

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ジャポニカ米由来のイネ枝作り酵素 I 型 (B E I) 及び I I b 型 (B E I I b) の遺伝子座が劣性ホモであり、遺伝的に固定されており、非遺伝子組み換え体であることを特徴とする難消化性澱粉高含有イネ変異体。

【請求項 2】

野生型に比べて、前記 B E I 及び前記 B E I I b の活性が低下していることを特徴とする請求項 1 に記載の難消化性澱粉高含有イネ変異体。

【請求項 3】

精米後のイネ種子は、難消化性澱粉の含有率が、親系統である B E I I b 欠損変異体よりも多い

ことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の難消化性澱粉高含有イネ変異体。

【請求項 4】

前記イネ種子を炊飯した場合、

すり潰さない状態の炊飯米における前記難消化性澱粉の含有率が 60 % 以上、すり潰した状態の炊飯米における前記難消化性澱粉の含有率が 20 % 以上であり、

前記イネ種子の玄米粉における前記難消化性澱粉の含有率が 32 % 以上である

ことを特徴とする請求項 3 に記載の難消化性澱粉高含有イネ変異体。

【請求項 5】

前記イネ種子の胚乳から製造される澱粉は、前記親系統である B E I I b 欠損変異体のイネ種子の胚乳から製造される澱粉と比べて、アミロペクチンの鎖長分布のうち、D P 19 以下が減少され、D P 20 以上が増加される

ことを特徴とする請求項 3 又は 4 に記載の難消化性澱粉高含有イネ変異体。

【請求項 6】

前記イネ種子の胚乳から製造される澱粉は、

前記親系統である B E I I b 欠損変異体のイネ種子の胚乳から製造される澱粉よりも、糊化ピーク温度が 7 以上高い

ことを特徴とする請求項 3 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の難消化性澱粉高含有イネ変異体。

【請求項 7】

前記イネ種子の胚乳から製造される澱粉は、算出されたアミロースの割合が 50 % 以上である

ことを特徴とする請求項 3 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の難消化性澱粉高含有イネ変異体。

【請求項 8】

前記イネ種子は、粉末化することで米粉、粥を攪拌することで米ゲルとしても利用可能である

ことを特徴とする請求項 3 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の難消化性澱粉高含有イネ変異体。

【請求項 9】

請求項 3 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の難消化性澱粉高含有イネ変異体の前記イネ種子の胚乳を粉末化することで製造された

ことを特徴とする米粉。

【請求項 10】

請求項 3 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の難消化性澱粉高含有イネ変異体の前記イネ種子の炊飯米、及び / 又は請求項 9 に記載の米粉より抽出される

ことを特徴とする難消化性澱粉。

【請求項 11】

請求項 3 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の難消化性澱粉高含有イネ変異体の前記イネ種子の粥を攪拌することで製造された

10

20

30

40

50

ことを特徴とする米ゲル。

【請求項 1 2】

請求項 3 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の難消化性澱粉高含有イネ変異体の前記イネ種子、請求項 9 に記載の米粉、請求項 10 に記載の難消化性澱粉、及び請求項 11 に記載の米ゲルのいずれか又は任意の組み合わせを含んで製造された

ことを特徴とする食品。

【請求項 1 3】

請求項 9 に記載の米粉、請求項 10 に記載の難消化性澱粉、及び請求項 11 に記載の米ゲルのいずれか又は任意の組み合わせを含む

ことを特徴とする食感改良剤。

10

【請求項 1 4】

非遺伝子組み換えの方式により、ジャポニカ米由来のイネ枝作り酵素 I 型 (B E I) 及び I I b 型 (B E I I b) の二重劣性ホモ変異体を作出させ、遺伝的に固定させる

ことを特徴とする難消化性澱粉高含有イネ変異体の作出方法。

【請求項 1 5】

前記 B E I の遺伝子の第 10 エキソンの最後の塩基がグアニンからアデニンへ変異し、前記 B E I I b の遺伝子の第 9 イントロンの最後の塩基がグアニンからアデニンに変異している一塩基置換を分子マーカーとして、前記二重劣性ホモ変異体を特定する

ことを特徴とする請求項 1 4 に記載の難消化性澱粉高含有イネ変異体の作出方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、特に難消化性澱粉 (R S) の含有率が格段に高い難消化性澱粉高含有イネ変異体、米粉、難消化性澱粉、米ゲル、食品、食感改良剤、及び難消化性澱粉高含有イネ変異体の作出方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

澱粉は不溶性であり、植物に特有の貯蔵多糖である。また、地球上のほとんどの生物が炭水化物源として、澱粉を利用している。

化学物質としての澱粉は、グルコースの 1, 4 による直鎖及び 1, 6 グルコシド結合による枝分かれ構造を含むグルコースポリマーである。

30

また、澱粉は、主として直鎖からなるアミロースと枝分かれ構造をもつアミロペクチンの高分子の集合体もある。

【0 0 0 3】

澱粉の生合成には、少なくとも 4 種類の酵素が関与していることが分かっている。この 4 種類の酵素は、基質供給酵素である A D P グルコースピロホスホリラーゼ (A G P a s e) 、 1, 4 グルコシド結合を伸長するスターチシンターゼ (S S) 、 1, 6 グルコシド結合からなる枝分かれ構造を形成する枝作り酵素 (B E) 、アミロペクチンの特徴であるクラスター構造を維持するために B E が付加した不適切な位置の枝分かれ構造をトリミングする枝切り酵素 (D B E) である。このように、植物の澱粉生合成には少なくとも 4 種類の酵素が関与している。なお、澱粉生合成に関与する酵素は、他にもあると考えられている（非特許文献 1 参照）。

40

【0 0 0 4】

加えて、高等植物の場合、これらの酵素には多数のアイソザイムが存在し、澱粉生合成に関与している。アイソザイムは、同様の酵素反応を触媒するアミノ酸配列の異なる酵素群のことである。たとえば、イネ (O r y z a s a t i v a) には、11 種類もの S S 、3 種類もの B E 、4 種類もの D B E が存在する。

近年、これらのアイソザイムは、組織特異性や、微妙な基質特異性によって、役割分担をしていることが分かってきた。アイソザイムの働きや役割を解明することは、アイソザイムの機能解明につながる。そして、アイソザイムの機能解明は、植物の澱粉生合成メカ

50

ニズムの全体像の解明には欠かせない。

このため、従来から各アイソザイムの変異体が開発されてきた。特定のアイソザイムが欠失した変異体の表現型を調べることで、そのアイソザイムの働きや役割を知ることができる。

【0005】

たとえば、各アイソザイムの機能を明確にするために、イネにおいて既に単離され、分析されている変異体には、SS1（非特許文献2、特許文献1）、SS1Ia（非特許文献3、特許文献2）、SS1IIa（非特許文献4、特許文献3）、GBSSI（非特許文献5、非特許文献11）、BEI（非特許文献6）、BEIIb（非特許文献7）、ISA1（非特許文献8）、PUL（非特許文献9、特許文献4）、PHO1（非特許文献10）等がある。10

これらの変異体のいくつかは、種子の胚乳に蓄積される澱粉の構造、物性が明らかになっている。具体的には、野生型とは異なることがあり、その構造の違いに伴い、澱粉粒の大きさや熱糊化温度、熱糊化粘度が異なる等の物性を示すことがある。これにより、各酵素の機能がある程度明らかになっている。

【0006】

一方、澱粉には、アミラーゼ等で容易に消化される成分の澱粉と、消化されにくい難消化性澱粉が存在する。難消化性澱粉（Resistant Starch、RS）は、消化液では分解されにくく、高分子のまま小腸を通過して大腸に到達することである。20

難消化性澱粉は、比較的高分子のまま大腸に到達し、腸内細菌による発酵を通して短鎖脂肪酸を分泌し、大腸環境を整え、大腸癌予防、便秘予防効果があることが大麦（非特許文献13）や小麦（非特許文献14）で知られている。このため、難消化性澱粉を多く含む大麦グリッツ等は、オーストラリアで既に商品化されている。

加えて、難消化性澱粉は、小腸でグルコースにまで分解されにくいため、カロリーオフ効果がある。難消化性澱粉は、アミロース含量が高い澱粉に多く含まれることがある。このため、高アミローストウモロコシが、ダイエット素材として、利用されている。

以上のように、難消化性澱粉は、食物繊維と類似した機能性を示す食品として摂取することが推奨されている。

【0007】

イネにおいては、通常の炊飯米にも難消化性澱粉は含まれるもの、その割合は、わずか1%前後であることが多い。30

これについて、澱粉生合成に関する酵素に変異を持つ上述の各イネ変異体においては、野生型より高アミロース性を示すイネ変異体系統は、野生型より有意に高い難消化性澱粉量を示した。一方、格段に高い難消化性澱粉量を示したのが、枝作り酵素BEIIbを欠損した変異体（以下、「be2b」と、記載する。）であった。be2bでは、難消化性澱粉量が劇的に増加する。具体的には、アミロペクチンの長鎖の増加とアミロースの増加とにより、難消化性につながることが明らかになっている。（非特許文献12）。

【0008】

このため、難消化性澱粉を増加させるため、BEIIbの発現量を減らした遺伝子組換えイネ（非特許文献15及び非特許文献16）が開示されている。40

しかしながら、非特許文献15及び非特許文献16に記載された米の難消化性澱粉の含有率を高める方式では、遺伝子組み換えの手法を用いているため、実用化が困難であった。

【0009】

これについて、組換えの手法を用いないイネ（非特許文献20、21、特許文献5）のbe2b系統も作出されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2003-079260号公報
【特許文献2】特開2005-269928号公報
【特許文献3】特開2006-051023号公報
【特許文献4】特開2007-020475号公報
【特許文献5】特開2012-019742号公報
【特許文献6】特開2009-254265号公報
【非特許文献】

【0011】

- 【非特許文献1】Y. Nakamura、Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue.、*Plant Cell Physiol.*、日本、Japanese Society of Plant Physiology、2002年、43、p. 718-725 10
- 【非特許文献2】N. Fujita他、Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice.、*Plant Physiol.*、アメリカ合衆国、American Society of Plant Biologist、2006年、140、p. 1070-1084
- 【非特許文献3】Y. Nakamura他、Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between japonica and indica rice cultivars.、*Plant Mol Biol.*、2005年、58、p. 213-227 20
- 【非特許文献4】N. Fujita他、Characterization of SSIIIa-deficient mutants of rice (*Oryza sativa L.*) ; the function of SSIIIa and pleiotropic effects by SSIIIa deficiency in the rice endosperm.、*Plant Physiol.*、アメリカ合衆国、American Society of Plant Biologist 30、2007年4月、144、4、p. 2009-2023
- 【非特許文献5】Y. Sano、Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm.、*Theor Appl Genet*、1984年、68、p. 467-473
- 【非特許文献6】H. Satoh他、Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm.、*Plant Physiol.*、アメリカ合衆国、American Society of Plant Biologist 40、2003年、133、p. 1111-1121
- 【非特許文献7】A. Nishi他、Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm.、*Plant Physiol.*、アメリカ合衆国、American Society of Plant Biologist、2001年、127、p. 459-472
- 【非特許文献8】Y. Nakamura他、Correlation between activities of starch debranching enzyme and -polyglucan structure in endosperms of sugary-1 mutants of rice.、*Plant J.*、イギリス、Blackwell、1997年、12、p. 143-153 50

【非特許文献9】N. Fujita他、Characterization of PUL-deficient mutants of rice (*Oryza sativa L.*) and the function of PUL on the starch biosynthesis in the rice endosperm.、*J Exp Bot.*、イギリス、Oxford University Press、2009年3月、60、3、p.1009-1023

【非特許文献10】H. Satoh他、Plastidic - glucan phosphorylase mutation dramatically affects the synthesis and structure of starch in rice endosperm.、*Plant Cell*、アメリカ合衆国、American Society of Plant Biologist、2003年、20、p.1833-1849

【非特許文献11】M. Isshiki 他、A naturally occurring functional allele of the rice waxy locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron.、*Plant J.*、1998年、15、p.133-138

【非特許文献12】Tsuiki 他、Alterations of Starch Structure Lead to Increased Resistant Starch of Steamed Rice: Identification of High Resistant Starch Rice Lines.、*Journal of Cereal Science*、2016年、68、p.88-92

【非特許文献13】Bird AR他、A novel barley cultivar (Himalaya 292) with a specific gene mutation in starch synthase IIa raises large bowel starch and short-chain fatty acids in rats.、*Journal of Nutrition*、2004年、134、p.831-835

【非特許文献14】Regina A他、High-amyllose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats.、*Proceedings of National Academy of Science*、2006年、103、p.3546-3551

【非特許文献15】Butardo VM他、Impact of down-regulation of starch branching enzyme IIB in rice by artificial microRNA- and hairpin RNA-mediated RNA silencing.、*Journal of Experimental Botany*、62、p.4927-4941

【非特許文献16】Zhu L他、High-amyllose rice improves indices of animal health in normal and diabetic rats.、*Plant Biotechnology Journal*、2012年、10、p.353-362

【非特許文献17】Wang ZY他、The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the waxy gene.、*The Plant Journal*、1995年、7(4)、p.316-622

【非特許文献18】西 愛子他、イネ枝作り酵素(BE)の二重変異の胚乳澱粉特性.、*Journal of Applied Glycoscience*、2008年、Vol. 55、(3)、Suppl.、p.43

10

20

30

40

50

【非特許文献19】藤田 直子他、低カロリー機能性米の地域普及をめざして～調理法の開発と栽培簡易化～、秋田県立大学ウェブジャーナルB、2017年、4、p.158-163

【非特許文献20】Asai H他、Deficiencies in both starch synthase (SS) IIIa and branching enzyme IIb lead to a significant increase in amylose in SSIIa inactive japonica rice seeds、Journal of Experimental Botany、2014年、65、p.5497-5507

【非特許文献21】Itoh Y他、Characterization of the endosperm starch and the pleiotropic effects of biosynthetic enzymes on their properties in novel mutant rice lines with high resistant starch and amylose content、Plant Science、2017年、258、p.52-60。 10

【非特許文献22】Wada T他、Development and characterization of a new rice cultivar, 'Chikushikona 85', derived from starch-branching enzyme IIb-deficient mutant line、Breeding Science、2018年、Doi:10.1270/jssbs.170 20
69

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

しかしながら、非特許文献12に記載のbe2b系統を含むBEI Ib欠損変異体の各系統では、炊飯米で測定した場合、難消化性澱粉含有率は、15～25%程度であった。これに加え、be2b系統は、種子が小さかったり、調理性が良くなかったりするため、実用性が低かった。実際に、難消化性澱粉を含むイネの具体的な販売は限定的であり、大量生産には至っていなかった。

より高い機能性を得るためにには、できる限り難消化性澱粉を多く含む、大規模栽培可能な米品種が必要であった。このため、従来より難消化性澱粉を多く含有しつつ、大規模栽培可能で収量も高いような、実用性の高い非遺伝子組み換え体のイネ変異体が求められていた。 30

【0013】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、上述の課題を解消することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の難消化性澱粉高含有イネ変異体は、ジャポニカ米由来のイネ枝作り酵素I型(BEI)及びIIb型(BEIIb)の遺伝子座が劣性ホモ(be1/be2b)であり、遺伝的に固定されており、非遺伝子組み換え体であることを特徴とする。 40

本発明の難消化性澱粉高含有イネ変異体は、野生型に比べて、前記BEI及び前記BEIIbの活性が低下していることを特徴とする。

本発明の難消化性澱粉高含有イネ変異体は、精米後のイネ種子は、難消化性澱粉の含有率が、親系統であるBEI Ib欠損変異体(be2b)よりも多いことを特徴とする。

本発明の難消化性澱粉高含有イネ変異体は、前記イネ種子を炊飯した場合、すり潰さない状態の炊飯米における前記難消化性澱粉の含有率が60%以上、すり潰した状態の炊飯米における前記難消化性澱粉の含有率が20%以上であり、前記イネ種子の玄米粉における前記難消化性澱粉の含有率が32%以上であることを特徴とする。

本発明の難消化性澱粉高含有イネ変異体は、前記イネ種子の胚乳から製造される澱粉は 50

、前記親系統である B E I I b 欠損変異体 (b e 2 b) のイネ種子の胚乳から製造される澱粉と比べて、アミロペクチンの鎖長分布のうち、D P 1 9 以下が減少され、D P 2 0 以上が増加されることを特徴とする。

本発明の難消化性澱粉高含有イネ変異体は、前記イネ種子の胚乳から製造される澱粉は、前記親系統である B E I I b 欠損変異体 (b e 2 b) のイネ種子の胚乳から製造される澱粉よりも、糊化ピーク温度が 7 以上高いことを特徴とする。

本発明の難消化性澱粉高含有イネ変異体は、前記イネ種子の胚乳から製造される澱粉は、算出されたアミロースの割合が 50 % 以上であることを特徴とする。

本発明の難消化性澱粉高含有イネ変異体は、前記イネ種子は、粉末化することで米粉、粥を攪拌することで米ゲルとしても利用可能であることを特徴とする。 10

本発明の米粉は、前記難消化性澱粉高含有イネ変異体の前記イネ種子の胚乳を粉末化することで製造されたことを特徴とする。

本発明の難消化性澱粉は、前記難消化性澱粉高含有イネ変異体の前記イネ種子の炊飯米、及び / 又は前記米粉より抽出されることを特徴とする。

本発明の米ゲルは、前記難消化性澱粉高含有イネ変異体の前記イネ種子の粥を攪拌することで製造されたことを特徴とする。

本発明の食品は、前記難消化性澱粉高含有イネ変異体の前記イネ種子、前記米粉、前記難消化性澱粉、及び前記米ゲルのいずれか又は任意の組み合わせを含んで製造されたことを特徴とする。

本発明の食感改良剤は、前記米粉、前記難消化性澱粉、及び前記米ゲルのいずれか又は任意の組み合わせを含むことを特徴とする。 20

本発明の難消化性澱粉高含有イネ変異体の作出方法は、非遺伝子組み換えの方式により、ジャポニカ米由来のイネ枝作り酵素 I 型 (B E I) 及び I I b 型 (B E I I b) の二重劣性ホモ変異体を作出させ、遺伝的に固定させることを特徴とする。

本発明の難消化性澱粉高含有イネ変異体の作出方法は、前記 B E I の遺伝子の第 10 エキソンの最後の塩基がグアニンからアデニンへ変異し、前記 B E I I b の遺伝子の第 9 イントロンの最後の塩基がグアニンからアデニンに変異している - 塩基置換を分子マーカーとして、前記二重劣性ホモ変異体を特定することを特徴とする。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、従来よりもイネ種子の難消化性澱粉含有率が高く、実用性が高いイネ変異体を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図 1】本発明の実施の形態に係る b e 1 / b e 2 b (# 1403) 、それらの親変異体 b e 1 (E M 557) 、 b e 2 b (E M 10) 、及び野生型 (台中 65 号及び金南風) の完熟胚乳から抽出したタンパク質のウエスタンプロッティングの結果を示す写真である。

【図 2】本発明の実施の形態に係る b e 1 / b e 2 b (# 1403) 、それらの親変異体 b e 1 (E M 557) 、 b e 2 b (E M 10) 、及び野生型 (台中 65 号及び金南風) の分子マーカーを用いた P C R 増幅後、制限酵素で切断した D N A バンドパターンを示した図である。 40

【図 3】本発明の実施の形態に係る b e 1 / b e 2 b (# 1403) 、それらの親変異体 b e 1 (E M 557) 、 b e 2 b (E M 10) 、及び野生型 (台中 65 号及び金南風) の完熟玄米の形態及び平均玄米重量を示す図である。

【図 4】本発明の実施の形態に係る b e 1 / b e 2 b (# 1403) 、それらの親変異体 b e 1 (E M 557) 、 b e 2 b (E M 10) 、及び野生型 (台中 65 号及び金南風) の完熟胚乳のアミロペクチンの鎖長分布 (M o l a r %) 示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

< 実施の形態 >

以下で図面を参照して、本発明の実施の形態について説明する。

上述したように、従来から、難消化性澱粉の含有量が多い種子を取得可能で、実用的なイネ変異体が求められていた。

本発明者らは、難消化性澱粉の取得について実用的なイネの変異体を探索するため、鋭意実験を行い、イネの澱粉の代謝系を網羅的に研究して、有益な表現型をもつ新規変異体を探索した。この際、本発明者らは、B E I 及び I I b 型の二重劣性ホモ変異体（二重変異体。以下、「b e 1 / b e 2 b」と記載する。）に着目した。このb e 1 / b e 2 bについては、従来、試験的に作出されたものの性質がよく調べられないまま失われており、難消化性澱粉量について、まったく知られていなかったためである。

このため、本発明者らは、b e 1 / b e 2 b を新たに作出し、性質について鋭意、実験を行って調べた。すると、作出されたb e 1 / b e 2 b のイネ種子は、難消化性澱粉含有率が非常に高く、実用性が高い難消化性澱粉高含有イネ変異体であることを見いだし、本発明を完成させるに至った。

【0018】

より具体的に説明すると、本発明の実施の形態に係るb e 1 / b e 2 b は、ジャポニカ米由来のイネ枝作り酵素I型（B E I）及びI I b型（B E I I b）の遺伝子座が劣性ホモであり、遺伝的に固定されており、非遺伝子組み換え体であることを特徴とする。

この本実施形態のb e 1 / b e 2 b は、両親変異体（b e 1、b e 2 b）及び野生型（W T）と比べて、以下のようないくつかの性質を得ることができる。

【0019】

本発明の実施の形態に係るb e 1 / b e 2 b のイネ種子からは、特に通常のイネの澱粉とは異なる性質と形状をもつ特性の澱粉を得られる。これらの特性の中で、特にユニークであるのは、見かけのアミロース含量と難消化性澱粉含有率である。

具体的に、本実施形態のb e 1 / b e 2 b の変異体米（イネ種子）は、難消化性澱粉含有率が、親系統であるb e 2 b よりも高くなる。これは、従来の非組換えイネ（非特許文献20、21、22、特許文献5、6）の中でも類をみないほどである。

【0020】

つまり、本発明の実施の形態に係るb e 1 / b e 2 b のイネ種子は、炊飯した場合、従来のイネ変異体より遙かに多い難消化性澱粉が含まれる。

より具体的には、本実施形態のb e 1 / b e 2 b における精米後のイネ種子を炊飯した場合、すり潰さない状態の炊飯米における難消化性澱粉の含有率が60%以上、すり潰した状態の炊飯米における難消化性澱粉の含有率が20%以上であり、イネ種子の玄米粉における難消化性澱粉の含有率が32%以上となる。

ここで、炊飯米の難消化性澱粉含有率は、調理や測定方法によって大きく異なる。たとえば、b e 1 / b e 2 b は、すり潰さない炊飯米は76.2%であるが、すり潰した場合、28.4%となる。また、玄米粉の難消化性澱粉含有率も35.1%となり、いずれも親系統のb e 2 b より格段に高い値を示す。

【0021】

他の特徴として、本発明の実施の形態に係るイネ種子の胚乳から製造される澱粉は、B E I I b の活性低下に起因する親系統イネ（b e 2 b）を用いて製造される澱粉と比べて、アミロペクチンの鎖長分布のうち、D P 1 9 以下が減少され、D P 2 0 以上が増加されることを特徴とする。

すなわち、後述する実施例の図4に示すように、本実施形態のb e 1 / b e 2 b のイネ種子の胚乳から製造される澱粉は、アミロペクチンの鎖長分布のうち、D P 1 9 以下が減少し、D P 2 0 以上が増加する。これは、アミロペクチンの長鎖量が、通常米に比べて格段に高いb e 2 b の澱粉と比べても多い。

【0022】

さらに、本発明の実施の形態に係るb e 1 / b e 2 b のイネ種子の胚乳から製造される澱粉は、アミロースの割合が50%以上となる。

加えて、本発明の実施の形態に係るb e 1 / b e 2 b のイネ種子の胚乳から製造される

10

20

30

40

50

澱粉は、b e 2 b を用いて製造される澱粉よりも、糊化ピーク温度が7以上高くなる。

つまり、本発明の実施の形態に係るイネ種子、イネ種子から製造される米粉、及び澱粉は、親系統のb e 2 b よりアミロペクチンの長鎖量が増加していることで、b e 2 b とは違った物性を示し、具体的には糊化ピーク温度が高くなる。

【0023】

ここで、本実施形態のb e 1 / b e 2 b のイネ種子、イネ種子から製造される精米、米粉、及び澱粉は、高アミロース含量及びアミロペクチンの長鎖が多いことに起因する老化性の高さから、老化性が有利に働く調理法において、調理性を高めることができる。

具体的には、本実施形態のイネ種子、イネ種子から製造される精米、米粉、及び澱粉は、老化性が有利に働く調理法である、麺や米菓に適している。さらに具体的には、本実施形態のイネ種子、米粉、及び澱粉は、ピラフ若しくはリゾット、米菓、グラノーラ等の食品に好適に用いることができる。これにより、従来とは、味わい、口触り、食感、風味等が異なる特徴ある食品を製造することができる。すなわち、「食感改良剤」として用いることが可能である。また、これらを用いた各種健康食品やダイエット食品、難消化性澱粉を精製したサプリメント等に利用可能である。

【0024】

さらに、本発明の実施の形態に係るb e 1 / b e 2 b のイネ種子は、粉末化することで米粉、粥を攪拌することで米ゲルとしても利用可能であることを特徴とする。

具体的には、本実施形態のb e 1 / b e 2 b のイネ種子は、粉碎機等で粉碎して、米粉として提供可能である。すなわち、b e 1 / b e 2 b のイネ種子の胚乳を粉末化することで米粉を製造できる。

また、b e 1 / b e 2 b のイネ種子の粥を攪拌することで米ゲルとして使用することができる。

本発明の実施の形態に係るb e 1 / b e 2 b のイネ種子を粉碎した粉碎物である米粉又は米ゲルは、パンや麺等に混合させて利用することができる。

この際、本実施形態の米粉、米ゲルについても、従来の100%米粉で作ったパンや麺等の食感を改良する「食感改良剤」として用いることも可能である。この「食感改良剤」として用いられる際の配合割合や配合順序や配合方法等は、加工法や製造法等や保存法等に対応して、任意に設定可能である。

【0025】

また、本実施形態のb e 1 / b e 2 b のイネ種子自体も、玄米のまま又は精米してダイエット米として提供することが可能である。この際、このダイエット米を、モチ米や通常米とブレンドすることで、高い老化性を緩和し、難消化性澱粉量を維持した状態で、良食味な炊飯米として食用に供することができる。

また、本実施形態の変異体米から抽出した澱粉自体を、難消化性澱粉が多く含まれる澱粉として使用することも可能である。

【0026】

より具体的には、本発明の実施の形態に係る食品は、b e 1 / b e 2 b のイネ種子、米粉、難消化性澱粉、及び米ゲルのいずれか又は任意の組み合わせを含んで製造されたことを特徴とする。

すなわち、このような本実施形態のb e 1 / b e 2 b のイネ種子、この粉末、米ゲル等を用いた食品は、麺、パン、ピラフ、かゆ、米菓等の米由来のダイエット素材として用いることが可能である。また、これらの食品は、習慣的に摂取することにより、低カロリー性を備え、大腸環境を整えるため糖尿病、大腸癌、便秘の予防等の効果が期待される。さらに、米粉100%の食品が開発されれば、小麦粉由来のグルテンを持たない、グルテンフリー食品として、小麦アレルギーの患者に有効な食品として提供できる。

【0027】

さらに、本発明の実施の形態に係る難消化性澱粉は、b e 1 / b e 2 b のイネ種子の炊飯米、及び/又は米粉より抽出されることを特徴とする。

本実施形態のb e 1 / b e 2 b は、炊飯米にしても多くの難消化性澱粉を含んでいる。

このため、この炊飯米を溶解、酵素処理等することで、容易に難消化性澱粉を分離することが可能となる。さらに、本実施形態の b e 1 / b e 2 b は、従来の系統に比べると、すり潰した状態でも多くの難消化性澱粉を含んでいる。このため、米粉から難消化性澱粉を抽出しても、実用的に多くの量を取得可能である。

この本実施形態の b e 1 / b e 2 b の米粉や澱粉は、アミロースの含量が高いことにより、工業的な用途にて使用可能である。これは、生分解性プラスチックなど、成形が必要な場合は、老化性が高い方が有利であるためである。たとえば、アミロースは温水に溶けるため、フィルム状に成形して、生分解性フィルム、医療用材料、縫合糸のような用途に用いることができる。また、体内で吸収分解される性質を用いて、再生医療の「足場」用の部材として用いることが可能である。

さらに、グラスファイバー作成時の資材、工業用糊、建築材料の配合剤、植物栽培用の資材等、様々な工業用途に利用可能である。

【0028】

ここで、これらの米粉、難消化性澱粉、米ゲル、及び食品は、上述の難消化性澱粉の特性、含まれた DNA 等により、直接特定することが可能である。

【0029】

本発明の実施の形態に係る難消化性澱粉高含有イネ変異体の作出方法は、非遺伝子組み換えの方式により、ジャポニカ米由来のイネ枝作り酵素 I 型 (B E I) 及び I I b 型 (B E I I b) の二重劣性ホモ変異体を作出させ、遺伝的に固定させることを特徴とする。このように、非遺伝子組み換えの方式により、ジャポニカ米由来 B E I I b の欠損に加えて B E I を欠損させ、遺伝的に固定させることで、両親変異体及び野生型と比べると、難消化性澱粉含有率を著しく高める b e 1 / b e 2 b を作出することができる。

より具体的には、本発明の実施の形態に係るイネ変異体の作出方法は、B E I の遺伝子の第 10 エキソンの最後の塩基がグアニンからアデニンへ変異し、B E I I b の遺伝子の第 9 イントロンの最後の塩基がグアニンからアデニンに変異している一塩基置換を分子マークとして、二重劣性ホモ変異体を特定する。

これらの二重変異の結果、本実施形態のイネ変異体は、野生型に比べて、B E I 及び B E I I b の活性が低下する。

具体的な作出による形質変化は、ウエスタンブロッティングでそれぞれのバンドが欠損していること、又は、分子マークを使って PCR 増幅及び制限酵素切断された DNA のアガロースゲル電気泳動パターンから二重変異体であることを確認することが可能である。

【0030】

以上のように構成することで、以下のような効果を得ることができる。

上述したように、トウモロコシ、大麦等には、難消化性澱粉量の高い系統が存在した。しかしながら、これらの植物の澱粉の生合成の機構は、イネとは大分、異なっていることが明らかとなっており、これをイネに適用できるかどうかは不明であった。

【0031】

また、従来から、アミロース含量が高い澱粉には、難消化性澱粉が多いと推測されていた。しかしながら、どのような構造、あるいは澱粉が難消化性を示すのかは、詳細については、不明であった。

一方で、枝作り酵素 B E I I b を欠損させ、アミロペクチンの長鎖が相対的に多くなった変異体 (b e 2 b 系統) は、アミロペクチンの長鎖量が通常米と変わらず、高アミロース性を示す系統より、難消化性澱粉量が格段に多かった (非特許文献 12)。これにより、難消化性澱粉は、アミロース含量よりもむしろアミロペクチンの長鎖量に由来することが明らかになってきていた。

【0032】

しかしながら、この非特許文献 12 の b e 2 b 系統は、炊飯米で測定した場合、難消化性澱粉含有率は、15 ~ 25 % 程度であった。

ここで、難消化性澱粉の摂取カロリーは、通常の澱粉の半分の 2 カロリーとして計算さ

れる。このため、難消化性澱粉含有率が15～25%程度であるb e 2 bの炊飯米は、通常品種の炊飯米を食べた時に比べて、わずか7.5～12.5%しかカロリーオフにならなかった。また、これらの数値は、炊飯米をすり潰さずに測定した値であるものの、実際に食べるときは咀嚼するため、難消化性澱粉含有の量はさらに低下する。さらに、難消化性澱粉含有率が高い米は、炊飯米として食する場合、食味がすぐれず、100%で食べることはかなり困難であるため、通常米とブレンドした状態で食べることになる。さらに、米粉として利用する場合は、消化液への露出が多くなるので消化されやすくなり、炊飯米として食べる時よりも難消化性澱粉量が更に低下する場合があることも分かってきた。

以上のこと考慮すると、実際に摂取した際により高い機能性を期待するためには、できる限り難消化性澱粉を多く含む、大規模栽培可能な米品種が必要となる。これに関して、従来のb e 2 bのような難消化性澱粉を含むイネ変異体は、実用性が低かった。10

このため、難消化性澱粉の含有率が高く、収量も高く、実用性を高めた非遺伝子組み換え体のイネ変異体が求められていた。

【0033】

これに対して、本発明の実施の形態に係る難消化性澱粉高含有イネ変異体は、類い希な難消化性澱粉含有率をもつイネ変異体である。

より具体的には、後述の実施例の表3や図3に示されるように、本実施形態の炊飯米の難消化性澱粉含有率は、従来のb e 2 bの一例であるEM10に比べて、約2倍程度高い値を示し、少なくとも20%の難消化性澱粉含有率となる。

【0034】

さらに、本発明の実施の形態に係る難消化性澱粉高含有イネ変異体のイネ種子、米粉、精製澱粉、及び／又は米ゲルは、これらを利用する飲食品及び工業製品に用いることができる。

具体的には、本実施形態のb e 1 / b e 2 bのイネ種子は、難消化性澱粉含有率が格段に高いため、食品に少量でも用いるだけで低カロリー化が可能であり、ダイエット食品を製造する際、低コスト化につながる。より具体的には、難消化性澱粉は、上述したように、通常の炭水化物が4 kcal / 1 gに対して、2 kcal / gであるため、本実施形態の変異体米を食品に含有させることで、確実に摂取カロリーを少なくすることができます。

また、本実施形態のb e 1 / b e 2 bのイネ種子を米粉、精製澱粉、及び／又は米ゲルとして添加して食品を製造した場合、その食品中の難消化性澱粉含有率も調理方法により変化するものの、機能性を高めることができる。ブレンドする際も従来のイネよりも添加量を抑えることができる。30

【0035】

また、本実施形態の食感改良剤は、これを既存のパンや麺等の食品に加えることで、例えば、これらの食品の粘度を低下させ、より「食べ応え」があり風味を引き立てるようになることができる。これにより、食品の製造者の望む食感が得られるように添加することが可能となる。加えて、食品の加工や保存する際にも、製造者の望む効果を付加可能となる。

さらに、本実施形態の食感改良剤は、加工デンプンのように化学的に修飾され、食品添加物としての表示が義務付けられているような添加物ではない。つまり、本実施形態の食感改良剤は、食品添加物ではなく、天然素材由来の添加剤として用いることが可能である。この上で、腸内フローラに良い影響を与えて、健康を増進させる効果が期待できる。40

【0036】

また、従来のb e 2 bの一例であるEM10は、種子が小さいため、精米上の困難があり、又、相対的に収量が低いため、実用的に使用できなかった。

これに対して、本発明の実施の形態に係るイネ変異体のイネ種子は、EM10よりも難消化性澱粉含有率が多くなり、更に、種子が大きくなるため、実用性がさらに高くなる。

【0037】

なお、本実施形態のb e 1 / b e 2 bについて、さらに種子重量を高めるため、品種改良を行い、その系統（株）を用いることも可能である。50

たとえば、本発明者らは、後述の実施例で示す b e 1 / b e 2 b のクローン（系統、株）である # 1 4 0 3 について、超多収米である秋田 6 3 号を戻し交配することによる品種改良も行ってみたところ、種子の巨大化が確認できた。すなわち、これら戻し交配した系統を、本発明の他の実施形態のイネ変異体として用いることが可能である。

また、上述の難消化性澱粉高含有イネ変異体の作出方法により、新たに b e 1 / b e 2 b の株を作出して、更に性質のよいものを選抜することも考えられる。

このようにして、種子が大きい株が得られれば、精米する上で大きなメリットとなる。また、種子が大きくなることから収量が高くなり、この生産性の高さが経済性にも貢献する。すなわち、難消化性澱粉を取得したり食品を製造したりする際に低コスト化につながる。このため、実際に食品等を製造する際、又は、炊飯米として提供する際の実用性を高めることができる。10

【実施例】

【0 0 3 8】

以下で、図を参照しながら本発明の実施例について説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら制限されるものではない。

【0 0 3 9】

〔実験方法と材料〕

(b e 1 / b e 2 b 二重変異体米の単離)

B E I I b 欠損変異体米 (E M 1 0) に B E I 変異体 (E M 5 5 7) を交配することで、b e 1 / b e 2 b 二重変異体米を作出し、その性質を調べた。20

【0 0 4 0】

以下で、b e 1 / b e 2 b 二重変異体米の作出法について説明する。本発明者らは、B E I I b 欠損変異体米 (E M 1 0) に B E I 変異体 (E M 5 5 7) を交配し、交配当代の F 1 種子を次年度に播種し、F 2 種子を得た。この中には、b e 1 / b e 2 b の二重変異体米は約 2 5 % 含まれていると推定された。

白濁種子の胚と反対側の胚乳 1 / 4 を使って、タンパク質を抽出し、B E I 抗体及び B E I I b 抗体でウエスタンプロッティングを行い、B E I 及び B E I I b が欠損している種子の胚側の残りの 3 / 4 を滅菌し、寒天培地に移植した。

これらの幼植物の葉身から P C R 法によって、B E I 及び B E I I b 遺伝子が欠損している個体を選抜し、栽培を続け、F 3 種子を取得し、# 1 4 0 3 と名付けた。この # 1 4 0 3 において、ウエスタンプロッティングにより、両タンパク質が欠損していることを確認した。30

【0 0 4 1】

ウエスタンプロッティングのための S D S - P A G E 手法について述べる。電気泳動槽にアクリルアミドゲルをセットして泳動バッファ (2 5 m M T r i s, 1 9 2 m M g l y c i n e, 0 . 1 % S D S) を注ぎ、ゲルのウェルに分子量マーカー (C a t # 1 6 1 - 0 3 7 3, B i o R a d 社製) を 5 μ L 、調製したサンプルを 1 0 μ L ずつアプライして、室温で電気泳動を行った。プロモフェノールブルー (B P B) フロントダイが濃縮ゲルを通過するまではゲル 1 枚あたり 1 0 m A の定常電流を流し、分離ゲルに到達した後ゲル 1 枚あたり 2 0 m A の電流を流して電気泳動を行い、B P B フロントダイがゲルの下から 1 c m 程度になるまで電流を流し停止した。40

【0 0 4 2】

S D S - P A G E によってゲル上に分離されたタンパク質を転写するためのメンブレン (P V D F 膜、M I L L I P O R E 社製、I P V H 0 0 1 0) 1 枚と、ろ紙 6 枚をゲルと同じ程度の大きさに切り、メンブレンは 1 0 0 % methanol に 2 0 秒浸してから、t r a n s f e r b u f f e r (2 5 m M T r i s, 1 9 2 m M g l y c i n e, 2 0 % methanol, 0 . 1 % S D S) に浸した。ろ紙はそのまま、t r a n s f e r b u f f e r が湿るぐらい浸した。S D S - P A G E を行ったゲルを t r a n s f e r b u f f e r の入ったプラスチックケースに移して 1 5 分間浸とうした。プロッティング用電極の陽極側に t r a n s f e r b u f f e r に浸したろ紙 3 枚を泡が入50

らないように重ね、その上にメンブレンを泡が入らないように重ね、次にゲルを泡が入らないように重ね、更にろ紙3枚を泡が入らないように重ねた。上部電極板（陰極）をセットし、メンブレン1枚当たり80mAの電流で1時間流した。1時間後、通電を止めてメンブレンをプラスチック容器に移し、プロッキング液（4%スキムミルク/TBS（10 mM Tris-HCl（pH 7.5）、500 mM NaCl））15mLを入れ、30分間浸とうした（プロッキング）。30分後、1次抗体（本実験では4%スキムミルク/TBSで抗BEI血清（非特許文献6）を1500倍希釈したもの、抗BEI Ib血清（非特許文献7）を3000倍希釈したもの）を添加して4で一晩ゆっくり浸とうさせた。

【0043】

10

翌日、メンブレンを約50mLの蒸留水で3回すすぎ、約50mLのTBST2（50 mM NaCl、1 mM Tris-HCl（pH 7.5）、1% Tween20）で1回、洗浄した。その後、4%スキムミルク/TBS10mLと共に、抗ウサギヤギ血清パーオキシダーゼ（Bio Rad社製）を5000倍希釈した2次抗体を添加して約2時間ゆっくり浸とうさせた。その後、メンブレンを約50mLの蒸留水で3回すすぎ、約50mLのTBST2で1回洗い、TBSで1回洗った後、新しいTBSに浸し、検出に用いた。

ウェスタンブロッティングを行ったメンブレンにECL溶液（Pierce West Pico Chemiluminescent substrate）を1mLかけることで発色させ、Fuji LAS4000（富士フイルム株式会社製）で発色したバンドを写真に撮り、その画像データを、ソフトウェア（MultiGauge）を用いて、検出したバンドの明るさやコントラストを編集した。写真撮影後、メンブレンを蒸留水で十分に洗浄した後乾燥させ保存した。

20

【0044】

次にPCR選抜のための幼植物からのDNA抽出方法について述べる。培地からセルトレイに移植した幼植物の葉身2cm程度をマルチビーズショッカー用のチューブに移し、液体窒素に入れ凍らせてマルチビーズショッカーで粉碎した（SPEED METER：2000 rpm、ON TIME：5秒、OFF TIME：0秒、CYCLE：1回）。400 μLのDNA抽出buffer（200 mM Tris-HCl（pH 7.5）、250 mM NaCl、25 mM EDTA、0.5% SDS）を加えてボルテックスし、15,000 rpm、20で5分間、遠心分離した。上清300 μLを新しい1.5 mLチューブに移し、300 μLのイソプロピルアルコールを加えよく混合し、15分間静置した。その後、上述のものと同じ条件で遠心分離し、チューブの底に半透明な沈殿があるか確認した後、70%エタノール1mLを加えて攪拌し、遠心分離後、上清を除去した。残った沈殿を減圧乾燥し、氷上で25 μLのTE buffer（10 mM Tris-HCl（pH 7.5）、1 mM EDTA-2Na）を加え懸濁した。その後、実験に用いるまで-30で冷凍保存した。

30

【0045】

40

ジャポニカ米のBEI遺伝子（OsBEI遺伝子、非特許文献6）は、14個のエキソンと13個のインtronから構成されており、BEI欠損変異体であるEM557は、第10エキソンの最後の塩基がグアニンからアデニンへ変異している。また、ジャポニカ米のBEI遺伝子（OsBEI Ib遺伝子、非特許文献7）は22個のエキソンと21個のインtronから構成されており、BEI Ib欠損変異体であるEM10は、第9インtronの最後の塩基がグアニンからアデニンに変異している。これらの塩基置換を利用して、分子マーカーを開発した。

【0046】

50

EM557の変異を検出するために、BEI-dCAPS-F（5'TCTCTGCA GTCAAGCTCTGCAATTTGTC3'）とBEI-ScaI-R（5'GGGC CCATACTAAATTACAATTGCCAGTAC3'）プライマーとゲノミックDNAを用いてPCRを行い、PCR産物をScaIで制限酵素処理した。具体的には

、Quick Taq HS dye mix (TOYOB0製) 5 μL, 4 μM プライマー 各0.5 μLずつ, DNA 1 μL, 蒸留水3 μLを混合し、94 2分×1サイクル、(94 20秒、50 20秒、68 20秒) × 38サイクル)でPCRを行った。PCR産物3 μL, 10×制限酵素Buffer 1 μL, ScaI 0.2 μL, 蒸留水5.8 μLを混合し、37 で30分以上反応させたのち、2 μLのLoading dye (36%グリセロール, 0.05% BPP, 0.035% キシレンサイアノール, 30 mM EDTA)を添加し、1×TBE, 15%アクリルアミドゲルで泳動した。泳動後、エチジウムプロマイドでゲルを染色し、UVトランスイルミネーターで検出すると、BEIに上記EM557の変異がある場合は、173 bpと30 bpのバンドが2本、変異がない場合は203 bpの単一バンドが得られた。

10

【0047】

同様に、EM10の変異を検出するために、EM10-N1aIV-F (5'GACT ATGCAGGAGAACATATTCAAGC3')とBEI-N1aIV-R2 (5'CTGTGAACAAACATCCATGAGCAC3')プライマーとゲノミックDNAを用いてPCRを行った(Quick Taq HS dye mix (TAKARA製) 5 μL, 4 μM プライマー各0.5 μLずつ, DNA 1 μL, 蒸留水3 μLを混合し、94 2分×1サイクル、(94 30秒、50 45秒、68 120秒) × 35サイクル)。PCR産物3 μL, 10×制限酵素Buffer 1 μL, N1aIV 0.2 μL, 蒸留水5.8 μLを混合し、37 で30分以上反応させたのち、2 μLのLoading dye (36%グリセロール, 0.05% BPP, 0.035% キシレンサイアノール, 30 mM EDTA)を添加し、1×TAE, 0.8%アガロースゲルで泳動した。エチジウムプロマイドでゲルを染色すると、BEIIbに上記EM10の変異がある場合は、1026 bpの単一バンドが、変異が無い場合は577 bpと447 bpの2本のバンドが得られた。

20

以上のように、得られるバンドの分子量の違いで、BEI及びBEIIbの欠損を確認した確実な材料を使って分析することが可能となる。

【0048】

(澱粉の精製方法)

澱粉の精製は、冷アルカリ浸せき法 (Yamamoto他、Denpun Kagaku 28:241-244 (1981)) を用いた。

30

10 g の玄米を80%まで精米し、0.1%のNaOHを200 mL加えて一晩4 で放置した。翌日、上清を捨て、乳鉢ですりつぶし、150 μmのメッシュに通して、3, 000 g、4 で10分間遠心分離した。

沈殿に0.1%のNaOHを600 mL加えて氷中で3時間振とうし、一晩4 で放置した。

翌日、上清を捨て、蒸留水でけん濁し、1Nの酢酸で中和した。さらに、蒸留水で5回洗浄し、乾燥させ、乳鉢で粉体にした。

【0049】

(澱粉の枝切り及びゲル濾過)

精製した澱粉5 mg に蒸留水0.25 mLを加えて混合し、2NのNaOHを0.25 mL加えて、37 で2時間糊化させた。

40

これに蒸留水3.65 mLを加え、5NのHClを90 μL加えて中和させた。次に、100 mMの酢酸緩衝液(pH 3.5)を1.5 mL加え、P. amyloderamoosaイソアミラーゼ(EC 3.2.1.68、林原生物化学研究所製)を12.5 μL(約875 unit)加え、37 で24時間揺らしながら反応させた。

そして、エタノールを5 mL加え、ロータリーエバポレーターで乾固させた。これに蒸留水を0.4 mL及び2NのNaOHを0.4 mL加えて、4 で30分間糊化させ、5 μmのフィルターで濾過した後、ろ液をゲル濾過カラムにアプライした。

【0050】

使用したカラムは、TSKgel toyopearl HW55S (300 × 20 m

50

m) 1本に T S K g e l t o y o p e a r 1 H W 5 0 S (300 × 20 mm) 3本(両カラムとも、TOSOH社製)を直列に接続したものであり、溶離液は0.2%のNaCl / 0.05NのNaOHを用いた。試験管1本あたり3mLずつ分取し、68本に分画し、各フラクションの澱粉ヨウ素複合体のmaxを求めた。糖量は、カラムに接続したRIディテクター(RI 8020、TOSOH社製)で検出した。

【0051】

(鎖長分布解析)

鎖長分布解析において、試料は、完熟種子1粒から外内穎及び胚を取り除き、ペンチで胚乳を粉碎した後、エッペンドルフチューブ内でプラスチック製ホモジナイザー(グライナー社製)を用いてさらに磨碎した粉末を用いた。
10

各々に5mLのメタノールを加え、10分間煮沸した。次に、2、500×gで10分間遠心分離し、上清を除去し、90%のメタノールを5mL加え2度洗浄した。

さらに、沈殿に5Nの水酸化ナトリウムを15μL加え、5分間煮沸して澱粉を糊化させた。

その糊化液を冰酢酸9.6μLで中和した後、蒸留水を1089μL、0.6Mの酢酸緩衝液(pH 4.4)を100μL、2%のアジ化ナトリウムを15μL、P. amylo de ramosaイソアミラーゼ(EC 3.2.1.68、林原生物化学研究所製)を2μL(約210unit)加え、スターラーバーで攪拌しながら37で8時間以上反応した。

次に、イソアミラーゼを2μL追加して8時間以上反応した後、常温で10,000×gで遠心分離し、上清を脱イオンカラム(AG501-X8(D)、Bio-Rad社製)で濾過した。
20

試料中の糖含量5~10nmol相当の還元末端をもつ-グルカン鎖を遠心濃縮機で乾燥させ、1-アミノピレン-3,6,8-三硫酸塩(APTS)溶液(2.5%のAPTS、15%の酢酸)を2μL、シアン化ホウ素ナトリウム溶液(1Mのシアン化ホウ素ナトリウム、100%のテトラヒドロフラン)を2μL添加し、55で90分間反応させた。

分析時には12.5倍に蒸留水で希釈して用いた。鎖長分布解析は、キャピラリー電気泳動装置(P/ACE MDQ、AB Sciex社製)を用いて行った。

グルコース重合度(DP)3以上の各ピーク面積を数値化し、DP60までのピーク面積の合計を100%としたときの各DPの割合(Mole%)を算出した。
30

【0052】

(示差走査熱量測定器DSC(Differential Scanning Calorimetry)による糊化温度の測定)

105で2時間乾燥させた澱粉、約3mgに蒸留水9μLを加えて混合し、昇温速度3/分で5から100までの温度変化させたときの示差走査熱量をDSC6100(セイコーインスツル株式会社製)で測定した。

その後、同機種のアプリケーションソフトを用いて、糊化開始温度、糊化ピーク温度、糊化終了温度、及び糊化熱量を算出した。

【0053】

(難消化性澱粉含有率の測定)

まず、すり潰さない炊飯米の難消化性澱粉含有率の測定における炊飯方法について述べる。15mLフタ付き遠沈管に約100mgの精米(5~8粒)を秤量し、パスツールビペットを用いて遠沈管内でサンプルを2回水洗した。遠沈管内の水分が精米重量の1.5倍±0.3mgの水量になるように蒸留水を加えた。すなわち、遠沈管内の全重量が精米の2.5倍になるようにした。遠沈管側面に付いた水を遠心分離機にかけて落とした。5合炊き炊飯器の炊飯釜に約250mLの水道水を入れ、マイクロチューブスタンドとガラスシャーレ(直径12cm)を置き、その上にサンプルの入った15mL遠沈管をななめに置いて5合炊き炊飯器で炊飯した。

次に、すり潰さない炊飯米の難消化性澱粉含有率の測定における炊飯方法について述べ
40

る。15mLフタ付き遠沈管に約1gの精米を秤量し、上記と同様の方法で、加水量1.5倍になるように加水し、炊飯した。炊飯した精米を乳鉢ですり潰し、250mg秤量して難消化性澱粉含有率の定量に用いた。

玄米粉の難消化性澱粉含有率の測定の際は、玄米をペンチと乳鉢で粉碎し、それらを約100mg測り取り、以下の方法で難消化性澱粉含有率の測定を行った。

【0054】

難消化性澱粉含有率は、R S assay Kit（メガザイム社製。以下、「R S 測定キット」という。）により測定した。

R S 測定キットの測定用のパンクレアチン - アミラーゼ（10mg/mL）+アミログルコシターゼ（3U/mL）は以下の通り作成した。50mL遠沈管に0.1Mマレート・ナトリウム・バッファー（pH 6.0）50mLと、R S 測定キットに付属のブタ臍臍 - アミラーゼ0.5gを溶かし、氷上で5分間振とう機で攪拌した。300U/unit/mLに希釈したアミログルコシターゼ（AMG）溶液0.5mLを加え攪拌し3,000rpm、25、10分遠心分離し、上清を新しい150mL遠沈管に移した。この試薬は必要分等倍に変化させ、その都度作成した。

【0055】

このように準備したパンクレアチン - アミラーゼ（10mg/mL）+AMG（3U/mL）4mLを各炊飯米に加え、恒温振とう機（MH-10, TATEC社製）を用いて164rpm、37で16時間、激しく振とうさせた。100%エタノール4mLを加えて攪拌し、3,000rpm、25、10分間で遠心分離し、50mL遠沈管に、すばやく上清を回収した。沈殿物に50%エタノールを2mL入れて攪拌した後、再度50%エタノールを8mL加え、全体量を10mLにし、攪拌した。3,000rpm、25、10分間で遠心分離して、上記の50mL遠沈管にすばやく上清を移した。この作業をもう一度行い、沈殿（この中に含まれる難消化性澱粉をrsとする）と上清（この中に含まれる可溶化した澱粉量をnon-rsとする）を分離した。なお、この一連の操作の際に用いた遠心分離機は（Allegra X-30R、BECKMAN社製）であり、スイングローター（SX4400）のパケットを用いた。

【0056】

沈殿に残っている上清をピペットでできるだけ取り除き、15mL遠沈管に入っているrsをプラスチックペッスルで潰しながら、2mLの2M KOHを加えた。スターラーバーを入れ、氷中で20分攪拌した。1.2M酢酸バッファー（pH 3.8）を8mL、AMG（3300U/mL）を0.1mL加えて、rsをグルコースまで分解させた。5分に1回ボルテックスで攪拌しながら、50で30分加熱し、4,500rpm、25、10分間で遠心分離した。

グルコースまで分解されたrsは遠沈管の目盛11mL、non-rsは目盛30mLまで、蒸留水でメスアップした。rsは難消化性澱粉が高いサンプル（難消化性澱粉が15%を超えるもの）及び、non-rsは0.1M酢酸ナトリウムバッファー（pH 4.5）で10倍希釈した。各溶解液及び希釈液10μLとグルコース測定試薬（GOPOD溶液）150μLとをそれぞれ2ホールずつ96穴のマイクロプレートの各穴にアプライした。また、別の穴に、検量線作成のためのグルコース溶液標準液（mg/mL）、その上から、0.1M酢酸ナトリウムバッファー（pH 4.5）、グルコース測定試薬（GOPOD溶液）をアプライした。マイクロプレートシートでふたをし、ハイブリオーブン（TATEC HB-80）で50、20分間反応させた。反応後、マイクロプレートリーダーを用いて、510nmの吸光度を測定した。

グルコース溶液の測定値から検量線を引き、各サンプルのグルコース濃度（μg/μL）を求め、100mg精米中のrs及びnon-rs量を算出した。難消化性澱粉含有率を示す難消化性澱粉含有率（%）は以下の式（1）により算出した。

$$\text{難消化性澱粉含有率（%）} = \frac{rs(\text{mg})}{[rs(\text{mg}) + non-rs(\text{mg})]} \dots \dots \text{式（1）}$$

10

20

30

40

50

【0057】

〔結果〕

まず、図1を参照して、*b e 1 / b e 2 b* (#1403) 及びそれらの親変異体 (EM557及びEM10) と野生型 (台中65号と金南風) の完熟胚乳から抽出したタンパク質のウエスタンブロッティングの結果について説明する。

なお、EM557及びEM10は、胚の突然変異源であるMNU (N-methyl-N-nitrosourea、メタンニトロソウレア) 処理を用いて選抜した。MNU処理は、文献 (非特許文献6及びYano, M., Okuno, K., Kawakami, J., Satoh, H. and Omura, T. (1985) High amylose mutants of rice, *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet* 69: 253-257.) に記載された方法に従って行った。

また、EM557の親系統は台中65号、EM10の親系統は金南風である。

【0058】

具体的には、本実施例のイネ変異体は、*b e 1 / b e 2 b* (#1403) 及びそれらの親変異体 (EM557及びEM10) と野生型 (台中65号と金南風) である。選抜により得られたF3種子が、望みの遺伝子型をホモに持つかを確認するため、ウエスタンブロッティングでBEI及びBEIIbのタンパク質バンドを検出した。

【0059】

図1(a)の写真は、#1403のF3種子及び親変異体及び野生型の種子各1粒から、ウレア緩衝液 (8M Urea, 125mM Tris-HCL, pH 6.8, 4% SDS, 5% 2-メルカプトエタノール) を用いて抽出したタンパク質をSDS-PAGEで分離し、BEI抗体で検出を行ったウエスタンブロッティングの検出結果を示す。図1(b)の写真は、BEIIb抗体で検出した結果を示す。各レーンは、左から、#1403の異なる種子 (6粒)、*b e 1* (EM557)、*b e 2 b* (EM10)、金南風及び台中65号の種子1粒から抽出したタンパク質を示す。

#1403のタンパク質を抽出したウエスタンブロッティングにおいては、いずれの種子でもBEI及びBEIIbバンドが欠損していた。

【0060】

次に、図2において、BEI及びBEIIbの欠損を確認するための分子マーカーを用いたPCR增幅後の制限酵素せん断したDNAバンドパターンを示す。BEI遺伝子が欠損しているときは、173bpと30bpのバンドが、正常な場合は、203bpのバンドが検出される。同様に、BEIIb遺伝子が欠損しているときは、1026bpのバンドが、正常な場合は、577bpと447bpの2本のバンドが検出される。#1403の異なる6個体由来のDNAでは、BEIにおいては、173bpと30bpの2本のバンド、BEIIb遺伝子においては、1026bpのバンドが得られたことから、BEI及びBEIIb遺伝子が欠損していることが証明された。

【0061】

次に、図3を参照して、*b e 1 / b e 2 b*二重変異体米及び、それらの親変異体 (EM557及びEM10) と野生型 (台中65号と金南風) の各クローニの完熟玄米の形態について説明する。

各クローニにおいて、左図は完熟玄米の下から光を当てて撮影した写真、右図は完熟玄米の上から光を当てて撮影した写真である。*b e 1* 親変異体の種子は、野生型とほとんど変化が無かったが、*b e 2 b*のクローニであるEM10の種子は白濁し、野生型 (日本晴) より小さかった。

これに対して、*b e 1 / b e 2 b*のクローニである#1403の種子は、*b e 2 b*のEM10と同様、玄米全体が白く濁る「白濁」の形態を示した。これに加え、#1403の種子の大きさは、EM10と比べて大きかった。

【0062】

また、図3は、*b e 1 / b e 2 b* (#1403)、それらの親変異体 (EM557及び

10

20

30

40

50

E M 1 0)、及び野生型(台中65号及び金南風)の玄米1粒重(mg)を測定したデータも示している。図3において、測定のn=50であり、玄米重量(mg)は平均±標準誤差、相対値は日本晴を100としたときの値を、それぞれ示す。

このように、be2bのクローンであるEM10は、野生型の56.9%の種子重量であった。

また、be1/be2bのクローンである#1403の玄米重量は野生型(金南風)の62.6%と、親系統のEM10より有意に大きく、玄米重量のさらなる減少は見られなかった。

【0063】

次に、図4を参照して、アミロペクチンの鎖長分布について説明する。

図4は、be1/be2b(#1403)、それらの親変異体(EM557及びEM10)、及び野生型(台中65号及び金南風)の完熟胚乳のアミロペクチンの鎖長分布を示すグラフである。図4において、横軸は、DP(degree of polymerization)は、グルコースの重合度を示す値である。縦軸は、Molar(%)を示す。

BEIIbの单一変異体のクローンであるEM10は、DP14の短鎖が野生型と比べて激減し、その代わりDP15の長鎖が増加していた。

また、be1/be2bのクローン#1403は、EM10のパターンに類似してDP6~14の短鎖の減少が大きいのが特徴であった。しかしながら、DP10~19の減少の程度はEM10より増加しており、DP20以上の長鎖は、EM10より増加していた。

以上のように、#1403のアミロペクチンの鎖長分布パターンは、EM10を野生型と比較した場合よりも、短鎖が減少し長鎖が増加する、より長鎖が多くなる特徴を示した。

【0064】

次に、下記の表1を参照して、ゲル濾過法による澱粉構造解析について説明する。

【0065】

【表1】

枝切り澱粉およびアミロペクチンのゲル濾過法による澱粉構造解析

系統	Fraction. I (%)	Fraction. II (%)	Fraction. III (%)	III/II
台中65号(WT)	21.1±0.3	19.7±0.1	59.2±0.4	3.0±0.0
金南風(WT)	20.6±0.2	18.9±0.2	60.5±0.1	3.2±0.0
EM557(be1)	21.6±0.3	18.6±0.1	59.8±0.4	3.2±0.0
EM10(be2b)	26.5±0.7	37.3±0.6	36.2±0.5	1.0±0.0
#1403(be1/be2b)	51.7±0.4	31.2±0.2	17.1±0.2	0.5±0.0

平均値±標準誤差, n=3

Fraction. I : 見かけのアミロース含量

Fraction. II : アミロペクチン長鎖

Fraction. III : アミロペクチン短鎖

【0066】

表1において、測定のn=3、エラーバーは標準誤差を示す。

澱粉を枝切りしたもののゲル濾過パターンは、3つのピークにわかれ、最も速く検出されるピーク(Fraction I)が見かけのアミロース、2番目に検出されるピーク(Fraction II)がクラスターを連結するB2鎖より長いアミロペクチンの長鎖、3番目に検出されるピーク(Fraction III)がアミロペクチンのクラスター内の短鎖である。表1は、それぞれbe1/be2b(#1403)、それらの親変

異体（EM557及びEM10）、及び野生型（台中65号及び金南風）のゲル濾過パターンから数値化したFr. I~IIIの各フラクションの割合とFr. IIIのIIに対する割合を示す。

【0067】

b e 1 は、枝切りした澱粉のゲル濾過の結果、見かけのアミロース含量が野生型と同等であった。b e 2 b は、見かけのアミロース含量が野生型に比べて約1.5倍高い（非特許文献19）。本実施例の実験結果においても、金南風の見かけのアミロース含量は20.6%であるのに対し、b e 2 b のクローンEM10は26.5%と約1.3倍の値を示した。

これに対して、b e 1 / b e 2 b のアミロース含量は51.7%と、b e 2 b のクローンEM10よりも更に約2.0倍高かった。また、b e 2 b では、短鎖の割合であるII/I / III 値が1.0と非常に小さいことから、アミロペクチンの長鎖の割合が非常に大きかった。b e 1 / b e 2 b は、この値が0.5であり、さらにアミロペクチンの長鎖の割合が高かった。

【0068】

以上のことから、b e 1 / b e 2 b は、b e 2 b よりアミロペクチンの長鎖の割合が高いえ、アミロース含量がb e 2 b より格段に高い値を示す、ということが明らかとなつた。

これにより、アミロペクチンの長鎖とアミロース含量が高い澱粉においては難消化性澱粉の割合が多い傾向があり、b e 1 / b e 2 b においても、澱粉の難消化性澱粉は非常に高くなることが分かる。このため、ダイエット素材を中心とした食品加工分野や添加剤及び工業資材として特徴的な製品を製造できると考えられる。

【0069】

次に、下記の表2を参照して、b e 1 / b e 2 b の澱粉の糊化温度について説明する。

【0070】

【表2】

示差走査熱量計(DSC)による熱糊化温度

系統名(遺伝子型)	糊化開始温度(°C)	糊化ピーク温度(°C)	糊化終了温度(°C)	糊化熱量(mJ/mg)
台中(WT)	51.0 ± 0.1 **	58.0 ± 0.0 **	64.1 ± 0.1 **	11.3 ± 0.1 **
金南風(WT)	45.4 ± 0.0 **	53.0 ± 0.1 **	59.7 ± 0.0 **	9.6 ± 0.2 **
EM557(b e 1)	45.6 ± 0.3 ***	53.8 ± 0.1 *,**	60.9 ± 0.1 *,**	10.0 ± 0.4 *,**
EM10(b e 2 b)	52.2 ± 0.6 ***	69.3 ± 0.4 *,**	83.5 ± 1.6 *	17.6 ± 2.0 **
#1403(b e 1/b e 2 b)	61.4 ± 1.3 *	76.8 ± 0.2 *	85.7 ± 0.7 *	7.1 ± 0.6 *

* WTと有意差あり(P<0.05)

** b e 1/b e 2 b と有意差あり(P<0.05)

【0071】

表2は、b e 1 / b e 2 b (#1403)、それらの親変異体（EM557及びEM10）、及び野生型（台中65号及び金南風）の胚乳澱粉の糊化温度及び糊化熱量を示す表である。

具体的には、b e 1 / b e 2 b (#1403)、それらの親変異体（EM557及びEM10）、及び野生型（台中65号及び金南風）の各澱粉糊試料の糊化開始温度、糊化ピーク温度、糊化終了温度、糊化熱量を示差走査熱量分析器（DSC）で測定した結果を示す。

EM10の糊化ピーク温度は金南風より約16度高かった。#1403は、EM10よりさらに7.5度高く、測定した澱粉の中では最も高い糊化温度を示した。一方、#1403の糊化熱量は、測定した澱粉の中で最も低い値を示した。上記の糊化の際に得られる吸熱反応は、アミロペクチンに由来しており、アミロース含量が極端に高い#1403は、アミロペクチンが少ないため、糊化熱量も低かったものと考えられる。

【0072】

次に、表3を参照して、b e 1 / b e 2 b の澱粉の難消化性澱粉含有率について説明す

る。

【0073】

【表3】

炊飯米および玄米粉の難消化性澱粉(RS)含有率(%)

系統名(遺伝子型)	すり潰さない炊飯米	すり潰した炊飯米	玄米粉
台中(WT)	1.3±0.1	0.2±0.0	0.9±0.0
金南風(WT)	1.2±0.0	0.2±0.0	0.9±0.0
EM557(<i>be1</i>)	1.4±0.3	0.1±0.0	1.2±0.0
EM10(<i>be2b</i>)	27.4±1.6	11.6±0.2	10.8±0.2
#1403(<i>be1/be2b</i>)	76.2±1.4	28.4±0.4	35.1±1.0
高RS米系統A	15.8±1.7	8.0±0.3	4.7±0.2
高RS米系統B	40.0±0.6	5.7±0.2	30.2±0.9
高RS米系統C	4.8±0.7	3.7±0.2	11.2±0.2

【0074】

表3は、*be1/be2b*(#1403)、それらの親変異体(EM557及びEM10)、及び野生型(台中65号及び金南風)に加え、比較対象として高難消化性澱粉米系統である3系統(高RS米系統A～C)の精米の炊飯米及び玄米粉の難消化性澱粉量を示す表である。表3において、数値は平均±標準誤差(N=3)を示す。

20

具体的には、*be1/be2b*(#1403)、それらの親変異体(EM557及びEM10)、及び野生型(台中65号及び金南風)に加え、高RS米系統A～Cの精米を1.5倍の加水量で炊飯し、すり潰していない炊飯米の難消化性澱粉含有率、乳鉢ですり潰した炊飯米及び加熱していない玄米粉をRS測定キットで測定した結果を示す。

【0075】

ここで、高RS米系統Aは、BEIIb活性が低下し、スターチシンターゼIIa活性も低下した難消化性澱粉含有率が高い株である#4019(特許文献5)を用いた。#4019は、超多収米である秋田63号と戻し交配を行うことで、種子重が元の1.5倍に増大したものである(非特許文献19)。

30

高RS米系統Bは、EM10を親系統として、アミロース含量が0%のモチ米の変異体と交配により作成した二重変異体である(特許文献6)。このモチ米と交配した二重変異体は、アミロースを含まないにもかかわらず、EM10のアミロペクチンの平均鎖長が極端に長いという性質に由来する難消化性澱粉を備えている。なお、高RS米系統Bは、品種改良がおこなわれていないため、種子は非常に小さく、収量が上がらないため、実用性が非常に低い。

高RS米系統Cは、BEIIb活性が低下した*be2b*の株の一例であるEM129を多収品種と戻し交配して品種登録申請された、ちくし粉85号である(非特許文献22)。この高RS米系統Cは、血糖値上昇抑制作用が示され、EM10と比べると多収である。

40

【0076】

結果として、高RS米系統Aの系統のすり潰さない炊飯米の難消化性澱粉含有率は15.8%、すり潰した炊飯米の難消化性澱粉含有率は8.0%、玄米粉の難消化性澱粉含有率は4.7%といずれも親系統のEM10より低い値を示した。

高RS米系統Bは、アミロースが含まれず、玄米粉の難消化性澱粉含有率は30.2%と高いにもかかわらずすり潰した炊飯米では、EM10と比べると、難消化性澱粉含有率が比較的少なかった。

高RS米系統Cの難消化性澱粉含有率は、玄米粉では、11.2%とEM10と同等の値を示すものの、炊飯米の難消化性澱粉含有率はEM10よりはるかに低くなっていた。

【0077】

ここで、すり潰さない炊飯米の難消化性澱粉含有率は、精米度合いによってその数値が

50

左右される。すなわち、種子が小さく、しわが寄った E M 1 0 、 # 1 4 0 3 、高 R S 系統 B は、精米した際、果皮が多く残っているので、それ以外の系統より難消化性澱粉含有率が高い値が出る傾向にある。一方、すり潰した炊飯米は、果皮が残っていたとしてもすり潰することで胚乳の内部が露出するため、精米度合いには左右されにくい。すり潰さない炊飯米において、# 1 4 0 3 の難消化性澱粉含有率は 7 6 . 2 % と、いずれの系統よりも格段に高い値を示した。

【 0 0 7 8 】

すり潰した炊飯米の難消化性澱粉含有率は、すり潰さない炊飯米よりいずれの系統でも低い値を示したが、# 1 4 0 3 は 2 8 . 4 % と、E M 1 0 や他の高 R S 米系統の中でも格段に高い値を示した。玄米粉については、高 R S 米系統 B では、3 0 . 2 % と高い値を示したが、# 1 4 0 3 の R S は、これよりも高い 3 5 . 1 % であった。10

以上のように、炊飯米、玄米粉のいずれでも、# 1 4 0 3 の R S は、従来の高 R S 米の中でも格段に高い値を示すことが明らかになった。

【 0 0 7 9 】

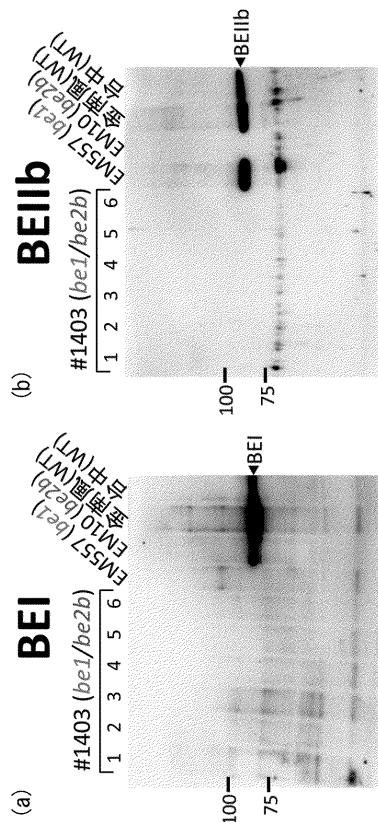
なお、上記実施の形態の構成及び動作は例であって、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で適宜変更して実行することができることは言うまでもない。

【 産業上の利用可能性 】

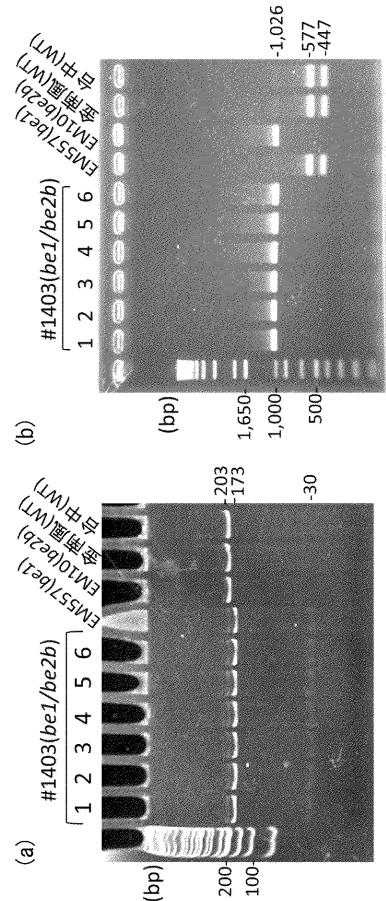
【 0 0 8 0 】

本発明は、ジャポニカ米由来のイネ枝作り酵素 I 型 (B E I) 及び I I b 型 (B E I I b) の活性が低下したイネ二重変異体のイネ変異体のイネ種子は、イネでは類い希な難消化性澱粉含量となるため、産業上利用可能である。20

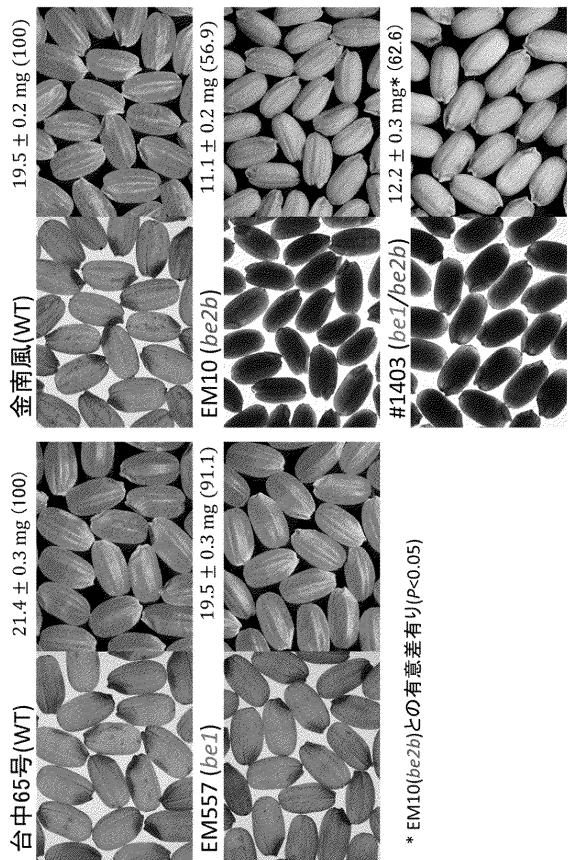
【 図 1 】



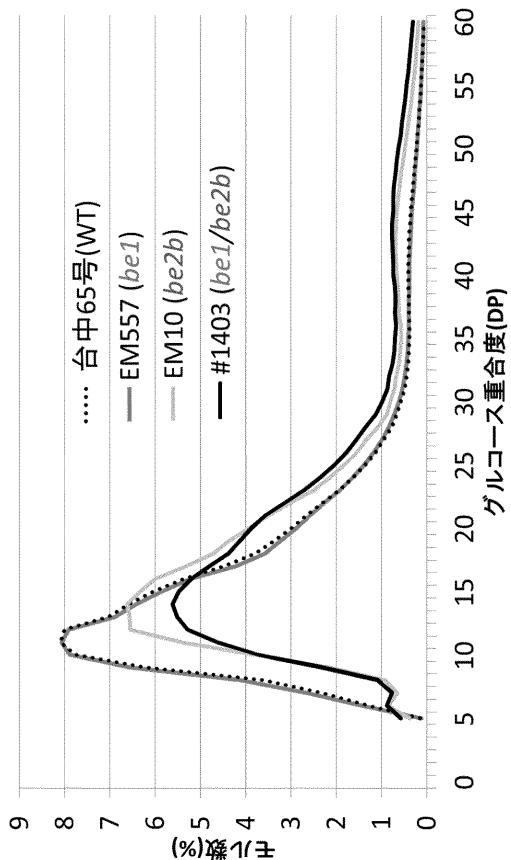
【 図 2 】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/6876 (2018.01) A 2 3 L 33/21
C 1 2 Q 1/6876

(72)発明者 藤田 直子
秋田県秋田市下新城中野字街道端西 241 - 438 公立大学法人 秋田県立大学生物資源科学部
内

(72)発明者 クロフツ 尚子
秋田県秋田市下新城中野字街道端西 241 - 438 公立大学法人 秋田県立大学生物資源科学部
内

(72)発明者 三浦 聰子
秋田県秋田市下新城中野字街道端西 241 - 438 公立大学法人 秋田県立大学生物資源科学部
内

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB02 AD08 CA11 CA14 CB01 CB02
4B018 MD34 MD49 ME14 MF01
4B023 LC09 LE07 LE19 LG10 LP20
4B025 LB25 LD01 LG02 LP20
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ04 QQ09 QQ12 QQ42 QQ52 QR32 QR35
QR55 QR62 QS02 QS16 QS25 QS32 QX01 QX02