

(前文)

酒類総合研究所は、中期計画に基づき、研究開発に関して外部有識者による評価及び助言を求め、業務運営に反映させることを目的とする「研究開発評価委員会」を設置しています。当該委員会は、当研究所研究開発評価委員会運営要領（指針）に基づき、重点的に研究資源を投入する研究（特別研究）について「国の研究開発評価に関する大綱的指針」に沿った事前評価、中間評価、及び事後評価等を行うこととされています。

この度、平成 18 年度から平成 22 年度にわたる第 2 期中期目標期間に実施した特別研究 4 課題について、事後評価をいただきましたので、ここに公表いたします。

1 開催日

平成 23 年 11 月 9 日（水）

2 場所

独立行政法人酒類総合研究所 広島事務所

3 出席委員

会長 太田明徳

委員 飯島信司、石川雄章、大河内基夫、熊谷日登美、中島邦雄、平田 大

(敬称略、五十音順)

(注)委員には、酒類製造に関する研究等に関して高い見識をお持ちの方が就任されています。

課題名：麴菌培養環境応答システムの解析及び麴菌総合データベースシステムの開発

1 実施者

プロジェクトリーダー（三上重明、山田 修） 他 20 名

2 研究の背景、目的及び期待される成果

我が国の「国菌」である麴菌については、15 年以上にわたるこれまでの基礎的解析及び当研究所をはじめとした関係各機関の連携により、ゲノム情報など国際的にも先導的な多くの分子生物学的知見が蓄積しつつある。一方、我が国の醸造産業の現状を概観するに、現在なお経験的な知識やノウハウを中心に製麴を行っており、ゲノム情報等が十分に生かされているとは言い難い。また、酵母と比較して、古典的な遺伝解析が出来ないなど解析が困難な点が数多く存在する。

そこで本研究では、製麴や麴菌の育種に利用することを最終的な目的とするポストゲノムの基礎的研究を着実に進め、ゲノム情報を活用するための基盤となる情報の提供を行う。また、我が国固有の技術である固体培養について、麴菌に影響を与える環境因子の検討とその様々なレベルでの調節機構の解析など、細胞内の遺伝子発現制御ネットワークを意識した解析を行う。

さらに、得られるポストゲノム情報を含む麴菌ポータルサイトの構築を目指し、麴菌総合データベースシステムの開発を行う。これらの研究により、ポストゲノム時代を迎えた麴菌研究の国際的な優位性を確保するとともに、酒類産業の活性化・高度化に貢献する。

3 研究概要

2005 年には全ゲノムシーケンスが報告されるなど、ここ数年、麴菌ゲノムについての情報が飛躍的に増加した。しかしながら、未だ得られたゲノム情報が十分に酒類産業に活かされている状況にはない。そのためには、酒類の品質や製造プロセスに影響を与える遺伝子群と、それらの遺伝子発現や翻訳産物の量的、質的変化を明らかにするとともに、これらの遺伝子群の発現制御システム等をネットワークとして理解する必要がある。

そこで、本研究では固体培養における各種醸造条件において、経時的な遺伝子発現（トランスクリプトーム解析）やタンパク質の変動（プロテオーム解析）を幅広く解析するとともに、下流の代謝産物である低分子化合物についても検討した。さらに、これら遺伝子群の発現制御システムについて解析を行い、関係する遺伝子群のネットワークを解明した。

また、現在、麴菌をはじめとした *Aspergillus* 属のゲノム情報をはじめとする多くの知見が蓄積しており、本研究を通して得られる遺伝子発現情報、プロテオーム情報など、膨大な研究成果の効率的な利用のためには、これらの情報を有効に利用できるデータベースシステムが必要である。そこで、可能な限りの研究情報を有機的に関連づけ、視覚的かつ効率的に情報を蓄積し、検索、閲覧が可能な麴菌総合データベースシステムの開発を行い、我が国の酒類産業を支える重要な知的基盤を構築した。

4 主な成果

A. 麴菌培養環境応答システムの解析

普通酒用及び大吟醸酒用米麴の製麴過程について、麴菌 DNAchip を用いて遺伝子の経時的発現解析を行い、両者で発現の異なる遺伝子を同定すると共に、出麴時点のタンパク質について

解析を行い、米麴タンパク質として生産されている 240 スポット（159 遺伝子）を同定した。また、製麴における麴菌の浸透圧、温度、気相の酸素濃度、酸化ストレス、原料米の品種、及び精米歩合の影響についてマイクロアレイ解析を行った。酸素濃度の影響については、プロテオーム解析と代謝物の解析も合わせて行い、低酸素条件では、呼吸が抑制され、有機酸の生産が増加することを明らかにした。また、浸透圧ストレス応答については、*atfA*, *atfB*, *HogA* 遺伝子の機能を、酸化ストレス応答については、Kap1 について解析するとともに、ヒストン脱アセチル化酵素遺伝子と環境応答及びストレス応答の影響について解析した。

次に、米麴で生産されるタンパク質に関わる 55 遺伝子について遺伝子破壊を行ったところ、9 遺伝子が必須であることが示唆された。さらに製麴及び清酒製造を行い、蒸米上での麴菌の生育及び発酵に大きな影響を与える遺伝子を 3 遺伝子見出した。つづいて、米麴で高発現し、かつ他の糸状菌類にも高度に保存される機能未知の 301 遺伝子を同定し、このうち 164 個について遺伝子破壊を行い、14 個の遺伝子が必須であることを明らかにした。また、遺伝子破壊によって糸状菌特有の分化である分生子形成に異常をもたらす遺伝子を 36 個見出した。

さらに、製麴中の麴菌細胞内の生理状態を知るために、NAD 及び NADP 酸化還元補酵素の量及び酸化還元比について解析し、低水分含量では、全 NAD(H) 含量・全 NADP(H) 含量・NADPH 還元型比率が高く NADH 還元型比率が低くなることを明らかにした。次に、LC/MS を用いた米麴の代謝物解析を行うために、多サンプルから効率よく代謝物抽出が行える方法を確立し、各種製麴条件における麴菌の代謝物を解析した。その結果、麴菌株の差や製麴温度の違いにより、一部のアミノ酸や有機酸、ビタミンの生成量が増動することを明らかにした。また、米麴の代謝物の経時変化について、LC/Q-TOFMS 及び GE/TOFMS を用いた解析を行った結果、アデニンやシトシンなどの核酸が製麴の経過に従い減少する一方、ベタインやカダベリンなどは増加することを確認した。また、増殖と酵素生産が旺盛になる仲仕事前後の時期に特異的にロイシンやバリンなどを含む疎水性アミノ酸代謝物群が増加することを見出し、この期間に一部の代謝が特異的に亢進している可能性が示唆された。

B. 麴菌総合データベースシステムの開発

麴菌 (*Aspergillus oryzae*) とその遺伝子などについて、PubMed を中心に情報を収集するとともに、黄麴菌の 13,765 遺伝子の全 ORF について、文献情報、各 ORF に対する核酸配列、cDNA 配列、アミノ酸配列、推定機能ドメイン、細胞内局在性の予測、9 種の子のう菌が持つホモログタンパク質との配列アラインメント、EST における発現情報などのデータ及びキーワード、さらに blast 相同性検索システムなどを含む麴菌ゲノム情報データベースを構築し、外部サーバへの移植、動作テスト、セキュリティ設定などを行い 2007 年 8 月に公開した。さらに麴菌全遺伝子の製麴における発現情報をデータベース化するとともに、黄麴菌と近縁種である *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. niger*, *Neurospora crassa*, *Gibberella zeae*, *Magnaporthe grisea*, *Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* の 13 種について染色体構造、遺伝子構造などの比較ゲノム解析を行い、麴菌ゲノム情報データベース、製麴時遺伝子発現データベース及び麴菌比較ゲノムデータベースを統合して最終的に麴菌総合データベースシステムを開発し、外部サーバへの移植、動作テスト、セキュリティ設定などを行い 2011 年 4 月に公開した。

5 評価結果

- ・ 必要性
 - きわめて重要 重要 必要 必要ではなかった
- ・ 効率性
 - きわめて効率的 かなり効率的 効率的 非効率
- ・ 有効性
 - きわめて有効 かなり有効 有効 有効性が認められなかった
- ・ 目標達成度
 - 計画以上 計画どおり やや不十分 不十分
- ・ 総合評価
 - 目標を十分に達成でき、科学技術の発展に大きな貢献を果たしたと評価される
 - 目標を概ね達成でき、科学技術の発展に一定の貢献を果たしたと評価される
 - 目標の達成が必ずしも十分でなかったが、研究への取り組みは評価される
 - 目標の達成が不十分であり、研究への取り組みも不十分であった

6 総合所見

本研究は、我が国における酒類醸造研究を主導する独立行政法人酒類総合研究所ならではの研究であり、かつ極めて重要な課題であり、効率的、着実に進展させたと評価する。麴菌培養環境応答システムの解析においては、環境要因によって変動する遺伝子発現、タンパク質、代謝産物が明らかになり、経験と勘に頼っていた製麴に科学的裏付けを与える成果が得られたほか、さらに環境をセンシングし遺伝子発現を制御する機構についても十分な成果をあげたと評価できる。今後は遺伝子破壊等による遺伝子機能の解析を継続し、研究成果を充実させていくべきである。また、本研究で開発された麴菌総合データベースシステムはゲノムデータばかりでなく麴菌全遺伝子の製麴における発現情報などを含んでおり、麴菌研究の発展にとって重要である。今後は酒類成分の解析のための麴菌メタボローム解析を行い、代謝の流れと環境要因の相関データを取り入れることなどにより、データベースをさらに充実させていただきたい。本研究の成果が関連学会誌等に公表されることにより、清酒業界のみならず多くの業界で応用されるなど、内外の研究の促進に役立つことから、大きな波及効果を期待する。

課題名：酒類の特性に關与する原料成分の解析及びその利用に關する研究

1 実施者

プロジェクトリーダー（橋爪克己、荒巻 功、後藤奈美） 他 17 名

2 研究の背景、目的及び期待される成果

清酒及びワインの品質・特性には、醸造微生物や醸造技術とならんで、原料の成分が反映するので、品質向上には原料からのアプローチが欠かせない。本研究は、清酒の製品特性や原料利用率に關与する原料米の主要成分であるタンパク質やデンプン、赤ワインの色や渋味成分に關与する醸造用ブドウのフェノール化合物に着目し、醸造の視点から、品種、実り（稔り）の過程及び醸造過程における各成分の挙動、変動要因を解明することを目的としている。本研究によって得られる成果は、優良原料の確保に向けた明確な育種・栽培指標等の提案に活かされるとともに、醸造法の改良・開発などに役立つことが期待される。

3 研究概要

A. 原料米成分の解析と利用

製品特性と原料利用率に關与する成分として、タンパク質とデンプンに着目して研究する。タンパク質は製品特性と関わりが深いと考えられており、酒造原料米の価格を決める指標としても用いられつつあるが、製品特性に關与するタンパク質由来の成分は必ずしも明確になっていない。そこで、清酒中の米タンパク質由来の呈味成分の探索及び蒸米消化特性の解析を行うことにより醸造との関わりを明確化し、清酒醸造への利用について検討した。また清酒の貯蔵劣化により生成するポリスルフィドと原料米タンパク質との関係についても解析した。

デンプンの分子構造と蒸米消化性との基本的関係は明らかになったが、精米歩合、品種などの変動要因、清酒醸造過程との関係は必ずしも明確ではない。そこでデンプンの分子構造に關して、精米歩合による変動やタンパク質の消化への影響について解析した。

B. 醸造用ブドウとワインのフェノール化合物に關する研究

日本では、赤ワイン用ブドウが十分に着色せず、色が薄く、ボディの軽い赤ワインになることが多い。そこで、ブドウの着色等、赤ワイン原料の品質向上に役立てるため、我が国の気象条件などを考慮し、温度、水分、光などの栽培条件が、醸造用ブドウのアントシアニン（色素）、プロアントシアニン（縮合タンニン、渋味成分）などのフェノール化合物の蓄積に及ぼす影響を明らかにした。また、植物ホルモンであるアブシジン酸（ABA）はブドウのアントシアニン蓄積を促進することが知られているが、それ以外の代謝系にはどのような影響を及ぼすのかを明らかにした。

醸造条件については、醸し発酵中の温度条件等がフェノール化合物の抽出・消長に及ぼす影響を明らかにした。

4 主な成果

A. 原料米成分の解析と利用

活性炭未処理の清酒から呈味性を示す米由来成分の検索を行い、苦味や不快な後味を示すグ

ルテリン酸性サブユニット由来の6~13アミノ酸残基で構成されるペプチドを見出した。これらの苦味ペプチドの清酒中での含量は、原料米の精米歩合やタンパク質（グルテリン）含量などによって変動することを明らかにするとともに、酸性カルボキシペプチダーゼ活性の高い酵素を上槽前に添加することにより低減できることを見出した。また、蒸米タンパク質の酵素消化特性を解析した結果、蒸米酵素消化の条件では糖濃度が高くなるため、呈味ペプチドの元となるイネグルテリン由来の高分子ペプチドの蓄積が認められた。一方、清酒もろみではその蓄積は少なく、苦味ペプチドを含む低分子ペプチドはもろみ初期から生成され、比較的速やかに分解されることを明らかにした。さらに、清酒の老香に大きく寄与するポリスルフィド生成に及ぼすタンパク質の影響を解析した結果、タンパク質の多い米は全硫黄含量が多く、その製成酒では全硫黄、含硫アミノ酸が多くなり、貯蔵後のポリスルフィド生成も高くなる傾向を示すことなどを明らかにした。

デンプンについては、精米歩合の変化によってデンプンの分子構造は変化しないことを明らかにし、デンプンの分子構造は清酒醸造で高度に精米を行う理由の一つではないことを示した。また、蒸米デンプンが老化しにくく消化されやすい米（アミロペクチン側鎖の短い米）はタンパク質が消化されやすく、デンプンの消化性がタンパク質の消化性にも影響することを明らかにした。

B. 醸造用ブドウとワインのフェノール化合物に関する研究

過剰な水分や成熟期の高温は果皮のアントシアニンを減少させ、幼果期の高温条件は果皮の縮合タンニンを減少させること、並びに、安定同位体ラベル実験によって、高温条件ではいったん生合成されたアントシアニンが果皮中で減少することを明らかにした。ブドウ果皮のジーンチップ解析により、植物ホルモンのABAはアントシアニン生合成の促進のみならず、果皮の成熟全般を促進している可能性を示唆した。開花期から成熟期にかけての光照射量の増加は、幼果期の縮合タンニンの生合成を促進し、その組成を変化させた。また、幼果におけるフラボノールの生合成はUV光によって特異的に誘導されるのに対し、縮合タンニンはUVの影響を受けず、主として白色光で誘導されるものの、遮光処理によってもその濃度の減少は部分的であった。以上は他の条件をそろえた実験結果であるが、国内各地で栽培されているワイン用ブドウについても、アントシアニン含量に対する高温や多雨の負の影響が確認されるとともに、過剰な窒素施肥による負の影響が示唆された。醸造条件の影響については、初期低温醸しによって、果皮からのアントシアニン、フラボノールの溶出が促進されるのに対し、種子からの渋味の荒い縮合タンニン等の溶出は抑制された。また、高温短期醸しによって赤色は濃い縮合タンニン濃度の低いワインが、初期低温醸しと高温短期醸しによっては、赤色と縮合タンニン濃度の高いワインが醸造できることを示し、発酵温度と醸し期間の影響が大きいことを明らかにした。

5 評価結果

- ・ 必要性
 - きわめて重要 □重要 □必要 □必要ではなかった
- ・ 効率性
 - きわめて効率的 □かなり効率的 □効率的 □非効率

- ・ 有効性
 - きわめて有効 かなり有効 有効 有効性が認められなかった
- ・ 目標達成度
 - 計画以上 計画どおり やや不十分 不十分
- ・ 総合評価
 - 目標を十分に達成でき、科学技術の発展に大きな貢献を果たしたと評価される
 - 目標を概ね達成でき、科学技術の発展に一定の貢献を果たしたと評価される
 - 目標の達成が必ずしも十分でなかったが、研究への取り組みは評価される
 - 目標の達成が不十分であり、研究への取り組みも不十分であった

6 総合所見

本研究は、日本酒やワインの味、香り、色などの改善に加え、良質な日本酒やワインの輸出にも貢献する研究であり、極めて価値が高く、着実に進展した。また、米とブドウという2つの醸造原料を取り上げ、ひとつの研究プロジェクトにまとめた努力を高く評価したい。清酒の原料米に関する研究では、原料米中のタンパク質に由来するペプチドが清酒の苦味成分として特定されたことは、酒類の分析及び品質管理などの面で高く評価できる成果である。清酒についての研究目標が香りから味にシフトしている中であって、呈味成分の研究を発展させたことは、業界及び市場のニーズにも合致している。今後、呈味性ペプチドの原因タンパク質の変動要因等が解明され、清酒の味の改善に応用されることを期待する。ワインの原料ブドウに関する研究では、実地栽培中の環境要因が果皮のポリフェノール量に及ぼす影響を明らかにし、ガイドラインとして栽培者に提示できたことを高く評価したい。また、ワインの醸造条件に関する知見は、国産赤ワインの品質改善に直接役立つものである。今後は、研究成果が活用されるよう着実に技術移転していただきたい。

課題名：清酒酵母の醸造特性及び栄養特性のポストゲノム解析

1 実施者

プロジェクトリーダー（下飯 仁） 他 36 名

2 研究の背景、目的及び期待される成果

清酒酵母と実験室酵母は同じ *Saccharomyces cerevisiae* に属しているが、清酒酵母は他の酵母と比べて優れた醸造特性及び栄養特性を持っている。しかし、その原因となる遺伝子は一部を除いて解明されていない。そこで本研究では、様々なポストゲノムの手法を用いて、清酒酵母の醸造特性及び栄養特性に関与している遺伝子及びそのメカニズムを解明する。醸造特性の解析においては、清酒酵母及び実験室酵母のゲノム情報に基づいて、比較ゲノム解析、DNA マイクロアレイ解析、QTL 解析などの手法を用いた解析を行い、清酒酵母の醸造特性の原因となる遺伝子を解明する。清酒酵母の醸造特性の遺伝子レベルでの解明は、清酒の品質の改良、多様化、製造方法の合理化などを旨とした清酒酵母の育種を行うための基礎的情報を提供する。また、栄養特性物質は細胞内でさまざまな代謝を調整、制御する物質であり、酵母の醸造特性にも大きく関与すると考えられる。清酒酵母をその栄養特性の面からさらに研究することは、清酒酵母の特性把握の切り口として有効であり、醸造物の栄養学的価値を高めるほか、酵母を含有する醸造副産物の有効利用、高品質な食資源酵母の育種にも応用することが可能である。

3 研究概要

A. 清酒酵母の醸造特性のポストゲノム解析

当研究所が代表者である産官学 26 グループから構成される清酒酵母ゲノム解析コンソーシアムを組織し、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）との共同研究によって、清酒酵母きょうかい7号のゲノム解析を行った。得られたゲノム解析の結果から、清酒酵母に特徴的な遺伝子を抽出し、それらの機能と清酒醸造との関係を解析した。また、清酒酵母の醸造特性について、個別の変異や量的形質遺伝子座（QTL）の解析を行い、醸造特性を支配している遺伝子を同定し、新規清酒酵母を育種するための基礎的情報を得た。さらに、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析により清酒酵母の系統関係の解析を行った。

B. 清酒酵母の栄養特性のポストゲノム解析

清酒酵母の新たな栄養特性について検索し、これまでに清酒酵母で S-アデノシルメチオニン（SAM）の蓄積量が多いことを確認したが、さらに葉酸も高濃度蓄積することを見出した。SAM 高蓄積機構について解析するため、実験室酵母の非必須遺伝子破壊株ライブラリーから SAM 高蓄積株をスクリーニングし、*AD01* 遺伝子破壊株（ $\Delta ad01$ 株）と *CYS4* 遺伝子破壊株（ $\Delta cys4$ 株）を取得した。さらに、 $\Delta ad01$ 株がコルディセピン耐性を有するという知見をもとに、遺伝子組換え操作によらない新規 SAM 高蓄積株の育種法を考案した。また、清酒酵母では葉酸量が対数増殖期から定常期に進むに従って増加すること、培地に特定のアミノ酸を添加することで葉酸量の顕著な増加・維持効果を示すことを見出した。

4 主な成果

A. 清酒酵母の醸造特性のポストゲノム解析

①清酒酵母のゲノム解析

独立行政法人製品評価技術基盤機構及び清酒酵母ゲノム解析コンソーシアム（酒類総合研究所、大学、公的研究機関、酒類製造業者等 26 団体から構成される）との共同研究により清酒酵母きょうかい7号ゲノムのドラフトレベルの解析を行い、全ゲノムの約 98%の塩基配列を明らかにした。また、コンソーシアムメンバーと共同で遺伝子のアノテーション（遺伝子情報の注釈及び整理）を行い、酒類総合研究所内に清酒酵母ゲノム配列データベースを作成し、2010 年 4 月に公開した。

酒類総合研究所独自に清酒酵母きょうかい7号と実験室酵母（S288C）のゲノム配列を比較した結果、清酒酵母と実験室酵母の塩基配列の相同性はほとんどの遺伝子で 99%以上であった。きょうかい7号では、*PHO3*、*PPT1*、*ASP3*、*AIF1*が欠失し、5 番染色体の一部及び 14 番染色体の一部に逆位構造が存在した。また、きょうかい7号には存在するが S288C には存在しない新規遺伝子を見出し、そのアミノ酸配列がエポキシド加水分解酵素と相同性を示すことから、*EHL1*（epoxide hydrolase like）と名づけた。

②清酒酵母の醸造特性に関与する遺伝子の解析

ゲノム解析の結果を精査して、醸造特性と関連のある変異遺伝子を検索した結果、現在使用されている主要な清酒酵母であるきょうかい6号、7号、9号、10号はいずれもストレス応答転写因子 *Msn4* の C 末端が欠損しており、転写因子として機能していないことが判明した。正常な *MSN4* 遺伝子をこれらの清酒酵母に導入すると発酵力が低下したことから、この変異が清酒酵母の高エタノール発酵性の原因の一つとなっていることが示唆された。

清酒酵母と実験室酵母の醸造特性の相違の原因となる遺伝子座を解析するために量的形質遺伝子座（QTL）解析を行った。まず、清酒酵母と実験室酵母の一倍体同士を交配し、ヘテロ二倍体を作製した後、孢子形成によって 100 株の一倍体を取得した。得られた一倍体を用いて清酒小仕込試験を行った結果、測定したすべての分析値（エタノール濃度、香気成分など）が連続的な山形の分布を示したことから、これらの形質が複数の遺伝子の支配を受けていることが示唆された。次に、100 株の一倍体について各株あたり 142 個（合計 14,200 個）の DNA マーカーの遺伝子型を決定した。得られた清酒醸造特性と遺伝子型のデータを用いて QTL 解析を行った結果、発酵力や香気成分の生成に関与する 25 個の有意な QTL を同定した。また、清酒酵母にも醸造に不利な QTL が存在しており、遺伝的に改良する余地が残されていることを確認した。

③清酒酵母の系統関係の解析

清酒酵母の系統関係を明らかにする目的で、清酒酵母きょうかい6号、7号、9号、10号などの各種醸造用酵母のゲノムを次世代型 DNA シーケンサーを用いて解析した。その結果、清酒酵母はワイン酵母等とは異なる独自のクラスターを形成することが確認された。清酒酵母の中でも、きょうかい6号、7号、9号、10号は他の清酒酵母と比べてきわめて近縁であり、現在使用されている清酒酵母には遺伝的な多様性が少ないことを明らかにした。また、これらの酵母では 2 本の相同染色体間のヘテロザイゴシティーが特異的なパターンを示しており、このパターンが菌株同定に有用であること、ヘテロザイゴシティーの喪失（LOH）がこれらの酵母菌株の進化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

B. 清酒酵母の栄養特性のポストゲノム解析

①清酒酵母の栄養特性の把握

清酒酵母の新たな栄養特性について、実験室酵母などとの比較により検索を行い、ビタミン B1, B2, B6 が 1.2 倍程度とやや多く、ナイアシンが 2.4 倍、グルタチオンが 1.3 倍、葉酸が 10 倍量程度多いことを見いだした。そこで、以前から清酒酵母で蓄積量が多いことを確認している SAM (2.4 倍) に加え、葉酸について詳細な解析を行った。

②SAM 蓄積の解析と応用

SAM 高蓄積機構について解析するため、実験室酵母の非必須遺伝子破壊株ライブラリーから SAM 高蓄積株をスクリーニングし、アデノシンリン酸化酵素の欠損株である $\Delta ado1$ 株とシスタチオンベータ合成酵素の欠損株である $\Delta cys4$ 株を取得した。 $\Delta ado1$ 株について DNA マイクロアレイ解析や SAM 周辺の代謝産物の測定を行った結果、SAM 蓄積とメチオニン代謝、糖代謝及びリン酸の蓄積とが密接に関係していることを明らかにした。また、 $\Delta ado1$ 株がコルディセピン耐性を有するという知見をもとに、遺伝子組換え操作によらない新規 SAM 高蓄積株の育種法を考案した。考案した方法により清酒酵母きょうかい 7 号ときょうかい 9 号より新規 SAM 高蓄積株を取得した。取得株では乾燥菌体 1 g あたり最大約 100 mg の SAM 蓄積量を達成した。なお、遺伝子組み換え操作によらない新規 SAM 蓄積株は、 $\Delta ado1$ 株と異なり、増殖に悪影響は認められなかった。取得株の *ADO1* 遺伝子のシークエンス及び相補性試験を行い、*ADO1* 遺伝子の機能が欠損していることを確認した。さらに、SAM は不安定な物質であるが、SAM 抽出画分にリン酸化化合物を添加することで SAM を安定化させる方法を開発するとともに、SAM を安定に保持できる酵母の乾燥条件を検討し、低温スプレイドライ法により高い SAM 残存率を得る条件を確立した。

③葉酸蓄積の解析と応用

葉酸の代謝研究のため、従来の微生物定量法に加え、新たに HPLC 法により様々な葉酸化合物を分別定量する分析法を確立し導入した。本法を用いて各種酵母の葉酸含量を測定した結果、清酒酵母が葉酸を高蓄積することを見出した。清酒酵母の中でも、特にきょうかい 6 号、7 号、9 号、15 号の特定の菌株が葉酸を高蓄積した。清酒酵母における葉酸量の経時的变化は、実験室酵母の挙動と異なり、対数増殖期から定常期に進むに従い増加することがわかった。さらに、葉酸高蓄積培地の検討を行った結果、各種アミノ酸を添加することで葉酸量の顕著な増加・維持効果を示すこと、蓄積する葉酸化合物の種類が変化することなどの知見を得た。

SAM 及び葉酸の高蓄積酵母については、いずれも特許を出願し、実用化に向けて民間企業との共同研究を立ち上げた。

5 評価結果

- ・ 必要性
 - きわめて重要 □重要 □必要 □必要ではなかった
- ・ 効率性
 - きわめて効率的 □かなり効率的 □効率的 □非効率
- ・ 有効性
 - きわめて有効 □かなり有効 □有効 □有効性が認められなかった
- ・ 目標達成度
 - 計画以上 ■計画どおり □やや不十分 □不十分

・ 総合評価

- 目標を十分に達成でき、科学技術の発展に大きな貢献を果たしたと評価される
- 目標を概ね達成でき、科学技術の発展に一定の貢献を果たしたと評価される
- 目標の達成が必ずしも十分でなかったが、研究への取り組みは評価される
- 目標の達成が不十分であり、研究への取り組みも不十分であった

6 総合所見

本研究は、極めて重要な研究で着実に進展しており、高く評価する。今後は、関連学会誌等に成果を公表するとともに、得られた知見の育種への応用と、研究成果の関連分野への波及効果を期待する。清酒酵母の醸造特性に関する研究では、コンソーシアムを立ち上げてきょうかい7号酵母のゲノム構造の決定に成功したほか、発酵力や香気成分の生成などの醸造特性に關与するQTLの同定、清酒酵母の系統解析などの大きな成果をあげたインパクトは大きい。これらの成果は基礎研究であるが、その情報は菌株の改良にも極めて大きな意味をもつと考えられる。網羅的解析とデータベース化は独立行政法人の研究所しかできない研究であり、今後も強力に押し進める必要がある。今後は、さらにバイオインフォマティクスと個別の遺伝子解析の両者を組み合わせることでポストゲノム研究においてさらなる成果をあげることが期待される。栄養特性に関する研究でも、酒類酵母中に蓄積される有用物質であるSAMや葉酸について、高蓄積株の育種や高蓄積培養条件の解明を行い、実用化（工業化）に直結できる成果をあげたと評価できる。今後は民間企業との共同研究の推進等を期待する。

課題名：酒類の安全性の確保に関する研究

1 実施者

プロジェクトリーダー（後藤邦康、須藤茂俊） 他 7 名

2 研究の背景、目的及び期待される成果

食品の安全性に対する消費者の関心は非常に高く、実際に安全性を脅かす事例が多発し大きな社会問題となっている。一方、食品の安全性を確保するためには科学的根拠に基づいたデータの集積が不可欠であるが、酒類の安全性に関しては、食品の一部として調査されてはいるものの、データは少ない。特に、清酒や焼酎のように日本伝統の酒類についての情報はさらに少ないのが現状である。そこで、本研究では安全性に関して社会的に関心の高い物質や酒類に関連のある成分について、国産酒類を主な対象として分析しデータの蓄積を行うとともに、必要に応じて酒類に適した分析法の開発、さらには酒類産業にとって安全性が危惧される物質の低減化のための研究を行うものである。また、酒類原料の由来等、酒類のトレーサビリティについても検討を加え、より安心して酒類が製造され、消費できる環境を醸成する。これらの研究により、日本で製造される酒類のより高い安全性の確保に寄与し、消費者の酒類に対する信頼をより高めることが期待される。さらに、最近増加している海外への国産酒類の輸出においても、安全面からの支援になるものと期待される。

3 研究概要

国際会議、学会等への出席や行政機関、関係業界等から情報収集を行い、酒類について社会的に関心度の高い物質として外因性内分泌かく乱物質、残留農薬等の分析を実施し、外部委託も活用して、現状の把握を行った。その結果に基づき、他の食品中の濃度との比較や酒類での特異値の出現状況等を勘案して目標物質を絞り、分析を行うとともに、必要に応じて酒類等に適した分析法の開発、さらには原因の探求及び低減化技術の開発を行った。また、酒類中の危惧物質の情報を収集し、蓄積した。

4 主な成果

A. 酒類の安全性に係る微量成分に関する研究

社会的に関心の高い物質として、外因性内分泌かく乱物質、残留農薬、原料米由来のカドミウムを対象に選び、酒類等におけるこれらの含有量等について調査した。また、酒類に関連のある成分としてカルバミン酸エチルを選定し、梅酒製造における低減方法及び増加要因について検討を行った。

その結果、種々の酒類中の外因性内分泌かく乱物質及び残留農薬については、食品衛生法または水道水の基準値を満たしていることを確認した。清酒製造における原料米由来のカドミウムについては、ほとんどが酒粕に移行し、清酒中にはわずかしか残らないことを確認した。

梅酒製造におけるカルバミン酸エチルの生成については、製造時の脱酸素剤の使用に低減効果がみられ（最大でおよそ 50%の減少）、木製樽容器に貯蔵すると、増加する可能性があるとの知見を得た。

なお、本研究で残留農薬の分析法を確立していたことにより、事故米穀不正規流通事件発生

時には、行政当局からの依頼に対し迅速に対応することができ、事件の沈静化に貢献することができた。

B. 酒類のトレーサビリティ

酒類のトレーサビリティについては、原材料等の確認及び原料品種の判別法について検討を行った。

原材料等の確認については、安定同位体比分析法の有効性について検討した。その結果、炭素安定同位体比分析が清酒への醸造アルコールの添加量の推測、及び単式蒸留しょうちゅうと連続式蒸留しょうちゅうの混和割合の推測に有効であることを確認した。また、エタノールの炭素安定同位体比と水の酸素安定同位体比の分析値の組み合わせが、泡盛及び黒糖焼酎と他の本格しょうちゅうとの判別に有効であることを確認した。

製成酒類から使用原料の品種を判別する手法の開発については、清酒及びワインから原料由来のDNAを用いる判別法について検討したが、原料由来のDNAの抽出及びそのPCR増幅は製成後の時間が経つにつれて困難となるため、結果的に、原料品種の判別方法の確立は現在のところ未了である。

5 評価結果

- ・ 必要性
 - きわめて重要 重要 必要 必要ではなかった
- ・ 効率性
 - きわめて効率的 かなり効率的 効率的 非効率
- ・ 有効性
 - きわめて有効 かなり有効 有効 有効性が認められなかった
- ・ 目標達成度
 - 計画以上 計画どおり やや不十分 不十分
- ・ 総合評価
 - 目標を十分に達成でき、科学技術の発展に大きな貢献を果たしたと評価される
 - 目標を概ね達成でき、科学技術の発展に一定の貢献を果たしたと評価される
 - 目標の達成が必ずしも十分でなかったが、研究への取り組みは評価される
 - 目標の達成が不十分であり、研究への取り組みも不十分であった

6 総合所見

本研究は地味な分野ではあるが、今後の我が国における酒類等の製造、販売において非常に重要であり、先導的で価値のある研究課題である。酒類の微量成分に関する研究において、外因性内分泌かく乱物質、残留農薬、カドミウム、カルバミン酸エチルを分析し、酒類の安全性の確保に寄与した成果は大きい。さらに、事故米等の突発的な諸問題に対しては機動力を発揮して、問題の解決に迅速かつ適切に対応したことを高く評価する。また、梅酒中のカルバミン酸エチルの低減に脱酸素剤が有効であるとの成果は、即実用化されるべき技術である。酒類のトレーサビリティについては、先導的な試みであり、困難な点も伴うが、原料の判別に有用で重要な課題であり、ぜひ今後も続け、完成させていただきたい。また、研究成果が酒類に対する「安全性の確

保」と「安心」につながるものだけに、分析技術に関するノウハウを維持・蓄積し、国際的な視野に立った調査を行うとともに、結果を積極的に公表し、酒類に対する国民の信頼に応えることを期待する。