

氏 名 廣田 直彦

授与した学位 博士

専攻分野の名称 農学

学位授与番号 博乙第4299号

学位授与の日付 平成21年 3月25日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者

(学位規則第5条第2項該当)

学位論文の題目 オオムギ種子リポキシゲナーゼ-1に関する育種学的研究

論文審査委員 教授 武田 和義 教授 野田 和彦 准教授 佐藤 和広

学位論文内容の要旨

本研究は、オオムギ(*Hordeum vulgare* L.)種子リポキシゲナーゼ-1 (LOX-1)の多様性を酵素レベルおよび遺伝子レベルの調査から明らかにし、見出された有用変異の遺伝特性および醸造特性を明らかにすることを目的とした。さらに明らかとなった LOX-1 の多様性に関して、地理的分布、諸形質との関連性および野生栽培オオムギ間の相違を解析することにより LOX-1 の分化について検討することとした。

LOX-1 の多様性を理解するために、世界から収集された栽培オオムギ(*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*)を供試して、LOX-1 熱安定性を調査したところ、供試系統は熱安定性の高い H-type と熱安定性の低い L-type に大別できた。両タイプの地理的分布を見たところ、東アジアやアフリカでは H-type が、ヨーロッパ、トルコでは L-type の出現率が高かった。野生オオムギ(*Hordeum vulgare* ssp. *spontanenm*)においては、H-type がほぼ独占的であることから、*Hordeum vulgare* の LOX-1 遺伝子のプロトタイプが H-type であることが示唆された。活性に関して栽培オオムギを調査した結果、同祖性の系統と考えられる LOX-1 活性を欠失する 6 系統が見出された。

LOX-1 熱安定性および活性欠失に関して、遺伝解析を行った。F2 種子における熱安定性は連続的な分離を示し、主働遺伝子と微働遺伝子の関与が示唆された。QTL 解析の結果、4H 染色体の主要な QTL が、種子 LOX の熱安定性を調節していると考えられた。連鎖分析により、LOX 熱安定性タイプ 4H 染色体 *LOXA* にマッピングされた。一方 LOX-1 活性欠失形質はメンデル遺伝学における 3:1 の分離比によく適合し、4H 染色体 *LOXA* 座近傍の劣性単一遺伝子により支配されていると考えられた。

世界各地の栽培オオムギを供試し、4つの一塩基多型(SNP)に関するタイピングを行ったところ、4つの遺伝子型に分類された。各タイプは、東域、西域およびエチオピアとネパールで特徴的な地理的分布パターンを示した。LOX-1 遺伝子型の分化について検討するため野生オオムギおよび西南アジアの栽培オオムギを用いて LOX-1 ハプロタイプを調査した結果、野生オオムギにおいては 6 個、栽培オオムギにおいては 10 個の遺伝子型が存在することが明らかとなった。野生オオムギの遺伝子型出現頻度を根拠とする、MSSS 型あるいは MMSS 型が栽培オオムギにおけるプロトタイプの遺伝子型であると考えられた。

遺伝子の構造および発現の解析から、LOX-1 活性欠失系統の欠失機作は、第 5 イントロンのスプライシング供与部位に生じた 1 塩基の変異により、スプライシング不全が起きると同時に、この変異により新たに形成された終止コドンにより、活性のない不完全な LOX-1 タンパク質しか発現できないことに起因していることが明らかとなった。この欠失機作に基づき、LOX-1 活性欠失形質のマーカーを開発した。

LOX-1 活性欠失系統の麦芽および醸造特性を明らかにするため、LOX-1 活性を持つ LOX-normal 区と LOX-1 活性を持たない LOX-null 区を、一交配に由来する F₄ 集団から調製した。これらの区間では、一般的な麦芽、麦汁およびビー分析項目の分析値には顕著な差は認められなかった。一方、LOX-null ビールは、ビール品質に悪影響を及ぼすトランス 2-ノネナールやトリヒドロキシオクタデセン酸含量が低いことが明らかとなった。また、ビールの泡持ちの指標である NIBEM 値は、LOX-null ビールが 21 秒高いことが明らかとなった。さらに、LOX-null ビールの老化度が有意に低いことが明らかとなった。これらの結果は、LOX-1 活性欠失オオムギが、他の重要な品質に影響を与えることなく、ビールの香味や泡持ちの安定性を向上させるのに有効に利用可能であることを示唆している。

論文審査結果の要旨

本研究は加齢に伴うビール品質の劣化に関与する脂肪酸過酸化酵素リポキシゲナーゼ(LOX)を育種的に制御しようとするものであり、邦文で130ページに取りまとめられている。

第1章ではLOXの熱安定性の簡易検定法を開発して1,040品種を評価し、熱安定性に高(H)、低(L)の二型があることを明らかにした。H型とL型には地理的分化があり、栽培オオムギの起原地とされる西南アジアではH型とL型がほぼ半々であるのに対して、東アジアとアフリカにはH型の品種が多く分布し、逆にトルコやヨーロッパにはL型の品種が多かった。野生オオムギはほとんどがH型であることから、オオムギのLOXのプロトタイプはH型であるとみられた。さらに1,152品種を評価した結果、LOX欠失型の変異体を6系統見いだした。これらの6系統は相互に酷似しており、同祖の変異体であろうと見られた。

第2章では遺伝解析をおこない、LOXの熱安定性および欠失変異が4H染色体上のLOX-1遺伝子に支配されていることを明らかにし、LOX-1遺伝子の近傍に選抜用の分子マーカーを開発して育種の効率化を可能にした。

第3章ではLOX-1遺伝子の塩基配列を解読し、熱安定性が4種類のアミノ酸の変化を伴う塩基置換によること、また欠失変異は一塩基置換に伴うストップコドンの出現によることを明らかにした。

第4章ではLOX-1欠失が麦芽および醸造特性に対して悪影響を及ぼさず、LOX-1欠失がビール品質の保持に有効であることを明らかにした。

第5章は総合考察である。なお、LOX-1欠失遺伝子は、カナダにおいてサッポロビール株式会社との共同研究によりビールムギの実用品種に導入され、実用性が証明されている。

このように、本研究はLOX変異体に関する基礎から応用に及ぶ優れた内容を含んでおり、論文発表および学力の確認においても優れた評価を受けたので、博士(農学)の学位にふさわしいと判定した。