

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：25406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26750023

研究課題名(和文) 魚のメタボロミクスによる新たな品質評価法の開発

研究課題名(英文) The development of a new quality assessment method using metabolomics of fish

研究代表者

馬淵 良太 (Mabuchi, Ryota)

県立広島大学・人間文化学部・助教

研究者番号：00632671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：食品の新たな品質評価法として着目されているメタボロミクス技術を魚肉の品質評価へ応用した。代表的な赤身魚であるハマチをモデルとして実験を行った。1)メタボロミクスの魚肉への適用を目的にハマチ筋肉の各部位の判別分析を行った。特に外観に大きな違いがない肩・尾・腹肉の判別を可能とした。2)貯蔵による代謝成分変化を把握した。貯蔵日数の予測モデルを構築し、既存の鮮度評価法と比較した結果、新たな鮮度評価法としての有効性が明らかとなった。3)味覚センサーで得られた各呈味値と代謝成分情報の相関性を解析し、呈味の予測モデルを構築するとともに各呈味に関わる代謝成分を特定した。

研究成果の概要(英文)：Metabolomics technology, which is gathering attention as a new method for assessing food quality, was used to assess the quality of fish meat. Yellowtail, a typical red-fleshed fish, was used as the model in this experiment. 1) To find applications of metabolomics in fish meat, an analysis to distinguish the various muscle parts in the yellowtail was conducted. In particular, it distinguished the dorsal, caudal, and ventral portions, which do not vary greatly in appearance. 2) It identified the changes in metabolic components associated with storage. A predicting model for the storage period was constructed and compared with the existing method for assessing freshness, and the results indicated its effectiveness. 3) The correlation between the values for various tastes obtained through the taste sensor and information of the metabolic components were analyzed. A predicting model of taste was then constructed while identifying the metabolic components associated with the various tastes.

研究分野：食生活学

キーワード：メタボロミクス 魚肉 品質評価 部位判別 鮮度評価 おいしさ評価 代謝成分 予測モデル

1. 研究開始当初の背景

メタボロミクスとは、アミノ酸、有機酸、糖類などの生体内代謝物を網羅的に解析することで、生体内情報を客観的に評価する手法である。この手法は、生理現象の解明や疾患バイオマーカーの発見など医療分野での応用例が目立つ。近年、食品分野でも応用可能であることが示唆され、緑茶やチーズなどの品質予測に関する報告がされている。しかし、魚などの水産食品の品質評価への応用例は認められない。

魚肉は、良質なタンパク質や EPA, DHA などの n-3 系の脂肪酸が多く含まれるヘルシーフードとして一般に認知されている。これらの脂肪酸には、抗炎症性、抗アレルギー性、アルツハイマー病などの脳疾患の予防効果など様々な機能があると考えられている。また、国民一人当たりの魚介類供給量と平均寿命の関係を見ると、魚介類供給量が多い国ほど平均寿命が長い傾向が認められている。そのため、老若男女を問わず摂取してほしい食品の一つである。しかしながら、魚肉は、貯蔵中の品質劣化が著しく、特に生の魚でその傾向が強い。このために食事としての提供が敬遠される場合も少なくない。したがって、魚肉の品質を正確に評価し提供することは非常に重要である。

生の魚の品質劣化は、細菌などの微生物による腐敗が起こる前に、内在性の酵素により、核酸関連物質やタンパク質などが分解することに起因している。魚の生化学的な鮮度評価法としては、生菌数、pH、有機酸含量、揮発性塩基窒素量、アンモニア、ヒスタミン、核酸関連物質などを用いた多くの鮮度評価法が考案されている。これらのほとんどが腐敗の度合を評価する指標である。そのため、日本人が可食可能な新鮮な魚の評価には不十分と言わざるを得ない。一方、魚の活きの良さ、すなわち鮮度を評価する指標としては、核酸関連物質の変動から計算される K 値が一般的に用いられている指標である。しかしながら、評価が難しい部位や魚種があることなど問題点もある。このように全ての魚類に利用可能な方法はないため、種々の方法を組み合わせ、包括的に評価することが理想的だが、多大な労力と時間が必要である。そのため、新たな魚肉の鮮度評価法の開発が望まれる。

一方、上述した生化学的变化により味成分も変化している。すなわち、食品のおいしさが変化していることを意味している。おいしさの評価は、現在でも官能評価が汎用されている。しかし、食べる人の状態に起因する要因(環境的・生理的・心理的)の影響が大きいため、おいしさの統一的評価は難しい。官能評価から信頼できるデータを得るためには、検査員の選定から訓練、評価方法の選定などに多大な時間と費用を要する。分析機器を用いて呈味物質や香気成分を定量的に分析することはできるが、それだけではおいし

さを判断することはできない。以上のことから魚肉のおいしさを評価できる新たな方法の開発が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

魚肉の品質評価へメタボロミクスを応用することを目的として、以下の3つの実験を行った。実験1では、魚肉試料のメタボロミクスへの適用を目的にハマチ肉を用いてメタボロミクスの実験系を確立した。またハマチ肉の各部位の判別分析を行った。実験2では、ハマチ肉の貯蔵試験を行い、貯蔵による代謝成分プロファイルへの影響を検討した。既存の鮮度評価法である生菌数およびK値と比較検討することで魚肉のメタボロミクスが新たな鮮度評価法として有効か検討した。実験3では、ハマチ肉の味覚センサー測定から得られた各呈味の応答値と代謝成分プロファイルの相関性を解析し、魚肉のおいしさを化学的に評価した。

3. 研究の方法

メタボロミクスは、その実施過程が代謝成分の分析とそれによって得られたデータの解析の大きく2つに分けることができる。メタボロミクスは、対象となる化合物の性質が非常に多様であるため、目的とする成分に応じて分析機器が選択されている。高速液体クロマトグラフ-質量分析装置、キャピラリー電気泳動-質量分析装置、ガスクロマトグラフ-質量分析装置(GC-MS)、核磁気共鳴装置などが用いられている。本研究では、魚肉の品質と関連が高いアミノ酸、有機酸、核酸関連物質などの低分子化合物を対象とし、その定性・定量分析に優れているGC-MSを用いた方法でメタボロミクスを実施した。一方、GC-MSで得られた代謝成分データは、一覧を作成後、メタボロミクス研究で広く使用されている多変量解析ソフトウェアSIMCAを用いてデータ解析を行った。各実験における具体的な方法は以下の通りである。

<実験1> 魚肉のメタボロミクス実験系の確立およびハマチ肉の部位判別分析

試料調製：広島市内の小売店から購入した養殖ハマチを用いた。各部位(肩肉、腹肉、尾肉および血合肉)に分けて、フードプロセッサでミンチにした。ミンチは、実際に食事するときを想定して5で1日貯蔵した。貯蔵後、分析まで-80で保存した。代謝成分の抽出：試料の一部を凍結乾燥させ、ミルで粉末にした。内部標準物質としてリピトールを加え、メタノール/超純水/クロロホルム混合液(2.5/1/1)で水溶性の一次代謝物を抽出した。抽出後、遠心エバポレーターで有機溶媒を濃縮し、凍結乾燥で試料を乾固した。誘導体化：GC-MSで分析可能な構造へ変換するため、ピリジンで可溶化したメトキシアン塩酸塩でオキシム化、MSTFAでトリメチルシリル化を行った。GC-MS分析：島津製作所(株)製のGCMS-QP2010 Ultraを用いた。GC

カラムは、DB-5 を使用した。GC のオープン温度は、初期温度 100 で、4 分間保持し、1 分間に 10 ずつ 320 まで昇温させ、320 で 11 分間保持した。注入口温度は、280 とした。注入モードは、スプリットとし、スプリット比は 10:1 で誘導体化試料 1 μ L を注入した。キャリアーガスは、ヘリウムを使用し、線速度一定 (39.0cm/sec) で制御した。ページ流量は、5 ml/min とした。MS の質量分離部には四重極型を、イオン化の方法として EI 法を用いた。イオン源温度は 200 、インターフェース温度は 280 、イオン化電圧は 70eV とした。測定モードはフルスキャンモードとし、45-600m/z を測定範囲とした。データ解析 : GC-MS 分析によって得られたピークのアノテーションは GCMS 代謝成分データベース Ver.2 を使用した。n-アルカンで補正した保持指標から類似度 80%以上かつターゲットイオンと確認イオンの比が絶対許容で 50%以上をアノテーション化合物とした。各化合物のターゲットイオンのピーク面積と内部標準物質 (リピトール) のターゲットイオンのピーク面積との比を内標比として算出し、半定量値とした。統計解析 : 多変量解析ソフト SIMCA 13 おおおよび 14 (MKS Umetrics AB) を用いて、主成分分析 (PCA) 、PLS-DA、OPLS-DA 等によりハマチ部位の判別分析を行った。

<実験 2 > 貯蔵による代謝成分プロファイルへの影響

貯蔵試験 : ハマチの普通肉 (肩) および血合肉のミンチをそれぞれ 0 で 3、7、14 日間、5 で 1、3、7 日間貯蔵した。貯蔵後、実験 1 で確立したメタボロミクスに供した。予測モデルの構築 : 代謝成分を説明変数 (x) 、貯蔵日数を応答変数 (y) とし、OPLS 解析を行い、貯蔵日数の予測モデルを構築した。さらに構築された予測モデルの各 x 変数の VIP 値 (重要な変数の強度) を算出した。一般生菌数 : 標準寒天培地を用いてコロニーカウント法により測定した。K 値 : 10%過塩素酸で核酸関連物質を抽出し、中和後、UPLC システム/TUV 検出器により分析した。カラムは、Kinetex Evo C18 を使用した。移動相は、100mM リン酸溶液/150mM トリエチルアミン溶液 = 100/1(v/v) を使用し、アイソクラティックで分析した。流量は、0.9mL/min。注入量は、1 μ L。測定波長は、260nm。核酸関連物質の同定は、標品の保持時間との比較により行い、外部検量線法により各核酸関連物質を定量した。定量値を用い、以下の式で K 値を算出した。 $K (\%) = (HxR+Hx) / (ATP+ADP+AMP+IMP+HxR+Hx) \times 100$

メタボロミクスで得られた結果と既存の鮮度評価法である一般生菌数、K 値を比較した。

<実験 3 > 魚肉のおいしさの化学的評価

味覚センサー : 実験 2 と同一の試料を用いて、冷水抽出によりエキス成分を抽出した。ミンチ 5g に 20mL の超純水を加え、氷上でホモジナイズし、遠心分離後の上清を 70mL にメスアップし、35mL を先味、35mL を後味の測定

に供した。味覚センサーは、味認識装置 TS-5000Z を用いた。6 種のセンサーを用いて各試料溶液の応答値を測定した。センサーは、AAE (旨味)、CTO (塩味)、CAO (酸味)、C00 (苦味)、AE1 (渋味) を使用した。3 回繰り返し測定の平均値よりウェーバーの法則に基づいてヒトが感じる味閾値の違いを推定し、得られた値を各味要素の味応答値とした。本研究で味要素は、先味として酸味、塩味、旨味、苦味雑味、渋味刺激、後味として苦味、渋味、旨味コクとした。

相関性解析 : SIMCA 14 を用いた。データセットは、実験 2 で得られた代謝成分を説明変数 (x) 、各味要素の応答値を応答変数 (y) とし、味要素ごとに OPLS 解析を行った。OPLS 解析で得られたモデルから各味要素の予測モデルを作成し、各味要素と代謝成分の相関関係を解析した。精度の良い予測モデルが構築された味要素は、VIP 値を算出し、VIP 値が 1.0 以上のものを味要素と相関性が高い重要な代謝成分とした。

4. 研究成果

<実験 1 > 魚肉のメタボロミクス実験系の確立 : 水溶性の一次代謝成分を対象とし、GC-MS を用いた方法を検討した。ハマチ肉の各部位を分析したところ、血合肉で 70、普通肉で 92 の代謝成分がアノテートされた。普通肉の各部位では、肩肉で 64、腹肉で 59、尾肉で 78 の代謝成分がアノテートされた。合計して 100 の代謝成分がハマチ肉から検出された。各成分を分類すると、糖類 40、アミノ酸 23、有機酸 7、核酸関連物質 5、リン酸化化合物 7、ビタミン類 4、その他 14 であった。魚の血漿中の代謝成分を測定した先行研究と比較して多くの成分がハマチ肉から検出された。また、他食品を対象としたメタボロミクス研究の先行研究と比較しても本研究で検出された代謝成分数は同程度検出できている。そのため GC-MS を用いた本方法は、魚肉のメタボロミクスへ容易に適用できた。ハマチ肉の部位判別分析 : 検出された代謝成分データ一覧を用い、多変量解析により部位判別分析を行った。まず PCA によりデータの全体像を確認した。その結果、血合肉と普通肉の間に大きな成分プロファイル差があること、普通肉の 3 群間にもある程度の成分プロファイル差があることが明らかとなった (Fig.1)。

次に、より詳細な解析をするため、まず普通肉と血合肉の 2 群間で OPLS-DA を行った。2 群には、統計学的に有意に成分プロファイル差があることが確認された。さらに 2 群の判別に重要な成分を *S*-plot 解析から得られた相関度 $p(\text{corr})$ で判断した。その結果、オルニチンやパントテン酸などが普通肉と血合肉の判別マーカーとして有効であることが明らかとなった。続いて、普通肉 3 群間の判別を OPLS-DA で行ったところ、統計学的に有意に 3 群を分けることができた。外観に大

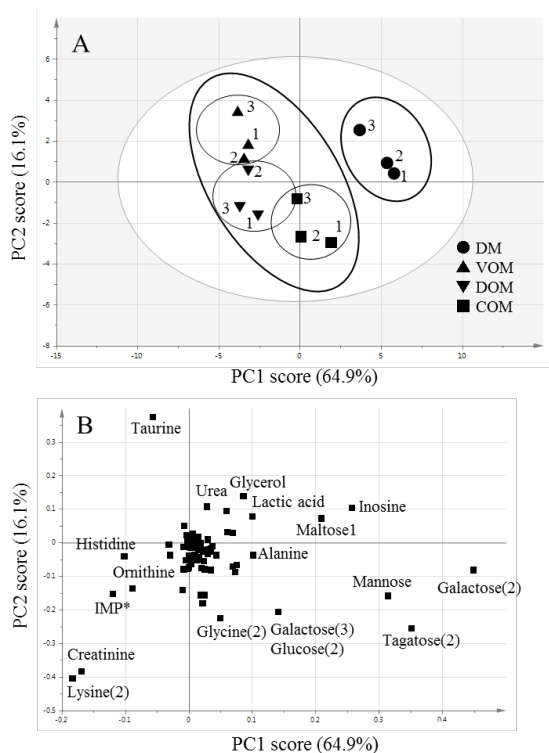


Fig.1 Principal component analysis for PC2 (16.2%) against PC1 (64.9%) for all metabolic components identified in muscle tissue of yellowtails by GC-MS. (A) score plot (B) loading plot. Dark muscle (DM), ventral ordinary muscle (VOM), dorsal ordinary muscle (DOM), caudal ordinary muscle (COM) *IMP: Inosine monophosphate

きな違いがない普通肉各部位を化学的に判別することができた。本方法は、食品偽装を防ぐための一手法として有効かもしれない。判別に重要な成分としては、グリセロール 3 リン酸、ニコチン酸アミド、バリンが特定され、これらは部位判別のマーカーとして有効である可能性が高い。

<実験 2> ハマチ肉の貯蔵による成分プロファイルへの影響と鮮度予測モデルの構築：貯蔵試験後の試料をメタボロミクスに供したところ、普通肉および血合肉ともに貯蔵によって代謝成分プロファイルが変化した。Fig. 2 に例として普通肉・0 貯蔵の結果を示した。

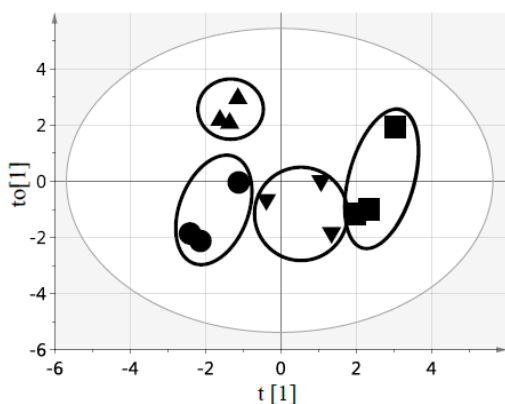


Fig. 2. Score plot obtained by OPLS analysis (ordinary muscle, 0°C storage). ●: not stored (0 days); ▲: stored for 3 days; ▼: stored for 7 days; ■: stored for 14 days.

さらに OPLS 回帰分析をしたところ、貯蔵日数の良好な予測モデルが構築できた (Fig. 3, Table 1)。

この予測モデルは、新たな鮮度評価モデルとして利用可能であると考えられる。また VIP 値から貯蔵によって変化する重要な成分を抽出したところ、様々な化学的性質を持つ成分が特定された (Fig. 4, Table 2)。

部位、貯蔵温度によって特定された成分が異なっていたことから、貯蔵による代謝機構が異なることを意味する可能性が高い。今後、代謝パスウェイ解析などを行い、貯蔵による代謝変化機構の解明に取り組む予定である。既存の鮮度評価法との比較：本研究の貯蔵試験で使用した条件では、普通肉と血合肉ともに一般生菌数の有意な増加は認められなかった。そのため、喫食可能な貯蔵条件であることが明らかとなった。K 値は先行研究と同様の変化を示した。まず、普通肉では、貯蔵前の 6.4% から貯蔵により徐々に増加し、0・14 日および 5・7 日貯蔵でそれぞれ 41.6% および 45.1% となった。K 値の目安としては、20% 以下で「刺身用」、50% 以下で加熱処理による喫食可能とされている。そのため、本研究の普通肉は、比較的鮮度が保たれる貯蔵条件であった。一方、血合肉は、貯蔵前で 31.3% と高く、0 貯蔵では、3 日貯蔵で 95.8% となり、5 貯蔵では、1 日で 92.2% となった。一般生菌数からは、喫食可能と判断された血合肉だが、K 値を指標とすると著しい鮮度劣化があると判断された。このことは、K 値が血合肉の鮮度評価に不相当であることを示している。一方、代謝成分プロファイルは、日数依存的な変化を示しており、K 値で評価ができない貯蔵条件の評価が可能である。血合肉貯蔵で高 VIP 値を示したタウリンなどは、新たな鮮度評価マーカー候補である。より長時間・高温での貯蔵試験やより詳細な微生物との関係解析等、更なる検証は必要なもののメタボロミクスに基づいた本手法は魚肉の新たな鮮度評価法として有効であることが示唆された。

<実験 3> 味覚センサーによる魚肉呈味評価：普通肉では、貯蔵により苦味雑味および苦味が増加傾向、血合肉では、渋味刺激および渋味が貯蔵により減少傾向を示したものの、普通肉および血合肉ともに貯蔵によって有意に変化する呈味は無かった。本研究の条件では保存による呈味への影響は大きくないことが明らかとなった。

代謝成分と呈味の相関性解析：OPLS 回帰分析による相関性解析を行ったところ、普通肉では、酸味、渋味刺激、旨味コク、血合肉では、酸味、旨味、旨味コクにおいて良好な呈味予測モデルが構築できた。呈味予測モデルの構築に重要な成分としては、以下のような結果が得られた。普通肉の酸味モデルでは、酸味物質であるグルコン酸などが高 VIP 値を示し、酸味と正の相関を示した。普通肉の旨味コクモデルでは、旨味物質であるイノシン酸など

が高VIP値を示し、旨味コクと正の相関を示した。血合肉の酸味モデルでは、リン酸や乳酸などが高VIP値を示し、酸味と正の相関を示した。普通肉の酸味モデルと異なる成分が血合肉の酸味モデルから得られた。貯蔵による呈味成分の変化は、魚肉部位により異なることが示唆された。本方法を用いることで好ましい呈味を示す魚肉の貯蔵条件を把握できる可能性がある。

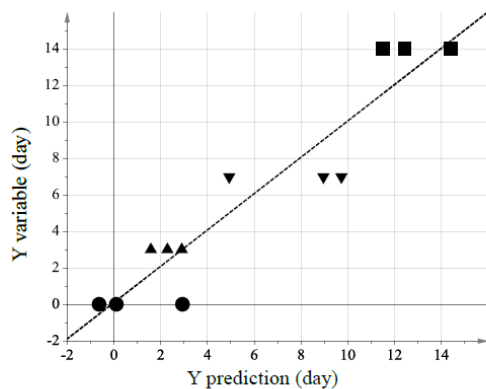


Fig. 3. A freshness prediction model for ordinary muscle stored at 0°C. ●: not stored (0 days); ▲: stored for 3 days; ▼: stored for 7 days; ■: stored for 14 days.

Table 1. List of model assessment obtained by OPLS analysis

Models	Ordinary (5°C)	Dark (0°C)	Dark (5°C)
A ^a	2+2	1+1	2+5
R ² Y	0.879	0.734	0.985
Q ² Y	0.767	0.581	0.868
Regression line	y=1.02x+0.01	y=0.95x+0.53	y=0.96x+0.002
R ² ^b	0.925	0.738	0.984
RMSEE	0.97	3.13	0.63
RMSEcv	1.10	3.49	0.92

^a Number of models

^b R² was obtained from the regression line

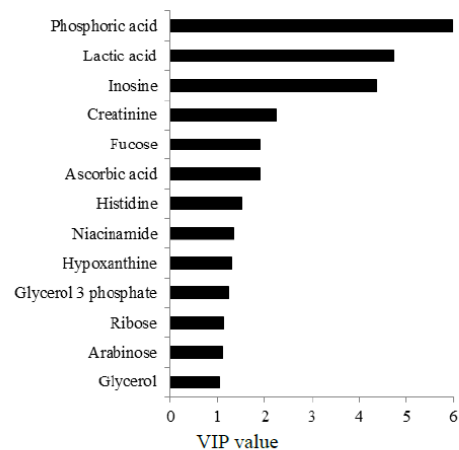


Fig. 4. Metabolic components with high VIP values obtained from the predictive model for ordinary muscle stored at 0°C.

Table 2. List of metabolites with high VIP values obtained using each model (VIP ranking).

VIP ranking	Ordinary (5°C)	Dark (0°C)	Dark (5°C)
	Metabolites name (VIP values)		
1	Phosphoric acid (6.24)	Galactose (4.95)	Taurine (4.52)
	Lactic acid (4.54)	Taurine (3.75)	Galactose (3.76)
2	Inosine (2.82)	Tagatose (2.74)	Tagatose (3.37)
	Histidine (2.51)	Mannose (2.51)	Mannose (2.34)
3	Creatinine (1.70)	Phosphoric acid (2.20)	Trehalose (1.80)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

(1) Ryota Mabuchi, Miwako Adachi, Haruka Kikutani, Shota Tanimoto: Discriminant analysis of muscle tissue type in yellowtail *Seriola Quinqueradiata* muscle based on metabolic component profiles. *Food Science and Technology Research*. 査読有. In press.

(2) 馬淵良太, 趙慧卿, 谷本昌太: 加熱処理がレモン果汁の成分プロファイルへ及ぼす影響. *日本食品科学工学会誌*. 査読有. 65(4) 183-191 (2018).

(3) 馬淵良太: 魚肉の品質評価へのメタボロミクスの応用. *アグリバイオ*. 査読無. 2(4) 52-55 (2018)

(4) Tanimoto Shota, Kikutani Haruka, Kitabayashi Kaori, Ohkita Tomoko, Arita Rino, Nishimura Sayaka, Takemoto Remi, Mabuchi Ryota, Shimoda Mitsuya: Qualitative changes in each part of yellowtail *Seriola quinqueradiata* flesh during cold storage. *FISHERIES SCIENCE* 査読有. 84(1) 135-148 (2018)

(5) Ryota Mabuchi, Huiqing Zhao, Rumi Kondo and Shota Tanimoto: A new method for assessing the freshness of fish meat based on metabolome analysis technology. The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium "Fisheries Science for Future Generations" Symposium Proceedings. 10020, 1-2 (2017)

(6) Shota Tanimoto, Minami Ueno, Ryota Mabuchi: Effect of rice flour with different characteristics on textural properties of heat-induced fish meat gels from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) without preheating. *Food Science and Technology Research*. 査読有. 20(6) 1235-1244 (2014)

〔学会発表〕(計15件)

*筆頭発表者のもののみ記載

(1) 馬淵良太, 趙慧卿, 谷本昌太: 加熱処理がレモン果汁の成分プロファイルに及ぼす影響. 平成28年度日本食品科学工学会西日本支部大会, 福岡市 (2016)

(2) 馬淵良太, 趙慧卿, 安達美和子, 谷本昌太: GC/MS メタボローム解析によるハマチ肉の鮮度予測モデルの構築. 日本水産学会大会講演要旨集, 秋季号, p44 (2016)

(3) 馬淵良太, 安達美和子, 菊谷遥香, 近藤留未, 谷本昌太: ハマチ血合肉の代謝成分プロファイルに及ぼす貯蔵の影響. 日本水産学会大会講演要旨集, 春季号, p106 (2016)

(4) 馬淵良太, 安達美和子, 菊谷遥香, 谷本昌太: メタボロミクスのハマチ筋肉への応用と魚肉部位判別分析への適用. 日本水産学会大会講演要旨集, 秋季号, p57 (2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬淵 良太 (Mabuchi Ryota)
県立広島大学・人間文化学部・助教
研究者番号：00632671

(2) 研究協力者

谷本 昌太 (Tanimoto Shota)
県立広島大学・人間文化学部・教授
研究者番号：80510908