

博士論文

論文題目 モチコムギ澱粉の性状と応用に関する研究

氏 名 早川 克志

略語表

1CW : No.1 Canada western red spring wheat

2D-PAGE : two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis

ASW : Australian standard white wheat

BIS : *N,N'*-(1,2-dihydroxyethylene)bis-acrylamide

BLAST : basic local alignment search tool

BSA : bovine serum albumin

CD-1479 : *Triticum aestivum* L. cv. 盛系 CD-1479

CS : *Triticum aestivum* L. cv. Chinese Spring

DP : degree of polymerization

DPA : days post anthesis

DSC : differential scanning calorimetry

DTT : dithiothreitol

ESGs : endosperm starch granules

FTIR : Fourier transform infrared spectroscopy

GBSS : granule-bound starch synthase

Glc-1-P : glucose-1-phosphate

GPC : gel permeation chromatography

HPAEC-PAD : high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric
detector

HPSEC : high performance size exclusion chromatography

K107 : *Triticum aestivum* L. cv. Kanto-107

N126 : *Triticum aestivum* L. cv. Norin-126 (Chihokukomugi)

N61 : *Triticum aestivum* L. cv. Norin-61

N7AT7B : *Triticum aestivum* L. cv. Chinese Spring nullisomic 7A-tetrasomic 7B

PSGs : pericarp starch granules

PVDF : polyvinylidene difluoride

PVP : polyvinylpyrrolidone

RVA : rapid visco analyzer

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SGP : starch granule protein

WW : western white wheat

目 次

序論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1
第一章 モチコムギの特質の解明 澱粉の糊化と老化特性	14
緒言	14
第一節 モチコムギ澱粉の成分特性評価、アミロペクチンの構造推定	15
第二節 モチコムギ澱粉の糊化特性評価	18
第三節 モチコムギ澱粉の老化特性評価	24
考察	27
実験の部	32
第二章 澱粉粒結合性澱粉合成酵素のアイソザイムの解析	36
緒言	36
第一節 果皮澱粉粒の構造解析	37
第二節 澱粉粒結合性タンパク質の構造解析及び澱粉合成活性	41
第三節 GBSS の機能推定	44
考察	48
実験の部	54
第三章 モチコムギ粉の二次加工適性の解明	58
緒言	58
第一節 モチコムギの製粉特性の把握	59
第二節 モチコムギ粉の生地物性の把握	62
第三節 モチコムギ粉の二次加工適性の解明	65
考察	74
実験の部	78
総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	82

引用文献	88
関係論文	105
謝辞	106

序論

農耕の長い歴史の中で人類が長期に渡って摂食してきたトウモロコシ、イネ、大麦、ソルガム、アマランスなどの穀物には、うるち系統とモチ系統が存在する。両系統の別は後に詳述するように澱粉の構成成分（アミロースとアミロペクチン）の量比によって決定されており、うるち系統よりモチ系統の方が高い粘性を示す。例えば、穀物の中で特にアジア地域を中心に主食作物として栽培されてきたイネの穀粒すなわち米には、炊飯してご飯として食すうるち米と蒸して搗いていわゆる餅として食すモチ米が存在する。イネは基本的には精白した穀粒そのものを食すが、多くの穀物は粉碎して穀粉として利用されることが多い。米もうるち米を水洗して乾燥させ細かく粉碎した上新粉が団子やまんじゅうなどの和菓子に用いられる。また、モチ米を水洗後加水しながら摩砕し乾燥させたものは白玉粉として用いられる。穀物の胚乳の多くを占める成分は澱粉である。穀物から精製した澱粉は、異性化糖、水飴、ぶどう糖などの原料になる他、ビール醸造、水産練り製品、和洋菓子、麺類、調味料、はるさめ、カレー粉、天ぷら粉など食品加工にも広く利用されるが、その用途もうるち系統の澱粉とモチ系統の澱粉では異なる。

穀物粉或いは澱粉は、パン、麺、菓子など小麦粉製品にも広く利用されている。小麦粉製品の構造特性（クリスピーネス、粘り、柔らかさ、硬さ、口内での崩壊感など）は、消費者に受け入れられるか否かを決定する重要な因子である。穀物の澱粉は、添加により小麦粉製品の物理的、流体力学的な特性を変える機能をもっているため、小麦粉製品に用途に応じた特定の構造特性を付与する目的で利用される。例えば、麺類や和菓子では、滑らかでソフトな食感を与えるワキシーコーンスターチが主に使われるが、洋菓子、水産練り製品などにはうるち系統であるコーンスターチが利用される。このように小麦粉製品に利用する場合もうるち系統とモチ系統では適応用途の違いが存在する。

穀物から抽出精製した澱粉に化学的加工を施した加工澱粉が現在の食品工業には広く利用されている。従来、安価で食品加工適性が高いためモチ系統であるワキシーコーンスタ

ーチが専ら利用されていた食品加工領域に、化学的加工を施したうるち系統澱粉が利用されてきている。例えば、ワキシーコーンスターチは、上述したように麺類全般に利用されるが、特に保存安定性に優れ、戻り温度が低く老化耐性が高いのでロングライフ麺、冷凍麺などにも利用されてきた。最近では、これら麺類の製造に、エーテル化、エステル化或いはリン酸架橋したうるち澱粉が利用されている。こうした食品加工への用途適応性の違いは、モチ澱粉とうるち澱粉の構造の違いが影響している（澱粉科学の事典 2003、でん粉製品の知識 1996）。

穀物の澱粉の主たる構成成分は、グルコース重合体であるアミロースとアミロペクチンである。アミロースは、ごくわずかに 1-6 グルコシル結合で枝分かれした構造をもっているが、基本的にはグルコースが 1-4 グルコシル結合している直鎖状の分子であり、グルコース残基 6 個で 1 巻きするらせん構造をとりヨウ素との複合体を形成するためヨウ素染色により青色を呈する。一方、アミロペクチンは、1-4 グルコシル結合している直鎖状の分子がグルコース残基約 25 個に 1 個の割合で 1-6 グルコシル結合した枝分かれ構造をもつ分子であり、ヨウ素染色はされないため染色液の色がそのまま残る（Whistler and Daniel 1984）。

澱粉合成の基本的な過程は、全ての植物組織で似通っていて（Badenhurizen 1969、Shannon and Garwood 1984、Preiss 1988）、葉緑体、アミロプラストでは 3 種の主要な過程で構成されている（Muller-Rober and Kossmann 1994）。すなわち、(a)組織体への Glc-1-P の供給、(b)Glc-1-P からの ADP-Glc の合成、(c)ADP-Glc からの澱粉（アミロースとアミロペクチン）の合成である。

図 0-1 に穀物の胚乳部での澱粉の生合成のスキームを示す（Rahman *et al.* 2000）。胚乳細胞の細胞質で sucrose から Glc-1-P が合成されアミロプラスト内にトランスポートされ ADP-glucose pyrophosphorylase によって ADP-glucose が合成される。或いは Glc-1-P は細胞質で引き続き ADP-glucose に合成されアミロプラスト内にトランスポートされる。

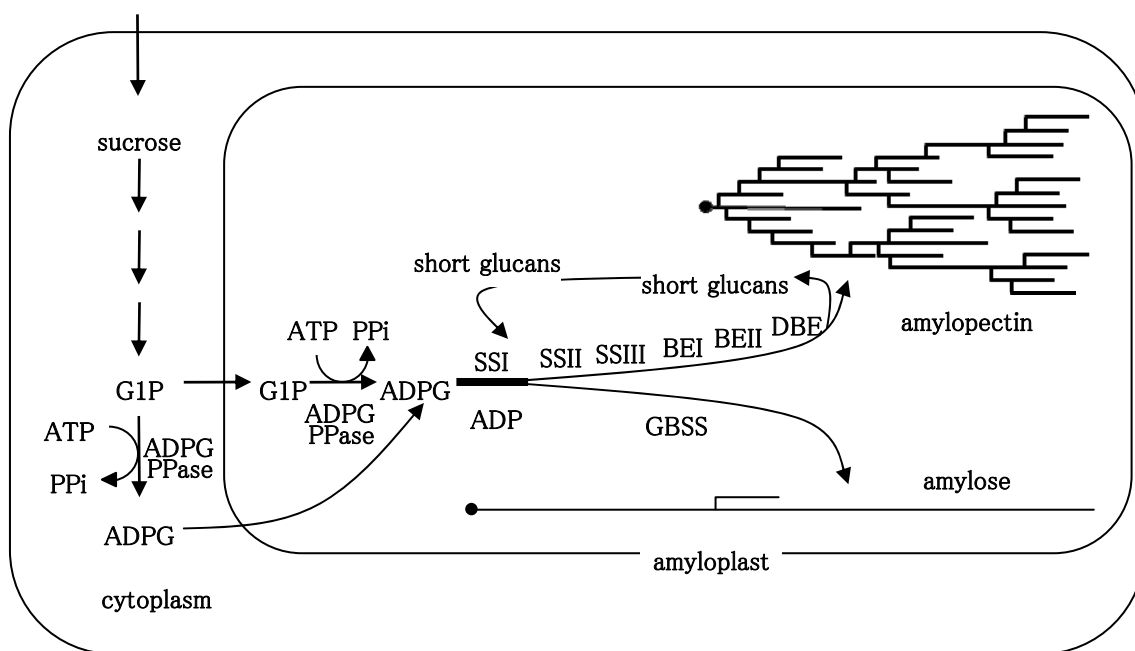


図 0-1. 胚乳澱粉の生合成スキーム

G1P : glucose-1-phosphate、ADPGPPase : ADP glucose pyrophosphorylase、

ADPG : ADP glucose、GBSS : granule bound starch synthase、

SSI : starch synthase 、 SS : starch synthase 、 SS : starch synthase 、

BE : starch branching enzyme 、 BE : starch branching enzyme 、

DBE : debranching enzyme、

amylose モデルおよび amylopectin モデル中の : 還元末端

ADP-glucose を基質として starch synthase による伸長反応が起こり、1-4 グルコシル結合したグルコース残基 7 個～8 個までのオリゴ糖が形成される。このオリゴ糖がベースになり、二種の澱粉分子アミロースとアミロペクチンが生合成される。アミロペクチンは、starch synthase や starch synthase による 1-4 グルコシル結合の伸長、starch branching enzyme 、 starch branching enzyme による 1-6 グルコシル結合の形成（分岐構造の形成）、isoamylase や pululanase など debranching enzyme による 1-6 グルコシル結合の切断を経て巨大分子として生合成される。アミロースは、granule bound starch synthase により基本的には 1-4 グルコシル結合のみで形成された非常に長い直鎖状分子として生合成される。

澱粉は穀粉の中で粒子として存在するが、澱粉粒は十分に水がある環境下で加熱すると吸水、膨潤し、やがて崩壊して冷却される過程でゲルやスラリーを形成する。この一連の過程の中で澱粉粒が崩壊するまでを糊化と呼ぶが、冷却されて形成された澱粉ゲルは初期の老化を起こしている。アミロースは、澱粉ゲルの形成時に重要な役割を演じる。膨潤された澱粉粒からいち早く溶出される分子はアミロースであり、澱粉ゲルはアミロースの作るマトリックスの中に膨潤、崩壊、分散した澱粉が横たわる形で形成される (Miles *et al.* 1985、Bohlin *et al.* 1986)。老化とは、糊化によって消失した結晶構造が再度形成される工程であるが、Goodfellow and Wilson (1990) は澱粉ゲルの FTIR による解析結果からアミロースが初期の老化に関与していることを示した。一方、アミロペクチンと澱粉ゲルの老化特性の関係を多くの研究者が指摘している (Miles *et al.* 1985、Biliaderis and Zawistowski 1990)。Gudmundsson (1994) もまたアミロペクチンが長期間保存後の老化や澱粉ゲルの構造変化の主因になると報告している。

うるち系統の澱粉のアミロース含量は通常 11-37% である (Shannon and Garwood 1984) が、モチ系統の澱粉のアミロース含量は、ほぼ 0% に近い。すなわち、モチ系統澱粉はほとんどアミロペクチンで構成されている。それゆえ、モチ系統澱粉は糊化や老化の過程においてうるち系統澱粉とは異なる特徴を示す。これらモチ系統澱粉の構造と特徴はよく研究されている。Shi and Seib (1992) は、示差走査熱量計 (DSC) を用いて 2 種のモチ性イネ、モチトウモロコシ、モチオオムギ由来の澱粉の糊化特性、老化特性を比較した。モチ系統澱粉の糊化特性は、モチ系統の特徴を示し穀物間で大きな違いは認められなかったが、老化澱粉の糊化開始温度が穀物間で異なることを見出した。さらにパルス電流検出器付き陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC-PAD) を用いてアミロペクチンの側鎖解析を行い、DSC で観察された再結晶ピークの大きさは、14-24 グルコース単位の側鎖の数と正の、6-9 グルコース単位の側鎖の数と負の相関を示すことを明らかにした。これらのことから澱粉の糊化特性はアミロース含量が、老化特性にはアミロペクチンの構造が大きく寄与し

ていることが推察される。

澱粉の老化は、モチ米粉を用いたおかき、あられのような食品では製造工程の中に促進工程が含まれており起こることが期待される現象であるが、パンや麺（パスタも含む）、菓子のような小麦粉の二次加工食品においては好ましくない現象である。Schoch and French（1947）により、アミロペクチンの再結晶がパンのクラムが硬くなる（パンの老化）主原因であることが示唆された。複数の研究者がこの仮説を検証し、支持してきた（Prentice *et al.* 1954、Colwell *et al.* 1969）。仮に、アミロペクチンの再結晶以外に老化に影響を及ぼす因子がないとすれば、老化の程度はアミロペクチン含量が高いほど言い換えればアミロース含量が低いほど高くなるということになる。すなわち、高アミロペクチンの澱粉は、通常の澱粉よりも早く硬くなるはずである。しかし、この仮説は、上述したようにワキシールコーンスターチが高い老化耐性をもつが故にロングライフ麺、冷凍麺で広く利用されている食品工業の現状を説明できない。このようなことから、老化は澱粉中のアミロペクチンの割合により決定づけられているのではなく、アミロースがアミロペクチンの再結晶化、すなわち老化を促進しているのではないかと推察される。

一方、米国農務省が発表しているCurrent World Production, Markets, and Trade Reports（2011）によれば、2010/11年産の世界三大穀物の生産量は、トウモロコシが82,912万トン、小麦が65,114万トン、米が44,937万トンである。産地での消費の内、飼料用途の比率は、トウモロコシが38%、小麦が15%であること、トウモロコシはバイオエタノール生産の原料としても利用されていることを考慮すると、食用穀物としては小麦が最も多く生産されていることが分かる。小麦は、ごく一部の地域で米のように穀粒そのものを食している以外は、ほとんどロールミルで粉碎され小麦粉として利用される。小麦は、パン類、菓子類（ケーキ類）、麺類、パスタ類など非常に広範囲の二次加工品の原料であるが、それは、穀物の中で唯一グルテニン（小麦グルテリン）とグリアジン（小麦プロラミン）をもっていてこれらが主体となりグルテンを形成し生地を作ることができたからである。小麦

は他の穀物では代替不能なユニークな穀物といえる。

今から 1 万年以上前に中央アジアのコーカサス地方に住んでいた先史人たちが、一粒系小麦 (*T. monococcum*) を播き始めたのが小麦栽培の起源とされており、人類の食の歴史は非常に長い (長尾 1984)。それにも関わらず、二次加工に有用なモチの小麦粉をこれまで人類は入手することができなかった。それは食用のコムギが 4 倍体 (デュラム小麦: *T. durum*) と 6 倍体 (普通小麦: *T. aestivum*) であったためと考えられる。

穀物澱粉がモチ性を獲得するためには、澱粉中にアミロースをほとんど含まないことが前提になる。穀物の胚乳部においてアミロースを合成する上で重要な役割を担っているワキシータンパク質 (Wx タンパク質) は、GBSS: EC 2.4.1.21 として同定されている (Echt and Schwatz 1981、Vos-Scheperleuter *et al.* 1986、Preiss 1991、Smith and Martin 1993)。トウモロコシ、イネ、オオムギ、ソルガム、アマランスを含む多くの穀物でこの酵素を欠損したモチ変異系統が確認されている。これらのモチ変異系統は、天然に存在していたもの、および人為的に突然変異を誘発したものの両方から発見されているが、確認された穀物はいずれも 2 倍体であり、基本的には栽培の歴史の中で変異系統が容易に形成されたものと考えられている。一方、普通小麦には、7A 染色体、4A 染色体、7D 染色体に 3 つのワキシー座遺伝子 *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* が存在していることが報告された (Chao *et al.* 1989)。これらの遺伝子により少なくとも 3 つの GBSS アイソザイムがコードされていると考えられた。同様にデュラム小麦は、2 つのワキシー座遺伝子 *Wx-A1*, *Wx-B1* をもち、これらが少なくとも 2 つの GBSS アイソザイムをコードしている。したがって、モチ小麦ができるためには、普通小麦では 3 つ、デュラム小麦では 2 つのワキシー座遺伝子が全てノックアウトされることが必須であり、それ故に自然界ではモチコムギは発見できなかったと考えられる。すなわち 3 つの GBSS アイソザイムの内、1 つでも健全であれば表現型としてはうるちコムギになってしまうからである。

Nakamura *et al.* (1992) は、モチコムギを作出するためには遺伝資源の中に存在するで

あろう GBSS アイソザイムの欠損系統(例えば Wx-A1 タンパク質欠損系統)をスクリーニングすることが重要と考え、少なくとも 3 種あるアイソザイムの単離同定系の開発を行った。

通常の SDS-PAGE では、3 種類あるアイソザイムは一本のバンドとしてしか検出されなかった。そこで、まず、Nakamura *et al.* (1992) は、ビスアクリルアミドの濃度を低くすることによって分離できるアイソザイムがないか検討したところ、分子量が僅かに高い Wx-A1 をそれ以外の Wx-B1 及び Wx-D1 と分離することに成功した。図 0-2 に示したレーン A は従来の方法(acrylamide/BIS=30:0.8)で CS(Wx-A1 タンパク質、Wx-B1 タンパク質、Wx-D1 タンパク質をもっている) 及び CS N7AT7B (Wx-B1 タンパク質、Wx-D1 タンパク質をもっている) の Wx タンパク質を電気泳動したもの、B は acrylamide/BIS=20:0.135 とビスアクリルアミドの割合を低くしたものである。図 0-2 には銀染色した結果を示した。A ではいずれもシングルバンドに見えるが、B では CS で 2 本のバンドが検出されている。

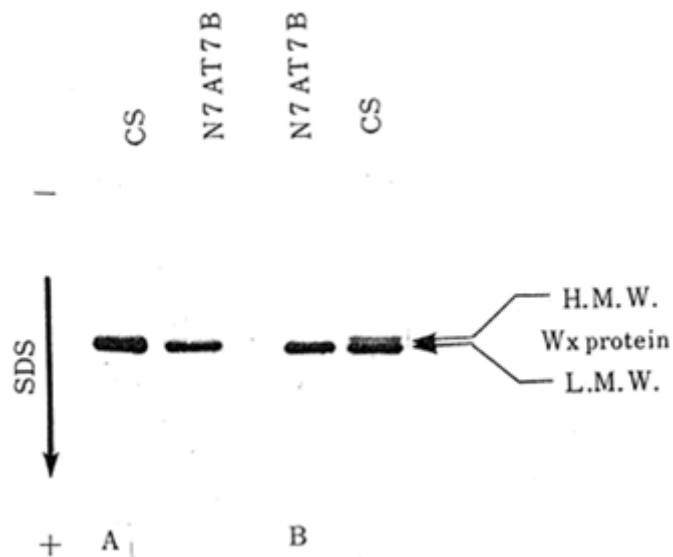


図 0-2. CS と CS-N7AT7B の SDS-PAGE (Nakamura *et al.* 1992)

SDS-PAGE 中 acrylamide/BIS 濃度 A = 30:0.8、B = 20:0.135

B の CS N7AT7B で高分子量側のバンドが欠損していることから、高分子量側のバンドが Wx-A1 タンパク質であることが分かる。しかし、この系では、Wx-B1 タンパク質と Wx-D1 タンパク質が分離できないのでさらなる分離が試みられた。Nakamura *et al.* (1993a) は、二次元電気泳動により等電点の違いから Wx-B1 タンパク質と Wx-D1 タンパク質が分離できることを明らかにした(図 0-3)。普通コムギである CS のワキシータンパク質を電気泳動した場合、左図のような電気泳動像が得られた。右図は、3 種のワキシータンパク質の分子量、等電点、検出タンパク質量(スポットの大きさや濃さ)の違いを模式化しているが、図中 A、B、D は、それぞれ 3 種のワキシータンパク質 Wx-A1、Wx-B1、Wx-D1 を示している。

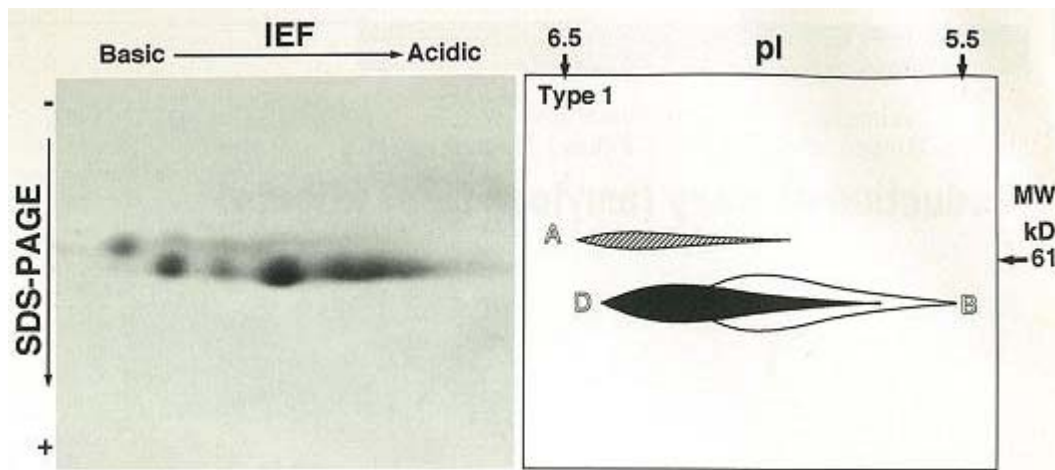


図 0-3. 普通小麦 Wx タンパク質二次元電気泳動像 (Nakamura *et al.* 1995)

模式図は 3 種類の Wx タンパク質の分子量(MW)、等電点(pI)、タンパク質量の違いを示す

A : Wx-A1 タンパク質、B : Wx-B1 タンパク質、D : Wx-D1 タンパク質

1 種のワキシータンパク質につき少なくとも 1 つの等電点が酸性側にシフトした微量なスポットが観察されるが、後述するように一連のスポット群は突然変異系統で同じ挙動を示す(例えば Wx-A1 タンパク質を欠損した突然変異系統は、図 0-3 の模式図に示した A のスポットだけではなく、やや pI が酸性側にシフトした微量なスポット及びもっと酸性側にシフトしたスメアなタンパク質も同時に欠損している)ことから同一の遺伝子産物であると

考えられる。主要な産物の一部がリン酸化など PI が酸性側になるような翻訳後の修飾を受けている可能性があるが、現在までに詳細な説明はなされていない。

図 0-4 には、GBSS 欠損変異系統のワキシータンパク質の二次元電気泳動パターンを模式化して示した。Wx-A1 タンパク質を欠損した突然変異系統のワキシータンパク質は Type 2、Wx-B1 タンパク質欠損変異系統のワキシータンパク質は Type 3 を、Wx-D1 タンパク質欠損変異系統のワキシータンパク質は Type 4 のパターンを示す。Wx-A1 タンパク質と Wx-B1 タンパク質を両方とも欠損した突然変異系統は Type 7 のようなパターンを示す。以上の確認により GBSS 欠損変異系統のスクリーニングの系を確立した。

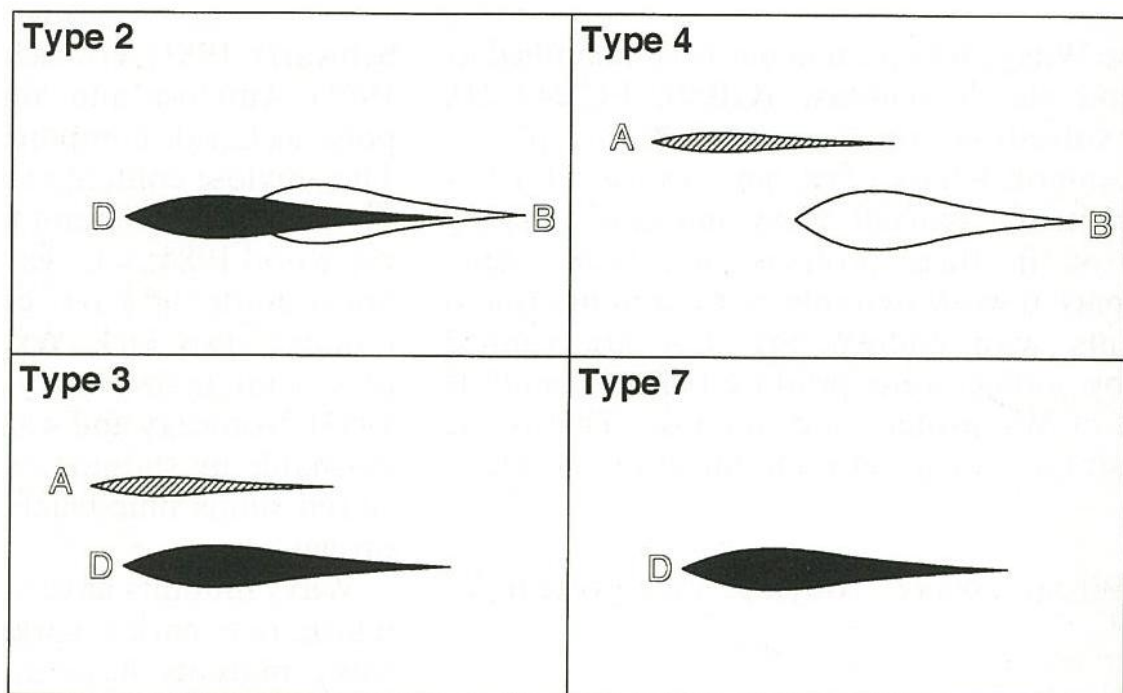


図 0-4. GBSS 欠損変異系統の Wx タンパク質の二次元電気泳動パターン

(Nakamura *et al.* 1995)

Type 2 : Wx-A1 タンパク質欠損変異系統、Type 3 : Wx-B1 タンパク質欠損変異系統、
Type 4 : Wx-D1 タンパク質欠損変異系統、
Type 7 : Wx-A1 タンパク質、Wx-B1 タンパク質欠損変異系統

この方法により国内外の 2000 系統を超える遺伝資源の中から、Type 7 の関東 107 号と

Type 4 の Bai-Huo を選抜することに成功した (Nakamura *et al.* 1993b; Nakamura *et al.* 1993c; Yamamori *et al.* 1994)。Nakamura *et al.* (1995) は、Wx-A1 タンパク質と Wx-B1 タンパク質を両方欠損する関東 107 号と Wx-D1 タンパク質を欠損する Bai-Huo を交配しワキシータンパク質が完全に欠損したモチコムギの作出を試みた。得られた交雑第一世代 3 個体から成熟した全ての交雑第二世代種子をヨウ素染色した。図 0-5 に染色した結果を示す。交配親の関東 107 号、Bai-Huo はヨウ素染色により青紫色を呈するのに対し、交雑第二世代の種子の中には図中央に示すようにヨウ素染色により染色されないものが確認された。このようなモチコムギは、交雑第二世代種子 1795 粒中、23 粒であった。モチ性が一遺伝子支配であれば、6 倍体であるコムギの場合、モチコムギの出現率は理論的には 64 粒中 1 粒になる。Nakamura *et al.* (1995) は、今回の結果を 自乗検定した結果、コムギの場合もモチが一遺伝子の制御下にあると考えて妥当だと結論付けた。

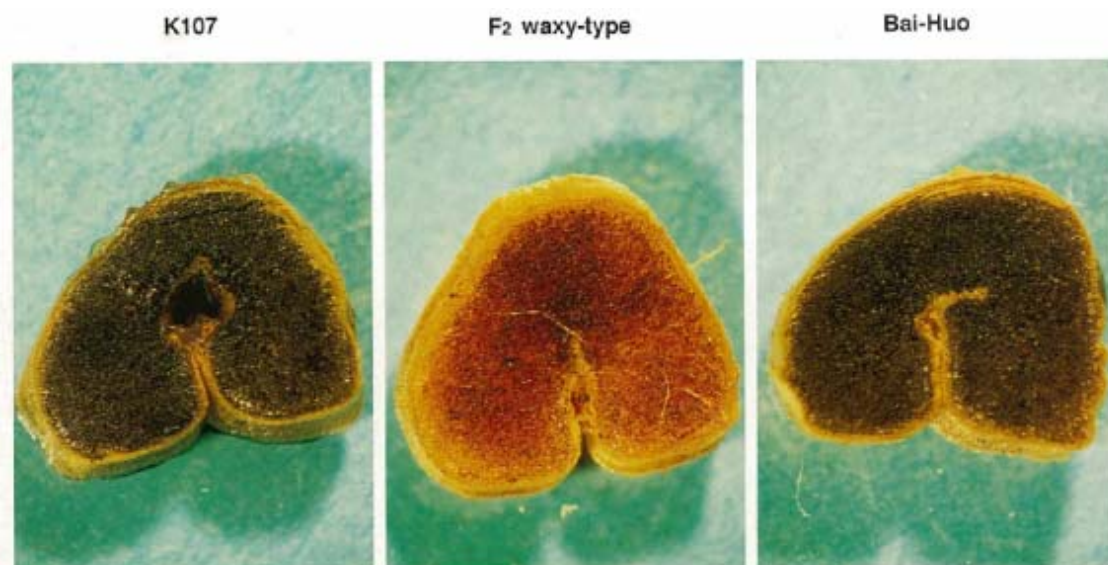


図 0-5. K107 X Bai-Huo 交雑第二世代種子横断面ヨウ素染色 (Nakamura *et al.* 1995)

K107 : Type 7 うるちコムギ (Wx-A1 タンパク質、Wx-B1 タンパク質欠損)

Bai-Huo : Type 4 うるちコムギ (Wx-D1 タンパク質欠損)

F₂ waxy-type : モチコムギ (Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1 タンパク質欠損)

図 0-6 にヨウ素染色で選抜したモチコムギ (交雑第二世代種子) から抽出したワキシ-

タンパク質の二次元電気泳動像を示した。交雑の両親である Bai-Huo は Wx-A1 タンパク質と Wx-B1 タンパク質を持っており、関東 107 号は Wx-D1 タンパク質しか持っていないのに対して、モチコムギ種子は 3 種のワキシータンパク質のいずれも持っていないことが確認された。

中村らによって世界で初めて育成されたモチコムギは、ワキシータンパク質全欠損コムギを目指して育成された (Nakamura *et al.* 1995)。胚乳の澱粉合成系の酵素で重要な役割を担うこの酵素が欠損したことによる澱粉の構造変化、それに伴う糊化特性、老化特性の変化、胚乳部ワキシータンパク質欠損に伴うアイソザイムへの影響、こうしたモチコムギの性状を踏まえた二次加工性の特徴を明らかにしたく研究を開始した。

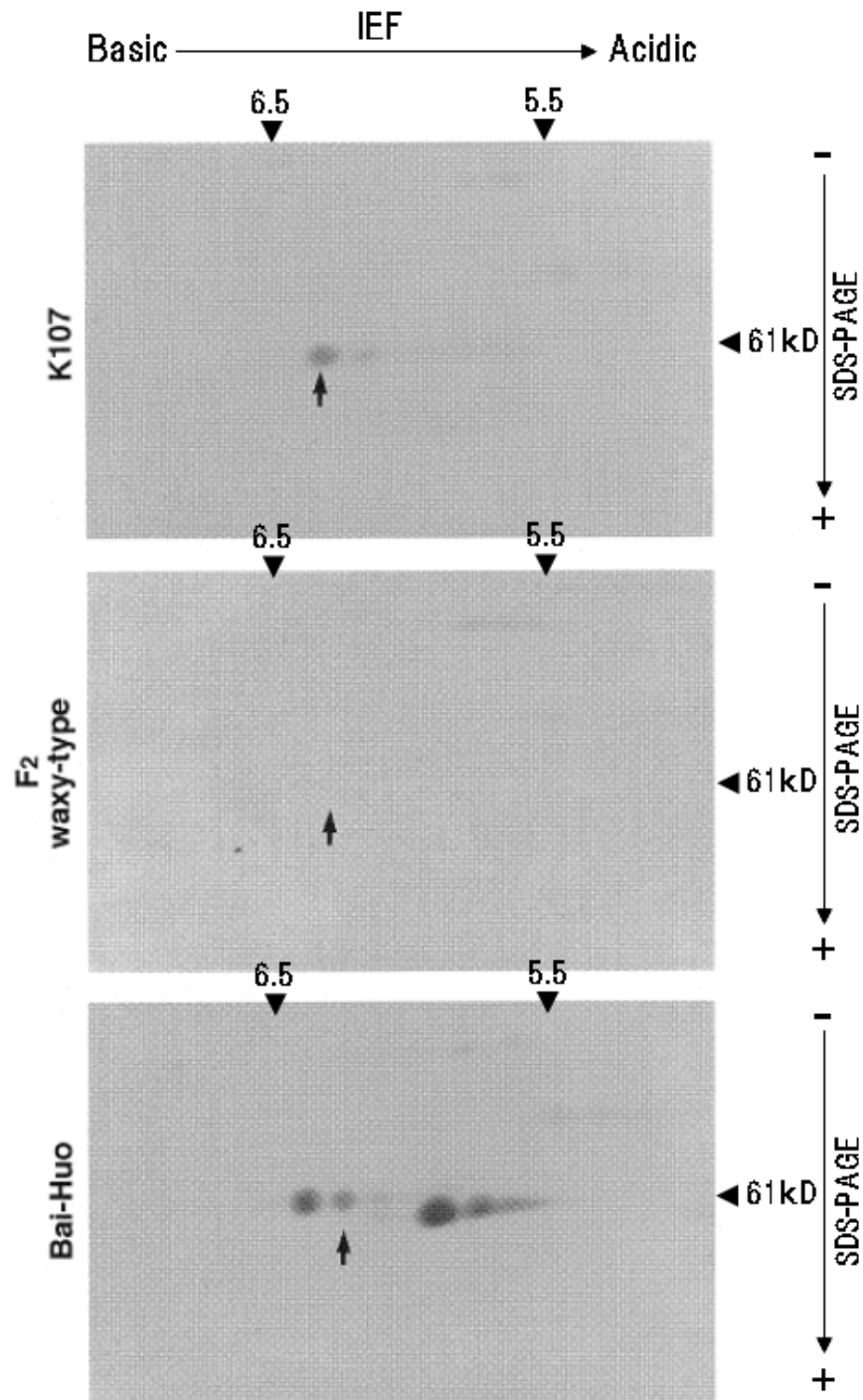


図 0-6.Wx タンパク質の二次元電気泳動パターン (Nakamura *et al.*1995)

K107 : Wx-D1 タンパク質のみ検出 (図 0-4.Type 7 相当)

Bai-Huo : Wx-A1 タンパク質、Wx-B1 タンパク質のみ検出 (図 0-4.Type 4 相当)

F₂ waxy-type (ヨウ素液で染色されなかった交雑第二世代種子): 全Wxタンパク質未検出

矢印 : 各ゲルでの同一位置

本稿第一章では、世界で初めて作出された 6 倍体モチコムギの澱粉の糊化特性を、結晶性の観点から X 線回折および DSC、機能性（澱粉糊形成時の粘弾性）の点からラピッドビスコアナライザー、Amylo/Viscogram での解析により明らかにすることを試みた。また、澱粉のもう一つの興味ある機能性である老化特性すなわち糊化後の再結晶性を X 線回折および DSC で評価することを試みた。さらに、アミロース、アミロペクチンに分離精製し、これら澱粉構成成分の構造的特徴を解明した。

第二章では、胚乳部では GBSS が欠損しているモチコムギの他組織での GBSS の存在の有無、機能を明らかにすることを試みた。胚乳以外の組織としてモチコムギの果皮の澱粉性状を評価し、澱粉合成酵素のアイソザイムを解明した。

第三章では、モチコムギをテストミルで粉砕し、通常のうるち小麦粉に対し様々な配合率での製パン試験、ケーキ製造試験、バターケーキ試験、製麺試験、麺皮食品製造試験を実施し、澱粉の特異な糊化特性、老化特性を反映したモチコムギの二次加工特性の評価を試みた。

第一章 モチコムギの特質の解明 澱粉の糊化と老化特性

緒言

モチコムギは、澱粉合成酵素の一種であるワキシータンパク質が欠損したコムギである。現在まで澱粉合成酵素と澱粉の性状を関連付けて解説した報告が数多くなされている (Stark *et al.* 1992; Visser and Jacobsen 1993; Müller-Räber and Kossmann 1994; Shewmakar *et al.* 1994)。また、ワキシータンパク質が欠損しているモチ変異系統が天然に存在しているトウモロコシ、イネ、オオムギ、ソルガム、アマランスなど多数の穀物では、モチ澱粉の構造と特徴がうるち澱粉と比較されてよく研究されている。例えば、Salomonsson and Sundberg (1994) は、ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) によりアミロース含量 7% のモチオオムギ (Compana) のアミロペクチンの分子量分布をアミロース含量 30% のうるちオオムギ (Golf) と比較評価したが、両者に大きな違いは見られなかったことを報告している。しかし、同一種のうるち穀粉とモチ穀粉の比較であるこれらの研究の結果の多くは、材料の品種特性差を含んだ結果であり、準同質系統間、親子系統間でうるち穀粉とモチ穀粉を比較した例はごく少ないと言わざるを得ない。本研究の対象にしているモチコムギは、両親系統 (うるち系統である関東 107 号、Bai-Huo) が明確であるので、品種特性を前提にモチコムギの特性を把握することが可能になる。

本章では、モチコムギ澱粉の構成成分、構造、物理的性状、糊化特性および老化特性を把握することを目的に、比色法によるアミロース含量測定、構造推定のためのゲルろ過解析、平均重合度測定、澱粉の粘性測定、糊化特性を明らかにするためのアミログラフ、ラピッドビスコアナライザー、結晶構造を明らかにするための X 線回折、DSC 解析および老化特性を評価するための冷蔵保存糊化澱粉の X 線回折、DSC 解析を行った方法と結果について記す。

第一節 モチコムギ澱粉の成分特性評価、アミロペクチンの構造推定

本節では、まずモチコムギ澱粉の構成成分の解析、構成成分の構造推定を試みた。

1. アミロース含量

モチコムギ及びモチコムギの両親系統(関東 107 号、Bai-Huo)の他に市販コムギでワキシータンパク質が健全な農林 61 号、Wx-B1 タンパク質が欠損している農林 126 号(チホクコムギ) 及びうるちトウモロコシ、モチトウモロコシのアミロース含量をヨウ素親和力より算出した結果を表 1-1 に示した。モチ系統の穀粉はいずれもアミロース含量は 0% であった。今回の測定結果では、3 つあるワキシータンパク質アイソザイムが 1 つ失われた農林 126 号と Bai-Huo とワキシータンパク質が健全な農林 61 号は 23.0% ~ 24.3% とアミロース含量に差は認められなかった。ところが、ワキシータンパク質アイソザイムが 2 つ失われた関東 107 号は 16.6% と極めて低くなっていた。

2. アミロペクチンの構造の特徴

図 1-1 にイソアミラーゼで α -1,6 結合を完全分解した関東 107 号のアミロペクチンをサイズ排除型カラムで分析したクロマトグラム(HPSEC パターン) を示す。Hizukuri (1986) によって提案されたアミロペクチンモデルによれば、図 1-1 に示した画分 A はアミロペクチンの長い側鎖、画分 B はより短い側鎖であり、画分 A に対する画分 B のピーク面積比($Fr. A / Fr. B$) がアミロペクチンの構造を評価する指標として利用される。各種澱粉の $Fr. A / Fr. B$ とアミロペクチン側鎖の平均重合度(DP) を表 1-1 に示した。 $Fr. A / Fr. B$ は、モチコムギも含めてコムギサンプル間では差がなく 0.97 ~ 1.17 の幅に収まった。トウモロコシはコムギに比べて低かった。側鎖の平均重合度は、モチコムギが 25 で両親がいずれも 22 であった。ワキシータンパク質が全くないモチコムギ澱粉は、アミロースがほとんど存在しないばかりではなく、アミロペクチンの構造もまた両親に比べて異なるものになっていることが明らかになった。

表 1-1. 澱粉のアミロース含量 (%) とアミロペクチンの構造的特徴

植物種	澱粉型 ^a	系統名	アミロース			アミロペクチン	
			含量 (%) ^b	画分	/画分 ^c	重合度 ^d	
コムギ	N	農林 61 号	23.0 ± 1.1	1.17 ± 0.08		21 ± 1	* * *
	N	農林 126 号	24.3 ± 1.6	1.17 ± 0.04		25 ± 2	
	N	関東 107 号	16.6 ± 1.0	0.97 ± 0.14		22 ± 1	
	N	Bai-Huo	24.2 ± 0.9	1.06 ± 0.08		22 ± 1	
	W	(モチコムギ)	0.0	1.15 ± 0.07		25 ± 1	
トウモロコシ	N (うるちトウモロコシ)		26.3 ± 0.3	0.83 ± 0.08		28 ± 2	
	W (モチトウモロコシ)		0.0	0.59 ± 0.10		23 ± 1	

a N=うるち澱粉, W=モチ澱粉

b 平均値 ± 標準誤差 (n=6)

c イソアミラーゼで消化したアミロペクチンの HPSEC パターンで出現した画分 に対する画分 のピーク面積比、平均値 ± 標準誤差 (n=6)

d アミロペクチン側鎖の平均重合度 (平均鎖長) 平均値 ± 標準誤差 (n=6) モチコムギに 対して t 検定を実施 (* : p<0.05 で有意)

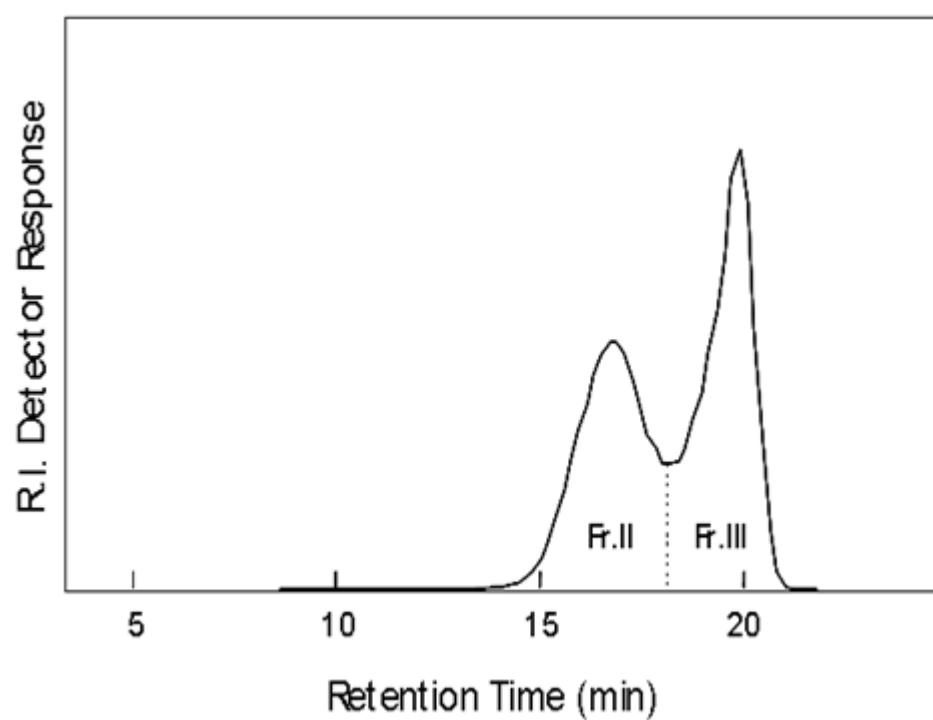


図 1-1. イソアミラーゼ処理した関東 107 号由来のアミロペクチンの HPSEC パターン

Fr. (アミロペクチンの側鎖の内、比較的長鎖分子画分)

Fr. (アミロペクチンの側鎖の内、比較的短鎖分子画分)

第二節 モチコムギ澱粉の糊化特性評価

第一節でモチコムギがアミロースをほとんど含まないこと、およびアミロペクチンの側鎖の平均鎖長が両親より長いことが明らかになった。これらの性質が澱粉の性状にどのように影響するかを明らかにするために、まず、モチコムギの糊化特性を評価した。

1. アミログラフ及びラピッドビスコアナライザー

図 1-2A には、市販コムギ（農林 61 号、チホクコムギ：農林 126 号）澱粉、モチトウモロコシ澱粉とモチコムギ澱粉のアミログラフパターンを示した。アミログラフは、澱粉の糊化特性を示す。市販コムギはどちらもうるちコムギであるが、モチコムギ澱粉は、加熱過程（25 から 95 まで温度上昇させる過程）で速やかに膨潤し最高粘度に達するまでの時間がうるちコムギ澱粉より早く、より低い温度で糊化が始まりより低い温度で糊化が完了すること、および最高粘度が低いことが明らかになった。また、モチコムギ澱粉はうるちコムギ澱粉と比較して冷却時の粘度上昇（セットバック）（95 から 63 に冷却するときの粘度上昇）が小さかった。一方、モチトウモロコシ澱粉は、うるちコムギ澱粉に対してモチコムギ澱粉と同様、糊化は早く低温で始まるが、モチコムギ澱粉とは異なり最高粘度は非常に高いことが観察された。冷却時の粘度上昇はモチコムギ澱粉と同様低かった。

図 1-2B には、モチコムギ澱粉と親品種（関東 107 号と Bai-Huo）のラピッドビスコアナライザーのパターンを示した。ラピッドビスコアナライザーはアミログラフと同様に澱粉の糊化特性を示すが、アミログラフより少量のサンプルで分析でき、短時間で温度上昇が完了するので内在性アミラーゼの影響を受けにくいという特徴がある。基本的にアミログラフと同様に糊化特性を評価できるが、粘度の単位（B.U. と RVU）はそれぞれメーカーが定義した単位であり、温度変化速度、時間も異なる両分析法の粘度およびピーク温度を直接比較することはできない。モチコムギ澱粉は親品種の澱粉より低温で糊化が開始、完了するが、最高粘度は低かった。また、セットバックは関東 107 号の澱粉もかなり低いが、モチコムギ澱粉はそれ以上に低いという特徴を示した。

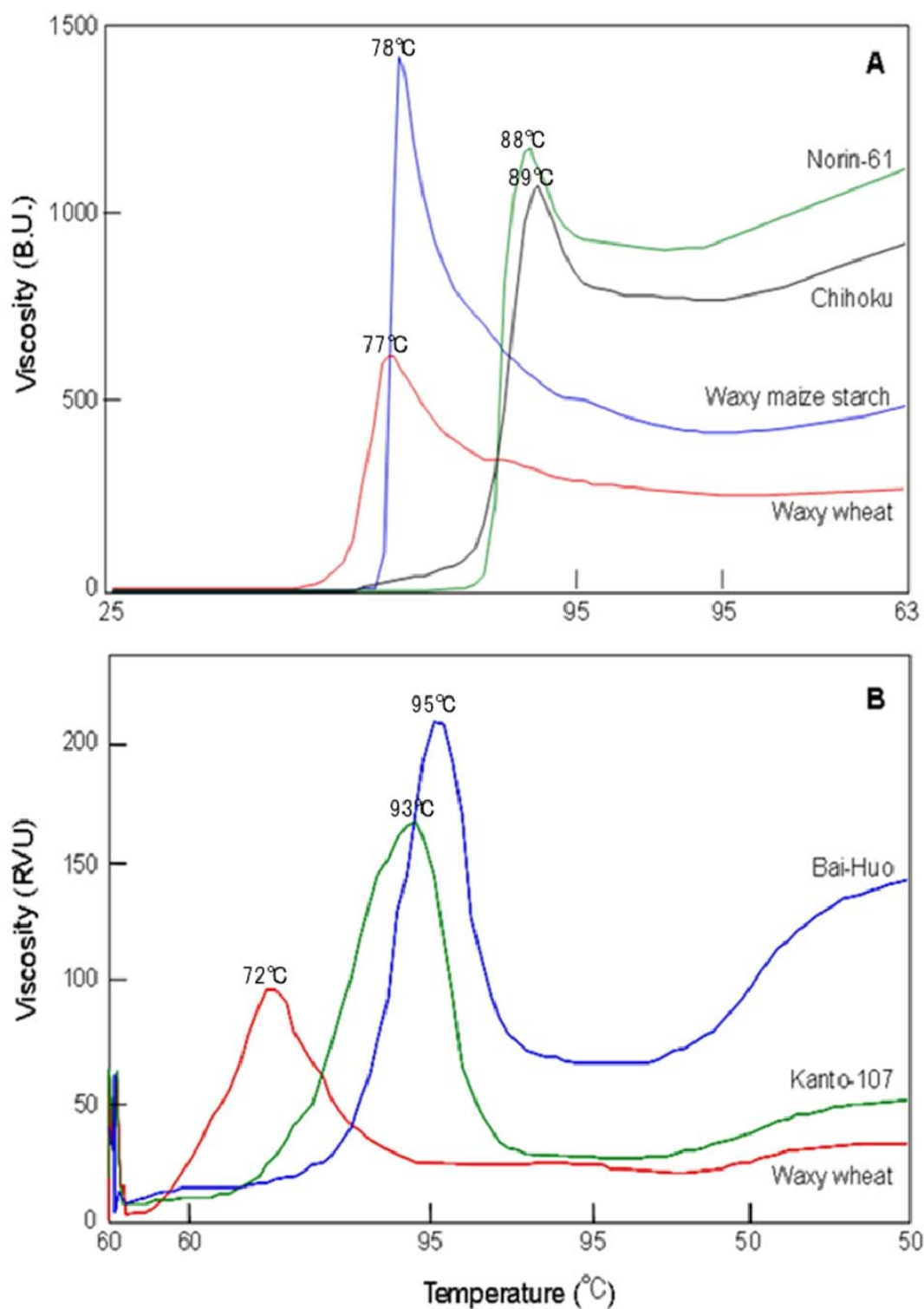


図 1-2. うるちコムギ澱粉、モチコムギ澱粉、モチコムギの親系統(関東 107 号、Bai-Huo)
 モチトウモロコシ澱粉の粘度特性比較 A : アミログラフ (B.U. : Brabender Unit)
 B : ラビッドビスコアナライザー (RVU : RVA Unit) A,B 共に温度はプログラム温度

2．X線回折

図 1-3 にモチコムギ澱粉とその両親系統（関東 107 号、Bai-Huo）コムギ澱粉の X 線回折パターンを示す。穀物の X 線回折図はその結晶構造によってトウモロコシ澱粉に代表される A 型とバレイショ澱粉に代表される B 型に分類されるが、各試料は、典型的な A 型のパターンを示すことが観察された。

3．DSC

図 1-4 に関東 107 号の DSC の吸熱パターンを示した。DSC では、澱粉の結晶構造の特徴およびアミロースと脂質の複合体の特徴が分かる。モチコムギ、その親系統コムギ（関東 107 号、Bai-Huo）、市販コムギ（農林 61 号、農林 126 号）、うるちトウモロコシ、モチトウモロコシから抽出した澱粉の DSC 解析の各温度特性値（ T_o 、 T_p 、 T_c ）と吸熱エネルギー（ H ）を表 1-2 にまとめた。

モチ澱粉は、うるち澱粉より糊化に要するエネルギー（ H ）が高い値を示した。アミロペクチン含量をベースにした吸熱エネルギー量（ H/AP ）は、ほとんど変わなかった。コムギ品種間では、モチコムギ澱粉が最も高い T_o 、 T_p 、 T_c を示した。モチトウモロコシ澱粉とうるちトウモロコシ澱粉の間の違いは少なかった。

モチコムギ澱粉とモチトウモロコシ澱粉は他の澱粉には存在する 100 付近のピークは観察されなかった。

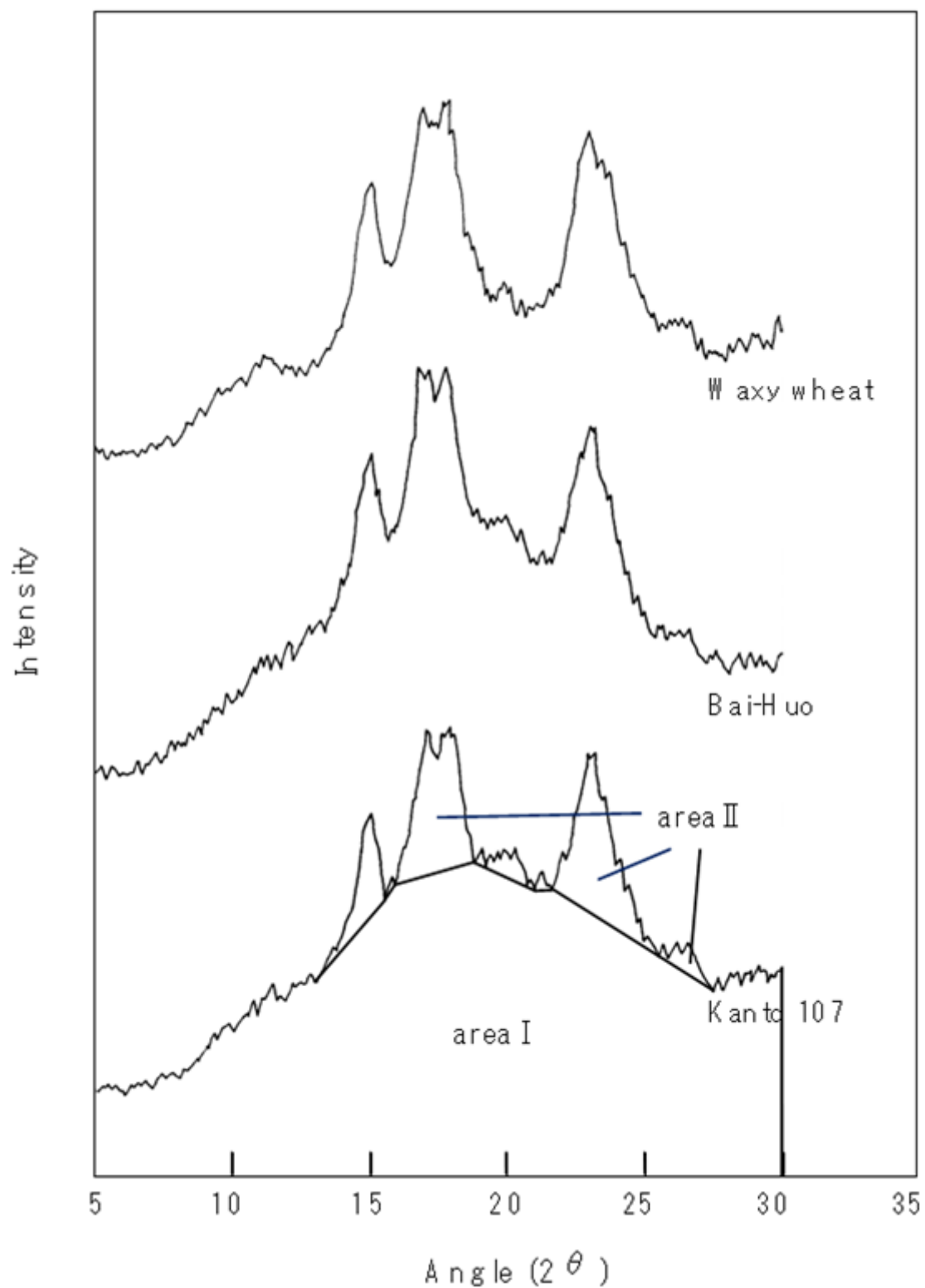


図 1-3. モチコムギと親系統コムギ(関東 107 号、Bai-Huo)から抽出した澱粉の X 線回折図

area I : 非晶質領域、area II : 結晶質領域 (糊化澱粉では消失) にそれぞれ由来する。

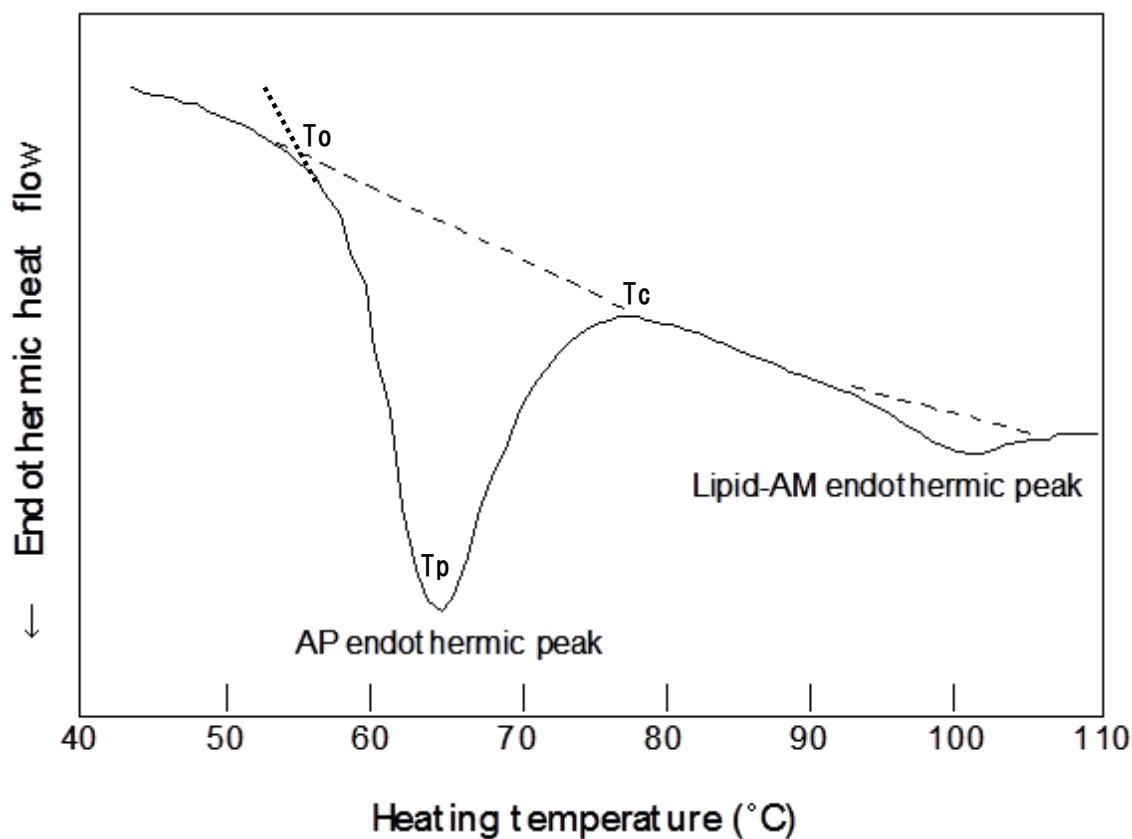


図 1-4. 関東 107 号の澱粉の DSC 解析

To : onset temperature (糊化前のベースラインと吸熱カーブの外挿した交点温度、相転移温度 = 糊化開始温度)

Tp : peak temperature (糊化ピーク温度)

Tc : conclusion temperature (糊化終了温度)

AP endothermic peak : アミロペクチン主体の結晶構造崩壊に伴う吸熱ピーク

Lipid-AM endothermic peak : 脂質とアミロース複合体の解離に伴う吸熱ピーク

表 1-2. 各種澱粉の相転移温度^a特性とエンタルピー^b

植物種	澱粉型 ^c	品種	AP吸熱ピーク ^d					Lipid-AM 吸熱ピーク ^d	
			To	Tp	Tc	ΔH	$\Delta H/AP$	Tp	ΔH^d
コムギ	N	Norin-61(N61)	57.6	62.4	73.7	6.1	7.7	100.1	0.7
			(1.2)	(0.1)	(0.5)	(0.4)	(0.5)	(0.4)	(0.1)
	N	Chihoku(N126)	58.7	64.3	75.1	6.3	8.2	100.7	0.4
			(0.1)	(0.2)	(0.6)	(0.3)	(0.4)	(0.4)	(0.0)
	N	Kanto107(K107)	59.0	64.1	78.1	7.6	8.9	100.3	0.4
			(0.4)	(0.3)	(1.0)	(0.5)	(0.6)	(0.4)	(0.1)
	N	Bai-Huo	56.2	62.2	76.5	7.4	9.5	100.0	0.4
			(0.6)	(0.2)	(0.5)	(0.3)	(0.4)	(0.4)	(0.1)
	W	(Waxy Wheat)	59.8	65.6	83.6	9.1	9.1	no peak	
			(0.4)	(0.2)	(0.7)	(0.5)	(0.5)		
トウモロコシ	N	(Normal Maize)	68.1	72.7	85.8	7.9	10.4	101.8	0.4
			(0.1)	(0.3)	(2.3)	(0.5)	(0.6)	(0.9)	(0.1)
	W	(Waxy Maize)	65.3	71.8	85.7	9.8	9.8	no peak	
			(0.2)	(0.2)	(1.1)	(0.6)	(0.6)		

a To=糊化開始温度, Tp=糊化ピーク温度, Tc=糊化終了温度

b H : J/g 澱粉、 H/AP : J/g アミロペクチン

c N=うるち澱粉、 W=モチ澱粉

d 値は n=6 の分析値の平均、() 内は標準偏差

第三節 モチコムギ澱粉の老化特性評価

第一節でモチコムギ澱粉の構造特性が、第二節でモチコムギ澱粉の糊化特性が明らかになった。第三節ではモチコムギ澱粉の老化特性を評価する。

1. 老化特性

図 1-5 にモチコムギ、その親系統（関東 107 号、Bai-Huo）の糊化澱粉を 4℃ に保存し経時的に測定した X 線回折図を示した。保存 0 日目の糊化澱粉からは、いずれも結晶構造由来の回折現象が確認できなかった。しかしながら、関東 107 号、Bai-Huo の糊化澱粉は 4℃ で 1 週間保存後に $2\theta = 17^\circ$ のピークが検出された。このピークは 4℃ での保存時間が長くなればなるほど成長していった。モチコムギ澱粉は少なくとも 2 週間目まではこのピークの増加はほとんどなかった。うるちコムギ澱粉は 3 週間目までに複数のピークが成長していくのが観察された。うるちコムギ澱粉は、完全糊化による結晶構造の崩壊が起こった後径時的に再結晶化（老化）領域が増大しているのに対し、モチコムギ澱粉はほとんど老化が観察されなかった。

図 1-6 にモチコムギ、その親系統コムギ（関東 107 号、Bai-Huo）、市販コムギ（農林 61 号、農林 126 号）、うるちトウモロコシ、モチトウモロコシ澱粉を DSC にかけて完全糊化したものを冷蔵保存し、1 週間後、2 週間後、3 週間後に DSC 測定した時の結晶構造崩壊に要するエネルギー（ H (mJ/mg)）の変化を示した。澱粉が完全に糊化しているため、保存 0 週間目の澱粉の DSC 曲線には相転移が観察されなかった。したがって H は 0 mJ/mg となっている。糊化澱粉試料を 4℃ で保存すると吸熱ピークが再び観察された。うるちトウモロコシは保存 1 週間で 3 週間保存後のうるちコムギでも達成しないレベルまで H が上昇した。Bai-Huo、関東 107 号といった親系統、チホクコムギ（関東 126 号）、農林 61 号といった市販うるちコムギ系統も 1 週間後に H の上昇が観察された。これに対して、モチコムギ、モチトウモロコシ澱粉は 1 週間後に H はほとんど上昇せず、3 週間後でも値は大きくなかった。

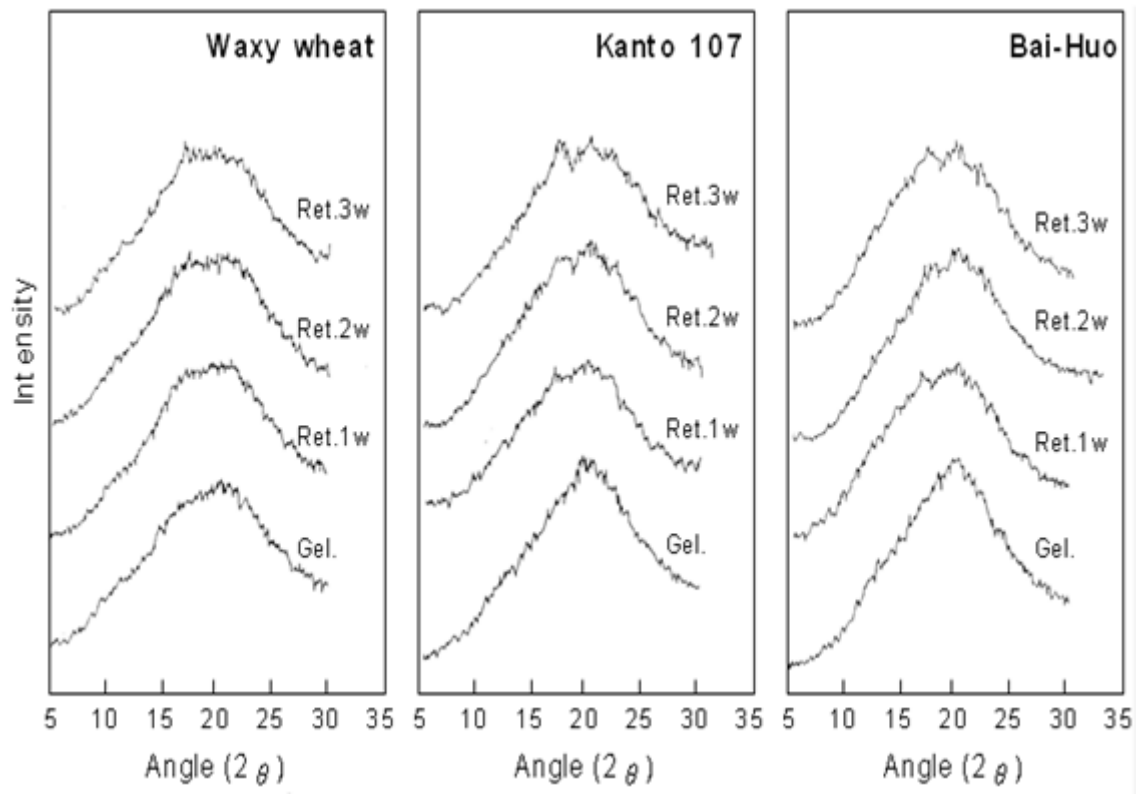


図 1-5. 完全糊化澱粉（モチコムギ、関東 107 号、Bai-Huo）を 4℃ で保存したときの X 線回折図の経時変化

Gel：新規に糊化した直後測定

Ret. 1w、Ret. 2w、Ret. 3w：4℃ で 1 週間、2 週間、3 週間保存後測定

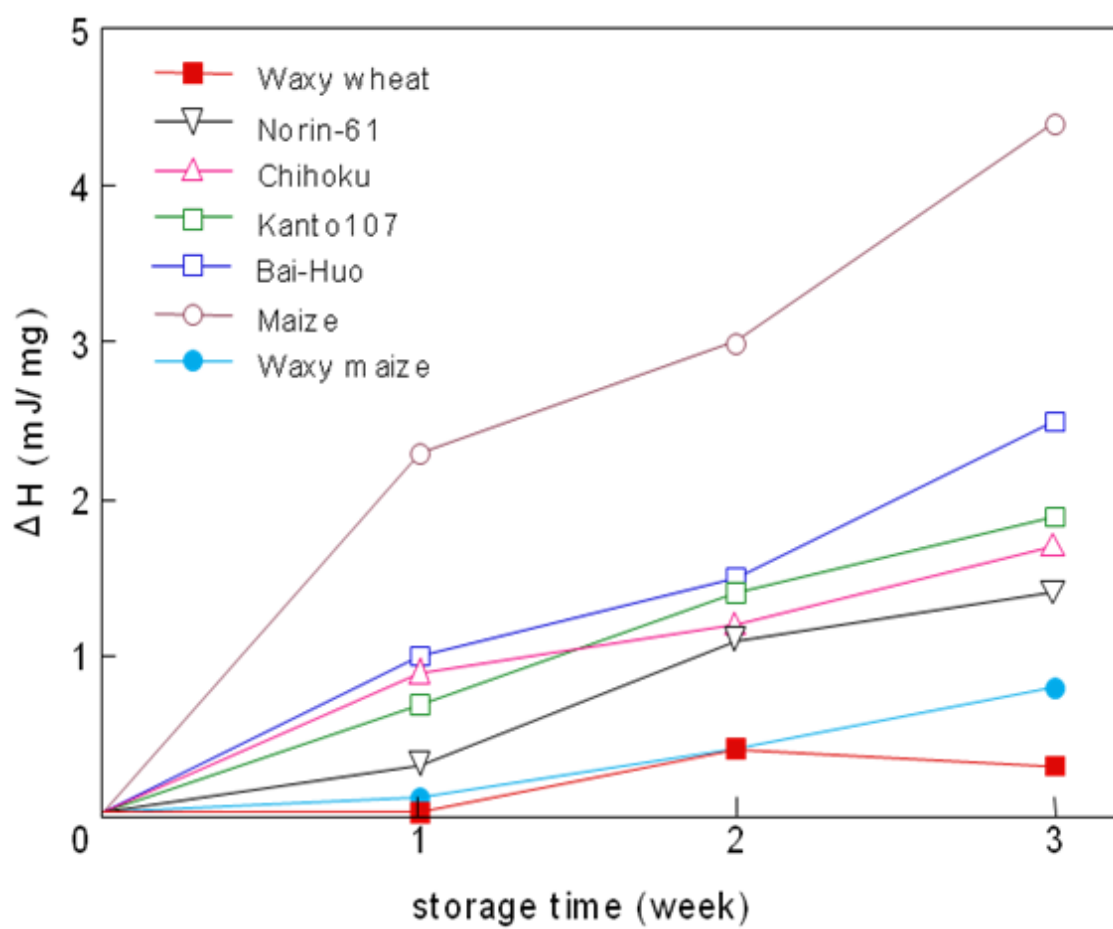


図1-6. 各種完全糊化澱粉を4 で保存した後のDSC解析で検出された結晶構造崩壊に要するエネルギー（ ΔH ）の経時変化

考察

今回ヨウ素親和力より比色法で算出した市販コムギのアミロース含量(表 1-1)は、Oda *et al.* (1992) や Yamamori *et al.* (1992) の報告で示されたもの(比色法)よりいくらか低めであった。比色法による見かけのアミロース含量測定はアミロペクチンの吸光をどう処理するかで値が異なることが知られていることから既知のデータとの比較はできないが、今回同じ手法で解析した品種間での測定値の比較は可能と判断した。

Nakamura *et al.* (1995) は、6 倍体モチコムギは Wx-A1 タンパク質、Wx-B1 タンパク質、Wx-D1 タンパク質を全て欠損しているのに対し、農林 61 号はこれら 3 つのタンパク質を全てもっていることを示している。農林 126 号(チホクコムギ)、関東 107 号及び Bai-Huo もまた、それぞれ Wx-B1 タンパク質、Wx-A1 タンパク質と Wx-B1 タンパク質、Wx-D1 タンパク質を欠損している。健全な農林 61 号と 3 つのアイソザイムの内 1 つを欠損した農林 126 号、Bai-Huo のアミロース含量がほとんど変わらず、2 つ欠損した関東 107 号のアミロース含量が顕著に低下している(表 1-1)ことから、ワキシータンパク質のアミロース伸長活性は 3 つのアイソザイムで均一ではないこと、アイソザイムの 1 種が欠損した場合にはそれを補う作用が働くこと、低アミロースコムギを得るにはワキシータンパク質を 2 つ以上欠損させることが重要と推察された。

本研究で得られた全てのアミロペクチンの側鎖の平均重合度(DP)は Bliaderis *et al.* (1981) と Hizukuri (1985) によって報告された範囲内に入っていた(表 1-1)。モチトウモロコシ澱粉は、うるちトウモロコシ澱粉より Fr. /Fr. と DP が共に低くなっており、モチトウモロコシ澱粉がうるちトウモロコシ澱粉より枝分かれ構造が少なく、側鎖も短いことが示唆された。対照的にコムギ品種間では Fr. /Fr. の値にほとんど違いが見られなかった。モチコムギ澱粉の Fr. /Fr. は、両親系統(関東 107 号と Bai-Huo)の値より大きかったが統計的な有意差を示さず、農林 61 号と農林 126 号と変わらなかった。アミロペクチンの側鎖の平均重合度については、モチコムギは親品種より有意に高い($P<0.05$)

値を示した。これらの結果は、モチコムギのアミロペクチンの構成グルコース鎖は、短鎖や長鎖に偏ることなく全体的に重合度が高いことが推察される。このアミロペクチンの構造は親の片方の品種のアミロペクチンの特性が遺伝したものではなく、ワキシータンパク質の欠損によって獲得した特徴であることを示唆している。

アミログラフ（図 1-2）におけるモチコムギ澱粉の特徴（うちコムギより糊化開始温度が低く冷却時の粘度上昇が小さい）はモチトウモロコシ澱粉でも共通に観察されたことから、これらの糊化特性はモチ系統に共通のものといえる。ラピッドビスコアナライザーでもモチコムギはアミログラフと同様の特性を示した。短時間で測定するが故に内在性酵素の影響をほとんど受けないとされるラピッドビスコアナライザーでもアミログラフ同様最高粘度が低いことが観察されたので、内在性アミラーゼの影響ではないことは明らかである。モチコムギ澱粉の糊化特性もまたワキシータンパク質がないために獲得した形質であると推察された。非晶質領域を形成するアミロースは、澱粉粒を安定に保つ機能をもっているが、モチコムギにはアミロースがないため澱粉膨潤がより低温で起こり、粒の崩壊も低温で起こると推定した。ピーク粘度が低いのも同様の理由と考えられる。冷却時の粘度上昇はモチコムギ澱粉程ではないものの関東 107 号の澱粉もかなり低かったことからこの特徴にはアミロース含量が関与している可能性がある。

澱粉の糊化は二つの段階に分けて考えることが提案されている（Shoch 1965）。最初の段階では、水を吸収することにより澱粉粒が膨潤する（Shoch 1965、Collison 1968）。第二段階では膨潤と共に澱粉分子の溶解が起こる。澱粉粒の非晶質領域は結晶領域よりも早く膨潤するが、膨潤力は結晶領域が崩壊し始める時に増大する。Tester and Morrison（1990）もまたアミロペクチン画分が膨潤力に影響することを示した。系が澱粉の糊化温度よりも高い温度に加熱されると、澱粉粒は崩壊し、アミロースとアミロペクチンの相互作用により冷却中にゲルやペーストが形成される。このことからモチコムギ澱粉が早く膨潤するのはアミロース含量が低い（アミロースが無い）からと考えられた。モチコムギ澱粉のセッ

トバックが小さい(図 1-2)のもまた、澱粉が冷却中に不可逆的に再結晶する誘因物質であるアミロースが欠損しているからと思われる。アミロースが連続的なゲルマトリックスを形成するのに必要(Ring and Stainby 1982、Ring 1985)なので、モチコムギ澱粉はこの構造が構築できなかったと推察された。関東 107 号もアミロース含量が少ないが故に冷却時粘度が上昇しなかったと考えられる。

X 線回折(図 1-3)の結果は、澱粉粒の結晶性と密接に関係があるため、澱粉粒の結晶領域、非晶質領域は主要なピークの面積を比較することによって評価できる。水平なベースラインとそれぞれのピークの tail-to-tail で引いたベースラインの間の面積は非晶質構造を反映していると考えられている(area_a)。一方、結晶領域は、それぞれのピークと tail-to-tail で引いたベースラインの間に囲まれた領域のトータルとして評価される(area_c)。モチコムギ澱粉の area_a/area_c 比は、親の系統よりいくらか低い値を示した。このことは、モチコムギ澱粉はアミロースを欠損したことにより非晶質領域が減少した或いはアミロペクチンが主体となっている結晶領域が相対的に増加した結果と推察される。

Eliassopn(1994)によれば、DSC 解析においてコムギでは 64℃ 付近に出現する大きいピークと 100℃ より若干低い温度で出現する小さいピークは、アミロペクチン主体の結晶構造が崩壊する(糊化する)のに必要な吸熱エネルギー、脂質 - アミロース複合体の解離に要する吸熱エネルギーをそれぞれ反映している(図 1-4)。モチコムギ澱粉(ほとんどアミロペクチンのみで構成)の糊化に要するエネルギー(H)がうるちコムギ澱粉(アミロースとアミロペクチンで構成)より高いのは、モチコムギ澱粉がうるちコムギ澱粉より高い結晶性を示すと結論付けた X 線回折のデータと矛盾しない。アミロペクチン含量をベースにした吸熱エネルギーは両澱粉で変わらないこともまたモチコムギ澱粉の結晶領域が相対的に大きいことを支持している。同様の結果はオオムギ(Morrison *et al.* 1993)、イネ(Biliaderis *et al.* 1986)、トウモロコシ(Inouchi *et al.* 1991)でも報告されている。モチコムギ澱粉が親も含めたどのうるちコムギ澱粉よりも高い To、Tp、Tc を示した(表

1-2)のはより強固な結晶領域が形成されているからと考えられる。モチコムギとモチトウモロコシで 100 付近のピークが検出されないのは、ヨウ素 ヨウ化カリとの複合体と同様、脂質との複合体も十分に長いグルコース鎖によるらせん構造をもつ分子との間で形成されるので、アミロースが欠損しているモチ系統澱粉では脂質との複合体が形成されないからである。

糊化直後の各種澱粉の X 線回折図が Verkleisterungs スペクトラムを示したのはそれらが完全に糊化したことを示している。親系統のコムギは、どちらも 4、1 週間保存後に $2\theta = 17^\circ$ のピークが検出され、貯蔵時間が長くなるにつれこのピークのみならず他のピークの成長も確認された(図 1-5)。これは再結晶が起こりその構造が貯蔵時間に伴い成長していることを意味している。4、3 週間保存後のピーク形状は、図 1-3 に示す生澱粉のパターンと異なることから再結晶構造は生澱粉の結晶構造とは異なることが確認された。これに対してモチコムギ澱粉では、4、3 週間保存後も老化による再結晶ピークがほとんど観察されないことからモチコムギ澱粉は非常に老化耐性が強い澱粉と推定される。同様の結果はモチ米澱粉でも観察された(Takeda and Hizukuri 1974)。

DSC 測定直後の試料を再び DSC にかけて $H=0$ になるが、測定直後のパンを 4 で保存して 1 週間後 DSC を再測定すると、糊化時の吸熱ピークより 10 程度低い温度に形状がブロードなピークが検出される(図 1-4 は糊化時の吸熱パターン)。これは、再結晶澱粉すなわち老化澱粉が形成されたことを意味するが、うるち澱粉は時間経過と共に H が上昇するのに対しモチコムギ澱粉はモチトウモロコシ澱粉同様 3 週間後もほとんど H の増加は認められなかった。DSC の測定結果からも X 線回折と同様、モチコムギ澱粉は老化に対する強い抵抗性をもっていることが示唆された。

以上のように、モチコムギ澱粉は、親の系統や他のうるちコムギ系統、さらにはモチトウモロコシとは異なる構造、性状を示すことを明らかにした。そこで、モチコムギの実用的な利用と食品素材としてのユニークな特徴を明らかにするために二次加工適性の解明を

行ったので第三章で報告する。また、胚乳組織では GBSS が欠損しているモチコムギの胚乳
以外の組織での GBSS の存在の有無を明らかにし、機能推定を行ったので第二章で報告する。

実験の部

1. 1. コムギ

6 倍体モチコムギ (Waxy hexaploid wheat WHW (*Triticum aestivum* L.)) (以下「モチコムギ」と表記する) のF₄種子、その親品種である関東 107 号、Bai-Huo及び、代表的な内麦品種である農林 61 号、農林 126 号 (チホクコムギ) は、いずれも東北農業試験場 (現: 東北農業研究センター) で栽培され 1995 年に収穫された。この 6 倍体モチコムギは、3 個のワキシータンパク質 (Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1) 全てを欠損していることが確認されている。今回試験に供したモチコムギは温室で、その他の品種は実験圃場で栽培されたものである。農林 61 号と農林 126 号は、現在、品種登録されている内麦の中でも最も製麺適性が優れた品種の一つである。それぞれの系統に存在するワキシータンパク質は、6 倍体モチコムギ (なし)、関東 107 号 (Wx-D1 タンパク質)、Bai-Huo (Wx-A1 タンパク質、Wx-B1 タンパク質)、農林 61 号 (Wx-A1 タンパク質、Wx-B1 タンパク質、Wx-D1 タンパク質)、農林 126 号 (Wx-A1 タンパク質、Wx-D1 タンパク質) である。

1. 2. 澱粉試料の調製

澱粉は、Endo *et al.* (1991) の方法に従って調製した。コムギ試料をコーヒーマルで粉碎し、80 メッシュの篩を通し回収した。粉碎した粉 30 g と水 21 ml を良く混合し生地玉を作成した。冷水中で 30 分間生地を静置した後、澱粉を水で洗い流し、生地から回収した。澱粉懸濁液を 100 メッシュのナイロン篩に通し、コムギふすまとグルテンを除いた。乳液状の澱粉懸濁液を遠心分離 (3,000 x g, 20 分間) し、沈殿した澱粉を凍結乾燥にかけた。澱粉の機能性に及ぼす影響が大きいため、脂質の影響を最小限に抑えるために次に示す手順によって室温で脱脂処理を行った。乾燥した澱粉をメタノールに分散し、2 時間攪拌した。その後、エタノールを使用して同様の処理を行った。脱脂した澱粉を以下の実験に供した。

トウモロコシ (*Zea mays* L.) 澱粉とモチトウモロコシ澱粉は、市販品 (日本食品加工(株) 社、東京) を上記した手順で同様に脱脂し実験に供した。単離した澱粉試料のアミロース含量は、Williams ら (1970) の方法を一部改良した方法により測定した。

1. 3. アミロペクチンの調製

アミロペクチンは、Banks and Greenwood (1967) の方法によって調製した。アミロースの沈殿剤として 1-ブタノールと 1-ヘキサノールを用いた。それぞれアミロペクチンの純度は、ヨウ素親和力 (Schoch 1964) で評価した。

1. 4. 高速サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC)

アミロペクチン (20 mg) を *Pseudomonas amyloclavata* 由来のイソアミラーゼ (EC 3.2.1.68) (600 U, Sigma Chemical Co., USA) を含む酢酸バッファー中で 40 °C 24 時間インキュベートし 1,6-結合を完全に切断した。引き続き、10 分間沸騰水中で処理し酵素を不活性化した。高速サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC) にアプライするまで不溶性物質の形成を防ぐため 40 °C で保存した。アミロペクチンの側鎖の分布を HPSEC システムを用いて評価した。このシステムは、ポンプ (HITACHI L-6200, 日立)、オートサンプラー (HITACHI 655A-40, 日立)、デガッサー (ERC-3310, Erma Optical Works)、屈折率測定計 (Shodex RI se-61, 昭和電工) 及びガードカラム (TSK guard column PWXL, 6.0 mm i.d. x 40 mm, 昭和電工) とガードカラムに続き直列させた 2 本のカラム (TSK-gel G3000PW, 7.5 mm i.d. x 300 mm, 昭和電工) で構成されている。カラムと検出器は、60 °C で維持した。溶離液は、ミリポアフィルター (0.45 µm) を通し、脱気した脱イオン化蒸留水を用いた (流速: 0.5 ml/分)。分解したアミロペクチン溶液 20 µl を HPSEC システムにインジェクトした。分子量マーカーとして TSK 標準溶液 POLY (polyethylene oxide, 昭和電工) を用いた。POLY には、分子量 21,000 から 160,000 に渡る polyethylene oxide が含まれている。

1.5. アミロペクチンの平均重合度の決定

アミロペクチン溶液の全炭水化物量をフェノール - 硫酸法で測定した。さらに同溶液中の非還元糖を迅速スミス分解法 (Hizukuri and Osaki 1978) を用いて定量した。全炭水化物量、非還元糖量共グリセロールを基準に算出した。平均重合度は、全炭水化物量を非還元糖量で割って算出した。

1.6. アミログラフ及びラピッドビスコアナライザー

澱粉の糊化特性を、Brabender 社製 Visco/Amylograph (type VA-1B) 及び Rapid Visco Analyser (RVA model 3D, Newport Scientific Pty., Ltd., Narrabeen, Australia) により解析した。アミログラムは、700-g.cm sensitivity のカートリッジを備えた Visco/Amylograph に 44.7 g の澱粉 (乾物換算) と 450 ml の水を加えて測定した。品温を 25 から 95 まで毎分 1.5 の割合で上昇させ、95 で 10 分間保持し、その後毎分 1.5 の割合で下降させ 63 に達するまで評価した。この間の攪拌抵抗を連続的に記録した。ラピッドビスコアナライザーは、カートリッジに 4 g の澱粉と 25 ml の水を加え測定した。品温を 60 で 2 分間保持した後、毎分 6 で 95 まで上昇させ、95 で 4 分間保持し、毎分 11.3 で 50 まで下降させ、最後に 50 で 4 分間保持した。この間の攪拌抵抗を連続的に測定した。ピーク粘度に加えブレイクダウン (糊化後の最高粘度からの粘度低下の度合い) とセットバック (冷却後の硬度上昇) を測定した。

1.7. X線回折

生澱粉、糊化澱粉 (生澱粉を 10 倍量の蒸留水中に懸濁し 30 分間煮立たせた澱粉)、老化澱粉 (糊化澱粉を 4 で 1、2、3 週間保存した澱粉) 各試料 500 mg を X 線回折装置 (理学電器 D/MAX-A) で解析した。各試料は湿度 90% で 16 時間保温することにより水分調製した後、5 度から 30 度まで毎分 4.8 度の速度で走査した。

1 . 8 . DSC

澱粉の結晶性推定をセイコー電子工業 DSC 560U system を用いて実施した。生澱粉懸濁試料（澱粉：水 = 1：4）を銀製の容器に入れシールし、25 から 150 に熱を加えた（毎分 5 上昇）。糊化時の吸熱エネルギー量（エンタルピー： H は、DSC 吸熱ピークの面積を測定することにより決定した。糊化開始温度（onset temperature、 T_o ）、糊化ピーク温度（peak temperature、 T_p ）、糊化終了温度（completion temperature、 T_c ）をそれぞれ測定した。94 から 120 の範囲で認められるアミロース - 脂質複合体の解離に要する吸熱ピークについてもまた H と T_p を測定した。

澱粉が糊化し低温にさらされ再結晶化したとき（老化後）の構造変化を Nakazawa *et al.*（1985）の方法によって解析した。最初の DSC 測定の直後、試料セルを 4 で 1、2、3 週間保存した。保存した試料を DSC により再解析した。再結晶再糊化時の吸熱エネルギー量（ H mJ/mg）を測定した。

第二章 澱粉粒結合性澱粉合成酵素のアイソザイムの解析

緒言

澱粉は胚乳部のような貯蔵組織だけでなく、他の組織でも同様に貯蔵されている (Badenhuizen 1969、Greenwood 1970)。モチ系統のイネの胚乳澱粉のアミロース含量はほぼ 0% であるのに対し葉や茎に存在する澱粉のアミロース含量は 25-35% であることから、GBSS が欠損しているモチ系統のイネの葉や茎には GBSSI とは異なる別の GBSS アイソザイムが存在していることが示唆されている。

著者らも未熟なモチコムギ (*Triticum aestivum* L.) の胚乳澱粉がヨウ素ヨウ化カリウム染色で染色されずアミロースがほとんど存在しないことを確認したが、果皮組織では濃紺に染まり果皮にはアミロースが存在することを明らかにした。これらのことから澱粉合成系、特にアミロース合成系は果皮と胚乳組織で異なることが示唆された。

コムギの果皮組織は非貯蔵器官における澱粉合成のメカニズムを研究するのに好都合な組織といえる。というのは、若い果皮組織は葉や茎組織より高い澱粉含量を示し、それ故、純度の高い澱粉が容易に得られるからである。

本章では、コムギの果皮の澱粉粒で発見し GBSS と名付けた GBSS のアイソザイムの特徴を明らかにした。

第一節 果皮澱粉粒の構造解析

まず、ヨウ素染色や電子顕微鏡観察によって果皮澱粉粒の構造解析を胚乳澱粉粒との比較において実施した。

1. 果皮澱粉粒

図 2-1 に開花後 5 日目、20 日目のモチコムギの種子断面及びモチコムギ、うるちコムギの果皮澱粉粒、胚乳澱粉粒をヨウ素染色した顕微鏡観察像を示した。また、図 2-2 にはモチコムギとうるちコムギの果皮澱粉粒 (PSGs : pericarp starch granules) と胚乳澱粉粒 (ESGs : endosperm starch granules) の電顕観察像を示した。

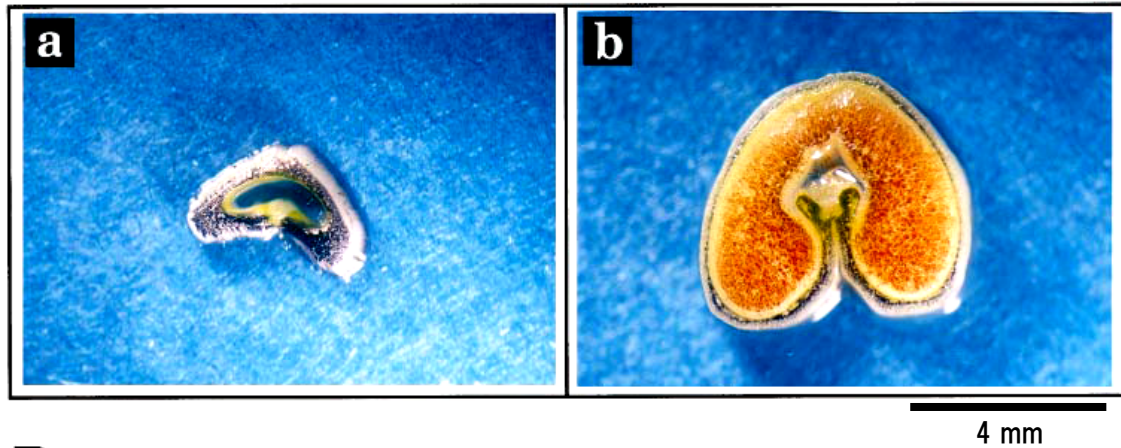
開花後 5 日目の種子は多量の澱粉により果皮層が厚くなるが、成熟した胚乳組織には果皮との間に明確に存在するアリューロン層が観察されないことから胚乳組織はこの段階では未発達であると判断した (図 2-1A)。開花後 20 日目には、胚乳組織にも果皮組織にも澱粉粒は存在する (図 2-1B)。

モチコムギの果皮澱粉粒と胚乳澱粉粒を比較すると澱粉の構成と粒の形態が異なっていた。モチコムギの果皮澱粉粒はアミロースの存在を示すように濃紺に染まるが、胚乳澱粉粒は染まらなかった (図 2-1)。胚乳澱粉粒は、以前 Parker (1985) が観察したように、大粒 (A 型) 澱粉と小粒 (B 型) 澱粉で構成されていた (図 2-1B、図 2-2)。しかしながら、PSGs は比較的サイズが一様で B 型澱粉粒よりやや小さめであった。PSGs は丸く扁平で平均直径は約 3 μm であった (図 2-2)。

表 2-1 にモチコムギ、うるちコムギの胚乳澱粉粒 (ESGs) 及び果皮澱粉粒 (PSGs)、モチトウモロコシの胚乳澱粉粒 (ESGs) の澱粉-ヨウ素複合体の最大吸収波長を示した。モチコムギ及びうるちコムギ由来の胚乳澱粉粒の澱粉-ヨウ素複合体の最大吸収波長はそれぞれ 538 nm、595 nm であった。胚乳澱粉粒に対してモチコムギ、うるちコムギの果皮澱粉粒の澱粉-ヨウ素複合体の最大吸収波長は約 600 nm であった。モチコムギにおいて果皮澱粉粒のアミロース含量は 19.4% で、胚乳澱粉粒のアミロース含量は 1% より少なかった。また、

モチコムギ、うるちコムギの果皮澱粉粒のアミロース含量（それぞれ 19.4%、18.5%）はうるちコムギの胚乳澱粉粒のアミロース含量（26.3%）より低かった。

A



B

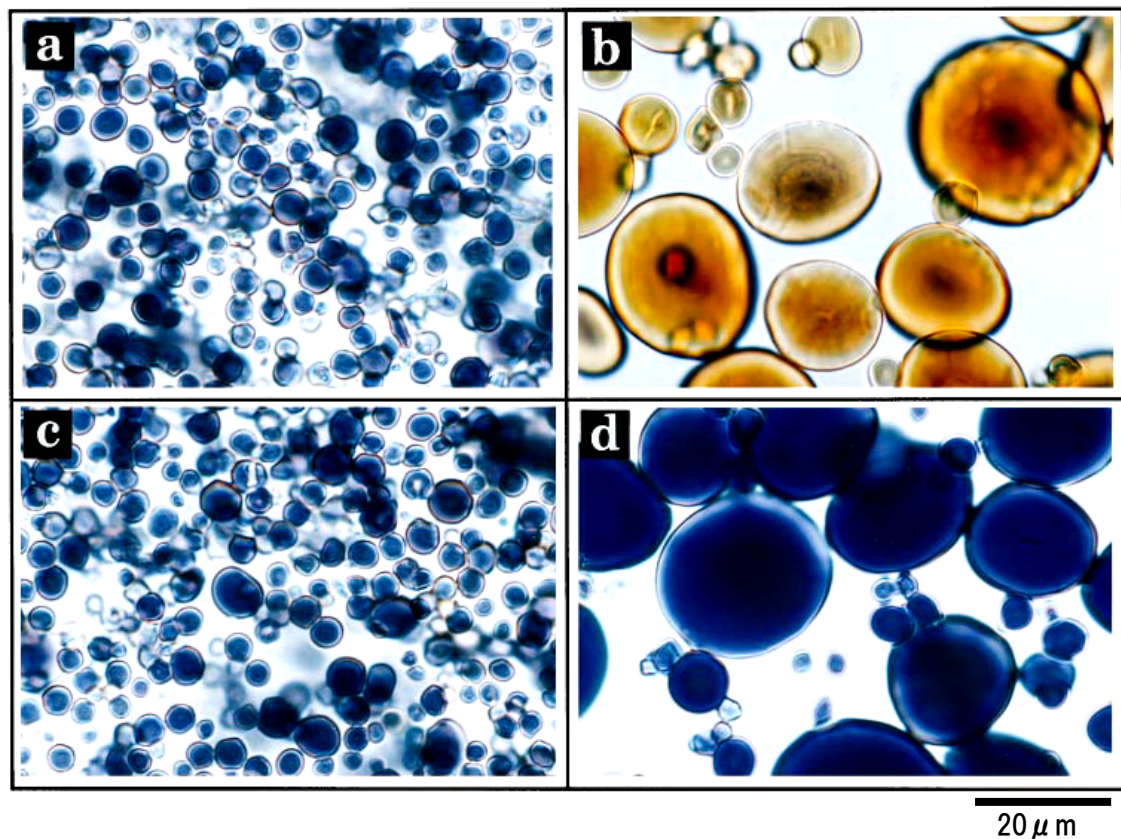


図 2-1. ヨウ素染色したコムギ種子断面及び澱粉粒の光学顕微鏡像

A：未熟種子の横断面(a)開花後 5 日目の種子、(b)開花後 20 日目の種子

B：澱粉粒(a)モチコムギ果皮澱粉、(b)モチコムギ胚乳澱粉、
(c)うるちコムギ果皮澱粉、(d)うるちコムギ胚乳澱粉（全て開花後 20 日目）

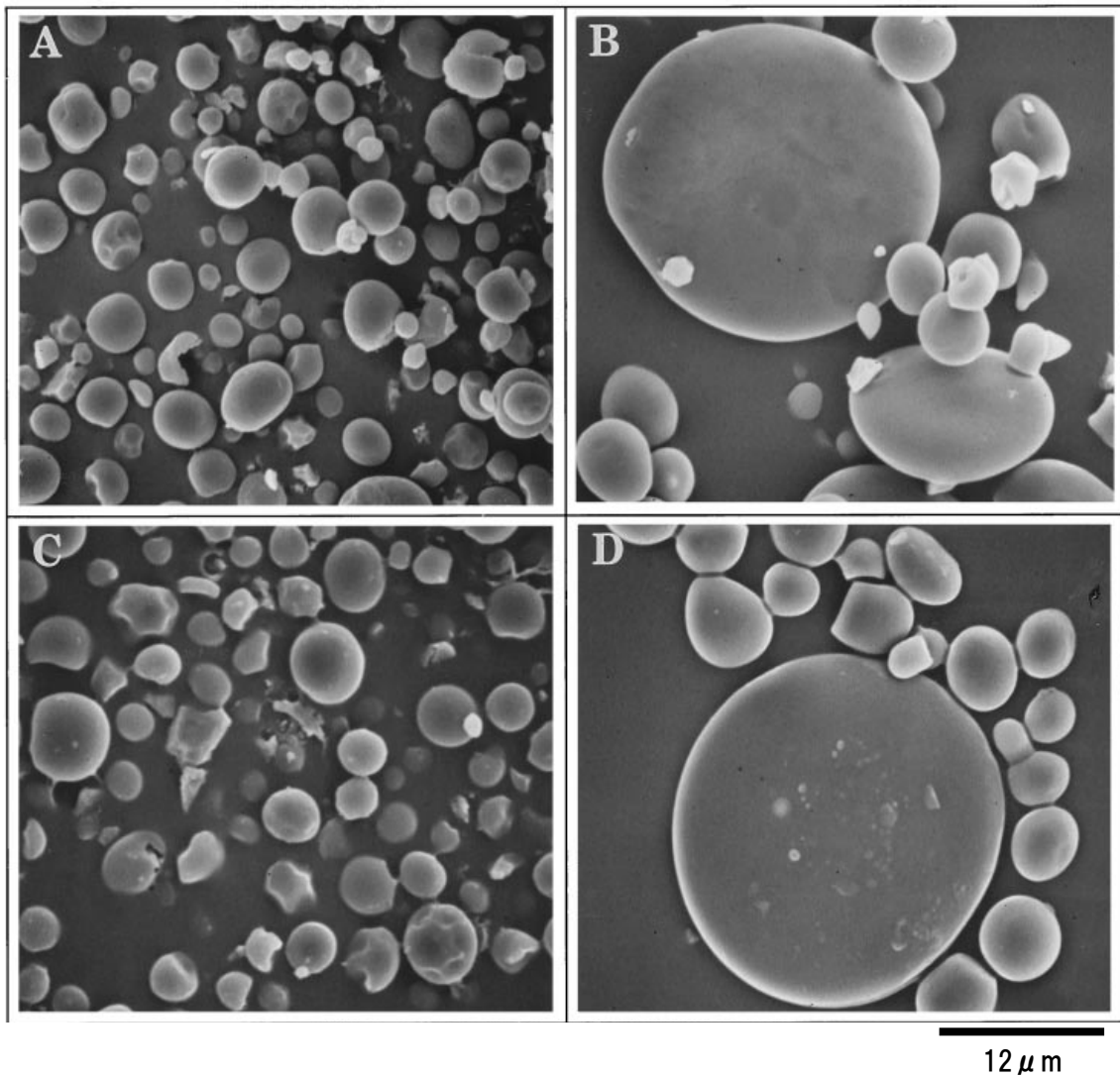


図 2-2. 果皮澱粉粒 (PSGs)、胚乳澱粉粒 (ESGs) の電子顕微鏡像

A : モチコムギ果皮澱粉粒、B : モチコムギ胚乳澱粉粒、C : うるちコムギ果皮澱粉粒、
D : うるちコムギ胚乳澱粉粒

表 2-1. 澱粉粒のアミロース含量及びヨウ素澱粉複合体の最大吸収波長

澱粉粒	アミロース含量 (%)	最大吸収波長 (nm)
モチコムギ		
胚乳澱粉粒 (ESG)	0.8	538
果皮澱粉粒 (PSG)	19.4	598
CS(うるちコムギ)		
胚乳澱粉粒 (ESG)	26.3	595
果皮澱粉粒 (PSG)	18.5	599
モチトウモロコシ		
胚乳澱粉粒 (ESG)	0.8	541

最大吸収波長は 1 M NaOH に溶解し酢酸で中和した澱粉粒 1 mg (25 ml) に 0.2 ml のヨウ素液を加え測定した。

第二節 澱粉粒結合性タンパク質の構造解析及び澱粉合成活性

第二節では、電気泳動により果皮に存在する澱粉粒結合性タンパク質の構造解析を行うと共に澱粉合成活性を測定した。

1. 澱粉粒結合性タンパク質の電気泳動

図 2-3 にモチコムギの未熟種子胚乳部及び果皮、うるちコムギの未熟種子果皮から抽出した澱粉粒結合性タンパク質を SDS-PAGE に供した結果を示した。うるちコムギの開花後 10 日目の未熟種子全体（果皮 + 胚乳組織）から抽出した澱粉粒（一番左のレーン）は、相対分子質量 61 kD、59 kD の 2 種の主要タンパク質を含んでいた。59 kD のタンパク質はモチコムギ、うるちコムギの PSGs で検出された。

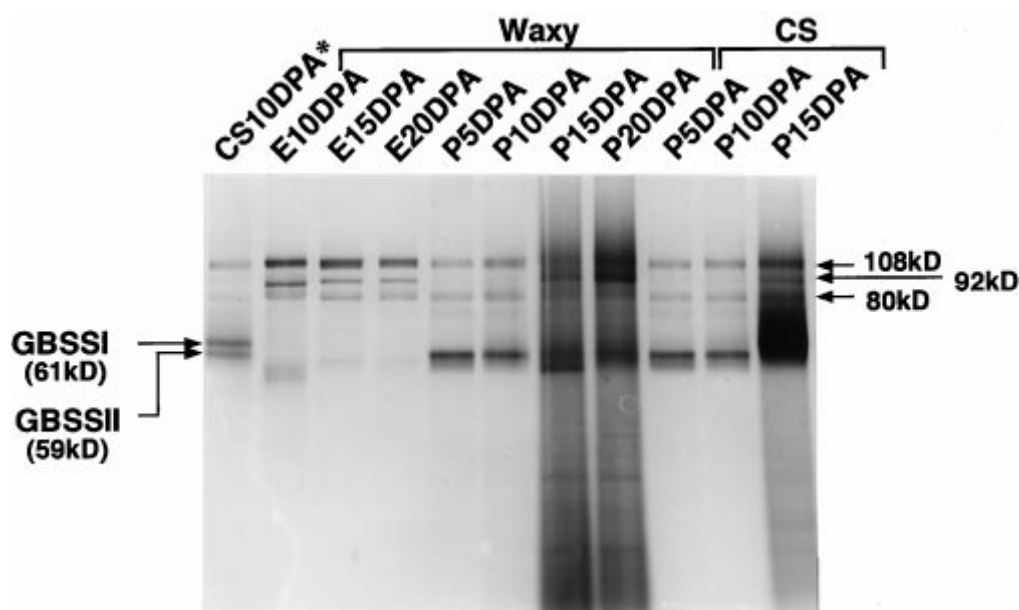


図 2-3. 澱粉粒結合性タンパク質の SDS-PAGE 像

Waxy : モチコムギ、CS : Chinese Spring (うるちコムギ)

E- : 胚乳澱粉粒 (ESGs) から抽出した澱粉粒結合性タンパク質、P- : 果皮澱粉粒 (PSGs) から抽出した澱粉粒結合性タンパク質

5DPA : 開花後 5 日目の未熟種子、10DPA : 開花後 10 日目の未熟種子、15DPA : 開花後 15 日目の未熟種子、20DPA : 開花後 10 日目の未熟種子

CS10DPA* : 開花後 10 日目の CS 未熟種子全体（果皮+胚乳組織）から抽出した澱粉粒結合性タンパク質

図 2-4 にモチコムギの果皮とうるちコムギの果皮を等量混合した材料から抽出した澱粉粒結合性タンパク質の二次元電気泳動像を示した。モチコムギの GBSS I (ワキシータンパク質) はどの組織においても発現していないので、モチコムギの果皮の澱粉粒結合性タンパク質 (GBSS) を単独で泳動した場合、GBSS との位置関係が分からない。モチコムギの GBSS の特徴を明らかにすることを目的として、あらかじめ二次元電気泳動像を把握しておいたうるちコムギの果皮由来澱粉結合性タンパク質と混合して二次元電気泳動に供した。この結果から、モチコムギの GBSS とうるちコムギの GBSS は同じものあること、コムギの GBSS と GBSS が等電点範囲 (GBSS の方が等電点範囲が狭い) と分子量 (GBSS が 2kD 程分子量が低い) において違いがあること、GBSS も GBSS と同様マイナーなスポット (主要な産物の一部がリン酸化など PI が酸性側になるような翻訳後の修飾を受けている可能性があるが詳細な説明はなされていない) を示すことが明らかになった。

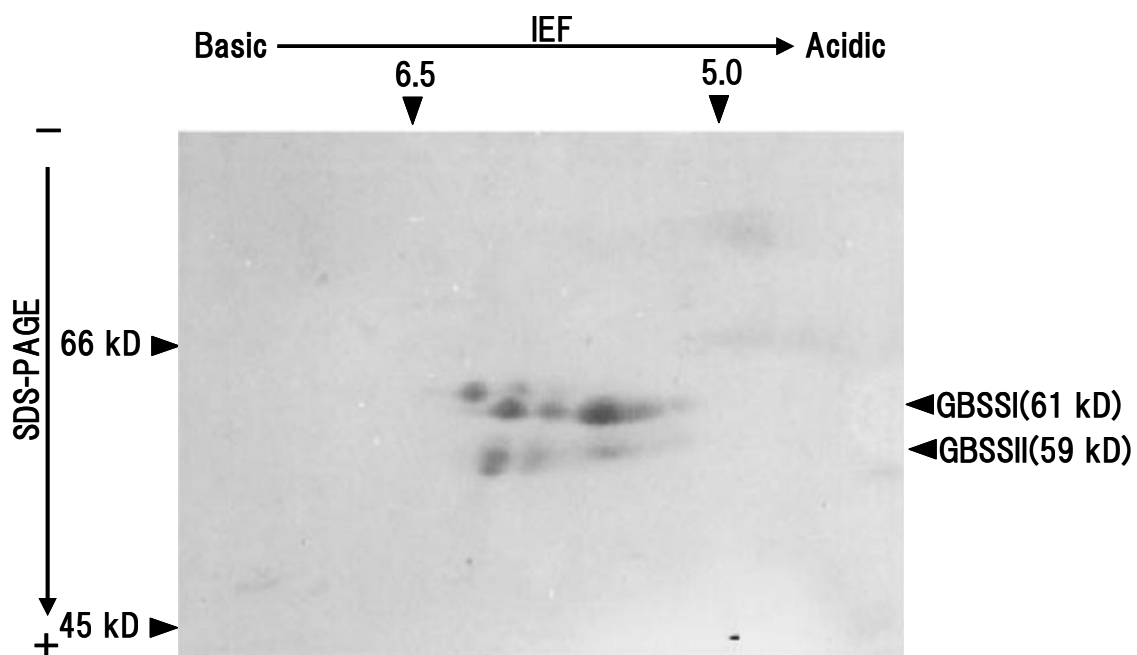


図 2-4. 果皮澱粉粒結合性タンパク質の二次元電気泳動像

2 . Starch synthase 活性

胚乳組織がほとんど発達していない開花後5日目未熟種子から果皮を開花後20日目種子から胚乳組織を切り出した。両組織をホモジナイズし、遠心分離した上清からSS活性を、沈殿から精製した澱粉粒でGBSS活性を測定した。GBSS活性は、澱粉粒をGlucoseの炭素の1つを ^{14}C に置き換えた ^{14}C ADP-Glcを含む反応液で反応させ、澱粉粒への ^{14}C ADP-Glcの取り込み量を液体シンチレーションカウンターにより測定することにより算出した。また、SS活性は、上記遠心分離上清をウサギ肝臓グリコーゲン、 ^{14}C ADP-Glcを含む反応液で反応させた後、ウサギ肝臓グリコーゲンに取り込まれた ^{14}C ADP-Glcの量により算出した。表2-2にモチコムギ、うるちコムギの果皮、胚乳組織における2種の澱粉合成活性（GBSS活性とSS活性）を示した。GBSSを欠損しているモチコムギとうるちコムギの胚乳澱粉粒のstarch synthase 活性は大きく違ったが、両コムギの果皮澱粉粒のstarch synthase 活性は同等であった。モチコムギ、うるちコムギの果皮澱粉粒とモチコムギの胚乳澱粉粒のstarch synthase活性を比較すると両果皮澱粉粒の活性の方が12倍高かった。果皮澱粉粒とうるちコムギの胚乳澱粉粒のstarch synthase 活性を比較すると果皮澱粉粒の活性の方が約1.5倍高かった。

表 2-2. 果皮、胚乳組織の澱粉合成活性

試料	GBSS (nmol/min/mg)	SS (nmol/min/mg)
果皮澱粉粒 (PSGs)		
モチコムギ	0.324 ± 0.045	1.22 ± 0.54
うるちコムギ (CS)	0.327 ± 0.009	1.11 ± 0.45
胚乳澱粉粒 (ESGs)		
モチコムギ	0.026 ± 0.004	
うるちコムギ (CS)	0.208 ± 0.036	

活性値：mg 澱粉当りの n=3 測定の平均値 ± 標準偏差

第三節 GBSS の機能推定

第三節では果皮で発現している GBSS のアミノ酸配列を明らかにし、抗トウモロコシワキシータンパク質抗体、抗バレイショ GBSS 抗体を用いた免疫反応により GBSS の機能を推定した。

1. N 末端アミノ酸配列

GBSS と GBSS 間の相同性をさらに調査するために、SDS-PAGE に供した CS (Chinese Spring: うるちコムギ) の GBSS タンパク質を調製し、気相シーケンサーにより GBSS の N 末端アミノ酸配列を決定した。35 アミノ酸配列が得られたので相同性検索を行った。GBSS の配列は、バレイショ、トウモロコシ、ソルガム、オオムギ、イネ、コムギの GBSS 或いはワキシータンパク質、大腸菌の glycogen synthase と高い相同性を示した。図 2-5 に GBSS とバレイショ、トウモロコシ、コムギの GBSS との相同性検索の結果を示した。相同性は、シグナルペプチドの切断部位である成熟タンパク質の N 末端から始まっている。14 番目から 18 番目の残基 (Lys-Thr-Gly-Gly-Leu) は GBSS と可溶性 starch synthase に保存されているモチーフに一致している (Ainswarth *et al.* 1993、Baba *et al.* 1993)。

WhGBSSI		ST	G	M	P	I	I	F	V	A	T	E	V	H	P	W	X	KTGGL	X	D	V	V	G	X	L	P	P	A	X	S	A		
PoGBSSI	G	.	.	.	K	G	M	N	L	I	F	V	G	T	E	V	G	P	W	S	KTGGL	G	D	V	L	G	G	L	P	P	A	L	A
MzGBSSI	A	.	S	A	.	G	M	N	V	V	F	V	G	A	E	M	A	P	W	S	KTGGL	G	D	V	L	G	G	L	P	P	A	M	A
WhGBSSI	A	T	G	S	G	G	M	N	L	V	F	V	G	A	E	M	A	P	W	W	KTGGL	G	D	V	L	G	G	L	P	P	A	M	A

図 2-5. コムギ GBSS の N 末端アミノ酸配列

WhGBSS : コムギの GBSS タンパク質 N 末端アミノ酸配列

PoGBSS : バレイショの GBSS アミノ酸配列(遺伝子配列から演繹)(van der Leij *et al.*, 1991)

MzGBSS : トウモロコシの GBSS アミノ酸配列(遺伝子配列から演繹)(Klosgen *et al.*, 1986)

WhGBSS : コムギの GBSS アミノ酸配列(遺伝子配列から演繹)(Ainsworth *et al.*, 1993)

: GBSS の配列と同一アミノ酸残基

: starch synthase に保存されているモチーフ

2 . GBSS のウェスタンブロット解析

図 2-6 に、バレイショおよびトウモロコシの GBSS に対する抗体を使用してウェスタンブロット解析を行った結果を示した。コムギの GBSS と GBSS はトウモロコシとバレイショの両抗血清とも交差反応を示した。GBSS はバレイショの GBSS 抗体と強く反応した (図 2-6-C Lane2) が、トウモロコシ抗体とはシャープなバンドが得られなかった (図 2-6-B Lane2)。

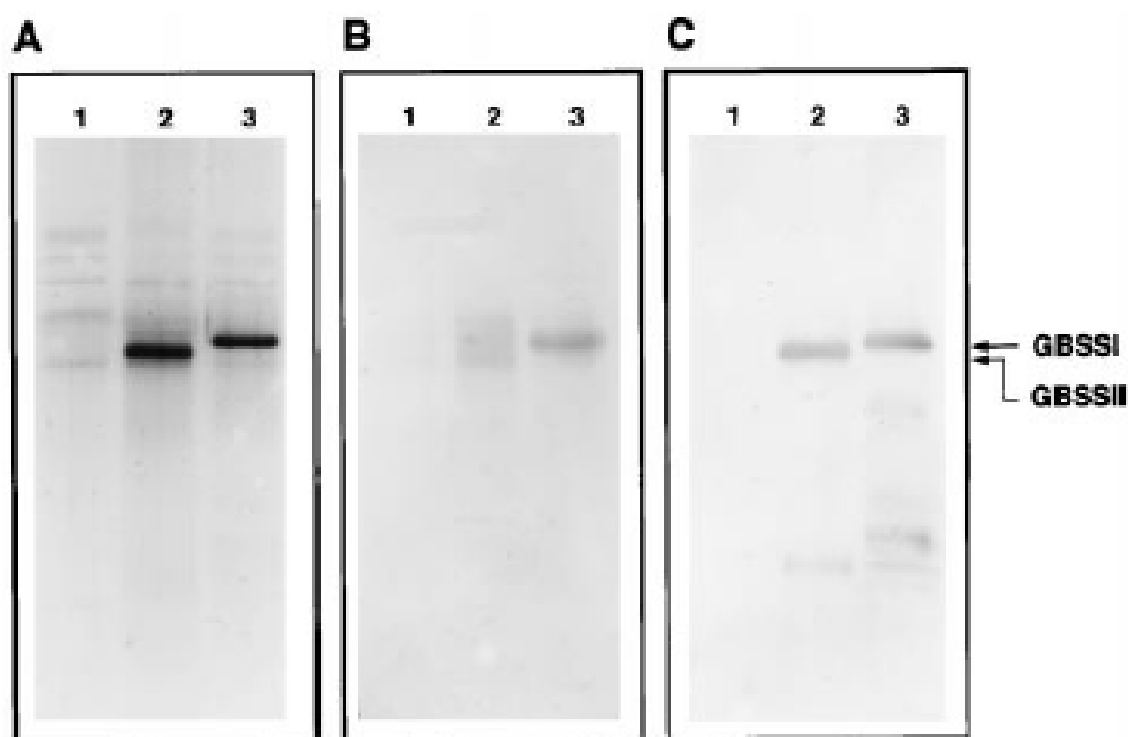


図 2-6. ウェスタンブロット解析

A : 澱粉粒結合性タンパク質の SDS-PAGE 像 (銀染色)

B : 抗トウモロコシ GBSS 抗体で免疫反応を行った澱粉粒結合性タンパク質

C : 抗バレイショ GBSS 抗体で免疫反応を行った澱粉粒結合性タンパク質

Lane1 : モチコムギの胚乳澱粉粒から抽出したタンパク質 (どちらも含まない)

Lane2 : モチコムギの果皮澱粉粒から抽出したタンパク質 (GBSS を含む)

Lane3 : うるちコムギの胚乳澱粉粒から抽出したタンパク質 (GBSS を含む)

可溶性画分に GBSS 以外の大量のタンパク質が存在したために、GBSS がこの画分に存在するか否かをポリアクリルアミドゲルを染めることによって決定するのは不可能であっ

た。

このため果皮と胚乳組織由来の可溶性画分をウエスタンブロット解析にかけた。図 2-7 はモチコムギの果皮澱粉粒結合性タンパク質、果皮可溶性タンパク質、胚乳澱粉粒結合性タンパク質、胚乳可溶性タンパク質をバレイシヨ GBSS 抗体で免疫解析を行った結果を示した。GBSSI 抗体は、果皮組織由来の可溶性画分のタンパク質とは交差反応を示さず、4 倍量の可溶性画分のタンパク質を交差させたときも同様であった。またモチコムギの胚乳由来の可溶性画分にも GBSS は検出されなかった。

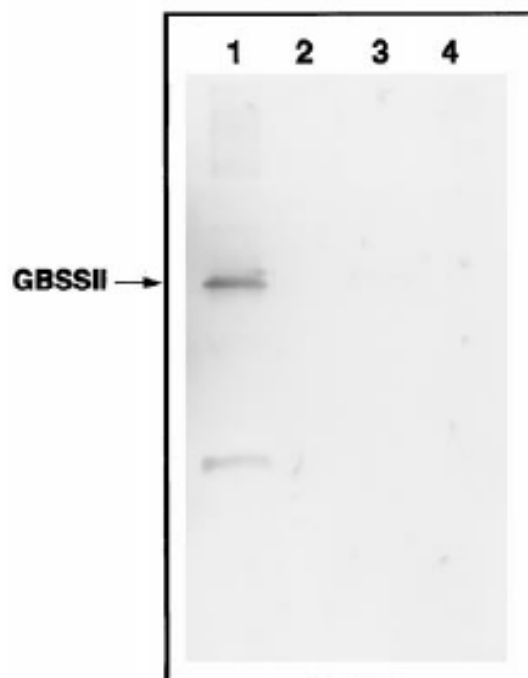


図 2-7. モチコムギ果皮、胚乳部澱粉粒結合性タンパク質及び可溶性タンパク質の抗バレイシヨ GBSS 抗体とのウエスタンブロット
Lane1：果皮澱粉粒結合性画分、Lane2：果皮可溶性画分、Lane3：胚乳澱粉粒結合性画分、Lane4：胚乳可溶性画分

考察

コムギ果皮の形態の調査により受精の時期にこの組織でヨウ素ヨウ化カリウムで濃紺に染まる澱粉粒があることが分かった (Eckerson 1917; Sandstedt 1946; Jenkins *et al.* 1975)。したがって、図 2-1 で開花後 5 日目の種子で観察された濃紺に染色された澱粉は肥大化した果皮に存在する澱粉粒であると推察したが、この澱粉は開花後 20 日目の種子でも果皮に存在することが明らかになった。胚乳が発達していくに連れ果皮澱粉は徐々に減少することが以前コムギ (Sandstedt 1946, Chevalier and Lingle 1983) でもイネ (Sato 1984) でも観察されている。この澱粉は一時的に果皮に貯蔵され、後に糖に変換され胚乳に澱粉合成の基質として移動していると考えられた (Chevalier and Lingle 1983)。

コムギの果皮組織は、形態的 (図 2-1) にもアミロース含量比 (表 2-1) からみても胚乳澱粉粒とは異なる澱粉粒を蓄積していることは明らかである。モチコムギとうるちコムギの胚乳澱粉粒の澱粉-ヨウ素複合体の最大吸収波長の違いは、アミロースの有無によった。モチコムギとうるちコムギの果皮澱粉粒の澱粉-ヨウ素複合体の最大吸収波長が 600 nm と同じなのは両方の澱粉がアミロースを含んでいることを示していた。モチコムギの果皮澱粉粒がアミロースを含んでいる一方で胚乳澱粉粒には無視できるほど低い量しか存在しない (図 2-1、表 2-1)。

モチコムギの果皮澱粉粒のアミロースの存在は、果皮組織に GBSS が GBSS のアイソザイムが存在することを意味していた。その理由は、この酵素は ADP-Glc からアミロース合成を行うために必要であるからである (Nelson and Pan 1995)。もし、GBSS が果皮組織においてアミロースを合成するならば、61 kD のタンパク質 (GBSS) は果皮澱粉粒に存在するはずだが、そのようなタンパク質はモチコムギ、うるちコムギ由来の果皮澱粉粒には見つからなかった (図 2-3)。この結果は、以前コムギ (Ainswarth *et al.* 1993) や他の穀物 (Klogen *et al.* 1986, Hirano and Sano 1991, Baba *et al.* 1993) で報告されている GBSS をコードする *waxy* 座遺伝子の胚乳、花粉特異的発現と矛盾しない。うるちコ

ムギの開花後 10 日目の未熟種子から検出された 2 種の主要タンパク質の内、61 kD のタンパク質はワキシータンパク質であり (Yamamori *et al.* 1992) ワキシータンパク質を欠損しているモチコムギには検出されなかった (図 2-3)。しかしながら、もう一つの澱粉粒結合性タンパク質 GBSS が果皮組織で検出された。このタンパク質は、トウモロコシ (Echt and Schwartz 1981、) イネ (Sano 1985) コムギ (Yamamori *et al.* 1992) バレイショ (Vos-Scheperkeuter *et al.* 1986) エンドウ (Smith 1990) の GBSS (或いはワキシータンパク質) で以前報告されている特徴と同様の特徴をもっていた。GBSS すなわち果皮で検出された 59 kD のタンパク質は、澱粉粒への結合能が非常に強く、SDS 溶液で洗った後も粒内あるいは粒上に残ったままであり、加熱で誘導した膨潤が起こった後ようやく澱粉粒から離れた。同様の特徴がトウモロコシのワキシータンパク質において報告されている (Echt and Schwartz 1981、Iman 1989)。

GBSS すなわち果皮から抽出した澱粉粒結合性タンパク質 (59 kD) の二次元電気泳動パターンは、3 種の相同的なワキシー座遺伝子 Wx-A1、Wx-B1、Wx-D1 でコードされる 3 種のタンパク質に分離される GBSS (61 kD) (Nakamura *et al.* 1993) と同様に、3 種のタンパク質で構成されているようであった (図 2-4)。

GBSS 以外にもおよそ 80 kD、92 kD、108 kD の 3 種の微量な澱粉粒タンパク質 (SGPs) が SDS-PAGE によって果皮澱粉にも胚乳澱粉にも検出された (図 2-3)。これらのタンパク質は、胚乳より果皮で相対的に量が少なかった。これらの澱粉結合性タンパク質は SGP1 (108 kD) SGP2 (92 kD) SGP3 (80 kD) と命名されたものと同じであった (Yamamori and Endo 1996)。SGP1 と SGP3 は可溶性 starch synthase、SGP2 は branching enzyme である (Takaoka *et al.* 1997)。

果皮澱粉粒は、モチコムギの胚乳澱粉粒の 12 倍、うるちコムギの胚乳澱粉粒の約 1.5 倍高い starch synthase 活性をもっていたが、このことは、うるちコムギの果皮における GBSS 活性が胚乳組織の活性より高いことを必然的に示すわけではない。何故ならば、果皮

澱粉粒は開花後 5 日目の種子から、胚乳澱粉粒は開花後 20 日目の種子から抽出しているからである。開花後 5 日目の未熟種子では未だ胚乳組織が発達していないので果皮澱粉粒が圧倒的に高い starch synthase 活性をもっていたと考えられる。モチコムギとうるちコムギの果皮組織の可溶性画分の starch synthase 活性もまた同様の結果であった(表 2-2)。

決定した GBSS のアミノ酸配列の中で 14 番目から 18 番目の残基 (Lys-Thr-Gly-Gly-Leu) は GBSS と可溶性 starch synthase に保存されているモチーフで構成されていた(図 2-5)(Ainswarth *et al.* 1993、Baba *et al.* 1993) が、このモチーフは、澱粉合成の基質である ADP-Glc の結合部位と考えられている (Furukawa *et al.* 1990)。

GBSS はバレイショの GBSS 抗体と強く反応したが、トウモロコシ抗体との反応は弱かった(図 2-6)。トウモロコシの GBSS のエピトープの構造は、コムギの GBSS のそれとは同一でないかも知れない。そうでなければ、トウモロコシ抗 GBSS 抗体に対する弱い反応は、この実験で使用したバレイショ抗 GBSS 抗体とトウモロコシ抗 GBSS 抗体間の力価の違いによるものかも知れない。バレイショ抗血清は 1/2000 希釈で GBSS と反応したが、トウモロコシ抗血清は 1/100 希釈のときにのみ反応した。GBSS は胚乳組織由来のタンパク質や果皮組織由来の可溶性画分のタンパク質に交差反応を示さなかった(図 2-6、図 2-7)。このことから GBSS が胚乳由来の澱粉粒結合性画分に特異的なように、GBSS は果皮組織の澱粉粒結合性画分に特異的に存在することが示唆された。

3 つの観点からこの新規なタンパク質は GBSS の一種であることが強く示唆される。(a) 高い澱粉合成活性(SS 活性)が果皮澱粉粒で検出された(表 2-2)、(b) GBSS の N 末端アミノ酸配列の複数個所の違いから推察するとこのタンパク質はコムギ GBSS や GBSS から派生した産物でないが、各植物種の GBSS と相同性が高いことが明らかになった(図 2-5)、(c) GBSS はバレイショとトウモロコシの GBSS と免疫的に関連があった(図 2-6)。

Starch synthase のアイソザイムが GBSS としてエンドウ (Dry *et al.* 1992) とバレイ

シヨ (Edwards *et al.* 1995) で報告された。しかしながら、アミロペクチン合成にも関与しているであろうこれらの酵素は、可溶性画分にも澱粉粒結合性画分にも存在し、多分澱粉形成の間に澱粉粒に取り込まれる (Martin and Smith 1995)。Smith *et al.* (1997) はエンドウとバレイシヨ由来の GBSS を単に starch synthase (SS) として報告したが、著者らは Dry *et al.* (1992) や Edwards *et al.* (1995) が報告しているように、主として澱粉粒結合画分に存在するアミロースの合成に関与する starch synthase のアイソザイムは、単に starch synthase と呼ぶのではなく、「GBSS」と呼ぶべきと考える。本論文で言及しているコムギの GBSS は GBSS としてのこの条件に適合する。

GBSS のアイソザイムが存在する証拠を複数の研究者が報告している。モチトウモロコシにおいて花粉、子葉鞘、胚乳の澱粉はアミロースを欠損しているが、果皮を含むほかの組織の澱粉はヨウ素染色により濃紺に染まっている (Hixon and Brimhall 1968、Badenhuizen 1969)。胚乳澱粉に不活性なワキシータンパク質が生産される 2 種のイネワキシ変異系統は葉組織では濃紺に染まる澱粉をもっているが、これは明らかにこれら 2 つの組織で別のワキシ座遺伝子が分存在することを示している (Sano 1985)。小野と鈴木 (1957) は、オオムギの数種のモチ栽培種ではヨウ素染色で染まらない澱粉が胚乳と花粉でのみばかりでなく葉にも存在することを示した。しかしながら、同じモチオオムギの再実験では葉には濃紺に染まる澱粉だけが見られた。この矛盾の理由は明らかでないが、これらの実験に使用したモチオオムギ品種は ESGs に 2% から 10% のアミロースと検出可能なワキシータンパク質を含み、完全なモチ系統ではなかったというのは注目すべきである (Ishikawa *et al.* 1994)。以前、胚乳澱粉にアミロースとワキシータンパク質の両方を欠損したオオムギワキシ変異系統が作られ (Ishikawa *et al.* 1994)、濃紺に染まる澱粉が若い果皮組織に発見された (Nakamura *et al.* 1998)。これらの結果は、単子葉植物の GBSS アイソザイムをコードする遺伝子は二種以上存在し、これらの遺伝子発現は組織特異的な様式で制御されているという証拠を示している。

双子葉植物においてはこの状況はもっと多様性がある。例えば、エンドウの低アミロース変異系統 (lam) (Denyer *et al.* 1995) は葉 (Tomlinson *et al.* 1998) や鞘 (Denyer *et al.* 1997) 由来の澱粉に主要な SGP をもっていた。このタンパク質は GBSS のアイソザイムと報告され (Denyer *et al.* 1997、Tomlinson *et al.* 1998) エンドウもまた GBSS をコードする二種以上の遺伝子をもっていることを示唆している。対照的にバレイショのアミロース合成では一種の GBSS が支配的である。GBSS 遺伝子上に一塩基欠損が起こっている (van der Leij *et al.* 1991) バレイショの amf 変異系統 (Vos-Scheperkeuter *et al.* 1987) は地下茎に加え、根、葉、花粉でもヨウ染色されない澱粉を有した (Jacobsen *et al.* 1989)。

Waxy 遺伝子 (GBSS 遺伝子) と GBSS 遺伝子の間の相同性の程度は、サザンハイブリダイゼーションでクロスハイブリする程は高くない。Waxy cDNA をサザンハイブリダイゼーションのプロープとして使用したが、waxy 遺伝子と強い相同性をもつ遺伝子断片は同定できなかった (Nakamura *et al.* 1998)。他の穀物での同様の実験では waxy cDNA に相同性をもつ単一遺伝子が同定されている (Shure *et al.* 1983、Hirano and Sano 1991)。図 2-8 にこれまでクローニングされたコムギの GBSS 及び GBSS (Vrinten and Nakamura 2000 : GenBank accession no.AF109395) の cDNA から演繹されたアミノ酸配列を示した。図 2-5 で示した starch synthase に保存されているモチーフは確認されたが、コムギの GBSS と GBSS との相同性は、コムギ GBSS のアイソザイム間の相同性よりかなり低かった。コムギの GBSS とコムギ、豆、バレイショの GBSS との相同性は、それぞれ 65.6%、69.9%、72.1% と他の穀物の GBSS との相同性がむしろ高かった。図 2-4 に示したように GBSS も A、B、D 染色体にコードされている少なくとも 3 種類のアイソザイムがあることが予想される。図 2-8 に示した cDNA から演繹されたアミノ酸配列と図 2-5 に示した GBSS のアミノ酸配列に違いがあるのは、アイソザイム間に多型が存在するためと推察される。GBSS 遺伝子のさらなるクローニングおよび座乗染色体の特定によりコムギ GBSS の機能についての推察が可能になると思われる。

GBSS -D1:MAALVTSQLATSGTVLGITDRFRRAGFQGVPRSPADAALGMRTVGAS
 GBSS -B1:MAALVTSQLATSGTVLGITDRFRRAGFQGVPRSPADAPLGMRTTGAS
 GBSS -A1:MAALVTSQLATSGTVLSVTDTRFRRPGFQGLRPRNPADAALGMRTVGAS
 GBSS : MGSIPNYCSYQTNSVGSCLKLSPHI-QFQQSCNNEVMFLSMRNKTQLAK

 AAPTQ SRKAHRGTRRCLSMVVRATGSGGMNLVFVGAEMAPWSKTGGLSDVLGGLPPA
 AAPKQSRKAHRGTRRCLSMVVRATGSAGMNLVFVGAEMAPWSKTGGLSDVLGGLPPA
 AAPKQ SRKPHRFDRRCLSMVVRATGSGGMNLVFVGAEMAPWSKTGGLSDVLGGLPAA
 RRATNYGT--HRNSSRTPAPIVCST--GMPIIFVATEVHPWCKTGGLSDVVGGLPPA

 MAANGHRVMVISPRYDQYKDAWDTSVVSEIKVVDKYERVRYFHCHYKRGVDRVFVDHPC
 MAANGHRVMVISPRYDQYKDAWDTSVVSEIKVADEYERVRYFHCHYKRGVDRVFVDHPC
 MAANGHRVMVISPRYDQYKDAWDTSVISEIKVVDKYERVRYFHCHYKRGVDRVFVDHPC
 LAAMGHRVMTIAPRYDQYKDTWDTNVLVEVIVGDRTEVTRFFHCHYKRGVDRVFVDHPC

 FLEKVRGKTKEKIYGPDAAGTDYEDNQRFSLCQAALEVPRI LNDNNPYFSGPYGED
 FLEKVRGKTKEKIYGPDAAGTDYEDNQRFSLCQAALEAPRI LNDNNPYFSGPYGED
 FLEKVRGKTKEKIYGPDAAGTDYEDNQRFSLCQAALEVPRI LNDNNPHFSGPYGED
 FLEKVVGKTGSKLYGPTTGDFRDNLRFCLLCQAALEAPRVLNNDNNSEYFSGPYGEN

 VVFVCNDWHTGLLACYLKSNIYQSSNGIYRAAKVAFCHNI SYQGRFSFDDFAQLNLPDR
 VVFVCNDWHTGLLACYLKSNIYQSSNGIYRTAKVAFCHNI SYQGRFSFDDFAQLNLPDR
 VVFVCNDWHTGLLACYLKSNIYQSSNGIYRTAKVAFCHNI SYQGRFSFDDFAQLNLPDR
 VVFVANDWHTAVLPCYLKSMYKQNGIYVNAKVAFCHNI AYQGRFPRVDFELLNLPES

 FKSSFDFIDGYDKPVEGRKINWMKAGILQADKVLTVSPYYAEELISGEARGCELDNIM
 FKSSFDFIDGYDKPVEGRKINWMKAGILQADKVLTVSPYYAEELISGEARGCELDNIM
 FKSSFDFIDGYDKPVEGRKINWMKAGILQADKVLTVSPYYAEELISGEARGCELDNIM
 FMPSFDFVDGHVKPVVGRKINWMKAGITECDVVLTVSPHYVKELTSGPEKGVDEL DGL

 RL TGI -TGIVNGMDVSEWDPTKDKFLAVNYDITTALEGKALNKEALQAEVGLPVDRKV
 RL TGI -TGIVNGMDVSEWDPAKDKFLAANYDVTTALEGKALNKEALQAEVGLPVDRKV
 RL TGI -TGIVNGMDVSEWDPIKDKFLTNYDVTTALEGKALNKEALQAEVGLPVDRKV
 RAKPLETGIVNGMDVVDWNPATDKYISVKYNATTVAEARALNKEILQAEVGLPVDSSI

 PLVAFIGRLEEKGPDVMIAAIP EILKEEDVQIVLLGTGKKKFERLLKSIEEFPSKV
 PLVAFIGRLEEKGPDVMIAAIP EILKEEDVQIVLLGTGKKKFERLLKSVEEFPSKV
 PLVAFIGRLEEKGPDVMIAAIP EIVKEEDVQIVLLGTGKKKFERLLKSVEEFPTKV
 PVIVFIGRLEEKGSDILIAAIP EFL -EENVQIIVLGTGKKKMEEELMLLEAKYPQNA

 RAVVRFNAPLAHQMMAGADVLAVTSRFEPGLIQLQGMRYGTPCACASTGGLVDTIVE
 RAVVRFNAPLAHQMMAGADVLAVTSRFEPGLIQLQGMRYGTPCACASTGGLVDTIME
 WAVVRFNAPLAHQMMAGADVLAVTSRFEPGLIQLQGMRYGTPCACASTGGLVDTIVE
 RGI AKFNVP LAHMMFAGANFIIVPSRFEPGLIQLQGMRYGVIPICSSSTGGLVDTVSE

 GKTGFHMGRLSVD CNVVEPADVKKVVTTLKRAVKVVGTPAYHEMVKNCMIQDLSWKGP
 GKTGFHMGRLSVD CNVVEPADVKKVVTTLKRAVKVVGTPAYHEMVKNCMIQDLSWKGP
 GKTGFHMGRLSVD CNVVEPADVKKVVTTLKRAVKVVGTPAYHEMVKNCMIQDLSWKGP
 GVTGFHMGSFNVEFETVDPADVAASNVTRALKQYKTPSFHAMVQNCMAQDLSWKGP

 AKNWEDVLLELGVEGSEPGVIGEEIAPLAMENVAAP
 AKNWEDVLLELGVEGSEPGVIGEEIAPLAMENVAAP
 AKNWEDVLLELGVEGSEPGVIGEEIAPLALENVAAP
 AKWEEALLGLGVEGSQPGIEGEEIAPLAKQNVATP

図 2-8. コムギ GBSS 及び GBSS の cDNA の塩基配列から演繹されたアミノ酸配列

: starch synthase に保存されているモチーフ

実験の部

2. 1. 植物材料

普通小麦 CD-1479 (*Triticum aestivum* L. cv. 盛系 CD-1479) と CS を 22 (昼)/15 (夜) の条件下温室で栽培した。CD-1479 は、モチコムギを半数体育種して作成した品種であり (Hoshino *et al.* 1996) CS は非モチ (うるち) コムギ品種である。CS は 3 種のワキシータンパク質をもっている一方で、CD-1479 は胚乳部には全てのワキシータンパク質が欠如している。

未熟種子を開花後 35 日目まで 5 日毎穂から採取した。未熟種子は液体窒素で凍結させ澱粉粒を抽出するまで -70 °C で保存した。

2. 2. 澱粉粒の調製

果皮と胚乳を未熟種子から分離した。胚乳組織は、開花後 5 日目では光学顕微鏡で観察できなかった。分離した果皮と胚乳は、過剰量の 0.25 M Tris-HCl (pH 7.5) で 3 回洗浄した。組織を乳鉢に移し、生重量の 3 倍量の SDS 緩衝液 (0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)、3% (W/V) SDS、10% (W/V) glycerol、0.05% (v/v) 2-mercaptoethanol) を入れホモジナイズした。ホモジェネートを 15,000 x *g* で 5 分間遠心分離した。上清をイムノブロット分析で可溶性画分として使用するまで -20 °C で保存した。沈殿物は SDS 緩衝液に再懸濁し一昼夜静置した。懸濁液は目開き 40 μ m のナイロンメッシュで濾過し 15,000 x *g* で 2 分間遠心分離した。沈殿物を SDS 緩衝液で 2 回洗浄し蒸留水で 3 回、冷アセトンで 3 回洗浄した。沈殿物を真空乾燥し -20 °C で保存した。

2. 3. 澱粉染色と顕微鏡解析

未熟種子と澱粉粒の切断組織をヨウ素液 (0.74 g の精製ヨウ素と 1.48 g の KI を 400 ml の蒸留水に溶解した) で染め、光学顕微鏡で観察した。走査型電子顕微鏡にかけるため、

澱粉粒をアルミニウムの土台に張った両面テープの上にまぶしイオンコーター（エイコーエンジニアリング）を用いて白金蒸着させた。観察は、電子顕微鏡 model S-2700（日立）で 10 kv の加速電圧で実施した。

2.4. アミロース含量

アミロース含量は、Yamamori *et al.* (1992) により報告された手法で測定した。すなわち、澱粉粒 (20 mg) を 5 ml の 25% (v/v) ethanol 含有 0.75 M NaOH 溶液に懸濁し、室温に 12 時間静置した。試料を蒸留水で 50 ml に調製し、アミロース含量を analyzer (Technicon, Bran-Lubbe 社) で KI-I₂ 溶液 (0.005% [w/v] KI, 0.003% [w/v] I₂) を用いて測定した。ポテトアミロースとアミロペクチン製剤 (Sigma) を検量線作成用に用いた。ヨウ素-澱粉複合体の最大吸収波長は Konishi *et al.* (1985) の方法に従って決定した。

2.5. SDS-PAGE と二次元電気泳動

澱粉粒結合タンパク質は 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離した (Laemmli 1970)。澱粉粒結合タンパク質を抽出するために精製澱粉を SDS 緩衝液で懸濁し沸騰水中で加熱溶解した。澱粉溶液を氷上で冷やし 15,000 × *g* で 10 分間遠心分離した上清を SDS-PAGE に供した。可溶性画分もまた沸騰水中で 5 分間加熱し、氷上で冷やした後 SDS-PAGE に供した。電気泳動後、タンパク質を銀染キット (和光化学) を用いて検出した。

澱粉粒結合タンパク質を Nakamura *et al.* (1993) の方法に従って二次元電気泳動で解析した。澱粉粒を可溶化液 (8 M urea, 2% [v/v] Nonidet-P40, 2% ampholine (pH 3.5-10)、5% [v/v] 2-mercaptoethanol、5% [w/v] PVP) に懸濁し、加熱し、氷上で冷却したものを 15,000 × *g* で 10 分間遠心分離した。上清を 400 V で 14 時間等電点電気泳動に供した。二次元目として 15% 低 Bis acrylamide gel で SDS-PAGE を行った。

2.6. 澱粉合成活性

澱粉合成活性を測定するため、500 mg の開花後 5 日目未熟種子及び 500 mg の開花後 20 日目種子の胚乳組織を乳鉢に移し、3 ml の氷冷緩衝液(50 mM Hepes-NaOH(pH 7.5)、5 mM MgCl_2 、2 mM DTT、1 mg/ml BSA) でホモジナイズした。ホモジェネートを 4℃ で 15,000 x g 10 分間遠心分離し、上清の可溶性酵素活性を測定した。沈殿物は緩衝液に再懸濁し、目開き 40 μm のナイロンメッシュで濾過した。懸濁液を澱粉粒が落ち着くまで 4℃ で 15 分間静置し、上清を除いた。澱粉粒を 2 サイクルの緩衝液による再懸濁-遠心分離を行った後、氷冷アセトンによって 1 サイクルの洗浄を行った。澱粉粒は 4℃ で空気乾燥し -20℃ に保存した。

澱粉粒結合性画分、可溶性画分の澱粉合成活性は、Singletary *et al.* (1997) に従い [^{14}C]ADP-Glc の取り込みによって評価した。GBSS 活性の測定は、1 mg の澱粉粒を 200 μl の反応緩衝液 (100 mM Bicine(pH 8.3)、25 mM KCl、10 mM GSH、4.5 mM EDTA、3.5 mM [^{14}C]ADP-Glc[120 dpm/nmol]) で連続的にマイルドな振盪を行い 25℃ で反応させる。1 時間後、1% KCl を含む methanol (70% [v/v]) を加えることによって反応を止め、10 分間氷温で培養する。可溶性澱粉合成酵素活性は、1 mg のウサギ肝臓グリコーゲンと 50 μl の可溶性抽出物を 1 mM の [^{14}C]ADP-Glc(222 dpm/nmol) を含む上記反応緩衝液による primer-dependent assay を用いて測定した。試料を 25℃ で 30 分間培養し、100 μl の 0.2 M NaOH を加えることで反応を止めた。1 ml の氷冷 ethanol を加えた後、反応液を氷温で 10 分間保温した。両アッセイにおいてコントロール反応液は、標識した ADP-Glc の添加後速やかに反応をストップさせた。

氷温で保温後、両アッセイの反応液を 15,000 x g で 10 分間遠心分離し、上清を除いた。沈殿物は懸濁液と ethanol 沈殿で 2 回洗浄した。沈殿物を 500 μL の 1 M HCl で再懸濁し、5 分間煮沸した後、冷やし、7 ml のシンチレーションカクテルと混合した。放射活性を液体シンチレーションカウンター (Aloka) で測定した。活性は 1 mg の澱粉が 1 分間に取り込む [^{14}C]ADP-Glc のモル数 (nmol/min/mg) で表した。

2.7. N末端アミノ酸配列解析

SDS-PAGEの後、タンパク質をゲルからPVDF膜にエレクトロブロッティングにより転写し(Hirano and Watanabe 1990)、クマシーブリリアントブルーRで染色した。対象となるバンドを抜き出し、気相プロテインシーケンサー(Applied Biosystems 470A Protein Sequencer)にかけた。アミノ酸配列とデータベース上にある他の配列との比較は、BLASTにより行った。

2.8. 免疫プロット解析

澱粉粒由来のタンパク質と可溶性画分を10%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEで分離し、PVDF膜にエレクトロブロットした。転写物は1%(w/v) BSAを含むTBST(20 mM Tris-HCl(pH 7.5)、150 mM NaCl、0.05% Tween 20)溶液中に25℃で60分間保温した後、TBST溶液で希釈した抗トウモロコシGBSS、ウサギ血清及び抗バレイシヨGBSSIウサギ血清(筑波大学馬場先生よりご提供いただいた)中に25℃で60分間保温した。引き続きウサギ抗IgG alkaline phosphatase 抱合体(Promega)中に25℃で60分間保温した後、免疫反応を起こした物質をWestern Blueで安定化したalkaline phosphataseの基質で検出した(Promega)。

第三章 モチコムギ粉の二次加工適性の解明

緒言

これまで我々が二次加工に利用してきた小麦粉は、2種の分子すなわちアミロースとアミロペクチンで構成される澱粉をもつ。小麦粉の二次加工は、基本的に加水 混合 加熱 冷却というプロセスを経る。澱粉粒は加水後の加熱中に膨潤するが、この段階でまずアミロースが溶出し、やがてアミロペクチンが主体となっている澱粉の結晶構造が崩壊し、膨潤した澱粉粒の崩壊により所謂糊化が完了する。糊化の完了と同時に冷却が起こり、澱粉は再結晶する。これが澱粉の老化である。Goodfellow と Wilson (1990) は、FTIR による研究によりアミロースが糊化後の冷却時に起こる短期間の老化に大きく関与することを示した。一方、アミロペクチンと澱粉ゲルの老化特性の関係を多くの研究者が指摘している (Miles *et al.* 1985、Biliaderis and Zawistowski 1990)。Gudmundsson (1994) はアミロペクチンが長期間の老化や澱粉ゲルの構造的変化の主因になると報告している。

第二章まででアミロースを含まないモチコムギの澱粉性状を明らかにした。その中で、うるちコムギ澱粉に比べて結晶領域が大きい、糊化開始温度、ピーク温度、完了温度が低い、セットバック（糊化後冷却時粘度）が低い、老化耐性が高いというモチコムギ澱粉の特徴は二次加工性に大きく影響を与えたと考えられた。そこで本章では、新規食品素材、食品改良剤としてのモチコムギの食品工業への利用可能性を評価することを目的に、モチコムギをテストミル粉碎し粉碎特性を評価し、その性状を特に物性試験を中心に確認し、パン、麺、菓子、パスタを含む各種二次加工試験を実施し官能特性、老化耐性等を評価、検証した。

第一節 モチコムギの製粉特性の把握

まず、二次加工試験のために東北農業研究センターで比較的大規模に栽培された２ロットのモチコムギ系統（モチコムギ-M及びモチコムギ-F）をビューラーテストミル（模式図を図3-1に示した）で粉碎し製粉特性を把握した。

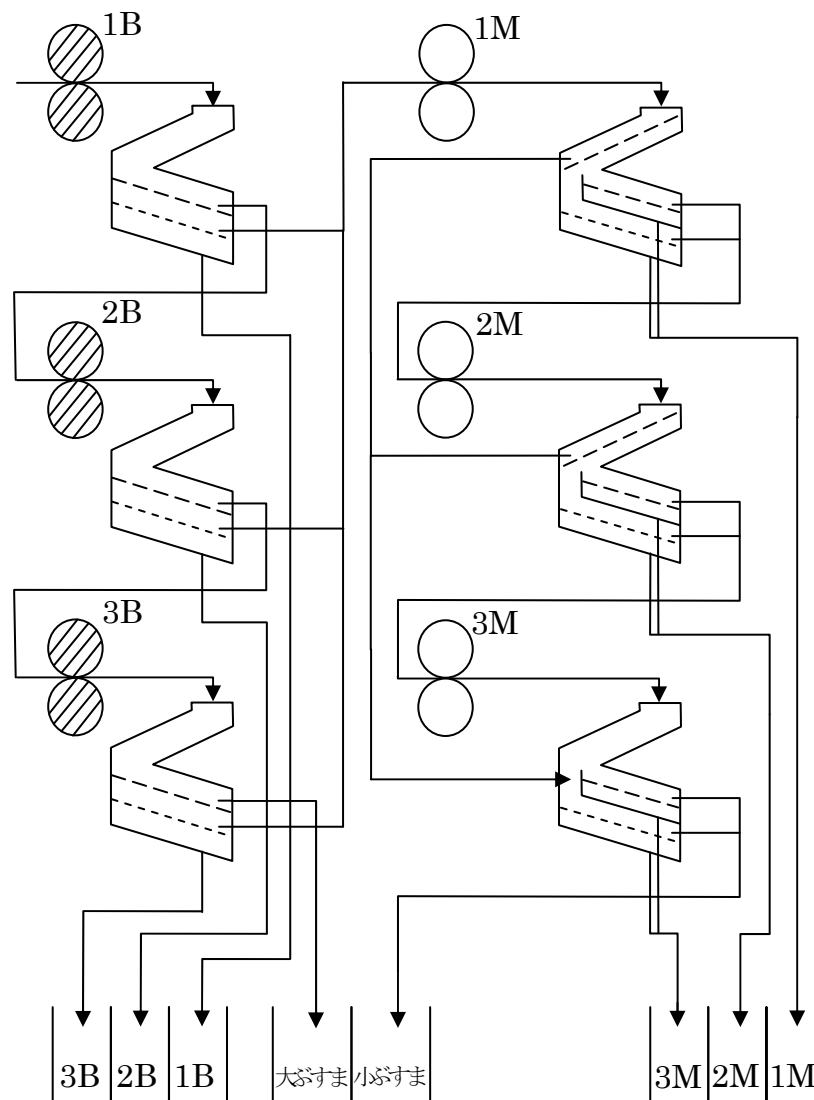


図 3-1. ビューラーテストミルの模式図

1B、2B、3B：プレーキロール、溝があり 1B 2B 3B の順に溝の数が増える

1M、2M、3M：ミドリリングロール、滑面ロール 1M 2M 3M の順にロール幅減る

篩から伸びる横矢印：篩未通過画分の流れ、篩から伸びる縦矢印：通過画分の流れ

1. 製粉特性

表 3-1 に 2 ロットのモチコムギのブレイキ粉 (1B、2B、3B)、ミドリング粉 (1M、2M、3M) の各セクションの収率 (原料小麦重量に対する重量 (%))、水分、灰分、粗タンパク質、平均粒度と市販コムギ (対照) 農林 61 号、チホクコムギ (農林 126 号)、1CW (カナダ産強力系小麦：パン用)、WW (アメリカ産薄力系小麦：菓子用)、ASW (オーストラリア産中力系小麦：麺用) 60% 粉 (二次加工試験のために調製した粉、図 3-1 の下部に示した 1B と 1M (上級粉)、2B と 2M (中級粉)、3B と 3M (下級粉) を混合し、テストミルに投入した原料小麦に対して 60% になるように上級粉から混ぜていった粉：例えば 1B+1M と 2B+2M だけで 60% に達すれば混ぜる必要はないが、足りなければ 3B+3M を混合する) の水分、灰分、粗タンパク質を示した。モチコムギの合計の欄に書かれているのは 60% 粉の分析値ではなく、ストレート粉 (1B~3B、1M~3M の粉を全部混合した粉) の分析値である。幅広く二次加工試験を実施するためにできるだけ多くの粉を利用する必要があったためストレート粉を作成した。従ってストレート粉の分析値が第三節に示す二次加工試験に供した粉の分析値となる。

モチコムギ-M の小麦粉収率は、モチコムギ-F よりも高かった (それぞれ 65.4%、60.9%)。ブレイキ粉はそれ程変わらないが、ミドリング粉がモチコムギ-M の方が多く採れた。特に 2M 粉の小麦粉収率が異なっていた (モチコムギ-M : 19.5%、モチコムギ-F : 14.8%)。ストレート粉の分析値をみると、モチコムギ-M の灰分 0.42 %、粗タンパク質 12.3% は 1CW (カナダ産パン用小麦) と同程度であった。それに対してモチコムギ-F の灰分は非常に高く 0.52% で通常のパン用粉 (強力粉) (1CW)、国内産麺用粉 (中力粉) (農林 61 号、チホクコムギ) よりも高い一方で粗タンパク質 10.2% はむしろ ASW (オーストラリア産麺用小麦) に近かった。モチコムギ-M の平均粒度は非常に高く 1CW に近いのに対し、モチコムギ-F は 32.0 μm と低かった。

表 3-1. テストミル各ストックの分析値^a

画分 ^b	収率 ^c (%)	水分 (%)	灰分 (%)	粗蛋白平均粒度 ^d (%)	(μm)
モチコムギ-M					
1B	3.5	15.4 \pm 0.2	0.39 \pm 0.02	11.5 \pm 0.3	56.1
2B	7.1	15.9 \pm 0.1	0.36 \pm 0.03	14.3 \pm 0.3	44.9
3B	1.5	14.3 \pm 0.2	0.60 \pm 0.04	17.7 \pm 0.1	43.5
1M	29.5	16.7 \pm 0.1	0.39 \pm 0.03	11.9 \pm 0.2	62.9
2M	19.5	15.8 \pm 0.2	0.43 \pm 0.02	11.8 \pm 0.3	48.5
3M	4.3	14.8 \pm 0.0	0.66 \pm 0.04	12.2 \pm 0.3	27.1
合計	65.4	16.1 \pm 0.2	0.42 \pm 0.02	12.3 \pm 0.2	53.5
モチコムギ-F					
1B	2.6	14.5 \pm 0.3	0.60 \pm 0.02	9.3 \pm 0.2	33.0
2B	7.9	15.4 \pm 0.2	0.54 \pm 0.02	10.2 \pm 0.3	25.0
3B	2.3	14.1 \pm 0.0	0.61 \pm 0.03	12.3 \pm 0.2	23.6
1M	28.1	16.1 \pm 0.3	0.51 \pm 0.01	9.9 \pm 0.1	35.3
2M	14.8	14.9 \pm 0.2	0.48 \pm 0.03	10.3 \pm 0.2	33.8
3M	5.2	13.6 \pm 0.3	0.57 \pm 0.02	10.5 \pm 0.3	22.8
合計	60.9	15.4 \pm 0.3	0.52 \pm 0.01	10.2 \pm 0.2	32.0
農林 61 号		13.7 \pm 0.2	0.39 \pm 0.01	7.8 \pm 0.2	
チホクコムギ (農林 126 号)		13.9 \pm 0.1	0.45 \pm 0.01	9.2 \pm 0.2	
1CW (強力系小麦)		14.0 \pm 0.2	0.42 \pm 0.00	12.4 \pm 0.2	
WW (薄力系小麦)		14.0 \pm 0.0	0.40 \pm 0.02	7.7 \pm 0.2	
ASW (中力系小麦)		14.0 \pm 0.2	0.40 \pm 0.01	8.8 \pm 0.1	

a 平均値 \pm 標準偏差、b ビューラーテストミルで粉碎した小麦粉画分 c 投入した原料小麦重量に対する各画分の重量比率 (各画分以外に小ふすま画分、大ふすま画分があり、また水の飛散があり合計は 100%にならない) d それぞれの画分の平均粒度

60%粉: 例えばモチコムギ-F は、1B+1M で 30.7%、2B+2M で 22.7%なのでこれらを全て混合して合計 53.4%になる粉を作る。60%粉を調製するにはあと 6.6%不足しているので、3B と 3M を混合したものの中から 6.6%分を加え 60%粉とする。このようにして調製した小麦粉を二次加工試験等に応用する。

第二節 モチコムギ粉の生地物性の把握

テストミルで2ロットのモチコムギの粉碎を完了し、両ロットの見かけのアミロース含量が0%であること、ヨウ素染液で染色されないことでモチコムギであることを確認し、澱粉の糊化特性、老化特性、生地物性の評価を実施した。

1. アミログラフ、ミキソグラフ

図3-2はモチコムギ2ロット（モチコムギ-F：福島産モチコムギ、モチコムギ-M：盛岡産モチコムギ）及びうるちコムギ2系統（農林61号（N61）、チホクコムギ（N126））から得られた60%粉のアミログラフを示した。モチコムギ2ロットはいずれもうるちコムギと比較してより低温で糊化が開始し完了する、糊化ピーク粘度が低い、セットバック（冷却時粘度上昇）がほとんど認められないという特徴を保持していた。モチコムギ-Fはモチコムギ-Mよりピーク粘度がより低かった。

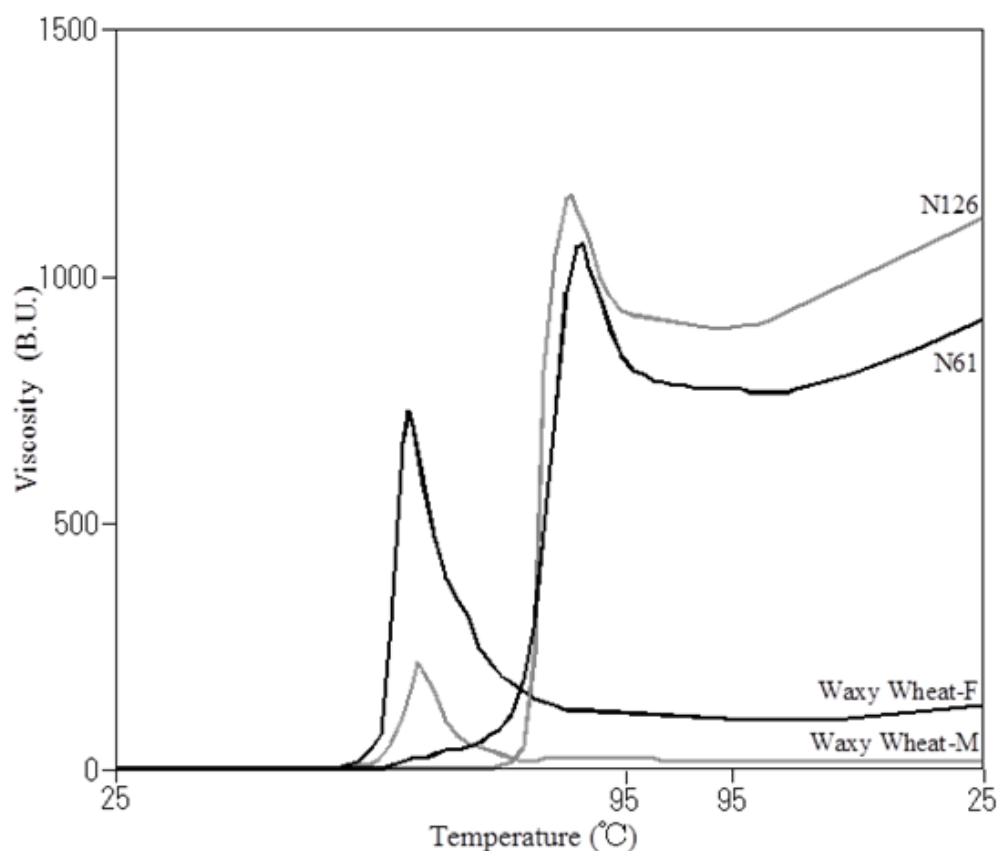
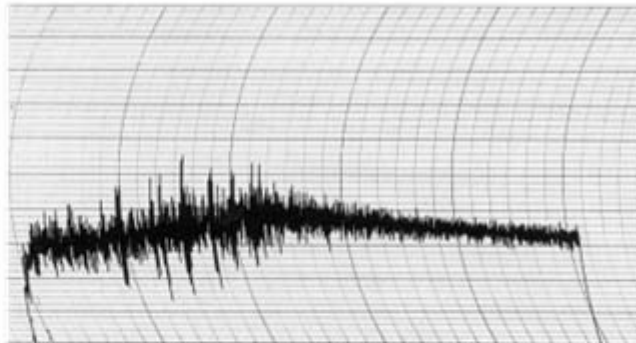


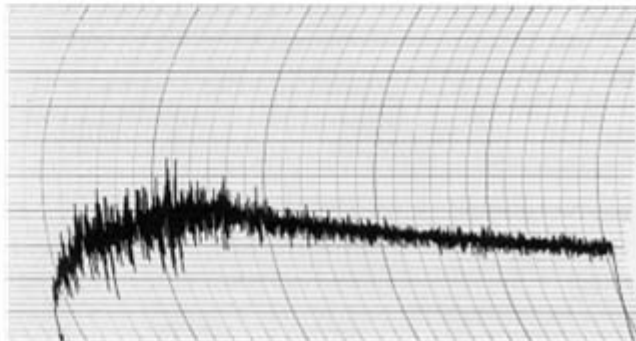
図3-2. うるちコムギ（農林61号（N61）、チホクコムギ（N126））とモチコムギ（モチコムギM、モチコムギ-F）のアミログラフ

図 3-3 は上記 4 点のミキソグラフを示した。これはミキシング時の生地抵抗を経時的に記録したものである。両モチコムギは、早い段階で生地がまとまり抵抗が上がっている。また、上下に大きく振れていることからミキシング幅が広い、ピークからの抵抗の減少が大きいのでブレイクダウンが大きいと判断した。これらはいずれも典型的なパン用コムギの特徴であり、モチコムギ 2 系統はパン用コムギに近い生地特性をもっていることが明らかになった。交配した直後の世代には、通常、選抜形質（モチ性）以外は両親のどちらかの形質が表れる。片親の関東 107 号は麺用コムギであるので、もう一方の親の Bai-Huo のタンパク質の特性がパン用コムギに近いためにミキソグラフがパン用小麦粉の特徴を示したと推察された（Nakamura *et al.* 1995）。

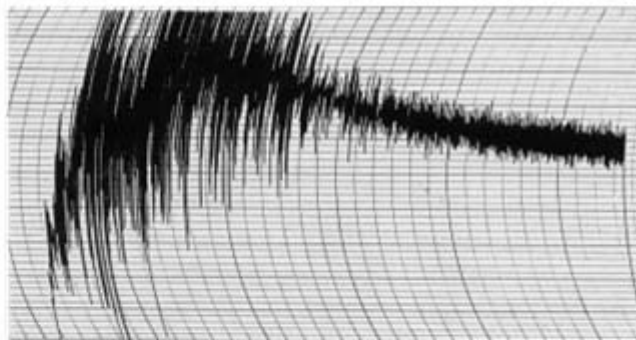
a) N61



b) N126



c) Waxy Wheat-M



d) Waxy Wheat-F

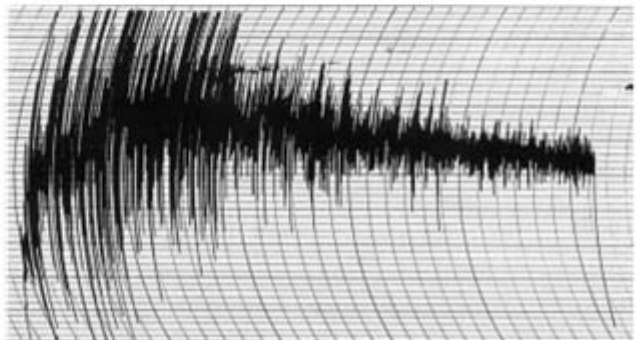


図 3-3. うるちコムギ（農林 61 号（N61））、チホクコムギ（N126）とモチコムギ（モチコムギ-M、モチコムギ-F）のミキソグラフ

第三節 モチコムギ粉の二次加工適性の解明

第二節までにモチコムギの2ロット（モチコムギ-F、モチコムギ-M）のテストミル粉碎を行い、やや収率は低いが製粉性に問題はないこと、モチコムギ-Fは強力粉並に粗タンパク質が高いこと、糊化が低温で始まり、冷却粘度が上がらない、老化耐性が高いという特徴があることを確認した。そこで本節では各種二次加工試験を行い、モチコムギの製パン性、スポンジケーキ適性、バターケーキ適性、製麺性を評価した。

栽培地域の効果を最小限にするために二次加工特性解明には2ロットのモチコムギを1:1にブレンドして使用した。結果としてブレンド小麦粉は、水分15.7%、灰分0.47%、粗タンパク質11.3%になった。

1. 製パン性

表3-2に製パン試験の結果をまとめた。

表3-2. モチコムギを配合した食パンの製パン特性と官能評価結果

配合 (%)	パン体積 (ml)	重量 (g)	製造日			4 1日貯蔵後		
			歯切れ	硬さ	口溶け	歯切れ	硬さ	口溶け
0	1700	542	5.0a	5.0a	5.0a	5.0c	5.0d	5.0c
5	1720	543	4.7b	5.2a	4.7b	6.2a	6.8ab	5.9a
10	1690	543	4.5b	5.0a	4.5b	6.0ab	7.1a	5.8a
30	1670	545	4.0c	4.6b	4.0c	5.6b	6.5b	5.3b
50	1720	551	3.2d	4.0c	3.2d	4.6c	6.0c	4.5d
100	1440	565	2.1e	2.8d	1.9e	2.7d	4.7d	2.1e

10人の官能スコアの平均。官能スコアは各項目においてカナダ・ウエスタン・レッド・スプリング NO.1 コムギ(10W)を5点とした相対値。スコアの横に示したアルファベット(a~e)は有意差の有無を表している。各官能項目の中で異なる文字が付いているものは互いに危険率5%で有意差がある(Tukey検定による)。配合：小麦粉総量に対するモチコムギ粉の割合

歯切れ：スコアが低いと団子状、高いとサクサクして歯切れがよい

硬さ：スコアが低いと硬い、高いと口当たりが軽く軟らかい

口溶け：スコアが低いと団子状、高いと口の中で広がるように溶けて口溶けがよい

図 3-4 にはスライサーでカットしたパンの内相を示した。モチコムギ由来のパンは、対照区と比べてパン体積が小さく、内相が荒れており気泡が大きく弾力も少なかった。モチコムギ 100%で製造したパンは陥没しパンの体をなさなかった。モチコムギの配合割合が 50%より少ないとき、パンへのダメージは小さかった。しかしながら、パンの内相構造は、モチコムギの量を増やすに連れて密から粗に変化した。気泡もまた楕円形から円形になり、気泡の壁の厚さも増加した。さらに、うるちコムギ粉へのモチコムギ粉の添加により、クリスプネス（まま粉状 カリカリする）、硬さ（硬い 柔らかい）、咀嚼性（軟らかい 粘着性）を含む官能特性に顕著に影響を与えた。咀嚼性は、モチコムギ粉を 5%添加したときでさえわずかに粘りが高くなっていた。モチコムギ粉を 30%加えたときパンは滑らかさに欠け、粘って口の中でだんご状になった。モチコムギ粉は内相の硬さにはほとんど影響しなかった。しかし、配合率 50%ではパンの内部構造は硬く荒いものになった。

4 一昼夜保存すると通常のパンは構造に影響を受け、硬くなり食感が悪くなった。一方モチコムギ粉を 5-30%配合したパンでは改良効果がみられた。モチコムギ粉を配合したパンのクラム（食パンのクラスト（耳）を除いた白い部分）は、冷蔵保存後もソフトで風味がよいものになった。

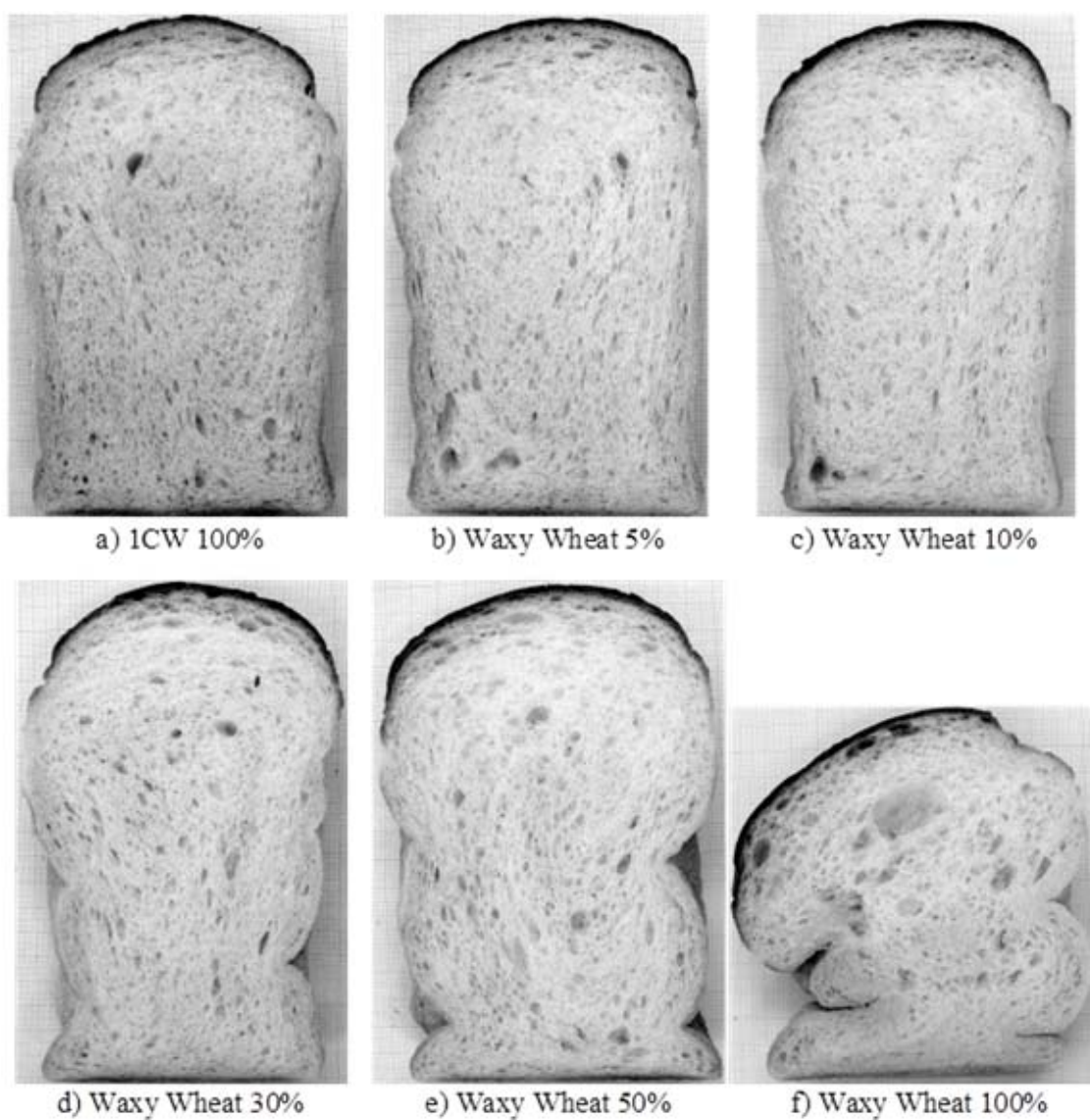


図 3-4. モチコムギ粉を配合した小麦粉で作成したパンの内相

2. スポンジケーキ適性

表 3-3 にスポンジケーキ試験官能検査の結果を示した。ケーキ体積はモチコムギ粉の量が増加するにつれて減少した。図 3-5 にケーキの内相を示した。モチコムギ粉の量が増加すると泡の形状が丸くなり、気泡壁の厚みが増し、水分、重量が増えた。

モチコムギ粉の配合率が 30% 以下の試料では粘性、弾力が好ましいと感じるパネラーが何人かいた。4 一昼夜保存したケーキはパンのときと同様の老化耐性を示した。モチコ

ムギ粉を 30%以下配合したケーキは対照区よりソフトで好ましい食感を維持しており、老化遅延効果が確認できた。

表 3-3. モチコムギを配合したスポンジケーキの特性と官能評価結果

配合 (%)	パン体積 (ml)	重量 (g)	製造日			4 1 日貯蔵後		
			歯切れ	硬さ	口溶け	歯切れ	硬さ	口溶け
0	1260	295	5.0ab	5.0a	5.0b	5.0c	5.0d	5.0c
5	1230	294	5.2a	5.1a	5.2ab	6.6a	7.2a	6.1a
10	1150	295	5.0ab	4.9a	5.3a	6.3ab	6.8ab	5.7a
30	1140	295	4.8b	5.0a	4.9b	6.0b	6.5b	5.3b
50	970	299	2.8c	2.9b	2.5c	4.2d	6.0c	3.8d
100	680	293	1.1d	1.5c	1.3d	1.9e	3.8e	1.7e

10 人の官能スコアの平均。官能スコアは各項目においてアメリカ・ウエスタン・ホワイト・コムギ (WW) を 5 点とした相対値。項目の中で異なる文字が付いているものは互いに危険率 5% で有意差がある (Tukey 検定による)。

配合：小麦粉総量に対するモチコムギ粉の割合

歯切れ：スコアが低いと団子状、高いとサクサクして歯切れがよい

硬さ：スコアが低いと硬い、高いと口当たりが軽く軟らかい

口溶け：スコアが低いと団子状、高いと口の中で広がるように溶けて口溶けがよい

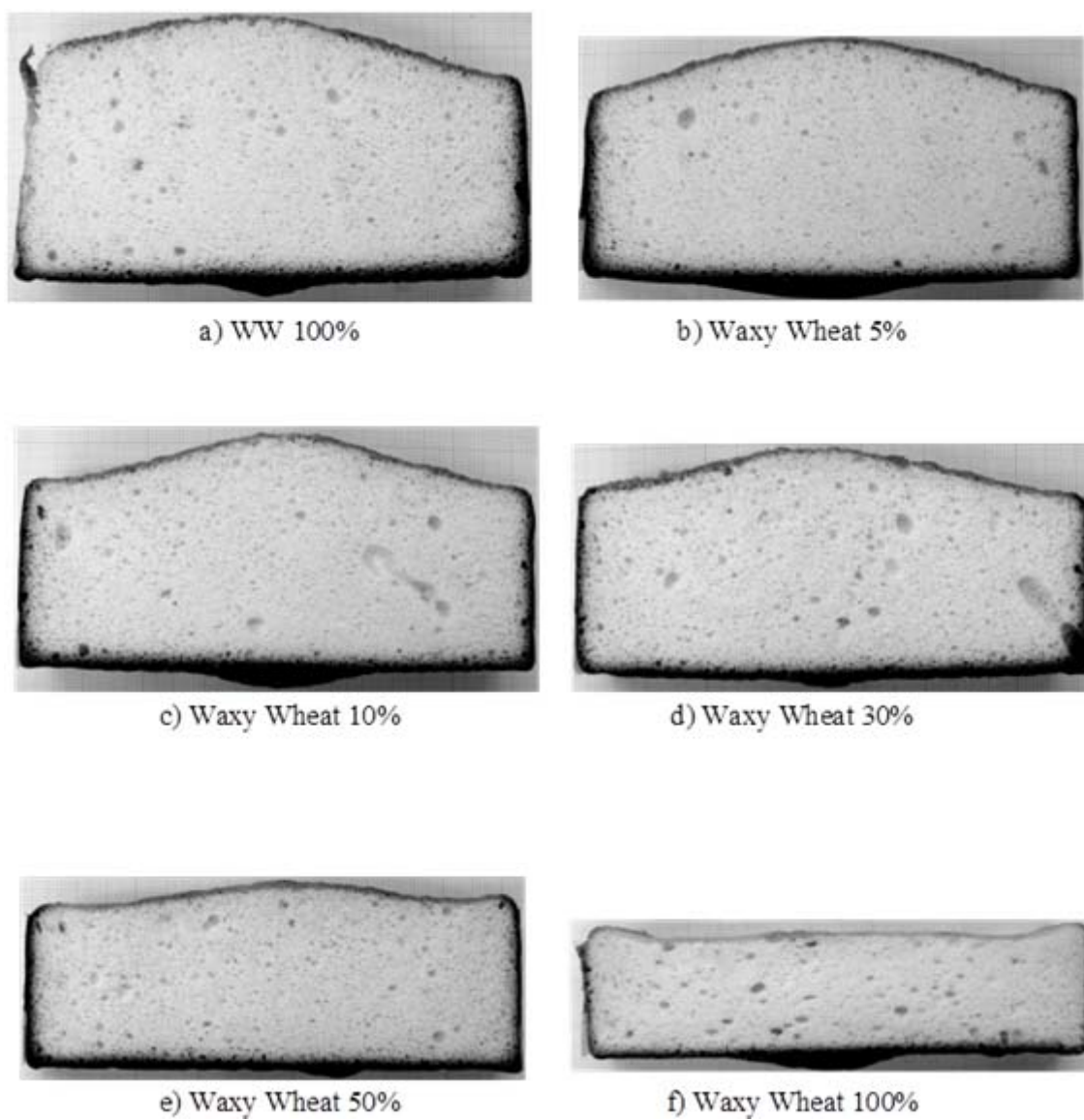


図 3-5. モチコムギ粉を配合した小麦粉で作成したスポンジケーキの内相

3 . バターケーキ適性

表 3-4 と図 3-6 にバターケーキ試験の結果を示した。モチコムギを 15%配合して作成したバターケーキは、対照区に対して、製造直後も 4 保存後も咀嚼性、食味においてより高いスコアを示した。

表 3-4. モチコムギを配合したバターケーキの特性と官能評価結果

配合 (%)	製造日			4 1 日貯蔵後		
	歯切れ	硬さ	口溶け	歯切れ	硬さ	口溶け
0	5.0a	5.0a	5.0b	5.0b	5.0a	5.0b
15	4.8ab	4.9a	5.8a	5.5a	4.8ab	5.9a
30	4.5b	4.1b	4.2c	4.8b	4.6b	4.3c

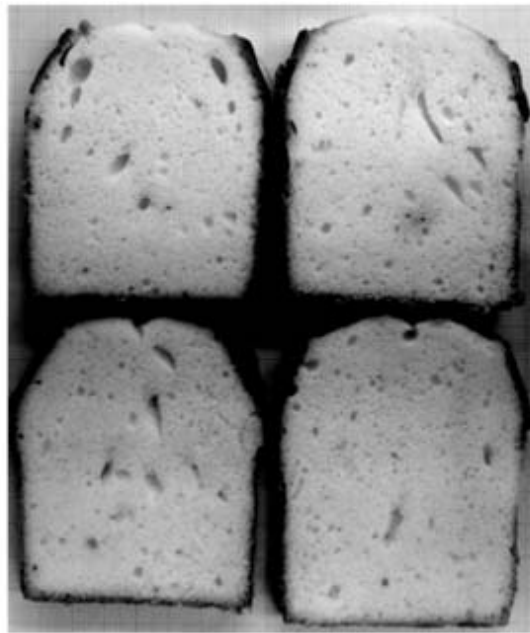
10 人の官能スコアの平均。官能スコアは各項目においてアメリカ・ウエスタン・ホワイト・コムギ（WW）を 5 点とした相対値。項目の中で異なる文字が付いているものは互いに危険率 5% で有意差がある（Tukey 検定による）。

配合：小麦粉総量に対するモチコムギ粉の割合

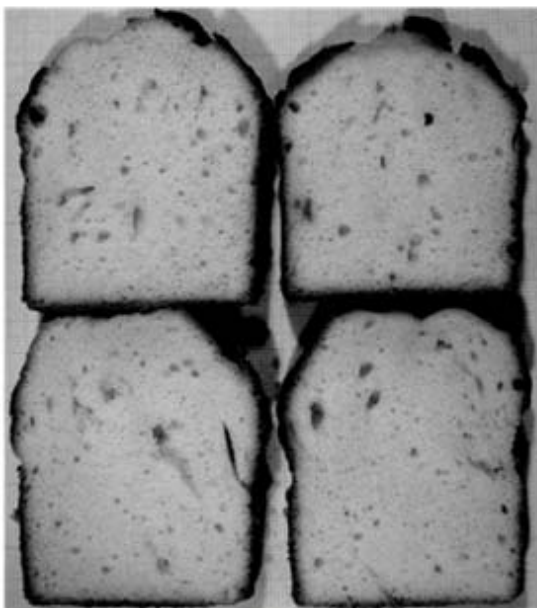
歯切れ：スコアが低いと団子状、高いとサクサクして歯切れがよい

硬さ：スコアが低いと硬い、高いと口当たりが軽く軟らかい

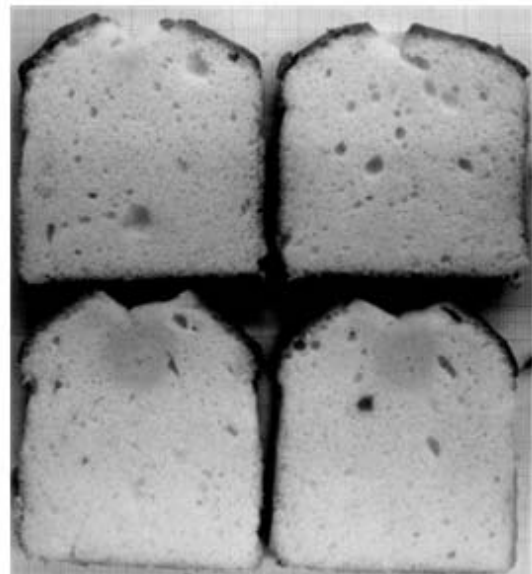
口溶け：スコアが低いとくちやつき、高いと口の中で広がるように溶けて口溶けがよい



a) WW 100%



b) Waxy Wheat 15%



c) Waxy Wheat 30%

図 3-6. モチコムギ粉を配合した小麦粉で作成したバターケーキの内相

4．製麺適性

表 3-5 にうどんの官能検査結果を示した。麺の弾性においてはいくらか改良の余地があることが観察されたが、硬さが劇的に減少していた。モチコムギ粉の澱粉の膨潤力は極めて高いため適正な料理時間で茹でるのが困難であった。麺は適度に膨潤する時間だけ茹でる必要がある。しかし、適正な茹で時間で調理すると、麺の表面の澱粉が極度に膨潤してお湯の中に溶け込みいわゆる茹で細りが起こった。

表 3-5. モチコムギを配合したうどんの官能特性

配合 (%)	製造日		4 1 日貯蔵後	
	硬さ	粘弾性	硬さ	粘弾性
0	5.0a	5.0b	5.0a	5.0b
30	2.9b	5.8a	3.0b	6.2a
50	2.5b	6.1a	2.7b	4.3c

10 人の官能スコアの平均。官能スコアは各項目においてオーストラリアン・スタンダード・ホワイト・コムギ（ASW）を 5 点とした相対値。項目の中で異なる文字が付いているものは互いに危険率 5% で有意差がある（Tukey 検定による）。

配合：小麦粉総量に対するモチコムギ粉の割合

硬さ：スコアが低いと硬い、高いと軟らかい

粘弾性：スコアが低いと粘弾性なく、ボキボキして硬い、高いと粘弾性強くソフトでモチモチしている

5．麺皮食品適性

表 3-6 はモチコムギを配合した麺皮を使い作成した餃子を冷凍保存し解凍調理後に官能評価を行った結果を示している。モチコムギを配合した試験区は配合なしの対照区よりも弾性、粘りが向上し、その改善効果は 30% 配合よりも 50% 配合でより顕著にみられた。

表 3-6. モチコムギを配合した餃子の官能特性

配合	-20 10 日貯蔵後	
(%)	硬さ	粘弾性
0	5.0a	5.0b
30	3.8b	6.3b
50	2.4c	8.3c

10 人の官能スコアの平均。官能スコアは各項目においてオーストラリアン・スタンダード・ホワイト・コムギ (ASW) を 5 点とした相対値。項目の中で異なる文字が付いているものは互いに危険率 5% で有意差がある (Tukey 検定による)。

配合：小麦粉総量に対するモチコムギ粉の割合

硬さ：スコアが低いと硬い、高いと軟らかい

粘弾性：スコアが低いと粘弾性なく、ボキボキして硬い、高いと粘弾性強くソフトでモチモチしている

考察

盛岡の試験圃場で栽培されたモチコムギ-Mの小麦粉の収率は福島で栽培されたモチコムギ-Fよりも4.5%高かった(表3-1)。これにはミドリリング粉(特に2M粉の収率差は4.6%)の収率が高いことが寄与している。モチコムギ-Mの粗タンパク質が12.3%と硬質系コムギであるパン用の10W並に高かったことと関係があると思われる。高タンパク質故に硬度も高く内麦で問題になる篩抜けがよいことから小麦粉収率が高かったと推察される。一方、モチコムギ-Fは麺用小麦として使われる通常の国内産小麦に近い性状を示した。同じ両親(関東107号とBai-Huo)由来のモチコムギでありながらこのような差異が生じるのは、ワキシータンパク質以外の遺伝的背景(タンパク質量を決定する因子や硬度を決定する因子など)が多様であることと盛岡の試験場の土壌の質によるものと考えられる。盛岡の試験圃場は育成したコムギが高タンパク質コムギになる傾向にある。しかし、どちらの系統もアミロース含量が0%であること、ヨウ素液で染色されないことでモチコムギであることを確認し、テストミル粉碎粉を物性試験、二次加工試験に供した。

図3-2で示したアミログラフの特徴は、第一章で報告したモチコムギ(二次加工試験に供したモチコムギの一世代前のモチコムギ)と同様であった。タンパク質含量に差はあったものの、モチコムギはうるちコムギに比べてより低温で糊化を開始し、より低温で糊化を完了する、糊化ピークも低く、セットバックも低いという澱粉の糊化性状はモチコムギに共通のものといえる。糊化ピークについては、モチコムギ-Fが一世代前のモチコムギと同様のピーク粘度を示しているのに対しモチコムギ-Mはさらに低い粘度を示した。表3-1にあるようにモチコムギ-Mはタンパク質含量が高いため、60%粉中の澱粉含量が相対的に低くなったことがピーク粘度低下の原因と考えられる。

示差走査熱量計(DSC)によりモチコムギ澱粉が高い老化耐性を示すことが確認できた。糊化の後4で3週間まで保存したモチコムギ2ロットのHの増加量は、うるちコムギよりはるかに小さかった。モチコムギ澱粉の老化耐性は、小麦粉二次加工食品に利用する

上で極めて重要な特質と思われた。

ミキシング時に望ましい硬さを生地に与える最適吸水量は、モチコムギの配合比率に比例して増加した。しかし、モチコムギ粉は一度かかえた水を製パン工程の終盤で抱えきれずに吐き出してしまうようにみえた。したがって内相が荒れてしまうように思われる。パンを作る場合、通常のパン用小麦粉に加えるモチコムギの適正配合率は、30%以下、好ましくは10%以下であると考えられた。同様の結論を Morita *et al.* (2002) が示している。

モチコムギ粉が、老化遅延のための改良剤としての機能をもっていることは特筆すべきである。多くの研究では、アミロペクチンの老化がパンのクラムの硬化の主因であると報告されている (Schoch and French 1947、 Prentice *et al.* 1954、 Colwell *et al.* 1969)。アミロースが澱粉の老化を誘発するが、アミロペクチンがパンの老化の程度を決定している。一日保存後のモチコムギの粉を含有する小麦粉で作成したパンは、保湿性、柔軟性、粘りを維持していた。アミロースフリーのモチコムギはパンの老化を遅延させると考えられてきたが、本研究の結果はこれを支持している。しかし、保存期間が十分に長くなったときモチコムギが高配合のパンはより老化が進むかも知れない。この問題を明らかにするために、さらに、長時間保存試験が必要となる。パンの老化を説明する仮説がいくつか提案されてきた。これらのほとんどが重要因子として水とその挙動に焦点をおいたものである (Zeleznak and Hoseney 1987、 Czuchajowska and Pomeranz 1989、 Piazza and Masi 1995、 Schiraldi *et al.* 1996)。モチコムギ粉の老化遅延効果をさらに理解するためには、アミロペクチンの構造解析だけではなく、他の構成成分との相互作用もまた検証していくことが必要と思われる。

スポンジケーキの内相も試験パンの内相と同様、気泡膜が厚く、細長より丸い気泡が多い一方で、一日保存後の老化耐性 (ソフトネス、粘りの維持) が認められた。バターケーキも同様であったが、モチコムギ 15%をうるち薄力粉に加えたとき最も官能的に好ましいものになることから、モチコムギの改良剤としての用途が期待される。

うどんには、適度な硬さと粘性が要求される。これらの官能特性は小麦粉のアミロース含量と負の相関にある (Oda *et al.* 1980)。モチコムギを育種した理由の一つは、うどんの官能特質とアミロース含量の関係を明らかにすることであった。アミログラフの結果から早茹でタイプの麺への応用が期待できた。しかし、低温で膨潤し澱粉粒の崩壊も早いという特質が茹で細りをもたらず結果になってしまった。これは今回のモチコムギに麵用小麦粉としては好ましくない遺伝型 (特にモチコムギの片親 Bai-Huo 由来である可能性高い) が存在することも一つの要因ではあるが、ゲル強度を高めていたアミロースが欠損した結果と考えられた。老化耐性が高くても糊化の段階で不都合が起こっては使用できないので、糊化特性がアプリケーションの許容範囲に入っているかを見極めることが重要といえる。100%モチコムギ粉では麺を作るのは困難という結論は Baik and Lee (2003) の報告を支持している。麺類では、最も期待できる改良効果が蒸し生地シート (餃子) の官能特性に現れた。冷凍餃子はいわゆる冷凍焼けを起こすことがある。餃子の耳の硬化がそれである。モチコムギを 30% 添加するとこれが顕著に改善されることが見出された。配合を 50% に増やすとさらに改良効果は高まる。

以上、モチコムギから調製した小麦粉の二次加工面での実用性を評価したところ、全小麦粉に対してモチコムギの粉を過度に (20% より多く) 加えるとほとんど全ての二次加工製品で機能的に劣る (くちやついたり、団子状になったり、クリスピー感が低下したり) ものになった。しかしながらモチコムギの粉を 20% 以下で混合したものは顕著に日持ち性が向上した。モチコムギ粉を配合した小麦粉の二次加工品の性状評価結果が次々と報告されている。Morita *et al.* (2002) は、モチコムギ粉のみではよい製パン性を示さないことを報告した。Baik and Lee (2003) は、モチコムギ粉のみではうどんに適さないことを示した。Guo *et al.* (2003) は、アミロース含量の調整によるトルティアやアジアのうどんに適したモチコムギ粉の通常的小麦粉へのブレンドの効果を報告した。モチコムギはアプリケーションによって適当な配合割合でブレンドして活用するのが有効と思われる。

Hung *et al.* (2006) は、高アミロースコムギと対比させてモチコムギのパンや麺への利用特性について総説している。Maningat and Seib (2010) は、コムギ澱粉の食品への応用について総説し、バター（天ぷらの衣用の生地など）のような高水分食品、パン、うどん、パスタのような中間的な水分の食品、クッキーのような低水分食品とアプリケーションを区別した上で要求される澱粉特性を議論している。両報告共、パンや麺（中間的な水分の食品）は澱粉の老化によって食品が硬くなる特性があるため、食品に老化耐性を付与するためには低アミロース含量のコムギ（モチコムギ）を用いることが有効としている。Yi *et al.* (2009) は、冷凍生地におけるモチコムギ粉の特性を評価している。モチコムギの配合割合を上げることにより冷凍障害が抑えられること、冷凍後焼成したパンがソフトネスを維持することを報告している。

本研究で世界で初めてモチコムギの老化耐性を報告したが、この特性は、その後育成された種々のモチコムギ、低アミロースコムギで複数のアプリケーション試験で検証され確認されている。今後、モチコムギはその特性の理解に基づいて有用な食品素材として二次加工製品に幅広く利用されると思われる。モチコムギの実用的な利用のためには、既に目的のアプリケーションに適性の高いコムギを遺伝的背景にもつモチコムギの育成、モチコムギ澱粉を物理的にあるいは化学的に修飾した澱粉の開発なども含めたさらなる研究が必要となる。

実験の部

3.1. コムギ

6 倍体モチコムギ (普通小麦) (*Triticum aestivum* L.) 2 ロット、市販のうるちコムギ 2 品種、3 銘柄を本研究では使用した (表 3-1)。1995 年、全てのワキシータンパク質 (GBSS) を欠損したモチコムギ (F4 種子) を農業研究機構の東北地方にある 2 つの実験圃場で栽培した。盛岡の圃場で栽培したモチコムギを waxy wheat-M、福島の実験圃場で栽培したモチコムギを waxy wheat-F とした。その他に 2 つの日本産麺用品種農林 61 号 (N61) と農林 126 号 (チホクコムギ : N126)、カナダ産レッド・スプリング小麦 No.1 (1CW : パン用小麦)、アメリカ産ウエスタン・ホワイト小麦 (WW : 菓子用小麦)、西オーストラリア産オーストラリア・スタンダード・ホワイト小麦 (ASW : 麺用小麦) を用いた。全ての小麦試料は、AACC 公定法 26-21A (AACC 2000) に従ってビューラー・テストミルにより粉碎して製粉特性の評価を行った。

3.2. 一般成分分析

水分と灰分は、それぞれ AACC 公定法 44-19、08-01 (AACC 2000) によって測定した。粗タンパク質は、公定法 46-11A 記載のケルダール法に従って測定した。小麦粉の平均粒度は Microtrack FRA (日機装) で測定した。澱粉は以前記述した方法に従って調製した (Hayakawa *et al.* 1997)。単離した澱粉試料のアミロース含量は Williams *et al.* (1970) の方法をベースに測定した。全ての試料は反復して測定した。

3.3. 生地物性

小麦粉試料のペースト化特性は 700-g.cm の感度のカートリッジをセットしたビスコアミログラフ (Brabender type VA-1B) を使って解析した。小麦粉懸濁液は、44.7 g の小麦粉 (乾重量) に 450 ml の水を加え作成した。混合物の温度を 25 から 95 まで毎分 1.5 で上昇させ、95 で 10 分間保持した後、63 まで冷却した。この研究に使われたパラメ

ーターは、ピーク粘度、ブレイクダウンとセットバックである。

小麦粉のミキシング特性をミキソグラフ (National Mfg. Co., Lincoln, NE) を用いて解析した。ミキソグラフの測定用カップの中に 30 g の小麦粉に 18 ml の水を加え Approved Method 54-40A (AACC 2000) に従って測定した。小麦粉の適性吸水は、Approved Method 54-21 (AACC 2000) に従って 50 g のミキサーボウルを用いファリノグラフで算出した。

3.4. 製パン試験

製パン試験は、モチコムギ粉、うるちコムギ粉で調製したパンで実施した (表 3-2)。小麦粉 300 g に対してパン酵母 (2%)、食塩 (1.5%)、砂糖 (3%)、ショートニング (2%) (ミヨシ油脂)、水 (28%) を混合した。加えた水の量は、ファリノグラフ試験で 500 BU を与える水量を基本に算出した。全ての添加物を垂直型ミキサー (品川) で低速 (60 rpm) で 5 分間混合した。さらに 2 分間 (或いは 2 分 30 秒) 高速で混合した。ミキシング後、得られる生地を 28 ± 0.5 にするために氷水や冷水を使用した。引き続き、生地を 28%、湿度 85% で 90 分間静置し発酵させた (共同電熱)。パンチング後、生地をさらに 30 分間発酵させ、2 つに分割し (それぞれ約 270 g)、27℃ で 20 分間静置し、成型を行った (オシキリ)。38℃、湿度 90% で約 40 分間最終発酵をとり 210℃ で 35 分間オープン (共同電熱) で焼成した。焼成したパンは、老化耐性を評価するために、室温と 4℃ で翌日まで保存した。翌日、パン体積と重量を測定し、10 人の訓練されたパネラーによって評価した。室温保存、冷蔵庫で 4℃ 保存したパンの官能特性 (クリスプネス、柔らかさ、滑らかさ) を熟練したパネラーにより 10 点法 (0 点:非常に劣る、10 点:非常に優れている) で最少間隔 1 点とし、1CW で作成したパン (全項目 5 点) との比較で実施した。

3.5. ケーキ製造試験

スポンジケーキ用バターをうるち小麦粉にモチコムギ粉をブレンドした小麦粉 (表

3-3) で作成した。卵 (30 、 800 g) と砂糖 (800 g) を混合物の比重が 0.24 g/ml に達するまで、高速 (295 rpm)、中速 (190 rpm) で順にミキシングした。水 (30 、 320 ml) を混合物に徐々に加えた。混合物の比重が 0.27 g/ml に達するまでさらにホイップした。小麦粉 (800 g) を加えへらでミックスした。バター (240 g) をケースに流し込み、デッキオーブン (共同電熱) で 190 、 30 分間焼成した。焼成したケーキは室温で 1 時間冷やした。老化に対する抵抗性を評価するために焼成したケーキをポリプロピレンの袋に包み翌日まで室温と 4 (冷蔵庫) で静置した。冷やした後、ケーキの体積と重量を測定し、10 人の熟練したパネラーにより評価した。パネリストは、室温保存、冷蔵庫で 4 保存したケーキのクリスプネス、硬さ、咀嚼性を 10 点法 (0 点:非常に劣る、10 点:非常に優れている) で最少間隔 1 点とし、WW で作成したケーキ (全項目 5 点) との比較で実施した。

3 . 6 . バターケーキ試験

バターケーキをモチコムギ粉とうるちコムギ粉 (表 3-4) と食塩 (5 g)、マーガリン (900 g) を合わせ、低速 (98 rpm) で 1.5 分間、高速 (295 rpm) で 1 分間混合した。砂糖 (900 g) を加え、高速で 5 分間混合した。全卵 (900 g) (30) を徐々に加え、低速で 7 分間、高速で 4 分間混合した。ブランデー (30 g) とラム (20 g) を加え、小麦粉 (1,000 g) とベーキングパウダー (15 g) を加えて低速で 2 分間混合した。バター (350 g) をパウンドケーキパンに注ぎいれデッキオーブン (共同電熱) で 180 で 25 分間焼成した。焼成したバターケーキを室温で 1 時間冷却した。老化に対する抵抗性を評価するために焼成したバターケーキをポリプロピレンの袋に包み翌日まで室温と 4 (冷蔵庫) で静置した。冷やした後、バターケーキを 10 人の熟練したパネラーにより評価した。パネリストは、室温保存、冷蔵庫で 4 保存したバターケーキの官能特性評価をクリスプネス、硬さ、咀嚼性を 10 点法 (0 点:非常に劣る、10 点:非常に優れている) で最少間隔 1 点とし、WW で作成したバターケーキ (全項目 5 点) との比較で実施した。

3.7. 製麺試験

小麦粉を添加物（1 kg 小麦粉、30 g 食塩、350 ml 水）とブレンドし横型の製麺ミキサー（東京麺機）（90 rpm）で 10 分間混合した（表 3-5）。生地を塊をロール間隙 3.6 mm にして製麺ロール（東京麺機）にかけ、一度折りたたみ、伸ばし、再度折りたたみ、伸ばしたものをポリエチレンの袋に包み室温で 1 時間静置した。生地シートはロール間を 3 回通過させたが、そのときのロール間隙を 3.0 mm、2.5 mm、2.45 mm に設定した。生地シートを No.10M 角型の切り刃を付けたロールに通し麺線を作成した。茹で後の麺の収率は官能試験に強く影響を与えるので麺の収率が約 260%になるまで麺を茹でた。老化耐性を評価するために同じ試料を翌日まで冷蔵庫内 4℃ 保存した。官能評価は 10 人の熟練したパネラーによって行われた。パネリストは、麺の官能特性評価を硬さ、弾性の観点から 10 点法（0 点：最少、10 点：最大）で、ASW で作成した麺（全項目 5 点）との比較で実施した。麺は料理後 5 分以内に暖かい薄い醤油スープ（だし汁）に漬けて評価した。

3.8. 蒸し生地シート（麺皮食品）（餃子）

小麦粉を添加物（1 kg 小麦粉、10 g 食塩、360 ml 水）と混合し水平型製麺ミキサー（90 rpm）で 10 分間混練した（表 3-6）。ミキシング後、上記製麺試験で記載した手法に従って厚み約 1.0 mm の生地シートを得た。シートをラウンド・カッター（直径 8 cm）で丸くカットし餃子を包む麺皮を得た。これらの麺皮で 12 g の肉と野菜を包み 0.5 気圧で 8 分間蒸煮した。蒸煮した餃子を急速冷凍し、-20℃ で 10 日間保存した。冷凍餃子をフライパンで調理した。官能評価は、10 人の熟練したパネラーにより実施した。パネリストは、餃子の皮の官能特性評価を硬さ、弾性の観点で 10 点法（0 点：最少、10 点：最大）で、1CW で作成した餃子（全項目 5 点）との比較で実施した。

総括

トウモロコシ、イネ、オオムギ、アマランス、ソルガムといった他の穀物には存在していたモチ系統がコムギ (*Triticum aestivum* L.) には存在しなかった。Nakamura *et al.* (1993b) が GBSSI 欠損コムギ系統のスクリーニング法を開発し、GBSSI 欠損コムギ系統同士を交配することによって世界で初めてモチコムギを作出することに成功した。モチコムギは、食品工業に革命的な変化を起こすことが期待された。本研究では、新規に作成されたモチ性普通コムギ (6 倍体モチコムギ) の澱粉性状の解析、澱粉性状を裏付ける GBSS のアイソザイムの解明、澱粉特性を生かした二次加工特性の把握を行い、食品工業におけるモチコムギの潜在能力を明らかにすることを試みた。

第一章では、モチコムギから単離した澱粉の粘弾性の特徴と分子構造を評価した。モチコムギ澱粉は、ラピッドビスコアライザーの解析により、糊化開始温度、ピーク粘度、糊化後冷却時粘度がうるちコムギに比べて低下していることが明らかになった。一方、示差走査型熱量計解析により、糊化特性関連温度 (T_0 , T_p と T_c)、エンタルピーが高いことが明らかになった。これらのことから、モチコムギの糊化は低温で開始するので麺などでは早茹で性が高い可能性があるが、アミロペクチンが主体となる澱粉の結晶構造はうるちコムギより強固なので、結晶構造を崩壊する、すなわち完全に糊化するためにはうるちコムギよりエネルギーを要することが推察された。このことは X 線回折でも裏付けられ、モチコムギとその親の品種の澱粉は一樣に典型的な A 型の X 線回折パターンを示す中で、モチコムギはやや高い結晶性を示した。また、DSC 分析と X 線回折の結果、モチコムギ澱粉は、より高い老化耐性をもつという特徴を示した。パン、麺、菓子など小麦粉ベースの二次加工品では、特に低温で保存した場合に急激に進む食品が硬くなる老化が問題となっているが、この結果はモチコムギがこの問題を解決する食品素材となり得ることを示唆した。

アミロペクチンの構造を解析したところ、モチコムギの側鎖の平均重合度は、親品種系統より有意に高い ($P < 0.05$) 値を示した。一方サイズ排除型クロマトグラフィーによりイソアミラーゼで分岐構

造を切断したモチコムギアミロペクチン澱粉の Fr.Ⅲ (比較的低分子の側鎖) / Fr.Ⅱ (比較的高分子の側鎖) は、両親系統の値と比較して統計的な有意差を示さなかった。これらの結果からモチコムギのアミロペクチンの構成グルコース鎖は、短鎖や長鎖に偏ることなく全体的に重合度が高いことが推察された。このアミロペクチンの構造は、親の片方の品種の特性が遺伝したものではなく、GBSSⅠの欠損によって獲得した新たな特徴であると考えられる。上記したモチコムギの糊化特性、老化特性は、胚乳組織において GBSSⅠが欠損したため生じたアミロース含量の極端な減少、アミロペクチンの構造変化に起因していると推定された。

第一章で見出されたモチコムギのユニークな糊化特性、老化特性は、胚乳組織において GBSS (ワキシータンパク質) が欠落している結果であることが容易に推定された。それにも関わらず、モチコムギの胚乳澱粉のアミロペクチン含量は親系統のそれより多くなっていた。GBSS が欠落している以上、アミロペクチンの構成成分である 1-4 結合をしている直鎖状の分子の供給を胚乳の GBSS 以外の酵素に委ねざるを得ない。その候補として元胚乳中では、従来その機能を担っている可溶性 starch synthase の活性上昇が予想されるが、胚乳以外の組織にある SS のアイソザイムの存在を仮定することもできる。他の組織で作られた澱粉が加水分解され転流し、貯蔵澱粉の基質の供給源となっていることは知られているからである。

第二章では、果皮における澱粉粒結合性澱粉合成酵素の性状を明らかにした。モチコムギの胚乳の澱粉粒と花粉はアミロースを含まず、それ故ヨウ素液により染色されない。しかしながら、我々はモチコムギの果皮組織由来の澱粉は濃紺に染まりアミロースを含んでいることを観察した。モチコムギにおいては胚乳澱粉粒より有意に高い澱粉合成活性が果皮の澱粉粒に存在することを見出した。GBSS とは分子量と等電点が異なる澱粉粒結合性タンパク質が果皮澱粉粒にはあるが、胚乳澱粉にはないことが明らかになった。このタンパク質を GBSS と命名したが、GBSS の N 末端アミノ酸配列は、コムギの GBSS との相同性は低く、他の穀物やバレイショのワキシータンパク質や GBSS と高い相同性を示した。

また、KTGGL というモチーフを含んでいたが、これは、植物の GBSS や大腸菌のグリコーゲン合成酵素の基質結合部位と推定されている。GBSS はバレイショやトウモロコシの GBSS に対する抗血清と特異的に交差反応を示した。本研究では、GBSS と GBSS が異なる穀物の中で組織特異的に発現していて、GBSS は果皮におけるアミロース合成において重要な機能をもっていることを示した。果皮組織にも澱粉分解系の酵素は存在すること、開花後 5 日目ぐらいまでは、ほとんど胚乳の成長はなく、果皮組織が専ら澱粉の蓄積のための組織となっていること、GBSS を完全に欠損したモチコムギの種子（その後成長した胚乳）にもアミロペクチンはきちんとむしろやや多めに存在していることから、開花後 5 日目ぐらいまで果皮に蓄積されたアミロース主体の澱粉が胚乳の発達時には分解されて胚乳澱粉合成の基質となっている可能性が示唆された。

第三章では、モチコムギから調製した小麦粉の二次加工面での実用性を評価した。評価したアプリケーションは、パン、スポンジケーキ、バターケーキ、うどん、餃子など麺皮食品である。小麦粉に対してモチコムギの粉を過度に（20%より多く）加えるとほとんど全ての二次加工製品で機能的に劣る（くちゃついたり、団子状になったり、クリスピー感が低下したり）ものになった。しかしながらモチコムギの粉を 20%以下混合したものは顕著に日持ち性が向上した。モチコムギ粉を含有する小麦粉で作成したパンは、一日保存後も保湿性、ソフトネス、粘りを維持していた。このモチコムギ粉の抗老化剤としての利用は、ケーキ製品でもまた確認できた。うどんには茹で細りしてしまうため不向きと考えられたが、冷凍餃子に利用したとき最も高い効果を示した。モチコムギ粉を 30～50%含む小麦粉を利用することにより冷凍解凍後に硬くなる問題（冷凍障害）が他の添加剤を入れることなく解決した。Yi *et al.* (2009) は、モチコムギを配合した冷凍生地を解凍後焼成したパンがソフトネスを長い間維持することを示すだけでなく、通常のコムギで作成した場合に見られる体積減少などの冷凍障害も抑制されることを報告している。総じてモチコムギ粉は、穀粉食品において老化耐性、冷凍耐性を向上させるのに有用であると思われる。

穀粉素材の澱粉特性がこれらの改良効果に反映していることは明白であった。モチコムギは、新しい食品素材としてのみではなく、改良剤としての効果も期待できると考えられる。

一方で、モチコムギの食品素材としての有効性については、パン、麺、菓子を中心としたアプリケーションに対して国内特許 7 件を 1997 年から 1998 年にかけて出願した（特開平 09-191818, 09-191819, 09-191842, 10-066511, 10-066527, 10-066529, 10-066530）、さらにアメリカ、カナダ、オーストラリアにも用途特許（US08/783207, US08/916703, CA10099/97, CA35213/97, AU2194944, AU2213965）の登録を完了しており、本素材の使用許諾を求めて海外から打診があったとも聞いている。こうした動きから著者らの研究が国益を守ることに少なからず寄与していると自負している。

なお、本研究第一章、第三章で用いたモチコムギの遺伝的背景を半数体育種で整えて作成されたのが、第二章で用いた盛系-CD-1478 と盛系-CD-1479 であるが、これらは 2000 年 10 月「はつもち」、「もち乙女」として品種登録が完了した。さらに「はつもち」に改良を加え、2009 年 9 月品種登録が完了したのが「もち姫」である。「もち姫」は東北地方の農家で栽培育成、地元の二次加工業者によって製品化されている。「もち姫」は北海道でも試験栽培され、長澤ら（2011）によりその試験結果が報告されている。国産超強力小麦「ゆめちから」とのブレンドにより柔らかく、もちもち感を有する老化が抑制されたパンが提案できることが示されている。さらに、老化耐性の高い国産ベーグルのようなアプリケーションが提案されている。第二章で示したようにモチコムギのみでのパンや麺のような通常の小麦粉製品への使用にはまだ改良の余地が残されているが、他の小麦粉とブレンドすることによりモチコムギの特性を生かした新規なアプリケーション開発が期待できる。また、従来、モチ性食品は消化がよく、モチオオムギはうるちオオムギより家畜の飼育効率が低いことが知られているが、最近、Fujita *et al.*（2012）は、モチコムギで作成した餅の特性を明らかにした。モチコムギの餅は官能検査の結果、物性が滑らかなので飲み込みやすく、モチ米で作った所謂餅より優れた崩壊性を示すので、あらゆる年代層に消化のよ

い機能性食品として提案できるという報告をしている。物性改良剤としてではなく機能性食品素材としての有効性も今後検証されていくことと思われる。

上記したように現在のモチコムギもブレンドやアプリケーションによっては有効な食品素材となり得るが、モチコムギのもつ老化耐性のようなユニークな特徴を最大限に生かすためには、モチコムギ単独での使用が有利になる。遺伝的背景を実用品種に落とし込んだ上でのさらなる研究開発が必要と考えられる。特に第一章で示した澱粉の脆弱性を改良する方向での育種が有効と考えられる。

澱粉の合成に関連する酵素はアイソザイムが次々に同定され、遺伝子構造が詳細に明らかになると共に、その機能が明らかになってきている。本報告の対象となった GBSS の他にも図 1. 胚乳澱粉の生合成スキームに示したように澱粉合成の基質提供に必須な ADP-glucose pyrophosphorylase、澱粉合成の最初の反応を担う starch synthase 、主にアミロペクチンの構成鎖の合成を担う starch synthase a、starch synthase 、starch synthase 、アミロース合成を担う granule bound starch synthase、主にアミロペクチンの分岐構造を作る starch branching enzyme 、starch branching enzyme a、starch branching enzyme b、分岐構造を切断し結晶構造を仕上げる isoamylase 1、isoamylase 2、pullulanase 1 などが胚乳澱粉の合成に関わっている酵素として同定されている (Stone B. and Morell M. K. 2009)。本報告にある GBSS だけでなく、澱粉生合成に関する遺伝子の欠損変異コムギは複数育成されその特徴が報告されている (Rahman *et al.* 2005)。アミロペクチンの分岐を促すはずの starch branching enzyme を欠損したコムギの澱粉の組成に大きな変化が観察されなかった (Regina *et al.* 2004) 一方、starch synthase a の欠損変異コムギはアミロース含量 35% と高アミロースコムギになること、糊化温度が 10℃ 低下することが報告されている (Yamamori *et al.* 2000)。starch synthase を欠損したら高アミロースになるというのは一見矛盾するようだが、SS a は単にオリゴ糖の伸長合成というのではなく、アミロペクチンの構成側鎖の提供を主に担っていると考えれば妥当な結

果といえる。澱粉分岐酵素の欠損による高アミロースコムギの育成については最近報告があり、starch branching enzyme a を RNAi でサイレンシングしたデュラムコムギはアミロース含量が 30.8% から 75% に大幅に増加した (Sestili *et al.* 2010)。このように酵素にある機能を想定しても実際に欠損株を作成すると影響が観察されない、逆に想定していない影響が観察されるということがあり、現在同定されている多数の澱粉合成関連酵素の全解明には時間がかかると思われる。地道に機能を評価していくことが重要である。その中で本論文は、6 倍体植物であるコムギにおける GBSS の機能を明らかにすると共に、澱粉を劇的に改変したコムギの食品工業への応用を示した点で意義のあるものと考えている。

1.7×10^{10} bp というゲノムサイズの大きさ故になかなか進まなかったコムギゲノム解析も IWGSC (国際コムギゲノムシーケンスコンソシアム) が推進しており、将来はこうした澱粉合成関連遺伝子の構造遺伝子部分だけの議論ではなく、上流の転写因子も含めた澱粉工学が可能になるとと思われる。

今回の世界初のモチコムギという食品素材が食品産業の中で展開していくことを期待すると共に、今後も新規穀物素材の評価、解析を積極的に行い食品工業の発展に貢献していきたいと思う。

引用文献

- American Association of Cereal Chemists. 1995. Approved Methods of the AACC, 9th ed. Methods 08-01, approved April 1961; Method 26-21A, approved October 1988; Method 44-19, approved April 1961; Method 46-11A, approved October 1976; Method 54-21, approved November 1995; Method 54-40A, approved November 1995. The Association: St. Paul, MN.
- Ainsworth, C., Clark, J. and Baisdon, J. 1993. Expression, organisation and structure of the genes encoding the waxy protein (granule-bound starch synthase) in wheat. *Plant Mol. Biol.* 22: 67-82
- Baba, T., Nishihara, K., Kawasaki, T., Shimada, T., Kobayashi, E., Ohnishi, S., Tanaka, K. and Arai, Y. 1993. Identification, cDNA cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (*Oryza sativa* L.) immature seeds. *Plant Physiol.* 103: 565-573
- Badenhuizen, N. P. 1969. The Biosynthesis of Starch Granules in Higher Plants. Appleton-Century-Crofts, New York, pp 1-115
- Baik, B. K., Park, C. S., Paszczynska, B. and Konzak, C. F. 2003. Characteristics of noodles and bread prepared from double-null partial waxy wheat. *Cereal Chem.* 80: 627-633.

- Banks, W. and Greenwood, C. T. 1967. The fractionation of laboratory-isolated cereal starches using dimethyl sulphoxide. *Starch/Stärke*, 19: 394-398.
- Biliaderis, C. G., Grant, D. R. and Vose, J. R. 1981. Structural characterization of legume starches. II. Studies on acid-treated starches. *Cereal Chem.* 58: 502-507.
- Biliaderis, C. G., Page, C. M. and Maurice, T. J. 1986. Thermal characterization of rice starches: A polymeric approach to phase transitions of granular starch. *J. Agric. Food Chem.* 34: 6-14.
- Biliaderis, C. G. and Zawistowski, J. 1990. Viscoelastic behavior of aging starch gels: Effects of concentration, temperature, and starch hydrolysates on network properties. *Cereal Chem.* 67: 240-246.
- Bohlin, L., Eliasson, A. C. and Mita, T. 1986. Shear stress relaxation of native and modified potato starch gels. *Starch/Stärke*, 38: 120-124.
- Chao, S., Sharp P. J., Worland A. J., Warham E. J., Koebner R. M. D. and Gale M. D. 1989. RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 78: 4935-504.
- Chevalier, P. and Lingle, S. E. 1983. Sugar metabolism in developing kernels of wheat and barley. *Crop Sci.* 23: 272-277

- Collison, R. 1968. Swelling and gelation of starch. Page 168 in: Starch and Its Derivatives. J. A. Radley, ed. Chapman and Hall: London.
- Colwell, K. H., Axford, D. W. E., Chamberlain, N. and Elton, G. S. H. 1969. Effect of storage temperature on the aging of concentrated wheat starch gels. J. Sci. Food Agric. 20: 550-555.
- Czuchajowska, Z., and Pomeranz, Y. 1989. Differential scanning calorimetry, water activity, and moisture contents in crumb center and near-crust zones of bread during storage. Cereal Chem. 66: 305-309.
- Dry, I., Smith, A., Edward, A., Bhattacharyya, M., Dunn, P. and Martin, C. 1992. Characterization of cDNA encoding two isoforms of granule-bound starch synthase which show differential expression in developing storage organs of pea and potato. Plant J. 2: 193-202
- Echt, C. S. and Schwartz, D. 1981. Evidence for the inclusion of controlling elements within the structural gene at the waxy locus in maize. Genetics 99: 275-284
- Eckerson, S. H. 1917. Microchemical studies in the progressive development of the wheat plant. State College of Washington Agricultural Experiment Station Bulletin 139: 3-21

- Edwards, A., Marshall, J., Sidebottom, C., Visser, R. G. F. and Martin, C. 1995.
Biochemical and molecular characterization of a novel starch synthase from potato tubers. *Plant J.* 8: 283-294
- Eliasson, A. C. 1994. Interactions between starch and lipids studied by DSC. *Thermochim. Acta* 246:343-356.
- Endo, S., Okada, K. and Nagao, S. 1991. Characterization of wheat starches by high-performance size-exclusion chromatography. (in Japanese) *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 38: 1-15
- Fujita, S., Kumagai, T., Yanabimachi, M., Sakurada, S., Sanpei, R., Yamoto, M. and Tohara, H. 2012. Waxy wheat as a functional food for human consumption. *J. Cereal Sci.* 55: 361-365.
- Furukawa, K., Tagaya, M., Inoue, M., Preiss, J. and Fukui, T. 1990. Identification of lysine 15 at the active site in *Escherichia coli* glycogen synthase. *J. Biol. Chem.* 265: 2086-2090
- Goodfellow, B. J. and Wilson, R. H. 1990. A Fourier transform IR study of the gelation of amylose and amylopectin. *Biopolymer* 30: 1183-1189.

- Greenwood, C. 1970. Starch and glycogen. In W Pigman, D Horton, eds, The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry, Ed 2. Academic Press, New York, pp 471-513
- Gudmundsson, M. 1994. Retrogradation of starch and the role of its components. *Thermochimica Acta* 246: 329-341.
- Guo, G., Jackson, D. S., Graybosh, R. A. and Parkhurst, A. M. 2003. Wheat tortilla quality : Impact of amylose content adjustments using waxy wheat flour. *Cereal Chem.* 80: 427-436.
- Guo, G., Jackson, D. S., Graybosh, R. A. and Parkhurst, A. M. 2003. Asian salted noodle quality : Impact of amylose content adjustments using waxy wheat flour. *Cereal Chem.* 80: 437-445.
- Hirano, H. and Watanabe, T. 1990. Microsequencing of proteins electrotransferred onto immobilizing matrices from polyacrylamide gel electrophoresis: application to an insoluble protein, *Electrophoresis* 11: 573-580
- Hirano, H. and Sano, Y. 1991. Molecular Characterization of the waxy locus of rice (*Oriza sativa*). *Plant Cell Physiol.* 32: 989-997
- Hixon, R. M. and Brimhall, B. 1968. Waxy cereals and red iodine starches, In JA Radley, ed, *Starch and Its Derivatives*, ED 4. Chapman and Hall, London, pp 247-281

Hoshino, T., Ito, S., Hatta, K., Nakamura, T. and Yamamori, M. 1996. Development of waxy common wheat by haploid breeding. *Breeding Sci.* 46: 185-188

Hizukuri, S. and Osaki, S. 1978. A rapid Smith-degradation for the determination of non-reducing, terminal residues of (1 → 4)- α -D-glucans. *Carbohydr. Res.* 63: 261-264.

Hizukuri, S. 1985. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydr. Res.* 141: 295-306.

Hizukuri, S. 1986. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydr. Res.* 147: 342-347.

Hung, P. V., Maeda, T. and Morita, N. 2006. Waxy and high-amylose wheat starches and flours – characteristics, functionality and application. *Trends Food Sci. Technol.* 17: 448-456

Inouchi, N., Glover, D. V., Sugimoto, Y. and Fuwa, H. 1991. DSC characteristics of gelatinization of starches of single-, double-, and triple-mutants and their normal counterpart in the Inbred Oh43 maize (*Zea mays* L.) background. *Starch/Stärke* 43: 468-472.

- Ishikawa, N., Ishihara, J. and Itoh, M. 1994. Artificial induction and characterization of amylose-free mutants of barley. *Barley Genet. News* 24: 49-53
- Jacobsen, E., Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Krijgsheld, H. T., Nijdam, H., Pijnacker, L. P., Witholt, B. and Feenstra, W. J. 1989. Phenotypic and genotypic characterization of an amylose-free starch mutant of the potato . *Euphytica* 44: 43-48
- Jenkins, L. D., Meredith, P. and Loney, P. D. 1975. The developing starch granule. Part I. The starch content of cereal granule during their development. *Starch/Starke* 27: 105-109
- Klosgen, R. B., Gierl, A., Schwartz-Sommer, Z. and Saedler, H. 1986. Molecular analysis of the waxy locus of *Zea mays*. *Mol. Gen. Genet.* 203: 237-244
- Konishi, Y., Nojima, H., Okuno, K., Asaoka, M. and Fuwa, H. 1985. Characterization of starch granule from waxy, nonwaxy, and hybrid seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Agric. Biol. Chem.* 49: 1965-1971
- Maningat, C. C. and Seib, P. A. 2010. Understanding the physicochemical and functional properties of wheat starch in various foods. *Cereal Chem.* 87: 305-314.
- Martin, C. and Smith, A. 1995. Starch biosynthesis. *Plant J.* 7: 971-985

Miles, M. J., Morris, V. J., Orford, P. D., and Ring, S. G. 1985. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydr. Res.* 135: 271-281.

Morita, N., Maeda, T., Miyazaki, M., Yamamori, M., Miura, H., and Ohtsuka, I. 2002. Dough and baking properties of high-amylose and waxy wheat flour. *Cereal Chem.* 79: 491-495.

Morrison, W. R., Tester, R. F., Snape, C. E., Law, R. and Gidley, M. J. 1993. Swelling and gelatinization of cereal starches. IV: Some effects of lipid-complexed amylose and free amylose in waxy and normal barley starches. *Cereal Chem.* 70: 385-391.

Müller-Räber, B. and Kossmann, J. 1994. Approaches to influence starch quality and starch quality in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 601-613.

Nakamura, T., Yamamori, M., Hidaka, S. and Hoshino, T. 1992. Expression of HMW Wx protein in Japanese common wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Japan. J. Breed.* 42: 681-685.

Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H. and Hidaka, S. 1993a. The waxy (Wx) protein of maize, rice and barley. *Phytochemistry* 33: 749-753.

Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H. and Hidaka, S. 1993b. Identification of three waxy proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochem. Genet.* 248: 253-259.

Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H. and Hidaka, S. 1993c. Decrease of waxy (Wx) protein in two common wheat cultivars with low amylase content. *Plant Breed.* 111: 99-105.

Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S. and Nagamine, T. 1995. Production of waxy (amylose-free) wheats. *Mol. Gen. Genet.* 248: 253-259.

Nakamura, T., Vrinten, P., Hayakawa, K. and Ikeda, J. 1998. Characterization of a granule-bound starch synthase isoform found in the pericarp of wheat. *Plant. Physiol.* 118 (2): 451-459.

Nakazawa, F., Noguchi, S., Takahashi, J. and Takada, M. 1985. Retrogradation of gelatinized potato starch studied by differential scanning calorimetry. *Agric. Biol. Chem.* 49: 953-957.

Nelson, O. and Pan, D. 1995. Starch synthesis in maize endosperm, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 475-496

Oda, M., Yasuda, Y., Okazaki, S., Yamauchi, Y., and Yokokawa, Y. 1980. A method of flour quality assessment for Japanese noodles. *Cereal Chem.* 57: 253-254.

Oda, S., Kiribuchi, C. and Seko, H. 1992. A bread wheat mutant with low amylose content induced by ethyl methanesulphonate. *Japan. J. Breed.* 42: 151-154.

- Parker, M. L. 1985. The relationship between A-type and B-type starch granules in the developing endosperm of wheat. *J. Cereal Sci.* 3: 271-278
- Piazza, L., and Masi, P. 1995. Moisture redistribution throughout the bread loaf during staling and its effect on mechanical properties. *Cereal Chem.* 72: 320-325.
- Preiss, J. 1988. Biosynthesis of starch and its regulation. In J Preiss, ed, *The Biochemistry of Plants*, Vol. 14. Academic Press, San Diego, pp 181-254
- Preiss, J. 1991. Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. In BJ Mifflin, ed, *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, vol.7. Oxford University Press, Oxford, pp 59-114
- Prentice, N., Cuendet, L. S., and Geddes, W. F. 1954. Studies on bread staling. V. Effect of flour fractions and various starches on the firming of bread crumb. *Cereal Chem.* 31: 188-206.
- Rahman, S., Li, Z., Batey, I., Cochranet, M. P., Apples, R. and Morell, M. 2000. Genetic alteration of starch functionality in wheat. *J. Cereal Sci.* 31: 91-110
- Rahman, S., Li, Z., Regina, A., Kosar-Hashemi, B., McMaugh, S., Konik-Rose, C. and Morell, M. 2005. Genetic control of wheat starch biosynthesis. *Wheat Information Service* 100: 77-87.

- Regina, A., Kosar-Hashemi, B., Li, Z., Rampling, L., Cmiel, M., Gianibelli, C., Konic-Rose, C., Larroque, O., Rahman, S. and Morell, M. K. 2004. Multiple isoforms of starch branching enzyme in wheat: lack of the major SBE-I isoform does not alter starch phenotype. *Funct. Plant Biol.* 31: 591-601.
- Ring, S. G. 1985. Some studies on starch gelation. *Starch/Stärke* 37: 80-83.
- Ring, S. G., and Stainsby, G. 1982. Filler reinforcement of gels. *Prog. Food Nutr. Sci.* 6: 323.
- Sestili, F., Janni, M., Doherty, A., Botticella, E., D' Ovidio, R., Masci, S., Jones, H. D. and Lafiandra, D. 2010. Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the *SBEIIa* genes. *BMC Plant Biol.* 10: 144-155.
- Salomonsson, A. C. and Sundberg, B. 1994. Amylose content and chain profile of amylopectin from normal, high amylose and waxy barleys. *Starch/Stärke* 46: 325-328.
- Sandstedt, R. M. 1946. Photomicrographic studies of wheat starch. I. Development of the starch granules. *Cereal Chem.* 23: 337-359
- Sano, Y. 1985. Gene regulation at the waxy locus in rice, *Gammap Field Symposia* 24: 63-79

Sato, K. 1984. Starch granules in tissues of rice plants and their changes in relation to plant growth. JAQR 18: 79-86

Shannon, J. C. and Garwood, D. L. 1984. Genetics and physiology of starch development. In RL Whistler, JN Bemiller, EF Paschall, eds, Starch: Chemistry and Technology, Ed 2, Academic Press, New York, pp 26-86

Schoch, T. J. 1964. Iodimetric determination of amylose. Page 157 in : Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 4. ed. Academic Press : New York.

Schoch, T. J. 1965. Starch in bakery products. Baker's Dig. 39(2): 48-52, 54-57

Schoch, T. J., and French, D. 1947. Studies on bread staling. I. The role of starch. Cereal Chem. 24: 231-249.

Shewmakar, C. K., Boyer, D. D., Wiesenborn, D. P., Thompson, D. B., Boerig, M. R., Oakes, J. V. and Stalker, D. M. 1994. Expression of *Escherichia coli* glycogen synthase in the tubers of transgenic potatoes (*Solanum tuberosum*) results in a highly branched starch. Plant Physiol. 104: 1159-1166.

Shi, Y. C. and Seib, P.A. 1992. The structure of four waxy starches related to gelatinization and retrogradation. Carbohydr. Res. 227: 131-145.

- Shure, M., Wessler, S. and Federoff, N. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35: 225-233
- Singleton, G. W., Banisadr, R. and Keeling, P. L. 1997. Influence of gene dosage on carbohydrate synthesis and enzymatic activities in endosperm of starch-deficient mutants of maize. *Plant Physiol.* 113: 293-304
- Smith, A. M. 1990. Evidence that the "waxy" protein of pea (*Pisum sativum* L.) is not the major starch-granule-bound starch synthase. *Planta* 182: 599-604
- Smith, A. M., Denyer, K. and Martin, C. 1997. The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 67-87
- Smith, A. M. and Martin, C. 1993. Starch biosynthesis and the potential for its manipulation. In D Grierson, ed, *Plant Biotechnology*, Vol. 3. Blackie Academic & Professional, Glasgow, pp 1-54
- Stark, D. M., Timmerman, K. P., Barry, G. F., Preiss, J. and Kishore, G. M. 1992. Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science* 258: 287-292.
- Stone, B. and Morell, M. K. 2009. Synthesis of Wheat Starch. In: *WHEAT* (4th ed.), by Khan, K. and Shewry, P. R., p.310. AACC International Press:St. Paul

- Takaoka, M., Watanabe, S., Sassa, H., Yamamori, M., Nakamura, T., Sasakuma, T. and Hirano, H. 1997 Structural characterization of high molecular weight starch granule-bound proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). J.Agric. Food Chem. 45: 2929-2934
- Takeda, S. and Hizukuri, S. 1974 . Characterization of the heat dependent pasting behavior of starches (Studies on the gelatinization of starches Part I) (in Japanese). Nogeikagakkaishi 48: 663-669.
- Tester, R. F. and Morrison, W. R. 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose and lipids. Cereal Chem. 67: 551-557.
- Tomlinson, K., Craig, J. and Smith, A. M. 1998. Major differences in isoform composition of starch synthase between leaves and embryos of pea (*Pisum sativum* L.). Planta 204: 86-92
- Van der Leij, F. R., Visser, R. G. F., Ponstein, A. S., Jacobsen, E. and Feenstra, W. J. 1991. Sequence of the structural gene for granule-bound starch synthase of potato (*Solanum tuberosum* L.) and evidence for a single point deletion in the amf allele. Mol. Gen. Genet. 228: 240-248
- Visser, R. G. F. and Jacobsen, E. 1993. Towards modifying plants for altered starch content and composition. Trends Biotech. 11: 63-68.

- Vos-Scheperleuter, G. H., de Bore, W., Visser, R. G. F., Feenstra, W. J. and Witholt, B. 1986. Identification of granule-bound starch synthase in potato tubers. *Plant Physiol.* 82: 411-416
- Vrinten, P. L. and Nakamura, T. 2000. Wheat granule-bound starch synthase and are encoded by separate genes that are expressed in different tissues. 122: 255-263.
- Whistler, R. L. and Daniel, J. R. 1984. Molecular structure of starch. In RL Whistler, JN Bemiller, EF Paschall, eds, *Starch: Chemistry and Technology*, Ed 2. Academic Press, New York, pp 153-182
- Williams, P. C., Kuzina, F. D. and Hlynka, I. 1970. A rapid colorimetric procedure for estimating the amylose content of starches and flour. *Cereal Chem.* 47: 411-420.
- Yamamori, M. and Endo, T. R. 1996. Variation of starch granule proteins and chromosome mapping of their coding genes in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 93: 275-281
- Yamamori, M., Nakamura, M. and Kuroda, A. 1992. Variation in the content of starch-granule bound (Wx) protein among several Japanese cultivars of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Eupytica* 64: 215-219.

Yamamori, M., Nakamura, T, Endo TR, and Nagamine, T. 1994. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. Theor. Appl. Genet. 89: 179-184.

Yamamori, M., Fujita, S, Hayakawa, K. and Matsuki, J. 2000. Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylose. Theor. Appl. Genet. 101: 21-29.

Yi, J., Kerr, W. L. and Johnson, J. W. 2009. Effects of waxy flour and water on frozen dough and bread properties. J. Food Sci, 74: 278-284.

Zelevnak, K. J., and Hosney, R. C. 1987. Characterization of starch from bread aged at different temperatures. Starch/Stärke 39: 231-233.

USDA 2011. Current World Production, Markets, and Trade Reports

不破英次、小巻利章、檜作進、貝沼圭二編 澱粉科学の事典 2003

ポケット農林水産統計 農林統計協会 2008

長尾精一 小麦とその加工 建帛社 1984

高橋禮治 でん粉製品の知識 幸書房 1996

長澤幸一，田引正，西尾善太，伊藤美環子，中村和弘，谷口義則，山内宏昭 2011. 国産もち小麦「もち姫」を含む国産小麦パンの製パン性および特徴的物性の解析. 日本調理科学会誌. 44:214-222.

關係論文

Hayakawa, K., Tanaka, K., Nakamura, T., Endo, S. and Hoshino, T. 1997. Quality characteristics of waxy hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.): Properties of starch gelatinization and retrogradation. Cereal Chem. 74: 576-580.

Nakamura, T., Patricia, V., **Hayakawa, K.** and Ikeda, J. 1998. Characterization of agranule-bound starch synthase isoform found in the pericarp of wheat. Plant Physiol. 118: 451-459.

Hayakawa, K., Tanaka, T., Nakamura, T., Endo, S. and Hoshino, T. 2004. End use quality of waxy wheat in various grain-based foods. Cereal Chem. 81: 666-672.

謝辞

本研究をまとめるにあたり懇切丁寧なる御指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 長澤寛道教授、同応用生命化学専攻 作田庄平准教授に深く御礼申し上げます。

本研究は、東北農業試験場（現東北農業研究センター）との共同研究で実施されたものであり、共同研究者の中村俊樹博士には微に入り細に渡る御指導をいただき深く感謝しております。

なお、本論分にまとめた研究は、主として日清製粉株式会社食品研究所および製粉研究所勤務中に実施されたものであり、共同研究者をはじめ、多くの方々の暖かいご支援のたまものであると心より感謝いたします。

特に、本研究の共同研究者としてご協力いただきました当時東北農業試験場の星野次汪博士、Patricia Vrinten 博士、池田順一博士、当時日清製粉株式会社の長尾精一博士、本井博文博士、遠藤繁氏、田中啓子氏、多胡征司氏、石神真二氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究をこのような形で学位論文としてまとめることを許可しご支援下さいました柘植宣孝所長、株式会社日清製粉グループ本社並びに日清製粉株式会社に感謝いたします。