

Development of PCR-based DNA marker for identifying wheat high-molecular-weight glutenin subunits "5+10" and its applications to breeding of bread-making cultivars for the Tohoku region

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): Bread-making quality, DNA marker, "5+10" subunit, Glu-D1d allele, "Yukichikara" 作成者: 石川, 吾郎, 齋藤, 美香, 伊藤, 裕之, 平, 将人, 前島, 秀和, 谷口, 義則, 中村, 俊樹 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001179

コムギ高分子量グルテニンサブユニット「5+10」を判別する PCR 用 DNA マーカーの開発およびその東北地方向けパン用品種への適用

石川 吾郎・齊藤 美香・伊藤 裕之・平 将人
前島 秀和・谷口 義則・中村 俊樹*

抄 録：最近，パン用国産コムギに対する需要が全国的に伸びてきていることを受けて，東北地方においても寒冷地向け早生・多収で製パン適性が高いコムギ品種の早期開発が求められている。そこで，高い製パン適性を示す高分子量グルテニンサブユニットを持つコムギ新品種の育成に役立てるため，それらを簡易に判別できる DNA マーカーの開発を行った。小麦粉の生地物性に影響を与える貯蔵タンパク質である高分子量グルテニンは3つの *Glu-1* 座 (*Glu-A1*, *Glu-B1* および *Glu-D1*) に支配されており，そのうち *Glu-D1* 座の対立遺伝子 *Glu-D1d* (「5+10」サブユニット) は生地物性を強化してパン体積を増大させることが知られている。そこで，*Glu-D1d* の有無を判別できる共優性の PCR 用 DNA マーカーを開発した。また，近年東北農業研究センターで育成されたパン用品種を中心に同マーカーにより *Glu-D1d* の有無の判定を行い，従来の SDS-ポリアクリル電気泳動法と比較して，有効であることを確認した。さらに，当初 *Glu-D1d* を持つと報告されていた「ゆきちから」はその遺伝子を持たないことを明らかにした。

キーワード：製パン適性，DNA マーカー，「5+10」サブユニット，*Glu-D1d* 対立遺伝子，「ゆきちから」

Development of PCR-based DNA marker for identifying wheat high-molecular-weight glutenin subunits "5+10" and its applications to breeding of bread-making cultivars for the Tohoku region : Goro ISHIKAWA, Mika SAITO, Hiroyuki ITO, Masato TAIRA, Hidekazu MAEJIMA, Yoshinori TANIGUCHI, and Toshiki NAKAMURA

Abstract : Recently, demand for domestic bread-making wheat cultivars is increasing throughout Japan, including the Tohoku area. The goal of this study was to design DNA markers to help our Breeding Department develop new wheat cultivars with high-molecular-weight glutenin (HMWG) subunits responsible for high bread-making quality. HMWG subunits of storage proteins are highly related to bread-making quality. There are three *Glu-1* loci, *Glu-A1*, *Glu-B1*, and *Glu-D1*, and several alleles from each locus have been characterized. Since the *Glu-D1d* allele responsible for producing the HMWG subunits "5+10" has the greatest positive effect on bread-making properties, a co-dominant DNA marker to be used for an effective identification of this allele was developed. By applying the marker to determine the presence or absence of the *Glu-D1d* allele in bread-making cultivars recently released from our institution, we showed that our PCR-based marker is more effective and accurate than the established SDS-PAGE method for HMWG subunit detection. In addition, the marker analysis revealed that the *Glu-D1d* allele was missing from the cultivar "Yukichikara", though this cultivar has been reported to carry the allele.

Key Words : Bread-making quality, DNA marker, "5+10" subunit, *Glu-D1d* allele, "Yukichikara"

はじめに

最近、パン用国産コムギ品種に対する実需者の要望が全国的に高まっており、東北地方においても寒冷地向け早生・多収で、製パン適性の高い良質品種に対する要望が強い。このような背景を受け、東北農業研究センターでは、外国産パン用コムギに近い生地特性と製パン適性を持つ寒冷地向けパン用コムギ品種「ハルイブキ」を 2001 年度に品種登録した (吉川ら 2004)。同品種の製パン適性の高い要因の 1 つとして、種子の貯蔵タンパク質のうち高分子量グルテニン (以下 HMWG と略記) に、国内品種では稀なサブユニット「5+10」を持つことが挙げられる。パン用の小麦粉はタンパク質含量が高いことが必須条件であるが、その質によっても製パン適性は左右される。これまでの研究で、HMWG サブユニット「5+10」を持つ小麦粉は、他のサブユニットを持つ場合に比べて生地物性が強く、パン体積が増大するため、製パン適性が高くなることが報告されている (Payne et al. 1987, Takata et al. 2000)。このことは、高い製パン適性が求められる北米やヨーロッパ諸国のコムギ品種の多くがこのサブユニットを持つことから裏付けられる (李ら 1995)。しかしながら、国内産コムギは従来より用途がうどんやそうめんなどの日本めんが主体であったため、我が国の命名登録品種 131 品種を中村 (2001) が調査したところ「5+10」サブユニットを持つのは「農林 35 号」および「ハルヒカリ」(農林 104 号) の 2 品種のみであった。そこで、東北農業研究センター (旧東北農業試験場) では、今から 10 年以上前より「5+10」サブユニットの導入を開始し、初の「5+10」サブユニットを持つパン用コムギ品種「ハルイブキ」を育成した。

コムギ種子の貯蔵タンパク質の 30 ~ 40% を占めるグルテニンは、乾燥種子あるいは小麦粉から適切な緩衝液を用いて容易に抽出することができるが、HMWG サブユニット組成を調査するためには SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) 法による各サブユニットの分離・同定が必要である。SDS-PAGE 法はタンパク質の分離分析において一般的に用いられる手法であるが、ゲルの作成や泳動操作に熟練を要するとともに、特に多検体を扱う場合には移動度の類似したサブユニット間で誤った判定をするおそれがあることから、実際の育種選抜に

用いることは難しく、より効率的な選抜手法の開発が急務となっていた。

ゲノム研究の加速によって、様々な植物種で有用遺伝子をその近くにある DNA 上の目印を利用して間接的に選抜する手法、いわゆる DNA マーカー育種の開発および実用化が進められており、コムギの品種育成においても製めん適性に関する DNA マーカー選抜が開始されている (石川ら 2003, 中村ら 2003)。DNA マーカーを育種に用いることのメリットのひとつとして、DNA を抽出する組織を選ばない点が挙げられる。したがって、例えば種子貯蔵成分を目的形質としている場合でも、幼苗などの組織を用いて分析することが可能であり、育種の効率化につながる。また、複数の異なる形質に関する DNA マーカーを開発できれば、一度抽出した DNA を別の形質の選抜にも利用できるとともに、マルチプレックス PCR による同時判定によって、選抜にかかる労力やコストをさらに抑えられる可能性がある。

本報告では、HMWG サブユニット「5+10」の有無を簡易に判別できる DNA マーカーの開発について報告する。また、このマーカーを用いて近年東北農業研究センターで育成されたパン用コムギ品種「ハルイブキ」および「ゆきちから」などの「5+10」サブユニットの有無を調査すると同時に、今回開発した DNA マーカーによる選抜の利点を述べる。

本稿の執筆にあたっては、多くのご助言・ご指導を頂いた作物機能開発部長宮川三郎博士に深く感謝する。

材料と方法

HMWG サブユニットの標準品種として、北海道農業研究センターから譲り受けた「ハルユタカ」、
「タクネコムギ」、
「農林 61 号」および「春のあけぼの」の種子を、東北農業研究センター育成の材料として「ハルイブキ」および「ゆきちから」を供試した。

また、「ハルイブキ」に関しては、ヘテロ個体の選抜の可能性を探るために同品種と「盛系 C-130a」との交雑に由来する F₂ 種子 12 粒を供試した。さらに「ゆきちから」に関しては、「5+10」サブユニットの来歴を判定する目的で、その両親である「東北 141 号」および「さび系 23 号」を供試した。

固定系統・品種では、3 粒の種子より貯蔵タンパク質を抽出し、別に発芽させた 3 個体の若葉を混合

したものから DNA 自動分離装置 PI-50 α (クラボウ)を用いてゲノム DNA を抽出した。一方, F_1 に由来する種子では, 胚を含まない半粒の粉末約 5mg を用いて貯蔵タンパク質を抽出し, 残りの半粒からの発芽実生葉を用いて同様の方法でゲノム DNA を抽出した。

SDS-PAGE は, 中村ら(1989)の方法に従った。PCR は, GeneAmp[®] PCR system 9700 (PE Applied Biosystems)を用いた。PCR 断片のゲルからの切り出しには QIAquick[®] Gel Extraction Kit (キアゲン), 塩基配列の決定には BigDye Terminator ver. 1.1 (PE Applied Biosystems), 塩基配列の解析およびプライマーの設計には, それぞれオンラインソフトウェア CLUSTALW 1.7 (DDBJ) および Net Primer (BioSoft International)を用いた。

マルチプレックス PCR では, 今回開発した DNA マーカーの PCR 反応液に, Nakamura ら(2002)による *Wx-B1* 遺伝子の欠失の有無を判別できるプライマーセット (BDLF: 5'-CTGGCCTGCTAC-CTCAAGAGCAACT-3'; BRD: 5'-CTGACGTC-CATGCCGTTGACGA-3')を終濃度各 0.2 μ M になるように加えた。それ以外の反応条件は, マルチプレックス PCR を行わない場合と同一にした。

結果

1. 高分子量グルテニンサブユニット遺伝子の比較
HMWG サブユニットは, *Glu-A1*, *Glu-B1* および *Glu-D1* と呼ばれる 3 つの遺伝子に支配され, これらは第 1 同祖染色体の長腕に座乗しており, それぞれの遺伝子座に多数の複対立遺伝子が報告されている(表 1)(Payne et al. 1987, Lukow et al. 1989, 中村 2002)。実際には, 各遺伝子座には x-type および y-type と呼ばれる密接に連鎖した 2 つの遺伝子が座乗しており, 両遺伝子間の物理距離は約 50 (D ゲノム) ~ 160kb (B ゲノム)であることが最近の研究で明らかとなっている(Gu et al. 2004, Kong et al. 2004)。しかしながら, これら 2 つの遺伝子間で組換えが起こる確率は非常に低いことから, これまでの HMWG サブユニットに関する研究ではこれら 2 つの遺伝子は同一の座として取り扱われている。

現在, 多数の HMWG サブユニット遺伝子が単離され, それらの塩基配列が公共のデータベースに登録されている(表 2)。ここで, 例えば *Glu-A1* 座の x-type の 1 サブユニットを「Ax1」と示すことが慣例となっており, 以後この方法に従うこととする。HMWG サブユニット遺伝子は, イントロンを含

表 1 コムギ高分子量グルテニンサブユニット遺伝子およびそれらの命名登録品種における頻度

遺伝子座	対立遺伝子	サブユニット		Glu-1 スコア ^{a)}	命名登録	
		x-type	y-type		品種 ^{b)}	標準品種 (由来国)
<i>Glu-A1</i>	<i>a</i>	1	-	3	4.6	Hope (USA)
	<i>b</i>	2*	-	3	8.6	Bezostaya-1 (USSR)
	<i>c</i>	-	-	1	86.8	Chinese Spring (China)
<i>Glu-B1</i>	<i>a</i>	7	-	1	1.7	Flinor (France)
	<i>b</i>	7	8	3	94.1	Chinese Spring (China)
	<i>c</i>	7	9	2	1.2	Bezostaya-1 (USSR)
	<i>d</i>	6	8	1	1.2	Hope (USA)
	<i>e</i>	20	-	1	0.6	Federation (Australia)
	<i>f</i>	13	16	3	0.0	Lancota (USA)
	<i>g</i>	13	19		0.0	NS335 (France)
	<i>i</i>	17	18	3	1.2	Gabo (Australia)
	<i>k</i>	22	-		0.0	Serbian (Yugoslavia)
<i>Glu-D1</i>	<i>a</i>	2	12	2	70.1	Chinese Spring (China)
	<i>b</i>	3	12	2	0.0	Hobbit (UK)
	<i>c</i>	4	12	1	1.2	Champlein (France)
	<i>d</i>	5	10	4	3.4	Hope (USA)
	<i>f</i>	2.2	12		25.3	Danchi (Japan)

^{a)} Payne ら(1987); Lukow ら(1989), ^{b)} 中村(2002)

まない2kb前後の遺伝子であり、その内訳は開始コドンから約60bpのシグナル領域、約300bpのN末端領域、約1200～1800bpの反復領域、約150bpのC末端領域の順となっている。反復領域には、アミノ酸にしてx-typeにはPGQGQQ, GYYPTSPQQ, およびGQQ, y-typeにはPGQGQQおよびGYYPT-

SLQQといった反復モチーフが多数含まれている。これらの塩基配列情報を用いてサブユニット間での相同性程度を反復領域とそれ以外の領域で比較したところ、HMWGサブユニット遺伝子間の多型は主に反復領域の長さにみられ、特に複対立遺伝子間ではほぼ全ての多型が反復領域内にみられた(表3)。

表2 構造遺伝子のほぼ完全な塩基配列が登録されているコムギ高分子量グルテニンサブユニット遺伝子

遺伝子名	登録番号	供試品種	参考文献
Ax	U19774	Asarce	Xin et al. (1992)
	AF145590	Pane-247	DeBustos et al. (2000)
Ax1	X61009	Hope	Halford et al. (1992)
Ax2*	M22208	Cheyenne	Anderson & Greene (1989)
Bx7	M22209	Cheyenne	Anderson & Greene (1989)
	X13927	Cheyenne	Anderson (unpublished)
Bx14	AY367771		Li et al. (2003)
Bx20 ^{a)}	AJ437000	Bidi 17(durum)	Halford (unpublished)
Bx23 ^{b)}	AY553933		Li et al. (unpublished)
Dx2	X03346	Yamhill	Sugiyama et al. (1985)
Dx2.2	AY159367	GM7249	Wan et al. (unpublished)
Dx5	X12928	Cheyenne	Anderson et al. (1989)
Dx2.1 ^{b)}	AY517724	Xinjiang	Goldsbrough et al. (1989)
			Jiang et al. (unpublished)
Ay	X03042	Cheyenne	Forde et al. (1985)
By8	AY245797	Semito(durum)	Jiang et al. (2003)
By9	X61026	Cheyenne	Halford et al. (1987)
Dy12	X03041	Chinese Spring	Tompson et al. (1985)
	AY486485	Xinkehan 9	Zhang et al. (unpublished)
	AY486484	Dongnong7742	Zhang et al. (unpublished)
Dy10	X12929	Cheyenne	Anderson et al. (1989)
			Goldsbrough et al. (1989)

^{a)} ストップコドンに対応する塩基のみ未登録

^{b)} 新規サブユニット遺伝子

表3 コムギ高分子量グルテニン遺伝子間における領域別相同性程度(%)

(左下:反復領域以外, 右上:反復領域での比較)

遺伝子名	塩基長(bp)		x-type								y-type				
	SNC ^{a)}	R	Ax	Ax1	Ax2*	Bx7	Bx14	Dx2	Dx5	Dx2.2	Ay	By8	By9	Dy10	Dy12
Ax ^{b)}	450	897		99	99	77	76	82	82	81	74	78	79	74	73
Ax1	450	2043	99 ^{c)}		99	78	77	82	82	81	74	78	79	74	73
Ax2*	450	1998	99	99		77	76	83	82	81	74	77	78	74	72
Bx7	435	1935	88	88	88		96	79	78	77	78	78	80	75	71
Bx14	450	1938	87	87	87	98		79	79	77	75	78	79	74	72
Dx2	456	2061	91	91	91	89	89		97	99	74	80	80	78	78
Dx5	459	2061	91	91	92	89	89	99		97	76	76	76	78	77
Dx2.2	459	2457	91	91	92	89	89	99	99		74	77	78	78	78
Ay ^{b)}	504	1305	82	82	82	81	81	84	84	83		91	91	87	88
By8	504	1659	84	84	84	83	82	83	83	82	91		99	94	94
By9	504	1614	84	84	84	83	82	83	83	82	91	99		93	93
Dy10	504	1443	86	85	86	84	84	84	84	84	92	95	95		98
Dy12	504	1479	85	85	85	84	83	84	84	84	92	94	94	99	

^{a)} SNC:反復領域以外; R:反復領域. ^{b)} AxおよびAyはタンパク質を発現していないが遺伝子は存在。^{c)} 太字は複対立遺伝子間での相同性。

2. 高分子量グルテニンサブユニット「5+10」 判別用 DNA マーカー

「5+10」サブユニットに対応する *Glu-D1* 座の対立遺伝子 *Glu-D1d* が強い生地物性を示す要因として、Dx5 の点突然変異によって生じたシステイン残基によって分子間結合が他のサブユニットをもつ場合よりも多くできるためと考えられている (Shewry et al. 1992)。そこで、Dx5 をターゲットとして DNA マーカーの開発を開始した。まず、Dx5, Dx2, Dx2.2, Ax, および Bx7 についてその配列の一部を整列化した (図 1)。この整列化によ

って *Glu-D1* 座 x-type 特異的な配列, Dx5 特異的な配列, 反復領域における反復モチーフ以外の配列を同定することができ、図中に示したように 3 種のプライマーを設計した。これら 3 種のプライマーを用いて図 2 で示した操作手順にしたがって PCR を行ったところ, *Glu-D1d* をもつ品種では 343bp と 320bp の 2 本の断片, 別の対立遺伝子である *Glu-D1a, c*, および *f* をもつ品種では 361bp の断片が得られた (図 3, レーン 1 ~ 4)。なお, これらの増幅断片は, 塩基配列を調べて目的の断片であることを確認している。Dx4 の塩基配列は現在までに公

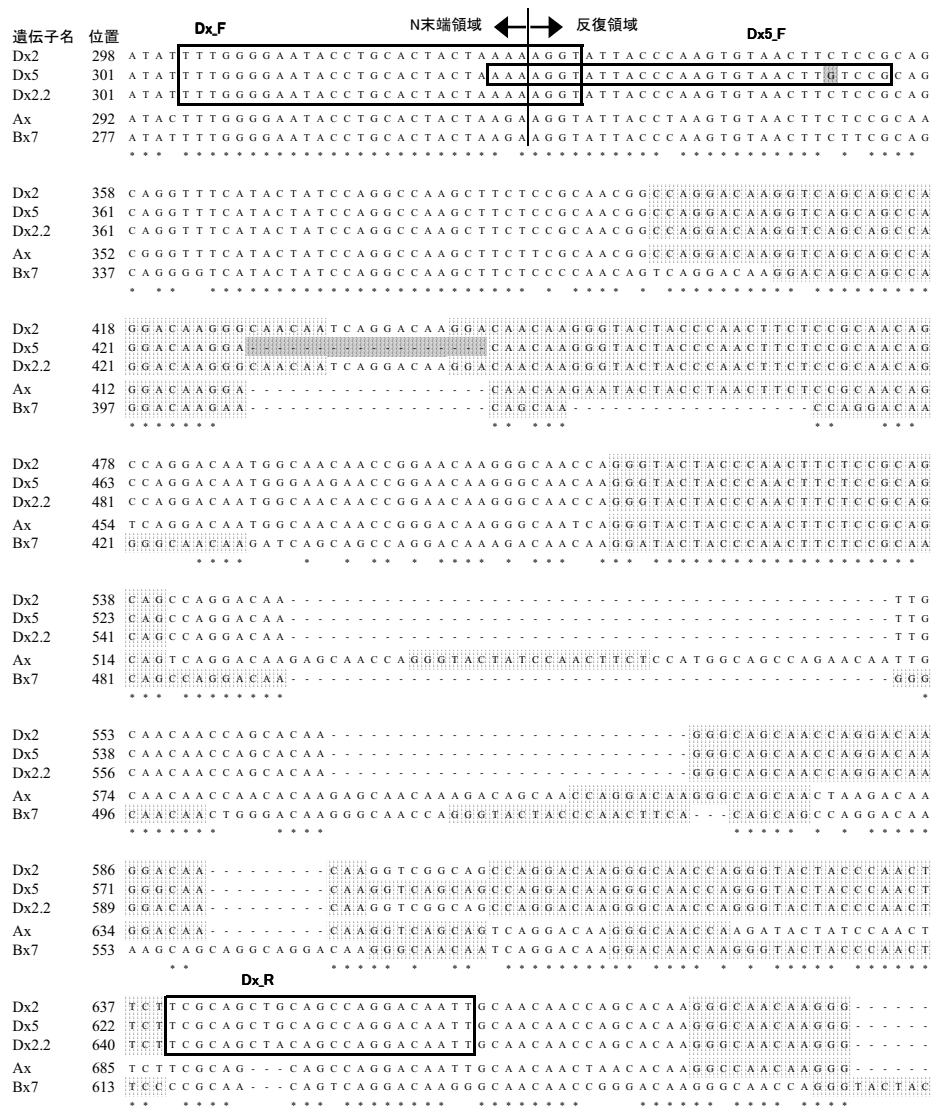


図 1 高分子量グルテニン x-type の主要サブユニット遺伝子を用いた塩基配列の比較。枠囲み部は「5+10」サブユニット判別用に設計したプライマーのアニーリングサイトを示し、濃い網掛け部は設計したプライマーによって認識できる Dx5 特異的な部分を示している。薄い網掛け部は反復モチーフをコードしている領域を示している。位置は開始コドンからの塩基数を示す。

共のデータベースに登録されていないが、得られた増幅断片のサイズなどからプライマーを設計した範囲では、Dx2 および Dx2.2 と相同であると考えられた。国内の命名登録品種は、ほぼ全て *Glu-D1a*, *c*, *d* あるいは *f* の 4 つの複対立遺伝子のいずれかを有していることから (中村 2001), 幅広い選抜集団でこのマーカーを適用できると考えられた (表 1)。

また、「盛系 C-130a」と「東北 205 号」との交雑集団を用いて、開発したマーカーによって *Glu-D1d* の有無を判定したところ、ヘテロ個体では 361bp, 343bp および 320bp の 3 本の増幅断片が得られ、共優性マーカーであった (図 4)。なお、DNA マーカーにより判別した分離集団における *Glu-D1d* の有無は SDS-PAGE の結果と一致していた (データ未提示)。

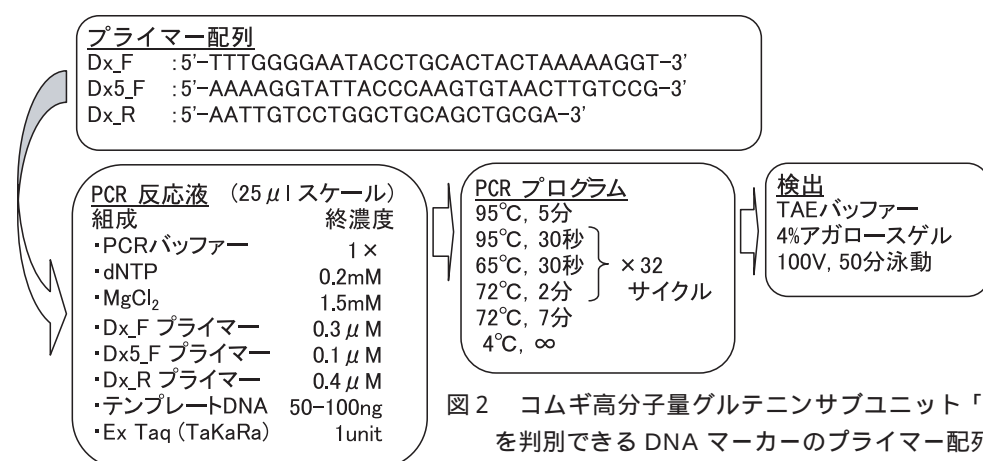


図 2 コムギ高分子量グルテニンサブユニット「5+10」の有無を判別できる DNA マーカーのプライマー配列と操作手順

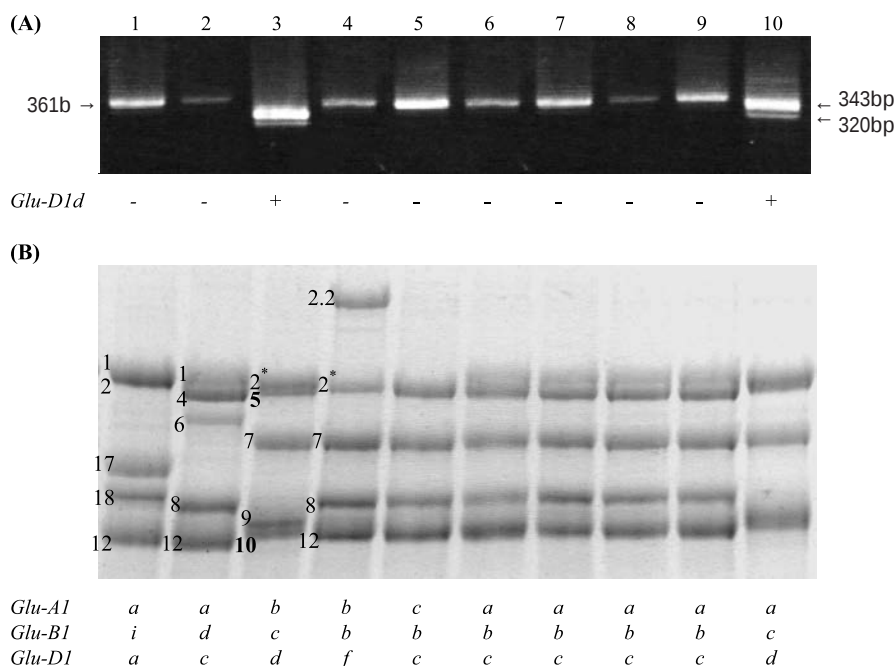


図 3 コムギ高分子量グルテニンサブユニットに関する遺伝子型判定。(A) DNA マーカーによる *Glu-D1d* の有無の判定 (+ : 有り, - : 無し), (B) SDS-PAGE を用いたタンパク質の泳動パターンによる判定。1 : 「ハルユタカ」, 2 : 「タクネコムギ」, 3 : 「春のあけぼの」, 4 : 「農林 61 号」, 5 : 「東北 141 号」, 6 : 「さび系 23 号」, 7 : 「盛系 B-1417」, 8 : 「東北 214 号」, 9 : 「ゆきちから」, 10 : 「ハルイブキ」。

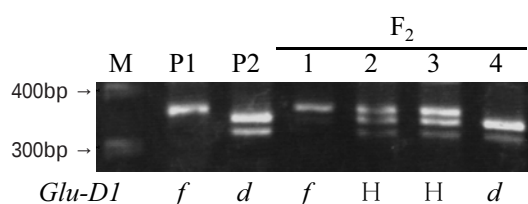


図4 分離集団を用いた高分子量グルテニンサブユニット「5+10」の DNA マーカーの適用。
P1 : 「盛系 C-130a」, P2 : 「東北 205 号」(ハルイブキ), F₂ : 「盛系 C-130a」/ 「東北 205 号」由来の F₂ 個体, M : サイズマーカー。
H : ヘテロ型個体。

3. Wx-B1 遺伝子変異の有無を判別する DNA マーカーとのマルチプレックス PCR

製パン適性とアミロース含量との関係については、小麦粉のアミロース含量をやや低下させると、製パン適性の向上、パンのしっとり感の変化、あるいはパンの保存性の向上などの効果があることが報告されている (Graybosch 1998, Lee et al. 2001, Morita et al. 2002, Takata et al. 2003, 吉川ら 2002a)。このことから、今後、めん用品種だけでなくパン用品種の開発においても、アミロース合成に関与する *waxy* 遺伝子の変異の有無を調査する必要があると考えられる。そこで、Nakamura ら (2002) が開発した低アミロースコムギを選抜するために実用化されているマーカーの中で、最も低アミロース化への寄与度の高い *Wx-B1* 座に関するマーカーと開発した *Glu-D1d* の有無を判別するマーカーとのマルチプレックス PCR を同一の条件で行った。その結果、マルチプレックス PCR による両者の同時判定が可能であった (データ未提示)。

4. 「ゆきちから」およびそれが由来した系統における *Glu-D1d* の有無

「ハルイブキ」や「ゆきちから」は寒冷地向けのパン用コムギ品種であり、*Glu-D1d* を持つ品種として報告されている (吉川ら 2002b, 吉川ら 2004)。そこで、今回開発した DNA マーカーを用いて、再度 *Glu-D1d* の有無を調査したところ、「ハルイブキ」は以前の報告通り同遺伝子を持っていることが確認されたが、「ゆきちから」は持っていないことが判

明した (図3 A, レーン 9)。この結果は、同品種の複数種子からの貯蔵タンパク質を用いた SDS-PAGE による解析結果とも一致しており (図3 B, レーン 9), 「ゆきちから」は *Glu-D1c* (「4+12」サブユニット) を持っていることが判定された。

吉川ら (2002b) によると、「ゆきちから」として登録される前の系統「東北 214 号」は、SDS-PAGE によって「5+10」サブユニットが確認されたことになっている。この相反する結果の原因として、次の3つの可能性が考えられた。つまり、

「東北 214 号」は、*Glu-D1d* と *c* の両対立遺伝子を持つ種子が混在する状態で維持されていて、分析に供試した種子は *Glu-D1d* を持っていたが、採種過程において系統内で *Glu-D1c* の方に選抜がなかった、SDS-PAGE によるサブユニット確認における誤判定、「東北 214 号」で確認以降、「ゆきちから」として本実験で分析されるまでに *Glu-D1c* サブユニットを持つ別系統・品種の混入が起こった、というものである。しかし、外観やその採種操作過程からの可能性は否定されることから、残る2つの可能性を探った。の可能性を検討するために、「ゆきちから」の両親系統である「東北 141 号」および「さび系 23 号」、さらにそれらの育成段階の系統として、1981 年当時 F₆ 世代から維持してきた1系統「盛系 B-1417」、および「東北 214 号」の種子を供試し、今回開発した DNA マーカーとタンパク質の SDS-PAGE の2つの方法で調査を行った (図5)。なお、両親系統は交配当時 (1975 年) の種子が手に入らなかったため保存してあるもの (2003 年採種) を用いた。その結果、いずれの品種・系統とも *Glu-D1d* は保有していなかった (図3 A, レーン 5 ~ 8)。さらに SDS-PAGE の結果でも、それらの品種・系統は全て *Glu-D1d* ではなく、*Glu-D1c* を持っていることが判明した。これらの結果から、「ゆきちから」が「5+10」サブユニットを持つという報告は、SDS-PAGE によるサブユニット判定の誤りであったと結論付けられた。

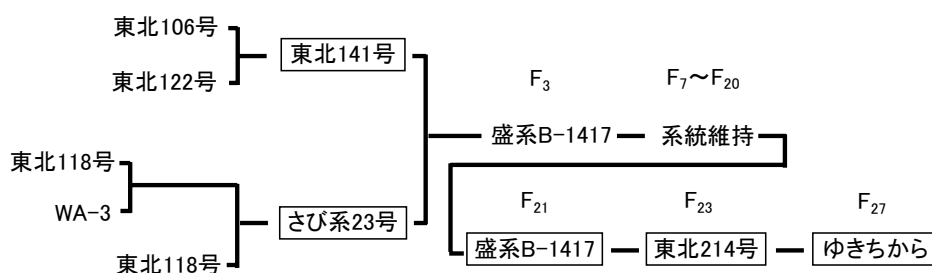


図5 パン用コムギ品種「ゆきちから」の系譜と選抜経過および高分子量グルテニンサブユニットに関する分析に供試した品種・系統（枠囲み）

考 察

コムギ HMWG サブユニットの遺伝子型を PCR によって簡易に判定しようとする試みは、これまでも多数の報告がある (Ahmad 2000, de Bustos et al. 2000, de Bustos et al. 2001, D'Ovidio et al. 1994, D'Ovidio・Anderson 1994, D'Ovidio et al. 1995, Ma et al. 2003, Moczulski・Salmanowicz 2003, Smith et al. 1994)。しかしながら、PCR の鋳型としてコムギのゲノム DNA を用いる場合、6 コピーある相同性の高い HMWG サブユニット遺伝子の識別が必要であり、特に反復領域にプライマーを設計する場合には、そのアニーリングサイトを限定するために反復モチーフを避けるといったマーカー開発の難しさがある。これらの理由によって、既報の DNA マーカーの多くは N 末端領域などに設計した対立遺伝子特異的プライマーを用いて、目的とする対立遺伝子が存在するときのみ増幅断片が得られる優性マーカーである。しかし、優性マーカーの問題として、ヘテロ個体を識別できないこと以外に、増幅断片が得られない場合に目的の対立遺伝子を持たないことによるのか PCR 反応のミスなのかの判定が難しいこと、および鋳型 DNA の量や PCR 条件によっては非特異的な増幅が生じてしまう場合がある。前者に関しては、必ず増幅するプライマーセットを反応液に加えてマルチプレックス PCR をすることで対応可能であるが、後者の問題はこれまでに開発された DNA マーカーが育種現場に普及していない大きな要因となっている。これらのことから、

育種に使える DNA マーカーとは、多検体を処理する場合でも誤りなく遺伝子型を判別できること、

特定の交雑集団だけではなく多様な遺伝資源で幅広く使えること、一連の操作が簡便かつ低コストであること、などが条件として挙げられる。

今回開発したマーカーは以下のような特徴があり、先に挙げた条件を満たすものである。Dx5 のシステイン残基への点突然変異領域に設計したプライマーによって、*Glu-D1d* を持つときのみ現れるバンドを含むため、判別ミスを防ぐことができる。*Glu-D1d* と *Glu-D1* 座の他の主要な対立遺伝子とを区別できるため、幅広い育種集団で利用できる。ヘテロ個体の識別が可能な共優性マーカーであることから、様々な世代の育種材料に適用できる。マルチプレックス PCR によって *Wx-B1* 遺伝子変異の有無を判別する DNA マーカーとの同時判別が可能である。ただし、PCR 用プライマーの利用において一般に検討しなければならないことであるが、本マーカーの作成に用いた GeneAmp[®] PCR system 9700 (PE Applied Biosystems) 以外の PCR 装置で本マーカーを用いる場合は、一塩基変異を認識している「Dx5_F」プライマーの動作を適正化するために、このプライマーの濃度調整が必要な場合がある。

「ゆきちから」の育成段階で HMWG サブユニットの判定ミスがあったという結果について、SDS-PAGE の染色ゲルのパターンをさらに詳細に検討してみると、「5+10」サブユニットの「5」のバンドと「4+12」サブユニットの「4」のバンドの移動度はほぼ同一であり、その判定は難しく、特に

「東北 214 号」の当初の判定に用いられていたゲルサイズの小さなミニゲルで判定を行った場合、判定ミスをする可能性が非常に高いといえる。また、1975 年の「東北 141 号」と「さび系 23 号」の交配当時は、HMWG サブユニットが小麦粉の生地物性に及ぼす効果に関しては、国内において情報も無く、その遺伝・育種的研究も行われていなかったと考えられる。中村ら（1989）による SDS-PAGE での東北地方の品種の *Gul-1* スコアの分析結果では、「5+10」を有するものは報告されておらず、1975 年時点において「5+10」を持つ品種・系統が旧東北農業試験場における育種材料に用いられていた可能性は低いと考えられ、その点からも今回の DNA マーカーによる「ゆきちから」は *Glu-D1d* を持たない」という判定結果は妥当と考えられる。

本研究によって、「ゆきちから」の高い製パン適性は *Glu-D1d* に起因しないことが明らかとなった。製パン適性は、HMWG 以外にも様々な要因によって変化するため（review in Cauvain 2003）、*Glu-D1d* を導入した場合においても、他の遺伝的背景や栽培環境によっては期待したほど製パン適性が向上しないことがあり得る。しかしながら、東北農業研究センターで製パン適性試験を行いながら選抜している系統について、本マーカーを用いて *Glu-D1d* の保有状況を調査したところ、37 系統中 17 系統で保有していた（データ未提示）。このことは、東北地方向けのパン用品種の開発には *Glu-D1d* の導入効果が現れており、今後同遺伝子を持つ系統の選抜を早期世代から開始することで、効率的な育種が図られると考えられる。その場合、交雑後の早い世代において特定の遺伝子型に偏って強い選抜をかけることで、それ以外の選抜目標形質に関して有望な遺伝子型を持った系統や、その対立遺伝子に何らかの劣悪な形質が連鎖している場合にはかえって育種効率を低下させる原因となってしまうので注意が必要である。今回の場合を例にとれば、交雑初期世代では DNA マーカーにより、*Glu-D1d* を持たない系統は排除することができる限り同遺伝子型に偏った選抜圧はかけないよう、同遺伝子の固定系統およびヘテロ系統は残し、その後の選抜世代においても維持しつつ、後期世代（生産力検定試験世代）においては目的の遺伝子型で固定した系統を選抜するという方法が理想的と考えられる。

DNA マーカーは、現在、育種のみならず品種識別や他品種混入の判定などでも強力な判定手法となっているが、その判断基準となるのが品種登録時点における DNA マーカーによる確認結果になると予想される。そのような観点からも、今後益々、DNA マーカー選抜を育種事業に導入する努力を図る必要がある。

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) de Bustos, A., P. Rubio and N. Jouve. 2000. Molecular characterisation of the inactive allele of the gene *Glu-A1* and the development of a set of AS-PCR markers for HMW glutenins of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100 : 1085-1094.
- 3) de 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.
- 4) Cauvain, S.P. 2003. Breadmaking: an overview. (Cauvain, S.P. ed., Bread making -improving quality-). Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. p. 8-28.
- 5) D'Ovidio, R., E. Porceddu and D. Lafiandra. 1994. PCR analysis of genes encoding allelic variants of high-molecular-weight glutenin subunits at the *Glu-D1* locus. *Theor. Appl. Genet.* 88 : 175-180.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Graybosch, R. A. 1998. Waxy wheats: origin, properties, and prospects. *Trends in Food Science & Technology* 9 : 135-142.
- 9) Gu, Y. Q., D. Coleman-Derr, X. Kong and O. D.

- Anderson. 2004. Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four Triticeae genomes. *Plant Physiol.* 135 : 459-470.
- 10) 石川吾郎, 齊藤美香, 中村俊樹. 2003. コムギの製麺適性に関する選抜の実例から見た DNA マーカー育種の現状と将来. *農及び園* 78 : 599-604.
- 11) Kong, X.-Y., Y. Q. Gu, F. M. You, J. Dubcovsky and O. D. Anderson. 2004. Dynamics of the evolution of orthologous and paralogous portions of a complex locus region in two genomes of allopolyploid wheat. *Plant Mol. Biol.* 54 : 55-69.
- 12) Lee, M.-R., B. G. Swanson and B.-K. Baik. 2001. Influence of amylase content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. *Cereal Chem.* 78 : 701-706.
- 13) 李春雨, 伊藤誠治, 渡辺満, 星野次汪. 1995. コムギ品種の高分子量グルテニン・サブユニット構成. *東北農試研究資料* 17 : 33-40.
- 14) Lukow, O. M., P. I. Payne and R. Tkachuk. 1989. The HMW glutenin subunit composition of Canadian wheat cultivars and their association with bread-making quality. *J. Sci. Food Agric.* 46 : 451-460.
- 15) Ma, W., W. Zhang and K. R. Gale. 2003. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat. *Euphytica* 134 : 51-60.
- 16) Moczulski, M. and B. P. Salmanowicz. 2003. Multiplex PCR identification of wheat HMW glutenin subunit genes by allele-specific markers. *J. Appl. Genet.* 44 : 459-471.
- 17) Morita, N., T. Maeda, M. Miyazaki, M. Yamamori, H. Miura and I. Ohtsuka. 2002. Effect of substitution of waxy-wheat flour for common flour on dough and baking properties. *Food Sci. Technol. Res.* 8 : 119-124.
- 18) 中村洋. 2001. 日本のコムギ品種に特有な種子貯蔵タンパク質グルテニン高分子量サブユニットの遺伝変異とその育種的意義に関する研究. *作物研報* 2 : 1-38.
- 19) 中村洋. 2002. コムギ・グルテニンタンパク質の遺伝変異とのコムギ育種. *農及び園* 77 : 475-480.
- 20) 中村俊樹, 山守誠, 谷口義則, 星野次汪. 1989. グルテニンサブユニットからみた東北小麦品種の製パン適性. *日作紀(別)* 58 : 269-270.
- 21) Nakamura, T., P. Vrinten, M. Saito and M. Konda. 2002. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers. *Genome* 45 : 1150-1156.
- 22) 中村俊樹, 石川吾郎, 齊藤美香. 2003. 部分的モチコムギ選抜からみた DNA マーカーの実用化. *冬作物研究* 3 : 7-16.
- 23) Payne, P. I., M. A. Nightingale, A. F. Krattiger and L. M. Holt. 1987. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* 40 : 51-65.
- 24) Shewry, P. R., N. G. Halford and A. S. Tatham. 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 15 : 105-120.
- 25) Smith, R. L., M. E. Schweder and R. D. Barnett. 1994. Identification of glutenin alleles in wheat and triticale using PCR-generated DNA markers. *Crop Sci.* 34 : 1373-1378.
- 26) 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. *Breed. Sci.* 50 : 303-308.
- 27) Takata, K., Z. Nishio, W. Funatsuki, T. Tabiki and H. Yamauchi. 2003. Quality characteristics of waxy wheat of hard grain using near isogenic line. *Proc. 10th Int. Wheat Genet. Symp.* 3 : 1400-1402.
- 28) 吉川亮, 中村和弘, 伊藤美環子, 星野次汪, 伊藤誠治, 八田浩一, 田野崎真吾, 谷口義則, 佐藤暁子, 中村洋. 2002a. 高製めん適性, 早生・多収の小麦新品種「ネバリゴシ」の育成. *東北農研研報* 100 : 1-26.
- 29) 吉川亮, 中村和弘, 伊藤美環子, 伊藤裕之, 中村洋, 星野次汪, 田野崎真吾, 谷口義則, 佐藤暁子, 伊藤誠治, 八田浩一, 後藤虎男, 藤原秀雄, 上田邦彦, 北原操一, 中島秀治. 2002b. 小麦農林 157 号「ゆきちから」. *農作物新品種登録簿*. 農林水産省生産局種苗課.(印刷中). 参照ホームページ (<http://www.naro.affrc.go.jp/hinshu/2002/2/komugi157.html>)
- 30) 吉川亮, 中村和弘, 伊藤美環子, 星野次汪, 伊藤誠治, 八田浩一, 田野崎真吾, 谷口義則, 佐藤

暁子，中村洋，高野博幸．2004．パン用小麦新品
種「ハルイブキ」の育成．東北農研研報 102：1-22．