

酵素反応を利用した GABA (γ-アミノ酪酸) の測定法

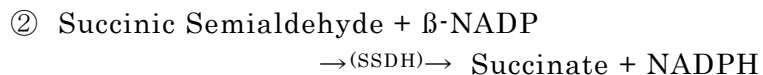
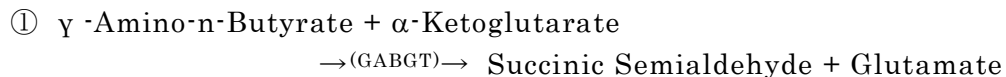
宮城大学 食産業学部 金内 誠
宮城大学大学院 食産業学研究科 宮澤 拓巳
宮城大学 食産業学部 津志田 藤二郎

【はじめに】

γ-アミノ酪酸 (GABA) は非タンパク質構成のアミノ酸の一種で、ヒトでは副交感神経の伝達物質でもある。これは玄米や野菜、果物、お茶などの農産物にも含まれ、近年では、乳酸菌などの微生物を用いた生産方法も報告されている。この物質には血圧降下作用や精神安定作用、腎機能活発化作用なども報告されているため、我が国では GABA を関与成分とする特定保健用食品や機能性表示食品も販売されるようになり、GABA は機能性成分の一つとして注目されている。

これまで、GABA の測定は HPLC 法、イオンクロマトグラフィー (IC) 法、GC 法など高価な機器による分析法が主流であった。このため、それらの機器を持たない食品企業などでの分析は難しい現状であった。そこで、ここでは汎用性の高い簡易なマイクロプレートリーダーで測定できる酵素反応による分析法を記載・紹介する。

本測定法で用いる GABase は、①GABA のアミノ基を α-ケトグルタル酸に転位させコハク酸セミアルデヒドを生成する GABA グルタミン酸トランスアミナーゼ (GABGT) と、②コハク酸セミアルデヒドをコハク酸へと変換させるコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (SSHD) を組み合わせた複合酵素であり、以下に示した 2 つの連続した反応を行う。



GABGT; γ -Aminobutyric Glutamic Transaminase

β -NADP; β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidized Form

SSDH; Succinic Semialdehyde Dehydrogenase

β -NADPH; β -Nicotinamide Reduced Form

そこで、本法は GABase (GABGT + SSHD) を使い、最終的に生成した β -NADPH (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸、還元型) をプレートリーダーによって測定し、GABA 含量を求める。

【準備するもの】

1. 実験器具

- ・プレートリーダー (340nm が測れること。Multiskan FC Microplate Photometer - Thermo Fisher Scientific など)
- ・96 穴マイクロプレート (平底)
- ・マイクロピペット (20 μ L および 100 μ L が量り取できる P20 および P200 が望ましい。また、8 連で量り取れるマイクロピペットが簡便である。)

- ・ 20mL ホールピペット
- ・ 粉砕機あるいはラボブレンダー
- ・ 15ml あるいは 50ml ポリプロピレンチューブ
- ・ 超音波装置
- ・ ろ紙 (定性用 No2 東洋ろ紙)
- ・ ロート
- ・ タイマー/ストップウォッチ

2. 試薬

- ・ ピロリン酸カリウム (Sigma-Aldrich Cat #. 322431 など)
- ・ 塩酸 (和光純薬工業 Cat #. 080-01066 など)
- ・ 2-メルカプトエタノール (和光純薬工業 Cat#. 137-06862 など)
- ・ α -ケトグルタル酸 (オキシグルタル酸) (和光純薬工業 Cat#.115-00082 など)
- ・ β -NADP (オリエンタル酵母 Cat #. 44290000 など)
- ・ GABase (Sigma-Aldrich Cat. G7509)
- ・ γ -アミノ酪酸 (γ -Amino-n-Butyric Acid、GABA) (和光純薬工業 Cat#.010-02441 など)

3. 試薬調整

- ・ 保存緩衝液 ; 500 mM ピロリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.6)
ピロリン酸カリウム (16.5g/100mL) を 1 M HCl を用い、pH 8.6 に調製する。
- ・ 抽出溶液調製用緩衝液 ; 50 mM ピロリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.6)
500 mM ピロリン酸カリウム緩衝液を希釈して作製。
- ・ 2mM 2-メルカプトエタノール含有 50 mM ピロリン酸カリウム緩衝液
- ・ 50 mM α -ケトグルタル酸溶液
 α -ケトグルタル酸 (73.1 mg) を 10mL の 50 mM ピロリン酸カリウム緩衝液に溶解する。
- ・ 25 mM β -NADP 溶液
 β -NADP (191.4mg) を 10mL の 50 mM ピロリン酸カリウム緩衝液に溶解させる。
- ・ GABase 溶液
GABase を使用直前に 1 U/mL となるように 50 mM ピロリン酸カリウム緩衝液に溶解する。
- ・ 10mM γ -アミノ酪酸溶液 (保存溶液)
使用時に 1mM γ -アミノ酪酸となるように 50 mM ピロリン酸カリウム緩衝液で希釈する。
- ・ 0.5M HCl
塩酸を蒸留水で希釈し、調製する。

【プロトコール】

- 1) 発芽玄米などの乾燥試料を粉砕機あるいはブレンダーなどで粉砕する。
- 2) 抽出用の 50mL チューブに、100 mM ピロリン酸カリウム緩衝液(pH 8.6)をホールピペットにて 20mL 分注する。
- 3) 約 0.5g の検体をチューブに添加し混和する。適宜 10～60 分間超音波装置に供試し室温で抽出を行う。
- 4) さらに冷蔵庫 4℃にて一晩（16～18 時間）放置し、抽出する。
- 5) 抽出溶液を良く攪拌した後、ろ紙にてろ過し、ろ液を測定用検体溶液とする。
- 6) 測定用試料溶液を 40 μL ずつプレートの各ウェルへ分注する。次いで 2-メルカプトエタノール含有 50 mM ピロリン酸カリウム緩衝液を 100μL、α-ケトグルタル酸溶液 を 20μL、β-NADP 溶液 を 20μL それぞれ加え、よく混和する。
- 7) 上記のとおり合計 180 μL の反応液を注入した各ウェルに 5～10 秒ごとに GABase を 20μL 添加し、よく混和後に 20～25℃で、正確に 30 分反応させる。
- 8) 30 分反応の後、各ウェルに上記 7) の操作と同様、5～10 秒ごとに 0.5 M HCl 溶液を 20μL 加え、よく混和して酵素反応を停止させる。
- 9) プレートリーダーにて 340nm の吸光度を測定する (E_{S1})。
- 10) 同様に測定用検体溶液を正確に 40 μL ずつ、プレートの各ウェルへ分注する。次いで 0.5M HCl 溶液 を 20μL 加え、2mM 2-メルカプトエタノール含有 50 mM ピロリン酸カリウム緩衝液を 100μL、α-ケトグルタル酸溶液を 20μL、β-NADP 溶液を 20μL 及び GABase を 20μL 添加し、よく混和し、プレートリーダーにて 340nm の吸光度を測定し (E_{S2}) ブランク値を求める。
- 11) さらに、酵素反応測定用マイクロプレートとブランク値測定用のマイクロプレート間の透過度を補正するため測定用検体溶液の代わりに 50 mM ピロリン酸カリウム緩衝液 40μL を用い、同様に測定し、 E_{B1} と E_{B2} を求める。
- 12) 1mM GABA 溶液を用い、適宜 0～1mM まで希釈した濃度系列を調整し、それぞれ 40 μL をマイクロプレートに採取し、6) と 7) のプロトコルに従い検量線作成する。
- 13) 測定用検体溶液の GABA 濃度が検量線内に入らないときは適宜希釈して使用する。

【計算】

- 1) 測定用検体溶液の GABA 濃度算出に用いる吸光度 ΔE の求め方

$$\Delta E_S = E_{S1} - E_{S2}$$

$$\Delta E_B = E_{B1} - E_{B2}$$

$$\Delta E = E_S - E_B$$

- 2) 吸光度 ΔE からの GABA 含量 (mg/100g) の求め方

求めた検量線の式に ΔE を代入し、測定用検体溶液の GABA 濃度 X を求める。
つぎに X を以下の式に代入し GABA 含量 (mg/100g) を求める。

GABA 含量 (mg/100g)

$$= \text{GABA 濃度 } X \times 20 / 0.5 \times 103.1 / 1000 \times 100 \times \text{希釈率}$$

表 1 検量線用の各濃度の GABA を用いた測定結果の例

GABA 濃度 (mM)	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0
ΔE	0.5906	0.2897	0.1374	0.0701	0.0295	0.0000
	0.6012	0.2950	0.1413	0.0762	0.0388	0.0000
	0.5731	0.2915	0.1422	0.0725	0.0298	0.0000
ΔE 平均	0.5883	0.2921	0.1403	0.0729	0.0327	0.0000
標準偏差	0.0116	0.0022	0.0021	0.0025	0.0043	0.0000

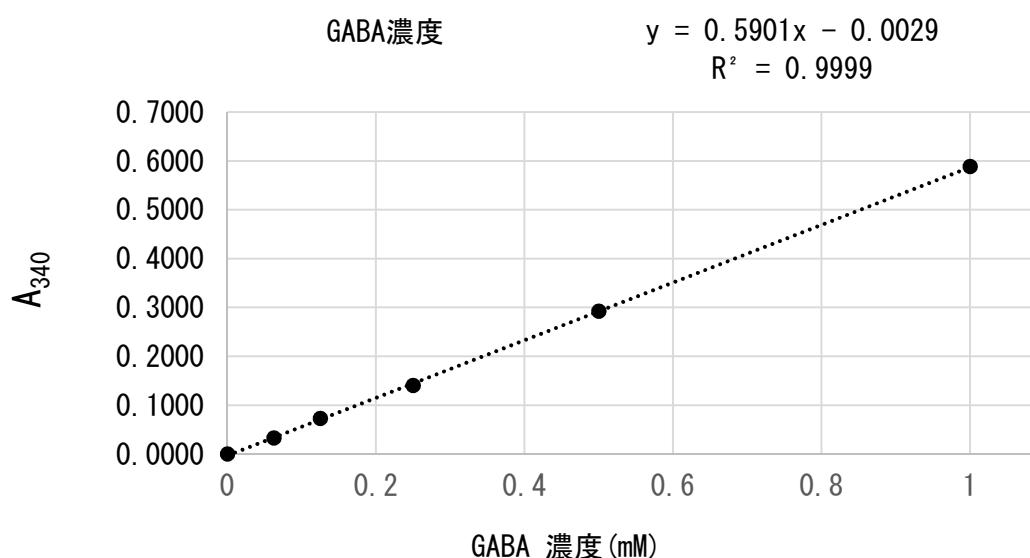


図 1 GABA 濃度測定例 (検量線)

【おわりに】

測定に際し、検体からの抽出液は、サンプルの残さなどでにごりが生じている場合は、遠心分離やシリンジフィルター (0.45 μm) にて、十分に浮遊物を除去する。また、測定のパイペット操作により酵素量が一定にならないことなどによる誤差が生じるので注意する。使用する GABase は高価なので、過剰量調整しないことが望ましい。また、もし、余剰の酵素溶液が生じる場合は 4℃ で保存し、1 週間程度で使い切ることが望ましい。 β -NADP も不安定な物質であるので、測定直前に調製することを進めたい。

このような、GABA は機能性成分として、各種食品への表示がおこなわれるようになった。最近では、発芽玄米やお茶からだけでなく発酵法や合成法で製造されたものを添

加するサプリメント状のものまで登場している。そのことから、様々な食品に対応できるような簡便な前処理と基質特異性を利用した方法が必要である。従来の HPLC 法に加え、酵素を利用した本法が GABA 測定に利用され、消費者の信頼性の確保の一助になることを期待する。

【参考文献】

- 1) 丸山浩治, 津志田藤二郎: 食品機能性評価マニュアル集第 I 集
- 2) 塚谷 忠之, 樋口 智子, 松本 清, 2006. 酵素反応を利用した γ -アミノ酪酸のマ
イクロプレートアッセイ: γ -アミノ酪酸生産性乳酸菌のスクリーニングへの適
用, 福岡県工業技術センター研究報告, 16, 33.
- 3) Jakoby W.B. 1962. Enzymes of γ -aminobutyrate metabolism. *Methods
Enzymol* 5, 771-774,
- 4) Sigma-Aldrich , Enzymatic Assay of GABASE.
(https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/gabase.pdf)
- 5) T sukatani T., Higuchi T., Matsumoto K. 2005. Enzyme-based microtiter
plate assay for γ -aminobutyric acid: Application to the screening of γ -
aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria. *Analytica Chimica Acta* 540,
293-297.