

同質遺伝子系統のウルチおよび モチコメ胚乳澱粉の微細構造

鈴木 幸雄・中野 真之・内田 綱

1940年代のはじめに澱粉の主成分は直鎖状のアミロースと枝分れしたアミロペクチンであることが明らかになって以来、多くの研究がなされているが、それらの構造および生合成機構についてはいまだに不明な点が多い(中村, 1974a, 1974b, Whistler ら, 1984)。また、澱粉粒についてはその分解機構の研究が現在活発に行われているが(桐淵・中村, 1975; Maeda et al., 1978; Fuwa et al., 1980; Taniguchi et al., 1982; Taniguchi et al., 1983)、その構造および生合成機構についてはわかっていない。

一般に澱粉粒は起源植物に特有な形、構造、性質をもっているが、同一植物においても澱粉粒に大小のある場合も知られている。それらが遺伝的要因に影響されていることは勿論であるが、温度などの生育環境条件によっても澱粉の構造と性質が変化し(Asaoka et al., 1984, Asaoka et al., 1985a)、また、澱粉粒の調製方法などによっても変化する(Adkins and Greenwood, 1966)。したがって、澱粉の特性を比較する場合、遺伝的背景の明らかな実験材料を使用し、正常株とそれと均質胚乳遺伝子をもった変異株から、同じ条件のもとで胚乳澱粉を調製し、それらの構造と性質について検討することが必要であろう。

Mercier (1973) はウルチ、モチ、高アミロース性のトウモロコシ胚乳澱粉の構造について検討し、各澱粉のイソアミラーゼによる枝切り後の鎖長分布から、モチ性澱粉のアミロペクチンはウルチ性のそれと同一であり、高アミロース性のアミロペクチンはウルチ、モチ性のそれに較べて平均重合度が約2倍大きいことを報告した。Inouchi ら (1983) は遺伝的背景の明らかなウルチ、モチ、グル、高アミロース、シュガリー I、シュガリー II 性のトウモロコシの胚乳澱粉の構造について調べ、モチ性以外では登熟初期にアミロース含量が増加し、シュガリー II 性アミロペクチンはウルチ性のそれと類似していることを指摘した。また、Asaoka ら (1985 b) は同質遺伝子系統のイネについて、登熟中の胚乳澱粉の構造および性質などの変化、およびそれら特性の生育環境温度による変化を詳細に調べ、澱粉のアミロース含量は登熟初期に増加し、その後一定となり、アミロペクチンの鎖長分布は登熟期を通じてほとんど変化が認められないこと、また生育環境温度が低温ではアミロース含量が増加し、高温ではアミロペクチンの長鎖が増加することなどを報告した。1984—1985年、著者らは同質遺伝子系統のイネのウルチおよびモチ性胚乳澱粉を実験材料として、モチ性澱粉の構造とウルチ性澱粉のアミロペクチンの構造の比較を、完熟期および乳熟期の胚乳澱粉、それらから調製したアミロペクチン、および α -アミラーゼ、グルコアミ

ラーゼ、硫酸による澱粉部分分解残存不溶物について検討し、ウルチ性澱粉のアミロペクチンの構造はモチ性澱粉のそれとよく類似していることを認めた(鈴木ら, 1986)。本報告ではこれらの結果について述べる。

実 験 方 法

1. 実験材料と試薬

イネ (*Oryza sativa* L. 品種: 台中65号) とその同質遺伝子系統のモチ株の種子は、北海道大学農学部木下俊郎教授より恵与された。これらの種子を岡山大学農業生物研究所の実験圃場にまき、採取した乳熟期および完熟期の種子を本実験に使用した。 *Pseudomonas amyloclavata* イソアミラーゼおよび *Aerobacter aerogenes* プルラナーゼは株式会社林原生物化学研究所、ブタ膵臓 α -アミラーゼは Boehringer Mannheim 社、*Rhizopus niveus* グルコアミラーゼは生化学工業株式会社、のそれぞれ製品である。他の試薬類はいずれも市販の特級品である。

2. 澱粉粒の調製

アルカリ法(山本ら, 1973)に準じて行った。すなわち、完熟種子を10%精白し、4~5倍量の0.1%水酸化ナトリウム水溶液に4℃で数夜浸漬後、ミキサーで碎き、150メッシュの篩を通した。2時間4℃で攪拌したのち、一夜静置した。上清液を捨て、0.1%水酸化ナトリウム水溶液を再び加え、攪拌後静置した。この操作を3回くり返したのち、塩酸で中和して水洗した。ついで n-アミルアルコールを1/5容量加え、はげしく攪拌後静置し、水層を集めた。この操作を n-アミルアルコール層が着色しなくなるまで数回くり返したのち、澱粉粒を集めてエーテル、エタノールで順次洗浄し、風乾した。乳熟期種子からは精白せずに上述と同操作により澱粉粒を得た。この際、塩酸で中和後、非常に沈澱し難い区分があったので、1 l のメスシリンダーに移して1 l にメスアップしたのち、攪拌、静置し、5時間後も沈澱しない区分と沈澱した区分に分別して調製した。後者の澱粉粒を実験に用いた。

3. 澱粉粒の脱脂

澱粉粒200g に85%メタノール600ml を加え、1時間還流煮沸攪拌後、熱時濾過した。この操作を3回くり返して脱脂澱粉粒を得た。

4. n-ブタノールによるアミロースとアミロペクチンの分別

Schoch 法 (T. J. Schoch, 1942) に準じて行った。すなわち、純水1.4 l に20%リン酸緩衝液 (pH 6.3, KH_2PO_4 16.4g および K_2HPO_4 3.6g に純水80ml を加えて溶解) 5 ml および n-ブタノール150ml を加えた混液を沸騰させ、これに水100ml に懸濁した澱粉30g を加えた。20分間加熱したのち、121℃で2時間オートクレーブにかけた。熱時遠心分離して不溶物を除いたのち、上清液に n-ブタノールを150 ml 加え、92~95℃に加熱し、室温まで徐冷した。徐冷物を10,000rpm で10分間遠心分離した。上清液を35℃で減圧濃縮後、1/10容量の n-ブタノールを加えて、再度加熱、徐冷、遠心分離し、得られた上清液を減

圧濃縮した。濃縮液に4倍量のメタノールを加え、生じた沈澱物をメタノール、エタノール、エーテルで順次洗浄、乾燥し、得られた標品をアミロペクチン区分とした。また、10分間遠心分離して得た沈澱物に、水1.5ℓおよびn-ブタノール150mlを加えて95℃に加熱溶解し、室温まで徐冷後遠心分離した。得られた沈澱物をメタノール、エタノール、エーテルで順次洗浄、乾燥させてアミロース区分を得た。

5. チモールによるアミロースおよびアミロペクチンの分別

Banks and Greenwood (1967)の方法に準じて行った。すなわち、ウルチ澱粉10gおよびモチ澱粉10gに、それぞれ90%ジメチルスルフォキシド400mlおよび600mlを加え、窒素ガスを通しながら室温で24時間攪拌した。透明になった各澱粉溶液に3倍量のn-ブタノールを加えて澱粉を沈澱させ、n-ブタノールで洗浄してジメチルスルフォキシドを除去した。得られた澱粉を水1ℓに懸濁し、窒素ガスを通しながら加熱溶解後、35℃で減圧濃縮してn-ブタノールを除去した。濃縮液に水を加えて1ℓにしたのち、窒素ガスを通しながら60℃まで加熱し、チモール1gを加えた。3日間室温で静置後遠心分離した。上清液はエーテルでチモールを除去後、減圧濃縮し、4倍量のメタノールを加え、生じた沈澱物をメタノール、エタノール、エーテルで順次洗浄、乾燥してアミロペクチンを得た。チモール沈澱物は水酸化ナトリウムに溶解後、塩酸で中和して水で1ℓにし、n-ブタノール100mlを加えて窒素ガスを通しながら60℃まで加熱溶解し、室温まで徐冷した。徐冷後遠心分離して得た沈澱物を再度溶解し、n-ブタノールにより沈澱した。再沈澱物をメタノール、エタノール、エーテルで順次洗浄し、乾燥してアミロースを得た。

6. ゲル濾過によるアミロースおよびアミロペクチンの分別

試料200mgに2/3 N水酸化ナトリウム水溶液6mlを加えて1夜4℃で溶解後、塩酸で中和した。これを45℃に保温したセファローズ CL-2 B カラム(2.6×950cm)に供した(流出液:0.02%窒化ナトリウム水溶液,流速:30分間当り5ml,フラクション:5ml)。各フラクションのヨウ素複合体吸収スペクトルを求め、 λ_{max} が550nm以下のフラクションをアミロペクチン、640nm以上のフラクションをアミロースとした。

7. α -アミラーゼによる澱粉粒の分解

澱粉粒1gに、50mMリン酸緩衝液(pH 6.9, 0.03M塩化ナトリウムおよび0.05M酢酸カルシウムを含む)10mlに溶解したブタ豚臓 α -アミラーゼ500単位を加え、37℃で攪拌しながら反応させた。分解率は反応液をミリポアフィルター0.45 μ mに通した濾液中の炭水化物量と反応液中の炭水化物量より算出した。反応液に等量の32%硫酸を添加して反応を停止させたのち、遠心分離し、得られた沈澱物は酸性を示さなくなるまで水洗、乾燥して残存不溶物の試料とした。

8. グルコアミラーゼによる澱粉粒の分解

澱粉粒1gに、0.1M酢酸緩衝液(pH 5.0, 0.01%塩化カルシウムを含む)10mlに溶解した*Rhizopus niveus*グルコアミラーゼ150単位を加え、37℃で攪拌しながら反応を行った。分解率の算出、反応停止、残存不溶物採取は α -アミラーゼの場合と同様に行った。

9. 硫酸による澱粉粒の分解

澱粉粒 1g に 16% 硫酸 10ml を加え、1 日に 2 回攪拌して 38°C で静置した。分解率の算出は α -アミラーゼの場合と同様にした。分解残存不溶物は酸性を示さなくなるまで遠心分離により水洗後、乾燥した。

10. 完熟種子澱粉粒、アミロース、およびアミロペクチンの枝切り

試料 60mg に、50mM 酢酸緩衝液 (pH 3.5) に溶解した *Pseudomonas* イソアミラーゼ 1475 単位を加え、40°C で 24 時間反応した。完熟種子澱粉粒には、2/3 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて 1 夜 4°C 放置、溶解し、塩酸で中和後、イソアミラーゼを作用させた。

11. 乳熟期種子澱粉粒、および酵素または酸による澱粉粒分解残存不溶物の枝切り

試料 60mg に、50mM 酢酸緩衝液 (pH 5.2) に溶解した *Pseudomonas* イソアミラーゼ 2950 単位を加え、40°C で 24 時間反応させたのち、沸騰水浴中に 5 分間浸漬して反応停止を行った。ついで *Aerobacter* プルラーゼ 16 単位を加えて 30°C で 24 時間反応した。澱粉粒およびその分解残存不溶物は 2/3 N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解、中和後、イソアミラーゼおよびプルラーゼによる枝切りを行った。

12. 枝切りした試料のトヨパールカラムによるゲル濾過

試料を 2/3 N 水酸化ナトリウム水溶液に低温で溶解後、トヨパール HW50SF カラム (2.6×100cm) およびこのカラムに連結したトヨパール HW55SF カラム (2.6×50cm) に供し、0.2% 塩化ナトリウムを含む 0.05N 水酸化ナトリウム水溶液で流出した。20 分毎に 5 ml のフラクションを集めた。各フラクションについて炭水化物量、鎖長、ヨウ素複合体吸収スペクトルを求めた。その λ_{\max} により第 I 区分 ($\lambda_{\max} \geq 620\text{nm}$)、中間区分 (620 nm > $\lambda_{\max} \geq 600\text{nm}$)、第 II 区分 (600 nm > $\lambda_{\max} \geq 540\text{nm}$)、第 III 区分 (540 nm > λ_{\max}) に分割した。

13. 澱粉粒、およびその酵素または酸による分解残存不溶物のセファローズカラムによるゲル濾過

試料 25mg を 2/3 N 水酸化ナトリウム水溶液に低温で溶解後、塩酸で中和してセファローズ CL-2 B カラム (2.6×90cm, 45°C) に供した。0.02% 窒化ナトリウム水溶液で流出し、30 分毎に 5 ml のフラクションを集めた。各フラクションについて炭水化物量、ヨウ素複合体吸収スペクトルを求めた。

14. 分析方法

炭水化物量の測定 フェノール硫酸法 (福井, 1969) により測定し、グルコース量として求めた。

還元末端量の測定 Nelson 法 (Nelson, 1944) により測定し、グルコース量として求めた。この値で炭水化物量を除して鎖長を求めた。

ヨウ素複合体吸収スペクトル 5 ml 中に糖質 0.2mg、ヨウ素 0.4mg、ヨウ化カリウム 4 mg を含む溶液を調製し、500~700nm の吸収スペクトルを日立 EPS-3 T 型自記分光光

度計を用いて測定した。また、この際の680nmにおける吸光度を青価とした。

実験結果

1. 完熟種子のウルチ胚乳澱粉およびモチ胚乳澱粉の成分

Fig. 1は両澱粉のセファローズ CL-2B カラムによるゲル濾過の流出パターンを示す。ウルチ(A)ではアミロペクチン(前のピーク)およびアミロース(後のピーク)にそれぞれ由来する2つのピークが認められた。モチ(B)ではアミロペクチンに由来するピークのみが見受けられた。

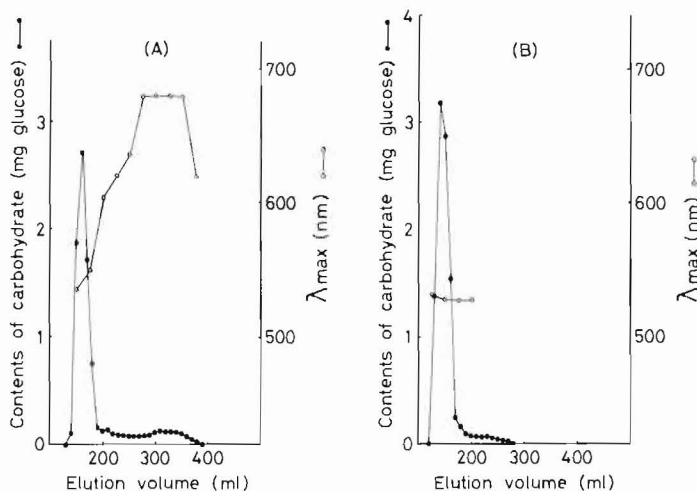


Fig. 1. Elution patterns on column of Sepharose CL-2B of starches from endosperm of matured seeds.
(A) Normal starch (B) Waxy starch

Fig. 2は両澱粉をイソアミラーゼで枝切りした後のトヨパールカラムによる流出パターンを示す。第I区分はアミロース、第IIおよび第III区分はアミロペクチンに由来する。ウルチ澱粉は第I区分を17.5%含み、モチ澱粉では含んでいなかった。第II区分および第III区分は平均鎖長がそれぞれ約40および15であり、ウルチとモチの間には大差がなかった。第III区分と第II区分の比(以下III/IIと表わす)はアミロペクチンの構造を表わす1つの指標となるが、この比も両者間には大差がなかった (Table 1)。

2. 両澱粉から調製したアミロペクチン

ウルチおよびモチのコメ胚乳澱粉から、Schoch法およびチモール法により、アミロペクチンを調製し、枝切り後、トヨパールカラムによるゲル濾過を行った結果を示す (Fig. 3および Fig. 4)。ウルチ澱粉から両法により調製したアミロペクチンには、いずれも第I区分が僅少含まれていた。中間区分の割合は Schoch法で分離したアミロペクチンで高い値を

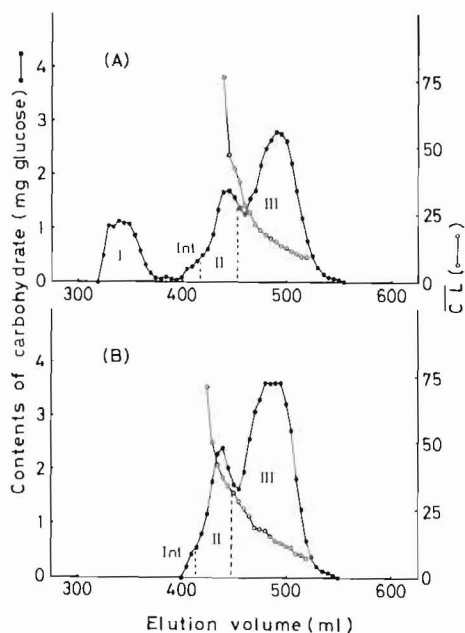


Fig. 2

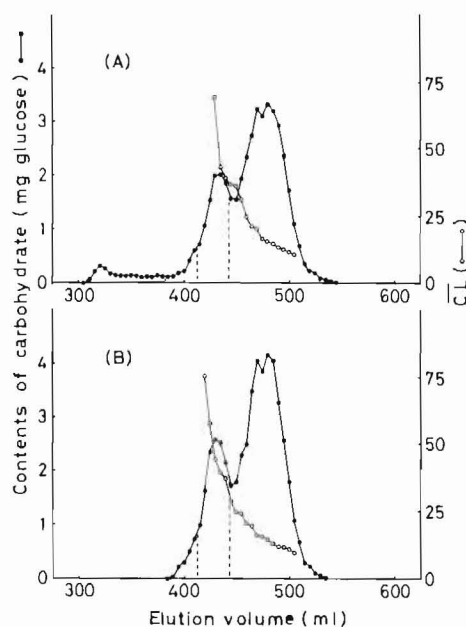


Fig. 3

Fig. 2. Elution patterns on columns of Toyopearl HW50SF and HW55SF of endosperm starches of matured seeds debranched by isoamylase.

(A) Normal starch (B) Waxy starch

Fig. 3. Elution patterns on columns of Toyopearl HW50SF and HW55SF of isoamylase-debranched amylopectin prepared from endosperm starches by Schoch's method.

(A) Normal amylopectin (B) Waxy amylopectin

Table 1. Properties of endosperm starches and their components debranched by isoamylase.

Materials	λ max*	BV*	Distribution of starch components (%)				
			I	Int.	II	III	III/II
Normal starch							
Native	600	0.36	17.5	2.2	18.1	62.1	3.43
Schoch amylopectin	540	0.16	5.2	3.7	20.0	71.1	3.56
Schoch amylose	680	1.38	92.3	4.4	3.3		
Thymol amylopectin	534	0.13	4.4	1.9	22.7	70.9	3.12
Thymol amylose	680	1.44	93.4	1.6	5.0		
Milky stage	588	0.32	11.5	4.2	19.6	64.6	3.29
Waxy starch							
Native	528	0.10	0	1.2	21.3	77.5	3.64
Schoch amylopectin	528	0.09	0	3.4	23.3	73.3	3.15
Thymol amylopectin	528	0.08	0	1.7	21.0	77.4	3.69
Milky stage	530	0.13	0.8	2.2	21.4	75.6	3.53

* : before debranching.

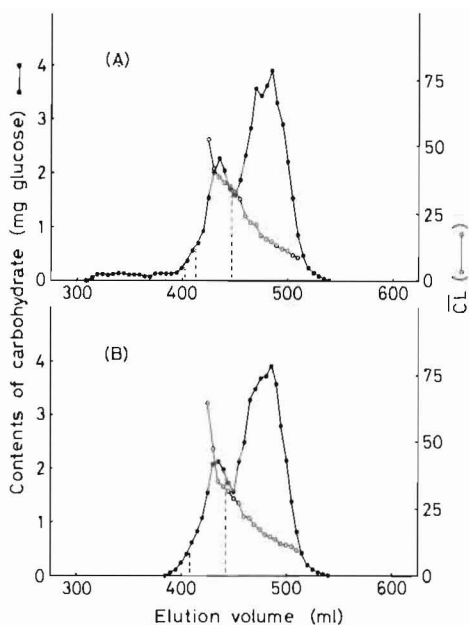


Fig. 4

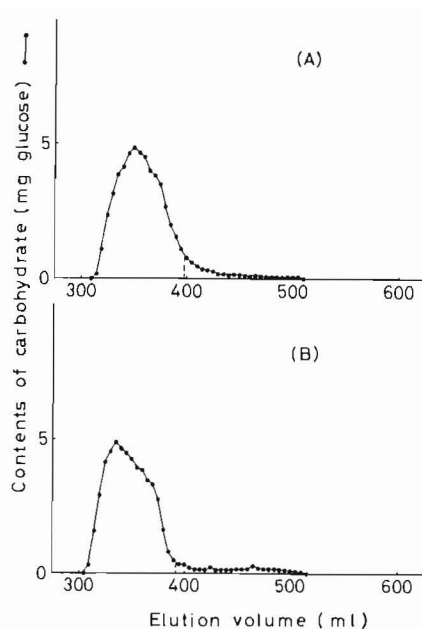


Fig. 5

Fig. 4. Elution patterns on columns of Toyopearl HW50SF and HW55SF of isoamylase-debranched amylopectins prepared from endosperm starches by modified fractionation with thymol.
(A) Normal amylopectin (B) Waxy amylopectin

Fig. 5. Elution patterns on columns of Toyopearl HW50SF and HW55SF of isoamylase-debranched amylose.
(A) Amylose prepared by Schoch's method
(B) Amylose prepared by modified fractionation with thymol

示した、第II区分および第III区分については、いずれの方法で調製したウルチ、モチのアミロペクチンでも大差が認められなかった (Table 1).

3. ウルチコメ澱粉から調製したアミロース

Fig. 5は、ウルチコメ澱粉から Schoch 法およびチモール法によりアミロースを調製し、枝切り後、トヨパールカラムによるゲル濾過を行った結果を示す。両法とも第I区分が大部分であり、その流出パターンも類似していたが、少量の中間区分および第IIあるいは第III区分をも含んでいた。

4. 乳熟期のウルチおよびモチ胚乳澱粉の成分

Fig. 6は乳熟期の両澱粉のセファローズ CL-2B カラムによる流出パターンを示す。ウルチおよびモチいずれの場合も、完熟種子澱粉の流出パターンと全体的には類似していたが、乳熟期のウルチ澱粉では、流出量220~230ml 区分に λ_{max} 600~620nm を示す中間

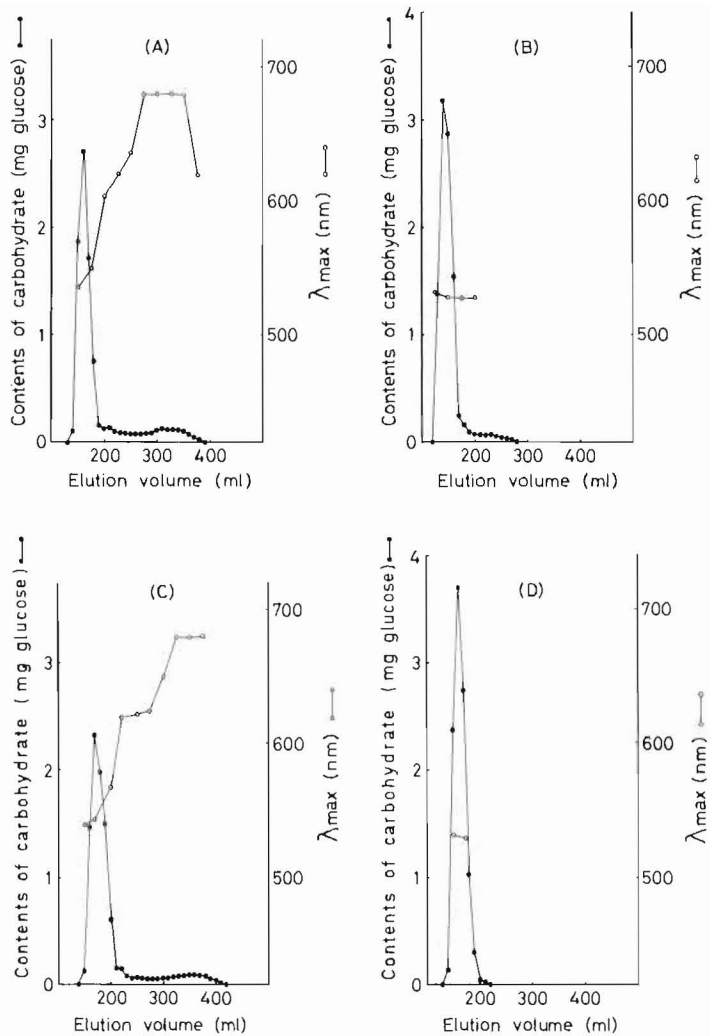


Fig. 6. Elution patterns on column of Sepharose CL-2B of endosperm starches from matured seeds and at the milky stage.

- (A) Normal starch from matured seeds
- (B) Waxy starch from matured seeds
- (C) Normal starch at the milky stage
- (D) Waxy starch at the milky stage

区分の存在が認められた。

Fig. 7 は乳熟期澱粉の枝切り後のトヨパールカラムによる流出パターンを示す。完熟種子のウルチおよびモチ澱粉の枝切り後の流出パターンと全体的には大差なかった。しかし、完熟種子澱粉に較べて、第 I 区分が少なく中間区分が多かった。したがって、ウルチではヨウ素複合体吸収スペクトルの λ_{\max} が低波長側へずれ、青価も低かった。モチでは第 I

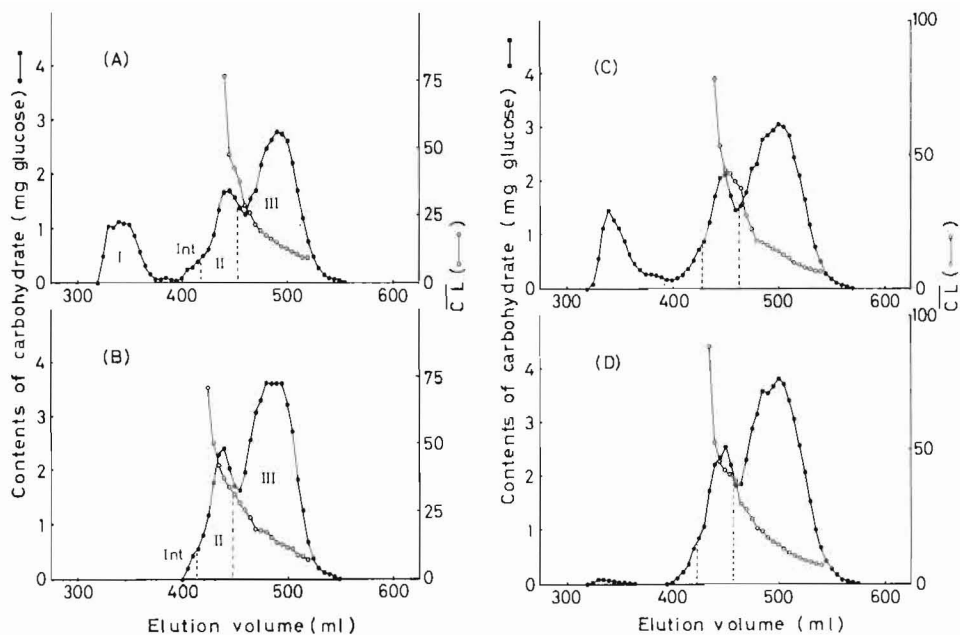


Fig. 7. Elution patterns on columns of Toyopearl HW50SF and HW55SF of isoamylase-debranched endosperm starches from matured seeds and at the milky stage.

- (A) Normal starch from matured seeds
- (B) Waxy starch from matured seeds
- (C) Normal starch at the milky stage
- (D) Waxy starch at the milky stage

区分が僅少量認められ、中間区分も多かった。アミロペクチン区分については、両者いずれの場合も III/II 値が若干低かった。特に、ウルチでは完熟種子澱粉に較べて第 II 区分および第 III 区分が多かった (Table 1, Fig. 8)。

5. α -アミラーゼによるウルチ澱粉およびモチ澱粉の分解残存不溶物

両澱粉粒はいずれも α -アミラーゼにより分解された (Fig. 9)。モチ澱粉がウルチ澱粉より分解され易かった。ウルチ澱粉では 82%，モチ澱粉では 88%，それぞれ α -アミラーゼにより分解後、得られた分解残存不溶物について以下検討した。

Fig. 10 (C) はウルチ澱粉の分解残存不溶物のセファローズ CL-2 B カラムによるゲル濾過の結果を示す。 α -アミラーゼ未処理澱粉に較べてアミロース区分が著しく増加していた。ヨウ素複合体吸収スペクトルの λ_{max} がアミロペクチンのピークでは長波長側へ、アミロースのピークでは低波長側へずれていた。

ウルチおよびモチ澱粉の α -アミラーゼ分解残存不溶物を枝切り後、ゲル濾過した結果を Fig. 11 に示す。ウルチでは未処理澱粉に較べて第 I 区分の含量が、モチでは中間区分の含量がそれぞれ増加していた (Table 2)。

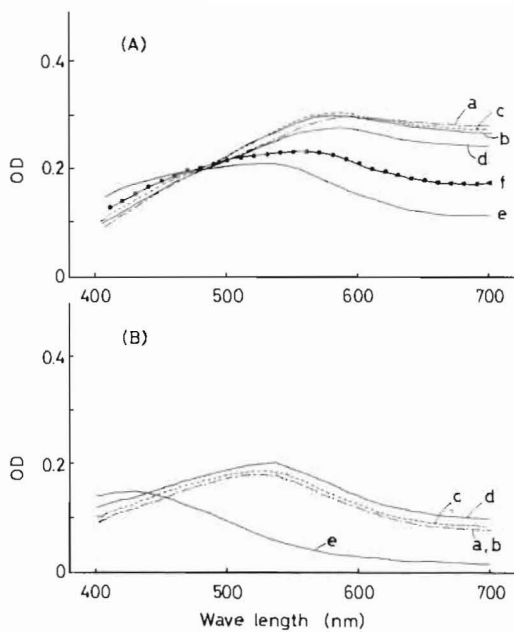


Fig. 8

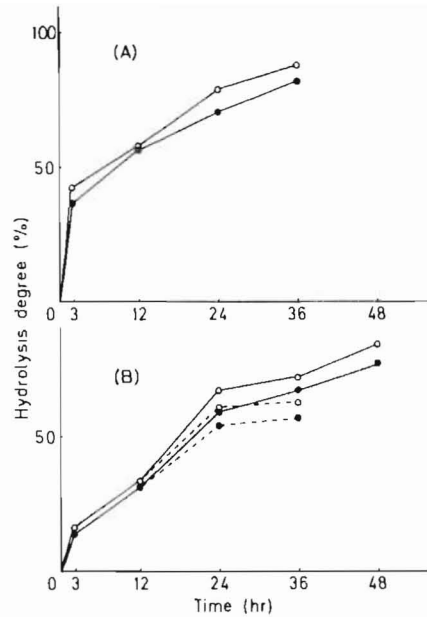


Fig. 9

Fig. 8. Absorption spectra of iodine-starch complexes.

- (A) Starch from matured seeds
- (B) Residue after hydrolysis by α -amylase
- (C) Residue after hydrolysis by glucoamylase
- (D) Starch at the milky stage
- (E) Residue after 70% hydrolysis by sulfuric acid
- (F) Residue after 19% hydrolysis by sulfuric acid

Fig. 9. Time courses of degradation of starch granules by α -amylase and glucoamylase.

- (A) Degradation by α -amylase (normal, \bullet — \bullet : waxy, \circ — \circ).
- (B) Degradation by glucoamylase (normal, \bullet — \bullet ; waxy, \circ — \circ ; no further addition of enzyme after 12hr incubation, -----).

ウルチではヨウ素複合体吸収スペクトルの λ_{max} が低波長側へずれたが、青価は変わらなかった。モチでは λ_{max} 、青価のいずれも変化がなかった (Fig. 8, Table 2)。

6. グルコアミラーゼによる両澱粉粒の分解残存不溶物

Fig. 9 (B)に示すように、両澱粉粒はグルコアミラーゼにより分解された。モチ澱粉がウルチ澱粉より分解され易かった。グルコアミラーゼによりウルチ澱粉77%、モチ澱粉84%それぞれ分解後、得られた分解残存不溶物について検討した。

ウルチ澱粉の分解残存不溶物のセファロースカラムによる流出パターンを Fig. 10 (D)に示す。未処理澱粉に較べてアミロース区分が増加していた。また、 λ_{max} がアミロペクチン区分では長波長側へ、アミロース区分では低波長側へそれぞれずれていた。

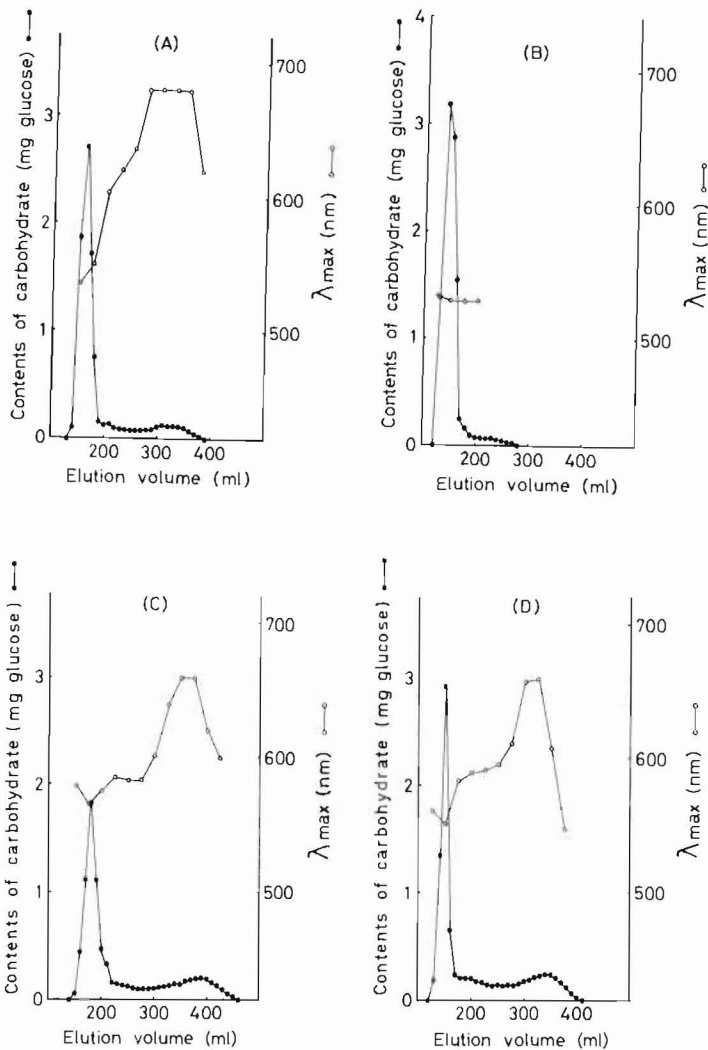


Fig. 10. Elution patterns on column of Sepharose CL-2B of endosperm starches from matured seeds and their insoluble residues after hydrolysis by α -amylase or glucoamylase.

- (A) Normal starch
- (B) Waxy starch
- (C) Residue after 82% hydrolysis by α -amylase
- (D) Residue after 77% hydrolysis by glucoamylase

両澱粉の分解残存不溶物の枝切り後のトヨパールカラムによる流出パターンを Fig. 12 に示す。未処理澱粉に較べて、ウルチでは第 I 区分が、モチでは中間区分がそれぞれ増加していた。ヨウ素複合体吸収スペクトルの λ_{\max} は、ウルチでは僅かに低波長側へずれていたが、モチでは変化がなかった。青価はいずれも変わらなかった。

Table 2. Properties of insoluble residues after hydrolysis by enzymes or acid

Materials	λ max*	BV*	Distribution of starch components (%)				
			I	Int.	II	III	III/II
Normal starch							
Native	600	0.36	17.5	2.2	18.1	62.1	3.43
Residue of 88% hydrolysis by α -amylase	582	0.38	22.7	2.8	16.2	58.2	3.59
Residue of 77% hydrolysis by glucoamylase	586	0.36	21.6	3.0	16.1	59.3	3.68
Residue of 19% hydrolysis by sulfuric acid	560	0.22	1.8	5.7	13.4	79.2	5.91
Residue of 70% hydrolysis by sulfuric acid	532	0.14	0	0.9	9.4	89.8	9.55
Waxy starch							
Native	528	0.10	0	1.2	21.3	77.5	3.64
Residue of 88% hydrolysis by α -amylase	528	0.11	0	2.7	21.5	75.8	3.53
Residue of 84% hydrolysis by glucoamylase	528	0.11	0	2.0	19.8	78.3	3.95
Residue of 70% hydrolysis by sulfuric acid	424	0.02	0	0	0	100	

* : before debranching.

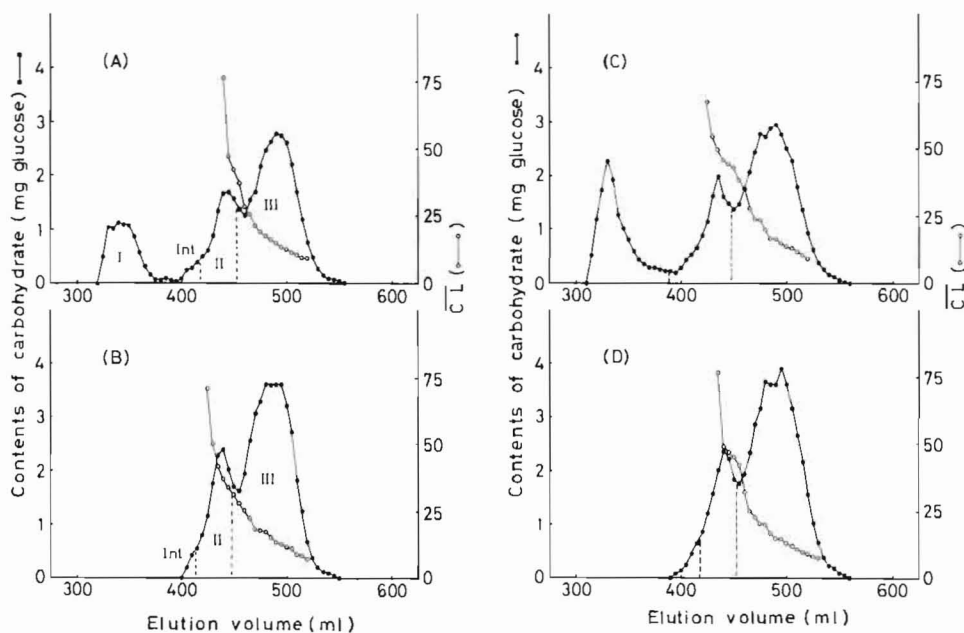


Fig. 11. Elution patterns on columns of Toyopearl HW50SF and HW55SF of isoamylase-debranched endosperm starch from matured seeds and their isoamylase-debranched insoluble residues after hydrolysis by α -amylase.

- (A) Normal starch (B) Waxy starch
 (C) Residue from normal starch after 82% hydrolysis
 (D) Residue from waxy starch after 88% hydrolysis

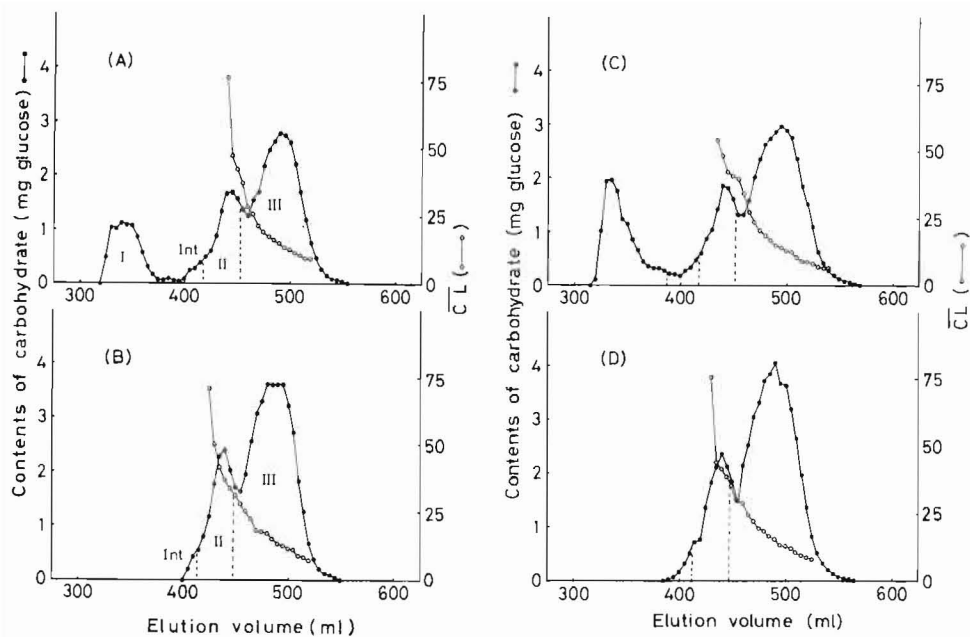


Fig. 12. Elution patterns on columns of Toyopearl HW50SF and HW55SF of isoamylase-debranched endosperm starch from matured seeds and their isoamylase-debranched insoluble residues after hydrolysis by glucoamylase.

- (A) Normal starch (B) Waxy starch
 (C) Residue from normal starch after 77% hydrolysis
 (D) Residue from waxy starch after 84% hydrolysis

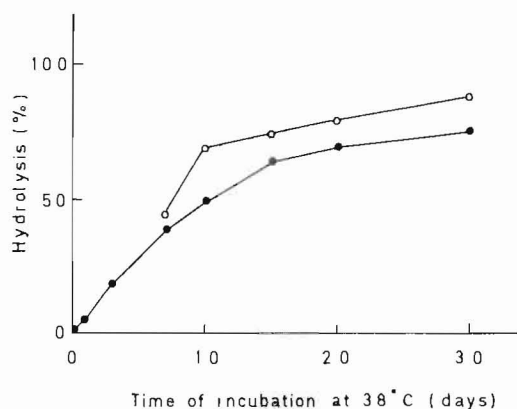


Fig. 13. Time course of degradation of starch granules by sulfuric acid
 Normal starch ●—●
 Waxy starch ○—○

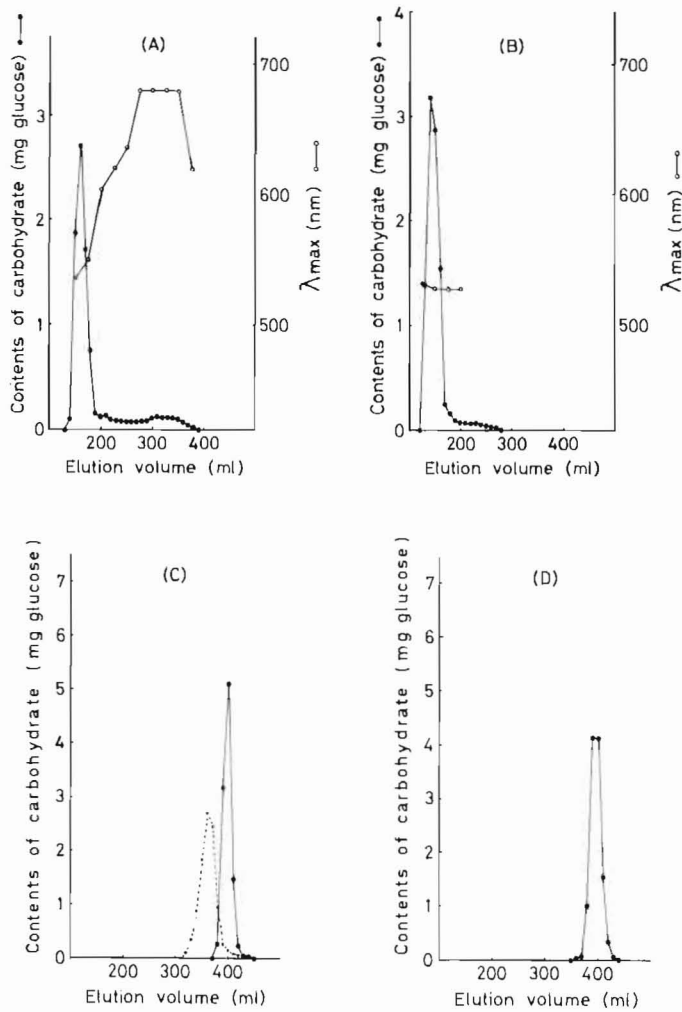


Fig. 14. Elution patterns on column of Sepharose CL-2B of endosperm starches from matured seeds and their insoluble residues after hydrolysis by sulfuric acid.

- (A) Normal starch (B) Waxy starch
 (C) Residues from normal starch after 19% hydrolysis (●-----●) and 70% hydrolysis (●——●)
 (D) Residue from waxy starch after 69% hydrolysis (●——●)

7. 硫酸による両澱粉粒の分解残存不溶物

両澱粉粒は16%硫酸中に浸漬することにより分解された(Fig. 13). 酵素による分解と同様に, モチ澱粉がウルチ澱粉より速やかに分解した. ウルチ澱粉では19%および70%, モチ澱粉では69%, それぞれ硫酸により分解後, 得られた残存不溶物について検討した.

Fig. 14 は分解残存不溶物のセファローズカラムによるゲル濾過の結果を示す. 両澱粉の

硫酸による分解残存不溶物には、アミロペクチンのピークが認められず、アミロースとほぼ同じ流出位置にのみ単一のピークを認めた。このピーク区分の平均重合度は、分解率19および70%のウルチ澱粉分解残存不溶物、および分解率69%のモチ澱粉分解残存不溶物において、それぞれ約90, 25, 30であった。

Fig. 15は分解残存不溶物の枝切り後のトヨパールカラムによる流出パターンを示す。ウルチ澱粉では分解が進むにつれ、第I、中間、第II区分が減少、消失して第III区分が増加した。モチ澱粉の69%分解残存不溶物ではほとんど全て第III区分であった。ウルチ澱粉の70%分解残存不溶物では第III区分の大きなピークとともに高分子側に肩が見受けられた。両澱粉の分解残存不溶物はいずれもヨウ素複合体吸収スペクトルの λ_{max} は低波長側へずれ、青価が低下し、450nm以下の吸収が増大した (Fig. 8)。

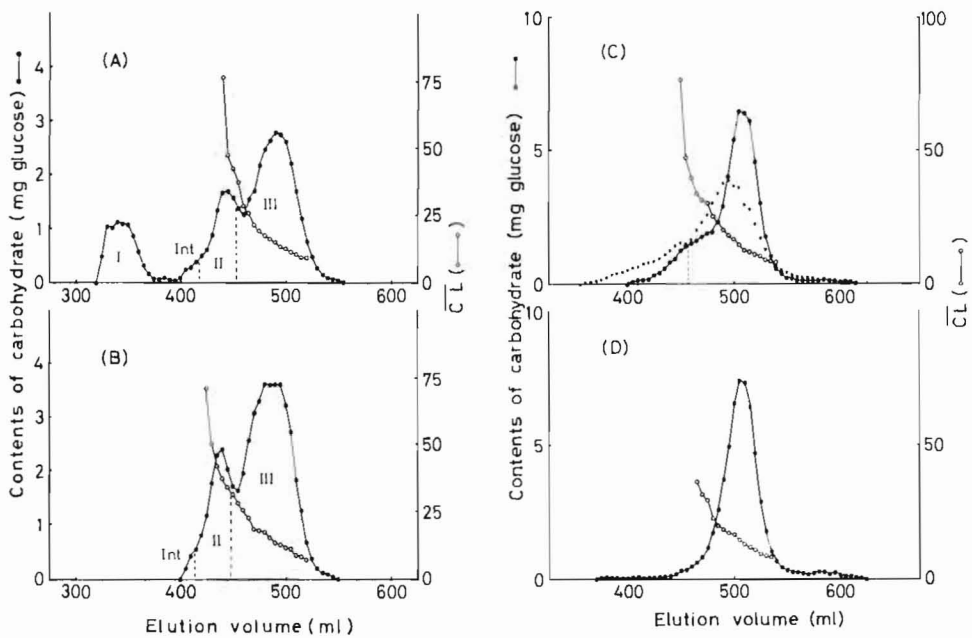


Fig. 15. Elution patterns on columns of Toyopearl HW50SF and HW55SF of isoamylase-debranched endosperm starch from matured seeds and their isoamylase-debranched insoluble residues after hydrolysis by sulfuric acid.

- (A) Normal starch (B) Waxy starch
 (C) Residues from normal starch after 19% hydrolysis (●●●●) and 70% hydrolysis (●—●)
 (D) Residue from waxy starch after 69% hydrolysis (●—●)

考 察

日本型ウルチ性イネ (品種: 台中65号) とその同質遺伝子系統のモチ性の完熟期および乳熟期の胚乳澱粉, およびそれら澱粉から Schoch 法およびチモール法で分離したアミロ

ペクチンの構造について、イソアミラーゼ、プルラーゼ、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼなどの酵素による分解、および分解物のカラムクロマトグラフィーによる解析を通じて検討した結果、モチ澱粉の化学構造はウルチ澱粉の主成分であるアミロペクチンのそれとよく類似していた。しかし、本研究では、ヨウ素複合体吸収スペクトルの λ_{\max} が600~620 nmを示す区分(中間区分)について未検討であり、また、ウルチおよびモチ澱粉、ならびにそれらから調製したアミロペクチンの各 β -リミットデキストリンの構造についても未検討であるので、さらに詳細な検討が必要であると思われる。

ウルチ澱粉から Schoch 法およびチモール法により調製したアミロペクチンおよびアミロースには、枝切り後のトヨパールカラムによる流出パターンから、それぞれアミロースに由来する第 I 区分、およびアミロペクチンに由来する第 II と第 III 区分が含まれていることが認められた。したがって、従来一般に行われた Schoch 法およびチモール法によるアミロースおよびアミロペクチンの分別は不完全であることを示唆した。また、Schoch 法よりもチモール法で調製したアミロペクチンには中間区分が少なかった。これはチモールにより、少し分枝した、いわゆる中間区分が除去されたためであろう (Banks and Greenwood, 1967)。

乳熟期のウルチ胚乳澱粉には、第 I 区分が少なく、第 II、中間、第 III 区分が多かったことは不破らの結果と一致した (Asaoka et al., 1985a)。

α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ処理した澱粉粒の分解残存不溶物の化学構造は互によく類似していた。このことは α -アミラーゼがエンド型に、グルコアミラーゼがエキソ型にそれぞれ可溶性澱粉に作用するが、固体である澱粉粒に対しては α -アミラーゼがグルコアミラーゼに似た作用様式を示すのかも知れない。 α -アミラーゼを澱粉粒に作用後、可溶化成分を検討したところ、ほとんどがグルコースであった結果とも一致している (鈴木ら、未発表)。また、両酵素による澱粉粒の分解残存不溶物にはアミロース区分が多く含まれていたこと、およびモチ澱粉粒がウルチより酵素の作用を受け易かったことは、ウルチ澱粉粒には酵素に対して抵抗性を示す部分が存在し、その部分にアミロースが多く存在しているとも考えられる。

硫酸によりウルチ澱粉粒を分解(分解率19%)した際、分解残存不溶物にはすでにアミロペクチン区分が完全に消失し、鎖長の大きいアミロースも殆んど認められなかったが、 α -アミラーゼやグルコアミラーゼによる分解残存不溶物(分解率約80%)には、なおアミロペクチンおよびアミロース区分が残存していた。この結果は、酵素と硫酸による澱粉粒の分解機構が全く相違していることを示唆した。

摘 要

同質遺伝子系統のイネ(品種:台中65号)のウルチ性およびモチ性の完熟種子の胚乳澱粉を、イソアミラーゼで枝切り後、ゲル濾過して生成物の鎖長分布を検討したところ、アミロペクチン由来の2つのピーク区分の流出パターンおよび比がウルチおよびモチで類似していることを認めた。また、ウルチ、モチ両者の澱粉粒から、Schoch 法およびチモール法により、それぞれ調製したアミロペクチンの鎖長分布には大差がなかった。乳熟期のウルチおよびモチ性胚乳澱粉を枝切り後、ゲル濾過して得たアミロペクチン由来の2つのピ

ーク区分の流出パターンおよび比も類似していた。以上の結果は、モチ胚乳澱粉の化学構造がウルチ澱粉のアミロペクチンの構造とよく類似していることを示唆した。

ウルチおよびモチ澱粉粒に α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよび硫酸を作用後、残存不溶物を枝切りして鎖長分布を調べたところ、両酵素の作用には両澱粉で大差が認められなかったが、酵素と硫酸による澱粉粒の分解機構には大きな相違を認めた。両酵素に対して抵抗性を示す残存不溶物はアミロース含量がウルチ澱粉のそれに較べて大であった。

文 献

1. Adkins, G. K. and Greenwood, C. T. 1966. The isolation of cereal starches in laboratory. *Stärke*, 18 : 213-218.
2. Asaoka, M., Okuno, K., Sugimoto, Y., Kawakami, J. and Fuwa, H. 1984. Effect of environmental temperature during development of rice plants on some properties of endosperm starch. *Stärke*, 36 : 189-193.
3. Asaoka, M., Okuno, K. and Fuwa, H. 1985a. Effect of environmental temperature at the milky stage on amylose content and fine structure of amylopectin of waxy and nonwaxy endosperm starches of rice (*Oryza sativa* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 49 : 373-379.
4. Asaoka, M., Okuno, K., Sugimoto, Y. and Fuwa, H. 1985b. Developmental changes in the structure of endosperm starch of rice (*Oryza sativa* L.). *Agric. Biol. Chem.* 49 : 1973-1978.
5. Banks, W. and Greenwood, C. T. 1967. The fractionation of laboratory-isolated cereal starches using dimethyl sulphoxide. *Stärke*, 19 : 394-398.
6. 福井作蔵, 1969. 還元糖の定量法, 生物化学実験法, A, 一般分析法, 1 : 45-47, 東京大学出版会, 東京.
7. Fuwa, H., Takaya, T. and Sugimoto, Y. 1980. Mechanisms of saccharide polymerization and depolymerization. ed. J. J. Marshall, p. 73-100. Academic Press, New York.
8. Inouchi, N., Glover, D. V., Takaya, T. and Fuwa, H. 1983. Development changes in fine structure of starches of several endosperm mutants of maize. *Stärke*, 35 : 371-376.
9. 桐淵滋雄, 中村道徳, 1975. 走査型電子顕微鏡によるデンプン粒の観察. 蛋白質, 核酸, 酵素, 20 : 126-139.
10. Maeda, I., Kiribuchi, S. and Nakamura, M. 1978. Digestion of barley starch granules by the combined action of α - and β -amylases purified from barley and barley malt. *Agric. Biol. Chem.* 42 : 259-267.
11. Mercier, C. 1973. The fine structure of corn starches of various amylose-percentage : waxy, normal and amylomaize. *Stärke*, 25 : 78-83.
12. 中村道徳, 1974a. 澱粉雜記 (I), 澱粉科学, 21 : 81-108.
13. 中村道徳, 1974b. 澱粉雜記 (II), 澱粉科学, 21 : 230-254.
14. Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153 : 375-380.
15. Schoch, T. J. 1942. Fractionation of starch by selective precipitation with butanol. *J. Am. Chem. Soc.* 64 : 2957-2961.
16. 鈴木幸雄, 中野真之, 内田綱, 1986. 同質遺伝子系統のウルチおよびモチ米澱粉の化学構造について. 農化, 60 : 1102. (日本農芸化学会第346回関西支部大会 (昭和61年10月10日, 鳥取) 講演要旨集 p.19.)

17. 鈴木幸雄, 中野真之, 内田 綱. 未発表.
18. 山本和夫, 沢田澄恵, 小野垣俊雄. 1973. アルカリ法による米澱粉の調製とその性状について. 澱粉科学, 20 : 99-104.
19. Taniguchi, H., Odashima, F., Igarashi, M., Maruyama, Y. and Nakamura, M. 1982. Characterization of a potato starch-digesting bacterium and its production of amylase, Agric. Biol. Chem. 46 : 2107-2115.
20. Taniguchi, H., Chung, M. J., Yoshigi, N. and Maruyama, Y. 1983. Purification of *Bacillus circulans* F-2 amylase and its general properties, Agric. Biol. Chem. 47 : 511-519.
21. Whistler, R. L. and Daniel, J. R. 1984. Starch : chemistry and technology. ed. by Whistler, R. L., Bemiller, J. N. and Paschall, E. F. p. 153-182. Academic Press, New York.

Fine Structure of Starches from Endosperms of Waxy and Non-waxy Near-isogenic Lines of Rice (*Oryza sativa* L.)

Yukio SUZUKI, Masayuki NAKANO and Kei UCHIDA

Summary

Starch granules were isolated from polished matured grains and seeds at milky stages of rice plants (*Oryza sativa* L.), waxy and non-waxy near-isogenic lines of a Japonica rice cultivar, Taichung 65. Two components (amylose and amylopectin) from these starches were prepared by the method of Schoch and by the addition of thymol, after dispersion of these starches. Also, insoluble starch fractions which were resistant against hydrolysis with enzyme and acid were obtained from starch granule-digests with α -amylase, glucoamylase and sulfuric acid. Using enzymatic and chromatographic methods which permit the direct examination of the constitutive chains of the starch materials, the fine structure of the non-waxy starch, its isolated two components and its enzyme- and acid- treated insoluble fractions have been compared with those of waxy starch. The results showed a close similarity between amylopectins from waxy and non-waxy starches.