

(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、「国の研究開発評価に関する大綱的指針」(平成24年12月6日内閣総理大臣決定)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。

この度研究開発評価委員会は、平成23年度から実施している研究課題のうち、3課題については、達成度、成功・不成功の原因の把握・分析、波及効果の把握・普及等に資することを目的とした事後評価を、2課題については、進捗状況の把握、目的・目標等の見直し、進め方の見直し、資源の再配分の決定等に資することを目的とした中間評価を実施し、報告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25年11月14日(木)

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、大河内基夫、岡崎直人、熊谷日登美、塚本芳昭、平田大

(敬称略、五十音順)

(注) 委員には、酒類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。

事後評価

課題名：飲酒による負の影響の軽減に資する研究

1 実施者

須藤茂俊、松丸克己、藤井力、伊豆英恵

2 研究の背景、目的及び期待される成果

1981年にマーモット博士（イギリス）が適度な飲酒が心身に良い影響を与える「J-カーブ効果」を提唱した後、国内外の疫学研究で多数、同様の結果が報告されている。その一方、心や体の健康に害をもたらす負の影響にも注意が必要であることから、適正飲酒の推進について大きな社会的要請がある。本課題では、飲酒による負の影響の軽減に資することを目的とし、研究を行った。

酒類成分の酔いに関わる神経受容体への影響：エタノールの脳における作用点の1つとして神経受容体があり、GABA_A受容体やNMDA型グルタミン酸受容体等の神経受容体にエタノールが作用することが「酔い」の一因とされる。酒類成分も神経受容体に影響を及ぼす可能性が示唆されているが、これまでに検討が少ないことから、酔いに影響を与える酒類成分の探索を試みた。仮に、酔いを抑制あるいは過度に促進する成分があれば、その物質制御が飲酒による負の影響の軽減につながる。また、酔いを過度に促進するような特徴を有する成分は、いわば酒類中の有害物質ともとらえられ、本研究による試みがその実態把握となり、酒類の品質・安全性の確保につながると期待される。

適量飲酒の効能：これまでに飲酒に関する研究は、疫学、生体への有害作用、ワインのポリフェノールの3点に集約される傾向にある。1980年代に「J-カーブ効果」が提唱されたものの、大量あるいは長期連続的飲酒による負の影響に研究が集中し、適量及び少量飲酒の研究がほとんどされてこなかった。適量及び少量飲酒の影響を調べ、飲酒の良い面と悪い面の両面を明らかにし、情報提供することは国民の利益につながり、酒類業の健全な発達に資すると期待される。

3 研究概要

A. 酒類成分の酔いに関わる神経受容体への影響

エタノールは様々な神経受容体に作用し、酔いに影響を及ぼす。例えば、これまでにエタノールがGABA_A受容体を活性化、NMDA受容体を阻害することが報告されている。今回、酒類成分がこれらの神経受容体に与える影響の解明を目的とし、検討を行った。また、神経受容体に影響を及ぼす成分を見いだした場合、動物に投与し、行動試験で影響を調べることにした。

GABA_A受容体を活性化する物質は、その作用程度に応じ、「抗不安→精神安定→睡眠→麻酔効果」といった多様な影響を及ぼす。酒類成分によるGABA_A受容体の活性化が適度であれば、抗不安など飲酒の良い影響を促進するが、その影響が過度になると泥酔や意識混濁など飲酒の負の影響を促進する可能性がある。NMDA受容体は学習、記憶、運動機能に関与し、NMDA受容体の適度な活性化によって記憶障害抑制、適度な阻害によって抗不安効果等が期待される。神経受容体活性に影響を与える酒類中の成分を制御することで、過度な酔いを防ぎ、飲酒による負の影響を軽減できる可能性がある。

B. 適量飲酒の効能

数多くの疫学研究で適量飲酒の効能が証明されているものの、非飲酒者に体調不良者が含まれる可能性、飲酒に関わる生活習慣や心理的効能、飲酒者の社会経済状態の影響が無視できないため、これまでに適量飲酒の効能がアルコール摂取の直接的効果である実証が得られていない。また、飲酒をめぐるこれまでの研究では、概して、有害影響に注目が集まり、効能や少量飲酒の研究はほとんどない。そこで飲酒の良い面と悪い面の両面的影響についての基盤的情報を得ることを目的とし、検討を行った。

4 これまでの主な成果

A. 酒類成分の酔いに関わる神経受容体への影響

酒類成分の酔いに関わる神経受容体への影響を調べ、酒類中のアルコールだけでなく、酒類成分が GABA_A 受容体や NMDA 受容体の活性に影響を与え、酔いに影響を与える可能性が示唆された。

(1) 清酒成分の GABA_A 受容体への影響（近畿大学との共同研究：平成 23 年 4 月～現在）

清酒（純米酒 3 点、純米吟醸酒 1 点、山廃純米酒 1 点、普通酒 1 点）をイオン交換樹脂で分画（塩基性アミノ酸、中・酸性アミノ酸、有機酸、糖の 4 画分）し、それらの GABA_A 受容体への影響を調べた。アフリカツメガエルの卵母細胞に GABA_A 受容体を発現させ、分画物存在下で二電極膜電位固定法によって GABA_A 受容体活性を測定した結果、4 画分中で有機酸画分による活性化率もっとも高かった。ただし、この画分に GABA は存在しないため、GABA 以外に GABA_A 受容体に作用する成分の存在が示唆された。また、色々な清酒でこの活性化が見られたため、この成分が普遍的に清酒に存在すると推測された。次に、有機酸画分を CE-TOFMS でメタボローム解析し、64 成分を同定した。その中の 13 成分（ピルビン酸、2-オキソグルタル酸、2-ヒドロキシ-4-メチル吉草酸、クエン酸、リンゴ酸、2-ヒドロキシ吉草酸、キナ酸、グルコン酸、グリコール酸、3-ヒドロキシ酪酸、メバロン酸、乳酸、パントテン酸）の標品を用いて活性測定（200 及び 500 μ M）を行った結果、活性化率に違いはあるが、いずれも GABA_A 受容体活性があり、これらが GABA 様物質となりうることを確認した。このうち、高い活性を示した乳酸、グルコン酸、ピルビン酸について GABA_A 受容体に対する薬理学的特徴を調べ、乳酸の EC₅₀（50%有効濃度）が GABA よりも低いことを示した。さらに乳酸、グルコン酸をマウスに腹腔内投与（10 mg/kg 体重）し、高架式十字迷路試験で抗不安作用があることを確認した。

(2) 清酒成分の NMDA 受容体への影響（近畿大学との共同研究：平成 23 年 4 月～現在）

NMDA 受容体の 4 つのサブタイプのうち、大脳皮質、海馬に多く存在する GluN1/GluN2B サブタイプと GluN1/GluN2A に対する清酒成分の効果を検討した。1) 同様に清酒分画物を用い、分画物存在下、グルタミン酸 100 μ M / グリシン 100 μ M を灌流し、二電極膜電位固定法で NMDA 受容体活性を測定した結果、塩基性アミノ酸及び有機酸画分による活性阻害がわかった。このうち、塩基性アミノ酸画分に着目して CE-TOFMS でメタボローム解析を行い、50 成分を同定した。塩基性アミノ酸画分に含まれるアミン類に着目し、標品（50-300 μ M）を用いて NMDA 受容体活性への影響を調べ、アグマチン、プトレシン、2-フェネチルアミン、

チラミンが GluN1/GluN2A 及び 2B 受容体を阻害、イソアミルアミンが GluN1/GluN2A 受容体を活性化して GluN1/GluN2B 受容体を阻害、スペルミンが GluN1/GluN2A 受容体を阻害して GluN1/GluN2B 受容体を活性化することを示した。これらについて、 IC_{50} (50%阻害濃度) を調べ、特に 2-フェネチルアミンが低濃度で阻害を示すことがわかった。

(3) 焼酎香気成分の NMDA 受容体への影響 (近畿大学との共同研究:平成 23 年 4 月~現在)

香気成分は鎮静効果やリラックス効果などをもたらすと考えられているが、その作用機序は不明な点が多い。今回、焼酎に含まれる香気成分の NMDA 受容体活性への効果を検討した。香気成分存在下 (2.5 mM)、2) 同様に NMDA 受容体活性 (GluN1/GluN2B、GluN1/GluN2A) を測定した結果、用いた 10 種類の香気成分すべてが活性を阻害した。特にフルフラール、ネロール、シトロネロールは高い活性阻害を示した。また、イソアミルアルコール、n-プロパノール、ネロール、シトロネロール、ゲラニオールではサブタイプ間で阻害率に違いがみられた。マウスに香気成分を腹腔内投与後 (15-90 mg/kg 体重)、高架式十字迷路試験をしたところ、NMDA 受容体阻害活性の高いシトロネロールは有意な抗不安作用を示し、他のリナロール、イソアミルアルコール、フェネチルアルコール、n-プロパノールも有意ではないが同様の作用があった。また、焼酎に含まれる程度の濃度でこれらの成分をそれぞれエタノールに添加し、エタノール (4 g/kg 体重) のみを投与した場合と自発運動量への影響を比較し、フェネチルアルコール (100ppm) 及びイソアミルアルコール (200ppm) による自発運動量抑制がわかった。以上より、香気成分が NMDA 受容体活性を阻害し、抗不安効果及び自発運動量抑制によって酔いに影響を与える可能性が示唆された。

B. 適量飲酒の効能

(1) 適量アルコール摂取の健康への影響 (広島大学、ビール酒造組合との共同研究:平成 24 年 4 月~現在)

適量アルコール摂取の健康への影響を動物実験で明らかにすることを目的とし、病態モデル動物で検討を行った。その結果、飲酒の J-カーブ効果が再現され、1%エタノール摂取で健康に良好な影響が確認された。また、マウスやラットにおける 1%エタノール摂取量をヒト換算した場合、純エタノール換算 10-20 g/日となり、厚生労働省による健康日本 21 で推奨される適量飲酒量と合致する値となった。

<老化促進モデルマウスに及ぼす影響>

老化促進モデルマウス SAMP1 (11 週齢) に固形飼料を 22 週間自由摂取させた。また飲料水として脱イオン水にエタノール (1%あるいは 2%) を加えて自由摂取させた (1 群 15~16 匹)。その結果、1%エタノール群では皮膚や眼等の老化状態を示す老化スコアが抑制される結果となったが、2%エタノール群では対照群と差は見られなかった。

<高脂肪食摂取ラットに及ぼす影響>

SD 系雄ラット (5 週齢) に牛脂 30%の高脂肪食を 12 週間自由摂取させた。また飲料水として脱イオン水にエタノール (1%あるいは 2%) を加えて自由摂取させた (1 群 14~15 匹)。その結果、餌摂取量、体重増加、肝臓や脂肪組織重量、血清の脂質やグルコースについてエタノール摂取の影響は見られなかった。その他の指標を調べた結果、水群と比較し、1%エタノール群で ALT 及び LDH 活性、アンモニア、尿酸が有意な低値を示し、肝機能の改善が示唆さ

れた。2%エタノール群でも、ALT 活性、アンモニア、尿酸が有意な低値を示した。調べた血中パラメーターの中でアルコール摂取の悪影響が見られたものはなく、肝臓やその他の組織の過酸化脂質量も特に変化は見られなかった。

(2) 習慣的飲酒者の心理・行動的特性（広島修道大学、ビール酒造組合との共同研究：平成24年4月～26年3月）

飲酒の効用を明らかにすることを目的とし、習慣的アルコール飲用者（1000名）と非習慣的アルコール飲用者（500名）を対象としてインターネット調査を行い、飲酒がQOL（Quality of life：生活の質）を高めることに貢献している者とそうでない者の2群を識別して解析を試み、飲酒の心理的効用を明らかにした。

調査は、①人口統計学的項目、②飲酒状況調査項目、③性格や幸福感測定項目、④飲酒動機や飲酒結果測定項目、⑤健康（生活習慣病罹患状況）測定項目で構成された質問票を用いた。この結果、飲酒者は非飲酒者と比較し、主観的幸福感が高く、飲酒の心理面での良い効果が認められた。この他、飲酒者は性格面で開放性、外向性が高く、神経症的傾向が低かった。また、飲酒動機として、社会性、食事、気分の高揚に関わる要素が挙げられた。ただし、女性において、ストレス対処が飲酒動機となった場合、飲酒量が増加し、健康阻害など負の影響が出ると示唆された。

(3) 適量飲酒のポジティブ効果の検証（産業医科大学、ビール酒造組合との共同研究：平成24年4月～25年3月）

男性19名の被験者でビール1缶（350ml）程度の適量飲酒後、生理・心理面への影響を検証し、有意差は認められなかったが、飲酒直後にアルコールに強いタイプで認知機能が向上する可能性が示唆された。

被験者は東大式ALDH2表現型スクリーニングテストでアルコールに強いタイプ（POSITIVE群）と弱いタイプ（NEGATIVE群）の2群に分類した。試験は飲酒前、飲酒直後、飲酒終了15分後、飲酒終了45分後の4時点で、呼気中アルコール濃度測定、気分や酔いの評価、図形による短期記憶課題を行った。また生理計測（心電図、血圧、呼吸、手掌発汗、鼻部皮膚組織血液量、脳血流、指脈波、瞳孔面積等）も継続して行った。短期記憶課題による認知機能試験の結果、飲酒前（before）から飲酒直後（immediately after）にかけてPOSITIVE群では正答率上昇、NEGATIVE群で正答率低下の傾向が見られた。気分評価で飲酒による緊張度の低下が認められたが、実験による長時間拘束による疲労感の上昇も認められた。種々の生理反応では、アルコールによる「血管拡張→血圧低下→心拍上昇」という一連の反応に応じた変化が観察されたが、群間で差異がある項目があり、ALDH2スクリーニングテストの妥当性が確認された。

本研究の動物試験計画は独立行政法人酒類総合研究所動物実験委員会、近畿大学工学部動物実験小委員会及び広島大学動物実験委員会、ヒト試験計画は産業医科大学倫理委員会の承認を受けたものであり、関連する法令等を遵守している。

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
- ・ 総合評価
 - 目標を十分に達成できた
 - 目標を概ね達成できた
 - 目標の達成が必ずしも十分でなかった
 - 目標の達成が不十分であった

6 総合所見

飲酒の負の影響に関し、酒の微量成分について分子生物学的手法を用いて解析した研究はきわめてユニークであり、科学的探究がなされた点は大いに評価できる。酒類成分の神経受容体に対する影響に関しては、清酒成分だけでなく焼酎の香気成分も抗不安効果及び自発運動量抑制を示したことは興味深い。今後、研究成果の学術論文等への公表、マスコミ等への情報発信を期待し、民間等との共同研究により発展させていくことが望まれる。

課題名：酵素生産技術の開発と応用に資する研究

1 実施者

正木和夫

2 研究の背景、目的及び期待される成果

クリプトコッカス sp. S-2 (以下 S-2 株) は生デンプン分解性を示す酵母として、家藤らによって当研究所にて単離された担子菌酵母である。S-2 株由来の酵素の研究から、生デンプン分解アミラーゼ、好酸性キシラナーゼ、好酸性セルラーゼ、クチナーゼ様酵素 (以下 CLE) などを生産することが明らかとなっている。CLE は酵母で初めて見出されたクチナーゼタイプの酵素であり、リパーゼ活性やエステル交換活性、プラスチック分解活性など独特の活性を示す。この研究課題では、これら、これまで酒類総合研究所で蓄積した微生物資源等を有効に社会還元できるよう、共同研究を推進しながら、S-2 株やそれら酵素に対する基盤的研究及び利用に必要な開発を進めた。

酵素による物質変換技術は、マイルドな条件下で進む環境に優しい技術であり、発酵技術の根幹でもある。また、酵素の利用技術は、優れた酵素の探索とそれら酵素の生産技術によって成り立つ。この S-2 株の酵素生産能力を応用した酵素生産宿主としての開発では、必要な要素として S-2 株の形質転換系 (遺伝子導入方法、マーカー遺伝子) 及び強力プロモーターの検討を行った。S-2 株は担子菌に分類される酵母であり、これまで開発が進んでいる子囊菌系の酵母とコドン利用が大きく異なる (S-2 株の GC 含量は 67%)。したがって、これまでそれら子囊菌で生産が難しい酵素の生産改善に期待が持てる。そこで、開発した S-2 株の酵素生産用宿主を産業用酵素の生産に応用する。また、S-2 株が本来独特な酵素を分泌生産していることから、この S-2 株の酵素生産用宿主開発はこれら酵素の大量生産のためにも有効である。

加えて、S-2 株由来の酵素の機能開発も進めた。CLE は上記のとおり特徴的な活性を持つ。この、X 線結晶構造解析も共同研究により解明されており、この立体構造情報を利用して、CLE の安定化を目指したアミノ酸置換を試みた。より安定な酵素の提供は、その利用において重要な意味を持ち、酵素の利用のみならず保存においても有効である。

3 研究概要

これまでに蓄積した酒類総合研究所の微生物、酵素などの遺伝子資源を有効に活用していくことを目的に、独自に単離した担子菌酵母 S-2 株を利用した酵素生産用宿主の開発とその酵母が生産する CLE の立体構造情報に基づいた安定化を試みた。さらに、CLE は S-2 株由来であることから、セルフクロニング技術による CLE の高生産を目指した。

(1) 酵素安定化

CLE の立体構造情報を基に、酵素分子内の空間 (cavity) を埋めるようなアミノ酸置換をデザインし、それらアミノ酸置換体を精製し、その熱安定性を調べ、安定化に寄与するアミノ酸を同定するとともに安定化 CLE の取得を目指す。

(2) CLE 高生産セルフクロニング株の作成

これまでに開発した S-2 株の酵素生産システムは、マーカー遺伝子、プロモーターは宿主である S-2 株由来のものであり、CLE を S-2 株で発現させようとするれば、全て自前のパーツ

を組み合わせた遺伝子組換え技術であるセルフクローニング株の作成が可能である。これら遺伝子の組み合わせを検討し、GLE の高生産セルフクローニング株の作成を目指す。

(3) 酵素生産宿主としての S-2 株

S-2 株の異種タンパク質発現系として能力を明らかにすること。さらに、産業用酵素の生産宿主としての能力を共同研究を通して評価する。

4 主な成果

(1) 酵素安定化

GLE の立体構造上 2 つの領域でのアミノ酸置換を試み、125 番目のシステイン残基の変異により熱安定性を向上させることができた。このことは、製品化された場合により安定に保存することできる可能性を示しており、実用化に向けては重要な知見だと考えている。今後は、この安定化 GLE についても、野生型 GLE と同様に大量生産可能かどうかについて検討していきたい。

(2) GLE 高生産セルフクローニング株の作成

キシラナーゼプロモーター、GLE 遺伝子、キシラナーゼターミネーター（または GLE ターミネーター）、*URA5* 遺伝子の断片を外部配列無しに繋いだポリヌクレオチド鎖を S-2 株のウラシル要求性株に導入し、約 50 株の形質転換体から高発現株を選抜した。これら形質転換体（セルフクローニング株）は S-2 の野生株の約 2.6 倍の GLE 生産能力を示したが、これまでに示したキシラナーゼプロモーターを使用した組換えタイプの形質転換体（野生株の 7.4 倍）を超えることが出来なかった。一方、GLE プロモーター、GLE 遺伝子、GLE ターミネーター、*URA5* 遺伝子を繋げた遺伝子で形質転換を行ったセルフクローニング株は野生株の 20 倍以上の GLE 生産量を示した。さらにそのセルフクローニング株の培地条件を検討したところ野生株の約 47 倍の GLE 生産量が可能であった（フラスコ培養時の培養液中に約 3 g/L の GLE 生産量）。現在のところ、ジャーファーメンターを用いた流加培養による、さらなる生産量向上に向けた検討を行っている。

(3) 酵素生産宿主としての S-2 株

西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ、*Aspergillus oryzae* 由来のグルコースデヒドロゲナーゼについて S-2 株の酵素生産システムにて生産を試みた。ペルオキシダーゼの生産においては、最適な分泌シグナルの選択、液胞輸送シグナルの削除、コドンの最適化により、発現量が飛躍的に向上した。コドンの最適化においては、翻訳効率の向上を期待したが、mRNA の ORF 領域内の PolyA 付加部位が取り除かれ、細胞内の mRNA の安定性に寄与することでタンパク質の生産が改善したと考えられた。最終的には、過去の研究例を超える生産量を達成した。また、同様にグルコースデヒドロゲナーゼについても最適なシグナル配列の選択とコドン最適化を施し、約 3g/L の生産が可能であった。他の酵母の酵素発現系の比較としては、ラッカーゼの生産において、*Pichia pastoris* で発現が難しいものについて、S-2 のシステムでより多くの発現が可能であった。

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
- ・ 総合評価
 - 目標を十分に達成できた
 - 目標を概ね達成できた
 - 目標の達成が必ずしも十分でなかった
 - 目標の達成が不十分であった

6 総合所見

酒総研の遺伝子資源を活用した、発展的かつ有意義な成果が得られている。特に新しい宿主ベクター系を開発して、実用化直前及び実用化のところまで進化させたことが評価できる。今後、醸造等への広い分野での応用を期待し、学会等での発表、民間等との共同研究等が望まれる。

課題名：酒類製造等における放射性物質の挙動等について

1 実施者

下飯仁、後藤奈美、藤井力、橋口知一、赤尾健、奥田将生、小山和哉

2 研究の背景、目的及び期待される成果

平成 23 年 3 月 11 日に発生した東北地方太平洋沖地震により原子力発電所の事故が発生した。それに伴う放射性物質の放出により、水道水、農畜水産物から放射性物質が検出され、国民の放射性物質に対する不安が高まった。さらに、我が国から輸出される酒類を含む食品等について、我が国の所管当局が発行する証明書の添付が必要となる事例が発生した。そこで、国税局・酒類総合研究所においては、酒類の放射性物質の分析を行い、酒類の安全性を確認している。

放射性セシウム (Cs) の酒類製造における挙動に関しては、海外においてビールやワインで若干の報告があったものの十分でなく、また清酒では報告がなかった。そのため、業界団体から酒類製造における Cs の挙動についての研究の要請があった。そこで、本研究では、酒類製造における Cs の挙動を明らかにするために、清酒、ワイン、梅酒等について放射性 Cs、又は放射性 Cs と化学的性質の類似する非放射性 Cs の製造工程における挙動について明らかにすることを目的とした。また、酒類製造における原料処理や製造工程の工夫による製品への Cs 移行の低減化についても検討した。以上の研究により酒類の安全性を宣言できるようになり、風評被害の防止に役立てられる。また、輸入規制の解除に向けての重要なデータを得ることができるものと期待される。

3 研究概要

平成 23 年 3 月の原発事故による放射性セシウム (Cs) の酒類原料から製成酒への移行が心配されたが、放射性 Cs の酒類醸造での挙動に関して十分な報告がなかった。そこで、酒類製造における Cs の挙動を明らかにするために、清酒、ワイン、梅酒について、放射性 Cs または放射性 Cs と化学的性質の類似する非放射性 ^{133}Cs の製造工程における挙動について解析を行った。また、酒類製造工程の工夫による製品への Cs 移行の低減化についても検討した。

4 主な成果

A. 酒類製造における放射性物質の挙動

(1) 清酒醸造中の Cs の挙動

- ① まず平成 23 年産米の収穫前に放射性セシウム (Cs) と化学的性質の類似する非放射性 ^{133}Cs の清酒製造工程での挙動を解析した。その結果、非放射性 ^{133}Cs 濃度は、精米歩合 70%まで精米すると玄米濃度に対して 20%程度まで減少し、それ以上精米を進めてもほとんど変化しなかった。小仕込み試験の結果、玄米中の非放射性 ^{133}Cs は、90%が精米、洗米・浸漬工程で除去され製成酒には 6%、酒粕に 4%しか移行しなかった。放射性 Cs と非放射性 Cs の挙動が同じであると仮定すると、放射性 Cs は製品にはほとんど残存しないことが推定された。以上の結果は、平成 23 年 10 月に概要をプレスリリースするとともにホームページに掲載し、清酒製造業者や一般消費者に公表した。また、この結果は EU の輸入規制解除に貢献した。

- ② 続いて、福島県から 150Bq/kg の放射性 Cs を含む玄米を入手し、非放射性 ^{133}Cs の実験と同様な実験を実施し、放射性 Cs は非放射性 ^{133}Cs と挙動が同じであることを確認した。

(2) ワイン醸造中の Cs の挙動

福島県農業総合研究センターの協力を得て、微量の放射性 Cs が検出されたブドウ‘高尾’及び‘キャンベル・アーリー’（両品種とも果皮が黒）を入手した。放射性 Cs の約 6 割は果皮・種子（重量では約 25%）に存在した。このブドウを用いて、醸し仕込み（赤ワイン）及び液仕込み（ロゼ）の小仕込みを行った。ブドウからワインへの放射性 Cs の移行率は榨汁率にほぼ等しく、醸し仕込みでは榨汁率よりやや高く、液仕込みではやや低くなった。また放射性 Cs の濃度比（製品/原料）は、醸し仕込みでは 1 よりわずかに高くなったことから、基準値よりやや低い原料を使用する必要があることが示された。醸造用ブドウ赤白 7 品種を用いた小仕込み試験を行い非放射性 ^{133}Cs のワインへの移行について検討を行った。果粒内の ^{133}Cs の分布は果肉に 70~80%が含まれた。各品種のブドウからワインへの ^{133}Cs の移行率及び濃度比は赤ワインにおいて白ワインよりも有意に高い傾向が見られ、放射性セシウムのブドウ果粒内分布や醸造工程中の挙動と矛盾しなかった。また、貯酒工程における澱下げによる Cs の変動について検討したところ、カルシウム型ベントナイトによって濃度依存的に ^{133}Cs は減少した。

(3) 焼酎・梅酒製造中の Cs の挙動

焼酎は、米、芋、泡盛製造工程の ^{133}Cs の挙動を解析したところ、原料に含まれる ^{133}Cs は蒸留により留液に移行しないことを確認した。

梅酒製造試験を行い、非放射性 ^{133}Cs の挙動を解析した。原料梅果実中の非放射性 ^{133}Cs は、梅重量の大半を占める果肉に 75%程度分布した。原料梅中の ^{133}Cs は、仕込み 1-2 ヶ月経過後には梅果実から梅酒に 70-80%程度移行し以後変化しなかった。原料梅からの加工係数（梅酒と原料梅の ^{133}Cs 濃度比）は 0.25 と十分低かった。以上から基準値内の原料を使用すれば何ら問題ないことが確認された。

B. 酒類製造工程における放射性物質の低減化

清酒原料米の掛け流しによる Cs の減少効果

原料米の浸漬時に掛け流しにすると白米の K 含量が減ることが知られている。K と Cs は同じような挙動をすることが知られていることから、24 時間の掛け流しを行った白米を使用したところ、官能評価を損ねることなく製成酒の非放射性的 ^{133}Cs 含量を従来法の約 8%（対玄米濃度比 0.4%）まで大幅に減少させることができた。なお、この方法では製麴や発酵に必要な K も少なくなりすぎることから、水にリン酸水素二カリウムを添加して 2 時間浸漬し、K 含量を戻してから使用した。この場合、K 含量は補われたが、グルコアミラーゼ等の酵素生産が悪くなり、発酵がやや遅れた。従って、この方法では酵素剤を併用する方がよいと考えられた。

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
- ・ 総合評価
 - 目標を十分に達成できた
 - 目標を概ね達成できた
 - 目標の達成が必ずしも十分でなかった
 - 目標の達成が不十分であった

6 総合所見

福島原発の事故を受け、国が当然行うべき時代の要請に応えた重要な研究テーマである。短時間で一定の指針を与える基礎的な結果を示したことで、EUによる清酒の輸入規制解除に貢献し、酒類の安全性について極めて重要な成果が得られている点は評価できる。概ね目的は達成できている。今後、本研究の成果については貴重なデータであるため、保存するとともに積極的な公表を望む。

中間評価

課題名：醸造副産物・廃棄物の有効利用・効率的処理に資する研究

1 実施者

家藤治幸、後藤奈美、山田修、藤井力、水野昭博、向井伸彦、金井宗良

2 研究の背景、目的及び期待される成果

食品リサイクル法（食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律）において、財務大臣は酒類関係の主務大臣である。同法第5条2には、国の責務として「食品循環資源に関する情報の収集、整理及び活用、食品循環資源の再生利用等の促進に関する研究開発の推進及びその成果の普及その他必要な措置を講ずるよう努めなければならない」とされている。本課題では、副産物の成分調査、有効成分の安定性試験と安定化法の開発、動物細胞を用いた機能性試験、有効成分高含有変異株の把握や育種を通じて、廃棄されていたものが有効利用される、もしくは、現在のリサイクル法よりもより付加価値が高く、有効に利用されるような研究成果につなげることを目指している。

そこで、全国の酒類製造場の協力のもと、新鮮な清酒粕や焼酎粕を収集し、醸造副産物利用の基礎となる一般成分値の把握と、酵母がつくる代謝物を中心に有効成分含量について把握することとした。清酒粕の成分値としては、広く日本食品標準成分表（以下、「成分表」という。）の数値が用いられているが、2000年が最終改訂版であり、中には1954年から更新されていない値も含まれている。焼酎粕については、広範な調査もほとんど行われていない。本調査によりもたらされる成分値は、有効利用法を考える上での基礎となることが期待される。さらに、様々な製造法の醸造副産物を収集することにより、どのような醸造条件や酵母が有効成分量と関連しているのか、明らかとなることが期待される。

醸造副産物の有効利用を推進するには、有効成分の安定性や安定条件の把握、安定性向上、さらには有効成分を高含有させる醸造条件や酵母等の把握が重要である。そこで、保存試験を行うとともに、安定性向上条件を検討する。また、調査により把握された高含有条件を検討するとともに、有効成分を高含有する酵母変異株の育種を目指す。

さらに、実際の副産物を用いた有効性を把握するため、清酒粕抽出物を用いて大腸がん由来細胞の抑制効果等を確認する実験を行った。副産物に含まれるどのような物質がどのような機構で抑制効果をもたらすかについても検討する。

本研究は、企業や酒造組合等との共同研究や受託研究も活用し、新たな価値の発見、高度利用への貢献を図る研究及び効率的処理方法に関する研究を行う。

3 研究概要

A. 醸造副産物の成分調査と有効利用に関する研究

(1) 清酒粕等醸造副産物の成分調査

清酒粕の一般成分は清酒粕の有効利用を考える上で基礎となるが、成分表の値には1954年から更新されていない成分も含まれる。清酒の製造法は、級別廃止や清酒の製法品質表示基準の制定、製造法の多様化等から清酒粕の成分も多様化していることが予想されたが、全国規模の調査はほとんど行われてこなかった。そこで、清酒酵母が高生産し、清酒粕に高含

有されていると思われる機能性成分の含有量とあわせて一般成分を分析し、清酒粕成分の現状を把握することとした。焼酎粕についても広範な調査例はほとんどなく、同様の調査が必要と思われる。機能性成分の安定性についてもほとんど明らかになっていない。

(2) 動物細胞を用いた機能性評価

焼酎粕については機能性評価の実験が多く行われており、当所でもアポトーシスによる大腸がん細胞の抑制効果を見いだしている。清酒粕抽出物について同様の評価を行うとともに、清酒粕中のどんな成分に抑制効果があるか検討する試験を行うこととした。

B. 清酒酵母の機能性成分高蓄積機構に関する研究

(1) 清酒酵母の機能性成分高蓄積能に寄与する遺伝子に関する研究

醸造副産物は発酵により様々な有用物質を含むことが経験的に知られているが、未だ十分な解析が進んでいない。そこで、醸造副産物を有効利用するための1つの取り組みとして清酒粕、焼酎粕の付加価値向上を図るための基礎的知見を得るために、清酒酵母における機能性成分（S-アデノシルメチオニン（SAM）、葉酸）の高蓄積機構の解析を行う。

多くの微生物の中でも酵母、特に清酒酵母がSAM、葉酸を高蓄積することが知られている。しかし、生物生産に関する形質であるSAM、葉酸蓄積能を支配している遺伝子を同定することは容易ではない。そこで、塩基配列の多型アレルと形質（ここではSAM、葉酸蓄積能）の連鎖解析を行う遺伝統計学的手法であるQTL（量的形質遺伝子座）解析を利用し、高蓄積に寄与している遺伝子群をゲノム網羅的に調べ、清酒酵母の機能性成分高蓄積能に寄与する遺伝子を明らかにする。

(2) 清酒酵母における葉酸高蓄積培地の検討

清酒酵母内で高蓄積する食事性葉酸（天然型）の高蓄積機構を解明することは、学術的知見とともに、清酒醸造の現場への貢献や、医療・健康食品の分野への応用が期待される。そこで、醸造副産物の有効利用に資する基礎的な知見を得る手がかりとして、特に清酒酵母に葉酸が155 µg/g DCW以上含有することができる新規葉酸高蓄積培地の検討を行う。

4 主な成果

A. 醸造副産物の成分調査と有効利用に関する研究

(1) 清酒粕等醸造副産物の成分調査

清酒粕については、全国42社の酒類製造場の協力のもと、新鮮な清酒粕109点を製造条件等の情報とともに収集した。なお、清酒粕ははがしたてのものを冷凍した状態で受取り、常法により分析した。

その結果、一般成分値について、タンパク質、脂質、炭水化物と灰分で特にばらつきが大きいこと、製造法が大きく異なる大吟醸酒と液化仕込み酒が最大値や最小値になることが多いことが分かった。成分表の数値と比べたところ、エネルギーが高く、水分が少ないこと、大吟醸以外で脂質が多いこと、液化仕込み以外で炭水化物が多く、タンパク質や灰分が少ないこと等、製造法の変化を反映した違いがあることが分かった。また、清酒粕の成分は製造法ごとに多様化しており、成分表の数値ひとつで多様化した清酒粕の成分値を代表するのは難しいことが分かった。

機能性成分については、清酒粕が S-アデノシルメチオニン (SAM) や葉酸を高含有していることが分かった。

清酒粕の SAM 含量は多いものと少ないもので 70 倍の差があり、どの製造法のカテゴリーでも多いものと少ないものがあった。平均は 50 mg/100 g で、特に多いもの (210 mg/100 g) は 20 g で抗うつ、50 g で抗肝障害、200 g で抗関節炎に有効とされる量を含んでいた。葉酸含量もどの製造法のカテゴリーでも多いものと少ないものがあり、平均は 176 μ g/100 g と食品としては比較的高含有していた。特に多いもの (527 μ g/100 g) は 40 g で成人の、80 g で妊娠時に必要な量を、清酒粕だけで摂取できる計算になる。葉酸高含有清酒粕にはきょうかい酵母でない自社酵母やアデニン要求性の変異株を用いた清酒粕が含まれていた。

機能性成分の安定性を確認したところ、SAM は冷凍や冷蔵でかなり安定であったが、葉酸は 4°C でも不安定であった。一方、凍結乾燥処理を行うと葉酸は室温でも極めて安定となった。その他、熱処理でも葉酸の安定性が向上することが分かった。

焼酎粕については、公設試や国税局からの情報をもとに焼酎粕やそれを用いた製品の提供を呼びかけ、本年度から分析を開始した。本年度は蒸留方法や原料等が異なる 40 点程度分析の予定である。

(2) 動物細胞を用いた機能性評価

清酒粕の水抽出物に大腸がん由来細胞の抑制効果があることが分かった。抑制物質を探索したところ、清酒粕抽出物に含まれる SAM に効果が見られることがわかったが、SAM だけでは抑制できないような低濃度の清酒粕抽出物でも大腸がん由来細胞を抑制することが分かった。また、煮沸して SAM 含量が大幅に減少した抽出物でも抑制効果が高かった。これらの結果は熱に弱い SAM 以外の熱に安定な成分が大腸がん細胞の抑制に寄与していることを示唆している。このことを明らかにするため、清酒粕抽出物に含まれている成分を検索し、ビタミン B6 の 1 種のピリドキサーールやフェルラ酸に効果があることを実験的に確認した。また、これらの抑制効果が大腸がん由来細胞のアポトーシスの誘導によるものであることを示す結果が得られた。

B. 清酒酵母の機能性成分高蓄積機構に関する研究

(1) 清酒酵母の機能性成分高蓄積能に寄与する遺伝子に関する研究

- ① 実験室酵母 X2180-1B と清酒酵母 K7H868a をかけ合わせて出来た交雑株 25 株から得られた四分子 90 株について、SAM、葉酸をそれぞれ分析した結果、SAM、葉酸ともに個々の株で大きな変動が見られた。また、実験室酵母一倍体と清酒酵母一倍体をかけ合わせることで、清酒酵母一倍体よりも SAM、葉酸を多く生産する株がいくつか得られた。
- ② QTL マッピングを行った結果、SAM に関しては第 8 番染色体に QTL の存在が示唆され、清酒酵母型アレルで相加効果を示した。一方、葉酸に関しては第 16 番染色体に QTL の存在が示唆され、実験室酵母型アレルで相加効果を示した。
- ③ SAM に関して、有意な QTL が存在する DNA マーカー近傍には 165 個の遺伝子が存在するため、実験室酵母ゲノムデータベース (SGD) と清酒酵母ゲノムデータベース (SYGD) を用いて、SAM 蓄積に寄与する候補遺伝子を探索した結果、*ERC1/YHR032W* を抽出した。
- ④ 候補遺伝子 *ERC1* が清酒酵母の SAM 高蓄積能に本当に寄与しているか確認するため、清酒酵母型、実験室酵母型の *ERC1* 遺伝子 (*XERC1*, *K7ERC1*) を実験室酵母の *ERC1* 破

壊株 (*BYΔerc1*) を形質転換させ、その形質転換体の SAM 蓄積量を振盪及び静置培養にて経時的に分析した。結果、清酒酵母型の *ERC1* を発現させることで SAM の蓄積が観察されたことから、清酒酵母が持つ SAM 高蓄積能に、清酒酵母型の *ERC1* が深く関与していることが示唆された。

- ⑤ 様々な醸造用酵母 *ERC1* の全長をシーケンスした結果、SNPs のパターンにより、焼酎酵母型、ワイン・ビール酵母型、清酒酵母型に分類されることが分かった。
- ⑥ *ERC1* の表現型 (過剰発現によるエチオニン耐性) を用いて SAM 高蓄積酵母の育種を試みた結果、清酒酵母 K7 及び K9 から新規な SAM 高蓄積清酒酵母を取得した。

(2) 清酒酵母における葉酸高蓄積培地の検討

- ① YNB 培地を基に、様々なアミノ酸、ビタミン等を添加した培地を用いて、清酒酵母きょうかい 9 号を 30°C にて振とう培養し、葉酸量を HPLC にて経時的に測定した。
- ② YNB 培地に各種アミノ酸を添加したところ、現在までに知られている実験室酵母の場合と同様に、清酒酵母においてもメチオニン添加培地において 5-CH₃-THF (5-メチルテトラヒドロ葉酸)、Gly 添加培地において THF (テトラヒドロ葉酸) が主に顕著に増加した。
- ③ 葉酸の構成成分であるパラアミノ安息香酸 (pABA)、葉酸代謝経路に重要な役割を果たしているビタミン類を単独で YNB 培地に添加しても、清酒酵母の葉酸量及び蓄積挙動に顕著な変化は見られなかった。
- ④ YNB 培地にメチオニン及び pABA を含む培地で清酒酵母きょうかい 9 号を培養すると、最大で約 190 µg/g DCW を達成した (特開 2013-63065)。

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

現在の酒粕成分を再検討し成分が試料によって大きく変動することを見いだしたことは大き

な成果と思われる。酒粕全体としての優位性も合わせて、成分表の改訂に結び付けていただきたい。民間企業等と共同研究が進められている点は産業応用の促進の観点から評価できる。酒類総合研究所ならではの研究プロジェクトであり、今後、他の機能性成分の探索や焼酎粕についてもさらに分析を進めて頂きたい。

課題名：酒類の長期品質保持に資する研究

1 実施者

後藤奈美、下飯仁、山田修、藤井力、須藤茂俊、松丸克己、磯谷敦子、水野昭博、日下一尊、金井宗良、西堀奈穂子、渡辺大輔

2 研究の背景、目的及び期待される成果

清酒は醸造酒であるため化学的変化を生じる成分を多く含んでおり、貯蔵により香りや味が大きく変化する。清酒の貯蔵によりさまざまな香りが生じるが、数年～数十年の単位で熟成させた長期熟成酒の香り（熟成香）は、ソトロン等に由来するカラメル様の香りが特徴である。一方、一般的な市販清酒の貯蔵・流通等で生じる香りは「老香（ひねか）」と呼ばれ、たくあん漬け様のおいしのジメチルトリスルフィド（DMTS）が大きく寄与している。「老香」は一般的には劣化臭ととらえられ、清酒の品質保証期間を短期間に限定する要因となっているため、業界から当研究所へ「老香」対策について要望がある。さらに、最近増加している清酒の海外輸出では（全生産量の約2%程度と推定）、輸出から飲用に供されるまでの時間が長いこと「老香」の発生もより大きくなるものと想定される。これまでに研究所では、「老香」にジメチルトリスルフィド（DMTS）が大きく寄与することを明らかにし、その前駆物質一つ 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl)pentan-3-one（DMTS-P1）を同定するとともに、その生成に酵母のメチオニン再生経路遺伝子が関与することを明らかにしている。また、アミノ酸度の低減によって「老香」の生成を抑制できることを明らかにした。「老香」の生成機構は複雑であり、効果的に抑制するためには直接的な「老香」生成機構の解明のみならず、硫黄代謝との関連や清酒製造工程との関連を含めた包括的な解析が必要である。本研究では、「老香」を抑制するために、DMTS 前駆物質生成に関与する遺伝子をターゲットとして DMTS 前駆物質低生産酵母の育種を行う。また、DMTS 生成機構の全体像を明らかにするため、DMTS の生成に関与する成分を詳細に検討する。さらに、清酒の製造工程と DMTS 生成との関係を網羅的に解析し、DMTS の生成を低減させる製造過程での制御方法を提案する。

以上で得られる結果により、長期貯蔵しても「老香」を生じにくい清酒の製造が可能となり、消費者に良質の清酒を提供することが可能となる。また、品質保証期間に科学的な根拠を与えることが可能となるため、これまで慣例により一定に定められている賞味期限を改善し、流通業者からの戻入酒を減少させる効果が期待される。さらに、輸出に供しても劣化しにくい酒が製造されることにより、清酒の輸出が促進されることも期待される。

3 研究概要

A. 清酒の貯蔵劣化臭の主要成分 DMTS の生成に関与する酵母遺伝子及び清酒成分の検討

(1) DMTS 前駆物質低生産酵母の育種

実験室酵母の遺伝子破壊ライブラリを用いた実験から、メチオニン再生経路遺伝子、特に *SPE2*、*MRI1*、*MDE1* 遺伝子が DMTS 前駆物質である DMTS-P1 の生成に大きく関与し、これらの遺伝子破壊株を用いた生成酒は DMTS 生成ポテンシャル（貯蔵によって生じる DMTS 量）が親株に比べて大きく減少することが明らかとなった。そこで、清酒酵母においてもこれらの遺伝子が DMTS-P1 の生成及び DMTS 生成ポテンシャルに関与するか確認を行う。また、これら

の遺伝子をターゲットとして DMTS 前駆物質低生産酵母の実用株を育種する。

(2) DMTS 生成に関与する清酒成分の検討

これまでの研究から、清酒中には DMTS-P1 以外の DMTS 前駆物質や DMTS-P1 から DMTS への反応を促進する成分などが存在することが示唆されている。これら DMTS-P1 以外の DMTS 生成に関与する成分を明らかにする。

B. DMTS 生成に関与する清酒製造条件の解析

DMTS の前駆体として DMTS-P1 が同定されたものの、反応の促進物質や抑制物質の存在が示唆されるなど、DMTS 生成機構の全容は明らかになっていない。そこで、我々は、これまで行ってきた仕込み試験について DMTS の生成に関与すると考えられる項目を抽出、実証を交えて解析するとともに、全国の製造場より上槽直後の清酒の提供を受け、DMTS 生成に関連する製造条件を統計的に解析することとした。本サブテーマでは、統計解析や実証試験により、DMTS 生成の制御方法を提案することを目的とする。

C. 硫酸塩の添加による清酒のアミノ酸量低下のメカニズムの検討

清酒中のアミノ酸は、アミノカルボニル反応の出発物質として、清酒の長期保存劣化に深く関わっており、清酒中のアミノ酸低減は清酒の劣化防止に効果があると期待される。

当所ではこれまでに、仕込水に中程度の硬水程度の硫酸塩 (2mM) を添加することにより、もろみのアミノ酸度が低減することを見出している。硫酸塩添加の効果はアミノ酸度低減に限定され、発酵経過や他の香味成分生成にほとんど影響しないことから、本法は非常に優れたアミノ酸低減法といえる。その機構は、酵母の代謝変化によるアミノ酸高蓄積に加え、硫酸塩によるアミノ酸溶出の抑制による、複合的な効果であることが示唆されている。

本研究は、硫酸塩添加によるアミノ酸の溶出抑制の機構を解明し、清酒の長期保存劣化に寄与する効果的なアミノ酸低減に寄与する知見を得ることを目的とした。

4 主な成果

A. 清酒の貯蔵劣化臭の主要成分 DMTS の生成に関与する酵母遺伝子及び清酒成分の検討

(1) 清酒酵母きょうかい7号 (K7) を親株として $\Delta mri1$ 、 $\Delta mde1$ 及び $\Delta spe2$ 破壊株を構築し、清酒小仕込み試験を行った。その結果、 $\Delta mri1$ 、 $\Delta mde1$ 株の生成酒は DMTS-P1 がほとんど検出されず、DMTS 生成ポテンシャルも親株の 1/10 以下に減少した。一方、 $\Delta spe2$ 株では DMTS-P1 は親株と同等かやや増加した。DMTS 生成ポテンシャルはやや減少したが、実験室酵母の場合と比べると減少率は小さかった。したがって清酒酵母の場合、*MRI1*、*MDE1* は育種ターゲットとなるが、*SPE2* はターゲットとしてあまり有効でないと考えられた。

MRI1、*MDE1* 遺伝子は、5'-methilthioadenosine (MTA) からメチオニンへのリサイクルに関与する。硫黄源を制限し、MTA を主要な硫黄源とする培地で培養条件を検討したところ、K7 と K7 の $\Delta mri1$ 株、 $\Delta mde1$ 株で増殖に 10 倍程度の差がみられた。この培養条件を利用して *mri1* または *mde1* 変異株のスクリーニングが可能と考えられた。一方、メチオニン要求性酵母の $\Delta mri1$ 株はメチオニンを MTA で代替した最小培地に生育できない。この表現型を利用するため、K7 のメチオニン要求株を UV 突然変異及び自然突然変異により取得した。小仕込み試験の結果、メチオニン要求株は親株より DMTS 生成ポテンシャルがやや高い傾向がみられ

たが、メチオニン要求株の *MR11* 遺伝子を破壊すると DMTS 生成ポテンシャルは大きく減少した。したがって、メチオニン要求株であっても *MR11* が機能しなければ DMTS 低減に有望と考えられた。

- (2) 清酒の主要成分である有機酸とアミノ酸について、DMTS-P1 から DMTS への反応を促進する効果 (DMTS 生成促進活性) を調べたところ、アミノ酸には活性がみられたが、有機酸にはほとんど活性がみられなかった。一方、清酒をイオン交換樹脂で分画した酸性画分には顕著な DMTS 生成促進活性がみられた。各種カラムで酸性画分を分画したところ、活性は複数のピークに分散し、DMTS 生成促進活性には複数の成分が寄与していることが示唆されたが、成分の同定には至らなかった。また、メチオニン再生経路破壊株を用いた実験から、*SPE2* 遺伝子が DMTS-P1 以外の DMTS 前駆物質の生成に関与する可能性が示唆された。

B. DMTS 生成に関与する清酒製造条件の解析

- (1) 小仕込み試験において、上槽時の酵母の死滅率と DMTS-pp との間に相関が見られたことから、もろみから採取した酵母を破碎して製成酒に添加し、15°C で保存し DMTS-pp に与える影響を調べた。その結果、酵母破碎物の添加量が多ければ多いほど、期間は長ければ長いほど、DMTS-pp が上昇した。アルコール添加によるもろみ中の酵母を殺して細胞内容物を漏出させた後に上槽した場合も同様であった。この製成酒を限外濾過したところ、活性は高分子画分に存在した。さらに、製成酒を熱処理すると活性は失われた。これらのことから DMTS-pp の上昇に関与する物質は酵素と考えられ、DMTS の生成には酵母細胞由来の酵素が関与している可能性が示唆された。
- (2) これまでの報告から、DMTS の生成にはメチオニン代謝が関係していることが示唆されている。そこで、メチオニンサルベージ経路 (MTA サイクル) の代謝産物を製成酒に添加し、15°C で7日間保存して清酒の DMTS-pp の変化を調べた。 α -Keto- γ -(methylthio)butyric acid (KMBA) を添加すると保存しなくても DMTS-pp は著しく高くなった。保存後の DMTS-pp については、KMBA と 5'-methylthioadenosine (MTA) で特に高くなった。一方、加熱処理した清酒あるいは限外濾過の下層 (低分子画分) では保存後の DMTS-pp は上昇しなかった。従って保存期間中に生じる KMBA や MTA から DMTS への変換には、何らかの酵素反応が必要と考えられる。
- (3) 全国の清酒製造場から提供された上槽直後の清酒 80 点について DMTS-pp を測定し、統計解析した。定性データのマン・ホイットニーの U 検定により、『かけ米の種類』『使用酵母の系統』『酒母の系統』『アルコール添加の有無』『上槽方法』が DMTS-pp と関連する候補として抽出された。『アルコール添加の有無』の影響について実証するため、醪への 30%アルコール添加試験を行ったところ、添加量に応じて DMTS-pp が低下し、添加による希釈が有効であることが示唆された。『上槽方法』の違いについてはもろみ垂れ歩合に着目し、上槽開始から経時的に製成酒を採取したところ、上槽末期の製成酒で DMTS-pp が最も高くなることが分かった。上槽末期の製成酒では総アミノ酸量と 260nm の吸光度が高く、圧搾によって酵母内容物が漏出している可能性が示唆された。
- (4) 製造条件や測定項目を説明変数としたステップワイズ法による重回帰 (MLR) 解析と partial least square regression (PLSR) 解析を行った。その結果、もろみの平均品温と積算温度、清酒の含硫アミノ酸濃度及び亜鉛濃度が DMTS-pp に対して重要な変数として選択され、説明率は MLR 解析では 63.4%、PLSR 解析では 64.2% となった。これらの変数の中では、品温は酵母の硫黄代謝、酵母内容物の漏出、含硫アミノ酸濃度、原料米の分解等に影響を与えられ、もろみの品温経過が主要因子であると考えられた。

これらの実験結果から、酵母死滅率の管理や品温管理の重要性とともに、生酒保存中の酵素反応にも気をつける必要があることが示唆された。保存後も DMTS が少ない清酒を製造するには、①酵母が死なないような品温管理、②アルコール添加等による希釈、③上槽末期の画分の除外、④生酒の低温管理、⑤滓引きによる酵母除去、⑥早めの火入れ等、が有効と考えられた。

C. 硫酸塩の添加による清酒のアミノ酸量低下のメカニズムの検討

米タンパク質の分解に関わる、酸性プロテアーゼ及び酸性カルボキシペプチダーゼについて、pH3 で中程度の硬水程度の硫酸塩 (2mM) を添加し、活性測定を行ったところ、酸性カルボキシペプチダーゼの活性低下が見られた。また、清酒もろみおける米タンパク質の溶解性を評価するため、乳酸酸性下における米粉からのグルテリン抽出を行ったところ、pH3 で 2mM の硫酸塩添加により米タンパク質の溶解性が低下した。以上のことから、硫酸塩添加によるアミノ酸の溶出抑制は、低 pH 環境における硫酸塩添加による酸性プロテアーゼ活性低下及び米タンパク質の溶解度低下の複合的な効果によると推定された。

硫酸塩を添加した清酒もろみでは留後 5 日程度で硫酸イオンが消失することから、より効率的なアミノ酸低減法を検討するべく、塩析効果の序列であるホフマイスター順位が比較的高い有機酸を添加して清酒小仕込みを行った。その結果、硫酸塩の効果には及ばないものの、各種有機酸は 2mM の濃度でアミノ酸低減効果を示した。なお、これら有機酸と硫酸塩を同時に添加した場合のアミノ酸度低減に対する相乗効果は認められなかった。

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
 - 課題の中止求められる

6 総合所見

清酒の輸出促進のみならず業界の安定的発展につながる研究として評価でき、今後も研究の発展及び継続が期待される。品質劣下は特に清酒の輸出時の最大の問題であり、劣化臭の生成という複雑な現象が徐々に解明され、劣化臭を抑制するための方法が明らかになりつつある。今後、DMTS生成能の上昇に関与する酵母中の酵素の同定や、DMTS以外の貯蔵臭原因成分につい

ても、研究展開頂きたい。