

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450007

研究課題名(和文)小麦粉品質の多様性拡大に向けた野生種染色体の微細領域導入による新規育種素材の開発

研究課題名(英文) Development of novel breeding materials by introducing microscopic chromosome regions from the wheat wild species for expanding diversity of wheat flour quality

研究代表者

田中 裕之(TANAKA, HIROYUKI)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：70283976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：小麦粉の品質、特に生地強度には胚乳に蓄積される種子貯蔵タンパク質の質と量が大きく影響する。コムギ近縁野生種がもつ種子貯蔵タンパク質は、多様性に富んでいるが、これまで小麦粉として利用されることはなかった。本研究では、コムギ近縁野生種由来種子貯蔵タンパク質遺伝子が座乗する染色体微細領域を日本の実用コムギ品種へ、人工交配により導入した。この系統は、新規かつ多様な小麦粉食品の加工適性に対応でき、バラエティーに富んだ小麦粉を生み出すコムギ育種素材の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Wheat flour quality, especially the dough strength is greatly influenced by the quality and the quantity of the seed storage protein accumulated in the endosperm. The seed storage protein of wheat wild species possesses a large diversity but has never been used as wheat flour. In this study, chromosome microscopic regions carrying the seed storage protein genes derived from the wheat wild species was introduced to a commercial Japanese wheat variety by artificial crossing. This line can respond to the processing suitability of new and diverse flour foods, lead to the development of wheat breeding material which produces wide varieties of wheat flour.

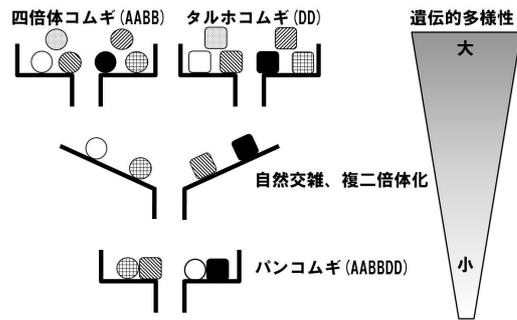
研究分野：植物遺伝学、植物育種学

キーワード：品質・成分 コムギ 野生種 種子貯蔵タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) パンコムギの進化における倍数化過程でのボトルネック効果

私たちが最も食しているパンコムギ(ゲノム構成 AABBDD)は、栽培種四倍体コムギ(AABB)と野生種タルホコムギ(DD)との自然交雑と複二倍体化から生じた異質6倍体である。この交雑は、ほんの数回、カスピ海南岸の限定された場所で起きたと考えられており、両親がもつ遺伝的多様性の一部だけパンコムギは受け継いだとされている(下図)。



(2) 野生種を使ったコムギの遺伝資源拡大は世界の趨勢

Warburton *et al.* (2006)は、国際トウモロコシ・コムギ改良センター(CIMMYT)で育成されたコムギ品種について、遺伝的多様性をSSRマーカーで調査した。その結果、遺伝的多様性は「緑の革命」当時の品種で減少したが、近年の品種では増加していた。これは、近年、各種ストレス耐性、多収性、高品質性を目指して、在来種や野生種を積極的に育種プログラムに導入したためである。

(3) 「コムギ異種染色体バンク」の開設(2003年鳥取大学)

申請者らは、2003年、文部科学省ナショナル・バイオリソース・プロジェクト・コムギ(NBRP・Wheat)のサブ機関として、「鳥取コムギ異種染色体バンク(Tottori Alien Chromosome Bank of Wheat: TACBOW)」を開設し、世界の各研究機関で断片的に保存されてきた異種染色体保有コムギ系統を収集した。このような特徴のあるバンクは、世界に唯一であり、集中的に異種植物の変異を解析することによって、有用遺伝子をもつ系統を効率的に選抜できる基盤となった。

(4) 野生種由来種子貯蔵タンパク質は従来の小麦粉品質を劇的に変化させる

TACBOWの系統は、均一な遺伝的背景の中に様々なコムギの近縁野生種に由来する異種植物の染色体が1対ずつ添加されている。従って、遺伝的ノイズが少なく、野生種に由来する個々の種子貯蔵タンパク質について、小麦粉品質への効果を調査するには優れたコレクションである。また、CIMMYTで展開されている「野生種の利用による遺伝資源拡大」とも目的が共通である。そこで、申請者らは、

TACBOWの一部の系統について、野生種に由来する種子貯蔵タンパク質の小麦粉品質への効果を調査したところ、その変異の大きさは予想以上であった。さらに、近畿中国四国農業研究センターとの共同研究により、種子を大量に増殖・製粉し、小麦粉品質を詳細に調査した。その結果、生地強度を格段に強め、パン用の小麦粉として優れた特性を示す系統があらわれた。

2. 研究の目的

TACBOWの系統は、遺伝的背景が実験系統であること、野生種から種子貯蔵タンパク質遺伝子以外の遺伝子も同時にパンコムギへ持ち込んでいることにより、実用品種と比べ農業形質は著しく劣っている。

そこで、野生種の染色体を段階的に実用品種の染色体に置き換えつつも、有用な種子貯蔵タンパク質を保有した系統を育成し、小麦粉の高品質化と新加工用途開発に向けた研究基盤を確立したいと考えるようになった。そこで研究期間内に上記の目標を達成するため、以下のことを行う。

(1) TACBOWの系統について、網羅的に少量の小麦粉で迅速に品質を評価する。これにより、既存のパンコムギには無いユニークな小麦粉品質特性をもつ系統を見いだす。

(2) (1)の選抜系統について、保有する野生種染色体に特異的な種子貯蔵タンパク質遺伝子を探索する。これによりユニークな小麦粉品質特性をもたらす原因遺伝子を突き止める。さらに、それらの遺伝子が座乗する野生種染色体を識別できるDNAマーカーを開発する。

(3) 有望な種子貯蔵タンパク質遺伝子が座乗する染色体領域は保持しつつも、野生種由来の不要な染色体領域を削除した系統を育成する。

(4) (3)の系統育成過程で、実用品種による連続戻し交配も同時に行い、遺伝的背景は農業形質に優れた実用品種となる系統を育成する。その際、(2)で見いだした遺伝子・DNAマーカーを利用して、各連続戻し交雑世代における有望遺伝子の存在と野生種由来染色体の削除程度を確認する。

(5) 以上で育成した系統について、種子を大量に増殖し、小麦粉品質の詳細な評価を行う。

3. 研究の方法

(1) TACBOWの58系統について、以下の解析を行った。

各系統について少量の種子(約5g)から製粉し、SDS沈降量(種子貯蔵タンパク質の種類と量を反映)とタンパク質含量(種子貯

蔵タンパク質の量を反映)を測定した。

有望系統の完熟種子から種子貯蔵タンパク質を抽出し、電気泳動によって分離した。その泳動パターンを元に野生種特有の種子貯蔵タンパク質を見いだすとともに、スポットの濃淡を元にタンパク質の発現量を調べた。

(2)(1)の結果を元に、ユニークな小麦粉品質に貢献する野生種由来種子貯蔵タンパク質遺伝子をクローニングするため、有望系統のゲノムDNAを鋳型として、パンコムギの種子貯蔵タンパク質で主要なグルテニンサブユニット遺伝子を網羅的に増幅できるプライマー(Long *et al.*, 2005)を用いてPCRを行った。増幅断片の塩基配列を決定した。

(3)野生種は、これまで育種に使われることがほとんど無かったことから、DNAマーカーは皆無に等しい。一方、パンコムギや同じイネ科のイネやオオムギといった主要穀物では、染色体全域で高密度に座乗するDNAマーカーが開発されている。これにより、様々な形質を効率的に選抜することが可能になっている。そこで、これら既知のDNAマーカーを本研究で扱う野生種へ転用した。特に、コムギPCR-based landmark unique gene (PLUG)マーカー(Ishikawa *et al.*, 2007)は、イネと相同性が高くゲノム中に反復が少ないコムギ発現遺伝子について、イントロンを挟むエクソンにプライマーが設計されている。従ってコムギ近縁野生種でもPCR増幅産物が得られやすく、イントロンに由来する増幅断片長多型やSNPsを多く期待できるので、本研究では、第1同祖群染色体に割り当てられたコムギPLUGマーカーの転用を試みた。

(4)野生種の染色体を段階的にパンコムギ実用品種の染色体に置き換えつつも、有用な種子貯蔵タンパク質を保有した系統を育成するため以下のことを行った。

パンコムギ(2n=42)の実験系統では、染色体数が1本ずつ少ないモノソミックシリーズ(2n=41)が育成されている。そこで、第1同祖群染色体のモノソミックと1の有望系統の野生種染色体が1対添加された個体とを交配し、F<sub>1</sub>を得た。F<sub>1</sub>の減数分裂過程では、パンコムギ染色体片腕と野生種染色体片腕とが動原体で結合したロバートソン型転座が約10%誘発される。この転座の有無は、Genomic in situ hybridization (GISH)法により、パンコムギと野生種の染色体をそれぞれ蛍光で染め分け、蛍光顕微鏡下で観察して選抜した。

パンコムギはA, B, Dの3種類のゲノムからなる異質6倍体のため、それぞれのゲノムには、祖先を同じくする同祖染色体が存在する。パンコムギでは通常、安定的に子孫を残

すため、減数分裂中に同祖染色体間是对合しないよう制御されている。この制御に関するPh遺伝子(5B染色体に座乗)を除くと、同祖染色体間で対合が生じる。そこで、5B染色体が1本少ないモノソミックと(4)-の選抜系統とを交配し、導入する野生種染色体と同祖のパンコムギ染色体との間で対合を誘発させた。これにより、野生種染色体とパンコムギ染色体との間で組換えを生じさせ、その後代で野生種由来の不要な染色体領域がパンコムギの染色体となった系統を昨年と同様にGISH法で選抜した。

農業形質に優れたパンコムギ実用品種を反復親として、(4)-で選抜した系統に連続戻し交配を行った。その際、(1)-で見いだした野生種に特有の種子貯蔵タンパク質を保有する系統を各世代で選抜した。さらに(3)で開発したDNAマーカーを用い、野生種由来染色体の削除程度を確認した。

(5)有望系統の小麦粉品質を再評価するため、(1)-と同様の解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1)TACBOWの系統について、タンパク質含量とSDS沈降量を元に生地強度を評価した結果、遺伝的背景のパンコムギ品種と比べ3.24~1.51倍の強生地強度を示す14系統を選抜した。それらの種子貯蔵タンパク質を電気泳動により解析した結果、異種由来のグリアジンバンドを7本、グルテニンスポットを61個見出した(図1)。選抜14系統について、遺伝的背景のパンコムギ品種由来の各バンド・スポットの濃淡から発現量を解析した結果、発現量の増加は1系統のグルテニンスポット1個のみであり、発現量の減少は7系統で延べ4本のグリアジンバンドと27個のグルテニンスポットで見られた。これら7系統では、異種由来種子貯蔵タンパク質が存在することに加え、生地強度の弱さに寄与する遺伝的背景のパンコムギ品種由来種子貯蔵タンパク質の発現量が減少することで、生地強

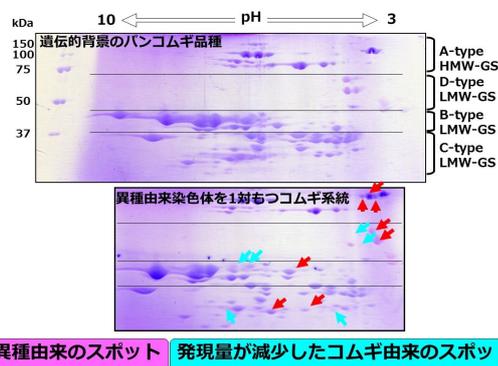


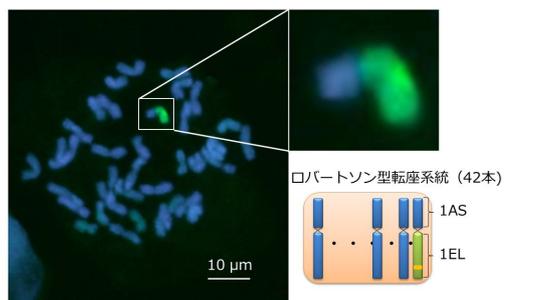
図1. 2次元電気泳動によるグルテニンの発現解析  
度が強くなっていると考えられる。

(2)種子貯蔵タンパク質の中でも分子種が多く知見の少ない低分子量グルテニンサブ

ユニット(LMW-GS)に着目し、異種由来 LMW-GS 遺伝子の N 末端領域のアミノ酸配列を元に分類した結果、s type が 8 個、m type が 15 個、i type が 4 個、不明な type が 2 個であった。グルテニンがポリマーを作り、生地強度を強くするために必須なアミノ酸であるシステインに注目すると、i type のうち 2 個には、反復領域中に余分なシステインをそれぞれ 1 個持っていた。また、m type のうち 1 個には、反復領域にあるはずのシステインが 1 個欠失していた。これらの異種由来 LMW-GS が持つ構造には、生地強度を高める可能性があると考えられる。

(3) 選抜 14 系統の中でも生地が強いコムギ近縁野生種 *Thinopyrum elongatum* の第 1 同祖群 (1E) 染色体を 1 対保有し、遺伝的背景が実験系統の Chinese Spring (CS) である系統 (CSDAL1E) に着目した。第 1 同祖群染色体に割り当てられたコムギ PLUG マーカーを用いた結果、全 121 個のうち、CSDAL1E で特異的な増幅断片が得られ、1E 染色体を識別できたマーカーは 33 個 (27.3%) であった。ゲノム別では 1A 由来で 21.6%、1B 由来で 30.9%、1D 由来で 24.7% であり、B ゲノム由来で最も多くの 1E 染色体識別マーカーを選抜できた。これまでに試みたオオムギ 1H 染色体由来 EST マーカーでは、1E 染色体を識別できたマーカーは 1 割にも満たず、6 割が PCR 増幅断片長多型なし、3 割が増幅断片なしであった。従って、本研究で用いたコムギ PLUG マーカーは高効率に 1E 染色体を識別できたと言える。

(4) CSDAL1E について、パンコムギの 1A 染色体との間で、ロバートソン型転座を誘発させた結果、1A 染色体短腕と 1E 染色体長腕 (1EL) からなる染色体を 1 本保有する個体 (T1AS.1EL) を見出した (図 2)。この個体



青色は小麦染色体、緑色は *Th. elongatum* 染色体を表す  
四角内は小麦・*Th. elongatum* 染色体間ロバートソン型転座が生じた染色体を表す  
図 2. GISH によるパンコムギ染色体と *Th. elongatum* 染色体の識別

では、1E 染色体に由来する高分子量グルテニンサブユニット (HMMW-GS) を保有していたことより、その HMMW-GS 遺伝子は 1EL に座乗することが明らかとなった。

次に、1A 染色体長腕と 1EL との間で同祖染色体間対合を誘発させ、(3) で選抜した 1E 染色体識別マーカーを用いて染色体の由来を調査した結果、長腕の動原体側で 7 個中 6 個および長腕の末端側で 2 個中 1 個のマ

ーカー近傍で、1EL が 1AL へ置換したと考えられる染色体をもつ 1 個体を得た。

(5) T1AS.1EL 系統の種子を大量に収穫し、製粉後、生地強度を評価した結果、T1AS.1EL 系統は、1EL 染色体を保有しない個体と比べ、有意に生地強度が強いことが明らかとなった。従って、CSDAL1E がもつ小麦粉生地が強い特性は、T1AS.1EL でも引き継がれていることが明らかとなった。従って、(4) で育成した 1E 染色体由来 HMMW-GS 遺伝子を含む染色体の微細領域を導入した系統についても、小麦粉生地が強い特性を持つことが予想され、小麦粉品質向上の育種素材として期待される。

#### <引用文献>

Warburton ML, Crossa J, Franco J, Kazi M, Trethowan R, Rajaram S, Pfeiffer W, Zhang P, Dreisigacker S, van Ginkel M (2006) Bringing wild relatives back into the family: recovering genetic diversity in CIMMYT improved wheat germplasm. *Euphytica* 149: 289-301.

Long H, Wei Y-M, Yan Z-H, Baum B, Nevo E, Zheng Y-L (2005) Classification of wheat low-molecular-weight glutenin subunit genes and its chromosome assignment by developing LMW-GS group-specific primers. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1251-1259.

Ishikawa G, Yonemaru J, Saito M, Nakamura T (2007) PCR-based landmark unique gene (PLUG) markers effectively assign homoeologous wheat genes to A, B and D genomes. *BMC Genomics* 2007, 8:135 doi:10.1186/1471-2164-8-135.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Tanaka H, Ohnishi Y, Takenaka S, Nitta M, Kawahara T, Nasuda S (2015) Allelic diversity of puroindoline genes at the *Ha* locus in the core-collection of hexaploid wheat accessions conserved by NBRP-Wheat. *Wheat Information Service*, 119: 7-10. (査読無し)

Garg M, Yanaka M, Tanaka H, Tsujimoto H (2014) Introgression of useful genes from *Thinopyrum intermedium* to wheat for improvement of bread-making quality. *Plant Breeding* 133 (3): 327-334 doi:10.1111/pbr.12167. (査読有り)

[学会発表](計 20 件)

林 奈津子, 田中 裕之: 小麦粉生地を強め

る高分子量グルテニンサブユニット遺伝子が座乗する 1EL 染色体腕部分領域の同祖染色体間組換えによるパンコムギへの導入。第 8 回中国地域育種談話会。2016 年 12 月 10・11 日、岡山大学資源植物科学研究所（岡山県倉敷市）。

赤松 紗也加，田中 裕之：小麦粉生地を強くする *Thinopyrum elongatum* 由来高分子量グルテニンサブユニット遺伝子をもつ 1EL 染色体部分領域のパンコムギへの導入。第 7 回中国地域育種談話会。2015 年 12 月 19・20 日、岡山大学農学部（岡山県岡山市）。

田中 裕之，黒柿 美咲，齋藤 美香，石川 吾郎，中村 俊樹，辻本 壽：小麦粉生地を強くする *Thinopyrum elongatum* 由来高分子量グルテニンサブユニット遺伝子をもつ 1E 染色体に特異的なコムギ PLUG マーカー。2015 年 3 月 21・22 日、玉川大学（東京都町田市）。

田中 裕之，小谷 貴恵，荒川 達也，辻本 壽：小麦粉生地の弱い異種染色体添加パンコムギ系統における種子貯蔵タンパク質の発現変動解析。2014 年 9 月 26・27 日、南九州大学（宮崎県都城市）。

田中 裕之，向井 佳奈子，西浦 愛子，上中 弘典，辻本 壽：*Thinopyrum elongatum* の 1E 染色体に座乗する新規高分子量グルテニンサブユニット遺伝子の分子構造。2013 年 10 月 12・13 日、鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）。

Tanaka H, Arakawa T, Kodani T, Tsujimoto H: Additional alien chromosomes in common wheat effect on the protein profile in the endosperm and dough strength. The 12th International Wheat Genetics Symposium (Program & Abstract Book, p. 197). 2013 年 9 月 8~14 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 裕之 (TANAKA, Hiroyuki)  
鳥取大学・農学部・准教授  
研究者番号：70283976

### (2) 連携研究者

辻本 壽 (TSUJIMOTO, Hisashi)  
鳥取大学・乾燥地研究センター・教授  
研究者番号：50183075