

大麦におけるリポキシゲナーゼ(LOX-2)簡易選抜法の開発

1. 試験のねらい

ビールの鮮度維持に関わる大麦のリポキシゲナーゼ(以下、LOX)には、種子貯蔵型の LOX-1 と発芽時に誘導される LOX-2 のアイソザイムがある。これまでに、LOX-1 欠失系統「大系 LM1」および「大系 LM2」を作出したが、ビール原料として利用するには、製麦という発芽工程を経るため、LOX-1 活性だけでなく、LOX-2 活性も低減させることが品質向上において重要である。そこで、LOX-1 欠失系統を変異親として LOX-2 欠失系統選抜に不可欠な LOX-2 活性の簡易測定・選抜法を開発する。

2. 試験方法

- (1) LOX-2 活性測定条件の検討：LOX-2 が優占アイソザイムとされる幼根を材料とし、LOX-1 活性は 10%未満に低下するが LOX-2 活性は残存すると報告されている pH8.5 と両アイソザイムの最適 pH である pH6.0 の反応液を用い、LOX 活性 (LOX-1 + LOX-2) を測定した。
- (2) 大量検定のための発芽・抽出条件の簡素化：より多くの材料を同時に処理するため、発芽条件 (発芽温度・発芽方法) 酵素抽出条件 (細胞磨砕機を用いた簡易抽出) について検討した。
- (3) LOX-2 活性簡易選抜法の開発：LOX-1 活性簡易評価法 (大関ら; 育種学研究 9, 55-61, 2007) を一部改変し、粗酵素液 160 μ l に 1 μ M メチレンブルーを含む 8mM リノール酸 40 μ l を加え、35 で 30 分間反応させた後、655nm の吸光度を測定し、吸光度の低下程度 (青色残存程度) によって LOX-2 活性を評価した。

3. 試験結果および考察

- (1) pH8.5 では、今回供試した品種系統間での差が認められなかった。一方、pH6.0 では LOX-1 欠失系統の LOX 活性値は、「大系 LM1」(53U)から「大系 LM2」(557U)にまで分布し、供試した品種系統間で差が認められたことから、幼根から抽出した LOX 活性を pH6.0 で測定することで LOX-2 活性測定を評価できると考えられた (図 - 1)。
さらに、幼芽鞘を用いた場合も同様の結果となり (データ省略) LOX-1 欠失の背景をもつ場合においては、幼根・幼芽鞘のいずれでも LOX-2 活性を測定できると考えられた。
- (2) 発芽方法は、従来の 20 5 日間から 25 4 日間に発芽日数を短縮し、園芸用セルトレー (7 \times 7 桝; 1 桝 4cm \times 4cm) を用いた小スケールで可能であることが明らかとなった (データ省略)。
また、細胞磨砕機 (FastPrep; MP24) を用いた簡易抽出法は、LOX 活性は低下するものの通常法との間に正の相関 ($r=0.68^{**}$) が認められ、簡易抽出により選抜が可能と考えられた (図 - 2)。
- (3) 粗酵素液を用いた標準法による活性値 (234nm の吸光度値から算出) と LOX-1 活性簡易評価法を一部改変した 96 穴プレートを用いた青色残存程度 (655nm の吸光度) の測定値との間には、負の相関 ($r=-0.70^{**}$) が認められ、これらを基に数粒で実施可能な簡易選抜法を開発した。(図 - 3、4)

4. 成果の要約

ビール鮮度の向上を図るため、麦芽製造時に発現する LOX-2 欠失系統の選抜を目的とし、有効な簡易選抜法を開発した。本法は、園芸用のセルトレー (7 \times 7 桝; 1 桝 4cm \times 4cm) を用い、25 (室温) で 4 日日間発芽させた数粒の幼根を材料とすることにより、LOX-2 活性を迅速かつ簡易に測定できる。

(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)

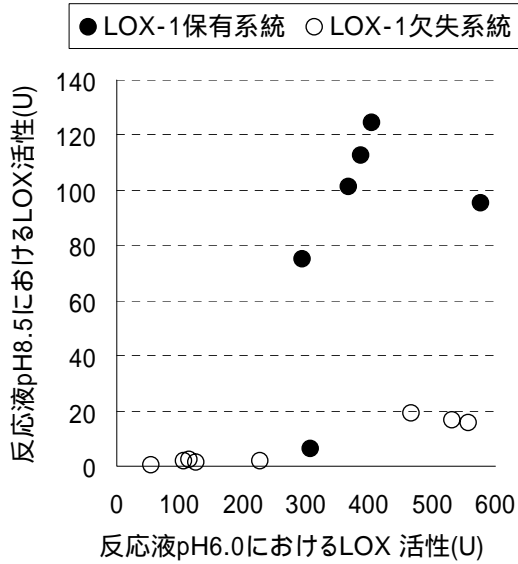


図 - 1 各 pH における幼根(5日目発芽粒)からの LOX 活性

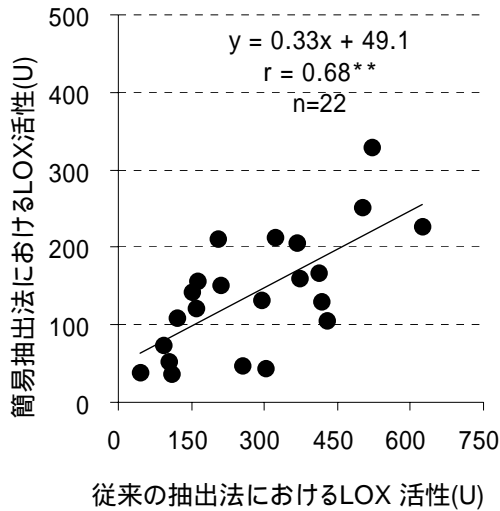


図 - 2 抽出方法を変えた場合の LOX 活性

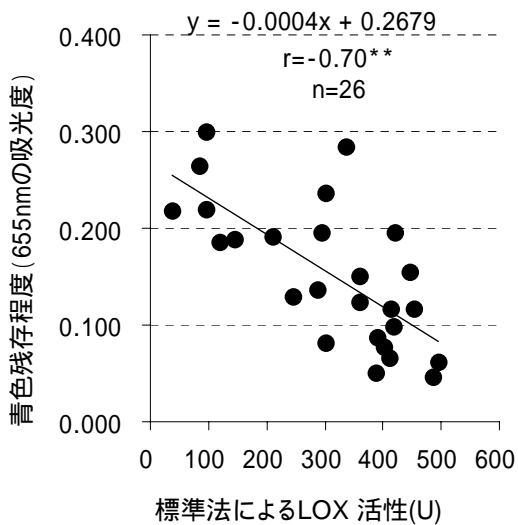


図 - 3 標準法による LOX 活性と青色残存程度の相関関係

注1 . LOX の活性測定は、リノール酸を基質として紫外部の吸光度の上昇を測定する方法(標準法)で行った。また、酵素活性の1単位(U)は幼根 1g あたり、吸光度を毎分 1.000 増加させる力価とした。

注2 . **は 1%水準で有意であることを示す。



図 - 4 LOX-2 簡易選抜法のプロトコル

注 . 写真 (a) は園芸用のセルトレーを用いた発芽の様子。写真 (b) は青色の残存程度を指標とした簡易選抜の様子。