

## 論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨

学位申請者氏名:加藤 亮

学位の種類:博士(食品栄養学)

学位記番号:博(健)甲第12号

学位授与年月日:平成27年9月30日

指導教員:高崎健康福祉大学教授

松岡 寛樹

審査委員:主査 高崎健康福祉大学 教授 綾部 園子

副査 高崎健康福祉大学 教授 岡村 信一

副査 高崎健康福祉大学特任教授 小澤 好夫

### 【論文題目】

タクアン漬けの $\gamma$ -アミノ酪酸蓄積と抗高血圧効果

Accumulation of  $\gamma$ -aminobutyrate and antihypertensive effect in takuan-zuke (salted radish)

### 【論文の内容の要旨】

#### 1. 緒論

日本の伝統的な食品である漬物を始め、醤油、味噌などの消費は著しく減少している。欧米型の食生活の普及と同時に、これらは消費者に敬遠される傾向にある。しかしながら、和食では漬物は香の物と呼ばれ、食欲を増進し、食の疲れをいやす重要な食材である。

近年、野菜は調理・加工によって二次代謝が亢進し、各種機能性成分を蓄積することが明らかにされている。特にグルタミン酸 (Glu) を基質としてグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 活性によって生成する $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は、血圧上昇抑制作用を有しており、そのメカニズムとして交感神経系の抑制、血管の拡張や抗利尿ホルモンの分泌抑制が知られている。近年は GABA 含有をアピールした機能性食品の開発研究が進んでいる。

本研究では、タクアン漬けの機能性を明らかにすることを目的とし、漬物製造における機能性成分の変動解析を行った。さらに、タクアン漬け製造時に増大する GABA に着目し、本態性高血圧自然発症ラット (SHR) を用いた抗高血圧効果について検討を行った。

#### 2. 実験方法

##### 2-1 タクアン漬けの試作と試料の調製

2009年8~12月および2013年9~11月に栽培された「干し理想」ダイコンを用いた。2009年は日干しおよび塩押しにより3週間脱水処理した後、常温および低温下にて塩/塩糠による8ヶ月間の塩蔵処理を行った。2013年では、日干しタクアン漬けでは脱水後、塩と同時にグルタミン酸ナトリウム (MSG) を添加し、塩蔵処理を行った。塩押しタクアン漬けでは、塩押し脱水と同時に MSG を添加し、塩蔵処理を行った。

## 2-2. タクアン漬けの成分解析と変動解析

各種条件下で試作したタクアン漬けの遊離アミノ酸、有機酸、遊離糖、遊離脂肪酸、水溶性ビタミンについて定量分析を行った。得られた定量データは、多変量解析ソフト Simca13.0.3 (Umetrics 社)を用いて、主成分分析(PCA)ならびに直交部分最小二乗(OPLS)回帰分析によるターゲット分析を行った。GAD 活性は、MSG を基質として GABA の生成量を測定し、乾燥重量当たりの酵素活性を求めた。GABA 富化タクアン漬けの色調について、肉眼観察ならびに分光測色計を用いて評価を行った。

## 2-3. SHR を用いたタクアン漬けの抗高血圧試験

ラットは 4 週齢の SHR を星野試験動物飼育所(株)より購入した。試料は 2013 年産の MSG 無添加区の 1 ヶ月間塩蔵した日干しタクアン漬けおよび塩押しタクアン漬けを用いた。飼料中の食塩濃度を 0.6%とし、タクアン漬け由来の GABA 濃度を基準として、低用量群 (0.2 mg/kg BW/日)、中用量群 (1.0 mg/kg BW/日)、高用量群 (5.0 mg/kg BW/日) になるように調製した。11 週齢より投与を開始し、飼料と飲水は自由摂取させた (5 匹/群)。陽性対照群(GABA 群)として GABA を溶かした水を与えた(1.0 mg/kg BW/日)。血圧測定は、非観血式自動血圧測定装置で行った。

## 3. 結果および考察

### 3-1. 脱水・塩蔵処理におけるタクアン漬成分の変動解析

2009 年産のダイコンより 6 種の条件下で試作したタクアン漬けの定量データを用いて、主成分分析を行った。スコアプロットにより 3 群に分類され、これに寄与する因子は脱水処理の違いによるものであった。ローディングプロットにより、分離に寄与する成分はグルコース、フルクトース、スクロース、グルタミン、リンゴ酸、プロリン、および GABA であった。グルコース、フルクトース、およびリンゴ酸は、脱水処理により減少し、プロリンおよびスクロースは日干し処理によってのみ増大した。機能性アミノ酸である GABA はいずれの脱水処理によっても増大した。OPLS 回帰分析より、塩蔵期間にともない、遊離脂肪酸量やピログルタミン酸は増大し、ナイアシンは糠塩蔵においてのみ増大することが明らかになった。

### 3-2. タクアン漬けの GABA 富化効果と GAD 活性および色調の変化

2013 年産の新鮮ダイコンの GABA 含量は、脱水処理により 18~32 倍に増大した。GAD 活性は新鮮ダイコンで最も高く、脱水処理により活性が低下していたため、GABA 増大は二次代謝に起因することが明らかになった。MSG 添加区の GABA 含量は 1~2 ヶ月間の塩蔵処理により無添加区に対して 1.2~3 倍になり、GABA を富化したタクアン漬けを試作することができた。内在 GAD 活性は既に消失していたが、上がり水の分析結果より、微生物の影響と推定される経時的な Glu の減少と GABA の増大が認められた。そのため、MSG 添加区では、上がり水からの GABA の移行が生じた結果であることが示唆された。MSG 添加したタクアン漬けの色調評価を行った結果、塩蔵 2 ヶ月でくすんだ灰色に変色し、4 ヶ月後には褐変化した。その要因として、MSG 添加がタクアン漬けの pH を中性化し、酸性状態にある無添加区と比べてアミノカルボニル反応が促進されたためと考え

られた。MSG の利用がかえってタクアン漬けの品質劣化を引き起こすことが明らかになり、日干や塩押しといった単純な脱水処理による伝統的な製法が望ましいことが示唆された。

### 3-3. SHR におけるタクアン漬けの抗高血圧効果

タクアン漬け投与による SHR の体重ならびに食餌摂取量に対する影響は見られなかった。高・中用量投与試験において、対照群が経時的に収縮期血圧が上昇したのに対し、日干および塩押しタクアン漬けの全ての投与群で有意な血圧上昇抑制効果がみられた。投与開始後 4~5 週間後には 20~25 mmHg の有意な低下が認められた。中・低用量投与試験では、日干タクアン漬けの低用量群の効果が消失したのに対し、塩押しタクアン漬けの低用量群では GABA 群ならびに中用量群と同程度の効果を有していた。生化学分析の結果、全てのタクアン漬け投与群において、血液尿素窒素/クレアチニン(BUN/Cre)比の低下やアンジオテンシン-I 変換酵素 (ACE) 活性の低下が見られたため、腎機能改善効果、血圧関連因子の制御機能を有することが明らかになった。さらに、GABA 群では ACE 活性に対する影響が認められなかったこと、そして塩押しタクアン漬けの抑制効果が低用量投与下でも高かったことから、血圧上昇抑制効果の発現には GABA 以外の他の因子も関与していることが示唆された。

## 4. 総括

本研究によって、日本の代表的な漬物であるタクアン漬けの *in vivo* における血圧上昇抑制作用について明らかにすることができた。同時に、タクアン漬け製造時の GABA の蓄積機能や未知の因子を生かすことで、現在広く普及している伝統的な製法においても、十分な効果が期待できることを明らかにした。

### 【論文審査の結果の要旨】

戦後 70 年が経ち、日本人の食生活は変化し、多くの伝統食品が衰退傾向にある。その一方で、日本のすぐれた食文化を守っていくことの重要性が認識され、ユネスコで「和食」が無形文化遺産に登録されたことも機に、和食の見直しが始まっている。海外でも和食ブームになっているが、和食の健康効果について科学的根拠に基づいて如何に発信できるかが重要であると思われる。

申請者の見出した主な新知見等は以下の通りである。

#### 1. 脱水・塩蔵処理におけるタクアン漬け成分の変動解析

タクアン漬けは年々生産量が減少しているものの、梅干しとともに日本を代表する漬物である。従来の漬物研究は、消費者の減塩嗜好にともなう低塩化により、保存性が低下したため、調味研究衛生学的研究が中心に行われてきた。以前より、タクアン漬けの個別あるいは化合物群毎の成分についての定量分析は行われてきているが、複数の化合物群を組み合わせた網羅的な解析までは到っていない。本研究では、代謝物総体(メタボローム)に基づく解析手法により、各種塩蔵ダイコンのターゲット分析を行い、漬物加工方法の違いがダイコンの二次代謝、そして食品機能に関わ

る成分にどのような影響を与えるかを解析した。

- ① 2009 年産のダイコンより試作したタクアン漬けの amino 酸, 有機酸, 糖, 脂肪酸, 水溶性ビタミンの 42 成分について PCA 解析を行った。スコアプロットにより 3 群に分類され, これに寄与する因子は脱水処理の違いによるものであることを明らかにした。
- ② 分離に寄与する成分はグルコース, フルクトース, スクロース, グルタミン, リンゴ酸, プロリン, および GABA であることを明らかにした。
- ③ グルコース, フルクトース, およびリンゴ酸は, 脱水処理により減少することを見出した。
- ④ プロリンおよびスクロースは日干し脱水処理によってのみ増大することを見出した。
- ⑤ 機能性 amino 酸である GABA はいずれの脱水処理によっても増大することを見出した。
- ⑥ スクロース, グルタミン, アスコルビン酸, トリプトファンは塩蔵期間の延長にともない減少し, 遊離脂肪酸およびピログルタミン酸は, 塩蔵時間にともない増大することを見出した。
- ⑦ ナイアシンは糠塩蔵においてのみ塩蔵時間に伴い増加することを見出した。

野菜を漬けるという工程により, 上がり水中への成分漏出が起きると考えられていたため, これまで漬物は食物繊維しか残らないスポンジ漬物と揶揄されていた。しかし, これらの網羅的な成分解析により, 漬物加工処理中の二次代謝物の動態を明らかにした。同時に, 二次代謝物の一つとして見出された機能性 amino 酸の一つである GABA はいずれの脱水処理においても増大させることを明らかにした。

## 2. タクアン漬けの GABA 富化効果と GAD 活性および色の変化

GABA は植物にとって物理化学的なストレスに対する応答物質であり, 抗高血圧効果を始めとする多様な生理機能を有している。経口摂取による GABA の抗高血圧効果は発現しやすいため, 食品機能研究において GABA 富化に関する研究が盛んに行われている。日干タクアン漬けにおいて GABA 増大することは既知の事実であるが, MSG を用いた脱水・長期塩蔵中の GABA ならびに GAD 活性の経時的な解析, そして色による品質評価を行った例はない。

このことから, 2013 年産のダイコンを用いて, 脱水塩蔵時に MSG 共存下ならびに非共存下における GABA 富化効果とその品質評価を行った。

- ① MSG を添加しないダイコンの GABA 増大は, 内因性の基質と酵素により蓄積するものであることを明らかにした。
- ② MSG を添加した場合は, 内因性の GABA 増大が起きた後, 上がり水で微生物により変換された GABA が濃度勾配にしたがいダイコン内に移行してきたものであることを明らかにした。
- ③ 各条件で試作されたタクアン漬けについて, 色の変化を測定したところ, MSG 添加したタクアン漬けは塩蔵時間にともない, 彩度の低下と褐変化が認められ, 品質劣化を引き起こすことを明らかにした。

これらのことから, タクアン漬けにおいても, 他の食品と同様に, MSG の添加により GABA を富化させることができるが, MSG 添加と GABA 変換にともなう pH の変動により, かえって品質を劣化させてしまうことを明らかにした。これらの成果から, タクアン漬けにおいては, GABA 蓄積効果と製品

寿命の延長効果を備えている広く普及している伝統的な製法が望ましいことを明らかにした。

### 3. SHR におけるタクアン漬けの抗高血圧効果

漬物は、食塩により血圧を上げるとされているため、その抗高血圧効果に対する知見は少ない。これまで得てきた知見から、伝統的な製法にしたがってつくられたタクアン漬けの機能性として、GABA 摂取による抗高血圧効果が期待される。そこで、本態性高血圧発症ラットである SHR を用いた動物実験により、タクアン漬けの抗高血圧効果を検討した。

- ① 日干タクアン漬けならびに塩押しタクアン漬けの抗高血圧効果を見出し、収縮期血圧が約 200 mmHg まで上昇したところで、上昇抑制作用が発現することを見出した。
- ② 日干タクアン漬けでは、用量依存的な抑制効果が認められ、低用量投与群において、その効果は消失することを明らかにした。
- ③ 塩押しタクアン漬けでは高用量群と中用量群の間に用量依存的な抑制効果が見出された。しかし、低用量投与群の効果は、日干タクアン漬けの結果とは異なり、中用量群と同等であった。この結果から、抗高血圧効果発現に対する塩押しタクアン漬けの優位性を明らかにした。
- ④ 血液分析により BUN/Cre 比ならびに ACE 活性の低下傾向を示すことを明らかにした。

GABA の効果は末梢交感神経抑制によるものであり、ACE 活性に対する阻害効果は極めて弱くことが知られている。また、低用量投与下における塩押しタクアン漬けの効果は、GABA のみでは説明できないものであり、そのため、塩押しタクアン漬けの抗高血圧効果の発現には他の因子も関与する可能性を見出した。

本研究により、伝統的な製法により GABA 蓄積させたタクアン漬けは抗高血圧効果を有することを明らかにした。同時に、塩押しタクアン漬けの結果から、未知の血圧上昇抑制因子が複合的に作用し、さらなる低用量投与下における抑制効果が期待できる知見を得た。申請者が得てきた研究成果は、和食の中で香の物として提供されている漬物が、通常量の摂取によって抗高血圧効果を発揮できる可能性を秘めていることを示しており、漬物に関する基盤的な研究を大きく発展させるものである。

論文審査を行った主査 1 名と副査 2 名による最終試験は 2015 年 8 月 4 日 10 時より 90 分間行われた。申請者は約 50 枚のスライドを用いて博士論文の内容を説明した。岡村教授より「タクアン漬け摂取による血圧上昇抑制効果の因子」について質問があった。また、小澤教授より「論文構成から見て、『GABA 富化技術』を論文タイトルに入れないう検討すべきである」という指摘があり、論文タイトルを変更した。本論文の主たる一部は学会誌『日本食品科学工学会誌』第 62 巻 10 号に掲載承認を得ている。

以上により、論文審査および最終審査の結果に基づき、審査委員会において慎重に審議した結果、本論文が博士(食品栄養学)の学位に十分値するものであると判断した。