



Title	大吟醸酒醸造に資する酒造好適米品種「白鶴錦」の特性解析
Author(s)	玉田, 佳大
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101621
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

大吟醸酒醸造に資する
酒造好適米品種「白鶴錦」の特性解析

玉田 佳大

2025年1月

大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻

目次

略号	1
第 1 章 緒論	3
1.1. 清酒および清酒の製造工程	3
1.2. 吟醸酒・大吟醸酒	4
1.3. 酒造好適米 (酒米)	5
1.4. 「山田錦」	5
1.5. 「白鶴錦」	6
1.6. 本博士論文の目的と構成	8
第 2 章 「白鶴錦」の醸造特性とそれに関連する米粒構造の解析	10
2.1. 諸言	10
2.2. 材料と方法	11
2.3. 結果と考察	15
2.4. 小括と展望	21
第 3 章 「白鶴錦」の大吟醸酒の成分的特性の解析	23
3.1. 諸言	23
3.2. 材料と方法	24
3.3. 結果と考察	27
3.4. 小括と展望	33

第4章 「白鶴錦」のDNA配列の特徴解析	34
4.1. 諸言	34
4.2. 材料と方法	35
4.3. 結果と考察	37
4.4. 小括と展望	45
第5章 総括と展望	47
5.1. 総括	47
5.2. 展望	48
引用文献	50
本博士論文に関連する業績	57
謝辞	60
付録	61

略号

GC/MS: gas chromatography/mass spectrometry, ガスクロマトグラフィー質量分析

DNA: deoxyribonucleic acid, デオキシリボ核酸

GlcNAc: *N*-acetyl-*D*-glucosamine, *N*-アセチル-*D*-グルコサミン

NEDC: *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, *N*-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩

MSTFA: *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide, *N*-メチル-*N*-(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド

AIA: Adobe Illustrator action

CSV: comma separated values

PCA: principal component analysis, 主成分分析

PLS: partial least square, 部分最小二乗

PC: principal component, 主成分

VIP: variable importance in the projection

CTAB: cetyltrimethylammonium bromide, 臭化セチルトリメチルアンモニウム

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane, トリスヒドロキシメチルアミノメタン

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸

VCF: variant call format

UTR: untranslated region, 非翻訳領域

Leu: leucine, ロイシン

Phe: phenylalanine, フェニルアラニン

Ser: serine, セリン

Thr: threonine, スレオニン

Ile: isoleucine, イソロイシン

Arg: arginine, アルギニン

Lys: lysine, リジン

Asn: asparagine, アスパラギン

His: histidine, ヒスチジン

Gly: glycine, グリシン

Asp: aspartic acid, アスパラギン酸

Val: valine, バリン

Glu: glutamic acid, グルタミン酸

Gln: glutamine, グルタミン

Met: methionine, メチオニン

Ala: alanine, アラニン

Pro: proline, プロリン

第 1 章 緒論

1.1. 清酒および清酒の製造工程

清酒は，日本古来の醸造酒であり，米 (*Oryza sativa* L.) を原料にして，麴菌 (*Aspergillus oryzae*) の生産する酵素によるデンプンの糖化と酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) によるアルコール発酵を同時に行う並行複発酵により醸造される (Okuda, 2019) .

清酒の製造工程を図 1-1 に示した．玄米を精米することで得られた白米は，洗米および浸漬による吸水後に，蒸きょうされる．蒸米は掛米，麴米の 2 通りの使用方法がある．掛米は蒸米の状態で，直接酒母または醪に投入される．一方，麴米として使用される蒸米は，麴菌の孢子を接種し，約 2 日間かけて麴菌を生育させる製麴によって米麴となる．これにより，糖化酵素をはじめとした酵素が生産される．酒母は，酵母の大量培養を目的として，米麴，蒸米，水に酵母を加えて約 1 週間かけて造られる．完成した酒母に，米麴，蒸米，水を三度に分けて添加することで，醪の仕込みが行われる．数週間の発酵を終えた醪は，上槽により，清酒と酒粕に分けられる．上槽後の清酒は，一般的に，殺菌と酵素の失活を目的に加熱を行う火入れ，味わいの深みを増加させることを目的に熟成を進行させる貯蔵，およびアルコール度数を市販規格に合わせるために加水希釈を行う割水などの工程を経て，出荷される．

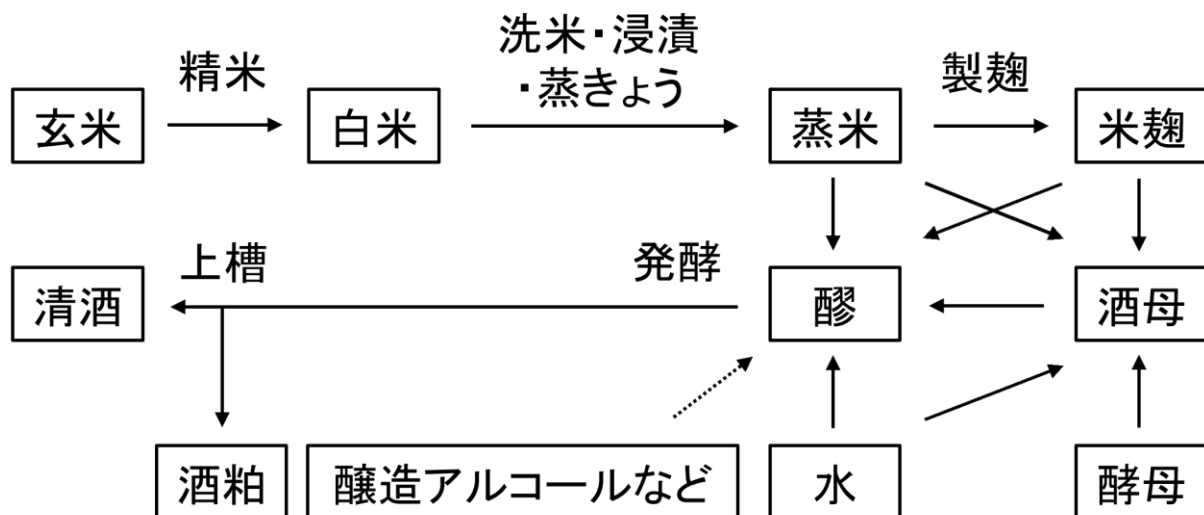


図 1-1. 清酒の製造工程

1.2. 吟醸酒・大吟醸酒

清酒の製造法の一つとして吟醸造りがある．吟醸造りとは原料米の精米歩合を 60% 以下にし，醪を低温で長期発酵させる醸造法であり，製造された清酒は吟醸酒と呼ばれる．ここで，精米歩合とは，白米のその玄米に対する重量の割合を指し，例えば，精米歩合 60%とは，玄米の表層部が 40%削り取られていることを示す．特に，精米歩合 50%以下の原料米を用いて吟醸造りにより製造された清酒は，大吟醸酒と呼ばれる（国税庁課税部酒税課, 2023）．吟醸酒や大吟醸酒は，吟醸香と呼ばれる果物のような華やかな香りとすっきりとしたなめらかな味わいを特徴とし，これらの特徴は吟醸造りによって引き出される．吟醸香を構成する主な成分として，リンゴのような香りを有するカプロン酸エチル，バナナのような香りを有する酢酸イソアミルが挙げられ，これらの成分は酵母によって生成される（灘酒研究会, 1997）．最近では精米歩合 35～40%の白米を用いて醸造された大吟醸酒も増えており（灘酒研究会, 1997），全国規模で新酒の品質を競う全国新酒鑑評会に出品される大吟醸酒の約 9 割が精米歩合 35～40%の区分に集中している（磯谷, 2024）．

1.3. 酒造好適米 (酒米)

清酒醸造に適した米は酒造好適米 (酒米) と呼ばれ、吟醸造りでは、酒米が使用されることが多い (増村, 2011) . 酒米は、一般米と比較して大粒である (Okuda, 2019) . 粒の大きさは通常玄米千粒重で表され、一般米の玄米千粒重は 20~24 g であるが、酒米ではそれより大きく、25~29 g 程度のものが多い (兵庫酒米研究グループ, 2010; 副島, 2017) . また、酒米は中心部に心白と呼ばれる白い部分を持つ (Okuda, 2019) . 心白部はデンプンの詰まりが密でないため、光が乱反射することで白く見える (兵庫酒米研究グループ, 2010) . 心白がある米では製麴の際に蒸米内部に麴菌が伸長しやすく (吉井, 2001; 上島, 2004) , その結果、糖化酵素の活性が高い米麴ができやすい (副島, 2017) . 心白がある米では吸水時に亀裂を生じやすく (上島, 2004) , こうした亀裂は蒸きょうによって接着されるが、この部分ではずれや小さな空洞を生じることが多い (吉井, 2001) . こうした空間は好気性の麴菌の生育にとって有利な環境になると推察され、これが麴菌の伸長の良さの一因であると考えられている (吉井, 2001) . 酒米として現在栽培されている品種は 100 以上にのぼる (Okuda, 2019) . 主な品種としては、「山田錦」、「五百万石」、「雄町」、「美山錦」が挙げられるが、全国の銘醸地で固有の酒米品種が開発・育成され、清酒醸造に用いられている (灘酒研究会, 1997) .

1.4. 「山田錦」

「山田錦」は、1923 年に兵庫県立農事試験場において、種子親に「山田穂」、花粉親に「短稈渡船」を用いて交配し、選抜された優良系統を、個体間の形質の分離がほとんど認められない遺伝的に固定された状態にした後、1936 年に兵庫県の奨励品種に編入された酒米品種である (吉田, 2012) . 吟醸造りにおいては、雑味や着色の原因となるアミノ酸の生成の原因となるタンパク質や、酵母による吟醸香の主要成分の生成の阻害や清酒本来の香りでない香りの生成の原因となる脂質の含有量が少ないことがよいとされる (兵庫酒米研究グループ, 2010; 副島, 2017; 玉田, 2020) が、「山田錦」は、タンパク質含量、脂質含量が低いという成分的特徴を有する (西村, 2008) . また、

大粒で適度な心白発現性があり，高精白が可能であるという形態的特徴も有する（西村，2008）ため，酒造技術者の中で最も評価が高く優れた酒米品種であると認識されている（吉田，2012; Okada, 2017）．全国新酒鑑評会の金賞受賞酒の多くが「山田錦」を使用した大吟醸酒であることからわかるように，大吟醸酒の醸造に非常に適した酒米品種であると考えられている（吉田，2012）．「山田錦」の主産地は兵庫県六甲山地北側であり（灘酒研究会，1997），全国新酒鑑評会に出品される「山田錦」使用酒の7割以上が兵庫県産の「山田錦」を使用している（磯谷，2024）．

1.5. 「白鶴錦」

白鶴酒造株式会社は，「山田錦」が有する優れた特性が何に由来するのかを明らかにするために，「山田錦」の両親品種である「山田穂」と「短稈渡船」に着目した．しかしながら，「山田錦」の交配に使用した「山田穂」および「短稈渡船」はすでに保存されていなかった．そこで，「山田穂」の純系淘汰品種である「新山田穂 1 号」，および「短稈渡船」と同様に「渡船」の純系淘汰品種であると推定される「渡船 2 号」の品種特性を調査した（長谷，1996; 長谷，1997）．なお，「渡船 2 号」は「短稈渡船」とほぼ同等の品種と推定されている（兵庫酒米研究グループ，2010）．ここで，純系淘汰とは，各地で栽培されている当該品種を収集し，優良なものを選抜し，遺伝的な固定を図った後に，新たな品種とする方法のことである（兵庫酒米研究グループ，2010）．その結果，「山田錦」の成分的特徴は「山田穂」に，形態的特徴は「渡船」に由来することが示唆された（西村，2008）．

そこで，白鶴酒造株式会社は，「山田錦」の両親に非常に類似した品種を再度交配することで，「山田錦」に遜色ない優良な酒米品種の開発を試みた．「新山田穂 1 号」および九州大学で保存されていた「山田穂」を種子親に，「渡船 2 号」および九州大学で保存されていた「渡船」を花粉親に使用し，1995 年に 4 通りの組み合わせで交配を行った（図 1-2）．優良系統を選抜し，遺伝的な固定を図った後，2007 年に「白鶴錦」として品種登録された．なお，「白鶴錦」として選抜された優良系統は，九州大

学で保存されていた「山田穂」と「渡船2号」の交配により得られたものである（西村, 2008）。

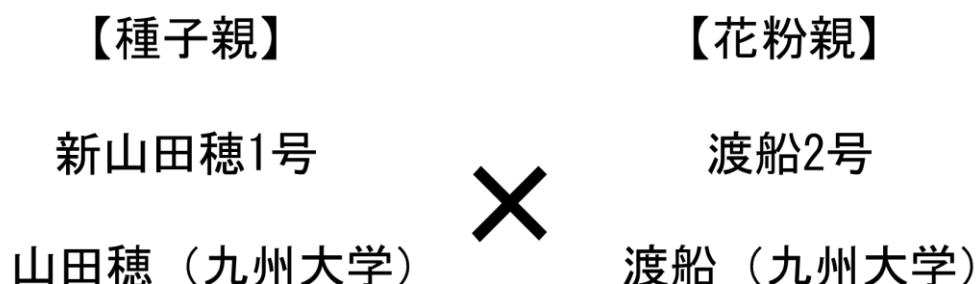


図 1-2. 「白鶴錦」開発の際の交配品種

「白鶴錦」を 2002～2004 年の 3 年間にわたって「山田錦」と兵庫県内の同一圃場で栽培し，栽培特性と玄米品質を調査した結果を表 1-1 に示した。「白鶴錦」の出穂期と成熟期は「山田錦」と同時期であり，稈長は「山田錦」より 4 cm 程度短かった。玄米千粒重は「山田錦」と比較してやや重く，心白の大きさがやや大きかった（西村, 2008）。なお，それ以後も，「白鶴錦」は「山田錦」と比較して玄米千粒重がやや重く，心白の大きさがやや大きいことが継続して確認されている。

表 1-1. 「白鶴錦」の栽培特性・玄米品質

品種	出穂期	成熟期	稈長 (cm)	玄米千粒重 (g)	心白発現率 (%)	心白率 (%)
山田錦	8 月 27 日	10 月 7 日	99.8	28.2	49.0	40.0
白鶴錦	8 月 26 日	10 月 5 日	96.2	29.2	44.3	42.6

2002～2004 年の調査平均値，調査圃場：兵庫県三木市吉川町

心白率 (%) = $(5 \times \text{大} + 4 \times \text{中} + 2 \times \text{小}) \times 100 / 5n$

引用文献（西村, 2008）の表をもとにして作成した。

「白鶴錦」を使用した大吟醸酒は、「山田錦」と同様に全国新酒鑑評会で金賞を受賞していることから、「白鶴錦」を使用することで「山田錦」に遜色ない酒質の大吟醸酒が醸造可能と考えられる。一方、「白鶴錦」を使用した清酒は「山田錦」とは異なる官能特性を持つと考えられ (西村, 2008) , 精米歩合 38%の「白鶴錦」の白米を用いて醸造された大吟醸酒は、同一条件で醸造された「山田錦」の大吟醸酒と比較してやわらかい味わいになる傾向がある (付録 表 A-1) 。

精米歩合 38%の白米における「白鶴錦」の粗タンパク質量, 粗脂肪量, 米の溶解性の指標である消化性, 精米特性には「山田錦」と顕著な差がないこと, 20 分・120 分吸水後の白米吸水率は「山田錦」と比較してやや低いことがこれまでに確認されている (小澤, 2008) が, 「白鶴錦」の詳細な特性については未解明である。

なお, 「白鶴錦」は, 2024 年時点で, 13 の酒造会社で大吟醸酒醸造を中心に使用されている。

1.6. 本博士論文の目的と構成

前述した通り, 「白鶴錦」の詳細な特性は解明されていない。「白鶴錦」の詳細な特性を解明できれば, 科学的根拠に基づいた「白鶴錦」の訴求, 「白鶴錦」の醸造特性の理解とそれに基づいた原料処理条件の設定, 「白鶴錦」の特性を考慮した酒質設計に役立つと期待される。

そこで, 本研究では, 「白鶴錦」の特性を「山田錦」との比較を通して明らかにし, 「白鶴錦」の大吟醸酒の醸造特性・酒質特性や遺伝的背景の理解に資する知見を得ることを目的とした。

大吟醸酒醸造の原料処理条件の設定においては, 使用する原料米の吸水特性, 製麹特性の理解が特に重要であり, これらの醸造特性には米粒構造特性が大きく影響すると考えられる。そこで, 第 2 章では, 精米歩合 38%の白米におけるこれらの醸造特性およびそれに関連する米粒構造特性を, 「山田錦」との比較を通して評価し, 「白鶴錦」の大吟醸酒の醸造特性とその要因の理解に繋がる知見を得ることを試みた。

第3章では、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) を基盤としたメタボロミクス技術により、「白鶴錦」の大吟醸酒の成分的特性を調査し、前述した「白鶴錦」の大吟醸酒の官能特性の要因解明に繋がる知見を得ることを試みた。

第4章では、「白鶴錦」と「山田錦」およびこれらの両親品種に相当または類似すると考えられる「新山田穂1号」、「渡船2号」の全ゲノム情報を比較解析し、「白鶴錦」と「山田錦」の両親品種からのDNAの継承の違いをゲノムレベルで解明することで、「白鶴錦」の遺伝的背景に関する知見を得ることを試みた。

第5章では、第2章から第4章で得られた知見を総括し、今後の展望を記載した。

第2章 「白鶴錦」の醸造特性とそれに関連する米粒構造の解析

2.1. 諸言

第1章で述べた通り，精米歩合38%の白米における「白鶴錦」の粗タンパク質量，粗脂肪量，消化性，精米特性には「山田錦」と顕著な差がないことが確認されている(小澤, 2008) が，その一方で，詳細な吸水特性や製麴特性については把握されていない。

白米の吸水状態は蒸米の硬軟に大きく影響し，その後の醸造工程に重要な影響を与える(古浦, 2010) が，特に，大吟醸酒醸造においては分～秒単位で吸水時間を調整し目標の吸水率に合わせる限定吸水を行うことからわかるように吸水状態の繊細な調整が求められ(熊谷, 1981)，使用する原料米の吸水特性とその要因を理解することが重要である。

また，清酒醸造においては，「一麴，二酛，三造り」と言われるように製麴が重要視され，特に吟醸造りにおいては，米麴は酒質に大きな影響を与えると考えられる(五味, 1987)．イソアミルアルコールとアセチル CoA からの酢酸イソアミル合成にかかわる酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼの活性は，グルコースが1～2%以上存在する条件では維持されるが，グルコース濃度が1%以下になると急激に低下する(Yoshioka, 1984; 石川, 1984; 五味, 1987)．また，グルコースはカプロン酸とエタノールからのカプロン酸エチル合成にかかわるエステラーゼの活性の維持にも関与しているとの報告(栗山, 1986)もあり，酵母による吟醸香の主要成分の生成活性を高いレベルで維持するためには，醪中のグルコース濃度を高く維持する必要がある(五味, 1987)．一方，不飽和脂肪酸はアルコールアセチルトランスフェラーゼをコードする主要な遺伝子である *ATF1* の抑制の原因となる(Fujii, 1997)．不飽和脂肪酸は主に米麴に由来し，米麴中の麴菌菌体量に依存して増加するため，大吟醸酒醸造においては，麴菌菌体量が少なくグルコース生成活性が高い米麴が望まれる．こうした特徴を持つ米麴を製麴するためには，蒸米の表面全体に麴菌を繁殖させるのではなく，

表面での増殖は限定的とし、蒸米内部に麹菌を伸長させるのがよいとされる (若井, 1992) . 一般米と比較して心白を有する酒米では、破精込みと呼ばれる麹菌の内部への伸長が良好である (家村, 1982) . 酒米の中でも、「山田錦」は蒸米内部が軟らかく保水性が良好であるため、麹菌が内部に伸長しやすく、上記の型の米麹が特に製麹しやすいと考えられている (若井, 1992) . そのため、「山田錦」は麹菌菌体量あたりのグルコース生成活性が高い米麹を製麹しやすいと考えられるが、その一方で、「白鶴錦」の製麹特性は不明である.

そこで、本章では、大吟醸酒醸造に資する精米歩合 38%の白米における「白鶴錦」の吸水特性、製麹特性とこれらに関連する米粒構造特性を、「山田錦」との比較を通して明らかにし、「白鶴錦」の大吟醸酒の醸造特性とその要因の理解に繋がる知見を得ることを目的とした.

2.2. 材料と方法

2.2.1. サンプル

2012 年に兵庫県で栽培された「山田錦」および「白鶴錦」の精米歩合 38%の白米を用いた. 参考までに、精米前の玄米の品質に関する情報を付録 (付録 表 A-2) に示した. また、2012 年に兵庫県で栽培された「山田錦」および「白鶴錦」の精米歩合 38%の白米を用いて、白鶴酒造株式会社 (兵庫, 日本) で製麹された米麹を用いた. 製麹には、吟醸用種麹であるハイ・G (株式会社樋口松之助商店, 大阪, 日本) を使用し、Ito らの文献 (Ito, 2017) に記載されたステップに沿って、蓋麹法 (灘酒研究会, 1997) で実施された. 初期水分量がおおよそ 9.0%の白米に吸水率が 30~31%となるように吸水させた後、60 分間蒸きょうし、31~32°C まで放冷した後に種麹を接種した. 各製麹操作を実施した温度や時間などの情報は表 2-1 に示した. なお、米麹は分析まで-80°C で保存した.

表 2-1. 製麴条件

操作	品温 (°C)	製麴時間 (h)	備考
種付け, もみ上げ	31~32	0	白米 10 kg あたり 1.5 g の種麴を接種
切り返し	33~35	22	
盛り	32	22	
仲仕事	36~37	27	
仕舞仕事	40~41	32	
出麴	42~44	48	

2.2.2. 試薬

エタノール, *t*-ブチルアルコール, メタノール, 酢酸ナトリウム三水和物, 酢酸, リン酸二水素ナトリウム二水和物, リン酸水素二ナトリウム十二水和物, *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc), 四ホウ酸カリウム四水和物, *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド, 塩酸, 乳酸, 乳酸ナトリウム, カルボキシメチルセルロースは富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪, 日本) から, *N*-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 (NEDC) はメルク (ニュージャージー州ローウェイ, 米国) から, ヤタラーゼはタカラバイオ株式会社 (滋賀, 日本) から購入した.

2.2.3. 吸水特性の調査

酒造用原料米全国統一分析法 (酒米研究会, 2022) を以下のように一部改変して測定した. 白米 10.0 g を吸水管に計量し, 10°C の水に浸漬させた. 吸水開始から 7, 8, 9, 10, 12, 15 分後に, 10°C, 1137× *g* で 4 分間遠心分離し, 遠心分離後の重量を測定することで各吸水時間における吸水率を算出した. 各品種について独立して *n*=3 で分析を行い, 品種による有意差の有無は, *F* 検定で等分散性を確認後, スチューデントの *t* 検定を行うことで評価した. なお, 使用した白米の初期水分量は, 「山田錦」が 8.9 ± 0.1%, 「白鶴錦」が 8.7 ± 0.2% (いずれも平均値±標準偏差 (*n*=3)) であり, *F* 検定で等分散性を確認後, スチューデントの *t* 検定を行った結果, 品種による有意差

はなかった。

2.2.4. 浸漬米の電子顕微鏡観察

白米を 30 分間吸水させた後、デカンテーションした。その後、50%、70%、80%、90%、99.5%エタノールに順次 30 分間×2 回ずつ浸漬し、エタノール置換を行った後、*t*-ブチルアルコールに 30 分間×3 回浸漬し、置換した。サンプルは、*t*-ブチルアルコールに浸漬させた後、凍結乾燥装置 VFD-21S (株式会社真空デバイス, 茨城, 日本) を用いて凍結乾燥した。イオンスパッター装置 E102 (株式会社日立製作所, 東京, 日本) により白金・パラジウム蒸着処理を行った後、電界放射形走査電子顕微鏡 Sirion (FEI 社, オレゴン州ヒルズボロ, 米国) を用いて、長軸方向に切断した米の断面を観察した。その際、加速電圧は 5 kV, ワーキングディスタンスは 15 mm とした。各品種について 3 検体ずつ観察した。

2.2.5. 吸水前の白米中の空隙量の測定

135°C で一晩放置し水分を除去した後の白米 10.0 g を吸水管に計量し、10°C のエタノールに 24 時間浸漬させた。浸漬しても膨潤しない溶媒であるエタノールを用いることで、膨潤しない白米の細孔の量を測定することが可能であると考えられる (伊藤, 1992)。浸漬終了後、10°C, 1137× *g* で 4 分間遠心分離した。浸漬前と遠心分離後の重量の差から、空隙に満たされたエタノール量を算出し、10°C のエタノールの密度を 0.798 g/mL とし、白米中の空隙量を求めた。各品種について独立して *n*=3 で分析を行い、品種による有意差の有無は、F 検定で等分散性を確認後、スチューデントの *t* 検定を行うことで評価した。

2.2.6. 米麴中のグルコース分布の可視化

米麴の質量分析イメージングは Wisman ら (Wisman, 2020b) と同様の方法で行った。具体的には、以下の方法で実施した。4%カルボキシメチルセルロースに包埋した米

麴を-80°Cで凍結後、20 μm の厚さの切片を作製し、クライオフィームで回収した。両品種ともに、断面積が最大になるように長軸方向に米麴を切断した。得られたフィルムをインジウムスズ酸化物スライドガラス (松浪硝子工業株式会社, 大阪, 日本) に導電性両面テープ (3M) を用いて貼り付けた後、真空蒸着装置である iMLayer (株式会社島津製作所, 京都, 日本) を用いて 220°C で 10 分間 NEDC を蒸着した。その後、スーパーエアブラシ (株式会社ウェーブ, 東京, 日本) を用いて 50%メタノールを用いて 7 mg/mL の濃度に調製した NEDC 溶液を 200 μL 噴霧した。作製したサンプルは iMScope QT (株式会社島津製作所) を用いて分析し、米麴中の m/z 215.03 のイオン強度 (任意単位) の分布を調べた。各品種について 3 検体ずつ解析した。

2.2.7. 米麴中の麴菌菌体量の測定

米麴中の麴菌菌体量の測定は、藤井ら (藤井, 1992) と同様の方法で行った。具体的には、以下の方法で実施した。米麴を 100°C で 1 時間乾燥後、高速ミル (CMT Company LTD, 東京, 日本) を用いて 3 分間粉碎した。粉碎後の米麴 1 g に 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を 5 mL 加え、手で振って洗浄した。その後、遠心分離 (2502 $\times g$, 10 分) し、上清を捨てた。以上の洗浄操作を 3 回繰り返した。50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を 5 mL 加え、さらに 10 mg のヤタラーゼを加えて混和し、37°C で 1 時間振盪した。遠心分離 (2502 $\times g$, 10 分) 後、上清を 0.45 μm メンブレンフィルター (DISMIC-25C cellulose acetate membrane: アドバンテック東洋株式会社, 東京, 日本) で濾過した。蒸留水で 5 倍希釈したサンプル 0.5 mL に 0.8 M 四ホウ酸カリウムを 20 μL 添加し混和後、5 分間煮沸した。10 N 塩酸を 12.5%含む酢酸 10 mL に *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 1 g を溶かした溶液を 0.6 mL 加え、37°C で 20 分間静置後、585 nm の吸光度を測定し、GlcNAc の検量線からサンプルの GlcNAc 濃度を算出した。麴菌菌体量は、菌体 1 mg に 139 μg の GlcNAc が含まれているとして算出した。各品種について独立して $n=3$ で分析を行い、品種による有意差の有無は、F 検定で等分散性を確認後、スチューデントの t 検定を行うことで評価した。

2.2.8. 米麴のグルコース生成総合活性の測定

米麴のグルコース生成総合活性は、豊田ら (豊田, 2023) と同様の方法で評価した。具体的には、以下の方法で実施した。米麴 5 g に 20 mM 乳酸緩衝液 (pH 4.0) 25 mL を加え、氷水浴 (未消化液) および 50°C 湯浴 (消化液) で 60 分間自己消化反応を行った。遠心分離 (2502× *g*, 5 分) 後、未消化液および消化液のグルコース濃度を定量し、自己消化反応によるグルコースの増加量を求めた。グルコース濃度は、グルコース分析装置 GA05 (株式会社エイアンドティー, 神奈川, 日本) を用いて定量した。グルコース生成総合活性 (U/g-*koji*) は米麴 1 g が 50°C で 60 分間に生成するグルコース量 (mg) で定義される。各品種について独立して *n*=3 で分析を行い、品種による有意差の有無は、F 検定で等分散性を確認後、スチューデントの *t* 検定を行うことで評価した。

2.2.9. 米麴中のグルコース含量の測定

米麴中のグルコース含量の測定は、岩野ら (岩野, 2002) の方法を参考にして、以下のように行った。米麴 2 g に 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.5) 8 mL を入れ、5°C で時々攪拌しながら 2 時間抽出した。No.5A の濾紙 (アドバンテック東洋株式会社) で濾過したものを抽出液とした。グルコース濃度は、グルコース分析装置 GA05 を用いて定量した。各品種について独立して *n*=3 で分析を行い、品種による有意差の有無は、F 検定で等分散性を確認後、スチューデントの *t* 検定を行うことで評価した。

2.3. 結果と考察

2.3.1. 吸水特性

精米歩合 38%の白米における「白鶴錦」の 20 分・120 分吸水後の白米吸水率は「山田錦」よりも低いことがわかっている (小澤, 2008) が、詳細な吸水特性は把握されていなかった。そこで、「山田錦」と「白鶴錦」の白米の初期吸水特性を比較した。その結

果,「白鶴錦」の白米は「山田錦」と比較して,初期吸水が有意に遅い ($p<0.01$) ことを確認した (図 2-1) . なお,翌年の 2013 年に栽培された兵庫県産の白米についても,同様の結果を得た (付録 図 A-1) .

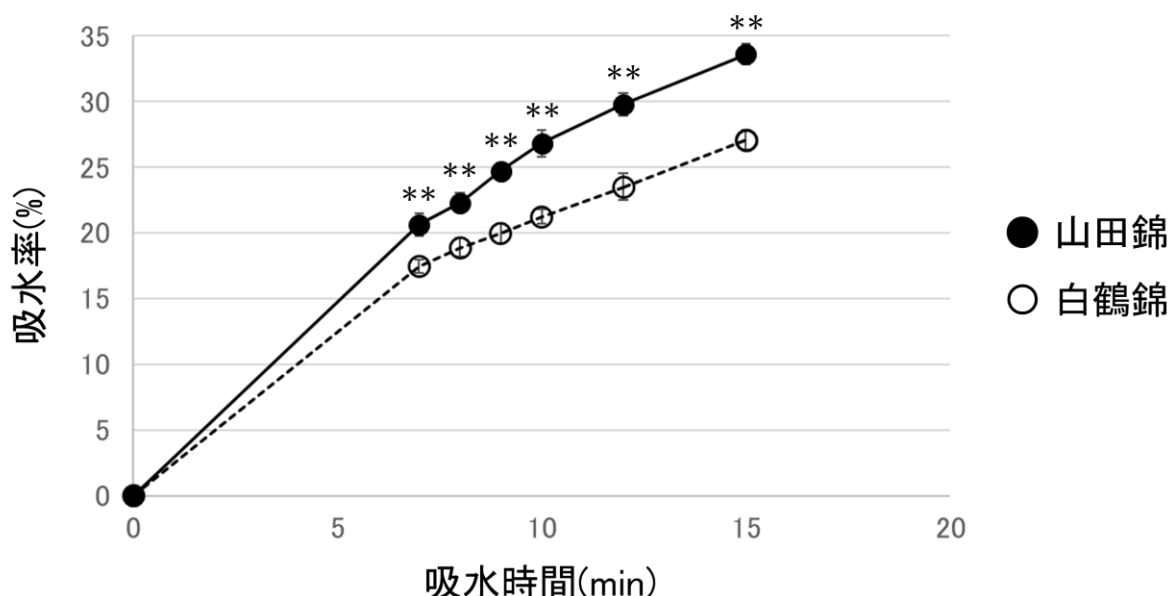


図 2-1. 2012 年兵庫県産の精米歩合 38%の白米の吸水曲線

平均値±標準偏差 ($n=3$) , ** $p<0.01$

2.3.2. 米粒構造特性

電子顕微鏡を用いて,「山田錦」と「白鶴錦」の浸漬米の断面を観察した. 米粒は,断面積が最大になるように長軸方向に切断した. 第 1 章で述べた通り,心白がある米は吸水時に亀裂を生じやすく,それによって製麴の際に蒸米内部に麴菌が入りやすくなると考えられている (上島, 2004) が,両品種ともに,吸水後の米内部で亀裂が観察された (図 2-2) . また,「白鶴錦」は断面の形状が円形に近く,「山田錦」とは異なる米粒構造を有することが示唆された (図 2-2) .

心白を持つ米粒では,デンプン粒間に多数の空隙部分が存在する (安藤, 1974) . 米粒に水を浸漬させると,これらの孔に水が浸透し吸水するとともに,吸水に伴ってデ

ンブン粒が膨張し孔の容積はさらに増加すると考えられる (伊藤, 1992) . 「白鶴錦」は「山田錦」よりも初期吸水が有意に遅かったが, この要因の一つとして, 吸水前の白米中の空隙量が少ない可能性があると考えた. 浸漬しても膨潤しない溶媒であるエタノールを用いることで, 白米中の細孔の量を測定することが可能であると考えられる (伊藤, 1992) . そこで, 水分を除去した「山田錦」と「白鶴錦」の精米歩合 38%の白米を, エタノールに 24 時間浸漬させ, 浸漬前後の白米重量を比較することで, 浸漬前の白米中の空隙量の違いを評価した. その結果, 「白鶴錦」の白米中の空隙量は「山田錦」と比較して有意に少なく ($p<0.01$) , 「山田錦」の約 3 分の 2 であった (図 2-3) . 「白鶴錦」は「山田錦」と比較して吸水前の白米中の空隙量が少なく, 密に詰まった構造をしていることが示唆され, これが初期吸水の遅さの一因になっていると考えられた. 今後, 供与品種を増やして, 白米中の空隙量と初期吸水速度の関係を明らかにすることで, 白米中の空隙量の少なさが「白鶴錦」の初期吸水の遅さの一因になっていることを強固に裏付けられる可能性がある.

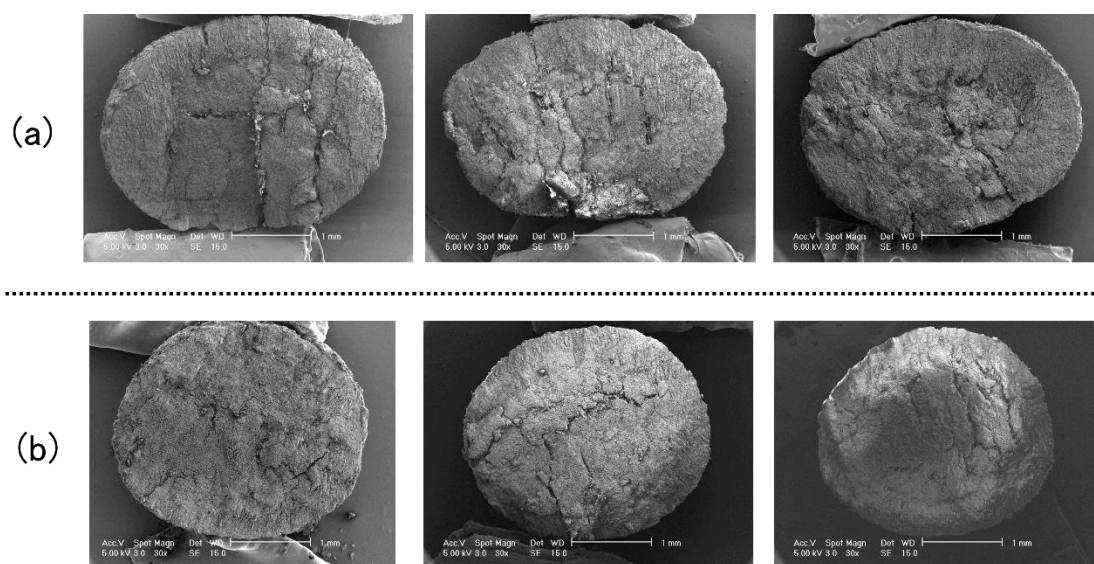


図 2-2. 精米歩合 38%の白米の浸漬後の断面の画像

(a) が「山田錦」, (b) が「白鶴錦」の白米の断面の画像である. 各品種について 3 検体ずつ観察した.

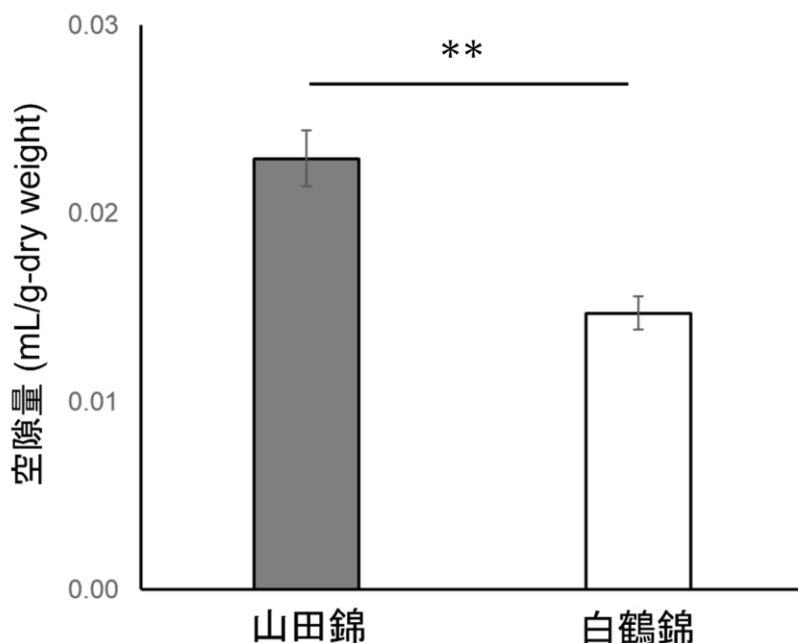


図 2-3. 精米歩合 38%の白米中の空隙量

平均値±標準偏差 (n=3) , ** $p<0.01$

2.3.3. 米麴の特性

本章の諸言で述べた通り，吟醸香の主要成分であるカプロン酸エチルや酢酸イソアミルの酵母による生成活性を高いレベルで維持するためには，麴菌菌体量が少なくグルコース生成活性が高い米麴が望まれる。「山田錦」はこのような特性を有する米麴の製麴に適していると考えられているが，その一方で，「白鶴錦」の製麴特性は不明であった。そこで，同一条件で製麴された「山田錦」と「白鶴錦」の米麴の特性を比較し，「白鶴錦」を使用することで，「山田錦」に遜色ない米麴が製麴可能か評価した。

「白鶴錦」の米麴のグルコース含量，麴菌菌体量を「山田錦」の米麴と比較した結果，両品種の米麴のグルコース含量，麴菌菌体量に有意差はなく，同程度であった（表 2-2）。さらに，豊田ら（豊田，2023）の報告を参考に，これらの米麴のグルコース生成総合活性を評価した。この方法では，米麴が有する様々な酵素の複合作用により，蒸米中のデンプンがグルコースに分解される現象を総合的に把握できる。その結果，「白鶴錦」の米麴のグルコース生成総合活性は「山田錦」と有意差がなく，同程度で

あった (表 2-2) .

グルコースは米麴の主要な成分であり、米のデンプンが麴菌の生産する糖化酵素によって分解されることで生成される (小林, 2009) . これまでに、当研究室では、質量分析イメージングを用いた米麴切片上におけるグルコース分布の可視化法を開発した (Wisman, 2020a; Wisman, 2020b) . 本手法では、米麴切片の表面に NEDC をマトリックスとして供給することで、グルコース由来の m/z 215.03 のイオン ([Glucose+Cl]) の強度分布を可視化する. 参考までに、グルコース標準品のマススペクトルを図 2-4 に示した. なお、米麴から検出される m/z 215.03 のピーク強度には、グルコースと同じ組成式を有する異性体由来のシグナルが含まれている可能性があるが、グルコースは米麴のデンプン分解酵素によって生成される主要な糖であることから、主にグルコースに由来すると考えられる (Wisman, 2020a) .

本手法を用いて、両品種の米麴中のデンプンが麴菌の生産する糖化酵素によってグルコースに分解された様子を観察し、米粒構造情報を保ったまま米麴の特性を理解することを試みた. 両品種の米麴の m/z 215.03 のピーク強度の分布を図 2-5 に示した. 米麴切片上の各領域におけるイオン強度は色の違いで示されており、青色の領域は強度が低く、緑色、黄色、赤色となるにしたがってイオン強度が高くなる. 緑色、黄色、赤色の箇所はグルコースが比較的良好に蓄積している箇所であると考えられる. 「白鶴錦」の米麴では「山田錦」と同様に、米の内部にもグルコースが分布していた. 前述した通り、米麴中のグルコースは麴菌が生成する糖化酵素によって米のデンプンが分解されて生産されるため、グルコースの蓄積箇所には麴菌が存在すると考えられる. このことから、「白鶴錦」の米麴は「山田錦」と同様に米の内部まで麴菌がよく伸長していることが示唆された. 本章の緒言で述べた通り、「山田錦」は麴菌が内部に伸長しやすいと考えられている (若井, 1992) が、「白鶴錦」も「山田錦」と同様に麴菌が内部に伸長しやすい米粒構造を有していると考えられた.

以上から、「白鶴錦」は「山田錦」と比較して空隙量が少ないなど異なる米粒構造を有すると考えられるものの、米の内部まで麴菌がよく伸長しており、麴菌菌体量や

グルコース生成総合活性が「山田錦」と同程度である，大吟醸酒醸造に適した米麴が製麴可能であることが示唆された．

表 2-2. 各品種の米麴のグルコース含量，麴菌菌体量およびグルコース生成総合活性

品種	グルコース含量 (mg/g-koji)	麴菌菌体量 (mg/g-koji)	グルコース生成総合活性 (U/g-koji)
山田錦	118 ± 1	3.9 ± 0.3	170 ± 5
白鶴錦	119 ± 1	4.0 ± 0.2	171 ± 4

平均値±標準偏差 (n=3)

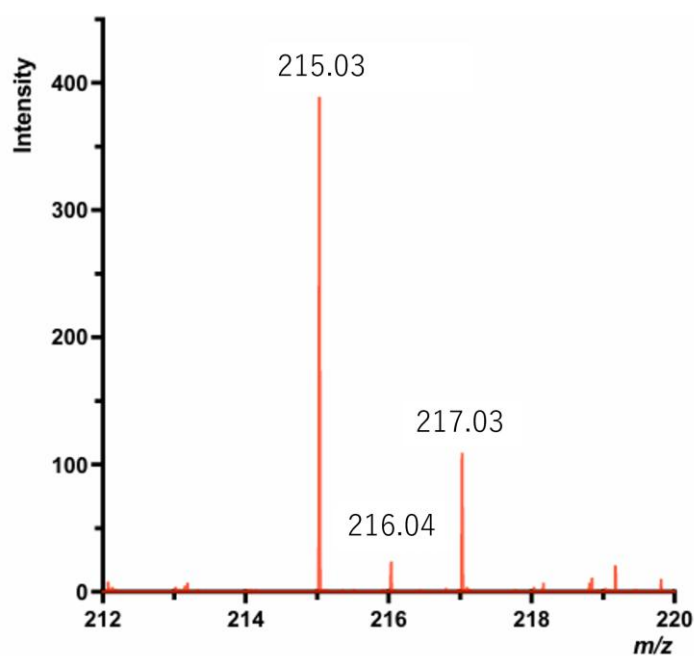


図 2-4. グルコース標準品のマススペクトル

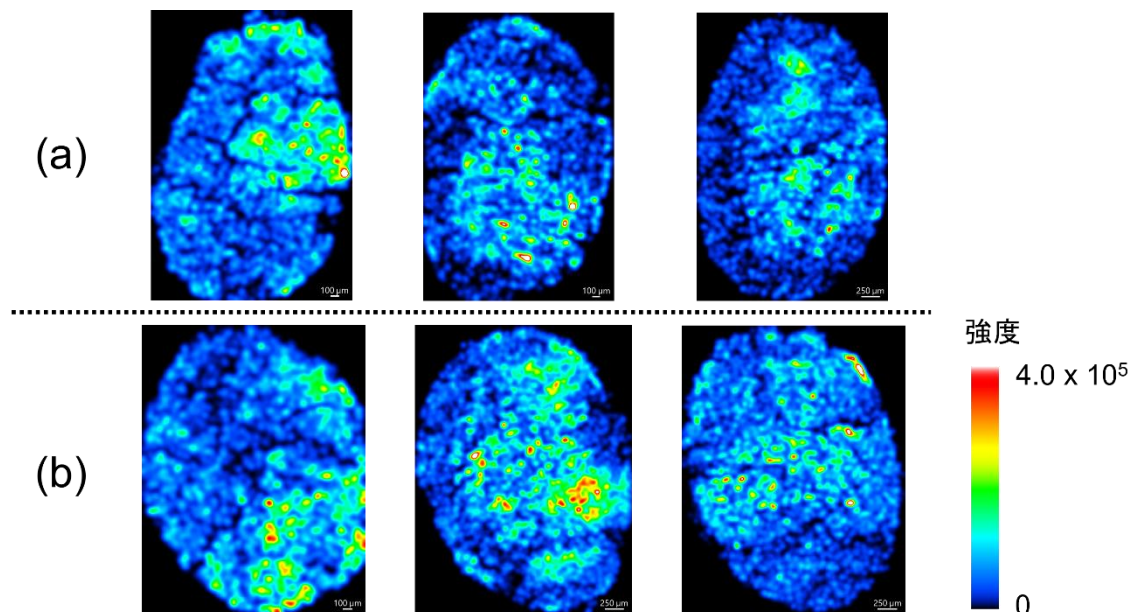


図2-5. 質量分析イメージングで取得された米麴切片上の m/z 215.03 のイオン強度 (任意単位) の分布

(a) が「山田錦」、(b) が「白鶴錦」の米麴の断面における分布である。青色の領域は強度が低く、緑色、黄色、赤色となるにしたがってイオン強度が高くなる。各品種について3検体ずつ分析した。

2.4. 小括と展望

本章では、精米歩合38%の「山田錦」と「白鶴錦」の白米の吸水特性、製麴特性およびこれらに関連する米粒構造特性を比較し評価することで、「白鶴錦」の大吟醸酒の醸造特性とその要因の理解に繋がる知見を得ることを目的とした。

「白鶴錦」の初期吸水は「山田錦」と比較して有意に遅かった。「白鶴錦」は「山田錦」と比較して白米中の空隙量が少なく、これが初期吸水の遅さの一因であると考えられた。

続いて、同一条件で製麴された「山田錦」と「白鶴錦」の米麴の特性を比較し評価した結果、「白鶴錦」の米麴の麴菌菌体量やグルコース生成総合活性は「山田錦」と同程度であった。また、質量分析イメージングを用いて米麴中のグルコース分布を可

視化することにより、「白鶴錦」の米麴は「山田錦」と同様に、米の内部まで麴菌がよく伸長していることが示唆された。以上から、「白鶴錦」は「山田錦」と同様に、大吟醸酒醸造に適した米麴が製麴可能であると考えられた。

以上のように、「白鶴錦」の大吟醸酒の醸造特性およびそれに関連する米粒構造特性に関する知見を得ることができた。本章で得た知見は、「白鶴錦」の特性を加味した吸水時間や製麴条件の設定など、大吟醸酒を醸造する際の原料処理条件設定に役立つ情報になると期待される。

第3章 「白鶴錦」の大吟醸酒の成分的特性の解析

3.1. 諸言

第1章で述べた通り、「白鶴錦」を使用した清酒は「山田錦」とは異なる官能特性を持つと考えられ(西村, 2008), 精米歩合38%の「白鶴錦」の白米を用いて醸造された大吟醸酒は, 同一条件で醸造された「山田錦」の大吟醸酒と比較してやわらかい味わいになる傾向がある(付録表A-1). 甘味成分は清酒にやわらかい味わいをもたらすと考えられている(橋本, 2020) ことから, 「白鶴錦」の大吟醸酒は「山田錦」と比較して甘味成分が多いなどの特性を有する可能性が考えられるが, 「白鶴錦」の大吟醸酒の成分的特性は把握されていなかった. こうした成分的特性を把握できれば, 「白鶴錦」の酒質特性の理解やその特性を活かした酒質設計への応用が期待できる.

メタボロミクス技術とは, 生体内の代謝物を網羅的に分析する技術である(Putri, 2013a). 多成分の量比のバランスによってサンプル間の違いが詳細に表現可能であるため, メタボロミクス技術は様々な食品サンプルの評価や二次機能の解析に応用されている(Pongsuwan, 2007; Yamamoto, 2012; Ochi, 2012; Mimura, 2014).

メタボロミクス技術にはさまざまな分析プラットフォームが使用されるが, その中でもGC/MSはクロマトグラフィーにおけるピークキャパシティが大きく, 保持時間の再現性に優れ, マススペクトルのデータベースが充実しているなどの利点があり, 他の分析プラットフォームと比較して化合物の同定が比較的容易である(Putri, 2013b). また, 誘導体化を行うことで, 清酒の主要な呈味成分である親水性低分子化合物を一斉に分析できる(Putri, 2013b; Mimura, 2014). やわらかい味わいに寄与すると考えられる糖や糖アルコールといった甘味成分の分析も可能であることから, GC/MSを基盤としたメタボロミクス技術は, 「白鶴錦」の大吟醸酒の成分的特性の解析にも有用であると期待される.

そこで, 本章では, GC/MSを基盤としたメタボロミクス技術を用いて, 「山田錦」および「白鶴錦」で醸造された大吟醸酒に含まれる親水性低分子化合物のプロファイ

リングを行い、「白鶴錦」の大吟醸酒の官能特性の要因解明に繋がる知見を得ることを目的とした。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 清酒サンプル

種麴（ハイ・G），水と仕込み配合は同一であり，使用する白米（精米歩合 38%）の品種（「山田錦」，「白鶴錦」）と酵母菌株（HL308，HL311）を変えて，総米 680 kg スケールで白鶴酒造株式会社で醸造された 15 種類の大吟醸酒を用いた．なお，原料米は全て兵庫県産である．2 株の酵母はいずれも，白鶴酒造株式会社保有の清酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) である．サンプルの内訳を表 3-1 に示した．

表 3-1. 清酒サンプル一覧

No.	酒造年度	原料米 品種	酵母菌株	日本酒度	エタノール 濃度 (%v/v)	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)
1	2011	白鶴錦	HL311	+2.8	17.6	1.4	1.1
2	2011	白鶴錦	HL311	+2.7	17.7	1.3	1.2
3	2011	白鶴錦	HL308	+2.8	17.5	1.2	1.0
4	2011	白鶴錦	HL308	+2.5	17.5	1.2	1.2
5	2011	山田錦	HL308	+5.1	17.6	1.2	0.9
6	2011	山田錦	HL311	+2.3	17.6	1.4	1.1
7	2011	山田錦	HL308	+3.2	17.7	1.2	1.1
8	2011	山田錦	HL308	+3.1	17.5	1.1	1.0
9	2011	山田錦	HL308	+3.2	17.8	1.2	0.8
10	2011	山田錦	HL308	+3.2	18.0	1.2	0.9
11	2011	山田錦	HL308	+2.2	17.6	1.2	1.0
12	2011	山田錦	HL308	+4.3	18.0	1.3	1.0
13	2012	白鶴錦	HL311	+2.8	17.6	1.3	1.1
14	2012	白鶴錦	HL308	+2.9	17.7	1.1	0.9
15	2012	山田錦	HL308	+3.4	17.6	1.1	0.9

3.2.2. 試薬

ニゲロース，コージビオース， α -エチルグルコシド，リビトール，ピリジン，HPLC グレードの蒸留水は富士フィルム和光純薬株式会社から，イソマルトースは株式会社林原（岡山，日本）から，イソマルトトリオースは東京化成工業株式会社（東京，日本）から，メトキシアミン塩酸塩はメルクから，*N*-メチル-*N*-(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド (MSTFA) はジーエルサイエンス株式会社（東京，日本）から購入した。

3.2.3. 標準溶液の分析

HPLC グレードの蒸留水を用いて，イソマルトース，ニゲロース，コージビオース，イソマルトトリオース， α -エチルグルコシドのそれぞれについて，10 mM の標準溶液を調製した．調製した標準溶液 15 μ L に内部標準物質としてリビトール水溶液 (0.2 mg/mL) 15 μ L を加えて凍結後，凍結乾燥機で一晩凍結乾燥を行った．凍結乾燥後のサンプルにメトキシアミン塩酸塩 (20 mg/mL，ピリジン溶液) を 100 μ L 加えた後，サーモミキサーを用いて 30°C で 90 分間振盪させることによりメトキシム化を行った．続いて，MSTFA を 50 μ L 加え，サーモミキサーを用いて 37°C で 30 分間振盪させることによりトリメチルシリル化を行った．得られた溶液をガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP2010 Ultra (株式会社島津製作所) に供した．分析条件を表 3-2 に示した．

表 3-2. GC/MS の分析条件

カラム	CP-SIL 8 CB low bleed/MS 30 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary column (アジレント, カリフォルニア州サンタクララ, 米国)
昇温条件	80°C (2 分) → 15°C /分 → 330°C (6 分)
キャリアガス	ヘリウム, 1.12 mL/分
注入温度	230°C
注入量	1 µL
スプリット比	1:60 (v/v)
イオン源温度	200°C
イオン化法	電子イオン化法
スキャン範囲	m/z 85~500

3.2.4. 清酒サンプルの分析

清酒サンプル 30 µL に内部標準物質としてリビトール水溶液 (0.2 mg/mL) 50 µL を加え, 2 時間遠心濃縮し, 凍結させた後に凍結乾燥機で一晩凍結乾燥を行った. 凍結乾燥後のサンプルの誘導体化と機器分析は 3.2.3 と同様の方法で行った. なお, 15 種類のそれぞれのサンプルについて, $n=3$ で分析した.

3.2.5. データ解析

分析データを Adobe Illustrator action (AIA) 形式で出力し, それらを MetAlign (Lommen, 2009) に供することでピーク検出とアライメントを行った. 出力した comma separated values (CSV) 形式のファイルを AIoutput (Tsugawa, 2011) に供し, 検出されたピークの保持時間とマススペクトルの情報をライブラリの情報と照合することで, 各ピークの化合物の同定を行った. なお, 3.2.3 で分析した化合物については, 標準品の保持時間とマススペクトルの情報と照合した. 続いて, 各サンプルについて各化合物の相対定量値を格納したデータ行列を作成した. なお, 各化合物の定量 m/z のイオン強度をリビトールの定量 m/z のイオン強度で除した値を, 各化合物の相対定量値とした. 各化合物の定量 m/z は表 3-3 に示した. また, AIoutput を用いて, 得ら

れたデータ行列を主成分分析 (PCA) , および部分最小二乗 (PLS) 判別分析に供した. なお, 多変量解析の際のスケーリング法にはオートスケーリングを選択し, 各化合物の相対定量値をサンプル間での平均値が 0, 分散が 1 となるように変換した.

3.3. 結果と考察

3.3.1. 化合物の同定

GC/MS で検出されたピークについて, **AIoutput** のライブラリに格納されている保持時間とマススペクトルの情報と照合することで化合物の同定を行った. なお, イソマルトース, ニゲロース, コージビオース, イソマルトトリオース, α -エチルグルコシドについては, 標準品の保持時間とマススペクトルの情報と照合することで同定した. その結果, 51 個の化合物が同定された (表 3-3) . これらの中には, アミノ酸, 有機酸, 糖, 糖アルコールをはじめとする清酒の主要な呈味成分が含まれていた.

表 3-3. GC/MS で同定された化合物

No.	保持 時間 (s)	定量 m/z	化合物名	No.	保持 時間 (s)	定量 m/z	化合物名
1	242.4	117	Propylene glycol	27	616.8	218	Phenylalanine
2	277.8	174	Pyruvic acid + Oxaloacetic acid	28	625.6	103	Arabinose
3	284.0	117	Lactic acid	29	632.5	103	Ribose
4	314.7	116	Alanine	30	633.4	116	Asparagine
5	319.1	174	<i>n</i> -Butylamine	31	651.7	217	Arabitol
6	389.3	144	Valine	-	654.2	217	Ribitol (内部標準物質)
7	421.5	174	2-Aminoethanol	32	680.5	156	Glutamine
8	422.3	299	Phosphoric acid	33	695.4	174	Glycylglycine
9	423.0	117	Glycerol	34	697.1	273	Citric acid + Isocitric acid
10	423.7	158	Leucine	35	698.7	142	Ornithine + Arginine
11	437.0	158	Isoleucine	36	738.1	103	Glucose
12	441.9	142	Proline	37	742.1	217	Mannitol
13	445.6	174	Glycine	38	742.8	174	Lysine
14	449.7	147	Succinic acid (or aldehyde)	39	744.2	154	Histidine
15	470.3	245	Fumaric acid	40	744.9	319	Galactitol
16	473.7	204	Serine	41	745.1	204	α -Ethylglucoside
17	488.0	218	Threonine	42	748.3	333	Galacturonic acid
18	535.3	147	Citramalic acid	43	751.2	218	Tyrosine
19	542.7	147	Malic acid	44	859.3	202	Tryptophan
20	550.5	217	Erythritol	45	867.2	117	Octadecanoic acid
21	559.8	232	Aspartic acid	46	1020.0	361	Trehalose
22	565.5	156	Pyroglutamic acid	47	1024.7	204	Nigerose
23	567.5	174	4-Aminobutyric acid	48	1039.9	204	Kojibiose
24	586.4	247	Acetoacetic acid	49	1065.8	204	Isomaltose
25	589.8	179	4-Hydroxyphenethyl alcohol	50	1269.6	361	Maltotriose
26	608.9	246	Glutamic acid	51	1352.8	204	Isomaltotriose

3.3.2. 多変量解析

GC/MS で取得した各サンプルの親水性低分子化合物プロファイルのデータ構造を大まかに把握するために、得られたデータ行列を PCA に供した。横軸を第 1 主成分 (PC1)，縦軸を第 2 主成分 (PC2) としたスコアプロットを図 3-1 (a) に、ローディングプロットを図 3-1 (b) に示した。PCA の結果，サンプル毎にスコアプロット上のプロット位置に違いがあった。しかしながら，2 種類の酵母菌株を使用したサンプルが混在していることもあり，原料米品種による明確な分離が認められなかった。

そこで，酵母菌株の影響を除外することを目的として，同一酵母菌株 (HL308) のサンプルのみを格納したデータ行列を作成し，PCA に供した。横軸を PC1，縦軸を PC2 としたスコアプロットを図 3-2 (a) に，ローディングプロットを図 3-2 (b) に示した。その結果，スコアプロットにおいて使用する原料米品種によってサンプルが 2 群に分かれる傾向が見られ，原料米品種が大吟醸酒の親水性低分子化合物プロファイルに影響を与えることが示唆された。

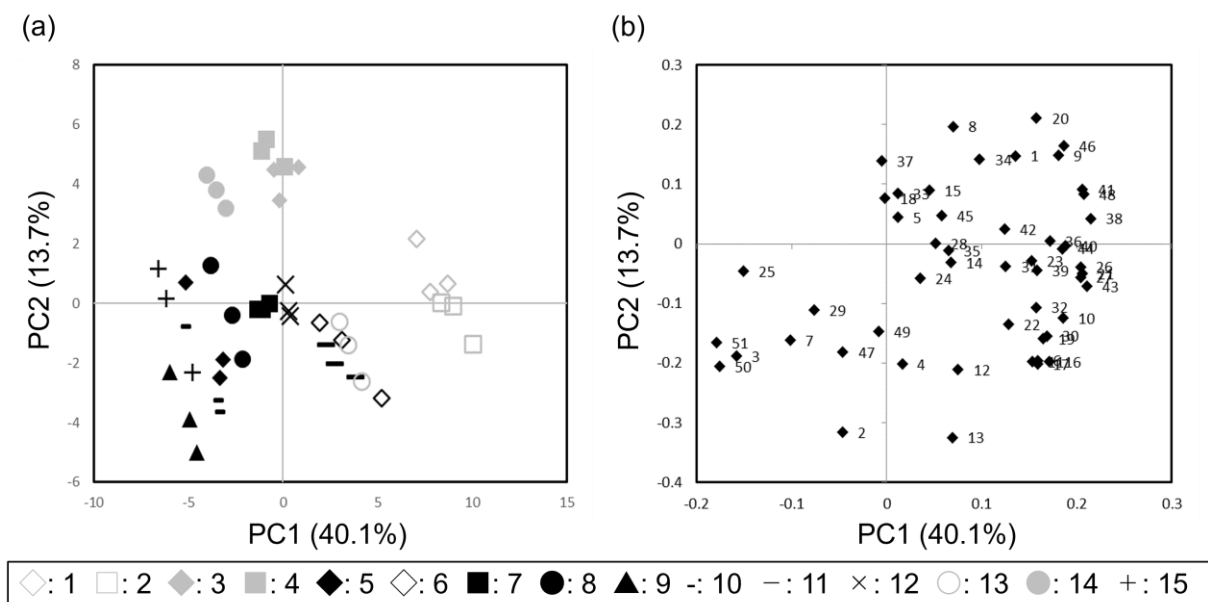


図 3-1. 全 15 サンプルの親水性低分子化合物プロファイルを用いた PCA の結果

(a) はスコアプロット，(b) はローディングプロットを示す。(a) の各サンプルの番号は表 3-1 に対応している。(b) の番号は表 3-3 に対応している。

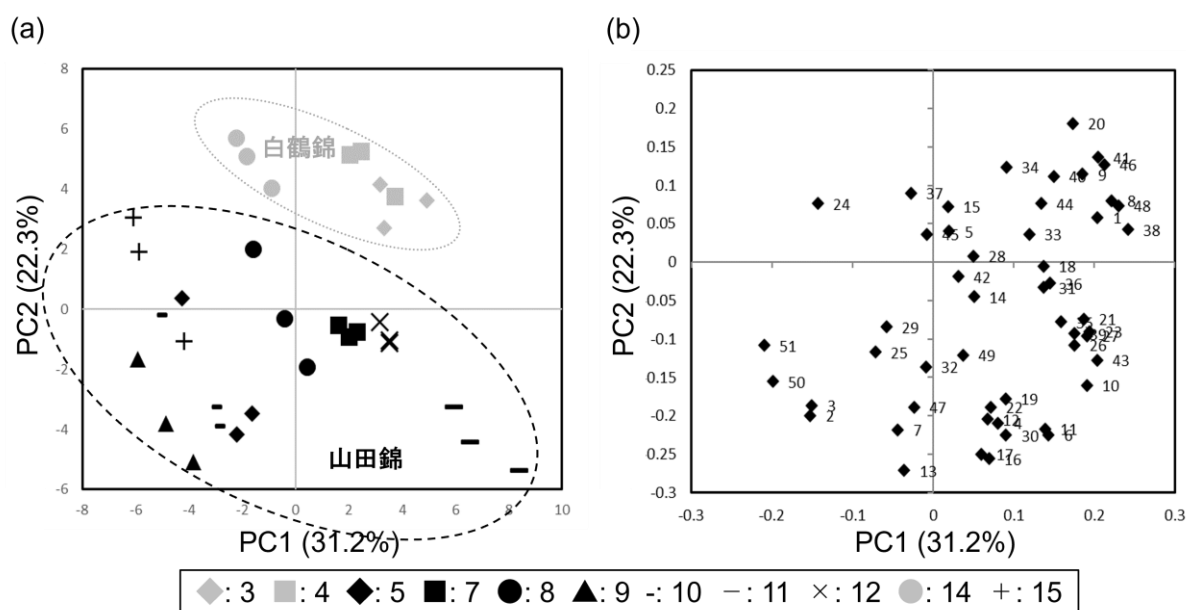


図 3-2. HL308 を使用したサンプルの親水性低分子化合物プロファイルを用いた PCA の結果

(a) はスコアプロット， (b) はローディングプロットを示す． (a) の各サンプルの番号は表 3-1 に対応している． (b) の番号は表 3-3 に対応している．

続いて，PLS 判別分析により，酵母菌株に関係なく原料米品種（「山田錦」，「白鶴錦」）を判別するモデルの構築を検討した．15 種類のサンプル全ての分析値を格納したデータ行列を説明変数とし，目的変数は，「山田錦」を 0，「白鶴錦」を 1 とした．

その結果，5 つの潜在変数を用いることで，モデルの予測性能を示す指標である Q^2 値が 0.950 である判別モデルが構築できた．横軸を潜在変数 1，縦軸を潜在変数 2 としたスコアプロットを図 3-3 (a) に，ローディングプロットを図 3-3 (b) に示した． $Q^2 > 0.9$ の場合は特に予測性能が良好とされる (Eriksson, 2001) ことから，大吟醸酒の親水性低分子化合物プロファイルを説明変数として用いることで，使用する酵母菌株に関係なく「山田錦」と「白鶴錦」を高い予測性能で判別可能なモデルが構築できたと考えられる．

また，各説明変数のモデル構築への寄与度の指標である VIP (variable importance in

the projection) 値を指標にすることで、原料米品種の判別に重要な化合物を抽出した (表 3-4) . Coefficient の値が正であれば「白鶴錦」で、負であれば「山田錦」で相対定量値が高いこととなる. 「白鶴錦」の大吟醸酒では「山田錦」と比較して、グリセロール、エリスリトールといった糖アルコールの相対定量値が高い傾向があった. グリセロールは上品な甘さを有し、清酒のふくらみに関与すると考えられている (大淵, 1991) . また、エリスリトールはすっきりとした爽快な甘味を呈する (高谷, 2013) . 前述した通り、甘味成分は清酒にやわらかい味わいをもたらすと考えられている (橋本, 2020) ことから、これらの糖アルコールの含有量が多いことが、やわらかい味わいであるという「白鶴錦」の大吟醸酒の官能特性の一因となっている可能性が考えられた.

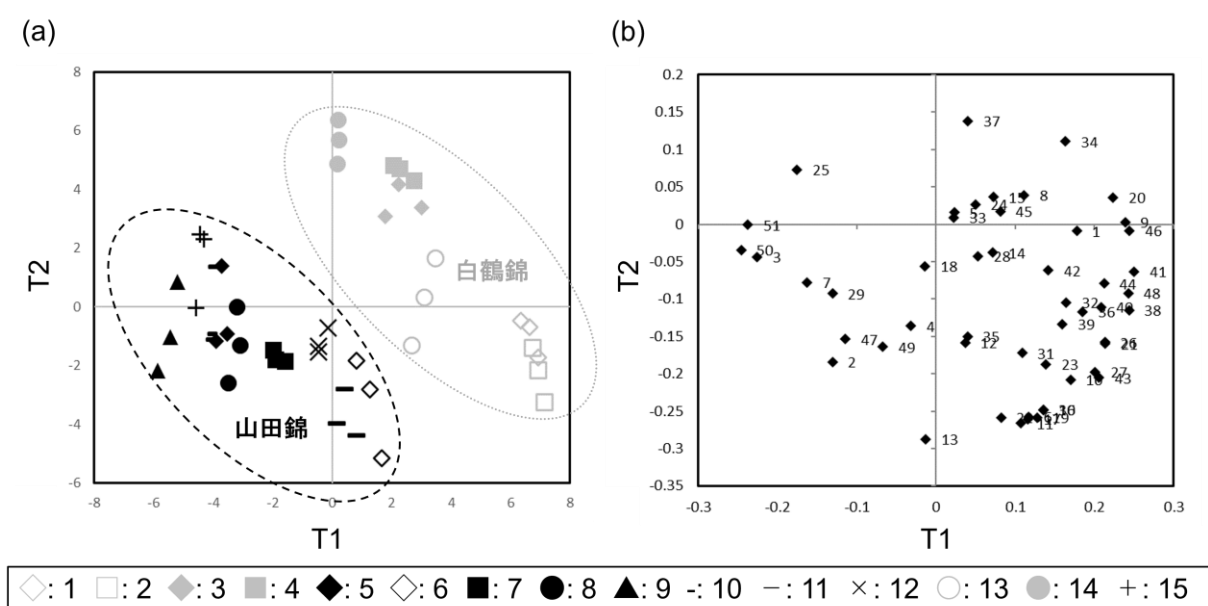


図 3-3. 親水性低分子化合物プロファイルを説明変数、原料米品種を目的変数とした PLS 判別分析の結果

(a) はスコアプロット, (b) はローディングプロットを示す. (a) の各サンプルの番号は表 3-1 に対応している. (b) の番号は表 3-3 に対応している.

表 3-4. PLS 判別分析における VIP 上位 10 化合物

化合物名	VIP	Coefficient
Citric acid + Isocitric acid	1.57	0.16
Glycerol	1.43	0.13
Maltotriose	1.42	-0.07
Erythritol	1.35	0.13
Trehalose	1.34	0.09
Isomaltotriose	1.30	-0.07
Lactic acid	1.29	0.00
Pyruvic acid + Oxaloacetic acid	1.28	-0.10
α -Ethylglucoside	1.24	0.06
Glycine	1.22	-0.10

Coefficient の値が正の化合物が「白鶴錦」で、負の化合物が「山田錦」で相対定量値が高い化合物である。

なお、糖アルコールは酵母のみならず麹菌によっても生産され、特に清酒中のエリスリトールは大部分が米麹由来であると考えられている（日本醸造協会, 1999）。第 2 章で使用した同一条件で製麹された「山田錦」と「白鶴錦」の米麹のグリセロール、エリスリトールの相対定量値を比較した結果、「白鶴錦」の方がこれらの糖アルコールの量が多かった（付録 図 A-2）。今後さらなる検証を行う必要があるが、「白鶴錦」の大吟醸酒におけるこれらの糖アルコール量の多さには、麹米としての特性が寄与している可能性が考えられる。固体培養における麹菌の糖アルコールの生産には培地の水分活性が影響し、低水分活性時に生産量が増加することが報告されている（Ruijter, 2004）。第 2 章において、「山田錦」と「白鶴錦」では米粒構造に違いがあると考えられたが、この違いが「山田錦」と「白鶴錦」の製麹過程における水分活性の推移の違いに影響し、麹菌によって生産される糖アルコール量の差に繋がっている可能性がある。これまで原料米品種の米粒構造特性の違いが麹菌の代謝に与える影響に関する知見はないが、今後このような観点で研究を進めることで、新たな知見を得られると期待される。

3.4. 小括と展望

本章では，GC/MS を用いて，種麴，水と仕込み配合は同一であり，使用する原料米品種（「山田錦」，「白鶴錦」）と酵母菌株（HL308，HL311）を変えて醸造された 15 種類の大吟醸酒に含まれる親水性低分子化合物のプロファイリングを行った．

その結果，51 個の化合物を同定できた．これらの中には，アミノ酸，有機酸，糖，糖アルコールをはじめとする清酒の主要な呈味成分が含まれていた．また，取得した分析値データを多変量解析に供することで，「白鶴錦」で醸造された大吟醸酒の成分的特性を把握できた．「白鶴錦」の大吟醸酒では「山田錦」と比較して，グリセロール，エリスリトールといった糖アルコールの含有量が多い傾向があった．こうした成分的特性が，「白鶴錦」の大吟醸酒のやわらかい味わいの一因となっている可能性が考えられた．

本章の結果は，「白鶴錦」の大吟醸酒の官能特性の要因の理解やその特性を考慮した酒質設計の一助になると考えられる．また，今後，このような成分的特性が生じる要因を解明することで，「白鶴錦」の醸造特性のより深い理解や「白鶴錦」の酒質特性をより引き出すような醸造方法の確立に繋がると期待される．

第4章 「白鶴錦」のDNA配列の特徴解析

4.1. 緒言

「白鶴錦」と「山田錦」の両親品種は非常に類似していると考えられるが、その一方で、両親品種からのDNAの継承の差異は不明である。

2005年に日本型イネ品種「日本晴」の全ゲノム情報の解読結果が報告され、日本水稲には少なくとも約32000の遺伝子が存在していることが明らかになった (International Rice Genome Sequencing Project, 2005) . 2011年には酒米品種である「雄町」の全ゲノム情報が解読され、「日本晴」の全ゲノム情報との比較により、多数のDNA多型が見出された (Arai-Kichise, 2011) . このように、イネの全ゲノム解析の基盤が整備され、全ゲノム情報の取得も容易になってきた。

DNA多型を含む品種の遺伝情報と系譜を組み合わせることで、イネの各品種の遺伝的構成や特性を解明でき、同一交配組み合わせ由来の後代品種間の差異を明らかにすることが可能である (Yamasaki, 2013) .

そこで、本章では、「白鶴錦」、「山田錦」とこれらの両親品種に相当または類似すると考えられる「新山田穂1号」、「渡船2号」の全ゲノム情報を比較解析することにより、「白鶴錦」と「山田錦」の両親品種からのDNAの継承の違いをゲノムレベルで解明し、「白鶴錦」の遺伝的背景に関する知見を得ることを目的とした。その際、「新山田穂1号」、「渡船2号」を「白鶴錦」および「山田錦」の両親品種とみなし、両親品種でそれぞれホモ型であり、かつ両親品種間で遺伝子型が異なるDNA多型に着目して解析を行った。

第2章において、「白鶴錦」と「山田錦」では白米の米粒構造、すなわち胚乳構造に違いがあると考えられた。デンプンは胚乳組織の主要な成分であり (増村, 2014) , デンプンの生合成に関連する遺伝子が胚乳構造に影響を与えるとの報告もある (阿久澤, 2012) . そこで、本章では、デンプンの生合成・蓄積や粒度に関連する遺伝子上に、「白鶴錦」と「山田錦」でDNA配列に違いがあるかについてもあわせて調査し

た.

4.2. 材料と方法

4.2.1. イネ種子

「白鶴錦」は、白鶴酒造株式会社が保管していた種子を用いた。「新山田穂 1 号」と「渡船 2 号」は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 (茨城, 日本) の農業生物資源ジーンバンクが保管する種子を入手した.

4.2.2. 試薬

臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB), トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris), 塩酸 (HCl), 塩化ナトリウム, 2-メルカプトエタノール, イソアミルアルコール, イソプロパノール, エタノールは富士フィルム和光純薬株式会社から, エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 二水素二ナトリウム二水和物はナカライテスク株式会社 (京都, 日本) から, クロロホルムはメルクから, RNase G.S, フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) はニッポンジーン (富山, 日本) から購入した.

4.2.3. イネからの DNA の抽出

「白鶴錦」, 「新山田穂 1 号」, 「渡船 2 号」の DNA は, 各品種のイネの幼葉から, 以下の方法で抽出した. ハサミで細断後に液体窒素で破碎した幼葉約 1.2 g に 2× CTAB 液 (2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M 塩化ナトリウム, 20 mM EDTA, 0.2% 2-メルカプトエタノール) 10 mL を加え, 60°C で 30 分間湯浴した. その後, クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を 10 mL 加え, 10 分間穏やかに振盪した. 遠心分離 (2385×g, 15 分) で得られた水層 7 mL に, 7 mL のイソプロパノールを加えた. 再度遠心分離 (2385×g, 5 分) し, 上清を捨て, 沈殿をエバポレーターで乾燥させた. その後, 2 mL の Tris-EDTA 緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)) に

溶解し、2 μ L の RNase G.S を加えた。37°C で 1 時間静置後、2 mL のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加え、5 分間穏やかに振盪した。遠心分離 (2385 $\times g$, 5 分) で得られた水層 1.5 mL に、1.5 mL のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加え、5 分間穏やかに振盪した。再度遠心分離 (2385 $\times g$, 5 分) し、得られた水層 1 mL に 0.1 mL の 5 M 塩化ナトリウムと 0.8 mL のイソプロパノールを加えて混和した。遠心分離 (20238 $\times g$, 30 分, 4°C) 後、水層を捨て、70% エタノール 1 mL を加えて、沈殿を軽くすすいだ。遠心分離 (20238 $\times g$, 5 分, 4°C) 後、水層を捨て、エバポレーターで DNA の沈殿を乾燥させた後、100 μ L の Tris-EDTA 緩衝液に溶解した。

4.2.4. 全ゲノム情報の取得とデータ解析

全ゲノム解析は、ユーロフィンジェノミクス株式会社 (東京, 日本) に委託し、以下のように実施された。

HiSeq X Reagent Kit v2.5 を用いてゲノムライブラリを作製後、イルミナ (カルフォルニア州サンディエゴ, 米国) の HiSeq X を用いて、リード長 2 $\times$ 150 bp のペアエンド法で全ゲノム情報を解読した。「山田錦」の全ゲノム情報は、Yabe ら (Yabe, 2018) のデータを用いた。

シークエンスデータは、cutadapt (Martin, 2011) (ver. 1.16) を用いてアダプター配列を除去後、Bowtie2 (Langmead, 2012) (ver. 2.3.3.1) を用いて参照ゲノム配列 (「日本晴」: IRGSP-1.0 (Kawahara, 2013)) にマッピングした。次に Picard tools (ver. 1.111) を用いて、PCR 増幅等のアーティファクトにより生成したと推定されるリードをマッピング結果から除去した。Samtools (Li, 2009) (ver. 1.6) および bcftools (ver. 1.6) を使用し、マッピング結果から参照ゲノム配列と異なる塩基配列を抽出した variant call format (VCF) ファイルを作成後、VCFtools (Danecek, 2011) (0.1.15) を用いて反復配列領域を除去した。

上記の VCF ファイルから位置情報および遺伝子型情報を抽出した。この際、信頼

性の低い遺伝子型情報の除去を目的に、Depth < 10 または Genotype Quality < 10 となる遺伝子型は未検出として扱った。Genotype Quality は、遺伝子型の正確性を示す指標として用いられ、 $-10 \times \log_{10}(\text{エラー率})$ で算出される (Kumaran, 2019) 。その後、「白鶴錦」、「山田錦」、「新山田穂 1 号」、「渡船 2 号」の 4 品種全てで遺伝子型が検出された DNA 配列上の箇所の中から、「新山田穂 1 号」および「渡船 2 号」でそれぞれホモ型であり、かつ両親品種間で遺伝子型が異なる配列を抽出した。各配列における「白鶴錦」と「山田錦」の遺伝子型が、「新山田穂 1 号」型の「A」、「渡船 2 号」型の「B」、「新山田穂 1 号」と「渡船 2 号」のヘテロ型の「H」、それ以外の遺伝子型の「D」のいずれであるかを調査した。また、GGT2 (Van Berloo, 2008) を使用し、両親品種間で配列に違いがある DNA 多型情報を由来の判定に用いて、「白鶴錦」ならびに「山田錦」の各ゲノム領域への継承が、どちらの親由来であるかを推定し図示した。

4.2.5. デンプン関連遺伝子における DNA 多型の調査

The Rice Annotation Project Database (Sakai, 2013) を用いて、デンプンの生合成・蓄積や粒度に関連する遺伝子を抽出した。各遺伝子の配列上に「新山田穂 1 号」と「渡船 2 号」でそれぞれホモ型であり、かつ配列が異なる DNA 多型がある場合は、「白鶴錦」と「山田錦」の遺伝子型を調査した。また、SnPEff (Cingolani, 2012) を用いて各変異にアノテーションを付け、遺伝子機能への影響度が High (高) , Moderate (中) , Low (低) および Modifier (予測困難) のいずれであるかを予測した。

4.3. 結果と考察

4.3.1. 全ゲノム情報の取得と DNA 多型の解析

イネゲノム約 3 億 7000 万塩基の配列情報の取得において、各品種の解読深度は「白鶴錦」が×86.1, 「新山田穂 1 号」が×77.8, 「渡船 2 号」が×91.3 と十分な解読量が得られた。なお, Yabe ら (Yabe, 2018) が取得した「山田錦」の配列情報の解読深度は×13.4 であった (表 4-1) 。「日本晴」を参照配列としたときのマッピング率は 95.5~98.9%

であった (表 4-1) . 4 品種全てで遺伝子型が検出された位置の中で, 両親品種 (「新山田穂 1 号」, 「渡船 2 号」) でそれぞれホモ型であり, かつ配列が異なる DNA 多型は 34625 箇所あり, ゲノム全体に概ね分布していた (図 4-1) . これら 34625 箇所の DNA 多型のそれぞれについて, 「白鶴錦」と「山田錦」では両親品種のどちらの DNA 多型を継承しているかを調査した. 「新山田穂 1 号」と「渡船 2 号」の DNA 多型については, 後代である「白鶴錦」ならびに「山田錦」において 1:1 の比での継承が期待される. 表 4-2 に示した通り, 割合のみを見ると, 「白鶴錦」は「渡船 2 号」由来の DNA 多型 (56.1%) を, 「山田錦」は「新山田穂 1 号」由来の DNA 多型 (53.7%) を多く継承しており, 両品種間で差があった.

続いて, 両親品種間で配列に違いがある DNA 多型情報を由来の判定に用いて, 「白鶴錦」ならびに「山田錦」の各ゲノム領域への継承が, どちらの親由来であるかを推定し図示した (図 4-2) . その結果, 「白鶴錦」と「山田錦」では, 両親品種からのゲノム領域の継承に相違があることが明確となった.

表 4-1. 各品種の解読深度とマッピング率

品種	解読深度	マッピング率 (%)
新山田穂 1 号	77.8	95.8
渡船 2 号	91.3	97.2
白鶴錦	86.1	95.5
山田錦	13.4	98.9

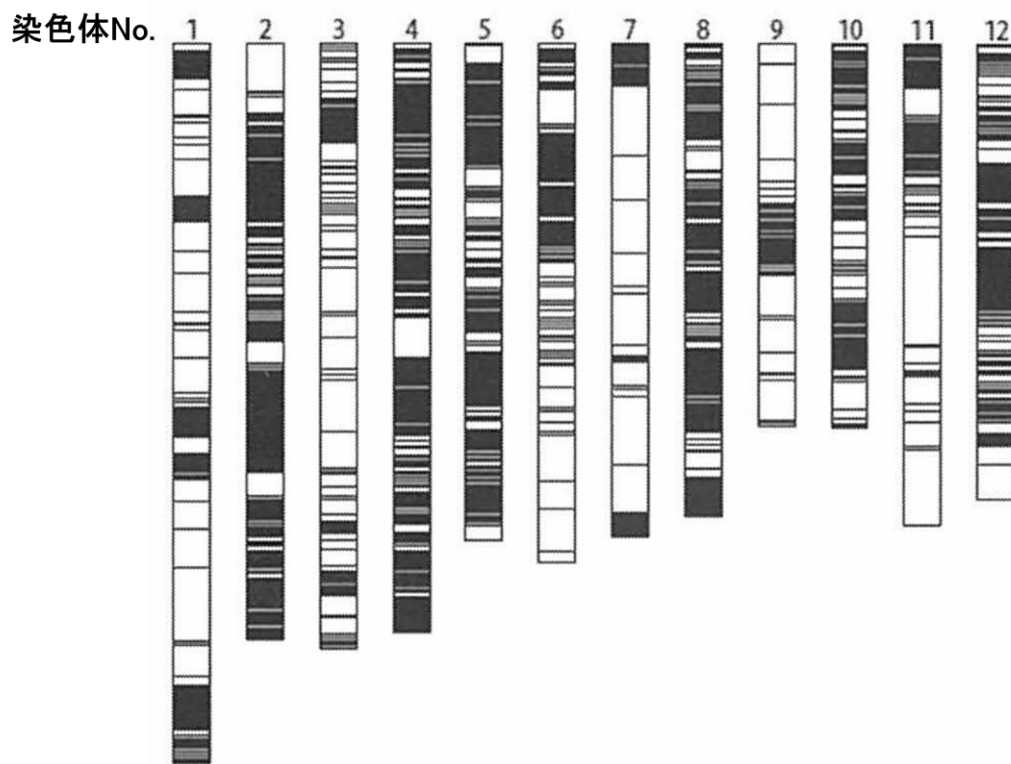


図 4-1. 「新山田穂 1 号」, 「渡船 2 号」 間の DNA 多型のゲノム上の分布

黒色の線は, 2 品種間で配列に違いがある DNA 多型の位置を示す.

表 4-2. 「白鶴錦」と「山田錦」の遺伝子型の割合

遺伝子型	白鶴錦	山田錦
「新山田穂 1 号」型 (A)	15051	18582
	(43.5%)	(53.7%)
「渡船 2 号」型 (B)	19427	15491
	(56.1%)	(44.7%)
ヘテロ型 (H)	116	509
	(0.3%)	(1.5%)
その他 (D)	31	43
	(0.1%)	(0.1%)

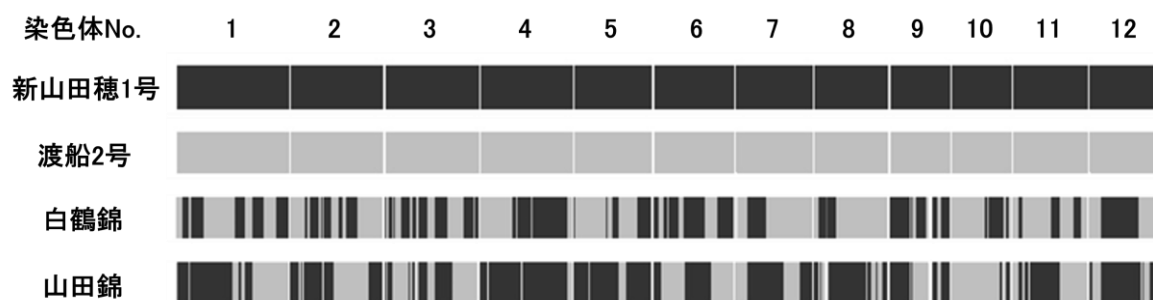


図 4-2. 「白鶴錦」と「山田錦」の両親品種からの DNA の継承様式

黒色の領域は「新山田穂 1 号」型，灰色の領域は「渡船 2 号」型，白色の領域は「新山田穂 1 号」と「渡船 2 号」のヘテロ型を示す。

4.3.2. デンプン関連遺伝子における DNA 多型の調査

The Rice Annotation Project Database (Sakai, 2013) を用いて，デンプンの生合成・蓄積や粒度に関する 59 遺伝子 (表 4-3) を抽出し，各品種の DNA 多型を調査した。59 遺伝子のうち，9 遺伝子上には両親品種間で配列が異なる DNA 多型があった。そのうち 7 遺伝子では，「白鶴錦」と「山田錦」の間でも DNA 多型に違いがあった。これら 7 遺伝子上の DNA 多型について，SnEff により付された各変異のアノテーション情報と遺伝子機能への影響の予測結果を表 4-4 に示した。なお，同一遺伝子が長さの異なる複数の翻訳産物を持つ場合があるため，1 つの変異に対して複数のアノテーション情報が付されることがある。その場合は，変異による遺伝子機能への影響が最も強いと予測されたアノテーション結果を記載した。デンプン直鎖伸長酵素をコードする *SSIIB* (Hirose, 2004) および *FLO5 (SSIIIA)* (Hirose, 2004; Fujita, 2007; Ryoo, 2007) ，貯蔵タンパク質の酸化フォールディングを促進するタンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードし，さまざまなタンパク質の割合の調節を通じて胚乳を含む種子の発達に重要な役割を果たすとともにデンプン合成酵素の活性に影響する *PDIL1-1* (Han, 2012; Kim, 2012) の 3 遺伝子には，翻訳後のアミノ酸にも影響し予測される影響度が Moderate (中) である変異があった。特に，*FLO5 (SSIIIA)* および *PDIL1-1* ではアミノ酸が置換され予測される影響度が Moderate (中) である DNA 多型がそれぞれ 8, 6 箇

所あり,「白鶴錦」と「山田錦」では遺伝子機能に差異がある可能性が考えられた。*FLO5 (SSIIIA)* はその機能が欠損したイネ変異体の表現型解析により,デンプンのアミロペクチン側鎖の鎖長分布やアミロース含量,胚乳構造に影響を与えると考えられている (Fujita, 2007; Ryoo, 2007) 。一方, *PDIL1-1* の機能が欠損したイネの種子では,不規則なデンプン粒とプロテインボディが生成され,その結果,胚乳が不透明になるとの報告がある (Kim, 2012) ことから, *PDIL1-1* も胚乳構造に重要な役割を果たすと考えられる。以上から,これらの遺伝子の変異が,第2章で示されたような「白鶴錦」と「山田錦」の米粒構造の違いに関与している可能性がある。

表 4-3. デンプンの生合成・蓄積や粒度に関する 59 遺伝子

ID	遺伝子名	ID	遺伝子名	ID	遺伝子名
Os01g0179400	<i>SSG4</i>	Os04g0409200	<i>SBE4</i>	Os06g0726400	<i>SBE1</i>
Os01g0180900	-	Os04g0517400	<i>PGSIP-B2</i>	Os07g0181000	<i>PKPA1</i>
Os01g0633100	<i>AGPL2</i>	Os04g0624600	<i>SSIIIB</i>	Os07g0243200	<i>AGPL4</i>
Os01g0720600	<i>SSIVA</i>	Os04g0645100	<i>FLO2</i>	Os07g0412100	<i>GBSSII</i>
Os01g0851700	<i>PHO2</i>	Os05g0121600	<i>RSR1</i>	Os07g0627000	<i>DPE1</i>
Os01g0856900	<i>SBDGP1</i>	Os05g0230900	<i>GLYI7</i>	Os08g0187800	<i>GPT1</i>
Os02g0135900	<i>GBP</i>	Os05g0393700	<i>ISA2</i>	Os08g0191433	<i>FLO5</i>
Os02g0202400	<i>BT1-1</i>	Os05g0405000	<i>FLO4</i>	Os08g0345800	<i>AGPS2</i>
Os02g0528200	<i>SBE3</i>	Os05g0446900	<i>SBDGP2</i>	Os08g0520900	<i>PHS8</i>
Os02g0744700	<i>SSIIB</i>	Os05g0522500	<i>HXK5</i>	Os08g0531000	<i>NPP1</i>
Os02g0765600	<i>AMY1A</i>	Os05g0533600	<i>SSIVB</i>	Os09g0298200	<i>AGPS1</i>
Os02g0807100	<i>SSIV3</i>	Os05g0580000	<i>AGPL3</i>	Os09g0469400	<i>ISA3</i>
Os02g0816800	<i>FLO13</i>	Os05g0595300	<i>NRR</i>	Os10g0189100	<i>PPGM</i>
Os02g0820900	<i>ETR3</i>	Os06g0130400	<i>SSG6</i>	Os10g0390500	<i>ALAAT</i>
Os03g0107800	<i>SEX4</i>	Os06g0133000	<i>WX1</i>	Os10g0437600	<i>SSIIC</i>
Os03g0686900	<i>FLO6</i>	Os06g0160700	<i>SSI</i>	Os10g0463800	-
Os03g0735000	<i>AGPL1</i>	Os06g0229800	<i>ALK</i>	Os10g0478200	<i>FLO16</i>
Os03g0758100	<i>PHO1</i>	Os06g0229900	-	Os10g0498600	<i>DU1</i>
Os04g0164900	<i>PUL</i>	Os06g0367100	<i>BE1</i>	Os11g0199200	<i>PDIL1-1</i>
Os04g0169100	<i>ETR2</i>	Os06g0498400	<i>GWD1</i>		

ID の列には The Rice Annotation Project Database (Sakai, 2013) に掲載されている Locus ID を, 遺伝子名の列には CGSNL gene symbol を記載した。

表 4-4. デンプンの生合成・蓄積や粒度に関する 7 遺伝子における「白鶴錦」と「山田錦」の遺伝子型と変異のタイプおよび遺伝子機能への影響の予測結果

No.	ID	遺伝子 名	染 色 体	位置, 遺伝子型, および変異のタイプ					影響度
				位置	遺伝子型		変異のタイプ	アミノ酸 置換	
					白鶴錦	山田錦			
1	Os01g0633100	AGPL2	1	25355046	A	B	intron	-	Modifier
				25355048	A	B	intron	-	Modifier
				25355205	A	B	intron	-	Modifier
				25355266	A	B	intron	-	Modifier
				25357086	A	B	intron	-	Modifier
				25357555	A	B	intron	-	Modifier
				25358332	A	B	intron	-	Modifier
				25358733	A	B	intron	-	Modifier
				25358877	A	B	intron	-	Modifier
2	Os02g0744700	SSIIB	2	31234046	B	A	missense	Leu/Phe	Moderate
3	Os02g0807100	SSIV3	2	34483753	B	A	3'UTR	-	Modifier
4	Os04g0164900	PUL	4	4410660	B	A	intron	-	Modifier
				4414391	B	A	intron	-	Modifier
				4415407	B	A	intron	-	Modifier
5	Os08g0191433	FLO5	8	5354128	A	B	synonymous	-	Low
				5354184	A	B	missense	Ser/Leu	Moderate
				5354380	A	B	synonymous	-	Low
				5354592	A	B	missense	Thr/Ile	Moderate
				5354722	A	B	synonymous	-	Low
				5354862	A	B	missense	Arg/Lys	Moderate
				5355177	A	B	missense	Ser/Asn	Moderate
				5355378	A	B	missense	Arg/His	Moderate
				5355585	A	B	missense	Gly/Asp	Moderate
				5355663	A	B	missense	Val/Glu	Moderate
				5355883	A	B	synonymous	-	Low
				5356488	A	B	missense	Arg/Lys	Moderate
				5356597	A	B	intron	-	Modifier
				5356600	A	B	intron	-	Modifier

				5356846	A	B	synonymous	-	Low
				5356961	A	B	intron	-	Modifier
				5357030	A	B	intron	-	Modifier
				5357151	A	B	intron	-	Modifier
				5357214	A	B	intron	-	Modifier
				5357619	A	B	synonymous	-	Low
				5358002	A	B	intron	-	Modifier
				5358029	A	B	intron	-	Modifier
				5358190	A	B	intron	-	Modifier
				5358308	A	B	intron	-	Modifier
				5358346	A	B	synonymous	-	Low
				5358803	A	B	intron	-	Modifier
				5358899	A	B	intron	-	Modifier
				5358962	A	B	intron	-	Modifier
				5358990	A	B	intron	-	Modifier
				5358999	A	B	intron	-	Modifier
				5359017	A	B	intron	-	Modifier
				5359705	A	B	intron	-	Modifier
				5359858	A	B	intron	-	Modifier
				5360399	A	B	intron	-	Modifier
				5360595	A	B	intron	-	Modifier
				5360623	A	B	intron	-	Modifier
				5360992	A	B	intron	-	Modifier
				5361571	A	B	intron	-	Modifier
				5361621	A	B	intron	-	Modifier
6	Os10g0498600	<i>DUI</i>	10	19010496	A	B	intron	-	Modifier
				4971625	B	A	intron	-	Modifier
				4971719	B	A	synonymous	-	Low
				4971809	B	A	synonymous	-	Low
				4971893	B	A	synonymous	-	Low
				4972037	B	A	missense	Lys/Glu	Moderate
7	Os11g0199200	<i>PDIL1-1</i>	11	4972189	B	A	intron	-	Modifier
				4972193	B	A	intron	-	Modifier
				4972195	B	A	intron	-	Modifier
				4972297	B	A	intron	-	Modifier
				4972298	B	A	intron	-	Modifier
				4972351	B	A	synonymous	-	Low

4972442	B	A	intron	-	Modifier
4972498	B	A	intron	-	Modifier
4972553	B	A	missense	Glu/Gln	Moderate
4972611	B	A	missense	Glu/Asp	Moderate
4972676	B	A	intron	-	Modifier
4972678	B	A	intron	-	Modifier
4972679	B	A	intron	-	Modifier
4972739	B	A	splice region & intron	-	Low
4972773	B	A	missense	Ile/Leu	Moderate
4972822	B	A	synonymous	-	Low
4972846	B	A	synonymous	-	Low
4972982	B	A	intron	-	Modifier
4972985	B	A	intron	-	Modifier
4973138	B	A	intron	-	Modifier
4973168	B	A	intron	-	Low
4973205	B	A	synonymous	-	Low
4973347	B	A	intron	-	Modifier
4973379	B	A	intron	-	Modifier
4973428	B	A	intron	-	Modifier
4973583	B	A	missense	Ile/Met	Moderate
4973680	B	A	intron	-	Modifier
4973833	B	H	synonymous	-	Low
4973848	B	A	synonymous	-	Low
4973899	B	A	synonymous	-	Low
4973935	B	A	synonymous	-	Low
4973968	B	A	synonymous	-	Low
4974047	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974060	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974113	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974178	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974192	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974195	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974205	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974235	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974263	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974317	B	A	upstream gene	-	Modifier

4974325	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974336	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974342	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974536	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974544	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974570	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974576	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974579	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974608	B	A	upstream gene	-	Modifier
4974697	B	H	upstream gene	-	Modifier
4974910	B	A	synonymous	-	Low
4974915	B	A	missense	Ala/Pro	Moderate
4974952	B	A	synonymous	-	Low

遺伝子型：A は「新山田穂 1 号」型，B は「渡船 2 号」型，H は「新山田穂 1 号」と「渡船 2 号」のヘテロ型を示す。

変異のタイプ：intron はイントロンの変異，missense はミスセンス変異，3'UTR は 3'非翻訳領域の変異，5'UTR は 5'非翻訳領域の変異，synonymous は同義変異，splice region はスプライス部位の変異，upstream gene は上流配列の変異を示す。

アミノ酸置換：白鶴錦/山田錦の順に示す。

影響度：High は高，Moderate は中，Low は低，Modifier は予測困難を示す。

4.4. 小括と展望

本章では，「白鶴錦」，「山田錦」とこれらの両親品種に相当または類似すると考えられる「新山田穂 1 号」，「渡船 2 号」の全ゲノム情報を比較することで，「白鶴錦」と「山田錦」の両親品種からの DNA の継承の違いをゲノムレベルで解明し，「白鶴錦」の遺伝的背景に関する知見を得ることを目的とした。

その結果，「白鶴錦」と「山田錦」では，両親品種に相当または類似すると考えられる「新山田穂 1 号」と「渡船 2 号」からのゲノム領域の継承に明確な違いがあった。また，デンプンの生合成に関与し米粒の胚乳構造に影響を与えると考えられる複数の遺伝子において，「白鶴錦」と「山田錦」の DNA 配列に違いがあることを見出した。

本章は、「白鶴錦」のみならず、「山田錦」の両親品種からの DNA の継承様式を解析した最初の報告でもあり、「山田錦」の優れた形質を生み出す遺伝的背景の理解にも繋がる知見であると考えられる。

本章では、「白鶴錦」と「山田錦」の両親品種からの DNA の継承の違いの解明に焦点をあてたが、全ゲノム情報は、酒米集団内の各品種や系統間の遺伝的距離の推察にも有効と期待される。中瀬ら (中瀬, 2024) は、本章で取得した全ゲノム情報を含めて、「白鶴錦」、「山田錦」、「山田穂」3 系統、「渡船」3 系統、「白鶴錦」の姉妹 2 系統、酒米品種「雄町」、一般米品種「コシヒカリ」、計 12 品種・系統の全ゲノム情報を比較し、検出された多型数を比較することで、系統樹を作成した (付録 図 A-3)。その結果、「コシヒカリ」と、酒米品種である他の 11 品種・系統の 2 つのグループに大きく分類され、「コシヒカリ」は酒米として保存性が高い領域に多くの多型を持つことにより、酒米品種・系統と遺伝的距離が生じていることが示唆された。酒米品種である 11 品種・系統は、「山田穂」グループと「渡船」グループにさらに分類され、「白鶴錦」は「渡船」グループに、「山田錦」は「山田穂」グループに含まれており、本章と矛盾しない結果であった。なお、本系統樹において、「白鶴錦」と「山田錦」の遺伝的距離と、「白鶴錦」と「コシヒカリ」の遺伝的距離の比率はおよそ 2:3 であった。

酒米として保存性が高い領域には、大粒、心白などの酒米品種であることを特徴づける米粒形質にかかわる遺伝子が存在していると考えられ、これらの形質にかかわる遺伝子が明らかにされ始めている (Yoshida, 2023)。また、これらの形質にかかわる量的形質遺伝子座の解明も進められている (Okada, 2017; Okada, 2018; Okada, 2020)。しかしながら、これらの形質は多数の遺伝子の相互作用に影響されることが考えられ (吉田, 2024)、全容は未解明である。今後、酒米の特性に重要な形質に関与する遺伝子や量的形質遺伝子座がさらに解明され、様々な品種・系統におけるこれらの領域の DNA 配列に着目することで、「白鶴錦」を含めた様々な酒米品種の特性を遺伝的な観点からより深く理解することが可能になることを期待する。

第5章 総括と展望

5.1. 総括

本研究では、「白鶴錦」の特性を「山田錦」との比較を通して明らかにし、「白鶴錦」の大吟醸酒の醸造特性・酒質特性や遺伝的背景の理解に資する知見を得ることを目的とした。

大吟醸酒醸造の原料処理条件の設定においては、使用する原料米の吸水特性、製麴特性の理解が特に重要であるが、「白鶴錦」の詳細な吸水特性や製麴特性についてはこれまで把握されていなかった。そこで、第2章では、「山田錦」と「白鶴錦」の精米歩合38%の白米の吸水特性、製麴特性およびこれらに関連する米粒構造特性を比較し評価することで、「白鶴錦」の大吟醸酒の醸造特性とその要因の理解に繋がる知見を得ることを目的とした。「白鶴錦」の初期吸水は「山田錦」と比較して有意に遅かった。「白鶴錦」は「山田錦」と比較して白米中の空隙量が少なく、これが初期吸水の遅さの一因であると考えられた。続いて、同一条件で製麴された「山田錦」と「白鶴錦」の米麴の特性を比較し評価した結果、「白鶴錦」の米麴の麴菌菌体量やグルコース生成総合活性は「山田錦」と同程度であった。また、質量分析イメージングを用いて米麴中のグルコース分布を可視化することにより、「白鶴錦」の米麴は「山田錦」と同様に、米の内部まで麴菌がよく伸長していることが示唆された。以上から、「白鶴錦」は「山田錦」と同様に、大吟醸酒醸造に適した米麴が製麴可能であると考えられた。

「白鶴錦」で醸造された大吟醸酒は「山田錦」の大吟醸酒と比較してやわらかい味わいになる傾向があるが、使用する原料米品種による成分的特性は把握されていなかった。そこで、第3章では、GC/MSを基盤としたメタボロミクス技術を用いて、種麴、水、仕込み配合は同一であり、使用する原料米品種（「山田錦」、「白鶴錦」）と酵母菌株を変えて醸造された15種類の大吟醸酒に含まれる親水性低分子化合物のプロファイリングを行った。その結果、51個の化合物が同定され、取得した分析値デー

タを多変量解析に供することで、グリセロールやエリスリトールといった糖アルコールの量が多いなど、「白鶴錦」で醸造された大吟醸酒の成分的特性を把握できた。こうした成分的特性が、前述した官能特性の一因となっていることが示唆された。

「白鶴錦」と「山田錦」の両親品種は非常に類似していると考えられるが、その一方で、両親品種からの DNA の継承の差異は不明であった。そこで、第 4 章では、「白鶴錦」、「山田錦」とこれらの両親品種に相当または類似すると考えられる「新山田穂 1 号」、「渡船 2 号」の全ゲノム情報を比較解析することにより、「白鶴錦」と「山田錦」の両親品種からの DNA の継承の違いをゲノムレベルで解明し、「白鶴錦」の遺伝的背景の理解に資する知見を得ることを試みた。その結果、「白鶴錦」は「渡船 2 号」由来の DNA 多型を、「山田錦」は「新山田穂 1 号」由来の DNA 多型を多く継承しているなど、「白鶴錦」と「山田錦」では両親品種からのゲノム領域の継承に明確な違いがあった。また、デンプンの生合成に関与し米粒の胚乳構造に影響を与えと考えられる複数の遺伝子において、「白鶴錦」と「山田錦」の DNA 配列に違いがあることを見出した。

以上のように、「白鶴錦」の大吟醸酒の醸造特性・酒質特性や遺伝的背景の理解に資する知見を得ることができた。

5.2. 展望

本研究で得られた知見は、科学的根拠に基づいた「白鶴錦」の訴求、「白鶴錦」の醸造特性の理解とそれに基づいた原料処理条件の設定、「白鶴錦」の特性を考慮した酒質設計に資すると考えられる。

現在、清酒醸造に重要な米粒形質にかかわる遺伝子や量的形質遺伝子座の解明が進められているが、今後、これらの領域の DNA 配列に着目することで、「白鶴錦」の特性を遺伝的な観点からより深く理解できるようになると考えられる。また、「白鶴錦」で醸造された大吟醸酒の成分的特性の要因を解明することで、「白鶴錦」の醸造特性のより深い理解や「白鶴錦」の酒質特性をより引き出すような醸造方法の確立に繋が

ると期待される。

酒米は清酒醸造における最も重要な原料であり，特に，高品質な大吟醸酒を安定的・合理的に醸造するためには，酒米品種の特性の理解が必要不可欠である．また，全国の銘醸地で様々な酒米品種が開発・使用されているが，それぞれの酒米品種の遺伝的特性や酒質特性を科学的に明らかにできれば，酒米を切り口にした清酒の訴求や酒米品種の特性を活かした酒質設計にも繋がると考えられる．しかしながら，酒米品種の特性を科学的かつ詳細に調査した研究は非常に限られており，酒米品種の特性に応じた原料処理条件の設定や酒質設計は未だ醸造技術者の勘と経験によるところが大きい．今後，本研究で使用した解析方法によって様々な酒米品種の特性が明らかにされ，酒米品種特性の理解・訴求やその特性を活かした醸造方法の確立や酒質設計，さらには，酒米品種の醸造特性と遺伝的特性の関連性の解明に繋がることを期待する．

引用文献

- Arai-Kichise Y., Shiwa Y., Nagasaki H., Ebana K., Yoshikawa H., Yano M., Wakasa K.:** Discovery of genome-wide DNA polymorphisms in a landrace cultivar of Japonica rice by whole-genome sequencing, *Plant Cell Physiol.*, **52**, 274-282 (2011).
- Cingolani P., Platts A., Wang L. L., Coon M., Nguyen T., Wang L., Land S. J., Lu X., Ruden D. M.:** A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3, *Fly*, **6**, 80-89 (2012).
- Danecek P., Auton A., Abecasis G., Albers C. A., Banks E., DePristo M. A., Handsaker R, Lunter G., Marth G., Sherry S. T., McVean G., Durbin R., 1000 Genomes Project Analysis Group:** The variant call format and VCFtools, *Bioinformatics*, **27**, 2156-2158 (2011).
- Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Wold S.:** *Multi- and Megavariable Data Analysis. Principles and Applications.* (Umetrics AB), p.107 (2001).
- Fujii T., Kobayashi O., Yoshimoto H., Furukawa S., Tamai Y.:** Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 910-915 (1997).
- Fujita N., Yoshida M., Kondo T., Saito K., Utsumi Y., Tokunaga T., Nishi A., Satoh H., Park J. H., Jane J. L., Miyao A., Hirochika H., Nakamura Y.:** Characterization of SSIIa-deficient mutants of rice: the function of SSIIa and pleiotropic effects by SSIIa deficiency in the rice endosperm, *Plant Physiol.*, **144**, 2009-2023 (2007).
- Han X., Wang Y., Liu X., Jiang L., Ren Y., Liu F., Peng C., Li J., Jin X., Wu F., Wang J., Guo X., Zhang X., Cheng Z., Wan J.:** The failure to express a protein disulphide isomerase-like protein results in a floury endosperm and an endoplasmic reticulum stress response in rice, *J. Exp. Bot.*, **63**, 121-130 (2012).

Hirose T., Terao T.: A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.), *Planta*, **220**, 9-16 (2004).

International Rice Genome Sequencing Project: The map-based sequence of the rice genome, *Nature*, **436**, 793-800 (2005).

Ito K., Gomi K., Kariyama M., Miyake T.: Quantitative evaluation of *haze* formation of *koji* and progression of internal *haze* by drying of *koji* during *koji* making, *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 62-70 (2017).

Kawahara Y., de la Bastide M., Hamilton J. P., Kanamori H., McCombie W.R., Ouyang S., Schwartz D. C., Tanaka T., Wu J., Zhou S., Childs K. L., Davidson R. M., Lin H., Quesada-Ocampo L., Vaillancourt B., Sakai H., Lee S. S., Kim J., Numa H., Itoh T., Buell C. R., Matsumoto T.: Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data, *Rice*, **6**, 4 (2013).

Kim Y. J., Yeu S. Y., Park B. S., Koh H. J., Song J. T., Seo H. S.: Protein disulfide isomerase-like protein 1-1 controls endosperm development through regulation of the amount and composition of seed proteins in rice, *PLOS ONE*, **7**, e44493 (2012).

Kumaran M., Subramanian U., Devarajan B.: Performance assessment of variant calling pipelines using human whole exome sequencing and simulated data, *BMC Bioinformatics*, **20**, 342 (2019).

Langmead B., Salzberg S.: Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, *Nat. Methods*, **9**, 357-359 (2012).

Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R.: The Sequence Alignment/Map format and SAMtools, *Bioinformatics*, **25**, 2078-2079 (2009).

Lommen A.: MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing, *Anal. Chem.*, **81**, 3079-3086 (2009).

Martin M.: Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads,

EMBnet J., **17**, 10-12 (2011).

Mimura N., Isogai A., Iwashita K., Bamba T., Fukusaki E.: Gas chromatography/mass spectrometry based component profiling and quality prediction for Japanese sake, *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 406-414 (2014).

Ochi H., Naito H., Iwatsuki K., Bamba T., Fukusaki E.: Metabolomics-based component profiling of hard and semi-hard natural cheeses with gas chromatography/time-of-flight-mass spectrometry, and its application to sensory predictive modeling, *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 751-758 (2012).

Okada S., Suehiro M., Ebana K., Hori K., Onogi A., Iwata H., Yamasaki M.: Genetic dissection of grain traits in Yamadanishiki, an excellent sake-brewing rice cultivar, *Theor Appl Genet.*, **130**, 2567-2585 (2017).

Okada S., Onogi A., Iijima K., Hori K., Hori K., Iwata H., Yokoyama W., Suehiro M., Yamasaki M.: Identification of QTLs for rice grain size using a novel set of chromosomal segment substitution lines derived from Yamadanishiki in the genetic background of Koshihikari, *Breed. Sci.*, **68**, 210-218 (2018).

Okada S., Iijima K., Hori K., Yamasaki M.: Genetic and epistatic effects for grain quality and yield of three grain-size QTLs identified in brewing rice (*Oryza sativa* L.), *Mol. Breed.*, **40**, 88 (2020).

Okuda M.: Rice used for Japanese sake making, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **83**, 1428-1441 (2019).

Pongsuwan W., Fukusaki E., Bamba T., Yonetani T., Yamahara T., Kobayashi A.: Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting, *J. Agric. Food. Chem.*, **55**, 231-236 (2007).

Putri S.P., Nakayama Y., Matsuda F., Uchikata T., Kobayashi S., Matsubara A., Fukusaki E.: Current metabolomics: Practical applications, *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 579-589 (2013a).

- Putri S.P., Yamamoto S., Tsugawa H., Fukusaki E.:** Current metabolomics: technological advances, *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 9-16 (2013b).
- Ruijter G. J. G., Visser J., Rinzema A.:** Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation, *Microbiology*, **150**, 1095-1101 (2004).
- Ryoo N., Yu C., Park C. S., Baik M. Y., Park I. M., Cho M. H., Bhoo S. H., An G., Hahn T. R., Jeon J. S.:** Knockout of a starch synthase gene *OsSSIIIa/Flo5* causes white-core floury endosperm in rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Cell Rep.*, **26**, 1083-1095 (2007).
- Sakai H., Lee S. S., Tanaka T., Numa H., Kim J., Kawahara Y., Wakimoto H., Yang C., Iwamoto M., Abe T., Yamada Y., Muto A., Inokuchi H., Ikemura T., Matsumoto T., Sasaki T., Itoh T.:** Rice Annotation Project Database (RAP-DB): An Integrative and Interactive Database for Rice Genomics, *Plant Cell Physiol.*, **54**, e6 (2013).
- Tsugawa H., Tsujimoto Y., Arita M., Bamba T., Fukusaki E.:** GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA), *BMC Bioinformatics*, **12**, 131 (2011).
- Van Berloo R.:** GGT 2.0: versatile software for visualization and analysis of genetic data, *J. Hered.*, **99**, 232-236 (2008).
- Wisman A. P., Tamada Y., Hirohata S., Fukusaki E., Shimma S.:** Metabolic visualization reveals the distinct distribution of sugars and amino acids in rice *koji*, *Mass Spectrometry*, **9**, A0089 (2020a).
- Wisman A. P., Tamada Y., Hirohata S., Gomi K., Fukusaki E., Shimma S.:** Mapping haze-komi on rice *koji* grains using β -glucuronidase expressing *Aspergillus oryzae* and mass spectrometry imaging, *J. Biosci. Bioeng.*, **129**, 296-301 (2020b).
- Wisman A. P.:** Study of haze-komi and metabolite distribution relation in rice *koji* by the combination of metabolomics and imaging techniques, 大阪大学博士論文 (2021).
- Yabe S., Yoshida H., Kajiya-Kanegae H., Yamasaki M., Iwata H., Ebana K., Hayashi T., Nakagawa H.:** Description of grain weight distribution leading to genomic selection for

grain-filling characteristics in rice, *PLOS ONE*, **13**, e0207627 (2018).

Yamamoto S., Bamba T., Sano A., Kodama Y., Imamura M., Obata A., Fukusaki E.: Metabolite profiling of soy sauce using gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry and analysis of correlation with quantitative descriptive analysis, *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 170-175 (2012).

Yamasaki M., Ideta O.: Population structure in Japanese rice population, *Breed. Sci.*, **63**, 49-57 (2013).

Yoshida H., Okada S., Wang F., Shiota S., Mori M., Kawamura M., Zhao X., Wang Y., Nishigaki N., Kobayashi A., Miura K., Yoshida S., Ikegami M., Ito A., Huang L., Hsing Y. C., Yamagata Y., Morinaka Y., Yamasaki M., Kotake T., Yamamoto E., Sun J., Hirano K., Matsuoka M.: Integrated genome-wide differentiation and association analyses identify causal genes underlying breeding-selected grain quality traits in japonica rice, *Mol. Plant*, **16**, 1460-1477 (2023).

Yoshioka K., Hashimoto N.: Ester formation by brewers' yeast during sugar fermentation, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 333-340 (1984).

阿久澤 さゆり: 調理におけるデンプンの物性と利用, *日本調理科学会誌*, **45**, 238-243 (2012).

安藤 孝雄, 市川 邦介: 透過型および走査型電子顕微鏡による米粒の胚乳構造の観察, *醱酵工学会誌*, **52**, 46-57 (1974).

家村 芳次, 藤田 栄信: 千粒重と粗蛋白質および心白面積も含めた表面積による評価法の検討 酒造原料米の評価についての研究(第2報), *日本醸造協会誌*, **77**, 260-264 (1982).

石川 雄章, 百瀬 洋夫, 吉沢 淑: 清酒酵母の Acetyl-CoA: alcohol acetyltransferase について, *日本醸造協会誌*, **79**, 62-66 (1984).

磯谷 敦子, 藤田 晃子, 赤松 史一, 岸本 徹, ボルジギン ソリナ, 西本 真樹, 神田 涼子, 寺本 聡子, 大串 憲祐, 福田 央: 令和4酒造年度全国新酒鑑評会出品酒の分析

について, *酒類総合研究所報告*, **196**, 1-18 (2024).

伊藤 清: 酒米の微細構造と消化性, *日本醸造協会誌*, **87**, 497-502 (1992).

岩野 君夫, 中沢 伸重, 伊藤 俊彦: 麴における黄麴菌の増殖量と代謝生産物量との関係, *日本醸造協会誌*, **97**, 865-871 (2002).

上島 脩志: 酒米における心白発現の遺伝, *日本醸造協会誌*, **99**, 50-52 (2004).

大淵 和彦, 神田 晃敬, 浜地 正昭, 布川 弥太郎: グリセロール高生産酵母の育種と清酒の醸造, *醗酵工学会誌*, **69**, 203-209 (1991).

小澤 禎一, 山内 隆寛, 神谷 久弥, 松永 將義, 花本 秀生: 白鶴錦の醸造特性評価, *日本醸造協会誌*, **103**, 800 (2008).

熊谷 知栄子: 吟醸米の水分調整法, *日本醸造協会誌*, **76**, 74-76 (1981).

栗山 一秀, 芦田 晋三, 斉藤 義幸, 秦 洋二, 杉並 孝二, 今安 聡: 醪におけるカプロン酸エチル生成に対する酵母と麴菌の役割, *醗酵工学会誌*, **64**, 253-259 (1986).

古浦 二郎, 玉置 雅彦, 荒巻 功, 猪谷 富雄: 浸漬における白米の吸水に対する水温と浸漬時間の影響—清酒醸造における蒸米の研究 (第2報)—, *日本醸造協会誌*, **105**, 539-545 (2010).

国税庁課税部酒税課: *酒のしおり* (国税庁) (2023).

小林 健: もう一つの並行複発酵—製麴工程, *日本醸造協会誌*, **104**, 726-742 (2009).

五味 勝也, 飯村 穰, 原 昌道: 吟醸酒用麴菌の育種, *日本醸造協会誌*, **82**, 792-797 (1987).

酒米研究会: *酒造用原料米全国統一分析法* (酒米研究会) (2022).

副島 顕子: *酒米ハンドブック* (文一総合出版) (2017).

高谷 正敏: エリスリトール, *オレオサイエンス*, **13**, 423-428 (2013).

玉田 佳大: 酒造好適米の特徴とその品種特性, *生物工学会誌*, **98**, 32 (2020).

豊田 敦至, 佐藤 智美, 齋藤 良, 吉川 茂利, 水野 正浩, 細井 淳, 岩野 君夫: 麴製造適性評価試験による酒造好適米品種「山恵錦」の特性評価, *日本醸造協会誌*, **118**, 436-446 (2023).

中瀬 舞, 浅井 拓也, 窪寺 隆文, 明石 貴裕, 山崎 将紀: 酒米品種「山田錦」, 「白鶴錦」 および両品種の近縁祖先品種・系統の全ゲノム情報を用いた比較解析, *日本醸造協会誌*, **119**, 439-455 (2024).

灘酒研究会: *灘の酒用語集* (灘酒研究会) (1997).

西村 顕: 独自酒米「白鶴錦」の開発, *第226回日本作物学会講演会要旨集*, 354 (2008).

日本醸造協会: *醸造物の成分* (日本醸造協会) (1999).

橋本 建哉, 伊藤 謙治: 日本酒商品情報の提供および活用に係る宮城県における取り組み, *日本醸造協会誌*, **115**, 505-512 (2020).

長谷 篤, 山下 伸雄, 永井 英雄, 池上 勝, 世古 晴美, 中島 有紀, 山本 俊哉, 大江 田 憲治, 近藤 恭一: 新山田穂1号の品種特性, *日本醸造協会誌*, **91**, 633-639 (1996).

長谷 篤, 山下 伸雄, 西村 顕, 近藤 恭一: 「渡船2号」の品種特性, *日本醸造協会誌*, **92**, 669 (1997).

兵庫酒米研究グループ: *山田錦物語 人と風土が育てた日本一の酒米* (神戸新聞総合出版センター) (2010).

藤井 史子, 尾関 健二, 神田 晃敬, 浜地 正昭, 布川 弥太郎: 市販酵素剤を利用した麴菌体量簡易測定法, *日本醸造協会誌*, **87**, 757-759 (1992).

増村 威宏: お米とお酒のいい関係, *生物工学会誌*, **89**, 265 (2011).

増村 威宏, 佐生 愛, 齋藤 雄飛: イネ種子の電子顕微鏡的解析, *顕微鏡*, **49**, 211-215 (2014).

吉井 美華, 荒巻 功: 走査電子顕微鏡による麴の観察, *日本醸造協会誌*, **96**, 806-813 (2001).

吉田 晋弥: 酒米品種群の成り立ちとその遺伝的背景, *日本醸造協会誌*, **107**, 710-718 (2012).

吉田 晋弥: 酒米品種を特徴づけるゲノム構造, *酒米懇談会講演要旨集*, **47**, 39-44 (2024).

若井 芳則: 吟醸酒と突きハゼ麴, *醗酵工学会誌*, **70**, 312 (1992).

本博士論文に関連する業績

原著論文

- 1) 玉田 佳大, 大東 功承, 西本 遼, 山内 隆寛, 浅井 拓也, 山下 伸雄, 明石 貴裕:
GC/MS を基盤としたメタボロミクス技術を用いた酵母菌株・原料米品種による大
吟醸酒の酒質特性解析, *日本醸造協会誌*, **112**, 827-835 (2017).
- 2) 玉田 佳大, 窪寺 隆文, 広畑 修二, 山崎 将紀: 酒米品種「白鶴錦」の遺伝的特性,
日本醸造協会誌, **116**, 339-346 (2021).
- 3) Tamada Y., Asai T., Kubodera T., Akashi T., Fukusaki E., Shimma S.: Rice grain
structural characteristics of sake rice cultivar *Hakutsurunishiki* for *daiginjo-shu* brewing.
Biosci. Biotechnol. Biochem., **88**, 445–452 (2024).

学会発表

- 1) 玉田 佳大, 太田 淳, 浅井 拓也, 明石 貴裕
“メタボローム解析技術を用いた米品種による清酒の酒質特長の定量的把握”
日本生物工学会大会, 広島, 2013 年 9 月
- 2) 玉田 佳大, 太田 淳, 浅井 拓也, 明石 貴裕
“白鶴錦製成酒の酒質特性の解析”
日本醸造学会大会, 東京, 2013 年 10 月
- 3) 玉田 佳大, 太田 淳, 浅井 拓也, 山下 伸雄, 明石 貴裕
“白鶴錦の酒質特性とその要因の解析”
日本醸造学会大会および日本醸造学会若手シンポジウム, 東京, 2015 年 10 月
- 4) 玉田 佳大, Adinda Putri Wisman, 窪寺 隆文, 明石 貴裕, 福崎 英一郎, 新聞 秀
一
“イメージング質量分析を用いた清酒における麴米品種の特性解析”
日本生物工学会大会, 大阪, 2018 年 9 月

5) 玉田 佳大, 窪寺 隆文, 広畑 修二, 山崎 将紀

”全ゲノム解析による酒米品種「白鶴錦」の遺伝的特性”

日本醸造学会大会, 東京, 2019 年 10 月

6) Tamada Y., Asai T., Kubodera T., Akashi T., Fukusaki E., Shimma S.

“Characteristics analysis of sake rice cultivar *Hakutsurunishiki* for *daiginjo-shu* brewing”

Metabolomics 2024, Osaka, June, 2024

7) 玉田 佳大, 浅井 拓也, 明石 貴裕, 福崎 英一郎, 新聞 秀一

“大吟醸酒醸造に資する酒米品種「白鶴錦」の特性解析”

第 18 回メタボロームシンポジウム, 山形, 2024 年 10 月

講演

1) 玉田 佳大

“清酒のおいしさの解析について”

平成 26 年度 近畿化学協会バイオ部会 第 2 回例会, 兵庫, 2015 年 2 月

2) 玉田 佳大

”清酒のおいしさの解析に関する研究”

第 108 回醗酵学懇話会, 兵庫, 2016 年 2 月

3) 玉田 佳大

“メタボロミクスによる白鶴錦の酒質特性の解析”

第 42 回酒米懇談会, 東京, 2018 年 9 月

4) 玉田 佳大, 明石 貴裕

”メタボロミクス技術を用いた酵母菌株・原料米品種による清酒の酒質特性解析”

日本醸造学会大会 (日本醸造協会技術賞受賞講演), 東京, 2018 年 10 月

5) 玉田 佳大

”白鶴錦の解析”

第 53 回兵庫バイオインダストリー研究会, 兵庫, 2018 年 10 月

6) 玉田 佳大

”メタボロミクス技術を用いた酵母菌株・原料米品種による清酒の酒質特性の解析,
イメージング質量分析を用いた清酒における麴米品種の特性解析”

第 5 回関西醸造研究セミナー, 京都, 2019 年 7 月

7) 玉田 佳大

“清酒成分と酒質特性（香味, DMTS 生成など）の関連性について”

第 107 回清酒製造技術セミナー, オンライン, 2021 年 4 月

受賞

1) 玉田 佳大, 明石 貴裕

“メタボロミクス技術を用いた酵母菌株・原料米品種による清酒の酒質特性解析”

日本醸造協会技術賞, 2018 年 10 月

謝辞

本論文を執筆するにあたり、ご懇篤なご指導とご高配を賜りました大阪大学大学院工学研究科 福崎 英一郎教授に謹んで深甚なる謝意を表します。

本論文を精読してくださり、有益なご助言を賜りました大阪大学生物工学国際交流センター 本田 孝祐教授、大阪大学大学院工学研究科 青木 航教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、温かいご指導と激励を賜りました大阪大学大学院工学研究科 新聞 秀一准教授、Sastia Prama Putri 准教授に厚く御礼申し上げます。

全ゲノム情報の取得やデータ解析において、懇切丁寧なご指導とご助言を賜りました新潟大学農学部 山崎 将紀教授、多大なるご協力を賜りましたユーロフィンジェノミクス株式会社 尾鼻 孝浩氏、宮城 竜太郎博士に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えてくださりました白鶴酒造株式会社 嘉納 健二代表取締役社長、櫻井 一雅専務取締役、西村 顕専務取締役に謹んで御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援とご助言を賜りました白鶴酒造株式会社 広畑 修二生産本部部長、明石 貴裕研究室長、浅井 拓也研究室次長、窪寺 隆文品質保証部参事に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の全般にわたり、様々なご協力をいただきました大阪大学大学院工学研究科 生物資源工学領域の皆様、白鶴酒造株式会社の皆様に厚く感謝申し上げます。

付録

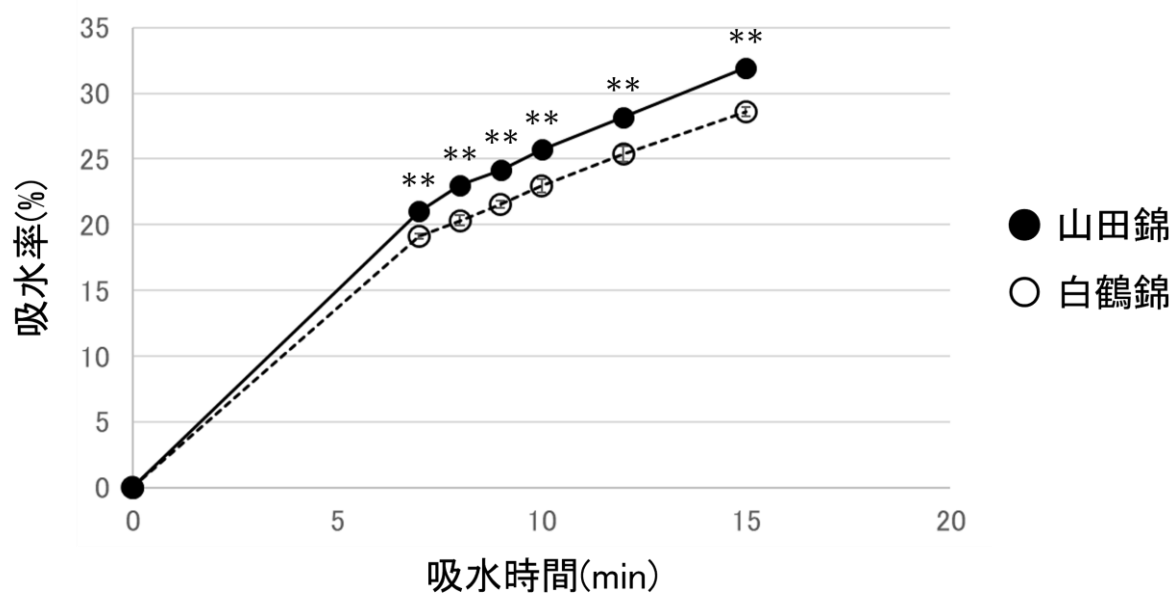


図 A-1. 2013 年兵庫県産の精米歩合 38%の白米の吸水曲線

平均値±標準偏差 (n=3) , ** $p<0.01$ (スチューデントの t 検定)

2.2.3 と同様の方法で測定した. 使用した白米の初期水分量は, 「山田錦」が $9.3 \pm 0.2\%$, 「白鶴錦」が $9.3 \pm 0.1\%$ (いずれも平均値±標準偏差 (n=3)) であり, F 検定で等分散性を確認後, スチューデントの t 検定を行った結果, 品種による有意差はなかった.

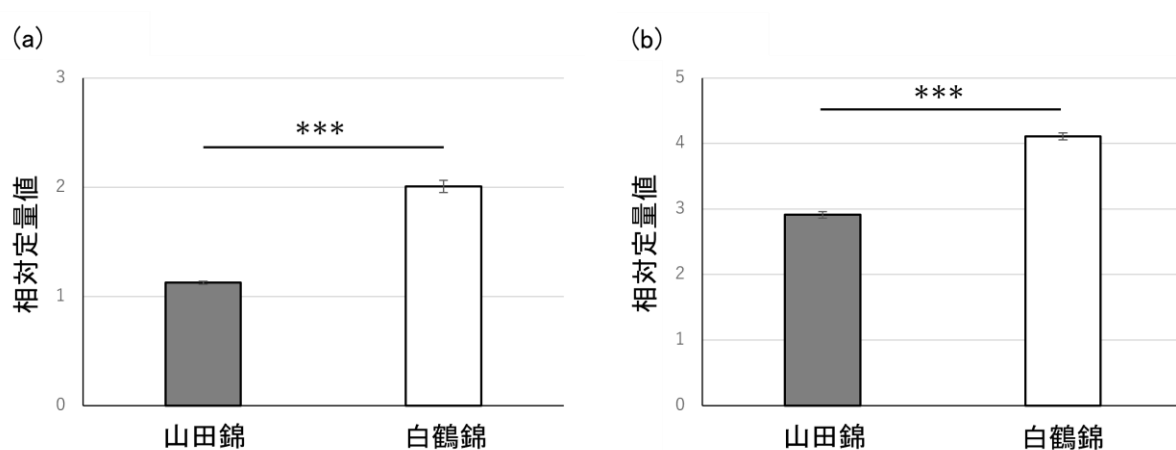


図 A-2. 「山田錦」と「白鶴錦」の米麴における糖アルコールの相対定量値

(a) グリセロールの相対定量値, (b) エリスリトールの相対定量値

平均値±標準偏差 (n=3) , *** $p < 0.001$ (スチューデントの t 検定)

引用文献 (Wisman, 2021) と同様の方法で測定した.

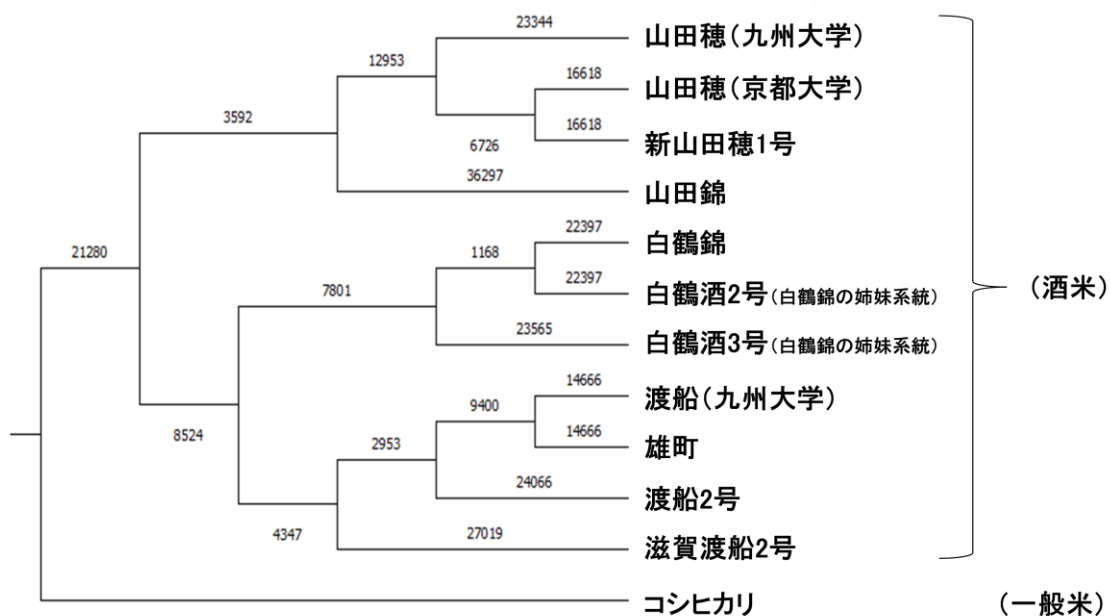


図 A-3. 「白鶴錦」, 「山田錦」, 「山田穂」 3 系統, 「渡船」 3 系統, 「白鶴錦」 の姉妹 2 系統, 酒米品種「雄町」, 一般米品種「コシヒカリ」の系統樹

引用文献 (中瀬, 2024) の図を一部改変して作成した.

表 A-1. 官能評価による大吟醸酒の「やわらかい味わい」の評価結果

No.	酒造年度	原料米 品種	日本酒度	エタノール 濃度 (%v/v)	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	「やわらか い味わい」
4	2011	白鶴錦	+2.5	17.5	1.2	1.2	1.3 ± 0.9
9	2011	山田錦	+3.2	17.8	1.2	0.8	0.5 ± 0.7
14	2012	白鶴錦	+2.9	17.7	1.1	0.9	1.4 ± 0.8
15	2012	山田錦	+3.4	17.6	1.1	0.9	0.6 ± 0.7

「やわらかい味わい」は官能評価 (ブラインド) により, 2 (あり), 1 (ややあり), 0 (なし) の3段階で評価され, 平均値±標準偏差 ($n=12$) を示す. サンプル No.は表 3-1 のサンプル No.に対応している.

表 A-2. 2012 年兵庫県産玄米の品質

品種	玄米千粒重 (g)	心白発現率 (%)	心白の大きさ			
			特大 (%)	大 (%)	中 (%)	小 (%)
山田錦	27.0	66	7	27	50	16
白鶴錦	27.4	56	14	38	38	10

心白の大きさは, 玄米の長軸方向に切断した断面積に占める心白の面積の割合を肉眼で観察し, その割合が 8 割以上であるものを特大, 6 割以上であるものを大, 3 割以上であるものを中, それ未満であるものを小とした.