

氏 名(本 籍)	中 ^{なか} 村 ^{むら} 俊 ^{とし} 樹 ^き (茨 城 県)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 乙 第 905 号
学位授与年月日	平成 5 年 7 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学位論文題目	コムギ (<i>Triticum aestivum</i> L.) の Waxy 遺伝子座に関する遺伝・育種学的研究
主 査	筑波大学教授 農学博士 高 柳 謙 治
副 査	筑波大学教授 農学博士 上 田 堯 夫
副 査	筑波大学教授 農学博士 大 庭 喜八郎
副 査	筑波大学教授 理学博士 鎌 田 博

論 文 の 要 旨

トウモロコシ、イネ、オオムギ、アワ、ソルガム、アマランサスなどの植物にモチ系統、ウルチ系統があることは以前より知られており、さらに最近では、X線照射によって2倍類のジャガイモにモチ系統が作り出されている。このモチ、ウルチの違いは貯蔵デンプンの違いによって特徴づけられ、ウルチデンプンは、アミロースとアミロペクチンから構成されているのに対してモチデンプンは、アミロースは含まれずアミロペクチンだけからなっている。ウルチの形質は、モチ形質に対して優性であり、それを支配する遺伝子(座)は、Waxy (Wx) 遺伝子(座)と呼ばれている。この遺伝子の産物がデンプン粒に強固に結合した分子量60kD程度のタンパク質(Wxタンパク質)であり、その実体が顆粒性デンプン合成酵素(Granule Bound Starch Synthase = GBSS)であることはよく知られている。トウモロコシ、イネ、ジャガイモなどの作物においては、モチ系統の存在によってWx遺伝子(座)の研究は飛躍的進歩を遂げ、現在アンチセンスRNA法などを用いた遺伝子レベルでのアミロース合成の制御が行われている。これに対して、コムギ(*Triticum aestivum* L.)においてはモチ系統が存在しないこと、またゲノム構成がAABBDDという異質6倍体であり、その遺伝解析も難しいことからWx遺伝子(座)に関する研究はほとんどなされてこなかった。しかし近年、コムギの胚乳デンプン中のアミロース含量が製麺適性に大きな影響を与え、その含量が低いほどよりよい麺ができることが明らかにされ、高品質のコムギ品種を育成する観点からもWx遺伝子(座)に関する基礎的研究の必要性が高まっている。そこで本研究では、Wxタンパク質に注目し、コムギの胚乳におけるWx遺伝子の発現およびその変異を明らかにすることを目的として実験を行い、以下の点を明らかにした。

1) コムギにおけるアミロース含量とWxタンパク質及びWx遺伝子座との関係

コムギの Wx タンパク質の分子量は、61kD とトウモロコシ、イネの Wx タンパク質より、1 kD 大きい、その量とアミロース含量との間には、それらの作物同様密接な関係があり、Wx タンパク質量が低下するとアミロース含量も低下する傾向があることを明らかにした（第Ⅰ章）。コムギには、A、B、D ゲノムそれぞれに由来する 3 種の Wx 遺伝子が存在するが、品種 Chinese Spring (CS) 及びそのナリソミッケーテトラソミック系統を用いた分析により、胚乳中の Wx 遺伝子数と Wx タンパク質の量の間には、明確な遺伝子量効果は見られないものの、各遺伝子数の変動に伴って、Wx タンパク質量にも変動が生じることから、3 種の遺伝子は全て胚乳中で発現し、Wx タンパク質の合成に関与していることを明らかにした（第Ⅱ章）。

2) 電気泳動による由来の異なる Wx タンパク質の分離

従来の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) で単一のバンドとして検出されるコムギの Wx タンパク質は、実際には、3 種の Wx タンパク質が重なったものである可能性が高いことが示唆されたので、分解能の極めて高い、ビスアクリルアミドゲルの濃度を下げた SDS-PAGE (Low-Bis SDS-PAGE) を用いた。その結果、コムギの Wx タンパク質は、高分子量と低分子量の二つのタンパク質に分離可能であり、CS のナリソミッケーテトラソミック分析により、高分子量のものは、A ゲノム由来の Wx 遺伝子 (Wx-A1) にコードされ、低分子量のものは、B、D ゲノム由来の Wx 遺伝子 (それぞれ Wx-B1, Wx-D1) にコードされる Wx タンパク質からなることを明らかにした（第Ⅲ章）。また、国内品種の中には、高分子量の Wx タンパク質を欠くものが存在し、その形質は、在来種より遺伝している可能性が高いことを明らかにした（第Ⅲ章）。さらに、低分子量の Wx タンパク質を Wx-B1, Wx-D1 遺伝子の産物に分離するための方法として二次元電気泳動 (2D-PAGE) が有効と考えられたが、Wx タンパク質の 2D-PAGE に関する報告はなく、イネ、トウモロコシ、オオムギを用いて、Wx タンパク質の 2D-PAGE による展開の条件を検討した。その結果、Wx タンパク質は、SDS を含む緩衝液で精製したデンプン粒に、尿素を含む Lysis 緩衝液を加え、2 分間の加熱処理を加えることにより 2D-PAGE で展開可能であり、作物により、サブユニット数やそれらの等電点領域が異なることを明らかにした（第Ⅳ章）。この方法により、Low-Bis SDS-PAGE において検出されるコムギの低分子量の Wx タンパク質は Wx-B1, Wx-D1 遺伝子にコードされる等電点の異なる 2 つのタンパク質のサブユニット群に分離することができ、酸性側のタンパク質は、Wx-B1 遺伝子に、また塩基性側のタンパク質は、Wx-D1 遺伝子にコードされることを明らかにした（第Ⅴ章）。これにより、コムギの胚乳における Wx 遺伝子の発現が初めて分離確認可能となった。

3) コムギ遺伝資源における Wx タンパク質及び Wx 遺伝子数の変異

2D-PAGE により多数のコムギ遺伝資源の胚乳中の Wx 遺伝子の発現を調査したところ、中には、3 種の Wx 遺伝子のうち、Wx-A1 遺伝子の発現を欠くもの、あるいは Wx-B1 遺伝子発現を欠くものの、さらにはそれら両方の遺伝子の発現を欠くものが存在することを明らかにすることができたと同時に、このうち、Wx-A1, Wx-B1 両遺伝子の発現を欠くものにおいては、Wx タンパク質も著しく減少していること、またその結果、胚乳中のアミロース含量も低下していることも明らかにした

(第Ⅵ章)。このように、部分的に W_x 遺伝子の発現を欠く遺伝資源が存在することの意義は大きく、コムギにはモチ変異個体はないと言われていたが、遺伝子型から見れば部分的なモチ変異体は存在しており、それらを組み合わせることによって、交雑により4倍体および6倍体のモチコムギの育成が可能ながことが明らかにできた。

4) 普通系コムギの起源と W_x タンパク質との関係

木原均博士のコムギの起源に関する研究に基づいて、一粒系コムギ (AA), チモフェービコムギ (AAGG), 二粒系コムギ (AABB), 普通系コムギ (AABBDD), それらの近縁野生種であるクサビコムギ (SS (=GG=BB)), タルホコムギ (DD) の W_x タンパク質を2D-PAGEで比較したところ、GゲノムおよびBゲノムの起源種となったとされるクサビコムギの W_x タンパク質とチモフェービコムギのGゲノムにコードされる W_x タンパク質、二粒系コムギのBゲノムにコードされる W_x タンパク質は、完全に一致し、またGゲノムの起源種、タルホコムギの W_x タンパク質は普通系のDゲノム上の W_x 遺伝子にコードされる W_x タンパク質とも完全に一致し、クサビコムギとタルホコムギの W_x 遺伝子は、チモフェービコムギ、二粒系コムギ、普通系コムギにそのまま受け継がれていることを明らかにした(第Ⅶ章)。しかしながら、Aゲノムのコードする W_x タンパクには変異が見られ、Aゲノムの起源種となった一粒系コムギの W_x タンパク質とチモフェービコムギのAゲノム由来の W_x タンパク質は、一致するものの、二粒系コムギや普通系コムギのAゲノム由来の W_x タンパク質とは、分子量、等電点とも異なり、一粒系コムギの W_x 遺伝子が進化の過程で変異したことも明らかにした(第Ⅶ章)。そして、一粒系コムギ、二粒系コムギ、チモフェービコムギそれぞれの中では、野生種と栽培種の W_x タンパク質が一致することにより、その変異は、一粒系コムギとクサビコムギの交雑の結果生じた4倍種植物から、染色体の構造分化によってチモフェービコムギと二粒系コムギが生じた時期か、あるいは野生の二粒系コムギの生じた極く初期の段階に起こった可能性が高いと結論づけられた。

論文の要旨

イネ、オオムギ、トウモロコシ、アワ等の穀類、ジャガイモ(2倍性種)などには、モチ系統が存在し、 W_x 遺伝子座の研究が飛躍的な進歩を遂げている。これに対してコムギでは、これまでにモチ系統がなく、その理由として、コムギのゲノム構成がAABBDDという異質6倍体のためにその遺伝解析が困難なことによると考えられてきた。

しかし、近年、コムギの需要拡大、加工適性とくに製麺適性という観点から、コムギ胚乳デンプンのアミロース含量の低いものが要求されるようになり、通常品種が28%程度のアミロースを含むのに対して21%~22%という、低アミロース含量の系統が見つかった。これを契機として本論文では、コムギの W_x 遺伝子座とその遺伝子産物である W_x タンパク質について詳細に検討し、コムギにおいてもモチ系統の育成が可能なることを示した。

まず、SDS電気泳動法で、61kDの単一バンドとして検出されるコムギの W_x タンパク質は、7A

染色体短腕，4A染色体長腕（7B染色体短腕の一部が転座したもの）及び7D染色体短腕上の3個の異なる座位にある Wx 遺伝子（それぞれを $Wx-A1$ ， $Wx-B1$ ， $Wx-D1$ で示す）によって別々に制御されており，それぞれの遺伝子産物（ Wx タンパク質）は二次元電気泳動によって分離できることを示した。この方法により遺伝資源として保存されている多数のコムギ品種・系統について調査した結果，これまでに知られているアミロース含量の最も低い「関東107号」では， $Wx-A1$ 及び $Wx-B1$ の遺伝子発現を欠いており，その他にも，いずれか一つの遺伝子の発現を欠くもの，両方の遺伝子発現を欠くものが見いだされた。しかし， $Wx-D1$ 遺伝子の発現を欠くものは見つからなかった。

以上のことは，コムギで開発されている‘Chinese Spring’の種々のナリソミック・テトラソミック系統の組合せや「関東107号」（ $wx-A1$ ， $wx-B1$ ， $Wx-D1$ ）と「関東82号」（ $wx-A1$ ， $wx-B1$ ， $Wx-D1$ ）の正逆交雑等でも確認され，遺伝子間に発現量の差異はあるものの， Wx タンパク質量，すなわちアミロース含量は胚乳中の Wx 遺伝子数によりほぼ決定されていることを明らかにした。

以上の結果から，これまでコムギにはモチ系統はないとされてきたが遺伝子型からみて部分的なモチ性変異体は存在し，それらを組み合わせることによって交雑により，4倍体及び6倍体のモチコムギの育成が可能なことを明らかにした。

さらに， Wx 遺伝子座の起源について，木原のコムギの起源に関する研究に基づき，コムギ属及び近縁野生種についても Wx タンパク質を比較したところ，普通系コムギのAゲノムの起源種とされる一粒系コムギ（AA）の Wx の遺伝子産物である Wx タンパク質は，分子量，等電点とも普通系コムギのものとは異なり，一粒系コムギとBゲノムの起源種であろうとされるクサビコムギ（SS〔=BB=GG〕）が交雑し，二粒系コムギが生じたときか，その直後に変異が起こっていること，BゲノムとDゲノムの Wx 遺伝子産物である Wx タンパク質については，それぞれの起源種のものと同一であることを明らかにした。

本研究は，これまで解明されていなかったコムギの Wx 遺伝子座について，その遺伝子産物である Wx タンパク質の分析法に二次元電気泳動法を適用することによって，コムギにも部分的なモチ系統が存在することを世界で初めて明らかにして，実用的にも意義のあるモチコムギの育成の可能性を示唆するとともに， Wx 遺伝子座の起源についても新しい知見を与えたものであり，基礎的にもまた応用的にもきわめて優れた論文であると評価できる。

よって，著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。