

リポキシゲナーゼ欠失大麦系統「大系 LM2」の作出および DNA マーカーの開発

1. 試験のねらい

ビール大麦に含まれるリポキシゲナーゼ(LOX)は、ビールの老化臭の原因物質を作り出し、また、泡もち性を低下させる。そのため実需者からは、ビールの鮮度維持向上のため、その低減化が強く求められている。これまでに、北米の六条ビール大麦品種「Karl」を原品種とする原麦リポキシゲナーゼ(LOX-1)欠失突然変異体「大系 LM1」を作出した。しかし、「大系 LM1」は晩生であり、大麦縞萎縮病やうどんこ病に罹病するなど、農業特性は改善すべき点が多い。そこで、さらなる育種の効率化のため、最新のビール大麦品種から新たな LOX-1 欠失大麦を作出する。

2. 試験方法

「サチホゴールドン」を原品種として、アジ化ナトリウムによる突然変異誘発処理を行った M₂ 1943 系統を材料として、LOX-1 活性欠失変異体の選抜を行った。選抜には、本県で開発した LOX 活性簡易評価法を用いた。得られた突然変異体の LOX-1 欠失遺伝子の塩基配列解析、タンパク質発現の有無の確認は、生物工学部あるいは農研機構作物研究所の協力により分析した。

3. 試験結果および考察

(1) 「大系 LM1」と同様に、LOX-1 活性を持たない「大系 LM2」を選抜した。「大系 LM2」の LOX-1 活性欠失性は選抜を行った M₃ 種子だけではなく、自殖後代(M₄、M₅)、交雑後代(F₂)でも確認された。また、「大系 LM2」と LOX-1 活性を有する系統の交雑 F₂ では LOX-1 活性の有：無が 156：42 に分離し、LOX-1 活性欠失性は単一劣性遺伝子の期待分離比に適合した($\chi^2=1.32$ 、 $P=0.22$)。

「大系 LM2」は、稈長が短く、穂長が長くなる傾向であったが、原品種「サチホゴールドン」と有意な差はみられなかった(表-1)。

(2) 「大系 LM2」の LOX-1 タンパク質は、コメの抗 LOX 抗体を用いたウェスタンブロッティングにおいて、原品種サチホゴールドンの 10 分の 1 以下となっており、正常に形成されていないことが明らかとなった(図-1)。

(3) 「大系 LM2」の LOX-1 遺伝子では、第 2 エクソン内に 1 塩基置換が生じ、終止コドンが形成され、正常な LOX-1 タンパク質が形成されないことが示された(図-2)。

(4) 「大系 LM2」の LOX-1 遺伝子の変異箇所を認識する制限酵素 *HphI* を利用した CAPS マーカー(図-3(a))と 2 塩基のミスマッチを導入したミスマッチプライマーにより(図-3(b))、LOX-1 遺伝子の正常型(LOX-1 活性をもつサチホゴールドン型)と変異型(LOX-1 活性をもたない大系 LM2 型)、ヘテロ型を判別することが可能となった。

4. 成果の要約

最新のビール大麦品種「サチホゴールドン」を原品種として、新たな LOX-1 活性欠失系統「大系 LM2」を作出した。また、「大系 LM2」に由来する LOX-1 変異遺伝子型判別に有用な DNA マーカーを開発した。

(担当者 栃木分場 ビール麦品質研究室 大関美香、五月女敏範、春山直人)

表 - 1 リボキシゲナーゼ欠失大麦系統「大系 LM2」の農業特性

系統名・品種名	稈長 cm	穂長 cm	不稔率 %	整粒歩合 %	整粒 千粒重 g
大系 LM2	85.5±8.6	7.2±0.4	0.4±1.1	92.8	50.6
サチホゴールド	88.7±4.2	6.4±0.5	2.0±2.9	97.4	47.7
	n.s	n.s	n.s	-	-



図 - 1 「大系 LM2」種子タンパク質のウェスタンブロッティング

- 注 1. 抗体: 抗コメ LOX-3 ポリクローナル抗体
 注 2. レーン 1; 原品種「サチホゴールド」
 2; レーン 1 の 1/3 の濃度
 3; レーン 1 の 1/10 の濃度
 4; レーン 1 の 1/30 の濃度
 5; レーン 1 の 1/100 の濃度

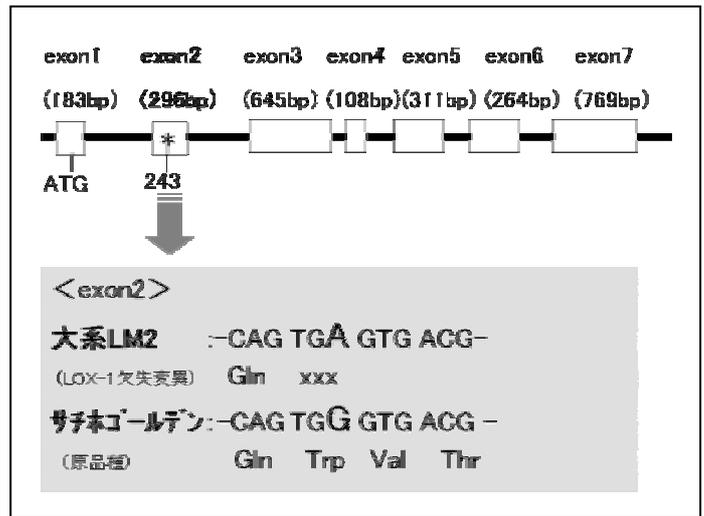
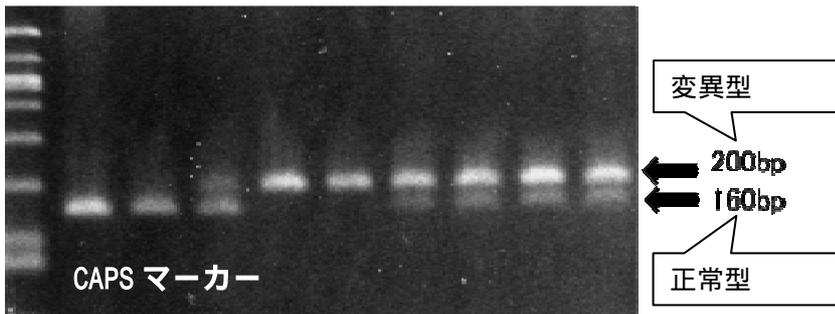


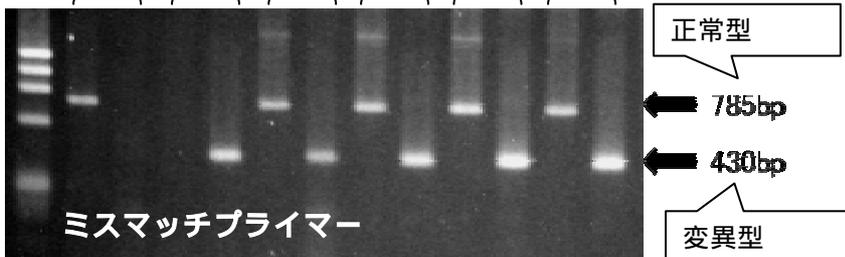
図 - 2 「大系 LM2」の LOX-1 遺伝子の変異部位
 注. 開始コドンから 243 番目の塩基 () が G A に置換し、停止

(a) M1 S S m L L F1 →



- S; サチホゴールド (正常型)
 m; 「大系 LM2」とサチホゴールドの mix
 L; 「大系 LM2」(変異型)
 F1; 「大系 LM2」/サチホゴールドの F1
 M1; DynaMarker DNA LowD
 M2; Marker4

(b) M2 S L m F1 →



- 注. 各サンプル 2 レーン.
 左側は正常型特異的プライマーによる増幅、右側は変異型特異プライマーによる増幅

図 - 3 DNA マーカーによる LOX-1 遺伝子型の判別