

コムギの穂発芽に係る種子休眠性と 二次加工適性劣化要因に関する研究

一ノ瀬 靖則

抄 録

コムギ生産における高品質化に役立つ知見を得るために、加工適性の劣化に関連の深い穂発芽性について、その発生要因と二次加工適性である製パン適性が劣化するメカニズムを解析するとともに、低アミロ化の簡易迅速測定方法について検討した。

穂発芽と関連する種子休眠性と種子胚のアブシジン酸感受性は同様の推移パターンを示し、穂発芽耐性弱品種は種子の成熟前に低下するのに対して、耐性強品種のアブシジン酸感受性は完熟期まで維持された。しかし、種子休眠性およびアブシジン酸感受性には、吸水温度の影響が大きく、多くの耐性強品種は低温でも休眠性とアブシジン酸感受性を維持したが、耐性強品種の中には低温条件下では急速に種子休眠性とアブシジン酸感受性を低下させる品種・系統が認められた。したがって、コムギ収穫期の天候が不順となる地域においては、コムギに低温での種子休眠性と ABA 感受性を付与することが重要であると考えられた。また、穂発芽と種子中の酵素活性との関係において、澱粉分解酵素である α -アミラーゼ活性と蛋白質分解酵素であるエンドプロテアーゼ活性では発現時期が異なり、 α -アミラーゼ活性は発芽の早い時期から急増するのに対して、エンドプロテアーゼ活性は発芽が進んでから増加することを明らかにした。

穂発芽による二次加工適性の劣化においては、製パン適性と蛋白質分解酵素であるエンドプロテアーゼ活性との間に高い負の相関が認められた。これをもとに、エンドプロテアーゼ活性の増加による小麦グルテンの分解が製パン適性劣化の主要因であることを明らかにした。

さらに、ドライケミストリー法による低アミロ小麦の簡易迅速選別法の可能性を検討した。その結果、ドライケミストリー法による小麦種子の α -アミラーゼ活性測定が簡易選別に有効であることを明らかにした。

キーワード：小麦、穂発芽性、製パン適性、 α -アミラーゼ、エンドプロテアーゼ

Studies on variation in seed dormancy and deterioration of bread-making quality related to the pre-harvest sprouting in wheat

Yasunori ICHINOSE

Abstract

This study focused on the cause of pre-harvest sprouting in wheat (*Triticum aestivum* L.) and the deleterious mechanism affecting bread-making quality during germination in order to improve the grain quality of wheat through breeding systems.

ABA-sensitivity in embryos, which is related to pre-harvest sprouting, of a susceptible cultivar was lost in parallel with the decline in grain dormancy prior to maturity. In contrast, the ABA-sensitivity of a pre-harvest sprouting tolerant cultivar was maintained up to maturity.

Seed dormancy and ABA-sensitivity in embryos are related to incubation temperature. At low incubation temperatures, large variations were evident in seed dormancy and ABA sensitivity even in pre-harvest sprouting tolerant cultivars. Some pre-harvest sprouting tolerant cultivars maintained dormancy with a high ABA sensitivity but other tolerant cultivars showed breaking of dormancy with loss of ABA sensitivity.

Considering wheat production in areas where weather conditions at maturity are often unfavorable, it would be of significant benefit to develop cultivars lacking low temperature germinability with ABA sensitivity.

In relation to pre-harvest sprouting and enzyme activity, α -amylase activity in the grains increased immediately after the start of imbibition. In addition, endo-protease activity increased from 7 to 10 days after the start of imbibition.

Deterioration mechanism of bread-making quality associated with pre-harvest sprouting.

There is a high degree of correlation between the endo-protease activity of whole wheat flour and bread-making quality. Therefore, it would seem that the main reason for the loss of bread-making quality of flour damaged by germination is the loss of endo-protease in the wheat grain, which also results in partial gluten decomposition.

We examined methods to estimate the maximum viscosity (MV) of wheat flour using a multilayered film dry chemistry system. This system can be applied as a useful method for the selection of wheat with low α -amylase activity and a high MV value in field conditions.

Key Words: wheat, preharvest sprouting, bread-making quality, alpha-amylase, endo-protease

Accepted 8 February, 2008

目 次

I	緒 言	84
II	登熟に伴う種子休眠性と酵素活性の変化	86
	1) 実験材料および方法	87
	2) 結果および考察	87
III	種子休眠性および酵素活性に対する吸水温度の影響	89
	1 低温吸水での種子休眠性と ABA 感受性の遺伝的変異	90
	1) 材料および方法	90
	2) 結果および考察	90
	2 低温吸水での休眠性と α -アミラーゼ、エンドプロテアーゼ活性の関係	94
	1) 材料および方法	94
	2) 結果および考察	95
IV	穂発芽による製パン性劣化要因の解析.....	100
	1) 材料および方法.....	100
	2) 結果および考察.....	101
V	低アミロ小麦の簡易迅速検定法の開発.....	106
	1) 材料および方法.....	106
	2) 結果および考察.....	107
VI	総合考察.....	113
	謝 辞.....	116
	引用文献.....	116

I 緒 言

国内における主な小麦生産地帯は、北海道、関東及び九州地方であり、そのなかでも北海道における小麦生産量は国内総生産量の6割以上を占めている(農林統計協会 2005)。その栽培面積は1990年には12万 ha まで達し、その後減少したものの、ここ数年は11~12万 ha のレベルにあり(日本麦類研究会 2007)。輪作体系上も重要な基幹作物の一つをなしている。ホクシンやチホクコムギに代表されるうどん用小麦粉原料となる軟質秋播コムギが全体の9割以上栽培されており、パン用小麦粉の原料である硬質春播コムギの栽培は1割程度に過ぎない。しかし、北海道産のパン用小麦に対する評価は高いことから、麺用、パン用を問わず小麦の大生産地である北海道については、実需者から高品質で安定した小麦生産への要望は強い。

これら多方面に利用される小麦粉の品質を大きく劣化させる要因の一つに穂発芽がある。穂発芽とは収穫前の穂中にある種子が発芽する現象をいう。北海道では小麦の成熟から収穫期にあたる7月から8月上旬にかけて、オホーツク高気圧の影響で天候が不順になることが多く、しばしば穂発芽の被害による小麦品質の劣化が大きな問題となっている(長内 1985、柳沢 2001)。一方、関東および九州地方では小麦収穫期が梅雨と競合することが多く(平野 1971)、作柄を不安定にする大きな要因である(藤田 2001)。さらに国外においても、近年世界各地で見られている不安定な天候の影響もあり、穂発芽はアメリカ、ヨーロッパ、カナダ及びオーストラリアをはじめとする主要な小麦生産国で重要な品質問題として捉えられている(長内 1985、Wahl and O'Rourke 1993)。

コムギの穂発芽は種子の休眠性と密接に関連した性質であり、穂発芽を回避するためには休眠性の強化が重要な課題となる。種子休眠性には様々な要因が関与しており、種皮・胚・胚乳それぞれの遺伝要因が相互にかつ複雑に影響し

合っている(Gale 1990)。このうち、種皮色に関しては、コムギ種子は赤粒種と白粒種に分けることができ、一般に赤粒種は白粒種よりも休眠性に優れることが古くから指摘されてきた(Nilsson-Ehle 1914)。このため、穂発芽の危険のある日本においては従来から、赤粒種の栽培が行われている(平野 1971)。また、同じ白粒種および赤粒種内においても品種間差が認められている(Upadhyay and Pausen 1988、McCaig and DePauw 1992)。さらに、コムギ種子中に含まれる発芽抑制物質と種子胚の関係も休眠性に強く関与している。特に種子中に含まれる植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)に対する種子胚の感受性は、種子の休眠性の程度と平行関係にあることから、種子の休眠性の変化を上手く説明することができる休眠性機構の一つとして働いていると考えられている(Walker-Simmons 1987、Hagemann *et al.* 1988、Noda *et al.* 1993、Kawakami *et al.* 1997)。休眠種子の胚はABA以外にもカテキンやタンニンに対してもABAと同様に感受性を示す(Stoy and Sundin 1976)。

一方、外的要因として、コムギ種子の登熟期間における気象条件も休眠性に影響し、特に気温と湿度の影響が大きい。この時期の気温が低いと休眠性は深くなり、逆に高いと浅くなる傾向がある(桑原・前田 1979)。また、収穫期前後には吸水が低温で起こるほど、休眠が打破されやすい(Osanai and Amano 1993、1996、1999)。一般に穀物種子の休眠性は温度に依存しており、コムギの場合は20℃以上で吸水させた場合に休眠性を示す品種であっても、12℃以下では休眠性を失う品種が多い(George 1967、Mares 1984、Oda and Seko 1993、Bewley and Black 1994)。このようにコムギ種子の休眠性が低温吸水により打破されやすい性質であることは、種子の登熟が低温かつ高湿度条件で進むことの多い北海道において特に問題となる。

1975年以降に限ってみても、ここ25年間で程度に変異はあるものの12回の穂発芽被害が報告されている（柳沢 2001）。秋播コムギに比べ成熟期、収穫期が遅い春播コムギでは事態はより深刻である。打開策の一つとして、Osanai and Amano（1993）は北海道における種子登熟期間の気象条件を考慮した低温穂発芽耐性小麦の育種を提案した。その後、低温条件下での系統選抜がこの地域での穂発芽耐性の付与に有効であることが示され（Osanai and Amano 1996、1999）現在では検定温度を10 - 15 °Cとした穂発芽極難系統の選抜が進行している（柳沢 2001）。

そういった選抜効率を高め品種改良を進めて行くには、種子の発達にともなう低温発芽性と胚のABA感受性の経時的変化や、それらの遺伝的変異の大きさおよび相互関係についての基礎的知見の蓄積が大切となってくる。同時に、発芽の過程での種子胚乳中の澱粉や蛋白質の分解反応を触媒する α -アミラーゼやエンドプロテアーゼの活性について、穂発芽の誘引となる低温吸水時での品種間差異を把握する必要がある。

穂発芽の被害で最も問題となるのは、小麦粉中の澱粉の分解による澱粉粘度の低下である。澱粉粘度測定器であるブラベンダー社のアミログラフにより測定した最高粘度（以下、アミロ値と称する）が300 BU（ブラベンダーユニット）以下まで低下したコムギは低アミロ小麦と呼ばれ、その後の二次加工適性が著しく劣化することから、流通面では規格外として扱われ商品価値を失ってしまう（食糧庁管理部検査課 1988、長尾 1995）。コムギの低アミロ化による品質劣化は特にうどん適性への影響が大きく、煮くずれ、ゆで汁への澱粉の溶出、歩留まりの低下などが指摘されている（食糧庁管理部検査課 1988）。このようなコムギの低アミロ化は、子実中の α -アミラーゼの増加による胚乳澱粉の分解によって引き起こされる（安永ら 1963、平野 1971）。

コムギの穂発芽被害に関しては、わが国のみならず世界の小麦生産地帯で問題となってい

る。製めん適性との関係については、子実中の澱粉分解と品質劣化の要因として、アミロ値、フォーリングナンバーおよび α -アミラーゼ活性の検討がなされてきた（MacGregor and Matsuo 1972、Meredith and Pomeranz 1985、MacGregor and Dushnicky 1989、Salomonsson *et al.* 1989、松崎・豊田 1996、Kruger *et al.* 1996）。それによると、 α -アミラーゼ活性は発芽のかなり初期段階から誘導され、それに伴ってアミロ値およびフォーリングナンバーが低下し、品質劣化が顕著となることが示されている。

一方、硬質コムギの製パン適性には、子実中の澱粉とともに貯蔵蛋白質であるグルテンの関与が大きく、発芽に伴うグルテンの劣化にはエンドプロテアーゼが強く影響している（Kruger 1971、Kruger and Preston 1977、Bushuk and Lukow 1987、Lukow and Bushuk 1984、Janssen *et al.* 1996a、Weegels *et al.* 1996）。これまでに、穂発芽による製パン性の劣化は、子実中の α -アミラーゼとエンドプロテアーゼの増加によって起こることが示唆されている（Preston and Kruger 1979、Meredith and Pomeranz 1985、Salomonsson *et al.* 1989、Sun and Henson 1991、Jones and Wrobel 1993）。しかし、製パン性の劣化機構については不明な部分も多く、両酵素の役割も明らかになっていない。このため、今後さらに製パン適性に優れた硬質コムギを育成するためには、製パン性の劣化機構について、両酵素の役割を含めてさらに解明を進める必要がある。

さて、最近わが国の小麦生産は大きな転換期に遭遇した。国産小麦は2000年度から民間流通へと移行し、品質評価基準にしたがって価格差が設定される品質取引が行われている。製粉用小麦の品質評価基準としては、容積重、水分とともに澱粉粘度が上げられており、この基準にしたがって取引価格の増減が行われる。このうち、澱粉粘度については、アミログラフに比べて少量サンプルで短時間に測定可能なフォーリングナンバーによる測定値（以下、フォーリングナンバー値と称する）300が基準となり、当面は270以下の小麦は取引価格が減額されるこ

ととなった(農林水産省 2000)。したがって、小麦の生産現場においては、これまで以上に低アミロ化防止への取り組みが大きな課題となってくる。また、健全な小麦であっても低アミロ小麦が少量でも混入すると、全体のアミロ値が大きく低下するため、低アミロの被害を軽減するためには健全粒と低アミロ小麦を仕分けして流通させることが重要である。これまでに道内の生産現場ではフォーリングナンバーの導入が進み、これをもとにした小麦の仕分けが行われている。また、 α -アミラーゼ活性とアミロ値およびフォーリングナンバー値の間には高い相関関係が認められる(中津ら 1989、渡辺ら 1994)ことから、北海道の農協では検査現場にオートアナライザーを用いた α -アミラーゼ活性自動測定装置の導入が進められている(中津ら 1997)。しかし、検査現場では、より簡便で迅速なシステムの開発が強く望まれている。

主に臨床分野で用いられているドライケミストリー法は、乾燥状態または外観上乾燥した状態で保存された試薬が、測定時に液状の試料と出会うことにより、初めて試薬に含まれるマトリックスにおいて化学反応が進行する分析法である(末広 1983)。このため、簡易な操作で短時間に高精度なデータが得られるなど既存の液体法と比べて利点が多く、さらに生産現場においても簡便に生化学分析を導入することができる(堀金ら 1997、Skerritt and Heywood 2000)。したがって、この方法は低アミロ小麦の簡易迅速検定を行う上でも有効な方法であると考えられる。

以上述べたように、わが国の小麦生産の安定

化を図り、自給率を向上させる上で、穂発芽被害の克服はわれわれに課せられた大きな課題であり、対応が迫られている。そこで、本研究は穂発芽対策技術の発展に資するための基礎的知見を提供することを目的に実験を行い、以下に結果を示し論議した。Ⅱで穂発芽発生の内的要因を理解し詳細に特徴付けるため、生産の中心地である北海道において登熟に伴う種子胚のABA感受性と α -アミラーゼ活性の変化を解析した。Ⅲでは穂発芽を誘引する気象条件を想定して、異なる種子発達時期に低温吸水処理を施し、そこでの休眠打破とABA感受性の遺伝的変異、および α -アミラーゼ、エンドプロテアーゼ活性の変動を比較検討した。実需面および生産現場対応の課題は、それぞれⅣとⅤで取り上げた。すなわち、Ⅳでは小麦粉の二次加工適性、特に製パン適性へ及ぼす穂発芽の影響を明らかにする目的で、人為的に品質劣化させた小麦粉からパン生地を作成し、その物理的性質ならびに酵素活性の変化を解析した。Ⅴでは生産現場で低アミロ小麦の発生を速やかにかつ正確に把握するために、ドライケミストリー法を応用した簡易迅速選別技術を開発し、その現地試料への適用性を検討した結果を論じた。Ⅵの総合考察では、本研究によって得られた知見が、今後の穂発芽被害の回避にどのように貢献できるか、また残された課題について従来の情報と論議し、将来の研究の方向性を考察した。なお、本報告は北海道農業研究センターおよび作物研究所において行なった研究結果を取りまとめたものである。

Ⅱ 登熟に伴う種子休眠性と酵素活性の変動

コムギ穂発芽には種子の休眠性が深く関係している。Belderok(1968)によれば、休眠とは形態的に健全な種子が水分・温度・光の最適条件におかれても発芽しない状態であり、休眠作用を停止する前に後熟期間が必要となる。休

眠性には、種皮・胚・胚乳それぞれが相互に関係しており、特に種子中に含まれる植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)に対する種子胚の感受性は休眠性機構の一つとして働いていると考えられている(Stoy and Sundin 1976、

Walker-Simmons 1987、Hagemann *et al.* 1988、Noda *et al.* 1993、Kawakami *et al.* 1997)。

穂発芽による品質劣化は、コムギ子実中の胚乳澱粉および貯蔵蛋白質の分解によって引き起こされる。このうち、澱粉粘度低下の原因となる胚乳澱粉の分解は、コムギ子実中の4種類の澱粉分解酵素 (α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、枝切り酵素および α -グルコシダーゼ) の協調作用によって進行する。しかし、無傷澱粉顆粒を直接分解することができるのは α -アミラーゼのみであることから、子実中の澱粉分解の主要因は α -アミラーゼによる分解である (Maeda *et al.* 1978、Salmonsson *et al.* 1989、Sun and Henson 1991)。

II ではまず、穂発芽耐性の違いが登熟期間中の休眠性、種子胚の ABA 感受性および α -アミラーゼ活性とどのように対応するのか知ろうとした。

1) 材料および方法

1994年に穂発芽耐性弱品種であるチホクコムギ、および穂発芽耐性強品種の Satanta を慣行法で栽培し、開花後20日より60日まで5日毎に穂を採取し、穂中央部の第1、第2穎果から手脱穀により種子を取り出し、直ちに試験に使用した。

発芽試験に用いた種子は次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素 5%) で20分間表面殺菌した後、蒸留水で数回洗浄してから使用した。種子より無菌状態で取り出した胚30個を 6 mL の蒸留水または、50 μ M ABA 溶液を加えた 9 cm シャーレ上の濾紙におき、20 時間の暗所で発芽させた。そして、置床後7日目に、2 mm 以上の鞘葉と

3本の種子根が観察された種子胚を発芽と見なし、その百分率を求めた。また、対照として種子の蒸留水での発芽率を調査した。試験は2反復で実施した。

α -アミラーゼ活性の測定は青色澱粉を基質とする臨床検査用キット (アミラーゼテスト A シオノギ、塩野義製薬) を用い、松倉ら (1984) の方法に準じて行った。粗酵素の抽出は 0.5% NaCl および 0.02% CaCl_2 を含む抽出液を用いた。乳鉢中でコムギ種子10粒に抽出液10mLを加えてすりつぶした後に、3,000g で10分間遠心し、その上澄みを粗酵素とした。反応は粗酵素 3 mL に基質懸濁液 (アミラーゼテスト A シオノギ 1錠を 0.1M リン酸緩衝液 pH5.0、4.5 mL に混合) 1 mL を加え、50 °C で30分間行った。反応液に 1 mL の 0.5M 水酸化ナトリウムを加えて反応を停止させた後、濾過して得られた濾液について、620nm 吸光度を測定した。 α -アミラーゼ活性は、酵素標品 (Sigma、 α -amylase Type VIII-A From Barley Malt) を基準として、可溶性澱粉を基質とした場合に1分間に 1 μ mol の maltose を生成する量を 1 U とし、種子 1 粒当たりの値で示した。試験は2反復で実施した。

2) 結果および考察

種子登熟期の6月11日から完熟期の8月20日における気象データを表1に示した。Satanta およびチホクコムギの開花日はそれぞれ、6月15日と6月18日であった。この年の平均気温と日照時間は平年を上回り、逆に降水量は下回った。以上のような気象条件のもと、両品種ともに開花後40日～45日目には収穫が可能となる完

表1 1994年のコムギ登熟期間の気象概要

項目		6/11-20	6/21-30	7/1-10	7/11-20	7/21-31	8/1-10	8/11-20
平均気温 (°C)	1994年	15.7	15.6	17.4	20.9	22.3	26.5	22.4
	平年	15.1	16.1	17.1	17.0	19.9	20.7	20.6
降水量 (mm)	1994年	19.0	4.0	28.0	9.0	0	27.0	109.0
	平年	23.3	23.5	23.4	46.8	24.5	28.8	47.5
日照時間 (時間)	1994年	58.2	51.0	23.5	51.1	34.0	77.1	21.6
	平年	47.9	36.2	45.2	12.0	29.2	38.7	37.3
開花後日数	チホクコムギ		2-12	13-22	23-32	33-43	44-53	54-63
	Satanta		6-15	16-25	26-35	36-46	47-56	57-66

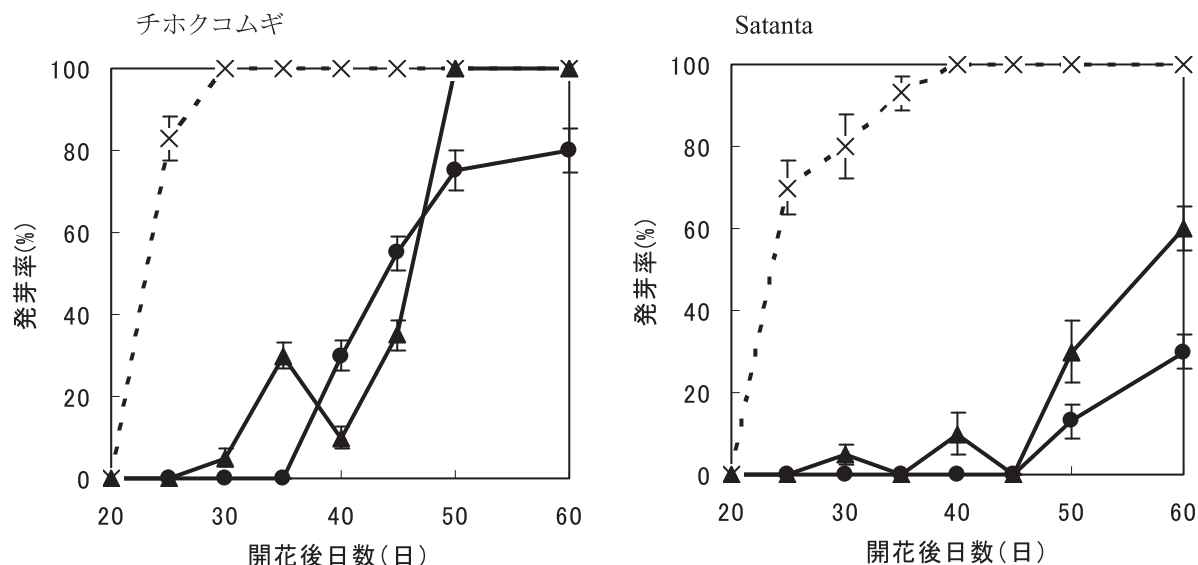


図1 穂発芽性の異なるコムギ品種における種子胚の発芽率の推移

チホクコムギおよび Satanta の種子を開花後20日より60日まで5日毎に採取し、種子胚を蒸留水 (×) および50μM ABA (●) 溶液中で20、7日間おき、発芽率を調査した。
対照として同様にコムギ種子 (▲) の蒸留水中での発芽率を調査した。
各点の縦棒は標準偏差 (n = 2) を示す。

熟期 (子実水分25・30%) を迎えた。

チホクコムギと Satanta の登熟に伴う種子胚 ABA 感受性の変化を図1に示した。種子胚の蒸留水中での発芽率は両品種ともに開花後20日以降に急速に高まり、35日以降になると100%に達し、胚の休眠性は消失していた。一方、ABA に対する胚の感受性は品種間で異なった。開花後35日までは両品種ともに種子胚の発芽は ABA によって完全に抑制された。しかし、穂発芽耐性弱のチホクコムギでは、35日以降胚の ABA 感受性は減少し、種子休眠がなくなった開花後50日目の完熟期には70%以上の胚が ABA 感受性を示さなかった。それに対して、穂発芽耐性強の Satanta は開花後40日目においても ABA 感受性を完全に保持していた。その後、開花後50日目以降に種子の休眠性が失われるのに平行して減少したが、60日目でも ABA 感受性は70%の胚で維持されていた。

本実験の結果は、穂発芽耐性弱品種の ABA 感受性が種子の成熟前に減少するのに対して、耐性品種は成熟期以降もさらに ABA 感受性を維持し、種子休眠性と平行関係を示すとした Walker-Simmons (1987) Kawakami *et al.* (1997) の報告と良く一致した。

図2に示した種子の登熟に伴う α -アミラー

ゼ活性の推移から、両品種ともに α -アミラーゼ活性は開花後20日の登熟初期に最も高く、その後、子実水分の減少に伴って開花後40日目まで急激に減少したことが分かった。この間、チホクコムギの活性は Satanta より有意に高く、約100 mU/grain の差異があった。完熟期の50日目以降再び上昇した。40日目から完熟期以降も Satanta の α -アミラーゼ活性は10mU/grain 以下に低く維持されたのに対して、チホクコムギの活性値は50日目以降の降雨 (表1) に伴う子実水分の増加にしたがって上昇し、60日目には Satanta の15倍の活性値を示した。

本実験におけるこのようなチホクコムギの活性増加は、種子登熟期間の気象条件は α -アミラーゼ活性のレベルに強く影響し、特に穂発芽耐性弱品種は種子登熟後期に活性が増大するとした Mares and Gale (1990) の報告と一致した。また、Nakatsu *et al.* (1996) は北海道におけるコムギ α -アミラーゼ活性の推移を以下の3つのタイプに類型化している。1. 子実水分の低下とともに活性は低下し、種子発達の糊熟期以降も低い値で推移するパターン、2. 子実水分の低下とともに活性は低下するが、糊熟期以降に降雨に遭うと休眠が打破されて α -アミラーゼ活性が増加するパターン、3. 子実水

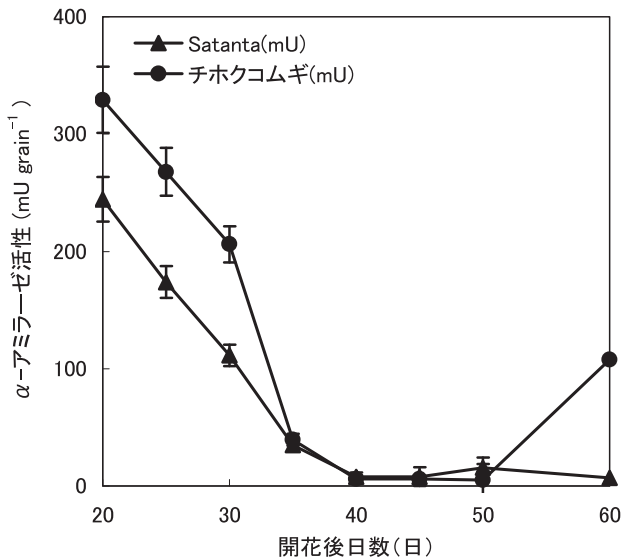


図2 登熟に伴う子実中の α -アミラーゼ活性の推移

チホクコムギおよび Satanta を開花後20日より60日まで5日毎に採取し、子実中の α -アミラーゼ活性を測定した。記号の縦棒は標準偏差 ($n=2$) を示す。

分が低下しても、 α -アミラーゼ活性は低下せず、糊熟期前後に全般に高く維持されるパターン。本実験の Satanta とチホクコムギの活性の推移をこれに当てはめると、図2で見たように、Satanta は糊熟期以降も活性の増加しないパターン1に、チホクコムギは糊熟期以降に降雨に遭い休眠が打破されて穂発芽が発生するとともに、 α -アミラーゼが発現しアミロ値が低下するパターン2に当てはまる。チホクコムギについては、Nakatsu *et al.* (1996) が先に北海道内

の複数の地域で7年間にわたって調査し、ほぼ2のパターンを示すものの、低温・湿潤な環境下ではパターン3によって穂発芽になることを観察している。

さらに、コムギの α -アミラーゼには Amy-1 と Amy-2 の2つのアイソザイムが認められている (Marchelo *et al.* 1980)。両者は等電点 (pI) や澱粉に対する親和性が異なっており、登熟初期には pI の低い Amy-2 が多く、種子の登熟に伴って低下し、成熟以降の発芽に伴って pI の高い Amy-1 が発現する (西川 1988)。したがって、本実験のチホクコムギにおける糊熟期以降の活性増加は Amy-1 によるものと推察された。

一方、Fukunaga *et al.* (1987) は出穂35日以降の穂発芽の程度と出穂後50日目の α -アミラーゼ活性の間には高い相関関係のあることを報告している。本実験においても、開花後30日目以降の休眠性の程度と開花後50日目以降の α -アミラーゼ活性の程度の間には関連があり、穂発芽耐性の違いによる品種間差が認められた (図1、2)。以上の結果から、コムギの α -アミラーゼ活性は種子胚の ABA 感受性および種子休眠性と密接に関連しており、種子登熟期間、特に糊熟期以降の気象条件の影響を強く受けることが確認された。

Ⅲ 低温吸水による種子休眠性および酵素活性の変動

穂発芽と関連の深い休眠性は温度に依存した性質であり、コムギ種子の場合は一般に低温下の吸水で休眠が打破されやすく、穂発芽耐性強品種を12 以下で吸水させたとき種子休眠性の品種間差は大きい (George 1967、Mares 1984、Oda and Seko 1993、Bewley and Black 1994)。このことは、収穫期前後の高温・多湿が穂発芽の発生要因である九州や関東の小麦栽培地帯よりも、降雨や細霧により15 以下の低温になることも希ではない北海道において問題となる

(土屋 1982)。実際、十勝地方では日照不足による低温・多湿条件のために引き起こされる穂発芽の被害が、頻繁に報告されている (加藤ら 1983、池田 1984、一ノ瀬 1994)。そのため、低温条件下での穂発芽耐性の付与が重要であることが指摘されており、これに向けた育種的な取り組みがなされている (Osanai and Amano 1993、1996、1999、柳沢 2001)。

一方、穂発芽に伴って起こる小麦品質の劣化には、コムギ子実中に含まれる澱粉分解酵素で

ある α -アミラーゼと蛋白質分解酵素であるエンドプロテアーゼが強く影響している(安永ら1963、平野1971、Kruger and Preston 1977、Preston and Kruger 1978)。穂発芽は圃場において登熟中に起こる現象であり、このため降雨時の低温の影響も種子の発達段階によって異なってくると予想される。しかし、低温吸水した種子でこれら酵素の活性がどのように変動しているかは必ずしも明確でない。

そこで、異なる発達時期の種子について、低温吸水したときの種子休眠性および酵素活性の変動について検討するために二つの実験を実施し、その結果をふたつに分けて論じた。まず、低温による休眠打破すなわち低温発芽性とABA感受性に関する遺伝的変異を調査し、つぎに α -アミラーゼ、エンドプロテアーゼ活性の変動を比較検討した。

1 低温吸水での種子休眠性とABA感受性の遺伝的変異

コムギ種子の休眠性は検定温度によって異なり、20℃以上での発芽率は低いが、16℃以下になると発芽率が急激に上昇する(Oda and Seko 1993、Bewley and Black 1994、Kuwabara *et al.* 1996)。また、種子胚のABA感受性も休眠性と同様に温度に依存し、30℃の高温では感受性は強く維持されるが、15℃では弱くなる(Walker-Simmons 1988)。一方、Noda *et al.* (1993)は穂発芽耐性強品種でも低温での吸水により、ABA感受性が消失するデータを得ている。しかし、それらのABA感受性の研究では限られた品種しか評価しておらず、低温発芽性と胚のABA感受性の遺伝的関係は明確でない。

本実験では、穂発芽を誘引する気象条件を想定した低温吸水処理(12℃、16℃)を異なる種子発達時期に施し、種子の休眠性およびABA感受性を指標として、休眠打破の遺伝的変異を明らかにしようとした。

1) 材料および方法

供試材料として、1997年に穂発芽耐性の異なる秋播17品種・系統および春播13品種・系統を慣行法で栽培した。これら30品種・系統は種子の発達時期の異なる2つの時期: 1) 糊熟期(子実水分35-40%: 生理的成熟期) 2) 完熟期(同25-30%)に穂を採取した。それぞれの成熟時期の判定はNoda *et al.* (1994) およびKuwabara *et al.* (1996)の方法をもとに、子実水分を測定することにより行った。各試料の穂は採取後、凍結傷害を防ぐために35℃にセットした通風乾燥機で2日間乾燥させ、子実水分を15%以下まで減少させた。その後、種子休眠性を保持させるために穂の状態で-20℃の冷凍庫に保存し、2ヶ月以内に使用した(Mares 1983)。

発芽試験に供試した種子は穂中央部の第1、第2穎果から手脱穀により採取し、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素5%)で20分間表面殺菌した後、蒸留水で数回洗浄してから使用した。発芽試験は2反復で種子50粒を蒸留水6 mLの蒸留水または50 μ M ABA溶液を加えた9 cmシャーレ上の濾紙におき、12℃、16℃および20℃の暗所で7日間発芽させた。発芽の評価はⅡの実験と同様で、2 mm以上の鞘葉と3本の種子根が観察された種子を発芽粒として置床後7日目にカウントし、全体に占める割合で発芽率を調査した。試験は2反復で行った。なお、20℃での発芽検定は対照実験として実施した。

2) 結果および考察

糊熟期に採取した種子の発芽率を表2に示した。表中のT(耐性)とS(感受性)で記載した穂発芽耐性は、Kuwabara *et al.* (1996)が3ヶ年にわたって北海道で栽培した同材料から収穫期に穂をサンプリングし、人工降雨処理によって評価した結果である。30品種・系統のうち、チホクコムギ、札系67号、ハルユタカ、関東74号およびGamenyaを除く25品種・系統の穂発芽耐性は20℃での種子休眠性の程度と一致が見られたが、他の二つの発芽温度、特に12℃での結果とは対応が見られなかった。

それぞれの品種・系統の種子休眠性の程度は

表2 穂発芽耐性の異なるコムギ品種・系統の発芽率

秋播コムギ	20	16	12	穂発芽 耐性	春播コムギ	20	16	12	穂発芽 耐性
赤粒品種	- % -					- % -			
北見72号	6	28	96	T	農林61号	0	54	96	T
北海251号	8	24	48	T	Park	0	14	54	T
Lancer	8	42	76	T	RL 4137	2	14	32	T
Satanta	12	38	90	T	ニシカゼコムギ	2	18	76	T
北系1354	22	22	58	T	ゼンコウジコムギ	8	10	46	T
ホクシン	32	82	96	T	ハルミノリ	8	64	98	T
ホロシリコムギ	32	72	94	T	ハルノアケボノ	28	72	80	T
チホクコムギ	34	34	94	S	ハルユタカ	40	82	68	S
Lewis	86	94	88	S					
白粒品種	- % -					- % -			
農林8号	2	34	46	T	AUS 1408	0	0	10	T
Clark's Cream	6	26	56	T	CI-1	8	30	42	T
Recital	12	48	60	T	関東74号	36	40	80	S
農林17号	12	94	88	T	Gamenya	36	48	56	S
8096A58-1	16	42	52	T	Verry "S"	62	84	52	S
北海253号	22	68	100	T					
札系67号	34	72	88	S					
北海252号	50	92	94	S					

穂発芽耐性の T (耐性) S (感受性) は北海道農研での評価による。

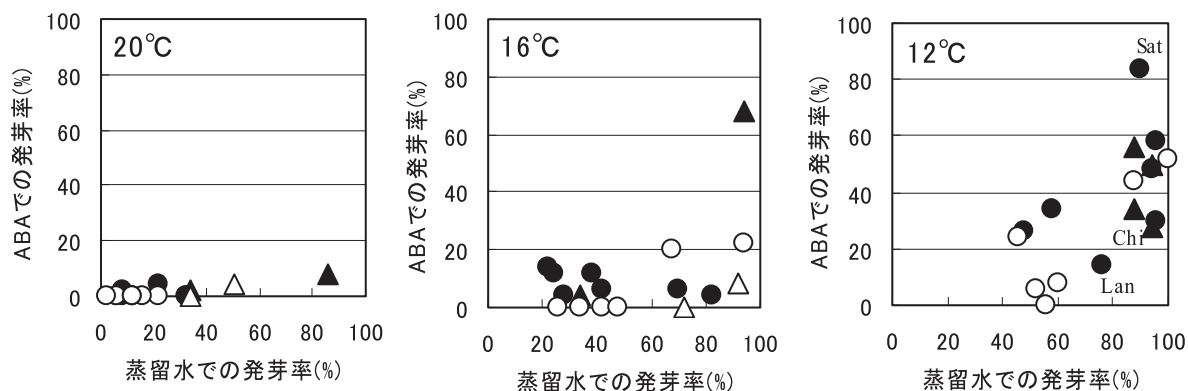
吸水温度により異なり、概して20℃における休眠性は、16℃および12℃に比べて強く表れた。それぞれの吸水温度では、休眠性の品種間差は赤粒品種だけでなく、白粒品種においても有意に認められた。また、20℃および16℃での発芽率が低い品種であっても12℃では、休眠は打破される傾向が強く、供試した穂発芽耐性強品種22系統のうち、9系統は12℃では80%以上の発芽率を示した。成熟期における種子の休眠性は温度に依存しており、30℃で休眠性を示す品種の中には10℃では休眠を示さない品種のあること、また、発芽が可能となる温度は種子が発達した後に上昇することが報告されている (George 1967、Mares 1984)。これらの報告は本実験において、20℃では穂発芽耐性強品種の休眠性は種子発達の後期である完熟期まで維持されていることと良く一致している。一方、12℃での発芽試験の結果から、穂発芽耐性強品種においても成熟種子の休眠性の程度は温度に依存しており、品種間差が大きいこと、すなわち低温発芽性には明らかな遺伝変異のあることが分かった。

図3に糊熟期における種子の発芽率とABA

感受性の関係を示した。種子の発芽に対するABA処理の影響も吸水温度によって異なった。ほとんどの品種で、20℃における種子の発芽はABAによって抑制された。16℃においても、穂発芽耐性強品種の発芽は抑制されたのに対して、弱品種の中にはABAの感受性が低下し発芽する品種・系統が認められた。さらに12℃においては、ABA感受性の品種間差が大きくなった。ほとんどの穂発芽耐性強品種では、この温度処理でABAによる発芽抑制効果が強く表れたものの、なかには穂発芽耐性弱品種と同様にABA感受性を減少させる品種・系統も認められた。すなわち、穂発芽耐性強品種・系統に分類されているLancerやRL4137の12℃におけるABA中での発芽率は20~25%であるのに対して、Satantaや農林61号の発芽率は90~100%まで上昇した。一方、発芽の傾向として、12℃での発芽率とABA感受性との相関は、秋播コムギ $r=0.670$ 、春播コムギ $r=0.901$ であり、両者には高い有意な正の相関関係 ($P<0.01$) が認められた。

完熟期における種子の発芽率とABA感受性の関係を図4に示した。種子の採取時期が遅れ

秋播コムギ



春播コムギ

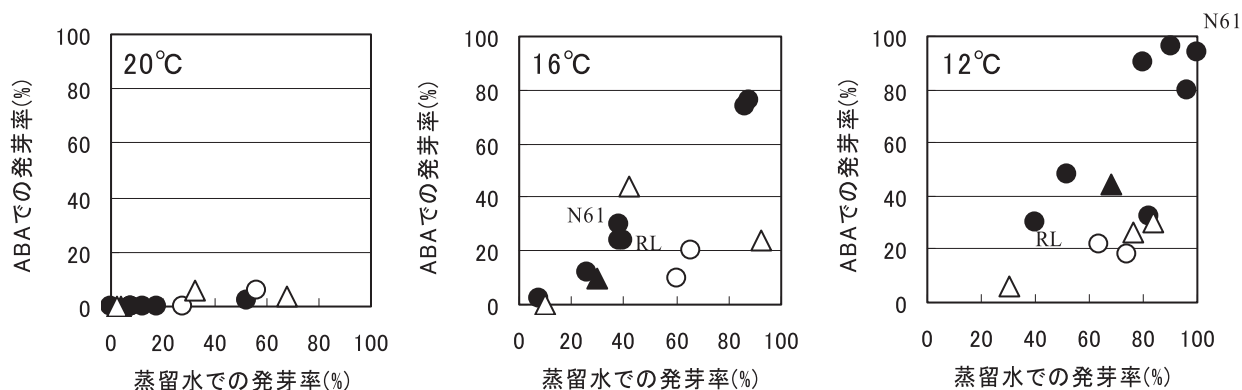


図3 糊熟期におけるコムギ種子の発芽率の変異

穂発芽性の異なるコムギ30品種・系統の種子を成熟期に採取し、蒸留水および50 μ M ABA 中での7日後の発芽率を調査した。

●：穂発芽難、赤粒品種、▲：穂発芽易、赤粒品種、○：穂発芽難、白粒品種、△：穂発芽易、白粒品種

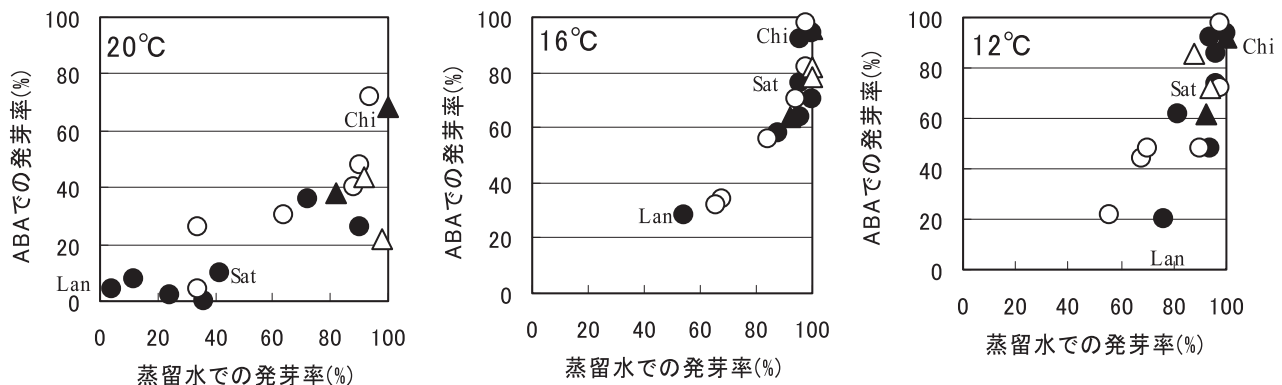
Sat：Satanta、Lan：Lancer、Chi：チホクコムギ、N61：農林61号、RL：RL4137

ることにより、ABA 感受性は低下したが、この傾向は特に穂発芽耐性弱品種において強かった。すなわち、穂発芽耐性弱品種であるチホクコムギのABA 感受性は12 のみでなく、16 および20 においても失われていた。これに対して、ほとんどの穂発芽耐性強品種・系統は完熟期まで、いずれの吸水温度においても種子のABA 感受性を維持したが、なかにはSatanta や農林61号のように12 のみならず、16 においても失う品種・系統も認められた。

本実験では、低温における種子休眠性の品種間差を明らかにするために、吸水温度を変えて種子発芽率と種子のABA 感受性を調査した。これまでに種子胚のABA 感受性は休眠性と

様に吸水温度の影響を強く受け、低温では休眠性とともに種子胚のABA 感受性も著しく低下することが知られている(Noda *et al.* 1994)。本実験では種子そのもののABA 感受性を調査したため、種子胚のABA 感受性と種子休眠性の両方を合わせて評価したことになるが、種子のABA 感受性は休眠性および種子胚のABA 感受性と同様に吸水温度の影響を強く受けることが確認できた。すなわち、糊熟期に採取した種子を12 ~ 20 で吸水させた場合、ほとんどの穂発芽耐性強品種・系統はかなり強い休眠性とABA 感受性を示したが、耐性品種の中には12 の低温においては休眠性やABA 感受性を失う品種・系統が認められた。したがって、種

秋播コムギ



春播コムギ

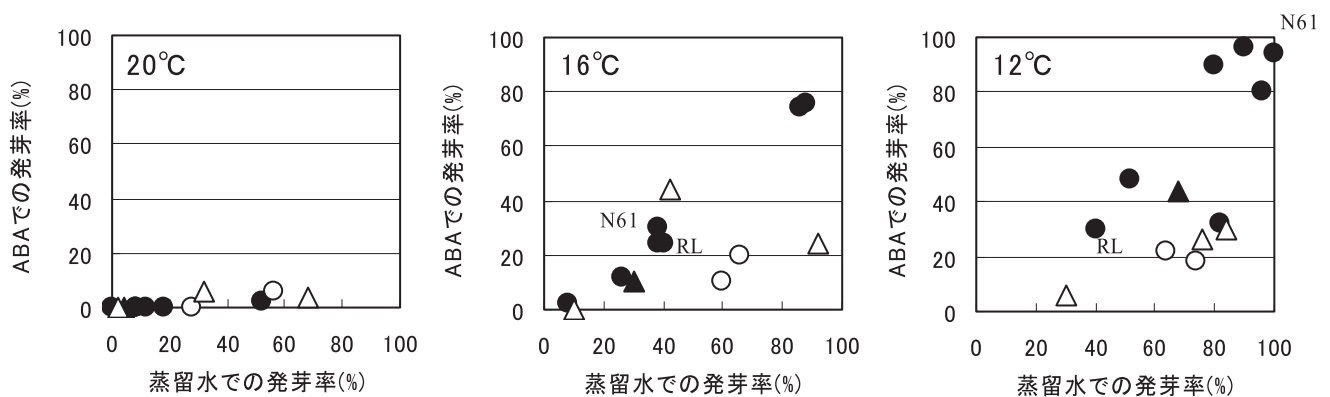


図4 完熟期におけるコムギ種子の発芽率の変異

穂発芽性の異なるコムギ30品種・系統の種子を成熟期に採取し、蒸留水および50 μ M ABA 中での7日後の発芽率を調査した。

●：穂発芽難、赤粒品種、▲：穂発芽易、赤粒品種、○：穂発芽難、白粒品種、△：穂発芽易、白粒品種

Sat：Satanta、Lan：Lancer、Chi：チホクコムギ、N61：農林61号、RL：RL4137

子の登熟が低温で湿度の高い状態で進む場合には、耐性品種に分類されるものでも糊熟期のような種子登熟の早い時期に種子の休眠性やABA感受性が破れる可能性がある。これらの結果は穂発芽耐性は部分的に低温での種子休眠性の強弱とは異なる遺伝的特性であることを示唆する。このことは、表2に示したように、供試したほとんどの品種・系統の穂発芽耐性が20で評価した種子休眠性の程度と一致したものの、12での結果とは対応が見られなかったことからもうかがえる。

Osanai and Amano (1993) は、低温での種子の発芽性をもとにした系統選抜が、低温・高

湿条件下での穂発芽耐性の強化に有効であることを報告している。そして、実際にこの方法により選抜されたOSおよびOW系統は、ゼンコウジコムギや北系1354といったわが国のトップレベルの耐性品種を凌駕する極強品種を育成するための育種素材として有望視されている(柳沢 2001)。その一方で、本実験では低温における種子発芽率とABA感受性との間には高い有意な正の相関関係が認められた(図3、4)。実験に供試した穂発芽耐性強品種のうち、12での休眠性の低かったSatantaや農林61号は、低温での種子のABA感受性も同様に弱まっていた。これらの品種は穂発芽耐性強品種育成の

ための育種母材としても用いられている主要品種であることから、交雑後代の選抜には注意が必要であろう。実際に、道立北見農試で育成された穂発芽耐性極難系統はABA感受性が非常に高いことが、穂発芽耐性を強くしている主要因と考えられている(柳沢 2001)。したがって、北海道における収穫時期の気象条件を考えると、低温条件下での穂発芽耐性を強化するためには、種子の成熟期における低温での休眠性評価と平行して、ABA感受性についても加味することが重要であると考ええる。

2 低温吸水での休眠性と α -アミラーゼ、エンドプロテアーゼ活性の関係

Ⅲ・1の試験から、低温(12、16)での種子の休眠性ならびにABA感受性には穂発芽耐性強品種・系統の間に差のあることが明らかになった。コムギ穂発芽で大きな問題となる品質の劣化は、コムギ子実中の貯蔵物質である胚乳澱粉および蛋白質がそれぞれ α -アミラーゼ、エンドプロテアーゼにより分解されることによって引き起こされる(MacGregor and Matsuo 1972、Kruger 1971、Prestone and Kruger 1978、MacGregor and Dushnicky 1989、Salomonsson *et al.* 1989)。

ここでは、コムギ子実中の α -アミラーゼとエンドプロテアーゼについて、穂発芽耐性の異なるチホクコムギとSatantaを対象に、2つの異なる成熟期(黄熟期、糊熟期)と完熟期において低温(12)で吸水させた時の活性の変化を解析し、穂発芽耐性と両酵素活性の関係を検討した。

1) 材料および方法

供試材料として、1997年に穂発芽耐性弱品種であるチホクコムギ、および穂発芽耐性強品種のSatantaを慣行法で栽培した。種子発達の異なる3つの時期:黄熟期(子実水分45-50%:形態的成熟期)および糊熟期(同35-40%:生理的成熟期)および完熟期(同25-30%)に穂を採取した。それぞれの成熟時期の判定はⅢ・

1の実験と同様であり、開花後30日目から41日目まで子実水分を測定することにより行った。各試料の穂は開花後33日、38日および41日目に採取し、凍結傷害を防ぐために通風乾燥機で35で2日間乾燥させ、子実水分を15%以下まで減少させた。種子は休眠性を保持させるために穂の状態で-20の冷凍庫に保存し、2ヶ月以内に使用した(Mares 1983)。

発芽試験に供試した種子は穂中央部の第一、第二穎果から手脱穀により採取し、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素5%)で20分間表面殺菌した後、蒸留水で数回洗浄してから使用した。発芽試験は2反復で種子50粒を蒸留水6mLを加えた9cmシャーレ上の濾紙におき、12および20の暗所に10日間で行った。そして、置床1、3、5、7および10日目に、Ⅲ・1の実験と同様に発芽率を調査した。シャーレ上の全ての発芽種子および未発芽種子は通風乾燥機において35で2日間乾燥後に α -アミラーゼ活性およびエンドプロテアーゼ活性を測定するまで、-20の冷凍庫に保存した。

全粒粉の調製は発芽試験後に、冷凍保存した種子を常温に戻した後、0.5mm目のスクリーンをつけた高速遠心粉碎器(Retch社、ZM-1型)で10,000回転で行った。

α -アミラーゼ活性の測定は修飾オリゴ糖 blocked 4-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7)を基質とする α -アミラーゼ活性測定キット(CERALPHA METHOD、メガザイム社)を用いて行った。粗酵素の抽出は渡辺ら(1994)の方法に準じて行った。全粒粉0.1gをエッペンドルフチューブに取り、これに抽出用緩衝液1.0mL(50mM リンゴ酸ナトリウム、50mM 塩化ナトリウム、2mM 塩化カルシウム、3mM アジ化ナトリウム、pH5.2)を加え、5分間攪拌後に10,000rpmで10分間遠心分離し、その上澄みを粗酵素液とした。活性の測定は渡辺ら(1994)の方法により行った。 α -アミラーゼ活性は1分間に1 μ molの4-nitrophenolを生成する α -アミラーゼの量を1Uとして、乾物1g当たりの自然対数値(log mU)で示した。

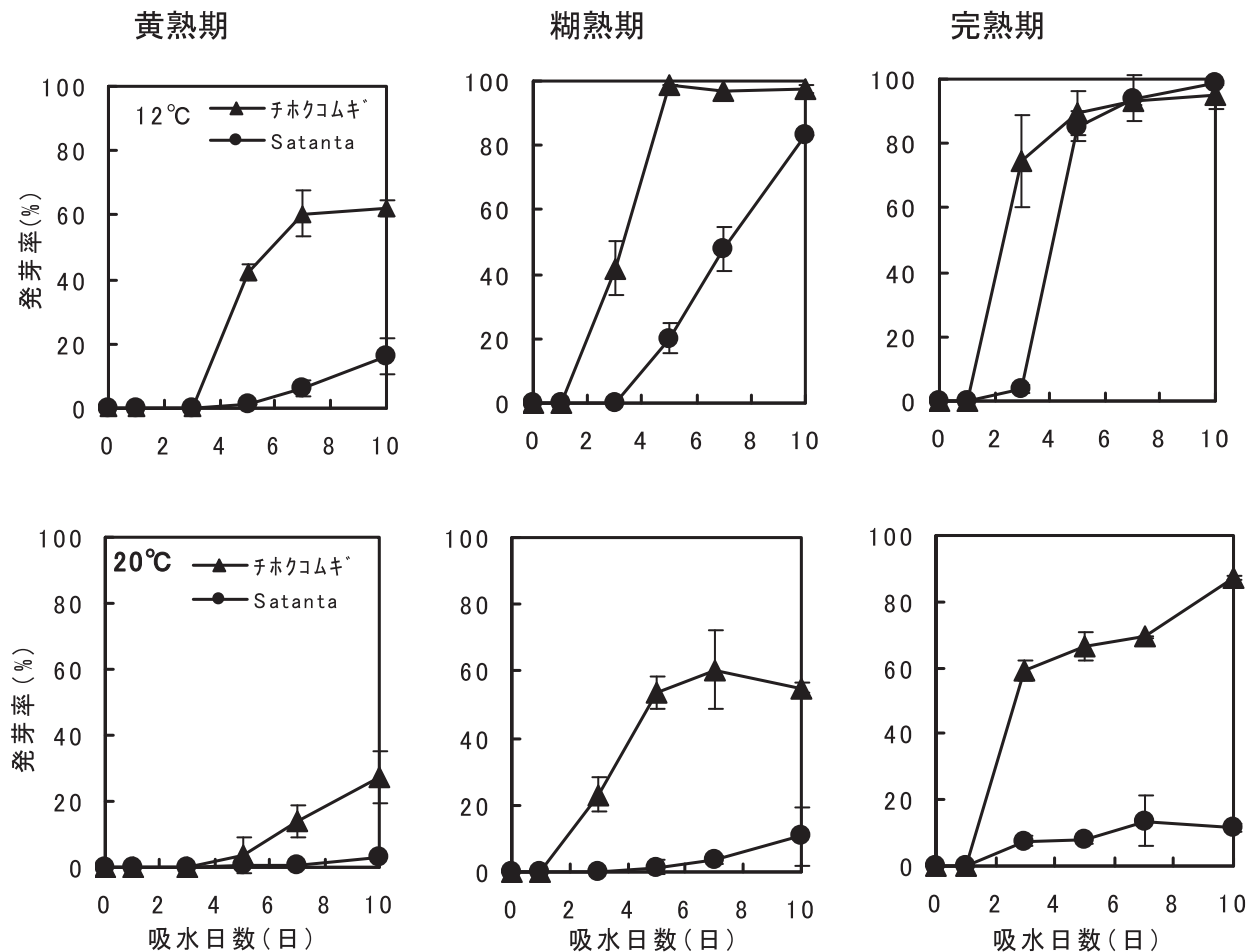


図5 穂発芽性の異なる2品種の発芽率の推移

チホクコムギおよび Satanta の種子を黄熟期、糊熟期および完熟期に採取し、12 (上段) および20 (下段) で7日間蒸留水中におき、発芽率 (%) を調査した。記号の縦棒は標準偏差 (n=2) を示す。

エンドプロテアーゼ活性の測定は青色色素を架橋させたカゼインを基質とするエンドプロテアーゼ活性測定キット (Protazyme AK tablet、メガザイム社) を用いて行った。手順は以下のようである。

全粒粉0.5g を30mL 容の三角フラスコに取り、これに抽出用緩衝液5.0mL (50mM McIlvines 緩衝液、pH6.0) を加え、15分間攪拌後に濾紙 (Advantec Toyp No 5A) で濾過したものを粗酵素液とした。粗酵素1.0mL を試験管に採り、40 の温浴槽で10分間ブレインキュベートした後、同様にブレインキュベートしておいた基質懸濁液 (Protazyme AK tablet 1錠を100mM リン酸緩衝液、1%チオ硫酸ナトリウム pH6.5に混合) 1mL を加え、10分ごとに手で攪拌しながら反応させた。反応が進むと粗酵素液中のエンドプロテアーゼの作用により、

青色色素を架橋したカゼインが分解され、色素が溶出する。3時間後に10mL の2%二リン酸ナトリウムを加え攪拌することにより、反応を停止させ、濾過して得られた濾液について、590nm 吸光度を測定した。エンドプロテアーゼ活性は乾物1g における1時間当たりの吸光度の変化量を U として示した。

α -アミラーゼ活性およびエンドプロテアーゼ活性の測定は2反復で行った。

2) 結果および考察

穂発芽耐性弱品種のチホクコムギおよび耐性強品種の Satanta を対象に、黄熟期 (子実水分45-50%)、糊熟期 (同35-40%) および完熟期 (同25-30%) の3つの異なる採取時期における、12 および20 での発芽率を図5に示した。

両品種の発芽率は、全ての採取時期において

20 に比べて12の方が高く推移した。また、20においてはチホクコムギの発芽率は常にSatantaに比べて高かった。黄熟期、糊熟期および完熟期の3つの採取時期における、種子の置床後10日目のSatantaとチホクコムギの発芽率の比は20においてはそれぞれ、18、17、12%であるのに対して、12では30、80、100%と種子の発達にしがたい増加した。

以上の結果から、種子の発芽率に対する温度の影響は穂発芽耐性の違いにより異なることが明らかになった。すなわち、20においては、穂発芽耐性強品種であるSatantaの発芽率は弱品種であるチホクコムギに比べて、完熟期まで常に低く推移した。一方、12においても黄熟期および糊熟期にはSatantaの発芽率はチホクコムギに比べて低くかったが、完熟期になると両者の差異は見られなくなった。

これまでに糊熟期および完熟期のコムギ種子の休眠性は温度に依存しており、20以上では休眠性を示す品種であっても、12以下の低温吸水により休眠が打破されることがわかっている(Oda and Seko 1993、Bewley and Black 1994)。さらにⅢ・1の結果から、低温による休眠打破の程度には顕著な遺伝変異のあることが分かった。Mares(1984)によると、非休眠性品種は20において登熟の早い時期から発芽するのに対して、休眠性品種はこの温度では完熟期以降まで発芽しない。同様にGeorge(1967)はアメリカ合衆国のいくつかの品種の成熟した種子は30では休眠性を示すが、10では示さないこと、さらに、これらの品種が30で発芽が可能となるのは完熟期以降になってからであることを報告している。これらの結果から、穂発芽耐性強品種の休眠性は常温においては完熟期以降まで保持されるのに対して、低温下で吸水したときは種子登熟の初期までしか保持されず、中期以降は徐々に失われる可能性が示唆された。

図6は採取時期の異なるチホクコムギとSatantaの種子を20および12で吸水させたときの α -アミラーゼ活性の変化である。黄熟期に採取した種子の α -アミラーゼ活性は両品

種ともに12の方が20に比べて高く推移した。しかし、糊熟期および完熟期と種子の発達が進むにつれ、チホクコムギの20における活性は12と同じレベルまで増加し、吸水温度によらず置床後10日目には12 log mUとなった。一方、Satantaの20における α -アミラーゼ活性は、種子の採取時期に関わらず、12に比べて低く推移し、置床10日目の活性は常に10 log mU以下であった。未発芽種子の α -アミラーゼ活性は3.52 log mUから5.97 log mUの広い範囲に分布した。さらに、わずかな発芽に伴って活性は急増し、発芽率が5%以上になると活性は8 log mU以上となった。また、発芽率と α -アミラーゼ活性との間には、穂発芽耐性、種子の採取時期および吸水温度の違いによる一定した傾向は認められなかった(図7)。

以上のように α -アミラーゼ活性は20に比べて特に12の低温では、品種固有の穂発芽耐性や採取時期に関わらず、吸水に伴って著しく増加することが明らかになった。Perata *et al.* (1992)はコムギ種子が発芽するためには、種子内での α -アミラーゼの誘導が必須条件であることを報告している。また、Sawada *et al.* (1996)によると発芽にまでは至っていない、いわゆる「芽切り種子」の中にも、発芽種子と同程度の高い α -アミラーゼ活性を示す種子が存在する。本実験においても、未発芽種子の中には発芽種子と同程度の高い活性の種子が認められた(図7)。これらの結果は、形態的にはまだ発芽に至っていない未発芽種子であっても高いレベルの α -アミラーゼ活性がすでに誘導されていることを示すものである。

一方、小麦粉の品質を表す指標であるアミログラム最高粘度およびフォーリングナンバーはコムギ種子中の α -アミラーゼ活性と非常に相関が高いことがこれまでに多く報告されている(D'Appolonia *et al.* 1982、Finney 1985、中津ら 1993、1997)。この高い相関を利用して、測定により簡便な α -アミラーゼ活性値によってアミロ値が推定できる。例えば修飾オリゴ糖を基質に用いるCERALPHA法により測定した α -アミラーゼ活性とアミロ値との回帰式が

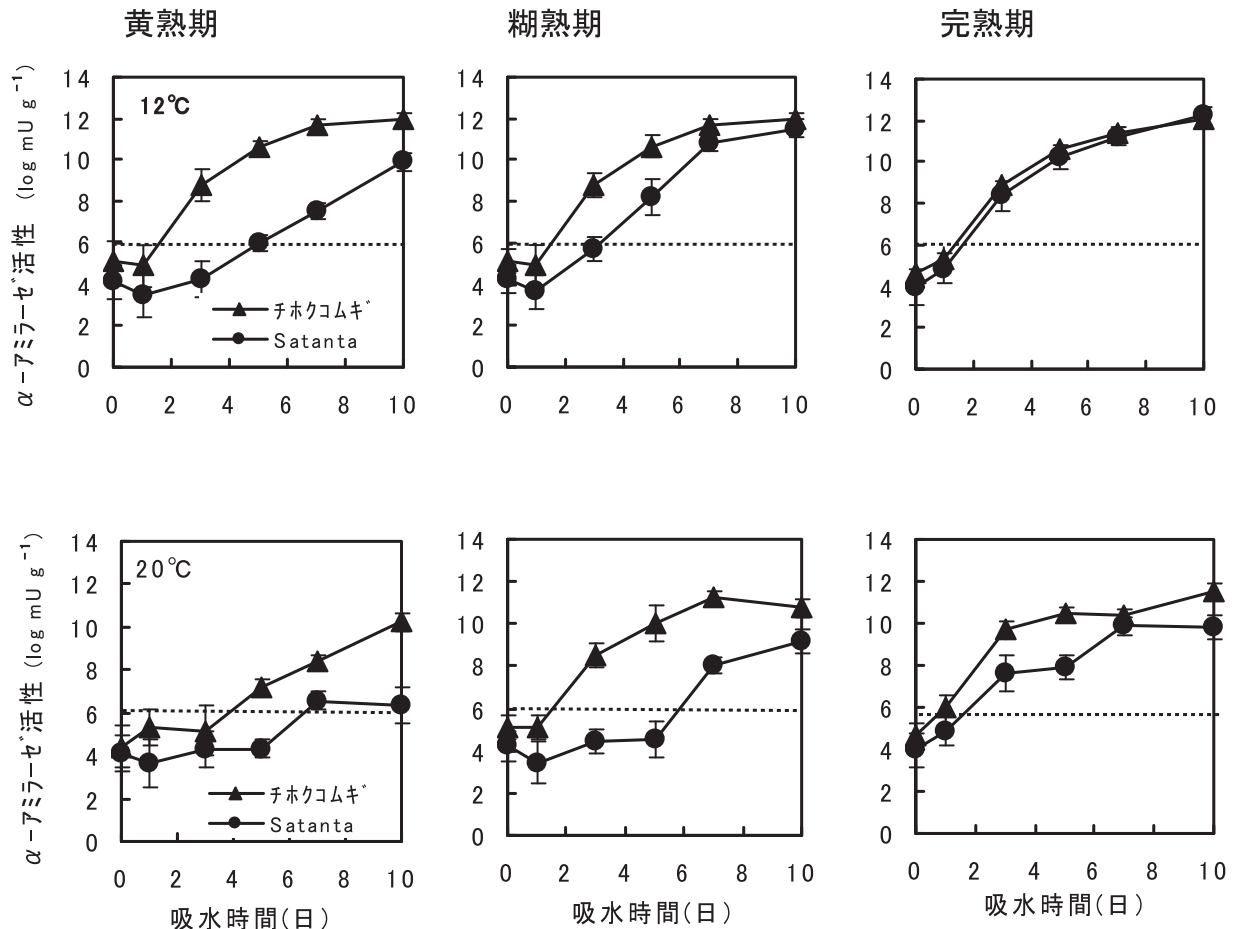


図6 穂発芽性の異なる2品種の α -アミラーゼ活性の推移

チホクコムギおよび Satanta の種子を黄熟期、糊熟期および完熟期に採取し、12（上段）および20（下段）で7日間蒸留水中におき、 α -アミラーゼ活性を測定した。点線はアミロ値300B.U.に相当する α -アミラーゼ活性（5.97 log mU）を表す。記号の縦棒は標準偏差（ $n=2$ ）を示す。

ら、自然対数値で表した全粒粉の α -アミラーゼ活性値でおよそ5.97 log mU（290mU/g）が低アミロ小麦の基準となるアミロ値 300 B.U. に相当する（中津ら 1997）。本実験における α -アミラーゼ活性の結果を中津らの結果に当てはめると、 α -アミラーゼ活性がアミロ値300 B.U.に相当する活性値よりも低い値となるのは発芽率が0%の場合のみであった。また、12では穂発芽耐性の強弱に関わらず糊熟期および完熟期になると、わずか1～2日の吸水でアミロ値は300 B.U.以下のレベルまで活性は増加することから、このような低温条件下ではわずかな降雨により耐性品種であっても小麦の品質が著しく低下することが危惧される。

本実験で得られたこのような結果は、特に低温・高湿な気象条件のもとで種子の登熟が進む北海道において非常に問題になってくる。道内

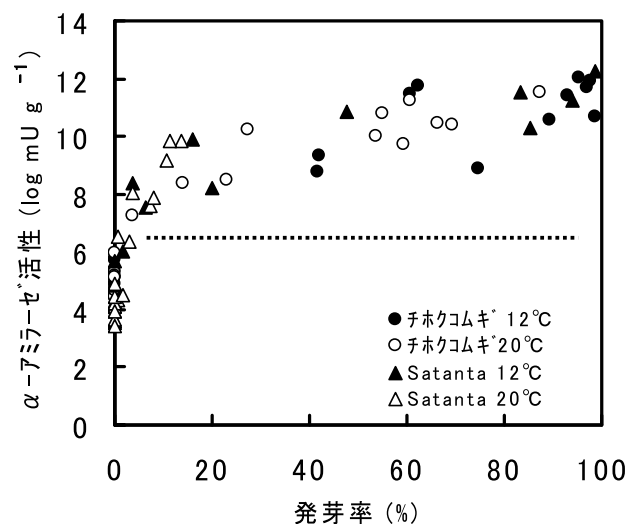


図7 発芽率と α -アミラーゼ活性の関係

点線はアミロ値300B.U.に相当する α -アミラーゼ活性（5.97 log mU）を表す。

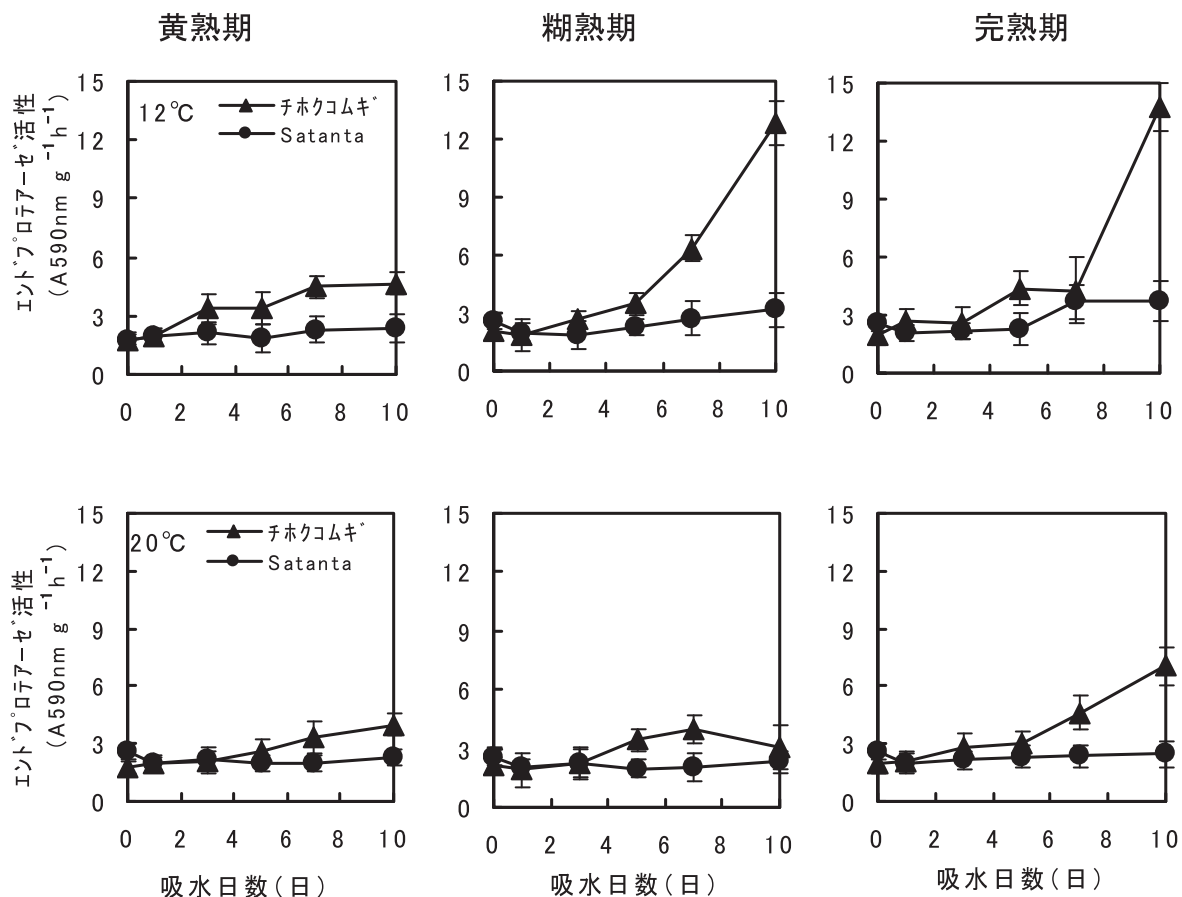


図8 穂発芽性の異なる2品種のエンドプロテアーゼ活性の推移

チホクコムギおよび Satanta の種子を黄熟期、糊熟期および完熟期に採取し、12 (上段) および20 (下段) で7日間蒸留水中におき、エンドプロテアーゼ活性を測定した。記号の縦棒は標準偏差 (n = 2) を示す。

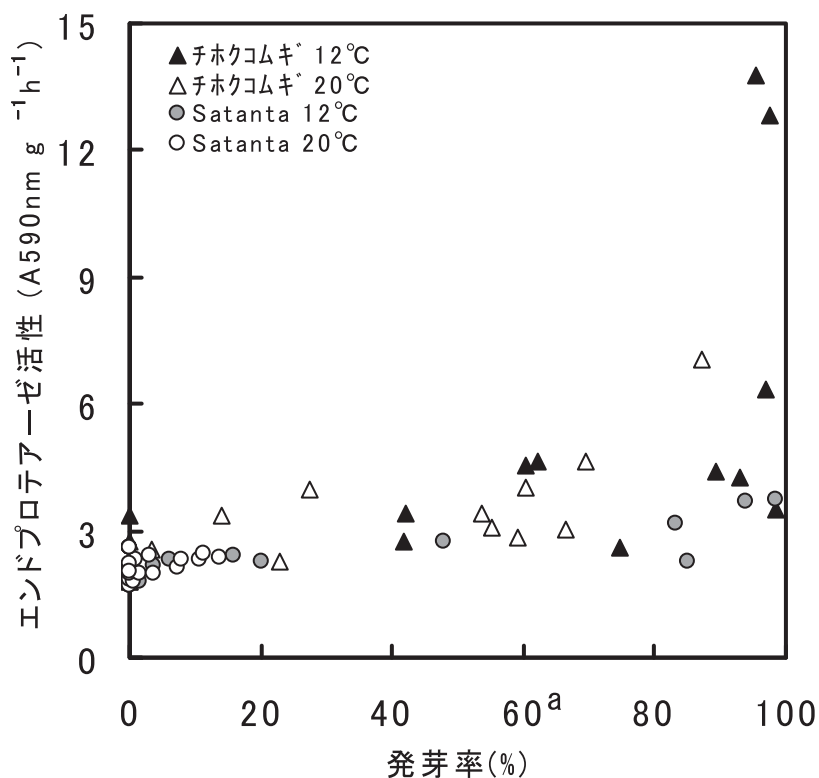


図9 発芽率とエンドプロテアーゼ活性の関係

の地域によっては、コムギ成熟期の気温が12以下となることも多く、さらに収穫期前後に降雨が続くこともしばしばである。したがって、この地域の気象条件は北海道の主要品種であるうどん加工適性に優れたチホクコムギやホクシンにとっては厳しく、穂発芽や低アミロ化の危険性も非常に高い。一方、穂発芽耐性強品種である Satanta はチホクコムギに比較して、穂発芽の危険性は低くなるものの、Satanta の穂発芽耐性のレベルもこの気象条件下では穂発芽の被害を回避する上で十分ではない。したがって、北海道における小麦収穫期の気象条件を考えると、低温条件下での穂発芽耐性と低アミロ耐性を付与することが非常に重要な課題となることが本実験の結果からも示唆された。

次に、採取時期の異なるチホクコムギと Satanta の種子を20 および12 で吸水させたときのエンドプロテアーゼ活性の変化を検討した。図8から、チホクコムギのエンドプロテアーゼ活性は12 および20 とともに、種子の置床7日目以降の増加が大きかった。また、3つの採取時期とともに12 におけるエンドプロテアーゼ活性は20 に比べて高く推移し、糊熟期および完熟期には活性は12 U以上となった。一方、Satanta のエンドプロテアーゼ活性は種子の採取時期および吸水時の温度に関わりなく、総じて低く推移し、いずれの採取時期においても活性は3U以下であった。図9から明らかなように、エンドプロテアーゼ活性は発芽率が90%までほとんど変化は見られないが、90%以上になると上昇し、6U以上となった。また、発芽率とエンドプロテアーゼ活性の関係においても穂発芽耐性、種子の採取時期および吸水温度の違いによる差異は認められなかった。

以上の結果から、エンドプロテアーゼ活性も α -アミラーゼと同様に12 の低温で吸水させると20 に比べて高く推移したが、その増加レベルは α -アミラーゼに比べると小さく、穂発芽耐性の違いによる品種間差も大きいことが明ら

かとなった。

Preston *et al.* (1978) はエンドプロテアーゼ活性は発芽の初期の段階ではほとんど変化せず、発芽の後期段階になってはじめて増加することを報告しており、今回得られた結果は、これとよく一致している。よって、 α -アミラーゼ活性は発芽のかなり初期段階から高いレベルで誘導されるのに対して、エンドプロテアーゼ活性は発芽のかなり進んだ段階になってから誘導され始めることが示唆された。先に述べたように、コムギ子実中のエンドプロテアーゼは、貯蔵蛋白質の分解、劣化に深く関わっている。Preston and Kruger (1979) は発芽時において、エンドプロテアーゼ(アゾカゼイナーゼ)、エキソプロテアーゼ(カルボキシペプチターゼ)活性の変化と貯蔵蛋白質への影響を検討し、エキソプロテアーゼ活性の変化はほとんど無いのに対して、エンドプロテアーゼ活性は発芽の進行に伴って上昇し、胚乳蛋白質の減少量と非常に相関が高いことを示した。一方、発芽に伴う製パン性の劣化機構について検討を行った Bushuk and Lukow (1987) の試験では、発芽による製パン性の劣化では、 α -アミラーゼによる胚乳澱粉の分解以上にエンドプロテアーゼによる貯蔵蛋白質分解の影響が大きかった。同様に、Yamauchi *et al.* (1998)、佐藤ら(1999)は、製パン性とアミロ値の関係について検討し、製パン性の劣化と澱粉粘度の低下は必ずしも一致していないことを指摘している。コムギ子実中のエンドプロテアーゼ活性と製パン性の関係については、未だに明らかになっていない部分が多く残っているが、本実験の結果は、発芽に伴って起こる種子中の貯蔵蛋白質の分解は、胚乳澱粉の分解に比べて発芽のより進んだ段階で起こることを示唆するものである。そこで、次のIVでは発芽に伴って起こる製パン性の劣化について、子実中の α -アミラーゼおよびエンドプロテアーゼの役割をもとに解析を行った。

Ⅳ 穂発芽による製パン性劣化要因の解析

コムギの穂発芽被害については、多くは子実中の澱粉分解による影響が検討され、アミロ値、フォーリングナンバーおよび α -アミラーゼ活性と製パン性との関係について解析されてきた(MacGregor and Matsuo 1972、Meredith and Pomeranz 1985、MacGregor and Dushnicky 1989、Salomonsson *et al.* 1989、松崎・豊田 1996)。しかしながら、澱粉粘度の低下と製パン性の劣化は必ずしも一致しないことから(Yamauchi *et al.* 1998、佐藤ら 1999)、穂発芽による製パン性の劣化は低アミロ化だけでは説明することはできない。このため、優れたパン用硬質コムギの評価を行う場面においては、これに変わる新たに実用的な品質基準の導入が要望されている。

硬質コムギの製パン適性には、従来からコムギ子実中の貯蔵蛋白質の質と量の影響が大きいことが指摘されている(Kruger 1971、Bushuk and Lukow 1987、Lukow and Bushuk 1984、Janssen *et al.* 1996b、Weegels *et al.* 1996)。発芽期の貯蔵蛋白質には様々なプロテアーゼが働きかける。まず、エンドプロテアーゼによって貯蔵蛋白質は可溶性ペプチドまで分解され、次いでそれはアミノペプチダーゼやカルボキシペプチダーゼなどのエキソペプチダーゼの作用でアミノ酸や小ペプチドに分解される。この過程のうち、緒言で述べたように発芽に伴うグルテン劣化にはエンドプロテアーゼが強く影響している。よって、穂発芽により引き起こされる製パン性の劣化は、子実中のエンドプロテアーゼの増加による蛋白質分解と α -アミラーゼの活性化による種子貯蔵澱粉の分解が協調的に連動している可能性があるものの(Preston and Kruger 1979、Meredith and Pomeranz 1985、Salomonsson *et al.* 1989、Sun and Henson 1991、Jones and Wrobel 1993)、両酵素の役割については十分明らかになっていない。

Ⅲの結果から、発芽に伴うコムギ子実中のエ

ンドプロテアーゼの誘導は α -アミラーゼに比べて、より発芽の進んだ段階で起こることが明らかとなった。このことは、発芽に伴って起こる子実中の貯蔵蛋白質の分解は、胚乳澱粉の分解に比べて発芽のより進んだ段階で起こる可能性を示唆するものである。

そこでここでは、穂発芽によって製パン性が劣化するメカニズムを両酵素の合成量の変動をもとにして明らかにする目的で行った。材料には小麦粉中のグルテン強度の異なる3品種(Victoria INTA、Leader および春のあけぼの)を用い、品質劣化させるため人為的に発芽処理した子実から小麦粉を調製し、粉中の澱粉、蛋白質品質について解析した。また、製パン性と関連の深い生地の物理的性質ならびにこれらと α -アミラーゼおよびエンドプロテアーゼ活性との関係について解析を行った。

1) 材料および方法

供試材料として、小麦粉のグルテンの強さが異なる硬質春播コムギ品種、Victoria INTA(超強力)、Leader(強力)および春のあけぼの(強力)を1997年4月下旬に播種し、慣行法により栽培した。これら3品種を糊熟期ならびに完熟期に収穫し、ガラス室で子実水分12%程度まで乾燥させた後に脱穀し、子実は4に保存した。

糊熟期に収穫したVictoria INTA、Leader、および春のあけぼのの子実を5で12時間水に浸漬後、20に24時間静置して発芽させた(以下、糊熟期+発芽処理；表でHarvest ripeness+GT)。また、 α -アミラーゼ粗抽出液調製では糊熟期に収穫した春のあけぼのの子実100gを用い、同様に水に浸漬後4日間20に静置して発芽させた。発芽処理した子実は35で2日間通風乾燥後4に保存した。

小麦粉はテンパリングによって子実水分を16%に調整した後、ビューラーテストミルで製粉し、60%粉(以下、小麦粉と呼ぶ)を調整し

た。全粒粉の調製は発芽試験後に、冷凍保存した種子を常温に戻した後、0.5mm 目のスクリーンをつけた高速遠心粉碎器（Retch 社、ZM-1 型）で10,000回転で行った。

澱粉品質は α -アミラーゼ活性とアミログラフによるアミロ値によって評価した。 α -アミラーゼ活性の測定は、修飾オリゴ糖 blocked 4-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG 7) を基質とする α -アミラーゼ活性測定キット（CERALPHA METHOD、メガザイム社）を用いてⅢ・2と同様の方法で行った。 α -アミラーゼ活性は1分間に1 μ mol の 4-nitrophenol を生成する α -アミラーゼの量を1U として、乾物1g 当たりの mU で示した。アミロ値はブラベンダー社製のアミログラフを使用し、小麦品質検定方法（1968）により測定し、アミログラム最高粘度（アミロ値）をブラベンダーユニット（B.U.）で示した。測定は小麦粉65g（水分13.5%ベース）で、25 から92 まで15 / 分で加熱して行った。

小麦粉を対象とした蛋白質含量の測定は近赤外法（Inframatic 8120、PerCon 社）で行い、SDS 沈降価の測定は Axford *et al.* (1979) の方法を改変した Takata *et al.* (1999) の方法により行った。SDS 沈降価は小麦粉中の蛋白質成分の健全度を示す指標の一つで、製パン適性とも非常に相関が高く（Axford *et al.* 1979） Takata *et al.* (1999) の改良方法では少量（2.5 g）のサンプルをで評価できるため、F₃といった分離初期世代に適用できる。小麦粉と全粒粉のエンドプロテアーゼ活性は青色色素を架橋させたカゼインを基質とするエンドプロテアーゼ活性測定キット（Protazyme AK tablet、メガザイム社）を用いて、Ⅲ・2と同様の方法で行った。活性は乾物1g で1時間当たりの吸光度の変化をU で示した。

小麦粉を用いた製パン試験の条件は、最終発酵を5% 生酵母で40分間に変更した以外は山内ら（2000）の方法に準拠し、ノータイム法により行った。生地のミキシングパターンの測定はクランプメーターを用いて、Takata *et al.* (1999) の方法により行った。また、生地物性

の測定は生地10g を用いて、山内ら（2000）の方法により行った。

α -アミラーゼ粗抽出液の調製は糊熟期に収穫し、4日間発芽処理した春のあけぼのの全粒粉を用いて行った。50g の全粒粉を100mL の蒸留水に懸濁させ、3000回転で15分間遠心分離した後に、上清を濾過（Advantec Toyo No 2）した濾液を粗抽出液とした。 α -アミラーゼの添加試験は粗抽出液中の α -アミラーゼ活性を測定し、これをもとに生地に粗抽出液を加えてから行った。なお、この粗抽出液は微量のエンドプロテアーゼ活性を含んでいるが、これについては別途エンドプロテアーゼ活性を測定し、製パン性に影響しない範囲の活性であることを確認した。

2）結果および考察

糊熟期および完熟期に収穫したサンプル、ならびに糊熟期 + 発芽処理サンプルから調製した小麦粉および全粒粉の澱粉品質を表3に示した。糊熟期に収穫した3品種の α -アミラーゼ活性は小麦粉で115mU（Victoria INTA）～159 mU（春のあけぼの）、全粒粉では218mU（春のあけぼの）～589mU（Victoria INTA）の範囲であった。この時のアミロ値は500 B.U.（Victoria INTA）～715B.U.（Leader）の範囲で、3品種ともに低アミロの基準値300B.U.を大きく上回り、健全なアミロ粘度を示した。一方、完熟期収穫および糊熟期 + 発芽処理を行った3品種の α -アミラーゼ活性は、小麦粉、全

表3 供試品種の小麦粉および全粒粉の α -アミラーゼ活性とアミロ値

品種名	α -アミラーゼ活性 (mUg ⁻¹)		アミロ値 (B.U.)
	小麦粉	全粒粉	
Victoria INTA			
糊熟期	115	589	500
完熟期	830	4011	70
発芽処理	3821	24645	30
ハルノアケボノ			
糊熟期	159	218	620
完熟期	404	1610	170
発芽処理	536	3679	140
Leader			
糊熟期	119	345	715
完熟期	1383	3542	70
発芽処理	2515	7365	55

粒粉ともに増大した。活性の増加を全粒粉で見
た場合、完熟期収穫では糊熟期収穫の7倍 (Vic-
toriaINTA、春のあけぼの) ~ 10倍 (Leader)、
さらに穂発芽の影響を想定し糊熟期に収穫後発
芽処理したコムギでは17倍 (春のあけぼの) ~
42倍 (Victoria INTA) まで増加した。逆に、
アミロ値は α -アミラーゼ活性の増加に付随し
て低下し、完熟期収穫で70 B.U (Victoria
INTA) ~ 170 B.U (春のあけぼの) で3品種
ともに低アミロ化し、さらに糊熟期収穫後の発
芽処理になると30 B.U ~ 140 B.U の極端に
低い値となった。これらの結果から、いずれの
品種も澱粉品質は糊熟期に収穫したときは健全
であるが、完熟期収穫、さらに糊熟期収穫後の
発芽処理により急激に劣化することが明らかと
なった。

次に、蛋白質品質に及ぼす影響について、蛋
白質含量、エンドプロテアーゼ活性、および
SDS 沈降価を測定し、表4に結果を示した。
小麦粉中の蛋白質含量は糊熟期収穫で、春のあ
けぼの 10.3%、Victoria INTA 12.4%、およ
び Leader 14.1%であり、完熟期収穫および糊
熟期 + 発芽処理と発芽が進行してもほとんど含
量の変化はなかった。また、小麦粉中のエンド
プロテアーゼ活性は糊熟期収穫で1.45 U (春
のあけぼの) ~ 1.73 U (Leader) の範囲であ
り、糊熟期 + 発芽処理でも1.68 U (Leader)
~ 1.88 U (Victoria INTA) で推移し、蛋白質
含量と同様ほとんど変化は見られなかった。一

表4 供試品種の蛋白質含量、エンドプロテアーゼ活性
および SDS-沈降価

品種	小麦粉の 蛋白質含量 (%)	エンドプロテアーゼ活性 ($A_{590g^{-1}h^{-1}}$)		SDS 沈降価 (cm^3)
		小麦粉	全粒粉	
Victoria INTA				
糊熟期	12.4	1.67	2.28	68
完熟期	12.6	1.83	3.22	70
発芽処理	12.4	1.88	3.92	63
ハルノアケボノ				
糊熟期	10.3	1.45	3.22	34
完熟期	10.5	1.64	3.49	35
発芽処理	10.3	1.70	3.70	34
Leader				
糊熟期	14.1	1.73	2.67	46
完熟期	15.1	1.88	3.63	38
発芽処理	14.8	1.68	4.13	31

方、全粒粉中のエンドプロテアーゼ活性は糊熟
期収穫で2.28 U (Victoria INTA) ~ 3.22 U
(春のあけぼの) であったが、糊熟期 + 発芽処
理で3.77 U (春のあけぼの) ~ 4.13 U (Leader)
まで増加した。以上のように小麦粉中のエンド
プロテアーゼ活性は発芽が進んでもほとんど変
化しなかったが、全粒粉中のそれは糊熟期収穫
後の発芽処理により、1.2倍 (春のあけぼの)
~ 1.7倍 (Leader) まで増加した。

糊熟期に収穫した小麦粉の SDS 沈降価は品
種によって大きく異なり、超強力粉である Vic-
toria INTA ($68cm^3$) は春のあけぼの ($34cm^3$)
および Leader ($46cm^3$) に比べて非常に高い値
を示した。完熟期収穫および糊熟期収穫後の発
芽処理により、SDS 沈降価は低下したが、
Leader に比べて Victoria INTA および春のあ
けぼのの低下は小さく、特に Victoria INTA
は発芽処理後も $63cm^3$ の高い値を維持した。本
実験の結果から発芽の進行により、子実中のエ
ンドプロテアーゼ活性が増加し、粉中の蛋白質
成分も劣化するが、その程度はコムギ子実中の
グルテンの強さにも関係しており、超強力的性
質を持つ Victoria INTA は発芽が進んでも小
麦粉中の蛋白質の劣化は Leader と比較して少
ないことが示唆された。

製パン製試験の結果 (表5) は、製パン適性
に及ぼす発芽の影響をパンの比容積、生地 of 真
空膨張量、ミキシングピークまでの時間、およ
び生地物性 (生地破断力、生地の破断変形量)
の変化をもとに調べたデータである。発芽がパ

表5 供試品種のパン比容積と生地物性

品種	パン比 容積 (cm^3g^{-1})	生地 膨張量 (cm^3)	ミキシング ピークまで の時間 (min)	生地 破断力 (N)	生地破断 変形量 (mm)
Victoria INTA					
糊熟期	6.89	143	6.4	3.30	38.5
完熟期	7.10	158	4.6	2.75	49.3
発芽処理	6.26	149	3.7	2.67	52.7
ハルノアケボノ					
糊熟期	5.83	125	2.9	2.06	42.2
完熟期	5.78	123	2.8	2.32	44.8
発芽処理	6.10	130	2.5	1.98	42.3
Leader					
糊熟期	7.00	130	1.9	2.17	55.0
完熟期	5.65	123	1.3	1.47	63.5
発芽処理	5.15	117	1.2	0.98	67.8

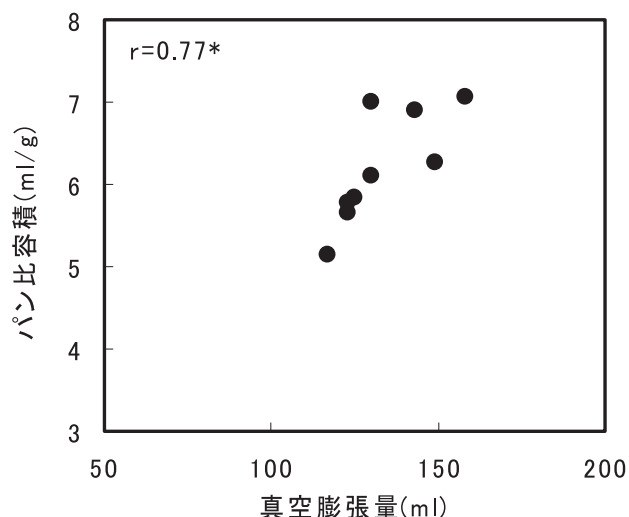


図10 生地真空膨張量とパン比容積の関係

*は5%水準で有意であることを示す。

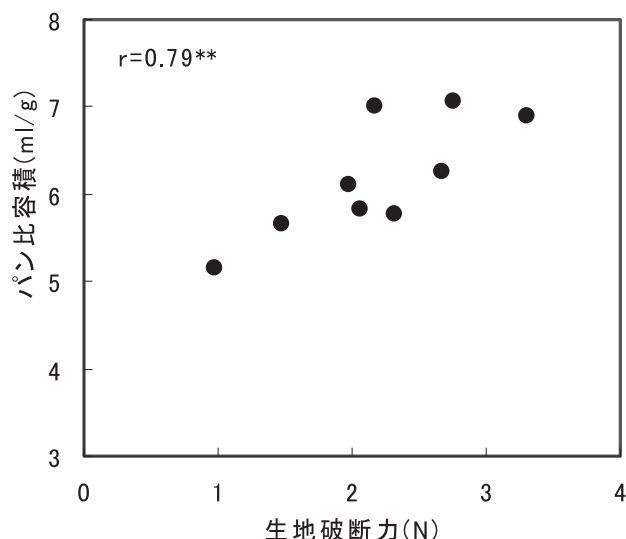


図11 生地の破断力とパン比容積の関係

**は1%水準で有意であることを示す。

ンの比容積に及ぼす影響は小麦粉中のグルテンの強さにより、3品種で大きく異なった。超強力コムギである Victoria INTA の比容積は糊熟期 + 発芽処理 ($6.26 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) では、糊熟期 ($6.89 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) に比べて、低下したが、既に低アミロ化している完熟期の比容積 ($7.10 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) が3サンプルの中で最も高い値となった。一方、春のあけぼのの比容積は糊熟期収穫 ($5.83 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) に比べ、完熟期収穫 ($5.78 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) で若干低下した。また、Leader の比容積は糊熟期収穫 ($7.00 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) から完熟期収穫 ($5.65 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) および糊熟期 + 発芽処理 ($5.15 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) と発芽の進行に伴って低下した。

山内ら (2000) は製パン適性を表す指標の中でも、特に生地の真空膨張量はパンの比容積と相関が高いことを報告している。サンプル数が十分多いといえないものの、本実験においても生地の真空膨張量とパンの比容積の間に正の有意な相関関係 ($r=0.77$, $P<0.05$) が認められた (図10)。したがって、生地のガス保持力がパンの比容積に強く関係するとした山内ら (2000) の結果を確認できた。他の製パン適性の指標では、発芽の進行に伴い、ミキシングピークまでの時間および生地破断力は低下し、破断変形量は増加した。しかし、これらの指標においても、超強力粉である Victoria INTA の変化量は他の2品種に比べて小さく、比較的高

い製パン適性を維持した。Lukow and Bushuk (1984) は発芽による製パン性の劣化はコムギ子実中の蛋白質であるグルテンの強度によって異なり、超強力小麦では発芽の影響が比較的小さいことを報告している。この点は、強いグルテンを持つ硬質コムギの製パン適性は、低アミロ化していても、アミロ値が300 B.U. ~ 100 B.U. の範囲であれば、比較的良好であること (Yamauchi *et al.* 1998、佐藤ら 1999) と一致する。これらのことから、発芽による製パン性の劣化は低アミロ化だけでは説明することはできないと考えられる。また、生地の製パン性には生地物性をはじめとする生地の物理的特性の影響が強いことがこれまでに多く報告されている (Janssen *et al.* 1996a、Janssen *et al.* 1996b、Weegels *et al.* 1996)。本実験においても生地の真空膨張量と関連しているパンの比容積は、製パン適性の指標である生地破断力と $r=0.79$ ($P<0.05$; 図11) およびミキシングピークまでの時間と $r=0.66$ ($P<0.05$; 図12) の関連が認められた。これら有意な正の相関から、生地の物理的特性が製パン適性に重要な役割を果たしていると考えられた。このため、発芽によるパン比容積の低下は、生地破断力およびミキシングピークまでの時間の低下で表される生地の弱化によって引き起こされることが示唆された。

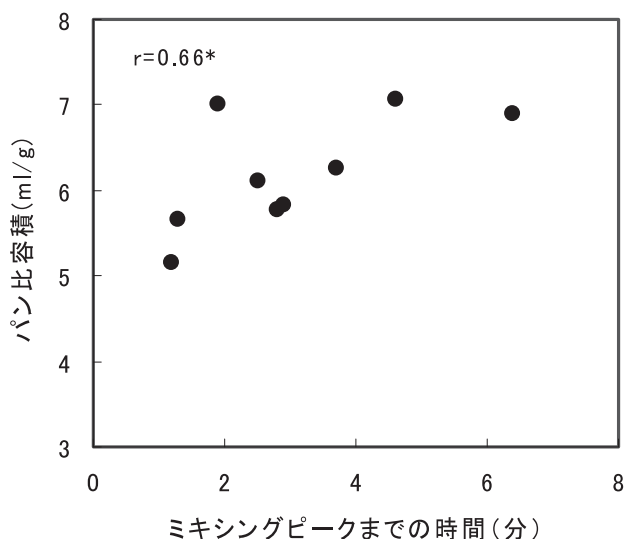
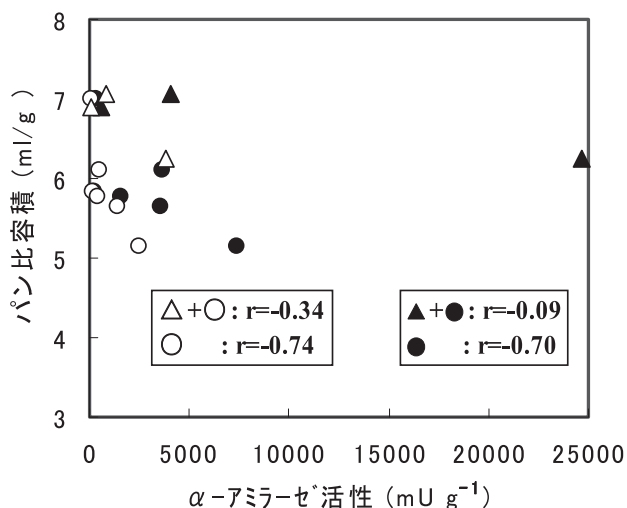


図12 ミキシングピークまでの時間とパン比容積の関係

*は5%水準で有意であることを示す。

図13 α -アミラーゼ活性とパン比容積の関係

小麦粉: Victoria INTA、 $\circ$ 小麦粉: ハルノアケボノおよび Leader
 全粒粉: Victoria INTA、 $\bullet$ 全粒粉: ハルノアケボノおよび Leader

次に、小麦粉および全粒粉中の α -アミラーゼ活性、エンドプロテアーゼ活性と製パン性の指標であるパンの比容積の関係を図13、14に示した。なお、これまでの試験結果から製パン性に関連の深い生地の物理的特性は品種によって異なることから、これ以降の酵素活性と製パン性の関係を表した図においては、超強力粉である Victoria INTA と強力粉である春のあけぼのおよび Leader はそれぞれ異なる記号で示した。春のあけぼのおよび Leader の強力粉について、パンの比容積と小麦粉および全粒粉中の α -アミラーゼ活性、および全粒粉中のエンド

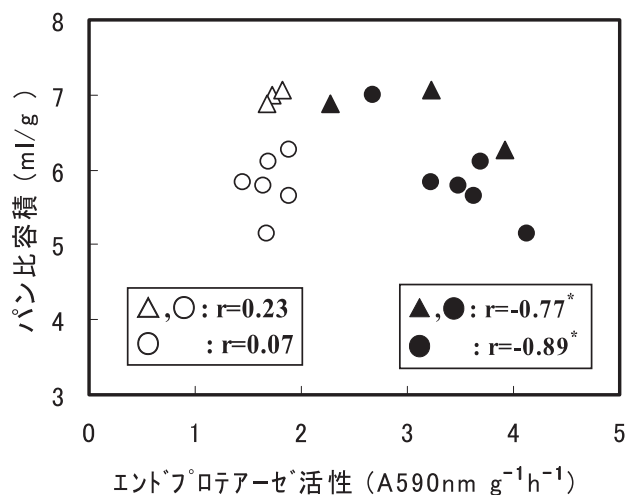


図14 エンドプロテアーゼ活性とパン比容積の関係

小麦粉: Victoria INTA、 $\circ$ 小麦粉: ハルノアケボノおよび Leader
 全粒粉: Victoria INTA、 $\bullet$ 全粒粉: ハルノアケボノおよび Leader
 *は5%水準で有意であることを示す。

ロテアーゼ活性の間にはそれぞれ、 $r = -0.74$ 、 -0.70 、 -0.89 の高い負の相関関係が認められたが、小麦粉中のエンドプロテアーゼ活性との間に相関関係は認められなかった ($r=0.07$)。一方、3品種全てを込みにした場合には、パンの比容積と全粒粉中のエンドプロテアーゼ活性との間に負の相関関係が認められた ($r = -0.77$) に対して、小麦粉および全粒粉中の α -アミラーゼ活性との間には相関関係は認められなかった ($r = -0.34$ 、 -0.09)。

このように、本実験においては、強力粉の α -アミラーゼ活性とパンの比容積の間には負の相関関係が認められたが、一般的には製パン性への α -アミラーゼの影響はそれほど大きくないと考えられている。また、Bushuk and Lukow (1987) は発芽による製パン性の劣化では、エンドプロテアーゼによる種子中の貯蔵蛋白質分解に比べて、 α -アミラーゼによる胚乳澱粉分解の影響は小さいことを報告している。

これらの酵素と製パン適性の関係についてさらに明確にするために、糊熟期に収穫した春のあけぼのの小麦粉に、 α -アミラーゼ粗抽出液を完熟期収穫および糊熟期収穫後の発芽処理の活性と同じレベルまで添加して、製パン試験を行った (表6)。 α -アミラーゼ粗抽出液の添加により、春のあけぼののアミロ値はそれぞれ完熟期収穫で350 B.U. および糊熟期収穫後の発芽

表6 小麦粉への α -アミラーゼ抽出液の添加量と製パン適性の関係

α -アミラーゼ抽出液の添加量	アミロ値 (B.U.)	パン比容積 (cm^3g^{-1})	ミキシングピークまでの時間 (min)	生地膨張量 (cm^3)	生地破断力 (N)	生地破断変形量 (mm)
糊熟期	620	5.83	2.9	125	2.06	42.2
完熟期	350	6.16	2.7	115	2.22	44.2
発芽処理	240	6.42	2.7	117	1.81	41.5

* 表中の完熟期および発芽処理区は糊熟期に収穫した春のあけぼのの小麦粉に、 α -アミラーゼ粗抽出液を完熟期収穫および糊熟期収穫後の発芽処理の活性と同じレベルまで添加して、製パン適性を評価した。

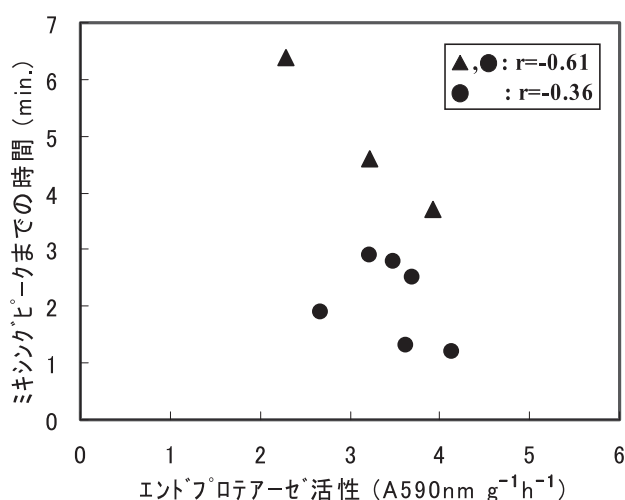


図15 子実中のエンドプロテアーゼ活性とミキシングピークまでの時間の関係

▲ : VictoriaINTA、● : ハルノアケボノおよび Leader

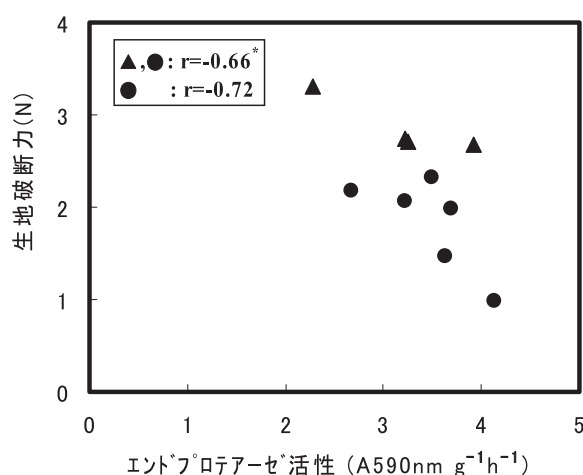


図16 子実中のエンドプロテアーゼ活性と生地破断力の関係

▲ : VictoriaINTA、● : ハルノアケボノおよび Leader

* は 5 % 水準で有意であることを示す。

処理で240 B.U.まで低下した。これに対して、添加後のパン比容積、ミキシングピークまでの時間、生地の真空膨張量、破断力および破断変形は全て添加前の糊熟期収穫と同様の値を示した。このように、 α -アミラーゼ活性が増加しても、製パン適性の指標となる各種生地特性に影響は見られないことから、 α -アミラーゼによる胚乳澱粉の分解は製パン性劣化の主要因ではないと考えられた。

次に、全粒粉中のエンドプロテアーゼ活性とミキシングピークまでの時間および生地の破断力との関係をそれぞれ図15、図16に示した。全粒粉中のエンドプロテアーゼ活性とミキシングピークまでの時間および生地の破断力との間には負の相関関係が認められ、特に生地破断力との間の相関関係が高かった（強力粉のみ $r = -0.72$ 、全品種込み $r = -0.66$ ）。これらの結果

から、エンドプロテアーゼの増加による子実中の蛋白質の分解が生地物性の劣化に強く関係していると考えられた。

本実験結果から穂発芽による製パン性の劣化においては、エンドプロテアーゼ活性の増加によって起こるコムギ子実中のグルテンの分解が主要因となり、このために生地破断力、ミキシングピークまでの時間および生地のガス保持力の低下で表される生地の軟化が引き起こされ、これによって比容積の低下が起こることが示唆された。

以上より、穂発芽による製パン性の劣化はエンドプロテアーゼ活性の増加によるグルテンの分解が主要因であると結論できる。従って、硬質コムギの育種段階における製パン性の評価には、成熟期における全粒粉中のエンドプロテアーゼ活性の測定が有効であると考えられた。

V 低アミロ小麦の簡易迅速検定法の開発

穂発芽により、低アミロ化した小麦は、その後のうどん加工適性が著しく劣化するため大きな問題となる(食糧庁管理部検査課 1988)。また、健全な小麦に低アミロ小麦が少量でも混入すると、全体のアミロ値が大きく低下するため、低アミロの被害を軽減するためには健全粒と低アミロ小麦を仕分けして流通させることが重要である。現在、道内の生産現場ではフォーリングナンバーの導入が進み、これをもとにした小麦の仕分けが行われている。しかし、この方法は子実の乾燥と粉碎が必要であることから迅速な測定法とは言えない。コムギの低アミロ化は登熟中にコムギ粒内で発芽関連酵素の活性が増加することにより起こり、 α -アミラーゼの活性化による澱粉粒の分解がその主要因である(Maeda *et al.* 1978、Salmonsson *et al.* 1989、Sun and Henson 1991)。 α -アミラーゼ活性とアミロ値およびフォーリングナンバー値の間には高い相関関係が認められることから、 α -アミラーゼ活性をもとにアミロ値を推定して、小麦を仕分けようとする試みがなされている(中津ら 1989、渡辺ら 1994)。実際に北海道の農協では検査現場にオートアナライザーを用いた α -アミラーゼ活性自動測定装置の導入が進められている(中津ら 1997)。しかし、検査現場では、多数の試料を集中して取り扱うため、複雑な操作のない、より簡便で迅速なシステムの開発が強く望まれている。

主に臨床分野で用いられているドライケミストリー法は、特定の化学反応に必要な試薬が乾燥状態で用意され、それに検体が添加されると検体の水分を溶媒として、試薬が含まれるマトリックス中で反応が進行する分析法である(亀井 1987)。このため、この方法は反応系で溶液を使用する必要がなく、簡易な操作で短時間に高精度なデータが得られるなど既存の液体法と比べて利点が多く(Skerritt and Heywood 2000)。農業現場においても簡便に生化学分析

を導入することができる(堀金ら 1997、Skerritt and Heywood 2000)。そこで、本研究ではこのドライケミストリー法を用いた小麦の簡易迅速選別の可能性を探る目的で、コムギ α -アミラーゼに特異的な修飾オリゴ糖(EPS: 4-Nitrophenyl- α -D-maltoheptaoside-4, 6-o-ethylidene)を基質とする多層フィルム式スライドを用いて、 α -アミラーゼ活性を測定し、修飾オリゴ糖基質を用いる既存の液体法(CER-ALPHA法)との関係、並びにアミロ値およびフォーリングナンバー値との関係を検討した。そして、次に北海道内の農家圃場で採取した小麦を対象に、ドライケミストリー法により測定した α -アミラーゼ活性とフォーリングナンバー値との関係をもとに現地試料への適用性を検討した。

1) 材料と方法

ドライケミストリー法と既存の液体法(CER-ALPHA法)による α -アミラーゼ活性の比較検討には1998年に55品種を標準栽培し、成熟期に採取後にブラベンダーテストミル(Quadrumat Junior、ブラベンダー社)を用いて調製した小麦粉を用いた。

ドライケミストリー法による α -アミラーゼ活性(以下、 α -アミラーゼ活性と称する)、フォーリングナンバー値、およびアミロ値の測定と相互の相関については1999年に標準栽培し、成熟期に採取したチホクコムギ(穂発芽耐性弱)およびホクシン(穂発芽耐性中)の2品種のコムギを用いた。また、現地試料の適用性試験用の試料は、2000年に道内6ヶ所(幕別、士幌、美瑛、士別、和寒、網走)の農家圃場で成熟期に各8~9点、計50点のホクシンを2反復で採取して用いた。

コムギ種子の発芽処理は糊熟期に収穫したチホクコムギおよびホクシンのコムギ粒を5で24時間水に浸漬後、20の恒温下に24時間静置

することによりおこなった。発芽処理した種子は35 で2日間通風乾燥後、全体に対して0・100%の割合(0、1、2、4、10、20、50、100%)で健全粒に混合し、様々な発芽割合のコムギ粒を調製した。

糊熟期収穫および発芽処理後のコムギ粒について、テンパリングにより水分を14.5%に調整した後、小麦品質検定方法(農林水産技術会議事務局 1968)に従って、ブラベンダーテストミル(Quadrumat Junior、ブラベンダー社)を用いて行い、60%粉を調製した(以下、小麦粉と称する)。

全粒粉の調製は糊熟期収穫、発芽処理後のコムギ種子および農家圃場で採取したサンプルについて、0.5mm目のスクリーンをつけた高速遠心粉砕器(ZM-2型、Retch社)で10,000回転で行った。なお、現地圃場で機械収穫・脱穀したコムギ粒は4の冷蔵条件のもとで試験場に持ち込み、35で2日間通風乾燥した後、粉砕した。水分含量はコムギ粒、粉砕後の全粒粉および小麦粉を105、16時間乾燥し測定した。

α -アミラーゼ活性測定は、渡辺ら(1994)の方法に準じて行った。小麦粉または全粒粉0.1gをエッペンドルフチューブに取り、これに抽出用緩衝液0.5mL(50mMリンゴ酸ナトリウム、50mM塩化ナトリウム、2mM塩化カルシウム、3mMアジ化ナトリウム、pH5.2)を加え、5分間攪拌後に10,000rpmで10分間遠心分離し、その上澄みを粗酵素液とした。

既存の液体法(CERALPHA法)による α -アミラーゼ活性測定方法は修飾オリゴ糖 blocked 4-nitrophenyl maltoheptaoside(BPNPG7)を基質とする α -アミラーゼ活性測定キット(CERALPHA METHOD、メガザイム社)を用い、渡辺ら(1994)の方法により、2反復で行った。 α -アミラーゼ活性は1分間に1 μ molの4-nitrophenolを生成する α -アミラーゼ量を1Uとして表示した。

ドライケミストリー法による α -アミラーゼ活性測定は、小型の臨床検査装置(富士ドライケム 3030、富士フィルムメディカル)を用い、

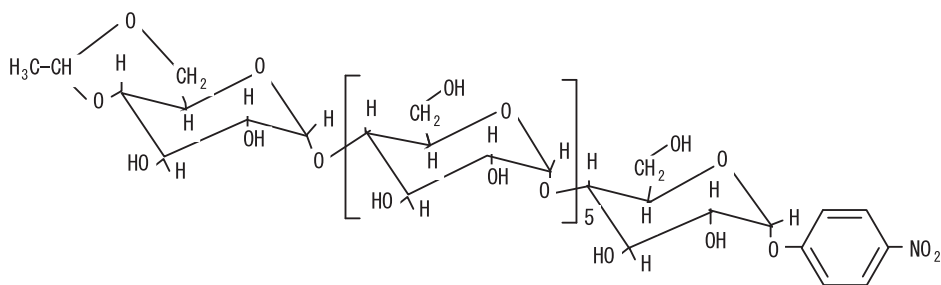
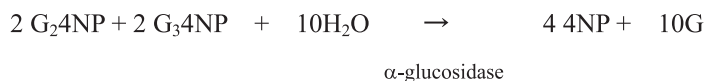
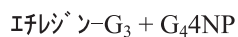
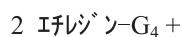
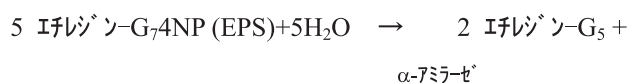
α -アミラーゼに特異的な修飾オリゴ糖 4-Nitrophenyl- α -D-maltoheptaoside-4、6-o-ethylidene(EPS)を基質とする(Krusen-Jarres and Kaiser 1989)研究用の多層フィルム式スライド(以下、試作スライドと称する)により2反復で行った。この方法では図17で示した手順で順次反応が進み、最終的に4-nitrophenolが生成される。試作スライドは図18で示した通り、展開層、発色層および透明支持体の三層構造をしており、展開層には基質として0.32 μ M EPS、緩衝液としてHEPES pH6.5および過剰量の α -グルコシダーゼを含む。抽出液300 μ Lを上述の臨床検査装置にセットすると、自動的に10 μ Lが吸引され、これが展開層に点着されて反応が開始する。反応は37のインキュベーター部において5分間行われる。最終的に生成した4-nitrophenolは発色層で黄色に発色し、機器内の分光光度計で400nmにおける吸光度が測定される。 α -アミラーゼ活性は、酵素標品(Sigma、 α -amylase Type VIII-A From Barley Malt)を基準として、可溶性澱粉を基質とした場合に3分間に1.0mgのmaltoseを生成する量を1Uとして表示される。

アミログラム最高粘度(アミロ値)は、ブラベンダー社製のアミログラフを使用し、小麦品質検定方法(農林水産技術会議事務局 1968)により2回測定し、平均値をブラベンダーユニット(B.U.)で表した。フォーリングナンバー値はフォーリングナンバー社(スウェーデン)のフォーリング・ナンバー1600型を使用し、同一試料について2回測定した。測定操作は、7.0gの全粒粉と25mLの蒸留水を専用の試験管中で攪拌混合し、これに専用の攪拌棒を挿入した。これを100の水槽にセットし、懸濁液中を攪拌棒が一定の位置まで降下する時間を測定した。

2) 結果と考察

既存の液体法(CERALPHA法)とドライケミストリー法の比較

図19に供試試料(小麦粉55点)のCERALPHA法とドライケミストリー法による α -アミラー

4-ニトロフェニル- α -D-マルトヘフタシト-4,6-O-イソプレジソ (EPS)

(NP: 4-ニトロフェノール; G: グルコース)

図17 ドライケミストリー法での α -アミラーゼ活性の測定手順

ゼ活性値の関係を示した。CERALPAH 法により測定した活性値とドライケミストリー法の活性値との間には高い相関係数 ($r=0.847$, $P<0.01$) が認められた。

チホクコムギ、ホクシンともに α -アミラーゼ活性は発芽粒の混合比率に従って上昇した (図20)。アミロ値と小麦粉の α -アミラーゼ活性との関係から、両品種ともにそれぞれの対数値の間には高い負の相関が認められた (チホクコムギ $r=-0.941$, $P<0.01$ 、ホクシン $r=-0.961$, $P<0.01$; 図21)。アミロ値と α -アミラーゼ活性の間の回帰式は、チホクコムギ $\log Y = -0.174 \log X + 6.819$ ($r=-0.957$, $P<$

0.01)、ホクシン $\log Y = -0.413 \log X + 7.619$ ($r=-0.946$, $P<0.01$) となり (Y は α -アミラーゼ活性、 X はアミロ値を示す) この式より、低アミロ小麦の指標となるアミロ値300 B.U.に相当する小麦粉の α -アミラーゼ活性を計算すると、およそチホクコムギ340 mU、ホクシン185 mUであった。

全粒粉を供試した場合も、同様に高い負の相関関係が認められた (チホクコムギ $r=-0.981$, $P<0.01$ 、ホクシン $r=-0.936$, $P<0.01$ 、図21)。この時の回帰式は、チホクコムギ $\log Y = -0.377 \log X + 8.228$ 、ホクシン $\log Y = -0.570 \log X + 9.089$ となった。この式よ

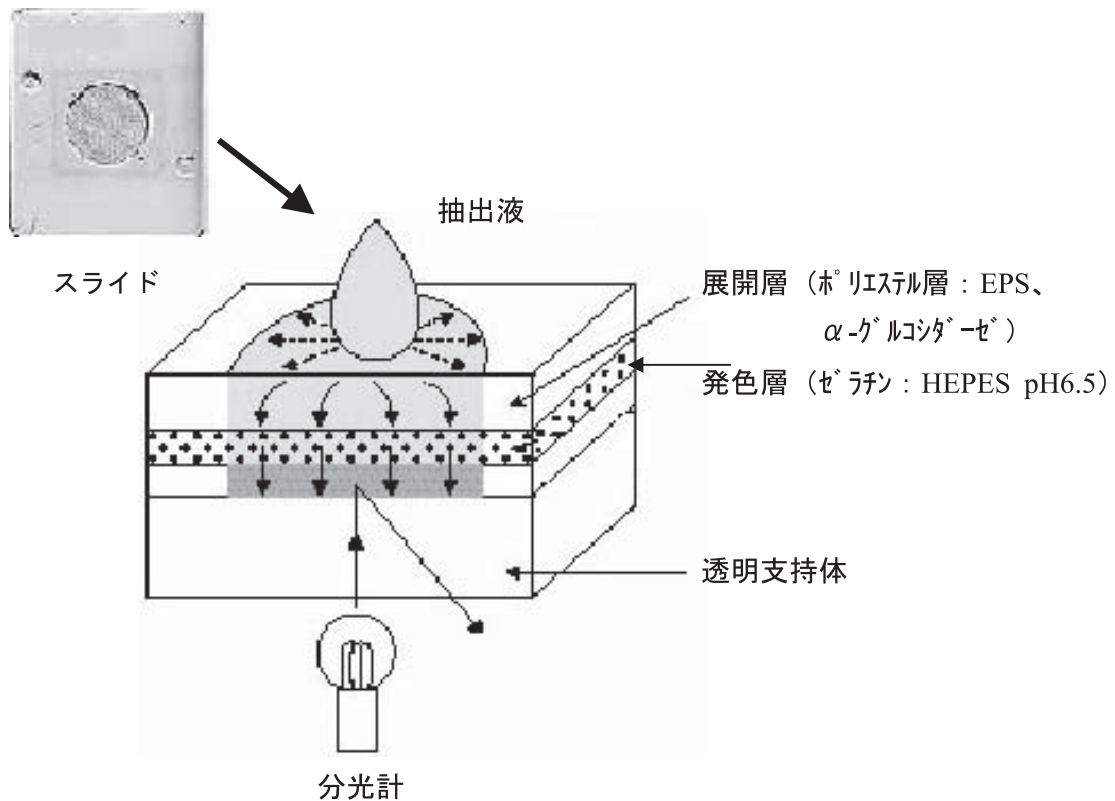


図18 多層フィルム式・スライドの構造

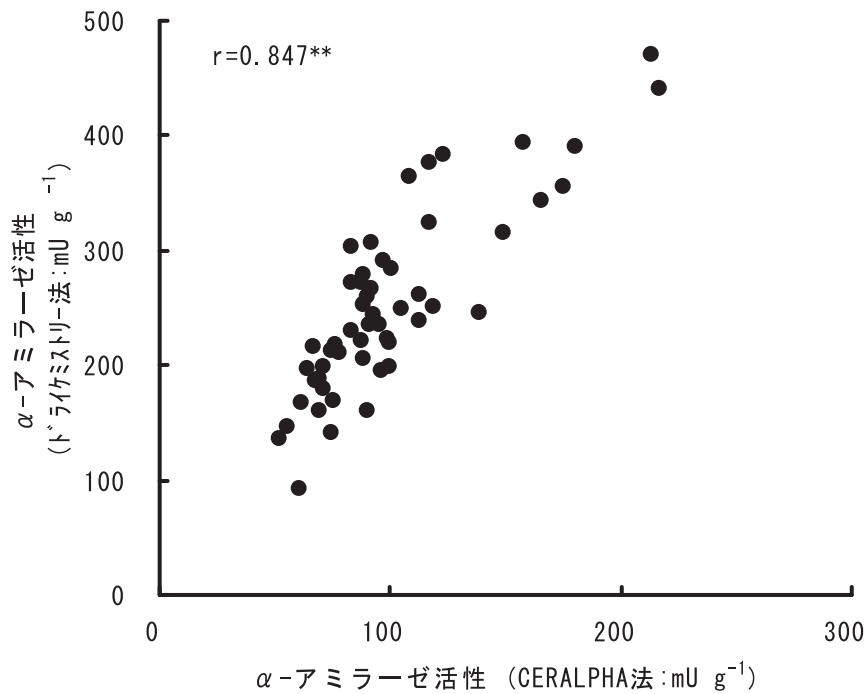


図19 α -アミラーゼ活性測定における CERALPHA 法とドライケミストリー法の比較

**は1%水準で有意であることを示す。

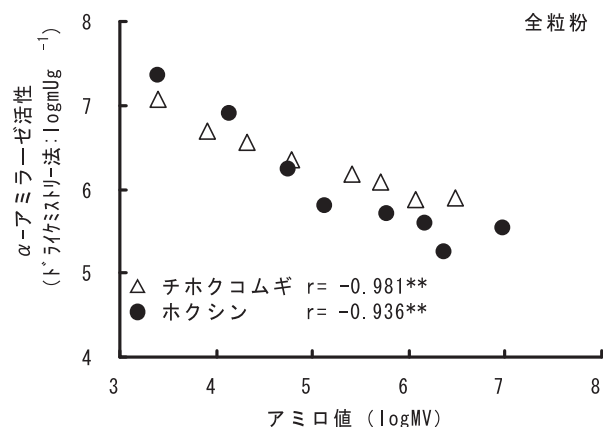
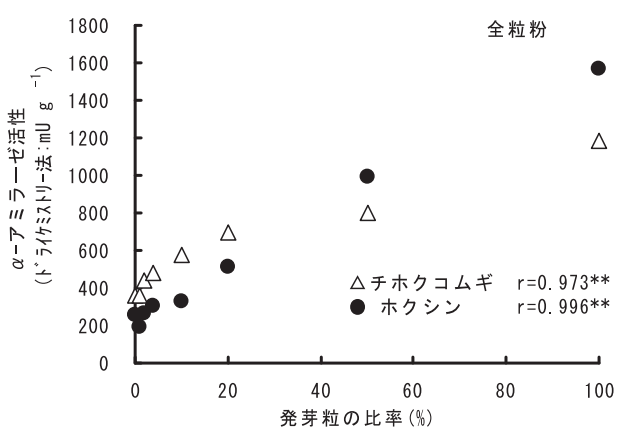
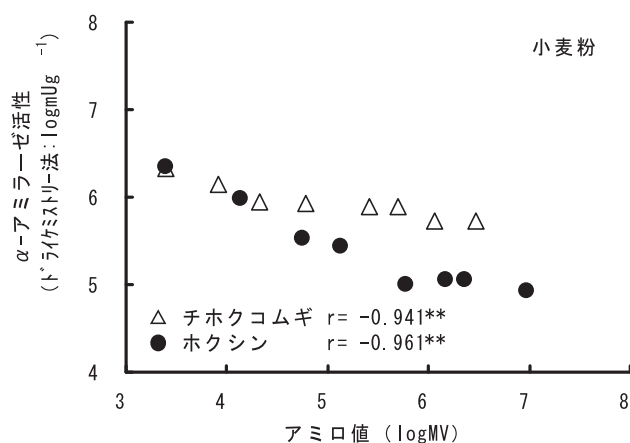
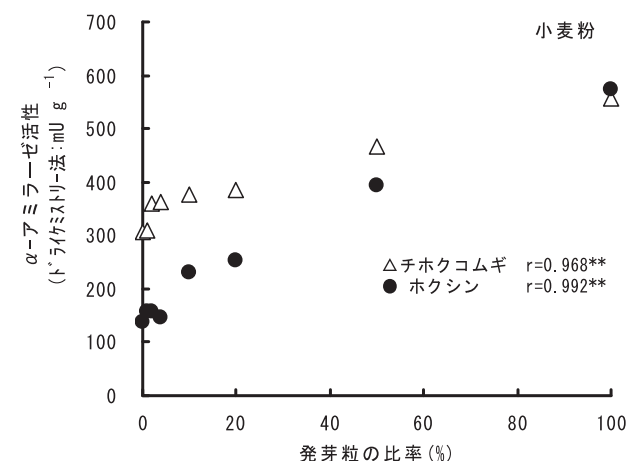


図20 発芽粒の比率とα-アミラーゼ活性の関係

**は1%水準で有意であることを示す。

図21 アミロ値とα-アミラーゼ活性の関係

**は1%水準で有意であることを示す。

り、低アミロ小麦の指標となるアミロ値300 B.U.に相当する全粒粉のα-アミラーゼ活性を計算すると、およそチホクコムギ430 mU、ホクシン333 mUであった。以上のように全粒粉を供試した場合も小麦粉と同程度の相関関係が得られた。また、アミロ値の高いところでは2品種間で相違が認められたが、その差異は小麦粉の方が全粒粉に比べて大きかった。

次に、生産現場においてはフォーリングナンバーによって澱粉粘度の検査が行われることから、フォーリングナンバー値とα-アミラーゼ活性の関係を検討した。フォーリングナンバー値と全粒粉中のα-アミラーゼ活性についても、アミロ値と同様にそれぞれの対数値の間には高い負の相関が認められた(チホクコムギ $r = -0.957$, $P < 0.01$ 、ホクシン $r = -0.946$, $P < 0.01$; 図22)。また、両者の回帰曲線にはアミ

ロ値との関係と同様に2品種間で差が認められた。

以上のようにドライケミストリー法により測定した小麦粉および全粒粉のα-アミラーゼ活性は既存の液体法との相関も高く、発芽粒の混合比率に従って上昇し、アミロ値およびフォーリングナンバー値との相関も高いことから、これをもとにして同一品種での低アミロ小麦の選別が可能であることが確認された。それぞれの相関関係において、アミロ値およびフォーリングナンバー値が高いところではそれぞれの値とα-アミラーゼ活性値の間には品種間差が認められた。また、その差異は全粒粉の場合に比べて、小麦粉で大きかった(図21)。アミロ値、フォーリングナンバー値とα-アミラーゼ活性の関係におけるこのような品種間差は、澱粉粒の性質の違いによることが報告されている(平ら

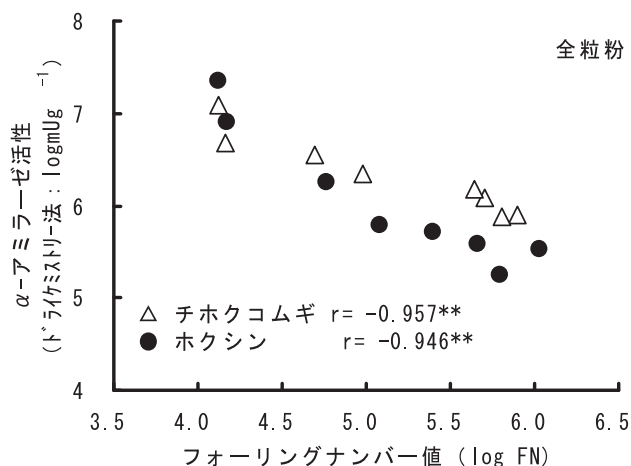


図22 フォーリングナンバー値と α -アミラーゼ活性の関係

**は1%水準で有意であることを示す。

1989)。渡辺ら(1994)は、品種毎に澱粉粒の性質の違いがアミロ値やフォーリングナンバー値に及ぼす影響は、アミロ値やフォーリングナンバー値が低い場合には、 α -アミラーゼによる澱粉の分解が進んでいるため小さいが、アミロ値、フォーリングナンバー値が高くなると、品種毎の澱粉粒の差異がアミロ値やフォーリングナンバー値に反映してくることを報告している。澱粉粒の品種間差と α -アミラーゼ活性の関係についてはさらに検討する必要がある。

低アミロの基準は300 B.U.であるが、生産現場ではフォーリングナンバーによる検定が行われることから、両者の関係について検討した。チホクコムギとホクシンのアミロ値とフォーリングナンバー値の関係を図23に示す。両者の間の相関係数はチホクコムギが $r=0.979$ ($P<0.01$)、ホクシンは $r=0.967$ ($P<0.01$)となり、アミロ値とフォーリングナンバー値には高い相関関係が認められた。また、両者の間の指数回帰式はチホクコムギが $X=25.771e^{0.0085Z}$ 、ホクシンは $X=32.031e^{0.009Z}$ であった (X はアミロ値、 Z はフォーリングナンバー値を示す)。フォーリングナンバー値とアミロ値の関係についてはフォーリングナンバー値のわずかな増減が、対応するアミロ値においては大きな差となって表れるため、フォーリングナンバーによる低アミロ小麦の判定には誤差が生じやすく、フォーリングナンバー値はアミロ値の大まかな推

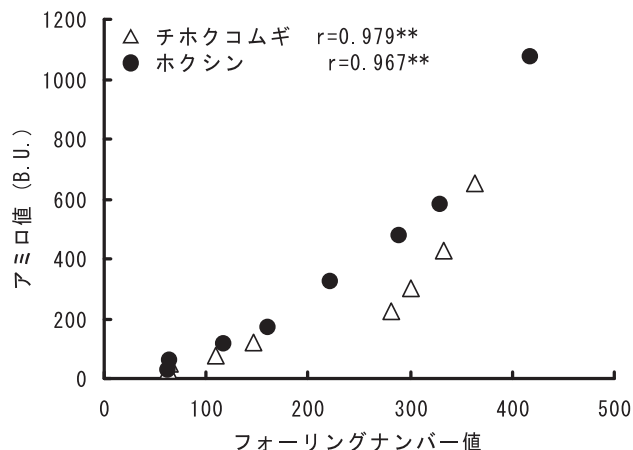


図23 フォーリングナンバー値とアミロ粘度 (B.U.) の関係

**は1%水準で有意であることを示す。

定および、アミロ値の低い、低アミロ小麦の判定において有効であることが報告されている(尾関・山内 1988、中津ら 1989)。本実験で得られたそれぞれの回帰式よりフォーリングナンバー値が300となるアミロ値を求めると、およそチホクコムギ330 B.U.、ホクシン470 B.U.となった。このことから、両品種ともにフォーリングナンバー値300以上であれば、低アミロ小麦の混入は防げることが明らかになった。

次に、ドライケミストリー法の現場試料への適用性を道内6ヶ所で成熟期に収穫されたホクシン50点を対象にして全粒粉のドライケミストリー法による α -アミラーゼ活性とフォーリングナンバー値との相関関係をもとに検討した。

試料のフォーリングナンバー値の平均は330で最大461、最小87であり、フォーリングナンバー値が300以下となったのは50点中17点であった。また、 α -アミラーゼ活性の平均は336mU、最大959mU、最小141mUであった。現地のコムギ試料においても α -アミラーゼ活性とフォーリングナンバー値の対数値の間には負の相関関係 ($r=-0.672$, $P<0.01$; 図24) が認められ、 α -アミラーゼの上昇に比例して、フォーリングナンバー値は低下した。 α -アミラーゼ活性値とフォーリングナンバー値の関係を示す対数回帰式は $\log Y = -0.566 \log Z + 8.961$ となった (Y は α -アミラーゼ活性値、 Z はフォーリングナンバー値を示す)。この回帰式をもとに

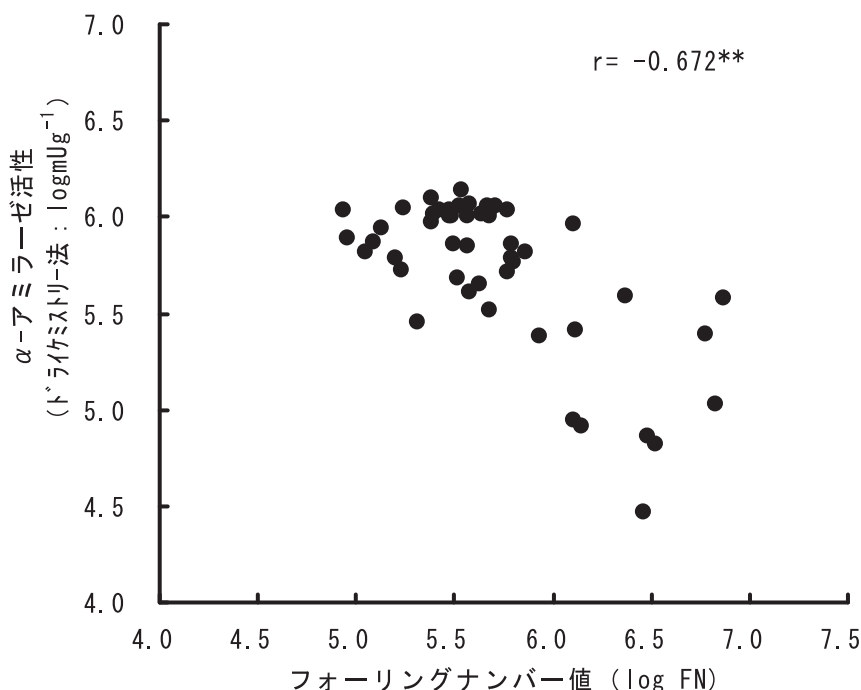


図24 現地圃場で採取したコムギ種子のフォーリングナンバー値と α -アミラーゼ活性との関係

北海道内6ヶ所(幕別、士幌、美瑛、士別、和寒、網走)の農家圃場で成熟期に各8~9点、計50点のホクシンを2反復で採取して α -アミラーゼ活性を測定した。 ** は1%水準で有意であることを示す。

したフォーリングナンバー値300に相当する α -アミラーゼ活性は、およそ310 mUであった。

以上のように実際の農家圃場より採取したコムギ試料においても α -アミラーゼ活性値とフォーリングナンバー値の間に相関関係が認められたことから、本試作スライドによるコムギ α -アミラーゼ活性測定は、検査現場での低アミロ小麦の選別にも有効であると考えられる。また、農家圃場より採取した材料を用いた試験では上述の発芽粒を混合した試験と比較して、相関係数が低い傾向にあった。平ら(1989)、中津ら(1993)は同一品種内であっても年次や栽培条件により澱粉の性質が異なり、このためにほぼ同一 α -アミラーゼ活性のコムギでも、その澱粉の差異がフォーリングナンバーの粘度に大きく影響し、 α -アミラーゼ活性とフォーリングナンバー値の間の相関を低下させると報告している。このようにフォーリングナンバー値と α -アミラーゼ活性の関係は品種だけでなく、栽培条件によっても影響を受けることから、 α -アミラーゼ活性とフォーリングナンバー値とのより

正確な関係式を作成するためには、品種および栽培条件別に両者の関係を検討する必要がある。また、本実験で使用した α -アミラーゼ測定用の試作スライドでは酵素反応はpH6.5で行われているが、コムギ α -アミラーゼの最適pHは5.5~6.0前後である。そのため、今回の測定法では活性値が最適pHでの測定に比べて低く表れる傾向がある(Tkachuk and Kruger 1974)。したがって、今後反応系pHを最適pH域に設定することにより、本法の測定感度が上昇し、アミロ値あるいはフォーリングナンバー値と α -アミラーゼ活性の相関関係がさらに高くなることが期待される。

コムギ子実中の α -アミラーゼ活性の簡易測定はこれまでもいくつか検討されているが、さらに簡便な方法への要望は強い。本研究で用いたドライケミストリー法では、粗抽出までの過程は、従前の測定方法と同様であるが、その後の測定を迅速・簡便に行うことが可能となった。サンプルを機器にセットすると、サンプル吸引・点着、インキュベーション、測定、演算

までの一連の作業が機器内で自動で進み6～7分後にはデータがプリントアウトされる。実際には、機器内で並行的に6連の反応が進むため、1時間当たり30～40試料程度の測定が可能であり、多点数の測定に対応できる。また、ドライケミストリー法ではすべての反応試薬がフィルム層内に塗布されている小型の多層式スライドを用いるため、従来の液体法のような酵素反応液などの調製が不要で廃液もでないなどの利点

もある。検査現場では前処理での濾過作業が作業上の大きな問題となるが、本試験で用いた試作スライドは展開層に濾過機能も備えており、この点も問題とならない。実際に検査現場に導入する場合には、収穫直後の子実粒を対象とする必要があり、前処理の方法などについてもさらに検討を要するが、以上のように本システムは有益性が大きいことから、今後の検査現場への導入が期待される。

VI 総合考察

日本における小麦の主産地は北海道、関東および九州地方である。しかし、日本においては収穫期の気象条件により、雨害の影響による穂発芽の発生がしばしば認められており、その後の加工適性上の問題から実需者側からその品質改善が強く求められている。また、穂発芽は我が国だけの問題ではなく、収穫期に降雨の機会が多い地域はもちろんのこと、赤粒種に比べて休眠性の劣る白粒種を栽培しているところでは危険性が高い。また、輸出国であるアメリカ、カナダ及びオーストラリアにおいては品質問題として重要視されている。

従来から、穂発芽被害の回避には熟期の異なる品種を用いた被害分散、特に早生化による被害回避と穂発芽耐性の強化が有効であることが示されている。このうち、熟期については、以前は早生品種は降雨を回避し、熟期が遅い品種よりも多少穂発芽耐性が弱くても良いと考えられてきた。しかし、わが国では作付け面積の増加とともに収穫期間が長くなり、収穫遅延により穂発芽被害の危険性が増している。また、実需者や消費者からは単一品種への要望が高く、複数品種のブレンドは主流にはなっていない。加えて、近年の不安定な気象条件の影響もあり、熟期に関わらず、穂発芽耐性そのものの強化が必要である（柳沢 2001）。

本研究は小麦生産における高品質化に役立つ知見を得る目的で、実需者から指摘を受けてい

る加工適性の劣化に関連の深い穂発芽耐性について、その発生要因、および穂発芽により二次加工適性であるパン適性が劣化するメカニズムを解析するとともに、穂発芽で問題となる低アミロ化の簡易迅速測定方法についての検討を行った。

1 登熟に伴う種子休眠性と胚のABA感受性の推移

まず、穂発芽の発生要因に関しては、主要な生産地である北海道において問題となる種子休眠性と温度の関係（野田ら 1999、Amano *et al.* 1999）を中心に検討した。成熟したコムギ種子の休眠性は吸水温度に依存しており、20℃以上で休眠性を示す品種・系統であっても12℃以下の休眠性の品種間差は大きい（George 1967、Mares 1984、Oda and Seko 1993、Bewley and Black 1994）。本研究の結果からも全ての穂発芽耐性強品種は20℃において休眠性を保つのに対して、12℃での休眠性には品種間差が認められた。また、種子のABA感受性についても休眠性と同様の傾向を示し、12℃では品種間差が認められた。なお、本実験では種子のABA感受性について解析したため、ここで得られた結果は、種子休眠性と種子胚のABA感受性を合わせて評価したことになる。種子胚のABA感受性は休眠程度の減少と平行して現れることが

ら、種子の休眠性の変化を上手く説明することができ、休眠機構と関連が深いものと考えられている(Walker-Simmons 1987、Hagemann *et al.* 1988、Noda *et al.* 1992、Kawakami *et al.* 1997)。これまでに、ABAによる胚の発芽抑制効果は高温では強く、逆に低温では弱く表れ、休眠性と同様に吸水温度に依存した性質であることが報告されている(Walker-Simmons 1988)。一方、Noda *et al.* (1990)は低温吸水処理による休眠性とABA感受性の減少には違いが認められることから、胚のABA感受性で休眠機構の全てを説明することはできず、ABA感受性は休眠機構の一部をなすものであると考察している。ABA感受性の実体としては、ホルモン受容体などが考えられているがまだ不明な部分も多く(野田・天野 1996)、今後の解明が必要である。

2 低温発芽性の遺伝変異

本実験の結果で見られたように、低温においては穂発芽耐性強品種の休眠性やABA感受性に品種間差が認められることは、穂発芽耐性はある部分においては、遺伝的に低温での穂発芽耐性の強弱とは異なる性質であることを示唆するものである。本実験で用いた材料のうち、12での休眠性やABA感受性の低かったSatantaおよび農林61号は穂発芽耐性強品種育成のための育種母材としても用いられてきた主要品種である。北海道における収穫時期の気象条件を考えると、穂発芽を防ぐためには低温条件下での休眠性とABA感受性の維持が重要となることから、これら育種母材の耐性レベルでは十分でないといえる。今後も、遺伝資源の探索とともに低温で休眠性が低下する機構についてさらに研究を進める必要がある。

実際に北海道ではこの点を考慮して、多段階温度(20 ~ 10)による穂発芽検定が行われている(Kuwabara *et al.* 1996、桑原・柳沢 2001)。また、Osanai and Amano (1993)によって、低温での種子の発芽性をもとにした系統選抜が行われており、これにより選抜された春

播きのOS系統および秋播きのOW系統は、本実験で用いた最も穂発芽耐性の強いLancerや北系1354以上に休眠性の強い能力を持つ。そのため、現在これら系統はさらに強い品種を育成するための育種素材として用いられている。コムギ種子の登熟期間に低温で高湿な気象条件の続く、北海道においては穂発芽を防ぐためには低温における穂発芽耐性が必要となることから、今後この遺伝子が導入されたコムギ母本の育成が期待されている。

3 低温発芽性と α -アミラーゼ、エンドプロテアーゼ活性の関係

穂発芽耐性と α -アミラーゼ、エンドプロテアーゼ活性との関係では、低アミロ化の主要因である α -アミラーゼ活性は、20 吸水においては種子の採取時期に依らず、穂発芽耐性の品種間差による違いが認められた。これに対して、12 の低温で吸水させた場合には、品種間差は黄熟期のみしか見られず、糊熟期および完熟期では穂発芽耐性に依らず吸水初期から著しく増加した。また、発芽率との関係では α -アミラーゼ活性が低アミロ小麦の基準となる300 B.U.以下となるのは発芽率0%のみであった。この結果は収穫時期に低温状態で降雨の起こりやすい北海道において特に問題となってくる。この地域ではSatantaのような穂発芽耐性強品種であっても α -アミラーゼ活性の増加により、低アミロ化する可能性が高い。このため、この地域においては低温条件下での穂発芽耐性が強く望まれる。上述のOS、OW系統は低温吸水下で発芽率が他の品種に比べて極めて低い。したがって、低温吸水下での子実中の α -アミラーゼ活性についても他の品種に比べて低く維持される可能性が考えられることから、この点についても今後、品種特性を含めてさらに解析を進める必要がある。

4 穂発芽による製パン性の劣化機構

Ⅲの結果からコムギ子実中の胚乳蛋白質分解

の主要因であるエンドプロテアーゼ活性は α -アミラーゼ活性と異なり、高温のみでなく低温吸水においても活性の増加は少ないことがわかった。また、発芽率との関係では発芽率90%までほとんど変化はなく、活性の増加はこれ以降であった。本実験の結果はコムギ胚乳中の貯蔵蛋白質は澱粉分解に比べて、穂発芽のより進んだ段階で引き起こされることを示唆するものである。製パン適性には小麦粉中の澱粉品質以上にグルテンの性質が大きく影響し、アミロ値が300 B.U.から100 B.U.の範囲であれば製パン適性の劣化はほとんど無い(Yamauchi *et al.*, 1998、佐藤ら 1999)。このため、硬質でパン用の道産小麦を安定的に生産するためには、アミロ値に変わるより正確な製パン適性の品質評価基準が求められている。製パン性の劣化機構について生地レベル、酵素レベルでの解析の結果から、発芽における製パン適性の劣化は生地レベルにおいては、生地破断力とミキシングピークまでの時間として表現できる生地の弱화가もととなって引き起こされることが示唆された。また、 α -アミラーゼ、エンドプロテアーゼ活性との関係では、生地の物理的特性と α -アミラーゼ活性との相関関係は小さいのに対して、全粒粉中のエンドプロテアーゼ活性と生地物性の間には負の相関関係が認められた。したがって、発芽時に起こる製パン適性の劣化はエンドプロテアーゼ活性の増加によって起こるコムギ子実中の蛋白質であるグルテンの分解が主要因となり、このために生地破断力、ミキシングピークまでの時間および生地のガス保持力の低下で表される生地の軟化が引き起こされ、これによって比容積の低下で表される製パン適性の劣化が起こることが示唆された。このため、製パン適性に優れた育種母材を選抜する上では、これまで行われてきた種子休眠性や α -アミラーゼ活性とともにエンドプロテアーゼ活性についても同様に評価することが重要であると考えられた。

しかし、この関連で本実験で解明できなかった課題がいくつか残った。その一つは製パン性に直接関与するエンドプロテアーゼの特定にま

では至らなかったことである。Jones and Wrobel (1993) は、オオムギを材料として等電点電気泳動を行った結果から、種子の発芽時に増加するエンドプロテアーゼはpH域によって異なっており、低pH域(pH3.8)ではシステインプロテアーゼが、また、中性pH域(pH6.5)では非システインプロテアーゼの活性が強くなることを報告している。しかし、エンドプロテアーゼの子実内部における作用システムは、安定性や基質特異性などの面から、澱粉分解酵素と比較してその特定は困難な部分が多い。今後、さらに精度の高い製パン適性に関する品質基準を策定するためには、子実中のグルテンの分解に関与するエンドプロテアーゼを特定するとともに、蛋白質を単離・精製し、その機能を解明することが重要である。単離・精製された蛋白質をもとに特異性の高い抗体を作成する事ができれば、遺伝子レベルでの研究も可能となり、その発現様式の解明する上での手がかりとなることが期待できる。

5 低アミロ小麦の簡易迅速検定法

小麦は2000年度より、民間流通の時代を迎え、品質基準に基づいた取引が行われている。製パン用小麦の品質基準としては容積重、水分とともに澱粉粘度が挙げられている。健全な小麦に発芽粒や低アミロ小麦が混じると全体の澱粉粘度の低下が大きいと、受け入れ段階で健全粒と低アミロ小麦を仕分けてから流通させることが重要な課題となる。このためには、迅速に多点数の試料を扱うため、澱粉粘度を簡易に測定する方法の開発が必要である。

スウェーデンやオーストラリアではフォーリングナンバーを用いて澱粉粘度を推測し、これにより仕分けをした流通が行われており、北海道においても同様の試みがなされている。しかし、この方法は子実の乾燥と粉碎が必要であることから迅速な測定法とは言えない。小麦の低アミロ化は登熟中にコムギ粒内で発芽関連酵素の活性が増加することにより起こり、 α -アミラーゼの活性化による澱粉粒の分解がその主要因

である。 α -アミラーゼ活性とアミロ値およびフーリングナンバー値の間には高い相関関係が認められることから、 α -アミラーゼ活性をもとにアミロ値を推定して、小麦を仕分けようとする試みがなされている(中津ら 1989、渡辺ら 1994)。実際に北海道の農協では検査現場にオートアナライザーを用いた α -アミラーゼ活性自動測定装置の導入が進められている(中津ら 1997)。しかし、検査現場では、多数の試料を集中して取り扱うため、複雑な操作のない、より簡便で迅速なシステムの開発が強く望まれている。

本研究で用いたドライケミストリー法による α -アミラーゼ活性測定は、粗抽出までの過程は、

従前の測定方法と同様であるが、その後の測定を迅速・簡便に行うことが可能となり、多点数の測定が可能となった。この他にもドライケミストリー法の利点としては濾過機能、酵素反応液の調製が不要などがあげられる。実際に検査現場に導入する場合には、収穫直後の子実粒を対象とする必要があり、前処理の方法などについてもさらに検討を要するが、以上のように本システムは有益性が大きい。したがって、今後、本システムの検査現場への導入が進めば、 α -アミラーゼ活性をもとにした小麦の仕分けにより、高品質小麦の流通が可能となることが期待される。

謝 辞

本研究をとりまとめるに当たり、帯広畜産大学 三浦秀穂教授には終始暖かい激励ときめ細やかな指導を賜るとともに、ご校閲をいただいた。

本研究は、北海道農業研究センターおよび作物研究所でおこなったコムギの穂発芽に関する研究結果を取りまとめたものである。研究を進めるにあたっては旧北海道農業試験場畑作物研究部品質評価研究室長 故漆崎末夫博士をはじめ、箱山 晋博士(現鹿児島大学農学部教授)、

中野 寛博士、山内宏昭博士には熱心なご指導とご助言をいただいた。また、麦育種研究室の桑原達夫室長、入来規雄博士、高田兼則博士にご助言とご指導をいただいた。

富士フィルムメディカル株式会社 升田 喜士博士には、ドライケミストリーによる α -アミラーゼ活性の測定において有益なご助言とご指導をいただいた。

以上の各位に対してここに記して感謝の意を表する。

引用文献

- Amano, Y., T. Fukase and K. Noda (1999) Pre-harvest sprouting of wheats in Japan. In: Weipert D (ed), Pre-harvest sprouting in cereals (1998) Assoc. Cereal Res, Detmold, Germany, pp1-8.
- Axford, D. W. E., E. E. McDermott and D. G. Redman (1979) Note on the sodium dodecyl sulfate test of bread making quality: com-

- parison with Pelshenke and Zeleny tests. Cereal Chem. 56:582-584.
- Belderok, B. (1968) Seed dormancy problems in cereals. Field Crop Abstracts 21:203-211.
- Bewley, J. D. and M. Black (1994) Dormancy and the control of germination. In: Seeds : Physiology of Development and Germination. Plenum Press, New York.

- Bushuk, W. and O. M. Lukow (1987) Effects of sprouting on wheat proteins and baking properties. In: Mares, D. J. (ed), Proceeding of Fourth International Symposium on Pre-harvest Sprouting in Cereals, Westview Press, Boulder, CO, USA, pp 188-196.
- D'Appolonia, B. L., L. A. MacArthur, W. Pisesookbunterng and C. F. Ciacco (1982) Comparison of the grain amylase analyzer with the Amylograph and falling number methods. *Cereal Chem.* 59:254-257.
- Finney, P. L. (1985) Effect of wheat variety on the relationship between falling numbers and alpha-amylase activity. *Cereal Chem.* 62:258-262.
- 藤田雅也 (2001) 穂発芽耐性研究及び育種の展開方向. 冬作物研究 1: 16-23.
- Fukunaga, K., T. Hoshino, U. Matukura, H. Taira and S. Oda (1987) Differences in pre-harvest sprouting and alpha-amylase activity among wheat cultivars. In: Mares, D. J. (ed) Proceedings of the Fourth International Symposium on Pre-harvest Sprouting in Cereals. Westview Press, Boulder, CO, USA, pp116 - 122.
- Gale, M. D. (1990) The genetics of pre-harvest sprouting in cereals, particularly in wheat. In: Derera, N. F. (ed), Pre-harvest field sprouting in cereals, CRC Press Inc., FL, USA, pp 85-110.
- George, D. W. (1967) High temperature seed dormancy in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Sci.* 7:249-253.
- Hagemann, M. G., P. Chevalier, M. K. Walker-Simmons, and A. J. Ciha (1988) Field studies on abscisic acid and embryonic germinability in winter wheat. *Field Crops Res.* 18:271-278.
- 平野寿助 (1971) 小麦登熟期の遭雨による品質低下とその機作. 中国農試報告 A20: 27-70.
- 堀金 彰・升田喜士・勝美明美・吉田 久・和田道宏・福住直樹 (1997) フィールドアナライザーを用いた小麦の穂発芽誘導過程の簡易分析. 育雑 47 (別 2): 223.
- 一ノ瀬靖則 (1994) 北海道における平成 5 年冷湿害の解析 - 畑作編, 小麦の被害実態及び対策, 北海道農業試験場研究資料 52: 7-10.
- 池田正昭 (1984) 十勝地方における昭和58年の畑作物冷害, 秋播コムギ, 北海道農業試験場研究資料26: 67-69.
- Janssen, A. M., T. van Vliet and M. Vereijken (1996a) Rheological behavior of wheat gluteins at small and large deformations. Comparison of two gluteins differing in bread making potential. *J. Cereal Sci.* 23:19-31.
- Janssen, A. M., T. van Vliet and M. Vereijken (1996b) Fundamental and empirical rheological behavior of wheat flour doughs and comparison with bread making performance. *J. Cereal Sci.* 23:43-54.
- Jones, B. L. and R. Wrobel (1993) The endoproteinases of germinating barley. In: Walker-Simmons, M. K., and J. L. Ried (eds), Pre-harvest sprouting in cereals 1992. AACC, MN, USA, pp 262-269.
- 亀井幸子 (1987) ドライケミストリーとその展望. 化学と生物 25: 379-387.
- 加藤雄久・岡崎紘一郎・石田茂樹 (1983) 十勝における秋播コムギの収穫遅延に伴う被害. 北海道農業試験場研究資料 22: 55-59.
- Kawakami, N., Y. Miyake and K. Noda (1997) ABA insensitivity and low ABA levels during seed development of non-dormant wheat mutants. *J. Exp. Bot.* 48:1415-1421.
- Kruger, J. E. (1971) Effect of proteolytic enzymes on gluten as measured by a stretching test. *Cereal Chem.* 48:121-132.
- Kruger, J. E. and K. R. Preston (1977) The distribution of carboxypeptidases in Anatomical tissues of developing and germinating wheat kernels. *Cereal Chem.* 54:167-174.
- Kruger, J. E., D. W. Hatcher and J. E. Dexter (1996) Influence of sprout damage on oriental noodle quality. In: Noda, K. and D. J.

- Mares (eds), Pre-harvest sprouting in cereals, 1995. CASJO, Osaka. Japan, pp 9-18.
- Krusen-Jarres, J. D. and C. Kaiser (1989) Evaluation of a new α -amylase assay using 4.6. etylidene-(G7)-1-4-nitrophenyl-(G1)- α -D-maltoheptaoside as substrate. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 27:103-113.
- 桑原達雄・前田浩敬 (1979) コムギの穂発芽に関する研究 1 . 登熟中の温度条件と休眠形成の関係 . 育雑29 (別 1) : 26-27 .
- 桑原達雄・柳沢 朗 (2001) 21世紀における北海道地域の作物育種戦略 - 小麦 - . 農業低温科学情報 7 : 3-8 .
- Kuwabara, T., N. Iriki and K. Takata (1996) Varietal differences in pre-harvest sprouting tolerance of winter wheat in Hokkaido. In: Noda, K. and D. J. Mares (eds), Pre-harvest sprouting in cereals, 1995. CASJO, Osaka. Japan, pp 197-203.
- Lukow, O. M. and W. Bushuk (1984) Influence of germination on wheat quality. I. Functional (breadmaking) and biochemical properties. Cereal Chem. 61:336-339.
- MacGregor, A. W. and R. R. Matsuo (1972) Starch degradation in endosperm of barley and wheat kernels during initial stages of germination. Cereal Chem. 59:210-216.
- MacGregor, A. W. and L. Dushnicky (1989) Starch degradation in endosperms of developing barley kernels. J. Inst. Brew. 95:321-325.
- Maeda, I., S. Kiribuchi and M. Nakamura (1978) Digestion of barley starch granules by the combined action of alpha- and beta-amylase purified from barley and barley malt. Agric. Biol. Chem. 42:259-267.
- Marchelo, B. A., L. J. LaCroix and J. E. Kruger (1980) α -Amylase isozymes in Canadian wheat cultivars during kernel growth and maturation. Can. J. Plant Sci. 60:433-443.
- Mares, D. J. (1983) Preservation of dormancy in freshly harvested wheat grain. Aust. J. Agric. Res. 34:33-38.
- Mares, D. J. (1984) Temperature dependence of germinability in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain in relation to pre-harvest sprouting. Aust. J. Agric. Res. 35:115-128.
- Mares, D. J. and M. D. Gale (1990) Control of alpha-amylase synthesis in wheat grains. In: Ringlund, K., E. Mosleth and D. J. Mares (eds), Proceedings of the Fifth International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals. Westview Press, Boulder, CO, USA, pp 379-392.
- 松倉 潮・加藤一郎・平 春枝・今井 徹 (1984) 国産小麦の品質 (第1報) 小麦及び小麦粉の品質特性とそれら特性間の相互関係 . 食総研報 44 : 97-100 .
- 松崎守夫・豊田政一 (1996) コムギ登熟期の気象条件と粉のアミログラム最高粘度 . 日作紀 65 : 569-574 .
- McCaig, T. N. and R. M. DePauw (1992) Breeding for preharvest sprouting tolerance in white seed-coat spring wheat. Crop Sci. 32:19-23.
- Meredith, P. and Y. Pomeranz (1985) Sprouted grain. In: Pomeranz, Y. (ed), Advances in cereal science and technology, vol.7, AACC, StPaul, MN, USA, pp 239-320.
- 長尾精一 (1995) 小麦の科学 . 朝倉書店 , 東京 , pp80-81 .
- 中津智史・市川信雄・平 春枝・斎藤昌義・相馬 暁 (1989) 低アミロ小麦の二・三の検定法の比較 . 北農 56 : 17-33 .
- 中津智史・市川信雄・大村邦男 (1993) α -アミラーゼ活性を指標にした低アミロ小麦の検定法 . 北農 60 : 397-403 .
- 中津智史・埜村朋之・今井 徹 (1997) オートアナライザーによる低アミロ小麦の簡易迅速検定法 . 日作紀 66 : 35-41 .
- Nakatsu, S., H. Miyamoto and Y. Amano (1996) Variation for α -amylase activity and dormancy in Hokkaido wheat varieties. In: Noda, K. and D. J. Mares (eds), Pre-harvest

- sprouting in cereals 1995, CASJO, Osaka, Japan, pp 411-418.
- Nilsson-Ehle, H. (1914) Zur Kenntnis der Keimungsphysiologie des Weizens in Zusammenhang stehenden inneren Faktoren. Z. Pflanzenzucht 2:153-157.
- 日本麦類研究会 (2007) 麦の品種別作付け面積 (平成18年産). pp 8.
- 西川浩三 (1988) コムギの登熟および発芽過程における種子の α -アミラーゼ活性の変異. 育種学最近の進歩 29: 83-92.
- Noda, K., C. Kawabata and N. Kawakami (1993) Wheat grain imbibition at low temperatures and embryo responsiveness to ABA. In: Walker-Simmons, M. K. and J. L. Ried (eds), Pre-harvest sprouting in cereals 1992. AACC, St. Paul, MN, USA, pp 373-379.
- Noda, K., C. Kawabata and K. Kanzaki (1994) Re-classification of developmental stage of wheat grain. Breed. Sci. 44:115-120.
- 野田和彦・天野洋一 (1996) 穀物種子の休眠と穂発芽. 植物の化学調節 31: 171-187.
- 野田和彦・天野洋一・鈴木孝子 (1999) コムギの穂発芽と天候. 育種学研究 1: 15-19.
- 農林水産技術会議事務局 (1968) 小麦品質検定方法 - 小麦育種試験地における -. 研究成果 35, 19-21, 44-46.
- 農林水産省 (2000) 麦をめぐる事情. I 国内産麦の流通をめぐる事情. pp 8-24.
- 農林統計協会 (2005) 平成16年産作物統計 (普通作物・飼料作物・工芸作物). pp 7.
- Oda, S. and H. Seko (1993) Evaluation of pre-harvest sprouting resistance in wheat using germination tests conducted at two temperatures. In: Walker-Simmons, M. K. and J. L. Ried (eds), Pre-harvest sprouting in cereals 1992. AACC, St. Paul, MN, USA, pp 69-75.
- 長内俊一 (1985) 道産小麦の安定生産条件. 3. 低アミロ問題と穂発芽抵抗性. 北農 52(4): 1-19.
- Osanai, S. and Y. Amano (1993) Selection of tolerant lines to low temperature germinability in wheat. In: Walker-Simmons, M. K. and J. L. Ried (eds), Pre-harvest sprouting in cereals 1992. AACC, St. Paul, MN, USA, pp 76-82.
- Osanai, S. and Y. Amano (1996) Selection for tolerance to low temperature germinability in winter wheat. In: Noda, K. and D. J. Mares (eds), Pre-harvest sprouting in cereals 1995. CASJO, Osaka, Japan, pp 239-247.
- Osanai, S. and Y. Amano (1999) Response of winter wheat showing reduced germinability in low temperatures and rain during grain development and ripening. In: Weipert, D. (ed), Pre-harvest sprouting in cereals 1998. Assoc Cereal Res, Detmold, Germany, pp 57-66.
- 尾関幸男・山内富士雄 (1988) フォーリングナンバーによる小麦の品質評価法について. 北農 55: 16-23.
- Perata, P., J. Pozueta-Romero, T. Akazawa and J. Yamaguchi (1992) Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. Planta 188:611-618.
- Preston, K. R. and J. E. Kruger (1979) Physiological control of exo- and endoproteolytic activities in germinating wheat and their relationship to storage protein hydrolysis. Plant Physiol. 64:450-454.
- Preston, K. R., J. E. Dexter and J. E. Kruger (1978) Relationship of exoproteolytic and endoproteolytic activity to storage protein hydrolysis in germinating durum and hard red spring wheat. Cereal Chem. 55:877-888.
- Salomonsson, L., K. Heneen, M. L-Raznikiewicz, M. Carlsson and R. Karlsson (1989) In vitro degradation of starch granules by α -amylase isomers from mature triticale. Starch 41:340-343.
- 佐藤暁子・小幡美環子・中村信吾・渡辺満 (1999) コムギ系統東北205号の製パン適性に及ぼす収獲時期の影響. 日作紀 68: 306-309.

- Sawada, S., H. Ishizuka, H. Kawano and H. Miura (1996) High α -amylase activity detected in dormant seeds of wheat. In: Noda, K. and D. J. Mares (eds), Pre-harvest sprouting in cereals, 1995. CASJO, Osaka, Japan, pp 463-467.
- 食糧庁管理部検査課 (1988) 小麦のアミロをめぐり諸問題 . pp 1-288 .
- Skeritt, J. H. and R. H. Heywood (2000) A five-minute field test for on-farm detection of pre-harvest sprouting in wheat. *Crop Sci.* 40:742-756.
- Stoy, V. and K. Sundin (1976) Effect of growth regulating substances in cereal seed germination. *Cereal Res. Commun.* 4:157-163.
- 末広雅也 (1983) Drychemistry の現状 . *Medical Technology* 11:496-505 .
- Sun, Z. and C. A. Henson (1991) A quantitative assessment of the importance of barley seed α -amylase, β -amylase, debranching enzyme, and α -glucosidase in starch degradation. *Arch. Biochem. Biophysics.* 284:298-305.
- 平 春枝・田中弘美・斎藤昌義 (1989) 国産小麦の品質 . 第3報 小麦粉および澱粉性質と品種・生産地・等級との関係 . *日作紀* 58:24-34 .
- Takata, K., H. Yamauchi, N. Iriki and T. Kuwabara (1999) Prediction of bread-making quality based by prolonged swelling SDS-sedimentation test. *Breeding Sci.* 49:221-223.
- Tkachuk, R. and J. E. Kruger (1974) Wheat α -amylase. 2. Physical characterization. *Cereal Chem.* 51:508-529.
- 土屋俊雄 (1982) 耐穂発芽性育種 , 北海道における水稲・小麦の良質品種早期開発 . 北海道立農業試験場資料 15:138-145 .
- Upadhyay M. P. and G. M. Paulsen (1988) Characterization of preharvest sprouting resistance in Clark's Cream white winter wheat. *Euphytica* 38:85-92.
- Wahl, T. I. and A. D. O'Rourke (1993) The economics of sprout damage in wheat. In: Walker-Simmons, M. K. and J. L. Ried (eds), Pre-harvest sprouting in cereals 1992. AACC, St. Paul, MN, USA, pp 8-17.
- Walker-Simmons, M. K. (1987) ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol.* 81:61-66.
- Walker-Simmons, M. K. (1988) Enhancement of ABA responsiveness in wheat embryos by high temperature. *Plant Cell Environ.* 11:769-775.
- 渡辺 満・松倉 潮・今井 徹 (1994) オリゴ糖誘導体を基質とした α -アミラーゼ活性測定による低アミロ小麦の迅速推定法 . *日食工誌* 41:927-932 .
- Weegels, P. L., R. J. Hamer and J. D. Schofield (1996) Critical review of the functional properties of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 23:1-18.
- Yamauchi, H., Y. Ichinose, K. Takata, N. Iriki and T. Kuwabara (1998) The degradation mechanism of bread making quality in sprouted damage wheat. *Cereal Food World* 43:521.
- 山内宏昭・一ノ瀬靖則・高田兼則・入来規雄・桑原達雄 (2000) 改良真空生地膨張量測定法による小麦粉の製パン性簡易評価 . *日食工誌* 47:46-49 .
- 柳沢 朗 (2001) 穂発芽耐性育種の現状と問題点 . *冬作物研究* 1:7-15 .
- 安永 隆・丸山順子・上村光男・福永公平 (1963) 登熟中の降雨が小麦の加工適性に及ぼす影響、(その1) 降雨による粒内酵素活性及び二、三の成分変化 . *日作紀* 32:152-156 .