

たかはし あすか

氏名（本籍地） 高橋飛鳥

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農博第1198号

学位授与年月日 平成30年3月27日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項

研究科，専攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科応用生命科学専攻

論文題目 オオムギのホルドインドリリングが精麦品質に及ぼす影響に関する研究

博士論文審査委員（主査）教授 西尾 剛

教授 鳥山 欽哉

教授 本間 香貴

論文内容要旨

オオムギのホルドインドリンが
精麦品質に及ぼす影響に関する研究
Studies of the effects of a *hordoindoline* gene on grain
and pearling quality traits in barley

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

高橋 飛鳥

指導教員

西尾 剛 教授

第1章 緒言

国産オオムギは、自給率向上の点でも、実需者からも、生産拡大と安定供給が求められている。一方で、オオムギは、麦ごはん・味噌・焼酎・麦茶・ビール用など、様々な用途があるため、加工用途に応じた高品質な原料が求められており、生産者の収益性を確保するためには用途ごとに求められる品質を達成することが必要である。オオムギを味噌や焼酎、麦ごはん用として利用するためには、穀粒の外皮と糊粉層を含む糠層を削る搗精を行い、精麦という形状にする必要がある。「搗精のしやすさ」つまり精麦品質は、オオムギにおいて極めて重要な形質のひとつである。

精麦品質とそれに関わる形質は、原麦特性と精麦特性に分けられる。原麦特性としては、穀粒硬度、硝子率などがあり、精麦特性としては、搗精時間、砕粒率、精麦白度などがある。穀粒硬度が高いと搗精時間が長くなり、搗精コストが高くなる。一方、硬度が低いと搗精時間は短くなるが砕粒率が高くなり品質が低下することが明らかになっている。また、硝子率が上がると、精麦白度が低くなるとともに、精麦時間が長くなることが報告されている。精麦品質は重要な形質であるとともに、原麦特性と精麦特性が互いに影響を与え合う複雑な形質である。しかし、精麦品質の評価には多量の供試材料が必要であり、後期世代まで評価することが出来ない。育種の初期世代での選抜のため、少量でも評価可能な手段が求められている。

コムギでは5D染色体短腕に位置する種子タンパク質ピュロインドリンの遺伝子が欠失すると穀粒硬度が高くなり、穀粒が硝子化することが知られている。ホルドインドリン遺伝子はピュロインドリン遺伝子と相同性がある。ホルドインドリン遺伝子は5H短腕に位置し、ホルドインドリン a、ホルドインドリン b-1、ホルドインドリン b-2の遺伝子である *Hina*, *Hinb-1*, *Hinb-2*がある。しかし、ホルドインドリンがオオムギの穀粒硬度や硝子率、その他精麦品質に影響するかどうかは明らかになっていない。

本研究では、オオムギの種子タンパク質ホルドインドリンの食用オオムギにおける穀粒硬度や硝子率等の精麦品質への影響を明らかにすることを目的とした。このため、ホルドインドリン b-2 タンパク質が欠失する遺伝子型 *Hinb-2b* を見出し、*Hinb-2b* を持つ系統と正常型の *Hinb-2a* を持つ系統と、これらを両親として作成した F₂ 集団および準同質遺伝子系統を用いて、ホルドインドリンが精麦品質におよぼす影響について検討した。

第 2 章 オオムギ種子タンパク質ホルドインドリンが穀粒硬度におよぼす影響

第 1 節 ホルドインドリンの遺伝子型と穀粒硬度の品種間差

ホルドインドリンと精麦品質との関係を調べるにあたり、精麦品質のうち、まず原麦特性である穀粒硬度と遺伝子型との関係を調べることにした。穀粒硬度に差のある国内品種・系統のホルドインドリンタンパク質の有無を調べて、ホルドインドリン遺伝子型を分析して、ホルドインドリン遺伝子型と穀粒硬度との関係を調べた。

オオムギ 10 品種・系統のホルドインドリンタンパク質を 2 次元電気泳動 (IPG×SDS-PAGE) で単離し、N 末端のアミノ酸配列を解析してタンパク質を同定したところ、ホルドインドリン b-2 (HINB-2) タンパク質のスポットが欠失している系統が存在した (Fig. 1)。また、同 10 品種・系統の *Hina*、*Hinb-1*、*Hinb-2* 遺伝子の全長塩基配列の解析を行ったところ、それぞれ 2 種類の遺伝子型が見つかった (Table 1)。*Hina* の対立遺伝子を *Hina-a* と *Hina-b*、*Hinb-1* の対立遺伝子を *Hinb-1a* と *Hinb-1b*、*Hinb-2* の対立遺伝子を *Hinb-2a* と *Hinb-2b* とした。このうち、*Hinb-2b* は、*Hinb-2a* と比較して、4 塩基置換と 1 塩基欠失があり、推定アミノ酸配列は、この 1 塩基欠失によるフレームシフトでストップコドンを生じており、*Hinb-2b* 遺伝子型を持つ系統は、2 次元電気泳動による解析でも HINb-2 のスポットが欠失していた (Fig. 1, Fig. 2)。*Hinb-2* 遺伝子型と穀粒硬度を比較したところ、HINb-2 欠失型の *Hinb-2b* を持つ品種・系統は、正常型の *Hinb-2a* を持つ系

統よりも有意に穀粒硬度が高かった (Table. 1)。以上の結果より、*Hinb-2*の変異が穀粒硬度を高める可能性が示唆された。

第2節 F₂集団におけるホルドインドリンの遺伝子型と穀粒硬度の関係の解析

品種間差の解析だけでは、遺伝的背景の違いによる差である可能性を排除できない。また、穀粒硬度への寄与が大きいβ-グルカン含量やタンパク質含量、粒重の影響をさらに検討する必要があるため、*Hinb-2a*と*Hinb-2b*を持つ系統間の交配によるF₂集団を用いて、ホルドインドリンと穀粒硬度の関係を明らかにすることとした。

F₂個体の*Hinb-2*の遺伝子型を判定するために、第410塩基の*SaI*制限酵素サイトを利用した*Hinb-2a*と*Hinb-2b*を判定する遺伝子判別マーカーとして、CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) マーカーを作成した。第410番目の1塩基置換により、*SaI*制限酵素サイトは、*Hinb-2a*では存在するが、*Hinb-2b*では存在しないため、判別が可能である。このCAPSマーカーは共優性マーカーであり、ホモとヘテロの系統の判別も可能であった (Fig.3)。

欠失型の*Hinb-2b*を持つ「四国裸84号」と正常型の*Hinb-2a*の「四国裸115号」のF₂分離集団を作成し、CAPSマーカーにより*Hinb-2*遺伝子型を判定した。*Hinb-2a*ホモ型、*Hinb-2b*ホモ型と判定されたそれぞれ12個体の合計24個体について、穀粒硬度、粒重、粒径、タンパク質含量、β-グルカン含量を測定した。*Hinb-2b*ホモ型個体の穀粒硬度 (HI) は平均で59.7、*Hinb-2a*ホモ型個体の穀粒硬度 (HI) の平均45.8に比べて、有意に高かった (Table 2)。また、*Hinb-2b*ホモ型個体のβ-グルカン含量は平均3.4%で、*Hinb-2a*ホモ型個体の平均3.6%よりも差異は小さいが有意に低かった。なお、*Hinb-2a*と*Hinb-2b*のヘテロ型の個体の穀粒硬度 (HI) の平均49.2は、それぞれのホモ型個体の中間の値であった。F₂個体の穀粒硬度の分布は、2つの遺伝子型で完全に分かれており、こ

の遺伝子型の効果が大きいことが明らかになった (Fig. 4a)。一方、 β -グルカン含量の分布は、2つの遺伝子型で重なっていた (Fig. 4b)。

以上の結果より、オオムギにおいて、ホルドインドリン **b-2** の変異が穀粒硬度に関与することを明らかにした。

第3章 オオムギ種子タンパク質ホルドインドリンが精麦品質におよぼす影響

第1節 準同質遺伝子系統におけるホルドインドリンの遺伝子型と精麦品質の関係の解析

Hinb-2 の穀粒硬度以外の精麦品質への影響を明らかにするため、*Hinb-2b* を持つ準同質遺伝子系統を用いて *Hinb-2* の精麦品質全体への影響を調べた。「四国裸 84 号」と「四国裸 109 号」の F₁ に「四国裸 84 号」を 4 回戻し交雑して、*Hinb-2a* を持つ「四国裸 84 号」の準同質遺伝子系統「四国裸 84 号-*Hinb-2a*」と、同様に「四国裸 84 号」と「四国裸 109 号」の F₁ に「四国裸 109 号」を 4 回戻し交雑して、*Hinb-2b* を持つ「四国裸 109 号」の準同質遺伝子系統「四国裸 109 号-*Hinb-2b*」を作成した。これらの準同質遺伝子系統と反復親の穀粒硬度、搗精時間、砕粒率、硝子率の比較を行った。

正常型の「四国裸 84 号-*Hinb-2a*」や「四国裸 109 号」に比べて欠失型の *Hinb-2b* を持つ「四国裸 84 号」や「四国裸 109 号-*Hinb-2b*」では、穀粒硬度と硝子率が有意に高く、搗精時間が長く、砕粒率が低くなった。走査型電子顕微鏡を用いて胚乳内部の微細構造を調べたところ、欠失型の *Hinb-2b* 型では *Hinb-2a* 型に比べて澱粉粒表層にマトリックスタンパク質が多く接着し一体化していた。コムギでも同様に、ピュロインドリンが欠失している硬質コムギでは、正常型の軟質コムギに比べて澱粉粒表層にマトリックスタンパク質が多く接着していた。

以上より、HINb-2 タンパク質が欠失した *Hinb-2b* 遺伝子型では、硬質コムギと同様の胚乳の微細構造を示し、このために、穀粒硬度と硝子率が高く、搗精時間が長く、砕粒率が

低くなることが示唆された。

第 2 節 異なるタンパク質含量を持つオオムギ穀粒におけるホルドインドリンの精麦品質におよぼす影響

穀粒硬度や硝子率は、タンパク質含量との関係が示唆されている。しかし、タンパク質含量が異なる場合のホルドインドリンと精麦品質の関係は不明である。そこで、*Hinb-2b* の準同質遺伝子系統(NILs) を用いて実肥施肥量を変えることで、異なるタンパク質含量の穀粒における *Hinb-2* 遺伝子型と穀粒硬度や硝子率との関係を調べた。

「四国裸 109 号」に 5 回の戻し交雑で欠失型の *Hinb-2b* を導入した系統「四国裸 109 号-*Hinb-2b*」に、異なる実肥施肥(NK 0, 0.3, 0.6 kg/a, 各 2 区)を行い、タンパク質含量と穀粒硬度と硝子率を測定したところ、「四国裸 109 号」と「四国裸 109 号-*Hinb-2b*」のいずれの供試系統においても、実肥量増加に伴いタンパク質含量が有意に増加した。穀粒硬度は、実肥 0, 0.3, 0.6 kg/a のいずれの処理においても、*Hinb-2b* 型は正常型に比べて高かった。硝子率は、実肥 0, 0.3, 0.6 kg/a のいずれの処理においても、同程度のタンパク質含量ならば *Hinb-2b* 型は正常型に比べて高かった。以上より、ホルドインドリンが欠失すると、タンパク質含量に関わらず、穀粒硬度と硝子率が高くなることが示された。

第4章 総合考察

HINb-2 が欠失すると、原麦特性としては、硝子率と穀粒硬度が上がり、精麦特性としては、搗精時間が長くなり、砕粒率が下がることを示した。また、元々この変異型を持つ系統を正常型に戻した場合、逆の傾向が見られたことから、これらの原麦特性、精麦特性の差が HINb-2 欠失型の遺伝子の効果と考えられた。さらに、追肥試験を行って、タンパク質含量の増加に関わらず HINb-2 が欠失すると穀粒硬度と硝子率が上がることを明らかにした。

HINb-2 が欠失すると、硬質コムギと同様にデンプンとマトリックスタンパク質が結合して、胚乳細胞質が強固に一体化することで種子穀粒硬度が上昇すると考えられる。デンプンとマトリックス蛋白質の隙間が少なくなることで胚乳がガラス化し乱反射が抑えられて、硝子率が上昇する。また、搗精は糠層と共に胚乳部分の一部を削り込むため、穀粒硬度が高いと搗精時間は長くなる。砕粒は胚乳が割れることで生じるため、胚乳細胞質が強固に一体化して胚乳組織全体が硬くなることで、砕粒率は低下すると考えられる。

以上より、HINb-2 は、欠失すると胚乳が硬質化するために、穀粒硬度、搗精時間、砕粒率、硝子率などの食用オオムギにおいて非常に重要な精麦品質に大きく影響するタンパク質である。これらのことから、この遺伝子型をターゲットにしたオオムギ育種は、今後のオオムギの品質向上に大きく貢献すると考えられる。*Hinb-2* の変異を利用して、加工目的に応じた穀粒硬度を持つ系統の選抜ができる可能性があると考えられた。

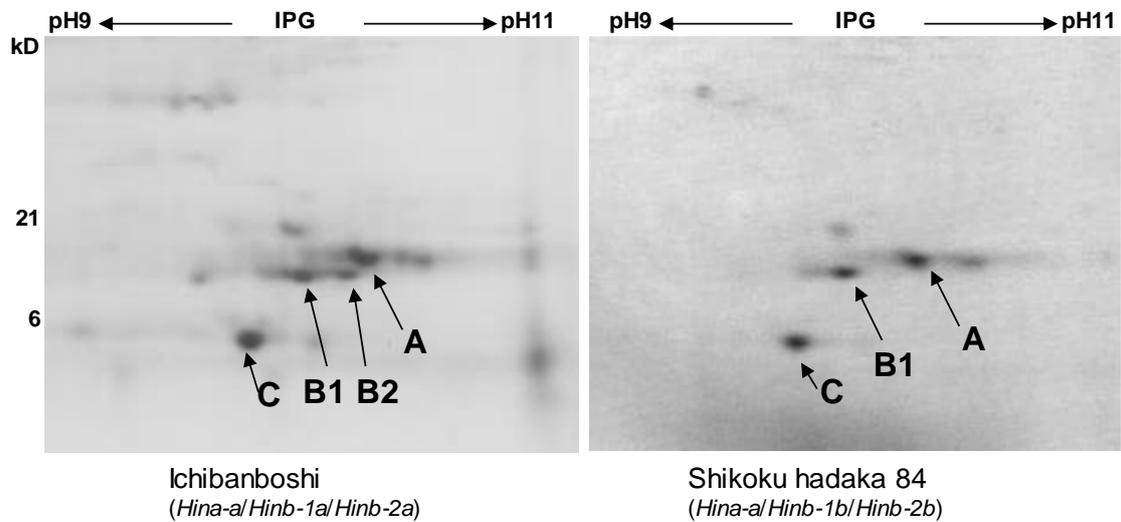


Fig. 1 Identification of HINa, HINb-1, and HINb-2 proteins by 2D-gel electrophoresis using ‘Ichibanboshi’ and ‘Shikoku hadaka 84’ with different HIN genotypes. A: HINa, B1: HINb-1, B2: HINb-2, and C: lipid transfer protein (C).

Table 1 *Hin* genotypes and grain characteristics of 10 barley cultivars/lines

Barley cultivars/lines	Row	Genotype			Hardness index (HI)	Grain weight (mg)	Grain diameter (mm)	β-glucan content (%)
		<i>Hina</i>	<i>Hinb-1</i>	<i>Hinb-2</i>				
Toyonokaze	Six row	<i>Hina-a</i>	<i>Hinb-1a</i>	<i>Hinb-2a</i>	61.6 e	36.1 de	2.7 d	4.5 d
Ichibanboshi	Six row	<i>Hina-a</i>	<i>Hinb-1a</i>	<i>Hinb-2a</i>	68.8 c	37.8 d	2.8 cd	4.4 d
Mannenboshi	Six row	<i>Hina-b</i>	<i>Hinb-1a</i>	<i>Hinb-2a</i>	75.2 b	35.6 e	2.7 cd	5.6 a
Sukai golden	Two row	<i>Hina-b</i>	<i>Hinb-1a</i>	<i>Hinb-2a</i>	60.4 d	46.9 b	2.9 a	3.8 f
Nishinohoshi	Two row	<i>Hina-b</i>	<i>Hinb-1a</i>	<i>Hinb-2a</i>	63.2 d	47.5 b	2.9 a	3.9 e
Shikoku hadaka 109	Two row	<i>Hina-b</i>	<i>Hinb-1a</i>	<i>Hinb-2a</i>	53.7 f	47.7 b	2.9 a	4.8 c
Shikoku hadaka 115	Two row	<i>Hina-b</i>	<i>Hinb-1a</i>	<i>Hinb-2a</i>	45.2 g	48.3 b	2.9 ab	3.8 f
Shikoku hadaka 84	Two row	<i>Hina-a</i>	<i>Hinb-1b</i>	<i>Hinb-2b</i>	79.2 a	43.2 c	2.8 bc	5.0 b
Miharu gold	Two row	<i>Hina-a</i>	<i>Hinb-1b</i>	<i>Hinb-2b</i>	69.9 c	51.4 a	2.9 ab	3.7 g
Shunrei	Two row	<i>Hina-a</i>	<i>Hinb-1b</i>	<i>Hinb-2b</i>	78.1 ab	51.4 a	2.9 ab	3.8 f

The same letters indicate that the values in the same column are not significantly different ($P < 0.05$) by Tukey-test.

HINb-2a	1	MKTLFLLALLALVASTTSAQYSVGGGYNDVGGGGGSQQ CPQ ERP NLGSCK	50
HINb-2b	1	50
▼			
HINb-2a	51	DYVMER CFT MKDFPV TWPTK WWKGG CE HEVREK CCQ QLS QIAPH CR CDAI	100
HINb-2b	51	100
.....			
HINb-2a	101	RGVIQ GKLGG IFGIGGGAVFKQIQRAQILPSK CN MGVD CR FPSGYYW	147
HINb-2b	101	.E*	102

Fig. 2 Alignment of the deduced HINb-2a and HINb-2b amino-acid sequences. Cysteine (C) residues are marked in bold-face type, and the sequence of TRD (tryptophan rich domain) is underlined. An arrowhead indicates the signal peptide cleavage site.

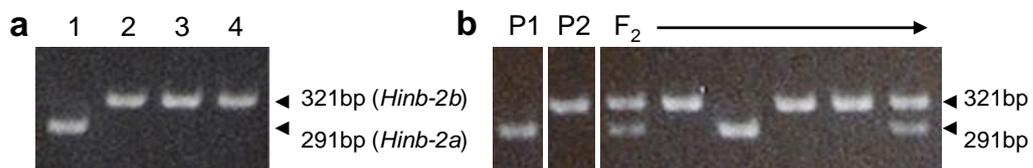


Fig. 3 Electrophoresis of CAPS products by 3% agarose gel. **a** lane 1: 'Shikoku hadaka 115'; lane 2: 'Shikoku hadaka 84'; lane 3: 'Shunrei'; lane 4: 'Miharu gold'. **b** P1: 'Shikoku hadaka 115'; P2: 'Shikoku hadaka 84'; F₂: F₂ lines from the cross 'Shikoku hadaka 84' / 'Shikoku hadaka 115'.

Table 2 Hardness index, grain weight, grain diameter, protein content, and β -glucan content of F₂ plants with different *Hinb-2* genotypes^a

F ₂ genotype	Hardness index (HI) ^b	Grain weight (mg) ^b	Grain diameter (mm) ^b	Protein content (%) ^b	β -glucan content (%) ^b
<i>Hinb-2a</i>	45.8±3.3 c	47.2±2.3 a	2.9±0.1 a	8.1±0.6 a	3.6±0.2 a
<i>Hinb-2b</i>	59.7±2.4 a	47.9±1.9 a	3.0±0.1 a	8.2±0.7 a	3.4±0.2 b
<i>Hinb-2a/Hinb-2b</i>	49.2±3.2 b	47.3±2.4 a	2.9±0.1 a	-	-

^a F₂ plants from the cross ‘Shikoku hadaka 84’ / ‘Shikoku hadaka 115’

^b The same letters indicate that the values in the same column are not significantly different (P<0.05) by Tukey-test.

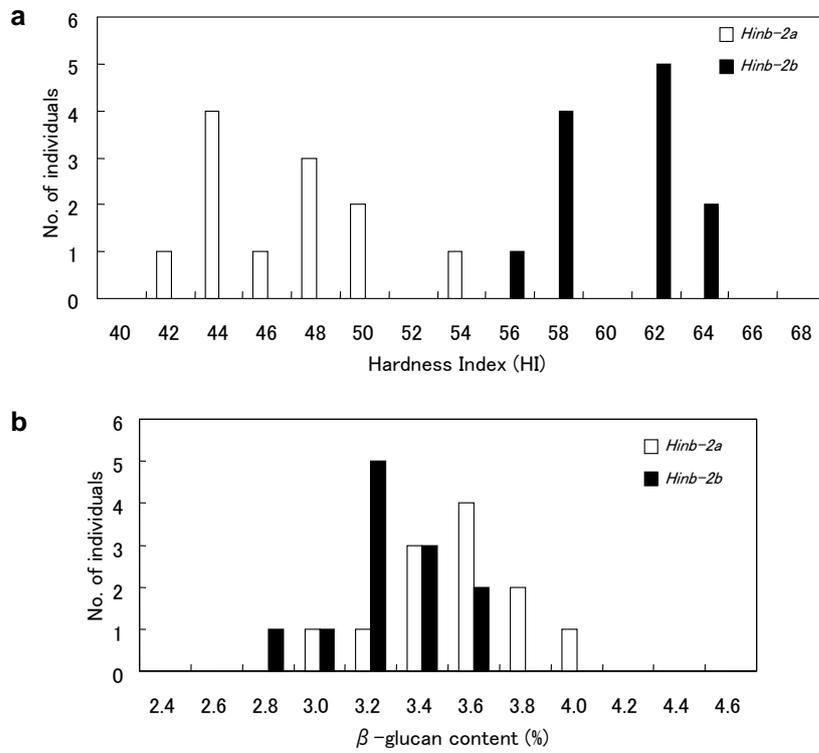


Fig. 4 Frequency distribution of hardness index (**a**) and β -glucan content (**b**) of F_2 plants with different *Hinb-2* genotypes. *Hinb-2a*: homozygotes of *Hinb-2a*, *Hinb-2b*: homozygotes of *Hinb-2b*.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名	高橋 飛鳥
審査委員	主査：教授 西尾 剛 副査：教授 鳥山 欽哉 教授 本間 香貴
学位論文 題目	オオムギのホルドインドリンドリンが精麦品質に及ぼす影響に関する研究
論文審査の結果の要旨	<p>オオムギを味噌や焼酎、麦ご飯として利用するには、搗精をして精麦にする必要があるが、搗精のしやすさ即ち精麦品質は極めて重要な形質である。精麦品質には、穀粒硬度や硝子率、砕粒率などがあり、精麦品質の評価には多量の試料が必要なため、少量でも評価可能な手段が求められている。本研究は、オオムギの種子タンパク質ホルドインドリンドリンの穀粒硬度や硝子率への影響を明らかにするために実施された。</p> <p>ホルドインドリンドリンを二次元電気泳動法で分析し、N末端アミノ酸配列分析により各スポットのタンパク質を同定した結果、ホルドインドリンドリン b-2 タンパク質 (HINb-2) を欠失している系統を見出した。その遺伝子の塩基配列を比較し、欠失型ではフレームシフト変異があることを明らかにした。HINb-2 欠失型の系統は、正常型の系統に比べて穀粒硬度が有意に高かったため、HINb-2 の有無が穀粒硬度に影響する可能性が示唆された。</p>

HINb-2 の穀粒硬度に対する影響を明らかにするため、HINb-2 欠失型と正常型の交配による F2 集団を用いて比較した。欠失型と正常型を簡易に判別するため、CAPS マーカーを開発した。これを用いて遺伝子型を判別し、それぞれのホモ接合型を選んで比較したところ、欠失型と正常型は、穀粒硬度の分布が完全に分かれており、欠失型の全個体が正常型より穀粒硬度が高かった。ヘテロ型は両者の中間の値を示し、どちらとも有意な差があった。このことから、HINb-2 の有無が穀粒硬度に関わることがわかった。

HINb-2 の有無の穀粒硬度以外の精麦品質への影響を明らかにするため、準同質遺伝子系統を作成して比較した。欠失型と正常型の F₁ にそれぞれの親を 4 回戻し交雑し、HINb-2 以外の遺伝的背景を揃えて、欠失型と正常型で搗精時間、砕粒率、硝子率を比較したところ、どちらの遺伝的背景においても、欠失型は硝子率が高く、搗精時間が長くなり、砕粒率が低くなった。走査型電子顕微鏡による胚乳内の微細構造観察で、欠失型では澱粉粒表層にマトリックスタンパク質が多く付着していることがわかった。追肥の窒素量を変えて栽培し、穀粒のタンパク質含量を変えて欠失型と正常型を比較したところ、タンパク質含量が上がると硝子率は高まるものの、タンパク質含量にかかわらず欠失型が正常型より硝子率が高くなることが示された。

以上のように本研究は、ホルドインドリンドリン b-2 タンパク質の変異が精麦品質に大きく影響することを明らかにし、その簡易選抜技術も開発したもので、農学上の貢献は大きい。審査員一同は、本論文は博士の学位を授与するに値する内容であると判定した。