

<平成 21 年度助成>

## 米の食味と機能性の向上をめざした日本晴変異体米の 作出と物性発現機構

阿久澤 さゆり

(東京農業大学 応用生物科学部)

### 1. 緒 言

澱粉は、植物による光合成の最終産物であり、それは植物が成長し、さらに種として次世代を残すシステムによる産物でもある。私たちは、植物が合成・蓄積した種や根茎を採取・収穫し、栄養(炭水化物)源として摂取するのみではなく工業製品としても古くから利用している。

日本の1年間の澱粉の需要量は、約260万トン(平成22年、農林水産省調べ)であるが、大部分が異性化糖や水あめなどの糖化製品とし利用され、供給量の大部分はトウモロコシ澱粉が占めている。また、各澱粉の特性を利用して食品に利用されているものは、経験によって植物の種類が選択<sup>1,2)</sup>されているため、目的としている澱粉の特性(糊化・老化特性、糊液の物性)が、どのような分子構造の違いによって発現しているのかは、いまだに明らかにされていない。

私たちの主食である米は、澱粉がイネ胚乳成分の約80%を占めており、澱粉の特性が、炊飯米の食味や形状、米粉の加工特性に大きく影響を及ぼしている。そのため、食味の改善および利用拡大を目的とした品種改良や、新しい特性を持つ米の開発をめざして、イネ胚乳澱粉の生合成に関与する酵素を欠損させた変異体の作出により、米および米澱粉の構造を変化させ、それらの物性に関する研究が行われ報告されている<sup>3)</sup>。

澱粉は、約80%を占めるアミロペクチンを主成分とし、直鎖を形成する $\alpha$ 1,4グルコシド結合と、分岐構造を形成する $\alpha$ 1,6グルコシド結合が繰り返

返されてクラスター構造が形成されているポリグルカンである。この、クラスターを構成しているポリグルカンの分岐数、分岐の位置、それぞれの構成鎖長とその割合などが、植物ごとに、合成酵素の発現時期によって制御されて、澱粉が合成されていると考えられている。イネの胚乳澱粉を合成するためには、基質供給酵素(AGPase)、枝つくり酵素(Starch Branching Enzymes;BE)、直鎖伸長酵素(Soluble Starch Synthases;SS)、枝切り酵素(Starch Debranching Enzymes;DBE)など多くの酵素が関与しており、澱粉合成の過程を知るためには、特定のアイソザイム1つを欠失させ、合成された澱粉構造の変化から、欠失したアイソザイムの機能を推測することが出来る<sup>4)</sup>。また、このような澱粉合成酵素を欠損させて作出した変異体米は、野生型とは異なるユニークな澱粉構造を示す変異体が多く、澱粉糊液の物性と澱粉構造の関係を知るためにも興味深い対象である。さらに、遺伝子組み換えではないため、野外での大量な栽培が可能であり、試料の収集やその後の実用化には有利な点もある。

私たちは、澱粉の構造とレオロジー特性の相互関係を明らかにし、澱粉性食材および澱粉の利用性の向上をめざして研究を行っている。その中でも、本研究では、澱粉合成に重要な役割を担うStarch synthase アイソザイムの1つであるSSIIIaが欠損した変異体を作成し、その胚乳澱粉を分離・精製して、澱粉の分子構造および糊液の粘弾性を検討し、米の新しい機能性の付与とその米粒および澱粉の利用性について検討した結果を

報告する。

## 2. 試料および実験方法

### 2.1 試料

日本晴(野生型)と日本晴にレトロトランスポゾン Tos17 が挿入され SSIIIa 活性が完全に欠損したイネ(SSIIIa 変異体)を作出した。脱穀し精白した後、UDY サイクロンサンプルミル(株式会社ニレコ社製)を用いて粉碎して精白米粉を得た。さらに、精白米粉を 0.1% 水酸化ナトリウム溶液に懸濁させ、冷アルカリ法で澱粉を分離精製して、日本晴および SSIIIa とともに、①米粒、②精白米粉、③分離澱粉を測定用試料とした。

### 2.2 精白米(生)および炊飯米の形態観察と破断特性

精白米および炊飯米の米粒の長さ、幅、厚さをノギスで測定した。炊飯方法は、米粒を純水で 4 ~ 5 回洗浄し、米粒重量の 1.5 倍量の水を加えて 30 分間浸漬した。その後、炊飯釜を用いて通電開始から終了までを 25 分とし、通電終了後 15 分放置して破断測定用試料とした。

破断測定は、山電(株)製 RheonerII 33005S で、治具は楔形プランジャー No.49 を用いて垂直方向に等速圧縮破断を行った。容器中央から炊飯米を一粒取り出し、測定台に横向きに置いて高さを測定後、圧縮スピード 1mm/sec、接触面積: 2mm<sup>2</sup>、格納ピッチ: 0.02、98% 圧縮により得られた応力-歪曲線から破断荷重(N)、破断歪率(%)を算出した。なお、明確な破断点を示さない破断曲線については、延性破断とし、曲線が平衡になった点を破断荷重とした。

### 2.3 精白米粉および分離精製澱粉のペースト特性と熱特性

ラピッドビスコアナライザー(New port scientific Pty. Ltd. 製、Rapid Visco Analyzer: RVA)を用いて、精白米粉および分離澱粉のペースト特性を測定した。全量 26g、6% (w/w 無水物換算) 濃度

として 30 分間膨潤させた。50 ~ 95℃ まで昇温 (6℃ /min) して 95℃ で 5 分間保持した後、再び 50℃ まで降温 (6℃ /min) して粘度曲線を得た。解析ソフトは ThermoLine for Windows (Newport Scientific Pty.Ltd. 製) を用い、粘度上昇開始温度、最高粘度、最低粘度、最終粘度を求めた。

示差走査熱量計 (DSC: SII 社製 DSC6100) による熱特性は、70  $\mu$ l 容銀容器に 30% 濃度 (w/w 無水物換算) になるように純水を入れて膨潤させた。リファレンスに純水を用いて、25 ~ 150℃ の温度範囲を昇温速度 2℃ /min で測定し、得られた吸熱曲線から糊化開始温度 ( $T_0$ )、糊化ピーク温度 ( $T_p$ )、糊化終了温度 ( $T_c$ ) を求め、この 3 点で囲まれた面積を吸熱エンタルピー ( $\Delta H$  mJ/mg) とした。

### 2.4 イオン交換-パルスアンペロメトリー法によるアミロペクチンの単位鎖長分布の測定

分離澱粉 30mg を Pseudomonas イソアミラーゼ (林原生物科学研究所製) で 18 時間以上枝きり反応を行い、Dionex 社製 DX-500 を用いてアミロペクチンの鎖長分布を測定した。

分離カラムは Dionex Carbopack PA-1、検出器は ED-40 を用いて、150mM 水酸化ナトリウムと酢酸ナトリウムを移動相として得られた溶出曲線から各鎖長割合を算出<sup>5, 6)</sup>した。

### 2.5 分離澱粉糊液の動的粘弾性測定による周波数依存性

澱粉糊液 (4% w/w 無水物換算) を調製し、Rheostress RS1 (HAAKE 社製) で、動的粘弾性を測定した。治具は C60/1-Ti を用い、ギャップサイズ 0.052mm、応力 0.2Pa、測定温度 50℃、周波数 0.01 ~ 50Hz の条件で周波数依存性を測定した。

### 2.6 $\alpha$ -アミラーゼによる生澱粉の消化性

分離澱粉を 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.9) に懸濁させ、ブタ膵臓  $\alpha$ -アミラーゼ (porcine pancrease  $\alpha$ -amylase, SIGMA Chemical CO., EC 3.2.1.1) を

261U 加え、5 時間および 24 時間反応後、反応停止液を加え、遠心分離(3000rpm、10min)を行った。上澄みと沈殿を分離し、上澄み中の生成糖を測定して消化率を算出した。また、沈殿部分は未分解澱粉であるため、エタノールで再結晶させ、風乾して消化澱粉試料とした。

### 2.7 X 線回折による分離澱粉および消化澱粉の結晶性の比較

分離澱粉および上記 2.6 で調製した消化澱粉の結晶性を測定した。測定機器は XRD-6100 (島津製作所製) を用いて、走査範囲  $4.0 \sim 50.0^\circ$ 、走査ステップ  $2.0^\circ$ 、走査速度  $2.0^\circ/\text{min}$ 、計数時間 0.6s、管電圧 40.0KV、管電流 30.0mA で行った。

### 2.8 GPC-MALLS による平均分子量測定

分離澱粉および上記 2.6 で調製した消化澱粉をジメチルスルホキシド (DMSO) で分散させた後、エタノールを加えて DMSO を除去し、純水に再分散させて試料溶液とした。

各試料溶液を高速液体クロマトグラフ (ShodexGPC-11) に示差屈折計 (RI) と多角度レーザー光散乱計 (MALLS: Wyaat Technology 社製) を検出器として測定し、Berry プロットにより平均分子量を算出した。分析条件は、移動相に 25mM 臭化リチウム溶液 (和光純薬社製、Cat. No.125 - 01122) を用い、流速 1.0ml/min、測定温度  $55^\circ\text{C}$ 、カラムは Shodex OH Pack SB-806M HQ と Shodex OH Pack SB-804M HQ を連結して用いた。

## 3. 結果および考察

### 3.1 米粒の形状観察及び炊飯米の破断特性

精白米の写真を図 1 に示した。

日本晴 (野生型) の長さは平均 5.1mm、幅 2.8mm で、変異体米 (SSIIIa) の長さは 5.5mm、幅 3.0mm でほぼ同じ大きさであった。千粒の重量は日本晴 20.0g、SSIIIa は 21.5g であり、SSIIIa では、米粒の形状および密度ともに日本晴と同程度であり、

日本晴に見られるように、通常の胚乳が形成されていることが示された。



図 1 日本晴 (野生型) と変異体米 (SSIIIa) の精白米

また、炊飯した米の形状を比較すると、生米に比べて、日本晴は長さが 1.57 倍、幅は 1.31 倍に膨張しており、一方、SSIIIa は長さが 1.82 倍、幅は 1.01 倍になっており、日本晴に比べて縦長の炊飯米であることが分かった。

炊飯米の破断特性では、破断荷重は 0.8N で、ほぼ同じ値であったが、日本晴は明確な破断点を示さない平衡破断を示し、SSIIIa は明確な破断点を示す脆い炊飯米であった。表面の付着性は、SSIIIa は日本晴に比べて著しく低い値であり、SSIIIa の炊飯米の特性は、細長い形状でありもろく表面の付着性が低い特性を示すことが明らかとなった。

### 3.2 RVA によるペースト特性

図 2 に日本晴と SSIIIa の精白米粉の RVA 曲線を示した。

精白米粉のペースト特性は、SSIIIa は日本晴に比べ最高粘度、最終粘度が著しく低い曲線を示した。また、粘度上昇開始温度は、日本晴  $71.7^\circ\text{C}$  に比べ、SSIIIa は  $88.4^\circ\text{C}$  と顕著に高い値であった。

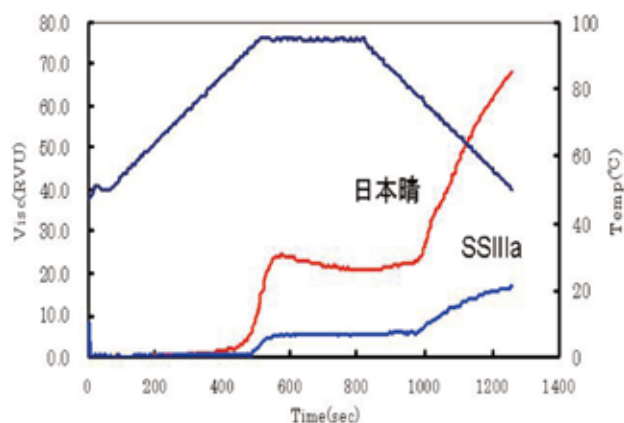


図 2 日本晴および SSIIIa の 6%精白米粉の RVA 曲線

澱粉のペースト曲線は、精白米粉の曲線に比べて、SSIIIa、日本晴ともに高い粘度曲線であった。しかし、精白米粉の粘度曲線で得られた傾向と同様に、SSIIIaは日本晴に比べて最高粘度、最終粘度共に著しく低いことが示された。精白米粉のペースト特性は、澱粉の特性が大きく反映されることから、SSIIIaの澱粉は、日本晴とはまったく異なる特性を持つことが示された。

### 3.3 DSCによる熱特性

精白米粉の吸熱曲線には日本晴、SSIIIaともに65℃と97℃付近に2つのピークが確認された。低温側のピーク1は、糊化開始温度がSSIIIaは57.3℃、日本晴59.8℃とSSIIIaが低値を示したが、ピーク温度、糊化終了温度は日本晴に比べ1～2℃程度高値を示した。吸熱エンタルピーは日本晴、SSIIIaともに近似した値であり、糊化に必要なエンタルピーは同程度であることが示された。しかし、高温側の第2ピークでは、SSIIIaの吸熱エンタルピーが日本晴に比べて約3倍であり、SSIIIaは高温で糊化する構造が日本晴より多く存在していることが示された。

### 3.4 HPAECによるアミロペクチンの単位鎖長分布の測定

HPAECで測定した日本晴分離澱粉のアミロペクチンの単位鎖長分布測定結果から算出した各鎖長の割合を図3に示した。

日本晴、SSIIIaともにDP12にピークを持つ単

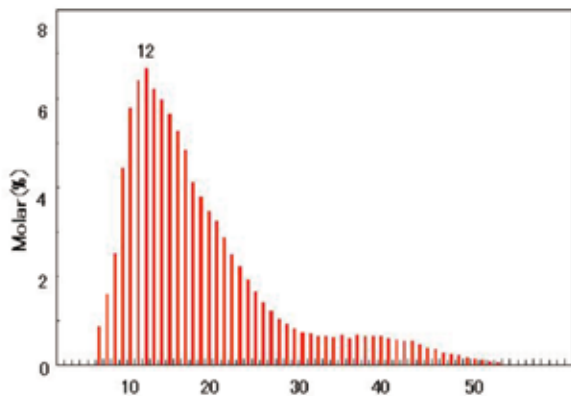


図3 日本晴分離澱粉のアミロペクチンの鎖長分布

位鎖長分布を示し、鎖長ごとの比較では、SSIIIaは日本晴に比べDP6-9が減少し、DP10-15が増加していた。

### 3.5 GPC-MALLSによる平均分子量測定

図4にSSIIIaのShodexGPC-11-MALLSシステムによる溶出曲線を示した。澱粉からアミロペクチンを分離していないため、アミロペクチンとアミロースの2つのピークが観察された。各ピークの散乱強度は、第1ピークが著しく大きく、このピークがアミロペクチンの溶出ピークであるため、第1ピークの平均分子量を算出した。第1ピークの平均分子量は、SSIIIaは日本晴に比べて約2/3程度の小さい分子量を示し、慣性半径も減少していた。

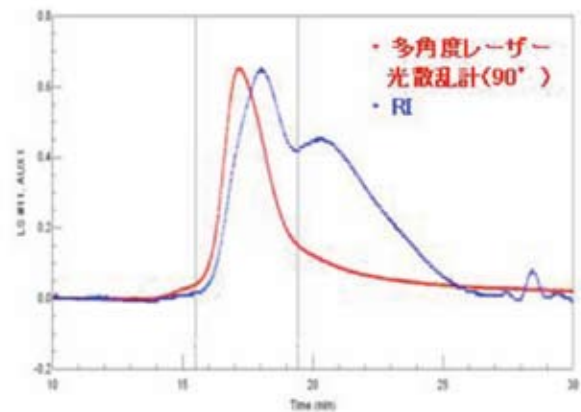


図4 ShodexGPC-11-MALLSシステムによる溶出曲線

HPAECで得られたアミロペクチンの構成鎖長分布がどのように配置で分岐して、アミロペクチン分子を構成しているのかということは継続して検討する必要があるが、SSIIIaが示した極めて低い粘度を発現する要因として、アミロペクチンの分子量の減少によるものではないかと考えられた。

### 3.6 動的粘弾性による周波数依存性

図5に4%分離澱粉糊液の動的粘弾性による周波数依存性で得られた周波数1.0Hzにおける貯蔵弾性率( $G'$ )、損失弾性率( $G''$ )の値を示した。

動的粘弾性特性では、日本晴およびSSIIIaともに、 $G'$ が $G''$ より高値を示しゲルを形成していることが示された。1.0Hzにおける $G'$ は日本晴

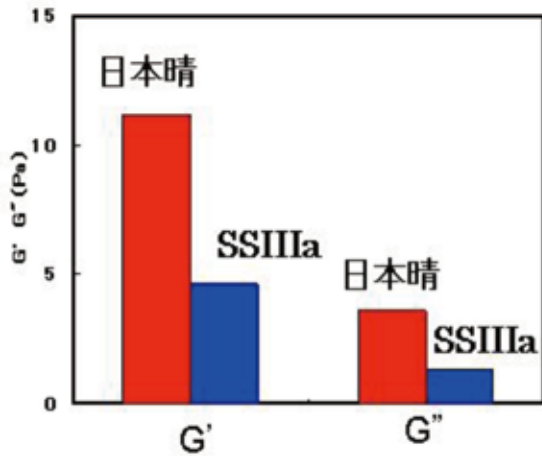


図5 4%分離澱粉糊液の動的粘弾性特性値

が11Pa、SSIIIaは4.6Paであり、SSIIIaが日本晴に比べ顕著に低値を示しており、RVAの結果と同様にSSIIIaは日本晴よりゲルの粘弾性が低いことが示された。

さらに、G'とG''の比で表される $\tan \delta$ は日本晴れ0.32、SSIIIa0.28となり、SSIIIaが形成するゲルは日本晴に比べ粘性部分が発現している割合が少ない糊液であることが示された。

### 3.7 ブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼによる消化性および消化澱粉のX線およびDSC特性

ブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼを生澱粉に5時間および24時間作用させた後、フェノール硫酸法とSomogyi-Nelson法を用いて糖量を測定し、消化率を算出した。日本晴は、5時間で約34%、24時間では約47%であり、SSIIIaもほぼ同程度で、

顕著な違いは認められなかった。

また、図6に未消化、5時間および24時間消化澱粉のX線回折図形を示した。結晶性は全ての試料でA型図形を示し、結晶化度は約10%であった。日本晴、SSIIIaともに消化時間の増加に伴い、5aのピークがわずかに強くなる傾向を示したが、結晶性は顕著な変化は認められなかった。ブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼ消化澱粉のDSC特性では、生および消化後の澱粉も日本晴よりSSIIIaの方がやや糊化開始温度が低いものの、ピーク粘度及び吸熱エンタルピーは同値であった。一方、酵素消化後では、第1ピークの吸熱エンタルピーが日本晴れ約13mJ/mgに比べ、SSIIIaは約11.5mJ/mgと小さく、さらに、第2ピークが明確になり、吸熱エンタルピーも約4mJ/mgと増加していた。第2ピークはアミロースと内部脂肪酸のヘリックスの融解であるといわれており、真のアミロース含量が日本晴15.0%、SSIIIa20%<sup>3)</sup>とSSIIIaが日本晴れに比べ高いことから、消化率が同様な値であっても、SSIIIaは高温で融解する構造、または消化されにくい構造が多く残存していることが示され、難消化性澱粉としての構造を形成しているのではないかと考えられた。

## 4. まとめ

以上の結果から、SSIIIa(変異体米)の特性は、

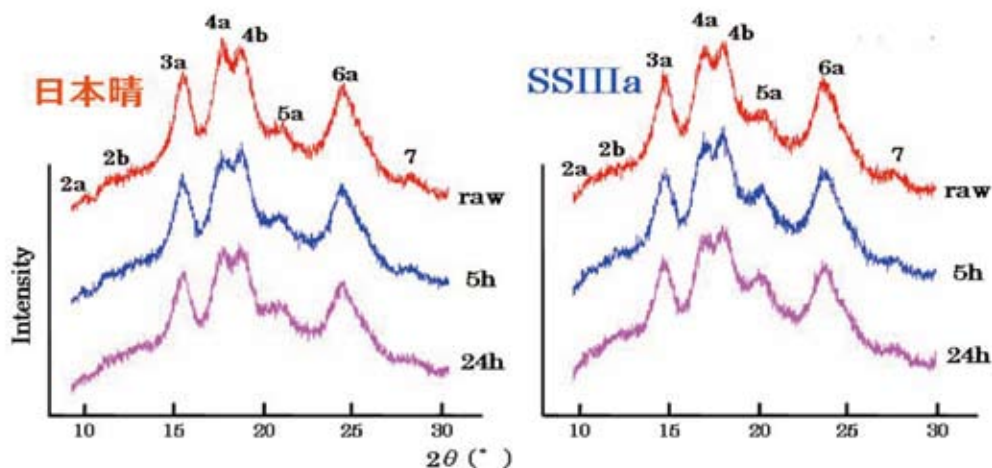


図6 SSIIIa ブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼ消化澱粉のX線回折図形

日本晴(野生型)と比較して、澱粉蓄積量は同程度であり、その炊飯米はもろく表面の付着性が低い特性を持つことが分かった。また、精白米粉のペースト特性では、著しく粘度が低い米粉ペーストであり、澱粉糊液の粘弾性特性においても、著しく粘度の低い特性を持つことが明らかとなった。SSIIIaは米粒および精白米粉、分離澱粉は、低付着性、低粘度特性および難消化性成分を有する国内産米として利用できると考えられた。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大な研究助成を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者各位に心より感謝を申し上げますとともに、貴財団の益々のご発展をお祈り申し上げます。また、共同研究者として、精力的に研究を遂行してくださいました秋田県立大学 藤田直子氏、鹿児島大学 花城 勲氏に深く感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Akuzawa S, Kawabata A (2003) Relationship among starch from different origins classified according to their physicochemical properties. *J. Appl. Glycosci.* 50: 11-16.
- 2) Ikeda M, Mastumori S, Akuzawa S. (2008) Effect of heat-Moisture Treatment on the Digestibility and Viscous Characteristics of Hard Wheat Flour and Separated Wheat Starch, *Food Pre. Science*, 34:203-208.
- 3) Fujita N, Yoshida M, Kondo T, Saito K, Utsumi Y, Tokunaga T, Nishi A, Satoh, H, Park J-H, Jane J-L, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y (2007) Characterization of SSIIIa-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.); the function of SSIIIa and pleiotropic effects by SSIIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiol* 144: 2009-2023.
- 4) Nakamura Y, (2002) Toward a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: Rice endosperm as a model tissue; *Plant Cell Physiol.* 43: 718-725
- 5) Hanashiro I, Abe J, Hizukuri S, (1996) A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography; *Carbohydrate research*; 283: 151-159.
- 6) Koizumi K, Kubota Y, Tanimoto T, Okada Y, (1989) Anion-exchange chromatography of homogeneous D-gluco-oligosaccharides and D-gluco-polysaccharides (polymerization degree greater than or equal to 50) with pulsed amperometric detection; *J. Chromatography* 464, 365-373.

## Rheological properties of SSIIIa-deficient mutants of rice grain and the starch

Sayuri Akuzawa

*Department of Nutritional Science, Faculty of Applied Bioscience  
Tokyo University of Agriculture*

Starch is one of the most important natural polymers available to humans. In addition to being a food material, starch is also used as an adhesive and texture modifier in industrial processes such as papermaking. Starch is known to display distinct physicochemical properties depending on its botanical origin.

The biosynthesis of starch is catalyzed by at least four enzymes; ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase), starch synthase (SS), starch branching enzyme (BE) and starch debranching enzyme (DBE). Analysis of various mutants has given important clues to our understanding the function of each isozyme. Indeed, some of these mutants have been shown to produce novel starches with great potential as new foodstuffs and/or for industrial applications. Starch synthase IIIa (SSIIIa)-deficient rice mutant, that was completely absent in SSIIIa activity, and the parental Nihonbare were characterized to reveal the relationship between the structure of the endosperm starches and the rheological properties of the corresponding starch pastes.

The length and width of the raw rice grains of SSIIIa and Nihonbare were similar, but the cooked rice grains of SSIIIa became longer than those of Nihonbare. The characteristic force-strain curve of the cooked rice grain of SSIIIa displayed brittleness. The RVA viscogram of SSIIIa showed low values for all the pasting characteristics, which were markedly different from those of Nihonbare. In terms of the dynamic viscoelasticity parameters, the storage modulus  $G'$  of SSIIIa was lower than that of Nihonbare. The proportion of short chains with DP 6 to 9 and DP 16-19 decreased while chains with DP 10 to 15 and DP 20 to 25 increased in the chain-length distribution patterns of amylopectin. The average of molecular weight of SSIIIa was smaller than that of Nihonbare. Changes in the pasting and rheological properties of SSIIIa were mainly caused by variations in the structure of amylopectin. We believe that the rice grains and the divided starch from SSIIIa constitute a promising food material.