討を加えていききたい。

### 引用文献

- 1) 公益社団法人日本食肉格付協会、令和元年格付結果の概要、(2020)
- 2) 独立行政法人農畜産業振興機構ホームページ公開データより
- 3) 及川彰：メタボロミクスの農業・食品分野への応用、化学と生物、第51巻、615-621、(2013)
- 4) 櫻井望：食品成分のメタボローム解析と未知成分同定のための“食品メタボロムレポジトリ”の提案、オレオサイエンス第19巻第2号、59-65 (2019)
- 5) 鈴木啓一ら：メタボロミクス解析による黒毛和種牛肉の美味しさに関わる指標の探索、平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 (Vol.33)、73-78 (2015)
- 6) 山田知哉：和牛肉のおいしさを「見える化」する、平成30年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 (Vol.37)、38-44 (2019)
- 7) 山田知哉：和牛肉のおいしさを「見える化」する(Ⅱ) 輸入牛肉との比較、平成31年度(令和元年度)食肉に関する助成研究調査成果報告書 (Vol.38)、78-81 (2020)