

リポキシゲナーゼ欠失ビール大麦の作出

1. 試験のねらい

ビール原料である大麦のリポキシゲナーゼ (LOX) はビール老化臭の原因物質生成や泡持ち性を低下させることから、低 LOX 大麦の育成が求められている。しかし、一般的な LOX 活性測定法は時間・労力を要するため育種規模での多点検定は難しい。そこで大麦 LOX 活性の簡易評価法を確立するとともに、LOX 活性欠失突然変異体のスクリーニングを行った。

2. 試験方法

米国六条ビール麦品種 Kar1 に対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後代 M2 258 個体を材料として、リポキシゲナーゼ欠損変異個体の選抜を行った。選抜にはダイズのリポキシゲナーゼアイソザイム判別に用いられている方法を改変した方法を開発した。得られた突然変異体の塩基配列解析、タンパク質発現の有無の確認は近中四農研あるいは作物研の協力により分析した。

3. 試験結果および考察

- (1) 大麦の LOX 活性はダイズ LOX アイソザイム判別に用いられているメチレンブルーの色素退色能を利用した方法 (Suda *et al.* 1995) を改変した。穀皮への色素吸着を除くために粗酵素抽出上清を分析サンプルに用いることで、低 LOX 大麦系統を適切に評価できる (図-1、図-2)。
- (2) 大麦の LOX 活性簡易評価法を用いて、Kar1 の M2 個体から種子の LOX 活性を持たない「大系 LM1」を選抜した。大系 LM1 の LOX 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) 及び交雑後代 (F2) でも確認された。大系 LM1/サチホゴールドデンの交雑 F2 では LOX 活性の有 : 無が 142 : 58 に分離し、LOX 活性欠失性は単一劣性遺伝子の期待分離比に適合した ($\chi^2=1.50$, $P<0.05$)。
- (3) 大系 LM1 の *Lox-1* 遺伝子では第 3 エクソン内で 1 塩基置換が生じ、終止コドンが形成されている (図-3)。コメの抗 LOX 抗体を用いたウェスタン解析でも大系 LM1 では LOX-1 タンパク質が正常に形成されていないことが確認された (図-4)。

4. 成果の要約

ビールの鮮度維持や泡持ち性に悪影響を及ぼす大麦のリポキシゲナーゼ (LOX) について簡易評価法を開発し、新規 *Lox-1* 遺伝子を有する LOX 活性欠失突然変異系統「大系 LM1」を選抜した。

(担当者 栃木分場 ビール麦研究室 大関美香、長嶺敬、関和孝博¹⁾、山口恵美子²⁾、加藤常夫³⁾)

¹⁾ 現 環境指導セ、²⁾ 現 下都賀農振、³⁾ 現 経営技術課

抽出
 原麦1粒を木づちで粉碎
 ↓ +1mMDTT/50mMリン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) 1.0ml
 ↓ 4°C, 1時間静置(15分ごとに攪拌)
 ↓ 15,000rpmで遠心分離5分間
 上清(粗酵素液)

反応
 粗酵素液0.8ml
 ↓ +LOX検出液(10μMメチレンブルー/8mMリノール酸 0.2ml)
 ↓ 35°Cで30分~1時間反応
 青色の退色程度を目視判定(極低LOX系統は退色しない)

図-1 大麦 LOX 活性の簡易評価法

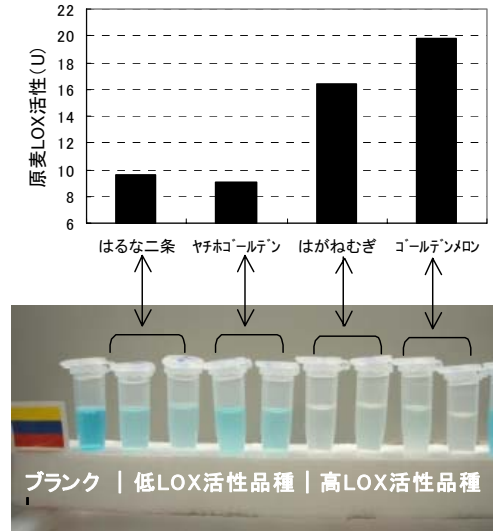


図-2 大麦 LOX 活性簡易評価法の様子

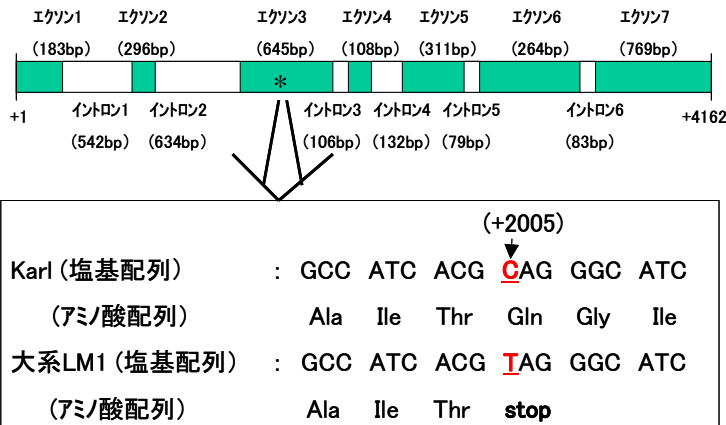
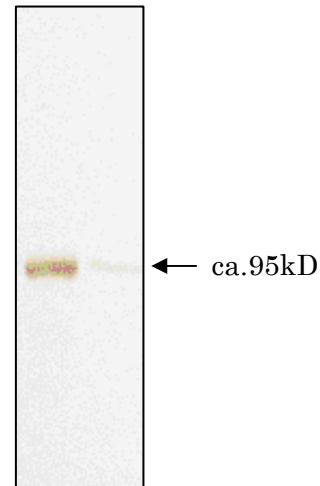


図-3 大系 LM1 の *lox-1* 遺伝子変異部位



1 2
 図-4 抗コメ LOX-3 ポリクローナル抗体による大麦種子タンパク質のウエスタンブロッティング

レーン 1 : Karl
 2 : 大系 LM1