

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月15日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500729

研究課題名（和文）大麦の細胞壁関連酵素と麦飯物性との関係解明に関する研究

研究課題名（英文）Study on elucidation of relation between cell-wall related enzymes and physical properties of cooked barley

研究代表者 大坪 研一 (OHTSUBO KEN-ICHI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：80353960

研究成果の概要（和文）：アミロース含量、タンパク質含量、麦飯物性測定、セルラーゼ活性など主要な大麦の品質特性を評価した。また、広範な大麦試料を用いてPCR用の鋳型DNAを調製し、細胞壁関連酵素、たとえばセルラーゼやキシラナーゼ等の新規プライマーを開発した。さらに、大麦の主要タンパク質、糖質関連酵素、プロテインZ、ホップ判別用プライマー、ビール酵母判別用プライマーなども開発し、これらのPCR結果を数値化して説明変数として、ビールの呈味性や気泡安定性を目的変数とする重回帰分析を行い、高い重相関係数を得た。

研究成果の概要（英文）：

Principal properties, such as amylose, protein and physical properties of cooked barley, were evaluated. Template DNAs for PCR were developed using world-wide barley samples, and primers for cell-wall related enzymes, such as cellulase or xylanase, were developed. Novel primers for main proteins, starch-related enzymes, protein Z, hop-related primers, yeast-related primers, were developed. Multiple regression analyses were carried out, using above-mentioned primers, for taste or foam stability of beer, which led to high multiple regression coefficients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食品、植物、酵素、物性

## 1. 研究開始当初の背景

植物の細胞壁は、ヘミセルロースとペクチンのマトリクスにセルロースマイクロフィブリルが存在し、微量のタンパク質が共存している (Sandhu ら, 2009)。最近、細胞壁に普遍的に存在する(1,3)(1,4)- $\beta$ -D-グルカンの合成に関係する酵素および遺伝子 (Rachel

らによる大麦 CSLF, 2008) (Doblin らによる大麦 CSLH, 2009) が解明されつつある。また、別の細胞壁主要成分であるアラビノキシランについても、 $\beta$ -1,4-キシラン合成酵素 (Roman ら, 2007) やキシランキシロシルトランスフェラーゼ (Chanhui ら, 2007) が合成に関与していると報告され、解明が進みつ

つある。大麦は他の穀類に比べて、 $\beta$ -(1,3)(1,4)-グルカンやアラビノキシランなどの非デンプン性多糖類が多く含まれ、大腸がん予防やコレステロール低下などの機能が期待される一方で、飼料や醸造における低利用率が問題となっている。麦飯が米飯に比べてきわめて硬い原因の候補として、大麦の細胞壁とその分解酵素に着目し、麦飯としての食味に対する細胞壁および関連酵素の影響について解明することが必要とされている。

## 2. 研究の目的

申請者らは、大麦の穀粉物性や麦飯物性に対する各種の細胞壁合成・分解酵素による影響を、デンプンやタンパク質などの主要成分による影響と比較しながら検討することを着想した。すなわち、本研究においては、細胞壁の構成成分であるセルロース、ヘミセルロースおよび細胞接着成分であるペクチンの合成酵素と、それぞれを分解するセルラーゼ、キシラナーゼおよびポリガラクトナーゼなどについて、酵素活性と上記の大麦利用特性（特に麦飯が硬い原因）との関係を解明し、麦飯物性を改良するとともに、酵素のDNAマーカーおよび多変量解析を開発して、育種初期のような微量試料の場合でも使用可能な品質推定技術を開発することを目的とする。すなわち、本研究では、これまでに研究報告が少ない、大麦の細胞壁の分解に関係するセルラーゼ、キシラナーゼ、ポリガラクトナーゼなどの内在性酵素が大麦の精麦適性や麦飯物性に与える影響について、デンプンやタンパク質などの主要成分による影響と比較しながら明らかにし、試料量の少ない初期選抜に有効なDNAマーカーを開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、大麦のセルロースシンターゼ等の各種細胞壁合成酵素、キシラナーゼ等の各種細胞壁分解酵素に焦点を当て、従来、品質指標とされてきた主要成分であるデンプンのアミロース含量やタンパク質含量等と比較しながら、細胞壁関連酵素の種類および活性と、大麦の主要品質特性である物理特性、特に麦飯物性や大麦粉末糊化粘度特性との関係を明らかにする。その結果に基づき、重要な酵素のDNA塩基配列から各種のDNAマーカーを開発し、大麦品質との関係を精査する。そこから選抜した有力マーカーの大麦品質に対する寄与率を考慮し、PCRによる物性推定技術を開発する。

各種の国産二条大麦（スカイゴールドなど）、六条大麦（ファイバースノウなど）、ハダカムギ（イチバンボシなど）、外国産大麦（スターリングなど）について、成分分析、

物性測定、糊化粘度測定を行う。すなわち、

①申請者らが米用に開発した一粒炊飯方法（中村ら、2007）、物性測定方法（高圧縮・低圧縮連続測定法（Okadomeら、1999）、多重バイト測定法（Nakamuraら、2009））および糊化粘度測定方法（大坪ら、2007）について、大麦評価のための最適化を含めて物性評価方法の確立を図る。また、

②これまで、申請者の研究室で米の識別や評価のために蓄積してきた各種のPCRプライマー（大坪ら、2003）（中村ら、2004）について、大麦への適用の可否を調査すると同時に、大麦の細胞壁関連酵素を中心に、新たなプライマーの設計・開発を行う。さらに、

③細胞壁関連酵素、特にセルラーゼ、キシラナーゼ、ポリガラクトナーゼなどの分解酵素を中心に、それらの酵素活性と大麦物性との関係について、既報の方法（Sungurtasら、2004）（Campenhoutら、2005）（Kimら、2006）による実験を行い、評価を加える。

## 4. 研究成果

イチバンボシ、サンシュウ、ダイシモチ等の主要な大麦の品質特性を評価した。すなわち、アミロース含量はヨード比色法、タンパク質含量はケルダール法、食物繊維含量はAOAC法、炊飯特性試験はDawsonらの方法、糊化特性試験はRapid Visco Analyzer法、麦飯物性測定はテンシプレッサーによる高圧縮・低圧縮連続測定法、セルラーゼ活性およびキシラナーゼ活性はメガザイムキット法によって測定した。その結果、イチバンボシはアミロースがやや高く、堅めの麦飯物性を示し、サンシュウは高タンパク質でさらに堅い物性となり、ダイシモチは低アミロースで麦飯表層の粘りが強かった。スカイゴールドやメトカーフなど、ビール醸造用の内外の広範な大麦試料を用いてPCR用の鋳型DNAを調製し、品質関連の各種のプライマーの共存下でPCRを行った。文献報告によるDNA塩基配列を基に、細胞壁関連酵素、たとえばセルラーゼ、キシラナーゼ、ポリガラクトナーゼ等の新規プライマーを開発した。さらに、大麦の主要タンパク質であるホルデインA、B、およびC、糖質関連酵素であるスターチシンターゼ、栄養性やビール品質に関係するトリブシンヒビター、リポキシングナーゼ、プロテインZ等のPCR用プライマーを開発した。大麦の主要な用途であるビールの品質に影響するPCRプライマーとして、ホップ判別用プライマー、ビール酵母判別用プライマーなども開発し、これらのプライマーによるPCR結果を数値化して説明変数とすることにより、ビールの呈味性（苦味、酸味、渋味）や気泡安定性を目的変数とする重回帰分析を行い、それぞれ、0.82、0.87、0.87および0.93という高い重

相関係数を得た。

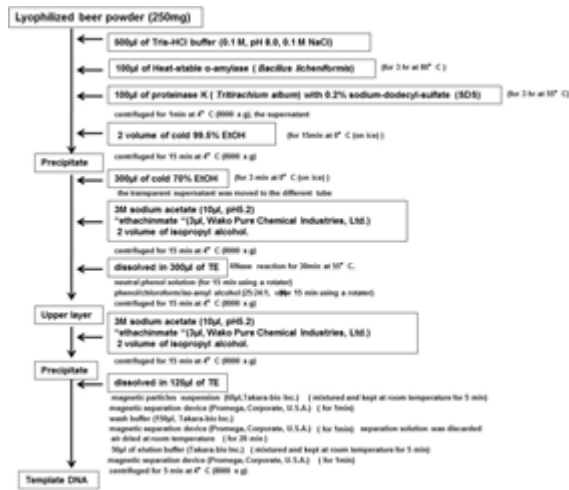


図1. ビールからの鋳型 DNA の調製方法

大麦加工品であるビールから PCR 用の鋳型 DNA を抽出・精製する方法を開発した。

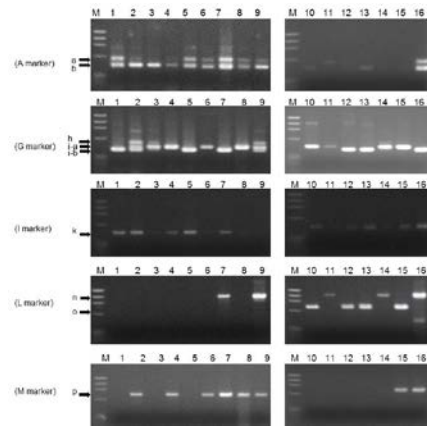


図2. 開発したプライマーによる PCR 結果

大麦のタンパク質、細胞壁分解酵素などに関する PCR 用プライマーを多数開発した。

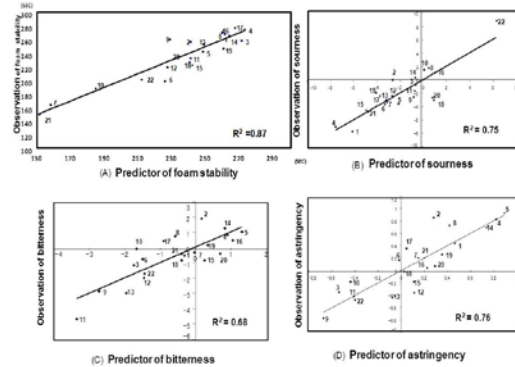


Fig. 10

図3. 味と気泡性に対する PCR による推定式

```

1  AAGTCTCGTGTGATCCCAAGGAGGCCAGGAGTGGAGTGGGACGTGCACTCTGCTG 60
61  GTCCAAGGCTTCCCATAAAGAAGGACGGCAACCGCCCGCTGAGTGGATGACAGGAGGG 120
    a
121  GCCTACCGGGGCTGCGGAGTAAATACGACCGGTGGGAGGTAGGTGGCTTCTGCCACGCTG 180
181  TCCTCGACACGGACGAGGAGGAGGGCTCGAGAGCGTCCGCTGCTGTCGCCACAACCCAA 240
241  ACAGGGTGCATGTTTGGCCGGAAATGGGTGCGCCGAACATAAAACGGACAAGATGCGTCT 300
301  TAGGGGACGCGAGCTGGGACGTGGGGTTTGTCGTTCTGCCCAAACGGACAGGGCCGG 360
361  ACCGGATGGGGTCGTGCACTGGAGTTGGCCTTACATTTCTTGTAAATTTGATTGGGGG 420
421  ACGAAGCAGAGGCTTAG 437
    
```

図4. アミラーゼ遺伝子に基づく DNA 塩基配列からの大麦の耐病性関連遺伝子の発見

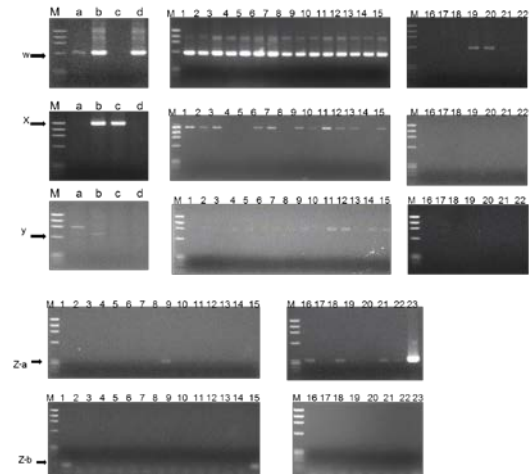


図5. 開発した各種の品質関連プライマーによる PCR 結果

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2件)

① Sumiko Nakamura, Ryosuke Tsushima, Ken'ichi Ohtsubo, A novel method for the preparation of template DNA for PCR from beer to detect materials and to develop DNA markers to evaluate the quality of beer, *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, 査読有り, 77(4), 820-831, 2013. Doi:10.1271/bbb.120969

② Sumiko Nakamura, Keisuke Machida, Ken'ichi Ohtsubo, Search for cell-wall-degrading enzymes of world-wide rice grains by PCR and their effects on the palatability of rice, *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, 査読あり, 76(99), 1645-1654, 2012. Doi:10.1271/bbb.120147

〔学会発表〕(計 1件)

①中村澄子、對馬諒介、大坪研一、ビールを試料とするPCRによる醸造原料および酵母の判別の試み、日本食品科学工学会第59回大会、藤女子大学、2012年8月30日

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：ビール原料及び製品の判別方法並びにその方法を利用したビール品質の評価方法

発明者：大坪研一・中村澄子

権利者：新潟大学

種類：特許

番号：2012-207452

出願年月日：24年9月20日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大坪 研一 (OHTSUBO KEN-ICHI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：80353960