

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

目次

- [I. 緒言](#)
- [1. 研究の背景](#)
- [2. 研究の目的](#)
- [3. グルテニンタンパク質に関する研究の動向](#)
- [II. 小麦粉の生地物性を強める低分子量グルテニンタンパク質の同定](#)
- [1. 超強力春まきコムギ品種「Glenlea」に由来する低分子量グルテニンタンパク質](#)
- [2. 強力秋まきコムギ系統「KS831957」に由来する低分子量グルテニンタンパク質](#)
- [III. 小麦粉の生地物性を強める低分子量グルテニンタンパク質の候補遺伝子の同定とDNAマーカーの開発](#)
- [1. 「Glenlea」の強い生地物性に関与するLMW-GS遺伝子とDNAマーカー](#)
- [2. 「KS831957」の強い生地物性に関与するLMW-GS遺伝子とDNAマーカー](#)
- [3. 小麦粉の生地物性を強める低分子量グルテニンタンパク質のDNAマーカーの利用例](#)
- [IV. 総合考察](#)
- [1. 春まきコムギと秋まきコムギの強い生地物性に関与するLMW-GSの相同性](#)
- [2. 超強力コムギ系統の作出方法](#)
- [3. DNAマーカーの有効性](#)
- [4. 生地物性に関わるLMW-GSの機能](#)
- [V. 摘要](#)
- [謝辞・引用文献](#)
- [Summary](#)

[次へ進む](#)

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

I. 緒言

1. 研究の背景

1) 国内における小麦粉の生産と消費ならびに国内のコムギ品種

コムギはイネやトウモロコシと並んで、世界で最も生産量の多い作物であり、年間の生産量は約6億トンに達している。コムギの栽培地帯は、北半球のスカンジナビア半島から南半球のアルゼンチンまでの広域に渡り、熱帯地方の高地をも含んでいる。収穫されたコムギの種子（玄麦）は小麦粉に挽かれて、世界の各地域で様々な形態の食品に加工されている。最も多く生産・加工されているパンコムギは6倍体の普通系コムギ（*Triticum aestivum* L.、 $2n=6X=42$ 、AABBDDゲノム）である。一方、4倍体のデュラムコムギ（*Triticum durum* L.、 $2n=4X=28$ 、AABBゲノム）はセモリナ粉に挽砕され、パスタ類に加工されて利用されている。

小麦粉は、水を加えて捏ねることによって生地（ドウ）が形成される。この生地の性質によって小麦粉は、強力粉、準強力粉、中力粉、薄力粉に分けられ、それぞれの用途も異なっている（下野と市川 2003）。強力粉や準強力粉の生地の物性は強いため、弾力性が高い。薄力粉の生地の物性は非常に弱いため、弾力性は低い。中力粉の生地物性はそれらの中間である。日本国内では、強力粉と準強力粉はパン、中華麺、即席麺などに利用され、中力粉は主にうどんに利用される。薄力粉はクッキー・スポンジケーキなどに利用されている。小麦粉のタンパク質含量は概ね強力粉（11.5～13.0%）と準強力粉（10.5～12.5%）で高く、薄力粉で低く（6.5～9.0%）、中力粉ではそれらの中間である（7.5～10.5%）。また玄麦粒の硬さによって硬質コムギ、軟質コムギに分類されるが、強力粉の原料となるコムギ品種（強力コムギ品種）のほとんどは硬質コムギである。

日本国内では約620万トンもの小麦玄麦が消費されるが、生産量はわずか約80万トンであり（農林水産省 平成14年度食糧需給表）、消費量の多くは米国、カナダ、オーストラリアなどの外国からの輸入に頼っている。強力粉・準強力粉、中力粉、薄力粉ごとの推定国内消費量と推定国内生産量を第1表に示した。強力粉・準強力粉については年間約200万トンも消費されているにも拘わらず、国内生産量は非常に少なく1万トン以下である。また、そのほとんどは準強力粉である。一方、国内のコムギ品種のほとんどが中力粉の原料となる中間質コムギであるため、国内の小麦粉生産量のほとんどが中力粉である。薄力粉生産を目的とした軟質コムギ品種は育成されていない。

強力粉・準強力粉の用途について第2表に示した。半量以上がパンに加工され、中華麺、即席麺の加工用はそれぞれ20%、16%ほどである。近年、パン用小麦粉については、生地の一次発酵後に冷凍された状態で流通し、各ベーカリーなどで二次発酵・焼成を行う「冷凍生地製パン法」が普及してきている。パンに加工される小麦粉の量は平成10年以降、大きな変化はないが、即席麺に加工される小麦粉は平成15年で約36万トンであり増加の傾向が見られる。

近年、消費者の国内産小麦（内麦）を使用したパンや麺を求める傾向は強くなっており、メーカー側も内麦を使用したパン、中華麺、即席麺などの食品の重要性を唱えている（花岡彰宏 私信）。このような市場の現状から、大量に消費される強力粉・準強力粉の国内生産量を高めるこ

と、過剰気味な中力粉の生地物性を準強力粉・強力粉の生地物性にまで強めることが必要であると考えられる。

国内で生産される準強力粉の原料となる準強力コムギ品種のほとんどは春まきコムギ品種である。なぜなら、春まきコムギのタンパク質含量が高くなりやすいため、生地物性の強い品種育成が春まきコムギを対象に行われたきたからである（下野と市川、2003）。しかし、わが国の小麦の生産量（平成15年）は秋まきコムギで約88万トンであるのに対し、春まきコムギはわずか約2.3万トンである（北海道農政事務所ホームページ、農林水産省プレスリリース）。平成14年に秋まきコムギ品種として登録された「キタノカオリ」は強力コムギ品種であり、将来大規模に作付けされることが期待されているが、平成16年の生産量見込みは数百トンであり、安定した生産がなされるまでには至っていない。したがって、春まきコムギに限らず、様々な農業特性を持つ秋まき強力コムギ品種を育成することが急務である。

## 2) 超強力小麦粉の有用性

カナダで育成されたコムギ品種のグループ(銘柄)の一つに、Canada Western Extra Strong red spring(CWES)がある。日本語では「超強力コムギ」と呼ばれるこのCWESに分類される品種から生産される小麦粉（超強力粉）は、(1)ファリノグラフの生地形成時間が非常に長い（Lukow and Bushuk 1984a）、(2)エクステンソグラフで非常に大きな最大抗張力を示す（Inoue and Bushuk 1992）、(3)還元剤処理に対する抵抗性を持つ（Kim and Bushuk 1995）等の特徴がある。つまり、超強力コムギは強力コムギよりもさらに強い生地物性を持っている。超強力小麦はまた、発芽による生地物性の弱化度合いが少なく（Lukow and Bushuk 1984a; 1984b）、生地の凍結や再凍結による生地物性の弱化度合いが少ない（Inoue and Bushuk 1992）。このような特徴を持つ超強力粉は、冷凍生地製パン法に向くこと（Inoue and Bushuk 1992）、また他の生地物性の弱い小麦粉と混合（ブレンド）することによって製パン適性などの加工適性を改善できること

（Bushuk 1980）がわかってきた。Yamauchiら（2001; 2003）は、低製パン適性の国内中力コムギ品種「ホクシン」と「ホロシリコムギ」、および穂発芽被害を受けた準強力コムギ品種「ハルユタカ」の小麦粉に対して外国産超強力小麦粉をブレンドすることによって、生地破断力で評価した生地物性の強さが向上して、パン用の外国産小麦粉が一般的に持っている製パン適性が付与されることを示した。これは、国内産で過剰気味の中力粉や穂発芽被害を受けて品質が低下した小麦粉を、超強力粉のブレンドによって強力粉の生地物性にまで改善出来るということである。しかし、前述したように、国内で育成された準強力コムギ品種の製パン適性はまだ十分でなく、さらに超強力コムギ品種は育成されていない。

以上のことから、国内産の強力粉への需要に応えるためには、国内で強力粉及び超強力粉を生産することが重要であると考えられる。しかし、外国産の強力コムギ品種や超強力コムギ品種をそのまま国内で栽培しても、栽培環境が大きく異なるため、穂発芽や種々の病害によって、健全な種子を得ることは困難である。したがって、国内で栽培可能な強力コムギ品種や超強力コムギ品種を育成することが重要かつ急務である。

[次へ進む](#) [目次に戻る](#)

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

## 1. 緒言

## 2. 研究の目的

### 1) 小麦粉の生地物性に影響を及ぼす要因

小麦粉の生地物性はグルテン（麩質）の性質に大きく影響される。グルテンは、コムギ種子貯蔵タンパク質のプロラミンに分類されるグルテニンタンパク質とグリアジンタンパク質が結合して形成される網目構造を持つポリマータンパク質である。このポリマーの分子量は数百万ダルトン以上にも及ぶ場合がある（Wrigley 1996）。植物のタンパク質を溶解性によってアルブミン、グロブリン、プロラミン、グルテリンに分類するOsborneの分類方法（1924）によれば、グリアジンタンパク質は水や塩溶液には不溶だがアルコール溶液に可溶な画分（プロラミン画分）に溶出されるタンパク質であり、ほとんどはジスルフィド基を介して分子内だけで結合するモノマータンパク質である。一方、グルテニンタンパク質はポリマータンパク質であるため、グルテリン画分に分類されるが、還元剤でモノマー化することによってアルコール溶液に溶出されるので広義のプロラミンとされている（Shewry et al. 1986）。グルテニンタンパク質は、ジスルフィド基によって分子内結合だけでなく分子間結合ができるため、他の分子とポリマーを形成してグルテンの骨格構造を作っている（第1図）。グリアジンタンパク質は主にグルタミン残基（Q）による水素結合によってグルテンに取り込まれている（Shewry et al. 1986）。製パン適性や中華麺加工適性は、このグルテンの理化学的性質によって大きく影響される。パン生地ではグルテンの網目構造があるために、発酵時に発生する二酸化炭素を生地内に保持し、生地を焼成した時にふっくらとパンが膨らみ、小穴が均一に空いたやわらかいパンができる。また、中華麺においてはグルテンが食感にコシを与える。一般的には、グルテンを形成するポリマーの分子量が大きいほど生地物性が強く、結果的にパンや麺への加工適性が高くなる（Field et al. 1983）。小麦粉の生地物性を評価する方法はいくつかあり、例えば、粉と水をミキシングする過程で得られるファリノグラフにおいては生地形成時間が長いほど生地物性が強く、ピン型ミキサーでミキシングする場合のミキソグラフにおいては、負荷が最大となるまでの時間（ピークタイム）が長いほど生地物性が強いと言える。パンを焼成した後に測定するパン容積（LV）あるいは比容積（SLV、単位重量当たりのパン容積）は製パン適性を直接的に評価できるパラメータである。

生地物性の強さに影響する要因としては、(1)小麦粉のタンパク質含量（Finney and Yamazaki 1946）、(2)グルテニンの総量と組成（Orth and Bushuk 1972, Payne et al. 1979, Payne et al. 1981a, Branlard and Dardevet 1985b, Payne 1987, Gupta et al. 1989, Gupta and Shepherd 1990）、(3)グリアジンの総量と組成（Branlard and Dardevet 1985a, Wesley et al. 1999）、(4)粒の硬度（Slaughter et al. 1992, Morris 1992）が挙げられる。Branlardら（2001）は、小麦162品種を用いてタンパク質含量、グルテニン、グリアジン、硬度、その他の不明要因の生地物性の強さの遺伝的分散への寄与度を検定しており、ミキソグラフにおけるピークタイム（生地物性の強さと相関のある）に対しては、グルテニン（46%）、その他の不明要因（22%）、グリアジン（14%）、硬度（9%）、タンパク質含量（9%）の順に寄与するとした。また、酸性溶液中の小麦粉の沈降量（パン比容積と相関のあることが知られる）に対しては、グルテニン（32%）、硬度（26%）、タンパク質含量（16%）、グリアジン（8%）、その他の不明要因（18%）、の順

に寄与するとした。これらのことから、小麦粉の生地物性の強さにはグルテニンの組成が最も影響すると言える。

本研究では、小麦粉の生地物性を強め、超強力小麦を特徴づけるようなグルテニンタンパク質を新たに同定することを目的とした。グルテニンタンパク質のうち、高分子量グルテニンタンパク質の研究は進んでいたが、超強力粉の生地物性を高分子量グルテニンタンパク質だけで説明するには不十分と考えられたため、研究が遅れているものの重要と考えられた低分子量グルテニンタンパク質に注目して同定を行った。

また、強力及び超強力コムギを育種する上で、生地物性を強めるようなグルテニンタンパク質を発現するコムギ系統の選抜の効率化が不可欠である。そこで、グルテニンタンパク質の遺伝子情報を元に、DNAマーカーによる簡便な検出技術を開発することも目的とした。

## 2) 北海道向け超強力および強力コムギ品種の重要性

国内での春まきコムギのほとんどと秋まきコムギの約2/3は北海道で生産されている。北海道の品種と本州の品種では低温要求性や日長感応性が異なるため、それぞれの栽培地に適する品種を育成する必要がある。今後、小麦の自給率を上げるためには、新たな超強力あるいは強力コムギ品種を、耕地面積を拡大しやすいと考えられる北海道に導入することが望ましい。したがって、本研究では、北海道向けの春まき及び秋まきの超強力及び強力コムギ品種を育種することを想定して、対照材料として北海道向けに育成された品種や系統を用いた。

[次へ進む](#)   [前に戻る](#)   [目次に戻る](#)

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

## I. 緒言

### 3. グルテニンタンパク質に関する研究の動向

コムギのグルテニンは他の種子貯蔵タンパク質と同様に、個体の光合成による炭酸同化が可能となるまでの初期成長に必要な養分（炭素、窒素、硫黄）として種子に貯蔵されている。しかし、コムギのグルテニンが持つ独特の性質は非常に弾力性のある生地を作ることを可能にし、穀物の中でコムギは最も汎用性のある加工食品の原料作物になっている。

モノマー化したグルテニンタンパク質は、ドデシル硫酸ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）によって泳動ゲル上にバンドとして分離され、個々のバンドはグルテニンサブユニットと呼ばれる。サブユニットは高分子量グルテニンサブユニット（HMW-GS）と低分子量グルテニンサブユニット（LMW-GS）に大別される。

#### 1) HMW-GSに関する研究

##### (1) 生地物性や製パン適性に関与するHMW-GS

HMW-GSは、SDS-PAGE上での分子量は約80~130kDaであり、第1同祖染色体群に座乗する *Glu-1* 遺伝子座に支配されている（Payne et al. 1980, 1981b）。HMW-GSは各 *Glu-1* 遺伝子座（*Glu-A1*、*Glu-B1*、*Glu-D1*）の連鎖する2種の対立遺伝子（x-type及びy-type遺伝子）にコードされるが、遺伝子が発現しない場合もあるため、パンコムギは3種から5種のHMW-GSを持っている（Payne and Lawrence 1983, Payne 1987, Payne et al. 1987）。これまで、多くの系統のHMW-GSと生地物性や製パン適性との関連が調べられてきた。また、組換え自殖系統（RIL）や準同質遺伝子系統（NIL）等を用いて二つずつの対立遺伝子由来のHMW-GSが比較され、効果の順位付けがなされてきた。その結果、*Glu-D1* のx-type（1Dx）及びy-type遺伝子（1Dy）にそれぞれコードされるサブユニット5と10（5+10と記される）が最も生地物性を強くし、良好な製パン適性に貢献することがわかってきた（Payne et al. 1981; 1987）。そのため、強力コムギ品種の育種において、この5+10を導入することが重視され、世界の強力コムギ品種の多くは5+10を持つ現状となった。一方、日本国内では、うどん用の秋まき中間質コムギ（中力コムギ）品種を中心に育種が進められ、それらの多くは5+10の対立形質である2+12を持っている。しかし2+12は製パン適性を高めることはできない（Payne et al. 1981a; 1987, Gupta and MacRitchie 1994）。

##### (2) HMW-GSの構造と生地物性との関連

これまでに主なHMW-GSの遺伝子が同定された（Shewry and Tatham 1997, Shewry et al. 2002）。x-type及びy-type遺伝子の一次構造を第2図に示した。HMW-GS遺伝子はいずれもイントロンを含まず、中央部分にはグルタミン（Q）、プロリン（P）、グリシン（G）が豊富な短いペプチドモチーフが繰り返される領域を持っており、その両側に反復配列を持たないN末端領域とC末端領域を持っている。HMW-GS遺伝子の推定アミノ酸配列は全体的に非常に相同性が高く、対立遺伝子の間には大きな違いはない。

Shewryら（2002）はHMW-GSの構造と生地物性との関連について以下のようにまとめている。N末端領域は $\alpha$ -helices構造となっていると推定される。N末端及びC末端領域には分子間結

合に関与するシステインのジスルフィド基 (SH基) を持ち、他のグルテニンサブユニットと分子間結合する。x-type遺伝子のうちHMW-GS5をコードする遺伝子1Dx5だけは反復配列に一つシステインを持っている。しかし、ジスルフィド基とグルテニンタンパク質の性質を完全に関連づけるほど、グルテニンのジスルフィド結合に関する理解は深まっていない。HMW-GSの3次元構造については間接的な証明の域を出ていないが、 $\beta$ -turnが規則的な螺旋構造を作っているために生地に弾力性がもたらされると推測されている。また近年、グルテニンの物性にはジスルフィド結合だけでなくこの螺旋構造に位置するグルタミン (Q) を介した水素結合が重要とされている。以上のように各サブユニット間で生地物性への寄与度は異なっているにも拘わらず、タンパク質の構造上の違いについてはいまだに不明の点が多い。

### (3) HMW-GS遺伝子を検出するDNAマーカーの開発

HMW-GS5や7をコードする遺伝子 (1Dx5、1Bx7) が同定され (Anderson et al. 1989、Anderson and Greene 1989)、これらの遺伝子をPCRによって検出する技術が開発されてきた (D'ovidio and Anderson 1994、D' Ovidio et al. 1995)。これまで多くのコムギ品種・系統に対してこれらマーカーの有効性が示された (Ahmad 2000、Bustos et al. 2001、Butow et al. 2003)。石川ら (2004) が開発した1Dx5遺伝子用マーカーは、PCR産物の多型によって1Dx5遺伝子とそれ以外の対立遺伝子を識別するものであり、国内の2+12を持つコムギ品種をベースにして5+10を導入した系統を選抜する際には、有効なマーカーであると考えられる。

## 2) LMW-GSに関する研究

### (1) LMW-GSの表記方法

LMW-GSはSDS-PAGE上の分子量が約20~60kDaのサブユニットであり、第1同祖染色体群の短腕に座乗する *Glu-3* 遺伝子座にコードされている (Singh and Shepherd 1988、Gupta and Shepherd 1990)。LMW-GS遺伝子は多重遺伝子であり、その数は全ゲノムで30~40と考えられている (Sabelli and Shewry 1991、Cassidy et al. 1998)。*Glu-3* 遺伝子座の構造についてはほとんど解明されていないが、複合座 (a complex locus) であることが示唆されている (D' Ovidio and Masci 2004)。Nielsenら (1968) は、ゲルろ過によって高分子量グリアジンと結合し、モノマーでないタンパク質を最初に「低分子量グルテニン」と呼んだ。その後、PayneとCorfield (1979) によって、SDS-PAGEで還元化グルテニンサブユニットが解析された。以来、多くの研究者が低分子量グルテニンの分離と遺伝的解析を行ってきた。

*Glu-A3*、*Glu-B3*、*Glu-D3* の対立遺伝子としてはそれぞれa~f、a~j、a~eが報告されており (Gupta and Shepherd 1990、Khelifi and Branlard 1992)、その多くは複数のサブユニットをコードしている。LMW-GSや二次元電気泳動で分離された低分子量グルテニンタンパク質スポット (LMWGスポット) のN末端アミノ酸配列が解析された結果、第一アミノ酸残基がセリンのものが最も多く、メチオニンのものが次に多かった (Tao and Kasarda 1989、Lew et al. 1992、Masci et al. 1995)。Lewら (1992) は第一アミノ酸残基がセリンのLMW-GSをLMW-s、メチオニンのものをLMW-mと表記した。別の表記法では、SDS-PAGEでのみかけの分子量をサブユニットの名前につけて標記されることもある (42-kDa、LMW-50など)。世界的にはGupta and Shepherd (1990) のアルファベットによる表記法が採用されることが多いが、前述のように統一化されたLMW-GSの表記法は残念ながら無い。これは、簡便で汎用性の高いLMW-GSの分離方法がなく、個々の研究者が扱う材料によって効率的な分離方法を独自に採択していることに起因する。さらに、このことは世界のコムギ品種間のLMW-GSの比較を困難にしている。

### (2) 生地物性や製パン適性に関与するLMW-GSの同定

LMW-GSやコード遺伝子と加工適性との関係は、HMW-GSと同様に、NIL、RIL等を用いて調べ

られている (Gupta et al. 1989; 1991; 1994, Khelifi and Branlard 1992、田引ら 1998、池口ら 1999、Wesley et al. 1999、Masci et al. 2000、Nagamine et al. 2000、Eagles et al. 2002、Flaete and Uhlen 2003、He et al. 2004)。なかでも生地物性を強める上で特に効果的な対立遺伝子としては、*Glu-B3b*、*Glu-B3f*、*Glu-A3d* 等が挙げられる。生地物性に及ぼすHMW-GS遺伝子とLMW-GS遺伝子との相加効果及び交互作用についても調べられており、HMW-GSと相加的に働くLMW-GSがいくつか報告されている。しかし、それらLMW-GSの生地物性への影響が同じ方法では評価されていないため、生地物性を強める効果の順位づけはできない。また、各対立遺伝子の生地物性の強さへの効果は品種の遺伝的背景によって左右されることが多い。

LMW-GSの研究はHMW-GSの研究に比べて遅れてきた。その主な原因としては、SDS-PAGEのゲル上で同程度の易動度を持つサブユニットが多数見られ、個々のサブユニットを区別するのが難しいことがあげられる。このような理由から、LMW-GS遺伝子は多数単離・同定されているものの、パンコムギの種子貯蔵タンパク質として実在しているLMW-GSと精密に対応づけた報告は、筆者が研究を開始した時点 (2001年) で2例しかなかった (Masci et al. 1998, Cloutier et al. 2001)。そのうち、Masci et al.ら (1998) が春まきコムギ「Yecora Rojo」を用いて同定した*Glu-B3* 由来の42-kDaサブユニットは複数の製パン適性の高い品種が共通して保有していることから (Masci et al. 2000)、製パン適性に貢献するサブユニットであると考えられた。

「42kDa」という分子量は遺伝子構造から推定されたもので、SDS-PAGEでのみかけの分子量は約48 kDaである。「Yecora Rojo」の42-kDaサブユニットは、強い生地物性を持つデュラムコムギの品種群「LMW-2」に特異的な42-kDaサブユニットと同一と考えられた (Pena et al. 1994, Pogna et al. 1988、Masci et al. 2000)。

### (3) LMW-s、LMW-m、LMW-iの構造と生地物性との関連

特異的な繰り返し配列を持つLMW-GS遺伝子が多数単離されている (D' Ovidio and Masci 2004)。HMW-GS遺伝子と同様、LMW-GS遺伝子もイントロンを含まない。これまでに単離されたLMW-GS遺伝子は20種を超えるが、それらは互いに塩基配列レベルでも推定アミノ酸配列レベルでも80%以上の相同性を示す。それらのシグナルペプチドを含む一次構造を第3図に示した。LMW-s、LMW-mは構造がよく似ており (第3図A)、短いペプチドが繰り返される領域と反復配列を持たないN末端及びC末端領域から構成されている。反復配列領域は、主にグルタミン (Q) プロリン (P)、フェニルアラニン (F)、セリン (S) から構成される6~9ペプチドのモチーフの繰り返しで構成されており、LMW-GSの疎水性を担っている。N末端領域は $\beta$ -turns構造となっており、C末端領域は $\alpha$ -helicesによりコンパクトな構造となっていると推察されている (D' Ovidio and Masci 2004)。LMW-s、LMW-mは8個のシステイン残基を持ち、それらの位置もよく保存されている。それらのうち最初と7番目のシステイン残基が分子間結合すると推察されている (Shewry and Tatham 1997)。これら2個のシステイン残基は他の分子と分子間結合する前に必要なLMW-GSの折りたたみ (folding) に関係していると推察され (Orsi et al. 2001)、また、この2個のシステイン残基による分子間結合によって、LMW-sとLMW-mはchain extenderとしてグルテニンポリマーを伸長させ、ポリマーの高分子量化を促していると推察されている (Masci et al. 1998)。

LMW-s、LMW-mと別種のLMW-GS遺伝子が単離されている。推定シグナルペプチドから判断すると、その成熟タンパク質のN末端はイソロイシン (I) と考えられるため、この遺伝子産物はLMW-iと呼ばれるが (Cloutier et al. 2001)、2001年の時点でタンパク質レベルではLMW-iは見つかっていなかった。後述するように、LMW-iの存在は本研究で初めて確認されることとなった。LMW-i遺伝子の塩基配列の解析から、LMW-iはLMW-s、LMW-mに存在するN末端の13アミノ酸残基を欠き、システイン残基数は8個であるが、その位置はLMW-s、LMW-mとは異なること

がわかった（[第3図B](#)）。LMW-iも分子間結合によってグルテンに取り込まれていることがわかっていて（Ferrante et al. 2004）、グルテンの物性との関係は不明である。

#### (4) LMW-GS遺伝子のグループ分けと由来ゲノム

Ikedaら（2002）は「農林61号」のLMW-GS遺伝子を網羅的に同定し、推定アミノ酸配列のN末端配列とC末端配列の違いに基づいて、12のグループに分類した。[第3表](#)に各グループのN末端配列及びC末端配列を記した。これまで単離されたLMW-GS遺伝子の多くはこの12グループに含まれるが、これらの推定アミノ酸配列と異なる配列を持つLMW-GSもいくつか見つかっている（D' Ovidio and Masci 2004）。G3グループのLMW-GS遺伝子はORFの同定が未完で、推定シグナルペプチドに相当するN末端側の数残基のデータが欠けている。この遺伝子は前出の「Yecora Rojo」の42-kDaサブユニットの推定遺伝子（EMBL accession number 'Y17845'、以後Y17845と表記）と相同性が非常に高い。

#### (5) LMW-GS遺伝子を検出するDNAマーカーの開発

Campenhoutら（1995）はパンコムギの各ゲノムの*Glu-3*に特異的なPCR産物を増幅させるプライマーを設計したが、製パン適性の高い品種の育成を目指した育種計画の中で利用することは想定していなかった。パンコムギの生地物性を強めるLMW-GSの遺伝子を検出するようなDNAマーカーの報告例は、Masciら（1998、2000）が製パン適性に関与する「Yecora Rojo」の42-kDaサブユニット遺伝子（Y17845）を複数の品種においてPCRで増幅した一例のみである。Y17845を増幅するプライマーはデュラムコムギの*Glu-B3*に特異的なLMW-GS遺伝子を増幅するプライマー（D' Ovidio et al. 1993; 1997 b; 1999）に基づいている。しかし、Y17845を増幅するプライマーは標的遺伝子以外のDNA配列を増幅するため、多型を検出しにくい場合もあると思われた。本研究では、実際の育種計画の中でより利用しやすいDNAマーカーを開発することを目的とした。

なお、本内容は北海道大学へ平成17年度に学位論文（学位記番号 第6348号）として提出したものであり、本内容の一部は学術雑誌（Maruyama-Funatsuki et al. 2004; 2005 a; 2005b）に公表されている。

[次へ進む](#)   [前に戻る](#)   [目次に戻る](#)

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

## II. 小麦粉の生地物性を強める低分子量グルテニンタンパク質の同定

### 1. 超強力春まきコムギ品種「Glenlea」に由来する低分子量グルテニンタンパク質

コムギ品種「Glenlea」の特段に強い生地物性に関与しているLMW-GSを同定するため、強力コムギ品種「春のあけぼの」と「Glenlea」を交配して得た準同質遺伝子系統（「NIL」）を用いてタンパク質解析と生地物性評価を行った。先に、Takataら（2001）は「NIL」を用いて、「Glenlea」のLMW-GSが強い生地物性に深く関与していることを示唆している。しかし、「NIL」と「春のあけぼの」の生地物性を比較したのみで、「Glenlea」との比較は行っていなかった。本研究では「Glenlea」の生地物性の評価も併せて行った。

LMW-GSを詳細に解析する上では、分子量が同様の複数のLMW-GSを識別する必要があるが、そのためには二次元電気泳動（2D-PAGE）による分離が有効と考えられるが、2D-PAGEによる分離の報告は少ない。さらに、生地物性や製パン適性に寄与するLMW-GSを分離世代において2D-PAGEで解析することによって明瞭な同定が可能になると思われるが、著者の知る限り報告事例はない。そこで、本研究では、異なる遺伝子型及び分離世代の個体におけるLMW-GSを2D-PAGEで分離して比較した。また、それらを詳しく特徴づけるために2D-PAGEで分離したLMWGスポットのN末端アミノ酸配列を解析した。さらに強い生地物性に関与しているLMW-GSをコードするゲノムを同定した。

#### 1) 材料と方法

##### (1) 材料

カナダの小麦銘柄CWES（超強力コムギ）に分類される品種「Glenlea」、国内の強力コムギ品種「春のあけぼの」、「春のあけぼの」×「Glenlea」に由来する「NIL」、及び製パン適性の高い米国産品種「Yecora Rojo」を用いた。

「NIL」は、「春のあけぼの」×「Glenlea」のF<sub>1</sub>及びGL1、GL2（「Glenlea」に特異的に存在する主要なLMW-GS）を持つ後代に対して、「春のあけぼの」を5回戻し交配し、BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>でGL1、GL2を持つ個体を選んで自殖させた。

「Glenlea」の生地物性を強くするLMW-GSの由来ゲノムを解析するために、まず2003年に温室内で「Chinese Spring」に「Glenlea」の花粉を交配し、F<sub>2</sub>種子を得た。結果と考察の項で述べるように「Glenlea」の生地物性を強くするLMW-GSと「Chinese Spring」のあるLMW-GSは対立関係にあることがわかったので、「Chinese Spring」のditelocentric系統「CS DT 1AL」、「CS DT 1BL」、「CS DT 1DL」（第1同祖染色体群の短腕欠失系統）を用いて、LMW-GSのコードゲノム同定を試みた。

「春のあけぼの」、「Glenlea」、「NIL」は2002年に北海道農業研究センター畑作研究部（芽室町）の試験圃場で栽培した。それぞれの品種・系統は3反復で栽培した。収穫した種子はビューラー社（Buhler Inc.、スイス）のテストミルを用いて製粉した。得られた小麦粉は製粉歩留が60%となるように調整して生地物性の評価実験に供した。

##### (2) グルテニンタンパク質の抽出

「春のあけぼの」、「NIL」、「Glenlea」、「Yecora Rojo」のグルテニンタンパク質の抽出は、Singhら（1991）とMelasら（1994）の方法を改変して行った。まず、種子を乳鉢と乳棒で粉碎し、アルブミン、グロブリン、グリアジン画分を可能な限り除去するため、粉120mg当り1.5mlの抽出バッファーES（50%（v/v）1-プロパノール、0.08Mトリス塩酸塩（Tris-HCl, pH 8.0））を加え、36rpm、60°Cで30分間振とうした。数秒間遠心分離（18000×g、20°C）したのち、上清を廃棄した。さらに、この抽出操作を2回繰り返して得た沈殿に60mMのジチオスレイトール（DTT）を含む600μlのESを加えて懸濁し、65°Cで1時間振とう（36rpm）した。これを10分間遠心分離（18000×g、20°C）し、上清600μlを回収し、これに1.4%（v/v）ビニルピリジンを含むESを等量加え、65°Cで30分振とう（36rpm）してアルキル化した。これを4つのマイクロチューブに分注し、それぞれに4倍の容量のアセトンを加えてグルテニンタンパク質を沈殿させ、遠心分離の後（18000×g、20°C、10分）、沈殿を65°Cで乾燥させた。

「春のあけぼの」×「Glenlea」のBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>後代の種子については、半分に切断して、胚を含まない種子片を乳鉢と乳棒で粉碎し、上記の方法に準じてグルテニンタンパク質を抽出した。ただし、溶液の量はすべて1/4にし、アルキル化した画分の分注は行わなかった。

### (3) グルテニンタンパク質の電気泳動

#### ア. SDS-PAGE

「春のあけぼの」、「NIL」、「Glenlea」、「Yecora Rojo」のLMW-GSをLaemmli（1970）の方法に従い、SDS-PAGEにより分離した。ポリアクリルアミド12.5%のスラブゲル（13.5×11cm）を作製し、(2)のグルテニン沈殿を100μlのサンプルバッファー（50mM Tris-HCl（pH 6.8）、2% SDS（w/v）、10% グリセリン（w/v）、8% メルカプトエタノール（v/v）、0.1% ブロモフェノールブルー（BPB, w/v））に溶解し、1レーンあたり溶液7.5μlをサンプルとして用いた。タンパク質分子量マーカーはlow molecular weight calibration kit（アマシャムファルマシアバイオテック、英国）を使用した。電気泳動は室温で、ゲル1枚あたり25mAの定電流条件で3時間行った。分離されたタンパク質は、0.25%のクマシーブリリアントブルー（CBB, w/v）で一晩染色して検出した。HMW-GSの判定は、既にHMW-GS組成の分かっている複数の品種と比較して行った。

BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>の半粒種子から抽出したグルテニンタンパク質の総量は少ないと考えられたので、これを、SDS-PAGEと2D-PAGEの両方で解析するために、グルテニン沈殿をまず250μlの2D-PAGEで用いられるlysis buffer（8M尿素、2%トリトンX-100（w/v）、20mM DTT、2% IPG buffer（pH 6-11, w/v; アマシャムファルマシアバイオテック）、0.00125% BPB）に溶解し、そのうち15μlの溶液に、5μlの4倍濃縮のサンプルバッファー（200mM Tris-HCl（pH 6.8）、8% SDS、40% グリセリン、32% メルカプトエタノール、0.4% BPB）を加え、SDS-PAGEに供した。通常、SDS-PAGEにはこのようなバッファーは用いないが、SDS-PAGEのバンドパターンを見た限りでは通常のバッファーを用いた場合に比べて特に差異はなかった。

#### イ. 2D-PAGE

「春のあけぼの」、「NIL」、「Glenlea」、「Yecora Rojo」のLMW-GSをより詳細に分離するために、等電点による分離（IEF）と分子ふるいによる分離（SDS-PAGE）を組み合わせた2D-PAGEを、標準的な方法（Gorg et al. 1988）により行った。(2)のグルテニン沈殿を、400μlのlysis bufferに溶解し、そのうち50μlを200μlのlysis bufferと合わせ、この中に一次元目用乾燥ゲル（Immobiline dry strip, pH 6-11, 13cm長; アマシャムファルマシアバイオテック）を浸して一晩静置して、乾燥ゲルを膨潤させながら試料をゲル中へ添加した。一次元目のIEFは、水平型電気泳動槽Multiphor II（アマシャムファルマシアバイオテック）を用いて300Vで1分行った後、1.5時

間の間に徐々に電圧を3500Vまで上昇させ、その後さらに3500Vで4時間行った。このゲルを6M 尿素、30% グリセロール、2% SDS、0.00625% BPB、0.5% DTT、50mM Tris-HCl (pH 6.8) を含む溶液中で10分間平衡化し、二次元目の電気泳動に供試した。二次元目については、アと同様の条件で、縦型電気泳動槽Ruby 600 (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いSDS-PAGEを行ったが、濃縮ゲルは用いず、平衡化したゲルを、分離用スラブゲル (16×15cm) の上に直接載せ、0.5%アガロースを含む0.125M Tris-HCl (pH 6.8) で固定した。これを泳動バッファアの温度を20°Cに保ちながら、ゲル1枚あたり30mAで15分通電した後、6mAで15時間泳動した。二次元目の泳動が終わったゲルは0.25% CBBで一晩染色し、タンパク質を検出した。

BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>については、アで250 μlのlysis bufferに溶解した試料のうち200 μlを2D-PAGEに供した。

#### (4) 生地物性の評価

タンパク質含量 (FP) は、Inframatic 8120 (Percon、ドイツ) を用いた近赤外分光法により測定した。生地物性の強さを評価するために、改良型「35gスワンソンヘッドピンタイプミキサー」(National Mfg., 米国) を用いてミキシング試験を行い、ピークタイム、ブレイクダウンを測定した。ミキサーで生地が捏ねられる間、機械は抵抗力を電流値 (A) で示す。一般的に、抵抗力は徐々に大きくなるが、ある時間に最大値となったのちに下がっていく。抵抗力が最大となる時間 (分: min) をピークタイムとして記録した。また、ピークタイムから2分後の抵抗力を記録し、最大抵抗力との差をブレイクダウンとして算出した。

Axfordら (1979) の方法によるSDS沈降量はパン容積と高い相関性がある。本研究では、Axfordらの方法を改良した方法 (Takata et al. 1999) を用い、各2.5gの小麦粉に100mlのSDS-乳酸溶液を加えて混合し、24時間静置した後、再び攪拌して20分後の沈降量を測定した。

各パラメータにつき、3反復の材料について各々測定し、遺伝子型間の差を検出するためにダuncanの多範囲検定法を適用した。

#### (5) N末端アミノ酸配列の解析

N末端アミノ酸配列解析に供するタンパク質をできるだけ多くするために、「春のあけぼの」、「Glenlea」のグルテニンタンパク質の2D-PAGEを複数回を行い、それぞれの品種に特異的なタンパク質スポットをゲルから回収した。次に、NA-1710 (日本エイドー、日本) を用いてスポットごとにゲル片からタンパク質を電氣的に溶出した。溶出した試料をSDS-PAGEに供し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Immobilon、Millipore、米国) 上に転写した。PVDF膜をCBBで染色し、検出されたタンパク質バンドを切り取り、(株) バイオロジカ (名古屋) に依頼して、PROCISE-cLC (アプライド・バイオシステムズ、米国) でN末端アミノ酸配列を決定した。

#### (6) 強い生地物性に関わるLMW-GSのコードゲノムの解析

「Chinese Spring」×「Glenlea」の72のF<sub>2</sub>種子から(2)の方法でグルテニンを抽出し、(3)イの種子片 (BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub> 個体) に適用した方法で2D-PAGEを行い「Glenlea」の強い生地物性に関わるLMWGスポットと対立関係にある「Chinese Spring」のLMWGスポットを検出した。第1同祖染色体群の短腕欠失系統 (ditelocentric系統) のグルテニンも同様に2D-PAGEに供し、「Chinese Spring」のLMWGスポットのコードゲノムを判定した。

## 2) 結果と考察

### (1) 春まきコムギ品種・系統のHMW-GS及びLMW-GSの組成

「春のあけぼの」、「NIL」、「Glenlea」、のグルテニンをSDS-PAGEにより解析した。泳動像を第4図に示した。また第4表には「春のあけぼの」、「NIL」、「Glenlea」のHMW-GS及びLMW-GS組成を示した。「NIL」においては、「春のあけぼの」に固有のHA1が失われ、「Glenlea」に由来する二つの主要なLMW-GS (GL1、GL2) が導入されていることを確かめた。GL1、GL2の推定分子量はそれぞれ42kDa、40kDaであった。「春のあけぼの」と「NIL」のHMW-GS組成は共通していた (*Glu-A1*、*Glu-B1*、*Glu-D1* にそれぞれコードされる2\*、7+9、5+10)。「Glenlea」においては2\*及び5+10が他の供試遺伝子型と共通していた。Lukowら (1992) は「Glenlea」の*Glu-B1*に由来する7と8のうち、7が過剰発現していることを報告しているが、本研究でも、CBB染色から判断される「Glenlea」の7の蓄積量が他に比べて多いことが確認された (第4図)。「Yecora Rojo」のグルテニンについては項を改めて考察する (II、1、2)、(7) )。

## (2) 強い生地物性に関与するグルテニンサブユニット

「春のあけぼの」、「NIL」、「Glenlea」の小麦粉の特性を示す4種のパラメータのデータを第4表に示した。「春のあけぼの」と「NIL」を比較するとタンパク質含量に差はなかったが、「NIL」のピークタイムとSDS沈降量の値は「春のあけぼの」より有意に大きかった。本結果は、「NIL」のパン比容積 (大きい値ほど高い製パン適性を持つ) と生地破断力 (大きい値ほど強い生地物性を持つ、山内ら; 2001) が「春のあけぼの」より大きいというTakataら (2001) による報告と矛盾しない。したがって、「NIL」は「春のあけぼの」より強い生地物性と優れた製パン適性を持つことが示唆された。「Glenlea」におけるSDS沈降量は「NIL」と有意差がなく、タンパク質含量とピークタイムの値は「NIL」より大きかった。したがって、「Glenlea」は「NIL」より少し強い生地物性を持つと考えられた。なお、遺伝子型間でブレイクダウンの値に有意差は見られなかった。

「春のあけぼの」と「NIL」のHMW-GS組成は共通しており、タンパク質含量にも有意差はなかったことから、「NIL」が「春のあけぼの」に比べ、より強い生地物性と高い製パン適性を示すのは、「NIL」に導入されたGL1、GL2に起因すると考えられる。またGL1、GL2は「Glenlea」の際立って強い生地物性にも関与していると考えられた。「Glenlea」の強い生地物性にはGL1、GL2に加えて、過剰発現したHMW-GS7 (7<sup>OE</sup>) や、他のマイナーなLMW-GS等も関与している可能性がある。

## (3) 2D-PAGEによる春まきコムギのLMW-GSの分離

遺伝子型に特異的なGL1、GL2、HA1を詳細に解析するため、「春のあけぼの」、「NIL」、「Glenlea」のグルテニンを2D-PAGEで分離した。予備実験において、一次元目のIEFのpH範囲を6-11にした場合にそれぞれの遺伝子型に特異的なLMWGスポットが明瞭に検出されたので、本研究では一貫して6-11の範囲で行った。SDS-PAGEで一本のバンドとして検出されたものが、2D-PAGEによって2~5個のLMWGスポットに分離された (第5図)。GL1は主にスポット番号1a、2a、3aから、GL2は4a、5aから成っていた。HA1は主にスポット番号6a、7a、8a、9a、10aから成っていた。「NIL」は「春のあけぼの」に由来する6a、7a、8a、9a、10aに替わって「Glenlea」に由来する1a、2a、3a、4a、5aを持っていた。

「春のあけぼの」×「Glenlea」に由来する95個体のBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>後代のグルテニンをSDS-PAGE (第6図) 及び2D-PAGE (第7図) で解析した。すべてのBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>後代において、上記のLMW-GSとLMWGスポットとの対応 (1a、2a、3aはG1、4a、5aはG2、6a、7a、8a、9a、10aはHA1) が見られた。また、G1の構成スポットは例外なくG2構成スポットと共に検出され

た(第7図)。それ故、GL1とGL2は共分離するとみなしてよい。

一本のバンドに対して2D-PAGEで複数のLMWGスポットが分離されたが、これらの複数のLMWGスポットは実験によるartifactsである可能性も考えられる。また、lysis buffer中の尿素またはDTTがある種のタンパク質を十分に溶解しないことが報告されており(Rabilloud 1997; 1998、Molloy et al. 1998)、これが原因で生じたのかもしれない。他方でartifactsでないとするれば、一つの遺伝子の産物が翻訳後の修飾を受けた複数のスポットとして現れた可能性や、個々のスポットがそれぞれ互いに異なる遺伝子にコードされている可能性も考えられる。

#### (4) 強い生地物性に関するLMW-GSのN末端アミノ酸配列

LMWGスポット1a~10aのN末端アミノ酸配列の解析を試みた。1a、2a、3a、4a、5a、7aの配列は決定できたが、「春のあけぼの」の6a、8a、9a、10aはアミノ酸のピークが得られなかった(第5表)。1a、2a、3a、4a、5a、7aのN末端はすべて「SHIPGLERPSQQ(QPLPP)」という配列を共有する。Lewら(1992)の表記法に従うと、これらすべては第一アミノ酸残基がセリン(S)であるので、LMW-sとなる。「SHIPGLE」という末端配列はこれまでN末端アミノ酸配列が分析されたLMW-GSの中で最も多い(Tao and Kasarda 1989, Masci et al. 1995)。また「SHIPGLERPSQQQPLPP」は「Yecora Rojo」の42-kDaサブユニットのN末端アミノ酸配列と一致する(Masci et al. 1998; 2000)。また、この配列を含むLMW-GSの推定コード遺伝子としては、「農林61号」のG3グループのLMW-s遺伝子(第3表、Ikeda et al. 2002)が考えられる。よって、GL1/GL2、HA1をコードする遺伝子を同定するには「春のあけぼの」、「NIL」、「Glenlea」のLMW-s遺伝子を解析する必要がある。

#### (5) LMW-GSの対立性

「NIL」、「Glenlea」の強い生地物性に関するLMW-GSの遺伝を調べるために、95個のBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>種子についてGL1/GL2とHA1の有無を調査した。供試種子は3タイプ、すなわちGL1/GL2を持つ26個(第7図A)、HA1を持つ25個(第7図B)ならびに両者を併せ持つヘテロ接合体と思われる44個(第7図C)に分けることができた。GL1/GL2とHA1のコード遺伝子に対立関係にあると仮定すると、それぞれの対立遺伝子のホモ接合体が25%、ヘテロ接合体が50%を占めることになる。実際分離比に対してカイ二乗検定を行ったところ、仮説が支持された( $\chi^2=0.615, p=0.74$ )。

第7図から明らかのように、2D-PAGEにより、各BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>種子におけるGL1/GL2とHA1を明確に同定できた。一方、SDS-PAGEにおいては、HA1遺伝子のホモ接合体とGL1/GL2、HA1のヘテロ接合体を区別し難い場合がある(第6図)。このように分離世代の個体に対する2D-PAGEにより、明瞭なLMW-GSの遺伝子型の同定ができた。

#### (6) GL1、GL2のコードゲノムの同定

「Chinese Spring」×「Glenlea」のF<sub>2</sub>種子のグルテニンをSDS-PAGEに供したが、GL1/GL2と対立関係にある「Chinese Spring」のLMW-GSを明瞭に判定できなかつたので、72のF<sub>2</sub>種子を2D-PAGEに供した(第8図)。その結果、GL1/GL2を構成するLMWGスポット(1a~5a)と「Chinese Spring」のLMWGスポット(1c~3c)との対立性が認められた。因みに1a~5aを持つF<sub>2</sub>は16個体、1c~3cを持つF<sub>2</sub>は18個体、すべてを持つF<sub>2</sub>は38個体である( $\chi^2=0.333, p=0.85$ )。

「Chinese Spring」の1c~3cのコード遺伝子がいずれのゲノムに含まれているかを明らかにする目的で、第1同祖染色体群の短腕欠失系統(ditelocentric系統CS DT 1AL、CS DT 1BL、CS DT 1DL)を2D-PAGEに供して解析した。CS DT 1BL(1B染色体短腕欠失系統)において1c~3cが欠

失っていた [\(第9図\)](#) ことから、1c~3c及び「Glenlea」のGL1/GL2はBゲノムのGlu-B3遺伝子の産物であることが示された。

#### (7) 「春のあけぼの」と「Yecora Rojo」のLMW-GS

「春のあけぼの」のHA1（推定分子量は48kDa）と「Yecora Rojo」の42kDaサブユニットはSDS-PAGEにおける易動度がほぼ一致した [\(第4図\)](#)。また、2D-PAGEで比較したところ、分離パターンも非常に類似していた [\(第10図\)](#)。以上から、HA1と42-kDaサブユニットは同一の分子である可能性が高い。

[次へ進む](#)   [前に戻る](#)   [目次に戻る](#)

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

## II. 小麦粉の生地物性を強める低分子量グルテニンタンパク質の同定

### 2. 強力秋まきコムギ系統「KS831957」に由来する低分子量グルテニンタンパク質

秋まきコムギ系統「KS831957」は超強力粉に近い強い生地物性と良好な製パン適性を持つ。そこで、「KS831957」の生地物性に関与しているGSの同定を試みた。まず、「KS831957」と中力コムギ品種「ホロシリコムギ」及びこれらの交配に由来する育成系統の生地物性を調査した。次いで、これらの育成系統のうち、HMW-GSとLMW-GSの組成の異なる二つの姉妹系統を交配して得たRILの生地物性を評価した。

これまで、超強力コムギを積極的に育種するために必要なグルテニンサブユニット組成についてはほとんど論じられてこなかったが、生地物性を著しく強めるHMW-GS 5+10遺伝子と交互作用あるいは相加効果を持つLMW-GS遺伝子を知ることが育種上有益と考えられる。そのようなLMW-GSあるいはコード遺伝子としては、*Glu-B3b* (Gupta et al. 1994)、*Glu-B3d* (He et al. 2004) やハルユタカの約45kDaのB2タイプサブユニット (田引ら 1998、池口ら 1999) が報告されているが、超強力小麦の特性に寄与するかは不明である。本研究では、5+10遺伝子と交互作用によって超強力小麦の特性に寄与する「KS831957」のLMW-GSを明らかにした。さらに、強い生地物性に関与している「KS831957」のLMW-GSと「Glenlea」のGL1、GL2をタンパク質レベルで詳細に比較し、春まきコムギと秋まきコムギに生地物性を強める類似したLMW-GSが存在することを示した。

#### 1) 材料と方法

##### (1) 材料

##### ア. 品種・系統

カンザス州立大学 (Manhattan, カンザス州、米国) で育成され、アメリカの小麦銘柄「Hard Red Winter」に分類される秋まきコムギ系統「KS831957」と国内の秋まき中力コムギ品種「ホロシリコムギ」を用いた。「ホロシリコムギ」は硬質小麦であるが製パン適性は低い。

「KS831957」と「ホロシリコムギ」は1997年9月播種/1998年7月収穫 (以降は播種年/収穫年で示す) 及び1998/1999で、北海道農業研究センター畑作研究部の試験圃場 (芽室町) にて栽培した。1998年に収穫したものはブラベンダー・ジュニア・テストミル (Brabender Inc., ドイツ) を用いて全粒粉にした。1999年に収穫したものはビューラー社 (Buhler Inc., スイス) のテストミルを用いて製粉し、得られた小麦粉を60%粉に調整した。これらの小麦粉は生地物性と製パン適性の評価実験に供した。

##### イ. 育成系統

「KS831957」 (種子親) × 「ホロシリコムギ」 (花粉親) はF<sub>3</sub>世代まで集団で維持した後、F<sub>4</sub>世代で選抜し系統育成を行った。これらのうち、SDS-PAGEによりHMW-GS及びLMW-GSの組成が異なる「勝系32号」、「勝系33号」、「勝系34号」の3系統を選んだ。これら3系統は「KS831957」と「ホロシリコムギ」と同様に栽培、製粉した。また、1998年に収穫したものはF<sub>6</sub>世代であり、1999年に収穫したものはF<sub>7</sub>世代であった。

## ウ. 組換え自殖系統 (RIL)

異なるHMW-GS及びLMW-GSの組成を持つ小麦粉の性質を調べるために、「勝系32号」(種子親)と「勝系34号」(花粉親)との交配に由来する83のRILを作出した。「勝系32号」×「勝系34号」のF<sub>1</sub>を4個体育て、得られたF<sub>2</sub>種子の中から、100粒を無作為に選抜した。単粒系統法(SSD法)により世代を進め、発芽不良・生育不良の個体を除いて83のF<sub>6</sub>のRILを得た。F<sub>6</sub>のRILの種子は2002年に温室内で結実させ、ブラベンダー・ジュニア・テストミル(Brabender Inc.)を用いて全粒粉とした。各RILのGSをSDS-PAGEにより分析して4タイプ(「KS831957」に由来するLMW-GS KS2/HMW-GS 2+12、KS2/HMW-GS 5+10、「ホロシリコムギ」に由来するLMW-GS HS1/2+12、HS1/5+10)に分け、タイプごとに数系統の小麦粉を等量ずつ混合し、生地物性の評価試験に供した。

F<sub>6</sub>のRILで、「KS831957」に由来するKS2または「ホロシリコムギ」に由来するHS1の遺伝子をホモ接合に持つ79系統を、2002/2003に北海道農業研究センター畑作研究部の試験圃場(芽室町)にて栽培してF<sub>7</sub>のRILの種子を得た。収穫した種子はビューラー社(Buhler Inc., スイス)のテストミルを用いて製粉し、得られた小麦粉を60%粉に調整して2D-PAGEに供した。

### (2) グルテニンタンパク質の抽出と電気泳動

種子または小麦粉からII、1、1)、(2)の方法でグルテニンタンパク質を抽出し、II、1、1)、(3)の方法で電気泳動を行った。ただし、F<sub>7</sub>のRILの2D-PAGEでは、グルテニン沈殿の溶解性を高めるため、lysis bufferの代わりに2% IPG Buffer (pH 6-11、アマシャムファルマシアバイオテック)を含むDeStreak™ Dehydration Solution (アマシャムファルマシアバイオテック)に溶解し、一次元目の乾燥ゲルの膨潤も同バッファーを用いて行った。また、二次元目のSDS-PAGEではゲル当たり6mAでの電気泳動時間を17時間に延長した。

### (3) 生地物性と製パン適性の評価

#### ア. 小麦粉と生地の特性評価

小麦粉のタンパク質含量(FP)を、Inframatic 8120 (Percon、ドイツ)を用いた近赤外分光法により測定した。RILのタンパク質含量はRAPID N (Elementar Co., 米国)を用いたデュマ法により測定した。

小麦粉の生地物性の強さを評価するために、II、1、1)、(4)と同様に改良型「35gスワンソンヘッドピンタイプミキサー」を用いてミキシング試験を行い、ピークタイムとブレイクダウンを測定した。F<sub>6</sub> RILの小麦粉は少量だったため、2g Mixograph (National Mfg., 米国)を用いた小規模ミキシング試験を行った。この試験では、付属ソフトウェアMIXSMARTR (National Mfg.)により、生地物性の強さと正の相関があるピークタイムとエンベロップエリアを算出した。エンベロップエリアは、抵抗値がある幅を持ってプロットされている領域のうち、ピークタイムからその2分後までの領域の面積を数値化したものである。

#### イ. 製パン適性評価

製パン適性試験は、ノータイム法(Yamauchi et al. 2001)を用いて行った。パン生地の材料の配合は小麦粉200g、ショ糖10g、食塩4g、油脂10g、イースト4g、アスコルビン酸30ppm、水適量であった。ミキシング時間を含めたベンチタイムは20分であった。生地は3つに分割し、38℃、相対湿度85%の条件で70分間発酵した。その後ただちに200℃で25分間焼成した。焼成1時間後にそれぞれのパンの重量と体積(cc)を測定した。単位重量当たりの体積(cc/g)を比容積(SLV)として示した。

II、1、1)、(4)と同様にパン容積と相関のあるSDS沈降量も測定したが、F<sub>6</sub> RILの小麦粉は少量だったため、マイクロSDS沈降テストを行った。20mlの有栓メスシリンダーに小麦粉0.5gと16mlのSDS-乳酸溶液を加えて行った。

## ウ. 統計処理

5つの品種・系統については、各パラメータにつき異なる収穫年（1998、1999年）で測定し（2反復）、遺伝子型間の差を検出するために分散分析とF検定を行った。F<sub>6</sub> RILについては複数の系統の小麦粉を混合した各タイプと同じ試料の測定を2反復行い、タイプ間の差を検出するために分散分析とF検定を行った。

### (4) N末端アミノ酸配列の解析

N末端アミノ酸配列解析に供するタンパク質量をできるだけ多くするために、「ホロシリコムギ」、「KS831957」のグルテニンタンパク質の2D-PAGEを複数回行い、それぞれに特異的なタンパク質スポットをゲルから回収した。その後の操作はII、1、1)、(5)と同様である。

## 2) 結果と考察

### (1) 秋まきコムギ品種・系統のHMW-GSおよびLMW-GSの組成

「ホロシリコムギ」、「KS831957」、「勝系32号」、「勝系33号」、「勝系34号」のグルテニンをSDS-PAGEにより解析した。泳動像は第11図に示した。HMW-GSについては、いずれもGlu-B1にコードされる7+9を持っていた。親品種「ホロシリコムギ」はこれに加え1、2+12（それぞれGlu-A1、Glu-D1にコードされる）を持ち、「KS831957」はこれらの対立遺伝子にコードされる2\*、5+10を持っていた。

LMW-GSの主要なサブユニットは「ホロシリコムギ」、「KS831957」間で異なる。すなわち、「ホロシリコムギ」では分子量約48kDaと43kDa（各々HS1、HS2と命名）の二つの主要なLMW-GSが特異的に検出された。「KS831957」では5つの主要なLMW-GS（KS1～KS5）が特異的に発現し、それらの分子量はそれぞれ約50kDa、42kDa、40kDa、36kDa、33kDaであった。

「勝系32号」のHMW-GS組成は1、7+9、5+10で「ホロシリコムギ」とは5+10のみが異なっていたが、LMW-GSについては「ホロシリコムギ」と類似していた。「勝系34号」のHMW-GS組成は「ホロシリコムギ」と一致したが、LMW-GSについては「KS831957」に由来するKS1、KS2、KS3を持っていた。「勝系33号」のHMW-GS組成（2\*、7+9、5+10）は、「KS831957」と一致し、さらにLMW-GSも「KS831957」と同様であった。

### (2) 秋まきコムギ品種・系統のLMW-GSの2D-PAGE

「ホロシリコムギ」、「KS831957」、「勝系32号」、「勝系33号」、「勝系34号」のLMW-GSを詳細に解析するために2D-PAGEを行った。まず、SDS-PAGEで一本のバンドとして検出されたものが、2D-PAGEによって1～4個のLMWGスポットに分離することが明らかとなった（第12図）。

「ホロシリコムギ」のHS1は主にスポット1b～3bから、HS2は4bから成っていた。さらに、「ホロシリコムギ」に固有の2個のスポット（1B、2B）が2D-PAGEで見いだされた。これらはSDS-PAGEでは判別されなかった。「KS831957」のKS1は1個のスポット5bで示され、KS2は6b、7bから成っていた。KS3は主に8b～11b、KS4は12b～14b、さらにKS5は主として15bから成っていた。

育成系統の2D-PAGEの結果を第13図に示す。「勝系32号」（第13図B）ではHS1に相当するLMWGスポット（1b～3b）とKS1に相当するLMWGスポット5bが見出された。SDS-PAGEにおい

ではKS1が主要なHS1と重なって判別出来なかったことがわかった。また、SDS-PAGEでは「勝系32号」はHS2を持つと判断されたが、2D-PAGEによるとHS2ではなく、「KS831957」のKS3を構成するスポット9bと同じ位置に分離されるスポットを保有していた。このスポットを「9b」と命名し、9bのみから構成されるKS3をKS3sと命名して区別した。さらに「勝系32号」は「ホロシリコムギ」に由来する2個のスポット1b、2bを持っていた。1b、2bは「勝系33号」(第13図D)及び「勝系34号」(第13図C)にも含まれていた。「勝系34号」のKS3に相当する4個のスポット(8b~11b)のうち、10bと11bの出現は不安定であり、出現したとしてもかすかに染色されるだけであった。これに反して「勝系33号」や「KS831957」(第13図E)の10bと11bの出現は安定しており、8bと同程度に染色された。したがって、「KS831957」(「勝系33号」)と「勝系34号」の10b、11bは別のものであり、「勝系34号」の10bと11bは実験によるartifactsと考えられた。さらに8b、9bは10b、11bとは独立に分離して「勝系34号」に遺伝したと考えられたので、8b、9bから成る「勝系34号」のKS3をKS3aと命名し、8b~11bから成る「KS831957」及び「勝系33号」のKS3と区別した。本項の2D-PAGEによって解析した結果明らかになった5つの品種・系統のLMW-GS組成及びHMW-GS組成を第6表にまとめた。

以上のように、SDS-PAGEでは同じサブユニットと判定し得るものが、2D-PAGEで分離することにより、それを構成するLMWGスポットが独立して遺伝する可能性があることが初めて確認された。見かけ上の分子量が同じで、一つのサブユニットを構成する複数のLMWGスポットの成因としては、前述のように、実験によるartifactsの可能性が考えられる。またはmRNAからの翻訳後に修飾を受けた結果生じた可能性もある。

### (3) 春まきコムギとの比較

「KS831957」と「ホロシリコムギ」を特徴づけるLMW-GSが「Glenlea」のGL1/GL2や「春のあけぼの」のHA1とそれぞれ同一か否かを知るためにSDS-PAGEを行った。その泳動像を第14図に示した。「春のあけぼの」のHA1は「ホロシリコムギ」のHS1と易動度が一致し、「Glenlea」のGL1とGL2は「KS831957」のKS2とKS3とそれぞれ易動度が一致した。また、HA1はHS1と、GL1はKS2と、さらにGL2はKS3aと2D-PAGEでの分離パターンが非常に類似していた(第5図と第12図)。しかし、一つのLMW-GSに内包される主なLMWGスポットの数には差も見られた。すなわち、HA1は5スポットに分離したのに対し、HS1スポットは3個であり、GL1で3個であるのに対し、KS2では2個であった。「Glenlea」と「KS831957」のグルテニンタンパク質を混合して2D-PAGEを行ったところ、「Glenlea」の1aと2a(GL1)、4aと5a(GL2)が「KS831957」の6bと7b(KS2)、8bと9b(KS3)とそれぞれ重なった(データは示さず)。以上のように、スポット数に違いはあるものの、各LMW-GSに相当するLMWGスポットのpIが非常に近似していたことから、HA1とHS1、GL1とKS2、GL2とKS3aはそれぞれ互いにほぼ同一のLMW-GSである可能性がある。

### (4) 秋まきコムギ品種・系統の生地物性と製パン適性、及び生地物性を強めるLMW-GS

5つの品種・系統について小麦粉の生地物性の強さの指標となるパラメータを測定し、第6表に示した。「ホロシリコムギ」と「KS831957」を比較すると、ブレイクダウンを除いてすべてのパラメータの値が「KS831957」の方が大きく、「KS831957」は「ホロシリコムギ」より明らかに強い生地物性を示した。「勝系33号」は「KS831957」と同程度の生地物性を持つと考えられた。「勝系34号」のパラメータは「ホロシリコムギ」と「KS831957」の中間値となった。また「勝系32号」の各パラメータは反復による測定値の差が大きく「ホロシリコムギ」と有意差が無かったが、平均値は「勝系34号」と同程度であったため、潜在的には「ホロシリコムギ」より強い生地物性を持っていると考えられた。

「勝系32号」は「ホロシリコムギ」のHMW-GS 2+12に代わって5+10を持っている。また、「KS831957」からLMW-GSが導入されており、これらのことが「ホロシリコムギ」より強い生地物性を示す主な要因であると推察された。「勝系34号」のHMW-GS組成は「ホロシリコムギ」と同じであるが、HS1、HS2に代わって「KS381957」に由来するKS1、KS2、KS3aを保有していることが、「ホロシリコムギ」より強い生地物性の要因となったと推察された。「勝系33号」では「KS831957」由来のHMW-GS 2\*、5+10、LMW-GS KS1~KS5を持ち、「勝系32号」や「勝系34号」よりさらに強い生地物性を示した。HMW-GS 2\*と1の生地物性の強さへの寄与度を比較した報告によると、HMW-GS 2\*は1とほとんど同程度の影響を与えるか、または1より若干寄与度が低いとされている (Khan et al. 1989, Wesley et al. 1999, Takata et al. 2000)。したがって、「勝系33号」が2\*を持つことが、「勝系32号」や「勝系34号」よりさらに強い生地物性を発揮する要因とは考え難い。よって、「KS831957」由来のHMW-GS 5+10及びLMW-GS KS2、KS3 (10b、11b)、KS4、KS5が強い生地物性に関与していると推察された。

#### (5) KS2とHS1の対立性

生地物性を強める「KS831957」のLMW-GSを決定するために、HMW-GS及びLMW-GS組成を持つ「勝系32号」(HMW-GS 1、7+9、5+10、LMW-GS HS1、KS1、KS3s)と「勝系34号」(1、7+9、2+12、KS1、KS2、KS3a)との交配に由来するRILを作成し、生地物性を評価した。まず、RILを分類するために「Glenlea」のGL1、GL2と泳動パターンが同様のKS2とKS3aに着目し、これと対立関係にある「ホロシリコムギ」のLMW-GSを検索した。83のRIL (F<sub>6</sub>)をSDS-PAGEに供したところ (第15図)、KS2は同定できたが、KS3aについては易動度の似たバンドがしばしば出現し、判定できなかった。そこで、KS2とHS1に着目してRILを分類した結果、KS2とHS1との対立性が見出された。KS2を持つRILは35系統、HS1を持つRILは44系統、両者をもつRIL (おそらくヘテロ接合体) は4系統であった。KS2、HS1をコードするGlu-3の対立遺伝子のF<sub>6</sub> RILにおける期待分離比は、ホモ接合体がそれぞれ48.4%で、ヘテロ接合体は3.1%となる。得られた系統比は期待比に適合した ( $\chi^2=1.800, p=0.41$ )。

SDS-PAGEではKS3aがKS2と共分離するか否かや、HS1を持つRILがKS1を持つか否かも判定できなかった。そこで、各LMW-GSを2D-PAGEで詳細に解析することにした。

#### (6) RIL (F<sub>7</sub>) の2D-PAGE

KS2及びHS1をコードする対立遺伝子についてホモ接合体である79のRIL (F<sub>7</sub>) のグルテニンを2D-PAGEで解析した。HS1をコードする対立遺伝子についてホモ接合体のRILのすべてにおいて、HS1を構成するLMWGスポット1b~3bが共に存在していた。KS2をコードする対立遺伝子に関してホモ接合体のRILのすべてにおいては、KS2の構成LMWGスポット (6b、7b) 及びKS3aの構成スポット (8b、9b) は共分離していた。以上から、GL1/GL2と同様にKS3aとKS2は共分離することが確認された。

KS2を持つF<sub>7</sub> RILの二つの例を第16図に示した。「勝系34号」の9bは一つのスポットであるように見えたが、F<sub>7</sub> RILの2D-PAGEを行った結果、9bは易動度が若干異なる2個のスポットから成っていると判定されたを (第16図)。2個のうち、易動度の遅い方のスポットは、2D-PAGE上の位置から判断すると「勝系32号」で検出された9b'と考えられた。9b'は79のうち51のRILで出現し、KS1を構成する5bと共分離していた (第16図a)。したがって、5b/9b' (KS1/KS3s) はGlu-a3またはGlu-D3の対立遺伝子に共にコードされていると考えられる。「勝系32号」と「勝系34号」の10個体以上のグルテニンを電気泳動で調査したところ、「勝系32号」はKS1/KS3

sのコード遺伝子をホモ接合に持ち、「勝系34号」はヘテロ接合に持つことがわかった（データは示さず）。

易動度の早い方の9bスポットは6b、7b、8bと共分離していた（[第16図b](#)）。そこで、KS3aを8b及び易動度の早い9bから成るLMW-GSと解釈した。「KS831957」、「勝系33号」、「勝系34号」の2D-PAGE像（[第13図](#)）では9bスポットと9b'が重なっていると考えられた。

#### (7) RIL (F<sub>6</sub>) の生地物性

HMW-GS 5+10と2+12、LMW-GS KS2/KS3aとHS1の生地物性に及ぼす影響を評価する目的で、F<sub>6</sub> RILをそれぞれの対立遺伝子の組み合わせに基づいて4タイプ（2+12/HS1、2+12/KS2、5+10/HS1、5+10/KS2）に分類した。なお、分析はSDS-PAGEによって行ったので、LMW-GSについてはKS2とHS1で分類した（KS3aを考慮していない）。

4タイプの生地物性を評価した結果を[第7表](#)に示した。4タイプのタンパク質含量に有意差は見られなかったため、GS組成の違いが他のパラメータの値によく反映されていると考えられた。2+12を共通にもち、LMW-GSが異なる2タイプを比較すると、ピークタイムとSDS沈降量は同じだが、エンベロップエリアの値はHS1タイプよりKS2（/KS3a）タイプの方が高かった。5+10を共通に持つ2タイプで比較すると、HS1を持つタイプよりKS2（/KS3a）を持つタイプでピークタイム、エンベロップエリア、SDS沈降量ともに有意に高い値となった。これらのことからHS1よりKS2/KS3aの方が生地物性を強める効果が高いことが明らかになった。また、KS2/KS3aの生地物性に及ぼす効果は5+10と組み合わせられることでより高まった（[第7表](#)）。別言すれば、KS2/KS3aのコード遺伝子と5+10のコード遺伝子は交互作用によって生地物性を強めると考えてよい。

#### (8) 強い生地物性に関わる低分子量グルテニンタンパク質のN末端アミノ酸配列

「KS831957」の強い生地物性に関与するKS2、KS3aおよびその対立形質であるHS1を構成するLMWGスポット（[第13図](#)）をN末端アミノ酸配列解析に供した。また、HS1、KS1、KS3（10b、11b）、KS4、KS5も生地物性を強めている可能性があるため、解析に供した。1b、2bは勝系系統すべてが持っており、「ホロシリコムギ」においても主要なLMW-GSではないため、生地物性に関して重要ではないと判断し、解析しなかった。

アミノ酸ピークが得られなかった「ホロシリコムギ」の1b、「KS831957」の5b、15bを除いた供試スポットのアミノ酸配列を[第8表](#)に示した。「ホロシリコムギ」のHS1に相当する2b、3b、「KS831957」のKS2に相当する6b、7b、KS3に相当する8b、9b、10bのN末端アミノ酸配列はすべて春まきコムギと同様に「SHIPGLERPSQQPLPP」に含まれた。ただし、9bと9b'は混合されたまま解析されている。もしも5bと共分離する9b'が、5bと同様に解読できていないとすれば、実際に解読されたアミノ酸配列はKS3aに含まれる9bのものと考えられる。KS3に相当する11b（「SHIPGLEKPSQQPL」）もまたLMW-sであったが、8番目のアミノ酸がリジン（K）であり、[第3表](#)のG4タイプに一致した。「KS831957」のKS4に相当する12b~14bはすべて「METRXIPGLE(Xは未同定)」であったので、LMW-mとなる。

「ホロシリコムギ」のHS2に相当する4b（「ISQQQ」）はLMW-iであった。LMW-iは遺伝子レベルでは多数見つかったものの、これまでタンパク質レベルで確認された例はなく、本研究の結果はLMW-iが実際に種子中に存在することを示した最初の報告である。

[次へ進む](#)   [前に戻る](#)   [目次に戻る](#)

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

## III. 小麦粉の生地物性を強める低分子量グルテニンタンパク質の候補遺伝子の同定と DNAマーカーの開発

### 1. 「Glenlea」の強い生地物性に関するLMW-GS遺伝子とDNAマーカー

「Glenlea」のGL1/GL2をコードする遺伝子を同定するため、あらかじめ単離したLMW-s遺伝子の塩基配列をもとにプライマーを設計し、逆転写PCR (RT-PCR) とゲノミックPCRによって、GL1/GL2と共分離する遺伝子を探索した。

#### 1) 材料と方法

##### (1) 材料

RT-PCRに供するために、2001年に「春のあけぼの」、「NIL」、「Glenlea」を28°Cに設定した温室（暖房と窓の開閉により温度制御される）で栽培し、未熟種子を得た。

また、II、1、1)、(2)でグルテニンを抽出するために半分に切断したBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>種子片（胚を含む側）を2003年に室内（室温）で発芽させ、その後園芸培土を入れた鉢に移植し、25°Cに設定した温室内で養成してゲノミックPCRに供した。

##### (2) RT-PCR

#### A. プライマー

「Glenlea」の開花後20日目の未熟種子からRNAを抽出し、GIBCO BRL社（現invitrogen、米国）の「MESSAGE MAKER」キットを用いてmRNA標品（Poly(A)+RNA）を精製した。このmRNAから、GIBCO BRL社の「SUPERSCRIPT™ Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning」キットを用いてcDNAライブラリーを作成した。このライブラリーに対して、LMW-GS遺伝子に特異的な反復配列をPCRによって増幅した断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、複数の陽性クローンを得た。その中の一つの遺伝子の塩基配列を基に、順方向プライマーS-type2F 5'-AACACTAGTTAACACTAGTCCACC-3'と逆方向プライマーS-type978R 5'-AAACAACACTAGTTTGGGCGGGTC-3'を設計した。

#### イ. LMW-s遺伝子の同定

「春のあけぼの」と「NIL」の開花20日目の未熟種子及び「Glenlea」の開花15日目の未熟種子からRNAを抽出し、MESSAGE MAKER（GIBCO BRL）を用いてPoly(A)+RNAを精製した。約100ngのPoly(A)+RNAからSUPERSCRIPT™ First-Strand Synthesis System（GIBCO BRL）を用いてcDNAを合成した。このcDNAの1/20量（1μl）を鋳型として用いた。RT-PCRは1μlの合成cDNA、1×Pfx Amplification Buffer（invitrogen）、1×PCRx Enhancer Solution（invitrogen）、1mM硫酸マグネシウム、0.25mMの各dNTP、125μMの各プライマー（S-type2F、S-type978R）、1.25UのPLATINUMR Pfx DNA polymerase（invitrogen）を含む20μlの反応系で行った。GeneAmp PCR System 2400（Perkin-Elmer）を用いて、94°Cで2分間反応させ、続いて1サイクルを94°Cで15秒、59°Cで30秒、68°Cで1分として45サイクル反応させ、最後に72°Cで7分間反応させた。PCR産物は、5μlの反応液を1.2%のアガロースゲルで電気泳動し、5μg/mlの臭化エチジウムで染色し、紫外線下で可視化した。

「春のあけぼの」、「NIL」、「Glenlea」において増幅したDNA断片をゲルから精製し、塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、ベクターへのサブクローニングによる反復配列の欠失 (D'Ovidio et al. 1999) を防ぐため、BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Ver. 2 (アプライドバイオシステムズ) とシーケンサー (model 377、アプライドバイオシステムズ) を用いて直接行った。塩基配列のデータはDNASIS (日立ソフトウェア、日本) 及び Sequencher (Gene Codes Co.、米国) を用いて解析した。

### (3) BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>個体に対するゲノミックPCR

ゲノミックPCRには、実際の育種計画でも利用できるようなシステムの構築を目指して、簡便なゲノミックDNAの抽出方法を採用した。DNA抽出は、Klimyukら (1993) の方法に準じて行った。胚を含むBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>種子片から葉を展開させ、3~4葉期の4cm程度の葉とガラスビーズを1.5ml 容チューブに入れ、液体窒素で凍結し、激しく振とうして粉碎した。これに80 µlの0.25N水酸化ナトリウムを加えて30秒間煮沸し、次に80 µlの0.25 N塩酸、40 µlのバッファー (0.5M Tris-HCl (pH 8.0)、0.25% polyethoxyethanol (IGEPAL CA-630)) を加えて2分間煮沸し、上清を鑄型とした。

プライマーには順方向プライマーs-F1:5'-CCATCCAACAACAACCACACCA-3'と逆方向プライマーs-R2:5'-CCCGAGTTGCTGTTGTGACTGC-3'を用いた。反応は1 µlの上清 (上記)、1×PCR Buffer (アプライドバイオシステムズ)、各100 µMのdNTP、0.05% IGEPAL、各250nMのプライマー、0.4UのAmpliTaq Gold™ (アプライドバイオシステムズ) を含む20 µlの反応系で行った。GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer) を用いて、94°Cで4分間反応させ、続いて1サイクルを94°Cで30秒、62°Cで30秒、72°Cで1分として50サイクル反応させ、最後に72°Cで7分間反応させた。10 µlの反応液を(2)イと同様に可視化した。

「春のあけぼの」、「NIL」、「Glenlea」に対しても同様にゲノミックPCRを行い、増幅したDNA断片の塩基配列を決定した。

## 2) 結果と考察

### (1) RT-PCRによるLMW-s遺伝子の同定

「Glenlea」のGL1/GL2および「春のあけぼの」のHA1をコードする遺伝子を同定するためにはLMW-s遺伝子を得ることが重要と考えた。「Glenlea」のcDNAライブラリーからLMW-s遺伝子の単離を試みたところ、[第3表](#)のG3グループに相当するLMW-s遺伝子が一種だけ見いだされた。この遺伝子 (cDNA32) は「Yecora Rojo」の42-kDaサブユニットをコードする遺伝子 (Y17845) と98.7%の相同性を示したが、Y17845の反復配列領域に相当する約350bpが欠失していた ([第17図](#))。Y17845はG3グループ (Ikeda et al. 2002) に属す。このグループの遺伝子はすべてシグナルペプチド数残基のデータを欠いている。しかし、cDNA32はORFの両側の非翻訳領域を含んでいた。そこで、LMW-s遺伝子の完全なORFを増幅させるために、cDNA32のORFの外側にプライマー (S-type2F/S-type978F) を設計した。

「Glenlea」、「NIL」、「春のあけぼの」に対してS-type2F/S-type978Fを用いたRT-PCRを行ったところ、「春のあけぼの」において約1300bpのDNA産物が、また「Glenlea」、「NIL」において約1200bpのDNA産物が増幅された ([第18図](#))。これらのDNA産物の塩基配列を解析したところ、これらは既知のLMW-GS遺伝子と相同性があった。そこで約1300bpと約1200bpのDNA産物にそれぞれgene symbol「HARU48K」、「GLEN42K」を命名し、これらをDDBJに登録した (HARU48K: accession number AB119006、GLEN42K: accession number AB119007)。HARU48K、GLEN42Kの推定アミノ酸配列は、LMWGスポット

1a、2a、3a、4a、5a、7aのN末端アミノ酸配列「SHIPGLERPSQQQLPP」を含んでいた。また、いずれもG3グループの完全なシグナルペプチドに相当すると思われる配列（「MKTFLIFALLAVAATSIAIQMEN」）を含んでいた（[第19図](#)）。このように、完全長のG3グループ遺伝子が今回初めて同定された。

HARU48K（1327bp）の含むORFは392のアミノ酸残基から成り（[第19図A](#)）、N末端（SHIPGLE）から始まる成熟タンパク質の分子量は42,084で、等電点（pI）は8.27と計算された。HARU48KとY17845は、塩基配列で99.0%、推定アミノ酸配列の場合は98.5%の相同性を示した。一方、GLEN42K（1180bp）は343のアミノ酸残基から成るORFを含み（[第19図B](#)）、N末端（SHIPGLE）から始まる成熟タンパク質の分子量は36,591で、等電点（pI）は8.47と推定された。

HARU48KとGLEN42Kのアミノ酸配列のアライメントを行った結果、互いの相同性は86.2%であり、GLEN42Kにおいては反復配列領域がHARU48Kより短いことがわかった（[第20図](#)）。さらにGLEN42K反復配列領域には、HARU48Kと異なる15個のグルタミン（Q）が連なったモチーフがあった。このようなモチーフは既知のLMW-GS遺伝子にはないことから、GLEN42Kは新規のLMW-GS遺伝子と考えられた。

既述のように、GL1/GL2を持つ「NIL」においてもGLEN42Kと同様の易動度を持つDNA断片が増幅されたが（[第18図](#)）、その塩基配列はGLEN42Kと全て一致した。

## (2) 分離世代の個体に対するゲノミックPCR

GLEN42KがGL1/GL2を、またHARU48KがHA1をそれぞれコードしているか否かを検証するために、「春のあけぼの」×「Glenlea」に由来するBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>の分離世代においてゲノミックPCRを行った。まず、「春のあけぼの」と「Glenlea」の両親間で多型が見いだされるようなプライマーを検討した。プライマーS-type2F/S-type978Rを用いたゲノミックPCRでは両者に対して1kbp以下のDNA断片が複数増幅され、多型は見いだされなかった。この理由としては、本研究で採用した簡便なDNA抽出法が1kbp以上のDNA断片を増幅するには適さないためと考えられた。そこで、HARU48Kの塩基配列を参考にして1kbp以下のDNA断片が増幅するようなプライマーセットを数種設計した。[第19図A](#)に示した配列の第179塩基から第200塩基に相当する順方向プライマーs-F1:5'-CCATCCAACAACAACCACACCA-3'と、第996塩基から第1017塩基に相当する逆方向プライマーs-R1:5'-CCCGAGTTGCTGTTGTGACTGT-3'を用いた際に、「春のあけぼの」で約800bpのDNA断片が増幅され、他方「Glenlea」ではより短いDNA断片がかすかに増幅された。

「Glenlea」での増幅効率を上げるために、s-R1の3'の塩基TをGLEN42Kの対応塩基Cに変更し、s-R2と名付けた。プライマーs-F1/s-R2を用いたPCRによって、「春のあけぼの」においては839bpのDNA断片が増幅し、「Glenlea」においては692bpのDNA断片が明瞭に増幅した。増幅断片の塩基配列を解析した結果、839bpのDNA断片はHARU48Kの第179塩基から第1017塩基に一致し、692bpのDNA断片はGLEN42Kの第179塩基から第870塩基に一致した（[第19図](#)、ただしプライマーに相当する部分の一部は一致しない）。

95個体のBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>種子のうち、18個体は出葉しなかったため、残り77個体のBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>後代に対してs-F1/s-R2を用いてゲノミックPCRを行った。その結果、839bpのDNA断片が増幅した個体はすべてHA1遺伝子に関してホモ接合体で、692bpのDNA断片が増幅した個体はすべてGL1/GL2遺伝子に関してホモ接合体であり、両方のDNA断片が増幅した個体はすべてヘテロ接合体であった（[第21図](#)）。なお、12個体のBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>植物においてはDNA断片の増幅が全く見られなかった。これは、鋳型に供し得るDNAが十分に抽出できなかったか、保存中にDNAが分解したことが原因と推察された。以上の結果から、GLEN42KはGL1、GL2のうち少なくとも1個のLMWGスポットをコード

していると推察した。また、LMWGスポット6a、8a、9a、10aも7aと同じN末端アミノ酸配列を持つとすれば、*HARU48K*はHA1を構成するこれらのスポットの少なくとも一つをコードしていると推察した。しかし、*Glu-3*座の構造は複雑であることが示唆され、全体像については不明の点が多い。よって、692bpのDNA断片がGL1/GL2のコード遺伝子と、839bpのDNA断片がHA1のコード遺伝子と密接に連鎖している可能性も否定できない。

上記のDNA断片は、育種計画の中で、生地物性を強めるGL1/GL2を持つ系統を選抜するためのDNAマーカーとして利用できると思われる。DNAマーカーによる選抜に要する時間は、コムギ種子からグルテニンを抽出してSDS-PAGEを行うのに要する時間より短いと考えられるので、選抜効率を上げることができると考えられる。特に、SDS-PAGEでの選抜においては、交配組み合わせによりGL1/GL2と易動度が似通ったLMW-GSが検出されてGL1/GL2の同定が難しく、2D-PAGEによる分離が必要になる場合が想定される。その場合は、DNAマーカーによる選抜の効率性がより高まる。また最近のコムギの育種法の中で、固定に要する時間を短縮するために多用されているdouble haploid line (DHライン)の作出において、半数体の幼葉に対してPCRを行ってGL1/GL2遺伝子の有無を判定すれば、種子が結実する以前に選抜できるため、選抜効率を大幅に高めることができる。

### (3) 「春のあけぼの」のHA1と「Yecora Rojo」の42-kDaサブユニットの類似性

「春のあけぼの」のHA1の候補遺伝子 (*HARU48K*) と「Yecora Rojo」の42-kDaサブユニットをコードする遺伝子 (Y17845) の塩基配列は高い相同性 (99.0%) を示し、推定アミノ酸配列中のシステイン残基の数と位置も完全に一致した。HA1と42-kDaサブユニットはSDS-PAGE、2D-PAGEによる分離パターンも非常に類似していた。これらの結果から、HA1と42-kDaサブユニットはほぼ同一の分子種であると考えられた。

Masciら (1998) は、「Yecora Rojo」の42-kDaサブユニットの高次構造を推測し、1番目と7番目のシステイン残基は共にポリペプチド鎖の中でflexibleな領域にあり、他の分子と結合しやすくなっていると考えた。また、この二つのシステイン残基の間は直鎖状の構造になっていると考えられたことから、42-kDaサブユニットはグルテニンポリマーを効率的に高分子量化し得る直鎖状chain extenderではないかと考えた。したがって、HA1もまたグルテニンポリマーの形成において42-kDaサブユニットと同様の役割を果たしているのかもしれない。

*GLEN42K*の推定アミノ酸配列から、この遺伝子産物もまた、反復配列が短いものの、8個のシステイン残基を持っており、システイン残基周辺のアミノ酸配列も*HARU48K*、Y17845と高い相同性を示した。よってGL1/GL2もHA1、42-kDaサブユニットと機能が似通っているかもしれない。

[次へ進む](#)   [前に戻る](#)   [目次に戻る](#)

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

## III. 小麦粉の生地物性を強める低分子量グルテニンタンパク質の候補遺伝子の同定と DNAマーカーの開発

### 2. 「KS831957」の強い生地物性に関するLMW-GS遺伝子とDNAマーカー

「KS831957」のKS2/KS3をコードする候補遺伝子を同定するために、「Glenlea」のGL1/GL2の候補遺伝子を増幅したプライマー及びDNAマーカーの増幅用プライマーを用いて、秋まきコムギ系統・品種に対してRT-PCRとゲノミックPCRを行った。

#### 1) 材料と方法

##### (1) 材料

RT-PCRに供するために、「ホロシリコムギ」、「勝系34号」、「KS831957」を北海道農業研究センターの試験圃場（札幌市）で2001/2002に栽培し、未熟種子を得た。

##### (2) RT-PCRによるLMW-s遺伝子の同定

「ホロシリコムギ」及び「勝系34号」の開花24日目の未熟種子と「KS831957」の開花19日目の未熟種子から1、1)、(2)イと同様にPoly(A)+RNAを精製し、RT-PCRを行った。増幅したDNA断片の塩基配列を1、1)、(2)イと同じ方法で決定した。

##### (3) 分離世代の個体に対するゲノミックPCR

「勝系32号」と「勝系34号」とを交配して得たF<sub>6</sub>世代の79のRILの種子を温室内で発芽させ、1、1)、(3)と同じ方法でDNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行った。PCRは春まきコムギの場合と同じプライマー（s-F1/s-R2、各125nM）を用い、1μlのDNA溶液の上清を含む20μlの反応系で行った。増幅効率を上げるために、他の反応液の条件は(2)のRT-PCRと同じ設定にした。GeneAmp PCR System 2400（Perkin-Elmer）を用いて、94℃で2分間反応させ、続いて1サイクルを94℃で15秒、60℃で30秒、68℃で1分として45サイクル反応させ、最後に72℃で7分間反応させた。反応液の5μlを1、1)、(2)イと同様にアガロースゲルで電気泳動した。

「ホロシリコムギ」、「KS831957」、「勝系32号」、「勝系34号」に対しても同様にゲノミックPCRを行い、増幅したDNA断片の塩基配列を1、1)、(2)イと同様に決定した。

#### 2) 結果と考察

##### (1) RT-PCRによるLMW-s遺伝子の同定

S-type2F/S-type978Rを用いたRT-PCRにより、「ホロシリコムギ」において約1300bpのDNA産物が、「KS831957」と「勝系34号」において約1200bpの産物がそれぞれ増幅された（[第22図](#)）。これらもまたLMW-GS遺伝子であったので、それぞれgene symbol「*HORO1*」、「*KANS2*」を命名し、DDBJに登録した（*HORO1* : accession number AB164415、*KANS2* : accession number AB164416）。

*HORO1*は「春のあけぼの」のHA1の候補遺伝子である*HARU48K*と100%の相同性を示した（[第23図A](#)）。推定アミノ酸配列は、HS1に相当するスポット2b、3bのN末端アミノ酸配列「SHIPGLERPSQQ」を含んでいた。*KANS2*は「Glenlea」の*GLEN42K*とほぼ同じ塩基配列を持っていた（[第23図B](#)）。唯一の違いは5'末端から数えて670番目の塩基が*GLEN42K*ではGであるの

に対し、Aとなっていることだった。したがってKANS2の216番目の推定アミノ酸はGLEN42Kのバリン (V) に代わってメチオニン (M) であった。その推定アミノ酸配列は、KS2及びKS3aに相当するスポット6b、7b、8b、9bのN末端アミノ酸配列「SHIPGLERPSQQQLPP」を含んでいた。ORFは343のアミノ酸残基から成り、N末端「SHIPGLE」から始まる成熟タンパク質の分子量は36,623 (GLEN42Kは36,591) で、等電点 (pI) は8.47 (GLEN42Kと同じ) と計算された。

HORO1とKANS2のORFの推定アミノ酸配列のアライメントを行った結果、それらの相同性は82.1%であり、KANS2においてはGLEN42Kと同様に、反復配列領域がHORO1より短かった。さらにGLEN42Kと同様に反復配列領域には、15個のグルタミン (Q) が連なったモチーフがあり、システイン残基の数と位置もGLEN42Kと完全に一致した。

「勝系34号」で増幅されたKANS2と同様の易動度を持つDNA断片 (第22図) の塩基配列はKANS2と全て一致した。

## (2) 分離世代の個体に対するゲノミックPCR

KANS2がKS2/KS3aを、またHORO2がHS1をそれぞれコードしているか否かを検証するために、両タンパク質のコード遺伝子に関してホモ接合体である79のRIL (F<sub>6</sub>) に対してゲノミックPCRを行った。まずプライマーs-F1/s-R2を用いて「ホロシリコムギ」、「KS831957」のPCRを行った。その結果、「ホロシリコムギ」においては839bpのDNA断片が、「KS831957」においては692bpのDNA断片がそれぞれ増幅された。塩基配列はそれぞれ、HORO1の第179塩基から第1017塩基、KANS2の第179塩基から第870塩基に一致した (第23図、ただしプライマーに相当する部分の一部は一致しない)。

「勝系32号」、「勝系34号」、そして79のRILに対してs-F1/s-R2を用いてゲノミックPCRを行ったところ、「勝系32号」とHS1遺伝子に関してホモ接合のRILにおいて839bpのDNA断片が特異的に増幅された (第24図)。これに対して、「勝系34号」とKS2/KS3a遺伝子に関してホモ接合のRILにおいては692bpのDNA断片が特異的に増幅された。「勝系32号」と「勝系34号」のDNA断片の塩基配列はそれぞれ「ホロシリコムギ」、「KS831957」のDNA断片と一致した。なお3系統のRILにおいてはDNA断片の増幅が全く見られなかった。これは、DNA抽出上の問題あるいは保存中のDNA分解に起因すると推察された。

仮に、「ホロシリコムギ」のHS1を構成するスポットでN末端が解読できなかった1bと、「KS831957」のKS3aを構成する9bのN末端が共に「SHIPGLERPSQQQLPP」と一致するならば、KANS2はKS2/KS3aの少なくとも一つのスポットをコードし、HORO1はHS1の少なくとも一つのスポットをコードしていると推察された。しかし、692bpのDNA断片を含むORFがKS2/KS3aのコード遺伝子と、839bpDNA断片を含むORFがHS1のコード遺伝子とそれぞれ密接に連鎖している可能性もある。

## (3) 候補遺伝子からみた「Glenlea」と「KS831957」のLMW-GSの類似性

「ホロシリコムギ」のHS1の候補遺伝子HORO1と「春のあけぼの」のHA1の候補遺伝子HARU48Kの塩基配列は100%一致した。また、KS2/KS3aの候補遺伝子KANS2とGL1/GL2の候補遺伝子GLEN42Kは1塩基のみが異なっていた。Glu-3遺伝子座の構造については十分に解明されておらず、本研究ではKS2/KS3aとGL1/GL2との対立性も検証していない。しかし、KS2/KS3aとHS1およびGL1/GL2とHA1はそれぞれ対立関係にあり、GL1/GL2とHA1はBゲノムに由来することが示された。また、これまでに同定されたLMW-GS遺伝子の翻訳領域の比較から、同じ第一同祖染色体 (1A、1B、1D) に含まれるLMW-GS遺伝子間の相同性は高く (96%以上)、異なるゲノム間での相同性は高くても96%であることがわかっている (D'Ovidio and Masci 2004)。したがって、KANS2、GLEN42K、HORO1、HARU48Kは同じGlu-B3遺伝子座上の対立遺伝子であ

るとみなしてよい。本研究の結果から、「ホロシリコムギ」のHS1、KS2、KS3aは「Glenlea」のHA1、GL1、GL2のそれぞれとほぼ同一の分子種であることが、タンパク質レベルのみならず遺伝子レベルからも示唆されたことになる。

II、2、(7)でHMW-GS 5+10とKS2/KS3aが相互作用して生地物性を強めると考えられたことから、KS2/KS3aとほぼ同一の分子種と考えられるGL1/GL2もまた5+10と相互作用している可能性がある。したがって、筆者はHMW-GS 5+10とKS2/KS3a及びHMW-GS 5+10とGL1/GL2を合わせ持つ系統は特段に強い生地物性を持つ超強力コムギになり得ると考えた。

#### (4) DNAマーカーの汎用性

以上の結果から、s-F1/s-R2を用いた簡便なPCRによって、強い生地物性に関わるLMW-GS遺伝子を春まきコムギおよび秋まきコムギにおいて検出できることがわかった。GL1/GL2と同様のLMW-GSは北米の多くの強力および超強力コムギ品種が持っている（Sylvie Cloutier、Kathy Adams私信）。また42-kDaサブユニットもいくつかの製パン性の高い品種に見られる（Masci et al. 2000）。したがって、世界の多くのコムギの遺伝資源に対して、s-F1/s-R2を用いた簡便なPCRでGL1/GL2（KS2/KS3a）やHA1（HS1）に類似したサブユニットを検出できる可能性がある。ただし、s-F1/s-R2を用いる場合、特定の遺伝資源の標的遺伝子がs-F1/s-R2の塩基配列の部分で変異を生じている場合はマーカーを増幅できない可能性もある。

[次へ進む](#)   [前に戻る](#)   [目次に戻る](#)

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

## III. 小麦粉の生地物性を強める低分子量グルテニンタンパク質の候補遺伝子の同定と DNAマーカーの開発

### 3. 小麦粉の生地物性を強める低分子量グルテニンタンパク質のDNAマーカーの利用例

本研究で開発したDNAマーカーの汎用性を検証するため、本DNAマーカーを用いた模擬的な育成系統選抜を試みた。種々の交配履歴をもつ育成系統についてHMW-GS 5のコード遺伝子（1Dx5）及びGL1/GL2（KS2/KS3）のコード遺伝子の有無をPCRによって判定し、DNAマーカーによる選抜の精度をタンパク質レベルで検証した。また、HMW-GS 5+10のみを持つ系統とHMW-GS 5+10及びLMW-GS GL1/GL2（KS2/KS3）を併せ持つ系統の生地物性の強さを比較し、5+10とLMW-GSの交互作用によって、超強力コムギ系統になり得るか否かを検討した。

#### 1) 材料と方法

##### (1) 生地物性の評価

北海道農業研究センター畑作研究部麦育種研究室が所蔵する14の育成系統を2002/2003に畑作研究部試験圃場（芽室町）において栽培して種子を得た。勝系シリーズは収穫した種子をビューラー社（Buhler Inc.）のテストミルを用いて製粉し、得られた小麦粉を60%粉に調整した。勝系シリーズ以外の系統はブラベンダー・ジュニア・テストミル（Brabender Inc.）を用いて全粒粉にした。この小麦粉を用いてInfraMatic 8120（Percon）によりタンパク質含量を測定し、改良型「35gスワンソンヘッドピンタイプミキサー」を用いたミキシング試験におけるピークタイムを測定した。

##### (2) PCR解析

16系統の種子を温室内で発芽させ、1、1)、(3)と同じ方法でDNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行った。

1D5xを識別するプライマー（以後、5+10マーカー）は石川ら（2004）が設計したもので、2種類の順方向プライマー（Dx5-F1: 5'-TTTGGGGAATACCTGCACTACTAAAAAGGT-3'、Dx5-F2: 5'-AAAAGGTATTACCCAAGTGTAAGTGTCCG-3'）と、1種類の逆方向プライマーDx5-R: 5'-AATTGTCCTGGCTGCAGCTGCGA-3'を用いた。反応は1μlのDNA溶液の上清、1×PCR Buffer（アプライドバイオシステムズ）、200μMの各dNTP、250nMのDx5-F1、150nMのDx5-F2、400nMのDx5-R、1UのAmpliAq Gold™（アプライドバイオシステムズ）を含む20μlの反応系で行った。GeneAmp PCR System 2400（Perkin-Elmer）を用いて、94℃で5分間反応させ、続いて1サイクルを94℃で30秒、65℃で30秒、72℃で2分として33サイクル反応させ、最後に72℃で7分間反応させた。8μlの反応液を4%アガロースで電気泳動したのちに紫外線下でPCR産物を可視化した。

強い生地物性に関与するLMW-GS GL1/GLI2及びKS2/KS3aの遺伝子に連鎖するDNAマーカー（以後、LMW-GSマーカー）は2、1)、(3)と同じ方法で検出した。

マーカー選抜によって推定されたグルテニン組成をタンパク質レベルで確認するためには、HMW-GSについてはII、1、1)、(3)アと同じ方法でSDS-PAGEを行った。また、LMW-GSについてはII、2、1)、(2)のF<sub>7</sub> RILと同じ方法で2D-PAGEを行った。

14系統について、5+10マーカーのみが検出された系統と、5+10マーカーとLMW-GSマーカーの両者が検出された系統に分類し、グループ間でのタンパク質含量とピークタイムの差をF検定により解析した。

## 2) 結果と考察

PCRにより5+10マーカーのみが検出された系統は7系統で、5+10マーカーとLMW-GSマーカーの両者が検出された系統は7系統であった。5+10マーカーが検出された14系統すべてにおいて、タンパク質レベルでHMW-GS 5+10が確認され、LMW-GSマーカーが増幅した7系統すべてでGL1/GL2 (KS2/KS3a) と酷似したLMWGスポットが確認された。このことから、マーカーの精度が高いことが示唆された。LMW-GSマーカーが増幅された系統は、「Glenlea」、「KS831957」、「芽系9919」（「勝系33号」）を交配親に持つものが多く、これらの交配親に由来するGL1/GL2またはKS2/KS3a 遺伝子が検出されたと考えられた。「I-621」は交配親に「Glenlea」、「KS831957」、「芽系9919」のいずれも含まないが、親品種の一つ「Karl」が「KS831957」と親品種「Plainsman V」を共有していた。したがって、「Plainsman V」がKS2/KS3a遺伝子を持っており、「I-621」に遺伝した可能性がある。このように、本マーカーによってGL1/GL2 (KS2/KS3a) 遺伝子を持つ遺伝資源を選抜できると考えられた。

増幅したマーカーによって分類した2グループ間でタンパク質含量には差が無かった。しかし、ピークタイムに関しては両者のマーカーが検出された系統の方が、5+10マーカーのみが増幅された系統より有意に長かった（[第9表](#)）。また、同程度のタンパク質含量をもつ2グループの系統を比較した場合も、両者のマーカーが検出された系統のピークタイムが長い傾向が見られた（[第25図](#)）。両者のマーカーが検出されたすべての系統が、麦育種研究室によって、超強力コムギの候補系統と判断されている。一方、5+10マーカーのみが検出されたグループでは芽系0308、芽系0309のみが超強力小麦の候補系統と判断された。これらのことから、超強力コムギの候補系統を育種する上で、本研究で開発したLMW-GSマーカーと5+10マーカーを組み合わせることで選抜することが有効であることが示唆された。

[次へ進む](#)   [前に戻る](#)   [目次に戻る](#)

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

## IV. 総合考察

### 1. 春まきコムギと秋まきコムギの強い生地物性に関与するLMW-GSの相同性

本研究では、春まきコムギ「Glenlea」と秋まきコムギ「KS831957」の強い生地物性に関与するLMW-GS（GL1/GL2およびKS2/KS3a）の候補遺伝子（それぞれGLEN42KとKANS2）を特定した。同遺伝子は相同性が非常に高かった（[第26図](#)）。加えて、これらのLMW-GSのSDS-PAGE、2D-PAGEでの分離パターンも酷似しており、決定できたLMWGスポットのN末端アミノ酸配列も一致した。また、GL1/GL2のコード遺伝子は1B染色体短腕に座乗することもわかった。これらのことから、GL1/GL2とKS2/KS3aはGlu-B3座に支配される同一またはよく似たLMW-GSであると考えられた。因みに池田と矢野（2005）は近年、Glu-B3座の10種の対立遺伝子（Glu-B3a～Glu-B3j）をそれぞれ持つ標準品種のLMW-GSの電気泳動とN末端アミノ酸配列解析の結果から、「Glenlea」のGlu-B3の対立遺伝子はGlu-B3gと最も類似しているとした。しかし、カナダCereal Research Centerの研究グループによれば、標準品種のGlu-B3gは別のサブユニットを支配しており、GL1/GL2をコードする対立遺伝子は未同定とされた（Sylvie Cloutier, Kathy Adams私信）。したがって、GL1/GL2とKS2/KS3aを既知のLMW-GSと完全に対応づけるには、更に詳細な遺伝実験が不可欠である。

同様に、春まきコムギ「春のあけぼの」のHA1と秋まきコムギ「ホロシリコムギ」のHS1もまた、タンパク質、候補遺伝子両レベルの高い類似性から、ほぼ同一なLMW-GSと考えた。また、HA1は「Yecora Rojo」のGlu-B3支配の42-kDaサブユニットとほぼ同一と考えられるので、HA1、HS1、42-kDaサブユニットはすべて類似するサブユニットとみてよい。池田と矢野（2005）はホロシリコムギのGlu-B3座の対立遺伝子はGlu-B3hと推察した。よってHA1、HS1、42-kDaサブユニットはすべてGlu-B3hに由来する可能性がある。しかし、標準品種と交配して後代を分析し、精度の高い同定を進める必要がある。

本研究において春まきコムギと秋まきコムギの両者で見出されたほぼ同一なLMW-GSはいずれも生地物性を強めた。これらの品種は、春まきコムギおよび秋まきコムギのそれぞれにおいて、生地物性を強めるLMW-GSを導入して強力および超強力コムギ品種を育種する際の母本になり得る。

[次へ進む](#)   [前に戻る](#)   [目次に戻る](#)

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

## IV. 総合考察

### 2. 超強力コムギ系統の作出方法

これまで、生地物性に対するHMW-GSとLMW-GSとの交互作用についての研究が行われた。しかし、LMW-GSの同定が難しいゆえに、各国の主要品種のLMW-GSのカタログ化が進まず、特定のLMW-GSを育種のマーカーに利用することはほとんど一般化していない。そのため、超強力コムギ系統を作出するのに必要な条件については十分議論されていないのが現状である。しかしながら、日本では中力コムギ品種が栽培小麦のほとんどを占めているにもかかわらず、国産の準強力及び強力粉の需要が非常に多く、中力コムギをパンなどに利用する点からも超強力コムギ品種の育成が重要である。本研究の結果に基づいて、著者はHMW-GS 5+10およびこれと交互作用を示すLMW-GS KS2/KS3a (GL1/GL2) を併せ持つ系統が超強力コムギ系統に成りうるという仮説を立てた。仮説を完全に立証するには至らなかったが、5+10のみを持つ系統に比べ、5+10とKS2/KS3a (GL1/GL2) を併せ持つ系統の生地物性が概して強いことが明らかとなり (III、3)、仮説を支持する傍証が得られた。今後、遺伝的背景を異にする世界の品種や系統を用い、本仮説を立証する必要がある。

[次へ進む](#)   [前に戻る](#)   [目次に戻る](#)

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

## IV. 総合考察

### 3. DNAマーカーの有効性

プライマーs-F1/s-R2を用いたゲノミックPCRで増幅するDNA断片は、小麦粉の生地物性を強めるLMW-GS遺伝子を簡便に検出し得るDNAマーカーとなることがわかった。これまで生地物性を強めるLMW-GSのマーカーとして知られているのは「Yecora Rojo」の42-kDaサブユニットを識別するもののみであった。GL1/GL2、KS2/KS3aは42-kDaサブユニットとほぼ同一なHA1、HS1に比べて、生地物性を強める効果が大きかったため、本研究で開発したLMW-GSマーカーは、現時点では最も強い生地物性を推測できる有効なマーカーであると言える。

DNAマーカーによる模擬的な選抜の結果から、超強力コムギの候補系統を育種する上で、本研究で開発したLMW-GSマーカーと5+10マーカーを組み合わせた選抜が有効であることが示唆された。

本マーカーによってコムギ遺伝資源のLMW-GSを識別して生地物性を推測できる可能性も高い。ただし、プライマー配列が標的遺伝子の配列と一致しない場合はPCR産物が増幅されない可能性があるため、グルテニンタンパク質の解析もあわせて行うと正確な評価が可能となると思われる。

[次へ進む](#)   [前に戻る](#)   [目次に戻る](#)

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

## IV. 総合考察

### 4. 生地物性に関わるLMW-GSの機能

#### 1) LMW-GSの量と質

特定のHMW-GSを過剰発現させた形質転換体の生地物性の評価から、HMW-GSの量が生地物性に及ぼす影響が推測された。1Dx5をパンコムギに導入することによって生地物性が強くなったという報告もあるが (Barro et al. 1997, Rooke et al. 1999, Popineau et al. 2001)、対象となるコムギ品種の遺伝的背景によっては、物性の強さと相関のある生地の破断力を極端に低下させるという報告もある (Barro et al. 2003)。HMW-GS 1の遺伝子 (1Ax1) を形質転換したパンコムギでも生地物性が強くなった (Barro et al. 1997; 2003, Vasil et al. 2001)。また、Dゲノムを持たないデュラムコムギに1Dx5及び1Ax1遺伝子を形質転換した例でも生地物性が強まっている (He et al. 1999)。以上のように特定のHMW-GSが過剰発現した場合には、生地物性が強まることが多い。

生地物性とLMW-GSとの関連性を解析した研究によると、LMW-GSもまた、構造 (質) のみならず、蓄積量も生地物性に影響するといわれている。例えば、概してLMW-sはLMW-mより生地物性を強くする効果が高く、その原因はLMW-sがLMW-mより蓄積量が多いことが原因であると推察されている (Masci et al. 1998)。また、D'Ovidioら (1999) は生地物性の強いデュラムコムギが特異的に持つ「LMW-2」と生地物性の弱いデュラムコムギに特異的な「LMW-1」のコード遺伝子から推定される一次構造を解析したところ、「LMW-1」は「LMW-2」と比較して、反復配列領域で13アミノ酸残基を欠失している以外はほとんど相同であったことから、「LMW-2」の蓄積量が多いことが強い生地物性の主要因であると考えた。

HA1 (HS1) とGL1 (KS2)、GL2 (KS3a) のタンパク質量について、2D-PAGEゲルのスポットのCBBによる染色程度から推測すると、相当するスポットの総量はおよそ  $GL1 (ks2) > HA1 (HS1) > GL2 (KS3a)$  となり、対立遺伝子ごとに比較すると  $GL1 + GL2 (KS2 + KS3a) > HA1 (HS1)$  となると推察される。したがって、GL1/GL2 (KS2/KS3 a) がHA1 (HS1) より生地物性を強める効果が高いことの原因として、グルテニンタンパク質の総量が多いことがあげられる。

一方、Masciら (2003) は「Cheyenne」の *Glu-D3* 由来のLMW-m遺伝子をパンコムギに導入したが、当該LMW-mが16倍に過剰発現した形質転換体のSDS沈降量が非形質転換体に比べて低下した (生地物性が弱化した)。このことから、過剰に蓄積したLMW-GSはむしろ生地物性を弱めてしまい、生地物性を強めるのに適した構造 (質) を持つLMW-GSが適量存在することが生地物性を強める上で重要であると考えられる。

Tosiら (2004a; 2004b) は分子間結合に関与すると考えられる二つのシステイン残基を持つLMW-s遺伝子をデュラムコムギに形質転換し、目的タンパク質の発現と、グルテンポリマーへの取り込みを確認した。また小麦粉特性を評価した2系統のうち、1系統のミキシング耐性が強まった (生地物性が強くなった)。

以上のことから、GL1/GL2 (KS2/KS3a) がHA1 (HS1) より生地物性を強める効果が高いのは、質と量の両方の条件を満たしている、つまりグルテニンポリマーを高分子量化するようなタ

ンパク質構造を持つGL1/GL2 (KS2/KS3a) が量的に適正な範囲で蓄積していることが原因であると推察した。

## 2) 候補遺伝子の一次構造の違い

タンパク質の高次構造は一次構造に大きく依存する。GLEN42KやKANS2がGL1/GL2 (KS2/KS3a) を直接コードしているか否かについては、形質転換や組換えタンパク質の解析により検証する必要がある。しかし、HA1よりGL1/GL2が、HS1よりKS2/KS3aが生地物性を強めたことは、それらの候補遺伝子配列より推定される一次構造の違いが原因となっている可能性は否めない。GLEN42KとKANS2の翻訳産物の一次構造がHARU48K、HORO1産物と大きく異なる点は、(1)反復配列が短いこと、(2)15個のグルタミン(Q)からなるモチーフを持っていたことである。

(1)については、これまでの報告によれば概して反復配列が長いLMW-GSがグルテニンポリマーの高分子量化に有利であると考えられてきた。LMW-sの分子間結合サイトと推定されている2個のシステイン残基の間はほぼ反復配列に相当する。Masciら(1998)はY17845(G3グループ)にコードされるLMW-sの2個のシステイン残基の間の反復配列の長さが長いほど、より高分子量のグルテニンポリマーを形成し、強い生地物性をもたらすと推測した。Patacchiniら(2003)とConsalviら(2004)は反復配列の長さが異なるLMW-GS遺伝子と、N末端側の分子間結合を担うと考えられるシステイン残基を他のアミノ酸に置換したLMW-GS遺伝子のポリマー化への影響を調べるために、大腸菌によって組換えタンパク質を大量に生産させた。その結果、分子間結合に関わるシステイン残基が2個あり、かつ反復配列が長い遺伝子産物の方が添加実験で生地物性を強めた(D'Ovidio and Masci 2004)。

(2)については、生地の弾力性よりもむしろ伸展性に貢献すると言われているグリアジンが15以上のグルタミン(Q)からなるモチーフを持つことを考えると、グルタミン鎖は一見、生地の弾力性に対しあまり貢献していないと思われる。しかしグリアジンのほとんどはシステイン残基で分子間結合せず、分子内結合している。2個のシステイン残基で分子間結合するLMW-sのグルタミン鎖は、グリアジンとは異なる仕組みでサブユニットの高次構造やグルテンの高分子量化に影響を与えているのかもしれない。ヒトのポリグルタミン病はポリグルタミン鎖の異常伸長が原因と考えられている。そのメカニズムは、伸長ポリグルタミン鎖を有する変異タンパク質では $\beta$ -sheet構造を形成しやすく、そのようなポリグルタミン鎖が相互に結合してタンパク質の凝集をもたらすと考えられている(Perutz et al. 2002 a, 2002 b)。LMW-GSとHMW-GSの反復配列はともにQを最も多く含んでおり、HMW-GSについては反復配列の $\beta$ -turnから成る螺旋構造に位置するQを介した水素結合がミキシング耐性(生地物性と正の相関がある)を増加させると推測されている(Shewry et al. 2002)。以上のことから、GLEN42KとKANS2の遺伝子産物であるLMW-sの高次構造において、比較的多くのグルタミンからなるモチーフを持つことが、グルテンの高分子量化と強い生地物性に貢献している可能性が考えられる。またこのようなGL1/GL2 (KS2/KS3a)の機能が、強い生地物性に対するHMW-GS 5+10との交互作用を説明するかもしれない。

今後、GLEN42KやKANS2の組換えタンパク質を大量に生産することやパンコムギに本遺伝子を導入して、グルテニンポリマー形成の様態、HMW-GSを含む他のサブユニットとの相互作用、分子間結合部位を解析することによってこれら遺伝子産物の役割を詳細に解析することが重要である。それによって、グルテニンと相同性の見られる他の穀物の種子貯蔵タンパク質(イネのプロラミン、オオムギのホルデンなど)との相違点や類似点がより明確になることが期待される。それらの研究結果から、小麦粉の新たな高付加価値食品を創出できる可能性がある。



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

V. 摘要

1. 本研究の目的は、小麦粉の生地物性を強める低分子量グルテニンサブユニット (LMW-GS) を同定し、育種を効率化するためにこれを検出するDNAマーカーを開発することである。
2. カナダ産超強力春まきコムギ品種「Glenlea」のLMW-GS GL1とGL2が準同質遺伝子系統「NIL」や「Glenlea」の非常に強い生地物性に寄与していることが示唆された。
3. GL1とGL2は共分離し、GL1/GL2と国産強力コムギ品種「春のあけぼの」のHA1のコード遺伝子是对立関係にあることがわかった。また、GL1/GL2とHA1は *Glu-B3* に支配されると考えられた。
4. 超強力粉並みの生地物性の強さを持つ米国産秋まきコムギ系統「KS831957」の生地物性にLMW-GS KS1~KS5が関与していると考えられた。
5. KS3は2D-PAGEにより4つのLMWGスポットに分離されたが、そのうち塩基性側の2つのスポットだけが「勝系34号」に導入されていたため、この2スポットをKS3aと命名した。KS2とKS3aは共分離し、KS2/KS3aと国産中力コムギ品種「ホロシリコムギ」のHS1のコード遺伝子是对立関係にあることが確認された。
6. KS2/KS3aと高分子量グルテニンサブユニット (HMW-GS) 5+10のコード遺伝子は交互作用して生地物性を強めた。
7. GL1、GL2、HA1はそれぞれKS2、KS3 a、HS1と電気泳動における分離パターンが酷似し、N末端アミノ酸配列も一致したことから、これらはそれぞれ類似した機能をもつ分子種と考えられた。
8. KS2/KS3 a (GL1/GL2) とHMW-GS 5+10の両方を併せ持つコムギ系統が超強力粉の特段に強い生地物性を持ち得ると考えられた。
9. 「Glenlea」のLMW-GS遺伝子 (*GLEN42K*) と「KS831957」の *KANS2* は「春のあけぼの」の *HARU48K* や「ホロシリコムギ」の *HORO1* より短い反復配列を持っており、既知のLMW-GS遺伝子には見られない15のグルタミン (Q) からなるモチーフを持つことから、新規のLMW-GS遺伝子であると考えられた。
10. *GLEN42K* はGL1/GL2の、*HARU48K* はHA1の候補遺伝子と考えられた。また、「KS831957」の *KANS2* はKS2/KS3aの、「ホロシリコムギ」の *HORO1* はHS1の候補遺伝子と考えられた。ただし、それぞれの候補遺伝子が各LMW-GSのコード遺伝子とそれぞれ密接に連鎖している可能性も否定し切れない。
11. 既報のG3グループのLMW-s遺伝子はすべてシグナルペプチドの数残基のデータが欠けているが、*HARU48K*、*GLEN42K*、*KANS2*、*HORO1* はORFを完全に含むG3グループのLMW-s遺伝子としては最初の報告となった。
12. プライマー-s-F1/s-R2を用いて増幅されるDNA断片はKS2/KS3a (GL1/GL2) のコード遺伝子を検出するDNAマーカーとして利用できる。またこのマーカーによる選抜で超強力コムギ系統を効率的に育成できる可能性が示された。



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

## 謝辞

本論文をとりまとめるにあたり、懇切なるご指導とご校閲を賜りました北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻育種工学講座遺伝子制御学分野教授 三上哲夫博士に心より感謝申し上げます。

本論文をまとめるにあたり細かなご指導、ご校閲を賜った北海道大学大学院農学研究科生物資源生産学専攻園芸緑地学講座園芸学分野教授 大澤勝次博士、北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻育種工学講座植物遺伝資源学分野教授 喜多村啓介博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究に着手する機会を賜るとともに、投稿論文執筆、実験計画と討論、本論文のとりまとめを通じ、終始一貫して忍耐強いご協力と激励、貴重なご助言をいただきました独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構北海道農業研究センター畑作研究部麦育種研究室（現近畿中国四国農業研究センター作物開発部小麦育種研究室）高田兼則博士、同部品質制御研究チーム長 山内宏昭博士、同センター地域基盤研究部冷害生理研究室 船附秀行博士に深く感謝申し上げます。

投稿論文への貴重なご助言とご校閲をいただきました帯広畜産大学畜産科学科食料生産科学講座植物生産科学分野助教授 三浦秀穂博士に感謝の意を表します。近畿中国四国農業研究センター作物開発部育種工学研究室 池田達哉博士には「Yecora Rojo」の種子を賜り、またLMW-GSの研究全般に関して多くのご教示をいただきました。また、岐阜大学応用生物科学部応用生物科学科教授 古田喜彦博士には「Chinese Spring」のditelocentric系統の種子を賜り、カナダCereal Research CenterのSylvie Cloutier博士、Kathy Adams氏には「Glenlea」のLMW-GSについてご教示いただきました。ここに深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、ご指導とご激励をいただきました北海道農業研究センター地域基盤研究部長（現独立行政法人 農業生物資源研究所ジーンバンク長）奥野員敏博士、同センター作物開発部長 山口秀和博士、桑原達雄 畑作研究部長、地域基盤研究部長 佐藤裕博士に深く感謝いたします。

投稿論文の共著者として多くのご協力そして有益なご意見をいただきました北海道農業研究センター地域基盤研究部育種工学研究室長（現上席研究官）加藤明博士、齋藤浩二博士、同センター畑作研究部麦育種研究室 田引正室長、西尾善太 研究員、伊藤美環子 主任研究官に感謝申し上げます。また、多くのご助言をいただきました北海道農業研究センター作物開発部作物品質チーム長 石井現相博士、地域基盤研究部育種工学研究室長 入来規雄博士に感謝申し上げます。

圃場栽培における技術的支援を賜りました北海道農業研究センター業務科 石井寛氏、竹本敏彦氏、和田勝喜氏、杉澤良太氏、ならびにタンパク質およびDNA解析の技術的支援を賜りました同センター非常勤職員 藤井江梨子氏、森峰子氏、蟹澤康子氏に切に感謝申し上げます。

本研究の多くの部分は、独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター（旧生研機構）の「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」で採択されたプロジェクト課題「北海農の超強力・強力小麦粉を用いた新高付加価値食品の開発」の中で行われました。異分野からの貴重なご助言をいただいた北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻分子生命科学講座微生物資源生態学分野教授 横田篤博士、（株）北海道グリーンバ

イオ研究所 猿山晴夫博士ならびに八幡江梨子 プロジェクト研究員、江別製粉(株)製造部 山本嘉彦部長、東洋水産(株)第一研究開発部 花岡彰宏氏、各機関の参画メンバー各位、プロジェクトの推進にご尽力いただきました生研センタープロジェクト推進リーダー 戸澤英男博士に深く感謝の意を表します。

## 引用文献

1. Ahmad, M., 2000. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 101, 892-896.
2. Anderson, O. D., F.C. Greene, R. E. Yip, N. G. Halford, P. R. Shewry, and L. M. Malpica-Romero, 1989. Nucleotide sequence of the two highmolecular-weight glutenin genes from the Dgenome of a hexaploid bread wheat, *Triticum aestivum* L. cv Cheyenne. *Nucl. Acid Res.* 17, 461-462.
3. Anderson, O. D. and F. C. Greene, 1989. The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 77, 689-700.
4. Axford, D. W. E., E. E. McDermott, and D. G. Redman, 1979. Note on the sodium dodecyl sulfate test of breadmaking quality: comparison with Pelshenke and Zeleny tests. *Cereal Chem.* 56, 582-584.
5. Barro, F., L. Rooke, F. Bekes, P. Gras, A. S. Tatham, R. Fido, P. A. Lazzeri, P. R. Shewry, and P. Barcel, 1997. Transformation of wheat with high molecular weight subunits genes results in improved functional properties. *Nature Biotechnol.* 15, 1295-1299.
6. Barro, F., P. Barcel, F. Bekes, P. A. Lazzeri, P. R. Shewry, J. Ballesteros, and A. Martn, 2003. Functional properties of flour from field grown transgenic wheat lines expressing the HMW glutenin subunit 1Ax1 and 1Dx5 genes. *Mol. Breeding* 12, 223-229.
7. Branlard, G. and M. Dardevet, 1985a. Diversity of grain protein and bread quality. I. Correlation between gliadin bands and technological characteristics. *J. Cereal Sci.* 3, 329-343.
8. Branlard, G. and M. Dardevet, 1985b. Diversity of grain protein and bread quality. II. Correlation between high molecular weight subunits of glutenin and flour quality characteristics. *J. Cereal Sci.* 3, 345-354.
9. Branlard, G., M. Dardevet, R. Saccomano, F. Lagoutte, and J. Gourdon, 2001. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica* 119, 59-67.
10. Bushuk, W, 1980. The baking potential of Glenlea wheat. *Can. J. Plant Sci.* 60, 737-739.
11. Bustos, A., P. Rubio, C. Soler, P. Garcia, and N. Jouve, 2001. Marker assisted selection to improve HMW-glutenins in wheat. *Euphytica* 119, 69-73.
12. Butow, B. J., W. Ma, K. R. Gale, G. B. Cornish, L. Rampling, O. Larroque, M. K. Morell, and F. Bekes, 2003. Molecular discrimination of Bx7 alleles demonstrates that a highly expressed high-molecular-weight glutenin allele has a major impact on wheat flour dough strength. *Theor. Appl. Genet.* 107, 1524-1532.
13. Campenhout, S. V., J. V. Stappen, L. Sagi, and G. Volckaert, 1995. Locus-specific primers for LMW glutenin genes on each of the group 1 chromosomes of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 91, 313-319.

14. Cassidy, B. G., J. Dvorak, and O. D. Anderson, 1998. The wheat low-molecular-weight glutenin genes: characterization of six new genes and progress in understanding gene family structure. *Theor. Appl. Genet.* 96, 743-750.
15. Cloutier, S., C. Rampitsch, G. A. Penner, and O. M. Lukow, 2001. Cloning and expression of a LMW-i glutenin gene. *J. Cereal Sci.* 33, 143-154.
16. Consalvi, V., R. Chiaraluce, C. Pattacchini, D. Lafiandra, R. D'Ovidio, and S. Masci, 2004. Structural analysis of two heterologously expressed native and mutated low molecular weight glutenin subunits. In: D. Lafiandra, S. Masci and R. D'Ovidio (eds), *The gluten proteins*, pp. 316-319, RS·C press, Cambridge.
17. D'Ovidio, R., 1993. Single-seed PCR of LMW glutenin genes to distinguish between durum wheat cultivars with good and poor technological properties. *Plant Mol. Biol.* 22, 1173-1176.
18. D'Ovidio, R. and O. D. Anderson, 1994. PCR analysis to distinguish between alleles of a member of a multigene family correlated with wheat bread-making quality. *Theor. Appl. Genet.* 88, 759-763.
19. D'Ovidio, R., S. Masci, and E. Porceddu, 1995. Development of a set of oligonucleotide primers specific for genes at the *Glu-1* complex loci of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 91, 189-194.
20. D'Ovidio, R., S. Masci, E. Porceddu and D. D. Kasarda, 1997a. Duplication of the Bx7 high-molecular-weight glutenin subunit gene in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar 'Red River 68'. *Plant Breed.* 116, 525-531.
21. D'Ovidio, R., M. Simeone, S. Masci, and E. Porceddu, 1997b. Molecular characterization of a LMW-GS gene located on chromosome 1B and the development of primers specific for the *Glu-B3* complex locus in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 95, 1119-1126.
22. D'Ovidio, R., C. Marchitelli, L. E. Cardelli and E. Porceddu, 1999. Sequence similarity between allelic *Glu-B3* genes related to quality properties of durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 98, 455-461.
23. D'Ovidio, R. and S. Masci, 2004. The lowmolecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J. Cereal Sci.* 39, 321-339.
24. Eagles, H. A., G. J. Hollamby, N. N. Gororo, and R. F. Eastwood, 2002. Estimation and utilisation of glutenin gene effects from the analysis of unbalanced data from wheat breeding programs. *Aust. J. Agric. Res.* 53, 367-377.
25. Ferrante, P., C. Patacchini, S. Masci, R. D'Ovidio, and D. Lafiandra, 2004. LMW-i type subunits are expressed in the wheat endosperm and belong to the gluten fraction. In: D. Lafiandra, S. Masci and R. D'Ovidio (eds), *The gluten proteins*, pp. 136-139, RS·C press, Cambridge.
26. Field, J. M., P. R. Shewry, and B. J. Mifflin, 1983. Solubilization and characterization of wheat gluten proteins; correlations between the amount of aggregated proteins and baking quality. *J. Sci. Food. Agric.* 34, 370-377.
27. Finney K. F. and W. T. Yamazaki, 1946. Water retention capacity as an index of the loaf volume potentialities and protein quality of hard red winter wheats. *Cereal Chem.* 23, 416-427.
28. Flaete, N. E. S. and A. K. Uhlen, 2003. Association between allelic variation at the

- combined *Gli-1*, *Glu-3* loci and protein quality in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Cereal Sci.* 37, 129-137.
29. Gorg, A., W. Postel, and S. Gunther, 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546.
  30. Gupta, R. B., N. K. Singh, and K. W. Shepherd, 1989. The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheats. *Theor. Appl. Genet.* 77, 57-64.
  31. Gupta, R. B., and K. W. Shepherd, 1990. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. *Theor. Appl. Genet.* 80, 65-74.
  32. Gupta, R. B., F. Bekes, and C. W. Wrigley, 1991. Prediction of physical dough properties from glutenin subunit composition in bread wheats: Correlation studies. *Cereal Chem.* 68, 328-333.
  33. Gupta, R. B., and F. MacRitchie, 1994. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, *Glu-1*, *Glu-3* and *Gli-1*, of common wheats. II. Biochemical basis of the allelic effects on dough properties. *J. Cereal Sci.* 19, 19-29.
  34. Gupta, R. B., J. G. Paul, B. B. Cornish, G. A. Palmer, F. Bekes, and A. J. Rathjen, 1994. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, *Glu-1*, *Glu-3* and *Gli-1*, of common wheats. I. Its additive and interaction effects on dough properties. *J. Cereal Sci.* 19, 9-17.
  35. He, G. Y., L. Rooke, S. Steele, F. Bekes, P. Gras, A. S. Tatham, R. Fido, P. Barcelo. P. R. Shewry, and P. A. Lazzeri, 1999. Transformation of pasta wheat (*Triticum turgidum* L.var. *durum*) with high-molecular-weight glutenin subunit genes and modification of dough functionality. *Mol. Breed.* 5, 377-386.
  36. He, Z. H., L. Liu, and R. J. Pe?a, 2004. Allelic variation at the *Glu-1* and *Glu-3* loci, presence of 1BL/1RS translocation, and their effect on dough properties of Chinese bread wheats. In: D. Lafiandra, S. Masci and R. D'Ovidio (eds), *The gluten proteins*, pp. 97-100, RS·C press, Cambridge.
  37. 北海道農政事務所ホームページ、<http://www5.ocn.ne.jp/~northfo/>.
  38. Ikeda, T. M., T. Nagamine, H. Fukuoka, and H. Yano, 2002. Identification of new low-molecular-weight glutenin subunit genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 104, 680-687.
  39. Ikeda, T. M., T. Nagamine, and H. Yano, 2004. Characterization of LMW-GS genes and the corresponding proteins in common wheats. In: D. Lafiandra, S. Masci and R. D'Ovidio (eds), *The gluten proteins*, pp. 101-104, RS·C press, Cambridge.
  40. 池田達哉、矢野博、2005. 小麦の生地物性に関わる低分子量グルテニン・サブユニットの遺伝子型の分類.平成16年度近畿中国四国農業研究成果情報、P49-50.
  41. 池口正二郎、田引正、庵英俊、村井達夫、長谷川明彦、柳沢朗、天野洋一、1999.パンコムギのミキシング特性およびグルテン特性に及ぼす貯蔵蛋白質組成の影響.育種学研究第1巻(別2), 214.
  42. Inoue, Y. and W. Bushuk, 1992. Studies on frozen doughs. II. Flour quality requirements for bread production from frozen dough. *Cereal Chem.* 69, 423-428.
  43. 石川吾郎、齋藤美香、中村和弘、伊藤裕之、中村俊樹、2004.パン用コムギ品種の選抜に利用可能な高分子量グルテニンサブユニットのDNAマーカー.育種学研究6(別1), 211.
  44. Khan, K., G. Tamminga, and O. M. Lukow, 1989. The effect of wheat flour proteins on

- mixing and baking: correlations with protein fraction and high molecular weight glutenin subunit composition by gel electrophoresis. *Cereal Chem.* 66, 391-396.
45. Khelifi, D and G. Branlard, 1992. The effects of HMW and LMW subunits of glutenins and of gliadins on the technological quality of progeny from four crosses between poor bread making quality and strong wheat cultivars. *J. Cereal Sci.* 16, 195-209.
  46. Kim, H. R. and W. Bushuk, 1995. Changes in some physicochemical properties of flour proteins due to partial reduction with dithiothreitol. *Cereal Chem.* 72, 450-456.
  47. Klimyuk V. I., B. J. Carrol, C. M. Thomas, and J. D. G. Jones, 1993. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *The Plant J.* 3, 493-494.
  48. Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
  49. Lew, E. J. L., D. D. Kuzmicky, and D. D. Kasarda, 1992. Characterization of low-molecular-weight glutenin subunits by reverse-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. *Cereal Chem.* 69, 508-515.
  50. Lukow, O. M and W. Bushuk, 1984a. Influence of germination on wheat quality. I. Function (breadmaking) and biochemical properties. *Cereal Chem.* 61, 336-339.
  51. Lukow, O. M and W. Bushuk, 1984b. Influence of germination on wheat quality. II. Modification of endosperm protein. *Cereal Chem.* 61, 340-344.
  52. Lukow, O. M , S. A. Forsyth, and P. I. Payne, 1992. Over-production of HMW glutenin subunits coded on chromosome 1B in common wheat, *Triticum aestivum*. *J Genet. Breed.* 46, 187-192.
  53. Marchylo, B. A., O. M. Lukow, and E. Kruger, 1992. Quantitative variation in high molecular weight glutenin subunit 7 in some Canadian wheats. *J. Cereal Sci.* 15, 29-37.
  54. Maruyama-Funatsuki, W., K. Takata, Z. Nishio, T. Tabiki, E. Yahata, A. Kato, K. Saito, H. Funatsuki, H. Saruyama and H. Yamauchi, 2004. Identification of low-molecular weight glutenin subunits of wheat associated with bread-making quality. *Plant Breed.* 123, 355-360.
  55. Maruyama-Funatsuki, W., K. Takata, H. Funatsuki, T. Tabiki, M. Ito, Z. Nishio, A. Kato, K. Saito, E. Yahata, H. Saruyama and H. Yamauchi, 2005a. Identification and characterization of a novel LMW-s glutenin gene of a Canadian Western Extra-Strong wheat. *J. Cereal Sci.* 41, 47-57.
  56. Maruyama-Funatsuki, W., K. Takata, H. Funatsuki, T. Tabiki, M. Ito, Z. Nishio, A. Kato, K. Saito, E. Yahata, H. Saruyama and H. Yamauchi, 2005b. An LMW-s glutenin gene of a Hard Red Winter wheat is similar to an LMW-s gene of a canadian western extra-strong wheat. *Breeding Sci.* 55, 241-246.
  57. Masci, S., E. J. L. Lew, D. Lafiandra, E. Porceddu, and D. D. Kasarda, 1995. Characterization of low molecular weight glutenin subunits in durum wheat by reverse-phased high-performance liquid chromatography and N-terminal sequencing. *Cereal Chem.* 72, 100-104.
  58. Masci, S., R. D'Ovidio, D. Lafiandra, and D. D. Kasarda, 1998. Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer. *Plant Physiol.* 118,

1147-1158.

59. Masci, S., R. D'Ovidio, D. Lafiandra, and D. D. Kasarda, 2000. A 1B-coded low-molecular-weight glutenin subunit associated with quality in durum wheats shows strong similarity to a subunit present in some bread wheat cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 100, 396-400.
60. Masci, S., R. D'Ovidio, F. Scossa, C. Patacchini, D. Lafiandra, O. D. Anderson, and A. E. Blechl, 2003. Production and characterization of a transgenic bread wheat line over-expressing a low-molecular-weight glutenin subunit gene. *Mol. Breed.* 12, 209-222.
61. Melas, V., M. H. Molel, J. C. Autran, and P. Feillet, 1994. Simple and rapid method for purifying low molecular weight subunits of glutenin from wheat. *Cereal Chem.* 71, 234-237.
62. Molloy, M. P., B. R. Herbert, B. J. Walsh, M. I. Tyler, M. Traine, J-C. Sanchez, D. F. Hochstrasser, K. L. Williams, and A. A. Gooley, 1998. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 837-8446.
63. Morris, C. F., 1992. Impact of blending hard and soft white wheats on milling and baking quality. *Cereal Foods World* 37, 643-644.
64. Nagamine, T., Y. Kai, T. Takayama, T. Yanagisawa, and S. Taya, 2000. Allelic variation at the *Glu-1* and *Glu-3* loci in southern Japanese wheats, and its effects on gluten properties. *J. Cereal Sci.* 32, 129-135.
65. Neilsen, H. C., A. C. Beckwith, and J. S. Wall, 1968. Effect of disulfide-bond cleavage on wheat gliadin fractions obtained by gel filtration. *Cereal Chem.* 45, 37-47.
66. 農林水産省平成14年度食料需給表, 2002. 農林水産省ホームページ、<http://www.maff.go.jp/www/info/index.html>.
67. Orsi, A., F. Sparvoli, and A. Ceriotti, 2001. Role of individual disulfide bonds in the structural maturation of a low molecular weight glutenin subunits. *J. Biol. Chem.* 276, 32322-32329.
68. Orth, R. A. and W. Bushuk, 1972. A comparative study of the proteins of wheats of diverse baking qualities. *Cereal Chem.* 49, 268-275.
69. Osborne, T. B., 1924. *Vegetable proteins*, pp. 154, Longmans Green, London.
70. Patacchini, C., S. Masci, R. D'Ovidio, and D. Lafiandra, 2003. Heterologous expression and purification of native and mutated low molecular weight mass glutenin subunits from durum wheat. *J. Chromatography B* 786, 215-220.
71. Payne, P. I., 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effects of allelic variation on breadmaking quality. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 141-153.
72. Payne, P. I. and K. G. Corfield, 1979. Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in a dissociating medium. *Planta* 145, 83-88.
73. Payne, P. I., K. G. Corfield, and J. A. Blackman, 1979. Identification of a high-molecular-weight subunit of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 55, 153-159.
74. Payne, P. I., C. N. Law, and E. E. Mudd, 1980. Control by homoeologous group I chromosomes of the high-molecular-weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 58, 113-120.
75. Payne, P. I., K. G. Corfield, L. M. Holt, and J. A. Blackman, 1981a. Correlations between the

- inheritance of certain high-molecular weight subunits of glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat. *J. Sci. Food Agric.* 32, 51-60.
76. Payne, P. I., L. M. Holt, and C. N. Law, 1981b. Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. Part 1: Allelic variation in subunits amongst varieties of wheat (*Triticum aestivum*). *Theor. Appl. Genet.* 60, 229-236.
77. Payne, P. I. and G. J. Lawrence, 1983. Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.* 11, 29-35.
78. Payne, P. I., M. A. Nightingale, A. F. Krattiger, and L. M. Holt, 1987. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the breadmaking quality of British grown wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* 40, 51-65.
79. Pena, R. J., J. Zarco-Hernandez, A. Amaya-Celis, and A. Mujeeb-Kazi, 1994. Relationship between chromosome 1B-encoded glutenin subunit compositions and bread-making quality characteristics of some durum wheat (*Triticum turgidum*) cultivars. *J. Cereal Sci.* 19, 243-249.
80. Perutz, M. F., J. T. Finch, J. Berriman, and A. Lesk, 2002a. Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5591-5595.
81. Perutz, M. F., B. J. Pope, D. Owen, E. E. Wanker, and E. Scherzinger, 2002b. Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the glutamine-rich and asparagin-rich domains of Sup35 of the amyloid beta-peptide of amyloid plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5596-5560.
82. Pogna, N., D. Lafiandra, P. Feillet, and J. C. Autran, 1988. Evidence for a different causal effect of low molecular weight glutenin subunits on gluten viscoelasticity in durum wheat. *J. Cereal Sci.* 7, 211-214.
83. Popineau, Y., G. Deshays, J. Lefebvre, R. Fido, A. S. Tatham, and P. R. Shewry, 2001. Prolamin aggregation, gluten viscoelasticity, and mixing properties of transgenic wheat lines expressing 1Ax and 1Dx high molecular weight glutenin subunit transgenes. *J. Agr. Food Chem.* 49, 395-401.
84. Rabilloud, T., C. Adessi, A. Giraudel, and J. Lunardi, 1997. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 307-316.
85. Rabilloud, T., C., 1998. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 758-760.
86. Rooke, L., F. Bakes, R. Fido, F. Barro, P. Gras, A. S. Tatham, P. Barcelo, P. Lazzeri, and P. R. Shewry, 1999. Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength. *J. Cereal Sci.* 30, 115-120.
87. Sabelli, P. A. and P. R. Shewry, 1991. Characterization and organization of gene families at the *Gli-1* loci of bread and durum wheats by restriction fragment analysis. *Theor. Appl. Genet.* 83, 209-216.
88. Shewry, P. R., A. S. Tatham, J. Forde, M. Kreis, and B. J. Mifflin, 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *J. Cereal Sci.* 4, 97-106.
89. Shewry, P. R. and A. S. Tatham, 1997. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *J. Cereal Sci.* 25, 207-227.

90. Shewry, P. R., G. H. Nigal, P. S. Belton, and A. S. Tatham, 2002. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Phi. Trans. R. Soc. Lond. B* 357, 133-142.
91. 下野勝昭、市川信雄監修、2003.北海道の小麦生産Q&A.ニューカントリー2003年夏季増刊号.
92. Singh, N. K. and K. W. Shepherd, 1988. Linkage mapping of the genes controlling endosperm proteins in wheat. 1. Genes on the short arms of group 1 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 75, 628-641.
93. Singh, N. K., K. W. Shepherd, and G. B. Cornish, 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunit of glutenin. *J. Cereal Sci.* 14, 203-208.
94. Slaughter, D. C., K. H. Norris, and W. R. Hruschka, 1992. Quality and classification of Hard Red wheat. *Cereal Chem.* 69, 428-432.
95. 総合食料局ホームページ.<http://www.syokuryo.maff.go.jp/>.
96. 田引正、池口正二郎、柳沢朗、天野洋一、1998.パンコムギのグルテン特性に及ぼす高分子、低分子グルテニンサブユニット構成の影響.育種学雑誌第48巻 (別2), 148.
97. Takata, K., H. Yamauchi, N. Iriki, and T. Kuwabara, 1999. Prediction of bread-making quality by prolonged swelling SDS-sedimentation test. *Breeding Sci.* 49, 221-223.
98. Takata, K., H. Yamauchi, Z. Nishio, and T. Kuwabara, 2000. Effect of high molecular weight glutenin subunits on bread making quality using near-isogenic lines. *Breeding Sci.* 50, 303-308.
99. Takata, K., H. Yamauchi, Z. Nishio, and T. Kuwabara, 2001. Bread-making quality of a near-isogenic line with specific low molecular weight glutenin components. *Breeding Sci.* 51, 143-146.
100. Tao, H. P. and D. D. Kasarda, 1989. Twodimensional gel mapping and N-terminal sequencing of LMW-glutenin subunits. *J. Exp. Bot.* 40, 1015-1020.
101. Tosi, P., R. D'Ovidio, J. A. Napier, F. Bakes, and P. R. Shewry, 2004a. Expression of epitope-tagged LMW glutenin subunits in the starchy endosperm of transgenic wheat and their incorporation into glutenin polymers. *Theor. Appl. Genet.* 108, 468-476.
102. Tosi, P., R. D'Ovidio, F. Bakes, J. A. Napier, and P. R. Shewry, 2004b. Transgenic expression of epitope-tagged LMW glutenin subunits in durum wheat: effect on polymer size distribution and dough mixing properties. In: D. Lafiandra, S. Masci and R. D'Ovidio (eds), *The gluten proteins*, pp. 22-25, RS·C press, Cambridge
103. Vasil, I. K., S. Bean, J. Zhao, P. McCluskey, G. Lookhart, H. P. Zhao, F. Altpeter, and V. Vasil, 2001. Evaluation of baking properties and gluten protein composition of field grown transgenic wheat lines expressing high molecular weight glutenin gene 1Ax1. *J. Plant Physiol.* 158, 521-528.
104. Wesley, A. S., O. M. Lukow, N. Ames, M. I. P. Kovacs, R. I. H. McKenzie, and D. Brown, 1999. Effect of single substitution of glutenin or gliadin protein on flour quality of Alpha 16, a Canada prairie spring wheat breeders' line. *Cereal Chem.* 76, 743-747.
105. Wrigley C. W., 1996. Giant proteins with flour power. *Nature* 381, 738-739.
106. 山内宏昭、高田兼則、桑原達雄、2001.小麦粉の簡易製パン性評価のための少量生地物性測定法.日本食品科学工学会誌 第48巻 (別2), 138-141.
107. Yamauchi, H., Z. Nishio, K. Takata, Y. Oda, K. Yamaki, N. Ishida, and H. Miura, 2001. The

bread-making quality of a domestic flour blended with an extra strong flour, and staling of the bread made from the blended flour. Food Sci. Technol. Res. 7, 120-125.

108. Yamauchi, H., T. Noda, C. Matsuura-Endo, Z. Nishio, K. Takata, T. Tabiki, K. Saito, Y. Oda, W. Funatsuki, and N. Iriki, 2003. Improving domestic flour for bread making by blending extra strong (ES) flour. Food Preservation Sci. 29 (4), 211-220.

[次へ進む](#)   [前に戻る](#)   [目次に戻る](#)

# Identification of low-molecular-weight glutenin components of wheat associated with strong dough property and their application to a breeding program

Wakako Maruyama - Funatsuki

## Summary

The annual consumption of strong wheat flour in Japan now exceeds two million tons. Although consumers are demanding foods made with domestic flour, domestic production of strong flour is less than 1% of total consumption. The use of blended flour consisting of medium-soft flour and extra-strong flour improves the quality of various foods such as bread, chinese yellow-alkaline noodles, and instant noodles. However, there are few strong wheat cultivars and no extra-strong wheat cultivars in Japan. About half of the total amount of wheat produced in Japan is cultivated in Hokkaido, a cold region of Japan. It is therefore essential to breed strong and extra-strong wheat varieties suitable for this region.

High-molecular-weight (HMW) glutenin subunits (GSs) that confer a strong dough property and good bread-making quality have been intensively studied. HMW-GS 5+10, encoded by the gene *Glu-D1*, plays an important role in dough properties appropriate for bread-making and has been used as a protein marker in selection of strong wheat varieties. On the other hand, the allelic form, HMW-GS 2+12, is widely present in Japanese wheat cultivars and is not greatly involved in strong dough properties. Although it is known that the compositions of low-molecular-weight (LMW) GSs are important factors for strong dough properties of wheat, it has not been determined which LMW-GSs confer an extra-strong dough property and how those LMW-GSs interact with HMW-GSs.

The aim of this study was to identify LMW-GSs associated with a strong dough property and to develop DNA markers linked to such LMW-GSs genes. In this study, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) was performed even in segregating populations to enable intensive monitoring of glutenin components, since the difficulty in resolving LMW-GSs is a bottleneck in research on LMW-GS.

### 1. Identification of LMW-GSs associated with a strong dough property

A near-isogenic line (NIL) in which LMW-GSs GL1 and GL2 are introduced from a Canadian Western Extra-Strong wheat cultivar, 'Glenlea', into a Japanese spring wheat cultivar, 'Harunoakebono', has much stronger dough property than does 'Harunoakebono'. GL1 and GL2 are therefore LMW-GSs associated with the strong dough property of the 'NIL'. Protein analysis for BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub> progenies derived from a cross between 'Harunoakebono' and 'Glenlea' showed that GL1 and GL2 are cosegregated and that HA1 of 'Harunoakebono' is an allelic form to GL1/GL2. Protein analysis for F<sub>2</sub> progenies derived from a cross between 'Chinese Spring' and 'Glenlea' and for ditelocentric lines of 'Chinese Spring' revealed that GL1 and GL2 are derived from the short arm of chromosome 1B (probably *Glu-B3* locus). However, these LMW-GSs have not been found to correspond to any allele previously reported.

Using a hard red winter wheat line, 'KS831957', with an extra-strong dough property and a Japanese wheat cultivar with a medium dough property as well as their progenies, 'Kachikei

32', 'Kachikei 33' and 'Kachikei 34', we identified LMW-GSs, KS1-KS5, associated with the extra-strong dough property. KS2 and KS3 of 'KS831957' comigrated with GL1 and GL2, respectively, in SDS-PAGE. KS3 was resolved into four protein spots in 2D-PAGE, and only two with higher pIs are segregated in 'Kachikei 34'. Therefore, the two spots were referred to as KS3a subunit. 2D-PAGE for F<sub>7</sub> RILs derived from a cross between 'Kachikei 32' and 'Kachikei 34' showed that KS2 and KS3a are cosegregated and that KS2/KS3a is an allelic form to HS1 of 'Horoshirikomugi' and 'Kachikei 32'. Flour evaluation tests for F<sub>6</sub> RILs revealed that KS2/KS3a and HMW-GS 5+10 show interaction effects on the strong dough property.

2D-PAGE analysis showed that KS2, KS3a and HS1 are resolved similarly to GL1, GL2 and HA1, respectively. Furthermore, the N-terminal amino acid sequences of all protein spots comprising KS2, KS3a, GL1, and GL2 were identical to 'SHIPGLERPSQQQLPP', which is the most-frequently analyzed sequence of LMW-GS and is classified as LMW-s (LMW-GS starting with serine). All N-terminal amino acid sequences of spots for HS1 and HA1 that we could determine are also the same as the above sequence.

## 2. Identification of candidate genes corresponding to LMW-GSs associated with a strong dough property

Reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCRs) using primers specific to an LMW glutenin gene, S-type2F/S-type978R, were performed for 'Harunoakebono', 'NIL' and 'Glenlea' and amplified a novel LMW-s glutenin gene, *GLEN42K*, for 'Glenlea' and 'NIL' and another LMW-s glutenin gene, *HARU48K*, for 'Harunoakebono'. The nucleotide sequence of *HARU48K* had 99% identity to that of Y17845, which is a gene corresponding to the 42-kDa subunit of 'Yecora Rojo' associated with good bread-making quality. Alignment of the deduced amino acid sequences of *GLEN42K* and *HARU48K* revealed that the identity is 86.2% and that *GLEN42K* has a shorter repetitive domain and a motif of fifteen continuous glutamine residues in the repetitive domain. The deduced amino acid sequences of the two genes included 'SHIPGLERPSQQQLPP'. All available LMW-s glutenin gene candidates including the deduced amino acid sequence 'SHIPGLERPSQQQLPP' are thought to lack nucleotides corresponding to several residues in the N-termini of signal peptides. Thus, *HARU48K* and *GLEN42K* are the first full-sized LMW-s glutenin genes including the deduced amino acid sequence 'SHIPGLERPSQQQLPP'.

Genomic PCR using primers, s-F1/s-R2, designed on the basis of inner sequences of the genes was carried out for the BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub> progenies and amplified two DNA fragments that correspond to *GLEN42K* and *HARU48K*. The two DNA fragments are respectively cosegregated with LMW glutenin components comprising GL1/GL2 and the allelic components comprising HA1. *GLEN42K* is therefore a candidate gene encoding at least one protein spot comprising GL1/GL2, and *HARU48K* is thought to be a gene encoding at least one protein spot comprising HA1. There is also a possibility these LMW-s genes are linked to genes directly encoding GL1/GL2 and HA1, respectively.

RT-PCR using S-type2F/S-type978R was performed for 'KS831957', 'Horoshirikomugi' and 'Kachikei 34' and amplified a candidate gene for KS2/KS3a, *KANS2*, and another candidate gene for HS1, *HORO1*. The partial inner sequences of the two genes that were amplified by

genomic PCR cosegregated with KS2/KS3a and HS1, respectively, in F<sub>6</sub> RILs. It was also found that *KANS2* has almost the same sequence as that of *GLEN42K* and that *HORO1* and *HARU48K* perfectly coincide.

HA1 of 'Harunoakebono', HS1 of 'Horoshirikomugi', and the 42-kDa subunit of 'Yecora Rojo' are thought to be homologous LMW-GS in that their candidate genes have very high identities and that they are resolved similarly in electrophoresis analysis. These LMW-GSs might all be chain extenders to accelerate glutenin polymer formations as predicted for the 42-kDa subunit of 'Yecora Rojo'.

GL1/GL2 of 'Glenlea' and KS2/KS3a of 'Horoshirikomugi' are also thought to be homologous since they have similar characteristics on the basis of genes and proteins. The fact that GL1/GL2 (KS2/KS3a) has greater effects on strong dough properties than does HA1 (HS1) might be caused by the structure as chain extenders and their higher amount level of GL1/GL2 (KS2/KS3a). In addition, interactions between a hydrogen-bond state caused by the glutamine motif and the high-dimensional structure of GL1 and/or GL2 (KS2 and/or KS3a) might affect gluten formation. Furthermore, these probable characteristics of GL1/GL2 (KS2/KS3a) may explain the effects of interaction between KS2/KS3a and HMW-GS 5+10 on the strong dough property. We hypothesized that a wheat variety carrying GL1/GL2 (KS2/KS3a) and HMW-GS 5+10 could have an extra-strong dough property.

### 3. DNA marker to detect genes corresponding to LMW-GSs associated with a strong dough property and its application to a breeding program

The inner DNA fragment of *GLEN42K* and *KANS2* that is amplified by genomic PCR in this study could be used as a DNA marker in marker-assisted selection for breeding varieties carrying GL1/GL2 or KS2/KS3a. The DNA marker may also be useful for detecting LMW glutenin components similar to GL1/GL2 and KS2/KS3a in other wheat varieties. A small-scale trial examination of selection showed that varieties carrying both the 5+10 marker and KS2/KS3a (GL1/GL2) marker tend to have stronger dough properties than do varieties with only the 5+10 marker. It is therefore thought that extra-strong varieties could be bred by selection using a convenient PCR method.

[前に戻る](#)   [目次に戻る](#)

第1表 日本国内における加工食品原料小麦粉の推定消費量と推定生産量（1998年）<sup>1</sup>

	国内消費量	国内生産量 <sup>2</sup>
強力・準強力粉	200万トン	1万トン以下
中力粉	35万トン <sup>3</sup>	40万トン
薄力粉	50万トン <sup>4</sup>	0

<sup>1</sup> 食糧庁（現総合食料局）による調べから推定した。玄麦ではなく、小麦粉の量を示している。製粉工場における全小麦粉生産量は約460万トンである。本表に現れない小麦粉は混合して食品に加工されたり、工業用や家庭用に利用されている。

<sup>2</sup> ハルユタカ（準強力粉）及びハルユタカ以外（中力粉）の玄麦生産量に0.7（平均的な製粉歩留）を乗じた。

<sup>3</sup> 生うどん、冷凍うどん、乾麺うどんの小麦粉消費量を積算した。

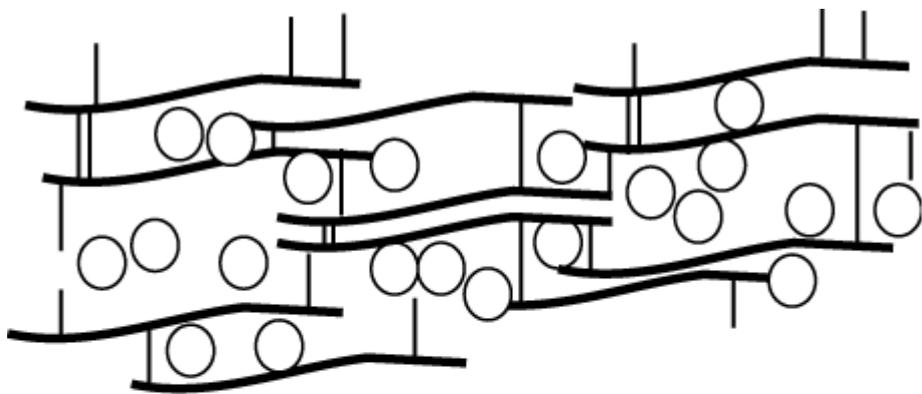
<sup>4</sup> 菓子用の小麦粉消費量を示した。

第2表 強力粉、準強力粉の使用内訳（1998年）<sup>1</sup>

（単位：万トン）

パン(うち冷凍生地)	中華麺	即席麺	合計
123.5(7.1)	39.8	31.8	195.1

<sup>1</sup> 食糧庁（現総合食料局）による調べ。



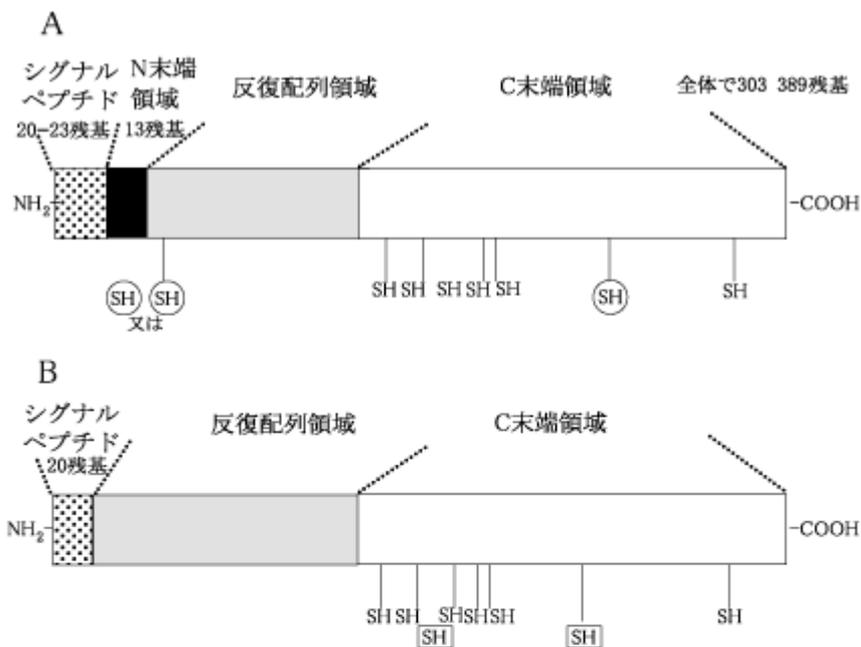
第1図 グルテンの模式図

グリアジンを○で示した。グルテニンサブユニットを太い線で示し、システイン残基による分子間のジスルフィド架橋を細い線で示した。



第2図 x-type及びy-type高分子量グルテニンサブユニット (HMW-GS) の一次構造の模式図

システイン残基の位置にジスルフィド基 (SH) を記した。シグナルペプチドは省略している。x-type遺伝子のうちHMW-GS 5をコードする遺伝子1Dx5だけは反復配列に一つSHを持っている。



**第3図** 低分子量グルテニンサブユニット (LMW-GS) の一次構造の模式図

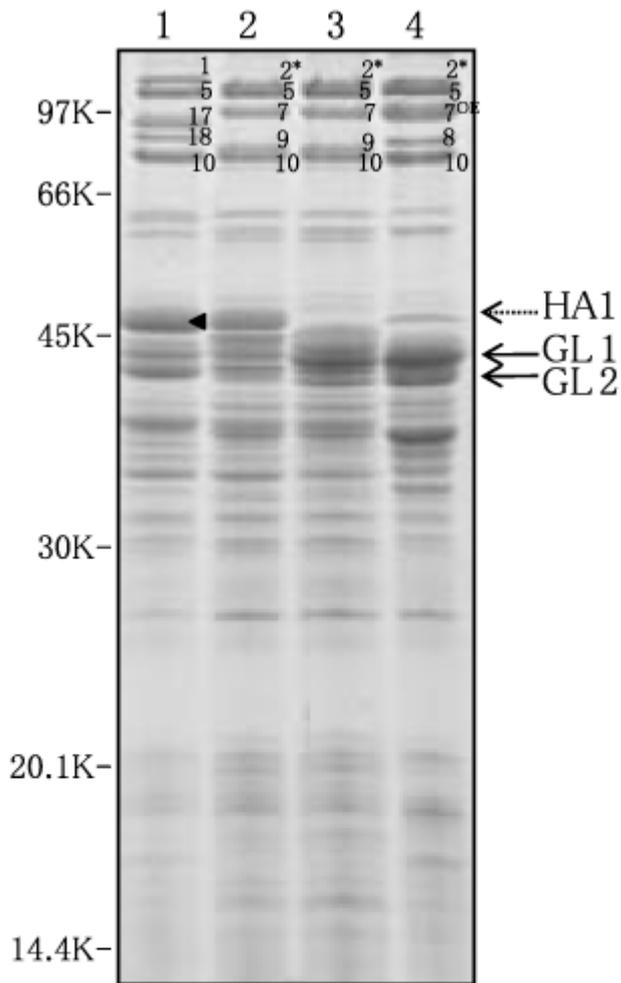
(A) LMW-s、LMW-mタイプ、(B) LMW-iタイプ:システイン残基の位置にジスルフィド基 (SH) を記した。○で囲んだSHは分子間結合をすると推定されており、それ以外のSHは分子内結合をすると推定されている。(A)のN末端に近いSHはLMW-mではN末端領域に、LMW-sでは反復配列領域に位置する。□で囲んだSHはLMW-i(B)でのみ見られる。

第3表 農林61号の低分子量グルテニン遺伝子の推定アミノ酸配列<sup>1</sup>

グループ	N末端 <sup>2</sup>	C末端	推定遺伝子座
G1	<u>MKTFLIFALLAVAATSAIAQ</u> METSHIPGLEKPSQQQPLPL	VGTQVGAY	<i>Glu-D3</i>
G2	<u>MKTFLIFALLAVAATSAIAQ</u> METSHIPSEKPLQQQPLPL	VGTRVGAY	<i>Glu-B3</i>
G3	<u>IFALLAVAATSAIAQ</u> MENSHIPGLERPSQQQPLPP	VGTGVBGY	<i>Glu-B3</i>
G4	<u>MKTFLIFALLAVAATSAIAQ</u> IENSHIPGLEKPSQQQPLPL	VGAGVGAY	<i>Glu-D3</i>
G5	<u>MKTFLIFALLAIAATSAIAQ</u> METSRVPGLEKPSQQQPLPP	IGTGVBGY	<i>Glu-D3</i>
G6	<u>MKTFLVFALLAVVATSAIAQ</u> MDTSCIPGLERPQQQPLPP	VGTGVBGY	<i>Glu-A3</i>
G7	<u>MKTFLVFALLAVVATSAIAQ</u> MDTSCISGLERPQQQPLPP	VGTGVBGY	<i>Glu-D3</i>
G8	<u>MKTFLVFALLAVVATSAIAQ</u> METSCIPGLERPQQQPLQQ	VGSRVGAY	<i>Glu-D3</i>
G9	<u>MKTFLVFALLAVVATSAIAQ</u> METSCIPGLERPQQQPLQQ	VGTQVGAY	<i>Glu-D3</i>
G10	<u>MKTFLVFALLAVAATSAIAQ</u> METRCIPGLERPQQQPLQQ	VGTGVBGY	<i>Glu-D3</i>
G11	<u>MKTFLVFALLALAAASAVAQ</u> ISQQQQPPFSQQQQIPVIHP	VGIGVBGY	<i>Glu-A3</i>
G12	<u>MKTFLVFALLALAAARAVAQ</u> ISQQQQPPFSQQQQPPFSQ	IGIGVBGY	<i>Glu-A3</i>

<sup>1</sup> Ikedaら(2001; 2004)の報告を元に示した。各グループのLMW-GSの推定遺伝子座は既知の情報やPCRによって判定された。G6、G7以外のグループの推定アミノ酸配列に一致するN末端アミノ酸配列を持つ低分子量グルテニンタンパク質スポットが「農林61号」において見つかった。

<sup>2</sup> 下線部分は推定されているシグナルペプチドを示す。G3のシグナルペプチドはIFALLAVAATSAIAQの場合とIFALLAVAATSAIAQMENの場合がある。



第4図 SDS-PAGEによる春まきコムギのグルテニンサブユニットの分離

「Yecora Rojo」(1)、「春のあけぼの」(2)、「NIL」(3)、「Glenlea」(4)。HMW-GSのサブユニット番号はサブユニットの右に記した。「春のあけぼの」に特異的に存在するHA1は破線で示し、「Glenlea」に特異的に存在するGL1、GL2は実線で示した。「Yecora Rojo」の42-kDaサブユニットは▲で示した。分子量マーカーの位置を左側に示した。

第4表 「春のあけぼの」、「Glenlea」、「NIL」の高分子（HMW-GS）及び低分子量グルテニンサブユニット（LMW-GS）の組成と生地物性<sup>1</sup>

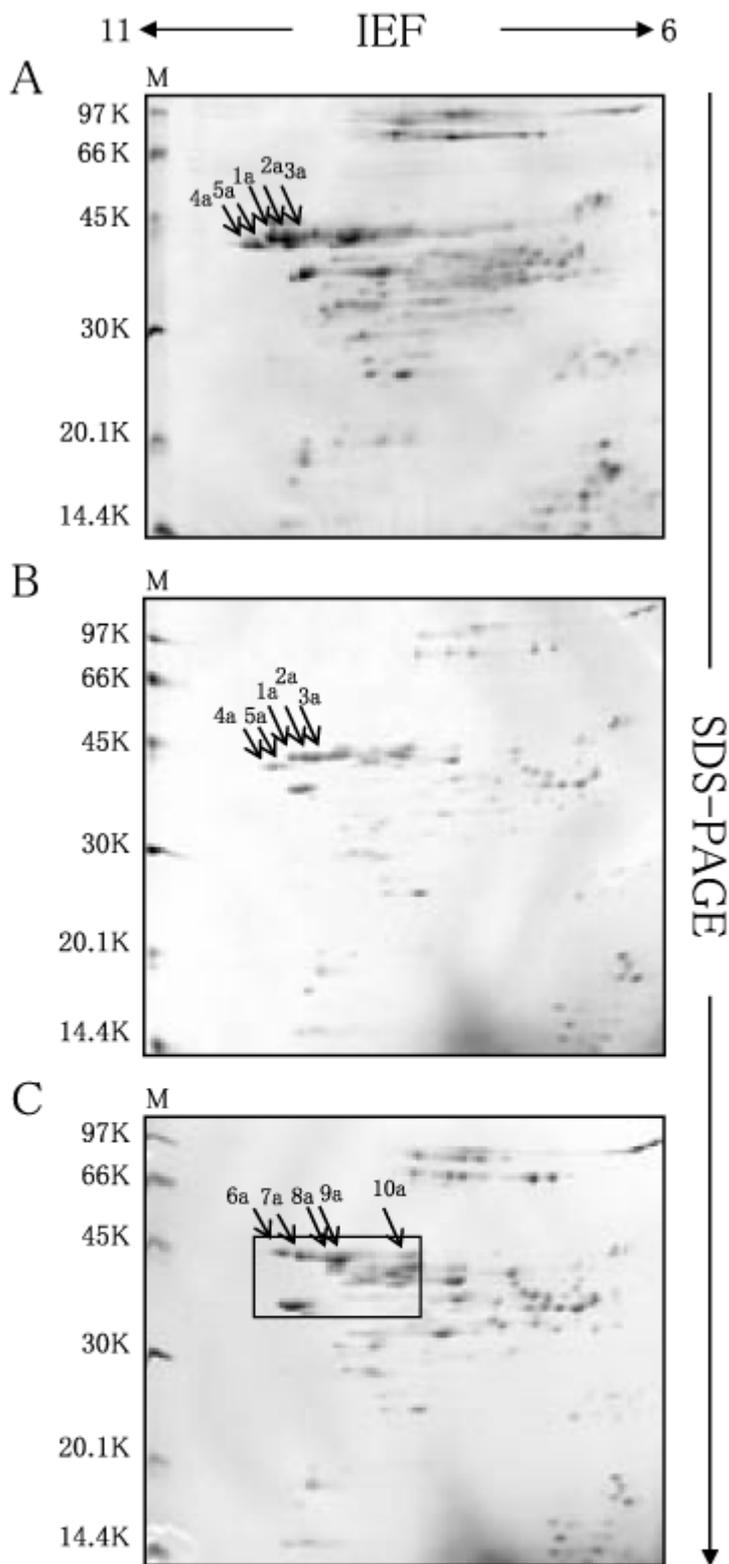
品種・系統	HMW-GS <sup>2</sup>			LMW-GS <sup>4</sup>	タンパク 質含量 (%)	ミキシング		SDS 沈降量 (ml)
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i> <sup>3</sup>	<i>Glu-D1</i>			ピーク タイム (min)	ブレイク ダウン (A)	
春のあけぼの	2 <sup>*</sup>	7+9	5+10	HA1	12.5 <sup>a</sup>	3.5 <sup>a</sup>	0.13 <sup>a</sup>	57.3 <sup>a</sup>
NIL	2 <sup>*</sup>	7+9	5+10	GL1/GL2	12.4 <sup>a</sup>	4.0 <sup>b</sup>	0.12 <sup>a</sup>	63.7 <sup>b</sup>
Glenlea	2 <sup>*</sup>	7 <sup>OE+8</sup>	5+10	GL1/GL2	14.8 <sup>b</sup>	5.3 <sup>c</sup>	0.15 <sup>a</sup>	63.7 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> 3つの異なる栽培プロットの小麦粉から得られた各値の平均値を示した。異なる記号は5%レベルで有意差があることを示す。

<sup>2</sup> HMW-GSを遺伝子座ごとに示した。

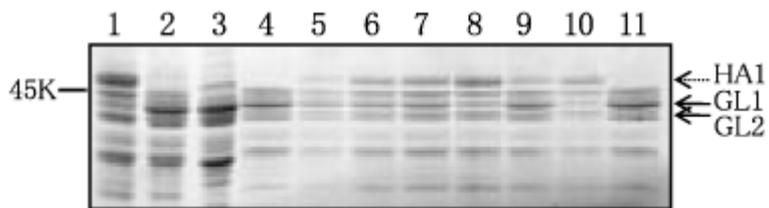
<sup>3</sup> 7<sup>OE</sup>は過剰発現（over-expressed）しているサブユニット7である。

<sup>4</sup> 第4図で示したLMW-GSと対応している。



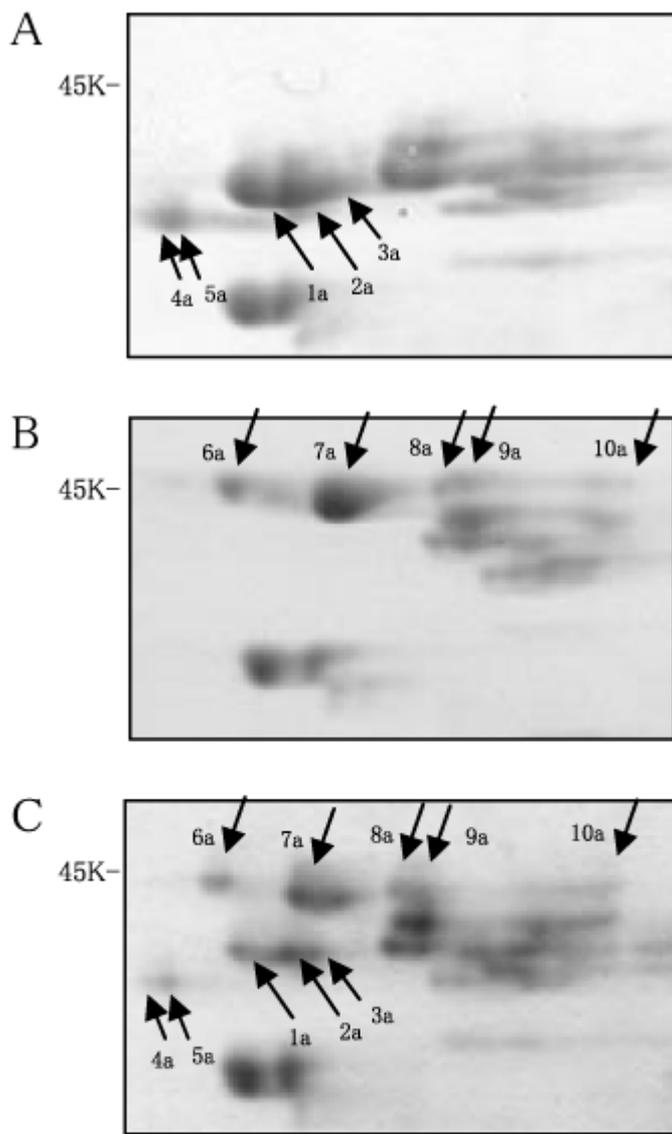
第5図 「春のあけぼの」、「NIL」、「Glenlea」のグルテニンタンパク質の2D-PAGEによる分離

「Glenlea」(A)、「NIL」(B)、「春のあけぼの」(C)。一次元目(水平方向)はpH 6-11の範囲で等電点電気泳動(左端がpH 11;右端がpH 6)を行い、二次元目(垂直方向)は12.5%のSDS-PAGEを行った。「春のあけぼの」、「Glenlea」に主に見られる低分子量グルテニン(LMWG)スポットを→で示した。分子量マーカー(M)のサイズを左に示した。Cの線で囲んだ部分を第7図で拡大して示した。



第6図 「春のあけぼの」と「Glenlea」の交配に由来する $BC_5F_2$ 後代のSDS-PAGEによる分離

「春のあけぼの」(1)、「NIL」(2)、「Glenlea」(3)、GL1/GL2を持つ $BC_5F_2$ (4, 11)、HA1/GL1/GL2を持つ $BC_5F_2$ (5, 6, 7, 9)、HA1を持つ $BC_5F_2$ (8, 10)のLMW-GSを示した。HA1は破線で示し、GL1、GL2は実線で示した。45K分子量マーカーの位置を左側に示した。



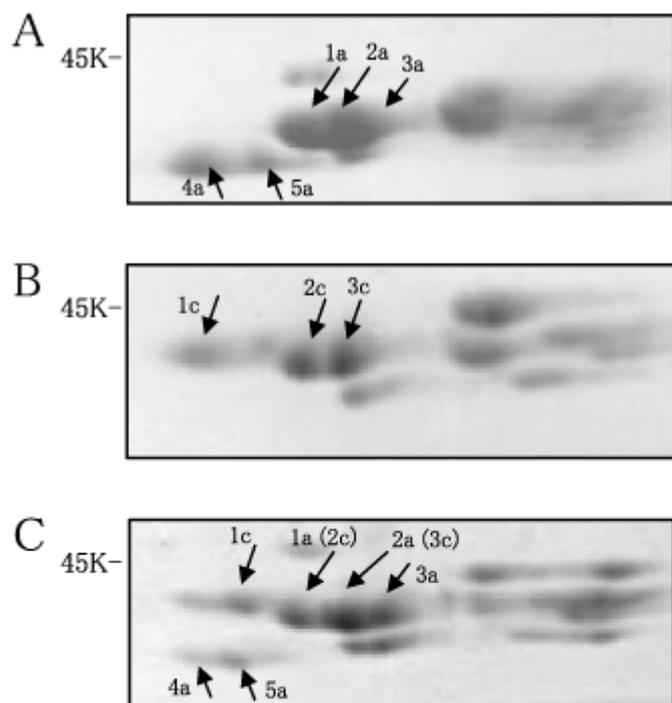
第7図 「春のあけぼの」と「Glenlea」の交配に由来する $BC_5F_2$ 後代のグルテニンタンパク質の2D-PAGEによる分離

ゲルの第5図Cの線で囲んだ部分を拡大して示している。GL1/GL2を持つ $BC_5F_2$ (A)、HA1を持つ $BC_5F_2$ (B)、両者を持つ $BC_5F_2$ (C)。45K分子量マーカーの位置を左側に示した。

第5表 春まきコムギのグルテニンタンパク質のN末端アミノ酸配列<sup>1</sup>

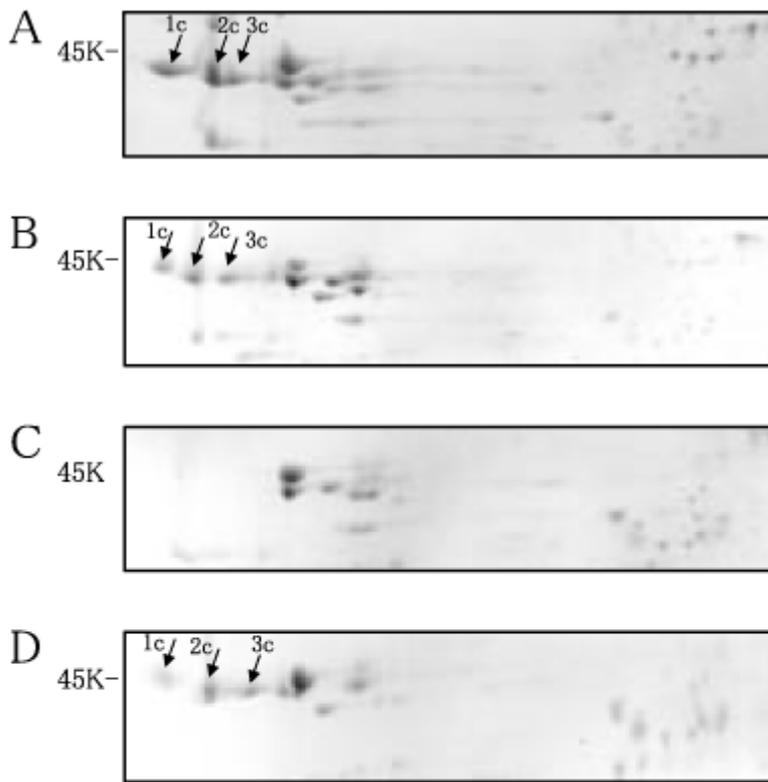
品種	スポット番号	アミノ酸配列	相当するサブユニット
Glenlea	1a	SHIPGLERPSQQQPLPP	GL1
	2a	SHIPGLERPSQQQ	GL1
	3a	SHIPGLERPSQQQ	GL1
	4a	SHIPGLERPSQQQPLPP	GL2
	5a	SHIPGLERPSQQQ	GL2
春のあけぼの	7a	SHIPGLERPSQQ	HA1

<sup>1</sup> それぞれのスポット番号は第5図のグルテニンタンパク質の番号と一致する。それぞれのスポットに相当するサブユニットも示した。アミノ酸は一文字表記法で示した: E, グルタミン酸; G, グリシン; H, ヒスチジン; I, イソロイシン; L, ロイシン; P, プロリン; Q, グルタミン; R, アルギニン; S, セリン。



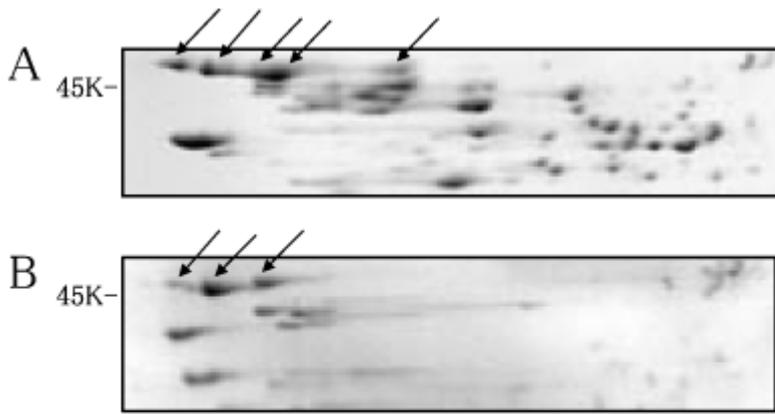
第8図 「Chinese Spring」と「Glenlea」のF<sub>2</sub>後代のグルテニンタンパク質の2D-PAGEによる分離

第7図と同様に、ゲルの塩基性側の一部分を拡大して示している。「Glenlea」のGL1/GL2を構成するスポット1a～5aを持つ F<sub>2</sub>(A)、「Chinese Spring」に由来するスポット1c～3cを持つ F<sub>2</sub>(B)、両者を持つF<sub>2</sub>(C)。1aと2c、2aと3cは重なっている。45K分子量マーカーの位置を左側に示した。



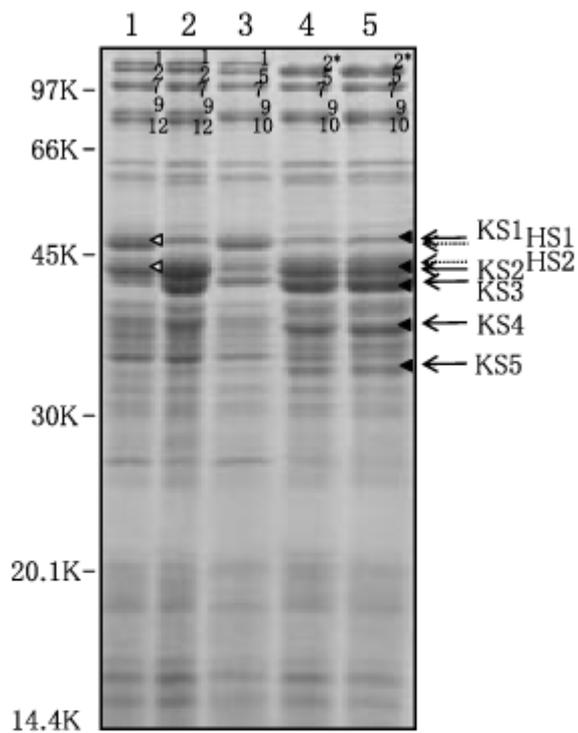
第9図 「Chinese Spring」と第1同祖染色体群の短腕を欠失するditelocentric系統のグルテニンタンパク質の2D-PAGEによる分離

「Chinese Spring」(A)、「CS DT 1AL (1Aの短腕欠失系統)」(B)、「CS DT 1BL (1Bの短腕欠失系統)」(C)、「CS DT 1DL (1Dの短腕欠失系統)」(D)。一次元目(水平方向)はpH 6-11の範囲で等電点電気泳動(左端がpH 11;右端がpH 6)を行い、二次元目(垂直方向)は12.5%のSDS-PAGEを行った。LMW-GSの部分のみを拡大して示している。「Glenlea」のGL1/GL2を構成するスポット1a~5aと対立関係にある「Chinese Spring」のスポット1c~3cを→で示した。45K分子量マーカーの位置を左側に示した。



第10図 「春のあけぼの」と「Yecora Rojo」のLMW-GSの2D-PAGEによる分離

「春のあけぼの」(A)、「Yecora Rojo」(B)。一次元目（水平方向）はpH 6-11の範囲で等電点電気泳動（左端がpH 11;右端がpH 6）を行い、二次元目（垂直方向）は12.5%のSDS-PAGEを行った。LMW-GSの部分のみを拡大して示している。「春のあけぼの」のHA1及び「Yecora Rojo」の42kDaサブユニットに相当するLMWGスポットを←で示した。45K分子量マーカーの位置を左に示した。



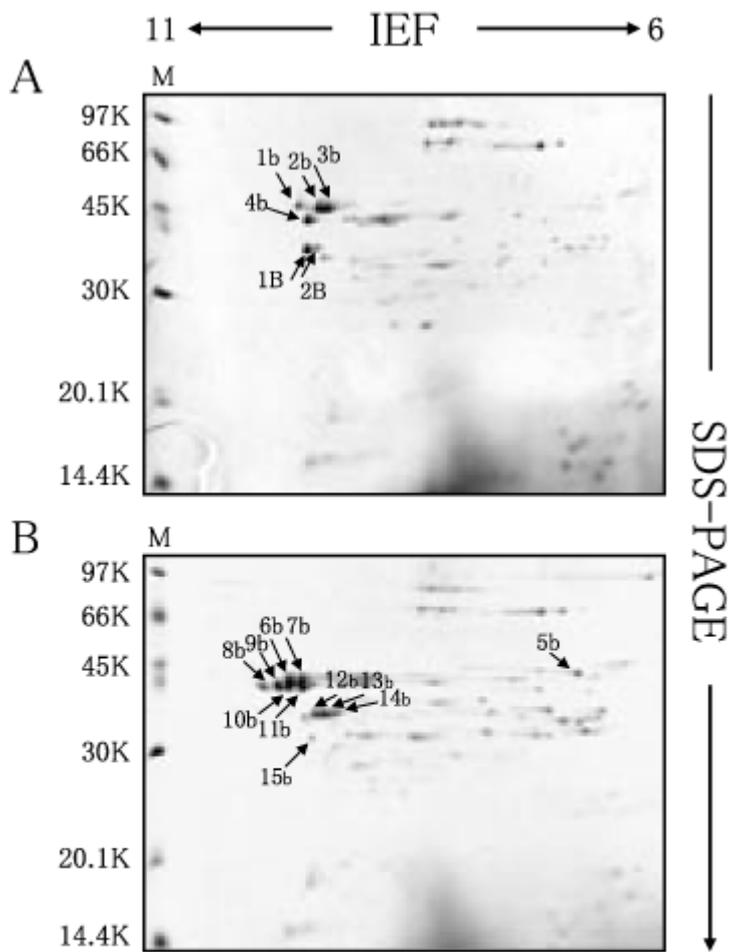
第11図 SDS-PAGEによる秋まきコムギのグルテニンサブユニットの分離

「ホロシリコムギ」(1)、「勝系34号」(2)、「勝系32号」(3)、「勝系33号」(4)、「K S 831957」。HMW-GSのサブユニット番号を右に記した。

△、→(破線):「ホロシリコムギ」に特異的に存在するHS1~HS2。

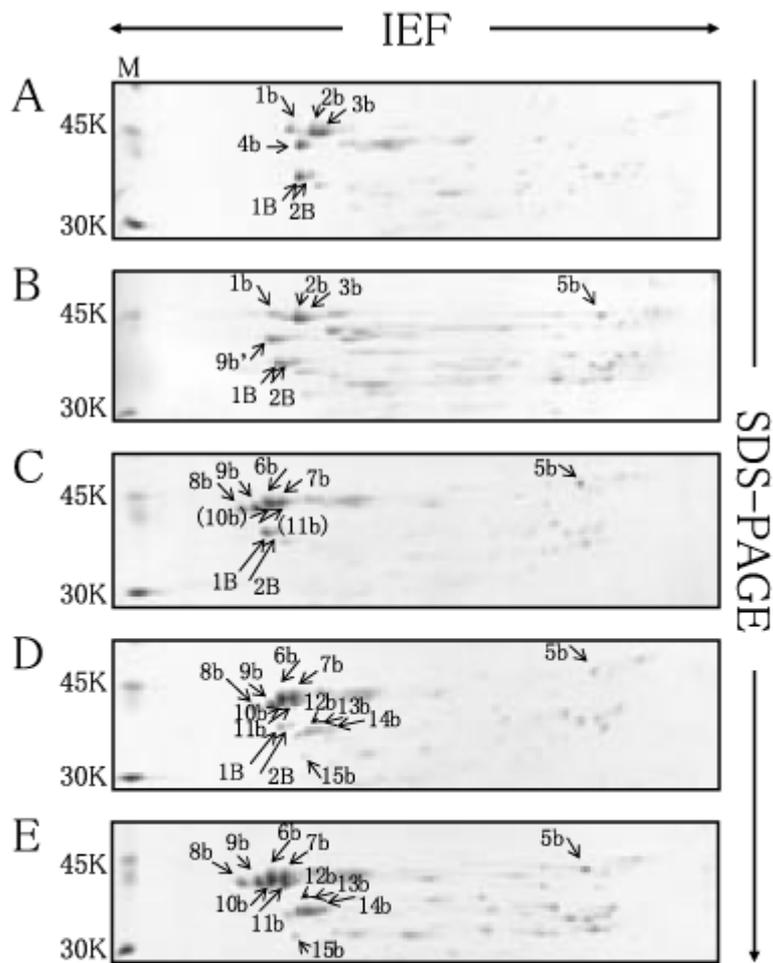
▲、→(実線):「K S 831957」に特異的に存在するKS1~KS5。

分子量マーカーの位置は左側に示した。



第12図 「ホロシリコムギ」、「KS831957」のグルテニンタンパク質の2D-PAGEによる分離

「ホロシリコムギ」(A)、「KS831957」(B)。一次元目(水平方向)はpH 6-11の範囲で等電点電気泳動(左端pH 11; 右端pH 6)を行い、二次元目(垂直方向)は12.5%のSDS-PAGEを行った。「ホロシリコムギ」、「KS831957」に主に見られるLMWGスポットを→で示した。分子量マーカー(M)のサイズを左に示した。



第13図 「ホロシリコムギ」、「KS831957」、それらの交配に由来する育成系統のグルテニンタンパク質の2D-PAGEによる分離

「ホロシリコムギ」(A)、「勝系32号」(B)、「勝系34号」(C)、「勝系33号」(D)、「KS831957」(E)。一次元目(水平方向)はpH 6-11の範囲で等電点電気泳動(左端pH 11;右端pH 6)を行い、二次元目(垂直方向)は12.5%のSDS-PAGEを行った。「ホロシリコムギ」、「KS831957」に由来するLMWGスポットを→で示した。分子量マーカー(M)のサイズを左に示した。

第6表 ホロシリコムギ、KS831957及びこれらの交配に由来する育成系統における高分子量(HMW-GS)及び低分子量グルテニンサブユニット(LMW-GS)の組成と製パン適性<sup>1</sup>

品種・系統	HMW-GS <sup>2</sup>			LMW-GS <sup>3</sup>	タンパク 質含量 (%)	ブレーク ダウン (A)	ピーク タイム (min)	SDS 沈降量 (ml)	パン 比容積 (cc/g)
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>						
ホロシリコムギ	1	7+9	2+12	HS1/HS2	9.9 <sup>a</sup>	0.14 <sup>ab</sup>	1.85 <sup>a</sup>	15.8 <sup>a</sup>	5.05 <sup>a</sup>
勝系34号	1	7+9	2+12	<u>KS1/KS2/KS3a</u>	12.4 <sup>bc</sup>	0.16 <sup>b</sup>	2.25 <sup>a</sup>	33.0 <sup>a</sup>	5.54 <sup>bc</sup>
勝系32号	1	7+9	5+10	HS1/ <u>KS1/KS3s</u>	11.5 <sup>ab</sup>	0.16 <sup>b</sup>	2.20 <sup>a</sup>	36.8 <sup>ab</sup>	5.28 <sup>ab</sup>
勝系33号	2*	7+9	5+10	<u>KS1/KS2/KS3/KS4/KS5</u>	12.8 <sup>bc</sup>	0.09 <sup>a</sup>	4.00 <sup>b</sup>	58.5 <sup>b</sup>	6.13 <sup>d</sup>
KS831957	2*	7+9	5+10	<u>KS1/KS2/KS3/KS4/KS5</u>	13.8 <sup>c</sup>	0.13 <sup>ab</sup>	3.65 <sup>b</sup>	58.8 <sup>b</sup>	6.00 <sup>cd</sup>

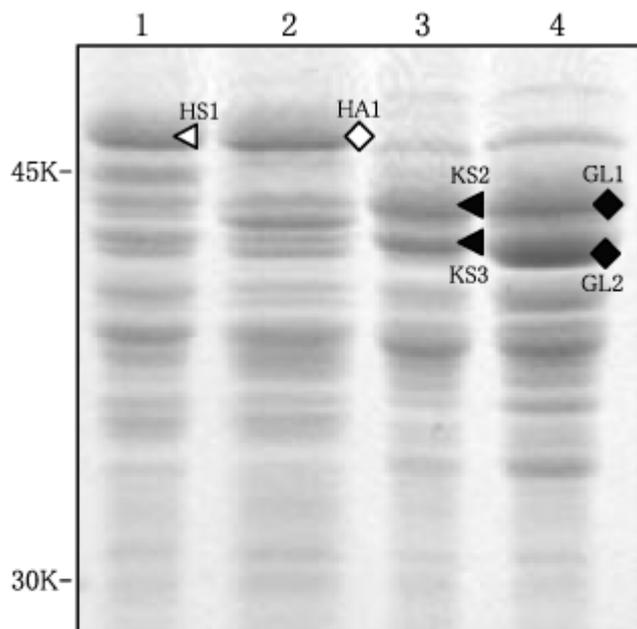
<sup>1</sup> 各値は1998年と1999年産の小麦粉から得た各値の平均値を示した。育成系統は、1998年ではF<sub>5</sub>世代、1999年ではF<sub>6</sub>世代であった。異なる記号は5%水準で有意差があることを示す。

<sup>2</sup> HMW-GSを由来する遺伝子座ごとに示した。

<sup>3</sup> 第11図で示したLMW-GSと対応している。

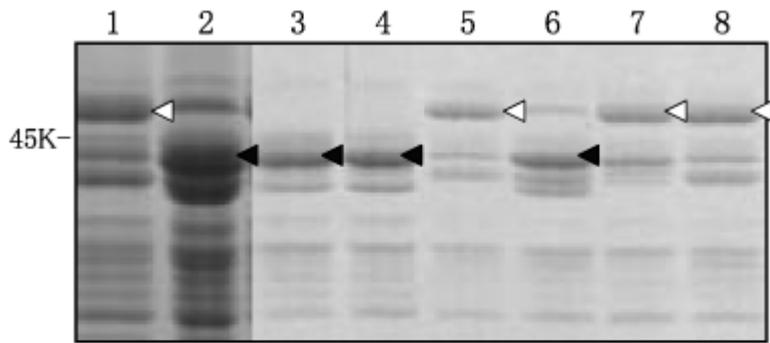
下線のあるサブユニットは「KS831957」に由来し、下線のないサブユニットは「ホロシリコムギ」に由来する。「ホロシリコムギ」、「勝系32号」、「勝系33号」、「勝系34号」は表記したLMW-GSに加えてLMWGスポット1B、2Bを持つ。

「勝系33号」及び「KS831957」のKS3はLMWGスポット8b~11bから成り、「勝系34号」のKS3aは8bと9bから成り、「勝系32号」のKS3sは9b'から成る。



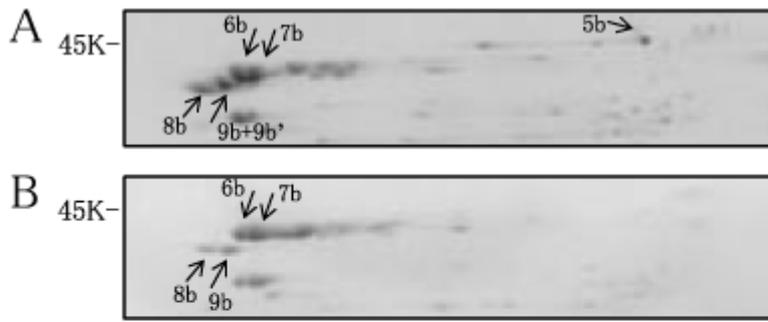
第14図 SDS-PAGEによる春まきコムギと秋まきコムギのグルテニンサブユニットの比較

「ホロシリコムギ」(1)、「春のあけぼの」(2)、「KS831957」(3)「Glenlea」(4)のLMW-GSを示した。「ホロシリコムギ」のHS1は△で、「春のあけぼの」のHA1は◇で示し、「KS831957」のKS2とKS3は▲で、「Glenlea」のGL1とGL2は◆で示した。分子量マーカーの位置は左側に示した。



第15図 「勝系32号」と「勝系34号」の交配に由来するF<sub>6</sub> RILのSDS-PAGEによる分離

「勝系32号」(1)、「勝系34号」(2)、KS2を持つF<sub>6</sub> RIL (3, 4, 6)、HS1を持つF<sub>6</sub> RIL (5, 7, 8) のLMW-GSを示した。HS1は△で示し、KS2は▲で示した。45K分子量マーカーの位置を左側に示した。



第16図 F<sub>7</sub> RILのLMW-GSの2D-PAGEによる分離

9bと9b'が重なっていると考えられるRIL(A)、9b'と5bがないRIL(B)。一次元目(水平方向)はpH 6-11の範囲で等電点電気泳動(左端がpH 11;右端がpH 6)を行い、二次元目(垂直方向)は12.5%のSDS-PAGEを行った。LMW-GSの部分のみを拡大して示している。45K分子量マーカーの位置を左に示した。

第7表 高分子量及び低分子量グルテニンサブユニット組成の異なる小麦粉の生地物性<sup>1</sup>

グルテニン		混合した RILの数	タンパク 質含量 (%)	2gミキシングテスト		SDS 沈降量 (ml)
高分子量グルテ ニンサブユニット	低分子量グルテ ニンサブユニット			ピークタイム (min)	エンベロープエリア	
2+12	HS1	7	9.9 <sup>a</sup>	2.63 <sup>a</sup>	29.7 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>
2+12	KS2(+KS3a)	5	10.6 <sup>a</sup>	2.67 <sup>a</sup>	37.3 <sup>b</sup>	1.9 <sup>a</sup>
5+10	HS1	7	10.5 <sup>a</sup>	2.89 <sup>b</sup>	33.2 <sup>ab</sup>	2.4 <sup>b</sup>
5+10	KS2(+KS3a)	4	11.1 <sup>a</sup>	3.68 <sup>c</sup>	42.3 <sup>c</sup>	3.6 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> 2回の計測値の平均値を示した。異なる記号は5%水準で有意差があることを示す。

第8表 秋まきコムギの低分子量グルテニンタンパク質のN末端アミノ酸配列<sup>1</sup>

品種・系統	スポット番号 <sup>2</sup>	アミノ酸配列 <sup>3</sup>	相当するサブユニット
ホロシリコムギ	2b	SHIPGLERPSQQ	HS1
	3b	SHIPGLERPS	HS1
	4b	ISQQQQ	HS2
KS831957	6b	SHIPGLERPSQQQPLPP	KS2
	7b	SHIPGLERPSQQQ	KS2
	8b	SHIPGLERPSQQQPLPP	KS3(KS3a)
	9b	SHIPGLERPSQQQPLPP	KS3(KS3a)
	10b	SHIPGLERPSQQQ	KS3
	11b	SHIPGLEKPSQQQPL	KS3
	12b	METRXIPGLE	KS4
	13b	METRXIPGLE	KS4
	14b	METRXIPGLE	KS4

<sup>1</sup> それぞれのスポット番号は第12図のグルテニンタンパク質の番号と一致する。それぞれのスポットに相当するサブユニットも示した。

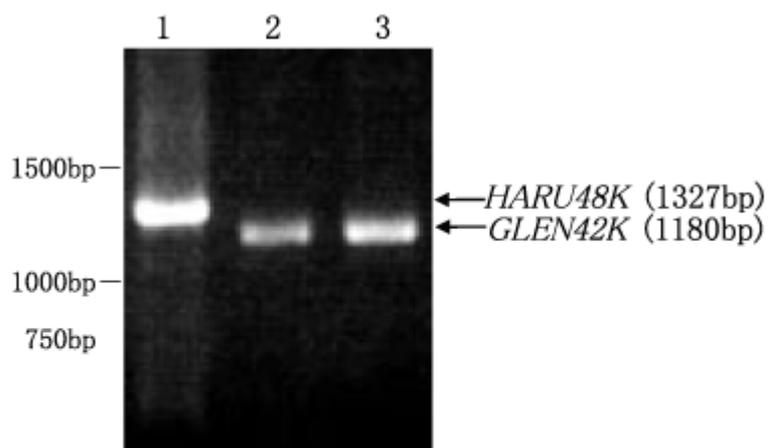
<sup>2</sup> 9bには5bと共分離する9b'が混合されている。

<sup>3</sup> アミノ酸は一文字表記法で示した: E, グルタミン酸; G, グリシン; H, ヒスチジン; I, イソロイシン; K, リジン; L, ロイシン; M, メチオニン; P, プロリン; Q, グルタミン; R, アルギニン; S, セリン; T, スレオニン; X, 未同定。

Y17845	-----	-VAATSAIAQ	MENSHIPGLE	RPSQQQPLPP	QQTLSHHHQQ	39
cDNA32	MKTFLIFALL	AVAATSAIAQ	MENSHIPGLE	RPSQQQPLPP	QQTLTTHHQQ	50
					#	
Y17845	QPIQQQPQQF	PQQQPCSQQQ	QQPPLSQQQQ	PPFSQQQQPP	FSQQQQPVLP	89
cDNA32	QPIQQQPHQF	PQQQPCSQQQ	QQPPLSQQQQ	PPFSQQQQPP	FSQQQQPVLP-	99
	#					
Y17845	QQPSFSQQQL	PPFSQQQQPP	FSQQQQPVLP	QQPSFSQQQL	PPFSQQQLPPF	139
cDNA32	-----	-----	-----	-----	-----	99
Y17845	SQQQQPVLPQ	QPPFSQQQLP	PFSQQQLPPFS	QQQQPVLPQQ	PPFSQQQQQP	189
cDNA32	-----	-----	-----	-----	-----	99
Y17845	ILPQQPPFSQ	QQQPVLLQQQ	IPFVHPSILQ	QLNPCKVFLQ	QQCSPVAMPQ	239
cDNA32	-----	-----LQQQ	IPFVHPSILQ	QLNPCKVFLQ	QQCSPVAMPQ	133
Y17845	SLARSQMLQQ	SSCHVMQQQC	CQQLPQIPQQ	SRYEAIRAIV	YSIILQEQQQ	289
cDNA32	SLARSQMLQQ	SSCHVMQQQC	CQQLPQIPQQ	SRYEAIRAIV	YSIILQEQQQ	183
Y17845	VQGSIQTQQQ	QPQQLGQCVS	QPQQQSQQQL	GQQPQQQQLA	QGTFLQPHQI	339
cDNA32	VQGSIQTQQQ	QPQQLGQCVS	QPQQQSQQQL	GQQPQQQQLA	QGTFLQPHQI	233
Y17845	AQLELMTSIA	LRTLPTMCNV	NVPLYRTTTR	VPFVGTGTVG	AY	381
cDNA32	AQLEVMTSIA	LRTLPTMCNV	NVSLYRTTTR	VPFVGTGTVG	GY	274
	#		#		#	

第17図 「Glenlea」のcDNAライブラリから単離されたLMW-GS遺伝子「cDNA32」と「Y17845」の推定アミノ酸配列のアライメント

DNASISのプログラムを用いてアライメントを行った。異なるアミノ酸残基を#で示した。推定ギャップを-で示した。



第18図 RT-PCRによる春まきコムギのLMW-s遺伝子の増幅

プライマーS-type2F/ S-type978Rを用いたRT-PCRを「春のあけぼの」(1)、「NIL」(2)、「Glenlea」(3)に対して行った。分子量マーカーの位置を左側に示した。





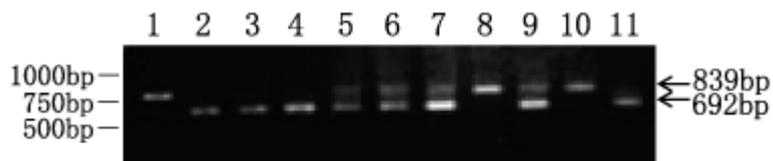
start of the mature protein



```
GLEN42K MKTFLIFALLAVAATSAIAQMENSHIPGLERPSQQQPLPPQQTLSHQQPQPVPQQQPQQF 60
HARU48K MKTFLIFALLAVAATSAIAQMENSHIPGLERPSQQQPLPPQQTLTTHHQQQQPIQQQPHQF 60
*****
GLEN42K PQQQFCSSQQQQ-----QQQQ---QQQQQQQ 82
HARU48K PQQQFCSSQQQQPPLSQQQPFFSQQQPFFSQQQPVLPPQPSFSQQQLPPFSQQQ--Q 118
*****
GLEN42K -PLSQQQPP-----FSQQPFFSQQQPVLPPQPSFSQQQLPPFSQQQPP 127
HARU48K PPFSSQQQPVLPPQPSFSQQQLPPFSQQQLPPFSQQQPVLPPQPPFSQQQLPPFSQQQLPP 178
* *****
GLEN42K FSQQQPVLPPQPPFSQQQQQPILPQQPSFSQQQQQLVLPQQQIPFVHPSILQQLNFC 187
HARU48K FSQQQPVLPPQPPFSQQQQQ-PILPQQPFFSQQQPVLVLLQQ-QIPFVHPSILQQLNFC 236
*****
GLEN42K VFLQQCCSPVAMPQSLARSQMLQQSSCHVMQQCCQQLPQIPQQSRYEAIRAIIYSIVLQ 247
HARU48K VFLQQCCSPVAMPQSLARSQMLQQSSCHVMQQCCQQLPQIPQQSRYEAIRAIVYSIILQ 296
*****
GLEN42K EQQQVRSIQTQQQPQQLGQCVSQPQQSSQQQLGQQPQQQQLAQGTFLQPHQIAQLEVM 307
HARU48K EQQQVQGSIQTQQQPQQLGQCVSQPQQSSQQQLGQQPQQQQLAQGTFLQPHQIAQLEVM 356
*****
GLEN42K TSIALRTLPMCRVNVPLRYRTTTSVPFGVGTGVGAY 343
HARU48K TSIALRTLPTMCNVNVSRYRTTTRVFPFGVGTGVGGY 392
*****
```

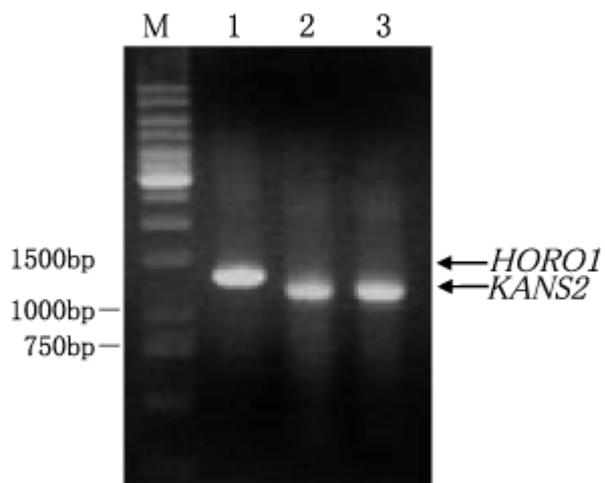
第20図 HARU48KとGLEN42Kの推定アミノ酸配列のアライメント

DNASISのプログラムを用いてアライメントを行った。同じアミノ酸残基は★で示した。推定ギャップは-で示した。15の連なるグルタミン配列を破線の下線で示した。システイン残基は□で囲んだ。



第21図 「春のあけぼの」と「Glenlea」の交配に由来するBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>後代のゲノミックPCR

「春のあけぼの」(1)、「NIL」(2)、「Glenlea」(3)、GL1/GL2を持つBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>後代 (4, 11)、HA1/GL1/GL2を持つBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub> (5, 6, 7, 9)、HA1を持つBC<sub>5</sub>F<sub>2</sub> (8, 10) に対してプライマーs-F1/s-R2を用いてゲノミックPCRを行った結果。839bpのDNA断片の有無がHA1の有無と一致し、692bpの断片の有無がGL1/GL2の有無と一致している。分子量マーカーの位置を左側に示した。



第22図 RT-PCRによる秋まきコムギのLMW-s遺伝子の増幅

プライマーS-type2F/ S-type978Rを用いたRT-PCRを「ホロシリコムギ」(1)、「勝系34号」(2)、「K S 831957」(3)に対して行った。分子量マーカー(M)のサイズを左側に示した。

A

start of the mature protein

↓

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
AACACTAGTTAACACTAGTCCACCATGAAGACCTTCCTCATCTTTGCCCTCCTCGCCGTTGCGGGGACAAAGTGCCATTGCACAAATGGAGAAATAGCCAC A
      M K T F L I F A L L A V A A T S A I A Q M E N S H I
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TCCTGGTTTGGAGAGCCATCGCAGCAACAACCATACCACCACCAACAACATTATCGCAACAACAACAACCCATCCCAACAACAACCCACCC A
  P G L E R P S Q Q Q P L P P Q Q T L T H H Q Q Q Q P I Q Q Q P H Q
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTTCCACAACAGCAACCATGTTTCACAGCAACAACAACAACCCACCATTTTCGCAACAACAACAACCCATTTTCGAGCAACAACAACCCACCATTTTC A
  F P Q Q Q P C S Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q P L S Q Q Q Q P P F S
310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
CAGCAACAACAACCCAGTTTCACCGCAACAACCCATCATTTTCGCAACAACAACAACCCACCATTTTCGAGCAACAACAACCCACCATTTTCACAGCAACA A
  Q Q Q Q P V L P Q Q P S F S Q Q Q L P P F S Q Q Q Q P P F S Q Q Q Q P V L P Q P P
410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
AACCACTTCTACCGCAACAACCATCATTTTCGCAACAACAACAACCCACCATTTTCACAGCAACAACAACCCACCATTTTCGAGCAACAACAACCCAGTACTAC C
  P V L P Q Q P S F S Q Q Q L P P F S Q Q Q L P P F S Q Q Q Q P V L P
510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
GCACAACAACAACCCATTTTCGAGCAACAACAACAACCCACCATTTTCACAGCAACAACAACCCACCATTTTCGAGCAACAACAACCCAGTACTACCGCAACAACCCAC C
  Q Q Q P P F S Q Q Q L P P F S Q Q Q L P P F S Q Q Q Q P V L P Q P P
610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
TTTTGCAACAACAACAACCAATTTTCACCGCAACAACCCACCATTTTCGCAACAACAACAACCCAGTTCCTACTGCAACAACAACAATACCATTTGTTTCAT C
  F S Q Q Q Q P I L P Q Q P P F S Q Q Q Q P V L L Q Q Q I P F V H P
710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
CATCTATCTGCGCAACAACAACCCATGCAAGGTTTCCTCCAGCAGCAATGCGCCCTGTGGCTATGCCACAAGTCTTGTAGGTGCGCAAAATGTTGC A
  S I L Q Q L N P C K V F L Q Q Q C S P V A M P Q S L A R S Q M L P
810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
GCAGAGCAGTTCCATGTGATGCAACAACAATGTTCCAGCAGTTGCCGCAATCCCGCAGCAATCCCGCTATGAGGCAATCCCGTCTATCGTCTACTC C
  Q S S C H V M Q Q Q C Q L P Q I P Q Q S R Y E A I R A I V Y S
910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
ATCATCTGCAACAACAACAACAGGTTCCATCCAACTCAGCAGCAACAACCCCAACAGTTGGGCAATGGGTTTCCCAACCCCAACAACAG T
  I I L Q Q Q Q V Q G S I Q T Q Q Q Q Q Q Q L G Q C V S Q Q Q Q S
1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
CACACAGCAACAACAACAACCCATGCAAGGTTTCGCAACAACAACAACCCACCATTTTCGCAACAACAACAACCCATGCAAGGTTGAGGTGATGACTTCCA T
  Q Q Q L G Q Q Q Q Q Q Q L A Q G T F L Q P H Q I A Q L E V M T S I
1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
TGCGCTCGTACCTGCGCAACAACAATGTTCAATGTTGCTGTATAGAACACCACCTAGGGTGCATTCGCGGTTGGCACCAGGTTGGTGGCTA C
  A L R T L P T M C N V N V S L Y R T T T R V P F G V G T G V G G Y
1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
TAATAAGGAAAGATCTCTAGTAATATATAGTTGGATCACCTTTGTTAGTTCGATGGATATGTCGATGCAAGGTTGACAAATAAGTGTCAACAACCGTC A
  *
1310    1320    1330
TGTTGACCCGCCAAACTAGTTGTTT

```

B

start of the mature protein

↓

```

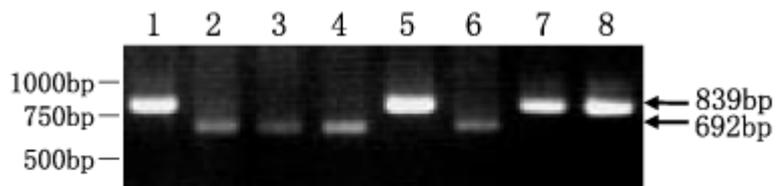
10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
AACACTAGTTAACACTAGTCCACCATGAAGACCTTCCTCATCTTTGCCCTCCTCGCCGTTGCGGGGACAAAGTGCCATTGCACAAATGGAGAAATAGCCAC A
      M K T F L I F A L L A V A A T S A I A Q M E N S H I
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TCCTGGTTTGGAGAGCCATCGCAGCAACAACCATACCACCACCAACAACATTATCGCAACAACAACAACCCATCCCAACAACAACCCACCC A
  P G L E R P S Q Q Q P L P P Q Q T L S H Q Q P Q Q P V Q Q Q P Q Q
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTTCCACAACAGCAACCATGTTTCACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACCCATTTTCGAGCAACAACAACCCACCATTTTCACAGCAACA A
  F P Q Q Q P C S Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q P L S Q Q Q Q P P F
310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TCACAGCAACAACCCAGTTTCGAGCAACAACAACCCATCATTTTCGCAACAACAACAACCCACCATTTTCGAGCAACAACAACCCACCATTTTCACAGCAACA A
  S Q Q Q P P F S Q Q Q Q P V L P Q Q P S F S Q Q Q L P P F S Q Q Q P
410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
CACCGTTTTCACAACAACAACAACCCAGTACTACCGCAACAACCCACCATTTTCGCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA A
  P F S Q Q Q Q P V L P Q Q P P F S Q Q Q Q Q Q Q P I L P Q Q P S F S
510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
GCACAACAACAACAACCATGTTTCACCGCAACAACAACCCATTTTCGCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA A
  Q Q Q Q Q L V L P Q Q Q I P F V H P S I L Q Q L N P C K V F L Q Q
610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
CAATGCAAGGTTGCGCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA A
  Q C S P V A M P Q S L A R S Q M L Q Q S S C H M M Q Q Q C C Q Q L P
710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
CGCAAAATCCCGCAGCAATCCCGCTATGAGGCAATCCCGTCTATCTACTCCATCGTTCCTGCAAGAACAACAACAGGTTGGGGTTCCATCCAAACTC A
  Q I P Q Q S R Y E A I R A I I Y S I V L Q E Q Q Q V R G S I Q T Q
810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
GCAGCAGCAACAACCCAGTTGGGCAATGTTTCCCAACCCCAACAGCAGTCACAGCAGCAACTCGGG CAACAACCTCAACAACAACAATGGCACAG
  Q Q Q P Q Q L G Q C V S Q P Q Q Q S Q Q Q L G Q Q P Q Q Q Q L A Q
910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
GGTACCTTTTTCGAGCCACACCAGATAGCTCAGCTTGAGGTGATGACTTCCATTTGCGCTCCGTACCCATACCAATGATGTCGCGGTGCAATGTCGCGGTTG T
  G T F L Q P H Q I A Q L E V M T S I A L R T L P M M C R V N V P L Y
1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
ATAGAACCACCACCTAGTGTGCCATTGCGGTTGGCACTGGAGTTGGTGCCTACTGATAAGGAAAGGTTCTCTAGTAATATATAGTTGGATCACCGTTGTT T
  R T T T S V P F G V G T G V G A Y *
1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180
AGTCGATGGATATGTCGATGCAAGGTTGACAAATAAGTGTCAACAACCGTCTGTTGACCCGCCAAACTAGTTGTTT

```

## 第23図 「ホロシリコムギ」及び「KS831957」のLMW-s遺伝子の塩基配列と推定アミノ酸配列

「ホロシリコムギ」のHORO1(A)、「KS831957」のKANS2(B)。プライマーS-type2F/S-type978Rは二重下線で示した。ストップコドンは★で示した。KS2/KS3aまたはHS1をコードする対立遺伝子に連鎖するDNAマーカーに相当する部分を下線で示した。LMWGスポットのN末端アミノ酸配列と一致する部分を下線で示した。15の連なるグルタミン配列を破線の下線で示した(Bのみ)。GLEN42Kと異なる塩基と推定アミノ酸を太字で示した(Bのみ)。システイン残基は□で囲んだ。HORO1及びKANS2Lの塩基配列はDDJBデータベースに登録した(それぞれaccession number AB164415、AB164416)。





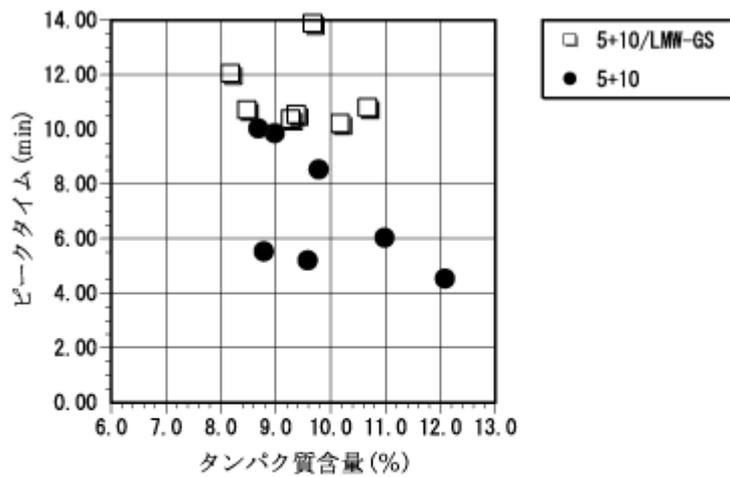
第24図 「勝系32号」と「勝系34号」の交配に由来するF<sub>6</sub> RILに対するゲノミックPCR

「勝系32号」(1)、「勝系34号」(2)、KS2 /KS3aを持つRIL (3, 4, 6)、HS1を持つRIL (5, 7, 8) に対してプライマー s-F1/s-R2を用いてゲノミックPCRを行った結果。839bpのDNA断片の有無がHS1の有無と一致し、692bpの断片の有無がKS2/KS3aの有無と一致している。分子量マーカーの位置を左側に示した。

第9表 育成系統における5+10マーカーとLMW-GSマーカーの有無と生地物性との関係<sup>1</sup>

系統名	交配組み合わせ	マーカー		タンパク 質含量(%)	
		5+10	LMW-GS		
勝系57号	KS831957/札系203	+	+	9.7	
勝系65号	札系159/KS831957//月系9509	+	+	10.7	
芽系0301	KS831957/札系198//北海257号	+	+	9.3	10.33
芽系0307	Glenlea/ホクシン	+	+	8.5	10.67
I-621	北見51号/Karl//札226	+	+	8.2	12.00
E-110	北見72号/芽系9919	+	+	9.4	10.50
E-210	北見72号/芽系9919	+	+	10.2	10.17
平均値				9.4 <sup>a</sup>	11.18 <sup>a</sup>
勝系47号	東山24号/KS831957//Chisholm/札系203	+	-	9.8	8.50
勝系59号	東山24号/KS831957//Chisholm/札系203	+	-	11.0	6.00
芽系0306	北海257号/Moscovskaya70	+	-	12.1	4.50
芽系0308	Glenlea/ホクシン	+	-	9.0	9.83
芽系0309	Glenlea/ホクシン	+	-	8.7	10.00
芽系0310	もち谷系H1884/北海257号	+	-	8.8	5.50
芽系0315	Laura/北海253号//ホクシン/Laura	+	-	9.6	5.17
平均値				9.9 <sup>a</sup>	7.07 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> 5+10マーカーについてはプライマーDx5-F1/Dx5-F2/Dx5-Rを用いてPCRを行い1Dx5を識別するマーカーが増幅したものを「+」で示した。LMW-GSはプライマーs-F1/s-R2を用いてPCRを行い「KS831957」と同じサイズのマーカーが増幅したものを「+」、異なるサイズのマーカーが増幅したものと増幅が全く見られなかったものを「-」で示した。異なる記号は1%水準で有意差があることを示す。



第25図 育成系統のPCRマーカーによる選抜結果

HMW-GS 5+10を判定するためにプライマーDx5-F1/Dx5-F2/Dx5-Rを用いてPCRを行い、生地物性を強めるLMW-GS遺伝子を判定するためにプライマーs-F1/s-R2を用いてPCRを行った。5+10マーカーのみが増幅したものは●で、5+10マーカーとLMW-GSマーカーが共に増幅したものは□で示した。各系統のタンパク質含量とピークタイムの値をグラフ化した。

