

巨大胚芽米を用いた穀物型スプラウトの機能性

竹内 若子

Functional Properties of the Sprouted Grain Obtained from Giant-Embryo Rice

Wakako TAKEUCHI

緒言

「米離れ」に伴う食習慣の変化は、結果的に油脂類の摂取過剰を招き、摂取エネルギーに占める脂質比率の増加をもたらした。また、糖尿病をはじめとする生活習慣病の増加に伴う日本人の疾病構造の変化は大きな社会問題となってきた。こうした現状の危機感をひとつのきっかけとし、米の消費量低下に歯止めをかけ、その需要拡大化をめざしたプロジェクト研究でもある通称「スーパーライス計画」は農林水産省の試験研究機関で1989年より実施されてきた。これは新たな米の利用・加工法の開発とともに、その利用目的に対応した新しい特性を備えた新形質米の育成と米の需要開拓を目的としたものである¹⁾。この新たな米の形質としては、長粒や大粒など粒の形状に関わるものやアミロース、たんぱく質など米胚乳の成分ならびに香りや色素に関与するものなどがある。このうち種々の高機能性成分を期待されて育成・流通している米の一つに「巨大胚芽米」がある。この巨大胚芽米の特性は突然変異によって得られたもので、精米せず、玄米で食用とする米でもある。粒大は通常の米と大差はないが、胚の大きさが通常米より2~4倍あることから、発芽時に γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid; GABA) の発現量も高く、ヒトの健康面への有益性が検討されつつある。近年、GABAは発芽玄米や発酵乳製品などに比較的多く含まれることから一般的によく知られるようになったが、自然界には広く存在するアミノ酸の一種で、野菜、果物から発酵食品に至るまで幅広く存在している成分でもある。実際に血圧降下作用、精神安定作用等に関する多くの報告例もあり²⁻³⁾、機能性素材として注目されているものの一つでもある。このため、より高濃度のGABA摂取がヒトにどのような影響を与えるのかについては、興味もたれるところであるが、未検証のものが多い。

著者らは、これまで各品種の米を試料とし、例えばうるち種の「あいちのかおり」(愛知県産)、低アミロース米の「おぼろづき」(北海道産)、モチ種の「ヒヨクモチ」(佐賀産)等を用い、高圧処理条件を変化させたときの糖質分解酵素 (α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼ)の活性変動や機能性成分としての食物繊維やGABA量について比較検討してきた。そこで、本研究では、新形質米、機能性成分米として育成され、流通しはじめた巨大胚芽米「カミアカリ」(福島県産)を試料米として用い、従来種の米「あいちのかおり」とのちがいで比較・検討した結果について報告する。

実験方法

1. 試料米と試料の調製

巨大胚芽米「カミアカリ」(JAS有機米, 福島県2009年度産) および「あいちのかおり」(愛知県 2009年度産) を試料米とし, 発芽および高圧処理が糖質の分解酵素活性や γ -アミノ酪酸 (GABA) 含量等に与える影響を調べるため, 下記の方法 (1) で処理した。

(1) 発芽 および 高圧処理

試料米を蒸留水で洗米後, 20分間浸漬したのち, 水を切って12穴マイクロプレートに蒸留水とともに玄米粒を入れ, 低温 (10℃) 下で, 24時間と48時間, 保温 (30℃) 下で24時間と48時間放置して発芽させた。高圧処理は, 食品加圧試験装置Frescal MFP-7000 (三菱重工業製) を用い, 下記の①, ②の法で実施した。なお, 高圧処理については, 武庫川女子大学, 升井洋至博士に依頼した。

- ① 静水圧処理: 200 MPa, 25℃水中で15分間処理後, 乾燥化
- ② 玄米処理: 200 MPa, 専用袋に入れ15分間処理

(2) 粗酵素液の調製

試料米約1.5 gを精秤し, これにセラルファ (Ceralpha) 緩衝液 10mlを加え, 十分磨砕した。磨砕後, 50ml容三角フラスコに移し, 卓上型振とう恒温槽 (パーソナル11, タイテック製) (40℃) で20分間振とうしながら粗酵素を抽出した。遠心後 (3,000 rpm×10分) の上清を分取し, これを粗酵素液として以下2~6の実験を行った。

2. α -アミラーゼ活性の測定: (Ceralpha法, メガザイム社)

アミラーゼ基質液100 μ lを試験管にとり, 40℃で5分間プレインキュベートした。このとき粗酵素抽出液もプレインキュベートした。基質液に粗酵素抽出液100 μ lを加えた時点から正確に20分間40℃で振とうさせながら反応させた。20分後, 反応停止試薬 (1.5ml) を加えて反応を止め, 蒸留水を対照に400nmにおける吸光度を測定した。 α -アミラーゼ活性は試料1 gあたりの活性単位Unitsで求めた。

3. β -アミラーゼ活性の測定: (Betamyl法, メガザイム社)

Betamyl基質液100 μ lを試験管にとり, 上記と同様に粗酵素液とともに40℃で5分間プレインキュベートした。基質液に粗酵素液100 μ lを加えた時点から正確に10分間, 40℃で振とうさせながら反応させた。その後, 反応停止試薬1.5mlを加えて直ちによく攪拌して, 反応を止め, 蒸留水を対照に400nmにおける吸光度を測定し, β -アミラーゼ活性 (Units/g) を算出した。

4. α -グルコシダーゼ (GSD) 活性の測定:

粗酵素液100 μ lと基質液 (10mMマルトース in McIlvaine buffer) 400 μ lを加えて全量を500 μ lとし, 30℃で10分間振とうさせながら反応させた。反応停止後, この反応液から50 μ lを別のチューブに分取し, 発色試薬を1.5ml加え, 37℃で5分間インキュベートした。インキュベート後, ブランクを対照に505nmにおける吸光度を測定した。なお, ブランクは粗酵素液

の代わりに蒸留水50 μ l で同様に操作したものとした。標準は、終濃度0.5~1.0mg/mlの各濃度のグルコース標準溶液について同様に操作し、グルコース検量線を作成した。これより生成グルコース量 (mg/ml) を求め、米1 gあたりの α -GSD活性値とした。

5. SDS-電気泳動及び抗グルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamic acid decarboxylase : GAD) によるWesternblot解析

粗酵素液を冷却遠心用チューブに2mlとり、20% TCAを等量加えてよく混和し、水中で30分放置した。放置後、12,000rpmで5分遠心分離し沈殿を分取した。この沈殿からTCAを除去するため冷却アセトンに2ml加えてよく懸濁させ、遠心分離を繰り返した。アセトンによる沈殿洗浄を再度行ったあと、この沈殿を少量の蒸留水に溶かし、SDS-PAGE用のサンプルとして用いた。SDS-電気泳動後、120mA、70分間通電することでゲルからニトロセルロースメンブレン (BIO-RAD製) へタンパク質を転写させた。その後、ブロッキングからタンパク質免疫検出に減圧吸引を活用する装置SNAP i.d. (日本ミリポア製) を用い、250倍希釈の一次抗体 (Anti-GAD 65/67, Rabbit-Poly) 3mlを加えて室温で10分間放置した。このあと減圧吸引し、続いて洗浄液 (30ml) を加えて吸引しながら洗浄し、これを3回繰り返した。次に150倍希釈した二次抗体 (AP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)) 3mlを加えて一次抗体と同様に処理し、発色試薬によって検出バンドを可視化させた。

6. 等電点電気泳動 (IEF) を用いた β -アミラーゼの活性染色

Ampholine (pH4.0-6.5) ゲル (GEヘルスケア) を用い、それぞれの粗酵素液20 μ l ずつをアプライし、泳動をスタートさせた。ゲルはMultiphor II を用い10℃に冷却しながら、2000V、7mA、7Wの条件下で4時間泳動した。泳動後のゲルは50mM酢酸ナトリウム緩衝液 (10mM CaCl₂ 含有, pH5.3) で軽くすすいだあと、1%デンブロン溶液中に入れ、37℃、90分間インキュベートした。このあと、デンブロン溶液を除去し、さらに37℃で30分間インキュベート (空気の少ない状況下では出現しないアミラーゼ活性もあるため) し、ヨウ素液で約1分程度染色した。ヨウ素-デンブロン反応で白く抜けたバンドを検出した。

7. γ -アミノ酪酸 (GABA) の抽出・測定

粉碎した試料米 (約5 g) に80%エタノールを加えてGABA抽出を行い、一定量 (50ml) とした。これより1mlを分取し、溶媒留去後、pH2.2クエン酸ナトリウム緩衝液 (和光純薬製) 1mlに再溶解し、メンブレン (0.45 μ m) にて濾過し、アミノ酸分析の試料とした。アミノ酸分析装置は、島津製のLC-VPアミノ酸分析システムによった。カラムは島津製Shim-Pack Amino-Na (150mm \times 6.0mm ID) とアンモニアトラップカラムのShim-Pack ISC-30 (50mm \times 4.0mm ID) を用い、カラム温度は60℃に設定した。移動相には島津アミノ酸移動相キット (Na型) および反応液としてオルトフタル酸 (OPA試薬) のアミノ酸反応キットを用い、流速0.3ml/min, 励起波長 (Ex) 350nm, 検出蛍光波長 (Em) 450nmとした。

結果及び考察

1. 発芽処理による巨大胚芽米の糖質分解酵素活性の挙動

α -アミラーゼ活性 (Units/g) は、玄米0.072, 24時間保温 (以下, 30℃発芽処理: 保温) 発芽では0.229, 48時間保温で0.327となり, 保温発芽の24時間で玄米の3.2倍に, 48時間では玄米の4.5倍の活性増加がみられた. この結果より α -アミラーゼは発芽とともに誘導・合成され, 増大することが確認できたが, 低温 (以下, 10℃発芽処理: 低温) 発芽では変化がみられなかった (図1). また, β -アミラーゼ活性 (Units/g) は, 玄米0.185, 24時間保温発芽で0.152, 48時間の保温発芽では0.493であった. 48時間保温では, 玄米に比べ2.6倍の活性増加がみられたが, 24時間保温では逆に玄米に比べ, やや低下傾向であった. 低温発芽では α -アミラーゼ活性と同様, 変化はほとんどみられず, 低下傾向であった. このことから, β -アミラーゼ活性は α -アミラーゼに比較し, その活性増加には時間を要すること, すなわち本実験で試みた24時間と48時間の範囲では, 30℃で48時間の時間を必要とすることがわかった (図1).

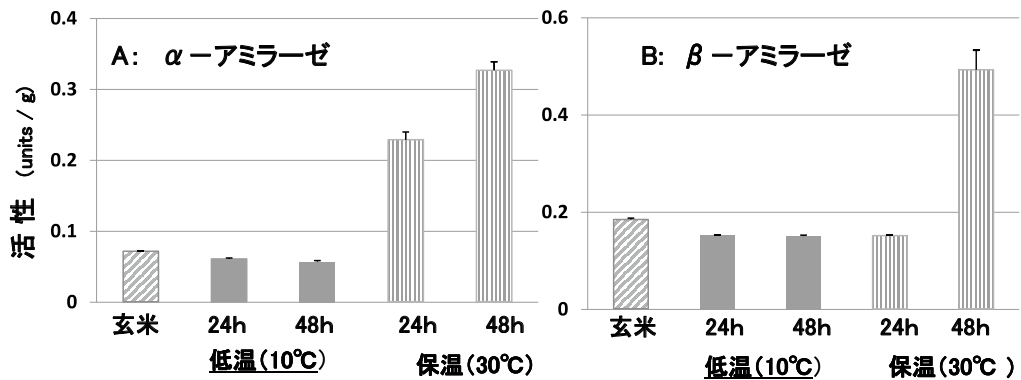


図1 発芽処理による巨大胚芽米の α 、 β -アミラーゼ活性の変化
平均値 \pm SE (n=3)

α -グルコシダーゼは米の常在酵素として一般的に知られているが, 生成グルコース量からみた活性(mg/g)は, 玄米20.7に対し, 24時間保温で21.3, 48時間保温では31.0であった. 48時間保温で玄米の1.5倍の活性増加を示したが, 24時間では玄米間との差はほとんどみられず, 低温発芽では玄米よりもやや低下傾向にあった (図2).

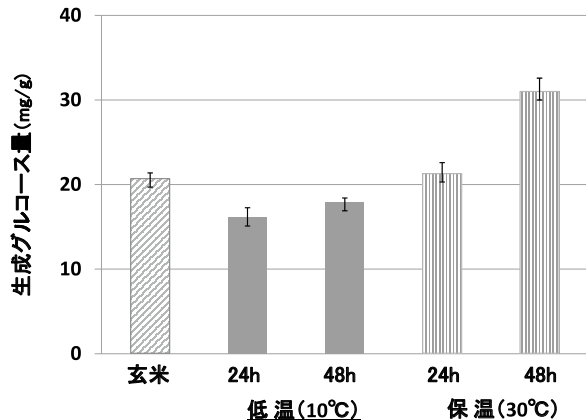


図2 発芽処理による巨大胚芽米の α -グルコシダーゼ活性の変化
平均値 \pm SE (n=3)

2. 等電点電気泳動 (IEF) 後の β -アミラーゼの活性

Fig. 3に見られるように巨大胚芽米の24時間保温発芽でpH 4.7に一つの活性バンドが、また、48時間保温発芽ではこれに加え、pH 4.9にもう1つの活性バンドが出現した。他のサンプルでも同様の活性バンドをうすく目視では確認できたが、このような明確な活性バンドは出現しなかった (図3)。48時間保温発芽のみ2本の活性バンドが検出されたのは、前述のように β -アミラーゼ活性が他のサンプルに比べて顕著に高値であったことを支持した。

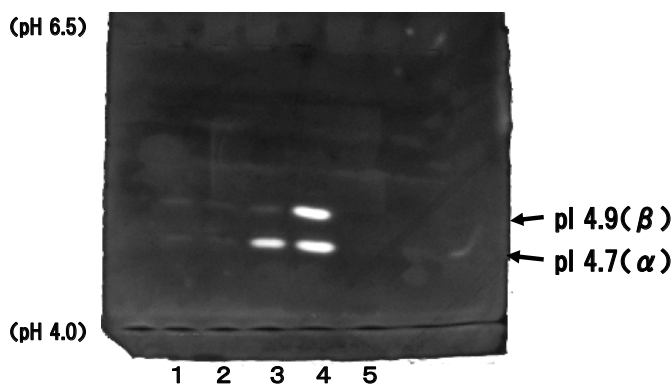


図3 等電点泳動後の活性染色法によるアミラーゼの検出 (巨大胚芽米)
 レーン1: 10°C発芽 (24h), 2: 低温発芽 (48h), 3: 30°C発芽 (24h)
 4: 30°C発芽 (48h), 5: 静水圧

3. アミノ酸分析によるGABA含量の比較

巨大胚芽米100gあたりのGABA含量 (mg) は、低温発芽の24時間で5.11, 48時間では4.39であり、保温発芽の24時間では4.87, 同じく48時間では5.08であった。比較の対照としての「あいちのかおり」の玄米では1.0mg/100gであった。巨大胚芽米はもともと「あいちのかおり」玄米の4.2倍ものGABAを含有していたが、発芽処理によりさらに1.2倍に増加した。この場合、発芽処理温度の差による影響はほとんど認められなかった (図4)。また、同じ高圧処理でも

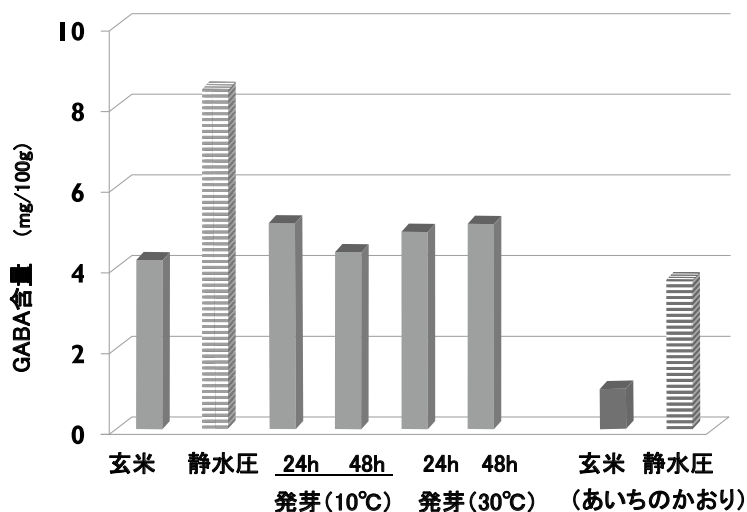


図4 発芽・静水圧処理による γ -アミノ酪酸含量の比較

水を仲介とした静水圧処理を施した巨大胚芽米では、玄米の2倍に、また、「あいちのかおり」では3.5倍の増加がみられた。高圧処理したあと、10℃または30℃で発芽させた場合での変化はみられなかった。また、胚芽部のGABA量を比較してみた結果、巨大胚芽米(46.3mg/100g)、「あいちのかおり」ではその1/4以下の(10.1mg/100g)であった(図5)。米の場合、発芽に伴いGABA含有量が増加することが知られているが、その発芽そのものが肉眼で判別できる時には、米の食味への関与が大きい⁴⁾とされる糖成分などは自己消化されてしまい、食味は低下する。このため、発芽玄米ではGABA量を指標とした発芽設定の方法も実施されてきており、目で見ても発芽しているかどうかの判別が困難なレベルが最良の発芽状態であることもわかってきている⁵⁾。

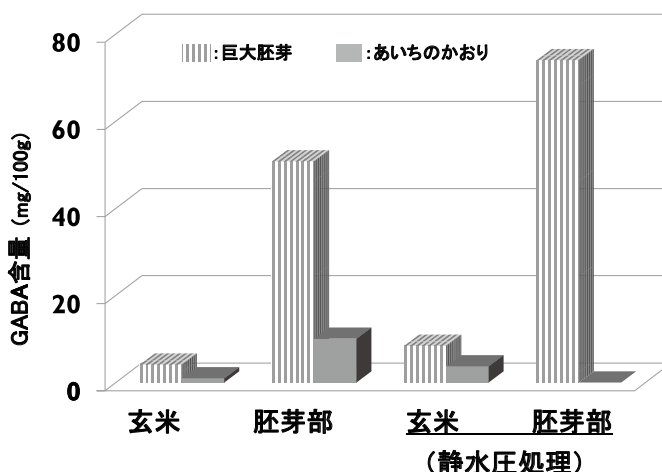


図5 静水圧処理によるGABA含量の変化

4. 抗グルタミン酸脱炭酸酵素 (Glutamic Acid Decarboxylase : GAD) 抗体を用いた解析

SDS-PAGE後のゲルをメンブレンへ120mA, 70分でタンパク質の転写を行い、250倍希釈した一次抗体 (Anti-GAD 65/67, Rabbit-Poly) および150倍希釈した二次抗体 (AP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)) を用いてウエスタンブロットを行った結果、GADとの反応は21kDaに出現した(図6)。なお、本実験で用いた泳動サンプルのうち、高圧処理後に30℃で発芽処理した両

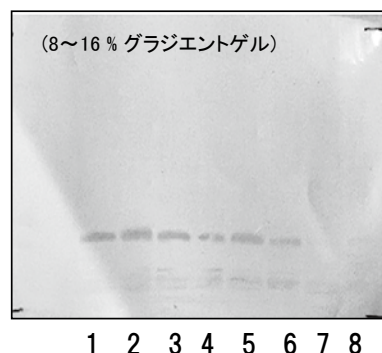


図6 抗グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 抗体によるウエスタンブロット解析

1 : あいちのかおり玄米 2 : 巨大胚芽玄米 3 : あいちのかおり (静水圧処理)
4 : 巨大胚芽米 (静水圧処理) 5 : 高圧後, 10℃発芽 (あいちのかおり)
6 : 高圧後, 10℃発芽 (巨大発芽米) 7 : 高圧後, 30℃発芽 (あいちのかおり)
8 : 高圧後, 30℃発芽 (巨大発芽米)

品種米とも反応バンドは極めて弱い発色であった (図 6, lane 7, 8). 10℃の発芽ではこの現象はほとんどみられなかった. これは高圧処理によって組織の破壊が生じ, このあとの水浸漬下 (30℃) での発芽処理では, タンパク質の一部が水の方へ溶出した結果, その反応性が弱まったか, あるいは高圧処理による酵素自体の失活によるものではないかと考えている.

本実験で用いた巨大胚芽米は精米せず, 玄米のまま食するタイプの品種であり, GABAのみならず, その胚芽部にはビタミンやミネラルなどの蓄積量も高い種子である. これに水分・温度などの条件を整えることで胚芽中の酵素類が活性化し, これによってグルタミン酸からGABAの生成, デンプンから低分子の糖 (甘味成分) へと変化が生ずる. また, 食物繊維も多く, 糖質代謝や脂質代謝への改善効果もあると考えている. これまでの高圧処理は, 非加熱殺菌を目的としたものが多かったが, 高圧処理がデンプンやタンパク質などの化学的性質ならびに物性の変化にも寄与することから多くの研究が行われている. 本研究では, 発芽や高圧処理が種子中の酵素活性に及ぼす影響について有益な結果が得られたものと考えている.

Summary

The changes in enzyme activity and the gamma-aminobutyric acid (GABA) content during germination at 10℃ or 30℃ and with high-pressure (200 MPa) treatment were investigated to identify the functional ingredients of cereal sprouts obtained from giant-embryo rice. The results showed that the GABA content of giant-embryo rice was about 4 times that of nonglutinous brown rice, and further increased by 1.2 times with the germination process. A 2 to 4-fold increase in the GABA content was also observed with the hydrostatic pressure process. The incubation at 30℃ increased the induction or synthesis of alpha-amylase at least 3 fold with germination and induction for 48 hours increased that of beta-amylase. Moreover, activity staining performed after isoelectric focusing (IEF) revealed two active bands (pI 4.7 and 4.9) 48 hours after incubation at 30℃ but only a single band (pI 4.7) at 24 hours. The appearance of the pI 4.9 active band was also a result supporting increased enzyme activity at 48 hours. We conclude that high-pressure and warm (30℃)-germination are effective to increase the functional ingredients of the giant-embryo rice.

謝 辞

本研究の遂行にあたり, 高圧処理等でご協力をいただきました武庫川女子大, 生活環境学部, 食物栄養学科の升井洋至博士に厚く御礼申し上げます. また, 実験は平成21年度卒, 食物栄養学科 食品学ゼミナール生の浅野 瞳, 今井皆美さんらのご協力によるものであることを記し, あらためて感謝の意を表します.

なお, 本研究の一部は日本農芸化学会2010年大会 (東京大学, 駒場) にて口頭発表した.

文 献

- 1) 石谷孝佑：コメの事典－稲作からゲノムまで－，幸書房（2002）
- 2) 辻 啓介，市川富夫，田辺伸和，阿部士朗，樽井庄一，中川靖枝：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降下作用，栄養学雑誌，**50**, 285-291（1992）
- 3) 岡田忠司，杉下朋子，村上太郎，村井弘道，三枝喜代，堀野俊郎，小野田明彦，高橋 励，高橋丈夫： 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神経障害に対する効果，日本食品科学工学会誌，**47**, 596-603（2000）
- 4) Wakako Takeuchi, Shin-ichiro Mitsunaga and Hironori Masui：Studies on Germination Conditions of Brown Rice to Improve the Palatability, J. Appl. Glycosci, **58**, 27-30（2011）
- 5) 安達修二編：生物資源から考える21世紀の農学 食品の創造，京都大学学術出版会，p41～57（2008年）
- 6) 東京大学大学院医学系研究科・医学部，<http://www.m.u-tokyo.ac.jp/news/press.html>，広報・プレスリリース最新情報2013年，2013年8月