ブラウン系統エノキタケによる γ -アミノ酪酸含有素材の 作出と血圧降下作用

原田 陽^{1*}, 永井 武², 山本美保²

¹ 地方独立行政法人北海道立総合研究機構森林研究本部林産試験場

² 財団法人日本食品分析センター多摩研究所

Production of GABA-Enriched Powder by a Brown Variety of *Flammulina velutipes* (Enokitake) and Its Antihypertensive Effects in Spontaneously Hypertensive Rats

Akira Harada^{1*}, Takeshi Nagai² and Miho Yamamoto²

¹ Hokkaido Research Organization, Forest Products Research Institute,
Nishikagura 1-10, Asahikawa, Hokkaido 071-0198

² Japan Food Research Laboratories, Tama Laboratory, Nagayama 6-11-10, Tama, Tokyo 206-0025

We investigated the production of γ -aminobutyric acid (GABA) from glutamic acid using mushroom fruiting bodies. It was found that *Flammulina velutipes* (Enokitake) had the highest GABA production ability among 11 mushroom varieties. The GABA content of brown Enokitake was 6% to 7% (dry powder) after reaction for 6 to 8 hours at 20°C. After a single administration of GABA-enriched Enokitake powder, a significant lowering of blood pressure was observed in spontaneously hypertensive rats (SHR), but no effects were observed in rats with normal blood pressure (WIST). Ingestion of GABA-enriched Enokitake powder (0.9 mg GABA/kg) resulted in a reduction in systolic blood pressure (SBP) by about 30 mmHg.

(Received Jun. 8, 2011 ; Accepted Jun. 23, 2011)

Keywords : mushroom, *Flammulina velutipes*, GABA, blood-pressure

キーワード : きのこ, エノキタケ, γ -アミノ酪酸, 血圧

γ -アミノ酪酸 (GABA) は、血圧降下作用^{1)~9)}, 精神安定作用^{10)~12)}, 成長ホルモン分泌促進作用¹³⁾等さまざまな効果が期待される成分として注目されている。また、GABA はグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の作用によりグルタミン酸が脱炭酸してできる⁴⁾ 非タンパク性アミノ酸の一種である。発芽玄米に含まれる成分として知られている他、動物、植物、微生物に広く含まれ、我々の食生活で通常摂取している食品成分のひとつであることが明らかになってきた。GABA を増やす技術として、乳酸菌¹⁴⁾¹⁵⁾ による発酵のほか、茶¹⁶⁾ や米胚芽¹⁷⁾ およびジャガイモ¹⁸⁾ に含まれる GAD を活性化する方法がある。さらには、カボチャ⁴⁾ や小麦胚芽¹⁹⁾ にグルタミン酸を添加して GAD で変換する方法がある。

きのこを原料とした GABA 生成に関しては、アガリクス菌糸体の培養や子実体中の GAD 活性化による方法²⁰⁾ 以外ほとんど報告されていない。国内では、シイタケやエノキタケを始めとするさまざまなきのこが栽培されている。

栽培方法として、原木栽培と菌床栽培があり、最近では施設内における菌床栽培が主流となっており、質・量ともに安定生産が可能である。例えば、エノキタケは、一般的に流通している純白系品種と流通量が少ない野生型のブラウン系品種があり、それぞれ食味に特徴があり、少なからずグルタミン酸を主とするアミノ酸が含まれていて、なじみある食材として活用されている。これらに GABA の機能性を付与した食品素材とすることにより付加価値向上に寄与することを考えた。

そこで本研究では、きのこの子実体を原料として、きのこの種類による GABA 生成能を比較した上で、グルタミン酸を添加する GABA 生成法を検討した。これにより得られた GABA を増やしたブラウン系統エノキタケをラットに強制経口投与して、血圧降下作用を確認したので報告する。

実 験 方 法

1. GABA 生成に及ぼす諸因子の影響

(1) 供試原料

国内で施設栽培が行われている主なきのこを原料とし

¹ 〒071-0198 北海道旭川市西神楽 1-10

² 〒206-0025 東京都多摩市永山 6-11-10

* 連絡先 (Corresponding author), harada-akira@hro.or.jp

た。すなわち、エノキタケ、シイタケ、ブナシメジ、ナメコ、マイタケ、エリンギ、タモギタケ、ヒラタケ、ツクリタケ、ムキタケで、いずれも北海道産である。エノキタケは愛別町で栽培された「チクマッシュ T-011」(純白系統、千曲化成)と「えぞ雪の下」(ブラウン系統、林産試験場 Fv 92-4)の2種類を供試した。GABA 生成反応前に、子実体の石突き部分を除去した。

(2) GABA 生成反応

原料の種類による GABA 生成能の比較は、それぞれの凍結乾燥粉末試料を用いて行った。すなわち、50 mL 容 PP 製チューブに入れた試料 1 g にグルタミン酸 100 mg を加え、蒸留水 10 mL に分散混合した。20℃ のウォーターバス中で振とう (120 rpm) させながら、6 時間反応を行った。

GABA 生成に及ぼす反応条件の影響は、ブラウン系統エノキタケ凍結乾燥粉末試料を用いて行った。温度 (10～40℃ の4条件) およびグルタミン酸添加量 (0～400 mg/g 試料の5条件) の影響を GABA 生成反応 6 時間で評価した。また、16 時間生成反応を行い経時的に反応液を採取し、時間の影響を評価した。いずれの場合にも反応後、蒸留水 30 mL を加え混合してから、5000×G で20分間の遠心分離、5A ろ紙による上清部の吸引ろ過を行い、ろ液 (エキス) を回収した。

生成反応に及ぼす規模の影響を検討するために、ブラウン系統エノキタケの子実体 12 kg (石突き除去) を供試して、スケールアップ試験を行った。子実体 (水分 90%) に蒸留水 12 kg、グルタミン酸 120 g を混合し、フードミキサーにより摩砕した。摩砕物をステンレス容器中に入れ、20℃ で2時間、10℃ で15時間静置した。その後、蒸留水 25.2 kg を加え混合してから、5000×G で20分間の遠心分離、5A ろ紙による吸引ろ過を行い、エキスを回収した。

(3) アミノ酸分析

HPLC Prominence システム (島津製作所) により分析を行った。GABA やグルタミン酸を含む遊離アミノ酸は、カラム Shim-pack Amino-Na (6×100 mm, 島津製作所) で分離し蛍光検出器 SHIMADZU RF-10AXL (島津製作所) で検出した。溶離液と反応液は、アミノ酸分析用キット (島津製作所) を使用した。カラム温度は 60℃ とした。GABA 生成反応後に得られたエキスをクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2) で適宜希釈した後に、孔径 0.45 μm のフィルターに通したものを上記 HPLC に注入し、分析し定量した。

GABA 生成率を以下のように算出し、評価した。

$$\text{GABA 生成率 (\%)} = (\text{GABA 生成量, mg/g dry}) / \{ (\text{グルタミン酸添加量, mg/g dry}) \times (\text{GABA 分子量, 103.12} / \text{グルタミン酸分子量, 147.13}) \}$$

2. GABA 含有素材のラットへの単回投与による血圧変化

(1) 試験動物

高血圧自然発症ラット (SHR/Izm 系, 12 週齢, 雄, 以下

SHR) を日本エスエルシー株式会社から購入した。正常血圧モデルラット (BrlHan: WIST, 10 週齢, 雄; 以下 WIST) を日本クレア株式会社から購入した。両種のラットとも、約 1 週間の予備飼育を行って一般状態に異常のないことを確認した後、試験に使用した。試験動物はポリカーボネート製ケージに収容し、室温 23±2℃, 照明時間 12 時間/日に設定した飼育室において飼育した。飼料 (マウス, ラット用固型飼料; ラボ MR ストック, 日本農産工業株式会社) および飲料水 (水道水) は自由に摂取させた。

(2) 試験液の調製と投与

検体は、GABA を 3% 含むブラウン系統エノキタケの凍結乾燥粉末とした。検体は、GABA 生成反応後に凍結乾燥し粉末化した。検体を注射用水で懸濁して、投与する試験液を調製した。いずれの場合にも試験液投与量を 10 mL/kg body weight (b.w.) とした。SHR に対する検体投与量として、0, 30, 90 mg/kg b.w. の3群を設定した。WIST に対しては、検体投与量を 100 mg/kg b.w., 試験液投与量を 10 mL/kg b.w. とした。体重を測定した後、各試験液を胃ゾンデにより強制単回経口投与した。SHR は各群 5 匹, WIST は3匹に投与した。

なお、本試験は日本動物実験学会の動物実験に関する指針に従い、実施した。

(3) 血圧測定

投与前 (9:00～10:00) 並びに投与後 4 時間 (13:00～14:00), 8 時間 (17:00～18:00) および 24 時間 (9:00～10:00) に非観血式自動血圧測定装置 BP-98A (Softron) を用いて保定温度 38℃ で、tail-cuff 法により収縮期および拡張期血圧を測定した。測定は1匹につき3回ずつ行い、その平均値を収縮期および拡張期血圧値とした。

(4) 統計学的解析

測定値は平均値±標準誤差で示し、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。

実験結果および考察

1. GABA 生成に及ぼす諸因子の影響

きのこ 11 種類の子実体を原料として、グルタミン酸を基質として反応を行った場合の GABA 生成量を Fig. 1 に示した。GABA 生成量は、きのこの種類により明らかに異なり、エノキタケとシイタケで高い結果が得られた。特にエノキタケはブラウン系でも純白系でも 6 時間という比較的短時間の反応で GABA 生成率が 80% を超えたことから、GABA 生成に有効な材料と考えられた。本実験条件でエノキタケは、他のきのこと比較して明らかに GAD 活性が高いことが示された。

次にブラウン系エノキタケを供試して反応温度 4 条件や反応時のグルタミン酸添加量 5 条件で、GABA 生成量を比較した。結果を Fig. 2A, B に示した。20℃ で生成量や生成率が高く、30 および 40℃ は 20℃ の 75% 程度の生成量

Fig. 1 Effects of mushroom varieties on the accumulation of γ -aminobutyric acid (GABA) in mushroom fruiting-bodies

□, GABA accumulated ; ○, GABA conversion rate.

Freeze-dried powder of mushroom fruiting-bodies were incubated in glutamic acid (Glu) solution. GABA in the solution was measured using HPLC.

であった (Fig. 2A) ことから, アガリクス子実体を原料とした GABA 生成反応³⁾⁶⁾²⁰⁾ のように, 温度を積極的に上げる必要がなく, 室温程度で効率的な GABA 生成が可能であることが示された. 続いて, GABA 生成反応に及ぼすグルタミン酸添加量の影響を評価した結果, 50~100 mg/g 原料の場合に GABA 生成率が高く, 100 mg/g 原料の場合に生成量が高くなった (Fig. 2B). 150 mg 以上/g 原料の場合, GABA 生成量および生成率が低下した. これは, 生成反応時の pH が GAD の至適 pH の範囲から外れ, 反応が進行しなかった可能性があり, 基質濃度を高める際は, カボチャ⁴⁾ や小麦胚芽¹⁹⁾ のように pH をコントロールする必要があると考えられる. カボチャ⁴⁾ では反応中にグルタミン酸を分割添加して pH コントロールすることにより, 小麦胚芽¹⁹⁾ では反応中に酸を適宜添加してコントロールすることにより, より高濃度の基質で反応を進めることが可能であった. 今後エノキタケでも検討の余地がある. 以上の結果を考慮して GABA 生成反応に及ぼす時間の影響を評価するため, 100 mg/g 原料のグルタミン酸を基質として GABA 生成反応を 20°C で 16 時間行った. 結果を Fig. 2C に示した. 反応開始後速やかに GABA の生成が始まり, 生成率は 4 時間で 60% を超え, 8 時間で 100% に達した. 6~8 時間で原料の 6~7% に相当する GABA 生成が可能である. アガリクスでは, 2.5~3.0% の GABA を含む乾燥物の製造が可能であり³⁾⁶⁾²⁰⁾, エノキタケも同等以上の GABA を含む素材製造が可能と考えられる.

エノキタケの生子実体 12 kg (石突き除去後) を供試して行ったスケールアップ試験の結果を Table 1 に示した.

Fig. 2 Effects of reaction conditions on the accumulation of GABA in mushroom fruiting-bodies of brown Enokitake

(A) Reaction temperature, (B) Adding amount of glutamic acid, (C) Reaction time. □, GABA accumulated ; ○, GABA conversion rate.

Freeze-dried powder of mushroom fruiting-bodies were incubated in glutamic acid solution. GABA in the solution was measured using HPLC.

固液分離を行って回収したエキスの GABA 濃度は 0.21% であった. また, 基質として添加したグルタミン酸の残存量が少なく, GABA 生成率は 100% を超え添加したグルタミン酸がほぼ全量 GABA へ変換された. 1 g の乾燥粉末を原料として 20°C で行った GABA 生成反応では, 6 時間で GABA 生成率は 100% となり (Fig. 2C), 反応温度 20°C と 10°C を併用した本試験でも同様な結果が得られたことから, 低温でも生成反応が効率よく進行すること, エノキタケが GABA 生成の原料として有効であることを示すこと

Table 1 Scale-up test of GABA production from brown Enokitake

Reaction mixture	
Adding amount of fresh Enokitake (kg)	12.0
Adding amount of water (kg)	37.2
Adding amount of glutamic acid (g)	120
Extract separated (mL)	
GABA cocentration (mg/mL)	2.1
GABA accumulated ^{a)} (g/100 g fresh)	
GABA accumulated (g/100 g dry)	0.7
GABA conversion rate ^{b)} (%)	101.3

^{a)}=(Extract separated, mL)×(GABA concentration, mg/mL)/(1000×120)

^{b)}=(GABA accumulated, g/100 g dry)/ {10×(Molecular weight of GABA, 103.12)/(Molecular weight of Glu, 147.13)}
Homogenate of reaction mixture was incubated for 2 hours at 20°C and for 15 hours at 10°C.

ができた。このように水分が90%含まれる生子実体を原料にして、g オーダーから kg オーダーへの GABA 生成反応のスケールアップが可能になった。

2. GABA 含有素材の血圧降下作用

SHR の実験では、収縮期および拡張期血圧について、投与後4および8時間に90および30 mg/kg b.w. 投与群で投与前と比較して、降下傾向が見られたが、対照群では投与前と比較して変化が見られなかった (Fig. 3). 投与後4および8時間においては、90 mg/kg b.w. 投与群および30 mg/kg b.w. 投与群で対照群と比較して有意差が見られた。投与後24時間においては、90および30 mg/kg b.w. 投与群ともに投与前の血圧値付近まで上昇した。

WIST の実験では、収縮期および拡張期血圧について、投与後4時間以降に顕著な変化が見られなかった (Fig. 4). 他の報告⁵⁾⁸⁾も考慮して、GABA は正常な血圧のラットに対して、血圧を下げないといえる。血圧が高めの人に作用し、正常な人は血圧低下を示さない²⁾ことが報告されていることから、本結果はこれまでのヒト試験による知見と一致している。

SHR に対して、0.9 mg/kg b.w. や 2.7 mg/kg b.w. の GABA を含むエノキタケの投与により、収縮期に30 mmHg 程度の血圧降下作用を示したことから、一定量以上の GABA を含むエノキタケの摂取により血圧降下作用が発現することが示唆された。GABA 強化ジャガイモでは、GABA 投与量 0.83~1.7 mg/kg b.w. の場合に 35 mmHg 程度の血圧降下がみられた⁸⁾ことが報告されており、本試験でも同様の結果が得られた。本結果から計算すると、体重 60 kg のヒトが 50 mg 程度の GABA を含むエノキタケを摂取することにより、血圧降下作用が発現する可能性が示唆される。

本試験は単回投与によるものであるが、大森ら¹⁾や渡辺

Fig. 3 Changes of blood pressure after administration of GABA-enriched Enokitake powder in spontaneously hypertensive rats (SHR)

Effects of a single oral administration of freeze-dried powder of GABA-enriched Enokitake on blood pressure in SHR. Each time point represents the mean±S.E. for 5 animals. Upper, SBP; Down, DBP.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the value obtained for the control (0 mg/kg).

Fig. 4 Changes of blood pressure after administration of GABA-enriched Enokitake powder in normal blood pressure rats (WIST)

Effects of a single oral administration of freeze-dried powder of GABA-enriched Enokitake on blood pressure in WIST. Each time point represents the mean±S.E. for 3 animals.

ら³⁾の報告では、SHR に対する GABA 含有素材の継続投与により血圧上昇を明らかに抑制したことから、本研究で得られた素材も同様の作用を示す可能性がある。軽症高血圧者を対象としたヒト試験で血圧上昇抑制作用が確認できた GABA 摂取量は、和風調味料で 20 mg/日²⁾、アガリクスで 25 mg/日⁶⁾、はっ酵乳で 12 mg/日⁷⁾と報告されていることから、エノキタケを原料とした GABA 生成スケールアップ試験で回収したエキス 10 mL で十分量の GABA を摂取することが可能である。また、50 mg 程度の GABA を含む 1~2 g のエノキタケ素材の摂取により同様の作用を持つ可能性が期待される。

以上から、ブラウン系統エノキタケの子実体粉末にグルタミン酸を添加し水に分散混合しながら、20℃で 6~8 時間反応を行うことにより原料の 6~7% に相当する GABA 生成が可能であること、得られた素材の SHR に対する単回経口投与により少量で顕著な血圧降下作用を持つことを示すことができた。

要 約

きのこの子実体を原料として、11 種類のきのこによる GABA 生成能を比較した上で、グルタミン酸を添加する GABA 生成法を検討した。きのこの中でもエノキタケの GABA 生成能が高く、ブラウン系エノキタケの子実体を原料とした場合 20℃ 6~8 時間の反応により原料の 6~7% に相当する GABA 生成が可能であった。GABA を増やしたブラウン系統エノキタケを高血圧自然発症ラット (SHR) に強制経口投与した結果、0.9 mg/kg の GABA を含むエノキタケの投与により、収縮期に 30 mmHg 程度の降圧作用を示した。正常血圧ラット (WIST) の実験では、血圧に顕著な変化が見られなかった。

本研究は、地域イノベーション創出総合支援事業・重点地域研究開発プログラム「シーズ発掘試験」の一環として行われたものである。

文 献

- 1) 大森正司, 矢野とし子, 岡本順子, 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 (1987).
- 2) 風見大司, 小倉長雄, 福地敏彦, 辻 啓介, 穴澤麻梨, 前田浩明, γ -アミノ酪酸配合和風調味料の軽症高血圧者, 正常高血圧者を含む健康者に対する降圧作用, 日本食品科学工学会誌, **49**, 409-415 (2002).
- 3) 渡辺敏郎, 山田貴子, 田中仁子, 姜 聖花, Mazumder T. K., 永井史郎, 辻 啓介, 高血圧自然発症ラットにおける γ -アミノ酪酸蓄積アガリクス茸の血圧降下作用, 日本食品科学工学会誌, **49**, 166-173 (2002).
- 4) 鶴澤昌好, 奥山知子, 村田真由美, 佐藤良二, 大森正司, γ -アミノ酪酸高含有カボチャ加工品製造とそのラット血圧上昇抑制作用, 日本食品科学工学会誌, **49**, 573-582 (2002).
- 5) Hayakawa, K., Kimura, M. and Kamada, K., Mechanism underlying gamma-aminobutyric acid-induced anti-hypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **438**, 107-113 (2002).
- 6) 渡辺敏郎, 川下文子, 石 知史, Mazumder T.K., 永井史郎, 辻 啓介, 段 武夫, 軽症高血圧者の血圧に及ぼす自己消化処理させたアガリクス茸の影響, 日本食品科学工学会誌, **50**, 167-173 (2003).
- 7) 梶本修身, 平田 洋, 西村 明, GABA 含有はっ酵乳製品の正常高値および軽症高血圧に対する長期摂取時の有効性と安全性, 健康・栄養食品研究, **6**, 1-14 (2003).
- 8) 野口智則, 中村和哉, 永井 武, 勝田真一, 古賀秀則, γ -アミノ酪酸を添加したジャガイモスナック菓子の高血圧自然発症ラットにおける血圧降下作用, 日本食品科学工学会誌, **54**, 75-81 (2007).
- 9) Yamakoshi, J., Fukuda, S., Satoh, T., Tsuji, R., Saito, M., Obata, A., Matsuyama, A., Kikuchi, M. and Kawasaki, T., Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **71**, 165-173 (2007).
- 10) 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, 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期精神障害に対する効果, 日本食品科学工学会誌, **47**, 596-603 (2000).
- 11) 藤林真美, 神谷智康, 高垣欣也, 森谷敏夫, 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 (2008).
- 12) 橋高隆一, 東口信二, 発酵 GABA の量産化と抗ストレス研究開発, 農林水産技術ジャーナル, **32**(2), 27-30 (2009).
- 13) Tujioka, K., Ohsumi, M., Horie, K., Kim, M., Hayase, K. and Yokogoshi H., Dietary γ -aminobutyric acid affects the brain protein synthesis rate in ovariectomized female rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **55**, 75-80 (2009).
- 14) 上野義栄, 宮島直人, 河村真也, 早川 潔, 乳酸菌の生理活性作用の利用, 京都府中小企業技術センター技報, **29**, 63-68 (2000).
- 15) 大友理宣, 木村貴一, 渡辺誠衛, 戸枝一喜, 米糠を用いた *Lactobacillus brevis* IFO12005 による γ -アミノ酪酸含有組成物の生産, 生物工学会誌, **84**, 479-483 (2006).
- 16) 津志田藤二郎, 村井敏信, 大森正司, 岡本順子, γ -アミノ酪酸を蓄積させた茶の製造とその特徴, 日本農芸化学会誌, **61**, 817-822 (1987).
- 17) Saikusa, T., Horino, T. and Mori, Y., Accumulation of γ -aminobutyric acid (Gaba) in the rice germ during water soaking. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2291-2292 (1994).
- 18) 野口智則, 中村和哉, 古賀秀則, 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 (2007).
- 19) 瀧川重信, 大笹 稿, 鈴木達郎, 遠藤千絵, 橋本直人, 齋藤勝一, 山内宏昭, 野田高弘, 小麦胚芽を用いた γ -アミノ酪酸の効率的製造法, 日本食品科学工学会誌, **56**, 114-117 (2009).
- 20) 姜 聖花, 渡辺敏郎, T.K. マズムダル, 永井史郎, アガリクス自己消化による GABA 高含有素材の開発, バイオインダストリー, **19**(2), 25-31 (2002).

(平成 23 年 6 月 8 日受付, 平成 23 年 6 月 23 日受理)