

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780004

研究課題名（和文） 種子貯蔵タンパク質遺伝子銀行を利用した人工合成タンパク質による小麦粉品質評価

研究課題名（英文） Evaluation of wheat flour quality by artificial proteins using a seed storage protein gene bank

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

研究成果の概要（和文）：小麦粉中に約 10%含まれる種子貯蔵タンパク質、特にグルテニンの構造と発現量は、生地強度に大きく影響する。本研究では、野生植物の染色体をもつ小麦から、パン用に求められる強い生地に関係する新たなグルテニンを探索した。その結果、リン酸化の影響を受けない複数の新規グルテニンを見いだした。さらに、1種類のタンパク質がもつ生地強度への効果を評価するため、人工的にタンパク質を作製する系を確立した。

研究成果の概要（英文）：The structure and expression level of the seed storage protein contained about 10% in wheat flour, especially glutenin effects on dough strength greatly. In this study, I searched for novel glutenins related to the strong dough which is appropriate for bread-making in common wheat with the alien chromosome of a wild plant. As a result, several novel glutenins which were not influenced by phosphorylation were found out. Furthermore, to evaluate the effect on the dough strength by one molecule of glutenin, I established the system to make the artificial protein of glutenin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：品質・成分、コムギ、野生種、グルテニン、人工タンパク質

1. 研究開始当初の背景

小麦粉中に約 10%含まれる種子貯蔵タンパク質は、多種類の組み合わせによって生地強度が大きく変わるため、加工適性決定の主要因である。種子貯蔵タンパク質の遺伝子座は、複数個の遺伝子が密に連鎖して座乗した多重遺伝子族を形成している。そのため、生地強度への個々の効果を評価することが困難である。これまでに私たちは、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（CS+1E1E）では、CS と比べ生地強度が強くなることを明らかにした（Grag *et al.* 2009）。

生地の強い小麦粉は需要の高いパン用に向くが、国内では僅かな品種しか育成されておらず、その小麦粉品質も輸入先である北米のパン用品種にはおよばない。

2. 研究の目的

1E 染色体の保有により、小麦粉の生地が強くなる CS+1E1E は、近縁野生種がもつ有用遺伝子をパンコムギへ導入し、育種に利用できる遺伝資源を拡大するための良いモデルケースといえる。生地の強さは、種子貯蔵タンパク質中のグルテニンの種類と発現量が大きく関与していることが知られている。そこで本研究では、以下の点を行うことで、

CS+1E1E がもつ各 1 分子種のグルテニンについて、品質評価できる研究基盤の確立を目指した。

(1) 1E 染色体に由来する新規グルテニンの探索と分子的特徴付け

(2) CS+1E1E がもつグルテニン遺伝子の網羅的解析

(3) グルテニンの人工合成とその小麦粉品質評価法の確立

3. 研究の方法

(1) 1E染色体由来グルテニンを識別するため、CSとCS+1E1Eについて、完熟種子の胚乳側 1/2 からグルテニンを抽出し、SDS-PAGE法および 2 次元電気泳動 (2DE) 法で分離した。それらのスポットの中で、タンパク質の等電点を変化させる翻訳後修飾の 1 つであるリン酸化の影響の有無を調べるため、Pro-Q[®] Diamondによる蛍光染色を行った。

(2) CS+1E1E のゲノム DNA を鋳型として、パンコムギの高分子量グルテニンサブユニット (HMW-GS) 遺伝子の完全長を網羅的に増幅できるプライマー (Liu *et al.* 2003) を用いて PCR を行った。2%アガロースゲル電気泳動で分離後、HMW-GS x-type と y-type それぞれに相当する長さの増幅断片を TA クローニングした。また、低分子量グルテニン (LMW-GS) 遺伝子を網羅的に増幅できる蛍光標識したプライマー (Zhang *et al.* 2011) を用いてフラグメント解析を行った。

(3) クローニングした HMW-GS 遺伝子を元に、コムギ無細胞タンパク質合成法によってタンパク質を人工合成した。作製した人工合成タンパク質は、ウエスタンブロット法により確認した。

人工合成タンパク質の生地強度評価のために用いる小麦粉には、添加する人工合成タンパク質以外の種子貯蔵タンパク質が少ないか無い方が、精度の良い評価が行える。CS では染色体を末端から段階的に削った系統が育成されている (Endo and Gill 1996; Tsujimoto *et al.* 2001)。そこで、種子貯蔵タンパク質遺伝子の多くが座乗している第 1 同祖群染色体に関する各系統について、完熟種子の胚乳側 1/2 からグリアジンとグルテニンを抽出し、それぞれ Aid-PAGE 法と SDS-PAGE 法で分離してそれらの構成を調査した。また、タンパク質の電気泳動では識別できない場合やタンパク質を発現しない対立遺伝子は、各系統の緑葉から抽出したゲノム DNA を鋳型として、それら遺伝子を特異的に増幅できるプライマー (Van Campenhout *et al.* 1995; Takata *et al.* 2008) を用いた PCR により調査した。さらに、各系統より小麦粉を調整し、生地強度の評価のため、小麦粉の

タンパク質含量と SDS 沈降量を測定した。染色体の削除により種子貯蔵タンパク質の種類が減少した系統を選抜後、それらを互いに交配させた。

4. 研究成果

(1) 2DE の結果、CS が 1E 染色体を保有したことにより、HMW-GS x-type および y-type でそれぞれ同じ分子量だが、等電点の異なるスポットが各 5 個、LMW-GS B-type では 2 個、C-type では 2 個の特異的スポットが見出された (図 1)。これらは、1E 染色体に由来する新規グルテニンであると考えられる。リン酸化タンパク質の検出の結果、これら HMW-GS および LMW-GS において、1E 染色体に由来する特異的スポットは全てリン酸化されていなかった。

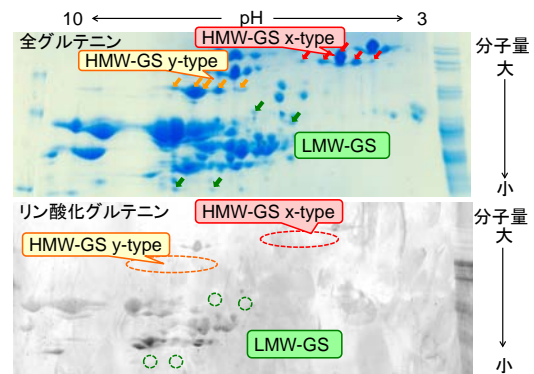


図 1. 2DEによるCS+1E1Eがもつグルテニンの発現パターン
矢印は1E染色体保有によって新たに発現したスポットを示す。
点線の円はそれらスポットがリン酸化されていれば検出された領域を示す。

(2) PCR の結果、1E 染色体に由来する HMW-GS x-type および y-type 遺伝子に相当する増幅断片がそれぞれ 1 本得られた (図 2)。

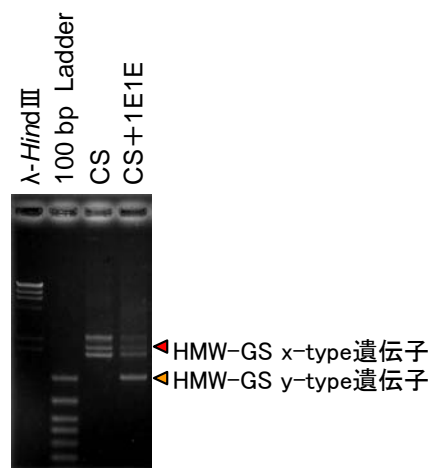


図 2. PCRによるHMW-GS遺伝子の網羅的増幅

それぞれの増幅断片をゲルから抽出し、クローニングした結果、x-type 遺伝子が 8 種類、y-type 遺伝子が 17 種類得られた。推定上のアミノ酸配列より等電点を予想した結果、N

末端領域から反復領域途中までの領域において x-type では最大 0.36 差、y-type では最大 0.29 差と異なっていた。従って 1E 染色体由来 HMW-GS はリン酸化による翻訳後修飾によるものではなく、それぞれ異なる遺伝子に由来すると考えられる。y-type の共通した特徴として、N 末端領域に生地を強くすると考えられる水素結合に関与するグルタミンへのアミノ酸置換 1 つとグルタミンの挿入 1 つが見出された。

LMW-GS 遺伝子のフラグメント解析結果より、1E 染色体に由来する特異的ピークが 2DE でみられたスポット数より多い計 21 個見出された (図 3)。これには、2DE で分離できず重なってしまったスポットや偽遺伝子が含まれていると考えられる。

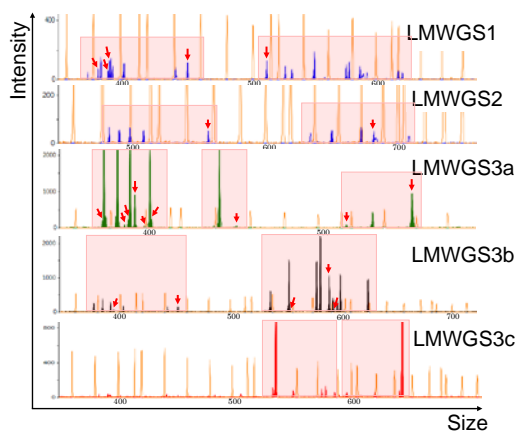


図3. LMW-GS遺伝子のフラグメント解析
矢印は1E染色体保有によって新たに検出されたピークを示す。

(3) 1E 染色体に由来する HMW-GS y-type 遺伝子 1 種類を人工合成した結果、分子量約 17 kDa のタンパク質が合成された (図 4)。

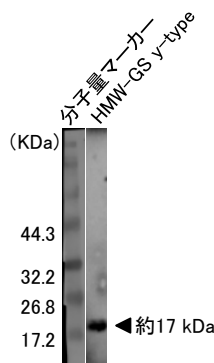


図4. ウェスタンブロット法による人工合成タンパク質の検出

塩基配列解析の結果、この遺伝子にはストップコドンが入っているため、推定よりも低分子量のタンパク質が合成されたことがわかった。今後さらに多くの HMW-GS 遺伝子を元に、人工合成タンパク質を作製する予定である。

染色体欠失部位の違いにより種子貯蔵タンパク質の種類が減少した系統を見いだした (Tanaka *et al.* 2012)。そこで、種子貯蔵タンパク質の種類がさらに減少した系統を得るため、互いに交配した。今後、種子貯蔵タンパク質をもたない種子貯蔵タンパク質フリー系統の選抜を行う。

以上より、1 分子種のグルテニンにおける高精度な品質評価を行うための基盤が整った。今後、様々な種類と量を組み合わせた人工合成タンパク質を種子貯蔵タンパク質フリー系統の小麦粉に添加し評価すれば、これまでグルテニン遺伝子間の強連鎖のため不可能であった 1 分子種のグルテニンにおける高精度な品質評価を行うことができる。この結果を元に、分子構造から小麦粉品質が予想できれば、その遺伝子領域をターゲットにした有用遺伝子の探索・DNA マーカーの開発が可能となる。これらの成果により、小麦粉の高品質化と新加工用途開発に向けて有用な知見を提示できると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

(1) Hiroyuki Tanaka, Hisashi Tsujimoto, Positive or negative effects on dough strength in large-scale group-1 chromosome deletion lines of common wheat (*Triticum aestivum* L.), *Euphytica*, 査読有, 186, 2012, 57-65
DOI: 10.1007/s10681-011-0489-8

〔学会発表〕 (計 8 件)

(1) 田中裕之、グルテン物性を支配するコムギ種子貯蔵タンパク質の分子構造解析、財団法人飯島記念食品科学振興財団第 25 回学術講演会、2012 年 11 月 22 日、学士会館

(2) Hiroyuki Tanaka, Hisashi Tsujimoto, Gradual deletions of group-1 chromosome influence the dough strength in common wheat, AACC International Annual Meeting, 2012 年 9 月 30~10 月 3 日、Westin Diplomat コンベンションセンター (アメリカ合衆国フロリダ州)

(3) 田中裕之、鍋内千里、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のパンコムギ実用品種への導入、日本育種学会、2012 年 9 月 14・15 日、京都産業大学

(4) 田中裕之、荒川達也、辻本壽、異種染色

体添加コムギ系統における種子貯蔵タンパク質の発現量と構造が生地強度におよぼす効果、日本育種学会、2011年9月23・24日、福井県立大学

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