

GABA A受容体に対する日本酒成分の効果

| | |
|-------|---|
| 誌名 | 日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan |
| ISSN | 09147314 |
| 著者名 | 山田,康枝 江口,将也 伊豆,英恵 後藤,邦康 須藤,茂俊 |
| 発行元 | 日本醸造協会 |
| 巻/号 | 105巻9号 |
| 巻号補足 | |
| 掲載ページ | p. 609-614 |
| 発行年月 | 2010年9月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



GABA_A 受容体に対する日本酒成分の効果

山田康枝^{*1}・江口将也¹・伊豆英恵²・後藤邦康³・須藤茂俊²

(¹近畿大学工学部生物化学工学科・²独立行政法人酒類総合研究所・³熊本国税局課税部鑑定官室)

平成 22 年 3 月 15 日受理

Effects of Components of Sake on GABA_A receptor

Yasue YAMADA^{*1}, Masaya EGUCHI¹, Hanae IZU², Kuniyasu GOTO³, Shigetoshi SUDO²

(¹Department of Biotechnology and Chemistry, Faculty of Engineering, Kinki University, 1 Umenobe, Takaya, Higashi-hiroshima, 739-2116, ²National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashi-hiroshima, 739-0046, ³Office of Brewing Technology, Kumamoto Regional Taxation Bureau, 1-2 Ninomaru, Kumamoto, 860-8603)

We investigated the effects of Japanese sake on the GABA_A receptor which plays a crucial role in effecting relaxation in the central nervous system. The activities of the GABA_A receptor channel were measured by using a *Xenopus* oocyte expression system. For removing ethanol and volatile compounds, two kinds of sake (junmai-shu) were fractionated by ion-exchange chromatography and lyophilized. The obtained four fractions consisted mainly of basic amino acids (C Fra.), neutral and acidic amino acids (R Fra.), organic acids (A Fra.) and sugars (N Fra.). The GABA_A receptor was activated by all fractions of sake. In particular, GABA-free A Fra. highly activated the GABA_A receptor. These results indicated that sake contains components able to activate the GABA_A receptor except for ethanol and GABA.

Key words : 日本酒, GABA_A 受容体, 活性化, リラックス効果

緒 言

適量の飲酒はリラックス効果をもたらすと言われて
いる。このリラックス効果はエタノールのイオンチャ
ンネル型 γ -aminobutyric acid 受容体 (GABA_A 受容
体) の亢進によるものと考えられている^{1,2)}。GABA_A
受容体は脳など中枢神経系に存在する主要な抑制性の
受容体で2つの α , 2つの β , 1つの γ サブユニット
からなり, この受容体に GABA が結合すると Cl⁻ チ
ャンネルが開いて膜電位を下げることで神経興奮を抑
制する³⁾。GABA 以外にも, ベンゾジアゼピン, パ
ルピツール酸, 神経ステロイド, 麻酔薬, エタノール
など多くの薬物が GABA_A 受容体に作用してその応答
を強める。その程度に応じて, 安らぎ, 精神安定, 睡
眠, 麻酔効果が生じることが知られ, 気分に影響する

物質の主要な作用対象である³⁾。また視床下部からの
副腎皮質刺激ホルモンの放出を GABA_A 受容体シナプ
スが抑制的に調節しているため, 抗ストレス作用にも
関与している⁴⁾。

一方, これまでにウイスキーやビールなどの酒類成
分存在下で GABA_A 受容体活性を測定した結果が得ら
れている^{5,7)}。ビールやホップなどから得られる香気
成分やエステル類, ウイスキーやその香気成分, ウイ
スキーの熟成とともに増加する香気成分に GABA_A 受
容体を亢進する効果があることが示されており, 酒類
に含まれるエタノールや GABA だけでなく, これ以
外の他の酒類成分が GABA_A 受容体を亢進すること
によって酒類飲用によるリラックス効果もたらされる
ことが示唆されている。

日本酒にも, ウイスキーなどの酒類と同様にリラッ

クス効果があることが動物行動実験で示されている^{8,9)}。しかしながら、日本酒中にエタノール以外にも、リラックス効果に関わる酒類成分が存在するかどうかについての十分な検討は行われていない。日本酒にはアミノ酸、有機酸をはじめ様々な成分が含まれており、その中にはGABA_A受容体を亢進するGABAも含まれている。日本酒原料である米麴において麴菌のグルタミン脱炭酸酵素によってグルタミン酸がGABAに変換されGABAが生成するが¹⁰⁾、醗の発酵初期においてGABAは酵母によって取り込まれることが示されている^{11,12)}。結果として、日本酒中へ移行するGABA量は3.61-7.56 mg/100 ml程度となる¹³⁾。青島らの樽酒を用いた検討により¹⁴⁾、0.18 mM程度のGABAを含む日本酒において、約1 mMのGABA相当のGABA_A受容体応答があったことが示されており、日本酒にGABA以外に活性化を引き起こす物質が存在することが示唆されている。しかしながら、樽酒をペンタン抽出して芳香成分のGABA_A受容体応答への影響を測定しても、有意な効果が見られなかったことから、この成分がペンタン抽出されない物質であると推測されている。

今回は日本酒に含まれるGABAの量を測定したうえで、日本酒成分存在下でGABA_A受容体活性を測定し、さらに最大活性を示すGABA存在下での日本酒成分の効果を測定することによって、GABA以外のGABA_A受容体を活性化する日本酒成分について調べた。GABA_A受容体の活性は、アフリカツメガエル卵母細胞にウシのGABA_A受容体を発現させ、二電極膜電位固定法により、Cl⁻イオンの透過を見ることによって電気生理学的に受容体活性を測定した。本実験では、純米酒2点を3種類のイオン交換クロマトグラフィーを用いて主に塩基性アミノ酸、中性・酸性アミノ酸、有機酸、糖を含む4つの画分に画分し、凍結乾燥することによりエタノールと揮発性物質を除いたものを用いて日本酒成分のGABA_A受容体への効果を検討した。

実験方法

1. mRNAの調製

牛の脳からクローニングしたGABA_A受容体の α 1と β 1を含むpSP6プラスミドを鋳型にし、*in vitro*でSP6 RNAポリメラーゼ (RiboMAX, Promega) を

用いてmRNAを合成した⁷⁾。

2. GABA_A受容体のアフリカツメガエル卵母細胞への発現

アフリカツメガエルを水中で眠らせた後、開腹し卵母細胞をとりだし、1 mg/ml コラゲナーゼ (SIGMA) を含むBarth液 (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 2.4 mM NaHCO₃, 7.7 mM Tris-HCl, pH 7.6) で2-4時間処理し、実体顕微鏡下でピンセットを用い卵胞膜を除去した卵母細胞に、ガラス管に充填した α 1と β 1のmRNAを注入した。卵母細胞はBarth液中で20℃で、約18-24時間培養した。

3. 電気生理学的手法によるGABA_A受容体活性の測定

電極用ガラス管に3 M KClを満した電極を用い、膜電位を-70 mVに固定し、オーサイトクランプTEV200 (DAGAN) を用い二電極膜電位固定法により活性を測定した。測定の際はND96溶液 (GABA_A受容体測定用リンゲル液：96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.5) を還流し¹⁵⁾、活性はND96溶液に溶かしたGABA溶液や日本酒画分を20秒間還流し、流れた電流を測定した。日本酒成分の受容体への効果を見るため、日本酒の各画分を単独で添加、あるいはGABA 200 μ Mにさらに日本酒の各画分を加えたものを還流して、GABA_A受容体への効果を検討した。すべての受容体活性はGABA 200 μ Mの電流値を100%として表した。

4. 日本酒の画分

佐藤らの方法¹⁶⁾により2種類の純米酒を3種類のイオン交換樹脂 (IRC76-AG, IR120BH-AG, IRA96SB-AG) を用いて分画し、凍結乾燥後、水に溶解し、塩基性アミノ酸 (C Fraction：以下C Fra.)、中・酸性アミノ酸 (R Fra.)、有機酸 (A Fra.)、糖 (N Fra.) 画分の50倍濃縮液を得た。ND96溶液50 mlに2 MのNaOHでpH 7.0に調整した濃縮液1 ml加え、日本酒本来の濃度に戻し、これを日本酒分画液とした。

5. 日本酒の中のGABA量

日本酒中のGABA含量は、全自動アミノ酸分析機 (JLC-500/V, 日本電子株式会社) から求めた。

6. 統計的有意差の検定

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。一元配置分散

分析後に Tukey-Kramer の HSD 検定を行なって検定し、危険率が5%以下の場合に有意差があると判定した。

実験結果

1. 日本酒中の GABA 量

本来、日本酒には GABA が含まれている。日本酒中の GABA の量を把握しておくため、日本酒 29 点（純米酒 8 点、生もと純米酒（以下、生もと）4 点、山廃純米酒（以下、山廃）5 点、吟醸酒 6 点、普通酒 6 点）の GABA 量を測定し、その結果を Fig. 1 に示した。純米酒は吟醸酒の 1.2 倍、普通酒の 1.5 倍の

GABA を含み、吟醸酒、普通酒に比べて純米酒の GABA 含量が多い傾向にあることが明らかになったが、有意ではなかった。さらに、生もとと山廃はいずれも純米酒の 1.7 倍の GABA を含み、純米酒、吟醸酒、普通酒に比べて GABA 含量が多い傾向にあることが明らかになったが有意ではなかった。今回は比較的 GABA 量の多い純米酒 2 点（A: 158.5 μ M, B: 281.7 μ M）について、GABA_A 受容体をどの程度活性化するか、また GABA 以外に GABA_A 受容体を活性化する成分が存在しないかを検討した。

2. GABA_A 受容体活性の測定

Fig. 2 に示すように、GABA_A 受容体活性を GABA

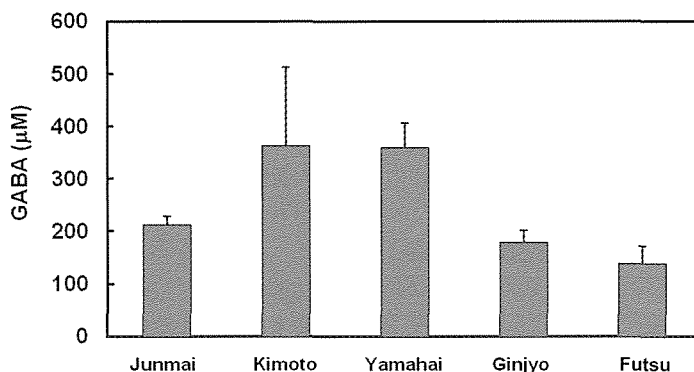


Fig. 1 GABA contents in various Japanese sakes. Data were expressed as the mean \pm SEM.

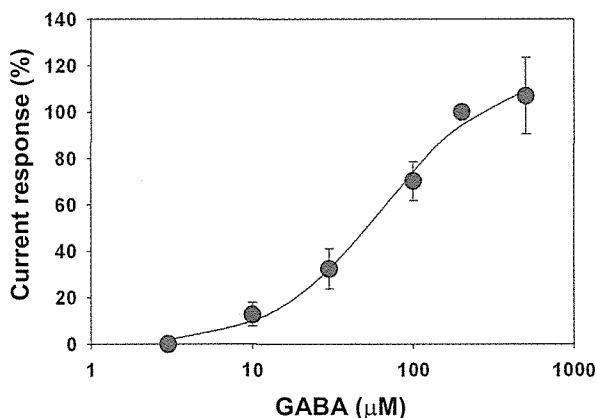


Fig. 2 Dose-response curve for GABA on the GABA_A receptor channel.

Various concentrations of GABA were applied and the steady state currents were measured in oocytes expressing the GABA_A receptor. Each point represents the mean \pm SE of the current amplitude from 3-5 oocytes. Theoretical curves were drawn according to the equation $I = I_{max} / [1 + (EC_{50}/A)^n]$, where we represent the current response. The EC_{50} value was 60.5 μ M.

の濃度を1-500 μ MにしてEC50 (50%有効濃度)を求めたところ60.5 μ Mであった。またその最大活性は200 μ Mであり、GABA量を増やしてもそれ以上の活性は見られなかった。

3. 日本酒の各画分中のGABA含量

純米酒A, Bの各画分中のGABA含有量を測定したところ (Table 1), A Fra. (有機酸), N Fra. (糖) 中にはGABAが検出されなかった。C Fra. (塩基性アミノ酸), R Fra. (中性・酸性アミノ酸) には、純米酒A, BともGABAが含まれていた。その濃度は純米酒A, BのC Fra. がそれぞれ57.3 μ Mと54.0 μ M, R Fra. が60.5 μ Mと138.0 μ Mであった。

4. 日本酒の各画分のGABA_A受容体活性への影響

GABA_A受容体測定の際に、純米酒A, Bのそれぞれの日本酒分画液を添加して測定した (Fig. 3)。C Fra. の場合、純米酒AではGABA200 μ Mの80%の活性、純米酒BではGABA200 μ Mの123%の活性が得られ、R Fra. の場合、純米酒Aでは200 μ Mの

85%, 純米酒Bでは200 μ Mと同等の活性が得られた。これはTable 1に示したC FraとR Fra. のGABA測定量から推定される活性より高い活性であった。

5. GABA_A受容体を活性化する日本酒成分

GABA_A受容体活性を活性化する物質を検討するために、最大活性を示す濃度であるGABA 200 μ Mに分画前の日本酒と同じ濃度の各画分を添加し測定した。GABA 200 μ Mに純米酒Aの各画分を添加し測定したところ (Fig. 4I), GABA 200 μ Mの活性を基準とするとC Fra. は基準の1.7倍, R Fra. は1.6倍, A Fra. は3.3倍, N Fra. は1.6倍となり、すべての画分において200 μ Mの最大活性を超える活性がみられた。そして、GABAの存在しないA Fra. において特に高い活性化がみられることが明らかになった。同様にGABA 200 μ Mに純米酒Bの各画分を添加し測定したところ (Fig. 4II), 純米酒BにおいてはA Fra. のみ活性化がみられることがわかった (2.4倍)。

考 察

日本酒中のGABA量を比較したところ、吟醸酒、普通酒に比べ、純米酒にGABAが多く含まれる傾向があり、純米酒の中でも、生もと、山廃でGABAがより多く含まれる傾向があることが明らかになった。GABAは日本酒原料である米麴において麹菌によって産生されるが¹⁰⁾、酵母が醗中のGABAを取り込む

Table 1 GABA contents of 2 junmai (A, B) fractions.

| Junmai | Fractions (μ M) | | | |
|--------|----------------------|--------|--------|--------|
| | C Fra. | R Fra. | A Fra. | N Fra. |
| A | 57.3 | 60.5 | n. d. | n. d. |
| B | 53.9 | 138 | n. d. | n. d. |

The detection limit is 1.0 μ M or less.
n. d.: not detected.

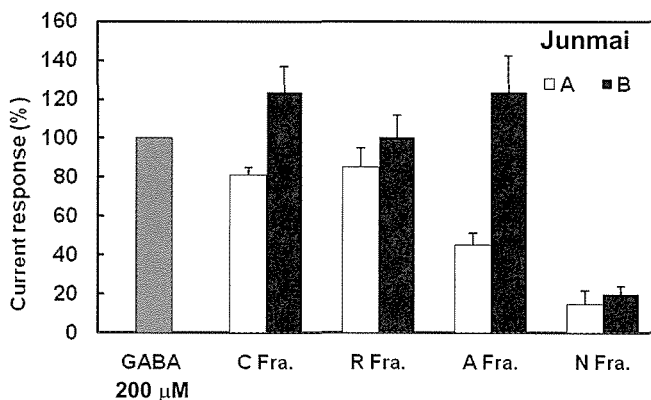


Fig. 3 Current responses of the GABA_A receptor evoked by junmai fractions.

Current responses of each fraction are indicated by the comparison with the maximum activity (GABA 200 μ M) as 100% oocytes (\square : Junmai A, \blacksquare : Junmai B). Data are expressed as the mean \pm SEM.

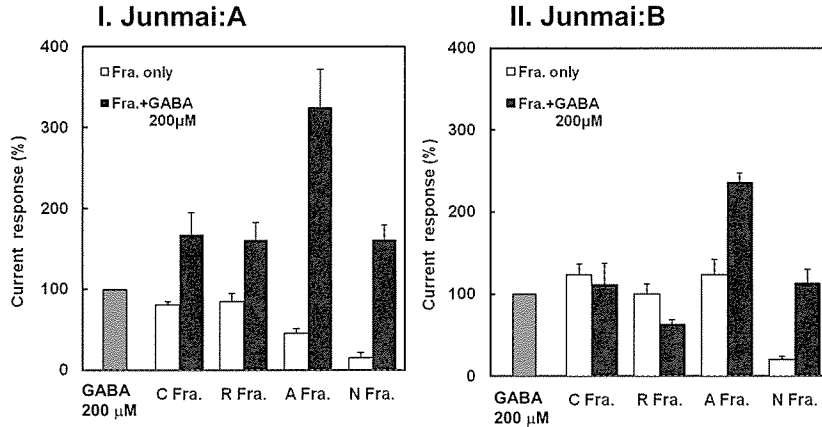


Fig. 4 Current responses of the GABA_A receptor evoked by junmai fractions in the presence of GABA (200 μM).

Current responses of each fraction are indicated by the comparison with the maximum activity (GABA 200 μM) as 100% (I: Junmai A, II: Junmai B) (□: Fra. only, ■: Fra. + GABA 200 μM). Data are expressed as the mean ± SEM.

ため^{11,12)}、そのバランスによって日本酒中の最終的なGABA含量が決まってくる。純米酒の中でも、生もとや山麴にGABAが多く含まれるのは、製造の過程で乳酸菌などの微生物がGABAの産生に関与するためであると推測される。

GABA_A受容体に対する日本酒成分の直接効果を検討するため、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたGABA_A受容体に直接作用させ、純米酒各分画のもつチャンネル活性を測定した。その際、最大活性を示すGABA濃度を予め測定したところ、その濃度は200 μMであった。200 μMのGABAに日本酒成分を添加して、活性が最大活性以上を示す場合は受容体が日本酒成分によって活性化されたことになると考えられる。受容体へ効果のある物質を特定しやすくするため、日本酒をイオン交換クロマトグラフィーで分画し、GABA_A受容体の活性に影響を与えるエタノールの効果を排除するために凍結乾燥を行った試料を用い、今回、検討を行った。検討には、2種類の純米酒を用いた。

純米酒A、Bの各分画のみを添加してGABA_A受容体活性を測定したところ、C Fra.とR Fra.のGABA含有量から推定される活性化効果より高い効果が認められることから、GABA以外にGABA_Aを活性化する物質が存在することが明らかとなった。アミノ酸分

析でGABAを検出できなかったA Fra.とN Fra.でも強い活性化効果が検出されたことから、GABA以外の物質の関与が強く示唆された。これに加え、C、R Fra.と同様、A、N Fra.にもGABA_A受容体を活性化する成分を含むと考えられたが、N Fra.はイオン交換樹脂に結合しない、主に糖が存在する画分であるため、A Fra.とN Fra.とは性質の異なる物質が活性化に関与する可能性がある。

純米酒AのA Fra.やN Fra.にGABAを添加した場合、添加GABA量から予想される活性化効果より高い効果が認められたことより、A Fra.やN Fra.にはGABA_A受容体を活性化する反応を促進する物質が含まれている可能性がある。同様に、純米酒AのC Fra.とR Fra.にもGABA_A受容体を活性化する物質が存在する可能性があり、これらの画分に含まれる反応促進物質が同じかどうかを今後、解析する必要がある。また純米酒Bの場合、A Fra.に活性化反応を促進する物質が存在するが、C Fra.とR Fra.にGABAを添加しても活性がむしろ減少することから、この画分には、逆にGABAがGABA_A受容体を活性化する反応を阻害する物質が含まれていると考えられる。これらのことについては、今後、詳細に検討していきたい。このように日本酒成分の4つの画分によって、GABA_A受容体の活性化が起こることが示された。そ

して、純米酒 A と B で同じ画分による結果を比較した場合、活性化の程度が異なっており、同じ純米酒によっても活性化率が異なることが示唆された。このことについては、さらに測定点数を増やし、純米酒だけでなく、生もと、山廃、吟醸酒や普通酒などについても、今後、検討を行って比較していきたいと考えている。青島らの報告¹⁴⁾で日本酒が GABA_A 受容体活性化を活性化成分を含有することが示唆されているが、ペンタン抽出後はこれらの成分が失われることを明らかにしている。今回、我々が用いたサンプル調製によるサンプルではこれらの活性化成分が含まれていたため、GABA_A 受容体の活性化が観察されたと思われる。

以上の結果から、日本酒成分中に GABA_A 受容体を直接活性化物質と、GABA が GABA_A 受容体を活性化する反応機構のどこかに関与することにより活性化を増大させる物質（物質単独では GABA_A 受容体を活性化することはなく、触媒効果）の 2 種類の存在が示唆された。

要 約

本研究では、中枢神経系においてリラックス効果に主要な働きをしている GABA_A 受容体に対する日本酒成分の効果を明らかにするため、アフリカツメガエル卵母細胞に発現した GABA_A 受容体のチャンネル活性への日本酒成分の影響を検討した。受容体へ効果のある物質を特定しやすくするため、イオン交換クロマトグラフィーで日本酒を分画し、揮発性成分を除き濃縮するために凍結乾燥を行い、塩基性アミノ酸画分、中・酸性アミノ酸画分、有機酸画分、糖画分を得た。これらの日本酒画分存在下で測定を行った結果、得られた全ての画分に GABA_A 受容体を活性化成分が存在することが示された。特に、有機酸を主に含む画分において、GABA が含まれないのにも関わらず、GABA 活性が存在し、さらに高い活性化率を示すことがわかった。以上のことから、日本酒にエタノールや GABA 以外の GABA_A 受容体活性化成分が存在することが示唆された。

謝 辞

本研究は筆者らと日本酒造組合中央会との共同研究

（平成 20-21 年度）における成果の一部をまとめたものである。ここに記して、日本酒造組合中央会に感謝いたします。

文 献

- 1) S. Kumar, P. Porcu, D. F. Werner, D. B. Matthews, J. L. Diaz-Granados, R. S. Helfand, and A. L. Morrow: *Psychopharmacology (Berl)*, **205**, 529-264 (2009)
- 2) K. A. Wafford, D. M. Burnett, T. V. Dunwiddie, and R. A. Harris: *Science*, **249**, 291-293 (1990)
- 3) C. D'Hulst, J. R. Atack, and R. F. Kooy: *Drug Discov. Today*, **14**, 866-875 (2009)
- 4) S. R. Keim, and A. Shekhar: *Brain Res*, **739**, 46-51 (1996)
- 5) S. J. Hossain, H. Aoshima, H. Koda, and Y. Kiso: *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6828-6834 (2002)
- 6) H. Aoshima, K. Takeda, Y. Okita, S. J. Hossain, H. Koda, and Y. Kiso: *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 2514-2519 (2006)
- 7) H. Koda, S. J. Hossain, Y. Kiso, and H. Aoshima: *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5238-5244 (2003)
- 8) 伊豆英恵, 後藤邦康, 山田康枝: 醸協, **103**, 807 (2008)
- 9) 伊豆英恵, 後藤邦康: 醸協, **104**, 787-795 (2009)
- 10) Y. Kato, Y. Kato, K. Furukawa, and S. Hara: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2600-2605 (2002)
- 11) T. Takahashi, A. Furukawa, S. Hara, and H. Mizoguchi: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 412-418 (2004)
- 12) 高橋俊成: 醸造論文集, **64**, 6-9 (2009)
- 13) 日本醸造協会, 醸造物の成分 (財団法人日本醸造協会, 東京), 63-84, (1999)
- 14) 折原佑輔, 和気洋子, 宇都宮仁, 青島均: 醸協, **101**, 349-356 (2006)
- 15) R. Chapell, O. F. Bueno, X. Alvarez-Hernandez, L. C. Robinson, and N. J. Leidenheimer: *J. Biol. Chem.*, **273**, 32595-32601 (1998)
- 16) 佐藤信, 中村欽一, 蓼沼誠: 醸協, **101**, 65, 255-259 (1970)