

日本のコムギ品種に特有な種子貯蔵タンパク質グルテニン高分子量サブユニットの遺伝変異とその育種的意義に関する研究

中 村 洋*

抄 録

国産小麦の国際競争力の向上が急務であり、そのためには、高品質品種の開発が重要である。そこで、コムギの品質特性と関連の深い種子貯蔵タンパク質のグルテニン遺伝子の変異を解析し、日本品種の特徴を明らかにしようとした。日本コムギの地方・改良品種には145kDaの高分子量グルテニンサブユニットが高頻度で存在していた。このサブユニットは145キロダルトン (kDa) の分子量を持ち、Dゲノムの第一染色体 (D1) に座乗する *Glu-D1* 遺伝子座の対立遺伝子の一つである *Glu-D1f* 遺伝子により発現すると推定された。このグルテニン *Glu-D1f* 遺伝子は、日本コムギを特徴付ける重要な遺伝子であることを明らかにした。すなわち、*Glu-D1f* 遺伝子は世界的に稀な遺伝子とみられ、中国品種にもわずか2%の低頻度で存在するに過ぎないのに対し、わが国の地方品種では25%、さらに改良品種では35%にも達していた。また、日本の改良品種の *Glu-D1f* 遺伝子の頻度の地理的変異 (傾斜) に関しては、地域適応性 (栽培特性) との関連での秋播性程度、また品質特性との関連で小麦粉の硬軟質性との間に明らかな相関関係が認められた。以上の結果から、日本のコムギ品種には、グルテニン遺伝子 *Glu-D1f* の頻度が特異的に高く、日本国内では南高北低の地理的傾斜があることが明らかになった。この原因として、地域適応性に伴う自然選択の影響や品質改良に伴う人為選抜の効果などが考えられた。

キーワード：グルテニン、高分子量サブユニット、種子貯蔵蛋白質、遺伝変異、日本普通系コムギ、対立遺伝子

Abstract

In order to increase the international competitiveness of domestically produced wheat, it is essential to improve the grain quality. To achieve this objective, the quality of grain from Japanese wheat cultivars must be characterized. The N-terminal amino acid sequence of the glutenin 145kDa subunit was determined using a gas-phase sequencer. It was revealed that the glutenin subunit expression was controlled by a single dominant allele designated as *Glu-D1f* and located on the 1D chromosome. In this study, I observed that the *Glu-D1f* gene occurred frequently among improved cultivars as well as Japanese landraces. The *Glu-D1f* gene has been characterized as one of the typical seed storage protein in the Japanese hexaploid wheat. The allelic frequency of the *Glu-D1f* allele for this subunit was shown to be in excess of 35% among improved Japanese cultivars but 25.3% among Japanese landraces, while it occurred in only 1.8% of the Chinese landraces. A strong correlation was observed between the intensity of winter habit and the occurrence of the *Glu-D1f* allele. The relationship between flour hardness and the occurrence of *Glu-D1f* allele was therefore examined. It was found that in the soft-flour cultivars, the *Glu-D1f* allele occurred more frequently than in the hard-flour cultivars. These findings suggest that the geographical clines in the frequency of the *Glu-D1f* allele observed among the Japanese improved cultivars as well as landraces may be caused by natural selection for winter habit and/or by artificial selection for flour hardness.

Key Words: glutenin, high-molecular-weight subunit, seed storage protein genetic diversity, Japanese common wheat, allele

目 次

緒言	4
コムギ種子貯蔵タンパク質グルテニンの高分子量サブユニットの 生化学的特質と遺伝様式の解明	5
1 一次構造およびペプチドマッピングによるグルテニン高分子量サブユニットの 特質解明	5
2 グルテニン145kDaサブユニットの遺伝様式の解明	9
3 要約	11
新旧コムギ品種の種子貯蔵タンパク質グルテニン・サブユニットの 変異解析ならびに系譜分析	11
1 日本の新旧品種におけるグルテニン・サブユニット構成の変異解析	12
2 グルテニン145kDaサブユニットに関する系譜分析	14
3 要約	16
種子貯蔵タンパク質グルテニン・サブユニットの地理的変異の解析	17
1 日中コムギ品種におけるグルテニン遺伝子の頻度分析	17
2 日本改良品種・系統におけるグルテニン遺伝子頻度の地理的変異の解析	19
3 要約	21
種子貯蔵タンパク質グルテニン145kDaサブユニットの遺伝変異と ほかの農業形質との関連	22
1 グルテニン145kDaサブユニットと秋播性程度との関係	22
2 グルテニン145kDaサブユニットと小麦粉の硬軟質性との関連	23
3 要約	25
総合考察	26
総合摘要	27
謝辞	29
引用文献	29
Summary	32
付表	35

緒 言

わが国の小麦作農業は、経営規模が過小である上に、生産資材や労賃が高価なため、生産性の向上によるコストの低減には限界がある。そこで、国産コムギの品質向上と成分改良により、国民のニーズと嗜好に合う高品質コムギ品種を育成し、国産小麦の付加価値を高めることが重要である(平成11年度食料・農業・農村白書)。

日本のコムギの品種改良は、1929(昭和4)年の農林1号の育成以来、国や県の試験場を中心にした公的育種により大きな成果をあげてきた。戦後の食料事情が改善されるまでは、収量や環境耐性などの栽培特性の改良に重点が置かれてきた。しかし、食料事情が改善され食生活の高度化と多様化が急速に進展する中で、コムギの育種目標の重点は、収量や環境耐性から品質や成分の改良に大きくシフトしてきた(山下1994)。

アジア・モンスーン気候のわが国の自然環境では、製パン適性の高いコムギの生産には不利な点も多いが、東アジアの伝統食品としてのめんの製造に適したコムギ品種の開発には有利な面もある。しかし、近年オーストラリア産のASW銘柄などの製めん特性のすぐれた輸入小麦に押され(高田1987)、わが国の小麦生産は大きな困難に直面している。この困難を打開するには、国民のニーズに合う高品質でユニークな成分をもつコムギ品種の開発を急ぐ必要がある(Nakamura1993)。

そこで、製パンや製めんなどに関連する加工特性と関係の深いコムギの種子貯蔵タンパク質の分析と遺伝変異の解析により、日本のコムギ品種の遺伝的特徴を明らかにし、今後のコムギ育種の参考となる情報を得る目的で本研究を実施した。

近年、コムギの種子貯蔵タンパク質、とくにグルテニンの高分子量サブユニット構成と品質との関連やそれらの遺伝変異の研究が盛んに行われるようになった。SDS-ゲル電気泳動により種子貯蔵タンパク質を分析することが容易に

なり、コムギ育種にも実用的に利用されている。たとえば、イギリスでは、SDS沈降テストとSDS-ゲル電気泳動によるタンパク質グルテニンの分析をF₃世代の個体別に行い、初期世代の品質評価が実施され、この方法が高品質コムギ育成の有効な手法と位置づけられている(Bingham and Lupton 1987)。また、カナダにおいても、高品質のコムギ品種開発のため、メキシコ品種のグルテニン・サブユニット17+18(*Glu-B1i*遺伝子支配)の導入を行った(Ng *et al.* 1989)。このように、SDS-ゲル電気泳動による分析は、高品質のコムギ品種を開発する上で重要な手法の一つになっている。

種子貯蔵タンパク質の遺伝的改良に関する研究は、製粉性や製パン適性の向上のための品質改善との関連で、多くの研究成果を挙げてきた(Shepherd *et al.* 1996)。最近20年の間に、タンパク質分析は大きな進歩を遂げ、コムギの種子貯蔵タンパク質のサブユニット構成の遺伝変異に関する研究が急速に発展した。コムギの種子貯蔵タンパク質の主要なものは、グルテニンとグリアジンであり(Milfin and Shewry 1979、田中1978)、両者が種子貯蔵タンパク質の80%以上を占めている。グルテニンは弾力性に関与し、グリアジンは粘性と伸展性に関与している。Sears(1954)の育成したChinese-Springのナリテトラ系統とダイテロ系統を用いて、種子貯蔵タンパク質関連グルテニン遺伝子の座乗染色体が決定されている(Worland *et al.* 1987)。グルテニン・サブユニットに関連するグルテニン遺伝子は、3つの第一同祖染色体(A1、B1、D1)の長腕上に座乗している(Payne and Lawrence 1983a)。これらのグルテニン遺伝子座は、それぞれ*Glu-A1*、*Glu-B1*および*Glu-D1*と命名され(Payne *et al.* 1982)、多数の複対立遺伝子が発見されている。これらの遺伝子座の対立遺伝子とタンパク質サブユニットには、万国共通の記号と番号が与えられている(Payne and Lawrence 1983a)。

種子貯蔵タンパク質の遺伝的改良には、量的改良と質的改良がある。量的改良とは、タンパク質含量の向上であり、質的改良とは、アミノ酸やポリペプチド（サブユニット）構成の改変である。前者は、遺伝的要因とともに環境要因が深く関わっているが、後者は、遺伝的要因の関与が大きい。すなわち、タンパク質含量は、品種によって異なるばかりでなく、自然環境や栽培条件による変動も大きい。一方、タンパク質のアミノ酸やポリペプチドの構成は遺伝的に

決定され、環境の影響は少ないとみられる。

本研究では、コムギの品質特性と関連の深い種子貯蔵タンパク質のサブユニット構成について、わが国の改良（農林登録）品種、育成系統、地方（在来）品種および隣国中国のコムギ品種の遺伝変異を解析し、その地理的分布や系譜の分析などにより、日本のコムギ品種の特徴を明らかにし、国産小麦の品質・成分の改良や新たな遺伝資源の開発に役立つ情報を得ることを目的として、実験と調査を行った。

コムギ種子貯蔵タンパク質グルテニンの高分子量サブユニットの生化学的特質と遺伝様式の解明

国産小麦の品質と成分の遺伝的改良や有用遺伝資源の開発に関連して、日本のコムギ品種の遺伝的特質を明らかにする目的で、日本品種のグルテニン・サブユニット構成の遺伝変異をSDS-ゲル電気泳動法により解析した。その結果、コムギの種子貯蔵タンパク質のグルテニン高分子量サブユニットの一つがわが国の多くの改良（農林登録）品種に存在することが明らかになり、これが日本のコムギ品種を特徴づけていることがわかった。そこで、このサブユニットの生化学的特質を明らかにするために、分子量を測定した。その結果、すでに報告されているグルテニン・サブユニットの2.2バンド（Payne *et al.* 1983b）と同一であることが確認され、さらに、このサブユニットのペプチドマッピングならびにアミノ酸配列の解明を行い、既知のグルテニン・サブユニットとの差異を明らかにした。多くの日本品種にみられるこのグルテニン・サブユニットの遺伝解析を行い、それを支配するグルテニン遺伝子の優劣性、遺伝子数、遺伝子座の推定を行い、その遺伝的特質とほかのグルテニン高分子量サブユニットとの遺伝的差異などについて検討を加えた。

1 一次構造およびペプチドマッピングによるグルテニン高分子量サブユニットの特質解明

日本の多くのコムギ品種に存在するグルテニン・サブユニットの生化学的特質を明らかにするために、まず、その分子量を測定した。また、このサブユニットのN末端アミノ酸配列を明らかにするとともに、ペプチドマッピングを用いて、それより内部の一次構造（アミノ酸配列）を調べた。さらに、既知のグルテニン・サブユニットとの比較により、このグルテニン・サブユニットの構造上の特徴を明らかにした。

1) 材料および方法

農林水産省農業研究センター麦品質評価研究室（当時）で保存していたコムギ品種農林61号の種子を1988年に当センター（当時）観音台畑圃場で栽培・増殖し、実験材料とした。播種、肥培管理、収穫、脱穀は慣行法によって行った。

コムギ農林61号の種子胚乳部より、グルテニンを抽出し、タンパク質の分析にはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（以後SDS-ゲル電気泳動と略称）を用いた（Nakamura *et al.* 1990）。分子量の測定は、SDS-ゲル電気泳動で分離されるグルテニン・サブユニットの移

動度を、分子量マーカー（ファルマシア社）との相対的な移動度により比較し、各タンパク質サブユニットの分子量を推定した。

まず、コムギ種子の胚乳部を粗砕して得られた10mgのコムギ粉末に300 μ lのトリス・塩酸緩衝液（pH 6.8）{0.25M トリス・塩酸バッファー（w/v）、2%（w/v）SDS、10%（v/v）グリセロール、5% 2-メルカプト・エタノール}を加え、2時間以上室温でよく振盪して種子貯蔵タンパク質を抽出した。これを15,000rpmの遠心分離にかけ、得られた上澄み液を電気泳動用試料とした。

SDS-ゲル電気泳動により、種子貯蔵タンパク質の分析を行った（Nakamura *et al.* 1990）。分離用ゲルは、1.5M トリス・塩酸緩衝液（0.27% SDSを含む、pH 8.8）と7.5%（w/v）アクリルアミドおよび0.2%（w/v）メチレンビス・アクリルアミドにより作製し、濃縮ゲルは0.25M トリス・塩酸緩衝液（0.2% SDSを含む、pH 6.8）と7.5%（w/v）アクリルアミドおよび0.2%（w/v）メチレンビス・アクリルアミドにより作成した。ゲルは横14cm、縦10cm、厚さ2mmの大きさのものを用いた。電極液は0.025M トリス・グリシン（0.1% SDSを含む、pH 8.3）とした。分離ゲルのアクリルアミド濃度は7.5%とし、定電流10mAで15時間の電気泳動を行った。泳動後、酢酸およびメタノールを含むコマシー・ブリリアントブルーR250でタンパク質を染色した。

SDS-ゲル電気泳動により分離されたタンパク質をエレクトロ・プロットングにより、PVDF膜に転写した。プロットング溶液A（トリス 36.3g、メタノール 200ml、10% SDS 5ml）、プロットング溶液B（トリス 3g、メタノール 200ml、10% SDS 5ml）、プロットング溶液C（トリス 3g、 α -amino-n-acid 5.2g、メタノール 200ml、10% SDS 5ml）を予め作成し、これらの溶液をプロットングに用いた。まず、電気泳動したゲルをプロットング溶液Cに浸してよく振盪させ、Whatman 3MM濾紙各2枚ずつをプロットング溶液A、B、Cに浸して振盪した。セミドライ・プロットング

装置の下から順に、プロットング溶液Aに浸した濾紙2枚、プロットング溶液Bに浸した濾紙2枚、メタノール浸漬後プロットング溶液Cで平衡化したPVDF膜1枚、電気泳動ゲル1枚、プロットング溶液Cに浸した濾紙2枚を重ね合わせて、定電流1mA（ cm^2 当たり）で90分間の転写を行った。分離ゲルの大きさが10×14cmなので、定電流140mAでタンパク質をポリビニリデン・ジフルオライド（PVDF）膜に転写し、転写の終了したPVDF膜をコマシー・ブリリアントブルーR250で染色した。Edman（1949, 1950）は、タンパク質やペプチドのN末端からのアミノ酸配列を分析する手法を開発しており、本実験では気相シーケンサー（Applied Biosystem Co., Ltd. Model 477A/120A）によるエドマン分解法により、種子貯蔵タンパク質の高分子量グルテニン・145kDaサブユニットのN末端アミノ酸配列（一次構造）を分析した。

SDS-ゲル電気泳動により分離されたタンパク質のグルテニン・サブユニットをエレクトロ・エルーションにより、ゲルから電氣的に抽出した（Hirano 1989）。試料カップの陰極側にゲル片を入れ、陽極側試料カップと電極槽にSDS-PAGE用電極液（トリス 3.0g、グリシン 14.4g、SDS 1.0gを超純水に溶かして1000mlとする）を注入して、電気泳動を2時間行って、陽極側試料カップでタンパク質の回収をした。エレクトロ・エルーションにより溶出されたタンパク質の脱塩・濃縮は、超純水で透析をした後、遠心濃縮器（スピードバック・コンセントレーター、Savant Co., Ltd.）でタンパク質の濃縮を行った。ペプチドマッピングはクリーブランド法（Cleveland *et al.* 1977）を用いた。トリス-SDS緩衝溶液に、濃縮・脱塩し精製されたグルテニン・サブユニット試料を溶解させ、電気泳動用ゲルの試料溝に20 μ lのタンパク質試料溶液を添加した。そして、高分子量グルテニン145kDa、2*および12の各サブユニットを *Staphylococcus aureus* V8プロテアーゼで部分分解して、ペプチドに断片化した。得られたペプチドをSDS-ゲル電気泳動によりマッピングし、

サブユニット間のペプチド組成の違いを調べた。

2) 結果

SDS-ゲル電気泳動により、分子量マーカートの相対移動度による比較をした結果、日本の多くのコムギ品種に存在するグルテニン・サブユニットの分子量を145(kDa)と推定し(表1)これを145kDaサブユニットと名付けた。SDS-ゲル電気泳動により分別した145kDaサブユニットをPVDF膜にエレクトロ・ブロッティングし、気相シーケンサーでアミノ酸の配列を分析した結果を表2に示した。このサブユニットのN末端アミノ酸配列の14残基までを明らかにすることができた。このサブユニットのアミノ酸配列は、N末端側よりグルタミン酸、グリシン、グルタミン酸、アラニン、セリン、グリシ

ン、グルタミン、ロイシン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、グルタミン酸、ロイシンであった。N末端のアミノ酸配列が明らかにされているほかのグルテニン・サブユニットと、このサブユニットのアミノ酸配列との相同性を調べた。その結果、すでに報告されているグルテニン高分子量サブユニットの一つのアミノ酸配列(Anderson *et al.* 1984、Anonymous 1983、Forde *et al.* 1985a、Forde *et al.* 1985b)と相同な配列をもつことがわかった。このため、145kDaサブユニットはグルテニン高分子量サブユニットの一つであると判断した。さらに、このサブユニットは、グルテニン高分子量サブユニットの中で最大の分子量をもつことがわかった。

農林61号から抽出・精製したグルテニン・サブユニットとペプチド分解したSDS-ゲル電気

表1 グルテニン高分子量サブユニットと分子量マーカートの分子量

分子量マーカート 高分子量グルテニン・サブユニット	分子量 (Da)
ホスホリラーゼb	94,000
アルブミン	67,000
オボアルブミン	43,000
カルボニックアンヒドラーゼ	30,000
トリピシニンヒピター -ラクトアルブミン	20,000 14,000
高分子量グルテニン・サブユニット145kDa	145,000

表2 グルテニン高分子量サブユニットにおけるN末端アミノ酸配列の相同性

ゲノム	サブユニット	N末端アミノ酸配列													
D	145kDa	E	G	E	A	S	G	Q	L	Q	X	E	R	E	L
D	2	E	G	E	A	S	E	Q	L	Q	C	E	R	E	L
D	5	E	G	E	A	S	E	Q	L	Q	C	E	X	E	L
D	10	E	G	E	A	S	R	Q	L	Q	C	E	R	E	L
D	12	E	G	E	A	S	R	Q	L	Q	C	E	R	E	L
A	1	E	G	E	A	S	G	Q	L	Q	C	E	X	E	L
B	7	E	G	E	A	S	G	Q	L	Q	C	E	X	E	L

棒：各サブユニット間のN末端アミノ酸配列の相同部分を示す。
サブユニット2、5、10、12、1および7のアミノ酸配列は、Shewry *et al.* (1984) から引用し、本研究で分析した145kDaサブユニットと比較した。
X：同定不明のもの

泳動パターンを図1に示した。1レーンが分子量マーカー、2レーンが145kDaサブユニット、3レーンがサブユニット2*、4レーンがサブユニット12の泳動像である。さらに、5~7レーンはグルテニンの145kDa、2*および12の各サブユニットを*Staphylococcus aureus* V8プロテアーゼでグルタミン酸残基のC末端側を特異的に切断することにより部分分解を行って、ペプチドに断片化した後の泳動像で、5レーンが145kDaサブユニット、6レーンがサブユニット2*、7レーンがサブユニット12の断片の電気泳動パターンを示している。これらの電気泳動パターンを比較した結果、145kDaサブユニットは、ほかのグルテニン高分子量サブユニット2*および12などとは、かなり異なったペプチドパターンを示した。

3) 考 察

コムギの種子貯蔵タンパク質であるグルテニンは、多数のタンパク質サブユニットがジスルフィド架橋によって結合して形成されている。このジスルフィド結合がグルテニン物性、特に

粘性に關与しているといわれている。ジスルフィド結合はシステイン残基間で形成されており、これらによるサブユニットの結合様式がコムギ品質と何らかの関わりをもつ可能性が考えられている(米沢 1978)。

コムギ品質、とくに製パン特性との関連では、コムギの品質に芳しくない影響をもつとみられているサブユニット2、9および12を支配するグルテニン遺伝子のクローニングが行われており、それらの塩基配列が明らかにされている(Halford *et al.* 1987、Sugiyama *et al.* 1985、Thompson *et al.* 1985)。また、コムギ品質によい効果をもつとされるサブユニット2*のN末端およびC末端のアミノ酸配列と一致するグルテニン遺伝子がクローニングされている(Forde *et al.* 1985b)。このグルテニン遺伝子は翻訳領域の中央部分に終止コドンTAGが存在する活性のない遺伝子である。従って、これは*Glu-A1b*遺伝子とは同一のものではないが、翻訳領域についてはきわめて類似したものと推定されている(Forde *et al.* 1985b)。

サブユニット2、9、12、および2*のアミノ酸配列が報告されている(Shewry *et al.* 1990)。これらのグルテニン・サブユニットは、いずれも三つの特徴的な領域から構成されており、それはN末端非反復配列領域、C末端非反復配列領域および中央部分に存在し、類似したアミノ酸配列が反復して出現する中央反復配列領域からなっている。サブユニット2*の推定アミノ酸配列にはシステインがNおよびC末端の非反復領域にそれぞれ5および1残基存在し、中央反復領域には存在しない。しかし、サブユニット9および12は中央反復配列領域に1残基余分にこのシステインを含んでいることがわかった。さらに、サブユニット2にはN末端非反復配列領域のシステインが2残基少なく、このことはグルテニン・サブユニット間でジスルフィド結合の形成能に違いがあることを示唆している。グルテニン・サブユニット間における品質に關与する程度の違いは、このようなタンパク質一次構造上の差異から生じているのではないかと推察されている(Shewry *et al.* 1990)。

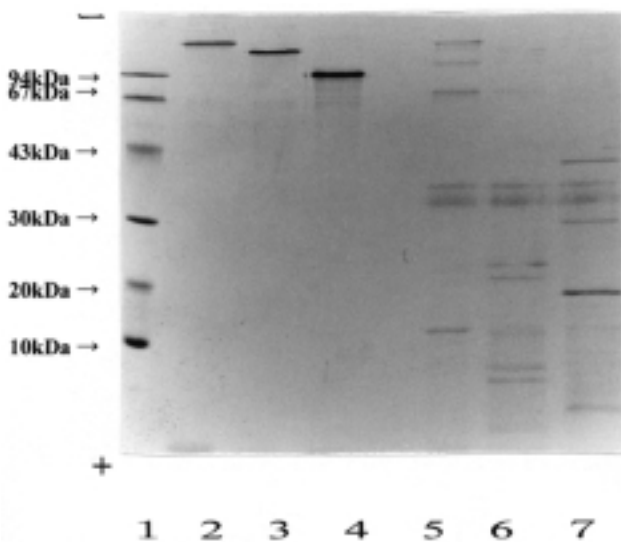


図1 コムギ農林61号におけるグルテニン高分子量サブユニットのペプチドマッピング

1: 分子量マーカー、2: 145kDaサブユニット、3: サブユニット2*、4: サブユニット12、5~7は各々、*Staphylococcus aureus* V8プロテアーゼによる部分分解でペプチド断片化したもので、5: 145kDaサブユニットをペプチド断片化、6: サブユニット2*をペプチド断片化、7: サブユニット12をペプチド断片化

また、中央部の反復配列領域にはグルタミン残基が多いが、ここで水素結合が形成される可能性もあり、この水素結合能にグルテニン・サブユニット間で差異が生じていれば、サブユニット構成の品質間差にも影響を及ぼすことになる。

Staphylococcus aureus V8プロテアーゼは、グルタミン酸残基のC末端側を特異的に切断する酵素である。従って、本実験結果は、3つのサブユニット間、すなわち145kDaサブユニット、サブユニット2*およびサブユニット12において、グルタミン酸の位置がかなり異なっていることを示している。これら3つのサブユニットのN末端アミノ酸配列は、互いに類似していることがすでに明らかとなっているが(Nakamura *et al.* 1990) 同類のグルテニン・サブユニットである145kDaサブユニット、サブユニット2*およびサブユニット12のC末端側領域については、アミノ酸配列に大きな差異があることがわかった。タンパク質のアミノ酸配列は、生物化学上最も基本的な構造である。本節における研究結果から、種子貯蔵タンパク質の同類のサブユニット、145kDaサブユニット、サブユニット2*およびサブユニット12間のタンパク質一次構造上の差異はかなり大きいことが推察された。今後、コムギの品質特性との関連を考える上でこのことは留意に値する。本実験では、最大高分子量のグルテニン145kDaサブユニットのN末端アミノ酸配列を明らかにしたが、今後、このグルテニン・サブユニットのC末端非反復領域および中央部分等の内部構造を詳しく調べることにより、タンパク質の一次構造がコムギ品質に及ぼす影響が明らかになる可能性が考えられる。タンパク質の二次構造および三次構造等の高次構造が一次構造にも影響しているといわれており(Halford *et al.* 1987、Sugiyama *et al.* 1985、Thompson *et al.* 1985) タンパク質の高次構造も併せて解明することにより、日本コムギ品種に特異的にみられるグルテニン145kDaサブユニットの生化学的特質が明らかにされるものと考えられる。

2 グルテニン145kDaサブユニットの遺伝様式の解明

グルテニン145kDaサブユニットが多くの日本品種に存在することがわかったことから、日本品種を特徴づける重要なタンパク質成分として、その遺伝様式の解明を試みた。このグルテニン・サブユニットを支配する遺伝子の優劣性、遺伝子数、遺伝子座の同定を行った。

1) 材料および方法

農林26号(145kDaサブユニット有)×Gamenya(145kDaサブユニット無)ならびにTordo(145kDaサブユニット無)×ニシカゼコムギ(145kDaサブユニット有)の2組合せの交配を、1988年に茨城県つくば市の農林水産省農業研究センター(当時)観音台畑圃場にて行った。これらの組合せにより得られたF₁ならびにF₂世代の種子を供試材料とした。両組合せの交配により得られたF₁およびF₂世代の種子の貯蔵タンパク質をSDS-ゲル電気泳動により分析し、グルテニン145kDaサブユニットの有無を調べた。分離用ゲルは、1.5M トリス・塩酸緩衝液(0.27% SDSを含む、pH 8.8)と7.5%(w/v)アクリルアミドおよび0.2%(w/v)メチレンビス・アクリルアミドにより作製し、濃縮ゲルは0.25M トリス・塩酸緩衝液(0.2% SDSを含む、pH 6.8)と7.5%(w/v)アクリルアミドおよび0.2%(w/v)メチレンビス・アクリルアミドにより作成した。ゲルは横14cm、縦10cm、厚さ2mmの大きさのものを用いた。電極液は0.025M トリス・グリシン(0.1% SDSを含む、pH 8.3)とした。分離ゲルのアクリルアミド濃度は7.5%とし、定電流10mAで15時間の電気泳動を行った。泳動後、酢酸およびメタノールを含むコマシー・ブリリアントブルーR250でタンパク質を染色した。

2) 結果

農林26号×Gamenyaの組合せのF₁およびF₂世代における145kDaサブユニットの分離状態を表3に示した。F₁世代では、20粒すべての種子

が145kDaサブユニットを有していた。F₂世代では、200粒の種子について145kDaサブユニット有無の分離は153:47となり、この値は3:1の分離比によく適合した ($\chi^2=0.24$ 、0.50 P 0.70)。

表3には、Tordo × ニシカゼコムギの交配組合せのF₁およびF₂世代における145kDaサブユニット分離の状況も示した(図2)。F₁世代では、20粒すべての種子が145kDaサブユニットを有していた。F₂世代の118粒の種子における

表3 農林26号 × GamenyaとTordo × ニシカゼコムギの2交配組合せにおける145kDaサブユニット支配の遺伝子の分離状況

交配組合せ 種子世代	検定数	145kDaサブユニット		分離比	χ^2 値	確率
		有	無			
農林26号 × Gamenya						
F ₁ 種子	20	20	0	1:0		
F ₂ 種子	200	153	47	3:1	0.24	0.50~0.70
Tordo × ニシカゼコムギ						
F ₁ 種子	20	20	0	1:0		
F ₂ 種子	118	85	33	3:1	0.55	0.30~0.50

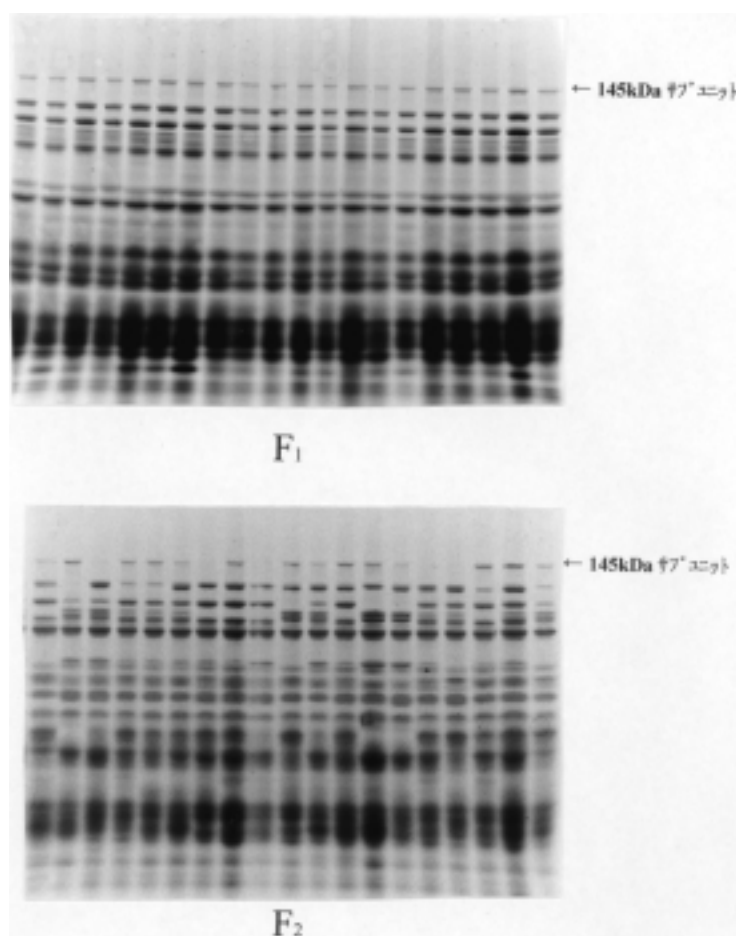


図2 Tordo × ニシカゼコムギの交配組合せF₁およびF₂世代における高分子量グルテニン145kDaサブユニットの分離状況を示す SDS-ゲル電気泳動パターンの例

145kDaサブユニット有無に関する分離は85:33となり、これも3:1の分離比によく適合した ($\chi^2=0.55$, 0.30 P 0.50)。

これらの結果から、グルテニン145kDaサブユニットの発現は、単一の優性遺伝子に支配されていることがわかった。また、Payne *et al.* (1983b) が日本のコムギ品種ダンチコムギで見つけたと報告されている2.2バンドと、このグルテニン・サブユニットとの相同性を調べたところ、SDS-ゲル電気泳動上におけるサブユニットの移動度から同一のサブユニットであることが明らかになった。

3) 考 察

多くの改良（農林登録）品種に存在し、日本品種を特徴づけているグルテニン145kDaサブユニットのF₁およびF₂世代における遺伝様式を分析した。その結果、このサブユニットは、単一優性遺伝子に支配されていることを明らかにできた。グルテニン・サブユニットの生成は、第一同祖染色体1A、1Bおよび1Dに座乗する遺伝子座の対立遺伝子群により支配されていることが知られている（Payne *et al.* 1984、Payne *et al.* 1987）。これらの遺伝子座は、それぞれ *Glu-A1*、*Glu-B1* および *Glu-D1* と命名されている（Payne *et al.* 1982）。多くの国々で、普通系コムギにおける *Glu-1* 遺伝子座の解析が行われ、多数の複対立遺伝子が発見されている（Payne *et al.* 1983a）。Payne *et al.* (1983b) の報告した2.2バンドと同一のタンパク質であることが明

らかになったことにより、145kDaサブユニットは *Glu-D1f* 遺伝子により支配されていると推察された。

3 要 約

本章では、多くの改良（農林登録）品種に存在し、わが国のコムギ品種を特徴づけているグルテニン145kDaサブユニットの生化学的特質およびその遺伝様式を解明した。その結果、次のことが明らかになった。

- 1) 分子量マーカーと特定タンパク質ポリペプチドとの相対移動度を比較した結果、多くの日本品種に存在するグルテニン・サブユニットの分子量を145kDaと推定した。
- 2) この145kDaサブユニット一次構造の一部、N末端のアミノ酸14残基を決定した。また、*Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼで部分分解し、ほかのグルテニン・サブユニット2*および12のペプチドパターンの異同を明らかにした。
- 3) このサブユニットとほかの同類の高分子量サブユニット2*および12のアミノ酸配列を比較し、グルタミン酸の位置に差異のあることを明らかにした。
- 4) 145kDaサブユニットの有無に関する遺伝分析を2つの交配組合せで行い、このサブユニットは両組合せとも、単一優性遺伝子に支配されていることを明らかにした。

新旧コムギ品種の種子貯蔵タンパク質グルテニン・サブユニットの変異解析ならびに系譜分析

コムギの品質特性と関連の深い種子貯蔵タンパク質グルテニン・サブユニット構成の品種間の差異を調べた。それに基づき、3種の同祖染色体に座乗する三つのグルテニン遺伝子座、*Glu-A1*、*Glu-B1*、*Glu-D1*における対立遺伝子の頻度を解析した。このことにより、日本のコム

ギ改良品種のグルテニン・サブユニットの特質を明らかにし、日本コムギの由来とそれに関連して遺伝的基盤に関する考察を行った。また、北海道地方の主導品種ホロシリコムギおよび九州地方の主導品種ニシカゼコムギの系譜分析を行い、145kDaサブユニットの消長と自然選択

あるいは人為選抜と関連の可能性について考察した。

1 日本の新旧品種におけるグルテニン・サブユニット構成の変異解析

わが国の新旧305品種・系統のグルテニン・サブユニット構成を比較分析し、品種改良過程におけるグルテニン遺伝子の消長を明らかにした。また、日本コムギ品種の特質をグルテニン・サブユニット構成から明らかにし、日本コムギの由来とその遺伝的基盤について考察を加えた。

1) 材料および方法

農林水産省ジーンバンク(当時)で保存している改良(農林登録)品種131点(付表1参照)および地方(在来)品種174点(付表2参照)のコムギ種子を、農林水産省農業研究センター(当時)観音台畑圃場(茨城県つくば市)で1988~1990年に栽培・増殖して実験材料とした。これらの実験材料の播種、肥培管理、収穫、脱穀調整は慣行法によって行った。耕種方法は、基肥のみで6-9-6化成肥料を用い、施肥量は7.5kg/a・8.5cm点播・畦幅80cm・畦長8mとした。得られたコムギ種子をSDS-ゲル電気泳動用の実験材料として用いた。

まず、コムギ種子の胚乳部を粗砕して得られた10mgのコムギ粉末に300 μ lのトリス・塩酸緩衝液(pH 6.8){0.25M トリス・塩酸バッファー(w/v)、2%(w/v) SDS、10%(v/v)グリセロール、5% 2-メルカプト・エタノール}を加え、2時間以上室温でよく振盪して種子貯蔵タンパク質を抽出した。これを15,000rpmの遠心分離にかけ、得られた上澄み液を電気泳動用試料とした。

SDS-ゲル電気泳動により、種子貯蔵タンパク質の分析を行った(Nakamura *et al.* 1990)。分離用ゲルは、1.5M トリス・塩酸緩衝液(0.27% SDSを含む、pH 8.8)と7.5%(w/v)アクリルアミドおよび0.2%(w/v)メチレンビス・アクリルアミドにより作製し、濃縮ゲルは

0.25M トリス・塩酸緩衝液(0.2% SDSを含む、pH 6.8)と7.5%(w/v)アクリルアミドおよび0.2%(w/v)メチレンビス・アクリルアミドにより作成した。ゲルは横14cm、縦10cm、厚さ2mmの大きさのものを用いた。電極液は0.025M トリス・グリシン(0.1% SDSを含む、pH 8.3)とした。分離ゲルのアクリルアミド濃度は7.5%とし、定電流10mAで15時間の電気泳動を行った。泳動後、酢酸およびメタノールを含むコマシー・ブリリアントブルーR250でタンパク質を染色した。

グルテニン高分子量サブユニットの発現は、*Glu-1*遺伝子座群に座乗する各対立遺伝子により支配されていることが知られている(Payne *et al.* 1987)。たとえば、サブユニット1は*Glu-A1a*遺伝子、サブユニット2*は*Glu-A1b*遺伝子、サブユニット7+8は*Glu-B1b*遺伝子、サブユニット5+10は*Glu-D1d*遺伝子、145kDaサブユニットは*Glu-D1f*遺伝子等、各サブユニットと*Glu-1*遺伝子座群の対立遺伝子が厳密に対応している。そこで、本実験では、Payne and Lawrence (1983a)の提唱したグルテニン高分子量サブユニットの数字番号を用いず、それらの発現を支配している*Glu-A1*、*Glu-B1*および*Glu-D1*遺伝子座に座乗する対立遺伝子の名称と出現頻度を検討の対象とした。グルテニン・サブユニットの同定に必要な標準品種として、Bezostaya-1、Champlein、Chinese-Spring、Danchi、Dunav、Federation、Gabo、Hobbit、Hope、Lancota、Norin 61、SappoおよびSerbianの13品種を用いた。

2) 結果

日本の改良品種における種子貯蔵タンパク質のSDS-ゲル電気泳動パターンを図3に例示した。改良(農林登録)品種および地方(在来)品種の*Glu-1*遺伝子座群の各対立遺伝子を有する品種数および頻度を表4に示した。

まず、*Glu-A1*遺伝子座では、改良・地方品種ともに*Glu-A1c*遺伝子の頻度が最大であった。改良品種では97点(74.1%)、地方品種でも151点(86.8%)がこのグルテニン遺伝子を持って

いた。改良品種では*Glu-A1a*遺伝子をもつものが16点(12.2%)、*Glu-A1b*遺伝子をもつのは18点(13.7%)であり、地方品種に比べて明らかに両グルテニン遺伝子の頻度は高まる傾向が認められた。

*Glu-B1*遺伝子座に関しては、1B染色体上に11の対立遺伝子が座乗し、既知のグルテニン・

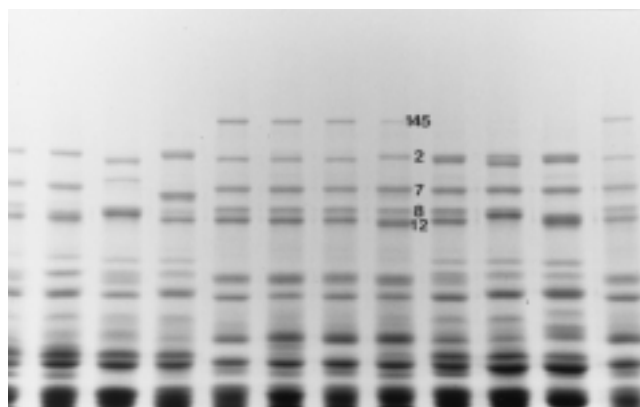


図3 日本改良(農林登録)品種におけるグルテニン高分子量サブユニットのSDS-ゲル電気泳動パターンの例示

注) 145は145kDaサブユニット、2はサブユニット2、7はサブユニット7、8はサブユニット8、12はサブユニット12を示す。

サブユニットの対立遺伝子の半分以上が、この染色体上に集中していることが知られている。新旧品種ともに、*Glu-B1b*遺伝子頻度が最大で、改良品種で109点(83.2%)、地方品種で164点(94.1%)と高かった。特にほとんどの地方品種が*Glu-B1b*遺伝子をもっており、改良品種ではやや減少する傾向が認められた。一方、*Glu-B1c*遺伝子の頻度は、改良品種では12.9%(17品種)であり、地方品種の頻度1.2%(2品種)より明らかに高まる点が注目された。*Glu-B1a*、*Glu-B1f*、*Glu-B1h*、*Glu-B1j*および*Glu-B1k*の各グルテニン遺伝子は、改良品種には存在しないこともわかった。改良品種では、*Glu-B1d*遺伝子(タクネコムギ)、*Glu-B1e*遺伝子(チホクコムギ、農林12号)、*Glu-B1g*遺伝子(ハルミノリ)および*Glu-B1i*遺伝子(ハルユタカ)の頻度は低く、わずか1~2品種にしか存在しなかった。さらに、*Glu-B1f*、*Glu-B1g*、*Glu-B1h*、*Glu-B1j*、*Glu-B1k*などの*Glu-B1*遺伝子座の対立遺伝子は地方品種には存在しないが、改良品種ではハルミノリにのみ*Glu-B1g*遺伝子が存在した。*Glu-B1a*(赤441、赤小麦、大石)、*Glu-B1c*(箕川、

表4 日本の改良(農林)品種131点および地方品種174点における*Glu-1*対立遺伝子の頻度

遺伝子座	対立遺伝子	サブユニット	改良品種		地方品種	
			品種数	頻度(%)	品種数	頻度(%)
<i>Glu-A1</i>	<i>a</i>	1	16	12.2	8	4.6
	<i>b</i>	2*	18	13.7	15	8.6
	<i>c</i>	Null	97	74.1	151	86.8
<i>Glu-B1</i>	<i>a</i>	7	0	0	3	1.7
	<i>b</i>	7+8	109	83.2	164	94.1
	<i>c</i>	7+9	17	12.9	2	1.2
	<i>d</i>	6+8	1	0.8	2	1.2
	<i>e</i>	20	2	1.5	1	0.6
	<i>f</i>	13+16	0	0	0	0
	<i>g</i>	13+19	1	0.8	0	0
	<i>h</i>	14+15	0	0	0	0
	<i>i</i>	17+18	1	0.8	2	1.2
	<i>j</i>	21	0	0	0	0
	<i>k</i>	22	0	0	0	0
<i>Glu-D1</i>	<i>a</i>	2+12	72	55.0	122	70.1
	<i>b</i>	3+12	2	1.5	0	0
	<i>c</i>	4+12	9	6.9	2	1.2
	<i>d</i>	5+10	2	1.5	6	3.4
	<i>e</i>	2+10	0	0	0	0
	<i>f</i>	145kDa+12	46	35.1	44	25.3

白肌第2号) *Glu-B1d*(穂長) *Glu-B1e*(冬白) および *Glu-B1i*(極早生2号)の各グルテニン遺伝子の頻度は低く、1~3品種の地方品種にのみ存在したが(付表3参照)、改良品種には認められなかった。

*Glu-D1*遺伝子座では、新旧品種の間でグルテニン遺伝子頻度に顕著な差異が認められた。改良品種では *Glu-D1a* 遺伝子の頻度は55%、*Glu-D1f* 遺伝子の頻度は35%であったが、地方品種ではこれらのグルテニン遺伝子頻度はそれぞれ70%および25%であった。地方品種と比べて改良品種では *Glu-D1a* 遺伝子の頻度が低くなり、*Glu-D1f* 遺伝子頻度が高まる傾向があった。*Glu-D1e* 遺伝子は改良品種にも地方品種にも存在せず、*Glu-D1b*(農林21号、農林42号)および *Glu-D1d*(農林35号、ハルヒカリ)の両グルテニン遺伝子についても、改良品種では2品種(1.5%)にしか存在しなかった。

以上の結果から、日本コムギ品種は145kDaサブユニットを支配する *Glu-D1f* 遺伝子を特異的に高い頻度でもっており、このグルテニン遺伝子を含むきわめてユニークなグルテニン・サブユニット構成をもつことがわかった。

3) 考 察

日本の新旧コムギ品種のグルテニン・サブユニット構成の解明により、いくつかの注目すべき点が明らかとなった。最も分子量の大きい145kDaサブユニットを支配する *Glu-D1f* 遺伝子が、わが国の多数の新旧品種に含まれているが、外国品種には希にしか存在しないことから(Morgunov *et al.* 1993)、*Glu-D1f* 遺伝子は日本のコムギ品種を特徴づける重要なグルテニン・サブユニットであることがわかった(Nakamura *et al.* 1999a、Nakamura 1999b)。

このグルテニン遺伝子が日本の新旧コムギ品種に高頻度で存在する理由としては、いくつか要因が想定される。まず、いわゆる「始祖効果」があげられる。日本のコムギ品種の多く祖先がこの遺伝子を持ち、それが地方(在来)品種に引き継がれ、それらを素材として育成された改良品種に継承されたと考えられる。

次に、自然選択や人為選抜による効果もあるものと推測される。自然選択に関連しては、日本のコムギは中国よりシルクロードを経て伝来したとされるが、その間、新しい自然環境や栽培条件に適応する過程で加わった自然選択によりグルテニン・サブユニット構成が変化した可能性を考えることができる。その結果として、*Glu-1* 遺伝子座群の対立遺伝子の頻度に大きな変化をもたらしたと思われる。また、人為選抜については日本伝来以後の品種改良、とくに製めん等に関連する加工適性を高める過程で加えられた人為選抜に反応して、グルテニン・サブユニット構成が変化し、*Glu-1* 遺伝子座群のグルテニン遺伝子頻度に大きな変化が生じたと考えられる。

2 グルテニン145kDaサブユニットに関する系譜分析

本節では、日本品種を特徴づけるグルテニン145kDaサブユニットについて、寒冷地の北海道地方および温暖地の九州地方で育成され、それぞれの地方で主導品種となっているホロシリコムギとニシカゼコムギの系譜分析を行い、育成過程におけるこのサブユニットの消長を明らかにした。

1) 材料および方法

北海道および九州地方で育成された農林登録品種ホロシリコムギおよびニシカゼコムギの系譜分析により、145kDaサブユニットの消長を調べた。これらの農林登録品種の祖先品種が145kDaサブユニットを持つか否かに基づき、品種改良過程におけるこのサブユニットの選択・淘汰の状況を推察した。

2) 結 果

北海道地方の主導品種ホロシリコムギと九州地方の主導品種ニシカゼコムギの系譜を調べ、145kDaサブユニットの消長を明らかにした。図4にはニシカゼコムギ(九州育成)、図5にはホロシリコムギ(北海道育成)の系譜を示した。

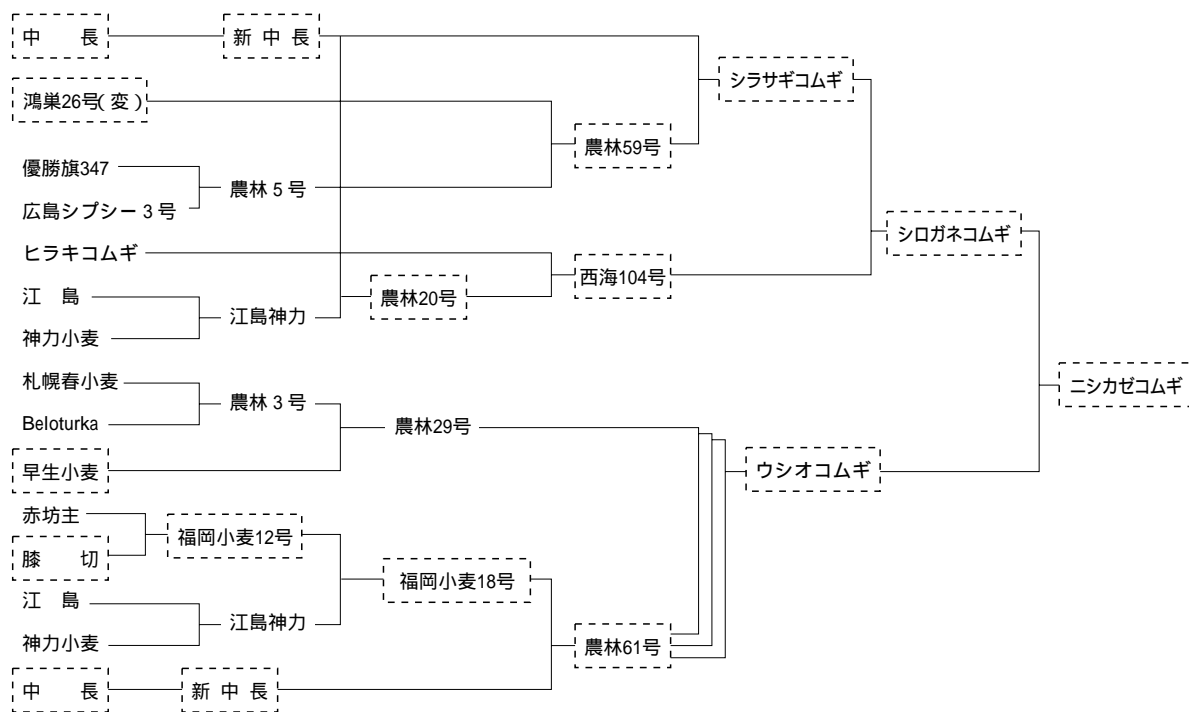


図4 ニシカゼコムギの系譜

注) 点線枠で囲った品種は145kDaサブユニット保有

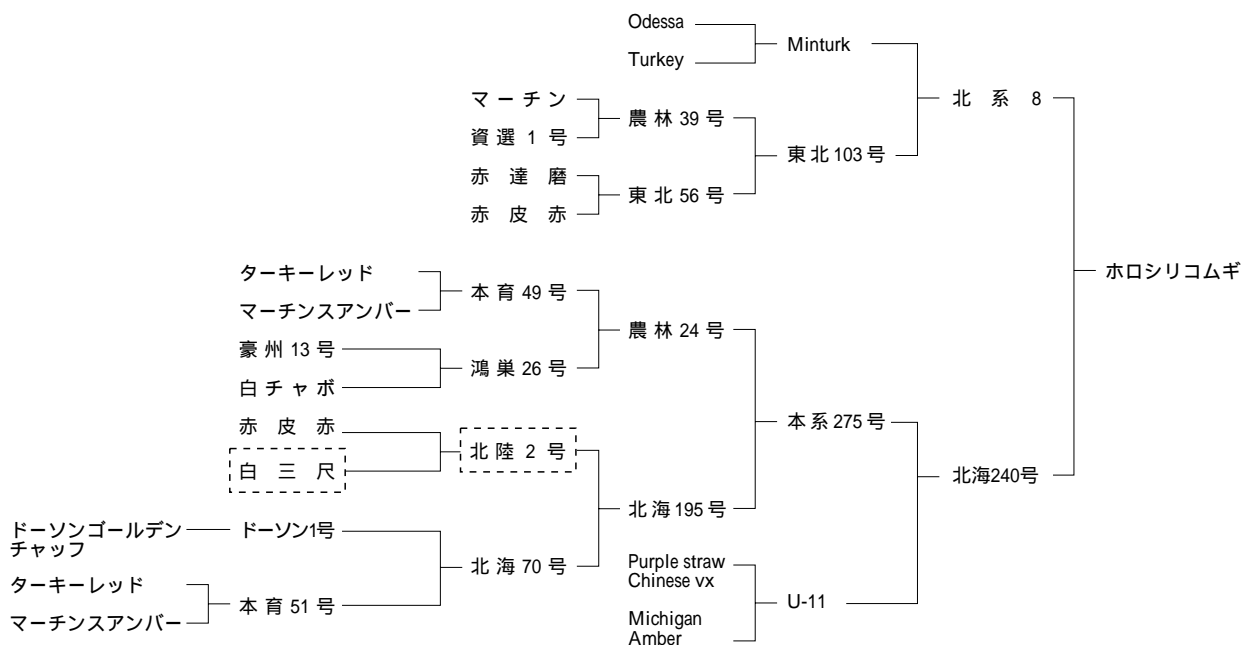


図5 ホロシリコムギの系譜

注) 点線枠で囲った品種は145kDaサブユニット保有

九州で育成され、この地方の主導品種であるニシカゼコムギの系譜をみると、グルテニン・サブユニット構成が明らかな祖先品種の間の交配組合せは16組あった。それらの組合せの系譜をみると、3世代前までのすべての祖先が *Glu-D1f* 遺伝子を保持し、7～8世代遡った祖先の地方品種中長、膝切、早生小麦などにもこのグルテニン遺伝子が存在し、系譜上頻繁にみられた。

グルテニン145kDaサブユニットを支配する *Glu-D1f* 遺伝子をもつ品種ともたない品種の間の交配組合せは7組ある。これらの組合せの中から、*Glu-D1f* 遺伝子をもつ品種が育成された組合せは6組であった。*Glu-D1f* 遺伝子をもつ系統が選抜されなかったケースとして農林29号があった。農林29号は、早生小麦 (*Glu-D1f* 遺伝子有) × 農林3号 (*Glu-D1f* 遺伝子無、北海道育成) の組合せから北海道で選抜・育成された経緯から判断して、選抜課程でこのグルテニン遺伝子が淘汰されたものと推測された。

北海道で育成された主導品種ホロシリコムギの系譜では、145kDaサブユニットを発現する *Glu-D1f* 遺伝子の有無に関して異なる交配親の組合せは2例あった。それらの系譜をみると6世代前の祖先である地方品種白三尺にのみ、*Glu-D1f* 遺伝子が存在した。北海道外で育成された北陸2号には、*Glu-D1f* 遺伝子が受け継がれ、農林登録品種となった。しかし、北海道で選抜された系統北海195号 { 北陸2号 (*Glu-D1f* 遺伝子有) × 北海70号 (*Glu-D1f* 遺伝子無) } には、このグルテニン遺伝子は存在しなかった。

これらのことから、九州などの西南暖地の育種では、145kDaサブユニットの発現に關与する *Glu-D1f* 遺伝子が選抜される傾向があるとみられたが、北海道などの寒冷地の育種では、このグルテニン遺伝子が逆に淘汰される傾向があるとみられた。

3) 考 察

北海道と九州で育成された主導品種ホロシリコムギおよびニシカゼコムギの系譜分析により、グルテニン145kDaサブユニットを支配す

る *Glu-D1f* 遺伝子がどう受け継がれているかを詳細に調査した。その結果、北海道のホロシリコムギでは、6世代前の祖先にあたる地方品種白三尺に145kDaサブユニットが含まれるに過ぎず、系譜上のほかの品種や系統には、このサブユニットをもつものは認められなかった (Nakamura 2000c)。

一方、このサブユニットをもつ九州品種ニシカゼコムギに関しては、3世代前までの祖先のすべてがこのサブユニットを有し、7～8世代遡った祖先にあたる中長、膝切、早生小麦などの地方品種も145kDaサブユニットをもち、これらの改良品種の育成過程では、145kDaサブユニットの発現に關与する *Glu-D1f* 遺伝子が有利に選抜されたと考えられる。

日本のコムギの改良において、とくに九州をはじめとする西南暖地の改良過程で、グルテニン145kDaサブユニットの発現に關与する遺伝子 *Glu-D1f* に有利に作用した選抜圧が何によるかは必ずしも定かではない。しかし、南北日本の代表品種の系譜分析にみられた非常に対照的な *Glu-D1f* 遺伝子の消長から、自然環境の違いによる自然選択、品種改良に伴う人為選抜、あるいは双方の影響を考察することができる。

3 要 約

わが国の改良 (農林登録) 品種131点と地方 (在来) 品種174点のグルテニン・サブユニット構成に基づき、品種改良に伴うサブユニット発現遺伝子の頻度の変化を分析した。その結果、地方品種にはある程度高い頻度でみられたグルテニン遺伝子が改良品種にはみられず、品種改良に伴い在来グルテニン遺伝子が消失し、遺伝的多様性が減少するケースが認められた。一方、わが国の多くのコムギ品種が持ち、それらを特徴づけているグルテニン145kDaサブユニットを発現する遺伝子 *Glu-D1f* の頻度は地方品種では25%であったのが、改良品種では35%に高められていた。さらに、北海道ならびに九州地方の主導品種、ホロシリコムギとニシカゼコムギの系譜上の品種や系統のグルテニン高分子量サ

ブユニット構成に基づき、145kDaサブユニットの消長を調べた結果、次のことがわかった。

- 1) 寒冷地北海道地方では、品種改良過程でこのサブユニットを支配する遺伝子*Glu-D1f*が淘汰される傾向がみられた。
- 2) 温暖地の九州地方では、地方品種が持つ145kDaサブユニットを支配する*Glu-D1f*遺伝

子が選択されて、新しい品種に引き継がれてきた。

- 3) 南北日本における*Glu-D1f*遺伝子の対照的な消長をもたらした要因は必ずしも明らかではない。しかし、異なる自然環境への適応に伴う自然選択、品種改良に伴う人為選抜、あるいは双方の影響が考えられる。

種子貯蔵タンパク質グルテニン・サブユニットの地理的変異の解析

本章では、わが国のコムギの伝来元とみられている中国の品種と日本の改良品種のグルテニン・サブユニット構成を比較し、両国品種間のサブユニット発現遺伝子の頻度の違いを明らかにした。また、前章では、わが国の新旧コムギ品種間のサブユニット発現遺伝子の頻度分析と南北日本で育成された主導品種の系譜分析に基づき、品種改良に伴うグルテニン遺伝子頻度の変化を明らかにできた。そこで本章では、地域ごとに育成された改良（農林登録）品種のグルテニン・サブユニット構成の違い、とくに日本品種を特徴づけている145kDaサブユニットの存否を調査し、グルテニン・サブユニット構成を支配している遺伝子頻度の地理的変異を解析した。

1 日中コムギ品種におけるグルテニン遺伝子の頻度分析

わが国へのコムギの伝来に深い関わりをもつと推測される中国のコムギ品種と日本の改良品種のグルテニン・サブユニット構成に基づき、両国コムギ品種のグルテニン関連遺伝子の頻度分析を行った。その結果から、日本のコムギ品種の特徴を明らかにし、その遺伝的基盤の狭隘化をもたらした要因について考察した。

1) 材料および方法

農林水産省ジーンバンクに保存されていた中国コムギ品種274点（付表4参照）と日本の改

良（農林登録）品種131点（農林1号～131号）を、農林水産省農業研究センター（当時）観音台畑圃場（茨城県つくば市）で、1988～1990年（日本改良品種）・1990年（中国品種）に栽培・増殖して実験材料とした。これらの実験材料の播種、肥培管理、収穫、脱穀調整は慣行法によって行った。耕種方法は、基肥のみで6-9-6化成肥料を用い、施肥量は7.5kg/a・8.5cm点播・畦幅80cm・畦長8mとした。得られたコムギ種子をSDS-ゲル電気泳動用の実験材料として用いた。栽培・増殖して実験材料とした。中国品種は在来品種が主で、育成品種も含まれているが最近20年以内の新しい育成品種はない。地域は、黒竜江・吉林・遼寧・内蒙古自治区・河北・北京・山東・天津・江蘇・華中・河南・杭州・南京・山西・陝西・華南・四川・チベット自治区・新疆ウイグル自治区等の中国の各地域の在来品種もしくは試験場等の育成品種であり、特定の地域に偏ったものではない。

SDS-ゲル電気泳動による種子貯蔵タンパク質の抽出・分析は、前章で記述したのと同じ方法で実施した。

2) 結果

日本の改良品種と中国品種のグルテニン・サブユニット構成に基づき、両国コムギ品種のグルテニン遺伝子の頻度を比較した結果を表5に示した。*Glu-A1*遺伝子座に関しては、日中品種間に大きな頻度差は認められなかった。*Glu-A1c*遺伝子は、中国品種には80.4%、日本品種

表5 中国274品種および日本改良(農林)131品種における*Glu-1*遺伝子座における対立遺伝子頻度の比較

遺伝子座	対立遺伝子	サブユニット	中国品種	日本改良品種
<i>Glu-A1</i>	<i>a</i>	1	5.2	12.2
	<i>b</i>	2*	14.4	13.7
	<i>c</i>	Null	80.4	74.1
<i>Glu-B1</i>	<i>a</i>	7	12.3	0
	<i>b</i>	7+8	71.9	83.2
	<i>c</i>	7+9	8.1	12.9
	<i>d</i>	6+8	3.9	0.8
	<i>e</i>	20	1.4	1.5
	<i>f</i>	13+16	0.7	0
	<i>g</i>	13+19	0.4	0.8
	<i>i</i>	17+18	0.7	0.8
	<i>k</i>	22	0.7	0
	<i>Glu-D1</i>	<i>a</i>	2+12	84.6
<i>b</i>		3+12	1.1	1.5
<i>c</i>		4+12	2.1	6.9
<i>d</i>		5+10	10.5	1.5
<i>f</i>		145kDa+12	1.8	35.1

には74.1%の頻度で存在した。日中コムギ品種とも、このグルテニン遺伝子の頻度が最も高かった。*Glu-A1a*遺伝子は中国品種では5.2%と低く、*Glu-A1b*遺伝子は日中品種間に大きなグルテニン遺伝子頻度の差異は認められなかった。

*Glu-B1*遺伝子座については、若干の差異がみられた。日本の改良品種にはなく中国品種のみ存在したのは、*Glu-B1a*、*Glu-B1f*、*Glu-B1k*などの対立遺伝子であった。とくに、*Glu-B1a*遺伝子は日本の改良品種には見いだせないが、中国品種には12%以上の高い頻度で存在していた。なお、日本の地方品種には、低頻度(2%弱)で見いだされた。*Glu-B1b*遺伝子は中国品種には71.9%、日本改良品種には83.2%の高い頻度で存在した。

*Glu-D1*遺伝子座については、日中品種間に顕著な差異が認められた。日中品種とも最高頻度のグルテニン遺伝子は*Glu-D1a*遺伝子であり、日本改良品種では55%、中国品種では85%の遺伝子頻度であった。また、*Glu-D1d*遺伝子をもつ日本品種はわずか2点(1.5%)にすぎないが、29点(10.5%)もの中国品種がこのグルテニン遺伝子を保有していた。

これとは対照的に、グルテニン145kDaサブユニットを支配している*Glu-D1f*遺伝子は、日本の改良品種には35%におよぶ高頻度で存在するのに反し、このグルテニン遺伝子をもつ中国品種はわずか5点(2%)に過ぎなかった。このことは、145kDaサブユニットの発現を支配する*Glu-D1f*遺伝子が、日本コムギ品種の特徴をあらゆるグルテニン高分子量サブユニットであることを裏付けた。

3) 考 察

わが国の改良(農林登録)品種を特徴づけているグルテニン145kDaサブユニットを発現する遺伝子*Glu-D1f*は、日本のコムギ品種には35%にもおよぶ高い頻度で存在する一方で、隣国である中国のコムギ品種には、ごく低頻度でしか存在しなかった。そのほかのグルテニン・サブユニット構成を支配する遺伝子の頻度にも、明瞭な差異がみられた。日本品種には含まれていない*Glu-B1*遺伝子座の*Glu-B1a*、*Glu-B1f*、*Glu-B1k*などの対立遺伝子が中国品種には存在していた(Nakamura 2000a, Nakamura 2000b)。このことから、日本と中国のコムギ品種の間には、グルテニン・サブユニット構成、すなわちグルテニン遺伝子に関する顕著な遺伝的分化が起こっていることがわかる。

このような日中間のコムギ品種にグルテニン遺伝子の遺伝的分化が生じた原因として、まず、始祖効果が考えられる。わが国のコムギが隣国である中国から伝来したとして、最初に渡来した祖先(始祖)が持っていたグルテニン遺伝子組成が日本の地方品種や改良品種の遺伝的構成に強い影響(効果)を与えたと考えられる。しかし、日本の自然環境、とくに西南暖地の日長や気象条件に適応する過程で作用した自然選択、また、品種改良、なかんずく製めん適性などの品質改良の過程で働いた人為選抜、あるいはそれら両者が日中コムギ品種の遺伝的分化に影響した可能性も考えられる。

中近東に起源したコムギがシルクロードを経て中国から日本に伝来し、わが国の自然環境や栽培条件に適応する過程で、コムギの遺伝的多

様性が失われてきたものと推察される。その結果、145kDaサブユニットを発現する*Glu-D1f*のような特定のグルテニン遺伝子が多くの日本品種に分布するようになり、このことが日本のコムギ品種の遺伝的基盤の狭隘化をもたらしたものと推定される。

2 日本改良品種・系統におけるグルテニン遺伝子頻度の地理的変異の解析

わが国のコムギ改良（農林登録）品種を育成地別（北海道、東北、北陸・長野、関東、東海・近畿、中国、四国・九州）に分け、各品種のグルテニン・サブユニット構成を調べ、それらに基づいて育成地別品種群間の*Glu-1*遺伝子座の対立遺伝子の頻度を計算し、地域間差異を調べ、その原因について考察した。

1) 材料および方法

改良（農林登録）品種131点および北海道ならびに九州地方の育成系統40点（付表5参照）を実験材料とした。農林水産省農業研究センター（当時）観音台畑圃場（茨城県つくば市）で、1988～1990年（日本改良品種）・1991年（北海道ならびに九州地方の育成系統40点）に栽培・増殖した。これらの実験材料の播種、肥培管理、

収穫、脱穀調整は慣行法によって行った。耕種方法は、基肥のみで6-9-6化成肥料を用い、施肥量は7.5kg/a・8.5cm点播・畦幅80cm・畦長8mとした。得られたコムギ種子をSDS-ゲル電気泳動用の実験材料として用いた。

前節で行ったのと同じ方法で、SDS-ゲル電気泳動により各品種のグルテニン・サブユニット構成を調べ、それから遺伝子座ごとの対立遺伝子の頻度を算出し、対立遺伝子頻度の地域間差異を明らかにした。

2) 結果

*Glu-A1*遺伝子座では、いずれの地域で育成された品種も*Glu-A1c*遺伝子の頻度が最も高い点では共通していた。一方、はっきりとした地域間差のみられるグルテニン遺伝子もあった。たとえば、北海道の育成品種には*Glu-A1a*と*Glu-A1b*遺伝子、北陸の育成品種には*Glu-A1a*遺伝子、四国・九州の育成品種には*Glu-A1b*遺伝子の頻度が比較的高く、育成地による特徴がみられた（表6）。また、四国・九州で育成された29品種は、*Glu-A1a*遺伝子を持っていなかった。このグルテニン遺伝子は関東以西の西南暖地の育成品種には低頻度ながら存在した。*Glu-A1c*遺伝子は、東北地方で育成された品種に特異的に多く見られ、27品種中25品種（92%）がこの

表6 日本改良（農林）品種の育成地域別品種群の*Glu-1*遺伝子座における各対立遺伝子の頻度

遺伝子座	対立遺伝子	サブユニット	育成地域別品種の対立遺伝子頻度 (%)							合計の品種数および頻度	
			北海道	東 北	北 陸	関東・長野	東海・近畿	中 国	四国・九州	品種数	頻度 (%)
<i>Glu-A1</i>	<i>a</i>	1	31	4	46	10	7	14	0	16	12.2
	<i>b</i>	2*	23	4	0	10	7	7	34	18	13.7
	<i>c</i>	Null	46	92	54	80	86	79	66	97	74.1
<i>Glu-B1</i>	<i>b</i>	7+8	46	100	62	75	100	86	90	109	83.2
	<i>c</i>	7+9	23	0	38	20	0	14	10	17	12.9
		R. S.	31	0	0	5	0	0	0	5	3.9
<i>Glu-D1</i>	<i>a</i>	2+12	54	92	47	55	20	64	38	72	55.0
	<i>b</i>	3+12	0	0	0	5	0	7	0	2	1.5
	<i>c</i>	4+12	23	4	38	0	0	0	0	9	6.9
	<i>d</i>	5+10	15	0	0	0	0	0	0	2	1.5
	<i>f</i>	145kDa+12	8	4	15	40	80	29	62	46	35.1
品 種 数			13	27	13	20	15	14	29	131	100.0

R. S. : 稀なサブユニット

グルテニン遺伝子を保有していた。しかし、北海道で育成された6品種(46%)、北陸・長野品種では7品種(54%)がこの遺伝子を保有し、他の地域で育成された品種ではさらに頻度が高く、日本のコムギ品種に広く分布するグルテニン遺伝子であった。

*Glu-B1*遺伝子座に関しては、いずれの地域の品種も*Glu-B1b*遺伝子を保有するものが最も多く、北海道の品種は希少サブユニット、東北の品種は*Glu-B1b*遺伝子を比較的高頻度でもっていた。東北および東海・近畿で育成された全ての品種が、*Glu-B1b*遺伝子をもつことは特徴的である。*Glu-B1c*遺伝子は、東北および東海・近畿で育成された品種には存在せず、*Glu-B1b*遺伝子頻度100%とは逆の結果であった。*Glu-B1d*遺伝子はタクネコムギ、*Glu-B1e*遺伝子はチホクコムギと農林12号、*Glu-B1g*遺伝子はハルミノリ、*Glu-B1i*遺伝子はハルユタカのみが保有していた。農林12号のみが関東地方の品種で、他の4品種はいずれも北海道品種であった。

*Glu-D1*遺伝子座については、対立遺伝子頻度の地域間差が特に顕著であった。145kDaサブユニットを支配している*Glu-D1f*遺伝子の頻度は、北低南高の地域的傾斜がはっきりと認められた。すなわち、北海道や東北で育成された品種では、このグルテニン遺伝子を持つ品種はわずか数パーセントを占めるに過ぎない。これとは対照的に、関東以南の地域で育成された品種では、この遺伝子をもつものが数十%以上に達した。東海ならびに四国・九州地方で育成された品種では、それぞれ80%および62%と高頻度であった。

*Glu-D1d*遺伝子は、製パン向けのすぐれた物性との関連で重要視されているグルテニン遺伝子であり、北海道で育成された2品種、農林35号とハルヒカリだけが保有していた。*Glu-D1c*遺伝子は、北海道で育成された品種のうちの3品種、農林8号、ムカコムギおよびタクネコムギだけが有し、東北地方の育成品種ではナンブコムギのみ、北陸・長野地方の品種では、農林17号、農林24号、農林31号、農林38号およびコケシコムギの5品種がこのグルテニン遺伝子を

有していた。

次に、北海道ならびに九州の両地方で育成されている系統について、グルテニン・サブユニットを発現する遺伝子の頻度を比較した(表7)。*Glu-A1*遺伝子座に関しては、北海道の育成系統は*Glu-A1a*遺伝子、九州の育成系統は*Glu-A1b*遺伝子を高頻度で保有していた。*Glu-B1*遺伝子座については、北海道系統の中には*Glu-B1a*遺伝子や*Glu-B1e*遺伝子などの希少なグルテニン遺伝子をもつものがみられたが、九州系統にはみられなかった(付表5参照)。

*Glu-D1*遺伝子座では、北海道系統には*Glu-D1a*、*Glu-D1c*、*Glu-D1d*の各グルテニン遺伝子が中庸の頻度で含まれているのに対し、九州系統には*Glu-D1a*および*Glu-D1f*遺伝子しかなく、*Glu-D1c*および*Glu-D1d*遺伝子をもつ系統はなかった。とくに、145kDaサブユニットを支配する*Glu-D1f*遺伝子は、九州地方の多くの育成系統にだけ存在し、北海道の育成品種には存在しなかった(付表5参照)。

日本の改良品種や育成系統については、*Glu-1*グループの3遺伝子座の対立遺伝子の頻度に明瞭な地域間差がみられた。とくに、わが国の多くのコムギ品種が保有している*Glu-D1f*遺伝子は、北日本の寒冷地域で育成された品種や系

表7 北海道および九州地域で育成された系統における*Glu-1*遺伝子座の各対立遺伝子頻度の差異

遺伝子座	対立遺伝子	サブユニット	育成系統における各対立遺伝子の頻度 (%)	
			北海道	九州
<i>Glu-A1</i>	<i>a</i>	1	56	0
	<i>b</i>	2*	0	46
	<i>c</i>	Null	44	54
<i>Glu-B1</i>	<i>a</i>	7 (R. S.)	11	0
	<i>b</i>	7+8	63	92
	<i>c</i>	7+9	19	8
	<i>e</i>	20 (R. S.)	7	0
<i>Glu-D1</i>	<i>a</i>	2+12	41	46
	<i>c</i>	4+12	37	0
	<i>d</i>	5+10	22	0
	<i>f</i>	145kDa+12	0	54
育成系統数			27	13

R. S. : 稀なサブユニット

統にはほとんどみられず、西南日本の温暖地域で育成された品種や系統に高い頻度で存在することがわかった。

3) 考 察

わが国の改良（農林登録）品種と北海道と九州で育成中の系統を育成地域ごとに分け、育成地域の品種や系統のグルテニン・サブユニット構成を解析した。その結果に基づき、3種の同祖染色体に座乗する遺伝子座の対立遺伝子の頻度を算出したところ、顕著な地理的変異が認められた（Nakamura 2000d）。この日本のコムギ品種のグルテニン・サブユニット構成、すなわち、それぞれのサブユニットの発現を支配する遺伝子頻度に見られる顕著な地域間差異をもたらした要因として、始祖効果、自然選択および人為選抜などが考えられた。

(1) 始祖効果

前節の日中コムギ品種間のグルテニン・サブユニット構成の比較・分析からも明らかのように、わが国に最初に伝来したコムギ品種のグルテニン遺伝子構成が地方（在来）品種に強く反映し、さらに、それらを育種素材として育成された改良（農林登録）品種にも引き継がれていると考えられる。また、地域ごとの育種目標に即した特性を備えた外国品種などを母材として改良を進めた結果、その遺伝的影響が改良品種に現れたことも考えられる。

たとえば、北海道地方で育成された農林35号とハルヒカリだけが製パン上の好ましい物性に関わるグルテニンの対立遺伝子 *Glu-D1d* をもち、この地方で製パン適性の優れた外国品種を育種素材とした名残とみることができる。また、北陸地方育成の農林17号、農林31号、農林38号、コケシコムギの4品種のみがユニークなグルテニン遺伝子構成（*Glu-Ala* 遺伝子、*Glu-B1c* 遺伝子、*Glu-D1c* 遺伝子の特異的に保有）をもち、北陸地方以外のほか地域で育成された品種には認められず、きわめて地域特異的なグルテニン・サブユニット構成であった。そこで、これら4品種の系譜を調査したところ、豪州13号、Martins Amber、Turkey Red、Turkey Red およ

びVelvet等の外国品種が多く使われており、これらの外国品種の影響が表れているものと推測された。

(2) 自然選択の影響

南北に長い日本列島はコムギの栽培に関連する気候・気象条件に大きな差異がある。とくに、気温や日長の差異や変化はコムギの生育相の転換に大きな影響をもつことがよく知られており、地域の環境条件にあった秋播性程度や早晩性をもつ品種が開発されてきた。こうした地域環境によく適応する（地域適応）品種を育成する過程で、地域適応性に関連するグルテニン遺伝子が直接選択されるか、あるいは、それと密接に連鎖するグルテニン遺伝子が有利に選択されたものと考えられる。コムギ種子タンパク質のグルテニン・サブユニット構成あるいはそれらを支配する遺伝子群の頻度の地理的変異も、地域の自然環境に適合する地域適応性の高い品種の開発過程で、直接的あるいは間接的な自然選択が働いた結果である可能性が考えられる。

(3) 人為選抜の効果

わが国で開発されるコムギ品種は、北海道を除く東北地方以南では、製めん適性のすぐれた品種の開発に育種目標の重点がおかれてきた。こうしたことが、育種素材の選定や系統選抜に大きな影響を及ぼしてきたと推察され、その効果がグルテニン・サブユニットの構成の地域間差異をもたらした可能性がある。とくに、わが国の多くのコムギ品種が保有する *Glu-D1f* 遺伝子の頻度が、北日本の品種で低く南日本で高いのは、育種の品質改良に伴う人為選抜の効果が大きいものと推測される。

3 要 約

コムギ種子貯蔵タンパク質グルテニンのサブユニット構成について、日中品種間比較ならびに日本品種の育成地間比較を行い、日本品種の遺伝的特質と関連グルテニン遺伝子の頻度の地域変異を明らかにした。その結果に基づき、グルテニン・サブユニット構成の地理的変異をもたらした要因に関し考察した。

- 1) 日本の改良品種には存在せず、中国品種に12%の頻度で存在するグルテニン遺伝子*Glu-B1a*が、日本の地方品種には低頻度(2%弱)で存在した。
- 2) *Glu-D1*遺伝子座では、日中品種間に顕著な差異があり、日本品種には希な*Glu-D1d*遺伝子は、中国品種には10.5%の頻度で含まれていた。
- 3) *Glu-D1f*遺伝子は、中国品種のわずか2%弱が持つに過ぎなかったが、日本の改良品種の35%が保有し、わが国のコムギ品種を特徴づける重要なグルテニン遺伝子であった。
- 4) 日本の改良品種のグルテニン・サブユニット構成には、育成地域別の品種群の間に顕著

- な地理的変異がみられた。特定の地域に限定的に存在し、その地域の品種を特徴づけているグルテニン遺伝子のあることがわかった。
- 5) 日本の改良品種に高頻度でみられたグルテニンの*Glu-D1f*遺伝子の頻度には地域差が顕著で、南で高く北で低い地理的傾斜が認められた。
- 6) グルテニン・サブユニット構成、すなわち、それらを支配するグルテニン遺伝子の頻度に見られた日中品種間差異ならびに国内地域間の変異をもたらした要因として、始祖効果、自然選択の影響、人為選抜の効果を想定し、それらの要因がどのようにしてグルテニン遺伝子頻度の変化をもたらしたかを考察した。

種子貯蔵タンパク質グルテニン145kDaサブユニットの遺伝変異とほかの農業形質との関連

わが国のコムギ品種には、地方(在来)改良(農林登録)を問わず、グルテニン高分子量サブユニットの一つである145kDaサブユニットを支配するグルテニン遺伝子*Glu-D1f*をもつ品種が多数あり、とくに、九州地方などの西南暖地で育成された品種に高い頻度で存在する。このグルテニン・サブユニットを支配する遺伝子がわが国のコムギ品種に高い頻度で存在し、南高北低の地理的変異を示す要因として、始祖効果のほか、栽培環境への適応に伴う自然選択の影響と品種育成、さらに品種改良での人為選抜による効果が考えられる。そこで、本章では、自然選択との関連で秋播性程度、人為選抜との関連では小麦粉の硬軟質性とグルテニン・サブユニット構成の変異との関係の解明を試みた。

1 グルテニン145kDaサブユニットと秋播性程度との関係

多くの日本品種がグルテニンの145kDaサブユニットをもち、それを支配するグルテニン遺伝子*Glu-D1f*の頻度が南高北低の地理的変異

(傾斜)を示すことから、コムギ品種の地域適応性と関連がある可能性が考えられた。南北に長い日本列島では、コムギ栽培期間の気温と日長に変化が大きく、地域適応性には秋播性程度が深く関わっているとみられる。そこで、日本の改良(農林登録)品種の秋播性程度とグルテニン145kDaサブユニットの存否との関係を調べた。

1) 材料および方法

わが国の改良(農林登録)131品種の秋播性程度を「麦類品種一覧」(1959)および「麦類の新品種」(1967, 1985)により調査し、秋播性程度の異なる ~ の7段階に群分けした。それらの群ごとに、145kDaサブユニットをもつ品種の割合を計算し、秋播性程度と145kDaサブユニットとの関連を調べた。

2) 結果

わが国のコムギ品種の秋播性程度は から の7段階に区分され、秋播性程度の低い ないし 群の品種は春播性であり、関東以西の西南

暖地の栽培に適する。秋播性程度 ないし の品種は秋播性であり、冬の気候が厳しい北海道、東北、北陸地方などの寒冷地の栽培に適する。

秋播性程度と *Glu-D1f* 遺伝子の有無との関連を調べたのが、表 8 である。秋播性程度 の品種は19点で、そのうち *Glu-D1f* 遺伝子を有するものは52.6%、秋播性程度 の品種は34点のうち67.6%、秋播性程度 の品種は11品種のうち36.4%、秋播性程度 は40品種中22.5%の品種が145kDaサブユニットを持っていた。秋播性程度 以上の品種は合わせて27点あり、そのうちこのサブユニットを持つ品種はなかった。このことから、145kDaサブユニット、すなわち *Glu-D1f* 遺伝子を持つ品種は、秋播性程度が小さく、それを持たない品種は秋播性程度が大きい傾向がみられた。

3) 考 察

コムギの秋播性は最も重要な栽培特性の一つであり、寒暖の差の大きなわが国のコムギ栽培では、地域適応性とも深く関係していることがよく知られている。秋播性程度 (~) の小さいコムギ品種は、関東以西の西南暖地のコムギ栽培に適し、早生で栽培期間が短い。秋播性程度 (~) の大きいコムギ品種は秋播性が高く、低温要求度が強く、北海道、東北、北陸等の寒冷地のコムギ栽培に適することもよく知られている。

そこで、本研究では、日本の改良品種を秋播性程度 (~) の違いにより7段階に群別し、群ごとにグルテニン145kDaサブユニットをもつ品種の割合を計算した。その結果から、秋播性程度の小さい群ほど、145kDaサブユニットを持つ品種の割合が高く、秋播性程度 以上の

群には、このサブユニットを持つ品種は見当たらなかった。換言すれば、グルテニン145kDaサブユニットをもつ品種は秋播性程度が小さく、もたない品種は秋播性程度が大きい傾向があるとみることができた。

コムギの秋播性程度は、地域適応性と深い関係があるとみられることから、秋播性程度を含め、コムギの地域適応性に関わる何らかの遺伝子と145kDaサブユニット支配の *Glu-D1f* 遺伝子との間に関連がある可能性も考えられる。しかし、両者の関係をもたらしした要因の一つとして、寒冷地と温暖地のコムギ育種における育種素材の差異に基づく単なる始祖効果にすぎないとする見解も否定できない。

2 グルテニン145kDaサブユニットと小麦粉の硬軟質性との関連

わが国のコムギでは、地方(在来)、改良(農林登録)問わず、多くの品種がグルテニン145kDaサブユニットを支配する遺伝子 *Glu-D1f* を持ち、とくに九州地方などの西南温暖地で育成された品種や系統に、このグルテニン遺伝子が高い頻度で存在する。この原因の一つとして、わが国のコムギの品種改良、とくに加工適性と関連した品質改良に伴う人為選抜の効果が考えられる。小麦粉の硬軟質性は、製パンや製めんなどに関連する加工特性の一つとして最も重要視されている。そこで、本節では、日本のコムギ改良品種の小麦粉の硬軟質性とグルテニン145kDaサブユニットとの関係を調べた。

1) 材料および方法

日本の改良(農林登録)品種131点を供試し、

表 8 日本改良(農林)131品種における145kDaサブユニットと秋播性程度との関連

秋 播 性 程 度							
145kDaを有する品種数	10	23	4	9	0	0	0
秋播性程度別の品種数	19	34	11	40	13	13	1
145kDaをもつ品種の割合(%)	52.6	67.6	36.4	22.5	0	0	0

穀実粒を手動粉碎器で粉碎し、粉碎された粒粉を100メッシュの篩にかけ、それを通過した小麦粉を少量とり、スライドガラス上で薄くのばして、顕微鏡下(倍率50倍~60倍)で観察し、小麦粉の硬軟質性を判定した。澱粉粒に透明な硝子状の硬質結晶粒子が半分以上混在するものを硬質粉とし、また、不透明で不整形の遊離澱粉が大部分を占めるものを軟質粉とし、その中間のものを準硬質粉と中間質粉とに区分した(池田 1961)。供試品種を硬質、準硬質、中間質、および軟質の4段階に群別し、各群ごとに145kDaサブユニットをもつ品種の割合を計算し、小麦粉の硬軟質性とこのグルテニン・サブユニットとの有無との関係を調べた。

2) 結果

日本のコムギ改良(農林登録)品種131点の小麦粉の硬軟質性を顕微鏡観察により判定した

結果(図6)、硬質品種14点(10.7%)、準硬質品種13点(9.9%)、中間質品種45点(34.4%)および軟質品種59点(45.0%)であった。この結果、わが国の改良品種のうち、約2割が硬質および準硬質の硬質系品種であり、中間質と軟質の軟質系品種がおよそ8割を占めた。

次に、コムギの最も重要な品質項目の一つである小麦粉の硬軟質性と、グルテニン145kDaサブユニットとの有無との関連を検討した結果、表9の通りであった。硬質および準硬質の硬質系品種27点の中には、145kDaサブユニットを保有する品種は存在しなかった。これとは対照的に、中間質および軟質の軟質系品種には、145kDaサブユニットをもつものが半数近くもあった。中間質品種45点中20品種、軟質品種59点中26品種がこのグルテニン・サブユニットを保有していた。

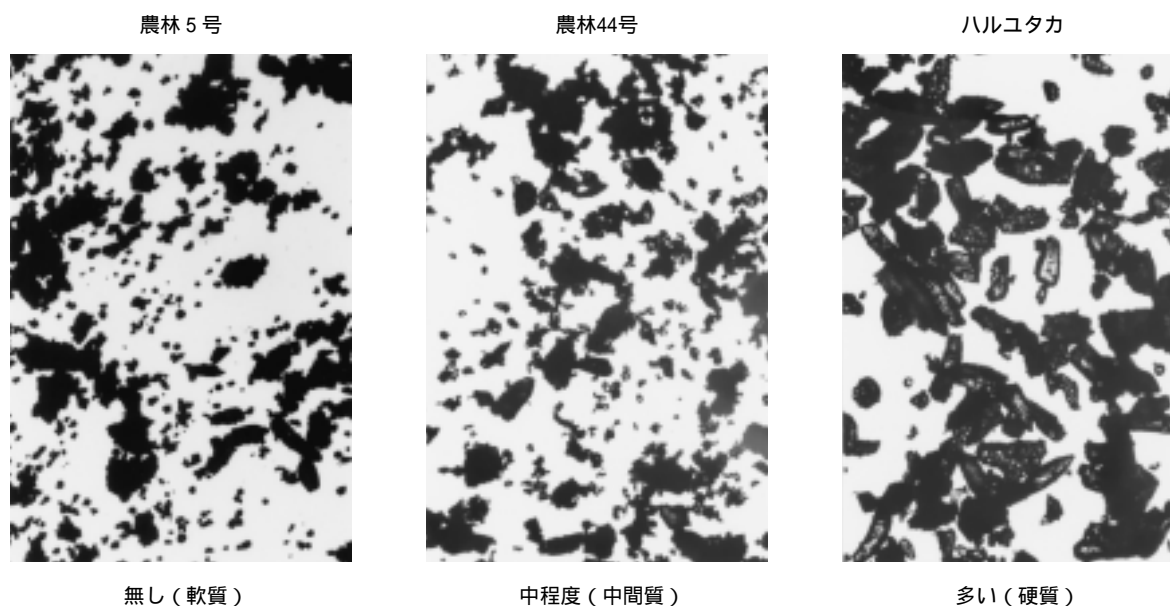


図6 顕微鏡観察における硬質結晶粒子の多少

表9 日本改良(農林)131品種における145kDaサブユニットと小麦粉の硬軟質性との関連

硬軟質性(粉)	軟質	中間質	準硬質	硬質
145kDaを有する品種数	26	20	0	0
硬軟質性別の品種数	59	45	13	14
145kDaをもつ品種の割合(%)	44.1	44.4	0	0

3) 考 察

小麦粉の硬軟質性は、製粉性や加工適性に深く関連する特性である（池田 1961）。硬質品種の方が軟質品種よりも製粉時における粉のふるい抜けが良く製粉性が向上する。また、一般に硬質系品種は製パン性にすぐれ、軟質系品種は製めん適性が高いとされている。このため、わが国においては、製めん適性の高い軟質品種が好まれ、とくに北海道以外の地域では、軟質系品種の改良にコムギ育種の重点がおかれてきた。その結果、日本の改良品種131点のうち、およそ8割の114点が軟質系品種となっている。

これらの軟質系品種の中でグルテニン145kDaサブユニットをもつ品種がほぼ半数を占めていることから、育種における製めん適性にすぐれた品質改良に伴う人為選抜が、145kDaサブユニット遺伝子である*Glu-D1f*遺伝子に有利に作用した可能性が考えられる。このグルテニン*Glu-D1f*遺伝子が、日本の硬質改良品種に存在が認められず軟質品種に高頻度で存在することから、パン用品質よりは軟質のめん用品質に関与していることが推察されるが、最近、このグルテニン遺伝子がパン物性に積極的に関与しない（negative）ことが明らかとなった（Takada *et al.* 2000）。しかし、この*Glu-D1f*遺伝子に人為選抜の効果が直接的に作用したのか、あるいは、このグルテニン遺伝子と製めん適性に関わる何らかの遺伝子との間の連鎖関係により間接的に作用したのかは定かではない。

北海道以外の地域で育成された改良品種の多くが軟質系で、その中の半数近くの品種がグルテニン145kDaサブユニットの*Glu-D1f*遺伝子を持つこと、さらに、九州地方の主導品種ニシカゼコムギの系譜において145kDaサブユニットを保有する品種や系統が高い頻度で存在することなどから判断すると、単に育種素材の違いによる始祖効果のみならず、北海道のパン用品種育成や西南暖地のめん用品種育成における製め

ん適性の向上との関連での人為選抜の効果を全面的に否定することは困難であると思われる。

3 要 約

グルテニン145kDaサブユニットを支配する遺伝子*Glu-D1f*をなぜ日本の多くのコムギ品種が持つようになったかを明らかにするため、わが国の改良（農林登録）品種の秋播性程度ならびに硬軟質性と145kDaサブユニットの有無との関係を調べた。その結果、次のことが明らかになった。

- 1) 日本のコムギ改良品種131点の秋播性程度を調べ、これらの品種を秋播性程度により、7階級に群別した。
- 2) 群ごとに、145kDaサブユニットを持つ品種の割合を計算した。その結果、秋播性程度の小さい3群に属する64品種のうち37%の品種、中庸の秋播性程度の品種の23%がこのサブユニットを持っていた。しかし、秋播性程度の大きい3群に属する27品種の中にはこのサブユニットを持つ品種は見当たらなかった。
- 3) 131点の改良品種の小麦粉の硬軟質性を調べ、硬質14品種、準硬質13品種、中間質45品種、軟質59品種であることがわかった。
- 4) 硬質系（硬質 + 準硬質）27品種の中には145kDaサブユニットを持つものはなかったが、軟質系（中間質 + 軟質）104品種では、約半数がこのサブユニットを持つことがわかった。

以上の結果から、グルテニン145kDaサブユニット、すなわち*Glu-D1f*遺伝子が日本の多くのコムギ品種に含まれている原因として、コムギ栽培特性として最も重要な秋播性程度に関する自然選択の影響、ならびに品質特性として特に重要な小麦粉の硬軟質性に関する人為選抜の効果などが考えられる。

総合考察

わが国の小麦作農業の振興と国産小麦の国際競争力の向上が急務である。そのため、国民の嗜好に合う高品質品種の開発とともに(山下1994)、国民の多様なニーズに応えてユニークな成分をもつ品種、例えばもち性コムギなどを開発し(Yamamori *et al.* 1995)、加工製品の付加価値を高めることが重要である。それには、これまでにわが国のコムギ改良に育種素材として用いられてきた地方(在来)品種や主として公的育種で開発されてきた改良(農林登録)品種の遺伝的特徴を明らかにし、それを踏まえた遺伝資源開発と育種計画が必要である。そこで、コムギの品質特性と関連の深い種子貯蔵タンパク質のグルテニン・サブユニットの構成とそれらを支配するグルテニン遺伝子の変異を解析し、日本品種の特徴を明らかにする目的で本研究を実施した。

まず、わが国の多くのコムギ品種が持つグルテニン高分子量サブユニットの生化学的特質を解明した。そのサブユニットは145(kDa)の分子量を持ち、Dゲノムの第一染色体(D1)に座乗する*Glu-D1*遺伝子座の対立遺伝子の一つである*Glu-D1f*遺伝子により発現すると推察された。次に、日本コムギの伝来元とみられる中国の品種と日本の新旧品種のグルテニン・サブユニット構成を調べ、それに基づいてグルテニン・サブユニットを支配するグルテニン遺伝子の頻度を求め、その地理的変異を解析した。その結果、中国品種より日本の地方(在来)品種、さらに地方品種より改良(農林登録)品種でグルテニン遺伝子の遺伝変異が縮小する傾向がみられた(Nakamura 2000a, 2000b, 2000c)。これらのことから、中国から日本へのコムギの伝来に伴い、さらに地方品種を母材とした改良品種の開発に伴い多数の遺伝子が失われた可能性が推測された。

一方、グルテニン145kDaサブユニットは世界的に稀なタンパク質サブユニットとみられ、中国品種にもわずか2%の低頻度で存在するに

過ぎず、この内訳は新疆ウイグル自治区在来種2点、河北1点と河南の品種2点であった。新疆ウイグル自治区はシルクロードの北ルートであり、河南地域はシルクロードの南ルートにあたる。また、新疆ウイグル自治区のコムギ遺伝資源探索収集系統(木原生研から分譲)には高頻度でこのグルテニン・サブユニットが見つかっており(中村 未発表)、これらの結果から、このサブユニットを支配する*Glu-D1f*遺伝子はシルクロードの北ルートである新疆ウイグル自治区に頻度高く存在し、この地域に我が国の始祖的な品種が多数存在したとも推察されるが、この点についてはさらに研究を進める必要性を認めた。また、わが国の地方品種では、このサブユニットを支配するグルテニン遺伝子*Glu-D1f*を持つ品種は25%、さらに改良品種では35%にも達していた(Nakamura 2000a, 2000b, 2000c)。このグルテニン遺伝子頻度の日中品種間の差異は、わが国に伝来したコムギの祖先がこのグルテニン遺伝子を持っていたことによるいわゆる「始祖効果」、また、伝来後日本の生育環境に適応することに伴う自然選択の影響によるものと考えられる。さらに、わが国の地方品種と改良品種の間のグルテニン遺伝子頻度の差異は、品種改良に伴う人為選抜の影響と考えることができる。

次に、日本の改良(農林登録)品種の145kDaサブユニットを発現する*Glu-D1f*遺伝子の頻度の地理的変異(傾斜)に関しては、地域適応性(栽培特性)との関連での秋播性程度、また品質特性との関連で小麦粉の硬軟質性との間に明らかな相関関係が認められた。この相関関係を育種母材による始祖効果だけに帰することには無理がある。南北日本の主導品種ニシカゼコムギとホロシリコムギの系譜分析などからも推察された通り、145kDaサブユニットを支配する*Glu-D1f*遺伝子頻度の変化に対する自然選択の影響や人為選抜の効果を否定することはできない。さらに、145kDaサブユニットを発

現する *Glu-D1f* 遺伝子が単一優性遺伝子であり、しかもコムギが自殖性植物であることを考えれば、育種によるグルテニン遺伝子頻度の変動を無視することはできないと考えられる。この *Glu-D1f* 遺伝子が、日本の硬質改良品種に存在が認められず軟質品種に高頻度で存在することから、パン用品質よりは軟質のめん用品質に関与していることが推察されるが(中村ら 1990) 最近、このグルテニン遺伝子がパン物性に積極的に関与しない (negative) ことが明らかとなった (Takada *et al.* 2000)。

中近東に起源したコムギがシルクロードを経て、中国から日本に伝来する過程で、その遺伝的多様性は大幅に失われたものと推測される。その上、わが国に伝来したコムギ品種は中国品種のごく一部に過ぎず、いわゆる「始祖効果」ないし「瓶首効果」により、コムギの遺伝変異は急激に減少したものとも考えることもできる。さらに、日本のコムギ品種が、地域の環境に適応する過程での自然選択や人の手による品種改良に伴う人為選抜により、さらに一部のグルテニン遺伝子が失われたと考えられる。

今回供試した中国のコムギ品種は、概して草丈が長く・晩熟で病害に弱く在来種的なものが多かったが、中には日本の早生品種並の品種や出穂後登熟が早いものもあった。粒色・粒大においても変異に富み、日本の改良品種では穂発芽との関連で白粒種は希であるが、今回供試した中国品種には白粒種も多数みられた(中村未発表)。以上のことから、我が国の関東以西の西南暖地向けの栽培適性を有するものもある

ことがわかり、グルテニン遺伝子のみならず栽培適性の上からも、日本の西南暖地におけるコムギ品種改良を進めるための育種素材として有望視された。

このように、コムギ起源中心の遺伝的多様性は、コムギがユーラシア大陸を横断して極東に達し、日本海を越えてわが国に伝来し、また、南北に長い日本列島の多様な地域環境に適応し、さらに伝統食品としてのめんなどの加工に適した品質を備えたコムギ品種を開発する過程で、大幅に失われたものと見なければならぬ。その結果、わが国のコムギ品種の遺伝的基盤はきわめて狭いものとなっていると考えられる。

今後、わが国の小麦作農業の課題は、高度化・多様化した国民のニーズに対応して、国産小麦の需要を大幅に拡大し、その国際競争力を高めることである。そのためには、高品質でユニークな成分をもつコムギ品種を開発し、その特性を活かして付加価値の高い小麦粉加工製品を作りだすことが重要と考えられる。このようなユニークな成分をもつ高品質のコムギ品種を開発するには、極端に狭まってしまったわが国のコムギの遺伝的基盤を飛躍的に拡大することが必要である。世界ではじめてわが国で開発された「もち遺伝子」(Yamamori *et al.* 1995) のような新たな遺伝資源の開発の重要性は指摘するまでもないが、改めて世界のコムギ遺伝資源を調査し、広範にパン用・めん用を問わず品質改善における有用な遺伝子源を探索・導入して、日本コムギ品種の遺伝的基盤の大幅な拡大に努める必要があると考えられる。

総合摘要

わが国のコムギ品種の遺伝的特質を明らかにし、コムギ育種で差し迫って重要となっている品質・成分の改良や新たな遺伝資源の開発に資する基礎的知見を得る目的で、本研究を実施した。わが国のコムギ改良(農林登録)品種や育成系統をはじめ、それらの母材となった地方

(在来)品種、さらに日本コムギの伝来元とみられる中国品種の種子貯蔵タンパク質・グルテニン高分子量サブユニット構成とそれらを支配するグルテニン遺伝子頻度の変異を解析し、次の事柄を明らかにした。

1) わが国の多数の改良品種や地方品種に存在

- し、それらの特徴づけている種子貯蔵タンパク質グルテニンの高分子量サブユニットの一つの生化学的特質を解明した。
- 2) そのサブユニットは、分子量145kDaのポリペプチドであり、同類のほかの高分子量サブユニットより格段に大きな分子量で、ペプチド末端の一次構造(アミノ酸配列)もほかの高分子量サブユニットと異なっていた。
 - 3) この145kDaサブユニットは、単一の優性遺伝子に支配されており、これが既存の2.2バンドのポリペプチドと同一で、Dゲノムの第一染色体(D1)に座乗する*Glu-D1*遺伝子座の対立遺伝子の一つである*Glu-D1f*遺伝子により発現すると考えられた。
 - 4) 145kDaサブユニットを支配する*Glu-D1f*遺伝子は、中国品種には2%弱しか存在しないのに、日本の地方品種には25%、改良品種には35%にもおよぶ高い頻度で存在した。
 - 5) 日本の改良品種では、北日本で育成された品種にはこの*Glu-D1f*遺伝子がほとんど見られないが、中部・南日本で育成された品種のおよそ48%が持っており、このグルテニン遺伝子頻度は、明らかな南高北低の地理的変異(傾斜)を示した。
 - 6) 北海道で育成されたホロシリコムギと九州で育成されたニシカゼコムギの系譜を調べた結果、前者では、数世代前の祖先にこの*Glu-D1f*遺伝子をもつ地方品種がわずかながらみつけたが、後者では、数世代前の地方品種のみならず、系譜上の大部分の品種・系統がこの*Glu-D1f*遺伝子を保有していた。
 - 7) 145kDaサブユニットの発現を支配する*Glu-D1f*遺伝子の有無と秋播性程度や小麦粉の硬軟質性との間には、はっきりとした相関関係が見られた。すなわち、秋播性程度が小さく

軟質性の品種に*Glu-D1f*遺伝子を持つものが多く、秋播性程度が大きく硬質性の品種には、このグルテニン遺伝子をもつものは見当たらなかった。

以上の結果から、日本のコムギ品種には、グルテニン145kDaサブユニットを発現する遺伝子*Glu-D1f*の頻度が高く、日本国内では南高北低の地理的傾斜があることが明らかになった。この原因として、限られた育種母材による始祖効果、地域適応に伴う自然選択の影響、品質改良に伴う人為選抜の効果などが考えられる。

中近東に起源したコムギがシルクロードを経てユーラシア大陸を横断し極東に達し、日本海を越えてわが国に渡来し、環境の変化に富む各地域に適応した品種を開発する過程で、コムギの遺伝的多様性が大幅に失われてきたものと推察される。本研究により、日本のコムギ品種を特徴づけるグルテニン高分子量サブユニットが存在し、それを支配するグルテニン遺伝子*Glu-D1f*の頻度が自然選択や人為選抜により変化してきたことがわかった。これらのことはいずれも、日本コムギの遺伝的基盤が狭いことを裏づけている。

今後、国民の要請に応え、国産小麦の国際競争力を高め、わが国の小麦作農業の発展を図るには、高品質でユニークな成分を持つコムギ品種の開発が急務である。それには、狭隘になり過ぎている日本コムギの遺伝的基盤を拡大する必要があり、もちコムギのような新しい遺伝資源を開発するとともに、世界のコムギ遺伝資源をさらに広範に探索・導入して、日本コムギ品種の遺伝的基盤を大幅に拡大することがとくに重要と考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、懇切なる御指導を賜り、本研究論文の校閲の労をとられた東京農業大学教授藤巻 宏博士に対し深甚なる感謝の意を表す。また、終始御指導・御鞭撻を賜った東京農業大学教授平井八十一博士、田邊猛博士、松本信二博士、元玉川大学教授故山下淳博士に対し深く謝意を表す。

さらに、本研究を実施するにあたり、御助言および御協力をいただいた農林水産省農業研究センター作物品質評価研究室（当時）、同東北

農業試験場作物開発部麦育種研究室（当時）および玉川大学育種学研究室の各位に対し、厚く感謝の意を表す。

また、供試材料を提供下さった農林水産省農業生物資源研究所ジーンバンク施設（当時）の各位、さらに、農林水産省農業研究センター観音台畑圃場管理および実験材料養成に御協力いただいた同企画調整部業務第2科（当時）の各位に対しまして、ここに記して厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Anderson, O.D., J.C. Litts, M.F. Gautier and C. Greene (1984) Nucleic acid sequence and chromosome assignment of a wheat seed storage protein gene. *Nucleic Acids Res.* 12, 8129-8144.
- Anonymous (1983) Descriptive list of varieties of cereals, Maize and Oilseeds. Alfred Stropheverlag, Government Varieties Office, Hannover, Germany.
- Bingham, J. and F.G.H. Lupton (1987) Production of new varieties: an integrated research approach to plant breeding. In *Wheat Breeding*. Ed. F.G.H. Lupton, Chapman and Hall, London, 487-537.
- Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. and Laemmli, U.K. (1977) U.K., *Journal of Biol. Chem.* 252, 1102-1106.
- Edman, P. (1949) A method for the determination of the amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* 22, 475-476.
- Edman, P. (1950) Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta. Chem. Scand.* 4, 283-293.
- Forde, B.G., A. Heyworth, J. Pywell and M. Kreis (1985a) Nucleotide sequence of a *B1* hordein gene and the identification of possible upstream regulatory elements in endosperm storage protein genes from barley, wheat and maize. *Nucleic Acids Res.* 13, 7327-7339.
- Forde, J., J.M. Malpica, N.G. Halford, P.R. Shewry, O.D. Anderson, F.C. Greene and B.J. Mifflin (1985b) The nucleotide sequence of a HMW glutenin subunit gene located on chromosome 1A of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Nucleic Acids Res.* 13, 6817-6832.
- Halford, N.G., J. Forde, O.D. Anderson, F.C. Greene and P.R. Shewry (1987) The nucleotide and deduced amino acid sequences of HMW glutenin subunit gene from chromosome 1B of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and comparison with those of genes from chromosomes 1A and 1D. *Theor. Appl. Genet.* 75, 117-126.
- Hirano, H. (1989) Microsequence analysis of winged bean seed storage proteins electroblotted from 2D-PAGE gel. *J. of Protein Chem.* 8, 115-130.
- 池田利良 (1961) 日本における硬質小麦の研究. 東海近畿農試特別報告 2, 55pp.

- Milfin, B.J. and P.R.Shewry (1979) The biology and biochemistry of cereal seed prolamins. In: Seed Protein Improvement in Cereals and Grain Legumes. IAEA, Vienna., 137-158.
- Morgunov, A.I., R.J.Pena, J.Crossa and S.Rajaram (1993) Worldwide distribution of *Glu-1* alleles in bread wheat. *J.Genet.and Breed.* 47, 53-60.
- Nakamura, H., H.Sasaki, H.Hirano and A.Yamashita (1990) A high molecular weight subunit of wheat glutenin seed storage protein correlates with its flour quality. *Japan.J.Breed.* 40, 485-494.
- Nakamura, H. (1993) Relation between seed storage proteins and Japanese noodle viscoelasticity in wheat. *Japan.J.Breed.* 43, 625-628.
- Nakamura, H., A.Inazu and H.Hirano (1999a) Allelic variation in high-molecular-weight glutenin subunit Loci *Glu-1* in Japanese common wheats. *Euphytica* 106, 131-138.
- Nakamura, H. (1999b) Identification of Alleles for Complex Gene Loci, *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* Which Code for High-Molecular-Weight Subunits of Glutenin in Japanese Hexaploid Wheat Varieties. *J.of Agric.and Food Chem.* 47 (12), 5273-5277.
- Nakamura, H. (2000a) The association between high-molecular-weight glutenin subunit compositions and bread-making quality of Chinese and Japanese hexaploid wheats. *Australian J.of Agric.Res.* 51 (3), 371-375.
- Nakamura, H. (2000b) Allelic variation at high-molecular-weight glutenin subunit Loci *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1*, in Japanese and Chinese hexaploid wheats. *Euphytica* 112, 187-193.
- Nakamura, H. (2000c) The high-molecular-weight glutenin subunit composition of Japanese hexaploid wheat landraces. *Australian J.of Agric.Res.* 51 (6), 673-677.
- Nakamura, H. (2000d) The relationship between high-molecular-weight glutenin subunit composition and the quality of Japanese hexaploid wheat lines. *J.of Agric.and Food Chem.* 48 (7), 2648-2652.
- Ng, P.K.W. and W.Bushuk (1989) Statistical relationships between high-molecular-weight subunits of glutenin and breadmaking quality of Canadian-grown wheats. *Cereal Chem.* 65, 408-413.
- 麦類品種一覽 (1959) 農林省編, 333pp.
- 麦類の新品種 (1967) 農林省編, 191pp.
- 麦類の新品種 (1985) 農林水産省編, 399pp.
- 平成11年度食料・農業・農村白書 (2000) 農林水産省編, 42-55.
- Payne, P.I., L.M.Holt, A.J.Worland and C.N.Law (1982) Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. 3. Telocentric mapping of the subunit genes on the long arms of the homoeologous group 1 chromosomes. *Theor.Appl. Genet.* 63, 129-138.
- Payne, P.I. and G.J.Lawrence (1983a) Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1*, and *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res.Commun.* 11, 29-35.
- Payne, P.I., L.M.Holt and G.J. Lawrence (1983b) Detection of a novel high molecular weight subunit of glutenin in some Japanese hexaploid wheats. *J.Cereal Sci.* 1, 3-8.
- Payne, P.I., L.M.Holt, E.A.Jackson and C.N.Law (1984) Wheat storage proteins: their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B304, 359-371.
- Payne, P.I., M.A.Nightingale, A.F.Krattiger and L.M.Holt (1987) The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *J.Sci.Food.Agric.* 40, 51-65.
- Sears, E.R. (1954) The aneuploids of common wheats. *Univ. Mo. Agric. Exp. Stn., Res. Bull.* 572, 1-59.
- Shepherd, K.W. (1996) Gluten genetics-a perspective after 30 years. *Gluten* 96, 8-13.

- Shewry, P.R. and A.S. Tatham (1990) The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem.J.* 267, 1-12.
- Sugiyama, T., A. Rafalski, D. Peterson and D. Soll (1985) A wheat HMW glutenin subunit gene reveals a highly repeated structure. *Nucleic Acids Res.* 13, 8729-8737.
- 高田宗晶 (1987) オーストラリア小麦の製めん適性と品種選定の経緯・国内産麦の用途開発と適地利用に関する調査研究報告書．日本穀物検定協会，25-52.
- Takada, K., H., Yamauchi, Z., Nishio and T. Kuwabara (2000) Effect of high molecular weight glutenin subunits on bread-making quality using near-isogenic lines. *Breed Sci.* 50, 303-308.
- 田中健次 (1978) 小麦タンパク質の性状・分離・利用．*食の科学*41，42-50.
- Thompson, R.D., D. Bartels, N.P. Harberd and R.E. Flavell (1985) Characterization of the multigene family coding for HMW glutenin subunits in wheat using cDNA clones. *Theor. Appl. Genet.* 67, 87-96.
- Worland, A.J., M.D. Gale and C.N. Law (1987) Wheat genetics. In *Wheat Breeding*. Ed. F.G.H. Lupton, Chapman and Hall, London, 129-171.
- 山下 淳 (1994) 日本の麦を考える．*全国米麦改良協会*，71pp.
- Yamamori, M. and T. Nakamura (1995) Inheritance of waxy endosperm character in a common wheat lacking three Wx proteins. *Breed. Sci.* 45, 377-379.
- 米沢大造 (1978) 小麦タンパク質の分子構造．*食の科学*41，35-45.

Characteristics of High-Molecular-Weight Glutenin Subunits in Japanese Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.)

Genetics and Potential for Improving the Grain Quality in Seed Storage Protein

Hiro NAKAMURA*

Summary

In order to increase the international competitiveness of domestically produced wheat, it is essential to improve the grain quality. It is also necessary to develop a unique product that will satisfy the demand of the Japanese consumers. To achieve this objective, the quality of grain from Japanese wheat cultivars must be characterized. The processing quality of wheat grain is strongly affected by the components of the seed storage protein, particularly high-molecular-weight (HMW) glutenin. The present study was undertaken to analyze the allelic composition of HMW glutenin in order to improve the grain quality of Japanese hexaploid wheat.

The allelic composition for the HMW glutenin subunit of 131 Japanese improved cultivars, 174 Japanese landraces and 274 Chinese landraces of wheat was investigated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), according to the procedure described by Payne *et al.* (1979). Gels consisted of 7.5% (w/v) acrylamide and of 0.2% (w/v) bis-acrylamide containing 1.5 M Tris-HCl at pH 8.8 and 0.27% SDS. The stacking gel contained 0.25 M Tris-HCl at pH 6.8. Wheat flour (10 mg) was suspended in 300 μ l 0.25 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) containing 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol and 5% (v/v) mercaptoethanol and shaken for 2h at room temperature. The suspension was heated at 95 $^{\circ}$ C for 3 min. The top portion of the supernatant was collected after centrifugation for 3 min at 15,000 rpm and 30 μ l of the extract was loaded into the gel slots. The electrode buffer consisted of 0.025 M Tris-glycine at pH 8.3, containing 0.1% (w/v) SDS. Electrophoresis was conducted at 10 mA constant current for 15 h until the bromophenol blue ran to the end of the gel. The gels were stained for several hours with Coomassie Blue R 250 in aqueous ethanol and acetic acid.

In this study, it was observed that the 145kDa HMW glutenin subunit occurred frequently among improved cultivars as well as Japanese landraces. This subunit has been characterized as the Japanese hexaploid wheat seed storage protein. The N-terminal amino acid sequence of the glutenin 145kDa subunit was determined using a gas-phase sequencer (Nakamura *et al.* 1990). Examination of the amino acid sequence and electrophoretic

mobility revealed that this subunit was identical with that of the 2.2 band reported by Payne *et al.* (1983). An investigation into crosses between variants with and without the 145kDa subunit revealed that the glutenin subunit expression was controlled by a single dominant allele designated as *Glu-D1f* located on the 1D chromosome (Nakamura *et al.* 1990).

The allelic frequency of this subunit was found to be in excess of 35% among the improved Japanese cultivars but 25.3% among the Japanese landraces, while it occurred in only 1.8 % of the Chinese landraces. Genealogical examinations revealed that the *Glu-D1f* allele was not only present in Nisikaze-komugi prevalent in the Kyushu district (southern Japan) but also frequently appeared in its pedigree, while it was absent in Horoshiri-komugi in the Hokkaido district (northern Japan), being carried only by a few of its remote ancestors (Nakamura *et al.* 1990).

A conspicuous geographical cline has been reported in the frequency of the *Glu-D1f* allele (Nakamura *et al.* 2000a). To analyze the factors involved in the establishment of this cline, the association of the occurrence of the glutenin subunit both with the winter habit and with the hardness of flour was studied.

Wheat cultivation environments in Japan are characterized by a diversity associated with the distance of the islands spanning from north to south, the improved Japanese cultivars as well as locally grown landraces differentiated into distinct types of winter habit. A strong correlation was observed between the intensity of the winter habit and the occurrence of the *Glu-D1f* allele. The improved cultivars with a weaker winter habit tended to carry the *Glu-D1f* allele more frequently, while this allele was absent in the cultivars with a stronger winter habit.

Flour hardness of wheat grains is considered to be closely related to the grain quality. The relationship between the flour hardness and the occurrence of the *Glu-D1f* allele was therefore examined. It was found that in the soft-flour cultivars, the *Glu-D1f* allele occurred more frequently than in the hard-flour cultivars. It was suggested that the geographical clines in the frequency of the *Glu-D1f* allele observed among Japanese improved cultivars as well as landraces may be caused by natural selection for the winter habit and/or by artificial selection for flour hardness. Japanese hexaploid wheats are characterized by a high frequency of alleles at the *Glu-1* locus such as *Glu-B1g* and *Glu-D1f* (Nakamura 2000a, 2000b, 2000c). Natural and /or artificial selection is considered to have narrowed the genetic base of Japanese wheat. The frequent occurrence of the *Glu-D1f* allele supports this assumption. The unique composition of the glutenin subunits of Japanese wheat grains is of considerable interest to both the Japanese wheat breeders and cereal chemists.

Cultivated hexaploid wheat is considered to have originated in the Middle and Near East and to have been transported via the Silk Road through China to the Far East and to Japan. In the course of this long journey and adaptation to diverse local environments, Japanese hexaploid wheat seems to have lost its genetic diversity. As a consequence of its spread, adaptation and phenotypic refinement, Japanese wheat has acquired the unique composition of glutenin subunits and a narrow genetic base. To further improve grain

quality and/or develop unique grains of hexaploid wheat in Japan, the genetic base of domestic wheat should be widened by inducing new and useful mutations like glutinousness or by introducing more actively exotic genetic resources.

付表1 日本改良（農林登録）品種におけるグルテニン高分子量サブユニット構成一覧

グルテニン対立遺伝子 <i>Glu-A1</i> <i>Glu-B1</i> <i>Glu-D1</i>			品 種 名
<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	シラネコムギ（農林131）
<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	農林21，農林42
<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	農林8，農林24，ナンブコムギ（農林82），ムカコムギ（農林108）
<i>a</i>	<i>b</i>	<i>f</i>	農林41，農林59，ジュンレイコムギ（農林96）
<i>a</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	農林17，農林31，農林38，コケシコムギ（農林89）
<i>a</i>	<i>d</i>	<i>c</i>	タクネコムギ（農林115）
<i>a</i>	<i>i</i>	<i>a</i>	ハルユタカ（農林130）
<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	エビスコムギ（農林87），サキウコムギ（農林91），ヒヨクコムギ（農林107），トヨホコムギ（農林119）
<i>b</i>	<i>b</i>	<i>f</i>	農林60，農林61，農林62，ユタカコムギ（農林92），ダンチコムギ（農林93），ハヤトコムギ（農林99），ニチリンコムギ（農林103），ウシオコムギ（農林105），コブシコムギ（農林110），サキガケコムギ（農林112），アサカゼコムギ（農林123），フクホコムギ（農林124）
<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	農林35
<i>b</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	ハルミノリ（農林111）
<i>c</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	農林1，農林2，農林3，農林4，農林5，農林6，農林7，農林9，農林10，農林13，農林14，農林18，農林25，農林27，農林29，農林32，農林33，農林34，農林36，農林37，農林39，農林40，農林44，農林45，農林46，農林47，農林48，農林51，農林52，農林55，農林56，農林58，農林66，農林67，農林68，農林70，農林71，農林73，農林74，スソノコムギ（農林77），イヨコムギ（農林79），ムツペンケイ（農林78），ハタマサリ（農林80），アオバコムギ（農林81），ヒカリコムギ（農林85），ミョウコウコムギ（農林86），ヒツミコムギ（農林88），オクコムギ（農林90），フルツマサリ（農林94），キタカミコムギ（農林97），ミクニコムギ（農林100），シモフサコムギ（農林101），ミヤギノコムギ（農林102），ゼンコウジコムギ（農林109），ハチマンコムギ（農林113），ハナガサコムギ（農林116），ゴガツコムギ（農林118），ワカマツコムギ（農林127）
<i>c</i>	<i>b</i>	<i>d</i>	ハルヒカリ（農林104）
<i>c</i>	<i>b</i>	<i>f</i>	農林15，農林19，農林20，農林22，農林23，農林26，農林28，農林30，農林43，農林49，農林50，農林53，農林54，農林57，農林63，農林64，農林65，農林72，シラサギコムギ（農林95），オマセコムギ（農林106），シロガネコムギ（農林117），セトコムギ（農林120），シロワセコムギ（農林122），ニシカゼコムギ（農林129）
<i>c</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	農林16，農林75，アカツキコムギ（農林83），ユキチャボ（農林84），ホロシリコムギ（農林114）
<i>c</i>	<i>c</i>	<i>f</i>	農林11，農林69，ユウヤケコムギ（農林76），フジミコムギ（農林98），チクシコムギ（農林121），ミナミノコムギ（農林125），フクワセコムギ（農林128）
<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	農林12，チホクコムギ（農林126）

付表2 HMWグルテニン・サブユニットを分析した日本地方(在来)174点の品種名リスト一覧

Aburakomugi	Bunshiho 1	Hayabozu	Kobouzu	Rokugo
Aichikomugi 2	Bunshiho 2	Hayakomugi	Kunimitsu	Sababozu
Aichikomugi 4	Bunshiho 3	Hayakomugi 2	Kokubunbouzu	Saigokuhozoroi
Aichikomugi 5	Bunshiho 4	Hayakomugi 2 (nagasaki)	Komugikangoro	Saigokuhozoroi 1
Aizukomugi	Bunshiho 5	Hayamehaikara	Komugishin 1	Sakigake 1
Aka	Chufu	Hidawase 1	Kochimurasan	Sakobore
Akakawa	Daruma	Hidawase 1 (hen)	Kumamotokomugi	Sakobore 96
Akamugi	Ejima	Higo 1	Kyotoakakomugi	Satuki
Akanankin	Ejimatinko 1	Himekei 2008	Maruhokomugi	Sekitori 1
Aka 431	Fukukei 4	Hirakikomugi	Mishima	Senshutuware
Aka 441	Fukukei 12	Hiroshimashipushi	Mubotinko	Shinchunaga
Akaboro 1	Fukuraku	Honaga	Murasakiaka	Shibushirazu
Akaboshi	Fukushimajyun 15	Hosogara	Nagahokomugi	Shigawasekomugi 8
Akabozu	Furutukomugi (Tohoku)	Homan	Nagasakikomugi	Shinrikikomugi
Akabozu 1	Fuyuka	Homan (kochi)	Nakaaizu	Shirasaya
Akabozuko 34	Fuyushiro	Hozanshu	Nakaaizukinai 5	Shirasaya 1
Akabungo	Fukoku	Hozoroi	Narasanjyaku	Shirasaya 2
Akadaruma	Fukokuhen	Hozoroisaki 1	Nishimura	Shiroboro 2
Akadaruma 7	Fuyokuibaraki 1	Iwasekomugi	Nittawase	Shiroboro 21
Akadarumasaki 1	Fukuokakomugi 18	Ikumamotokomugi	Nobeokabozukomugi	Shirobozu
Akashode	Gifukomugi 3	Itishiro	Nyubai	Shirobozu 1
Akakarashi	Gifukomugi 26	Igatikugo	Nyubai 1	Shirobozu 2
Akakawaaka 1	Gokuwase 2	Igatikugo 1	Nyubai 2	Shirobozu 3
Akakomugi	Hokuei	Igatikugo 2	Ojimawase	Shirohada
Akatake 1	Higashinishiki	Igatikugo 3	Ojimawasesaki 1	Shirohada 2
Akakanibaraki 1	Hagawa	Inayamakomugi	Okinawazairaimubo	Shirokawashiro
Akagegunbai	Hikan	Ishikawawasekomugi	Okinawazairaiyubo	Shiroshinraku
Amayoke	Hatioji	Ishiwari	Onibozu	Shiromansakuakomugi 3
Asahi	Haruhime	Itokomugi	Ohie	Shirosanjyaku
Akagegunbai 22	Hashirikomugi	Jyujyokomugi	Ohishi	Shirodaruma
Asozairai (yubo)	Hashirikomugi 2	Kagawawasekomugi	Ohitatikuma	Shirochabo
Asozairai 1	Hatadakomugi	Kagoshima	Ohitaigatikugo	Tinko 1
Asozairai 2	Hatadakomugi 2	Kairiyotikuzen	Ohitakomugi	Tinko 2
Asozairai	Hatuhokomugi	Kairyowasekomugi	Ohitakomugi 1	Tinko 3
Bankyo 1		Koborehakoku	Ohkubo	Shode

付表3 日本地方(在来)品種における*Glu-B1*遺伝子座に座乗する稀なグルテニン高分子量サブユニットとそれを有する品種名

グルテニン対立遺伝子	品 種 名
<i>Glu-B1a</i>	赤441, 赤小麦, 大石
<i>Glu-B1c</i>	箕川, 白肌第2号
<i>Glu-B1d</i>	穂長
<i>Glu-B1e</i>	冬白
<i>Glu-B1i</i>	極早生2号

付表4 HMWグルテニンサブユニットを分析した中国品種274点のリスト一覧

1885 (Beijing)	Dongnong 55-823	Jiebozbaimai	Nongda 155	Tsehsien 2
54	Doude 1	Jiebozshaomai	Nongda 183	Tsinan 2
665-7-3	Eizhou	Jinan 9	Nongda 498	Tsinan 4
7301	Etian	Jinchun 279	Nongyi 139	Tsinan 5
Aidou 3	Eyu 2	Jinchun 310	Nongda 139	Tsinan 6
Aifeng 3	Fengchan 3	Jinda 2905	Oropenwhite	Tsinan 9
Aifeng 4	Fengchan 3-2	Jinda 4197	P 101	Wangxi 6
Ailimai	Fengfugiang 2	Jing 1-38(spring-brown)	P 108	Weidibaimai
Aisuizaoshaomai	Fubei	Jing 1-38(spring-white)	P 108-1	Wenshanfufong
Bai (S)	Ganmai 1	Jing 19	Pimai 1	Xianganshaomai
Baida	Ganmai 8	Jinghong 1-38	Pimai 4	Xianganshaomai 1
Baihou	Gaomibaimai	Jinghong 3 (spring)	Pingyuan 50	Xianganshaomai 1(brown)
Baihuomai	Gaoyou	Jinghong 5	Pingyuan 50-1	Xianganshaomai 2(white)
Baimangcao	Guangxingmai	Jinghong 5 (spring)	Pingyuan 50-2	Xianmai 3
Bainaobaikai	Haomaishaomai	Jinghong 6 (spring)	Pudong	Xibei 501
Baiqiaochunmai	Hekima 1	Jinghong 9	Pukou	Xinmai
Baixing (spring)	Hekima 4	Jingsheng 19	Qianchun	Xinshi
Baiyupi	Heshangchon (C52)	Jinnai landrace 2	Qianchun 5	Xinshishaomai
Baizi	Hong (S)	Jinnan 2	Qiantao landrace 2-2	Xinshuguang 1
Bakefuke (W)	Hongchunmai	Jinnan 4	Qiantao landrace-2	Xinshuguang 2
Bakefuke (winter)	Hongguang	Jinnan 5	Qiaodou 1 (C48)	Xinshuguang 3
Beijing 11	Honghao 4	Jinnan 6	Qingchun 5	Xinshuguang 4
Beijing 15	Hongheshangmao	Jinnan 7	Qingyu	Xinshuguang 5
Beijing 16	Honghuamai	Jinnan 8	Quanzho	Xuehou 14
Beijing 2	Honghuomai	Jinnaoliangliang	Raochunmai	Xuzhou
Beijing 3	Hongmai	Jinshi	Rashinpaipi	Xuzhou 2
Beijing 5	Hongqiaodongmai	Jinzhengbaimai	Ryochun 6	Xuzhou 4
Beijing 6	Hongqiaomai	Kaixin 124	Ryochun 8	Xuzhou 14
Beijing 8	Hongwangzha	Kaoxianhong	Sanyuehuang 1	Yang 302 (1)
Beijing 9	Hongxing (spring)	Kehan 8 (C51)	Sanyuehuang 2	Yang 302 (2)
Beijing landrace (W)	Hsinmai 2	Kuwabao 328	Sanyuehuang 3	Yangnon 78
Beijing 10	Hsinmai 4	Lichengdaibao	Sanyuehuangse	Yannongyoumang 685
Beijingbai	Huamai	Linying 3	Shannong 205	Yishao
Beishan	Huang (Fupei)	Liuhe	Shaobaomai	Youmai 9
Beishanbao	Huanghai 26	Longchun 1	Shaoryan 4	Youmangbaikai
Biansui	Huanghai 103	Longchun 5	Shaowangmai	Youmangshaobaomai
Binong 6	Huanghai 121	Longchun 7	Shaoyan 4	Youzimai
Caizihuang	Huanghai 124	Machamai	Shaoyan 5	Yuanbaiqiaomai
Caizihuang 1	Huanghai 131	Manzhou 2	Shijiaeren 407	Yuapo (S)
Caizihuang 2	Huanghai 180	Maohuomai	Shijiaeren landrace (W)	Zaoshaomai
Changshan 2	Huanghai 197	Meimangbaimai	Shite 14	Zaoshaomai 1
Chengduquangxing	Huangliaomaozi	Meimanghongliang	Taian	Zaoshaomai 2
Chun 3	Huangpi	Meimangliang	Taian 2	Zeshantaibai
Chun 7112	Huangpi 1	Meiyubaimai	Taian 3	Zhemai 1
Congming 169	Huangpi 2	Mingquang	Taimai	Zhemai 2
Congming 204	Huangzhou	Nangda 2419	Taimai 4	Zhenshangzaosheng
Dai 45	Huanon 1	Nangda 2419-1	Taimai 4-1	Zhong 7901
Dingningbai	Huanong 7	Nangda 2419-2	Taimai 4-2	Zhongda 2419
Dongfanghong 3	Huanong 9	Nangda 2419-3	Taimai 4-2 (brown)	Zhongnong 28
Dongfonghong	Hungtongmai	Nanjing	Taimai 4-3	Zhongzhi 1
Donghonglong	Huoshaotian 2	Nanjingdawanghua (W)	Taishan 4	Zhongzhi 2 (brown)
Donghongmai	Huoshuotian	Nong 6028	Taishan 5	Zhongzhi 3
Dongnong 55-825	Hweih sien	Nongda 16	Taishani	Zhongzhi 6
Dongnong 55-876	Jichun 279	Nongda 36	Tengfuqiang 2	Zhuyeqing
Dongnong 55-882	Jichun 310	Nongda 141	Tongzhoushaobaiyu	

付表5 日本コムギ40系統におけるHMWグルテニン・サブユニット構成と*Glu-1*スコア

小麦系統名		高分子量グルテニン・サブユニット構成			<i>Glu-1</i> スコア	育成地域
本育	37	Null	7+9	2+12	5	北海道
本育	50	1	7+8	4+12	7	北海道
本育	51	Null	7+8	2+12	6	北海道
本育	52	1	7+8	5+10	10	北海道
本育	53	1	7+8	4+12	7	北海道
本育	54	1	7+8	4+12	7	北海道
本育	68	1	7+8	4+12	7	北海道
本育	133	1	7+8	4+12	7	北海道
北海	44	1	7	5+10	8	北海道
北海	61	1	7	5+10	8	北海道
北海	62	1	7+8	5+10	10	北海道
北海	63	Null	7+9	2+12	5	北海道
北海	64	1	7	5+10	8	北海道
北海	65	Null	7+9	2+12	5	北海道
北海	106	Null	7+8	2+12	6	北海道
北海	115	1	7+8	5+10	10	北海道
北海	116	Null	7+9	2+12	5	北海道
北海	138	1	7+9	2+12	7	北海道
北海	153	Null	7+8	4+12	5	北海道
北海	165	Null	7+8	2+12	6	北海道
北海	180	1	7+8	4+12	7	北海道
北海	183	Null	7+8	4+12	5	北海道
北海	195	Null	7+8	2+12	6	北海道
北海	240	Null	20	2+12	4	北海道
北見	17	1	7+8	4+12	7	北海道
北見	18	1	7+8	4+12	7	北海道
北見	22	Null	20	2+12	4	北海道
伊賀筑後	1	Null	7+8	2+12	6	九州
伊賀筑後	2	Null	7+8	2+12	6	九州
伊賀筑後	3	Null	7+8	2+12	6	九州
南九州	62	2*	7+8	2+12	8	九州
西海	95	2*	7+8	2+12	8	九州
西海	98	Null	7+8	145kDa+12	5	九州
西海	104	Null	7+8	145kDa+12	5	九州
西海	113	2*	7+8	145kDa+12	7	九州
西海	149	2*	7+8	145kDa+12	7	九州
西海	150	2*	7+8	145kDa+12	7	九州
西海	151	Null	7+9	2+12	5	九州
西海	152	2*	7+8	145kDa+12	7	九州
西海	153	Null	7+8	145kDa+12	5	九州

Breeding of "Wheat Norin-PL 8 (Tanikei A6599-4)", a waxy wheat line with starch showing a stable hot paste viscosity.

Chikako KIRIBUCHI-OTOBE, Takashi YANAGISAWA, Hisashi YOSHIDA^{*1}, Isao YAMAGUCHI^{*2},
Hidefumi SEKO^{*3}, Tomohiko USHIYAMA^{*4} and Yoichi AMANO^{*5}

Summary

Mutant wheat Norin PL-8 (Tanikei A6599-4) was induced from low-amylose wheat Tanikei A6099 by sodium azide treatment. The line contained 1.6% amylose and was considered to be a waxy mutant. Analysis of the amylose content of F₁ seeds revealed the incomplete dominance and gene dosage effect of the *Wx-D1* alleles. Norin-PL 8 exhibited a unique pasting curve with stable hot paste viscosity in the Rapid ViscoAnalyser (RVA) measurement. Genetic analysis suggested that both the waxy character and the stable hot paste viscosity of Tanikei A6599-4 were controlled by the same mutated *Wx-D1* gene. Although Norin-PL 8 showed a high yielding ability, the line could not be registered as a new variety because of the small grain size, low milling yield and poor flour colour. Therefore the line was officially registered as a parental line by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries in 2001.

Received 25 October, 2001

^{*1}National Institute of Agrobiological Sciences

^{*2}Japan Seed Trade Association

^{*3}Japan International Cooperation Agency

^{*4}Nagano Agricultural Experiment Station

^{*5}Hokkaido Prefectural Tokachi Agricultural Experiment Station