

乳酸菌による発芽玄米機能性成分の 生産誘発機構に関する研究

学位論文内容の要旨

γ -アミノ酪酸(GABA)は自然界に広く分布するアミノ酸の一種で、哺乳動物の脳や脊髄に存在する抑制系の神経伝達物質である。GABAの生理作用として神経抑制作用や精神安定機能、血圧上昇抑制作用、脳の代謝促進作用等が知られている。医薬品としてのGABAは、脳の血流を改善し酸素供給量を増加させ、脳の代謝を亢進させる働きを持つことから、脳卒中、脳動脈後遺症による頭痛、耳鳴り、意欲低下などの治療に利用されている。最近では、GABAの血糖値の上昇抑制について報告されている。近年、健康に対する意識の高まりとともに、機能性食品や栄養補助食品に対する関心が非常に高くなっている。この背景には、社会問題化している生活習慣病があげられるが、特に高血圧は循環器疾患の危険因子として深い関わりがある。高血圧や脳卒中の発症には遺伝的要因と環境要因が関与しているが、特に食生活の改善による生活習慣病の予防が重要である。

こうした生活習慣病を日常の食生活から予防するという観点から、GABAを富化した発芽玄米および発芽玄米を利用した発酵食品の開発が進められてきた。玄米を30~35°Cの水に24時間ほど浸漬すると、胚芽が0.5~1mmほど発芽し始めるので、この玄米は一般に発芽玄米とよばれている。発芽の過程で玄米中のグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD:EC 4.1.1.15)によって、グルタミン酸からGABAに変換されることが知られている。技術開発の過程で生乳に発芽玄米を加え、ヨーグルトを製造したところ、通常のものに比べて発芽玄米入りヨーグルト中のGABAが増加した。こうした現象を詳細に解析することにより、乳酸菌を使った高機能を有する発酵食品の開発が可能であると考えられた。そこで、本研究は、機能性成分であるGABAに着目し、乳酸菌を利用した機能性食品の高度化に資することを目的に研究を行った。

1. 発芽玄米の新規製造法および機能性成分の挙動解明

発芽玄米製造過程の微生物制御と安定したGABA含量の安定的維持を目的として、真空低温浸漬による発芽処理方法を検討した。以下の発芽処理の比較検討を行った。条件は、1)35°Cで24時間浸漬、2)15°Cで18時間浸漬後、温度を35°Cにして6時間浸漬、3)真空ポンプを設置した発芽器を15°Cに設定し、18時間浸漬後、温度を35°Cにして6時間浸漬した。浸漬後の玄米の一般生菌数と、発芽させた玄米中の遊離アミノ酸を測定した結果、真空低温浸漬による発芽処理法(3)は、通常の方法(1)と比較すると一般生菌数の増加を1 log オーダー抑えることができた。GABA含量は、常圧の低温浸漬で

製造した発芽玄米(2)に比べると蓄積量が増加したが、従来の発芽玄米(1)に含まれている GABA 含量 (約 10 mg/100 g) とほぼ同様の値となった。

2. GABA 生産乳酸菌の検索

高血圧等の生活習慣病を日常の食生活から予防するという観点から、さらに高濃度の GABA 含有食品の開発が望まれた。そこで、乳酸菌の GABA 生産に着目し、GABA 生産乳酸菌の検索を行った。乳酸菌 74 株を 50 mM グルタミン酸を含む MRS 培地で 7 日間培養後、培地中の GABA を測定した結果、*Lb. plantarum* NFRI 7313、*Lb. brevis* NFRI 7340 と *Lb. amylovorus* NFRI 7415 に GABA 生産能が認められた。16S rDNA 遺伝子解析により同定を行った結果、GABA 生産乳酸菌 NFRI 7415 は、*Lb. paracasei* に属する株であることが示唆された。NFRI 7415 は培養 144 時間 (6 日間) で 100 mM のグルタミン酸から 60 mM の GABA を蓄積した。また、定常期を過ぎてから細胞の外に大量の GABA が生産され、菌体内には GABA は蓄積しないものと推測された。

3. *Lb. paracasei* における GABA 生産条件の検討

Lb. paracasei NFRI 7415 が大量に GABA を生産する培養条件の検討を行ったところ、グルタミン酸の至適濃度は 500 mM、至適培養温度は 37°C であった。MRS 培地の pH を 5.0 に調製することで GABA の生産量が増加した。また、GAD の補酵素であるピリドキサルリン酸 (PLP) を MRS 培地に 10 μ M 添加することで、GABA の生産量は増加した。

4. *Lb. paracasei* の GAD の精製とその性質

GABA 生産に関与する GAD の酵素学的性質を明らかにするため、*Lb. paracasei* の GAD の精製を行った。MRS 培地で 37°C、72 時間培養して得られた細胞をホモジナイザーにより粉碎し、粗酵素液とした。粗酵素液を硫酸塩析した後、疎水クロマトグラフィーと、イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-Sepharose と 2 回の Mono-Q) に供した。Mono-Q 溶出画分を SDS-PAGE で解析した結果、分子量 57 kDa の単一バンドが検出され、分子量 57 kDa (SDS-PAGE)、110 kDa (ゲルろ過) であった。精製 GAD の諸性質を調べたところ、至適 pH 5.0、至適温度 50°C、 K_m 値および V_{max} は 5.0 mM、7.5 mM であった。また、N 末端アミノ酸配列は、SEKNDEQMI と推測された。

5. *Lb. paracasei* の GAD 遺伝子のクローニング

GAD 遺伝子 (*gadB*) のクローニングを行った。精製酵素の N 末端配列および他の細菌の *GadB* において保存されたアミノ酸配列からプライマーを設計し、PCR により *gadB* の部分断片を取得した。部分断片の塩基配列を基に、インバース PCR を行い *gadB* の全長を含む 1.8 kbp 断片を取得した。塩基配列を決定し、481 アミノ酸残基であり、精製酵素で決定した N 末端配列と同一の配列が含まれていた。また、*Lb. paracasei* の *GadB* は、*Lb. brevis* を含む他の乳酸菌の *GadB* と高い相同性を示したが、保存領域の一部で差異が観察された。

以上の研究結果から、*Lactobacillus paracasei* NFRI 7415 の GAD の至適温度が 50°C と比較的高いため、GABA 生産のための工業生産およびバイオリアクターへの利用や、発芽玄米を添加した発酵食品の開発が可能であると考えられる。今後の課題としては、遺伝子レベルの研究により *gadB* の発現と制御、さらには大量に GABA を生産するメカニズムが解明されることが必要と考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	木村俊範
副査	教授	松田従三
副査	助教授	川村周三
副査	教授	樋元淳一（酪農学園大学）
副査	ユニット長	島 純（食品総合研究所）

学位論文題名

乳酸菌による発芽玄米機能性成分の 生産誘発機構に関する研究

本論文は7章からなり、図 29、表 18、引用文献 109 を含む、総頁数 117 の和文論文であり、別に 3 編の参考論文が添えられている。

米の用途拡大と生活習慣病を日常の食生活から予防するという観点から、GABA（ γ -アミノ酪酸）を富化した発芽玄米および発芽玄米を利用した発酵食品の開発が進められてきた。発芽玄米とは玄米を 30~35℃の水に 24 時間ほど浸漬し、胚芽が膨張して 0.5~1 mm になって発芽し始めた状態のものを指す。

本研究では、発芽玄米の主要機能性成分である GABA の生産に着目しつつ、より高い機能性を有する乳酸発酵食品の開発を目的として発芽玄米製法の改良、および高濃度 GABA 生産にかかわる乳酸菌探索と生産機構解明に関する検討をおこなった。

1. 発芽玄米の新規製造法開発および機能性成分の挙動解明

発芽玄米製造過程の微生物制御と安定した GABA 含量の安定的維持を目的として、減圧低温浸漬による発芽処理方法を開発し、従来製造法と比較した。

1) 35℃で 24 時間浸漬（対照区）

2) 15℃で 18 時間浸漬後、温度を 35℃にして 6 時間浸漬（低温常圧・対照区）

3) 真空ポンプを設置した発芽器を 15℃に設定し、18 時間浸漬後、温度を 35℃にして 6 時間浸漬

浸漬後の玄米の一般生菌数を測定した結果、真空低温浸漬による発芽処理法は、従来法と比較して一般生菌数の増加を抑えることができた。GABA 生成の観点では、低温常圧浸漬法で製造した発芽玄米よりも GABA 含量が増加し、また通常法による発芽玄米の GABA 含量（約 10 mg/100 g）ともほぼ同様の値となり、その有効性が確かめられた。

2. GABA 生産乳酸菌の検索

GABA 含量のさらなる増加を目指し、乳酸菌の GABA 生産性に着目して GABA 生産乳酸菌の検索を行った。乳酸菌 74 株を 50 mM グルタミン酸を含む MRS 培地で 7 日間培養後、培地中の GABA を測定した結果、*Lb. plantarum* NFRI 7313、*Lb. brevis* NFRI 7340 と *Lb. amylovorus* NFRI 7415 に GABA 生産能が認められた。また 16S rDNA 遺伝子解析により同定を行った結果、GABA 生産乳酸菌 NFRI 7415 が *Lb. paracasei* に属する株であることも示唆できた。NFRI 7415 は培養 144 時間 (6 日間) で 100 mM のグルタミン酸から 60 mM の GABA を生産した。

3. *Lb. paracasei* における GABA 生産条件の検討

Lb. paracasei NFRI 7415 が大量の GABA を生産する培養条件の検討をおこなった結果、至適温度は 37°C、グルタミン酸の至適濃度は 500 mM であった。MRS 培地の pH を 5.0 に調製することで GABA の生産量が増加した。また、GAD (グルタミン酸脱炭酸酵素) の補酵素であるピリドキサーリン酸 (PLP) を MRS 培地に 10 μ M 添加することで、GABA の生産量をさらに増加させることができた。

4. *Lb. paracasei* の GAD の精製とその生化学的性質

GABA 生産に関与する GAD の酵素学的性質を明らかにするため、*Lb. paracasei* の GAD の精製を行った。粗酵素液を疎水クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィー (DEAE-Sepharose と 2 回の Mono-Q) に供し、Mono-Q 溶出画分を SDS-PAGE で解析した結果、分子量は 57 kDa (SDS-PAGE) であった。精製 GAD の諸性質を調べたところ、至適 pH 5.0、至適温度 50°C、 K_m 値および V_{max} は 5.0 mM、7.5 mM であった。

また *Lb. paracasei* の GAD 遺伝子のクローニング、精製酵素の N 末端配列などを調べ、GABA 生産機能発現メカニズムを探った。しかし *Lb. paracasei* の GAD 遺伝子アミノ酸配列 GadB は、*Lb. brevis* を含む他の乳酸菌の GadB と高い相同性を認めたものの、GABA 生成にかかわる遺伝子発現メカニズムの全容を解明するには至らなかった。

以上の研究結果は発芽玄米の製法改良と機能性成分 GABA の大量生産に結びつく新規の提案、およびスクリーニングされた *Lb. paracasei* の諸性質とその応用に関する重要な知見とを提供しており、本研究成果は学術および実用の両観点から高く評価できる。

よって審査員一同は、小松崎典子が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。