

博士論文

リポキシゲナーゼ 1 欠失ビールオオムギ品種育成と  
その特性に関する研究

令和2年

保木 健宏

# 目次

<b>序章</b>	1
<b>第1章 北米に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「CDC PolarStar」</b>	
第1節；緒言	8
第2節；材料および方法	10
第3節；結果	
第1項；育成経過	18
第2項；農業特性評価	23
第3項；麦芽品質評価	26
第4項；醸造試験評価	30
第4節；考察	32
<b>第2章 豪州に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「SouthernStar」</b>	
第1節；緒言	35
第2節；材料および方法	36
第3節；結果	
第1項；育成経過	40
第2項；農業特性評価	43
第3項；麦芽品質評価	47
第4項；醸造試験評価	51
第4節；考察	53
<b>第3章 北海道に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「札育2号」</b>	
第1節；緒言	55

第2節;材料および方法	57
第3節;結果	
第1項;育成経過	59
第2項;農業特性評価	63
第3項;麦芽品質評価	66
第4項;醸造試験評価	69
第4節;考察	71
<b>第4章    LOX-1 欠失オオムギ品種の泡持ちおよび香味耐久性</b>	
第1節;緒言	74
第2節;材料および方法	75
第3節;結果	
第1項;THOD 含量と泡品質に与える影響評価	77
第2項;T2N 含量と官能評価に与える影響評価	79
第4節;考察	84
<b>総合考察</b>	89
<b>摘要</b>	99
<b>Summary</b>	102
<b>謝辞</b>	106
<b>引用文献</b>	107

## 序章

ビールは、アルコール飲料の中でも古くから世界中で広く生産、飲用されてきたものの一つである。ビールの主原料は麦芽、ホップ、水であり、その他に米、コーンスターチ等の穀類が副原料として使用されている。オオムギ (*Hordeum. Vulgare L.*) の種子から製麦工程を経て麦芽が造られ、さらにオオムギ麦芽は仕込工程でホップとともに麦汁となり、酵母による発酵工程、貯酒工程を経てビールが醸造される。その間、各工程で各種の品質評価がなされ美味しく高品質なビールが造られるが、その最も上流に位置するのがオオムギそして麦芽であり、麦芽が「ビールの魂」といわれる由縁である。そのため、オオムギのなかでも特に製麦・ビール醸造に適したものをビールムギと呼び、その麦芽のエキスや全窒素含量、可溶性窒素含量、酵素力、最終発酵度などの形質改良を目的に長年にわたり国内外でビールムギ育種が進められてきた。

日本で最初にビールが醸造されたのは、1853年（嘉永6年）蘭学医川本幸民が兵庫県内の自宅で試醸したのが初めてと言われているが、本格的に醸造が行なわれたのは1869年（明治2年）アメリカ人醸造技師により横浜にビール醸造所が建設されてからである。その後明治20年代には本格的な規模を持った複数の醸造会社が設立され、近代的なビール産業の幕開けとなったが、その当時原料の麦芽やホップはすべて輸入に頼ったままであった。一方、北海道では開拓使が殖産を目的に建設した札幌麦酒醸造所（サッポロビール株式会社の前身）が1876年（明治9年）に竣工し、ビールの醸造が開始された。ここでは、当初から農家や屯田兵との特約栽培の形で原料用のオオムギを調達し、麦芽を製造していた。その後、ビール生産の増加に伴い国産ビールムギのニーズが高まり、1895年（明治28年）には京都で契約栽培が始められ、その後急速に国内における栽培が広がった。1925年（大正14年）には2.2万ha、3.9万tのビールムギが生産され、1939年（昭和14年）には2.7万ha、6.7万tの生産をみた。戦後さらに増加し、1960年（昭和35年）には8.3万ha、23万tを記録した。これらの背景もあり、国内でも海外から積極的に優良品種を導入するとともに、農業

特性に優れより高品質なビールムギ品種の開発を目指した交配育種が進んだ。1968年（昭和43年）には、産官共同育種体制の確立を目的として第1回の「ビール大麦育種打合せ会」が開催され、1971年（昭和46年）打合せ会の中で「ビール大麦指定品種選定規則」が提案、制定され、ビール会社、国、県が育成した系統を合同で評価し、その結果をもとに本会において品種の選定を行う方式が確立した。以降これに基づく育成系統合同比較試験（以下合同比較試験）の計画から成果の検討、さらには有望品種の決定がこの会で定める主要事項となり、ビールムギ育種の発展のもととなった。現在も合同比較試験のもと、新たな品種が認定され普及が進められている（増田澄夫, 1993）。このように、わが国のビールムギ育種は100年以上の歴史と優れた育種体制を有し、国内におけるビール原料の安定調達に資する多数のビールムギ品種を育成してきた。例えば、1981年に育成された「はるな二条」は、製麦における種子に含まれるデンプン、タンパク質などの物質分解、いわゆる溶けが良好で、重要な麦芽品質の評価項目であるエキス、酵素力、最終発酵度が高く、醸造適性が極めて優れる品種であった。本品種は関東を中心に広く普及するとともに、高品質化に必須の育種母本として広く使用された。また、関東のビールムギ栽培地域を中心に蔓延したオオムギ縞萎縮病抵抗性品種として、「ミサトゴールデン」をはじめ、「ミカモゴールデン」、「みょうぎ二条」などが育成され、縞萎縮病による産地壊滅の危機が救われた。さらに筆者らは複数のオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子を有する「彩の星」を育成し、埼玉県における普及を進めてきた（荒井ら, 2011）。「彩の星」は、現在埼玉県で広く栽培されている品種である。

現在、ビールムギを生産する道府県のうち、栃木県、佐賀県、北海道などはビールムギ品種の作付面積、国内ビール4社との契約数量が比較的多く、国産ビールムギの主要産地となっている。国内におけるビールムギの栽培面積は拡大し、さらには合同比較試験のもと国内におけるビールムギ品種のレベルは著しく向上したが、ビール生産の飛躍的増加には追い付けず、麦芽の輸入数量は年々増加し国内のみならず海外で栽培されるビールムギのさらなる高品質化も望まれる状況となった。2015年の国内

の二条オオムギ生産量は、ビール用だけでなく食糧用途も含め作付面積は 3.8 万 ha、生産量は約 11.3 万 t であるのに対し(農林水産省,平成 30 年度麦の需給に関する見通しおよび麦の参考統計表,2018)、国内ビールメーカーが輸入した麦芽の総量は約 51 万 t となっている(財務省,財務省貿易統計 2018)。このような状況を鑑み、サッポロビール株式会社は、海外の主要ビールムギ産地における高品質ビールムギ品種の育成を目的として、1990 年代前半からカナダと豪州で現地の大学との共同育種を開始した。これまで、「CDC Aurora Nijo」、「CDC Reserve」や「Lofty Nijo」(Ogushi et al., 2002)などのカナダや豪州に適応したビールムギ品種が育成されてきた。しかし、普及や商業利用の面では、未だ十分な成果はあがっていない。

ビール醸造は、原料である麦芽を製造する製麦工程、ビールを醸造する仕込工程、発酵・貯酒工程、発酵に使用した酵母を取り除く濾過工程、製品を容器に充填するパッケージング工程からなる。ビールムギ品種は、実際に栽培・生産する生産者のニーズである農業特性、また、醸造家、消費者のニーズであるオオムギ・麦芽品質、製麦・醸造特性を兼ね備えている必要がある。前述したように、ビールの製造には様々な工程が必要であり、原料の品質は工程における様々な条件を想定した非常に多くの分析項目により評価される。これらの多岐にわたるニーズを表現型として全て兼ね備えた品種を一般的な交配育種で開発することは極めて難しい。また、醸造特性やビール品質などの表現型は醸造試験によりその評価を行う必要があるが、適正な醸造特性、ビール品質の評価を行うためには、比較的大規模あるいは商業規模の醸造設備を用い試験を行う必要があり、そのための種子量を確保する必要がある。このため、評価自体に多大な時間や労力がかかるとともに、醸造特性、ビール品質の評価は、農業特性や比較的少量の種子で評価できる麦芽品質等の評価を終えた後、育種の最終段階において実施せざるを得ないため、それらの表現型に基づく早期の選抜と醸造特性、ビール品質の戦略的、積極的な向上は困難であった。また、このような多大な労力や時間をかけた系統を最終評価で試験中止にせざるを得ない場合もある。加えて、作物育種は非常に時間がかかり、一般的なビールムギ育種は開発開始から商業利用までに 10 年

以上の年月を要するが、ユーザーのニーズはより短期間で変化することから、育種目標の一貫性が保てないことも品種開発を困難にする一因である。これらの課題を克服するため、育種戦略の見直しや新たな育種技術の開発、導入が不可欠である。

連続戻し交配は、既存の品種に特定の形質（遺伝子）を導入するために、様々な作物種において適用されている（Wilcox & Cavins, 1994; Neeraja et al., 2007）。また、近年、他の作物同様ビールムギでもゲノム解析が進み、塩基配列と醸造品質との関連が明らかにされつつある（Iimure et al., 2011）。製麦工程では、オオムギ種子の発芽により発現するアミラーゼ、プロテアーゼ、グルカナーゼ等の酵素の働きにより種子貯蔵物質であるデンプン、タンパク質、 $\beta$ -グルカンなどの高分子物質が低分子化される。また、これらの酵素は仕込工程においても働きビール品質に大きな影響を与える。これらの酵素の活性や熱安定性はオオムギ品種により差異があることが知られている。また、一部の酵素を制御する遺伝子が同定されており、オオムギ育種に利用されている（Kihara, Kaneko & Ito, 2008; Xu et al., 2018）。筆者らは、ビールの外観上の美しさに寄与し、ビールの香りを保持する蓋の役割を果たす泡の保持（以下泡持ち）に麦芽中のタンパク質が量的に関与することを明らかにするとともに、複数の泡持ち関連タンパク質を同定し、それらを制御する DNA マーカーを開発、育種利用を進めている（Iimure et al., 2010; Iimure, Zhou & Hoki, 2014）。また、筆者らは、ミカモゴールドン / Harrington の倍加半数体システムを用い高密度マップを作成し、2H 染色体と 5H 染色体に重要な麦芽品質の一つである麦芽エキスを制御する DNA マーカーを見出し、これらについても育種利用を進めているところである（Zhou et al. 2012）。これまで、麦芽分析や醸造試験によって初めて評価されていたこのような特性についても、DNA マーカーを利用した選抜技術（Molecular Marker-Assisted Selection、以下 MMAS）が確立され、当該技術を用いることにより、育種の初期世代から醸造特性に関する形質を選抜できるため、育種そのものの効率が大きく改善されるとともに、早期にかつ確実に高品質なビールムギを育成できることが期待されている。特に、連続戻し交配と MMAS を組み合わせることにより、既存品種の特性に可能な限り影響を与えず、目的の遺伝子を確実に

つ迅速に導入することが可能となる。

麦芽の成分やその変化が大きく関与するビール品質の一つに保存期間や高温への暴露によるビールの香味の劣化（以下、老化）があり、ビール製造に関わる技術者、研究者にとって、香味耐久性、すなわちビールが市場に出たからの老化に対する耐久性の向上は長年の課題であった。ビールの老化に伴って知覚されるようになる臭い（以下老化臭）は「カードボード（段ボール）臭」あるいは「紙臭」と称され、一般的に製造から1 - 3ヶ月経過すると知覚されるようになると言われている（Drost et al., 1990）。また、ビールの老化に関しては、多くの物質あるいは反応経路が関与していることが明らかとなっている（Bamforth, 1999）。現代のビール醸造所では、ビール製造工程における酸化抑制のための施策が講じられており、一定の成果をあげている（Maeda, 1999; Takashio & Shinotsuka, 2001）。しかし、醸造設備を最適化するためには多大な投資が必要となり、小規模のビールメーカーがそのような投資を行うことは現実的には難しい。一方で、仕込工程において生成される老化臭の原因物質の一つは、トランス 2 ノネナール(*trans*-2-nonenal、以下 T2N)とされている（Drost et al., 1990）。老化臭に関して以前から多くの研究がなされてきたが、いまだビール醸造、品質管理の大きな課題である（Jamieson & Van Gheluwe 1970; Meligaard 1975; Drost et al., 1990; Lermusieau et al., 1999）。T2N は、仕込工程において、麦芽に存在するリノール酸（linoleic acid）が酵素的酸化もしくは非酵素的酸化（自動酸化）により9-ヒドロキシペルオキシド（9-hydroxyperoxide、以下 9-PHOD）に変化し、さらに分解を受けることで生成すると考えられる（Walker, Hughes & Simpson, 1996; Lermusieau et al., 1999; Kuroda et al., 2003）。また、9-PHOD は、さらにトリヒドロキシオクタデセン酸（trihydroxyoctadecenoic acid、以下 THOD）へと変換される（Kuroda et al., 2002）。THOD はビールの泡持ちを低下させ（Kobayashi et al., 2002）また収斂味を与え、キレを悪くすることが知られている（Kobayashi et al., 2000; Kuroda, Maeda & Takashio, 2003）。従って、9-PHOD の生成を抑制することで、T2N や THOD の生成を抑制すること可能と考えられ、ビール成分の自動酸化に関する研究成果（Kaneda et al., 1989; Kaneda et al.,



1990; Bamforth, Muller & Walker, 1993) が実際のビール醸造に活用されている (Maeda, 1999; Takashio & Shinotsuka, 2001)。一方、仕込工程におけるリノール酸の酵素的酸化には、リポキシゲナーゼ (lipoxygenase、以下 LOX) (EC.1.13.11.12) が関与していることが知られており (Walker, Hughes & Simpson, 1996) 麦芽や仕込中の LOX 活性を低減することにより、T2N の前駆体を減少することを目的として、いくつかのアプローチが取られた (Wu et al., 1997; Larsen et al., 2001; Ueda et al., 2001)。例えば、製麦の発芽工程において、発芽温度が低い方が麦芽の LOX 活性が低くなることが明らかとなっている (Yang & Schwarz, 1995)。また、製麦の焙燥工程において、より高い焙焦温度とより長い焙燥時間を適用することで、麦芽の LOX 活性を低減することができる (Dumoulin & Boivin, 2001)。しかしながら、このような製麦工程の調整による LOX 活性の制御は、他の麦芽品質にも影響を与える。例えば、高い焙焦温度は麦芽の色度の上昇の原因となり、必ずしも醸造家が求める麦芽品質を実現できないことになる。このように、一般的なビールのムギを用い、製麦・醸造工程において、自動酸化を抑制する、あるいは LOX 活性を低減させることにより酵素的酸化を抑制し、香味耐久性を高めるアプローチは、多額の設備投資や LOX 活性以外の麦芽品質への影響などの欠点を有するといえる。これに対し、LOX 活性が低いあるいは LOX 活性を持たない大麦を使用することは、工程や麦芽品質等に制約を与えることなくどのようなタイプの醸造設備やビールにも適用できる可能性があり、最も実用的、効果的な方法であると想定された。

オオムギにおいては、現在までに少なくとも 4 種類の LOX アイソザイムに関する報告がある (Yang et al. 1993; Feussner et al. 1995)。オオムギ種子中に存在する LOX には、リポキシゲナーゼ-1 (lipoxygenase-1、以下 LOX-1) とリポキシゲナーゼ-2 (lipoxygenase-2、以下 LOX-2) の 2 つのアイソザイムが知られており (Yabuuchi 1976; Baxter 1982; Doderer et al. 1992; Yang et al. 1993) その遺伝子が単離されている。また、LOX-1 および LOX-2 は、それぞれ前述の 9-HPOD および 13-HPOD の生成を触媒する (Yang et al. 1993)。LOX-1 は、LOX-2 より低い pI を示し、完熟種子においてほぼ独

占的な LOX 活性を与えることが知られている ( Yang et al. 1993; Yang and Schwarz 1995 )。従って、麦芽中の LOX-1 を抑制することで、香味耐久性や泡持ちの改善を図ることが可能と考えられた。

そこで、Hirota et al. ( 2005 ) は、上記の仮説に基づき、育種による香味耐久性や泡持ちの向上を目的に岡山大学資源生物科学研究所のオオムギ遺伝資源を調査した結果、種子中の LOX-1 活性が認められない在来種 6 系統を発見した。遺伝解析の結果、この LOX-1 欠失形質は単一の劣性遺伝子により支配され、その欠失メカニズムは第 5 イントロンのスプライシング供与部位の変異であった ( Hirota et al., 2005 )。同時に、LOX-1 欠失形質を導入した品種を迅速かつ効率的に育成するため、この遺伝子の検出が可能な Cleaved Amplified Polymorphic Sequence ( 以下 CAPS ) マーカーを開発した ( Hirota et al., 2005 )。

また、Hirota et al. ( 2006a, 2006b ) は、LOX-1 欠失形質の効果を確認するために、試験用に育成した材料で醸造試験を実施し、ビール中の T2N 含量および THOD 含量を低減しビールの香味耐久性や泡持ちを改善する効果を確認した。

本論文では、上記のような既報の研究成果を鑑み、各主要オオムギ産地に適応した LOX-1 欠失形質を導入したビールオオムギ品種を連続戻し交配と MMAS を適用することで早期に育成し、その農業特性、麦芽品質と醸造特性を明らかにすることを目的とした。第 1 章において、北米に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種を育成し、その農業特性と麦芽品質を調査し、LOX-1 欠失形質の農業特性や麦芽品質、醸造特性への影響を明らかにした。第 2 章では、豪州に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種を育成し、その農業特性と麦芽品質、醸造特性を調査した。第 3 章では、北海道に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種を育成し、その農業特性と麦芽品質、醸造特性を調査した。第 4 章では、LOX-1 欠失形質の泡持ちや香味耐久性に対する効果をパイロットスケールおよび商業スケールの醸造設備において検証した。

## 第1章 北米に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「CDC PolarStar」

### 第1節；緒言

北米(カナダ・アメリカ合衆国)は、世界の主たるオオムギ生産地域の一つであり、両国で年間約 1,100 万トン(2017 年)のオオムギが生産され、世界のオオムギ生産量の約 7 %程度を占めている(Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020)。アメリカ合衆国がビールの大生産・消費国であることから、当然ながら麦芽生産量も多く、世界の麦芽製造能力の約 17 %が北米 2 か国により保有されていると言われている(Rahr Maltings 社, 2017)。特に農業国であり、ビール生産・消費量が多くないカナダは積極的にオオムギ、麦芽の輸出を行っており、日本の麦芽輸入量の約 33 %を北米産麦芽が占めている(財務省, 財務省貿易統計 2018)。このような状況から、日本のビール産業にとって、北米、特にカナダは重要なオオムギ生産・麦芽供給国であり、カナダから高品質なオオムギ麦芽を調達することは、高品質なビール製造のために重要であるといえる。

上記のような背景から、より高品質なビールムギ品種の開発とそれを用いた高品質麦芽の調達を目的に、サッポロビール株式会社は、カナダ・サスカチュワン大学 Crop Development Centre(以下 CDC)との共同育種を開始し、筆者らは「CDC Aurora Nijo」, 「CDC Reserve」などのビールムギ品種を育成してきた。しかし、「CDC Aurora Nijo」は、醸造試験において発酵性に難があり、また、「CDC Reserve」は、穂発芽耐性の付与のために休眠性を高めたことから、麦芽の溶けが不十分であったなどの理由のために商業的に十分活用されていない。

共同育種のパートナーであるサスカチュワン大学 CDC において開発された高品質の二条ビールムギ品種「CDC Kendall」(Plant breeders' rights office, Canadian Food Inspection Agency Web site)は、農業特性が生産者に受け入れられ、製麦会社やビール製造会社に品質が高く評価されたことから、カナダの主たるオオムギ生産地域である

西カナダプレーリー地域で広く普及した品種であった。

そこで、ビールの老化臭の原因物質である T2N や収斂味の原因物質であり、泡持ち低下の原因となる THOD の生成に関与する LOX-1 欠失形質を確実に有し、かつ一般的な麦芽品質や農業特性について既存品種と遜色がないビールムギ品種を確実に迅速に育成するため、「CDC Kendall」を反復親として使用した連続戻し交配と MMAS を適用する育種戦略をとることにより、LOX-1 欠失形質を有しかつ優良な農業特性や麦芽品質を備える品種の育成を実施した。

## 第 2 節 ; 材料および方法

### 連続戻し交配

「戻し交配」とは、ある特定の形質（遺伝子）のみを導入するための育種技術である。取り込ませたい形質を持つ親を「一回親」(Figure 1 の A') と呼び、その形質を持たず、その形質を取り込ませたい親を「反復親」(Figure 1 の A) と呼ぶ。一回親に対して反復親を交配し、生まれた子孫（雑種第 1 代;  $F_1$ ）に対して再度反復親を交配する。これを「戻し交配」と呼び、その子孫を戻し交配第 1 代 ( $BC_1$ ) と呼ぶ。交配して得られた各世代において、望む形質を持った個体を選んで次の戻し交配を行う。これを繰り返すことを「連続戻し交配」と呼び、これにより導入したい特定の形質以外の遺伝的背景が反復親に近い系統を育成することが可能である (Figure 1)。この手法と MMAS を組み合わせることにより、表現型で選抜できない形質や劣性形質の場合でも、容易に目的の形質（遺伝子）を導入することが可能となる。迅速かつ効率的に実用的な LOX-1 欠失オムギ品種を育成するため、各産地における現地育種機関との共同育種プログラムを活用し、CAPS マーカーを用いた MMAS と連続戻し交配の手法を用いて、各産地の主力品種に LOX-1 欠失形質を導入することとした。

### CAPS マーカーを使用した LOX-1 欠失個体の選抜

DNA マーカーとは、生物のもつ DNA の塩基配列の違いを目印として利用する手法である。農業分野でも様々な DNA マーカーが開発されているが、育種目標となる形質の表現型と連鎖した DNA マーカー、例えば、抵抗性品種に特異的にみられる DNA 配列を目印としたものなどを利用することによって、簡便に抵抗性や品質などの遺伝的な違いを選抜することができる。このような DNA マーカーを利用した選抜を Molecular Marker-Assisted Selection (MMAS) という。育種における選抜では、各種選抜条件を設定したり、検定材料を養成するために時間と労力がかかるが、MMAS では茎や葉等の組織の一部を用いて環境条件に影響されることなく遺伝的な違いを調

べるため、検定の労力を軽減したり、形質によっては短期間での改良も可能となる。

構造遺伝子多型による LOX-1 型の検出には CAPS 法を用いた。用いたプライマーは、既報 (Robinson et al., 1995; Hirota et al, 2005) の LOX-1 cDNA の配列をもとに以下のように設計した。

5' -CATCAAGGCCATCACGCAGGGCATCCTGCC- 3'

5' -CCAGTCCTTGTACACCACGGCCGACATCCC- 3'

PCR による LOX-1 構造遺伝子(一部)の増幅は、T-100 サーマルサイクラー(Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて、(98 10 秒、60 5 秒、72 1 分) × 35 回の増幅条件で行った。得られた増幅断片は、既報 (Robinson et al., 1995) をもとに制限酵素 AfaI (タカラバイオ株式会社) で消化後、2.5% アガロースゲル電気泳動を行いバンドを確認した。

### 育成・農業特性評価

「CDC Kendall」を連続戻し交配における反復親として、岡山大学資源生物研究所の遺伝資源から発見した種子中の LOX-1 活性が認められない在来種「OUI003」(Hirota et al., 2005) を 1 回親として用いた。連続戻し交配の過程において、2001 年から 2002 年までサッポロビール株式会社で交配を実施し、その後 CAPS マーカーをサスカチュワン大学 CDC に導入し、2003 年以降はサスカチュワン大学 CDC において、戻し交配および MMAS を実施した。

連続戻し交配を実施後、自殖した植物体から MMAS により「OUI003」由来の LOX-1 活性欠失の原因遺伝子(以下 LOX-1 欠失遺伝子)を有する個体(以下 LOX-1 欠失個体)を選抜した。選抜した LOX-1 欠失個体の種子を増殖し、複数系統をサスカチュワン大学 CDC が運営する生産力検定試験である Standard Barley Yield Trial (以下 SBYT) に供試した。

SBYT において、達観調査と農業特性、麦芽品質で選抜した系統をカナダの品種認定試験である Western Canadian Cooperative Two-Row Barley Registration Test (以下 2R-COOP) に供試した。同時に北アメリカの典型的なオオムギの病害に対する抵抗性を評価するため、耐病性検定圃場における耐病性検定に供試した。農業特性評価と耐病性検定は、カナダにおける穀類・豆類等の品種登録の可否判断を司る The Prairie Grain Development Committee (以下 PGDC) の分科会である The Prairie Recommending Committee for Oat and Barley (以下 PRCOB) が示すプロトコル (The Prairie Recommending Committee for Oat and Barley, 2016) に基づき実施した。各試験における試験地は Table 1 に示した。

Table 1. Trial sites of Standard Barley Yield Trial (SBYT) and Western Canadian Cooperative Two-Row Barley Registration Test (2RCOOP) in Canada.

Standard Barley Yield Trial (SBYT)

Province	Site
Alberta	Lacombe, Taber
Saskatchewan	Goodale, Harris, Saskatoon, Wakaw

Western Canadian Cooperative Two-Row Barley Registration Test (2RCOOP 1st year)

Province	Soil type	Site
Alberta	Black and gray soil zone	Beavorlodge, Calmer, Fort vermillion, Lacombe
Saskatchewan	Black soil zone	Indian Head, Melfort, Regina
	Brown soil zone	Biesecker, Harris, Lethbridge, Saskatoon, Swift Current, Trochu, Watrous
Manitoba	Black soil zone	Brandon, Grenlea

Western Canadian Cooperative Two-Row Barley Registration Test (2RCOOP 2nd year)

Province	Soil type	Site
British Columbia	Black and gray soil zone	Dowson Creek
Alberta	Black and gray soil zone	Beavorlodge, Calmer, Fort vermillion, Lacombe
Saskatchewan	Black soil zone	Indian Head, Melfort, Regina
	Brown soil zone	Biesecker, Harris, Lethbridge, Saskatoon, Swift Current, Scott, Watrous
Manitoba	Black soil zone	Brandon



## マイクロ製麦・大麦および麦芽品質評価

これ以降、小規模製麦装置を用いた育種評価のための 1kg 以下の製麦をマイクロ製麦と称する。「CDC PolarStar」の育成過程におけるマイクロ製麦およびオオムギ・麦芽品質評価は、2R-COOP1 年目（2006 年）、2R-COOP2 年目（2007 年）の産物を用いて、サスカチュワン大学および 2R-COOP の参画機関において実施した。オオムギ・麦芽品質は、American Society of Brewing Chemist (ASBC) 公定法に準拠し、2R-COOP の標準法に従い分析した。

オオムギの評価項目は、整粒歩合 (Plump)、千粒重 (Kernel weight)、タンパク質 (Protein)、発芽勢 (Germination energy) とした。麦芽の評価項目は、エキス (微粉) (Fine extract)、可溶性窒素 (Soluble nitrogen)、酵素力 (Diastatic power)、 $\alpha$ -アミラーゼ活性 (Alpha-amylase)、 $\beta$ -グルカン (Beta-glucan)、粘度 (Viscosity)、フライアブリティ (Friability)、剥皮粒比率 (Peeled) とした。

マイクロ製麦は、2R-COOP 標準法に従い実施した。製麦工程の概要は次の通りである。フェニックス社製小規模製麦装置 (500 g / 点) (Phoenix Biosystems, SA, Australia) を使用し、浸麦工程は、水温 13℃、張り 10 時間、切り 18 時間、張り 8 時間、切り 12 時間の計 38 時間の設定とした。発芽工程は 15℃ 一定で、96 時間の設定とした。焙燥工程は、30℃ / 48 (6 時間) / 48 (16 時間) / 48 (8 時間) / 66 (10 時間) / 66 (85 (2 時間) / アブダル 85 (6 時間) の計 48 時間の設定とした。

## 醸造試験用材料

醸造試験に用いた材料は、Table 2 に示した。Trial 1 - 4 は同じ産年度、産地の材料、それ以外は夫々別の産年度、産地の材料を使用した。各試験に用いた麦芽の産年度については、Table 2 に示した。産地については、すべてカナダ国内であり、同一地域で生産したのものを使用した。Trial 5 - 7 については、商業設備で製麦した麦芽を使用した。

## 醸造試験用パイロットスケール製麦

醸造試験用パイロットスケール製麦 (100 kg 大麦 / バッチ) は、サッポロビール株式会社商品・技術イノベーション部商品・技術開発グループ標準法に従い実施した (Ogushi et al., 2002)。これ以降、本製麦設備で製麦することをパイロット製麦と称する。浸麦工程は、水温 14℃、張り 6 時間 / 切り 6 時間を繰り返す工程とした。事前に予備浸麦を行い、浸麦時間を決定した。発芽工程は 14℃ 一定で、発芽時間は 144 時間に設定した。焙燥工程は、55℃ (5.0 時間) 60℃ (5.5 時間) 65℃ (2.0 時間) 75℃ (1.5 時間) 83.5℃ (4.5 時間) (新鮮空気 100%) の計 18.5 時間の設定とした。

## LOX 活性測定

オオムギ種子および麦芽の LOX 活性測定は、既報に従い実施した (Hirota et al., 2005; Hirota et al., 2006a)。

オオムギ種子もしくは麦芽を粉碎し、400  $\mu$ l の抽出バッファー (0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5)) を添加した。抽出液を 4℃ で 30 分間振とう後、15000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清を粗酵素液とした。酵素活性測定は、黒田 (2001) の方法を利用した。粗酵素液 10  $\mu$ l に 5  $\mu$ l の基質液 (40 mM リノール酸、1.0% (W/V) Tween20) および 85  $\mu$ l の抽出バッファーを加え、混和後 24℃ で所定時間反応させた。反応の停止は、100  $\mu$ l の停止液 (80 mM 2,6-ジ-t-ブチル-p-クレゾール、25 mM 硫酸、0.25 mM 硫酸アンモニウム鉄 (II) 6 水和物、100 mM キシレノールオレンジ、90% メタノール) を添加、30 分静置後、波長 550 nm の吸光度を測定した。陰性対照は、100℃ で 5 分間熱処理し、LOX 活性を失活させた粗酵素液を同様に反応させたものを用いた。すべての熱処理は、PTC-200 Peltier Thermocycler (MJ Research 社) を使用した。1 ユニットの LOX 活性は、クメンヒドロキシペルオキシドを標準として、1 g の麦芽が 1 分間にヒドロキシペルオキシド 1 nmol を生成する酵素量と定義した。

#### 400L パイロットスケール醸造試験

400 L パイロットスケール醸造設備における醸造試験は、サッポロビール株式会社商品・技術イノベーション部商品・技術開発グループ標準法 (Ogushi et al., 2002) に従い実施した。原料配合は、「CDC PolarStar」の試験については、Table 2 に示した。

「SouthernStar」, 「札幌2号」については、各章に示した。仕込ダイアグラムは、50 20分→65 40分→73 3分とした。90分間煮沸した後、エキスを10.9 - 11.1 %となるよう調整し、その後麦汁を冷却した。15 × 10<sup>6</sup> cell/mL の下面発酵酵母を麦汁に添加し、10.5 で8 - 10日間経過した。熟成は8 で8日間、その後0 で20 - 25日間経過した。ろ過、瓶詰は効率的に酸素を除去できるパイロットスケールの設備にて実施した。

#### 5000L パイロットスケールおよび商業スケール醸造試験

5000 L パイロットスケール醸造設備における醸造試験は、サッポロビール株式会社生産・技術開発部ミニブルワリーグループ標準法に従い実施した。商業スケールの醸造試験は、サッポロビール株式会社が所有する複数の醸造所で実施した。基本的な醸造方法は、前述した400 L パイロットスケール醸造試験の方法に準じ、「CDC Kendall」もしくは「AC Metcalfe」を対照として使用した。「CDC Kendall」を連続戻し交配の反復親として使用したことから、LOX-1 欠失形質以外の遺伝的背景が極めて「CDC Kendall」と近く、LOX-1 欠失形質の効果を評価するために適切と考えられたことから、「CDC Kendall」をほとんどの試験において対照とした。また、「AC Metcalfe」は、カナダのビールムギの主力品種であることから対照とした。パイロットスケールおよび商業スケール醸造試験の原料配合を含む条件については、Table 2 に要約した。

Table 2. Conditions of pilot and commercial scale brewing trials

Trial	Scale	Control	Beer type	Crop	Malt %	LOX-1 null malt %	Adjuncts	LOX-1 null Barley %	
1st			Beer		100	0 or 100	0	0	
2nd	Pilot	400 L	CDC Kendall	Beer	2006	71	29 % (Starch/Corn/Rice)	0	
3rd						Low malt beer	24	0	76 % (Barley)
4th			Low malt beer		24	0 or 24	76 % (Sugar)	0	
5th	Pilot	5000 L	AC Metcalfe	Beer	2009	70	0 or 70	30% (Starch)	0
6th	Commercial	285 hL	Commercial mixed malt	Beer	2007	74	0 or 74	26% (Corn Syrup)	0
7th	Commercial	1000 hL	CDC Kendall	Beer	2009	100	0 or 100	0	0

### 第 3 節 ; 結果

#### 第 1 項 ; 育成過程

2001 年に、「OUI003」を母親、「CDC Kendall」を父親とした交配を実施した。2002 年から 2004 年にかけて、4 回の戻し交配と  $BC_1F_1 \sim BC_4F_1$  において MMAS によるヘテロ個体の選抜を実施し、2004 年に 5 回目の戻し交配を終了後、MMAS により  $BC_5F_2$  世代から LOX-1 欠失ホモ個体 51 個体を選抜した。CAPS マーカーを用いた MMAS による LOX-1 欠失ホモ個体の選抜結果の例を Figure 1 に示した。Figure 1 に示した通り、育種の選抜過程において、LOX-1 欠失遺伝子について、ホモ個体、ヘテロ個体を識別することが可能であった。「OUI003」由来の LOX-1 欠失遺伝子を有する系統は、0.7 kb と 0.3 kb のバンドを示し、「CDC Kendall」由来の野生型の LOX-1 遺伝子を有する系統は、0.7 kb と 0.6 kb のバンドを示した。

各  $BC_4F_4$  系統をニュージーランドにおける種子増殖を兼ねた SBYT に 2005 年に供試し、達観調査結果と農業特性、麦芽品質のデータを得た。並行してさらに戻し交配と冬季間の温室による増殖を行い、 $BC_5F_4$  世代で、カナダにおける SBYT を実施した。上記の  $BC_4$  世代および  $BC_5$  世代の SBYT 試験のデータに基づき、戻し交配第 5 代由来で最も「CDC Kendall」に近い性質を持つと思われる 12 系統を選抜した（データ示さず）。選抜した 12 系統を混合し育種家種子と定義し、2006 年と 2007 年に「TR06918」として 2R-COOP に供試した。Figure 2 に育種家種子の AfaI-CAPS 法によるバンドパターンを示した。また、2007 年に「TR06918」を麦芽品質の最終評価を行う試験である Western Canadian Two-Row Barley Collaborative Malting Test (Collab) に供試し、最終の麦芽品質評価を行なった。なお、本試験は、通常 2 年行うことになっているが、連続戻し交配により育成した品種であること等を理由に 1 年短縮した。2008 年 2 月に開催された PGDC 年次総会において、予定より 1 年早く PRCOB における仮品種登録の承認を得て、2008 年 5 月に「CDC PolarStar」と命名、仮品種登録 (Interim Registration)

し、2011年に本品種登録（Full Registration）に移行した（Figure 3）。

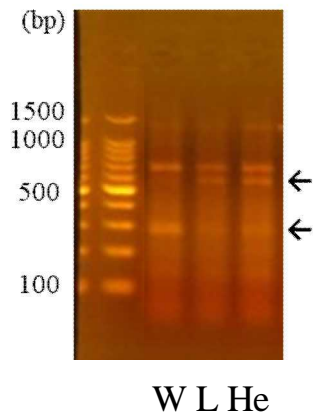


Figure 1. Examples of DNA band pattern obtained by the AfaI-CAPS method for the selection of heterozygous and homozygous single plants for LOX-1 null gene in the process of backcrossing.

Lanes: W, homozygous (wild type gene); L, homozygous (LOX-1 null gene) and He, heterozygous

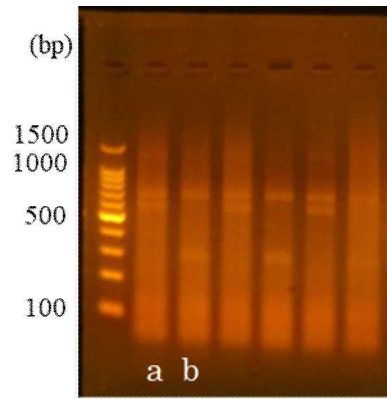


Figure 2. DNA band pattern obtained by the AfaI-CAPS method for CDC PolarStar (a) and its recurrent parent CDC Kendall (b).



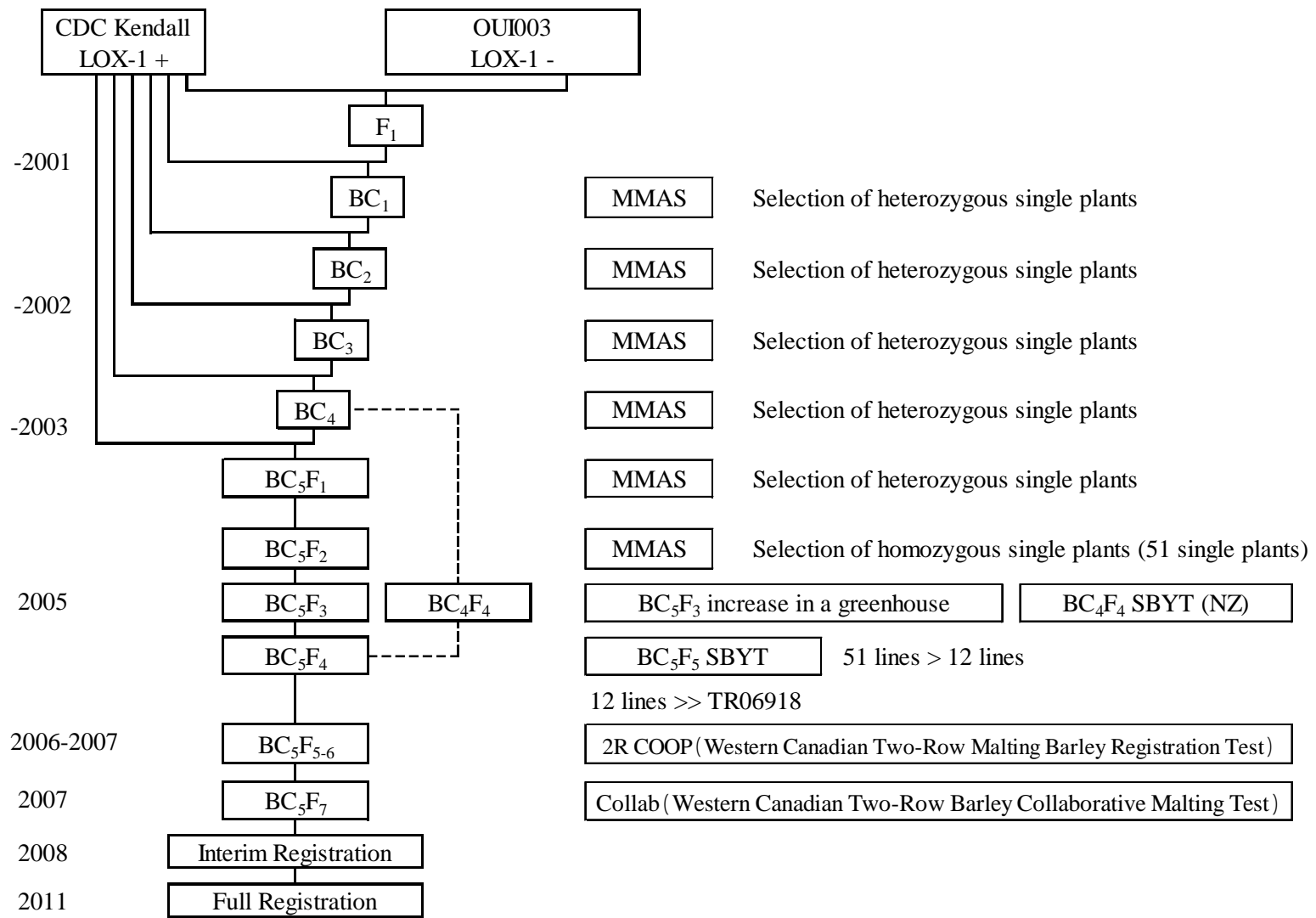


Figure 3. The breeding process of 'CDC PolarStar'

## 第 2 項 ; 農業特性評価

育成過程の代表的なデータとして、「TR06918」として供試した 2 カ年（2006 年、2007 年）の 2R-COOP の農業特性の評価結果を Table 3 に示した。本試験において、収量とその他の農業特性について、「CDC PolarStar」と反復親である「CDC Kendall」、カナダに適応したビールムギ品種である「Harrington」、「AC Metcalfe」、「CDC Copeland」、多収飼料オオムギ品種である「Xena」を比較した。収量は、各試験地の平均で、2006 年の試験において、「CDC PolarStar」が 5.29 t/ha であったのに対し、「CDC Kendall」は 5.42 t/ha とほぼ同等であり、2006 年、2007 年の試験において、「CDC PolarStar」が夫々 5.29 t/ha、4.93 t/ha であったのに対し、カナダにおける二条ビールムギの主力品種である「AC Metcalfe」は 5.33 t/ha、4.97 t/ha であり、「AC Metcalfe」に匹敵する収量性を示した。稈長は、耐倒伏性に関与する重要な形質であるが、2006 年の試験において、「CDC PolarStar」は 84.1 cm に対し、「CDC Kendall」は 80.8 cm と「CDC PolarStar」がわずかに高く、2006 年、2007 年の試験において、「CDC PolarStar」が夫々 84.1 cm、85.1 cm であったのに対し、「AC Metcalfe」が 83.1 cm、85.9 cm とほぼ同程度であった。それ以外の農業特性に関する調査項目については、2006 年の試験で、「CDC PolarStar」と「CDC Kendall」に差は認められなかった。また、2006 年、2007 年の試験において、「CDC Kendall」と「AC Metcalfe」に大きな差は認められなかった。

また、耐病性に関する評価結果を Table 4 に示した。耐病性については、反復親である「CDC Kendall」とほぼ同様の傾向を示し、裸黒穂病（False loose smut; *U.nigra*）に抵抗性、網班病にやや抵抗性であり、裸黒穂病（Loose smut; *U.nuda*）、黒さび病および雲形病に罹病性であった。また、2006 年、2007 年の試験において、「AC Metcalfe」と比較し、明らかに劣る点は見られなかった。

上記の結果から、「CDC PolarStar」の収量性、その他の農業特性は、反復親である「CDC Kendall」とほとんどの項目で同程度であり、カナダにおける主要ビールムギ品種である「AC Metcalfe」に匹敵すると考えられた。

Table 3. Grain yield and agronomic trait data of CDC PolarStar and check cultivars in Western Canadian Cooperative Two-Row Barley Registration Tests (2R-COOP) during 2006 and 2007.

Year		2006						2007				
Variety		Harrington	Xena	AC Metcalfe	CDC Kendall	CDC PolarStar	Number of sites	CDC Copeland	Xena	AC Metcalfe	CDC PolarStar	Number of sites
Grain yield	(kg/ha)	5065	6266	5334	5290	5424	16	5084	5629	5071	4933	15
as AC Metcalfe	(%)	95	117	100	99	102		100	111	100	97	
Days to head	(days)	58.0	57.8	58.4	59.2	58.7	13	59.0	56.6	56.6	57.9	11
Days to maturity	(days)	86.1	87.5	86.9	86.0	85.6	13	90.0	90.3	89.2	88.1	13
Height	(cm)	81.0	83.6	83.1	80.8	84.1	14	87.0	85.6	85.9	85.1	14
Lodging score <sup>1</sup>	1-9	6.0	4.8	5.7	6.8	7.3	2	4.5	3.8	4.2	4.7	2
Test weight	(kg/hl)	64.5	67.0	66.2	65.4	64.9	13	63.3	66.2	65.2	64.9	13
Kernel weight	(g 1000k <sup>-1</sup> )	42.6	49.8	44.7	43.4	44.1	13	43.8	47.2	42.7	42.9	12
Plump	(%) >2.44mm	88.0	93.4	89.9	92.7	91.4	10	88.0	89.0	87.8	92.0	11

<sup>1</sup> 1=no lodging; 9=completely lodging

Table 4. Disease reaction summaries of CDC PolarStar and check cultivars in Western Canadian Cooperative Two-Row Barley Registration Tests (2R-COOP) during 2006 and 2007.

Year		2006					2007			
Variety	Harrington	Xena	AC Metcalfe	CDC Kendall	CDC PolarStar	CDC Copeland	Xena	AC Metcalfe	CDC PolarStar	
	102 <sup>1</sup>	10 <sup>7</sup>	10	9	5	5	6	9	9	8
WSNB	858 <sup>1</sup>	10	10	10	9	8	9	10	9	9
	857 <sup>2</sup>	9	3	5	3	1	5	5	5	3
MNB		7.5	2.0	4.5	1.5	1.0	2.0	1.0	3.5	1.0
BSB		7.5	7.0	5.5	6.5	4.5	4.5	5.0	5.0	4.5
MSB		4.5	5.0	3.5	4.0	4.5	5.0	4.5	3.5	4.3
SSB		6.5	5.0	4.5	4.8	6.0	5.5	4.5	3.5	4.5
WSB	1903 <sup>3</sup>	7 <sup>8</sup>	6	6	6	5	6	7	6	4
FHB <sup>4</sup>		2.3	1.3	2.3	2.5	2.3	1.8	2.2	2.2	2.8
DON <sup>4</sup>		5.9	3.7	5.6	5.4	5.9	1.9	1.7	5.9	3.1
WSS	1998 <sup>5</sup>	S <sup>9</sup>	S	S	S	S	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	1493 <sup>6</sup>	S <sup>9</sup>	S	S	S	S	S	S	S	S
ES	Aug. 9	1.5	2.5	0.5	2.0	4.0	3.0	2.0	2.0	1.5
LS	31-Jul	6.5	7.0	6.0	4.0	5.5	4.0	3.5	3.5	3.5
SCS		S <sup>10</sup>	S	R	MR	MR	MR	S	R	S
	<i>U. nuda</i>	29%	81%	0%	81%	81%	94%	89%	0%	n.a.
WS	<i>U. hordei</i>	10	3	3	3.5	0	0.5	0	0	0
	<i>U. nigra</i>	22.5	40	7.5	26.5	tr	0	0	0	0
LCRR		89%	89%	89%	87%	89%	96%	57%	80%	80%
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	S <sup>11</sup>	MRMS	MS	MS

WSNB, Winnipeg seedling net blotch; MNB, Melfort net blotch; BSB, Brandon spot blotch; MSB, Melfort spot blotch; SSB Saskatoon spot blotch; WSB Winnipeg spot blotch; WSS1998, Winnipeg seedling Septoria 1998; WSS1493, Winnipeg seedling scald 1493; ES, Edmonton scald; LS, Lacombe scald; SCS, Saskatoon covered smut; WS, Winnipeg smut, LCRR, Lacombe common root rot

1 *Pyrenophora teres* net-form isolates

2 *Pyrenophora teres* spot-form isolate

3 *Cochliobolus sativus* isolate

4 FHB, Fusarium head blight; DON, deoxynivalenol; FHB rating scale=0-5 (0=best)

5 *Septoria passerinii* isolate

6 *Rhynchosporium secalis* isolate

7 10=very susceptible, 9=susceptable, 7=moderately susceptible, 5=moderately resistant-moderately susceptible,

3=moderately resistant, 1=resistant.

8 0-9 scale: 0=no visible lesions, 4=small, 9=very large, coalescing.

9 R, resistant; MR, moderately resistant; MS, moderately susceptible; MSS, moderately susceptible-susceptable; S, susceptible.

10 I, immune; R, resistant; MR, moderately resistant; S, susceptible; HS, highly susceptible.

11 MR, moderately resistant; MRMS, moderately resistant-moderately susceptible; MS, moderately susceptible.

n.a.: data not available

### 第3項；麦芽品質評価

育成過程の代表的なデータとして、「TR06918」として供試した2ヵ年(2006~2007年)の2R-COOPの麦芽品質の評価結果をTable 5に示した。対照は反復親である「CDC Kendall」、二条ビールムギの代表的な品種である「Harrington」、「AC Metcalfe」、「CDC Copeland」とした。

「CDC PolarStar」は、2006年の試験において反復親である「CDC Kendall」と同等の麦芽品質を示した。麦芽エキス(Fine extract)は「CDC PolarStar」が80.7%であったのに対し、「CDC Kendall」が80.4%、酵素力(Diastatic power)は「CDC PolarStar」が149°Lに対し、「CDC Kendall」が150°L、 $\alpha$ -グルカンは「CDC PolarStar」が80 mg/Lに対し、「CDC Kendall」が61 mg/Lなど、重要な麦芽分析項目について、ほぼ同程度の値を示した。

また、2006年、2007年の試験において、カナダの二条ビールムギの主力品種である「AC Metcalfe」に匹敵する麦芽品質を示した。例えば、麦芽エキスについては、2006年、2007年の試験において、「CDC PolarStar」が夫々80.7%、80.9%であったのに対し、「AC Metcalfe」は80.9%、81.7%とほぼ同等であった。酵素力は「CDC PolarStar」が149°L、137°Lであったのに対し、「AC Metcalfe」は130°L、123°Lと「CDC PolarStar」がやや高かった。また、 $\alpha$ -グルカンは「CDC PolarStar」が80 mg/L、97 mg/Lであったのに対し、「AC Metcalfe」は81 mg/L、87 mg/Lとほぼ同様の値を示した。

パイロットスケールおよび商業スケールの醸造試験に用いた「CDC PolarStar」と各対照麦芽の分析値をTable 6に示した。Trial 1-4は同じ麦芽を使用した。対照として反復親のCDC Kendallを用いたTrial 1-4とTrial 7については、麦芽分析値に差は認められなかった。これらの結果もまた、LOX-1欠失形質が一般的な麦芽品質項目に大きな影響を与えないことを示唆していた。一般的な麦芽品質項目と対照的に、Trial 1-4に用いられた「CDC PolarStar」と「CDC Kendall」の麦芽のLOX活性は、各々0.3 unit、15.1 unitと明らかな差が見られた。また、Figure 2に示した最終的に選抜した「CDC

PolarStar」の AfaI-CAPS 法によるバンドパターンと麦芽の LOX 活性の測定結果から、  
選抜した系統が LOX-1 欠失形質を確実に有していることを確認できた。

Trial 5 に用いた麦芽の可溶性窒素 (Soluble nitrogen) については、対照と「CDC  
PolarStar」でやや差が認められた。

Table 5. Malting quality of CDC PolarStar and check cultivars in Western Canadian Cooperative Two-Row Barley Registration Tests during 2006 and 2007.

Year			2006				2007			
Variety		Harrington	AC Metcalfe	CDC Kendall	CDC PolarStar	Number of sites	CDC Copeland	AC Metcalfe	CDC PolarStar	Number of sites
Plump	(%)	93.0	97.3	97.0	95.8	2	94.1	92.8	96.3	3
Kernel Weight	(g 1000k <sup>-1</sup> )	45.7	47.8	45.2	45.0	2	43.1	42.3	42.5	3
Protein	(%)	11.8	11.9	12.2	12.2	2	10.2	10.7	11.1	3
Germination	4ml (%)	100	99	100	98	2	97	98	99	3
Energy	8ml (%)	99	93	95	93	2	96	96	94	3
Fine Extract	(%)	80.5	80.9	80.4	80.7	2	81.1	81.7	80.9	3
Soluble Protein	(%)	5.0	4.8	4.9	5.0	2	4.6	4.8	4.8	3
Diastatic Power	(°L)	108	130	150	149	2	105	123	137	3
Alpha- Amylase	(D.U.)	58.4	62.3	59.6	60.4	2	52.0	68.0	69.1	3
Beta-Glucan	(mg/L)	150	81	61	80	2	80	87	97	3
Viscosity	(cps)	1.45	1.43	1.42	1.44	2	1.43	1.42	1.42	3
Friability	(%)	89.7	90.0	91.6	92.4	1	98.4	99.4	97.1	2
Peeled	(%)	3.4	2.1	2.6	2.2	1	5.7	4.8	3.0	2

Table 6. Malting quality of CDC PolarStar and control malts for pilot and commercial scale brewing trials.

Trial		1st-4th		5th		7th	
Variety		CDC Kendall	CDC PolarStar	AC Metcalfe	CDC PolarStar	CDC Kendall	CDC PolarStar
Malt Moisture	(%)	8.0	4.3	4.7	4.2	3.9	4.2
Color	(°EBC)	3.9	3.8	3.8	4.5	3.8	3.5
Boiled Wort Color	(°EBC)	6.9	7.0	7.2	8.7	6.2	6.9
Extract	(% d.b.)	79.8	78.2	83.0	82.5	81.8	82.5
Soluble Nitrogen	(%)	0.762	0.756	0.785	0.861	0.734	0.736
Total Protein	(%)	11.8	11.7	11.6	11.3	11.0	10.5
Kolbach Index	(%)	40.4	40.4	42.3	47.6	41.6	43.7
Apparent Attenuation Limit	(%)	82.9	82.3	81.0	83.2	82.8	83.4
Diastatic Power	(°WK)	n.a.	n.a.	553	481	n.a.	n.a.
Viscosity	(mPa · S)	1.40	1.49	1.50	1.46	1.46	1.46
Friability	(%)	n.a.	n.a.	86.0	86.0	n.a.	n.a.
Wort Beta-glucan	(mg/L)	50	59	59	39	28	37
LOX activity	(unit)	15.1	0.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a.: data not available

The malt used for Trial 1-4 was identical.



## 第4項；醸造特性評価

「CDC PolarStar」を用いた、パイロットスケールおよび商業スケールの醸造試験の結果を Table 7 に示した。これ以降、醸造試験の結果について記述する際、「CDC PolarStar」をはじめとする育成した LOX-1 欠失品種から製造した麦芽から醸造したビールと反復親およびその他の対照品種から製造した麦芽から醸造したビールについて、その品種名（例えば、「CDC PolarStar」「CDC Kendall」）あるいは対照と簡略に記載した。

Table 2 に示したように、Trial 1 - 4 は、400 L パイロットスケール醸造設備において、同じ由来の麦芽を用い、それぞれ 麦芽 100 %ビール、 麦芽 71 %ビール、 麦芽 24 %、オオムギ 76 %低麦芽使用率ビール、 麦芽 24 %、液糖 76 %低麦芽使用率ビールの仕様で醸造し、 、 、 については麦芽、 についてはオオムギを「CDC PolarStar」と対照麦芽もしくは副原料としてのオオムギで置き換え比較した。また、Trial 5 については、5000 L パイロットスケール醸造設備で麦芽 70 %ビール、Trial 6 は商業規模の 285 hL 醸造設備で麦芽 74 %ビール、Trial 7 は商業規模の 1000 hL 醸造設備で麦芽 100 %ビールの仕様で試験を実施した。Trial 5 - 7 については、麦芽の由来は各々異なった。

各試験において、醸造工程上の問題は発生しなかった。また、分析した一般的なビール品質分析項目に関しては、試験の仕様や醸造設備に基づく差異は試験間で認められたが、各試験の「CDC PolarStar」と対照品種間で各分析項目に大きな差異は認められなかった。

Table 7. Analyses of CDC PolarStar and control worts and beers

Trial		1st		2nd		3rd		4th		5th		6th		7th	
Variety		CDC Kendall	CDC PolarStar	CDC Kendall	CDC PolarStar	CDC Kendall	CDC PolarStar	CDC Kendall	CDC PolarStar	AC Metcalfe	CDC PolarStar	Commercial mixed malt	CDC PolarStar	CDC Kendall	CDC PolarStar
Wort															
Extract	(%)	11.36	11.36	11.17	11.17	10.06	10.14	12.24	12.15	12.27	12.23	n.a.	n.a.	12.65	12.69
Final Attenuation	(%)	69.3	70.3	72.1	73.3	74.7	73.2	70.1	70.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Apparent Attenuation Limit	(%)	85.5	86.8	88.9	90.2	92.1	90.3	86.9	87.2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
pH		5.63	5.65	5.57	5.54	5.43	5.46	5.9	5.94	5.25	5.35	n.a.	n.a.	5.24	5.22
Color	(°EBC)	9.5	9	6.8	6.6	4.8	4.7	3.6	3.7	9.7	10.2	n.a.	n.a.	10.5	10.8
BU		36.2	34.2	35.9	34.9	38.6	37.1	33.5	34.7	34.8	33.7	n.a.	n.a.	31.8	31.6
Polyphenol	(mg/L)	233	213	183	181	207	194	96	93	178	170	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Free Amino Nitrogen	(mg/L)	204	197	148	143	93	97	59	59	163	160	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Beer															
Original Gravity	(%)	11.11	11.11	10.67	10.75	8.33	8.57	12.1	12.01	11.08	11.08	10.71	10.46	11.87	11.87
Final Extract	(%)	3.54	3.49	3.05	3.03	2.15	2.32	3.75	3.68	3.57	3.43	3.29	3.02	3.57	3.75
Final Attenuation	(%)	68.1	68.6	71.4	71.8	74.2	72.9	69	69.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Apparent Extract	(%)	1.68	1.62	1.2	1.15	0.66	0.81	1.5	1.72	1.73	1.56	1.47	1.21	1.54	1.77
Apparent Attenuation Limit	(%)	84.9	85.4	88.8	89.3	92.1	90.5	85.9	86.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Alcohol	(vol %)	4.98	5	4.98	5.05	3.97	4.02	5.52	5.5	n.a.	n.a.	4.86	4.86	5.45	5.34
Alcohol	(w/w %)	3.91	3.93	3.92	3.97	3.13	3.17	4.34	4.32	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
pH		4.61	4.62	4.55	4.5	4.63	4.59	3.47	3.47	4.26	4.24	4.3	4.26	4.56	4.56
BU		20.7	21.4	23.3	22.5	20.3	18.5	15.3	14.4	19.8	20	19.1	18.3	18.9	20
Polyphenol	(mg/L)	201	190	153	146	123	120	88	84	139	129	132	126	192	151
Free Amino Nitrogen	(mg/L)	132	118	80	74	25	28	12	11	73	64	n.a.	n.a.	80	91
Acetaldehyde	(mg/L)	1.4	2.8	2.8	3.4	1.2	1.1	1.5	1.3	2.3	0.8	1.2	1.6	0.7	0.4
Acetone	(mg/L)	0.7	0.9	1	0.8	0.4	0.6	0.9	0.7	0.6	6	0.6	1.3	1.1	0.4
Ethyl Acetate	(mg/L)	22	24	23	22	23	24	26	23	17	17	13	13	20	28
Isoamyl Acetate	(mg/L)	1.4	1.6	1.7	1.8	1.8	1.6	1.5	1.5	1.1	1.3	0.7	0.7	1.2	1.6
n-Propanol	(mg/L)	10	12	11	11	11	12	11	10	12	12	17	12	14	16
Isobutanol	(mg/L)	7	9	9	10	9	10	7	7	8	10	14	12	10	10
Isoamyl Alcohol	(mg/L)	47	53	55	52	59	81	66	59	52	58	67	69	59	58
Ethyl Caproate	(mg/L)	0.14	0.17	0.19	0.23	0.13	0.13	0.17	0.17	0.2	0.21	n.a.	n.a.	0.17	0.18

n.a.: data not available

## 第4節；考察

本章の試験結果から、「CDC PolarStar」は、「CDC Kendall」とほぼ同等の農業特性を持ち、カナダの二条ビールムギの主力品種であった「AC Metcalfe」との比較し、遜色ない収量性と農業特性を有することが明らかとなった( Table 3, 4 )。このことから、北米における「CDC PolarStar」の栽培について大きな懸念はないと判断された。

LOX 欠失形質は、他の作物、例えばダイズ ( Kitamura et al., 1982; Davies & Nielsen, 1986 ) やイネ ( Shirasawa et al., 2008 ) で発見されてきた。LOX 欠失ダイズでは、LOX 欠失系統が対照品種と比較して通常の生育を示すことが明らかとなっている( Pfeiffer, Hildebrand & TeKrony, 1991 )。しかし、オオムギにおいては、LOX-1 欠失形質が麦芽、麦汁、ビールの品質にネガティブな影響を与えないことは示されていたが( Hirota et al., 2006a; Hirota et al., 2006b )、農業特性への影響は報告されていなかった。連続戻し交配で育成された「CDC PolarStar」と反復親である「CDC Kendall」の本研究における比較から、LOX-1 欠失オオムギは通常の生育を示し、LOX-1 欠失形質が農業特性に対し大きな影響を与えないことが初めて明らかとなった。本結果は、ビール品質の改善を目的として、LOX-1 欠失形質をビールムギ育種に適用できることを示す非常に重要な知見であった。

また、「CDC PolarStar」と「CDC Kendall」の麦芽品質に差異は認められなかった( Table 5, 6 )。また、前述した SBYT を含むカナダにおける公的試験以前の育種の選抜過程においても、「CDC PolarStar」と「CDC Kendall」の麦芽品質はほぼ同等であった( データ示さず )。これらの結果から、LOX-1 欠失形質は一般的な麦芽品質に影響を与えないと考えられた。既報において、LOX-1 構造遺伝子について、CAPS マーカーでタイピングし、LOX-1 欠失型と LOX-1 非欠失型でグルーピングした F<sub>4</sub> バルク集団の可溶性窒素含量を含む麦芽品質全般に差がなかったことが示されており ( Hirota et al., 2006b )、本研究における結果を支持するものである。

一方、一般的な麦芽品質項目と対照的に、Trial 1 - 4 に用いた「CDC PolarStar」と

「CDC Kendall」の麦芽 LOX 活性には明らかな差が認められ、「CDC PolarStar」において極めて活性値が低かった。この結果は、既報(Hirota et al., 2006b)における LOX-1 欠失と LOX-1 非欠失の F<sub>4</sub> バルク集団の比較に関する結果と一致しており、LOX-1 欠失形質の導入が成功していることが確認できた。

Trial 1 - 4 の「CDC PolarStar」の麦芽で LOX 活性がわずかに検出された。Yang et al. (1993) は、オオムギから LOX の 2 つのアイソザイム (LOX-1、LOX-2) を抽出、精製し、等電点や分子量を調査し、LOX-2 は完熟種子ではほぼ活性を示さず、発芽種子で活性を示すことを示した。また Hirota et al. (2006a) は、日本の在来種である「大正麦」と「OUI003」後代系統の F<sub>4</sub> 種子で LOX 活性とウェスタンブロット分析で LOX-1 の欠失を確認し、グループ分けした LOX-null、LOX-normal バルク種子を製麦し麦芽分析と醸造試験を実施したが、LOX-null 麦芽でもわずかな LOX 活性 (LOX-normal 集団の約 8%) を確認した。これらのことから、検出された LOX 活性は、LOX のアイソザイムである LOX-2 の残存活性であると推測された。

LOX-1 欠失形質を有する「CDC PolarStar」の一般的な麦汁およびビール品質分析項目について、対照に「CDC Kendall」を用いた Trial 1 - 4 および Trial 7 において、大きな差はなかった。また、「CDC PolarStar」のビール品質は、得られたビール分析値と一般的な下面発酵の淡色 (ピルスナー) ビール分析値との比較から問題ないと判断された。本結果から、LOX-1 欠失形質は、主要なビール品質に影響を与えないことを示唆しており、「CDC PolarStar」はビール醸造に適した品種であると判断された。

連続戻し交配は、さまざまな作物種の育種において、特定の遺伝子、形質を既存の品種に導入するために用いられる手法である。LOX-1 欠失形質を有するインドの在来種である「OUI003」は、二条オオムギと形態面、農業特性面、品質面の全てにおいて、全く異なる性質を有している。従って、連続戻し交配は、生産者にとって許容できる農業特性と製麦、醸造を目的とした十分な品質を有する LOX-1 欠失系統を効率よく確実に育成する最も適切な方法であり、かつ有用な育種母本となる系統を育成する方法と考えられた。本育種戦略により、著者は北米初の LOX-1 欠失オオムギ品種であ

る「CDC PolarStar」を交配開始から 8 年以下で品種登録することに成功した。

## 第2章 豪州に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「SouthernStar」

### 第1節；緒言

豪州は、世界の主たる大麦生産地域の一つであり、年間約 1,350 万トン（2017 年）の大麦が生産され、世界の大麦生産量の約 9 %を占めている（Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020）。日本への麦芽の輸入量は北米、欧州と比較すると少ないが、南半球・北半球の産地分散による麦芽供給のリスクヘッジが可能であること、船足が速いことや麦芽価格が比較的安価であることから、日本向けの麦芽供給基地となってきた。また、現在アジア各国でのビール生産量は増加しており、今後ビール生産・消費がさらに伸びると考えられるアジアに地理的に近い豪州は、より重要なビールムギの産地となると考えられる。

そこで、高品質なビールムギ品種の開発とそれを用いた高品質麦芽の調達を目的に、サッポロビール株式会社は豪州・アデレード大学との共同育種を開始し、これまで「Lofty Nijo」(Ogushi et al., 2002)などのビールムギ品種を育成してきた。しかし、「Lofty Nijo」は、DMSP がやや高いという品質上の欠点があったため、商業的には十分に活用されていない。

一方、「Flagship」は、共同育種のパートナーである豪州・アデレード大学において開発された高品質の二条ビールムギ品種であり（McMichael et al., 2001）農業特性がオオムギ生産者に受け入れられ、製麦会社やビール製造会社に品質が高く評価され、サッポロビール株式会社もその品質を評価し使用してきた。そこで、LOX-1 欠失形質を確実に有し、かつ一般的な麦芽品質や農業特性について、既存品種と遜色がないビールムギ品種を確実にかつ迅速に育成するため、既存の豪州の優良品種であった「Flagship」を反復親として使用した連続戻し交配と MMAS を適用することで、LOX-1 欠失形質を有し「Flagship」の優良形質である麦芽品質や農業特性を引き継ぐ品種の育成を実施した。

## 第 2 節 ; 材料および方法

### 育成・農業特性評価

カナダにおける「CDC PolarStar」と同様に、CAPS マーカーを用いた MMAS と連続戻し交配の手法によって、「Flagship」に LOX -1 欠失形質を導入することを目指した。本育成では直接「OUI003」を 1 回親とするのではなく、本研究で採用した連続戻し交配による LOX-1 欠失形質の導入を開始する以前に、LOX-1 欠失形質の導入と良好な品質と高い農業特性を備えた品種育成を目的に交配された材料を 1 回親として使用し、「Flagship」を連続戻し交配することによって「Flagship」に極めて近い系統を育成することとした。連続戻し交配を実施後、自殖した植物体から MMAS により LOX-1 欠失遺伝子を有する個体を選抜した。選抜した LOX-1 欠失個体を用い、共同育種パートナーであるアデレード大学の複数回の試験 (Stage 0、Stage 2) において、目視により「Flagship」と類似している系統を選抜した。選抜した系統を Stage 3 Advanced Yield Trial (8 試験地)、Stage 4 Advanced Yield Trial (17 試験地) に供試し、反復親である「Flagship」との同一性を評価した。試験方法はアデレード大学の標準法に基づき、Stage 3 試験および Stage 4 試験共に 1 区 4 m<sup>2</sup> (3.2m×1.25m) の 3 反復で行われた。すべての試験で「Flagship」を対照として評価し、収量、整粒歩合、その他農業特性を評価した。各試験地の名称を略号と共に Table 8 に示した。

### 製麦

#### 育成系統評価用マイクロ製麦

麦芽品質を評価するために、Stage 3 試験、Stage 4 試験において収穫された産物を用い、マイクロ製麦と麦芽品質分析を実施した。フェニックス社製小規模製麦装置 (Phoenix Biosystems, SA, Australia) をマイクロ製麦 (250 g 大麦 / 点) に使用した。浸麦工程は、水温 15℃、張り 5 時間 / 切り 7 時間を繰り返し、浸麦度 43.5 % ターゲットとした。事前に少量のサンプル (30 g) で予備浸麦を行い、浸麦時間を決定した。

発芽工程は、15 一定で、発芽時間は 139 時間に設定した。焙燥工程は、55 (13.5 時間、新鮮空気 100 %) 65 (8 時間、循環空気 100 %) 75 (3.5 時間、新鮮空気 50% / 循環空気 50 %) 83.5 (4 時間、新鮮空気 50% / 循環空気 50 %) の計 29 時間の設定とした。

## 醸造試験用材料

後述する育成経過において、2009 年に Stage 2 試験に供試した 33 系統の中から Flagship 型として問題のないと考えられた 21 系統の種子を混合して増殖用種子とし、400L パイロットスケール醸造試験用の種子増殖を行った。増殖した「SouthernStar」の種子を、同様に栽培した「Flagship」と共に醸造試験用材料として使用した。

## 醸造試験用パイロットスケール製麦

製麦方法は、第 1 章に記載の通りである。

## 麦芽品質分析

パイロット製麦した麦芽および購入した商用麦芽の麦芽分析は、サッポロビール株式会社バイオ研究開発部において、European Brewing Convention (EBC) 公定法に準拠し、水分 (Malt moisture)、色度 (Color)、煮沸色度 (Boiled wort color)、エキス (微粉) (Fine extract)、全窒素 (Total nitrogen)、可溶性窒素 (Soluble nitrogen)、KI (Kolbach Index)、最終発酵度 (Apparent attenuation limit)、酵素力 (Diastatic power)、VZ 45、粘度 (Viscosity)、 $\beta$ -グルカン (Beta-glucan)、フライアビリティ (Friability) について実施した (In Analytica European Brewery Convention, seventh ed., 2010)。

## 400 L パイロットスケール醸造試験

2 回実施した。1 回目の試験においては同じ産地から得られた「Flagship」を同様にパイロット製麦した材料を対照として用い、2 回目の試験においては商業利用のた



めに購入した Joe White Maltings 社製の「Flagship」麦芽を対照として使用した。400 L  
パイロットスケール醸造試験の方法は、第 1 章に記載の通りである。原料配合は、麦  
芽 71% にコーンスターチなどの副原料を使用する配合とした。

Table 8. Trial sites of Stage 3 Trial and Stage 4 Trial in Australia.

Stage 3 Trial	
State	Site (Abbreviation)
South Australia	Brinkworth(BRI), Callington(CAL), Clinton(CLI), Geranium(GER), Riverton(RIV), Weetulta(WEE), Yeelanna(YEE)
New South Wales	Wagga Wagga(WAG)
Stage 4 Trial	
State	Site (Abbreviation)
South Australia	Brinkworth(BRI), Callington(CAL), Clinton(CLI), Geranium(GER), Maitland(MAI), Minnipa(MRC), Roseworthy(RAC), Weetulta(WEE)
Victoria	Birchip(BIR), Murrayville(WUR), Swan Hill(SWA), Tarranyurk(TAR)
New South Wales	Burcher(BUR), Moombooldool(MOO), Narrandera(NAR)
Western Australia	Corrigin(COR), Grass Patch(GRA)

## 第 3 節 ; 結果

### 第 1 項 ; 育成過程

2005 年に、LOX -1 欠失形質をもつことが確認された交配材料を父親とし、「Flagship」を母親とした最初の交配を実施した。2005 年から 2007 年にかけて、5 回の戻し交配と  $BC_1F_1 \sim BC_5F_1$  の各世代において MMAS によるヘテロ個体の選抜を実施し、2007 年に得られた 12 系統群の  $BC_5F_2$  種子約 1200 粒を豪州に送付し、豪州における植物検疫上の規制に基づき、植物検疫のための温室内にて播種した。検疫施設内で栽培中の  $BC_5F_2$  個体から幼苗の葉をサンプリングし、アデレード大学において、MMAS により LOX-1 欠失ホモ個体 115 個体を得た。

2008 年に上記で得られた  $BC_5F_3$  の LOX-1 欠失系統 112 系統をアデレード大学の Stage 0 試験（系統養成試験）に供試し、穂形および達観調査により有望と考えられる 33 系統を選抜した。2009 年にこれら 33 系統を本来の Stage 1 試験（系統選抜試験）から Stage 2 試験（生産力検定予備試験）に 1 年早く昇格させて実施し、達観調査と収量性により有望と考えられる 5 系統を選抜した（データ示さず）。2010 年にこの 5 系統を Stage 3 試験（生産力検定試験、8 試験地）に供試し 2 系統を選抜した。

2011 年にこれらの系統をアデレード大学の Stage 4 試験（生産力検定試験 2 年目、17 試験地）に供試し、1 系統を選抜した。Figure 4 に最終的に選抜した本系統の育種家種子の AfaI-CAPS 法によるバンドパターンを示した。2012 年に最終的に選抜されたこの系統を「SouthernStar」として品種登録申請した。

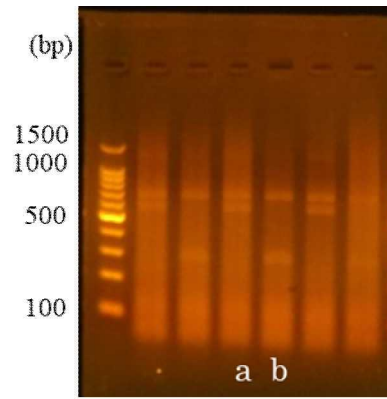


Figure 4. DNA band pattern obtained by the AfaI-CAPS method for SouthernStar (a) and its recurrent parent Flagship (b).

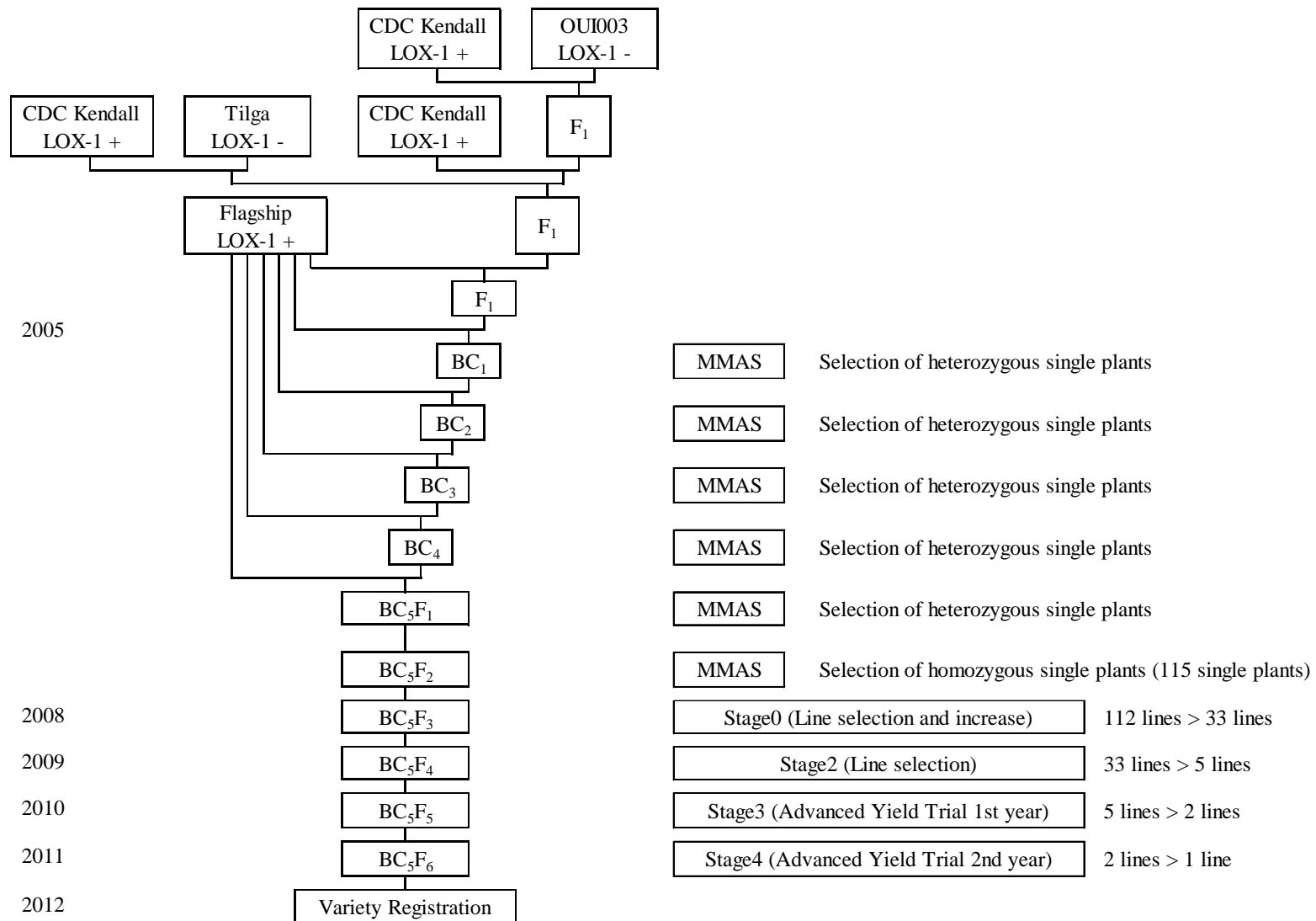


Figure 5. The breeding process of 'SouthernStar'.

## 第 2 項 ; 農業特性評価

Stage 3 試験の結果を Table 9 に示した。「SouthernStar」の平均収量は 3.39 t/ha であり、「Flagship」の平均収量 3.28 t/ha とほぼ同等の値を示した。また、重要な農業形質である草丈 (Height) は、「SouthernStar」が 63 cm に対し、「Flagship」で 60 cm と大差なく、整粒歩合 (Plumpness) は、「SouthernStar」で 94.5 % に対し、「Flagship」で 94.9 % と同程度の値を示した。

耐倒伏性 (Lodging score) は、達観調査による倒伏程度の評価をスコア化したものであり、2 産地で「SouthernStar」が 7.8 および 8.5、「Flagship」が 7.7 および 8.5 とほぼ同等の値を示し耐倒伏性に差は認められなかった。成熟期 (Maturity) についても、差は認められなかった。

穂発芽 (pre-harvest sprouting; PHS) が「SouthernStar」および「Flagship」両方で観察された。

Stage 3 試験では耐病性評価も実施した。その結果、豪州のオオムギ栽培において比較的重要な病害である雲形病 (Scald) 網斑病 (Spot-form net blotch および Net-form net blotch) に関する耐病性評価について、差は認められなかった。

Stage 4 試験の結果を Table 10 に示した。Stage 4 試験では、収量を 17 試験地で評価し、合わせてその他農業特性、耐病性を複数の試験地で評価した。「SouthernStar」の平均収量は 3.17 t/ha であったのに対し「Flagship」は 3.23 t/ha であり、ほぼ同程度の値を示した。また、整粒歩合 (Plumpness) は、「SouthernStar」が 92.3 % に対し「Flagship」が 95.2 %、嵩比重 (Test weight) は、「SouthernStar」が 718 g/l に対し「Flagship」が 716 g/l と穀粒の物理的特性にも差は認められなかった。成熟期 (Maturity) 耐倒伏性 (Lodging score) にも大きな差はなかった。

耐病性については、Stage 3 試験で調べた病害に加え、うどんこ病 (Powdery mildew) 葉さび病 (Leaf rust) についても調査した。うどんこ病の耐病性スコアが「SouthernStar」が 3.1 に対し「Flagship」も 3.1 であり、葉さび病については、「SouthernStar」が 6.0

に対し「Flagship」が6.5であった。Stage 3 試験でも調査した雲形病（Scald）、網斑病（Spot-form net blotch）も含め、耐病性に差は認められなかった。

Table 9. Grain yield, agronomic performance and disease resistance of SouthernStar and Flagship in the Stage 3 Trial in 2010.

Variety\Location	Grain Yield (t/ha)									Plumpness (%) >2.5 mm		Height <sup>1</sup>			
	BRI	CAL	CLI	GER	RIV	WAG	WEE	YEE	Ave.	BRI	BRI	CAL	WAG	WEE	
SouthernStar	3.06	3.57	4.95	3.85	2.31	2.37	3.93	3.07	3.39	94.5	m	mt	63	m-mt	
Flagship	3.18	3.51	4.51	3.80	2.53	2.10	3.69	2.88	3.28	94.9	m	mt	60	m-mt	

Variety\Location	Establish <sup>2</sup> (0-20)					Growth Score <sup>3</sup> (0-9)	Lodging Score <sup>4</sup> (1.0-9.0)	Maturity <sup>5</sup>	Straw Break <sup>6</sup> (1.0-9.0)	Sprouting	
	CAL	GER	RIV	WAG	WEE	WAG	GER	WEE	GER	RIV	
SouthernStar	17	16	17	8	18	6	7.8	8.5	m-me	8.3	yes
Flagship	17	16	17	8	18	6	7.7	8.5	m-me	8.2	yes

Variety\Location	Leaf Rust				Scald				SFNB <sup>7</sup>				NFNB <sup>8</sup>			
	BRI <sup>9</sup>	CAL <sup>9</sup>	GER <sup>9</sup>	RIV <sup>9</sup>	CAL <sup>10</sup>	RIV <sup>10</sup>	STR <sup>10</sup>	HOR <sup>9</sup> 16/9	HOR <sup>9</sup> 12/10	BRI <sup>10</sup>	CAL <sup>10</sup>	GER <sup>10</sup>	RIV <sup>10</sup>	HOR <sup>9</sup> 22/9	HOR <sup>9</sup> 4/11	NTR <sup>11</sup>
SouthernStar	5	2	1	1	1	1	6/7	3.0	5.0		3.0	2.0	1	5	5	P
Flagship	4	2	2	1	1	1	6	3.0	5.0	3	2.0	2.0	1	4	4	P

<sup>1</sup> s=short; m=middle; t=tall or (cm)

<sup>2</sup> 0=0%; 20=100%

<sup>3</sup> 0=poor; 9=excellent

<sup>4</sup> 1.0=flat; 9.0=upright

<sup>5</sup> e=early; m=medium; l=late

<sup>6</sup> 1.0=100%; 9.0=0%

<sup>7</sup> Spot Form Net Broth

<sup>8</sup> Net Form Net Broth

<sup>9</sup> 1=resistant; 9=susceptible

<sup>10</sup> 1=resistant; 5=susceptible

<sup>11</sup> P=better than Keel; 5=equal to Keel; 7=susceptible; 7/9=very susceptible



Table 10. Summary of grain yield, agronomic performance and disease resistance of SouthernStar and Flagship in the Stage 4 Trial in 2011.

	Grain Yield (t/ha)	Plumpness (%) >2.5 mm	Test Weight (g/l)	Maturity (3, 5, 7) <sup>2</sup>	Lodging Score (1-9) <sup>3</sup>	Boron Toxicity (1-9) <sup>4</sup>	Powdery Mildew (1-9) <sup>5</sup>	SFNB <sup>1</sup> (1-9) <sup>5</sup>	Leaf Rust (1-9) <sup>5</sup>	Scald (1-9) <sup>5</sup>
Variety\Number of Location	16	3	1	4	1	1	3	2	2	1
SouthernStar	3.17	92.3	718	5.4	2	9	3.1	3.0	6.0	5
Flagship	3.23	95.2	716	5.0	1	9	3.1	1.0	6.5	4

<sup>1</sup> Spot Form Net Broth

<sup>2</sup> 3=late; 5=medium; 7=early

<sup>3</sup> 1=flat; 5=upright

<sup>4</sup> 1=tolerant; 9=intolerant

<sup>5</sup> 1=resistant; 9=susceptible

### 第 3 項 ; 麦芽品質評価

2010 年、2011 年の Stage 3 試験および Stage4 試験における「SouthernStar」の麦芽品質を「Flagship」と比較した結果を Table11 に示した。本項では、特に重要な麦芽品質分析項目について記述する。

まず、Stage 3 試験において、麦芽エキス ( Fine extract ) は「SouthernStar」が 83.0 % に対し「Flagship」が 82.2 % と「SouthernStar」が若干高かった。可溶性窒素 ( Soluble nitrogen ) は「SouthernStar」が 0.557 % に対し「Flagship」が 0.584 % と大きな差はなく、ビールの凍結混濁の原因物質である  $\alpha$ -グルカン は両者で非常に低く、「SouthernStar」が 8 mg/L に対し「Flagship」で 9 mg/L と差は認められなかった。Stage 4 試験における結果においても、これらの重要項目について両者で大きな差はなく、また若干の差があった場合でも Stage3 試験と同様な一定の傾向はなかった。

一方、酵素力 ( DP; Diastatic power ) は、Stage3 試験および Stage4 試験いずれにおいても「SouthernStar」が若干低い傾向にあった。酵素力は、麦芽の全窒素含量 ( TN; Total nitrogen ) ( 粗タンパク質含量 ( Protein ) / 6.25 ) により影響を受けるため、育種の指標として単位窒素量あたりの酵素力を使用する場合もある。そこで、単位窒素量あたりの酵素力 ( DP / TN ) で見ても「SouthernStar」が若干低く、2 カ年の試験においてその傾向が認められた。

醸造試験に使用した麦芽の麦芽品質について Table 12 に示した。麦芽品質については、一般的な麦芽品質項目で大きな差は認められなかった。特に同一の産地、産年度のオオムギを製麦した 1 回目の試験においては、麦芽エキスは「SouthernStar」が 81.5 % に対し「Flagship」が 82.4 % であった。可溶性窒素は「SouthernStar」、「Flagship」とも 0.718 % であった。 $\alpha$ -グルカンは「SouthernStar」が 11 mg/L、「Flagship」が 20 mg/L であった。酵素力は「SouthernStar」が 255 °WK、「Flagship」が 240 °WK であり、前述した酵素力の傾向と逆の傾向を示したが、各麦芽品質分析項目に大きな差は認められなかった。一方、1 回目の醸造試験に用いられた「SouthernStar」と「Flagship」

の LOX 活性は、大麦で 1.1 unit、11.6 unit、麦芽で 0.5 unit、3.2 unit と大麦および麦芽において明らかな差が認められた。また、Figure 4 に示した最終的に選抜した「SouthernStar」の AfaI-CAPS 法によるバンドパターンと麦芽の LOX 活性の測定結果から、選抜した系統が LOX-1 欠失形質を確実に有していることを確認できた。

Table 11. Malting quality of SouthernStar and Flagship in the Stage 3 and the Stage 4 Trials during 2010 and 2011.

Variety	Year Location	Steeping Time (hr)	Cast Moisture (%)	Color (°EBC)	Boiled wort color (°EBC)	Fine extract (% d.b.)	Protein (%)	Total nitrogen (%)	Soluble nitrogen (%)	Kolbach Index
SouthernStar	2010	44	43.4	3.7	6.0	83.0	7.9	1.26	0.557	44.0
Flagship	WEE	44	43.4	4.3	6.1	82.2	8.3	1.33	0.584	44.0
SouthernStar	2011	45	43.3	3.9	5.9	79.2	12.2	1.95	0.730	37.5
Flagship	CAL	44	43.4	3.3	5.5	79.6	11.9	1.90	0.681	35.8

Variety	Year Location	Diastatic power (°WK)	DP/TN	Apparent attenuation limit (%)	VZ 45 °C (%)	Viscosity (mPa·s)	Friability (%)	Wort beta- glucan (mg/l)
SouthernStar	2010	207	164	84.5	35.9	1.50	92.4	8
Flagship	WEE	229	172	84.4	38.2	1.47	91.1	9
SouthernStar	2011	315	161	83.4	50.8	1.50	36.2	32
Flagship	CAL	356	187	83.8	48.8	1.50	45.2	42

Table 12. Malting quality of SouthernStar and Flagship for pilot-brewing trials.

Variety	Malting	Trial	Color	Boiled wort color	Fine extract	Protein	Total nitrogen	Soluble nitrogen	Kolbach Index	Diastatic power	DP/TN
			(°EBC)	(°EBC)	(% d.b.)	(%)	(%)	(%)	(%)	(°WK)	
SouthernStar	Pilot	1st	4.9	8.5	81.5	9.5	1.520	0.718	47.0	255	168
Flagship			3.0	8.0	82.4	9.5	1.520	0.718	47.4	240	158
SouthernStar	Commerical	2nd	4.8	8.3	81.9	9.4	1.504	0.719	48.0	239	159
Flagship			4.5	8.0	82.2	9.5	1.520	0.695	45.8	274	180

Variety	Malting	Trial	Apparent attenuation limit	VZ45 °C	Viscosity	Friability	Wort beta- glucan	LOX activity barley	LOX activity malt
			(%)	(%)	(mPa·s)	(%)	(mg/l)	(Unit)	
SouthernStar	Pilot	1st	81.8	40.3	1.48	81.1	11	1.1	0.5
Flagship			83.0	41.7	1.49	83.6	17	11.6	3.2
SouthernStar	Commerical	2nd	82.1	40.3	1.48	78.2	8	-	-
Flagship			83.3	41.3	1.48	90.1	20	-	-

## 第4項；醸造試験評価

サッポロビール株式会社商品・技術イノベーション部商品・技術開発グループにおいて、パイロット製麦および400 Lパイロットスケール醸造試験を2回実施した。1回目の試験においては、同じ産地から得られた「Flagship」を「SouthernStar」と同じくパイロット製麦した材料を対照として用い、2回目の試験においては、商業利用のため購入した Joe White Maltings 社製の「Flagship」麦芽を対照として使用した。

1回目の試験、2回目の試験いずれにおいても発酵経過に差はなく異常もなかった（データ示さず）。また、Table 13 に麦汁品質および一般的なビール品質を示した。本項では、特に重要な項目について以下に記述する。

麦汁のエキス (Extract) は、「SouthernStar」が1回目、2回目が各々11.48 %、11.43 %、「Flagship」が11.41 %、11.34 %、仮性最終発酵度 (Apparent Attenuation Limit) は「SouthernStar」が86.8 %、85.1 %、「Flagship」が87.0 %、86.8 %であった。

ビールの原麦汁エキス (Original gravity) は、「SouthernStar」が10.78 %、10.97 %に対し、「Flagship」が11.22 %、10.82 %、アルコール (Alcohol) は、「SouthernStar」が4.92 Vol %、4.93 Vol %に対し、「Flagship」が5.14 Vol %、4.89 Vol %となった。また、ビールの香気成分として重要な酢酸エチル (Ethyl acetate) は、「SouthernStar」が22.7 mg/L、21.0 mg/L に対し、「Flagship」が24.1 mg/L、19.4 mg/L、酢酸イソアミル (Isoamyl acetate) は、「SouthernStar」が1.3 mg/L、1.2 mg/L、「Flagship」が1.5 mg/L、1.4 mg/L となった。

以上の結果から、これらの麦汁品質やビール品質を示す分析項目を含む各項目について対照とほぼ差がなく、一般的な下面発酵の淡色ビール分析値に照らしても、特に問題となる点は認められなかった。

Table 13. Wort and beer analysis of SouthernStar and Flagship at pilot scale brewing.

Variety		SouthernStar	Flagship	SouthernStar	Flagship
Trial		1st		2nd	
<b>Wort</b>					
Extract	(%)	11.48	11.41	11.43	11.34
Final Attenuation	(%)	69.9	70.2	69.0	70.2
Apparent Attenuation Limit	(%)	86.8	87.0	85.1	86.8
pH		5.37	5.50	5.39	5.45
Colour	(°EBC)	7.9	6.4	7.7	6.5
BU		40.5	39.7	37.7	39.2
Polyphenol	(mg/L)	253	251	236	255
Free Amino Nitrogen	(mg/L)	158	155	139	127
<b>Beer</b>					
Original Gravity	(%)	10.78	11.22	10.97	10.82
Final Extract	(%)	3.28	3.39	3.46	3.35
Final Attenuation	(%)	69.6	69.8	68.5	69.0
Apparent Extract	(%)	1.44	1.48	1.63	1.52
Apparent Attenuation Limit	(%)	86.6	86.8	85.1	86.0
Alcohol	(Vol %)	4.92	5.14	4.93	4.89
Alcohol	(w/w %)	3.86	4.04	3.87	3.85
pH		4.28	4.27	4.28	4.24
Colour	(°EBC)	5.7	4.8	5.6	4.6
BU		24.3	24.8	19.3	21.7
Polyphenol	(°EBC)	207	215	199	216
Acetaldehyde	(mg/L)	1.3	1.7	1.3	3.5
Acetone	(mg/L)	0.8	0.8	0.7	0.6
Ethyl Acetate	(mg/L)	22.7	24.1	21.0	19.4
Isoamyl Acetate	(mg/L)	1.3	1.5	1.2	1.4
n-Propanol	(mg/L)	11.5	11.7	13.4	12.5
Isobutanol	(mg/L)	12.7	13.2	11.5	9.2
Isoamyl Alcohol	(mg/L)	55	60	54	60
Ethyl Caproate	(mg/L)	0.26	0.30	0.29	0.34

## 第 4 節 ; 考察

「SouthernStar」の収量と耐病性を含む農業特性は、2 カ年にわたる試験において、「Flagship」と比較し大きな差は認められなかった (Table 9, 10)。この結果から、「SouthernStar」の農業特性は「Flagship」と同等であり、「Flagship」が豪州に適応し一定程度の普及をしていたことから、「SouthernStar」も豪州における栽培に適応できると考えられた。また、本結果は LOX-1 欠失形質が農業特性に大きな影響を与えないことを示しており、これは過去の他の作物における知見 (Davies & Nielsen, 1986; Kitamura et al., 1982; Shirasawa et al., 2008) や「CDC PolarStar」の結果を支持するものである。ただし、「Flagship」は、穂発芽耐性が比較的弱く (Hills et al., 2009) 本研究において、「Flagship」および「SouthernStar」のいずれにおいても穂発芽が観察された (Table 9)。弱い穂発芽耐性の「Flagship」から「SouthernStar」への導入は、その性質が「Flagship」の品質と連鎖しており (Hills et al., 2009) かつ連続戻し交配を適用していることから得られた結果であると考えられた。

麦芽品質は、一般的な麦芽品質項目について大きな差は認められなかった (Table 11, 12)。育種過程における麦芽品質分析においては、酵素力の指標である DP / TN が「SouthernStar」で低い傾向を示したが、醸造試験に供した麦芽品質の分析結果および「CDC PolarStar」、後述する「札育 2 号」の結果を含めて一定の傾向は認められず、LOX-1 欠失形質そのものによる影響ではないと考えられた。

一般的な麦芽品質項目と対照的に、1 回目の醸造試験に用いられた「SouthernStar」と「Flagship」のオオムギ種子・麦芽の LOX 活性には明らかな差が認められた (Table 12)。これらの結果は、LOX-1 欠失形質は「SouthernStar」において主要な麦芽品質に大きな影響を与えないことを示唆しており、過去の知見 (Hirota et al., 2006a) および「CDC PolarStar」の結果を支持するものである。また、これらの結果から、「SouthernStar」は醸造家によって評価された「Flagship」と同等の麦芽品質を持ち、豪州において商業的に実用性のあるビールムギ品種であると考えられた。



醸造品質は1回目、2回目の試験いずれにおいても、麦汁品質、発酵経過（データ示さず）および一般的なビール品質の評価項目について対照とほぼ差がなく、特に問題となる点は認められなかった（Table 13）。本結果は「SouthernStar」がビール醸造に適した品種であることを示唆していた。

「OUI003」は、形態的にも、農業特性、麦芽品質についてもビールムギ品種とは異なり通常の交配育種で豪州に適応した LOX-1 欠失ビールムギ品種を育成することは非常に時間がかかることが想定されたため、本研究では、まず豪州に適応しかつ生産者や醸造家が望む収量性、農業特性、品質を有するビールムギ品種を、「Flagship」を反復親として用いた連続戻し交配と MMAS を適用し早期に育成することを目的とした。本育種戦略に基づき、著者らは豪州初の LOX-1 欠失オオムギ品種である「SouthernStar」を交配開始から8年で品種登録申請することに成功した。

一方、上記戦略にはデメリットも明らかとなった。反復親がネガティブな形質を持つ場合、その形質も選択的に改善しない限り付与されてしまうことである。すなわち、本研究では、「SouthernStar」は「Flagship」から穂発芽耐性が弱い形質を引き継いでおり、本形質は豪州での栽培において制約やリスクとなりうることが推定された。今後は、本研究で育成した「SouthernStar」を豪州に適応した農業特性と良好な品質を有した LOX-1 欠失形質導入親とし、他方、穂発芽耐性の強い品種・系統を交配親として用い、穂発芽耐性を有する LOX-1 欠失オオムギ品種を育成していく必要があると考えられた。この考えは、すでにサッポロビール株式会社の育種プログラムに反映され、次世代の LOX-1 欠失品種の育成が進められている。

### 第3章 北海道に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「札幌2号」

#### 第1節；緒言

序章において記述した通り、北海道では開拓使が殖産を目的に建設した札幌麦酒醸造所（サッポロビール株式会社の前身）が1876年（明治9年）に竣工しビールの醸造が開始され、農家や屯田兵との特約栽培の形で原料用のビールムギを調達し麦芽を製造していた。当初、「シバリー」や「ゴールデンメロン」といった欧州からの導入品種が定着し、1930年には「スワンハルス」、「ハンナ」が導入され栽培されたが、不稔や雨害に弱いなどの特性から大正半ばには「シバリー」が主力品種となった。しかし、「シバリー」にも不稔が目立つようになり、「シバリー」から純系分離した「北海道シバリー」や交雑種の「北大1号」が普及されたが不稔の問題は解決できず、昭和15年には、ビールムギの栽培は最盛期の10%、500haあまりに激減した。その後、不稔抵抗性品種の育成や発生機作の解明を進め、不稔が少なく栽培性が優れた「ハルピン二条」が導入品種の中から選抜され、昭和22年に北海道の奨励品種となった。昭和24年に大日本麦酒株式会社が分割され、当時存在した新琴似試験地、成城試験地はサッポロビール株式会社の所属となり、昭和28年に新琴似試験地にて「日星」、「春星」が育成された。同年道立北見農業試験場に大麦指定試験地が設置されたことを契機に育成試験を縮小、新たな交配の実施を中止した。その後生産者が満足できる新たな普及品種が出ない中、昭和37年北見農試とサッポロビール株式会社が共同育種試験を行うことに合意、6年間にわたり共同試験を実施後、昭和44年に北見農試の育種事業に移行し、サッポロビール株式会社は品質評価に協力する形で昭和47年「ほしまさり」が育成された。農業特性は大きく改良されたものの、品質面の課題であった発酵渋滞を解決すべく引き続き北見農試における単独育種が進められ、平成2年に「りょうふう」が品種登録された。「りょうふう」は、平成31年まで長年にわたり北海道の優良品種として栽培されてきた。平成4年から、サッポロビール株式会社と北

見農業試験場の共同育種の形で育種が継続されたが、北海道のビールムギ育種からの撤退に伴い、平成 20 年以降、サッポロビール株式会社が、公的試験を北海道に委託する形で単独で育種を進め、平成 23 年からは東京農業大学生物産業学部網走寒冷地農場に圃場管理や一部の特性調査を委託する形で育種を進めている。

北海道はビールムギの主産地の一つであり、日本における唯一の春播きオオムギの産地である。「りょうふう」は北海道に適応した唯一のビールムギ品種であり (Sato et al., 1990)、北海道において 20 年以上生産されている。醸造家や生産者にはバランスの良い麦芽品質と欠点のない農業特性が評価されている。これらの理由から、「りょうふう」を連続戻し交配の反復親として使用し、LOX-1 欠失形質を有し「りょうふう」と遜色のない農業特性と麦芽品質を有する LOX-1 欠失オオムギ品種の育成を実施した。

## 第 2 節 ; 材料および方法

### 育成・農業特性評価

サッポロビール株式会社バイオ研究開発部人工気象庫において、連続戻し交配を実施後、自殖した植物体から達観評価、MMAS により LOX-1 欠失個体を選抜した。選抜した LOX-1 欠失個体由来の各系統を播種し、達観評価、農業特性評価およびジェノタイピングの結果に基づき選抜した。

農業特性評価は、主たるオオムギ生産地域および各地域の農業試験場を含む 4 試験地、上川農業試験場（上川郡比布町）、北見農業試験場（常呂郡訓子府町）、東京農業大学網走寒冷地農場（網走市）、中富良野現地（空知郡中富良野町）における合同比較試験において、各試験地の標準法に基づき実施した。「りょうふう」と「札育 2 号」の各農業特性に関する指標について、マイクロソフトエクセル 2013 を用いた対応のない t 検定による有意差検定を実施した。

### ジェノタイピング

「りょうふう」、「札育 2 号」、「CDC Kendall」および「CDC PolarStar」の DNA サンプルを、1 ヶ月間温室で栽培した幼苗の葉から調製した。DNA 抽出は、セチルトリメチルアンモニウムブロミド法 (CTAB 法) (Murray & Thompson, 1980) にて実施した。抽出した DNA サンプルは、Diversity Array Technology 社 (<http://www.diversityarrays.com>) に送付し、Dr. Andrzej Kilian が開発した Diversity Array Technology (Jaccoud et al., 2001) により染色体 1H から 7H に分布する 1,500 以上のマーカーを用い実施した。

### 穂発芽検定

成熟期（穂首が黄化し、穂軸や穀粒からは緑色が抜け、穀粒には爪のあとがつき、ほぼ口ウくらいの硬さになる時期）と成熟期から 5 日後に必要な数の穂をサンプリング

した。サンプリングした穂をインキュベータにて 35℃ で 24 時間乾燥し、乾燥後穂を手で脱穀した。100 粒を 2ろ紙 2 枚を敷いたペトリ皿にとり (n=2)、4.5 mL の水道水を入れ、暗所にて 17℃ で発芽させた。発芽率を 120 時間後に測定し、発芽粒数を穂発芽耐性 (休眠性) の指標とした。

「北育 33 号」は北海道向けに過去育成された系統であり、「りょうふう」より明らかに穂発芽耐性が弱い特性を有する。一方、「りょうふう」は実用上十分な穂発芽耐性を有する品種である。北海道の生育環境において適切な穂発芽耐性を有するかどうかを判断するため、「北育 33 号」および「りょうふう」を対照品種として用いた。

### マイクロ製麦・麦芽品質分析

麦芽品質を評価するために、農業特性を評価した各試験地で収穫された合同比較試験の産物を用い、マイクロ製麦と麦芽品質分析を実施した。方法は第 2 章に記載の通りである。

### 醸造試験用材料

2012 年に網走にて栽培した「札育 2 号」および「りょうふう」を試験に供した。

### 醸造試験用パイロットスケール製麦および麦芽品質・LOX 活性分析

醸造試験用パイロットスケール製麦および LOX 活性分析の方法は、第 1 章に記載の通りである。麦芽品質分析の方法は、第 2 章に記載の通りである。

### 400 L パイロットスケール醸造試験

400 L パイロットスケール醸造試験の方法は、第 1 章に記載の通りである。「りょうふう」を対照品種として用いた。原料配合は、麦芽 71% にコーンスターチなどの副原料を使用する配合とした。

## 第 3 節 ; 結果

### 第 1 項 ; 育成過程

「OUI003」と「りょうふう」の最初の交配を 2004 年に実施した。その後の育成経過は、Figure 5 に示した。すなわち、2004 年から 2008 年にかけて 7 回の連続戻し交配と各世代 ( $BC_xF_1$ ) における CAPS マーカーを用いた MMAS によるヘテロ個体の選抜を実施した。温室内で  $BC_7F_1$  世代を自殖し  $BC_7F_2$  種子を得た。2009 年に北海道において約 1,200 個体の  $BC_7F_2$  個体から達観評価と MMAS により LOX-1 欠失ホモ個体を 44 個体選抜した。2010 年に 44 の LOX-1 欠失ホモ個体由来の 30 系統を播種し、18 系統を達観調査と農業特性評価により選抜した (データ示さず)。

ジェノタイピングは、選抜した 18 系統に対し実施した。結果を Table 14 に示した。選抜した各系統と「りょうふう」を比較すると、96.7~99.8 %と概して高い合致率を示した。この値は、「CDC PolarStar」とその反復親である「CDC Kendall」を比較した場合の合致率 98.1 %と同様もしくはそれ以上の合致率であった。農業特性と本ジェノタイピング結果から、最も合致率が高い 1 系統 (C42-7-3; 99.8 %) を選抜した。

選抜した 1 系統 8 個体の  $BC_7F_4$  種子を温室内で播種、増殖した。本系統 ( $BC_7F_5$ ) を「富系 1101」の系統名にて 2011 年に合同比較試験・系統比較試験に供試し、2012 年、2013 年に「札育 2 号」として合同比較試験・品種比較試験に供試した ( $BC_7F_6$  および  $BC_7F_7$ )。また、Figure 6 に示した最終的に選抜した本系統の育種家種子の AfaI-CAPS 法によるバンドパターンを示した。2013 年には、後述する農業特性、麦芽品質の結果に基づき品種登録申請を行い、2016 年に品種登録された。

Table 14. Genotyping of Satuiku 2 go, Ryohfu and other varieties

Comparison	Number of total markers	Number of valid markers	Concordance rate
Ryohfu vs Satuiku 2 go			
C42-1-2*	1477	1468	97.3
C42-1-3	1477	1470	98.3
C42-2-2	1477	1470	98.2
C42-2-3	1477	1461	97.1
C42-3-2	1477	1461	97.3
C42-3-4	1477	1460	98.3
C42-4-2	1477	1447	98.2
C42-4-5	1477	1469	98.2
C42-5-1	1477	1456	97.9
C42-5-4	1477	1452	97.7
C42-5-5	1477	1459	98.5
C42-6-2	1477	1458	98.4
C42-8-6	1477	1464	97.6
C42-7-2	1477	1469	99.3
<b>C42-7-3</b>	<b>1477</b>	<b>1470</b>	<b>99.8</b>
C42-7-4	1477	1473	99.8
C42-8-2	1477	1457	96.7
C42-8-5	1477	1466	97.4
CDC Kendall vs CDC PolarStar	1675	1630	98.1
Ryohfu vs CDC Kendall	1675	1629	68.7

\*ID for each selected line

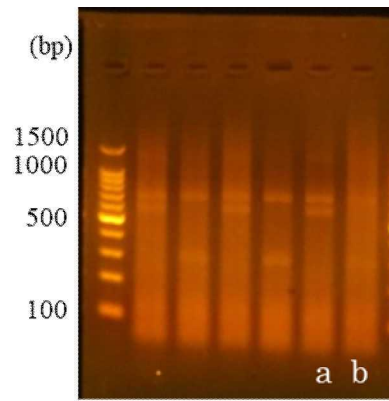


Figure 6. DNA band pattern obtained by the AfaI-CAPS method for Satuiku 2 go (a) and its recurrent parent Ryohfu (b).



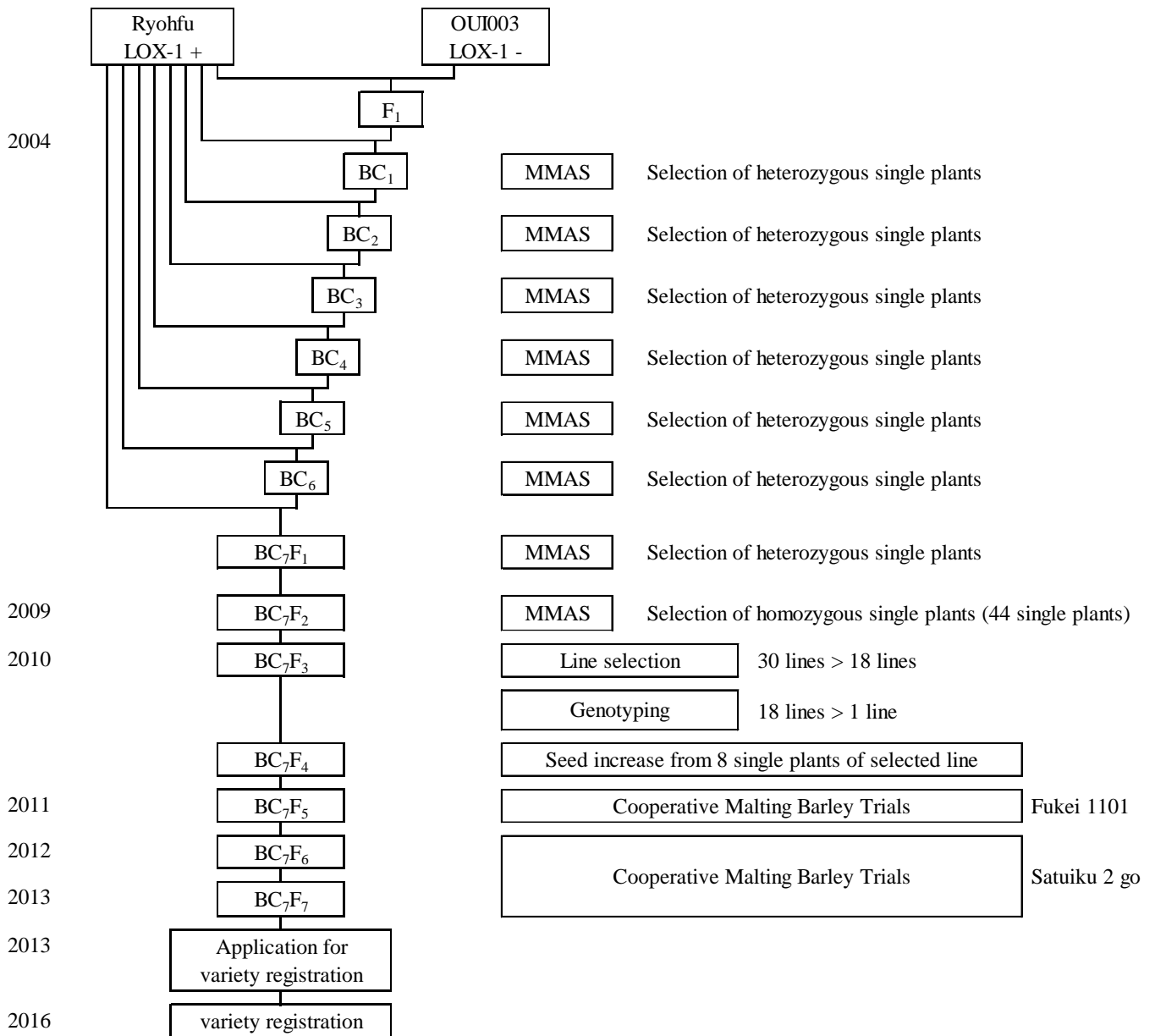


Figure 7. The breeding process of 'Satuiku 2 go'

## 第 2 項 ; 農業特性評価

2011 年から 2013 年にかけての合同比較試験において、「札育 2 号」の収量やその他の農業特性について、反復親である「りょうふう」と比較した。その結果を Table 15 に示した。

稈長 (Stem length) は、3 カ年の平均で、「札育 2 号」で 81.4 cm、「りょうふう」で 83.4 cm と「札育 2 号」が 2cm 低く、穂数 (panicle number) は、「札育 2 号」で 584 本/m<sup>2</sup>、「りょうふう」で 557 本/m<sup>2</sup>と「札育 2 号」でやや多かった。千粒重 (1000 kernel weight) は、「札育 2 号」が 46.7 g、「りょうふう」が 48.4 g と「札育 2 号」で若干小さかった。しかしながら、これらの項目の差は有意ではなかった。

収量は、3 カ年平均で、「札育 2 号」で「りょうふう」比 102 % とほぼ同程度であった。また、これらの項目以外の農業特性評価項目については、両者でほぼ同程度であり、差は認められなかった。

Table 16 に示した「札育 2 号」の穂発芽耐性は「りょうふう」と同程度であり、穂発芽耐性が弱い「北育 33 号」に対し明らかに強い穂発芽耐性 (休眠性) を示した。その他の品質低下の原因となる赤カビ病抵抗性や裂皮粒発生程度などのその他の特性についても、差は認められなかった (データ示さず)。

Table 15. Agronomic performance of Satuiku 2 go and Ryohfu in the Cooperative Malting Barley Trials during 2011-2013.

Variety	Year	Heading date (M/D)	Maturing date (M/D)	Stem length (cm)	Ear length (cm)	Panicle number (/m <sup>2</sup> )	Spikelet number (/ear)	Sterile rate (%)	Lodging score <sup>1</sup> (0-4)	Grain yield (kg/a)	test weight (g/L)	Kernel weight (g/1000 kernel)	Plumpness (%) >2.5 mm	Grain yield <sup>2</sup> (kg/a)	% as Ryohfu (%)
Fukei 1101	2011	7/1	8/2	87.2	5.7	590	19.5	5.1	0.0	42.4	694	44.2	93.2	39.4	102
Ryohfu		6/30	8/1	87.9	5.9	571	19.8	5.0	0.5	41.8	694	45.7	93.4	39.2	100
Satuiku 2 go	2012	6/30	8/4	83.9	5.9	645	21.0	2.5	0.4	49.3	727	45.2	96.3	47.4	105
Ryohfu		6/29	8/4	87.6	6.0	613	20.9	2.0	0.4	46.8	728	47.3	97.2	45.6	100
Satuiku 2 go	2013	6/30	7/30	74.7	6.0	531	20.9	4.5	0.6	35.6	706	50.0	95.9	34.4	101
Ryohfu		6/30	7/30	76.4	6.0	502	20.4	4.8	0.7	35.4	704	51.3	96.0	34.2	100
Satuiku 2 go	2011- 2013 average	6/30	8/1	81.4	5.9	584	21.4	4.1	0.4	41.9	709	46.7	95.2	40.0	102
Ryohfu		6/30	8/1	83.4	6.0	557	21.1	4.0	0.5	40.9	708	48.4	95.6	39.2	100

1 1=no lodging; 4=completely lodging

2 screened by 2.5 mm sieve

2011 trial grown at 4 sites (Kamikawa Agr. Exp. Sta., Kitami Agr. Exp. Sta., Abashiri and the Tokyo Univ. of Agr.)

2012 trial grown at 4 sites (Kamikawa Agr. Exp. Sta., Kitami Agr. Exp. Sta., Abashiri and the Tokyo Univ. of Agr.)

2013 trial grown at 5 sites (Kamikawa Agr. Exp. Sta., Nakafurano, Kitami Agr. Exp. Sta., Abashiri and the Tokyo Univ. of Agr.)

The average values of every trial sites in each year are shown (n=13).

Table 16. Pre-harvest sprouting tolerance of Satuiku 2 go and Ryohfu during 2012 and 2013.

Variety	Year	Ripening stage (%)	5 days after (%)
Satuiku 2 go		1	7
Ryohfu	2012	8	13
Hokuiku 33 go		76	92
Satuiku 2 go		3	2
Ryohfu	2013	3	11
Hokuiku 33 go		88	96
Satuiku 2 go	2012-	2	5
Ryohfu	2013	3	11
Hokuiku 33 go	average	82	94

conducted at the Tokyo Univ. of Agr.

### 第3項；麦芽品質評価

「札育2号」の麦芽品質は、2011年から2012年にかけての合同比較試験において調査した。その結果をTable 17に示した。

麦芽エキス (Fine extract) は、3ヵ年平均で「札育2号」が82.4%に対し「りょうふう」が82.5%、酵素力 (Diastatic power) は、「札育2号」が252°WKに対し「りょうふう」が237°WKであった。α-グルカン は、「札育2号」が37 mg/Lに対し「りょうふう」が43 mg/Lとほぼ同等であった。ただし、「札育2号」の可溶性窒素 (Soluble nitrogen) は3ヵ年の平均で0.726%であったのに対し「りょうふう」は0.759%であり、その差はわずかではあるものの危険率5%で有意に低かった。

サッポロビール株式会社商品・技術イノベーション部商品・技術開発グループにおいてパイロットスケール製麦および400Lパイロットスケール醸造試験を2回実施した。醸造試験に用いた麦芽は、1回目の試験においては同じ産地から得られた「りょうふう」を同様にパイロット製麦したものを対照として用い、2回目の試験においてはサッポロビール株式会社群馬工場で製造された「りょうふう」麦芽を対照として使用した。麦芽品質をTable 18に示した。対照、試験ともオオムギを同様の条件で栽培した1回目の試験に用いた麦芽について、特に重要な麦芽品質項目である麦芽エキスは「札育2号」が81.2%に対し「りょうふう」が81.9%、可溶性窒素は「札育2号」が0.789%に対し「りょうふう」が0.780%、酵素力は「札育2号」が276°WKに対し「りょうふう」が255°WK、α-グルカンは「札育2号」が33 mg/Lに対し「りょうふう」が85 mg/Lと一般的な麦芽品質項目で大きな差は認められなかった。一方、一般的な麦芽品質項目と対照的に、麦芽のLOX活性は、1回目の試験に用いた麦芽で「札育2号」が0.2 unitに対し「りょうふう」が26.4 unit、2回目の試験に用いた麦芽で「札育2号」が検出されず、「りょうふう」が28.4 unitと明らかな差が認められた。また、Figure 6に示した最終的に選抜した「札育2号」のAfaI-CAPS法によるバンドパターンと麦芽のLOX活性の測定結果から、選抜した系統がLOX-1欠失形質を確実に有していることを確認できた。

Table 17. Malting quality of Satuiku 2 go and Ryohfu in the Cooperative Malting Barley Trials during 2011 and 2012.

Variety	Year	Cast moisture (%)	Steeping time (hr)	Color (°EBC)	Boiled wort color (°EBC)	Fine extract (% d.b.)	Protein (%)	Soluble nitrogen (%)	Kolbach Index	Diastatic power (°WK)	Apparent attenuation limit (%)	Viscosity (mPa·s)	Friability (%)	Wort beta-glucan (mg/l)	
Fukei 1101	2011	43.3	54	3.5	6.0	82.8	10.3	0.733	44.6	284	85.5	1.47	90.9	44	
Ryohfu		43.4	52	3.6	6.4	82.8	10.5	0.777	46.3	264	85.5	1.46	92.2	47	
Satuiku 2 go	2012	44.6	58	3.3	5.5	82.1	10.4	0.720	43.5	220	84.9	1.48	94.0	30	
Ryohfu		44.4	57	3.2	5.5	82.5	10.6	0.741	43.8	210	84.6	1.49	93.2	39	
Satuiku 2 go	2011-2012 average	43.9	56	3.4	5.7	82.5	10.3	0.726	}*	44.0	252	85.2	1.48	92.5	37
Ryohfu		43.9	54	3.4	5.9	82.6	10.6	0.759		45.0	237	85.0	1.48	92.7	43

2011 and 2012 trials grown at 4 sites

(Kamikawa Agr. Exp. Sta., Kitami Agr. Exp. Sta., Abashiri and the Tokyo Univ. of Agr.)

The average values of every trial sites in each year are shown (n=8).

\* Significantly different at the 5 % probability level.

Table 18. Malting quality of Satuiku 2 go and Ryohfu for pilot brewing trials.

Variety	Malting	Trial	cast moisture (%)	Color (°EBC)	Boiled wort color (°EBC)	Fine extract (% d.b.)	Protein (%)	Soluble nitrogen (%)	Kolbach Index	Diastatic power (°WK)	Apparent attenuation limit (%)	Viscosity (mPa·s)	Friability (%)	Wort beta- glucan (mg/l)	LOX activity (Unit)
Satuiku 2 go	Pilot	1st	45.1	3.5	6.5	81.2	11.1	0.789	44.3	276	84.6	1.48	96.0	33	0.2
Ryohfu			44.4	3.2	5.3	81.9	10.6	0.780	46.0	255	84.4	1.51	94.1	85	26.4
Satuiku 2 go	Commerical	2nd	44.8	3.3	5.6	81.2	11.2	0.780	43.4	304	85.0	1.47	94.5	31	n.d.
Ryohfu			47.3*	2.8	4.8	82.1	10.6	0.744	44.0	310	86.2	1.48	96.5	56	28.4

\*maximum moisture content after spraying in germination box.

\*n.d.: not detected

## 第4項；醸造試験評価

醸造評価の1回目試験、2回目試験いずれにおいても、発酵経過に差はなく異常は認められなかった（データ示さず）。また、Table 19 に麦汁品質および一般的なビール品質を示した。

特に重要な項目である麦汁の仮性最終発酵度（Apparent Attenuation Limit）は、「札育2号」が86.7%、87.6%、「りょうふう」が86.5%、88.5%であった。

ビールの原麦汁エキス（Original gravity）は「札育2号」が11.07%、10.77%に対し「りょうふう」が11.01%、10.80%、アルコール濃度（Alcohol）は「札育2号」が5.07 Vol%、4.98 Vol%に対し「りょうふう」が5.03 Vol%、5.02 Vol%であった。

ビールの香気成分として重要な酢酸エチル（Ethyl acetate）は、「札育2号」が24.9 mg/L、23.3 mg/Lに対し「りょうふう」が25.8 mg/L、23.4 mg/L、酢酸イソアミル（Isoamyl acetate）は「札育2号」が1.6 mg/L、1.5 mg/L、「りょうふう」が1.7 mg/L、1.5 mg/Lであった。これらの項目を含め、麦汁・ビール品質を示す各項目について、「札育2号」と「りょうふう」の間にほぼ差はなく、一般的な下面発酵の淡色ビール分析値との比較においても特に問題となる点は認められなかった。



Table 19. Wort and beer analysis of Satuiku 2 go and Ryohfu at pilot scale brewing.

Variety		Ryohfu	Satuiku 2 go	Ryohfu	Satuiku 2 go
Trial		1st		2nd	
<b>Wort</b>					
Extract	(%)	11.45	11.39	11.35	11.38
Final attenuation	(%)	69.4	69.6	71.2	70.5
Apparent attenuation limit	(%)	86.5	86.7	88.5	87.6
pH		5.35	5.34	5.32	5.39
Colour	(°EBC)	5.6	5.8	4.8	5.1
BU		39.7	39.5	39.1	37.0
Polyphenol	(mg/L)	216	222	200	215
Free amino nitrogen	(mg/L)	166	158	155	158
<b>Beer</b>					
Original gravity	(%)	11.01	11.07	10.80	10.77
Final extract	(%)	3.34	3.34	3.12	3.16
Final attenuation	(%)	69.7	69.8	71.1	70.7
Apparent extract	(%)	1.47	1.45	1.26	1.30
Apparent attenuation limit	(%)	86.6	86.9	88.4	87.9
Alcohol	(Vol %)	5.03	5.07	5.02	4.98
Alcohol	(w/w %)	3.95	3.99	3.95	3.92
pH		4.35	4.33	4.30	4.28
Colour	(°EBC)	3.7	4.0	3.5	3.7
Bitter unit		21.7	21.8	20.1	19.6
Polyphenol	(°EBC)	176	183	n.a.	n.a.
Acetaldehyde	(mg/L)	1.1	1.2	1.0	1.0
Acetone	(mg/L)	0.5	0.5	0.6	0.6
Ethyl acetate	(mg/L)	25.8	24.9	23.4	23.3
Isoamyl acetate	(mg/L)	1.7	1.6	1.5	1.5
n-Propanol	(mg/L)	10.6	10.9	10.6	10.7
Isobutanol	(mg/L)	8.0	7.9	7.2	7.0
Isoamyl alcohol	(mg/L)	52	51	50	48
Ethyl caproate	(mg/L)	0.26	0.26	0.27	0.27

## 第4節；考察

本章の結果から、「札育2号」の収量性やその他の農業特性について一部の項目で若干の差が認められたが有意な差ではなく、収量の結果から収量には影響を与えないと考えられた (Table 15, 16)。このことは、LOX-1 欠失形質が農業特性に対し大きな影響を与えないことを示唆しており、序章で述べた過去の知見 (Hirota et al., 2005, 2006a, 2006b) と矛盾せず、また、「CDC PolarStar」や「SouthernStar」における結果を支持するものであった。

また、「札育2号」において、LOX-1 欠失形質は主要な麦芽品質に影響を与えないが、明らかに麦芽の LOX 活性が低減することを示しており (Table 17, 18) 過去の知見 (Hirota et al., 2005) および LOX-1 欠失形質を有する「CDC PolarStar」と「SouthernStar」における結果を支持するものであった。ただし、「札育2号」においては、「りょうふう」と比較し可溶性窒素 (SN) が有意に低いという結果が得られており、この点は今後製造現場での利用時に製麦工程で実際に同様の傾向を示すか、その場合工程の調整によりコントロールできるものであるかどうか確認する必要があると考えられた。また、同様の結果は「CDC PolarStar」や「SouthernStar」では必ずしも確認されておらず、LOX-1 欠失形質そのものの影響ではないと考えられた。可溶性窒素の差はわずかであり、「札育2号」は「りょうふう」とほぼ同等の麦芽品質を持つと考えられた。

本研究において、「りょうふう」と「札育2号」の候補系統についてジェノタイピングを行った結果、選抜した各系統と「りょうふう」との間に高い合致率が示された (Table 14)。この値は、「CDC PolarStar」とその反復親である「CDC Kendall」を比較した場合の合致率と同様もしくはそれ以上の値を示した。「札育2号」の育成過程では戻し交配を7回実施しており、戻し交配を5回実施し育成した「CDC PolarStar」とその反復親「CDC Kendall」の合致率 (98.1%) と比較し、より合致率の高い系統が得られたことは合理的であると考えられた。また、1 遺伝子をターゲットにした5回もしくは7回の戻し交配で想定される1回親と反復親の遺伝的背景の理論上の合致率 (夫々98.4%、99.6%) に対しても近似の値となっていた。同じ LOX-1 欠失遺伝子をターゲットにした連続戻し交配で育成した

「CDC PolarStar」, 「SouthernStar」は LOX-1 欠失遺伝子を有し、かつ反復親である「CDC Kendall」, 「Flagship」と同様の農業特性や麦芽品質を有することが明らかとなっている。本結果から、連続戻し交配における LOX-1 欠失遺伝子導入にあたっては、戻し交配の回数は少なくとも5回以上行うことで目的を達成できると考えられた。ただし、どのような遺伝子をターゲットとするか、またその遺伝子が反復親の重要な農業形質や品質形質との染色体上の位置や距離により、必要な戻し交配回数は変わる可能性がある。また、場合によっては、連続戻し交配による特定の形質(遺伝子)の導入が機能しない可能性も考えられた。なお、「りょうふう」および「CDC Kendall」では比較的低い合致率であり、これらの連続戻し交配に使用した親は遺伝的背景が異なることを示していた。

「CDC PolarStar」とその反復親である「CDC Kendall」の合致率は98.1%であり、両者の間に農業特性や麦芽品質に大きな差異はなかったこと、「札幌2号」とその反復親である「りょうふう」で同程度もしくはそれ以上の合致率を示していたことから、「札幌2号」は、「りょうふう」と同程度の農業特性や麦芽品質を有することが期待されたことから、99.8%と最も合致率が高い1系統を選抜し、この1系統に対する農業特性や麦芽品質を評価した。その結果、「りょうふう」と同程度の農業特性、麦芽品質を有していることが明らかとなった。

日本において、秋播オオムギの生産地域である本州や九州においては収穫時期が梅雨にかかることがある。従って、ビールムギ品種は穂発芽のリスクを低減するため、一定程度の穂発芽耐性(休眠性)を有する必要がある。また、日本、特に本州におけるビールムギ育種においては、前述したオオムギ縞萎縮病抵抗性品種の育成とともに、梅雨を避けるため早生化が重要な育種目標であった。現在、北海道においても、同様に収穫時期に断続的に降雨がある場合があり、北海道向けのビールムギ品種についても一定程度の休眠性を有する必要がある。「りょうふう」は、これまでの北海道における栽培状況から、当該地域における栽培に供するために、適当な穂発芽耐性(休眠性)を有すると考えられた。したがって、「札幌2号」が「りょうふう」と同等の休眠性を示したことから、北海道における栽培において必要とされる穂発芽耐性を有すると判断された。

「札育 2 号」の醸造品質は、2 回の試験のいずれにおいても麦汁品質、発酵経過（データ示さず）および一般的なビール品質の評価項目について対照である「りょうふう」との間にほぼ差はなく、特に問題となる点は認められなかった（Table 19）。これは、「CDC PolarStar」と「SouthernStar」の結果と一致した。これらの結果は、「札育 2 号」がビール醸造に適した品種であることを示唆していた。

上記の穂発芽耐性を含む農業特性評価から、「札育 2 号」を北海道において栽培することに大きな懸念はないものと考えられた。また、麦芽品質、醸造特性も問題なく、商業的に利用可能であると結論付けられた。本結論に基づき、2013 年に本邦初の LOX-1 欠失オオムギ品種である「札育 2 号」の品種登録申請を行い、2016 年に品種登録が完了した（農林水産省品種登録データベース）。これにより、北海道において、良好な麦芽品質を有する既存品種と遜色ない LOX-1 欠失オオムギ品種を確実に育成する当初の目的は達成された。

## 第4章 LOX-1 欠失オオムギ品種の泡持ちおよび香味耐久性

### 第1節；緒言

本論文ではこれまでに、ビールオオムギ各生産地に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種を育成し、LOX-1 欠失形質がその農業特性、一般的な麦芽品質や醸造特性、ビール品質に大きな影響を与えず、オオムギ種子および麦芽の LOX 活性が低減することを明らかにした。本章においては、育成品種の LOX-1 欠失形質がビール品質である泡持ちや香味耐久性にどのような影響を与えるかについて検討した。

## 第 2 節 ; 材料および方法

### 材料

「CDC PolarStar」, 「SouthernStar」 および「札幌 2 号」と対照品種を用いてパイロットスケール醸造試験および商業スケール醸造試験で醸造したビールを用いた。

### 泡持ち (NIBEM 値) の測定

ビールの泡持ちは、NIBEM 泡持ち測定機 (NIBEM foam stability tester type NIBEM-T/haffmans BV, Venlo, Holland) を用い、メーカーの推奨法に従い実施した。

### T2N 含量および THOD 含量の測定

T2N および THOD 含量は、既報 (Kobayashi et al., 2002; Hirota et al., 2006a; Hirota et al., 2006b) に従い測定した。

ビール中の THOD 含量は、高速液体クロマトグラフィー質量分析を用い、以下の通り測定した。移動相の流速 0.3 mL / 分とし、移動相としては 0.5 % 酢酸 (A 液) とアセトニトリル (B 液) の混合液を用い、A : B=35:65 (0 分) - 5:95 (30 分) のリニアグラジエントの条件で行った。また、カラムはウォーターズ社製 Asymmetry (106005; C18, 3.5  $\mu$  m : 2.1 $\times$ 150mm) を用い、カラム温度は 50 とし、ヒューレットパッカード社製 1100 型高速液体クロマトグラフシステムを用いて、5  $\mu$ L のビールサンプルを分離した。質量分析は、ウォーターズ ZQ を用い、ES イオン化ネガティブモードで質量 329 をモニタリングした。THOD の標準液は、ビール抽出サンプルを用いた。

ビール中の T2N 含量は、以下の通り測定した。各条件に保存したビールサンプル 8 mL をバイアルに入れ、3 g の NaCl、および 20  $\mu$ L の 20 ppm 1 - ノネナール / エタノール溶液を添加後、閉栓した。スペルコ製ポリジメチルシロキサン SPME ファイバーを挿入し、40 で 15 分間インキュベートした後、ガスクロマトグラフィーに供試した。ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーは、Hewlett Packard HP6890/MSD5972A システム

を用いた。キャピラリーカラムとしてJ&W社製DB-1(30 m×0.25 mm、フィルム厚1 μm)を、キャリアガスとしてヘリウム(1 mL/分)を用い、オープン条件は60 から225 (5 /分)とし、セレクトイオンモード(m/z:70)でT2Nの定量を行った。なお、定量にはシグマ社製T2Nを標準とした標準添加法を用いた。

### ビールの老化度官能評価

官能評価は、3つの項目(老化臭、老化味、総合老化度)について実施した。老化臭は、ビールの老化に伴って発生し、紙(段ボール)、ウイスキーあるいはカラメル的な臭いと認識される(Shimizu et al., 2002)。総合老化度は、「老化程度の総合的な印象」と定義した。官能評価は、訓練された評価者グループにより製造直後のサンプルと保存したサンプルについて実施した。3つの評価項目については、0(新鮮)から4(極度に老化)で、0.5刻みで評点をつけた。官能評価点は、マイクロソフトエクセル2013を用いた対応のあるt検定により、統計的な差の有無を解析した。

## 第 3 節 ; 結果

### 第 1 項 ; THOD 含量と泡品質に与える影響評価

育成した各 LOX-1 欠失オオムギ品種とその反復親およびそれ以外の対照品種から製造した麦芽を用いたビール中の THOD 含量とビールの泡持ち (NIBEM 値) を測定した。結果について、「CDC PolarStar」を Table 20a、「SouthernStar」を Table 20b、「札育 2 号」を Table 20c に示した。THOD 含量は、「CDC PolarStar」に関する全ての試験において測定した。

「CDC PolarStar」の THOD 含量は 0.1 - 1.1 mg/L であり、それに対し対照の THOD 含量は 0.3 - 2.2 mg/L と「CDC PolarStar」で明らかに低かった。同様に、「SouthernStar」の THOD 含量は 0.8 - 0.9 mg/L であったのに対し、対照は 1.4 - 1.8 mg/L であった。「札育 2 号」においても、1.0 - 1.2 mg/L に対し、対照は 3.2 mg/L といずれの試験においても反復親およびその他対照品種との比較で同様の傾向を示し、LOX-1 欠失麦芽で醸造したビールにおいて THOD 含量は低くなっていた。

一方、泡持ちの指標である NIBEM 値は、「CDC PolarStar」において対照比 96 - 105 %、「SouthernStar」において 1 回目、2 回目で対照比 99 %、101 %、「札育 2 号」において 1 回目、2 回目で対照比 99 %、104 % であった。これらの結果から、いずれの LOX-1 欠失オオムギ品種においても、各々の対照品種と比較し明確な泡持ちの向上は認められなかった。



Table 20a. THOD concentrations and NIBEM values of beers made with CDC PolarStar and control malt.

Trial		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	
THOD	(mg/L)	CDC PolarStar	1.1	1.0	0.6	0.1	0.3	0.3	0.8
		Control	1.5	1.4	1.5	0.3	0.7	0.9	2.2
NIBEM % as CDC Kendall	(%)	CDC PolarStar	100	96	99	98	96	101	105
		Control	100	100	100	100	100	100	100

Table 20b. THOD concentrations and NIBEM values of beers made with SouthernStar and Flagship malt.

Trial		1st	2nd	
THOD	(mg/L)	SouthernStar	0.8	0.9
		Flagship	1.4	1.8
NIBEM % as Flagship	(%)	SouthernStar	99	101
		Flagship	100	100

Table 20c. THOD concentrations and NIBEM values of beers made with Satuiku 2 go and Ryohfu malt.

Trial		1st	2nd	
THOD	(mg/L)	Satuiku 2 go	1.2	1.0
		Ryohfu	3.2	3.2
NIBEM % as Ryohfu	(%)	Satuiku 2 go	99	104
		Ryohfu	100	100

## 第 2 項 ; T2N 含量と官能評価に与える影響評価

「CDC PolarStar」およびその反復親を含む対照品種の T2N 含量を製造直後の新鮮なビール（以下、直後品）と各条件で保存したビール（以下、保存品）について測定した。また、それらのビールについて官能評価を実施し、その結果を Table 21a に示した。

直後品の T2N 含量は、全ての試験において「CDC PolarStar」と対照で同程度の値を示し、「CDC PolarStar」で 0.02 - 0.17 ppb に対し対照で 0.02 - 0.14 ppb であった。保存品の T2N 含量は直後品と比較し「CDC PolarStar」、対照の両方で増加していた。しかしながら、保存品において「CDC PolarStar」の T2N 含量は 0.05 - 0.37 ppb であったのに対し、対照は 0.10 - 0.44 ppb と「CDC PolarStar」で低い傾向を示した。

直後品と保存品の老化に関する官能評価は、Trial 1 を除いて、評価した 3 つの項目である老化臭（Off-flavor）、老化味（Stale taste）および総合老化度（Total staleness）のうち、1 つ以上で「CDC PolarStar」の評価点が有意に小さかった。すなわち、Trial 1 を除くすべての試験で「CDC PolarStar」の香味耐久性が高かった。総合老化度の評価点は、有意差が認められなかった Trial 1 を除き、「CDC PolarStar」が 0.9 - 1.9 であったのに対し対照は 1.2 - 2.7 であった。これらの結果から、LOX-1 欠失形質がビールの老化を抑制する効果を有することが確認できた。

また、同一のオオムギ、麦芽を使用した Trial 1 - 4 において、特に低麦芽使用率仕様の Trial 3 および Trial 4 において、「CDC PolarStar」と対照の T2N 含量の差が比較的大きかった。

「SouthernStar」および「Flagship」について、「CDC PolarStar」と同様に T2N 含量の測定と官能評価を実施した。なお、本試験では、T2N 含量は、37 1 週間、30 2 週間の処理区でのみ測定した。その結果を Table 21b に示した。

ビール中の T2N 含量は、直後品では「SouthernStar」と「Flagship」で同程度であったが、保存品のうち 37 1 週間の保存品では、1 回目の試験で「SouthernStar」が 0.10 ppb に対し、「Flagship」で 0.16 ppb、2 回目の試験で「SouthernStar」が 0.07 ppb に対し、対照が 0.11 ppb

と差が認められた。

官能評価においては、1回目の試験では、すべての処理区で老化度のスコアに大きな差がなく有意差が認められなかった。一方、2回目の試験では、20 1ヵ月の処理区を除きすべての処理区で総合老化度について有意差が認められた。これらの結果から、LOX-1欠失形質がビールの老化を抑制する効果を有することが確認でき、保存条件のうち30 1ヵ月の条件で最も香味耐久性の改善効果が認められた。また、「CDC PolarStar」の試験において設定しなかった、20 5ヵ月の処理区においても、「SouthernStar」で老化度が有意に低かった。

「札育2号」および「りょうふう」を材料としたビールのT2N含量の測定および官能評価を実施した。その結果をTable 21cに示した。

T2N含量は、直後品では「札育2号」と「りょうふう」で同程度であったが、いずれの保存品でもT2N含量が増加し、その増加の程度は2回の試験ともにすべての条件で「りょうふう」でより顕著であった。特に、37 1週間および30 1ヵ月ではその差が大きかった。すなわち、37 1週間の保存条件では、1回目の試験で「札育2号」が0.10 ppb、「りょうふう」が0.13 ppb、2回目の試験で「札育2号」が0.08 ppb、「りょうふう」が0.11 ppbであった。なお、30 1ヵ月の保存条件では、1回目の試験で「札育2号」が0.11 ppb、「りょうふう」が0.16 ppb、2回目の試験で「札育2号」が0.04 ppb、「りょうふう」が0.06 ppbであった。

官能評価においては、「札育2号」は直後品以外すべての保存品で「りょうふう」と比較し低い老化度を示し、30 1ヵ月の保存条件において、1回目試験で香味耐久性の評価指標である老化臭、老化味、総合老化度の全て、2回目試験で老化味、総合老化度で有意な差があった。これらの結果から、保存条件のうち30 1ヵ月の条件で最も香味耐久性の改善効果が認められた。

Table 21a. T2N concentrations and sensory evaluations of beers made with CDC PolarStar and control malt.

Trial	T2N (ppb)				Sensory evaluation (0-4)									Number of panelists
	Fresh beer		Stale beer		Off-flavor			Stale taste		Total staleness				
	Test	Control	Test	Control	Test	Control		Test	Control	Test	Control			
1st	0.08	0.08	0.32	0.33	1.6	1.7	n.s.	1.6	1.6	n.s.	1.1	1.1	n.s.	>11
2nd	0.07	0.07	0.22	0.23	1.4	2.0	*	1.6	2.1	*	1.6	2.2	*	>11
3rd	0.08	0.1	0.08	0.19	1.7	2.3	n.s.	1.8	2.6	*	1.9	2.7	*	>11
4th	0.02	0.02	0.37	0.44	1.7	1.9	*	1.5	2.0	*	1.7	2.2	*	>11
5th	0.05 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.1 <sup>b</sup>	0.25 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	1.6	2.3	**	7
6th	0.14	0.17	0.18	0.27	1.6	2.2	*	2.0	2.4	**	1.9	2.4	**	11
7th	0.04	0.06	0.05	0.10	-	-	-	-	-	-	0.9	1.2	*	6

The T2N analyses and the sensory evaluations were conducted for the beers stored at 30°C in 1 month except Trial 5.

<sup>a</sup> 5°C at 1mo <sup>b</sup> 37°C at 14 days

\* Significantly different at the 5 % probability level.

\*\* Significantly different at the 1 % probability level.

n.s.: not significant

Table 21b. T2N concentrations and sensory evaluations of beer made with SouthernStar and Flagship malt.

Trial	T2N (ppb)						Total Staleness (0-4)												Number of panelists						
	Fresh beer		37 °C		30 °C		37 °C		30 °C		20 °C		30 °C		20 °C		20 °C								
	SS	Fl	SS	Fl	SS	Fl	SS	Fl	SS	Fl	SS	Fl	SS	Fl	SS	Fl	SS	Fl							
1st	0.03	0.05	0.10	0.16	0.09	0.11	1.0	1.1	n.s.	1.1	1.1	n.s.	1.1	1.1	n.s.	1.7	1.5	n.s.	1.3	1.4	n.s.	1.8	1.7	n.s.	>15
2nd	0.04	0.05	0.07	0.11	0.06	0.08	1.1	1.7	***	1.0	1.5	***	1.0	1.1	n.s.	1.4	1.9	***	1.6	1.9	*	1.7	2.2	***	>16

SS: SouthernStar Fl: Flagship

\* Significantly different at the 5 % probability level.

\*\* Significantly different at the 1 % probability level.

\*\*\* Significantly different at the 0.1 % probability level.

n.s.: not significant

Table 21c. T2N concentrations and sensory evaluations of beers made with Satuiku 2 go and Ryohfu malt.

Trial	T2N (ppb)				Sensory evaluation (0-4)									Number of panelists
	Fresh beer		Stale beer		Off-flavor			Stale taste			Total staleness			
	S2	Ryo	37 °C 1 Week		S2	Ryo	n.s.	S2	Ryo	n.s.	S2	Ryo	n.s.	
1st	0.03	0.03	0.10	0.13	1.0	1.1	n.s.	1.1	1.1	n.s.	1.1	1.3	n.s.	8
2nd	0.03	0.05	0.08	0.11	0.6	1.0	*	0.9	1.1	n.s.	0.9	1.2	n.s.	7

Trial	T2N (ppb)		Sensory evaluation (0-4)									Number of panelists
	Stale beer		Off-flavor			Stale taste			Total staleness			
	20 °C 1 month		S2	Ryo	n.s.	S2	Ryo	n.s.	S2	Ryo	n.s.	
1st	0.06	0.07	0.8	0.8	n.s.	0.7	0.8	n.s.	0.7	0.8	n.s.	8
2nd	0.03	0.04	0.8	0.9	n.s.	0.9	0.9	n.s.	0.9	0.9	n.s.	10 <sup>a</sup>

Trial	T2N (ppb)		Sensory evaluation (0-4)									Number of panelists
	Stale beer		Off-flavor			Stale taste			Total staleness			
	30 °C 1 month		S2	Ryo	n.s.	S2	Ryo	* <th>S2</th> <th>Ryo</th> <th>* </th>	S2	Ryo	*	
1st	0.11	0.16	1.3	1.8	**	1.2	1.8	***	1.2	1.8	**	9
2nd	0.04	0.06	1.5	1.7	n.s.	1.3	1.6	*	1.5	1.7	*	11 <sup>b</sup>

S2: Satuiku 2 go Ryo: Ryohfu

<sup>a</sup>Stale taste = 9 <sup>b</sup>Stale taste =10

\* Significantly different at the 5 % probability level.

\*\* Significantly different at the 1 % probability level.

\*\*\* Significantly different at the 0.1 % probability level.

n.s.: not significant

## 第 4 節 ; 考察

トリヒドロキシオクタデセン酸(以下 THOD)は、ビールの泡持ちに対する負の効果を持つことが知られている。THOD の生成に対する LOX-1 の関与が明らかとなり、Kuroda et al. (2002)、Kobayashi et al. (2002) はジヒドロキシオクタデセン酸および THOD がリノール酸から生成し、これらの物質を添加することで泡の付着が減少することを示すことで、明らかにビールの泡に対する負の影響 (Foam Damaging Effect、以下 FDE) を示すことを報告した。また、Hirota et al. (2006a) は、LOX-1 非欠失麦芽と比較し LOX-1 欠失麦芽を原料とするビールで THOD 含量が低く、泡持ち (NIBEM 値) が高いことを確認した。しかしながら、本研究における一連の試験では、LOX-1 欠失麦芽を原料としたビールにおいて、対照品種の麦芽、すなわち LOX-1 欠失麦芽を原料としたビールと比較し THOD 含量は減少したが、泡持ちは明確には改善されなかった。これについては、いくつかの原因が推測された。既報において、Kobayashi et al. (2002) は、THOD を含む脂肪酸の濃度から計算される FDE 値と泡持ちを示す NIBEM 値に正の相関があることを示した。得られた相関における THOD 含量の範囲は、 $0.0082 \text{ mol/m}^3$  (2.7 ppm) から  $0.02 \text{ mol/m}^3$  (6.6 ppm) であり、本研究における THOD 含量の範囲よりやや高かった。また、Hirota et al. (2006) の報告でも、今回の一連の試験と比較するとやや高い範囲であった。そのため、THOD 含量の差による泡持ちの改善効果が一連の試験において明確でなかった可能性がある。この THOD 含量が低かった原因については不明であるが、材料の遺伝的背景の差異が関連している可能性が考えられた。ビールムギはビール醸造に適したオオムギであり、その育種の過程で、製麦特性、麦芽品質、醸造特性、ビール品質などが評価され、その結果に基づき選抜されてきた。泡持ちも重要なビール品質の一つであり、ビール品質の評価項目として評価されている。本研究の各産地における LOX-1 欠失オオムギ品種育成に用いた反復親品種である「CDC Kenadall」「Flagship」および「りょうふう」は、各産地に適したビールムギ品種であり、前述した THOD の泡持ちへの影響を示した既報 (Hirota et al., 2005) で用いられた材料と異なり、ビールムギとして育種で選抜されていること、あるいはビール

ムギとして育成された品種・系統が交配親として使用されていることにより、それらの品種から製造したビールの THOD 含量が低かった可能性が考えられた。

ビールの泡の安定性は、ホップのイソ酸、タンパク質、ポリペプチドなどを含むビール中の様々な成分の相互作用に依存している。ビール中に含まれるタンパク質である lipid transfer protein (LTP1) は、泡にダメージを与える遊離脂肪酸を結合することで、泡の保持に寄与する麦芽由来のタンパク質であることが知られている。いくつかの報告においては、変性した LTP1 のみが泡を安定化する性質を有することが示されている (Sorensen et al., 1993; Bech et al., 1995; Lusk, Goldstein & Ryder, 1995)。一方、Van Nierop et al. (2003) は、LTP1 は変性することにより遊離脂肪酸を結合する機能が減少するとしている。また、オオムギ種子中の LTP1 含量は品種間差が大きく、品種の選択により泡持ちを改善できるかもしれないことが報告されている (Evans & Hejgaard, 1999)。どちらの形態が遊離脂肪酸の結合に機能するとしても、麦芽中の LTP1 含量の差異が泡持ちの差の原因となっている可能性がある。THOD 含量に明確な差がある場合でも、もし LTP1 が THOD 含量の低いビールと THOD 含量の高いビールのいずれにおいても、ビール中の遊離脂肪酸を結合するのに十分量存在する場合、THOD 含量の差の影響が相殺され泡持ちが明確に改善されないことが考えられた。

本章の結果において、ビール原料とするオオムギに LOX-1 欠失形質を導入することによりビール中の THOD 含量が減少することが示された。ビール原料となるオオムギに LOX-1 欠失形質を導入することによるビールの泡持ちに対する寄与度については、さらなる検討が必要であると考えられた。

これまでの研究により、多くの物質や経路がビールの老化に関わっていることが明らかとなっている (Bamforth, 1999; Vanderhaegen et al, 2006)。ビールの老化をもたらす物質の生成反応は、前駆体物質の酸化的変換と非酸化的変換に大別される (Kaneda et al., 1999)。ビールの老化的香味を抑制するため、老化の原因物質の前駆体の低減や除去、それらの前駆体から老化的香味に関連する物質への変換率の制御、老化的香味のマスキングなど様々な対策が提案されている。現代の醸造所では、ビールの酸化に関する様々な対策が行われ、



香味耐久性の改善に一定の効果を示している (Maeda, 1999; Takashio & Shinotsuka, 2001)。T2N はビールの老化的香味の原因物質の一つと考えられており (Drost et al., 1990) 麦芽中の LOX-1 は、T2N の前駆体である 9-HPOD の形成を触媒する。LOX 活性を低減することにより T2N の前駆体を減少させるため、いくつかのアプローチが検討されてきた (Larsen et al., 2001)。しかしながら、T2N を減少させるために LOX-1 欠失オオムギを利用することは、最も現実的、実用的な方法であると考えられた。なぜなら、LOX-1 欠失オオムギは、どのようなタイプのビール、どのような醸造設備でも使用できると考えられるからである。

「CDC PolarStar」「SouthernStar」および「札育2号」を用いた試験において、LOX-1 欠失形質の導入が一般的なビール品質項目に対し影響を与えないことが示された (Table 7, 13, 19)。また、本章の結果から、LOX-1 欠失麦芽から製造したビールでは、LOX-1 非欠失麦芽から製造したビールと比較し保存品において T2N 含量が減少しており、香味耐久性の改善効果が示された。「CDC PolarStar」を用いた一連の試験において、同一の麦芽およびオオムギを用いて実施された「CDC PolarStar」と対照の T2N 含量の差は麦芽使用率が低い条件で大きかった (Table 21a)。このような傾向について、いくつかの要因が推測できた。第一に、麦芽使用比率の低いビールにおいては、麦芽に由来するポリフェノールなどの抗酸化物質の濃度が通常のビールと比較し少なく、香味耐久性も比較的低いと考えられた。第二に、麦芽は焙燥工程において高温で焙燥されるため、オオムギの方がより高い LOX 活性を示すと考えられた。これらの要因から、麦芽として用いるより、副原料としてオオムギを用いた方が麦汁中の LOX の活性差が大きいと考えられた。これらのことから、T2N 含量に対する LOX-1 欠失形質の効果は、低麦芽使用率、オオムギを副原料として使用する条件でより明確になったと考えられた。また、「CDC PolarStar」を用いた一連の醸造試験においては、商業スケールの醸造設備を用いた試験を実施し、T2N 含量に対する LOX-1 欠失形質の効果と CDC PolarStar を用いた製品における老化的香味の抑制効果を確認した。本研究において、ビールの老化的香味の抑制に対し、LOX-1 欠失形質が産業上実用的であることが初めて示された。

「SouthernStar」を用いた2回の醸造試験において、ビール中のT2N含量は、直後品では「SouthernStar」と「Flagship」で同程度であったが、保存品において「Flagship」で明らかに高かった（Table 21b）。これは、「CDC PolarStar」と「CDC Kendall」の一連の醸造試験の結果と同様の傾向であった。官能評価においては、「SouthernStar」を用いた1回目の醸造試験では、すべての試験区で老化度のスコアに有意差は認められなかった。一方、2回目の醸造試験では、20℃で1ヵ月保存の処理区を除きすべての試験区で総合老化度について有意差が認められた。37℃、1週間保存品について、醸造試験1回目における「SouthernStar」のT2N含量が0.10 ppb、醸造試験2回目における「Flagship」のT2N含量が0.11 ppbと近い含量を示した（Table 21b）。T2Nの官能閾値は0.11 ppbといわれており（Meligaard, 1975）、1回目の「SouthernStar」と2回目の「Flagship」のT2N含量が官能閾値に極めて近かった。このT2N含量の分布が、官能評価結果の差に影響を与えていた可能性が考えられた。

また、比較的低い温度での保存品における老化度に対するLOX-1欠失形質の影響は「CDC PolarStar」の試験においては確認していなかったが、「SouthernStar」の試験において、20℃で3ヵ月もしくは5ヵ月間保存したビールで老化が抑制されることが明らかとなった（Table 21b）。「CDC PolarStar」を用いた一連の醸造試験（Table 21a）において、30℃で1ヵ月保存したビールおよび37℃で2週間保存したビールで、老化が抑制されることが確認された。また、「SouthernStar」を用いた醸造試験（Table 21b）においては、37℃で1週間、30℃で2週間および1ヵ月保存したビールで老化が抑制されることが確認された。これらの結果から、LOX-1欠失形質が、商業的な流通で想定されるより広い保存温度条件と保存期間において、老化の抑制に寄与する可能性が示唆された。

「札育2号」を用いた醸造試験の30℃、1ヵ月保存品について、1回目の試験における「札育2号」と「りょうふう」のT2N含量の差は0.05 ppbであったが、2回目の試験では差はより小さく0.02 ppbであった（Table 21c）。T2Nの官能閾値は0.11 ppbであると言われている（Meligaard, 1975）。2回目の試験においては、30℃1ヵ月保存品においてT2N含量は両者とも0.11 ppbより低かった。一方、1回目の試験においては、「りょうふう」

の T2N 含量は 0.11 ppb より高く、「札育 2 号」は 0.11ppb と閾値と同じであった。これら点が、老化度の評価における差異の原因となっていることが考えられた。

各品種のいずれの試験においても、オオムギに対し LOX-1 欠失形質を導入することにより保存ビール中の T2N 含量が低減し老化的香味の生成が抑制され、その効果は 30 、1 ヶ月の保存条件で最も顕著であった。また、同条件での試験、すなわちほぼ同一の原料配合である 400L パイロットスケール醸造試験（「CDC PolarStar」の Trial 2 と「札育 2 号」）における 30 、1 ヶ月保存条件における比較では同様に直後品と保存品の T2N 含量に差が認められたが、「札育 2 号」の試験において、T2N 含量が低いレベルにあった（Table 21a, 21c）。この理由は不明であるが、各試験に使用した麦芽の品質あるいは各品種の遺伝的背景が基本的な T2N の含量レベルに影響を与えていることが推察された。

育成した LOX-1 欠失オオムギ品種を用いた一連の試験の結果から、LOX-1 欠失形質を付与することによりビールの老化を抑制することが可能であり、その効果がパイロットスケールから商業スケールの醸造設備で確認されたことから、産業上実用的であることが示された。また、LOX-1 欠失形質が複数の異なる遺伝的背景においても効果を発揮することが明らかとなった。ただし、LOX-1 欠失麦芽で製造したビール中にも T2N や THOD が存在することから、自動酸化や酵素的酸化を抑制する他の施策は依然有効であると考えられた。製麦工程や麦芽品質がビール中の T2N 含量に与える影響はこれまでも報告されているが、工程の変更はビール品質に影響する他の麦芽品質に影響を与えかねないため、可能な限り適用可能な施策を検討する必要があると考えられる。併せて、LOX-1 欠失形質を導入したオオムギ・麦芽においても、アイソザイムである LOX-2 に由来すると推測される残存 LOX 活性を有するため、それを低減することがさらに香味耐久性を改善する戦略の一つとなると考えられる。工程における低減とともに、LOX-2 を欠失した遺伝資源の探索も手段として考えられ、実際に研究が進められている（Google patent, カールスバーグ社特許）。

## 総合考察

アルコール飲料の中でも古くから世界中で広く生産、飲用されてきたものの一つであるビールは、製麦工程、仕込工程、発酵・貯酒工程を経て製造される。その間、これらの工程で各種の品質評価がなされ、美味しく高品質なビールが造られている。この工程の最も上流に位置するのがオオムギそして麦芽であり、麦芽が「ビールの魂」といわれる由縁である。そのため、オオムギ麦芽のエキスや全窒素含量、可溶性窒素含量、酵素力、最終発酵度などの形質改良を目的に、長年にわたり国内外でビールムギ育種が進められてきた。

麦芽の成分や組成が大きく関与するビール品質の一つに保存期間や高温への暴露によるビールの老化があり、ビール製造に関わる技術者、研究者にとって、香味耐久性、すなわちビールが市場に出たからの老化に対する耐久性の向上は、高品質なビール製造や流通時の品質維持のため解決すべき非常に重要な課題であり、その向上はビール産業のさらなる発展に大きく寄与するものである。

ビールの老化に伴って知覚される老化臭の原因物質の一つは、仕込工程において生成されるトランス 2 ノネナル (*trans*-2-nonenal、以下 T2N) であり、その発生には複数の経路がある (Walker, Hughes & Simpson, 1996; Lermusieau et al., 1999; Kuroda et al., 2003)。これまでのビール製品では、工程における酸素との接触を抑制することや製麦・醸造工程においてリポキシゲナーゼ (lipoxygenase、以下 LOX) 活性を低減させることにより香味耐久性を高めるアプローチを採ってきた。しかしこのアプローチは、多額の設備投資や LOX 活性以外の麦芽品質へ影響を及ぼす可能性があるなどの欠点を有する。これに対し、本論文で報告した LOX 活性が低いオオムギを使用することは、工程や麦芽品質等に制約を与えることなく、どのようなタイプの醸造設備やビールにも適用できる可能性があり、香味耐久性や泡持ちを改善するための実用的、効果的な方法であると想定された。

このような仮説に基づき、Hirota et al. (2005) は、育種による香味耐久性や泡持ちの向上を目的に、岡山大学資源生物科学研究所のオオムギ遺伝資源を調査した結果、種子中に

LOX-1 活性が認められない在来種 6 系統を発見した。遺伝解析の結果、この LOX-1 欠失形質は単一の劣性遺伝子により支配され、その欠失メカニズムは、第 5 イントロンのスプライシング供与部位の変異であった (Hirota et al., 2005)。同時に、LOX-1 欠失形質を導入した品種を迅速かつ効率的に育成するため、この遺伝子の検出が可能な CAPS マーカーを開発した (Hirota et al., 2005)。また、LOX-1 欠失形質の効果を確認するために、試験用に育成した材料で醸造試験を実施し、ビール中のトリヒドロキシオクタデセン酸 (trihydroxyoctadecenoic acid、以下 THOD) 含量と T2N 含量が低下し、ビールの泡持ちや香味耐久性を改善する効果を確認した (Hirota et al., 2006a; Hirota et al., 2006b)。

上記の研究成果を鑑み、本論文では各主要オオムギ産地に適応した、LOX-1 欠失形質を導入したオオムギ品種を連続戻し交配と DNA マーカーを利用した選抜技術 (Molecular Marker-Assisted Selection、以下 MMAS) を適用することで早期に育成すること、その農業特性、麦芽品質と醸造特性を明らかにすることを目的とした。

本研究において育成した「CDC PolarStar」「SouthernStar」および「札育 2 号」について、第 1 章～第 3 章において、農業特性と麦芽品質を評価した。農業特性について、海外においては各育成地における共同育種パートナー (カナダ・サスカチュワン大学 CDC、豪州・アデレード大学) の協力のもと、公的試験あるいはパートナーが運営する育種試験において評価した。また、北海道においては、東京農業大学生物産業学部の協力のもと、農業特性を評価した。

LOX 欠失形質は、他の作物、例えばダイズ (Kitamura et al., 1982; Davies & Nielsen, 1986) やイネ (Shirasawa, 2008) で発見されてきた。LOX 欠失ダイズでは、LOX 欠失系統が対照品種と比較し通常の生育を示すことが明らかとなっている (Pfeiffer, Hildebrand & Tekrony, 1991)。しかし、オオムギにおいては、LOX-1 欠失形質が麦芽、麦汁、ビールの品質にネガティブな影響を与えないことは示されていたが、農業特性への影響は報告されていなかった (Hirota et al., 2006a; Hirota et al., 2006b)。本研究における、連続戻し交配で育成された各 LOX-1 欠失オオムギ品種と反復親の比較から、LOX-1 欠失オオムギは反復親と同程度の生育を示し、LOX-1 欠失形質がオオムギの農業特性に対し影響を与えない

ことが初めて示された。本結果は、ビール品質の改善を目的として、LOX-1 欠失形質をビールムギ育種に適用できることを示す非常に重要な知見であった。

一方、育成した品種において、農業特性に関する懸念点も明らかとなった。例えば、「Flagship」は穂発芽耐性が比較的弱く（Hills et al., 2009）、「Flagship」を反復親として育成した「SouthernStar」においても穂発芽耐性が弱いことが観察された。弱い穂発芽耐性の「Flagship」から「SouthernStar」への導入は、その性質が「Flagship」の麦芽品質、特に麦芽中のデンプンやタンパク質などの高分子物質の分解、いわゆる溶けに関連する品質である可溶性窒素や Kolbach Index などと連鎖しており（Hills et al., 2009）かつ連続戻し交配を適用していることから、合理的な結果であると考えられた。この結果は、連続戻し交配と MMAS を用いた LOX-1 欠失品種を早期に育成する戦略にはデメリットも存在し、1 回親の導入したい形質である LOX-1 欠失形質を確実に導入すると同時に、反復親がネガティブな形質を持つ場合、その形質も選択的に改善しない限り付与されてしまうことが明らかとなった。「SouthernStar」は「Flagship」から穂発芽耐性が弱い性質を引き継いでおり、本形質は豪州での栽培において制約やリスクとなりうると考えられた。今後は、本研究で育成した「SouthernStar」を豪州に適応した農業特性、良好な品質を有した LOX-1 欠失形質導入親として使用し、他方穂発芽耐性の強い品種・系統を交配親として用い、穂発芽耐性を有する LOX-1 欠失ビールムギ品種を育成していく必要があると考えられた。

本研究において育成した各 LOX-1 欠失ビールムギ品種と反復親の麦芽品質には大きな差異は認められなかった。既報において、LOX-1 遺伝子について CAPS マーカーでタイピングし、LOX-1 欠失型と LOX-1 非欠失型でグルーピングした F<sub>4</sub> バルク集団の麦芽品質に差がなかったことが示されている（Hirota et al., 2006b）。これらの結果は、LOX-1 欠失形質が主要な麦芽品質に大きな影響を与えないことを示唆していた。しかしながら、「札育 2 号」においては、「りょうふう」と比較し可溶性窒素（SN）が有意に低いという結果が得られた。この点は、今後製麦工場において原料として利用する際に製麦工程で同様の傾向を示すか、工程の調整により SN を適切な範囲にコントロールできるものであるかどうか、見極めていく必要があると考えられる。なお、LOX-1 欠失品種で SN が低くなる傾

向は「CDC PolarStar」や「SouthernStar」では必ずしも確認されておらず、LOX-1 欠失形質そのものの影響ではないと考えられた。いずれにしても、SN の差はわずかであり、「札育 2 号」は、「りょうふう」とほぼ同等の麦芽品質を持つと考えられた。一方、育成した各 LOX-1 欠失ビールムギ品種と反復親のオオムギ種子および麦芽で LOX 活性に明らかな差が認められた。この結果は、既報 (Hirota et al., 2006b) における LOX-1 非欠失と LOX-1 欠失の F<sub>4</sub> バルク集団の比較に関する結果と一致しており、麦芽でわずかに検出された LOX 活性は LOX のアイソザイムである LOX-2 の活性であると考えられた。これらの結果から、LOX-1 欠失形質の導入が成功していることが確認された。

育成された LOX-1 欠失オオムギ品種とその反復親を用いた醸造試験を実施し、LOX-1 欠失形質は、ビールの泡持ち (NIBEM 値) や T2N 含量、THOD 含量および官能評価結果以外の一般的な麦汁・ビール品質項目にほぼ影響を与えないことを示した。また、各 LOX-1 欠失オオムギ品種のビール品質は、一般的な下面発酵の淡色ビール分析値と比較し、問題がないものと結論付けられた。このことから、LOX-1 欠失形質が主要なビール品質に影響を与えないこと、育成した各 LOX-1 欠失オオムギ品種がビール醸造に適していることが示された。

以上のことより、育成した LOX-1 欠失オオムギ品種は、連続戻し交配と MMAS を適用した育種戦略により LOX-1 欠失形質が導入され、農業特性、麦芽品質およびビール品質に優れた各反復親の特性を引き継いでいることが明らかとなった。

第 4 章では、育成した LOX-1 欠失オオムギ品種である「CDC PolarStar」「SouthernStar」および「札育 2 号」と各々の反復親を含む対照品種を用いてビールを製造し、LOX-1 欠失形質が泡持ちや香味耐久性に与える影響を検討した。

THOD は泡持ちに対する負の効果を持つことが知られている (Kobayashi et al., 2002)。また、Hirota et al. (2006a) は、LOX-1 非欠失麦芽と比較し LOX-1 欠失麦芽を用いたビールで THOD 含量が低く泡持ちが高いことを確認した。しかしながら、本研究における一連の試験では、THOD 含量は明らかに減少していたが、泡持ちは明確には向上していなかった。既報において、Kobayashi et al. (2002) は、THOD を含む脂肪酸の濃度から計算さ

れる FDE 値と泡持ちを示す NIBEM 値に正の相関があることを示し、相関におけるビール中の THOD 含量の範囲は  $0.0082 \text{ mol/m}^3$  (2.7 ppm) から  $0.02 \text{ mol/m}^3$  (6.6 ppm) であった。本研究における THOD 含量はこの範囲よりやや高かった。そのため、THOD 含量の差による泡持ちの改善効果が一連の試験において明確でなかった可能性があった。この THOD 含量が低かった原因については不明であるが、材料の遺伝的背景の差異が関連している可能性が考えられた。ビールムギはビール醸造に適したオオムギであり、その育種の過程で製麦特性、泡持ちを含む醸造特性が評価され選抜されている。LOX-1 欠失ビールムギ品種育成に用いた反復親は各産地に適したビールムギ品種であり、前述した THOD の泡持ちへの影響を示した既報(Hirota et al., 2006)で用いられたオオムギ材料と異なり、ビールムギとして育種で選抜されていることあるいはビールムギとして育成された品種・系統が交配親として使用されていることにより、THOD 含量が遺伝的に低かった可能性が考えられた。

また、ビール中に含まれるタンパク質である LTP1 は、泡にダメージを与える遊離脂肪酸と結合することで、泡の保持に寄与する麦芽由来のタンパク質であることが知られている。これまでの報告においては、変性した LTP1 のみが泡を安定化する性質を有することが示されている (Sorensen, et al., 1993; Bech, 1995; Lusk, Goldstein & Ryder, 1995)。一方、Van Nierop et al. (2003) は、LTP1 は変性することにより遊離脂肪酸を結合する機能が減少するとしている。さらに、オオムギ種子中の LTP1 含量は、品種間差が大きく、品種の選択により泡持ちを改善できるかもしれないことが報告されている (Evans & Hejgaard, 1999)。これらの報告により、麦芽中の LTP1 含量の差異が泡持ちの差の原因となっている可能性が示唆されている。このことより、THOD 含量に明確な差がある場合でも、もし LTP1 が THOD 含量が低いビールと THOD 含量が高いビールのいずれにおいてもビール中の遊離脂肪酸を結合するのに十分量存在する場合、THOD 含量の差の影響が相殺され、泡持ちが明確に改善されない可能性も考えられた。しかしながら、本研究において、LOX-1 欠失により THOD 含量が減少することが明らかに示され、これは既報(Hirota et al., 2006a; Hirota et al., 2006b)と矛盾がなかった。泡持ちの改善に対する異なる効果については、さ



らなる検討が必要であると考えられた。

「CDC PolarStar」「SouthernStar」および「札育2号」を供試した試験において、これらの品種の T2N 含量は保存前の製品では対照と同程度であった。ビールを保存することにより各 LOX-1 欠失オオムギ品種および対照とともに T2N 含量が増加したが、その増加の程度は対照でより大きく、LOX-1 欠失形質が保存したビール中の T2N 含量の低減に寄与していることが明らかになった。

「CDC PolarStar」を供試した試験では、30 で 1 ヶ月間保存した製品の T2N 含量は、「CDC PolarStar」が 0.05 - 0.37 ppb であったのに対し、対照が 0.10 - 0.44 ppb であった。同一の「CDC PolarStar」の麦芽およびオオムギ種子を用いて実施された「CDC PolarStar」と対照の T2N 含量の差は、低麦芽使用率、オオムギ種子を副原料として使用する条件でより大きかった。このような傾向は、第一に、低麦芽使用率のビールにおいては、麦芽に由来するポリフェノールなどの抗酸化物質の濃度が通常のビールと比較し少なく、香味耐久性も比較的低いと考えられること、第二に、麦芽は焙燥工程において高温で焙燥されるため、オオムギの方がより高い LOX 活性を示すことが原因であると推測された。つまり麦芽として用いるより、副原料としてオオムギを用いる方が麦汁中の LOX 活性差が大きくなり、結果として T2N 含量に対する LOX-1 欠失形質の効果は、低麦芽使用率、オオムギ種子を副原料として使用する条件でより明確となったと考えられた。また、「CDC PolarStar」を用いた醸造試験では、商業スケールの醸造設備を用い T2N 含量に対する LOX-1 欠失形質の効果を確認した。現代のビール醸造所では、ビール製造工程における酸化抑制のための施策が講じられ一定の成果をあげているが (Maeda, 1999; Takashio & Shinozuka, 2001)、「CDC PolarStar」の商業スケールの醸造設備における試験においても、明確に T2N の低減効果とそれによる老化的香味の抑制効果が示されており、LOX-1 欠失形質が産業上応用可能であることが本研究において初めて示された。

「SouthernStar」における試験では、1 回目、2 回目いずれの試験でも保存したビールの T2N 含量には一定程度の差が認められたが、官能評価においては 1 回目の試験ではすべての試験区で老化度のスコアに大差なく、有意差は認められなかった。一方、2 回目の試

験では、20 1 ヶ月の保存条件を除きすべての処理区で有意差が認められた。これらの官能評価結果の差異には、T2N 含量と官能閾値との関係が影響していることが考えられた。また、「CDC PolarStar」の試験においては設定しなかったが、20 5 ヶ月の保存条件で LOX-1 欠失形質によりビールの老化が抑制されることが明らかとなった。本結果から、商業的な流通で想定されるより広い保存温度条件における老化の抑制に寄与する可能性が示唆された。

「札幌 2 号」における試験では、1 回目、2 回目いずれの試験においても、30 1 ヶ月の保存条件で最も香味耐久性の改善効果が大きかった。当該条件における T2N 含量は、「札幌 2 号」において、1 回目の試験で 0.11 ppb、2 回目の試験で 0.04 ppb であった。「CDC PolarStar」の 400L パイロットスケール醸造設備で製造した副原料使用ビールの仕様で実施した試験 (Trial2) では「CDC PolarStar」の T2N 含量が 0.22 ppb であり、「札幌 2 号」の T2N 含量はより低かった。この理由は不明であるが、各試験に使用した麦芽の品質あるいは各品種の遺伝的背景が基本的な T2N の含量レベルに影響を与えていることが推察された。

各品種のいずれの試験においても、LOX-1 欠失形質を導入することにより、保存ビール中の T2N 含量が低減し老化的香味の抑制効果があることが明らかとなり、その効果は 30 1 ヶ月保存条件で最も顕著となると考えられた。また、各品種での同条件での試験で、直後品、保存品の T2N 含量に差が認められ、それが保存品における試験区と対照区の老化的香味の差の有無に関連していた。この差の原因を明らかにすることはできなかったが、これらは麦芽品質の差異や各品種の遺伝的背景によるものと考えられた。

製麦工程や麦芽品質がビール中の T2N 含量に与える影響はこれまでも報告されているが、各工程の変更はビール品質に影響する他の麦芽品質に影響を与えかねないため、可能な限り適用可能な施策を検討する必要がある。併せて、LOX-1 欠失麦芽においてもアイソザイムである LOX-2 に由来する残存活性を有するため、LOX-2 の残存活性を低減することがさらに香味耐久性を改善する戦略の一つとなると考えられた。今後は製麦工程、ビール製造工程における低減とともに、LOX-2 を欠失した遺伝資源の探索と利用がビール

の香味耐久性をさらに向上させる手段として考えられる。

本論文における結果から、本研究において育成した「CDC PolarStar」「SouthernStar」および「札育2号」は LOX-1 欠失形質を有し、農業特性、麦芽品質およびビール品質に優れた各反復親の特性を引き継いでいること、導入した LOX-1 欠失形質は、本研究において育成した各 LOX-1 欠失オオムギ品種でその効果を発揮し、ビールの保存時の老化的香味の抑制に寄与することが明らかになった。これらの結果から、LOX-1 欠失形質は、LOX-1 欠失オオムギ品種の育成に用いた、複数の反復親の異なる遺伝的背景において効果を発揮すると結論できた。また、「CDC PolarStar」を用いた一連の醸造試験においては、商業スケールの醸造設備における T2N 含量の低減と老化的香味の抑制効果を確認し、LOX-1 欠失形質が産業上応用可能であることを本論文において初めて明らかにすることができた。

これらの各産地に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種は、現在商業利用が進められている。すなわち、北米においては「CDC PolarStar」およびその後続品種であり、現在カナダにおいて最も作付面積が多い品種である「CDC Copeland」を反復親として「CDC PolarStar」と同様の手法で育成した、多収性の LOX-1 欠失ビールムギ品種である「CDC PlatinumStar」が商業化されており、「CDC PolarStar」および「CDC PlatinumStar」を含め、作付面積ベースで約 10,000 ヘクタール、生産量で約 30,000 トンを目標として生産が実施された。豪州においても、「SouthernStar」を作付面積ベースで約 1,500 ヘクタール、生産量で約 5,000 トンを目標とした生産が実施された。また、北海道においては、2019 年にこれまで生産していた「りょうふう」の大部分が「札育2号」に切り替えられ、約 1,500 ヘクタール、生産量で約 5,600 トンを目標とした生産が実施された。生産したオオムギは、カナダ、豪州においては、契約している麦芽会社で麦芽に加工され、サッポロビール株式会社が購入し、基幹製品に使用している。また、「札育2号」については、サッポロビール株式会社が全量購入し自社で製麦、製品に使用している。このように、複数の産地に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種を育成・普及し、異なる産地から LOX-1 欠失麦芽を調達することにより、調達安定性を高めることが可能となってきた。

最後に、「CDC PolarStar」は、カナダの主要品種である「AC Metcalfe」や「CDC Kendall」

と同等の収量性を持つものの、現在のカナダの主力品種である「CDC Copeland」あるいは、現在普及が進められつつある新品種である「AAC Synergy」,「CDC Bow」等と比較すると、特に収量性や耐病性など農業特性が劣ることは否めない。また、実用上は大きな問題はないものの、「CDC Kendall」と同様やや稈質が弱く耐倒伏性が劣る傾向があり、耐病性についても改善の余地がある。これらのことから、現在これらの点が、すでに次の育種目標として取り込まれ、新たな品種の育成が行われた。すなわち、「CDC Copeland」を反復親とし「CDC PolarStar」と同じ戦略に基づき「CDC PlatinumStar」が育成され、現在、当該品種がカナダにおいて生産している主たる LOX-1 欠失オオムギ品種となっている。併せて、LOX-1 欠失形質を有しその他の農業特性や麦芽品質も一般的なビールムギ品種と比較し遜色がない「CDC PolarStar」,「CDC PlatinumStar」を交配親として用いた交配育種により、より多収性で品質が優れた次世代の LOX-1 欠失オオムギ品種の育成が進められている。

豪州、日本においても基本的な次世代の LOX-1 欠失オオムギ品種の育種戦略は同一である。「SouthernStar」,「札幌2号」は、LOX-1 欠失形質以外はその反復親である「Flagship」や「りょうふう」の農業特性、麦芽品質に極めて近い特性を持っており、その欠点を受け継いでいることや収量性が現行の品種・育成系統と比較し若干劣る点などで、育種的改良の余地がある。例えば、「SouthernStar」は、「Flagship」の極めて良好な品質は引き継いでいるもの、同時に穂発芽耐性が低い特性を受け継ぎ、実際にここ数年の生産において穂発芽の被害を受けているため、これらの点は今後育種目標として改善していく必要があると考えられた。

このように、「連続戻し交配」は、特定の形質を付与し、反復親の他の性質を確実に育成した品種に受け継がせることができるメリットがある反面、反復親のある性質について、それを凌駕することはない、また反復親の欠点を受け継ぐ可能性が極めて高いというデメリットがある。一連の LOX-1 欠失ビールムギ品種の育成においては、一回親である「OUI003」が在来種であり、ビールムギが備えるべき基本的な性質、すなわち、形態的特性、農業特性、品質特性を備えていなかったことから、連続戻し交配により各産地にお

ける LOX-1 欠失品種をより迅速に育成し商業化を進めることと同時に、今後の各産地における育種に利用できる、各産地に適応しかつ問題のないビールムギとしての品質を有した、優れた育種母本の作出を目指した。本戦略に基づき、著者は北米初の LOX-1 欠失オオムギ品種である「CDC PolarStar」を交配開始から 8 年以下で品種登録することに成功した。同じく、豪州初の LOX-1 欠失オオムギ品種である「SouthernStar」、国内初の LOX-1 欠失オオムギ品種である「札育 2 号」についても、同様の期間で育成、品種登録（品種登録申請）することに成功した。従来一般的な交配育種では、十数年かかるのが通常であり、連続戻し交配と MMAS を組み合わせた育種戦略は、LOX-1 欠失ビールムギ育種の初期段階として、LOX-1 欠失形質以外の農業特性、麦芽品質およびビール品質などを適切に兼ね備えた系統を迅速に確実に育成する方法として効果的であったといえる。現在、各産地において、育成を行った各品種を母本に用い次世代の LOX-1 欠失ビールムギ品種の育成を進めており、本形質のさらなる普及・利用の進展が望まれる。

## 摘要

本研究では、主要ビールオオムギ産地に適応した LOX-1 欠失形質を導入したオオムギ品種を連続戻し交配と MMAS を適用することで早期に育成し、その農業特性、麦芽品質と醸造特性を明らかにするとともに、これらの品種の泡持ちおよび香味耐久性を明らかにすることを目的とした。

### 北米に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「CDC PolarStar」

連続戻し交配と MMAS を適用し、北米初の LOX-1 欠失オオムギ品種「CDC PolarStar」の育成に成功した。収量性やその他の農業特性、一般的な麦芽品質は、その反復親であり、北米でその農業特性や麦芽品質が評価されていた二条ビールムギ品種である「CDC Kendall」と同等であった。これまで、LOX-1 欠失形質がオオムギの農業特性に与える影響について報告されておらず、本研究結果から、LOX-1 欠失形質がビールオオムギの農業特性に影響を与えることなく、LOX-1 欠失形質をビール品質改良のためビールムギ育種に利用できる重要な知見が得られた。

また、LOX-1 欠失形質のビール品質への影響を確認するため、パイロットスケール醸造設備および商業規模の醸造設備を用いて一連の醸造試験を実施し、LOX-1 活性がないことにより影響を与えると想定される形質以外の一般的な麦汁・ビール品質に対し、LOX-1 欠失形質は大きな影響を与えないことが明らかとなった。

### 豪州に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「SouthernStar」

連続戻し交配と MMAS を適用し、豪州に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「SouthernStar」の育成に成功した。連続戻し交配の反復親として、豪州の二条ビールオオムギ品種であり、品質が極めて優れている点が評価されている「Flagship」を使用した。

収量性やその他の農業特性、一般的な麦芽品質は、「SouthernStar」と「Flagship」でほぼ同等であった。また、LOX-1 欠失形質のビール品質への影響を確認するため、パイロットスケール醸造設備を用いて醸造試験を実施し、一般的な麦汁・ビール品質は同等であり、それらに対し LOX-1 欠失形質は大きな影響を与えないことが明らかとなった。

## 北海道に適應した LOX-1 欠失オオムギ品種「札育 2 号」

連続戻し交配と MMAS を適用し、LOX-1 欠失形質を「りょうふう」に導入することにより、北海道に適應した、本邦初の LOX-1 欠失オオムギ品種である「札育 2 号」の育成に成功した。連続戻し交配の反復親として使用した「りょうふう」は、北海道に適應した唯一の春播きビールのムギ品種であり、20 年以上も日本のビール業界で使用されている品種である。

「札育 2 号」の収量性やその他の農業特性、一般的な麦芽品質は、「りょうふう」とほぼ同等であった。また、LOX-1 欠失形質のビール品質への影響を確認するため、パイロットスケール醸造設備を用いて醸造試験を実施し、一般的な麦汁・ビール品質は同等であり、それらに対し LOX-1 欠失形質は大きな影響を与えないことが明らかとなった。

## LOX-1 欠失オオムギ品種の泡持ちおよび香味耐久性

本研究で育成した LOX-1 欠失オオムギ品種である「CDC PolarStar」「SouthernStar」および「札育 2 号」から製造したビールでは、対照と比較しトリヒドロキシオクタデセン酸 (THOD) やトランス-2-ノネナール (T2N) などのビール品質を低下させる物質の含量が減少することが明らかとなった。しかし、THOD 含量の減少にもかかわらず、対照と比較し、LOX-1 欠失品種から製造したビールにおけるビールの泡持ちの改善は明確ではなかった。

官能評価により、LOX-1 欠失オオムギ品種から製造したビールにおいて老化的香味が

抑制されていることが明らかになり、T2N の低減とビールの老化的香味の抑制に対する LOX-1 欠失形質の効果が明確に確認された。また、一連の試験から、その効果は 30 1 ヶ月の保存品で最も明確であることが明らかとなった。

また、「CDC PolarStar」における試験では、パイロットスケール醸造設備や商業スケールの醸造設備を用い、複数の醸造条件で醸造試験を実施した結果、官能評価においてほぼすべての試験で LOX-1 欠失形質の優位性が示された。特に、LOX-1 欠失形質の効果は麦芽使用率の低い、オオムギを副原料で使用する仕様でより顕著であった。また、商業スケールの醸造設備における T2N の低減と老化的香味の抑制効果を確認し、LOX-1 欠失形質が産業上応用可能あることを初めて示した。

「SouthernStar」の試験においても、T2N 含量低減と老化的香味の抑制について、LOX-1 欠失形質の効果が示された。本試験では、20 5 か月の保存品でもその効果が確認され、LOX-1 欠失形質は通常の商業的流通において想定されるより広い温度条件の範囲でビール品質、新鮮さの保持に寄与する可能性が示された。

以上、本研究の結果から、LOX-1 欠失形質は、LOX-1 欠失オオムギ品種の育成に用いた、複数の反復親の異なる遺伝的背景において効果を発揮していることが明らかとなった。複数の産地に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種を育成することは、異なる産地から LOX-1 欠失麦芽を調達しそれらを製品に使用することで、調達安定性と製品の香味耐久性を高めることに大きく寄与するものである。また、連続戻し交配と MMAS を組み合わせた育種戦略は、LOX-1 欠失オオムギ育種の初期段階として、LOX-1 欠失形質以外の農業特性、麦芽品質およびビール品質などを適切に兼ね備えた系統を迅速に確実に育成する方法として効果的であった。これらのことから、現在、各産地において育成を行った各品種を母本に用い次世代の LOX-1 欠失オオムギ品種の育成が進められており、本形質のさらなる普及と利用の進展が望まれる。



## SUMMARY

### **BREEDING OF LIPOXYGENASE-1 NULL MALTING BARLEY VARIETIES AND STUDY OF THEIR CHARACTERISTICS.**

Trihydroxyoctadexenoic acid (THOD) and trans-2-nonenal (T2N) are substances that negatively affect beer quality such as foam and flavor stabilities, respectively. These substances are generated in the brewing process and during storage by enzymatic and non-enzymatic oxidation of linoleic acid. Enzymatic oxidation of linoleic acid is catalyzed by lipoxygenase in malt. Therefore, it is expected that breeding lipoxygenase-1 null (LOX-1 null) malting barley could be one of the effective measures to improve beer quality.

The objectives of the study are to develop LOX-1 null malting barley varieties adapted to the major barley-producing areas of the world and to evaluate the value of LOX-1 null barley varieties based on their agronomic performance, malting quality, and brewing performance.

#### **Breeding the lipoxygenase-1 null malting barley variety CDC PolarStar suitable for cultivation in North America**

CDC PolarStar was developed by successive backcross and molecular marker-assisted selection (MMAS).

The yield potential, agronomic performance, and general malting quality of CDC PolarStar were equivalent to those of the recurrent parent CDC Kendall, which is one of the well-accepted two-rowed malting barley varieties in North America. Several brewing trials were performed through a pilot and commercial brewing process to evaluate the effects of the LOX-1 null trait on beer quality. The analyses of products brewed with CDC PolarStar indicated that the LOX-1 null trait did not affect the wort and beer quality. This is the first time that the LOX-1 null trait has been introduced to a barley variety that is commercially cultivated in North America.

## **Breeding the lipoxygenase-1 null malting barley variety SouthernStar suitable for cultivation in Australia**

Flagship is a two-rowed malting barley variety cultivated in Australia, and its malting quality has been well evaluated. The LOX-1 null trait was introduced into Flagship by successive backcross and MMAS to develop a LOX-1 null malting barley variety adapted for cultivation in Australia. Thus, SouthernStar was successfully developed as the first LOX-1 null malting barley variety in Australia.

The yield potential, agronomic performance, disease resistance, and general malting quality of SouthernStar and Flagship were almost identical. Brewing trials were conducted using a pilot-scale brewing apparatus to evaluate the effects of the LOX-1 null trait on beer quality. The wort and beer quality of SouthernStar and Flagship were similar.

## **Breeding the lipoxygenase-1 null malting barley variety Satuiku 2 go for Hokkaido, Japan**

Ryohfu is the only spring-sown malting barley variety cultivated in Hokkaido, located in the northern part of Japan, and it has been used in the Japanese brewing industry for >20 years. Satuiku 2 go was successfully developed as the first LOX-1 null malting barley variety in Japan by successive backcross and MMAS to introduce the LOX-1 null trait into the recurrent parent Ryohfu.

The agronomic performance and general malt quality of Satuiku 2 go were almost equivalent to those of Ryohfu. Wort and beer analyses of the pilot-scale brewing trial indicated that the LOX-1 null trait had little effect on the general characteristics of wort and beer.

## **Foam and flavor stabilities of beer made with LOX-1 null malting barley varieties**

Beers made with the LOX-1 null malting barley varieties showed a lower level of THOD and

T2N compared with those made with the control malt including the recurrent parents. Although the THOD content of beers brewed with LOX-1 null varieties was lower than that of the control beers, the foam stability of those beers did not improve.

The T2N content of beers brewed with LOX-1 null varieties stored in various storage conditions was generally lower than that of the control beers. The sensory evaluation of well-trained panelists showed significant superiority of the beers made with the LOX-1 null varieties in terms of staleness. Thus, the positive effects of the LOX-1 null trait for the reduction in T2N and the suppression of beer staleness were verified. It was the most obvious for beers stored at 30°C for 1 month.

In the trials for CDC PolarStar, several brewing trials were conducted under several brewing conditions at various facilities. The sensory evaluations showed significant superiority of CDC PolarStar beers in terms of staleness in almost all the trials, and the positive effect of the LOX-1 null trait was more apparent in low malt beer conditions. Moreover, the present study showed that the LOX-1 null trait can contribute to the reduction in T2N and staleness in beer produced at commercial-scale breweries, and the LOX-1 null trait is industrially practical and applicable.

In the SouthernStar trials, the positive effects of the LOX-1 null trait for the reduction in T2N and the suppression of beer staleness were also verified for beer stored at 20°C for 5 months. To date, the effects of the LOX-1 null trait on staleness for beer stored at a relatively lower temperature, such as 20°C, has not been reported. Thus, the LOX-1 null trait may help to retain the freshness of beer in a wider range of storage conditions, which is more likely to happen with the commercial distribution of beer.

The results of the present study indicate that the LOX-1 null trait can function within different genetic backgrounds of the recurrent parents used for the development of LOX-1 null malting barley varieties. The breeding of LOX-1 null barley varieties for multiple barley-producing areas can contribute to the secure procurement of LOX-1 null malt from different sources.

The strategy for breeding the LOX-1 null malting barley variety with a combination of successive backcross and MMAS is practical and effective for developing lines with the LOX-1 null trait and other traits, such as agronomic performance, malting quality, and brewing quality. Presently, traditional crossbreeding using the developed varieties in this study as parents is in progress in various barley-producing areas such as Canada, Australia, Europe, and Japan. It is expected that superior LOX-1 null varieties with higher agronomy and quality will be developed and used in the near future.

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、全過程を通して東京農業大学生物産業学部吉田穂積教授には終始懇切な御指導、御激励と論文の御高閲を賜り、ここまでお導きいただくとともに、同大学網走寒冷地農場における育種試験の実施に多大なる御協力を頂いた。また、同部伊藤博武教授、小栗 秀教授、妙田貴生教授には論文の御高閲を賜った。

カナダ・サスカチュワン大学 Dr. Bryan Harvey 教授、Dr. Brian Rossnagel 教授、オーストラリア・アデレード大学 Dr. Jason Eglinton 教授とその研究室のスタッフには、共同育種における育種試験の実施に多大なるご協力とご指導を頂いた。

サッポロビール株式会社バイオ研究開発部長須田成志氏、斉藤 渉氏、金谷良市博士、木原 誠博士、廣田直彦博士、大串憲祐博士、同社酒類技術研究所飯牟禮隆博士、すでにご退職された伊藤一敏博士、林 勝弘氏、山田眞司氏らには、研究全体にわたりご協力、ご意見、ご指導を頂いた。

また、同社商品・技術イノベーション部蛸井 潔博士には、醸造分野の立場から多大なるご協力、ご助言、御指導を頂いた。

また、バイオ研究開発部麦育種開発センターおよび原料品質管理センターの皆様には、研究推進の上での材料養成および分析など種々のご協力を頂いた。また、同社商品・技術イノベーション部、各工場の皆様には、醸造試験の実施にご尽力を頂いた。

最後に保木千賀子、陽人、日向子には、本論文の完成にご協力いただいた。

ここに、以上の皆様方に対し、心より感謝の意を表します。

誠にありがとうございました。

## 引用文献

- Bamforth, C.W., Muller, R.E., and Walker, M. D. (1993) Oxygen and Oxygen Radicals in Malting and Brewing: A Review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 51, 3, 79-88.
- Bamforth, C.W. (1999) The science and understanding of the flavour stability of beer: A critical assessment. *Brauwelt Int.* 17, 98-110.
- Baxter, E.D. (1982) Lipoxygenase in malting and mashing. *J. Inst. Brew.* 88, 390-396.
- Bech, L.W., Vaag, P., Heinemann, B., and Breddam, K. (1995) Throughout the brewing process barley lipid transfer protein 1 (LTP1) is transformed into a more form-promoting form. *Eur Brew. Conv. Congr. Proc., Brussels* 25, 561-568.
- Davies, C.S., and Nielsen, N.C. (1986) Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-2 in soybean. *Crop Sci.* 26 (3), 460–463.
- Doderer, A., Kokkelink, I., van der Veen, S., Valk, B., Schram, A. W., and Douma., A. C. (1992) Purification and characterization of two lipoxygenase isozymes from germinating barley. *Biochem. Biophys. Acta* 1120, 97-104.
- Drost, D.W., Van den Berg, R., Freijee, F.J.M, Velde, E.G. and Holleman, S.M. (1990) Flavor Stability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 48, 124-131.
- Dumoulinm, M., and Boivin, P. (2001) Industrial kilning technologies and their influence on organoleptic quality of malt. *Proc. EBC Congress, 28th* 200–209.
- Evans, D.E., and Hejgaard, J. (1999) The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part I. The effect of germination and kilning on the level of protein Z4, protein Z7 and LTP1. *J. Inst. Brew.* 105, 159-169.
- European Brewery Convention (2010) In: *Analytica European Brewery Convention, seventh ed.* Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
- Feussner, I., Hause, B., Voros, K., Parthier. B., and Wasteranack, C. (1995) Jasmonate-inducible lipoxygenase forms are located in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgale* cv. Salome).

Plant J. 7, 949-957

Food and Agriculture Organization of the United Nations, (2020) Food and agriculture data

<http://www.fao.org/faostat/en/#home>

Hills, A.L., Paynter, B.H., Harasymow, S., and Tarr, A. (2009) New malting varieties less susceptible to pre-harvest sprouting than Hamelin and Flagship. In: Proc. 14<sup>th</sup> Australian Barley Technical Symposium.

Hirota, N., Kaneko, T., Kuroda, H., Kaneda, H., Takashio, M., Ito, T., and Takeda, K.

(2005) Characterization of lipoxygenase-1 null mutants in barley. *Theor. Appl. Genet.* 111, 1580-1584.

Hirota, N., Kuroda, H., Takoi, K., Kaneko, T., Kaneda, H., Yoshida, I., Takashio, M., Ito, K., and Takeda, K. (2006a) Brewing Performance of Malted Lipoxygenase-1 Null Barley and Effect on the Flavor Stability of Beer. *Cereal Chemistry* 83, 250-254.

Hirota, N., Kuroda, H., Takoi, K., Kaneko, T., Kaneda, H., Yoshida, I., Takashio, M., Ito, K., and Takeda, K. (2006b) Development of novel barley with improved beer foam and flavor stability— The impact of lipoxygenase-1-less barley in the brewing industry. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 43, 2, 131–135.

Iimure, T., Nankaku, N., Hirota, N., Zhou, T.S., Hoki, T., Kihara, M., Hayashi, K., Ito, K., and Sato, K. (2010) Construction of a novel beer proteome map and its use in beer quality control. *Food Chem.* 118, 566-574.

Iimure, T., Kihara, M., Ichikawa, S., Ito, K., Takeda, K., and Sato, K. (2011) Development of DNA markers associated with beer foam stability for barley breeding. *Theor. Appl. Genet.* 112, 1, 109-120.

Iimure, T., Zhou, T.S., and Hoki, T. (2014) Development of CAPS markers and its use for malting barley breeding. *CLEAVED AMPLIFIED POLYMORPHIC SEQUENCES (CAPS) MARKERS IN PLANT BIOLOGY* Nova Science Publishers, Inc. 1510-165.

Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., and Kilian, A. (2001) Diversity arrays: A solid state

- technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res* 29, e25.  
<https://doi.org/10.1093/nar/29.4.e25>.
- Jamieson, A.M., and Van Gheluwe, J.E.A. (1970) Identification of a Compound Responsible for Cardboard Flavor in Beer. *Proceedings. Annual meeting - American Society of Brewing Chemists* 28, 1, 192-197.
- Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S., and Kamada, K. (1989) The role of free radicals in beer oxidation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 47, 49–53.
- Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S., and Kamimura, M. (1990) Effect of free radicals on haze formation in beer. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1909–1912.
- Kaneda, H., Kobayashi, N., Takashio, M., Tamaki, T., and Shinotsuka, K. (1999) Beer staling mechanism. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 36, 41-47.
- Kihara, M., Kaneko, T., and Ito, K. (2008) Genetic variation of beta-amylase thermostability among varieties of barley, *Hordeum vulgare* L., and relation to malting quality. *Plant Breeding* 117, 5, 425-428.
- Kitamura, K., Davies, C.S., Kaizuma, N., and Nielsen, N.C. (1982) Genetic analysis of a nullallele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. *Crop Sci.* 23 (5), 924–927.
- Kobayashi, N., Kaneda, H., Kuroda, H., Watari, J., Kurihara, T., and Shinotsuka, K. (2000) Behavior of Mono-, Di-, and trihydroxyoctadecenoic acids during mashing and methods of controlling their production. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 69-73.
- Kobayashi, N., Kaneda, H., Kuroda, H., Kobayashi, M., Kurihara, T., Watari, J., and Shinotsuka, K. (2000) Simultaneous determination of mono-, di-, and trihydroxy -octadecenoic acids in beer and wort. *J. Inst. Brew.* 106, 107-110.
- Kobayashi, N., Segawa, S., Umemoto, S., Kuroda, H., Kaneda, H., Mitani, Y., Watari, J., and Takashio, M. (2002) A New Method for Evaluating Foam-Damaging Effect by Free Fatty Acids. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 60, 37-41.
- Kuroda, H., Kobayashi, N., Kaneda, H., Watari, J., and Takashio, M. (2002) Characterization of



- factors that transform linoleic acid into di- and trihydroxyoctadecenoic acid in mash. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 73-77.
- Kuroda, H., Furusyo, S., Maeba, H., and Takashio, M. (2003) Characterization of factors involved in the production of 2(E)-nonenal during mashing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 691-697.
- Kuroda, H., Maeba, H., and Takashio, M. (2003) Enzymes that Transform Linoleic Acid into Di- and Trihydroxyoctadecenoic Acids in Malt. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 40, 11-16.
- Larsen, O. V., Aastrup, S., Nielsen, H., and Lillelund, A.C. (2001) Improvement of flavour stability by reduction of trans-2-nonenal – A case study *Proc. EBC Congress, 28<sup>th</sup> 56*, 1-7.
- Lermusieau, G., Noël, S., Liégeois, C., and Collin, S. (1999) Nonoxidative Mechanism for Development of *Trans* -2-Nonenal in Beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57, 1, 29-33.
- Maeda, M. (1999) Preventive production of beer against oxidation. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 36, 55-59.
- Lusk, L., Goldstein, H., and Ryder, D. (1995) Independent role of beer proteins, meranoidins and polysaccharides in foam retention. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 53, 93-103.
- McMichael, G.L., Eglinton, J.K., Barr, A.R., and Chalmers, K.J. (2001) Developing marker-trait associations in the population Chieftan/Barque/Manley/VB9104, using novel techniques. In: *Proc. 28th EBC Congress 56*, 1–7.
- Meligaard, M.C. (1975) Flavor chemistry of beer. II. Flavor and threshold of 239 aroma volatiles, *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 12, 151–168.
- Murray, M.G., and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321–4325.
- Neeraja, C.N., Maghirang-Rodriguez, R., Pamplona, A., Heuer, S., Collard, B. C. Y. , Septiningsih, E. M., Vergara, G., Sanchez, D., Xu, K. , Ismail, A. M., and Mackill, D. J. (2007) A marker -assisted backcross approach for developing submergence -tolerant rice cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 115, 767–776.
- Ogushi, K., Barr, A.R., Takahashi, S., Asakura, T., Takoi, K., and Ito, K. (2002) Lofty Nijo: a high

- quality malting barley variety released from an Australian - Japanese collaboration. *J. Inst. Brew.* J. 108, 1, 13-18.
- Pfeiffer, P.W., Hildebrand, D.F., and TeKrony, D.M. (1991) Agronomic performance of soybean lipoxygenase isolines. *Crop Sci.* 32(2), 357-362.
- Plant breeders' rights office, Canadian Food Inspection Agency  
<https://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/pbrpov/cropreport/bar/app00001029e.shtml>
- Robinson, D.S., Wu, Z.C., Domoney, C., and Casey, R. (1995) Lipoxygenases and the quality of foods. *Food Chemistry* 54, 33–43.
- Sato, K., Narita, H., Ochi, H., Kira, K., and Morimura, K. (1990) A new malting barley variety, 'Ryohfu', *Hokkaido Pref. Kitami Agric. Exp. Stn.* 61, 31–43.
- Shirasawa, K., Takeuchi, Y., Ebitani, T., and Suzuki, Y. (2008) Identification of gene for rice (*Oryza sativa*) seed lipoxygenase-3 involved in the generation of stale flavor and development of SNP markers for lipoxygenase-3 deficiency. *Breed Sci.* 58, 169–176.
- Shimizu, C., Ohno, M., Araki, S., Furusyo, S., Watari, J., and Takashio, M. (2002) Effects of reduction of carbonyl compounds by yeast on flavor stability of Happosyu. *J. Am. Soc. Chem.* 60, 122–129.
- Sorensen, S.B., Bech, L.M., Muldberg, M., Beenfeldt, T., and Bredda, K. (1993) Barley lipid transfer protein 1 is involved in beer foam formation. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 30, 135-145.
- Takashio, M., and Shinotsuka, K. (2001) Continuing progress wit/hanti-oxidative production system. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 38, 41-45.
- The Prairie Recommending Committee for Oat and Barley (2016) 'PRCOB Operating Procedure'  
[http://www.pgdc.ca/committees\\_ob.html](http://www.pgdc.ca/committees_ob.html)
- Ueda, T., Sasaki, K., Inomoto, K., Kono, K., Kagami, N., Shibata, K., and Eto, M. (2001) Development of novel malt evaluation method for improving beer flavor stability. *Proc. EBC Congress*, 28<sup>th</sup> 55, 1-9.

- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., and Derdelinckx, G. (2006) The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chemistry* 95, 357-381.
- Van Nierop, S.N.E., Evans, D.E., Axcell, B.C., Cantrell, I.C., and Rautenbach, M. (2003) Impact of different wort boiling temperatures on the beer foam stabilizing properties of lipid transfer protein 1. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3120-3129.
- Walker, M.D., Hughes, P.S., and Simpson, W.J. (1996) Use of chemiluminescence HPLC for measurement of positional isomers of hydroperoxy fatty acids in malting and the protein rest stage of mashing. *J. Sci. Food Agric.* 70, 341-346.
- Wilcox, J.R., and Cavins, J.F. (1994) Backcrossing high seed protein to a soybean cultivar. *Crop Science* 35, 4, 1036-1041.
- Wu, Y., Schwarz, P.B., Doehlert, D.C., Dahleen, L.S., and Horsley, R. D. (1997) Rapid separation and genotypic variation of barley (*Hordeum vulgare* L.) lipoxygenase isozymes. *J. Cereal Sci.* 25, 49-56.
- Yabuuchi, S. (1976) Occurrence of a new lipoxygenase in germinating barley embryo. *Agric. Biol. Chem.* 40: 1987-1992.
- Yang, G., Schwarz, P.B., and Vick, B. A. (1993) Purification and characterization of lipoxygenase isozymes in germinating barley. *Cereal Chem.* 70, 589-595.
- Yang, G., and Schwarz, P. B. (1995) Activity of lipoxygenase isozymes during malting and mashing. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 53, 45-49.
- Yang
- Xu, Y., Zhang, X.Q., Harasymow, S., Westcott, S., Zhang, W., and Li, C. (2018) Molecular marker assisted backcrossing breeding: an example to transfer a thermostable beta-amylase gene from wild barley. *Mol. Breeding* 38: Article number: 63 <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0828-8>
- Zhou, T.S., Iimure, T., Kanatani, R., Hirota, N., Kihara, M., Hoki, T., and Sato, K. (2012) Malting quality quantitative trait loci on a high-density map of Mikamo golden × Harrington cross in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Mol. Breeding* 30, 103-112.

荒井正一、金谷良市、斉藤 渉、保木健宏、木原 誠、高橋 進、小林千裕、七森理仁、吉田慎一郎、山田眞司（2011）複合耐病性を有する高品質ビール大麦品種「彩の星」の育成 第120回日本育種学会大会（秋季大会）

黒田 久夫(2001) 穀類中のリポキシゲナーゼ活性の測定方法 日本特許庁 特許公開 2001 - 29097 .

増田 澄夫、ビール麦の育種史を作る会 編（1993）わが国におけるビール麦育種史 p40-42.

Google patent, カールスバーグ社特許（US9363959B2）

<https://patents.google.com/patent/US9363959B2/en>

財務省, 財務省貿易統計 <https://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>

Rahr Malting社（2017）世界の製麦会社の製造能力

農林水産省, 農林水産省品種登録データベース

[http://www.hinshu2.maff.go.jp/vips/cmm/apCMM112.aspx?TOUROKU\\_NO=24752&LANGUAGE=Japanese](http://www.hinshu2.maff.go.jp/vips/cmm/apCMM112.aspx?TOUROKU_NO=24752&LANGUAGE=Japanese)

農林水産省（2018）平成30年度 麦の需給に関する見通しおよび麦の参考統計表