原 著 論 文

DNA マーカーを用いたコムギ変異型 *Wx-B1* 遺伝子の欠失点の推定

齊藤美香・石川吾郎・米丸淳一・中村俊樹

東北農業研究センター, 盛岡市, 〒020-0198

摘 要

パンコムギ品種「関東 107 号」における *Wx-B1* 遺伝子の変異は、麵用コムギに適する「やや低アミロース」形質の要因であり、育種における重要な選抜指標となっている。その変異の原因がコード領域全体の欠失であることは既に報告されているが、そのゲノム上での欠失点はまだ明らかにされていない。そこで、本研究では、コムギ EST 情報、オオムギおよびヒトツブコムギの *waxy* 遺伝子を含む BAC クローン塩基配列情報、さらにはイネゲノム情報を利用してマーカーを作製することにより、1) *Wx-B1* 遺伝子下流の欠失点は、終止コドンから 3.3 kb から 6 kb の間に存在すること、2) 同欠失により、*Wx-B1* 遺伝子の下流に存在する機能未知の遺伝子も同時に欠失していることを明らかにした。

キーワード

コムギ, *waxy* 遺伝子, 比較ゲノム, DNA マーカー

緒 言

胚乳中のアミロースは、*waxy* (*Wx*) タンパク質として知られるデンプン粒結晶型デンプン合成酵素 I (granule-bound starch synthase I: GBSSI) によって合成されている。*Wx* タンパク質は *waxy* 遺伝子に支配されており、この遺伝子の変異によって GBSSI 活性や GBSSI タンパク質を欠いたモチ系統がいくつかの穀物で同定されている (Eriksson 1970)。パンコムギ (*Triticum aestivum* L.) においては、3 つの *waxy* 遺伝子が存在し、それぞれ 7A (*Wx-A1*), 4A (*Wx-B1*), 7D (*Wx-D1*) 染色体上に位置している。これまでに、*Wx-A1* および *Wx-B1* タンパク質を欠く「関東 107 号 (K107)」と *Wx-D1* タンパク質を欠く「白火」を掛け合わせることで全ての *Wx* タンパク質を欠失しているモチコムギが作出され (Nakamura *et al.* 1995), そのモチコムギを用いることにより、「K107」由来の *Wx-A1*, *-B1* 遺伝子、「白火」由来の *Wx-D1* 遺伝子に生じた変異も同定されている (Vrinten *et al.* 1999)。

我が国に麵用として輸入されているオーストラリア産コムギ Australian Standard White (ASW) が粘弾性や食感などの製麵適性に優れている理由の一つとしてアミロー

ス含量が低いことに起因することは判明していたが (Oda *et al.* 1980, Toyokawa *et al.* 1989), それを裏付けるように ASW 構成品種の多くが *Wx-B1* タンパク質を欠失していることも判明している (Yamamori *et al.* 1994)。さらに、我が国の育種事業においても、低アミロース品種である「K107」の変異型 *Wx-B1* 遺伝子がうどん用品種に導入され、やや低アミロース化することで製麵適性が向上した品種が育成されてきている (星野ら 1985)。しかしながら、Zhao *et al.* (1998) はオーストラリアのコムギ品種における *Wx-B1* タンパク質の製麵適性への影響を調べ、*Wx-B1* タンパク質の欠失だけでは製麵適性の向上を説明できないことを報告しており、*Wx-B1* 遺伝子に連鎖する何らかの要因の関与を示唆した。

「K107」に生じている *Wx-B1* 遺伝子の変異は、タンパク質コード領域全体を含む幅広い領域の欠失であることが推定されているが (Vrinten *et al.* 1999), その欠失点はまだ同定されていない。Gale *et al.* (1995) の連鎖地図によると、*Wx-B1* 座はパンコムギ品種「Chinese Spring (CS)」の 4A 染色体長腕 (4AL) のセントロメアから 97.2 cM の距離に位置している。また、Araki *et al.* (1999) は「K107」の 4A 染色体を野生型品種である「CS」に置換した系統を用いて連鎖地図を作製している。Gale *et al.* (1995) の地図では *Wx-B1* 座を挟む *Xpsr115* および *Xpsr119* の 2 つの RFLP マーカー間の距離は約 35 cM であるのに対し、この場合、同区間の距離は 24.8 cM である (図 1)。この

図 1. コムギ *Wx-B1* 座近傍の RFLP マーカーの位置関係
下部には Gale *et al.* (1995) および Araki *et al.* (1999) の連鎖地図における *Xpsr115* および *Xpsr119* 間の距離を示した。なお, *Xumc190*, *Xak466*, *XksuD9* は Gale *et al.* (1995) の地図でのみ用いられている。

2つの連鎖地図に見られる約 10 cM の差は「K107」の *Wx-B1* 座に生じている欠失によるものと考えられ, これらの結果からも *Wx-B1* 遺伝子のコード領域だけではない広い範囲が欠失している可能性が高いと推察された。

これまでに我々は, 日本およびオーストラリアを含む世界各国の *Wx-B1* タンパク質を欠く品種について *Wx-B1* 遺伝子の有無を PCR マーカーで調べているが, 全ての品種の変異は「K107」に生じている *Wx-B1* 変異の検出用マーカーで判別でき, 両国の品種に生じている変異は同じである可能性が高いことが示唆された (Nakamura *et al.* 2002, Saito *et al.* 2004)。しかしながら, これらの品種における欠失範囲が同じかは不明であり, 品種により製麺適性に影響を与える遺伝子が *Wx-B1* 遺伝子に連鎖して欠失している可能性も考えられる。*Wx-B1* 遺伝子の欠失点解明は, 同遺伝子に連鎖して欠失した遺伝子の同定, さらに製麺適性に関与する未知の遺伝子の同定に繋がる可能性があると考えられる。また, これまでは欠失点が同定されていないことから変異型 *Wx-B1* 遺伝子の選抜には優性マーカーを用いているが, 欠失点の同定は共優性マーカーの開発につながることから, *Wx-B1* 座に関するヘテロ個体の選抜が可能になり育種においても重要な意味を持つと考えられる。

パンコムギでは *waxy* 遺伝子の転写領域に関しては詳細な配列情報が存在するが, その上流, 下流域を含めて近傍のゲノム情報はほとんど存在せず, パンコムギのゲノム情報のみでは欠失点を同定することは非常に困難であると判断された。しかしながら, 一つの方法として, 他の植物種とのシンテニーを利用して *Wx-B1* 座の近傍に DNA マーカーを開発し, その有無を調査することが, 同欠失範囲を推定する有効な方法であると考えた。そこで, 本研究では, 1) オオムギ (*Hordeum vulgare* L.) およびヒトツブコムギ (*T. monococcum* L.) の *waxy* 遺伝子を含むバクテリア人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC)

クローン配列とコムギ EST 配列の比較, 2) イネ (*Oryza sativa* L.) のゲノム情報とコムギ EST 配列の比較により *Wx-B1* 座近傍へ新たな PCR マーカーを作製し, それらマーカーを用いて *Wx-B1* 遺伝子の欠失点の同定を試みた。

材料および方法

1. 植物材料

供試材料は「CS」および日本とオーストラリアのコムギ系統, すなわち野生型 *Wx-B1* 品種として「農林 61 号」, 「Bencubbin」および「Mintlor」, 変異型 *Wx-B1* 品種として「きぬいろは」, 「もち乙女」, 「Arrona」および「Rosella」を用いた。なお, 「もち乙女」の変異型 *Wx-B1* 遺伝子は「K107」に由来するものである。「CS」の染色体置換系統 (Sears 1966) および染色体欠失系統 (Endo and Gill 1996) は作製したマーカーの染色体上の位置決定に用いた。ゲノム DNA は Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction Kit (Amersham Bioscience) を用いて 100 mg の実生より抽出した。

2. コムギ *Wx-B1* 遺伝子近傍のゲノム配列の単離

コムギ *Wx-B1* 遺伝子 5'-UTR の単離には 5'-F (5'-CCGCGCCGCGCGACTGTGAGTAC-3') およびコムギの 3つの *waxy* 遺伝子に共通な部位に設計した AR2 (5'-CCGCGCTTGAGCAGTGGAAGTACC-3', Nakamura *et al.* 2002) を用いた。同遺伝子下流の配列の単離には, *WxB1-F* (5'-GGCTCGTCGATCCCTTGTGTAAATTCTTCA-3') および 3'-R1 (5'-TGAGAAACATCTGCCTGCAA-3') を用いた。イネ D1 および P1 遺伝子のコムギオルソログ候補配列の単離には, それぞれ D1_F (5'-AAAAGAATGCCATCACCTTCA-3') および D1_R (5'-GGCATGGTGACTTGGAGATAG-3'), P1_F (5'-ATGGACAAGGTGCTGGCSTTC-3') および P1_R (5'-GCACACGATGGTCTCGAAGC-3') を用いた。他のマーカー情報に関しては, 表 1 に示した。

3. 他の植物種との配列比較

塩基配列の比較は, MultAlin (Corpet 1988) によって行った。オオムギ, ヒトツブコムギおよびイネゲノム配列と類似性の高いコムギ EST 配列の抽出は, データベースで公開されているゲノム配列を質問配列として BLASTN 検索によって行った。オオムギおよびヒトツブ

表 1. コムギにおける *Wx-B1* 座近傍の DNA マーカーのプライマー配列

マーカー名		フォワード (5'-3')		リバース (5'-3')		サイズ (bp)
5'-UTR	5'-F	CCGGCCGCGCGACTGTGAGTAC	5'-R	GAAGGCGGTATTAGGATGGATCTGCTAGTC		177
3'-1	3'-F1	CCAGATATGTCATGTATCGGCTATAG	3'-R2	GAGAACATGAGAAGAACAACAACTAGA		3100
3'-2	3'-F2	TGCCATGGAGTAGTTGGTGCTA	3'-R2	GAGAACATGAGAAGAACAACAACTAGA		430
D1_4A	D1_4A-F	CCTCCGGCTTCACAAAGA	D1_4A-R	CATCTACAGCATGCTGCTTCTT		250
P1_4A	P1_4A-F	GCCCCCGGCGCCAGTAA	P1_4A-R	TGGTCTCGAAGCAGTCGATT		211

コムギに対して期待値が e^{-100} 以下、またイネに対しては期待値が e^{-10} 以下かつ bit score が 80 以上を示したコムギ EST 配列を、オルソログ候補とした。

4. PCR および配列決定

Wx-B1 遺伝子の変異の同定には、Nakamura *et al.* (2002) によるプライマーセット (BDFL および BRD) を用いた。全ての PCR はアニーリング温度を除き Nakamura *et al.* (2002) による条件で行い、アニーリング温度は各々のプライマーセットに合わせて 60°C から 65°C の間で調節した。PCR の後、1% または 4% アガロースゲルで電気泳動を行った。電気泳動後にアガロースゲルから切り出した PCR 産物は、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製し、pCR4-TOPO ベクター (Invitrogen) に組み換えた。挿入配列は T3 および T7 プライマーを用い、ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により配列を解析した。

結果

1. コムギ *Wx-B1* 遺伝子 5'-UTR への PCR マーカー作製

コムギの *Wx-B1* 遺伝子は、翻訳開始コドンの 12 塩基上流までしか公共のデータベースに登録されていない (AB019623)。一方、*Wx-A1* 遺伝子は、プロモーター領域および翻訳されない第 1 エキソンを含む開始コドンから約 4 kb 上流までの配列が登録されている (AY278458, AY050175)。そこで、*Wx-B1* 遺伝子上流域の欠失の確認に使用するマーカーを作製するために、*Wx-A1* 遺伝子上流の配列を用いて *Wx-B1* 遺伝子上流の配列の単離を試みた。

まず、5'-F および AR2 プライマーを用いて「CS」のゲノム DNA を鋳型として PCR を行った結果、長さの異なる 3 本の増幅産物が得られた (データ省略)。それらをクローニングして配列を解読し、*Wx-B1* 遺伝子の開始コドンから 654 bp 上流の 5'-UTR 配列を決定した。得られた配列と *Wx-A1* の当該配列 (794 bp) の多型部位を利用して *Wx-B1* 特異的な断片のみが得られるリバープライマー (5'-R) を再度設計し、これを 5'-UTR マーカーとした (表 1, 図 2)。このリバープライマーは、*Wx-B1* の開始コドンから 477 bp 上流に位置している (図 2a)。さらに、日本およびオーストラリアの野生型および変異型 *Wx-B1* 遺伝子を持つ品種を用いてこのマーカーの有無を調査したところ、野生型 *Wx-B1* 遺伝子を持つ品種では増幅産物が得られたのに対し、変異型のものでは得られなかった (図 3)。このことから、少なくとも変異型では *Wx-B1* 遺伝子の開始コドンの上流 477 bp までを欠失していることが示された。

図 2. *Wx-B1* 遺伝子近傍の構造および 4A 染色体特異的なマーカー
a) *Wx-B1* 遺伝子近傍を模式化した。箱は遺伝子を表し、ATG は翻訳開始コドン、Ter は終止コドンを示した。矢印はプライマーの位置と方向、両矢印は *Wx-B1* 遺伝子とプライマー間およびプライマー間の距離を示した。5'-F および AR2 プライマーは、*Wx-B1* 遺伝子上流の配列の単離に、3'-F1 および 3'-R2 プライマーは、同遺伝子下流の配列の単離に用いた。b) 4A 染色体特異的な増幅を示すマーカーセットによる PCR。それぞれのプライマーセットに対応するマーカー名は、5'-F および 5'-R が 5'-UTR、3'-F1 および 3'-R2 が 3'-1、ならびに 3'-F2 および 3'-R2 が 3'-2 である。M: 1 kb Plus Ladder (Invitrogen)。

図 3. 野生型および変異型 *Wx-B1* 遺伝子を持つ日本とオーストラリアコムギ系統における *Wx-B1* 座近傍のマーカー分析
表 1 および図 2 に示したマーカー (D1_4A, 5'-UTR, 3'-1 および 3'-2) ならびに Nakamura *et al.* (2002) による *Wx-B1* 遺伝子変異検出のためのマーカー (*Wx-B1*) を用いた。レーン 1: CS, 2: きぬいろは, 3: 農林 61 号, 4: もち乙女, 5: Bencubbin, 6: Arrona, 7: Mintlor, 8: Rosella, M: 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen)。

2. オオムギおよびヒトツブコムギのゲノム配列を用いた PCR マーカー作製

オオムギ (AF474373, 全長 124050 bp) およびヒトツブコムギ (AF488415, 168746 bp) の *waxy* 遺伝子を含む BAC

クローンにおける同遺伝子の上流および下流 10 kb の範囲を整列化し比較した。Waxy 遺伝子の翻訳開始コドンから上流に関しては、オオムギで約 1.5 kb、ヒトツブコムギで約 1.2 kb 上流の配列が互いに類似性を示した。両植物種の類似性を示した配列間で、特に類似性の高い部分にプライマーを設計し、PCR によりコムギゲノム DNA より Wx-B1 遺伝子上流配列の単離を試みた。しかしながら、先に単離した 654 bp よりも上流の 4A 染色体特異的な配列を単離することはできなかった。

Waxy 遺伝子下流に関しては、終止コドンからオオムギで約 6.6 kb、ヒトツブコムギで約 7.3 kb 下流までの配列が高い保存性を示した。BLASTN 検索により、オオムギおよびヒトツブコムギの waxy 遺伝子下流約 1.6 kb から 5.1 kb の範囲に 50 クローンのコムギ EST が高い類似性(期待値が e^{-100} 以下)を示したことから、この領域には機能を持つ遺伝子の配列が存在すると考えられた。また、これらの EST クローンには、胚乳由来のライブラリより単離されたものも含まれており、イネやトウモロコシの cDNA クローンとも高い類似性が見られた。それらの EST クローンの中から「CS」を材料に cDNA 化されたもののみを選び出し、オオムギおよびヒトツブコムギの配列とともに整列化したところ、3 種類のコンティグを作製できた。それらは、A、B、D ゲノムに由来する 3 つの同祖遺伝子に相当する配列であると考えられた。さらに同遺伝子は、4 つのイントロンを持つと推察され、また、アミノ酸に変換したところ、オオムギおよびヒトツブコムギの配列から、この遺伝子は waxy 遺伝子とは逆方向に転写されると考えられた(図 2a)。これらのコンティグ間で共通な配列より作製したプライマー (3'-R1) と、Wx-B1 遺伝子特異的なイントロン配列を基に作製したプライマー (WxB1-F) を用い「CS」ゲノムを鋳型にした PCR によって、Wx-B1 遺伝子を含む 4A 染色体特異的な約 4.2 kb の断片が増幅された(データ省略)。この断片の配列解析により、Wx-B1 遺伝子の終止コドンから 3750 bp 下流までの配列情報が新たに得られた。

Wx-B1 遺伝子の終止コドンより 3316 bp 下流に作製した 3'-F1 プライマーと、オオムギおよびヒトツブコムギの waxy 遺伝子の終止コドンよりそれぞれ 5804 bp、6384 bp 下流にある保存された配列に設計した 3'-R2 プライマーによって、「CS」ゲノムより約 3.1 kb の断片が増幅された(図 2a)。また、オオムギおよびヒトツブコムギの waxy 遺伝子の下流 5411 bp および 5960 bp にある共通配列に設計したフォワードプライマー (3'-F2) と 3'-R2 プライマーを用いた PCR によって、「CS」ゲノムより約 430 bp の断片が増幅された(図 2a)。鋳型としてナリソミック-テトラソミック系統を用いたところ、両プライマーセットで増幅された断片は 4A 染色体特異的であることが明らかとなった(図 2b)。3.1 kb および 430 bp の断片が増幅されるプライマーセットをそれぞれ 3'-1 および 3'-2 とした(表 1)。染色体欠失系統を用いた解析により、3'-2 は Wx-

B1 遺伝子(del4AL-1 と del4AL-6 の間)よりもセントロメア側に存在する欠失ビン (del4AL-4 と del4AL-1 の間)に存在していることが明らかになった(データ省略)。

作製されたプライマーを使い、日本およびオーストラリアの野生型および変異型 Wx-B1 遺伝子を持つ品種について分析した結果、3'-1 では野生型品種のみで増幅が見られ変異型品種では増幅が見られなかった(図 3)。一方、3'-2 を用いた PCR では、野生型および変異型両品種において増幅が認められた(図 3)。これらのことから、変異型品種においては、Wx-B1 遺伝子の下流約 3.3 kb から 6 kb の約 2.7 kb の間に 3' 側の欠失点が存在すると考えられた(図 4)。

3. イネ waxy 近傍の遺伝子のコムギオルソログ候補の抽出

RFLP マーカーやコムギ EST を用いたこれまでの比較ゲノム研究により、waxy 遺伝子が座乗するコムギ第 7 染色体群とイネ第 6 染色体間にはシンテニーが保たれていることが報告されている(Gale and Devos 1998, Hossain *et al.* 2004, Sorrells *et al.* 2003)。そこで、イネのゲノム配列とコムギの EST 配列の比較により、イネの waxy 遺伝子周辺に存在する遺伝子とオルソログな関係にあるコムギ遺伝子の配列を抽出し、Wx-B1 遺伝子近傍にマーカーが作製可能かを検証した。イネ品種「日本晴」の第 6 染色体上に位置づけられている P1 フェージ由来人工染色体 (P1 artificial chromosome, PAC) クローンの AP002542 は waxy 遺伝子を含んでおり、イネゲノムのアノテーションを自動化したプログラムである RiceGAAS (Rice Genome Automated Annotation System, <http://RiceGAAS.dna.affrc.go.jp/>) によって waxy 以外に 46 遺伝子の存在が予測されている。また、この PAC クローンには先に単離した Wx-B1 遺伝子の下流にある遺伝子は存在していなかった。BLASTN 検索により、これら 46 遺伝子のうち 16 遺伝子がコムギ EST クローンと高い類似性を示した。それらの EST クローンがイネの 16 遺伝子に対するコムギのオルソログの候補として最適であるかを確認するために、もっとも高い類似性を示した EST クローンを質問配列として「日本晴」の全ゲノム配列に対して BLASTN 検索を行った。16 個の EST クローンのうち、13 クローンは最初の BLASTN 検索で高い類似性を示した第 6 染色体上のイ

図 4. イネとのシンテニーを利用して作製したマーカーとコムギの Wx-B1 座の間に予測される位置関係
野生型または変異型 Wx-B1 遺伝子を持つ品種の 4A 染色体特異的な PCR 産物の有無を + または - で示した。

ネ遺伝子と最も高い類似性を示したが、3 クローンは他の染色体上の遺伝子に対して最も高い類似性を示した。これら 13 クローンのうち、イネの *waxy* 遺伝子の最も近傍にあり、同遺伝子よりテロメア側約 6 kb に座乗するものを D1、セントロメア側約 14 kb に座乗するものを P1 とした。

D1 および P1 のコムギオルソログ候補にマーカーを作製するために、コムギ EST 配列とイネゲノム配列との比較から、コムギ EST 配列に含まれるエキソン・ジャンクション部位を推定し、それを挟むようにプライマーを設定した。それら 2 つのプライマーセット (D1_F および D1_R, P1_F および P1_R) を用いて「CS」のゲノム DNA を鋳型に PCR を行ったところ、それぞれ一本のバンドが増幅された。それらの増幅産物をクローン化して配列を調べたところ、それぞれのプライマーセットにより少なくとも 3 種類の高い類似性を示す配列から増幅されていることが判明した。その結果より、同増幅産物は同祖遺伝子に起源すると断定された。それらの配列の違いを利用して、4A 染色体上の配列のみ増幅可能な 2 つのプライマーセットを同定した。D1 および P1 のコムギオルソログ候補より作製されたプライマーセットをそれぞれ D1_4A および P1_4A と名付けた (表 1)。4AL の染色体欠失系統のゲノム DNA を鋳型に 2 つのプライマーセットを用いた PCR により、D1_4A は *Wx-B1* 遺伝子 (Yamamori *et al.* 1994) と同じ欠失ビンに、P1_4A は *Wx-B1* 遺伝子よりもセントロメア側の欠失ビン (del4AL-2 と del4AL-4 の間) に位置していることが確認された (データ省略)。このことから、D1_4A によって増幅された断片はテロメア側に存在する *Wx-B1* 座近傍のマーカーとして利用可能であると考えられた (図 4)。

D1_4A による日本およびオーストラリアの野生型および変異型 *Wx-B1* 品種のゲノム DNA を鋳型にした分析では、全ての品種で増幅が確認された (図 3)。このことから、供試した変異型 *Wx-B1* 品種の *Wx-B1* 遺伝子の欠失点はこのマーカーより *Wx-B1* 遺伝子に近い位置にあると推察された。

考 察

これまでに、*Wx-B1* タンパク質を欠失しているパンコムギ品種は世界各国の遺伝資源において同定されている (Yamamori *et al.* 1994, 1998, Boggini *et al.* 2001, Urbano *et al.* 2002)。それら品種のゲノムに生じた変異の詳細な配列情報などは報告されていないが、タンパク質のコード領域全体を欠失している「K107」(Vrinten *et al.* 1999) の他に、同領域全体を欠失していないもの (Urbano *et al.* 2002) が報告されている。しかしながら我々が開発した PCR マーカーを用いて Yamamori *et al.* (1998) によって報告されている世界各国の *Wx-B1* タンパク質欠失品種を調べた結果では、変異は共通で、「K107」と同様にコー

ド領域全体の欠失であると判断された (Saito *et al.* 2004)。このことから、コード領域全体を欠失した変異が世界のパンコムギ遺伝資源において主要なものであると考えられるが、これまでその欠失点は明らかにされていなかった。本研究では *Wx-B1* 遺伝子下流 3.3 kb から 6 kb の間に欠失点が存在することを明らかにした (図 4)。

ゲノムサイズが 1.6×10^{10} bp と非常に大きいことから、ゲノム情報の少ないパンコムギにおいて、*Wx-B1* 遺伝子近傍の配列情報はこれまで報告されていなかったが、本研究では、比較ゲノムのアプローチにより同遺伝子の下流約 6.4 kb の配列を単離することができ、その配列より欠失点を同定する DNA マーカーができた。また同遺伝子下流約 1.6 kb から 5.1 kb の間に別の遺伝子が存在することが推察された。本研究で用いた *Wx-B1* タンパク質欠失変異品種においては、マーカー解析によって *Wx-B1* 遺伝子とともにその下流にある遺伝子も欠失していることが明らかとなった。この遺伝子は、機能が既に解明されている遺伝子とは高い類似性が見られなかったが、この遺伝子に高い類似性を示すコムギ EST クローンは胚乳由来のライブラリより単離されたものもあったことから、胚乳組織においても発現していると考えられた。Zhao *et al.* (1998) は *Wx-B1* タンパク質の欠失だけでは製麺適性の向上を説明できないとしていたが、*Wx-B1* 遺伝子とともに下流の遺伝子も欠失していることが胚乳組織に何らかの影響を与えている可能性も考えられる。

本研究ではまた、イネ *waxy* 近傍の遺伝子とオルソログスな関係にあるコムギ遺伝子候補を選び出し、それらの配列をもとに設計したプライマーによってマーカー作製を試みた。オオムギやヒトツブコムギにおける BAC クローン配列の比較では *Wx-B1* 遺伝子上流域にマーカーを作製することはできなかったものの、イネとのシンテニーを利用することで同領域にマーカーを作製することができた。このことから、この方法はゲノム情報の少ないコムギにおいて標的遺伝子の近傍に存在する遺伝子への新たなマーカー作製に有効であると考えられる。コムギでは、EST 情報を基に設計したプライマーによる増幅産物には同祖遺伝子由来の 3 つの断片が含まれていることが多く、それら断片に多型を見出して各同祖遺伝子を仕分けることが PCR マーカー作製には不可欠である。コムギの同祖遺伝子の配列間には、エキソンよりもイントロン領域に違いが多く見られることが示されている (Bryan *et al.* 1999) ことから、このイントロン多型を利用することによって同祖遺伝子に特異的なマーカーの作製が効率化されたと考えられた。コムギのゲノム DNA を鋳型とした PCR でイントロンを含む増幅断片が得られるようにするには、イネゲノム配列との比較によってコムギ EST におけるエキソン・ジャンクション部位を予測し、それを挟むようにプライマーを設計する必要がある。本研究では、そのようにして得られた増幅産物に含まれるイントロン間の多型を利用して 4A 染色体特異的なマ

カーを作製することができた。このことから、コムギの遺伝子におけるイントロンの位置をコムギESTとイネゲノム配列との比較で予測することは、マーカー作製を効率化する有効な手段であるといえる。現在、その原理を利用して、ゲノム情報の少ない植物種でも効率的にマーカーを自動作製できるPLUG (PCR-based landmark unique genes) システムを作製中であり(米丸ら 2005)、このシステムによりコムギの全染色体にわたる遺伝子由来のPCRマーカー作製を進めている(石川ら 2005)。このシステムを用いることで、これまでにマーカーの無かった領域にも3同祖遺伝子それぞれを同定可能なマーカーを作製できることから、様々な遺伝子に生じた変異の同定にも利用でき、今後育種に利用可能な多くのマーカーが開発できると考えられる。

Araki *et al.* (1999) による「K107」由来の4A染色体の連鎖地図とGale *et al.* (1995) の「CS」の連鎖地図上では*Wx-B1*座近傍の2つのマーカー間には約10 cMの差があった(図1)。Erayman *et al.* (2004) はコムギの連鎖地図と物理地図上のマーカーの分布を比較することにより、連鎖距離あたりの物理距離を推測している。*Wx-B1*座近傍のマーカーである*Xak466*や*Xumc190*が存在している第4染色体群の領域は、1 cMあたり1220 kbであると見積もられている。この領域において10 cMの範囲が欠失していた場合、およそ1.2 Mbの欠失が予想できる。本研究では*Wx-B1*遺伝子下流域における欠失範囲は同定できたことから、*Wx-B1*遺伝子上流域が広範囲にわたって欠失していると考えられる。最近、いくつかのコムギゲノムのBACライブラリが作製されており(Lijavetzky *et al.* 1999, Cenci *et al.* 2003, Nilmalgoda *et al.* 2003, Janda *et al.* 2004)、それらBACクローン配列の解析によって、100 kbにつき平均で数個の遺伝子が乗っていることが明らかにされている(Brooks *et al.* 2002, Faris *et al.* 2003, Anderson *et al.* 2003, Kong *et al.* 2004)。しかしながら、これらの報告は同時に、遺伝子の分布は均等ではなく、コムギゲノム中にはレトロトランスポゾンのクラスタによって隔てられた「島」に遺伝子が存在し、これらの「島」における遺伝子密度は10 kbにつき数個と非常に高くなっていることも示されている。本研究で用いたヒトツコムギのBACクローンにおいても、*waxy*遺伝子を含む約62 kbの領域に集中して遺伝子が予測され、それ以外の領域には多くのレトロトランスポゾンが存在していた。オオムギとヒトツコムギを比較した際に*waxy*遺伝子を含む約11 kb以外の近傍の配列は保存性が低いことが判明したが、その理由として、レトロトランスポゾンの挿入により遺伝子間領域が広がったことが考えられる。また、本研究でイネ遺伝子のオルソログから作製したマーカーと*Wx-B1*遺伝子との距離がイネに比べ長くなっている理由の一つとしても、これらのマーカー間へ多くのレトロトランスポゾンが挿入しクラスタを形成したことに由来すると考えられる。さらに、

*Wx-B1*遺伝子の欠失の際に、同遺伝子の近傍に存在するレトロトランスポゾンに加え遺伝子の「島」も同時に欠失している可能性があり、今回欠失が確認された遺伝子以外にも胚乳で発現している遺伝子が複数欠失していることも考えられる。

本研究では、現在までに報告されているものよりも*Wx-B1*遺伝子近傍に新たなマーカーを作製することができ、同遺伝子下流の欠失点が存在する範囲を絞り込むことができた。しかし、共優性マーカーの開発に繋がる変異型*Wx-B1*遺伝子上流の欠失点を同定することはできなかった。今後さらに欠失点を同定するためのマーカーを作製していくためには、パンコムギのBACライブラリを用いる方法が考えられる。野生型の*Wx-B1*遺伝子および近傍の配列を含むBACクローンを単離し、それらのゲノム配列をもとに作製した*Wx-B1*近傍マーカーで野生型と変異型の比較をすることで、欠失点の同定が可能になる。本研究で開発したマーカーはコムギBACライブラリにおける*Wx-B1*遺伝子近傍の配列を含むクローンの選抜にも有効であり、今後はこれらのマーカーやBACライブラリを利用して、育種に利用可能な*Wx-B1*遺伝子の共優性マーカーの開発に取り組みたいと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、京都大学大学院農学研究科遠藤隆教授には、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトによる支援のもと、コムギ染色体欠失系統を分譲していただいた。ここに記して深く謝意を表します。

引用文献

- Anderson, O.D., C. Rausch, O. Moullet and E.S. Lagudah (2003) The wheat D-genome HMW-glutenin locus: BAC sequencing, gene distribution, and retrotransposon clusters. *Funct. Integr. Genomics* 3: 56–68.
- Araki, E., H. Miura and S. Sawada (1999) Identification of genetic loci affecting amylose content and agronomic traits on chromosome 4A of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 98: 977–984.
- Boggini, G., M. Cattaneo, C. Paganoni and P. Vaccino (2001) Genetic variation for waxy proteins and starch properties in Italian wheat germplasm. *Euphytica* 119: 111–114.
- Brooks, S.A., L. Huang, B.S. Gill and J.P. Fellers (2002) Analysis of 106 kb of contiguous DNA sequence from the D genome of wheat reveals high gene density and a complex arrangement of genes related to disease resistance. *Genome* 45: 963–972.
- Bryan, G.J., P. Stephenson, A. Collins, J. Kirby, J.B. Smith and M.D. Gale (1999) Low levels of DNA sequence variation among adapted genotypes of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 99: 192–198.
- Cenci, A., N. Chantret, X. Kong, Y. Gu, O.D. Anderson, T. Fahima, A. Distelfeld and J. Dubcovsky (2003) Construction and characterization of a half million clone BAC library of durum wheat

- (*Triticum turgidum* ssp. *durum*). Theor. Appl. Genet. 107: 931–939.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl. Acids Res. 16: 10881–10890.
- Endo, T.R. and B.S. Gill (1996) The deletion stocks of common wheat. J. Hered. 87: 295–307.
- Erayman, M., D. Sandhu, D. Sidhu, M. Dilbirli, P.S. Baenziger and K.S. Gill (2004) Demarcating the gene-rich regions of the wheat genome. Nucl. Acids Res. 32: 3546–3565.
- Eriksson, G. (1970) The waxy character. Hereditas 63: 180–204.
- Faris, J.D., J.P. Fellers, S.A. Brooks and B.S. Gill (2003) A bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus Q in wheat and identification of a candidate gene. Genetics 164: 311–321.
- Gale, M.D., M.D. Atkinson, C.N. Chinoy, R.L. Harcourt, J. Jia, Q.Y. Li and K.M. Devos (1995) Genetic maps of hexaploid wheat. Proc. 8th Int. Wheat Genet. Symp. 1: 29–40.
- Gale, M.D. and K.M. Devos (1998) Comparative genetics in the grasses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1971–1974.
- 星野次汪・福永公平・小田俊介 (1985) 小麦品種・系統の麵品質に関する粉の物理・化学特性値間相関. 育種 35 (別 2) : 256–257.
- Hossain, K.G., V. Kalavacharla, G.R. Lazo, J. Hegstad, M.J. Wentz *et al.* (2004) A chromosome bin map of 2148 expressed sequence tag loci of wheat homoeologous group 7. Genetics 168: 687–699.
- 石川吾郎・米丸淳一・齊藤美香・中村俊樹 (2005) PLUG システムを用いたコムギおよびオオムギの *Wx* 座近傍 PCR マーカーの開発. 育種学研究 7 (別 1・2) : 169.
- Janda, J., J. Bartos, J. Safar, M. Kubalakova, M. Valarik, J. Cihalikova, H. Simkova, M. Caboche, P. Sourdille, M. Bernard, B. Chalhouh and J. Dolezel (2004) Construction of a subgenomic BAC library specific for chromosomes 1D, 4D and 6D of hexaploid wheat. Theor. Appl. Genet. 109: 1337–1345.
- 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.
- Lijavetzky, D., G. Muzzi, T. Wicker, B. Keller, R. Wing and J. Dubcovsky (1999) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for the A genome of wheat. Genome 42: 1176–1182.
- Nakamura, T., P. Vrinten, M. Saito and M. Konda (2002) Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers. Genome 45: 1150–1156.
- Nakamura, T., M. Yamamori, H. Hirano, S. Hidaka and T. Nagamine (1995) Production of waxy (amylose-free) wheats. Mol. Gen. Genet. 248: 253–259.
- Nilmalgoda, S.D., S. Cloutier and A.Z. Walichnowski (2003) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) and validation of genome coverage using locus-specific primers. Genome 46: 870–878.
- Oda, M., Y. Yasuda, S. Okazaki, Y. Yamauchi and Y. Yokoyama (1980) A method of flour quality assessment for Japanese noodles. Cereal Chem. 57: 253–259.
- Saito, M., M. Konda, P. Vrinten, K. Nakamura and T. Nakamura (2004) Molecular comparison of waxy null alleles in common wheat and identification of a unique null allele. Theor. Appl. Genet. 108: 1205–1211.
- Sears, E.R. (1966) Nullisomic-tetrasomic combinations in hexaploid wheat. In “Chromosome manipulation and plant genetics”, Riley, R. and K.R. Lewis (eds.), Oliver and Boyd, Edinburgh, p. 29–45.
- Sorrells, M.E., M. La Rota, C.E. Bermudez-Kandianis, R.A. Greene, R. Kantety *et al.* (2003) Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. Genome Res. 13: 1818–1827.
- Toyokawa, H., G.L. Rubenthaler, J.R. Powers and E.G. Schamus (1989) Japanese noodle qualities. II. Starch components. Cereal Chem. 66: 387–391.
- Vrinten, P., T. Nakamura and M. Yamamori (1999) Molecular characterization of waxy mutations in wheat. Mol. Gen. Genet. 261: 463–471.
- Urbano, M., B. Margiotto, G. Colaprico and D. Lafiandra (2002) Waxy proteins in diploid, tetraploid and hexaploid wheats. Plant Breed. 121: 465–469.
- Yamamori, M., T. Nakamura, T.R. Endo and T. Nagamine (1994) Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. Theor. Appl. Genet. 89: 179–184.
- Yamamori, M., T. Nakamura and C. Kiribuchi-Otobe (1998) Waxy protein alleles in common and emmer wheat germplasm. Misc. Publ. Natl. Inst. Agrobiol. Resour. 12: 57–104.
- 米丸淳一・石川吾郎・福岡浩之・齊藤美香・中村俊樹 (2005) イネおよびアラビドプシスの配列データベースを用いた PLUG マーカー作成のための Web システムの構築. 育種学研究 7 (別 1・2) : 168.
- Zhao, X.C., I.L. Batey, P.J. Sharp, G. Crosbie, I. Barclay, R. Wilson, M.K. Morell and R. Appels (1998) A single genetic locus associated with starch granule properties and noodle quality in wheat. J. Cereal Sci. 27: 7–13.

Analysis of Deletion Breakpoints in a Wheat Null *Wx-B1* Allele Using Molecular Markers

Mika Saito, Goro Ishikawa, Junichi Yonemaru and Toshiki Nakamura

National Agricultural Research Center for Tohoku Region, Morioka 020-0198, Japan

The entire coding region of the *Wx-B1* gene on chromosome 4A appears to be deleted in the hexaploid wheat cultivar Kanto 107, the deletion breakpoints have not yet been identified. In the present study, PCR-based markers were designed. However, for analyzing the deletion breakpoints using a comparative genomics analysis method, which was based on the synteny between wheat and the related grass species barley, einkorn wheat and rice. Using these markers, we revealed that one of the deletion breakpoints was located approximately 3.3 to 6 kb downstream of the *Wx-B1* gene. Moreover, we observed that a second gene, with an unknown function that was located downstream of the *Wx-B1* gene, was also missing in the null *Wx-B1* cultivars.

Key Words: *Triticum aestivum*, *waxy*, comparative genomics, PCR-based marker.