

Development of DNA Markers for Identification of Wheat Cultivars and Wheat Food Products

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): 作成者: 藤田, 由美子 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001731

コムギ品種および加工食品におけるDNA品種識別技術の開発

藤田由美子

Key words : コムギ, 品種識別, DNAマーカー, SSR, SNP, 加工食品

目 次

I 緒 論	41	2 特定品種の簡易識別法の開発	62
II コムギ加工食品からのDNA抽出と断片化の 評価	43	V SNPを用いた特定コムギ品種の定量技術	66
1 市販食品から抽出したDNAの評価	43	1 リアルタイムPCRを用いた標的遺伝子領 域の検出法の開発	66
2 PCR法の適用と限界増幅長の評価	44	2 品種の相対定量法の開発と検出下限の評 価	70
III SSRマーカーを用いたコムギ品種識別技術	46	VI 総 合 考 察	72
1 EST-SSRマーカーの開発	46	摘 要	74
2 国内品種の品種内多型の評価	53	謝 辞	74
3 国産コムギと輸入コムギの識別	57	引 用 文 献	75
IV SNPマーカーを用いたコムギ品種識別技術	60	Summary	79
1 コムギの遺伝子領域におけるSNPの探索	60		

I 緒 論

品種とは分類学上の種および亜種の下位の分類単位であり、作物や家畜の種類をそれぞれの特徴に基づいて区別した最小単位である⁴⁷⁾。とりわけ農産物において、品種は収穫物などについての表現型のみでは相互に見分けがつかない場合もあるが、その遺伝子型には差異が存在し、品種を特徴づけている。自殖性作物の品種は純系、栄養繁殖作物の品種はクローンであり、双方ともに品種内の遺伝変異はほとんどないが、他殖性作物の品種は遺伝的に固定しておらず、栽培上支障がない程度の遺伝変異を含んだ集団である。いずれの生殖様式であっても、新品種が成立するためには既存品種よりも優れた特性をもち、実用上支障がない程度に均質であることや、後代にわたり維持される特性であることが必要である。

日本において植物新品種は重要な知的財産であり、特許権や商標権と同様に、植物新品種の育成者の権利は種苗法によって「育成者権」として付与・保護されている²²⁾。1978年に種苗法が制定されて以来、本格的な品種保護が始まり、種苗の不正利用による育成者権侵害に対して罰則措置がとられることとなった。さらに2003年の改正によって種苗のみならず、収穫物段階での権利侵害に対しても罰則が適用されることとなり、大規模な侵害に対して十分な抑止力を確保するため、法人による権利侵害への罰金額の上限が1億円に引き上げられた。また、同時期に関税率法の改正が行われ、税関における輸入禁制品に、知的財産権侵害品の一つとして育成者権が加えられることとなった。これにより、育成者権者が税関に対して侵害の証拠資料とともに輸入差止申し立てを行い、税関において侵害物品と認定された場合には没収・廃棄などの措置をとることが可能となり、品種保護への取り組みはますます活性化し

ている。

一方、近年では消費者の食に対する関心が高まりを見せ、「コシヒカリ」に代表されるように米や野菜など、一部の農産物における特定品種のブランド化が加速している。それに伴い、消費者の関心に応えるため、加工食品の原材料品種、原産地について自主的に表示をして販売するケースが増加した。これらの表示は、農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS法）に従い、適正に行うこととされているが、農産物の種類によっては品種や産地間の価格差が大きいために偽装表示がたびたび問題となっている。このような状況から、農林水産省は食品関連団体に対し、原産地表示について積極的な情報提供を行うよう通知を出す一方で³⁵⁾、偽装表示に対する抑止力を強化するため、虚偽の表示を行った販売元に対して罰則を適用することとし、JAS法の一部を改正した³⁶⁾。

このように、品種の育成者権の保護や適正な利用に関する監視のために法的な措置が整備され、大きな抑止力を発揮する体制が整えられた。しかしながら、一方では不正が発生した場合に、それらを立証することが不可欠となり、品種や原産地の識別技術の開発が急務となっている⁴⁾。植物体の場合は外観から品種を同定することも可能であるが、収穫物は一般に植物体の一部のみであるため識別が困難な場合もある。さらに、加工食品ともなると外観からその原材料品種を判断することはほぼ不可能である。そのため、植物体の表現型ではなく、遺伝子型、すなわちDNAを利用した品種識別が注目されるようになってきた。これまで、DNA分析技術はヒトの個人識別などにおいて先進的に活用されてきたが、分析技術の進歩とともに、植物分野にも大きな功績をもたらしている。DNA分析による品種識別技術は、①簡易・迅速である、②植物体への再生が困難な試料でも識別可能である、③生産環境に左右されず結果が客観的で安定している、などの利点があり、「コシヒカリ」をはじめとする米の品種識別において有用性が実証され³⁷⁾、イチゴやイグサなどの様々な農産物でも広く利用されるようになった^{18, 43)}。その手法は、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) や AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), CAPS (Cleaved Amplified

Polymorphic Sequence), SSR (Simple Sequence Repeat), SNP (Single Nucleotide Polymorphism) など様々な種類があり、対象とする植物のゲノム情報の多少によって適した手法を選択できる。

日本におけるコムギ (*Triticum aestivum* L.) の年間消費量は約600万トンに及び、コムギは日本人にとって米と同様に主要な穀類の一つである。かつてコムギの主な加工用途はめん類であったが、第二次世界大戦後の食の多様化に伴い、パン類やクッキー、ケーキ、ビスケットなどの菓子類が広く普及し、コムギの加工用途は大きく拡大した。そのため、元来、めん用に適した品質を持つ国内品種のみでは需要の拡大に対応できず、その多くを輸入に依存するようになった。近年、小麦粉の生産量は460万トンで、そのうち、二次加工品であるめん類が127万トン、パン類が118万トンに及ぶが、カロリーベース自給率は14%程度に留まる³⁴⁾。しかしながら、1999年から「麦新品种緊急開発プロジェクト」が発足し、多用途に対応するための新品种開発が急がれた結果、めん用のみならずパン用品種の開発が進み、生産現場への導入が進んでいる。コムギはほとんどの都道府県において作付されており、現在、国内において栽培される品種は40近く存在する。北海道における生産が約60%を占め、次いで福岡県や佐賀県など九州地方において生産が盛んである³²⁾。香川県の育成品種「さぬきの夢2000」に代表されるような地域限定のブランド品種もあり、個々の品種の生産量は少ないものの、各地に適した品種が普及し、地域特産品として好まれている。近年の消費者の安全・安心志向の高まりや地産地消の推進などから、国産コムギを使用しためん類やパン類の需要は増加の一途をたどっており、国産コムギを使用した商品の80%以上で原材料品種や産地に関する表示があることから、食品表示の信頼性を確保することが急務となっている。

コムギは製粉し、こねる、加熱するなどの多様な工程を経て食品へと加工される。一般的に輸入コムギは国産コムギと比較して加工時の作業性に優れ、また、コストを低減させることもできるために、近年、輸入コムギを混ぜたにも関わらず、それらを使った商品を国産あるいは特定品種名を記載して「100%使用」と表示するケースが散見される。しか

し、生産現場から流通、加工まで、多くの工程を経るコムギでは、思いがけない原材料の取り違いや意図しない他品種の混入が想定される。とりわけ一部のブランド化した品種では「100%使用」の表示に対して、意図的な混合と非意図的な混入を区別するために、混入の許容範囲を知る必要があり、品種を識別する技術とともに定量技術の開発もまた求められている。コムギの品種識別技術は、県内およびその近隣地域で流通するコムギ品種を対象に、RAPD法を用いたものがいくつか開発されてきた^{17, 55)}。それらは栽培種子のもととなる原種や原原種の純度維持や混種の確認など、種子の管理を目的として開発されており、市場流通品種を網羅していない、植物体から抽出したDNAによる品種の識別を想定しているなどの問題があることから、加工食品へ適用することは困難である。

本研究は、加工食品に適用できるコムギ品種識別技術を開発することを目的として実施した。はじめに、主要なコムギ加工食品からDNA抽出を行い、DNAの状態を確認するとともにDNAマーカーの適用条件を検討した。次に、現在の国内市場流通品種を網羅したコムギ品種識別技術を開発するため、SSRマーカーの開発を行い、市販の加工食品への適用および実用性を評価した。さらに、特定品種に的を絞ったより簡易で迅速な識別技術の開発を目的として、コムギの遺伝子領域におけるSNPを探索し、マーカー化を行った。また、それらのSNP情報を利用し、小麦粉における特定品種の定量技術の開発を試みた。

II コムギ加工食品からのDNA抽出と断片化の評価

1 市販食品から抽出したDNAの評価

DNAを用いた品種識別を行うためには、識別対象からDNAを抽出できることが必要条件である。Tilley⁵³⁾は、パンを対象としてミキシングや発酵、焼成などの加工工程の各段階における生地からDNAを抽出し、工程が進むにつれて断片化が著しく進み、増幅長の長いDNAマーカーでは安定的に増幅できなくなる傾向があることを示した。しかし、コムギはパンをはじめ、めん類や多種多様な菓子類の原材料として利用されており、DNA品種識別を

行うためにそれらの多くに適用できる条件を明らかにする必要がある。加工食品からのDNA抽出法は、餅や炊飯から米の品種を識別するためにCTAB法を利用したものや、 α -Amylase および Proteinase K を用いる酵素法が考案されている³⁷⁾。また、加工食品から遺伝子組換えダイズやトウモロコシなどを検出するため、イオン交換樹脂カラム QIAGEN Genomic-tip (QIAGEN) が基準法として採用されている⁵⁾。本節では、様々な原材料から作られた加工食品に対して適用されている QIAGEN Genomic-tip を利用して、主要なコムギ加工食品からDNAを抽出し、その純度や断片化の状態を確認した。

1) 材料および方法

加工食品はすべて市販品で、クッキー 2 種類 (A, B)、クラッカー、パン、半生うどん (加熱前および加熱後)、パイ、小麦粉を供試した。クッキーについては、製造元が異なる一般的なもの、A (小麦粉以外の植物 (ゴマ) が多く含まれるもの)、B (国産小麦使用、副原料が少ないもの) を選択した。半生うどんおよび小麦粉を除く 5 種類については、それぞれのサンプル毎に個包装に含まれるすべてを遊星型ボールミル (フリッチェ社) で粉碎し、1 g を計量した。半生うどんは一部を採って同様に粉碎し、1 g 計量した (加熱前)。残りのめんを 12 分間ゆで、これらは水分含量が高いと考えられるため、2 g 計量した (加熱後)。小麦粉はそのまま 1 g 計量した。

QIAGEN Genomic-tip 20/G および Genomic DNA Buffer Set (QIAGEN) を用いて添付のマニュアルに従い、DNA を抽出した。分光光度計 DU600 (Beckman Coulter) を用いて 230, 260, 280, 320nm の値を測定した。各食品につき、DNA 抽出と吸光度測定を 2 回行った。抽出した DNA (200ng) は 1% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、UV を照射して泳動像を確認した。

2) 結果および考察

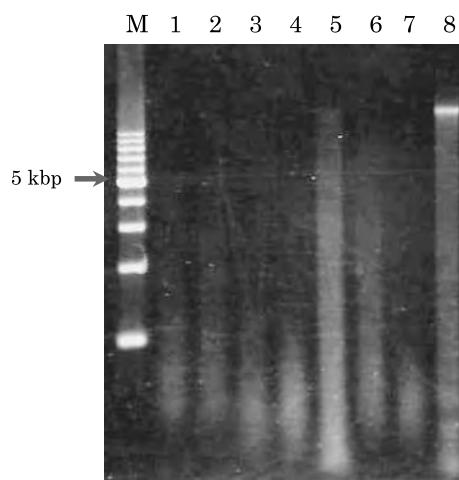
8 種類の食品から抽出した DNA の 260/280nm 値および抽出量を第 1 表に示した。260/280nm 値は 1.6 ~ 1.8 であり、いずれの食品からも PCR 反応に支障の

第1表 コムギの加工食品から抽出したDNAの260/280nm値と抽出量

市販加工食品	260nm/280nm	抽出量 (μg/g)
1 クッキー(A)	1.785	69.89
2 クッキー(B)	1.736	23.88
3 クラッカー	1.808	133.52
4 パン	1.795	68.98
5 半生うどん 加熱前	1.788	85.23
6 半生うどん 加熱後	1.659	9.73
7 パイ	1.795	55.13
8 小麦粉	1.784	127.99

ない純度のDNAが抽出できたと考えられた。抽出量は食品により大きな差異が見られ、多いものはクラッカー (133.52 μg) や小麦粉 (127.99 μg) であり、クッキーB (23.88 μg) や加熱後の半生うどん (9.73 μg) では少量であった。クラッカーや小麦粉は水分含量が少なく、そのためにクラッカーでは微細な粉砕ができたことや、供試量のうち小麦粉の占める割合が他の食品と比較して高いことが要因として考えられる。また、クッキーでは種類によって油脂や砂糖など小麦粉以外の原材料が多く含まれる場合があること、加熱後の半生うどんでは水分含量が多いことなどが抽出量に影響したと考えられる。従って、加工食品からDNAを抽出するにあたっては、その種類に応じて適切な供試量を検討する必要があると考えられた。

各食品から抽出したDNAについて泳動する量を一定に調整してアガロースゲル電気泳動を行ったところ、小麦粉以外の食品では断片化したスメアな状態であることが確認された (第1図)。さらに加熱前の半生うどんを除き、1 kbp以下の低分子の断片が多く含まれる傾向があった。一方、加熱前の半生うどんでは、高分子から低分子にわたる広範囲の断片が含まれていた。パンの製造過程であるミキシングおよび発酵までの工程を行ったそれぞれの生地から抽出したDNAについても加熱前の半生うどんと同様の傾向があるが、その後10分以上の焼成を行った後には数百bp程度に断片化されることが報告されている⁵³⁾。これらのことから、原材料の混合やミキシングなどの物理的な力が加えられる段階でDNAの断片化は生じるものの、その後の加熱が著



第1図 コムギの加工食品から抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動図

M: 1kbp ladder marker; 1. クッキー (A); 2. クッキー (B); 3. クラッカー; 4. パン; 5. 半生うどん加熱前; 6. 半生うどん加熱後; 7. パイ; 8. 小麦粉。

しい断片化の要因であると推測された。

2 PCR法の適用と限界増幅長の評価

食品から抽出したDNAは、その加工工程によって断片化の程度が大きく異なる⁵³⁾。そのため、DNAマーカーにより安定的に検出できる限界の増幅長は食品毎に異なることが予想される。様々なコムギ加工食品に対してDNAマーカーを適用し、品種識別を行うため、いずれの食品においても検出できる可能性の高い増幅長を設定することが必要である。本節では、加工工程の異なる食品から抽出したDNAを用いて、増幅長の異なる5組のプライマーによりPCRを行うことで、検出限界となる増幅長を評価した。

1) 材料および方法

コムギの Dihydroflavonol-4-reductase を合成する遺伝子 *TaDFR-A* (Accession. no. AB162138) の塩基配列を基に、増幅長が92bp, 288bp, 489bp, 968bp, 1498bpとなる5組のプライマー対を設計した (第2表)。プライマー配列のBLASTN検索を行い、コムギ以外の作物における Dihydroflavonol-4-reductase などの塩基配列に対する相同性が低いことを確認した。また、5種類の植物 (イネ, オオム

ギ, トウモロコシ, ダイズ, ソバ) から抽出したDNAを用いて増幅産物が得られないことを確認し, コムギゲノムの *TaDFR-A* を特異的に増幅するプライマー対であることを確認した. PCR反応は, 前節2-1において抽出された8種類のコムギ加工食品(クッキー2種類(A, B), クラッカー, パン, 半生うどん(加熱前および加熱後), パイ, 小麦粉)のDNAを用いた. 反応は, 5pmol primer set,

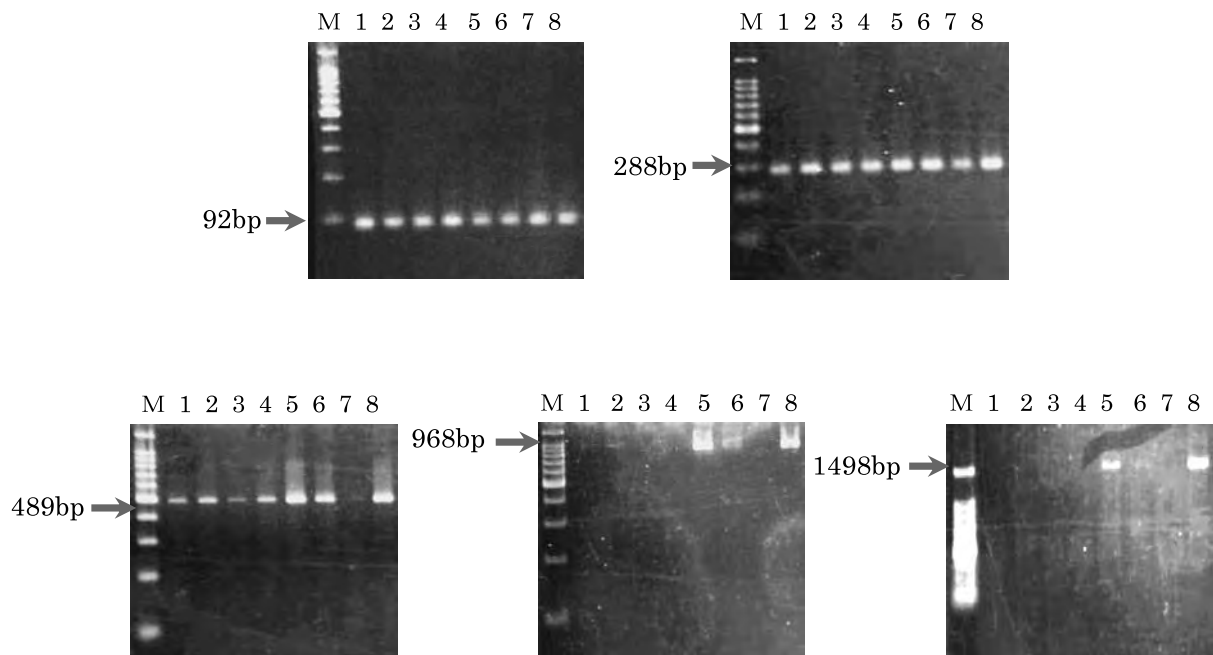
第2表 *TaDFR-A*を検出する5組のプライマー対

プライマー	増幅長	プライマー配列 (5'-3')
DFR-A8A9L DFR-A9R	92	GGGTGAGCCTCCTTCTCTCT CTTCTCAACGTTGGCTGACA
DFR-A8A9L DFR-A11R	288	GGGTGAGCCTCCTTCTCTCT CAGCAGTATTTCCGTGGCTA
DFR-A12A15L DFR-A9R	489	ACCCCTCCTCCATTGTTCAT CTTCTCAACGTTGGCTGACA
DFR-A12A15L DFR-A14R	968	ACCCCTCCTCCATTGTTCAT GCTGCTTCAGCAAGTAGAGGT
DFR-A12A15L DFR-A15R	1498	ACCCCTCCTCCATTGTTCAT GAGAGGAATGAGGCCCTTCT

0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 1×PCR Buffer (15mM Tris-HCl pH8.3, 50mM KCl), 0.5 units AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, 以下ABI), 25ng鑄型DNAを含む25μlの溶液で行った. PCR反応にはGeneAmp PCR System 9700 (ABI)を用い, 反応条件は94℃ 9分間, (94℃ 30秒間, 60℃ 1分間または2分間, 72℃ 30秒間)×35サイクル, 72℃ 7分間とした. 1%または3%のアガロースゲルを用いて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで染色してUVを照射し, 増幅産物の有無を確認した.

2) 結果および考察

増幅長92bpおよび288bpのプライマー対では, 8種類すべての食品において増幅産物が得られた(第2図). パイから抽出したDNAについては, 489bpのプライマー対では安定的に増幅できず, 968bpおよび1498bpを増幅させるプライマー対ではほとんど増幅が見られなかった. また, クッキーAやクラッカー, パンでは, 968bpのプライマー対で安定的な増幅が見られなくなり, 1498bpではまったく増幅が見られなかった. 加熱後の半生うどんもまた,



第2図 コムギの加工食品から抽出したDNAを用いた5組のプライマー対によるPCR産物のアガロースゲル電気泳動図

M: サイズマーカー; 1. クッキー (A); 2. クッキー (B); 3. クラッカー; 4. パン; 5. 半生うどん加熱前; 6. 半生うどん加熱後; 7. パイ; 8. 小麦粉.

968bpまでのプライマー対では増幅可能であったが、1498bpでは安定的に増幅産物を得ることができなくなった。したがって、すべてのプライマー対を適用できたのは、加熱前の半生うどんと小麦粉の2種類のみであった。

限界となった増幅長を比較すると、短いものから、[パイ]、[クッキー (A) ・クラッカー・パン]、[クッキー (B) ・半生うどん (加熱後)]、[半生うどん (加熱前) ・小麦粉] の順であった。パイやクッキー、クラッカー、パンについては通常、加工の最終段階において180~200℃程度の高温で焼成するのに対して、うどんなどのめん類は約100℃の熱湯で調理されるものである。したがって、高温で加熱された食品ほど長い増幅領域を検出することが困難であり、低分子のDNA断片が多く含まれると推測される。このことは、前節において、各食品から抽出したDNAをアガロースゲル電気泳動によって観察した結果から推測された断片化の状態と一致すると考えられる。しかし、各食品によってDNAの断片化の程度は異なるものの、コムギを原材料とする主要な加工食品からDNAを抽出することは可能であり、増幅長を300bp程度までに設定しておくことで高温加熱された食品にもDNAマーカーを適用することが可能であると考えられた。

III SSRマーカーを用いたコムギ品種識別技術

1 EST-SSRマーカーの開発

SSR (Simple sequence repeat) は多型性が高く、信頼度が高いDNAマーカーとして知られ、ヒトの個人識別や親子鑑定において実績のある技術である。また、ナシなどの果実やダイズ、デュラムコムギなどの農産物において品種識別のために広く利用されるようになってきた^{16, 38, 41, 57)}。その開発には手間や労力、コストがかかることが欠点であったが、近年では新手法の開発によって比較的容易にできるようになり、EST (Expressed sequence tag) などの大量の塩基配列情報があれば、SSRの探索やプライマー設計を自動的に短時間で行うことも可能となった^{8, 12, 64)}。本節では、データベースに登録されているコムギのESTを用いてSSRマーカー開発支援プログラム「read2Marker」⁸⁾によりSSRの探索と

プライマー設計を行い、加工食品に適用できる条件を満たすコムギ品種識別技術の開発を行った。

1) 材料および方法

SSRマーカーの設計元として、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Ftp>) に登録されているUniGene (*Triticum aestivum* L.) を利用した。SSRの探索とプライマー対の設計は、SSRマーカー開発支援プログラム「read2Marker」を用いて行った。SSRは、複数のモチーフが含まれる場合は繰り返し合計4回以上、単一のモチーフの場合は繰り返し3回以上の領域を対象とした。プライマーの条件は、 T_m 値が60~70℃、最適なプライマー長を24bp、増幅領域の長さを100~300bpとして設計した。

PCRによる増幅産物の有無や多型の確認は、「チクゴイズミ」「ふくさやか」「春よ恋」「ハルユタカ」「ホクシン」「ネバリゴシ」「小麦農林61号」「さぬきの夢2000」「シラサギコムギ」「シロガネコムギ」「タマイズミ」「Calingiri」「Eradu」「Zak」の14品種を用いて行った。DNAの抽出は、CTAB法²⁸⁾を改変して行った。それぞれ種子1粒をMicro Smash MS-100R (トミー精工) によって粉碎し、400 μ lの1.5% CTAB溶液 (75 mM Tris-HCl [pH 8.0], 15 mM EDTA [pH 8.0], 1.05 M NaCl) を加え、DNAを抽出した。その後、等量のchloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 溶液を加えて夾雑物を除去し、DNAを含む溶液の1.5倍量の1%CTAB溶液 (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA [pH 8.0]) を加えてDNAを析出させた。再びDNAを1M NaCl溶液に完全溶解した後、2-propanolによって析出させた。その後、沈殿物を乾燥させ、50 μ lの1×TE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0]) に溶解したものをDNA溶液とした。各品種につき、3反復実施した。

PCR反応は、2 pmol primer set, 0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 1× PCR Buffer, 0.2 units AmpliTaq Gold DNA Polymerase (ABI), 10ng鋳型DNAを含む10 μ lの溶液で行った。PCR反応にはGeneAmp PCR System 9700 (ABI) を用い、反応条件は94℃ 9分間、(94℃30秒間、60℃30秒間、72℃30秒間) ×35サイクル、72℃ 7分間とした。増

第3表 SSRマーカーによる品種識別に供試したコムギ品種

No.	品種	No.	品種	No.	品種	No.	品種
1	アブクマワセ	16	きぬあずま	31	さぬきの夢2000	46	Eradu
2	アヤヒカリ	17	キヌヒメ	32	シラネコムギ	47	Alturas
3	バンドウワセ	18	きぬいろは	33	シラサギコムギ	48	Eden
4	チホクコムギ	19	きぬの波	34	シロガネコムギ	49	Eltan
5	チクゴイズミ	20	キタカミコムギ	35	しゅんよう	50	Hyak
6	ダブル8号	21	きたもえ	36	タイセツコムギ	51	Jagger
7	ダイチノミノリ	22	キタノカオリ	37	タクネコムギ	52	Jubilee
8	ふくほのか	23	コユキコムギ	38	タマイズミ	53	Lewjiain
9	ふくさやか	24	ミナミノカオリ	39	つるびかり	54	Tyee
10	春のかがやき	25	ナンブコムギ	40	ゆきちから	55	White Bird
11	春よ恋	26	ネバリゴシ	41	ユメアサヒ	56	Zak
12	ハルユタカ	27	ニシホナミ	42	Aroona	57	AC Barrie
13	ホクシン	28	ニシノカオリ	43	Arrino	58	CDC Teal
14	ホロシロコムギ	29	小麦農林26号	44	Cadoux		
15	イワイノダイチ	30	小麦農林61号	45	Calingiri		

42~46：オーストラリア品種；47~56：アメリカ品種；57, 58：カナダ品種

幅産物は、3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った後、エチジウムブロマイドで染色し、UV照射して増幅産物を確認した。増幅産物が少量、または確認されなかったプライマー対については、アニーリング温度を50~70℃の間で12段階に設定してグラジエントPCRを行い、最適温度を調査した。

また、各プライマー対のコムギに対する特異性を調べるため、オオムギ「イチバンボシ」、マンネンボシ、「カシマムギ」、「スカイゴールデン」、「ダイシモチ」、「シュンライ」、イネ「コシヒカリ」、「日本晴」、「モチミノリ」、ダイズ「ニシムスメ」、「アキシロメ」、「タマホマレ」、「フクユタカ」、「エンレイ」、「サチユタカ」、トウモロコシ（市販品）、ソバ（市販品）を対象にPCRを行い増幅産物の有無を確認した。

開発したSSRマーカーによる品種識別のために、国内41品種およびアメリカ、カナダ、オーストラリアの17品種を供試した（第3表）。PCR反応は、フォワードプライマーが4色の蛍光色素（FAM, VIC, NED, PET）のいずれかで標識されたプライマー対を用い、上記と同様に行った。増幅産物はキャピラリー型電気泳動装置3130xl Genetic Analyzer（ABI）によって分離・検出し、増幅産物長はGeneScan 500LIZをサイズスタンダードとして遺伝

子解析ソフトウェア GeneMapper（ABI）を用いて解析した。

さらに、加工食品への適用性を評価するため、それぞれ表示がある4種類の市販加工食品；小麦粉（さぬきの夢2000）、クッキー（国産コムギ）、ゆでうどん（チクゴイズミ）、パン（国産コムギ）を供試した。DNAの抽出は各食品1g（ゆでうどんのみ2g）から、QIAGEN Genomic-tip 20/GおよびGenomic DNA Buffer Set（QIAGEN）を用いて、添付のマニュアルに従って行った。ただし、Proteinase Kを推奨量の2倍使用した。PCR反応と増幅産物の解析は上記と同様に行い、加工食品に含まれる原材料品種を推定するためのソフトウェア「MixAssort」⁷⁾を用いて品種を識別した。

2) 結果および考察

「read2Marker」によって検出されたEST-SSRの種類と数、作出されたプライマー数と供試結果を第4表に示した。合計35,263個のEST（2005年9月時点）のうち、3,759個から2塩基モチーフ4,156および3塩基モチーフ2,839のSSRが検出された。同様にESTからSSRを探索した報告では、1塩基から7塩基のモチーフのコムギSSRにおいて、最も多いのは3塩基モチーフで約70%を占めており、2塩基モチ

第4表 UniGeneを用いたread2MarkerによるSSRマーカー開発の結果

パラメーター	EST数	SSRs数	プライマー組数	%
UniGene	35,263			
SSRを含む	3,759			10.7 ^d
1種類	1,104			
2種類以上	2,655			
2種類	2,197			
3種類	362			
4種類	76			
5種類	16			
6種類	1			
7種類	3			
反復配列の型				
2塩基		4,156		
3塩基		2,839		
プライマー設計可	2,710			72.1 ^e
供試			186	
PCR増幅 ^a	可		138	74.2 ^f
	不可		48	25.8 ^f
多型有り ^b			71	38.2 ^f
コムギ特異性有り ^c			24	12.9 ^f

a~c 3%アガロースゲル電気泳動によって検出した結果.

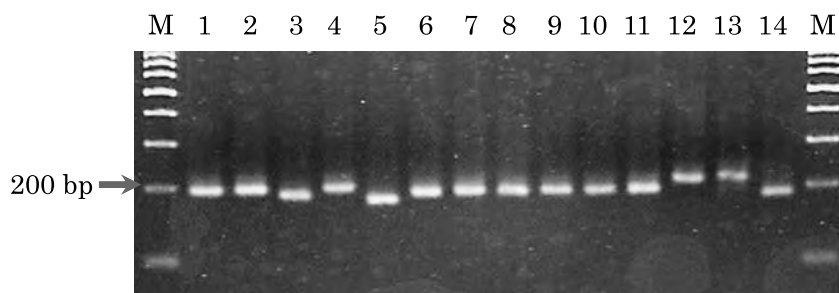
b コムギ14品種間で1品種以上に多型があったもの.

c 多型があったプライマーの中でコムギ特異性があったもの.

d UniGene数に対する割合.

e SSRを含むEST数に対する割合.

f 供試したプライマー数に対する割合.



第3図 EST-SSRマーカーTaSE3による増幅産物のアガロースゲル電気泳動図

M: 100 bp ladder marker; 1. チクゴイヅミ; 2. ふくさやか; 3. 春よ恋; 4. ハルユタカ;
5. ホクシン; 6. ネバリゴシ; 7. 小麦農林61号; 8. さぬきの夢2000; 9. シラサギコムギ;
10. シロガネコムギ; 11. タマイヅミ; 12. Calingiri; 13. Eradu; 14. Zak

ーフは10%程度であることが示されている^{10, 30}). 彼らは少なくとも合計12bpまたは14bpとなる繰り返し数のSSRを検出しているのに対して, 本節では2塩基モチーフにおいて繰り返し数が3回以上であるSSRを対象としているために異なる結果が生じたと考えられ, コムギのESTには繰り返し数6回以下

の2塩基モチーフのSSRが大量に含まれていることが示唆された.

検出されたSSRのうち, 72%についてプライマー設計が可能であったが, 8回以上の反復があるSSR, または2種類以上のSSRを含む場合は合計11回以上の反復を含むSSRであることを条件として186組の

第5表 開発された10組のEST-SSRマーカーの詳細

遺伝子座	プライマー配列 (5'-3')	アニーリング温度 (°C)	UniGene	CloneID	Accession No.	塩基数 (bp)	反復領域	増幅産物長 (bp)
<i>TaSE3</i>	フォワード CACCGATCGATCAACAAGTCAAAA	60	UniGene	CloneID	S12969134S	435	(ag)13	130
	リバース CATCATCATCGGTTCTTGGGA		EST	Accession No.	BJ286520	506	(ag)19	190
<i>TaSE6</i>	フォワード CCTAAGAGAGCTTGGCTTCGTTCAT	60	UniGene	CloneID	S13163776S	377	(tgt)11	154
	リバース CACAAAGAAAAGAAAGACCCCTCATTTG		EST	Accession No.	CA637867	505	(tgt)15	214
<i>TaSE37</i>	フォワード ATCCGCTACGGAAGAAATACCACA	60	UniGene	CloneID	S12990001S	172	(aca)3, (ac)10	149
	リバース GTTGCTGGCCCTGCCATGTTTA		EST	Accession No.	BQ161628	232	(aca)3, (ac)10	149
<i>TaSE63</i>	フォワード CGTGTGCTCTCGCAGTTTCATAGT	60	UniGene	CloneID	S15880719S	449	(ta)3, (ag)7, (ag)4	224
	リバース CCTCGCCCTTCTAAATTAAGCTCCGT		EST	Accession No.	CD454085	569	(ta)3, (ag)7, (ag)4	224
<i>TaSE92</i>	フォワード TCGCCGTACCCCTACCATACCATAC	60	UniGene	CloneID	S17888177S	899	(ct)3, (tct)6, (ta)4	285
	リバース AGCGGTTACAGTACGTCCATGTTG		EST	Accession No.	CK161286	899	(ct)3, (tct)6, (ta)4	285
<i>TaSE96</i>	フォワード TGGGACAAGTCCCTAGGTAAGACG	60	UniGene	CloneID	S12868242S	739	(tc)10, (ca)3, (gt)3	287
	リバース GTAGTCCGCCCCAGCCTCTACTTTT		EST	Accession No.	BF482277	739	(tc)10, (ca)3, (gt)3	287
<i>TaSE117</i>	フォワード CCACATAAAAATGCTGGACGCATA	60	UniGene	CloneID	S17884449S	697	(cca)8, (caa)3	161
	リバース GGGAGAAGCTCCAGAAAGGAACTCTC		EST	Accession No.	CK157595	877	(cca)8, (caa)3	161
<i>TaSE123</i>	フォワード TGTTAGGAGTAGGAATCAGGGCTGC	60	UniGene	CloneID	S13140945S	413	(tct)10	188
	リバース GACCACCAGATCTTGGAGCAAACT		EST	Accession No.	CA615035	481	(tct)11	248
<i>TaSE149</i>	フォワード TCAAAGTTCTTGCCATCTCTTCCC	60	UniGene	CloneID	S13183712S	443	(tc)8	152
	リバース TATGGCCCTTGCTGTAGCTTCACT		EST	Accession No.	CA657802	512	(tc)20	212
<i>TaSE151</i>	フォワード TGGTACGTTTACAGGTTCAATGG	50	UniGene	CloneID	S16222508S	727	(tg)8	164
	リバース TCTTATCAACCACACGCTTAAA		EST	Accession No.	CD894305	787	(tg)8	164

UniGene : read2Markerによるプライマー設計で使用された塩基配列。対象となる反復領域と増幅産物長を示す。
 EST : UniGeneと相同性のあるEST。UniGeneからread2Markerによって開発されたプライマーにより、ESTの塩基配列上で対象となる反復領域と増幅産物長を示す。

プライマー対を選定し、供試した。アニーリング温度が60°Cで良好な増幅が見られなかったプライマー対が72組あったため、グラジエントPCRに供試したところ、24組のプライマー対では最適なアニーリング温度を設定することで増幅産物を得ることが可能であった。増幅産物が得られた合計138組のプライマー対のうち、71組でコムギ14品種間の多型が検出され、そのうち24組でコムギゲノムへの特異性が確認された。EST-SSRマーカーはゲノムDNAから開発されたSSRマーカーと比較して多型性が乏しいことが指摘されている^{3, 6, 51, 54}。本節においては、供試した186個のEST-SSRのうち38.2%が多型が確認され、Torada *et al.*⁵⁴の結果とほぼ一致した。

再現性が良く、単一の増幅産物を生じるプライマー対を選抜し（第3図、一例）、最終的に、10組のEST-SSRマーカーを選定した（第5表）。また、58品種について調査した増幅産物長を第6表にまとめた。「read2Marker」によってUniGeneをもとに設計されたプライマーにより算出された増幅産物長

（第5表）と58品種から得られた増幅産物長（第6表）を比較すると、大きく異なる遺伝子座がいくつかあった。そこで、設計元のUniGeneと相同性のあるESTをデータベースDDBJによって検索し、実際の増幅産物の塩基配列と比較したところ、ESTの塩基配列と一致しており、目的の領域を増幅していることが確認された。TaSE3, 6, 123, 149ではUniGeneの塩基配列においてSSRの直近60塩基対が欠失しており、増幅産物長の差異の要因であることが確認された。

各品種3粒の遺伝子型を調査した結果、ほとんどの品種で種子間における遺伝子型の差異は見られなかったが、「ダイチノミノリ」および「Tyee」「Zak」ではいくつかの遺伝子座で種子間の分離が検出された（第7表）。そのため、これら3品種についてさらに6粒の調査を行ったところ、「Tyee」および「Zak」ではすべての遺伝子型が一致していたが、「ダイチノミノリ」では遺伝子座 TaSE37において、種子毎に2つの遺伝子型のいずれかが検出された。

第6表 10組のEST-SSRマーカーを用いたコムギ58品種間の遺伝子型数と増幅産物長

EST-SSR マーカー	遺伝子型数	増幅産物長 (bp)										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	—
TaSE3	11	180	184	187	190	194	196	198	200	214	216	—
TaSE6	5	198	205	214	224	227						
TaSE37	4	143	151	154								—
TaSE63	4	230	261	263	267							
TaSE92	2	293	305									
TaSE96	4	295	313	315	317							
TaSE117	2	166	172									
TaSE123	7	258	267	282	285	288	291	297				
TaSE149	5	204	210	212	214	216						
TaSE151	3	173	175	177								

—；増幅なし

第7表 4組のEST-SSRマーカーによって検出されたコムギ品種内における種子間

No.	品種	TaSE3				TaSE6		TaSE37		TaSE96		遺伝子型数
		180	184	200	—	214	224	151	154	313	315	
7	ダイチノミノリ							b+5	a, c+1			2
54	Tyee	b			a, c+6	b, c+6	a			a, c	b+6	4
56	Zak		b+6	a, c								2

a, b, c は各1粒から抽出したDNAを示し、さらに6粒の追加調査を行った結果を「+数」で示す。

第8表 10組のEST-SSRマーカーを用いたコムギ58品種の遺伝子型カタログ

No.	品種	EST-SSRマーカー										
		TaSE	TaSE	TaSE	TaSE	TaSE	TaSE	TaSE	TaSE	TaSE	TaSE	
		3	6	37	63	92	96	117	123	149	151	
1	アブクマワセ	G	B	C	C	B	C	B	D	C	A	
2	アヤヒカリ	G	D	B	A	B	C	B	D	C	A	**
3	バンドウワセ	G	B	B	A	B	C	B	E	C	A	#
4	チホクコムギ	A	D	B	A	B	B	A	F	C	A	
5	チクゴイズミ	F	D	B	C	B	C	B	D	C	A	*
6	ダブル8号	F	B	—	A	B	C	B	D	B	C	
7	ダイチノミノリ	G	B	B ^{&}	C	B	C	B	D	C	A	\$
8	ふくほのか	F	D	B	C	B	C	B	D	C	A	*
9	ふくさやか	G	D	C	C	B	C	B	D	C	A	\$\$
10	春のかがやき	G	D	B	A	B	C	B	D	C	A	**
11	春よ恋	C	D	A	A	B	B	B	D	C	A	
12	ハルユタカ	H	A	C	A	B	C	B	D	C	A	
13	ホクシン	A	D	B	A	A	B	B	F	D	A	
14	ホロシリコムギ	G	B	C	A	B	B	A	F	C	A	
15	イワイノダイチ	G	B	C	A	B	C	B	D	C	B	
16	きぬあずま	F	D	B	C	B	C	B	D	C	A	*
17	キヌヒメ	G	B	B	C	B	C	B	D	C	A	\$
18	きぬいろは	G	D	B	A	B	C	B	D	C	A	**
19	きぬの波	G	D	B	C	B	C	B	E	C	A	
20	キタカミコムギ	B	D	C	B	B	B	A	E	C	A	
21	きたもえ	G	D	B	A	A	B	B	B	D	A	
22	キタノカオリ	G	B	C	A	B	B	A	G	B	A	
23	コユキコムギ	E	B	—	A	B	C	B	C	C	C	
24	ミナミノカオリ	G	B	A	A	B	C	B	D	C	A	
25	ナンブコムギ	A	B	B	A	B	B	B	F	C	A	
26	ネバリゴシ	E	D	B	A	B	B	B	D	C	A	
27	ニシホナミ	F	D	B	C	B	C	B	D	C	A	*
28	ニシノカオリ	G	B	A	C	B	C	B	D	C	B	
29	小麦農林26号	G	D	C	C	B	C	B	D	C	A	\$\$
30	小麦農林61号	G	B	C	C	B	A	B	D	C	A	
31	さぬきの夢2000	F	D	B	A	B	C	B	E	C	A	
32	シラネコムギ	F	B	—	A	B	C	B	D	C	C	
33	シラサギコムギ	G	D	C	C	B	C	B	D	C	A	\$\$
34	シロガネコムギ	G	B	B	C	B	C	B	D	C	A	\$
35	しゅんよう	G	C	C	B	B	C	B	B	C	B	
36	タイセツコムギ	A	B	C	A	A	B	A	F	C	A	
37	タクネコムギ	A	B	B	A	B	B	B	D	C	C	
38	タマイズミ	G	B	B	A	B	C	B	E	C	A	#
39	つるびかり	F	B	B	A	B	C	B	E	C	A	
40	ゆきちから	A	B	B	A	B	C	B	D	C	C	
41	ユメアサヒ	B	E	A	C	A	B	B	A	C	A	
42	Aroona	B	B	A	A	B	D	B	D	C	A	
43	Arrino	J	E	B	D	B	C	B	D	B	A	
44	Cadoux	H	E	—	A	B	B	B	D	D	C	
45	Calingiri	I	D	A	A	B	B	A	D	D	A	
46	Eradu	J	E	A	D	B	C	B	D	B	A	
47	Alturas	H	C	C	A	B	B	B	G	C	C	
48	Eden	H	B	A	A	B	C	B	D	D	C	
49	Eltan	D	C	A	A	B	B	A	C	E	C	
50	Hyak	A	C	C	A	B	C	A	E	D	A	
51	Jagger	G	A	B	B	B	C	—	A	C	A	
52	Jubilee	H	D	A	A	B	B	B	C	D	A	##
53	Lewjiain	—	C	A	A	B	B	A	C	E	C	
54	Tyee	— ^{&}	C ^{&}	C	B	B	B ^{&}	A	E	D	A	
55	White Bird	H	D	A	A	B	B	B	C	D	A	##
56	Zak	B ^{&}	C	C	A	B	D	B	D	A	A	
57	AC Barrie	J	B	A	A	B	C	A	G	B	A	
58	CDC Teal	G	B	A	B	B	B	B	D	B	A	

& 品種内で多型があったものを示す (第7表参照).

A~Jは、第6表に記載したそれぞれのマーカーの増幅産物長の種類を示す.

表外の同記号のものは同じ遺伝子型を示す.

42~46: オーストラリア品種; 47~56: アメリカ品種; 57, 58: カナダ品種

これらの結果から、供試した3品種の種子については品種内多型が生じていたものと推測された。

10組のEST-SSRマーカーによって決定された国内外58品種の遺伝子型を第6表に示したアルファベットで表し、10個のアルファベットの組合せによって品種を識別した(第8表)。国内品種と国外品種は識別でき、国内41品種では26品種を個別に識別可能で、残りの15品種は5つのグループに識別できた。国内生産量が多い「ホクシン」や「小麦農林61号」、需要の多い「さぬきの夢2000」や「春よ恋」は個別に識別可能であった。TaSE3の遺伝子型C、EおよびFは国内品種に特有の遺伝子型であり、とりわけ遺伝子型Cは主要パン用品種「春よ恋」に特異的であった。また、「小麦農林61号」はTaSE96において特異的な遺伝子型Aを示し、TaSE92の遺伝子型A、TaSE123の遺伝子型B、FおよびTaSE151の遺伝子型Bもまた、国内品種に特有の遺伝子型であった。一方、TaSE3の遺伝子型D、IおよびJは国外5品種のみに見出され、TaSE63の遺伝子型Dはオーストラリア品種に特有であった。また、TaSE149の遺伝子型A、Eはアメリカの3品種のみに示された。これら国外品種特有の遺伝子型は、

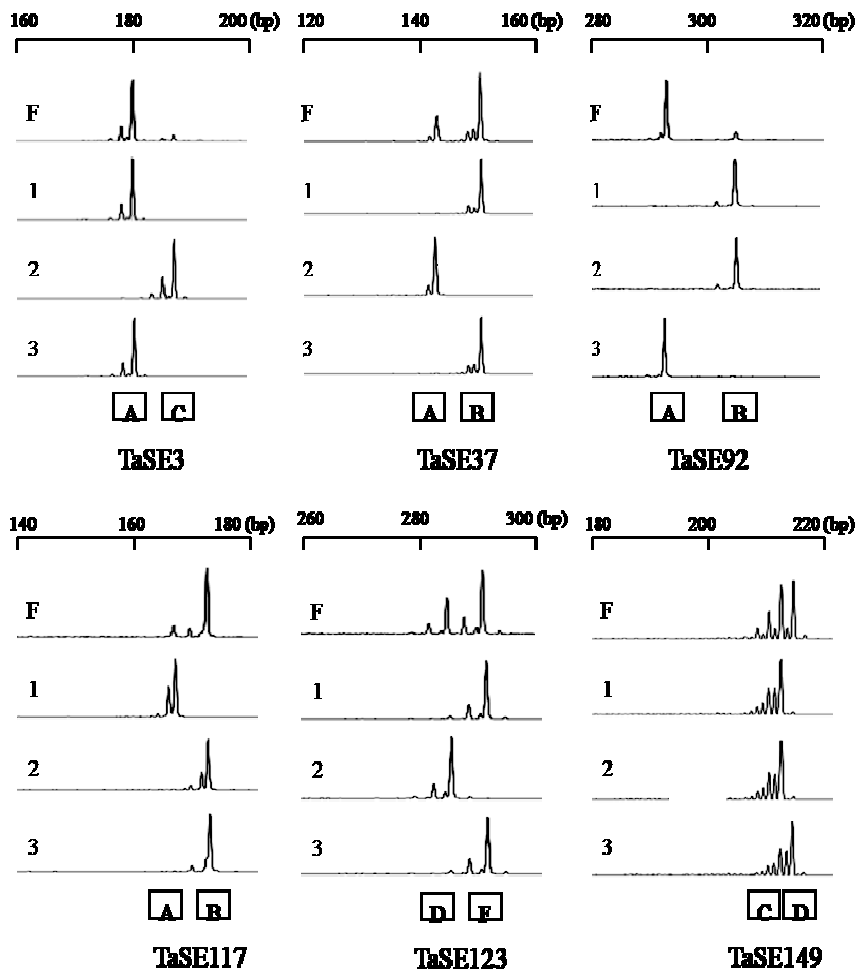
「国産コムギ100%使用」と表示された加工食品の真偽確認に利用できる可能性があると考えられた。

4種類の市販加工食品の原料コムギ品種の識別を行った(第9表)。小麦粉では表示通りに「さぬきの夢2000」の遺伝子型とすべて一致した。国産コムギを使用したクッキーは、「ホクシン」の遺伝子型を示し、ゆでうどんでは表示された「チクゴイズミ」の遺伝子型を示した。国産コムギを使用したパンでは7つの遺伝子座で複数の遺伝子型が検出され、それらの組合せから「チホクコムギ」や「ホクシン」「春よ恋」の遺伝子型が同定された。複数品種が検出されたパンについて、GeneMapperによる解析図から「ホクシン」の増幅産物量は「チホクコムギ」「春よ恋」に比較して多く含まれる傾向が見られた(第4図)。一方、クッキーやゆでうどん、パンでは品種を同定することができない遺伝子型が「MixAssort」により「Unsolved」として検出された。明確な識別結果が得られた小麦粉の原料品種「さぬきの夢2000」は、2003年に品種登録されて以来、香川県内でのみ栽培されていることから、遺伝的に高い純度が保たれてきたと推測される。しかしながら、「チクゴイズミ」や「ホクシン」「春よ恋」

第9表 10組のEST-SSRマーカーおよびMixAssortを用いた市販加工食品におけるコムギ品種の識別

加工食品および品種	EST-SSRマーカー									
	TaSE 3	TaSE 6	TaSE 37	TaSE 63	TaSE 92	TaSE 96	TaSE 117	TaSE 123	TaSE 149	TaSE 151
1 小麦粉 (さぬきの夢2000)	F	D	B	A	B	C	B	E	C	A
さぬきの夢2000	F	D	B	A	B	C	B	E	C	A
2 クッキー (国産コムギ)	A	D	B	A	A	B	A, B	F	D	A
ホクシン	A	D	B	A	A	B	B	F	D	A
Unsolved							A			
3 ゆでうどん (チクゴイズミ)	F	B, D	A, B	A, C	B	C	A, B	D	C	A
きぬあずま	F	D	B	C	B	C	B	D	C	A *
チクゴイズミ	F	D	B	C	B	C	B	D	C	A *
ニシホナミ	F	D	B	C	B	C	B	D	C	A *
ふくほのか	F	D	B	C	B	C	B	D	C	A *
Unsolved		B	A	A			A			
4 パン (国産コムギ)	A, C	A, D	A, B	A	A, B	B	A, B	D, F	C, D	A
チホクコムギ	A	D	B	A	B	B	A	F	C	A
春よ恋	C	D	A	A	B	B	B	D	C	A
ホクシン	A	D	B	A	A	B	B	F	D	A
Unsolved		A								

*を付した品種は同じ遺伝子型を示す。



第4図 6組のEST-SSRマーカーを用いたPCR増幅パターン

F. パン (国産コムギ使用)；1. チクゴイズミ (種子)；2. 春よ恋 (種子)；3. ホクシン (種子)

は広域で栽培されていることから栽培地によって遺伝的な分離と固定が生じ、同定され得ない遺伝子型が検出される要因となった可能性がある。開発したマーカーによる品種内多型の有無を調査し、識別能力を明らかにする必要があると考えられた。

2 国内品種の品種内多型の評価

DNA品種識別技術検討会において定められたガイドライン⁴⁾では、「品種を特徴づける塩基配列は、単に品種間で相違があればよいだけでなく、品種内の各個体間で一致することが確認されている領域を品種識別の根拠とすべきである」としており、DNAマーカーによって検出される遺伝子型の均一性は不可欠な要素である。本節では、Ⅲ-1節において開発したEST-SSRマーカーによる品種識別技術の識別能力を調べるため、都道府県において維持管

理されている原種または原原種を用いて品種内多型の有無を調査した。また、SSRマーカーの設計元であるESTについて、データベースを利用して相同性のある塩基配列の検索を行い、他の植物種での同祖的な遺伝子の有無について考察した。

1) 材料および方法

水陸稲・麦類・大豆奨励品種特性表³³⁾に記載されている各都道府県のコムギの奨励品種を参考に、複数の都道府県で奨励されている15品種を対象とした(第10表)。奨励品種として採用している全26府県(青森, 秋田, 岩手, 宮城, 福島, 栃木, 茨城, 群馬, 埼玉, 千葉, 長野, 静岡, 愛知, 岐阜, 三重, 滋賀, 京都, 兵庫, 山口, 徳島, 香川, 福岡, 佐賀, 長崎, 大分, 熊本)から各品種5g以上の近年産の原種(入手困難な場合は原原種)を収集した。

第10表 供試品種およびそれらを奨励品種として採用する府県数 (2007年時点)

品種名	育成年次	育成地	奨励品種採用 府県数
あやひかり	1999	農業研究センター (現 作物研究所)	2
イワイノダイチ	1999	九州農業試験場 (現 九州沖縄農業研究センター)	5
キタカミコムギ	1959	東北農業試験場 (現 東北農業研究センター)	2
きぬの波	2001	群馬県農業技術センター	2
シラネコムギ	1986	長野県農業試験場	2
シロガネコムギ	1974	九州農業試験場 (現 九州沖縄農業研究センター)	5
タマイズミ	2002	作物研究所	3
チクゴイズミ	1993	九州農業試験場 (現 九州沖縄農業研究センター)	7
ナンブコムギ	1951	盛岡農事改良実験所 (現 東北農業研究センター)	2
ニシノカオリ	1999	九州農業試験場 (現 九州沖縄農業研究センター)	6
ネバリゴシ	2000	東北農業試験場 (現 東北農業研究センター)	3
小麦農林61号	1944	佐賀県農業試験場	12
ふくさやか	2002	近畿中国四国農業研究センター	2
ミナミノカオリ	2003	九州沖縄農業研究センター	3
ゆきちから	2003	東北農業研究センター	3

第11表 10組のEST-SSRマーカーによるコムギ15品種の遺伝子型カタログ

品種	TaSE3	TaSE6	TaSE37	TaSE63	TaSE92	TaSE96	TaSE117	TaSE123	TaSE149	TaSE151
あやひかり	G	D	B	A	B	C	B	D	C	A
イワイノダイチ	G	B	C	A	B	C	B	D	C	B
キタカミコムギ	B	D	C	B	B	B	A	E	C	A
きぬの波	G	D	B	C	B	C	B	E	C	A
シラネコムギ	F	B	—	A	B	C	B	D	C	C
シロガネコムギ	G	B	B	C	B	C	B	D	C	A
タマイズミ	G	B	B	A	B	C	B	E	C	A
チクゴイズミ	F	D	B	C	B	C	B	D	C	A
ナンブコムギ	A	B	B	A	B	B	B	F	C	A
ニシノカオリ	G	B	A	C	B	C	B	D	C	B
ネバリゴシ	E	D	B	A	B	B	B	D	C	A
小麦農林61号	G	B	C	C	B	A	B	D	C	A
ふくさやか	G	D	C	C	B	C	B	D	C	A
ミナミノカオリ	G	B	A	A	B	C	B	D	C	A
ゆきちから	A	B	B	A	B	C	B	D	C	C

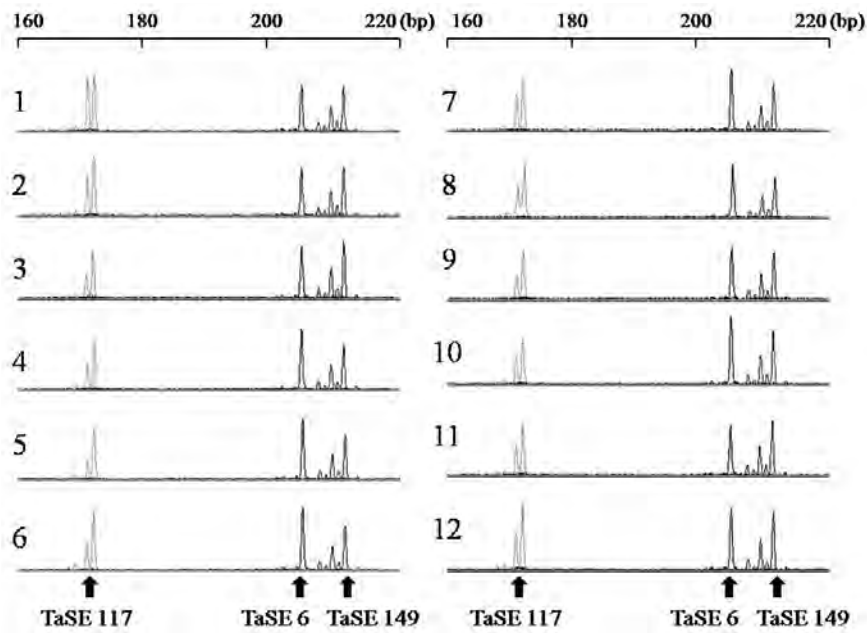
DNAの抽出は、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を一部改変して行った。種子各1粒をMicro Smash MS-100R (トミー精工) を用いて粉砕し、buffer AP1を400ml および RNase A を4 μ l 加えて55°Cで15分間保温した。続いて Proteinase K を4 μ l 加えて55°Cで15分間保温した後、添付のマニュアルに従ってDNAを精製、分離し、TEを用いて100 μ lの溶出液を回収した。各品種・産地につき、3粒のそれぞれから (①), (②), (③), また、別の3粒をまとめてDNAを抽出した (④)。PCR反応およ

び増幅産物の解析は前節と同様に行った。

塩基配列の比較は、EST-SSRマーカーの設計元であるEST配列を質問配列としてBLASTN検索によって行い、期待値が e^{-40} 以下を示した塩基配列を抽出した。

2) 結果および考察

15品種のうち14品種では、供試した種子の遺伝子型はすべて遺伝子型カタログ (第11表) と一致し、品種内多型や種子間の分離は検出されなかった。奨



第5図 小麦農林61号におけるTaSE6, 117, 149のPCR増幅パターン

1. 千葉県産；2. 茨城県産；3. 栃木県産；4. 埼玉県産；5. 群馬県産；6. 愛知県産；
7. 岐阜県産；8. 滋賀県産；9. 京都県産；10. 山口県産；11. 福岡県産；12. 大分県産

励品種としての採用府県が最も多い「小麦農林61号」について、GeneMapperによる増幅パターンの一部を第5図に示した。「小麦農林61号」を含む14品種において、いずれの種子でも同様の増幅パターンを示しており、差異は確認されなかった。1品種については1取り寄せ先に由来する原種のみ、TaSE96の遺伝子型のばらつきが見られ、遺伝子型BまたはCが検出された。そこで、さらに原原種6系統の提供を受け、同様に調査したところ、TaSE96を除く遺伝子型はすべて遺伝子型カタログと一致しており、TaSE96では5系統が遺伝子型Bを示し、遺伝子型Cを示す系統は1系統のみであった（第12表）。

西尾ら³¹⁾は、1944年に育成された「小麦農林61号」を奨励品種とする県から種子の提供を受け、採種地間の形質変異を調査したところ、いくつかの形質では表現型や遺伝子型に有意な差があることを示した。しかし、すべて通常の観察では見出すことが困難な微小な変異であり、原原種、原種の維持管理において周到な配慮がなされ、主働遺伝子による変異は異常個体として排除されてきたものと考えられている。また、小林ら¹⁷⁾はRAPD法を用いて、「小麦農林61号」において採種地間でDNAレベルの変異が生じていることを明らかにし、西尾らによって

第12表 1品種1府県に由来する原種および原原種のTaSE96の遺伝子型

	DNA			
	①	②	③	④
原種	B	C	B	BC
原原種				
系統 1	B	B	B	B
系統 2	C	C	C	C
系統 3	B	B	B	B
系統 4	B	B	B	B
系統 5	B	B	B	B
系統 6	B	B	B	B

①, ②, ③はそれぞれ種子1粒から、④は種子3粒をまとめて抽出したDNAである。

確認された変異の存在を実証した。このことから、長期にわたり維持される品種において微小なゲノムの変動は避けられないものとして存在することが示唆される。本節では、26の府県から取り寄せたコムギ15品種の原種または原原種（59組合せ）の中で、1取り寄せ先に由来する1品種を除き、すべて3-1節で作成した遺伝子型カタログと相違ないことが確認された。特に、最も長期にわたり広域で栽培されている「小麦農林61号」において品種内多型が確認されなかったことは、西尾ら³¹⁾によって示され

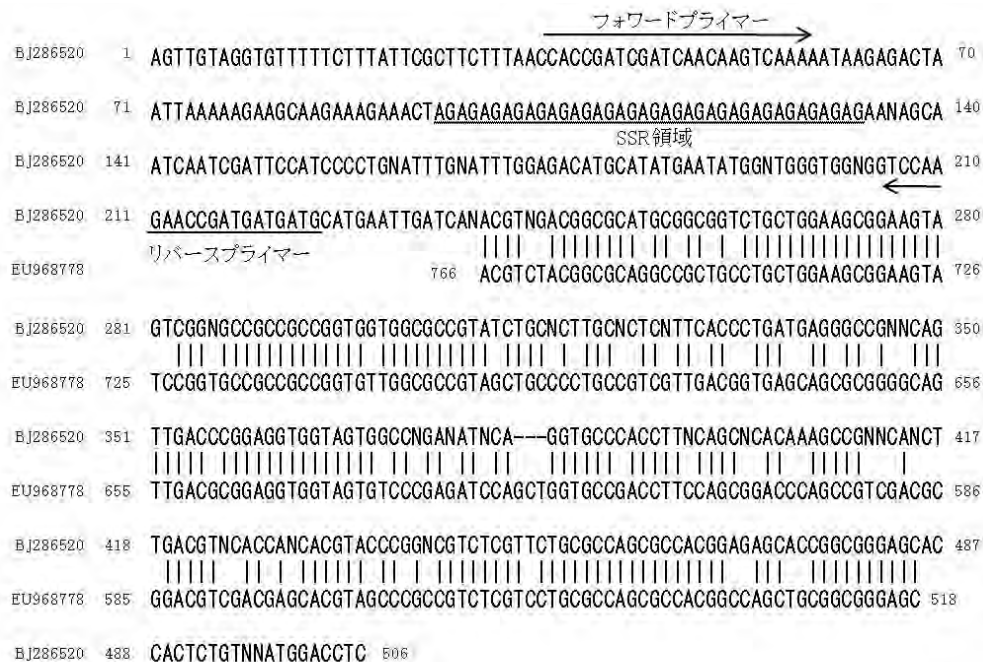
た各所における適切な種子の維持管理の状況を実証する一方で、これらのマーカーによって検出されるDNA領域の均一性や長期にわたる不変性を証明するものと考えられる。また、1品種に見られたTaSE96の遺伝子型の変異は、原原種の追加調査によって特定の系統に固定された変異であることが示された。原原種はほとんどの場合、各所において複数の系統が維持されている。本調査は、共優性マーカーであるSSRを利用し、59の品種・採種地の組合せすべてについてTaSE96の遺伝子型を調べており、今回判明したTaSE96の遺伝子型の変異は極め

て稀なものであったと推測される。

10組のマーカーの設計元であるEST配列と相同性を示す遺伝子を検索したところ、TaSE3, 92, 117, 123, 151のESTにおいて条件を満たす相同配列があった。すべてのESTでコムギヤイネ、トウモロコシのcDNA配列と高い相同性を示すものが検出されたが、そのうち予想される機能を示した相同配列について第13表に示した。TaSE151を除く4つのESTではすべてZea maysの塩基配列との相同性が検出された。TaSE3では、240~485bpの領域においてVAMP protein SEC22 (EU968778, EU967361)の

第13表 BLASTを用いた10個のEST配列の相同性検索の結果

遺伝子座	Accession No.	塩基数 (bp)	反復領域	bit score	期待値	予測される機能	植物種
TaSE3	BJ286520	506	(ag)19	203	9.00E-49	VAMP protein SEC22	Zea mays
TaSE6	CA637867	505	(tgt)15	—	—	—	—
TaSE37	BQ161628	232	(aca)3, (ac)10	—	—	—	—
TaSE63	CD454085	569	(ta)3, (ag)7, (ag)4	—	—	—	—
TaSE92	CK161286	899	(ct)3, (tct)6, (ta)4	387	7.00E-104	pectate lyase	Zea mays
TaSE96	BF482277	739	(tc)10, (ca)3, (gt)3	—	—	—	—
TaSE117	CK157595	877	(cca)8, (caa)3	464	3.00E-127	beta 1,3 galactosyltransferase	Zea mays
TaSE123	CA615035	481	(tct)11	183	8.00E-43	SAUR25-auxin-responsive SAUR family member	Zea mays
TaSE149	CA657802	512	(tc)20	—	—	—	—
TaSE151	CD894305	787	(tg)8	219	2.00E-53	alpha-1,2-fucosidase	Lilium longiflorum



第6図 EST (BJ286520) におけるTaSE3の検出領域 および他植物との相同性が検出された領域 (EU968778, Zea mays)

塩基配列と相同性があった(第6図)。TaSE92では、13~544bpにおいてpectate lyase (NM_001157251)を生じる塩基配列との高い相同性があった。TaSE117では、351~867bp領域においてbeta 1,3 galactosyltransferase (NM_001157513)、TaSE123では、1~269bp領域においてSAUR25-auxin-responsive SAUR family member (NM_001153763)との相同性があった。TaSE151では、40~541bp領域において*Lilium longiflorum*のalpha-1,2-fucosidaseとしての機能が予測されるLluc遺伝子(AB326211)と一部、相同性があった。また、品種識別マーカーとして設計されたフォワードおよびリバースプライマーの塩基配列は、コムギ以外の植物では、完全に一致する配列や類似した配列はなかった。

これら5つのESTで見出されたオルソログ候補が、実際にどのような形質に影響しているか、また、実際に多型が形質の品種間差異として現れているかは未知である。しかし、将来的に遺伝子の機能解析が進めば、コムギ品種間で多くの多型が検出されたこれらのDNA領域が品種識別の用途以外においても有用なマーカーとして利用できる可能性がある。また、相同性のある遺伝子が見出されなかった5つのESTについては、これまでにデータベースに登録されているESTの中ではコムギに特異的な塩基配列であることが示された。品種識別マーカーの開発にあたっては、コムギに由来するDNAのみで増幅産物が得られるようにプライマーを選抜してきたた

め、これらのマーカーはオルソログ候補が検出されなかった、あるいは候補があった場合でもプライマーを設計した位置に相同性がなかったと考えられ、加工食品における品種識別に有効であると考えられる。すなわち、コムギ以外に由来するDNAが含まれる食品からの品種識別において、実用的に利用できるマーカーであることが証明された。

3 国産コムギと輸入コムギの識別

輸入コムギは、No. 1 Canada Western Red Spring (1CW) や、Australian Standard White (ASW)、Dark Northern Spring (DNS)、Hard Red Winter (HRW)、Western White (WW) などの名称で呼ばれる銘柄の形で、主にカナダ、アメリカ、オーストラリアから輸入されている。これらは加工用途に応じて品質を最適化するために複数の品種がブレンドされているが、その構成は明らかではなく、年度によって構成品種やブレンド比率が変動することもある。Ⅲ-1節において作成した遺伝子型カタログでは、輸入銘柄(ASW, WW, HRW, 1CW)を構成すると考えられている主要17品種の中に、4組のマーカー(TaSE3, 63, 96, 149)によって国内品種にはない遺伝子型を示すものが確認された(第14表)。構成品種の変動に伴う銘柄において、これらの特徴的な遺伝子型を安定的に検出できる場合、国産コムギを100%使用した加工食品の真偽を確認するための簡易識別法になり得ると考えら

第14表 10組のEST-SSRマーカーを用いたコムギ58品種間の遺伝子型数と増幅産物長

EST-SSR マーカー	遺伝子型数	増幅産物長 (bp)										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	-
TaSE3	11	180	184	187	190	194	196	198	200	214	216	-
TaSE6	5	198	205	214	224	227						
TaSE37	4	143	151	154								-
TaSE63	4	230	261	263	267							
TaSE92	2	293	305									
TaSE96	4	295	313	315	317							
TaSE117	2	166	172									
TaSE123	7	258	267	282	285	288	291	297				
TaSE149	5	204	210	212	214	216						
TaSE151	3	173	175	177								

- ; 増幅なし

斜字で示した増幅産物長は国外品種特有であることを示す。

れる。本節では、複数年度の5種類の輸入銘柄を対象として遺伝子型の調査を行い、国産コムギと輸入コムギの効率的な識別法について検討した。

1) 材料および方法

輸入銘柄(輸入年度)は、1CW(2006, 2007), ASW(2005, 2006, 2007), DNS(2006, 2007), HRW(2006, 2007), WW(2007)を使用した。各10gの種子をマルチビーズショッカー(安井器械)によって粉碎し、そのうち1gを計量してⅢ-1節に示した改変CTAB法をスケールアップした方法によりDNAを抽出した。

また、ASW(2005, 2006), DNS(2006), HRW(2006), WW(2005, 2006)をビューラーテストミルによって製粉した小麦粉を用いて、各1gからDNAを抽出し供試した。

DNAの抽出は各サンプル3反復行った。

PCR反応は、Ⅲ-1節で開発された10組のEST-SSRマーカーを用い、前節と同様に行った。なお、供試材料はすべて農林水産省総合食料局食糧部から無償で譲渡いただいたものを使用した。

2) 結果および考察

すべての供試材料において、同一サンプルから3反復抽出したDNAの間では再現性のある結果が得られており、複数品種を含む銘柄から各品種の構成

割合に応じてほぼ均一なDNA溶液が得られていると推測された。また、ASW(2006), WW(2005, 2006)を除き、種子由来および小麦粉由来の結果で差異は見られなかったため、サンプリングの方法の違いに基づく結果の変動は小さいと考えられた。ASW(2006)の小麦粉では、種子由来および2005年度の結果と大きく異なっていたことから、保管時および製粉作業時などに生じた何らかの事故により、正確な結果が得られなかったと考えられた。いずれの銘柄においても各マーカーにつき複数の遺伝子型が検出されており、年度の異なるサンプル間で一部異なる遺伝子型を示した(第15表)。HRWではTaSE3やTaSE123の遺伝子型が年度間で大きく異なり、構成品種やブレンド比率の大幅な変更に起因すると考えられた。

TaSE63, 96, 149における国外品種特有の遺伝子型(TaSE63: D, TaSE96: D, TaSE149: A, E)については、複数年度にわたって検出されない場合があった(第15表)。また、複数品種から構成される銘柄の状態では主要な遺伝子型としては検出されず、明確な識別が困難な場合もあったことから、安定的な指標としては利用できないものと考えられた。一方、TaSE3では、国外品種特有の遺伝子型を複数年度にわたり、安定的に検出することが可能であった。ASWでは遺伝子型I, 1CWおよびDNSでは遺伝子型J, また、WWでは58品種間では確認

第15表 5種類の輸入小麦銘柄におけるEST-SSRマーカーの遺伝子型

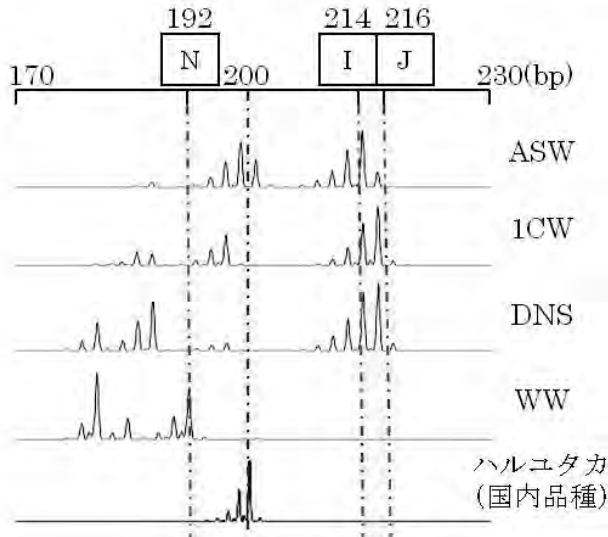
輸入銘柄	輸入年度	EST-SSRマーカー									
		TaSE3	TaSE6	TaSE37	TaSE63	TaSE92	TaSE96	TaSE117	TaSE123	TaSE149	TaSE151
1CW	2006	A B C F J	B D	A B	A D	B	B	A B	D G	B C	A C
	2007	A B C F J	B D	A B	A C D	B	B	A	D G	B C	A C
ASW	2005	C G H I	B D E	A B C	A D	B	B C	A B	D	B C D	A C
	2006	B E G H I	B D E	A B C	A D	B	B C	A B	D	B C D	A C
	2007	C G H I	B D E	A B C	A D	B	B C D	A B	D	B C D	A C
DNS	2006	C E F J	B D	A B C	A C D	A B	B	A B	D G	B C	A C
	2007	A C F J	B C D E	A B C	A C D	A B	B	A	D G	B C D E	A C
HRW	2006	A C	A B C D E	A B C	A B	A B	B	A B	B D E	B C D E	A C
	2007	B C G	A B C D	A B C	A B	A B	B	A B	A N D E	B C D E	A C
WW	2005	A N	A B C D	A B C	A B	B	B	A B	A C D F	C D E	A C
	2006	A N	A B C D	A B C	A B D	B	B	A B	A C D	C D E	A C
	2007	A B N	A B C D	A B C	A B D	B	B	A	A B C D E	C D E	A C

斜字で示した遺伝子型は国外品種特有であることを示す。

A~Jは、第14表に記載したそれぞれのマーカーの増幅産物長の種類を示し、Nは新規の遺伝子型を示す。

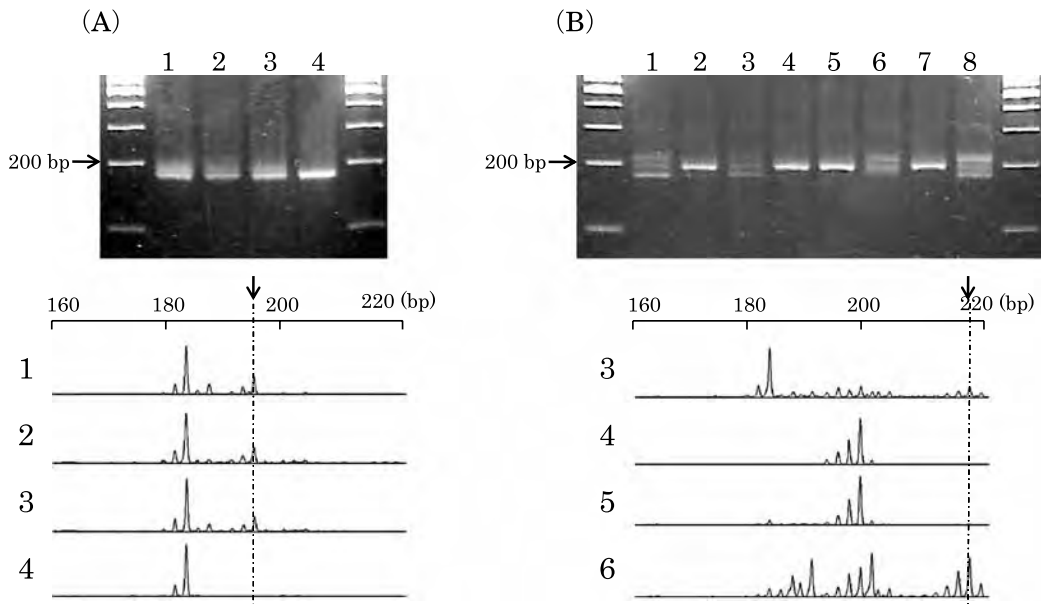
されていない新しい遺伝子型Nがすべての年度において主要な遺伝子型として検出された（第7図）。

複数品種から構成される銘柄では、DNAマーカーを利用してジェノタイピングを行った場合、1組のマーカーで複数の遺伝子型を検出することは容易



第7図 4種類の輸入小麦銘柄および国内品種におけるEST-SSRマーカーTaSE 3の増幅パターン

に予想される。しかし、構成品種やブレンド比率の年度間変動についての情報は不明であるため、検出される遺伝子型の変動は予測できない。本節の結果から、銘柄の状態であっても再現性よく複数の遺伝子型を検出することが可能であることが示された。また、輸入年度によって一部遺伝子型の変動は見られたものの、大幅な変動は少なかったことから、各銘柄の主要品種の遺伝子型を安定的に検出できると考えられた。TaSE3は、1CW、ASW、DNS、WWにおいて検出される各主要品種の遺伝子型が国外品種に特徴的なものであるため、国産コムギを使用した食品に混入しているか否かを簡易に識別するための指標として有効に利用できるものと考えられた。実際に市販の菓子類でのDNAシーケンサーを用いた詳細な解析によって、菓子類の原料として多用されるWWの遺伝子型N（192bp）を検出することが可能であった（第8図A）。また、めん類の原料に用いられるASWの遺伝子型I（214bp）について、市販のめん類から検出することができた（第8図B）。TaSE3において、国内品種で検出される最長の増幅断片は200bpであることから（第7図）、簡易



第8図 市販加工食品のEST-SSRマーカーTaSE 3によるPCR増幅パターン（上図：アガロースゲル電気泳動図；下図：GeneMapperによる解析図）

- (A) 菓子類 1. クッキーA；2. クッキーB；3. クッキーC；4. クッキーD（国産小麦100%）
- (B) めん類 1. ゆでうどんA；2. ゆでうどんB（チクゴイズミ100%）；3. ゆでうどんC；4. ゆでうどんD（さぬきの夢2000 100%）；5. 乾麺A（さぬきの夢2000 100%）；6. 半生麺；7. 乾麺B（国産小麦100%）；8. そうめん

検出法であるアガロースゲル電気泳動を利用して容易に国産コムギと識別することも可能である。但し、構成品種の変動可能性を考慮して、毎年度、輸入される銘柄の遺伝子型の確認が必要である。

IV SNPマーカーを用いたコムギ品種識別技術

1 コムギの遺伝子領域におけるSNPの探索

SNP (Single nucleotide polymorphism) はDNA上の塩基種の違いのことを表し、広義には挿入欠変異 (Insertion/Deletion: InDel) やSSRを含むと考えられる。これらのDNA上の差異が直接的または間接的に遺伝子の機能に影響を与えていることは近年の研究によって徐々に明らかにされてきており、遺伝子上のSNPの解析は遺伝子の機能解明や有用遺伝子の同定につながることから、重要な情報となり得る。それらは品種育成における選抜マーカーとして利用されることが多いが、一方では近縁品種間にも存在し得るために品種識別に対して大きな効果を持つと考えられる。本節では、特定品種を簡易かつ迅速に識別する技術を開発するための基盤として、現在の主要品種を対象とし、各種遺伝子領域におけるSNPを探索することで、多型情報の蓄積を行った。

1) 材料および方法

SNPの探索には、「Calingiri」, 「チクゴイズミ」, 「ふくさやか」, 「春よ恋」, 「ホクシン」, 「小麦農林61号」, 「さぬきの夢2000」, 「シラサギコムギ」の8品種を供試した。(独)農研機構・近畿中国四国農業研究センターで維持管理されている種子を用い、DNAはⅢ-2節と同様に DNeasy Plant Mini Kit を利用して種子3粒からまとめて抽出した。

DDBJ (<http://arsa.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) において、*Triticum aestivum* L. (complete cds) について登録されている遺伝子を検索した。その中から任意に選択した遺伝子の塩基配列を利用し、Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) によってTm値57~63℃、最適プライマー長20bp、増幅領域の長さ400~1400bp または 2500~3000bp に設定してシーケンスのためのプライマーを設計した。対象とした遺伝子領域は、sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST), histon H1, histon H2A, histon H2B123, histon H2B153, wMAD2-A1, resistance-related receptor-like kinase (RLK-R1) (accession no. DQ270234) の7つであり、各領域に設計されたプライマー配列を第16表に示した。

PCR反応は、4pmol primer set, 0.4mM dNTPs, 1×PCR Buffer II (2.5mM Mg²⁺), 0.4units LA *Taq* DNA polymerase (Takara Bio), または4pmol

第16表 各遺伝子領域に設計されたプライマー配列

遺伝子名	フォワードプライマー (5'→3')	リバースプライマー (5'→3')
1-SST	1F CCAAGGACCTCATTCCTACTGG	1R GATTGGTGCAATGTGTTTGC
	2F CTTGGGTGGGGTAGATCCTT	2R GAGGCCCTTGGACACATAGA
	3F CAGTCGATTCCGAGGACAGT	3R TCGACGACTACCAAGTCATCAT
histon H1	1F GTGTGACAACCCAAATGCAG	1R ATGGCTCTCGCTGTTTGTTC
histon H2A	1F AGTCGACCACGACCCAAG	1R TTCCTCTTACAGCGCATGA
	2F CGCTCCATTTTCATCTCACA	2R GGTGCTAGATCGGAATGCTC
	3F GCACCCAAGCAAATCAACTT	3R AGCTCAGCACCTGAGATTC
	4F CGTCGCCGAGAAGTAGTAG	4R CAGCACAGGAAGCAAGGATT
histon H2B123	1F GTCGACCTGTCCACAACAGA	1R TGCTGGGGATTTTTAAGTGG
	2F CCACCGTCCATATCCTAAA	2R TGGTGGCGATCTAATACACG
	3F GCCAAGAAGAGCAACGAGAC	3R AATGAAGAGGGGAAGGAGGA
histon H2B153	1F CGTCGCTAGGTGGTTTATGG	1R GGGATCAAAGCAAGAACTCG
	2F AACAAAGAGCCACCATCAC	2R GCAAAGACACAGAGCGAGTG
	3F AACAGGCGGCTTCAGTTAGA	3R TCTCTTTCAGAAAAGGCCAGA
wMAD2-A1	1F AGAGAGAGCGCGAAGAAGG	1R GGAATTTAGGACTGAATCGGATG
	2F GAAGGATAAGCATTAAAGCAAAGC	2R AACAGTACAGGTTTTGGTAGACG
RLK-R1	1F TTACTTGCCATAGCGCTCCT	1R GGTCCACTGCCTTCACATCT

primer set, 0.2mM dNTP, 1mM Mg²⁺, 1 unit PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara Bio) に40ng DNAを加えた20 μ l溶液中で行った。PCR反応にはTaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (Takara Bio) を用い、反応条件は94°C 1分間, (94°C 30秒間, 57~66°C 30秒間, 72°C 30~180秒間) \times 30サイクル, 72°C 7分間 (LA Taq DNA polymerase使用時), または, (98°C 10秒間, 57°C 5秒間, 72°C 30~180秒間) \times 30サイクル (PrimeSTAR HS DNA polymerase使用時) とした。増幅産物は0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、バンドを確認した後、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてゲルから回収、精製した。その後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いてシーケンス反応を行い、3130xl Genetic Analyzer (ABI) によって解析した。DNASIS proソフトウェア (HitachiSoft) を用いて8品種の塩基配列を比較し、SNPの有無を調査した。

2) 結果および考察

7つの遺伝子領域 1-SST, histon H1, histon H2A, histon H2B123, histon H2B153, wMAD2-A1, RLK-R1を対象として8品種の塩基配列を解析し、RLK-R1を除く6遺伝子領域の結果を第17表に示した。計16682bpの塩基配列を対象としたが、解読できた領域は12997bpであった。コムギは異質倍数体 (AABBDD)²⁰⁾ として知られ、wMAD2¹⁵⁾ やWknox1 (KN1 homeobox)²⁵⁾, TaDFR (dihydroflavonol-4-reductase)¹³⁾ のように、3組のゲノム間で同祖遺伝子を持つ場合がある。ダイレクトシーケンスを行った場合に、複数の類似した塩基配列が存在する

ために解読が困難になる領域があり、対象としたすべての塩基配列を明瞭に決定できなかったが、解読できた領域12997bpにおいて合計169bpの塩基対の挿入や欠失、置換を検出することができた。また、RLK-R1では一部、解読することが可能であったが、品種間で塩基配列の差異が非常に多く、広範囲の挿入・欠失領域や高頻度の塩基置換のためにそれらの変異を正確に把握することが困難であった。

histon H2Aでは合計137bpと最も多くの変異が検出されたが、そのほとんどはイントロン領域に存在した。histon H2B123および153, wMAD2-A1においてもエクソン領域と比較してイントロン領域の変異が同量、または多い傾向があった。一方、1-SSTでは、エクソン領域にのみ変異が検出された。histon H1では8品種の塩基配列はすべて同じであった。

2品種間におけるSNP数と多型率を第18表に示した。「ホクシン」は他の品種と異なる塩基配列が多く存在する傾向があり、「Calingiri」や「チクゴイヅミ」、「春よ恋」、「さぬきの夢2000」との間で150bp (多型率1.2%) 以上の相違があった。オーストラリア品種である「Calingiri」は、「ふくさやか」、「ホクシン」、「小麦農林61号」、「シラサギコムギ」との間で1%程度の多型があったものの、国内品種におけるそれぞれの多型率と同程度であったことから、対象とした6種類の遺伝子領域では国内外品種間の大きな差異は見られなかった。また、「ふくさやか」と「シラサギコムギ」では多型が確認されなかったが、「ふくさやか」は「シラサギコムギ」と「シロガネコムギ」が交配親であるため、遺伝的な差異が少ないことを示唆する結果であった。

第17表 6種類の遺伝子領域におけるコムギ8品種間のSNP数

遺伝子	Accession No.	全長 (bp)	解読領域 (bp)	コムギ8品種間におけるSNP数		
				エクソン	イントロン	合計数
1-SST	AB159786	3326	2114	4 (1)	0	4 (1)
histon H1	D87064	3025	2530	0	0	0
histone H2A	L75802	2546	2433	7 (1)	130 (9)	137 (10)
histone H2B123	D37944	2901	2700	2	2 (1)	4 (1)
histone H2B153	D37945	3209	2160	6 (1)	16 (2)	22 (3)
wMAD2-A1	AB166871	1675	1060	1	1	2

() ; 挿入/欠失箇所の数

第18表 6種類の遺伝子領域におけるコムギ8品種の各品種間のSNP数(N)および多型率(R)(%)

品種	Calingiri		チクゴイズミ		ふくさやか		春よ恋		ホクシン		小麦農林61号		さぬきの夢2000	
	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R
チクゴイズミ	11	0.085												
ふくさやか	135	1.039	127	0.977										
春よ恋	11	0.085	16	0.123	138	1.062								
ホクシン	156	1.200	156	1.200	29	0.223	158	1.216						
小麦農林61号	133	1.023	132	1.016	4	0.031	135	1.039	25	0.192				
さぬきの夢2000	9	0.069	6	0.046	130	1.000	16	0.123	158	1.216	134	1.031		
シラサギコムギ	133	1.023	127	0.977	0	0.000	138	1.062	29	0.223	4	0.031	130	1.000

今回、解読対象としたヒストン遺伝子は、コアヒストンと呼ばれる histon H2A, histon H2B, histon H3, histon H4 および、リンカーヒストン histon H1 に分類される。コアヒストンから作られたタンパク質はDNAが巻きついてヌクレオソームを形成し、ヌクレオソーム間をリンカーDNAが繋いでいる²¹⁾。リンカーヒストンはヌクレオソームに結合したDNAとリンカーDNAの両方に結合することで、ヌクレオソームへDNAを強く巻きつける役割を持つ⁵²⁾。コムギのヒストン遺伝子の中には塩基配列の特徴から2, 3の変異型が存在することが明らかにされているが^{14, 48, 59)}、品種間における多型の存在は知られていない。本研究では、histon H2A および histon H2B においてエクソン領域から品種間における多数のSNPが検出されており、この中には非同義置換となるものも含まれる可能性があるため、品種によってヌクレオソームが異なる形質や機能を示す可能性が示唆された。その一方で、histon H1 においてまったく多型が見出されなかったことは、リンカーヒストン特有の役割の不変性を示すと考えられた。また、MAD2は植物にとって不可欠なタンパク質であり、MAD2遺伝子の塩基配列は種間において高度に保存されていることが指摘されている¹⁵⁾。本研究ではMAD2-A1遺伝子のエクソン領域において1品種に1カ所の塩基置換が検出されたが、同義置換(GAC→GAT)であったことから、形質や機能に変異は生じていないと考えられ、品種間においてもMAD2が高度に保存されていることが示唆された。

近年、SNPの解析は高速かつ自動化された手法や装置の利用によって簡単に行うことが可能となって

きた。それでもなお、倍数体であるコムギでは解析が困難になりがちであり、マーカー開発にも手間がかかる傾向にある。しかしながら、近縁度が高まっている最近の栽培品種において多くのSNPが検出され、遺伝的な多様性が示唆されたことから、DNAによる品種識別に対してSNPが有用なツールになると考えられた。

2 特定品種の簡易識別法の開発

前節において6種類の遺伝子領域から合計169bpのSNPsを検出し、有用な品種識別マーカーとなり得る可能性が示唆された。本節ではSNPをDNAマーカー化し、国内に流通する主要品種・銘柄の遺伝子型を決定することで、簡易かつ迅速な品種識別技術の開発を試みた。

1) 材料および方法

プライマーの設計はPrimer3を用い、増幅領域を100~300bpに設定して、その他の条件はIV-1節と同様に行った。CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) マーカーを作成するため、DNASIS proソフトウェア (HitachiSoft) を用いて適用できる制限酵素を検索した。

品種の識別のため、国内42品種および輸入銘柄6種類を供試した(第19表)。国内品種については(独)農研機構・近畿中国四国農業研究センターで維持管理されている種子を用い、輸入銘柄は農林水産省総合食料局食糧部から無償で譲渡いただいたものを使用した。また、ビューラーテストミルによって製粉された「さぬきの夢2000」および「さぬきの夢2009」、香川県内の製粉会社で製粉されたASW

(2009年輸入), 市販の加工食品4種類(ゆでうどん, 菓子A, B, C)を, 開発したSNPマーカーを評価するために供試した. DNAは, 国内品種についてはⅢ-2節と同様の方法で3粒からまとめて抽出した. 輸入銘柄は各10gの種子をシェイクマスター(Bio medical science)によって粉碎し, 100mgを計量して同様にDNAを抽出した. 小麦粉は100mgを計量して同様にDNAを抽出した. 加工食品からのDNA抽出は, 村上ら^{26, 27)}の方法に従って行った.

PCR反応は, 2pmol primer set, 0.2mM dNTPs, 1×PCR Buffer (2.5mM Mg²⁺含む), 0.2units LA

Taq DNA polymerase (Takara Bio), 20ng鋳型DNAを含む10μlの溶液中で行った. PCR反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (Takara Bio)を用い, 反応条件は94℃1分間, (94℃30秒間, 53~60℃30秒間, 72℃30秒間)×30サイクル, 72℃7分間とした. 増幅産物はそれぞれ適した制限酵素約2Uを用いて各バッファーで最適化した15μlの溶液中で反応させた後, GelRed (Biotium)を含む3%アガロースゲルで電気泳動し, バンドパターンを確認した. 供試したプライマーの組合せは33組であり, これらについて, 延べ48種類の制限酵素で試験を行

第19表 SNPマーカーによる品種識別に供試したコムギ品種

No.	品種	No.	品種	No.	品種
1	アブクマワセ	17	シロガネコムギ	33	ハルユタカ
2	あやひかり	18	タイセツコムギ	34	春よ恋
3	イワイノダイチ	19	ダイチノミノリ	35	バンドウワセ
4	キタカミコムギ	20	タクネコムギ	36	ふくさやか
5	キタノカオリ	21	ダブル8号	37	ふくほのか
6	きたほなみ	22	タマイズミ	38	ホクシン
7	きたもえ	23	チクゴイズミ	39	ホロシリコムギ
8	きぬあずま	24	チホクコムギ	40	ミナミノカオリ
9	きぬいろは	25	つるびかり	41	ゆきちから
10	きぬの波	26	ナンブコムギ	42	ユメアサヒ
11	キヌヒメ	27	ニシノカオリ	43	1CW
12	コユキコムギ	28	ニシホナミ	44	ASW
13	さぬきの夢2000	29	ネバリゴシ	45	DNS
14	しゅんよう	30	小麦農林26号	46	HRW
15	シラサギコムギ	31	小麦農林61号	47	PH
16	シラネコムギ	32	春のかがやき	48	WW

43~48は2007年輸入の銘柄を使用. 1CW: No.1 Canada Western Red Spring; ASW: Australian Standard White; DNS: Dark Northern Spring; HRW: Hard Red Winter; PH: Prime Hard; WW: Western White

第20表 「ニシノカオリ」の識別マーカー(Ch2-Bsc4I)および「春よ恋」「ハルユタカ」を識別するマーカーセット(dCh2-HpaII, Cs-SacII)

マーカー名	アニーリング温度(℃)		プライマー配列(5'・3')	増幅産物長(bp)
Ch2-Bsc4I	60	フォワード	TGGATAGATCTTGC GTGAGC	278
		リバース	TCGATCCTTCTTCGTCCATC	
dCh2-HpaII	53	フォワード	CATCCTTATTTTTTCACTCCACCG	137
		リバース	CGGGTATTGGCCATATTCAG	
Cs-SacII	56	フォワード	TGGATCCACTGACTTAATGGTG	344
		リバース	GTTGGCGAGGACAAGGAG	

第21表 3組のCAPSマーカーを用いた国内42品種および6輸入銘柄の遺伝子型カタログ

No.	品種名	マーカー名		
		Ch2-Bsc4I	dCh2-HpaII	Cs-SacII
		+ :200bp - :278bp	+ :115bp - :137bp	+ :306bp - :344bp
1	アブクマワセ	+	-	+
2	あやひかり	+	-	+
3	イワイノダイチ	+	-	+
4	キタカミコムギ	+	-	+
5	キタノカオリ	+	-	+
6	きたほなみ	+	-	+
7	きたもえ	+	-	+
8	きぬあずま	+	-	+
9	きぬいろは	+	-	+
10	きぬの波	+	-	+
11	キヌヒメ	+	-	+
12	コユキコムギ	+	-	+
13	さぬきの夢2000	+	-	+
14	しゅんよう	+	-	+
15	シラサギコムギ	+	-	+
16	シラネコムギ	+	-	+
17	シロガネコムギ	+	-	+
18	タイセツコムギ	+	-	+
19	ダイチノミノリ	+	-	+
20	タクネコムギ	+	-	+
21	ダブル8号	+	-	+
22	タマイズミ	+	-	+
23	チクゴイズミ	+	-	+
24	チホクコムギ	+	-	+
25	つるびかり	+	-	+
26	ナンブコムギ	+	-	+
27	ニシノカオリ	-	-	+-
28	ニシホナミ	+	-	+
29	ネバリゴシ	+	-	+
30	小麦農林26号	+	-	+
31	小麦農林61号	+	-	+
32	春のかがやき	+	-	+
33	ハルユタカ	+	+	+
34	春よ恋	+	+	+-
35	バンドウワセ	+	-	+
36	ふくさやか	+	-	+
37	ふくほのか	+	-	+
38	ホクシン	+	-	+
39	ホロシリコムギ	+	-	+
40	ミナミノカオリ	+	-	+
41	ゆきちから	+	-	+
42	ユメアサヒ	+	-	+
43	1CW	+	+-	+-
44	ASW	+-	+-	+-
45	DNS	+-	+-	+-
46	HRW	+	-	+-
47	PH	+-	+-	+
48	WW	+	-	+

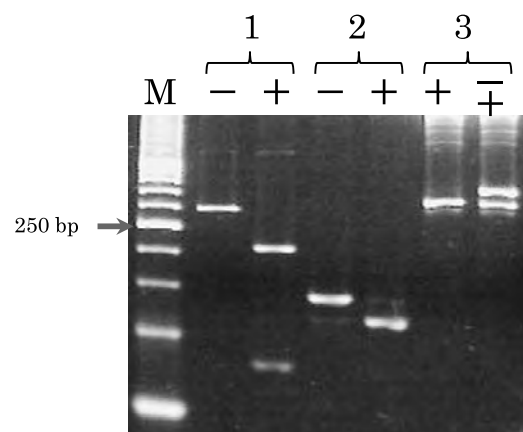
+, -はそれぞれ制限酵素で切断されるものと切断されないものを示し, '+-'は両方の遺伝子型が含まれることを示す。43~48は2007年輸入の銘柄を使用。1CW: No.1 Canada Western Red Spring; ASW: Australian Standard White; DNS: Dark Northern Spring; HRW: Hard Red Winter; PH: Prime Hard; WW: Western White.

った。

また、開発したマーカーのコムギに対する特異性を調べるため、オオムギ「イチバンボシ」, 「マンネンボシ」, 「カシマムギ」, 「スカイゴールド」, 「ダイシモチ」, 「シュンライ」, イネ「コシヒカリ」, 「日本晴」, 「モチミノリ」, ダイズ「ニシムスメ」, 「アキシロメ」, 「タマホマレ」, 「フクユタカ」, 「エンレイ」, 「サチユタカ」, トウモロコシ(市販品), ソバ(市販品)を用いて増幅産物の有無を確認した。

2) 結果および考察

8品種間で1品種に特異的なSNPを重点的に対象としてプライマー設計と制限酵素の検索を行い、国内42品種・6輸入銘柄の遺伝子型を調査した。ほとんどのマーカーは複数の品種で同じ遺伝子型を示し、1品種または少数品種に特異的なマーカーではなかった。しかし、国内42品種間で「ニシノカオリ」に特異的なマーカー、「春よ恋」, 「ハルユタカ」を簡易に識別するマーカーセットを開発することが可能であった(第20, 21表)。「ニシノカオリ」を識別するマーカー Ch2-Bsc4I は、histon H2A で検出された Calingiri に特異的なSNPをマーカー化したもので、国内品種では「ニシノカオリ」のみが異なるパターンを示した。また、「春よ恋」, 「ハルユタカ」を識別するマーカー dCh2-HpaII および Cs-SacII はそれぞれ histon H2A, 1-SST で見出されたSNPを



第9図 3組のCAPSマーカーによる検出パターン
M: 50bp ladder marker; 1. Ch2-Bsc4I; 2. dCh2-HpaII; 3. Cs-SacII. +, -はそれぞれ制限酵素で切断されるものと切断されないものを示し, '+-'は両方の遺伝子型が含まれることを示す。

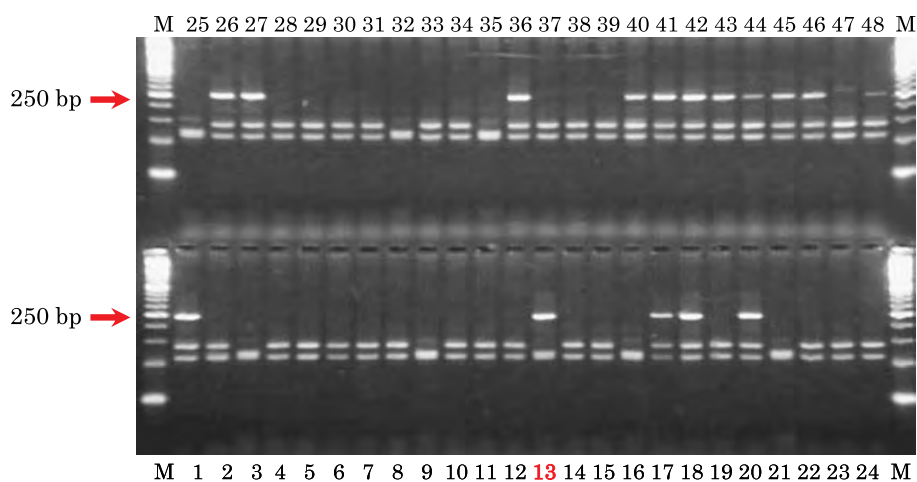
マーカー化したものである。いずれもアガロースゲル電気泳動によって明確にバンドパターンを見分けることが可能であり、簡易な識別法として利用できると考えられた（第9図）。

また、「さぬきの夢2000」を識別するマーカーセットを開発した（第22表）。マーカーRLK Idは、塩基配列の品種間差異が非常に豊富であったRLK-R1において設計されたIn/Delマーカーであり、244bpの産物について品種間で増幅の有無に違いが生じる。MAD2A1428-BseGIは供試した8品種の中では、「さぬきの夢2000」のみに違いが見られたwMAD2-A1のSNPを利用したCAPSマーカーである。2組の

マーカーを用いてマルチプレックスPCRを行い、制限酵素BseGIで処理することで、国内42品種および6輸入銘柄の間で「さぬきの夢2000」のみが異なるバンドパターンとなり、識別することが可能である（第10図）。「さぬきの夢2000」は香川県で育成されためん用品種（2003年品種登録）であり、香川県内においてのみ栽培、流通するブランド品種として知られている。品種名を表示して販売されている小麦粉やうどん、菓子類などの加工食品も多く、それらの流通量が生産量を明らかに上回り、偽装表示が散見される事態となったことから、品種識別技術は重要なツールとして求められていた。「さぬきの夢

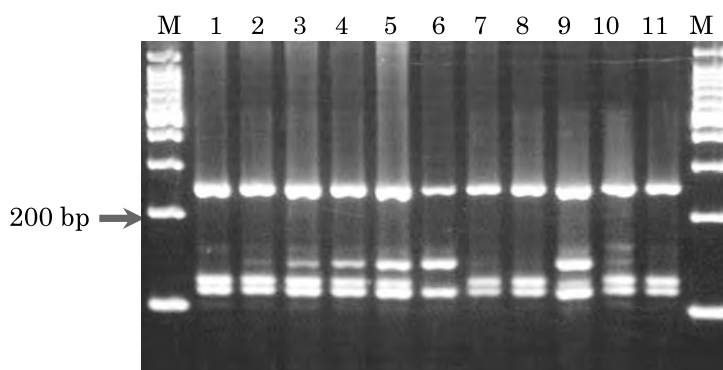
第22表 「さぬきの夢2000」を識別するためのIn/DelマーカーおよびCAPSマーカー

マーカー名	アニーリング温度(°C)	プライマー配列(5'-3')	増幅産物長(bp)
RLK Id	60	フォワード CCTGCCTTAGCAACACAACA	244
		リバーズ GGTCCACTGCCTTCACATCT	
MAD2A1428-BseGI	60	フォワード ATTCACTCATCCTCCGTCCA	275
		リバーズ AACAGTACAGGTTTTGGTAGACG	



第10図 「さぬきの夢2000」(No.13)の識別マーカーセットによる検出パターン

M: 50bp ladder marker; 1. アブクマワセ; 2. あやひかり; 3. イワイノダイチ; 4. キタカミコムギ; 5. キタノカオリ; 6. きたほなみ; 7. きたもえ; 8. きぬあずま; 9. きぬいろは; 10. きぬの波; 11. キヌヒメ; 12. コユキコムギ; 13. さぬきの夢2000; 14. しゅんよう; 15. シラサギコムギ; 16. シラネコムギ; 17. シロガネコムギ; 18. タイセツコムギ; 19. ダイチノミノリ; 20. タクネコムギ; 21. ダブル8号; 22. タマイズミ; 23. チクゴイズミ; 24. チホクコムギ; 25. つるびかり; 26. ナンプコムギ; 27. ニシノカオリ; 28. ニシホナミ; 29. ネバリゴシ; 30. 小麦農林26号; 31. 小麦農林61号; 32. 春のかがやき; 33. ハルユタカ; 34. 春よ恋; 35. バンドウワセ; 36. ふくさやか; 37. ふくほのか; 38. ホクシン; 39. ホロシリコムギ; 40. ミナミノカオリ; 41. ゆきちから; 42. ユメアサヒ; 43. No.1 Canada Western Red Spring; 44. Australian Standard White; 45. Dark Northern Spring; 46. Hard Red Witer; 47. Prime Hard; 48. Western White.



第11図 「さぬきの夢2000 (SY2000)」の識別マーカーセットによる識別例

M: 100bp ladder marker

- | | | |
|---------------------------------|---------------------|----------------|
| 1. 小麦粉 (SY2000) | 6. 小麦粉 (ASW) | |
| 2. 小麦粉 (SY2000 : ASW = 95 : 5) | 7. ゆでうどん | } SY2000使用の市販品 |
| 3. 小麦粉 (SY2000 : ASW = 90 : 10) | 8. 菓子A | |
| 4. 小麦粉 (SY2000 : ASW = 75 : 25) | 9. 菓子B | |
| 5. 小麦粉 (SY2000 : ASW = 50 : 50) | 10. 菓子C | |
| | 11. 小麦粉 (さぬきの夢2009) | |

2000」に意図的に混ぜられる可能性が高いものとしては、めん用の主要な輸入銘柄であるASWがあり、これらを簡易に識別できることが重視される。「さぬきの夢2000」に対してASWを5、10、25、50%の比率でブレンドした小麦粉から抽出したDNAを用い、開発したマーカーセットによって検出したところ、ブレンド比率に比例してASWのパターンが混合した状態で表され、5%程度のブレンド比率であっても検出することが可能であった(第11図, No.1~6)。「さぬきの夢2000」を使用したことが表示された市販の加工食品4種類を供試した場合では、3種類の食品において「さぬきの夢2000」のバンドパターンを検出することができ、その他1種類は表示と異なることが示唆された(第11図, No.7~10)。また、後継品種として今後、「さぬきの夢2000」に代わり普及が見込まれている「さぬきの夢2009」の遺伝子型を確認したところ、「さぬきの夢2000」と同型であったことから、本マーカーセットは将来的に継続して利用することが可能と考えられた。

前章において開発されたSSRマーカーでは、基本的に10組のマーカーすべてを用いて決定された遺伝子型の組合せから品種を同定する必要がある、詳細な遺伝子型の決定にはDNAシーケンサーを使用するなど、コストや時間がかかることが欠点である。食品表示などの検査では、多数の検体を対象とする

場合も想定され、簡易・迅速に識別することが重要となる。SNPを基に開発されたマーカーでは、アガロースゲル電気泳動法により識別できることや、1~2組のマーカーで識別できるため、容易にマルチプレックスPCRを行うことが可能であるなど、SSRによる識別技術と比較して低コストかつ時間短縮が可能となり、特定品種の簡易識別法として有用であると考えられた。しかし、より多くの遺伝子座を検出し遺伝子型を決定することで、品種識別の精度は高まることから⁵⁶⁾、簡易識別法とSSRによる詳細な品種識別法を適宜、併用することが望ましい。

V SNPを用いた特定コムギ品種の定量技術

1 リアルタイムPCRを用いた標的遺伝子領域の検出法の開発

コムギの加工食品は市場に流通するまでに多様な工程を通過する。その間に、原材料品種の取り違いや製造時の意図しないコンタミネーションが発生する可能性があり、品種の純度を維持するのが困難となる場合が想定される。これらの問題は、香川県のブランド品種「さぬきの夢2000」において、品種の「100%使用」表示に対する許容範囲の設定に際して混乱をもたらす要因となっており、非意図的な混入量を調査するため、品種の定量技術が求められている。本節では、リアルタイムPCRを利用し、前章で

見出されたSNPの定量的検出法の開発を行った。

1) 材料および方法

Primer Express (ABI) を用いて、マニュアルで推奨される標準的な設定に従い、リアルタイムPCRのためのプライマーおよびプローブを設計した。プローブは5'末端に蛍光色素FAMまたはVICを付与し、3'末端に非蛍光性消去剤および Minor Groove Binder (MGB) を付与した TaqMan MGBプローブとした。

リアルタイムPCRによる定量性の確認は、「チクゴイズミ」, 「ふくさやか」, 「ホクシン」, 「イワイノダイチ」, 「さぬきの夢2000」, 「きたほなみ」, 「きたもえ」, 「小麦農林61号」, 「さぬきの夢2000」, 「シラネコムギ」, 「シロガネコムギ」, 「つるぴかり」, 「ユメセイキ」, ASW (2008年輸入), ASW (2009年輸入) の15品種・銘柄を用いて行った。国内13品種は(独)農研機構・近畿中国四国農業研究センターで維持管理されている種子を用い、Ⅲ-2節と同様の方法で3粒からまとめてDNAを抽出した。銘柄はⅣ-2節に示した方法と同様にしてDNAを抽出した。

リアルタイムPCRは、0.625 μ M primer set, 各0.5 μ M MGBプローブ, 12.5 μ l *Premix EX Taq* (Takara Bio), 1.5 μ l ROX Reference Dye, 25ng鋳型DNAを含む25 μ lの溶液を調整し、ABI Prism 7000 (ABI) を用いて行った。反応条件は、95°C 1分間, (95°C 5秒間, 60°C 31秒間) \times 40サイクルとした。解析はSequence Detection System (ABI) によって行った。Threshold Lineの設定はKuribara *et al.*¹⁹⁾ を参考として実施した。1反応プレート内において各サンプル3反復反応させ、それらの平均値を算出した。ネガティブコントロールとして超純水を用いた。

設計したプライマーによる増幅産物の塩基配列を確認するため、「チクゴイズミ」, 「ホクシン」, 「イワイノダイチ」, 「さぬきの夢2000」, 「シラネコムギ」, 「タマイズミ」の6品種を供試し、4 pmol primer set, 0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 1 \times PCR Buffer, 0.4 units AmpliTaq Gold DNA Polymerase (ABI), 40ng鋳型DNAを含む20 μ lの溶液を調整してPCR反応を行った。PCR反応にはTaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (Takara Bio) を用い、反応

条件は94°C 9分間, (94°C 30秒間, 60°C 30秒間, 72°C 30秒間) \times 30サイクル, 72°C 7分間とした。増幅産物は3%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色し確認した後にゲルから切り出し、pGEM-T Easy Vector System I (Promega) およびECOS competent *E. Coli* DH5a (ニッポンジーン) を用いてクローニングした。各品種8コロニーを採取して挿入を確認した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを精製し、Ⅳ-1節と同様にしてシークエンス反応を行い、塩基配列を解析した。

2) 結果および考察

前章において、各種の遺伝子領域でコムギ8品種間におけるSNPの探索を行ったところ、histon H1を対象に解読された2530bpの塩基配列で、多型はまったく検出されなかったことから、コムギ品種に共通の内部標準としてhiston H1を選定した。また、Ⅳ-2節において、「さぬきの夢2000」を識別するためにマーカー化したwMAD2-A1上のSNPを利用し、定量化のための指標とした。Primer Expressを用いて、両遺伝子上にリアルタイムPCR用のプライマーおよびTaqMan MGBプローブを設計することが可能であり、内部標準 (*H1-IPC*) は80bp, 識別指標 (*MAD*) は119bpの領域が対象とされた(第23表)。遺伝子座*MAD*は、「さぬきの夢2000」を含む7品種の遺伝子型 (*MAD-V*型) およびその他31品種および5輸入銘柄の遺伝子型 (*MAD-N*型)(第24表)の2種類に分類されることから、それぞれに対してプローブを設計した。

これらのプライマーおよびプローブを用いて15品種・銘柄を対象にリアルタイムPCRを行ったところ、すべての品種・銘柄で良好な増幅が見られた。Threshold Lineと増幅曲線の交点であるCt値は、サンプル間で若干のばらつきがあったが、*H1-IPC* および*MAD*の両遺伝子座において各品種内で大きなばらつきはなく安定した値であったことから、初期鋳型量の差異に基づくものであり、両遺伝子それぞれにおいてコピー数の品種間差異はないと考えられた(第12図A)。増幅産物をアガロースゲル電気泳動したところ、*H1-IPC*, *MAD*ともに非特異的な増幅は見られず、目的とする長さの産物のみが得られ

第23表 histon H1およびwMAD2-A1において設計されたリアルタイムPCRに用いるプライマー対とプローブ

遺伝子座	プライマーおよびプローブ配列(5'・3')	増幅産物長(bp)	
<i>H1-IPC</i>	フォワード	CGCGCTTCCTTGAATTGAC	80
	リバーズ	CATTCGCATGCAGGTTTCCT	
	TaqMan MGB プローブ	TCTCCCTTTGTCTGTCTCGC	
<i>MAD</i>	フォワード	CTGCTCCATGAAACCTAATGCTAA	119
	リバーズ	GGGTCACATCCACAGGTCCT	
	TaqMan MGB プローブ(V型)	GACGACTTGGATGAGC	
	TaqMan MGB プローブ(N型)	GACGACTTGGACGAGC	

第24表 主要国内品種および輸入銘柄のMADにおける遺伝子型の分類

MAD遺伝子型	品種および銘柄		
V型	ダブル8号	きぬいろは	つるびかり
	春のかがやき	さぬきの夢2000	
	イワイノダイチ	シラネコムギ	
N型	アブクマワセ	きたほなみ	シロガネコムギ
	あやひかり	キタカミコムギ	しゅんよう
	チクゴイズミ	きたもえ	タクネコムギ
	ふくほのか	キタノカオリ	タマイズミ
	ふくさやか	コユキコムギ	ゆきちから
	春よ恋	ミナミノカオリ	ユメアサヒ
	ハルユタカ	ナンブコムギ	ユメセイキ
	ホクシン	ネバリゴシ	1CW
	ホロシリコムギ	ニシホナミ	ASW
	きぬあずま	ニシノカオリ	DNS
	キヌヒメ	小麦農林61号	HRW
	きぬの波	シラサギコムギ	WW

V型：「さぬきの夢2000」の遺伝子型

N型：「さぬきの夢2000」と異なる遺伝子型

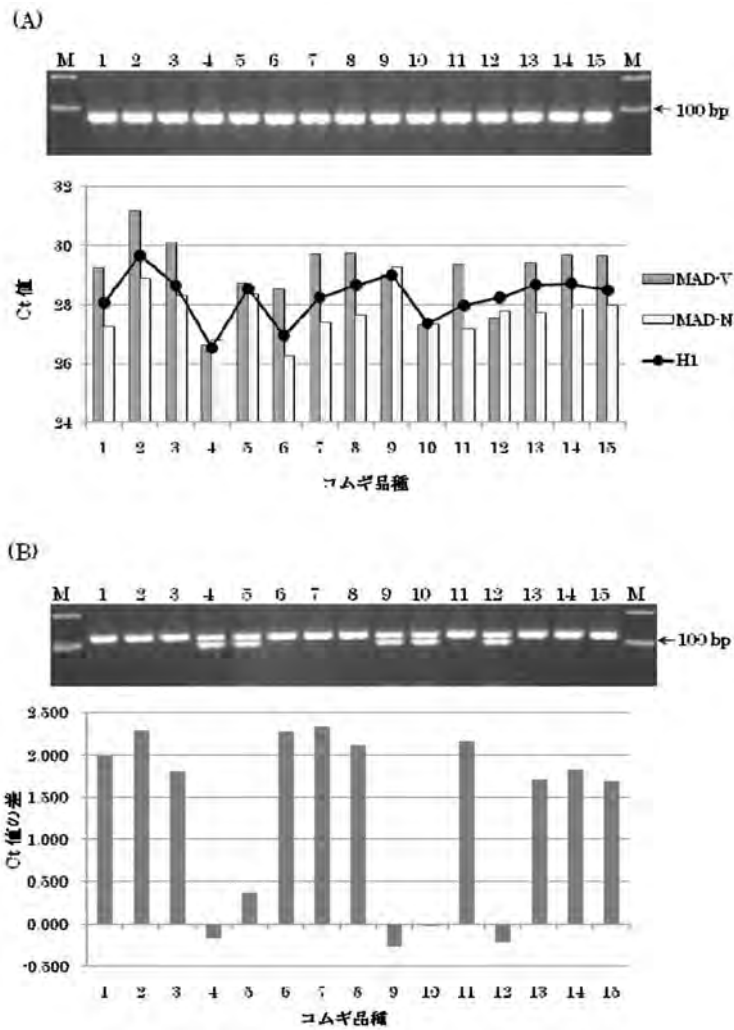
1CW：No.1 Canada Western Red Spring；ASW：Australian Standard White；DNS：Dark Northern Spring；HRW：Hard Red Winter；WW：Western White.

ていた。また、MAD-N型の10品種（No.1, 2, 3, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 15）では、MAD-VとMAD-NのCt値に約2サイクルの差があり、MAD-V型の5品種（No.4, 5, 9, 10, 12）ではCt値の差は見られなかった（第12図B）。

MAD2遺伝子はA, B, Dゲノムにそれぞれ同祖遺伝子が存在するため、プライマーの設計場所によっては3遺伝子に由来する増幅産物が得られる。リアルタイムPCR用に設計されたプライマーはA, B, Dゲノムの各遺伝子を増幅させる可能性が高い領域に設計されていたため（第13図）、本プライマーを用いた増幅産物をクローニングし、塩基配列を確認したところ、リバーズプライマーの5'側が一致していないBゲノムの同祖遺伝子は増幅されていなかっ

たが、AゲノムおよびDゲノムの遺伝子に由来する産物が含まれていた。実際にリアルタイムPCRによって得られた増幅産物を制限酵素BseGIによって処理した後にアガロースゲル電気泳動すると、SNPを認識して切断されるAゲノム由来の増幅産物と、切断されないDゲノム由来の増幅産物が含まれるために2種類のバンドが検出された（第12図B）。また、H1-IPCを検出するプライマーによって増幅された産物の塩基配列を解読した結果、目的の領域であることが確認された。

PCR法を用いた定量技術は遺伝子組み換え体(GMO)を検出する手法としてよく利用されてきた^{24, 63)}。リアルタイムPCRは、検出のためのプライマーおよびプローブの設計を綿密に行い、検量線

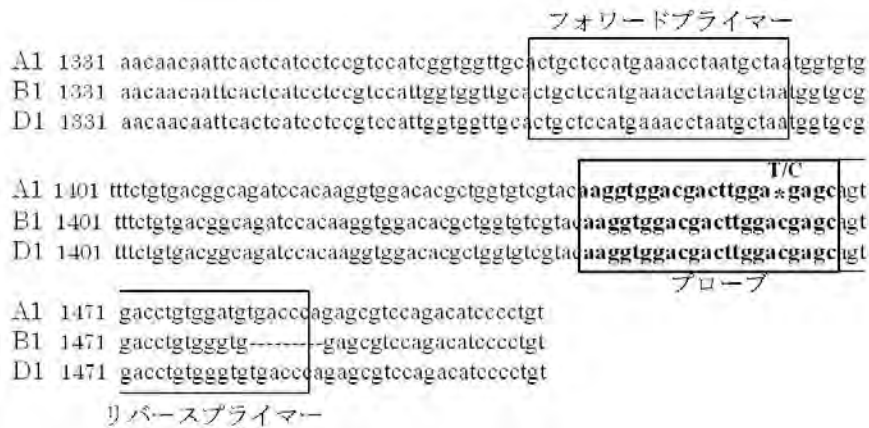


第12図 リアルタイムPCRによるコムギ15品種のCt値および増幅産物のアガロースゲル電気泳動図

(A) H1-IPCおよびMAD-V, MAD-NのCt値とH1-IPCによる増幅産物の電気泳動図

(B) MAD-VとMAD-NのCt値の差およびMADによる増幅産物の電気泳動図 (制限酵素BseGI処理後)

1. チクゴイズミ; 2. ふくさやか; 3. ホクシン; 4. イワイノダイチ; 5. きぬいろは; 6. きたほなみ; 7. きたもえ; 8. 小麦農林61号; 9. さぬきの夢2000; 10. シラネコムギ; 11. シロガネコムギ; 12. つるびかり; 13. ユメセイキ; 14. ASW (2008); 15. ASW (2009)



第13図 MAD2遺伝子において設計されたプライマーおよびTaqMan MGBプローブの位置

作成のための標準試料やPCR反応条件を十分に最適化することで、極めて正確な定量が可能となるため、現在では主要な分析法となっている^{19, 44)}。一方、ヨーロッパではパスタの品質管理のため、製造過程においてデュラムコムギに混入したパンコムギを定量的に検出するための手法としてリアルタイムPCRが利用されている¹⁾。また同様に、アレルギー物質の検出のため、パンコムギやオオムギ、ライムギなどの *Triticum* 属の植物を食品中から検出する手法が開発されており^{49, 50)}、リアルタイムPCRはGMOのみならず、食品中の特定物質を定量的に検出する手法として有用である。

本節においては、内部標準とする「histon H1」ならびに「さぬきの夢2000」の定量指標である wMAD2-A1のSNPに対してリアルタイムPCRのためのプライマー・プローブをうまく設計することができ、両遺伝子座における良好なPCR反応を確認することができた。また、遺伝子座MADにおけるV型品種とN型品種の差を明確に検出することができたため、これらの差を用いて「さぬきの夢2000」を定量的に検出することが可能であると考えられた。

2 品種の相対定量法の開発と検出下限の評価

前節において、リアルタイムPCRを用い、wMAD2-A1遺伝子のSNPを定量的に検出できる可能性が見出された。本節では「さぬきの夢2000」の小麦粉に対して他品種の小麦粉を様々な比率で混合した模擬混入サンプルを用いて品種の相対定量法を開発し、その検出感度を評価した。

1) 材料および方法

ビューラーテストミルによって製粉した「さぬきの夢2000」、「チクゴイズミ」、「小麦農林61号」の小麦粉、および香川県内の製粉会社で製粉されたASW (2009年輸入) を供試した。「さぬきの夢2000」の小麦粉を基本に、その他の2品種・1銘柄が各々全体の0, 20, 50, 80, 100%の比率で含まれるものを調整し、150mgとした小麦粉からIV-2節で示した方法でDNAを抽出した。また、「さぬきの夢2000」の小麦粉を基本に、全体の1, 3, 5, 8, 10, 15, 20%の比率になるように「チクゴイズミ」を混合した小麦粉150mgからそれぞれDNAを抽出

し、供試した。リアルタイムPCRは前節と同様の方法で実施し、Ct値を決定した。検量線の作成には、「さぬきの夢2000」と「チクゴイズミ」を等量混合した小麦粉からDNAを抽出して適宜希釈し、250, 50, 10, 2, 0.4, 0 ngのDNAを供試してPCR反応を行い、それぞれのCt値を決定した。

2) 結果および考察

検量線作成用のDNA 6種類とともに、「さぬきの夢2000」と「チクゴイズミ」の小麦粉および両品種を用いた3種類のブレンド小麦粉を用いて、前節で開発されたプライマー・プローブ (第23表) によりリアルタイムPCRを行った。決定されたCt値から、「さぬきの夢2000」に対して混合された「チクゴイズミ」の比率を相対的に算出する方法を検討した (第25表)。H1-IPC, MAD-VおよびMAD-NのCt値についてそれぞれの検量線からLogの値を求め、定量値 (H, V1, N1) を算出した。その後、V1およびN1を内部標準Hによって除し、初期鋳型量のばらつきを補正した (V2, N2)。前節においてMAD-N型品種とMAD-V型品種の間で差異が確認されたCt値の差をそれぞれ算出し (D1)、「さぬきの夢2000」のみから得られたD1値を基準としてその他のサンプルのD1値の差を算出することで、相対定量値D2とした。混合比率に応じて、D2値が0.305~1.190と段階的に変動しており、含まれる遺伝子型の差を定量的に検出していると考えられた。これらD2値と混合比率の間には高い相関があり ($R^2 > 0.98$)、再現性も良好であった (第14図A)。また、ブレンドする品種を「小麦農林61号」または複数品種が含まれるASWとした場合でも同程度の相関が見られたことから (第14図B)、開発したプライマー・プローブは目的とする遺伝子領域を正確に検出することが可能で、定量性に優れた技術であると考えられた。

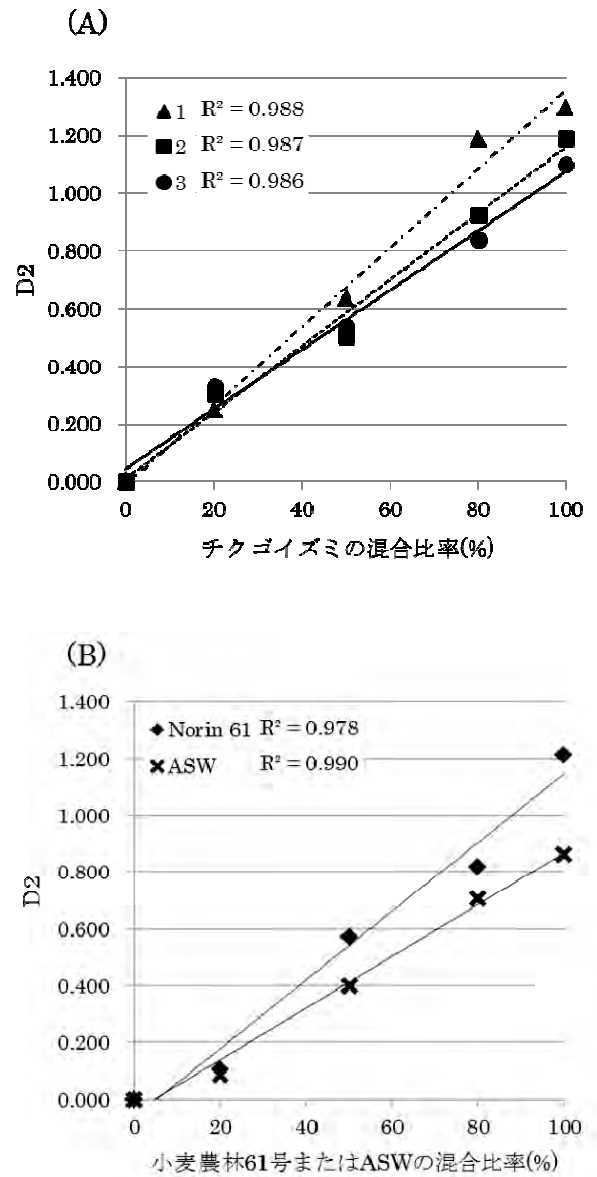
本技術の検出下限を評価するため、低混合比率の小麦粉を用いて定量を行ったところ、同一サンプルであっても5回の実験間で値の変動は大きく、安定しない傾向にあった (第26表)。1%および3%の混合比率の小麦粉では特に変動が大きく、基準とする「さぬきの夢2000」のD1値を下回る場合があり、定量は困難であると考えられた。また、5反復の平

第25表 リアルタイムPCRを用いたブレンド小麦粉における品種の相対定量法

DNA量 (ng)	H1-IPC			MAD-V			MAD-N			MAD-Vと MAD-Nの 差		S(100%)に 対する相対値 D2 (D1*)	
	Log	Ct	定量値 (H)	Log	Ct	定量値 (V1)	Log	Ct	定量値 (N1)	補正值 N2 (N1/H)	D1 (N2-V2)		
100:0		30.03	24.77	28.32	1.528	33.76	1.363	28.43	1.276	18.87	0.762	-0.601*	0.000
80:20		30.22	21.88	28.68	1.432	27.05	1.236	28.30	1.313	20.58	0.941	-0.296	0.305
50:50		29.89	26.99	28.65	1.439	27.48	1.018	28.01	1.396	24.88	0.922	-0.096	0.505
20:80		30.03	24.72	29.20	1.290	19.49	0.789	27.85	1.441	27.58	1.116	0.327	0.928
0:100		29.91	26.70	29.41	1.232	17.07	0.639	27.59	1.516	32.80	1.229	0.589	1.190
250		2.398	26.40	24.95				24.39					
50		1.699	29.01	27.78				26.99					
10		1.000	31.38	30.40				29.49					
2		0.301	33.95	32.97				31.93					
0.4		-0.398	36.46	35.25				34.15					
傾き				-3.584				-3.498					
切片				35.023				32.889					
相関係数				1.000				0.999					

S：さぬきの夢2000；C：チクゴイズミ

** S, Cの等量ブレンド小麦粉から抽出したDNAを使用。



第14図 リアルタイムPCRを用いて算出したD2値と品種混合比率との相関

- (A) 「さぬきの夢2000」と「チクゴイズミ」のブレンド小麦粉
▲：1反復目，■：2反復目，●：3反復目
- (B) 「さぬきの夢2000」と「小麦農林61号」またはASWのブレンド小麦粉

均値と混合比率の相関係数は約0.92であり、数%程度の差異を正確に見分けることは困難であると考えられた(第15図)。

リアルタイムPCRを用いた遺伝子組み換え体(GMO)の定量分析では、PCR反応に供試する初期鋳型量が定量値に大きな影響を与えることが示唆されており、厳密な定量を行うためには、最適な増幅産物長を設定することや供試するDNA量を十分に

第26表 「さぬきの夢2000」と「チクゴイズミ」のブレンド小麦粉を用いた低混合比率におけるD2値の再現性

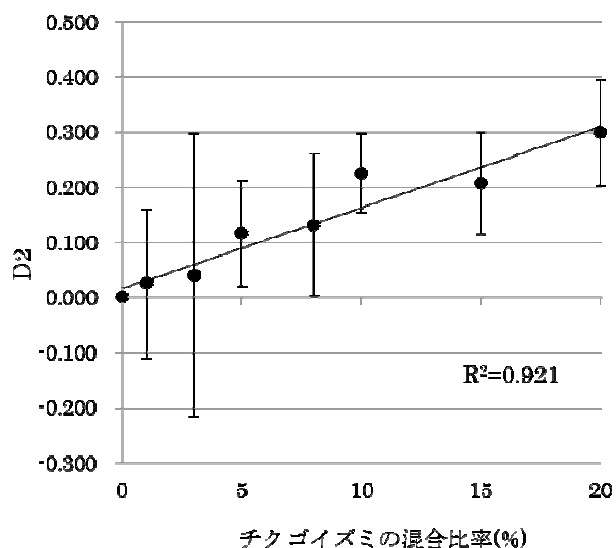
チクゴイズミの混合比率 (%)	D2値の平均 (5反復)	標準偏差	変動係数 (%)
1	0.025	0.134	535.281
3	0.040	0.257	640.902
5	0.116	0.095	81.936
8	0.132	0.130	98.786
10	0.226	0.071	31.441
15	0.207	0.093	44.790
20	0.299	0.096	32.228

VI 総合考察

コムギは米や野菜のように植物体のまま市場に流通することはほとんどなく、その加工食品は多種多様に存在する。本研究は、近年の消費者の食に対する関心の高さを背景とし、食品表示の信頼性の確保に寄与することを目的として実施されたが、コムギ品種の識別にあたり加工食品を対象とすることは新たな知見と工夫の積み重ねを必要とした。

始めに、コムギ加工食品からDNAを抽出し、DNA品種識別の適用可能性を明らかにした。加工食品からのDNA抽出は既存の手法を用いて行うことが可能であった。加工工程の異なる食品ではDNAの断片化の程度が異なり、高温焼成されたものほど著しく断片化していることが確認された。また、DNAマーカーによって増幅可能な長さが食品により異なることが明らかとなり、めん類やパン類、菓子類などの主要なコムギ加工食品に対してDNA品種識別技術を適用するため、DNAマーカーの増幅産物長を300bp程度までに設定することを識別技術の条件とした。一方、加工食品からのDNA抽出法は、現在では、小麦粉、めん類、パン類のみならず、最も多様な菓子類を対象とした場合でも、より簡易かつ迅速に行うことが可能となり、識別技術の適用範囲が大きく拡大することとなった²⁷⁾。

日本におけるコムギの種子生産は、主要農作物種子法に基づく奨励品種制度によって管理されている。各都道府県は新しく開発された品種を奨励品種として採用すると、育成地から育種家種子の配布を受けて、原原種として増殖、維持、管理する。さらに、原原種を用いて原種を生産し、原種から一般栽培用種子を生産する。したがって、奨励品種としての採用が長期にわたるほど、各都道府県における管理の期間が長くなり、品種登録時に遺伝的に完全には固定していなかった遺伝子座、あるいは自然突然変異が生じた座位において、地域ごとに独自の分離と固定が生じ、同じ品種であっても地域間での遺伝的な違いが存在する可能性がある。DNAを用いて正確な品種識別を行うために、それらの前提を踏まえた上で、どのようなDNA領域を指標として利用するかが重要である。



第15図 「さぬきの夢2000」と「チクゴイズミ」のブレンド小麦粉を用いて算出したD2値と混合比率との相関

D2: 5反復の平均値。垂直バーは標準偏差を示す。

検討することが重要である¹¹⁾。本節では、20～30%程度の混合比率の差異があるサンプル間においては、相対定量値 (D2) と混合比率には高い相関が得られており、優れた定量性が確認された。一方、20%以下の混合比率で設定されたサンプル間では定量値のばらつきが大きかったことから、正確な定量を行うためには、より厳密な反応条件の検討が必要であると考えられた。

SSRマーカーは多型性が高く、信頼度の高いDNAマーカーとして、ヒトのDNA鑑定で実用化されており、果樹やダイズ、バレイショなどの農産物の品種識別においても主要な技術となっている^{2, 16, 38, 57}。コムギについてもSSRマーカーは多数開発されているが^{40, 42, 45, 46}、近年ではEST配列から作出されたものも多い^{9, 10, 30, 60}。EST-SSRはゲノム由来のSSRと比較して種内の多型性が低いが、これは前者が翻訳領域であることから保存性が高いものと考えられている^{6, 51}。したがって、種間の識別においてより正確な解析ができることや、実際に遺伝子間の機能的な変異を検出できる可能性があることから、遺伝資源の多様性評価や遺伝子機能の解析に有用なマーカーである^{61, 62}。

そこで、国内コムギ品種の中には60年間にわたって現在でも栽培されている品種もあることから、品種内多型が少ないことが期待されるEST-SSRに着目した。加工食品に適用できる品種識別技術として、増幅産物長を300bp程度とし、コムギゲノムへの特異性が確認できた10組のEST-SSRマーカーを開発した。国内外のコムギ58品種を対象に作成した遺伝子型カタログでは、すべての品種を識別することはできなかったが、国内外品種の識別と、国内の主要品種を個別に識別することが可能となった。また、一部のEST-SSRマーカーを用いて、輸入コムギ銘柄において国外品種特有の遺伝子型を検出することができ、市販加工食品において国産コムギと輸入コムギの識別を容易に行うことが可能となった。日本におけるコムギの消費量のうち、輸入コムギは約85%を占めており、国産コムギを使用したと表示される食品の簡易検査法としての活用が期待される。

一方、開発したEST-SSRマーカーを用いて、26の府県から取り寄せたコムギ15品種の原種または原原種（59組合せ）の遺伝子型を調査した結果、品種内多型はほとんど検出されなかった。そのため、長期間にわたり高度に保存されているDNA領域であることが明らかとなり、品種識別マーカーとして適していることが証明された。ところが、本研究と同様にSSRを用いたカナダのデュラムコムギ品種の識別では、18品種のうち3品種で品種内多型があり、最も古い1936年の登録品種では8つのバイオタイプの存在が報告されている⁴¹。SSRマーカー8組のうち、

EST-SSRは5組含まれていたが、品種内多型が確認されたマーカー3組のうち2組はEST-SSRであった。塩基配列の保存性が高く、比較的安定して遺伝すると考えられるEST-SSRの変異が確認されたことは、当時のカナダでは品種の登録、配布時における遺伝的な固定度が低かったために、種子の維持管理の過程で遺伝的に分離したことが原因と考えられる。そのため、このような外国で育成された品種の遺伝子型の判定にあたっては、開発したEST-SSRマーカーについても注意を要すると考えられた。

また、近縁度が高まっている現在の栽培品種間において、コムギの各種遺伝子領域には多数のSNPが存在することが明らかとなった。これらの遺伝的な多様性はより高精度なDNA品種識別を可能にすると考えられ、蓄積した多型情報は将来的に普及する品種に対しても有用な識別マーカーになり得る可能性がある。本研究では、現在、需要が高い「さぬきの夢2000」を始めとする4品種について、EST-SSRマーカーによる識別と比較して、簡易かつ迅速に利用できる識別技術を開発することができた。また、SNPを利用して、リアルタイムPCR法による「さぬきの夢2000」の定量技術を開発でき、「さぬきの夢2000」の育成者である香川県や、食品検査機関において活用が期待される。SNPはSSRと比較して既存の情報はまだ少ないものの、数の多さや豊富な多型性などDNAマーカーとしての利点を多く備え、その汎用性は品種の識別に大きな効力をもつと考えられる。

品種の定義として、農業形質や外観、品質などの表現型の均一性は大きな要素である。それらに関連していることが明確な遺伝子をマーカーとすることができれば、品種の識別はもちろんのこと、品種開発におけるMAS (Marker assisted selection) としての利便性や、普及後の形質の維持など、様々な場面で有効な手法になると考えられる。したがって、今後のゲノム研究の進展に伴って遺伝子機能の詳細な解明が進めば、実用形質と関連したDNAマーカーを利用した識別技術も期待できると考えられる。一方、実用形質に的を絞ったDNAマーカーのみでは、近縁度が高まるにつれて品種間の相違が検出されなくなる可能性があり、品種識別を目的とした場合にはゲノム上のあらゆる品種間変異を利用するこ

ともまた必要となってくる。近年では、ゲノム中の転移因子であるレトロトランスポゾンを利用した手法によって品種固有のマーカーが開発されており、ブランド品種の保障のためにより強力なツールを開発することも可能となった^{29, 39, 58)}。このように様々なDNAマーカーが利用できる中では、識別技術の使用目的に応じて最適な組合せを選択し、活用することが大切である。しかしながら、DNAを用いた品種識別技術では、検出するDNA領域の数を増やすことによって、同一品種と判断する確率を限りなく100%に近づけることは可能であるが、100%の判断を下すことは理論上、不可能である⁵⁶⁾。DNAマーカーによる品種の同定は絶対的なものではないことを考慮し、それ以外の情報を含めて総合的に判断する必要があることに注意したい。

摘 要

本研究は、国内コムギ品種およびそれらを使用しためんやパン、菓子などの加工食品について、原材料品種や産地に関する表示の信頼性を確保するため、コムギ品種識別技術を開発することを目的として実施した。まず初めに、コムギ加工食品から抽出したDNAの状態の確認とDNAマーカーの適用可能性を明らかにした。次に、EST-SSRマーカーを開発し、国内市場に流通する主要品種を網羅した品種識別技術を開発した。また、各種遺伝子領域からSNPを探索し、特定品種を簡易迅速に識別するDNAマーカーを開発するとともに、リアルタイムPCR法を用いた定量技術を開発した。研究成果を要約すると、以下の通りである。

1. 既存のDNA抽出法を用いて、うどんやパン、クッキーなどのコムギ加工食品からDNAを抽出することが可能であった。
2. 製粉された小麦粉ではDNAの断片化はほとんど確認されなかったが、パイなどの高温で加熱された食品ほどDNAは著しく断片化していた。
3. DNAの断片化の程度が異なる多様なコムギ加工食品に対して、一般的に適用できるDNAマーカーの増幅産物長は、300bp程度であると推測された。
4. 増幅産物長を300bp程度に設定し、イネやオオ

ムギなどのDNAは検出しないコムギ特異性の高い10組のEST-SSRマーカーを開発した。

5. EST-SSRマーカーを用いて、コムギ58品種（国内41，国外17）に関する遺伝子型カタログを作成した。これらを基に、国内外品種を識別でき、「ホクシン」や「小麦農林61号」などの主要国内品種を識別することが可能となった。
6. 原材料品種名などの表示がある市販加工食品において、EST-SSRマーカーによる品種識別が可能であることを確認した。
7. 国内15品種の原種・原原種を用いて、EST-SSRマーカーによる品種内多型の有無を調査し、これらの遺伝子座における品種内多型は極めて少ないことを確認した。
8. 複数の品種で構成される輸入コムギ銘柄5種類についてEST-SSRマーカーによる遺伝子型を調査し、各銘柄におけるパターンの特徴や、輸入年度間の遺伝子型の変動を明らかにした。
9. EST-SSRマーカーTaSE3は、主要な輸入コムギ銘柄において現在の国内品種では検出されない遺伝子型を示すことを確認した。
10. 6種類の遺伝子領域から、8品種間において合計169bpのSNPを見出した。これらの蓄積した多型情報をもとに、将来的に普及する品種に対しても有用な識別マーカーを開発できると考えられた。
11. SNPをDNAマーカー化することにより、パン用品種「ニシノカオリ」、「春よ恋」、「ハルユタカ」を、国内市場に流通する主要品種間において簡易迅速に識別できる技術を開発した。
12. SNPをもとに、めん用品種「さぬきの夢2000」を主要品種と簡易迅速に識別するマーカーセットを開発した。また、リアルタイムPCR法を用いてSNPを定量化し、「さぬきの夢2000」を定量する技術を開発した。

謝 辞

本論文は、岡山大学学位審査論文を基に編集、加筆したものである。学位論文を作成するにあたり、岡山大学教授田原誠博士に懇篤なる校閲を賜りました。同教授一瀬勇規博士、同教授加藤鎌司博士には

貴重なご助言とご校閲を賜りました。ここに謹んで深く感謝の意を表します。

本研究の端緒は近畿中国四国農業研究センターの矢野博博士から賜り、終始懇篤なる指導を賜りました。研究の着手にあたっては、同センターの池田達哉博士、荒木悦子博士に指導と助言をいただきました。研究の遂行にあたっては、同センターの石川直幸氏、高田兼則博士、谷中美貴子氏、香川県農業試験場の村上恭子氏、十鳥秀樹氏、河田和利氏、本田雄一氏に協力と助言をいただきました。また、SSRマーカーの開発にあたっては、野菜茶業研究所の福岡浩之博士に協力と援助をいただきました。コムギ原種および原原種の収集にあたっては多くの府県の担当各位に協力をいただきました。元近畿中国四国農業研究センター所長（現日本大学）鳥越洋一博士には助言と激励をいただきました。ここに各位に対して深甚なる感謝の意を表します。

なお、本研究は2006年度から2010年度にかけて実施された農林水産省委託プロジェクト「食品・農産物の表示の信頼性確保と機能性解析のための基盤技術の開発」の支援により行われた。

引用文献

- 1) Alary, R., A. Serin, M.-P. Duviau, P. Joudrier and M.-F. Gautier 2002. Quantification of Common Wheat Adulteration of Durum Wheat Pasta Using Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cereal Chem.* 79 (4) : 553–558.
- 2) 浅野尚樹・小曾納雅則・野口 健・伴 義之 2008. DNA分析によるバレイショ遺伝子型データベース化. *育種学研究* 10 : 63–69.
- 3) Cho, Y.G., T. Ishii, S. Temnykh, X. Chen, L. Lipovich, S.R. McCouch, W.D. Park, N. Ayres and S. Cartinhour 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 713–722.
- 4) DNA品種識別技術検討会 2003. 農林水産省品種登録ホームページ : <http://www.hinsyu.maff.go.jp/>
- 5) 独立行政法人 農林水産消費技術センター 2002. JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査分析マニュアル 改訂第2版.
- 6) Eujayl, I., M.E. Sorrells, M. Baum, P. Wolters and W. Powell 2002. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 104: 399–407.
- 7) 藤井 浩・山下浩之・藤田由美子・矢野 博・村上恭子・本田雄一・十鳥秀樹 2009. DNAマーカーによるタイピングデータを用いて複数品種が混合されている食品に含まれる原材料品種を判定するソフトウェアの開発と小麦加工品への適用. *DNA多型* 17 : 96–101.
- 8) Fukuoka, H., T. Nunome, Y. Minamiyama, I. Kono, N. Namiki and A. Kojima 2005. read2Marker: a data processing tool for microsatellite marker development from a large data set. *BioTechniques* 39: 472–476.
- 9) Gao, L.F., R.L. Jing, N.X. Huo, Y. Li, X. P. Li, R.H. Zhou, X.P. Chang, J.F. Tang, Z.Y. Ma and J.Z. Jia 2004. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1392–1400.
- 10) Gupta, P.K., S. Rustgi, S. Sharma, R. Singh, N. Kumar and H.S. Balyan 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol. Gen. Genomics.* 270: 315–323.
- 11) Gryson, N. 2010. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 2003–2022.
- 12) Hamilton, M.B., E.L. Pincus, A. Difiore and R. Fleischer 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* 27: 500–507.
- 13) Himi, E. and K. Noda 2004. Isolation and location of three homoeologous dihydroflavonol-4-reductase (DFR) genes of wheat and their

- tissue-dependent expression. *J. Exp. Bot.* 55: 365–375.
- 14) Huh, G.H., T. Nakayama, T. Meshi and M. Iwabuchi 1997. Structural characteristics of two wheat histone H2A genes encoding distinct types of variants and functional differences in their promoter activity. *Plant Mol. Biol.* 33: 791–802.
- 15) Kimbara, J., T.R. Endo and S. Nasuda 2004. Characterization of the genes encoding for MAD2 homologues in wheat. *Chrom. Res.* 12: 703–714.
- 16) Kimura, T., Y.Z. Shi, M. Shoda, K. Kotobuki, N. Matsuta, T. Hayashi, Y. Ban and T. Yamamoto 2002. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. *Breed. Sci.* 52: 115–121.
- 17) 小林俊一・吉田智彦 2006. RAPD分析による栃木県を中心とした関東周辺地域のムギ類優良品種識別. *日本作物学会紀事* 75: 165–174.
- 18) 國久美由紀・松元 哲 2004. DNA分析によるイチゴ品種の識別. *農業および園芸* 79(1): 180–184.
- 19) Kuribara, H., Y. Shindo, T. Matsuoka, K. Takubo, S. Futo, N. Aoki, T. Hirano, H. Akiyama, Y. Goda, M. Toyoda and A. Hino 2002. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Int.* 85: 1077–1089.
- 20) Lilienfeld FA 1951. H Kihara: Genome analysis in *Triticum* and *Aegilops*. X Concluding review. *Cytologia* 16: 001–123.
- 21) Luger, K., Madev A.W. and Richmond R.K. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251–260.
- 22) 丸山恵史 2003. 植物新品種育成者の権利保護とDNA品種識別技術. *育種学研究* 5: 127–135.
- 23) Matsuoka, T., Y. Kawashima, H. Akiyama, H. Miura, Y. Goda, Y. Kusakabe, K. Isshiki, M. Toyoda and A. Hino 2000. A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. *J. Food. Hyg. Soc. Japan.* 41: 137–143.
- 24) Matsuoka, T., H. Kuribara, H. Akiyama, H. Miura, Y. Goda, Y. Kusakabe, K. Isshiki, M. Toyoda and A. Hino 2001. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *J. Food. Hyg. Soc. Japan.* 42: 24–32.
- 25) Morimoto, R., T. Kosugi, C. Nakamura and S. Takumi 2005. Intragenic diversity and functional conservation of the three homoeologous loci of the KN1-type homeobox gene *Wknox1* in common wheat. *Plant Mol. Biol.* 57: 907–924.
- 26) 村上恭子・河田利和 2008. 市販キットを用いた小麦加工品からの簡便迅速なDNA抽出法. *香川県農業試験場研究報告* 59: 45–49.
- 27) 村上恭子・本田雄一・十鳥秀樹・藤田由美子 2010. 小麦品種判別のための菓子類からの簡便迅速なDNA抽出法. *DNA多型* 18: 89–92.
- 28) Murray M.G. and W.F. Thompson 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321–4325.
- 29) 中川 藍・山下裕樹・田原 誠・大山由美 2009. レトロトランスポゾンDNAマーカーを用いたアズキ品種「しゅまり」の識別. *DNA多型* 17: 85–91.
- 30) Nicot, N., V. Chiquet, B. Gandon, L. Amilhat, F. Legeai, P. Leroy, M. Bernard and P. Sourdille 2004. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theor. Appl. Genet.* 109: 800–805.
- 31) 西尾小作・中川元興・牛腸英夫・渡辺進二 1973. 採種地を異にする小麦農林61号の主要形質の差異について. *東海近畿農業試験場研究報告* 26: 98–126.
- 32) 農林水産省大臣官房統計部 (平成22年12月10日) 農林水産統計: 平成22年産4麦の収穫量. http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/index.html#y7
- 33) 農林水産省生産局 (平成20年3月) 水陸稲・麦類・大豆奨励品種特性表.

- 34) 農林水産省総合食料局（平成22年3月31日）麦の需給に関する見通し。 <http://www.maff.go.jp/j/press/soushoku/boueki/100331.html>
- 35) 農林水産省消費・安全局（平成20年3月19日）加工食品に係る原料原産地情報の積極的な提供について（通知）。 http://www.maff.go.jp/j/jas/kansi/gengen_suisho.html
- 36) 農林水産省消費・安全局（平成21年）農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS法）の一部を改正する法律（平成21年法律第31号）について。 http://www.maff.go.jp/j/jas/jas_gaiyou.html
- 37) 大坪研一 2003. 米, 米飯, 餅のDNA鑑定による品種判別技術. *ぶんせき* 2 : 77-82.
- 38) 小曾納雅則・木村鉄也・伴 義之 2003. Sattマーカーを利用したダイズ品種（登録品種および輸入加工品）の品種識別. *育種学研究* 5（別2） : 230.
- 39) 大江夏子・田原 誠・山下裕樹・丸谷 優・蔵之内利和 2004. レトロトランスポゾンを利用したサツマイモ加工品の原料品種判定. *育種学研究* 6 : 169-177.
- 40) Pestsova, E., M.W. Ganal and M.S. Roder 2000. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome* 43: 689-697.
- 41) Perry, D.J. 2004. Identification of Canadian durum wheat varieties using a single PCR. *Theor. Appl. Genet.* 109: 55-61.
- 42) Roder, M.S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.-H. Tixier, P. Leroy and M.W. Ganal 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
- 43) 齋藤 彰 2004. DNAマーカーによるイグサ品種の識別. *農業および園芸* 79（1） : 168-174.
- 44) Shindo, Y., H. Kuribara, T. Matsuoka, S. Furui, C. Sawada, J. Shono, H. Akiyama, Y. Goda, M. Toyoda and A. Hino 2002. Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules. *J. AOAC Int.* 85: 1119-1126.
- 45) Song, Q.J., E.W. Fickus and P.B. Cregan 2002. Characterization of trinucleotide SSR motifs in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 104: 286-293.
- 46) Song, Q.J., J.R. Shi, S. Singh, E.W. Fickus, J.M. Costa, J. Lewis, B.S. Gill, R. Ward and P.B. Cregan 2005. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 110: 550-560.
- 47) 武田和義 1993. *植物遺伝育種学*. 裳華房
- 48) Taoka, K., N. Ohtsubo, Y. Fujimoto, K. Mikami, T. Meshi and M. Iwabuchi 1998. The modular structure and function of the wheat H1 promoter with S phase-specific activity. *Plant Cell Physiol.* 39(3): 294-306.
- 49) Terzi, V., M. Malnati, M. Brbanera, A.M. Stanca and P. Faccioli 2003. Development of analytical systems based on real-time PCR for Triticum species-specific detection and quantitation of bread wheat contamination in semolina and pasta. *J. Cereal Sci.* 38: 87-94.
- 50) Terzi, V., F. Infascelli, R. Tudisco, G. Russo, A. M. Stanca and P. Faccioli 2004. Quantitative detection of Secale cereal by real-time PCR amplification. *Lebensm.-Wiss. U. -Technol.* 37: 239-246.
- 51) Thiel, T., W. Michalek, R.K. Varshney and A. Graner 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 411-422.
- 52) Thomas, J.O. 1999. Histon H1: Location and role. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 312-317.
- 53) Tilley, M. 2004. PCR amplification of wheat sequences from DNA extracted during milling and baking. *Cereal Chem.* 81: 44-47.
- 54) Torada, A., M. Koike, K. Mochida and Y. Ogiwara 2006. SSR-based linkage map with new markers using an intraspecific population of common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1042-1051.
- 55) 内村要介・佐藤大和・松江勇次 2000. RAPD

- 分析による麦類の品種識別. 育種学研究 別
2 : 113.
- 56) 鶴飼保雄 2004. 植物品種における品種同定理論. 農業および園芸 79 (1) : 194-198.
- 57) Yamamoto, T., T. Kimura, J. Soejima, T. Sanada, Y. Ban and T. Hayashi 2004. Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. Breed. Sci. 54: 239-244.
- 58) 山下裕樹・田原 誠・大山由美 2008. レトロトランスポゾンDNAマーカーを用いたアズキ品種の識別. DNA多型 16 : 82-87.
- 59) Yang, P., K. Taoka, T. Nakayama and M. Iwabuchi 1995. Structural and functional characterization of two wheat histone H2B promoters. Plant Mol. Biol. 28: 155-172.
- 60) Yu, J.-K., T.M. Dake, S. Singh, D. Benscher, W. Li, B. Gill and M.E. Sorrells 2004a. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat. Genome 47: 805-818.
- 61) Yu, J.K., M. La Rota, R.V. Kantety and M.E. Sorrells 2004b. EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice. Mol. Genet. Genomics 271: 742-751.
- 62) Wang. H.-Y., Y.-M. Wei, Z.-H. Yan and Y.-L. Zheng 2007. EST-SSR DNA polymorphism in durum wheat (*Triticum durum* L.) collections J. Appl. Genet. 48(1): 35-42.
- 63) Wurzel, A., A. Bluth, P. Zeltz, C. Pfeifer and R. Willmund 1999. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. Food Control 10: 385-389.
- 64) Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Mol. Ecol. 11: 1-16.

Development of DNA Markers for Identification of Wheat Cultivars and Wheat Food Products

Yumiko FUJITA

Summary

Common wheat (*Triticum aestivum* L.) is an important food crop in Japan. Traditionally, wheat had been used in noodles but when the Japanese diet diversified after World War II, wheat products such as bread, cake, and Chinese noodles became common foods. The original Japanese wheat cultivars were unsuitable for these nontraditional flour products, and now, nearly 90% of the wheat consumed in Japan is imported. To increase self-sufficiency in agricultural production, the Japanese Government promotes wheat cultivation. As wheat production increases, users demand domestic wheat with a grain quality similar to that of imported wheat. Wheat breeding in Japan has been devoted to developing cultivars with grain qualities suited to Japanese noodles, Chinese noodles, bread, and soy sauce. As a result, a number of new cultivars have been released and have replaced the old cultivars.

Plant breeder's rights are granted to the breeder of a new cultivar in Japan under the Plant Variety Protection and Seed Law. Amendment of the law in 2005 has extended breeder's rights to include not only the propagation materials, such as seeds and seedlings, but also the harvested materials and products manufactured from the cultivar. Therefore, a reliable cultivar identification method must be developed for wheat grain and manufactured products to protect breeder's rights from unauthorized product use.

An identification method is also required to ensure proper food labeling and thereby a fair trade in wheat products. All foods distributed in Japan must follow the Government Quality Labeling Standards. The system requires proper food labeling, which includes cultivar names if they appear on the product label. However, deceptive labeling of a product is often discovered and reported because a specific cultivar is popular in the marketplace. The labeling standard system has been revised to reinforce the penalties for violations of the labeling standards and to allow the system enforcement office to disclose the violators.

In this study, we have developed some tools for identification of wheat cultivars. First, DNA was extracted from wheat food products and the condition was investigated to apply DNA markers. DNA can be extracted from wheat food products such as udon, bread and a cookie using a popular method. It was confirmed that DNA from flour was in a normal form, whereas DNA from baked food products was strongly degraded. To identify cultivars from popular wheat food products, it is necessary that the size of DNA markers in the product is less than 300 bp.

Second, EST (Expressed sequence tag) -SSR (Simple sequence repeat) markers were developed for the identification of major wheat cultivars in the Japanese market. Ten SSR markers were developed from the wheat EST database. These markers cannot occur in other crops, and the product size ranged from 143 bp to 317 bp. The genotypes of 41 domestic and 17 imported cultivars were determined using the 10 EST-SSR

markers. These markers can distinguish between domestic and imported cultivars, and can identify major domestic cultivars, e.g. 'Hokushin' and 'Norin 61'. EST-SSR markers can be used to identify cultivars from wheat food products such as noodles and bread. In addition, a polymorphism within cultivars was investigated using the 10 EST-SSR markers about 15 domestic wheat cultivars. It became clear that the polymorphism was rarely generated on these sites, and the markers have a high level of reliability as an identification tool.

The genotype of the 10 EST-SSR sites was investigated for five imported wheat brands. Each brand was characterized by its genotype, and variations among import years were detected. The marker 'TaSE3' could be used to detect the unique genotypes of foreign cultivars from the major imported wheat brands, and then identify which domestic wheat products were adulterated with imported wheat.

Third, SNPs (Single nucleotide polymorphisms) were identified from wheat genes to identify a specific cultivar, and markers were developed. A total of 169 bp of SNPs were found in six genes among the eight wheat cultivars. The polymorphism information seems to be a useful identification tool for new cultivars in the future. SNP markers were developed for the identification of the domestic wheat cultivars 'Nishinokaori', 'Haruyokoi', and 'Haruyutaka'. These cultivars are suitable for bread and Chinese noodles, and are popular in the Japanese market. It is expected that these SNP markers will be a simple and rapid tool to protect the value of these cultivars.

Fourth, an identification tool for the domestic wheat cultivar 'Sanukinoyume 2000' was developed based on SNP data. In addition, a quantitative method was constructed using a real-time PCR, and the level of reliability was estimated. 'Sanukinoyume 2000' is a popular cultivar in Kagawa Prefecture, and has been protected by the original certification system of the prefecture. The qualitative and quantitative methods are useful for verification of products made from the cultivar.