

澱粉粘度安定性に優れるもち性小麦の突然変異に関わる遺伝子の 変異特定と機能解明ならびに遺伝子マーカーの開発

柳沢貴司*

抄 録

もち性突然変異系統谷系A6599-4 (小麦中間母本農8号) とその原系統谷系6099 (小麦中間母本農7号) のWx-D1タンパク質 (GBSSI) をSDS-PAGE、ペプチドマッピングで解析し、それを基に遺伝子配列を決定した。成熟タンパク質のN末端から258番目のアミノ酸残基は原系統がアラニンなのに対して変異系統ではスレオニンに変化していた。倍加半数体系統やF₅系統を用いてこの1塩基置換を検出するdCAPSマーカーを作製した。このマーカーで野生型、変異型、ヘテロを検出することが可能であり、変異型を示した後代系統はすべてもち性の個体であった。これらの結果により1塩基置換がもち性の原因であることが明らかとなった。このdCAPSマーカーはこの変異型アレルを選抜するのに有効である。

この変異系統を畑および温室 (15°Cおよび20°C) で栽培して比較したところ、温室で栽培すると、見かけのアミロース含量が上昇した。Wx-D1タンパク質の発現量の増加が見られたことからWx-D1遺伝子がこのことに関わっていることが示唆された。またRVA (ラピッドビスコアアナライザー) による粘度特性では最高粘度に達する時間が遅くなり、最高粘度を保持する時間が短くなるという特徴が見られた。また倍加半数体を用いた解析によりこの特性が遺伝することを示した。

キーワード: 小麦、もち性、点突然変異、dCAPSマーカー、アミロース含量、低温での成熟、澱粉粘度特性、ラピッドビスコアアナライザー

Abstract

The Wx-D1 protein (granule-bound starch synthase) of Tanikei A6599-4 was analyzed by SDS-PAGE, peptide mapping, and DNA sequencing. Amino acid substitution (alanine substituted for threonine) caused by single nucleotide polymorphism (SNP) in the *Wx-D1* gene occurs at position 258 in the the mature protein in Tanikei A6599-4. We developed a PCR-based (dCAPS) marker to detect and select this SNP. All progeny lines having SNP of the mutant allele were waxy. Taken together, results for dCAPS analysis, immunoblot analysis, and assays of starch synthase activity of granule-bound proteins indicate that SNP in the *Wx-D1* gene is responsible for its waxy character. This mutant wheat line was grown in a field and in a greenhouse (at 15°C) to compare the apparent amylose content and starch pasting properties. The apparent amylose content of flour and starch increased and starch pasting parameters (RVA) (measured using a Rapid Visco-Analyzer (RVA)) changed during seed maturation in Tanikei A6599-4 grown in the greenhouse due to the cool growth temperature.

Key Words: wheat, waxy, single nucleotide polymorphism, dCAPS marker, amylose content, cool growth temperature, starch pasting property, Rapid Visco Analyzer

はじめに

穀物種子の胚乳澱粉はアミロースとアミロペクチンから構成され、アミロースを欠くか、量が著しく低減するとそれを「もち性」と称する。もち性は胚乳をヨウ素ヨードカリウム溶液で染色すると赤褐色に染色されて、青紫色で染色されるうるち性と表現型で容易に判別可能なため、穀物ではもち性に関する系統およびそれを用いた研究が盛んに行われている。

作物研究所小麦育種研究室では農業研究センター時代より麺の食感改良を育種目標として取り組む中で、もち性を含むアミロース含量の低い系統を選抜してきた。小麦系統谷系A6599-4 (小麦中間母本農8号) は谷系A6099 (小麦中間母本農7号) から突然変異で選抜されたもち性系統で、谷系A6599-4の胚乳や花粉の澱粉を

ヨウ素ヨードカリウム溶液で染色すると、アミロースフリーのもち性とは異なり、濃茶色を呈するという特徴がある (Kiribuchi-Otobe *et al.* 1998)。

アミロース合成に関与するWxタンパク質はGBSSI (granule bound starch synthase I) という酵素であり (Nelson and Rines 1962, Echt and Schwarz 1981)、Wx遺伝子がこれをコードしており、多くの作物で遺伝子配列が解析されている。小麦はA,B,Dの3ゲノムから構成される6倍体であり、Wx遺伝子を3セット (Wx-A1,B1,D1) 有し、それぞれがWx-A1,B1,D1タンパク質をコードする (Chao *et al.* 1989, Nakamura *et al.* 1993)。谷系A6599-4の原系統である谷系A6099は関東107号 (Wx-A1b,B1b,D1a) に由来する突然変異系統である。関東107号はDゲノム由来のWx-D1遺伝子のみが発現して、

3種類のW_xタンパク質のうちW_x-D1タンパク質が産出している。それが原因でW_x遺伝子が3セット発現している系統と比べるとアミロース含量が低くなっている。

したがって谷系A6599-4のもち性にはW_x-D1遺伝子に関わることが示唆され、これを解析することはアミロース合成機構を解明する手段の一つとなると考えられた。さらに遺伝子の変異が特定されれば、その塩基配列の情報を基に選抜ができる遺伝子マーカーの開発が可能と考えられた。

一方、種子が登熟する期間の低温により澱粉中のアミロース含量が変動する現象はイネ (Asaoka *et al.* 1984) やトウモロコシ (Ferguson and Zuber 1962) で観察され、アミロースを合成するW_x遺伝子の発現が温度により変動することが指摘されている。コムギでは低温での成熟によりアミロース含量が若干増加するという報告 (Tester *et al.* 1995) があるが、これらは通常のアミロース含量の系統での解析であり、その要因について言及されていない。アミロース含量が低下した系統、中でも谷系A6599-4のようにアミロース含量が極めて低下した系統では解析した例はない。また谷系A6599-4はRVA (ラピッドビスコアライザー) を用いて澱粉の粘度特性を調べるとアミロースフリーのもち性に比べて、最高粘度を保持する時間が長く、粘度安定性に優れる特性を有する (Kiribuchi-Otobe *et al.* 1998)。アミログラフで計測されたパラメータはアミロース含量と相関関係があり、麺の品質にも関わることが報告されており (Toyokawa *et al.* 1989)、低温で成熟させた系統ではRVAによる澱粉の粘度特性も解析した。

なお本総説の内容の中でW_x-D1遺伝子上の変異特定についてはYanagisawa *et al.* (2001) に報告した。この変異がもち性に関わることを示し、さらに遺伝子マーカー (dCAPSマーカー) を開発したことについてはYanagisawa *et al.* (2003) に報告した。低温で登熟した際にアミロース含量および澱粉の粘度特性が変動することについてはYanagisawa *et al.* (2004) に報告した。本総説は上記に報告した内容により詳細

な議論を付け加えた。特に育種の過程で選抜するための遺伝子マーカーについて議論を深めた。また今後の研究課題について議論した。

1 実験材料

谷系A6599-4と原系統である谷系A6099およびA6099の原系統である関東107号を用いた。W_x-D1遺伝子上で見い出したSNP (一塩基遺伝子多型) ともち性との関係を調べるために、谷系A6599-4と関東118号との交配組み合わせによる倍加半数体22系統ならびに谷系A6599-4と関東119号 (あやひかり) との交配組み合わせによる172系統 (F₅) を用いた。倍加半数体の作出はトウモロコシ花粉を用いて未成熟の胚培養を行う方法である (Inagaki *et al.* 1997)。谷系A6599-4、関東118号、関東119号ともにW_x-D1遺伝子のみ発現する。倍加半数体の系統は低温によるアミロース含量やRVA特性解析の際にも使用した。

また低温によるアミロース含量の変動の解析では谷系A6599-4の兄弟系統である谷系A6598を使用した。またW_xタンパク質を欠くアミロースフリー系統の谷系H1881 (あけぼのもち) を種々の実験のコントロールとして用いた。

2 もち性遺伝子 (W_x-D1遺伝子) 上の変異特定

アミロース合成酵素であるW_xタンパク質は澱粉に強固に結合しているため、澱粉をSDSバッファー (10% グリセリン、62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2.5% SDS および5%メルカプトエタノール) で懸濁し、沸騰して膨潤させて初めて可溶化する。このサンプルを用いてSDSポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ、図1にあるようにアミロースフリーのもち性系統谷系H1881 (あけぼのもち) がこのタンパク質を欠くのに対し、谷系A6599-4では原系統 (谷系A6099) と同様の濃度でタンパク質が発現することが明らかとなった。イネのW_xタンパク質を抗体として用いたイムノブロット解析にお

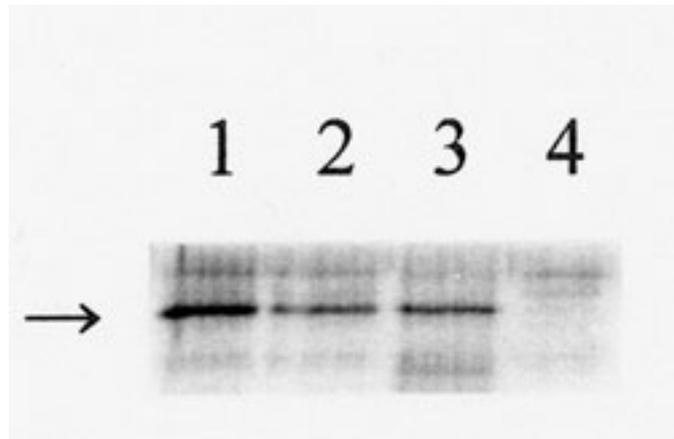


図1 Wx-D1タンパク質のSDSポリアクリルアミド電気泳動像 (デジタル写真)

レーン1, 関東107号、レーン2, 谷系A6099、レーン3, 谷系A6599-4;
レーン4, 谷系H1881. 矢印で示すのがWx-D1タンパク質である。
分離ゲル10%、銀染色 (銀染色キットII 和光純薬) を行った。

いても同様の結果を得た。谷系A6599-4および原系統谷系A6099は関東107号に由来する突然変異系統であるのでこのタンパク質がWx-D1タンパク質であることは明らかである。谷系A6599-4のアミロース含量は谷系A6099に比べて激減しており (Kiribuchi-Otobe *et al.*1997)、谷系A6599-4のWx-D1タンパク質の構造遺伝子もしくはそれを制御する遺伝子に変異があることが強く示唆された。

この研究結果を得た時点では、小麦のWx遺伝子の配列は発表されていたものの (Ainsworth *et al.* 1993)、どのゲノム由来か特定されていなかった (後になりこれはAゲノム由来と特定されたMurai *et al.* 1999a)。一方、Dゲノム由来のWxタンパク質の配列は報告があったので (Fujita *et al.* 1996)、Dゲノム特異的な配列の特定を目的としてタンパク質のN末端および内部配列のペプチドマッピングを行ったところ、原系統谷系A6099と突然変異系統谷系A6599-4との間で異なるアミノ酸残基が見いだされた (図2)。また小麦の3ゲノム間の遺伝子配列の相同性は高いと考えて、上記の遺伝子配列情報を基に、RT-PCRを行った。プライマーはペプチドマッピングで特定されたアミノ酸置換を挟む領域で

5' -ACTTCATCGACGGCTACGAC-3' と 3' -TGCAGCGCCTCCTTGTTTCAG-5' という配列を設計した。テンプレートには開花後、15日目の胚乳からBio-Mag mRNA separationキット (PerSeptive Biosystems) でpoly A+ RNAを抽出した後に、Marathon cDNAキット (Clontech Lab., Inc.) を用いてアダプターの結合したcDNAを用いた。増幅した295bpのPCR産物をTAクローニングキット (Invitrogen Corporation) でクローン化し、塩基配列を解析するとWx-D1遺伝子特異的な配列を得ることができた。これらの配列を基にしてMarathon cDNAキットのアダプタープライマーとWx-D1遺伝子特異的なプライマーを用いて5' RACE および3' RACEを実行した。これにより原系統である谷系A6099および谷系A6599-4のDゲノム由来のWx-D1遺伝子をDNAシーケンサー (Applied Biosystems 377) により塩基配列を決定した。この結果、アミノ酸置換が特定された遺伝子配列以外の変異は見られずこの遺伝子をWx-D1eと命名した。決定した塩基配列はEMBL genbank AF250137に登録している。タンパク質はAAL41028に登録している。図2に成熟タンパク質のアミノ酸配列を示す。

ATGSGGMNLV FVGAEMAPWS KTGGLGDVLG GLPPAMAANG HRVMVISPRY DQYKDAWDTS
 VVSEIKVVVDK YERVRYFHCY KRGVDRVFVD HPCFLEKVRG KTKEKIYGPD AGTDYEDNQQ
 RFSLLCQAAL EVPRILNLDN NPYFSGPYGE DVVFCVNDWH TGLLACYLKS NYQSNGIYRA
 AKVAFCIHNI SYQGRFSFDD FAQLNLPDRF KSSFDFFIDGY DKPVEGRKIN WMKAGILQAD
 KVLTVSPYYA EELISGETRG CELDNIMRLT GITGIVNGMD VSEWDPTKDK FLAVNYDITT
 ALEGKALNKE ALQAEVGLPV DRKVPLVAFI GRLEEQKQPD VMIAAIPEIL KEEDVQIVLL
 GTGKKKFERL LKSIEEKFPS KVRAVRFNA PLAHQMMAGA DVLAVTSRFE PCGLIQLQGM
 RYGTPCACAS TGGLVDTIVE GKTGFHMGR L SVDCNVVEPA DVKKVVTTLK RAVKVVGTPA
 YHEMVKNCMI QDLSWKGPAK NWEDVLLELG VEGSEPGVIG EEIAPLAMEN VAAP

図2 谷系A6599-4の成熟したWx-D1タンパク質のアミノ酸配列

アンダーラインが引かれている箇所はペプチドマッピングで解析した配列、また白抜き太字で記載したのがアミノ酸置換が見出された箇所である。原系統ではここはA（アラニン残基）である。タンパク質のN末端の解析の際には、SDSポリアクリルアミド電気泳動したゲルをPVDF膜にエレクトロブロットした後にクマシーブリリアントブルー染色して、目的のタンパク質に相当する部分を切り出して、プロテインシーケンサー（BeckmanLF3000）で解析した。内部配列の解析の際には、泳動後にクマシーブリリアントブルー染色して、目的のタンパク質に相当する部分を切り出し、このゲルをウエルに挿入し、Tris-SDS buffer（125 mM Tris-HCl（pH6.8）、0.1%SDS および5%グリセリン）で懸濁した1 μg（0.023 units）の*Staphylococcus aureus* V8 proteaseを挿入したゲルに重層して再度電気泳動した後に上記と同様にエレクトロブロットして解析した。

3 Wx-D1e遺伝子が発現するWx-D1タンパク質の機能と構造

谷系A6599-4のWx-D1タンパク質の成熟タンパク質のN末端から258番目のアミノ酸残基は原系統の谷系A6099がアラニン残基なのに対しスレオニン残基に変化することでタンパク質の

立体構造が変化をして、アミロース合成酵素としての機能がなくなるか、著しく低下することが示唆されたため、澱粉に結合しているタンパク質の澱粉合成酵素活性を測定した。その結果、原系統よりも得られた数値が低く、アミロースフリーの系統に近い値をとった（表1）。この方法は目的の酵素であるGBSSIのアミロース合

表1 成熟中の澱粉結合タンパク質の澱粉合成の酵素活性平均値±標準誤差（3回の反復による）

谷系A6099	0.0718±0.0086(nmol min ⁻¹ grain ⁻¹)
谷系A6599-4	0.0286±0.0020
谷系H1881	0.0324±0.0030

注) 開花後、15日目の未成熟種子の穂を-80℃の冷凍庫に使用するまで保存した。澱粉に結合したタンパク質の澱粉合成酵素の活性はNakamura *et al.* (1989)の方法に従った。この方法は磨砕した胚乳にADPグルコースとアミロペクチンを添加して、GBSSIの働きでADPグルコースをADPに変換し、次にADPをピルビン酸キナーゼでATPに変換し、最後にATPにNADPとグルコースを添加して、ヘキソキナーゼとグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼによる反応でNADPHに変換してNADPHの増加量を340nmの吸光度で求めるものである。

成活性を直接測定するのではなく、澱粉に結合しているすべての酵素の澱粉合成活性を測定している。コムギでは成熟中の胚乳に3つの澱粉結合型の合成酵素が同定されているので (Denyar *et al.* 1995)、GBSSI以外の澱粉合成酵素の活性の差を検出している可能性も否定できないが、以下の理由によりその可能性は極めて低く、得られた数値の差はGBSSI活性の差を反映していると考えられる。

第一に3つのW_xタンパク質をすべて欠くもちコムギを本実験とは別の手法で解析したGBSSI活性の値がW_xタンパク質を有するもち性の活性の値に比べて極めて低いこと (Nakamura *et al.* 1998)、第二に2倍体の一粒系コムギ *Triticum monococcum* でW_xタンパク質を欠くもち変異体では、GBSSI活性が得られないという報告があること (Fujita *et al.* 1998)、第三に谷系A6599-4は原系統谷系A6099からの化学変異原を用いた突然変異系統で、遺伝的な背景が同一でW_x-D1タンパク質のアミノ酸置換が起きていることである。

単子葉植物特にイネ科作物ではW_x遺伝子の塩基配列解析が進んでおり、アラインメントを

行くと、本結果で得られたアミノ酸置換の起きた箇所と相同のアミノ酸配列はアラニンで保存されている (コムギMurai *et al.* 1999a, 1999b, 野生コムギYan *et al.* 2000, イネHirano and Sano 1991, Wang *et al.* 1990, 野生イネUmeda *et al.* 1991, オオムギRohde *et al.* 1988, ソルガムHsieh *et al.* 1996, トウモロコシKlosgen *et al.* 1986, アワFukunaga *et al.* 2002)。タンパク質の1つのアミノ酸が置換するだけでその機能が劇的に変わることは普遍的な知見となっている。Web上のタンパク質の二次構造のサイト (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>) で解析したところ、W_x-D1タンパク質のヘリックス構造とコイル構造の位置が変わる可能性が示唆された (図3)。タンパク質の三次構造 (立体構造) がアミノ酸置換によりどのように変わるかという詳しい解析はX線回折を用いる等のタンパク質の立体構造の解析手法に委ねる必要がある。これについては今後の研究課題である。また酵素の活性についてもW_xタンパク質を単離してアミロース合成活性を直接測定する手法の開発が待たれる。

谷系 A6099 (*W_x-D1a*)

E E L I S G E A R G C E L R G C
H H H H C C C C C H H H H H H C

谷系 A6599-4 (*W_x-D1e*)

E E L I S G E T R G C E L R G C
H H H H H C C C C C H H H H C C

図3 W_x-D1 タンパク質の予想される二次構造 (一部)

上列: アミノ酸配列

下列: 予想される二次構造

H: ヘリックス構造 C: コイル構造

4 もち性変異の選抜のための遺伝子マーカーの開発

谷系A6599-4の*Wx-D1*遺伝子上で特定された点突然変異がもち性の原因であると断定するためには一塩基多型 (SNP) のある系統は必ずもち性であることを示す必要があり、その解析を行った。

この研究を始めた時点では小麦の*Wx*遺伝子はA,B,Dゲノム由来の3つとも発表されており (Murai *et al.* 1999a)、*Wx-D1*遺伝子特異的なプライマー設計が可能であったのでSNPの解析にPCRをベースとしたdCAPS (derived cleaved

amplified polymorphic sequence) マーカーを用いた (Michaels and Amasino 1998; Neff *et al.* 1998)。dCAPSマーカーとはSNP近傍の塩基配列に適切な制限酵素サイトがない場合に、PCRのプライマー側にテンプレートと数塩基のミスマッチが起こるように設計する。こうすることで得られた増幅産物に適切な制限酵素の切断サイトが生み出される。すなわちSNPの有無を制限酵素切断部位の有無に変えることで、この制限酵素で切断されるかどうかでSNPの有無を解析するものである。この方法を図示した (図4)。解析用のプライマーは変異型 (谷系A6599-4タイプ:*Wx-D1e*) の増幅産物をAgeIで切

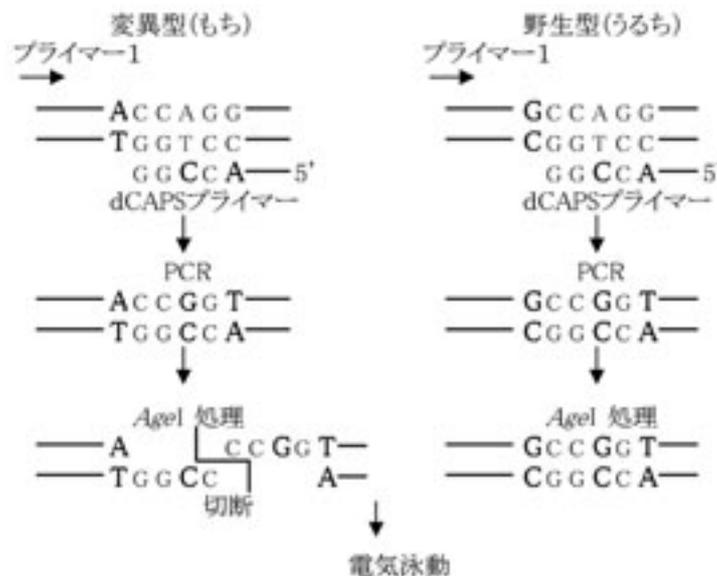


図4 dCAPSプライマーを用いてSNPを判別する方法

断するものと、野生型 (関東118号, 関東119号タイプ:*Wx-D1a*) の増幅産物をDdeIで切断する2種類を用いた。

またプライマーとテンプレートとがミスマッチを起こしている部位に制限酵素サイトが生まれるためPCR増幅産物を制限酵素処理した後で得られる野生型と変異型の分子量の差はプライマーの長さ程度となる。プライマーは通常約20bpであるのでこの20bpの分子量の差をアガロースゲル上で簡便に検出するには、PCR増幅産物の大きさは約200-300bpが適当である。なぜならそれより得られる産物の分子量が大きいと電気泳動した際に、アガロースゲル上で差が区別しにくくなるからである。

谷系A6599-4の変異付近の塩基配列は3つのゲノムの間で共通の配列が多いために1回のPCRで約200bpが得られるような*Wx-D1*遺伝子特異的な配列をプライマーを設計することが難しかったのでnested PCRを行った。

これは1回目に*Wx-D1*遺伝子特異的なプライマーで増幅、2回目にdCAPSを利用したプライマーで増幅するという方法である。表2にプライマーの配列を示す。PCRのテンプレートには幼葉からISOPLANT (ニッポンジーン) で抽出したゲノム由来のDNAを使用した。

倍加半数体22系統ならびにF₅世代172系統を用いて、dCAPSマーカーを使って解析を行った一部の結果を図5に示す。

表2 dCAPS 解析で使したPCRのプライマー

<i>AgeI</i> 切断用	1st primer	Forward	1	CAATGGCATCTACAGGGCCGCA
		Reverse	1	GACGGCGAGGAACTTGTCCTGG
	nested primer	Forward	2	CTTCTCCTTCGACGACTTCG
		dCAPS Reverse	2	GTCGAGCTCGCAGCC <u>ACCGG</u>
<i>DdeI</i> 切断用	1st primer	Forward	3	GCTGACGGTGAGCCCCTACTAC
		Reverse	3	CCCTCACCTTGCTCGGGAAT
	nested primer	dCAPS Forward	4	CGGAGGAGCTCATCTCTGG <u>GCTAA</u>
		Reverse	4	TGCAGCGCCTCCTTGTTTCAG

下線はテンプレートに対するミスマッチ箇所である。

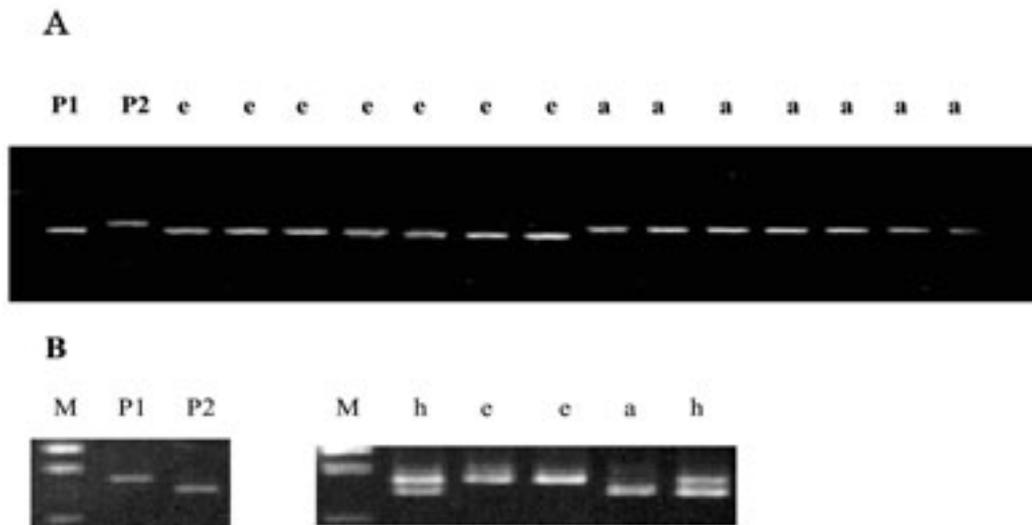


図5A,B dCAPS 産物の電気泳動像

PCR反応液中には50 μ l中にEx Taq buffer, 2.5mM dNTP mixtureおよび0.4 μ M primer を含む。PCRの条件は最初に95℃で5分間加熱し、ついで95℃、30秒、60℃、30秒、72℃1分間で30サイクル加熱、冷却を繰り返した。

A, 関東118号 (Wx-Dla) × 谷系A6599-4 (Wx-Dle) 由来の倍加半数体第2世代の系統；PCR産物はF2とR2プライマーとで増幅し、制限酵素 Age I 5 unitsで処理した。4 % Nusieve GTG agarose gel(FMC)in 0.5×TBEで1時間電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して蛍光トランスイルミネーター下で観察、写真撮影を行った。P1, 谷系A6599-4(Wx-Dle), P2, 関東118号(Wx-Dla), e, もち個体, a, うるち個体 DNA断片の分子量はそれぞれ192bp(P1 and e)と208bp(P2 and a)である。

B, 関東119号 (Wx-Dla) × 谷系A6599-4 (Wx-Dle) 由来のF₅系統；PCR産物はF4とR4プライマーとで増幅し、制限酵素DdeIでAと同様の条件で処理した後、電気泳動をした。M, 分子量マーカー ϕ X-Hinc II digest, P1, 谷系A6599-4(Wx-Dle)(274bp), P2, 関東119号(Wx-Dla)(256bp), h, ヘテロ個体, e, もち個体, a, うるち個体

*AgeI*を用いるプライマーセットではPCRの増幅産物のサイズは208bpであり、これを*AgeI*処理すると、野生型由来の産物は切断されないが、変異型由来の産物は切断される。*AgeI*でPCR産物が切断された個体すなわち変異型を示した個体はすべてヨウ素ヨードカリウム染色の結果、谷系A6599-4タイプのもち性であり、野生型を示した個体はすべてうるち性であった。また、*DdeI*を使ったプライマーでは、PCR産物のサイズは274bpであり、野生型が切断されて256bpとなり、変異型は切断されない。

このマーカーは共優性であり、制限酵素処理して野生型、変異型の両方のバンドが出現する個体はヘテロであると考えられる。F₅系統の中にはそのような個体があった。倍加半数体22系統についてはcDNA塩基配列の解析も行い、上記の結果と一致することを確認した。したがってこの解析結果よりWx-DI遺伝子上に見出されたSNPがもち性の原因であることは明らかである。

なお倍加半数体系統では、もち:うるち=11:11であった。F₅系統の材料では、もち:うる

ち:ヘテロ=83:79:10であり、この分離比を χ^2 検定すると($\chi^2=0.16$; $P=0.925$)となり、期待比(15:15:2)とよく適合した。

5 dCAPSマーカーの有効性

遺伝子マーカーとしてdCAPSプライマーを用いる1塩基置換の選抜には変異型が切断されるプライマーを使う方が良いと考えられる。なぜなら、制限酵素処理した時に何らかの原因で切断されないことがあった場合に変異型が切断されず野生型が切断されるプライマーの組み合わせを用いると変異型と野生型の区別を誤る可能性があるからである。

解析に用いた材料は表現型(もち・うるち)とSNPとの関連を明らかにするために $Wx-D1$ 遺伝子のみ発現する系統を用いたが、このdCAPSマーカーは3つの Wx 遺伝子が発現する系統でも利用可能である。片親に谷系A6599-4、もう片親に3つの Wx 遺伝子が発現する系統の交配組合せの後代系統の $Wx-D1$ 座を決めるにはこのdCAPSマーカーの利用が最も有効である(Kiribuchi-Otobe *et al.* 2004)。またコムギのように高次倍数性の作物ではゲノムが大きく、 Wx 遺伝子以外でも遺伝子を複数セット持ち、しかもその遺伝子間の相同性が極めて高い可能性がある。さらに前述したようにdCAPSマーカーは共優性であるので、育種の選抜過程で使用するのに有用なマーカーと考えられる。もち性は劣性形質であり、ヨウ素ヨードカリウム染色で判定しやすいので、効率良く選抜するためには表現型で選抜した方が有効である。しかしながら6倍体であるコムギの場合、 Wx 遺伝子が3つ働いているうるち性ともち性を交配して得られた F_2 ではもち性は1/64の確率でしか得られないので、初期世代から劣性形質であるもち性を選ぶためには系統数を大きくとらなくてはいけない。うるち性ともち性に関してヘテロである個体を選抜すれば後代でもち性が分離してくる可能性がある。初期世代では圃場選抜をして有用な農業形質の固定を図り、中期世代でもち個体を表現型で選抜する場合には、初期世代で

共優性マーカーを用いれば、うるちホモとヘテロとは区別がつくので、うるちホモを外してもちホモとヘテロを残すといった選抜が可能である。育種の現場でこのようなDNAマーカーを継続的に選抜に用いるには、さらなる手法の改善、迅速化も必要である。例えば、プライマーの工夫によりPCRのみで野生型、変異型を区別するとか、複数形質を同時に行うことを可能にするなどである。なおこのプライマーに関しては平成14年3月に特許出願を行った(特願2002-66746)。

6 低温で登熟させた時のアミロース含量の変化

小麦育種研究室の育種事業の慣行法で栽培された系統と比較して低温で登熟させた時にアミロース含量がどのように変動するかを調べるために、登熟時期に温度制御できる自然光の日長制御型温室(8時間日長)を用いて15℃もしくは20℃の設定でポット栽培した。収穫した種子を粉碎して得た粉およびこれから抽出した澱粉の見かけのアミロース含量を測定した(表3)。関東107号では有意な差がなかったが、谷系A6099,谷系A6598および谷系A6599-4では15℃の温室内で登熟したものは畑で栽培したもの比べて見かけのアミロース含量が高く、統計的にも有意な差が見られた。実験に使用した系統は畑栽培においてオートアナライザーで計測した見かけのアミロース含量の数年間のデータでは著しい年次間の変動は見られない(Yamaguchi *et al.* 1998, Kiribuchi-Otobe *et al.* 2001b)。

谷系A6599-4については、20℃での温室栽培も行ったところ、15℃での結果ほどの増加はしなかったが、やや含量が増加するという結果が得られた(表3)。関東118号と谷系A6599-4の交配組合せによる倍加半数体の後代系統のうち、 $Wx-D1e$ 遺伝子を持つことをdCAPSマーカーで確認した系統は15℃の栽培ですべて見かけのアミロース含量が上昇していた。澱粉を顕微鏡下で観察すると低温で成熟させた系統由来の澱粉の方がやや青みの程度が増加していた(図6)。

表3 小麦粉および澱粉の見かけのアミロース含量 (平均値±標準偏差 % 5回の反復による)

		畑	温室 (15°C)	温室 (20°C)
小麦粉	関東107号	23.22±1.09	22.62±2.32ns	ND
	谷系A6099	17.61±1.16	18.61±1.08**	ND
	谷系A6598	14.68±0.94	17.86±2.16**	ND
	谷系A6599-4	5.88±0.74	8.85±0.99**	6.71±0.27**
澱粉	谷系A6099	24.47±0.88	26.67±0.52**	ND
	谷系A6598	21.31±1.41	24.45±0.99**	ND
	谷系A6599-4	5.56±0.13	9.34±0.30**	6.95±0.16**
	DH-975	4.53±0.35	9.20±0.39**	ND
	DH-977	5.83±0.34	9.24±0.15**	ND
	DH-980	5.18±0.55	7.99±0.11**	ND
	DH-982	5.82±0.38	8.33±0.26**	ND
	DH-985	6.25±0.58	10.65±0.05**	ND
	DH-987	5.79±0.11	7.84±0.14**	ND
	DH-988	5.20±0.26	6.60±0.58*	ND
	DH-989	6.18±0.27	9.91±0.27**	ND
	DH-990	5.03±0.32	7.45±0.20**	ND
	DH-991	6.27±0.12	8.67±0.15**	ND

ns: 有意差なし; ND (データなし)

** : 0.01%で有意

小麦粉のアミロース含量はオートアナライザー (Technicon) を用いて測定した。小麦粉100mgのヨウ素呈色度がポテトアミロースαmgと一致した場合に、その小麦粉の見かけのアミロース含量をα%とした。小麦粉中のタンパク質含量、水分含量およびアミロヘクチンの呈色への寄与は考慮していない。また澱粉のアミロース含量はアミロースフリーのもち性の澱粉とアミロース含量既知の澱粉の610nmの吸光度の値を基にして作成した検量線を用いて算出した。

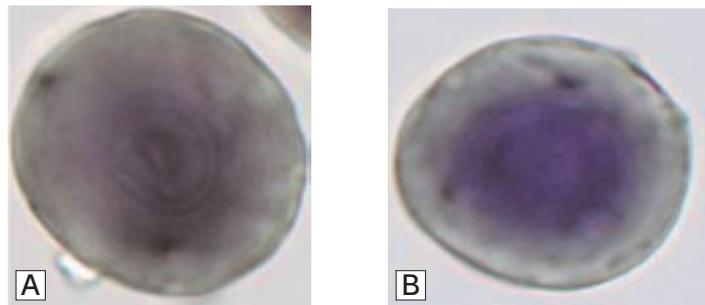


図6 ヨウ素ヨードカリウム溶液にて染色した澱粉粒 (デジタル写真)

A: 畑栽培, B: 温室栽培 (15°C)

SDSポリアクリルアミド電気泳動による解析より15°Cで栽培すると畑栽培よりも谷系A6099, 谷系A6598および谷系A6599-4ともにWx-D1タンパク質の発現量がやや増加している (表4) ことから、この現象にWx-D1遺伝子が関与していると考えられた。

低温で成熟させた時に統計的に有意にアミロース含量の上昇が見られた系統は関東107号由来の突然変異系統 (谷系A6099) か谷系A6099に由来する突然変異系統 (谷系A6598、谷系

表4 畑栽培と温室栽培 (15°C) におけるWx-D1タンパク質の発現量

	畑	温室 (15°C)
谷系A6099	100	119
谷系A6598	100	130
谷系A6599-4	100	107

畑栽培での発現量を100とした (3反復の平均)。

SDS-PAGEして銀染色した後、Scion image Beta 4.02 プログラムで発現量を解析した。

このプログラムは <http://www.scioncorp.com> から得ることができる。

A6599-4) なので、関東107号の $Wx-D1$ 遺伝子に誘起された突然変異が低温成熟において遺伝子発現を制御するという可能性が示唆される。なお関東107号と谷系A6099との間では成熟タンパク質をコードする $Wx-D1$ 遺伝子領域には変異はない (Yanagisawa *et al.* 2001) ので、この遺伝子を制御する領域の変異であることが考えられるが、上述した仮説の実証は今後の課題である。イネにおいては Wx^a の対立遺伝子では Wx^b の対立遺伝子に比べて Wx タンパク質の発現量が10倍以上あり、アミロース含量も多いことが知られている (Isshiki *et al.* 1998, Sano 1984)。また Wx^b の対立遺伝子を有する場合、低温で成熟させると Wx タンパク質の発現量が上昇し、アミロース含量が増加することが知られている (Hirano and Sano 1998)。この現象は、 Wx^b 遺伝子では第1イントロンのスプライシングサイトに点突然変異があり、種子成熟中の温度が高い場合にはスプライシングの効率が低下するのに対して、低温で成熟させた場合には効率が比較的高く、 Wx 遺伝子への転写が維持されるためではないかと考えられている (Larkin and Park 1999)。

また今回の実験方法では、アミロース含量算出の基準となるのがヨウ素ヨードカリウム呈色

反応によるため、アミロースの増加ではなくアミロペクチンの長鎖が増加したことを検出した可能性も残されている。また、ヨウ素ヨードカリウムは脂質と結合しているアミロース中には取り込まれないので、脂質の増加によって見かけのアミロース含量が低くなる。しかしコムギでは脂質と結合しているアミロースの含量は温度の影響を受けないという報告 (Tester *et al.* 1995) や、オオムギやコムギでは温度を上げて栽培しても脂質の含量は微増するだけであるという報告 (Tester and Karkalas 2001) もある。こうしたことから本研究において脂質に結合しているアミロースは、見かけの含有量にはほとんど影響していないと考えられる。

7 低温で登熟させた時の澱粉粘度特性の変化

ラピッドビスコアナライザー (RVA) により澱粉の粘度特性を調べると、低温 (15°C) で登熟させた谷系A6599-4の通常で栽培した場合に比べて粘度の上昇が遅く、最高粘度に達する時間が遅れた。また、最高粘度を保持する時間がやや減少するという特徴を示した (図7)。これについて関東118号と谷系A6599-4の交配組

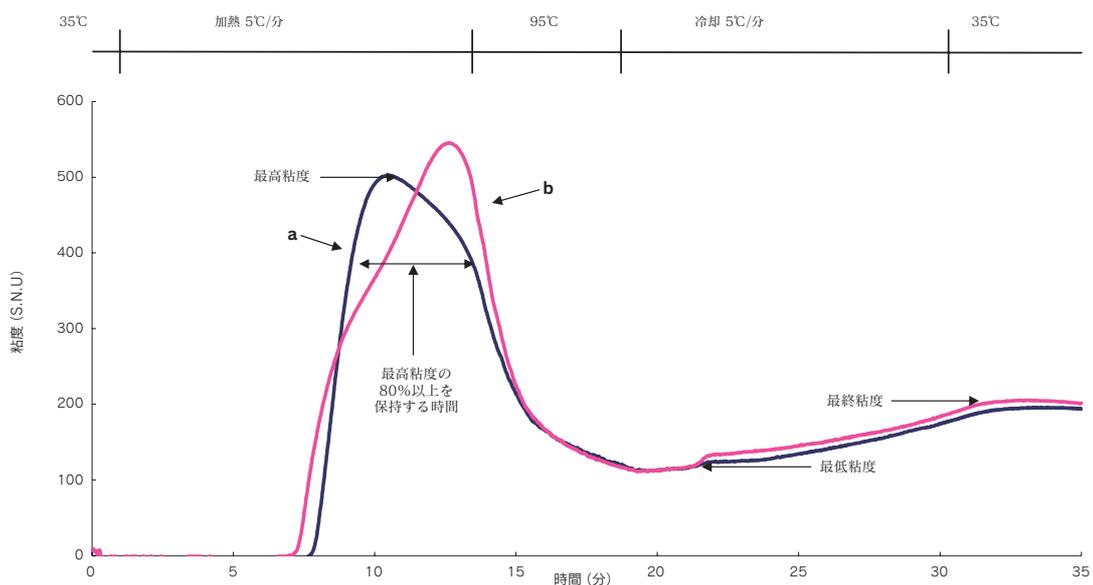


図7 谷系A6599-4の澱粉のRVAパターン a: 畑栽培 b: 温室栽培 (15°C)

RVAの条件は34°Cで2分間保持し、次に毎分5°Cの割合で94°Cまで加熱し、94°Cで5分間保持、次に毎分5°Cの割合で34°Cに冷却し、34°Cで4分間保持して終了した。また澱粉濃度は澱粉3gに蒸留水25mlを加えたものとした。攪拌速度は最初の10秒間が960rpmであり、その後は160rpm一定速度である。これによりPV (peak viscosity; 最高粘度)、MV (minimum viscosity; 最低粘度) およびFV (final viscosity; 最終粘度) が記録される。

合せによる倍加半数体の中で後代系統について調べたところ、*Wx-D1e*遺伝子をもつ谷系A6599-4タイプの系統のRVAパターンはやはり同様の傾向を示した。この粘度特性を示す指標として最高粘度の80%以上を保持する時間と最高粘度に達する時間との関係について図8で示した。このことより*Wx-D1e*遺伝子がこの現象

にも関わることを示唆された。

RVAで計測された各パラメータの数字を表5に示した。最終粘度とトータルセットバックの値も15°Cでの栽培の方が畑栽培よりも高い値を示した。

Yamamori *et al.* (2000) やZeng *et al.* (1997) の報告にあるようにRVAのパラメータとアミ

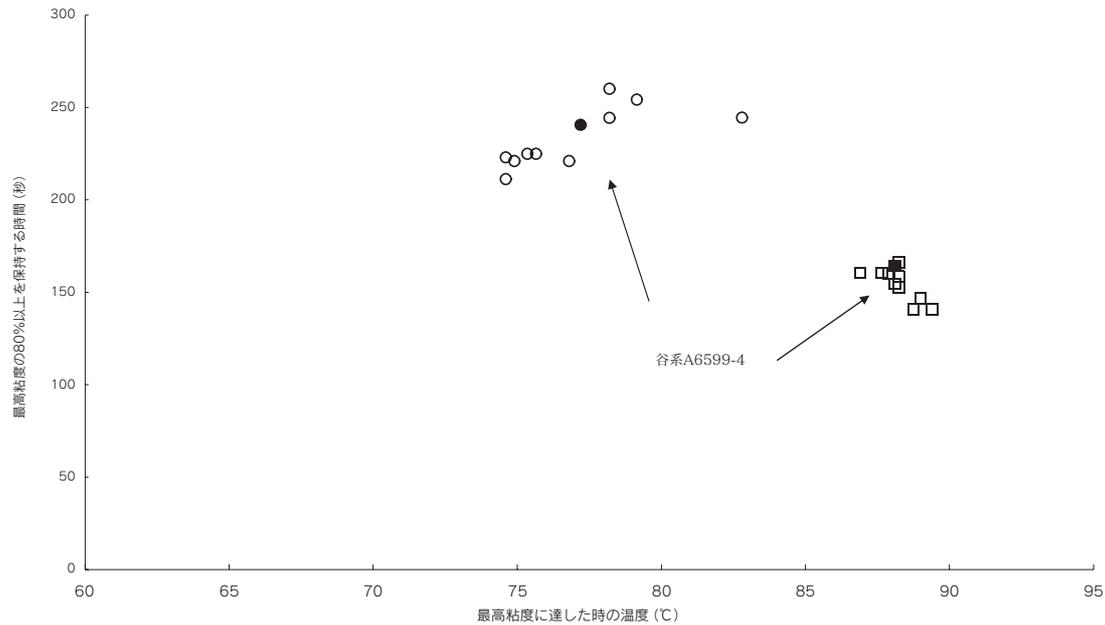


図8 谷系A6599-4 (●■) ともち性の倍加半数体系統 (○□) における粘度安定性の変化
○●畑栽培；□■温室栽培 (15°C)

表5 畑栽培と温室栽培におけるRVAパラメーターの比較 (反復なし)

	PV (SNU)		MV (SNU)		FV (SNU)		BD (SNU)		TSV (SNU)		SV (SNU)	
	畑	温室 (15°C)	畑	温室 (15°C)	畑	温室 (15°C)						
谷系A6099	336.7	365.2	140.9	150.8	273.4	355.0	195.8	214.3	132.5	204.2	63.3	10.2
谷系A6598	353.0	376.5	131.9	148.7	280.8	340.4	221.1	227.8	148.9	191.8	72.2	36.1
谷系A6599-4	502.5	545.6	111.4	111.2	195.8	205.4	391.1	434.4	84.3	94.3	306.8	340.2
DH-975	543.0	484.6	115.5	108.2	198.3	198.6	427.5	376.4	82.8	90.4	344.8	286.0
DH-977	526.8	566.2	118.8	124.7	194.9	207.0	407.9	441.5	76.1	82.3	331.8	359.2
DH-980	543.0	547.0	115.5	104.8	198.3	201.3	427.5	442.2	82.8	96.4	344.8	345.8
DH-982	497.0	544.8	114.9	114.8	198.0	203.5	382.1	430.1	83.1	88.8	299.0	341.3
DH-985	573.6	546.0	117.3	122.3	198.0	217.8	456.3	423.8	80.7	95.6	375.6	328.2
DH-987	569.9	568.3	118.8	112.2	191.3	201.6	451.1	456.1	72.5	89.4	378.6	366.7
DH-988	494.3	503.0	108.3	101.0	188.1	191.0	385.9	402.0	79.8	90.0	306.2	312.0
DH-989	532.1	593.3	131.4	137.3	196.4	218.9	400.7	456.0	65.0	81.7	335.7	374.3
DH-990	551.1	570.6	131.9	125.3	197.8	209.0	419.2	445.3	65.9	83.7	353.3	361.6
DH-991	504.8	548.1	124.6	119.3	193.4	201.2	380.2	428.8	68.8	81.8	311.3	346.9

PV: Peak Viscosity (最高粘度), MV: Minimum Viscosity (最低粘度), FV: Final Viscosity (最終粘度), BD: Breakdown (ブレイクダウン), TSV: Total Set back (トータルセットバック), SV: Set back (セットバック) なおBD (breakdown ブレイクダウン) はPV-MVで求められる。TSV (total set back トータルセットバック) はFV-MVで求められる。SV (setback セットバック) はPV-FVで求められる。

ロース含量とは関係があるので、最終粘度やトータルセットバックの値は種子成熟中の微妙なアミロース含量の変化をモニターする指標となる可能性が示唆される。ジャガイモ澱粉は谷系A6599-4のように粘度安定性があるが、これはリン酸モノエステルが粘度特性に影響を与えて熱や力に対して抵抗力を持つためと考えられている。また、リン酸モノエステルと結合したカリウムが他のカチオンと置き換わると粘度が失われるという報告がある (Hofstee and de Willigen 1956)。Kiribuchi-Otobe (2001a)らは、塩化ナトリウムを添加するとジャガイモ澱粉の最高粘度は下がるが、谷系A6599-4の澱粉は下がらないことを報告している。15°Cで栽培した谷系A6599-4の澱粉もやはり下がることはなく、谷系A6599-4を低温で成熟させた際にRVAの粘度特性が変動することにはリン酸モノエステルの影響はないと考えられる。登熟中の温度が上昇すると澱粉粒の数や大きさが減少し、ゲル化温度が上昇するとの報告 (Tester *et al.* 1995)があり、畑栽培と15°Cの温室栽培の間では澱粉の粒の大きさの違いやアミロペクチンの結晶性の違いが澱粉粘度特性の差となって現れている可能性がある。

おわりに

今まで述べてきたように、谷系A6599-4は *Wx-D1e* 遺伝子を有し、アミノ酸の置換した *Wx-D1* タンパク質を発現している。アミロース合成酵素としての機能は低下している可能性が示唆されたが、*Wx* 遺伝子の生産物すなわち GBSSI がアミロースの合成だけでなくアミロペクチンの合成にも関与するという報告 (Denyer *et al.* 1996) もあり、*Wx-D1e* 遺伝子の作用でアミロペクチンの構造に変化を来すことも考えられる。

また澱粉のRAVパターンにおいても、アミロースフリーのもち性小麦系統では最高粘度に達した後で、速やかに粘度が低下するが、谷系A6599-4では図7で示したように最高粘度に達してからその粘度を比較的長く保持するという

特徴をもつ。粘度安定性を有する澱粉の性質と *Wx-D1e* 遺伝子の形質とが分離せず、*Wx-D1e* 遺伝子の作用で粘度安定性を示す澱粉が生産される可能性が示されている (Kiribuchi-Otobe *et al.* 2001a)。このように、*Wx-D1e* 遺伝子によって発現するアミノ酸の置換した *Wx-D1* タンパク質の機能解析をすることにより澱粉の生合成や澱粉の構造に関して新たな知見が得られる可能性があり興味深い。アミノ酸の変異した *Wx* タンパク質が生体内でどのような働きをしているかを実証するには、谷系A6599-4の *Wx-D1e* 遺伝子をクローン化し、それを遺伝子組換え技術を用いて別の生物 (例えばもち性イネ) に導入して変異型の *Wx* タンパク質を発現させ、その澱粉特性を解析するという研究方法が考えられる。またその実験系が働けばクローン化した遺伝子に site directed mutagenesis を起こして多様な変異を起こして、それを基に生産されるアミノ酸置換したタンパク質の構造と機能の解析が可能と考えられる。

低温で成熟するとアミロース含量の上昇に伴い粘度特性が変動するので、RVAの粘度曲線の変化はアミロースが影響していると考えられるが、アミロペクチンも低温で成熟する際の粘度特性にも影響を与えているのかもしれない。澱粉の物理化学的性質は分子サイズや鎖長の分布、枝分かれのパターン等、様々な要因から構成される (Blennow *et al.* 2001) ので成熟温度が異なると粘度特性の変動する要因を解明するには谷系A6599-4の澱粉構造を詳細に解析する必要があると思われる。

この総説では谷系A6599-4が有する *Wx-D1e* 遺伝子を中心に論じたが、原系統谷系A6099や谷系A6598の *Wx* 遺伝子もイネの *Wx^a* 遺伝子のように発現が温度によって変化する。これらの系統は通常栽培してもアミロース含量の低い、低アミロース系統であるので、その変異と温度変化による遺伝子発現の変化について解析すれば新たな知見が得られる。

澱粉は太陽エネルギーを小さな種子に効率よく詰め込むためにとられた形態である。人間の食生活には不可欠な存在であるだけでなく、こ

れを加工して様々な食品産業や工業の場面で利用されている。本総説で得られた研究結果が新たな特性をもつ澱粉を産出する作物の育種に寄与することを願ってやまない。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、山口勲夫、吉田久、藤田雅也室長の暖かい支援と継続的な激励の言葉をいただいた。乙部千雅子氏は谷系A6599-4の作出者であり、本研究の端緒から常に有効な助言をいただいた。Wx-D1遺伝子の解析にあたり、育種工学研究室（現 遺伝子技術研究室）の戸澤 譲氏、川岸万起子氏に技術指導をいただいた。dCAPSプライマーの設計にあたっては岡山大学の加藤鎌司助教授より有益

な情報をいただいた。イムノブロット解析にあたり、米品質評価研究室の鈴木保宏氏の技術指導をいただいた。またイネのWxタンパク質の抗体は東京大学の平野博之助教授から分譲いただいた。酵素活性測定にあたっては稲栽培生理研究室の梅本貴之氏の技術指導をいただいた。また澱粉のアミロース含量およびRVAの解析は土井芳憲室長の御厚意により近畿中国四国農業研究センター四国研究センター裸麦育種研究室で行った。これらの方々に深く感謝を申し上げますとともに、これ以外にも多くの方々との意見交換、情報交換の中から研究のアイデアが生まれ、研究に対するモチベーションを持続することができたことを深く感謝する。

引用文献

- Ainsworth, C., J. Clark and J. Balsdon (1993) Expression, organization and structure of the genes encoding the waxy protein (granule-bound starch synthase) in wheat. *Plant Mol. Biol.* 22,67-72.
- Asaoka, M., K. Okuno, Y. Sugimoto, J. Kawakami and H. Fuwa (1984) Effect of environmental temperature during development of rice plants on some properties of endosperm starch. *Starch/Stärke* 36,189-193.
- Blennow, A., A. M. Bay-Smidt and R. Bauer (2001) Amylopectin aggregation as a function of starch phosphate content studied by size exclusion chromatography and on-line refractive index and light scattering. *Int. J. Biol. Macromol.* 28, 409-420.
- Chao, S., P. J. Sharp, E.J. Worland, A.J. Warham, R.M.D. Koebner and M.D. Gale (1989) RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 78,495-504.
- Denyer, K. C.M. Hylton, C.F. Jenner and A.M. Smith (1995) Identification of multiple isoforms of soluble and granule-bound starch synthase in developing wheat endosperm. *Planta* 196,256-265.
- Denyer, K, B. Clarke, C. Hylton, H. Tatge and A.M. Smith (1996) The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant J.* 10:1135-1143.
- Echt, C.S. and D. Schwartz (1981) Evidence for the inclusion of controlling elements within the structural gene at the waxy locus in maize. *Genetics* 99,275-284.
- Ferguson, V.L. and M.S. Zuber (1962) Influence of environment on amylose content of maize endosperm. *Crop Sci.* 2, 209-211.
- Fujita, N., A. Wadano, S. Kozaki, K. Takaoka, S. Okabe and T. Taira (1996) Comparison of the primary structure of Waxy proteins (granule-bound starch synthase) between polyploid wheats and related diploid species. *Biochem. Genet.* 34,403-413.
- Fujita, N. and T. Taira (1998) A 56kDa protein is a novel granule-bound starch synthase existing in

- the pericarps, aleurone layers, and embryos of immature seeds in diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). *Planta* 207, 125-132.
- Fukunaga, K., M. Kawase and K. Kato (2002) Structural variation in the *waxy* gene and differentiation in foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv. implication for multiple origins of the *waxy* phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 268,206-213.
- Hirano, H. and Y. Sano (1991) Molecular characterization of the *waxy* locus of Rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Physiol* 32, 989-997.
- Hirano, H.Y. and Y. Sano (1998) Enhancement of Wx gene expression and the accumulation of amylose in response to cool temperatures during seed development in rice. *Plant Cell Physiol.* 39,807-812.
- Hofstee, J. and de Willigen, A. H. A. (1956) Starch. Pages 1-33 in, *Foodstuffs, their plasticity, fluidity and consistency*. G.W.S. Bair ed. J. Nikuni and T. Isemura trans. Asakura Shoten, Tokyo
- Hsieh, J., C. Liu and Y.C. Hsing (1996) Molecular cloning of a sorghum cDNA encoding the seed *waxy* protein. *Plant Physiol.* 112,1275.
- Inagaki, M., N. Nagamine and A. Mujeeb-Kazi (1997) Use of pollen storage and detached-tiller culture in wheat polyhaploid production through wide crosses *Cereal Res. Com.* 25,7-13.
- Isshiki, M., K. Morino, M. Nakajima, R. J. Okagaki, S.R. Wessler, T. Izawa and K. Shimamoto (1998) A naturally occurring functional allele of the rice *waxy* locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron. *Plant J.* 15,133-138.
- Kiribuchi-Otobe, C., T. Yanagisawa and H. Yoshida (1998) Wheat mutant with *waxy* starch showing stable hot paste viscosity. *Cereal Chem.* 75,671-672.
- Kiribuchi-Otobe, C., T. Yanagisawa and H. Yoshida (2001a) Genetic analysis and some properties of starch in *waxy* mutant wheat Tanikei A6599-4. *Breed Sci.* 51,241-245.
- Kiribuchi-Otobe, C., T. Yanagisawa and H. Yoshida, I. Yamaguchi, H. Seko, T. Ushiyama and Y. Amano (2001b) Breeding of "Wheat Norin-PL 8 (Tanikei A6599-4)", a *waxy* wheat line with starch showing a stable hot paste viscosity. *Bull. of the NICS* 2,63-74.
- Kiribuchi-Otobe, C., K. Kurita, T. Yanagisawa, G. Takeda and A. Inazu (2004) Interactions Among Wx Genes and the Effects of a Mutated *Wx-D1e* Allele on Starch Properties in Wheat. *Cereal Chem.* 81,48-50
- Klosgen, R. B., A. Gierl, Z. Schwarz-Sommer and H. Saedler (1986) Molecular analysis of the *waxy* locus of *Zea mays*. *Mol. Gen. Genet* 203, 237-244.
- Larkin, P.D. and W. D. Park (1999) Transcript accumulation and utilization of alternate and non-consensus splice sites in rice granule-bound starch synthase are temperature-sensitive and controlled by a single-nucleotide polymorphism. *Plant Mol. Biol.* 40,719-727.
- Michaels, S. D. and R. M. Amasino (1998) A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *Plant J.* 14,381-385.
- Murai, J., T. Taira and D. Ohta (1999a) Isolation and characterization of the three *Waxy* genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat. *Gene* 234,71-79.
- Murai, J., T. Taira and D. Ohta (1999b) Isolation and characterization of the four *Waxy* genes encoding the granule-bound starch synthase in tetraploid wheats. *Appl. Biol. Sci.* 5,31-42.
- Nakamura, T., M. Yamamori, H. Hirano and S. Hidaka (1993) Identification of three Wx proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochem. Genet.* 31,75-86.
- Nakamura, T., P. Vrinten, K. Hayakawa and J. Ikeda (1998) Characterization of a granule-bound starch synthase isoform found in the pericarp in wheat. *Plant Physiol.* 118,451-459.
- Nakamura, Y. K. Yuki, S. Y. Park and T. Ohya (1989) Carbohydrate metabolism in the

- developing endosperm of rice grains. *Plant Cell Physiol.* 30,833-839.
- Neff, M. M., J. D. Neff, J. Chory and A. E. Pepper (1998) dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms, Experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J* 14,387-392.
- Nelson, O.E. and H. W. Rines (1962) The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 9,297-300.
- Rohde, W., D. Becker and F. Salamini (1988) Structural analysis of the waxy locus from *Hordeum vulgare*. *Nucl Acid Res* 16,7185-7186.
- Sano, Y. (1984) Differential regulation of *waxy* gene expression in rice endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 68,467-473.
- Tester, R.F., W.R. Morrison, R.H. Ellis, J.R. Piggott, G.R. Batts, T.R. Wheeler, J.I.L. Morison, P. Hadley and D. A. Ledward (1995) Effects of elevated growth temperature and carbon-dioxide levels on some physicochemical properties of wheat-starch. *Journal of Cereal Science* 22,63-71.
- Tester, R. and J. Karkalas (2001) The effects of environmental conditions on the structural features and physico-chemical properties of starches. *Starch/Stärke* 53, 513-519.
- Toyokawa, H., G. L. Rubenthaler, J. R. Powers and E. G. Schanus (1989) Japanese noodle qualities. II. Starch components. *Cereal Chem.* 66,215-219.
- Umeda, M. H. Ohtsubo and E. Ohtsubo (1991) Diversification of the rice *Waxy* gene by insertion of mobile DNA elements into introns. *Jpn. J. Genet* 66,569-586.
- Wang, Z., Z. Wu, Y. Xing, F. Zheng, X. Guo, W. Zhang and M. Hong (1990) Nucleotide sequence of rice *waxy* gene. *Nucl. Acids Res.* 18,5898.
- Yamaguchi, I., C. Kiribuchi-Otobe, T. Yanagisawa, T. Ushiyama, H. Seko, Y. Amano, S. Miyagawa, A. Kuroda and S. Oda (1998) Breeding of wheat Norin-PL 7 (Tanikei A6099) New germplasm accession with low amylose content. *Bull. Natl. Agric. Res. Cent.* 29,1-11.
- Yamamori, M. and N. T. Quynh (2000) Differential effects of *Wx*-A1, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100, 32-38.
- Yan, L., M. Bhave, R. Fairclough, C. Konic, S. Rahman and R. Appels (2000) The genes encoding granule-bound starch synthases at the *waxy* loci of the A, B and progenitors of common wheat. *Genome* 43,264-272.
- Yanagisawa, T., C. Kiribuchi-Otobe and H. Yoshida (2001) An alanine to threonine change in the *Wx*-D1 protein reduces GBSS I activity in waxy mutant wheat. *Euphytica* 121, 209-214.
- Yanagisawa, T., C. Kiribuchi-Otobe, H-Y. Hirano, Y. Suzuki and M. Fujita (2003) Detection of single nucleotide polymorphism (SNP) controlling the *waxy* character in wheat by using a derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) marker. *Theor. Appl. Genet.* 107,84-88.
- Yanagisawa, T., C. Kiribuchi-Otobe and M. Fujita (2004) Increase in apparent amylose content and change in starch pasting properties at cool growth temperature in mutant wheat. *Cereal Chem.* 81,26-30.
- Zeng, M., C. F. Morris, I. L. Batey and C. W. Wringley (1997) Sources of variation for starch gelatinization, pasting, and gelation properties in wheat. *Cereal Chem.* 74,63-71.

Detection and marker development for single nucleotide polymorphism (SNP) on *Wx-D1* gene, and changes in starch properties at cool growth temperature in waxy wheat with starch showing stable hot paste viscosity

Takashi Yanagisawa*

Keywords: wheat, waxy, single nucleotide polymorphism, dCAPS marker, amylose content, cool growth temperature, starch pasting property, Rapid Visco Analyzer

Summary

The *Wx-D1* protein (granule-bound starch synthase) of "Tanikei A6099" (original line) and "Tanikei A6599-4" (mutant waxy line) was analyzed by SDS-PAGE, peptide mapping, and DNA sequencing. Amino acid substitution (alanine to threonine) occurs at position 258 in the mature protein in Tanikei A6599-4.

Using 22 doubled-haploid (DH) lines and 172 F₅ lines derived from cross the wild type × the mutant, we detected SNP via a PCR-based (dCAPS) marker. Amplified PCR products from *Wx-D1* gene specific primers, followed by mismatched primers designed for dCAPS analysis, were digested with the appropriate restriction enzyme. The 2 alleles and the heterozygote genotype were easily and rapidly discriminated by gel electrophoresis resolution, which showed single nucleotide polymorphism (SNP). All progeny lines that have SNP of the mutant allele were waxy. Taken together, the results of dCAPS analysis, immunoblot analysis, and assays of starch synthase activity of granule-bound proteins indicate that SNP in the *Wx-D1* gene was responsible for its waxy character. This dCAPS marker is therefore useful for introducing the mutant allele into elite breeding lines. Mutant wheat lines with low amylose content were grown in a field and in a greenhouse to compare the apparent amylose content and starch pasting properties. The apparent amylose content of flour and starch increased and starch pasting parameters measured by a Rapid Visco-Analyzer (RVA) changed in the greenhouse under cool temperatures during seed maturation. Densitometric analysis of the protein band separated by electrophoresis suggests that the increase in amylose content caused by cool temperature is related to the amount of *Wx-D1* protein, i.e., the *Wx-D1* gene is responsible for these changes. In the starch of "Tanikei A6599-4" (waxy mutant with stable hot paste viscosity), the peak viscosity temperature was higher and the time maintained above 80% of the peak was shorter at 15°C than in that from the field. Genetic analysis using DH lines from the combination "Tanikei A6599-4" and

*National Agricultural Research Center for Western Region

"Kanto 118" (low-amylose line) showed that apparent amylose content increased and the starch pasting curve and properties changed in waxy progenies similar to "Tanikei A6599-4".