

古代米の品種改良とデンプンの分子構造変化に関する研究

福森郁哉、三島隆

三重大学生物資源学部附属農場

Correlation between breed improvement of ancient rice and changing molecular structure of starch

Abstract

The rice is a one of most useful cereal food, and has tried to breed improvement. The rice that have new phenotype is necessary for a long time because of life cycle. And rice grains have many genotype and phenotype, so, we need to many labors to select the rice grain that have better phenotype. We try to solve this problem using much less sample volume. The molecules of rice starch was separated from proteins and lipids using alkaline solution, but they were damaged and lost the molecular information. We will plan to make the procedure that more mild treatment to solve starch granule and analysis by a half part of rice granule, and the other will using to plant cell culturing, at goal. And we compare to amylose content by this way and general method.

緒論

米は世界中で栽培されている重要な作物であり、その起原は熱帯アジアの湿地に分布する野生の植物である。最近では品種改良により低アミロース含有米のような食味改善された品種や、栄養強化のための高タンパク質米、また腎臓病患者の食事療法の用途に用いる低タンパク質米や米アレルギー患者のための低アレルゲン米のように様々な品種改良が行われている。

自然交配による品種改良は、様々な品種を交配し、栽培、収穫して得るため手間と時間がかかり、得られた種子は様々な遺伝形質を有すので、栽培し再度収穫するまで特性を明らかにできない。そこで、遺伝形質を素早く解析でき、さらに米そのものの特性を測定できる手法が必要となる。

米の特性を表す代表的成分の一つであるデンプンの分子構造の分析は、これまで除タンパク・脱脂処理した米粉を用いてきた。しかし、これらの処理は最低でも20gの米を必要とし、米を破碎する時に物理的な力や熱による影響を受け、デンプン粒を調製する時に長時間アルカリ溶液で処理するなど、デンプンの分子構造を損傷する可能性がある。

本研究では米粒をそのまま溶解して分析に用いることにより、少量のサンプルでデンプンの分子構造を明らかにすることを目的とし、究極の目的として米粒を半分に分け、胚のない方でデンプンの分子構造を解析し、胚のある方を組織培養に用いるという効率の良い品種改良系を確立することである。また、この方法で調製したデンプン溶液はタンパク質と脂質を含み、これらがデンプンの分子構造の分析結果に影響する可能性があるため、アミロース含量の測定で最も正確とされるヨウ素電流滴定の測定結果とこれらの分析結果を比較し、その関係を調べる。

材料と方法

材料 彩の国粳種生産組合から入手した収量の多いウルチ種のフクヒビキ、東北農業試験場から分与していただいた紫黒米モチ種の東北糯149号、フクヒビキを父とし東北糯149号を母とする三重大学附属農場で収穫された紫黒米ウルチ種の奥羽368号、フクヒビキを父とし紫黒米モチ種の東糯396を母とする彩の国粳種生産組合から入手した紫黒米モチ種の朝紫を用いた。また、対照として2000年および2001年9月に三重大学附属農場で収穫されたコシヒカリを用いた。系統樹を図1に示した。

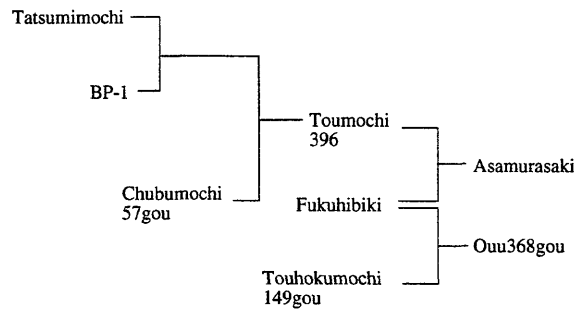


Figure1 Dendrogram of the rice using this experiment

米の大きさと重さの比較 米粒の長さ、幅、厚さをノギスを使って測定し、重さを精密天秤で測定した。この値から次式によって米粒の体積と密度を計算した。

$$\text{体積}(\text{mm}^3) = \frac{4}{3} \times (\text{長さ}(\text{mm}) \div 2) \times (\text{幅}(\text{mm}) \div 2) \times (\text{厚さ}(\text{mm}) \div 2) \times \pi$$

$$\text{密度}(\text{mg}/\text{mm}^3) = \text{重さ}(\text{mg}) \div \text{体積}(\text{mm}^3)$$

各品種で10粒ずつ測定し、平均及び標準誤差を計算した。

米粒からのデンプン溶液の調製 コシヒカリ2粒を、屈曲蓋付試験管に入れ、0.2~1.2N水酸化ナトリウム1.25mlを加え、4℃で10時間、12時間、15時間、18時間、48時間と処理時間を変え、スターラーで攪拌しながら又は攪拌無しでインキュベートした。これに蒸留水を3回に分けて加え、1N塩酸を加えて中和した。蒸留水と1N塩酸は合計で6.1mlになるようにした。中和後3%アジ化ナトリウム0.15mlと0.1M酢酸緩衝液(pH5.5) 7.5mlを加え、遠心分離(3,000rpm, 10min.)した。上清をとりフェノール硫酸法¹⁾で全糖量を、改良Park-Johnson法²⁾で還元糖量を測定した。

米デンプンの分子構造の比較 米2粒を溶解しやすいように2つに割って蓋付きの試験管に入れ、0.8N水酸化ナトリウム1.25mlを加えて4℃で12時間スターラーを用いて攪拌した。これに蒸留水5.1mlを3回に分けて加え、1N塩酸1mlを加えて中和した。3%アジ化ナトリウム0.15mlと0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)7.5mlを加え、遠心分離(3000rpm,10min.)して不溶物を除去した。除去後、上清をとり、これをデンプン溶液とした。これを10mlとり、Toyopearl HW-65F充填カラム(φ26×100mm)に供し、50mM塩化ナトリウムと0.02%アジ化ナトリウムを含む溶離液で溶出させた。各フラクションの全糖量をフェノール硫酸法で、還元糖量を改良Park-Johnson法で測定した。また、各フラクションの青価³⁾を測定した。

デンプン分子に含まれるA鎖、B鎖の分子量分布を調べるため、イソアミラーゼ (Isoamirase P (1,250,000u/g) Lot No.21001 林原製) 200mgを50mM酢酸緩衝液(pH5.5,0.03%アジ化ナトリウム)15mlに懸濁し、遠心分離(4℃, 5,000rpm,10min.)した。上清をとり、同様の操作で2回沈澱を懸濁し、遠心分離して上清をとった。この上清をイソアミラーゼ溶液とした。

上記のデンプン溶液13mlにイソアミラーゼ溶液0.1ml(約600mU)を加えて37℃に設定したウォーターバスで反応させた。24時間後、48時間後、72時間後に0.5mlサンプリングして全糖量と還元糖量を測定し、重合度の低下が見られなくなったところで100%枝切り処理が完了したとみなした。100%枝切り処理が完了したデンプン溶液を沸騰浴中で5分間加熱して酵素を失活させ、遠心分離(3,000rpm, 10min.)し、上清10mlをToyopearl HW-50S充填カラムに供した。各フラクションの全糖量、還元糖量を、青価を測定した。

青価の測定 試料溶液2.5mlより定法³⁾を用いて測定を行った。青価は次式によって計算した。

$$\text{青価} = \frac{680\text{nmでの吸光度}}{\text{全糖量}(\mu\text{g})} \times 120$$

米デンプンの調整 米20gよりアルカリ沈澱法⁹⁾を用いて調整した。うち2gをジメチルスルフォキシドを用いて脂質を抽出し、エタノール、ジエチルエーテルを用いて溶媒を取り除いた。これを乾燥させ、実験に用いた。

アミロース含量の測定 ウルチ種では100mg、モチ種では250mgの脱脂デンプンを50mlメスフラスコに入れ、99%エタノールで十分に湿らせてから1N水酸化カリウム25mlを加えて溶かし、蒸留水を加えて50mlにメスアップし、ヨウ素電流滴定法を用いて測定した。試料100mgに結合したヨウ素分子の量をヨウ素親和力とし、以下のように計算した。

$$\text{ヨウ素親和力 (mg I}_2\text{/試料100mg)} = \frac{0.00157\text{N}}{\text{ヨウ素酸カリウム(ml)}} \times 0.2 \times \frac{100}{\text{試料の全糖量(mg/10ml)}}$$

アミロースのヨウ素親和力を20としアミロース含量を以下のように計算した。

$$\text{アミロース含量(\%)} = \frac{\text{試料のヨウ素親和力}}{\text{アミロースのヨウ素親和力}} \times 100$$

結果と考察

米の形態の差異 米粒の長さ、幅、厚さ、体積、重さ、密度とその標準誤差を表1に示した。コシヒカリと比較すると、フクヒビキは体積と重さにおいて少し大きかった。東北糯149号は長さが長く、幅、体積、重さが小さかった。奥羽368号は長さ、体積、重さ、密度が大きかった。朝紫は密度が小さかった。奥羽368号及び親であるフクヒビキ、東北糯149号と比較したところ、奥羽368号は親の品種のどちらかに似た形質または両親の中間の形質になると推測したが、奥羽368号は長さ、体積、重さ、密度においてフクヒビキと東北糯149号より大きくなり、親子間での関係は見られなかった。また、モチ種とウルチ種の差異も見られなかった。

Table1 Comparison of size and weight of each rice grains

Cultivar	Length of a grain(mm) (±S.E.)	Width of a grain(mm) (±S.E.)	Thickness of a grain(mm) (±S.E.)	Volume of a grain(mm ³) (±S.E.)	Weight of a grain(mg) (±S.E.)	Density of a grain(mg/mm ³) (±S.E.)
Fukuhibiki	4.91 (±0.01)	2.92 (±0.02)	2.05 (±0.01)	15.4 (±0.1)	22.4 (±0.2)	1.45 (±0.01)
Touhokumochi 149gou	5.27 (±0.02)	2.58 (±0.01)	1.75 (±0.01)	12.5 (±0.1)	17.8 (±0.3)	1.42 (±0.01)
Ouu368gou	5.63 (±0.03)	2.89 (±0.01)	2.02 (±0.01)	17.3 (±0.1)	27.0 (±0.2)	1.56 (±0.01)
Asamurasaki	5.08 (±0.03)	2.75 (±0.01)	2.06 (±0.01)	15.1 (±0.2)	20.4 (±0.3)	1.35 (±0.01)
Koshihikari	4.96 (±0.02)	2.85 (±0.01)	1.95 (±0.01)	14.4 (±0.2)	20.4 (±0.2)	1.42 (±0.01)

米粒からのデンプン溶液調製時の最適条件検討 様々なアルカリ処理条件での全糖量と還元糖量を図2に示した。0.6N水酸化ナトリウムを用い、攪拌の有無と時間を変えてアルカリ処理したところ、攪拌したものは攪拌しなかったものより全糖量が多かったため、攪拌した方がデンプンの溶出量が多いと推察された。アルカリ処理時間は12時間のものは18時間のものより全糖量が多く、12時間以上アルカリ処理を行うとデンプンの分解が多くなると推察された。よって0.6N水酸化ナトリウムを用いてのアルカリ処理は12時間が最適であると推察された。

水酸化ナトリウム濃度を変えて、攪拌しながら12時間アルカリ処理したところ、全糖量は1N水酸化ナトリウムを用いたものが最も多かったが、還元糖量が0.8N水酸化ナトリウムを用いたものより少

なかった。これは、アルカリ溶液中ではデンプン分子の還元末端がフリーのアルデヒド基として比較的多く存在しており、それがデンプンの分子を攻撃することによりデンプン分子が壊れたためと推測した。よって2番目に全糖量が多い0.8N水酸化ナトリウムを用いたものが最適であると考えた。

0.8N水酸化ナトリウムを用いて攪拌しながら時間を変えてアルカリ処理を行ったところ、12時間処理したものが最も全糖量が多いため、これが最適であると推察された。よって、米粒からデンプンを溶解する最適条件を0.8N水酸化ナトリウム1.25mlを加えて4℃で12時間スターラーを用いて攪拌させると定めた。

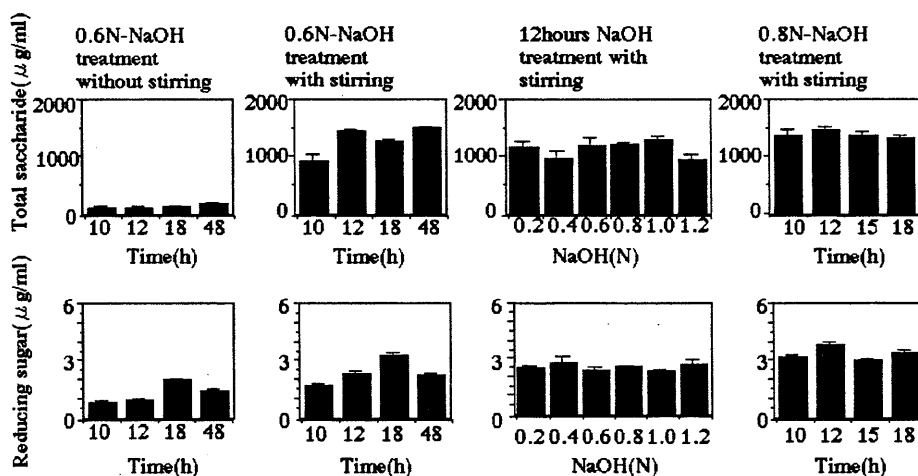


Figure2 Effect of total saccharide and reducing sugar volume with various treatment for rice grain

米デンプンの分子構造の比較 米デンプン溶液のToyopearl HW-65F充填カラムでの溶出パターンを図3に示した。溶出パターンには大きく3つのピークが見られた。ピークに従ってフラクションナンバー21~60をfr.1、フラクションナンバー61~70をfr.2、フラクションナンバー71~100をfr.3とした。fr.1は全ての米の品種に存在し、全体の糖量に対する糖量の割合が大きく、高分子側に存在し、青価が低いことからアミロペクチン画分であると考えた。fr.2は青価が高く、モチ種でピークが見られなかったことからアミロース画分であると考えた。fr.3は低分子側に存在し、精米度合の高いコシヒカリでピークが見られなかったことから米粒表面に含まれる少糖類を含む画分であると考えた。これらのフラクションの全体の糖量に対する糖量の比率(TSR)、フラクションの青価、全体の青価の合計に対するフラクションの青価の合計(比青価)を表2に示した。ウルチ種のフクヒビキ、奥羽368号、コシヒカリのTSRを比較すると、奥羽368号のfr.1が小さく、fr.2、fr.3が大きかった。また、奥羽368号のfr.2の青価は他のものより小さかった。モチ種の東北糯149号と朝紫は全体的に近い値になった。奥羽368号とその親の品種のフクヒビキ、東北糯149号を比較すると、奥羽368号のfr.2の青価においてフクヒビキと東北糯149号の間の値となった。

イソアミラーゼで枝切り処理した米デンプン溶液のToyopearl HW-50S充填カラムでの溶出パターンを図4に示した。溶出パターンには大きく4つのピークが見られた。ピークに従ってフラクションナンバー21~29をfr.1、フラクションナンバー30~40をfr.2、フラクションナンバー41~60をfr.3、フラクションナンバー61~70をfr.4とした。fr.1は青価が高く、モチ種でピークが見られなかったことからアミロース画分であると考えた。fr.2は全ての米の品種に存在し、重合度が30以上であり、青価がfr.1の次に高かったことから、アミロペクチン長鎖の画分であると考えた。fr.3は全ての米の品種に存在し、重合度が30以下であり、青価が低かったことからアミロペクチン短鎖の画分であると考えた。fr.4は低分子側に存在し、精米度合の高いコシヒカリでピークが見られなかったことから米粒

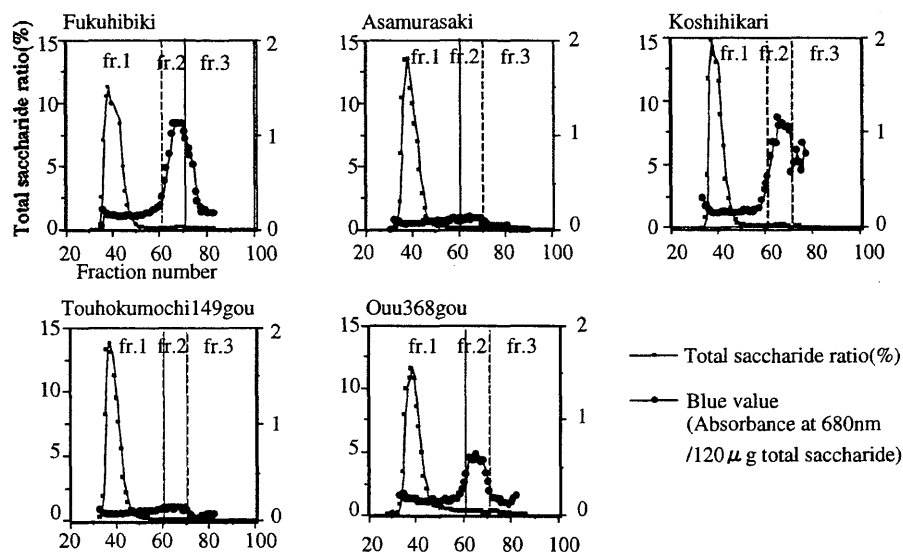


Figure3 GPC profiles of rice starch on Toyopearl HW-65F

Table2 Composition of each fraction of rice starch on Toyopearl HW-65F

		fr.1 (F.N.21~60)	fr.2 (F.N.61~70)	fr.3 (F.N.71~100)
Fukuhibiki	Total saccharide ratio(%)	96	2	2
	Blue value ¹⁾	0.2	1.0	0.4
	Relative blue value(%) ²⁾	23	48	29
Touhokumochi 149gou	Total saccharide ratio(%)	97	1	2
	Blue value	0.1	0.1	0.1
	Relative blue value(%)	55	29	16
Ouu368gou	Total saccharide ratio(%)	92	4	4
	Blue value	0.2	0.6	0.1
	Relative blue value(%)	40	43	16
Asamurasaki	Total saccharide ratio(%)	97	1	2
	Blue value	0.1	0.1	0.0
	Relative blue value(%)	58	29	13
Koshihikari	Total saccharide ratio(%)	97	2	0
	Blue value	0.2	1.0	0.6
	Relative blue value(%)	28	40	25

¹⁾ Absorbance at 680nm/120 μg total saccharide

²⁾ Total blue value of fraction/total blue value x100

表面に含まれる少糖類を含む画分であると考えた。これらのフラクションのTSR、フラクションの青価、比青価を表3に示した。ウルチ種であるフクヒビキ、奥羽368号、コシヒカリを比較すると、フクヒビキと奥羽368号は全体的に近い値であったが、コシヒカリはTSRにおいてフクヒビキ、奥羽368号に対してfr.2が小さく、fr.3が大きく、モチ種の東北糯149号に近い値であった。モチ種である東北糯149号と朝紫を比較すると、TSRにおいて朝紫の方がfr.2が大きくfr.3が小さかった。奥羽368号とその親の品種のフクヒビキ、東北糯149号を比較すると、奥羽368号はフクヒビキと全体的に近い値であり、東北糯149号とは近い値でなかった。

ヨウ素電流滴定によるアミロース含量の測定 アミロース含量は米の食味に大きく影響する因子の1つである。本研究ではヨウ素電流滴定によって測定されたアミロース含量と、GPCのアミロース画分であると考えられるデンプン溶液のToyopearl HW-65F充填カラムのfr.2と枝切りしたデンプン溶液のToyopearl HW-50S充填カラムでのfr.1のTSR、青価、比青価を比較し、その関係を調べた。

ウルチ米におけるヨウ素電流滴定でのアミロース含量は13~17%であったのに対し、GPCのアミロース画分であると考えられるフラクションのTSRは全体の2~4%であった。ヨウ素電流滴定でのアミロース含量は次の式で計算した。

$$\text{アミロース含量(\%)} = \frac{\text{試料のヨウ素親和力}}{\text{アミロースのヨウ素親和力}} \times 100$$

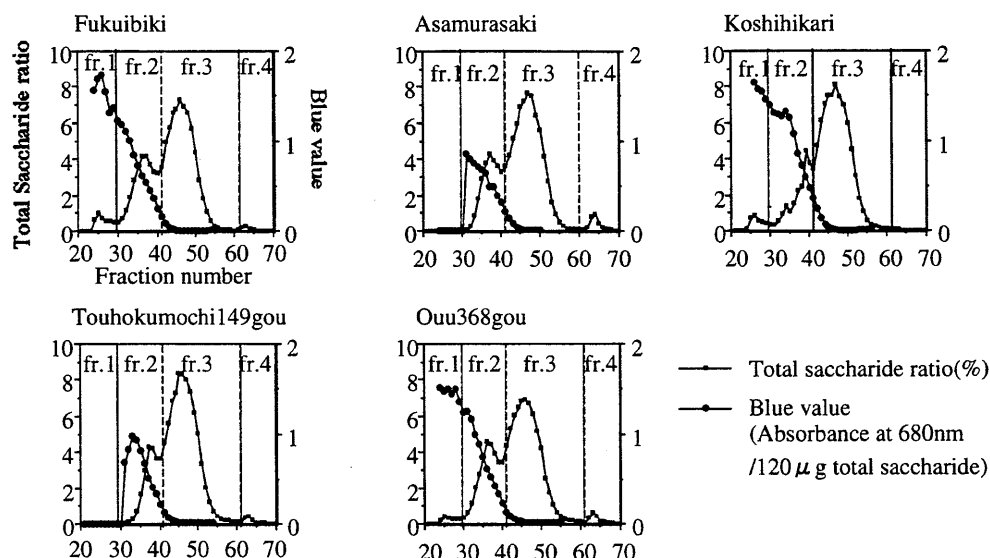


Figure4 GPC profiles of completely debranched rice starch on Toyoperl HW-50S

Table3 Composition of each fraction of rice starch on Toyopearl HW-50S

		fr.1 (F.N.21~29)	fr.2 (F.N.30~40)	fr.3 (F.N.41~60)	fr.4 (F.N.61~70)
Fukuhibiki	Total saccharide ratio(%)	4	29	66	1
	Blue value ¹⁾	1.6	0.6	0.0	0.0
	Relative blue value(%) ²⁾	52	46	2	0
Touhokumochi 149gou	Total saccharide ratio(%)	0	22	77	1
	Blue value	0.0	0.5	0.0	0.0
	Relative blue value(%)	0	95	5	0
Ouu368gou	Total saccharide ratio(%)	2	31	66	2
	Blue value	1.5	0.6	0.0	0.0
	Relative blue value(%)	50	48	3	0
Asamurasaki	Total saccharide ratio(%)	1	25	71	3
	Blue value	0.0	0.5	0.0	0.0
	Relative blue value(%)	0	92	9	0
Koshihikari	Total saccharide ratio(%)	3	19	77	0
	Blue value	1.1	0.8	0.1	0.0
	Relative blue value(%)	33	62	5	0

¹⁾ Absorbance at 680nm/120 μg total saccharide

²⁾ Total blue value of fraction/total blue value x100

アミロースのヨウ素親和力はほぼ20であるためこの値を20と定めて計算した。この計算方法ではアミロペクチンのヨウ素親和力を考慮せずに計算している。実際バレイショのアミロペクチンのヨウ素親和力は0.4と低い。しかし、インディカ米はアミロペクチンのヨウ素親和力が1.3~2.5と高く、アミロース含量に大きく影響するという報告がある⁴⁾。アミロペクチンのヨウ素親和力を考慮するとアミロース含量は以下のように計算される。

$$\text{アミロース含量(\%)} = \frac{\text{試料のヨウ素親和力} - \text{アミロペクチンのヨウ素親和力}}{\text{アミロースのヨウ素親和力} - \text{アミロペクチンのヨウ素親和力}} \times 100$$

アミロペクチンのヨウ素親和力を考慮せずに計算すると、ウルチ米のアミロース含量はジャポニカ米で18~22%、インディカ米では30~32%であるが、アミロペクチンのヨウ素親和力を考慮して計算すると、ウルチ米のアミロース含量はジャポニカ米、インディカ米ともに15.5~18.5%であるとされている。このようにインディカ米においてはアミロペクチンのヨウ素親和力を考慮せずに計算したときに対し、アミロペクチンのヨウ素親和力を考慮して計算したときではアミロース含量が6.9~10.9%減少する。また、ジャポニカ米でも同様に1.8~3.8%減少するが、インディカ米ほど大きな差はない。

一方、本研究のGPCでのアミロース画分であると考えられるフラクションのTSRは2~4%となり、

ヨウ素電流滴定でのアミロース含量よりはるかに低い値となった。この原因として、GPCに供したデンプン溶液に含まれる脂質が影響したと考えられる。高級脂肪酸はアミロースと複合体をつくり、遠心分離によって沈澱することが知られている⁹⁾。よってデンプン溶液中のアミロースは脂肪酸と複合体をつくって沈澱したためこのフラクションのTSRが低い値となったと考えられる。また、アミロースが何らかの力でToyopearl HW-65FおよびHW-50Sに吸着された可能性も考えられる。

本研究ではヨウ素電流滴定によって測定されたアミロース含量と、GPCのアミロース画分であると考えられるデンプン溶液のToyopearl HW-65F充填カラムでのfr.2と枝切りしたデンプン溶液のToyopearl HW-50S充填カラムでのfr.1のTSR、青価、比青価を比較し、その関係を調べた。ヨウ素電流滴定のアミロース含量は、Toyopearl HW-50S充填カラムでのfr.1の青価、比青価と同じ傾向が見られた。また、Toyopearl HW-50S充填カラムでのfr.1とfr.2のTSRの合計がヨウ素電流滴定のアミロース含量と同じ傾向であった。それに対し、Toyopearl HW-65F充填カラムでのfr.2はアミロース含量と相関性が見られなかった。このフラクションはモチ種においてもある程度の比青価を示したため、アミロペクチンがこのフラクションに含まれると考えた。

本研究では1つの品種につき米粒4粒という少量のサンプル量でアミロース含量に関する情報を得る系を確立するための基礎的なデータを得ることができた。今後、米粒半分というさらに少量のサンプル量でデンプン分子の構造が解析できるように実験系の改良を行うことが課題である。

摘要

本研究では、東北糯149号、フクヒビキ、奥羽368号、朝紫、コシヒカリを用いて米粒の形態的特性および米粒2粒からのデンプン分子構造の解明を試みた。形態的特性やデンプン分子量分布には、親間の中間の形質を示すものが見られた。アミロースに関しては、定法と比較してGPC法では低い値を示すが、似た傾向を示した。

謝辞

本研究を行うにあたり貴重なサンプルを分与していただいた三重大学附属農場の田代亨先生に深く感謝いたします。

参考文献

- 1)二國二郎：澱粉科学ハンドブック 189-190 (1977)
- 2)中村道徳、貝沼圭二：澱粉関連糖質実験法 125 (1986)
- 3)中村道徳、貝沼圭二：澱粉関連糖質実験法 90-93 (1986)
- 4)Y. Takeda, S. Hizukuri : Carbohydrate Research 168 79-88 (1987)
- 5)二國二郎：澱粉科学ハンドブック 171 (1977)