

## ビール大麦の主要形質DNAマーカーの開発・評価と 育種利用上の問題点

長嶺敬・天谷正行・池田達哉<sup>1)</sup>・大関美香・春山直人・加藤常夫<sup>2)</sup>・五月女敏範

**摘要：**ビール大麦育種の効率化を目的として、麦芽品質や農業特性に大きな影響を及ぼす5種類の遺伝子について、DNAマーカーを開発あるいは既報マーカーの有用性について検討した。ビールの香味安定性、泡持ち性に関わるリポキシゲナーゼ (*Lox-1*) に関してはCAPSマーカー及びミスマッチプライマー法に遺伝子型判別法を開発した。また、麦芽蛋白質分解に関わるセリンプロテアーゼ (*Cxp1*)、縞萎縮病抵抗性 (*rym5*)、うどんこ病抵抗性 (*mlo*)、凍霜害の回避に有用な秋播性 (*Vrn-H2*) については、外国品種を用いた研究報告のあるDNAマーカーについて、日本品種への適用性を評価した。これらのマーカーの有用性や日本品種のもつ遺伝子型変異を解析するとともに、マーカーを適用することが出来ない品種を明らかにし、育種利用上の問題点を明らかにした。

**キ-ワ-ド：**DNAマーカー、ビール大麦、育種、リポキシゲナーゼ、縞萎縮病抵抗性

## Development and Evaluation of DNA Markers for Japanese Malting Barley Breeding

Takashi NAGAMINE, Masayuki AMAGAI, Tatsuya M. IKEDA, Mika OOZEKI, Naoto HARUYAMA,  
Tsuneo KATO and Toshinori SOUTOME

**Summary :** DNA markers were developed for selecting lipoxygenase-deficient lines and published DNA markers were evaluated for four breeding characters to develop an efficient system for malting barley breeding. For the efficient selection of lipoxygenase-deficient lines which are effective to keep beer flavor and form stability, cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and genotype-specific PCR markers were developed. DNA markers for serine protease activity (*Cxp1*), barley yellow mosaic virus resistance (*rym5*), powdery mildew resistance (*mlo*) and winter habit (*Vrn-H2*) were evaluated. Based on the analysis of the genotype variation among Japanese cultivars, we found that the usability of the markers for *rym5*, *mlo*, and *Vrn-H2* has limitation in Japanese malting barley breeding.

**Key words :** DNA marker, malting barley, breeding, lipoxygenase, barley yellow mosaic virus resistance

## 緒言

近年の作物ゲノム研究の進展は著しく、ビール大麦においてもDNAマーカーを利用した育種の効率化が可能になっている。DNAマーカーを利用した育種体系を構築するには、1) 重要な育種形質を選抜できること、2) 選抜ミスが少ないこと、すなわち遺伝子本体または強い連鎖を持つマーカーであること、3) DNA抽出の手間を考慮すれば、出来るだけ多くの形質についてマーカーを揃えて選抜を実施すること、が望ましいと考えられる。

本研究ではビール大麦育種において重要かつ上記の条件をみたす5形質(原麦リポキシゲナーゼ欠損特性、セリンプロテアーゼ活性、縞萎縮病抵抗性、うどんこ病抵抗性、秋播性)に関するDNAマーカーについて検討した。

原麦リポキシゲナーゼ欠損特性は、ビールの鮮度維持(香味安定性)や泡持ち性の改良に、極めて大きい効果を示し<sup>3,4)</sup>、ビール大麦の飛躍的な高品質化に有用な特性である。当研究室で作出した原麦リポキシゲナーゼ欠損突然変異系統である大系LM1がもつ変異型*Lox-1*遺伝子の育種への活用が急務となっている<sup>15)</sup>。

セリンプロテアーゼは麦芽タンパク質の分解に関与しており、低活性型遺伝子を導入することにより、スカイゴールドなど問題となっている麦芽タンパク質の過剰分解特性の改善が期待される形質である。

縞萎縮病抵抗性はウイルス汚染の広がる栃木県でのビール大麦生産に欠くことの出来ない特性であり、複数の抵抗性遺伝子が知られている<sup>20,12)</sup>。最近、栃木県北部で見つかった新たなウイルス系統に対しては、本研究での対象抵抗性遺伝子*rym5*と最近の育成品種の持つ抵抗性遺伝子*rym3*との相補作用で抵抗性が発現すると見られており、その重要性が増している。

うどんこ病抵抗性は多収で整粒歩合の高い品種の育成には不可欠の条件であり、数多くの抵抗性遺伝子が報告されている<sup>9,6)</sup>。欧州ではうどんこ病菌レースの変化による「抵抗性品種の罹病化」が生じており、新たな抵抗性遺伝子の利用や抵抗性遺伝子の集積が重要な育種課題となっている。本研究で対象とした抵抗性遺伝子*mlo*は抵抗性崩壊がおこりにくい有望な遺伝子と考えられており<sup>8,17)</sup>、抵抗性遺伝子源の多様化が必要な日本のビール大麦育種にも特に有用な遺伝子である。

秋播性は凍霜害の回避、早播き適性の向上などのために有効な特性であり、「秋播性早生」ビール大麦の育成は長年の課題となっている<sup>26,19,7)</sup>。

本稿で報告するDNAマーカーはリポキシゲナーゼについては今回新たに開発したものであるが、他形質についてはすべて海外の品種を用いた研究で報告されたマーカーである。これらのマーカーを育種素材の遺伝的背景がかなり異なる日本での育種に利用するためには事前にその有用性や育種素材の違いによる限界などを評価する必要がある。本研究ではこのようなマーカー自体を評価するとともに、日本のビール大麦の遺伝的変異についての検討を行った。

## 試験方法

### 1. 材料及び方法

#### 1) 材料

DNAマーカーの開発や評価には遺伝子型が既知の品種・系統を用いた。また、栃木分場で育成した品種・系統など主要な日本のビール大麦品種について、各DNAマーカーによる分析を行い、遺伝的変異を分析した。

なお、リポキシゲナーゼのDNAマーカー開発には、大系LM1や一般品種の他、(大系LM1×サチホゴールド)のF<sub>1</sub>種子やF<sub>3</sub>種子なども用いた。

#### 2) DNA抽出法

大麦種子からのDNA抽出はIkedaら<sup>6)</sup>の方法で行った。すなわち、大麦種子の胚1個をルータードリルで削りだした粉(5mg程度)あるいは5mm角の葉片を1.5mlチューブにいれ、DNA抽出液(100mM Tris-HCl (pH 8.0), 50mM EDTA, 500mM NaCl, 1.25% SDS) 500μlを加えて混和した後、65℃処理を15分間行う。ついで、5M 酢酸カリウム液 160μlを加えて氷上10分間静置した後、遠心分離(12500rpm×5分)によって得られる上清 500μlを別のチューブに移し、イソプロパノール330μlと混和後、氷上に5分間静置する。遠心分離(12500rpm×5分)後、上清を捨て、70%エタノール 500μlを加えて、遠心分離(12500rpm×5分)を再度行う。上清を捨てて、室温で10~15分間乾燥させた後、RNase(6.7μg/ml)を含むTE緩衝液(10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA) 50μlに溶解して、10分間の65℃処理を行い、DNA抽出サンプルとした。

#### 3) PCRによるDNA増幅及び制限酵素処理

PCRの反応液組成は滅菌イオン交換水 12μl, PCR緩衝液(組成) 1.5μl, dNTPs(デオキシリボヌクレオチド3リン酸混合液各2mM) 1.5μl, フォワードプライマー, リバースプライマー(100pmol/μl, インビトロジェン社に依頼合成)各0.08μl, DNAポリメラーゼ0.15

unit (0.06 μl, Blend Taq, TOYOBO社), 鋳型DNA 30 ng (1 μl) とした.

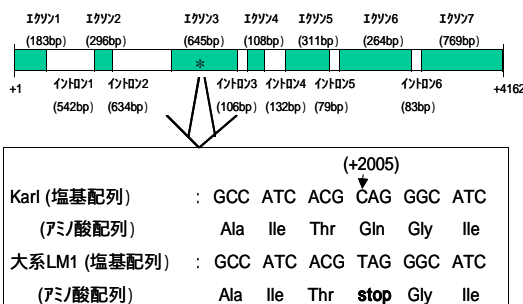
サーマルサイクラーはMycycler (パイオラッド社) を用い, 各種プライマーの塩基配列およびPCR反応条件は第1表に示した.

CAPSマーカーにおける制限酵素処理は後述のとおりである.

PCR産物あるいはCAPS産物は1.8%アガロースゲルで100V, 20~30分間電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色した後, 紫外線照射下で写真撮影した. ただし, 低分子バンド(100bp以下)の差異を検討した*Lox-1*遺伝子のCAPS解析においては20%アクリルアミドゲル(9cm幅×7cm高)で100V, 2.5時間の電気泳動を行った.

### (1) 原麦リボキシゲナーゼ遺伝子 *Lox-1*

原麦リボキシゲナーゼ欠損突然変異系統である大系LM1の*Lox-1*遺伝子にある1塩基置換(第1図)<sup>15)</sup>を検出するように, 増幅プライマーを設計し, CAPS法あるいはミスマッチプライマー法による*Lox-1*遺伝子型の判別を試みた.



第1図 大系LM1の*Lox-1*遺伝子の変異 (大関ら2007)<sup>15)</sup>

#### a. CAPS法

第1表に示したプライマー(940LOX), PCR反応条件により得られたPCR反応液15 μlに制限酵素*Bsa*AI 1 unit (New England BioLabs社)と添付の反応緩衝液2 μlを添加し, 37℃ 8時間の反応を行い, アクリルアミド電気泳動に供した.

#### b. ミスマッチプライマー法

「ミスマッチプライマー法」とは20塩基程度の増幅プライマーの3'末端にミスマッチ塩基を1塩基だけ導入した場合にはPCRによる増幅が起こるが, 増幅プライマーの3'末端に加えて, 3'末端から3塩基目にさらにもう一つミスマッチを導入した場合には増幅できないケ

ースが多いことを利用して, 目的遺伝子の1塩基多型を検出する方法で, イネのいもち病抵抗性遺伝子の検出<sup>2)</sup>などで利用されている.

この方法を用いて, 正常型と大系LM1型の*Lox-1*遺伝子塩基配列を考慮したミスマッチ塩基を導入したプライマーを設計し, 遺伝子型特異的なPCR増幅を試みた(第2図). 大系LM1型遺伝子の特異的増幅を目的とするLOX48.3プライマーセットあるいは正常型遺伝子の特異的増幅を目的とするLOX50プライマーセットを用いて第1表の条件で, PCRを行った. 第2図に示したとおり, いずれのプライマーの増幅を目的とする遺伝子に対しては1塩基のみがミスマッチを持ち, 増幅したくない対立遺伝子については2塩基のミスマッチを持つように設計されている.

LM1型特異的プライマー ATCAAGGCCATCAIGT  
 正常型特異的プライマー ATCAAGGCCATCAAGC  
 ×  
 (正常型塩基配列) ATCAAGGCCATCACGC  
 (LM1の塩基配列) ATCAAGGCCATCACGT

### 第2図 特異的増幅プライマーと*Lox-1*塩基配列のミスマッチ構造

× 共通ミスマッチ塩基  
 遺伝子型に依存したミスマッチ/対合塩基

実験材料にはサチホゴールド/大系LM1のF<sub>3</sub>種子から, あらかじめリボキシゲナーゼ活性評価の色素退色法<sup>15)</sup>により, *Lox-1*遺伝子型判定をしたLM1型ホモ, ヘテロ, 正常型ホモ各10粒を実験に用いた.

### (2) セリンプロテアーゼ *Cxp1*

麦芽タンパク質の分解に関与するセリンプロテアーゼのmRNAの発現量の多寡に関わるeQTLであることがPotokinaら<sup>18)</sup>によって報告されているCAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) マーカー Te945を用いて, 日本品種の遺伝子型変異の解析を行った.

PCRは第1表に示したプライマー, 条件で行った. PCR産物(15 μl)に制限酵素 FastDigest *Bse*GI 0.1 μl (Fermentas社)と添付の反応緩衝液2 μlを37℃ 3時間の反応を行い, アクリルアミド電気泳動に供した.

### (3) 縞萎縮病抵抗性 *rym5*

海外品種を用いた研究により, オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子rym5と0.034cMで連鎖することが, Pellioら<sup>16)</sup>によって報告されているAFLP多型由来のSTSマーカーE31/M41(の有用性を評価した. 材料には, ウイルス汚染圃場での抵抗性反応からrym5遺伝子型が既知の品種

・系統などを用いた実験を行った．PCRは第1表に示した条件により行った．

**(4) うどんこ病抵抗性 *mlo***

うどんこ病抵抗性に関わる*mlo*遺伝子5'上流域(-2.3kb)の挿入/欠失変異(In/del変異)を検出するTacconiら<sup>23)</sup>のom2マーカーの有用性を評価するために、日本品種や既知の*mlo*抵抗性遺伝子を有する品種Chariot (*mlo-1*)、Alexis (*mlo-9*)などを用いて実験を行った．PCRは第1表に示した条件により行った．

**(5)秋播性 *Vrn-H2***

播性に関わる*Vrn-H2*遺伝子のSTSマーカーとして、Szucsら<sup>22)</sup>が報告したZCCT-Ha/bマーカーの有用性を評価するために、秋播性を有するMaris Otterなどの標準品種や日本品種を用いて、第1表の条件で実験を行った．

**第1表 遺伝子型判別に用いたプライマーの塩基配列及びPCR条件**

目的形質	マーカーあるいはプライマーセット名	Fプライマー塩基配列	Rプライマー塩基配列	PCR温度条件	マーカーの原報	
リボキシゲナーゼ欠損特性 <i>Lox-1</i> (CAPS)	940LOX	GCAACGGAGGGAGTAA AACA	CGATGGCTTGGACCAA TTAC	94 4分-(94 40回-72 5分	30秒-53 45秒-72 45秒) ×	なし
リボキシゲナーゼ欠損特性 <i>Lox-1</i> (LM1型特異的増幅)	LOX48.3	ATCAAGGCCATCATGT	CGATGGCTTGGACCAA TTAC	94 4分-(94 40回-72 5分	30秒-47 45秒-72 45秒) ×	なし
リボキシゲナーゼ欠損特性 <i>Lox-1</i> (正常型特異的増幅)	LOX50	ATCAAGGCCATCAAGC	CGATGGCTTGGACCAA TTAC	94 4分-(94 40回-72 5分	30秒-47 45秒-72 45秒) ×	なし
セリンプロテアーゼ <i>Cxp1</i>	Te945	GTCGTGCCACGGAAAT TACT	AACACCACTGGCAACT TOCT	94 4分-(94 35回-72 5分	30秒-60 30秒-72 30秒) ×	Potonika <i>et al.</i> (2006) <sup>18)</sup>
縞萎縮病抵抗性 <i>rym5</i>	E31/M41	GAGTCGTCAACAAGTA CCTTGC	GTGGCTGTAATAGGC TAAGGCC	94 4分-(94 35回-72 5分	30秒-60 30秒-72 30秒) ×	Pellio <i>et al.</i> (2005) <sup>16)</sup>
うどんこ病抵抗性 <i>mlo</i>	om2	TAGCAATCAOGGTCAC GTCAAC	COGCAAGGCTGCTATG AAAAGGG	94 4分-(94 回-72 5分	30秒-65 50秒-72 1分) × 35	Tacconi <i>et al.</i> (2006) <sup>23)</sup>
秋播性 <i>Vrn-H2</i>	ZCCT-Ha/b	CCTAGTTAAAACATAT ATCCATAGAGC	GATCGTTGCGTTGCTA ATAGTG	94 4分-(94 35回-72 5分	30秒-55 30秒-72 45秒) ×	Szucs <i>et al.</i> (2006) <sup>22)</sup>

**結果及び考察**

**1. リボキシゲナーゼ遺伝子 *Lox-1* の遺伝子型判別**

リボキシゲナーゼは脂質酸化に関わる酵素で、その作用により麦芽中に生じた過酸化脂質はビールの鮮度低下(老化臭)の原因物質であるトランスノネールなどを生成する．そのためリボキシゲナーゼ活性を製麦法<sup>25)</sup>や仕込み法<sup>27)</sup>の改良や、大麦の育種<sup>3,4,15,1)</sup>によって抑制する研究がなされている．

大系LM1は米国品種Karlが原品種の突然変異変異系統であり、農業特性が劣るため実用品種としての利用価値は低い<sup>15)</sup>．そのため、大系LM1がもつリボキシゲナーゼ活性欠損型*Lox-1*遺伝子を実用性の高い有用母本に導入、選抜することが求められている．

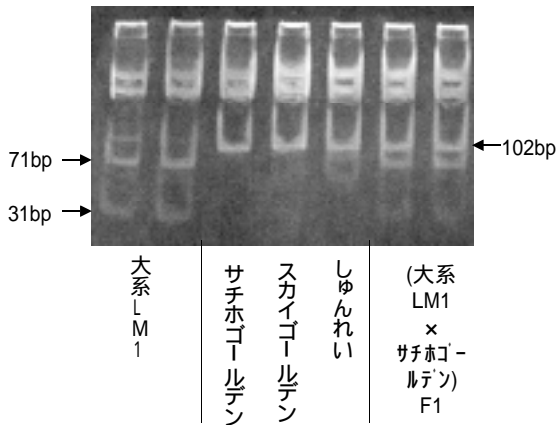
以下、大系LM1型*Lox-1*遺伝子の選抜を目的とした2種類のDNAマーカーの検討結果を記す．

**1) CAPSマーカー**

PCRによって得られる940bpの増幅産物は*Bsa*I処理

により、*Lox-1*遺伝子型に応じた多型が見られた(第3図)．正常型遺伝子を持つ系統では3本のバンド(102, 328, 510bp)がみられ、大系LM1型遺伝子を持つ系統では102bpバンドが消失し、代わりに71bp, 31bpのバンドがみられた．正常型/大系LM1型のヘテロ個体(=大系LM1 × サチホゴールデンのF<sub>1</sub>)では両方の遺伝子に対応したバンドが検出できた．すなわち、CAPS法によれば、育種目的の大系LM1型*Lox-1*遺伝子をホモで持つ系統の選抜や連続戻し交雑中のヘテロ個体の選抜ができることが明らかとなった．

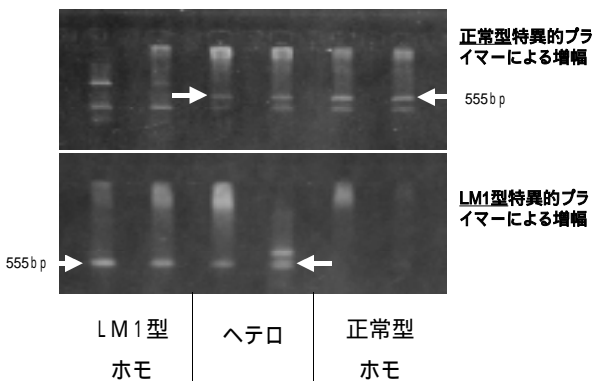
すなわち、本法による遺伝子型の判定はおもに102bpバンド, 71bpバンドの有無を目安として判断することになるが、いずれも分子量が小さいため、アガロースゲルでは誤判定が生じやすく、低分子域分解能の優れるアクリルアミドゲルを用いて判定することが望ましいと考えられた．



第3図 CAPS法による*Lox-f*遺伝子型の判別

## 2) ミスマッチプライマー法

大系LM1型遺伝子特異的増幅プライマー (LOX48.3) 及び正常型遺伝子特異的増幅用プライマー (LOX50) のいずれにおいても、遺伝子型に対応した目的増幅産物 (555bp) が得られた (第4図)。非特異的増幅バンドも見られたが、本法によって目的遺伝子の有無が判定できた。ただし、ホモ/ヘテロについては、1種類のマーカーのみでは判定できないので、目的に応じてプライマーを使い分ける必要があると考えられた。例えば、連続戻し交雑による大系LM1型*Lox-f*遺伝子の導入には大系LM1型特異的増幅プライマーを用いて、555bpバンドの得られる個体選抜を行う。また、大系LM1型のホモ固定系統 (= LOX欠損系統) の選抜には正常型特異的プライマーを用いて、555bpバンドの得られない系統を選抜する。



第4図 ミスマッチプライマー法による*Lox-f*遺伝子型の判別

## 2. セリンプロテアーゼ *Cxp1*遺伝子型の判別

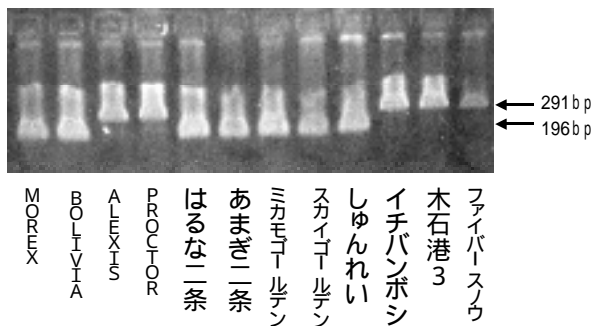
最近の育成品種であるスカイゴーデンなどでは、麦芽タンパク質が過度に分解しやすい特性があり、その育種的改善が強く求められている。麦芽タンパク質の過剰分解には、1) 麦芽プロテアーゼ活性が高いこと、2) 原麦 - グルカンが低いこと、などが関わっている<sup>13)</sup>。麦芽品質に悪影響を与えずに、麦芽タンパク質の過剰分解を抑制するには、プロテアーゼ活性をやや抑制することが望ましいと考えられている。セリンプロテアーゼは麦芽に含まれる諸種のプロテアーゼの一つであり、その発現量を低下させることができれば、麦芽タンパク質の過剰分解特性を改善できる可能性がある。Potonikaらの報告<sup>18)</sup>によるセリンプロテアーゼのeQTLマーカーTe945は、セリンプロテアーゼ遺伝子*Cxp1*内の1塩基多型 (SNP) を検出するマーカーであるが、セリンプロテアーゼmRNAの発現量の多寡と関係することが明らかとなっている。そこで、Te945に関する日本の大麦品種・系統の遺伝的変異について分析した。

その結果、ビール用品種では供試したすべての品種・系統がセリンプロテアーゼmRNA高発現型であるタイプ (増幅産物長196bp) であった (第4図, 第2表)。食用品種では皮麦、裸麦ともに低発現型のタイプ (増幅産物長291bp) のほうが多かった。

今後のビール大麦育種では低発現型のタイプ 遺伝子を導入することにより、過剰な麦芽タンパク質分解を抑制した系統が効率的に選抜できる可能性がある。

ただし、本マーカーはeQTLマーカーであるため、実際のプロテアーゼ活性との関係、さらに麦芽タンパク質分解程度との関係について評価する必要がある。タイプ

遺伝子を持つ木石港3やAlexisは栃木分場では頻りに育種利用してきた品種であるので、これまでの育成中断系統の中にはタイプ 遺伝子をもつ系統もあると思われる。それらの再発掘、データ利用も含めて今後の研究が重要である。



第5図 セリンプロテアーゼCxp1遺伝子型の品種間差異

タイプ (高発現型) = 196bpバンドをもつ  
 タイプ (低発現型) = 291bpバンドをもつ

第2表 諸形質のDNAマーカー分析により判定した主要品種・系統の遺伝子型

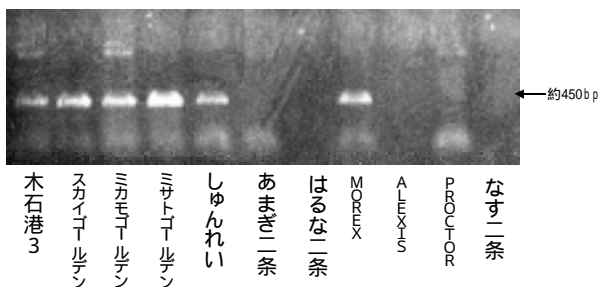
品種・系統名	セリンプロテアーゼ		縞萎縮病抵抗性		うどんこ病抵抗性		秋播性 Vrn-H2	特性	品種・系統名	セリンプロテアーゼ		縞萎縮病抵抗性		うどんこ病抵抗性		秋播性 Vrn-H2	特性
	Cxp1	Te945マーカー	rvm5	E31/M41マーカー	mlo	om2マーカー				ZCCT-Ha/b	Cxp1	Te945マーカー	rvm5	E31/M41マーカー	mlo		
あかぎ二条	1)	-2)			Del3)		春播型4)	ビール用	りょうふう							春播型	北海道品種
アサゴールド			+		In		春播型	ビール用	北育33号		(+)					春播型	北海道品種
アズマゴールデン			-		Del		春播型	ビール用	北育39号		(+)					春播型	北海道品種
おうみゆたか			+		In		春播型	ビール用	大系LM1	ND	-		ND			春播型	Karl突然変異
関東二条29号	ND5)		-		ND		春播型	ビール用	大系HG12	ND	ND		ND			秋播型	秋播性中間母本
きぬか二条			+		Del		春播型	ビール用	大系HG13	ND	ND		ND			秋播型	秋播性中間母本
きぬゆたか			+		In		春播型	ビール用	大系HG32	ND	+		ND			秋播型	秋播性中間母本
きぬ二条12号			+		In		春播型	ビール用	大系HG33	ND	ND		ND			秋播型	秋播性中間母本
ゴールデンロン			-		In		春播型	ビール用	大系HH12	ND	ND		ND			秋播型	秋播性中間母本
こまき二条			+		In		春播型	ビール用	大系HH27	ND	ND		ND			秋播型	秋播性中間母本
さきたま二条			+		In		春播型	ビール用	大系HH43	ND	ND		ND			秋播型	秋播性中間母本
サチゴールデン			-		Del		春播型	ビール用	大系HH8	ND	ND		ND			秋播型	秋播性中間母本
さつきばれ			-		In		春播型	ビール用	大系HK69	ND	ND		ND			秋播型	秋播性中間母本
スカイゴールデン			+		Del		春播型	ビール用	大系HM102	ND	ND		ND			秋播型	秋播性中間母本
シバリー			-		In		春播型	ビール用	Alexis		-		In			春播型	mlo-9品種
大系HO4			+		Del		春播型	ビール用	Charriot		(+)		In			春播型	mlo-11品種
ダイセンゴールド			-		Del		春播型	ビール用	Maris Otter	ND	ND		ND			秋播型	秋播性品種
つゆしらず			-		Del		春播型	ビール用	Morex		(+)		ND			春播型	外国品種
とね二条			+		In		春播型	ビール用	Optic		(+)		ND			春播型	外国品種
なす二条			-		In		春播型	ビール用	Otis		-		ND			春播型	外国品種
ニシゴールド			+		Del		春播型	ビール用	Proctor		-		ND			春播型	外国品種
ニューゴールデン			-		Del		春播型	ビール用	木石港3		+		ND			秋播型	外国品種
にらさき二条			-		In		春播型	ビール用	かすまぎ		+		In			ND	食用六条品種
はるな二条			-		Del		春播型	ビール用	ファイバースノウ		+		In			秋播型	食用六条品種
ほうしゅん			+		In		春播型	ビール用	べんけいむぎ		+		In			秋播型	食用六条品種
ミカモールデン			+		Del		春播型	ビール用	関東皮78号		+		In			ND	食用六条品種
ミサトゴールデン			+		Del		春播型	ビール用	関東皮82号		+		In			ND	食用六条品種
ミハルゴールド			+		Del		春播型	ビール用	西海皮60号		-		In			ND	食用六条品種
ミホゴールデン			-		In		春播型	ビール用	東山皮100号		-		In			ND	食用六条品種
みょうぎ二条			+		In		春播型	ビール用	東山皮101号		+		In			ND	食用六条品種
ヤシゴールデン			-		In		春播型	ビール用	東山皮102号		-		In			ND	食用六条品種
ヤチゴールデン			+		Del		春播型	ビール用	東北皮37号		+		In			ND	食用六条品種
関東二条34号			-		Del		春播型	ビール用	東北皮38号		+		Del			ND	食用六条品種
九州二条16号			+		In		春播型	ビール用	北陸皮35号		+		In			ND	食用六条品種
新田二条19号			+		In		春播型	ビール用	北陸皮38号		+		In			ND	食用六条品種
新田二条20号			+		Del		春播型	ビール用	ニシホシ		+		In			春播型	食用皮麦
新田二条21号			-		Del		春播型	ビール用	イチバンボン		-		In			秋播型	裸麦
中間母本農1号			+		Del		春播型	ビール用	マンネンボン		(+)		Del			秋播型	裸麦
栃系216			-		Del		ND	ビール用	御堀裸3号		(+)		ND			ND	裸麦
栃木ゴールデンロン			-		Del		春播型	ビール用	四国裸103号		(+)		In			春播型	裸麦
ほしまさり			-		In		春播型	北海道品種	赤神力		(+)		ND			ND	裸麦

1) Cxp1遺伝子型: I ... タイプ (高発現型); ... タイプ (低発現型)  
 2) rvm5遺伝子型: + ... rvm5を有する; - ... rvm5をもたない; (+) ... 誤判定品種 (rvm5をもたない品種であるがバンド検出)  
 3) mlo遺伝子型: In ... 挿入型(1000bpバンド); Del...欠失型(750bpバンド)  
 4) Vrn-H2遺伝子型: 関東二条29号、ヤチホゴールデンは播性の秋播性をもつが、マーカー判定は春播型(本文参照)  
 5) ND...供試せず

### 3. 縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym5* の遺伝子型判別

縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym5* はミサトゴールドン、ミカモゴールドンやタカホゴールドンの縞萎縮病抵抗性品種がもつ抵抗性遺伝子である。*rym5* を有する系統は縞萎縮病型ウイルスには抵抗性だが、型ウイルスに対しては罹病するため<sup>20,12)</sup>、型ウイルス汚染地帯が大きくなった栃木県では型、型の両ウイルス系統に抵抗性を示す *rym3* 遺伝子がおもに育種利用されている。しかし最近、栃木県北部で見つかった新たな縞萎縮病ウイルスレースに対しては抵抗性遺伝子が *rym3* あるいは *rym5* を単独で有する品種・系統は罹病し、*rym3* と *rym5* を併せもつ品種・系統(スカイゴールドン、栃系331など)のみが抵抗性を示すことから *rym5* の重要性が再認識されてきた(加藤ら 未発表)。

そこで、*rym5* と強く連鎖することが報告されている STS マーカー E31/M41 を栃木分場での育種に利用するために、マーカーの評価を行った。*rym5* 遺伝子型が既知の品種・系統を用いて評価した結果、日本のビール大麦品種・系統では 450bp バンドの有無と *rym5* 遺伝子型が完全に一致し、抵抗性品種のみに 450bp バンドが現れた(第6図、第2表)。



第6図 縞萎縮抵抗性遺伝子 *rym5* に連鎖する E31/M41 マーカーに関する品種間差異

*rym5* を有する品種: 木石港3 スカイゴールドン、ミカモゴールドン、ミサトゴールドン、しゅんれい

しかし、Morex や Chariot など一部の外国品種や、裸麦品種などには *rym5* を持たないにもかかわらず、450bp バンドが見られ、誤判定が生じることが分かった(第2表の網掛け品種)。近中四農研大麦研究チームでの実験でも、E31/M41 マーカーについては、裸麦品種では *rym5* 遺伝子型と対応がとれないとのことである(近中四農研・柳澤貴司氏 私信)。また、Stracke ら<sup>21)</sup> は *rym5* 遺伝子近傍領域の 132kb の中に SNPs など 90 種類程度の変異を報告している。

これらのことから、E31/M41 マーカーは変異に富んだ *rym5* 遺伝子近傍領域の変異検出マーカーであり、遺伝的変異がごく限られている日本のビール大麦品種・系統

の集団中では *rym5* 遺伝子型と連鎖が保たれているが、裸麦や外国品種などでは連鎖していないケースが多いマーカーであると考えられた。今後、*rym5* 遺伝子については他の SNP マーカーなどの検討により、より汎用性の高い DNA マーカーを選択・利用する必要がある。

ただし、*rym5* 遺伝子はビール大麦育種のなかでも重要性が高く、早急に選抜開始する必要がある。現在の育種状況においては、日本のビール大麦品種から *rym5* を導入しようとする交配組合せがほとんどである。したがって、E31/M41 マーカーの利用が可能と判断される組合せが大半であり、汎用性の高い DNA マーカーの開発までの当面の間は、本マーカーでの選抜を進めることが望ましいと思われる。

一般に病害抵抗性育種においては、抵抗性遺伝子の集積(ピラミディング)が有効な手法であることが知られている。縞萎縮病はビール大麦生産に対して過去に壊滅的な影響を与えた経緯もある重要病害であるため、栃木県北部の新ウイルス系統や今後見つかるであろうウイルス系統への育種の対応が不可欠である。栃木分場の型ウイルス汚染圃場での *rym3* 選抜と E31/M41 マーカーあるいは今後開発されると思われる汎用性の高いマーカーを用いた *rym5* 選抜を併用することにより、*rym3* と *rym5* を併せ持つ系統の選抜が今後の育種においては重要である。

### 4. うどんこ病抵抗性遺伝子 *mlo* の遺伝子型判別

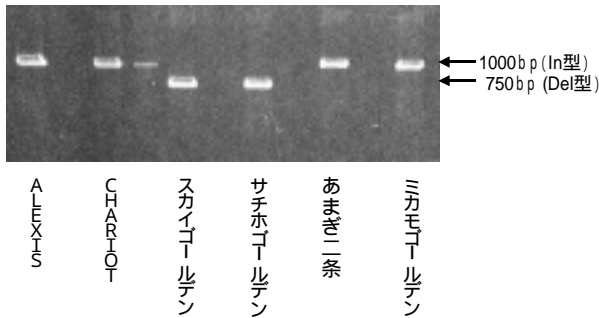
ミカモゴールドン、あまぎ二条、はるな二条など古い品種の多くがうどんこ病抵抗性をもたないが、タカホゴールドン以降の新しい育成品種はほとんどが抵抗性をもつ。ただし、日本品種が持つうどんこ病抵抗性はタカホゴールドンの系譜上の Mona やミハルゴールドの系譜上の Spartan に由来する *Mla9* や *Mlk* など少数の抵抗性遺伝子に依存している<sup>11,28)</sup>。うどんこ病は数多くの抵抗性遺伝子が報告されているが<sup>9)</sup>、うどんこ病菌レースの変化に伴う「抵抗性の崩壊」が欧州では問題となっており、抵抗性遺伝子源の拡大が重要課題となっている。

本項でとりあげる *Mlo* 座のうどんこ病抵抗性遺伝子については抵抗性機作が他の抵抗性遺伝子と異なり、すべての菌系に対して抵抗性を示し、抵抗性の崩壊が見られていないことから、持続性の高い抵抗性遺伝子として期待されている<sup>8,17)</sup>。

そこで、本項では Tacconi ら<sup>17)</sup> が開発した *mlo* 遺伝子 5' 上流域 (-2.3kb) の In/Del 変異を検出する om2 マーカーを栃木分場での育種に利用するための評価を行った。

*Mlo* 座の抵抗性遺伝子をもつ外国品種 Alexis (遺伝子: *mlo-9*)、Chariot (*mlo-11*) はいずれも高分子バンド

(1000bp)をもつIn型であったが、うどんこ病抵抗性を持たないあまぎ二条、ミカモゴールドンなど一部の日本品種にもIn型の品種が見られた(第7図, 第2表)。一方、スガイゴールドンやサチホゴールドンなど最近の品種・系統の多くでは抵抗性外国品種とは異なる低分子量バンド(Del型, 1000bpバンド)がみられた。



**第7図 うどんこ病抵抗性mlo遺伝子型と連鎖するom2マーカに関する品種間差異**  
mlo遺伝子を有する品種はALEXIS, CHARLOTのみ。

Mlo遺伝子領域あるいはその近傍では多数のSNPsやIn/Del変異が報告されている<sup>23)</sup>。日本のビール大麦品種・系統の系譜上にはmlo遺伝子をもつ抵抗性品種はほとんどない。Alexisなどmlo遺伝子を有する外国品種と同じIn型に分類された日本品種の多くはうどんこ病罹病性であり、mlo遺伝子をもたないことは明らかである。すなわち、om2マーカに関する日本品種の多型はMlo遺伝子領域の多様性に起因するものであり、いずれのタイプともに日本品種ではmlo遺伝子とは連鎖していない。

したがって、rym5遺伝子に対するE31/M41マーカと同様、mlo遺伝子に対するom2マーカの利用は限定的とならざるを得ない。すなわち、om2マーカを用いてはAlexisやChariotのmlo遺伝子を導入しようとする場合、交配母本とする日本品種はDel型のものに限られる。In型の母本に対して、DNAマーカによりmlo遺伝子を導入するには、om2マーカとは異なる抵抗性品種のみをグループ化するマーカの開発が必要であると考えられた。ただし、先述の通り、交配母本として頻用されるサチホゴールドンなど最近の優良育成品種の多くはDel型であり、In型母本用のマーカは相対的には必要性が低い。

### 5. 播性遺伝子 *Vrn-H2* の遺伝子型判別

ビール大麦では一般に早生品種ほど茎立期が早く、早春の低温による幼穂の凍霜害を受けやすい<sup>26,19,7)</sup>。そのため、秋播性(低温要求性)を導入して、茎立期を遅く

して、出穂は比較的早い「秋播型早生」の育成が求められている。

大麦の播性(低温要求性)には*Vrn-H1*座(旧称:*Sh2*座, 座乗染色体 5HL), *Vrn-H2*座(*Sh*座, 4HL), *Vrn-H3*座(*Sh3*座, 1HL)の3遺伝子座が関わっており、秋播性となるのは*vrn-H1*, *Vrn-H2*, *vrn-H3*の組合せの場合に限られる<sup>24)</sup>。

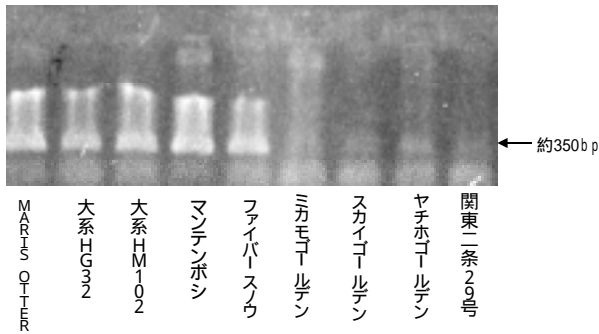
本項ではこのうち、*Vrn-H2*遺伝子について解析を行った。*Vrn-H2*座のSTSマーカ-ZCCT-Ha/bについて、秋播性程度が既知の主要品種や栃木分場育成系統を材料として、日本品種に対するマーカの適合性を評価した。

その結果、秋播性*Vrn-H2*遺伝子を持つ標準品種Maris Otterと同様の350bpバンドが、栃木分場で育成した秋播性系統である大系HG32, 大系HM102や、六条品種マンネンボシ, ファイバースノウなどの秋播性品種・系統で見られた(第8図, 第2表)。しかし、栃木分場で育成し、これまで秋播性を有すると考えてきたサチホゴールドン, 関東二条29号(いずれも播性は )ではバンドが検出されず、春播性*Vrn-H2*遺伝子を有すると判断された(第8図)。この原因としては、1)大系HG32などの秋播性程度( )以上)に比べると、サチホゴールドンなどの秋播性程度は低いことから、本来は春播型の遺伝子型であるにもかかわらず感光性, 純粋早晩性などの影響も受ける圃場での播性検定試験において、秋播性と誤判定された可能性、2)サチホゴールドンなどの秋播性遺伝子が本マーカでは検出できない可能性、が考えられた。

すなわち、本マーカではサチホゴールドンタイプを選抜することはできないが、栃木分場で秋播性早生遺伝子源として、交配利用している品種・系統の多くが検出可能であった。秋播性の選抜は圃場での選抜には多くの労力がかかるため、DNAマーカ選抜が今後特に重要になると思われる。

なお、今後十分な検討が必要であるが、*Vrn-H1*座に関するDNAマーカを用いた予備実験の結果では日本のビール大麦品種・系統では秋播性遺伝子をもっているものが多いと思われた(未発表)。*Vrn-H3*座については、春播性遺伝子を持っているのはエチオピア在来種など特殊なものに限られるため<sup>24)</sup>、日本品種の育種では当面は意識する必要はないと考えられる。





第8図 播性に関わる *Vrn-H2* 遺伝子型の品種間差異

## 6. 今後の課題

上述のように、今回供試した *rym5*, *mlo*, *Vrn-H2* に関わるDNAマーカーは外国品種での研究をもとに開発されたマーカーであるために、日本品種や一部の外国品種では適用できない事例が見られた。今後、適用できないケースが少ない（汎用性が高い）マーカーの開発が望まれる。しかし、現在の栃木分場でのビール大麦育種において、今回のマーカーで選抜できないケースは限定的である。圃場選抜の難しい形質もあり、DNAマーカーを早期に利用する必要がある。

DNAマーカーを効率的に育種利用するためには煩雑なDNA抽出法の簡略化や、さらに多くの形質に関わるDNAマーカーの開発・評価が望まれる。重要性や開発実現性が高いDNAマーカーとしては以下の形質が考えられる。1) ビールの低温混濁や食用麦の炊飯後褐変の原因物質であるポリフェノール含量を著しく低下させる効果のあるプロアントシアニジンフリー遺伝子 *ant28* や、2) 縞萎縮病抵抗性遺伝子としてもっとも利用頻度が高い *rym3*, 3) 西日本で汚染が拡大しているマイルドモザイク病に対する抵抗性を発揮する抵抗性遺伝子 *rym1*, 4) プロアントシアニジンフリー系統の共通の問題である穂発芽耐性<sup>14)</sup>を改良するための休眠性、などである。

今後ますますゲノム情報開発は進み、新たな情報を育種に生かす努力を続ける必要がある。圃場での農業特性の選抜、製麦による麦芽品質分析と、DNAマーカーによる選抜、といった育種3要素への研究資源（労力、研究費など）の配分の最適化が重要な課題となる。育種材料・集団のレベル、選抜対象形質に対するDNAマーカーの効果、研究員人数などによって、最適配分は変化する。状況に応じて、柔軟かつ大胆に配分変更していくことが、優良品種の効率的育成には不可欠である。

## 謝辞

本研究の一部は農林水産省指定試験事業、プロジェクト研究「低コストで質のよい加工・業務用農産物の安定供給技術の開発」および農林水産研究高度化事業「極低ポリフェノール大麦を利用した機能性食材の新規用途開発」により実施したものである。研究材料の養成、分析には大塚孝、田中良張、荒川秀樹の諸氏に協力いただいた。ここに記して感謝の意を表する。

## 引用文献

1. Douma, A.C., Doderer, A., Cameron-Mills, V., Skadhauge, B., Bech L.M., Schmitt, N., Heistek, J. C. and Van Mechelin, J. R. (2002) Low-lipoxygenase 1 barley. International Patent Treaty Publication W02002/053721.
2. 林敬子・橋本憲明・太源正明・芦川育夫 (2002) アレル特異的PCRマーカーをもちいたSNPs検出の安定性。育種学研究4(別2): 265.
3. Hirota, N., Kaneko, T., Kuroda, K., Kaneda, H., Takashio, M., Ito, K. and Takeda, K. (2005) Characterization of lipoxygenase-1 null mutants in barley. *Theor. Appl. Genet.* 111:1580-1584.
4. Hirota, N., Kuroda, K., Takoi, K., Kaneko, T., Kaneda, H., Yoshida, I., H., Takashio, M., Ito, K. and Takeda, K. (2006) Brewing performance of malted lipoxygenase-1 null barley and effect on the flavor stability of beer. *Cereal. Chem.* 83:250-254.
5. 日浦運治・部田英雄(1957) オオムギの耐病性に関する研究 第12報 ウドンコ病に対する抵抗性遺伝子の連鎖。農学研究45:14-48.
6. Ikeda, T.M., Nagamine, T., Fukuoka, H. and Yano, H. (2002) Characterization of new low molecular-weight glutenin subunit genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 104:680-687.
7. 稲垣正典・増田澄夫 (1984) オオムギにおける節間伸長期の品種間差異について。育種。34:191-196.
8. Jorgensen, J. H. (1984) Durability of the *ml-o* powdery mildew resistance genes in barley. *Vortr. Pflanzenzuchtg.* 6:22-31.
9. Jorgensen, J. H. (1993) Coordinator's report: Disease and pest resistant genes. *Barley Genetics Newsletter* 22: 110-131.

10. Jorgensen, J.H. (1994) Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 97-119
11. 河田尚之・石川直幸・福田瑛・早乙女和彦・加藤常夫・五月女敏範・大塚勝・徳江紀子・宮川三郎・神永明・佐々木昭博・桐生光広・伊藤浩・吉田久・田谷省三・天谷正行・小林俊一・瀬古秀文・藤井敏男・小松田美津留・氏原和人・関口忠男・倉井耕一 (1995) 二条大麦新品種「タカホゴールド」の育成. 栃木農試研報43:107-126.
12. 河田尚之・五月女敏範 (1998) オオムギ縞萎縮病抵抗性準同質遺伝子系統の作出と病原ウイルス系統に対する反応. 栃木農試研報47:65-77.
13. 長嶺敬・関和孝博・山口恵美子・加藤常夫 (2005) ビール大麦の高品質化育種. 農業及び園芸80:546-552.
14. 長嶺敬・山口恵美子・大関美香・関和孝博・渡邊修孝・渡辺浩久・大野かおり・糸川伸晃・望月哲也・河田尚之・加藤常夫(2006) 極低ポリフェノールビール大麦育成系統の品質および農業特性. 栃木農試研報58:79-86.
15. 大関美香・長嶺敬・池田達哉・鈴木保宏・関和孝博・山口恵美子・加藤常夫 (2007) 我が国のビール大麦品種におけるリポキシゲナーゼ活性の変異と新たな活性欠失突然変異系統の作出. 育種学研究9:55-61.
16. Pellió, B., Streng, S., Bauer, E., Stein, N., Perovic, D., Schiemann, A., Friedt, W., Ordon, F. and Graner, A. (2005) High-resolution mapping of the *Rym4/Rym5* locus conferring resistance to the barley yellow mosaic virus complex BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in barley. *Theor. Appl. Genet.* 110:283-293.
17. Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., Collins, N.C., Panstruga, R., Schulze-Lefert, P. (2002) The Barley MLO Modulator of Defense and Cell Death Is Responsive to Biotic and Abiotic Stress Stimuli1. *Plant Physiol.* 129:1076-1085.
18. Potokina, E., Prasad, M., Malysheva, L., Roder, M.S. and Graber, A. (2006) Expression genetics and haplotype analysis reveal cis regulation of serine carboxypeptidase (*Cxp1*), a candidate gene for malting quality in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Funct. Integr. Genomics* 6:25-35.
19. 早乙女和彦・伊藤浩・五月女敏範・福田暎・宮川三郎 (1994) 秋播性二条オオムギ品種の気象変動に対する生産安定性. 栃木農試研報. 42:53-64.
20. 五月女敏範・早乙女和彦・河田尚之・福田暎・宮川三郎(1995) エステラーゼアイソザイム同位酵素遺伝子型を標識としたオオムギ縞萎縮病抵抗性の選抜ならびに抵抗性遺伝子の集積. 栃木農試研報 43:95-106.
21. Stracke, S., Presterl, T., Stein, N., Perovic, D., Ordon, F. and Graner, A. (2007) Effects of introgression and recombination on haplotype structure and linkage disequilibrium surrounding a locus encoding Bymovirus resistance in barley. *Genetics.* 175:805-817.
22. Szucs, P., Karsai, I., von Zitzewitz, J., Meszaros, K., Cooper, L.L.D., Gu, Y.Q., Chen, T.H.H., Hayes, P.M. and Skinner, J.S. (2006) Positional relationships between photoperiod response QTL and photoreceptor and vernalization gene in barley. *Theor. Appl. Genet.* 112:680-687.
23. Tacconi, G., Baldassarre, V., Collins, N. C., Bulgarelli, D., Stanca A. M. and Vale, G. (2006) Haplotype characterization and markers at the barley *Mlo* powdery mildew resistance locus as tools for marker-assisted selection. *Genome* 49:864-872.
24. Takahashi, R. and Yasuda, S. (1971) Genetics of earliness and growth habit in barley. In: *Barley Breeding II.* pp 388-408.
25. Ueda, T., Sasaki, K., Inamoto, K., Kagami, N., Kono, K., Shibata, N. and Eto, M. (2001) Development of novel malt evaluation method for improving beer flavor stability. *Proc. 28th EBC Congress*, pp 55-61.
26. 山野昌敏・藤井敏男・小熊純一・久保野実 (1973) 栃木県における二条オオムギの凍霜害に関する調査研究. 栃木農試研報 17:36-46.
27. 安井哲二 (2001) ビールのカードボード臭について. *日本醸造協会誌*96:94-99.
28. 吉川亮・浜地勇次・古庄雅彦・伊藤昌光・吉田智彦・水田一枝・山口修・吉野稔・篠崎正住 (1997) ビール大麦新品種"ミハルゴールド"の育成. 福岡農総試研報16:17-22.