

## Analyses on Composition, Content and Distribution of Seed Storage Proteins in Rice Grain

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大平, 陽一 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24514/00001777">https://doi.org/10.24514/00001777</a>

# 水稻種子貯蔵タンパク質の組成, 含有率に及ぼす栽培・環境条件の影響ならびに米粒内分布特性に関する研究

大平陽一<sup>1</sup>

**Key words** : 水稻, 種子貯蔵タンパク質, タンパク質変異米, プロテインボディ I, プロテインボディ II, 登熟気温, 窒素施用, 搗精, 免疫蛍光顕微鏡観察

## 目 次

I 緒 論	1	2 窒素施用条件が生育・収量性に及ぼす影響と米粒のPB-I割合および総タンパク質含有率の変動要因	23
1 研究の背景, 既往の成果と課題	1	IV 種子貯蔵タンパク質の米粒内の分布特性	27
2 本研究の目的と構成	4	1 搗精した米粒のSDS-PAGE分析に基づく米粒内の種子貯蔵タンパク質の分布特性	27
II 作期が米粒のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響	5	2 免疫蛍光顕微鏡観察による米粒内における種子貯蔵タンパク質の分布の解析	31
1 登熟温度が米粒のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響	5	V 総合考察	37
2 作期が登熟期の気象条件ならびに米粒のタンパク質組成および総タンパク質含有率に及ぼす影響	11	1 本研究で得られた新規知見に係る考察	37
3 作期が生育・収量性に及ぼす影響と米粒のPB-I割合および総タンパク質含有率の変動要因	16	2 タンパク質含有率およびタンパク質組成の耕種的な制御技術と収穫後調製技術に係る考察	39
III 窒素施用条件が米粒のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響	19	摘 要	41
1 窒素施用条件が米粒のタンパク質組成および総タンパク質含有率に及ぼす影響	19	謝 辞	42
		引用文献	42
		Summary	48

## I 緒 論

### 1 研究の背景, 既往の成果と課題

日本人の主食である米にはタンパク質が含まれ, 古くは米の栄養価を高める観点から, 米粒内の総タンパク質含有率の品種間差異<sup>8, 11)</sup>, 窒素施用や気象条件と米粒の総タンパク質含有率との関係<sup>10, 11, 12, 30, 31, 69, 77)</sup>が研究され, 総タンパク質含有率を高める試みがな

された. 近年になると, 米粒の総タンパク質含有率が高いほど炊飯米の食味は悪化することが知られるようになり<sup>21, 23, 42, 95)</sup>, 良食味米の需要の高まりとともに米粒の総タンパク質含有率を高めない栽培技術が推奨されるようになっている. また, 良食味米の付加価値という点では, (財)日本穀物検定協会が実施・発表する食味ランキングが特定の産地・品種の米価に影響することなどから, 良食味米の生産意義は大きい. 従来, 炊飯米の食味は総タンパク質

含有率との関係で論じられることが多かったが、タンパク質組成の影響に関する知見が報告されるようになった。米の貯蔵タンパク質は主にデンプン性胚乳に蓄積され、デンプン性胚乳に存在するタンパク質顆粒（プロテインボディ）は、プロラミンを主要な構成要素とするプロテインボディタイプ I（PB-I）と、グルテリンやグロブリンを主要な構成要素とするプロテインボディタイプ II（PB-II）に分けられる<sup>59, 81)</sup>。益重ら<sup>41)</sup>は、プロテインボディ全体に対する PB-I の比率が小さい米ほど食味評価が高いことを報告した。また、Furukawa ら<sup>7)</sup>は、米から抽出したタンパク質を加えて白米を炊飯し、物性を調査した結果、グルテリンを加えても炊飯米の堅さや粘りに影響は認められなかったが、プロラミンを加えた場合には堅さが増すとともに粘りが低下したことを報告し、タンパク質組成が食味に影響を及ぼすことが示唆された。

米粒のタンパク質組成は前述した食味への影響のほかに、酒米の酒造適性に対する関与が報告されている<sup>7, 25, 26, 32)</sup>。また、米の新規用途として近年研究が進められている米粉パンの物性に米粒のタンパク質組成が影響することが報告されている<sup>78)</sup>。このほかに、米粒のタンパク質組成を把握することは人体へのタンパク質吸収の面からも重要と考えられる。すなわち、PB-I は年輪構造を示すとともに<sup>59, 81)</sup>、ペプシンによる消化に対して難消化性であり<sup>59, 80)</sup>、人の排泄物中に存在する米由来のタンパク質は年輪構造を示す顆粒であることが電子顕微鏡観察によって明らかにされている<sup>84)</sup> ことから、PB-I は難消化性タンパク質とされているからである。

これらのことから、米粒の総タンパク質含有率およびタンパク質組成に及ぼす栽培・環境条件の影響を明らかにすることは重要と考えられる。これまでに、登熟気温などの気象条件、窒素施肥法が米粒の総タンパク質含有率に及ぼす影響については多くの検討がなされている。一方、米粒のタンパク質組成に及ぼす登熟気温<sup>83, 94)</sup>、窒素施肥法<sup>5, 57, 66, 86, 95)</sup>の影響については知見がわずかであり、圃場栽培条件における気象の影響については知見がごくわずかである<sup>5)</sup>。また、従来の知見の一部にはタンパク質組成の解析手法の問題があり、詳細は後述するが、現在妥当と考えられる手法を用いて解析することが

課題となっている。

米の新規需要の拡大を目的として、新形質米に関する農林水産省プロジェクト研究が1989年からスタートした。そのプロジェクトの中で、米粒のタンパク質組成を遺伝的に改変したタンパク質変異米水稻品種が育成された。一般食用水稻品種の PB-I は、胚乳における総タンパク質含有量のおよそ20%を占めている<sup>59)</sup> が、タンパク質変異米では、総タンパク質に占める PB-I の主構成要素のプロラミンの割合が高くなり、逆に PB-II の主構成要素グルテリンやグロブリンの割合が低下した品種がある。最初に育成されたのは、一般食用水稻品種「ニホンマサリ」<sup>24)</sup> にエチレンイミン処理を施して突然変異を誘導し、選抜された低グルテリン系統に「ニホンマサリ」を戻し交配した低グルテリン米水稻品種「エルジーシー1」である<sup>55)</sup>。米の主要な貯蔵タンパク質の組成には品種間差異があるが<sup>3, 97)</sup>、日本で育成された品種間では変異が小さかった<sup>3)</sup>。そうした中、日本育成品種の遺伝的背景を持ちながらタンパク質組成が異なる品種が育成されたことは画期的であった。次いで、低グルテリン米水稻品種「春陽」<sup>90)</sup>、低グルテリン形質に低アミロース形質を付与した「LGCソフト」<sup>19)</sup>、低グルテリン形質に加えて26kDa グロブリンが欠失した「エルジーシー活」と「エルジーシー潤」も育成されている<sup>56)</sup>。これらタンパク質変異米水稻品種は、主食用、酒造用および米粉用として利用されているが、米粒のタンパク質組成はもとより、収量性や米粒の総タンパク質含有率に及ぼす栽培・環境条件の影響について知見はわずか<sup>57)</sup> である。また、一般食用水稻品種だけでなく、タンパク質変異米水稻品種も合わせて調査・解析することで、米粒のタンパク質組成に及ぼす栽培・環境条件の影響の理解が深まり、食味・品質向上技術に資することが期待される。

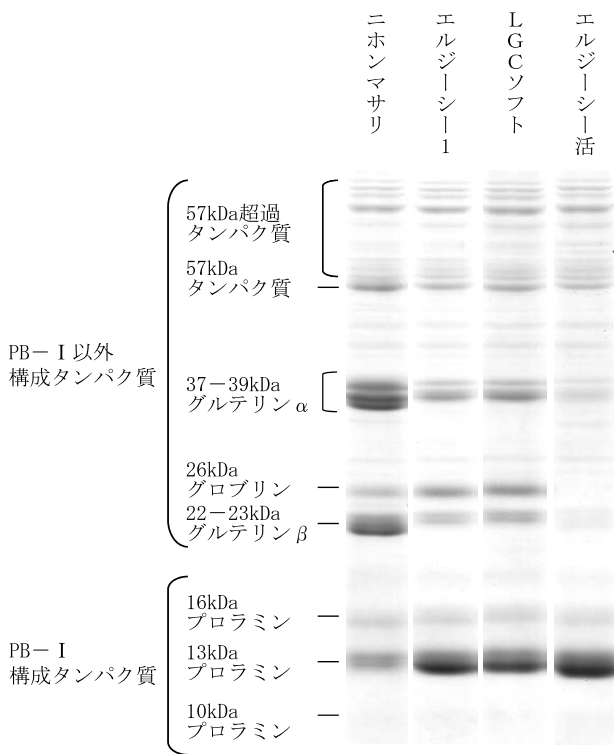
植物の種子貯蔵タンパク質は、古くは純水可溶性、アルコール可溶性、アルカリ可溶性などその溶解性によって分類された<sup>67)</sup>。山下・藤本<sup>95)</sup>は、この溶媒抽出法によって米粒のタンパク質組成に及ぼす窒素施肥条件の影響を検討し、施肥量の増加による米粒の総タンパク質含有率の増加はグルテリンの増加によることを報告している。また、折谷・葎田<sup>66)</sup>も、出穂期の窒素追肥により米粒の総タンパク質に

占めるグルテリンの割合が増加したことを報告している。しかし、溶媒抽出法にはタンパク質の回収率や定量性に難点があり<sup>86)</sup>、解析結果は実態を正確に反映しているとは考えにくい。1987年になると消化酵素ペプシンを用いた改良型の溶媒抽出法が報告され<sup>59)</sup>、建部ら<sup>86)</sup>は、この方法を用いて米粒のタンパク質組成と窒素施用条件および稲体の窒素栄養条件との関係を解析している。この方法においても、一般に日本稲ではプロラミンの割合が20%程度とされている<sup>59)</sup>が、建部ら<sup>86)</sup>は実験の結果プロラミンの割合が5~12%であったことから、プロラミン抽出の安定性に対する検討の必要性を論じている。平野<sup>9)</sup>は、一般食用水稲品種「コシヒカリ」と低グルテリン米水稲品種「エルジーシー1」の白米を供試して、建部ら<sup>86)</sup>と同様のペプシンを用いた溶媒抽出法でタンパク質組成を解析するとともに、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で抽出したタンパク質の電気泳動 (SDS-PAGE) (第1図; ここでは一般食用水稲品種「ニホンマサリ」と3つのタンパク質変異米水稲品種について示す) とデンストメーターを組み合わせた方法でも解析し、測定方法

の比較検討を行っている。その結果、ペプシンを用いた溶媒抽出法では、「コシヒカリ」と「エルジーシー1」のプロラミンの割合は、それぞれ12.3%と15.2%であり、その違いは2.9%にすぎなかった。一方、SDS-PAGEに基づく方法では、「コシヒカリ」のプロラミン (13kDa + 16kDa) の割合が25.6%であったのに対し、「エルジーシー1」では48.8%と大きな違いが認められた。なお、Furukawaら<sup>6)</sup>の蛍光標識抗体を用いた顕微鏡観察の報告から、プロラミンの含有量を低グルテリン米水稲品種と一般食用水稲品種とで比較するとその違いは歴然である。したがって、米粒のタンパク質組成に及ぼす窒素施用条件の影響を溶媒抽出法によって解析した既報<sup>66, 86, 95)</sup>の結果を鵜呑みにすることは妥当でないと考えられる。また、現時点において米粒のタンパク質組成を定量的に明らかにする上で望ましい方法はSDS-PAGEに基づく方法であり、本方法によって米粒のタンパク質組成に及ぼす栽培・環境条件の影響を検討することが課題である。

一般食用水稲品種の種子貯蔵タンパク質は、米粒の外層部に多く分布することが古くから報告されている<sup>30, 48, 49, 54)</sup>。しかし、タンパク質種に分類して米粒内の分布を検討した研究はわずかである。これまでに、静川ら<sup>75)</sup>は、「コシヒカリ」について搗精によって削られた部分の米粉を回収し、SDS-PAGE分析による層別のタンパク質含有量を分析している。同様の方法で、タンパク質変異米水稲品種についても米粒内のタンパク質の分布が明らかになることが期待できる。また、搗精歩合に基づく米粒内のタンパク質の分布の解析は、用途に応じた搗精歩合の判断に有益となり得る。

前述した搗精歩合に基づく米粒内のタンパク質分布の解析では、実際の収穫後の調製方法に資する結果を得ることができる。しかし、学術的な米粒内のタンパク質分布の解析には不向きな点がある。すなわち、玄米は楕円形であるが、搗精にともなって米粒の基部側と頂端側が背側と腹側よりも多く削られて次第に円形に近づくため、玄米の元の形に即したタンパク質の分布は分かり得ない。また、背側と腹側とのタンパク質の分布の差異も解析は不可能である。こうした米粒内のタンパク質分布を解析する手段として、米粒の切片を作成し、蛍光標識抗体を用



第1図 米粒から抽出したタンパク質のSDS-PAGEによる泳動像

いて貯蔵タンパク質の分布を観察する方法があげられる。Furukawaら<sup>6)</sup>は、一般食用水稲品種と酒造好適米水稲品種ならびに低グルテリン米水稲品種・系統の精玄米と70%搗精した白米について、蛍光標識抗体を用いて米粒内のプロラミンとグルテリンの分布を調査している。そして、低グルテリン米水稲品種・系統では、プロラミンが70%搗精した白米の内層部にも多く存在し、タンパク質の分布に品種間差異があることを示唆した。しかし、観察画像は米粒のごく一部であり、全体像を捉えていないことから、玄米の形に即したタンパク質の分布や背側と腹側とのタンパク質の分布の差異については課題として残されたままである。一般食用水稲品種とタンパク質変異米水稲品種について、上記課題を解決し、比較・解析することで、米粒のタンパク質蓄積について新規知見が得られることが期待される。

## 2 本研究の目的と構成

本研究は、一般食用水稲品種および米粒内のタンパク質組成が一般食用水稲品種とは遺伝的に異なるタンパク質変異米水稲品種を用いて、米粒の総タンパク質含有率とタンパク質組成に及ぼす栽培・環境条件の影響を明らかにすること、米粒内のタンパク質分布を明らかにすることを目的とした。本論文の内容は以下の構成とした。

「Ⅱ」において、作期が米粒のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響を明らかにする。登熟期の気象条件は、収量性と米粒の総タンパク質含有率に影響を及ぼすことが報告されているが、米粒のタンパク質組成に及ぼす影響については知見<sup>5)</sup>がわずかである。また、同一の栽培地でも作期が異なると登熟期だけでなく生育期全般の気象条件、稲体の生育、収量性が異なるが、作期が異なる条件でタンパク質変異米水稲品種の米粒の総タンパク質含有率およびその変動要因を検討した事例は見当たらない。そこで、「登熟温度が米粒のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響」では、穂ばらみ期まで同一の条件でポット栽培した稲を自然光型人工気象室内で気温が異なる条件で登熟させ、登熟温度がタンパク質組成とタンパク質含有率に及ぼす影響を検討する。「作期が登熟期の気象条件ならびに米粒のタンパク質組成および総タンパ

ク質含有率に及ぼす影響」では、作期の移動にともなう登熟期の気温および日射量の変化と米粒の総タンパク質含有率およびタンパク質組成との関係を検討する。そして、ポット試験で明らかになった米粒のタンパク質組成と登熟温度との関係を圃場栽培条件で確認する。「作期が生育・収量性に及ぼす影響と米粒のPB-I割合および総タンパク質含有率の変動要因」では、タンパク質組成の変動を把握する指標としてPB-I割合（総タンパク質に占める10～13kDaプロラミンの割合）を用い、生育特性および収量特性と米粒のPB-I割合および総タンパク質含有率との関係を検討する。

「Ⅲ」において、窒素施用条件が米粒のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響を明らかにする。窒素施用条件は、収量性と米粒の総タンパク質含有率に影響を及ぼすことが数多く報告されているが、米粒のタンパク質組成に及ぼす影響についての知見<sup>5, 57, 86, 95)</sup>およびタンパク質変異米水稲品種の米粒の総タンパク質含有率に及ぼす影響についての知見<sup>57)</sup>はわずかである。「窒素施用条件が米粒のタンパク質組成および総タンパク質含有率に及ぼす影響」では、窒素施用量と窒素追肥時期が米粒のタンパク質組成および総タンパク質含有率に及ぼす影響を明らかにする。「窒素施用条件が生育・収量性に及ぼす影響と米粒のPB-I割合および総タンパク質含有率の変動要因」では、窒素施用条件と生育・収量性との関連および米粒のPB-I割合と総タンパク質含有率の変動要因を検討する。

「Ⅳ」において、種子貯蔵タンパク質の米粒内の分布特性を検討する。「搗精した米粒のSDS-PAGE分析に基づく米粒内の種子貯蔵タンパク質の分布特性」において、搗精歩合の異なる米粒のタンパク質組成や各種タンパク質含有量を分析することで、搗精に基づく米粒内の層別のタンパク質分布を明らかにする。「免疫蛍光顕微鏡観察による米粒内における種子貯蔵タンパク質の分布の解析」では、Saitoら<sup>72)</sup>の手法を用いて米粒の全体像を捉えた上で、蛍光標識抗体を用いて23kDaグルテリンと13kDaプロラミンの米粒内の分布を把握する。そして、米粒内のタンパク質の分布を米粒表面からの相対距離と蛍光強度により定量的に明らかにする。また、免疫蛍光顕微鏡観察において示唆された米粒の背側と腹

側とのタンパク質の局在に関する品種間差異を背側あるいは腹側を研削した米粒のSDS-PAGE分析によっても検討する。

「V」の総合考察では、過去の知見と本研究で得られた新規知見を整理し、今後の課題を抽出するとともに、良食味米生産などを見据えた耕種的技術、収穫後調製技術について言及する。

本論文は、タンパク質変異米水稲品種の特性解明と安定生産に関する一連の研究として2003年から2006年にかけて実施した結果に基づき、日本作物学会に発表した論文<sup>60, 61, 62, 63</sup>)と未発表のデータをもとに取りまとめた。

## II 作期が米粒のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響

### 1 登熟温度が米粒のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響

これまでに、人工気象器を用いることで異なる気温を設定すると、一般食用水稲品種の米粒の総タンパク質含有率は登熟温度が高いほど増加すると報告されている<sup>11, 39, 74, 79, 96</sup>)。一方、米粒のタンパク質組成に及ぼす登熟温度の影響に関する報告は限られている。田中ら<sup>83</sup>)は、登熟温度25℃と比較して35℃では、総タンパク質に占める13kDaプロラミンの割合が減少し、逆に60~70kDaのタンパク質画分の割合が増加したと報告している。また、Yamakawaら<sup>94</sup>)は、開花後5日目から20日目まで登熟温度25/20℃と33/28℃処理を行い、33/28℃処理ではグルテリンは影響をほとんど受けなかったのに対して、タンパク質顆粒PB-Iの主構成要素である13kDaプロラミン含量が大きく減少したことを報告している。一方、タンパク質変異米水稲品種に関しては、米粒内の総タンパク質含有率とタンパク質組成に及ぼす登熟温度の影響の知見は無い。近年の日本では、登熟期の高温によって玄米の外観品質および玄米粒重が低下する高温障害が大きな問題となっている<sup>52</sup>)。今後の地球温暖化の進行<sup>22</sup>)も考慮すると、登熟温度が米粒の総タンパク質含有率およびタンパク質組成といった成分品質に及ぼす影響を明らかにすることは重要な課題といえる。また、前述した田中ら<sup>83</sup>)の報告はタンパク質の電気泳動像から定性的に判断

した結果であり、Yamakawaら<sup>94</sup>)の報告ではグルテリンと13kDaプロラミンとの比率について温度処理間の比較に留まっている。

そこで、一般食用水稲品種「ニホンマサリ」<sup>24</sup>)とタンパク質変異米水稲品種「LGCソフト」<sup>19</sup>)を供試して、穂ばらみ期までは同一条件で栽培し、それ以降は異なる登熟温度で栽培することにより、米粒のタンパク質組成と総タンパク質含有率およびPB-I(10~13kDaプロラミンの総計)含有率に及ぼす登熟温度の影響を定量的に明らかにすることを目的とした。また、穂上の着生位置によって、登熟期間の穎果の窒素集積パターン<sup>1</sup>)および米粒の総タンパク質含有率に及ぼす作期や窒素施用といった栽培条件の影響<sup>45</sup>)は異なる。これらのことから、米粒のタンパク質組成と総タンパク質含有率に及ぼす登熟温度の影響は、穂上の着生位置によって異なる可能性がある。そこで、登熟温度の影響をより詳細に明らかにするために、1次枝梗粒と2次枝梗粒に分類して検討した。

### 1) 材料および方法

一般食用水稲品種「ニホンマサリ」<sup>24</sup>)と低グルテリン米水稲品種「LGCソフト」<sup>19</sup>)を用いた。「LGCソフト」は、低グルテリン米水稲品種「エルジーシー1」<sup>55</sup>)と「ニホンマサリ」の低アミロース突然変異系統NM391とを交配して育成された品種である。「LGCソフト」はタンパク質変異米遺伝子として低グルテリン遺伝子*Lgc1*<sup>16, 17</sup>)を持つ。

上記品種の栽培は、近畿中国四国農業研究センター(広島県福山市)で実施した。2005年5月31日に水稲育苗培土(みのる産業)を詰めた育苗箱(14×32穴、みのる産業)に催芽した種子を1穴あたり3粒播種した。播種後は、慣行法に準じて21日間育苗した。水田土壌(細粒質灰色低地土)を詰め、代かきを模して土壌を攪拌しておいた1/2,000 a プラスチックポットに育苗した苗(苗齢4.8~5.0)を1株3本植えて8株、円形に移植した。施肥は、代かき時にN, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>Oをそれぞれポットあたり0.3 g 施用し、追肥として移植後25日目にNをポットあたり0.3 g, 移植後35日目にN, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>Oをそれぞれポットあたり0.2 g 施用した。穂ばらみ期までは屋外で栽培し、分けつは適時除去して主稈の

みを育成した。穂ばらみ期以降は、室温を25℃/23℃:日平均24.0℃(L区), 30℃/26℃:日平均28.0℃(M区), 33℃/29℃:日平均30.6℃(H区)(6:30~17:30/18:30~5:30, 17:30~18:30と5:30~6:30は温度変化時間帯)とした自然光型ファイトトロンで栽培した。各温度処理には1品種あたり3ポットを供試した。出穂後積算気温1,000℃・日の期間の日平均日射量は、L区, M区, H区のそれぞれで15.4±5.3, 15.3±5.8, 15.6±5.9MJm<sup>-2</sup>d<sup>-1</sup>(平均値±標準偏差)であった。出穂後の積算気温が約1,000℃・日に達した時、稲株を地際で刈り取り、風乾した後、1次枝梗粒と2次枝梗粒に分けて脱穀した。脱穀後に粉数を計測し、粉すりして得られた粗玄米を粒厚選別した。粒厚1.8mm以上を精玄米として、玄米千粒重と1穂あたりの精玄米重を測定した。登熟歩合は、1穂あたりの精玄米粒数の1穂粉数に占める割合とした。

各処理区のポット毎の精玄米5~6gを粉碎機(UDY社, サイクロンミル)で粉碎した。そして、SDS-PAGE分析によるタンパク質組成の解析および総タンパク質含有率の測定に供した。

SDS-PAGE分析およびタンパク質組成の解析は以下のように行った。約20mgの米粉末とSDS-Urea溶液(4% SDS, 8M Urea, 5% メルカプトエタノール, 125mM Tris-HCl (pH6.8), 20%グリセリン)700μLを2mL容のチューブ内で十分に混和し、チューブを横にして35℃で1日静置した。その後、チューブを立てて35℃で1日静置した後、上清をポリアクリルアミドゲル電気泳動して各タンパク質画分に分離した。電気泳動後のゲルを0.08%クマシーブリアントブルーR 250溶液中で1日振盪してタンパク質を染色した。上述したSDS-PAGE法は西尾<sup>58)</sup>に準じて行った。次に、1次元電気泳動ゲル解析用ソフトウェア(コスモ・バイオ社, Phoretix 1D Advanced)を用いて、電気泳動後のゲルの画像(第1図)から57kDa超過タンパク質(分子量57kDaを超える複数のタンパク質画分の合計), 57kDaタンパク質(37-39kDaグルテリンαと22-23kDaグルテリンβの前駆体), 37-39kDaグルテリンα, 26kDaグロブリン, 22-23kDaグルテリンβ, 16kDaプロラミン, 13kDaプロラミン, 10kDaプロラミンを定量し、タンパク質組成を解析した。これらのタンパク

質画分の合計値を100%として各タンパク質画分の割合を算出した。本研究では、既報<sup>40, 59, 81)</sup>に準じて、10kDaプロラミン, 13kDaプロラミンおよび16kDaプロラミンの合計をPB-Iとした。

精玄米の総タンパク質含有率は、80℃で3日以上乾燥した米粉末を供して、燃焼法(元素分析装置(エレメンタール社, rapidN III))によって測定した窒素含有率に米のタンパク質換算係数5.95<sup>51)</sup>を乗じて算出した。各タンパク質画分の含有率は、総タンパク質含有率に各タンパク質画分の割合を乗じて算出した。

## 2) 結果

### (1) 収量構成要素と収量に及ぼす登熟温度の影響

精玄米の千粒重(以下千粒重)は、「ニホンマサリ」と「LGCソフト」のいずれにおいても、そして穂上位置にかかわらず登熟温度が高いほど低下した(第1表)。1次枝梗粒と2次枝梗粒を込みにしたすべての粒の千粒重をL区とH区とで比較すると、その差は「ニホンマサリ」で0.6g, 「LGCソフト」で0.8gであった。いずれの品種も、千粒重は1次枝梗粒の方が2次枝梗粒よりも3.6~3.8g重い特徴があった。1次枝梗粒, 2次枝梗粒ともに、千粒重は「ニホンマサリ」が「LGCソフト」よりも2.2~2.6g重かった。

1穂あたりのすべての粒の登熟歩合に対する登熟温度の影響は有意ではなかった(第1表)。しかし、「LGCソフト」の2次枝梗粒では、H区の登熟歩合は、M区とL区の登熟歩合に比較して13~17%低かった。2次枝梗粒の登熟歩合は1次枝梗粒の登熟歩合より低い傾向にあり、登熟温度が高いほどその傾向は顕著であった。また、1次枝梗粒と2次枝梗粒のいずれにおいても、「LGCソフト」の登熟歩合は「ニホンマサリ」よりも低く、H区でその差が顕著であった。

1穂あたりの精玄米重に対する登熟温度の影響は有意ではなかった(第1表)。1穂あたりの精玄米重は、「ニホンマサリ」では1.42~1.44gであったが、「LGCソフト」では1.05~1.19gであり、登熟温度の最も高かったH区で品種間差が大きかった。

### (2) タンパク質組成に及ぼす登熟温度の影響

1次枝梗粒と2次枝梗粒を込みにしたすべての粒

第1表 収量と収量構成要素に及ぼす登熟温度の影響

穂上着生位置	品種	温度処理	1穂籾数	玄米千粒重 (g)	登熟歩合 (%)	精玄米重 (g)	
1次枝梗 (P)	ニホンマサリ	L	45.8 ± 0.5	25.1 ± 0.6	89.0 ± 1.8	1.02 ± 0.04	
		M	45.4 ± 0.8	24.5 ± 0.4	91.6 ± 1.5	1.02 ± 0.02	
		H	46.2 ± 1.5	24.5 ± 0.4	92.0 ± 0.8	1.04 ± 0.04	
	LGCソフト	L	43.6 ± 1.1	22.7 ± 0.2	79.0 ± 4.7	0.78 ± 0.07	
		M	44.5 ± 0.7	22.2 ± 0.3	82.5 ± 1.7	0.81 ± 0.03	
		H	43.9 ± 0.6	21.9 ± 0.3	76.9 ± 2.7	0.74 ± 0.04	
	分散分析		温度 (A)	ns	*	ns	ns
			品種 (B)	ns	**	*	**
			A×B	ns	ns	ns	ns
2次枝梗 (S)	ニホンマサリ	L	21.9 ± 1.2	21.3 ± 0.5	85.7 ± 3.3	0.40 ± 0.01	
		M	22.1 ± 1.3	20.8 ± 0.2	88.7 ± 3.4	0.41 ± 0.04	
		H	22.7 ± 2.7	20.7 ± 0.4	83.6 ± 0.8	0.39 ± 0.05	
	LGCソフト	L	26.9 ± 1.5	19.0 ± 0.1	80.9 ± 3.6	0.41 ± 0.02	
		M	26.3 ± 2.7	18.6 ± 0.2	76.7 ± 1.0	0.37 ± 0.04	
		H	26.3 ± 1.0	18.3 ± 0.2	64.2 ± 3.1	0.31 ± 0.03	
	分散分析		温度 (A)	ns	*	*	ns
			品種 (B)	*	***	***	ns
			A×B	ns	ns	*	ns
分散分析		温度 (A)	ns	*	*	ns	
		着生位置 (C)	***	***	**	***	
		A×C	ns	ns	*	ns	
P+S	ニホンマサリ	L	67.7 ± 1.2	23.9 ± 0.6	88.0 ± 1.7	1.42 ± 0.05	
		M	67.5 ± 1.2	23.3 ± 0.2	90.7 ± 2.0	1.43 ± 0.05	
		H	68.9 ± 1.2	23.3 ± 0.4	89.5 ± 0.4	1.44 ± 0.03	
	LGCソフト	L	70.4 ± 0.8	21.3 ± 0.2	79.6 ± 4.2	1.19 ± 0.08	
		M	70.7 ± 3.3	20.8 ± 0.2	80.6 ± 1.5	1.19 ± 0.06	
		H	70.2 ± 1.2	20.5 ± 0.3	72.7 ± 2.5	1.05 ± 0.06	
	分散分析		温度 (A)	ns	*	ns	ns
			品種 (B)	**	***	**	**
			A×B	ns	ns	ns	ns

数値は平均値 ± 標準偏差を示す。重量は水分15%換算値。\*, \*\*, \*\*\*はそれぞれ5%, 1%, 0.1%水準で有意であることを示し、nsは5%水準で有意でないことを示す。

を対象とすると、「ニホンマサリ」の総タンパク質に占めるPB-I構成タンパク質の合計割合（以下PB-I割合）は18.7～25.7%であった（第2表）。また、PB-I構成タンパク質の中で大きな割合を占めているのは13kDaプロラミンであった。「LGCソフト」も13kDaプロラミンがPB-I構成タンパク質の中で最も大きな割合を占めたが、その割合は27.3～37.6%と「ニホンマサリ」の2.2～2.6倍であり、PB-I割合も「ニホンマサリ」の1.9～2.0倍であった。PB-I構成タンパク質以外のタンパク質は、「ニホンマサリ」では22-23kDaグルテリンβおよび37-39kDaグルテリンαがそれぞれ20.9～22.8%および28.2～31.6%と大きな割合を占め、両タンパク質画分の合計は約5割を占めた。一方、「LGCソフト」では、22-23kDaグルテリンβと37-39kDaグルテリ

ンαの割合の合計は21.8～26.2%であり、「ニホンマサリ」の1/2以下であった。

PB-I構成タンパク質の内、13kDaプロラミンと16kDaプロラミンの総タンパク質に占める割合は、登熟温度が高いほど低く、割合の変動が大きかったのは13kDaプロラミンであった（第2表）。1次枝梗粒と2次枝梗粒を込みにしたすべての粒について、13kDaプロラミンの割合をH区とL区で比較すると、「ニホンマサリ」では6.2%、「LGCソフト」では10.3%の差異があった。また、品種と登熟温度の間には5%水準で有意な交互作用が認められた。PB-I構成タンパク質以外のタンパク質では、「ニホンマサリ」と「LGCソフト」のいずれも、22-23kDaグルテリンβ、37-39kDaグルテリンα、57kDaタンパク質および57kDa超過タンパク質の総タンパク質



第2表 精玄米のタンパク質組成に及ぼす登熟温度の影響

穂上着生位置	品種	温度処理	PB-I 構成タンパク質の割合 (%)				PB-I 構成タンパク質以外のタンパク質の割合 (%)					
			10kDa プロラミン	13kDa プロラミン	16kDa プロラミン	合計	22-23kDa グルテリン $\beta$	26kDa グロブリン	37-39kDa グルテリン $\alpha$	57kDa	>57kDa	
1次枝梗 (P)	ニホンマサリ	L	1.9 ± 0.4	17.5 ± 0.9	7.1 ± 0.6	26.5 ± 0.5	20.8 ± 0.4	6.0 ± 0.2	28.0 ± 0.4	7.9 ± 0.1	10.8 ± 0.8	
		M	1.7 ± 0.3	13.5 ± 0.5	7.0 ± 0.4	22.1 ± 1.1	21.6 ± 0.7	5.4 ± 0.4	29.7 ± 0.3	9.1 ± 0.4	12.0 ± 0.8	
		H	2.1 ± 0.1	11.3 ± 0.6	6.3 ± 0.2	19.7 ± 0.7	22.9 ± 0.1	4.4 ± 0.1	31.4 ± 0.5	9.9 ± 0.5	11.8 ± 0.2	
	LGCソフト	L	2.4 ± 0.3	39.2 ± 0.9	8.8 ± 0.5	50.4 ± 0.3	8.7 ± 0.3	9.9 ± 0.2	12.5 ± 0.3	6.8 ± 0.2	11.6 ± 0.2	
		M	2.2 ± 0.2	34.1 ± 0.8	8.2 ± 0.5	44.6 ± 1.1	8.7 ± 0.1	10.3 ± 0.2	14.2 ± 0.1	8.9 ± 0.5	13.3 ± 0.8	
		H	2.5 ± 0.3	29.1 ± 1.3	7.9 ± 0.4	39.5 ± 1.4	9.3 ± 0.4	10.0 ± 0.2	16.3 ± 0.7	10.4 ± 0.2	14.4 ± 0.4	
	分散分析		温度 (A)	ns	***	*	***	*	*	***	**	**
			品種 (B)	ns	***	**	***	***	***	***	ns	***
			A×B	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	ns
2次枝梗 (S)	ニホンマサリ	L	1.9 ± 0.3	15.6 ± 0.6	6.2 ± 0.2	23.7 ± 0.1	21.0 ± 0.5	5.4 ± 0.2	28.6 ± 0.3	9.9 ± 0.4	11.3 ± 0.7	
		M	1.9 ± 0.4	11.5 ± 0.5	5.6 ± 0.3	19.1 ± 0.9	21.4 ± 0.3	4.6 ± 0.2	30.5 ± 0.3	11.7 ± 0.7	12.7 ± 0.8	
		H	1.9 ± 0.1	9.1 ± 0.4	5.2 ± 0.3	16.2 ± 0.5	22.6 ± 0.3	4.0 ± 0.1	32.2 ± 0.4	12.3 ± 0.2	12.7 ± 0.5	
	LGCソフト	L	1.6 ± 0.3	34.7 ± 1.1	7.3 ± 0.5	43.6 ± 1.7	9.0 ± 0.7	9.7 ± 0.3	13.9 ± 0.1	8.9 ± 0.3	14.9 ± 0.3	
		M	2.1 ± 0.1	30.8 ± 0.8	7.4 ± 0.2	40.4 ± 0.9	8.7 ± 0.2	9.9 ± 0.3	14.6 ± 0.1	11.1 ± 0.4	15.4 ± 0.6	
		H	1.6 ± 0.2	22.9 ± 1.5	6.3 ± 0.3	30.8 ± 2.0	9.7 ± 0.1	10.2 ± 0.6	18.1 ± 0.5	12.8 ± 0.6	18.4 ± 1.9	
	分散分析		温度 (A)	ns	***	*	***	*	ns	**	***	*
			品種 (B)	ns	***	**	***	***	***	***	ns	*
			A×B	ns	*	*	*	ns	*	*	ns	ns
分散分析		温度 (A)	ns	***	*	***	*	*	***	***	**	
		着生位置 (C)	ns	***	*	***	ns	*	**	**	***	
		A×C	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
P+S	ニホンマサリ	L	1.9 ± 0.2	16.9 ± 0.8	6.8 ± 0.4	25.7 ± 0.4	20.9 ± 0.4	5.8 ± 0.2	28.2 ± 0.2	8.5 ± 0.1	10.9 ± 0.7	
		M	1.8 ± 0.1	12.9 ± 0.3	6.5 ± 0.2	21.2 ± 0.5	21.6 ± 0.5	5.2 ± 0.2	29.9 ± 0.2	9.9 ± 0.2	12.2 ± 0.3	
		H	2.0 ± 0.1	10.7 ± 0.5	6.0 ± 0.1	18.7 ± 0.5	22.8 ± 0.1	4.3 ± 0.1	31.6 ± 0.4	10.5 ± 0.3	12.1 ± 0.2	
	LGCソフト	L	2.1 ± 0.3	37.6 ± 0.6	8.3 ± 0.5	48.0 ± 0.8	8.8 ± 0.4	9.9 ± 0.1	13.0 ± 0.6	7.5 ± 0.2	12.8 ± 0.0	
		M	2.2 ± 0.1	33.1 ± 0.8	8.0 ± 0.4	43.2 ± 1.1	8.7 ± 0.1	10.1 ± 0.2	14.3 ± 0.1	9.6 ± 0.5	14.0 ± 0.7	
		H	2.2 ± 0.3	27.3 ± 1.2	7.4 ± 0.2	36.9 ± 1.4	9.4 ± 0.3	10.1 ± 0.1	16.8 ± 0.6	11.1 ± 0.3	15.6 ± 0.7	
	分散分析		温度 (A)	ns	***	*	***	*	*	***	***	**
			品種 (B)	ns	***	**	***	***	***	***	ns	**
			A×B	ns	*	ns	*	ns	*	ns	*	ns

数値は平均値±標準偏差を示す。\*, \*\*, \*\*\*はそれぞれ5%, 1%, 0.1%水準で有意であることを示し、nsは5%水準で有意でないことを示す。

に占める割合は、登熟温度の高い処理ほど高かった。

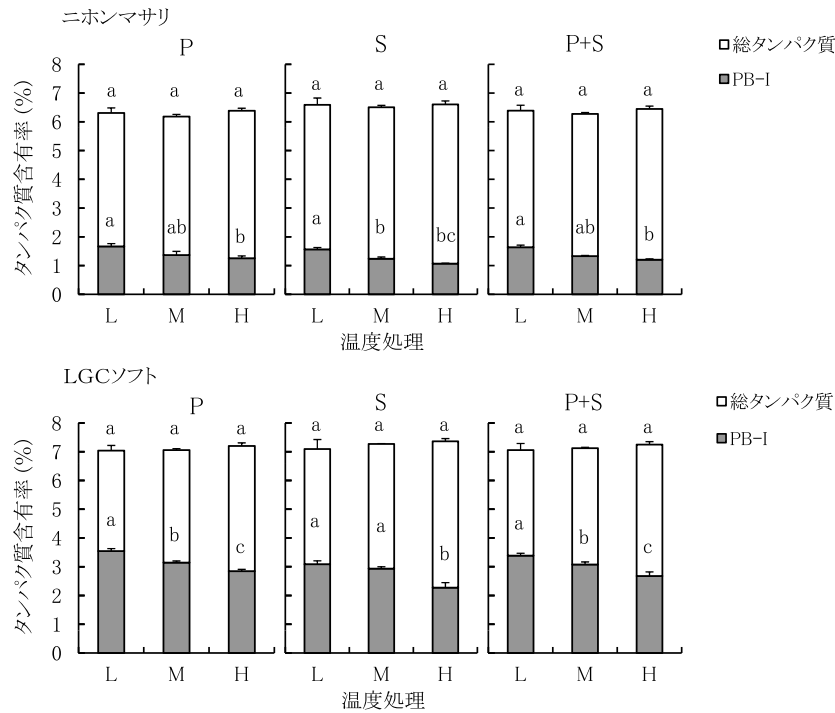
穂上位置によって米粒のタンパク質組成は異なり、「ニホンマサリ」と「LGCソフト」のいずれも、13kDaプロラミン、16kDaプロラミンおよびPB-I割合が1次枝梗粒より2次枝梗粒で低かった(第2表)。一方、37-39kDaグルテリン $\alpha$ 、57kDaタンパク質および57kDa超過タンパク質の割合は1次枝梗粒よりも2次枝梗粒で高かった。タンパク質組成に及ぼす登熟温度の影響は、1次枝梗粒と2次枝梗粒とで概ね類似し、いずれのタンパク質画分においても、着生位置と登熟温度との間に有意な交互作用は認められなかった。

### (3) タンパク質含有率に及ぼす登熟温度の影響

1次枝梗粒と2次枝梗粒を込みにしたすべての粒を対象とすると、総タンパク質含有率は、「ニホンマサリ」では6.3~6.5%、「LGCソフト」では7.1~7.3%であり(第2図)、明瞭な品種間差異(P<

0.01)が認められる一方で、登熟温度の影響は判然としなかった(第2図、第3表)。穂上位置別の米粒の総タンパク質含有率にも、登熟温度による有意差は認められなかった。両品種とも、総タンパク質含有率は1次枝梗粒よりも2次枝梗粒の方が有意に高かった(P<0.01)。

総タンパク質含有率と前項で示したタンパク質組成に基づいて算出したPB-I含有率は、登熟温度が高い処理区ほど低下した(第2図)。1次枝梗粒と2次枝梗粒を込みにしたすべての粒のPB-I含有率についてL区とH区とを比較すると、その差は、「ニホンマサリ」では0.4ポイント、「LGCソフト」では0.7ポイントであった。PB-I含有率には、5%水準で有意な品種と登熟温度との交互作用が認められ(第3表)、登熟温度の高まりにともなうPB-I含有率の低下は「ニホンマサリ」より「LGCソフト」で顕著であった(第2図)。



第2図 精玄米の総タンパク質含有率およびPB-I含有率に及ぼす登熟温度の影響

P；1次枝梗，S；2次枝梗，L；平均24.0℃，M；平均28.0℃，H；平均30.6℃。垂線は標準偏差を示す。同一品種内の異なる英文字間には5%水準で有意差があることを示す（LSD法）。

第3表 精玄米の総タンパク質含有率とPB-I含有率に及ぼす登熟温度の影響の分散分析

穂上着生位置	要因	総タンパク質含有率	PB-I含有率
1次枝梗 (P)	温度 (A)	ns	***
	品種 (B)	**	***
	A×B	ns	*
2次枝梗 (S)	温度 (A)	ns	***
	品種 (B)	**	**
	A×B	ns	*
P+S	温度 (A)	ns	**
	着生位置 (C)	**	**
	A×C	ns	ns
P+S	温度 (A)	ns	***
	品種 (B)	**	**
	A×B	ns	*

\*, \*\*, \*\*\*はそれぞれ5%, 1%, 0.1%水準で有意であることを示し，nsは5%水準で有意でないことを示す。

### 3) 考察

一般食用水稲品種「ニホンマサリ」とタンパク質変異米水稲品種「LGCソフト」のいずれも，米粒の総タンパク質に占める13kDaプロラミンおよびPB-

Iの割合は，登熟温度が高いほど低くなった（第2表）。本研究で得られた13kDaプロラミンに関する結果は，田中ら<sup>83)</sup>が一般食用水稲品種「ユーカーラ」の穂培養実験により，登熟温度25℃と比較して35℃では13kDaプロラミンの割合が小さかったとする報告，およびYamakawaら<sup>94)</sup>が複数の一般食用水稲品種を供試して，登熟温度33/28℃では25/20℃より13kDaプロラミン含量は大きく減少したとする報告と一致した。登熟期の高温条件は，貯蔵タンパク質に関連する遺伝子発現量を低下させ，中でも13kDaプロラミンの遺伝子発現量が顕著に低下する<sup>94)</sup>。このことから，「ニホンマサリ」と「LGCソフト」においても，高い登熟温度条件下では13kDaプロラミンの遺伝子発現量が低下し，13kDaプロラミンおよびPB-Iの生成量が低下したと推測される。

26kDaグロブリンを除くPB-I構成タンパク質以外のタンパク質画分の割合は，登熟温度が高いほど高くなった。登熟期のイネ種子において，遊離アミノ酸含有量は登熟期間を通じて低く<sup>27)</sup>，転流窒素は速やかにタンパク質に合成・貯蔵されると考えられ

ている。一般食用水稻品種の種子中のグルテリン含有量は、開花後5日目から急速に増加し、グロブリン含有量も開花後5日目から徐々に増加する<sup>82)</sup>。一方、プロラミン含有量は開花後5~10日目まではほとんど増加せず、開花後10日目以降になって増加し始め、グルテリンなどと同様に開花後30日目頃に最大となる<sup>82)</sup>。このような登熟期の種子中におけるタンパク質集積量の経時変化は、タンパク質変異米水稻品種「LGCソフト」の交配親であるタンパク質変異米水稻品種「エルジーシー1」でも確認されている(飯田 私信)。これらのことを踏まえると、登熟温度が高いほど13kDaプロラミンおよびPB-Iの生合成が低下し、余剰となった転流窒素が57kDaタンパク質やグルテリンなどのタンパク質画分の生合成に使われたと推測される。そのほかに、登熟温度が米粒の成熟速度を早め、比較的遅い時期に蓄積する13kDaプロラミンの割合が相対的に低くなったことも考えられるが、この点についてはさらなる検討が必要である。

本研究では、登熟温度によるPB-I割合の変動が「ニホンマサリ」よりも「LGCソフト」で大きかった(第2表)。前述したタンパク質組成に及ぼす登熟温度の機作を想定すると、登熟温度が高まった場合に、13kDaプロラミンの割合が「ニホンマサリ」よりも高い「LGCソフト」では、「ニホンマサリ」より顕著に13kDaプロラミンの生合成抑制の影響がタンパク質組成に現れたことが推測される。

「ニホンマサリ」と「LGCソフト」のいずれも、穂上位置によって米粒のタンパク質組成は異なり、1次枝梗粒よりも2次枝梗粒の方が13kDaプロラミンの割合は低く、57kDa超過タンパク質、57kDaタンパク質および37-39kDaグルテリン $\alpha$ の割合は高いことが明らかになった(第2表)。この結果は、(1)タンパク質の種類によって米粒内における経時的な蓄積のパターンが異なることと、(2)1次枝梗粒と2次枝梗粒では登熟期間が異なることに起因すると推察される。すなわち、プロラミンはグルテリンより遅れて蓄積を開始し、徐々に増加することが知られている<sup>82)</sup>。そして、窒素の蓄積は強勢穎果が弱勢穎果に先行し、窒素の蓄積速度は、登熟期間全般を通して強勢穎果より弱勢穎果で低い<sup>1)</sup>。したがって、2次枝梗粒では貯蔵タンパク質の形成が

不十分なうちに乾燥・完熟し、1次枝梗粒と比較して総タンパク質に占める13kDaプロラミンの割合が低くなった可能性がある。また、2次枝梗粒では、グルテリンの前駆体である57kDaタンパク質<sup>73, 93)</sup>の割合が多かったことも、貯蔵タンパク質形成の途中で米粒の乾燥・成熟が完了した可能性を示唆するものである。

1次枝梗粒と2次枝梗粒とでタンパク質組成は異なったが、登熟温度の変化にともなう各タンパク画分の割合の変動は1次枝梗粒と2次枝梗粒とで類似し、米粒の着生位置と登熟温度との間に有意な相互作用は認められなかった。したがって、米粒内のタンパク質の生合成・蓄積に対する登熟温度の影響は、穂上の着生位置にかかわらず等しく受けると考えられた。

米粒の総タンパク質含有率は、登熟温度が高いほど増加したとの報告がある<sup>11, 39, 74, 79, 96)</sup>。それは、米粒におけるタンパク質の蓄積量に対してデンプンの蓄積量が相対的に少なく、千粒重が低下したことによると考えられている<sup>39, 74, 96)</sup>。本研究においても、穂上位置にかかわらず登熟温度が高いほど千粒重は低い傾向が認められた(第1表)。しかし、登熟温度と総タンパク質含有率との間に有意な相関関係は認められなかった。供試6品種系統の中で1品種のみ、明らかに米粒内の総タンパク質含有率が登熟温度の影響を受けなかったとする梁取<sup>96)</sup>の報告を考慮すると、「ニホンマサリ」と「LGCソフト」は、総タンパク質含有率が登熟温度の影響を容易に受けない品種である可能性が考えられる。これまでに、松江ら<sup>47)</sup>も、栽培年次や作期が異なるサンプルの分析の結果、登熟温度と総タンパク質含有率との関係は品種によって有意にならなかったことを報告している。そして、森田<sup>52)</sup>は、松江ら<sup>47)</sup>の結果について、高温による玄米1粒重の低下程度によって総タンパク質含有率の高温反応が変わることをその理由として推察している。これらのことから、米粒の総タンパク質含有率に及ぼす登熟温度の影響の品種間差異とその要因については、一層検討の余地があると考えられた。

## 2 作期が登熟期の気象条件ならびに米粒のタンパク質組成および総タンパク質含有率に及ぼす影響

一般食用水稲品種とタンパク質変異米水稲品種のいずれも、米粒内のPB-I割合は登熟温度が高いほど低くなり、一方で総タンパク質含有率に及ぼす登熟温度の影響は小さかった。本結果は、穂揃い期までを同一条件で栽培して生育を揃え、その後人工気象室において成熟期までの温度条件を複数設け、日々一定としたポット試験に基づくものである。一方、圃場栽培条件下では、気温は日々変化するだけでなく、年次あるいは移植時期の差異によって登熟期の前半と後半の気温が大きく異なる場合がある。また、年次や移植時期によって、出穂期の生育量や窒素栄養状態、登熟期の日射量、収量および収量構成要素が異なり、米粒の総タンパク質含有率とタンパク質組成に影響を及ぼす可能性がある。一般食用水稲品種では、米粒の総タンパク質含有率が出穂期前後の窒素栄養状態の影響を強く受けることが多数報告されている。さらに、米粒の総タンパク質含有率は登熟期の日射量<sup>20, 76)</sup> および登熟歩合<sup>2, 38, 68, 88, 96)</sup>とも関係することが知られている。また、千粒重および稈長と米粒のタンパク質組成との間には関連のあることが示唆されている<sup>86)</sup>。一方、タンパク質変異米水稲品種では、米粒の総タンパク質含有率とタンパク質組成の変動要因について、生育特性、収量構成要素および登熟期の気象条件との関連が不明である。

そこで、「ニホンマサリ」と「LGCソフト」に加え、低グルテリン・26kDaグロブリン欠失米水稲品

種「エルジーシー潤」を供試した。そして、年次と移植時期を複数設けることによって圃場条件下で登熟期の気温が変わる条件を作出し、登熟気温と米粒のタンパク質組成との関係について、ポット試験の結果の確認を試みた。また、登熟期の気象条件と米粒の総タンパク質含有率およびタンパク質組成との関係を明らかにすることを目的とした。

### 1) 材料および方法

一般食用水稲品種「ニホンマサリ」、タンパク質変異米水稲品種「LGCソフト」および「エルジーシー潤」を供試した。「エルジーシー潤」は、「エルジーシー1」に一般食用水稲品種「コシヒカリ」の26kDaグロブリン欠失突然変異系統を交配して育成された低グルテリン・26kDaグロブリン欠失米水稲品種であり<sup>56)</sup>、低グルテリン遺伝子 *Lgc1*<sup>16, 17)</sup> と26kDaグロブリン欠失遺伝子 *glb1*<sup>18)</sup> を共に持つ品種である。

供試品種は、2003年から2006年に近畿中国四国農業研究センターの水田圃場（広島県福山市、北緯34°30′・東経133°23′、標高2m、細粒灰色低地土）で栽培した。水稲用育苗培土（みのる産業）を詰めた育苗箱（14×32穴、みのる産業）に2003年は1穴あたり1粒、2004年～2006年は1穴あたり3粒の催芽した種子を播種し、葉齢3.4～5.0の苗を4月28日～6月29日に手植えした（第4表）。2004年6月11日は「LGCソフト」のみ移植した。2003年は条間30cm株間25cm、1株1本植え、2004年から2006年は条間30cm株間15cm、1株3本植えとした。試験区は11～19m<sup>2</sup>とし、2003年は「LGC

第4表 移植日と「LGCソフト」の出穂期および登熟期における気温と日射量

年次	移植日	出穂期	出穂後0～15日		出穂後16～30日		出穂後0～30日	
			気温 (°C)	日射量 (MJ m <sup>-2</sup> )	気温 (°C)	日射量 (MJ m <sup>-2</sup> )	気温 (°C)	日射量 (MJ m <sup>-2</sup> )
2003	5月13日	8月4日	26.4	15.2	27.8	16.6	27.1	15.9
2004	5月13日	7月28日	27.8	18.1	27.0	15.7	27.4	16.9
		8月13日	26.9	15.1	25.5	13.1	26.2	14.1
2005	4月28日	7月18日	28.3	21.3	28.3	19.5	28.3	20.4
		8月2日	28.4	19.4	26.6	16.6	27.5	18.0
		8月9日	27.4	16.0	26.2	15.6	26.8	15.8
2006	5月16日	8月4日	29.6	20.2	27.6	17.8	28.6	19.0
		8月17日	26.5	16.6	25.9	14.4	26.2	15.5
		8月22日	26.6	16.6	23.2	12.6	24.9	14.6

「エルジーシー潤」と「ニホンマサリ」の出穂期は、「LGCソフト」と2日以内の差であった。

ソフト」と「ニホンマサリ」を3反復の乱塊法で配置し、「エルジーシー潤」は無反復とした。2004年は2反復の乱塊法で配置した。2005年と2006年は移植時期を主区、品種を副区として3反復(2005年)ないし2反復(2006年)の分割ブロック法で配置した。肥料は、いずれの年次・試験区とも基肥としてN, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>Oをそれぞれm<sup>2</sup>あたり4g施用し、追肥は、2003年は出穂前23~25日に、2004年から2006年は出穂前27~32日にNをm<sup>2</sup>あたり4g施用した。2006年6月29日移植は追肥量を2gとした。病虫害防除は慣行の方法にしたがった。

粒厚1.8mm以上の精玄米約25gを粉碎機(UDY社, サイクロンミル)で粉碎し、「II-1」に記載した方法に準じて総タンパク質含有率の測定とSDS-PAGE分析およびタンパク質組成の解析を行った。

圃場の気温と日射量は、近畿中国四国農業研究センターの気象観測データを用いた。

## 2) 結果

### (1) 各年次の気象概況, 出穂期および登熟期の気象条件

2003年は6月下旬から8月中下旬にかけて平年よりも低温寡照に経過した(図表省略)。対照的に、2004年は6月下旬から7月下旬が高温多照の傾向にあった。ただし、2004年8月第1半旬と8月第4~第5半旬は平年より低温寡照であった。2005年は6月の1ヶ月が平年より高温多照であり、7月第1~第2半旬に低温寡照となった後、7月中旬から7月下旬が再び高温多照であった。2005年は8月以降が平年に類似した気象条件であった。2006年は7月第4~第5半旬に低温寡照であったが、7月第6半旬から8月第6半旬まで平年より高温多照であり、その後9月中旬までは平年より低温寡照であった。

移植時期を4月28日から6月29日と広範に設けたことにより、「LGCソフト」の出穂期は7月18日から8月22日となった(第4表)。出穂後0~15日の日平均気温(以下気温)は26.4~29.6℃, 出穂後16~30日の気温は23.2~28.3℃であった。ほとんどの作期で出穂後0~15日の気温は出穂後16~30日の気温よりも高かったが、2005年4月28日移植では両者に差が無く、2003年5月13日移植では出穂後16~30日の気温の方が出穂後0~15日の気温

よりも高かった。出穂後0~30日では、2006年6月29日移植の気温が24.9℃と最も低く、最も高かったのは同年5月16日移植であり、その差は3.7℃であった。また、4カ年設けた5月中旬移植における出穂後0~30日の気温は27.1~28.6℃で、年次間差は1.5℃であったが、出穂後0~15日の登熟期前半の気温には26.4~29.6℃の年次変動があり、年次間差は最大で3.2℃であった。

出穂後0~15日の日平均日射量(以下日射量)は15.1~21.3MJm<sup>-2</sup>, 出穂後16~30日の日射量は12.6~19.5MJm<sup>-2</sup>であった(第4表)。同一年次では、5月中旬移植と比較して6月上旬~下旬移植の方が日射量は低かった。

「エルジーシー潤」と「ニホンマサリ」の出穂期は、「LGCソフト」と2日以内の差であったことから、両品種の登熟期の気温や日射量は「LGCソフト」と同様であった(第4表)。

### (2) 米粒のタンパク質組成, 総タンパク質含有率およびPB-I含有率

精玄米のタンパク質組成を第5表に示した。「LGCソフト」では、「ニホンマサリ」より22~23kDaグルテリンβと37~39kDaグルテリンαの割合が低く、13kDaプロラミンの割合が高いことでPB-I割合も高かった。また、「エルジーシー潤」では、22~23kDaグルテリンβと37~39kDaグルテリンαの割合が「LGCソフト」よりも低いことに加え、26kDaグロブリンが欠失し、13kDaプロラミンおよびPB-I割合が一層高かった。

「エルジーシー潤」の16kDaプロラミンと22~23kDaグルテリンβ、「ニホンマサリ」の10kDaプロラミンと22~23kDaグルテリンβは、その割合に年次および移植時期の差(P<0.05)は認められなかったが、それ以外のタンパク質画分では差が認められた(第5表)。PB-I割合は、「ニホンマサリ」では16.9~21.6%, 「LGCソフト」では37.2~46.1%, 「エルジーシー潤」では56.9~62.8%の変動を示した。

精玄米の総タンパク質含有率は、「ニホンマサリ」が6.6~8.1%, 「LGCソフト」が6.9~8.9%, 「エルジーシー潤」が6.9~8.2%であり、最小値と最大値との差は「ニホンマサリ」と「エルジーシー潤」が1.3~1.5ポイント、「LGCソフト」が2.0ポイントであった(第6表)。移植日を4時期設けた2005年で

第5表 精玄米におけるタンパク質画分の割合

品種	年次	移植日	PB-I 構成タンパク質の割合 (%)				PB-I 構成タンパク質以外のタンパク質の割合 (%)				
			10kDa プロラミン	13kDa プロラミン	16kDa プロラミン	合計	22-23kDa グルテリン $\beta$	26kDa グロブリン	37-39kDa グルテリン $\alpha$	57kDa	>57kDa
ニホンマサリ	2003	5月13日	1.3 a	15.5 a	4.7 bc	21.6 a	21.7 a	6.4 a	32.0 ab	8.6 c	9.8 b
	2004	5月13日	1.3 a	13.5 bc	5.1 ab	19.8 bcd	21.8 a	6.4 ab	31.9 ab	9.2 abc	10.9 ab
	2005	4月28日	1.0 a	11.0 de	4.9 abc	16.9 e	21.6 a	5.5 b	32.7 ab	10.0 a	13.3 a
		5月17日	1.4 a	11.6 de	5.4 a	18.5 cd	21.7 a	6.3 ab	31.0 b	9.8 ab	12.8 a
	2006	6月2日	1.1 a	12.1 cd	5.1 ab	18.3 de	21.9 a	6.3 ab	31.0 b	9.8 a	12.8 a
		6月21日	0.8 a	14.9 ab	4.2 c	19.9 bc	21.4 a	6.2 ab	32.2 ab	8.9 bc	11.4 ab
	2006	5月16日	1.3 a	10.5 e	5.1 ab	16.9 e	21.8 a	6.1 ab	33.5 a	9.9 a	11.8 ab
		6月29日	1.2 a	14.1 ab	5.2 ab	20.5 ab	20.9 a	6.3 ab	31.6 ab	9.2 abc	11.4 ab
LGCソフト	2003	5月13日	0.8 b	38.5 a	5.7 b	45.0 a	8.0 b	11.5 ab	14.5 d	8.0 bcd	13.0 bc
	2004	5月13日	1.0 ab	34.3 bcd	6.2 ab	41.5 abc	8.5 ab	11.6 ab	15.1 bcd	8.4 abc	14.8 abc
		6月11日	1.1 ab	38.7 a	6.3 ab	46.1 a	8.7 ab	12.2 a	14.4 cd	6.7 d	11.9 c
	2005	4月28日	1.2 a	30.0 e	6.1 ab	37.2 c	8.9 ab	10.8 b	16.0 ab	9.7 a	17.4 a
		5月17日	1.0 ab	30.7 de	6.5 ab	38.1 bc	8.9 ab	10.7 b	15.6 b	9.3 a	17.3 a
	2006	6月2日	1.0 ab	31.9 cde	6.1 ab	39.0 bc	8.5 ab	11.1 ab	15.6 bc	9.3 ab	16.6 ab
		6月21日	1.0 ab	36.7 ab	5.8 b	43.4 a	8.4 b	11.5 ab	14.3 d	8.0 cd	14.4 abc
	2006	5月16日	1.1 ab	29.6 e	6.7 ab	37.4 c	9.7 a	12.2 a	16.9 a	8.9 abc	15.0 abc
6月29日		0.8 ab	34.4 bc	7.1 a	42.4 ab	9.2 ab	11.4 ab	15.1 bcd	7.8 cd	14.2 abc	
エルジーシー潤	2003	5月13日	1.7	54.0	7.1	62.8	5.7	—	8.7	7.8	14.9
	2004	5月13日	1.7 ab	52.4 ab	6.9 a	60.9 ab	6.3 a	—	9.0 b	8.4 ab	15.4 ab
	2005	4月28日	1.8 ab	47.9 b	7.1 a	56.9 b	6.8 a	—	9.2 b	8.7 a	18.5 a
		5月17日	1.8 ab	50.7 ab	7.1 a	59.6 ab	6.5 a	—	8.3 b	8.1 ab	17.5 ab
	2006	6月2日	1.9 a	50.1 ab	6.8 a	58.9 ab	6.7 a	—	8.6 b	8.2 ab	17.7 ab
		6月21日	1.7 ab	54.1 a	6.7 a	62.5 a	6.4 a	—	8.7 b	7.1 b	15.4 b
	2006	5月16日	1.8 ab	48.9 b	7.3 a	58.0 b	7.1 a	—	10.3 a	8.3 ab	16.4 ab
		6月29日	1.5 b	51.8 ab	7.2 a	60.5 ab	6.0 a	—	8.6 b	7.7 ab	17.2 ab

同一品種内の異なる英文字間には5%水準で有意差があることを示す (Tukey-Kramer法)。なお、「エルジーシー潤」の2003年のデータは反復がないため、多重検定から除外した。

第6表 精玄米の総タンパク質含有率 (%)・PB-I 含有率 (%) と登熟期間の気温・日射量との相関係数

年次	移植日	ニホンマサリ		LGCソフト		エルジーシー潤	
		TP	PB-I	TP	PB-I	TP	PB-I
2003	5月13日	7.3 b	1.6 a	7.7 cd	3.5 bc	7.6	4.8
2004	5月13日	7.0 c	1.4 b	7.7 cd	3.2 bcd	7.3 bc	4.4 b
	6月11日	—	—	8.9 a	4.1 a	—	—
2005	4月28日	6.6 d	1.1 d	6.9 e	2.6 e	6.9 c	3.9 c
	5月17日	6.9 c	1.3 bc	7.4 cd	2.8 de	7.1 bc	4.2 bc
2006	6月2日	6.9 c	1.3 c	7.3 de	2.8 de	7.3 b	4.3 bc
	6月21日	8.1 a	1.6 a	8.3 b	3.6 b	8.2 a	5.1 a
2006	5月16日	7.4 b	1.3 c	7.8 bc	2.9 de	8.1 a	4.7 ab
	6月29日	6.9 c	1.4 b	7.4 cde	3.1 cd	7.2 bc	4.3 bc
気温との 相関係数	0~30DAH	-0.120	-0.561	-0.319	-0.517	-0.010	-0.258
	0~15DAH	-0.247	-0.751 *	-0.336	-0.625	-0.003	-0.342
	16~30DAH	-0.003	-0.295	-0.235	-0.325	-0.012	-0.132
日射量との 相関係数	0~30DAH	-0.312	-0.740 *	-0.607	-0.768 *	-0.244	-0.516
	0~15DAH	-0.354	-0.769 *	-0.549	-0.743 *	-0.291	-0.568
	16~30DAH	-0.218	-0.589	-0.590	-0.699	-0.168	-0.400

TPとPB-Iは、精玄米の総タンパク質含有率とPB-I含有率を示す。\*は5%水準で有意であることを示す。同一品種内の異なる英文字間には5%水準で有意差があることを示す (Tukey-Kramer法)。なお、「エルジーシー潤」の2003年のデータは反復がないため、多重検定から除外した。DAHは出穂後日数を示す。

は、いずれの品種も移植日が遅いほど総タンパク質含有率が高い傾向にあった。また、移植日を2時期設けた2004年の「LGCソフト」でも、総タンパク質含有率は5月13日移植より6月11日移植の方が高かった。6月29日移植のみ総窒素施用量を減じた2006年では、供試した3品種の総タンパク質含有率は5月16日移植より6月29日移植の方が低かった。いずれの年次にも共通して設けた5月中旬移植では、2005年の総タンパク質含有率が他年次より低い傾向にあった。

精玄米のPB-I含有率は、「ニホンマサリ」が1.1～1.6%、「LGCソフト」が2.6～4.1%、「エルジーシー潤」が3.9～5.1%であった(第6表)。総タンパク質含有率が高い年次や移植時期では、PB-I含有率も高い傾向にあった。しかし、例えば「LGCソフト」では、2003年5月13日移植と2006年5月16日移植とで総タンパク質含有率の差は0.1ポイントしかなかったが、PB-I含有率の差は0.6ポイントであり、PB-I含有率の差に総タンパク質含有率よりもPB-I割合が強く反映した場合が認められた。

### (3) 登熟期の気象条件と米粒のタンパク質組成およびタンパク質含有率との関係

米粒のPB-I構成タンパク質画分の中で、13kDaプロラミンは、いずれの品種も出穂後0～15日の気温と負の相関を示し、出穂後0～30日および出穂後0～15日の日射量とも負の相関関係を示した(第7表)。一方、16kDaプロラミンおよび10kDaプロラミンの割合と登熟期の気温および日射量との間には有意な相関関係が認められなかった。PB-I割合は13kDaプロラミンの影響を反映して気温あるいは日射量との相関関係が類似した。

PB-I構成タンパク質以外のタンパク質画分は、「LGCソフト」では、37-39kDaグルテリン $\alpha$ および22-23kDaグルテリン $\beta$ の割合が出穂後0～15日の気温と正の相関関係( $r = 0.923^{***}$ ,  $0.717^*$ )を示した(第7表)。また、「エルジーシー潤」でも類似した傾向にあった。一方、「ニホンマサリ」では、出穂後0～15日の気温と37-39kDaグルテリン $\alpha$ および22-23kDaグルテリン $\beta$ との相関は認められず、57kDaタンパク質の割合と正の相関関係( $r = 0.787^*$ )を示した。日射量との関係では、PB-I割合は、出穂後0～30日および出穂後0～15日の日射

第7表 精玄米の各タンパク質画分の割合と登熟期間の気温および日射量との相関係数

品種	出穂後 日数 (日)	PB-I構成タンパク質				PB-I構成タンパク質以外のタンパク質				
		10kDa プロラミン	13kDa プロラミン	16kDa プロラミン	合計	22-23kDa グルテリン $\beta$	26kDa グロブリン	37-39kDa グルテリン $\alpha$	57kDa	>57kDa
ニホンマサリ										
気温	0～30	0.279	-0.689	0.132	-0.699	0.774 *	-0.490	0.528	0.536	0.301
	0～15	0.395	-0.912 **	0.507	-0.849 **	0.515	-0.409	0.465	0.787 *	0.502
	16～30	0.132	-0.371	-0.163	-0.429	0.774 *	-0.431	0.448	0.233	0.089
日射量	0～30	0.180	-0.796 *	0.205	-0.813 *	0.449	-0.771 *	0.524	0.711 *	0.544
	0～15	0.135	-0.816 *	0.320	-0.816 *	0.204	-0.753 *	0.497	0.760 *	0.606
	16～30	0.199	-0.646	0.049	-0.679	0.642	-0.666	0.469	0.544	0.389
LGCソフト										
気温	0～30	0.506	-0.609	-0.203	-0.655	0.237	-0.108	0.694 *	0.652	0.485
	0～15	0.539	-0.849 *	0.367	-0.832 **	0.717 *	-0.027	0.923 ***	0.629	0.562
	16～30	0.369	-0.302	-0.559	-0.383	-0.156	-0.141	0.377	0.521	0.321
日射量	0～30	0.457	-0.805 **	0.014	-0.836 **	0.395	-0.394	0.783 *	0.818 **	0.722 *
	0～15	0.535	-0.850 **	0.267	-0.846 **	0.594	-0.342	0.796 *	0.732 *	0.714 *
	16～30	0.322	-0.661	-0.243	-0.722 *	0.145	-0.397	0.673 *	0.804 **	0.642
エルジーシー潤										
気温	0～30	0.612	-0.610	0.326	-0.583	0.656	—	0.624	0.715 *	0.150
	0～15	0.522	-0.792 *	0.442	-0.773 *	0.850 **	—	0.701	0.651	0.379
	16～30	0.522	-0.325	0.161	-0.299	0.350	—	0.410	0.580	-0.052
日射量	0～30	0.510	-0.805 *	0.439	-0.788 *	0.717 *	—	0.545	0.754 *	0.483
	0～15	0.386	-0.825 *	0.382	-0.824 *	0.760 *	—	0.492	0.680	0.579
	16～30	0.558	-0.679	0.434	-0.650	0.581	—	0.522	0.722 *	0.329

\*, \*\*および\*\*\*は、それぞれ5%、1%および0.1%水準で有意であることを示す。

量と負の相関関係 ( $r = -0.846^{**} \sim -0.788^*$ ) を示した。

さらに、登熟期間を5日間ずつに区切ってPB-I割合と気温および日射量との相関関係を検討した。「LGCソフト」と「エルジーシー潤」では、出穂後0～5日および6～10日の気温が、PB-I割合と負の相関関係 ( $r = -0.857^{**} \sim -0.709^*$ ) を示した(第8表)。一方、「ニホンマサリ」では、出穂後6～10日および11～15日の気温がPB-I割合と負の相関関係 ( $r = -0.788^*, -0.756^*$ ) を示した。日射量に関しては、「LGCソフト」では出穂後0～5日と6～10日、「エルジーシー潤」では出穂後0～5日の日射量がPB-I割合と負の相関関係 ( $r = -0.783^* \sim -0.713^*$ ) を示したが、「ニホンマサリ」では出穂後0～5日、6～10日のいずれも5%水準で有意な相関関係が認められなかった。

米粒の総タンパク質含有率は、出穂後0～15日、16～30日、0～30日の期間のいずれの気温とも5%水準で有意な相関関係になく(第6表)、日射量とも同様であった(図表省略)。一方、PB-I含有率は、「ニホンマサリ」で出穂後0～15日の期間の気温と5%水準で有意な相関関係が認められたほか、「ニホンマサリ」と「LGCソフト」において出穂後0～15日、0～30日の期間の日射量と5%水準で有意な相関関係が認められた(第6表)。

### 3) 考察

「II-1」において、米粒のPB-I割合は、登熟期の温度が高いほど低くなることを述べた。これは、登熟温度を人工的に制御して調査した結果に基づくが、異なる年次・移植時期を設定した圃場栽培条件下でも同様の結果が確認された。さらに、本研究か

ら、タンパク質変異米水稲品種では出穂後0～10日の気温がPB-I割合に影響することが示唆された(第8表)。一方、一般食用水稲品種「ニホンマサリ」では、出穂後6～15日の気温がPB-I割合と高い相関を示したことから、貯蔵タンパク質の蓄積過程における品種間差異が示唆された。このような品種間差異を生じた要因を以下に考察する。

「II-1」の考察において、高温条件では13kDaプロラミンの遺伝子発現量が低下<sup>94)</sup>し、13kDaプロラミンおよびPB-Iの生合成が低下した結果、余剰となった転流窒素が57kDaタンパク質やグルテリンなどのタンパク質画分の生合成に使われたことを述べた。したがって、一般食用水稲品種とタンパク質変異米水稲品種とでは13kDaプロラミン遺伝子の発現時期に差があることで気温の影響を受けやすい時期が異なっていたことが仮説としてあげられる。このほかに、PB-I割合が決定されるメカニズムを考える上では、PB-I構成タンパク質以外のタンパク質画分についても考察する必要がある。本研究の結果、「ニホンマサリ」では、37-39kDaグルテリン $\alpha$ および22-23kDaグルテリン $\beta$ の前駆体である57kDaタンパク質<sup>73, 93)</sup>が出穂後0～15日の気温と高い正の相関を示したのに対して、タンパク質変異米水稲品種では、37-39kDaグルテリン $\alpha$ や22-23kDaグルテリン $\beta$ の割合が出穂後0～15日の気温と高い正の相関を示した(第7表)。そして、一般食用水稲品種では、グルテリンは開花後5日目から10日過ぎにかけて急速に米粒内に蓄積されることが知られている<sup>82)</sup>。また、グルテリンの生合成にかかわる遺伝子には、その発現量が登熟気温の影響を受けるものとほとんど受けけないものがあることが報告されている<sup>94)</sup>。さらに、タンパク質変異米水稲品種の低

第8表 気温および日射量と精玄米のPB-I割合との相関係数

品種	出穂後日数(日)						
	-5～0	0～5	6～10	11～15	16～20	21～25	26～30
気温							
ニホンマサリ	-0.140	-0.658	-0.788 *	-0.756 *	-0.408	-0.614	-0.080
LGCソフト	-0.165	-0.838 **	-0.851 **	-0.496	-0.332	-0.525	-0.118
エルジーシー潤	0.036	-0.857 **	-0.709 *	-0.300	-0.347	-0.434	0.019
日射量							
ニホンマサリ	0.028	-0.662	-0.597	-0.233	-0.460	-0.865 **	0.267
LGCソフト	0.190	-0.772 *	-0.783 *	0.153	-0.511	-0.832 **	0.139
エルジーシー潤	-0.131	-0.713 *	-0.663	0.315	-0.710 *	-0.589	0.189

\*と\*\*は、それぞれ5%と1%水準で有意であることを示す。



グルテリン形質は、RNA干渉によってグルテリンの多重遺伝子簇の発現が抑制されたことによる<sup>36)</sup>。これらのことから、登熟初期の気温とグルテリンの遺伝子発現および生合成との関係がタンパク質変異米水稻品種と一般食用水稻品種とで異なり、それがPB-I割合と登熟気温との相関係数が高い時期に関する品種間差に反映したことが推測された。

次に、登熟気温と米粒の総タンパク質含有率との関係について考察する。本研究では、いずれの品種でも登熟気温は米粒の総タンパク質含有率と相関を示さなかった(第6表)。本研究における出穂後0～30日の平均気温は、24.9℃～28.6℃と高く、2006年6月29日移植を除くとすべて26℃以上の高温登熟条件であったことが特徴である(第4表)。一方、米粒の総タンパク質含有率は、登熟気温が高いほど高まるとする報告<sup>11, 39, 74, 79, 96)</sup>では、人工気象室により登熟気温を17℃～29℃や20℃～27.5℃などと広範に設定している。また、登熟気温と米粒の総タンパク質含有率との関係を圃場試験によって調査した報告<sup>28, 33, 34, 65, 89)</sup>を見ると、出穂後30日間あるいは出穂後40日間の平均気温が20～25℃以下となった試験区が多く含まれており、一方では登熟気温が高い試験区では28～30℃あるいは26～27℃であった。したがって、米粒の総タンパク質含有率に及ぼす登熟気温の影響については、登熟気温が25℃以下となる条件を設定してさらに検討する必要がある。ただし、圃場試験で登熟気温と米粒の総タンパク質含有率との関連を論じた既報では、移植時期を遅らせて登熟気温が低い条件で米粒の総タンパク質含有率が高まったとする報告が多い。本研究でも、窒素施用量を同一として移植時期を変えた2004年と2005年の試験では、移植時期を遅らせて登熟気温が低い条件で総タンパク質含有率が高い傾向にあった(第6表)。この結果は、登熟気温が低いことによって総タンパク質含有率が高くなったのか、移植時期を遅らせたことで稲体の窒素栄養状態が高まって総タンパク質含有率が高くなったのかが不明であり、この点については次項で言及する。

日射量とPB-I割合およびPB-I含有率との関係について述べる。本研究で供試した3品種ともに、PB-I割合は出穂後0～30日および出穂後0～15日の日射量と負の相関関係を示した(第7表)。これ

らの期間の日射量は、いずれも気温と密接に関連しており( $r = 0.839^{**} \sim 0.925^{***}$ , 図表省略)、登熟気温の影響を反映した可能性が高いと考えられる。「ニホンマサリ」と「LGCソフト」のPB-I含有率も出穂後0～30日および出穂後0～15日の日射量と負の相関関係を示し(第6表)、PB-I割合を反映したと推察された。今後は、遮光処理なども行って、登熟気温と日射量の影響を明らかにする必要がある。

### 3 作期が生育・収量性に及ぼす影響と米粒のPB-I割合および総タンパク質含有率の変動要因

前項で得られた知見を踏まえ、作期が生育や収量性に及ぼす影響を明らかにするとともに、生育・収量性と米粒の総タンパク質含有率およびPB-I割合との関係を検討する。

#### 1) 材料および方法

供試品種および耕種概要は「II-2」と同じである。

出穂期に1試験区あたり7株の主稈の止葉の葉色を葉緑素計(コニカミノルタ社, SPAD-502)で測定した。「LGCソフト」については、出穂期に1試験区あたり8～10株を抜き取り、その内の中庸な2株を穂、葉身、稈・葉鞘、枯死部に分解した。また、分解時に葉面積を葉面積計(ライカ社, LI-3100)で測定した。分解に供しなかった6～8株の根を切り取った後、分解した部位も含めて80℃で3日以上乾燥し、重量を測定してm<sup>2</sup>あたりの部位毎の乾物重と葉面積(LAI)を算出した。分解した各部位は粉碎機(CMT社, TI-200)で粉碎し、80℃で3日以上乾燥した後、元素分析装置(エレメンタル社, rapidN III)で燃焼法によって窒素含有率を測定した。

成熟期には、1試験区あたり7株の最長稈長を調査した。出穂後の積算気温1,005～1,077℃・日に1試験区あたり2.2～3.2m<sup>2</sup>の稲株を刈り取り、収量と収量構成要素を楠田<sup>37)</sup>に準じて調査した。粒厚1.8mm以上の玄米を精玄米とした。精玄米重と玄米千粒重は水分15%換算値として表示した。

## 2) 結果

### (1) 生育と収量

「LGCソフト」の出穂期の全重は、2006年6月29日移植が730g<sup>m</sup><sup>-2</sup>と最も低く、それ以外では863～1,154g<sup>m</sup><sup>-2</sup>であった(第9表)。また、出穂期のLAIは4.24～6.41であった。止葉の葉色(SPAD値)は、34.3～39.9であり、その差は最大で5.6ポイントであった。「エルジーシー潤」と「ニホンマサリ」の出穂期の葉色はそれぞれ33.0～38.3と33.2～38.0であり(図表省略)、年次あるいは移植時期による数値の高低が「LGCソフト」に類似した。移植時期を4時期設けた2005年では、いずれの品種も4月28日移植と6月21日移植の葉色が5月17日移植と6月2日移植より高かった。追肥の窒素施用量を減じた2006年6月29日移植の葉色は、いずれの品種も2006年5月16日移植より低かった。出穂期の茎葉部窒素含有率は0.95～1.33%、茎葉部窒素含有量は7.62～11.32g<sup>m</sup><sup>-2</sup>であった。2004年では、茎葉部窒素含有率は移植日の遅い方が高かった。また、2005年では、最も遅い6月21日移植の茎葉部窒素含有率が最も高かった。一方、2006年では茎葉部窒素含有率に移植日による差異がなく、茎葉部窒素含有量は移植日の早い方が高かった。稈長は、いずれの品種も2006年6月29日移植が最も低く、最も高かったのは2005年6月2日移植であり、その差は11.4～12.8cmであった(第10表)。

精玄米重は、いずれの品種も2006年6月29日移植が最も低く、486～506g<sup>m</sup><sup>-2</sup>であった(第10表)。

それ以外では、「LGCソフト」が556～617g<sup>m</sup><sup>-2</sup>、「ニホンマサリ」と「エルジーシー潤」が541～667g<sup>m</sup><sup>-2</sup>であった。穂数は、2003年が325～337本<sup>m</sup><sup>-2</sup>といずれの品種でも最も少なく、最も多かったのは2005年4月28日移植あるいは2005年5月17日移植の535～556本<sup>m</sup><sup>-2</sup>であった。総粒数は、穂数の多少とは必ずしも一致せず、2006年6月29日移植が26.9～28.6千粒<sup>m</sup><sup>-2</sup>と最も少なく、2005年6月21日移植が36.5～38.5千粒<sup>m</sup><sup>-2</sup>と最も多かった。登熟歩合は、「ニホンマサリ」が71.0～91.3%、「LGCソフト」が80.8～88.9%、「エルジーシー潤」が68.2～85.9%であり、いずれの品種も総粒数が最も多かった2005年6月21日移植で登熟歩合が最も低かった。千粒重は、「ニホンマサリ」が21.7～23.7g、「LGCソフト」が19.7～21.6g、「エルジーシー潤」が20.2～22.5gであり、その差は最大で1.9～2.3gであった。

### (2) 生育および収量に関する諸形質と米粒の総タンパク質含有率およびPB-I割合との関係

「LGCソフト」の出穂期の茎葉部窒素含有率と同窒素含有量は、精玄米の総タンパク質含有率と正の相関関係( $r = 0.714^*$ ,  $0.767^*$ )を示したが、PB-I割合とは相関が認められなかった(第9表)。また、出穂期の全重、LAIおよび止葉の葉色は、総タンパク質含有率やPB-I割合とも相関関係が認められなかった。「ニホンマサリ」と「エルジーシー潤」でも、止葉の葉色は総タンパク質含有率およびPB-I割合と相関を示さなかった(図表省略)。

収量構成要素では、登熟歩合と総タンパク質含有

第9表 「LGCソフト」の出穂期における生育と窒素栄養状態

年次	移植日	全重 (g m <sup>-2</sup> )	LAI	止葉 葉色	窒素含有率 (%)	窒素含有量 (g m <sup>-2</sup> )
2003	5月13日	939 def	5.03 bc	36.8 bc	1.16 bc	9.39 bcd
2004	5月13日	1154 a	6.06 ab	36.2 bcd	1.03 cd	10.28 abc
	6月11日	1022 bcd	6.17 a	37.1 b	1.31 a	11.32 a
2005	4月28日	920 ef	4.80 bc	37.1 b	1.07 cd	8.42 de
	5月17日	1090 ab	5.53 ab	34.3 d	0.95 d	8.81 cde
	6月2日	1057 bc	5.39 abc	34.4 d	1.00 d	8.91 cde
	6月21日	863 f	5.46 abc	39.9 a	1.33 a	9.54 bcd
2006	5月16日	971 cde	6.41 a	36.6 bc	1.24 ab	10.60 ab
	6月29日	730 g	4.24 c	34.9 cd	1.24 ab	7.62 e
相関係数 TP		0.046	0.554	0.544	0.714 *	0.767 *
PB-I/TP		-0.204	-0.024	0.395	0.587	0.327

窒素含有率と窒素含有量は、茎葉部における含有率と含有量を示す。TPとPB-Iは精玄米の総タンパク質含有率とPB-I含有率を示す。異なる英文字間には5%水準で有意差があることを示す(Tukey-Kramer法)。\*は、5%水準で有意であることを示す。

第10表 稈長, 収量および収量構成要素

品種	年次	移植日	稈長 (cm)	精玄米重 (g m <sup>-2</sup> )	穂数 (本 m <sup>-2</sup> )	総粒数 (千粒 m <sup>-2</sup> )	登熟歩合 (%)	千粒重 (g)
ニホンマサリ								
	2003	5月13日	80.3 b	606 bc	336 d	29.6 cd	86.4 b	23.7 a
	2004	5月13日	81.1 ab	655 ab	466 b	33.4 b	84.7 b	23.1 ab
	2005	4月28日	74.4 c	665 a	536 a	32.7 b	91.3 a	22.3 cd
		5月17日	81.4 ab	667 a	528 a	33.9 b	87.6 ab	22.4 c
	2006	6月2日	85.0 a	636 ab	429 b	32.1 bc	86.3 b	23.0 b
		6月21日	81.3 ab	580 c	489 b	36.5 a	71.0 c	22.4 c
		5月16日	81.3 ab	607 bc	489 b	32.9 b	84.9 b	21.7 d
	6月29日	73.6 c	504 d	378 c	26.9 d	82.8 b	22.6 bc	
相関 係数	TP		0.369	-0.309	-0.058	0.477	-0.856 **	-0.120
	PB-I / TP		-0.043	-0.493	-0.768 *	-0.388	-0.388	0.757 *
LGCソフト								
	2003	5月13日	75.1 ab	583 ab	325 d	30.6 c	88.0 a	21.6 a
	2004	5月13日	75.8 ab	610 ab	502 b	35.2 ab	83.1 ab	20.8 bc
		6月11日	75.6 ab	556 b	539 ab	33.8 b	83.4 ab	19.7 e
	2005	4月28日	68.3 c	603 ab	556 a	34.6 b	86.6 ab	20.1 de
		5月17日	75.8 ab	610 ab	537 a	33.9 b	88.9 a	20.3 cde
		6月2日	77.9 a	604 ab	427 c	32.9 bc	86.9 ab	21.2 ab
	2006	6月21日	72.4 b	617 a	487 b	37.3 a	80.8 b	20.5 cd
		5月16日	76.5 a	573 ab	505 b	34.4 b	83.4 ab	19.9 de
	6月29日	66.2 c	486 c	391 d	27.1 d	88.3 a	20.3 cde	
相関 係数	TP		0.305	-0.093	0.121	0.280	-0.666 *	-0.283
	PB-I / TP		-0.014	-0.299	-0.403	-0.196	-0.249	0.195
エルジーシー潤								
	2003	5月13日	81.4	615	337	31.7	85.9	22.5
	2004	5月13日	79.3 c	620 ab	511 b	37.0 ab	76.1 abc	22.0 a
	2005	4月28日	74.9 d	665 a	535 a	37.2 ab	84.3 a	21.2 cd
		5月17日	79.1 c	650 a	547 a	36.8 ab	83.7 a	21.1 d
		6月2日	86.8 a	608 ab	442 b	35.0 b	80.0 ab	21.7 ab
	2006	6月21日	85.0 ab	562 bc	480 b	38.5 a	68.2 c	21.4 bcd
		5月16日	82.4 bc	541 c	490 b	38.0 ab	70.6 bc	20.2 e
	6月29日	74.0 d	506 c	400 c	28.6 c	81.9 a	21.6 abc	
相関 係数	TP		0.643	-0.533	-0.188	0.316	-0.812 *	-0.254
	PB-I / TP		0.251	-0.242	-0.563	-0.307	-0.117	0.673

TPとPB-Iは、精玄米の総タンパク質含有率とPB-I含有率を示す。同一品種内の異なる英文字間には5%水準で有意差があることを示す (Tukey-Kramer法)。なお、「エルジーシー潤」の2003年のデータは反復がないため、多重検定から除外した。\*と\*\*は、それぞれ5%と1%水準で有意であることを示す。

率との間に負の相関関係 ( $r = -0.856^{**} \sim -0.666^{*}$ ) が3品種で認められた (第10表)。また、「ニホンマサリ」では、穂数および千粒重がPB-I割合と相関関係 ( $r = -0.768^{*}$ ,  $r = 0.757^{*}$ ) を示したが、「LGCソフト」と「エルジーシー潤」では、有意な相関関係は認められなかった。

### 3) 考察

「LGCソフト」の米粒のPB-I割合は、出穂期の生育量、茎葉部窒素含有率および同窒素含有量と有意な相関関係が認められず (第9表)、収量、収量構成要素、稈長などとも同様であった (第10表)。

また、「エルジーシー潤」のPB-I割合も出穂期の葉色、収量および収量構成要素と高い相関関係を示さなかった。これらのことから、タンパク質変異米水稻品種における米粒のPB-I割合は、作期を違えた場合の出穂期における窒素栄養状態、生育、さらには総粒数、千粒重および登熟歩合などとの関連性は低いと推察される。一方、一般食用水稻品種である「ニホンマサリ」では、千粒重がPB-I割合と正の相関関係を示した (第10表)。同様の傾向は「II-1」のポット試験でも認められている。さらに、1次枝梗に由来する精玄米は2次枝梗の精玄米よりも粒重が大きいことが一般的であり、本研究の「II-1」

における「ニホンマサリ」と「LGCソフト」を使った試験でも同様であるが、1次枝梗の精玄米は、2次枝梗の精玄米より13kDaプロラミンの割合が高く、PB-I割合が高かった（第2表）。建部ら<sup>86)</sup>も粒厚の厚い玄米は、薄い玄米よりプロラミンの割合が高かったことを報告している。したがって、本研究の千粒重とPB-I割合との間に認められた正の相関関係は、既報と矛盾しないと考えられる。しかし、本研究では、タンパク質変異米水稲品種でもニホンマサリと同様に千粒重が変動したにもかかわらず、千粒重とPB-I割合との間に明瞭な関係が認められなかった。この点については、設定する条件を拡大するなどしてさらに検討する必要がある。

米粒の総タンパク質含有率は、供試した3品種ともに出穂期の葉色と5%水準で有意な相関関係になかった（第9表、一部図表省略）が、抜き取り調査を行った「LGCソフト」では、総タンパク質含有率は出穂期の茎葉部窒素含有率および茎葉部窒素含有量と正の相関関係にあった（第9表）。出穂期前後の稲体の窒素栄養状態は、米粒の総タンパク質含有率と密接な関係を示すことが数多く報告されており、タンパク質変異米水稲品種の作期が異なる条件においても、米粒の総タンパク質含有率に出穂期の窒素栄養状態が影響していると考えられた。また、窒素施用量が同一の場合、移植時期を遅らせると出穂期の稲体の窒素栄養状態が高まっていた（第9表）。このことから、「II-2」で認められた移植時期が遅いほど米粒の総タンパク質含有率が高まる現象は、登熟期間の気温の差異よりもむしろ、稲体の窒素栄養状態が高まることに起因すると考えられた。

米粒の総タンパク質含有率は、登熟歩合と負の相関関係を示すことが知られているが<sup>2, 38, 68, 88, 96)</sup>、タンパク質変異米水稲品種においても同様の関係が本研究で認められた（第10表）。良食味米および酒造好適米の生産では、米粒の総タンパク質含有率を高めないことが求められることから、登熟歩合にも留意した作付け計画および栽培管理が重要になると考えられた。

### Ⅲ 窒素施用条件が米粒のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響

#### 1 窒素施用条件が米粒のタンパク質組成および総タンパク質含有率に及ぼす影響

施肥窒素は、貯蔵タンパク質の基質となるため、古くは米の栄養価を高める観点から、窒素施用量と米粒の総タンパク質含有率との関係が研究された<sup>10, 12, 30, 31, 69, 77)</sup>。近年になると、米粒の総タンパク質含有率が高いほど炊飯米の食味は悪化することが知られるようになった<sup>21, 23, 42, 95)</sup>。また、良食味米の需要の高まりとともに、稲体窒素吸収量あるいは葉色による栄養診断、土壌診断に基づいて窒素施用量を調節し、総タンパク質含有率を制御する肥培管理技術の研究が数多く行われた。一方、窒素施用条件が米粒のタンパク質組成に及ぼす影響についての報告は一般食用水稲品種でも数が少なく<sup>5, 66, 86, 95)</sup>、タンパク質変異米水稲品種に関する知見はごくわずかである<sup>57)</sup>。

そこで、一般食用水稲品種、低グルテリン米水稲品種および低グルテリン・26kDaグロブリン欠失米水稲品種を供試して、窒素施用量と窒素追肥時期が米粒のタンパク質組成と総タンパク質含有率に及ぼす影響を検討した。

#### 1) 材料および方法

一般食用水稲品種「ニホンマサリ」、タンパク質変異米水稲品種「LGCソフト」（低グルテリン米水稲品種）および「エルジーシー潤」（低グルテリン・26kDaグロブリン欠失米水稲品種）を供試した。

試験は、2003年、2004年および2006年に近畿中国四国農業研究センター内の水田で行った。育苗にはポット育苗用育苗箱（14×32穴、みのる産業）を用い、育苗培土（みのる産業）を詰めた後、催芽した種子を播種した。播種粒数は、2003年は1穴あたり1粒、2004年と2006年は3粒とした。播種後は一般的な方法で育苗し、2003年と2004年は5月13日に、2006年は5月16日に同センター内の水田に手植えした。2003年は条間30cm株間25cm、1株1本植えとし、2004年と2006年は条間30cm株間15cm、1株3本植えとした。試験区は、面積を11～18m<sup>2</sup>

とし、窒素施用処理を主区、品種を副区とする分割区法により3反復(2003年)ないし2反復(2004年と2006年)で配置した。ただし、2003年の「エルジーシー潤」は反復を設けなかった。

つぎに、施肥窒素の条件について以下に示す。2003年は、無窒素区、少肥区および標肥区を設け、総窒素施用量は少肥区が $6\text{ gm}^{-2}$ (基肥 $4\text{ gm}^{-2}$ 、分けつ盛期の追肥 $2\text{ gm}^{-2}$ )とし、標肥区は $10\text{ gm}^{-2}$ (基肥 $4\text{ gm}^{-2}$ 、分けつ盛期 $2\text{ gm}^{-2}$ 、幼穂形成期 $4\text{ gm}^{-2}$ )とした。2004年は、窒素を基肥に $4\text{ gm}^{-2}$ 施用し、分けつ盛期、最高分けつ期、穂首分化期、幼穂形成期のいずれかに $4\text{ gm}^{-2}$ 施用する試験区(総窒素施用量 $8\text{ gm}^{-2}$ )を3品種に設けた。このほかに、「LGCソフト」については、分けつ盛期と幼穂形成期に窒素をそれぞれ $2\text{ gm}^{-2}$ と $4\text{ gm}^{-2}$ 追肥して合計 $10\text{ gm}^{-2}$ とした試験区を設けた。さらに、異なる窒素供給条件を設定するために、速効性肥料で $4\text{ gm}^{-2}$ と肥効調節型被覆尿素(チッソ旭肥料, LP100)  $3\text{ gm}^{-2}$ を基肥として施用し、穂首分化期に窒素を $4\text{ gm}^{-2}$ 施用する試験区(総窒素施用量 $11\text{ gm}^{-2}$ )を設けた。2006年は、基肥として $4\text{ gm}^{-2}$ の窒素を施用し、追肥しない試験区(総窒素施用量 $4\text{ gm}^{-2}$ )を設けた。また、5月中旬移植では基肥のほかに穂首分化期に $4\text{ gm}^{-2}$ の窒素を施用する試験区(総窒素施用量 $8\text{ gm}^{-2}$ )、6月下旬移植では基肥のほかに穂首分化期に $2\text{ gm}^{-2}$ の窒素を施用する試験区(総窒素施用量 $6\text{ gm}^{-2}$ )を設けた。なお、いずれの処理区も $\text{P}_2\text{O}_5$ と $\text{K}_2\text{O}$ は基肥として

$4\text{ gm}^{-2}$ 施用した。

成熟期には各試験区から42株(2003年)、54株(2004年)、48株(2006年)を刈り取り、粒厚 $1.8\text{ mm}$ 以上の玄米を精玄米とした。精玄米約 $25\text{ g}$ を粉碎機(UDY社, サイクロンミル)で粉碎し、「II-1」に準じて総タンパク質含有率の測定とSDS-PAGE分析およびタンパク質組成の解析を行った。

## 2) 結果

### (1) 出穂期と登熟期間の気象条件

出穂期は、「II-2」で記述したように、作期が同一であれば品種間の差異は1~2日であった。また、いずれの品種も、窒素施用条件による出穂期の差異は1日以内であった(図表省略)。したがって、登熟期間の気象条件も、作期が同一であれば品種間および窒素施用処理間に差異はほとんどなかった。

### (2) 米粒のタンパク質組成に及ぼす窒素施用条件の影響

第11表から第14表に各年次の米粒のタンパク質組成を示した。総窒素施用量 $0\text{ gm}^{-2}$ (無窒素区)、 $6\text{ gm}^{-2}$ (少肥区)、 $10\text{ gm}^{-2}$ (標肥区)の3処理を設けた2003年では、PB-I割合が、「ニホンマサリ」では $19.9\sim 21.6\%$ 、「LGCソフト」では $43.1\sim 45.0\%$ 、「エルジーシー潤」では $60.7\sim 62.8\%$ であり、総窒素施用量が最も多かった標肥区のPB-I割合がわずかに高い傾向にあった(第11表)。同様に、総窒素施用量が多い条件でPB-I割合の高い傾向が、2004

第11表 窒素施用条件が精玄米のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響(2003年)

品種	窒素施用処理	タンパク質組成(%)									タンパク質含有率(%)	
		PB-I構成タンパク質				PB-I構成タンパク質以外のタンパク質					総タンパク質	PB-I
		10kDa プロラ ミン	13kDa プロラ ミン	16kDa プロラ ミン	合計	22-23kDa グルテ リンβ	26kDa グロブ リン	37-39kDa グルテ リンα	57kDa	>57kDa		
ニホンマサリ												
	無窒素	0.9 a	14.3 b	4.6 a	19.9 c	22.9 a	5.6 a	31.4 a	10.0 a	10.2 a	5.8 c	1.2 c
	少肥	1.0 a	14.4 b	5.4 a	20.8 b	22.2 a	6.4 a	31.1 a	9.2 ab	10.3 a	6.7 b	1.3 b
	標肥	1.3 a	15.5 a	4.7 a	21.6 a	21.7 a	6.4 a	32.0 a	8.6 b	9.8 a	7.3 a	1.6 a
LGCソフト												
	無窒素	0.5 a	37.9 ab	5.2 a	43.5 a	8.6 a	10.6 a	15.1 a	8.5 a	13.6 a	7.1 b	3.1 b
	少肥	0.5 a	37.0 b	5.6 a	43.1 a	8.5 ab	10.9 a	15.2 a	8.7 a	13.5 a	7.2 b	3.1 b
	標肥	0.8 a	38.5 a	5.7 a	45.0 b	8.0 b	11.5 a	14.5 b	8.0 a	13.0 a	7.7 a	3.5 a
エルジーシー潤												
	無窒素	1.0	53.3	6.5	60.8	5.9	—	9.1	8.8	15.4	6.5	4.0
	少肥	0.7	53.1	6.9	60.7	5.4	—	8.6	9.7	15.5	6.8	4.1
	標肥	1.7	54.0	7.1	62.8	5.7	—	8.7	7.8	14.9	7.6	4.8

「エルジーシー潤」は反復なし。「エルジーシー潤」には $26\text{ kDa}$ グロブリンが存在しないため「-」で示した。同一品種内の異なる英文字間には $5\%$ 水準で有意差があることを示す(LSD法)。

年の「LGCソフト」(第13表), 2006年の5月中旬移植の供試全品種(第14表)で認められた。一方, 2006年の6月下旬移植では, 総窒素施用量が異なる条件でも「ニホンマサリ」と「エルジーシー潤」でPB-I割合に有意な処理間差は認められなかった(第14表)。また, 総窒素施用量を同一として追肥時期を変えた2004年の試験では, いずれの品種も追肥時期によるPB-I割合に差異は認められなかった(第12表)。

PB-I割合に窒素施用処理間の差異が認められる場合において, PB-I構成タンパク質画分の中で有意な差異が認められたのは13kDaプロラミンであった(第11, 14表)。PB-I構成タンパク質以外のタ

ンパク質画分の中で26kDaグロブリンのみは, その割合がPB-I割合が高くなる場合でも変化しない(第11, 13表)か高くなる(第14表)傾向にあった。

PB-I割合と総タンパク質含有率との単相関係数は0.088~0.453 ( $P > 0.05$ )であったが, 出穂後0~15日の気温の影響を取り除き(登熟気温固定), PB-I割合と総タンパク質含有率との偏相関を検討すると, 偏相関係数は0.831\*\*~0.907\*\*\*であり, いずれの品種も高い正の相関関係を示した(第15表)。

(3) 米粒の総タンパク質含有率およびPB-I含有率に及ぼす窒素施用条件の影響

米粒の総タンパク質含有率は, 作期が同一であれば総窒素施用量の多い条件で高まった(第11, 13,

第12表 窒素追肥時期が精玄米のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響 (2004年)

品種	窒素追肥時期	タンパク質組成 (%)									タンパク質含有率 (%)	
		PB-I 構成タンパク質				PB-I 構成タンパク質以外のタンパク質					総タンパク質	PB-I
		10kDa プロラ ミン	13kDa プロラ ミン	16kDa プロラ ミン	合計	22-23kDa グルテ リンβ	26kDa グロブ リン	37-39kDa グルテ リンα	57kDa	>57kDa		
ニホンマサリ												
	分けつ盛期	1.0 a	13.0 a	5.5 a	19.4 a	22.3 a	6.5 a	31.6 a	9.2 a	10.9 a	7.2 b	1.4 b
	最高分けつ期	0.8 a	13.0 a	5.6 a	19.4 a	21.9 a	6.4 a	31.8 a	9.3 a	11.2 a	7.1 b	1.4 b
	穂首分化期	1.3 a	13.5 a	5.1 a	19.8 a	21.8 a	6.4 a	31.9 a	9.2 a	10.9 a	7.0 b	1.4 b
	幼穂形成期	1.2 a	13.9 a	5.3 a	20.4 a	21.9 a	6.3 a	32.3 a	8.8 a	10.2 a	7.8 a	1.6 a
LGCソフト												
	分けつ盛期	0.9 a	33.1 a	6.6 a	40.7 a	9.1 a	11.5 a	15.2 a	8.5 a	15.0 a	7.8 b	3.2 a
	最高分けつ期	0.9 a	34.9 a	6.7 a	42.6 a	9.0 a	11.7 a	14.9 a	8.3 a	13.6 a	7.9 ab	3.4 a
	穂首分化期	1.0 a	34.3 a	6.2 a	41.5 a	8.5 a	11.6 a	15.1 a	8.4 a	14.8 a	7.7 b	3.2 a
	幼穂形成期	0.9 a	33.9 a	6.7 a	41.5 a	8.9 a	12.2 a	15.2 a	8.0 a	14.2 a	8.4 a	3.5 a
エルジーシー潤												
	分けつ盛期	1.3 a	51.3 a	7.3 a	59.9 a	7.0 a	—	9.6 a	8.4 a	15.1 a	7.3 b	4.4 a
	最高分けつ期	1.4 a	51.7 a	7.2 a	60.4 a	6.9 a	—	9.3 a	8.3 a	15.0 a	7.2 b	4.3 a
	穂首分化期	1.7 a	52.4 a	6.9 a	60.9 a	6.3 a	—	9.0 a	8.4 a	15.4 a	7.3 b	4.4 a
	幼穂形成期	1.5 a	51.9 a	7.2 a	60.6 a	6.5 a	—	9.6 a	8.2 a	15.1 a	7.6 a	4.6 a

「エルジーシー潤」は反復なし。「エルジーシー潤」には26kDaグロブリンが存在しないため「-」で示した。同一品種内の異なる英文字間には5%水準で有意差があることを示す(LSD法)。

第13表 窒素施用条件が「LGCソフト」の精玄米のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響 (2004年)

窒素施用処理	タンパク質組成 (%)									タンパク質含有率 (%)	
	PB-I 構成タンパク質				PB-I 構成タンパク質以外のタンパク質					総タンパク質	PB-I
	10kDa プロラ ミン	13kDa プロラ ミン	16kDa プロラ ミン	合計	22-23kDa グルテ リンβ	26kDa グロブ リン	37-39kDa グルテ リンα	57kDa	>57kDa		
基肥(速効性)+追肥1回	1.0 a	34.3 a	6.2 a	41.5 b	8.5 a	11.6 a	15.1 a	8.4 a	14.8 a	7.7 b	3.2 b
基肥(速効性)+追肥2回	0.8 a	37.3 a	6.8 a	44.9 a	8.8 a	12.7 a	14.6 a	7.0 a	12.0 b	9.1 a	4.1 a
基肥(速効性+緩効性)+追肥1回	1.0 a	36.3 a	6.6 a	43.8 ab	8.1 a	12.3 a	14.3 a	8.1 a	13.4 ab	8.9 a	3.9 a

「基肥(速効性)+追肥1回」は第13表の穂首分化期追肥と同一処理で総窒素施用量8 gm<sup>-2</sup>であり, 「基肥(速効性)+追肥2回」は第12表の標肥と同様の窒素施用方法(総窒素施用量10 gm<sup>-2</sup>)である。「基肥(速効性+緩効性)+追肥1回」の総窒素施用量は11 gm<sup>-2</sup>, 追肥時期は穂首分化期である。異なる英文字間には5%水準で有意差があることを示す(LSD法)。

第14表 窒素追肥が精玄米のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響 (2006年)

品種	移植時期	窒素追肥	タンパク質組成 (%)								タンパク質含有率 (%)		
			PB-I 構成タンパク質				PB-I 構成タンパク質以外のタンパク質				総タンパク質	PB-I	
			10kDa プロラ ミン	13kDa プロラ ミン	16kDa プロラ ミン	合計	22-23kDa グルテ リンβ	26kDa グロブ リン	37-39kDa グルテ リンα	57kDa			>57kDa
ニホンマサリ													
	5月中旬	無	1.1 a	9.0 d	4.8 a	14.9 c	21.9 a	5.5 b	33.7 a	10.4 a	13.6 a	6.6 c	1.0 c
		4gN	1.3 a	10.5 c	5.1 a	16.9 b	21.8 a	6.1 a	33.5 a	9.9 ab	11.8 b	7.4 a	1.3 b
	6月下旬	無	1.0 a	13.5 b	5.4 a	19.9 a	20.7 b	6.4 a	31.3 b	9.4 b	12.4 ab	6.4 c	1.3 b
		2gN	1.2 a	14.1 a	5.2 a	20.5 a	20.9 b	6.3 a	31.6 b	9.2 b	11.4 b	6.9 b	1.4 a
LGCソフト													
	5月中旬	無	1.0 a	27.7 d	6.3 a	35.0 d	9.9 a	11.6 b	17.5 a	10.0 a	16.0 a	7.0 c	2.5 c
		4gN	1.1 a	29.6 c	6.7 a	37.4 c	9.7 ab	12.2 a	16.9 a	8.9 b	15.0 a	7.8 a	2.9 b
	6月下旬	無	0.8 a	32.4 b	6.7 a	39.8 b	9.4 b	11.5 b	15.7 b	8.1 bc	15.6 a	7.0 c	2.8 b
		2gN	0.8 a	34.4 a	7.1 a	42.4 a	9.2 c	11.4 b	15.1 b	7.8 c	14.2 a	7.4 b	3.1 a
エルジーシー潤													
	5月中旬	無	2.1 a	43.5 b	6.8 a	52.4 b	7.5 a	—	10.3 a	10.3 a	19.6 a	6.8 c	3.5 b
		4gN	1.8 a	48.9 ab	7.3 a	58.0 a	7.1 a	—	10.3 a	8.3 b	16.4 a	8.1 a	4.7 a
	6月下旬	無	1.2 a	51.7 a	7.3 a	60.2 a	6.0 b	—	8.2 c	8.2 b	17.4 a	6.7 c	4.0 ab
		2gN	1.5 a	51.8 a	7.2 a	60.5 a	6.0 b	—	8.6 b	7.7 b	17.2 a	7.2 b	4.3 ab

「エルジーシー潤」には26kDaグロブリンが存在しないため「-」で示した。同一品種内の異なる英文字間には5%水準で有意差があることを示す (LSD法)。

第15表 精玄米の総タンパク質含有率および登熟気温とPB-I割合との相関係数

品種	単相関係数		偏相関係数	
	総タンパク質含有率	登熟気温	総タンパク質含有率 (登熟気温固定)	登熟気温 (総タンパク質固定)
ニホンマサリ	0.088	-0.879 ***	0.907 ***	-0.979 ***
LGCソフト	0.453	-0.732 **	0.905 ***	-0.945 ***
エルジーシー潤	0.154	-0.779 **	0.831 **	-0.935 ***

登熟気温は出穂後0～15日間の日平均気温を用いた。「LGCソフト」; n = 13, 「エルジーシー潤」と「ニホンマサリ」; n = 11. \*\*, \*\*\*はそれぞれ1%, 0.1%水準で有意であることを示す。

14表)。総窒素施用量を同一として追肥時期を変えた2004年の試験では、いずれの品種も幼穂形成期の追肥が総タンパク質含有率を高めた (第12表)。

PB-I含有率はおおむね総タンパク質含有率と類似した処理間差を示したが、例えば第14表における「エルジーシー潤」の6月下旬移植の追肥処理間差のように、総タンパク質含有率で認められた有意な差がPB-I含有率では認められなくなる場合が散見された (第12, 14表)。

### 3) 考察

一般食用水稲品種に関する多くの知見と同様に、タンパク質変異米水稲品種でも窒素施用量が多い条件および窒素追肥時期が遅い条件で米粒の総タンパク質含有率は高まることが明らかになった。

本研究では、窒素施用量を高めて米粒の総タンパク質含有率が高まる条件でPB-I割合はわずかに高

くなることを示唆する結果が得られた。また、このことは、PB-I構成タンパク質である13kDaプロラミンの割合が高まり、PB-I構成タンパク質以外のタンパク質では、グロブリンを除く各種タンパク質の割合が低くなることによるものと推察された (第11, 13, 14表)。山下・藤本<sup>95)</sup>や折谷・葭田<sup>96)</sup>、建部<sup>86)</sup>は、一般食用水稲品種について、窒素施用量を増すほど、また遅い時期の窒素追肥処理によって米粒の総タンパク質含有率は高くなったが、タンパク質組成に変化は認められない、もしくはグルテリンの割合が高まったことを報告している。西村ら<sup>57)</sup>は、低グルテリン米水稲品種と低グルテリン・26kDaグロブリン欠失系統を供試し、窒素施用量の違いによって総タンパク質含有率は変化するが、タンパク質組成はほとんど影響されないと報告している。これら既報は、本研究で示唆された窒素施用量の増加によって総タンパク質含有率が増加すると

PB-I 割合はわずかに高まる傾向とは異なるものである。以下では、既報と本研究とで矛盾が生じた理由を考察したい。

緒論でも触れたが、山下・藤本<sup>95)</sup>や折谷・葭田<sup>66)</sup>は、溶媒抽出によって貯蔵タンパク質を分画定量し、建部ら<sup>86)</sup>は、Ogawaら<sup>59)</sup>のペプシンを用いた抽出法で貯蔵タンパク質を分画定量した。溶媒抽出法の難点は、抽出効率、特にプロラミン抽出の不安定性にある。平野<sup>9)</sup>は、建部らと同様の方法でタンパク質組成を解析するとともに、著者と同様のSDS-PAGE法に基づく方法でも解析し、測定方法の比較検討を行っている。その結果を見ると測定方法によってタンパク質組成には大きな隔たりがあり、タンパク質の溶媒抽出・分画によるタンパク質組成の解析を行った既報は、実態を正確に反映していない可能性が高いと考えられた。

一方、西村ら<sup>57)</sup>は、本研究と同様にSDS-PAGE法と画像解析による方法でタンパク質組成を解析している。しかし、本研究のように数十g単位の米粒を粉砕したサンプルではなく、1処理区の分析に精玄米10粒を用い、1粒ずつ測定した値の平均値を使って窒素施用条件との関係を検討している。何粒を測定すれば処理区全体を正確に反映する結果が得られるかは不明であるが、本研究の「II-1」において1次枝梗着生粒と2次枝梗着生粒とでタンパク質組成が大きく異なることが明らかになっていることから、10粒の測定では誤差が大きく、窒素施用量あるいは米粒の総タンパク質含有率とタンパク質組成との関係を捉え難くしていた可能性がある。

米粒の総タンパク質含有率の増加にともなう、どのようなメカニズムで13kDaプロラミンの割合が増加したのかは不明であるが、従来の知見から若干考察してみたい。Tanakaら<sup>82)</sup>は、登熟期の米粒中のグルテリンとプロラミンの蓄積開始時期にはタイムラグがあり、プロラミンはグルテリンより5日以上遅れて蓄積することを報告している。また、グルテリン含有量は開花後5日目頃から急速に増加するのに対して、プロラミンは徐々に増加するとしている。そして、窒素施用量が多い場合や窒素追肥時期が遅い場合は、登熟後期まで米粒中に窒素の供給が続くことが推測される。これらのことから、総タンパク質含有率が高まる窒素施用条件および稲体窒素

栄養状態では、グルテリンと比較して遅い時期に蓄積するプロラミンの方がより形成されやすいことが推察された。

## 2 窒素施用条件が生育・収量性に及ぼす影響と米粒のPB-I割合および総タンパク質含有率の変動要因

さまざまな窒素施用条件における生育・収量性を把握し、米粒の総タンパク質含有率とPB-I割合の変動要因を明らかにすることを目的とした。

### 1) 材料および方法

供試品種と栽培概要は「III-1」と同様である。

出穂期の葉色、成熟期の稈長と倒伏程度を「II-3」と同様に調査した。また、「LGCソフト」については、2004年の肥効調節型肥料を用いた処理を除いてすべての処理で出穂期と成熟期に抜取調査を行い、葉面積、部位別の乾物重、窒素含有率の測定および部位別窒素含有量の検討を「II-3」に準じて行った。

収量と収量構成要素の調査は「II-3」に準じて行った。

### 2) 結果

#### (1) 生育と収量

2003年、2004年および2006年の試験を通して、「LGCソフト」の出穂期の全重は607~1,194g<sup>m</sup><sup>-2</sup>、LAIは2.5~7.2であり、同一の作期では、窒素施用量が多いほど高い場合が多かった(第16表)。出穂期の葉色(SPAD値)は31.2~38.7であった。2003年の試験では、出穂期の葉色は標肥区が最も高く、穂肥を施用しなかった少肥区と無窒素区が同程度であった。総窒素施用量を同一として追肥時期の処理を設けた2004年の試験では、出穂期の葉色は、追肥時期を分けず盛期あるいは最高分けつ期とした処理区で最も低く、穂首分化期、幼穂形成期と追肥時期を遅くするにしたがって高くなった。2006年の試験では、無追肥区よりも追肥区(穂首分化期)の方が出穂期の葉色は2.4~4.1ポイント高かった。出穂期の葉色に対する窒素施用条件の影響は、「ニホンマサリ」と「エルジーシー潤」でも類似した(データ省略)。「LGCソフト」の出穂期の茎葉部窒素含有



第16表 窒素施用条件が「LGCソフト」の出穂期の生育と窒素栄養状態に及ぼす影響

年次	窒素施用処理	総窒素施用量 (gN m <sup>-2</sup> )	全重 (g m <sup>-2</sup> )	LAI	止葉 葉色	窒素含有率 (%)	窒素含有量 (g m <sup>-2</sup> )
2003	無窒素	0	607 b	2.5 b	31.2 b	0.78 c	4.2 c
	少肥	6	933 a	4.6 a	32.1 b	0.92 b	7.4 b
	標肥	10	939 a	5.0 a	36.8 a	1.16 a	9.4 a
2004	分けつ盛期追肥	8	1168 a	6.5 ab	33.9 c	1.02 b	10.2 a
	最高分けつ期追肥	8	1193 a	7.2 a	34.3 c	1.09 ab	11.3 a
	穂首分化期追肥	8	1154 a	6.1 b	36.2 b	1.03 b	10.3 a
	幼穂形成期追肥	8	1038 b	5.7 b	38.3 a	1.21 a	11.0 a
	基肥(速効性)+追肥2回	11	1194 a	6.9 a	38.7 a	1.27 a	13.2 a
2006	無追肥 (5月中旬移植)	4	893 a	4.9 b	32.5 c	0.95 b	7.3 b
	4gN追肥 (5月中旬移植)	8	971 a	6.4 a	36.6 a	1.24 a	10.6 a
	無追肥 (6月下旬移植)	4	668 b	3.6 c	32.5 c	0.95 b	5.5 c
	2gN追肥 (6月下旬移植)	6	730 b	4.2 bc	34.9 b	1.24 a	7.6 b
相関 係数	TP		0.714 **	0.723 **	0.888 ***	0.714 **	0.882 ***
	PB-I /TP		0.108	-0.025	0.322	0.137	0.166

窒素含有率と窒素含有量は、茎葉部における含有率と含有量を示す。TPとPB-Iは精玄米の総タンパク質含有率とPB-I含有率を示す。同一年次内の異なる英文字間には5%水準で有意差があることを示す(LSD法)。\*\*、\*\*\*はそれぞれ1%、0.1%水準で有意であることを示す。

率は0.78～1.27%、茎葉部窒素含有量は4.2～13.2g<sup>m</sup><sup>-2</sup>であり、同一の作期では、窒素施用量が多いほど高い場合が多かった(第16表)。稈長は、いずれの年次においても窒素施用量が多いほど長くなったが、2003年と2006年の試験では倒伏は全く生じなかった(第17表)。台風の影響が大きかった2004年の試験では、「LGCソフト」の倒伏程度は総窒素施用量を同一とした場合に追肥時期が早いほど高い傾向にあった。ただし、処理区全体の倒伏程度は0.5～2.0と軽微であった。「ニホンマサリ」と「エルジーシー潤」では、倒伏程度は0.5～1.5であり、追肥時期による差異は認められなかった。

精玄米重は、いずれの品種も2003年の試験における無窒素区が最も低く、362～401g<sup>m</sup><sup>-2</sup>であった(第17表)。それ以外では、「LGCソフト」が401～610g<sup>m</sup><sup>-2</sup>、「ニホンマサリ」と「エルジーシー潤」が448～655g<sup>m</sup><sup>-2</sup>であった。2003年と2006年の試験結果から、総窒素施用量が多いと穂数および総粒数が多くなり、精玄米重も高くなった。追肥時期の影響を検討した2004年の試験では、精玄米重は穂首分化期および幼穂形成期の追肥でやや高い傾向にあった。穂首分化期の追肥によっていずれの品種も総粒数は多くなったが、「LGCソフト」では登熟歩合の低下は認められず、「ニホンマサリ」と「エルジーシー潤」でも登熟歩合は幼穂形成期の追肥と比較して2～4ポイントの低下に留まった。2006年の試験における登熟歩合は、「LGCソフト」では窒素施用

処理間の有意差(P<0.05)が認められなかったが、「ニホンマサリ」では5月中旬移植および6月下旬移植において追肥処理区の方が無追肥区よりも8～9ポイント低く、「エルジーシー潤」では5月中旬移植において追肥処理区の方が無追肥区よりも19ポイント低かった。千粒重は、「ニホンマサリ」が21.7～24.3g、「LGCソフト」が19.9～22.1g、「エルジーシー潤」が20.2～23.3gであった。

#### (2) 生育および収量に関する諸形質と米粒の総タンパク質含有率およびPB-I割合との関係

「LGCソフト」の出穂期における全重、LAI、止葉の葉色、茎葉部窒素含有率および茎葉部窒素含有量は、精玄米の総タンパク質含有率と高い正の相関関係(r=0.714\*\*～0.888\*\*\*)を示したが、PB-I割合とは有意な相関関係を示さなかった(第16表)。「ニホンマサリ」と「エルジーシー潤」でも出穂期の葉色と総タンパク質含有率は正の相関関係(r=0.809\*\*～0.842\*\*\*)を示したが、出穂期の葉色とPB-I割合とは有意な相関関係を示さなかった(図表省略)。

登熟過程における稲体の窒素動態と精玄米の総タンパク質含有率およびPB-I割合との関係を検討するために、「LGCソフト」について、Δ茎葉部窒素含有量(出穂期の茎葉部窒素含有量-成熟期の茎葉部窒素含有量)と登熟期間の稲体窒素吸収量を算出し、総タンパク質含有率およびPB-I割合との相関係数を第18表に示した。Δ茎葉部窒素含有量は精

第17表 窒素施用条件が稈長、倒伏程度、収量および収量構成要素に及ぼす影響

品種	年次	窒素施用処理	稈長 (cm)	倒伏程度 (0無~5甚)	精玄米重 (g m <sup>-2</sup> )	穂数 (本 m <sup>-2</sup> )	総粒数 (千粒 m <sup>-2</sup> )	登熟歩合 (%)	千粒重 (g)
ニホンマサリ									
2003		無窒素	66.0 c	0.0 a	401 b	232 c	18.6 b	91 a	23.7 a
		少肥	76.5 b	0.0 a	577 a	364 a	28.4 a	88 ab	23.0 b
		標肥	80.3 a	0.0 a	606 a	336 b	29.6 a	86 b	23.7 a
2004		分けつ盛期追肥	79.8 a	0.5 a	623 ab	514 a	30.0 b	89 a	23.5 b
		最高分けつ期追肥	80.1 a	1.0 a	596 b	509 a	28.7 b	88 ab	23.6 b
		穂首分化期追肥	81.1 a	1.0 a	655 a	466 ab	33.4 a	85 b	23.1 c
		幼穂形成期追肥	78.1 b	1.0 a	633 ab	427 b	29.9 b	87 ab	24.3 a
2006		無追肥 (5月中旬)	75.1 ab	0.0 a	544 ab	436 b	26.1 b	93 a	22.5 b
		4gN追肥 (5月中旬)	81.3 a	0.0 a	607 a	489 a	32.9 a	85 b	21.7 c
		無追肥 (6月下旬)	68.8 b	0.0 a	448 b	339 c	20.6 c	92 a	23.6 a
		2gN追肥 (6月下旬)	73.6 b	0.0 a	504 ab	378 c	26.9 b	83 b	22.6 b
相関係数TP			0.832 ***	0.489	0.844 **	0.655 *	0.816 **	-0.547	0.027
PB-I /TP			-0.057	0.164	0.002	-0.390	-0.052	-0.366	0.634 *
LGCソフト									
2003		無窒素	62.3 c	0.0 a	362 c	224 c	18.8 b	90 a	21.3 a
		少肥	71.6 b	0.0 a	547 b	358 a	29.5 a	89 a	20.7 b
		標肥	75.1 a	0.0 a	583 a	325 b	30.6 a	88 a	21.6 a
2004		分けつ盛期追肥	72.9 a	2.0 a	544 b	518 a	31.8 b	82 a	20.8 b
		最高分けつ期追肥	74.9 a	1.5 ab	575 ab	543 a	33.0 ab	83 a	21.0 b
		穂首分化期追肥	75.8 a	1.5 ab	610 a	502 ab	35.2 a	83 a	20.8 b
		幼穂形成期追肥	71.5 a	0.5 b	605 ab	441 b	33.8 ab	81 a	22.1 a
2006		無追肥 (5月中旬)	70.4 b	0.0 a	470 b	417 bc	25.9 bc	88 a	20.5 b
		4gN追肥 (5月中旬)	76.5 a	0.0 a	573 a	505 a	34.4 a	83 a	19.9 d
		無追肥 (6月下旬)	62.1 d	0.0 a	401 b	358 c	22.4 c	86 a	20.8 a
		2gN追肥 (6月下旬)	66.2 c	0.0 a	486 ab	391 b	27.1 b	88 a	20.3 c
相関係数TP			0.633 *	0.488	0.789 **	0.574	0.791 **	-0.801 **	0.431
PB-I /TP			-0.058	0.088	0.115	-0.372	-0.022	0.180	0.534
エルジーシー潤									
2003		無窒素	68.4	0.0	385	226	18.8	91	22.5
		少肥	77.3	0.0	545	361	29.1	87	21.6
		標肥	81.4	0.0	615	337	31.7	86	22.5
2004		分けつ盛期追肥	77.7 a	1.5 a	599 ab	532 b	32.9 b	83 a	22.1 b
		最高分けつ期追肥	77.9 a	1.5 a	591 b	577 a	32.1 b	83 a	22.2 b
		穂首分化期追肥	79.3 a	1.5 a	620 ab	511 b	37.0 a	76 b	22.0 b
		幼穂形成期追肥	78.5 a	1.5 a	636 a	430 c	34.2 ab	80 ab	23.3 a
2006		無追肥 (5月中旬)	74.4 b	0.0 a	541 a	453 ab	28.8 b	90 a	20.8 c
		4gN追肥 (5月中旬)	82.4 a	0.0 a	540 a	490 a	38.0 a	71 b	20.2 d
		無追肥 (6月下旬)	69.1 c	0.0 a	464 a	362 b	23.2 c	90 a	22.4 a
		2gN追肥 (6月下旬)	74.0 b	0.0 a	506 a	400 ab	28.6 b	82 a	21.6 b
相関係数TP			0.859 ***	0.278	0.636 *	0.451	0.843 **	-0.858 ***	-0.156
PB-I /TP			0.112	0.210	0.108	-0.252	-0.020	-0.116	0.638 *

2006年の窒素施用処理欄における括弧内は移植時期を示す。TPとPB-Iは、精玄米の総タンパク質含有率とPB-I含有率を示す。同一品種・同一年次内の異なる英文字間には5%水準で有意差があることを示す(LSD法)。\*、\*\*、\*\*\*はそれぞれ5%、1%、0.1%水準で有意であることを示す。

玄米の総タンパク質含有率と高い正の相関関係 ( $r = 0.892^{***}$ ) を示した。一方、登熟期間の稲体窒素吸収量と総タンパク質含有率とは相関係数が負の値を示し、5%水準で有意な相関関係は認められなかった。Δ茎葉部窒素含有量および登熟期間の稲体窒素吸収量はPB-I割合と有意な相関関係を示さなかった。

稈長は、精玄米の総タンパク質含有率と正の相関関係 ( $r = 0.633^* \sim 0.859^{***}$ ) を示したが、PB-I割合とは相関関係を示さなかった(第17表)。いずれの品種も、精玄米重と総粒数は総タンパク質含有率と正の相関関係 ( $r = 0.636^* \sim 0.844^{**}$ ) を示し、「ニホンマサリ」では穂数も総タンパク質含有率と正の

第18表 「LGCソフト」の登熟過程における窒素動態と精玄米の総タンパク質含有率およびPB-I割合との関係

	Δ茎葉部 窒素含有量	登熟期間の稲体 窒素吸収量
TP	0.892 ***	-0.535
PB-I /TP	0.204	0.073

数値は相関係数を示す。Δ茎葉部窒素含有量 = 出穂期の茎葉部窒素含有量 - 成熟期の茎葉部窒素含有量。TPとPB-Iは精玄米の総タンパク質含有率とPB-I含有率を示す。n = 12。\*\*\*は0.1%水準で有意であることを示す。

相関関係 ( $r = 0.655^*$ ) を示した(第17表)。「LGCソフト」と「エルジーシー潤」では、登熟歩合が総タンパク質含有率と負の相関関係 ( $r = -0.858^{***} \sim$

-0.801\*\*) を示した。収量および収量構成要素の中でPB-I割合と相関関係を示したのは千粒重であり、「エルジーシー潤」と「ニホンマサリ」で正の相関関係 ( $r = 0.634^* \sim 0.638^*$ ) が認められた。

### 3) 考察

本研究では、出穂期の全重や成熟期の稈長など生育に関する形質と米粒のPB-I割合との間に相関関係は認められなかった。このことから、窒素施用条件が異なることで生育が大きく変わっても、米粒のタンパク質組成に直接影響することはないと考えられた。収量および収量構成要素の中では、「ニホンマサリ」と「エルジーシー潤」の玄米千粒重がPB-I割合と正の相関関係 ( $P < 0.05$ ) を示し、「II-3」の「ニホンマサリ」の作期が異なる場合と同様の結果が得られた。また、「LGCソフト」では、相関係数が5%水準で有意ではなかったが、上記2品種と同様に相関係数は正の値 ( $P < 0.1$ ) であった。このことから、栽培方法による千粒重の変化が米粒のPB-I割合の変化に関与することが推察された。

米粒の総タンパク質含有率は、「ニホンマサリ」のみならずタンパク質変異米水稻品種においても出穂期の葉色、茎葉部窒素含有率および同窒素含有量と高い正の相関関係にあった (第16表)。一般食用水稻品種では、米粒内の総タンパク質含有率が高いほど炊飯米の食味が低下することが知られ<sup>21, 23, 42, 95)</sup>、良食味米生産の観点から、米粒内の総タンパク質含有率の変動に関与する要因については多数の検討がなされてきた。中でも、出穂前後および登熟初期における葉身・茎葉の窒素含有率、稲体窒素吸収量、葉色などの窒素栄養状態を示す測定値と米粒内の総タンパク質含有率とは密接な関係にあることを示す報告が数多い。本研究結果から、タンパク質変異米水稻品種においても、米粒の総タンパク質含有率は稲体の窒素栄養状態の影響を強く受けることが示された。さらに本研究では、出穂期の茎葉部窒素含有量から成熟期の茎葉部窒素含有量を差し引いた値が総タンパク質含有率と高い正の相関関係を示す一方、登熟期間の稲体窒素吸収量と総タンパク質含有率は有意な相関関係を示さなかった (第18表)。このことから、登熟期間に土壌から吸収する窒素量よりも、出穂期までに茎葉部に蓄積されて、その後、

米粒に転流する窒素量が米粒の総タンパク質含有率を決定する上で重要であると考えられた。

本研究では、米粒の総タンパク質含有率が総籾数および精玄米重と正の相関関係にあった (第17表) が、これは窒素施用量を高めて総籾数および精玄米重が高まる条件で総タンパク質含有率も高まったためと考えられた。作期の影響を検討した結果と同様に、「LGCソフト」と「エルジーシー潤」では総タンパク質含有率が登熟歩合と負の相関関係にあった (第17表) ことから、総タンパク質含有率の決定に、登熟歩合は重要な形質と考えられた。

総窒素施用量を同一として追肥時期の影響を検討した試験では、穂首分化期の窒素追肥で総籾数が多くなり、収量はほかの追肥時期と比較して同等もしくはそれ以上であった (第17表)。また、「III-1」で述べたように、穂首分化期の窒素追肥は幼穂形成期の追肥と比較して米粒の総タンパク質含有率が低かった (第12表)。これまでに、穂首分化期の窒素追肥は上位葉を著しく伸長ならびに下垂させ、登熟期間の受光体勢が悪化することで登熟歩合の低下および収量の低下を引き起こすとされてきた<sup>50)</sup>。しかし、本研究で供試した「ニホンマサリ」、「LGCソフト」および「エルジーシー潤」では、観察の結果、受光体勢の悪化は認められなかった。また、従来、穂首分化期の窒素追肥は下位節間の伸長を促して倒伏しやすい草姿を形成するとされている<sup>50)</sup>。登熟期間に倒伏が生じた場合には、その時期にもよるが、登熟歩合ひいては収量の低下を生じるとともに、米粒の総タンパク質含有率の増大を生じる場合がある<sup>42)</sup>。本研究では、台風の影響を強く受けた2004年に追肥時期の試験を行っているが、倒伏程度は最も高い処理区でも2.0に留まった (第17表)。本研究では下位節間長の調査は行っていないが、穂首分化期の追肥処理が必ずしも他の追肥時期より稈長の著しい伸長を引き起こしていなかった (第17表)。「ニホンマサリ」、「LGCソフト」および「エルジーシー潤」は、短稈で耐倒伏性に優れる<sup>19, 24, 56)</sup> ことを考え合わせると、これらの品種は穂首分化期の窒素追肥を行っても耐倒伏性および登熟歩合の大幅な低下を生じる可能性は低いと考えられた。また、穂首分化期の窒素追肥は収量を高めつつ、総タンパク質含有率を抑制する効果があると考えられた。

#### IV 種子貯蔵タンパク質の米粒内の分布特性

##### 1 搗精した米粒のSDS-PAGE分析に基づく米粒内の種子貯蔵タンパク質の分布特性

日本人は、精玄米の外層10%程度を搗精した白米を炊飯して主に食している。この搗精の意味合いは、食したときに渋み・えぐみをもたらす糠層など米粒の外層部分を取り除くことにある。酒造においては、さらに高度に搗精した白米を利用する。このほかに、腎疾患患者の病態食には酒造用と同様に高度搗精した白米を用いることがある。米粒内のタンパク質の分布を明らかにすることは、学術面のみならず米のさまざまな利用場面において有用となる。一般食用水稲品種では、米粒のタンパク質は糠層にも存在し<sup>4, 30, 35, 48, 49, 54</sup>、胚乳では外層部に多く含まれる<sup>72, 75, 82</sup>ことが知られている。しかし、各種貯蔵タンパク質に分類して米粒内の分布を調査した研究は少なく<sup>72, 75</sup>、タンパク質変異米水稲品種に関してはわずかである<sup>6</sup>。そこで、精米機を用いて玄米を高度に搗精し、搗精歩合の異なる米粒のSDS-PAGE分析に基づいて、一般食用水稲品種およびタンパク質変異米水稲品種の米粒内におけるタンパク質の分布特性を定量的に検討することを目的とした。

##### 1) 材料および方法

###### (1) 供試品種と栽培概要および精玄米の調製

一般食用水稲品種「ニホンマサリ」、タンパク質変異米水稲品種「エルジーシー1」、[LGCソフト]および「エルジーシー活」を供試した。「エルジーシー活」は、「エルジーシー潤」と同様に、「エルジーシー1」に「コシヒカリ」の26kDaグロブリン欠失突然変異系統を交配して育成された低グルテリン・26kDaグロブリン欠失米水稲品種である<sup>56</sup>。

2003年4月18日に水稲用育苗培土（みのる産業）を詰めた育苗箱（14×32穴、みのる産業）に催芽種子を1穴あたり1粒播種した。播種後は慣行法に準じて25日間育苗した。5月13日に苗（苗齢4.6～4.9）を近畿中国四国農業研究センター内の水田に条間30cm株間25cm、1株1本で手植えた。各品種の栽培面積は12m<sup>2</sup>とし、3反復の乱塊法で配置し

た。肥料は、基肥としてN、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、K<sub>2</sub>Oをそれぞれm<sup>2</sup>あたり4g施用し、移植後27日目には追肥としてNをm<sup>2</sup>あたり2g施用した。このほかに、「エルジーシー活」では移植後60日目に、「エルジーシー活」を除く品種では移植後63日目にNをm<sup>2</sup>あたり4g施用した。成熟期に稲株を地際で刈り取り、風乾後脱穀・籾すりして粒厚1.8mm以上の玄米を精玄米とした。

###### (2) 精玄米の搗精と米粒の粉碎

調製した精玄米は、精米機（山本製作所、RICEPAL31）で90%に搗精し、さらに研削型の精米機（サタケ、Grain Testing Mill TM-05）で80%、70%、60%および50%に搗精した。これら搗精した白米と精玄米のそれぞれ約25gを、粉碎機（UDY社、サイクロンミル）で粉碎した。

###### (3) 米粒内タンパク質のSDS-PAGE分析、総タンパク質含有率の測定および層別タンパク質の割合の算出

SDS-PAGE分析およびタンパク質組成の解析ならびに精玄米と搗精した白米の総タンパク質含有率の測定は「II-1」に準じた。精玄米および白米1粒あたりのタンパク質含有量は、1粒あたりの乾物重にタンパク質含有率を乗じて算出した。

各タンパク質画分の米粒内における層別の含有量と各画分の存在割合は、以下によって算出した。精玄米（搗精歩合100%）と搗精歩合90%の米粒内のタンパク質含有量の差を100～>90%層のタンパク質含有量とした。次に、100～>90%層のタンパク質含有量を精玄米のタンパク質含有量で除して100～>90%層におけるタンパク質の存在割合を算出した。同様に搗精歩合の異なる米粒内の各タンパク質含有量の差を算出し、精玄米のタンパク質含有量で除して、90～>80%層、80～>70%層、70～>60%層、60～>50%層、50～>0%層における各タンパク質の存在割合を算出した。

## 2) 結果

### (1) 米粒内におけるタンパク質の層別含有量

精玄米のタンパク質含有量と搗精歩合の異なる米粒のタンパク質含有量の差から算出した層別のタンパク質含有量を第19表に示した。PB-I構成タンパク質の主要なタンパク質画分である13kDaプロラミ

ンは、いずれの品種でも90～>80%層で最も多く、この層より内層部では内側ほど低下した。各層における13kDaプロラミン含有量は、「エルジーシー1」と「LGCソフト」では「ニホンマサリ」よりも1.9～3.5倍多く、「エルジーシー活」では「ニホンマサリ」の3.1～4.3倍であった。16kDaプロラミンと10kDaプロラミンは、100～>90%層と90～>80%層で多かった。16kDaプロラミン含有量は、いずれの層でも「ニホンマサリ」よりタンパク質変異米水稻品種の方がやや多かったが、13kDaプロラミンと比較すると各層における含有量の品種間差は小さかった。これら3つのタンパク質画分の総量であるPB-I含有量は、13kDaプロラミンと同様に90～>80%層で最も多く、この層より内層部では内

側ほど少なかった。

22-23kDaグルテリンβ含有量は、いずれの品種とも90～>80%層で最も多く、80～>70%層よりも内側では徐々に低下した(第19表)。各層における22-23kDaグルテリンβ含有量は、「ニホンマサリ」よりも「エルジーシー1」および「LGCソフト」の方が明らかに少なく、「エルジーシー活」はこれら2品種よりもさらに少なかった。26kDaグロブリンは、「エルジーシー1」、「LGCソフト」および「ニホンマサリ」とも90～>80%層で最も高い含有量を示し、それよりも内側では徐々に低下した。また、いずれの層においても、「ニホンマサリ」より「エルジーシー1」と「LGCソフト」の方が26kDaグロブリン含有量は多かった。37-39kDaグルテリ

第19表 精玄米と搗精各層におけるタンパク質含有量

品種	精玄米・搗精各層	PB-I 構成タンパク質含有量 (μg/粒)				PB-I 構成タンパク質以外のタンパク質含有量 (μg/粒)					総タンパク質含有量 (μg/粒)
		10kDa プロラミン	13kDa プロラミン	16kDa プロラミン	合計	22-23kDa グルテリンβ	26kDa グロブリン	37-39kDa グルテリンα	57kDa	>57kDa	
ニホンマサリ	精玄米	21.6	218.9	80.9	321.3	341.1	80.6	482.6	121.7	145.7	1493.0
	100～>90%層	4.9	33.1	15.0	53.1	46.0	13.1	86.7	54.8	44.2	297.8
	90～>80%層	4.1	66.0	17.0	87.1	100.1	19.5	132.7	24.8	14.8	379.0
	80～>70%層	2.6	28.2	6.8	37.6	46.8	8.7	66.1	8.6	8.6	176.5
	70～>60%層	2.6	20.3	7.7	30.6	34.1	8.6	48.0	7.4	14.0	142.6
	60～>50%層	1.9	16.2	5.7	23.8	29.9	6.6	36.0	4.8	9.7	110.8
	50～>0%層 (50～>0%層)	5.5 (1.1)	55.1 (11.0)	28.6 (5.7)	89.2 (17.8)	84.2 (16.8)	24.2 (4.8)	113.1 (22.6)	21.2 (4.2)	54.4 (10.9)	386.3 (77.3)
エルジーシー1	精玄米	27.1	613.1	118.2	758.4	110.9	160.8	181.2	99.5	174.1	1484.7
	100～>90%層	9.9	91.8	25.7	127.4	15.4	25.1	37.5	55.3	48.2	308.9
	90～>80%層	4.3	186.7	20.0	211.0	24.5	42.6	42.7	17.5	23.8	362.1
	80～>70%層	3.1	98.9	14.9	117.0	14.7	21.0	19.7	4.2	12.8	189.2
	70～>60%層	1.0	69.5	10.8	81.3	12.7	16.9	17.4	3.2	13.3	144.9
	60～>50%層	2.9	48.0	10.1	61.0	8.6	12.9	12.3	2.9	10.6	108.3
	50～>0%層 (50～>0%層)	5.8 (1.2)	118.1 (23.6)	36.7 (7.3)	160.6 (32.1)	35.1 (7.0)	42.4 (8.5)	51.6 (10.3)	16.3 (3.3)	65.3 (13.1)	371.4 (74.3)
LGCソフト	精玄米	20.6	525.3	100.1	641.0	120.0	165.1	212.0	106.9	191.1	1436.1
	100～>90%層	6.3	79.3	18.8	99.4	15.1	26.0	40.4	54.0	52.6	287.6
	90～>80%層	3.8	156.8	19.4	180.0	26.9	41.0	48.0	20.5	27.2	343.6
	80～>70%層	3.0	91.1	12.5	106.5	17.1	24.7	28.0	6.6	13.9	196.7
	70～>60%層	1.5	59.2	9.0	69.6	13.1	17.8	21.2	4.8	15.5	142.0
	60～>50%層	0.7	35.9	8.5	45.1	10.2	12.4	16.5	3.2	11.4	98.8
	50～>0%層 (50～>0%層)	5.4 (1.1)	103.1 (20.6)	31.9 (6.4)	140.4 (28.1)	37.6 (7.5)	43.2 (8.7)	57.9 (11.6)	17.8 (3.6)	70.4 (14.1)	367.4 (73.5)
エルジーシー活	精玄米	31.7	768.0	104.2	904.0	58.4	—	104.1	97.0	221.2	1384.6
	100～>90%層	7.9	116.6	18.8	143.2	5.4	—	29.6	54.8	72.1	305.1
	90～>80%層	6.3	211.7	21.6	239.5	11.8	—	16.5	14.7	26.9	309.5
	80～>70%層	3.6	118.8	11.1	133.5	4.9	—	9.4	3.9	13.3	165.0
	70～>60%層	2.6	82.0	10.4	94.9	6.2	—	9.7	4.6	17.7	133.3
	60～>50%層	2.7	68.7	8.9	80.4	4.9	—	6.5	2.1	13.4	107.3
	50～>0%層 (50～>0%層)	8.7 (1.7)	170.3 (34.1)	33.5 (6.7)	212.4 (42.5)	25.1 (5.0)	—	32.4 (6.5)	16.8 (3.4)	77.7 (15.5)	364.5 (72.9)
分散分析											
品種		ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***
精玄米・搗精各層		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
品種×精玄米・搗精各層		*	***	ns	***	***	***	***	ns	***	***

括弧内の数値は、50～>0%層と他の層との比較のために1/5倍した値を示した。\*、\*\*、\*\*\*はそれぞれ5%、1%、0.1%水準で有意、nsは5%水準で有意でないことを示す。26kDaグロブリンについては、「エルジーシー活」を除いて分散分析を行った。

ン $\alpha$ 含有量は、「ニホンマサリ」では90～>80%層で最も多く、80～>70%層よりも内側では徐々に低下した。一方、「エルジーシー1」と「LGCソフト」でも37-39kDaグルテリン $\alpha$ 含有量は90～>80%層で最も多かったが、100～>90%層との差異は小さく、「エルジーシー活」では、100～>90%層が最も多かった。そして、その含有量は米粒の内側ほど少なかった。各層における22-23kDaグルテリン $\beta$ 含有量の品種間差は22-23kDaグルテリン $\beta$ と類似した。57kDaタンパク質と57kDa超過タンパク質の含有量は、タンパク質変異米水稲品種、「ニホンマサリ」ともに100～>90%層が最も多く、90～>80%層がこれに続き、80～>70%層より内側では含有量が少なく、さらに内層ほど低下、あるいは一定であった。57kDaタンパク質含有量は、100～>90%層では品種間差がみられなかったが、それよりも内側では「ニホンマサリ」よりタンパク質変異米水稲品種の方がやや少なかった。57kDa超過タンパク質は、いずれの層でも「ニホンマサリ」よりタンパク質変異米水稲品種の方がやや多く、中でも「エルジーシー活」で多かった。

総タンパク質含有量は、いずれの品種も90～>80%層で最も多かったが、「エルジーシー活」では100～>90%層にもほぼ同量存在した(第19表)。そして、80～>70%層を含む内層部では内側ほど低下した。

#### (2) 米粒内におけるタンパク質の層別存在割合

米粒内におけるタンパク質の搗精に基づく層別分布を明らかにするために、各層に含まれるタンパク質含有量を精玄米のタンパク質含有量で除して層別のタンパク質の存在割合を算出し第3図に示した。50～0%層の存在割合は、他の層との比較を容易にするために1/5を乗じた値で示した。

PB-IおよびPB-Iの主構成要素である13kDaプロラミンの存在割合は、いずれの品種でも100～>90%層が15～17%であり、90～>80%層が27～30%と最も高かった(第3図a, b)。そして、80～>70%層が12～16%であり、それより内層部では内側ほど低かった。PB-Iおよび13kDaプロラミンの層別の存在割合に大きな品種間差はみられなかった。

22-23kDaグルテリン $\beta$ 、26kDaグロブリンおよび

37-39kDaグルテリン $\alpha$ の存在割合は、「エルジーシー活」の37-39kDaグルテリン $\alpha$ を除いて、90～>80%層が22～29%と最も高く、80～>70%層が8～14%であり、それより内層部では内側ほど低かった(第3図c, d, e)。57kDaタンパク質の存在割合は100～>90%層が45～57%と最も高く、90～>80%層が15～20%、80～>70%層およびその内層部が2～7%であった(第3図f)。また、100～>90%層における57kDaタンパク質の存在割合はタンパク質変異米水稲品種で高かった。57kDa超過タンパク質の存在割合は100～>90%層が28～33%と最も高く、90～>80%層から内層部では6～14%であった(第3図g)。

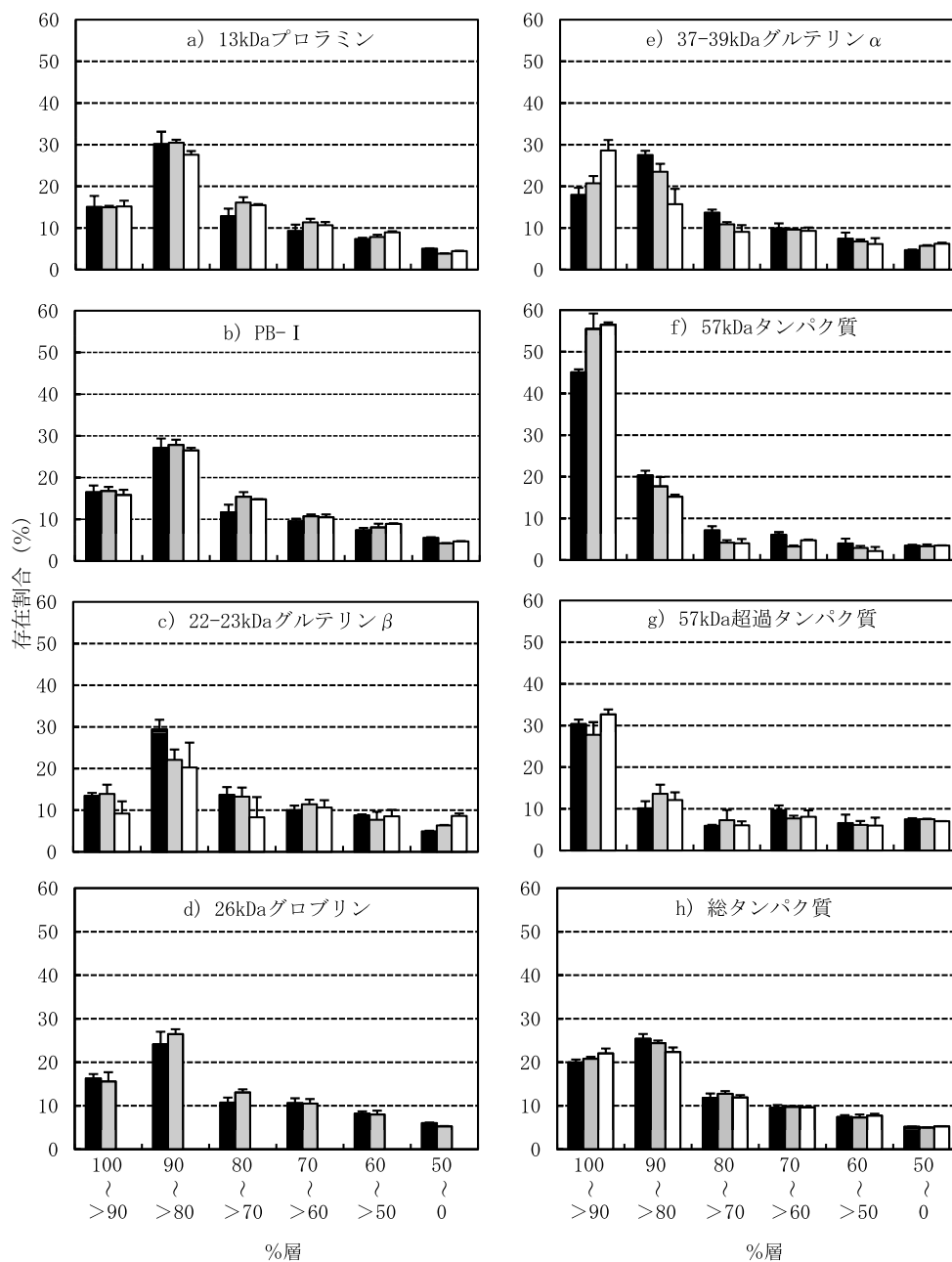
総タンパク質の存在割合は、100～>90%層が20～22%、90～>80%層が22～25%と高く、80～>70%層が12～13%、それより内層部では内側ほど低かった(第3図h)。各層の総タンパク質の存在割合に明瞭な品種間差はみられなかった。

### 3) 考察

一般食用水稲品種「ニホンマサリ」の総タンパク質は、その45%が100～>80%層に存在し、タンパク質変異米水稲品種「エルジーシー1」、「LGCソフト」および「エルジーシー活」においても、同様の割合で存在することが明らかになった(第3図h)。

タンパク質変異米水稲品種は、一般食用水稲品種と比較して総タンパク質に占めるPB-I、特に13kDaプロラミンの割合が高いことが知られており<sup>19, 55, 56, 90)</sup>、本研究でも同様の結果が得られた(第19表)。PB-Iおよび13kDaプロラミン含有量は、米粒内のいずれの層においても「エルジーシー活」が最も多く、「エルジーシー1」と「LGCソフト」がそれに続き、「ニホンマサリ」は最も少ないことが明らかになった(第19表)。また、総タンパク質と同様に、PB-Iおよび13kDaプロラミンは90～>80%層に最も多く存在し、内層ほど少ないことが示された。

57kDaタンパク質と57kDa超過タンパク質は、いずれの品種も総タンパク質やPB-Iと異なり100～>90%層の最外層に最も多く存在し(第3図f, g)、特にタンパク質変異米水稲品種では57kDaタ



第3図 米粒内における層別のタンパク質の存在割合

■：「ニホンマサリ」, ■：「エルジーシー1」, □：「エルジーシー活」. 「LGCソフト」は、「エルジーシー1」と同様の傾向を示したためデータを省略した. 50～0%層は、他の層との比較のために1/5倍した値を示した. 垂線は標準偏差を示す.

ンパク質の最外層における局在の程度が大きかった. また、「エルジーシー活」のみ37-39kDaグルテリン $\alpha$ が100～>90%層に最も多く存在し(第3図e), タンパク質種によっては米粒内分布に品種間差のあることが明らかになった.

37-39kDaグルテリン $\alpha$ と22-23kDaグルテリン $\beta$ は、57kDa前駆体タンパク質がPB-IIに輸送された

後に開裂して形成される<sup>73, 93)</sup>. したがって、米粒内における37-39kDaグルテリン $\alpha$ と22-23kDaグルテリン $\beta$ の分布は類似すると推測された. しかし、「エルジーシー活」における37-39kDaグルテリン $\alpha$ と22-23kDaグルテリン $\beta$ の分布は異なっていた. 供試したタンパク質変異米水稻品種は、いずれも低グルテリン遺伝子 *Lgc1*<sup>16, 17)</sup> を持つが、37-39kDa

グルテリン $\alpha$ 含有量と22-23kDaグルテリン $\beta$ 含有量は、「エルジーシー活」の方が「エルジーシー1」および「LGCソフト」よりも明らかに少なかった(第19表)。PB-IIには、37-39kDaグルテリン $\alpha$ と22-23kDaグルテリン $\beta$ に加えて26kDaグロブリンも蓄積される<sup>40)</sup>ことを考え合わせると、「エルジーシー活」の26kDaグロブリン欠失遺伝子 $glb1$ <sup>18)</sup>が、37-39kDaグルテリン $\alpha$ と22-23kDaグルテリン $\beta$ の生成、蓄積過程に何らかの影響を及ぼした可能性もある。

「エルジーシー活」は、低グルテリンと26kDaグロブリン欠失の二つの形質を持つ代わりに13kDaプロラミンの割合が総タンパク質のほぼ半分を占める品種である<sup>56)</sup>。「エルジーシー活」だけでなく低グルテリン米水稲品種「エルジーシー1」と「LGCソフト」も持つ低グルテリン形質は、RNA干渉によって生じる<sup>36)</sup>。しかし、「エルジーシー活」のように低グルテリン遺伝子 $Lgc1$ <sup>16, 17)</sup>に加えて26kDaグロブリン欠失遺伝子 $glb1$ <sup>18)</sup>を持つと、何故低グルテリン形質が「エルジーシー1」と「LGCソフト」よりも強く現れる(第19表)のかは未解明である。また、26kDaグロブリンが欠失するメカニズムも不明である。タンパク質変異米水稲品種の13kDaプロラミンの割合が高い要因は、本来グルテリンとグロブリンの合成に利用される基質が余剰になり、その基質が13kDaプロラミンの合成に利用されたことによると推測されることから、タンパク質の分布に品種間差異を生じた要因を考察するにあたり、今後はこれら基礎的なメカニズムの解明が必要である。

## 2 免疫蛍光顕微鏡観察による米粒内における種子貯蔵タンパク質の分布の解析

前項では、精玄米および搗精した白米のSDS-PAGE分析に基づいて米粒内のタンパク質分布を論じた。しかし、玄米を搗精すると、その形状は楕円形から円形に近づくため、目的のタンパク質が玄米表面からどの程度の位置にどの程度の量が存在するかといった米粒内のタンパク質分布は把握できない。また、搗精には限界があることから、米粒のごく内層のタンパク質分布も把握が不可能である。こうした学術的な意味での米粒内のタンパク質分布を解析する手法として、米粒の切片を作成し、蛍光標

識抗体を用いて貯蔵タンパク質の分布を観察する方法があげられる。Furukawaら<sup>6)</sup>は、低グルテリン米水稲品種・系統についてPB-Iの主構成要素である13kDaプロラミンとPB-IIの主構成要素の一つである23kDaグルテリンを蛍光標識して顕微鏡観察を行っている。そして、一般食用水稲品種よりも13kDaプロラミンが玄米の外層部だけでなく、70%搗精した白米の外層部にも多量に存在することを明らかにしている。しかし、完熟した米粒は固く、観察に適した薄い切片の作成は困難であった。このことから、観察画像は玄米と70%搗精した白米の比較的外層の一部であり、タンパク質変異米水稲品種について米粒の全体像を捉えた上でプロラミンやグルテリンの分布はこれまで示されていなかった。

近年、Saitoら<sup>72)</sup>は、凍結粘着フィルム法<sup>29)</sup>を応用して米粒切片を作成し、抗体を用いてタンパク質を蛍光標識して観察する手法を開発した。本手法では、観察に適した良好な状態の薄い切片が得られ、米粒の全体像を捉えた上でタンパク質の分布を把握できる。そのため、「IV-1」では把握できなかった玄米表面からのタンパク質の存在位置、米粒のごく内層におけるタンパク質分布、さらに背側や腹側、頂端側、基部側のタンパク質分布の差異を明らかにできることが期待される。そこでこの手法を用いて、一般食用水稲品種、低グルテリン米水稲品種および低グルテリン・26kDaグロブリン欠失米水稲品種について、米粒内における13kDaプロラミンと23kDaグルテリンの分布を調査した。

また、蛍光顕微鏡観察では実験の煩雑さから供試できる米粒の数に限りがあったことから、米粒背部と腹部とのタンパク質の分布様式について、背側あるいは腹側を研削した米粒のSDS-PAGE分析によっても検討した。

### 1) 材料および方法

#### (1) 供試品種と栽培概要および精玄米の調製

「IV-1」と同様とした。

#### (2) 23kDaグルテリンと13kDaプロラミンの蛍光標識抗体を用いた顕微鏡観察

Saitoら<sup>72)</sup>に準じて以下の方法で行った。



### a 包埋・切片作成

調製した精玄米の中でも充実の良い粒を選び、1品種につき3粒を3%カルボキシメチルセルロース(CMC)中に沈めて24時間減圧処理した。Kawamoto・Shimizu<sup>29)</sup>の方法に準じてプラスチック製包埋容器に減圧後の精玄米を入れ、3%CMCを充填し、液体窒素で冷却したヘキサン中で急速凍結させた。-25℃に設定したクリオスタット(Walldolf社, HM500M; MICROM)中で、クライオフィルムトランスファーキット(ライカ社)を用いて作成した粘着フィルムをトリミング後の試料面に貼り付け、厚さ約10μmの縦断凍結切片を作成した。切片はスライドガラスに固定し、室温で解冻して100%エタノールに浸漬した。

### b 抗体反応

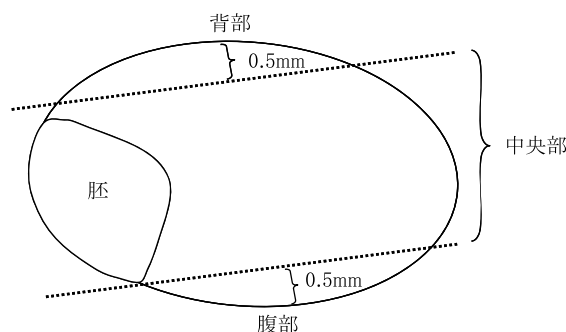
切片を4%パラフォルムアルデヒドで固定した後(10分, 室温), 5分毎にリン酸buffer (0.1M phosphate buffer (pH7.2))で3回洗浄した(室温)。TBST溶液(0.01M Tris-HCl (pH8.0), 0.15M NaCl, 0.05% Tween20)で希釈した1%BSA溶液でブロッキング反応を行った(60分, 室温)。蛍光色素Cy3標識抗13kDaプロラミン抗体と蛍光色素Cy5標識抗23kDaグルテリン抗体(Amersham Biosciences社)を用いて遮光下で抗体反応を行った(60分, 室温)。同時にネガティブコントロールとしてCy3標識抗ウサギIgG抗体(Amersham Biosciences社)を用いて遮光下で抗体反応を行った(60分, 室温)。反応後にTBST溶液で20分毎に3回洗浄した(室温)。その後, 30%グリセリンで試料を封入した。

### c 蛍光顕微鏡観察

落射蛍光顕微鏡(オリンパス社, BX51)を用いて抗体反応を行った試料およびネガティブコントロールを観察した。

### (3) 顕微鏡観察画像の蛍光強度の数値化

画像解析ソフトImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>)を用いて、精玄米の縦断切片蛍光画像の蛍光強度を数値化した。同一品種でも、縦断切片の横幅と縦幅の長さは玄米によって、また、切片作成時の玄米の切断位置によってわずかに異なったため、横幅あるいは縦幅の長さを100として、玄米表面からの相対距離の蛍光強度を検出した。米粒全体の蛍光強度は玄米によって異なったため、検出し



第4図 米粒の背側あるいは腹側の部分研削

た蛍光強度の合計を100として、相対距離における相対蛍光強度を示した。

### (4) 米粒の背側あるいは腹側の研削と米粒のタンパク質組成・総タンパク質含有量の分析

精玄米の背側あるいは腹側を表面から0.5mm, デジタルノギスで計測しながら胚を残したままやすりで研削した(第4図)。1反復につき50粒を供試し, 3反復で試験した。

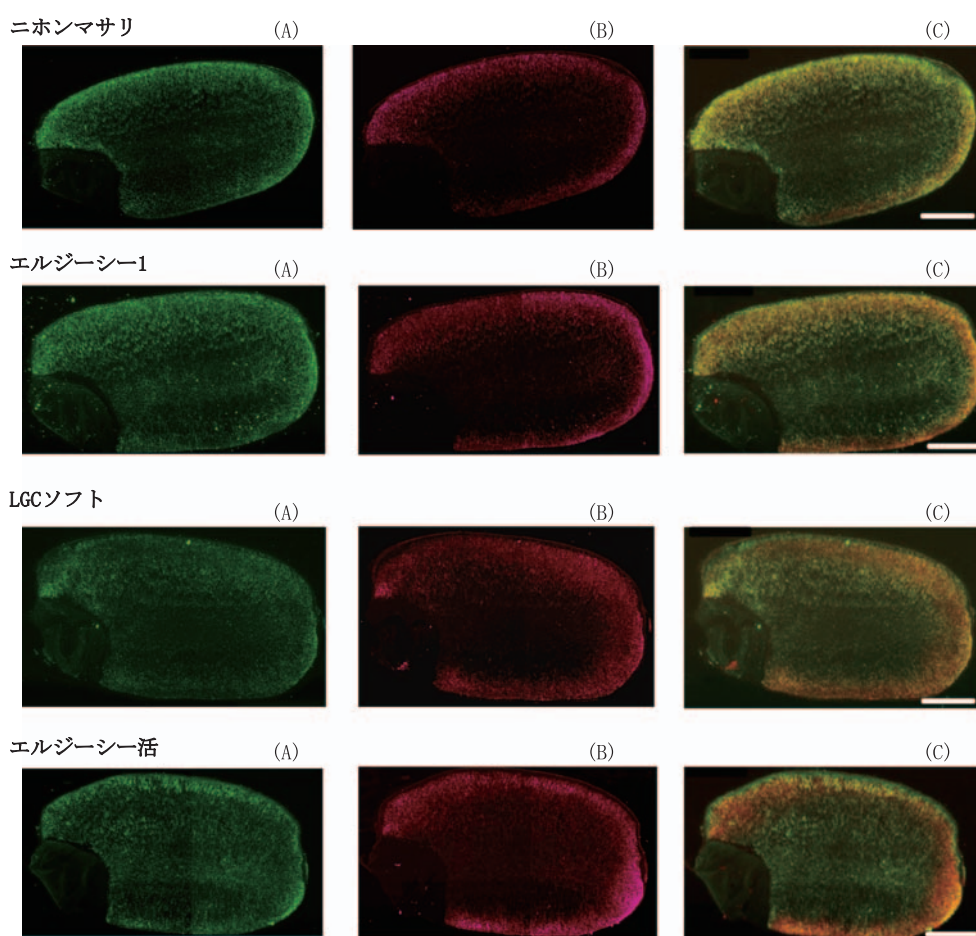
精玄米の背側あるいは腹側を研削した米粒それぞれ50粒を, 粉碎機(UDY社, サイクロンミル)で粉碎して総タンパク質含有率の測定およびSDS-PAGE分析に基づくタンパク質組成の解析を行った。米粒内のタンパク質含有量から背側あるいは腹側を研削した米粒のタンパク質含有量を差し引いて, 腹部あるいは背部の総タンパク質含有量および各タンパク質含有量を算出した。

## 2) 結果

### (1) 蛍光顕微鏡観察と画像解析によるグルテリンとプロラミンの米粒内分布

精玄米(以下玄米)の縦断切片の蛍光顕微鏡観察画像を第5図に示した。同一品種の各画像は, 同一個体から得られたものである。23kDaグルテリンは, 蛍光色素Cy5標識抗23kDaグルテリン抗体を特異的に結合させて緑色で示し(第5図A), 13kDaプロラミンは, 蛍光色素Cy3標識抗13kDaプロラミン抗体を特異的に結合させて赤色で示した(第5図B)。13kDaプロラミンと23kDaグルテリンを検出した画像を重ね合わせた画像(第5図C)では, 両タンパク質が同部位に, あるいはごく近傍に存在する場合は黄色で示した。

13kDaプロラミンを示す蛍光の強度と領域の広さ



第5図 23kDaグルテリンと13kDaプロラミンの米粒内の分布

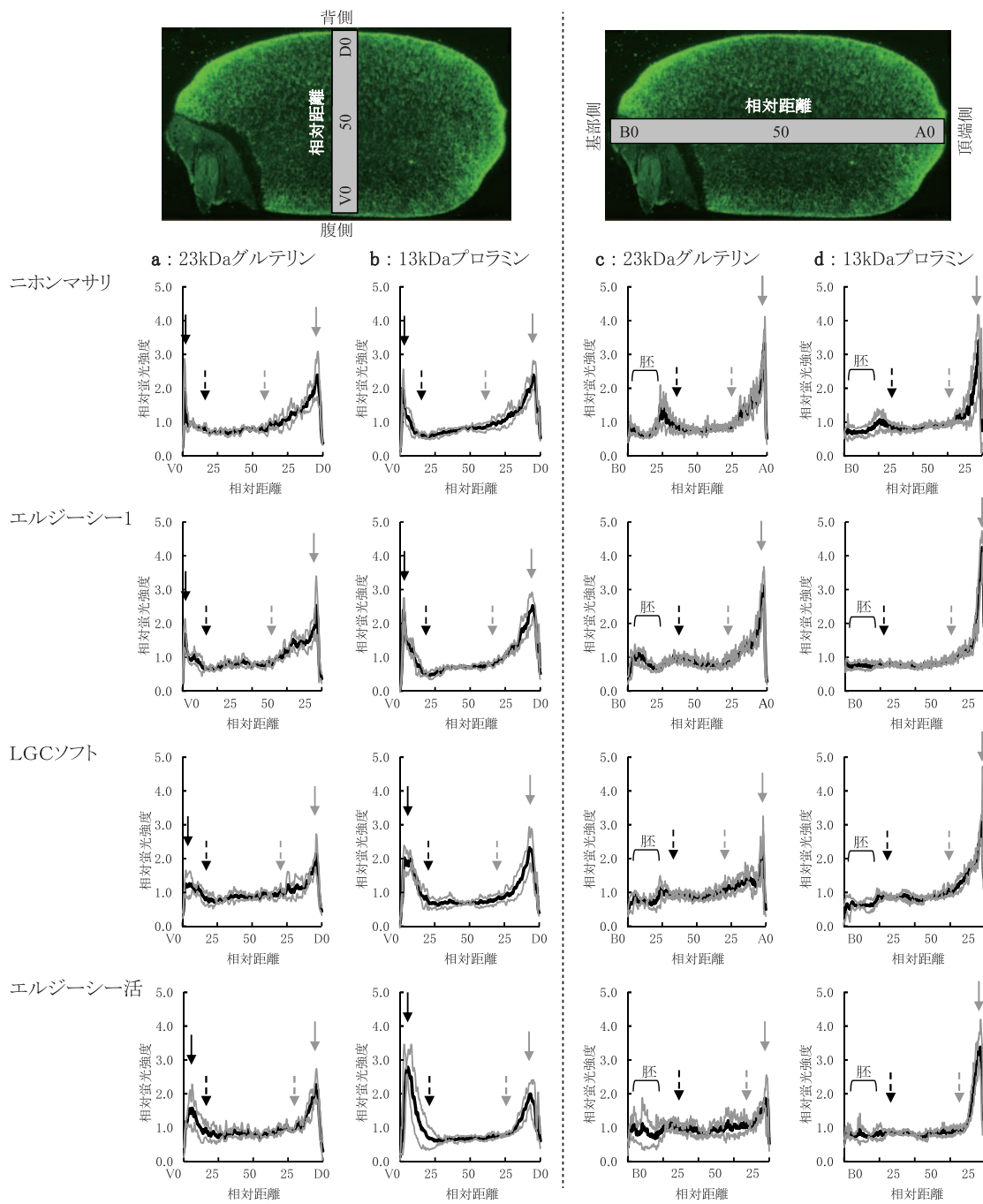
蛍光標識抗体を用いた精玄米の縦断切片の観察画像。(A) 抗23kDaグルテリン抗体, (B) 抗13kDaプロラミン抗体, (C) AとBの重ね合わせ画像。スケールバーは1mmを示す。

を品種間で比較すると、「ニホンマサリ」よりも低グルテリン米水稲品種「エルジーシー1」と「LGCソフト」、低グルテリン・26kDaグロブリン欠失米水稲品種「エルジーシー活」で赤色の濃い領域が多かった(第5図B)。また、重ね合わせた画像から、「ニホンマサリ」と比較して「エルジーシー1」と「LGCソフト」では23kDaグルテリンを示す緑色よりも13kDaプロラミンを示す赤色の程度が高く、「エルジーシー活」ではその傾向が一層顕著であった(第5図C)。

「ニホンマサリ」とタンパク質変異米水稲品種のいずれも、23kDaグルテリンの緑色(第5図A)と13kDaプロラミンの赤色(第5図B)は、米粒の外層部で濃く、米粒の中央部では薄く観察された。次に、23kDaグルテリンと13kDaプロラミンの分布を詳細に把握するために、画像解析によって米粒内の蛍光強度を数値化して第6図に示した。23kDaグル

テリンの相対蛍光強度は、玄米の腹側において、いずれの品種も玄米表面から相対距離2~6にピークとなり、相対距離約20の位置まで減少した。ピークの相対蛍光強度は1.3~1.9であった。一方、背側では、いずれの品種も玄米表面から相対距離4~5にピークとなり、「ニホンマサリ」では相対距離約40、「エルジーシー1」と「LGCソフト」では相対距離30~35、「エルジーシー活」では相対距離約20の位置まで減少した。背側のピークの相対蛍光強度は、いずれの品種も2.1~2.5と腹側より高かった。上記以外の米粒内層部における23kDaグルテリンの相対蛍光強度は0.6~0.9とほぼ一定であった。

13kDaプロラミンの相対蛍光強度は、玄米の腹側において、いずれの品種も玄米表面から相対距離3~6の位置にピークがあり、23kDaグルテリンと同様に相対距離約20まで減少した(第6図)。一方、背側では、いずれの品種も玄米表面から相対距離5



第6図 蛍光顕微鏡画像から数値化した米粒内の相対蛍光強度

写真の四角は画像解析した範囲を示す。四角の幅は0.5mm。黒色の線は平均値を示し、灰色の線は平均値±標準偏差を示す。実線の矢印は蛍光強度のピークを、点線の矢印は底を示す。

～7の位置にピークがあり、「ニホンマサリ」では相対距離約40,「エルジーシー1」と「LGCソフト」では相対距離約30,「エルジーシー活」では相対距離約20の位置まで減少した。上記以外の米粒内層部における13kDaプロラミンの相対蛍光強度は0.5～0.9とほぼ一定であった。「ニホンマサリ」,「エルジーシー1」および「LGCソフト」では、玄米背側

における13kDaプロラミンのピークの相対蛍光強度は2.3～2.5であり、腹側のピーク値である1.9～2.3より高い傾向にあった。一方、「エルジーシー活」では、玄米背側における13kDaプロラミンのピークの相対蛍光強度は2.0であり、腹側のピーク値2.8より低かった。

玄米の基部側では、胚部分で23kDaグルテリンと

13kDaプロラミンとともに相対蛍光強度が他の部位より低かった（第6図）。頂端側では、いずれの品種も23kDaグルテリンと13kDaプロラミンの相対蛍光強度は玄米表面から相対距離2～4の位置にピークがあり、相対距離20～30の位置まで減少した。頂端側の玄米表面から相対距離20～30の位置と基部側の玄米表面から相対距離約40の位置との間の米粒内層部では、23kDaグルテリンと13kDaプロラミンの相対蛍光強度はいずれの品種も0.6～1.1の範囲でほぼ一定であった。

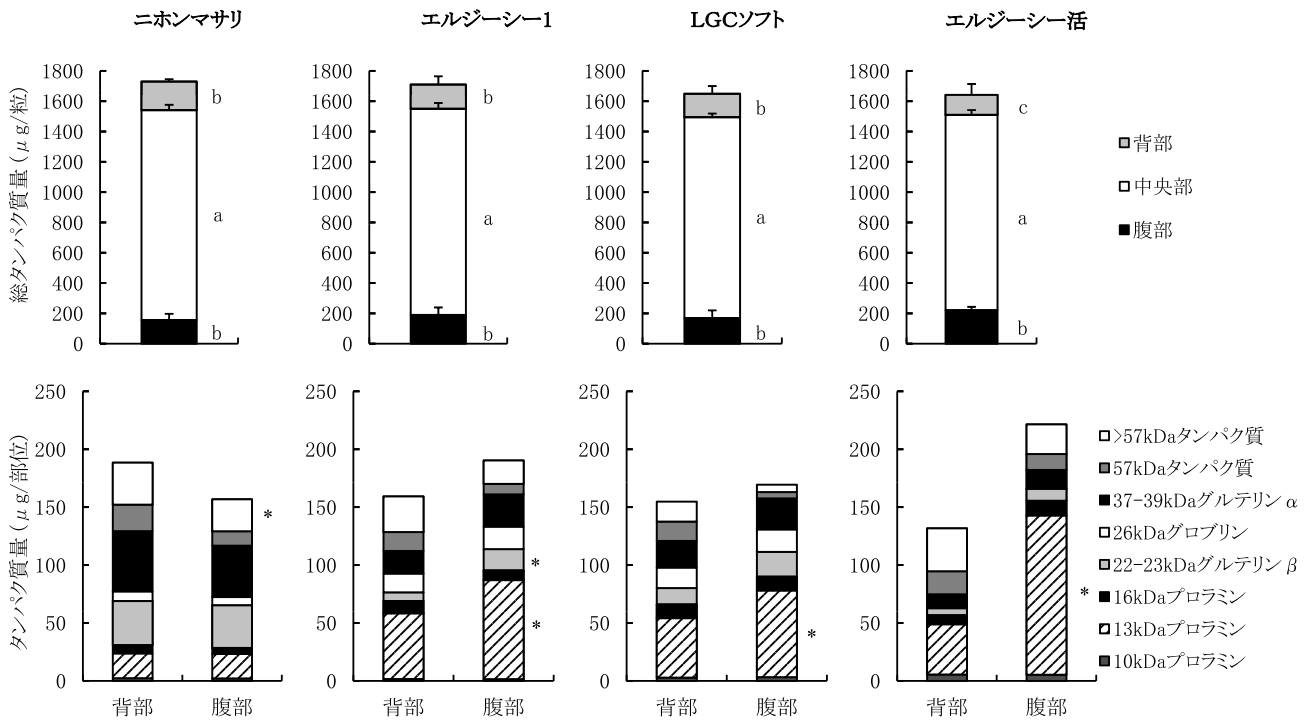
(2) 米粒背部と腹部のタンパク質の局在の差異

背側あるいは腹側を0.5mm研削した精玄米（第20表）を分析に供して、背部と腹部の各タンパク質含有量を算出し第7図に示した。「ニホンマサリ」, 「エルジーシー1」および「LGCソフト」では、背部あるいは腹部の総タンパク質含有量は142～157μg/粒であり、背部と腹部とで有意な違い（ $P < 0.05$ ）はなかった。一方、「エルジーシー活」の腹部の総タンパク質含有量は221μg/粒と背部の132μg/粒より有意に（ $P < 0.05$ ）高かった（第7図）。その違いは腹部の総タンパク質含有率が高いこと（第20表）に起因した。「ニホンマサリ」では、13kDa

第20表 研削した米粒の特性

品種と研削処理	幅 (mm)	重量 (mg / 粒)	研削率 (%)	総タンパク質含有率 (%)
ニホンマサリ				
対照	2.96 a	24.4 a	—	7.1 a
背側研削	2.45 b	22.0 c	9.1 a	7.0 a
腹側研削	2.46 b	22.5 b	8.0 a	7.0 a
エルジーシー1				
対照	2.97 a	24.8 a	—	6.9 a
背側研削	2.47 b	22.5 c	9.1 a	6.9 a
腹側研削	2.49 b	23.0 b	7.7 a	6.6 a
LGCソフト				
対照	2.88 a	22.6 a	—	7.3 a
背側研削	2.38 b	20.8 b	8.4 a	7.2 ab
腹側研削	2.39 b	20.9 b	7.6 a	7.1 b
エルジーシー活				
対照	2.87 a	20.4 a	—	8.0 a
背側研削	2.38 b	18.8 b	7.9 a	8.0 a
腹側研削	2.38 b	18.8 b	8.2 a	7.6 b
分散分析				
品種	***	***	ns	***
研削処理	***	***	ns	**
品種×研削処理	ns	ns	ns	ns

研削率は研削後の粒重を研削前の粒重で除して算出した。\*と\*\*はそれぞれ1%および0.1%水準で有意であることを示す。nsは5%水準で有意でないことを示す。同一品種内の異なる英文字間には5%水準で有意差があることを示す（Tukey法）。



第7図 米粒の背部および腹部のタンパク質量

垂線は標準偏差を示す。異なる英文字間には5%水準で有意差があることを示す（Tukey法）。\*は、背部と腹部の間に5%水準で有意差があることを示す（t検定）。

プロラミン含有量は背部と腹部とで有意な違い ( $P < 0.05$ ) はなかった (第7図). 一方, タンパク質変異米水稻品種では, 13kDaプロラミン含有量が背部よりも腹部で有意に高かった ( $P < 0.05$ ). その傾向は「エルジーシー活」で顕著であり, 13kDaプロラミン含有量の腹部と背部との差は倍以上であった.

### 3) 考察

本研究では, Saitoら<sup>72)</sup> が一般食用水稻品種を用いて実施した研究と同様に, 米粒の全体像を捉えた上でタンパク質変異米水稻品種の米粒内における13kDaプロラミンと23kDaグルテリンの分布を視覚的に把握することができ, 一般食用水稻品種と比較検討することができた. 13kDaプロラミンを示す蛍光の強度と領域の広さを品種間で比較すると, 一般食用水稻品種「ニホンマサリ」よりも低グルテリン米水稻品種「エルジーシー1」と「LGCソフト」では蛍光の強い領域が多く, 低グルテリン・26kDaグロブリン欠失米水稻品種「エルジーシー活」ではその傾向が一層顕著であった (第5, 6図). この結果は, 米粒から抽出したタンパク質のSDS-PAGE分析によって, タンパク質変異米水稻品種では総タンパク質に占める22-23kDaグルテリン $\beta$ および37-39kDaグルテリン $\alpha$ の割合が低く, 13kDaプロラミンの割合が高いとするタンパク質変異米水稻品種の育成に関する報告<sup>19, 55, 56, 90)</sup>, 本研究の「II~III」および「IV-1」の結果と合致した.

これまでに, 米粒切片中の総タンパク質を染色して観察する組織化学的手法により, 一般食用水稻品種の総タンパク質は, 米粒の内層部と比較して外層部の糊粉層およびサブアリュロン層に多く分布することが報告されている<sup>4, 30, 35, 48, 49, 54)</sup>. しかし, プロラミンやグルテリンなどの種々タンパク質について, それらの米粒内の分布を定量的に報告した例はわずかである. 静川ら<sup>75)</sup> は, 一般食用水稻品種「コシヒカリ」の玄米を搗精し, 削られた米粉中のタンパク質組成をSDS-PAGE法によって分析することで層別の各タンパク質の分布を報告している. しかし, 玄米を搗精すると頂端側と基部側が背側と腹側に比較して多く削られ, 玄米の形状を保ったままの白米が得られないことから, 玄米表面からどの程

度の距離にタンパク質が多く分布するのかを正確に把握することは既報<sup>75)</sup> では不可能であった. また, 搗精には限界があることから, 米粒のごく内層における各タンパク質の分布もこれまでに明らかにされていなかった.

そこで本研究では, Saitoら<sup>72)</sup> に準じた方法で米粒の免疫蛍光顕微鏡観察を行うとともに画像解析を行った. その結果, いずれの品種にも共通することとして, PB-Iの主構成要素である13kDaプロラミンとPB-IIの主構成要素である23kDaグルテリンは, 玄米の背側, 腹側, 頂端側の玄米表面から相対距離2~7の位置に分布量のピークがあることが示された. また, 分布量の底は腹側では玄米表面から相対距離約20の位置, 頂端側では約20~30の位置であった. 一方, 背側では, 13kDaプロラミンと23kDaグルテリンの玄米表面から分布量の底までの相対距離が, 両タンパク質ともに「ニホンマサリ」 > 「エルジーシー1」  $\approx$  「LGCソフト」 > 「エルジーシー活」の関係にあり, 品種間差異のあることが明らかになった. このように米粒の外層部では13kDaプロラミンと23kDaグルテリンの分布量が顕著に変化していたのに対して, 内層部では, 両タンパク質が存在するものの, 少ない量でほぼ一定に分布することも明らかになった.

さらに, 本研究では, 蛍光顕微鏡観察の結果, 「エルジーシー活」の13kDaプロラミンの分布量のピークは玄米の背側よりも腹側で高く, 「ニホンマサリ」とは異なることを示唆する興味深い結果が得られた (第6図). 蛍光顕微鏡観察による画像解析の結果を詳細に検討すると, 「ニホンマサリ」では, 腹側と背側における13kDaプロラミンの相対蛍光強度のピーク値の差は0.45ポイントであったのに対して, 「エルジーシー1」と「LGCソフト」ではその差が0.14~0.29ポイントと小さかった (第6図). また, 背側における13kDaプロラミンの分布量の底は, 「ニホンマサリ」より「エルジーシー1」と「LGCソフト」の方がやや玄米表面に近い位置にあった. これらを考慮すると, 13kDaプロラミンの分布量が玄米の背側より腹側に多い傾向は, 「エルジーシー活」 > 「エルジーシー1」  $\approx$  「LGCソフト」 > 「ニホンマサリ」の関係にあると考えられる. したがって, タンパク質変異米水稻品種と一般食用

水稲品種とでは背側と腹側における13kDaプロラミンの分布様式が異なることが示唆された。

蛍光顕微鏡観察で認められた背部と腹部との13kDaプロラミンの分布様式の品種間差異は、部分切除した玄米のSDS-PAGE分析によっても確認された。このような品種間差異を生じた要因を考察することは、直接参考となる知見がないために困難である。しかし、これまでにタンパク質変異米水稲品種では、一般食用水稲品種よりも13kDaプロラミンの蓄積量が出穂後15日目の時点で多く、特に「エルジーシー活」のような低グルテリン・26kDaグロブリン欠失米水稲品種では、13kDaプロラミンが登熟後期まで増加し続けることが報告されている<sup>57)</sup>。したがって、このような登熟過程における13kDaプロラミン合成量の推移の品種間差異も米粒内の分布の品種間差異の要因となっている可能性がある。

登熟過程における穎果への物質輸送は、背面通導組織を通じて背側から生じ<sup>15)</sup>、顕微鏡観察の結果から、開花後6～7日目にはタンパク質顆粒が穎果の背側で確認されている<sup>4, 14)</sup>。一方、デンプン粒は、開花後4日目から胚乳の最も中心部においてその蓄積が確認されており<sup>13)</sup>、タンパク質顆粒の蓄積よりやや先んじている。このことから、胚乳中心部では13kDaプロラミンと23kDaグルテリンの分布量が少ない、もしくは無いことを当初予想したが、本研究の結果はこの予想に反するものであった。Tanakaら<sup>82)</sup>は、登熟過程における経時的な米粒中の成分分析により、デンプンは開花後5～6日目から18日目頃まで、総タンパク質は開花後7日目頃から20日目頃まで急速に蓄積されることを報告している。このことから、開花後2週間弱の期間にデンプンおよび総タンパク質の90%以上が蓄積されていると考えられる。このように、デンプンとタンパク質は急速に蓄積される時期の多くが重なっているにもかかわらず、13kDaプロラミンと23kDaグルテリンの分布量は米粒外層部で顕著に高かった(第5, 6図)。これらのことは、デンプンが胚乳中心部から蓄積されるのに対して、タンパク質は何らかの制御のもとに米粒の内層部では少なく、外層部で多く蓄積され、蓄積過程が異なることを示唆している。しかし、登熟全般を通した米粒内の局所的なタンパク質蓄積過程については、タンパク質変異米水稲品種のみなら

ず一般食用水稲品種でも知見が見あたらない。したがって、登熟過程の経時的なタンパク質の蓄積を蛍光顕微鏡観察などによって明らかにすることが今後の課題と考えられた。

## V 総合考察

### 1 本研究で得られた新規知見に係る考察

#### 1) 栽培・環境条件とタンパク質組成

過去の研究<sup>66, 86, 95)</sup>では、一般食用水稲品種の米粒のタンパク質組成および各種タンパク質含有率に及ぼす窒素施用条件の影響を米粒タンパク質の溶媒抽出による分析結果に基づいて論ずることが多かった。しかし、溶媒抽出法によって得られたデータの正確性については緒言で述べたとおりである。本研究では、SDS-PAGE分析に基づいて、登熟気温と窒素施用方法の影響を検討することで新規の知見を得ることができた。まず、登熟気温の影響としては、気温が高いほど総タンパク質に占める13kDaプロラミンの割合およびPB-I割合は低下し、26kDaグロブリンを除くPB-I構成タンパク質以外のタンパク質画分の割合は高まることが明らかになった。また登熟気温が米粒の13kDaプロラミンの割合に及ぼす影響は、一般食用水稲品種よりもタンパク質変異米水稲品種の方が強く受けることが示唆された。これまでに、登熟気温が米粒のタンパク質組成に及ぼす影響について論じた報告はわずかであり<sup>83, 94)</sup>、しかも既報では定性的あるいは一部のタンパク質のみに関する結果が示されるのみであった。一方、本研究ではタンパク質変異米水稲品種も含めて定量的に登熟気温がタンパク質組成に及ぼす影響を明らかにできた点で意義は大きい。

米粒のタンパク質組成を溶媒抽出法に基づいて分析した既報では、窒素施用量を高めると、米粒のグルテリン含有率が顕著に高まることで総タンパク質含有率が高まるとされていた<sup>66, 95)</sup>。一方、本研究では、米粒の総タンパク質含有率が高まる窒素施用条件では、各種タンパク質の含有率が増加しており、中でも13kDaプロラミン含有率が高まりやすい傾向がいくつかの試験で認められた。本研究で認められた総タンパク質含有率が高まる条件で13kDaプロラミンの割合が高まる傾向は、学術的に興味深い。こ

のような現象が生じた機作としては、莖葉部の窒素が登熟後期まで穎果に転流し続けることで、グルテリンなどより遅れて米粒内に蓄積されるプロラミン<sup>82)</sup>の生合成量が高まったことが推測されるが、このことを裏付ける直接的なデータは得られていないことから今後の検討が必要である。

## 2) 栽培・環境条件と総タンパク質含有率

窒素施用条件の影響を検討した「Ⅲ-2」において、「ニホンマサリ」, 「LGCソフト」および「エルジーシー潤」のいずれの品種でも、出穂期の葉色は米粒の総タンパク質含有率と高い正の相関関係 ( $r = 0.809^{**} \sim 0.888^{***}$ , 第16表, 一部図表省略) を示すことを明らかにした。一方、作期の影響を検討した「Ⅱ-3」において、出穂期の葉色と米粒の総タンパク質含有率との相関係数は正の値だが、5%水準で有意とならない結果が得られた。これらのことから、作期が異なる条件では、出穂期の葉色以外に米粒の総タンパク質含有率に大きく影響を及ぼす要因があったことが推察された。これまでに、気象要因の解析結果から、登熟期間の日射量と米粒内の総タンパク質含有率とは負の相関関係を示すことが報告されている<sup>20, 76)</sup>。また、登熟期間の遮光処理によって光合成量は低下し、米粒内のデンプン蓄積が不十分になることで総タンパク質含有率は増加する<sup>43, 91)</sup>ことが報告されている。一方、本研究では、登熟期間の日射量は作期によって異なったにもかかわらず、米粒の総タンパク質含有率と一定の関係が見出されなかった(第6表)。これらを総合すると、作期が異なる条件では、出穂期の葉色と登熟期間の日射量とが互いに米粒の総タンパク質含有率に影響を及ぼした結果、それぞれの影響が不明瞭となった可能性が考えられた。そこで、出穂期の葉色を固定

して相関分析を行うと、米粒の総タンパク質含有率は登熟期間の日射量との偏相関係数が $-0.463 \sim -0.757^*$ であり、「LGCソフト」と「ニホンマサリ」では5%水準で有意な負の相関関係が認められた(第21表)。このことは、出穂期の稲体窒素栄養状態が同条件であれば、登熟期間の日射量が高いほど光合成が活発になることにより、穎果内で相対的にタンパク質よりも炭水化物の蓄積量が増加して米粒の総タンパク質含有率は低下することを示唆するものである。なお、登熟期間の日射量を固定すると出穂期の葉色値と総タンパク質含有率との偏相関係数は $0.504 \sim 0.803^*$ であり、一部5%水準で有意な正の相関関係が認められた(図表省略)。これらのことから、作期が異なる条件では、登熟期間の日射量と出穂期の窒素栄養状態の双方が米粒の総タンパク質含有率に影響を及ぼしたと推察された。

## 3) タンパク質の米粒内分布

これまでに、タンパク質変異米水稻品種の米粒内におけるタンパク質の分布に関しては、Furukawaら<sup>6)</sup>の低グルテリン米水稻品種を対象として蛍光顕微鏡観察を行った知見があるのみであった。また、Furukawaら<sup>6)</sup>の報告は、抗体反応を利用して米粒内のプロラミンとグルテリンの分布を一般食用水稻品種も含めて初めて可視化した点で極めて貴重であるが、米粒切片の作成が困難であったことから、米粒の全体像を捉えた解析はなされていなかった。一方、本研究では、新規に開発された米粒切片の作成手法<sup>72)</sup>を用いることで、米粒の全体像を捉えた上でプロラミンとグルテリンの分布を可視化することができた。また、低グルテリン米水稻品種だけでなく低グルテリン・26kDaグロブリン欠失米水稻品種について、画像解析を加えることで定量的にタンパク質の局在を明らかにすることができた。

本研究から、一般食用水稻品種と比較してタンパク質変異米水稻品種の方がプロラミンとグルテリンは米粒の背側において外層部に局在する傾向のあることが示された。また、タンパク質変異米水稻品種は一般食用水稻品種と異なり、プロラミンが背側よりも腹側に相対的に多く分布する特性が示された。このプロラミンの分布特性の品種間差については、背側あるいは腹側を研削した米粒のSDS-PAGE分析

第21表 出穂期の葉色値を固定した条件における登熟期間の日射量と精玄米の総タンパク質含有率との偏相関係数

品種	偏相関係数
ニホンマサリ	$-0.757^* \sim -0.608$
LGCソフト	$-0.724^* \sim -0.701^*$
エルジーシー潤	$-0.503 \sim -0.463$

出穂期の葉色値は止葉と第2葉の両者に関するデータを用いて解析した。日射量は出穂後0~30日の数値を用いた。\*は5%水準で有意であることを示す。

の結果からも追認された。こうしたタンパク質の分布が明らかになることにより、後述する搗精技術によって、用途に応じて米粒からタンパク質を除去することが可能になると考えられる。

搗精した米粒のSDS-PAGE分析に基づく米粒内のタンパク質の分布の解析から、総じていずれのタンパク質画分も外層に多く分布し内層ほど少ないが、57kDa超過タンパク質と57kDaタンパク質および「エルジーシー活」の37-39kDaグルテリン $\alpha$ は100～>90%層に最も多く存在し、それ以外のタンパク質画分は90～>80%層に最も多く存在したことから、タンパク質の種類によって局在に差違のあることが明らかになった。また、タンパク質画分によっては、タンパク質変異米水稲品種と一般食用水稲品種「ニホンマサリ」とで分布が異なる場合があることも明らかになった。

本研究で得られたこれらの新規知見は、タンパク質の種類によって蓄積時期が異なること<sup>82)</sup>、および、登熟過程におけるタンパク質組成の経時変化がタンパク質変異米水稲品種と一般食用水稲品種とで異なる<sup>57)</sup>ことと関連する可能性がある。登熟過程における米粒内の空間的な貯蔵タンパク質の遺伝子発現は未解明であり、米粒内のタンパク質蓄積メカニズムを解明する上で今後検討が必要である。

## 2 タンパク質含有率およびタンパク質組成の耕種的な制御技術と収穫後調製技術に係る考察

### 1) 移植時期と窒素施用法

本研究の圃場試験は広島県福山市で実施したことから、供試した品種は温暖地向けであることから、温暖地で一般食用水稲品種およびタンパク質変異米水稲品種を栽培することを前提として論じたい。炊飯米の食味向上および酒造適性の向上を目的とした場合、米粒の総タンパク質含有率は過度に高くないことが望ましい。移植時期を6月下旬に遅らせると、登熟期間の日射量が低下し、窒素施用量が同一の場合は出穂期の稲体窒素栄養条件が高まることで、米粒の総タンパク質含有率は高まる傾向にあった。また、遅い時期の移植では収量が低下しやすかった。一方、4月下旬や5月上中旬の移植では総タンパク質含有率は抑制しやすかったが、高温障害によって玄米の外観品質の低下を引き起こし始める登熟気温

とされる日平均気温26～27℃<sup>52)</sup>を上回る傾向にあった。高温障害を受けると、米粒内のデンプン顆粒が十分に形成されないことによる背白米の増加にともなう炊飯米の食味への悪影響<sup>92)</sup>、胴割れ米の増加<sup>53)</sup>による搗精時の碎米の増加につながる。これらのことから、4月下旬や5月上中旬の移植は避け、6月中旬頃までの過度に遅くならない時期に移植時期を設定することが望ましいと考えられた。

従来の多くの知見と同様に、本研究においても窒素施用量は少ない方が米粒の総タンパク質含有率は低かった。また、一般食用水稲品種の施肥体系では、穂肥を幼穂形成期に施用することが一般的である。しかし、本研究結果から、「ニホンマサリ」のような短程の一般食用水稲品種および本研究で供試した耐倒伏性に優れるタンパク質変異米水稲品種では、幼穂形成期よりも10日ほど早い穂首分化期の窒素追肥を行い、それ以降の追肥を行わないことで、幼穂形成期の追肥並みの収量を確保しながら、米粒の総タンパク質含有率を低減できることが示唆された。従来、穂首分化期の追肥は稈の下位節間を著しく伸長させて倒伏を助長するとともに、上位の葉身を伸長させて下垂させることで受光体勢を悪化させ、登熟歩合の低下および収量の低下を引き起こすとされてきた<sup>50)</sup>。しかし、本研究で供試した一般食用水稲品種「ニホンマサリ」およびタンパク質変異米水稲品種では、穂首分化期の窒素追肥を行ってもこうした悪影響は認められなかった。これは、供試した品種が、いずれも短程で葉身が直立しやすい性質を持つためと考えられた。

米粒の総タンパク質に占めるPB-Iやプロラミンの割合は低い方が、炊飯米の食味は優れ<sup>7, 41)</sup>、酒造適性も良好である<sup>7, 32)</sup>ことを示唆する報告がある。本研究から、PB-Iやプロラミンの割合を耕種的に低下させるためには、窒素施用量を抑制すること、登熟初期の気温を高める移植時期の設定が有効であることが示された。前述したように、窒素施用量を抑制することは米粒の総タンパク質含有率の抑制にもつながることから、タンパク質組成も含めた成分品質の向上という点で妥当な栽培方法と考えられた。一方、登熟気温に関しては、前述したように高温障害が生じると、炊飯米の食味の低下<sup>92)</sup>、胴割れ米の増加<sup>53)</sup>による搗精時の碎米の増加を助長し、



食味の面からも酒造の面からも好ましくないと考えられる。したがって、本研究で供試した品種と同等の早晩性の品種の場合、温暖地では登熟初期が著しく高温になる4月下旬や5月上中旬の移植時期は避け、なおかつ過度に移植時期が遅くならないことが望ましいと考えられた。

このほかに、登熟気温は、炊飯米の食味や酒造適性と関係するアミロース含有率にも影響を及ぼす<sup>46, 64, 65, 85, 87</sup>。さらに、本研究では、1次枝梗に着生した千粒重が大きく充実の良い玄米の方が2次枝梗に着生した玄米よりもPB-I割合が高いことが明らかになった。1次枝梗に着生した玄米の方が2次枝梗に着生した玄米よりも食味は優れることが知られている<sup>44</sup>。本研究では、食味試験を実施していないことから、耕種的にタンパク質組成を変動させた場合の炊飯米の食味については、アミロース含有率や総タンパク質含有率、玄米の外観品質が一定の条件を設定するなど、なお一層の検討を要する。

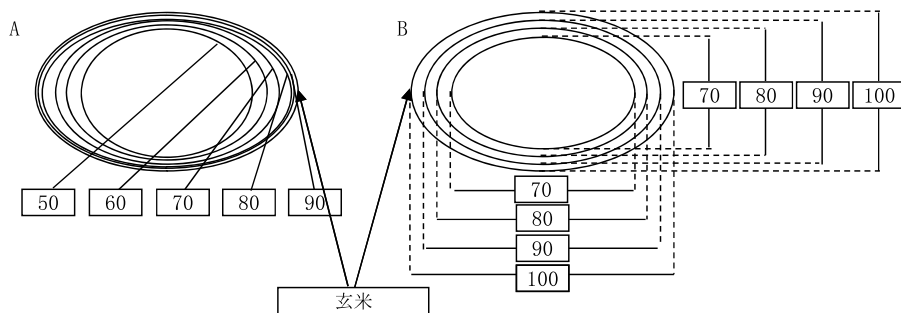
## 2) 搗精

通常、一般食用水稲品種を用いた主食用の米飯には外層約10%を取り除いた搗精歩合90%程度の白米が用いられている。一方、搗精に基づく米粒内のタンパク質分布の解析の結果から、13kDaプロラミンあるいはPB-Iは90~>80%層に最も多く分布していることが明らかになった。筆者は予備的な官能食味試験により、「LGCソフト」の搗精歩合80%の白米は、搗精歩合90%の白米よりも食味が優れることを示すデータを得ている。今後は、さまざまな品種について、搗精歩合80%と90%の白米の食味

を比較することにより、さらなる良食味米の可能性について検討する余地があると考えられた。

高度搗精では、本研究でも用いた普通精米が一般的である<sup>70</sup>ことから、普通精米で得られたサンプルの分析結果は、玄米から特定のタンパク質を除去する搗精歩合を考察する上で実用に即したものである。しかし、普通搗精では米粒の頂端側と基部側が背側と腹側に比較して多く削られる(第8図)。蛍光顕微鏡観察の結果から、13kDaプロラミンは、米粒の頂端側において玄米表面から相対距離20~30の位置に多く分布しており、背側では玄米表面から相対距離20~40、腹側では玄米表面から相対距離20の位置に多く分布し、内層部では少なかった(第6図)。このことから、仮に13kDaプロラミンの除去を目的に普通精米して、頂端側が背側と腹側に比較して多く削られた場合、頂端側内層部の13kDaプロラミンの含有量が少ない部位も多く削られることになり、歩留まりの悪化につながる。玄米の形状を極力保ったまま搗精する手法としては原形精米と扁平精米<sup>70, 71</sup>がある。これらの手法は、歩留まりを極力低下させずに、玄米から13kDaプロラミンなど特定のタンパク質を除去する上で有効な手段になり得ると考えられた。

本研究により一般食用水稲品種およびタンパク質変異米水稲品種の米粒内の各種タンパク質の分布が明らかになり、搗精歩合を高めるほど白米の各種タンパク質含有率は低下したことから、米粒内の特定のタンパク質含有率が何らかの栽培要因で高まっても、高度に搗精することで、用途に応じてタンパク質を除去することが可能と考えられた。ただし、高



第8図 搗精にともなう米粒形状の変化

(A) はⅣ-1で搗精歩合を変えて得られた米粒を用いて実測値に基づいた形状を示し、数値は玄米を100とした重量%を示す。(B)は玄米の形状を保ったまま削られることを想定した理論値に基づく米粒の形状を示し、数値は玄米の横あるいは縦の長さを100とした距離%を示す。

度搗精にかかるコストおよび歩留まりの点から、前述した窒素施用条件と移植時期に留意して栽培することで、あらかじめ目的とするタンパク質の含有率が低い米を生産することが重要と考えられた。

## 摘 要

一般食用水稲品種および一般食用水稲品種とは米粒内のタンパク質組成が遺伝的に異なるタンパク質変異米水稲品種を用いて、登熟気温、作期および窒素施用条件といった栽培・環境条件が米粒内のタンパク質組成に及ぼす影響をSDS-PAGE分析に基づいて定量的に検討するとともに、米粒内の総タンパク質含有率についても調査して、タンパク質組成および総タンパク質含有率の変動要因を解析した。また、米粒内の各種タンパク質の分布を、搗精した米粒のSDS-PAGE分析および蛍光標識抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡観察と画像解析によって調査した。以下、研究成果を要約する。

### 1 作期が米粒のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響

穂ばらみ期以降、人工的に気温を24.0℃、28.0℃および30.6℃に制御したポット試験では、登熟温度が高いほど米粒内の総タンパクに占めるPB-I（10～13kDaプロラミンの合計）割合、特に13kDaプロラミンの割合が低下し、グロブリンを除くPB-I以外のタンパク質画分の割合は高まった。また、登熟温度がPB-I割合に及ぼす影響の程度は低グルテリン米水稲品種「LGCソフト」の方が一般食用水稲品種「ニホンマサリ」よりも大きかった。「ニホンマサリ」、「LGCソフト」ともに、千粒重の大きい1次枝梗粒の方が2次枝梗粒よりもPB-I割合が高い特徴を持つが、登熟温度がタンパク質組成に及ぼす影響は、穂上の着生位置によって異ならなかった。上記2品種に加え、低グルテリン・26kDaグロブリン欠失米水稲品種「エルジーシー潤」を供試して複数年実施した作期移動試験では、3品種ともに出穂後15日間の平均気温とPB-I割合が負の相関関係を示し、上述の人工的に気温を制御した試験による知見が確

認された。作期を違えた場合の窒素栄養状態や稈長などの生育特性と米粒のタンパク質組成とは関連が低いと考えられた。「ニホンマサリ」では、収量構成要素の中で、千粒重とPB-I割合とが正の相関関係を示した。複数年の作期移動試験に基づくと、登熟気温と総タンパク質含有率との間に相関関係は認められなかったが、同一年次では、移植時期を遅らせて登熟気温が低い条件で総タンパク質含有率は高まる傾向にあった。

### 2 窒素施用条件が米粒のタンパク質組成およびタンパク質含有率に及ぼす影響

「ニホンマサリ」、「LGCソフト」および「エルジーシー潤」を供試して窒素施用量と窒素追肥時期の影響を検討した。窒素施用量を高めて総タンパク質含有率が高まる条件でPB-I割合はわずかに高くなることが示唆された。「ニホンマサリ」と「エルジーシー潤」では千粒重とPB-I割合とが正の相関関係を示した。「ニホンマサリ」と同様に、タンパク質変異米水稲品種でも窒素施用量が多い条件および窒素追肥時期が遅い条件で出穂期の稲体の窒素栄養状態が高まり、それにもなって総タンパク質含有率は高まる傾向にあった。窒素追肥時期を慣行の幼穂形成期よりも約10日早い穂首分化期とすることにより、収量は慣行と同等ながら、総タンパク質含有率は抑制される傾向のあることが明らかになった。

### 3 種子貯蔵タンパク質の米粒内の分布特性

「ニホンマサリ」、「LGCソフト」に加え、低グルテリン米水稲品種「エルジーシー1」、低グルテリン・26kDaグロブリン欠失米水稲品種「エルジーシー活」について搗精歩合がさまざま異なる米粒を作出し、それらのSDS-PAGE分析を行って米粒内の層別のタンパク質分布を検討した。総じていずれのタンパク質画分も米粒の外層に多く分布し内層ほど少なかった。ただし、57kDa超過タンパク質と57kDaタンパク質および「エルジーシー活」の37-39kDaグルテリン $\alpha$ は100～>90%層に最も多く存在し、

それ以外のタンパク質画分は90～80%層に最も多く存在し、タンパク質の種類によって局在に差違のあることが明らかになった。また、タンパク質画分によっては、タンパク質変異米水稲品種と一般食用水稲品種「ニホンマサリ」とで分布が異なる場合があることも明らかになった。種子貯蔵タンパク質の米粒内の分布特性をより直接的に明らかにするために、13kDaプロラミンと23kDaグルテリンの蛍光標識抗体を用いてそれぞれの分布を解析した。搗精歩合の異なる米粒のSDS-PAGE分析に基づく結果と同様に、両タンパク質は米粒の外層部に多く存在した。米粒の背側では、13kDaプロラミンと23kDaグルテリンは「ニホンマサリ」と比較してタンパク質変異米水稲品種の方がより外層部に局在する傾向のあることが示された。また、タンパク質変異米水稲品種は「ニホンマサリ」と異なり、13kDaプロラミンが背側よりも腹側に相対的に多く分布する特性が示された。この13kDaプロラミンの分布特性の品種間差については、背側あるいは腹側を研削した米粒のSDS-PAGE分析の結果からも確認された。

#### 4 総合考察

年次・作期が異なる条件において、米粒の総タンパク質含有率に大きく影響を及ぼすのは、登熟気温よりも登熟期間の日射量と出穂期の窒素栄養状態と推察された。炊飯米の食味や酒造適性を考慮して、温暖地において米粒内の総タンパク質含有率およびPB-I割合を抑制するためには、窒素施用量を抑制した上で、登熟期の高温障害を助長する4月下旬や5月上中旬の移植は避け、登熟期の日射量の低下と稲体の高窒素栄養状態を引き起こさないように6月中旬頃までの過度に遅くならない移植時期を設定することが望ましいと考えられた。本研究により一般食用水稲品種およびタンパク質変異米水稲品種の米粒内の各種タンパク質分布が明らかになり、搗精歩合を高めることで用途に応じて特定のタンパク質を米粒から除去できる可能性が示された。

#### 謝 辞

本研究の取りまとめにあたっては、京都大学大学院農学研究科白岩立彦教授に懇切丁寧なご指導を賜りました。また、田中朋之准教授にデータおよびその解釈の信憑性についてご検討いただきました。近畿中国四国農業研究センターにおいて実施した試験および結果の取りまとめにあたっては、佐々木良治博士に常に温かいご指導、激励、ご協力をいただきました。飯田修一博士には、タンパク質変異米水稲品種の種子を提供していただくとともに、研究開始当初よりタンパク質組成の分析方法、結果の取りまとめについて貴重なご指導ご助言をいただきました。竹田博之氏には、研究を遂行する上で多大なご協力をいただきました。京都府立大学大学院生命環境科学研究科増村威宏博士には、研究の遂行や結果の取りまとめにあたって貴重なご指導ご助言をいただきました。また、斎藤雄飛博士、中塚信明氏、重光隆成氏には米粒内のタンパク質の蛍光顕微鏡観察においてご協力をいただきました。労の多い圃場試験では、近畿中国四国農業研究センターの小畑義宏氏、後藤昭仁氏、藤井良之氏、山下大朗氏ならびに業務第1科の諸氏に多大なご協力をいただきました。農業形質の調査や実験材料の調製、米粒のタンパク質の分析では、近畿中国四国農業研究センターの松浦和子氏、赤木富貴子氏にご協力をいただきました。本研究の一部は農林水産省委託プロ（『新鮮でおいしい「ブランド・ニッポン」農産物提供のための総合研究』）の研究予算で実施しました。記して厚く感謝を申し上げます。

#### 引用文献

- 1) 荒井邦夫・河野恭広 1979. 水稲の穂の発育に関する研究第2報 穂上位置別穎果の窒素集積パターンに及ぼす出穂期窒素追肥の影響. 日作紀48: 335-342.
- 2) 辺 嘉賓・多田宏樹・劉 建・塩津文隆・諸隈正裕・豊田正範・楠谷彰人 2006. 水稲における収量および食味特性の日中品種間比較. 日作四国支報43: 13-22.

- 3) 陳 錦清・武田元吉・松崎昭夫 1989. 電気泳動によるイネ粒タンパク質の品種間差異Ⅱ. 育雑39 (別1) : 448 - 449.
- 4) Del Rosario, A. R., V. P. Briones, A. J. Vidal and B. O. Juliano 1968. Composition and endosperm structure of developing and mature rice kernel. *Cereal Chem.* 45: 225 - 235.
- 5) 福田あかり・吉永悟志・長田健二・白土宏之 2006. 玄米タンパク質の組成割合と施肥, 気象条件との関係解析. 日作東北支部会報49 : 7 - 8.
- 6) Furukawa, S., T. Mizuma, Y. Kiyokawa, T. Masumura, K. Tanaka and Y. Wakai 2003. Distribution of storage proteins in low-glutelin rice seed determined using a fluorescent antibody. *J. Biosci. Bioeng.* 96: 467 - 473.
- 7) ———, K. Tanaka, T. Masumura, Y. Ogihara, Y. Kiyokawa and Y. Wakai 2006. Influence of rice proteins on eating quality of cooked rice and on aroma and flavor of sake. *Cereal Chem.* 83: 439 - 446.
- 8) 東 正昭・櫛淵欽也・伊藤隆二 1974. 高蛋白米品種の育種に関する基礎的研究Ⅰ 玄米蛋白含有率の品種間差異および諸形質とくに収量との関係について. 育雑24 : 88 - 96.
- 9) 平野泰志 2003. 米貯蔵タンパク質のペプシン分解特性. 埼玉農総研研報3 : 13 - 16.
- 10) 本庄一雄・檀淵晴三郎・平野 貢 1966. 栄養的優良米の生産に関する研究—尿素の葉面撒布が水稲の収量並に玄米, 藁の窒素含有率に及ぼす影響—. 日作東北支部報8 : 23 - 25.
- 11) ——— 1971 a. 米のタンパク含量に関する研究第1報 タンパク質含有率の品種間差異ならびにタンパク質含有率に及ぼす気象環境の影響. 日作紀40 : 183 - 189.
- 12) ——— 1971 b. 米のタンパク含量に関する研究第2報 施肥条件のちがいが玄米のタンパク質含有率およびタンパク質総量に及ぼす影響. 日作紀40 : 190 - 196.
- 13) 星川清親 1968. 米の胚乳発達に関する組織形態学的研究第11報 胚乳組織における澱粉粒の蓄積と発達について. 日作紀37 : 207 - 216.
- 14) ——— 1970. 米の胚乳発達に関する組織形態学的研究第12報 蛋白顆粒の形態とその発達について. 日作紀39 : 295 - 300.
- 15) Hoshikawa, K. 1989. *The growing rice plant.* Nobunkyo, Tokyo. 270 - 271.
- 16) 飯田修一・塔野岡卓司・西尾 剛 1993. イネのグルテリンを減少させる突然変異遺伝子のRFLPマッピング. 育雑43 (別2) : 92.
- 17) Iida, S., E. Amano and T. Nishio 1993. A rice (*Oryza sativa* L.) mutant having a low content of glutelin and a high content of prolamine. *Theor. Appl. Genet.* 87: 374 - 378.
- 18) ———, K. Miyahara and T. Nishio 1998. Rice mutant lines lacking alpha-globulin. *Breed. Sci.* 48: 45 - 49.
- 19) 飯田修一・春原嘉弘・前田英郎・松下 景・根本 博・石井卓朗・吉田泰二・中川宣興・坂井真・西尾 剛 2004. 良食味低グルテリン米品種「LGCソフト」の育成. 近中四農研報3 : 57 - 74.
- 20) 飯塚 清・前原 宏 1998. 米のタンパク質含量と気象要因. 日作関東支報13 : 20 - 21.
- 21) 稲津 脩 2005. 高品質米 (低タンパク質米) の栽培技術. 農機誌67 : 4 - 9.
- 22) IPCC 2007. *The AR4 synthesis report: Summary for policymakers.* [http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4\\_syr\\_spm.pdf](http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4_syr_spm.pdf) 2012年1月31日閲覧.
- 23) 石間紀男・平 宏和・平 春枝・御子柴穆・吉川誠次 1974. 米の食味に及ぼす窒素施肥および精米中のタンパク質含有率の影響. 食品総合研究所研究報告29 : 9 - 15.
- 24) 伊藤隆二・櫛淵欽也・池橋 宏・中根 晃・東正昭・谷口 晋 1974. 水稲新品種「ニホンマサリ」について. 農事試験場研報21 : 79 - 91.
- 25) 岩野君夫・中沢伸重・伊藤俊彦・高橋 仁・上原泰樹・松永隆司 2001. 清酒麴の酵素活性に及ぼす原料米タンパク質組成の影響. 醸協96 : 857 - 862.
- 26) ——— . ——— . ——— . ——— . ——— .

- 2002. 並行複発酵及び製成酒成分に及ぼす原料米のタンパク質組成の影響. 醸協 97: 552 - 558.
- 27) Juliano, B.O. 1985. Polysaccharides, proteins, and lipids. "Rice: Chemistry and technology 2nd ed.". Am. Assoc. Cereal Chem. Inc., St. Paul, Mn. 59 - 174.
- 28) 川口祐男・高橋 渉・南山 恵 1995. 水稻の移植時期と外観品質, 蛋白質含有率との関係. 日作紀64 (別号2): 49 - 50.
- 29) Kawamoto, T. and M. Shimizu 2000. A method for preparing 2- to 50- $\mu$ m-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochem. Cell Biol.* 113: 331 - 339.
- 30) 木戸三夫・梁取昭三 1965. 米粒蛋白質集積過程の組織化学的研究. 日作紀34: 204 - 209.
- 31) ——・—— 1968. 栽培条件が米質, 特に米粒の蛋白質含有量に及ぼす影響に関する研究. 日作紀37: 32 - 36.
- 32) 木崎康造・小原 昭・逸見彰則・荒巻 功・小林信也・岡崎直人 1993. 酒造原料米のプロテインボディの品種間差. 醸協88: 326 - 331.
- 33) 小出俊則・伊藤和久・高松美智則 1995. 酒造米「若水」の品質安定に関する研究 (第1報) 移植時期, 施肥法の影響. 愛知農総試研報27: 41 - 48.
- 34) 今野 周・一戸每子・山下 亨・梅津敏彦・芳賀静雄・栗野省三・武田正宏 1994. 水稻品種「はえぬき」「どまんなか」の栽培技術の確立第2報 品質及び食味評価に及ぼす単位面積当たり籾数と登熟期間の気温の影響. 山形県立農試研報28: 21 - 38.
- 35) Krishnan, S., G. A. I. Ebeneze and P. Dayanandan 2001. Histochemical localization of storage components in caryopsis of rice (*Oryza sativa* L.). *Current Sci.* 80: 567 - 571.
- 36) Kusaba, M., K. Miyahara, S. Iida, H. Fukuoka, T. Takano, H. Sassa, M. Nishimura and T. Nishio 2003. Low glutelin content1: A dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. *The Plant Cell* 15: 1455 - 1467.
- 37) 楠田 宰 1995. 水稻の収量及び収量構成要素の調査方法について. 植調29: 138 - 143.
- 38) 楠谷彰人・浅沼興一郎・木暮 秩・関 学・平田壮太郎・柳原哲司 1992. 暖地における早期栽培水稻品種キヌヒカリの収量および食味. 日作紀61: 603 - 609.
- 39) 前重道雅 1981. 米の食味関与要因の変動に関する研究第3報 玄米タンパク質含量におよぼす登熟気温の影響. 広島農試報告44: 39 - 44.
- 40) 増村威宏・田中國介 2007. コメの品質, 食味向上のための窒素管理技術3 イネ種子タンパク質の合成・集積と米粒内分布に関する分子機構. 農及園82: 43 - 48.
- 41) 益重 博・平井信行・増村威宏・田中國介 1995. イネ種子プロテインボディの含量と米の食味との相関性. 日本農芸化学会誌69 (臨時増刊): 155.
- 42) 松江勇次・水田一枝・古野久美・吉田智彦 1991. 北部九州産米の食味に関する研究第3報 移植時期, 倒伏の時期が米の食味および理化学的特性に及ぼす影響. 日作紀60: 490 - 496.
- 43) ——・古野久美・吉田智彦 1992. 北部九州産米の食味に関する研究第1報 登熟中期以降の遮光処理が米の食味および理化学的特性に及ぼす影響. 日作紀61: 218 - 222.
- 44) Matsue, Y., K. Odahara and M. Hiramatsu 1994. Differences in protein content, amylose content and palatability in relation to location of grains within rice panicle. *Jpn. J. Crop Sci.* 63: 271 - 277.
- 45) 松江勇次・尾形武文 1999. 栽培条件が穂上位置別の米粒のタンパク質含有率に与える影響. 日作紀68: 370 - 374.
- 46) ——・佐藤大和・内村要介・尾形武文 2002. 低アミロース米品種における登熟温度が精米のアミロース含有率および玄米の白濁に及ぼす影響. 日作紀71: 463 - 468.
- 47) ——・尾形武文・佐藤大和・浜地勇次 2003. 登熟期間中の気温と米の食味および理化学的特性との関係. 日作紀72 (別1): 272 - 273.
- 48) 松本 和・岡崎正一 1971. 米粒の組織化学的

- 研究 (第1報) 米粒及び炊飯粒のたんぱく質、脂質の分布について. 高知学園短期大学紀要 2: 35 - 40.
- 49) ———・山本文子・岡崎正一 1977. 米粒の組織化学的研究 (第3報) 品種によるたんぱく質の分布. 高知学園短期大学紀要 8: 37 - 41.
- 50) 松島省三 1973. 稲作の改善と技術. 養賢堂 東京.
- 51) 文部科学省 2005. 五訂増補日本食品標準成分表.  
[http://www.mext.go.jp/b\\_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031802.htm](http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031802.htm). 2012年1月31日閲覧.
- 52) 森田 敏 2008. イネの高温登熟障害の克服に向けて. 日作紀 77: 1 - 12.
- 53) 長田健二 2006. 高温登熟と米の胴割れ. 農及園 81: 797 - 801.
- 54) 長戸一雄・江幡守衛・石川雅士 1972. 米粒の蛋白質含量に関する研究. 日作紀 41: 472 - 479.
- 55) 西村 実 2002. 腎臓病患者への低グルテリン米の適用. 育種学研究 4 (別2): 28 - 31.
- 56) Nishimura, M., M. Kusaba, K. Miyahara, T. Nishio, S. Iida, T. Imbe and H. Sato 2005. New rice varieties with low levels of easy-to-digest protein, 'LGC-Katsu' and 'LGC-Jun'. *Breed. Sci.* 55: 103 - 105.
- 57) 西村 実・宮原研三・森田竜平 2007. 水稲の種子貯蔵タンパク質変異系統におけるタンパク質組成およびその集積過程に及ぼす施肥法の影響. 日作紀 76: 562 - 568.
- 58) 西尾 剛 1996. イネ育種マニュアル. 養賢堂 東京. 50 - 53.
- 59) Ogawa, M., T. Kumamaru, H. Satoh, N. Iwata, T. Omura, Z. Kasai and K. Tnaka 1987. Purification of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition. *Plant Cell Physiol.* 28: 1517 - 1527.
- 60) 大平陽一・竹田博之・佐々木良治 2009. タンパク質変異米水稲品種の米粒内における種子貯蔵タンパク質の分布. 日作紀 78 (1): 58 - 65.
- 61) Ohdaira, Y., H. Takeda and R. Sasaki 2010. Effects of Temperature on the Digestible Protein Content of Grains during Ripening in a Seed-protein Mutant Rice Cultivar LGCsoft. *Plant Prod. Sci.* 13 (2): 132 - 140.
- 62) ———, T. Masumura, N. Nakatsuka, T. Shigemitsu, Y. Saito and R. Sasaki 2011. Analysis of Storage Protein Distribution in Rice Grain of Seed-Protein Mutant Cultivars by Immunofluorescence Microscopy. *Plant Prod. Sci.* 14 (3): 219 - 228.
- 63) 大平陽一・竹田博之・佐々木良治 2013. 作期が異なる圃場栽培条件におけるタンパク質変異米水稲品種の米粒のタンパク質組成とタンパク質含有率の変動要因. 日作紀 82 (1): 18 - 27.
- 64) 奥田将生・橋爪克己・沼田美子代・上用みどり・後藤奈美・三上重明 2009. 気象データと原料米の酒造適性との関係. 醸協 104: 699 - 711.
- 65) 大友孝憲・吉田茂敏・白石真貴夫・斉藤清男 1992. 水稲の登熟気温が米の窒素, アミロース含有率および食味に与える影響. 日作九支報 59: 38 - 40.
- 66) 折谷隆志・葭田隆二 1984. 作物の窒素代謝に関する研究第18報 水稲の葉面生長, 蛋白質合成及びsink形成における追肥窒素の利用に関する研究. 日作紀 53: 204 - 212.
- 67) Osborn, T. B. 1924. *The vegetable protein. Longmans Green & Co., New York.* P.154
- 68) 太田和也・小山 豊・在原克之 2010. 温暖地早期栽培における水稲品種「ひとめぼれ」の窒素施用条件並びに栽植密度が籾数及び登熟歩合に及ぼす影響—玄米品質低下要因の解明—. 日作紀 79: 213 - 220.
- 69) 尾崎 清 1949. 水稲の窒素代謝に関する研究. 1 出穂開始期以降の窒素の供給が玄米の蛋白質の種類及びその含量に及ぼす影響について. 土肥誌 20: 31 - 36.
- 70) 斎藤富男 1993. 酒造用白米の形状と精米効率. 醸協 88: 170 - 177.
- 71) ———・手塚信也・近藤 修・岡田光司・坂本恭輝・久保克朗・杉山隆一・栗林直章・吉井忠 1994. 偏平精米を用いた清酒醸造試験. 醸

- 協89：489 - 491.
- 72) Saito, Y., N. Nakatsuka, T. Shigemitsu, K. Tanaka, S. Morita, S. Satoh and T. Masumura 2008. Thin frozen film method for visualization of storage proteins in mature rice grains. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 2779 - 2781.
- 73) Sarker, S. C., M. Ogawa, M. Takahashi and K. Asada 1986. The Processing of a 57-Da precursor peptide to subunits of rice glutelin. *Plant Cell Physiol.* 27: 1579 - 1586.
- 74) 徐 錫元・茶村修吾 1980. 玄米の蛋白質・燐・カリウム含有率の品質間差異, およびそれらに及ぼす登熟期間の気温としゃ光の影響. *日作紀* 49: 199 - 204.
- 75) 静川幸明・大橋善之・増村威宏・田中國介 2002. 酒造好適米および主食用米の玄米中貯蔵タンパク質顆粒 (Protein Body) を構成するプロラミン, グルテリン, グロブリンの含有量とその分布. *日作紀* 71 (別1): 224 - 225.
- 76) 多田宏樹・劉 建・辺 嘉賓・塩津文隆・諸隈正裕・豊田正範・楠谷彰人 2006. 水稲における日中品種間交雑による後代系統の収量及び食味特性. *日作四国支報* 43: 23 - 33.
- 77) 平 宏和・松島省三・松崎昭夫 1970. 水稲収量の成立原理とその応用に関する作物学的研究 第92報 窒素施肥による米の蛋白質の収量およびその栄養価増大の可能性の栽培試験. *日作紀* 39: 33 - 40.
- 78) 高橋 誠・本間紀之・諸橋敬子・中村幸一・鈴木保宏 2009. 米の品種特性が米粉パン品質に及ぼす影響. *食科工誌* 56: 394 - 402.
- 79) Tamaki, M., M. Ebata, T. Tashiro and M. Ishikawa 1989. Physico-ecological studies on quality formation of rice kernel I. Effects of nitrogen top-dressed at full heading time and air temperature during ripening period on quality of rice kernel. *Jpn. J. Crop Sci.* 58: 653 - 658.
- 80) 田中國介・増村威宏 1988. イネ種実におけるタンパク質の集積機構. *化学と生物* 26: 543 - 550.
- 81) Tanaka, K., T. Sugimoto, M. Ogawa and Z. Kasai 1980. Isolation and characterization of two types of protein bodies in the rice endosperm. *Agric. Biol. Chem.* 44: 1633 - 1639.
- 82) ———, Z. Kasai and M. Ogawa 1995. Accumulation of reserve substances and formation of subcellular organelles. In T. Matsuo, K. Kumazawa, R. Ishii, K. Ishihara and H. Hirata eds., *Science of the rice plant, Physiology. Food and agriculture policy research center, Tokyo.* 100 - 116.
- 83) 田中朋之・山口武視・中野淳一 2005. イネ穂培養法による高温・多窒素処理が玄米品質に及ぼす影響評価第二報: タンパク質組成の解析. *日作紀* 74 (別1): 66 - 67.
- 84) Tanaka, Y., S. Hayashida and M. Hongo 1975. The relationship of the feces protein particles to rice protein bodies. *Agric. Biol. Chem.* 39: 515 - 518.
- 85) 丹野 久・本間 昭・宗形信也・吉村 徹・平山裕治・前川利彦・沼尾吉則・尾崎洋人・荒木和哉・菅原 彰 2010. 北海道産うるち米の精米蛋白質含有率とアミロース含有率における年次間および地域間差異と生育特性との関係. *日作紀* 79: 440 - 449.
- 86) 建部雅子・及川 勉・松野宏治・清水恵美子・米山忠克 1996. 水稲白米のグルテリンおよびプロラミン含有率に対する窒素栄養条件の影響. *土肥誌* 67: 139 - 146.
- 87) 館山元春・須藤 充・神田伸一郎・坂本聖子・坂井 真 2003. 水稲低アミロース品種の環境による食味の変動第3報 登熟気温の違いによるアミロース含有率変動の品種間差異. *日作東北支報* 46: 53 - 55.
- 88) 内村要介・尾形武文・佐藤大和・松江勇次 2000. 水稲湛水直播栽培におけるケイ酸施用が倒伏, 収量, 食味および精米の理化学的特性に及ぼす影響. *日作紀* 69: 487 - 492.
- 89) 上田一好・楠谷彰人・浅沼興一郎・一井眞比古 1998. 香川県における水稲品種キヌヒカリの移植時期に関する研究—収量および食味と気象要因との関係—. *日作紀* 67: 289 - 296.
- 90) 上原泰樹・小林 陽・太田久稔・清水博之・福井清美・三浦清之・大槻 寛・小牧有三・笹原

- 英樹 2002. 水稲新品種「春陽」の育成. 中央農研研報 1 : 1 - 21.
- 91) 若松謙一・田中明男・上蘭一郎・佐々木修 2006. 水稲の暖地早期栽培における登熟期間の遮光処理が収量, 品質, 食味に及ぼす影響. 日作九支報 72 : 19 - 21.
- 92) —— 2010. 暖地水稲の登熟期間の高温が玄米外観品質に及ぼす影響. 鹿児島農総セ研報 (耕種) 4 : 9 - 125.
- 93) Yamagata, H., T. Sugimoto, K. Tanaka and Z. Kasai 1982. Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. *Plant Physiol.* 70: 1094 - 1100.
- 94) Yamakawa, H., T. Hirose, M. Kuroda and T. Yamaguchi 2007. Comprehensive expression profiling of rice grain filling-related genes under high temperature using DNA microarray. *Plant Physiol.* 144: 258 - 277.
- 95) 山下鏡一・藤本堯夫 1974. 肥料と米の品質に関する研究 4 窒素肥料による精米のタンパク質の変化と食味との関係. 東北農試研報 48 : 91 - 96.
- 96) 梁取昭三 1975. 米粒構成物質の集積過程よりみた米質に関する研究. 新大農紀要 13 : 67 - 134.
- 97) Yupsnanis, T., M. Moustakas and S. Karakoli 1992. Seed protein electrophoresis for varietal identification in rice (*Oryza sativa* L.) *J. Agronomy Crop Sci.* 168: 95 - 99.



## Analyses on Composition, Content and Distribution of Seed Storage Proteins in Rice Grain

Yoichi ODAIRA<sup>1</sup>

### Summary

Effects of temperatures during the ripening period, cropping seasons and nitrogen application conditions on seed protein composition in rice grains were analyzed quantitatively based on the SDS-PAGE technique using a normal-type rice cultivar and seed-protein mutant rice cultivars (SPMC) which have different genetic characteristics of protein composition in rice from normal-type rice cultivars. Also, the effects of the cultivation and environmental conditions on total protein contents (TP) in rice grains were investigated and factors affecting protein compositions and contents were analyzed. In addition, characteristics of the protein distribution in rice grains were analyzed by SDS-PAGE analysis of rice grains which had different milling percentages and immunofluorescence microscopic analysis.

A normal cultivar 'Nihonmasari' and a low-glutelin cultivar 'LGCsoft' were grown under a natural condition until the booting stage, and then in temperature-controlled greenhouses set at 24.0°C, 28.0°C, and 30.6°C (mean temperature). The ratio of the PB-I (sum of 10~13 kDa prolamin) to total protein (PB-I/TP) was lower and the ratio of another protein fraction excepting 26 kDa globulin was higher in high-temperature conditions in both cultivars. Also, the effect of temperature on PB-I/TP was larger in 'LGCsoft' than in 'Nihonmasari'. The grain weight and PB-I/TP in the grains on the primary branches were higher than those on the secondary branches in both cultivars. The patterns of change in the protein compositions with the temperature during the ripening period were similar for the primary and the secondary branches. In field experiments of 'Nihonmasari', 'LGCsoft' and a low-glutelin 26-kDa-globulin-deficient cultivar 'LGC-Jun' over several years and cropping seasons, a negative correlation ( $r = -0.849^{**} \sim -0.773^*$ ) between PB-I/TP and air temperature from 0 to 15 days after heading was observed in all cultivars. This tendency was similar to the result of artificially controlled temperature. It was considered that there were no relations between protein compositions in rice grain to the shoot nitrogen status or growth characteristics (for example, culm length) under different cropping seasons and years. There was a positive correlation between PB-I/TP and 1000-grain weight in 'Nihonmasari'. Based on the field experiments over several years and cropping seasons, a significant correlation between TP and temperature during the ripening period was not observed. However, as limiting in the same year, TP tended to be high by delayed transplanting with lower temperature during the ripening period.

Effects of the amount of nitrogen application and the timing of nitrogen topdressing on protein composition and TP in 'Nihonmasari', 'LGCsoft' and 'LGC-Jun' were examined. PB-I/TP became higher slightly under elevated TP conditions by high amount of nitrogen application. Similar to 'Nihonmasari',

---

Lowland Crops Research Division, NARO Western Region Agricultural Research Center

<sup>1</sup> NARO Tohoku Agricultural Research Center

TP of SPMCs tended to be high under high nitrogen status of shoot at heading stage when larger application of nitrogen fertilizer and delayed nitrogen topdressing. It is considered that nitrogen topdressing at the neck node differentiation stage, which was about 10 days earlier than the panicle formation stage, enable to suppress TP compared to that at the panicle formation stage. In addition, yield was equal between the timing of nitrogen topdressing at the neck node differentiation stage and the panicle formation stage.

Distribution of seed storage proteins in rice grain of 'Nihonmasari' and three SPMCs such as 'LGCsoft', a low-glutelin cultivar 'LGC-1' and a low-glutelin 26-kDa-globulin-deficient cultivar 'LGC-Katsu' was examined by SDS-PAGE analysis using rice with different milling percentage. All of the protein fractions tended to be higher in the outer layer of rice grain. However, 37-39 kDa glutelin  $\alpha$  of 'LGC-Katsu', 57 kDa protein and 57 kDa excess protein of all cultivars were highest in the 100->90% layer, another protein fraction was highest in the 90->80% layer. It was revealed that localization patterns in rice grain were different depending on the type of protein and there were varietal differences of the protein localization. Characteristics of protein distribution in rice grain were examined directly by immunofluorescence microscopy using fluorescence-labeled antibodies of 13 kDa prolamin and 23 kDa glutelin. Abundant 13 kDa prolamin and 23 kDa glutelin was observed in the outer regions of rice grains. On the dorsal side of rice grain, 13 kDa prolamin and 23 kDa glutelin of SPMCs localized outer region than that of 'Nihonmasari'. Distribution patterns of 13 kDa prolamin of SPMCs differed from 'Nihonmasari'. A larger quantity of 13 kDa prolamin localized on the ventral than the dorsal side of rice grain in SPMCs. This result was confirmed by SDS-PAGE analysis of grains grinding the ventral side or the dorsal side.

It was suggested that the solar radiation during the ripening period and the nitrogen status in shoot at the heading stage had large effect on TP rather than the temperature during the ripening period under different cropping years and seasons. To suppress TP and PB-I/TP in rice grain considering eating quality of cooked rice and sake making properties, it is important to not adjust the excessively delayed transplanting and also adjust the planting season to avoid extremely high temperatures during the ripening period. The desirable transplanting timing is considered to be until about mid-June from late-May with the reduction of applied nitrogen amount in warm region. This study revealed characteristics of distribution of seed storage proteins in rice grain of normal-type rice cultivar and SPMCs. Therefore, these findings might be useful to remove specific seed storage proteins from rice grain by appropriate milling percentage for the various purposes.