

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究」

分担研究報告書(平成25年度)

バイオテクノロジー応用食品のメタボローム解析

研究分担者 太田 大策 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 教授

研究要旨:

本研究は、バイオテクノロジーの応用によって新開発される食品中に含まれる低分子有機化合物(生体成分)を質量分析装置によって一斉分析し、安全性評価のための基礎データとすることを目的としている。平成25年度は、1) 植物性食品であるイネ科のイネ種子と、2) 動物性食品であるサケ科アマゴを解析対象とした。まず、1) イネ種子中の主要アレルゲンである 14-16 kDa タンパク質群(α-amylase/trypsin 阻害タンパク質ファミリータンパク質群)の発現を RNAi 法で抑制した RA14-pANDA 系統(GM イネ)、および非組換え体(non-GM イネ)の種子からメタノール/クロロホルム/水抽出液を調製し GC-MS を用いたメタボローム解析に供した。GC-MS 分析によるすべての計測データ(イオン化されて検出された化合物の質量値とイオン強度の情報)を用いて主成分分析したところ、GM イネと non-GM イネは独自のメタボロームを形成することが明らかとなった。標準化合物を用いて同定・定量した 52 化合物に関する主成分分析に於いても、GM イネと non-GM イネが独立したメタボロームを形成した。これらのメタボロームクラスター形成は、GM イネにおける 14 種の化合物(アミノ酸 2 種類、炭化水素 7 種類、補酵素 2 種類、脂質 1 種類、核酸 2 種類)の蓄積量の有意な増加と、2 種類の化合物(アミノ酸 1 種類、補酵素 1 種類)の蓄積量の有意な減少によるものであった。GM イネにおいては、RNAi 法によって α-amylase/trypsin 阻害タンパク質ファミリーのタンパク質群の発現が抑制された結果、種子貯蔵デンプンおよび種子貯蔵タンパク質の分解に関わる代謝活性が亢進したと考えられ、遺伝子組換えによる代謝変動の範疇に入るものと推察される。次に、2) ヒト成長ホルモン GH をアマゴで高発現させた遺伝子組換え体 GH 系統(GM アマゴ)と非組換え体(non-GM アマゴ)の 3 段階の生育ステージ(100 g, 125 g, 150 g)にある個体から採取した筋肉組織を供試し、そのメタノール/クロロホルム/水抽出液を GC-MS メタボローム解析に用いた。GC-MS 分析によるすべての計測データを用いて主成分分析したところ、GM アマゴと non-GM アマゴが形成するメタボロームには明確な差は無かった。GM アマゴでは、同定した 72 化合物のうち大部分の化合物の蓄積量に変化は認められなかったが、4 種類の化合物(cis-aconitate, GABA, glutamate, phosphate)の蓄積量が有意に減少していた。LC-MS/MS を用いた脂質プロファイリングに供した。その結果、GM アマゴと non-GM アマゴの極性脂質プロファイルに顕著な違いは認められなかった。

A. 研究目的

遺伝子組換え技術の発達には生物の遺伝情報の総体であるゲノムを人為的に改変し、多様な形質を付与することを可能とした。これまでに、アグロバクテリウム法やパーティクルガン法といった遺伝子導入技術を用い、主に作物を対象として、栽培コストの削減、日持ち性の向上、栄養価の向上などの有用形質が導入されてきた。これらの遺伝子組換え生物に導入された遺伝子の機能は多岐に渡るが、除草剤耐性や昆虫食害抵抗性、内生の代謝改変を目的とした多様な酵素タンパク質などが挙げられる。近年では、環境ストレス応答性の転写調節因子遺伝子の導入によって、乾燥ストレスや浸透圧ストレス（塩ストレス）耐性を付与した遺伝子組換え作物が注目されている。さらに、新しい遺伝子組換え技術として、ゲノム上の特定の領域を編集することが可能なゲノム編集法が実用化されつつあり、遺伝子組換え生物が今後も生まれ続けると予想される。

遺伝子組換えなどのバイオテクノロジーの応用によって新機能を賦与された生物に於いては、当初目的の機能改変を達成するとともに、全般的な細胞機能の状態を把握するための解析情報の取得も必要となる。このような解析目的には、生物の構成要素の総体を系統的に理解することを目的としたオミクス研究手法が極めて有用である。代表的なオミクス解析として、転写産物の総体を対象とするトランスクリプトーム解析、タンパク質の総体を対象とするプロテオーム解析、代謝産物の総体を対象とするメタボローム解析が挙げられる。

本研究では、質量分析によるメタボローム解析を実施し、遺伝子組換え生物における代謝動態変化の有無を明らかにし、遺伝子組換え作物の安全性評価のための基礎データを取得することを目的とした。平成 25 年度は、植物性食品であるイネ科のイネと、動物性食品であるサケ科のアマゴを解析対象

とし、GC-MS を用いた中心代謝産物の一斉解析と LC-MS を用いた極性脂質の一斉解析を実施した。

B. 研究方法

< 供試試料 >

イネ種子中の主要アレルゲンである 14-16 kDa タンパク質群をコードする遺伝子の発現が RNAi 法によって抑制された低アレルゲンイネ RA14-pANDA 系統 (GM イネ) は、東京理科大学の島田浩章教授から提供していただいた。対照区として非遺伝子組換えイネ (non-GM イネ) を用いた。これらの系統の種子を微粉末に加工した状態の試料を供試した。

ヒト成長ホルモン遺伝子を過剰発現させた遺伝子組換え高成長アマゴ (GM アマゴ) は、水産総合研究センターの名古屋博之先生から提供していただいた。対照区として非遺伝子組換えアマゴ (non-GM アマゴ) を用いた。GM および non-GM アマゴは、生重量が 100 g, 125g, 150 g に達した個体を 3 個体ずつサンプリングし、3 枚におろした片身（筋肉組織）を液体窒素で急速凍結させた後、5 mm 程度の大きさに破砕した状態の試料を供試した。

< 方法 >

1. 中心代謝産物の GC-MS 分析

1-1. 抽出

代謝物の抽出溶媒としてメタノール:クロロホルム:水 = 3:1:1 (v/v/v) 混合溶媒を用いた。内部標準として、イネでは reserpine (混合溶媒中の濃度 125 $\mu\text{g/mL}$) を、アマゴでは stigmasterol (混合溶媒中の濃度 50 $\mu\text{g/mL}$) を加えた。液体窒素を用いて予冷した乳鉢と乳棒を用いて凍結試料を磨砕し、液体窒素を用いて予冷した 2.0 mL チューブに新鮮重量で 50 mg を秤量した。そのチューブに 500 μL の氷冷したメタノール/クロロホルム/水混合溶

媒と 300 mg の石英砂を加えボルテックスミキサーを用いて 10 秒間混合し, 続いてミキサーミル MM400 (Retsch 社) にセットし frequency 30 回/毎秒で 2 分間粉碎した (アルミブロックは予め氷冷したものをを用いた). 次に, 10 分間遠心し (16,200 × g, 4 °C), 上清 500 μL を新しい 2.0 mL チューブに回収した. 回収した上清 100 μL を新しい 2.0 mL チューブに分注し, 遠心エバポレータ CC-105 (TOMY 社) で 3 時間乾固させ, さらに, 凍結乾燥機 FDU-1200 (EYELA 社) にかける 12 時間乾固させた.

1-2. 誘導体化

抽出した代謝産物の誘導体化はトリメチルシリル化剤である MSTFA

[N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide] を用いた. まず, 2.0 mL チューブ内で乾固させた試料に 40 μL の MSTFA を加え, ボルテックスミキサーを用いて 30 秒間混合した. 続いて 2.0 mL チューブを Thermomixer comfort (Eppendorf 社) にセットし 1,000 rpm, 37 °C の条件で 45 分間反応させた. 反応後の 2.0 mL チューブを 37 °C に予熱したヒートブロックに移し, 反応液の温度を徐々に室温まで下げた. 次に, 2 分間遠心し (16,200 × g, 室温), 上清 35 μL を回収した.

1-3. GC-MS の設定

誘導体化した試料の分析には, GC-TOF/MS (Autosampler, PAL GC-xt, JASCO 社; GC, Agilent 6890N, Agilent 社; MS, GCT premier, Waters 社) を用いた. MSTFA により誘導体化した試料 1 μL を GC-MS にインジェクトした. インジェクター温度は 230 °C (cold trap splitless mode) に設定した. GC の分離には HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) (Agilent Technologies 社) を

用いた. キャリアガスはヘリウムを用い, ガス流量は 1.0 mL / min とした. GC の昇温条件は, 70 °C (1 min), 1 °C/min, 76 °C (0 min), 6 °C/min, 350 °C (1 min) とした. GC-MS トランスファーラインは 250 °C, MS イオン源温度は 250 °C とした. イオン化は electron-ionization (EI) モード (70 eV) で行い, スキャン範囲は m/z 40-650 とした.

1-4. データ取得

GM および non-GM イネは, 粉末試料からそれぞれ 4 回の独立した抽出を行い, 各抽出液を 1 回 GC-MS 分析に供した. また, GM および non-GM アマゴは, 各個体由来の試料からそれぞれ 1 回抽出を行い, 各抽出液を 1 回 GC-MS 分析に供した. 得られたマスプロファイルからのピーク抽出およびピーク面積値の算出は MassLynx (Waters 社) を用いた. 個々の化合物の同定は, 93 化合物を同定することが可能な in house の化合物ライブラリ (市販標準物質の精密質量情報, フラグメントピーク情報, カラム保持時間の情報を格納) を用いた. 同定された化合物の相対含有量は, 内部標準物質のピーク面積値との比較による相対面積値として算出した.

1-5. データ解析

GM と non-GM それぞれから検出された代謝産物について, 平均値の差を Student's t-test により検定した. また, 主成分分析 (Principal component analysis) により GM と non-GM の代謝プロファイルを比較した. Student's t-test は Microsoft Excel (Microsoft 社) を用い, 主成分分析は統計解析ソフト Pirouette (Infometrix 社) を用いた.

2. 極性脂質の LC-MS 分析

2-1. 総脂質の抽出

アマゴ筋肉組織からの総脂質の抽出は Folch method¹⁾ の改変法を用いた。総脂質の抽出溶媒として クロロホルム:メタノール = 2:1 (v/v) 混合溶媒を用いた。

液体窒素を用いて予冷した乳鉢と乳棒を用いて凍結試料を磨砕し、液体窒素を用いて予冷した 2.0 mL チューブに 50 mg (wet weight) を秤量した。そのチューブに 500 μ L の氷冷したクロロホルム/メタノール混合溶媒と 300 mg の石英砂を加えボルテックスミキサーを用いて 10 秒間混合し、ミキサーミル MM400 (Retsch 社) にセットし frequency 30 回/毎秒で 2 分間粉碎した (アルミブロックは予め氷冷したものをを用いた)。ローテーター RT-50 (TAITEC 社) にセットし室温で 15 分間攪拌した後、10 分間遠心し (16,200 \times g, 室温), 上清 450 μ L を新しい 2.0 mL チューブに回収した。回収後の残存物に 500 μ L の氷冷したクロロホルム:メタノールを加え、同様の手順で再抽出後、10 分間遠心し (16,200 \times g, 室温), 上清 450 μ L を先に回収したチューブに加えた。次に、180 μ L の 0.9% NaCl (0.2 \times volume) を加え、10 秒間ボルテックスし、3 分間遠心 (16,200 \times g, 室温) 後、上層を除去した。チューブに残存した中間層と下層を遠心エバポレータで乾固した。乾固した総脂質抽出物に 1 mL のメタノールを加え、ボルテックスミキサーを用いて 30 秒間混合し 3 分間遠心 (16,200 \times g, 室温) 後、上清を孔径 0.22 μ m の PTFE メンブレンフィルター (Millipore 社) で濾過しバイアルに回収した。

2-2. LC-MS の設定

極性脂質の分析には、LC-iontrap TOF/MS (Nano Frontier LD, Hitachi HighTechnologies 社) を用いた。クロロホルム/メタノール混合溶媒により抽出した試料 5 μ L を LC-MS にインジェクトした。LC の分離には、YMC-Pack Diol-120-NP column (150 \times

2.0 mm, 粒子径 5 μ m, YMC 社) を用いた。移動相は A (水, 0.1% ギ酸), B (アセトニトリル, 0.1% ギ酸) を用い、流量は 0.2 mL/min, カラム温度は 40 $^{\circ}$ C とした。グラジエント条件は、0 min, 3% A; 20 min, 35% A; 20.1 min, 50% A; 25 min, 50% A; 25.1 min, 3% A; 37 min, 3% A に設定した。

2-3. 開裂フラグメント情報の取得

LC-MS を用いたデータ取得は、full MS スキャンとデータ依存的 MS/MS スキャンを組み合わせて行った。Full MS のスキャン範囲は m/z 100-1500 とし、スキャン毎に m/z 400-1500 の範囲の親イオン (イオン強度順に上位 2 番目まで) を対象とし開裂フラグメントの情報を取得した。

2-4. 開裂フラグメントの情報に対する注釈付け

極性脂質の開裂フラグメント情報に対する注釈付けには LipidBlast ライブラリ²⁾ を用いた。LipidBlast ライブラリはインシリコで予測された脂質分子の開裂フラグメント情報のデータベースであり、極性脂質を中心として約 12 万の脂質分子の開裂フラグメント情報が格納されている

(<http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/LipidBlast>)。

LipidBlast ライブラリを利用して脂質分子に注釈付けをおこなった³⁾。まず、NIST Mass Spectral Search Program (version 2.0) に LipidBlast ライブラリをインポートし、相同性検索のリファレンスライブラリとして指定した。次に、LC-MS を用いて取得した脂質分子の開裂フラグメント情報を分析データごとに Mascot Generic Format (MGF) ファイルとして取り出し、NIST Mass Spectral Search Program にインポートした。1 個の MGF ファイルには、1 回の LC-MS 分析で取得した 100 個の親イオンの開裂フラグメント情報が含まれている。個々の親イオン由来の開裂フラグメント情報をクエリとして NIST Mass Spectral

Search Program により相同性検索を実行すると、LipidBlast ライブラリに格納されている開裂フラグメント情報の中から類似性の高い開裂フラグメント情報を持つ脂質分子の構造情報が一覧として表示される。開裂フラグメント情報の類似性は dot product 値として算出される。Dot product 値は 0-1000 の範囲の値を取り、この値が大きいほど 2 者の開裂フラグメント情報の類似性が高いことを意味する。本研究では、個々のクエリに対する注釈として、dot product 値が最も高いライブラリ中の脂質分子の構造情報を採用した。これらの注釈情報のうち、dot product 値が 600 以上のものを対象として、脂質クラス、炭素鎖長、不飽和結合数の 3 通りの視点から整理して GM と non-GM 間で比較した。

C. D. 結果と考察

1. 低アレルゲン米のメタボローム解析

GM イネおよび non-GM イネの種子からメタノール/クロロホルム/水抽出液を調製し GC-MS を用いたメタボローム解析に供した。得られた GC-MS 全イオンクロマトグラム中には、アミノ酸、有機酸、単糖、二糖、三糖、脂肪酸、ステロールが含まれていた。得られた全イオンのイオン強度情報を用いて主成分分析を行った結果、各系統は独自のクラスターを形成した (Fig. 1A)。GC-MS 全イオンクロマトグラムから標準化合物の分析データに基づいて 52 化合物を同定し、その 52 化合物の蓄積量の情報を用いて主成分分析を行った結果、全イオンのイオン強度情報を用いた場合と同様に、各系統は独自のクラスターを形成した (Fig. 1B)。両者の代謝プロファイルの違いに関わる化合物を特定するために、ローディングプロットを調べたところ、GM イネにおいて高蓄積している化合物として、adenine, glycerol などが見出され、逆に non-GM イネにおいて高蓄積している化合物として、threonine, / -tocopherol (-,

および -tocopherol は RT やマススペクトルからは区別できないため、両者の面積値の合計値をもとにして評価した) などが見出された (Fig. 1C)。

次に、GM イネと non-GM イネの種子抽出物中に含まれる化合物の蓄積量の平均値の差を Student's t-test により検定した (Table 1)。同定・定量できた化合物 (合計 52 種) のうち、GM イネでは 2 種のアミノ酸類 (quinic acid, tyrosine), 7種の炭水化物類 (erythritol, glucose, myoinositol, fructose, mannitol, galactose, malate), 補酵素 2 種類 (ascorbate, pantothenate), 脂質 (glycerol), 核酸 2 種類 (adenine, cytidine) の合計 14 種類の化合物蓄積量が有意に増加しており、2 種類の化合物 (threonine, / -tocopherol) の蓄積量が有意に減少していることが分かった (Table 1)。

GM イネにおいてノックダウンされている 14-16 kDa アレルゲンタンパク質は、イネ種子の主要なタンパク質の一群であり、 α -amylase/trypsin inhibitor family に属する。これらのタンパク質群は、貯蔵多糖として種子中にデンプンを蓄えるイネにおいて、種子の登熟段階や休眠期間中の α -amylase の活性を抑制し、デンプンの蓄積を促す役割を担うと考えられる。Western-blot の結果から、GM イネ種子の 14-16 kDa タンパク質群の蓄積量の減少が示されている (東京理科大学島田教授)。今回の分析に供した GM イネ種子においては、14-16 kDa アレルゲンタンパク質 (α -amylase/trypsin inhibitor) の発現が抑制され、その結果、 α -amylase 活性が野生型に比べて高く維持されることで、デンプン分解活性および糖代謝、アミノ酸合成活性に影響が及んだ可能性が考えられた (Table 1)。

2. 高成長アマゴのメタボローム解析

GM アマゴおよび non-GM アマゴの筋肉組織成分を、GS-MS 分析による中心代謝分析と、LC-MS

による脂質プロファイリングによって比較解析した。試料のメタノール/クロロホルム/水抽出液を GC-MS を用いたメタボローム解析に供して得られた全イオンクロマトグラム中には、アミノ酸、有機酸、単糖、糖リン酸、脂肪酸、ステロールが含まれていた。得られた全イオンのイオン強度情報を用いて主成分分析を行った結果、各系統あるいは魚体重の差を反映する明確なクラスターは形成されなかった (Fig. 2)。GC-MS 分析によって同定・定量できた 72 化合物の蓄積量の差を Student's t-test により検定したところ、GM アマゴでは 4 種類の化合物 (*cis*-aconitate, glutamate, GABA, phosphate) の蓄積量が有意に減少していることが分かった (Table 2)。

次に、リン脂質などの極性脂質やトリアシルグリセロールなどの中性脂質の蓄積プロファイルを調べるために、LC-MS/MS を用いた脂質プロファイリングに供した。検出されたすべてのイオンに対し、LipidBlast ライブラリを用いて注釈情報を付与した。付与した注釈情報を脂質クラス、炭素鎖長、不飽和結合数ごとに分類し、その結果を Fig. 3 に示した。GM アマゴでは炭素鎖長が 21-25 の脂質分子の注釈数の有意な増加が認められたが (Fig. 3)、その他の脂質カテゴリでは注釈情報の数に有意な差は見られなかった。

GC-MS による中心代謝の解析と LC-MS/MS による脂質プロファイルの解析結果から、GM アマゴと non-GM アマゴの極性脂質プロファイルに顕著な違いは認められなかった。今後は魚体重に加えて、GM と non-GM 生育齢を合わせた比較メタボローム解析の実施が必要であると考えられる。

E. 参考文献

1) Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1):

497-509 (1957)

2) Kind T., Liu K.H., Lee do Y., DeFelice B., Meissen J.K., Fiehn O.: LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nat Methods*. 10(8): 755-758 (2013)

3) Takumi O., Takeshi F., Atsushi O., Rai N., Masami N., Tobias K., Oliver F., Shigehiko K., Masanori A., Daisaku O.: Exploration of polar lipid accumulation profiles in *Euglena gracilis* using LipidBlast, an MS/MS spectral library constructed in silico. *Biosci Biotechnol Biochem* (in press)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 佐々木貴子・小川拓水・岡澤敦司・三沢典彦・太田大策: 遺伝子組換えアスタキサンチン高産生レタスの代謝プロファイリング, 第 31 回日本植物細胞分子生物学会大会, (2013. 9)

2) 佐々木貴子・小川拓水・岡澤敦司・三沢典彦・太田大策: 遺伝子組換えアスタキサンチン高産生レタスのメタボローム解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会 (2014. 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

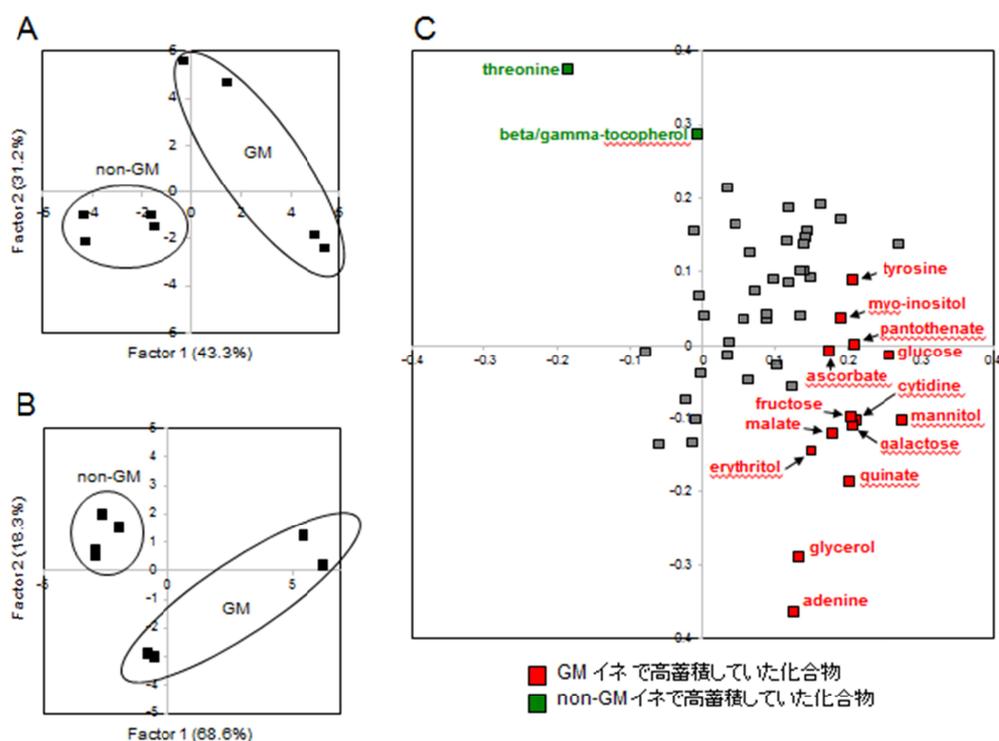


Fig. 1. GM イネ種子抽出物のメタボローム解析(主成分分析). A. GC-MS分析で計測した全イオンによる主成分分析結果. B. 同定・定量した52化合物の主成分分析. C. Bで示した52化合物の主成分分析のローディングプロット.

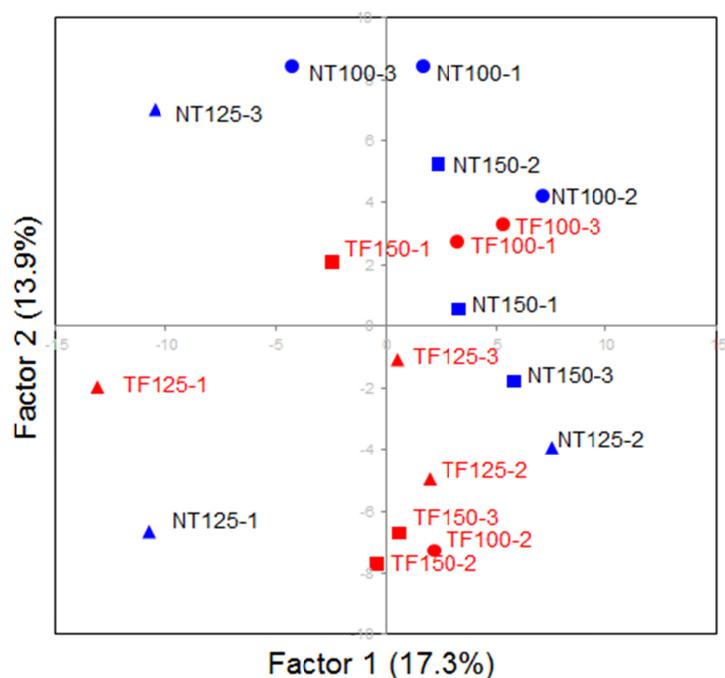


Fig. 2. GMアマゴ抽出物のGC-MSメタボローム解析(主成分分析).

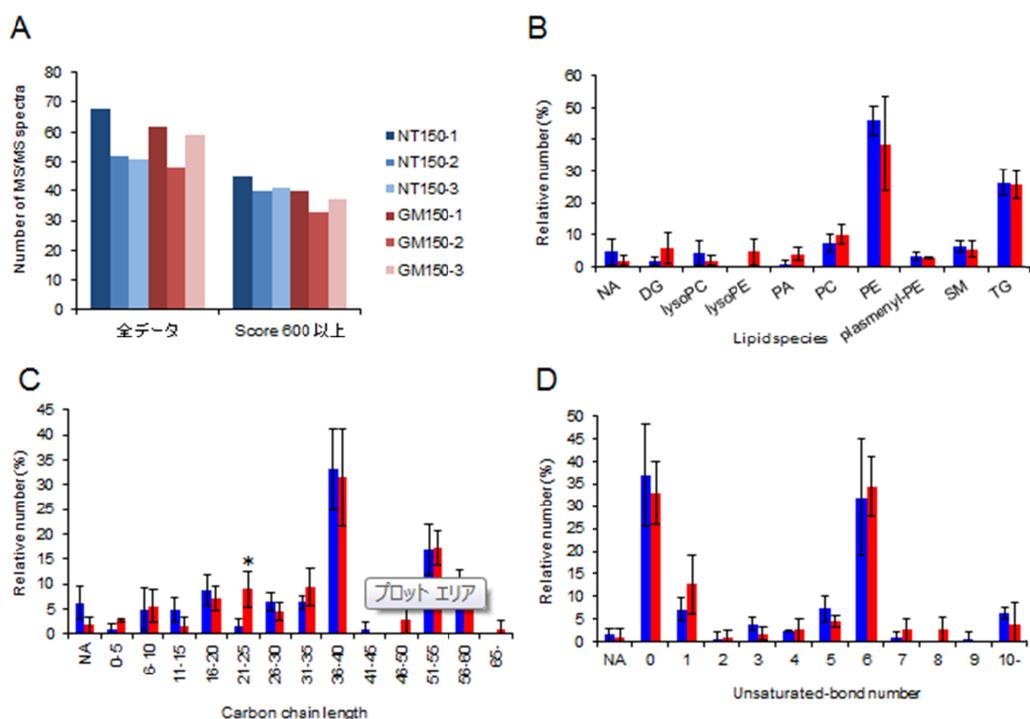


Fig. 3. LC-MS分析によるGMアマゴと non-GMアマゴの脂質プロファイルの比較。
 A. 150gの個体 (GMアマゴと non-GMアマゴ各3個体) の試料から得られたMS/MSデータの数。 B. 蓄積した脂質クラス別の註釈数の比較。 C. 炭素鎖長ごとに分類して比較した結果。 D. 不飽和結合数ごとに分類した結果。 *: t-test $p < 0.05$. ■ ; non-GM, ■ ; GM.

Super Pathway	Sub Pathway	Name	Ratio (GM/n on-GM)	t-test	
Amino acid	Aromatic amino acid metabolism (PEP derived)	quinate	6.0	**	
		tyrosine	3.4	*	
		tryptophane	2.0		
		phenylalanine	1.8		
	Aspartate family (OAA derived)	threonine	0.1	*	
		aspartate	2.0		
	Branched Chain Amino Acids (OAA derived)	isoleucine	2.0		
		leucine	2.0		
	Branched Chain Amino Acids (pyruvate derived)	valine	1.4		
		arginine	3.1		
	Glutamate family (alpha-ketoglutarate derived)	proline	2.6		
		serine	1.1		
	Serine family (phosphoglycerate derived)				
Carbohydrate	Amino sugar and nucleotide sugar	erythritol	4.6	**	
	Glycolysis	glucose	5.0	**	
		glucose-6-phosphate	1.9		
		fructose-6-phosphate	1.5		
		lactate	0.9		
		glucose-1-phosphate	0.8		
	Inositol metabolism	myo-inositol	3.1	*	
	Sucrose, glucose, fructose metabolism	fructose	5.6	**	
		mannitol	20.3	**	
		galactose	4.2	**	
		sophorose	3.2	**	
		maltose	1.2		
		1-kestose	1.3		
		sucrose	1.1		
	Trehalose		1.2		
	TCA cycle	malate	3.8	**	
		cis-aconitate	1.0		

Super Pathway	Sub Pathway	Name	Ratio (GM/n on-GM)	t-test	
Cofactors, Prosthetic Groups, Electron Carriers	Ascorbate metabolism	ascorbate	2.6	*	
	CoA metabolism	pantothenate	4.2	**	
	Nicotinate and nicotinamide metabolism	nicotinate	1.9		
	Oxidative phosphorylation	phosphate	0.9		
Tocopherol metabolism	beta/gamma-tocopherol	0.4	*		
	alpha-tocopherol	0.9			
Lipids	Free fatty acid	hexadecanoate	1.6	*	
		octadecadienoic acid	1.2		
		heptadecanoate	1.9		
	Glycerolipids	glycerol	4.9	**	
		1-palmitoylglycerol	1.4		
	Phospholipids	glycerol-2-phosphate	1.4		
	Sterols	Campesterol	0.8		
		squalene	1.3		
	Nucleotide	Purine metabolism	adenine	5.7	**
			guanine	1.2	
adenosine			1.0		
Pyrimidine metabolism		cytidine	4.9	**	
		thymidine	1.8		
uridine	0.6				
Secondary metabolism	Amine derived	tryptamine	1.9		
	Terpenoids	stigmasterol	1.5		

■ GM イネで高蓄積
 ■ non-GM イネで高蓄積
 * *: t-test $p < 0.05$, * *: t-test $p < 0.01$

Table 1. GM イネと non-GM イネの種子抽出物中の化合物蓄積量の比較

Name	Ratio (GM/non-GM)	t-test
malate	0.526	**
gamma-aminobutyrate (GABA)	0.158	**
adenine	0.509	*
glutamate	0.413	*
myo-inositol	1.566	*
phosphate	0.264	*
panthothenate	1.593	*
cis-aconitate	0.447	*
pyruvate	1.654	
beta-alanine	0.462	
5-oxoproline	0.605	
glycerol	0.588	
heptadecanoate	0.838	
putrescine	0.509	
galactose	1.034	
glucose	1.034	
erythritol	0.647	
lysine	3.776	
glycerol-2-phosphate	0.343	
ribose	0.513	
glucose-1-phosphate	0.745	
fructose	0.556	
tryptophane	1.457	
glycine	0.421	
cyanoo-alanine	0.22	
oxalosuccinate	0.446	
cystein	0.72	
nicotinate	0.724	
glycerate	0.569	
glutamine	0.225	
mannitol	1.572	
ethanolamine	0.408	
succinate	1.832	
hexadecanoate	0.503	
squalene	0.818	
uridine	0.434	

Name	Ratio (GM/non-GM)	t-test
itaconate	0.592	
agmatine	0.739	
cholesterol	0.452	
maltose	1.167	
serine	0.709	
ornithine	0.78	
ribitol	0.768	
thymidine	0.79	
sucrose	2.062	
alpha-tocopherol	0.764	
fructose-6-phosphate	0.652	
histidine	1.216	
lactate	1.311	
valine	1.263	
threonine	1.414	
arginine	0.808	
isoleucine	1.199	
1-palmitoylglycerol	0.876	
ascorbate	0.787	
leucine	1.159	
tyrosine	1.186	
glucose-6-phosphate	0.521	
ribose-5-phosphate/R5P	0.828	
phenylalanine	0.87	
tryptamine	0.728	
proline	1.396	
cytidine	1.094	
sophorose	0.913	
fumarate	0.909	
octadecadienoic acid	0.931	
3-methyl-2-oxovalerate	0.779	
beta/gamma-tocopherol	0.79	
adenosine	0.946	
guanine	1.064	
quinat	0.963	
aspartate	1.023	

■ GMアマゴで高蓄積, ■ non-GMアマゴで高蓄積, *; t-test $p < 0.05$, **; t-test $p < 0.01$

Table 2. GM アマゴと non-GM アマゴの筋肉組織抽出物中の化合物蓄積量の比較.

