遺伝子組換え低グルテリン米利用による酒質向上の可能性

丸田嘉幸¹⁾・井上 剛¹⁾・新田直人²⁾

(日本たばこ産業(株)遺伝育種研究所, (株)オリノバ)

(現在: 日本たばこ産業(株)たばこ事業本部品質分析部¹⁾, 日本たばこ産業(株)渉外企画部²⁾)

平成 14 年 10 月 30 日受理

The possible improvement in quality of sake brewed from transgenic low-glutelin rice

Yoshiyuki MARUTA, Tsuyoshi INOUE, Naoto NITTA

(Plant Breeding and Genetics Research Laboratory, Japan Tobacco Inc.,
700 Higashibara, Toyoda, Iwata, Shizuoka 438-0802, Japan)

(Orynova K. K., 700 Higashibara, Toyoda, Iwata, Shizuoka 438-0802, Japan)

Transgenic rice H 75 was generated by transformation with an antisense glutelin gene construct and grown in an ordinal paddy field in 1998 and 1999 under approval of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. H 75 showed a 40% reduction of glutelin content in grains as well as an increase in prolamine content compared with the original variety, Tsukinohikari, in 1998 and with Tsukinohikari, another variety, Gohyakumangoku, and non-transformant, which was obtained as a revertant from H 75 at T₁ generation by genetic segregation, in 1999. The total seed-protein content of H 75 did not significantly differ from that of the original variety, Tsukinohikari. Sake brewed from 70% polished H 75 grains contained 40% less amino acid content than sake brewed from 70% polished non-transgenic rice grains. A sake storage test showed that the sake from H 75 was lower in sake coloration, 3-deoxyglucosone content, and ultraviolet absorbance than sake from non-transformant and Gohyakumangoku during the entire test period of six months. The results suggest that a low-glutelin content of H 75 caused the sake to have less amino acid content and inhibited the deterioration of sake quality during storage.

Key words: グルテリン・遺伝子組換え・酒造適性

緒 言

米には乾物重当たり 7-9%のタンパク質が、主として貯蔵タンパク質顆粒であるプロテインボディ(PB)中に存在する。清酒醗過程で、タンパク質は麹のタンパク分解酵素によって、アミノ酸やペプチドに分解され、さらにアミノ酸は上槽後の貯蔵中にメイラード反応などの基質となり、メラノイジンや老香成分などに变化する¹⁾。

貯蔵タンパク質の約 6 割を占めるグルテリンはプロテインボディ II (PB-II) に、約 2 割を占めるプロラ

ミンはプロテインボディ I (PB-I) に局在している。木崎らは醗日数の経過とともに、PB-II を構成するタンパク質は初期から急速に消化されるのに対して、PB-I を構成するタンパク質は消化されなかったと報告している²⁾。また、若井らは原料米中の PB-II 量と酒造適性値とは負の相関があるのに対して、PB-I 量は酒造適性値への影響は少ないと考えられると報告している³⁾。一方、古川らは PB-I の溶解性には品種間差がみられたが、PB-II の溶解性は品種に関わらず高く、PB-II 量と上槽酒アミノ酸度には正の相関があると報告している⁴⁾。最近、突然変異処理によって育成

された低グルテリン系統を用いた小仕込試験の結果から、製成酒のアミノ酸度が低くなると報告された⁵⁻⁷⁾。このように、PB-IIに局在するグルテリンが製成酒の酒質に影響をおよぼす成分の一つであると考えられた。

我々はアンチセンス法と呼ばれる遺伝子組み換え技術を用いて、米中のグルテリン含量が低減したイネを作出した。アンチセンス法とはある特定遺伝子のアンチセンス鎖を発現させることにより、該遺伝子から翻訳されるタンパク質の合成量を制御する手法である。この技術は遺伝子組換え作物（日持ちのするトマトなど）として実用化されている。本研究ではグルテリン遺伝子中のタンパク質をコードする塩基配列を逆向きに繋ぎ代えたアンチセンス遺伝子をイネに導入した。得られた低グルテリン米を用いて、酒造原料米としての適性試験および小仕込試験を実施した。その結果、本遺伝子組換え低グルテリン米においても製成酒のアミノ酸度が低くなることが確認された。さらに小仕込酒の貯蔵試験を実施し、酒質の経時変化を調査したので報告する。

実験方法

1. 使用原料米

グルテリンのアンチセンス遺伝子の導入により作出した低グルテリン組換え米（名称：H 75，原品種「月の光」⁸⁾）を用いた。組換え体 H 75 の自殖後代の遺伝子分離によりアンチセンス遺伝子が欠失した米（名称：後代非組換え体），組換え体 H 75 の原品種の月の光および酒造好適米品種の五百万石をそれぞれ対照として用いた。平成 10 年に組換え体 H 75 と月の光の 2 品種を、平成 11 年に組換え体 H 75，月の光，後代非組換え体および五百万石の 4 品種を、静岡県磐田郡豊田町の日本たばこ産業㈱遺伝育種研究所内の圃場で栽培した。収穫後の玄米は 4℃の保冷库内に保管した。

2. 原料米の貯蔵タンパク質量

熊丸⁹⁾の方法に従い、原料米の玄米および 70% 精白米から貯蔵タンパク質をアルブミン+グロブリン、グルテリンおよびプロラミンの 3 分画として抽出した。分画した各タンパク質を BSA（ウシ血清アルブミン）を標準試料に用いて、BCA プロテインアッセイ試薬（ピアス社製）にて定量した。原料米の 70% 精白処理は（財）日本醸造協会に委託した。

3. 原料米の特性分析

原料米の特性分析は平成 10 年および平成 11 年に栽培した前述の 4 品種 6 点の玄米および 70% 精白米について、酒造用原料米全国統一分析法（酒米研究会編，1996 年）により行った。なお、原料米の特性分析は収穫年にそれぞれ（財）日本醸造協会に委託した。

4. 小仕込試験

仕込配合は掛米 115 g，麴米 30 g（アルコール脱水麴）および汲水 220 ml で行った。掛米は平成 10 年および平成 11 年に栽培した前述の 4 品種 6 点を、精米歩合 70% に調整して使用した。麴米は五百万石（精米歩合 60%）を使用した。酵母は協会 701 号酵母を用いて、発酵 15℃の一定温度で行い、CO₂ 減量 49-50 g（アルコール生成量 19.0%前後を目標とする）で発酵を止めた。小仕込酒の分析を国税庁所定分析法注解（第四回改正，1993 年）により行った。なお、粕歩合は乾物重量による歩合を示した。小仕込および小仕込酒の分析は収穫年にそれぞれ（財）日本醸造協会に委託した。

5. 仕込後の米タンパク質の変化

小仕込試験に用いた組換え体 H 75，後代非組換え体および五百万石について、70% 精白米および小仕込後に分離した酒粕を材料に用いた。70% 精白米は粉碎機により、酒粕は乾燥後、乳鉢を用いて粉とした。それぞれ 50 mg を計り取り、1.5 ml の 125 mM Tris-HCl (pH6.8)，4% SDS，4 M urea および 5% 2-メルカプトエタノールを含む溶液でタンパク質を抽出した。抽出液から 10 μl をとり、14% のポリアクリルアミドゲルによる電気泳動により分離した後、ゲルをクマシーブルーで染色した。

6. 小仕込酒貯蔵試験

仕込配合は掛米 397 g，麴米 104 g（アルコール脱水麴）および汲水 759 ml で行った。掛米は平成 11 年に栽培した組換え体 H 75，後代非組換え体および五百万石の 3 点を、精米歩合 70% に調整して使用した。麴米は五百万石（精米歩合 60%）を使用した。酵母は協会 701 号酵母を用いて、発酵 15℃の一定温度で行い、CO₂ 減量 169-170 g（アルコール生成量 18.5%前後を目標とする）で発酵を止めた。東洋濾紙による自然濾過により、小仕込酒と酒粕とに分離した。その後、小仕込酒を 30℃で 6 ヶ月間まで貯蔵した。なお、本貯蔵試験には火入れ操作をしない生酒を供試し

た。貯蔵中の小仕込酒の分析を国税庁所定分析法注解（第四回改正，1993年）により行った。3-デオキシグルコソシ（3-DG）の測定は岩野ら¹⁰⁾の方法により行った。有機酸およびアミノ酸の測定は高速液体クロマトグラフィーにより行った。なお，本試験の小仕込および小仕込酒の分析は平成12年4月に（財）日本醸造協会に委託した。

実験結果及び考察

1. 原料米の貯蔵タンパク質量

組換え体 H 75 の玄米のグルテリン含量は平成10年産が原品種月の光の60.7%（グルテリン量は玄米100gあたり組換え体 H 75 が2.15g，原品種月の光が3.54g）であり，平成11年産が63.5%（玄米100gあたり2.24gおよび3.53g）であった。後代非組換え体（Non-transformant）のグルテリン含量も玄米100gあたり3.54gであったことから，組換え体 H 75 の低グルテリン性は培養変異等に因るものではなく，導入したグルテリンのアンチセンス遺伝子の作用により，グルテリン含量が原品種月の光の約60%程度に低減したものと考えられた（Table 1）。一方，プロラミンは，平成10年産および11年産，両年とも組換え体 H 75 が原品種月の光に対して，200%程度にまで増加していた（Table 1）。また，ケルダール分析による粗タンパク質量は，組換え体 H 75 と原品種

月の光（平成10年産：10.1%および9.8%，平成11年産：8.2%および8.1%）との間に大きな差は認められなかった（Table 2）。このことから組換え体 H 75 におけるグルテリンの減少分は，他の貯蔵タンパク質，特にプロラミンが増加したことにより相殺されたと考えられた。

2. 原料米の特性

Table 2 に原料米の特性分析の結果を示した。組換え体 H 75 は，千粒重が原品種月の光と比べて，10%程度増加していた。この大粒化は後代非組換え体においても認められたので，導入したグルテリンのアンチセンス遺伝子に起因した現象ではなく，組換え体作出時の培養変異等に起因した現象であると考えられた。また，組換え体 H 75 および後代非組換え体では，心白の発現がおよそ80%の粒で観察された（データ非掲載）。この心白の発現は大粒化の副次的影響ではないかと思われた。組換え体 H 75 および後代非組換え体の白米吸水率は，20分吸水率および120分吸水率のいずれにおいても，原品種月の光に比べて高かった。また，蒸米消化性は蒸米吸水率，全糖（Brix）の生成が原品種月の光に比べて，組換え体 H 75 および後代非組換え体で高く，溶解性に優れていた。また，70%精米時における碎米率が若干高くなっていた。柳内¹¹⁾によると，心白粒は無白粒に比べて玄米千粒重が大きく，白米吸水率および蒸米消化性が高く，精米

Table 1 Protein content in brown and 70% polished rice grains.

Albumin-globulin, prolamine, and glutelin were extracted sequentially with several kinds of solvents. Proteins in each fraction were quantified with the BCA protein assay reagent using BSA as the standard.

Protein fraction	Protein content (% w/w in rice grains)					
	1998		1999			
	Tsukinohikari	H 75	Tsukinohikari	H 75	Non-transformant	Gohyakumangoku
Brown rice grains						
Albumin/Globulin	1.68	1.98	1.52	1.76	1.41	1.43
Glutelin	3.54	2.15	3.53	2.24	3.54	3.86
Prolamine	1.60	3.09	1.01	1.99	1.08	1.03
70% polished rice grains						
Albumin/Globulin	0.99	1.25	0.89	1.14	1.22	0.85
Glutelin	2.82	1.69	2.94	1.85	2.76	3.03
Prolamine	0.94	2.30	0.77	1.30	0.76	0.67

Table 2 Rice grain features

	Varieties					
	1998		1999			
	Tsukinohikari	H 75	Tsukinohikari	H 75	Non-transformant	Gohyakumangoku
Brown rice grains						
1000 kernel weight(g)	21.8	23.8	22.7	25.0	24.5	26.2
Water content(%)	14.8	14.9	13.8	14.7	14.3	13.3
Crude protein(%)	9.8	10.1	8.1	8.2	8.3	8.9
70% polished rice grains						
Broken rice ratio(%)	8.2	10.8	3.0	3.8	3.6	11.4
Water content(%)	13.6	13.5	13.3	13.8	13.7	13.2
Crude protein(%)	6.6	6.9	5.7	5.6	5.3	6.1
Absorbed water 20 min(%)	21.9	28.2	20.7	26.6	26.2	25.9
Absorbed water 120 min (%)	27.6	29.0	27.4	27.7	27.6	27.1
Absorbed water(ST*)(%)	32.3	35.0	32.7	35.5	32.3	31.4
Digestibility(Brix)(%)	9.2	9.9	7.6	8.9	9.8	10.2
Digestibility(A-A**)(ml)	1.2	1.0	0.9	0.8	1.0	1.2

* Steamed rice, ** Amino acidity

Table 3 Results of small-scale brewing with 70% polished rice grains

	Varieties					
	1998		1999			
	Tsukinohikari	H 75	Tsukinohikari	H 75	Non-transformant	Gohyakumangoku
Fermentation time (days)	24	20	23	23	24	19
Sake meter	+7.0	+14.0	+15.0	+18.0	+14.0	+15.0
Alcohol(%)	18.8	18.6	19.5	19.1	19.1	19.6
Acidity(ml)	3.2	2.6	2.8	2.7	3.1	2.7
Amino acidity(ml)	2.5	1.5	1.8	1.1	1.7	1.8
OD 430	0.088	0.074	0.053	0.053	0.053	0.054
Extract(%)	4.8	3.6	3.7	3.0	3.6	3.7
Ratio of sake cake (%)	15.0	16.5	13.8	14.7	14.1	12.8
Iron(ppm)	0.10	0.11	0.09	0.07	0.09	0.10

時に割れやすい傾向を持つと報告している。組換え体 H 75 および後代非組換え体の吸水性・消化性の向上についても心白の発現が、起因していると考えられた。

3. 小仕込試験結果

精米歩合 70% の精白米を用いて発酵を開始し、アルコール分 19.0% 前後生成した時点で発酵を止めた

後、各種の分析を行った (Table 3)。組換え体 H 75 は原品種月の光と比べて、小仕込酒のアミノ酸度が低くなっていた。組換え体 H 75 のアミノ酸度は平成 10 年産が原品種月の光の 60% であり、平成 11 年産が 61% であった。組換え体 H 75 のグルテリン含量は原品種月の光のおよそ 60% であり、アミノ酸度の低減割

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of 70% polished rice grains and sake cake proteins in transgenic line H 75 (lane 2), non-transformant (lane 1), and Gohyakumangoku (lane 3).

Total protein was extracted with 4% SDS and 4 M urea in 125 mM Tris-HCl (pH 6.8) containing 5% 2-mercaptoethanol and was subjected to SDS-PAGE on 14% polyacrylamide gel. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

合とほぼ一致していた (Table 1)。酒中のアミノ酸は、そのほとんどが米のタンパク質に由来している。米タンパク質は、麹菌の生産する酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼなどのタンパク分解酵素によって分解されアミノ酸になる¹²⁾。若井ら³⁾によると、PB-II 量と上槽酒中のアミノ酸度とは有意な正の相関があり、また、蒸米の溶解過程で PB-II はすべて消化されるが、PB-I は蒸米残査中に 20~30% 残存したと報告している。この報告は、小仕込後に分離した酒粕を用いた電気泳動の結果に見られたように、PB-II を構成するグルテリンはほぼ分解されたのに対して、PB-I を構成するプロラミンは分解されにくく、酒粕中に残存したことと一致していた (Fig. 1)。これらのことから、組換え体 H 75 の低グルテリン性が小仕込酒のアミノ酸度を低下させたものと考えられた。

また、組換え体 H 75 で増加したプロラミンは、小仕込酒のアミノ酸生成への関与が低いと考えられた。

組換え体 H 75 小仕込酒のその他の特徴は、蒸米の消化性が良好だったにもかかわらず、粕歩合が若干多い結果となった (Table 3)。これは発酵が緩やかに進んだために、原料利用率が低くなったものと推察された。水間らが報告した低グルテリン米 LGC-1 についても原料利用率の低下が指摘されており、低グルテリン性の影響が考えられた⁶⁾。しかし、この原料利用率低下の要因としては、原料米の低グルテリン化によって醪中アミノ酸度が減少したことにより、酵母の生育が抑制され発酵が緩やかになったためなどの原因が考えられたが、詳細は不明である。

4. 小仕込酒貯蔵試験結果

アルコール生成量 18.5% の小仕込酒 (生酒) を 30°C で 6 ヶ月間まで貯蔵した。その間に行った各種分析の結果を Table 4 に示した。組換え体 H 75、後代非組換え体および五百万石の 3 点すべての試料とも、アルコール分および日本酒度は、30°C、6 ヶ月貯蔵した酒と上槽直後の小仕込酒との間にはほとんど変化が認められなかった。また、組換え体 H 75 の日本酒度は後代非組換え体および五百万石よりも、+10 前後高く推移していた。

4-1 酸度

酸度は 3 点すべての試料で、30°C、6 ヶ月貯蔵後に、滴定値が 0.2~0.3 ml 減少していた (Table 4)。酸度の減少は有機酸組成の分析結果から、ピルビン酸、リンゴ酸およびコハク酸の減少が起因していると考えられた (Table 5)。特にリンゴ酸およびコハク酸は 6 ヶ月後におよそ 100 ppm の減少を示していた。佐藤ら¹³⁾ は日本酒の熟成中にコハク酸、リンゴ酸が減少し、コハク酸モノエチル、リンゴ酸モノエチルに一部変化すると報告している。コハク酸モノエチル、リンゴ酸モノエチルは無臭であるが、コハク酸モノエチルはコハク酸のくどい酸味が消え、すっきりした酸味を呈するとされている。本試験では、小仕込酒中のコハク酸モノエチル、およびリンゴ酸モノエチルの定量は行っていない。しかし、コハク酸およびリンゴ酸の減少に伴ない、これらエチル成分が増加している可能性がある。また、組換え体 H 75 の酸度は後代非組換え体および五百万石よりも、滴定値が 0.4 ml 程低く推移していた (Table 4)。特に、ピルビン酸、乳酸およ

Table 4 Changes in qualities for small-scale brewing sake during storage

Months Items	H 75					Non-transformant					Gohyakumangoku				
	0	1	2	3	6	0	1	2	3	6	0	1	2	3	6
Alcohol(%)	18.5				18.5	18.5				18.5	18.5				18.4
Sake meter	+15.0				+15.0	+5.0				+4.0	+6.0				+5.0
Total acidity(ml)	2.90				2.70	3.30				3.10	3.40				3.10
Amino acidity(ml)	1.00	1.00	1.05	1.05	1.05	1.80	1.85	1.90	1.90	1.90	1.90	1.95	2.00	2.00	2.00
OD 430	0.07	0.10	0.12	0.13	0.18	0.08	0.11	0.16	0.20	0.32	0.09	0.12	0.17	0.21	0.35
3-DG(mM)	0.31	0.32	0.33	0.33	0.35	0.53	0.55	0.60	0.65	0.70	0.49	0.52	0.56	0.61	0.70
OD 280	7.6	7.9	8.1	8.2	8.4	9.9	10.4	11.0	11.1	11.8	10.7	11.0	11.4	11.8	12.8

Table 5 Changes in acid content in small-scale brewing sake during storage

Months Acid	H 75				Non-transformant				Gohyakumangoku			
	0	1	3	6	0	1	3	6	0	1	3	6
Citric acid	68	61	40	35	71	65	49	30	89	80	55	56
Pyruvic acid	85	83	83	79	165	160	152	138	151	145	135	127
Malic acid	425	403	395	389	389	375	353	328	505	487	452	420
Succinic acid	404	392	337	303	394	345	229	217	327	288	254	230
Lactic acid	351	352	352	381	524	520	518	505	569	575	580	585
Fumaric acid	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
Acetic acid	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Pyroglutamic acid	38	74	103	121	48	168	202	230	45	176	218	242

(ppm)

びピログルタミン酸の含有量の低さが目立った (Table 5)。日本酒に含まれる有機酸の約73%が、醪中で酵母における TCA サイクルおよびグリオキシル酸サイクル等で生成される¹⁴⁾。また、酵母は醪中でアミノ酸を栄養源にして生育している。組換え体 H 75 の低グルテリン性に起因したアミノ酸度の減少によって酵母の生育が抑制され、その結果、酵母による有機酸生成量が減少し、組換え体 H 75 酒中の酸度が低くなった可能性が考えられた。

4-2 アミノ酸度

アミノ酸度は3点すべての試料で、2ヶ月後まで若干の増加傾向を示したが、その後6ヶ月まで全く変動しなかった。また、組換え体 H 75 酒中のアミノ酸度は後代非組換え体および五百万石よりも、滴定値が

0.80-0.95ml 低く推移していた (Table 4)。組換え体 H 75 酒中のアミノ酸量の減少は、蒸米溶解過程において分解されやすいグルテリンが減少したことに起因していると考えられた。酒中のアミノ酸組成の分析結果から、上槽直後の組換え体 H 75 酒中では定量した18種のアミノ酸がすべて一様に少なくなっていた (Table 6)。その後6ヶ月間の貯蔵で Val, Ile, His の変動が後代非組換え体および五百万石と比べて異なっていたが、その原因は不明である。また、3点すべての試料は30°C、6ヶ月間貯蔵後に、Aspが増加傾向を示し、Thr, Glu, Cys, Met, Trp が減少傾向を示した。近藤ら¹⁵⁾によると、火入れを行わなかった生酒では30°C、1ヶ月間の貯蔵で Thr, Cys 以外のアミノ酸はすべて増加し、アミノ酸総量は増加したと報告し

Table 6 Changes in amino acid content in small-scale brewing sake during storage

Items \ Months	H 75		Non-transformant		Gohyakumangoku	
	0	6	0	6	0	6
Asp	28.8	38.9	69.7	98.2	72.9	98.7
Thr	71.1	38.2	160.3	78.6	175.2	83.7
Ser	31.2	35.2	80.1	85.9	85.6	88.7
Glu	142.2	121.2	280.1	229.2	300.5	243.7
Pro	108.3	117.7	122.7	125.8	129.3	130.5
Gly	103.0	114.7	147.9	156.1	152.7	159.5
Ala	234.2	251.2	419.6	431.5	450.9	456.4
Cys	44.7	N.D.	N.D.	9.2	71.2	32.9
Val	63.2	116.1	108.7	99.9	100.4	105.0
Met	67.0	39.6	91.1	30.3	90.8	29.8
Ile	28.7	28.1	58.9	97.5	87.0	100.3
Leu	73.9	75.8	174.0	181.7	188.6	193.7
Tyr	87.0	89.9	177.4	180.5	173.3	176.9
Phe	40.4	43.8	88.1	92.9	91.6	94.9
His	83.6	60.6	116.6	118.9	127.5	127.4
Trp	8.8	6.7	17.1	10.1	21.4	11.4
Lys	55.2	58.3	126.0	125.9	138.3	135.9
Arg	176.2	181.0	189.6	189.4	183.6	186.1

(ppm)

ている。本試験では2ヶ月以後、アミノ酸総量は一定に推移していた (Table 4)。生酒には麹由来の酵素や死滅酵母菌体から活性化・漏出した酵素が活性を保って含まれており、それら酵素の作用で生酒中のタンパク質やペプチドからアミノ酸が生成・増加する。同時に、貯蔵熟成中にアミノ酸の多くはアミノカルボニル反応によって着色物質のメラノイジンや、熟成香氣成分に変化し減少する。本試験では貯蔵2ヶ月以後、アミノ酸の増加・減少反応がわりあったために、アミノ酸総量が一定に推移したと思われる。これまでの研究報告によると、貯蔵熟成中に特に減少の著しいアミノ酸は Thr, Trp および含硫アミノ酸 (Cys, Met) で、いずれもメラノイジン、ハルマンなどの蛍光物質や老香の生成への寄与が大きいアミノ酸である¹⁾。本試験においても減少したアミノ酸は Thr, Glu, Cys, Met,

Trp であり、いずれも熟成に大きく寄与するアミノ酸であった (Table 6)。また、Glu の減少はピログルタミン酸の増加に寄与していると考えられた¹³⁾。

4-3 着色度 (OD 430)

着色度は3点すべての試料で、貯蔵日数に比例して増加していく傾向にあった。その増加率は後代非組換え体および五百万石で非常に高く、組換え体 H 75 との差は貯蔵日数に比例して広がる傾向にあった。そして、貯蔵6ヶ月後の後代非組換え体および五百万石の着色度は、組換え体 H 75 の1.8-2.0倍程度にまで増加していた (Table 4)。

4-4 3-デオキシグルコソン (3-DG)

3-DG は30℃、6ヶ月貯蔵後、組換え体 H 75 ではわずかに増加した程度であった (0.31 → 0.35 mM)。一方、後代非組換え体および五百万石ではその増加率

は高く (0.53→0.70mM, 0.49→0.70mM), 貯蔵6ヶ月後の後代非組換え体および五百万石の3-DGは, 組換え体H75の2倍程度に増加していた。また, 上槽直後の測定値も組換え体H75では, 後代非組換え体および五百万石よりも0.18-0.22mM低かった (Table 4)。

4-5 紫外部吸収 (OD 280)

紫外部吸収は3-DGと同様な傾向を示した。30°C, 6ヶ月貯蔵後, 組換え体H75のOD 280は7.6→8.4に増加した。一方, 後代非組換え体および五百万石は9.9→11.8, および10.7→12.8に増加し, いずれも高い増加率を示した (Table 4)。

日本酒の着色度と品質との間には負の相関関係が認められている¹⁶⁾。日本酒は貯蔵熟成過程に着色度が増加していく。着色成分は40~80%を酒中アミノ酸とグルコースとのアミノ・カルボニル反応によって生成するメラノイジンが占めるといわれている¹⁷⁾。メラノイジン生成過程の中間体の1つが3-DGであり, H75酒の着色度および3-DGは共に対照より低く推移した。また, 他の着色成分, ハルマンはTrp (またはSer) とアセトアルデヒドの縮合により生成する¹⁾。紫外部吸収は日本酒中の芳香族アミノ酸 (Tyr, Trp, Phe) 量の指標であり, 芳香族アミノ酸は, 日本酒中で苦味等の雑味に寄与していると考えられている¹⁸⁾。このように日本酒の着色度および味とアミノ酸とは密接な関係があり, アミノ酸度の低い日本酒は品質が良いという関係が認められている¹⁹⁾。

アミノ酸度の低い日本酒を造るには, 原料米に含まれるタンパク質を低減させることが必要である。そのために高度精白米を使用した酒造りへと全国的に移行してきている。一方, 品質を維持しながらもコスト削減を図る酒造りを考えることも必要である。これまでに精白米を乳酸浸漬する, あるいは乳酸菌培養液に浸漬するなどの方法により, 米の低タンパク質化処理が行われている。その低タンパク質化処理米を用いた小仕込試験の結果から, アミノ酸度の低い日本酒が製造されることが確認された。しかし, 前者では浸漬に伴う乳酸の持ち越しから酸度の高い日本酒となり, 実用にあたっては乳酸の除去が必要と判断されている²⁰⁾。後者では目標の日本酒に近い品質が得られたものの, 5.5%の米タンパク質を4.5~4.8%に減少させるには15時間にもおよぶ浸漬処理が必要であるとされて

いる²¹⁾。

本研究により, 米貯蔵タンパク質のうち, プロテインボディII (PB-II) を構成するグルテリンを特異的に低減させた低グルテリン米を用いることで, アミノ酸度の低い日本酒を造ることができ, その後の貯蔵過程における品質劣化をある程度抑制できる可能性が示唆された。

要 約

遺伝子組換えの手法により作出した低グルテリン米 (組換え体H75) を用いた酒造りを検討した結果, 以下のような知見を得た。

- (1) 組換え体H75の米貯蔵タンパク質のうち, グルテリン量が原品種月の光の60%程度に低減していたが, 全タンパク質量では差は認められなかった。
- (2) 組換え体H75原料米は培養変異によるとみられる大粒・心白が観察され, 蒸米消化性が向上していた。
- (3) 小仕込試験により得られた日本酒は, 組換え体H75酒中のアミノ酸度が原品種月の光酒中の60%程度に低減していた。
- (4) 小仕込酒の貯蔵試験を行った結果, 組換え体H75酒中では後代非組換え体および五百万石で造った酒と比べて, 着色度, 3-デオキシグルコソンおよび紫外部吸収が低く推移することが確認された。
- (5) 以上の結果から, 本低グルテリン米は精米特性や醪での溶解性にやや問題があるが, アミノ酸度の低い日本酒を造るためには有用な原料米と推察された。

謝 辞

本試験結果の報告にあたり原稿を校閲していただきました今関英雅名古屋大学名誉教授に対しまして心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) 清酒製造技術: 366-381 (財) 日本醸造協会 (1991)
- 2) 木崎康造: 第14回酒米懇談会講演要旨集, 1-12 (1990)

- 3) 若井芳則：第 17 回酒米懇談会講演要旨集，2-13 (1993)
- 4) 古川幸子，水間智哉，柳内敏晴，清川良文，若井芳則：醸協，**95**(4)，295-303 (2000)
- 5) 古川幸子：第 25 回酒米懇談会講演要旨集，26-38 (2001)
- 6) 水間智哉，古川幸子，清川良文，若井芳則，山本佳宏，筒井延男，松下 景，前田英郎，飯田修一，根本 博：生物工学会誌，**80**(11)，503-511 (2002)
- 7) 岩野君夫，中沢伸重，伊藤俊彦，高橋 仁，上原 泰樹，松永隆司：醸協，**97**(7)，522-528 (2002)
- 8) Yoshiyuki Maruta, Jun Ueki, Hideaki Saito, Naoto Nitta and Hidemasa Imaseki : Molecular Breeding, **8**(4), 273-284 (2001)
- 9) Kumamaru T, Satoh H, Iwata N, Omura T, Ogawa M, Tanaka K : Theor Appl Genet, **76**, 11-16 (1988)
- 10) 岩野君夫，来間健次，衣山陽三，中村伝市，河地元彦：醸協，**65**(1)，59-62 (1970)
- 11) 柳内俊靖：第 21 回酒米懇談会講演要旨集，7-13 (1997)
- 12) 醸造物の成分：63-84(財)日本醸造協会 (1999)
- 13) 佐藤 信，菱沼 誠，高橋康次郎，根立恵夫：醸協，**69**(9)，595-598 (1974)
- 14) 醸造物の成分：50-62(財)日本醸造協会 (1999)
- 15) 近藤恭一，中沢英五郎，草間 透，竹村成三：醸協，**78**(10)，760-762 (1983)
- 16) 佐藤 信，大場俊輝，高橋康次郎，杉谷 守：醸協，**73**(6)，473-478 (1978)
- 17) 醸造物の成分：96-108(財)日本醸造協会 (1999)
- 18) 国税庁所定分析法注解 第四回改訂：p. 30(財)日本醸造協会 (1993)
- 19) 秋山裕一，醸造試験所所員一同：醸協，**77**(1)，57-61 (1982)
- 20) 木崎康造：醸協，**94**(1)，48-50 (1999)
- 21) 田村 巧，後藤 誠，安澤義彦，勝又和明，片岡 惇：醸協，**95**(12)，907-911 (2000)