特 集 記 事

プロテオーム解析に基づくビールオオムギ品質選抜法の開発

飯牟礼隆

サッポロビール株式会社価値創造フロンティア研究所, 静岡県焼津市岡当日 10, 〒425-0013

Development of selection methods in malting barley breeding based on proteome analysis

Takashi Iimure

Frontier Laboratories of Value Creation, Sapporo Breweries Ltd., Yaizu, Shizuoka 425-0013

キーワード

ビールオオムギ, ビール品質, プロテオーム解析, タンパク質, DNA マーカー

1. はじめに

ビールは古くから世界中で飲用されているアルコール飲料の一つである。ビールの主原料はオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) 由来の麦芽とホップ (*Humulus lupulus*) である。ビールは複雑な工程を経て醸造される。オオムギを発芽させ麦芽を製造する製麦工程, 麦芽から発酵性糖を抽出し, ホップを添加して煮沸することで麦汁を調製する仕込工程, 酵母を添加してエタノール発酵を行う発酵工程, 熟成を行う貯酒工程, さらに酵母などを除去するろ過工程などにより成る。これらの各工程における技術開発や適切な管理だけでなく, 原料の品質もビール品質に影響する重要な要因であることが知られている。

ビールの「おいしさ」は味や香りだけでなくその外観も重要である。黄金の液色と白い泡のコントラストが見た目の美しさを演出する。泡はビールの酸化やガスの揮散を防ぐ役割もあるため, グラス等に注がれた泡の保持性 (泡持ち) はビールの重要な品質の一つとなっている。またビールは保存により濁りを生じることがあるが, これを防止することもビール醸造において重要である。泡持ちや混濁性はオオムギの栽培環境にも左右されるが, オオムギ品種によっても差が生じることから, これらは遺伝形質でもあったと考えられる (Evans and Hejgaard 1999, Robinson *et al.* 2007)。ビールオオムギの育種では, 収量性や耐病性などの農業生産性, エキス分や発酵性などの麦芽品質の向上が主な育種目標になっているが, 育種によるビール品質の向上も可能であると考えられる。しかし, ビール品質の向上を目的にした育種においては選抜における課題がある。表現型に基づく選抜, すなわちオオムギの個体や系統ごとにビールを醸造し, 泡持ち

や混濁といった醸造形質を評価することは困難である。ビールオオムギ育種においてビールの醸造試験は育種の最終段階で行われるのみであり, それは一般的には選抜ではなく, 評価と捉えられている (図 1)。

DNA マーカーを利用した選抜は, 育種の初期世代に対して適応可能であり, 多検体を一度に選抜できるため, 多くの作物育種において利用されている。ビールオオムギ育種においても, 耐病性 (Pellio *et al.* 2005), 休眠性 (Sato *et al.* 2009), 麦芽のエキス分 (Zhou *et al.* 2012) など多くの形質に対する DNA マーカーが開発され, 育種において利用されている。ビール品質に関するオオムギ DNA マーカーの開発には, 他の形質同様, QTL 解析や全ゲノム関連解析 (GWAS) といった遺伝解析の手法が理論的には有効であるが, 上述の通り, 多数の系統について泡持ちや混濁を評価するには多大な労力と時間が必要であり, 現実的とは言えない。これらの形質にはタンパク質が大きな影響を与えていることが知られており, 生化学的手法により品質関連タンパク質や遺伝子を同定することが可能である。そのための手法として, タンパク質を網羅的に解析するプロテオーム解析が有効な手段と考えられる。プロテオーム解析は近年の質量解析技術の大幅な進歩により, 様々な生物種, 食品の分析に利用されている。図 2 に示す通り, オオムギからビールに至る醸造工程においてプロテオームは劇的に変化する。ビール中のタンパク質からオオムギのタンパク質, そして遺伝子まで工程を遡ることで, 醸造品質の遺伝的制御が可能になると考えられる。

本研究では, ビールのプロテオーム解析を通じてビールの泡持ちおよび混濁に関連するタンパク質および遺伝子を同定し, 育種選抜において汎用的に利用可能なビール品質関連 DNA マーカーを開発することを目指した (図 1)。

図 1. ビール品質関連 DNA マーカーを適応したビールオオムギ育種の流れ.

図 2. ビール醸造工程と二次元電気泳動解析により検出したプロテオーム変化.

2. ビールおよび麦汁プロテオームマップの開発

ビールに含まれるタンパク質は分子量約 10 kDa のオオムギ由来 lipid transfer protein 1 (LTP1) と、分子量約 40 kDa のセリンプロテアーゼインヒビターであるオオムギ由来 protein Z type serpin (protein Z) が支配的であり、これらのタンパク質については泡持ちとの関与も示唆されていることから詳細な解析が成されてきた (Evans and Hejgaard 1999, Maeda *et al.* 1991, Sørensen *et al.* 1993). 一方で、泡持ちや混濁などのビール品質に関与するタンパク質はこれら 2 種のタンパク質だけではないと考えられた. 品質に関連するビール中のタンパク質を同定するに当たっては、解析の基盤として、ビールタンパク質の組成を理解する必要がある. そこで、プロテオーム解析を通じて、ビールおよび発酵前の麦汁のタンパク質組成に関する情報基盤を整備した. ビールおよび麦汁タンパク質を二次元電気泳動で分離し、検出されたタンパク質スポット (ビールは 199 個, 麦汁は 202 個) について質量

解析とデータベース検索によってタンパク質を同定した (Iimure *et al.* 2010, 2012). これにより二次元電気泳動像とタンパク質情報から成るビールおよび麦汁プロテオームマップを開発できた. 原料であるオオムギ麦芽の違いによるビールプロテオームの差異を明らかにするために、異なるオオムギ品種由来の麦芽から醸造したビール、および異なる麦芽製造 (製麦) 条件で調製した麦芽から醸造したビールの二次元電気泳動解析を実施した. サンプル間の二次元電気泳動像の比較、およびビールプロテオームマップとの照合により、barley dimeric alpha amylase inhibitor-1 (BDAL-1), alpha-amylase/trypsin inhibitor CMb precursor および LTP1 などのオオムギ由来タンパク質、さらに thioredoxin; Trx2p, yeast triosephosphate isomerase, enolase 1 といった酵母由来のタンパク質スポット濃度に差が検出された (Iimure *et al.* 2010). さらに、これらのビールサンプルは泡品質および混濁性に違いが見られたことから、醸造に用いるオオムギ品種および製麦条件がビールプロテオームの差を生み出し、その差がビール品

質の差異に影響していることが推察された。

また、ホップの添加および煮沸により発酵開始前の麦汁が調製されるが、この際麦芽由来のタンパク質は変性され、一部は凝固し、系外に除去されるため、煮沸工程の条件（煮沸温度や時間など）はビール品質に大きく影響する。プロテオームマップを解析の基盤として、煮沸前および後の麦汁、さらに煮沸時の沈殿物の詳細なプロテオーム解析を行ったところ、煮沸工程において protein Z に麦芽由来の特定のペプチドが結合することにより protein Z が凝固、沈殿することが示唆された (Iimure *et al.* 2012)。

3. 泡持ち関連タンパク質の同定と解析

ビールの泡持ちは大麦品種や製麦条件によって差が生じることが知られている。製麦工程ではオオムギ種子に吸水させ発芽させるが、オオムギ種子の含水率（浸麦度）が高いとプロテアーゼ活性が高まり、オオムギ由来のタンパク質の分解が促進される。タンパク質分解により生じたアミノ酸は発酵工程において酵母の窒素源として重要な役割を担う。一方で、オオムギ由来のタンパク質はビールの泡持ちに重要な役割を果たしており、一般的には浸麦度が増加するとビールの泡持ちは低下することが知られている (Evans and Sheehan 2002)。発酵を円滑に進めるためのアミノ酸を供給するために製麦時の浸麦度が制御されるが、製麦に用いるオオムギ品種としては発酵に支障を来さない量のアミノ酸を供給し、かつ泡持ちも良い品種が望ましいと言える。日本と北米のビールオオムギ、それぞれ 2 品種、1 品種について浸麦度を変えて製麦を行い、それぞれの麦芽を単独で用いた醸造試験を実施した。その結果、日本の 2 品種は浸麦度が増加すると泡持ちは低下したが、北米品種は浸麦度によらず泡持ちが高いレベルで一定であるという特異な性質を示した (Okada *et al.* 2008)。この性質はアミノ酸を十分に供給し、かつ泡持ちの良いビールを醸造する上では有用なものである。泡持ちに関与するタンパク質は一般的に疎水性が高く、泡に濃縮される性質を有すると考えられる。試験した北米品種の泡持ちが良い性質の原因を明らかにするために、各サンプルのビール中に含まれる全タンパク質、疎水性タンパク質を多く含むと考えられる 25% 飽和硫酸アンモニウム沈殿画分、さらにビールの泡に濃縮される画分それぞれについて二次元電気泳動解析を行ったところ、分子量約 12 kDa の一連のタンパク質スポットが北米品種由来のビールでは浸麦度によらず明瞭に検出できたのに対し、日本の 2 品種では浸麦度の増加とともに減少、もしくは低浸麦度でも薄いスポットのみが確認できた。これらタンパク質スポットが泡持ちに関与するタンパク質候補であることが示唆されたため、これらのタンパク質スポットの質量解析およびデータベース検索を行ったところ、全てのスポットが barley dimeric alpha

amylase inhibitor-1 (BDAI-1) と同定された (Iimure *et al.* 2008)。さらに、塩析およびカラムクロマトグラフィーによりビールから BDAI-1 を精製した。この精製 BDAI-1 をビールに添加したところ、添加量依存的に泡持ちが向上したことから、BDAI-1 は泡持ちに直接作用するタンパク質であることが示された (Iimure *et al.* 2015)。BDAI-1 は新規な泡持ち関連タンパク質である。

ビール中に最も多く含まれるタンパク質は protein Z であり、protein Z は表面粘度および弾力性が高いタンパク質であるとされている (Maeda *et al.* 1991)。protein Z には Z4、Z7 および Zx の 3 つのサブファミリーが存在するが、ビール中では protein Z4 と Z7 が支配的であり、Zx はわずかに存在するのみである (Fasoli *et al.* 2010, Konečná *et al.* 2012)。ビール中の Z4 と Z7 の存在比率は用いるオオムギ品種に依存することが明らかになっている (Evans and Hejgaard 1999, Iimure *et al.* 2011)。protein Z4 および Z7 をそれぞれ特異的に認識する抗体を用いて、ビール中の protein Z4 および Z7 含量とビールの泡持ちの関係を調査したところ、protein Z4 は泡持ちと正の、protein Z7 は負の有意な相関関係が確認された (Iimure *et al.* 2011)。

ホルディンはオオムギ種子中の主要なタンパク質である。ホルディンは分子量によって B、C、D、 γ ホルディンに分類される (Skerritt and Janes 1992)。B ホルディンはホルディンの 70–80% を、C ホルディンは 10–12% を占め、D および γ ホルディンの比率は低い。ホルディンは製麦、仕込工程で低分子化され、一部がビール中に移行することが知られている。近年のビールプロテオーム解析により、低分子化された様々なアミノ酸配列を有するホルディン由来ペプチドが検出されている (Colgrave *et al.* 2012, Picariello *et al.* 2011, Weber *et al.* 2009)。本研究では B ホルディンと泡持ちの関係を詳しく調べた。B ホルディン欠失系統 (Risø 56) を CDC Kendall に 2 回戻し交雑した系統を育成した。2 つの異なる環境下で栽培したオオムギからそれぞれ麦芽を調製し、醸造試験を行ったところ、B ホルディン欠失系統は対照と比較して泡持ちが低下したことから、B ホルディンは泡持ちに関与するタンパク質であることが示唆された。また、B ホルディンのアリル、すなわちオオムギ種子タンパク質の SDS-PAGE で検出される B ホルディン型と泡持ちの関係を明らかにするために、ミカモゴールドン-Harrington の倍加半数体 95 系統を B ホルディン型により 2 つの集団に分け、それぞれの型でバルク集団を調製し、3 つの異なる環境下で栽培したオオムギから麦芽を調製後、醸造試験を実施した。B ホルディンがミカモゴールドン型の系統は Harrington 型と比較して有意に泡持ちが良かったことから、泡持ちの良いビールオオムギ育種において B ホルディンがミカモゴールドン型のものを選抜することが好ましいことが示唆された。

図3. protein Z4, protein Z7 および B ホルデインの CAPS マーカー。

H : はるな二条型 (低泡持ち), K : CDC Kendall 型 (高泡持ち), A : Harrington 型 (低泡持ち), M : ミカモゴールドデン型 (高泡持ち)。

4. 泡持ち関連 DNA マーカーの開発

3つの異なる環境で栽培した23品種のオオムギ種子中の protein Z4 および Z7 含量を定量したところ、品種間差が認められた (Iimure *et al.* 2011)。そこで protein Z4 および Z7 含量が高い3品種、低い3品種それぞれの構造遺伝子の一部およびプロモーターを含むと考えられる5'側の塩基配列を調査した。protein Z4 については翻訳開始コドンより5'側に SNPs を含む5つの多型を検出した。このうち1つの SNP に制限酵素認識配列が含まれたため、この多型を標的とした cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカーを開発した (図3)。また、protein Z7 については、翻訳開始コドンより5'側の塩基配列が29 bp しか公開されていなかったため、thermal asymmetric interlaced (TAIL) PCR を行い、307 bp の新規な塩基配列情報を取得した。これらの領域に23個の多型を検出できた。このうち制限酵素認識配列を含む多型を標的として CAPS マーカーを開発した (図3)。これらの DNA マーカーで同定された遺伝子型により、オオムギ種子中の protein Z4 および Z7 含量の平均値に有意な差があることが確認された。さらに、11品種の麦芽をそれぞれ単独で使用して醸造したビールの泡持ちの各マーカーの遺伝子型による平均値に有意な差が認められた (Iimure *et al.* 2011)。以上のことから、泡持ちの良いオオムギを選抜する上で本 DNA マーカーは有効であることが示唆された。また、日本、北米、豪州、欧州のビールオオムギ64品種について protein Z4 および Z7 の遺伝子型を調査したところ、2つの遺伝子において、ともに泡持ちの良いアイルを有する品種は北米、欧州に多く、調査した中では日本には1品種しか存在しなかった。

既知の B ホルデイン塩基配列のうち、登熟中に発現することが確認されている遺伝子の塩基配列情報をもとに、品種間の多型を検出し、CAPS マーカーを開発した (図3)。泡持ちの良いミカモゴールドデン型は日本の品種に多く確認された。このため、主として北米および欧州品種が有する protein Z4 および Z7 の高泡持ちアイルと、日本品種が有する B ホルデインの高泡持ちアイルを集積することで、より泡持ちの良い品種を育成することが可能で

あると考えられる。一方、ビールの好ましくない香りの原因物質の前駆体の1つとされる S-メチルメチオニン (SMM) 含量の QTL 解析により、B ホルデイン遺伝子近傍に QTL が検出されている (Zhou *et al.* unpublished data)。高泡持ち性となる B ホルデインミカモゴールドデン型を有するオオムギは、その大部分が高 SMM となるが、北海道向け育成系統の中から、B ホルデインがミカモゴールドデン型かつ低 SMM である北系 0685 を見出した。本系統を交配母本として利用することで、高泡持ちかつ低 SMM となるビールオオムギの育成が期待される。

5. 混濁関連タンパク質の同定

長期保存により混濁した4種のビールサンプルから混濁物を回収し、その中に含まれるタンパク質を二次元電気泳動で分離し、質量解析とデータベース検索で同定したところ、4つのサンプルで共通して検出されたタンパク質として BDAI-1, CMb component of tetrameric alpha amylase inhibitor (CMb) および trypsin inhibitor CMe precursor (CMe) が同定された (Iimure *et al.* 2009)。混濁物中タンパク質と同定されたタンパク質のアミノ酸組成比較、および混濁関連タンパク質が吸着するとされるシリカゲルに吸着したタンパク質のプロテオーム解析の結果から、これらのタンパク質は混濁の核ではなく、混濁を成長させる因子であることが示唆された (Iimure *et al.* 2009)。BDAI-1 および CMb は新規な混濁関連タンパク質であり、これらを遺伝的に制御することで、混濁のより少ないビールオオムギの開発が可能になることが期待される。

6. おわりに

ビール醸造に携わる研究者や技術者の弛まぬ努力によって、今日では高い品質のビールを安定的に製造することが可能になった。一方で、更なる高品質化も求められており、現在も鋭意研究・開発が進められている。様々なアプローチがある中で、本研究では生化学的解析の結果をビールオオムギ育種に応用することで、育種によっ

てビール品質を向上できる可能性を示すことができた。評価に多大な労力を必要とする醸造形質に対して、DNA マーカーによる選抜を適用することは育種の選抜において大きな威力を発揮する。また、本研究で開発した DNA マーカーを用いて、好ましいアレルを集積することが可能になると考えられる。さらに、本研究で同定した泡品質や混濁に関連するタンパク質および遺伝子の情報を元に、ビール品質をより向上させるアレルを遺伝資源からスクリーニングする、あるいは突然変異により得るなどのアプローチが可能である。農業形質や麦芽品質と合わせて、醸造形質に関しても DNA マーカーによる選抜を行うことで、より高品質なビールオオムギ、そしてさらに高い品質を有するビールを醸造できるようになることを期待したい。

謝 辞

本研究は多くの方々のご支援、ご協力およびご指導のもと遂行することができたものである。特に岡山大学の佐藤和広教授には本研究を全面的にご支援頂き、多大なるご指導を賜った。岡山大学の武田和義名誉教授には研究に対する姿勢などをご教授頂いた。また東京大学の岩田洋佳准教授、サッポロビール株式会社バイオ研究開発部、価値創造フロンティア研究所、および商品・技術開発センターの方々には試験材料育成、麦芽の調製、分析、試験醸造、データ解析の手法など多方面にわたってご協力、ご支援を頂いた。皆様方にここに深謝申し上げる。本研究は科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業 (CREST) および生物系特定産業技術研究支援センターの基礎研究推進事業の支援のもと行われたものである。

引用文献

Colgrave, M.L., H. Goswami, C.A. Howitt and G.J. Tanner (2012) What is in a beer? Proteomic characterization and relative quantification of hordein (gluten) in beer. *J. Proteome Res.* 11: 386–396.

Evans, D.E. and J. Hejgaard (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.

Evans, D.E. and M.C. Sheehan (2002) Don't be fobbed off, substance of beer foam, a review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 60: 47–57.

Fasoli, E., G. Aldini, L. Regazzoni, A.V. Kravchuk, A. Citterio and P.G. Righetti (2010) Les Maîtres de l'orge: The proteome content of your beer mug. *J. Proteome Res.* 9: 5262–5269.

Iimure, T., K. Takoi, T. Kaneko, M. Kihara, K. Hayashi, K. Ito, K. Sato and K. Takeda (2008) Novel prediction method of beer foam stability using protein Z, barley dimeric α -amylase inhibitor-1 (BDAI-1) and yeast thioredoxin. *J. Agric. Food Chem.* 56: 8664–8671.

Iimure, T., N. Nankaku, M. Watanabe-Sugimoto, N. Hirota, Z. Tiansu, M. Kihara, K. Hayashi, K. Ito and K. Sato (2009) Identification of novel haze-active beer proteins by proteome analysis. *J.*

Cereal Sci. 49: 141–147.

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

Iimure, T., M. Kihara, S. Ichikawa, K. Ito, K. Takeda and K. Sato (2011) Development of DNA markers associated with beer foam stability for barley breeding. *Theor. Appl. Genet.* 122: 199–210.

Iimure, T., N. Nankaku, M. Kihara, S. Yamada and K. Sato (2012) Proteome analysis of the wort boiling process. *Food Res. Intern.* 45: 262–271.

Iimure, T., M. Kihara, K. Sato and K. Ogushi (2015) Purification of barley dimeric α -amylase inhibitor-1 (BDAI-1) and avenin-like protein-a (ALP) from beer and their impact on beer foam stability. *Food Chem.* 172: 257–264.

Konečná, H., L. Müller, H. Dosoudilová, D. Potěšil, J. Buršíková, O. Šedo, I. Márová and Z. Zdráhal (2012) Exploration of beer proteome using OFFGEL prefractionation in combination with two-dimensional gel electrophoresis with narrow pH range gradients. *J. Agric. Food Chem.* 60: 2418–2426.

Maeda, K., S. Yokoi, K. Kamada and M. Kamimura (1991) Foam stability and physicochemical properties of beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 49: 14–18.

Okada, Y., T. Iimure, K. Takoi, T. Kaneko, M. Kihara, K. Hayashi, K. Ito, K. Sato and K. Takeda (2008) The influence of barley malt protein modification on beer foam stability and their relationship to the barley dimeric α -amylase inhibitor-I (BDAI-I) as a possible foam-promoting protein. *J. Agric. Food Chem.* 56: 1458–1464.

Pellio, B., S. Streng, E. Bauer, N. Stein, D. Perovic, A. Schiemann, W. Friedt, F. Ordon and A. Graner (2005) High-resolution mapping of the Rym4/Rym5 locus conferring resistance to the barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 110: 283–293.

Picariello, G., F. Bonomi, S. Iametti, P. Rasmussen, C. Pepe, S. Lilla and P. Ferranti (2011) Proteomic and peptidomic characterization of beer: Immunological and technological implications. *Food Chem.* 124: 1718–1726.

Robinson, L.H., P. Healy, D.C. Stewart, J.K. Eglinton, C.M. Ford and D.E. Evans (2007) The identification of a barley haze active protein that influences beer haze stability: The genetic basis of a barley malt haze active protein. *J. Cereal Sci.* 45: 335–342.

Sato, K., T. Matsumoto, N. Ooe and K. Takeda (2009) Genetic analysis of seed dormancy QTL in barley. *Breed. Sci.* 59: 645–650.

Skerritt, J.H. and P.W. Janes (1992) Disulphide-bonded gel protein aggregates in barley: quality-related differences in composition and reductive dissociation. *J. Cereal Sci.* 16: 219–235.

Sørensen, S.B., L.M. Bech, M. Muldbjerg, T. Beenfeldt and K. Breddam (1993) Barley lipid transfer protein 1 is involved in beer foam formation. *Tech. Quart. Master Brew. As. Am.* 30: 136–145.

Weber, D., C. Cléroux and S.B. Godefroy (2009) Emerging analytical methods to determine gluten markers in processed foods—method development in support of standard setting. *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 111–117.

Zhou, T.S., T. Iimure, R. Kanatani, N. Hirota, M. Kihara, T. Hoki and K. Sato (2012) Malting quality quantitative trait loci on a high-density map of Mikamo golden $\times$ Harrington cross in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol. Breed.* 30: 103–112.