

(前文)

酒類総合研究所は、第3期中期計画（平成23年度から平成27年度）に基づく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」を開催しました。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、「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、事後評価等を行うこととされています。

この度は、平成23年度から実施している研究課題のうち、特に基礎的・基盤的な3課題について、進捗状況の把握、目的・目標及び進め方の見直し、見直しに基づく資源の再配分等に資することを目的とする中間評価をして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24年11月20日（火）

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 太田明德

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：酒類成分の解析に関する研究

1 実施者

岩下和裕、磯谷敦子、高橋 圭、徳岡昌文、松丸克己、後藤奈美

2 研究の背景、目的及び期待される成果

これまでに、清酒の成分としては約 300 種類の物質が報告されている。しかし、近年の質量分析に基づくメタボロミクス技術の向上により、清酒には、これまでに報告されているより、さらに多くの成分が含まれていることが明らかになりつつある。また、既知の成分についても、これまではアミノ酸や有機酸などの対象とする成分ごとに分析法が必要であったが、より多くの成分を一度の分析で比較測定することが可能となっている。そこで、最新の質量分析装置を用いて、清酒やワインなどの醸造酒についての成分分析法を開発すること、さらには得られる多量のデータを処理する技術を確立することは、酒類の品目判定、混入物判定、酒類の安全性の確保など行政目的を達成するための基盤的研究として重要である。また、酒類に含まれる物質は原料から製造工程を経て酒類メタボライトへと変換されるが、その一連の変遷は十分に解析されていない。これら醸造中の成分変化は、品目判定や適正表示の観点から重要である。清酒中のペプチドについては、清酒中に比較的大量に含まれているものの各ペプチド成分の種類や量など不明な点が多い。そこで、基盤的な研究としてペプチド検出法の検討を行うとともに、原料米タンパク質の麴・もろみ中での変化などのペプチド生成機構について重点を置いた解析を行う。また、経験上、麴菌は清酒の品質に大きな影響を及ぼすことが明らかで、かつ麴の使用割合は清酒の特定名称表示の要件の判定にも重要であるが、麴菌遺伝子の大半が機能未知であるなど、未解明な点が多い。そこで、麴と清酒成分との関係についても重点的に研究を行う。

3 研究概要

A. 質量分析による醸造酒の成分解析法の開発

清酒を例にすると、これまでに約 300 成分が報告されているが、これらの成分を測定するには、それぞれの成分に合わせた多種多様な測定法が必要で、清酒成分全体を短期間で把握するのは大変に困難であった。また、最近の質量分析法（メタボロミクス技術）の発展により、酒類中にはこれまでに報告されているより多くの成分が含まれていることが明らかになりつつある。そこで、酒類の分析に質量分析に基づく方法を用いることで、これまでより短期間で多様な成分について分析することが可能となる。また、質量分析法に基づいた分析では、一度に多量のピークデータが得られる。得られたデータを比較するためには、多量のピークデータのマッチングや統計処理法を開発する必要がある。そこで、LC-Q/TOF MS, GC-MS を中心に清酒を対象として分析法の開発を行うとともに、得られたピークのマッチング法、溶出時間と精密質量による ID 化法について検討を行う。さらに、これらのデータを用いた統計処理法についても研究を行う。また、LC-Q/TOF MS については、物質同定のためのライブラリーがないことから、入手可能で量的に多く含まれる成分から順に標準品による同定リストの作成を行う。

B. 醸造中の成分変化と醸造条件、醸造工程の清酒成分への影響

原料や使用微生物、製造工程、濾過、貯蔵の工程、その後の化学変化など最終産物である清

酒の成分にはいろいろな条件が影響を与える。これらの醸造条件の影響を解析するためには、清酒製造中の成分変化を解析することも重要である。特に、もろみ前半は大量の糖分が含まれ、解析に影響を与えることも考えられる。また、これら醸造条件の違いは互いが最終産物の成分変化に影響を与えることが予想される。以上のことから、原料中、あるいは醸造工程中の成分変化について測定法の開発を行うとともに、原料や各工程と製成酒の成分との関連について解析する方法を開発する。

C. 酒類中の低分子オリゴペプチド分析・生成に関する研究

ジペプチドは、醸造酒に含まれる低分子オリゴペプチドの主要な構成物質であり、栄養要素としての役割のほかに呈味性に関係していると考えられている。また、生理的機能を保持している可能性が指摘されており、未知の機能も多いため食品産業を中心に多分野への応用が期待されている。しかし、これまでに論文として報告されているジペプチドの同定方法と定量解析方法は、網羅性の観点から制約があり、それぞれのジペプチドのプロファイリングと構造推定、定量解析に関しては少なからず困難を伴うものであった。そこで、本研究では、清酒やワイン、ビールなどの醸造酒を用いて、低分子オリゴペプチドの定性（プロファイリング）・定量方法を開発し、醸造酒の低分子オリゴペプチドの情報を収集することを目的とする。また、清酒においてこれらのペプチドは麹菌が生産するプロテアーゼが原料米のタンパク質に作用することにより生成するものと考えられる。これまでの研究で、麹菌のゲノム中には60遺伝子のプロテアーゼ、69遺伝子のペプチダーゼが報告されており、主要な酸性プロテアーゼ (*pepA* 遺伝子) でさえも、米タンパク質分解に対する作用は十分に研究されているとは言い難い。そこで、これらのプロテアーゼ、ペプチダーゼについて米タンパク質分解との関連について解析する。

4 これまでの主な成果

A. 質量分析による醸造酒の成分解析法の開発

これまでに、LC-Q/TOF MS については、清酒分析についての知見や最適な方法等がなかった。そこで、分析法の開発を行うために、既知の清酒成分について文献等を調査し清酒メタボライトリストの作成を行った。続いて、本リストから各物性ごとに69成分を選抜し、標準品を混合したモデル清酒の作成を行った。また、本解析は特定の物質を対象としないため、分析用の溶媒中の不純物や使用器具等からの溶出も分析の妨げになる。そこで、溶出や不純物の混入の少ない器具や試薬の選定、モデル清酒を使用した分離カラムや送液プログラム、イオン化、検出条件などの検討を行った。最終的に、清酒を用いて、前処理法を含めて検討することで分析法を開発した。同様に、揮発成分についてもスターラーバー抽出法を中心とした分析法を開発した。得られた分析法を用いて、多様な清酒、多様なワインの分析を行ったところ、主成分分析により清酒は品質表示基準ごとに、ワインは原料ブドウ品種ごとにグルーピングされた。以上のとおり、質量分析法を用いた基礎的な分析技術を確立した。

B. 醸造中の成分変化と醸造条件、醸造工程の清酒成分への影響

はじめに、原料の精米歩合や製造方法と清酒成分との関連について、質量分析に基づいた分析法で解析することが可能であるかどうかについて検討を行うために、山田錦を原料として、精米歩合の異なる純米酒、本醸造酒について分析を行った。その結果、LC-Q/TOF MS により分

析を行い、主成分分析を行ったところ、第1主成分が精米歩合と相関していることが明らかとなった。また、誘導体化した不揮発成分のGC-MSを用いた分析においても、同様の結果を得た。以上のことから、清酒の成分と精米歩合に相関が見られることが明らかとなった。さらに、これまで米麴の麴菌株が清酒成分に与える影響について明らかではなかったことから、ゲノム系統が明らかでない54株の麴菌株を用いた製麴とその麴を用いた小仕込みによる清酒製造を行い、LC-Q/TOF MSによる成分分析と主成分分析、クラスター分析による解析を行った。その結果、麴菌株のゲノム系統と成分による分類は良く相関したことから、麴菌株の違いは清酒の成分に影響を与えることが明らかとなった。

C. 酒類中の低分子オリゴペプチド分析・生成に関する研究

清酒を中心とした醸造酒に含まれるジペプチドを解析するために超高速液体クロマトグラフィー(UHPLC)と三連四重極質量分析計(MS/MS)を用いたプロファイリング方法・定量分析方法及び四重極-飛行時間型質量分析計(Q/TOF MS)を用いた構造推定方法を開発した。まず、アミノ基/イミノ基の誘導体化試薬である6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate(AQC)と醸造酒や標品のジペプチドと反応させた(誘導体化)。続いて、UHPLCによる誘導体化ペプチドの高分離を行うために、2.7 μm粒子が充填され、タンデムに繋いだ2種類のコアシェル型粒子カラムを用いる方法を開発した。検出法としてMS/MSで開裂し生成するAQCを検出するプレカーサーイオンスキャンを行なうことで、選択的にアミノ基・イミノ基を持つ成分を検出可能とした。清酒とビール、ワインにこの方法を用いて、ジペプチドを比較すると、それぞれの酒類で明らかに異なっていた。特に、清酒は、他の醸造酒と比べて多くの種類と高い濃度のジペプチドを含んでいることが分かった。また、32種類のジペプチド標品を用いてMS/MS解析により、清酒に含まれるジペプチドの定量分析を試みた。その結果、清酒中から約1~100 μMの濃度範囲で、ジペプチドが検出された。

続いて、ジペプチド標品がない場合でも網羅的に醸造酒のジペプチドの検出を行なうためにQ/TOF MSを用いた構造推定方法を開発し、清酒中から35種類以上のジペプチドと数種類のトリペプチドの検出に成功した。MS/MSとQ/TOF MS解析の両方の結果を併せると、清酒には60種類以上のジペプチドが含まれることが分かった。さらに、清酒中において定量できたジペプチドについて、その多くは原料米タンパク質であるグルテリンが米麴中のプロテアーゼ類により加水分解されることにより派生すると推定した。

そこで、清酒製造で機能しているプロテアーゼを調べるために、これまでの米麴プロテオーム解析の研究で明らかとなっていた、麴菌プロテアーゼ、ペプチダーゼについて、遺伝子破壊株の作成を行った。得られた遺伝子破壊株を用いて、米麴を作成したところ、プロテアーゼ関連酵素はもとより、菌体量、酵素生産全体に大きな影響を受けたものが見出された。

5 評価結果

- ・ 必要性
 - きわめて重要 □重要 □必要 □必要ではない
- ・ 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い

・ 進捗状況

■計画以上 □計画どおり □やや遅れている □遅れている

・ 総合評価

□拡大して実施すべきである

■継続して実施すべきである

□問題点を解決し、効果的、効率的な実施が求められる

□研究内容、計画、推進体制等の見直しが求められる

□課題の中止が求められる

6 総合所見

高度な分析方法を開発し、清酒成分のプロファイリングと微量成分の同定の飛躍的進歩を図ったことを高く評価する。本研究の成果は、酒類の安全性、品目判定、混入物判定等に大きく貢献することが予想され、消費者ニーズや行政ニーズに応えるものである。ぜひ継続して実施していただきたい。今後は、必要に応じて外部の専門家との連携（共同研究）を進めて、未同定成分の同定や成分の定量性の評価を行い、製品の品質の予測や原料品種の同定等にも資するようなプロファイルを早期に確立することを期待する。

課題名：醸造原料に関する研究

1 実施者

後藤奈美、奥田将生、小山和哉、高橋 圭

2 研究の背景、目的及び期待される成果

酒類は原料・製法・アルコール度数及びエキス分によって分類、課税されている。また、原料の品種や産地をラベルに表示した製品も多く市販されており、国民の適正表示への関心が高まっているところである。これらのことから、酒類の品目の判定という課税上の問題、並びに適正表示の確保に対応できる分析・調査方法の開発が求められている。そのため、これらの目的に酒類原料の各種成分の分析値をどの程度利用することができるか明らかにする。

また醸造用原料米については、近年、ミニマムアクセス米等の外国産米、低グルテリン米等の新規形質米のように多様なものが醸造に使用される可能性が大きくなっている。したがって、酒税法や酒類業組合法に基づく酒税調査や適正表示の確保等の基盤的情報として、これらの米の成分特性を把握する。

さらに、酒類には原料に由来する成分が多く含まれることから、酒類原料の成分を把握し、酒類の安全性確保に資する。併せて、国産ワインの輸出促進等に資するため、わが国固有の醸造用ブドウ品種、育種品種等の特徴を把握する。

以上で得られる成果は、各種酒類原料の成分の特徴、並びに酒類に反映される原料由来成分の特徴を明らかにするものであることから、酒税行政の基盤情報として役立つとともに、酒類業界に酒類の品質設計や品質の向上にも役立つ情報を提供することができる。また、酒類原料の育種及び栽培指標の策定に役立つ情報を提供できる。これらの研究の波及効果は、酒類産業全体の振興、並びに国民が高品質な酒類を楽しむという生活の潤いの提供となって現れることが期待される。

3 研究概要

A. 醸造用原料米に関する研究

以下に示す醸造用原料米の成分（無機元素、タンパク質、代謝物、デンプン）の特徴、並びに清酒に反映される原料由来成分の特徴を明らかにする。

- i) 無機元素：施肥に用いられない土壌由来の無機元素は産地の特徴を反映すると考えられるが、醸造用原料米については品種産地や精米歩合の影響に関する報告が少ない。そこで、原料米の無機元素を分析し品種産地や精米歩合の影響を明確化する。
- ii) タンパク質・代謝化合物：醸造用原料米のタンパク質は清酒のアミノ酸・ペプチド組成や量に影響を及ぼし品質特性に関わりが深いと考えられている。近年のイネゲノム解析の結果、米タンパク質の60%を占めるグルテリンは15の遺伝子から成ることなどが明らかになってきたが、グルテリンやプロラミンの各遺伝子に基づくタンパク質レベルでの米粒内分布については明らかにされていない。また、代謝化合物については、糠にビタミンや脂質が多いことなどは明らかにされているが、米粒内部での分布については多くが不明である。そこで、醸造用原料米の貯蔵タンパク質と代謝化合物の米粒内分布について明らかにする。
- iii) デンプン：デンプンの分子構造及び老化特性は、蒸米消化性との基本的関係は明らかにな

ってきたが、醸造過程との関係については必ずしも明確ではない。そこで、醸造用原料米のみでなく甘藷や麦等の焼酎原料についても異なる年次や産地、品種のデンプン特性を分析し、醸造との関係を明らかにする。

また、上記成分について、清酒に反映される原料米の成分的特徴が、醸造条件によってどの程度変動するかを明らかにする。

B. 醸造用ブドウに関する研究

ワインの産地（地理的表示）や品種名の適正表示の確保に資するため、醸造用ブドウに含まれる種々の成分について、品種や産地による組成や含有量の特徴の有無、またその特徴がワインにどの程度反映されるかを明らかにする。ブドウに含まれる成分については、次の成分に着目して取り組み、必要に応じて他の成分についても順次行うこととする。

- i) フェノール化合物：醸造用ブドウのフェノール化合物は品種（遺伝的要因）と栽培条件（環境要因）の影響を受けることが知られている。しかし、我が国では海外の有名産地とは大きく異なる気象条件、食用品種や兼用品種の利用、及び棚仕立てなど、独自の事情があることから、これらの条件が醸造用ブドウのフェノール化合物に及ぼす影響を明らかにする。
- ii) 微量元素：これまでに、市販ワイン中の微量元素による輸入ワインと国産ワインの識別の可能性が示唆されていることから、さらにその有効性や、施肥条件、醸造条件等の影響を検討する。

また、わが国でワイン原料として用いられている固有品種や育成品種について、その特徴を把握する。さらに、DNA 多型解析による酒類原料（ブドウ以外を含む）の同定について検討する。

4 主な成果

A. 醸造用原料米に関する研究

- i) 無機元素：醸造用原料米の無機元素に関して、各元素の精米による含有量の変化を調べた。その結果、すべての元素において精米により減少したが、元素によって減少のパターンは異なることが明らかとなった。Cu、Mo 含量は精米歩合 30%まで精米歩合の低下とともに減少した。その他は、精米歩合 70%まで減少し以後変化しなかったが、残存率が比較的高い元素 (Zn, B, Se)、中程度 (Ca, Na, Ni, K, Mn, Cs, Rb)、残存率の低い元素 (Sr, Si, Mg, Ba) に分類された。また、品種に関しては山田錦に比べ五百万石の Fe, K, Mg, P, Sr 含量が有意に高かったが、同一品種でも産地による変動も大きかった。本課題に関連して清酒醸造工程における Cs の挙動を調べたところ、玄米中の Cs は精米や洗米によりかなりの部分が除去され、清酒にはほとんど移行しないことが明らかになった。
- ii) タンパク質・代謝化合物：醸造用原料米について、精米歩合別の米粉末を分画し、タンパク質の分布を SDS-PAGE やイムノブロット法、MALDI-TOF MS/TOF MS 法などにより解析した。米の外側から内側に向けて米粉末単位重量あたりのタンパク質は全体的に減少したが、その減少の程度は一様でなくタンパク質ごとに異なった。種子貯蔵タンパク質であるグルテリンとプロラミンについては、米粒内のタンパク質局在がサブファミリーごとに異なることが示唆された。続いて、精米歩合別の米粉末中の極性代謝化合物を CE-TOF MS 法によって網羅的に解析した。極性代謝化合物のプロファイルは、米粒内の部位に依存して大きく変化し、米粒

の外側でほとんどの化合物の含有量が高いことを確認したが、それとは反対に米粒中央で外側と同程度の含有量を示す化合物を見出した。一方、米品種・産地による特徴的な成分変化は見出すことができなかった。その理由として、気象条件を含めた栽培環境の影響が大きいことが考えられた。

B. 醸造用ブドウに関する研究

- i) フェノール化合物に及ぼす栽培条件の影響：日本各地のワイナリーから提供された赤ワイン用ブドウ（メルロ及びカベルネ・ソービニヨン）を用いた2年間の疫学的調査結果を解析した。ブドウの分析値及び気象データを説明変数とする重回帰分析の結果、アントシアニンの蓄積には降水量や気温、果汁の窒素分が負の相関を示し、収穫年よりも産地の影響が大きいことが示された。一方、プロアントシアニジン（縮合タンニン）の蓄積は7月の日照時間と正の相関を示し、産地よりも収穫年の影響が大きいことが明らかになった。また当所圃場で栽培するブドウを用いた実験から、プロアントシアニジンとフラボノールは遮光で蓄積が抑制されるが、フラボノールが UV で生合成を促進されるのに対し、プロアントシアニジンは UV ではなく白色光が生合成を促進することが明らかになった。
- ii) 品種によるフェノール化合物の特徴：フェノール化合物の品種による特徴を把握するため、5品種（欧州系品種（カベルネ・ソーヴィニヨン）及び国産品種を含む）の収穫期の果皮におけるフェノール化合物組成を比較している。Preliminary な結果として、カベルネ・ソーヴィニヨンは、主にプロアントシアニジン濃度及び組成の違いによって他品種と区別しうることが示された。

5 評価結果

- ・ 必要性
 - きわめて重要 重要 必要 必要ではない
- ・ 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い
- ・ 進捗状況
 - 計画以上 計画どおり やや遅れている 遅れている
- ・ 総合評価
 - 拡大して実施すべきである
 - 継続して実施すべきである
 - 問題点を解決し、効果的、効率的な実施が求められる
 - 研究内容、計画、推進体制等の見直し求められる
 - 課題の中止が求められる

6 総合所見

醸造用原料の無機元素、タンパク質、代謝産物等の分析を行い、それらの産地、品種、収穫年等の変動要因との相関を明らかにしつつあり、着実に進展していると評価する。本研究は、

酒類の品目や原料の生産地の判定に資するものであり、適正な課税や表示による消費者の知る権利の確保に沿った研究であり、輸出促進にも必要であることから、独立行政法人酒類総合研究所で取り組むべき重要な課題である。今後は、継続して研究を進めるとともに、産地、栽培条件、気象条件などの影響を整理し、気候の変動によらず一定の成分、あるいは一定の品質をもつ醸造用原料が得られるようにするにはどうすればよいかについても検討していただきたい。また、米やブドウのSNPsを用いた系統解析については、その有効性から今後も積極的に進める必要がある。米タンパク質の局在調査については、抗体を使用した間接免疫蛍光法の導入も検討していただきたい。本研究の将来的波及効果として、米については日本発の世界に誇るデータベースの確立、ワイン用ブドウについては国際的に汎用されるデータベースの確立を目指す研究協力体制の推進を期待する。

課題名：醸造微生物に関する研究

1 実施者

下飯 仁、山田 修、後藤奈美、岩下和裕、赤尾 健、渡辺大輔、高橋 徹、周 延

2 研究の背景、目的及び期待される成果

当研究所は、これまでに酵母や麹菌などの醸造微生物に関する豊富で幅広い知見や技術を蓄積してきた。醸造微生物に対する酒税及び酒類行政上の要請としては、菌株の安全性の研究を通じた酒類の安全・安心の確保や、菌株の精密な識別技術の開発によるトレーサビリティの向上などの課題が現に存在する。

また、醸造微生物は、酒類製造において原料から酒類への物質変換過程を担う存在であり、各種の酒類成分の生成に強く関与していることから、将来的な酒税及び酒類行政上の課題においても醸造微生物に関する知見や技術を用いて取り組むべきものが多いと見込まれる。例えば、酒類中の特定成分のうち、菌株の安全性、不正使用、種類の判別などに係るものについて、醸造微生物による生成の実態や生成経路の解明などの検討が求められることが想定される。随時生じるこうした課題に適切かつ迅速に対応するためには、研究所がこれまでに蓄積してきた醸造微生物に関する様々な資産を活かし、更には発展させながら備えておく必要がある。醸造微生物に関する知見や技術を効率的に広く蓄積していくためには、必要に応じて他の研究課題とも連携しながら、応用ゲノミクスの視点から包括的に取り組んでいくことが有効である。

そこで、酵母については、各種酵母菌株のゲノム（遺伝型）及び表現型情報を網羅的に収集し、これらの菌株間の共通点・相違点などを詳細に解析する。これにより菌株を正確に判別する技術や遺伝型から表現型特性を推定する技術を開発する。

また、麹菌については、ゲノム情報を活用して、麹菌の有用形質の遺伝的背景を解析し、さらに麹菌が生産する代謝物の合成に関わる遺伝子の機能を網羅的に把握することを目指す。

3 研究概要

A. 分析・鑑定の高度化に資する醸造用酵母の基盤的研究

上記の目的を達成するため、また併せて酵母に関する汎用性の高い情報及び技術基盤の整備を目指すとともに、対応可能な解析技術の範囲についても拡大を図るために、以下のように研究を進めていく。すなわち、様々な酵母菌株について広くゲノム（遺伝型）情報を独自の解析及び公開情報の利用により収集し、菌株によるゲノム（遺伝型）情報の差異について解析する。ここから得られる成果は、直ちに菌株の判別技術の開発に利用できる。また、現状では様々な菌株について同一条件で測定された表現型の情報は少なく、遺伝型の情報量と著しくバランスを欠いている。そこで、様々な酵母菌株の醸造特性などの表現型情報を収集し、酒類製造時の各種成分値の範囲に関する知見を得る。これは、成分異常値の原因の推定の際に有効である。さらに、ゲノム情報と表現型との関係性について遺伝統計的解析及び個別遺伝子の解析を行い、醸造特性に影響を与える遺伝子の推定を試みる。

こうした取組みは、酒類行政上の課題の解決に資することが主たる目的であるが、波及的効果として酒類製造業の振興に繋がる技術開発、更には基礎科学への貢献も期待できる。例えば、表現型の詳細な解析は菌株の個性の再評価も意味し、酒類製造現場での菌株選択の新たな指標

の提供を可能にする。また、醸造特性の遺伝的原因の解明などを通じて、菌株の育種・選抜に有用な遺伝的指標の提供が可能である。更には、醸造用酵母の保存管理法や、醸造用酵母の多様化や進化についても示唆的な情報が得られることが期待できる。

B-1. 分析・鑑定的高度化に資する麴菌の基盤的研究（黒麴菌）

麴菌を含む糸状菌のゲノム解析が進展し、そのゲノム中には1万を超える遺伝子が存在していること、そしてその大半が機能未知であることが明らかとされつつある。そこで、麴菌について、ゲノム情報を活用し、麴菌の有用形質の遺伝的原因についての解析を行う。また、麴菌は、カビ毒オクラトキシンAなどを生産しないことが証明されているが、生理活性を有する他の二次代謝産物を生産する可能性も示唆されている。また、近年、事故米のように醸造原料等への汚染菌の繁殖によるカビ毒混入の危険性も懸念されている。そこで、二次代謝産物の生合成経路及び二次代謝産物の原料となりうる代謝産物の生産に関与すると推測される遺伝子群を網羅的に同定するとともに、どのような物質を生合成するのかを、遺伝子高発現や遺伝子破壊などの方法により解析する。さらに、これら遺伝子群が製麴条件下などどのような条件で発現しているかをRT-PCR法などにより詳細に検討する。また、データベースを活用し醸造原料等汚染菌のゲノム情報も利用する。これにより、麴菌がどのような代謝物をどのようなタイミングで生産するのかを把握することで酒類の安全性の確保に資するための基盤的な情報を確保することができる。

B-2. 分析・鑑定的高度化に資する麴菌の基盤的研究（黄麴菌）

黄麴菌は、コウジ酸やペニシリン等の有用二次代謝産物や、シクロピアゾン酸などの毒性のある二次代謝産物を生産する菌株があることが知られていた。また、アフラトキシンは生産しないものの、その遺伝子クラスタを有している株があることが知られており、これらの遺伝子は醸造環境で発現しないことから安全であると考えられている。しかし、近年のゲノム解析の結果から、*Aspergillus* 属のゲノム中には、これまでに知られているよりも遙かに多くの二次代謝生産遺伝子クラスタがあることが明らかになった。これらの遺伝子の多くは実験条件では沈黙していることが多く、他の生物との共培養や昆虫からの補食など環境条件の変化により発現するものがあることが明らかとなっている。二次代謝クラスタの遺伝子発現については、アフラトキシン遺伝子クラスタについて多くの研究が行われており、*AfIR*など遺伝子クラスタ特有の転写因子が明らかになっていることに加え、*LaeA*複合体などゲノムワイドなレギュレーションにかかわる因子も明らかになっている。このような観点から、機能未知の遺伝子クラスタの機能について解析するとともに、その発現制御機構についてゲノムワイドなレギュレーションを軸に解析を行う。

4 主な成果

A. 分析・鑑定的高度化に資する醸造用酵母の基盤的研究

現在までに新たに約20サンプルについてゲノム配列解読を実施し、醸造用酵母の遺伝情報基盤を充実させた。また、過去にゲノム情報取得済みの菌株と併せて、ゲノムワイドな系統関係及びSNP（1塩基多型）分布について解析した。その結果、同一株由来の保存菌株間でもSNPの分布パターンに差のあることがわかり、実際の継代培養や保存の間にLOH（異型性の喪失）

が生じていることが判明した。このことは、LOH が菌株の進化の一因であるという考え方を支持するものである。

醸造特性に影響を与える遺伝子の研究においては、清酒酵母きょうかい7号 (K7) のゲノム解析結果から、酵母の細胞周期における休止期移行制御において必須な役割を果たす *RIM15* 遺伝子上の機能欠失変異を同定し、当該変異により K7 は実験室酵母と比べて休止期への移行 (ストレス耐性獲得、細胞周期停止、貯蔵性多糖蓄積) に欠損を示すことを見出した。さらに、実験室酵母において *RIM15* 遺伝子を欠失させると発酵速度が著しく上昇したことから、当該変異が清酒酵母の高発酵性をもたらす一因であることが明らかとなった。この *RIM15* の変異の分布は、優良清酒酵母 (K6、K7、K9、K10 及び派生株) に特異的であり、*RIM15* の欠損を介した休止期移行欠損及び高発酵性はこれらの菌株における共通の表現型であることが示唆された。

また、酵母の細胞形態を網羅的に解析する CalMorph システムによる解析の結果、K6、K7、K9、K10 は実験室酵母と比べて「細胞サイズが小さく出芽細胞の割合が高い」という共通の表現型を示した。細胞周期の G1 期が短縮された変異株との表現型の類似性から、K7 では G1 期サイクリン *CLN3* が高発現し、これにより G1 期の進行が促進されていることを明らかにした。更に K7 の *CLN3* 破壊株では発酵力が著しく低下したことから、清酒酵母における *CLN3* 高発現が高発酵性の一因であると推測された。

酵母菌株の判別技術の開発の一環として、上述の *RIM15* 変異等をマーカーとした優良清酒酵母の識別方法を確立した。具体的には、近年遺伝子診断や作物品種の鑑定などに応用されているリアルタイム PCR 技術の一種である HRM (高解像度融解曲線分析) 法に関する条件検討を行った結果、優良清酒酵母とその他の菌株を簡便に区別することが可能となった。今後は、取得済みのゲノム情報を活用して各々の菌株に固有の SNP 等に注目することにより、さらに詳細な判別技術を開発していく予定である。

B-1. 分析・鑑定の高度化に資する麹菌の基盤的研究 (黒麹菌)

これまで ITS などの塩基配列解析から、黒麹菌は *Aspergillus niger* とは別の種であること、黒麹菌は、*A. niger* においてカビ毒オクラトキシン A 生合成に関与する遺伝子を持たないことを報告した。また、産学官連携の下、黒麹菌のゲノム配列の解析を行い、GlimmerHMM などにより ORF (Open Reading Frame) を予測したところ、黒麹菌は 12,921 個の遺伝子を保有すると予想され、*A. niger* とほぼ同等数の遺伝子を有していることを明らかとした。また、塩基レベルでの相性は 88.9% と予想され、ゲノムレベルでも黒麹菌は *A. niger* とは別種であることが示唆された。さらに、全 ORF に対して InterProScan 解析を実施し、機能ドメイン、GO term との関連付、WolfPSORT による局在性予測を行い、解析結果をデータベース化するとともに blast 相同検索などによる解析が可能なシステムの開発を行った。現在、開発したシステムは研究所内からのみ利用可能であるが、今後は論文の発表にあわせて所外でも利用できるよう公開する予定である。(http://192.168.1.100/)

また、個別遺伝子の機能ドメインなどの予想結果を利用し、二次代謝産物の生合成に関与していることが示唆される Polyketide synthase (PKS) 及び Non-ribosomal peptide synthase (NRPS) のタンパク質をコードしていると予想される遺伝子を網羅的に解析したところ、黒麹菌は染色体上にそれら遺伝子をそれぞれ 77 及び 13 個有していると考えられた。現在、様々なツールを利用し terpene 系化合物を含む二次代謝産物生合成クラスタの予想が可能な

antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell) システムによる遺伝子クラスタの構造解析を行っている。

上記 *in-silico* 解析から推測された二次代謝産物の生合成に関与していると思われる遺伝子については、遺伝子破壊や遺伝子高発現によりその機能を確認する必要がある。しかし、黒麹菌においては、遺伝子破壊技術はおろか形質転換技術すら確立されていなかった。そこで黒麹菌の形質転換方法の確立を目指すこととした。黄麹菌で一般的な形質転換方法であるプロトプラスト-PEG 法を用いて黒麹菌の形質転換を行ったところ、回収することのできるプロトプラスト数は極めて少なく黄麹菌の 1/1000 程度であった。回収されたプロトプラストを用いて形質転換を行ったが、プロトプラスト数が少な過ぎたためか形質転換体を得ることができなかった。また、エレクトロポレーション法による形質転換も検討したが、プロトプラスト-PEG 法と同様に形質転換体を得ることができなかった。そこで近年、糸状菌の形質転換にも応用されているアグロバクテリウム法を用いた形質転換について検証を行った。アグロバクテリウム法は上記2つの方法とは異なり、アグロバクテリウム菌が宿主に感染することを利用した方法であり、形質転換体を得られるまでの時間はやや長くかかるが高い形質転換効率を有するといわれている。アグロバクテリウム法によりハイグロマイシン耐性遺伝子をマーカーに黒麹菌の形質転換を行ったところ、一度の形質転換で数百コロニーもの形質転換体を得ることができた。これらのことから黒麹菌の形質転換方法としてアグロバクテリウム法が最適であることが明らかとなった。

次に、遺伝子機能を解明するために必要となる遺伝子破壊効率の高い菌株宿主の造成を行った。遺伝子組換えは非相同組換えと相同組換えに分けられる。遺伝子破壊を行うためには、優先的に相同組換えを起こさせる必要がある。しかしながら、糸状菌は相同組換えよりも非相同組換えが優先的に働くため、遺伝子破壊が困難であることが広く認められている。その要因として Ku70/80 複合体や DNA ligase IV (*ligD*) 遺伝子が機能しているためであること、黄麹菌では *ligD* 遺伝子を破壊することにより遺伝子破壊効率が飛躍的に向上することがこれまでの研究により報告されている。そこで黒麹菌においても *ligD* 遺伝子を破壊し、遺伝子破壊効率の高い宿主を造成することとした。形質転換方法にはこれまでに確立したアグロバクテリウム法を使用し、黒麹菌の *ligD* 遺伝子の破壊を試み 2 株の *ligD* 遺伝子破壊株を取得した。次いで、黒麹菌の黒色色素の生産に関与する *pksP* 遺伝子を目的遺伝子として *ligD* 破壊株における遺伝子破壊効率を検定した。その結果、遺伝子破壊カセット内部の相同領域を 500 bp 以上とすることにより 100%の確率で遺伝子破壊を行うことが可能であることが明らかとなった。さらに、遺伝子破壊技術の確立だけでなく遺伝子高発現実験系の構築にも成功しており分子生物学的研究に必要な技術である遺伝子破壊・遺伝子高発現が可能な系の確立に成功した。

黒麹菌は黄麹菌と比べてマイコトキシンの非生産性に関する知見が非常に少ない。このことから、食品衛生法により規制されているマイコトキシン及び今後、食品衛生法で規制対象になる可能性のあるマイコトキシンに関して黒麹菌を用いた麹中でのこれらマイコトキシンの有無を分析した。分析対象はアフラトキシン B1, B2, G1, G2, パツリン, ゼアラノン, デオキシニバレノール, フモニシンの計 8 種類とした。結果として、いずれのマイコトキシンも不検出であり、上記マイコトキシンの生産性という観点での安全性は高いと考えられる。

B-2. 分析・鑑定の高度化に資する麹菌の基盤的研究 (黄麹菌)

これまでのゲノム解析を元に、黄麴菌のヒストン修飾に関連する遺伝子としてヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）に着目し解析を行ったところ、11個のHDACを有していた。これらについて、遺伝子破壊を行ったところ、*Rpd3*は破壊できず必須遺伝子であることが示唆されたが他の遺伝子は破壊株が得られた。そこで、これらの破壊株について、コウジ酸生産性を指標に二次代謝生産について解析を行ったところ、2つの破壊株でコウジ酸生産性が大幅に上昇することが明らかとなった。特に菌類に特異的であり機能解析されていない sirtuin 系のHDACである *hstD*破壊株について、定量的にコウジ酸生産性を検討したところ、親株に比べ200倍に上昇していた。さらに、ペニシリン生産も活性化されており、マイクロアレイ解析を行ったところ、他の二次代謝クラスタを含む代謝に関わる遺伝子群が数多く活性化されていた。そこで、二次代謝生産に幅広くかかわる *LaeA* の遺伝子発現について解析したところ、*hstD*破壊株で上昇していることが明らかとなった。そこで、2重破壊株等を用いて遺伝学的な関連について解析したところ、*HstD*は *LaeA* の発現を制御することにより、グローバルなレギュレーションを行っていることが明らかとなった。本研究は、*LaeA* の制御に直接かかわる因子を示した最初の例でもある。（コウジ酸の新規生産技術として特許出願）

5 評価結果

- ・ 必要性
 - きわめて重要 重要 必要 必要ではない
- ・ 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い
- ・ 進捗状況
 - 計画以上 計画どおり やや遅れている 遅れている
- ・ 総合評価
 - 拡大して実施すべきである
 - 継続して実施すべきである
 - 問題点を解決し、効果的、効率的な実施が求められる
 - 研究内容、計画、推進体制等の見直し求められる
 - 課題の中止が求められる

6 総合所見

本研究は、独立行政法人酒類総合研究所で取り組むべき重要な研究課題であり、継続して実施することが必要である。清酒酵母のストレス応答遺伝子の研究は酵母のアルコール発酵力を理解する上でエポックメイキングな新しい発見であり、高く評価する。また、酵母のゲノム情報やSNPsの研究は菌株の改良、保存、管理方法の開発にも資するものである。黒麴菌については、*Aspergillus niger*と別の種であることやマイコトキシンの非生産性を証明し、酒類のみならず醸造物全般の安全性にも寄与する重要な成果を挙げている。黄麴菌についても、マイコトキシンの非生産性による安全性に資する成果を挙げるとともに、二次代謝産物生産に関するエピジェネティック制御などの重要な知見が得られている。今後は、遺伝子の発現から生成する

二次代謝産物の予測が可能になることを期待するとともに、二次代謝産物に関して、外部の研究機関との共同研究を進め、研究のより一層の効率化、迅速化を図り、本研究の成果による波及効果と応用範囲をより広いものにすることが望ましい。また、本研究は基盤研究の側面もあることから、研究中に派生する萌芽的な研究にも着目して、新たな研究課題の創出につなげていただきたい。