

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350115

研究課題名(和文) 飯の糖量に関わるアミラーゼインヒビターの炊飯動態とその作用解析

研究課題名(英文) Distribution of  $\alpha$ -glucosidase interacting proteins, which could affect glucose production during cooking, in rice grains and their elution behavior during rice cooking

研究代表者

大倉 哲也(OOKURA, Tetsuya)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・主席研究員

研究者番号：70353935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ご飯の甘味にはグルコースを含む還元糖の果たす役割が大きい。本研究では、オリゴ糖の非還元末端よりグルコースを生成する  $\alpha$ -グルコシダーゼと相互作用するタンパク質に注目し、その抗体を製作して解析を行った。玄米中で  $\alpha$ -グルコシダーゼと当該タンパク質とは、アミロプラスト細胞壁に主に局在していた(免疫染色)。炊飯過程では当該タンパク質は、炊飯液並びに米粒内の両方で検出された(イムノブロット)。炊飯過程での米粒からのタンパク質抽出効率が変動したため、ELISAによる当該タンパク質の定量はできなかった。その結果、 $\alpha$ -グルコシダーゼと当該タンパク質の相互作用が飯の糖量に及ぼす効果については、今後の課題として残された。

研究成果の概要(英文)：Glucose and reducing sugars play important roles for sweet taste of cooked rice. We focused on the  $\alpha$ -glucosidase, which produces glucose from non-reducing ends of starch, and its interacting proteins. Having produced antibodies against the interacting proteins, we investigated their distribution in rice grains and their elution behavior during rice cooking with immunoblot analysis and immuno-fluorescent staining.

In brown rice, immunostain analysis revealed that the interacting proteins and  $\alpha$ -glucosidase were mainly localized along cell walls of amyloplasts. During rice cooking, the interacting proteins were detected in rice grains and in cooking water. Not having gotten reproducible protein recovery from cooked rice grains, we were unable to obtain amounts of the interacting proteins in cooked rice grains. Further study is required for elucidating how the interacting proteins and  $\alpha$ -glucosidase affect glucose production during rice cooking.

研究分野：食生活学

キーワード：免疫染色 炊飯 イムノブロット ELISA  $\alpha$ -グルコシダーゼ アミラーゼインヒビター

## 1. 研究開始当初の背景

米(*Oryza sativa*)は小麦、とうもろこしと並び世界の三大穀物とされる重要な食料資源である。世界で年間6億トン以上が生産され、日本をはじめとするアジア地域で集中的に消費されている。

ご飯のおいしさを決定する甘みや粘りには、炊飯中に生成する還元糖やデンプンの物理構造変化が寄与している。米粒中のタンパク質含有率が高まると硬くて粘りの少ない飯になり、これにはプロラミン(アルコール可溶)が集積するプロテインボディ I の関与が示唆されている<sup>1</sup>。一方、塩溶性低分子グロブリンに属するαアミラーゼ/トリプシンインヒビター(以下αアミラーゼインヒビター)は、アレルゲンとして胚乳中に含まれるという報告<sup>2</sup>はあるものの、食味との関わりは未知で、炊飯過程における米粒内での挙動に関する報告はなされていない。

申請者は、これまで米の内在性デンプン分解酵素について米粒内局在や炊飯中の溶出挙動を明らかにしてきており(図1)、炊飯過程における糖生成メカニズムについて多くの知見を蓄積してきた。

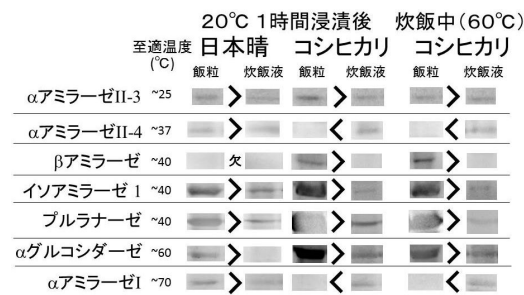


図1 デンプン分解酵素(7種)の炊飯過程における飯粒内外の分布

すなわち浸漬時にデンプン分解酵素の一部は炊飯液中に漏れるものの酵素によるデンプンの分解は主に飯粒中で起こり<sup>3,4,5</sup>、分解酵素の分布や動態には品種間で差があることを明らかにした<sup>3,5</sup>。このように、酵素に対する特異的な抗体を作製して、抗原抗体反応を用いることにより、酵素の動態把握を可能とする手法を確立してきている。

また申請者らは、炊飯の温度履歴を種々に変えた条件で炊飯を行うことにより、昇温速度が遅いほどグルコース量が増加し<sup>6,7,8</sup>、昇温期に60で15分間保持させると至適活性温度を60に持つαグルコシダーゼが活性化し<sup>8</sup>、顕著なグルコースの生成が行われることを示して、食味発現のメカニズムを解明する研究を行ってきた。

申請者は、米胚乳からαグルコシダーゼを陽イオン交換樹脂を用いて精製する過程でαグルコシダーゼ活性を示す画分に20kDa以下のαアミラーゼインヒビターが含まれており、この画分を50kDa分子量カット膜で遠心濾過してもアミラーゼインヒビターが膜を通過していないことを見出している。この結果は、ア

ミラーゼインヒビターがαグルコシダーゼと複合体を形成していることを示唆し、米の炊飯過程でも「αグルコシダーゼが局在する部位にαアミラーゼインヒビターが共存し、相互作用により酵素活性を調節している」のではないかと仮説をたてるに至っている。

本研究では米の炊飯時に、αアミラーゼインヒビターがどこに存在するかをデンプン粒レベルから米一粒レベルで精査し、αアミラーゼインヒビターとαグルコシダーゼとの動態と合わせて、αアミラーゼインヒビターと酵素との相互作用によりグルコースの生成が調節されるメカニズムを解明すること、および得られた知見をもとに嗜好性の高い米飯の炊飯条件を考察し、米の利用拡充に寄与する基礎的かつ有用なデータを蓄積することを目指す。

## 2. 研究の目的

米は日本人の食生活を特徴付ける重要な食品である。飯の食味に胚乳内デンプンがデンプン分解酵素で分解されて生じる糖が寄与することは知られている。が、デンプン分解酵素と相互作用するタンパク質の挙動や食味への寄与については明らかにされていない。本研究では、デンプンを分解するαグルコシダーゼと相互作用するαアミラーゼインヒビターが共局在することに注目し、米の炊飯過程における溶出挙動や米粒一粒レベルからデンプン粒レベルまでの局在の変化等について免疫染色法を主とする解析方法を用いて明らかにする。これにより、従来困難とされているタンパク質の挙動や相互作用を解析し得る実験手法を提案し、嗜好性の高い飯の炊飯条件を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、イムノプロット法を用いて炊飯中のαアミラーゼインヒビターの溶出挙動解析を行うとともに、凍結切片を作製して免疫染色に適した特異的抗体を用いてデンプン粒レベルおよび一粒レベルでαアミラーゼインヒビターとαグルコシダーゼの分布を解明するとともに、アミラーゼインヒビターとαグルコシダーゼの相互作用(共局在・存在比・温度依存性)が炊飯過程でのグルコースの生成に果たす役割を明らかにする。このため、下記の事項について研究を進める。

研究期間内では以下の3つの項目について明らかにする予定である。

(1) コシヒカリにおけるαアミラーゼインヒビターの局在の解明と溶出挙動解析  
免疫蛍光染色法を用いてコシヒカリ玄米におけるαアミラーゼインヒビターの分布を明らかにするとともに、炊飯過程における溶出挙動をイムノプロット法で解析する。

(2)異なる米品種での $\alpha$ アミラーゼインヒビターの局在の解明と溶出挙動解析  
免疫蛍光染色法を用いて異なる品種の米における $\alpha$ アミラーゼインヒビターの分布を明らかにするとともに、炊飯過程における溶出挙動をイムノプロット法で解析する。

(3) $\alpha$ アミラーゼインヒビターと $\alpha$ グルコシダーゼの相互作用と動態解析  
炊飯過程における $\alpha$ アミラーゼインヒビターと $\alpha$ グルコシダーゼの動態を免疫染色法で、量的な相関をELISA法で解析し、さらに異なる温度履歴で調理する場合や、食味が異なる同一品種で動態解析を行うことで、相互作用によるグルコース生成の調節メカニズムを解明する。

#### 4. 研究成果

ご飯の甘味にはグルコースを含む還元糖の果たす役割が大きいとされている。本研究ではオリゴ糖の非還元末端よりグルコースを生成する $\alpha$ グルコシダーゼと相互作用する $\alpha$ アミラーゼインヒビターに注目し、その抗体を作製して米の炊飯過程における溶出挙動や米粒一粒レベルでの局在の変化等について解析を行った。

$\alpha$ アミラーゼインヒビターに対するポリクローナル抗体を用いたイムノプロット解析で、炊飯途上(20、40、60)において $\alpha$ アミラーゼインヒビターは炊飯液並びに米粒内の両方で検出された。炊飯液や米粒ならびに飯粒を摩砕した粉からの抽出条件の最適化を図りながら、抽出液中の $\alpha$ アミラーゼインヒビター量を定量する系の構築を試みた。米粒および摩砕した飯粒については、抽出されるタンパク質の種類及び総タンパク量の繰り返し精度が低く定量を行うことができなかったものの、炊飯液についてはイムノプロットで得られた溶出挙動結果と矛盾しないプレリミナリーな結果が得られた。

$\alpha$ アミラーゼインヒビターを主に認識する別の抗体を用いて、3種の粳米品種(コシヒカリ・ミルキークイーン・日本晴)について玄米および90%搗精米の炊飯途上の飯粒において、 $\alpha$ グルコシダーゼのペプチド配列に対する抗体とともに蛍光二重染色を行った。玄米中で $\alpha$ グルコシダーゼと $\alpha$ アミラーゼインヒビターは、主に糊粉層並びにアミロプラスト細胞壁において共局在していたが、品種や炊飯途上の飯粒によっては $\alpha$ グルコシダーゼと $\alpha$ アミラーゼインヒビターとが共局在しない切片もあった。この局在の差が、炊飯中の飯粒中の $\alpha$ アミラーゼインヒビター量と相関するかについては、飯粒中の $\alpha$ アミラーゼインヒビターが定量できていないため現時点では不明である。

また、90%搗精米中の $\alpha$ アミラーゼインヒビターと $\alpha$ グルコシダーゼの相互作用は免疫沈

降により確認できたものの、飯粒からの繰り返し精度の高い抽出法が確立できなかったため、炊飯途上の飯粒内の $\alpha$ アミラーゼインヒビターの絶対量を測定することができなかった。そのため、 $\alpha$ アミラーゼインヒビターと $\alpha$ グルコシダーゼとの相互作用が飯の糖量に及ぼす効果については、今後の課題として残された。

#### 参考文献

1. 田中ら、*Agric. Biol. Chem.* **44**、1633-1639(1980)
2. 山田ら、*日本食品科学工学会誌*、**53**、583-586 (2006)
3. Tsuyukubo ら、*Food Sci. Tech. Res.*、**19**、303-311 (2013)
4. Tsuyukubo ら、*Food Sci. Tech. Res.*、**18**、659-666 (2012)
5. Tsuyukubo ら、*Food Sci. Tech. Res.*、**16**、523-530 (2010)
6. 馬橋ら、*日本調理科学会誌*、**43**、237-245 (2010)
7. 馬橋ら、*日本調理科学会誌*、**43**、228-236 (2010)
8. Mabashi ら、*Food Research International* **42**(1)、157-164(2009)

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

大倉哲也 他 米内在性プルラナーゼの米粒内分布 日本農芸化学会平成 27 年度大会 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

researchmap

<https://researchmap.jp/fri/?lang=japanese>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

大倉 哲也 (OOKURA, Tetsuya)

国立開発法人農業・食品産業技術研究機構・食品研究部門・主席研究員

研究者番号：70353935

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

香西 みどり (KASAI, Midori)  
お茶の水女子大学・人間創成科学科・教授  
研究者番号：10262354

露久保 美夏 (TSUYUKUBO Mika)  
東洋大学・食環境科学部・助教  
研究者番号 50646924

(4)研究協力者

なし