

資 料

メタボローム解析を用いた食品成分の評価技術の確立（第1報）

－メタボローム解析による日本酒の品質評価技術について－

大渡 康夫[†]・牧野 正知[§]・松林 和彦^{*}・田畑 光正^{*}

1. 目 的

「メタボローム (= Metabolome)」とは、代謝産物を意味する「Metabolite (メタボライト)」に、全体を意味するラテン語の接尾語「ome (オーム)」が組み合わされた造語である。ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS) を用いたメタボローム解析では、アミノ酸や糖、有機酸、脂肪酸などの代謝産物を網羅的に分析することができる。これらは食品の味や栄養、品質などに大きく関わるため、食品分野において、近年メタボローム解析を活用した研究が飛躍的に増えている¹⁾⁻⁶⁾。また、地方の特産品の特徴づけや品質管理に活用する事例も報告されており⁷⁾⁻¹⁰⁾、鳥根県でもメタボローム解析技術を企業の技術支援に活かせるような取り組みが求められる。

一方、日本酒は、精米歩合や麴米の使用割合、醸造アルコール添加の有無など「清酒の製法品質表示基準」に基づき、吟醸酒や純米酒などの区分に分類され¹¹⁾、さらには原料米や製法の違いで多様なタイプのお酒が上市されている。日本酒に含まれる成分の数は、これまでに約300種類の化合物が報告されているが¹²⁾、この中から製品の特徴となるものを見出すために、一つずつ成分を調べることは、理論的には可能でも現実的に不可能に近い。この課題に対して、複数成分を網羅的に測定できるメタボローム解析技術が、酒質と成分の客観的評価法として適用され始めている¹³⁾⁻¹⁵⁾。

そこで本研究では、分類別に異なる日本酒を実試料として選択し、それぞれに特徴ある成分を捉えることを目的に、GC/MSを用いたメタボローム解析による品質評価技術の確立の検討を行った。

2. 方 法

2.1 試料

県内の同一メーカーの市販酒で、分類別に5点（普通酒、本醸造酒原酒、純米酒生酏、特別純米酒、純米吟醸酒）を選択し、分析試料に用いた。

2.2 GC/MSによるメタボローム解析

2.2.1 試料の前処理（誘導体化）

前処理はMimuraらの方法に準じて行った¹⁴⁾。試料20 μ Lに内部標準物質のRibitol (0.2mg/mL水溶液) を60 μ L加えて混合し、遠心式濃縮機 (VR-C36R, タイテック) を用いて減圧しながら25°C, 2,000rpm, 10分間遠心した。その後-80°Cディープフリーザーで30分間凍結し、凍結乾燥機 (FD-10BME, 日本テクノサービス) で一晩乾固した。用事調製したメトキシアミン塩酸塩 (20mg/mLピリジン溶液, 富士フィルム和光純薬) を100 μ L加え、超音波洗浄機を用いて残滓が分散するまで処理した。インキュベーター内に攪拌機 (TM-282, アズワン) をセットし、30°C, 1,200rpm, 90分間攪拌しながらオキシム化を行った。続いて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) (富士フィルム和光純薬) を50 μ L添加し、37°C, 1,200rpm, 30分間再度攪拌しながらトリメチルシリル化を行った。反応終了後、遠心機 (CF16RX, 日立工機) で15,000rpm, 3分間遠心して上澄みをGC/MS用のバイアルに回収した。誘導体化処理後の試料は分解されやすいため、反応後ただちに分析に供した。なお、各試料の前処理はN=3で実施した。また、全5種類の試料を等量比で混合したものをQC (Quality control) 試料として用意し、同様に前処理を行った。

表1 GC/MS測定条件

装置	: Trace1310 GC / ISQ QD MS / TriPlus RSH
カラム	: CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS (30m, 0.25mm, 0.25 μ m, Agilent Technologies)
注入量	: 1 μ L
注入法	: スプリット, 1 : 25
注入口温度	: 230°C
オープン	: 80°C (2min) - 15°C/min - 330°C (6min)
カラム流量	: He, 1.12mL/min
トランスファー温度	: 250°C
イオン源温度	: 200°C
イオン化電圧	: 70eV
質量範囲	: m/z 80 - 500
分析モード	: Scan (0.2 sec. / scan)
データ取得時間	: 4.5 min ~ 24.0 min

[†]食品技術科 (現: 生物応用科),[§]生物応用科 (現: 食品技術科), ^{*}食品技術科

2.2.2 GC/MS分析

GC/MS分析はMimuraらの方法に準じて行った¹⁴⁾。装置はISQ 7000シングル四重極 GC-MSシステム (Thermo Fisher Scientific) を用い、測定条件は表1に示す。データにバイアスがかからないように、実試料の測定の順番はランダム化した。さらにMSの感度ドリフトを補正するため、分析の前後および試料5回測定ごとにQC試料を挟みながら測定を行った。また、保持指標 (Retention Index) を求めるためアルカン混合標準溶液 (C8-20, C21-40 Alkane standard solution, Sigma Aldrich) を同じ条件で測定した。

2.2.3 データ解析

分析データをnetCDFフォーマットに変換し、津川らが開発したメタボローム解析用ソフトウェアMS-DIAL (ver. 3.96) により、ベースライン補正、ピーク検出、デコンボリューション、アライメント、化合物同定を行った¹⁶⁾。スペクトルライブラリーには、MSPフォーマットの「Osaka Univ. DB (CPSil-8CB, Kovats RI, 430 records)」をPRI Meからダウンロードし、化合物同定に用いた¹⁷⁾。未同定のピークはNIST 11 MS スペクトルライブラリーのマススペクトルとの照合により化合物を推定した。その後、内部標準物質およびLOWESS法¹⁸⁾ によりピーク強度を標準化し、得られたデータ行列を、Web解析ツールMetaboAnalyst 4.0に供し多変量解析を行った^{19), 20)}。AutoScalingで正規化した後に主成分分析 (principal component analysis;

PCA) および階層的クラスター分析 (hierarchical cluster analysis; HCA) を実施した。

3. 結果および考察

3.1 GC/MSによる日本酒の代謝物分析

GC/MSにより分析した各試料のトータルイオンクロマトグラム (TIC) を図1に示す。この分析によりアミノ酸、糖、有機酸などの成分が同時に多数検出され、デコンボリューション、アライメントなどのデータ処理により、439個の成分由来のピークが確認された。各ピークの保持指標とマススペクトルをライブラリー情報と照合することで76個の代謝物を同定し、未同定のピークについてはUnknownとして、その後の多変量解析に供した。

3.2 主成分分析によるメタボローム解析

多変量 (高次元) のデータを2~3次元に縮約し、試料間の差異を可視化する解析の一つとして、主成分分析 (PCA) がメタボローム解析においては有効な手法である。GC/MS分析で取得したデータ行列をPCAにより解析した結果、スコアプロット上で日本酒の種類ごとに分類することができた (図2 A)。さらに、分散分析 (ANOVA, $p < 0.05$) によるフィルタリングを行い、群間で統計的有意差がない成分は除去し、ピーク数を439個から158個に絞り込むことで試料間の差異をより明確に表すことができた (図2 B)。続いて、試料中のどのような成分が影響しているのか、ローディングプロットにより確認した (図2 C)。

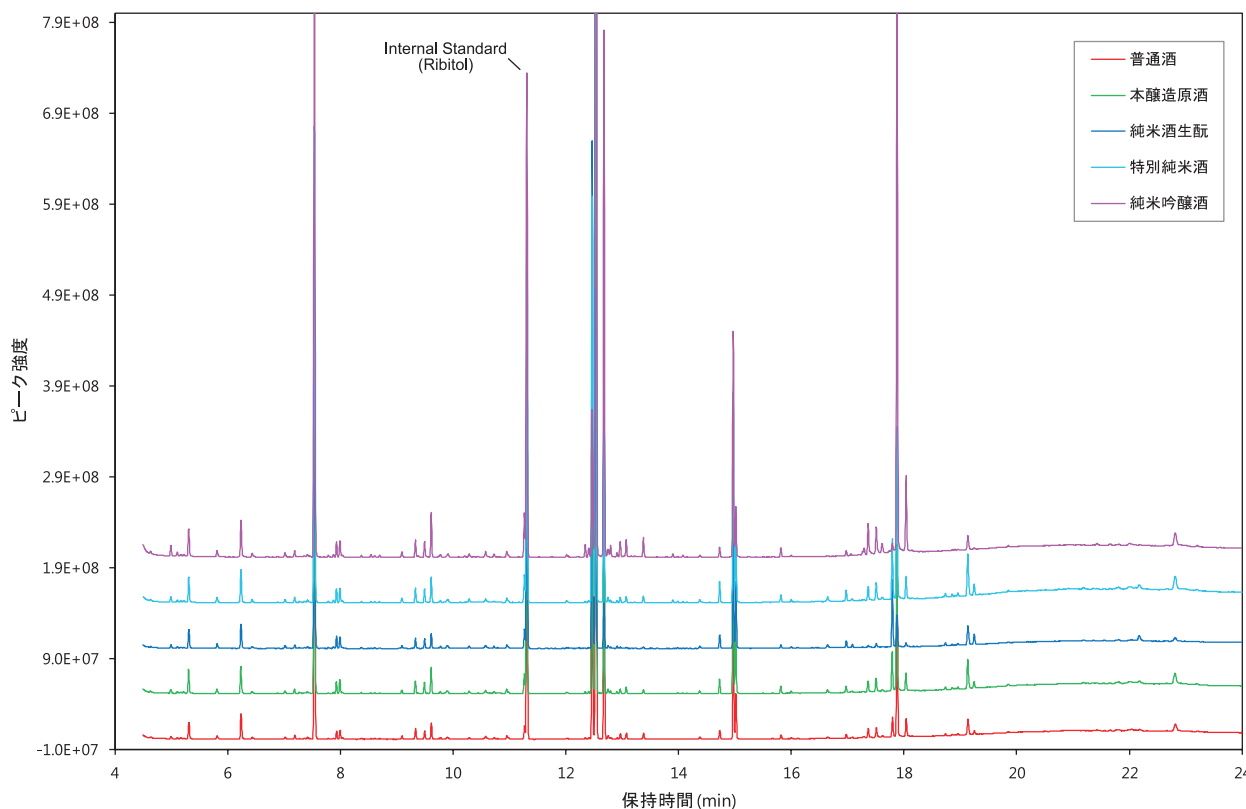


図1 各試料のトータルイオンクロマトグラム

純米酒生酏および純米吟醸酒は第1主成分(PC1; 横軸)の正負のスコアで分類され、それぞれに多くの成分が特徴的にプロットされていた。それに対し、普通酒, 本醸造原酒, 特別純米酒は第2主成分(PC2; 縦軸)の正側に位置し, そのローディングプロットの結果から特徴づける成分数が比較的少ないことが推測できた。このように, 主成分分析によるメタボローム解析で日本酒の分類が可能であることが示された。

3.3 階層的クラスター分析によるメタボローム解析

階層的クラスター分析(HCA)は, ピーク強度変動の類似度をもとに試料間の距離を定義し, 距離が近いもの同士をクラスターで分類する手法である。図3にHCAによる解析結果をヒートマップで示した。ヒートマップは, 色の違い(赤色:多い, 青色:少ない)で各成分の存在量を

可視化するため, 試料に含まれる全成分を俯瞰して見ることができる。図に示すとおり, 普通酒は5種類の中では成分の存在量が最も少なく, 本醸造原酒と特別純米酒は成分の変動パターン(=メタボロームプロファイル)が類似していた。一方で, 純米酒生酏と純米吟醸酒は成分数が比較的多いものの, そのメタボロームプロファイルは他の試料とは類似しておらず, 両者が試料間で異なる特性を示すことが容易に推定できた。

次に試料間で有意差がある成分のうち, 特徴的だったものを抜粋して図4に示した。純米酒生酏に特徴的が多い成分としてCadaverine, Putrescineなどのアミン類が確認された(図4 A左, 中央)。これらアミン類は微生物によるアミノ酸の脱炭酸反応によって産生される代謝物であり, 通常, 食品の腐敗生産物中に多く見出されるが, 発酵食品

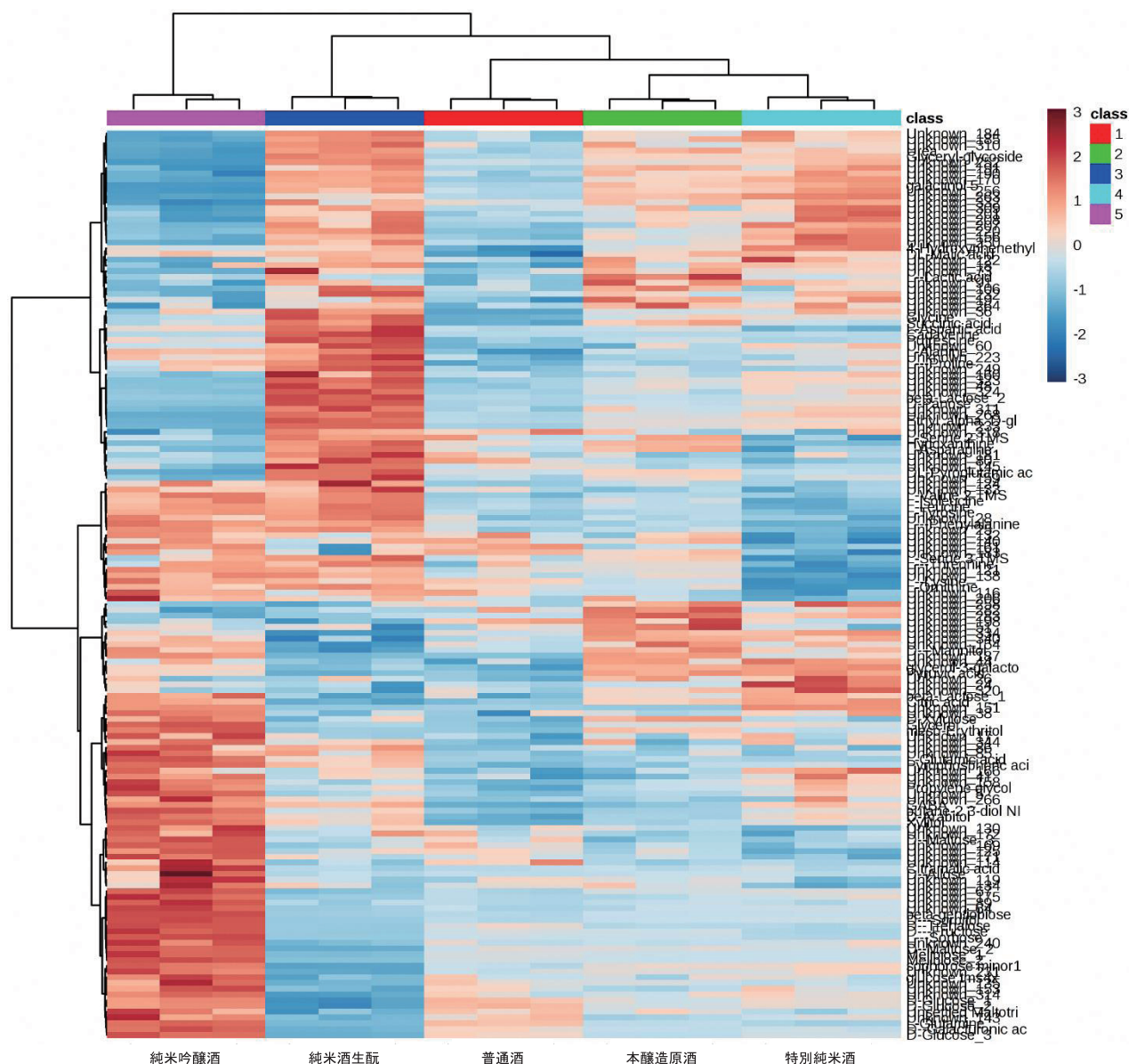


図3 階層的クラスター分析

縦軸は成分, 横軸は試料を示す。赤色に近いほど平均値よりも高く, 青色に近いほど平均値よりも低いことを示す。

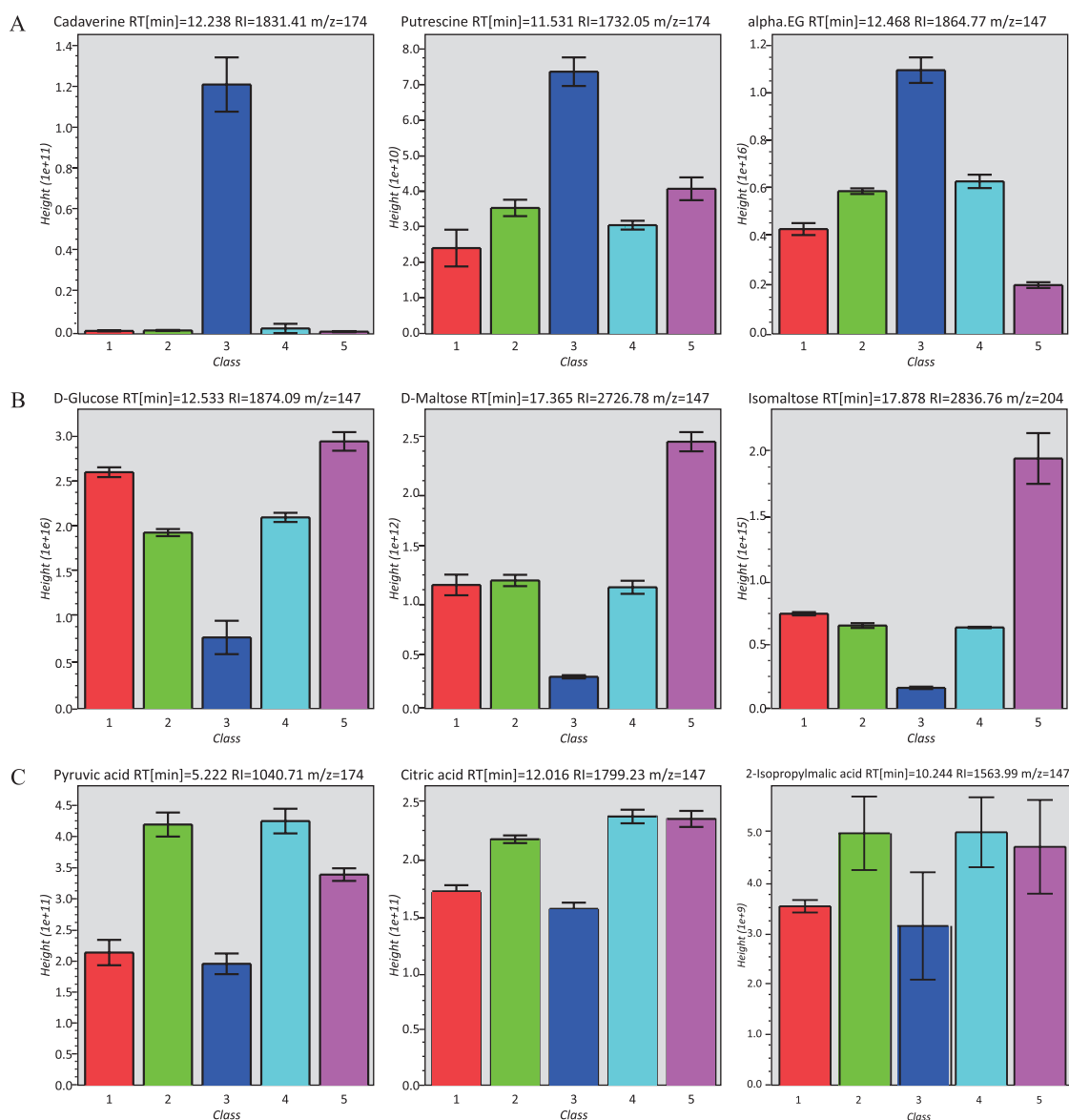


図4 各試料に特徴的な成分のピーク強度

1：普通酒，2：本醸造原酒，3：純米酒生酏，4：特別純米酒，5：純米吟醸酒

(A) 左：Cadaverine，中央：Putrescine，右： α -EG

(B) 左：Glucose，中央：Maltose，右：Isomaltose

(C) Pyruvic acid，中央：Citric acid，右：2-Isopropylmalic acid

(チーズ，味噌，醤油，ワイン，ビール)にも含まれており²¹⁾，日本酒では生酏のお酒に多いことが報告されている²²⁾。今回の試料にアミン類が多く検出されたことは過去の知見と一致する。さらに，日本酒特有の機能性成分として注目されるEthyl- α -D-Glucoside (α -EG)が純米酒生酏で多く認められた(図4 A右)。 α -EGは日本酒中に0.2~0.7%含まれており，即効性の甘味と遅効性で穏和な苦味を持つ呈味成分であると報告されている²³⁾。その機能性としては，「皮膚」，「肝保護」，「利尿・体重抑制」，「腸内環境」などの分野で効果が評価されている²⁴⁾。このように網羅的な探索から思いもよらない成分が発見できることはメタボローム解析の利点の一つと言える。純米吟醸酒では，Glucose，Maltose，Isomaltoseなどの糖類が多く存在した

(図4 B)。一般に吟醸酒は糖の生産力を高めた吟醸用麴を原料に，甘味を基調とした味わいの酒質に仕上げるため，糖類などの成分が比較的になる。対照的に，純米酒生酏はこれら糖類の存在量が試料間で最も低く，酒質としては辛口タイプのお酒と推測された。食品の品質を評価するうえで単一の成分だけでなく複数の成分で評価することは極めて重要であり，メタボローム解析のような多成分一斉分析法が有効である。特別純米酒と本醸造原酒では，Pyruvic acid，Citric acid，2-Isopropylmalic acidを含む有機酸類が類似の変動を示した(図4 C)。日本酒中の有機酸の多くは酵母によって作られることから²⁵⁾，この2種のお酒の醸造には同系統の酵母の使用の可能性が考えられた。さらに普通酒の場合，標準より多めの醸造用アルコール

ルを添加し、最終的に加水してアルコール度を調整するため、成分全体の濃度が薄まる。つまり、メタボローム分析の結果は、試料間の製造条件の違いを反映しており、製造プロセスの検証などにも応用が可能と考えられる。

以上のことから、GC/MSを用いたメタボローム解析は、通常の分析では長期間を要するような多成分の評価を、短時間で成し遂げることが可能であり、尚且つ試料間の成分的特性の差異を把握するのに非常に有用な手法であることが示された。今後は日本酒だけに限らず、島根県の特産品も含めた様々な食品の分析にも応用していく。

文 献

- 1) Pongsuwan, W.; Fukusaki, E.; Bamba, T.; Yonetani, T.; Yamahara, T.; Kobayashi, A. Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007, vol.55, no.2, p.231-236.
- 2) Ochi, H.; Naito, H.; Iwatsuki, K.; Bamba, T.; Fukusaki, E. Metabolomics-based component profiling of hard and semi-hard natural cheeses with gas chromatography/time-of-flight-mass spectrometry, and its application to sensory predictive modeling. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2012, vol.113, no.6, p.751-758.
- 3) Yamamoto, S.; Bamba, T.; Sano, A.; Kodama, Y.; Imamura, M.; Obata, A.; Fukusaki, E. Metabolite profiling of soy sauce using gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry and analysis of correlation with quantitative descriptive analysis. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2012, vol.114, no.2, p.170-175.
- 4) 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*. 2013, vol.51, no.9, p.615-621.
- 5) 関山恭代, 池田成志, 富田 理. NMRによる実践的な農業メタボロミクス研究に向けて. *化学と生物*. 2017, vol.55, no.6, p.392-399.
- 6) 河原崎正貴. 食品分野におけるメタボリック・プロファイリングの活用. *化学と生物*. 2017, vol.55, no.8, p. 538-546.
- 7) 大西茂彦, 松岡博美, 浅井貴子. そら豆醬油の成分的特徴. *日本醸造協会誌*. 2014, vol.109, no.12, p.860-865.
- 8) 樋口誠一, 横堀正敏, 仲島日出男. 県産食品の網羅的成分分析と品質管理への利用－清酒をモデルとして－. *埼玉県産業技術総合センター研究報告*. 2016, vol.14, p.68-72.
- 9) 澤田和敬. 佐賀県産清酒の市場競争力向上を目指した評価技術の開発. *平成28年度佐賀県工業技術センター研究報告書*. 2016, p.7-10.
- 10) 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*. 2018, vol.65, no.4, p.183-191.
- 11) 国税庁. 「清酒の製法品質表示基準 (平成元年国税庁告示第8号)」平成元年11月22日.
<https://www.nta.go.jp/taxes/sake/hyoji/seishu/kokuji891122/03.htm>. (参照: 2019年9月1日)
- 12) 日本醸造協会. 醸造物の成分 (清酒編). 1999, p.1-83.
- 13) Sugimoto, M.; Koseki, T.; Hirayama, A.; Abe, S.; Sano, T.; Tomita, M.; Soga, T. Correlation between sensory evaluation scores of Japanese sake and metabolome profiles. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010, vol.58, no.1, p.374-383.
- 14) Mimura, N.; Isogai, A.; Iwashita, K.; Bamba, T.; Fukusaki, E. Gas chromatography/mass spectrometry based component profiling and quality prediction for Japanese sake. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2014, vol.118, no.4, p.406-414.
- 15) Takahashi, K.; Kabashima, F.; Tsuchiya, F. Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry reveals the correlation between chemical compounds in Japanese sake and its organoleptic properties. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2016, vol.121, no.3, p.274-280.
- 16) Tsugawa, H.; Cajka, T.; Kind, T.; Ma, Y.; Higgins, B.; Ideda, K.; Kanazawa, M.; VanderGheynst, J.; Fiehn, O.; Arita, M. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature methods*. 2015, vol.12, no.6, p.523-531.
- 17) PRIME: Platform for RIKEN Metabolomics.
<http://prime.psc.riken.jp/>. (参照: 2019年1月17日)
- 18) Cleveland, W. LOWESS: A Program for Smoothing Scatterplots by Robust Locally Weighted Regression. *The American Statistician*. 1981, vol.35, no.1, p.54-54.
- 19) Xia, J.; Wishart, DS. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature protocols*. 2011, vol.6, no.6, p.743-760.
- 20) MetaboAnalyst 4.0. <https://www.metaboanalyst.ca/>. (参照: 2019年9月1日)
- 21) 井部明広. 食品に含まれるアミン類. *日本調理科学会誌*. 2014, vol.47, no.6, p.341-347.
- 22) 梅津雅裕. 清酒醸造とアミノ酸及びアミン類について. *日本醸造協会雑誌*. 1962, vol.57, no.5, p.359-365.
- 23) 岡 智, 佐藤 信. 清酒の風味構成に対するエチル α -D-グルコシドの寄与. *日本農芸化学会誌*. 1976, vol.50, no.10, p.455-461.
- 24) 伊豆英恵, 鎌田直樹, 高橋千秋. 清酒及び醸造副産物の機能性. *日本醸造協会誌*. 2015, vol.110, no.4, p.198-206.
- 25) 浅野忠男, 黒瀬直孝. 清酒酵母の有機酸生成について. *日本醸造協会誌*. 2000, vol.95, no.4, p.227-234.