

タンパク質組成変異米及び胚乳白濁変異米の
成分・プロテインボディ構造・加工特性に関する研究

芦田 かなえ

2011年7月

目次

略語一覧	(iii)
序論	1
第1部 タンパク質組成変異米の品質評価	4
緒言	4
第1章 タンパク質組成変異米の遊離アミノ酸含量	6
1-1-1. はじめに	6
1-1-2. 材料と方法	6
1-1-3. 結果	8
1-1-4. 考察	11
1-1-5. 図表	13
第2章 タンパク質組成変異米のプロテインボディ構造	18
1-2-1. はじめに	18
1-2-2. 材料と方法	18
1-2-3. 結果	20
1-2-4. 考察	23
1-2-5. 図表	25
結語	28
第2部 乳白変異米等の米粉としての有効利用	29
緒言	29
第1章 胚乳白濁変異米の製粉特性	31
2-1-1. はじめに	31
2-1-2. 材料と方法	31
2-1-3. 結果	33
2-1-4. 考察	39
2-1-5. 図表	41

第2章 乳白変異米の米粉としての加工適性評価.....	50
2-2-1. はじめに.....	50
2-2-2. 材料と方法.....	51
2-2-3. 結果.....	53
2-2-4. 考察.....	58
2-2-5. 図表.....	61
結語	68
総合考察	69
要旨	76
謝辞	80
参考文献	81
報文目録	appendix I
参考論文目録	appendix II

略語一覽

CBB	Coomassie Brilliant Blue
DAF	day after flowering
EMS	ethyl methanesulfonate
ER	endoplasmic reticulum
<i>esp2</i>	<i>endosperm storage protein mutant 2</i>
<i>flo</i>	<i>floury endosperm mutant</i>
γ -ABA	γ -amino-n-butyric acid
<i>glb1</i>	<i>α-globulin deficient mutant</i>
<i>glup3</i>	<i>glutelin precursor mutant 3</i>
HI	hardness index
<i>Lgc1</i>	<i>low glutelin content 1</i>
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PB	protein body
PB-I	type I protein body
PB-II	type II protein body
PDI	protein disulfide isomerase
PPDK	pyruvate orthophosphate dikinase
RVA	rapid visco analyser
RVU	rapid visco units
SDS	sodium dodecyl sulphate
SEM	scanning electron microscopy
SKCS	single kernel characterization system
SLV	specific loaf volume
TEM	transmission electron microscopy
Q ₃ (30)	cumulative distribution at 30 μ m of particle size distribution
VPE	vacuolar processing enzyme

序論

イネ (*Oryza sativa* L.) はイネ科イネ属の1年生草本であり、アジア、アフリカ、南アメリカなど世界各地の水田及び畑で広く栽培されている。その耕地面積は世界で約1億7千万haあり、生産量は年間4億t以上(精米ベース)である(農林水産省, 2009)。世界生産量の7割以上が中国、インド、インドネシア、バングラデシュ、ベトナム、タイ等の東南アジア地域で生産されている。米は小麦、トウモロコシと並ぶ世界3大穀物で、世界人口の過半数の人々の主食となっている。

米の主要成分は澱粉で、精白米の70~80%(生鮮重)を占める。澱粉は、グルコース単位が直鎖状に α -1,4結合で重合したアミロースと、 α -1,6結合による分岐を持つアミロペクチンによって構成されている。米はアミロース含量によってウルチとモチとに分けられるが、モチ米の澱粉はほぼアミロペクチンのみから成る一方、ウルチ米の澱粉はアミロースとアミロペクチンの両方から構成されている。一般に、アミロース含量の低い米は炊飯した際に軟らかくて粘りの強い、もちもちとした食感の飯になり、逆にアミロース含量の高い米は硬く粘りの弱い、パサパサとした食感の飯になる。日本で主食用として消費されている米はウルチ米で、そのアミロース含量は15~20%程度である(奥野, 1995)。世界の米をみると、アミロース含量の変動はより大きく、アミロース含量30%以上の米もある。

収穫された籾は、籾摺りによって籾殻を取り除いて玄米にした後、90%程度まで搗精して糠を取り除いて精米にされる。精米は主に炊飯して粒の状態でもち米として食べられる。また、精米は製粉され、麺や菓子等に加工される。日本では、ウルチ米を製粉したものは「上新粉」、「上用粉」と呼ばれ、団子や柏餅、ういろ等加工される。モチ米を製粉したものは「白玉粉」、「もち粉」と呼ばれ、白玉団子や求肥、大福餅等に加工される(奥座ら, 2008)。上新粉は、ウルチ米の精米を水洗いし、水を切った後にロール製粉によって製造される。上用粉は、上新粉と同様に作られるが、ロール製粉ではなく胴搗製粉によって製造される。白玉粉は、モチ米の精米を洗米し、水に浸して水挽き製粉した後、乾燥させて製造される(町田, 1999; 全国穀類工業共同組合, <http://www.komeko.net/whats/make.html>)。また、1990年代に新潟県で開発された新しい製粉技術によって、小麦粉並みに粒子径が細かく、かつ損傷の少ない米粉が製造できるようになり、米粉が洋菓子やパン等に加工されるようになった。この新しい製粉技術では、精米をペクチナーゼで処理して軟化した後に、湿った状態で気流粉碎する(宋戸・江川, 1992)。

米は日本では古くから主食として生産・消費されている。しかし、生活様式の変化、食の多様化や外食・中食の増加に伴い、その消費量は減少し続けている。米の一人あたり年間消費量は、平成 21 年度には 58.5 kg となっており、最も多かった昭和 40 年度の約半分にまで落ち込んでいる（農林水産省，2010a）。米の消費量が減少している代わりに、小麦や油脂類、畜産物からの熱量摂取は増加している。消費量の増加し続けている小麦や油脂、畜産物はその大半が外国からの輸入に頼っている。平成 21 年度の小麦の自給率はカロリーベースで 9%、油脂類は 3%、畜産物は 17%（輸入飼料による生産を除く）である。一方、米の自給率は 96%（カロリーベース，平成 21 年度）であり、米は日本で自給率が最も高い農産物となっている。平成 21 年度の日本の総合食料自給率は 40%（カロリーベース）で、先進国の中で最低水準である。世界の食料事情をみると、特定の国に農産物の生産・輸出が偏っていることから天候不順等の影響が出やすく、また、新興国における需要が高まっている等、需要面と供給面で様々な不安要因がある。このような状況の中、今後特に需給が逼迫すると予想される穀物を中心として、食糧自給率の向上を目指すことが課題となっている。そのために、外食・中食産業に対応した米や、飼料用米、米粉用米等の利用を拡大し、水田の有効利用を進めることが必要とされている（農林水産省，2010b）。主食用米以外の米の利用を拡大するためには、新しい用途に対応した特性を持つ品種の開発と普及が必要である。

加工・業務用米や飼料用米、米粉用米には、これまで栽培されてきた主食用の米とは異なる性質が求められる。新しい特徴を持つ米は新形質米と呼ばれ、その多くは外国稲との交配や突然変異の導入によって育成される。新形質米には、低アミロース米、高アミロース米、多収穫米、タンパク質組成変異米、有色素米、巨大胚米、澱粉変異米、香り米などがある。例えば、低アミロース米は冷めても粘りが強く、チルド米飯やおにぎり等の加工に使われ、高アミロース米は粘りが弱いため、チャーハンや米麺への加工に使われる。多収穫米は家畜の飼料として利用される（農業・食品産業技術総合研究機構，2009）。しかし、新形質米の加工適性や成分特性については、特徴ある形質以外に不明な部分が多い。したがって、突然変異の導入や外国稲からの遺伝子導入によって育成された新形質米には、特徴ある形質に付随して、様々な形質が導入されている可能性が高い。また、新形質米の育成は行われているものの、その加工適性について十分な試験はなされておらず、特に、遺伝背景を同一とする試験材料で加工特性の比較を行った事例がほとんどない。新形質米の実用面を考えると、従来の品種との比較を行えば良いが、導入した突然変異遺伝子や外国

稲の遺伝子を新しい品種育成に利用していくためには、遺伝背景の近い材料で比較を行うことで、遺伝子の効果を明らかにする必要がある。このように、新形質米の利用を拡大するためには、注目されている特性以外の成分特性や加工特性を詳細に解析し、遺伝背景の近い親系統と詳細に比較して評価する必要がある。そこで、本研究では、一般栽培品種への突然変異の導入によって育成された新形質米を材料として、その成分特性と加工特性の評価を行うこととした。

第 1 部「タンパク質組成変異米の品質評価」では、タンパク質組成変異米の成分特性を分析し、遊離アミノ酸含量を明らかにするとともに、タンパク質顆粒構造を明らかにした。タンパク質組成変異米は、消化酵素によって分解されにくいタンパク質顆粒を構成するプロラミンを増やした系統で、低タンパク質食としての利用が期待されているが、その成分特性や消化性に関わるタンパク質顆粒構造等は明らかでなかった。化学分析によってタンパク質組成変異米における主要成分含量を定量して親系統と比較するとともに、透過型電子顕微鏡観察によって消化されにくいとされるタンパク質顆粒の形態を解析した。

第 2 部「乳白変異米等の米粉としての有効利用」では、胚乳白濁変異米を材料として、その製粉特性と米粉パンへの加工適性を評価した。胚乳白濁変異系統は粉質米とも呼ばれ、粉への加工に向いていると考えられてきたが、米粉への加工適性は調べられてこなかった。そこで、胚乳白濁変異系統を粉碎して得られる米粉の特性を親系統と比較するとともに、市販の米粉用製粉機を用いて米粉を調製し、米粉パンを焼成して加工適性を評価した。

第 1 部 タンパク質組成変異米の品質評価

緒言

米は世界で最も重要な穀物の一つであり、世界人口の約半数が米を主食としている。米の主な成分は澱粉である。米のタンパク質含量は約 7% (w/w) で澱粉の次に多く含まれるが、他の穀物と比べるとその含量は低い (Shih, 2004)。しかし、必須アミノ酸の含量が多いため米を主食とする人の重要なタンパク質供給源となっている。

米の貯蔵タンパク質は、水可溶性のアルブミン、塩可溶性のグロブリン、アルコール可溶性のプロラミン、希酸または希アルカリ可溶性のグルテリンに分類される。これらの貯蔵タンパク質は、プロテインボディ (PB) と呼ばれる特別な細胞小器官に蓄積される。透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察により、米の胚乳には形態的に異なる 2 つのタイプの PB が存在することが報告されている。一つは、タイプ I の PB (PB-I) と呼ばれ、層状構造を持つ直径 1~2 μm の球状の PB である。もう一つは、タイプ II の PB (PB-II) と呼ばれ、四酸化オスミウムにより濃く均一に染色される結晶性の PB で、直径 2~4 μm の不定形な形をとる (Bechtel and Pomeranz, 1978; Tanaka *et al.*, 1980)。PB-I は粗面小胞体で形成される一方、PB-II はゴルジ体経由でタンパク質を蓄積する液胞由来の小器官である (Bechtel and Juliano, 1980)。精米に含まれるタンパク質の 20% を占める PB-I は主にプロラミンを蓄積する一方、タンパク質の 60% を占める PB-II には主にグルテリンとグロブリンが蓄積される (Ogawa *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1980; Yamagata *et al.*, 1982)。ヒトは米のタンパク質を完全に消化できない (Tanaka *et al.*, 1975)。形態学的な研究により、単胃動物の糞便中に見つかる米の未消化残物と PB-I は同一のものであることが示唆されている (Barber *et al.*, 1998)。

米のタンパク質の消化性を向上もしくは低下させるため、あるいは、米に新しい加工特性を付与するために、突然変異を導入することでタンパク質組成を改変させることができる。SDS-PAGE はタンパク質組成変異系統を選抜するための一般的な手法となっており、多くの貯蔵タンパク質組成を改変させた系統が育成されている (Kumamaru *et al.*, 1988; Iida *et al.*, 1993, 1997, 1998)。例えば、一般的なウルチ米品種である「ニホンマサリ」に γ 線照射することで得られた低グルテリン含量かつ高プロラミン含量の変異体である「NM67」に、ニホンマサリを戻し交配することによって「LGC1」が育成された (Iida *et al.*, 1993)。グルテリン遺伝子は多重遺伝子であるが、LGC1 の形質を付与する優性突然変異遺伝子 *Lgc1* は、

逆方向反復配列を形成する *GluB4* と *GluB5* という非常に高い相同性を示す二つのグルテリン遺伝子の間の領域に 3.5 kb の欠失がある。この *GluB4* と Δ *GluB5* の逆方向反復配列から二重鎖 RNA 領域を持つヘアピン RNA が転写され、RNAi を引き起こしてグルテリン多重遺伝子の発現を抑制している (Kusaba *et al.*, 2003)。また、LGC1 でプロラミン含量が高まるのは、グルテリン含量が減ったことの補償作用によると考えられている (Kusaba *et al.*, 2003)。「K×433」は、「コシヒカリ」に γ 線照射して得られた 26 kDa グロブリン欠失変異体「89WPKG30-433」にコシヒカリを戻し交配して育成された系統である (Iida *et al.*, 1998)。この形質は単一の劣性遺伝子 *gbl1* に支配され、*gbl1* 遺伝子は 26 kDa グロブリンの構造遺伝子を含む領域における 62.8 kb の欠失に由来すると報告されている (Morita *et al.*, 2009)。LGC1 と 89WPKG30-433 を交配して育成された、低グルテリン含量、26 kDa グロブリン欠失、高プロラミン含量の品種「LGC 潤」も育成されている (Nishimura *et al.*, 2005)。

上述した系統はいずれも、PB-II を構成するタンパク質 (グルテリン及びグロブリン) を減少させ、逆に難消化性の PB-I を構成するタンパク質 (プロラミン) を増加させた系統であり、慢性腎臓病患者の食事療法において実施される低タンパク質食への利用が期待される (Iida *et al.*, 1993)。日本の成人人口における慢性腎臓病患者数は約 1,330 万人 (成人人口の 12.9%) と推計されている。慢性腎臓病が進行した末期腎不全患者数は日本でも世界中においても年々増加し続けており、その数は 2010 年には世界で 210 万人になると言われている (日本腎臓学会, 2009)。タンパク質の摂取制限は、慢性腎臓病の進行を抑制すると考えられており、食事全体のアミノ酸バランスが良い動物性食品を主なタンパク質摂取源とし、主食類 (米飯, パン, 麺, 等) からのタンパク質摂取をできるだけ減らすことが必要となる (日本腎臓学会, 2009)。

一方、低タンパク質食としての利用が期待されるタンパク質突然変異米におけるタンパク質組成以外の成分特性や、消化性に影響すると考えられる PB の構造については明らかでない。そこで、第 1 部では、これら PB-II に関するタンパク質組成変異系統における成分特性とプロテインボディ構造について解析した。タンパク質組成変異系統が、これまでにならぬ成分特性や構造を持つとすれば、新たな利用方法の開発につながると期待される。

第 1 章 タンパク質組成変異米の遊離アミノ酸含量

1-1-1. はじめに

タンパク質組成を改変したイネ突然変異系統が育成されているが、他の穀物においてもタンパク質組成を改変した系統が多数育成されている。ダイズでは、主要なタンパク質であるグリシニンと β -コングリシニンの欠失系統を集積した「QF2」系統が育成されており、その子実中には高濃度の遊離アミノ酸が蓄積されることが知られている (Takahashi *et al.*, 2003)。QF2 の遊離アミノ酸含量は、普通のダイズ品種と比較して 3~8 倍高く、特にアルギニンを多く蓄積する。この遊離アミノ酸含量の増加は、グリシニンと β -コングリシニン含量の低下の補償作用によると考えられている (Takahashi *et al.*, 2003)。トウモロコシでは、リジン含量を向上させた *opaque-2* 変異体が育成されている。この *opaque-2* 変異体の胚乳では、貯蔵タンパク質のうち、リジンを含まないゼインタンパク質の生合成が抑制され、リジンを含むタンパク質の生合成が促進されていると考えられている (Moro *et al.*, 1996)。*Opaque-2* 遺伝子は、ゼインタンパク質のプロモーター領域に結合するロイシンジッパー型の転写活性化因子をコードすると報告されている (Schmidt *et al.*, 1990)。また、*opaque-2* 変異体は、種子中の遊離アミノ酸含量が増加する (Mirsa *et al.*, 1975)。*opaque-2* 変異体の胚乳では、アミノ酸や炭水化物の代謝の変化が生じており、この代謝の変化が遊離アミノ酸の過剰生産と蓄積を引き起こす (Wang and Larkins, 2001)。

ダイズやトウモロコシの知見から、イネにおいても貯蔵タンパク質の改変がアミノ酸や炭水化物の代謝に影響し、種子成分含量に何らかの影響を及ぼす可能性が高いと考えられるが、そのことを明確に示した報告はない。そこで、本研究では、タンパク質組成変異系統とタンパク質組成変異系統を集積させた系統を材料として、種子の主要成分である澱粉含量とタンパク質含量及び遊離アミノ酸含量を解析した。

1-1-2. 材料と方法

材料

タンパク質組成変異米 4 系統 (LGC1, K \times 433, LGC潤, QA28) とその親系統 (コシヒカリまたはニホンマサリ) を材料とした。LGC1 は、ニホンマサリ由来の低グルテリン変異体

である NM67 にニホンマサリを戻し交配して得られた系統である (Iida *et al.*, 1993). K×433 は、コシヒカリ由来の 26 kDa グロブリン欠失系統変異体である 89WPKG30-433 にコシヒカリを戻し交配した系統である (Iida *et al.*, 1998). LGC 潤は、低グルテリン変異体と 26 kDa グロブリン欠失変異体を交配して得られた二重変異体である (Nishimura *et al.*, 2005). QA28 は低グルテリン変異体と 26 kDa グロブリン欠失変異体, グルテリン a-2 サブユニット欠失変異体, グルテリン a-3 サブユニット欠失変異体を交配して得られた四重変異体である. 各系統の系譜を図 1-1-1 に示す. これらの系統を, 近畿中国四国農業研究センター (広島県福山市) の水田圃場で 2004 年度に栽培し, 3 株ずつ収穫した.

タンパク質組成の解析

タンパク質組成は Iida *et al.* (1993) の方法を改良して分析した. リードペンチを用いて玄米 1 粒を潰し, 550 μ l の SDS-urea 液 (8% 尿素, 4% SDS, 5% 2-メルカプトエタノール, 20% グリセロール, 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8)) に懸濁して 30°C 下で 16 時間インキュベートした. この懸濁液を 7,000 \times g で 1 分間遠心分離し, 上清 3.5 μ l を 15%ポリアクリルアミドゲルにアプライして SDS-PAGE を行った. 電気泳動後, ゲルを Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 液で染色した.

窒素含量の定量

超遠心ミル (Model ZM1; Retsch GmbH and Co., Germany) に 0.5 mm スクリーンを装着して玄米を粉碎し, 米粉サンプルを得た. 米粉中の窒素含量を, デュマの燃焼法 (AOAC 968.06, 1990) に従って, 窒素分析計 Rapid NIII (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany) を用いて測定した. 標準物質として, アスパラギン酸 (A8949, Sigma-Aldrich) を用いた. 水分含量は 135°C, 1 時間の常圧加熱乾燥法により求めた.

玄米総澱粉含量の測定

玄米の総澱粉含量は, メガザイム社のキット (Total Starch Assay Kit) を用いてアミログルコシダーゼ/ α -アミラーゼ法 (AACC 公定法 76-13, AACC International, 2000) に基づき測定した. 即ち, 粉碎した玄米に耐熱性 α -アミラーゼを加えて完全に加水分解・可溶化したのち, アミログルコシダーゼでグルコースに完全に分解し, このグルコース量をグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼとの反応による吸光度測定によって求めた.

遊離アミノ酸含量の定量

粉碎した玄米 1.0 g (生鮮重) を 8%トリクロロ酢酸 5 ml 中で 3 分間超音波破碎することにより、遊離アミノ酸を抽出した。粗抽出液を遠心分離 (10,000 ×g, 4 分) 後、上清を 0.45 μm のフィルター (ADVANTEC Dismic-25HP045AN) で濾過し、高速アミノ酸分析計 (HITACHI L-8800) を用いて遊離アミノ酸を定量した。

統計解析

全ての測定は最低 3 回行い、得られた数値を平均した。変異体とその親系統との間での平均値の対比較は、t 検定を用いて行った。主成分分析は Statistical Analysis System ソフトウェア (SAS ver. 9.1.3, SAS Institute Inc.) の PRINCOMP プロシジャを用いて行った。

1-1-3. 結果

タンパク質組成

本研究に用いたタンパク質組成変異米のタンパク質組成を明らかにするために、SDS-PAGE を行った (図 1-1-2)。コシヒカリとニホンマサリのタンパク質組成はほぼ同じであった。LGC1 では、既報 (Iida *et al.*, 1993) の通り、グルテリンが少なく、プロラミンと 26 kDa グロブリンが多かった。K×433 では、26 kDa グロブリンが欠失している代わりに、新たな 32 kDa のバンドが検出された。この 32 kDa のバンドは、酸可溶性のグルテリン画分に属する (Iida *et al.*, 1998)。LGC 潤では Nishimura *et al.* (2005) の報告にある通り、グルテリンが少なく、26 kDa グロブリンが欠失しており、13 kDa プロラミンが多いパターンを示した。四重変異体の QA28 ではグルテリンをほとんど持たず、26 kDa グロブリンを欠損し、13 kDa プロラミンを多量に含むバンドパターンを示した。

LGC1 における 13 kDa プロラミンと 26 kDa グロブリンの増加は、グルテリンの減少に対する補償作用だと考えられている (Kusaba *et al.*, 2003)。ダイズでも同様に、7S グロブリン含量と 11S グロブリン含量との間に有意な負の相関があり、7S グロブリン欠失系統では総タンパク質含量を野生型と同程度に保つために 11S グロブリンの過剰生産によって 7S グロブリンの欠失を補っていると考えられている (Ogawa, T. *et al.*, 1989)。しかし、K×433 は親系統のコシヒカリと比べて 13 kDa プロラミンや他のポリペプチドがそれほど増加していな

かった。CBB 染色濃度はタンパク質含量を正確に反映している訳ではないが、26 kDa グロブリンの欠失は、グロブリン以外の貯蔵タンパク質の増加では補償されていないと考えられる。

タンパク質欠失を集積させたダイズ系統 QF2 では、種子の窒素が遊離アミノ酸の状態で蓄積されている (Takahashi *et al.*, 2003)。同様に、ゼインタンパク質の減少したトウモロコシの *opaque-2* 変異体も、ゼイン以外のタンパク質の増加に加えて遊離アミノ酸を多く蓄積する (Moro *et al.*, 1996)。これらの知見から、K×433 も遊離アミノ酸を蓄積すると考えられた。LGC1 もまた、13 kDa プロラミン及び 26 kDa グロブリンの増加だけでなく、遊離アミノ酸を多く蓄積する可能性があると考えられた。

玄米における総澱粉含量と窒素含量

貯蔵タンパク質の組成改変によって、玄米の窒素含量や炭水化物含量、粒重が変化しているかどうか調べた。LGC 潤と QA28 はコシヒカリとニホンマサリの交雑系統なので、コシヒカリとニホンマサリの両方と比較した。玄米総澱粉含量に関しては、80.0~82.6%の範囲に収まり、タンパク質組成変異系統と親系統との間に有意差はなかった (表 1-1-1)。QA28 の千粒重は 17.4 g とコシヒカリ (18.4 g) やニホンマサリ (19.6 g) よりも有意に軽かったが、LGC1, K×433, LGC 潤の千粒重 (それぞれ, 19.7 g, 18.0 g, 17.9 g) は親系統と同程度であった。LGC1 と K×433 の窒素含量は、それぞれ 1.21%, 1.37% で親系統と比較して有意差はなかった。LGC 潤の窒素含量は 1.24%, QA28 の窒素含量は 1.25% であり、コシヒカリの 1.34% よりも少なかったが、ニホンマサリ (1.27%) とは有意差が無かった。

ダイズでは、主要タンパク質の欠失が種子窒素含量に影響することはほぼない (Takahashi *et al.*, 2003)。イネにおいても、LGC1 の *lgc1* 遺伝子と K×433 の *glb1* 遺伝子は、胚乳の澱粉含量、粒重、窒素含量にほとんど影響しないと考えられた。

玄米の遊離アミノ酸含量

タンパク質組成の変異によって遊離アミノ酸含量に影響があるか否かを検証するために、12 種類の玄米の遊離アミノ酸 (Ala, Arg, Asp, γ -amino-*n*-butyric acid (γ -ABA), Glu, Gly, His, Lys, Ser, Thr, Tyr, Val) 含量を定量した。他のアミノ酸 (phosphoserine, taurine, citrulline, Met, Ile, Leu, Phe, β -alanine, hydroxylysine, ornithine) も検出されたが、定量下限を下回っていた。K×433 では全ての遊離アミノ酸含量が、親系統のコシヒカリよりも高かった (表 1-1-2)。また、

K×433 の総遊離アミノ酸含量はコシヒカリの 1.5 倍であった。Thr, Arg, Lys, Tyr がそれぞれ 2.6 倍, 2.3 倍, 2.2 倍, 2.2 倍と大きく増加した一方, Asp, Gly, Glu の増加量は約 1.4 倍と小さかった。コシヒカリからのアミノ酸含量の増加割合と, 26 kDa グロブリンのアミノ酸組成との間に相関は認められなかった。LGC 潤と QA28 では, γ -ABA と Gly を除くほとんどの遊離アミノ酸がコシヒカリやニホンマサリよりも多く含まれていた。これらの変異系統での総遊離アミノ酸含量は, コシヒカリやニホンマサリの 1.4~1.5 倍であった。K×433 と同様に, これらの変異系統でも Thr, Arg, Lys, Tyr の含量がコシヒカリよりも大きく増加していた。しかし, LGC1 では Asp と Thr が 1.1 倍に増加していたのを除いて, ほとんどの遊離アミノ酸含量は親系統のニホンマサリと同程度であった。

ダイズのタンパク質変異集積系統 QF2 における総遊離アミノ酸含量は, 他のタンパク質組成変異系統や野生型の 3~8 倍に増加する (Takahashi *et al.*, 2003)。QF2 における遊離アミノ酸含量増加の大半が, Arg 含量の増加による。トウモロコシでは, *opaque-2* 遺伝子を持つ複数の近交系統で, 穀粒の総遊離アミノ酸含量が親系統 (野生型) の 3~12 倍に増加する (Wang and Larkins, 2001)。これら近交系統における遊離アミノ酸の増加程度の違いは, 遺伝背景と関係すると考えられている。*opaque-2* 変異系統では Arg も増加するが, Asp から合成されるアミノ酸 (Lys, Thr, Met, Ile) と解糖系の中間産物から合成されるアミノ酸 (Ser, Leu, Ala, Val) が特に増えており (Wang and Larkins, 2001), ダイズのように Arg 含量が大半を占めることはない。K×433 における遊離アミノ酸の増加程度は個々のアミノ酸で異なるものの, ダイズやトウモロコシのように特定のアミノ酸が大きく増加してはいなかった。このことから, タンパク質欠失変異体において遊離アミノ酸の蓄積をもたらす代謝機構はダイズ, トウモロコシ, イネの間で異なると考えられた。

玄米における遊離アミノ酸含量の変動について総合的な解釈を行うため, 主成分分析を行った。固有値 1 以上の有意な主成分は第 1 主成分 (PC1) のみで, PC1 で全分散の 87% を説明できた。PC1 は γ -ABA を除く各々の遊離アミノ酸含量と正の相関関係にあったため, 全体的な遊離アミノ酸含量を示すと解釈できた。PC1 を数直線上にプロットすると, 実験に用いた品種と系統が二つのグループに分けられた (図 1-1-3)。1 つのグループはコシヒカリ, ニホンマサリ, LGC1 で構成され, もう 1 つは K×433, LGC 潤, QA28 によって構成された。後者のグループは前者のグループよりも総遊離アミノ酸含量が 1.4~1.5 倍に増加していた。後者のグループのみで共通する特徴は, *gbl1* を有し, 26 kDa グロブリンを欠失していることであった。このことは, *gbl1* 遺伝子が遊離アミノ酸の増加と関係していることを示唆し

ている。

1-1-4. 考察

トウモロコシの *opaque-2* 変異体では、貯蔵タンパク質の生合成の低下と、遊離アミノ酸含量の増加との間に関係があると考えられている (Wang and Larkins, 2001)。本研究では、イネ胚乳において 26 kDa グロブリンの欠失が玄米の遊離アミノ酸含量の増加を伴うことを明らかにした。このことは、イネにおいてもトウモロコシの *opaque-2* 変異体と同様に、貯蔵タンパク質の変異と遊離アミノ酸含量とが関連していることを示唆している。ダイズでは、主要なタンパク質である 7S グロブリン (β -コングリシニン) を欠失した複数の系統において、11S グロブリン (グリシニン) 含量の増加が認められ、7S グロブリン含量と 11S グロブリン含量の間に有意な負の相関を示すことから、7S グロブリンの欠失は 11S グロブリンの増加によって補償されると考えられている (Ogawa *et al.*, 1989)。7S グロブリン単独の欠失では遊離アミノ酸含量に変化は認められないが、11S グロブリン欠失との集積により、遊離アミノ酸が有意に増加する (Takahashi *et al.*, 2003)。このことから、貯蔵タンパク質欠失系統では、補償タンパク質に蓄積されない余剰のアミノ酸が遊離アミノ酸として蓄積すると考えられる。イネにおいても、*glb1* 変異体では、補償タンパク質として新たに 32 kDa グルテリンが蓄積されるが、余剰のアミノ酸が遊離アミノ酸として蓄積されると考えられる。しかし、*Lgc1* 遺伝子はグルテリン含量の低下を引き起こすにもかかわらず、遊離アミノ酸含量への影響はほぼ認められなかった。*Lgc1* 変異体におけるグルテリン含量の低下は、13 kDa プロラミンや 26 kDa グロブリンのようなグルテリン以外の貯蔵タンパク質含量の増加によって十分に補われていると考えられた。

トウモロコシやダイズの知見から、貯蔵タンパク質の減少によって生じた余剰アミノ酸が、種子内で遊離アミノ酸として蓄積されると考えられる。しかし、Morita *et al.* (2009) の報告によると、*glb1* は 26 kDa グロブリン構造遺伝子の上流 42 kb から下流 20 kb までの大きな領域を欠失している。国立遺伝学研究所のイネ遺伝子配列データベース (Oryzabase, <http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp>) を検索すると、この領域には 26 kDa グロブリン以外にも、未知のタンパク質が 5 つ、putative receptor-like protein kinase が 1 つ、peroxidase が 1 つ、putative betain-5-o-glucosyl transferase が 1 つコードされている。これらの遺伝子が K×433 における遊離アミノ酸の増加に関わっている可能性もある。今後は、遺伝

子ノックダウン手法の活用によって、26 kDa グロブリン遺伝子欠失単独の効果を確認する必要があると考えられる。

LGC 潤を含むいくつかのタンパク質欠失系統は、消化されないと考えられるプロラミンを多く蓄積するため、慢性腎臓病患者のための低タンパク質食としての有効性が試験されつつある (Nishimura *et al.*, 2005)。本研究の結果は、低タンパク質食としての利用を検討する際には、消化性タンパク質と同様に腎臓への負担となり得る遊離アミノ酸含量についても考慮する必要があることを示している。*g1b1* 遺伝子を有する K×433, LGC 潤, QA28 では、共通して遊離アミノ酸含量が多かった。26 kDa グロブリンもグルテリンも PB-II に蓄積される (Yamagata *et al.*, 1982) が、それぞれのタンパク質を低下させた時の代謝への影響は異なると考えられた。13 kDa プロラミンを多く蓄積する *Lgc1* 変異体と遊離アミノ酸を多く蓄積する *g1b1* 変異体では PB の構造も異なる可能性があると考えられる。

米のタンパク質は、種子内で均一には分布しておらず、玄米の外周部、特に糊粉層（糖層）の内側にあるサブアリュロン層に多く蓄積される (Saito *et al.*, 2010)。タンパク質の種類によっても分布は異なり、グロブリンは40%が糠の画分に、56%が精米の画分に蓄積されるのに対し、プロラミンは21%が糠の画分に、75%が精米の画分に蓄積され、グルテリンは5%が糠の画分に、93%が精米の画分に蓄積される (Shih, 2004)。また、種子の免疫染色法による蛍光顕微鏡観察により、プロラミンは玄米の外周部に多く存在するが、グルテリンは種子の中心部にかけて広く分布することが報告されている (増村・斎藤, 2010)。一方、コシヒカリにおいて、遊離アミノ酸は胚芽や糠に多く蓄積される (Saikusa *et al.*, 1994)。26 kDa グロブリン欠失系統においても、遊離アミノ酸が胚芽や糠に局在していれば、搗精によって *g1b1* 遺伝子を有する系統から腎臓への負担となり得る遊離アミノ酸を除去することができると考えられる。しかし、タンパク質組成が変化しているため、遊離アミノ酸の蓄積される部位も変化している可能性がある。タンパク質組成変異米を低タンパク質米として利用するためには、今後、遊離アミノ酸が種子のどの部位に蓄積されているのかを明らかにする必要があると考えられる。

1-1-5. 図表

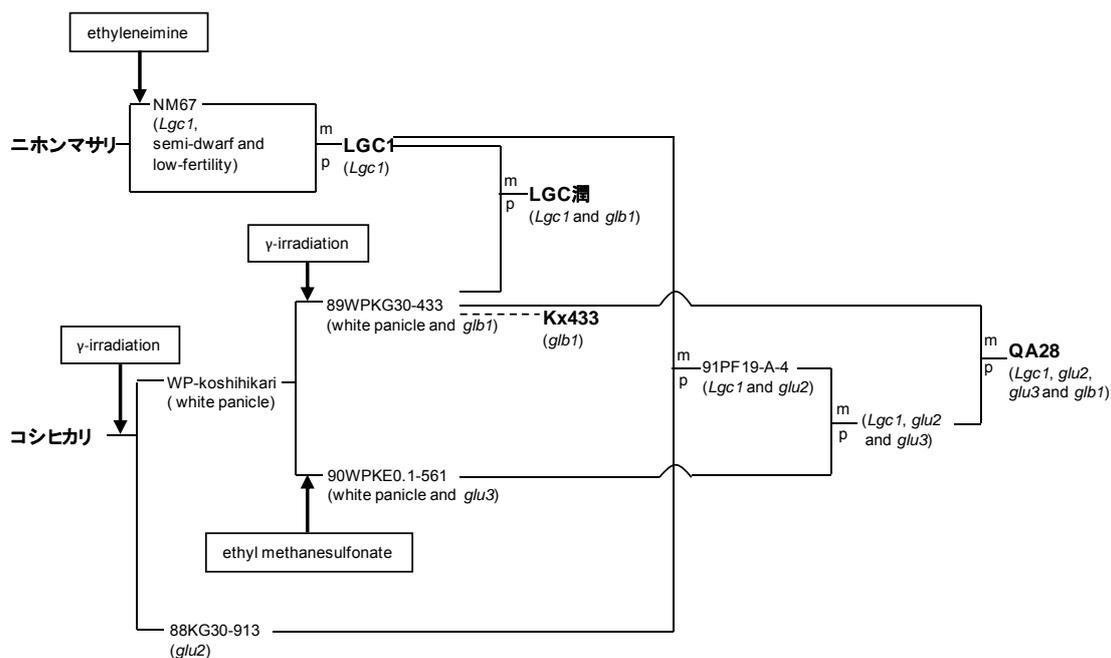


図 1-1-1. タンパク質組成変異系統の系譜図.

変異源は四角で囲んで表示. 破線は戻し交配を示し, 89WPKG30-433 をコシヒカリに戻し交配することで Kx433 が育成された. 本研究で用いた栽培品種及び系統は太字で示す. *Lgc1*, 低グルテリン遺伝子; *glb1*, 26 kDa グロブリン欠失遺伝子; *glu2*, グルテリン a-2 サブユニット欠失遺伝子; *glu3*, グルテリン a-3 サブユニット欠失遺伝子. m, 母本; p, 父本.

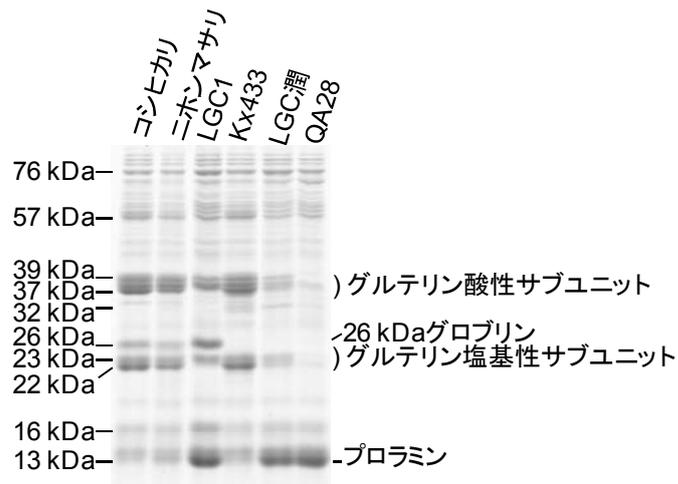


図 1-1-2. タンパク質組成変異系統とその親系統の SDS-PAGE バンドパターン.

表 1-1-1. 玄米の千粒重, 総澱粉含量, 窒素含量 (乾物重)

a. コシヒカリとその変異系統

	コシヒカリ	K×433	LGC潤	QA28
千粒重 (g)	18.4 ± 0.3	18.0 ± 0.6 ns	17.9 ± 0.8 ns	17.4 ± 0.4 *
澱粉含量 (%)	81.0 ± 0.3	80.6 ± 0.6 ns	82.3 ± 1.2 ns	80.0 ± 1.2 ns
窒素含量 (%)	1.34 ± 0.02	1.37 ± 0.02 ns	1.24 ± 0.04 *	1.25 ± 0.04 *

b. ニホンマサリとその変異系統

	ニホンマサリ	LGC1	LGC潤	QA28
千粒重 (g)	19.6 ± 0.4	19.7 ± 0.4 ns	17.9 ± 0.8 ns	17.4 ± 0.4 **
澱粉含量 (%)	82.6 ± 1.1	82.5 ± 0.3 ns	82.3 ± 1.2 ns	80.0 ± 1.2 ns
窒素含量 (%)	1.27 ± 0.04	1.21 ± 0.02 ns	1.24 ± 0.04 ns	1.25 ± 0.04 ns

平均値 ± 標準偏差. t検定を用いて変異系統と親系統とを比較した. *, 5%水準で有意. **, 1%水準で有意. ns, 有意差無し.

表 1-1-2. 玄米の遊離アミノ酸含量 (mg/100 g, 乾物重)

a. コシヒカリとその変異系統

遊離アミノ酸	コシヒカリ	Kx433	LGC潤	QA28
Ala	3.88 ± 0.20	6.86 ± 0.15 **	6.87 ± 0.45 **	6.20 ± 0.14 **
Arg	4.46 ± 0.23	10.33 ± 1.34 *	9.25 ± 0.43 **	9.99 ± 0.86 **
Asp	17.38 ± 0.60	23.50 ± 2.42 *	20.13 ± 1.10 *	28.34 ± 0.96 **
γ-ABA	3.41 ± 1.05	6.12 ± 0.10 *	2.84 ± 1.65 ns	5.09 ± 0.71 ns
Glu	28.14 ± 1.87	38.34 ± 0.78 **	33.83 ± 1.71 *	33.70 ± 0.17 *
Gly	0.96 ± 0.04	1.30 ± 0.04 **	1.31 ± 0.11 *	1.32 ± 0.11 *
His	1.20 ± 0.11	2.43 ± 0.12 **	2.05 ± 0.10 **	2.15 ± 0.13 **
Lys	1.38 ± 0.12	3.01 ± 0.26 **	2.71 ± 0.36 *	2.76 ± 0.16 **
Ser	3.86 ± 0.24	6.18 ± 0.49 **	6.53 ± 0.66 *	6.63 ± 0.18 **
Thr	0.69 ± 0.09	1.79 ± 0.13 **	1.76 ± 0.06 **	2.17 ± 0.04 **
Tyr	0.82 ± 0.14	1.78 ± 0.20 **	1.59 ± 0.12 **	2.27 ± 0.15 **
Val	0.87 ± 0.06	1.70 ± 0.11 **	1.82 ± 0.05 **	1.95 ± 0.17 **
計	67.05 ± 2.27	103.34 ± 4.03 **	90.68 ± 6.04 *	102.57 ± 2.32 **

b. ニホンマサリとその変異系統

遊離アミノ酸	ニホンマサリ	LGC1	LGC潤	QA28
Ala	4.69 ± 0.22	4.46 ± 0.05 ns	6.87 ± 0.45 **	6.20 ± 0.14 **
Arg	4.95 ± 0.17	5.11 ± 0.13 ns	9.25 ± 0.43 **	9.99 ± 0.86 **
Asp	15.61 ± 0.69	17.33 ± 0.40 *	20.13 ± 1.10 **	28.34 ± 0.96 **
γ-ABA	2.53 ± 0.85	2.11 ± 0.89 ns	2.84 ± 1.65 ns	5.09 ± 0.71 *
Glu	28.24 ± 0.99	29.11 ± 1.52 ns	33.83 ± 1.71 *	33.70 ± 0.17 *
Gly	1.12 ± 0.02	1.07 ± 0.04 ns	1.31 ± 0.11 ns	1.32 ± 0.11 ns
His	1.79 ± 0.09	1.77 ± 0.10 ns	2.05 ± 0.10 *	2.15 ± 0.13 *
Lys	1.42 ± 0.16	1.51 ± 0.18 ns	2.71 ± 0.36 *	2.76 ± 0.16 **
Ser	3.90 ± 0.13	3.86 ± 0.17 ns	6.53 ± 0.66 *	6.63 ± 0.18 **
Thr	0.90 ± 0.04	1.03 ± 0.05 *	1.76 ± 0.06 **	2.17 ± 0.04 **
Tyr	0.87 ± 0.04	0.90 ± 0.05 ns	1.59 ± 0.12 **	2.27 ± 0.15 **
Val	1.14 ± 0.05	1.19 ± 0.02 ns	1.82 ± 0.05 **	1.95 ± 0.17 *
計	67.16 ± 1.72	69.44 ± 0.94 ns	90.68 ± 6.04 *	102.57 ± 2.32 **

平均値 ± 標準偏差. t検定を用いて変異系統と親系統とを比較した. *, 5%水準で有意. **, 1%水準で有意. ns, 有意差無し.

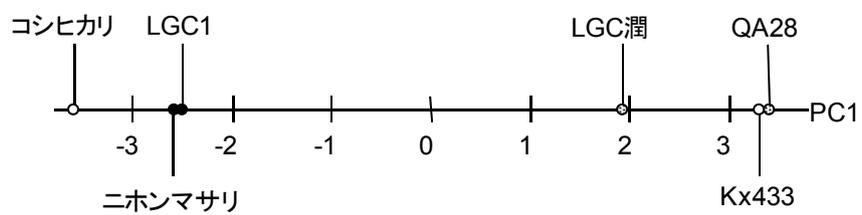


図 1-1-3. 遊離アミノ酸含量の主成分分析から得られた第 1 主成分 (PC1) の散布図.
 PC1 のみが固有値 1 以上を示し, 全分散の 87%を占めた.

第2章 タンパク質組成変異米のプロテインボディ構造

1-2-1. はじめに

米に新しい加工特性を付与するため、あるいは、タンパク質の消化性を変化させるために、貯蔵タンパク質の組成を改変した系統が多く育成されている。プロラミン組成を改変すると、プロラミンの蓄積される PB-I の層状構造に影響することが知られている(門間ら, 2000; Ogawa, M. *et al.*, 1989). Takemoto *et al.* (2002) は, 57 kDa グルテリン前駆体を多く蓄積し, グルテリンの酸性サブユニット及び塩基性サブユニットを少なく蓄積する *endosperm storage protein mutant 2 (esp2)* 変異体について, 正常な形の PB-II と, PB-I の代わりに新しい形の PB が認められると報告している. また, 同じく大量の 57 kDa グルテリン前駆体を蓄積し, 少量のグルテリンの酸性及び塩基性サブユニットを蓄積する *glutelin precursor mutant 3 (glup3)* 変異体は, 正常な形の PB-I と球形化した PB-II を蓄積する. この球形化した PB-II は, 野生型の PB-II で観察される結晶構造を持たない (Kumamaru *et al.*, 2010). *esp2* 変異体はタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (protein disulfide isomerase, PDI) の変異, *glup3* 変異体は液胞プロセシング酵素 (vacuolar processing enzyme, VPE) の変異と, どちらもタンパク質局在輸送遺伝子の変異に由来することが明らかとなっている (Takemoto *et al.*, 2002; Kumamaru *et al.*, 2010).

一方, 低グルテリン遺伝子 *Lgc1* や 26 kDa グロブリン欠失遺伝子 *glb1* は, 貯蔵タンパク質の構造遺伝子そのものに欠損がある (Kusaba *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2009). Furukawa *et al.* (2007) は低グルテリン含量かつ高プロラミン含量を示す系統「LGC1」と「多収系 1001」の成熟した胚乳において, 数多くの PB-I が認められると報告している. しかし, 貯蔵タンパク質構造遺伝子の変異体における PB-I と PB-II の形態については詳細には解析されていない. そこで, 本研究では, 貯蔵タンパク質構造遺伝子への変異導入によるタンパク質組成の改変が, PB 構造に影響をもたらすか否かを明らかにするために, 構造遺伝子の欠損由来の変異系統である *Lgc1* 変異体と *glb1* 変異体を材料として, 登熟過程におけるポリペプチド組成と PB 構造の変化を解析した.

1-2-2. 材料と方法

材料

コシヒカリと 3 系統のタンパク質組成変異系統 (LGC1, K×433, LGC 潤) を用いた。

登熟中の種子を、開花後 5 日目, 10 日目, 15 日目, 20 日目にサンプリングし、ピンセットを用いて穎を取り除いた。タンパク質組成分析用のサンプルは、穎を取り除いた後、直ちに液体窒素中で急速凍結させ、 -80°C で保存した。透過型電子顕微鏡観察用のサンプルは、穎を取り除いた後、直ちにカミソリを用いて約 1 mm の厚さにスライスし、予冷しておいた固定液 (3%グルタルアルデヒド, 0.1M リン酸緩衝液, pH 7.2) に浸漬した。

コシヒカリと LGC1, LGC 潤は 2005 年にガラス温室で栽培した。コシヒカリと K×433 は 2006 年に近畿中国四国農業研究センター (広島県福山市) の水田圃場で栽培した。

タンパク質組成の解析

サンプリングした玄米は、凍ったまま、550 μl の SDS-urea 液 (8% 尿素, 4% SDS, 5% 2-メルカプトエタノール, 20% グリセロール, 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8)) に浸し、 30°C 下で 16 時間インキュベートした。その後、マイクロ乳棒を用いて摩砕した。成熟した玄米については、リードペンチを用いて玄米 1 粒を潰し、550 μl の SDS-urea 液に懸濁して 30°C 下で 16 時間インキュベートした。これらの懸濁液を 7,000 $\times g$ で 1 分間遠心分離し、上清を粗タンパク質抽出液とした。粗タンパク質抽出液を 2 倍希釈し、プロテインアッセイキット (RC DC protein assay kit, Bio-Rad, USA) を用いて粗タンパク質含量を測定した。粗タンパク質 3 μg を 15%ポリアクリルアミドゲルにアプライして SDS-PAGE を行った。電気泳動後、ゲルを Coomassie G-250 液 (SimplyBlue Safestain solution, Invitrogen, USA) で染色した。タンパク質の抽出及び SDS-PAGE は、独立した 3 株から無作為にサンプリングした種子を用いて 3 回行った。タンパク質組成の解析は、Phoretix 1D ソフトウェア (Nonlinear Dynamics Ltd., UK) を用いて行い、得られた結果を平均した。

透過型電子顕微鏡観察

サンプリング後に固定液中に浸漬した種子を引圧下に 2~4 時間置き、前固定を行った。その後、0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 7.2) で 30 分おきに 3 回洗浄した。洗浄したサンプルは、オスミウム固定液 (2%四酸化オスミウム, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH7.2)) 中に 1 時間浸すことによって後固定し、Milli-Q 水を用いて 10 分おきに 6 回洗浄した。後固定したサンプルは、エタノール上昇系列 (30% , 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) で脱水したのち、

50%樹脂 (LR-White 樹脂 (The London Resin Co. Ltd., UK) : エタノール=1 : 1) 中で一晩おだやかに振盪した。100% LR-White 樹脂に置換してさらに一晩振盪したのち、ゼラチンカプセル中に LR-White 樹脂を入れてサンプルを沈め、60°C 下で3日間重合させた。カッターナイフを用いて、重合の終わったサンプルブロックからゼラチンカプセルを取り除き、サンプル面をトリミングし、ガラスナイフで表面を磨いた。その後、ダイヤモンドナイフとウルトラマイクロトーム (ULTRACUT-N, Reichert-Nissei または Ultracut UCT, Leica) を用いて90 nm 厚の超薄切片を切り出した。超薄切片はフォルムバル膜を貼ったニッケルグリッドの上に回収し、2%酢酸ウラニルで染色した後にクエン酸鉛染色を行った。切片の観察は、透過型電子顕微鏡 (日本電子 JEM-1010 または日立 H-8000) を用いて行った。

1-2-3. 結果

種子登熟過程におけるポリペプチド組成の変化

種子登熟過程におけるポリペプチド組成の変化を SDS-PAGE によって解析した (図 1-2-1A)。ポリペプチドは過去の報告 (Yamagata *et al.*, 1982, Ogawa *et al.*, 1987) を参考に、6つの画分 (57 kDa プレグルテリン, 37-39 kDa グルテリン, 26 kDa グロブリン, 22-23 kDa グルテリン, 10-16 kDa プロラミン, その他ポリペプチド) に分類した。各画分の割合は、SDS-PAGE を行ったゲルをデンスitomーターで解析し、レーン全体の染色濃度に対する割合で表した (図 1-2-1B)。なお、親系統であるコシヒカリとニホンマサリは共に一般的なウルチ米であり、タンパク質組成も似通っていた (図 1-1-2) ので、本実験ではコシヒカリのみを対照として用いた。

種子登熟過程を通して、水田圃場で栽培したコシヒカリとガラス温室で栽培したコシヒカリの SDS-PAGE プロファイルは似通っていた。Yamagata *et al.* (1982) の報告と同様に、コシヒカリでは開花後5日目から15日目まで、37-39 kDa グルテリンと22-23 kDa グルテリンが主要なポリペプチドであった。また、Yamagata *et al.* (1982), Li and Okita (1993) の報告と同様に、プロラミンの割合は種子登熟過程の後期において増加していた。

低グルテリン変異体の LGC1 及び LGC 潤においては、開花後5日目から15日目にかけてのプロラミンの増加が顕著であった (図 1-2-1B)。同時に、プロラミンは登熟期間を通して常に主要なポリペプチドであった。LGC1 と LGC 潤は、*Lgc1* 遺伝子を持っているため、37-39 kDa グルテリンと22-23 kDa グルテリンの量はコシヒカリと比較して低かったが、57

kDa プレグルテリンの割合はコシヒカリと同程度であった。

26 kDa グロブリン欠失変異系統である K×433 におけるグルテリンとプロラミンの蓄積パターンは、コシヒカリとよく似ていた (図 1-2-1B)。K×433 と LGC 潤では、開花後 10 日目に、32 kDa のポリペプチドが検出され、その後、他のグルテリンポリペプチドと同様に蓄積していた (図 1-2-1A)。この 32 kDa ポリペプチドはグルテリンに属すると報告されている (Iida *et al.*, 1998)。32 kDa ポリペプチドの蓄積は、K×433 において「その他のポリペプチド」の割合が増加することに寄与していると考えられた。

種子登熟過程におけるプロテインボディの微細構造

コシヒカリの開花後 10 日目の PB 微細構造を図 1-2-2 と図 1-2-3 に示す。これまで報告されている PB 構造から、球形の小さな構造体が PB-I で、楕円形で濃く染色されている大きな構造体が PB-II であると判断された。PB-II は貯蔵タンパク質を蓄積する液胞由来の細胞小器官で、コシヒカリの登熟の初期段階では PB-II の周囲に液胞膜が認められた (図 1-2-3A)。細胞質には小胞体が観察され、PB-I の膜に沿ってポリソームが観察された (図 1-2-3A)。コシヒカリで観察されたこれらの PB 微細構造は、過去の報告 (Yamagata *et al.*, 1982; Yamagata *et al.*, 1986) と一致していた。開花後 15 日目には、PB-II が視野の大部分を占めていた (図 1-2-2B)。開花後 20 日目には、PB が澱粉粒の間に蓄積されていた (図 1-2-2C)。澱粉粒間を充たしている PB は主に電子密度の濃い PB-II であり、PB-I は不定形の PB-II の中に埋められるように蓄積していた。水田圃場で栽培したコシヒカリの胚乳微細構造 (図 1-2-2A, B, C) と、ガラス温室で栽培したコシヒカリの胚乳微細構造 (図省略) との間に違いは認められなかった。

LGC1 では、PB-II と考えられる濃く染色される構造が、開花後 10 日目から 15 日目にかけて観察されたが、これら PB-II の構造は周囲が欠けたように見受けられる構造を示した (図 1-2-2D, E)。この欠けた PB-II は、コシヒカリの PB-II よりも小さく見えた。また、PB-II の周囲には液胞膜が観察され、PB-I の周囲にはポリソームが観察された (図 1-2-3B)。LGC1 では非常に多くの数の PB-I が観察されたが、PB-I の大きさや層状構造はコシヒカリで観察されたものと似ていた。SDS-PAGE の結果から、LGC1 の登熟中の種子では PB-I を構成する 10-16 kDa プロラミンが主要なタンパク質であることが示唆されていたが (図 1-2-1B)、この結果と対応するように、LGC1 の胚乳では PB-I が主な PB であった。Furukawa *et al.* (2007) も低グルテリン米は多くの PB-I を蓄積すると報告している。低グルテリン米で増

加したプロラミンポリペプチドは、増加した PB-I に蓄積されると考えられた。コシヒカリとは異なり、LGC1 では、開花後 20 日目の澱粉粒の隙間は PB-I によって充たされていた (図 1-2-2F)。開花後 20 日目において、PB-I は球形を保っていたのに対し、澱粉粒の表面が凸凹していたことから、PB-I は登熟中の澱粉粒よりも固いと考えられた。

LGC 潤では、開花後 10 日目から 20 日目にかけて、数多くの PB-I が観察された (図 1-2-2G, H, I)。一方、濃く染色されるタンパク質凝集物を液胞の中に蓄積する PB-II 様の構造が少数観察された (図 1-2-3C)。このタンパク質凝集物の電子密度は、野生型の PB-II の電子密度と同程度であったので、この PB-II 様の構造は、PB-II に由来するものだと考えられた。LGC 潤は、PB-II に蓄積されるグルテリンのレベルが低くかつグロブリンをほとんど持たない。このため、PB-II 様の構造の大きさは野生型のものよりも小さくなったと考えられた。LGC 潤では、LGC1 と同様に、PB-I が開花後 20 日目の澱粉粒の間を埋めていた (図 1-2-2I)。

K×433 では主要な PB は濃く染色され、いびつな形を示した (図 1-2-2J, K, 図 1-2-3D)。このいびつな PB は、コシヒカリの PB-II と同程度の電子密度を示すことから、PB-II の変形したものであると判断された。K×433 は 26 kDa グロブリンを欠損しているため、変形した PB-II はグルテリンを蓄積していると考えられた。コシヒカリで観察された PB-II と同様に、K×433 の開花後 15 日目において、変形した PB-II は視野の大半を占めていた。野生型の PB-II は発芽時に分解されて崩壊するが、PB-II は中央部から分解されるため、楕円形の形をほぼ残したまま中心部から断片化される (Horikoshi and Morita, 1982)。K×433 で観察された変形した PB-II の構造は、外周部が大きく凹凸していたものの、中央部が分解されているようには見受けられず、野生型の PB-II が発芽時に崩壊する様子とは異なっていた。Lgc1 変異体において PB-II はコシヒカリよりも小さくなっていたが、その形が K×433 の PB-II のように崩壊することは認められなかった (図 1-2-2D, E)。K×433 では、PB-II を囲む液胞膜を明確に観察することができなかった (図 1-2-3D)。Kawagoe *et al.* (2005) は、多くの種子貯蔵タンパク質間で保存されている CCxQL モチーフにある 2 つのシステイン残基が、米の貯蔵タンパク質輸送にも大きな役割を果たすと報告している。本研究で得られた結果は、26 kDa グロブリンタンパク質そのものが PB-II の形を維持するために何らかの役割を果たしていることを示唆している。免疫化学的研究手法により、グルテリンとグロブリンは PB-II に局在し、グルテリンの結晶を取り囲むポケットにグロブリンが蓄積することが明らかとなっている (Krishnan *et al.*, 1992; Krishnan and White, 1995)。このことから、PB-II 基質中のグロブリンの局在が、PB-II の正常な形を保つために必要不可欠である可能性がある。K×433 において、

PB-Iの大きさや形、層状構造は野生型のコシヒカリと変わらなかった(図 1-2-3D)。コシヒカリと同様、開花後 20 日目において、澱粉粒間の隙間は、濃く染色されるタンパク質で充たされており、PB-Iはその中に埋まっていた(図 1-2-2L)。

1-2-4. 考察

LGC1 では、グルテリン含量の低下が PB-II 構造の小型化を、プロラミン含量の増加が PB-I の数の増加をもたらしていたが、PB-I の大きさには影響が認められなかった。一方、K×433 では、26 kDa グロブリンの欠失が PB-II 構造の崩壊を引き起こしたと考えられる。Lgc1 遺伝子はグルテリン構造遺伝子領域に欠失を、gbl1 遺伝子は 26 kDa グロブリン構造遺伝子を含む領域に欠失がある (Kusaba *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2009)。グルテリンもグロブリンも PB-II を構成するタンパク質であるが、その含量の改変が PB 構造に与える影響は異なっていた。タンパク質の局在輸送に関する変異体の研究で、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) や液胞プロセシング酵素 (VPE) が PB 構造に影響を及ぼすことが明らかになっている (Takemoto *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009; Kumamaru *et al.*, 2010)。本研究での結果は、貯蔵タンパク質そのものが、正常な PB を形成するのに重要な役割を担っていることを示唆している。また、貯蔵タンパク質の欠失によって、タンパク質のプロセシングや輸送に関わる遺伝子の発現に変化が生じている可能性もある。本研究で用いた系統において、タンパク質局在遺伝子の発現状況の変化を調べたり、PB 内でどのようなタンパク質がどのように蓄積されているのかを観察したりすることにより、貯蔵タンパク質が形成される機構がより明らかになると考えられる。

前章で述べたように 26 kDa グロブリンの欠失は種子の遊離アミノ酸含量を増加させるが、グルテリン含量の低下は遊離アミノ酸含量には影響しない。PB-II 構造の変化と、遊離アミノ酸含量の増加、gbl1 変異の間に何らかの関連があると推察される。Takaiwa *et al.* (2008) は、ダイズのグリシニン A1aB1b タンパク質と A3B4 タンパク質を共発現させた遺伝子組換えイネは特徴的な PB-II 構造を示す、と報告している。この遺伝子組換えイネで観察される PB-II の形態は、外周部が大きく凸凹しており、本研究で観察された K×433 の PB-II の形態と似ている。ダイズのグリシニンは、イネのグルテリンと相同のタンパク質であることから、過剰なグルテリンの蓄積が、PB-II 構造の崩壊をもたらしたとも考えられる。

遺伝子組換えにより 26 kDa グロブリンとグルテリンサブユニットの発現を抑制させた米

では、PB-IIの形状がややいびつになり、PB-IIに蓄積されるタンパク質凝集物の間に隙間が入ることから、26 kDa グロブリンはPB-IIの形成に重要であると考えられている (Kawakatsu *et al.*, 2010). *gbl1* は、26 kDa グロブリン構造遺伝子を含む 62.8 kb の領域を欠失しており (Morita *et al.*, 2009), 1-1-4 で述べた通り、この領域にコードされている他の遺伝子も失っている。このことから、26 kDa グロブリンの構造遺伝子周辺にある別の遺伝子が、タンパク質構造に影響している可能性もある。しかし、グロブリン遺伝子をノックアウトした米でもPB-II構造の変化が報告されている (Kawakatsu *et al.*, 2010) ことから、26 kDa グロブリンそのものがPB-IIの形状維持に関わっている可能性が高いと考えられる。

PB-Iはヒトの糞便中に認められるコメの不消化残物と同じ構造をしている (Tanaka *et al.*, 1975)。PB-Iを構成する主なタンパク質はプロラミンであり、LGC1はプロラミン含量が高いため、タンパク質の消化性が低いと予想され、低タンパク質食として有効であると期待されている (Iida *et al.*, 1993)。望月・原 (2000) は、慢性腎臓病の食事療法におけるLGC1の有用性について調査し、主食として主に米飯を摂取する患者では、腎機能障害進行の抑制に有用であると結論づけている。本研究においてLGC1で増加したPB-Iの構造は、野生型の成熟したPB-I構造とほぼ同じであった。慢性腎臓病の食事療法におけるLGC1の有用性試験結果から考えて、LGC1で増えたプロラミンはPB-Iに蓄積され、PB-Iの数は増えるが、ヒトはこの新たに増加したPB-Iを消化できないと考えられた。LGC潤もまた胚乳に多くの成熟したPB-Iを蓄積していたことから、LGC潤も低タンパク質食として有用であると期待される。

米にPB-Iを加えて炊飯すると硬い米飯になり、PB-IIを加えると色つやと香りが悪化する (Furukawa *et al.*, 2006)。プロラミンの添加は、米澱粉ゲルの硬さと粘着性を低下させるとともに、水を加えて加熱する際の吸水量を減らす、吸水速度を速める効果がある (Baxter *et al.*, 2004)。また、グロブリン抽出物を加えて酒を醸造すると日本酒度が高くなり、アルブミンやグルテリン、プロラミンを加えると逆に日本酒度が低くなる (日本酒度は高いほど辛口、低いほど甘口となる) (Furukawa *et al.*, 2006)。このように、PBの形態やPBに蓄積されるタンパク質の量は、消化性だけでなく、調理特性や醸造特性にも密接に関わることが知られている。よって、タンパク質組成変異米の加工適性を評価する場合には、PB構造についても明らかにすることが重要である。本研究では、K×433が新奇なPB-II構造を示すことを見いだしたが、K×433は炊飯米や酒等に加工した場合に、風味や食感など全く新しい特徴を持つ可能性があると考えられる。

1-2-5. 図表

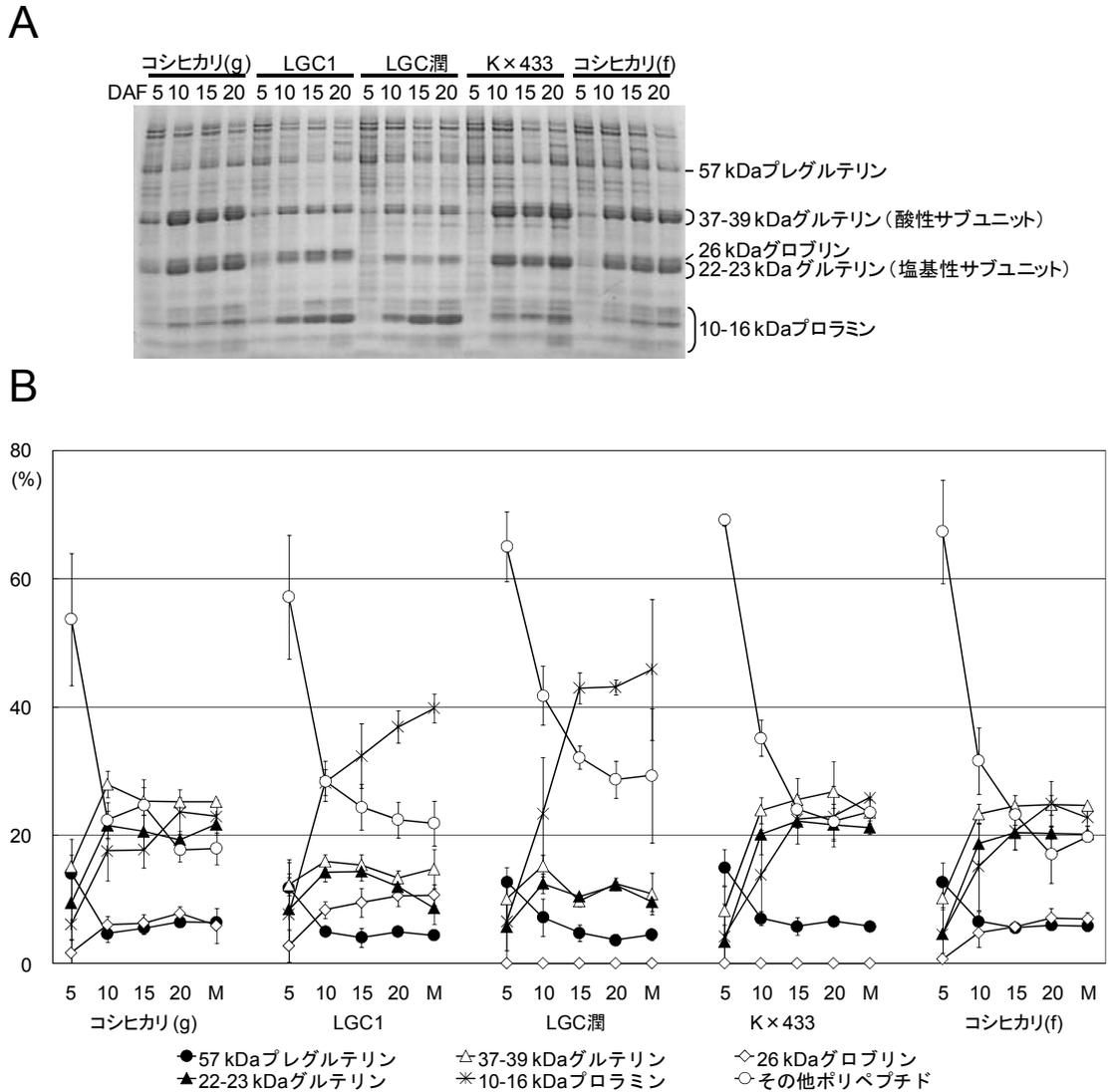


図 1-2-1. コシヒカリとタンパク質組成変異系統の種子貯蔵タンパク質組成.

A, SDS-PAGE で分離したバンドパターン. DAF, 開花後日数. (f), 実験圃場でサンプリングした種子, (g), 温室でサンプリングした種子. B, 登熟過程における種子貯蔵タンパク質組成の変化. 縦軸はレーン全体の染色濃度に対する各画分の相対割合を示す. 横軸の数値は開花後の日数を示す. M, 完熟種子.

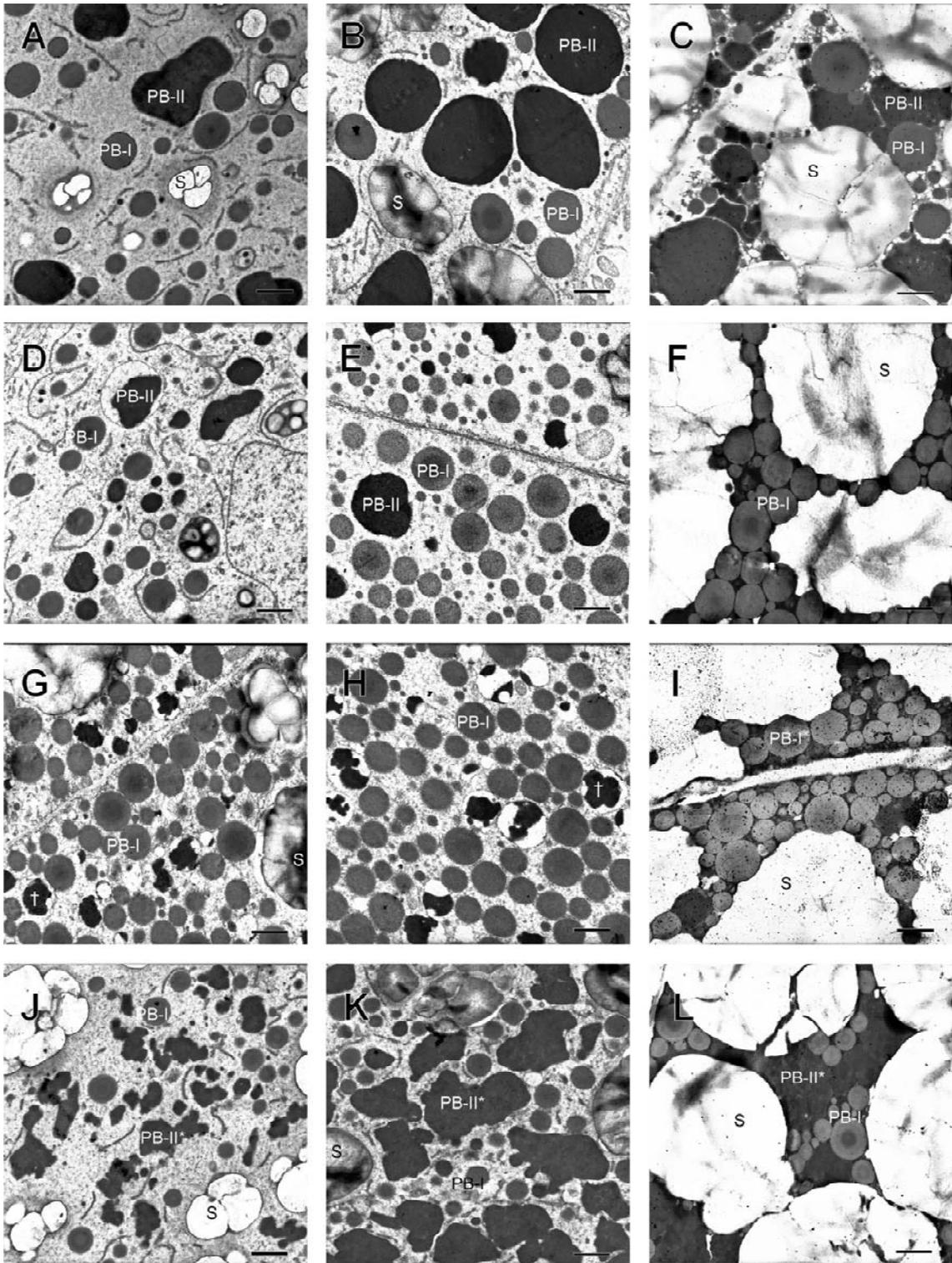


図 1-2-2. 登熟過程における胚乳サブアリュロン層の透過型電子顕微鏡写真。

A, B, C: コシヒカリ ; D, E, F: LGC1 ; G, H, I: LGC 潤 ; J, K, L: K×433. A, D, G, J: 開花後 10 日目 ; B, E, H, K: 開花後 15 日目 ; C, F, I, L: 開花後 20 日目. S, 澱粉粒. †, PB-II と同程度の電子密度を示す PB-II 様構造; PB-II*, 変形した PB-II. Bars = 2 μ m.

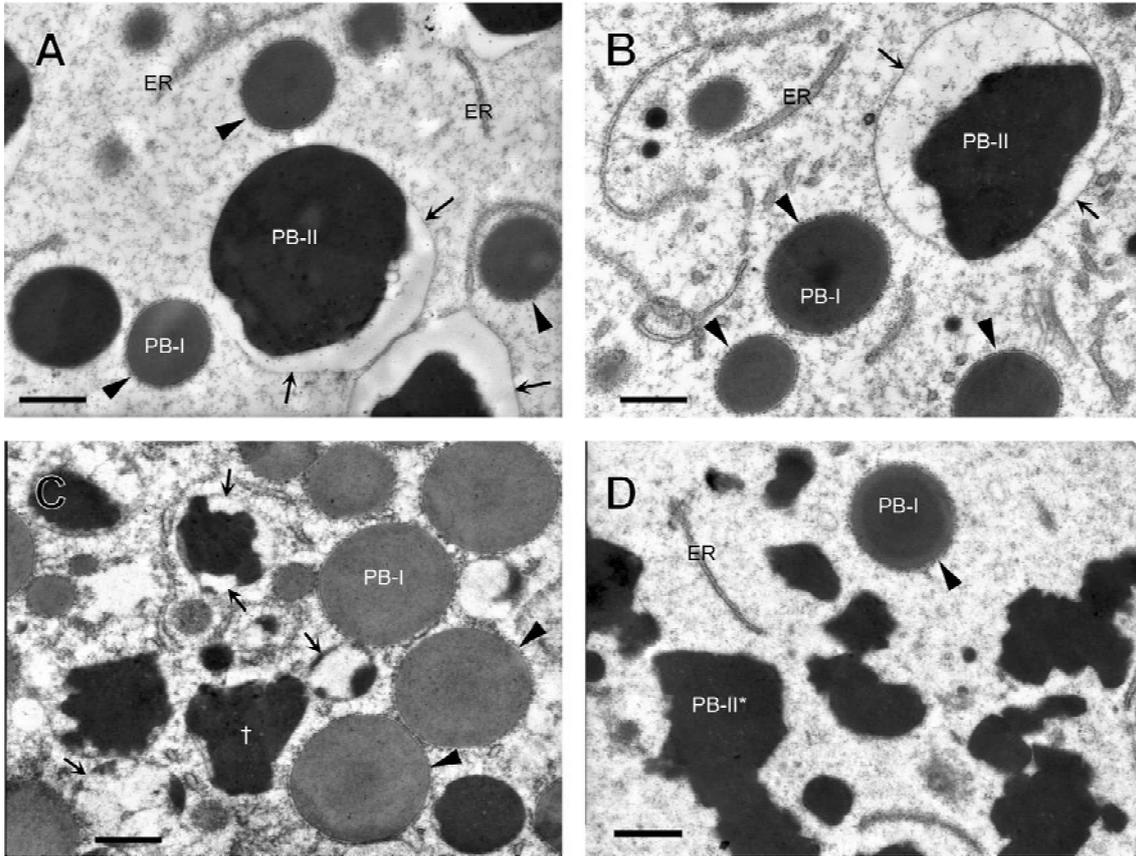


図 1-2-3. 開花後 10 日目におけるプロテインボディ構造.

A, コシヒカリ; B, LGC1; C, LGC 潤; D, K×433. ER, 小胞体. 矢頭は PB-I を取り囲むポリソームを示す. 矢印は PB-II の膜を示す. 他のシンボルは図 1-2-2 と同じ. Bars = 1 μm.

結語

米の消化性や加工適性を改変させるために、種子貯蔵タンパク質の組成を改変させた様々な突然変異系統が育成されているが、SDS-PAGE で分離したタンパク質組成以外の成分特性については明らかでないものが多い。そこで、タンパク質組成変異米のうち、PB-II に含まれる種子貯蔵タンパク質を低減もしくは欠損させた系統の成分特性と PB 構造を解析した。

まず、タンパク質組成変異系統における遊離アミノ酸含量を解析した。低グルテリン遺伝子 (*Lgc1*) を有する突然変異系統では、グルテリン含量の低下を補うように 13 kDa プロラミンが多く蓄積されていたが、遊離アミノ酸含量は親系統と同程度であった。一方、26 kDa グロブリン欠失遺伝子 (*gbl1*) を有する突然変異系統では、新たな 32 kDa ポリペプチドの蓄積と遊離アミノ酸含量の増加が認められた。なお、*Lgc1* と *gbl1* は、各々グルテリンの構造遺伝子と 26 kDa グロブリンの構造遺伝子を含む領域の欠失に由来する。グルテリンとグロブリンはどちらも PB-II を構成するタンパク質であるが、*Lgc1* と *gbl1* のもたらす貯蔵タンパク質組成とアミノ酸代謝への影響は異なると考えられた。

また、*Lgc1* 変異体、*gbl1* 変異体、*Lgc1* と *gbl1* を集積した変異系統を材料として、種子登熟過程における胚乳のポリペプチド組成と微細構造を解析した。*Lgc1* 変異体は、種子登熟過程の早い段階からプロラミンを蓄積しており、その胚乳には成熟した PB-I が多数観察されるとともに、小型で欠けたような PB-II が少数観察された。*gbl1* 変異体では、変形した PB-II が観察されたが、その電子密度は野生型の PB-II と同程度であった。グルテリンとグロブリンはいずれも PB-II に蓄積される貯蔵タンパク質であるが、それらの組成変化が PB-II の構造にもたらす影響は全く異なっていた。*gbl1* 変異体の胚乳で観察されたユニークな PB-II の構造は、米の新しい加工特性をもたらす可能性があると考えられた。

第 2 部 乳白変異米等の米粉としての有効利用

緒言

米は主に粒食として消費されているが、粉としても利用されている。米粉は古来、アジア地域において麺や菓子等の加工に利用されてきた。また、米粉は小麦アレルギー患者のための小麦粉の代替粉としても利用されている。小麦アレルギーとしては、古くから小麦に含まれるタンパク質「グルテン」の吸収障害であるセリアック病が知られている。米国では 200 万人ものセリアック病患者(133 人に 1 人)がいると言われており (National Institutes of Health of the U.S. Department of Health and Human Services, 2008), 近年, セリアック病への認識の広まりとともにグルテンを含まない食品 (グルテンフリー食品) への関心が高まっている (O'Neill, 2010)。米は低アレルギー性の穀物でグルテンを含まないことから, グルテンフリー食品の素材としての利用が広まると考えられている (O'Neill, 2010)。日本では近年, 減少し続けている米の消費を拡大するために, 米粉の利活用が注目されている。中でも, パンとしての米粉の利用は, 大手の製パン会社やスーパー, コンビニエンスストアなどが取り扱いを開始していることもあり認知度が高まっている。

米粉を製造する際には, 主に三種類の方法が使われる。一つ目は湿式製粉 (wet-milling) と呼ばれる方法で, 米を水に浸して軟らかくした後に軽く脱水し, 米の重量の 3~4 倍量の水を加えながら粉碎する方法である。二つ目は半乾式製粉方法 (semidry-milling) で, 米を水に浸して軟らかくした後に脱水し, 加水せずに湿った状態で粉碎する方法である。なお, 半乾式製粉は, 湿った状態で製粉を行うことから, 日本の米粉製造においては湿式製粉として扱われている。三つ目は乾式製粉 (dry-milling) で, 米をそのまま粉碎機に投入して製粉する方法である。湿式製粉では, 粉碎時に加える圧力や熱が少なくなるため, 澱粉への損傷を低減できる。このため, 三種の製粉方法のうち, 最も加工に優れた粉を製造できるとされている。しかし, 湿式製粉や半乾式製粉では粉の乾燥過程や排水処理過程が必要となるため大規模な製粉設備が必要となる (Yeh, 2004)。このことから, 一般的に, 湿式製粉は乾式製粉に比べて多くの設備投資とランニングコストがかかると考えられる。

米の胚乳は澱粉粒が密に詰まった構造をしているため硬い。日本で普通栽培されているウルチ米の胚乳は光を透過するため半透明であるが, 栽培条件等により澱粉粒の充填が疎になると胚乳に白色不透明部が発生する。澱粉粒間に隙間が生じると, そこで光を乱反射

するため胚乳は白く濁って見える（田代・江幡, 1975; Tashiro and Wardlaw, 1991）. 白濁部分の全くない米（完全米）は、外観が優れるだけでなく精米時の重量ロスが少ないことから、生産者にも消費者にも望まれる（Bergman *et al.*, 2004）. 胚乳の白濁は種子の一部に発生することもあれば、種子全体が白濁するものまであり、白濁部分の大きさや部位によって以下のように分類される. 「背白米」は穀粒背側に沿って白色不透明な筋のある粒を指す. 「基白米」は穀粒基部に白色不透明部分が生じる米をいう. 「腹白米」は穀粒腹部に白色不透明部分がある粒である. 「心白米」は粒の中心部に白色不透明部分がある粒を指すが、胚乳横断面の白濁部分は線状である. 「乳白米」は粒が全体的に不透明で乳白色に見えるが、表面には光沢があり、胚乳横断面はほぼ白色不透明で周囲をわずかに透明な部分が囲んでいる. 全体が不透明で表面にも光沢がない米は「死米」と呼ばれる（星川, 1990; 堀末, 1995; Raju *et al.*, 1991; Tashiro and Wardlaw, 1991; Approved Method 61-99, AACC International, 2000）. モチ米や低アミロース米も白色不透明な胚乳であるが、これはウルチ米で生じる白濁とは異なる. モチ米では、澱粉粒間に隙間は認められず、複粒澱粉の表面に凹部が多数あり、複粒澱粉の内側に面する単粒澱粉の表面に小さな穴が存在する（田代・江幡, 1975）.

ウルチ米の胚乳における白色不透明部は栽培環境によって生じるが、突然変異の導入により、遺伝的に胚乳の白濁する系統も作り出せる. 心白米で白濁部分が大きい変異体や、乳白米の変異体は、粉質変異体 (*floury endosperm mutant, flo*) とも呼ばれる（Satoh and Omura, 1981; Kaushik and Khush, 1991; Kang *et al.*, 2005）. 胚乳の白濁は、搗精時に胚乳を砕けやすくするため好ましくない形質として考えられているが、澱粉粒が離れやすく粉にしやすいと期待されている（Satoh and Omura, 1981; Homma *et al.*, 2007）.

胚乳白濁変異米は、少ない力で製粉できると考えられるため、乾式製粉でも澱粉への損傷が少なく、優れた粉が製造できるのではないかと考えられる. そこで、第 2 部では、胚乳白濁変異系統について、その成分特性、構造特性および粉としての加工特性を解析した.

第 1 章 胚乳白濁変異米の製粉特性

2-1-1. はじめに

ウルチ米に生じる白色不透明部は、穀粒を脆くするため、精米時に割れやすくなってしまい、好ましくない特性として扱われている (Raju *et al.*, 1991). しかし、裏を返すとそれだけ粉砕しやすいと考えられる. 一方、小麦は古くから製粉して利用されてきた. 小麦の穀粒は外皮が中心部まで入り組んだ構造をしているため、ロールミルによる乾式粉砕により胚乳部分を外皮から分離し、篩い分けによって外皮・アリーロン層・胚芽・胚乳を含む「ふすま」を取り除くことで製粉される. 米の胚乳は澱粉が密に詰まっているため製粉に向かず、ロールミルで製粉すると粒子が粗くザラザラとした粉になる. 小麦粉のように細かく製粉しようとする、製粉時に大きな力を加える必要があり、澱粉が損傷してしまう. 粉砕時に加わる圧力や熱などの物理的な力によって損傷した澱粉 (損傷澱粉) は、通常の澱粉よりも吸水しやすく、種子内在性澱粉分解酵素の作用を受けやすいことから、その後の生地等への加工特性に影響する. 米粉の製造においては、この損傷澱粉を低減させるために、コストのかかる湿式製粉が用いられている (Yeh, 2004). 粉砕しやすい穀粒を原材料として使用すれば、乾式製粉でも澱粉への損傷を低減させることが可能となり、製粉コストの低下につながると期待できる. 乳白変異米は澱粉粒が分離しやすいと報告されており (Satoh and Omura, 1981), 製粉にも適していると考えられる (Homma *et al.*, 2007). しかし、胚乳白濁変異米の製粉特性についてこれまで詳細に調べられたことはなく、白色不透明部が穀粒と粉の特性にどのような影響を及ぼすか明らかでない.

本研究では、半透明の一般米「コシヒカリ」を親として得られた胚乳白濁変異米を材料として、その形態学的特性、化学特性、物理特性について解析した. 遺伝的背景がほぼ同じであるため、コシヒカリとコシヒカリ由来の変異系統を比較することで胚乳白濁変異の影響を明確にすることができると考えられる.

2-1-2. 材料と方法

材料

一般品種である「コシヒカリ」および 20 種類のコシヒカリ由来の胚乳白濁変異米を材料

として用いた。コシヒカリはウルチ米で、胚乳の外観は半透明である。突然変異体は、1985年から1987年にかけて、コシヒカリへの γ 線照射もしくはエチルメタンスルホン酸 (EMS) 処理によって突然変異を導入し、胚乳白濁の形質を示す系統を選抜したものである。各変異系統の胚乳白濁形質は4世代以上安定しており、遺伝的に固定されていると考えられる。なお、本論文ではこれらの系統に FLO と大文字表記の系統名を付しているが、後代の検定は現在進行中であるため、必ずしも変異が優勢であることを示すものではない。

すべての材料は、近畿中国四国農業研究センター（広島県福山市）の水田圃場で2005年度および2006年度に栽培し、無作為に選んだ3株を収穫し、別々に分析を行った。2005年に収穫した種子は、形態学的解析に、2006年に収穫した種子は、成分解析と物理特性の解析に用いた。

種子の形態学的解析

種子をライトボックス上で観察し、写真撮影した。表面構造の解析には走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた。SEM 解析用のサンプルは、玄米を切断後にカーボンテープを用いて試料台に固定し、イオンスパッタ (日立 E102) を用いて白金-パラジウムでコーティングした。完成したサンプルは、SEM (日立 S-2500) を用い、高真空下、加速電圧 20 kV で観察した。

種子成分の解析

玄米を空調の整った製粉室で48時間以上静置することで水分含量を平衡化した後、玄米を0.5 mm スクリーンを装着したサイクロテックミル (Cyclotec 1093, Tecator AB) を用いて粉砕した。玄米粉の水分含量は、135°C、1時間の常圧加熱乾燥法により求めた。総澱粉含量は、1-1-2. と同様に、メガザイム社の Total Starch Assay Kit を用いて、アミログルコシダーゼ/ α -アミラーゼ法に基づき定量した。窒素含量は、窒素分析計 rapidNIII (Elementar Analysensysteme GmbH) を用いて、デュマ燃焼法 (AOAC 968.06, 1990) に基づき測定した。窒素含量の定量には、アスパラギン酸 (A8949, Sigma-Aldrich) を標準物質として用いた。アミロース含量は、コンカナバリン A 法 (Gibson *et al.*, 1997) に基づき、メガザイム社の Amylose/amylopectin Assay Kit を用いて定量した。即ち、サンプル中の脂質を取り除いた後、コンカナバリン A 処理を行うことでアミロペクチンを沈殿させて取り除き、上清中のアミロースを定量した。同時に、アミロペクチンを含むサンプルについて、グルコースに酵素

分解し、グルコース量から総澱粉量を測定した。この総澱粉量に対するアミロースの割合を算出した。

損傷澱粉の測定

玄米粉中の損傷澱粉含量は、AACC 公定法 76-31 (AACC International, 2000) に基づき、キット (Starch Damage Assay Kit, Megazyme) を用いて測定した。即ち、米粉をカビ由来の α -アミラーゼ処理することにより、損傷を受けた澱粉のみをマルトサッカライドと限界デキストリンとに分解し、これをアミログルコシダーゼでグルコースにまで分解し、生成されたグルコース量を吸光度測定によって定量した。

物理特性の解析

玄米を空調の整った部屋で 24 時間以上静置した後、単穀粒評価システム (Single kernel characterization system, SKCS) (モデル 4100, Perten Instruments AB) を用いて 200 粒の穀粒硬度を測定した。SKCS の概要を図 2-1-1 に示す。玄米粉の粒度分布は、レーザー回折式乾式粒度分布測定装置 (HELOS&RODOS, Sympatec GmbH) を用いて解析し、累積分布 50% を示す粒子径を中位径とした。玄米粉の糊化特性は、ラピッドビスコアナライザー (RVA) (モデル 3D+, Newport Scientific Pty. Ltd.) を用いて、AACC 公定法 61-02 (AACC International, 2000) に基づき測定した (図 2-1-2)。

統計解析

全ての測定は 3 回以上行い、得られた結果を平均した。コシヒカリと胚乳白濁系統間における平均値の対比較は、t 検定を用いて行った。主成分分析は Statistical Analysis System ソフトウェア (SAS ver. 9.1.3, SAS Institute Inc.) の PRINCOMP プロシジャを用いて行った。

2-1-3. 結果

胚乳白濁変異米の形態的特徴

胚乳の白濁程度を明らかにするために、ライトボックス上に玄米と玄米の横断面を並べて撮影した (図 2-1-3)。親系統であるコシヒカリは半透明で、ライトボックスの光を透過する一方、胚乳白濁変異米は白色不透明部が光を散乱するため暗く見えた。玄米横断面から、

胚乳白濁変異系統における白色不透明部の大きさにはバリエーションがあることが分かった。胚乳白濁変異系統は、胚乳の白濁程度から二つのグループに分けられた。一つは、胚乳全体が白濁する「乳白米」のような外観を示すグループで、もう一つは円盤状の白濁部分が胚乳中央部に存在する「心白米」のような外観を示すグループである。胚乳白濁変異系統のうち、FLO69, FLO23, FLO36, FLO113, FLO114, FLO85, FLO61 は乳白のグループに、FLO115, FLO28, FLO10, FLO21, FLO105, FLO100, FLO106, FLO75, FLO110, FLO86, FLO89, FLO126, FLO96 は心白のグループに分類した。

胚乳内の構造を解析するため、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて玄米横断面を観察した (図 2-1-4)。半透明なコシヒカリの胚乳と、胚乳白濁米 (FLO115, FLO86, FLO96 (図 2-1-4) 及び他の心白グループ (写真省略)) の周辺部で認められる半透明部分では、細胞と複粒澱粉 (アミロプラスト) が密に詰まっていた。複粒澱粉の内部には単粒澱粉が密に詰まっていることが観察された。胚乳白濁米 (FLO36, FLO85, FLO115, FLO86, FLO96 (図 2-1-4) 及び他の全ての胚乳白濁系統 (写真省略)) の白色不透明部では、複粒澱粉が疎に蓄積されており、単粒澱粉が断面に露出しているのが観察された。白濁部分には無数の空間が認められた。なお、第 1 部で解析したプロテインボディについては、単粒澱粉よりも小さいため図 2-1-4 では判別できなかった。

胚乳白濁変異体で認められた、澱粉粒間に隙間のある白色不透明部の構造は、これまで報告されているウルチ米の胚乳白濁部 (田代・江幡, 1975; Satoh and Omura, 1981; Kaushik and Khush, 1991; Tashiro and Wardlaw, 1991; Kim *et al.*, 2000; Listle *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2005) と同じであった。モチ米や低アミロース米では、澱粉粒間に隙間はなく、複粒澱粉表面に多数の凹みと単粒澱粉表面に小さな穴が認められる (田代・江幡, 1975)。胚乳白濁変異米の白色不透明部の構造は、澱粉粒間に隙間がある点が、モチ米や低アミロース米の構造とは異なっていた。

胚乳白濁変異米の物理的特徴

胚乳内に空間の多い構造は粒重の低下をもたらすと考えられるため、千粒重を調査した。FLO115, FLO10, FLO100, FLO96 を除き、ほとんどの胚乳白濁変異米は、親系統のコシヒカリよりも千粒重が有意に軽かった (表 2-1-1)。乳白グループに分類される変異系統は全てコシヒカリよりも千粒重が軽いことから、白色不透明部に伴って生じる空間の多い胚乳構造は、粒重と密接に関係すると考えられた。心白の表現形を示す *flo4* 変異体は、野生型より

も粒重が有意に軽いと報告されている (Kang *et al.*, 2005) が、本研究で用いたいくつかの心白変異系統は、コシヒカリと同程度の粒重を示した。

また、胚乳内の空間は穀粒を脆くすると考えられるため、SKCS を用いて穀粒硬度 (単位: hardness index, HI) を測定した (表 2-1-1)。FLO96 を除く全ての胚乳白濁変異系統の穀粒硬度は、親系統のコシヒカリよりも有意に ($P < 0.01$) 低かった。小麦の穀粒は、その硬さによって「extra soft ($HI \leq 9$)」、「very soft ($10 \leq HI \leq 24$)」、「soft ($25 \leq HI \leq 34$)」、「medium soft ($35 \leq HI \leq 44$)」、「medium hard ($45 \leq HI \leq 64$)」、「hard ($65 \leq HI \leq 80$)」、「very hard ($81 \leq HI \leq 90$)」、「extra hard ($91 \leq HI$)」のように分類される (Approved Method 55-31, AACCI International, 2000)。日本においては、軟質小麦、中間質小麦、硬質小麦の三種に分類される。乳白変異系統は、軟質小麦 (soft から medium soft) と同程度の硬さを示す一方、心白変異系統は、硬質小麦 (medium hard から hard) と同程度の硬さを示した。コシヒカリの穀粒硬度は、硬質小麦 (hard) と同程度であった。Tamaki *et al.* (2006) は、半透明の米の穀粒硬度は心白の米よりも有意に硬いと報告している。本研究では、澱粉粒が密に詰まった構造をほとんど持たない乳白系統において、穀粒硬度が特に低かった。このことは、胚乳の白濁とそれに伴う疎な胚乳構造が、穀粒硬度の低下をもたらしていることを示唆している。

胚乳白濁変異米の化学特性

澱粉粒間に隙間がある胚乳では澱粉含量が低下している可能性があるため、総澱粉含量を定量した。FLO23 と FLO61 の玄米総澱粉含量は、コシヒカリよりも有意に低かった (表 2-1-1)。他の変異系統の総澱粉含量も、コシヒカリより低い傾向が認められた。胚乳白濁粒で総澱粉含量が低くなる傾向は、他の粉質変異系統や環境要因で発生する白色不透明粒ではこれまで報告されていない。

また、アミロース含量を定量したところ、FLO69, FLO23, FLO36, FLO61, FLO28, FLO10, FLO21, FLO105, FLO100, FLO126 においてコシヒカリよりも有意に低いことが明らかになった。一方、FLO89 と FLO96 はコシヒカリよりもアミロース含量が高かった (表 2-1-1)。本研究で用いた胚乳白濁系統の多くは、コシヒカリよりも低いアミロース含量を示したが、その胚乳の構造はモチ米や低アミロース米のものとは異なっているため、アミロース含量の低下はモチや低アミロース系統とは異なる機構で生じていると考えられる。

環境要因で発生する胚乳白濁米は、半透明の穀粒よりもアミロース含量が有意に低くなると報告されている (Kim *et al.*, 2000)。また、水田圃場の試験では、高温によって生じた

胚乳白濁粒は、半透明の粒よりもアミロース含量が低くなるが、ガラス温室の試験では逆にわずかに高くなるとも報告されている (Lisle *et al.*, 2000). Patindol and Wang (2003) は、圃場で栽培した米を材料として、胚乳白濁粒から精製した澱粉は、半透明の胚乳から精製した澱粉よりもアミロース含量が低く、胚乳の白濁がアミロース含量の低下と関係していると報告している. Tamaki *et al.* (2006) は、遺伝的に心白が生じやすい系統を材料として、心白の粒と心白のない粒を比較し、アミロース含量には有意差が無いと結論づけている. 粉質の形質を持つ *flol*, *flo2*, *flo4* 変異体では、アミロース含量は親系統よりも低くなる (Kaushik and Khush, 1991; Kang *et al.*, 2005). これらの報告から、胚乳白濁粒のアミロース含量は、遺伝背景によって異なると考えられる. 本研究で用いた胚乳白濁変異系統は様々なアミロース含量を示したので、胚乳白濁系統間で白濁の生じる機構は異なる可能性がある.

小麦では、一般に、硬質で硝子質のものはタンパク質含量が高い (Cornell and Hovelings, 1998). しかし、コシヒカリとその胚乳白濁変異系統の間で窒素含量に有意な差はなかった (表 2-1-1). また、タンパク質組成についても、胚乳白濁変異系統の SDS-PAGE バンドパターンはコシヒカリと一致していた (データ省略).

胚乳白濁変異米から調製した玄米粉の損傷澱粉と粒径

胚乳白濁変異系統からサイクロテックミルで調製した米粉は、いずれもコシヒカリより損傷澱粉含量が有意に低かった (表 2-1-1). 特に、穀粒硬度の低い系統は損傷澱粉が低くなり、SKCS 硬度と損傷澱粉含量の間には有意な相関が認められた ($r = 0.95^{**}$). 市販の米粉は、損傷澱粉を少なくするために、精米を水に浸して、湿式または半乾式製粉により製造される (Yeh, 2004). 従来の半乾式製粉により製造された、市販されている米粉 (上新粉もしくは上用粉) の損傷澱粉含量は、7.1~17.8%である (Araki *et al.*, 2009). 乳白変異系統は、乾式製粉でも損傷澱粉の少ない米粉が得られたことから、米粉製造に適していると推測される.

また、穀粒硬度の低い系統はコシヒカリよりも粒子径が有意に小さくなった (表 2-1-1). SKCS 硬度と粒子の中位径との間には有意な相関が認められた ($r = 0.89^{**}$). つまり、穀粒硬度の低い系統ほど、細かい米粉になった. 胚乳白色不透明部に認められる疎な構造は、細胞や澱粉粒を互いに離れやすくするため、粒子径が細かくなると考えられた.

穀粒と粉の特性に基づく胚乳白濁系統の分類

胚乳白濁系統とコシヒカリの穀粒と粉における物理化学的特徴を総括するため、主成分分析によって表 2-1-1 のデータを解析した。第 1 主成分 (PC1) と第 2 主成分 (PC2) が有意で (固有値 > 1), PC1 と PC2 の累積寄与率は 76%であった。PC1 は寄与率 58%を占め、千粒重 ($r=0.75^{**}$) と総澱粉含量 ($r=0.88^{**}$), 穀粒硬度 ($r=0.91^{**}$), 損傷澱粉含量 ($r=0.92^{**}$), 中位径 ($r=0.84^{**}$) と有意な正の相関を示し、窒素含量 ($r=-0.46^*$) と有意な負の相関を示した。PC2 は窒素含量 ($r=0.76^*$) と正の相関を, 粒重 ($r=-0.44^*$) と負の相関を示した。PC1 と PC2 の散布図から, 胚乳白濁系統は二つのグループに分けられた (図 2-1-5)。グループ A は FLO69, FLO23, FLO36, FLO113, FLO114, FLO85, FLO61 を含み, グループ B は FLO115, FLO28, FLO10, FLO21, FLO105, FLO100, FLO106, FLO75, FLO110, FLO86, FLO89, FLO126, FLO96 を含む (表 2-1-1)。コシヒカリはグループ B に近かった。

グループ A はグループ B に比べて有意に, 粒重が軽く ($P < 0.05$), 総澱粉含量が少なく ($P < 0.01$), 穀粒硬度が低く ($P < 0.01$), 損傷澱粉含量が低く ($P < 0.01$), 粒子径が小さかった ($P < 0.01$)。このグループは, 形態的特徴に基づく分類と一致していた。即ち, グループ A は乳白変異系統で, グループ B は心白変異系統で構成されていた。このことから, 胚乳白濁変異系統では, 白色不透明部の存在により, 穀粒や粉の物理化学的特性が変化していると結論づけられた。

また, 主成分分析によるグループの分離は, SKCS 硬度と損傷澱粉の相関図および SKCS 硬度と中位径の相関図においても見いだされた (図 2-1-6)。損傷澱粉が少なくかつ粒子径の細かい米粉が, 乳白変異系統 (グループ A) から得られた。胚乳白濁変異系統は, 図 2-1-6 で二つのグループに分かれるが, 胚乳において白色不透明部が増加すると, 穀粒の硬さが大幅に低下する境界が存在する可能性があると考えられた。もしくは, この二つのグループの中間の特性を示す系統が存在する可能性もあると考えられた。

胚乳白濁変異系統の玄米粉における RVA 糊化特性

コシヒカリとその胚乳白濁変異系統から調製した玄米粉の RVA 糊化特性を表 2-1-2 に示す。ほとんどの胚乳白濁変異系統は, コシヒカリよりも最高粘度・最低粘度・最終粘度が低く, ブレークダウンとセットバック値が小さかった。胚乳白濁変異系統で最終粘度が低かったことから, これらの系統の粉はよりソフトなゲルを形成すると考えられた。FLO61, FLO28, FLO105, FLO126 のピーク時間は, コシヒカリよりも有意に遅かった。FLO69, FLO23,

FLO113, FLO114, FLO115, FLO105, FLO96 の糊化温度は、コシヒカリよりも有意に低い一方、FLO86, FLO89, FLO126 の糊化温度はコシヒカリよりも有意に高かった。コシヒカリと、コシヒカリと同等のアミロース含量を示す FLO85 と FLO86 の RVA プロファイルを図 2-1-7 に示す。コシヒカリと FLO85, FLO86 との RVA 曲線の違いは、これまでに報告された半透明粒と白濁粒の RVA 曲線の違い (Lisle *et al.*, 2000) とよく似ていた。このことは、穀粒における白色不透明部の存在と、RVA 粘度曲線の全体的な低下とが関係していることを示唆している。

Okadome *et al.* (1998) は、8~31%のアミロース含量を示す米について、アミロース含量と最終粘度との間に相関があると報告している。しかし、本研究では、アミロース含量と最終粘度との間に有意な相関は認められなかった。タンパク質も糊化特性に影響すると言われている (Fitzgerald *et al.*, 2003) が、コシヒカリと胚乳白濁系統との間で窒素含量やタンパク質組成に差は無かった。有意な正の相関が、玄米の総澱粉含量と最高粘度 ($r = 0.86^{**}$)、最終粘度 ($r = 0.57^{**}$)、最低粘度 ($r = 0.58^{**}$) との間に認められたことから、胚乳白濁変異系統の玄米粉における粘度の低さは、澱粉含量の低さに由来すると考えられた。

RVA 特性には、製粉方法や粉の粒子径も影響する。粒子径の大きな粉は、細かいものよりも最高粘度が高いと報告されている (Okadome *et al.*, 1998)。胚乳白濁米は半透明の米よりも最高粘度と最終粘度が低いが、この RVA 特性の違いはアミロース含量やアミロペクチン構造、タンパク質組成のいずれによっても明確に説明できないと報告されている (Lisle *et al.*, 2000)。Lisle *et al.* (2000) は、複粒澱粉よりも単粒澱粉が多いといったような、白濁化による粒の構造変化によって起こる粉の違いが RVA 特性に影響するのではないかと述べている。細かい粒子は表面積が大きいいため、粒子径は粉と水の相互作用に大きな影響をもたらすと考えられる。粗い粉よりも細かい粉の方が、吸水能力が大きい (Nishita and Bean, 1982)。これらの報告から、粒子の細粒化が、吸水量の増加と粘度の低下を引き起こしていると考えられる。つまり、細かい粒子は膨潤しやすく、糊化が始まると、加熱と攪拌によって澱粉の崩壊が早く進むため、粘度が低くなると考えられる。

小麦粉では、損傷澱粉が増加するとアミログラフで測定した粘度のピークが低くなる (Evers and Stevens, 1988)。米粉においても、損傷澱粉が多いとアミログラフのピーク粘度が低くなり、吸水量が増える (有坂ら, 1992)。胚乳白濁変異米から調製した米粉は、コシヒカリから調製した米粉よりも損傷澱粉が低かった (表 2-1-1) が、FLO28, FLO126, FLO96 を除いてコシヒカリよりも最高粘度が低かった。本研究で用いた材料では、総澱粉含量の

RVA 特性への影響の方が、損傷澱粉の影響よりも大きかったと考えられる。粒子径を揃えた様々な損傷澱粉を示す粉や、損傷度の揃った様々な粒子径の粉など、試験に適した材料を得ることが困難なため、損傷澱粉と粒子径と糊化特性との関係は十分には解明されていない。

玄米粉の RVA 特性をまとめるため、主成分分析を行った。固有値が 1 以上であった第 1 主成分 (PC1)、第 2 主成分 (PC2)、第 3 主成分 (PC3) の寄与率はそれぞれ 61%、17%、15%で、累積寄与率 93%を占めた。有意な正の相関が、PC1 と最高粘度 ($r = 0.94^{**}$)、最低粘度 ($r = 0.94^{**}$)、ブレイクダウン ($r = 0.80^{**}$)、最終粘度 ($r = 0.97^{**}$)、セットバック ($r = 0.88^{**}$) との間に認められた。PC2 はピーク時間と正の相関を ($r = 0.81$)、ブレイクダウンと負の相関 ($r = -0.53^*$) を示した。PC3 は糊化温度と正の相関関係 ($r = 0.91^{**}$) にあった。これらの主成分のプロットでは、胚乳白濁系統もコシヒカリも均一に分散しており (図省略)、系統を分類することはできなかった。

2-1-4. 考察

本研究では、穀粒と粉の特性に及ぼす胚乳白濁変異の影響を明らかにした。形態観察と主成分分析から穀粒と粉の物理化学特性を総合的に捉えると、白色不透明部の大きな系統ほど PC1 スコアが小さいことから (図 2-1-5)、PC1 は白濁の影響を表していると考えられた。即ち、胚乳白濁変異の導入によって、穀粒硬度・千粒重・玄米総デンプン含量が低下し、その結果、得られる粉の損傷澱粉含量と粒子径が小さくなると考えられた。白濁部分の大きい乳白変異米からは、損傷澱粉が少なくかつ粒子径の細かい粉を簡単に得ることができると考えられる。

RVA 糊化特性の主成分分析からは、胚乳白濁の影響を明確に解釈することができなかった。しかし、乳白変異米から調製した粉は粘度が低かったことから、米加工品に新しいテクスチャーを付与することができる可能性がある。

いくつかの胚乳白濁系統は、過去に報告された粉質変異系統 (Satoh and Omura, 1981; Kaushik and Khush, 1991; Kang *et al.*, 2005) と同様の形態的特徴と化学的特徴を示した。このことは、本研究で用いた胚乳白濁遺伝子のいくつかは、既知の対立遺伝子と同一である可能性を示唆している。現在、対立性検定と遺伝子座の同定を進めており、乳白変異系統のうち 6 系統は同一遺伝子座にある劣性変異遺伝子に支配されることを明らかにしつつある。

胚乳白濁変異系統は、搗精中に割れやすいことから、市場で好ましくない形質として扱われ、育種においては白濁のない米が選抜されてきた。本研究で用いた乳白変異系統は、家庭用小型精米器（マジックミル RSKM5B, サタケ）で搗精した場合、21~27% (w/w)の重量ロスがあり、かつほとんどの粒が割れていた。これとは対照的に、コシヒカリを搗精した場合は、重量ロスは10% (w/w)にとどまり、砕米もほとんど発生しなかった。搗精時における重量ロスは、胚乳白濁部の脆い構造によって引き起こされる。よって、乳白変異米から精米粉を生産するためには、重量ロスの少ない新しい精米方法を開発する必要がある。また、玄米は精米よりもより栄養豊富なため、胚乳白濁変異米は、玄米粉としての利用に適していると考えられる。小麦は、製粉によって外皮・アリーロン層・胚芽・胚乳を含む「ふすま」を取り除いた小麦粉が利用されているが、ふすまを含む全粒粉もパン等に加工されて利用されている。ふすまはグルテンの膜形成を阻害することから、全粒粉はグルテンの特性を活かしたパンや麺には加工しにくいから、栄養価が高いことから、小麦粉に混合してパンや菓子等に広く利用されている。玄米粉も種皮や糠、胚芽を含むため、小麦の全粒粉と同様に、パン等への加工は困難であると考えられる。また、玄米粉は精米粉よりも褐色を帯びており、油を多く含むため酸化しやすいといった特性もある。しかし、玄米粉の加工特性については未解明な部分が多い。濱田ら（2010）は、気流粉碎機による半乾式製粉方法を用い、玄米の吸水時間を調整することで、製パン適性の良い玄米粉を製造する方法を報告している。糠の酸化による劣化を防ぐため、焙煎した玄米粉も販売されている。玄米粉の加工特性を明らかにすることで、乳白変異米を玄米粉として加工利用する方法が開発できると考えられる。

一般に、乾式製粉によって製造された粉は、粒子径が細かいほど損傷澱粉が多い（Nishita and Bean, 1982）。同一の気流粉碎機を用いた場合、半乾式製粉した粉は、乾式製粉した粉よりも損傷澱粉が少ない（有坂ら, 1992）。緒言でも述べたが、様々な加工用途において、湿式および半乾式製粉で製造された粉は乾式製粉で作られたものに比べて優れるが、粉の乾燥や排水処理が必要となる（Yeh, 2004）。本研究の結果は、適切な材料を使用すれば、乾式製粉においても損傷澱粉の少ない米粉を製造することが可能であることを示している。本研究で用いた乳白変異系統は、低コストで損傷澱粉が少なくかつ粒子径の細かい粉を生産するのに適した材料の候補だと考えられる。

2-1-5. 図表

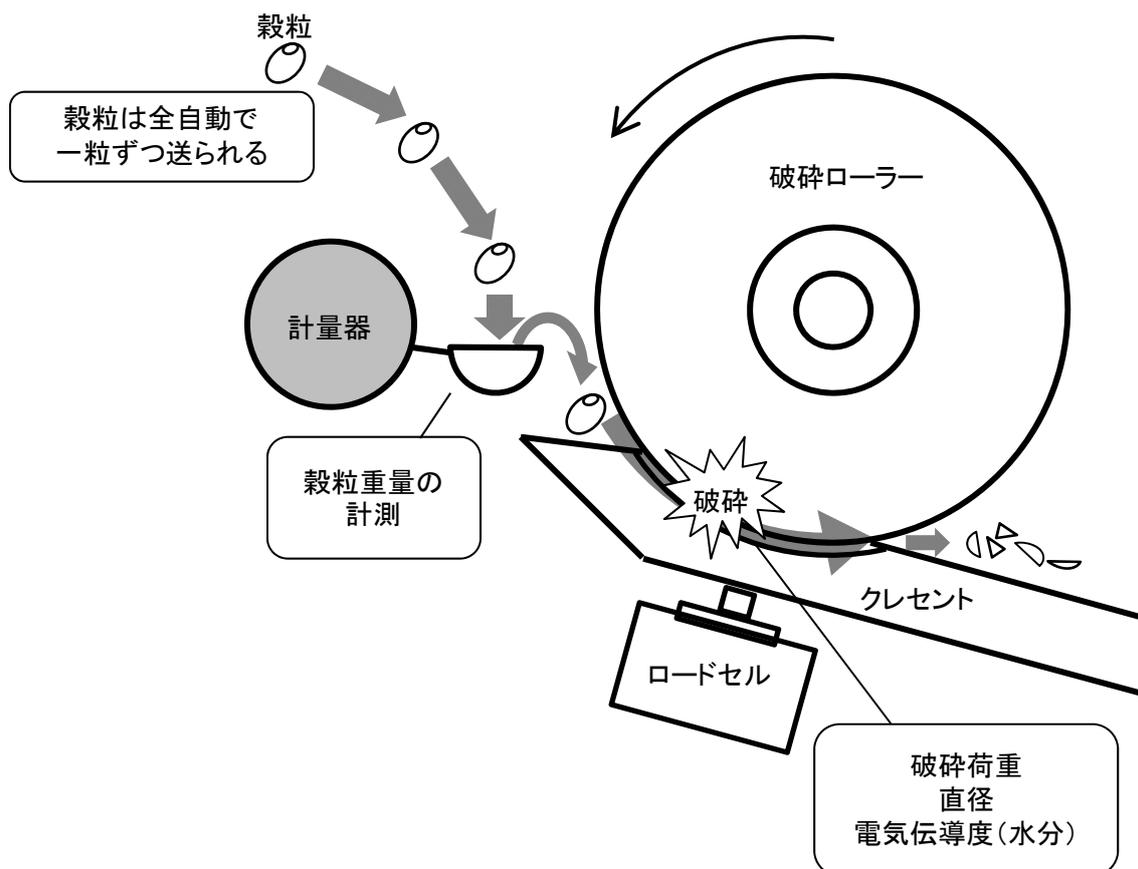


図 2-1-1. 単穀粒評価システム (SKCS) の概要.

SKCS は、測定サンプル個々の穀粒の「硬度」を測定するために、Perten Instruments 社と米国農務省 (USDA) の共同研究によって開発された装置。自動的に穀粒を分別し、個々の穀粒の重量・直径・水分・破碎強度を測定し、これらの測定パラメータを使用して硬度 (Hardness Index, HI) が計算される。

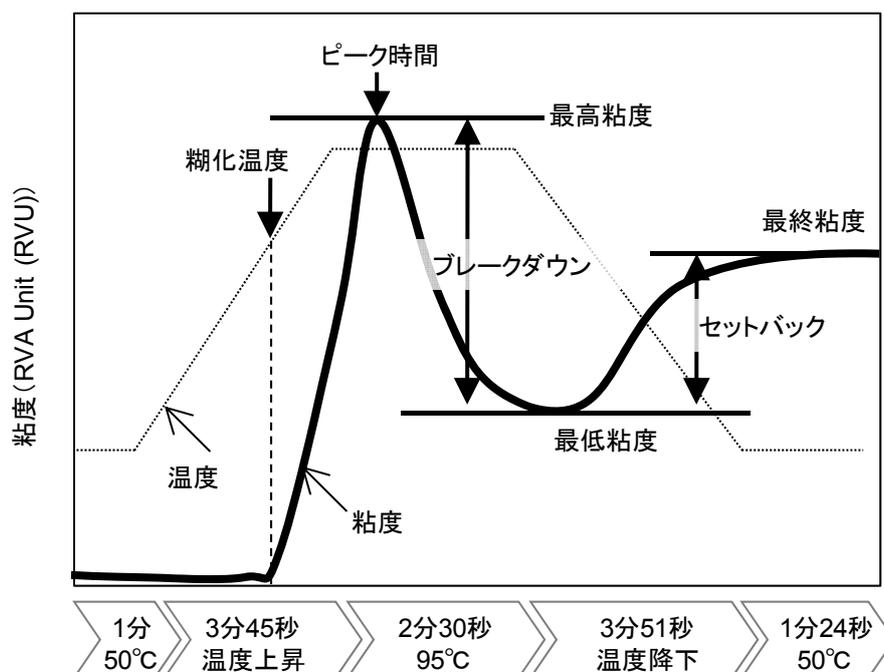


図 2-1-2. RVA 糊化特性の測定方法.

ラピッドビスコアナライザーは、糊化粘度特性を測定する装置である。アルミカップに米粉 3.0 g (12%水分換算) と水 25 ml を入れ、攪拌しながら、加温して一定の高温で保持した後、温度を下げる。この間の粘度の変化を測定する。測定条件は AACC 公定法 61-02 (AACC International, 2000) に従った。

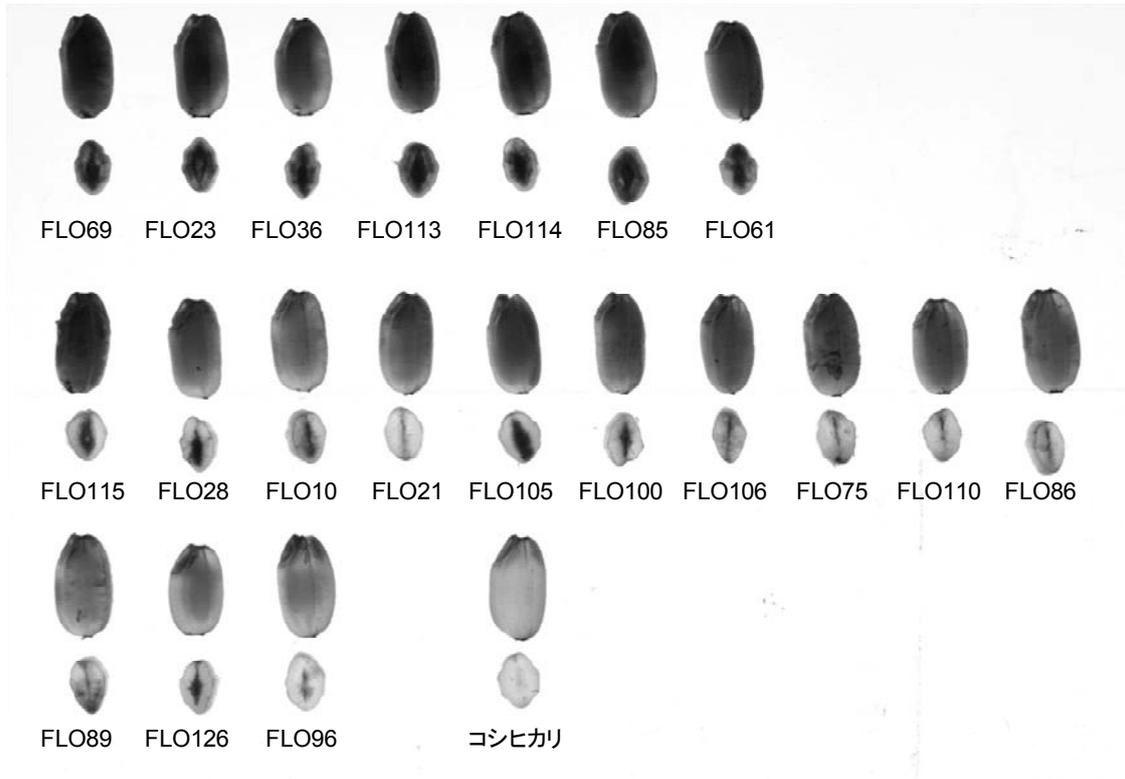


図 2-1-3. コシヒカリと胚乳白濁変異系統における玄米の外観と横断面.

各玄米の横断面は全粒の写真の下に示す.

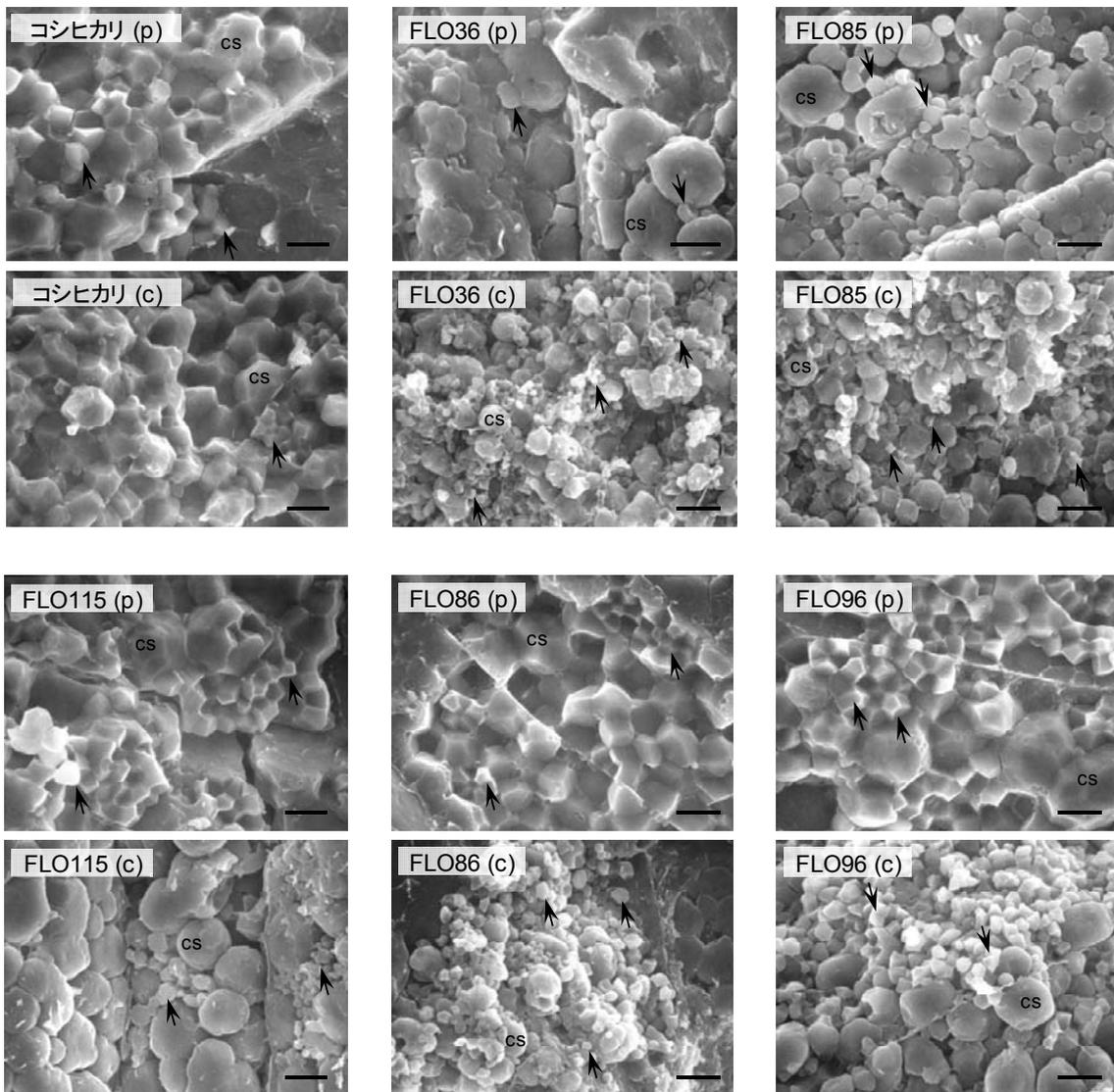


図 2-1-4. コシヒカリと胚乳白濁変異系統における玄米横断面の走査型電子顕微鏡写真.
 各変異系統から周辺部(p)および中心部(c)の2枚の写真を示す. 矢印は単粒澱粉を指す. CS,
 複粒澱粉. Bars = 10 μ m.

表 2-1-1. コシヒカリと胚乳白濁変異系統の穀粒および玄米粉における物理化学的特性

Line†	千粒重 (g, 乾物重)	SKCS HI (HI)	窒素含量 (%, 乾物重)	澱粉含量 (%, 乾物重)	アミロース 含量 (%)	損傷澱粉 (%)	中位径 (μ m)	PCA グループ
コシヒカリ	18.3 \pm 0.6	73 \pm 2	1.40 \pm 0.13	79.9 \pm 3.2	14.9 \pm 0.3	12.0 \pm 0.7	79.0 \pm 4.9	
FLO69 (86KE2)	16.1 \pm 0.3 **	29 \pm 2 **	1.35 \pm 0.10	75.1 \pm 0.9	14.0 \pm 0.0 **	5.7 \pm 0.3 **	43.0 \pm 2.5 **	A
FLO23 (86KG71)	15.8 \pm 0.1 **	30 \pm 1 **	1.54 \pm 0.05	74.0 \pm 0.5 *	13.4 \pm 0.2 **	5.8 \pm 0.2 **	52.6 \pm 1.3 **	A
FLO36 (87KG56)	16.3 \pm 0.4 **	31 \pm 2 **	1.46 \pm 0.05	74.6 \pm 0.9	12.2 \pm 0.1 **	5.7 \pm 0.2 **	51.5 \pm 2.1 **	A
FLO113 (87KE37)	15.3 \pm 0.5 **	32 \pm 2 **	1.48 \pm 0.05	75.0 \pm 0.7	14.7 \pm 0.9	6.4 \pm 0.3 **	50.6 \pm 1.5 **	A
FLO114 (87KE39)	16.7 \pm 0.6 *	35 \pm 3 **	1.42 \pm 0.04	75.6 \pm 0.8	14.7 \pm 0.2	5.7 \pm 0.3 **	55.0 \pm 0.5 **	A
FLO85 (86KE38)	16.6 \pm 0.3 **	35 \pm 2 **	1.50 \pm 0.02	75.0 \pm 0.5	15.4 \pm 0.2	6.4 \pm 0.3 **	47.9 \pm 1.0 **	A
FLO61 (85KE15)	15.3 \pm 0.2 **	39 \pm 2 **	1.54 \pm 0.01	73.8 \pm 1.1 *	11.4 \pm 0.1 **	6.4 \pm 0.4 **	60.7 \pm 2.4 **	A
FLO115 (87KE40)	18.2 \pm 0.5	52 \pm 0 **	1.34 \pm 0.04	77.8 \pm 1.4	14.4 \pm 0.7	9.6 \pm 1.0 *	69.6 \pm 7.3	B
FLO28 (87KG11)	16.5 \pm 0.3 **	54 \pm 2 **	1.46 \pm 0.07	75.9 \pm 1.6	11.6 \pm 0.1 **	9.1 \pm 0.9 **	63.0 \pm 2.9 **	B
FLO10 (85KG26)	17.7 \pm 0.7	55 \pm 1 **	1.43 \pm 0.03	76.9 \pm 1.1	12.7 \pm 0.2 **	9.8 \pm 1.0 *	70.6 \pm 6.4	B
FLO21 (86KG45)	16.4 \pm 0.4 **	56 \pm 2 **	1.41 \pm 0.06	75.6 \pm 0.8	12.5 \pm 0.2 **	8.9 \pm 0.2 **	74.0 \pm 2.3	B
FLO105 (87KE6)	16.8 \pm 0.1 **	57 \pm 2 **	1.30 \pm 0.01	76.3 \pm 2.1	14.2 \pm 0.1 *	9.6 \pm 0.2 **	62.2 \pm 1.6 **	B
FLO100 (86KE101)	16.9 \pm 0.7	57 \pm 1 **	1.57 \pm 0.06	76.2 \pm 1.0	14.0 \pm 0.1 **	10.2 \pm 0.4 *	68.7 \pm 1.9 *	B
FLO106 (87KE18)	16.4 \pm 0.3 **	58 \pm 1 **	1.43 \pm 0.01	76.4 \pm 0.7	14.7 \pm 0.3	10.2 \pm 0.5 *	66.2 \pm 0.9 *	B
FLO75 (86KE16)	16.2 \pm 0.2 **	59 \pm 2 **	1.41 \pm 0.06	75.6 \pm 0.7	16.3 \pm 2.2	9.8 \pm 0.1 **	63.1 \pm 3.2 **	B
FLO110 (87KE27)	16.3 \pm 0.5 **	59 \pm 0 **	1.45 \pm 0.06	75.5 \pm 0.9	14.6 \pm 0.4	9.7 \pm 0.3 **	78.1 \pm 3.7	B
FLO86 (86KE41)	16.0 \pm 0.4 **	62 \pm 2 **	1.46 \pm 0.04	75.2 \pm 1.3	15.2 \pm 0.2	10.4 \pm 0.3 *	59.7 \pm 2.0 **	B
FLO89 (86KE48)	16.0 \pm 0.5 **	66 \pm 1 **	1.50 \pm 0.04	74.7 \pm 0.4	16.2 \pm 0.3 **	9.4 \pm 0.2 **	75.7 \pm 4.3	B
FLO126 (87KE90)	16.1 \pm 0.3 **	66 \pm 2 **	1.47 \pm 0.04	77.7 \pm 0.3	12.7 \pm 0.4 **	10.1 \pm 0.1 **	75.2 \pm 2.3	B
FLO96 (86KE76)	17.3 \pm 0.4	72 \pm 2	1.38 \pm 0.01	77.6 \pm 0.6	17.7 \pm 0.3 **	10.2 \pm 0.3 *	80.5 \pm 0.5	B

平均値 \pm 標準偏差. SKCS HI, SKCS hardness index. 中位径は累積分布50%における粒子径. PCAグループは主成分分析による分類. †検定を用いて変異系統とコシヒカリとを比較した. *, 5%水準で有意. **, 1%水準で有意.

‡, 変異系統は穀粒硬度の低い順に並べた. 変異系統名の後ろに括弧書きで別名を表示. 別名の頭2桁は突然変異処理を行った年度を示す. KEはコシヒカリへのEMS処理を、KGはコシヒカリへの γ 線処理を表す.

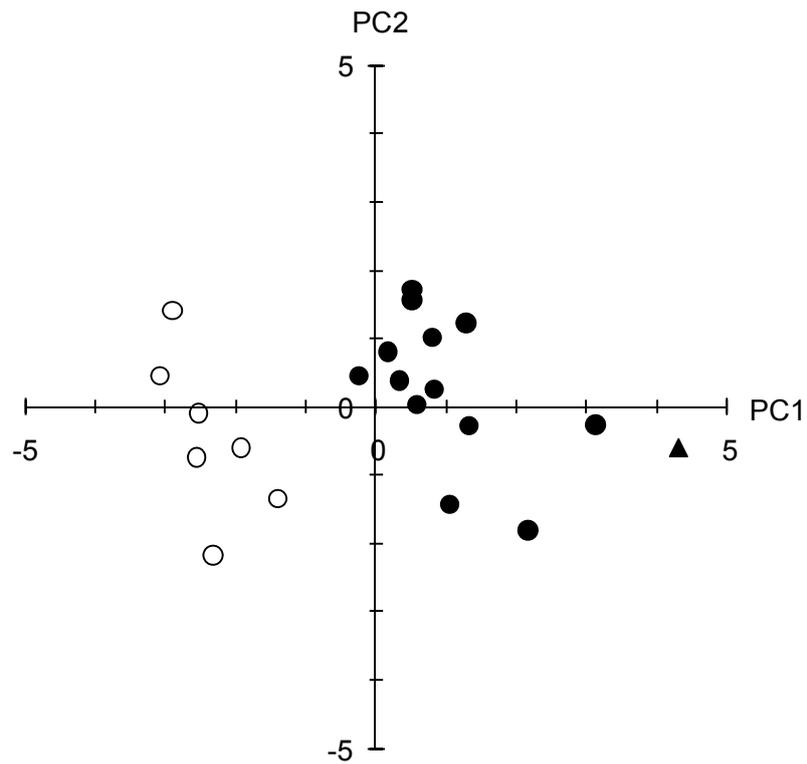


図 2-1-5. 物理化学的特性に基づいた第 1 主成分 (PC1) と第 2 主成分 (PC2) の散布図.
 コシヒカリと各変異系統の物理化学的特性値(表 2-1-1)の主成分分析に基づいて作成した.
 ○, グループ A; ●, グループ B; ▲, コシヒカリ.

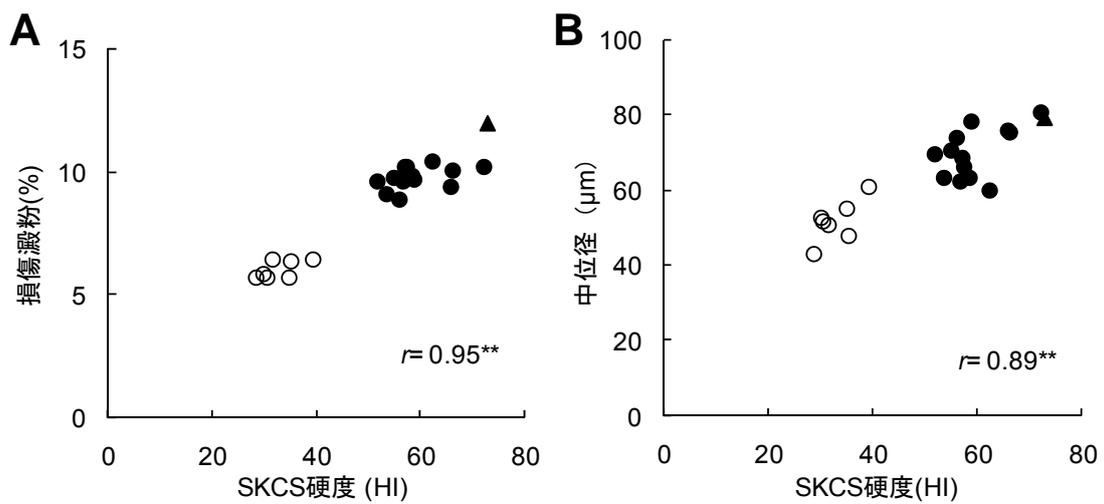


図 2-1-6. SKCS 硬度と粉の損傷澱粉の関係 (A) 及び SKCS 硬度と粉の中位径との関係 (B).

○, グループ A; ●, グループ B; ▲, コシヒカリ.

表 2-1-2. コシヒカリと胚乳白濁変異系統から調整した玄米粉の RVA 糊化特性

Line†	最高粘度 (RVU)	最低粘度 (RVU)	ブレイクダウン (RVU)	最終粘度 (RVU)	セットバック (RVU)	ピーク 時間 (min)	糊化温度 (°C)
コシヒカリ	210.4±13.2	84.4±1.5	126.0±12.6	152.4±1.7	68.0±0.1	5.4±0.0	73.1±0.1
FLO69	171.3±6.2 **	73.8±3.3 **	97.5±3.6 *	130.6±4.1 **	56.8±0.8 **	5.4±0.1	71.8±0.4 **
FLO23	162.4±2.1 **	71.1±0.9 **	91.3±1.2 **	131.4±2.1 **	60.3±2.0 **	5.4±0.0	72.3±0.1 **
FLO36	163.7±4.9 **	70.1±1.0 **	93.6±3.9 *	129.4±4.2 **	59.3±3.4 *	5.4±0.1	72.3±0.8
FLO113	160.0±4.9 **	70.4±3.4 **	89.6±1.6 **	130.2±5.5 **	59.8±2.2 *	5.4±0.0	72.2±0.1 **
FLO114	168.6±0.7 *	73.5±1.3 **	95.1±0.6	135.4±2.7 **	61.9±1.4 **	5.4±0.0	71.7±0.5 **
FLO85	163.3±5.7 **	71.1±1.8 **	92.2±3.9 *	129.4±2.1 **	58.3±1.1 **	5.4±0.0	72.5±0.5
FLO61	151.5±12.8 **	66.3±6.4 **	85.2±6.6 **	119.5±9.5 **	53.2±3.1 *	5.6±0.0 **	73.2±0.1
FLO115	164.5±12.3 *	63.2±6.9 **	101.3±5.5 *	114.6±15.0 *	51.4±8.2	5.2±0.1	71.9±0.3 **
FLO28	179.7±2.0	75.6±0.5 **	104.1±2.4 *	137.0±1.3 **	61.4±1.3 **	5.5±0.0 *	73.1±0.2
FLO10	181.4±7.1 *	76.4±1.9 **	105.1±6.5	136.7±4.0 **	60.3±2.8 *	5.4±0.0	73.1±0.1
FLO21	170.5±3.7 **	73.0±0.8 **	97.5±3.9 *	131.5±3.0 **	58.5±2.3 *	5.4±0.0	72.8±0.5
FLO105	183.1±2.3 *	83.6±1.4	99.5±2.7 *	147.2±3.3	63.6±1.9	5.6±0.0 **	70.6±0.8 **
FLO100	168.5±1.9 **	72.9±1.4 **	95.5±1.0	134.5±2.3 **	61.6±1.0 **	5.4±0.0	73.0±0.1
FLO106	173.7±2.7 **	72.6±1.2 **	101.2±2.6 *	138.2±4.6 **	65.6±4.3	5.4±0.1	73.2±0.9
FLO75	167.6±4.2 **	71.3±2.5 **	96.3±1.9	132.0±3.5 **	60.7±1.1 **	5.3±0.0	73.2±0.0
FLO110	172.4±5.5 **	76.4±2.4 **	96.0±4.8 *	139.7±5.3 *	63.3±3.0	5.4±0.0	74.1±0.4
FLO86	162.5±6.0 **	70.3±2.1 **	92.3±3.9 *	133.4±3.6 **	63.1±2.2	5.4±0.0	74.0±0.1 **
FLO89	163.1±1.9 **	71.9±1.8 **	91.2±3.1 **	135.6±4.1 **	63.7±2.5	5.4±0.0	74.1±0.4 *
FLO126	188.0±5.5	85.5±3.5	102.4±3.3 *	155.1±6.6	69.6±3.2	5.6±0.0 **	73.8±0.1 **
FLO96	194.7±4.7	78.3±0.8 **	116.4±4.1	152.4±3.8	74.1±4.1	5.4±0.0	72.2±0.2 **

平均値±標準偏差. t検定を用いて変異系統とコシヒカリとを比較した. *, 5%水準で有意. **, 1%水準で有意. †, コシヒカリおよび胚乳白濁変異系統の並び順は表2-1-1に同じ.

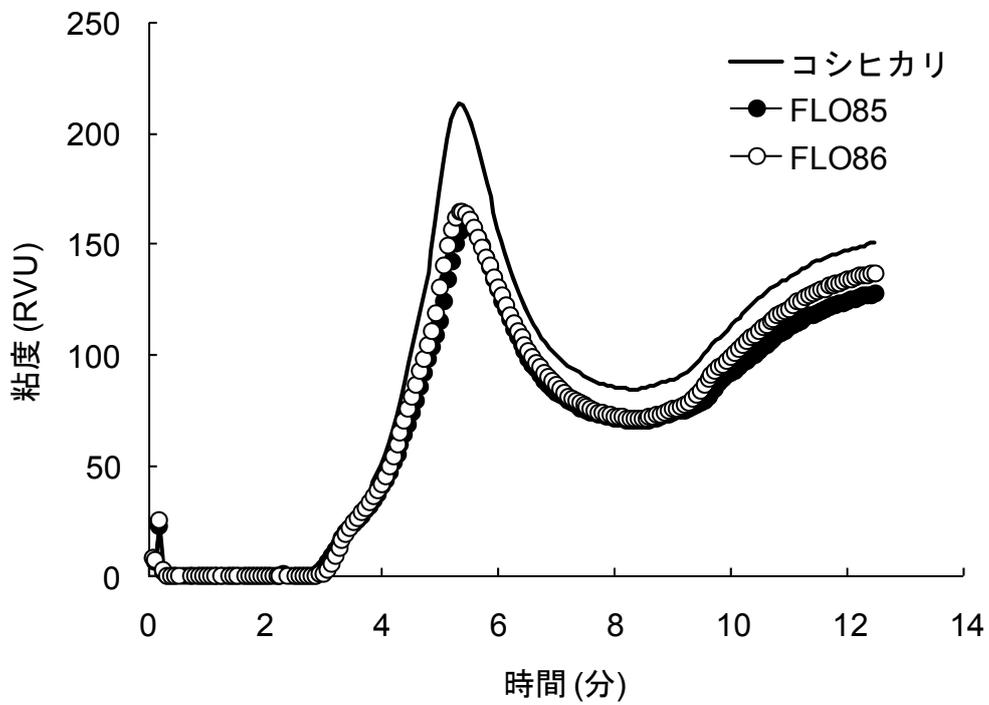


図 2-1-7. コシヒカリ及びコシヒカリと同程度のアミロース含量を示す胚乳白濁変異系統から調製した玄米粉の RVA 粘度曲線.

第2章 乳白変異米の米粉としての加工適性評価

2-2-1. はじめに

米は小麦粉の代替粉として使われ、パン等に加工される。米は小麦のグルテンのように、発酵によって生じたガスを保持する膜を形成できる種子貯蔵タンパク質を持たない (Yeh, 2004)。このため、米粉を用いたパン (米粉パン) は次の3種の製造方法によって作られる。一つ目は、「グルテン添加米粉パン」で、米粉に小麦から抽出したグルテンを2割程度添加する。二つ目は「グルテンフリー米粉パン」で、米粉に増粘多糖類などの粘性物を添加する。三つ目は、「米粉混成パン」で、小麦粉に米粉を1~5割程度混合して作られる (Nishita et al., 1976; 青木, 2008; 與座ら, 2008)。欧米諸国では小麦アレルギーのためのグルテンフリー米粉パンが最も広まっているが、日本では、米粉の割合が多く比較的簡単に作ることのできるグルテン添加米粉パンが、近年急速に普及しはじめている。

米粉パンに適する米粉の特性は、作成する米粉パンの種類によって異なる。粒子径が粗くて損傷澱粉の少ない米粉はグルテンフリー米粉パンに向いており、粒子径が細かくて損傷澱粉が多い米粉は小麦粉7割/米粉2割の米粉混成パンに適している (Nishita and Bean, 1982)。また、損傷澱粉含量が10~15%で細かい粒子径の米粉が、米粉を3~4割含む米粉混成パンには適している (高野ら, 1986)。粒子径が40 μm 前後で、損傷澱粉の少ない粉がグルテン添加米粉パンに適しているとされ (江川, 2003), Araki et al. (2009) によって、米粉の損傷澱粉含量とグルテン添加米粉パンの比容積との間に有意な負の相関が確認された。米粉の糊化特性もまた、米粉パンの特性に影響すると示唆されている (Nishita and Bean, 1979)。

現在、米粉パン用の米粉は、主に穀粒をペクチナーゼ処理した後に、気流粉碎機で半乾式製粉する方法 (宍戸・江川, 1992; 諸橋ら, 2000) によって製造される。この方法により、損傷澱粉が極めて少なくかつ粒子径が細かい米粉を製造することができるが、高額な製粉機械と複雑な製粉工程が必要である。一方、衝撃式粉碎機 (ピンミル) を用いて乾式粉碎することでも米粉を作ることができる。この米粉は、気流粉碎機で製造された米粉よりも粗く、損傷澱粉が多い (Araki et al., 2009)。しかし、ピンミルは気流粉碎機よりも安価で、精米を製粉機に投入するだけで米粉が調製できるという簡便性を備えている。このため、もし米粉パン加工に適する米粉がピンミルでも製造できれば、製粉コストの低下と米

粉利用の普及につながると考えられる。

前章で、乳白変異米は乾式製粉でも粒子径が細かく、損傷澱粉が少ない米粉になることを見いだした。近年急速に普及しているグルテン添加米粉パンにおいては、粒子径が細かくかつ損傷澱粉の少ない米粉が適していると報告されている (Araki *et al.*, 2009)。このため、乳白変異系統は、ピンミル乾式製粉による米粉製造の原材料として有効ではないかと期待される。そこで、コシヒカリとその乳白変異系統の精米を材料として、気流粉碎機による半乾式製粉法とピンミルによる乾式製粉法によって米粉を調製し、米粉の特性とグルテン添加米粉パンの比容積を調査した。また、グルテン添加米粉パンの比容積に影響する米粉の糊化特性を明らかにするため、RVA 糊化特性と比容積との相関関係を解析した。

2-2-2. 材料と方法

材料

コシヒカリとコシヒカリ由来の乳白変異系統 6 系統を材料として用いた (表 2-2-1)。これらの系統を、近畿中国四国農業研究センター (広島県福山市) の水田圃場で 2007 年度に栽培した。籾摺りはロール式籾摺機 (THU35B, サタケ) を用いて行い、精米は家庭用小型精米器 (マジックミル RSKM5B, サタケ) を使用して行った。

気流粉碎機による製粉

新潟県農業総合研究所食品研究センターにおいて、精米をペクチナーゼ処理後に、気流粉碎機を用いて半乾式製粉した。製粉は、基本的に新潟県の特許 (宍戸・江川, 1992; 諸橋ら, 2000; 高橋ら, 2009) に従って行った。精米 1 kg を水洗後、ペクチナーゼ製剤 (5 unit/L, スミザイム PTE, 新日本化学工業株式会社) を含む約 0.02 M のクエン酸ナトリウム水溶液に 40 °C 下で 1 時間浸漬した。その後、脱水して気流粉碎機 (YAKUSHIN KV-3-4S, 株式会社躍進機械製作所) を用いて、湿った状態のまま粉碎した。粉碎時に加水は行わなかった。粉は粉乾燥機 (MDW-20, 不二パウダル株式会社) を用いて水分含量約 10% になるまで乾燥させた。

ピンミルによる製粉

精米 1 kg を穀粒粉碎機 (粉じまん KJ-II, 宝田工業株式会社) で粗粉碎したのち、200 μm

のスクリーンを装着したピンミル（高速回転万能粉碎機，宝田工業株式会社）を用いて乾燥した状態で粉碎した．得られた粉は電動篩（宝田工業株式会社）を用いて篩い分け，150 μm 目開きを通過した粉を回収した．

穀粒と粉の特性の解析

精米を空調の整った部屋で48時間以上静置した後，SKCS（モデル4100，Perten Instruments AB）を用いて精米300粒の穀粒硬度を測定した．精米粉の粒度分布，総澱粉含量，損傷澱粉含量，RVA糊化特性，水分含量は，2-1-2に記載した方法で測定した．

製パン試験

グルテン添加米粉パンは，Araki *et al.* (2009)の方法に基づいて焼成した．製パン試験のフローチャートを図2-2-1に示す．材料は，80 g（14%水分ベース）の精米粉，20 g（生鮮重，水分含量~5.7%）のグルテン製剤（グルテンと乳化剤であるグリセリン脂肪酸エステルを含む）（ドウマスターFR，理研ビタミン株式会社），5 gの上白糖，2 gの食塩，10 gのショートニング（ふっくらパンショートニング，日本製粉株式会社），1.5 gのドライイースト（ふっくらパンドライイースト，日本製粉株式会社），80 mlの蒸留水を用いた．予め10分の1スケールの材料を用いてミキソグラフ（National Manufacturing Co., USA）で最大粘度に到達する時間を測定し，ミキシング時間を決定した．ピンミキサー（National Manufacturing Co）に全ての製パン材料を投入し，ミキシング時間に到達するまで混合した．パン生地を丸めてボウルに入れ，ラップをかけて27°C下で20分間生地を休ませた．その後，成形機（スーパーミニ・モルダーSMMR2501，株式会社愛工舎製作所）に通して空気を抜いて生地を巻き，小型の食パン型に入れた．これを40°C，湿度80%に設定したホイロで50分間発酵させたのち，200°Cの電気オーブンに入れて25分間焼成した．オーブンから取り出して型からパンを抜き室温で放冷し，1時間後にパンの重量を測定し，同時に菜種置換法によりパンの容積を測定した．重量あたりの容積を，パン比容積（ml/g）として計算した．

統計解析

穀粒と粉の特性解析については，2回以上測定を行い，製パン試験は4反復行った．得られた値は平均した．統計解析ソフト（SAS v.9.2, SAS Institute）のGLMプロシジャを用いて，Tukeyの多重検定を，PRINCOMPプロシジャを用いて主成分分析を行った．

2-2-3. 結果

穀粒の白濁と硬度

コシヒカリと乳白変異米における精米の穀粒硬度を表 2-2-1 に示す。コシヒカリの精米の穀粒硬度（単位，HI）は 64 で，乳白変異米の穀粒硬度は 17～28 とコシヒカリよりも低かった。前章で明らかにした通り，乳白変異米の玄米の穀粒はコシヒカリよりも軟らかい。精米においても，胚乳白色不透明部と穀粒硬度が密接に関連していることが確認された。

精米粉の総澱粉含量

乳白変異米からピンミルで調製した精米粉の総澱粉含量は，84.2～86.8%であり，コシヒカリから気流粉碎機で調製した精米粉の 91.4%よりも有意に少なかった（表 2-2-2）。また，FLO69 と FLO85 をピンミルで製粉した精米粉の澱粉含量はそれぞれ 85.1%，84.2%で，同じ系統を気流粉碎機で製粉したもの（それぞれ 89.1%，88.3%）よりも有意に少なかった。気流粉碎機による製粉には水洗とペクチナーゼ処理の工程が含まれているため，糠や胚乳の周辺部，胚乳中の水溶性物質が取り除かれると考えられる。これら物質の除去が，気流粉碎機による製粉で調製した米粉における総澱粉含量を高めたと考えられる。前章において，玄米粉では，乳白変異米はコシヒカリよりも澱粉含量が低くなる傾向を示した。気流粉碎機による製粉においても，ピンミルによる製粉によっても，同一の製粉方法であれば，乳白変異系統とコシヒカリの間で総澱粉含量に有意な差はなかった。

精米粉の損傷澱粉

気流粉碎機で製粉した米粉はいずれも損傷澱粉含量が 1.2～3.2%と低かった（表 2-2-2）。以前から報告されているように（有坂ら，1992；宍戸・江川，1992），ペクチナーゼ処理による穀粒の軟化と，湿った状態で製粉することが澱粉への損傷を低減していると考えられた。ピンミルで製粉したコシヒカリの損傷澱粉は 8.9%になり，気流粉碎機で製粉したものよりも多かった。乳白変異系統は，ピンミルで製粉しても気流粉碎機で製粉しても，コシヒカリよりも損傷澱粉が有意に少なかった。ピンミルで製粉した乳白変異米の損傷澱粉は 5.5～6.9%になり，ピンミルで製粉したコシヒカリよりも少ないものの，気流粉碎した米粉よりは多かった。前章では，乾式製粉において，乳白変異系統の玄米はコシヒカリよりも

損傷澱粉が少なく細かい粉になった。穀粒の白色不透明部が粉の損傷澱粉に与える影響は、気流粉碎機による製粉でもピンミルによる製粉でも共通して認められた。

精米粉の粒度分布

精米粉の粒度分布を図 2-2-2 に、中位径を表 2-2-2 に示す。気流粉碎機で製粉したコシヒカりは、50~60 μm 付近にピーク、15~20 μm 付近に肩を示し、100 μm よりも大きい粒子をほとんど持たない粒度分布を示した(図 2-2-2A)。ピンミルで製粉したコシヒカりは、130 μm 付近のピークと 15~20 μm 付近の肩を持ち、100 μm 以上の粒子の画分が多い粒度分布を示した(図 2-2-2B) その結果、気流粉碎機で製粉したコシヒカりの中位径は、ピンミルで製粉したものよりも有意に小さかった(表 2-2-2)。図 2-2-2 のどちらの粒度分布においても、30 μm 付近が谷もしくはピークと肩の境界になっていた。和菓子用やパン用として市販されている多くの米粉が、30 μm 付近に谷もしくはピークと肩の境界をもつ粒度分布パターンを示す(Araki *et al.*, 2009)。そこで、30 μm 以下の粒子の割合を、粒子径 30 μm における累積分布 ($Q_3(30)$) の値として示した(表 2-2-2)。気流粉碎機で製粉したコシヒカりは、ピンミルで製粉したものよりも 30 μm 以下の粒子の割合が大きかった。

乳白変異系統を気流粉碎機で製粉すると、いくつかの系統は 15~20 μm と 40~50 μm 付近の二つのピークをもつ粒度分布を示したが、残りは 15~40 μm のなだらかなピークをもつ粒度分布を示した。また、いずれも 100 μm 以上の画分をほとんど持たなかった(図 2-2-2A)。これら精米粉の大部分が 30 μm 以下の粒子で構成されていた(表 2-2-2)。ピンミルで製粉した乳白変異系統の粒度分布は、15~20 μm と 100 μm 付近の二つのピークを持っていた(図 2-2-2B)。ピンミルによる製粉では、いずれの乳白変異系統から調整した米粉でも、粒度分布パターンは似通っていた。気流粉碎機による製粉では、乳白変異系統間で粒度分布に若干の違いがあるように見えたが、気流粉碎機での製粉はピンミルでの製粉よりも複雑なため、製粉条件のわずかな差が粒度分布に影響したと考えられた。ピンミル製粉した乳白変異米は、気流粉碎したものよりも中位径が有意に大きく、 $Q_3(30)$ が有意に小さかった(表 2-2-2)。

気流粉碎機による製粉でもピンミルによる製粉でも、コシヒカ리와乳白変異系統では粒度分布パターンが異なった。乳白変異米からはコシヒカリよりも粒子径の細かい粉が得られた。乳白変異米から調製した米粉は、コシヒカリよりも 30 μm 以下の画分が多く、15~20 μm のピークを持ち、中位径が有意に小さいという特徴を共通して示した。Araki *et al.*

(2009) は、米粉の粒度分布における 20 μm 付近のピークは複粒澱粉によって構成されていると報告している。前章において、乳白変異米の胚乳白濁部では半透明の胚乳よりも複粒澱粉同士の間には多くの空間が認められた。このことから、乳白変異米の澱粉粒はバラバラになりやすいため、15~20 μm のピークが大きい粒度分布を持つ細かい粉になると考えられた。

ピンミルで製粉した乳白変異米の粒度分布は、気流粉碎機で製粉したコシヒカリと比較すると、より大きな粒子径 (100 μm 付近) にピークを持つが、30 μm 以下の画分が多かった。これにより、ピンミルで製粉した乳白変異米のほとんどが、気流粉碎機で製粉したコシヒカリと同程度か、より小さい中位径を示した (表 2-2-2)。

精米粉の RVA 糊化特性

精米粉の糊化特性を明らかにするために、RVA を用いて粘度特性を測定した (表 2-2-2)。気流粉碎機とピンミルのいずれの製粉においても、乳白変異系統から調製した精米粉は、コシヒカリよりも最高粘度が低かった。しかし、気流粉碎機で製粉した乳白変異系統のほとんどは、気流粉碎機で製粉したコシヒカリよりも高いもしくは同程度の最終粘度を示した。ピンミル製粉したコシヒカリと乳白変異系統との間で、最終粘度に有意差は無かった。コシヒカリおよび乳白変異系統から気流粉碎機で調製したすべての精米粉と乳白変異系統からピンミルで調製した精米粉は、セットバック値が大きかったため、この澱粉ゲルは老化しやすいと考えられた。いずれの製粉方法でも、乳白変異米はコシヒカリよりもピーク時間が遅くなった。前章で、微細な粒子はより早く膨潤し、糊化が開始すると加熱と攪拌によって澱粉の崩壊が早く進むため、RVA 粘度が低くなると考えられたが、表 2-2-2 の結果では、細かい粒子の方がより遅いピーク時間を示した。乳白変異米とコシヒカリとの間では、アミロペクチンの微細構造のような澱粉特性に違いがあり、その違いが RVA 特性に影響しているのではないかと推察された。

コシヒカリと乳白変異系統の FLO85 から調製した精米粉の RVA 糊化曲線を図 2-2-3 に示す。気流粉碎機製粉でもピンミル製粉でも、FLO85 から調製した米粉のピーク時間はコシヒカリよりも明らかに遅かった。FLO85 の精米粉の最高粘度はコシヒカリよりも低かったが、最終粘度はコシヒカリと同程度であった。気流粉碎機による製粉では、水洗とペクチナーゼ処理によって糠や胚乳外周部、水溶性物質等の粘度を下げる成分が除去されるため、ピンミル製粉した粉よりも粘度が高くなると考えられた。

グルテン添加米粉パンの比容積

コシヒカリおよび乳白変異系統から二つの製粉方法で調整した精米粉の加工特性を明らかにするため、グルテン添加米粉パンを焼成し、比容積を算出した(表 2-2-2)。比容積は大きいほど望ましく、小麦粉パンの標準的な比容積は 4~6 程度である。気流粉碎機で製粉すると、乳白変異系統もコシヒカリも高い比容積のパン(4.3~4.7 ml/g)が焼成できる米粉になった。気流粉碎機で製粉したもので比較すると、コシヒカリと乳白変異系統の間でパン比容積に有意な差はなかった。コシヒカリをピンミルで製粉した精米粉は、気流粉碎機で製粉したものよりも比容積が有意に低い米粉パン(3.7 ml/g)になった。しかし、乳白変異米からは、ピンミル製粉でも、コシヒカリを気流粉碎機で製粉した精米粉と同程度の比容積を示す米粉パン(3.9~4.4 ml/g)になる米粉を調製できた。このことは、乳白変異系統を用いると、ピンミルによる乾式製粉でも米粉パンを作るのに適した米粉が製造可能になることを示している。

一般的に、小麦粉での製パン試験における最適加水量は、パンを作る人の経験と主観によって決められるか、ファリノグラフもしくはミキソグラフで測定した生地物性から推定されて決められる(Approved Method 10-10B, AACC international, 2000)。グルテン添加米粉パンの焼成においても、加水量を 75~90 ml の間で変えると、比容積も変わる(荒木ら、未発表)。しかし、米粉パンにおいて最適加水量を決める基準が定まっていないため、本研究では加水量を一定(80 ml)にして全ての製パン試験を行った。損傷澱粉含量や粒子径は吸水に影響するはずなので、最適加水量は米の系統間や製粉方法間で異なると考えられる。最適な加水でパンを焼けば、比容積はより大きくなる可能性がある。

比容積と粉の特性との関係

グルテン添加米粉パンの比容積と関係する米粉の特性を明らかにするため、比容積と精米粉の特性データとの単相関分析を行った。比容積は、RVA 最低粘度、最終粘度、セットバック、ピーク時間、糊化温度と有意な相関関係にあった(図 2-2-4A~E)。この結果は、最低粘度と最終粘度が高く、セットバックが大きく、ピーク時間が遅く、糊化温度の低い米粉が、高い比容積を示す米粉パンになることを示している。

比容積と精米粉の損傷澱粉含量との間には有意な負の相関($r = -0.90^{**}$)が認められた(図 2-2-4F)。この相関は、Araki *et al.* (2009) の結果とも一致している。即ち、損傷澱粉の少な

い米粉からは、比容積の大きな米粉パンが焼けることを示している。

比容積は粒子の中位径とも有意な負の相関 ($r = -0.86^{**}$) を示した (図 2-2-4G)。これまでに比容積と中位径との間に有意な相関を見いだした報告はないが、本研究で用いた米粉の中位径は損傷澱粉と強い相関関係 ($r = 0.83^{**}$) にあるため、比容積とも有意な相関を示したと考えられる。また、 $30\ \mu\text{m}$ 以下の粒子の割合も比容積と有意な正の相関関係 ($r = 0.86^{**}$) にあった (図 2-2-4H)。 $30\ \mu\text{m}$ 以下の粒子の割合は、比容積の高い米粉パンを作成するために重要な指標であると考えられた。Araki *et al.* (2009) は粒度分布における $20\ \mu\text{m}$ と $60\ \mu\text{m}$ のピークがグルテン添加米粉パンへの適性を評価するための重要な指標になり得るとしている。本研究においては、 $60\ \mu\text{m}$ のピークは気流粉碎機で製粉した米粉でのみ認められた。一方、比容積の高い米粉パンを焼成できた米粉は、共通して $15\sim 20\ \mu\text{m}$ のピークを示していた (図 2-2-2)。このことから、 $15\sim 20\ \mu\text{m}$ のピークを伴う $30\ \mu\text{m}$ 以下の粒子の割合が増えることで、比容積が大きくなったと考えられる。損傷澱粉含量が多い場合は、細かい粉でも比容積の高い米粉パンを焼くことはできないと報告されている (Araki *et al.*, 2009)。一般的に、乾式製粉では細かく製粉すればするほど損傷澱粉も多くなる (Nishita and Bean, 1982)。粒度分布と比容積との関係については、損傷澱粉を考慮しながらさらに解析する必要がある。

比容積と総澱粉含量 ($r = 0.37$)、RVA 最高粘度 ($r = -0.05$)、ブレイクダウン ($r = -0.34$) との間に有意な相関は認められなかった。

主成分分析

米粉の特性と比容積についてのデータを集約するために、主成分分析を行った。固有値 1 以上を示したのは第 1 主成分 (PC1) と第 2 主成分 (PC2) で、PC1 と PC2 の累積寄与率は 90%であった。PC1 は寄与率 60%を占め、PC1 と $Q_3(30)$ ($r = 0.95^{**}$)、比容積 ($r = 0.90^{**}$)、セットバック ($r = 0.86^{**}$)、最終粘度 ($r = 0.85^{**}$)、ピーク時間 ($r = 0.74^{**}$)、最低粘度 ($r = 0.70^{**}$)、中位径 ($r = -0.94^{**}$)、糊化温度 ($r = -0.93^{**}$)、損傷澱粉 ($r = -0.91^{**}$) との間に有意な相関が認められた。PC2 と有意な相関を示したのは、最高粘度 ($r = 0.99^{**}$)、ブレイクダウン ($r = 0.87^{**}$)、総澱粉含量 ($r = 0.86^{**}$)、最低粘度 ($r = 0.66^*$)、ピーク時間 ($r = -0.62^*$) であった。

PC1 と PC2 の散布図は、製粉方法と乳白変異の有無によって得られた米粉がグループ化されることを示している (図 2-2-5)。PC1 は比容積の高い米粉パンを焼くための、米粉の適

性を表していると考えられた。PC2 は糊化特性の一部を表していると考えられた。気流粉碎機で製粉した乳白変異系統のPC1 スコアが最も高く、ピンミルで製粉した乳白変異系統は、気流粉碎機で製粉したコシヒカリと同程度の PC1 スコアを示した。いずれの系統においても、気流粉碎機で製粉した粉の方がピンミルで製粉したものよりも PC1 スコア、PC2 スコアともに高かった。また、いずれの製粉方法においても、乳白変異系統を材料とした粉の方がコシヒカリを材料とした粉よりも PC1 スコアが高く、PC2 スコアが低かった。気流粉碎機による製粉方法も、乳白突然変異の導入も、どちらも PC1 スコアを高くする効果があると考えられた。

2-2-4. 考察

乳白変異米は、ピンミルによる乾式製粉でも粒子径が細かくかつ損傷澱粉の少ない粉になり、その粉から焼いたグルテン添加米粉パンの比容積は、コシヒカリを気流粉碎で半乾式粉碎した米粉から焼いたパンの比容積と同程度であった。主成分分析の結果、米粉パンを焼くための米粉の適性を示す指標として PC1 が見いだされた。コシヒカリをピンミルで製粉した粉を基点として捉えると、気流粉碎機による半乾式製粉方法の適用も、乳白突然変異の導入も、どちらも同程度に PC1 スコアを高くする効果、即ち製パン適性を高める効果があると考えられた (図 2-2-5)。現在、製パン適性の高い高品質な米粉は、気流粉碎機による半乾式製粉によって製造されている。コシヒカリを気流粉碎機で半乾式製粉した米粉と、乳白変異米をピンミルで製粉した米粉の PC1 スコアは同程度であった。つまり、ピンミルと乳白変異米の組み合わせにより、気流粉碎機で半乾式製粉した米粉と同程度の高い製パン適性を示す米粉が製造可能であることが示された。ピンミルによる乾式粉碎は、湿式粉碎および半乾式粉碎で必要となる複雑な製粉工程を必要としないため、乳白変異系統とピンミルの組み合わせにより、製パン性の高い米粉をより簡便に生産することができると考えられる。

本研究では、グルテン添加米粉パンへの加工適性を評価したが、世界的に見ると小麦アレルギーに対応したグルテンフリー食品としての米粉パンの需要が高い。Yano (2010) は、グルタチオンを添加することで、グルテンフリー米粉パンの膨らみを向上させることができると報告している。グルタチオンを米粉に添加すると、RVA 糊化温度が低くなることから、澱粉の糊化を妨げるタンパク質バリアがグルタチオンによって切断されて膨らみが向

上すると考えられている (Yano, 2010). 本研究においては, グルテン添加米粉パンの比容積と RVA 糊化温度との間に有意な相関が認められ, 乳白変異米から調整した米粉の RVA 糊化温度は, コシヒカリよりも低くなる傾向が認められた (図 2-2-4). グルテンフリー米粉パンの膨らみ向上において, グルタチオン添加による RVA 糊化温度の低下がどの程度関わっているのか明らかではないが, 本研究で用いた乳白変異系統の米粉もグルテンフリー米粉パンに適応した場合によく膨らむ可能性があると考えられる. 世界的な需要の観点から, 今後はグルテンフリー米粉パンへの加工適性を評価する必要がある.

乳白変異系統は米粉加工用系統の育成母本として有望であると考えられる. しかし, 乳白変異米は搗精中に割れやすく, 精米時の重量ロスが通常の米よりも大きい. そのため, 乳白変異米用の新しい精米方法を開発する必要がある. もしくは, 精米中のロスが少ない (例えば, 中心部が軟らかく外周部が硬い構造の穀粒), より搗精特性に優れた乳白変異系統を探索する必要がある. 北海道農業研究センターで育成された乳白変異品種「ほしのこ」においても, 試験粉碎機で米粉を調製したところ, 比較品種の「ほしのゆめ」よりも損傷澱粉が少なく粒子径の細かい粉であった. 「ほしのこ」は乳白変異米であるにも関わらず, 精米歩留が約 80%~90%と高い (芦田, 未発表). この品種における精米歩留が高くなる機構を解明することができれば, 乳白変異米でも精米歩留を高くすることができると考えられる. また, 乳白変異米は千粒重が軽いため収量が低い. このため, 多収穫米との交配を行い, 乳白変異系統に多収性を付与する試みが始まっている. また, 2-1-4 で述べたように, 乳白変異米を玄米粉として利用することができれば, 精米ロスの問題が解決できる. しかし, 玄米をピンミルで乾式製粉すると, 糠に含まれる油分が製粉機内部や篩いに付着してしまう問題が発生することから, 粉の流動性が低下しても製粉が可能となるように製粉機の構造を改良する必要がある.

乳白変異米だけでなく, 環境条件で生じる白色不透明ウルチ米についても, 胚乳澱粉の充填が疎であれば粉になりやすいと考えられる. 本研究の結果は, 屑米や精米工場の色彩選別機ではじかれた白濁米についても, 米粉加工用の原材料として有効利用できる可能性を示唆している. 屑米や等級の低い米を利用した米粉生産は, 米粉の原材料の低コスト化の観点, 屑米等に付加価値をつける観点から, 重要であると考えられる. 今後は, 屑米等の製粉特性や加工特性についても明らかにする必要がある.

パンの比容積は, 小麦であれば大きい (4~6 ml/g) 方が望ましいとされている. 本研究における米粉パンの評価では, 小麦粉パンに準じて, 大きな比容積を示すことが望ましい

こととした。比容積が大きいパンは、いわゆる「パンらしい」軽い食感を示すが、米粉独自の「もちもち感」は感じにくい傾向があった。米粉パンの製パン性評価において、小麦粉パンと同じ基準を採用すべきかどうかは、今後検討していく必要がある。

グルテン添加米粉パンの比容積と RVA 糊化特性値との間に有意な相関が見いだされた。一般的に、糊化特性には損傷澱粉、粒子径、アミロース含量やアミロペクチン側鎖長分布等の澱粉特性が影響する。RVA は少量（3 g）の米粉で短時間にサンプルの糊化特性を測定できる。本研究で解析した米粉よりもよりバリエーションの大きい米粉を用いて RVA 特性値とパンの特性値との関係を解明することで、RVA 特性値を米粉の評価指標として活用できるようになると期待される。

2-2-5. 図表

表 2-2-1. 精米の穀粒硬度

系統名	SKCS硬度 (HI)
親系統	
コシヒカリ	64 ± 21
乳白変異系統	
FLO23 (86KG71)†	17 ± 19
FLO36 (87KG56)	23 ± 20
FLO69 (86KE2)	24 ± 18
FLO85 (86KE38)	25 ± 17
FLO113 (87KE37)	20 ± 21
FLO114 (87KE39)	28 ± 20

2007年に収穫した穀粒300粒の平均値±標準偏差. SKCS, 単一穀粒分析装置; HI, hardness index. †, 変異系統名の後ろに括弧書きで別名を表示. 別名の頭2桁は突然変異処理を行った年度を示す. KEはコシヒカリへのEMS処理を、KGはコシヒカリへのγ線処理を表す.

〔材料〕

	ベーカース%	分量(14%米粉水分ベース)
米粉	80	80 g
グルテン	20	20 g
上白糖	5	5 g
食塩	2	2 g
ショートニング	10	10 g
ドライイースト	1.5	1.5 g
蒸留水	80	80 mL

〔工程〕

ミキシング	ミキソグラフで測定した最大粘度到達時間まで
↓	
丸め	生地を手でまとめて丸める
↓	
フロアタイム	27°C, 湿度85%, 20分
↓	
空気抜き	モルダー(目盛8.5)
↓	
成形	モルダー(目盛6.5)
↓	
ホイロ	40°C, 湿度80%, 50分
↓	
焼成	200°C, 25分

図 2-2-1. 製パン試験のフローチャート.

ベーカースパーセントはパン生地の仕込みに使われる表示で、材料中の粉の総重量を 100 として、その他の材料を粉に対する割合で表したもの。

表2-2-2. 精米粉の特性

	澱粉 含量 (%, db)	損傷 澱粉 (%)	中位径 (μm)	Q ₃ (30) (%)	最高 粘度 (RVU)	最低 粘度 (RVU)	ブレーク ダウン (RVU)	最終 粘度 (RVU)	セット バック (RVU)	ピーク 時間 (min)	糊化 温度 (°C)	比容積 (ml/g)
気流粉砕機による製粉												
コシヒカリ	91.4 a	3.2 e	42.0 c	36.8 j	426.8 a	201.0 a	225.8 a	311.5 b	110.5 cde	5.7 c	71.5 a	4.3 abc
FLO23	87.8 abcd	1.2 h	20.6 g	63.6 e	329.5 d	181.8 bc	147.6 b	300.3 bc	118.5 cd	5.9 b	70.3 a	4.5 ab
FLO36	88.8 abc	2.2 f	16.6 h	72.9 c	319.2 e	174.8 cd	144.4 b	289.0 cd	114.3 cd	5.9 b	70.4 a	4.6 ab
FLO69	89.1 ab	1.4 h	17.6 h	70.7 d	335.3 c	189.7 b	145.6 b	309.5 b	119.8 bc	6.0 ab	71.0 a	4.7 a
FLO85	88.3 abc	2.1 fg	16.2 h	76.4 ab	321.7 e	185.7 b	136.0 bc	309.0 b	123.3 bc	6.0 ab	70.8 a	4.5 ab
FLO113	88.6 abc	2.1 f	15.9 h	77.1 a	326.7 d	201.2 a	125.5 cd	333.6 a	132.4 ab	6.0 ab	70.8 a	4.6 ab
FLO114	88.3 abc	1.9 g	16.7 h	75.3 b	331.4 cd	203.1 a	128.3 cd	342.6 a	139.5 a	6.1 a	70.3 a	4.5 b
ピンミルによる製粉												
コシヒカリ	87.8 abcd	8.9 a	92.3 a	21.0 k	398.5 b	168.1 de	230.4 a	267.9 e	99.8 e	5.4 d	72.8 a	3.7 d
FLO23	85.6 bcd	6.9 b	34.0 f	47.3 f	287.0 g	160.5 de	126.4 cd	276.2 de	115.6 cd	5.9 b	71.6 a	4.2 abcd
FLO36	86.5 bcd	6.2 c	37.7 e	44.8 g	290.3 g	165.5 de	124.8 cd	279.3 de	113.8 cd	6.0 ab	71.5 a	3.9 cd
FLO69	85.1 cd	5.5 d	45.5 b	39.7 i	301.0 f	163.8 de	137.3 bc	270.5 e	106.7 de	5.9 b	71.6 a	4.2 abcd
FLO85	84.2 d	5.6 d	39.3 de	43.4 gh	289.0 g	162.0 de	127.0 cd	282.7 de	120.7 bc	6.0 ab	71.5 a	4.4 abc
FLO113	85.2 cd	6.8 b	37.8 e	45.1 g	288.2 g	166.0 de	122.2 d	283.5 cde	117.5 cd	6.0 ab	71.7 a	4.1 bcd
FLO114	86.8 bcd	6.0 c	41.8 cd	42.2 h	287.8 g	159.8 e	128.0 cd	272.7 de	112.9 cd	5.9 b	71.5 a	4.1 bcd

Q₃(30), 30 μm 以下の粒子の割合; RVU, RVA unit. 異なるアルファベットは5%水準でTukeyの検定により系統間差があることを示す。

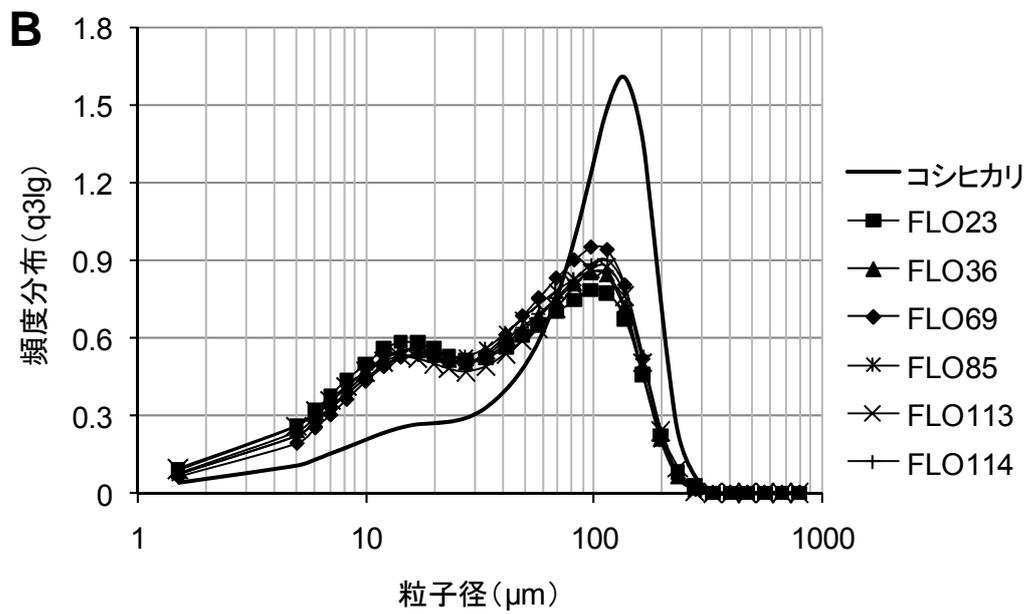
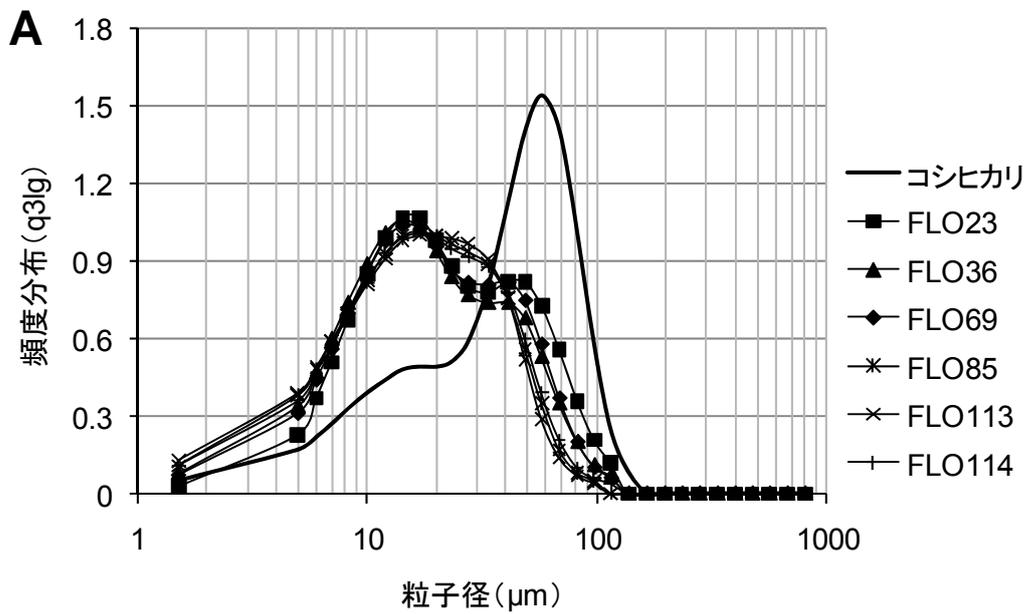


図 2-2-2. 精米粉の粒度分布.

A, 気流粉碎機を用いて半乾式製粉した米粉. B, ピンミルを用いて乾式製粉した米粉.

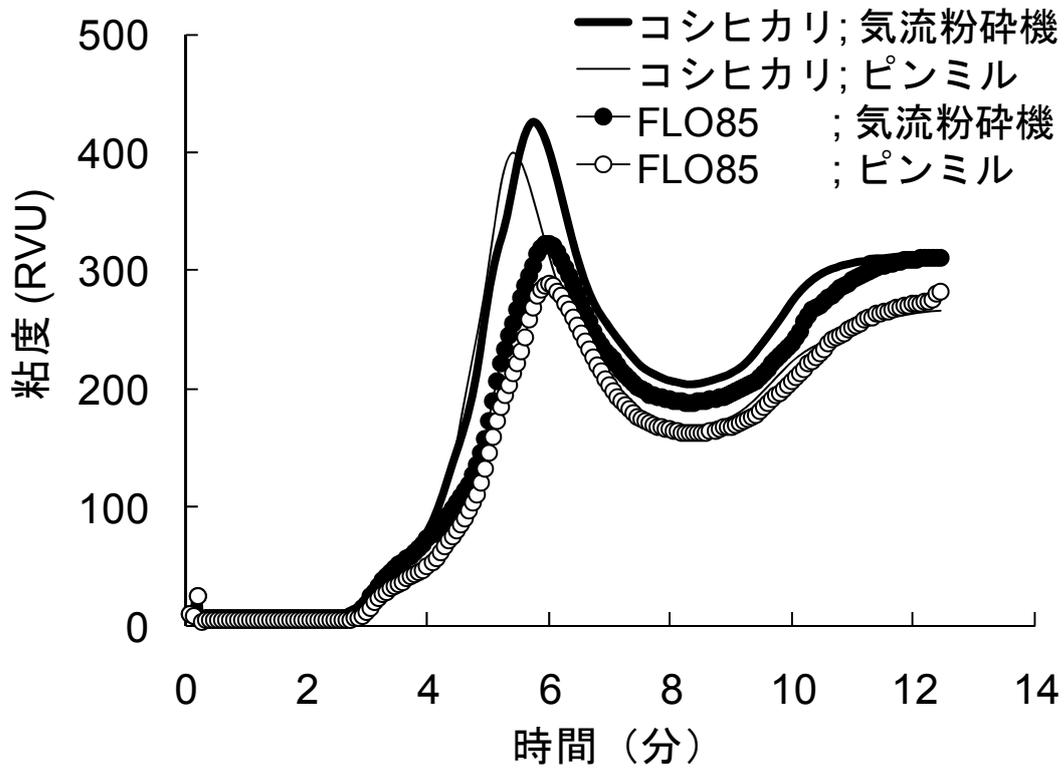


図 2-2-3. コシヒカリと乳白変異米 (FLO85) から調製した精米粉の RVA 糊化曲線。
 気流粉碎機, 気流粉碎機を用いて半乾式製粉した米粉; ピンミル, ピンミルを用いて乾式製粉した米粉.

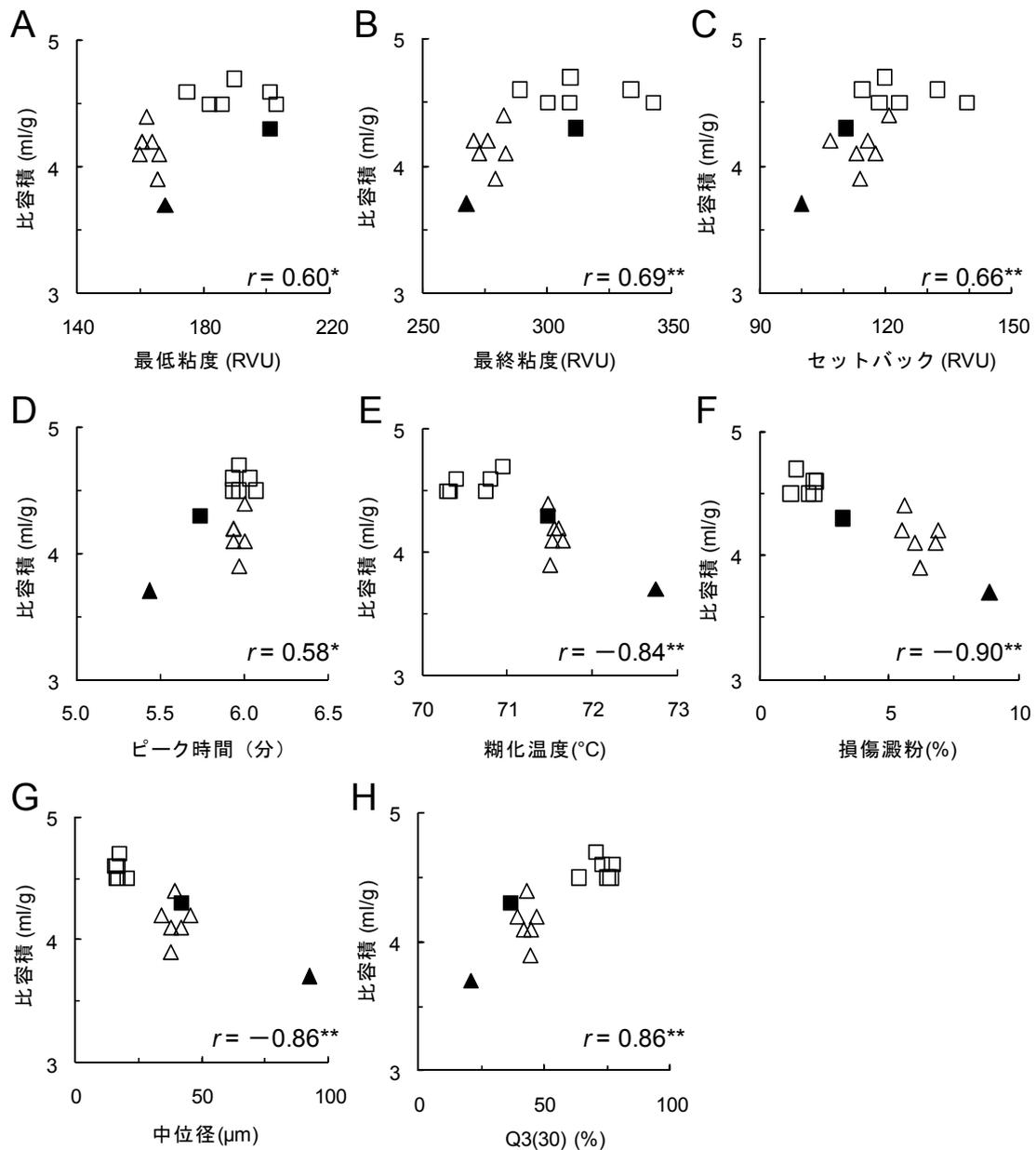


図 2-2-4. グルテン添加米粉パンの比容積と米粉の特性値との相関.

四角のシンボルは気流粉碎機を用いて半乾式製粉した米粉を，三角はピンミルを用いて乾式製粉した米粉を示す. 黒色はコシヒカリを，白色は乳白変異米を表す. *と**はそれぞれ，5%水準および1%水準で有意であることを示す.

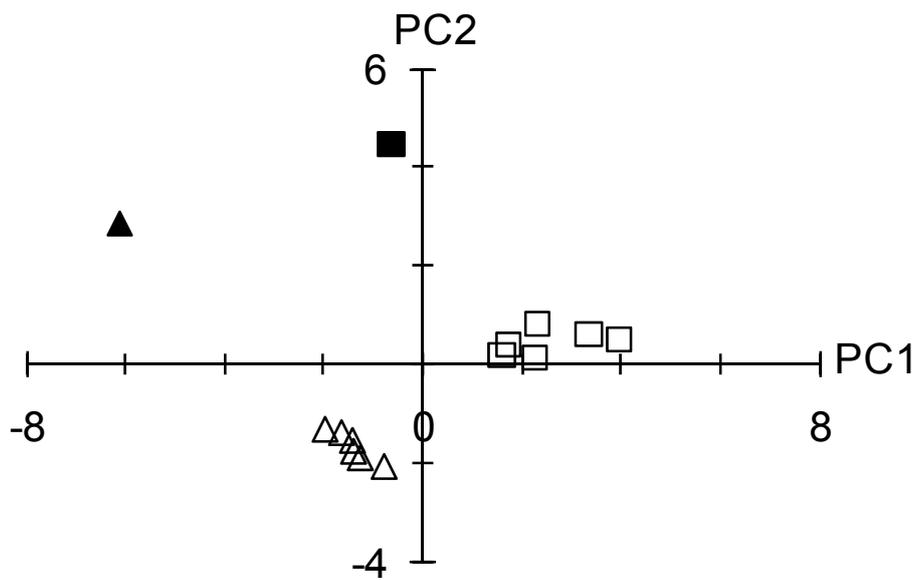


図 2-2-5. 精米粉の特性に基づいた第 1 主成分 (PC1) と第 2 主成分 (PC2) の散布図。
 コシヒカリと乳白変異系統から調製した精米粉の特性 (表 2-2-2) の主成分分析に基づいて
 作成した。シンボルは図 2-2-3 に同じ。

結語

米粉の利活用が広まりつつある中、米粉としての利用に適した品種系統の育成が望まれているが、どのような特性を持つ米が米粉への加工に適しているのか明らかでない。そこで、胚乳内の澱粉粒がバラバラになりやすいと考えられるウルチ米の胚乳白濁変異系統の特性と、米粉への加工適性を解析した。

胚乳白濁変異米の胚乳白色不透明部では、澱粉粒が粗に蓄積されており、この構造が穀粒硬度の低下をもたらしていると考えられた。穀粒硬度が低いと、粉碎時における損傷澱粉が少なくなり、かつ、得られた米粉の粒子径が細くなった。このことは、乳白変異系統が米粉製造の原材料として適していることを示唆している。本研究で用いた乳白変異系統は、物理化学的特徴によっても、形態的特徴によっても 2 つのグループ（乳白グループと心白グループ）に分けることができた。乳白グループの系統は、心白グループよりも粒重が軽く、総澱粉含量が少なく、穀粒硬度が低く、粉碎時の損傷澱粉が少なく、製粉するとより細かい粉になった。胚乳白濁変異系統から調製した玄米粉の RVA 糊化特性を調査すると、半透明のコシヒカリよりも粘度が低くなった。この粘度低下は、損傷澱粉含量の低下によって説明可能であった。

また、製粉性が優れると期待される乳白変異系統を、米粉用製粉機で製粉した場合の加工適性について評価した。乳白変異米は気流粉碎機で半乾式製粉しても、ピンミルで乾式製粉しても、損傷澱粉が少なく、粒子径が細かく、RVA 糊化温度が低く、最終粘度が高く、セットバックが大きく、ピーク時間が遅い米粉になった。このような特性を持つ粉からは比容積の大きな米粉パンを焼くことができた。気流粉碎機による半乾式製粉を行うことで、コシヒカリからも製パン性に優れた米粉を製造することができた。ピンミルで製粉した乳白変異米からは、コシヒカリを気流粉碎機で製粉した粉と同程度の比容積を示すパンが焼成可能であった。乳白変異系統とピンミル乾式製粉の組み合わせにより、米粉パンへの加工に適した米粉を低コストで製造することが可能になると期待される。

総合考察

米は日本において最も自給率の高い農産物であるが、その消費量は昭和 40 年代から減少し続けている。これに伴って食料自給率も低下し続けており、平成 21 年にはカロリーベースで 40%にまで落ち込んでいる。世界の食料事情が不安定な中、今後食料を安定して供給するために、米の利用を進めることで、食料自給率の向上を目指すことが課題となっている（農林水産省，2010ab）。米の利用拡大を図るためには、従来の主食用米とは異なる特徴を持つ新形質米を育成し、加工業務用、飼料用、米粉用として活用していくことが有効であると考えられる。そこで、本研究では、新形質米として育成された胚乳形質突然変異系統の成分特性・構造特性・加工特性を明らかにした。ここでは、突然変異の導入による品質特性への影響と、突然変異導入によって育成された新形質米の利活用を中心に考察する。

種子貯蔵タンパク質の組成改変が種子成分と PB 構造に与える影響

米に含まれるタンパク質の消化性を改変させるために、突然変異の導入によって種子貯蔵タンパク質の組成を改変させた系統が育成されている（飯田，2006）。しかし、これらの系統の米において、タンパク質組成以外の成分特性や消化性に関わる PB 構造は十分研究されてこなかった。本研究では、タンパク質組成突然変異系統における成分特性と構造特性を解析した。グルテリンの欠失は、13 kDa プロラミンの増加をもたらしていた。また、PB-II に蓄積するタンパク質が減少するため、PB-II は周囲が欠けたような形を示し、やや小型化していた。同時に、13 kDa プロラミンが増加することで、PB-I の数の増加が確認された。低グルテリン原因遺伝子はグルテリンの構造遺伝子における欠失に由来する（Kusaba *et al.*, 2003）。このことから、グルテリン含量の低下や PB-II 構造の変化以外に認められる、プロラミン含量の上昇や PB-I の数の増加といった現象は、*Lgc1* 遺伝子の多面作用であると考えられる。一方、26 kDa グロブリンの欠失は、新たな 32 kDa のグルテリン画分に属するタンパク質の発現と、遊離アミノ酸含量の増加をもたらしていることが明らかになった。26 kDa グロブリン欠失系統においても、PB-II に蓄積するタンパク質が減少するため、その構造にも何らかの影響があると予想されたが、PB-II の形が崩壊し、野生型の PB-II とも *Lgc1* 変異体における PB-II とも全く異なる様相を示した。26 kDa グロブリン欠失遺伝子も 26 kDa グロブリンの構造遺伝子領域の欠失に由来する（Morita *et al.*, 2009）。遊離アミノ酸含量の増加と PB-II 構造の変化は、*glb1* 遺伝子の多面作用であると考えられる。グルテリンもグロブリ

ンも PB-II を構成するタンパク質であるが、その構造遺伝子の変異が、種子成分や PB 構造に及ぼす作用は異なっていた。トウモロコシの *opaque-2* 変異体は、ゼインタンパク質のプロモーター領域に結合する転写活性化因子をコードする遺伝子の変異に由来するが (Schmidt *et al.*, 1990), 貯蔵タンパク質の組成改変によって、アミノ酸や炭水化物の代謝の変化が引き起こされている (Wang and Larkins, 2001)。Lgc1 変異体における 13 kDa プロラミンの増加や *gbl1* 変異体における遊離アミノ酸の増加は、減少したタンパク質を補うために生じる現象であると考えられるが、アミノ酸や炭水化物の代謝にどのような変化が生じているのか興味深い。マイクロアレイやメタボロミクス等の手法を用いた網羅的な解析により、代謝経路がどのように変化しているのかを詳細に解析することができると考えられる。

タンパク質組成変異米の加工利用

米の PB-I は消化されにくいことから、PB-II に蓄積されるグルテリンとグロブリンを減少させ、PB-I に含まれるプロラミンを増加させた米は、低タンパク質食として有用であると考えられている (Iida *et al.*, 1993 ; 飯田, 2006)。実際に、低グルテリン系統の LGC1 は、慢性腎臓病患者の食事療法において、腎機能障害進行の抑制に有用であると報告されている (望月・原, 2000)。本研究において、LGC1 では PB-I の数が増加していることが確認された。このことから、PB-I の増加によって、LGC1 ではタンパク質の消化性が低減されていると考えられた。また、26 kDa グロブリンの欠失を組み合わせることで PB-II に蓄積されるタンパク質をさらに低減させた LGC 潤においても、多くの PB-I が観察された。しかし、本研究によって 26 kDa グロブリンの欠失は、腎臓に負担をかける恐れのある遊離アミノ酸含量の増加を伴うことが確認された。従って、LGC 潤を低タンパク質食として利用できるかどうかについては、臨床試験を行って慎重に検証する必要がある。

タンパク質は米粒の約 7%程度しか含まれていないが、タンパク質は米の調理特性に影響を及ぼす。タンパク質含量が高くなると硬くて粘りの少ない炊飯米になることから、タンパク質含量が高いほど食味は低下する (山下・藤本, 1974)。Furukawa *et al.* (2006) は、米から抽出した PB-I と PB-II を加えて炊飯試験を行い、PB-I を追加した炊飯米は硬くなり、PB-II を加えた炊飯米は色つやが悪化して好ましくない香りを持つようになると報告している。米のタンパク質は、RVA 糊化特性にも影響を及ぼし、タンパク質を除去すると最高粘度と最終粘度が低下する (Fitzgerald *et al.*, 2003)。また、米のタンパク質組成は、醸造した際の香りや風味等にも影響する (Furukawa *et al.*, 2006)。このように、タンパク質の量や組

成は加工特性に大きく影響する。本研究では、低グルテリン系統と 26 kDa グロブリン欠失系統において、それぞれ特徴ある PB 構造を示すことを明らかにしたが、米粉として利用した場合にも新たな特性を付与する可能性がある。低グルテリン米から調製した米粉で作った米粉パンは、膨らみが良く風味が良い傾向があると言われている（鈴木, 2010）。米粉パンの加工において米のタンパク質がどのように影響するのかは明らかでないが、タンパク質組成を最適なものに改変させることで、より風味の良い米粉パンを作成することができる可能性がある。

貯蔵タンパク質による PB 構造の形成

貯蔵タンパク質構造遺伝子の変異体で観察された PB の構造変化は、種子貯蔵タンパク質そのものが PB 構造を維持するのに関わる可能性を示唆している。これまで、タンパク質のプロセッシングに関わる遺伝子の変異体、*esp2* や *glup3*, において、PB の構造に変化が認められることは報告されている（Takemoto *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009; Kumamaru *et al.*, 2010）が、貯蔵タンパク質そのものが PB の形状維持に関わっているという報告はない。貯蔵タンパク質そのものが PB の形状を維持する上でどのような働きを持っているのかについて興味深い。PB-II では、グルテリンとグロブリンが均一に蓄積されているのではなく、それぞれのタンパク質が PB-II 内に局在している。特に、26 kDa グロブリンはグルテリンを取り囲むように蓄積される（Krishnan *et al.*, 1992; Krishnan and White, 1995）。低グルテリン系統ではなく、26 kDa グロブリン欠失系統においてのみ PB-II の構造が崩壊することから、タンパク質の局在と PB の形態に関わる可能性があると考えられる。今後、*Lgc1* 変異体や *glb1* 変異体において、抗グルテリン抗体や抗グロブリン抗体等を用いた免疫電子顕微鏡観察を行うことで、変異した PB にどのようなタンパク質がどのように蓄積されているのか明らかにする必要がある。

胚乳白濁変異が種子特性に及ぼす影響

米は主に粒食されるが、米粉としても古くから利用されている。近年では、小麦粉の代替粉としての米粉の利用が注目されている。米は穀粒が硬いため、小麦粉のように細かく製粉しようとする、粉砕のために加わる物理的な力によって、胚乳の澱粉が損傷する。損傷澱粉を少なくするために、米粉を製造する際には、穀粒を湿らせた状態で製粉する。しかし、湿式製粉や半乾式製粉には排水処理施設等の大規模な製粉設備と製粉コストがか

かる。米をそのまま製粉機に投入することで製粉が可能になれば、製粉コストの低下につながると思われる。そこで、胚乳が粉になりやすいと考えられる胚乳白濁変異系統を材料として、米粉としての利用可能性を評価した。胚乳に白色不透明部を持つ心白～乳白の突然変異系統において、白色不透明部では澱粉の充填が疎になっていることが明らかとなった。白色不透明部の大きい系統ほど、穀粒の硬度が低下していたことから、澱粉粒間の空間の存在が穀粒の硬さを低下させていると考えられた。また、胚乳の白濁によって、玄米の総澱粉含量が低下し、粒重が軽くなることが示唆された。このように、胚乳白濁変異米は通常の穀粒と異なる性質を示し、特に胚乳白濁部分の大きい乳白変異米は、乾式製粉でも損傷澱粉が少なくかつ粒子径の細かい粉になり、この粉を利用すると、比容積の大きな米粉パンが焼けることが明らかになった。

ウルチ米における環境要因で生じた胚乳白色不透明部においても、澱粉粒間に隙間が生じている（田代・江幡, 1975）。このことから、環境要因で生じる胚乳白濁粒も、米粉にすると損傷が少なくかつ細かい粉になると考えられる。実際に、精米工場等では出てくる篩下の米（いわゆる屑米）や、色彩選別機ではじかれた等級の落ちる米について、試験粉碎機で粉碎すると、完全粒のものよりも細かく、かつ損傷澱粉の少ない粉になった（芦田, 未発表）。これらの米粉について加工適性試験はまだ行っていないが、屑米や等級の低い米を原材料として用いることで、米粉の価格を抑えることができると考えられる。

米粉用品種としての乳白変異米の活用

米は日本で自給率の最も高い農産物であることから、米粉の利活用により減少し続けている米の消費を拡大することができれば、食糧自給率向上にもつながると考えられる。現在、米粉パンや洋菓子への加工に適した米粉は、酵素処理後に气流粉碎機で半乾式製粉することで製造されている。この方法を用いると、品種系統を問わず、「粒子径が細かく、かつ損傷澱粉の少ない米粉」を製造することが可能であるが、大規模で高額な製粉プラントと複雑な製粉作業工程が必要とされる。全国的に米粉を普及させるためには、酵素処理後に气流粉碎機で半乾式製粉した米粉を大量生産し、安定した品質の米粉を流通させることが重要であると考えられる。しかし、「地元産、安全・安心・手作り」を求める消費者ニーズや、地産地消の取り組みとして米粉を利用したいというニーズに応えるためには、より簡便な製粉機で米粉を製造することが重要であると考えられる。乳白変異米は、簡便に利用できるピンミルを使用した乾式製粉でも加工特性の優れた米粉を製造できる原材料にな

りうることから、米粉用品種の育成母本として活用できると考えられる。

米粉の普及と課題

米を粉として利用する研究は昭和 50 年代にも農林水産省が中心となって行われていた（與座ら，2008）。しかし，当時は米の製粉技術が発達しておらず，損傷澱粉が少なく粒子径の細かい米粉を製造することができなかつたため，「おいしい」米粉食品を作ることができず，結果，普及には至らなかつた。現在では，酵素処理後に気流粉碎機で半乾式製粉する方法により高品質な米粉が製造可能になっていることから，米粉は洋菓子やパン等様々な用途に利用されている。大手スーパーでも上新粉等の伝統的な米粉とは別に，調理用やパン用の米粉が並びはじめ，2010 年には米粒からパンが焼けるホームベーカリー「GOPAN」も発売されるなど，米粉食品への関心が高くなっている。米粉の認知度が高まった大きな理由は，高品質な米粉によって「おいしい」米粉食品の製造が可能となったためだと考えられる。酵素処理後に気流粉碎機で半乾式製粉する米粉製造技術は新潟県で開発された（宍戸・江川，1992；諸橋ら，2000）ため，現時点では高品質な米粉の利用は日本にとどまっている。本研究では，乳白変異米を利用することで，簡便に高品質な米粉を製粉できる可能性を示した。世界中で食の多様化が進む中，日本発の食品として，高品質な米粉とその加工品を発信することで，世界中で米粉の利用が進むと期待される。

これまで米は粒食されてきたため粒食に適した品種が育成されてきたが，米粉の普及が進みつつある今後は，粉食に適する品種を育成していく必要があると考えられる。また，米粉は小麦粉よりも価格が高いため，米粉の普及を促進するためには製粉コストと原料コストを下げる必要がある。乳白変異米等の粉に適した品種を選択することで，製粉コストを下げるができると考えられる。原料コスト低下のためには，多収性や耐病性を付与し，低コストで多収栽培が可能な品種を育成する必要がある。

グルテンフリー食品としての米粉の利活用

米粉はアジア地域を中心に伝統的に麺や菓子に加工されて利用されてきた。近年ではアレルギーや健康への関心の高まりとともに，欧米諸国を中心に麦類に含まれるグルテンタンパク質を含まない食品を求める動きが大きくなっており，米粉はグルテンフリー食品の素材としても注目されている（O'Neill, 2010）。グルテン不耐性であるセリアック病患者の数は米国だけでも 200 万人いると言われており，患者は小麦，大麦，ライ麦等の穀物を摂

取することができない。小麦加工食品はグルテンの性質を活かしたものが多いため、米粉をそのまま小麦粉の代替粉として置換するだけでは、パンや麺は作れない。しかし、米粉の粘度を調整したり、タピオカ澱粉やグアーガム等の添加物を加えたりすることで、パンや麺の形状をした食品を作ることはできる。米粉を使った食品は、「しっとり」「もっちり」「サクサク」といった独特の食感を持つため、これまでのパンや麺の概念とは異なる新食品として米粉加工品の利用が広まると期待される。加工に適した高品質な米粉を作るには特殊な製粉技術が必要であるが、乳白変異米を利用して米粉をより身近に利用できるようなになれば、セリアック病患者をはじめとする小麦アレルギー患者のいる家庭の食生活をより豊かにすることができると思われる。

胚乳白濁を生じる原因

本研究で用いた胚乳白濁変異系統において、胚乳の白濁がどのような機構で生じているのかについては明らかでない。現在、粉質胚乳（乳白～心白の胚乳白濁系統）の系統として、*flol*, *flo2*, *flo3*, *flo4*, *flo5* が報告されている。このうち、乳白変異で遺伝子レベルまで解析の進んでいるものは、*flo2* と *flo4* である。*flo2* の原因遺伝子は第 4 染色体に座乗し、胚乳が白濁するだけでなく、16 kDa タンパク質の発現が低下する（島田ら, 2006）。*flo2* 変異体では、澱粉の生合成に関わる遺伝子の発現が低下している（Kawasaki *et al.*, 1996）。本研究で用いた胚乳白濁突然変異系統については、タンパク質組成が野生型と同一であることから、*flo2* とは異なる遺伝子座に変異が生じていると考えられる。*flo4* は第 5 染色体に座乗し、pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) 遺伝子をコードしていることが報告されている（Kang *et al.*, 2005）。粉質米品種「ほしのこ」についても、PPDK の変異であることが報告されている（松葉ら, 2010）。本研究で用いた乳白変異系統についても、遺伝解析と座乗染色体の特定を進める予定であるが、既知の粉質原因遺伝子と同一であるかもしれないし、新たな粉質原因遺伝子に由来している可能性もある。いずれにせよ、突然変異系統を育種母本として有効利用するためには、原因遺伝子を探り、選抜用のマーカーを開発する必要がある。

乳白変異米から調製した米粉の加工特性

RVA による糊化特性の解析によって、乳白変異米の米粉は低い粘度を示すことが明らかとなった。このことは、乳白変異米の米粉はより軟らかいゲルを形成することを示唆して

いる。高橋ら（2009）は、粉質米の「北陸 166 号」は同程度のアミロース含量の通常米に比べて、焼成後のパンが軟らかく、また、硬化速度も遅いと報告している。乳白変異米で認められた低い RVA 粘度と、パンの硬さとの間に何らかの関係があると推察される。乳白変異米から調製した米粉は、より比容積の大きなパンが焼けるが、パン以外にも、麺や洋菓子に加工した際に、口溶けや食感が軟らかくなる等、ユニークな食感をもたらす可能性が高いと考えられる。RVA 特性には、粉の粒子径や損傷澱粉の他、アミロース含量やアミロペクチンの側鎖長分布も影響する。本研究で用いた乳白変異米は、澱粉粒の間に隙間があることから、何らかの形で澱粉の生合成が抑制されていると推測される。今後、乳白変異米において、アミロース画分を含む澱粉の鎖長解析や、アミロペクチン側鎖長分布を測定し、澱粉特性にどのような変化が生じているのか明らかにする必要がある。

新形質米を利用した加工用米の育成

本研究では、タンパク質組成変異米が新しい加工特性を持つ可能性を示し、また、乳白変異米が米粉加工用品種として利用できる可能性を示した。米の加工特性には、澱粉特性も重要な形質である。例えば、グルテン添加米粉パンには、中程度のアミロース含量（15～25%）の米が適する（高橋ら，2009）。また、米を加工・業務用として利用する際には、原材料の低コスト化の観点から、多収性も重要な形質である。今後、米を主食用以外の用途で活用するためには、多収性、最適な澱粉特性、最適なタンパク質組成等の様々な形質を組み合わせた品種を育成する必要がある。様々な新形質米の特徴を効率よく組み合わせるためには、新形質米の特徴をもたらす遺伝子を解明し、効率よく選抜するためのマーカーを開発する必要があると考えられる。本研究で用いた突然変異系統を品種育成に応用するためには、突然変異の原因遺伝子の解明と、選抜用のマーカー開発についてさらなる研究が必要である。

要旨

本研究では、米の新たな利用方法の開発と普及に資するため、新形質米として育成された突然変異米の品質特性を解析した。

第1部. タンパク質組成変異米の品質評価

米のタンパク質は、プロテインボディ (PB) と呼ばれる細胞小器官に蓄積される。PBには二種類あり、プロラミンが蓄積される PB-I がタンパク質の 20%を、グルテリンとグロブリンが蓄積される PB-II がタンパク質の 60%を占める。ヒトの糞便中に PB-I と同じ形態のタンパク質顆粒が認められることから、ヒトは PB-I を完全には消化できないと考えられている。低タンパク質米として利用するために、突然変異の導入によって、PB-II に蓄積されるタンパク質を減少させ、PB-I に蓄積されるタンパク質を増加させた系統が育成されている。しかし、そのタンパク質組成以外の成分特性や、消化性と密接に関わる PB 構造については明らかでない。そこで、「コシヒカリ」または「ニホンマサリ」由来で種子貯蔵タンパク質の組成を改変させた米における成分特性と PB 構造特性を明らかにした。

1-1. タンパク質組成変異米の遊離アミノ酸含量

ダイズやトウモロコシにおいて、種子貯蔵タンパク質の組成を改変すると、アミノ酸や炭水化物の代謝に影響し、種子中の遊離アミノ酸含量が増加することが報告されている。米においても同様に、タンパク質組成の改変によって種子成分含量に影響があると予想される。そこで、タンパク質組成変異系統の低グルテリン (*Lgc1*) 変異体と 26 kDa グロブリン欠失 (*gbl1*) 変異体、ならびに *Lgc1* と *gbl1* の集積系統における種子の澱粉含量、窒素含量、遊離アミノ酸含量について定量を行った。

Lgc1 変異体、*gbl1* 変異体、ならびに *Lgc1* と *gbl1* の集積系統において、玄米の澱粉含量、窒素含量、千粒重は、それぞれの親系統と同程度であった。*Lgc1* 変異体においては、玄米の遊離アミノ酸含量は親系統と同程度であったが、*gbl1* を有する系統は、共通して遊離アミノ酸を親系統の約 1.5 倍多く蓄積していた。タンパク質組成を詳細に解析すると、*Lgc1* 変異体においては、グルテリン含量の低下だけでなく、13 kDa プロラミンと 26 kDa グロブリンの増加が追認された (Kusaba *et al.*, 2003)。*gbl1* 変異体では、26 kDa グロブリンの欠失だけでなく、グルテリン画分に属する 32 kDa の新たなポリペプチドを蓄積することが追認

された (Iida *et al.*, 1998). *Lgcl* も *glbl* も、貯蔵タンパク質の構造遺伝子における欠失に由来するが、それぞれの遺伝子が他の貯蔵タンパク質組成やアミノ酸代謝に及ぼす影響は異なると考えられた。グルテリンも 26 kDa グロブリンも PB-II に蓄積されるタンパク質であるが、*Lgcl* 変異体におけるグルテリンの減少は 13 kDa プロラミンの増加によって補償され、*glbl* 変異体における 26 kDa グロブリンの欠失は、遊離アミノ酸や未知のポリペプチドの増加によって補償されていると考えられた。

1-2. タンパク質組成変異米のプロテインボディ構造

種子貯蔵タンパク質の組成は、それが蓄積される PB の構造とも密接に関わる。タンパク質局在輸送遺伝子の変異に由来するタンパク質組成変異系統においては、PB の形態が変化することが報告されている。タンパク質の消化性を低下させるために育成された *Lgcl* 変異体と *glbl* 変異体、ならびに *Lgcl* と *glbl* の集積系統については、消化性にかかわる PB 構造に関して不明である。また、貯蔵タンパク質構造遺伝子における変異が PB 構造に及ぼす影響も不明である。そこで、*Lgcl* 変異体と *glbl* 変異体、ならびに *Lgcl* と *glbl* の集積系統の登熟過程におけるポリペプチド組成を SDS-PAGE によって、PB 構造を透過型電子顕微鏡観察によって解析した。

Lgcl 変異体では、登熟過程全般にわたってプロラミンが主要なタンパク質であった。*glbl* 変異体におけるグルテリンとプロラミンの蓄積は、野生型と同様であった。*Lgcl* 変異体では、周辺部が欠けたように見受けられる小型の PB-II と、野生型よりも多くの数の PB-I が観察された。*glbl* 変異体では、成熟した PB-I が観察されたが、PB-II の形状が崩壊し、いびつな形を呈していた。これまで、タンパク質のプロセッシングに関わる変異が PB 構造に影響することは報告されていたが、本研究によって、貯蔵タンパク質そのものが PB の形状を維持するために必要であることが示唆された。また、*Lgcl* 変異体で観察された PB-I の構造は野生型のものによく似ていたことから、*Lgcl* 変異体で増加した PB-I は消化されにくいと考えられた。*glbl* 変異体で認められた新規な PB-II 構造は、*glbl* 変異体において風味や食感など全く新しい特性を付与する可能性があると考えられた。

第2部. 乳白変異米等の米粉としての有効利用

米を米粉として利用する際には、粒子径が細かくかつ胚乳澱粉の損傷を少なくするために、米を水浸漬して軟化させてから、湿った状態で製粉する湿式（半乾式）製粉が行われ

る。しかし、湿式製粉法は大規模な設備とランニングコストがかかる。米粉の利用を拡大するためには、簡便な製粉方法でも粒子径が細かくかつ損傷澱粉が少ない粉になる系統を開発する必要がある。粉質米と呼ばれる乳白や心白の外観を示すウルチの突然変異系統は、粉になりやすい系統として期待されるが、その米粉への加工適性についてはこれまで報告されていない。そこで、コシヒカリ由来の胚乳白濁突然変異系統について、その成分特性および構造特性と、米粉としての加工適性を評価した。

2-1. 胚乳白濁変異米の製粉特性

製粉時に加わる物理的な力により生じる損傷澱粉は、加工特性に影響を及ぼす。一般的に、損傷澱粉が少ない米粉は加工適性が優れる。粉質米とも呼ばれる胚乳白濁変異米は、少ない力で粉砕でき、損傷澱粉の少ない粉になりやすいと予想される。そこで、胚乳白濁変異系統の穀粒と粉における構造特性と物理化学特性を明らかにした。

胚乳白濁変異系統は、白色不透明部の大きさから、乳白変異系統と心白変異系統とに分けられた。走査型電子顕微鏡で観察すると、胚乳白色不透明部では澱粉粒間に隙間が認められた。胚乳白濁系統は親系統よりも穀粒硬度が低かった。胚乳白濁変異米の千粒重、澱粉含量、アミロース含量は親系統よりも低くなる傾向が認められた。タンパク質組成と含量に関しては、親系統と同様であった。胚乳白濁変異米を試験粉砕機で粉砕すると、親系統よりも損傷澱粉が少なく、かつ粒子径の細かい米粉になった。得られた米粉についてラピッドビスコアナライザー（RVA）を用いて糊化特性を解析したところ、胚乳白濁変異米から調製した米粉は粘度が低くなる傾向が認められたが、これは澱粉含量の減少と関係していると考えられた。物理化学的特性に基づいて主成分分析を行ったところ、胚乳白濁変異米は乳白と心白のグループに分けられた。このことから、胚乳白濁変異系統では、白色不透明部の有無によって、穀粒や粉の物理化学的特性に変化が生じると考えられた。乳白変異米は、親系統の米や心白変異米よりも損傷澱粉が少なく粒子径の細かい米粉になったことから、米粉製造に適していると期待された。

2-2. 乳白変異米の米粉としての加工適性評価

米粉パンは様々な方法によって製造されているが、小麦のグルテンタンパク質を添加して製造する方法が、簡便なため最も広まっている。グルテン添加米粉パンには、損傷澱粉が少なく、かつ粒子径の細かい米粉が適している。そこで、簡便なピンミルによる乾式製

粉方法と、現在最も優れる米粉を製粉できる酵素処理後に気流粉碎機で半乾式製粉する方法で、乳白変異米から米粉を調製し、その加工特性を評価した。

乳白変異米は、ピンミルで乾式製粉しても、気流粉碎機で半乾式製粉しても、親系統よりも損傷澱粉が少なくかつ粒子径の細かい米粉が製造できた。グルテン添加米粉パンを焼成すると、損傷澱粉が少なくかつ粒子径の細かい米粉ほど、比容積の大きなパンになった。乳白変異米をピンミルで乾式製粉した米粉は、親系統の米を気流粉碎機で半乾式製粉した米粉と同程度の比容積を示す米粉パンになった。RVA 糊化特性のうち、糊化温度、最終粘度、セットバック、ピーク時間とパン比容積との間に有意な相関が認められた。米粉の特性と加工特性について主成分分析によってとりまとめると、製粉方法の違いと、乳白変異の有無によってグループに分けられた。乳白変異の導入は、気流粉碎機による半乾式製粉の適用と同様に、米粉のパン加工適性を高める効果があると考えられた。

謝辞

本論文のとりまとめにあたり，終始ご指導とご助言をくださいました，名古屋大学生命農学研究科生物圏資源学専攻作物科学研究分野の畑信吾教授に深く感謝の意を表します。

研究の実施にあたり，近畿中国四国農業研究センターの安井健博士，飯田修一博士，作物研究所の鈴木保宏博士から多くのご指導とご助言を頂きました。透過型電子顕微鏡観察については，京都府立大学の増村威宏博士，齊藤雄飛博士，広島大学の嶋村正樹博士からご指導とご協力を頂きました。米の製粉にあたっては，新潟県農業総合研究所と宝田工業株式会社に協力を頂きました。近畿中国四国農業研究センターの稲育種研究室および業務第 1 科の方々には試験材料の育成や調製にあたり多大な協力を頂きました。また，職場の方々から様々な形で協力と励ましを頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

最後に，常に私を温かく見守ってくださり，支え続けてくださいました友人と家族に心から感謝いたします。

参考文献

- AACC International (2000) Approved Methods 10-10B, 55-31, 61-02, 61-99, 76-13 and 76-31. In: *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th Ed.* AACC International, St. Paul, MN, USA.
- AOAC 968.06 (1990) Protein (crude) in animal feed. In: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., vol. I*, Ed. by Helrich, K., The Association of Official Analytical Chemists, Inc.: Arlington, VA. pp. 71-72.
- 青木法明 (2008) 多種多様な, 米粉パンと米粉パン向き米粉. *農林経済* **9982**, 2-7.
- Araki, E., Ikeda, T.M., Ashida, K., Takata, K., Yanaka, M. and Iida, S. (2009) Effects of rice flour properties on specific loaf volume of one-loaf bread made from rice flour with wheat vital gluten. *Food Science and Technology Research* **15**, 439-448.
- 有坂将美, 中村幸一, 吉井洋一 (1992) 製粉方法を異にした米粉の性質. *澱粉科学* **39**, 155-163.
- Barber, D.L., Lott, J.N.A. and Yang, H. (1998) Properties of rice (*Oryza sativa* L.) faecal protein particles: Light and electron microscopic observations. *Journal of Cereal Science* **27**, 83-93.
- Baxter, G., Blanchard, C. and Zhao, J. (2004) Effects of prolamin on the textural and pasting properties of rice flour and starch. *Journal of Cereal Science* **40**, 205-211.
- Bechtel, D.B. and Pomeranz, Y. (1978) Ultrastructure of the mature ungerminated rice (*Oryza sativa*) caryopsis. The starchy endosperm. *American Journal of Botany* **65**, 684-691.
- Bechtel, D.B. and Juliano, B.O. (1980) Formation of protein bodies in the starchy endosperm of rice (*Oryza sativa* L.): a re-investigation. *Annals of Botany* **45**, 503-509.
- Bergman, C. J., Bhattacharya, K. R. and Ohtsubo, K. (2004) Rice end-use quality analysis. In: *RICE: Chemistry and Technology Third Edition*. Ed. by Champagne, E.T., AACC International, St. Paul, MN, USA. pp. 415-472.
- Cornell H. J. and Hoveling, A. W. (1998) The wheat kernel. In: *Wheat: Chemistry and utilization*. Technomic Publishing Company, Inc. PA. pp. 1-42.
- 江川和徳 (2003) 米粉パンの開発. *農林水産研究ジャーナル* **26** (10), 11-16.
- Evers, A. D. and Stevens, D. J. (1988) Production and measurement of starch damage in flour part 4: Effect of starch damage on hot pasting properties. *Starch/Stärke* **40**, 297-299.
- Fitzgerald, M. A., Martin, M., Ward, R. M., Park, W. D. and Shead, H. J. (2003) Viscosity of rice

- flour: A rheological and biological study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2295-2299.
- Furukawa, S., Tanaka, K., Masumura, T., Ogihara, Y., Kiyokawa, Y. and Wakai, Y. (2006) Influence of rice proteins on eating quality of cooked rice and on aroma and flavour of sake. *Cereal Chemistry* **83**, 439-446.
- Furukawa, S., Itou, M., Masumura, T., Tanaka, K., Kiyokawa, Y. and Wakai, Y. (2007) Ultrastructure of low-glutelin rice endosperm. *Plant Biotechnology* **24**, 227-229.
- Gibson, T. S., Solah, V. A. and McCleary, B. V. (1997) A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with concanavalin A. *Journal of Cereal Science* **25**, 111-119.
- 濱田茂樹, 青木法明, 鈴木保宏 (2010) 膨らみの向上した玄米粉パンの製パン特性. *育種学研究* **12** (別 2), 152.
- Homma, N., Morohashi, K., Yoshii, Y., Hosokawa, H. and Miura, K. (2007) Properties and components of the floury and sugary mutant rice cultivars developed in the Hokuriku region. *Food Science and Technology Research* **13**, 422-426.
- Horikoshi, M. and Morita, T. (1982) Changes in ultrastructure and subunit composition of protein body in rice endosperm during germination. *Agricultural and Biological Chemistry* **46**, 269-274.
- 堀末登 (1995) VI-2. 種子の生産, 環境と品質 2. イネ. *種子のバイオサイエンス*. 種子生理生化学研究会編, 学会出版センター, pp. 251-258.
- 星川清親 (1990) 米質と等級規格. *稲学大成第 1 巻「形態編」*. 松尾孝嶺編, 社団法人農山漁村文化協会, pp. 312-317.
- Iida, S., Amano, E. and Nishio, T. (1993) A rice (*Oryza sativa* L.) mutant having a low content of glutelin and a high content of prolamine. *Theoretical and Applied Genetics* **87**, 374-378.
- Iida, S., Kusaba, M. and Nishio, T. (1997) Mutants lacking glutelin subunits in rice: mapping and combination of mutated glutelin genes. *Theoretical and Applied Genetics* **94**, 177-183.
- Iida, S., Miyahara, K. and Nishio, T. (1998) Rice mutant lines lacking α -globulin. *Breeding Science* **48**, 45-49.
- 飯田修一 (2006) 米の可消化性タンパク質をさらに低減する. *農業および園芸* **81** (1), 197-202.
- Kang, H., Park, S., Matsuoka, M. and An, G. (2005) White-core endosperm floury endosperm-4 in

- rice is generated by knockout mutations in the C4-type pyruvate orthophosphate dikinase gene (OsPPDKB). *The Plant Journal* **42**, 901-911.
- Kaushik, R. P. and Khush, G. S. (1991) Endosperm mutants in rice: gene expression in japonica and indica backgrounds. *Cereal Chemistry* **68**, 487-491.
- Kawakatsu, T., Hirose, S., Yasuda, H. and Takaiwa, F. (2010) Reducing rice seed storage protein accumulation leads to changes in nutrient quality and storage organelle formation. *Plant Physiology* **154**, 1842-1854.
- Kawagoe, Y., Suzuki, K., Tasaki, M., Yasuda, H., Akagi, K., Katoh, E., Nishizawa, N.K., Ogawa, M. and Takaiwa, F. (2005) The critical role of disulfide bond formation in protein sorting in the endosperm of rice. *Plant Cell* **17**, 1141-1153.
- Kawasaki, T., Mizuno, K., Shimada, H., Satoh, H., Kishimoto, N., Okkumura, S., Ichikawa, N. and Baba, T. (1996) Coordinated regulation of the genes participating in starch biosynthesis by the rice *Floury-2* locus. *Plant Physiology* **110**, 89-96.
- Kim, S. S., Lee, S. E., Kim, O. W. and Kim, D. C. (2000) Physicochemical characteristics of chalky kernels and their effects on sensory quality of cooked rice. *Cereal Chemistry* **77**, 376-379.
- Krishnan, H.B., White, J.A. and Pueppke, S.G. (1992) Characterization and localization of rice (*Oryza sativa* L.) seed globulins. *Plant Science* **81**, 1-11.
- Krishnan, H.B. and White, J.A. (1995) Morphometric analysis of rice seed protein bodies. *Plant Physiology* **109**, 1491-1495.
- Kumamaru, T., Satoh, H., Iwata, N., Omura, T., Ogawa, M. and Tanaka, K. (1988) Mutants for rice storage proteins 1. Screening of mutants for rice storage proteins of protein bodies in the starchy endosperm. *Theoretical and Applied Genetics* **76**, 11-16.
- Kumamaru, T., Uemura, Y., Inour, Y., Takemoto, Y., Siddiqui, S.U., Ogawa, M., Hara-Nishimura, I. and Satoh, H. (2010) Vacuolar processing enzyme plays an essential role in the crystalline structure of glutelin in rice seed. *Plant and Cell Physiology* **51**, 38-46.
- Kusaba, M., Miyahara, K., Iida, S., Fukuoka, H., Takano, T., Sassa, H., Nishimura, M. and Nishio, T. (2003) *Low glutelin content1*: A dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. *The Plant Cell* **15**, 1455-1467.
- Li, X. and Okita, T.W. (1993) Accumulation of prolamines and glutelins during rice seed development: a quantitative evaluation. *Plant and Cell Physiology* **34**, 385-390.

- Lisle, A. J., Martin, M. and Fitzgerald, M. A. (2000) Chalky and translucent rice grains differ in starch composition and structure and cooking properties. *Cereal Chemistry* **77**, 627-632.
- 町田栄一 (1999) 伝統的米粉 (米穀粉) 加工方法と施設・資材. *地域資源活用食品加工総覧 第4巻加工品編*. 農山漁村文化協会, pp. 486-493.
- 増村威宏, 齋藤雄飛 (2010) 米の食味に關与する貯蔵タンパク質の米粒内分布の解析. *農業および園芸* **85**, 1235-1239.
- 松葉修一, 船附稚子, 黒木慎, 横上晴郁, 清水博之 (2010) 米粉向け水稻品種「ほしのこ (北海 303 号)」の粉質性に関する選抜 DNA マーカー. *農研機構平成 21 年度成果情報*. (URL; <http://www.naro.affrc.go.jp/top/seika/2009/10cryo/cryo09-38.html>)
- Mirsa, P.S., Mertz, E.T. and Glover, D.V. (1975) Studies on corn proteins. VIII. Free amino acid content of opaque-2 double mutants. *Cereal Chemistry* **52**, 844-848.
- 望月隆弘, 原茂子 (2000) 保存期慢性腎不全の食事療法における低蛋白米の有用性. *日本腎臓学会誌* **12**, 24-29.
- 門間美千子, 齋藤昌義, 千国幸一, 斎尾恭子 (2000) 貯蔵タンパク質組成が変異した米胚乳細胞におけるプロラミン蓄積型プロテインボディの微細構造. *日本食品科学工学会誌* **47**, 938-942.
- Morita, R., Kusaba, M., Iida, S., Nishio, T. and Nishimura, M. (2009) Development of PCR markers to detect the *gbl1* and *Lgc1* mutations for the production of low easy-to-digest protein rice varieties. *Theoretical and Applied Genetics* **119**, 125-130.
- Moro, G.L., Habben, J.E., Hamaker, B.R. and Larkins, B.A. (1996) Characterization of the variability in lysine content for normal and opaque2 maize endosperm. *Crop Science* **36**, 1651-1659.
- 諸橋敬子, 鍋谷隆史, 吉井洋一, 江川和徳 (2000) 小麦粉の代替品となる米粉の製造方法及び当該米粉を使用した加工食品. 特許第 3076552 号.
- National Institutes of Health of the U.S. Department of Health and Human Services (2008) Celiac Disease. NIH Publication No. 08-4269. (ホームページで公開. URL; <http://digestive.niddk.nih.gov/ddiseases/pubs/celiac/>)
- 日本腎臓学会 (2009) CKD 診療ガイド 2009. 日本腎臓学会編, 東京医学社. (ホームページで公開. URL; http://www.jsn.or.jp/jsn_new/iryuu/kaiin/free/primers/pdf/CKDguide2009.pdf)
- Nishimura, M., Kusaba, M., Miyahara, K., Nishio, T., Iida, S., Imbe, T. and Sato, H. (2005) New rice

- varieties with low levels of easy-to-digest protein, 'LGC-Katsu' and 'LGC-Jun'. *Breeding Science* **55**, 103-105.
- Nishita, K.D. and Bean, M.M. (1979) Physicochemical properties of rice in relation to rice bread. *Cereal Chemistry* **56**, 185-189.
- Nishita, K.D. and Bean, M.M. (1982) Grinding methods: their impact on rice flour properties. *Cereal Chemistry* **59**, 46-49.
- Nishita, K.D., Roberts, R.L. and Bean, M.M. (1976) Development of a yeast-leavened rice-bread formula. *Cereal Chemistry* **53**, 626-635.
- 農業・食品産業技術総合研究機構 (2009) 新しい米を創る'09. (ホームページで公開. URL; <http://nics.naro.affrc.go.jp/publications/newrice09.pdf>)
- 農林水産省 (2009) 海外食料需給レポート. (ホームページで公開. URL; http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/jki/j_rep/annual/2009/index.html)
- 農林水産省 (2010a) 平成 21 年度食料需給表. (ホームページで公開. URL; <http://www.maff.go.jp/j/press/kanbo/anpo/pdf/100810-03.pdf>)
- 農林水産省 (2010b) 平成 21 年度食料・農業・農村白書. (ホームページで公開. URL; http://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_maff/h21/index.html)
- Ogawa, M., Kumamaru, T., Satoh, H., Iwata, N., Omura, T., Kasai, Z. and Tanaka, K. (1987) Purification of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition. *Plant and Cell Physiology* **28**, 1517-1527.
- Ogawa, M., Kumamaru, T., Satoh, H., Omura, T., Park, T., Shintaku, K. and Baba, K. (1989) Mutants for rice storage proteins 2. Isolation and characterization of protein bodies from rice mutants. *Theoretical and Applied Genetics* **78**, 305-310.
- Ogawa, T., Tayama, E., Kitamura, K. and Kaizuma, N. (1989) Genetic improvement of seed storage proteins using three variant alleles of 7S globulin subunits in soybean (*Glycine max* L.). *Japanese Journal of Breeding* **39**, 137-147.
- Okadome, H., Toyoshima, H. and Ohtsubo, K. (1998) Evaluation of gelatinization properties of rice grains with a Rapid Visco Analyser. In: *Proc. Australian Cereal Chemistry Conference, 48th*, Ed. by O'Brien, L., Blakeney, A.B., Ross, A. S. and Wrigley, C.W., RACI, North Melbourne, Australia. pp. 336-340.
- 奥野員敏 (1995) 成分からみた新形質米とその特性. *米の科学*. 石谷孝佑・大坪研一編, 朝倉

- 書店, pp. 61-77.
- O'Neill, J. (2010) Gluten-free foods: trends, challenges, and solutions. *Cereal Foods World* **55**, 220-223.
- Patindol, J. and Wang, Y. (2003) Fine structures and physicochemical properties of starches from chalky and translucent rice kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2777-2784.
- Raju, G. N., Manjunath, N. and Srinivas, T. (1991) Grain chalkiness in cereals. *Tropical Science* **31**, 407-415.
- Saikusa, T., Horino, T. and Mori, Y. (1994) Distribution of free amino acids in the rice kernel and kernel fractions and the effect of water soaking on the distribution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, 1122-1125.
- Saito, Y., Shigemitsu, T., Tanaka, K., Morita, S., Satoh, S. and Masumura, T. (2010) Ultrastructure of mature protein body in the starchy endosperm of dry cereal grain. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**, 1485-1487.
- Satoh, H. and Omura, T. (1981) New endosperm mutations induced by chemical mutagens in rice, *Oryza sativa* L. *Japanese Journal of Breeding* **31**, 316-326.
- Schmidt, R.J., Burr, F.A., Aukerman, M.J. and Burr, B. (1990) Maize regulatory gene opaque-2 encodes a protein with a "leucine-zipper" motif that binds to zein DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 46-50.
- Shih, F.F. (2004) Rice proteins. In: *Rice: Chemistry and Technology Third Edition*, Ed. by Champagne, E.T., AACC International, St. Paul, MN, USA. pp. 143-162.
- 島田浩章, 菊池尚志, 岸本直己, 矢崎潤史, 佐藤光 (2006) flo2 変異の形質が導入された低アレルギー植物およびその作出方法. 特許第 3848183 号.
- 宍戸巧一, 江川和徳 (1992) ペクチナーゼ処理による米粉の製造法及びその製パン適性 (第 1 報) 米の粉食化に関する研究. *新潟県食品研究所研究報告* **27**, 21-28.
- 鈴木保宏 (2010) 米粉利用の現状と今後. *みんなの農業広場*. (社) 全国農業改良普及支援協会 (URL; <http://www.jeinou.com/benri/rice/running/2010/05/260935.html>)
- Takahashi, M., Uematsu, Y., Kashiwaba, K., Yagasaki, K., Hajika, M., Matsunaga, R., Komatsu, K. and Ishimoto, M. (2003) Accumulation of high levels of free amino acids in soybean seeds through integration of mutations conferring seed protein deficiency. *Planta* **217**, 577-586.

- 高橋誠, 本間紀之, 諸橋敬子, 中村幸一, 鈴木保宏 (2009) 米の品種特性が米粉パン品質に及ぼす影響. *日本食品科学工学会誌* **56**, 394-402.
- Takaiwa, F., Sakuta, C., Choi, S-K., Tada, Y., Motoyama, T. and Utsumi, S. (2008) Co-expression of soybean glycinins A1aB1b and A3B4 enhances their accumulation levels in transgenic rice seed. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1589-1599.
- 高野博幸, 豊島英親, 小柳妙, 田中康夫 (1986) 米粉高置換添加ライスブレッドの品質改善. *食品総合研究所研究報告* **48**, 52-62.
- Takemoto, Y., Coughlan, S.J., Okita, T.W., Satoh, H., Ogawa, M. and Kumamaru, T. (2002) The rice mutant esp2 greatly accumulates the glutelin precursor and deletes the protein disulfide isomerase. *Plant Physiology* **128**, 1212-1222.
- Tamaki, M., Kurita, S., Toyomaru, M., Itani, T., Tsuchiya, T., Aramaki, I. and Okuda, M. (2006) Difference in the physical properties of white-core and non-white-core kernels of the rice varieties for sake brewing is unrelated to starch properties. *Plant Production Science* **9**, 78-82.
- Tanaka, K., Sugimoto, T., Ogawa, M. and Kasai, Z. (1980) Isolation and characterization of two types of protein bodies in the rice endosperm. *Agricultural and Biological Chemistry* **44**, 1633-1639.
- Tanaka, Y., Hayashida, S. and Hongo, M. (1975) The relationship of the feces protein particles to rice protein bodies. *Agricultural and Biological Chemistry* **39**, 515-518.
- 田代亨, 江幡守衛 (1975) 腹白米に関する研究第 4 報 白色不透明部の胚乳細胞の形態的特徴. *日本作物学会紀事* **44**, 205-214.
- Tashiro, T. and Wardlaw, I. F. (1991) The effect of high temperature on kernel dimensions and the type and occurrence of kernel damage in rice. *Australian Journal of Agricultural Research* **42**, 485-496.
- Wang, Y., Zhu, S., Liu, S., Jiang, L., Chen, L., Ren, Y., Han, X., Liu, F., Ji, S., Liu, X and Wan, J. (2009) The vacuolar processing enzyme OsVPE1 is required for efficient glutelin processing in rice. *The Plant Journal* **58**, 606-617.
- Wang X. and Larkins, B.A. (2001) Genetic analysis of amino acid accumulation in opaque-2 maize endosperm. *Plant Physiology* **125**, 1766-1777.
- Yamagata, H., Sugimoto, T., Tanaka, K. and Kasai, Z. (1982) Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. *Plant Physiology* **70**, 1094-1100.

Yamagata, H. and Tanaka, K. (1986) The site of synthesis and accumulation of rice storage proteins.

Plant and Cell Physiology **27**, 135-145.

山下鏡一, 藤本堯夫 (1974) 肥料と米の品質に関する研究 2 窒素肥料が米の食味, 炊飯特性,

デンプンの理化学的性質等に及ぼす影響. *東北農業試験場研究報告* **48**, 65-79.

Yano, H. (2010) Improvements in the bread-making quality of gluten-free rice batter by glutathione.

Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**, 7949-7954.

Yeh, A. (2004) Preparation and applications of rice flour. In: *Rice: Chemistry and Technology Third*

Edition, Ed. by Champagne, E.T., AACC International, St. Paul, MN, USA. pp. 495-539.

與座宏一, 岡部繭子, 島純 (2008) 米粉利用の現状と課題—米粉パンについて—. *日本食品*

科学工学会誌 **55**, 444-454.

報文目録

- 1) Ashida, K., Iida, S. and Yasui, T. (2006) Lack of 26 kDa globulin accompanies increased free amino acid content in rice (*Oryza sativa* L.) grains. *Journal of Cereal Science* **43**, 387-392.
- 2) Ashida, K., Iida, S. and Yasui, T. (2009) Morphological, physical, and chemical properties of grain and flour from chalky rice mutants. *Cereal Chemistry* **86**, 225-231.
- 3) Ashida, K., Araki, E., Iida, S. and Yasui, T. (2010) Flour properties of milky-white rice mutants in relation to specific loaf volume of rice bread. *Food Science and Technology Research* **16**, 305-312.
- 4) Ashida, K., Saito, Y., Masumura, T. and Iida, S. (2011) Ultrastructure of protein bodies in mutant rice (*Oryza sativa* L.) with altered storage protein composition. *Breeding Science* **61**, 201-207.

参考論文目録

- 1) Maeda, D., Ashida, K., Iguchi, K., Chechetka, S.A., Hijikata, A., Okusako, Y., Deguchi, Y., Izui, K. and Hata, S. (2006) Knockdown of an arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporter gene of *Lotus japonicus* suppresses mutualistic symbiosis. *Plant and Cell Physiology* **47**, 807-817.
- 2) Araki, E., Ikeda, T.M., Ashida, K., Takata, K., Yanaka, M. and Iida, S. (2009) Effects of rice flour properties on specific loaf volume of one-loaf bread made from rice flour with wheat vital gluten. *Food Science and Technology Research* **15**, 439-448.
- 3) Yasui, T., Ashida, K. and Sasaki, T. (2009) Chain-length distribution profiles of amylopectin isolated from endosperm starch of waxy and low-amylose bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with common genetic background. *Starch/Stärke* **61**, 677-686.
- 4) Yasui, T. and Ashida, K. (2011) Waxy endosperm accompanies increased fat and saccharide contents in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) grain. *Journal of Cereal Science* **53**, 104-111.