

氏 名	保 木 健 宏		
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (生物産業学)		
学位記番号	乙 第 948 号		
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 17 日		
学位論文題目	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		
論文審査委員	主査 教 授・博士 (農学)	吉 田 穂 積	
	教 授・博士 (生物産業学)	伊 藤 博 武	
	教 授・博士 (学術)	小 栗 秀	
	教 授・博士 (農学)	妙 田 貴 生	

論文内容の要旨

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ことが分かっている。この T2N 生成経路の一つであるリノール酸の酵素的酸化にリポキシゲナーゼ (lipoxygenase, 以下 LOX) が関与していることが知られている (Walker, Hughes & Simpson, 1996)。これまでのビール製品では、製麦・醸造工程において、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が採られてきた。しかし、このアプローチは、LOX 活性以外の麦芽品質への影響などの欠点を有する。一方、LOX 活性が低いオオムギを使用することは、ビール製造工程や麦芽品質等に制約を与えることなく香味耐久性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。そこで、本論文では、主要オオムギ産地である北米、豪州、北海道に適応した 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 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し、その農業特性、麦芽品質と醸造特性及び育成品種の 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対する影響を明らかにすることを目的とした。

まず、第2章で北米に適応した 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検討した。すなわち、カナダ・サスカチュワン大学 Crop Development Centre において開発された高品質の二条ビールムギ品種「CDC Kendall」を戻し親とし、種子中の LOX-1 活性が認められない在来種「OUI003」を1回親として連続戻し交配と 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、かつ優良な麦芽品質や農業特性を備える品種の育成を実施した。その結果、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」と同等である北米初の LOX-1 欠失オオムギ品種「CDC PolarStar」の育成に成功した。これまでに 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明らかにされておらず、本結果から、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 欠失形質をビールムギ育種に利用できる知見が初めて得られた。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および商業スケール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。

次に、第3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、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検討した。すなわち、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る「Flagship」を戻し親とし、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、一般的な交配育種により育成された LOX-1 欠失系統を1回親として連続戻し交配と 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、かつ優良な麦芽品質や農業特性を備える品種の育成を実施した。その結果、耐病性を含む農業特性は、豪州の大麦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ている「Flagship」と比較し大きな差は認められず、豪州における栽培に適応できる「SouthernStar」の育成に成功した。しかしながら、戻し親であった「Flagship」と同様に「SouthernStar」においても穂発芽が観察された。これは、穂発芽に関する形質が「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が、育種過程における麦芽品質分析において酵素力の指標である DP/TN が「SouthernStar」で低い傾向を示した。しかし、この傾向は、他の育成品種の結果をふまえ、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。醸造品質は、麦汁品質、発酵経過及び一般的なビール品質の評価項目について、対照品種との間にほとんど差がなく、特に問題となる点は認められなかった。以上の結果より「SouthernStar」がビール醸造に適した品種であることが示唆された。これらの結果から豪州初の 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。

第 4 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、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検討した。すなわち、平成 4 年より北海道のビールオオムギ優良品種として栽培されてきた「りょうふう」を戻し親とし、LOX-1 欠失形質をもつ「OUI003」を 1 回親として連続戻し交配と 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、かつ優良な麦芽品質や農業特性を備える品種の育成を実施した。その結果、「りょうふう」と比較し収量性やその他の農業特性について有意な差を持たない「札育 2 号」の育成に成功した。

これらの結果から「CDC PolarStar」や「SouthernStar」における結果と同様に LOX-1 欠失形質がオオムギの農業特性に対し大きな影響を与えないことが明らかとなった。また、「札育 2 号」は「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適切な穂発芽耐性を有すると判断された。「札育 2 号」の麦芽の LOX 活性が低減していたが、主要な麦芽品質に大きな影響を認められず、これも「CDC PolarStar」と北海道「SouthernStar」と同様の結果を得られた。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ており、この点は今後製造現場での利用時に製麦工程で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、検討する必要があると考えられた。「札育 2 号」の醸造品質は、麦汁品質、発酵経過及び一般的なビール品質の評価項目について、「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ことから「札育 2 号」がビール醸造に適した品種であると考えられた。これらの結果から本邦初の 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、北海道において、良好な麦芽品質を有する LOX-1 欠失オオムギ品種育成に成功した。

第 5 章では、本論文で育成された LOX-1 欠失形質品種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及び商業スケール醸造設備で検証した。その結果、「CDC PolarStar」「SouthernStar」および「札育 2 号」から製造したビールでは、泡持ちを低下させる原因物質であるトリヒドロキシオクタデセン酸 (Trihydroxyoctadecenoic acid, 以下 THOD) や T2N などのビール品質を低下させる物質の含量が対照と比較し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、対照品種から製造したビー

ルと比較し、LOX-1 欠失品種から製造したビールにおける泡持ちの改善は明確にすることはできなかった。

一方、官能評価の結果、LOX-1 欠失オオムギ品種から製造したビールは、香味の老化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。さらに、「CDC PolarStar」における試験では、パイロットスケールや商業スケールの醸造設備を用い、複数の条件で醸造試験を実施した結果、ほぼすべての試験の官能評価において、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 の低減効果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。特に、20℃5 か月の保存品でも LOX-1 欠失形質の効果が確認され、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の新鮮さの保持に寄与する可能性が示された。

以上、本論文において育成した「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戻し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、本論文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、複数の戻し親の異なる遺伝的背景において効果を発揮することを明らかにできた。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 の低減効果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も初めて明らかにすることができた。

審査報告概要

本論文は、主要オオムギ産地である北米、豪州、北海道に適応した世界初の LOX-1 欠失形質を導入したビールオオムギ品種の早期育成と育成品種の 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対する影響を明らかにしたものである。まず第1章では北米でその農業特性や麦芽品質が評価されている二条ビールムギ品種「CDC Kendall」を戻し親と

し、種子中の LOX-1 活性が認められない在来種「OUI003」を 1 回親として連続戻し交配と分子マーカーによる選抜による育種戦略により、LOX-1 欠失形質を有し、かつ優良な麦芽品質や農業特性を備える品種の育成を実施し、北米初の LOX-1 欠失オオムギ品種「CDC PolarStar」の育成に成功した。この育成結果よりオオムギにおいて 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 欠失形質をビールムギ育種に利用できることを明らかにした。また、LOX-1 欠失形質のビール品質への影響は、LOX-1 活性がないことにより影響がでると想定される形質以外の一般的な麦汁やビール品質の項目に対し LOX-1 欠失形質は大きな影響を与えないことも明らかとした。第 2 章では豪州の大麦生産者に受け入れられ、豪州初の LOX-1 欠失オオムギ品種「SouthernStar」の育成に成功した。第 3 章では、本邦初で北海道に適した LOX-1 欠失オオムギ品種である「札育 2 号」の育成に論じ、その醸造品質の特性を明らかにされた。さらに、第 5 章ではこれら新たに育成された LOX-1 欠失形質品種の泡持ちや香味耐久性に対する効果を商業スケール醸造設備で検証し、本論文で育成された LOX-1 欠失大麦品種から製造したビールでは、泡持ちを低下させる原因物質や老化臭原因物質である T2N などのビール品質を低下させる物質の含量が既存品種と比較し減少することを明らかとし、LOX-1 欠失オオムギ品種が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した。

これらの成果は、①育種的手法を用いて変異遺伝子を栽培品種に導入し、多段階の戻し交配を経ることで母品種とゲノム構成が 99 % 同一な栽培大麦品種の作出に成功した。②作出した LOX-1 活性欠失大麦系統の農業上の形質を反復親系統と比較し、耐病性、収量等の栽培特性が同等であることを示した。③LOX-1 活性欠失大麦系統を用いた醸造試験を行い、反復親大麦系統を用いたビールと醸造上の特性は同等であるだけでなく、保存したビールにおける老化臭低減効果が実証された。さらに、LOX-1 欠失形質が LOX-1 欠失オオムギ品種の育成に用いた複数の戻し親の異なる遺伝的背景において効果を発揮することを初めて明らかにした。

本論文は、ビールの老化対策を原料の面から挑戦し、世界初の LOX-1 欠失品種を開発して商品化に結びつけ、LOX-1 欠失形質オオムギがビール産業に大きな貢献をすることを示唆しており、審査委員一同は博士（生物産業学）の学位を授与する価値があると判断した。