

イネ胚乳澱粉のアミロース含有率に関する育種学的研究

白石, 真貴夫
九州大学農学研究科農学専攻

<https://doi.org/10.11501/3065535>

出版情報 : 九州大学, 1992, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

イネ胚乳澱粉のアミロース含有率に関する
育種学的研究

白石真貴 著

199

イネ胚乳澱粉のアミロース含有率に関する
育種学的研究

白石真貴 著

199

①

イネ胚乳澱粉のアミロース含有率に関する育種学的研究

第1章 緒言	1
第2章 材料と方法	5
第3章 結果と考察	15
第4章 結論	25
参考文献	30
謝辞	35
索引	40
図表目録	45
表1	50
表2	55
表3	60
表4	65
表5	70
表6	75
表7	80
表8	85
表9	90
表10	95
表11	100
表12	105
表13	110
表14	115
表15	120
表16	125
表17	130
表18	135
表19	140
表20	145
表21	150
表22	155
表23	160
表24	165
表25	170
表26	175
表27	180
表28	185
表29	190
表30	195
表31	200
表32	205
表33	210
表34	215
表35	220
表36	225
表37	230
表38	235
表39	240
表40	245
表41	250
表42	255
表43	260
表44	265
表45	270
表46	275
表47	280
表48	285
表49	290
表50	295
表51	300
表52	305
表53	310
表54	315
表55	320
表56	325
表57	330
表58	335
表59	340
表60	345
表61	350
表62	355
表63	360
表64	365
表65	370
表66	375
表67	380
表68	385
表69	390
表70	395
表71	400
表72	405
表73	410
表74	415
表75	420
表76	425
表77	430
表78	435
表79	440
表80	445
表81	450
表82	455
表83	460
表84	465
表85	470
表86	475
表87	480
表88	485
表89	490
表90	495
表91	500
表92	505
表93	510
表94	515
表95	520
表96	525
表97	530
表98	535
表99	540
表100	545

白石真貴夫

1 9 9 3

目 次

第1章 序 論	1
第2章 イネ胚乳澱粉中のアミロペクチン共存下でのアミロース含有率測定法の設定	6
第1節 ヨウ素呈色法に基づくアミロペクチン共存試料中のアミロース含有率測定法の設定	8
第2節 アミロース含有率の簡易測定法の創設	24
第3節 考 察	36
第3章 イネ胚乳澱粉中の“見かけのアミロース含有率”に関する品種間変異	43
第4章 イネ澱粉胚乳中の見かけのアミロース含有率と澱粉結合型タンパク質含量との関係	64
第1節 α タンパク質の精製	67
第2節 ウエスタンブロッティング法による α タンパク質の検出	74
第3節 酵素結合免疫吸着測定法による α タンパク質の定量	87
第4節 考 察	96
第5章 登熟温度がイネ胚乳澱粉の諸特性に及ぼす影響	103
第1節 登熟温度が澱粉特性に与える影響	104
第2節 出穂後の登熟温度と見かけのアミロース含有率との関係	113
第3節 考 察	125
第6章 総合考察	133
摘 要	147
謝 辞	151
引用文献	152

第 1 章 序 論

わが国における稲作研究は、国民の食糧自給という目標達成のために、生産性の向上と安定化を目的とした品種の育成と栽培技術の改善に務めた結果、自給達成の目的を果たし、大きな成果を挙げてきた。しかし、食糧事情の好転と生活水準の向上は、国民の食生活の多様化を招き、結果として米消費量の減退傾向を来たし、量から質への転換を余儀なくされている。そのため、「コシヒカリ」、「ササニシキ」などに代表される良食味品種の品質要因の解析が必要になり、米飯の食味とイネ胚乳澱粉の物理化学的性質との関係についての研究が開始され、米飯の味に関する科学的説明が進展しつつある。

イネ胚乳中に含まれる成分は、澱粉が約 75%、タンパク質が 6~7%、残りが脂質その他とされている。タンパク質や脂質が米飯の食味に与える影響は無視できないが、米飯の食味に対する澱粉の与える影響は最も大きい。澱粉は 2 つの成分に大別され、グルコースが直鎖状に結合したアミロースと、分岐構造をもつ

アミロペクチンから構成される。特に、イネ胚乳澱粉に占めるアミロース成分の割合（以下アミロース含有率と略する）は、米飯の粘弾性と深い関係にあることが知られている（Juliano and Pascual 1980）。倉沢（1969）は、イネ胚乳澱粉中のアミロース含有率が米飯の粘りと密接に関係することを明らかにし、アミロース含有率の低い米飯の食味評価が高いことを認めている。また、稲津（1979）は、粘りの少ない北海道産米の食味改善方向として、低アミロース品種育成の重要性を指摘している。

このように、わが国の良食味品種育成における低アミロース化の重要性が指摘されたにも拘らず、アミロース含有率に関する遺伝・育種学的研究は、1970年代までは、あまり大きな進展をみなかった。その理由として、日本国内の粳性品種のアミロース含有率が20%前後で、変異の幅も小さく（稲津ら 1974）、また、アミロース含有率の測定に用いられてきたヨウ素呈色法は分析精度が低く、しかも多大な労力と時間を必要とすることなどが挙げられる。

しかし、1980年代に入り、アミロース含有率が低

下した dull 変異体 (Okuno *et al.* 1983, Satoh and Omura 1981) の存在が明らかにされ、それらの遺伝解析が進むに伴い、イネの胚乳澱粉のアミロース含有率が単因子支配であることが明らかにされた。また、オートアナライザーによるアミロース含有率の迅速大量測定法が開発されたこともあり (佐々木ら 1980)、イネの低アミロース性に関する遺伝・育種学的研究は、急速な進展をみた。さらに、Sano (1984) は、日、印品種間で認められたアミロース含有率の差異が、糯性および粳性を支配する $w1$ 遺伝子座の $w1^a$ と $w1^b$ の複対立遺伝子の違いによることを明らかにした。これらアミロース含有率に関する遺伝・育種学的研究および分析手法の基礎に立って、低アミロース化による育種の方向が確立され、低アミロース遺伝子を導入した新品種育成の成果が得られつつある (佐々木 1991)。

ところで、イネ胚乳澱粉の構造の決定には、アミロース含有率のみならず、アミロペクチンの分子構造の違いが大きく影響する (檜作 1988)。アミロペクチンは、イネ胚乳澱粉の約 80% を占める主成分であり、その分子構造や理化学的特性の違いは、米飯の食味に

強く影響することが考えられる。しかしながら、これまでの低アミロース化を目指した育種では、イネ胚乳澱粉中のアミロペクチンの構造の差異は、ほとんど注目されなかった。その理由として、①アミロペクチンを直接定量する手法がないこと、②アミロースとアミロペクチンの分別が困難であることから、アミロース含有率に関する変異とアミロペクチンの構造変異を明確に分けることができなかつたこと、③アミロペクチンに関する遺伝変異がほとんど知られていなことなどが挙げられる。しかし、今後の米の用途拡大を図るためには、アミロース含有率だけでなく、アミロペクチンに関する変異を収集し、遺伝的評価を加える必要がある。そのためには、アミロース含有率に関する変異の評価を的確に行うとともに、アミロペクチンについてもその変異の評価法を確立することが急務である。

このような観点から、本研究では、まず、アミロース含有率に関する変異を正確に評価できる測定法を開発し、その方法によって既存の品種にみられる遺伝変異を把握するとともに、免疫化学的手法によって Wx 遺伝子の産物である Wx タンパク質含量を測定し、ア

ミロース含有率との関係を明らかにした。さらに、登
熟温度が澱粉の諸特性に及ぼす影響についても明らか
にした。本論文は、これらの成果をとりまとめたもの
である。

第2章 イネ胚乳澱粉中のアミロペクチン共存下での

アミロース含有率測定法の設定

イネ胚乳澱粉中のアミロース含有率に関する遺伝変異を知るためには、多くの系統や個体を調査する必要がある。そこで、アミロース含有率を少量の粗澱粉試料、あるいは粒単位で、正確、迅速かつ簡便に測定する方法の開発が不可欠である。

アミロースは、グルコースの α -1,4結合からなる直鎖構造を、アミロペクチンは、 α -1,6結合を介した分枝構造を形成することから、両者は区別される。また、植物澱粉をヨウ素-ヨウ化カリウム溶液で染色した場合、アミロースは、アミロースのらせん構造内部にヨウ素原子を包接し、アミロース-ヨウ素複合体を形成するため、その溶液は青色を呈する。これに対し、アミロペクチンはヨウ素との複合体を形成しないため、染色溶液は茶色のままで呈色反応を示さない。このようなアミロースとアミロペクチンのヨウ素に対する反応性の違いを利用して、澱粉試料中のアミロース含有率は、分光学的に測定されている。

この方法では、まずアミロースとアミロペクチンの割合を変えて混合・糊化する。次いで、標準混合糊化液のヨウ素呈色度の測定値とアミロース含有率との関係を求め、得られた検量線に基づいて、アミロース含有率を算出する (McCready and Hassid 1943, Williams *et al.* 1958)。このヨウ素呈色法に基づくオートアナライザー (テクニコン社) を用いた自動測定法が開発され、一般的な澱粉試料については、アミロース含有率の測定が可能となった (Robyt and Bemis 1967, Juliano 1971)。しかし、オートアナライザーは処理できる検体数が限られるうえ、操作が煩雑である。加えて、ヨウ素呈色法では、測定値がアミロペクチン由来のヨウ素呈色値の影響を受けることが指摘されている (Banks *et al.* 1974, Juliano *et al.* 1981)。従って、ヨウ素呈色法によって、アミロース含有率に関する遺伝変異を探索する場合、アミロペクチンの呈色の影響を考慮する必要がある。

そこで、本章では、アミロペクチン共存下でのアミロース含有率の正確な評価法の設定を目的として、まずヨウ素呈色法の抜本的な検討を行うことによって改良法を設定するとともに、続いてアミロースとアミロペクチン

のヨウ素複合体が与える各最大吸収波長が相互に依存し合うことを明らかにし、アミロース含有率の簡易迅速な新測定法を開発した。

第1節 ヨウ素呈色法に基づくアミロペクチン共存試料中のアミロース含有率測定法の設定

従来、ヨウ素呈色法ではアミロースのヨウ素吸収スペクトルの最大吸収波長（以下 λ_{max} と略する）である600～620 nmにおける吸光度から、アミロースの含有率を測定する方法が採用されてきた。ところが糊化澱粉液をヨウ素で染めた場合に出現する吸収スペクトルは、アミロースとアミロペクチンという異なる2成分に依存する吸収スペクトルの重なりあったものから構成されている。従って、600～620 nmにおける吸光度では、アミロースばかりでなくアミロペクチンの呈色値も含んでいる。このことから、ヨウ素呈色法を用いてアミロース含有率を正確に測定するためには、アミロペクチンの影響が最も少ない波長域で測定することが不可欠となる。

本節では、アミロースとアミロペクチンの個別の吸収

スペクトルを求め、アミロペクチンの影響の最も小さい波長を選択することによって、アミロペクチン共存下でのアミロース含有率のより正確な測定方法の設定を試みた。

1. 材料および方法

供試材料

材料には、水稻品種「金南風」の受精卵細胞を N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 処理して誘発した糯性突然変異 2 系統 (矢野 1984)、低アミロース突然変異 9 系統 (矢野 1984)、amylose extender 突然変異 3 系統 (Yano *et al.* 1985) および原品種「金南風」を用いた。また、比較のために、栽培品種として「日本晴」、
「台中 65 号」、
「IR 36」および「台中在来 1 号」を供試した (Table 2-1)。全供試材料は、1987 年九州大学農学部附属農場で慣行法に従って栽培した後、完熟種子を収穫したものである。

標準試料

標準アミロースにはトウモロコシ由来のアミロース (東京化成製) を用い、標準アミロペクチンとしては、ト

Table 2-1. Materials examined in amylose content.

Sample	Gene	Amylose type
Mutants *		
EM 1	<i>wx</i>	none
EM 2	<i>du-2</i>	low
EM 10	<i>ae</i>	high
EM 12	<i>du-1</i>	low
EM 15	<i>du-2</i>	low
EM 21	<i>wx</i>	none
EM 23	<i>du-3</i>	low
EM 57	<i>du-1</i>	low
EM 69	<i>du-3</i>	low
EM 72	<i>ae</i>	high
EM 85	<i>du-2</i>	low
EM 98	<i>du-4</i>	low
EM 127	<i>ae</i>	high
EM 140	<i>du-5</i>	low

Varieties		
Kinmaze		medium
Nipponbare		medium
Taichung 65		medium
Taichung Native 1		high
IR 36		high

*: All mutants were induced from a paddy rice variety, Kinmaze, by MNU treatment.

ウモロコシ由来のアミロペクチン(Sigma社製)を用いた。

粉碎試料の調製

完熟種子を佐竹製作所製テスト粉摺機で脱ぶした。搗精は、ケット化学研究所製試験用小型搗精機パーレストにより行った。白米の粉碎は、平工製作所製試料粉碎機TI-110によって行い、100メッシュ篩通過のものを供試した。

澱粉含有率の推定

白米の粉碎試料 200 mg に、80%エチルアルコールを加えて低分子糖を除去した後、精製水 5 ml を加え、15分間加熱し、澱粉を糊化した。室温で冷却後、52%過塩素酸 6.5 ml を加え、室温に 20分間放置後、精製水 20 ml を加えて攪拌し、5,000 × g で 10分間遠心分離した。得られた上清を精製水で 50 ml に定容後、一定希釈液を試料液としてフェノール-硫酸法(Dubois *et al.* 1956)によってグルコース量を求め、澱粉含有率を算出した。

澱粉原液の調製

粉碎試料 20 mg に 2 ml の 1 M 水酸化カリウムを加え、4℃で一、夜糊化した後、精製水を加えて 10 ml に定

容し、澱粉原液とした。

ヨウ素呈色度の測定

澱粉溶液のヨウ素呈色反応は、2 ml の澱粉原液に 1 ml の 1 M 酢酸と 1 ml の 0.2% ヨウ素 - 2% ヨウ化カリウム溶液を加えて行い、精製水で 100 ml に定容して測定試料液とした。従って、澱粉溶液の最終濃度は $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ となった。ヨウ素複合体の吸収スペクトルは、自記分光光度計（島津製作所製 UV-2100）を用いて測定した。測定は、UV-2100 に島津製作所製電子冷熱式セル温度コントローラを装着して行い、温度設定は 25°C とした。

遠心分離処理

試料澱粉溶液の示す濁りの影響を検討するため、8 ml の澱粉原液を $10,000 \times g$ で遠心分離し、上清をヨウ素呈色反応に供試した。次に、遠心分離残渣に 2 ml の 1 M 水酸化カリウムを加え、 4°C で一夜糊化した後、精製水を加えて 10 ml に定容した溶液のヨウ素呈色反応を測定した（Fig. 2-1）。

2. 結 果

(1) アミロースとアミロペクチンのヨウ素複合体の吸収スペクトルと遠心分離操作の影響

一般に、糊化澱粉溶液は僅かな濁りを呈する。吸光度測定においては、試料液の透明化、すなわち濁りの除去は、スペクトルの測定の誤差を少なくするうえで重要な操作である。しかしながら、遠心分離残渣中には、一部未糊化澱粉が含まれる危険性が存在する。そこで、Fig. 2-1 に示した手順で、標準試料について遠心分離によるヨウ素複合体の吸収スペクトルに対する影響を検討した (Fig. 2-2)。遠心分離前のアミロースとアミロペクチンの吸収は、ともに 400~900 nm の範囲内で認められた。アミロペクチンの最大吸収波長域は 520~530 nm にあったが、アミロースの最大吸収波長域の 600~620 nm でのアミロペクチンの吸収もかなり高いことが確認された。遠心分離後、アミロースとアミロペクチンの吸光度は全波長で若干低下したが、遠心分離による吸光度への影響は極めて小さかった。従って、遠心分離の操作は省略できると考えられる。さらに、遠心分離残渣に対しても同様に、1 M 水酸化カリウムを加えてアルカリ糊

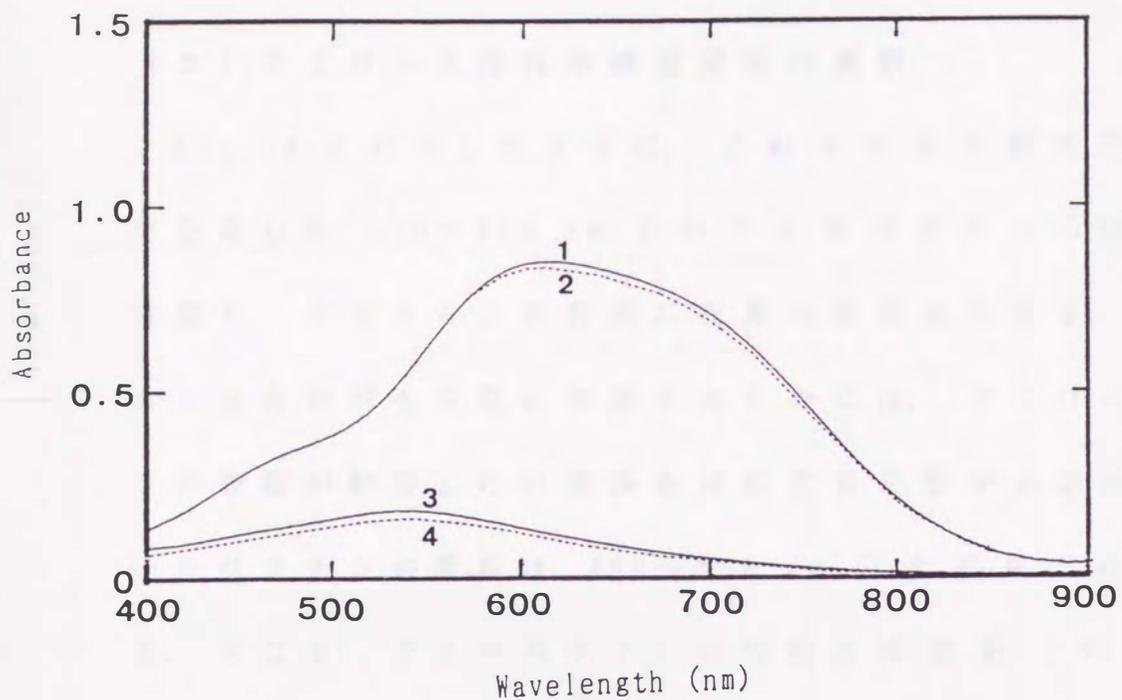


Fig. 2-2. Absorption spectra of iodine complexes of amylose and amylopectin, which are prepared with centrifugation and without centrifugation.

1: Amylose (without centrifugation)

2: Amylose (with centrifugation)

3: Amylopectin (without centrifugation)

4: Amylopectin (with centrifugation)

Sample concentration: $40 \mu\text{g/ml}$

Reference: $\text{I}_2\text{-KI}$ solution

Both amylose and amylopectin are prepared from maize.

化を試みたが、ほとんど呈色を確認できなかったことから、1回のアルカリ処理で充分糊化が行われ、アミロースとアミロペクチンは、完全に溶解できると考えられる。

(2) アミロース含有率測定波長の選択

Fig. 2-2 に示したように、これまでヨウ素呈色反応で使用した 600~620 nm でのアミロペクチンの吸光度は高く、アミロース含有率に有意の誤差を与える。アミロース含有率を正確に測定するためには、アミロペクチンの吸収が影響しない波長を選択する必要があるが、アミロペクチンの吸収は 400~900 nm の全波長で見られる。そこで、アミロペクチンの吸収を雑音量 (N) とみたとて、N に対するアミロースの吸収 (信号量 = S) の割合、すなわち S/N (比) の最も高い波長を選択するために、Fig. 2-2 で得られたアミロペクチンの吸収スペクトル (Curve 3) に対するアミロースの吸収スペクトル (Curve 1) の割合を全波長にわたって算出した (Fig. 2-3)。従来のアミロース含有率測定波長域の 600~620 nm で、S/N は 10 以下と低かった。このことは、600~620 nm の波長域でアミロース含有率を測定すると、共存するアミロペクチンによる妨害が 10% 以上に達する

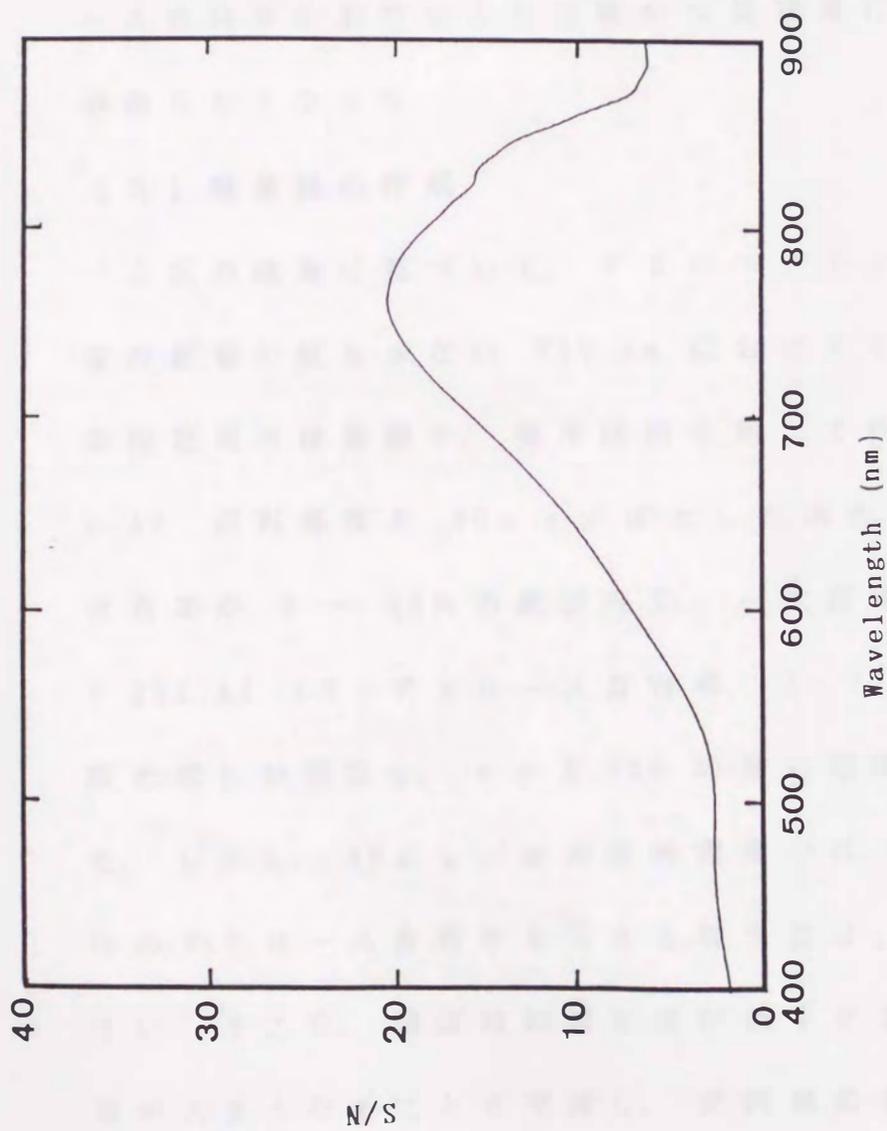


Fig. 2-3. Absorption ratio of amylose (Signal:S) to amylopectin (Noise : N). The spectra of amylose and amylopectin are in Fig.2-2.

ことを明示している。これに対し、740~790 nm の範囲では、S/N は 19~20 となり、770 nm において極大値に達した。この結果は、アミロペクチンの影響が 770 nm で最も少なくなることを示すものであり、本波長で測定することにより、アミロペクチン共存下でのアミロース含有率の測定をより正確かつ高精度に行い得ることが明らかとなった。

(3) 検量線の作成

上記の結果に基づいて、アミロペクチンのヨウ素呈色度の影響が最も少ない 770 nm におけるアミロース含有率測定用の検量線を、標準試料を用いて作成した (Fig. 2-4)。試料濃度を $40 \mu\text{g} / \text{ml}$ とした場合、アミロース含有率が 0 ~ 30% の範囲内で、一次回帰式 $Y = 0.38 + 332.8X$ (Y: アミロース含有率, X: 770 nm における吸光度) が成立し、 $r = 0.998$ の高い相関関係が得られた。しかし、 $40 \mu\text{g} / \text{ml}$ の試料濃度では、770 nm で 30% のアミロース含有率を与える吸光度は、0.1 程度と小さい。そこで、測定時の吸光度が低すぎると読みとり誤差が大きくなることを考慮し、試料濃度を $160 \mu\text{g} / \text{ml}$ とし検量線を作成した。その結果、0~30% の範囲内で、

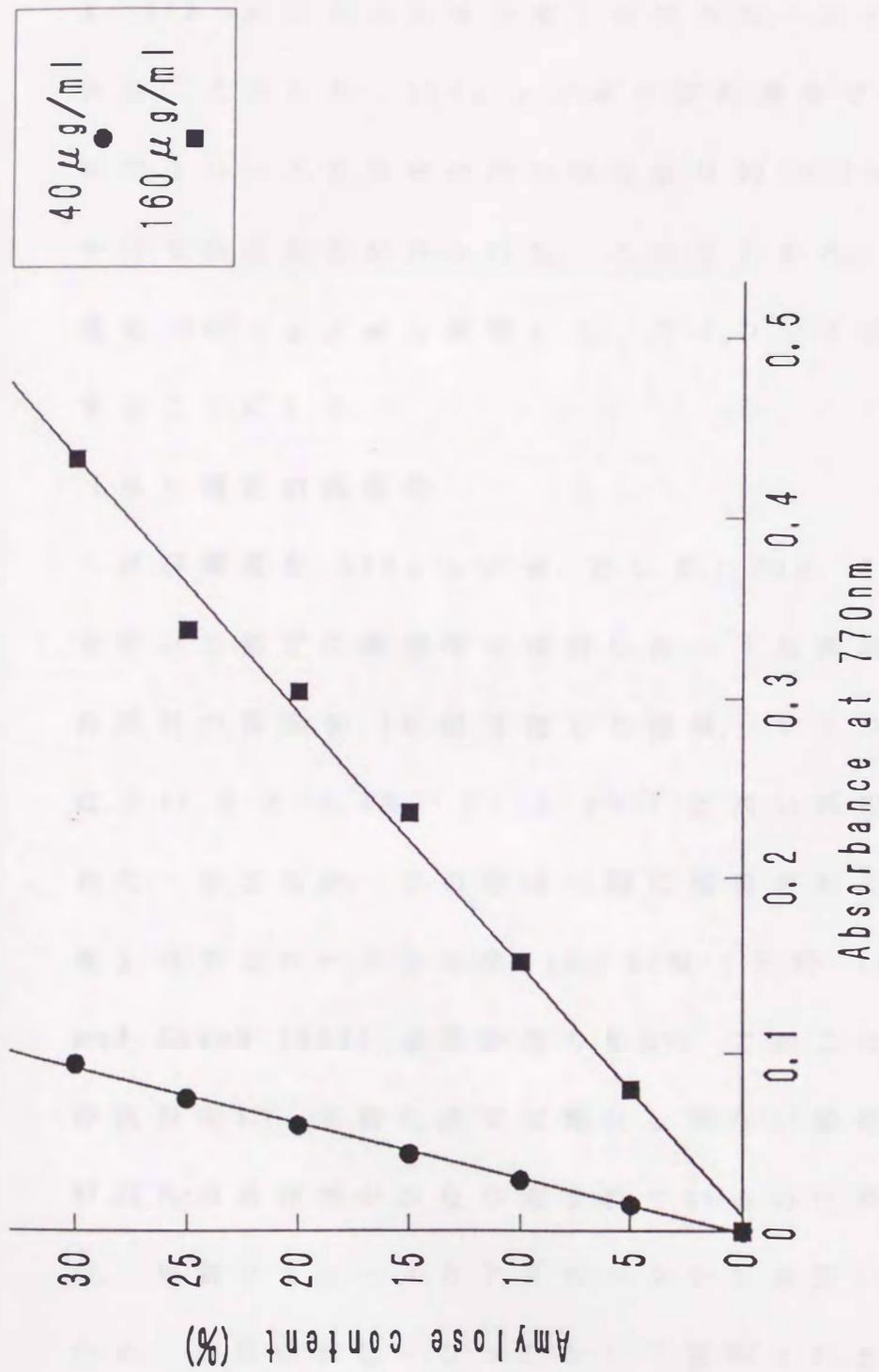


Fig. 2-4. Relationship between absorbance at 770 nm and amylose content in different sample concentration.

一次回帰式 $Y = -0.58 + 70.6X$ (Y: アミロース含有率, X: 770 nm における吸光度) が得られ, $r = 0.996$ を与えた. このとき, $160 \mu\text{g} / \text{ml}$ の試料濃度では, 5~30% のアミロース含有率の間の吸光度は約 0.1~0.5 となり, 十分な吸光度差が得られた. このことから, 今後試料濃度を $160 \mu\text{g} / \text{ml}$ に調整して, アミロース含有率を測定することにした.

(4) 測定の再現性

試料濃度を $160 \mu\text{g} / \text{ml}$ として, Fig. 2-4 の検量線を用いて測定の再現性を検討した. 「金南風」の白米粉砕試料の測定を 10 回反復した結果, アミロース含有率は, $11.8 \pm 0.4\%$ (CV 3.4%) と高い再現精度が得られた. ところが, この値は一般に報告されている「金南風」のアミロース含有率 16~17% (矢野 1984, Omura and Satoh 1984) よりかなり低い. このことは, 白米粉砕試料中に, 本糊化法では糊化し得ない澱粉ならびに澱粉以外の共存物がかなり含まれているのに対し, 検量線は, 精製アミロースとアミロペクチンを用いて作成したため, 測定値が低くなったとして説明される. 従って, 従来法に基づき, 白米粉砕試料中のアミロース含有率に

本法によって得られた含有率を一致させるためには、補正を行う必要がある。「金南風」の澱粉含有率をフェノール硫酸法で測定したところ、その値は72%となった。一般に、玄米中の澱粉含有率は70%前後であることが知られている (Juliano and Bechtel 1985)。そこで「金南風」の胚乳中の澱粉含有率を72%として、1.39 (= 1/0.72) を乗じたところ16.4%となり、従来の値とほぼ一致した。従って、粗澱粉試料のアミロース含有率は測定値に1.39を乗じて値の補正を行うことにした。

(5) 品種・系統のアミロース含有率

供試した品種・系統の粉碎試料について、従来の測定波長域での測定結果との比較を行うために、770 nm によって算出したアミロース含有率と従来の620 nm における吸光度との関係を Fig. 2-5 と Table 2-2 に示した。両者の値は互いに相関があり、amylose extender 突然変異3系統を除いて、一次回帰式 $Y = 0.258 + 0.027X$ (Y: 620 nm における吸光度, X: 770 nm で測定したアミロース含有率, $r = 0.982$) に適合した。また、amylose extender 突然変異3系統は、620 nm のヨウ素呈色度をみると原品種の「金南風」よりいずれも高い

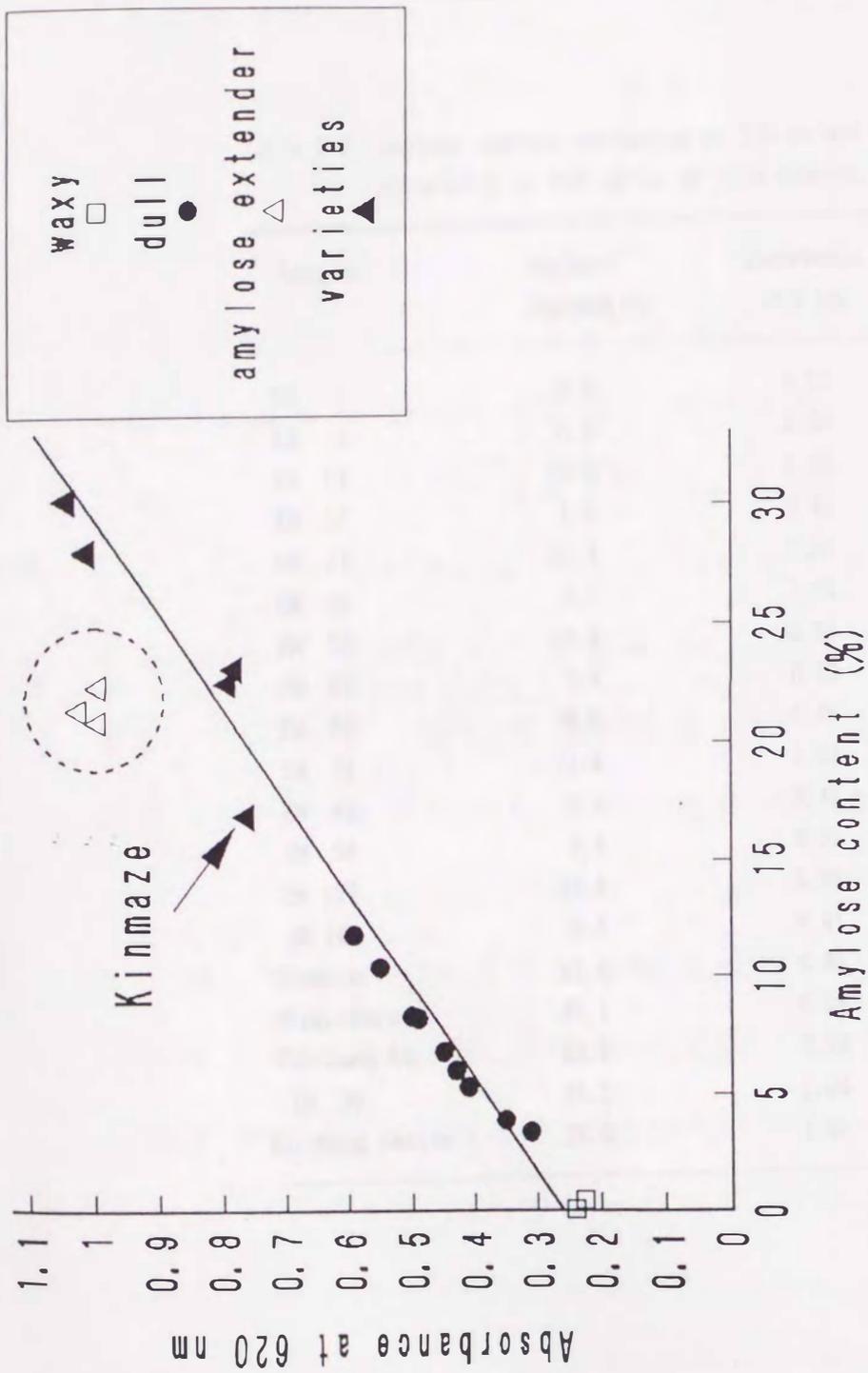


Fig. 2-5. Relationship between amylose content estimated at 770 nm and absorbance at 620nm of 19 rice samples. Three amylose extender mutants (Δ) excluded from the regression equation ($Y = 0.258 + 0.027X, r = 0.982$).

Table 2-2. Amylose content estimated at 770 nm and absorbance at 620 nm in 19 rice samples.

Sample	Amylose content (%)	Absorbance (620 nm)
EM 1	0.5	0.23
EM 2	8.3	0.50
EM 10	20.9	0.99
EM 12	6.0	0.43
EM 15	11.8	0.59
EM 21	0.1	0.24
EM 23	10.4	0.55
EM 57	3.9	0.35
EM 69	6.8	0.45
EM 72	21.4	1.02
EM 85	8.2	0.49
EM 98	3.4	0.31
EM 127	22.4	0.99
EM 140	5.3	0.41
Kinmaze	16.4	0.76
Nipponbare	23.1	0.78
Taichung 65	22.5	0.79
IR 36	30.2	1.04
Taichung Native 1	28.0	1.01

値となったが、770 nm で測定した amylose extender 突然変異系統のアミロース含有率は「金南風」よりわずかに高い程度で、高アミロース性の「IR36」や「台中在来1号」と同程度の値を示す系統は認められなかった。このことは、amylose extender 突然変異系統が、770 nm での測定に適合しないことを示唆している。

以上の結果から、イネ胚乳中のアミロース含有率の測定に当たっては、試料濃度を $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ とすることが適当であり、アミロペクチンのヨウ素複合体の吸収と重複する 620 nm を避けて、重複の少ない 770 nm で測定することによって、遺伝変異の検出に有効なアミロース含有率をより正確に求められると結論される。

第2節 アミロース含有率の簡易測定法の創設

第1節では、測定波長に従来の 600 ~ 620 nm に代えてアミロペクチンの影響の少ない 770 nm を採用することで、アミロース含有率をより正確に測定することができた。しかし、ヨウ素呈色法では、分析前に試料を計量し、分析後試料の重量に応じて測定値の補正を行う必

要がある。このことが、多数の試料を処理する際に障害になっている。従って、できるだけ分析過程の操作を簡略化することが望まれる。さらに、遺伝変異の検出においては、1粒単位でのアミロース含有率測定が望まれる。

一方、アミロースとアミロペクチンのヨウ素複合体は、互いに異なる吸収スペクトルを示し、それぞれの最大吸収スペクトル (λ_{\max}) はアミロースが 600~620 nm, アミロペクチンが 520~530 nm 前後の値を示す (Fig. 2-2)。Chinnaswamy and Bhattacharya (1986) は、アミロースとアミロペクチンを混合した場合、その混合比率によって λ_{\max} が変動することを明らかにした。測定される λ_{\max} が、澱粉試料の重量に関係なく、アミロースとアミロペクチンの混合比率によって決定されるとすれば、試料のアミロース含有率の測定は容易となる。

本節では、ヨウ素複合体の吸収スペクトルの λ_{\max} に注目して、 λ_{\max} とアミロース含有率との関係を詳細に検討することによって、アミロース含有率に関する変異をより簡易迅速に、しかも 1粒単位でも測定し得る新測定法の設定を試みた。

1. 材料および方法

標準試料

第1節と同様、トウモロコシ由来のアミロース（東京化成製）とアミロペクチン（Sigma社製）を用いた。

材料

第1節と同じ14変異系統および5品種を供試した（Table 2-1）。試料の調製は第1節の方法に準じて行った。

最大吸収波長（ λ_{max} ）の測定

20 mgの白米粉砕試料，もしくは白米，玄米各1粒に1 M水酸化カリウム 2 mlを加え，4℃で一夜糊化し，1 M酢酸 4 mlを加えた後，全量を精製水で10 mlに定容し，澱粉原液とした。澱粉原液 0.3 mlに，0.2%ヨウ素-2%ヨウ化カリウム溶液を0.1 ml添加し，全量を精製水で5 mlとした後，ヨウ素-ヨウ化カリウム溶液をブランクとして吸収スペクトルをとり λ_{max} を求めた。

測定装置

吸光度は，分光光度計（島津製作所製ダブルビーム自記分光光度計 UV-260）で測定し，シッパーユニット（島津製作所製 260L）とオートサンプラー（島津製作

所製 ASC-5) を組合わせたフローセルによる自動連続測定を行った。

2. 結 果

(1) アミロース・アミロペクチンの構成比率と λ_{\max}

アミロースとアミロペクチンの構成比率とヨウ素複合体の吸収スペクトルの λ_{\max} との関係を明らかにするために、アミロースとアミロペクチンの混合比率を変えた試料について、ヨウ素複合体の吸収スペクトルの変化を測定した (Fig. 2-6)。図から明らかのように、アミロースの含有率が低下するとともに各波長の吸光度は低下し、吸収スペクトルの λ_{\max} は低波長側へ順次移動した。この現象は、Fig. 2-7 によって説明される。Fig. 2-7 は、20% アミロースと 80% アミロペクチンの混合比率を想定した図である。Curve 1 と Curve 2 は、20% アミロースと 80% アミロペクチンの単独吸収スペクトルを、Curve 3 は 20% アミロースと 80% アミロペクチン混合物の吸収スペクトルをそれぞれ示したものである。また、Curve 1 と Curve 2 を加算することにより形成される吸収スペクトルを破線の Curve 4 に示した。

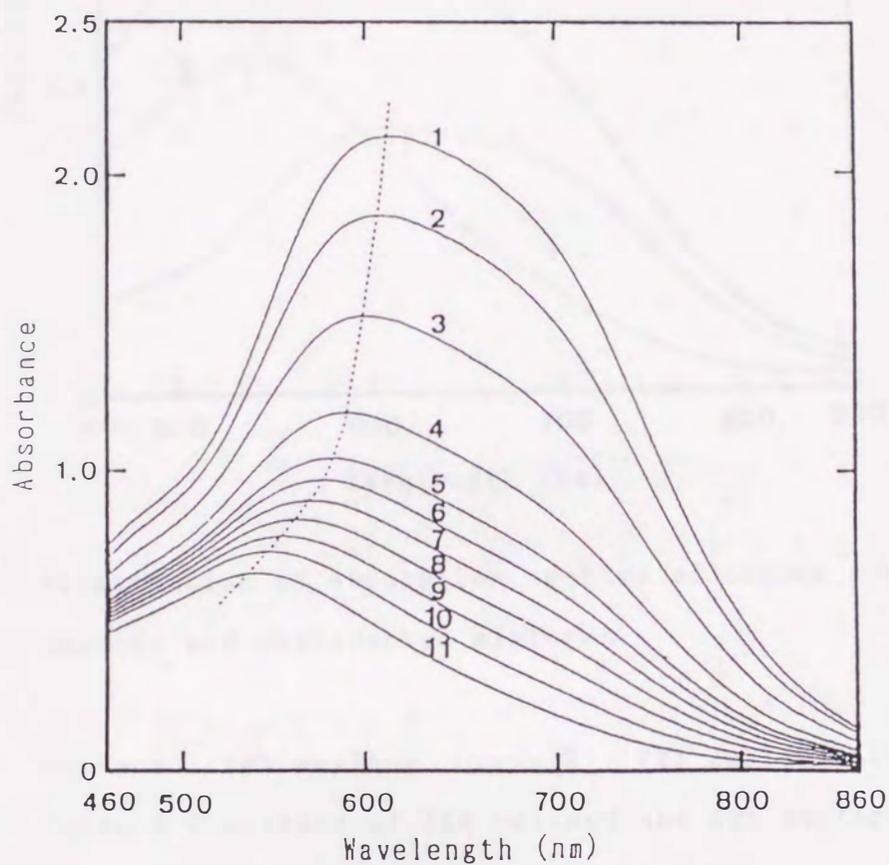


Fig. 2-6. Absorption spectra of iodine complexes of amylose : amylopectin mixtures with different compositions. The composition of the standard mixtures follows : 100 (Curve 1), 80 (2), 60 (3), 40 (4), 30 (5), 25 (6), 20 (7), 15 (8), 10 (9), 5 (10) and 0 (11) % amylose.

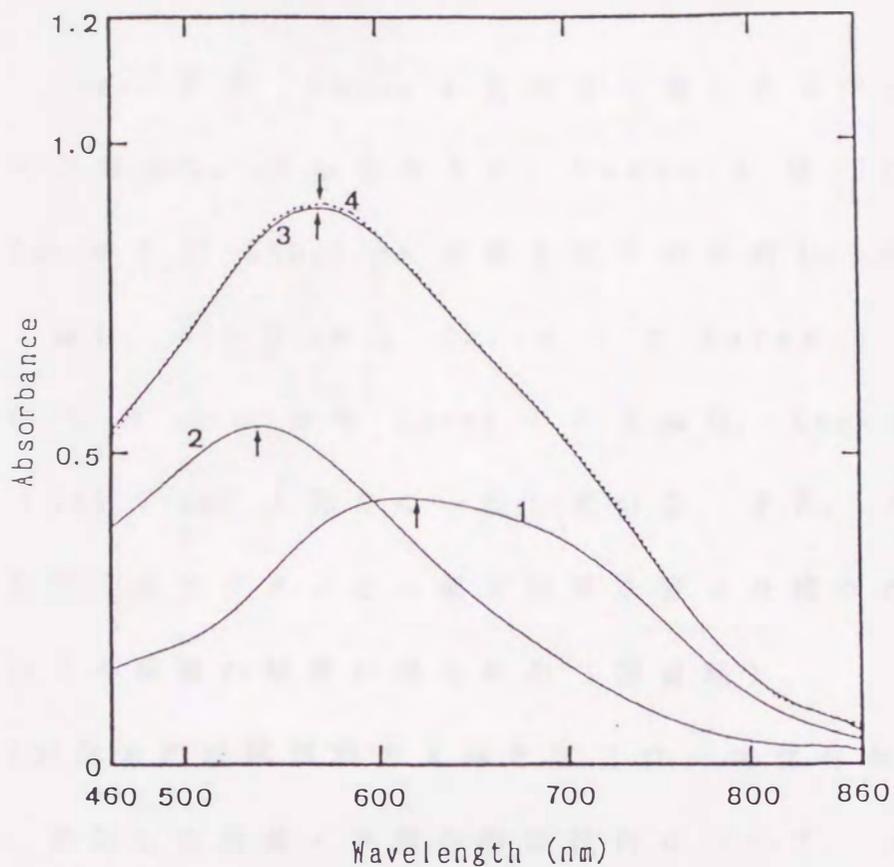


Fig. 2-7. Illustration of absorption spectra of iodine complex of amylose and amylopectin mixtures.

Curve 1 : 20% amylose. Curve 2 : 80% amylopectin

Curve 3 : mixture of 20% amylose and 80% amylopectin

Curve 4 : Curve 1 + Curve 2

Arrows indicate the λ_{\max} (Wavelength of absorption maximum).

Curve 3 は, Curve 4 とほぼ一致したスペクトルパターンを示し, λ_{\max} をみると, Curve 1 は 614.0 nm, Curve 2 は 535.5 nm の値を示すのに対し, Curve 3 の λ_{\max} は, 565.5 nm と Curve 1 と Curve 2 の間の値を示した. しかも Curve 3 の λ_{\max} は, Curve 4 の λ_{\max} (565.5 nm) と完全に一致している. また, アミロースとアミロペクチンとの混合比率を変えた種々の試料についても同様の結果が得られた (図省略).

(2) 白米の粉碎試料の λ_{\max} とアミロース含有率との関係

供試した品種・系統の粉碎試料について, λ_{\max} と第1節で行った 770 nm によるアミロース含有率 (以下アミロース含有率と略す) との関係を図 2-8 に示した. 両者の関係は, 一次回帰式 $Y = -280.7 + 0.535 X$ (Y : アミロース含有率, X : λ_{\max}) によく適合し ($r = 0.98$), 両者の間に高い正の相関関係が認められた. また, amylose extender 突然変異系統の λ_{\max} は, 原品種「金南風」とほとんど差がないことから, λ_{\max} によるアミロース含有率の測定は, 770 nm の場合と異なり, 高アミロース突然変異系統でのアミロース含有率測定にも十分適用可能なことが明示されている (Table 2-3).

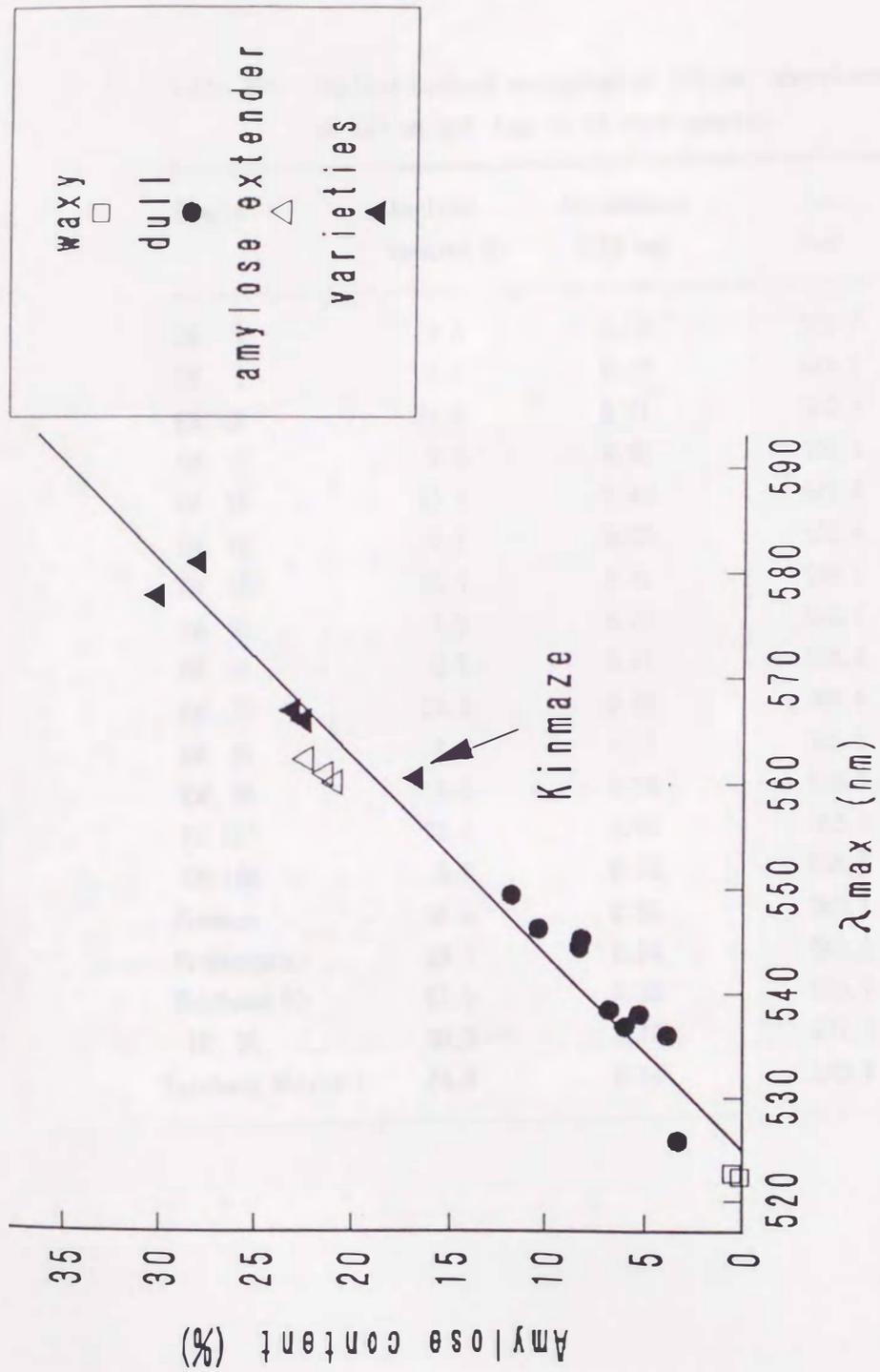


Fig. 2-8. Relationship between the λ_{max} and amylose content estimated at 770 nm in 19 rice samples. The correlation coefficient (r) = 0.98, and the line of the best fit is given by $Y = -280.7 + 0.535X$.

Table 2-3. Amylose content estimated at 770 nm. absorbance at 620 nm and λ_{max} in 19 rice samples.

Sample	Amylose content (%)	Absorbance (620 nm)	λ_{max} (nm)
EM 1	0.5	0.20	522.7
EM 2	8.3	0.37	544.4
EM 10	20.9	0.71	560.0
EM 12	6.0	0.30	536.8
EM 15	11.8	0.44	549.4
EM 21	0.1	0.20	522.4
EM 23	10.4	0.41	546.2
EM 57	3.9	0.29	536.0
EM 69	6.8	0.31	538.4
EM 72	21.4	0.69	560.8
EM 85	8.2	0.37	545.2
EM 98	3.4	0.24	525.7
EM 127	22.4	0.68	562.2
EM 140	5.3	0.31	538.0
Kinmaze	16.4	0.53	560.4
Nipponbare	23.1	0.54	566.8
Taichung 65	22.5	0.53	565.9
IR 36	30.2	0.70	577.7
Taichung Native 1	28.0	0.66	580.8

このことは、Fig. 2-9 でも明らかである。Fig. 2-9 は、 λ_{\max} と従来の測定波長の 620 nm における吸光度との関係を示したものである。amylose extender 突然変異 3 系統を除いて、 λ_{\max} とヨウ素呈色度の関係は一次回帰式 $Y = -4.28 + 0.0086X$ (Y : アミロース含有率, X : λ_{\max} , $r = 0.99$) によく適合した。amylose extender 突然変異 3 系統のヨウ素呈色度は、原品種の「金南風」より高い値となったが、それらの λ_{\max} は、比較品種でみられたような高い値を示さなかった (Table 2-3)。

(3) 粒単位によるアミロース含有率測定の検討

amylose extender 突然変異体 3 点を除く 16 点について、白米の粉碎試料、白米および玄米を用いて λ_{\max} を測定した結果を Table 2-4 に示した。1 系統あたり白米の粉碎について 5 回反復で、また粉碎前の白米と玄米については、各 10 粒を粒単位で測定した。表から明らかかなように、白米の粉碎試料の測定結果では、標準偏差は極めて小さく、分析精度は良好であった。玄米の平均値は、白米の粉碎試料とほぼ同等の値が得られたが、標準偏差は白米の粉碎試料のそれよりやや大きかった。このように、白米と玄米の測定値の標準偏差が白米の粉

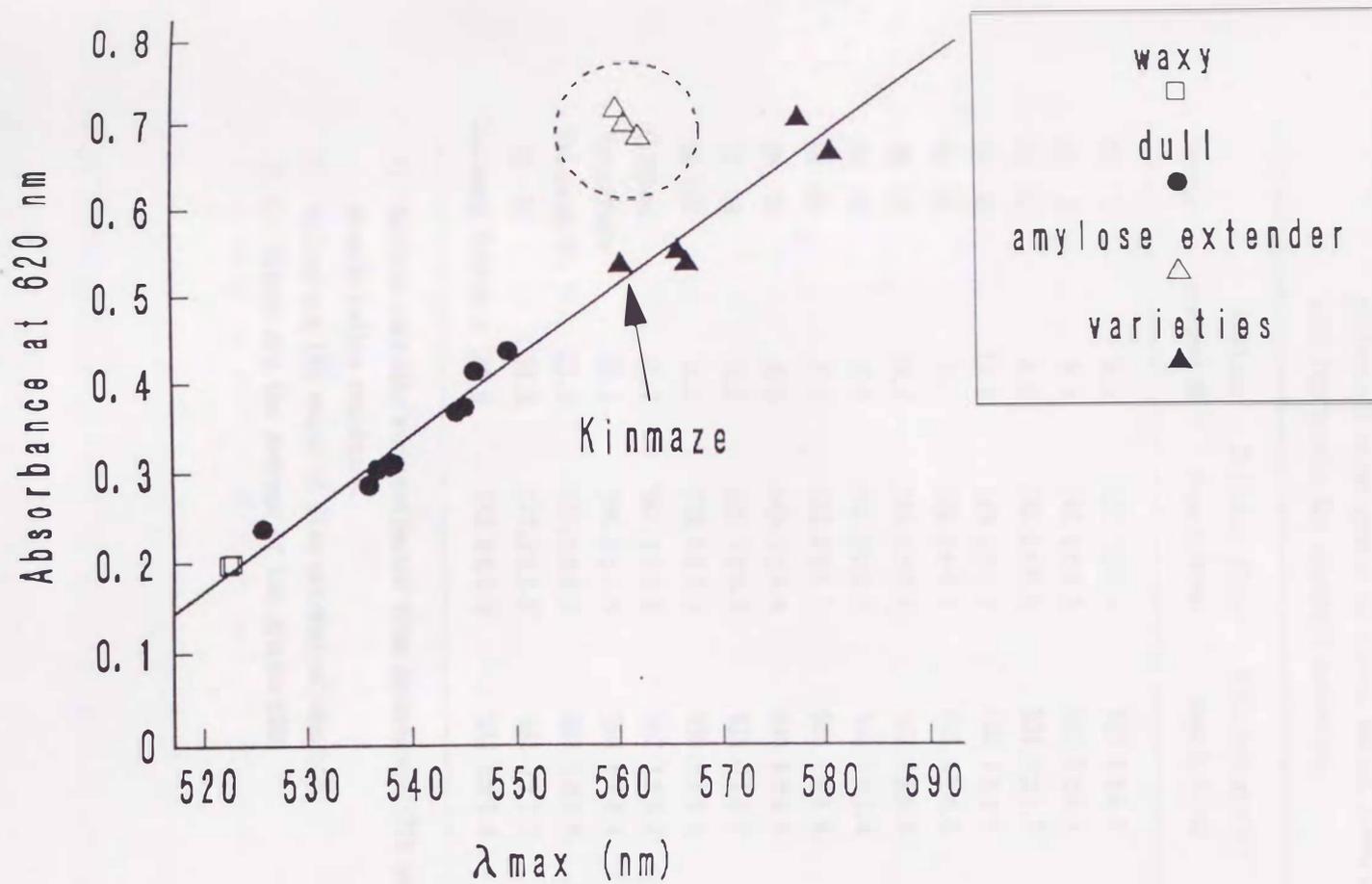


Fig. 2-9. Relationship between the λ_{max} and absorbance at 620nm in 19 rice samples. Three amylose extender mutants (Δ) were excluded from the regression equation ($Y = -4.28 + 0.0086X$, $r = 0.99$).

Table 2-4. The λ_{\max} values of iodine complexes in polished flours, polished grains and brown grains of eleven mutant lines and five varieties. \pm SD represents the standard deviation.

Sample	Amylose content (%) ¹⁾	Polished flour ²⁾ Mean \pm SD (nm)	Polished grain ³⁾ Mean \pm SD (nm)	Brown grain ⁴⁾ Mean \pm SD (nm)
EM 1	0.5	522.7 \pm 0.5	523.1 \pm 0.6	523.5 \pm 0.8
EM 2	8.3	544.4 \pm 0.8	542.9 \pm 5.1	542.6 \pm 4.4
EM 12	6.0	536.8 \pm 0.6	534.7 \pm 1.9	536.0 \pm 1.1
EM 15	11.8	549.4 \pm 1.1	548.7 \pm 4.1	546.1 \pm 2.7
EM 21	0.1	522.4 \pm 0.1	523.8 \pm 0.6	523.4 \pm 1.2
EM 23	10.4	546.2 \pm 0.8	552.2 \pm 4.6	547.2 \pm 3.6
EM 57	3.9	536.0 \pm 0.2	533.5 \pm 1.4	536.1 \pm 1.8
EM 69	6.8	538.4 \pm 1.3	538.1 \pm 1.6	541.3 \pm 3.2
EM 85	8.2	545.2 \pm 0.4	540.6 \pm 2.6	541.8 \pm 3.0
EM 98	3.4	525.7 \pm 0.3	525.0 \pm 0.7	524.4 \pm 1.9
EM 140	5.3	538.0 \pm 0.3	535.5 \pm 1.6	536.6 \pm 1.6
Kinmaze	16.4	560.4 \pm 1.9	562.3 \pm 3.2	562.9 \pm 3.0
Nipponbare	23.1	566.8 \pm 1.9	568.6 \pm 3.4	566.1 \pm 0.8
Taichung 65	22.5	565.9 \pm 0.3	567.3 \pm 2.0	566.4 \pm 0.3
IR 36	30.2	577.7 \pm 1.2	582.3 \pm 1.7	582.0 \pm 1.9
Taichung Native 1	28.0	580.8 \pm 1.4	584.8 \pm 1.4	584.8 \pm 1.5

1): Amylose contents were estimated from absorbance (770 nm) of starch-iodine complexes.

2): Values are the means of five determinations \pm SD.

3),4): Values are the average of ten grains \pm SD.

砕試料に比べてやや大きくなる原因は、アミロース含有率が粒間で差のあることが原因と考えられる。

なお、単粒による測定では、シッパーユニットとオートサンプラーを組合せたフローセルによる自動連続測定により、1粒につき2回反復測定するとして、1日300粒程度の測定が可能であった。

以上の結果から、 λ_{max} によってアミロース含有率が容易に測定できることが明らかとなった。また、本節の最終目的である多数の試料を取扱う変異の調査や遺伝解析にも、 λ_{max} による粒単位の測定法が利用できると考えられる。

第3節 考 察

アミロース含有率に関する遺伝変異の探索とその育種素材としての評価を行うためには、次の条件を満たす測定方法の開発が不可欠である。すなわち、①澱粉中のアミロース含有率を正確かつ高精度に測定できること、②試料の調製が容易で、かつ測定操作が簡便で再現精度が高いこと、③測定に要する時間が短いこと、④微量の試

料（単粒）で分析が可能ながことが挙げられる。さらに、
⑤測定に要する費用が安価であることも重要な条件の一つである。特に、遺伝学的な解析や育種の選抜過程においては、多数の試料を取扱わねばならないために、上記の諸条件が満足できる測定法の確立が切望される。

①に関しては、電流滴定法（Larson *et al.* 1953）や電位差滴定法（Banks *et al.* 1974）が比較的正確な方法とされている。両方法とも澱粉溶液をヨウ素溶液で滴定する際、アミロースと複合体を形成できなかった遊離ヨウ素の存在によって引き起こされる急激な電流、電圧の変化を測定するものである。この時得られる滴定曲線から澱粉試料のヨウ素親和力を求め、アミロース含有率を算出する。このヨウ素親和力測定法は、比較的正確とされているが、測定に際して、澱粉試料の精製と煩雑な操作を要することから、多数の試料の測定には不向きである。そこで第1節では、簡便法として一般に普及しているヨウ素呈色法（McCready and Hassid 1943, Williams *et al.* 1958）の改良に着手した。

これまでヨウ素呈色法ではアミロースの吸収スペクトルの最大吸収域の600～620 nmでの測定が一般的であ

ったが、Fig. 2-2 で示すように可視域のほぼ全波長域にあたる 400 ~ 900 nm でアミロペクチンの吸収が認められた。特に、600 ~ 620 nm でのアミロペクチンの吸収はかなり高い。Juliano (1982) は、アミロース含有率の異なる胚乳澱粉から分別したアミロースとアミロペクチンの画分の中に、互いの成分が夾雑し、分画できないものがあることを明らかにした。また、アミロペクチンの微細構造について、鎖長分枝や超長鎖に関する変異があることも知られている (Takeda *et al.* 1987)。従って、従来の 600 ~ 620 nm で測定するヨウ素呈色法する場合、アミロース共存下ではアミロペクチンに関する変異を検知することは不可能と考えられる。

そこで、アミロペクチンの影響の最も少ない測定波長として、S/N が最も高い 770 nm を選択した (Fig. 2-3)。本法は、アミロペクチン共存下でのアミロース含有率を正確に測定し得ることから、一般の澱粉試料のアミロース含有率を測定できる有用な手法と考えられる。しかし、770 nm でもヨウ素呈色法では、アミロペクチンの吸収の除去には限界があるように考えられる。また、この波長を使うと当初設定した濃度条件ではアミロース

の吸収が低すぎることから、試料濃度を4倍 ($160 \mu\text{g}/\text{ml}$) にする必要があった (Fig. 2-4)。本法では、アミロースの最大吸収波長域で測定するのと異なり、770 nmはアミロースの吸収が急速に低下する波長域にあるので、測定時の読み取り誤差には注意を要するが (Fig. 2-2)、自動測定装置では問題とならない。

一方、Fig. 2-8 と Fig. 2-9 で示したように、アミロースの含有率が増加するにつれて λ_{max} は高くなり、アミロース・アミロペクチンの構成比率とよく対応することが明らかとなった。さらに、 λ_{max} は澱粉の特異的なヨウ素呈色スペクトルから得られることから、脂質やタンパク質などの夾雑物の影響を受けないことが特徴として挙げられる。第1節と第2節で検討した2つの方法 (770 nm で測定するヨウ素呈色法と λ_{max} を指標とする簡易測定法) によって測定した値の間の相関は高く (Fig. 2-8)、 λ_{max} 法によって、従来同様の信頼度でアミロース含有率の測定が行えることを明示している。 λ_{max} によるアミロース含有率の測定法では、試料を計量する手間を省くことができ、測定時間の大幅な短縮が可能となる。また、Table 2-4 に示したように、 λ_{max} の測定

は、白米、玄米ともに一粒単位の測定が可能で、再現精度も高いことから、多数の試料を取扱う遺伝・育種学の研究分野では、極めて有用である。

ところで、第1節で行ったヨウ素呈色法の改良法(770 nm)と従来の方法(620 nm)との比較では、相関係数は $r = 0.982$ と高かった (Fig. 2-5)。しかも、両方法を併用することにより amylose extender 突然変異系統を、容易に識別することが可能である (Fig. 2-5, Table 2-2)。amylose extender 突然変異系統の澱粉の特徴は、アミロペクチンの鎖長分布の変化にあり、高いヨウ素呈色度を与えることが報告されている (Yano *et al.* 1985)。Banks *et al.* (1974) は、このような特異的な澱粉特性を持つ試料については、従来ヨウ素呈色法では、アミロース含有率を正確に評価できないことを指摘している。Fig. 2-5 で示したように、amylose extender 突然変異系統のアミロース含有率は、770 nm 法でも「金南風」よりわずかに高い値を与えるに留まっている。このことは、アミロペクチンのヨウ素複合体の吸収を完全に除去できていないことを示すものと考えられる。amylose extender 突然変異系統は、 λ_{max} と 620

nmとの関係でも、特異的な集団として認められた (Fig. 2-9)。しかし、Fig. 2-9の結果が Fig. 2-5と異なる点は、amylose extender 突然変異系統の λ_{\max} が、原品種「金南風」のそれとあまり差がみられなかったことである。これらの結果は、 λ_{\max} によってアミロース含有率の測定が従来のヨウ素呈色法と同様の精度で行えることを示すばかりでなく、少なくとも amylose extender 突然変異系統については、アミロペクチンの鎖長変化によるヨウ素呈色変化の影響を除去できることを示すものと考えられる。amylose extender 突然変異系統にみられるアミロペクチンの特異なヨウ素複合体の吸収の影響を受けないという点では、 λ_{\max} によってアミロース含有率を測定する方が、770 nmによる方法に比べ、より優れていると考えられる。

また、単純に λ_{\max} やヨウ素呈色法の改良法でアミロースの含有率を測定するだけでは、アミロペクチンに関する多様な変異を見落す危険性がある。従って、従来の 600~620 nm の吸光度と 770 nm の吸光度あるいは λ_{\max} を組合せてアミロース含有率を測定し、イネ胚乳澱粉に関する評価を行うことが必要である。この点、最近の分

光光度計の進歩は大きく、より多次元の測定が可能になるものと考える。

第3章 イネ胚乳澱粉中の“見かけのアミロース含有率”に関する品種間変異

イネの胚乳は、白色不透明の糯性胚乳と、半透明の粳性胚乳とに明確に区別されている。また、糯性胚乳にアミロースがほとんど含まれないとされてきたことから、既存の品種のアミロース含有率の変異の調査は、主に粳性品種を対象に行われてきた (Williams *et al.* 1958, Horiuchi and Tani 1966, Webb *et al.* 1968, Kurasawa *et al.* 1969)。ところが、第2章で述べたように、胚乳澱粉中のアミロペクチンの鎖長の変化は、アミロース含有率の測定値に影響を及ぼす。既存の糯性品種の胚乳澱粉がアミロペクチンのみで構成されているとすれば、糯性胚乳澱粉について求められた第2章第2節の λ_{max} を指標とするアミロース含有率は、アミロペクチン中の長鎖 α -1,4結合グルコース部の割合を示すことになる。今、粳性品種の胚乳澱粉中にも同様のヨウ素反応陽性アミロペクチンが存在すると想定すれば、得られたアミロース含有率は、アミロペクチン中の長鎖 α -1,4結合グルコース部を含む“見かけのアミロース含有率”を示すことに

なる。この糯性品種の中にみられる見かけのアミロース含有率の差異は、アミロペクチンに関する変異の存在を示しているものと考えられる。従って、粳性品種ばかりでなく糯性品種についても見かけのアミロース含有率を測定し、その変異を明らかにする必要がある。

九州大学農学部遺伝子資源研究センターでは、国内外の品種を多数保存している。これらの保存品種の特徴は、温帯性品種が多いこと、大部分が在来品種で、多様性に富んでいること、取寄せ先が明らかであること、さらには糯性および粳性品種が豊富にあることなどが挙げられる。現在、保存品種の主要形質については調査が進められ、多様な変異が存在することが確認されている。しかし、保存品種の胚乳澱粉中の見かけのアミロース含有率に関する品種間変異は調べられていない。

そこで本章では、保存品種を肉眼観察によって糯性と粳性に分別し、それぞれの品種群について λ_{max} によって測定した見かけのアミロース含有率に関する変異を調査し、それらの地理的分布についても考察した。

1. 材料および方法

供試品種

材料には、九州大学農学部遺伝子資源研究センターで保存する国内外の2,602品種を供試した。これらの材料については、糯性および粳性を肉眼で判別し、取寄せ先別に品種数をTable 3-1に示した。供試品種については、Table 3-1に示すように、南アジアと東南アジアの品種が少ない。この理由は、南アジアと東南アジアの品種のうち、短日性の品種については、中緯度の九州大学農学部附属農場では採種できず、品種数が限られたことによる。このことから、国別には分けずに南アジアと東南アジアの地域として整理した。なお、南アジアはスリランカ、パキスタン、インド、ネパールの品種、また、東南アジアはフィリピン、ベトナム、カンボジア、タイおよびミャンマーの品種から構成されている。中国の品種は揚子江を境に南北に分け、朝鮮半島の品種については北緯38度線を境に南北に分けた。ロシアの品種は1929年にバビロフ博士により寄贈を受けたものでロシア共和国内での地域の特定はできない。日本の品種はH0群とL0群に分けた。H0群は栽培品種であるのに対

Table 3-1. Materials examined in varietal variation of apparent amylose content.

Origin	Number of varieties		
	Glutinous	Non-glutinous	Total
South Asia ¹⁾	0	62	62
Southeast Asia ²⁾	3	20	23
Taiwan	0	25	25
South China ³⁾	2	54	56
North China ⁴⁾	5	58	63
South Korea ⁵⁾	61	116	177
North Korea ⁶⁾	6	17	23
Russia	6	88	94
Japan (HO group)*	122	638	760
(LO group)**	570	749	1319
Total	775	1827	2602

1) Sri Lanka, Pakistan, India, Nepal

2) Philippines, Vietnam, Cambodia, Thailand, Myanmar

3).4) China was divided into south and north regions by the Yangtze River.

5).6) The Korea peninsula was divided into south and north regions by the 38°N latitude.

* : Cultivars, ** : Landraces

し、L0 群の品種は 1962 年から 1965 年にかけて全国各地から収集した在来品種で、それらの県別の品種数を Table 3-2 に示した。

これらの品種は、九州大学農学部附属農場で慣行法で栽培・収穫した。なお、L0 群のうち 729 品種は、1985 年産種子を、残り 590 品種は 1986 年産種子を用いた。また、L0 群以外は 1984 年産種子を用いた。

アミロース含有率の測定

アミロース含有率の測定は、第 2 章第 2 節の λ_{\max} を指標にした方法によって行った。分光光度計は、島津製作所製 UV-260 を用い、シッパーユニット（島津製作所製 260L）とオートサンプラー（島津製作所製 ASC-5）を用いて連続測定を行った。測定には、1 品種あたり玄米 2 粒を選び、1 粒につき 2 回反復して λ_{\max} を測定し、その平均値をとった。アミロース含有率は、Fig. 2-8 から得られた回帰式を用いて算出した。なお、マイナス値はすべて 0% とした。

Table 3-2. Japanese local varieties.

Origin	Number of varieties		
	Glutinous	Non-glutinous	Total
Kyushu			
Fukuoka	10	28	38
Nagasaki	49	62	111
Oita	52	51	103
Kumamoto	11	12	23
Miyazaki	43	85	128
Kagoshima	47	57	104

Shikoku			
Kochi	2	19	21
Tokushima	22	64	86

Chugoku			
Shimane	62	58	120
Tottori	7	18	25
Hiroshima	29	65	94

Kinki			
Shiga	21	13	34
Mie	14	25	39
Nara	9	6	15
Wakayama	28	31	59

Chubu			
Fukui	12	11	23
Ishikawa	11	10	21
Toyama	11	7	18
Niigata	8	6	14
Nagano	31	36	67

Tohoku			
Akita	49	53	102
Fukushima	42	32	74

Total	570	749	1319

2. 結 果

(1) 供試全品種の見かけのアミロース含有率の変異

供試全品種の見かけのアミロース含有率の変異幅を糯性および粳性品種群に分けて Table 3-3 に示した。肉眼によって分別した糯性および粳性品種群間には見かけのアミロース含有率に関して明かな差異が認められた。すなわち、糯性品種群の変異は 0% から日本の「かさず糯」(LO 498) の 7.8% まで幅広く、また大部分の品種は 0~4% の範囲内にあった。なお、供試品種の胚乳はすべて白色不透明で、肉眼観察による品種間の差異は認められなかった。これに対し、粳性品種群では、日本の「三角稻」(HO 668) の 9.6% から「台湾在来種」(HO 510) の 33.9% までの変異が認められた。

(2) 糯性品種群の見かけのアミロース含有率の変異

糯性品種の見かけのアミロース含有率の変異を地域別に Table 3-4 に示した。

南アジアでは糯性品種は認められず、東南アジアの糯性品種は、3 品種に限られた (Table 3-1)。見かけのアミロース含有率は 2% 以下のものはないが、6.5% の高いものがみられた。

Table 3-3. Variation in apparent amylose content among rice varieties examined.

Kind of rice	Apparent amylose content (%)															
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30 \leq
Glutinous	323	389	51	12												
Non-glutinous					1	7	30	68	231	256	387	300	306	85	133	23

Figures indicate number of varieties.

Table 3-4. Variation in apparent amylose content among glutinous rice varieties.

Origin	Apparent amylose content (%)			
	0	2	4	6≤
Southeast Asia		2		1
South China	2			
North China			3	1
South Korea	3	53	5	
North Korea		5	1	
Russia	1	3	1	1
Japan	317	323	43	9
Total	323	389	51	12

Figures indicate number of varieties.

中国の揚子江以南では 2 品種に過ぎず、いずれも見かけのアミロース含有率は、2 % 以下であった。これに対して、中国北部の 5 品種の見かけのアミロース含有率はすべて 2 % 以上で、6 % 以上の高い品種もみられた。

朝鮮半島の品種では 3 % のものを中心に分布がみられ、2 % 以下の低いものは、南部にあったが、北部ではみられなかった。

供試したロシアの品種は、6 品種と少ないにも拘らず、0.5 ~ 6.4 % の広い変異を示した。

日本の品種数は 692 品種で、供試した糯性全品種の約 90 % を占めた。見かけのアミロース含有率の変異の幅は、0 ~ 7.8 % と広がった。在来糯性品種の見かけのアミロース含有率の地域別の分布を Table 3-5 に示した。九州、四国および近畿地方の品種はすべて 6 % 以下で 1 % のものが大部分を占めた。中国地方の品種は 2 % のものを中心に分布し、広島と島根では 6 % 以上の高いものもみられた。中部から東北にかけては 3 % のものを中心に分布し、2 % 以下のものは少なかった。また、福井と福島で 6 % 以上のものがみられた。以上のように、日本の糯性品種では、北部のものほど見かけのアミロース含

Table 3-5. Variation in apparent amylose content among glutinous Japanese local varieties.

Origin	Apparent amylose content (%)			
	0	2	4	6≤
Kyushu				
Fukuoka	10			
Nagasaki	49			
Oita	51	1		
Kumamoto	8	3		
Miyazaki	39	4		
Kagoshima	34	13		
Shikoku				
Kochi	2			
Tokushima	16	6		
Chugoku				
Shimane	18	31	9	4
Tottori	1	6		
Hiroshima	10	15	3	1
Kinki				
Shiga	5	16		
Mie	1	10	3	
Nara	5	4		
Wakayama	22	6		
Chubu				
Fukui	2	8	1	1
Ishikawa		10	1	
Toyama		9	2	
Niigata	1	6	1	
Nagano	3	22	6	
Tohoku				
Akita	5	41	3	
Fukushima	3	31	5	3
Total	285	242	34	9

Figures indicate number of varieties.

有率が高い傾向にあった。

(3) 粳性品種内の見かけのアミロース含有率の変異

Table 3-6 には、粳性品種の収集地別の見かけのアミロース含有率の分布状況を示した。

見かけのアミロース含有率は、収集地によって明らかに異なり、南アジア、東南アジア、台湾および中国南部の地域では、日本を含む他の地域の品種より高い見かけのアミロース含有率を示した。

南アジアの品種では、概して 26% 以上の見かけのアミロース含有率の高いものが多く分布していた。

東南アジアの品種では、20% 前後のものが 2 品種みられたほかは、26% 以上の見かけのアミロース含有率の高い品種が多く分布していた。

台湾の品種では、見かけのアミロース含有率は、20.9% ~ 33.3% の範囲にあり、29% 前後を中心に分布していた。

中国の品種の見かけのアミロース含有率は、12.9% ~ 32.3% の広い範囲内に分布がみられた。揚子江以南では、26% 以上の高いものが多くみられたのに対し、中国北部では、16% ~ 24% の範囲内の見かけのアミロース含有率の低いものが多く分布していた。

Table 3-6. Variation in apparent amylose content among non-glutinous rice varieties.

Origin	Apparent amylose content (%)												
	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30≤	
South Asia								1	1		17	39	4
Southeast Asia							1	1		3	5	8	2
Taiwan								1	1	3	1	14	5
South China							3	2	3	1	17	27	1
North China				1	1	8	13	8	13	6	5	2	1
South Korea			1	4	2	13	15	25	15	22	7	1	1
North Korea			1	2		3	3	2		1		4	1
Russia				2	5	5	10	17	14	24	5	4	2
Japan	1	5	21	60	202	211	330	253	246	28	24	6	
Total	1	7	30	68	231	256	387	300	306	85	133	23	

Figures indicate number of varieties.

朝鮮半島の品種の見かけのアミロース含有率の変異幅は 11.1~31.3% の広い範囲内にあった。20% 前後を中心に分布がみられたが、26% 以上の高い見かけのアミロース含有率の高い品種も多くみられた。

ロシアの品種は、18~26% を中心にして 13.6~30.4% の範囲内に分布がみられた。

日本の品種では、20% 前後のものを中心に 9.6~33.9% の範囲に分布していた。東南アジアや台湾にみられた 26% 以上の見かけのアミロース含有率の高い品種の存在も認められたが、20% 以下の見かけのアミロース含有率の低い品種も多くみられた。粳性品種の見かけのアミロース含有率の地理的変異は、糯性品種の場合と異なり、北部の品種ほど低い見かけのアミロース含有率を示す品種が多くみられた (Table 3-7)。九州や四国地方の品種は、20% 前後のものを中心に分布し、26% 以上の見かけのアミロース含有率の高いものが多くみられた。特に鹿児島で 28% 以上のものが多くみられた。なお、これらの見かけのアミロース含有率の高い品種の玄米は、比較的長粒のものが多かった。中国、近畿地方の品種の変異のモードは九州と四国地方のものに比べ、18~20%

Table 3-7. Variation in apparent amylose content among non-glutinous Japanese local varieties.

Origin	Apparent amylose content (%)											
	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30≤	
Kyushu												
Fukuoka				6	5	7	6	4				
Nagasaki				12	16	22	4	5	1	2		
Oita				3	9	19	11	7	1	1		
Kumamoto					3	7						
Miyazaki				2	5	8	33	12	18	2		
Kagoshima				1	6	2	10	5	21	3	8	1
Shikoku												
Kochi					1	1	8	6	2	1		
Tokushima				12	20	20	8	3			1	
Chugoku												
Shimane		3	4	11	22	14	4					
Tottori				3	10	4	1					
Hiroshima			2	14	21	17	10	1				
Kinki												
Shiga			1	1	4	5	1	1				
Mie			2	9	9	3	2					
Nara				4		1						
Wakayama			2	3	5	9	6	6				
Chubu												
Fukui				3	5	3						
Ishikawa				3	5	1	1					
Toyama		1	1	2	1	1			1			
Niigata			1	2	2		1					
Nagano	1	2	2	19	3	9						
Tohoku												
Akita		1	17	24	7	4						
Fukushima		3	5	9	10	4			1			
Total		1	10	46	156	162	198	85	70	8	12	1

Figures indicate number of varieties.

とやや低く、すべて 26% 以下の範囲内にあった。島根では、13.6% と見かけのアミロース含有率の低いものもみられた。中部および東北地方では見かけのアミロース含有率は総じて低いものが多く、16~18% のものを中心に 11.2~25.9% の範囲内にあった。富山、長野、秋田および福島では、14% 以下の見かけのアミロース含有率の低い品種もみられた。

なお、供試した全粳性品種について、第 2 章第 2 節の手法に従い、 λ_{\max} に加えて、ヨウ素呈色度 (620 nm) を測定したが、第 2 章でみられたアミロペクチンの構造変化に起因する amylose extender 変異 (Yano *et al.*, 1985) は見出せなかった。

3. 考 察

本章では、イネ胚乳澱粉の見かけのアミロース含有率の変異を知るために、九州大学で保存するイネ保存品種のうち国内外の 2,602 品種を用いて、第 2 章で述べた λ_{\max} 法で見かけのアミロース含有率を調査した。その結果、見かけのアミロース含有率は、糯性品種群で 0~7.8%、粳性品種群では 9.6~33.9% の幅広い変異があ

ることを明らかにした (Table 3-3) . こうした幅広い見かけのアミロース含有率の変異については、既に Nakagahra *et al.* (1986) も南アジアおよび東南アジアから収集した 872 品種を用い、類似の結果を得ている。特に、ミャンマーおよびインド東北部の品種では見かけのアミロース含有率が 0~31% にかけて、ほとんど連続的な変異を示すことを報告している。また、同様に、中国雲南省の品種でも幅広い見かけのアミロース含有率の変異が認められたことから、これらの地域が見かけのアミロース含有率に関して遺伝変異の宝庫であることを指摘している。

糯性品種と粳性品種の差異は wx 遺伝子座の対立遺伝子の違いによるもので、糯性品種は wx 遺伝子を持ち、その穀粒にはアミロースが含まれないといわれてきた。しかし、本章の結果で、糯性品種群でも見かけのアミロース含有率に関して 0~7.8% の変異が認められたことは、注目すべきことである。また、飯塚ら (1977) は穀粒の肉眼観察から日本や外国の糯性品種に完全に糯性のものからやや粳性に近いものまでの変異があることを見いだしている。こうした変異がアミロースの存在によ

るものか、あるいは他の遺伝的要因によって、見かけのアミロース含有率を高めたかは明瞭でない。もし遺伝的要因であるとするれば、*wx* 遺伝子座で劣性遺伝子の複対立系が分化しているか、あるいは遺伝的背景の差異が関与して、見かけのアミロース含有率に変異をもたらしたとも考えられる。Kumar *et al.* (1987) は、アミロース含有率が 0~0.2% の糯性品種に、13~29% のアミロース含有率の範囲内にある粳性 3 品種を交配して、遺伝解析を行った結果、それぞれの F₂ 集団で糯性と判別された集団のアミロース含有率が 0~4% の範囲で変異したことを報告している。このことは、遺伝的背景が見かけのアミロース含有率に影響することを示唆するものである。

一方、本研究に供試した粳性品種においては見かけのアミロース含有率に 9.6~33.9% の変異がみられた。こうした幅広い変異についても既に多くの報告がある (Williams *et al.* 1958, Webb *et al.* 1968 など)。

また、人為突然変異によっても種々の見かけのアミロース含有率に関する変異体が得られている (Satoh and Omura 1981, Okuno *et al.* 1983, Yano *et al.* 1988)。

粳性品種の場合、*wx* 座の *wx* 複対立系の分化がみられ、

その遺伝子の差異によってアミロース含有率が左右される (Sano 1984) . さらに, *wx* 遺伝子座以外の遺伝子変異によっても見かけのアミロース含有率は影響される. 例えば, 第2章でも述べたように *du* 遺伝子によって, 見かけのアミロース含有率は低下し, *ae* 遺伝子によって高アミロースとなる. さらに, 稈性×稈性の雑種集団から選抜された系統が, 見かけのアミロース含有率に関して幅広い変異を示すことから, 遺伝的背景も見かけのアミロース含有率の差異に影響すると考えられる (Kumar and Khush 1987, 1988) .

ここで興味あることは, 見かけのアミロース含有率に明らかな地理的変異が認められたことである. 本章の結果では, 実験に供した品種の制約から南アジアと東南アジアの品種について詳細に論究することは困難であるが, 概して見かけのアミロース含有率の高い品種が多い傾向にあった. これまでに報告されている南アジアや東南アジアの栽培品種についての結果 (飯塚ら 1977, Nakagahra *et al.* 1986) と併せて考えると, 見かけのアミロース含有率の地理的変異がより一層明瞭になる. すなわち; 南アジアのインドやバングラデシュにおいて

は、 粳性品種の中でも見かけのアミロース含有率の高い “高アミロース品種” が多い。ところがネパールでは糯性品種が僅かに栽培され、 粳性品種は高アミロース群と日本の品種に近い見かけのアミロース含有率が 16~20% 程度の “低アミロース群” とに分類される。東南アジアのマレーシアでは糯性品種を含む幅広い見かけのアミロース含有率の変異を示すが、 多くの粳性品種は概して高アミロース群に属する。ミャンマー、インド東北部および中国雲南省では見かけのアミロース含有率に関して極めて幅広い変異が認められた。さらに、本章の結果から中国南部では高アミロースの品種が多く、中国北部、朝鮮半島では逆に低アミロース品種が増加してくる傾向が認められた。

日本の品種については糯性と粳性両品種群について多くの品種を供試できた。そのため、日本国内における見かけのアミロース含有率の地理的変異について詳しく考察を試みることにする。糯性品種については、九州と四国では比較的見かけのアミロース含有率の低い品種が多くみられ、中国地方の日本海沿岸から中部、東北にかけて見かけのアミロース含有率の高い品種が多く認められ

た。これに対し、粳性品種では、九州と四国では見かけのアミロース含有率が高い品種が多く、南アジアや東南アジアで見られる高アミロース品種も認められた。中国地方の日本海沿岸から中部、東北の粳性品種については、低アミロース品種が増加し、糯性品種とは全く逆の傾向を示すことが明らかとなった。これらのことは、 w_1 遺伝子座で分化した複対立系か、あるいは w_1 遺伝子座に影響を及ぼす遺伝的背景について地理的分布の差異があることを強く示唆するものと考えられる。従って、日本の糯性および粳性品種は、見かけのアミロース含有率を制御する遺伝子資源を豊富に含んでいると考えられる。

見かけのアミロース含有率の測定法として本章で採用した λ_{max} 法では、玄米 1 粒による測定が可能である。そのため、約 2,600 系統の調査にかかった日数は 10 日と非常に短かった。このことは、新しく開発した λ_{max} 法が、多数の試料について見かけのアミロース含有率を測定する場合、極めて有効な測定法であることを示している。