

学位論文題名

小麦粉の生地物性を強める低分子量グルテニンタンパク質の 同定とその育種的利用に関する研究

学位論文内容の要旨

生地物性が強い強力粉および準強力粉を利用した加工食品の国内における需要は高いが、国内生産量は需要の1%にも満たない。小麦粉の生地物性に最も影響するグルテニンタンパク質のうち、高分子量グルテニンサブユニット（HMW-GS）については研究が進んでいるが、低分子量グルテニンサブユニット（LMW-GS）と生地物性との関連については十分解明されていない。本研究の目的は、生地物性を強める LMW-GS を同定し、育種を効率化するためにこれを検出する DNA マーカーを開発することである。

生地物性を強める LMW-GS の同定

カナダ産超強力春まきコムギ品種「Glenlea」、国産強力コムギ品種「春のあけぼの」、ならびに「Glenlea」の LMW-GS GL1 と GL2 を「春のあけぼの」に導入した「NIL」の生地物性を評価した。その結果、GL1 と GL2 が「NIL」や「Glenlea」の非常に強い生地物性に寄与していることが示唆された。「春のあけぼの」×「Glenlea」の BC₃F₂ 個体のグルテニンの解析から、①GL1 と GL2 は共分離すること、②GL1/GL2 と「春のあけぼの」の HA1 のコード遺伝子是对立関係にあることがわかった。「Chinese Spring」×「Glenlea」の F₂ 及び「Chinese Spring」の ditelocentric 系統の解析から、GL1/GL2 と HA1 は *Glu-B3* に支配されると考えられた。

超強力粉並みの生地物性の強さを持つ米国産秋まきコムギ系統「KS831957」の LMW-GS KS2、KS3 は、SDS-PAGE において「Glenlea」の GL1、GL2 と同じ易動度を持っていた。KS3 は 2D-PAGE で4つの LMWG スポットに分離されたが、そのうち塩基性側の2つのスポットだけ（KS3a と命名）が独立に遺伝した。「KS831957」×国産中力コムギ品種「ホロシリコムギ」に由来する育成系統である「勝系 32 号」と「勝系 34 号」の交配に由来する RIL のグルテニンの 2D-PAGE の結果から、①KS2 と KS3a が共分離すること、②KS2/KS3a と「ホロシリコムギ」の HS1 のコード遺伝子是对立関係にあることが確認された。GL1、GL2、HA1 は KS2、KS3a、HS1 とそれぞれ SDS-PAGE および 2D-PAGE における分離パターンが酷似しており、さらに決定できたこれらの LMWG スポットの N 末端アミノ酸配列はすべて「SHIPGLERPSQQQLPP」に含まれたことから、これらはそれぞれ類似した機能をもつ分子種と考えられた。「勝系 32 号」（HS1 及び生地物性を非常に強めることで知られる HMW-GS 5+10 を持つ）×「勝系 34 号」（KS2/KS3a 及び 5+10 と対立関係にあり生地物性を強める効果がない HMW-GS

2+12 を持つ) の RIL の生地物性を評価した結果、2+12 と 5+10 のいずれを共通に持つ場合も、HS1 を持つ RIL より KS2/KS3a を持つ RIL の生地物性が強かった。また、KS2/KS3a と 5+10 のコード遺伝子は交互作用して生地物性を強めた。このことから、KS2/KS3a (GL1/GL2) と HMW-GS 5+10 の両方を併せ持つコムギ系統が超強力粉の特段に強い生地物性を持ち得ると考えた。

生地物性を強める LMW-GS の候補遺伝子の同定

プライマー-S-type2F/S-type978R を用いて「春のあけぼの」、「Glenlea」、「NIL」に対して RT-PCR を行った結果、LMW-GS 遺伝子が増幅された。「Glenlea」、「NIL」の LMW-GS 遺伝子 (*GLEN42K*) は「春のあけぼの」の LMW-GS 遺伝子 (*HARU48K*) より短い反復配列を持っており、既知の LMW-GS 遺伝子には見られない 15 のグルタミン (Q) からなるモチーフを持つことから、新規の LMW-GS 遺伝子であると考えられた。*HARU48K*、*GLEN42K* の推定アミノ酸配列は HA1、GL1、GL2 の N 末端アミノ酸配列を含んでいた。これらは ORF を完全に含む G3 グループの LMW-s 遺伝子としては最初の報告となる。

LMW-GS と遺伝子の対応付けを行うために、「春のあけぼの」×「Glenlea」の BC₅F₂ 個体に対して、*HARU48K*、*GLEN42K* の内部配列を増幅するようなプライマー-s-F1/s-R2 を用いてゲノミック PCR を行った結果、*HARU48K* の内部配列は HA1 と共分離し、*GLEN42K* の内部配列は GL1/GL2 と共分離した。このことから、*GLEN42K* は GL1/GL2 の、*HARU48K* は HA1 の候補遺伝子と考えられた。「KS831957」、「ホロシリコムギ」、「勝系 34 号」に対してプライマー-S-type2F/S-type978R を用いて RT-PCR を行った結果、「ホロシリコムギ」で得られた LMW-GS 遺伝子 (*HORO1*) は *HARU48K* と塩基配列が 100%一致した。「KS831957」、「勝系 34 号」で得られた LMW-GS 遺伝子 (*KANS2*) は *GLEN42K* と 1 塩基のみが異なっていた。プライマー-s-F1/s-R2 を用いて「勝系 32 号」×「勝系 34 号」の RIL のゲノミック PCR を行った結果、*HORO1* の内部配列は HS1 と、*KANS2* の内部配列は KS2/KS3a とそれぞれ共分離した。したがって、*KANS2* は KS2/KS3a の、*HORO1* は HS1 の候補遺伝子と考えられた。

GL1/GL2 と KS2/KS3a、HA1 と HS1 は、それぞれの候補遺伝子の塩基配列がほぼ同一であったことから、いずれも *Glu-B3* に支配される機能の類似した LMW-GS であると推察された。GL1/GL2 と KS2/KS3a が HA1 や HS1 より生地物性を強める効果が高い原因は、これらが他の分子と結合してポリマーを高分子量化させるのに適した構造を持ち、さらに適正の範囲で種子に蓄積していることではないかと推察した。

生地物性を強める LMW-GS 遺伝子を検出する DNA マーカーの開発と育種的利用

プライマー-s-F1/s-R2 を用いて増幅される DNA 断片を KS2/KS3a (GL1/GL2) のコード遺伝子を検出する DNA マーカーとして利用できるか否かを検証するため、模擬的選抜試験を行って、5+10 や KS2/KS3a (GL1/GL2) のコード遺伝子を検出するマーカーが増幅した系統のグルテニンタンパク質を調査したところ、マーカーとタンパク質組成が一致した。さらに、5+10 マーカーのみが検出された系統より、5+10 マーカーと GL1/GL2 (KS2/KS3a) マーカーの両者が検出された系統の生地物性が強くなったことから、マーカーによる選抜で超強力コムギ系統を効率的に育成できる可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 上 哲 夫

副 査 教 授 喜 多 村 啓 介

副 査 教 授 大 澤 勝 次

学 位 論 文 題 名

小麦粉の生地物性を強める低分子量グルテニンタンパク質の 同定とその育種的利用に関する研究

本論文は82頁からなる和文論文であり、図25と表9を含む。別に参考論文18編が添えられている。

生地物性の強い強力粉や準強力粉を利用した加工食品の需要は多いが、国内生産量は需要の1%にも満たない。小麦粉の生地物性に最も影響を及ぼすグルテニンタンパク質のうち、高分子量グルテニンサブユニット(HMW-GS)に関しては研究が進んでいるが、低分子量グルテニンサブユニット(LMW-GS)と生地物性との関連については十分解明されていない。本研究の目的は、生地物性を強めるLMW-GSを同定するとともに、育種の効率化を図るためにこれを検出できる分子マーカーを開発することである。得られた結果は以下のように要約される。

1. 生地物性を強める LMW-GS の同定

カナダ産超強力春まきコムギ品種「Glenlea」のグルテニンは2つの主要なLMW-GS(GL1とGL2)を含む。遺伝解析を通じてGL1とGL2は共分離し、強い生地物性に関与することがわかった。また、GL1/GL2はBゲノムに含まれる*Glu-B3*遺伝子座に支配されると考えられた。

次いで、超強力粉なみの生地物性を示す米国産秋まきコムギ系統「KS831957」の生地物性には、LMW-GS KS1-KS5が関与していることを明らかにした。

生地物性を強めるKS2とKS3a(二次元電気泳動で分離する塩基性側のKS3スポット

ト) はそれぞれ GL1、GL2 と N 末端アミノ酸配列が一致し、電気泳動像も酷似するので機能の似たほぼ同一の分子種と考えられる。さらに、KS2/KS3a と HMW-GS 5+10 のコード遺伝子は交互作用を現わし、生地物性を強めることが判明した。したがって、KS2/KS3a (GL1/GL2) と HMW-GS 5+10 の両方を併せ持つコムギが超強力コムギになり得ると考えた。

2. 生地物性を強める LMW-GS の候補遺伝子の同定

GL1/GL2 の候補遺伝子 (*GLEN42K* と命名) および KS2/KS3a の候補遺伝子 (*KANS2*) を同定した。これらはいずれも新規の LMW-GS 遺伝子であり、既知の LMW-GS 遺伝子には見られない 15 個のグルタミン残基の連なるモチーフを持つ。GL1/GL2 や KS2/KS3a と同じ N 末端アミノ酸配列を有する既報の LMW-GS 遺伝子については、完全長の ORF が公表されていない。したがって、*GLEN42K*、*KANS2* は ORF を完全に含む LMW-GS 遺伝子として最初の報告例となる。

3. DNA マーカーの開発

GLEN42K の内部配列を増幅するプライマーを設計した。これを用いて増幅した DNA 断片は、KS2/KS3a (GL1/GL2) のコード遺伝子を検出する DNA マーカーとして利用できることを立証した。またこのマーカーを用いた選抜を通じて、超強力コムギ系統を効率的に育成できる可能性が示された。

本研究は、小麦粉の生地物性とグルテニンタンパク質組成との関連性を詳細に解析したものである。得られた知見は強力コムギの育種に寄与するところが大きく、学術および応用の両面で高く評価できる。

よって審査員一同は、船附稚子が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。