

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：33101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560043

研究課題名(和文)赤タマネギ添加による種子の発芽促進機構の解明

研究課題名(英文) Investigation on the mechanism of acceleration of germination by red onion

研究代表者

大坪 研一 (Ken'ichi, Ohtsubo)

新潟薬科大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：80353960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：赤玉葱添加による発芽促進機構の解明について植物ホルモンの関与と細胞壁分解酵素の活性化を見出し、プロテオーム解析による機能解明を行い、代謝回転の促進と情報伝達、インドール酢酸の関与を明らかにし、赤玉葱添加発芽種子の機能性について、GABAの増加による高血圧抑制機能と、ポリフェノールの増加による抗酸化性の増加とを見出し、赤玉葱添加発芽玄米が、機能性食品として有望であることを示した。各種玄米の発芽を行い、ORAC値、RS含量等を測定し、赤玉葱発芽玄米が有意に低い難消化性を示した。また、高いα-セクレターゼ阻害活性を示すことから、赤玉葱発芽玄米が、糖尿病及び認知症の両方の予防に有効であることを示した。

研究成果の概要(英文)：On the mechanism of germination acceleration by red onion, we found that plant hormone and cell-wall decomposing enzymes are closely related in it. Furthermore, we clarified that promotion of metabolism, signal transduction, and IAA cause the acceleration of germination by proteome analysis. Pre-germinated brown rice with red onion showed inhibition of hypertension by the increase of GABA, and increase of polyphenol led to the strong anti-oxidation function. Thus, pre-germinated brown rice is promising as a bio-functional food. We measured ORAC and resistant starch of the germinated brown rice with red onion, which showed high resistance to digestion. As it shows inhibitory activity against beta-secretase, it is promising to prevent consumers from diabetes and dementia.

研究分野：食品科学

キーワード：米 デンプン 発芽 糖尿病 認知症 赤タマネギ

### 1. 研究開始当初の背景

発芽玄米は、玄米の栄養性と精米の良食味性を兼備する食品であり、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)、 $\gamma$ -オリザノール、食物繊維、フェルラ酸、イノシトール等の機能性成分が含まれており、高血圧の予防、便秘の改善、脂肪肝の予防、精神の安定等の機能が報告されている。しかし、発芽玄米製造時には玄米を 30 ~ 40 度の温水に 10 時間 ~ 48 時間浸漬するため、微生物汚染と異臭発生が問題となっている。筆者らは、玄米の発芽時に赤タマネギを添加することで、発芽を促進しながら、微生物増殖と異臭発生を抑制でき、しかも赤タマネギに含まれる機能性成分であるケルセチンなどが発芽玄米中に移行することを発見し、特許を出願した。赤タマネギはケルセチンなどの機能性成分を多く含んでおり、ケルセチンには糖尿病症状の軽減、脂肪やコレステロールを多く含む食事で誘導される内臓脂肪の蓄積や血中脂質濃度の上昇が抑制されることが報告されている<sup>1)</sup>。

### 2. 研究の目的

発芽玄米は、玄米の栄養機能性と精米の良食味性を兼備するが、発芽玄米製造時の微生物汚染と異臭発生が問題である。筆者らは、玄米の発芽時に赤タマネギを添加することで、発芽を促進しながら、微生物増殖を抑制できることを発見した。しかし、発芽促進と微生物増殖抑制の機構については、未解明であり、発芽促進効果については、ジベレリンの増加、糖およびアミラーゼによる代謝促進、セルラーゼ等による組織の軟化の可能性が、微生物増殖抑制については、含硫化合物による微生物の代謝阻害、ファイトアレキシンやファイトアンティシピンの生産の可能性が考えられる。本研究ではこれらの機構解明に取り組むとともに、赤タマネギ添加発芽玄米の特長と機能性を明示し、特性を活用した新用途を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料

コシヒカリ玄米 (H27 年新潟産)・コシヒカリ発芽玄米 (水発芽)・コシヒカリ赤玉葱発芽玄米、黒米 (おくのむらさき) 玄米 (H27 年山形産)・黒米発芽玄米 (水発芽)・黒米赤玉葱発芽玄米、恋あずさ玄米 (H27 年岐阜産)・恋あずさ発芽玄米・恋あずさ赤玉葱発芽玄米。発芽条件は既報<sup>2)</sup>に従って行った。即ち、水発芽 (pH5.8 の滅菌脱イオン水を用い、35 度で 16 時間振とう) 赤玉葱発芽 (pH5.8 の 2% の赤玉葱水溶液を用い、35 度で 16 時間振とう)。

#### (2) 発芽促進機構の解明

赤玉葱添加による発芽促進機構の解明についてはジベレリン阻害剤のウニコナゾール添加による発芽促進効果の増減を調べ、細胞壁分解酵素であるキシラナーゼ等の活性を測定し、赤タマネギ添加の有無による発芽種子のプロテオーム解析を行った。

#### (3) 米飯物性の測定

米飯の物性測定はテンシプレッサー (タケトモ電機、Myboysystem) を用いた。水分含量に応じて炊飯時の加水量を調節した。即ち、玄米 10g をアルミカップにとり、電気釜 (National、SR-SW182) の外釜に 500ml の水を加え、5 つのアルミカップをその中に並べ、25 分の蒸し調理、10 分間の蒸らし後、25 ~ 2 時間インキュベーターに保温し、炊飯米試料を調製し、米飯 10g について 2×3 バイト法により各物性値 (硬さ・こし・付着・粘り) を 3 反復測定した。

#### (4) D-グルコース (還元糖) の定量

凍結乾燥した炊飯米をコーヒーミルサーで粉碎し、炊飯米粉 100mg を 2ml のチューブに入れ、60% エタノールを 1.0ml 加え、ローテーターで 1 時間抽出した。その後、20 ~ 15000rpm、15 分遠心分離した上澄み液を試料抽出液として用いた。その後、Roche Diagnostics GmbH 社製の F-キットで D-グルコースの測定を行った。

#### (5) L-グルタミン酸量測定

前記 (4) と同じ試料抽出液を用い、Roche Diagnostics GmbH 社製の F-キット (L-グルタミン酸) で L-グルタミン酸含量を求めた。

#### (6) ポリフェノール含量

試料中のポリフェノール含量の測定は、辻らのフォーリン・チオカルト試薬による測定方法<sup>3)</sup>を改良した方法を用いた。

#### (7) レジスタントスターチ含量

レジスタント含量はメガザイム社製のキットを用い AOAC の方法に従って測定した。

#### (8) ORAC 値

H-ORAC の測定は Prior et al<sup>4)</sup> および伊藤ら<sup>5)</sup> の方法に従い、L-ORAC の測定は、渡邊ら<sup>6)</sup> の方法に従って測定した。ORAC 測定用の抽出液は Prior の方法に一部変更を加えて調製した。粉末試料 100mg からヘキサン 10mL × 2 回で抽出し、上清を採取した。混合したヘキサン抽出液からヘキサンを除去 (70 度、10 分間) し、アセトン 250  $\mu$ L に再溶解し、さらに 7% RMCD 溶液 (RMCD; 0.7 g のメチル- $\beta$ -サイクロデキストリン (Sigma Chemical Co.) を 10 mL の 50% アセトンで溶解) 750  $\mu$ L で溶解し L-ORAC 測定試料とした。一方残渣はヘキサンを蒸発させた後、アセトン / 水 / 酢酸 (70 : 29.5 : 0.5, V/V/V ; AWA 溶液) 10mL を加え、超音波処理 (37 度、15 分間) を行った後、室温で 15 分間放置し、遠心後 AWA 溶液で 25mL に定量し H-ORAC 測定試料とした。トロロックスの検量線は、50、25、12.5、6.25  $\mu$ mol/L の濃度範囲で作成した。fluorometer 96-well plate (AS One Corporation) を使用し測定を行った。蛍光強度は、485 nm (励起) と 530 nm (放射) で測定し、fluorescent microplate reader (Grating Based Multimode Reader SH-9000: Corona Electric Co, Ltd.) を用い測定した。トロロックスの検量線溶液、ブランク (dilute buffer)、試料抽出液を各 (35  $\mu$ L)、fluorescein 溶液

(115  $\mu\text{L}$ , 110.7  $\text{nmol/L}$ ) と AAPH (2, 2'-azobis (2-amidino -propane) dihydrochloride) 溶液 (50  $\mu\text{L}$ , 31.7  $\text{mmol/L}$ : H-ORAC, 63.4  $\text{mmol/L}$ : L-ORAC) を加え、37、90 分間で測定を行った。

(9) アセチルコリンエステラーゼ阻害活性  
アセチルコリンエステラーゼ阻害活性の測定は Ellman et al.<sup>7)</sup>, Augustinsson et al.<sup>8)</sup>, Dawson et al.<sup>9)</sup> の方法に従い測定した。各試料の炊飯米の凍結乾燥粉 0.03 g を 0.3 ml の 80% エタノールに加え水中で 15 分間抽出した。遠心後、上清を蒸留水で 8 倍に希釈し、色素を除去するために フィルター (MILLEX-GN33 mm: Millipore Ireland Ltd.) を使用した。測定には 96-well microtiter plate (AS ONE Corporation) を使用した。50 mM リン酸バッファー (pH 8.0) (50  $\mu\text{L}$ )、0.226 U/ml (1.65  $\text{ng/mL}$ ) 酵素 (from the electric eel: Sigma-Aldrich Co. LLC) (25  $\mu\text{L}$ )、補酵素 (10 mM, 125  $\mu\text{L}$ : 39.6 mg の DTNB と 15 mg の重炭酸ナトリウムを 10 mL の 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) で溶解) と各試料からの抽出液 (25  $\mu\text{L}$ ) (ブランクは 10% エタノールを使用) を加え、37 で 5 分間インキュベートした後、25  $\mu\text{L}$  の 3 mM (0.99  $\text{mg/mL}$ ) 基質 (MATP+: Dojindo Laboratories Co., Ltd.) を加え、fluorescent microplate reader (Grating Based Multimode Reader SH-9000: Corona Electric Co, Ltd.) を用い 412 nm で測定した。酵素の濃度は 0.035 U/ $\mu\text{L}$  に設定して測定した。ポジティブコントロールとしてタクリンを使用した。IC50=0.0916  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (2.29  $\text{ng/well}$ )。

(10) -セクレターゼ阻害活性  
-セクレターゼ (BACE1) 阻害活性は、BACE1 activity detection kit (Fluorescent; Sigma-Aldrich Co. LLC.) を使用して測定した。各試料の炊飯米の凍結乾燥粉 0.1 g を 1.0 mL の 10mM 酢酸バッファー (pH 5.0; 0.1% Triton と 0.05% CHAPS 含有) に混合し、室温で 1 時間抽出した。遠心後、色素を除去するために フィルター (MILLEX-GN33 mm: Millipore Ireland Ltd.) を使用した。測定には 96-well plate (tissue culture plate: AS One Corporation) を使用した。フルオレセントバッファー (78  $\mu\text{L}$ )、各試料からの抽出液 (30  $\mu\text{L}$ ) (ブランクは 10mM 酢酸バッファーを使用) と 0.03 U/ $\mu\text{L}$  酵素 (10  $\mu\text{L}$ ) を加え、37 で 10 分間インキュベートし、50  $\mu\text{M}$  の基質 (20  $\mu\text{L}$ ) を加え、蓋をして 37 で 2 時間インキュベートした。320 nm (励起波長) と 405 nm (放射波長) の条件で fluorescent microplate reader (Grating Based Multimode Reader SH-9000: Corona Electric Co, Ltd.) を用いて測定した。酵素の濃度は 0.015 U/ $\mu\text{L}$  に設定し測定した。ポジティブコントロールとしてフィチン酸を使用した。

IC50=0.27  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (6.75  $\text{ng/well}$ )。

(11) GABA の測定

凍結乾燥発芽玄米粉の遊離アミノ酸は、スルホサリチル酸とクエン酸ナトリウム緩衝液で抽出した。試料 0.6g に 10% スルホサリチル酸 5mL を加え、室温で 20 分間抽出した。攪拌後、3N の NaOH で pH2.2 に調整後、クエン酸ナトリウム緩衝液で 10mL に定量した。遠心後、上清を 0.45 $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターに通した。アミノ酸分析は、全自動アミノ酸分析機 (Amino Tac JLC-500/v、日本電子株式会社 (JEOL) 製) を用いて分析した。

(12) 統計解析

各測定値は、統計解析ソフト (エクセル統計) を用いて、一元配置多重比較 Tukey 法により有意差検定を行った。各物性値と理化学測定値および官能検査値との相関をエクセル統計の相関行列・t 検定により求めた。

#### 4. 研究成果

(1) 発芽促進機構の解明

赤玉葱添加による発芽促進機構の解明については植物ホルモンの関与と細胞壁分解酵素の活性化を見出し、プロテオーム解析による機能解明については代謝回転の促進と情報伝達、インドール酢酸の関与を明らかにし、赤玉葱添加発芽種子の機能性については、GABA の増加による高血圧抑制機能とポリフェノールの増加による抗酸化性の増加とを見出し、赤玉葱添加発芽イネ種子が、機能性食品として有望であることを明らかにした。

(2) ORAC 値

コシヒカリの L, H-ORAC 値において、水発芽は玄米に比べ、ほぼ同じ値を示したが、赤玉葱発芽は、玄米に比べ、有意に高い値を示した。「おくのむらさき」の L, H-ORAC 値において水発芽は玄米の 70% 低い値を示し、赤玉葱発芽は玄米の 50% 低い値を示した。「恋あずさ」の L-ORAC 値において水発芽および赤玉葱発芽は玄米の 70% 低い値を示し、H-ORAC 値の水発芽は玄米の 30% 低い値を示し、赤玉葱発芽は玄米の 20% 低い値を示した。(表 1)

黒米である「おくのむらさき」の抗酸化性は水溶性のアントシアニン色素に由来するため、発芽により有意に減少したものと推定されたが、L, H-ORAC 値とも、赤玉葱発芽は水発芽の約 1.5 倍高い値を示した。恋あずさの赤玉葱発芽においても、H-ORAC 値は、水発芽の約 1.1 倍高い値を示した。

(3) レジスタントスターチ含量 (RS 含量)

コシヒカリおよび「おくのむらさき」における水発芽において、有意に玄米の約 20% 低い値を示したが、赤玉葱発芽においては有意に玄米の約 1.2 倍高い値を示した。「恋あずさ」の水発芽においては玄米の約 10% 低い値を示したが、赤玉葱発芽においては玄米の約 10% 高い値を示した。(表 1)

一般に、発芽における酵素の活性化によってデンプンが分解され、RS 含量は減少すると推定されるが、赤玉葱発芽では、水発芽に比べ、物性値における「硬さ」が強くなるため RS 含量が高くなるものと推定された。著者ら

は既報<sup>10)</sup>において、デンプンの組成のうち、アミロペクチンの短鎖の割合が少なく、長鎖の割合が多いAE変異米は物性が非常に硬く、RS含量が高いことを報告した。

(4) L-グルタミン酸含量

コシヒカリおよび「恋あずさ」の水発芽では、有意に玄米の約1.6~2.5倍高い値を示し、さらに赤玉葱発芽において有意に水発芽の約1.3~1.6倍高い値を示した。「おくのむらさき」における水発芽において、玄米の約40%低い値を示し、赤玉葱発芽においては玄米の約30%低い値を示した。(表1)GABAは、グルタミン酸からグルタミン酸デカルボキシラーゼの作用を受けて生成される<sup>11)</sup>。

(5) ポリフェノール含量

コシヒカリおよび「恋あずさ」の水発芽において、玄米に比べわずかに高い値を示し、さらに赤玉葱発芽において有意に水発芽の約1.3~1.6倍高い値を示した。「おくのむらさき」における水発芽において、玄米の約40%低い値を示し、赤玉葱発芽においては玄米の約30%低い値を示した。「おくのむらさき」は水溶性のアントシアニン色素を有するため、発芽により有意に減少したものと推定されたが、赤玉葱発芽は水発芽の1.1倍高い値を示した。これは赤玉葱に含有するケルセチンによるものと推定された(表1)。黒米の色素については、シアニジン-3-グルコシドやペオニジン-3-グルコシドなどのアントシアニンが報告されている<sup>12, 13)</sup>。

(6) GABA 含量

コシヒカリおよび「恋あずさ」の水発芽において、有意に玄米の約1.3~1.4倍高い値を示し、さらに、赤玉葱発芽において、有意に玄米の約1.7倍高い値を示した。「おくのむらさき」における水発芽および赤玉葱発芽において、玄米の約50%低い値を示した。この結果はGABAがグルタミン酸からグルタミン酸デカルボキシラーゼの作用を受けて生成されるため、「おくのむらさき」の水発芽および赤玉葱発芽は玄米に比べグルタミン酸含量が有意に減少したためと推定された。またGABAの蓄積量は品種により異なり、巨大胚芽米の「恋あずさ」の水発芽は、コシヒカリの1.4倍、「おくのむらさき」の4.3倍高い値を示し、「恋あずさ」の赤玉葱発芽はコシヒカリの1.5倍、「おくのむらさき」の5.0倍高い値を示した(表1)。

(7) グルコース含量

コシヒカリの水・赤玉葱発芽のグルコース含量値は玄米の60%~70%低い値を示した。「おくのむらさき」の玄米、水、赤玉葱発芽のグルコース含量は、ほぼ同じ値を示した。「恋あずさ」の水、赤玉葱発芽のグルコース含量値は、玄米の1.1倍、高い値を示した(表1)。グルコース含量は、5%の危険率で米飯物性の「硬さ」と「噛みごたえ」に正の相関を示した。

(8) アセチルコリンエステラーゼ阻害活性  
アセチルコリンエステラーゼは、脳神経系

でのニューロンのシナプス(結合部位)末端の神経伝達物質であるアセチルコリンを分解し、その神経伝達を持続させない重要な機能を有する重要な酵素である。アセチルコリンが減少して、十分な神経活動が損なわれた病がアルツハイマー型認知症である。Vladimirら<sup>14)</sup>は、紫蘇科の植物からアセチルコリンエステラーゼ阻害活性を発見した。本研究においては、コシヒカリの水発芽のみ阻害活(0.017ng-TCEq./μL)を示した。(表1)

(9) -セクレターゼ阻害活性

アルツハイマー型認知症の主な原因は、脳内でのアミロイドβペプチド(Aβ)の過剰産生と蓄積であると考えられている。Aβは、Aβ前駆体タンパク質(APP)からアスパラギン酸プロテアーゼであるβ-セクレターゼ1(BACE1)及びβ-セクレターゼにより順次切り出される。従って、これらのセクレターゼ活性の抑制が、アルツハイマー型認知症の予防の有力な手段となる<sup>15)</sup>。

コシヒカリの赤玉葱発芽において、有意に玄米の約2.7倍高い値を示したが、水発芽による阻害活性は示されなかった。「おくのむらさき」における水発芽および赤玉葱発芽は、玄米の約2.0~3.5倍高い値を示し、赤玉葱発芽は水発芽の約1.7倍高い値を示した。「恋あずさ」の水発芽は玄米の約1.1倍高い値を示し、赤玉葱発芽は玄米とほぼ同じ値を示した。本研究においては、コシヒカリの玄米(0.004μg-PAeq./μL)、コシヒカリの赤玉葱発芽玄米(0.011μg-PAeq./μL)、「おくのむらさき」の玄米(0.008μg-PAeq./μL)、「おくのむらさき」の水発芽玄米(2.042μg-PAeq./μL)、「おくのむらさき」の赤玉葱発芽玄米(3.525μg-PAeq./μL)、「恋あずさ」の玄米(2.042μg-PAeq./μL)、「恋あずさ」の水発芽玄米(2.220μg-PAeq./μL)、「恋あずさ」の赤玉葱発芽玄米(2.077μg-PAeq./μL)等が阻害活性を示した(表1)。

Table 1. Antioxidative activity, component analysis and inhibition of enzyme reaction of brown rice and germinated brown rice

品種	L-Asp		L-Glu		GABA		Total polyphenols		GABA		AChE		BACE1	
	μg/g	mg/g	μg/g	mg/g	μg/g	mg/g	μg/g	mg/g	μg/g	mg/g	ng-TCEq./μL	ng-TCEq./μL	μg-PAeq./μL	μg-PAeq./μL
玄米	4.4	0.12	41.6	0.17	0.00	0.7	0.00	14.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
水発芽	4.8	0.11	42.0	0.18	0.00	7.8	0.00	18.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
赤玉葱発芽	6.0	0.11	47.1	0.18	0.00	12.4	0.07	18.6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
恋あずさ	1.8	0.01	18.0	0.00	0.00	0.0	0.00	1.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
恋あずさ水	2.0	0.01	18.0	0.00	0.00	0.0	0.00	1.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
恋あずさ赤	2.8	0.01	18.0	0.04	1.1	0.00	10.8	0.00	1.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
おくのむら	1.4	0.02	18.7	0.23	0.00	0.0	0.00	1.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
おくのむら水	1.8	0.01	18.8	0.00	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
おくのむら赤	1.1	0.01	17.1	0.18	0.00	0.0	0.00	1.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

\*) Significant difference (p < 0.05) between brown rice and germinated brown rice.  
 \*\*) Significant difference (p < 0.05) between brown rice and brown rice with onion.  
 \*\*\*) Significant difference (p < 0.05) between brown rice and brown rice with water.  
 \*\*\*\*) Significant difference (p < 0.05) between brown rice and brown rice with water and brown rice with onion.  
 \*) Significant difference (p < 0.05) between brown rice and brown rice with water.  
 \*\*) Significant difference (p < 0.05) between brown rice and brown rice with onion.  
 \*\*\*) Significant difference (p < 0.05) between brown rice and brown rice with water and brown rice with onion.

(10) 米飯物性の測定

米飯物性の「硬さ」において、コシヒカリおよび「恋あずさ」の水、赤玉葱発芽は、有意に玄米の約50%~60%低い値を示した。同様に「おくのむらさき」の水、赤玉葱発芽は、有意に玄米の約14%~20%低い値を示した。米飯物性の「噛みごたえ」において、コシヒカリおよび「恋あずさ」の水、赤玉葱発芽は、有意に玄米の約60%~76%低い値を示した。同様に「おくのむらさき」の水

発芽は、玄米の約 9%低い値を示したが、赤玉葱発芽は有意に玄米の 1.1 倍高い値を示した。米飯物性の「附着」において、コシヒカリおよび「恋あずさ」の水、赤玉葱発芽は、有意に玄米の約 1.1~1.2 倍高い値を示した。一方「おくのむらさき」の水、赤玉葱発芽は、有意に玄米の約 64%~73%低い値を示した。米飯物性の「粘り」において、コシヒカリおよび「恋あずさ」の水、赤玉葱発芽は、玄米の約 1.1~1.4 倍高かった。「おくのむらさき」の水、赤玉葱発芽は、玄米の約 63%~74%の低い値を示した(表 2)。

Table 2. The physical properties of the cooked rice grains of brown rice and pre-germinated brown rice.

	Hardness	SD	Toughness	SD	Adhesion	SD	Stickiness	SD
Brown rice of Koshihikari	9.3	a 2.2	22.7	a 1.8	45.9	a 2.0	30.6	a 4.2
Germinated brown rice of Koshihikari under soaking in deionized water	4.8	b 2.0	16.0	b 1.5	30.0	b 1.0	32.0	a 3.8
Germinated brown rice of Koshihikari under soaking in 2% red onion solution	6.9	b 0.0	17.2	b 1.1	36.6	c 6.2	43.8	b 4.0
Brown rice of Okunomusubi	17.3	a 1.2	24.2	a 1.6	40.7	a 17.1	29.7	a 9.9
Germinated brown rice of Okunomusubi under soaking in deionized water	13.8	b 1.0	22.0	a 0.8	26.0	b 8.8	15.0	b 3.8
Germinated brown rice of Okunomusubi under soaking in 2% red onion solution	14.8	b 1.8	27.1	b 0.2	29.6	c 8.9	17.1	b 4.1
Brown rice of Foliassai	10.3	a 1.4	26.0	a 1.2	54.0	a 8.5	30.5	a 3.1
Germinated brown rice of Foliassai under soaking in deionized water	6.0	b 0.5	16.0	b 0.8	36.0	a 8.8	32.0	a 2.6
Germinated brown rice of Foliassai under soaking in 2% red onion solution	6.8	b 0.1	16.1	b 0.7	36.4	b 1.8	42.4	b 1.0

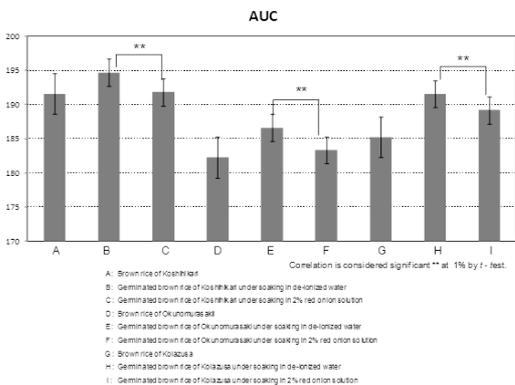
Means with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

### (11) 血糖値 (AUC) の推定

既報<sup>16)</sup>で報告した 120 分後の AUC (血糖曲線下面積: area under curve) の推定式に従い 3 品種の玄米、水発芽玄米、赤玉葱発芽玄米の AUC の値を算定した(図 1)。

Estimation formula: blood glucose level (AUC) = - 7.647 × resistant starch - 0.980 × hardness + 38.285 × glucose content + 198.757.

図 1D の「おくのむらさき」の玄米が最も低い値を示し、B のコシヒカリの水発芽が最も高い値を示した。3 品種とも玄米が最も低い値を示したが、120 分後の AUC (血糖曲線下面積: area under curve) の推定式に従い、3 品種の玄米、水発芽玄米、赤玉葱発芽玄米の AUC の値を算定した結果、3 品種とも水発芽に比べ赤玉葱発芽が 1%の危険率で有意に低い値を示した。



$$\text{Blood glucose level (AUC)} = -7.647 \times \text{Resistant starch content} - 0.980 \times \text{hardness} + 38.285 \times \text{Glucose content} + 198.757$$

Fig 1. The validation test for application of the formula for estimating the AUC of blood glucose level for 120 min postprandial

### (12) 各試料の米飯物性値と機能性成分との相関

米飯物性の「硬さ」とポリフェノール ( $r = 0.78; p < 0.05$ )、グルコース含量 ( $r = 0.77; p < 0.05$ )、H-ORAC 値 ( $r = 0.82; p < 0.01$ ) は高い正の相関を示し、GABA とは高い負の相関 ( $r = -0.78; p < 0.05$ ) を示した。米飯物性の「噛みごたえ」とグルコースは、高い正

の相関 ( $r = 0.67; p < 0.05$ ) を示し、GABA とは高い負の相関 ( $r = -0.75; p < 0.05$ ) を示した。米飯物性の「附着」と GABA は高い正の相関 ( $r = 0.97; p < 0.01$ ) を示した。米飯物性の「粘り」と GABA は、高い正の相関 ( $r = 0.87; p < 0.01$ ) を示した。また、ポリフェノール含量と H-ORAC は高い正の相関 ( $r = 0.94; p < 0.01$ ) を示し、 $\alpha$ -セクレターゼ阻害活性はレジスタントスターチ含量と高い正の相関 ( $r = 0.75; p < 0.05$ ) を示し、L-ORAC と高い負の相関 ( $r = -0.68; p < 0.05$ ) を示した。(表 3)

この結果、玄米は、発芽することにより、米飯の物性値の「粘り」と「附着」が増加し、「硬さ」が減少することが明らかとなり、機能性成分も増加することが確認された。

Table 3. Correlation between physical parameters of cooked rice with analysis of functional components

	L-ORAC	H-ORAC	RS	Glucose	Resistant starch	GABA	Starch	Acetylcholinesterase inhibition rate	$\alpha$ -Secretase inhibition rate	Hardness	Toughness	Adhesion	Stickiness
L-ORAC	1.00												
H-ORAC	0.87	1.00											
RS	-0.68	0.69	1.00										
Glucose	0.69	0.69	0.67	1.00									
Resistant starch	0.68	0.68	0.67	0.67	1.00								
GABA	-0.75	-0.75	-0.75	-0.75	-0.75	1.00							
Starch	-0.68	0.69	0.69	0.69	0.69	-0.68	1.00						
Acetylcholinesterase inhibition rate	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	-0.68	0.69	1.00					
$\alpha$ -Secretase inhibition rate	-0.68	0.69	0.69	0.69	0.69	-0.68	-0.68	0.69	1.00				
Hardness	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	-0.78	0.78	0.78	-0.78	1.00			
Toughness	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	-0.68	0.69	0.69	0.69	0.69	1.00		
Adhesion	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	-0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	1.00	
Stickiness	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	-0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	1.00

Correlation significant at % (\*), or % (\*\*), or % (\*\*\*) by the method of test.

### (13) 要約

本研究において、赤玉葱添加による発芽促進機構の解明については植物ホルモンの関与と細胞壁分解酵素の活性化を見出し、プロテオーム解析による機能解明については代謝回転の促進と情報伝達、インドール酢酸の関与を明らかにし、赤玉葱添加発芽種子の機能性については、GABA の増加による高血圧抑制機能とポリフェノールの増加による抗酸化性の増加とを見出し、赤玉葱添加発芽イネ種子が、機能性食品として有望であることを明らかにした。

玄米の食味、食感、利便性を改善したものが発芽玄米である。発芽玄米は発芽時に玄米中のフィチン酸が脱リン酸酵素 (フィターゼ) の働きによってリンとイノシトールに分解され、ミネラルが分離し、吸収されやすい形に変化する。同時にたんぱく質が遊離アミノ酸に分解され、GABA (  $\gamma$ -アミノ酪酸) が増加する。GABA は神経伝達物質であり、脳への酸素供給量を増加させ、抗痙攣作用、抗不安作用、脳の代謝機能亢進などが認められ医薬品として利用されている。ラットを使った研究では血糖および糖尿病合併症改善効果<sup>17, 18)</sup>、血中コレステロール低下効果<sup>11, 19)</sup>が報告されている。また「発芽玄米食が 2 型糖尿病患者などの脂質異常症や高血糖を改善する」<sup>12)</sup>と報告されている。

また近年、糖尿病はアルツハイマー病の発症に強く影響し、九州大学が行っている「久山町研究」<sup>13)</sup>では、高齢糖尿病患者では認知症の合併が多いことが明らかとなっている。

本研究においては、各種玄米 (一般汎用米: コシヒカリ、紫黒米: おくのむらさき、巨大胚芽米: 恋あずさ) を用い、既報<sup>2)</sup>に従い水発芽、赤玉葱発芽を行い、ORAC 値、RS

含量、グルタミン酸含量、ポリフェノール含量、GABA 含量、グルコース含量、炊飯物性値を測定し、発芽による機能性成分と玄米の種類における相違を明らかにし、既報<sup>16)</sup>で報告した 120 分後の AUC (血糖曲線下面積: area under curve) の推定式に従い 3 品種の玄米、水発芽玄米、赤玉葱発芽玄米の AUC の値を算定した結果、3 品種とも、水発芽より、赤玉葱発芽が 1% の危険率で有意に低かった。

また、認知症予防に有効な食材を探索するために、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性、 $\alpha$ -セクレターゼ阻害活性の測定を行った。この結果、3 品種の赤玉葱発芽、特に黒米である「おくのむらさき」が、水発芽に比べ高い  $\alpha$ -セクレターゼ阻害活性を示した。

以上の結果、「おくのむらさき」の赤玉葱発芽玄米が、糖尿病および認知症予防に有効であることが示唆された。

#### (14) 引用論文

- 1) 小堀真珠子, Functional Food, 5(2), 126-129, 2011.
- 2) Nakamura S. et al. Biosci Biotechnol Biochem. 75(3), 572-574(2011).
- 3) Tsuji M. et al. 山梨工業技術センター研究報告. 15, (2001).
- 4) Prior et al. J. Agric. Food Chem. 51, 3273 - 3279 (2003).
- 5) 伊藤満敏ら: 日本食品工学誌. 58, 576 - 582(2011).
- 6) Watanabe J. et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77, 4, 857-859 (2013).
- 7) Ellman G. L. et al. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95 (1961).
- 8) Augustinsson K. B. et al. Biochem J. 139, 123-127(1974).
- 9) Dawson R. M. Biochem J. 149, 293-295 (1975).
- 10) Nakamura S. et al. J. Agric. Food Chem. 59, 10665 -10676(2011).
- 11) Kim J Y. et al. Int J Vitam Nutr Res. 77, 99 -106 (2007).
- 12) Tzu-Fang Hsu. et al. J Nutr Sci. Vitaminol. 54, 163-168 (2008).
- 13) Yoshitake T. et al. Neurology, 45, 1161(1995).
- 14) Vladimir-Knežević S. et al. Molecules. 19, 767-782(2014).
- 15) 谷口ら. New Food Industry. 56(9), 45-53(2014).
- 16) Nakamura S. et al. J. Appl. Glycosci. 62, 53-63 (2015).
- 17) Usuki S. et al. Nutr Metab (Lond), 23.25 (2007).
- 18) Hagiwara H. et al. Biosci Biotechnol Biochem. 68, 444-447 (2004)
- 19) Miura D. et al. Life Sci. 13, 259 - 264(2006).

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) 渡辺賢一、S. アヒルガム、P. ピチャイマニ、A.P. ラクスマナン、V. ソエテクノ、張馬 梅蕾、野本真由美、中村隆志、鈴木浩志、平山匡男、倉田忠男、後藤 博、門脇基二、大坪研二、中村澄子: 新形質米(巨大胚芽米・発芽玄米) 配合パックライス摂取時の血圧と血糖値への効果、新潟医学会雑誌、129(4)、199-209、2015.

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 大坪研二、菅原雅通、中村澄子: 赤タマネギ添加発芽玄米の糖尿病および認知症の発症予防の可能性、日本農芸化学会 29 年度大会、京都市、2017、3/18.
- 2) K. Ohtsubo: Processing of rice to enhance the bio-functionality, 東アジア米機能性標準化シンポジウム, Kyoto, 2014, 12/10-12.
- 3) K. Ohtsubo: Quality evaluation and authentication by PCR for wheat/rice bread, Rice International Conference 2014, Pintung, Taiwan, 2014, 11/27.
- 4) K. Ohtsubo: Current status and prospect of rice flour industry and technology in Japan, Symposium on Promoting the Rice Flour Industry, Wanju, Korea, 2014, 5/27.

〔図書〕(計 2 件)

- 1) T. Ishitani and K. Ohtsubo: Rice utilization and processing in Japan, Rice Processing, Erling, pp.184-203, 2014.
- 2) 大坪研二・中村澄子: 米の品質評価、品種判別および加工利用に関する研究、化学と生物、52(5)、1-6、2014.

〔産業財産権〕

取得状況(計 2 件)

名称: 発芽種子およびその製造方法  
発明者: 大坪研二、中村澄子  
権利者: 新潟大学  
種類: 日本特許  
番号: 第 5641467 号  
取得年月日: 平成 26 年 11 月 7 日  
国内外の別: 国内

名称: 発芽玄米米飯およびその製造方法  
発明者: 大坪研二、中村澄子  
権利者: 新潟大学  
種類: 日本特許  
番号: 第 5550103 号  
取得年月日: 平成 26 年 5 月 30 日  
国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大坪 研二 (OHTSUBO Ken'ichi)  
新潟薬科大学・応用生命科学部・教授  
研究者番号: 80353960

(2) 研究協力者

中村 澄子 (NAKAMURA Sumiko)  
新潟薬科大学・応用生命科学部・特任准教授  
研究者番号: 30534739