

コメにおける4-アミノ酪酸（GABA）増量法の開発
ならびにその利用

2016年1月

三枝貴代

コメにおける4-アミノ酪酸（GABA）増量法の開発
ならびにその利用

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生命産業科学専攻
博士（農学）学位論文

三 枝 貴 代

目 次

図・表・写真一覧	vi
略語表	viii
論文概要	1
第1章 序論	3
第2章 水浸漬によるコメ中の遊離アミノ酸の変動と4-アミノ酪酸 (GABA) の蓄積	5
2. 1 水浸漬によるコメ中の遊離アミノ酸含量の変動	5
2. 1. 1 序	5
2. 1. 2 材料及び方法	6
2. 1. 2. 1 コメ	6
2. 1. 2. 2 コメの分画	6
2. 1. 2. 3 コメからの遊離アミノ酸の抽出	6
2. 1. 2. 4 遊離アミノ酸の定量	6
2. 1. 2. 5 水浸漬処理	7
2. 1. 3 結果	7
2. 1. 3. 1 コメ粒における遊離アミノ酸の分布	7
2. 1. 3. 2 水浸漬処理によるコメ粒各分画中の遊離アミノ酸含量の変動	8
2. 1. 4 考察	8
2. 2 コメの水浸漬処理による4-アミノ酪酸 (GABA) の蓄積	9
2. 2. 1 序	9
2. 2. 2 材料及び方法	10
2. 2. 2. 1 コメの分画と胚芽の分取	10
2. 2. 2. 2 コメ粉及びコメ胚芽中の遊離アミノ酸の抽出と定量	11
2. 2. 2. 3 コメ胚芽の水浸漬処理による GABA 生成、蓄積へのグルタミン酸 含量減少との関係についての検討、GABA 蓄積の至適温度、 至適 pH の測定	11
2. 2. 3 結果	11
2. 2. 3. 1 コメ粒各分画での GABA の経時的な蓄積	11
2. 2. 3. 2 GABA 蓄積の至適温度	12
2. 2. 3. 3 GABA 蓄積の至適 pH	12
2. 2. 4 考察	12
2. 2. 4. 1 水浸漬によるコメ粒での GABA の蓄積とその植物生理学的意味	12
2. 2. 4. 2 GABA を富化したコメの機能性食品としての利用可能性	13

第3章	水浸漬による4-アミノ酪酸（GABA）蓄積への有機溶媒脱脂等、 加工処理と GABA 富化脱脂コメ胚芽の生理作用	27
3. 1	コメ胚芽の水浸漬による GABA 蓄積への有機溶媒脱脂による影響	27
3. 1. 1	序	27
3. 1. 2	材料及び方法	27
3. 1. 2. 1	コメ胚芽	27
3. 1. 2. 2	脱脂	28
3. 1. 2. 3	GABA 含量の測定	28
3. 1. 2. 4	水分量、油分、酸価の測定	28
3. 1. 2. 5	有機溶媒残存試験	28
3. 1. 3	結果	29
3. 1. 3. 1	水浸漬処理によるコメ胚芽での GABA 蓄積への <i>n</i> -ヘキサン脱脂の 影響	29
3. 1. 3. 2	GABA 蓄積への脱脂用有機溶媒変更の影響	29
3. 1. 3. 3	GABA 蓄積への脱脂溶媒残存の影響	30
3. 1. 4	考察	30
3. 2	脱脂コメ胚芽の水浸漬処理後の遠赤外線乾燥装置利用の検討	31
3. 2. 1	序	31
3. 2. 2	材料及び方法	31
3. 2. 2. 1	遠赤外線乾燥装置の試作	31
3. 2. 2. 2	脱脂コメ胚芽の遠赤外線乾燥装置による加工	31
3. 2. 3	結果	32
3. 2. 3. 1	加水条件による影響	32
3. 2. 3. 2	乾燥温度による影響	32
3. 2. 4	考察	32
3. 3	GABA 富化脱脂コメ胚芽の更年期および初老期患者への生理作用	33
3. 3. 1	序	33
3. 3. 2	材料及び方法	33
3. 3. 2. 1	GABA 富化脱脂コメ胚芽の調製	33
3. 3. 2. 2	生理効果試験対象患者	33
3. 3. 2. 3	投与試験方法と倫理規定の事前説明	34
3. 3. 2. 4	評価方法	34
3. 3. 2. 5	解析方法	34
3. 3. 3	結果	34
3. 3. 3. 1	GABA 富化脱脂コメ胚芽経口投与による高血圧症状の改善	34
3. 3. 3. 2	GABA 富化脱脂コメ胚芽経口投与による精神症状の改善	35

3. 3. 4 考察	35
第4章 4-アミノ酪酸 (GABA) 富化用食品素材としてのコメの品種選定および栽培条件等の検討	47
4. 1 多様な遺伝背景を持つコメの胚芽での水浸漬処理による GABA の蓄積	47
4. 1. 1 序	47
4. 1. 2 材料及び方法	47
4. 1. 2. 1 コメ	47
4. 1. 2. 2 コメ胚芽の調製	47
4. 1. 2. 3 コメ胚芽の水浸漬処理と遊離アミノ酸の測定	48
4. 1. 3 結果	48
4. 1. 4 考察	48
4. 2 多様なコメ品種玄米での GABA 蓄積への早刈りの影響	49
4. 2. 1 序	49
4. 2. 2 材料および方法	50
4. 2. 2. 1 コメ	50
4. 2. 2. 1 栽培法、施肥および刈り取り時期の決定	50
4. 2. 2. 3 玄米の GABA 蓄積量の測定	50
4. 2. 3 結果	51
4. 2. 4 考察	51
4. 3 多様なコメ品種玄米での GABA 蓄積への窒素施肥条件の影響	51
4. 3. 1 序	51
4. 3. 2 材料及び方法	51
4. 3. 2. 1 コメ	51
4. 3. 2. 2 栽培法および施肥条件	52
4. 3. 2. 3 玄米の GABA 蓄積量の測定	52
4. 3. 3 結果	52
4. 3. 3. 1 穂揃期窒素追肥の影響	52
4. 3. 3. 2 幼穂形成期窒素追肥の影響	52
4. 3. 4 考察	53
4. 3. 4. 1 追肥の影響	53
4. 3. 4. 2 品種間差	54
4. 4 多様な品種・系統と、多様な産地の、玄米での遊離アミノ酸含量	54
4. 4. 1 序	54
4. 4. 2 材料および方法	54
4. 4. 2. 1 コメ	54

4. 4. 2. 2	玄米中の遊離アミノ酸量の測定	55
4. 4. 3	結果	55
4. 4. 3. 1	水浸漬処理前の遊離アミノ酸含量	55
4. 4. 3. 2	水浸漬処理による遊離アミノ酸含量の変動	56
4. 5	考察	56
第5章 乳酸菌を利用した高 GABA 蓄積玄米飼料素材の開発		 70
5. 1	コメへの添加発酵で GABA を高含量蓄積する乳酸菌の選抜	70
5. 1. 1	序	70
5. 1. 2	材料及び方法	70
5. 1. 2. 1	コメ	70
5. 1. 2. 2	乳酸菌	71
5. 1. 2. 3	発酵	71
5. 1. 2. 4	遊離アミノ酸の抽出と定量	71
5. 1. 2. 5	pH の測定及び有機酸の定量	71
5. 1. 3	結果	72
5. 1. 4	考察	72
5. 2	GABA 高蓄積乳酸菌を利用した GABA 高富化乳酸発酵米作成における コメ品種選定の影響	73
5. 2. 1	序	73
5. 2. 2	材料及び方法	73
5. 2. 2. 1	コメ及び乳酸菌	73
5. 2. 2. 2	発酵	73
5. 2. 2. 3	遊離アミノ酸抽出と定量	74
5. 2. 2. 4	pH の測定	74
5. 2. 3	結果	74
5. 2. 4	考察	74
5. 3	GABA 高蓄積乳酸菌を利用した子豚用飼料素材の開発	74
5. 3. 1	序	74
5. 3. 2	材料及び方法	75
5. 3. 2. 1	コメ及び乳酸菌	75
5. 3. 2. 2	発酵	76
5. 3. 2. 3	遊離アミノ酸の抽出と定量	76
5. 3. 2. 3	pH の測定	76
5. 3. 3	結果	76
5. 3. 4	考察	76

第6章 総合考察	・ ・ ・ ・ ・	83
6. 1 本研究のまとめ	・ ・ ・ ・ ・	83
6. 2 本研究の社会への影響と発展	・ ・ ・ ・ ・	84
6. 3 今後の展開	・ ・ ・ ・ ・	87
引用文献、参考文献	・ ・ ・ ・ ・	89
謝辞	・ ・ ・ ・ ・	106
付記	・ ・ ・ ・ ・	107

図・表・写真一覧

図 2 - 1. コメの分画。	14
図 2 - 2. コメ粒における遊離アミノ酸の分布。	17
図 2 - 3. コメ各画分を 30°C、4 時間水浸漬した時の、総遊離アミノ酸含量、 GABA 含量、グリシン含量、バリン含量、グルタミン酸含量、	21
図 2 - 4. 30°C 水浸漬処理による白米表層部分 (Fraction 1) の遊離アミノ酸含量の 変動。	22
図 2 - 5. コシヒカリ胚芽の水浸漬処理による、グルタミン酸含量と GABA 含量の 変動。	23
図 2 - 6. コシヒカリ胚芽での GABA 蓄積への温度の影響。	24
図 2 - 7. コシヒカリ胚芽での GABA 蓄積への pH の影響。	25
図 2 - 8. GABA の代謝経路 (GABA shunt)。	26
図 3 - 1. コメ胚芽脱脂時の <i>n</i> -ヘキサン温度と、脱脂後の GABA 蓄積量と油分量。	37
図 3 - 2. <i>n</i> -ヘキサン脱脂における脱脂時間と、脱脂後の GABA 蓄積量と油分量。	38
図 3 - 3. <i>n</i> -ヘキサン脱脂における脱脂回数と、脱脂後の GABA 蓄積量と油分量。	39
図 3 - 4. コメ胚芽脱脂に用いる有機溶媒組成が、脱脂後の GABA 蓄積量に与える 影響。	40
図 3 - 5. 脱脂コメ胚芽への有機溶媒添加が GABA 蓄積量に与える影響。	41
図 3 - 6. 遠赤外線試作機内の胚芽温度の推移。	42
図 3 - 7. GABA 富化脱脂コメ胚芽投与試験時の血圧変化。	45
図 4 - 1. 異なる 10 品種のコメ胚芽での水浸漬処理による GABA 蓄積量。	59
図 4 - 2. 異なる 10 品種のコメ胚芽での水浸漬処理による遊離グルタミン酸含量の 変動。	60
図 4 - 3. 植物細胞での刺激応答における Ca ²⁺ イオン、カルモデュリン (CaM) と GABA の相互作用。	61
図 4 - 4. 多様な品種・系統、産地の玄米での遊離グルタミン酸含量と、 総遊離アミノ酸含量。	67
図 4 - 5. 多様な品種・系統、産地の玄米での遊離酸性アミノ酸含量と、 総遊離アミノ酸含量。	68
図 4 - 6. 多様な品種・系統、産地の玄米での総遊離アミノ酸含量と その水浸漬処理による変動。	69
図 5 - 1. モミロマン玄米に各種乳酸菌を添加したサイレージの GABA 蓄積量と pH。	80
図 5 - 2. モミロマン玄米を各水分率に調湿したサイレージの GABA 蓄積量と pH。	81
表 2 - 1. 遊離アミノ酸定量条件 (日立 L-8500 型アミノ酸アナライザー)。	15
表 2 - 2. 遊離アミノ酸定量用生体液分析プログラム (日立 L-8500 型アミノ酸アナライザー)。	16
表 2 - 3. コメ粒の遊離アミノ酸含量分布。	18
表 2 - 4. 1 時間水浸漬処理後のコメ粒中の遊離アミノ酸含量。	19

表 2 - 5. 4 時間水浸漬処理後のコメ粒中の遊離アミノ酸含量。	・ ・ ・ ・ ・	20
表 3 - 1. 遠赤外線試作機を用いた GABA 富化脱脂コメ胚芽の乾燥温度による 水分量と GABA 蓄積量。	・ ・ ・ ・ ・	43
表 3 - 2. GABA 富化脱脂コメ胚芽による精神症状改善効果。	・ ・ ・ ・ ・	44
表 4 - 1. 水浸漬によるコメ胚芽での GABA 蓄積量の品種間差測定に用いたコメと、 その胚芽重量割合。	・ ・ ・ ・ ・	58
表 4 - 2. 玄米の水浸漬による GABA 蓄積量への刈り取り時期の影響。	・ ・ ・ ・ ・	63
表 4 - 3. 玄米の水浸漬による GABA 蓄積量への穂揃期追肥の影響と玄米収量。 基肥なしあるいは多肥（基肥多肥+幼穂形成期追肥）条件において。	・ ・ ・ ・ ・	64
表 4 - 4. 玄米の水浸漬による GABA 蓄積量への幼穂形成期追肥の影響と玄米収量。 基肥標準条件において。	・ ・ ・ ・ ・	65
表 4 - 5. 遊離アミノ酸含量測定に用いたコメの特性。	・ ・ ・ ・ ・	66
表 5 - 1. コシヒカリ玄米に乳酸菌を添加したサイレージ中の主要な 遊離アミノ酸含量と pH。	・ ・ ・ ・ ・	78
表 5 - 2. 各施肥条件で栽培した玄米 4 品種を用いた RO50 株での乳酸発酵後 GABA 含量。	・ ・ ・ ・ ・	79
表 5 - 3. RO50 株乳酸発酵コメ粉による子豚飼養成績。	・ ・ ・ ・ ・	82
写真 3 - 1. ギャバ富化脱脂コメ胚芽市販商品。	・ ・ ・ ・ ・	46
写真 4 - 1. 発芽玄米商品広告の一例。	・ ・ ・ ・ ・	62

略語表

Ala	:	alanine, アラニン
Arg	:	arginine, アルギニン
Asn	:	asparagine, アスパラギン
Asp	:	aspartic acid, アスパラギン酸
CaM	:	calmodulin, カルモデュリン
cv.	:	cultivar, 栽培品種
DW	:	dry weight, 乾燥重量
FW	:	fresh weight, 生重量
GAD	:	glutamate decarboxylase, グルタミン酸脱炭酸酵素
GABA	:	gamma-aminobutyric acid, 4- アミノ酪酸、ギャバ
Gln	:	glutamine, グルタミン
Glu	:	glutamic acid, グルタミン酸
Gly	:	glycine, グリシン
His	:	histidine, ヒスチジン
Ile	:	isoleucine, イソロイシン
Leu	:	leucine, ロイシン
Lys	:	lysine, リジン (リシン)
Met	:	methionine, メチオニン (メサイオニン)
<i>n-</i>	:	<i>normal</i> , 標準 (直鎖の)
ND	:	not detectable, 検出なし
PB	:	protein body, タンパク顆粒
Phe	:	phenylalanine, フェニルアラニン
Pro	:	proline, プロリン
SDS	:	sodium dodecyl sulfate, ラウリル硫酸ナトリウム塩
Ser	:	serine, セリン
Tau	:	taurine, タウリン
TCA	:	trichloroacetic acid, トリクロロ酢酸
Thr	:	threonine, トレオニン (スレオニン)
t.	:	trace, 痕跡 (一定値以下)
Tyr	:	tyrosine, チロシン
Val	:	valine, バリン
WW	:	wet weight, 湿重量

コメにおける 4-アミノ酪酸 (GABA) 増量法の開発 ならびにその利用

生命環境科学研究科 生命産業科学専攻

氏名：三枝貴代 (学籍番号：201530297)

論文概要

コメの食味決定要因は、主に物性と鮮度である。物性を決定する物質はデンプンなどの多糖類とタンパク質であり、低分子成分である核酸や、少糖類、遊離アミノ酸は、含量も少なく、食味には影響しないと考えられてきた。しかし、良食味米には、遊離の酸性アミノ酸（グルタミン酸、アスパラギン酸）が多いことが知られている。1992年、コメには存在しないとされていたオリゴ糖が、加水調理の際、酵素作用によって生成することが明らかとなった。遊離アミノ酸も、調理中に酵素作用によって増加する可能性が示唆されたので、これを確認する事を目的に実験を行った。

コメ粒中の遊離アミノ酸変動を測定するために、大量にデンプンを含む試料での酵素反応停止方法として、最終濃度 8% (w/v) のトリクロロ酢酸 (TCA) 水溶液を用いる手法を開発した。遊離アミノ酸の分布がコメ粒表面に偏っていた場合にも食味への影響が期待できることから、研削式精米機を用いてコメを表面から一定重量毎に削り取って分画した。得られたコメ粉に加水、一定温度一定時間で保温後、TCA で酵素反応を停止、ろ過して得られた抽出液をアミノ酸アナライザーで分析、遊離アミノ酸を定量した。コメ粒の表面では、遊離アミノ酸のほとんどが、水に漬けて 4 時間以内に 1.2 - 3.2 倍程度に増加、アラニンなど一部の甘味アミノ酸で呈味閾値に近づく事を確認した。一方で、遊離グルタミン酸含量は急激に減少した。この時、グルタミン酸から一分子脱炭酸反応で生成する 4-アミノ酪酸 (GABA) が生成、大量に蓄積する事を発見した。

GABA は植物がストレスを受けた時に、急速に生成、蓄積するアミノ酸である。哺乳類においては経口投与すると副交感神経に作用、血圧上昇を抑制することが知られている。籾摺や精米などによる物理的ストレスの影響は、乾燥種子ではゆっくりと進行する。水を加えることで、基質と酵素の自由度が上昇、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) が急激に作用して、コメ粒中の遊離グルタミン酸が GABA に変換されたと考えられた。この時 GABA の蓄積量は、当初存在した遊離グルタミン酸の量から推定される量よりも多く、タンパク質分解酵素も GABA の蓄積に関与したと考えられた。

コメは、日本人にとって毎日食べることが可能な食品であり、一食に食べる量も多い。GABA は長期間体内に留まらないので、安全性も高い。コメにおける GABA 蓄積現象は、通常の調理条件での加工が可能と予想され、水浸漬処理を行ったコメは機能性食品として理想的な条件を有していた。そこで、コメ粒に GABA を蓄積させ、健康補助食品として利用する事を試みた。

最初に、GABA 蓄積の条件を検討した。コメ (cv. コシヒカリ) 中の GABA は、至適 pH 5.5、至適温度 30 - 40°C で、水浸漬後 48 時間後まで連続的に増加蓄積した。玄米では、4 時間で 12.4 mg / 100 g · FW に到達、生理効果のでる 20 mg / day 摂取は容易に可能と予想された。

特に胚芽には大量の GABA (300 mg / 100 g · FW 以上) を蓄積させることが可能であった。油分の

多い胚芽は保存性を高めるために脱脂が必要となったが、*n*-ヘキサンを用いることで、GABA 蓄積量を減少させることなく脱脂することに成功した。この GABA 含量を増加させた脱脂コメ胚芽でサプリメントを試作、初老期高血圧症患者に経口投与すると、高血圧を抑制するのみでなく、精神安定作用があることが明らかとなった。そこで、本品を錠剤に加工、健康補助食品として製造、販売を行った。

次に、GABA 富化食品用に最適なコメ品種について検討した。GABA 蓄積への品種選定の影響は大きかった。ホシユタカなどの一部品種では、水浸漬中に一度増加した GABA が減少した。また、コシヒカリの倍以上 (玄米で 40 mg / 100 g ・ FW 以上) GABA を蓄積する品種 (cv. ベこごのみ) も存在した。対して栽培法では、早刈りや窒素追肥により GABA を増加させる試みには大きな成果はあがらなかった。

更に、生産費の高さが問題となっている飼料米の付加価値を上げるために、GABA のストレス低減効果を利用したコメ飼料素材の開発を試みた。病気の垂直感染を防ぐために仔豚は早めに親豚から離すが、この時ストレスによる下痢が多発し、減産に直結する。飼料米はバックサイレージ法で密封、乳酸発酵させると、加水状態でも長期保存が可能となる。乳酸菌によって下痢を防ぎ、かつ多量の GABA でストレスを低減させる飼料を作るために、まず、発酵によって玄米粉に GABA を蓄積させる効果のある乳酸菌を検索し、*Lactococcus lactis* RO50 株を選抜した。取扱い重量を減らすために加水量の削減を試み、30 % (w / w) の加水で発酵が可能であることを確認した。RO50 株と多肥栽培した GABA 蓄積能の高い多収米 (cv. モミロマン) の玄米を用い、通常の子豚舎の温度である 30℃ で、30 日程度発酵を行い、1,500 mg / kg (150 mg / 100 g ・ FW) の GABA を蓄積させたコメ飼料素材を作成することに成功した。この飼料素材を用いた飼養試験の結果、仔豚の下痢発生率低減効果が確認された。

水に漬けるだけで米の中に GABA を多量に蓄積させられる事の発見は、発芽玄米などの商品名で、多くの企業から商品化された。また、本研究をヒントに、コメ以外の種子を利用した GABA 富化食品も複数の企業で開発され、多種類販売されている。

第1章 序論

食品には、三つの機能が存在すると考えられている（大阪教育大学食物学研究室 2010）。

一次機能は、身体を維持、活動させるための物質を与える機能で、栄養機能とも呼ばれている。五大栄養素（炭水化物、脂質、タンパク質、ビタミン、ミネラル）と水分を与える機能であり、これらの成分は、摂取しない場合には生命を維持することは不可能となる。二次機能は、心地よい味、香り、食感、見た目など、主においしさに係わる機能で、嗜好・食感機能とも呼ばれている。二次機能が満たされた食事を得ることは、安心感と満足感を与え、人の心を安定させ、喜びを与える。三次機能は、食品が人の体調に与える望ましい機能であり、健康性・生体調節機能とも呼ばれる。食品の中には、体調を整えたり病気を予防したりする機能を持つ成分を含むものが多数存在する。三次機能を有する成分は機能性成分と呼ばれる。機能性成分を多く含む食品を積極的に利用しようという考えは古くから存在し、我が国でも中国大陸から伝わった「医食同源」という言葉が良く知られている。

1980年頃から、食品の三次機能を積極的に利用しようという考えが世界的に盛んになってきた。感染症による死亡率の低下に伴い、癌や心臓病などの、いわゆる成人病による死亡率が増大したためである。

米国では1990年、アメリカ国立癌研究所によって、食事による癌予防を目指し **Designer foods project** が開始された。日本でも、厚生省（現・厚生労働省）と農林水産省を中心に食品機能性成分の研究が開始された。高齢化にともなう医療費の増大が予想されたことと、農産物とその加工品の付加価値を高めて国際競争力を獲得することを目的としていた。1991年には特定保健用食品（トクホ）の制度が設けられ、1998年には最初の認可が行われている。三次機能を有する事が科学的に確認された食品は、旧来のいわゆるエビデンスのない「健康食品」と区別するために、「機能性食品」と呼ぶこととなった。

一方、我が国におけるコメの消費量は毎年減少している。年間1人当たりの消費量は精米重量に換算すれば1962年度の118.3 kg/year をピークに、2014年度には54.6 kg/year と、半減している（農林水産省「食糧需給表」より）。そのため1970年にはコメの生産調整が開始され、転作が奨励されるようになった。

炊飯米を中心とした日本食が体に良いことは良く知られている（都築 2015）。また、コメは日本の気象条件に合った作物であり、面積あたりの収量が高く、現在でも日本人にとっては主食とされている食品である。コメの自給率は96%であり、穀物消費におけるコメの割合を上げることは、食糧自給率を向上させる目的でも望ましい。コメの魅力を高め、少しでもその消費量をあげるために、1991年には農林水産省で「スーパーライス計画」が開始され、様々な性質を持つコメの育種が始まった。それまで農林水産省におけるコメの育種は、機械化や省力化に対応した栽培適正や、耐病性、多収などを主な目的としていたが、「スーパーライス計画」では、コメの食品としての二次機能と三次機能の改善、多用途化等を目指し、実需者に多くの選択肢を与えられるような魅力的な品種の開発を目指し、多種多様なコメが作出された（大坪 2002）。

コメの中に機能性成分が存在する場合、その含有率が高くなくても、毎日継続してかなりの量を食えることができることから、生理効果が発揮されやすいと考えられる。機能性のあるコメは、高齢化が進む我が国ではニーズが高いと予想される。価格的にも期待でき、輸入米との差別化が可能となり、将来性が期待された（農林水産先端技術産業振興センター 2007）。そこで、農水省所轄の研究機関（現・農研機構及び農業生物資源研究所）でも、コメの中の機能性成分の検索と、機能性成分含量の多いコメ品種の選抜、機能性成分含量を増大させるコメ加工法の開発研究が開始された。

コメの中の機能性成分としては、血糖値の急激な上昇を抑えるレジスタントスターチ（大澤・井上 2007）、レジスタントプロテイン、アラビノース（菱沼ら 2010）、腸内環境を整えるオリゴ糖、キシロオリゴ糖、高血圧症抑制や肝機能改善等の効果を有するペプチド類や遊離アミノ酸類、肝機能の改善や血中脂質代謝を改善する γ -オリザノール、抗酸化性があるトコフェロール類やタンニン、強い抗酸化性と癌抑制作用が期待できるトコトリエノール類、低密度コレステロールの低下や脂肪肝発症抑制効果のあるイノシトール、眼精疲労の回復に効果があるとされる有色米中のアントシアニンなどが期待されている（山本 2002、谷口ら 2012）。

本研究は、コメの中に、高血圧症を抑制するアミノ酸 GABA が、水に漬けるだけの簡単な加工法で増加・蓄積する現象を発見し、蓄積量を効率良く増加させる方法を開発、その新たな機能性を検討、確認、製品化を行うことを目的に行われた。

第2章 水浸漬によるコメ中の遊離アミノ酸の変動と4-アミノ酪酸 (GABA) の蓄積

2. 1 水浸漬によるコメ中の遊離アミノ酸含量の変動

2. 1. 1 序

コメの食味を決定する要因は、主に、鮮度とコメ本来の物性である。

鮮度低下による食味劣化の主たる原因は、第一に、保管中の乾燥による胴割米の発生に由来する炊飯米のべたつきや煮崩れ、調理時の吸水不調によって炊飯米が固くぼそぼそとした感触に変わる等の、物性の悪化である。第二は、脂質の酸化である。酸化は、空気中の酸素の影響と、米粒中の脂質分解酵素の作用によって起こる。酸化によって生成した脂質分解物は、デンプン類と結合して吸水性を低下させたり、異臭、いわゆる古米臭をもたらせたりする。これら鮮度低下を原因とする食味の劣化は、コメを気体透過率の低いフィルムで脱気密封包装する、低温で保管する、可能なならば籾付きのまま保管して利用直前まで籾摺りや精米を行わないこと等で、ある程度防止できる。

一方、コメ本来の物性は、主にデンプンなどの多糖類の性質とタンパク質含量によって決定する。特にデンプンにおけるアミロース・アミロペクチン比率は、コメの粘りの決定要因であり、食味の善し悪しに大きな影響を与えている。北海道におけるきらら397 (稲津 1989、佐々木ら 1990) は、アミロース・アミロペクチン比率改善のみをターゲットとして成分育種を行ったことによる良食味米開発の成功例として、広く知られている。また、タンパク質含量は、高くなることで疎水性が増し、物性が悪化してコメの味を悪くすると考えられている (日本穀物検定協会 2012)。

しかしながら、良食味米の代表であるコシヒカリと同じアミロース・アミロペクチン比率で、同じタンパク質含量のコメ品種を開発、栽培しても、コシヒカリほどはおいしくならない。原因として、一つはコシヒカリのコメ粒の物理構造が考えられている。コシヒカリはコメ粒に緻密にデンプンが詰まることで透明感のある美しい玄米外観を有している。この構造が、炊飯時の均質な膨らみと、弾力のある噛み応えをもたらしていると推定されている (池田ら 1997、杉浦ら 2013)。

アミロース・アミロペクチン比率とタンパク質含量だけで米の良食味を説明できない理由のもう一つの可能性は、これまでコメの食味とは無関係だと考えられてきた成分の影響である。核酸や少糖類、遊離アミノ酸等は、含量が元々少ないことで、人間の呈味閾値に到達しておらず、コメの食味とは関係ないと考えられてきた。

従来、コメの中の低分子成分は、生のコメを粉碎、そこから成分を抽出して定量分析されてきた。しかし1992年、田島らによって、長くコメの中には存在しないと考えられてきたオリゴ糖が、調理加工中に生成していることが発見された。コメの中にあるアミラーゼ等の多糖分解酵素が、加水操作によって働きだすことによるものと考えられる。

同様に遊離アミノ酸も、調理過程での水浸漬中に、プロテアーゼやペプチダーゼ等タンパク質分解酵素が働き、調理前よりも増加する可能が考えられた。コメに含まれるタンパク質は、粒の表面ほど含量が高い (静川ら 2002、大平ら 2009)。酵素作用による加水分解でタンパク質から遊離アミノ酸が生成した場合、人間の舌にふれるコメ粒の表面では遊離アミノ酸が呈味閾値を超える事も考

えられた。

そこで、コメを、粒の表面から複数の画分に分け、得られたコメ粉を水に浸漬し、コメの各画分の遊離アミノ酸含量について、調理前後でどの程度変動するかの測定を行うこととした。

2. 1. 2 材料及び方法

2. 1. 2. 1 コメ

コメは、良食味米であるコシヒカリを用いた。コシヒカリは、1992年広島県福山市の農水省中国農業試験場（現・農研機構近畿中国四国農業研究センター）の水田圃場にて栽培した。収穫後、稲架かけで乾燥、脱穀、籾摺りを行い、目開き1.8 mmの篩でふるって未熟粒を取り除いた。供試までは種子庫にて10°Cで保管した。

コメの水分率は105°C、16時間加熱通風乾燥を行い、重量法で求めた。使用したコメの水分率は12.5% (w/w)であった。以後、コメとコメ粉重量およびコメに含まれる成分含量は、12.5% (w/w) 水分を含んだコメの値として表示する。

2. 1. 2. 2 コメの分画

玄米を200 g計り取り、家庭用小型精米器RMA-150（柳沢精機製作所（現KYB-YS株式会社）、長野）で95%重量が残るだけの精米を行った。得られた最外層の5%重量分を糠とした。さらに、試験用研削式精米器TM5（サタケ、広島）を用い、図2-1に示した通り、コメの表面を外側から順に、以下の重量分削り取って分画した。すなわち、5 - 10%：画分1 (Fraction 1)、10 - 14%：画分2 (Fraction 2)、14 - 18%：画分3 (Fraction 3)、18 - 23%：画分4 (Fraction 4)、23 - 27%：画分5 (Fraction 5)、残ったコメ粒中心部 (27 - 100%) は遠心式粉碎器 pulluerisette 14 (FRITSCH、ドイツ) に目開き0.5 mmの篩をつけて粉碎し、画分6 (Fraction 6) とした。白米は玄米から5%重量の糠を取り除いた後に、玄米は玄米をそのまま、遠心式粉碎機 pulluerisette 14 に0.5 mm目開きの篩をつけて粉碎して供試した。また、Fraction 1 と Fraction 2 を茶こしでふるい、網目の上に残った胚芽を得た。

2. 1. 2. 3 コメからの遊離アミノ酸の抽出

コメ粉を2.00 gねじ蓋つき試験管（内径18 mm、長さ125 mm）にはかりとり、8% (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA) 水溶液を10.00 ml 添加、よく混和して1時間以上室温で保管後、定性ろ紙No. 2 (ADVANTEC、埼玉) でろ過、ろ液を更に0.45 μm孔のセルロースアセテートフィルターユニットDISMIC 25CS045AN (ADVANTEC、埼玉) でろ過、得られた溶液を、コメの遊離アミノ酸抽出液とした。

抽出は4回行い、抽出液の遊離アミノ酸量測定結果は、単純平均値で示した。

2. 1. 2. 4 遊離アミノ酸の定量

コメの遊離アミノ酸抽出液を、高速アミノ酸分析計 L-8500（日立ハイテクノロジーズ、東京）にリチウムイオン交換カラム P/N 855-3501（内径 4.6 mm、長さ 60 mm、三菱化成、東京）を接続、表 2-1 の測定条件で、表 2-2 に示す生体液分析プログラムを用いて、ニンヒドリン発色法によって定量分析を行った。

2. 1. 2. 5 水浸漬処理

コメ粉を 2.00 g ねじ蓋つき試験管（内径 18 mm、長さ 125 mm）にはかりとり、蒸留水 8.00 ml を加えて混和後、振とう機付き恒温水槽 NTS-1300（東京理科器械、東京）内でおだやかに振とう（4 cm 振とう幅で、50 往復 / min）しながら 30°C で保温、0、1、4 時間経過後、それぞれに 40 % (w/v) TCA 水溶液を 2.00 ml 添加、混和して酵素反応を停止した。

溶液を 2. 1. 2. 3 節で示した方法でろ過、得られたアミノ酸抽出液を、2. 1. 2. 4 節の方法で測定した。

実験は各試験区でそれぞれ 4 回行い、結果は単純平均値で示した。

2. 1. 3 結果

2. 1. 3. 1 コメ粒における遊離アミノ酸の分布

図 2-2 に遊離アミノ酸の生コメ粒での含量分布を示した。コメ粒の表面ほど遊離アミノ酸含量が高い事が確認された。

表 2-3 に、生米における遊離アミノ酸のコメ粒各分画での遊離アミノ酸の含量を示した。コメは 150 g (1 合) に対して水をおおよそ 220 ml (1.2 合) を加え、一定時間給水させた後、加熱炊飯する。水分の一部は炊飯中に湯気となって減少するが、炊飯後のコメ粒の中の成分含量は調理中に含量変動しない場合には、水によっておおよそ 2.4 倍に希釈されると概算される。その計算に基づくと、本実験で測定した 95 % 重量残の精米での白米中の遊離アミノ酸の内、呈味閾値（吉田ら 1966）を超えていると推定されるものは、旨みを示す酸性アミノ酸であるグルタミン酸 (Glu: 含量 16.3 mg / 100 g・FW、呈味閾値 5 mg / 100 ml) とアスパラギン酸 (Asp: 含量 8.9 mg / 100 g・FW、呈味閾値 3 mg / 100 ml) のみであったが、注意深く口に含み無味のサンプルと比較して初めて味が感じられるぎりぎりの値であり、8 割以上の人にその味が感じられる含量レベル (Glu 20 mg / 100 ml、Asp 35 mg / 100 ml) には至らず、コメの食味に大きな影響を及ぼしている可能性は低いと考えられた。また、通常の精米では、今回行った糠を 5 % 重量として残分重量が 95 % となる、いわゆる五分搗き米 (95 % 精米) よりも、より多くの糠を削り取っている。保存性を高めるためなどの目的や、栽培時に肥料過多があった場合には白米表面に苦み等が出るのでそれを取り除くことや、コメをより白く美しく見せること等が目的だが、通常、糠は 10 % 重量分削りとり、残分重量割合は玄米の 90 % となる (十分搗き米)。その場合、より多くの糠を削り取るため、Glu や Asp が呈味閾値を超える可能性は極めて低い。

しかしコメの表面に相当する Fraction 1 (95 % 精米時) と Fraction 2 (90 % 精米時) 及び糠、胚

芽では、Glu 及び Asp の含量は、確実に味が感じられる含量 (Fraction 1 の Glu: 含量 102.5 mg / 100 g・FW、呈味閾値 5 mg / 100 ml、Asp: 含量 62.5 mg / 100 g・FW、呈味閾値 3 mg / 100 ml) に到達しており、白米の実際に舌に触れる部分では、ほとんどの人にアミノ酸の味が感じられている可能性が示唆された。

2. 1. 3. 2 水浸漬処理によるコメ粒各分画中の遊離アミノ酸含量の変動

そこで、調理後遊離アミノ酸がタンパク質から加水分解されて生成、増大、はっきりとコメの味を作り出している可能性を考え、コメを水浸漬処理した後の遊離アミノ酸含量を測定した。各分画の遊離アミノ酸含量について、30°C 水浸漬処理 1 時間後の値を表 2-4 に、水浸漬処理 4 時間後の値を表 2-5 に示した。

さらに、図 2-3 に白米の表面部分に相当する Fraction 1 での、30°C 水浸漬した時の遊離アミノ酸の、水浸漬処理前の値を 1 とした時の変動割合を示した。図 2-3 に示したように、多くのアミノ酸が白米の表面 (Fraction 1) では 30°C、4 時間水浸漬で、1.2 - 3.2 倍に増大した。しかし最も食味への影響が高いと考えられたアミノ酸である Glu は減少し、Asp も増大しない結果となった。対して、4-アミノ酪酸 (GABA) が急激に増大、67.5 mg / 100 g・FW と、当初含量の 5.2 倍量蓄積した。

図 2-4 に、コメ各分画での総遊離アミノ酸含量と、GABA 含量、グリシン (Gly) 含量、バリン (Val) 含量、Glu 含量の、30°C、4 時間水浸漬処理による変動割合を示した。コメは粒の表面ほど、遊離アミノ酸含量の変動幅が大きい傾向があった。多くのアミノ酸が水浸漬によって増大したが、個々のアミノ酸は呈味域値を超えなかった。

胚芽では GABA 以外の遊離アミノ酸含量の変動量も大きかった。30°C、4 時間水浸漬処理によって、グリシン (Gly) は 4.3 倍、アラニン (Ala) は 2.1 倍に増大した。大部分の遊離アミノ酸含量が水浸漬で増大するため、胚芽では、わずか数時間で遊離アミノ酸含量の総分子量が急増する現象が、試験管内でアミノ基をニンヒドリン発色させる方法によって容易に観察できる (三枝 1995)。

2. 1. 4 考察

コメの中の遊離アミノ酸含量は、長く、呈味閾値以下と考えられてきた。吉田ら (1966) によるアミノ酸の呈味についての精密な調査結果と、生コメ中の遊離アミノ酸含量の測定値とを比較すると、コメ全粒、特に白米中の遊離アミノ酸含量は、ほとんどの人間に関知可能なレベルに到達していなかった。その一方で、良食味米では、酸性アミノ酸である Glu や Asp の含量が高いことがよく知られている (岡崎・沖 1961、松崎ら 1992)。

遊離アミノ酸には、それぞれ特有の味がある (河合 2011) が、特に Glu は、チャヤコンブ、トマトなど、多くの食品の旨味原因物質として知られている。今回の測定結果から、白米では、生コメの場合 Glu 及び Asp はコメ表面では、ほとんどすべての人間に関知可能な含量を十分に超えており、コメの味に影響を与えている可能性が高いと考えられた。また、多くのアミノ酸が呈味閾値を超えてはいないものの、炊飯に先立つ水浸漬の過程で増加した。単独のアミノ酸では閾値を超えていな

くても、アミノ酸同士は相乗効果を示す可能性が高く（田中ら 1969a、横塚ら 1969）、甘みを示すアミノ酸である Ala や Gly などは、含量が高いこともあり、味に影響を及ぼしている可能性も考えられる。

しかし、旨味アミノ酸である Glu と Asp は、コメを水に漬けると急激に減少した。これはグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の作用によると考えられる。

同時に水浸漬処理により、GABA 含量の急増が観察された。GABA は植物にストレスを与えると 5 分以内に GAD の作用で、Glu から一分子脱炭酸反応が起こり、生成、蓄積されるアミノ酸である (Wallace et al. 1984)。コメの種子は、収穫後脱穀や籾すりによって物理的なストレスを受ける。しかし玄米や白米の水分率は 12 - 15 % 程度であり、そのままでは水溶性の基質である Glu は、水溶性酵素 GAD の作用をほとんど受けない状態にある。そこに水を加えたことで、急激に酵素反応が働き出し、Glu が GABA に変換され、蓄積されたと考えられた。また、GAD は、Asp も基質とし、1/50 の活性で脱炭酸するため (千畑・柿本 1982)、GAD の活性が高いと考えられる画分では、Glu だけでなく Asp も減少したと推定される。

佐々木ら (2010) の報告によれば、食味試験では GABA は、苦みあるいは酸味を与えるアミノ酸である。旨みを示すと予想される Glu や Asp が急激に減少して GABA に変化することで、食味は悪化する可能性がある。しかし、炊飯前の水浸漬時間が延びることで、雑菌の増殖以外の理由によってコメの食味が悪くなるという報告はあまり存在しない。関・貝沼 (1982) によると、一定時間以上ならば、水浸漬時間によってコメの食味は大きく変化しない。

炊飯されたコメの表面では、Glu や Asp は減少するものの、遊離アミノ酸の総量は増大している (図 2 - 3)。増量の大きい Gly は、酸性アミノ酸の旨みを増強する効果が知られている (横塚ら 1969)。また、Gly 以外のいくつかのアミノ酸でも核酸系呈味物質と共存した時に酸性アミノ酸の旨みを増強する事が知られている (田中ら 1969b)。個々のアミノ酸の味には個性があるが、それが集まった時には全体としてアミノ酸味とでもいべき旨みが作り出されている可能性があり、それがコメの味に寄与している可能性は高い。

2. 2 コメの水浸漬処理による4-アミノ酪酸(GABA)の蓄積

2. 2. 1 序

前節で、コメ粒を調理加工中に遊離グルタミン酸が急激に減少、4-アミノ酪酸 (GABA) が精製、蓄積する現象を発見した事を報告した。

GABA はほとんどの生物に存在するが、タンパク質構成に係わらないアミノ酸である。高等植物においては低温 (Cholewa et al. 1997)、高圧 (Sasagawa et al. 2006)、機械的刺激 (Bown and Zhang 2000)、細菌感染 (Sarraj et al. 1998)、低酸素 (Shelp et al. 1995)、炭酸ガス処理 (片桐・清水 1994、Deewatthanawong et al. 2010)、カルス培養 (Wickremasinghe and Swain 1965、Tokunaga et al. 1976) など、ほとんどのストレスにおいて、急速に細胞内に流入する Ca^{2+} イオンによって活性化するグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の作用で (Snedden et al. 1995、Baum et al. 1996)、遊離グルタミン酸から短時間で生成す

ることが知られている (Bown and Shelp 1997, Shelp et al. 1999, Kinnersley and Turano 2000)。哺乳類においては、副交感神経の伝達物質であり (岡田ら 1978)、高血圧自然発症ラットに経口投与することで高血圧症を抑制することが知られている (Stanton 1963)。この性質を利用し、1987 年、チャ葉を嫌気処理することによって GABA を蓄積させた健康補助食品「ギャバロン茶」が農水省茶業試験場 (現・農研機構野菜茶業研究所) の津志田らによって開発され (Tsushida and Murai 1987、津志田ら 1987)、高血圧自然発症ラットを用いた動物実験での有効性も確認されたことから (大森ら 1987)、1992 年頃より販売されている。しかし嫌気処理は、密閉条件を必要とするため、加工には回分処理 (batch processing) を行うことになる。大量処理に向けた流れ作業 (assembly-line operation) を行えない点で、嫌気処理によるストレス負荷処理には、生産効率上の問題があった。またチャ葉の場合、収穫した当日に加工処理を行う必要もあり、大量生産は不可能である。

しかしコメ種子を水に浸漬しただけで、「ギャバロン茶」と同等、あるいはそれ以上の含量 GABA が蓄積できる可能性が高いこと、材料の保管が生のコメよりはるかに容易であること、また、コメは日本人にとって毎日食べることが可能であることなどの点から、コメに GABA を蓄積させた食品は機能性食品として理想的な条件を揃えていた。そこで、水浸漬処理の条件等を検討し、健康補助食品として利用することを試みることにした。

2. 2. 2 材料及び方法

2. 2. 2. 1 コメの分画 と胚芽の分取

コメはコシヒカリを用いた。コシヒカリは、1992 年広島県福山市の農水省中国農業試験場 (現・農研機構近畿中国四国農業研究センター) の水田圃場にて栽培した。収穫後、稲架かけで乾燥、脱穀、粃摺りを行い、目開き 1.8 mm の篩でふるって未熟粒を取り除いた。供試までは種子庫にて 10°C で保管した。

コメの水分率は 105°C、16 時間通風乾燥を行い、重量法で求めた。供試したコメの水分率は 12.5% (w/w) であった。以後、コメとコメ粉重量およびコメに含まれる成分含量は、12.5% (w/w) 水分を含んだコメの値として表示する。

コメは、玄米を 200 g 計り取り、家庭用小型精米器 RMA-150 (柳沢精機製作所 (現 KYB-YS 株式会社)、長野) で 95% 重量が残るだけの精米を行い、得られた最外層の 5% 重量分を糠とした。さらに、試験用研削式精米器 TM5 (サタケ、広島) を使い、図 2-1 に示した通り、コメの表面から各重量で削り取り、5 - 10% : Fraction 1、10 - 14% : Fraction 2、14 - 18% : Fraction 3、18 - 23% : Fraction 4、23 - 27% : Fraction 5 を得、コメ粒中心部 27 - 100% は、遠心式粉砕器 pulluerisette 14 (FRITSCH、ドイツ) に目開き 0.5 mm の篩をつけて粉砕し、Fraction 6 とした。白米は玄米から 5% 重量の糠を取り除いた後に、玄米は玄米をそのまま、遠心式粉砕機 pulluerisette 14 に 0.5 mm 目開き篩をつけて粉砕して供試した。また、Fraction 1 と Fraction 2 のコメ粉を茶こしでふるい、網目の上に残った胚芽を得た。

胚芽の水分率も 105°C、16 時間乾燥を行い、重量法で求めた。供試した胚芽の水分率は 5.9% (w

/w) であった。以後、胚芽に含まれる成分含量は、5.9% (w/w) 水分を含んだ値として表示する。

2. 2. 2. 2 コメ粉およびコメ胚芽中の遊離アミノ酸の抽出と定量

コメ粉の遊離アミノ酸の抽出と定量は、2. 1. 2. 2節に記載した方法で行った。

胚芽の遊離アミノ酸の抽出と定量は以下の通り行った。

すなわち、胚芽 0.400 g をねじ蓋つき試験管 (内径 18 mm、長さ 125 mm) にはかりとり、蒸留水を 8.00 ml 加え、振とう機付き恒温水槽 NTS-1300 (東京理科器械、東京) 内でおだやかに振とう (4 cm 振とう幅で 50 往復 / min) しながら一定温度で保温、一定時間経過後、それぞれに 40% (w / v) TCA 水溶液を 2.00 ml 添加、混和して酵素反応を停止した。反応液を定性ろ紙 No. 2 (ADVANTEC、埼玉) でろ過、ろ液を更に 0.45 μ m 孔のセルロースアセテートフィルターユニット DISMIC 25CS045AN (ADVANTEC、埼玉) でろ過、得られた溶液を、胚芽の遊離アミノ酸抽出液とした。

遊離アミノ酸抽出液を、高速アミノ酸分析計 L-8500 (日立ハイテクノロジーズ、東京) にリチウムイオン交換カラム P/N 855-3501 (内径 4.6 mm、長さ 60 mm、三菱化成、東京) を接続、表 2-1 の測定条件で、表 2-2 に示す生体液分析プログラムを用いてニンヒドリン発色法によって定量分析を行った。

それぞれ 4 回測定し、結果は単純平均値で示した。

2. 1. 2. 3 コメ胚芽の水浸漬処理による GABA 生成、蓄積へのグルタミン酸含量減少との関係についての検討、GABA 蓄積の至適温度、至適 pH の測定

胚芽での GABA 蓄積のグルタミン酸含量の減少との関係は、胚芽に蒸留水を加えた後、40°C で、0 分、5 分、10 分、20 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間保温後、酵素反応を TCA で停止、測定を行った。

至適温度は、胚芽に水を加えた後、振とう機つき恒温水槽 NTS-1300 (東京理科器械、東京) 内にねじ付き試験管を設置し、ゆるく振とう (4 cm 振とう幅で 50 往復 / min) しながら、30°C、40°C、50°C、60°C、70°C で保温、0 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、24 時間、48 時間後、酵素反応を TCA で停止し、GABA の含量を測定した。

至適 pH は、コシヒカリ胚芽に加える水を、pH 3.0、4.0、5.0、5.5 に調製した 0.1 M クエン酸緩衝液に、あるいは pH 5.5、6.0、7.0、8.0 に調製した 0.1 M リン酸緩衝液に変えて添加、40°C で 1 時間及び 4 時間経過後に酵素反応を TCA で停止し、GABA の含量を測定した。

2. 2. 3 結果

2. 2. 3. 1 コメ粒各分画での GABA の経時的な蓄積

表 2-3、表 2-4、表 2-5 及び図 2-4 に示した通り、GABA はコメ粒の表面ほど、多量に生成蓄積した。他の遊離アミノ酸と異なり Fraction 5 など、比較的コメ粒の中心近くでも水浸漬によって

増大したため、コメ全体として多量の GABA が蓄積する結果となった。

特に糠と胚芽で GABA 蓄積量が多かった。糠にはいわゆる糠臭さがあり、またリグニンやセルロースなどの消化困難で水和しづらい多糖類が多く含まれることから食味はあまり良くない。対して胚芽は、甘い味と香ばしい風味があり、試食の結果も良かったことから、以後は胚芽の利用を目指し、胚芽における GABA の蓄積条件を検討することとした。

図 2-5 にコシヒカリ胚芽での遊離グルタミン酸と GABA の含量の経時変動を示した。水に浸漬すると 10 分以内に GABA が急速に合成され、それに伴ってグルタミン酸が減少した。グルタミン酸の減少は 2 時間程度でほぼ停止したが、以後も GABA の生成、蓄積は継続し、8 時間後には当初胚芽中に存在したグルタミン酸含量 295 mg / 100 g · FW を越える 350 mg / 100 g · FW に到達した。

2. 2. 3. 2 GABA 蓄積の至適温度

図 2-6 に、各温度条件でのコメ胚芽での GABA 蓄積量を示した。至適温度は 30 – 40℃ であった。GABA の生成に関与する酵素は、50℃ を越えた程度の温度で失活すると予想された。長時間経過するとやや低めの温度で GABA の蓄積量が高くなることから、GABA の生成が植物由来の酵素の作用による可能性が高い事が示唆された。

2. 2. 3. 3 GABA 蓄積の至適 pH

図 2-7 に、各 pH 条件でのコメ胚芽での GABA 蓄積量を示した。至適 pH は 5.5 であった。

2. 2. 4 考察

2. 2. 4. 1 水浸漬によるコメ粒での GABA の蓄積とその植物生理学的意味

GAD は、大腸菌から高等動植物まで、ほとんどすべての生物が持っている重要な酵素である。GABA は、動物においては抑制性神経伝達物質としての重要性が最初に確認されたが (Bazemore et al. 1957)、植物における役割は、かつてはグルタミン酸含量の調整のために合成しているだけなのであろうと考えられていた (山中ら 1972、Selman and Cooper 1978)。しかし近年、GABA が植物の成長に重要な役割を果たす事や (Baumu et al. 1996、Kathiresan et al. 1997)、果実の登熟に関与している事 (Gallego et al. 1995) が知られるようになってきた。特に機械的な刺激によって生成蓄積した GABA が細胞の伸張を抑制する作用 (Bown and Zhang 2000) は、風の強い環境では植物の背丈が低くなることで、折れたり飛ばされたりすることを防ぐ役割があると推定される。

図 2-8 に、GABA の代謝経路を示した。GABA にはここで示された経路以外にも分解される経路があるが、GABA の合成については、生体内ではほぼ GAD の作用のみによって行われている。植物における GAD は、カルモデュリン結合部位を持つ (Gallego et al. 1995、Baum et al. 1996、Akama et al. 2001) ことで、ストレス時に Ca²⁺イオンによって素早く活性化される。コメ粒中の GAD は精製され、その性質もよく知られている (Zung et al. 2007)。活性の至適温度は 40℃、至適 pH は 5.5

であり、コシヒカリ胚芽での GABA 蓄積の至適条件と一致しており、コメでの急激な GABA 蓄積はコメの持つ GAD の働きであることが推定された。また、当初存在したグルタミン酸の量よりも多くの GABA が蓄積することから、GABA の生成蓄積は GAD だけでなく、遊離グルタミン酸を供給するタンパク質の加水分解酵素の働きが関与している事が示唆された。

2. 2. 4. 2 GABA を富化したコメの機能性食品としての利用可能性

GABA は神経伝達物質であることから、安全性については慎重に確認されてきた。経口投与のほかに腹腔内投与、皮下投与なども行われているが、急性毒性、亜急性毒性、変異原性、遺伝毒性のいずれもが確認されていない（吉國ら 2008）。血液中に入っても血液・脳関門をほとんど通過できないと考えられており（今堀・山川 1998）、投与を停止すると速やかに効果が失われることから（Stanton 1963）、機能性食品として安全性の面で、理想的ではないかと考えられている。

GABA をコメに蓄積させるためには、通常の水道水の pH である 5.5 - 6.0 程度の弱酸性環境で 30℃ 程度に保温し、数時間待つだけである。これは通常の炊飯前水浸漬に、極めて近い条件である。そのため、小さな工場や家庭でも実行がたやすい。そこで、この加工手法について特許取得を行った。

ただしコメの中の酵素を利用する必要があるため、付着している細菌の滅菌がほとんど不可能であることから、雑菌による汚染の心配が発生すると予想された。コシヒカリ胚芽では、加水後 40℃ で 24 時間経過後も GABA の蓄積はゆるやかに継続し、48 時間後にも GABA の生成増加は停止しなかったが、試料がアルコールの香りのする発酵臭を発生出したので、長期間での実験は行わないこととした。加工時の課題になり、今後解決の必要な問題と考えられる。

本実験の手法によってササニシキのコメ胚芽に GABA を蓄積させ、飼料に添加、高血圧自然発症ラットに投与したところ、GABA 蓄積前の胚芽投与時と比較して、血圧が抑制されたことが確認された（斎藤ら 1995）。

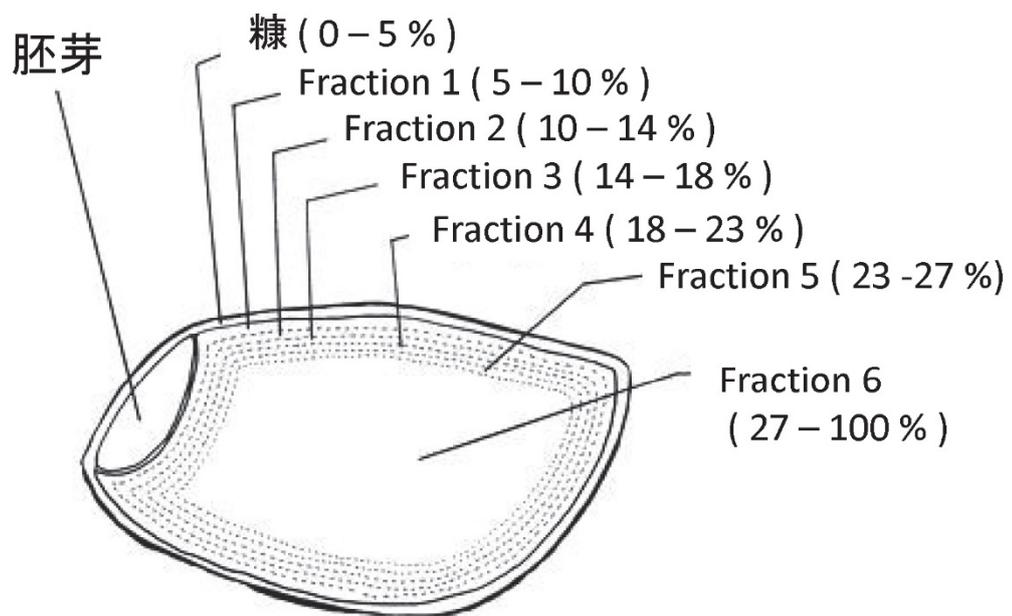


図 2-1. コメの分画。

表 2-1. 遊離アミノ酸定量条件 (高速アミノ酸分析計 L-8500)。

1. システム	
高速アミノ酸分析計 L-8500 (日立ハイテクノロジーズ、東京)	
2. 分析カラム	
リチウム型イオン交換ゲル 2622 (三菱化成、東京)	
充填カラム P/N855-3501 (4.6 × 60 mm)	
3. 溶離液 (MCIL-8500 緩衝液 PFI キット、三菱化成、東京)	
1)	クエン酸リチウム4水和物 5.73 g
	塩化リチウム 1.24 g
	クエン酸 19.90 g
	エチルアルコール 30.00 ml
	チオジグリコール 5.0 ml
	BRIJ-35 1.00g
	全量 (蒸留水で fill up する) 1000 ml
2)	クエン酸リチウム4水和物 9.80 g
	塩化リチウム 6.36 g
	クエン酸 12.00 g
	エチルアルコール 30.0 ml
	チオジグリコール 5.0 ml
	BRIJ-35 1.00g
	全量 (蒸留水で fill up する) 1000 ml
3)	クエン酸リチウム4水和物 8.79 g
	塩化リチウム 26.62 g
	クエン酸 11.27 g
	エチルアルコール 100.0 ml
	ベンジルアルコール 3.0 ml
	BRIJ-35 1.00 g
	全量 (蒸留水で fill up する) 1000 ml
4)	クエン酸リチウム4水和物 9.80 g
	塩化リチウム 28.15 g
	クエン酸 3.30 g
	BRIJ-35 1.00 g
	全量 (蒸留水で fill up する) 1000 ml
4. 発色液 (ニンヒドリン試液ワコーアミノ酸自動分析用 L-8500 セット、和光、大阪)	
5)	ニンヒドリン
	水酸化ホウ素ナトリウム入り
	プロピレングリコールモノメチルエーテル入り
	全量 (蒸留水で fill up する) 1000 ml
6)	酢酸リチウム二水和物緩衝液
	プロピレングリコールモノメチルエーテル入り
	全量 (蒸留水で fill up する) 1000 ml
5) と 6) を同量で混合して反応コイルに流す	
5. 発色反応	
カラムを通った溶離液 0.4 ml/min に	
発色液 0.4 ml/min を加熱した反応コイルで 135 °C で、1.78 min 加熱	
6. 測定	
アミノ酸は 570 nm、イミノ酸は 440 nm の吸光度で測定	
7. アミノ酸標準液	
7)	アミノ酸混合標準液 AN II 型 (和光、大阪)
8)	アミノ酸混合標準液 B 型 (和光、大阪)
7) と 8) を同僚混合して、0.2 N の塩酸水溶液で希釈して用いた	

表 2 - 2. 遊離アミノ酸定量用生体液分析プログラム
(日立 L-8500 型アミノ酸アナライザー)。

溶離時間 (min)	溶離液 (%) ¹⁾				カラム温度 (°C)
	1	2	3	4	
0 - 10	100	0	0	0	30
10 - 18	100	0	0	0	32
18 - 21	80	20	0	0	32
21 - 32	80	20	0	0	52
32 - 39	10	90	0	0	52
39 - 43	10	90	0	0	45
43 - 49	0	100	0	0	45
49 - 67	0	0	100	0	70
67 - 76	0	0	100	0	45
76 - 92	0	0	0	100	45
92 - 107	0	0	0	100	70

¹⁾ 溶離液の組成は表 2 - 1 に示した。

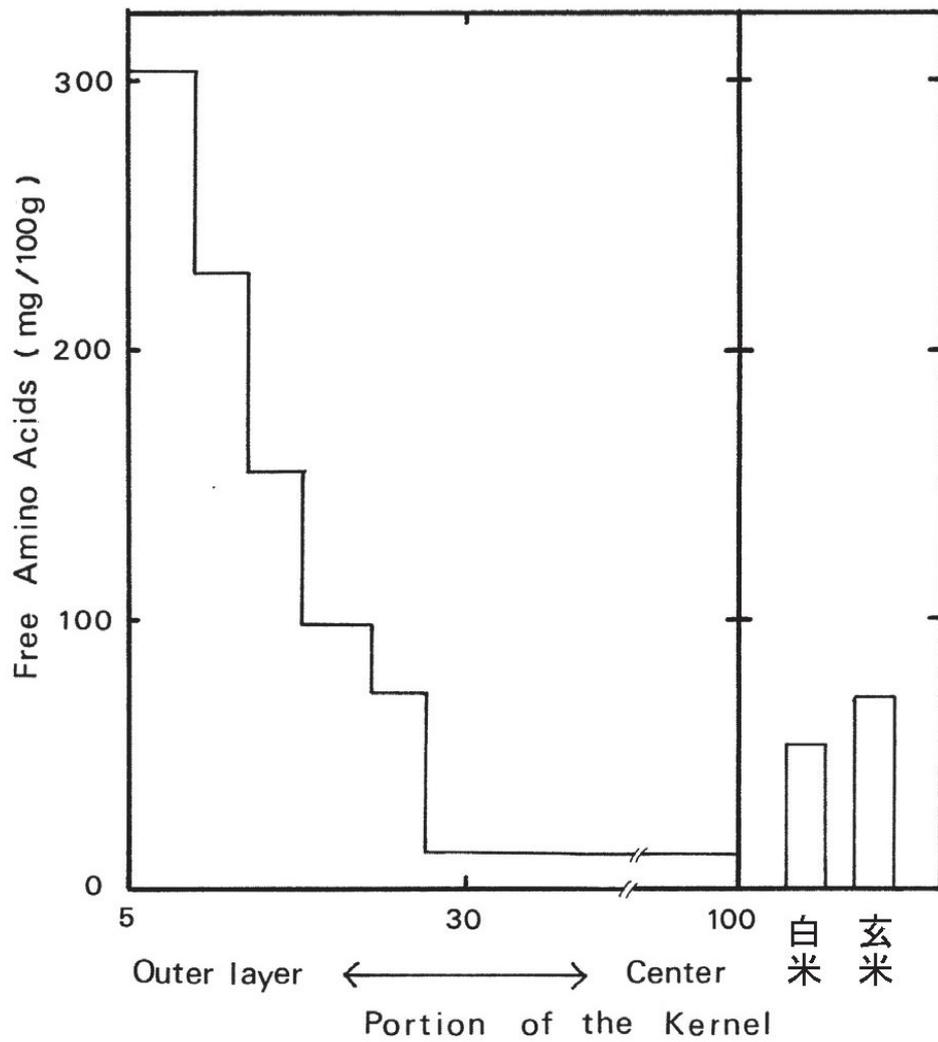


図 2-2. コメ粒における遊離アミノ酸の分布。
 コメ粉を図 2-1 で示したように外層から削り分け、それぞれ、
 8% (w/v) で抽出した。

表 2-3. コメ粒の遊離アミノ酸含量分布 (mg/100 g)。¹⁾

画分	コメ表層からの重量%																総量					
	Tau	Asp	Thr	Ser	Asn	Glu	Gln	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe		GABA	Lys	His	Arg	
Fraction 1	5-10	6.4	59.7	4.8	18.1	23.1	109.8	2.4	5.6	4.1	22.5	4.1	5.5	2.2	3.5	2.8	2.6	12.9	4.0	3.0	5.7	302.8
Fraction 2	10-14	5.3	43.8	3.8	13.2	14.2	82.1	1.7	3.7	3.1	17.4	3.3	4.4	2.0	3.3	2.5	2.3	9.8	3.2	1.8	7.1	228.0
Fraction 3	14-18	4.4	28.2	2.5	8.6	8.0	52.6	1.2	3.0	2.2	11.8	2.4	3.3	1.7	2.8	1.8	2.0	7.1	2.5	1.6	7.0	154.7
Fraction 4	18-23	3.7	15.5	1.7	5.7	5.2	32.9	0.7	1.4	1.6	7.9	1.6	2.9	1.6	2.8	0.8	1.8	4.3	1.5	0.8	3.1	97.5
Fraction 5	23-27	3.0	12.7	1.2	4.1	4.7	23.0	0.7	1.7	1.2	5.7	1.1	1.8	1.0	1.7	1.0	0.6	3.3	0.9	0.6	2.1	72.1
Fraction 6	27-100	2.5	1.9	t. ²⁾	0.7	ND ³⁾	3.9	t.	ND	0.3	0.8	t.	0.8	t.	0.5	t.	0.3	0.8	t.	t.	t.	12.5
白米	5-100	2.9	8.9	0.8	2.9	2.6	16.3	0.6	1.5	1.0	3.9	0.6	1.6	0.7	1.2	0.7	0.7	3.0	0.6	0.6	1.6	52.7
玄米	0-100	3.5	16.7	1.0	3.6	3.6	21.0	0.7	1.6	1.1	4.9	0.7	1.8	0.8	1.3	0.8	0.8	3.8	0.7	0.6	1.6	70.6
糠	0-5	8.5	72.5	5.6	20.8	28.2	#####	2.3	6.6	5.1	25.8	4.8	6.9	2.6	3.8	3.2	2.6	15.9	5.4	2.9	5.6	361.3
胚芽		7.9	#####	11.2	30.5	23.6	#####	2.4	8.4	7.6	40.4	9.3	9.3	5.2	7.7	5.4	4.1	25.4	14.1	6.9	28.6	594.9

1) コメ粉 2.00 g に 8% (w/v) TCA 水溶液を 10.00 ml 加えて、抽出を行った。測定は 4 回行った。

2) t. : 0.3 mg/100 g 未満。

3) ND : 検出できなかった。

表 2-4. 1 時間水浸漬処理後のコメ粒中の遊離アミノ酸含量 (mg / 100 g)。¹⁾

画分	コメ表層 からの																総量					
	Tau	Asp	Thr	Ser	Asn	Glu	Gln	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe		GABA	Lys	His	Arg	
Fraction 1	5.1	62.5	5.9	20.2	24.8	102.5	3.2	6.4	6.7	25.5	5.3	5.9	3.0	5.8	3.0	3.8	25.2	5.8	3.5	7.6	331.7	
Fraction 2	10-14	5.1	41.9	4.9	15.1	18.4	27.0	2.7	3.9	6.0	4.8	4.9	3.0	5.9	3.5	3.7	54.0	6.1	2.9	4.5	237.3	
Fraction 3	14-18	3.4	26.8	3.3	10.0	9.9	30.1	1.9	3.0	3.6	3.3	3.8	2.4	4.2	2.6	3.3	26.1	4.3	2.0	6.7	164.3	
Fraction 4	18-23	2.8	16.3	2.0	6.2	5.5	20.5	1.6	2.6	2.6	2.2	2.8	1.9	3.5	1.9	2.4	14.2	2.4	1.2	3.9	105.2	
Fraction 5	23-27	2.4	10.4	1.3	4.0	2.9	15.7	1.2	2.2	1.9	6.4	1.7	2.5	1.8	2.9	2.3	7.0	1.3	2.2	2.6	74.8	
Fraction 6	27-100	2.4	1.8	t. ²⁾	0.7	t.	3.7	t.	1.1	t.	0.9	t.	0.9	0.3	0.5	t.	0.8	t.	t.	t.	13.4	
白米	5-100	2.3	8.9	1.0	3.1	2.8	14.5	0.7	2.8	1.3	4.3	1.2	2.3	1.5	2.2	1.1	4.7	0.9	0.7	2.0	59.6	
玄米	0-100	2.8	11.9	1.3	4.1	4.4	17.3	0.9	3.8	1.6	6.2	1.5	2.3	1.4	2.4	1.3	9.2	1.4	0.8	2.2	78.5	
糠	0-5	6.6	75.1	7.4	23.8	26.8	#####	1.8	5.4	9.0	32.5	7.1	6.6	4.1	8.0	4.3	29.0	9.8	7.3	9.6	400.9	
胚芽		8.7	61.4	14.3	35.6	32.3	81.4	6.9	9.0	16.9	80.0	12.6	10.1	7.4	14.1	7.4	6.6	#####	20.4	12.3	41.4	645.2

1) コメ粉 2.00 g に水 8.00 ml 加えて、30℃で 1 時間おだやかに振とうしつつ保温した後、40% (w/v) TCA 水溶液を 2.00 ml 加えて混和し、ろ過、ろ液を測定した。測定は 4 回行った。

2) t. : 0.3 mg / 100 g 未満。

表 2-5. 4時間水浸漬処理後のコメ粒中の遊離アミノ酸含量 (mg/100 g)。¹⁾

画分	コメ表層 からの																総量				
	Tau	Asp	Thr	Ser	Asn	Glu	Gln	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe		GABA	Lys	His	Arg
Fraction 1	4.2	59.6	7.3	21.3	27.3	46.0	4.1	5.9	12.9	28.0	8.5	5.3	5.1	11.1	4.5	6.5	67.5	10.5	4.3	12.1	352.0
Fraction 2	3.5	40.5	5.5	15.5	18.8	18.7	3.1	4.6	8.3	19.6	6.1	4.4	8.9	8.2	3.9	5.1	60.2	7.0	3.2	12.0	257.1
Fraction 3	2.6	25.6	3.8	10.6	9.9	25.7	2.4	4.0	5.1	14.2	4.5	4.0	3.4	6.4	3.3	4.3	31.0	5.2	2.2	10.0	178.2
Fraction 4	1.9	16.3	2.2	6.4	5.7	20.0	2.0	3.4	3.2	9.5	3.2	3.1	2.6	4.7	2.8	3.8	15.1	2.6	1.3	2.3	112.1
Fraction 5	1.6	10.2	1.5	4.1	3.0	16.3	1.6	2.4	2.2	6.7	2.3	2.4	2.3	3.8	2.3	2.9	7.0	1.4	0.8	1.0	75.8
Fraction 6	1.4	1.6	t. ²⁾	0.6	t.	3.9	t.	0.9	t.	0.8	t.	0.8	0.3	0.5	t.	t.	0.7	t.	t.	t.	11.5
白米	1.1	8.1	1.0	3.1	2.7	13.8	0.9	2.4	1.5	4.4	1.5	2.4	1.7	2.8	1.7	2.3	5.5	1.2	0.8	2.1	61.0
玄米	1.2	6.0	1.7	4.7	4.2	14.9	1.4	2.5	2.9	7.0	2.3	2.2	2.2	3.7	2.3	2.9	12.4	2.4	1.3	3.4	81.6
糠	4.5	82.1	12.1	29.2	32.3	####	6.3	9.2	15.9	44.0	13.4	7.0	8.4	19.7	7.0	9.7	46.4	21.2	8.2	17.0	519.4
胚芽	8.5	60.8	19.7	41.9	36.8	91.0	15.1	13.9	33.0	84.6	18.5	11.0	11.2	23.9	10.5	10.8	####	30.4	18.5	48.3	807.7

1) コメ粉 2.00 g に水 8.00 ml 加えて、30℃で 1 時間おだやかに振とうしつつ保温した後、40% (w/v) TCA 水溶液を 2.00 ml 加えて混和し、ろ過、ろ液を測定した。測定は 4 回行った。

2) t. : 0.3 mg/100 g 未満。

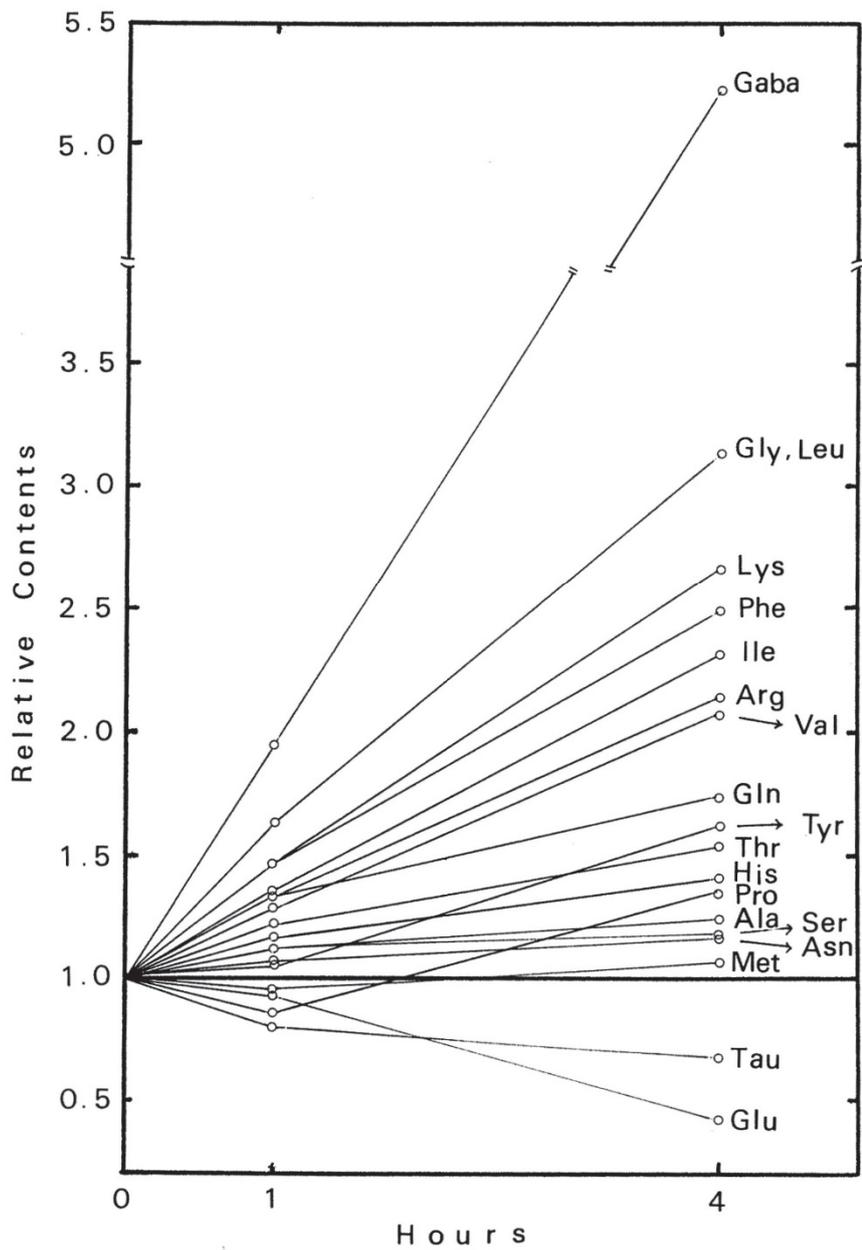


図 2-3. 30°C 水浸漬処理による白米表層部分 (Fraction 1) の遊離アミノ酸含量の変動。

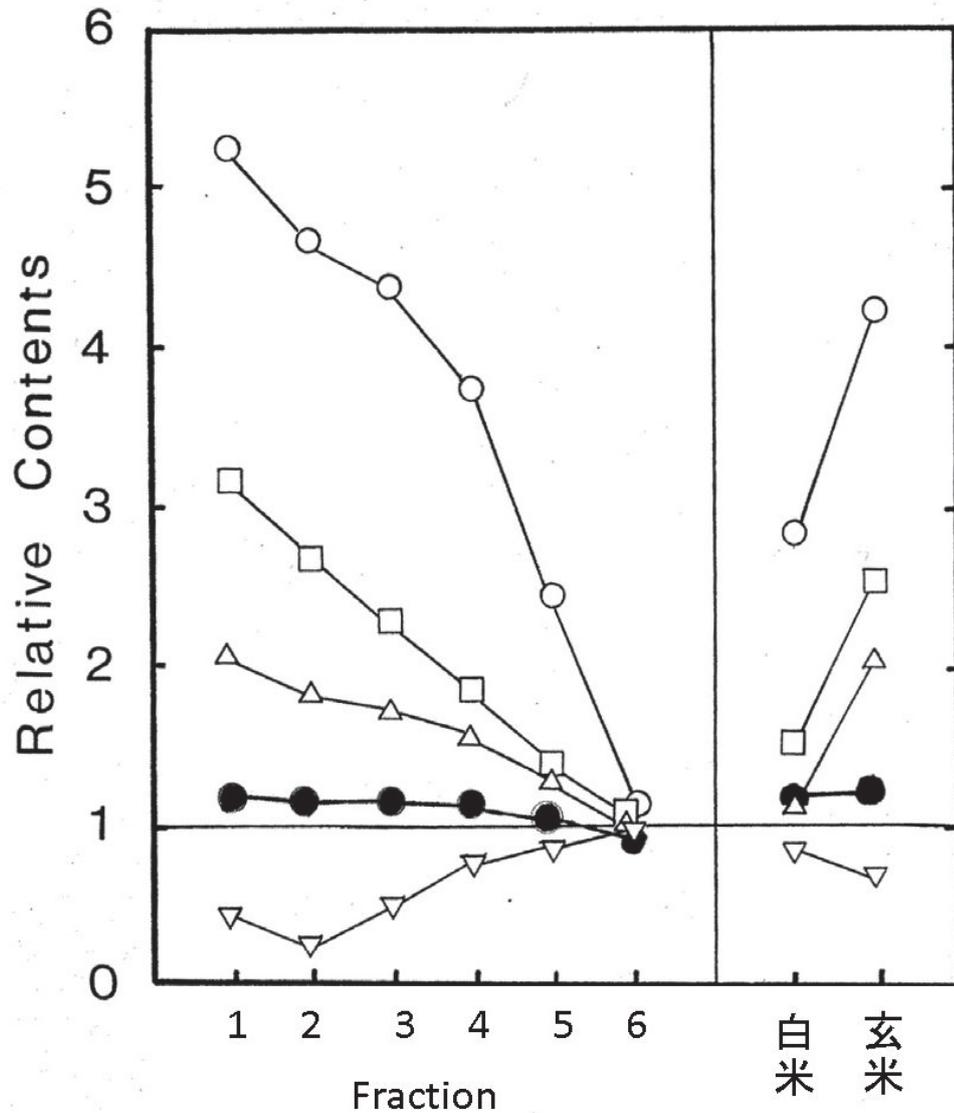


図 2-4. コメ各画分を 30°C、4 時間水浸漬した際の、総遊離アミノ酸含量、GABA 含量、グリシン含量、バリン含量、グルタミン酸含量の変動。
 コメは図 2-1 に示したように、外層から分け取った。
 ●：総遊離アミノ酸含量、○：GABA 含量、□：グリシン含量、△：バリン含量、▽：グルタミン酸含量。

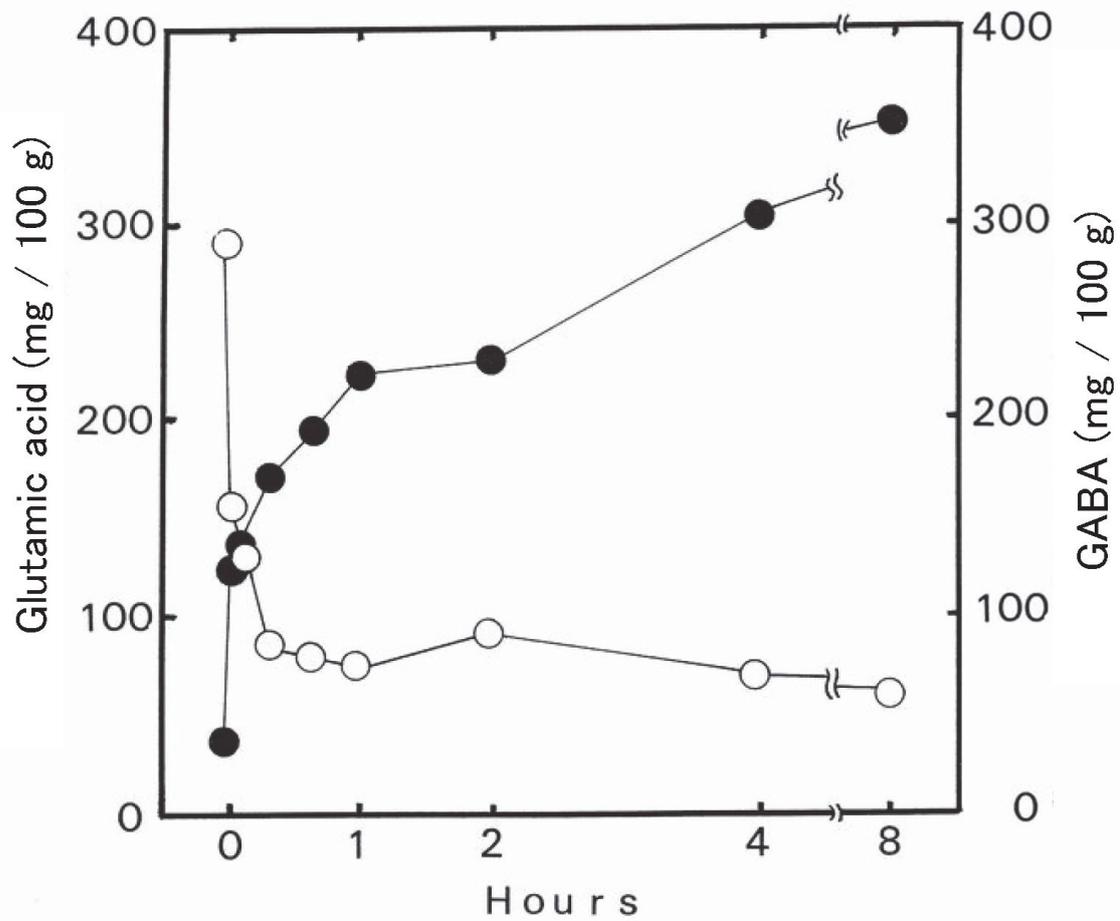


図 2-5. コシヒカリ胚芽の水浸漬処理による、グルタミン酸含量と GABA 含量の変動。
 水浸漬は 40°C で行った。
 ○ : グルタミン酸、● : GABA。

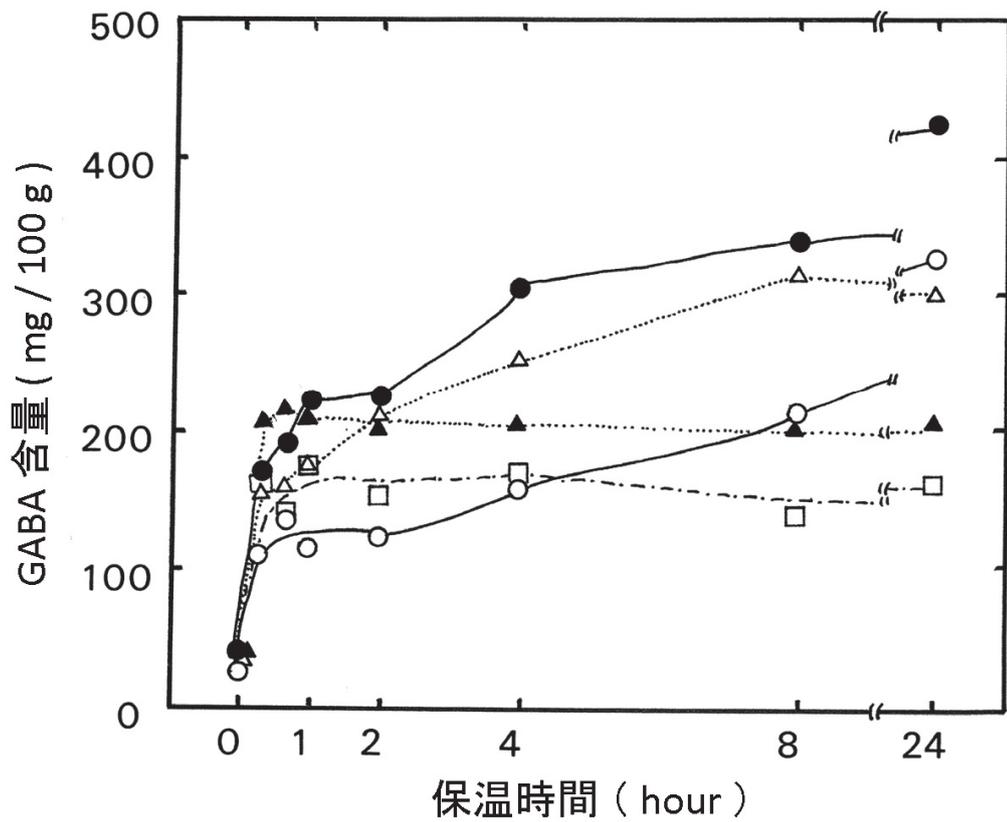


図 2-6. コシヒカリ胚芽での GABA 蓄積への温度の影響。
 ○ : 30°C、● : 40°C、△ : 50°C、▲ : 60°C、□ : 70°C。

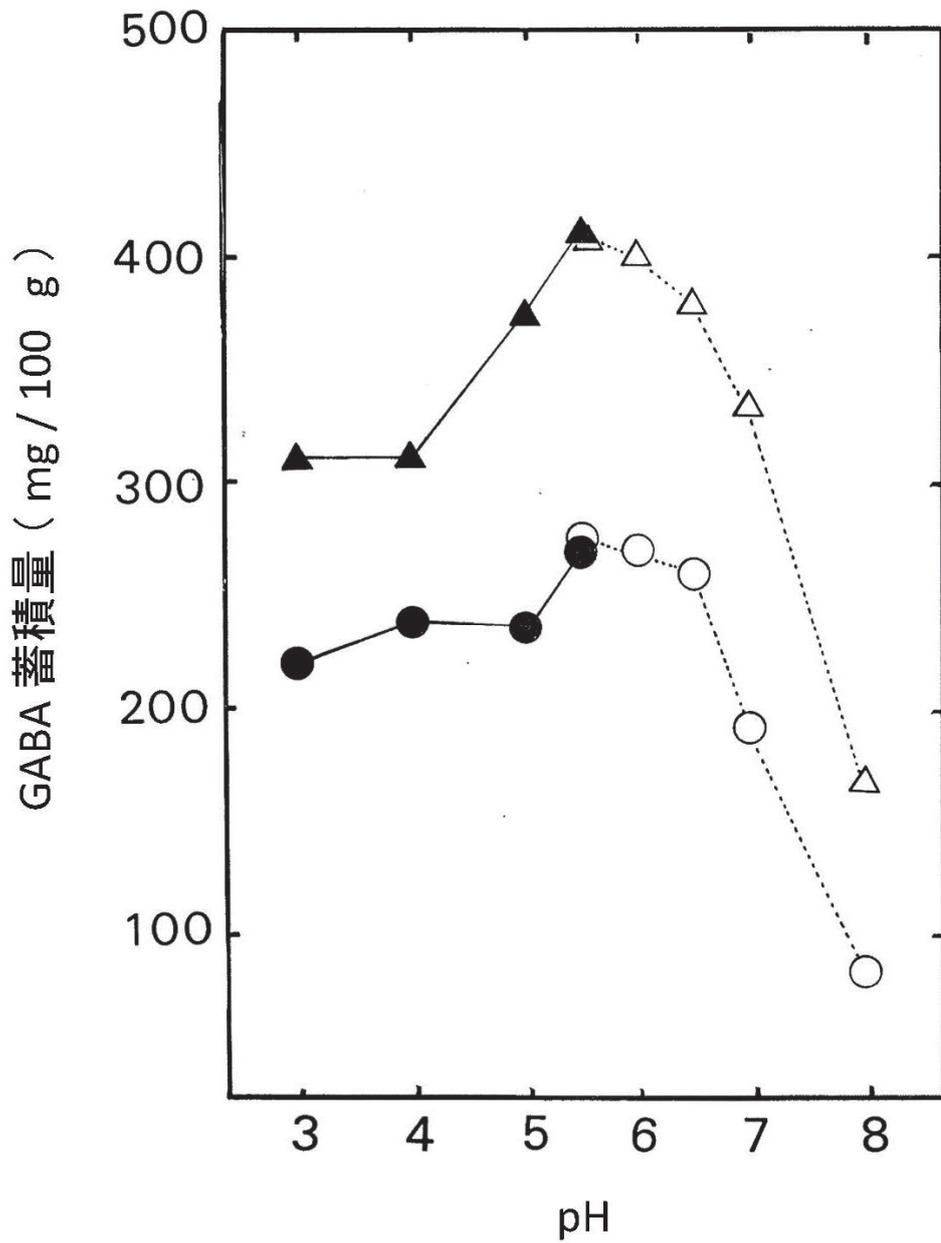


図 2-7. コシヒカリ胚芽での GABA 蓄積への pH の影響。

- , ▲ : 0.1 M クエン酸緩衝液、○, △ : 0.1 M リン酸緩衝液。
- , ○ : 40°C で 1 時間保温後、▲, △ : 40°C で 4 時間保温後。

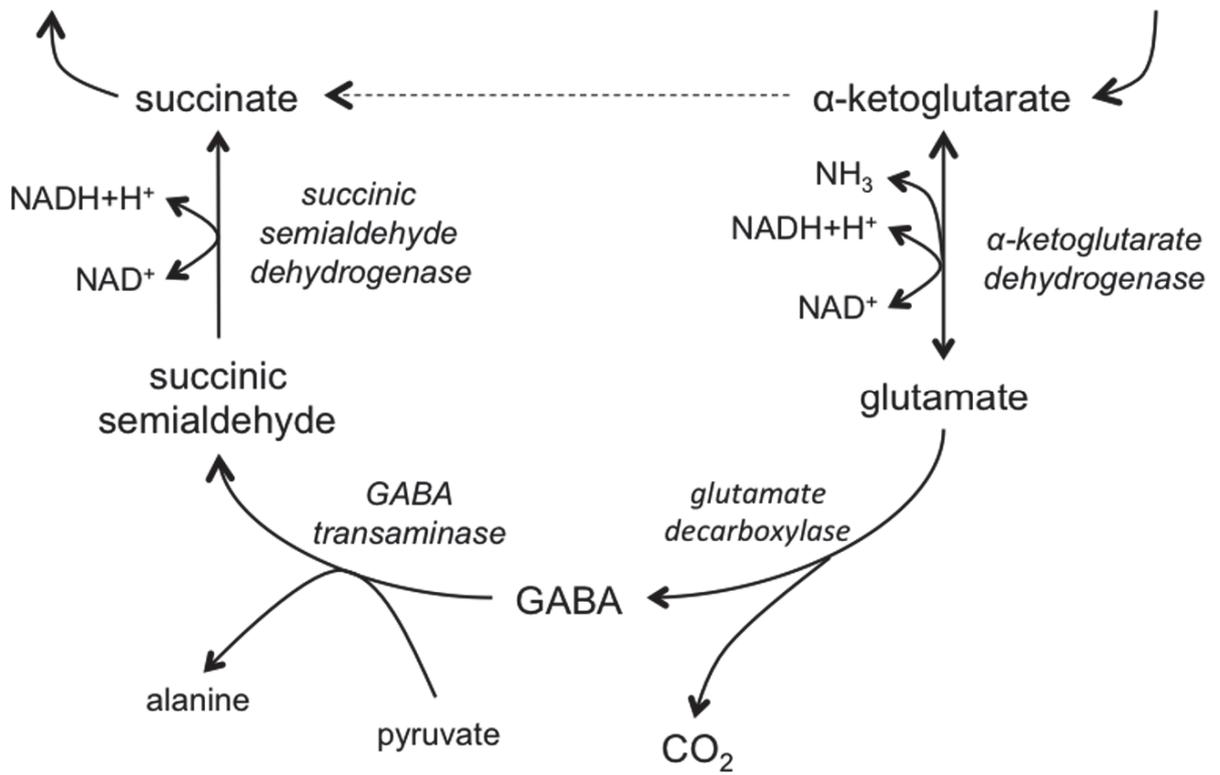


図 2-8. GABA の代謝経路 (GABA Shunt)。

(Mead et al. 2013 より)

第3章 水浸漬による4-アミノ酪酸 (GABA) 蓄積への有機溶媒脱脂等、加工処理と GABA 富化脱脂コメ胚芽の生理作用

3. 1 コメ胚芽の水浸漬による GABA 蓄積への有機溶媒脱脂による影響

3. 1. 1 序

前章で、コメを水に浸漬処理するだけで大量の4-アミノ酪酸 (GABA) が蓄積する現象を報告した。GABA 蓄積の最適条件は、弱酸性、30°C で4 - 8時間程度の静置保温であり、食品加工上、取り扱いが極めて簡単であった。また、原料の保蔵についても、通常の玄米保管方法に準じて行えるものと予想された。

高齢化や肥満によって、高血圧症患者は世界的に増加傾向にある (Chaib 2013)。GABA は、高血圧自然発症ラットの血圧上昇をゆるく抑制し (Stanton 1963)、高血圧状態のモルモットと比較して正常血圧状態のモルモットの血圧はあまり下げない (Giuliani 1986)。経口投与による安全性も高く (平野 2003)、投与を停止すると速やかに分解代謝される (横越 2008)。材料が一般的な食品であるコメであること、GABA 蓄積の原因がコメに元々含まれている植物酵素による自然な刺激応答反応であり、加工時に微生物由来の酵素製剤等の食品添加物添加を行う必要がないことなどから、消費者の安心感も高いと予想された。

特にコメ胚芽では GABA の蓄積量が多く、わずかな摂取量で十分な生理効果を発揮させる加工食品の製造が可能となることが予想された。

胚芽は、精米によって生じるコメ糠に通常3割程度含まれており、栄養価にすぐれ、食味も良好であるが、そのほとんどが利用されていない。コメ胚芽が広く利用されない理由は、胚芽に20% (w/w) 程度含まれている油分が、分解、酸敗しやすいためである。コメ粒の中に存在するコメ油は、最初に酵素作用によってリン脂質や中性脂質が加水分解されることから、劣化が開始する (Yasumatsu et al. 1964、松田・平山 1973)。米油を包んだオイルボディの脂質二重膜が精米の機械的な圧力によって破壊されて、脂質と脂質分解酵素が接触することによるものであり、酸敗は極めて短時間に起こるため、米油会社では精米後の糠を48時間以内に回収しなくてはならないとしている。

しかし、*n*-ヘキサンにより脱脂して油分を取り除くことで、残された炭水化物やタンパク質部分での古米臭の発生等が防止できる (森高ら 1972) ことが知られている。

そこで、コメ胚芽を利用した機能性食品を作成、利用するために、胚芽を脱脂して貯蔵性を高める加工を試みた。その時、脱脂条件によって、また脱脂時使用した有機溶媒の種類や残存が、水浸漬による GABA 蓄積を妨げることがないかどうかについて検討することとした。

3. 1. 2 材料及び方法

3. 1. 2. 1 コメ胚芽

胚芽は、1993年岐阜県で栽培されたササニシキ玄米を15°Cの保冷庫で貯蔵しておいたものを、1994

年2月に精米し、得られた糠から0.25 mm の目開きの篩によって分け取り、ただちに実験に用いた。

胚芽の水分含量は5.76% (w/w)、油分は21.5% (w/w)、GABA含量は37.6 mg/100 g・FWであった。

3. 1. 2. 2 脱脂

胚芽20.0 gを200 ml容の三角フラスコに入れ、有機溶媒100 mlを加え、内径0.8 mm、長さ1.2 mのガラス管を通したシリコン栓で蓋をして、振とう機付き恒温水槽 NTS-1300 (東京理科器械、東京) で一定温度に保っておだやかに振とう (4 cm 振とう幅で40 往復/min) を行った。ただし-20℃と0℃では、三角フラスコをシリコン栓で密閉、低温庫内に保管し、時々手で攪拌処理を行う方法を用いた。

一定時間経過後、混濁液を定性ろ紙 No.2 (ADVANTEC、埼玉) でろ過して胚芽を分け取った。分け取った胚芽は乾いたろ紙上に移し、デシケーター中で、室温で2時間、減圧乾燥処理を行った。

3. 1. 2. 3 GABA含量の測定

胚芽0.400 gをねじ蓋つき試験管 (内径18 mm、長さ125 mm) にはかりとり、蒸留水を8.00 ml 加え、振とう機付き恒温水槽 NTS-1300 (東京理科器械、東京) 内でおだやかに振とう (4 cm 振とう幅で50 往復/min) しながら40℃で、2時間保温後、40% (w/v) TCA 水溶液を2.00 ml 添加、混和して酵素反応を停止した。反応液を定性ろ紙 No.2 (ADVANTEC、埼玉) でろ過、ろ液を更に0.45 μm 孔のセルロースアセテートフィルターユニット DISMIC 25CS045AN (ADVANTEC、埼玉) でろ過、得られた溶液を、胚芽の遊離アミノ酸抽出溶液とした。

遊離アミノ酸抽出溶液は、高速アミノ酸分析計 L-8500 (日立ハイテクノロジーズ、東京) にリチウムイオン交換カラム P/N 855-3501 (内径4.6 mm、長さ60 mm、三菱化成、東京) を接続、表2-1の測定条件で、表2-2に示す生体液分析プログラムを用いてニンヒドリン発色法によって定量分析を行った。

測定はそれぞれ3回行った。

3. 1. 2. 4 水分量、油分、酸価の測定

水分率は、135℃、17時間加熱通風乾燥し、重量法によって求めた。

油分は、日本油化学会の基準油脂分析試験法 (1990a) に従い、エチルエーテル抽出部分の重量を測定して求めた。

酸化は、日本油化学会の基準油脂分析試験法 (1990b) に従い、エチルエーテル抽出油1 g中の遊離脂肪酸を中和するに要する水酸化カリウムのmg重量を、滴定法によって求めた。測定は3回行い、単純平均値を示した。

3. 1. 2. 5 有機溶媒残存試験

胚芽を*n*-ヘキサンにより脱脂 (40℃、2時間) 後、減圧乾燥処理 (室温、2時間) を行った胚芽に、

n-ヘキサン、あるいはエタノールを、胚芽重量に対し 0、1、10、20、50% (w/w) 添加、室温で 1 時間静置後、水浸漬処理による GABA 蓄積量を測定した。

3. 1. 3 結果

3. 1. 3. 1 水浸漬処理によるコメ胚芽での GABA 蓄積への *n*-ヘキサン脱脂の影響

コメ油の製造は、通常 *n*-ヘキサンを使用して抽出法によって行われている。そこでまず、*n*-ヘキサンを用いた脱脂によるコメ胚芽での GABA 蓄積量への影響について検討した。40°C で 2 時間常圧脱脂を行うと、コメ胚芽の油分は 21.5% (w/w) から 3.9% (w/w) に減少した。この時、酸価は 51.5 mg/g から 22.8 mg/g、油分中の遊離脂肪酸含有率は 5.54% (w/w) から 0.45% (w/w) へと減少した。生胚芽と *n*-ヘキサン脱脂胚芽は、蒸留水に浸漬する前は、それぞれ 38 mg/100 g・FW と 45 mg/100 g・DW の GABA を含んでいたが、40°C、2 時間の水浸漬処理によって、それぞれ 251 mg/100 g・FW と 329 mg/100 g・DW まで GABA が増加した。

次に、*n*-ヘキサンを用いた胚芽の脱脂における、脱脂処理温度の影響について検討を行った。図 3-1 に、常圧で 2 時間、-20、0、10、20、30、40、50、69°C の各温度条件で脱脂を行ったコメ胚芽での GABA 蓄積量 (40°C、2 時間水浸漬処理) と残存油分を示した。常圧で処理可能な最も高温の *n*-ヘキサンの沸点である 69°C での脱脂を含む、どの温度条件での脱脂でも、脱脂処理による GABA 蓄積量の減少は確認されなかった。しかし、十分に油分を取り除くためには、30°C 以上の温度での脱脂が望ましいことが示唆された。

更に、*n*-ヘキサンを用いた胚芽の脱脂における、脱脂処理時間の影響についても検討を行った。図 3-2 に、それぞれ常圧 30°C で、1、2、4、6、24 時間脱脂を行ったコメ胚芽での GABA 蓄積量 (40°C、2 時間水浸漬処理) と残存油分を示した。4 時間までは GABA 蓄積量の減少は起こらなかったが、その後はやや減少した。

n-ヘキサンを用いた脱脂における、脱脂処理回数の影響についても検討した。図 3-3 に、常圧 30°C で、各回 2 時間、1、2、3 回脱脂処理を行ったコメ胚芽での GABA 蓄積量 (40°C、2 時間水浸漬処理) と残存油分を示した。脱脂処理回数が増えると残存油分は減少するが、GABA 蓄積量は減少しなかった。

3. 1. 3. 2 GABA 蓄積への脱脂用有機溶媒変更の影響

現在、食用油脂の抽出、精製に用いることが許可されている有機溶媒は、*n*-ヘキサン、アセトン、エタノールの 3 種のみである。*n*-ヘキサン以外の有機溶媒で脱脂を行った時、胚芽での水浸漬処理による GABA 蓄積量に影響がどうかの検討を行った。

n-ヘキサンを、0、5、20、40、60、80、100% (v/v) アセトンもしくはエタノールに置き換えて脱脂を行ったコメ胚芽での GABA 蓄積量 (40°C、2 時間) を、図 3-4 に示した。*n*-ヘキサンをアセトンで置き換えた場合は、胚芽の水浸漬処理による GABA 蓄積量に有意な変化はなかった。しかしエタノールで置き換えた場合には、わずか 5% (v/v) の置き換えで、GABA 蓄積量が約 40% (w/w) も減少した。しかし、*n*-ヘキサンをエタノールに置き換える割合を増加させた時、GABA 蓄積量の減少は大きくなる

ず、100% エタノールでの脱脂処理では、*n*-ヘキサン脱脂と比べて約 20% (w/w) の減少にまで回復した。

3. 1. 3. 3 GABA 蓄積への脱脂溶媒残存の影響

コメ胚芽の脱脂を行った後、有機溶媒の残存があった場合の胚芽での水浸漬処理による GABA 蓄積量への影響について検討するために、脱脂コメ胚芽に *n*-ヘキサンもしくはエタノールを添加した条件での GABA 蓄積量 (40°C、2 時間) を測定する実験を行った。結果を図 3-5 に示した。*n*-ヘキサンの添加で GABA 蓄積量は減少しなかった。しかしエタノールの添加では、添加しない時の蓄積量が 320 mg / 100g・DW であったのに対して、10% (w/w) 添加によって GABA 蓄積量は約 1/3 の 118mg / 100 g・DW に減少、50% (w/w) 添加では約 1/5 の 76 mg / 100 g・DW まで減少した。

3. 1. 4 考察

第2章では実験にコシヒカリを用いたが、第3章では実験にササニシキを用いた。ササニシキ胚芽での GABA の蓄積量はコシヒカリ胚芽と同等、あるいはそれ以上であった。グルタミン酸含量の高い良食味米では、品種にかかわらず GABA 蓄積量が充分期待できる可能性が示唆された。

n-ヘキサンで脱脂を行うことによって、水浸漬後の胚芽での GABA 蓄積量は増大した。その増加量は油分が減少したことによる胚芽の重量減少割合から計算される値にほぼ等しく、*n*-ヘキサン脱脂では GABA 蓄積に関与する酵素の失活がほとんど起こらなかった事が示唆された。

n-ヘキサンで常圧脱脂を行う際には、図 3-1 の結果から、30°C 以上、図 3-2、図 3-3 の結果から 6 時間未満で処理することが望ましいと考えられた。6 時間以上の脱脂処理で GABA 蓄積量のわずかな減少が起こるのは、長時間 30°C で保管されたことによる酵素の失活が原因と考えられる。

脱脂に用いる溶媒については、*n*-ヘキサンと同様、アセトンを用いた脱脂でも GABA 蓄積量が減少しないことが確認された (図 3-4)。両溶媒の価格はほぼ同等であり、引火の危険など安全性についても、いずれも消防法で危険物第四類第一石油類と分類されており、ほぼ同等である。しかし *n*-ヘキサンの方が化学的に安定であること、沸点がやや高いため取り扱い上の危険が少ないこと、また使用後に水と分離させることが容易であり食用油製造工場での繰り返し使用に向いていることなど、利点が多い。そのため、通常の食用油製造には *n*-ヘキサンが用いられ、コメ油も *n*-ヘキサンで抽出製造されている。コメ胚芽を用いた機能性食品の製造にも、*n*-ヘキサンを用いた脱脂をすることが望ましいと考えられる。また、図 3-5 の結果から見て、*n*-ヘキサンならば、万が一胚芽に残存しても、水浸漬による GABA 増加加工時に、蓄積量を減少させる影響はないものと予想された。

対して、エタノールを用いた場合は、わずかな添加でも水浸漬処理による GABA 蓄積量を著しく減少させた。100% (v/v) エタノールを用いた場合よりも、*n*-ヘキサンにわずかにエタノールを加えた時の影響が大きい理由は、疎水性の高い *n*-ヘキサンと共存することによって、疎水性の高い細胞膜表面を通過しやすくなったエタノールが、より深く胚芽の細胞内親水性部分に入り込み、タンパク質変性等の影響を与えた結果だと考える。

GABA を生成するグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) は、基質も酵素も親水性であり、そのため水と親

和性の高いエタノールは、GAD の作用を強く失活させると考えられる。特に水浸漬処理を行う際のエタノールの共存は、GABA 蓄積にとって致命的であった。この事は、水浸漬処理時、処理水内にアルコール発酵を行う酵母が混入することで GABA 蓄積量が著しく減少する可能性があることを示唆しており、コメ胚芽を用いた GABA 富化食品を作成する際には、処理前に加工機械等を十分に消毒しておくことが重要であると考えられた。

3. 2 脱脂コメ胚芽の水浸漬処理後の遠赤外線乾燥装置利用の検討

3. 2. 1 序

水浸漬処理によってコメに GABA を蓄積させる際には、コメに内在する酵素を利用するため、材料の加熱殺菌はできない。GABA とその前駆体であるグルタミン酸は水溶性なので、材料を長時間水洗いすることも望ましくない。また、前節の実験結果 (図 3-5) から、材料をエタノール消毒する事を行ってはならないことが明らかとなった。従って、水浸漬でコメに GABA を蓄積させた後は、雑菌の繁殖を予防するためにすみやかに乾燥させる必要がある。

遠赤外線乾燥装置は、試料の内部まで熱を素早く伝える利点がある。GABA 胚芽を乾燥させるために、遠赤外線乾燥装置を試作し、製品の GABA 蓄積量を測定した。

3. 2. 2 材料及び方法

3. 2. 2. 1 遠赤外線乾燥装置の試作

装置は内部に金属製トレイを設置し、トレイの上下から遠赤外線を照射するように設計した。熱センサーを庫内に設置し、ヒーターの温度設定は可変にした。装置の仕様は下記の通りである。

外寸：幅 60 mm × 奥行き 700 mm L × 高さ 1480 mm。

質量：約 120 kg。

電力：遠赤外線ヒーター 3.6 KW (0.15 KW × 24 個)。

波長：ピーク 2.4 μm (温度設定 120°C の時)。

ワークトレイサイズ：幅 300 mm × 奥行き 150 mm × 高さ 50 mm。

通風方式：トレイ上部に配置した 5 本のダクト (内径 2 mm のノズル 20 個) から 200 mm Aq の圧力で送風。

3. 2. 2. 2 脱脂コメ胚芽の遠赤外線乾燥装置による加工

遠赤外線装置内に設置したトレイに *n*-ヘキサン脱脂 (常圧、40°C、2 時間処理) を行ったササニシキ胚芽 (原料は 3. 1. 2. 1 節に示した方法で分け取った) 50.0 g (水分率 19.1% (w/w)) を均質に広げ、蒸留水を加え、ヒーターを 50°C に設定、品温を 30 - 40°C 程度に維持した状態で 4 時間静置後、各温度で加熱乾燥処理を行った。

GABA の蓄積量は、3. 1. 2. 3 節で示した方法で、水分率は 3. 1. 2. 4 節に示した方法で測

定した。

3. 2. 3 結果

3. 2. 3. 1 加水条件による影響

蒸留水を胚芽の 1.5 倍 (w/w) と 3.0 倍 (w/w) 加え、ヒーターの設定温度 50.0 °C、水浸漬開始時の胚芽温度 24.0°C、4 時間静置後の胚芽温度 37.5 °C で脱脂胚芽に GABA を蓄積させた。その後ヒーター温度 70°C で 2 時間乾燥を行った時の、最終 GABA 含量と最終水分量を測定した (胚芽の最終温度は 53.1°C)。

胚芽重量の 1.5 倍 (w/w) 加水では、GABA 含量は 302 mg/100 g・WW、水分率は 12.0% (w/w)、3.0 倍 (w/w) 加水では、GABA 含量は 346 mg/100 g・WW、水分率は 14.7% (w/w) となった。蓄積する GABA の量に大きな差はないが、水分が多い方が、GABA 蓄積量がやや増える。原因はヒーターを高温に切り替えてから胚芽温度が GAD の失活する値に到達するまでに時間がかかったためだと考えられる。

3. 2. 3. 2 乾燥温度による影響

コメ胚芽は、わずかな加湿で GABA 蓄積が起こることがわかった。加える水の量が少ないほど、GABA 蓄積後の乾燥に用いるエネルギーは節約できる。そこでコメ胚芽 50.0 g (水分率 19.0% (w/w)) に、蒸留水を胚芽重量の 0.5 倍 (w/w) 加え、混和、ヒーター温度 50.0°C で 4 時間静置後 (静置後の胚芽温度は 41.0°C)、ヒーターの設定温度を 70°C、85°C、100°C に設定、乾燥を行った時の胚芽温度の推移を図 3-6 に、GABA 含量と水分量を表 3-1 に示した。

いずれの乾燥温度でも、1 時間以内に水分量 (胚芽乾物に対しての % 重量、水分率に換算すると値はやや小さくなる) は 15.0% 以下にまで減少した。ヒーターが 70°C の時は、85°C や 100°C の時よりも GABA の蓄積量がやや多かった。

いずれの乾燥温度でも加熱による GABA の減少は確認できず、すべて 300 mg/100 g・DW 以上 GABA を含む乾燥脱脂コメ胚芽を得ることができた。

3. 2. 4 考察

ヒーターを 70°C にした乾燥では GABA 蓄積量が他の温度と比べてやや多かったのは、胚芽温度が GAD の失活する温度と推定される 50 数°C (図 2-6 から推定) に到達するまでに余分の時間がかかったためであると考えられる。図 3-6 からも、本装置において胚芽温度が 50°C を越えるまでに要する時間が、他の温度設定時よりかかっている可能性が推定された。

販売されている米の水分率は、おおよそ 12 - 15% (w/w) である。穀物にカビが生えない安全な保管条件は水分率 15.0% (w/w) 以下とされており (石橋・田中 1971-1972)、脱脂コメ胚芽の保管時の水分率もこれに準じると推定される。今回試作を行った遠赤外線装置では、いずれの加熱温度でも 1 時間以内に十分に水分量が下がり、乾燥効率は極めて良好だった。試作では回分処理を行ったが、脱脂胚芽

の水浸漬、保温、乾燥を一連で行うことが可能であり、連続処理装置に改良することも容易であると推測され、GABA を水浸漬によってコメに増加させる加工作業での利用が可能と考えられた。

GABA が良く水に溶けることから、本装置を利用し脱脂コメ胚芽に GABA を増加させた後、乾燥し、テフロン加工のフライパンで焙煎、80°C の湯で抽出して、農水省中国農業試験場（現・農研機構近畿中国四国農業研究センター）にて「GABA 富化コメ胚芽茶」として 1995 年から 4 年間、一般公開にて来場者を対象に試飲を行った。香ばしくておいしいとの評価が得られたが、本装置の改良によって、GABA の蓄積から乾燥、焙煎までも一台で行うことも可能となると考えられる。

3. 3 GABA 富化脱脂コメ胚芽の更年期および初老期患者への生理作用

3. 3. 1 序

GABA は、哺乳類にとっては抑制系の神経伝達物質である (Hayashi 1958)。高血圧を抑制する (Stanton 1963) のみでなく、脳内に高濃度に存在し、脳代謝を亢進させるなどの、生理的に望ましい効果があり (Petty et al. 1990、茅場 2001)、医薬品としても利用されている。

また、予備試験 (斎藤ら 1995) において、水浸漬によって GABA を蓄積させた胚芽を高血圧自然発症ラットに投与したところ、GABA 蓄積前の胚芽と比べて高血圧を抑制する効果があることも確認された。

そこで、試作を行った GABA 富化脱脂コメ胚芽を、偽薬 (プラセボ) と比較、血圧やヒトの精神作用への影響を確認することとした。

3. 3. 2 材料及び方法

3. 3. 2. 1 GABA 富化脱脂コメ胚芽の調製

胚芽は、岐阜県内で栽培されたササニシキ玄米を精米、糠から 0.25 mm の篩をつけた分別機で分け取り、ただちに *n*-ヘキサンによる脱脂を行った。この操作によって胚芽中の油分は、22.5% (w/w) から 1.8% (w/w) に低下した。

得られた脱脂コメ胚芽 16 kg に 8 L の脱イオン水を加え、40°C で 4 時間保温し、GABA を蓄積させた。雑菌の繁殖を抑制するために、GABA 蓄積操作終了後すぐに 85°C で 15 分加熱した後、60°C に保った真空乾燥機中で水分率が 5.8% (w/w) になるまで乾燥させた。

GABA 富化脱脂コメ胚芽中の GABA 含量は、292 mg / 100 g (w/w) であった。100 g・WW 中の成分は、糖質 44.7 g、タンパク質 24.4 g、脂質 1.8 g、食物繊維 13.3 g、ナトリウム 7.46 mg であった。これを試験品とし、プラセボと比較した。

対照として用いるプラセボには、GABA 富化前の脱脂コメ胚芽を粉末化して用いた。GABA 含量は 25 mg / 100 g・WW、外観は GABA 富化脱脂コメ胚芽と同じに見えるように加工した。

3. 3. 2. 2 生理効果試験対象患者

不眠や不安、更年期障害等、精神不調を訴えている初老期女性患者 20 名（関西地区在住の日本人、通院治療）を、A 群（15 名）と B 群（5 名）に無作為に分けて実験を行った。患者の平均年齢は 49.1 才 ± 11.7 才であった。

3. 3. 2. 3 投与試験方法と倫理規定の事前説明

大阪市立大学医学部付属病院及び大阪外国語大学保険管理センターの内科外来診療所において、ダブルブラインドクロスオーバー法で行った。

投与は 1 日 3 回、患者の任意の場所において、食間、経口投与で行った。GABA 富化脱脂コメ胚芽による GABA 摂取量は 1 日あたり、26.4 mg（プラセボをでは、2.3 mg）であった。

A 群には、最初の 8 週間試験品である GABA 富化脱脂コメ胚芽を投与、その後 8 週間プラセボを投与した。B 群はその逆の順序で、最初にプラセボ、その後に試験品を各 8 週間投与した。

投与試験は 1996 年修正版ヘルシンキ宣言（日本医師会 2013）の規定に基づき、事前に試験の目的と内容について被験者に説明を行い、被験者の自由意志でいつでも試験への参加を打ち切れる事を告げ、同意を得た後に開始した。

3. 3. 2. 4 評価方法

血圧測定と聞き取りは各群、実験開始時、最初の試料の投与中（試験開始から約 4 週間後、ただし患者の都合により数日前後する場合もあった）、試験品とプラセボの切り替え時、次の試料の投与中（投与試料切り替えから約 4 週間後、ただし患者の都合により数日前後した）、試験終了時の 5 回、外来診療室で行った。

精神症状については、症状なし、症状弱、症状中、症状強の 4 段階にわけて評価した。

3. 3. 2. 5 解析方法

精神症状が完全に改善した場合を「著明改善」、1 段階改善した場合を「改善」、変化のない場合を「不変」、1 段階以上悪化した場合を「悪化」とした。「著明改善」と「改善」の合計で改善率を示した。統計処理は non-parametric 処理で行った。

3. 3. 3 結果

2. 3. 3. 1 GABA 富化脱脂コメ胚芽経口投与による高血圧症状の改善

GABA 富化コメ胚芽を投与した時の患者の血圧を、図 3-7 に示した。GABA 富化脱脂コメ胚芽を投与すると収縮期血圧、拡張期血圧ともにゆるやかに低下し、投与を停止するとほぼ元通りの値に戻った。

他のラットやヒトを用いた実験と同じく、脱脂コメ胚芽でも、GABA による血圧低下効果が確認された。また、摂取を停止すると、摂取の影響がすみやかに消失することも確認され、本製品の安全性を示していると考えられた。

3. 3. 3. 2 GABA 富化脱脂コメ胚芽経口投与による精神症状の改善

GABA 富化コメ胚芽を投与した時の患者の精神症状の改善状態を表 3-2 に示した。p < 0.05 で、GABA 富化脱脂コメ胚芽による精神症状の改善効果が確認された。

特に不眠、イライラ、頭痛などで、顕著な改善 (p < 0.01) が確認された。

3. 3. 4 考察

GABA 富化コメ胚芽での血圧低下効果は、含まれている GABA の効果と考えられる。試験品をプラセボに変えるとすみやかに血圧が元に戻るなど、GABA 製剤 (Stanton 1963) や、GABA を多く含む他の食品 (大森ら 1987、辻ら 1992) の経口投与と同じ試験結果が得られた。

一方、GABA そのものでは確認されていたものの (Petty et al. 1990)、GABA を含む食品での精神症状改善効果は、本試験以前にはほとんど報告がなく、新しい知見であった。GABA は血圧が正常な人の血圧は下げすぎないという利点があるので (梶本ら 2004)、高血圧症患者以外にも、ストレス対応食品として適用できる可能性が示唆された。

経口摂取された GABA が血圧を下げるのは、血管拡張作用 (Billingsley et al. 1980) のほかに、高血圧自然発症ラットでの実験結果では、交感神経抑制作用 (Kimura et al. 2002)、抗利尿ホルモン分泌抑制作用 (Invino et al. 1983) などが働いていると考えられている。一方で、脳血液関門を通過しないと考えられている GABA に精神安定作用があるのは、主に副交感神経末端へ作用によると推定されているが、ヒトでは、交感神経もわずかに活性化しており、総自律神経活動が増加していると報告されている (藤林ら 2008)。抗痙攣薬として、GABA を分解する GABA アミノ基転移酵素 (GABA : pyruvate transaminase) を阻害する薬剤や、副交感神経末端での選択的 GABA 再吸収阻害薬、GABA の合成促進剤などが開発、利用されているが、これらの薬剤は全て副交感神経末端での GABA の存在量を増やす作用があり、GABA や、抗てんかん薬として使われている GABA アナログを投与した時と同様の効果が現れる。近年、これらの薬剤に抗不安薬としての可能性があることが指摘されている (Stahl 2004)。また、GABA を含む食品をラットに与えると、不安感を和らげ、幸福感をもたらすとされるホルモンのセロトニンの分泌が促進されたという報告があり (奥山ら 2004)、GABA が多くの生理作用に関与していることが推測される。

コメ油では国内 2 位のシェアを持つオリザ油化株式会社は、新たなコメ油製品の開発を目指して 1980 年に、純正玄米胚芽油「タフロン」の販売を開始していた。その開発過程で、糠から胚芽を分け取る技術を開発したことから、コメ糠から容易に大量のコメ胚芽だけを得ることが可能であった。しかし胚芽油を得るために *n*-ヘキサン抽出を行った後の脱脂コメ胚芽は食品としては利用できず、低価格で飼料原料として販売されていた。

本研究によって脱脂コメ胚芽は健康補助食品として有効利用が可能であることがわかり、オリザ油化株式会社では、1995 年から加水による脱脂コメ胚芽での GABA 富化加工を開始、健康補助食品素材としてさまざまな形の製品を製造、販売することとなった (オリザ油化株式会社 2008)。また、本研究で臨床試験に用いられた GABA 富化脱脂コメ胚芽は有効性が確認されたので、錠剤化して摂取しやすい形にして商品化、写真 3-1 に示す状態で販売を行っている。本製品は、一般的なサプリメントと異なり

賦形剤を用いず 100% 胚芽から生成された粉末を打錠したものである点から、安全性も高いと考えられる。

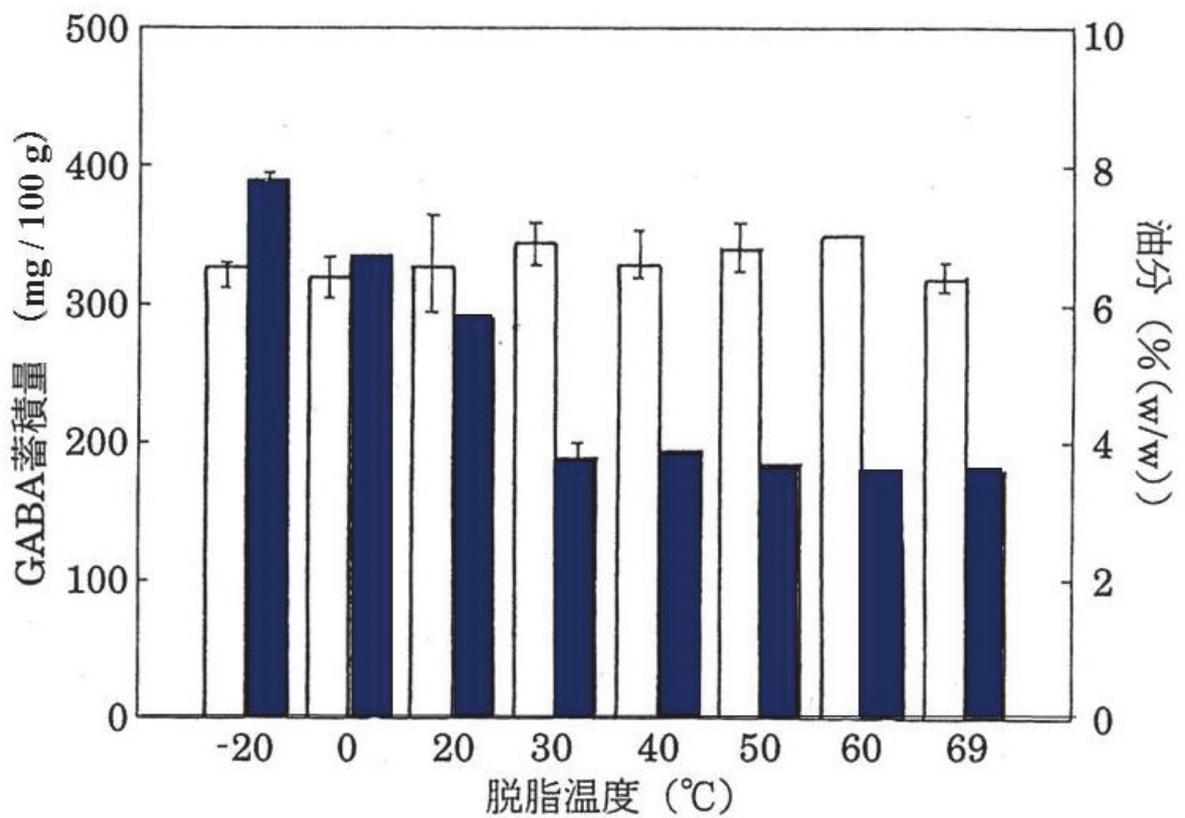


図 3-1. コメ胚芽脱脂時の *n*-ヘキサン温度と、脱脂後の GABA 蓄積量と油分量。

胚芽はササニシキを用いた。脱脂は、胚芽 20.0 g に対し、*n*-ヘキサンを 100 ml 加え、常圧ゆるい振とう下で2時間行い、胚芽はろ紙で分け取って脱気乾燥した。

□ : GABA 蓄積量、■ : 油分。

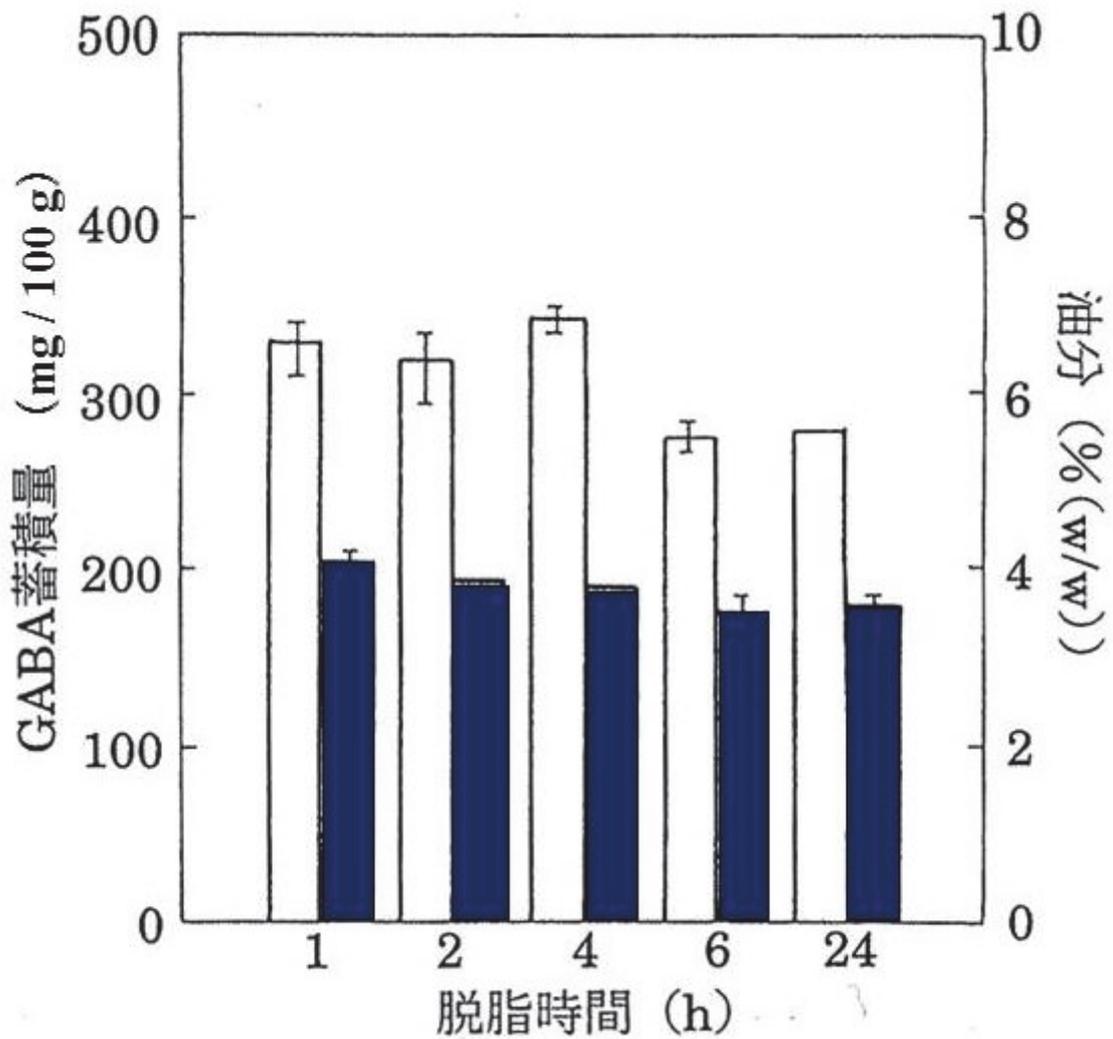


図 3-2. *n*-ヘキサン脱脂における脱脂時間と、脱脂後の GABA 蓄積量と油分量。

胚芽はササニシキを用いた。脱脂は、胚芽 20.0 g に対し、*n*-ヘキサンを 100 ml 加え、30℃ で行い、胚芽はろ紙で分け取って脱気乾燥した。

□ : GABA 蓄積量、■ : 油分。

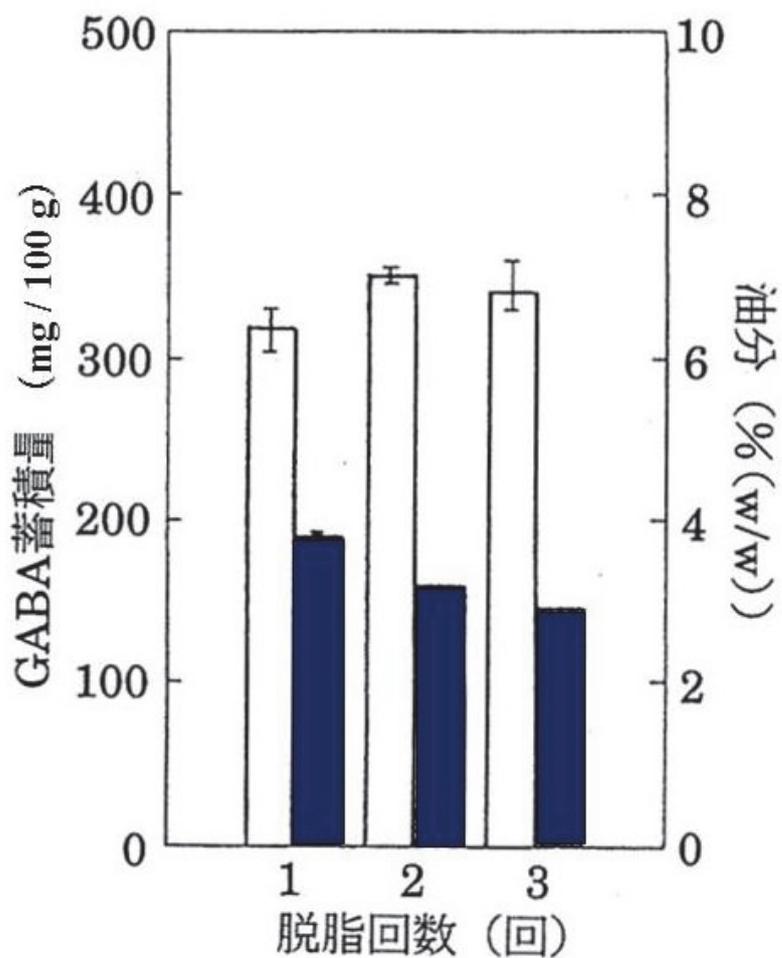


図 3-3. *n*-ヘキサン脱脂における脱脂回数と、脱脂後の GABA 蓄積量と油分量。

胚芽はササニシキを用いた。脱脂は、胚芽 20.0 g に対し、*n*-ヘキサンを 100 ml 加え、各回とも 30℃ で 2 時間行った、胚芽はろ紙で分け取って脱気乾燥した。

□ : GABA 蓄積量、■ : 油分。

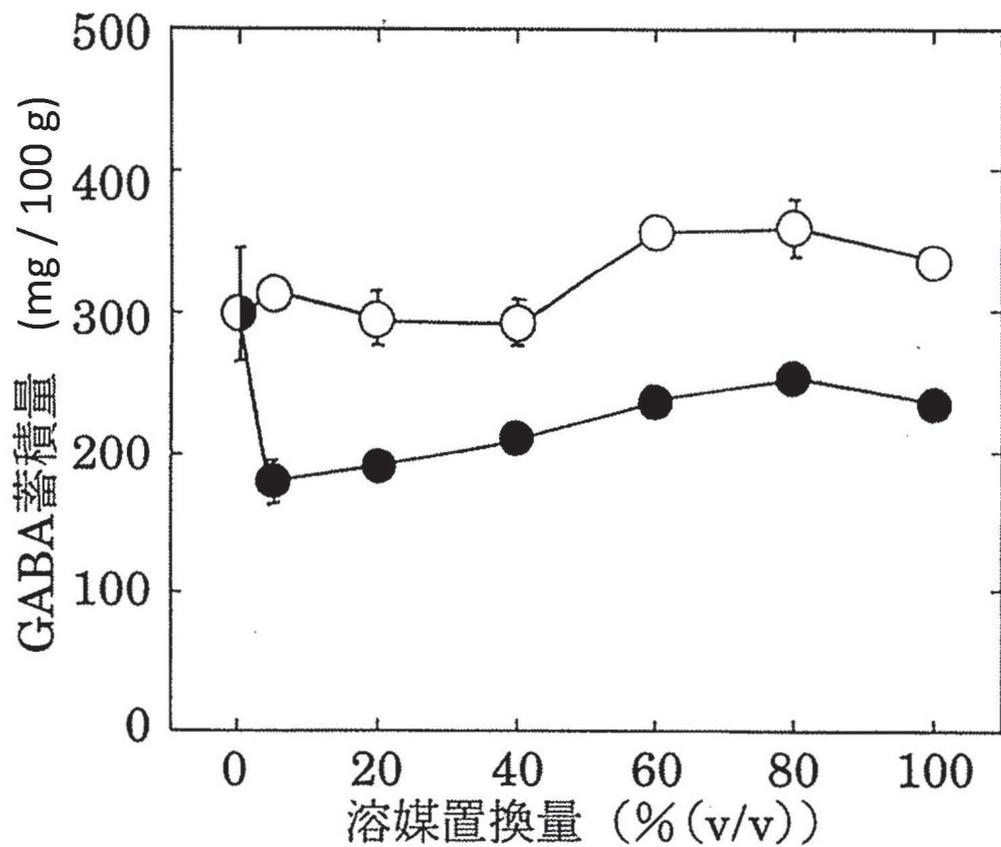


図 3-4. コメ胚芽脱脂に用いる有機溶媒組成が、脱脂後の GABA 蓄積量に与える影響。

実験に用いた有機溶媒は *n*-ヘキサンをベースにして、溶媒置換量に応じた体積割合で置き換えを行った。○：アセトン、●：エタノール。

胚芽はササニシキを用いた。脱脂処理は、胚芽 20.0 g に対し、有機溶媒を 100 ml 加え、40°C で 2 時間行い、胚芽はろ紙で分け取って脱気乾燥した。

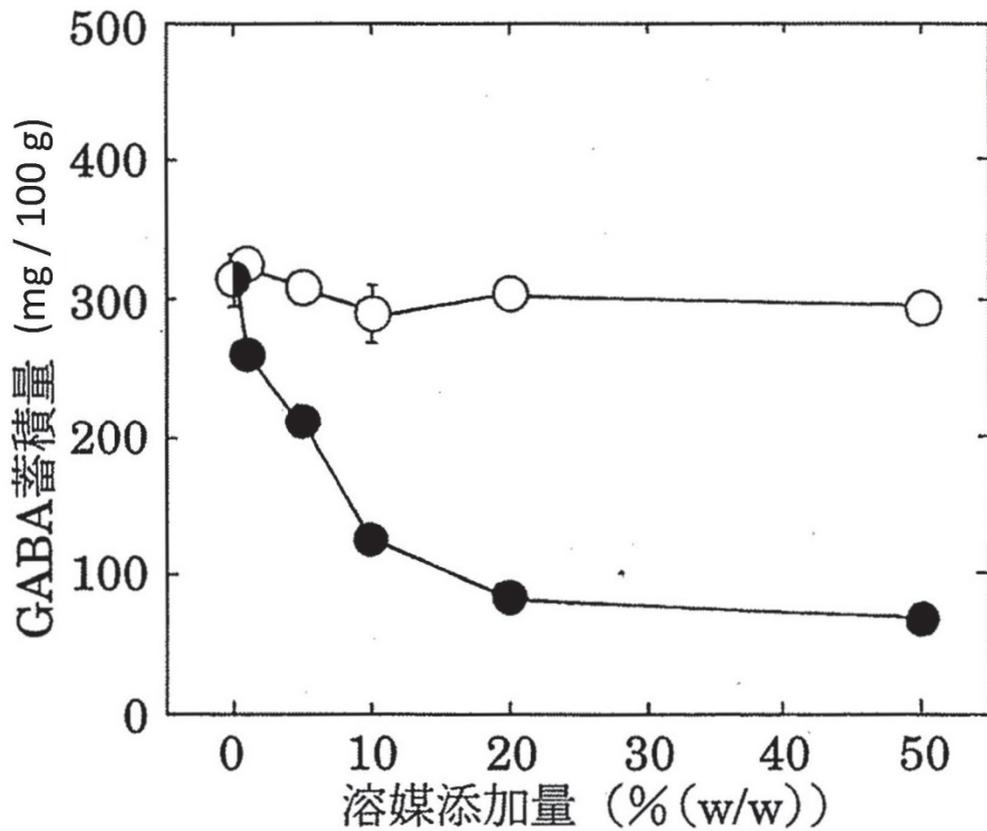


図 3-5. 脱脂コメ胚芽への有機溶媒添加が GABA 蓄積量に与える影響。

ササニシキ胚芽を *n*-ヘキサンで常圧 30℃、2 時間脱脂を行った脱脂コメ胚芽を用いた。水浸漬処理 1 時間前に、示された胚芽に対する重量割合で溶媒を添加、室温で静置後、40℃ で 2 時間 GABA を水浸漬処理したのちの GABA 蓄積量を示した。

○ : *n*-ヘキサン、● : エタノール。

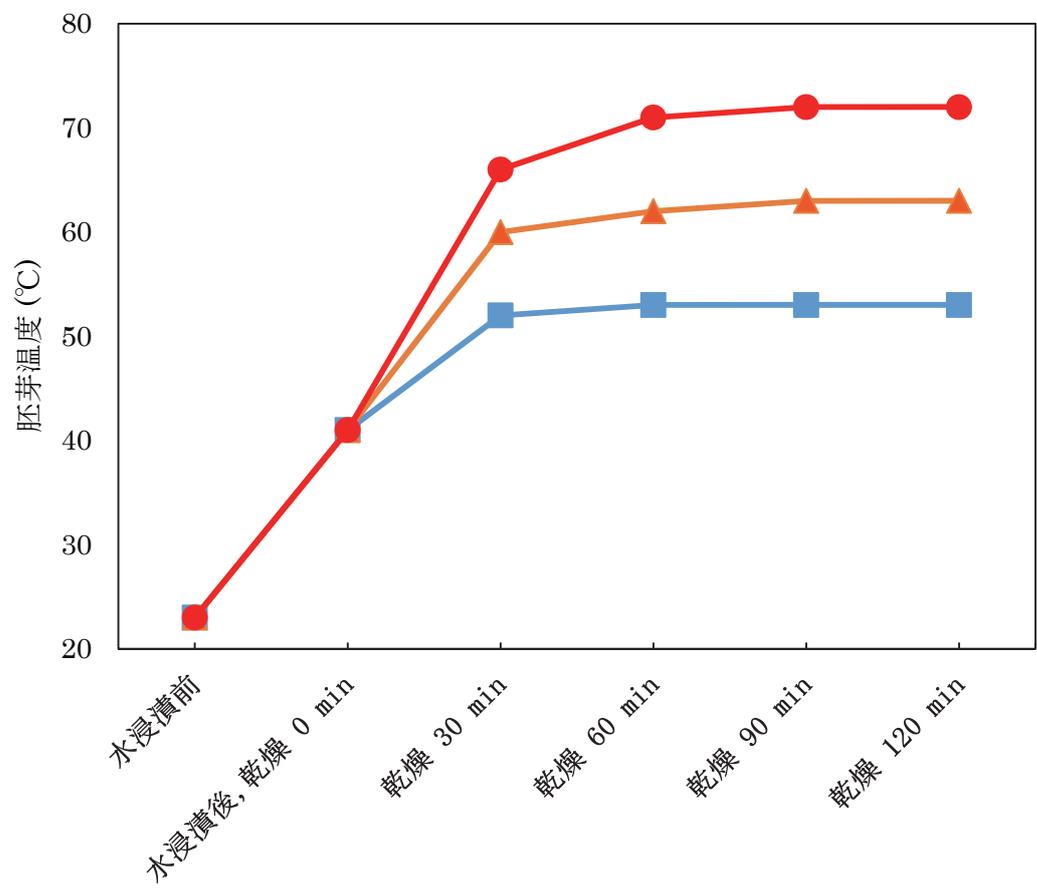


図 3-6. 遠赤外線試作機内の胚芽温度の推移。

■ : 70°C、▲ : 85°C、● : 100°C。

表 3 - 1. 遠赤外線試作機を用いたGABA富化脱脂コメ胚芽の乾燥温度による水分量とGABA蓄積量。

ヒーター設定温度 (°C)	70		85		100	
胚芽温度 (°C)	50 ± 4		60 ± 5		70 ± 5	
	水分量*	GABA含量*	水分量	GABA含量	水分量	GABA含量
	(% (w/w))	(mg/100 g)	(% (w/w))	(mg/100 g)	(% (w/w))	(mg/100 g)
加水前	23.1	76	23.1	76	23.1	76
加水後	198.5	76	198.5	76	198.5	76
乾燥開始時	24.7	320	24.7	320	24.7	320
乾燥1時間後	24.7	357	11.8	326	10.7	325
乾燥2時間後	12.0	370	10.9	331	9.5	326

* 水分量とGABA含量は、胚芽乾物当たりの値を示した。

表 3 - 2. GABA富化脱脂コメ胚芽による精神症状改善効果。

	症例数	改善度				改善率 (%) [*]
		著明改善	改善	不変	悪化	
GABA富化 脱脂コメ胚芽	20	2	13	5	0	75.0
プラセボ	20	1	4	11	4	25.0

* 改善率は $p < 0.05$ で有意であった。

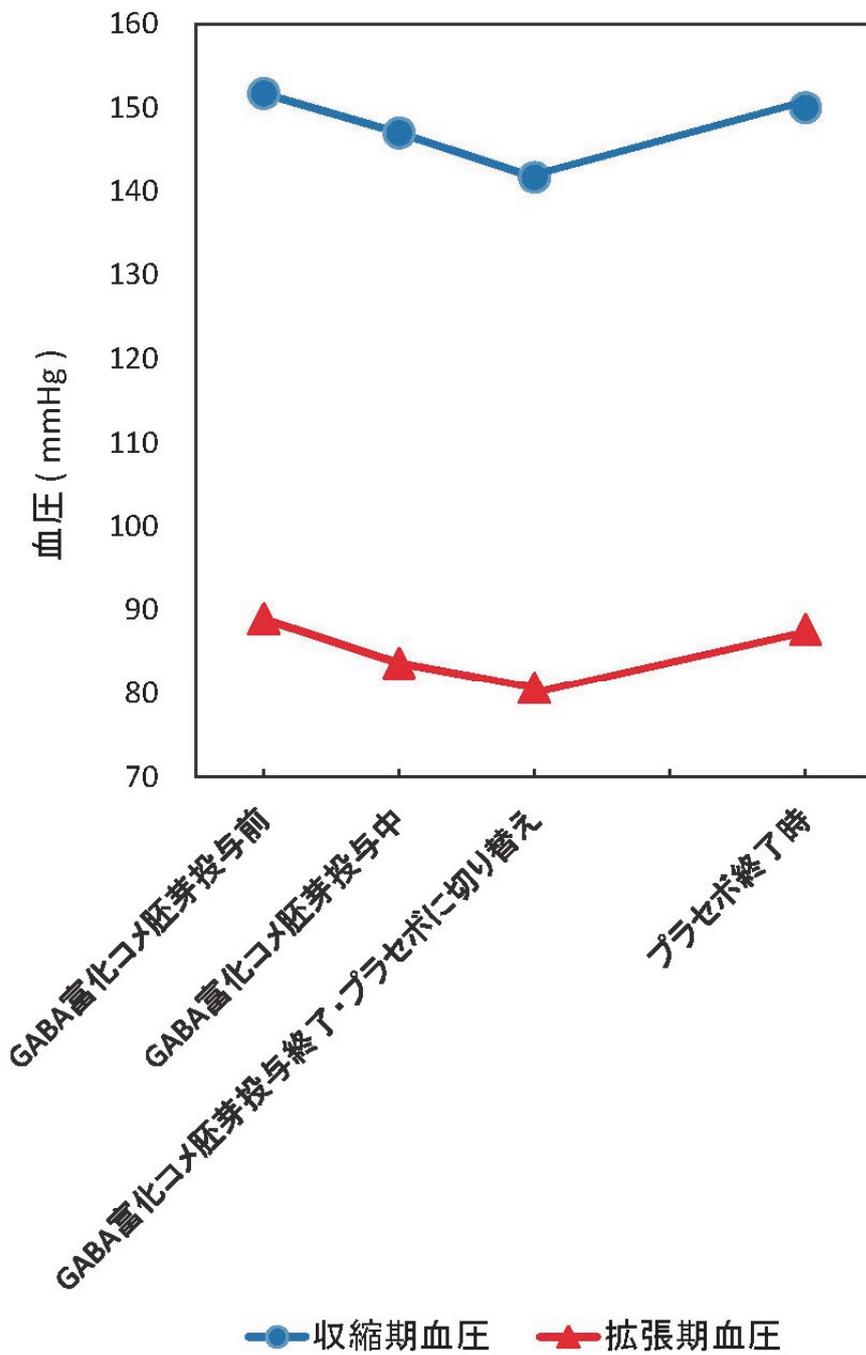


図 3-7. GABA 富化脱脂コメ胚芽投与試験時の血圧変化。

GABA 富化脱脂コメ胚芽投与とプラセボ投与による投与期間は 8 週間、投与終了後の測定までの期間も 8 週間とした。



写真 3-1. GABA 富化脱脂コメ胚芽商品例。

(オリザ油化株式会社提供)

第4章 4アミノ酪酸 (GABA) 富化用食品素材としてのコメの品種選定および栽培条件等の検討

4. 1 多様な遺伝背景を持つコメの胚芽での水浸漬処理による GABA の蓄積

4. 1. 1 序

前章までで、コメを水浸漬することによって遊離アミノ酸が増大し、特に 4アミノ酪酸 (GABA) が急激に増加、蓄積する事を報告した。GABA は経口投与で、高血圧症を抑制するばかりではなく、精神安定作用があることが確認され、機能性食品素材として期待できた。コメを水浸漬処理することで GABA を増加させた食品は、安全性の面でも、日本人の食習慣の面でも、日常に取り入れやすく、より GABA を蓄積するコメ品種の開発は有益であると思われる。

前章までに実験に用いたコシヒカリ及びササニシキは良食味米であり、GABA を生成する酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の基質となる遊離グルタミン酸 (図 2-8) の含量が他のコメ品種よりも多い事が知られている。遊離グルタミン酸は、コメに加水することで、タンパク質などが加水分解されて生成していることが前章までの実験結果から明らかであった。

コメに含まれるタンパク質含量は品種によっても大きな違いがある。また、遊離アミノ酸含量も品種によって異なることから、コシヒカリやササニシキより多くの GABA を蓄積するコメ品種が存在することが期待できた。

そこで多様な遺伝背景を持つコメで、胚芽の水浸漬処理による GABA 蓄積量を比較検討することとした。

4. 1. 2 材料及び方法

4. 1. 2. 1 コメ

コメは10系統、測定に用いた。

彩、キタカオリ、北海 269 号は、北海道札幌市の農水省北海道農業試験場 (現・農研機構北海道農業研究センター) の水田圃場で、ヒメノモチは、岩手県盛岡市の農水省東北農業試験場 (現・農研機構東北農業研究センター) の水田圃場で、タカナリは、茨城県つくばみらい市の農水省農業研究センター (現・農研機構中央農業総合研究センター) の水田圃場で、オオチカラは、新潟県上越市の農水省北陸農業試験場 (現・農研機構中央農業総合研究センター北陸研究センター) の水田圃場で、コシヒカリ、ホシユタカ、中国 137 号 (品種登録名「はいみのり」)、中国糯 120 号は、広島県福山市の農水省中国農業試験場 (現・農研機構近畿中国四国農業研究センター) の水田圃場で、1992 年に栽培したものを、供試まで 10°C の種子庫で保管、1993 年 春に用いた。

各品種の栽培地と特徴、玄米に占める胚芽重量割合を表 4-1 に示した。コメの水分率はすべて、12.2 - 13.0% (w/w) の範囲にあった。

4. 1. 2. 2 コメ胚芽の調製

コメは、家庭用小型精米器 RMA-150 (柳沢精機製作所 (現 KYB-YS 株式会社)、長野) で玄米を 95% 重量が残る精米を行い、得られた五分搗き米を、試験用研削式精米器 TM5 (サタケ、広島) を用い、玄米の 80% 重量程度になるまで搗精、得られたコメ粉を茶こしでふるって、網目上に残った胚芽を得た。

胚芽の水分率は、得られた胚芽の総重量が少なかったため、測定を行っていないが、GABA 蓄積量は、胚芽をコメから分け取った時の重量 (水分率 5 - 6% (w/w) 程度と推定される) に占める重量で記載した。

4. 1. 2. 3 コメ胚芽の水浸漬処理と遊離アミノ酸の測定

胚芽 0.400 g をねじ蓋つき試験管 (内径 18 mm、長さ 125 mm) にはかりとり、蒸留水を 8.00 ml 加え、振とう機つき恒温水槽 NTS-1300 (東京理科学器械、東京) 内でおだやかに振とう (4 cm 振とう幅で、50 往復 / min) しながら 40°C で保温、0、1、4 時間経過後、それぞれに 40% (w/v) TCA 水溶液を 2.00 ml 添加、混和して酵素反応を停止した。反応液を定性ろ紙 No. 2 (ADVANTEC、埼玉) でろ過、ろ液を更に 0.45 μ m 孔のセルロースアセテートフィルターユニット DISMIC 25CS045AN (ADVANTEC、埼玉) でろ過、得られた溶液を、胚芽の遊離アミノ酸抽出液とした。

遊離アミノ酸抽出液を、高速アミノ酸分析計 L-8500 (日立ハイテクノロジーズ、東京) にリチウムイオン交換カラム P/N 855-3501 (内径 4.6 mm、長さ 60 mm、三菱化成、東京) を接続、表 2-1 の測定条件で、表 2-2 に示す生体液分析プログラムを用いてニンヒドリン発色法によって定量分析を行った。

それぞれ 4 回測定し、結果は単純平均値で示した。

4. 1. 3 結果

図 4-1 に、コメ 10 系統の胚芽を水に漬け、40°C で保温した時の GABA 蓄積量を示した。良食味米であるコシヒカリ胚芽の GABA 蓄積量は供試したコメ品種・系統の中では多い方 (4 時間後に 238 mg / 100 g \cdot FW) であったが、北海 269 号の胚芽のように、重量あたりコシヒカリの 2 倍以上 (4 時間後に 554 mg / 100 g \cdot FW) もの GABA を蓄積する系統が存在した。

一方、ホシユタカの胚芽のように、いったん増加した GABA が時間経過と共に減少する品種も存在し、GABA は水浸漬中に増加・蓄積するだけでなく、分解も受けることがわかった。

図 4-2 に、水浸漬処理時の胚芽中の遊離グルタミン酸含量の変動を示した。図 4-2 の左枠内に示したように、ほとんどの品種で遊離グルタミン酸は GABA の生成に伴って減少したが、右枠内に示したように、北海 269 号、タカナリ、中国糯 120 号の 3 品種は、増大した。特に北海 269 号での遊離グルタミン酸増加量は多かった。

4. 1. 4 考察

コメ品種による GABA 蓄積量の差は著しく大きかった。北海 269 号はコメ粒のタンパク質含量が高い傾向があり、また貯蔵タンパク質加水分解能力も高いことによって、大量に遊離グルタミン酸を生成していると考えられた。その結果、水浸漬により遊離のグルタミン酸が大量に生成し、北海 269 号の胚芽における多量の GABA 蓄積につながる事が推定された。胚芽での GABA 蓄積量が多いだけでなく、

北海 269 号は玄米に占める胚芽の重量割合の高い巨大胚米であることから、玄米重量あたりでも、コシヒカリよりはるかに多い GABA 蓄積が期待できると考えられた。

また中国 137 号は、GABA 蓄積量の多い胚芽重量割合の高い巨大胚米であることから、GABA 専用品種として育成された後、「はいみのり」の品種名で品種登録された（根本ら 2001）。品種登録時に測定された胚芽重量割合は玄米重の 8.78% であった。

一方、一度増加した GABA 蓄積量が長時間水浸漬することで減少する場合があることも明らかとなった。すなわち、コメにおける GABA の蓄積量の決定には、GAD による合成だけでなく、GABA アミノ基転移酵素 (GABA : pyruvate transaminase) 等の酵素作用による分解も重要な役割を果たし、両者のバランスの結果決定していることが示唆された。通常の水浸漬条件では、コメ胚芽もしくはコメ粉を入れた水は、GAD の至適 pH 5.5 に極めて近い環境となり、GABA アミノ基転移酵素の至適 pH 8.2 (Ansari 2005) からは遠いが、コメ種子内では、GABA は合成と同時に分解も受けている事が明らかとなった。いったん増加した GABA 蓄積量が低下したホシユタカは、インド型品種であり、他の品種と遺伝的背景が大きく異なっており、GABA 蓄積量が遺伝子によって制御されている可能性があるものと考えられる。

GAD や、GAD の基質となる遊離グルタミン酸を生成するプロテアーゼやペプチダーゼ等のタンパク質加水分解酵素は、アミラーゼ類と異なり、耐熱性があまり高くない。GABA を蓄積させた食品製造の原料となるコメの保管では、高温環境に長期間置かないように気をつかう必要があるが、原料となるコメの品種選択についても充分検討する必要があることが判明した。

図 4-3 に、Snedden ら (1995) が作成した植物細胞のストレス応答時における Ca^{2+} イオンとカルモデュリン (CaM)、GABA の相互作用の模式図を示した。GABA の植物体内での合成はほとんどが GAD によって起こっていると推定されているが、GABA の分解は、代謝経路 (GABA Shunt、図 2-8) で GABA 分解について主たる働きをしているとされる GABA アミノ基転移酵素だけではなく、Snedden らも推定している。長時間の水浸漬時に GABA が減少する品種では、コメを水に浸漬した時の弱酸性環境で GABA を別分子に変換することのできる酵素が働いているものと推定される。

4. 2 多様なコメ品種玄米での GABA 蓄積への早刈りの影響

4. 2. 1 序

コメを水に漬けると GABA が多量に蓄積するという報告の結果、多くの研究者がコメを原料に GABA を蓄積させる方法について研究を開始した。

一方、1998 年頃より信州大学を中心に、玄米を一晩水につけ、糠層からわずかに芽の先が出る段階まで発芽させたものを「発芽玄米」と名付け、商品化がすすめられていた。発芽玄米には、当時機能の少なく高压炊飯ができなかった炊飯器でも、白米と同じ条件で炊飯できるという利点があった。また、通常のコメと異なり吸水性が良いことで、白米と任意の割合で混ぜて炊飯する事が可能となり、手軽に食物繊維やビタミンが摂取できる事から人気が出た。

健康食品などの製造販売を行っている株式会社ファンケル (神奈川県横浜市) でも「発芽玄米」の商品化を計画、その成分分析を行ったところ、GABA が大量に蓄積することを確認した。そこで、我々の

所有する特許の許諾を受け、「発芽玄米」の商品（商品名「発芽米」）説明チラシに GABA 含量分析値をつけて販売するようになったところ（写真 4-1）、コメから GABA が摂取でき、それが高血圧症抑制作用を持つこと、また、ストレス抑制作用もあることが広く一般に知られるようになった。GABA の生理効果が広く知られるのに伴って、より GABA 蓄積量の多いコメ品種、コメ栽培法などの開発が求められるようになってきた。

そこで、まず GABA 蓄積食品用のコメの栽培方法として、収穫時期を早める早刈りの効果を検討することとした。

4. 2. 2 材料及び方法

4. 2. 2. 1 コメ

コメは、タカナリ、ふくひびき、奥羽 394 号、べこごのみ、夢あおばを用いた。いずれも玄米中の胚芽率は 2 - 3% (w/w) の、巨大胚米ではない品種である。

2005 年、茨城県つくばみらい市の農研機構中央農業総合研究センターの水田圃場にて栽培、収穫後、稲架かけによって乾燥、脱穀し、籾摺後、目開き 1.8 mm の篩でふるって未熟粒を除き、供試まで 4°C で暗所保管した。

4. 2. 2. 1 栽培法、施肥および刈り取り時期の決定

基肥として高度化成を用いて窒素 7.0 kg/10 a を施用し、幼穂形成期に NK 化成肥料として窒素 5.1 kg/10 a を追肥した。

いずれの品種も、出穂後 5 週間後を目安に、5 割程度の籾が黄化し、玄米が透明になった時期（黄熟期）に早刈りを行った。完熟期刈りは、その 1 週間後、ほとんどの籾が黄化し、玄米の 9 割程度が緑色を失った時機に行った。

4. 2. 2. 3 玄米の GABA 蓄積量の測定

玄米を目開き 0.5 mm の篩を付けた遠心式粉碎機 pulluerisette 14 (FRITSCH ドイツ) で粉碎、2.00 mg ねじ蓋つき試験管（内径 18 mm、長さ 125 mm）にはかりとり、蒸留水 8.00 ml を添加、混和して振とう機付き恒温水槽 NTS-1300（東京理科器械、東京）内でおだやかに振とう（4 cm 振とう幅で 50 往復 / min）しながら 40°C で保温、0、4、24 時間経過後、それぞれに 40% (w/v) TCA 水溶液を 2.00 ml 添加、混和して酵素反応を停止した。反応液を定性ろ紙 No.2 (ADVANTEC、埼玉) でろ過、ろ液を更に 0.45 μm 孔のセルロースアセテートフィルターユニット DISMIC 25CS045AN (ADVANTEC、埼玉) でろ過、得られた溶液を、玄米の遊離アミノ酸抽出液とした。

遊離アミノ酸抽出液を、高速アミノ酸分析計 L-8500（日立ハイテクノロジーズ、東京）にリチウムイオン交換カラム P/N 855-3501（内径 4.6 mm、長さ 60 mm、三菱化成、東京）を接続、表 2-1 の測定条件で、表 2-2 に示す生体液分析プログラムを用いてニンヒドリン発色法によって定量分析を行った。

それぞれ 3 回測定し、結果は単純平均値で示した。

4. 2. 3 結果

各米品種の早刈りと完熟刈りで得られた玄米の水浸漬処理による GABA 蓄積量を、表 4-2 に示した。早刈りによって GABA 蓄積量が増大する傾向は観察されなかった。

GABA 蓄積量についての品種間差は大きく、べこごのみでは、短時間に多量の GABA (4 時間で 20.0 mg/100 g 以上) が蓄積した。また、ふくひびきは長時間水浸漬処理を行っても GABA 蓄積量が増え続けたのに対し、タカナリや夢あおぼでは、早刈りすると一度増えた GABA が減少した。

4. 2. 4 考察

前節で、玄米中の GABA 蓄積には、GAD 以外に、プロテアーゼやペプチダーゼなどのタンパク質分解酵素等が深く関わっていることが明らかになった。

コメは完熟より 10 日早く早刈りを行うことで、澱粉分解酵素の活性が高いコメを収穫することができ、それによって炊飯後の白米の甘みが増す現象が報告されている (新井 2012)。GABA 蓄積に関与する酵素も早刈りによって高い活性が予想され GABA 蓄積量が増大する事を期待したが、GABA 蓄積量は 4 時間水浸漬では、あまり変動しなかった。さらに 24 時間水浸漬処理を行ったところ、早刈り米で GABA の減少が起こる品種がいくつかあったことから、GAD 活性が高くなっていても、GABA を分解する酵素の活性も高くなり、GABA 蓄積量が増大しなかったと考えられた。以上の結果から、玄米で GABA 蓄積量を増やすためには、早刈りは望ましくないことが示唆された。

武田ら (2007) の報告によると、ひとめぼれ、あきたこまちでは、未熟粒の多い篩下米 (粒厚 1.80 mm 未満) で、「発芽玄米」の GABA 蓄積量は、篩上米 (粒厚 1.90 mm 以上) の倍以上の含量を示している。これは未熟米 (早刈りに近い条件) であることよりも、未熟なためにコメ粒の厚みが薄く、その結果、糠や胚芽、玄米表面に相当する画分のコメ全体に占める重量割合比率が高かったためだと考えられる。

4. 3 多様なコメ品種玄米での GABA 蓄積への窒素施肥条件の影響

4. 3. 1 序

前章までで明らかになったように、コメの中の GABA は、水浸漬処理の最初は GAD の働きだけで急増するが、それ以降は、遊離グルタミン酸の供給速度にある程度依存して増大する。遊離グルタミン酸はコメの中の貯蔵タンパク質から供給されていることが予想される。

そのため、コメ粒内のタンパク質含量が増えれば GABA の蓄積量も増大する可能性が高いと推定されたので、次に、栽培法として窒素追肥の影響を検討した。

4. 3. 2 材料及び方法

4. 3. 2. 1 コメ

穂揃期窒素追肥の影響試験には、べこごのみとふくひびきを、2006年栽培して用いた。

幼穂形成期窒素追肥の影響試験には、べこあおぼとモミロマンを、2007年栽培して用いた。

いずれの品種も巨大胚米ではない品種である。茨城県つくばみらい市の農研機構中央農業総合研究センターの水田圃場にて栽培した。収穫後、稲架かけによって乾燥、脱穀し、籾摺後、目開き1.8mmの篩でふるって未熟粒を除き、供試まで4℃暗所で保管した。

4. 3. 2. 2 栽培法および施肥条件

穂揃期窒素追肥の影響試験は、2006年に基肥なし区と多肥区を設け、べこごのみとふくひびきを用いて試験した。基肥なし区は、基肥を施用しなかった。多肥（基肥多肥+幼穂形成期追肥）区では、基肥は高度化成として窒素を7.0kg/10a施用し、幼穂形成期にNK化成肥料として窒素を5.0kg/10a追肥した。いずれの品種でも、基肥なし区と多肥区それぞれに、穂揃期に硫酸として窒素を2.1kg/10a追肥する試験区（基肥なし+追肥区、多肥+追肥区）を設けた。

幼穂形成期追肥の影響試験は、2007年に、基肥を被覆尿素肥料として窒素を8.3kg/10a用いた基肥標準区で、べこあおぼとモミロマンを用いて試験した。いずれの品種でも、幼穂形成期にNK化成肥料として窒素を3.4kg/10a追肥する試験区（基肥標準+追肥区）を設けた。

いずれの区でも3カ所坪刈りを行って、試供玄米を得た。

4. 3. 2. 3 玄米のGABA蓄積量の測定

GABA蓄積量は、4. 2. 2. 3節で記載した方法で測定した。

4. 3. 3 結果

4. 3. 3. 1 穂揃期窒素追肥の影響

基肥なしあるいは多肥条件での、水浸漬処理による玄米でのGABA蓄積量への穂揃期追肥の影響と玄米収量を、表4-3に示した。基肥なし条件では、追肥がGABA蓄積量の増大に効果があるかのように見えたが、統計的に有意差は認められなかった。また、多肥条件では追肥を行ってもGABA蓄積量が増大せず、ふくひびきではむしろ多肥条件下での穂揃期追肥はGABA蓄積量を減少させる結果となった。穂揃期追肥でGABA蓄積量を増やす事は、通常の施肥条件では出来ないと思われた。

一方、品種間差は大きく、べこごのみは水浸漬4時間から24時間の間GABA蓄積量が増大しつづけたが、ふくひびきでは水浸漬4時間で蓄積したGABAが24時間後には分解されていた。

4. 3. 3. 2 幼穂形成期窒素追肥の影響

基肥標準条件での、水浸漬処理による玄米でのGABA蓄積量への幼穂形成期追肥の影響と玄米収量を、表4-4に示した。幼穂形成期での追肥も、GABA蓄積量の増大には寄与しなかった。また、モミロマンでは追肥がむしろGABA蓄積量を減少させる傾向があるように見えたが、これも統計的に有意差は認められなかった。

ここでも品種間差は大きく、モミロマンは水浸漬 4 時間から 24 時間の間、GABA 蓄積量が増大しつづけたが、べこあおばでは水浸漬 4 時間で蓄積した GABA が 24 時間後には分解されていた。

4. 3. 4 考察

4. 3. 4. 1. 追肥の影響

穂揃期の追肥はコメ収量の増大に寄与しなかったため、追肥した窒素はタンパク質などの窒素化合物としてコメ粒中に蓄積した可能性が高い。従って基肥なし条件では、不足していたコメ粒中のタンパク質含量が穂揃期の追肥によって補われた事による GABA 蓄積量の増大があった可能性が考えられる。しかし多肥条件では、GABA の合成に関与する酵素類だけでなく、分解に関与する酵素も増大したためか、あるいは追肥がプロラミンのように水浸漬後すぐには分解しないタンパク質の増大のみに寄与したためか、GABA 蓄積量の増大には寄与しなかった。しかし建部らの報告 (1996) によれば、施肥条件によってプロラミン含量割合の変動は確認されていないため、追肥によって特定のタンパク質のみの増大の可能性はあまりないものと考えられるため、増大した窒素化合物がプロラミンだけであった可能性は低いと推定される。

本実験結果の確認のために、GAD の基質となる遊離アミノ酸の供給源となるタンパク質の特定を試み、以下の実験を行った。水浸漬処理を行ったコメからタンパク質を抽出、アクリルアミドゲルの濃度を数種類変更して SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。タンパク質をクマシーブリリアントブルーで染色、目視にてタンパク質の変動を観察した。しかし顕著に含量が減少したと思われるタンパク質泳動バンドを確認することはできなかった (データをここでは示さない)。コメの中に GABA が蓄積する際、その原料となる遊離グルタミン酸の供給源となるタンパク質は、未だ不明である。山田ら (2006) の報告によると、玄米のグルテリン画分は、水浸漬し加温した発芽誘導条件下では、特定のタンパク質ではなく、全体がほぼ均質に減少した。

基肥標準施肥条件での幼穂形成期での追肥も、GABA 蓄積量を増大させなかった。追肥を幼穂形成期に行うと、玄米中のタンパク質含量は増大せず、玄米収量のみが増加することが知られている (平 1970)。表 4-4 に示した通り、この実験でも、幼穂形成期追肥は収量増大に寄与した。そのため、種子中のタンパク質含量はあまり変動せず、GABA 蓄積量にも影響がなかったと考えられた。

追肥が玄米中のタンパク質含量をあげる効果は追肥の時期によって大きく異なる (藤井ら 1998、後藤ら 2006)。GABA 蓄積量を増大させるためには玄米のタンパク質等、窒素化合物の含量を上げることが有効であると予想されるので、追肥は幼穂形成期より穂揃期に施用する方が望ましいと推定されたが、その効果は必ずしも確認されなかった。また、コメ粒中のタンパク質含量を増大させることは食味の低下につながり、実用上では問題が大きい。

いずれの時期の追肥も複数の品種で、水浸漬処理による GABA 蓄積量を増大させる効果がないことが確認されたので、GABA 富化コメ食品製造のためのコメの栽培においては、窒素肥料の極端な不足のみに気をつけて栽培を行えば充分であることが明らかとなった。

4. 3. 4. 2 品種間差

第4章2節および3節で、2005 - 2007年、早刈りや追肥によってGABA蓄積量の増大を試みたが、栽培方法による劇的なGABA蓄積量増加方法を見つけることはできなかった。

一方、それらの実験において、GABA蓄積量へのコメ品種選定の影響が著しく大きいことが、はっきりと確認された。2005年と2006年に栽培を行ったべこごのみでは、GABA蓄積量が特に大きかった（水浸漬40°C、4時間で、20 mg / 100 g・FW以上、24時間で40 mg / 100 g・FW以上）。

遺伝的背景の近いコメ品種では、GABA蓄積量に大きな差はなく、蓄積量の変動も水浸漬処理時間に対してどの品種もほぼ同じ動きを示す（呂ら2010）が、第4章1節での実験結果で示したように、遺伝的に多様なコメを用いた場合には、GABA蓄積量は大きく変動する。コメでは、胚芽で特にGABA蓄積量が多いため、現在までにGABA富化米用に開発されたコメ品種はすべて巨大胚米である。それらの巨大胚米玄米でのGABA蓄積量はおおよそ20 - 45 mg / 100 gである（根本ら2001、河野ら2008、石井ら2013）が、大きな胚芽による独特の食感が食味を低下させる傾向がある。

しかし今回の実験で得られたべこごのみでのGABA蓄積量増大の結果から、巨大胚米以外でもGABAを多量に蓄積する玄米品種が開発できる可能性が示唆された。

4. 4 多様な品種・系統と、多様な産地の、玄米での遊離アミノ酸含量

4. 4. 1 序

前節までで、コメでのGABA蓄積量については、窒素施肥法よりも品種の違いによる影響が大きいことがわかった。しかし、コシヒカリなど栽培地域の広いコメでは（米穀安定供給確保支援機構情報部2014）、産地によって味が異なることが良く知られており、それは必ずしも粘度などの物性やタンパク質含量のみで決定しないと考えられている。

ここで、多種多様なコメと3つの産地から得られたコシヒカリでの遊離アミノ酸含量について測定し、栽培地の変更等によるGABA蓄積量の増大の可能性について検討したい。

4. 4. 2 材料および方法

4. 4. 2. 1 コメ

コメは1994年に、農水省の各農業試験場（現・農研機構と農業生物資源研究所）および岡山県農業総合センター農業試験場の水田圃場で栽培を行った。コシヒカリは同年、新潟県長岡市の新潟県農業総合研究所作物研究センターの水田圃場と、新潟県上越市の農水省北陸農業試験場（現・農研機構中央農業総合研究センター北陸研究センター）の水田圃場、および島根県飯石郡飯南町の篤農家所有の水田、3カ所で栽培した。本実験には、コシヒカリBL種は用いていない。

彩、キタカオリ、北陸296号、北海277号は、北海道札幌市の農水省北海道農業試験場（現・農研機構北海道農業研究センター）の水田圃場で、ヒメノモチ、奥羽348号、奥羽354号は岩手県盛岡市の農水省東北農業試験場（現・農研機構東北農業研究センター）の水田圃場で、Lgc-1は、茨城県つくば市

の農水省農業生物資源研究所（現・農業生物資源研究所）の水田圃場で、タカナリ、サリークィーン、鴻280号、鴻糯360号、関東170号は、茨城県つくばみらい市の農水省農業研究センター（現・農研機構作物研究所）の水田圃場で、オオチカラ、ハバタキ、北陸149号、北陸153号、北陸161号、北陸糯167号は、新潟県上越市の農水省北陸農業試験場（現・農研機構中央農業総合研究センター北陸研究センター）の水田圃場で、ホシユタカ、中国113号、中国137号は、広島県福山市の農水省中国農業試験場（現・農研機構近畿中国四国農業研究センター）の水田圃場で、ヒノヒカリは、福岡県筑後市の農水省九州農業試験場（現・農研機構九州沖縄農業研究センター）の水田圃場で、旭、アケボノ、日本晴、吉備の華は、岡山県赤磐市の岡山県農業総合センター農業試験場の水田圃場で栽培した。これらの品種の特徴は、表4-5に示した。

すべて、収穫後、稲架かけで乾燥、脱穀、籾摺後、1995年2月の供試まで10℃の種子庫内で保管した。

4.4.2.2 玄米中の遊離アミノ酸量の測定

玄米を目開き0.5mmの篩を付けた遠心式粉碎機 pullerisette 14（FRITSCH ドイツ）で粉碎、2.00mg ねじ蓋つき試験管（内径18mm、長さ125mm）にはかりとり、蒸留水8.00mlを添加、混和して振とう機つき恒温水槽 NTS-1300（東京理科器械、東京）内でおだやかに振とう（4cm 振とう幅で、50往復/min）しながら30℃で保温、0、4時間経過後、それぞれに40%（w/v）TCA水溶液を2.00ml添加、混和して酵素反応を停止した。反応液を定性ろ紙 No.2（ADVANTEC、埼玉）でろ過、ろ液を更に0.45μm孔のセルロースアセテートフィルターユニット DISMIC 25CS045AN（ADVANTEC、埼玉）でろ過、得られた溶液を、玄米の遊離アミノ酸抽出液とした。

遊離アミノ酸抽出液を、高速アミノ酸分析計 L-8500（日立ハイテクノロジーズ、東京）にリチウムイオン交換カラム P/N 855-3501（内径4.6mm、長さ60mm、三菱化成、東京）を接続、表2-1の測定条件で、表2-2に示す生体液分析プログラムを用いてニンヒドリン発色法によって定量分析を行った。

それぞれ3回測定し、結果は平均値で示した。

4.4.3 結果

4.4.3.1 水浸漬処理前の遊離アミノ酸含量

図4-4に、多様な品種・系統の玄米での総遊離アミノ酸含量と遊離グルタミン酸含量を、図4-5に、総遊離アミノ酸含量と遊離酸性アミノ酸含量（遊離グルタミン酸含量+遊離アスパラギン酸含量）を示した。表4-5に記載した通り、遺伝的背景が多用であり栽培地も広範囲であるコメを用いたが、総遊離アミノ酸含量に占める遊離グルタミン酸含量比率あるいは遊離酸性アミノ酸含量比率は、ほぼ一定であった。

良食味米であるコシヒカリで特に総遊離アミノ酸含量に占めるグルタミン酸含量やアスパラギン酸含量が高いという事実は観察されなかった。また、全く同じコシヒカリでも、栽培地によって遊離アミノ

酸含量が異なることがわかった。

4. 4. 3. 2 水浸漬処理による遊離アミノ酸含量の変動

図4-6に、多様な品種・系統の玄米での総遊離アミノ酸含量の、水浸漬処理（40℃で、2時間）前後の値を示す。

ほとんどのコメで、水浸漬処理によって総遊離アミノ酸含量に大きな増加はなかった。栽培地の異なるコシヒカリも、産地によって総遊離アミノ酸含量が大きく異なったが、水浸漬処理による変動については、産地間に大きな差はなかった。

しかしいくつかの系統で、水浸漬処理によって総遊離アミノ酸含量が大きく変動した。水浸漬処理で総遊離アミノ酸含量が大きく減少したコメは、オオチカラ、ハバタキ、Lgc-1で、増大したコメは、北海269号と中国137号であった。

4. 5 考察

おいしいお米には遊離の酸性アミノ酸含量が高いと言われているが（岡崎・沖 1961、松崎ら 1992）、遊離の酸性アミノ酸含量が高いコメでは、総遊離アミノ酸含量も高い傾向があることが明らかになった。これは、遊離アミノ酸の中で特に味が良いアミノ酸の割合が増えているからそのコメがおいしいのではなく、全体に遊離アミノ酸含量が増えることによっておいしく思うようになる可能性を示しており、第2章1節での、ヒトがコメの遊離アミノ酸の味を総量としていわゆるアミノ酸味として感じ取り、かつ、それを好ましく思っているのではないかという推定を補強する結果となると考えられた。

しかし遊離アミノ酸含量は、品種固有の値とは限らなかった。ここでは産地の異なるコメは、コシヒカリの3点を測定したのみだが、その遊離アミノ酸含量は産地によって大きく異なった。一部の品種では産地によって遊離アミノ酸含量が変動する可能性があると考えられる。

この理由は、第一に、コシヒカリが最初の交配から60年以上が経過した古い品種であるため品種内に多型が生じている可能性が考えられたが、貴島ら（2010）の報告によると、遺伝子解析ではコシヒカリの品種同一性は比較的良く保たれている。

もう一つの可能性は、窒素施肥法の改良以外の方法で、同じコメ品種での各種遊離アミノ酸含量を増やす栽培環境、栽培方法が存在する可能性である。これは、GABAを増加させる栽培方法が存在する可能性について検討の余地があることを示している。一方でこの結果は、GABAを増量させたコメ加工食品を製造する際に、原料ロットによるGABA蓄積量の違いが生み出される可能性を示唆しており、工場での原料管理の難しさを推定させた。実際に食品工場では、思ったよりもGABAが増大しない材料がまれに存在して問題となっているが、その原因の一つと考えられる。

ほとんどのコメ品種・系統では、総遊離アミノ酸含量は、水浸漬処理では大きく変動しなかった。全体に、水浸漬処理によってプロテアーゼやペプチダーゼの働きにより遊離アミノ酸がやや増加する傾向にあることが観察されたが、別の代謝物に変換されるアミノ酸も多かったためであると考えられた。

北海269号と中国137号で、水浸漬によって遊離アミノ酸が目立って増える現象は、両系統が共に巨大胚米であり、GADやプロテアーゼ類の活性が高い胚芽の重量割合が高いことによって、玄米において

多量の GABA を蓄積する現象に寄与していると考えられた。先に述べたように、中国 137 号は後に「はいみのり」の品種名で、GABA 高蓄積米として品種登録されている（根本ら 2001）。

一方、水浸漬で遊離アミノ酸が減少したコメの内、*lgc-1* は一般食用品種ニホンマサリを、エチレンイミンを用いた化学変異処理を行って得られた NM67 に原品種を戻し交配して得られた後代系統であり、グルテリン含量が低く、プロラミン含量が高いことが知られている（西村ら 2007）。ヒトではプロラミンで構成されるコメのプロテインボディ I (PB-I) が消化出来ないことから、これらの性質を持つコメは、タンパク質摂取制限が必要な腎臓病患者用に栽培されている（松井ら 2013）。コメの発芽時にも、疎水性が高く構造の強固な PB-I はすぐには分解されないと推測されており、そのため、数時間での水浸漬処理による遊離アミノ酸増加量が低かった事が考えられる。

ハバタキ（密陽 42 号×密陽 25、インド型）とオオチカラ（BG1×収 3116、突然変異による大粒化品種を用いて育成）は、いずれも他のコメ系統と大きく遺伝系統が異なっているが、遊離アミノ酸の増加量が低かった理由については、不明である。

表 4 - 1. 水浸漬によるコメ胚芽でのGABA蓄積量の品種間差測定に用いたコメと、その胚芽重量割合。

品種・系統名	供試サンプル栽培地	特性		親品種	胚芽重量割合 (% (w/w))
コシヒカリ	広島県	良食味米	<i>japonca</i>	農林22号×農林1号	3.5
彩	北海道	低アミロース	<i>japonca</i>	永系84271×キタアケ	3.3
キタカオリ	北海道	香り米	<i>japonca</i>	(TANGON×北海241号) ×北海244号	3.0
北海269号	北海道	巨大胚	<i>japonca</i>	((探系2006×北海241号) ×北海241号) ×北海244号	9.0
ヒメノモチ	岩手県	モチ	<i>japonca</i>	大系227×こがねもち	3.0
タカナリ	茨城県	多収	<i>hybrid</i> *	密陽42号×密陽25号	3.0
オオチカラ	新潟県	大粒	<i>japonca</i>	BG1×収3116	3.6
ホシユタカ	広島県	高アミロース、 長粒	<i>hybrid</i>	中国55号×KC89	4.3
中国137号 (はいみのり)	広島県	巨大胚	<i>japonca</i>	EM40×アケノホシ	10.3
中国糯120号	広島県	モチ	<i>japonca</i>	アケノホシ×みたまもち	2.4

* *hybrid* は *japonica* と *indica* の交雑系統。

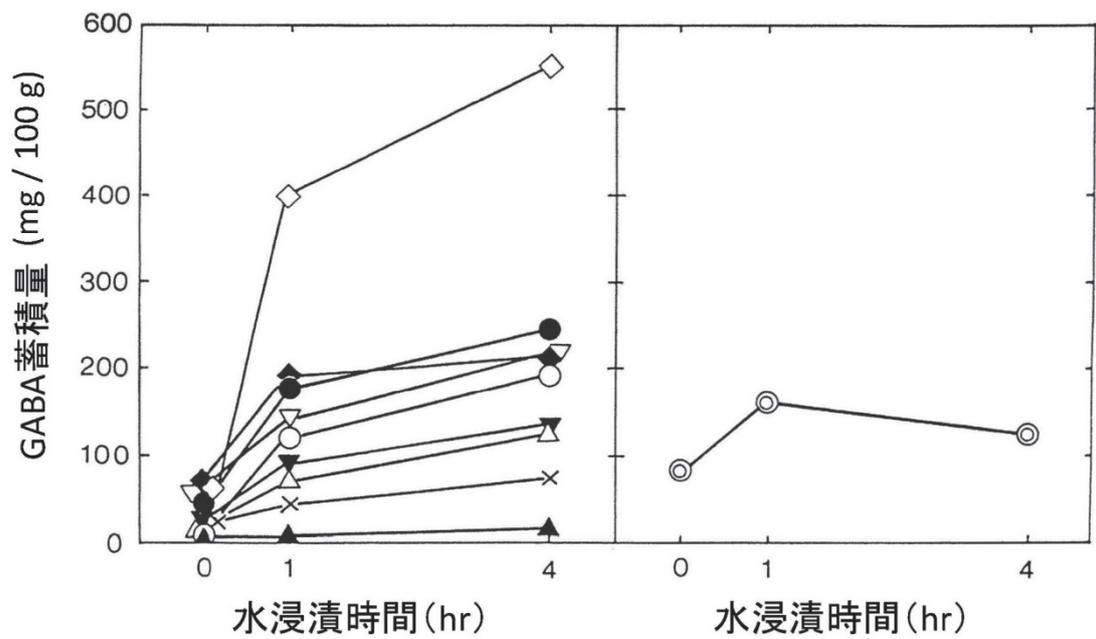


図 4-1. 異なる 10 品種のコメ胚芽での水浸漬処理による GABA 蓄積量。

胚芽は 40°C で水浸漬処理を行った。

左のパネルには GABA 蓄積量が 4 時間後も増大を続けた品種を、

右のパネルには一度増加した GABA が 4 時間後には減少した品種を示した。

● : コシヒカリ、○ : 彩、▲ : タカナリ、△ : オオチカラ、◆ : 中国 137 号、

◇ : 北海 269 号、▼ : 中国糯 120 号、▽ : ヒメノモチ、◎ : ホシユタカ。

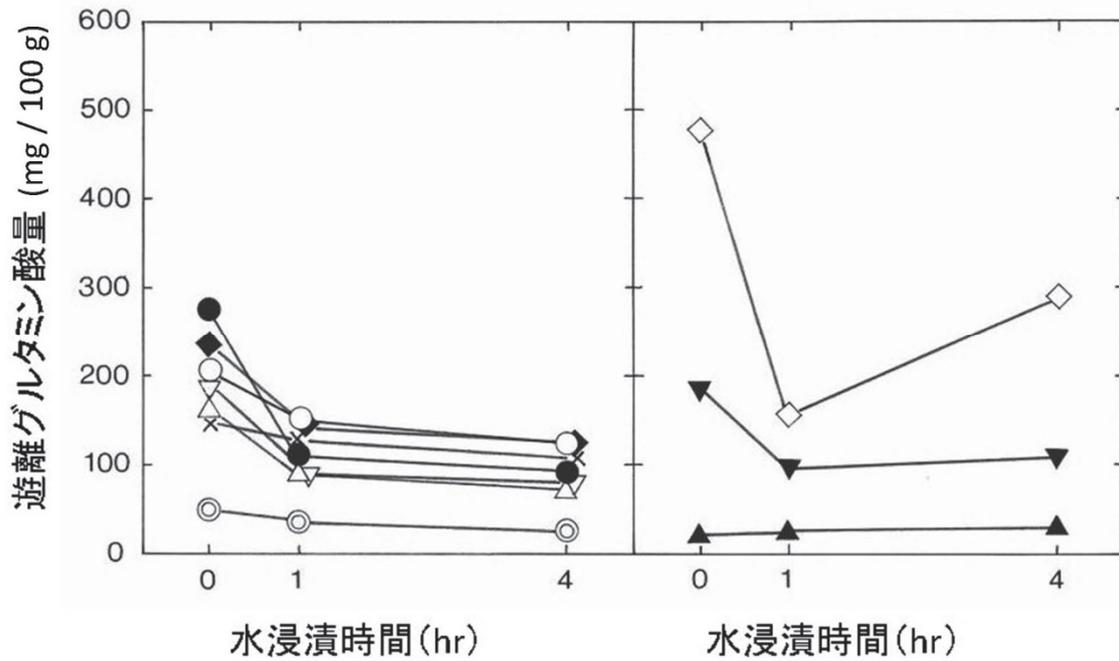


図 4-2. 異なる 10 品種のコメ胚芽での水浸漬処理による遊離グルタミン酸含量の変動。
 胚芽は 40℃ で水浸漬処理を行った。
 左のパネルには遊離グルタミン酸が 4 時間後も減少を続けた品種を、
 右のパネルには一度減少したグルタミン酸が 4 時間後増大に転じた品種を示した。
 ● : コシヒカリ、○ : 彩、▲ : タカナリ、△ : オオチカラ、◆ : 中国 137 号、
 ◇ : 北海 269 号、▼ : 中国糯 120 号、▽ : ヒメノモチ、◎ : ホシユタカ。

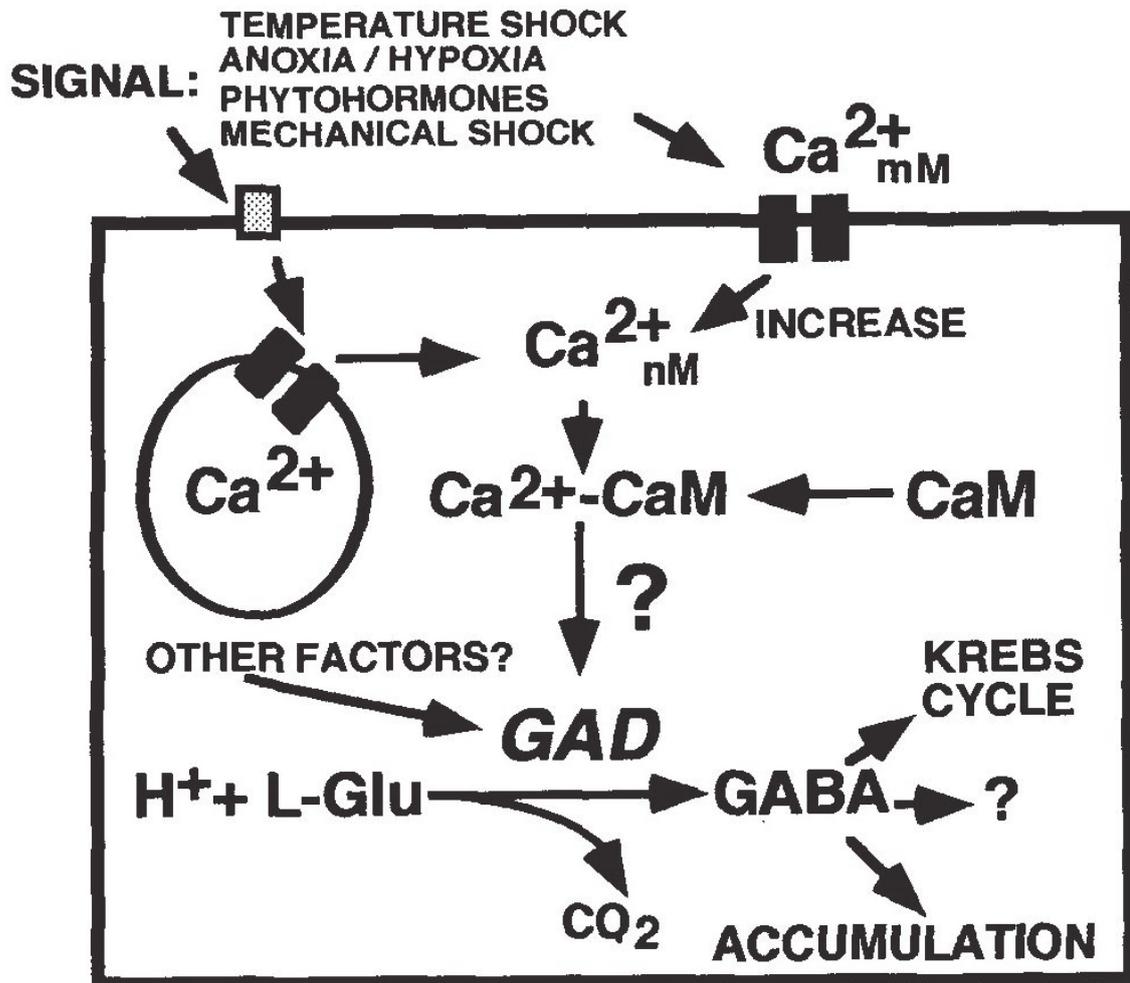


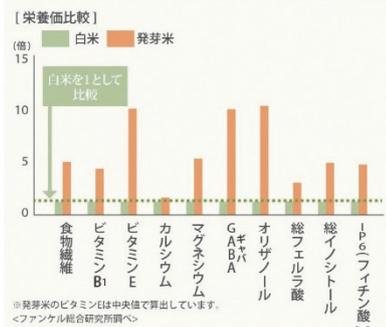
図 4-3. 植物細胞での刺激応答における Ca^{2+} イオン、カルモデュリン (CaM) と GABA の相互作用。
 (Snedden et al. 1995)

**発芽米の栄養価はこんなに豊富！
毎日の食卓から、健康生活をはじめましょう。**

玄米をほんの少し発芽させた「発芽玄米」は、白米以上の栄養価！

健康で元気な毎日を応援するGABA（ギャバ）、腸内環境を整える食物繊維、サビから体を守るビタミンE、体調を整えるマグネシウム・カリウム・カルシウムなどのミネラルも豊富に含まれています。

<白米を1とした時の発芽米との栄養価比較>



さらにうれしい成分も

発芽米の研究から発見された注目成分「PSG」

PSGは、発芽の過程で増加することが発見された、血管の老化や血中コレステロールにアプローチする注目成分。エネルギー代謝を高めたり、内臓脂肪の減少にも関与し、ダイエット効果も期待できます。

写真 4-1. 発芽玄米商品広告の一例。

(ファンケル株式会社 1999)

表 4 - 2. 玄米の水浸漬によるGABA蓄積量への刈り取り時期の影響 (mg/100 g・FW)。

水浸漬 時間 (hr) *	タカナリ		ふくひびき		奥羽飼394号		べこごのみ		夢あおば	
	早刈	完熟期刈	早刈	完熟期刈	早刈	完熟期刈	早刈	完熟期刈	早刈	完熟期刈
0	3.3	1.4	7.4	5.6	9.2	4.7	13.3	18.7	4.1	3.1
4	7.7	4.8	12.6	14.3	14.0	15.6	21.9	20.6	10.6	10.6
24	3.7	6.0	15.2	16.6					2.8	13.1

* 水浸漬処理は40℃で行った。
下に、4時間後のGABA蓄積量の統計処理結果を示した。

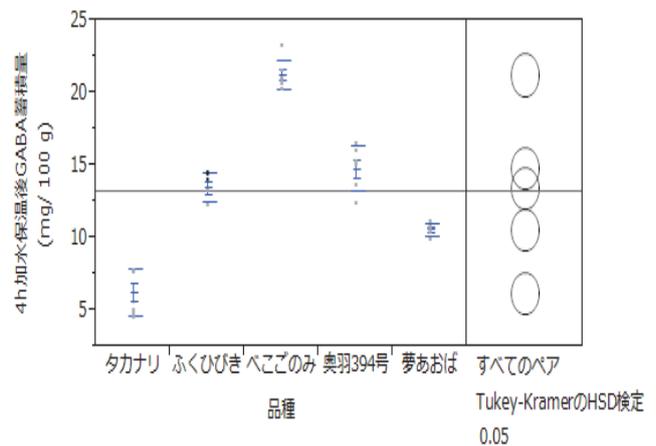
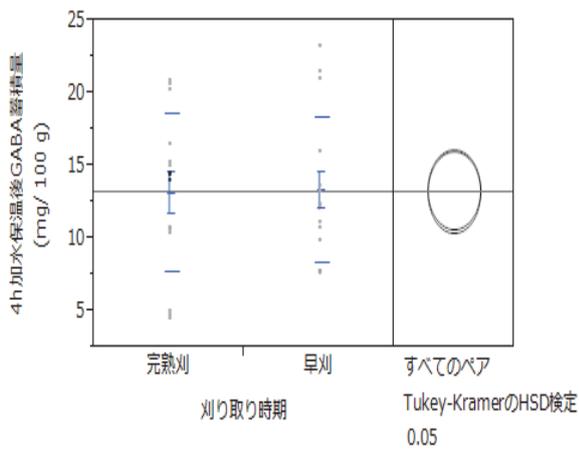


表 4 - 3. 玄米の水浸漬によるGABA蓄積量への穂揃期追肥の影響と玄米収量 (mg / 100 g・FW)。
 基肥なしあるいは多肥（基肥多肥+幼穂形成期追肥）条件において。

水浸漬時間 (hr) *	べこごのみ				ふくひびき			
	基肥なし区	基肥なし+追肥区	多肥区	多肥+追肥区	基肥なし区	基肥なし+追肥区	多肥区	多肥+追肥区
0	2.6	2.4	10.5	9.1	3.2	4.0	3.6	3.4
4	11.3	10.9	23.2	21.7	32.9	31.3	30.4	16.2
24	28.1	40.6	44.3	47.5	13.0	25.6	2.9	17.1
玄米収量 (kg/10 a) **	509	502	599	587	437	420	720	730

* 水浸漬処理は40℃で行った。

** べこごのみは一部鳥害を被った。

下に24時間後のGABA蓄積量について統計処理結果を示した。

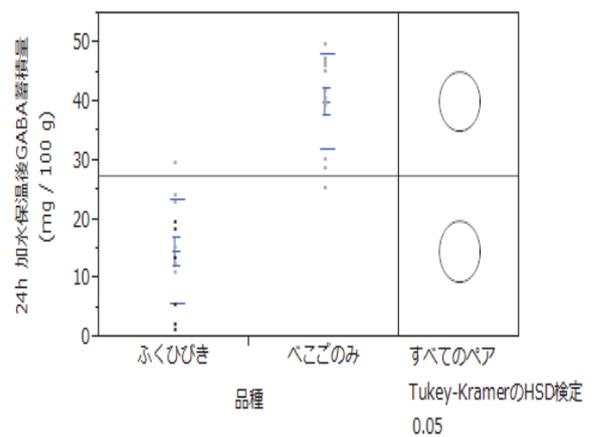
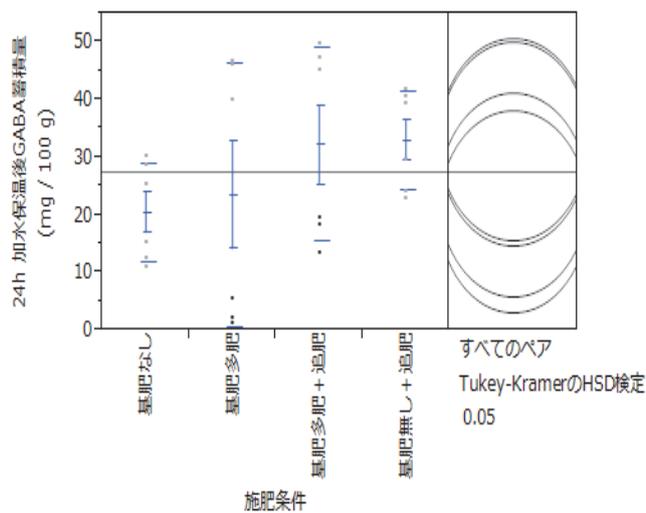


表 4 - 4. 玄米の水浸漬によるGABA蓄積量への幼穂形成期追肥の影響と玄米収量。
基肥標準条件において。

水浸漬時間 (hr) *	べこあおば		モミロマン	
	標準区	標準+追肥区	標準区	標準+追肥区
0	0.3	0.9	1.3	1.7
4	2.2	2.6	4.4	3.6
24	1.7	1.9	15.2	6.8
玄米収量 (kg / 10a)	439	693	492	515

* 水浸漬処理は40℃で行った。
下に統計処理結果を示した。

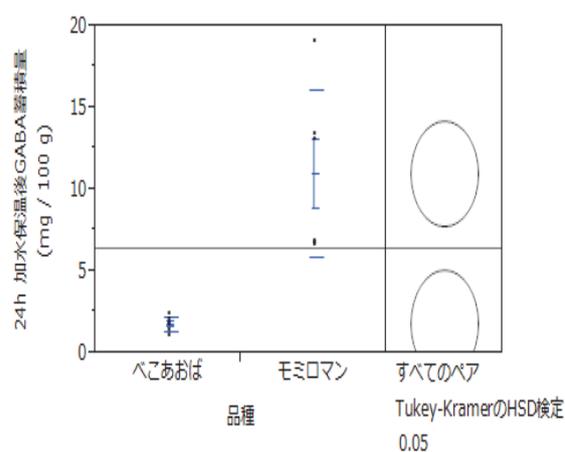
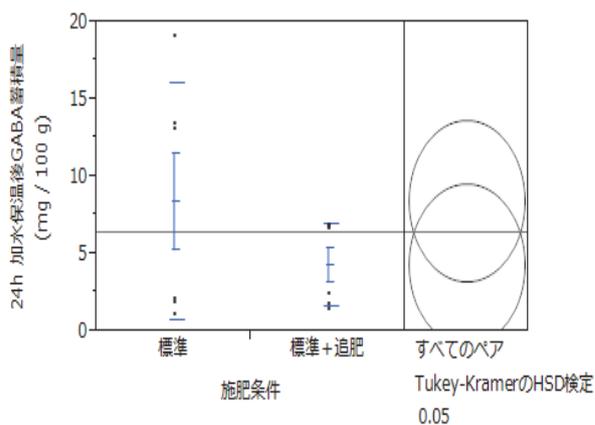


表 4 - 5. 遊離アミノ酸含量測定に用いたコメの特性。

品種・系統名	供試サンプル	栽培地	特性
コシヒカリ・A		新潟県上越市	良食味米 <i>japonca</i>
コシヒカリ・B		新潟県長岡市	良食味米 <i>japonca</i>
コシヒカリ・C		島根県飯石郡飯南町	良食味米 <i>japonca</i>
彩		北海道札幌市	低アミロース <i>japonca</i>
キタカオリ		北海道札幌市	香り米 <i>japonca</i>
北海 296 号		北海道札幌市	巨大胚 <i>japonca</i>
北海 277 号		北海道札幌市	大粒、多収 <i>japonca</i>
ヒメノモチ		岩手県盛岡市	モチ <i>japonca</i>
奥羽 348号		岩手県盛岡市	香り米 <i>japonca</i>
奥羽 354号 (シルキーパール)		岩手県盛岡市	低アミロース <i>japonca</i>
Lgc-1		茨城県つくば市	低グルテリン <i>japonca</i>
タカナリ		茨城県つくばみらい市	多収 <i>hybrid</i> *
サリークィーン		茨城県つくばみらい市	長粒、香り米 <i>indica</i>
鴻 280号		茨城県つくばみらい市	紫黒米 <i>japonca</i>
鴻糯 360号		茨城県つくばみらい市	大粒、多収、モチ <i>japonca</i>
関東 170号		茨城県つくばみらい市	極小粒 <i>japonca</i>
オオチカラ		新潟県上越市	大粒 <i>japonca</i>
ハバタキ		新潟県上越市	多収 <i>indica</i>
北陸 149号 (華麗米)		新潟県上越市	長粒、良食味 <i>hybrid</i>
北陸 153号		新潟県上越市	大粒、多収 <i>hybrid</i>
北陸 161号		新潟県上越市	低アミロース <i>japonca</i>
北陸糯 167号 (めばえもち)		新潟県上越市	巨大胚芽、モチ <i>japonca</i>
ホシユタカ		広島県福山市	長粒、高アミロース <i>hybrid</i>
中国 113号		広島県福山市	低タンパク <i>japonca</i>
中国 137号 (はいみのり)		広島県福山市	巨大胚 <i>japonca</i>
中国糯 120 号		広島県福山市	モチ <i>japonca</i>
ヒノヒカリ		福岡県筑後市	良食味 <i>japonca</i>
旭		岡山県赤磐市	硬質、胚芽脱落低 <i>japonca</i>
アケボノ		岡山県赤磐市	硬質 <i>japonca</i>
日本晴		岡山県赤磐市	標準的な食味 <i>japonca</i>
吉備の華		岡山県赤磐市	長粒 <i>japonca</i>

* *hybrid* は *japonica* と *indica* の交雑系統。

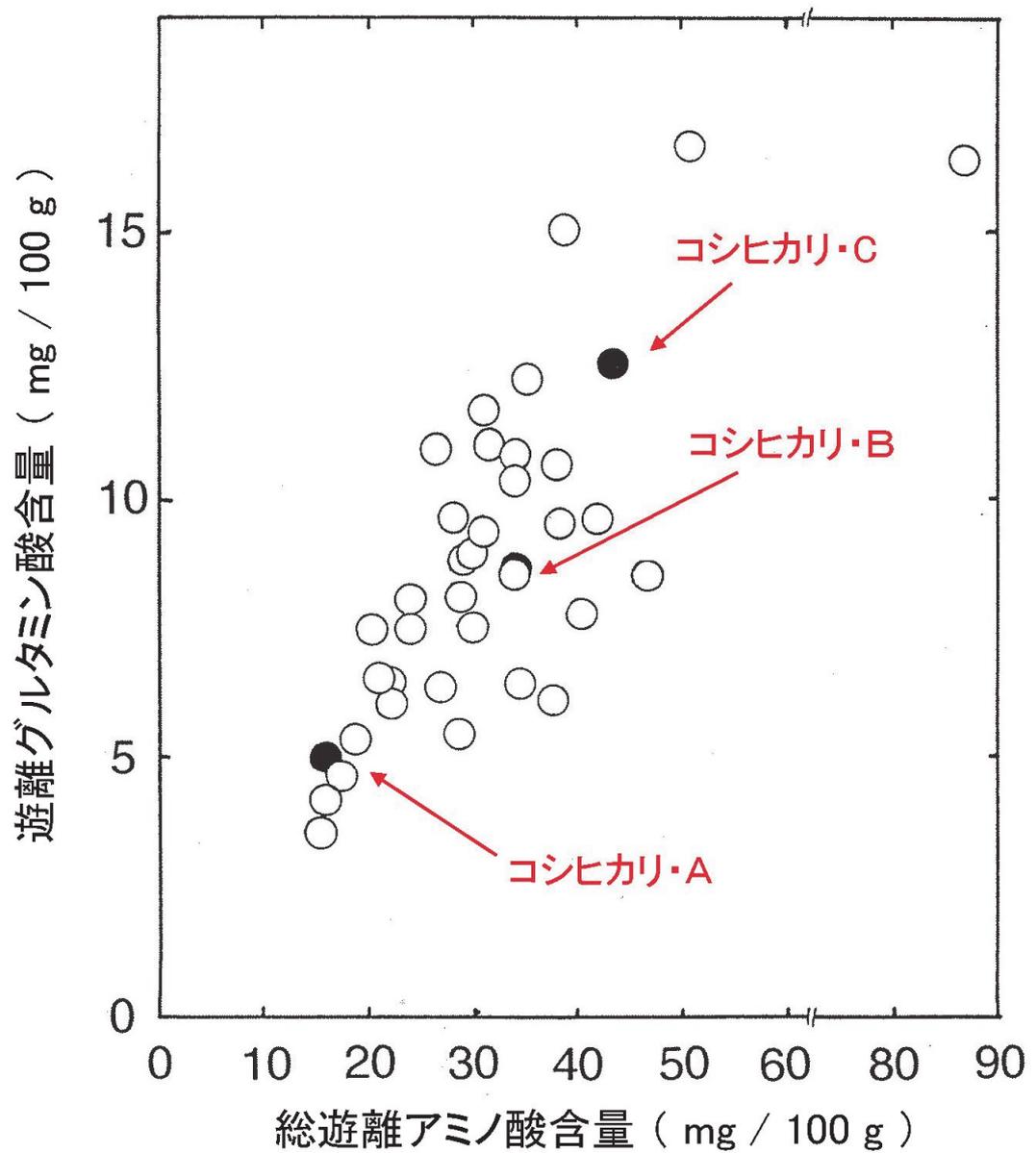


図 4-4. 多様な品種・系統、産地の玄米での遊離グルタミン酸含量と、総遊離アミノ酸含量。
 コシヒカリ・A は新潟県上越市で、コシヒカリ・B は新潟県長岡市で、
 コシヒカリ・C は島根県飯石郡飯南町で栽培した。

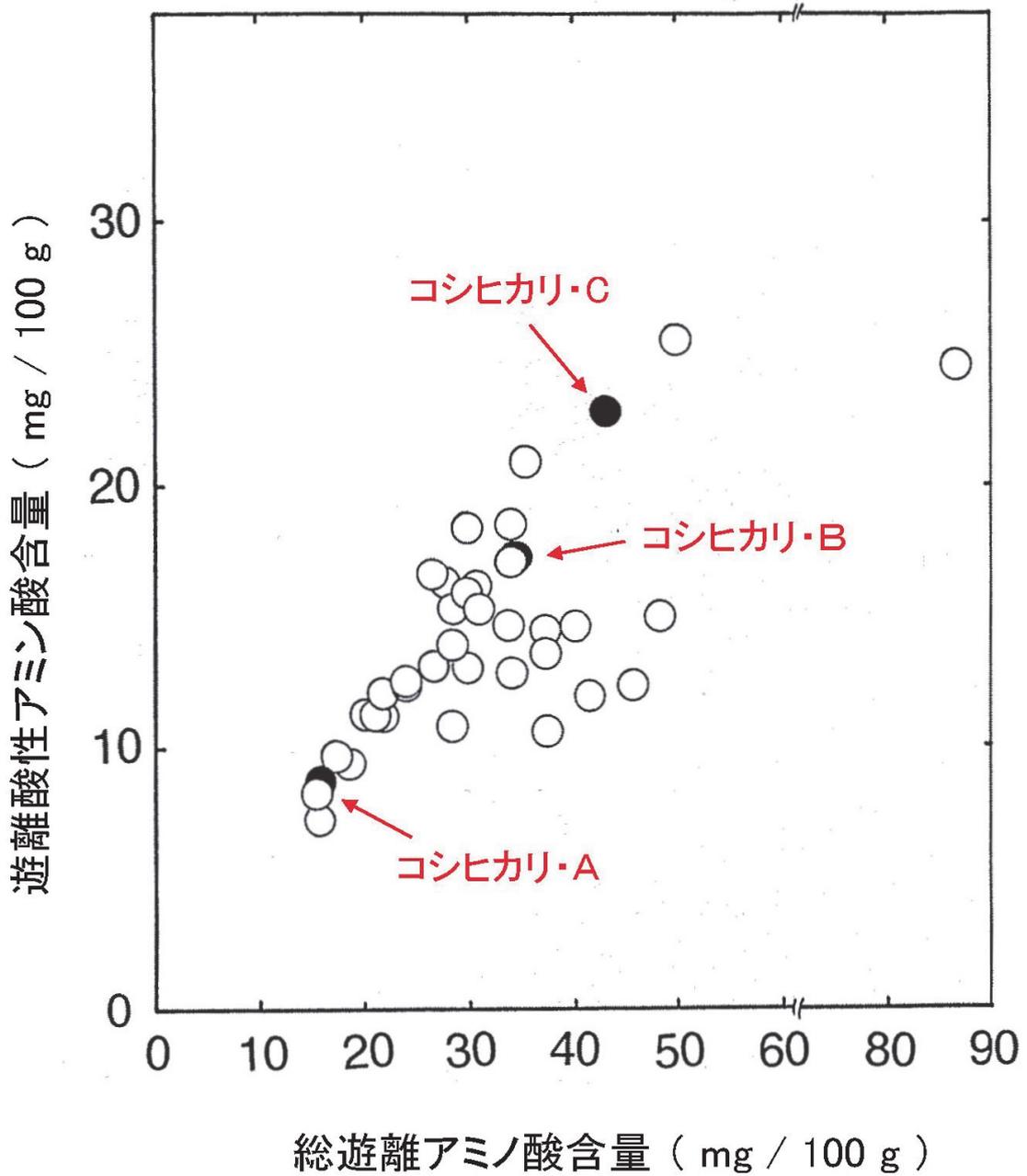


図 4-5. 多様な品種・系統、産地の玄米での遊離酸性アミノ酸含量と、総遊離アミノ酸含量。
 コシヒカリ・A は新潟県上越市で、コシヒカリ・B は新潟県長岡市で、
 コシヒカリ・C は島根県飯石郡飯南町で栽培した。

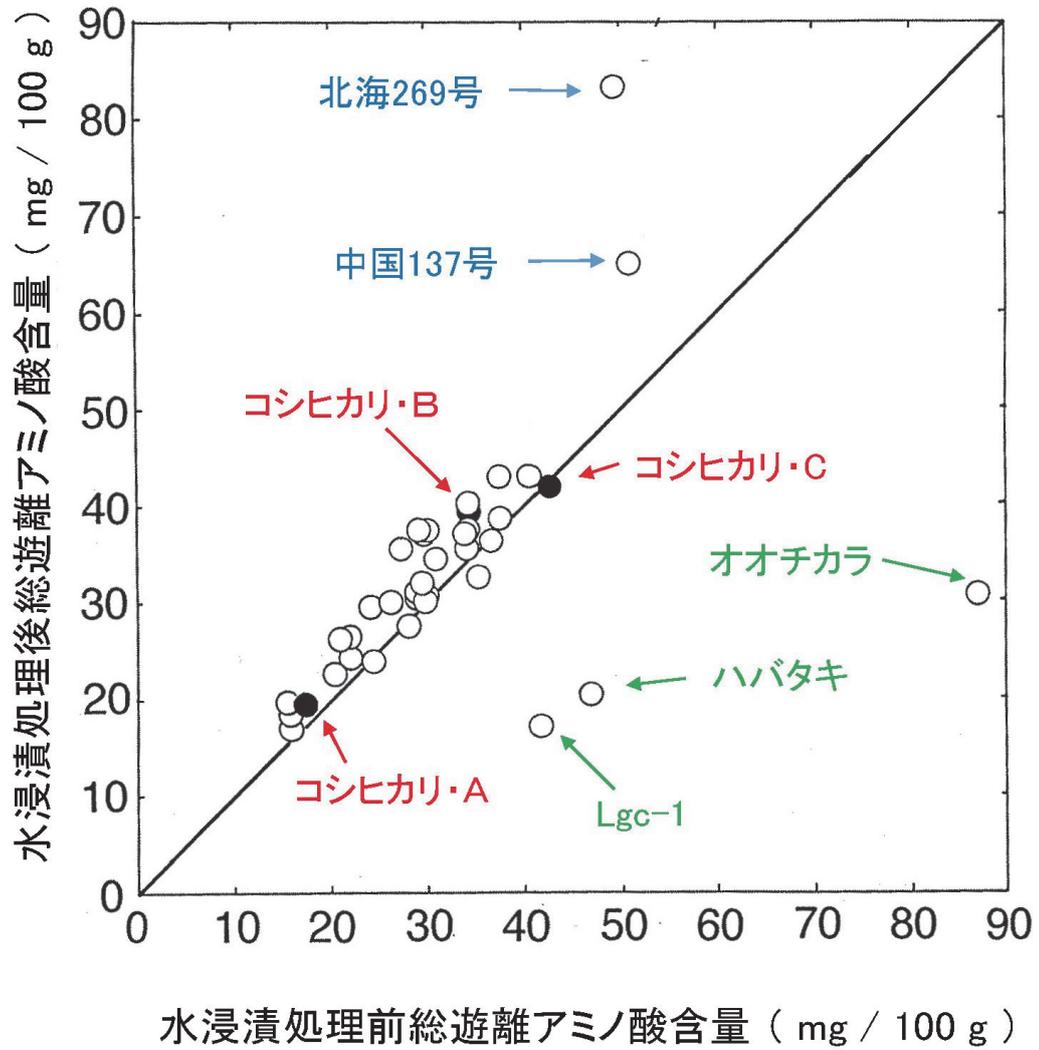


図 4-6. 多様な品種・系統、産地の玄米での総遊離アミノ酸含量とその水浸漬処理による変動。
 コシヒカリ・A は新潟県上越市で、コシヒカリ・B は新潟県長岡市で、
 コシヒカリ・C は島根県飯石郡飯南町で栽培した。
 水浸漬処理は 40℃で、2 時間行った。

第5章 乳酸菌を利用した高 GABA 蓄積玄米飼料素材の開発

5.1 コメへの添加発酵で GABA を高含量蓄積する乳酸菌の選抜

5.1.1 序

前章までで、コメを水に浸漬すると GABA が急激に生成、蓄積することを報告した。GABA には高血圧症抑制作用があるだけでなく、精神安定作用があることと、それを含む食品を経口摂取することでその効果が発揮されることが明らかになったことにより、4-アミノ酪酸 (GABA) 含量を増大させた様々な食品が開発、販売されるようになった。

特に、高血圧症の治療及び予防のためにナトリウムの摂取を控えている患者及び患者予備軍の増加も一因で近年消費量が著しく低下している漬物製造業での利用を目指し、GABA 含量の増加加工法の研究が盛んに行われている (平井ら 2006、上野ら 2007)。しかしその多くが、GABA の前駆体であるグルタミン酸をグルタミン酸ナトリウムとして添加、細菌の持つグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の作用によって GABA を増大させるという方法で GABA の蓄積を試みている。グルタミン酸は、グルタミン酸ナトリウムより高価であり、食品添加物としての供給体制も整っていない。またナトリウム塩より水に溶けにくいいため、調味液にうまく溶けないためである。しかし食品からのナトリウム摂取量を減らしたい高血圧症患者にとって魅力的な製品開発とは言えない結果となっている。また、すべて GABA に変換されずに残存した場合、グルタミン酸は GABA の作用と拮抗する (メルクマニユアル 2005) ことが知られており、GABA のストレス低減作用の妨げとなる可能性が高い。外部からのグルタミン酸の大量添加は、生物の代謝処理速度を超える場合もあると予測されるため、GABA による生理効果を期待する食品製造には望ましくない方法であると考えられる。

イネ科の植物体や穀物では遊離グルタミン酸含量が高いため、水分率の多い環境で保管した時の GABA 蓄積量が、他の植物種より多くなるというすぐれた特性がある (蔡ら 2007、Nogata and Nagmine 2009、古賀 2012)。乳酸菌などの細菌を用いた発酵による GABA 増加を目指す場合でも、コメを用いることで、グルタミン酸ナトリウムの添加を行わずに大量に GABA を蓄積させることも可能となると予測される。

そこでまず、コメに添加して乳酸発酵させた時に、コメ乳酸発酵物に多量に GABA を蓄積できる乳酸菌のスクリーニングを行った。

5.1.2 材料及び方法

5.1.2.1 コメ

2004 年茨城県つくばみらい市の農研機構中央農業総合研究センターの水田圃場で栽培したコシヒカリを玄米で用いた。収穫後、稲架かけで乾燥、脱穀、粳摺を行った後、供試まで 4℃ で保管した。施肥は、LP40 として窒素 3.0 kg / 10 a、LP70 として窒素 2.0 kg / 10 a を基肥として施用した。

5. 1. 2. 2 乳酸菌

畜草 1 号株 (*Lactobacillus plantarum*)、SN1 株 (*Lactobacillus plantarum*)、LQ80 株 (*Lactobacillus plantarum*)、LP1 株 (*Lactobacillus plantarum*)、CA25 株 (*Pediococcus acidilactici*)、It62 株 (*Enterococcus faecium*)、RO50 株 (*Lactococcus lactis*) を供試した。いずれの乳酸菌も使用前に変法 GAM ブイヨン培地 (ニッスイ製菓, 東京) を用い 40°C 静置で液体培養を行った (岡田 1992)。

5. 1. 2. 3 発酵

小規模サイレージ発酵試験法 (蔡 2004) を用いた。

玄米を目開き 1.5mm の篩をつけた遠心式粉碎器 pullerisette 14 (FRITSCH、ドイツ) を用いて粉碎、水分率を 30 % (w/w) に調製後、対数増殖期にある乳酸菌培養液を玄米 100 g (水分率 15 % 換算) に対して 100 μ l の割合で添加して混合、ポリエチレン・ナイロンの積層フィルム製袋「飛竜 KN-210」 (旭化成パックス株式会社、東京) に入れ、バキュームシーラー SQ-202 (シャープ株式会社、大阪) で脱気密封し、30°C で 32 日間保温した。

乳酸菌無添加区と畜草 1 号株、SN1 株、LQ80 株、RO50 株、It62 株、CA25 株の各乳酸菌を加える 6 処理区の計 7 区を設け、各区 3 点ずつ調製した。

5. 1. 2. 4 遊離アミノ酸の抽出と定量

発酵が終了した玄米粉 2.00 mg をねじ蓋つき試験管 (内径 18 mm、長さ 125 mm) にはかりとり、40 % (w/v) TCA 水溶液 10.00 ml を添加、混和して室温で 1 時間以上静置後、定性ろ紙 No. 2 (ADVANTEC、埼玉) でろ過、ろ液を更に 0.45 μ m 孔のセルロースアセテートフィルターユニット DISMIC 25CS045AN (ADVANTEC、埼玉) でろ過、得られた溶液を、玄米の遊離アミノ酸抽出液とした。

遊離アミノ酸抽出液を、高速アミノ酸分析計 L-8500 (日立ハイテクノロジーズ、東京) にリチウムイオン交換カラム P/N 855-3501 (内径 4.6 mm、長さ 60 mm、三菱化成、東京) を接続、表 2-1 の測定条件で、表 2-2 に示す生体液分析プログラムを用いてニンヒドリン発色法によって定量分析を行った。それぞれ 3 回測定し、単純平均計算をした。

玄米粉は、105°C、17 時間加熱通風乾燥による重量法で水分率を求め、遊離アミノ酸含量は乾物あたりの重量で示した。

5. 1. 2. 5 pH の測定及び有機酸の定量

発酵後の玄米粉を、乾物換算重量で約 15g 分ポリエチレン袋に入れ、蒸留水 140ml を加え、一晚 4°C で保管後、バッグミキサー 400 P (アズワン、大阪) で混合、ろ紙 No. 2 (ADVANTEC、埼玉) でろ過した溶液の pH を測定した。各区 3 点の発酵米粉をそれぞれ測定し、結果は平均値で示した。

pH 測定に用いたろ液は 0.45 μ m 孔のセルロースアセテートフィルターユニット DISMIC

25CS045AN (ADVANTEC、埼玉) でろ過、高速液体クロマトグラフ有機酸分析システム Prominence (島津、京都) で、Shim-pack SCR-102H カラム (内径 8mm、長さ 300mm、島津、京都) を 2 本直列で用い、pH 緩衝化法で分離、電気伝導度法によって検出し、有機酸の定量を行った (島津株式会社 2015)。

5. 1. 3 結果

乳酸菌無添加区、および 6 種の乳酸菌を添加し、ポリエチレン・ナイロン積層フィルムの袋に密閉して 30°C で 32 日間、乳酸発酵させた後の遊離アミノ酸含量を表 5-1 に示した。RO50 株を用いると、他の乳酸菌と比べて多量に GABA を蓄積 (64.5 mg / 100 g · FW) させることが可能であることがわかった。

また、CA25 株では遊離グルタミン酸が多量に蓄積するなど、乳酸菌の菌株によって蓄積する遊離アミノ酸の組成が大きく変わることが明らかとなった。

乳酸菌を添加した区では、いずれも乳酸発酵が起こることによって pH が乳酸菌無添加区より低下した。RO50 株添加区では湿重中に乳酸が 0.48 % (w / w)、酢酸が 0.06 % (w / w)、CA25 株添加区では湿重中に乳酸が 0.67 % (w / w)、酢酸が 0.07 % (w / w) 蓄積したのに比較し、乳酸菌無添加区では乳酸が 0.11 % (w / w)、酢酸が 0.05 % (w / w) の蓄積であった。いずれの試験区でもプロピオン酸や酪酸は生成していなかった。

5. 1. 4 考察

有機酸の分析結果から、玄米には元々乳酸菌がほとんど存在していなかったことが示唆された。この結果は、コメのマイクロフローラを調査した報告 (飯塚 1960) とも一致する。飼料としてコメを利用する際、コメをソフトグレインサイレージとして乳酸発酵をさせる方法が広く検討されているが (井上ら 2012)、スムーズな乳酸発酵を行うためには、乳酸菌の添加を行う必要があると考えられた。

RO50 株を用いた時の 64.5 mg / 100 g · FW の GABA 蓄積は、巨大胚米など、水浸漬処理によって GABA を多量に蓄積する事が可能なコメ品種を用いても、元々コメが持っている GAD などの酵素の作用だけでは到達できないほどの高含量であった。コメを水浸漬処理した時には第 2 章で述べたように、雑菌の繁殖による汚染が懸念される。しかし乳酸発酵を行うことによって、生成した乳酸の作用によって米粉の pH が下がり (pH 5.7 → pH 4.7)、食中毒菌の増殖が抑制できるという効果も期待できると考えられた。乳酸菌を用いたコメの発酵処理は、GABA を増加させた食品製造において大きな可能性が期待できる。

細菌利用による食品への GABA 蓄積の試みは、辻ら (1992) による紅麹菌などから始まり、主に乳酸菌を中心に GABA を多量に蓄積できる菌株が検索されてきた。GABA を蓄積する乳酸菌は、*Lactobacillus brevis*、*L. plantarum*、*L. lactis*、*Enterococcus casseliflavus*、*Streptococcus thermophilus* などが知られているが (早川ら 1997)、RO50 株は発酵が速く、バクテリオシンを生産することで幅広い抗菌スペクトルを有し、食品腐敗の原因菌となる酪酸菌 (*Clostridium butyricum*)、

Bacillus 属菌、ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) などに強い抗菌作用を示すため (蔡 2002)、栄養価が高く腐敗しやすい玄米を加工する際の添加剤として理想的である。いずれの試験区においても酪酸は検出されなかったことから有害な酪酸菌の増殖はなかったと推定されるが、GABA の蓄積を目的とする場合には、材料を滅菌する事ができないため、RO50 株の性質は有益である。

RO50 株以外にも、発酵に用いた乳酸菌にはそれぞれ蓄積する遊離アミノ酸組成に、株毎の特徴があった。CA25 株では、旨みを示すグルタミン酸、アスパラギン酸、甘みを示すグリシン、アラニンが大量に蓄積されたことから、発酵後の米粉の味を改善する効果が期待できる可能性が高いと推定される。また、グルタミン酸を大量に蓄積することから、RO50 株との組み合わせ利用も検討可能だと考えられた。

5. 2 GABA 高蓄積乳酸菌を利用した GABA 高富化乳酸発酵米作成におけるコメ品種選定の影響

5. 2. 1 序

前章で、コメにおける GABA の蓄積量決定には、コメ品種選定の効果が大きい事を明らかにした。乳酸菌を用いた発酵におけるコメでの GABA 蓄積についても、コメの品種や栽培方法が影響を与える可能性が考えられたので、検討を行うこととした。

5. 2. 2 材料及び方法

5. 2. 2. 1 コメ及び乳酸菌

コメは、モミロマン、北陸 193 号、ミズホチカラ、日本晴を用いた。いずれも胚芽の玄米に占める重量割合は 2 - 3% (w/w) で、巨大胚米ではない。

茨城県つくばみらい市の農研機構中央農業総合研究センターの水田圃場で、2010 年、3 つの異なる施肥区を設け、それぞれに 4 品種のコメを栽培した。無堆肥区では硫酸として 2 kg / 10 a の窒素、LP40 として 2 kg / 10 a の窒素、LP70 として 2 kg / 10 a の窒素を基肥として施用した。堆肥 5 年目 (2 t / 10 a ・年) 施用の堆肥連用区では、無堆肥区の窒素施肥量に加えて、冬期耕起を行った際に牛糞堆肥 2 t / 10 a を加えた。堆肥残効穂肥区では、堆肥 6 t / 10 a ・年の 4 年連用の残効がある区で、2010 年は堆肥を施用せず、無堆肥区の窒素施肥量に加えて幼穂形成期に尿素として 4 kg / 10 a の窒素を施肥した。

乳酸菌は RO50 株 (*Lactococcus lactis*) を用いた。使用前に変法 GAM ブイヨン培地 (ニッスイ製薬、東京) を用い 40℃ 静置で液体培養を行った。

5. 2. 2. 2 発酵

小規模サイレージ発酵試験法 (蔡 2004) を用いた。

玄米を目開き 1.5mm の篩をつけた遠心式粉碎器 pulluerisette 14 (FRITSCH、ドイツ) を用いて

粉碎、水分率を 30 % (w / w) に調製後、対数増殖期にある RO50 株培養液を玄米 100 g (水分率 15 % 換算) に対して 100 μ l の割合で添加して混合、ポリエチレン・ナイロンの積層フィルム製袋「飛竜 KN-210」(旭化成パックス株式会社、東京) に入れ、バキュームシーラー SQ-202 (シャープ株式会社、大阪) で脱気密封し、30 $^{\circ}$ C で 30 日間保温した。

5. 2. 2. 3 遊離アミノ酸抽出と定量

5. 1. 2. 4 節で示した方法で行った。

5. 2. 2. 4 pH の測定

5. 1. 2. 5 節で示した方法で行った。

5. 2. 3 結果

4 品種の玄米を用い、RO50 株を添加、ポリエチレン・ナイロン積層フィルム袋内に密閉して 30 $^{\circ}$ C、30 日間で乳酸発酵を行った時の GABA 蓄積量を表 5-2 に示した。

明らかにコメ品種の違いによって、GABA 蓄積量の変動した。北陸 193 号では GABA 蓄積量が少なく (30 mg / 100 g \cdot FW 程度)、モミロマンでは GABA 蓄積量が多く (70 mg / 100 g \cdot FW 程度)、その差は 2 倍を超えていた。

また、施肥による差は、品種間差ほど大きくはなかった。

5. 2. 4 考察

乳酸菌などの細菌を用いてコメに GABA を蓄積させる場合にもコメの品種選定は重要であることがわかった。対して、窒素施肥によって GABA 蓄積量は、あまり変動しなかった。3 章での実験結果と同じく、ここでも、穂肥の効果は GABA 蓄積量を増やすよりも減らす方向に作用した。

乳酸菌は単独ではタンパク質を分解利用できないと言われている (岡田 2002)。そのため、コメに添加発酵した場合でも、コメタンパク質の分解過程はコメの持つタンパク質分解酵素の作用に強く依存している事が推測された。そのため今回の結果のように、蓄積する GABA の含量に、コメ品種選定の影響が大きかったと考えられた。

GABA 富化食品用のコメは、コメ粒内の酵素による GABA 増大を目指す場合と、乳酸発酵による GABA 増大を目指す場合とで、同じ品種、同じ栽培法を用いることが可能で、かつ、必要であると推定された。

5. 3 GABA 高蓄積乳酸菌を利用した子豚用飼料素材の開発

5. 3. 1 序

近年栽培面積が増加している飼料用米は、牛 (丸山ら 1983、西村ら 2009)、豚 (松本ら 2009、真原ら 2011)、鶏 (立川ら 2009、石田・堀野 2011) などの飼料で、トウモロコシの代替とし

て利用可能であることが明らかになりつつある。しかし輸入濃厚飼料と比べて生産費は未だ割高である (熊澤 2008)。

飼料用米の生産費低減方法については、家畜堆肥の利用や直播栽培などが試みられているほか、収穫後の加熱通風乾燥に要する費用を削減するために立毛乾燥が試みられている (菊屋ら 2013、吉永 2013)。また、サイレージ加工は、収穫後の乾燥が不要である点で、飼料用米の食用への流用防止 (亀岡 1982) や家畜嗜好性向上目的のほかに、費用削減の面でも期待されている。

一方、飼料用米に付加価値を付け加える試みも行われている。飼料用米給与によって脂質部分に特徴のある豚肉が生産できたという報告 (勝俣ら 2009、水木ら 2011、高橋ら 2011) が多くある。そのほか飼料用米給与では、トウモロコシ給与と比べて仔豚での下痢症発症率が低下するとの報告 (片野・小材 2010) もあるが、その効果は常に観察されるわけではない (片野 2011)。

豚のストレスを低減させ下痢症を防ぐことは、死亡率を下げ、肥育成績を上げられるため、乳酸菌や納豆菌の飼料への添加によるプロバイオティクスが期待されている (大塚ら 2005、坂 2008)。特に仔豚では、病気の垂直感染を防ぐために早めに母豚から放して集団飼育するが、その際のストレスが非常に大きいことが知られている (辻ら 2004)。

前章までで、GABA が高血圧症を抑制するのみでなく、精神安定作用を有すること、また、玄米に水を加えると GABA を多量に蓄積することを報告した。さらに前節の実験において、乳酸菌の利用で更にコメに GABA を多量に蓄積させることが可能であることが明らかになった。

そこで、飼料用米に乳酸菌添加を行い、GABA を富化することでストレス低減効果のある仔豚用飼料米サイレージの作成を試みた。

5. 3. 2. 材料および方法

5. 3. 2. 1 コメ及び乳酸菌

コメは、前節で GABA 蓄積量が多かった品種モミロマンを用いた。本品種は飼料米用に開発された多収品種であり、巨大胚米ではない。

モミロマンは 2008 年、茨城県つくばみらい市の農研機構中央農業総合研究センターの水田圃場で栽培した。飼料価格を低減させることを目的に、面積あたりの収量をあげるための多肥栽培を行った。すなわち、基肥として 14-14-14 化成として 7.0 kg / 10 a の窒素、LP70 として 4.2 kg / 10 a の窒素、LPS100 として 4.0 kg / 10 a の窒素を施用した。栽培コストを下げるために、追肥の施用は行わなかった。

乳酸菌は畜草 1 号株 (*Lactobacillus plantarum*)、LP1 株 (*Lactobacillus plantarum*)、CA25 株 (*Pediococcus acidilactici*)、It62 株 (*Enterococcus faecium*)、RO50 株 (*Lactococcus lactis*) を供試した。使用前に変法 GAM ブイヨン培地 (ニッスイ製薬、東京) を用い 40°C 静置で液体培養を行った。

5. 3. 2. 2 発酵

小規模サイレージ発酵試験法（蔡 2004）を用いた。

玄米を目開き 1.5mm の篩をつけた遠心式粉碎器 pullerisette 14（FRITSCH、ドイツ）を用いて粉碎、水分率を 20、30、40 % (w / w) に調製後、対数増殖期にある乳酸菌株培養液を玄米 100 g（水分率 15 % 換算）に対して 100 μ l の割合で添加して混合、ポリエチレン・ナイロンの積層フィルム製袋「飛竜 KN-210」（旭化成パックス株式会社、東京）に入れ、バキュームシーラー SQ-202（シャープ株式会社、大阪）で脱気密封し、30 $^{\circ}$ C で 0、1、3、5、10、12、18、24、32 日間保温した。

5. 3. 2. 3 遊離アミノ酸の抽出と定量

5. 1. 2. 4 節で示した方法で行った。

5. 3. 3. 3 pH の測定

5. 1. 2. 5 節で示した方法で行った。

5. 3. 3 結果

モミロマン玄米を粉碎、30 % (w / w) に調湿、乳酸菌を加えず、あるいは 3 種の乳酸菌株のいずれかを加え、ソフトグレインサイレージとして乳酸発酵させた時の GABA 蓄積量を図 5-1 の左枠に示した。RO50 株を用いると大量（1100 – 1500 mg / kg (110 – 150 mg / 100 g) \cdot FW) に GABA を蓄積できることが、再度確認できた。GABA の蓄積量はおおよそ 20 日程度で上限に到達する。その時の発酵状態を確認するために測定した pH の推移を図 5-1 の右枠に示した。RO50 株を用いた乳酸発酵による pH の低下は 5 日で下がりきり、その後ゆるやかに上昇する。

ソフトグレインサイレージを飼料素材として取り扱う際、畜産従事者の肉体的負担を下げるために、穀物に加える水分量は可能な限り減らすことが望ましい。モミロマン玄米を、20、30、40 % (w / w) に調湿した時の GABA 蓄積量と pH の推移を図 5-2 に示した。RO50 は 20 % (w / w) の水分率環境では十分に発酵できないことがわかったが、30 % (w / w) より多くの水分は必要ないことが明らかとなった。20 – 30 % (w / w) の間に最適な水分率が見つかることが予想される。

5. 3. 4 考察

RO50 によるモミロマン玄米ソフトグレインサイレージの発酵は、仔豚舎の一般的な温度である 30 $^{\circ}$ C で、十分に発酵した。GABA が 1,000 mg / kg 以上蓄積するまでには 10 – 20 日程度で充分であり、32 日保管後も含量はほとんど低下しなかったことから、実用に足るものと考えられた。最終的には、多くの試験区で 1,500 mg / kg (150 mg / 100 g) \cdot FW の高含量に到達している。GABA の蓄積は、pH が低下しきった後にも引き続き起こっている。RO50 株は発酵が早い乳酸菌であるため、発酵による乳酸の生成と増殖が 5 日程度で終了し、その後は残されたコメ粒と乳酸菌の酵素によ

て GABA が生成したことが推定された。いわゆる発酵における熟成過程で GABA の蓄積が起こっている状態であると考えられる。

GABA 製剤を与えた離乳仔豚では闘争行動がやや減少することが報告されている（中村ら 2009）。また、本法によって調製した RO50 乳酸菌発酵玄米をコーンと代替、給与することにより、離乳仔豚で、単なるコメ粉給与だけでは不可能であった下痢症抑制効果が確認され、表 5-3 に示すように無添加区だけでなく抗生物質添加区と比較しても増体重が勝る結果が得られた（松家ら 2013）。RO50 株によるプロバイオティック効果か GABA の精神安定作用のいずれかが、仔豚に効果があったものと考えられ、今後現場での実験を行う事が予定されている。

表 5 - 1. コシヒカリ玄米に乳酸菌を添加したサイレージ中の主要な遊離アミノ酸含量 (mg / 100 g) とpH。

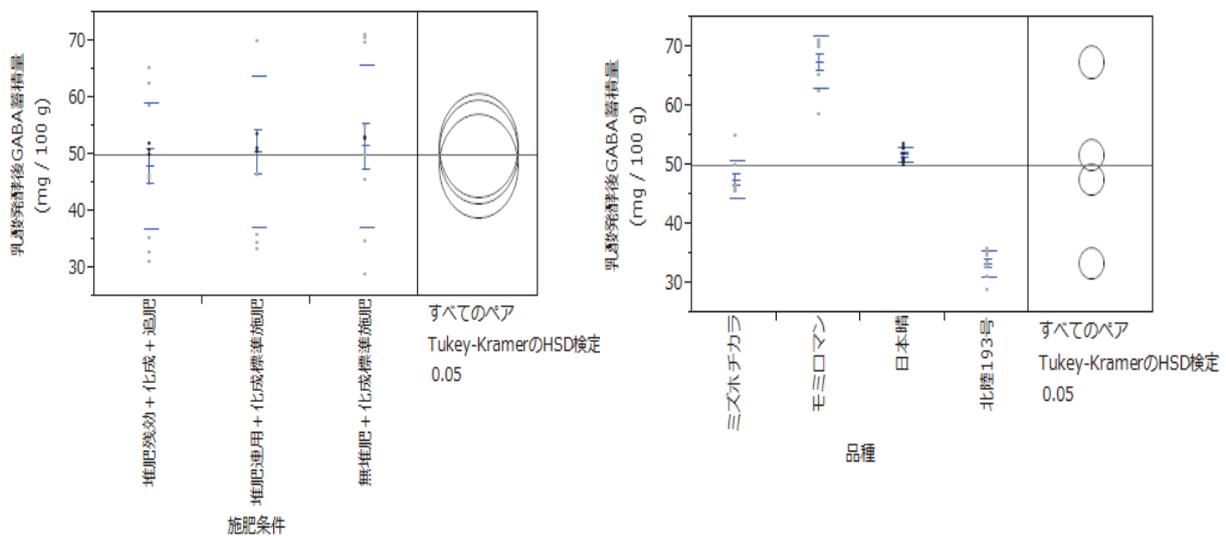
乳酸菌	GABA	Glu	Asp	Arg	Gly	Ala	pH
なし	48.6	53.4	23.4	34.2	30.1	61.9	5.7
<i>Lactobacillus plantarum</i> 畜草1号	35.5	48.9	32.5	81.6	24.6	49.1	3.9
<i>Lactobacillus plantarum</i> SN1	32.6	56.8	39.2	67.4	22.3	47.3	3.9
<i>Lactobacillus plantarum</i> LQ80	32.8	43.3	30.0	74.4	23.5	43.4	3.9
<i>Lactococcus lactis</i> RO50	64.5	32.7	70.1	24.2	36.3	69.0	4.7
<i>Enterococcus faecium</i> It62	34.4	53.0	25.6	15.9	24.6	26.5	4.8
<i>Pediococcus acidilactici</i> CA25	31.8	120.1	77.4	3.7	46.0	113.2	4.2

サイレージは水分率 30 % (w / w) に調湿、30℃で、32日間保管した。

表 5 - 2. 各施肥条件で栽培した玄米 4 品種を用いた
RO50株での乳酸発酵後のGABA含量 (mg / 100 g)。

施肥条件	米品種			
	モミロマン	北陸193号	ミズホチカラ	日本晴
無堆肥	70.5	32.6	50.3	52.8
堆肥連用	69.5	34.5	46.4	51.7
堆肥残効穂肥	62.2	33.0	46.1	50.9

玄米粉は水分率 30 %(w/w)に調湿、30℃で30日間保管した。
下に統計処理結果を示した。



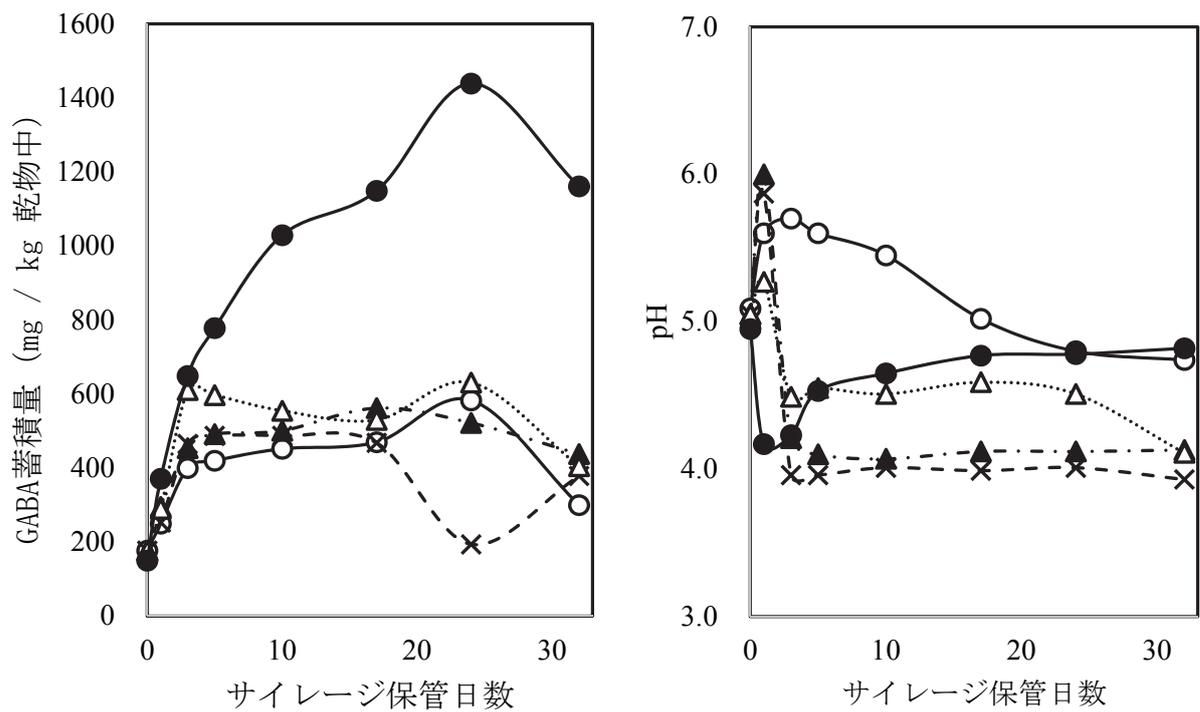


図 5 - 1. モミロマン玄米に各種乳酸菌を添加したサイレージの GABA 蓄積量 (mg / kg · DW) と pH。
 玄米は 30 % (w / w) に調湿し、30°C で保管した。
 ○ : 無添加、× : *L. plantarum* LP1、▲ : *P. acidilactici* CA25、
 △ : *E. faecium* It62、● : *L. lactis* R050。

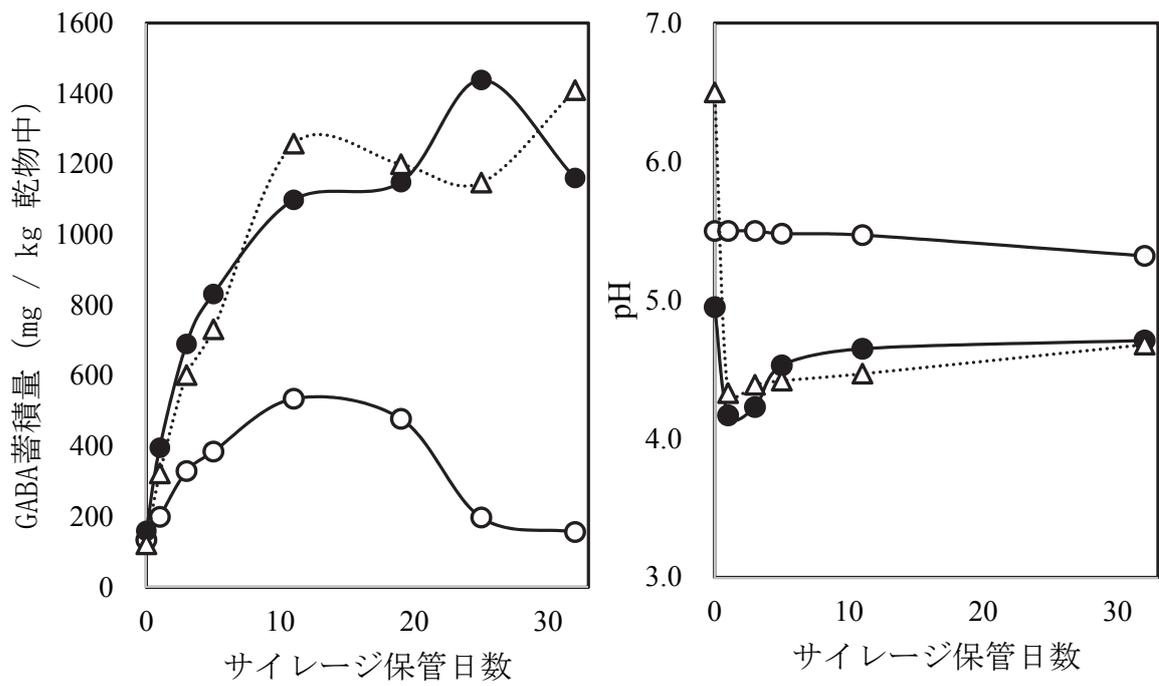


図 5 - 2. モミロマン玄米を各水分率に調湿したサイレージの GABA 蓄積量 (mg / kg・DW) と pH。
 玄米に *L. lactis* R050 株を添加、30℃ で保管した。
 水分率は重量割合で、○ : 20 %、● : 30 %、△ : 40 %。

表 5 - 3. R050株乳酸発酵コメ粉による仔豚飼養成績。

	給与 0 - 19 日 1日増体重 (g)	給与 20 - 28日 1日増体重 (g)
無添加コメ粉区	333.7	554.4
R050発酵コメ粉区	472.4	667.1
抗生物質添加コメ粉区	387.4	603.3

(松家ら 2013)

第6章 総合考察

6.1 本研究のまとめ

本研究では、コメの食味改善を目的に、タンパク質やデンプン等の高分子以外にも、低分子成分が食味に影響を与えている可能性について考え、遊離アミノ酸に注目、コメ粒中の分布と、調理中の含量変動について分析を行った。大量にデンプンを含む試料で、確実に酵素活性を停止し、遊離アミノ酸を抽出するために、最終濃度 8% (w/v) のトリクロロ酢酸 (TCA) を用いる手法を開発し、定量を行った。コメ粒中の遊離アミノ酸は、舌にふれる表面部分に多く、また調理中に含量が変動することによって、食味に影響を与えている可能性が示唆された。

この時、コメを調理するために水に漬けると 4-アミノ酪酸 (GABA) が大量に生成、蓄積することを発見した。

GABA は経口投与によって哺乳動物の高血圧を抑制することが知られている物質であることから、コメの水浸漬加工によって高血圧抑制効果のある健康補助食品の作成が可能となると予想された。そこでまず、コメに GABA が大量に蓄積する加工条件についての検討を行った。GABA 蓄積の至適温度は 30 – 40°C、至適 pH は 5.5 であった。これはコメのグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の至適温度、至適 pH と一致し、GABA 蓄積はコメ粒中の酵素作用によって起こることが示唆された。この条件は、通常の調理前水浸漬条件、あるいは発芽条件で、GABA の増大が可能であることを示している。また、30°C、4 時間処理後の GABA の蓄積量は、基質となる遊離グルタミン酸含量から推定される量よりも多かったことから、GABA の蓄積には GAD 以外にタンパク質分解酵素なども関与していると考えられた。玄米 (cv. コシヒカリ) での GABA 蓄積量は、30°C、4 時間処理後で 12.4 mg / 100 g · FW であり、GABA が高血圧抑制効果を発揮出来ると推定されている 20 mg / day 摂取は容易であると考えられた。

GABA はコメ粒では、特に胚芽部分に多く蓄積した。そこで胚芽から GABA 高富化健康補助食品を作成することを試みた。保存性を低下させる高い油脂含量を改善するために、有機溶媒脱脂を試み、*n*-ヘキサンを用いることによって GABA 蓄積量を減らさず脱脂が可能となることを確認した。脱脂コメ胚芽 (cv. ササニシキ) には、300 mg / 100 g · DW 以上の GABA が蓄積した。

GABA 富化加工を行った脱脂コメ胚芽を高血圧傾向のある初老期女性患者に経口投与する実験を行ったところ、高血圧症抑制効果だけでなく、精神安定効果があることを確認した。そこで、実験に用いた GABA 富化脱脂コメ胚芽粉末を錠剤形に打錠し、サプリメントとして製造、販売を行うこととした。

発芽玄米でも水浸漬の影響による GABA の蓄積が確認されたことで、従来の繊維質やビタミン、ミネラルの摂取などの目的以外に高血圧症傾向の抑制や精神安定効果を求めての利用が盛んになってきたことから、コメの品種によって GABA 蓄積量に違いがあるかどうかの検討も行うことにした。コメでの GABA 蓄積量は、品種によって大きく異なった。また、一度増加した GABA 含量が減少する品種が存在したことから、コメでの GABA 蓄積量は、生合成量と分解量とのバランスによって決定することが明らかとなった。

GABA 蓄積量へのコメの栽培条件の影響についても検討を行ったが、早刈りや窒素追肥によって GABA 蓄積量を増大させることはできなかった。GABA の蓄積においては、栽培方法より品種選定の影響が大きいことが示唆された。しかし遊離アミノ酸含量が、同じ品種でも産地によって異なる事例も確認されたことから、栽培法によって GABA 蓄積量を上げる方法を今後見つけられる可能性も残っていると推定された。

細菌の GAD を利用して GABA を増大させる試みも様々な食品で行われているが、多くはグルタミン酸ナトリウムの添加によるものである。コメ粒中にはグルタミン酸が多いことから、グルタミン酸ナトリウムの添加を行わずに、細菌利用による GABA の大量蓄積が可能となることが予想された。乳酸菌を利用することでプロバイオティック効果も期待できるので、植物性の乳酸菌から GABA を大量に蓄積できる菌株を検索、*Lactococcus lactis* RO50 株を選抜した。コメでの GABA 蓄積量へは、RO50 株を添加して乳酸発酵を行う際にも、窒素施肥方法の変更よりも、コメの品種選定の影響の方が大きいことが確認された。RO50 株と基肥窒素多肥栽培を行ったモミロマンを用いることで、150 mg / 100 g・FW の GABA が蓄積したコメ粉を得ることができた。これを仔豚用の飼料で、コーンと置き換えて配合、飼養したところ、下痢症の低減が確認された。

GABA は急激には血圧を下げず、投与を停止すると速やかに体外に排泄され、ゆるやかに血圧が回復することから、健康補助食品に用いる機能性成分として、理想的な性質を有していると思われる。コメに GABA を蓄積させることで毎日の摂取が無理なく行え、継続的に高血圧抑制、精神安定作用が期待できるものと考えられた。

6. 2 本研究の社会への影響と発展

本研究成果が公表されるまでは、GABA の高血圧症抑制作用の効果を目的に開発、販売された食品および飲料は、チャ葉を嫌気処理加工した「ギャバロン茶」のみであった。嫌気処理はバッチ処理を行う必要があるため大量生産に向かず、製品管理にも高度な技術を必要とするため、他の食品では GABA を蓄積させる方法として応用利用されなかった。

本研究で発見した、材料を水浸漬処理することによる GABA 蓄積方法は、嫌気処理よりはるかに簡便であり、加工設備への投資額も低く抑えることが可能となる。また、連続した生産が可能なベルトコンベア方式での加工も可能となるので、大量生産が容易である。さらに本研究成果の公表によって、GABA を増加させた食品には、高血圧症抑制だけでなく精神安定作用があり、経口投与で効果を発揮させることが可能であると広く知られたため、多くの大学、公的研究機関、企業で、一斉に GABA 含量を増加させた食品の研究開発、販売が開始されることになった。本研究結果を元に取り得た特許は、その請求範囲が、コメおよびコムギを水浸漬処理することによって GABA の大量蓄積を可能とする方法についてであったが、20 社以上の企業から申請されて、許諾利用された。

現在、コメにおける GABA については、主に玄米を発芽させた「発芽玄米」の研究が広く行われている（大久ら 2003）。発芽処理は玄米を水に浸漬、30℃ 程度で 12 - 24 時間保温することによって行われる。この時、水浸漬により、脱穀や籾摺時の機械的スナストレスへの応答反応が開始され、コメ粒に GABA が多量に蓄積する。ストレス応答の結果として起こった GABA の生合成は、その

後ゆるやかに植物の発芽と生育中に起こる通常の生理反応へと移り変わって継続する (Baum et al. 1996, Xu et al. 2010)。「発芽玄米」は、カロリーやビタミンなど、健康に有益な成分が、発芽に用いられることによって、玄米と比較して含量低下することが知られている。しかし GABA は、一般的な食用品種では、発芽前の玄米での含量の 2 倍以上に増加、蓄積する。

農水省所轄の研究機関 (現・農研機構) では、「発芽玄米」用の巨大胚米品種を複数作出、品種登録を行っており (根本ら 2001、遠藤ら 2006、松下ら 2008、石井ら 2013)、加工利用についても研究され (河野ら 2008、竹内 2014)、一部の品種では村おこし産品として栽培されるようになってきた。

その他、農産種子とそのモヤシなどを利用した GABA 蓄積の研究としては、先行研究が多く (Wickremasinghe and Swain 1965, Tokunaga et al. 1976, Shelp et al. 1995)、GAD の基質となるグルタミン酸の供給源となるタンパク質が多く含まれていることから、ダイズなどの豆類での応用研究が盛んに行われている (片桐・清水 1994、水野ら 2002、水野・山田 2007)。オオムギ (Nogata and Nagamine 2009) やゴマ (長島ら 2005)、ソバ (清水 2003) でも同様の研究が行われ、一部製品化も行われた。

種子以外の野菜では、トマト (山中ら 1972) やジャガイモ (中村ら 2006、野口ら 2007) に GABA が大量に蓄積することが報告されている。カボチャでの GABA 蓄積加工品 (商品名「パンプキンギャバ」、ロッテ物産) は (奥山ら 2004)、江崎グリコ株式会社においてチョコレートに添加して利用され、「ストレス社会で闘うあなたに…」 (商品名「メンタルバランスチョコ GABA」) の惹句で販売されている。またチャでは、嫌気ストレス反応によって製造されていた「ギャバロン茶」を、機械的ストレスや水浸漬処理によって加工し、製造価格を下げると共に、GABA 含量を増大させようとする試みも行われている (白木 2000)。

微生物を利用した GABA 蓄積食品の開発研究も盛んに行われている。ヨーグルト (早川ら 2004) やチーズ (野口ら 1999)、漬物など、主に乳酸菌を用いた乳酸発酵によって GABA を蓄積させた事例が多いが (早川ら 1997)、従来はあまり乳酸発酵処理を行わなかった食品も、GABA の蓄積を目的に乳酸発酵を行う試みがなされるようになった (森ら 2007、広瀬ら 2008、梅川ら 2008)。

それらの商品開発に伴い、GABA 増加食品の安全性 (松原ら 202、梶本ら 2004)、高血圧症抑制効果 (安井ら 2004、榊原 2006、樋渡ら 2010、白井ら 2011)、精神安定効果 (藤林ら 2008、吉田ら 2015)、腎機能改善 (林ら 2000) 等、多くの健康機能について検討が行われている (海老塚 2007、山本ら 2011)。未だ *in vitro* での実験結果ではあるが、アレルギー抑制効果を確認したグループも存在する (川崎ら 2014)。さらに、潮ら (2008) の報告によれば、GABA には高血圧症抑制、精神安定効果以外に、抗 II 型糖尿病作用もあると推測されており、今後 GABA を増加させた食品の開発はより一層求められることが予想される。

機能性食品として効果が発揮される GABA の摂取量は、文献により数値が様々である。高血圧症予防には 10 - 20 mg / day、精神安定には 30 - 50 mg / day を要すると考えられているが (横越 2008)、より少量でも効果有りとする報告も多い。本研究によって開発された方法で加工したコメの経口摂取によって、GABA で機能性が発揮できる量の摂取は容易に可能であると考えられる。

本研究では、炊飯に先立ってコメの水浸漬処理等を行った段階での GABA 蓄積量のみを示したが、その後の多くの研究から、炊飯による加熱処理を受けた後も、水浸漬処理によって生成した GABA はほとんど分解されず、含量が維持されることも明らかとなっている(杵淵ら 1999a、大久ら 2005、山崎 2009)。

「発芽玄米」は、TV 等によるコマーシャル効果と、高血圧症患者の増加等によって、発売数年後から爆発的に消費量が增大したが、2000 年頃をピークに、現在の消費量は最盛期の 6 - 7 割程度にまで減少している。第 2 章 1 節の考察で述べた通り、加水処理による遊離酸性アミノ酸類の含量減少による食味の低下だけでなく、異臭などによる風味低下が原因で、「おいしくない」と評価され、リピーターが多くなかったためだと考えられる。「発芽玄米」の食味が低下する主要要因である異臭の発生原因は、玄米中の脂質の酸化(水野ら 2012、吉田ら 2015)、細菌の増殖などによるものと推定される。雑菌については多くの GABA 富化コメ加工品工場で問題になっており、0.1% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウムでの消毒などが試みられている(鈴木・前川 1999)。

水浸漬による風味低下と雑菌汚染を避けるために、水浸漬以外の方法でコメに GABA を増加させる加工法の開発も研究されている。GABA は植物のストレス応答として生成、蓄積することから、高圧によるストレスをかける方法が試みられ、実験レベルでは成功している(山崎・笹川 1998、杵淵ら 1999b、Sasagawa et al. 2006)。

また、「発芽玄米」の持つ玄米本来の糠の風味や食感なども、消費者に嫌われる原因となった可能性が高い。玄米には、セルロースやリグニン等、水和されにくく消化されにくい成分が多いため、食事中に糠が口の中に大きなかけらとして残り、食感を低下させる原因となる。疎水性成分含量の高さやタンパク含量の高さによる独特の苦みなどの問題も多い。

GABA は、糠を取り除いても胚芽部分を残せば、かなりの含量をコメ粒に蓄積させることが可能となる。精米法により胚芽を意図的に残す胚芽精米(福場 1978)は、健康を目的として製造、利用されている自主流通米であり、胚芽の保有率 80% 以上を基準としているが、かつては胚芽の落ちにくい品種を選んで製造したため、食味が劣っていた。しかし近年の精米技術の発達により、胚芽精米はコメの品種を選ばずに可能となってきており、新たな GABA 富化コメ加工商品の開発も期待できる。また、胚芽の胎盤部分のみを残す精米法(商品名「金芽米」、東洋ライス株式会社)なども試みられており、新たな GABA 富化コメ加工商品の開発も期待できる。

より GABA 含量の高いコメを育種するために、コメの GAD 遺伝子の解析も進められている。Akama らは、2001 年、イネの GAD を解析した結果、2 つある GAD 遺伝子の一方がカルモデュリン(CaM) 制御部位を欠失していることを発見した。その結果コメにおいては、GABA の生合成が通常の植物と異なり、ストレスとは無関係な制御を受けている遺伝子が含まれている可能性が示された。この CaM 結合部位欠失 GAD 遺伝子の機能を確認するために GAD 遺伝子の C 末端を削除してイネ細胞に導入、発現させたところ、通常の 100 倍もの濃度で GABA の蓄積が確認された(Akama and Takaiwa 2007)。これを応用し、発芽時 GABA 蓄積量の少ないコメ粒の中心部分でも GABA を大量に蓄積するコメを作出することが試みられている(赤間 2010)。

6. 3 今後の展開

GABA 以外にも、コメの中の機能性成分を利用しようという試みが盛んに行われている。

トコトリエノールはイネ科以外の植物にはあまり多く含まれないことと、強力な抗酸化活性があり、癌予防効果が期待されることで、コメの中の機能性成分利用において大きな期待がよせられている。2005 年には、農研機構東北農業研究センター、東北大学、日本医科大学、富山県農業技術センター、民間会社 2 社の共同研究が開始（農研機構 2005）され、高含量品種の選抜も行われた（Sookwong et al. 2007、2009）。しかし一方で、トコトリエノールは効果濃度と細胞毒性の出る濃度との差が小さく、アポトーシスを誘導する作用があること（McIntyre et al. 2000、中島・矢野 2010）等から投与量の決定が難しいこと、保管中の酸化による減少が激しいことなどが理由で、利用は困難と推定された。2012 年度末には 10 年間続いたトコトリエノール研究会も解散している。

レジスタントスターチは、肥満症患者の増大に伴って（日本においては女性の肥満率は横ばいだが、男性の肥満率は増大している）、その有効性が期待されるようになった。農研機構中央農業総合研究センターではレジスタントスターチの多いコメ品種（cv. 越のかおり）を開発、東京滋恵医科大学、女子栄養大学、新潟県農業総合研究所との共同研究で、2013 年から、糖尿病を持たない弱肥満者での血糖値抑制効果についてのヒト介入試験が開始された（農研機構 2015）。

大学を中心としたいくつかの研究グループでは、コメ糠と胚芽に多く含まれている γ -オリザノールの研究を盛んに行っている。 γ -オリザノールは、血中脂質代謝を改善し肝機能を改善する（石田ら 1982、三谷ら 1983、Pocai et al. 2006）。また、高脂肪食への嗜好を抑制する可能性もあり（Kozuka et al. 2012）、日本においても今後需要が高くなると予想される。すでに医薬品として（商品名「ハイゼット錠」、大塚製薬）、また抗酸化剤として食品添加物利用が認められており、大量投与による毒性もほとんどないことから、機能性食品に利用する成分として理想的な条件を有していると考えられる。

本論文著者も γ -オリザノール高含量米品種の選抜を試みている。その際、米から抽出後、製品のコメ油として調理に利用する段階での高温条件では抗酸化性天然物の中で最も安定性が高いことが知られている γ -オリザノールが（梶本・嘉ノ海 1994）、玄米として保管中にゆっくりと減少していることを発見した（三枝ら 2014）。 γ -オリザノールは栽培環境によって同じ品種でも含量が変動することが知られており（Britz et al. 2007、Nakano et al. 2013）、収穫後の乾燥条件、保管条件によって同じ品種でも変動するため（三枝・鈴木 2016・発表予定）、含量の高いコメ品種選抜とその利用には、細かい注意が必要である。 γ -オリザノールは、コメ粒における抗酸化活性について、主要な役割を果たしていると考えられているが、コメの抗酸化活性は同じ品種間で栽培地によって 3 倍もの差異があることが報告されており（秋山 2004）、これらの成分を目的とした育種には高度な技術が必要であることが予測される。

また、米の内因性酵素を利用した加工処理方法については、発芽玄米を中心として、機能性成分を含む有用成分含量の変動について、広く研究されている。ゴマでは発芽によって抗酸化活性が増大するという報告があり（福田ら 1985）、粳米や（Lee et al. 2007）、玄米（Chunga et al. 未発表）でも発芽による抗酸化活性とその原因となる成分の増大が報告されている。また、玄米を発芽させる

ことで内因性酵素の作用によってコメの低アレルギー化が可能であるという報告（山田ら 2006）等があり、興味深い。

消費量が減ったとはいえ、コメは今でも日本において最も重要な作物である。また、アジア各国では、コメについての日本の高い育種、栽培技術提供への期待が大きい。高齢化と、消費者の要望の多様化に応じるためにも、コメの機能性の研究は今後ますます重要性を増すと考えられる。また健康機能性に重点を置いたコメの開発は、商品の差別化につながり、TPP 締結後の国際競争力の確保の面でも重要である。今後もコメにおける、より有益な機能性成分の検索と、その生成要因の解明による新品種の育種、新たな食品加工法の開発による有用成分含量の増大化等の研究に取り組んでいきたいと考える。

引用文献・参考文献

Akama, K., Akihiro, T., Kitagawa, M. and Takaiwa, F. (2001) Rice (*Oryza sativa*) contains novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1522**, 143 – 150

Akama, K. and Takaiwa, F. (2007) C-terminal extension of rice glutamate decarboxylase (OsGAD2) functions as an autoinhibitory domain and overexpression of a truncated mutant results in the accumulation of extremely high levels of GABA in plant cells. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 2699-2707

赤間一仁 (2010) GABA 強化米の開発. 日本農薬学会誌, 35, 157-159

秋山美展 (2004) 米の活性酸素消去活性とその相乗作用 和食の健康維持効果に新たな視点. 化学と生物, **42**, 416 - 421

Anseri, M.I., Lee, R-H. and Chen, S-C. G. (2005) A novel senescence-associated gene encoding γ -aminobutyric acid (GABA) : pyruvate transaminase is upregulated during rice leaf senescence. *Physiologia Plantarum*, **123**, 1 - 8

新井映子 (2012) 米の糖質分解酵素活性と米飯食味 早刈り米のおいしさの秘密とは. 応用糖質科学, **2**, 203 -207

Baum, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., ASrazi, T., Katsnelson, H., Zik, M. and Fromm, H. (1996) Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *The EMBO Journal*, **15**, 2988 - 2996

Bazemore, A.W. Elliott K.A.C. and Florey, E. (1957) Isolation of factor I. *Journal of Neurochemical*, **1**, 334 - 339

米穀安定供給確保支援機構情報部 (2014) 平成 25 年度産水稻の品種別作付動向について. 東京, <http://www.komenet.jp/pdf/H25sakutuke.pdf> [2015 年 10 月 9 日参照]

Billingsley, M., Suria, A., Gilman, R., Shokes, L. and Shahvari, M. (1980) Evidence for GABA involvement in the peripheral control of blood pressure and vascular resistance. *Brain Research Bulletin*, **5**, 329 - 333

Bown, A.W. and Shelp, B.J. (1997) The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiology*, **115**, 1-5

Bown, A.W. and Zhang, G. (2000) Mechanical stimulation, 4-aminobutyric acid (GABA) synthesis, and grown inhibition in soybean hypocotyl tissue. *Canadian Journal of Botany*, **78**, 119 - 123

Britz, S.J., Prasad, P.V.V., Moreau, R.A., Allen, L.H.Jr., Kremer, D.F. and Boote, K. (2007) Influence of growth temperature on the amounts of tocopherols, tocotrienols and γ -oryzanol in brown rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 7559 - 7565

蔡義民 (2002) サイレージ発酵の微生物的制御. *土と微生物*, **56**, 75 - 83

蔡義民・岩澤敏幸・松井繁幸・大石利之・大石誠一・守谷直子・徐春城・三枝貴代・石田元彦 (2007) モウソウチクサイレージの調製と発酵品質. *日本畜産学会第107回大会要旨集*, 15

Chaib, F. (2013) World Health Day 2013: measure your blood pressure, reduce your risk. World Health Organization, Geneva, http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/world_health_day_20130403/en/ [2015年9月10日参照]

Cholewa, E., Cholewinski, A.J. Shelp, B.J., Snedden, W.A. and Bown, A.W. (1997) Cold-shock-stimulated γ -aminobutyric acid synthesis is mediated by an increase in cytosolic Ca^{2+} , not by an increase in Cytosolic H^+ . *Canadian Journal of Botany*, **75**, 375 - 382

Chunga, S.I., Lo, L.M.P. and Kang, M.I. (未発表) Effect of germination on the antioxidant capacity of 1 pigmented rice (*Oryza sativa* L. cv. Superjami and Superhongmi).

Deewatthanawong, R., Rowell, P. and Watkins, B. (2010) γ -aminobutyric acid (GABA) metabolism in CO_2 treated tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, **57**, 97 - 105

海老塚広子・佐々木千恵・喜瀬光男・有田政信 (2007) 発芽玄米含有レトルト米飯を摂取したときの健康人の栄養状態及び身体状況に与える影響. *日本食生活学会誌*, **18**, 216 - 222

遠藤貴司・山口誠之・片岡 知守・中込弘二・滝田 正・東正昭・横上晴郁・加藤浩・田村泰章・小綿寿志・小山田善三・春原嘉弘 (2006) 耐冷性の強い巨大胚水稻新品種「恋あずき」の育成. *東北農業研究報告*, **105**, 1 - 16

ファンケル株式会社 (1999) 確かな機能が毎日の健康を応援！ 発芽米. ファンケル株式会社, 神奈川県, http://www.fancl.co.jp/Items/Detail?category=02&item_code=6188a [2015年10月2日参照]

藤林真美・神谷智康・高垣欣也・森谷敏夫 (2008) GABA 経口摂取による自律神経活動の活性化. 日本栄養・食糧学会誌, **61**, 129 - 133

藤井弘志・安藤豊・松田裕之 (1998) 追肥時期および遮光処理による穎花生産効率の変化とそれが精米のタンパク質含有率におよぼす影響. 日本土壌肥料学雑誌, **69**, 463 - 469

福場博保 (1978) 胚芽米について. 調理科学, **11**, 51 - 54

福田靖子・大澤俊彦・並木満夫 (1985) ゴマの発芽にともなう抗酸化性の増大について. 日本食品科学工学会誌, **32**, 407 - 412

Gallego, P.P., Whotton, L., Picton, S., Grierson, D. and Gray, J.E. (1995) A role for glutamate decarboxylase during tomato ripening : the characterization of a cDNA encoding a putative glutamate decarboxylase with a calmodulin-binding site. *Plant Molecular Biology*, **27**, 1143 - 1151

Giulliani, S., Maggi, C.A and Meli, A. (1986) Differences in cardiovascular responses to peripherally administered GABA as influenced by basal conditions and type of anaesthesia. *British Journal of Pharmacology*, **88**, 659-670

後藤英次・野村美智子・稲津脩 (2006) 寒冷地水稲に対する時期別追肥窒素の利用率と各器官への配分. 日本作物学会紀事, **75**, 443 - 450

Hayashi, T. (1958) Inhibition and excitation due to gamma-aminobutyric acid in the central nervous system. *Nature*, **182**, 1076 - 1077

早川潔・上野義栄・河村真也・谷口良三・小田耕平 (1997) 乳酸菌による γ -アミノ酪酸の生産. 生物工学会誌, **75**, 239 - 244

早川和仁・木村雅行・松本圭介・三沢宏 (2004) 血圧降下作用を有する γ -アミノ酪酸含有発酵乳の研究開発. ヤクルト研究所研究報告集, **24**, 1 - 22

平井啓理・落合春奈・森勝史・瀧井幸男 (2006) しば漬由来 γ -アミノ酪酸 (GABA) 産生乳酸菌の単離とその特性. 食品・臨床栄養, **1**, 49 - 52

平野綾子 (2003) 発芽玄米の栄養価と γ -アミノ酪酸 (GABA) の機能性と安全性, 食品成分の有効性の評価および健康影響評価 研究成果公開システム, 国立健康・栄養研究所、東京、
<http://www.nutritio.net/healthfood/FMPro%3F-db%3Dhealthfood-bbs.fp5%26-lay%3Dmain%26-Format%3Ddetail.htm%26hatugenID%3D45%26-Find> [2015年9月10日参照]

広瀬直人・氏原邦博・照屋亮・前田剛希・吉武均・和田浩二・吉元誠 (2008) γ -アミノ酪酸 (GABA) を増強したサトウキビ乳酸発酵飲料の開発. 日本食品科学工学会誌, **55**, 209 - 214

菱沼清・出川洋子・宮脇洋之・世利謙二・讃井和子 (2010) 血糖値上昇抑制効果を有する機能性糖質 L-アラビノースの生理機能研究と工業生産技術の開発. 日本応用糖質科学会平成 22 年度大会 (第 59 回) 第 18 回糖質関連酵素化学シンポジウム, セッション AW-5

樋渡一之・成澤昭芳・保莉美佳・戸枝一喜 (2010) 自然発症高血圧ラットにおける米糠発酵エキス配合飲料の血圧上昇抑制作用. 日本食品科学工学会誌, **40**, 40 - 43

飯塚広 (1960) 米のマイクロフロラ, 食品衛生学雑誌, **1**, 17-29

池田ひろ・木村利昭・小川敬子・口羽章子 (1997) 米飯の性状と構造の関係について (第 2 報) 炊飯における加熱速度の影響. 日本家政学会誌, **48**, 875 - 884

今堀和友・山川民夫 編. (1989) γ -アミノ酪酸. 生化学事典 第 3 版, 東京化学同人, 東京, 74 - 75

稲津脩 (1988) 北海道産米の食味向上による品質改善に関する研究. 北海道立農業試験場報告, **66**, 1 - 89

井上秀彦・上垣隆一・遠野雅徳・小林寿美・松尾守展・伊吹俊彦 (2012) 完熟期収穫の飼料用米の調製処理がサイレージ発酵特性におよぼす影響. 日本草地学会誌, **58**, 153 - 165

Invino, M., De Caro, G., Massi, M., Steardo, L. and Poenaru, S. (1983) Muscimol inhibits ADH release induced by hypertonic sodium chloride in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **19**, 335 -338

石田幸十郎・安井多喜雄・岸本孝彦・今岡昭夫・関一郎・茂在敏司・宮城建雄・樋口久人・秋岡壽・林勝 (1982) 血清脂質に及ぼす γ -Oryzanol の影響. 動脈硬化, **10**, 583 - 588

石田充亮・堀野善久 (2011) 大和肉鶏への飼料米給与試験. 奈良畜産技術センター報告, **6**, 18 - 26

石橋貞人・田中俊一郎 (1971-1972) 米の品質と乾燥および貯蔵の原理. 農業機械学会誌, **33**, 312 - 322

石井卓朗・出田収・松下景・春原嘉弘・前田英朗・飯田修一 (2013) 苗立性のすぐれる低アミロース巨大胚水稻品種「はいごころ」の育成, 近畿中国四国農業研究センター研究報告, **12**, 25 - 41

梶本五郎・嘉ノ海有紀 (1992) 油脂中の抗酸化剤の熱分解について. 調理科学, **25**, 278 - 282

梶本修身・平田洋・中川聡史・梶本佳孝・早川和仁・木村雅行 (2004) GABA 含有はっ酸乳製品の正常血圧者に対する降圧効果. 日本食品科学工学会誌, **51**, 79 - 86

亀岡暄一 (1982) 飼料米の利用. 農水技術研究ジャーナル, **5(6)**, 16 - 18

片桐充昭・清水純夫 (1994) 大豆もやし成育中の二酸化炭素ガス処理による γ -アミノ酪酸 (GABA) 生成と低温保存中における GABA の消長. 日本食品低温保蔵学会誌, **20**, 181 - 185

片野良平 (2011) 飼料用米の離乳子豚への給与効果 第2報. 群馬県畜産試験場報告, **18**, 14 - 19

片野良平・小材幸雄 (2010) 飼料用米の離乳子豚への給与効果. 群馬県畜産試験場報告, **17**, 55 - 58

Kathiresan, A., Tung, P., Chinnappa, C.C. and Reid, D.M. (1997) γ -inobutiric acid stimulated ethylene biosynthesis in sunflower. *Plant Physiology*, **115**, 129 - 135

勝俣昌也・佐々木啓介・斉藤真二・石田藍子・京谷隆侍・本山三知代・大塚 誠・中島一喜・澤田一彦・三津本充 (2009) 肥育後期豚への玄米の給与が皮下脂肪の性状に及ぼす影響. 日本畜産学会報, **80**, 63 - 69

河合美佐子 (2011) 生物工学基礎講座 バイオよもやま話 味をきめるアミノ酸. 生物工学, **89**, 680 - 682

川崎梓・原崇・城斗志夫 (2014) BBL-2H3 細胞およびラット腹腔滲出細胞に対する γ -アミノ酪酸のヒスタミン遊離抑制作用, 日本食品科学工学会誌, **61**, 362 - 366

- 茅原紘・杉浦友美 (2001) 近年の GABA 生理機構研究 脳機能改善作用、高血圧抑制作用を中心に。食品と開発, **36**, 4 - 6
- 貴島祐治・堀田夕夏・石黒聖也・山村和照・埴章・内藤聡・佐野芳雄 (2010) トランスポゾンを目指にしたコシヒカリ品種内の遺伝的差異。育種学研究, **12**, 81 - 86
- 菊屋良幸・近乗偉夫・江川寛子・清水康弘・安井利昭・長谷川 航 (2013) 大分県における飼料用米品種の選定と栽培法の確立 第 2 報 「ホシアオバ」の低コスト、高品質栽培法。日本作物学会九州支部会報, **79**, 30 - 34
- 杵淵美倭子・関谷美由紀・山崎彬・山本皓二 (1999a) 高圧処理により γ -アミノ酪酸 (GABA) を蓄積させた玄米の一般生菌数の変化と加工玄米の性質。日本食品科学工学会誌, **46**, 329 - 333
- 杵淵美倭子・関谷美由紀・山崎彬・山本皓二 (1999b) 高圧処理を利用した玄米中への γ -アミノ酪酸(GABA)の蓄積。日本食品科学工学会誌, **46**, 323 - 328
- Kimura, M., Hayakawa, K. and Sansawa, H. (2002) Involvement of γ -aminobutyric acid (GABA) B receptors in the hypotensive effect of systemically administered GABA in spontaneously hypertensive rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, **89**, 388 - 394
- 古賀良太・鏑田仁人・池口主弥・高垣 欣也・入野 信人・近藤 隆一郎 (2012) 大麦若葉末の γ -アミノ酪酸 (GABA) 富化方法および高血圧自然発症ラットにおける血圧上昇抑制作用。日本未病システム学会雑誌, **18**, 11 - 16
- 河野元信・劉厚清・平井敬・水野英則・飯田修一・春原嘉弘・松下景・出田収 (2008) 巨大胚米を用いた発芽米及び発芽玄米の加工特性に関する研究。美味技術研究会誌, **11**, 25 - 28
- Kozuka, C., Yabiku, K., Sunagawa, S., Ueda, R., Taira, S. Ohshiro, H., Ikema, T., Yamakawa, K., Higa, M., Tanaka, H., Takayama, C., Matsushita, M., Oyadomari, S., Shimabukuro, M. and Masuzaki, H. (2013) Brown rice and its component, γ -oryzanol, attenuate the preference for high-fat diet by decreasing hypothalamic endoplasmic reticulum stress in mice. *Diabetes*, **51**, 3084 - 3093
- Kinnersley, A.M. and Turano, F.J. (2000) Gamma aminobutyric acid (Gaba) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **19**, 479 - 509

熊澤喜久雄 (2008) 飼料米の生産を巡る諸問題 1. 農業および園芸, **83**, 845 - 851

Lee, Y.R., Woo, K.S., Kim, K.J. Son J.-R. and Jeong, H.-S. (2007) Antioxidant activities of ethanol extracts from germinated specialty rough rice. *Food Sci. Biotech.*, **5**, 765 - 770

林智・斉藤ひろみ・大森正司・猪俣智夫・加藤みゆき・澤井祐典・深津修一・袴田勝弘 (2000) 食塩負荷ラットの血圧および腎機能におよぼす嫌気処理茶（ギャバロン茶）の影響. 日本家政学誌, **51**, 261 - 271

呂慶伝・後藤清和・西津貴久 (2010) 玄米の GABA 富化条件と品質について. 農業機械学会誌, **72**, 291 - 296

真原隆治・中村妙・伊藤千恵・森田幹夫・相馬由和・藤木美佐子 (2011) 養豚における飼料用米給与技術の確立. 茨城県畜産センター報告, **44**, 54 - 59

丸山国美・長妻義孝・入江壮 (1983) 乳牛における飼料米給与技術に関する試験. 埼玉県畜産試験場報告, **21**, 66 - 70

松田英幸・平山修 (1973) 米貯蔵時における脂質成分ならびに脂質加水分解酵素活性の変化. 日本農芸化学会誌, **47**, 379 - 384

松原大・上野裕文・宗行哲・只野健太郎・陶山徹・今泉記代子・鈴木淑水・曲田清彦・菊地範昭・中道昇・熊谷裕生・猿田亨男 (2002) γ -アミノ酪酸 (GABA) 含有錠剤食品の血圧に及ぼす影響と安全性の評価. 薬理と治療, **30**, 963 - 972

松井崇晃・石崎和彦・橋本憲明・中村澄子・大坪研一 (2013) イネにおける低グルテリン遺伝子 Lgc1 選抜 PCR マーカーによる低グルテリン準同質遺伝子系統の育成と Lgc1 遺伝子が基本農業形質に与える影響. 育種学研究, **15**, 83 - 89

松本友紀子・鈴木邦夫・高橋圭二 (2009) 玄米及びモミ米の給与が肥育後期豚の発育と肉質に及ぼす影響. 千葉県畜産センター研究報告, **9**, 1 - 4

松家憲子・山口智美・堀北直樹・先川正志・金丸芳・新居雅宏 (2013) 乳酸菌発酵試料米を利用したプロバイオティクス試料の開発. 徳島県畜産研究所報告, **12**, 23 - 30

松下景・春原嘉弘・飯田修一・前田英郎・根本博・石井卓朗・吉田泰二・中川宣興・坂井真 (2008) 巨大胚水稻品種「はいいぶき」の育成. 近畿中国四国農業研究センター報告, **7**, 1 - 14

松崎昭夫・高野哲夫・坂本晴一・久保山勉 (1992) 食味と穀粒成分および炊飯米のアミノ酸の関係. 日本作物学会紀事, **61**, 561 - 567

McIntyre, B.S., Briski, K.P., Tirmenstein, M.A., Fariss, M.W., Gapor, A. and Sylvester, W. (2000) Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on normal mouse mammary epithelial cells. *Lipids*, **35**, 171 - 180

Mead, O., Thynne, E., Winterberg, B, and Solomon, P.S. (2013) Characterising the role of GABA and its metabolism in the wheat pathogen *stagonospora nodorum*. *PLOS one*, **8**, e78368

メルクマニュアル (2005 (最終改訂 11 月)) 神経伝達. 18 版 日本語版,
<http://mercmanual.jp/mmpej/sec16/ch207/ch207a.html> [2015 年 9 月 10 日参照]

三谷公互・木戸康博・清水精一・森田誠治 (1983) 高コレステロール血症ラットのコレステロール代謝に及ぼす γ -oryzanol (Hi-Z) の影響. 動脈硬化, **11**, 411 - 416

水木亮史・新山栄一・山岸和重 (2011) 玄米の配合割合の違いが肥育後期豚の発育及び肉質に及ぼす影響. 富山畜研報, **2**, 37 - 40

水野時子・島田信二。丹治克男・山田幸二 (2002) 大豆の水浸漬による遊離アミノ酸の変動. 日本家政学会誌, **53**, 1197 - 1202

水野時子・山田幸二 (2007) 市販大豆もやしの生育過程における γ -アミノ酪酸および遊離アミノ酸組成の変動. 日本食生活学会誌, **17**, 329 - 335

水野英則・福森武・劉厚清・佐々木泰弘・落合真也 (2012) 湿り空気による加温・加湿が粳の GABA 富化並びに品質に及ぼす影響. 農業機械学会誌, **73**, 226 - 233

森久子・渡辺恭子・磯野義員 (2007) 茶抽出物中で γ -アミノ酪酸を生成する乳酸菌 *Lactobacillus burevis* mh4219 の分離とそれを用いた発酵茶飲料のストレス低減効果. 生物工学会誌, **85**, 521 - 526

森高真太郎・沢田幸七・安松克治 (1972) 脱脂精白米の貯蔵性について (穀類に関する研究 第 8 報). 栄養と食糧, **25**, 16 - 20

長島万弓・石山絹子・七野知子・福田靖子 (2005) 発芽ゴマ食品の機能性と食味に及ぼす発芽の影響. 日本調理化学会誌, **38**, 455 - 461

中島啓介・矢野友啓 (2010) トコトリエノールとアポトーシス. ビタミン, **84**, 612

中村和哉・奈良一寛・野口智紀・大城哲也・古賀秀徳 (2006) ジャガイモおよびその加工食品の γ -アミノ酪酸 (GABA) 含量. 日本食品科学工学会誌, **53**, 514 - 517

中村幸造・植竹勝治・吉田善廣・江口祐輔・田中智夫 (2008) 運動場への放牧と γ -アミノ酪酸 (GABA) 投与による離乳子豚の飼育管理由来ストレス軽減効果 福祉性評価指標の検討. 日本家畜管理学会誌・応用動物行動学会誌, **45**, 9 - 18

Nakano, H., Ono, H., Iwasawa, N., Takai, T., Arai-Sanoh, Y. and Kondo M. (2013) Isolation and identification of phenolic compounds accumulated in brown rice grains ripened high air temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**, 11921 - 11928

根本博・飯田修一・前田英郎・石井卓朗・中川宣興・星野孝文・坂井真・岡本正弘・篠田治躬・吉田泰二 (2001) 巨大胚新水稻品種「はいみのり」の育成. 中国農業試験場研究報告, **22**, 25 - 40

西村実・宮原研三・森田竜平 (2007) 水稻の種子貯蔵タンパク質変異系統におけるタンパク質組成およびその集積過程に及ぼす施肥法の影響. 日本作物学会紀事, **76**, 562 - 568

西村慶子・東政則・須崎哲也・中原高士 (2009) 飼料用米が搾乳牛の生産性に及ぼす影響 2. 宮崎県畜産試験場試験研究報告, **22**, 13 - 16

日本医師会 (2013) ヘルシンキ宣言 最新のヘルシンキ宣言改定について. 東京、
<http://www.med.or.jp/wma/helsinki.html> [2015年11月26日参照]

Nogata, Y. and Nagamine, T. (2009) Production of free amino acids and γ -aminobutyric acid by autolysis reaction from wheat bran. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **57**, 1331 - 1336

野口将・染谷幸雄・古川左近・鈴木一郎 (1999) 熱処理した *Lactococcus lactis* 添加によるチーズへの γ -アミノ酸蓄積法. 日本畜産学会報, **70**, J392 - J402

日本穀物検定協会 (2012) おいしさ (食味) 指標について. 食味・銘柄表示・安全性についての用語解説. 東京、http://www.kokken.or.jp/infosystem03_01.html [2015年9月25日参照]

日本油化学協会 (1990a) 油脂含量. 基準油脂分析試験法, 日本油化学協会, 東京, 1.1.3.3 - 71

日本油化学協会 (1990b) 酸価. 基準油脂分析試験法, 日本油化学協会, 東京, 1.1.3.4 - 83

野口智紀・中村和哉・古賀秀徳 (2007) 各種処理によるジャガイモ塊茎の γ -アミノ酪酸 (GABA) 増加方法. 日本食品科学工学会誌, **54**, 447 - 451

農研機構 (2005) 生物系特定産業技術研究支援センター 研究資金業務 異分野融合支援事業 こめトコトリエノールを活かす食品開発と米アグリビジネスの展開. 茨城、
<http://www.naro.affrc.go.jp/brain/ibunya/theme/2005/022864.html> [2015年10月2日参照]

農研機構 (2015) 機能性をもつ農林水産物・食品開発プロジェクト 食後血糖上昇を抑制する高アミロース米等とその加工食品の開発. 茨城、
http://www.naro.affrc.go.jp/project/f_foodpro/subject/a1.html [2015年10月7日参照]

農林水産先端技術産業振興センター (2007) 機能性成分米の商業化に向けたビジネスモデル構築のための調査事業報告書. 東京、
<https://www.jataff.jp/project/download/pdf/31-2007062717004213589.pdf> [2015年10月9日参照]

岡田早苗 (1992) 乳酸菌の分離・培養・保存. 乳酸菌研究集談会誌, **2**, 55 - 57

岡田早苗 (2002) 植物性乳酸菌世界とその秘めたる可能性. *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*, **13**, 23 - 36

岡崎正一・沖佳子 (1961) 精白米中の遊離アミノ酸について. 日本農芸科学会誌, **35**, 194 - 199

岡田安弘 (1978) 生体における GABA の分布と機能. 代謝, **15**, 327 - 340

奥山智子・塚田陽康・鶴澤昌好・山田健二 (2004) エーテル暴露ラットの血漿ホルモンおよびマウス麻酔持続時間に及ぼす γ -アミノ酪酸高含有カボチャ加工品の影響. 日本食品科学工学会誌, **51**, 703 - 707

大久長範・大能俊久・森勝美 (2003) 発芽玄米と粳発芽玄米の γ -アミノ酪酸および遊離アミノ酸含量. 日本食品科学工学会誌, **50**, 316 - 318

大久長範・吉元茜・大能俊久・秋山美展 (2005) 分つき米の予備加熱と炊飯による γ -アミノ酪酸の蓄積. 日本調理科学会誌, **38**, 254-256

大平陽一・竹田博之・佐々木良治 (2009) タンパク質変異米水筒品種の米粒内における種子貯蔵タンパク質の分布. 日本作物学会紀事, **78**, 58 - 65

大阪教育大学食物学研究室 (2010) 食品の機能. 食教育情報 Web. 大阪, <http://lfs.ict.osaka-kyoiku.ac.jp/Plone/98df72693068305d306e54688fba/98df54c1306e6a5f80fd>
[2015年10月2日参照]

大森正司・矢野とし子・岡本良子・津志田藤二郎・村井俊信・堀口満 (1987) 嫌気処理茶 (ギャバロン茶) による高血圧自然発症ラットの血圧上昇抑制作用. 日本農芸化学会誌, **61**, 1449 - 1451

大坪研一 (2002) 新形質米の特性とその利用例. 日本調理科学会誌, **35**, 393 - 398

大塚誠・石田藍子・村上斉・成田卓美・湊一・高田良三 (2005) 発酵乳の離乳子豚に対する使用成績改善効果. 日本養豚学会誌, **42**, 54 - 60

大澤実・井上直人 (2007) アミロース含量の異なるコメにおけるデンプンの α -アミラーゼによる消化性とグリセミック・インデックス. 日本作物学会紀事, **76**, 410 - 415

オリザ油化株式会社 (2008) 「 γ -アミノ酪酸含有」米胚芽食品 オリザギャバ®. 愛知, http://www.oryza.co.jp/pdf/japanese/Oryza%20GABA_j%209.0.pdf [2015年9月25日参照]

Petty, F., Kramer, K., Dunnam, D. and Rushi, A.J. (1990) Plasma GABA in mood disorders. *Psychopharmacology Bulletin*, **26**, 157 - 151

Pocai, A., Lam, T.K.T., Obici, S., Gutierrez-Juarez, R., Muse, E.D., Arduini, A. and Rossett, L. (2006) Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats. *Journal of Clinical Investigation*, **116**, 1081 - 1091

三枝貴代 (1995) 米胚芽中の γ -アミノ酪酸 (GABA) を増やす. 水浸漬により激増. 高血圧治療食への応用に期待. 化学と生物, **33**, 211 - 212

三枝貴代・箭田（蕪木）佐衣子・石川哲也 (2014) 玄米の γ -オリザノール含量への施肥及び貯蔵の影響. 日本作物学会関東支部会報, **29**, 32 - 33

三枝貴代・鈴木啓太郎 (2016・発表予定) 玄米中の γ -オリザノール含量の保蔵中の変動とその品種間差. 日本作物学会記事, **85**(別 1), ページ未定

斎藤ひろみ・小久保清子・中田裕子・大森正司・三枝貴代・堀野俊郎・森隆 (1995) 水浸漬米胚芽によるラット血圧上昇抑制作用について. 日本食品科学工学会第 42 回大会講演要旨集, 139

坂代江 (2008) 納豆が子豚の健康に及ぼす影響. *All About Swine*, **33**, 15 - 19

榊原正樹・吉川典孝・太郎田博之・稲福桂一郎・宮城健 (2006) スピルリナの乳酸発酵による γ -アミノ酪酸 (GABA) の高含有化及び血圧降下作用. *DIC Technical Review*, **12**, 13 - 19

Sarraj, R., Shelp, B.J. and Sinclair, R. (1998) Accumulation of γ -aminobutyric acid in nodulated soybean in response to drought stress. *Physiologia Plantarum*, **102**, 79 - 86

Sasagawa, A., Naiki, Y., Nagashima, S., Yamakura, M., Yamazaki, A. and Yamada, A. (2006) Process for producing brown rice with increased accumulation of GABA using high-pressure treatment and properties of GABA-increased brown rice. *Journal of applied Glycoscience*. **53**, 27 - 33

佐々木公子・岩城知津・上野洋志 (2010) GABA (γ -アミノ酪酸) の食味への関与について. 美作大学・美作短期大学部紀要, **55**, 65 - 70

佐々木多喜雄・佐々木一男・柳川忠男・沼尾吉則・相川宗巖 (1990) 水稻新品種「きらら 397」の育成について. 北海道立農試集報, **60**, 1 - 18

関千恵子・貝沼やす子 (1982) コメの調理に関する研究 第 2 報 炊飯条件としての浸水時間. 家政学雑誌, **5**, 228 - 234

Selman, I.W. and Cooper, P. (1978) Changes in the free amino compounds in young tomato plants in light and darkness with particular reference to γ -aminobutyric acid. *Annals Botany*, **42**, 627 - 636

千畑一郎・柿本年雄 (1982) 4. 1. 1. 15 Glutamate decarboxylase. 酵素ハンドブック (丸尾文治・田宮信雄 監修), 朝倉書店, 東京, 634 - 635

Shelp, B.J., Walton, C.S., Snedden, W.A. Tuin, L.G., Oresnik, I.J. and Layzell, D.B. (1995) Gaba shunt in developing soybean seeds in associated with hypoxia. *Physiologia Plantarum*, **94**, 219 - 228

Shelp, B.J., Bown, A.W. and McLean, M.D. (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science*, **4**, 446 - 452

島津株式会社 (2015) Prominence 有機酸分析システム. 京都,
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/n/price/lc/lc9.htm> [2015年12月1日参照]

清水恒 (2003) 雑穀及びソバの GABA 生成特性. 日本作物学会東北支部報告, **46**, 77 - 78

白井展也・鈴木啓太郎・大坪研一 (2011) NaCl を添加した発芽玄米の高血圧自然発症ラット (SHR / Izm) の血圧上昇抑制効果と血糖調整に関連するホルモンへの影響. 日本食品科学工学会誌, **58**, 324 - 329

白木与志也 (2000) チャ生葉における γ -アミノ酪酸の効率的蓄積方法の開発. 神奈川県農業総合研究所研究報告, **141**, 39 - 47

静川幸朗・大橋善之・増村威宏・田中國介 (2002) 酒造好適米および主食用米の玄米中タンパク質顆粒 (Protein Body) を構成するプロラミン、グルテリン、プロブリンの含有量とその分布. 日本作物学会紀事, **71** (別1), 224 - 225

Snedden, W.A., Arazi, T., Fromm, H and Shelp, B.J. (1995) Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase. *Plant Physiology*, **108**, 543 - 549

Sookwong, P., Nakagawa, K., Murata, K., Kojima, Y and Miyazawa, T (2007) Quantitation of tocopherol in various rice brans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 461 - 466

Sookwong, P., Murata, K., Nakagawa, K., Shibata, A., Kimura, T., Yamaguchi, M., Kojima, Y and Miyazawa, T. (2009) Cross-fertilization for enhancing tocotrienol biosynthesis in rice plant and QTL analysis of their F₂ progenies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 4620 - 4625

Stahl, S. M. (2004) 抗不安薬としての抗痙攣薬 その1 GABA 作用を持つチアガビンや、その他の抗痙攣薬. *Journal of Clinical Psychiatry*, **65**, 291 -292

杉浦和彦・本庄弘樹・林元樹・野々山利博・山下和巳・虎澤明広・山内章 (2013) 愛知県における水稲品種コシヒカリの外観品質低下要因及びその対策について. 日本作物学会紀事, **82**, 262 - 269

鈴木啓太郎・前川孝昭 (1999) 発芽玄米製造時の微生物制御. 農業施設, **30**, 137 - 144

Stanton, H.C. (1963) Node of action of gamma amino butyric acid on the cardiovascular system. *Archives Internationales de pharmacodynamie*, **143**, 195 - 204

立川昌子・浅野智宏・石川寿美代・島部奈美・早川博 (2009) 飼料米給与による採卵鶏への影響. 岐阜県畜産研究所報告, **9**, 41 - 46

平宏和 (1970) 多収穫栽培米のタンパク質含量に与える施肥の影響. 日本作物学会紀事, **39**, 200 - 203

田島眞・堀野俊郎・前田万里・孫鐘録 (1992) 米粒外層から抽出されるオリゴ糖. 日本食品科学工学会誌, **41**, 339 - 340

高橋圭二・赤木友香・鈴木邦夫・新垣裕子・村野多可子 (2011) 玄米の配合割合の違いが肥育後期豚の発育及び肉質に及ぼす影響. 千葉県畜産センター研究報告, **11**, 15 - 19

武田進一・遠山良・齋藤博之 (2007) 篩い下米を用いた発芽玄米の検討. 日本調理科学会誌, **40**, 99 - 103

竹内若子 (2014) 巨大胚芽米を用いた穀物型スプラウトの機能性. 名古屋女子大学紀要 (家政・自然科学編), **60**, 11 - 18

建部雅子・及川勉・松野宏治・清水美恵子・米山忠克 (1996) 水稲白米のグルテリンおよびプロラミン含有率に対する窒素栄養条件の影響. 日本土壌肥料学雑誌, **67**, 139 - 146

田中輝男・斎藤伸生・奥原章・横塚保 (1969a) α -アミノ酸の呈味に関する研究 第3報 α -アミノ酸の旨み増強作用について 2. 日本農芸化学会誌, **43**, 263 - 268

田中輝男・斎藤伸生・奥原章・横塚保 (1969b) α -アミノ酸の呈味に関する研究 第3報 α -アミノ酸の旨み増強作用について 1. 日本農芸化学会誌, **43**, 171 - 176

谷口久次・橋本博之・細田朝夫・米谷俊・築野卓夫・安達修二 (2010) 米糠含有成分の機能性とその向上. 日本食品科学工学会誌, **59**, 301 - 318

Tokunaga, M., Nakano, Y. and Kitaoka, S. (1976) The GABA Shunt in the callus derived from soybean cotyledon. *Agricultural and Biological Chemistry*, **49**, 115 - 20

辻啓介・市川富夫・田辺伸和・小畑裕士・阿倍士朗・樽井庄一・中川靖枝 (1992) 紅麴抽出物と γ -アミノ酪酸の高血圧自然発症ラットにおける血圧低下作用. 栄養学雑誌, **5**, 285 - 291

辻裕美子・大島一郎・青木高信・田中欽二・尾野喜孝 (2004) 早期離乳が子豚の発育と行動および枝肉成績に及ぼす影響. 佐賀大学農学部彙, **89**, 185 - 191

Tsushida, T. and Murai T. (1987) Convention of glutamic acid to γ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions. *Agricultural and Biological Chemistry*, **51**, 2865 - 2871

津志田藤二郎・村井俊信・大森正司・岡本良子 (1987) γ -アミノ酪酸を蓄積させた茶の製造とその特徴. 日本農業科学会誌, **61**, 817 - 822

都築毅 (2015) 日本食が老化や健康機能に与える影響. *YAKUGAKU ZASSHI*, **135**, 57 - 65

上野義栄・平賀和三・森義治・小田耕平 (2007) 漬物から γ -アミノ酪酸 (GABA) 高生産乳酸菌の分離とその応用. 生物工学会誌, **85**, 100 - 114

潮秀樹・長阪玲子・前原裕之・金本繁晴・毛利建太郎・堀正俊 (2008) コメ抽出物 γ -オリザノールおよびGABAの新たな生理作用. 美味技術研究会, **2008** (12), 21 - 25

梅川逸人・辰野拓也・王ヤ・平山碧・服部美香・荒木利芳 (2008) 海苔発酵エキスの投与が高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響. 日本食品科学工学会誌, **55**, 502 - 505

Wallace, W., Secor, J. and Schrador, L.E. (1984) Rapid accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness or mechanical manipulation. *Plant Physiology*, **75**, 170 - 175

Wickremasinghe, R.L. and Swain, T. (1965) The accumulation of γ -aminobutyric acid in bean callus tissue. *Phytochemistry*, **4**, 687 - 691

Xu, J.G., Hu, Q.P., Duan, J.L. and Tian, C.R. (2010) Dynamic changes in γ -aminobutyric acid and glutamate decarboxylase activity in Oats (*Avena nuda* L.) during steeping and germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 9759 - 9763

山田千佳子・和泉秀彦・加藤保子 (2006) 米アレルゲンタンパク質とその低減化. 川崎医療福祉学会誌, **16**, 21 - 29

山本周美・西村沙矢香・小林由佳・瀧井幸男 (2011) GABA 含有漬物摂取による女子学生の腸内環境の改善. 食品・臨床栄養, **e2011**, 9 - 20

山中博之・茶珍和雄・緒方邦安 (1972) トマト果実の貯蔵とアミノ酸代謝に関する研究 第3報 トマト果実におけるグルタミン酸および γ -アミノ酪酸の代謝. **41**, 317 - 321

山本愛二郎 (2002) 伝統食品としての米とその良さを探る. 栄養・食糧学雑誌, **55**, 231 - 233

山崎彬 (2009) 高圧食品開発物語 その2 炊飯性にすぐれた加工玄米の製造方法. 高圧力の科学と技術, **6**, 182 - 186

山崎彬・笹川秋彦 (1998) 高圧処理による米加工食品の開発. 日本食品科学工学会誌, **45**, 526 - 532

Yasumatsu, K. and Moritaka, S. (1964) Fatty acid compositions of rice lipid and their changes during storage. *Agricultural and Biological Chemistry*, **5**, 257 - 264

安井裕次・鈴木啓太郎・岡留博司・奥西智也・橋本勝彦・大坪研一 (2004) 発芽玄米・発芽大麦混合利用による粉末の製造とその高血圧抑制効果. 日本食品科学工学会, **51**, 592 - 603

横越英彦 (2008) 特集 広がりつつあるサプリメントを理解する 腎不全患者に活用するために 各論 8. GABA (ギャバ). 臨牀透析, **24**, 1761 - 1763

横塚保・斎藤伸生・奥原章・田中輝男 (1969) α -アミノ酸の呈味作用に関する研究 第1報 グリシンの旨み増強作用について. 日本農芸化学会誌, **43**, 165 - 170

吉田正昭・二宮恒彦・池田真吾・山口静子・吉田知子・小原正美 (1966) アミノ酸の呈味に関する研究 第1報 各種アミノ酸の刺激閾の測定. 日本農芸科学会誌, **40**, 295 - 299

吉田慎一・原本正文・福田明彦・水野英朗・田中藍子・西村三恵・西平順 (2015) 北海道産 GABA 富化米の最適製造条件の設定とヒトへの抗ストレス作用. 日本食品科学工学会誌, **62**, 95 - 103

吉國義明・堀江健二・谷川鯉沙・横越英彦 (2008) GABA の製法・安全性・効能効果に関する最近の進歩. *Food and Food Ingredients Journal of Japan*, **213**, 1145 - 1156

吉永悟志 (2013) 飼料用米の低コスト・安定多収に向けての栽培技術：肥培・疎植・直播・立毛乾燥などで工夫を. 畜産コンサルタント, **49** (2), 18 - 21

Zhang, H., Yao, H-Y., Chen, F and Wang, X. (2007) Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ. *Food Chemistry*, **101**, 1670 - 1676

謝 辞

本研究は、1992年から1998年、農水省中国農業試験場（現・国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（略称・農研機構）近畿中国四国農業研究センター）で、1998年から2012年、農研機構中央農業総合研究センター（独法化前は農水省中央農業研究センター）で行われました。

第2章および第3章1節、第4章1節および4節は、当時中国農業試験場品質特性研究室長であった森隆様のご指導の下に行われ、第3章2節および3節は、そのご後任としてみえられた小野田明彦様のご指導の下に行われました。その期間にわたって、同試験場の堀野俊郎様には、材料米の提供、コメの栽培および品質について、ご助言、ご指導をいただきました。また、第3章2節に記載した遠赤外線乾燥装置は、小野田明彦様の設計により試作されました。

GABAの高血圧症抑制効果につきましては、高血圧自然発症ラットでの実験は、当時大妻女子大学教授であった大森正司様によって、ヒトにおける高血圧症抑制と精神安定作用についての臨床試験は、オリザ油化株式会社の岡田忠司様の材料調製により、総合医科学研究所の梶本修身様を中心とした医師の皆様によって行われました。さらに、GABA富化脱脂コメ胚芽の製品化につきましては、岡田忠司様を中心としたオリザ油化株式会社の皆様の努力によるものです。

第4章2節および3節、第5章は、当時中央農業総合研究センターの総合研究第3チーム、その後、関東飼料イネ研究チームのチーム長であった石田元彦様、そのご後任として見えられた中西直人様のご指導によって行われました。その期間にわたって、同センターの石川哲也様には、材料米の提供、試験区的设计などにつきまして、多くのご助言、ご指導をいただきました。

供試した乳酸菌は、農研機構畜産草地研究所の蔡義民様より提供を受け、またソフトグレインサイレージ作成手法につきましてもご助言をいただきました。乳酸菌添加発酵コメ粉の遊離アミノ酸含量の定量につきましては、農研機構畜産草地研究所の樋口浩二様のご協力をいただきました。

筑波大学生命環境系教授の繁森英幸教授のご指導の下で、本論文の取りまとめが行われました。また取りまとめにあたりましては、王碧昭教授、吉田滋樹准教授、山田小須弥准教授から、多くのご助言、ご指導を頂きました。

筑波大学への入学は、農研機構作物研究所稲研究領域長の安東郁男様と所長の矢野昌裕様のご助言、ご許可によって可能となりました。

お世話になった皆様に、深く御礼申し上げます。

[2016年1月]

付 記

本論文は、以下の雑誌並びに学会発表した研究報告、および特許等をまとめたものである。

[学術論文]

Takayo Saikusa, Toshiroh Horino, Yutaka Mori (1994) Distribution of free amino acids in the rice kernel and kernel fractions and the effect of water soaking on the distribution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42** (5), 1122 - 1125

Takayo Saikusa, Toshiroh Horino, Yutaka Mori. (1994) (Note) Accumulation of γ -aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **58** (12), 2291 - 2292

岡田忠司・杉下朋子・村上太郎・村井弘道・三枝貴代・堀野俊郎・小野田明彦・梶本修身・高橋励・高橋丈夫 (2000) γ -アミノ酪酸蓄積脱脂コメ胚芽の経口投与における更年期障害及び初老期精神障害に対する効果. 日本食品科学工学会誌, **47** (8), 596 - 603

三枝貴代・岡田忠司・村井弘道・森隆・堀野俊郎・大森正司・伊藤昌博・小野田明彦 (2001) コメ胚芽での4-アミノ酪酸(GABA)蓄積に対する有機溶媒脱脂の影響. 日本食品科学工学会誌, **48** (3), 196 - 201

三枝貴代・石川哲也・樋口浩二・石田元彦. (2015) 4-アミノ酪酸富化食品用玄米を生産するための品種選定および追肥と収穫時期の検討. 日本食品科学工学会誌, **62** (9), 461 - 464

三枝貴代・蔡義民・樋口浩二・石川哲也・石田元彦 (2016 投稿中) 4-アミノ酪酸(GABA)高蓄積乳酸菌 *Lactococcus lactis* RO50 株の選抜と RO50 株を利用した GABA 富化コメ粉の製造. 日本食品科学工学会誌

[学会発表]

三枝貴代・森隆・堀野俊郎 (1993) コシヒカリ米粒中の遊離アミノ酸の分布と水浸漬時の変動. 日本作物学会紀事, **62** (別 1), 286 - 287

Takayo Saikusa, Toshiroh Horino, Yutaka Mori (1994) Distribution of free amino acids in the ricekernel and effects of water soaking on their contents. AACC 79th Annual Meeting, 180

三枝貴代・堀野俊郎・森隆・小野田明彦 (1995) 新形質米の米粒中での遊離アミノ酸の分布と加水による変動. 日本食品科学工学会第 42 回大会講演要旨, 124

斉藤ひろみ・小久保清子・中田裕子・大森正司・三枝貴代・堀野敏郎・森隆 (1995) 水浸漬胚芽米によるラット血圧上昇抑制作用について. 日本食品科学工学会第 42 回大会講演要旨集, 139

小野田明彦・三枝貴代・堀野俊郎・野村大八・伊藤昌博・村上太郎・岡田忠司 (1996) 遠赤外線による Gaba 富化脱脂米胚芽の乾燥. 日本食品科学工学会第 44 回大会講演要旨集, 82

Takayo Saikusa, Tetsuya Ishikawa, Kanako Kusa, Motohiko Ishida and Yimin Cai (2006) The accumulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) in high moisture rice as feed for swine. XIIth AAAP Animal Science Congress 2006, 291

三枝貴代・石川哲也・樋口浩二・石田元彦 (2007) 収穫時期、施肥法による米粒中の GABA の変動. 作物学会紀事, 76 (別 1), 290 - 291

三枝貴代・蔡義民・樋口浩二・石川哲也・石田元彦 (2009) 乳酸菌を添加した玄米ソフトグレインサイレージの GABA 蓄積. 日本草地学会誌, 55 (別), 121

[特許]

三枝貴代・堀野俊郎・森隆 (1994) γ -アミノ酪酸を富化した食品素材. 特許第 2590423 号

三枝貴代・堀野俊郎・森隆 (1996) γ -アミノ酪酸の製造法. 特許第 2813771 号

小野田明彦・堀野俊郎・三枝貴代・左向敏紀・塚原菊一・小松崎典子 (1998) 飼料並びにその製造方法. 特開 2000-32923 号

三枝貴代・蔡義民・石田元彦 (2010) γ -アミノ酪酸含有飼料とその製造法, 特願 2010-067464

[その他]

三枝貴代 (1995) 米胚芽中の γ -アミノ酪酸 (GABA) を増やす. 水浸漬により激増. 高血圧治療食への応用に期待. 化学と生物, 33 (4), 211 - 212