

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05447

研究課題名（和文）高GABA含有量機能性白米の製造法および好適水稻品種の開発

研究課題名（英文）Production method of high GABA polished rice and selection of suitable rice varieties for it.

研究代表者

堀端 章（HORIBATA, AKIRA）

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：70258060

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：玄米に含まれる、-アミノ酪酸（GABA）は、発芽の過程で顕著に増加することが知られている。発芽玄米から調製した白米は高濃度のGABAを含み、良食味と高い機能性を期待できる。水浸処理中のGABAの動態に関する調査を行った結果、発芽の過程で新生されたGABAは効果的に白米層に移行することが示されたが、その移行の効率には品種間差が認められた。そこでさらに、72系統の突然変異系統を供試して、GABAの新生量および胚乳移行率に関する遺伝的変異を探索したところ、いずれに形質においても複数の突然変異が確認され、それぞれが多数の遺伝子によって支配されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GABAはストレス緩和や血糖値上昇抑制など、現代人の抱えるさまざまな健康上の問題を緩和する一方で、過剰摂取による問題が報告されていない機能性成分である。このGABAの一日に必要なとされる標準摂取量を通常の白米から摂取することができれば、QOLの向上に資すると考えられる。本研究は、この水準のGABA含有量を白米にもたせることを目的として関与する遺伝子の探索に取り組んだものである。遺伝子の特定にまでは至らなかったが、多数の遺伝子が関与しており、高GABA白米の生産に向けた品種改良が可能であることを示した点で、学術的意義および社会的意義を持つと考えている。

研究成果の概要（英文）：-aminobutyric acid, GABA, which is naturally present in brown rice, significantly increases during the germination process. White rice prepared from germinated brown rice contains a high concentration of GABA, offering both good taste and enhanced functionality. Research on the dynamics of GABA during water immersion revealed that newly synthesized GABA effectively migrates to the white rice layer during water immersion. However, the efficiency of this migration varies among rice varieties. When we tested 72 mutant strains, exploring genetic variations related to the de novo synthesis of GABA and the rate of migration from the embryo to the endosperm, we observed multiple mutations across these traits. Each of these traits appears to be governed by numerous genes.

研究分野：植物育種学

キーワード： -アミノ酪酸 GABA富化処理 白米 突然変異 胚乳移行率

1. 研究開始当初の背景

GABA の生理的作用、特に血圧降下作用 (①、②) は広く認知されており、特定保健用食品にも認定されている。さらに近年では、GABA の経口摂取がヒトのストレス軽減 (③) や睡眠の質の改善 (④) に資するとの報告もみられる。GABA の生理的作用については現在も研究が進められているところである。

玄米も GABA を豊富に含む食品であるが、さらに、玄米の水浸処理によって得られる「発芽玄米」の GABA 含有量は、水浸処理を行わない玄米の数倍となることが広く認知されている (⑤)。しかし、玄米の食味は白米に顕著に劣り、玄米食は一部の理解あるひとにしか広がっていない。そこで、玄米浸水処理によって GABA 新生を誘導するとともに、玄米が吸水することで水溶性アミノ酸である GABA を白米中に移行させ、得られた発芽玄米を乾燥させてから搗精を行うことによって、良食味の高 GABA 含有量白米を得ることを考えた。

2017 年から 2019 年にかけて、一般社団法人機能性健康米協会の助成を受けて実施した小規模の予備試験の結果、一般的な飯米用イネ品種 (19 品種) では、玄米中の GABA 含有量には顕著な遺伝的差異が認められたが、白米の GABA 含有量に有意な差が見られないことが示された。一方、発芽玄米および発芽玄米を搗精して得られた発芽玄米由来白米においては、水浸処理中に GABA が新たに合成され (GABA 新生) て増加し、胚乳部へと移行することが明らかになった。ここで観察された GABA 新生能と水浸処理前の玄米中の GABA 含有量との間に相関はなかった。胚芽が形成される過程における GABA の蓄積と、水浸処理によって新たに合成される GABA の量に関連が見られないことから、これらは互いに異なる遺伝的制御系に依拠すると考えられた。さらに、一部のサンプルについて、外層から順次研削して層別に GABA 含有量を測定したところ、GABA は胚乳の外層 (糊粉層) まで浸透しているものの、その内側には到達していなかった。胚芽で新生された GABA の 40% から 80% が胚乳部に移行したが、移行率にも品種間差が認められた。

2. 研究の目的

上述の背景のもとで明らかになったのは、「玄米における GABA 新生能に遺伝的差異があるのであれば、それに基づく高 GABA 水稻新品種の開発が可能であること」と、「GABA の白米移行に遺伝的差異があるのであれば、高 GABA 含有量白米を得るためには GABA 新生能だけでなく GABA の白米移行率に関しても並行して選抜を行う必要があること」である。このため本研究では、1. 玄米水浸処理中の GABA 新生能に関する遺伝的変異の探索および関連遺伝子の単離と、2. 玄米水浸処理中における新生 GABA の動態の解明と遺伝的変異の探索を目的とした。

遺伝変異の探索には、申請者が育成してきたイネ内在性トランスポゾン (*mPing*) の挿入突然変異系統を用いた。放射線や化学的突然変異原による突然変異とは異なり、構造が既知のトランスポゾンの新規挿入によって生じた突然変異は、トランスポゾンの塩基配列情報を標識として容易に原因遺伝子の探索と単離を進めることができる。さらに、トランスポゾンの転移による自然突然変異は、「遺伝子組み換え技術」ではないため、見出された遺伝子は高機能性白米を得るための品種育成に直ちに用いることができる。

また、玄米水浸処理によって GABA が胚乳に移行することは既に明らかであるが、どの時期にどのように移行するのかを明らかにできれば、如何なる方法で搗精すれば、より高い機能性を有する白米を得ることができるのかを明らかにすることができる。これまでとは異なる新たな搗精技術の創出に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

上述の 2 つの目的を達成するため以下の実験を計画して並列的に進めた。

1. の目的のために、2021 年度には、保有している突然変異系統から来歴の異なる数十系統を選んで、玄米水浸処理中の GABA 新生能に関する突然変異系統を探索した。20 系統を供試して行った予備試験においても 1 系統の GABA 新生能の高い系統が得られたため、規模を大きくすることによってさらに高い系統が得られることが期待される。2 年度には、見出した突然変異系統を含む系統群において、GABA 新生能に関する遺伝的分離を観察し、この変異が遺伝する特性であることを明らかにする。3 年度には、上述のトランスポゾンタギング法を用いて、GABA 新生能に関連する突然変異遺伝子の単離・同定を行う。

2. の目的のために、初年度には、既存の品種を供試し、水浸処理の時間を変えて得られた玄米を外層から順に研削して、酵素法によって層別に GABA 含有量を調査する。想定される結果は、浸漬時間の延長とともに胚乳の内層まで次第に浸潤するのか、浸漬時間を延長しても胚乳の外層にとどまり続けるのかである。何れの結果が得られるのかによって、GABA は吸水にともな

って受動的に移動している、胚乳外層まで能動的に移動している、あるいは、胚乳外層と内層の間に GABA の通過を阻害する構造が存在する、などの可能性を考えることになる。2 年度には、水温を変える、あるいは、加圧水を用いることで、新生 GABA の動態に変化が見られるかを明らかにする。3 年度には、1. の実験において見出された突然変異体を供試して、突然変異が新生 GABA の動態にどのような変化をもたらすかを明らかにする。

これらの実験を通じて得られるものは、「GABA 新生能に関わる突然変異遺伝子」と「発芽玄米由来白米中の GABA 含有量を向上させる搗精技術」である。

なお、遺伝子を単離する過程で、候補遺伝子の塩基配列を決定するために、遺伝子組み換え技術を用いる可能性があるが、遺伝子組換え植物の育成は行わない。

4. 研究成果

2021 年度は、GABA の定量分析に関して、新規の方法の導入と評価、ならびに GABA の定量分析に用いる試料の作成を進めた。まず、GABA の定量分析法であるが、従来は複数酵素が混合された GABAse による GABA の分解と、分解時に生じる NADPH の呈色反応を利用して定量していた（酵素法）。この手法では夾雑物による測定値の誤差を補正するため、コントロール実験を必要とし、その上で実験から得られた測定値からコントロール実験で得られた測定値を減算して GABA を定量していたため、特に GABA の濃度が薄い場合にはしばしば負の値を取り得た。すなわち感度が低いことが問題となっていた。

そこで、Enzyme Sensor Co. Ltd. から発売された GABAse とは異なる酵素を利用した酵素法を用いた GABA 定量キットの適用を検討した。このキットの場合は、3 段階反応を用いているが、反応を開始させる前の前処理において、問題となる副反応を生じる夾雑物を分解する過程が加えられているため、精度に優れていた。また、コントロール実験を行って差分をとる必要もなく、1 サンプルあたりの分析時間も 30 分程度に抑えることが可能であった。これらのことから、本研究に用いるのに十分な精度と迅速性をもつことが保証されたため、今後の実験ではこの GABA 定量キットを用いることとした。

筆者の研究室は、水稻を中心とする植物育種学研究室であって、数千種類に及ぶ水稻遺伝資源を保有しているが、各の保有量は数百粒の種子である。本研究には少なくとも各品種・系統について、2 kg 程度の品質のより玄米が必要になるため、上述の実験に並行して、本研究に供試する品種および突然変異系統を紀の川市内の実験圃場に栽植して、十分な量の玄米を収穫した。

2022 年度は、コシヒカリ系統の極良食味品種ミルキークイーンと、旭系統の良食味品種日本晴とを供試して、水蒸気による加湿処理の時間と GABA 新生量ならびに白米層への GABA の移行率に関して詳細な調査を行った。水蒸気による加湿処理の時間については 5 時間、10 時間および 20 時間とし、小型精米器を用いて外層から順に検索しながら、GABA が玄米中のどの層まで移行しているかを調査した。用いた 2 品種のうち、ミルキークイーンは、低アミロース品種であって胚乳中の細胞間にわずかな間隙があるのを特徴としているため、GABA の白米への浸透速度が速いことを期待して供試した。

実験の結果、品種（遺伝子型、G）、層別（L）および水蒸気による加湿処理の時間（T）が GABA 含有量に及ぼす作用について、3 種の主効果および 2 種の交互作用が高度に有意であった（表 1）。主効果に見られる差異は当然のこととして、交互作用 G×L が有意になったことに着目した。このことは、品種（遺伝子型）によって、GABA がどの層まで浸透するかが決まることを示している。また、交互作用 L×T も高度に有意であった。このことは水蒸気による加湿処理の時間が異なると、GABA の存在する層が異なることを示している。すなわち、高 GABA 含有白米の製造に適した処理時間があることを示唆している。

表 1 品種、層および催芽処理時間における GABA 含量に関する分散分析

変動因	自由度	平方和	分散	F 値	P 値
主効果					
遺伝子型 (G)	1	6337.5	6337.5	206.46	1.06×10 ⁻²¹
層 (L)	3	28666.9	9555.6	311.30	4.20×10 ⁻³⁸
処理時間 (T)	3	3629.0	1209.7	39.41	1.51×10 ⁻¹⁴
交互作用					
G×L	3	2778.6	926.2	30.17	2.81×10 ⁻¹²
G×T	3	351.5	117.2	3.82	1.40×10 ⁻²
L×T	9	18728.1	2080.9	67.79	2.73×10 ⁻²⁹
G×L×T	9	1947.2	216.4	7.05	5.25×10 ⁻⁷
誤差	64	1964.6	30.7		
全体	95	64403.4			

両品種ともに、5時間までは GABA 総量が顕著に増加した後、加湿処理時間の延長にともなって漸増した。一般的に市販されている発芽玄米では、24時間以上の水漬処理が行われるので、処理期間が長くなるほど GABA 総量が増える傾向は理解できる。しかしながら、催芽してから白米を得ようとする、長期間の水漬処理は玄米を軟化させ搗精を困難にする。本実験においても加湿処理時間の延長にともなう玄米の軟化は観察された。一方、白米層への GABA の移行率は、5時間の処理まで急増した後、20時間まで漸増した。これらの結果から、高 GABA 含有白米の製造には、5時間から10時間程度の催芽処理が適切であると考えられた。一方、品種間の比較においては、当初の想定通り、ミルキークイーンの方が日本晴よりも白米層への GABA の移行が早く進むことが示された。GABA の白米への移行に関しては、胚乳の構造が関与することが示唆された。

2023年度は、植物育種学研究室が保有している12系統群、73系統の突然変異系統を供試して、玄米、白米、5時間の水蒸気による加湿処理（以降、GABA 富化処理）後玄米および GABA 富化処理玄米由来白米について GABA 含有量を計測し、GABA 新生量または GABA の胚乳への移行について突然変異系統間差を調査した。これらの突然変異系統にはトランスポゾン *mPing* の転移によって誘発された種々の突然変異が保有されているが、各々の突然変異遺伝子については未同定のコレクション (*mPing* タグライン) である。

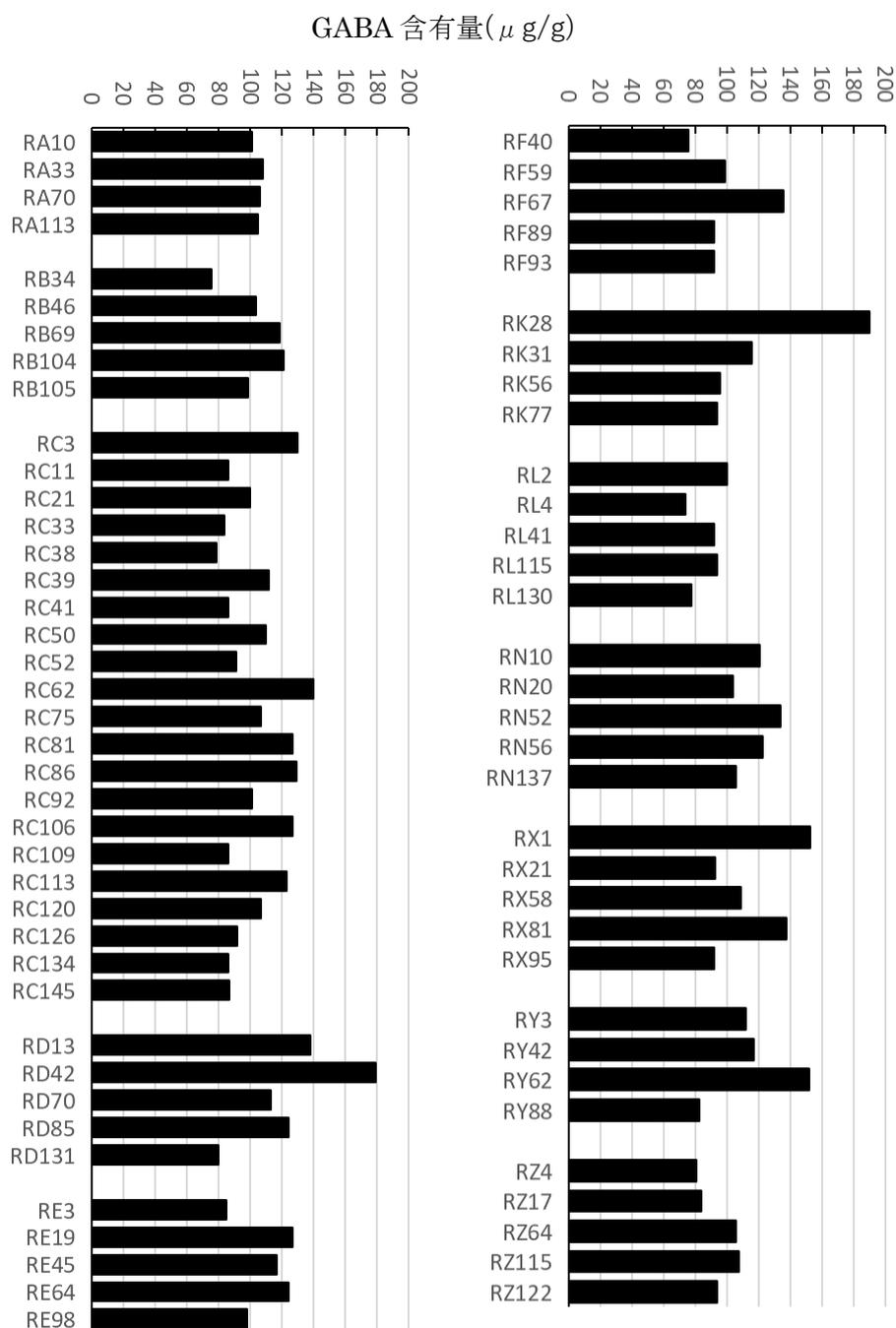


図1 *mPing* タグラインにおける GABA 新生に関する系統変異

GABA 新生量に関しては、供試した 12 系統群中 5 系統群 (RC 系統群、RD 系統群、RK 系統群、RX 系統群および RY 系統群) において顕著な GABA 新生量を増加させる突然変異遺伝子の誘発が示唆された (図 1)。また、RB 系統群、RE 系統群および RF 系統群においても系統群内の系統間に 40 μ g/g 以上の変異が観察された (図 1)。供試した 12 系統群中、8 系統群において GABA 新生に関する突然変異の誘発が認められたことは、GABA 新生に関与する遺伝子の種類が多く、かつ、各々の作用力が大きいことを示唆している。また、RC 系統群では、予備的試験で GABA 新生能に関与する突然変異の誘発が示唆されていたため、本研究では 21 系統を供試して GABA 新生能に関する後代検定と遺伝解析を試みた。その結果、RC 系統群には GABA 新生に関与する少なくとも 2 種類の遺伝子が分離していることが示唆された。

一方、GABA の胚乳への移行率についても突然変異系統間で異なり、RC 系統群、RD 系統群、RN 系統群および RY 系統群においては、系統群内の系統間において 20%以上の胚乳への移行率に関する差が認められた。RC 系統群については、GABA 新生能と同様に GABA の胚乳への移行率についても遺伝解析を試みたが、不明瞭であった。少なくとも 2 種類、おそらくは 3 種類の遺伝子が関与している可能性がある。

以上のように、突然変異系統を用いた調査では極めて高頻度に GABA の新生または胚乳への移行率に関する変異が観察された。一般的な突然変異の生起頻度を考慮すれば、この結果は、GABA の新生または胚乳への移行率に関与する遺伝子が多数存在することを示している。

本研究において、GABA 新生能に関する遺伝的変異を認めたが、その単離同定にまでは至らなかった。一方、玄米水浸処理中における新生 GABA の動態の面では、5 時間から 10 時間かけて白米層に移行することが示された。GABA の胚乳への移行率に関する遺伝的変異の存在も示唆されたが、その単離同定にまでは至らなかった。おそらくは複数の遺伝子が関与しているため単離同定は容易ではないことが想定される。一方、水稻育種上の観点からは、これらの形質に関して選抜に耐え得る顕著な変異が存在することから、この知見に基づいて高 GABA 白米の生産に適した品種の開発は可能であろうと考えられた。

<引用文献>

- ① 梶本修身、平田洋、中川聡史、梶本佳孝、早川和仁、木村雅行、GABA 含有はっ酵乳製品の正常高値血圧者に対する降圧効果、日本食品科学工学会誌、51 巻 2 号、2004、79-86
- ② 佐々木泰弘、河野元信、ギャバ(GABA)の効能と有効摂取量に関する文献的考察、美味技術研究会誌 15 巻、2010、32-37
- ③ 吉田慎一、原本正文、福田朋彦、水野英則、田中藍子、西村三恵、西平順、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、63 巻 2 号、2015、95-103
- ④ 菅美奈子、GABA の抗ストレス作用による睡眠改善効果、食品工業、56 巻 20 号、2013、61-68
- ⑤ 呂慶云、後藤清和、西津貴久、玄米の GABA 富化条件と品質について、農業機械学会誌、72 巻 3 号、2010、291-296

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 堀端 章、加藤 恒雄	4. 巻 67
2. 論文標題 玄米の催芽処理にともなう -アミノ酪酸(GABA)増加の品種・系統間差異およびGABA富化白米への適用性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 作物研究	6. 最初と最後の頁 57～63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18964/jcr.67.0_57	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀端章、加藤恒雄
2. 発表標題 胚芽処理にともなう玄米および白米のGABA増加に関する遺伝的差異の探索
3. 学会等名 近畿作物・育種研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------