

# メタボローム解析技術を用いた鶏卵および鶏卵加工品の 精密品質解析のための基盤技術開発

九州大学生体防御医学研究所・教授 馬場 健史

## ■ 緒 言

研究助成者はこれまで食品のメタボローム解析(フードメタボロミクス)によって、例えば、醤油の風味<sup>1)</sup>やチーズの食味<sup>2)</sup>に関連する親水性代謝物成分を同定してきた。また、脂溶性成分である脂質の網羅的解析を実施するために、超臨界流体クロマトグラフィー質量分析(supercritical fluid chromatography mass spectrometry : SFC/MS)の適用を試み、SFC/MSによるリピドーム解析(脂質メタボロミクス)の技術開発を行ってきた<sup>3,4)</sup>。鶏卵の成分の解析についてはこれまで数多くの報告があるが、網羅的な成分の解析に基づいたプロファイリングは実施されていない。また、鶏卵および鶏卵加工品の二次機能(おいしさ)に関する研究においても、多成分を対象とした複合解析は行われていない。そこで、当該研究では、代謝物のノンターゲットの網羅的な解析を目的とするメタボローム解析の技術を鶏卵成分の精密プロファイリングへの適用を試みた。まず鶏卵中の代謝物の中でも重要な脂質成分に着目し、鶏卵に含まれている脂質の網羅的な解析に対応したリピドーム解析手法の技術開発を行うとともに実サンプルへの適用についても試み、鶏卵成分の詳細な形質情報が取得可能なメタボリックプロファイリングシステムの構築に取り組んだ。具体的には、「特長卵」と「レギュラー卵」の卵黄に多量に含まれるトリアシルグリセロール(TAG)分子種を指標に、1)同一卵での分析値の安定性評価、2)同一個体から産まれた鶏卵における分析値の安定性評価、3)「特長卵」と「レギュラー卵」の成分比較、を実施した。さらに、本研究では「特長卵」と「レギュラー卵」の食味試験結果を踏まえて、鶏卵の香りや味と相関する特異的なマーカー成分の探索を行った。

## ■ 方 法

全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所養鶏研究室から提供して頂いた、特長卵(試験区、10羽×2日間サンプリング)及びレギュラー卵(対照区、10羽×2日間サンプリング)の卵黄を測定試料とした。卵黄試料は、卵黄中心部、及び卵黄の端からそれぞれ約1mL採取し液体窒素にて急速凍結させた後に、凍結乾燥機にて完全に乾固させた。その後、卵黄乾燥試料を細かく粉砕し、均一化した後に10mgずつ秤量した。

脂質成分の抽出は、メタノール：クロロホルム：水=10：5：3を用いたBligh-Dyer法によって行った。1mLの混合抽出溶媒を添加し、1分間ボルテックスによる攪拌を行い、続いて5分間超音波抽出を実施した。遠心分離後、上清700 $\mu$ Lを2mLチューブに回収し、クロロホルム195 $\mu$ L、水195 $\mu$ Lを加え、ボルテックスで攪拌後、再度遠心分離を行った。液液分画後、下相(クロロホルム相)100 $\mu$ Lを回収し、メタノールにて2倍希釈したものを測定試料とした。

リピドーム解析は、超臨界流体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析システム(supercritical fluid chromatography triple quad LCMS-8040 : SFC/MS/MS, 島津製作所)にて行った。各装置は、島津製作所製Labsolutionsソフトウェアver. 5.42を用いて制御した。SFCによるトリアシルグリセロールの分離は以下の条件で実施した。カラム, CHIRALPAK OD-3, 3.0×150mm, 3 $\mu$ m (Daicel); 流速, 1.2 mL/min; カラムオープン温度, 5 $^{\circ}$ C; 背圧, 10MPa; 試料導入量, 2 $\mu$ L; 溶媒 A, CO<sub>2</sub>; 溶媒 B (モディファイアー), メタノール/水(95/5, V/V) (5mM 酢酸アンモニウム); イオン化補助液(メイクアップポンプ), 流速 0.05mL/min (溶媒 B)。グラジエント条件には, [溶媒 B (%)–時間(分)], 0% (0分); 40% (15分); 40% (18分); 0% (18.1分); 0% (20分)で行った。MS/MSの各種パラメータを以下に示す。極性, positive; エレクトロスプレー電圧, 4.0kV; 脱溶媒管温度, 250 $^{\circ}$ C; ヒートブロック温度, 400 $^{\circ}$ C; ネブライザーガス流量, 3.0L/min; ドライングガス流量, 15.0L/min; 衝突誘起解離ガス圧, 0.23MPa; 検出電圧, 2.16kV。TAGの検出は、多重反応モニタリング(multiple reaction monitoring, MRM)法を採用し、220種の分子種に対して1~3のMRMチャンネルを設定し行った。

取得したデータは、Labsolutions, version 5.42(島津製作所)により化合物同定と面積値の算出を行った。また、取得した卵黄試料のTAGデータをもとに多変量解析の一つであるPartial least squares projection to latent structures based discrimination analysis(PLS-DAをSIMCA-P(version 13.0.3, Umetrics)を用いて実施した。食味試験は、「総合」、「香」、「味」の3項目に対して12名のパネリストに

よる5段階評価(-2, -1, 0, 1, 2)により行った。

## ■ 結果および考察

鶏卵には多種多様な脂質が存在していることが予想されるが、その詳細な分子種プロファイルは明らかとなっていない。特に、TAGは、脂肪酸側鎖のバリエーションが多様であり、構造・幾何異性体も数多く存在していることが想定されているため、これら分子種の精確かつ包括的な分析はきわめて難しいと考えられてきた。従来のTAG分析の多くは、酸あるいは塩基を触媒としてTAGとメタノールによるメチルエステル化反応によって生成した脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)によって実施してきた。しかしながら、本手法では、個々のTAG分子種を観測することはできない。そこで、本研究では超臨界流体の低粘性、高拡散性というクロマトグラフィーの移動相として好ましい性質を生かしたSFC/MS/MSによる新規TAGの包括的分析手法の開発を行った。はじめに、標準試料を用いてTAGの分離に最適なカラムの選定を行った。その結果、キラルカラムの一つであるCHIRALPAK OD-3がTAG分子種を広く分離できることを見出した。さらに、カラム温度を下げることによって、その分離能は格段に向上することを発見した。また、MRM法を組み合わせることで、微量な成分の検出が可能になるだけでなく、脂肪酸側鎖の異なる構造異性体の分離も達成できることが分かった。

続いて、開発した新規TAG分析手法を用いて、「同一卵での分析値の安定性評価」を行った。特長卵(試験区、10羽)の卵黄中心部及び卵黄の端からサンプリングした試料をSFC/MS/MSに供したところ、56種のTAGが検出された。さらに、卵黄中心部及び卵黄の端の2群においてStudent's *t*-testを実施したところ、56種全てのTAGに対して統計学的有意差( $P < 0.05$ )は見られなかった。すなわち、TAG分子種は卵黄全体に均一に分布していることが分かった。

次に、「同一個体から産まれた鶏卵における分析値の安定性評価」を行った。同一個体から別日に採取した特長卵(試験区、9羽)のリピドーム解析結果を比較したところ、56種のTAG変動率の平均値は80～107%の範囲内に入った。従って、同一個体から産まれた鶏卵のTAG成分はある一定範囲におさまる再現性があることが分かった。

最後に、特長卵(試験区、10羽、19鶏卵)及びレギュラー卵(対照区、10羽、16鶏卵)の比較解析を行った。12名のパネリストによる食味試験の結果、試験区は対照区と比べて、「香り」については優れている傾向があり、一方で「味」については、対照区の方が良い傾向が見られた。続いて、TAGプロファイル結果をもとにPLS-DAによる両者の判別分析を実施した。その結果、試験区と対照区はクラスター分離したことから、TAGプロファイリング技術をもとに鶏卵の質の違いを客観的に判別できることを明らかにした。また、検出された56種のTAGの中で、およそ半数にあたる27種のTAG分子種において統計学的に有意な変動を示した(表1)。特に、TAG56:7(16:0/18:1/22:6)は試験区の卵黄において5倍多く存在していることが明らかとなり、この成分が官能評価の「香り」と強い相関があることが明らかになった。

## ■ 要約

本研究では、鶏卵成分の精密プロファイリングを目的として、代謝物のノンターゲットの網羅的な解析を目的とするメタボローム解析手法の適用を試みた。まず、鶏卵中の重要成分である脂溶性成分にフォーカスしたリピドーム解析システムの構築に取り組み、SFC/MS/MSによる鶏卵に含まれる脂溶性成分の包括的なプロファイリングシステムを構築した。また、TAGの包括的かつ精確な分析手法の開発にも成功した。続いて、開発した分析手法を用いて「同一卵での分析値の安定性評価」及び「同一個体から産まれた鶏卵における分析値の安定性評価」を行った。その結果、卵黄のサンプリング部位は解析結果に影響を与えず、TAG分子種が卵黄全体に均一に分布していることを明らかにした。また、同一個体から産まれた鶏卵においても、TAGプロファイル結果は類似しており、鶏卵の質は日間で大きく変動しないことを示した。最後に、特長卵とレギュラー卵のリピドーム解析を実施したところ、両者のTAGプロファイルは大きく異なり、統計学的に有意に変動した成分が卵黄の「香り」や「味」に大きく寄与していることが示唆された。当該研究で開発したSFC/MS/MSによる脂質フードメタボロミクス技術は、鶏卵や鶏卵加工品の品質評価だけでなく、新製品の開発や鳥の飼育条件、鶏卵加工品の製造工程等の技術開発や管理などの様々な応用に適応可能であると考えられる。

## ■ 文 献

1. 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. *J. Biosci. Bioeng.*, 114(2), 170-175(2012).
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. *J. Biosci. Bioeng.*, 113(6), 751-758(2012).
3. Bamba, T., Lee, J.W., Matsubara, A., Fukusaki, E., Metabolic profiling of hydrophobic compounds lipids by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogra. A*, 1250, 212-219 (2012).
4. 高橋政友, 和泉自泰, 馬場健史, 【特集】フードメタボロミクス最前線. 超臨界流体テクノロジーのフードメタボロミクスへの応用. *BIO INDUSTRY*, 32(10), 17-24(2015).

表 1 特長卵とレギュラー卵の卵黄中に含まれる TAG 成分の比較

| TAG                      | Fold change (試験区/対照区) | P-value (Student's <i>t</i> -test) |
|--------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| TAG54:0 (18:0/18:0/18:0) | 0.4                   | 0.02463                            |
| TAG54:2 (18:0/18:0/18:2) | 0.4                   | 0.02177                            |
| TAG52:1 (16:1/18:0/18:0) | 0.5                   | 0.00912                            |
| TAG54:6 (16:0/18:2/20:4) | 0.6                   | 0.00549                            |
| TAG54:2 (18:0/18:1/18:1) | 0.7                   | 0.01753                            |
| TAG54:1 (18:0/18:0/18:1) | 0.7                   | 0.03374                            |
| TAG48:0 (16:0/16:0/16:0) | 0.7                   | 0.00609                            |
| TAG48:0 (14:0/16:0/18:0) | 0.7                   | 0.00866                            |
| TAG46:0 (14:0/16:0/16:0) | 0.7                   | 0.00589                            |
| TAG52:0 (16:0/18:0/18:0) | 0.7                   | 0.03470                            |
| TAG56:6 (18:1/18:1/20:4) | 0.7                   | 0.02116                            |
| TAG54:3 (18:0/18:1/18:2) | 0.8                   | 0.04547                            |
| TAG54:5 (16:0/18:1/20:4) | 0.8                   | 0.04411                            |
| TAG52:4 (16:0/18:2/18:2) | 0.8                   | 0.03433                            |
| TAG48:1 (14:0/16:0/18:1) | 0.8                   | 0.03992                            |
| TAG50:3 (16:1/16:1/18:1) | 1.2                   | 0.01589                            |
| TAG48:2 (14:0/16:1/18:1) | 1.2                   | 0.04900                            |
| TAG50:2 (16:1/16:1/18:0) | 1.2                   | 0.02366                            |
| TAG50:3 (16:0/16:1/18:2) | 1.3                   | 0.00920                            |
| TAG50:2 (16:0/16:0/18:2) | 1.3                   | 0.03431                            |
| TAG48:2 (16:0/16:1/16:1) | 1.3                   | 0.02180                            |
| TAG50:2 (16:0/16:1/18:1) | 1.3                   | 0.00376                            |
| TAG54:5 (18:1/18:1/18:3) | 1.4                   | 0.01142                            |
| TAG48:3 (16:1/16:1/16:1) | 1.4                   | 0.01170                            |
| TAG50:4 (16:1/16:1/18:2) | 1.5                   | 0.00048                            |
| TAG54:6 (18:1/18:2/18:3) | 1.8                   | 0.00004                            |
| TAG56:7 (16:0/18:1/22:6) | 5.0                   | 0.000000001                        |