

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	野間 聡	
学位の種類	博士(理学)	
学位記番号	乙第1710号	※論文博士は乙
学位授与の日付	令和6年6月28日	
学位授与の要件	文部科学省令学位規則第4条第2項該当	
学位論文題目	Contribution of $\alpha$ -gliadin alleles to the extensibility of flour dough in Japanese wheat cultivars	
主指導教員	川浦 香奈子	
論文審査委員	(主査) 木下 哲	教授
	(副査) 辻 寛之	准教授
	(副査) 持田 恵一	客員教授
	(副査) 丸山 大輔	准教授
	(副査) 嶋田 幸久	教授

## 論文内容の要旨

コムギは主要作物であり、世界中でさまざまな食品として消費されている。小麦粉のこの広い加工特性はグルテンの特質による。グルテンは、コムギの種子貯蔵タンパク質であるグルテニンとグリアジンから構成され、グルテニンはポリマーとなりグルテンの弾性に、グリアジンはモノマーでグルテニンと非共有結合することにより粘性に関与するとされる。申請者は、コムギ種子に含まれるタンパク質の中で約3割を占め最も多く含まれる $\alpha$ グリアジンに着目した。 $\alpha$ グリアジンをコードする遺伝子は複雑であり、多重遺伝子族でコピー数が多く、偽遺伝子も存在する。また異質六倍体であるパンコムギではA、B、およびDゲノムに由来する同祖染色体の各遺伝子座(*Gli-A2*、*Gli-B2*、および*Gli-D2*)に複数の $\alpha$ グリアジン遺伝子がトランスポゾンを含んで不均一に存在することが報告されている。これらのことから、コムギのゲノム中に存在する $\alpha$ グリアジンをコードする遺伝子を網羅的に調査し、小麦粉の生地物性との関連を明らかにすることを目的に研究を進め、原著論文をもとに三章で構成される学位論文となっている。

第一章では、コムギのゲノムに存在する $\alpha$ グリアジン遺伝子の構成と発現を明らかにした。パンコムギ標準実験系統である品種Chinese Springを用い、ゲノムDNAを鋳

型としたPCRにより90種の塩基配列の異なる $\alpha$ グリアジン遺伝子を同定した。染色体異数体系統を用いて、これらの座乗する染色体を決定した。同定した $\alpha$ グリアジン遺伝子について最新のリファレンスゲノム配列との対応を調査したところ、90種のうち52遺伝子が共通し、全長をコードする遺伝子配列はすべて網羅することを明らかにした。また、リファレンスゲノムにない遺伝子配列も同定できていたことから、得られた $\alpha$ グリアジン遺伝子配列は妥当であることが示された。さらに、3カ年に渡り圃場で栽培されたコムギの登熟期の種子を用いて発現解析を行った。その結果、 $\alpha$ グリアジン遺伝子の発現時期はどの年度も開花後日数ではなく積算温度に調節されることを明らかにした。一方で、発現量は $\alpha$ グリアジン遺伝子によって個別に異なり、日照時間やその他の環境要因に影響されることを明らかにした。

第二章では、 $\alpha$ グリアジンの遺伝子型と小麦粉生地物性との関連を明らかにした。品種Chinese Springで種子登熟期に発現している $\alpha$ グリアジン遺伝子をPCRにより単離したところ、26種が同定された。個別に特異的なプライマーを作成し、日本の商業栽培コムギ22品種のゲノムDNAを用いてPCRを行い、増幅の有無を品種間で比較したところ、*Gli-A2*で2種類、*Gli-B2*で10種類、*Gli-D2*で4種類の遺伝子型を判別することができた。また、この22品種の小麦粉の生地物性をアルベオコンシストグラフにより測定したところ、品種によって伸展性に違いがあることが示された。品種の遺伝子型により生地の伸展性に違いがあるかを検定したところ、*Gli-A2*、*Gli-B2*、*Gli-D2*のそれぞれで生地の伸展性が有意に高い遺伝子型が示された。さらに*Gli-A2*の遺伝子型 $\alpha$ -1は、収穫年度の異なる小麦粉においても $\alpha$ -2より生地の伸展性が高かったことから、生育環境に影響されにくく、育種的にも有用な遺伝子型であることが示唆された。

第三章では、日本のコムギ品種における $\alpha$ グリアジンの遺伝的多様性を評価した。商業栽培コムギ22品種に加え、農研機構で選出された日本のコムギコアコレクション95品種を用いて $\alpha$ グリアジンの遺伝子型を決定し、育成年代ごとに多様性をpolymorphic information content index (PIC値)により評価した。*Gli-A2*、*Gli-B2*、*Gli-D2*の各遺伝子座で時代の経過とともにPIC値が高くなっていったことから、遺伝的多様性は高くなる傾向にあることが示された。また、小麦粉の生地伸展性が高い遺伝子座の頻度を各遺伝子座で調査したところ、時代の経過とともに頻度が高くなっていることが示された。これらのことから、日本のコムギの品種は、品種改良により生地の伸展性の高い $\alpha$ グリアジンの遺伝子型が選択されてきたことが示唆された。

これらの研究から、コムギにおいて種子貯蔵タンパク質である $\alpha$ グリアジンの小麦粉の生地伸展性を高める遺伝子型が明らかになった。また、多重遺伝子である $\alpha$ グリアジン遺伝子の発現量は個別に環境の影響を受けること、一方で環境の影響を受けにくい遺伝子型が明らかになった。本研究では標準実験品種であるChinese Springの $\alpha$ グリアジン遺伝子を基準に解析を行っているため、今後は他の品種も含めた包括的な評価を行うことで、これらの知見の育種への活用が期待される。

## 論文審査結果の要旨

本学位論文の審査は、提出された学位論文の内容、博士論文発表会での発表内容、口頭試問にもとづき、5名の審査員（主査：木下哲教授、副査：嶋田幸久教授、辻寛之准教授、丸山大輔准教授、持田恵一客員教授）により、令和6年3月28日に実施された。口頭試問は論文に関する専門分野の学識、関連分野の学識に関して行われた。これらの内容から、同日に開かれた審査委員会において博士（理学）の学位授与に相当するか審議された。

申請者は、コムギの種子貯蔵タンパク質である $\alpha$ グリアジンをコードする多重遺伝子を網羅的に解析し、個別の遺伝子発現は生育環境に影響されることを報告した。また、日本のコムギ品種において小麦粉の生地伸展性を高める遺伝子型を見出したことを報告した。

丸山委員から、日本の育種の変遷から、 $\alpha$ グリアジン遺伝子型の多様性や生地伸展性を高める遺伝子型が高くなっていることが分かったが、品種Chinese Springに存在する $\alpha$ グリアジン遺伝子を基準に評価を行っているので、Chinese Springが最も遺伝子数が多く進展性も良いということにならないかと指摘があった。これに関して、最近のゲノム解読の報告を示し、他の品種にはChinese Springにない $\alpha$ グリアジン遺伝子が存在するので、Chinese Springを基準とした遺伝子型の判断はできることは示せたが、包括的ではないことを説明した。また、グルテンはタンパク質同士が架橋してできているが、胚乳の中でもできているか、またその解析法について質問された。これに対して、胚乳内でゴルジ体から分泌されるときにジスルフィド結合により架橋されているという報告はあり、非還元下でのタンパク質の電気泳動で示せると回答した。

辻委員から、育種の変遷で、遺伝的多様性が上がると小麦粉の生地物性が良くなる遺伝子型が増えるのか、また、多様性はPIC値で示しているが、2種類しか遺伝子型がない遺伝子座でPIC値は有効なのか質問された。これらに関して、近年になるにしたがって外国の品種を小麦粉の品質改良の育種に用いているため、結果として多様性が高くなったと推察していることを説明した。PIC値については、2種類の遺伝子型に対して有効か確認できていないが、多様性が高まっているとはいえることを説明した。さらに辻委員からは、収穫年度が異なる小麦粉で安定して生地伸展性を高める遺伝子型について、統計手法や解釈について指摘された。これに関しては、結果は同様になるが、解釈に誤解があることが考えられたため、確認するとした。

嶋田委員からは、育種の変遷で、生地伸展性を高める遺伝子型の頻度が上がっているが、生地伸展性には影響しない遺伝子型の頻度も変わっているのではないかと指摘された。これに対して、実際に伸展性に関与しない遺伝子型で頻度が高くなっている

ものもあり、環境の影響を受けやすいために育種の過程で選択されてこなかった可能性を説明した。また、本研究で得られた遺伝子配列の一部はリファレンスゲノム配列にはなかった理由を問われた。これに対して、本研究ではPCRにより遺伝子配列を取得しており、リファレンスゲノムの方では、 $\alpha$ グリアジン遺伝子の配列に繰り返し配列が多いのでpartialになっているという推察を回答した。

持田委員から、リファレンスゲノムに対する遺伝子の検索方法について質問された。これに対して、ゲノム中で実際に配列がpartialになっているのか、アノテーションの問題なのか、明確な回答はされなかった。また、生地の伸展性に関与する遺伝子型について、遺伝子の数なのか遺伝子の効果によるものか問われた。これに関しては、今回の結果からは言えないが、報告などから両方の面から考えていることを説明した。さらに、生地の伸展性を高める遺伝子型を結論付けているが、グルテンは他の種子貯蔵タンパク質と超分子構造を取るので、他の要因も考慮する必要があることを指摘された。これに関して、他のタンパク質の影響はあると考えていることを回答した。今回はゲノムのバックグラウンドをそろえていないので、今後、準同質遺伝子系統を用いることや、小麦粉に個別の精製タンパク質を添加する実験を行うことで今回見出した遺伝子座の有効性を明らかにできることを説明した。

木下委員からは、種子貯蔵タンパク質の発現を調節するトランスの因子について質問された。これに対して、作成したモデル図を使い、環境と転写因子およびシス配列の関連について申請者の考えを説明した。転写因子以外にもアセチル化、脱メチル化やポリコーム系の関与についても議論された。また、種子の登熟期の温度が変わると発現も変わることから、遺伝子の発現やタンパク質の蓄積は胚乳で見るとはならず、さらに細かい局在を見る必要があることを指摘された。これに関して、実際にタンパク質やデンプンの局在が変わる報告はあり、小麦粉の品質にも関わるので今後の課題であることを回答した。

また、発表会では割愛されたセリアック病の原因となる $\alpha$ グリアジンにあるエピトープについて質問された。丸山委員からは、生地の伸展性を高めることとエピトープを減らすことは両立できるか問われた。これに関して、エピトープは短いアミノ酸配列なので、ゲノム編集によりグリアジンの量は減らさずに改変できる可能性があるかと回答した。嶋田委員から、抗エピトープ抗体を用いて免疫ブロットをやっているが、エピトープを網羅できているのか指摘があった。これに対しては、エピトープとして報告されているものを使っているが、網羅しているとは言えないことを説明した。加えて、嶋田委員からは、グリアジンにはアレルギーのエピトープの数も多いことから、低アレルゲン小麦の作出は可能であるか問われた。これに関して、発見されていないアレルゲンもあることから、企業の立場としてアレルゲンを無くしたコムギができたとしてもアレルゲンフリーとは言えないが、治療のツールとして低アレルゲン小麦が利用できることを説明した。持田委員からは、コムギの代替のオオムギやオート麦について議論があり、オオムギやオート麦にもアレルギーのリスクはあるため、マイコプロテインによってグルテン構造を作って代替品にする試みが説明された。