九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

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：

第４章　イネ胚乳澱粉中の見かけのアミロース含有率と澱粉粒結合型タンパク質含量との関係

一般に，糯性品種はアミロースを欠き，アミロペクチンのみからなる胚乳澱粉を有するといわれてきた．しかし，前章で述べたように，糯性品種として分類されてきたものの中に，ヨウ素反応で見かけ上アミロースを有すると考えられる品種の存在が示された．しかも，それらの見かけのアミロース含有率の変異幅は，0～7.8%と大きい．このことは，糯性品種が少量ながらアミロースを含むか，もしくはアミロペクチンがヨウ素原子と結合し得るような長鎖のアミロペクチン分枝をもつかの何れかである．このことを明らかにするためには，真のアミロースの量とアミロペクチン由来の見かけのアミロースの量を正確に分別定量する必要がある．澱粉中のアミロースの有無を調べる手段としては，ペーパークロマトグラフィー（滝 1959）やゲル濾過法（Ikawa *et al*. 1978, 1981）などが知られているが，いずれの手法も，直鎖のアミロースと，アミロペクチンの長鎖分枝を区別することは困難である．従って，胚乳中に存在する真のアミロ

ースの量を測定するための手法を開発しなければならない.

イネ胚乳中のアミロース生合成は，第 6 染色体上に座乗する *wx* 遺伝子座の *Wx* 遺伝子によって支配され（Ikeno 1914, Nagao and Takahashi 1963, 岩田・大村 1971），この *wx* 遺伝子座の遺伝子産物は澱粉粒に結合して存在する分子量約 60,000（60 kDa）のポリペプチド（以下 *Wx* タンパク質と略する）で，アミロースを生合成する澱粉粒結合型の NDPG-glucosyl transferase と推定されている（Sano 1984）.

Wx タンパク質含量は，日，印品種間で差異があることが報告されている（Sano 1984）. また，Sano *et al.* (1985a) は，*Wx* タンパク質含量とアミロース含有率との関係を調査した結果，それらには正の相関関係があることを報告している. さらに，アミロース含有率を低下させる *du* 遺伝子が，*Wx* タンパク質の生成量を低下させることも明らかにされ（Sano *et al.* 1985b），*Wx* タンパク質含量とアミロース含有率の間の密接な関係が示唆された. これらのことから，*Wx* タンパク質含量とアミロース含有率の間に高い相関があるならば，*Wx* タン

パク質含量の差異を調べることは，アミロース含有率に関する変異探索の有力な手段になる．

Wx タンパク質の定量は，SDS-PAGE で分離した後，60 kDa のタンパク質としてデンシトメトリーによって行われるが，分析に至るまでに時間がかかり，多数の試料の分析は困難である（Echt and Schwartz 1981, Sano 1984）．これに対し，60 kDa タンパク質に対する抗体を用いた免疫反応による分析では，特異的かつ高感度でその濃度を決めることができ，胚乳中に存在する 60kDa タンパク質を定量することが可能となる．免疫反応は，特異的に行われるため，目的とする測定対象物を分離する前処理が不要となるなど測定の短縮化，簡便化が促進され，多数の検体を扱う遺伝・育種学の分野では，変異分類の有効な手段の1つになりつつある．

このような観点から，本章では免疫化学的手法によって *Wx* タンパク質を検出し，見かけのアミロース含有率の異なる糯性および粳性品種を用いて，*Wx* タンパク質含量と見かけのアミロース含有率との関係を調査した．

第1節　Wx タンパク質の精製

Wx タンパク質を免疫化学的手法を用いて検出するためには，Wx タンパク質を精製し，Wx タンパク質に対する特異的抗体を調製する必要がある．

種子胚乳中には，Wx タンパク質以外にも多くのタンパク質が存在する．このため，Wx タンパク質の精製には，これら Wx タンパク質以外のタンパク質を除去せねばならない．さらに，Wx タンパク質は，澱粉粒に強固に結合していることから，Wx タンパク質を精製するためには，この結合をはずす必要がある．Wx タンパク質以外のタンパク質を除去するため，ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）や n-ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（DoBS）のような界面活性剤と還元剤（2-メルカプトエタノール）で澱粉粒を処理し，その後，精製した澱粉粒を糊化することで Wx タンパク質を澱粉粒から分離する手法が報告されている（Echt and Schwartz 1981, Sano 1984, Villareal and Juliano 1986）．しかし，界面活性剤や還元剤を用いた強力な変性条件下で澱粉粒を処理すると，他のタンパク質の混入は避けられるが，

Wx タンパク質の一部も同時に除去され，最終的に得られる Wx タンパク質の収量が低下することが考えられる．

他のタンパク質の混入を避け，目的とする Wx タンパク質のみを効率的に得るためには，まず最初にプロテアーゼ処理を行い，表面タンパク質を消化・除去し，その後，澱粉粒に結合した Wx タンパク質を分離する手法が望ましい．本節では，プロテアーゼの一種であるペプシンで澱粉を処理することで，Wx タンパク質の効率的な精製法の確立を試みた．

1. 材料および方法

供試材料

Wx タンパク質の精製には，「金南風」の白米粉砕試料を用いた．なお，本試料の見かけのアミロース含有率は 17.1% であった．

酵　素

Sigma 社製 ペプシン（EC3.4.23.1., 2,500 units/mg, P-7012）を用いた．

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）

SDS-PAGE は，Laemmli（1970）の不連続緩衝液系を用

いて行った．分離ゲルのサイズは 90 x 60 x 1 mmに，またアクリルアミドおよびビスアクリルアミドの濃度は14%および 0.4%にそれぞれ設定した．泳動は，120 Vの定電圧で行い，泳動後コマジーブリリアントブルー（CBB）R-250 を用いてタンパク質を染色した．分子量マーカーは，Bio-Rad 社製の SDS-PAGE スタンダード（Low）を使用した．

タンパク質の電気溶出

澱粉とSDS-ポリアクリルアミドゲルからのタンパク質の溶出は，Kobayashi *et al.*（1985）の手法に従って行った．

タンパク質の定量

タンパク質の定量は，Lowry *et al.*（1951）の方法に従って行った．標準タンパク質として，牛血清アルブミン（Sigma 社，No. A-7888）を用いた．

澱粉粒の精製

Wx タンパク質の精製手順を，Fig. 4-1 に示した．「金南風」の白米粉砕試料 1 kgを出発材料としたペプシン処理を効率的に行うために，白米粉を精製水に懸濁し，1 分間超音波処理した後，5,000 x g で 10 分間遠

心分離し，上清を除去した．この操作を 2 回繰返した．この処理によって微細な澱粉粒子を得ることができた．遠心分離残渣を Walpole の緩衝液（0.2 M 酢酸ナトリウム－0.2 M 塩酸；pH 1.7）に懸濁し，ペプシンを 1 %（W /V）になるように加え，2 時間，37℃で振盪した．ペプシン処理後，5,000 x g で 10 分間遠心分離し上清を除去した．遠心分離残渣に精製水を加えてよく攪拌し，5,000 x g で 10 分間遠心分離し上清を除去した．この操作を 3 回繰返し，精製澱粉粒を得た．

澱粉粒からの *Wx* タンパク質の溶出

精製澱粉粒に Laemmli（1970）の抽出用緩衝液（0.125 M トリス－塩酸，4% SDS，8 M 尿素，20% グリセリン，5% 2－メルカプトエタノール；pH 6.8）を加え，澱粉を糊化した．この澱粉溶液から *Wx* タンパク質を電気溶出した．

SDS-PAGE による *Wx* タンパク質の精製

さらに精製を進めるため，SDS-PAGE によるタンパク質の分離を行った．泳動終了後，CBB で染色し，分子量 60 kDa 付近の濃く染色される 1 本のバンドをゲルから切出した．切出したゲルからタンパク質を電気溶出した

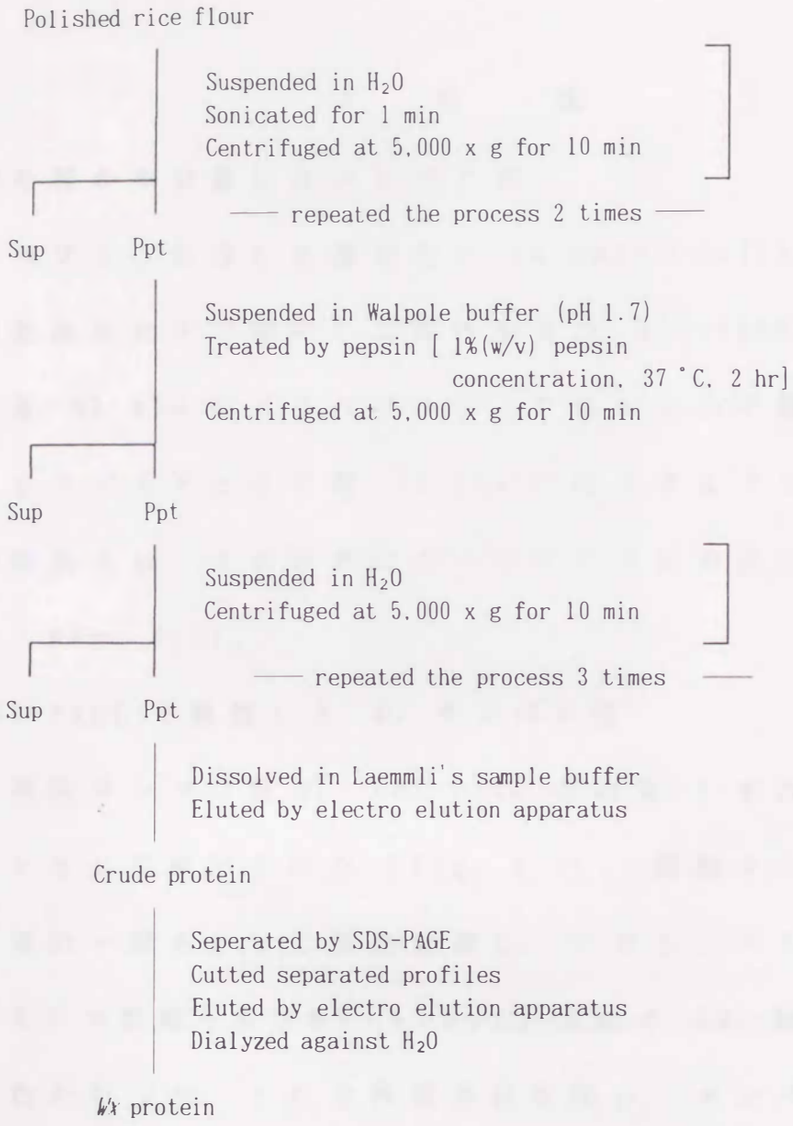

Fig. 4-1. Flow chart for purification of Wx protein in starchy endosperm of rice.

後，精製水に対して透析し，精製 *Wx* タンパク質を得た．

2．結　　果

澱粉粒から分離したタンパク質

ペプシン処理した澱粉粒に Laemmli（1970）の抽出用緩衝液を加えて糊化した澱粉溶液の SDS-PAGE では，分子量 57 kDa のポリペプチドより僅かに分子量の大きいポリペプチドと分子量 13 kDa に相当するポリペプチドが検出され，それ以外のポリペプチドは検出されなかった（Fig. 4-2）．

SDS-PAGE で精製した *Wx* タンパク質

精製タンパク質は，SDS-PAGE の結果 1 本のポリペプチドとして検出された（Fig. 4-2）．精製タンパク質の溶液の一部をとって凍結乾燥し，アセトン－トリエチルアミン－酢酸－水（85：5：5：5）混液で SDS 除去および脱色を行った．これを再度凍結乾燥し，タンパク質を計量した．本実験操作によって，白米粉砕試料 1 kg から 10 mg の精製タンパク質が得られた．

分子量の推定

分子量マーカーを用いて，精製 *Wx* タンパク質の分子

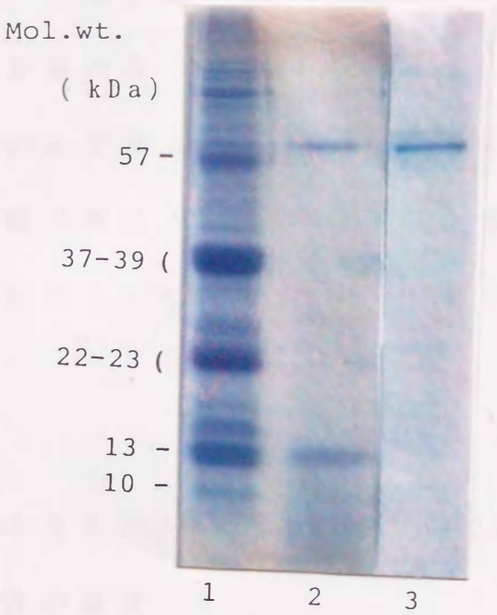

Fig. 4-2. SDS-PAGE profiles of proteins present in samples obtained from each purification step. Detailed steps for purification were described in the text. Lane 1. total proteins in polished rice flour ; Lane 2. proteins electro-eluted from the purified starch granules after digesting by pepsin ; Lane 3. purified *Wx* protein.

量を推定した（Fig. 4-3）．マーカータンパク質の分子量の対数値を縦軸に，またゲル上の相対移動度を横軸にとり，同時に泳動した精製 *Wx* タンパク質の相対移動度から分子量を求めた．今回精製した *Wx* タンパク質の分子量は 60 kDa であることが確認された．

以上の精製手順により，ペプシン処理を行った澱粉粒から抗体調製に十分な量の精製 *Wx* タンパク質を得ることができた．

第２節　ウエスタンブロッティング法による *Wx* タンパク質の検出

Wx タンパク質を特異的に検出するためには，*Wx* タンパク質に対する抗体を調製し，免疫反応を利用した実験系を確立する必要がある．しかし，*Wx* タンパク質がゲル中に留まっている限り，抗体の結合は容易ではない．一方，タンパク質はニトロセルロース膜の表面に静電気的な結合で吸着するので，抗体の吸着が容易となり，測定対象のタンパク質の高感度の検出が可能となる．Towbin *et al.*（1979）は，ゲル内のタンパク質をニト

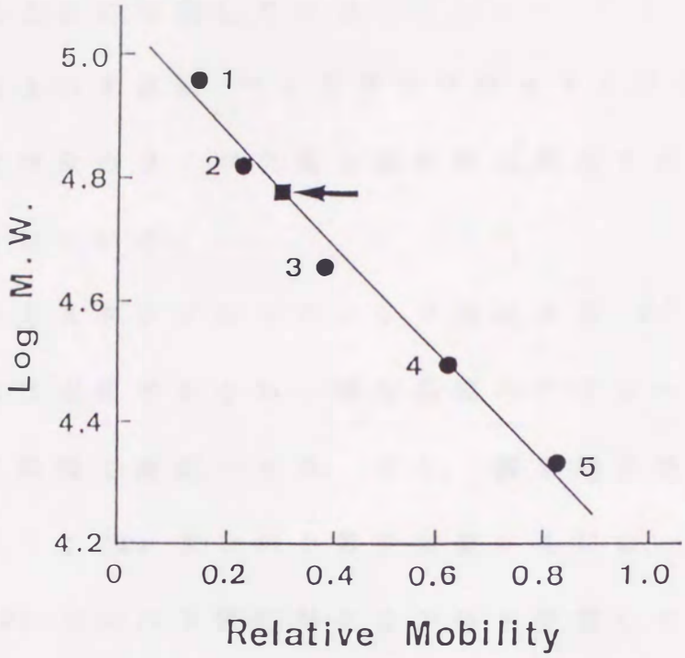

Fig. 4-3. Estimation of molecular weight of *Wx* protein by SDS-PAGE.

Wx protein obtained by the purification method as shown in Fig. 4-4 and marker proteins were subjected to SDS-PAGE.

Marker proteins ; 1. Phosphorylase ;
2. Bovin serum albumin ; 3. Ovalbumin
4. Carbonic anhydrase ; 5. Soybean tripsin inhibitor.

Closed square indicates purified *Wx* protein.

ロセルロース膜上に電気泳動的に短時間で効率良く移行することに成功している.

以上の手法は,ウェスタンブロッティング法と呼ばれ,測定対象のタンパク質を定性的に検出する手法として利用されている.

ウエスタンブロッティング法による Wx タンパク質の定量は困難であるが, 糯性品種のアミロースの存在の有無は肉眼で確認できる. また, 酵素結合免疫吸着測定法によって Wx タンパク質を定量するには, 調製した抗体の Wx タンパク質に対する力価を把握しておく必要がある.

本節では, 前節で精製した Wx タンパク質に対する抗体を調製し, 見かけのアミロース含有率の異なる糯性および粳性品種を用いて, ウエスタンブロッティング法による Wx タンパク質の検出を試みた.

1. 材料および方法

供試試料

Wx タンパク質の検出には, 第3章で供試した多数の品種の中から選んだ見かけのアミロース含有率の異なる

糯性および粳性の 75 品種と「金南風」由来の amylose extender 変異 2 系統，糯性変異 1 系統および原品種「金南風」を供試した．

抗血清の作成

精製した Wx タンパク質を抗原として，家兎に免疫し，抗血清を作成した．すなわち，精製 Wx タンパク質 0.5 mg を含む 0.5 mℓ の 20 mM りん酸緩衝液（pH 7.0）に等量の Difco 社製フロイント完全アジュバントを混ぜ，家兎（ニュージーランドホワイト）に 2 週間間隔で 3 回筋肉注射し，最後の筋肉注射から 1 週間後に総量 0.2 mg の Wx タンパク質を含む 1.0 mℓ の 20 mM りん酸緩衝液（pH 7.0）を，耳下に静脈注射した．静脈注射 1 週間後に採血を行い，抗血清を得た．なお，標準血清としては注射前に採血したものを用い，得られた抗血清は -40℃で保存した．

γ－グロブリン（IgG）の精製

γ－グロブリン（IgG）の精製は，Clark and Adams（1977）の方法に従って行った．まず，抗血清 2 mℓ に精製水 18 mℓ を加え，さらに 20 mℓ の飽和硫酸アンモニ

ウムを加えて塩析し，30,000 x g，4 ℃で 10 分間遠心分離を行った後，残渣を集め，1/2 濃度のりん酸緩衝生理食塩水（PBS）中に再懸濁した．1/2 濃度の PBS に対して，一夜透析を行った後，Aquacide（Calbiochem 社）で 2.5 mℓまで濃縮し，PD-10（Pharmacia 社）で脱塩した．脱塩した試料を DE52(Whatman 社)のカラム(1.6 x 5 cm）に通し，1/2 濃度の PBS で溶出した．溶出部分を 2 mℓ画分で回収し，ベックマン DU-7 分光光度計を用いて，各画分の A_{278}／A_{250}を測定した．2.5 以上の値を示す画分を回収混合した後，A_{280}を測定し，A_{280} = 1.4 を 1.5 mg IgG／mℓ として，含まれる IgG を定量した．精製した IgG は，-40℃で冷凍保存した．

SDS-PAGE

SDS-PAGE は，Laemmli（1970）の不連続緩衝液系を用いて行った．分離ゲルのサイズは，90 x 60 x 1 mm に，またアクリルアミドの濃度は 14%にそれぞれ設定した．泳動用試料は，玄米 1 粒に Laemmli（1970）の抽出用緩衝液（0.125 M トリス－塩酸，4% SDS，8 M 尿素，20 % グリセリン，5 % 2－メルカプトエタノール；pH 6.8）を加えて，乳鉢で磨砕し，5,000 x g で 10 分間

遠心分離した上清を用いた．電気泳動は 120V 定電圧で行った．

ウエスタンブロッティング法

ウエスタンブロッティング法は，Towbin *et al.*（1979）の方法に従って行い，手順は Fig. 4-4 に示した．まず，試料を SDS-PAGE で泳動・分離させた後，分離ゲルをニトロセルロース膜（Bio-rad，0.45μm）と重ね，平板型転写装置（日本エイドー，NA-1512型）を用いて 150 mA 定電流で 30 分間泳動転写した．次に，ニトロセルロース膜を 6％のスキムミルク（雪印乳業社）を含む TBST（トリス 3.03 g，塩化ナトリウム 4.5 g，Tween 20 0.25 mℓ を精製水に溶かし，塩酸で pH 8.0に調整した後，500 mℓ に定容）中で 5 分間振盪した後，TBST 中で 5 分間振盪する洗浄操作を 3 回行った．洗浄後一次抗体溶液（抗 *Wx* タンパク質 IgG／TBST 希釈溶液）中で 30 分間振盪し，TBST 中で 5 分間の振盪洗浄操作を 3 回行った．さらに，ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ・ヤギ IgG（TAGO 社，No. 6430）の TBST 希釈二次抗体溶液中で30 分間振盪した後，TBST による 5 分間の振盪洗浄操作を 3 回行った．最後に基質溶液（ジアミノベ

SDS-PAGE (14% polyacrylamide gel)

|

Electro-blotting (150 mA : 30 min)

|

Blocking (6% skim milk - TBST : 5 min)

|

Washing (TBST : 5 min x 3 times)

|

Treating with first antibody (anti-*Wx* protein, x 4,000 dilution : 30 min)

|

Washing (TBST : 5 min x 3 times)

|

Treating with second antibody (Peroxidase-conjugated anti-rabit IgG goat, x 2,000 dilution : 30 min)

|

Washing (TBST : 5 min x 3 times)

|

Coloring (diaminobenzidine)

|

Washing

|

Drying

Fig. 4-4. Flow chart for detecting *Wx* protein by immuno-blotting.
All procedures were done at room temperature.

ンチジン 5 mg, 30%過酸化水素水 16μℓ／50 mM トリス－塩酸緩衝液 10 mℓ：pH 7.2）を添加し，発色させた．発色を確認した後，直ちに精製水で洗浄して反応を停止させ，自然乾燥後保存した．転写後のタンパク質の染色は，CBB-R250 によって行った．

アミロース含有率の測定

アミロース含有率は，第2章第2節の λ_{max} 法によって測定した．

2. 結　　果

(1) 調製した IgG の反応性

ウエスタンブロッティング法により Wx タンパク質に対するウサギ IgG の反応性を検討した．Wx タンパク質の精製に供試した「金南風」の白米粉砕試料から，Laemmli (1970) の抽出緩衝液で抽出した粗タンパク画分を SDS-PAGE で分離し，ニトロセルロース膜に転写した (Fig.4-5)．レーン 1 (Lane 1) は，CBB-R250 でタンパク染色したもので，レーン 2 は酵素免疫染色したものである．一次抗体を 4,000 倍希釈，二次抗体を 2,000 倍希釈にそれぞれ設定した場合に，最も良好な検

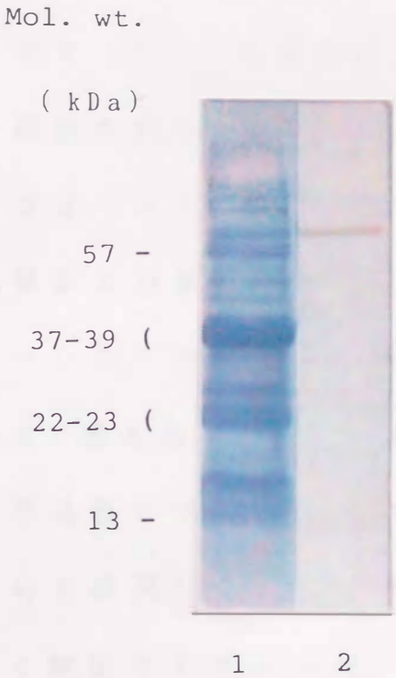

Fig. 4-5. Western-blotting of rice proteins.
Proteins were seperated by SDS-PAGE and then blotted into the cellulose nitrate membrane.
Lane 1; the membrane stained with amido black 10B.
Lane 2; the membrane treated with rabbit anti-*Wx* protein IgG.

出感度が得られた．レーン 2 では，分子量 60 kDa に相当する単一のバンドが検出された．このことから，今回作成したウサギ IgG が特異的に Wx タンパク質に反応することが確認された．なお，免疫前に採血して得られた標準血清では，バンドは検出されなかった．

（2）供試品種および系統からの Wx タンパク質の検出

供試品種について，ウエスタンブロッティング法によって Wx タンパク質を検出し，その結果を Table 4-1 に示した．糯性品種には，見かけのアミロース含有率が 0～7.8％のものを供試したが，いずれの品種も Wx タンパク質は，全く検出されなかった．このことは，供試した糯性品種では，アミロースが生合成されていないことを示している．

粳性品種は，いずれも 1 本のバンドが検出できた．また，品種間で染色程度に差異が認められ，「金南風」と同程度に染色された 1 本のバンドが検出されたもの（Wx-M 型）と，「金南風」よりはるかに濃く染色された 1 本のバンドが検出されたもの（Wx-H 型）と，染色濃度の異なる 2 群に分類することができた．

Wx-M 型品種群の見かけのアミロース含有率は 11.0～

Table 4-1. Origin, relative amount of Wx protein, apparent amylose content and the λ_{max} of iodine complexes in starchy endosperm of rice varieties.

Variety	Origin	Amount of Wx protein[1]	Apparent amylose content (%)[2]	λ_{max} (nm)
Glutinous				
LO 942	Japan	−	0.0	523.7
LO 1137	Japan	−	0.0	523.7
LO 1244	Japan	−	0.0	524.9
LO 1164	Japan	−	0.8	526.2
LO 187	Japan	−	2.4	529.2
HO 861	North China	−	2.4	529.2
HO 812	South China	−	3.1	530.5
HO 885	South Korea	−	3.1	530.5
HO 869	South Korea	−	3.2	530.7
LO 1050	Japan	−	3.4	531.0
LO 96	Japan	−	3.6	531.4
HO 1268	North China	−	3.7	531.6
HO 878	South Korea	−	3.7	531.6
HO 829	South Korea	−	3.7	531.6
HO 639	South China	−	3.8	531.8
HO 831	South Korea	−	4.1	532.3
HO 888	South Korea	−	4.1	532.3
HO 1292	North China	−	4.4	532.9
HO 827	South Korea	−	4.7	533.5
LO 575	Japan	−	4.8	533.6
HO 952	South Korea	−	4.8	533.6
LO 491	Japan	−	5.2	534.4
HO 875	South Korea	−	6.0	535.9
LO 639	Japan	−	6.5	536.8
HO 1252	North China	−	6.7	537.2
LO 516	Japan	−	6.9	537.6
LO 110	Japan	−	7.8	539.3
LO 551	Japan	−	7.8	539.3
Non-glutinous				
HO 376	North Korea	+	11.0	545.2
HO 1348	South Korea	+	11.2	545.6
LO 1299	Japan	+	11.7	546.5
LO 97	Japan	+	12.0	547.1
LO 1302	Japan	+	12.0	547.1
LO 155	Japan	+	12.1	547.3
HO 1324	South Korea	+	12.2	547.5
HO 1351	South Korea	+	12.2	547.5
LO 1291	Japan	+	12.4	547.9
HO 380	North Korea	+	12.5	548.1
HO 383	North Korea	+	12.6	548.2
HO 1273	North China	+	12.9	548.8
HO 1347	South Korea	+	13.1	549.2
LO 125	Japan	+	13.4	549.7

(to be continued)

Table 4-1. (continued)

Variety	Origin	Amount of *Wx* protein[1]	Apparent amylose content (%)[2]	λ_{max} (nm)
LO 226	Japan	+	13.5	549.9
LO 138	Japan	+	13.6	550.1
LO 577	Japan	+	13.6	550.1
LO 1147	Japan	+	14.1	551.1
LO 216	Japan	+	14.2	551.2
LO 329	Japan	+	14.2	551.2
LO 502	Japan	+	14.2	551.2
LO 34	Japan	+	15.8	554.2
LO 637	Japan	+	16.8	556.1
LO 947	Japan	+	17.7	557.8
LO 839	Japan	+	17.9	558.1
LO 331	Japan	+	18.3	558.9
LO 344	Japan	+	18.7	559.6
HO 1346	South Korea	++	18.8	559.8
LO 906	Japan	+	19.0	560.2
HO 1251	North China	++	19.3	560.7
LO 65	Japan	+	19.5	561.1
LO 281	Japan	+	20.2	562.4
LO 143	Japan	+	20.4	562.8
HO 1341	South Korea	++	20.4	562.8
HO 1356	South Korea	++	20.6	563.2
LO 1142	Japan	+	20.6	563.2
HO 1250	North China	++	20.7	563.4
LO 306	Japan	+	20.9	563.7
HO 422	South China	++	29.3	579.4
HO 1378	South Korea	++	29.3	579.4
HO 508	Taiwan	++	29.4	579.6
HO 414	North China	++	29.5	579.8
HO 415	South China	++	29.5	579.8
HO 1150	South China	++	29.5	579.8
HO 1144	South China	++	29.5	579.9
HO 1262	North China	++	29.5	579.9
HO 1109	South China	++	29.9	580.6
Endosperm mutant				
EM 21	*wx* mutant	−	0.0	523.4
EM 72	*ae* mutant	+	18.3	558.9
EM 129	*ae* mutant	+	20.4	562.8
Kinmaze	(Original cultivar)	+	18.3	558.9

1) *Wx* protein was assayed by the western-blotting method.
- : not stained, + : stained as well as 'Kinmaze', ++ : strongly stained
2) Apparent amylose content was estimated from the λ_{max} value.

20.9%の範囲内にあった．これに対し，Wx-H 型品種群の見かけのアミロース含有率は，29%程度のものと朝鮮半島南部と中国北部の品種にみられる 18.8～20.7%の 2 群に分類された．

「金南風」に由来する amylose extender 変異 2 系統からは，いずれも「金南風」と同程度の濃さのバンドが検出された．従って，amylose extender 変異 2 系統は「金南風」と同じ Wx-M 型品種群に属するものと推察された．

以上のように，ウエスタンブロッティング法により，Wx タンパク質を粳性品種から一本のバンドとして特異的に検出し，バンドが全く検出されない糯性品種と判別することができた．また，粳性品種は，検出されたバンドの濃淡に基づいて，薄く染色される Wx-M 型品種群と濃く染色される Wx-H 型品種群に分類することを可能にした．

第３節　酵素結合免疫吸着測定による *Wx* タンパク質の定量

第２節でも明らかなように，ウエスタンブロッティング法では *Wx* タンパク質の有無は明瞭に区別できるが，検出したバンドの濃淡から *Wx* タンパク質含量を推定することは困難である．従って，品種中の *Wx* タンパク質含量の変異を調査するためには，ウエスタンブロッティング法に代わる定量法が必要である．

酵素結合免疫吸着測定（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay : ELISA）は，測定対象を特異的かつ高感度で定量できることから，タンパク質をはじめとしてウイルスや食品中の微量成分の定量に広く利用されている（Voller *et al*. 1979）．

本節では，ELISA による *Wx* タンパク質の定量法を確立し，ウエスタンブロッティング法によってバンドが検出された粳性品種の見かけのアミロース含有率と *Wx* タンパク質含量の関係について検討した．

1. 材料および方法

供試試料

第2節で *Wx* タンパク質が検出された粳性 47 品種と「金南風」由来の amylose extender 変異体 2 系統，糯性変異体 1 系統および原品種「金南風」を供試した．

ELISA 間接法

ELISA は，Voller *et al.*（1979）の方法に従って間接法で行い，手順を Fig. 4-6 に示した．まず，抗原を被覆用緩衝液（炭酸ナトリウム 1.59 g，炭酸水素ナトリウム 2.93 g を精製水で 100 mℓ に定容．pH 9.6）によって希釈し，これをイムノプレート（Nunc社，96 穴，NO.4-42404）の各穴に 0.1 mℓ ずつ分注し，4 ℃一夜静置し抗原を吸着させた．次に，穴の液を除去し，PBST（リン酸二水素カリウム 0.2 g，塩化ナトリウム 8.0 g，塩化カリウム 0.2 g，Tween20 0.5 mℓ を精製水に溶し，1,000 mℓ に定容．pH 7.4）で 3 分間静置する洗浄操作を 4 回行った後，1% BSA-PBST を各穴に十分満たし，室温で 1 時間静置後，ブロッキング操作を行った．ブロッキング操作終了後 BSA 溶液を除去し，PBSTで 3 分

間静置する洗浄操作を 4 回繰返し，一次抗体溶液（抗ヤタンパク質 IgG／PBST希釈溶液）を各穴に 0.1㎖ ずつ分注し，室温で 2 時間静置した．一次抗体溶液を除去し，PBST で 3 分間静置の洗浄操作を 4 回行い，アルカリホスファターゼ標識抗ウサギ・ヤギ IgG（TAGO社，No.6530）の PBST 希釈二次抗体溶液を各穴に 0.1 ㎖ずつ分注し，室温で 2 時間静置した．酵素反応は二次抗体溶液を除去し，PBST で3 分間静置する洗浄操作を 4 回繰返した後，1.0 ㎎／㎖濃度の ρ－ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを含む 10 %ジエタノールアミン緩衝液（ジエタノールアミン 100 ㎖，アジ化ナトリウム 0.2g，塩化マグネシウム・6 水和物 100 ㎎を精製水に溶し，塩酸で pH 9.8 に調製した後，1,000 ㎖に定容）を各穴に 0.1 ㎖ずつ分注し室温で 1～2 時間反応させた．発色を確認した後，3 M 水酸化ナトリウムを各穴に 0.05 ㎖ ずつ分注して反応を停止させ，各穴の 405 nm における吸光度をイムノリーダー（インターメッド，NJ-2000）で測定した．なお，PBST による洗浄はすべてイムノウオッシャー（インターメッド，NK- 300）による自動洗浄で行った．

Coating (diluted antigen : 0.1 mℓ/well : 4°C overnight)

|

Washing (PBST : 3 min x 4 times)

|

Blocking (1% BSA-PBST : 0.1 mℓ/well : room temperature : 1 hr)

|

Washing (PBST : 3 min x 4 times)

|

Adding of first antibody (anti-*Wx* protein, x 3,000 dilution
: 0.1 mℓ/well: room temperature, 2 hr)

|

Washing (PBST : 3 min x 4 times)

|

Adding of second antibody (Alkaline phosphatase-conjugated
anti-rabbit IgG goat IgG, x 2,000
dilution : 0.1 mℓ/well : 2 hr)

|

Washing (PBST : 3 min x 4 times)

|

Coloring (*p*-nitrophenyl phosphate : 0.1 mℓ/well : 1～2 hr)

|

Stopping (3 M NaOH : 0.05 mℓ/well)

|

Measuring (Absorbance at 405 nm)

Fig. 4-6. Indirect-ELISA method used for *Wx* protein assay. All procedures were done at room temperature except for coating.

2. 結　　果

(1) 抗原の濃度と ELISA 値との関係

ELISA によって抗原を定量するには，抗原の絶対量と酵素の反応量が比例することを確認したうえで，同じ条件で測定を行う必要がある．そこで精製 Wx タンパク質を抗原として，抗原の濃度と ELISA によって最終的に測定される 405 nm における吸光度との関係を検討した（Fig. 4-7）．一次抗体の希釈を 3,000 倍，二次抗体の希釈を 2,000 倍にそれぞれ設定した場合に最良の検出感度が得られた．抗原の濃度と 405 nm における吸光度との関係は，抗原の濃度が 0～300 ng／㎖ の範囲で一次回帰式 Y = 0.1704 + 0.0053X（Y : 405 nm における吸光度，X : 抗原濃度）によく適合した．両者の間に高い正の相関関係（r = 0.992）が認められたことから，本条件による ELISA 間接法による抗原の定量性が確認された．

(2) 供試品種および系統の Wx タンパク質含量と見かけのアミロース含有率の関係

ELISA の抗原抗体反応および酵素反応は，保温時間に

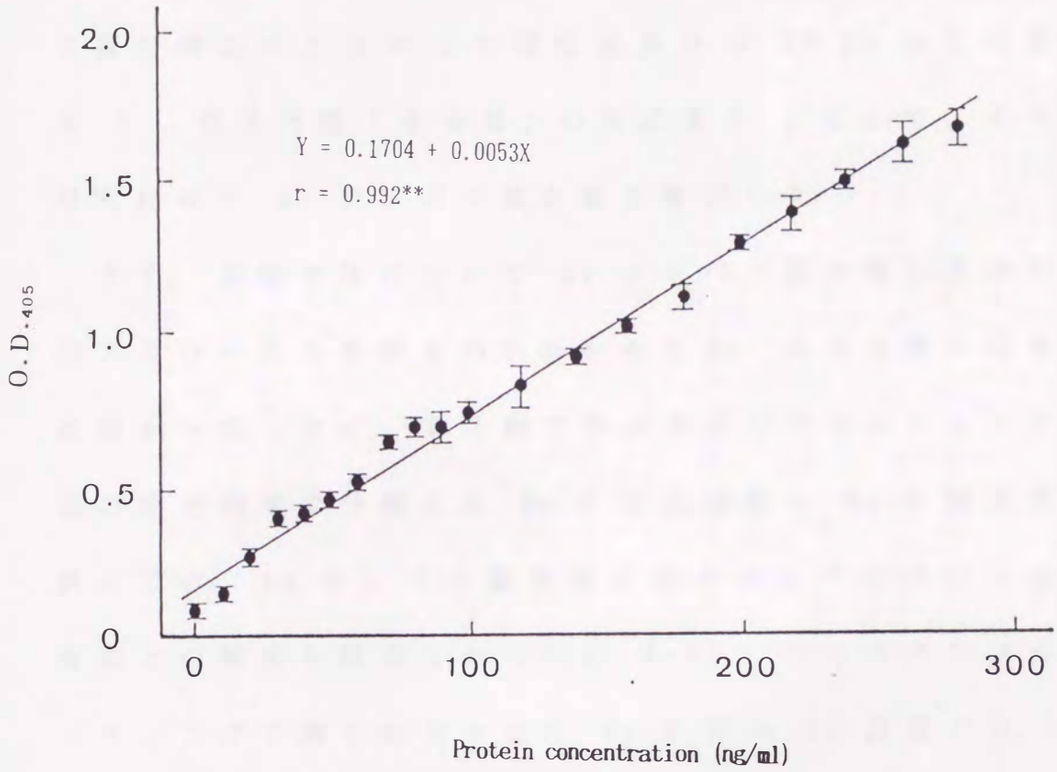

Fig. 4-7. The relationship between the concentration of purified *Wx* protein and absorbance at 405 nm in the indirect ELISA. Value is the mean of three determinations ± its standard deviation. The line fits to a linear regression (Y = 0.1704 + 0.0053X, r = 0.992**). ** : Significant at the 1% level.

影響を受け，同じ検体でも各回の吸光度の測定値は異なる．従って，プレート毎に対照をおくことが必要である．そこで，ウエスタンブロッティング法により *Wx* タンパク質が検出されなかった糯性変異体の EM 21 の反応量を 0，粳性品種「金南風」の反応量を 1 として，その相対比から *Wx* タンパク質含量を算出した．

まず，品種全体について *Wx* タンパク質含量と見かけのアミロース含有率との関係をみたが，両者の間の相関は低かった．次に，第 2 節でウエスタンブロッティング法の染色程度で分類した Wx-H 型品種群と Wx-M 型品種群に分け，*Wx* タンパク質含量と見かけのアミロース含有率との関係を調査した（Fig. 4-8）．ウエスタンブロッティングで濃く染色された Wx-H 型の 14 品種では，見かけのアミロース含有率の高い品種ほど *Wx* タンパク質含量が多く，一次回帰式 $Y = 8.79 + 1.82X$（Y：見かけのアミロース含有率，X：*Wx* タンパク質含量，$r = 0.86$，1% 水準で有意）によく適合した．しかし，Wx-H 型品種群の *Wx* タンパク質の含量の変異幅は，比較品種として示した「金南風」の約 5 ～ 12 倍の広い範囲内にあり；見かけのアミロース含有率が 29% 程度の高

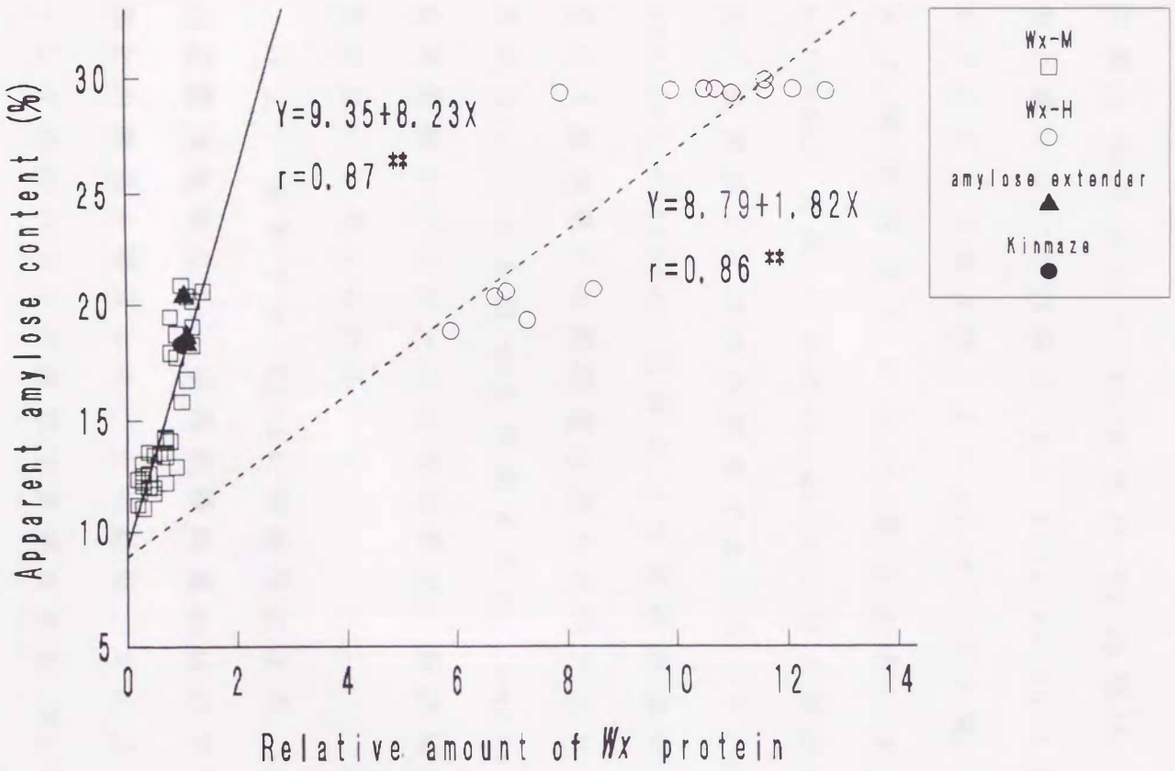

Fig. 4-8. The relationship between relative amount of Wx protein and apparent amylose content. Varieties were classified into two groups. Wx-H and Wx-M.

** : Significant at the 1% level.

い集団と18.8～20.7%の低い集団に分けられる可能性が考えられた．これに対し，ウエスタンブロッティング法で薄く染色された Wx-M 型の 33 品種は，Wx-H 型品種群と異なる一次回帰式 Y = 9.35 +8.23 X（Y：見かけのアミロース含有率，X：*Wx* タンパク質，r = 0.87，1%水準で有意）によく適合した．また，amylose extender 変異 2 系統の *Wx* タンパク質含量は，原品種の「金南風」とほぼ同程度であった（Fig. 4-8）．amylose extender 変異のヨウ素複合体の λ_{max} は，原品種の「金南風」と同程度で見かけのアミロース含有率に差がないことも併せて考慮すると，amylose extender 変異系統のアミロースの生成量は，原品種「金南風」と差がないと考えられる．

以上，本節では ELISA 間接法による *Wx* タンパク質の定量法を確立し，粳性品種の見かけのアミロース含有率との関係を調査した．その結果，ウエスタンブロッティング法のバンドの濃淡で分類された Wx-H 型品種群と Wx-M 型品種群のそれぞれについて，*Wx* タンパク質含量と見かけのアミロース含有率との間に直線的な比例関係が認められ，*Wx* タンパク質含量から見かけのアミロー

ス含有率を推定することができることを明らかにした.

第4節　考　察

本章では，イネ胚乳中に含まれる *Wx* タンパク質含量と見かけのアミロース含有率との関係を明確にすることを目的に，*Wx* タンパク質を免疫化学的手法によって特異的に定量する方法の開発を試みた.

最初に，ペプシン処理による澱粉粒の表面タンパク質の除去を試みた（Fig. 4-1）. ペプシン処理の結果，Fig. 4-2 の SDS-PAGE 像に示したように，処理した澱粉試料からは，分子量 60 kDa に相当するポリペプチドの他に，分子量 13 kDa のポリペプチドが得られた. 両ポリペプチドの移動度の差が大きいことから，分子量 60kDa の *Wx* タンパク質は，ゲル切出し法によって容易に精製することができた.

ところで，分子量 13 kDa のポリペプチドは，イネ胚乳中に存在するタンパク質顆粒 I 型（PB-I）の構成ポリペプチドで，アルコール可溶性のプロラミンを主成分とすること が知られている（Tanaka *et al*. 1980）. また，

PB-I がペプシンに対して難分解性であることも報告されている（Ogawa *et al*. 1987）．ペプシン処理した澱粉粒から効率的に *Wx* タンパク質を分離するためには，分子量 13 kDa のポリペプチドをアルコール画分として除去する方法を検討する必要があるものと考える．

本精製手順では，白米粉砕試料 1 kg から 10 mg の精製 *Wx* タンパク質が得られた．Villareal and Juliano（1989）は，白米の澱粉粒にプロテアーゼ処理を施すことによって，本実験で供試した「金南風」とほぼ同じ見かけのアミロース含有率をもつ品種の胚乳中に含まれる *Wx* タンパク質の含有率が，約 0.01～0.02％であることを報告している．本精製に供試した最初の白米試料の重量は 1 kg であることから，約 200 mg の *Wx* タンパク質が含まれているものと推定される．従って，*Wx* タンパク質の回収率は，約 5 ％（10 mg/200 mg）と計算される．本精製手順では，澱粉粒を尿素によって糊化することによって，*Wx* タンパク質を分離し，電気溶出によって *Wx* タンパク質を回収した．10 mg という精製タンパク質の量は，抗体を調製するには充分な量であるが，さらに回収率を向上させるためには，澱粉粒からの *Wx* タ

ンパク質の効率的な分離法を開発することが必要と考えられる．その解決方法として，尿素以外の澱粉糊化剤の採用や澱粉の熱処理などが考えられる．

一方，ペプシン処理で *Wx* タンパク質が消化されずに残ったことは，*Wx* タンパク質の胚乳組織中の存在形態を知るうえで重要な示唆を与えるものと考える．これまで，イネでは，*Wx* タンパク質に対応する顆粒性酵素 NDPG-glucosyl transferase の可溶化に成功していないことから（Tanaka and Akazawa 1971），*Wx* タンパク質は，澱粉粒に強固に結合した形で存在すると考えられてきた（Sano 1984）．しかしながら，本実験では，ペプシン処理を施した澱粉からは最終的に多くの精製 *Wx* タンパク質が得られた．このことは，*Wx* タンパク質が，極めて難溶解性のタンパク質であるのか，もしくはプロテアーゼが作用しにくい内在性の膜タンパク質であることを示している．Villareal and Juliano（1986）も類似の結果を得ている．今後澱粉の生合成経路を解明するために，胚乳組織内での *Wx* タンパク質の存在形態を明らかにすることは重要であることから，免疫電顕などの手法を用いて，*Wx* タンパク質の局在性を早急に明らかに

することが必要と考える.

前章で，見かけのアミロース含有率に関して幅広い変異がみられた糯性品種（Table 3-1）については，*Wx* タンパク質は全く検出されず，*Wx* タンパク質が検出された粳性品種と明確に区別された（Table 4-1）．このことは，供試した糯性品種ではアミロースの生合成が行われていないことを強く示唆するものである．これらの変異がアミロペクチンの鎖長変化などアミロペクチンの何らかの構造変化に起因する可能性も十分考えられる．

このようにウエスタンブロッティング法では，*Wx* タンパク質を特異的に検出でき，しかも免疫反応を肉眼で簡易に判定できることから，今後澱粉の糯性と粳性を判別するうえで有用な手法となるものと考えられる．

一方，粳性品種は，ウエスタンブロッティング法によって検出されるバンドの濃淡から，濃く染色される Wx-H 型品種群と薄く染色される Wx-M 型品種群の 2 群に分類できた（Table 4-1）．ELISA 間接法によって粳性品種の *Wx* タンパク質を定量した結果，Wx-H 型品種群に属する品種の *Wx* タンパク質含量は，Wx-M 型品種群に属する品種のそれに比べて，5～10 倍とはるかに多か

った（Fig. 4-8）. Sano（1984）は，イネの *Wx* 座に *Wx* タンパク質の生成量を異にする複対立遺伝子が存在することを明らかにし，*Wx* タンパク質含量の多い印度型品種の Wx^a 遺伝子が，*Wx* タンパク質含量の少ない日本型品種の Wx^b 遺伝子に比べ，胚乳澱粉中の見かけのアミロース含有率を高めることを報告した．本実験のウエスタンブロッティング法によって分類した Wx-H 型品種群と Wx-M 型品種群は，それぞれ Sano（1984）が報告した *Wx* 座の複対立遺伝子 Wx^a と Wx^b をそれぞれにもつ品種群に対応するものと考えられる．

ところで，*Wx* タンパク質含量と見かけのアミロース含有率との間には，直接的な比例関係のあることが報告されている（Sano *et al*. 1985a，植松ら 1991）．本実験では，ELISA 間接法によって定量した粳性品種の *Wx* タンパク質含量と見かけのアミロース含有率との間には直線的な比例関係はみられなかった．しかし，Wx-H 型品種群（Wx^a）と Wx-M 型品種群（Wx^b）に分けることで，それぞれの品種群について，一次回帰直線を引くことができた（Fig.4-8）．Villareal and Juliano（1989）は，*Wx* タンパク質を SDS-PAGE 分析後，デンシトメーター

で染色程度を測定し，*Wx* タンパク質含量と見かけのアミロース含有率との間に *Wx*^{a} 群と *Wx*^{b} 群それぞれに直線的な比例関係があることを報告している．このように *Wx* タンパク質含量と見かけのアミロース含有率との間に 2 つの品種群に分けて比例関係がみられたことは，アミロース生合成を行う顆粒性酵素の活性の強さが，両品種群でかなり差があると考えられる．さらに，両品種群内にも *Wx* タンパク質含量に変異がみられた．このことは，*Wx*タンパク質含量の差が *wx* 遺伝子座の単一の遺伝子の作用によって決定されるばかりでなく，調節遺伝子のような様々な遺伝子の相互作用の結果によることを示唆するものと考えられる（Sano *et al.* 1985b）．

一方，amylose extender 変異系統の *Wx* タンパク質含量は，原品種の「金南風」とほとんど差がなかった（Fig.4-8）．第 2 章で，amylose extender 変異系統がアミロペクチンの構造変異体である可能性が示唆されたが，本実験の結果は，amylose extender 変異系統ではアミロースの増加はなく，ヨウ素呈色度の増加が，アミロペクチンの構造変化によることを明示している。

このように，ELISA 間接法はウエスタンブロッティン

グ法に比べて *Wx* タンパク質の定量が容易で，かなり微量の試料で *Wx* タンパク質を検出できる．また，イムノプレートとイムノリーダーの併用によって，多数の検体の同時分析が可能となる．従って，今後見かけのアミロース含有率の変異を調べるうえで，ELISA 間接法は有効な手段の1つになるものと考える．

第５章　登熟温度がイネ胚乳澱粉の諸特性に及ぼす影響

遺伝資源を有効に活用するためには，それらの特性を正しく評価する必要がある．形質は遺伝子と環境との相互作用によって発現する．従って，遺伝子と環境の関係を正確に把握することは，遺伝資源の評価，活用にとって最も重要である．

気象や土壌施肥などの栽培条件の違いは，イネ胚乳の成分や品質に大きな影響を及ぼす．特に出穂後の登熟温度は胚乳中の澱粉特性と密接な関係があることが指摘されている（木戸・梁取 1968，平ら 1979，Tamaki *et al*. 1989a，1989b など）．

本章では，*Wx* タンパク質含量の差によって分類した3品種群を用い，制御温度環境下および自然環境下での種子胚乳澱粉に関する諸特性の変動について調査し，これら品種群の登熟温度に対する発現の差異について検討した．

第1節　登熟温度が澱粉特性に与える影響

登熟温度が澱粉特性に与える影響を正確に把握するためには，制御環境下で諸形質の発現を調べる必要がある．

本節では，*Wx* タンパク質含量によって分類した3品種群に属する数品種を，人工的に温度を制御した環境下で登熟させ，胚乳澱粉の見かけのアミロース含有率，*Wx* タンパク質含量，糊化温度，アルカリ崩壊度，水溶性全糖含有率の各項目に関して，登熟温度の影響を検討した．

1．材料および方法

供試材料

糯性3品種および粳性3品種（Wx-H型：2，Wx-M型：1）計6品種を供試した．対照として，粳性品種「金南風」（Wx-M型）と「金南風」由来の糯性突然変異系統EM 21（*wx*）を用いた（Table 5-1）．

温度処理

各品種および系統は，1988年に九州大学農学部附属農場において栽培し，出穂直後，株をポットに移植し，九州大学生・物環境調節研究センター内の特殊環境調節実験

Table 5-1. Materials grown at different temperatures during ripening.

Variety	Origin	Amylose type
HO 639	South China	none (*wx*)
HO 829	South Korea	none (*wx*)
HO 842	Japan	none (*wx*)
HO 508	Taiwan	high (Wx-H)
HO 1144	South China	high (Wx-H)
LO 226	Japan	medium (Wx-M)
EM 21	*wx* mutant	none (*wx*)
Kinmaze	Original variety	medium (Wx-M)

室において登熟させた．環境条件は，自然光下で 20℃，25℃および 30℃の 3 段階の温度を設定し，相対湿度は 70％とした．

λmaxおよびアミロース含有率の測定

各温度処理区の完熟種子を収穫し，第 2 章第 1 節の方法に準じて搗精，粉砕を行い，白米の粉砕試料を得た．さらに，第 2 章第 2 節の方法に準じて試料をアルカリ糊化し，ヨウ素－ヨウ化カリウム溶液を加えた後，吸収スペクトルをとり，そのλmaxを測定した．アミロース含有率は，第 2 章第 2 節に従ってλmaxから算出した．

Wx タンパク質の定量

第 4 章の方法に準じて，Wx タンパク質をウエスタンブロッティング法と ELISA 間接法によって定量した．20℃で登熟した粳性の「金南風」の反応量を 1，糯性の EM 21 の反応量を 0 とし，その相対比から各品種の Wx タンパク質含量を求めた．

糊化開始温度の測定

糊化開始温度の測定は，佐藤ら（1988）の方法に従って行った．すなわち，白米の粉砕試料約 3 mg を石英の 1 cm 角セルに入れ，精製水約 3 mℓ を加え，島津製作所

製電子冷熱式セル温度コントローラーで加熱した．糊化の過程の測定波長は，最も変化を認めやすい 372 nm を用いた（貝沼ら 1968）．測定は，島津製作所製自記分光光度計 UV-260 を用いて行った．なお糊化開始温度は，加熱後溶液の白濁化によって 372 nm の吸収が最高点に達した温度とした．

アルカリ崩壊度の判定

白米を 1.7% 水酸化カリウム溶液に浸漬し，一夜放置した後，肉眼によって崩壊度を調査した．崩壊度は，Little *et al.*（1958）の方法に準じて 1 ～ 7 階級に分類した．階級値が大きいものほど崩壊し易いものであることを示している．

水溶性全糖の定量

精白米粉 200 mg に精製水 20 mℓ を加えて混合した後，上清を濾過，採取した．この操作を 2 回行った後，抽出液を 100 mℓ に定容した．この抽出液の一定希釈液を試料液とし，フェノール硫酸法（Dubois *et al.* 1956）を用いて，グルコース量として水溶性全糖を定量した．

2. 結　　果

(1) 糯性品種群に対する登熟温度の影響

異なる温度条件下で登熟した糯性品種の澱粉特性をTable 5-2に示した．HO 639のλ_{max}は，20℃区で522.4 nm，25℃区で526.7 nm，30℃区では533.6 nmと高温条件下で登熟したものほど高い値を示し，20℃区と30℃区とのλ_{max}の差は約10 nmであった．EM 21を含む他の供試品種もHO 639と同様の傾向を示した．しかし，Wxタンパク質は，各温度処理区について，全品種，系統とも検出されなかった．Wxタンパク質は，アミロース合成酵素であることから（Sano 1984），供試した糯性品種ではアミロースは温度条件に関係なく生合成されていないと推察された．このことは登熟温度の差異による胚乳澱粉のλ_{max}の変化が，アミロースの増減ではなく，アミロペクチンの鎖長の変化などアミロペクチンの構造が温度の影響を受けることを示している．

澱粉の糊化特性については，全品種，系統とも高温条件下で登熟したものほど糊化開始温度は高くなった．また，アルカリ崩壊性も高温条件下で登熟したものほど崩壊度の階級値は小さくなり，崩壊は難と判定された．糊

Table 5-2. Some properties of endosperm starches of glutinous rice varieties grown at different temperature during ripening.

Variety	Temperature (°C)	Apparent amylose content[1] (%)	λ_{max} (nm)	*Wx* protein[2]	T.I.G.[3] (°C)	Alkali spreading score[4]	Water soluble total sugars (%)
	20	0.0	522.4	0	43	4	12.1
HO 639	25	1.1	526.7	0	47	4	9.8
	30	4.8	533.6	0	59	2	7.7
	20	0.0	524.6	0	42	5	15.2
HO 829	25	2.5	529.3	0	47	4	12.3
	30	4.7	533.5	0	57	2	12.7
	20	0.0	522.8	0	39	5	14.0
HO 842	25	1.8	528.0	0	45	4	9.3
	30	3.7	531.6	0	59	2	10.8
	20	0.0	518.8	0	41	7	25.8
EM 21	25	0.0	524.7	0	45	4	18.8
	30	3.5	531.2	0	55	2	17.0

1) Apparent amylose content was estimated from the λ_{max} value.
2) *Wx* protein was assayed by the western-blotting.
3) Temperature at initiation of gelatinization
4) Scored by the method of Little *et al.* (1958)

化開始温度は，どの温度処理区においても品種間差はなかった．アルカリ崩壊性についても同様の傾向がみられた．

水溶性全糖の含有率は，どの品種も 7 %以上の高い含有率を示し，低温条件下で登熟した品種ほど高い含有率を示す傾向にあった．

（２）粳性品種に対する登熟温度の影響

異なる温度条件下で登熟した粳性品種の澱粉特性を Table 5-3 に示した．

① Wx-H 型品種群

HO 508 と HO 1144 の各温度処理区の λ_{max} 値は，576 ～ 581 nmの範囲内にあって，温度処理区間の差はほとんどみられなかった．また，Wx タンパク質含量は 9 前後で，温度処理区間の差はみられなかった．このことから，Wx-H 型品種群に属する HO 508 と HO 1144 の λ_{max} は，登熟温度の影響を受けないと考えられる．一方，アルカリ崩壊度は 2 と両品種とも崩壊し難く，かつ各温度処理区間で差はみられなかった．これに対し，糊化開始温度は糯性品種と同様 Wx-H 型粳性品種においても高温条件下で高くなる傾向にあった．

Table 5-3. Some properties of endosperm starches of non-glutinous rice varieties grown at different temperatures during ripening.

Variety	Temperature (°C)	Apparent amylose content[1] (%)	λ_{max} (nm)	Wx protein[2]	T.I.G.[3] (°C)	Alkali spreading score[4]	Water soluble total sugars (%)
HO 508	20	28.6	578.1	9.5	58	2	1.7
	25	27.6	576.3	9.7	60	2	2.0
	30	27.6	576.3	8.7	65	2	2.0
HO 1144	20	30.0	580.7	9.6	60	2	1.8
	25	27.6	576.4	8.2	65	2	1.7
	30	27.9	576.8	9.7	67	2	2.1
LO 226	20	17.0	556.4	1.1	47	6	4.4
	25	16.2	555.0	0.7	51	4	3.3
	30	11.3	545.8	0.6	55	2	7.2
Kinmaze	20	19.1	560.4	1.0	48	7	3.1
	25	15.0	552.7	0.6	52	4	3.7
	30	12.8	548.6	0.3	55	2	5.3

See the footnotes in Table 5-2.

水溶性糖含有率は，1.7～2.1%と糯性品種群のものよりかなり低下し，登熟温度差による糖含有率の変動幅も小さかった．また，高温条件下で登熟したものほど高い糖含有率を示す傾向にあった．

② Wx-M 型品種群

LO 226 の λ_{max} 値は，20℃区で 556.4 nm，25℃区で 550.0 nm，30℃区で 545.8 nm と高温条件下で登熟したものほど低下し，見かけのアミロース含有率は低く評価された．また，Wx タンパク質含量は，高温条件下で登熟したものほど少なくなる傾向にあった．対照品種「金南風」も同様の傾向を示した．Wx タンパク質の高温条件下での減少は，アミロース生成量の減少を示すものと考えられる．従って，λ_{max} の高温条件下での低下は，真のアミロース含有率の低下を示していると考えられる．

LO 226 と「金南風」の糊化開始温度は 47～55℃の範囲内にあり，Wx-H 品種群の HO 508 と HO 1144 でみられた糊化開始温度のそれぞれの最低温度の 58℃と 60℃より低かった．糊化開始温度は，高温区で登熟したものほど高くなり，糯性品種群や Wx-H 品種群でみられた結果と一致した．加えて，アルカリ崩壊度は高温条件下で

登熟したものほど，難となる傾向がみられた．

水溶性糖含有率は，3.1～7.2%の範囲内にあり，Wx-H型品種群の2倍以上の含有率を示した．登熟温度に対する影響は，Wx-H型品種群と同様に，高温条件下で登熟したものほど高い値を示す傾向にあった．

以上，*Wx*タンパクの含量の差によって分類した3品種群に属する数品種を出穂後人工的に制御した温度条件下（20℃，25℃および30℃）で登熟させ，登熟温度に対する各品種群の反応の違いを調査した結果，糯性品種群とWx-M型品種群の諸特性が，登熟温度の変化に応じて大きく変動することが明らかになった．これに対し，Wx-H型品種群の諸特性は，登熟温度の変化に対して変動が小さく，比較的安定した反応を示すことが判明した．

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

前節では，胚乳中の*Wx*タンパク質含量の違いによって分類した品種群間で登熟温度に対する反応が，異なることを明らかにした．

しかしながら，既存の品種群の出穂期の幅は広く，登熟温度に対する反応は品種群内でも異なることが考えられる．そこで本節では，第３章で供試した保存品種の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を調査した．

1．材料および方法

供試品種

第３章で供試した品種のうち，1984 年に収穫した 1,298 品種について出穂期と見かけのアミロース含有率の関係を調査した．品種毎の出穂後の登熟温度は，1984 年福岡県気象月報の平均気温のデータから得た．

Wx タンパク質の検出

第４章第２節の方法に従って，Wx タンパク質をウエスタンブロッティング法によって検出した．

2．結　　果

（１）供試品種の Wx タンパク質の含量の差による分類

供試品種の Wx タンパク質をウエスタンブロッティング法によって検出した結果を地域別に Table 5-4 に示

した.

Wx タンパク質が全く検出されなかった 210 品種は，糯性品種と判定された．また，これら 210 品種は，肉眼観察によってもすべて糯性であることが確認された．

Wx タンパク質が検出された粳性品種は，バンドの染色程度に基づき，濃く染色される Wx-H 型品種群（312 品種）と薄く染色される Wx-M 型品種群（776 品種）に分類した．また，地域別に品種数を比較すると，南アジア，東南アジア，台湾および中国南部では Wx-H 型の占める割合が高かった．これに対し，中国北部，朝鮮半島およびロシアでは，Wx-M 型品種群が占める割合が高く，日本では，Wx-M 型品種群の占める割合が高かった．

（２）出穂期と登熟温度との関係

澱粉中のアミロースは，開花 5 日目以降から徐々に増加を始め，開花後 19 ～ 23 日で最大量となる（Asaoka *et al*. 1985b）．そこで，出穂期以後 20日間の温度の平均を登熟期間の温度（登熟温度）とした．供試した品種の出穂期の幅は，7 月 18 日～ 9 月 27 日の範囲内にあった．供試品種の出穂期と登熟温度との関係を Fig. 5-1 に示した．登熟温度は 7 月下旬から 8

Table 5-4. Materials examined in relationships between average temperature after heading date and apparent amylose content.

Area	Number of varieties		
	Glutinous	Non-glutinous	
	gruop	Wx-H group	Wx-L group
South Asia & Southeast Aisa	3	78	3
Taiwan	0	21	4
South China	8	53	12
North China	5	37	21
South & North Korea	67	50	83
Russia	6	53	35
Japan	121	20	618

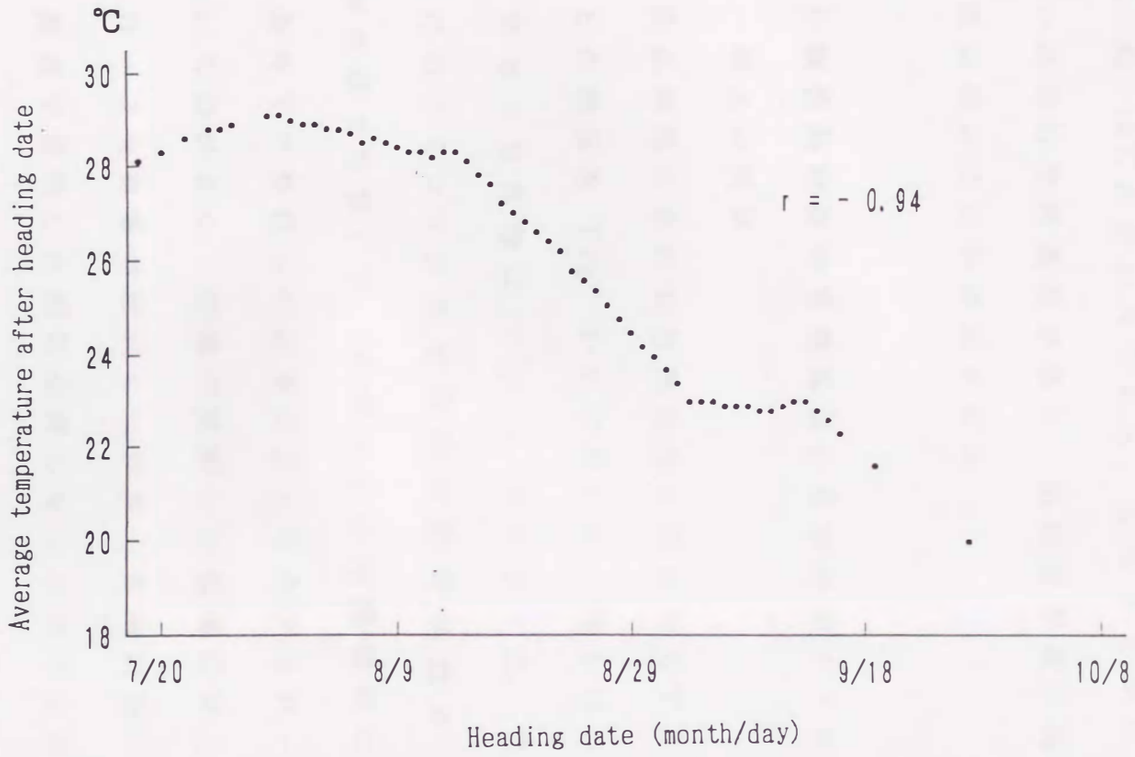

Fig. 5-1. Relationship between heading date and average temperature for 20 days after heading date at Fukuoka in 1984.

月 3 半旬までは，ほぼ 28 ～ 29℃でほとんど変化しなかったが，それ以降温度は低下し，9 月末には 20℃となり，約 10℃の差がみられた．このことから，出穂期の早い品種は登熟温度が高く，出穂期が遅い品種ほど登熟温度は低いことが確認された．

（3）糯性品種群の登熟温度と見かけのアミロース含有率との関係

糯性品種群における登熟温度と見かけのアミロース含有率との関係を Fig. 5-2 に示した．見かけのアミロース含有率の変異幅は 0 ～ 6.7%であった．登熟温度と見かけのアミロース含有率間の相関係数は r = 0.57（1%水準で有意）で，両者は正の相関関係にあった．高温条件下で登熟した品種は見かけのアミロース含有率が高いものが多く，低温で登熟した品種には，見かけのアミロース含有率の低いものが多くみられた．この結果は，高温で登熟した糯性品種の見かけのアミロース含有率が上昇した前節の実験結果とよく一致した（Table 5-2）．

一方，供試品種の中で日本の品種の見かけのアミロー

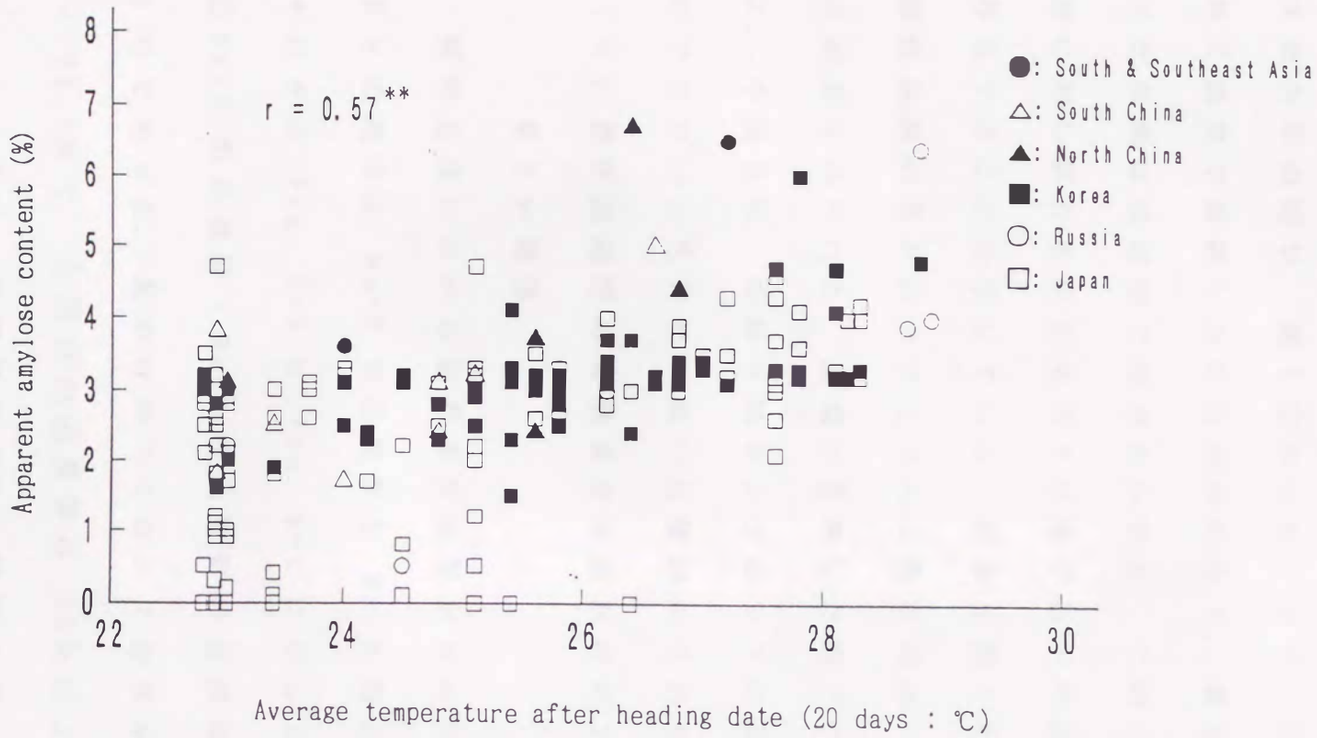

Fig. 5-2. Relationship between average temperature after heading date for 20 days and apparent amylose content in glutinous rice varieties (N=210).
**:Significant at the 1% level.

ス含有率の幅が，最も広かった．また，日本の品種では，同じ温度で登熟したにもかかわらず，見かけのアミロース含有率は品種間で差がみられた．このことは，登熟温度に対し異なる反応を示す品種が日本の品種の中に多数存在することを示している．日本を除く他の地域では，糯性品種の見かけのアミロース含有率は，2％以上のものが多くみられた．高温で登熟した南アジア，東南アジア，中国北部，朝鮮半島およびロシアの品種に，見かけのアミロース含有率の高い品種がみられた．

（4）粳性品種群の登熟温度と見かけのアミロース含有率との関係

粳性品種における登熟温度と見かけのアミロース含有率との関係を Wx-H 型品種群と Wx-M 型品種群に分け，それぞれ Fig. 5-3 と Fig. 5-4 に示した．

① Wx-H 型品種群：Wx-H 型品種群の登熟温度の差は，約 8 ℃であった．見かけのアミロース含有率の幅は，14.6 ～ 33.3％で，大部分の品種群は 25％以上の高いものであった．特に，登熟温度の低い品種の中に，見かけのアミロース含有率が 25％以上のものも多かった．これに対し，登熟温度の高い品種群の見かけのアミロース含有

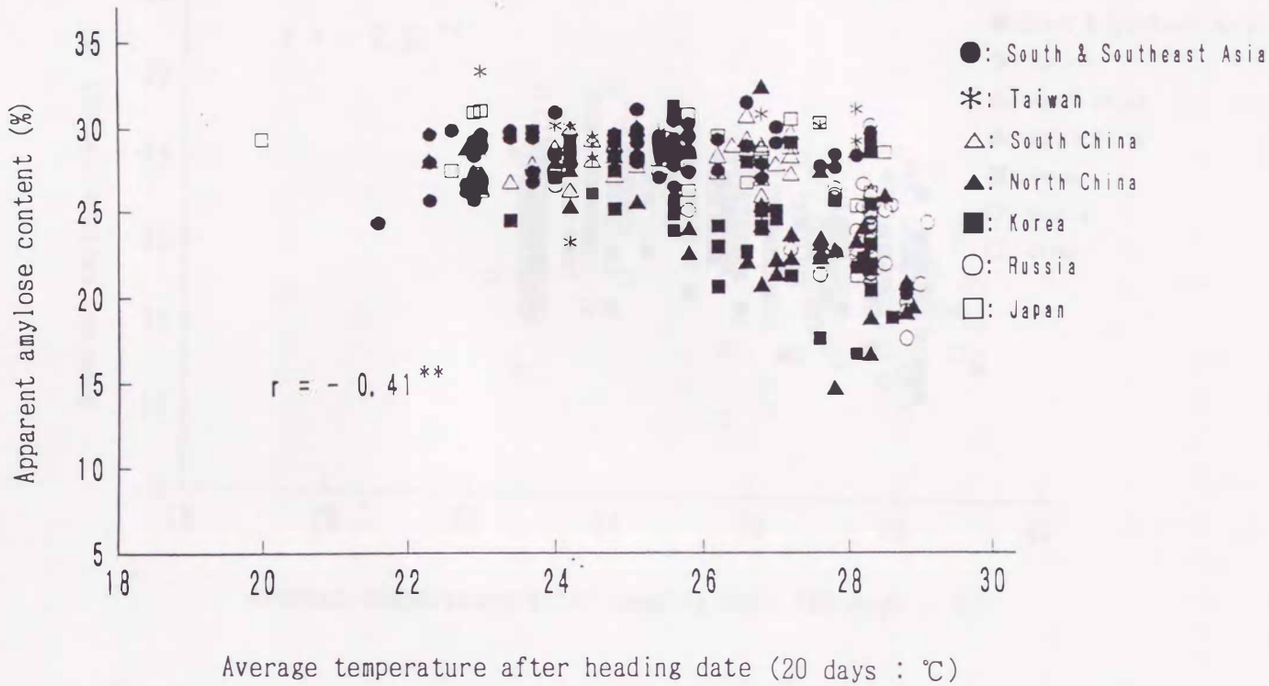

Fig. 5-3. Relationship between average temperature after heading date for 20 days and apparent amylose content in non-glutinous rice varieties of Wx-H group (N=312).

**:Significant at the 1% level.

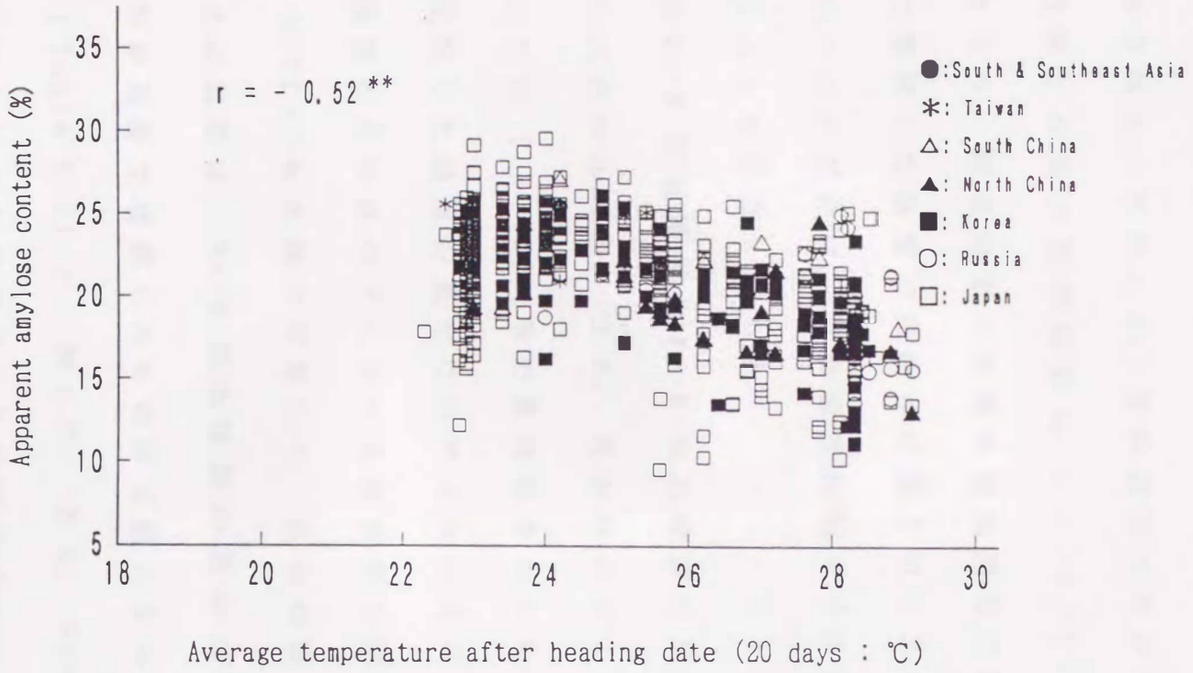

Fig. 5-4. Relationship between average temperature after heading date for 20 days and apparent amylose content in non-glutinous rice varieties of Wx-M group (N=776).

**:Significant at the 1% level.

率は南アジアや東南アジアの品種では高いが，中国北部，朝鮮半島およびロシアの品種に 25％以下の低いものがみられた．そのため，登熟温度と見かけのアミロース含有率との間の相関係数は r = -0.41（1％水準で有意）となり，両者の間には負の相関関係が認められた．高温で登熟した品種の見かけのアミロース含有率の差は大きく，このことは，登熟温度に対する反応が品種間で異なることを示唆している．

② Wx-M 型品種群：Wx-M 型品種群の登熟温度には，約 6℃の差があった．また，見かけのアミロース含有率については 9.6～29.6％の変異幅を示した．概して，高温で登熟した品種の見かけのアミロース含有率は低く，登熟温度と見かけのアミロース含有率の間の相関係数は r= -0.52（1％水準で有意）で，負の相関関係が認められた．この結果は，Wx-M 型品種群の見かけのアミロース含有率が高温で登熟したものほど低くなった前節の実験結果（Table 5-2）と一致した．また，Wx-H 型品種群と同様に登熟温度が同じでも見かけのアミロース含有率は，品種間でかなりの差異が認められた．このことは，登熟温度に対する反応に品種間差異があることを示している．

以上の結果から，糯性品種群の見かけのアミロース含有率は，高温で登熟したものは高く，低温で登熟したものは低い傾向にあることが明らかとなった．これに対し，粳性の Wx-M 型品種群の見かけのアミロース含有率は，高温で登熟したものは低く，低温で登熟したものは高い傾向が認められ，粳性品種群と登熟温度に対する反応は異なった．また，Wx-H 型品種群の登熟温度に対する反応は，概ね第 1 節の結果と同様に登熟温度が異なっても安定していることが確認されたが，高温で登熟した Wx-H 型品種群の一部には，見かけのアミロース含有率が低いものもみられた．このことは，Wx-H 型品種について，アミロース含有率に関する幅広い変異が存在することを示している．前節では，Wx-H 型品種は登熟温度の影響を受けないと考えられた．しかし，この Wx-H 型品種でみられる見かけのアミロース含有率の低い品種が，見かけのアミロース含有率が高い品種同様登熟温度の影響を受けにくいか，あるいは，Wx-M 型同様登熟温度の影響を受けるか，今後の検討事項である．

第3節　考　　察

登熟温度がイネ胚乳中の諸特性に及ぼす影響については多くの報告がある．なかでも登熟温度が見かけのアミロース含有率や糊化特性に対して及ぼす影響ついてはこれまで詳しく調べられている．

イネ胚乳澱粉の見かけのアミロース含有率については，高温下で低下し（鈴木ら 1966，Heu *et al.* 1976），またイネ胚乳澱粉の糊化温度は，高温下で上昇する（檜作 1977，Asaoka *et al.* 1984）など，登熟温度とアミロース含有率や糊化温度との間には，相関が認められている．一方，佐野・勝又（1985）は，*wx* 遺伝子座の複対立遺伝子 Wx^a と Wx^b をもつ系統の登熟温度に対するアミロース含有率の変動が互いに異なることから，登熟温度に対する反応が遺伝子間で異なることを報告している．また，*de la* Cruz *et al.*（1989）も，登熟温度に対するアミロース含有率や糊化温度の変動が品種間で異なることを明らかにしている．このように，登熟温度と見かけのアミロース含有率や糊化特性との関係については，一定の傾向はみられない．

本章では，*Wx* タンパク質含量の差によって分類した糯性品種群，Wx-H 型品種群および Wx-M 型品種群について，見かけのアミロース含有率，糊化特性および水溶性全糖含有率の変動について登熟温度に対する反応を明らかにした．

糯性品種群の見かけのアミロース含有率（λ max）は，高温条件下で高くなる傾向にあった（Table 5-2）．これらの糯性品種からは *Wx* タンパク質が検出されなかったことから，アミロースは生合成されていないと考えられる．従って，糯性品種群にみられる見かけのアミロース含有率（λ max）の差異は，アミロペクチンの構造変異によって生じた可能性が高い．Asaoka *et al.*（1984，1985a，1985b）は，アミロペクチンの鎖長について低温で登熟したものは短鎖が多く，高温条件下で登熟したものに長鎖が多く含まれることを報告した．高温条件下では長鎖が多くなることによって，ヨウ素と澱粉の結合量が増加し，その結果λ max も高くなると考えられる．このことは，糯性品種群の見かけのアミロース含有率（λ max）が，高温条件下の登熟で上昇した本実験の結果を支持するものである．

粳性品種でもアミロペクチンの長鎖は高温条件下の登熟で多くなると考えられる．本実験では，「金南風」由来の糯性変異系統 EM 21 の λ_{max} は，高温条件下で高くなったのに対し，粳性の「金南風」の λ_{max} は，高温下の登熟で減少した．また，アミロース合成酵素である *Wx* タンパク質の発現量は低下した．このことは，高温条件下では，実際にアミロースの生成量が低下したこと示している．従って，粳性の Wx-M 型品種群でみられた高温条件下の登熟での見かけのアミロース含有率の低下は，アミロペクチンの長鎖の増加を伴い，実際のアミロース含有率はさらに低くなっていると推察される．

このような見かけのアミロース含有率が登熟温度の違いによって変動する原因として，①アミロースとアミロペクチンの生合成能，例えば，生合成速度の温度依存性が両者で異なる，② *Wx* タンパク質のアミロース生合成能の温度依存性が，Wx-H 型と Wx-M 型で異なる，③集積部位であるアミロプラスト内のアミロースとアミロペクチン集積速度が異なるの３点が考えられよう．①と②については酵素レベルでの詳細な解析が必要になるものと考えられる．③については，Asaoka *et al*.（1985b）が

報告したアミロースとアミロペクチンの集積パターンの違いによって説明される．すなわち，粳性品種の登熟期における胚乳中のアミロースとアミロペクチンの集積の経時的変化については，アミロペクチンが開花後 5 日頃から直線的に増加し，開花 20 日後最大量に達するのに対し，アミロースが開花 5 日以降徐々に増加を始め，開花 20 日後頃に最大量に達する．従って，高温条件下では，登熟初期にアミロペクチンが急激に蓄積されるため，蓄積速度の遅いアミロースの含有率は，結果的に低くなると考えられる．

一方，Wx-H 型品種群に多くが属すると考えられる印度型品種群の登熟速度は，日本型品種群（Wx-M 型品種群）より速いことが報告されている（Nagato and Chaudhry 1969，長戸ら 1975，Yoshida 1981，笹原ら 1982）．Wx-H 型品種群では登熟速度が速いために，アミロプラスト内の両成分の集積速度に差がないことが考えられる．この点については今後の検討が必要であろう．

アルカリ崩壊性や熱糊化性など澱粉の糊化特性に対し，登熟温度は，米の炊飯特性や加工特性に強く影響することが知られている（Juliano 1982）．本実験では，糯性

品種群，粳性品種群とも低温で登熟した胚乳澱粉に比べて，高温で登熟したもののほうがアルカリ崩壊性は難と判定され，また糊化温度は高くなった（Table 5-2，5-3）．このことは，高温で登熟した胚乳澱粉が糊化し難くなることを示している．江幡（1968）や Asaoka *et al*.（1984）も類似の結果を得ている．一方，アルカリ崩壊性と糊化温度については，糯性品種，Wx-H 型品種および Wx-M 型品種の各群内で，品種間差はみられなかったが，各品種群間には品種間差が認められた．このことは，アルカリ崩壊性と熱糊化性に関わる何らかの遺伝変異の存在を示すものと考えられる．

穀粒中に含まれる糖の含量も澱粉の構造的変化とともに食味や調理・加工特性に大きく影響することが知られている（柳瀬ら 1982，大坪ら 1988）．糯性品種群の水溶性全糖の含有率は，粳性品種群のそれに較べて著しく高かった（Table 5-3）．また，登熟温度の違いによる水溶性全糖の含有率の変化は，澱粉の生合成経路を考えるうえで注目される．澱粉生合成の原料は転流で運ばれてくるショ糖とされている（Murata *et al*. 1966）．また、ショ糖は，ショ糖合成酵素を介して澱粉生合成の基

質として利用される（Murata *et al*. 1964, Murata and Akazawa 1966）．糯性品種群の水溶性全糖の含有率が粳性品種群に比べて高かったことは，アミロースが生合成されていないために転流されたショ糖が利用されずに多く残っていることが考えられる．粳性品種については，Wx-H 型品種群の水溶性全糖の含有率は，Wx-M 型群のそれに比べて低かった（Table 5-3）．供試した Wx-H 型品種群の見かけのアミロース含有率は，Wx-M 型品種群のそれに比べて低いことから，Wx-H 型品種群がショ糖を効率的に利用したことが考えられる．また，Wx-M 型品種群では，高温下で *Wx* タンパク質含量が減少すると澱粉中の水溶性全糖の含有率は増加した．このことは，澱粉中のアミロース生合成量が減少するのに伴って，未利用基質のショ糖が増加したことを示唆している．

糯性品種群について，低温条件下の登熟で水溶性全糖の含有率が増加したことは，アミロペクチンの生合成にあたって低温条件下の登熟では，基質が有効に利用されなかったことが原因と考えられる．一方，粳性品種群では Wx-M 型品種群の水溶性全糖の含有率が，高温で登熟したものほど高く，糯性品種群と逆の傾向にあった．し

かし，Wx-H 型品種群の水溶性全糖の含有率は登熟温度の影響を受けなかった．Wx-M 型品種群の場合，高温下では見かけのアミロース含有率が低下するために澱粉生合成基質の利用が減り，水溶性全糖の含有率が高くなったことが考えられる．これに対し，Wx-H 型品種群では見かけのアミロース含有率に変化がなく，澱粉生合成基質の供給に登熟温度が影響しなかったため，水溶性全糖の含有率に差がみられなかったと考えられる．

以上のように，登熟温度の違いによる澱粉特性の変化に関して，糯性品種群，Wx-H 型品種群および Wx-M 型品種群で異なることが明らかとなった．すなわち，登熟温度を制御した条件下では，Wx-H 型品種群の諸特性の変動が，Wx-M 型品種群のそれに比べて小さかった．このことは，供試した Wx-M 型品種では，見かけのアミロース含有率に関して，温度の影響を受け易いのに対し，Wx-H 型品種群の登熟温度に対する反応が安定したものであることを示している（Table 5-3）．Wx-M 型品種の穀粒品質に地域間差がみられ，また，年次変動も大きいことなど知られているが，Wx-M 型品種の品質不安定性は，Wx^{b} 遺伝子の発現の温度依存性に起因すると考えら

れる．Wx-H 型品種群では，中国北部，朝鮮半島およびロシアの品種に，見かけのアミロース含有率の低いものが多数みられた（Fig. 5-3）．Wx^a 遺伝子の発現の温度依存性は低いことから，これらの品種が見かけのアミロース含有率に関して登熟温度に安定した反応を示せば，育種上有用な素材になると考えられる．