

マイクロプレートリーダーを用いた酵素法による 中玉トマトの γ -アミノ酪酸(GABA)含量の簡易測定法

田島万穂路¹⁾・大石直記¹⁾・二俣翔¹⁾・石黒雄大²⁾・山下寛人³⁾・一家崇志³⁾・

片井秀幸¹⁾・大石智広¹⁾

¹⁾農林技術研究所, ²⁾岐阜大学大学院連合農学研究科, ³⁾静岡大学農学部

A Simple Method for Measuring γ -Aminobutyric Acid (GABA) Content in Medium Tomato Samples Using an Enzymatic Assay with a Microplate Reader

Mahoro Tajima¹⁾, Naoki Ohishi¹⁾, Natsuru Futamata¹⁾, Yoshiki Ishiguro²⁾,
Hiroto Yamashita³⁾, Takashi Ikka³⁾, Hideyuki Katai¹⁾ and Tomohiro Ohishi¹⁾

¹⁾Shizuoka Res. Inst. of Agri. and Forest., ²⁾The United Graduate school of Agricultural Science, Gifu Univ., ³⁾Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ.

キーワード：機能性表示食品, GABA, トマト

I 緒 言

アミノ酸の一種である γ -アミノ酪酸(以下, GABA)は、ヒトが摂取することで、精神的ストレス緩和¹⁴⁾や血圧降下作用⁹⁾を有するとされ、トマトなどの農産物の機能性表示食品の関与成分として多く届け出られている¹¹⁾¹⁰⁾。

農産物のGABA含量は、品種や作型、栽培管理方法などで異なるため^{9)~7)}、¹²⁾、¹⁵⁾、機能性表示食品の届出といったGABA含量に基づく販売促進を行う場合には、表示する含量を上回る栽培管理が必要となる⁷⁾。そのような栽培管理技術の研究開発や、生産された農産物の品質確認には、多数の試料を測定するため、測定時間とコストを削減した効率的なGABA含量の簡易測定法が求められる。

GABA含量の測定には、一般的に高速液体クロマトグラフィー(以下, HPLC法)が用いられるが¹¹⁾、¹⁹⁾、試料の前処理や測定に多くの工程や時間を要する。また、簡易なGA

BA含量の測定法として、酵素反応を利用し、マイクロプレートリーダーにより吸光度を測定する手法が報告されているが、数種類の試薬を用いる必要がある³⁾、¹³⁾、¹⁶⁾。

一方、酵素試薬2種類と試料を混合し、付属の比色計でGABA含量の測定が可能なキット⁴⁾(GABA ミエール®, エンザイム・センサ製)(以下, 測定キット)が市販されており、トマトでの測定が報告されている⁴⁾、¹⁷⁾。測定キットは、試薬A液により試料中のL-グルタミン酸及びアスコルビン酸を除去した後、試薬B液を添加してカタラーゼ阻害剤の存在下でGABA トランスアミラーゼ(E. C2. 6. 1. 19)及びL-グルタミン酸オキシダーゼ(E. C1. 4. 3. 11)により過酸化水素を発生させ、引き続き発色剤及びパーオキシダーゼ(E. C1. 11. 1. 7)により色素形成を行い、比色計を用いて比色定量を行うものである⁴⁾(以下, 測定キット法)。測定キット法は、HPLC法と比較して測定時間が短く、装置の導入や維持、試薬やカラム等の購入費用といった運用コストを抑えられる。また、酵素反応を利用した他の手法よ

りも使用する試薬数が少なく、室温での反応が可能であるため操作が簡便である^{4), 17)}。しかしながら、測定キット法で用いる比色計は、試料を1点ずつ測定する必要があるため、試料点数が多い場合には測定に時間を要し、試薬コストの増大も想定される。

そこで本研究では、試料50点以上の多検体測定を想定し、機能性表示食品として多く届け出られているトマトのうち、中玉トマトのGABA含量の簡易測定を目的に、測定キットの酵素試薬を用いてマイクロプレートリーダーによる多検体測定(以下、マイクロプレートリーダー法)を実施し、その実用性や測定コストについて検討したので報告する。

II 材料及び方法

1 GABA標準液の検量線評価

GABA標準液の濃度測定における測定液量及び反応時間が及ぼす影響を検討し、その検量線を評価した。GABA標準液は、GABA粉末試薬(東京化成工業製)を超純水に溶解し、濃度8水準(0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200ppm)に調整した。

試験は、使用する各試薬量から設定した50 μ L区、100 μ L区及び130 μ L区について、各濃度のGABA標準液を各6反復で実施した(表1)。

測定には、マイクロプレートリーダー(Spark®, テカンジャパン製)、96穴平底マルチウェルプレート(FALCON353072, コーニングジャパン製)、測定キット付属の酵素試薬(試薬A液:L-グルタミン酸及びアスコルビン酸の除去、試薬B液:GABAトランスアミラーゼ、L-グルタミン酸オキシダーゼ、発色剤及びパーオキシダーゼ等)を用いた。分注には、マルチチャンネルピペット、シングルチャンネルピペット及び電動連続分注器(エッペンドルフ製)を用いた。なお、96穴平底マルチウェルプレートは2枚用意し、試料用プレートと測定用プレートとした。

試料用プレートにはGABA標準液を適量分注し、測定用プレートには試薬A液を表1の規定量を分注した。次に、試料用プレートのGABA標準液を測定用プレートに添加してピペッティングにより混合し、マイクロプレートリーダーで攪拌(10秒間、8の字、振幅2.5mm、回転数108rpm)後、30℃で10分間反応させた。試薬A液の反応後、すみやかに測定用プレートに試薬B液を表1の規定量を分注し、ピペッティングにより混合して、マイクロプレートリーダーで攪拌(10秒間、8の字、振幅2.5mm、回転数108rpm)後、1分ごとに15分後までの吸光度を測定した。吸光度測定は、測定波長555nm、温調30℃、フラ

ッシュ10回、ウェルの中心部の値を採用した。吸光度は、各測定値からGABA標準液0ppmの値を引いて補正した。GABA濃度は、補正した吸光度から検量線を作成して算出した。

表1 測定液量の検討

試験区	試料 (μ L)	試薬 ¹⁾		総量 (μ L)
		A液 (μ L)	B液 (μ L)	
130 μ L区	13	130	130	273
100 μ L区	10	100	100	210
50 μ L区	5	50	50	105
(参考) 測定キット	50	500	500	1,050

1)測定キット付属試薬

2 中玉トマト果汁を用いたGABA添加回収試験

マイクロプレートリーダー法における中玉トマト果汁のマトリックスの影響を確認するため、添加回収試験を実施した。中玉トマトは、AOI-PARC研究用温室(静岡県沼津市)において、高糖度・高機能性トマト養液栽培システム²⁾を用いて栽培し、2025年7月25日に赤熟期で収穫した果重39.0gの‘フルティカ’(タキイ種苗)1果を供試した。中玉トマトは、果皮表面を紙ワイパー(ケイドライ132-S, 日本製紙クレシア製)で拭き、ヘタを除いた後、果実を包丁で4等分し、マルチビーズショッカー(MB1200, 安井器械製)で破碎し(2500rpm, 15秒)、転倒混和のうえ速やかに15mLチューブに分注後、遠心分離をして(15310G, 10分, 4℃)、上清液を回収した。

測定試料は、上清液を10倍希釈してGABA非添加1点とGABA添加3点の計4濃度に調整し、各4反復を試験に供した。調整方法は、上清液100 μ Lに、前述1と同様の手順で調整したGABA標準液900 μ Lを添加し、GABA添加濃度が生鮮重当たり0, 9, 45, 90mg/100gF.W.となるようにした。

測定方法は、前述1と同様の手順で行い、試薬A液及び試薬B液は130 μ L、測定試料は13 μ Lとした。GABA濃度は、検量線用標準液(0~200ppm, 8点)による検量線に基づき算出し、その値を生鮮重当たりのGABA含量(mg/100gF.W.)に換算し、回収率を求めた。

3 測定キット法及びHPLC法との比較

マイクロプレートリーダー法と既存の測定法との相関関係を明らかにするため、測定キット法及びHPLC法で前述2の測定試料のGABA含量を測定し、マイクロプレートリーダー法での測定値と比較した。

測定キット法では、測定キット付属の試薬A液、試薬B液、校正用標準液、セル及び比色計を用いて測定マニユア

ルに準じて実施した。まず、試薬 A 液 500 μ L 及び測定試料 50 μ L をセルに分注し、10 分間反応後、試薬 B 液 500 μ L を加え、10 分間反応後に比色計により測定した。

HPLC 法では、測定試料を 0.45 μ m セルロースアセテートメンブレンフィルター(C045A025A 及び 43303010, アドバンテック東洋製)でろ過し、HPLC(LC-10AT, DGU-20A5 R, CTO-10Avp, RF-20A, SCL-10Avp, SIL-10AF, 島津製作所製)及びカラム(Ascentis Express C18(7.5cm $\times$ 4.6mm, 5 μ m), シグマアルドリッチ製)を用いて、Yamashita et al. の方法¹⁸⁾からグラジエント条件を一部改変し(移動相 B: 初期条件 5% $\rightarrow$ 5 $\sim$ 10%(5.5 分間) $\rightarrow$ 10 $\sim$ 18%(0.1 分間) $\rightarrow$ 18%(6.4 分間) $\rightarrow$ 18 $\sim$ 95%(0.1 分間) $\rightarrow$ 95%(1.9 分間) $\rightarrow$ 95 $\sim$ 5%(0.5 分間) $\rightarrow$ 5 $\sim$ 0%(0.5 分間)), OPA プレカラム誘導体化法により実施した。

HPLC 法及び測定キット法ともに測定結果を生鮮重に換算して GABA 含量(mg/100gF.W.)を求めた。

4 測定の所要時間及び試薬費用の比較

測定コストを比較するため、マイクロプレートリーダー法と測定キット法の測定時間と試薬費用を比較した。マイクロプレートリーダー法では、GABA 標準液 50 点と検量線用標準液 8 点を前述 2 の手順で測定したときの時間を計測した。一方、測定キット法では、GABA 標準液 50 点と校正液 2 点(超純水 1 点, キット付属の標準液 1 点)を前述 3 の手順で測定し、測定用セルを並べてから最後のセルの測定完了までの時間を計測した。

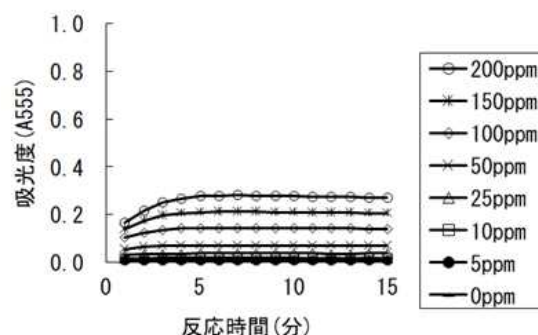
測定に必要な試薬費用は、各測定方法で使用した試薬使用量から試薬使用量の削減量を試算した。

Ⅲ 結果 及 び 考 察

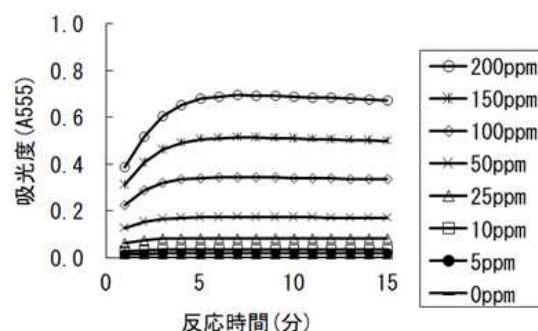
1 GABA 標準液の検量線評価

試薬 B 液を添加後の反応時間に伴う吸光度の変化を確認したところ、プラトーに達した時間は 50 μ L 区では 5 分、100 μ L 区では 7 分、130 μ L 区では 8 分であった(図 1)。いずれの試験区でも、プラトー到達時の GABA 濃度と、測定キットの反応時間である 10 分の GABA 濃度とに差はなかった(データ略)。

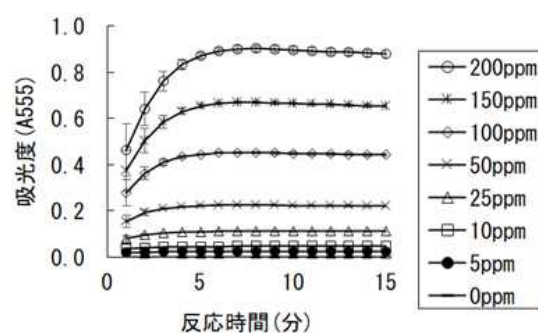
なお、130 μ L 区では全濃度範囲で気泡の発生がなく安定した測定が可能であったが、50 μ L 区及び 100 μ L 区では気泡の混入により測定値にばらつきが生じた。また、50 μ L 区では気泡がない場合も吸光度が安定しなかった。このため、50 μ L 区及び 100 μ L 区は、気泡がなく吸光度も安定していた 1 反復での結果を採用した。



(1) 50 μ L 区



(2) 100 μ L 区



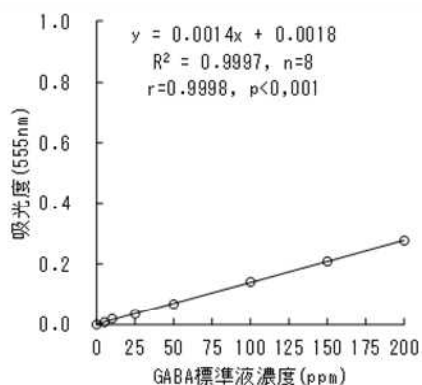
(3) 130 μ L 区

図 1 反応液量別の吸光度の時間的経過
(50 μ L 区, 100 μ L 区 : n=1 反復, 130 μ L 区 : n=6 反復)

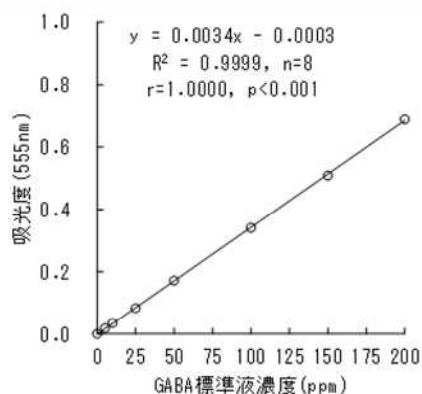
反応時間 10 分の吸光度と GABA 標準液濃度の相関関係は、50 μ L 区は $r=0.9998$, $p<0.001$, 100 μ L 区は $r=1.0000$, $p<0.001$, 130 μ L 区は $r=0.9998$, $p<0.001$ であり、有意な正の相関を示した。一次回帰式は、50 μ L 区は $y=0.0014x+0.0018$, $R^2=0.9997$, 100 μ L 区は $y=0.0034x-0.0003$, $R^2=0.9999$, 130 μ L 区は $y=0.0045x+0.0002$, $R^2=0.9996$ であり、いずれも高い直線性が認められた(図 2)。

これらのことから、マイクロプレートリーダー法は GABA 標準液を高い精度で測定することが可能であった。なお、分注操作性と測定値の安定性を考慮して、反応時間 1

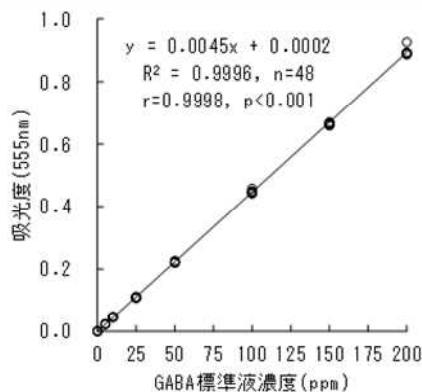
0分、測定液量130 μ Lの条件で行うことが適当であると考えられた。また、本手法を他の試料に適用する際は、試料の性状に応じて、気泡の影響がなく安定的に測定できる測定液量を事前に検討する必要がある。



(1)50 μ L区



(2)100 μ L区



(3)130 μ L区

図2 反応時間後10分のGABA標準液濃度と吸光度との関係

(50 μ L区, 100 μ L区: n=8, 130 μ L区: n=48)

2 中玉トマト果汁を用いたGABA添加回収試験

中玉トマト果汁へのGABA添加量とマイクロプレートリーダー法による測定値の関係は、相関係数 $r=0.9997$, $p<0.001$, 一次回帰式 $y=1.0011x+48.606$, 決定係数 $R^2=0.9994$ (図3)であり、有意な正の相関と高い直線性が認められた。

各GABA添加量における回収率は、添加量9mg/100gF.W.では理論値57.5mg/100mgF.W.に対して平均測定値58.2mg/100gF.W.で回収率108.0%, 添加量45mg/100gF.W.では理論値93.5mg/100mgF.W.に対して平均測定値92.8mg/100gF.W.で回収率98.4%, 添加量90mg/100gF.W.では理論値138.5mg/100gF.W.に対して平均測定値139.1mg/100mgF.W.で回収率100.6%であり、いずれのGABA添加量における変動係数CVは0.8%以下であった(表2)。

これらのことから、中玉トマト果汁において、マイクロプレートリーダー法はマトリックスの影響や測定間誤差が小さく、GABA含量の測定に適用できることが示唆された。

なお、測定キット法は、トマト以外にブロッコリー⁴⁾やヘチマ⁸⁾でGABA含量の測定が報告されていることから、これらの品目についてもマイクロプレートリーダー法の適用が可能であると考えられる。

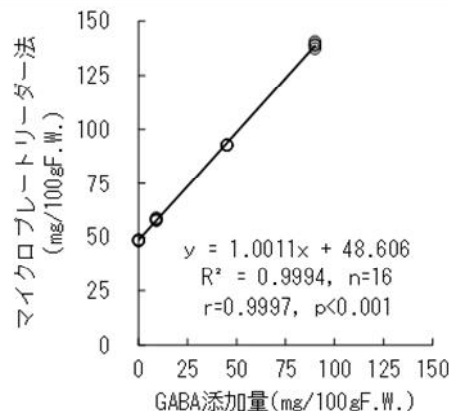


図3 中玉トマト果汁へのGABA添加量とマイクロプレートリーダー法による測定値との関係(n=16)

表2 中玉トマト果汁へのGABAの添加によるマイクロプレートリーダー法の測定値に及ぼす影響

GABA 添加量 (mg/100gF.W.)	平均測定値 ¹⁾ (mg/100gF.W.)	回収率 ²⁾ (%)	CV ³⁾ (%)
0	48.5 $\pm$ 0.2	—	0.5
9	58.2 $\pm$ 0.5	108.0	0.8
45	92.8 $\pm$ 0.1	98.4	0.1
90	139.1 $\pm$ 1.1	100.6	0.8

1) 4反復, 数値は平均値 $\pm$ 標準偏差。

2) 回収率(%)=(定量値-GABA非添加試料の定量値)/GABA添加量 $\times$ 100。

3) CV(%)=定量値の標準偏差/平均定量値。

3 測定キット法及び HPLC 法との比較

マイクロプレートリーダー法による測定値と、測定キット法及び HPLC 法による測定値とを比較した。測定キット法との比較では、相関係数 $r=0.9987$, $p<0.001$, 一次回帰式 $y=0.8779x+1.7536$, 決定係数 $R^2=0.9975$ であり(図 4), HPLC 法との比較では、相関係数 $r=0.9833$, $p<0.001$, 一次回帰式 $y=0.7274x+3.6087$, 決定係数 $R^2=0.9668$ と(図 5), いずれも有意な正の相関と高い直線性が認められた。このことから、マイクロプレートリーダー法は、中玉トマト果汁の GABA 含量測定において、従来の測定キット法や HPLC 法と同様に測定が可能であると考えられた。

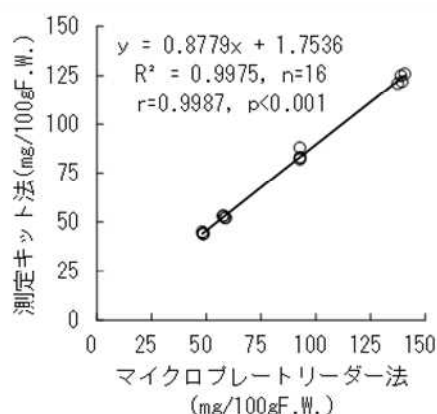


図4 中玉トマト果汁への GABA 添加におけるマイクロプレートリーダー法と測定キット法の測定値との関係 (n=16)

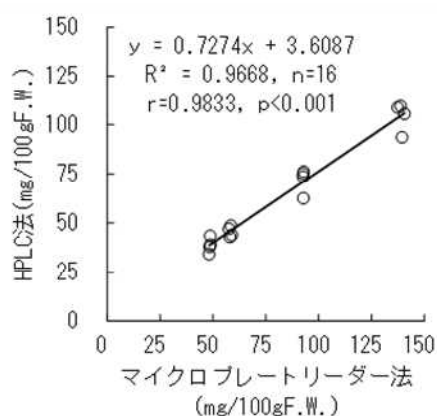


図5 中玉トマト果汁への GABA 添加におけるマイクロプレートリーダー法と HPLC 法の測定値の関係 (n=16)

4 測定の所要時間及び試薬費用の比較

測定に要した時間は、マイクロプレートリーダー法では 34 分、測定キット法では 48 分で、マイクロプレートリーダー法の方が 14 分短く、測定キット法から 29%短縮した。測定に用いた試薬費用は、マイクロプレートリーダー法では測定キット法と比較して 71%削減した。

これらのことから、マイクロプレートリーダー法は、中玉トマト果汁の GABA 含量測定が可能で、所要時間と試薬使用量を削減できる技術として有用な測定法であると考えられた。

IV 摘 要

本研究では、市販の酵素試薬とマイクロプレートを用いて、マイクロプレートリーダーによる GABA 含量の簡易測定法について検討した。その結果、GABA 標準液及び中玉トマト果汁を測定試料とした場合に、反応時間 10 分、測定液量 130 μ L の条件下で行うことで、高い精度での測定が可能であった。また、本手法は、既存の測定キット法や HPLC 法の測定値との高い相関関係が示唆され、測定コストは測定キット法と比べて測定時間を 29%短縮し、試薬費用を 71%削減することができた。

謝 辞

本研究の実施にあたり、測定装置の使用方法について助言をいただいた静岡県農林技術研究所の大場聖司氏、小杉徹氏、野村健太氏、また、試験に供した中玉トマトの栽培や測定作業に協力をいただいた静岡県農林技術研究所の山本満氏、室園幸子氏に感謝を申し上げる。

本研究は、静岡県先端農業プロジェクト「AOI プロジェクト」の一環で実施した。

引 用 文 献

- 1) 池ヶ谷篤, 豊泉友康, 大場聖司, 中畠輝子(2024): 生鮮食品の機能性表示について. 日本調理科学会誌 57, Vol.2, 146-149.
- 2) 大石直記(2025): 多様な栽培目標に対応できる植物重量給液制御システムの開発と実用化. 施設と園芸 No. 211(2025 秋), 8-13.
- 3) 金内誠, 宮澤拓巳, 津志田藤二郎: 酵素反応を利用した GABA(γ -アミノ酪酸)の測定法. 食品機能性評価マニュアル(IV), <https://www.fmric.or.jp/ffid/ffmanual/manual40110.pdf>(2025 年 8 月 31 日参照).

- 4) 日下部均(2021): アミノ酸測定に適した酵素の発見と測定キットの開発. 化学と生物 59, Vol.10, 520-526.
- 5) 小杉徹(2023): 温室メロンの新たな魅力〜「GABA」を中心に〜. 経済連情報, 6月号, 7-8
- 6) 静岡県農林技術研究所 2018 年度研究成果情報「温室メロンには機能性関与成分の GABA が安定的に含まれている」(2019): https://www.pref.shizuoka.jp/_res/projects/default_project/_page_001/058/826/06-melongaba.pdf(2025 年 8 月 31 日参照).
- 7) 圖師一文, 松添直隆, 吉田敏, 筑紫二郎(2005): 水ストレス下および塩ストレス下で栽培したトマトにおける果実内成分の比較. 植物環境工学, 17, Vol.3, 128-136.
- 8) 土田永渡, 前田剛希, 棚原尚哉, 澤井祐典, 高良健作, 和田浩二(2022): 酵素法を用いたヘチマの γ -アミノ酪酸(GABA)の簡易定量. 日食科工会誌 69, Vol.7, 361-367.
- 9) 山越純, 下條亮, 中川聡史, 泉井直子, 荻原俊男(2006): γ -アミノ酪酸(GABA)含有減塩しょうゆの長期摂取時の正常高値血圧者および軽症高血圧者に対する有効性および安全性の検討. 薬理と治療 Vol.34, 691-709.
- 10) 堀江健二, 渡部和哉, 坂下真耶, 山津敦史(2019): GABA の生産技術の確立と高機能性食品の市場開発ユニークな機能性食品素材 “GABA” はどのようにして生まれたか?. 化学と生物 57, Vol.4, 207-212.
- 11) 丸山浩治, 津志田藤二郎: 発芽玄米中の γ -アミノ酪酸(GABA)の分析. 食品機能性評価マニュアル(II), https://www.fmric.or.jp/ffd/ffmanual/100426_tsushida.pdf (2026 年 2 月 12 日参照).
- 12) 山本(前田)万里(2020): 5 年目を迎えた機能性表示食品制度と農林水産物での活用. Functional Food Research, 16, 11-20.
- 13) 吉橋忠, Varayanond, W., Tungtrakul, P. and Surojanametkul, V. (2008): 食品中の γ -アミノ酪酸(GABA)の簡易迅速定量法の開発. 国際農林水産業研究成果情報 (平成 19 年度), 31-32.
- 14) Nakamura, H., Takishima, T., Kometani, T. and Yokogoshi, H. (2009): Psychological stress-reducing effect of chocolate enriched with gamma-aminobutyric acid (GABA) in humans: assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin A. Int J Food Sci Nutr., 60, 106-113.
- 15) Saito, T., Matsukura, C., Sugiyama, M., Watahiki, A., Ohshima, I., Iijima, Y., Konishi, C., Fujii, T., Inai, S., Fukuda, N., Nishimura, S. and Ezura, H. (2008): Screening for γ -aminobutyric Acid (GABA)-rich Tomato Varieties. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 77, Vol.3, 242-250.
- 16) Tsukatani, T., Higuchi, T. and 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, Vol.540, 293-297.
- 17) Nishiyama, T., Sulistyaningdyah, WT., Ueda, K. and Kusakabe, H. (2020): GABA enzymatic assay kit. Biosci. Biotechnol. Biochem., 84, 118-125.
- 18) Yamashita, H., Uchida, T., Tanaka, Y., Katai, H., Nagan o, A.J., Morita, A. and Ikka, T. (2020): Genomic predictions and genome-wide association studies based on RAD-seq of quality-related metabolites for the genomics-assisted breeding of tea plants. Sci. Rep., 10, 17480.
- 19) 米中の γ -アミノ酪酸(GABA)の定量—高速液体クロマトグラフ法(JAS0032)(2025): https://www.aff.go.jp/j/jas/jas_standard/attach/pdf/index-394.pdf(2025 年 8 月 31 日参照).