

米の蛋白質の量的質的改良に関する研究 : Dye-Binding Capacity法の検討と日本在来稻の育種素材としての評価

辛, 英範
九州大学農学部育種学教室

田中, 幸彦
九州大学農学部育種学教室

片山, 平
九州大学農学部育種学教室

<https://doi.org/10.15017/23236>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 31 (4), pp.145-150, 1977-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

米の蛋白質の量的質的改良に関する研究

Dye-Binding Capacity 法の検討と日本在来稲の 育種素材としての評価

辛 英 範・田中幸彦*・片山 平

九州大学農学部育種学教室

* 農林省農業技術研究所放射線育種場

(1976年11月16日受理)

Studies on the Quantitative and Qualitative Improvement of Rice

Application of DBC as a Screening Technique and Assessment of Japanese Local Rice Varieties for High Protein and Lysine

YOUNG-BOUM SHIN, SACHIIHIKO TANAKA*
and TAIRA KATAYAMA

Laboratory of Plant Breeding, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812

* National Institute of Radiation Breeding,
Ohmiya-machi, Ibaraki-ken, 319-22

緒 言

トウモロコシにおける高リジン遺伝子の *opaque-2* が発見されて以来 (Mertz *et al.*, 1964), オオムギ (Munck, 1972), モロコシ (Singh and Axtell, 1973) などで高リジン系統についての報告がなされている。これよりさき, Woodworth *et al.* (1952) はトウモロコシの蛋白質および油に対する 50 世代にわたる選抜で高低両蛋白系統の育成に成功した。これらのことから, 蛋白質含有量とアミノ酸構成とは異なる遺伝的背景をもつことが推定され, 高蛋白でかつ高リジン系統の育成が試みられるようになってきた。

米については, その蛋白質は良質ではあるが, リジンおよびスレオニンが不足し, また, 蛋白質含有量の少ないことが指摘されている。したがって種子蛋白質が多く, かつ蛋白質の構成アミノ酸中とくにリジン含有量の多い品種の作出が要望されている。

このような研究においては, 多数の材料から目的形質をいかにして能率的に選抜するか, すなわち, 簡便なスクリーニングの方法の開発が重要である。

Fraenkel-Conrat and Cooper (1944) によつて開発されたオレンジ G による Dye-Binding Capacity (DBC) 法は, 多数の材料について効率的に蛋白質含有量を推定することができ, 高蛋白質系統のスクリーニングに有効な手法としてトウモロコシ, オオムギ, モロコシなどの作物で活用されてきた (Mossberg, 1969)。イネにおいてもすでに DBC 法による色素結合量とリジンおよび蛋白質含有量との間に相関があるとされている (IRRI, 1969; Osone and Takagi, 1970)。

本報告は, ひろくイネ属植物を対象として, 高蛋白および高リジン系統のスクリーニングに対して DBC 法がどの程度適用しうるかを再確認するため, ミクロ・ケルダール法, DBC 法およびアミノ酸分析によつてえられた結果について, それぞれの間の相関係数を求めるとともに, 供試材料の高蛋白・高リジン育種素材としての価値を検討したものである。

本研究遂行に当たり, 種々有益なる助言を賜つた四国農業試験場瀬古秀文博士および九州農業試験場吉田智彦技官の両氏に対し深謝する。

Table 1. Materials used in this experiment.

Material	No. of varieties or lines	Material	No. of varieties or lines
Japanese local varieties	1271	<i>O. perennis</i> (W1185, W0106)	2
Ecotype, Bulu	2	<i>O. paraguayensis</i> (W1144)	1
" Bolo	2	<i>O. punctata</i> (Y20, W1514)	2
" Aus	1	<i>O. officinalis</i> (Y21, W0002)	2
" Aman	1	<i>O. malabarensis</i> (W0021)	1
" Tjereh	3	<i>O. brachyantha</i> (W0023)	1
<i>O. sativa</i> (W0647)	1	<i>O. subulata</i>	1
<i>O. breviligulata</i> (Y8)	1	Total	1292

材料および方法

1972年九大附属農場で栽培した日本在来米 1271 品種を室温で保存し、その種子を 1974 年に分析の主材料とし、ほかに野生稲 9 種 12 系統、インドおよびインドネシアの生態型 (Bulu, Bolo, Aus, Aman, Tjereh) 9 系統を供試した (Table 1)。

まず、DBC 法によつて分析した 1292 品種・系統を、オレンジ G の結合量から大、中、小の 3 段階に分け、それぞれについて任意に抽出した 102 品種・系統の蛋白質含有量を測定した。さらに蛋白質含有量に関して任意に抽出した 31 品種・系統についてアミノ酸分析を行い、えられた結果から相互間の相関係数を求めた。それぞれの測定法の概略はつぎのとおりである。

DBC 法 玄米を 60 メッシュ以下に粉碎して試料とした。試料 1 g に試薬溶液 10 ml を加え、室温で 3 時間振とうしたのち 10,000 RPM で 10 分間遠沈し、その上澄液をワットマンろ紙 No. 44 でろ過した。ろ液は島津製作所の回折格子形光电比色計を用い、ろ液中の試薬残存量を測定したのちキャリブレーションカーブから試料と結合したオレンジ G の色素量を計算した。なお、試薬溶液はクエン酸 15.84 g/l、硫酸ナトリウム 2.98 g/l、チモール 0.30 g/l で pH 2.2 の緩衝液を作り、オレンジ G 0.2% を加えて調製した。

蛋白質定量 試料 0.5 g をマイクロ・ケルダール法で分析し、その全窒素量を 5.95 を乗じて粗蛋白質含有量とした。

アミノ酸分析 試料の前処理は酸加水分解法によつた。40 mg 前後の試料と約 20 ml の 6 N HCl 溶液をアンフル型試験管に入れ、15~20 時間常温常圧下で浸漬し、30~60 分間真空ポンプで減圧したのち封管した。これを 110°C 定温器中で 24 時間加水分解したのち開封してメスフラスコに移し、2~3 倍に稀釈し、ロータリーエバポレーターで減圧乾固した。こ

れを 10 ml の蒸留水に溶解してろ過したのち、アミノ酸自動分析機 (日本電子製 JLC-5AH) で分析した。

結 果

日本在来米 81 品種、インドおよびインドネシアの生態型 9 系統および野生稲 12 系統、計 102 品種および系統につき、マイクロ・ケルダール法でえた粗蛋白質含有量と、DBC 法によるオレンジ G の結合量との関係を Fig. 1 に示した。同図から明らかなように粗蛋白質含有量の増加に伴いオレンジ G の結合量も増加し、両者の間には $r = 0.893^{**}$ (**1% 水準で有意) の高い相関のあることが認められた。

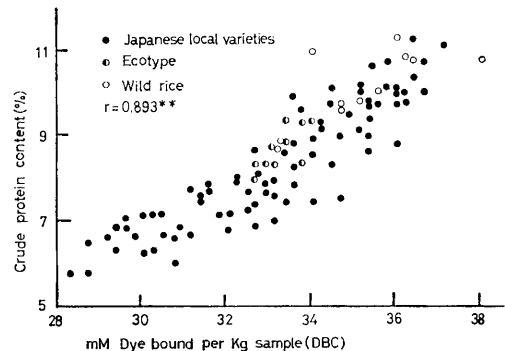


Fig. 1. The correlation between protein and dye-binding capacity (DBC).

日本在来米の粗蛋白質含有量は大体 5.8~11.3% で正規分布に似た連続分布を示した。これに対し、栽培稲の生態型と野生稲の粗蛋白質含有量はそれぞれ 8.0~9.4% および 8.8~11.3% の範囲で、野生稲の方が在来米および生態型に比べ、やや高い傾向がみられた。また日本在来米および野生稲の中には粗蛋白質含有量 11.3% と比較的高い品種または系統のあることがみられる (Table 2)。

供試した 31 品種におけるアミノ酸分析結果によるリジン含有量と DBC 法のオレンジ G 結合量との関係を Fig. 2 に示した。同図から明らかなように、両

Table 2. Mean and range of crude protein content in Japanese local variety, ecotype and wild rice

Material	No. of varieties or lines	Mean (%)	Maximum (%)	Minimum (%)
Japanese local varieties	81	8.3	11.3	5.8
Ecotype	9	8.7	9.4	8.0
Wild rice	12	10.0	11.3	8.8

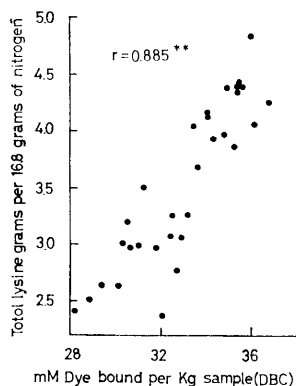


Fig. 2. The correlation between total lysine and dye-binding capacity (DBC).

者の間には $r = 0.885^{**}$ の高い正の相関が認められた。アミノ酸分析を行つた 31 品種のリジン含有量は窒素 16.8 g 当り最低 2.37 g 最高 4.85 g であつた。なお、日本在来籾 1271 品種の中 36 品種では kg 試料当り結合したオレンジ G の量は 35 mM 以上を示した。

リジン含有量に対応する 100 g 蛋白質当り結合したオレンジ G の量と粗蛋白質含有量との関係をまとめて Fig. 3 に示す。同図から、両者間には $r = -0.938^{**}$ の高い負の相関が認められた。

アミノ酸分析に供試した日本在来籾 31 品種中、高リジン含有量を示した“冷水”(LO,97)と、他作物の

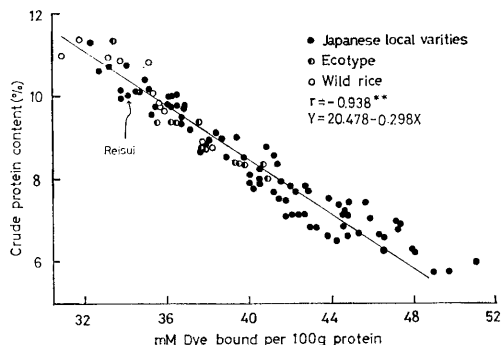


Fig. 3. The correlation between protein and dye bound per 100g protein.

高リジン系統 opaque-2, floury-2 (トウモロコシ), Hiproly (オオムギ) との各アミノ酸構成を比較して Table 3 に示した。必須アミノ酸の含有量は他の作物の高リジン系統とほぼ同じ程度である。とくに従来、米において低いと指摘されているリジン含有量は、窒素 16.8 g 当り 4.85 g と高く、メチオニン含有量は 1.77 g とかなり低い。ちなみにこの品種の蛋白質含有量は約 10% であつた。

考 察

作物の成分含有量の遺伝に関するこれまでの研究によれば、複数の遺伝子またはポリゾーンに支配される場合と単一遺伝子に支配される場合がある。前者の例はトウモロコシ (Frey, 1949), コムギ (Haunold *et al.*, 1962), オオムギ (吉田・桐山, 1972), インゲン (Leleji *et al.*, 1972) などの蛋白質およびエンバクの油 (Brown *et al.*, 1974; Frey *et al.*, 1975) などで、それらの広義の遺伝力は比較的高い (Haunold *et al.*, 1962; Leleji *et al.*, 1972; Brown *et al.*, 1974)。一方、後者はトウモロコシ (Mertz *et al.*, 1964; Nelson *et al.*, 1965), オオムギ (Doll, 1973) およびソルガム (Singh and Axtell, 1973) などのリジン含有量の例があげられる。

米を主食とする人々にとっては蛋白質含有量が少なく、またリジン含有量の不十分な米の成分改良は極めて重要な問題であり、最近この方面の研究も盛んに行われるようになってきた (Juliano *et al.*, 1968; Tanaka and Tamura, 1968; Tanaka, 1969, 1970, 1973; Tanaka and Takagi, 1970; IRRI, 1969; Kataoka, 1974; Chu *et al.*, 1974)。

一般に成分育種において重要なことの 1 つに、いかにして多数の材料から簡便・迅速かつ安価に希望型を選抜することができるかの分析法の問題がある。粗蛋白質の定量に関してはすでにマイクロ・ケルダール法が利用され、さらにビュレット法なども開発されてスクリーニングの能率化が進められている。これに対して、アミノ酸分析は手間と時間がかかり、その上経費面でも利用に困難性があつたがリジンなど Basic

Table 3. Comparison of amino acid contents between Japanese local rice variety "Reisui" and other high lysine variety "Kaohsiung" or crop. (amino acid content/16.8 gN)

Amino acid	Rice		Corn ²		Barley ³ Hipoly
	Reisui	Kaohsiung ¹	opaque-2	floury-2	
Alanine	6.53	6.70	6.7	8.0	4.2
Arginine	10.04	8.98	7.2	6.3	4.4
Aspartic acid	11.14	13.24	8.8	10.5	6.2
Cystine	—	1.14	2.0	1.6	1.7
Glutamic acid	22.84	21.77	17.2	18.5	24.0
Glycine	5.23	5.80	5.1	4.7	3.7
Histidine	3.14	2.74	3.5	2.9	2.1
Iso-Leucine*	4.75	4.33	3.4	4.0	3.9
Leucine*	9.36	6.89	9.3	12.0	7.0
Lysine*	4.85	4.31	5.0	4.8	4.0
Methionine*	1.77	2.95	2.2	2.7	2.0
Phenylalanine*	6.17	6.28	4.4	5.2	6.0
Proline	—	5.44	8.4	8.8	12.0
Serine	5.07	6.13	4.7	5.2	4.6
Threonine*	3.78	4.40	3.8	4.1	3.5
Tyrosine	3.39	3.64	4.2	4.6	2.9
Valine*	6.75	6.18	5.2	5.7	5.3
Protein	10.06**	12.52**	10.5	17.0	17.2

* essential amino acid, ** protein content (%) in dried seed.

¹ Juliano *et al.* (1964), ² Nelson (1969), ³ Munck (1972)

Amino Acids 含量の推定に DBC 法の有用性が発表されて (Fraenkel-Conrat and Cooper, 1944) 以来, この方面の研究が活発となつてきた。すなわち, Mossberg (1969) はオオムギ, コムギ, カラスムギ, ライムギなどでリジンのスクリーニングに DBC 法を利用し, また Munck *et al.* (1970) はオオムギで高リジン系統 "Hipoly" を選抜した。イネでは Osone and Takagi (1970) が高蛋白米のスクリーニングに, また IRRI (1969) で高リジンのスクリーニングに本法の有用性を示した以外は DBC 法を利用した報告はない。

マイクロ・ケルダール法により分析してえられた粗蛋白質含有量と DBC 法によるオレンジ G 結合量との間には高い正の相関 ($r=0.893^{**}$) があり (Fig. 1), この結果は Osone and Takagi (1970), Chan *et al.* (1971) の米に関する報告ともよく一致した。また Basic Amino Acids であるリジンの含有量とオレンジ G 結合量との間にも高い正の相関 ($r=0.885^{**}$) が示された (Fig. 2)。このことは他の作物の場合 (Mossberg, 1969) と同様に DBC 法がイネにおいても高リジン系統のスクリーニングに有用な手法であることを示唆している。さらに粗蛋白質含有量(%)と蛋白質 100 g 当りに結合した色素量との間には高い負の相関 ($r=-0.938^{**}$) がみられる (Fig. 3)。Munck (1972) が述べているように, 同図の回帰直線から正の方向に有意にかたよつた品種または系

統の有無によつて, 容易に高リジン品種または系統のスクリーニングが可能であることを示している。しかし現在までのところ, イネにおいてはオオムギなどの場合と異なり, リジン含有量のみが大幅に変異した品種または系統は見いだされていない。

在来稲の粗蛋白質含有量の変異は室内乾燥種子で 5.8~11.3% と比較的広い分布を示したのに対し, 生態型および野生稲ではそれぞれ 8.0~9.4% および 8.8~11.3% の範囲であつた (Table 2)。これら粗蛋白質含有量の変異幅は田中 (1970) の在来稲および Kataoka (1974) の突然変異系統からえられた結果のそれとほぼ同程度であつたが, 単位面積当りの蛋白およびリジン収量については今後更に検討する必要がある。なお野生稲についても今後の究明に期待したい。

蛋白質含有量とリジン含有量との間には負の相関があるとの報告もあるが (Juliano *et al.*, 1964), 本実験における在来稲の 1 品種 "冷水" の場合, 粗蛋白質含有量は約 10%, リジンの含有量は N 16.8 g 当り 4.85 g を示し, いずれも比較的高い。さらにこの品種は Kaohsiung (Juliano *et al.*, 1964) と比較して必須アミノ酸のイソロイシン, ロイシン, バリンのほか, 特にリジンの含有量が高いのに対し, メチオニン, フェニールアラニン, スレオニン含有量は低い。高リジンであるトウモロコシの opaque-2, floury-2 およびオオムギの Hipoly と比較しても "冷水" のリジン含有量はほぼ同程度であつた (Table 3)。

Mertz (1973) は米のリジン含有量は多くの場合 opaque-2 の値に近いが、高蛋白・高リジン系統の育成を試みたところリジン含有量が減少したと報告している。このような現象が一般的であるか否かは、イネの成分育種、とくに高蛋白・高リジン系統の育成に重要な問題であり、今後の検討が望まれる。

要 約

1. 日本在来種 1271 品種のほか野生種および生態型の 21 系統、計 1292 品種および系統を用い、米の高蛋白・高リジン系統の簡易スクリーニング法としての DBC 法の有用性を検討するため、DBC、マイクロ・ケルダール法およびアミノ酸分析によつてえられたそれぞれの結果について相関を求めた。

2. DBC 法によるオレンジ G 色素結合量は粗蛋白質含有量およびリジン含有量との間にそれぞれ $r = 0.893^{**}$ 、および $r = 0.885^{**}$ の高い正の相関を示した。

3. 粗蛋白質含有量と蛋白質 100 g 当り結合したオレンジ G 量との間には高い負の相関 ($r = -0.938^{**}$) が示された。その回帰直線から有意にかたよつたプロットの有無によつて、容易に高リジン系統をスクリーニングできることを示唆している。

4. 以上の結果から、米の高蛋白・高リジン系統のスクリーニングに DBC 法の利用性の高いことが示唆された。

5. 日本在来種品種“冷水”の蛋白質およびリジン含有量はトウモロコシの opaque-2, floury-2 やオムギの Hiproly のそれとほぼ等しい。

文 献

- Brown, C. M., A. N. Aryeetey and S. N. Dubey 1974 Inheritance and combining ability for oil content in oats (*Avena sativa* L.). *Crop Sci.*, **14**: 67-69
- Chan, H. Y., T. S. Chou, Y. E. Chu and H. W. Li 1971 Breeding for high protein and balanced amino acid rice varieties. II. Application of dye-binding capacity method in rice grain. *Bot. Bull. Acad. Sinica*, **12**: 84-88
- Chu, Y. E., Y. S. Li and K. S. Tsai 1974 Breeding for high protein and balanced amino acid rice varieties. 4. The distribution of protein contents in a rice grain. *Euphytica*, **23**: 153-158
- Doll, H. 1973 Inheritance of the high-lysine character of a barley mutant. *Hereditas*, **74**: 293-294
- Fraenkel-Conrat, H. and M. Cooper 1944 The use of dyes for determination of acid and basic groups in proteins. *J. Biol. Chem.*, **154**: 239-246
- Frey, K. J. 1949 The inheritance of protein and certain of its components in maize. *Agron. J.*, **41**: 113-117
- Frey, K. J., E. G. Hammond and P. K. Lawrence 1975 Inheritance of oil percentage in interspecific crosses of hexaploid oats. *Crop Sci.*, **15**: 94-95
- Haunold, A., V. A. Johnson and J. W. Schmidt 1962 Genetic measurements of protein in the grain of *Triticum aestivum* L. *Agron. J.*, **54**: 203-206
- IRRI 1969 Improvement of the protein content of rice. *Annual Report*, pp. 32-37
- Juliano, B. O., G. M. Bautista, J. C. Lugay and A. C. Reyes 1964 Studies on the physicochemical properties of rice. *Agri. Food Chem.*, **12**: 131-139
- Juliano, B. O., C. Ignacio, V. M. Panganiban and C. M. Perez 1968 Screening for high protein rice varieties. *Cereal Science Today*, **13**: 299-313
- Kataoka, K. 1974 Induction of high protein mutants in rice with ethylene imine treatment. *Gamma Field Symposia* (in Japan), **13**: 49-59
- Leleji, O. I., M. H. Dickson, L. V. Crowder and J. B. Bourke 1972 Inheritance of crude protein percentage and its correlation with seed yield in beans, *Phaseolus vulgaris* L. *Crop Sci.*, **12**: 168-171
- Mertz, E. T. 1973 穀類蛋白質の育種による改善。栄養と食糧, **26**: 1-13
- Mertz, E. T., L. S. Bates and O. E. Nelson 1964 Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science*, **145**: 279-280
- Mossberg, R. 1969 Evaluation of protein quality and quantity by dye-binding capacity: A tool in plant breeding. *IAEA*, (1969): 151-160
- Munck, L. 1972 Improvement of nutritional value in cereals. *Hereditas*, **72**: 1-128
- Munck, L., K. E. Karlsson, A. Hagberg and B. O. Eggum 1970 Gene for improved nutritional value in barley seed protein. *Science*, **168**: 985-987
- Nelson, O. E. 1969 Genetic modification of protein quality in plants. *Advan. Agron.*, **21**: 171-194
- Nelson, O. E., E. T. Mertz and L. S. Bates

- 1965 Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. *Science*, **150**: 1469-1470
- Osone, K. and T. Takagi 1970 Studies on breeding for high protein content and quality in rice. I. Estimation of seed-protein content using the dye-binding method. *Japanese J. Breed.*, **20**: 301-304
- Singh, R. and J. D. Axtell 1973 High lysine mutant gene (*hl*) that improves protein quality and biological value of grain sorghum. *Crop Sci.*, **13**: 535-539
- Tanaka, S. 1969 Some useful mutations induced by gamma irradiation in rice. *IAEA*, (1969): 517-527
- 田中幸彦 1970 米の蛋白質含有率の品種間差異について. 育種, **20** (別2): 164-165
- Tanaka, S. 1973 Varietal differences in protein content of rice. *IAEA*, (1973): 107-113
- Tanaka, S. and Y. Takagi 1970 Protein content of rice mutants. *IAEA*, (1970): 55-62
- Tanaka, S. and S. Tamura 1968 A short report on gamma ray induced rice mutants having high protein content. *Japan Agri. Res. Quart.*, **3**: 1-4
- Woodworth, C. M., E. R. Leng and R. W. Jugenheimer 1952 Fifty generations of selection for protein and oil in corn. *Agron. J.*, **44**: 60-65
- 吉田智彦・桐山 毅 1972 大麦の蛋白質改良育種に関する研究—高蛋白品種 Hiprolyとその雑種後代系統における蛋白含量変異— 育種, **22** (別2): 104-105

Summary

In this paper, possibility of screening with the DBC method for high lysine content in the materials consisting of 1271 Japanese local rice varieties, 9 lines of ecotypes and 9 species (12 lines) of wild rice were studied.

The results showed good correlation between DBC and lysine and protein contents of the materials used in the present experiment. For the samples employed, the correlation coefficient between the DBC, the protein level of 102 varieties and lines of Japanese local rice, ecotype and wild rice was 0.893** and the lysine level of 31 Japanese local varieties, 0.885**. Negative correlation coefficient between the protein and the lysine content per 100 g protein was obtained as shown in Fig. 3 ($r = -0.938^{**}$). From the result shown in Fig. 3, significantly deviate plots toward positive side from the regression line are also assumed as high lysine varieties or lines.