

## SSRマーカーによるラーメン用小麦品種 「ちくしW2号」の識別

高田衣子\*・甲斐浩臣・塚崎守啓・馬場孝秀<sup>1)</sup>

福岡県育成のラーメン用小麦品種「ちくしW2号」の知的財産権の保護のため、「ちくしW2号」を含む県内に普及する小麦 8品種および中華めん用市販小麦粉18種について、DNAマーカーを用いた効率的識別技術の確立を検討した。

SSR法において、2種のDNAマーカー gwm 210およびgwm 533を用いることにより、県内に普及する小麦品種と「ちくしW2号」を識別できることが明らかとなった。葉身、粒、粉、生めん、ゆでめんのいずれの状態でも、識別に十分な収量、純度のDNAを抽出することができた。また、これらのマーカーにより、「ちくしW2号」と中華めん用市販小麦粉とを識別することが可能であった。

以上の結果から、DNAマーカー gwm 210およびgwm 533を用いたSSR法により、「ちくしW2号」を多様な材料において識別できることが明らかとなった。

[キーワード：小麦、品種識別、DNAマーカー、SSR]

Discrimination of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivar ‘CHIKUSHI-W2’ Using SSR Markers. TAKATA Kinuko, Hiroomi KAI, Morihiro TSUKAZAKI and Takahide BABA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 31: 8-12 (2012)

To protect the intellectual property rights of wheat cultivar ‘CHIKUSHI-W2’ bred at the Fukuoka Agricultural Research Center, we developed discrimination technology for 8 wheat cultivars cultured in Fukuoka Prefecture, including ‘CHIKUSHI-W2’ and for 18 flour products for Chinese noodle. For this technology, we used the SSR method. Using two DNA markers (gwm210, gwm533), ‘CHIKUSHI-W2’ was distinguished from 7 other cultivars and 18 flour products. The yield and purity of DNA extracted from leaf, grain, flour, fresh noodle, and boiled noodle were all sufficient for this technology. These results show that, using two DNA markers (gwm210, gwm533), ‘CHIKUSHI-W2’ was distinguished from other cultivars and flour products in various sample conditions.

[Key words : wheat, identification, DNA markers, SSR]

### 緒 言

福岡県は、北海道に次ぐ国内第2位の小麦生産地であり、本県における小麦の作付面積は麦類全体の約75%を占めている。また小麦は米麦大豆2毛作体系の重要な土地利用型作物として位置づけられている。しかし、小麦作付品種のほとんどは日本めん用品種であり、その需要は飽和状態となっていることから(菊池2007, 中山2010)、需要の高い優良品種の導入とその作付け推進が重要な課題となっていた。また、本県では、低加水で細いストレートめんを用いた博多ラーメンや久留米ラーメンなど、全国的にも有名なラーメン食文化が発達している(長尾1998, 奥山2003)が、めんの原料となる小麦のほとんどを外国産小麦に頼っていた(農林水産省2008)。

このような背景から、福岡県農業総合試験場では新たな需要を創出する小麦品種の育成に取り組み、2008年、我が国で初めてラーメン専用の小麦品種「ちくしW2号」を育成した(2010年8月品種登録)。「ちくしW2号」は、「東山40号(のちのハナマンテン)」を母、「西海186号(のちのミナミノカオリ)」を父とした組合せに由来する。高タンパク含量でラーメン適性が高く、早生、多収であり、縞萎縮病に抵抗性で、穂発芽

性は難である(古庄ら2009)。2009年に福岡県の準奨励品種に採用され、2011年産(2010年秋播種)では約770ha作付されており、今後も面積は拡大する予定である。

一方、本県では「ちくしW2号」の消費拡大や普及促進を図るために、本品種を使った小麦粉やラーメン等の商品に「ラー麦」という商標登録を行い、地域ブランド農産物として育てようとしている(<http://www.pref.fukuoka.lg.jp/d05/ra-mugi.html>)。このような中、品種の偽装や異品種混入は消費者の信頼を損なう大きな要因となる。そのため、知的財産権の侵害にあたる異品種を識別して知的財産権を保護することは、ブランド農産物の競争力を強化する有効な手段になる。

小麦を含む農産物の品種識別については、DNA分析技術が広く用いられており、代表的なものとしてRandom Amplified Polymorphic DNA (RAPD)法がある。小林・吉田(2006)はRAPD法を用いたムギ類の品種識別を報告しているが、RAPD法は他のDNA分析と比較しての再現性の低さや、他品種と近縁度が高い場合の識別が困難になる可能性も併せて指摘している。DNA品種識別検討委員会では、再現性の高い分析手法として、Cleaved Amplified Polymorphism

\* 連絡責任者(農産部: kinu-t@farc.pref.fukuoka.jp)

受付2011年7月29日; 受理2011年10月6日

1) 現 福岡県農林水産部経営技術支援課

Sequence (CAPS) 法, Simple Sequence Repeats (SSR) 法などを挙げており, その中でもSSR法は多型性ならびに再現性が高く, 品種識別に適するとされている(独立行政法人種苗管理センター 2008)。小麦の品種識別においても, SSR法を用いることで多型が得られやすく, 国内品種の多型解析に有効であるといった報告がある(中村ら 2004)。

そこで本研究では, 福岡県育成の「ちくしW2号」について, SSR法を用いた識別技術の確立を試みた。また, 小麦は米や果樹などと異なり, 小麦粉やめんなどのように加工された状態で市場に流通することがほとんどであるが, 小麦加工品は外観や成分などから使用品種を判別することが不可能である。そこで, ラーメン用の小麦として想定される加工品についても, 識別可能であるか併せて検討したので報告する。

## 材料および方法

### 1 供試品種および材料

試験は, 福岡県育成品種「ちくしW2号」およびその母, 父品種に加え, 福岡県内に普及している主要な小麦品種を中心とした合計 8品種(「ちくしW2号」, 「ミナミノカオリ」, 「東山40号」, 「ニシノカオリ」, 「ニシホナミ」, 「チクゴイヅミ」, 「シロガネコムギ」, 「農林61号」)ならびに, 県内製粉企業 5社が販売する主要な中華めん用小麦粉18種を用いて行った。解析材料は, 小麦品種については葉身, 粒, 小麦粉, 生めん, ゆでめんとした。

### 2 DNAの抽出

DNA抽出に供試する材料の調製法は以下のとおりとした。葉身は生葉を凍結乾燥(東京理化学器械社製 FDU-1299)したのちにマルチビーズショッカー(安井機器社製 MB 501)で2,000rpm, 10秒間破碎処理した。粒はミルサー(岩谷産業社製 IFM-66D)で破碎し, 小麦粉は現物を使用した。生めんは, 小麦粉1,000g, 食塩10g, 粉末かんすい10g, 水 280gの割合で配合して生地をつくり, 製麺機(さぬき製麺社製 セとTS-1P)を用いて農業総合試験場で製造し, 凍結している状態を乳鉢で粉碎した。ゆでめんは, 冷凍した生めんを沸騰した水で一般のゆで時間よりもやや長い 2分間加熱したもので, 再度冷凍し凍結している状態を乳鉢で押しつぶした。これらの調製した材料からDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製)によりゲノムDNAを抽出した。DNAの抽出には 1サンプルあたりそれぞれ第1表に示す量を供試した。抽出したDNAは分光光度計(Thermo社製 Nano Drop)で純度と抽出量を調査し, 10ng/μLに濃度調整してPCR反応に供試した。

### 3 PCR反応

PCRのプライマーは, GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>) およびコムギ統合データベース (<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/>) において公開されているDNAマーカー 328種類を使用した。

反応液の組成は, 鋳型としてのゲノムDNA20ng, Forward側プライマーとReverse側プライマーを各 0.5mM, Ex Taq (Takara社製) 0.5unit, Ex Taq

と同梱のdNTP混合液 250μM, MgCl<sub>2</sub> 1.5μM, 1×PCRバッファーを含む合計10μLとした。PCR反応は, Program Temp Control System PC-818 (ASTECC社製) で94℃ 9分間の処理ののち, 熱変成94℃ 30秒, アニール60℃ 30秒, 伸長反応72℃ 30秒を 1サイクルとして35サイクル行い, 最後に72℃ 5分間の処理を行った。2種類のプライマーを用いたマルチプレックスPCRの反応液の組成は, Forward側プライマーとReverse側プライマーを各0.25mMとし, その他は前述の反応液組成と同様とした。

PCR反応後のDNA増幅断片は, 電気泳動用電源(ATTO社製 AE-8750)で200V, 3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。泳動時間は55分間とし, ゆでめんから抽出したDNAを用いたマルチプレックスPCR反応についてはバンドの重複を避けるため60分間とした。泳動後, アガロースゲルを 2μg/mLのエチジウムブロマイド溶液で 1.5時間染色後, 紫外線照射下で断片長多型を調査した。

## 結果および考察

### 1 解析材料からのDNA抽出

葉身, 粒, 小麦粉, 生めん, ゆでめんの各解析材料から抽出したDNA収量(μg/100mg)は3.39~21.08であり, 粒とゆでめんでは少ない傾向がみられた(第1表)。これは, 材料の粉碎程度や水分含量に起因すると考えられた。一方, DNAの純度を示す 260/280nm値は1.72~2.06であった。DNAの純度は 260/280nm値が2.0で最も高く, 1.7以上で実用上問題ないとされることから, いずれの解析材料でも, 多型分析を行うのに十分な純度と収量のDNAがDNeasy Plant Mini Kitによる簡易抽出で得られることが明らかとなった。

第1表 「ちくしW2号」および「ミナミノカオリ」の各解析材料から抽出したDNAの収量と純度

供試材料	供試量 <sup>1)</sup> (mg)	サンプル100mg あたりDNA収量 (μg)		DNA純度 <sup>2)</sup> (260/280 nm)
		ちくしW2号	ミナミノカオリ	
葉身	ちくしW2号	70	8.45	1.89
	ミナミノカオリ	40	12.90	1.91
粒	ちくしW2号	100	3.44	2.06
	ミナミノカオリ	100	5.39	1.95
粉	ちくしW2号	100	9.07	1.93
	ミナミノカオリ	100	7.54	1.89
生めん	ちくしW2号	250	8.08	1.93
	ミナミノカオリ	250	21.08	1.92
ゆでめん	ちくしW2号	250	5.25	1.72
	ミナミノカオリ	250	3.39	1.91

1) 供試量は, 葉身は乾物重, その他は生体重。

2) 260/280 nmの値が2.0でDNAの純度は最も高く, 1.7以上で実用上問題ない。

### 2 DNAマーカーの選定

供試した 8品種の葉身から抽出したDNAを鋳型としたPCR反応を行い, DNA多型を調査した。供試した 328種のDNAマーカーのうち, gwm 210では「ちくしW2号」とその母親である「東山40号」で約200bpのバンドが増幅されず多型が認められなかったが, その他の 6品種では約 200bpのバンドが増幅され, 「ちくしW2号」および「東山40号」との多型が認められた(第1図)。また, gwm 533では「ちくしW2号」とその父親である「ミナミノカオリ」で約 110bpのバンドが増幅され多型が認められなかったが, 他の 6品種では約 110bpのバンドが増幅されず, 「ちくしW2号」および「ミナミノカオリ」との多型が認められた。こ

これらのことから、gwm 210とgwm 533の 2種のマーカーを併用することで「ちくしW2号」を他の 7品種から識別できることが明らかとなり、これらを「ちくしW2号」識別のためのマーカーとして選定した。

さらに、これらのマーカー利用における「ちくしW2号」の識別にかかる手順を簡素化するため、gwm 210とgwm 533について同時検出系（マルチプレックスPCR）の確立を試みた。その結果、2種類のプライマーを同時に用いても、「ちくしW2号」では約 200bpのバンドが増幅せず、約 110bpのバンドが増幅され、各々単独でPCR反応を行った場合のバンドパターンを再現できた（第1図）。これらの結果から、マルチプレックスPCR反応により「ちくしW2号」と県内に普及する主要品種とを識別する手法を確立できた。

「ちくしW2号」の知的財産権保護のために、多様な場面で本手法が活用されるべきことを考慮すると、より操作性が良く、安全性が高い手法であることが望まれる。SSRマーカーの増幅産物は 100～200bpであり、多型も 2～3bpの差しかないこともある。このため、アガロースゲルによる分離能ではアガロース濃度を 3～4%まで高めても10bp未満のバンドの大きさの差を判定するのは困難である（中村ら 2004）。そのため、本来はポリアクリルアミドゲルによる検出が適していると報告されている（小林ら 2006）。しかしながら、ポリアクリルアミドゲルは作成の手順が煩雑であり、また、アクリルアミドは神経毒が強く危険が伴う。そのため、3%アガロースゲルを用いて増幅産物の検出を試みたところ、gwm 210とgwm 533を用いた「ちくしW2号」の識別では十分に検出でき、多型を判定できることが明らかとなった。

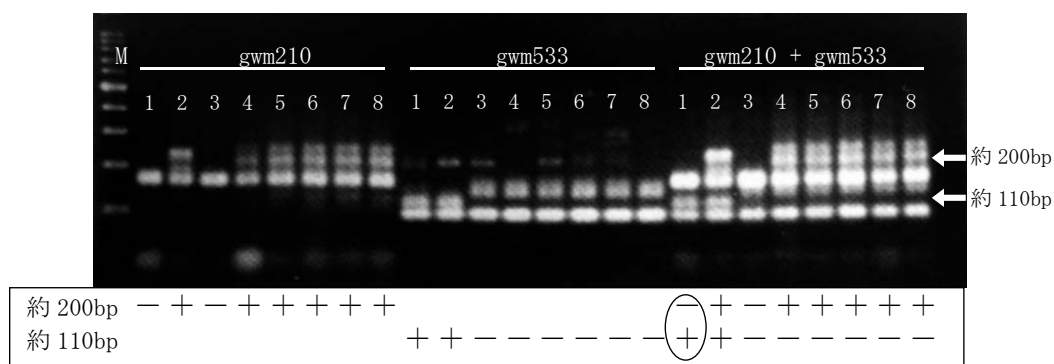
このように、再現性と信頼度が高いSSR法（独立行政法人種苗管理センター 2008）において、ポリアクリルアミドゲルよりも操作が簡便なアガロースゲルを用いて多型を検出でき、「ちくしW2号」の識別に必要な 2種のマーカーによる多型情報をマルチプレックスPCR反応により一度で得られる手法を確立した。これ

により、育成品種の保護が必要となる場面において、本手法が迅速に活用されることが期待できる。

### 3 小麦加工品における識別

「ちくしW2号」および「ミナミノカオリ」の葉身、粒、小麦粉、生めん、ゆでめんから抽出したDNAを鋳型とし、SSRマーカー gwm 210を用いてPCR反応を行い、DNA多型を調査した。その結果、すべての解析材料において「ちくしW2号」と「ミナミノカオリ」の識別性は保存されており、めんやゆでめん等の小麦加工品においても「ちくしW2号」を識別できることが明らかとなった（第2図）。

菓子やパンなどの小麦加工食品から抽出したDNAは高熱で加工した食品ほど断片化が進んでいるものの、ほとんどの小麦加工食品でDNAを抽出することができ、300bp以下のPCR増幅は可能であるとの報告がある（藤田ら 2006）。本報告においても、加熱処理した解析材料であるゆでめんから抽出したDNAは、他の材料から抽出したDNAよりも検出されるバンドの数が増えたことから、断片化する傾向がみられた（第2図）。しかし、「ちくしW2号」の識別に必要なバンド（約 200bp）は明瞭に検出されており、ゆでめんも解析材料として十分使用できると考えられた。一方、加熱処理した材料においては、DNAの断片化によりPCR反応で増幅されるバンドの数が増加し、gwm 210においてゆでめんのみおよそ 110bpの位置にバンドが検出された（第2図）。これは、gwm 533において「ちくしW2号」の識別に必要なバンドが検出される位置と近接することから、gwm 210とgwm 533のマルチプレックスPCR反応を行った場合、バンドが重複して識別が困難になることが危惧された。そこで、1種のマーカーで多型を検出する場合よりも泳動時間を 5分程度延長してバンドの間隔を広くするよう試みた。その結果、ゆでめんから抽出したDNAにおいても識別に必要なバンドが重複することはなく、マルチプレックスPCR反応により「ちくしW2号」を他の品種と識別す



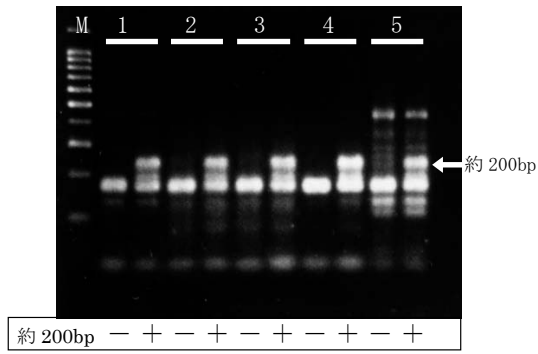
第1図 「ちくしW2号」および県内流通主要品種のバンドパターン

注) マーカーは左より gwm210, gwm533, gwm210 と gwm533 の混合（マルチプレックス）。

M: サイズマーカー (100bp ladder), 1: ちくしW 2号, 2: ミナミノカオリ, 3: 東山 40号, 4: ニシホナミ, 5: ニシノカオリ, 6: チクゴイズミ, 7: シロガネコムギ, 8: 農林 61号  
各品種とも葉身から抽出したDNAを用いた。

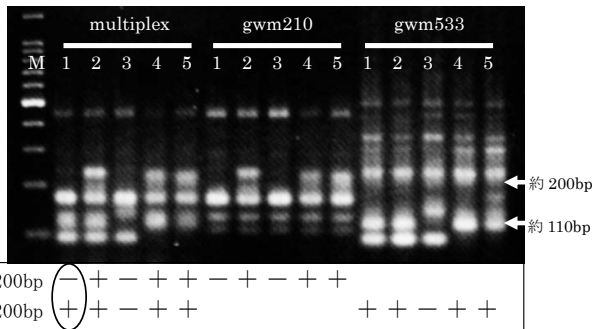
◁の位置(約 200bp および約 110bp)のバンドの有無 (+, -) でちくしW 2号を識別する。

(ちくしW 2号は約 200bp, 約 110bp それぞれ-, +)



第2図 「ちくしW2号」および「ミナミノカオリ」の各材料から抽出したDNAのバンドパターン

注) マーカーは gwm210  
 M: サイズマーカー (100bp ladder)  
 1: 葉身, 2: 粒, 3: 小麦粉, 4: 生めん,  
 5: ゆでめん  
 左: ちくしW2号, 右: ミナミノカオリ

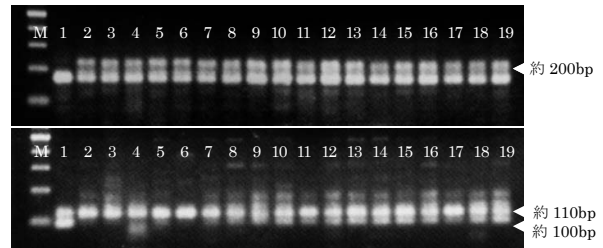


第3図 ゆでめんより抽出したDNAにおけるマルチプレックス反応を用いた識別

注) M: サイズマーカー (100bp ladder)  
 1: ちくしW2号, 2: ミナミノカオリ, 3: 東山40号,  
 4, 5: 中華めん用市販小麦粉

ることができた(第3図)。これらのことから、葉身、粒、小麦粉、生めん、ゆでめんの全ての状態で「ちくしW2号」であるか否かをマルチプレックスPCR反応により識別できることが明らかとなった。なお、泳動時間の延長幅については、電気泳動時のゲルの温度が高いほど泳動は速くなることから、ゲルの温度に影響する泳動バッファーの量や泳動槽内のゲルの枚数などにより、調節する必要があると考えられる。

めんの原料となる小麦を外国産小麦に頼っているという背景から(農林水産省 2008)、主要な中華めん用小麦粉には外国産小麦を用いていることが予測される。そこで、「ちくしW2号」の小麦粉ならびに県内製粉企業5社が販売する主要な中華めん用小麦粉18種について、選定した2種のSSRマーカーで遺伝子型の調査を行った。その結果、gwm 210では、「ちくしW2号」は約 200bpのバンドは増幅されず、中華めん用小麦粉は約 200bpのバンドが増幅された。gwm 533では、「ちくしW2号」は約 100bpならびに約 110bpの2つのバンドが増幅され、中華めん用小麦粉では約 100bpのバンドが増幅されないものや「ちくしW2号」では増



第4図 「ちくしW2号」および中華めん用市販小麦粉のバンドパターン

注) マーカーは、上図: gwm210, 下図: gwm533。  
 M: サイズマーカー (100bp ladder), 1: ちくしW2号,  
 2-19: 中華めん用市販小麦粉

DNA抽出

抽出材料

- 葉身: 凍結乾燥後粉砕
- 粒: 粉砕
- 小麦粉: 現物
- 生めんおよびゆでめん: 凍結状態で乳鉢でつぶす

マルチプレックス PCR 反応

使用 SSR マーカー: gwm210, gwm533  
 (中華めん用小麦粉は gwm210 のみで識別可)

アガロース電気泳動

識別に用いるバンド

- gwm210: 約 200bp
- gwm533: 約 110bp
- (中華めん用小麦粉は 110bp 以外のバンド)

第5図 SSRマーカーによる「ちくしW2号」識別の流れ

幅されなかったバンドが確認されるものなど、サンプルにより様々な多型を示した(第4図)。これらのことから、gwm 210とgwm 533の両マーカーともに「ちくしW2号」と中華めん用小麦粉18種とを識別することができた(第4図)。「ちくしW2号」と中華めん用小麦粉との場合、1つのマーカーで「ちくしW2号」を識別できることから、明瞭なバンドが検出されるgwm 210のみの使用で十分であると考えられる。

以上のように、「ちくしW2号」と福岡県内に普及する主要な小麦品種ならびに県内製粉企業5社が販売する主要な中華めん用小麦粉18種とを識別できる手法を確立でき(第5図)、本手法が育成品種の保護に活用されることで、競争力強化や異品種混入に対する抑止力として有効な手段になると考えられる。また、葉身、粒、小麦粉、生めん、ゆでめんの全ての状態で識別可能であることから、市場流通の幅広い場面において、本手法を「ちくしW2号」の知的財産権保護に活用できると期待される。

## 引用文献

- 独立行政法人種苗管理センター (2008) DNA品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン-SSRについて. P. 3-4.
- 藤田由美子・池田達哉・荒木悦子・矢野 博 (2006) 小麦加工食品からのDNA抽出法およびDNA断片化程度の評価. DNA多型 114: 154-156.
- 古庄雅彦・塚崎守啓・松江勇次・内村要介・山口 修・馬場孝秀・高田衣子・宮崎真行・濱地勇次 (2009) ラーメン用小麦新品種「ちくしW2号」の育成. 福岡農総試研報28: 39-44.
- 菊池むつみ (2007) 平成20年産国内小麦の入札について. 米麦改良2007(10): 2-7.
- 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. 日作紀75(2): 165-174.
- 長尾精一 (1998) 世界の小麦の生産と品質-上巻-. 東京: 輸入食料協議会事務局, pp.83.
- 中村和弘・中村信吾・伊藤裕之 (2004) マイクロサテライト法による日本の主要小麦品種判別手法の開発. 北陸作物学会報40: 68-70.
- 中山則和 (2010) 国産小麦品種開発の現状と今後の方向性. 米麦改良2010(7): 2-9.
- 農林水産省総合食料局食糧貿易課企画班 (2008) 麦の受給に関する見通し (平成20年度) について. 米麦改良2008(5): 2-9.
- 奥山忠政 (2003) 文化麺類学・ラーメン篇. 東京: 明石書店, pp.77-86.