

PCR法による醸造酒の原料判別技術

大坪研一^{1*}・中村澄子²・原口和朋²

(平成20年7月20日受付)

要 約

農産物のDNA品種判別技術が開発されつつあるが、原料のDNA抽出が難しい加工品への適応は、難易度が高い。特に、日本酒は、発酵によるDNAの分解、発酵微生物のDNAの混在、PCR阻害物質の共存等の理由により、これまで原料米の品種を判別することができなかった。このたび、日本酒から原料米由来のDNAのみを抽出、増幅する手法を開発し、PCRにより原料米品種を判別することが可能になった。なお、この技術は、ワインから原料ブドウ品種を判別する手法としても応用可能である。

新大農研報, 61(1):1-9, 2008

キーワード：米、酒、品種判別、PCR、DNA

1. はじめに

醸造酒には、ワインのように、果実に含まれる糖質を原料として直接アルコール発酵させる単発酵酒、ビールのように大麦の麦芽を原料とし、糖化後アルコール発酵させる単行複発酵酒、清酒（日本酒）のように、米のデンプンを原料に、麹菌・酵母による糖化とアルコール発酵を同時に行わせる並行複発酵酒がある（東，2003）。清酒やワインのような醸造酒の品質は、原料植物、すなわち、イネやブドウの品種が強く影響するとされている。

農林水産省総合食料局による平成16年産醸造用米の作付けは15.2千haにおよび、作付け上位品種は山田錦（5.0千ha）、五百万石（4.5千ha）、美山錦（1.4千ha）で、ほぼ全体の作付けの7割を占めている。これらに雄町（0.39千ha）、兵庫夢錦（0.34千ha）、八反錦1号（0.29千ha）などが続き、醸造用として作付けされる品種は79品種（平成16年産）となっている。

日本酒の原料になる酒米の品種育成には、長い年月と多大な労力を必要とする。近年、インゲンマメやイチゴにおいて、国産品種が外国に不正に持ち出され、安価に生産されるという事件が起こり、育成者権を重視する観点から平成15年に種苗法が改正され、平成17年には、加工品にまで適用できるように再改正された。酒米の育成者権を保護する意味から、日本酒を試料とする原料米の判別技術の開発が必要とされている。

また、包装ラベルに記載されている品種と実際に使用されている品種が同一であるか確認できれば、高級酒の原料表示の偽装を防止・抑制できる。もちろん、大部分の酒造企業では正しい表示をしていると思われるが、ほんの一部でも偽装表示があれば、消費者の表示に対する信頼を損なうと同時に、業界全体の信用をも損なうことになってしまう。そこで、日本酒を試料とする原料米の品種判別技術の開発が必要とされていた。

2. 日本酒を試料とするDNA判別の技術的問題点およびその解決方法

発酵食品の場合は、発酵過程におけるDNAの分解及び発酵微生物のDNAの混在のため、原料植物のDNA品種判別は困

難とされていた（Garcia-Beneytez, 2002）。醸造酒の場合は、既報（大坪ら，2001）（中村ら，2004）における米飯や糯加工品（あられ・煎餅）の場合と異なり、麹菌・酵母・ホップ・ブドウ果皮などの共存とともに、ポリフェノールおよび、メイラード反応をはじめとする成分間反応のため、黄色や赤褐色の色素成分が増加している。ポリフェノールやメラノイジン等の色素成分は、その多くが酵素阻害作用を持っており、PCRを阻害する。また、醸造酒の場合、原料植物の品種のDNA以外に、麹菌や酵母などのDNAが混在しているという問題がある。日本酒やワイン等の発酵品については、もともと液状であって水分含量が高く、固形物が少ない上に、製造過程（発酵段階）で微生物によって米のDNAも分解されてしまうため、前記原料植物のDNA品種判別技術の適用が困難とされてきた（Garcia-Beneytez, 2002）。

また、遺伝子組み換え植物（GMO）及びその加工品の検知においても、導入遺伝子の配列に基づいて設計されたプライマーを用いるPCRによって導入遺伝子が検出されるが、醤油などの発酵された加工品の場合は、発酵過程におけるDNAの分解および発酵微生物のDNAの混在のため、遺伝子組み換えの有無の検知が困難とされてきた。

すなわち、流通消費段階で入手可能な醸造酒製品を試料とし、その原料植物又は品種をDNA分析によって判別するためには、発酵工程を経ないために原料植物のDNAが多量に存在する固形の米飯や餅と異なり、発酵中の微生物による分解を受けながら、なお液体中に残存している極微量の原料植物由来のDNAあるいはその断片を、加熱による分解、変性、重合等を起こさない条件で濃縮し、糖質、蛋白質、脂質等の混在物から分離精製することが必要である。

これらの問題点を解決するために、筆者らは、非加熱濃縮により醸造酒を粉末化し、既報（大坪ら，2001）（中村ら，2004）の酵素法により、デンプンおよびタンパク質を分解除去した後、回収した沈殿から70%エタノールを用い、DNAを溶出すると同時に色素成分を除去し、CTABあるいはフェノール処理により多糖類やタンパク質を除き、市販されている醸造酒（清酒・

¹新潟大学農学部応用生物化学科

²(独)農研機構食品総合研究所

*代表著者：ohtsubok@agr.niigata-u.ac.jp

ビール・ワイン) から高品質の PCR 用鋳型 DNA を抽出・精製することを可能にした。

また、分離精製した原料植物由来の DNA あるいはその断片を PCR で増幅し、その多型によって原料植物又は品種を判別するために、混在する麹菌や酵母などの DNA は増幅しないで、植物由来の DNA のみが増幅するようなプライマーを選定あるいは開発した。

さらに、原料植物由来の DNA あるいはその断片が PCR の鋳型として利用可能となり、DNA の増幅に好適なプライマーが共存した状態で、識別可能な DNA 多型が現れるためには、鋳型 DNA 濃度、プライマー濃度、DNA ポリメラーゼの種類と添加量、反応液濃度、変性温度、アニーリング温度、伸長温度など、PCR が順調に終了するための好適な反応条件を選定した。

この方法により、醸造酒 (清酒・ビール・ワイン) から DNA を抽出し、原料植物由来のプライマーによる PCR を行った結果、これらの増幅 DNA が微生物由来のものでなく、原料植物である米・大麦・ブドウ由来のものであることを塩基配列から確認した。本報による抽出方法では、Garcia らが報告しているような抽出による失敗 (Garcia-Beneytez, 2002) は殆どないため、今後の醸造酒の酒質と原料植物および原料品種の関係等の醸造酒の開発や品種改良にも役立つものと期待される。

3. DNA の濃縮方法

日本酒、ビール、ワインなどの醸造酒の場合は、その大部分が水であり、日本酒では約 82 ~ 84%、ビールでは 88 ~ 93%、ワインでは 87 ~ 89%、紹興酒では約 79% が水であり、固形物含量はきわめて低い (5 訂日本食品標準成分表、科学技術庁資源調査会、平成 12 年)。しかも、製造過程で麹菌や酵母菌の DNA 分解酵素によって原料植物や種子中の DNA の大部分が分解されてしまうため、PCR におけるプライマーが結合する (アニーリング) ために必要な濃度の鋳型 DNA を得るためには濃縮工程が必要となる。しかし、一般に用いられる加熱濃縮方法では、濃縮過程で DNA の分解や変性が起こり、PCR の鋳型としての使用が不可能になってしまう。

そこで、筆者らは、醸造酒を冷風乾燥、冷風減圧乾燥、減圧遠心乾燥からなる乾燥方法のうちの何れかの方法で濃縮して薄膜にする工程を加えることを検討した。その結果、醸造酒を凍結乾燥、気流乾燥、噴霧乾燥からなる乾燥方法のうちの何れかの方法で粉末にする工程を用いると、試料醸造酒の品温を上昇させることなく水分を除去して粉末化できるので、醸造酒に残存する極微量の鋳型 DNA の品質を損なうことなく、しかも極めて高い濃縮効率で抽出することが可能になることを見いだした。

4. 鋳型 DNA の抽出・精製方法

前項の方法で調製した粉末試料から PCR 用の鋳型 DNA を抽出精製するためには、従来、米飯や餅に適用してきた前記酵素法だけでは不十分であった。その理由としては、米飯や餅と異なり、醸造酒の場合には、発酵過程を経るために、標的とする DNA 以外に、麹菌や酵母の菌体あるいはその残さが共存しており、また、原料の成分である澱粉、タンパク質、脂質、細胞壁なども発酵過程で分解され、成分間反応なども進行し、きわめて複雑な組成を有しているということが挙げられる。そこで、筆者らは、酵素法を改良し、耐熱性アミラーゼ、プロテアーゼ K 処理の直後にフェノール処理を反復して残存タンパク質を

徹底的に除去することにより、従来の酵素法の延長では不可能であった醸造酒製品からの原料植物由来の鋳型 DNA の抽出・精製を可能にすることを発案した。さらに、酵素法で澱粉及びタンパク質を分解除去した後に、CTAB 法による抽出・精製法を組み合わせた場合は、醸造酒を原料として、高品質の PCR 用鋳型 DNA を高収率で抽出精製できることを見出した。

醸造酒の場合は、既報における米飯や餅の場合と異なり、麹菌、酵母、ホップ、ブドウ果皮などの共存により、ポリフェノール等の色素成分を多く含んでいる。さらに、原料の加熱殺菌、発酵および「火入れ」等の発酵停止処理等により、メイラード反応を始めとする成分間反応が起こり、黄色や赤褐色の色素成分が増加する。ポリフェノールやメラノイジン等、これらの色素成分は、その多くが酵素阻害作用を持っており、PCR を阻害する。そこで、筆者らは、醸造酒から鋳型 DNA を抽出精製するに際し、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール等の親水性有機溶剤を用いて色素成分を除去することとした。この工程を加えることにより、PCR で重要な役割を果たす DNA ポリメラーゼ等の酵素活性が色素成分によって阻害されることが激減し、植物の種類や品種を判別するための増幅 DNA が多く得られることになった (中村ら, 2007) (図 1)。

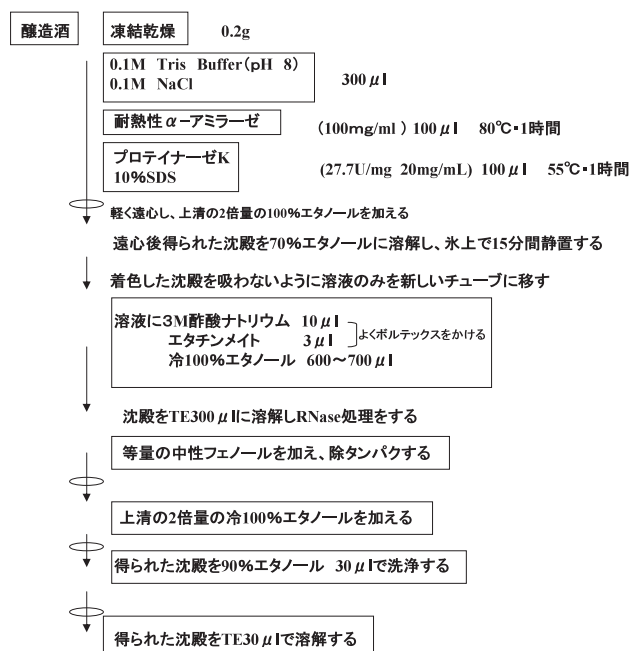


図 1. 醸造酒から PCR 用鋳型 DNA を抽出・精製する方法

5. PCR 用のプライマーの選定及び設計

次いで、PCR において、麹菌や酵母菌の DNA の共存による判別阻害を防ぐため、対象とする植物に特有のプライマーを使用することにした。たとえば、筆者らがこれまでに米の品種判別用に開発してきた RAPD-STs プライマー (大坪ら, 2002) や、米の食味推定用に開発してきた澱粉合成酵素や蛋白質に関連するプライマー (中村ら, 2004)、あるいはいもち病抵抗性遺伝子関連のプライマー (中村ら, 2006) などが例として挙げられる。

また、Nishikawa ら (Nishikawa et al, 2005) や Islas-Osuna ら (Islas-Osuna et al, 2006) が報告しているミトコンドリア DNA は、核 DNA と異なり、輪状の構造であり、細胞当たりの DNA 数も多く、塩基置換速度が核 DNA より速く、母性遺伝という核 DNA とは異なる遺伝様式をとる。従って、ヒトミトコンドリア DNA の制御領域 (D ループ) における配列多型解析は、人類進化の研究や法医学的な個人識別の有力な手段となっている。例としては、ミトコンドリアチトクローム遺伝子、ミトコンドリアタンパク質合成遺伝子、ミトコンドリアヒートショックタンパク質遺伝子、ミトコンドリア転写因子、ミトコンドリアリボソームタンパク質遺伝子、ミトコンドリア D ループ配列、ミトコンドリア分子シャペロン遺伝子、アポトーシス誘導因子、FZO タンパク質遺伝子、ミトコンドリア反復配列等が挙げられる。

また、植物特有の光合成器官である葉緑体に含まれる葉緑体 DNA を用いることによって、醸造酒に含まれる酵母由来の DNA や麹菌由来の DNA の共存による識別阻害を排除しながら、醸造酒原料植物の判別を行うことが可能となる。例としては、葉緑体に含まれる反復配列 (Nishikawa et al, 2005) 等が挙げられる。

反復配列とは、DNA において構成塩基である A、T、G、C の一定の配列が繰り返し出現する部分を指し、これらの反復配列のうちから、原料植物に特有の反復配列を選抜して PCR 用プライマーとして使用することにより、麹菌や酵母に由来する DNA による識別妨害を排除して原料植物の識別を行うことができ、例としては、稲におけるミトコンドリア反復配列、大麦やブドウにおけるマイクロサテライト反復配列などを挙げることができる。

また、DNA の塩基配列における 1 塩基の置換による相違である SNP も使用可能である。植物遺伝子における SNPs はきわめて出現頻度が高く、これに基づく個体識別はきわめて有望とされており、前述の植物遺伝子中の SNPs に着目することにより、麹菌や酵母に由来する DNA とは区別しながら醸造酒の識別を行うことが可能になる。例としては、グルテリン遺伝子等 (中村ら, 2004) を挙げることができる。

6. PCR 法による酒米および日本酒の判別例

(1) コシヒカリポジキットによる判別

次に、市販吟醸酒及び酒造好適米を PCR によって比較した例を示す。酒造好適米である山田錦、八反、兵庫夢錦、雄町の初試料をケット科学研究所製の試験用粉摺り器で粉摺りし、ケット科学研究所製の試験用精米機 (パーレスト) を用いて精米歩留まり 90% の精米試料を得た。この精米試料をイワタニ製のミルサー (IFM-100) を用いて粉碎し、粉末試料とした。精米粉末試料 0.4 g を $2 \times$ CTAB 0.6 mL に滅菌水 0.2 mL を加えた水溶液により、65℃で 30 分間抽出し、同液に等量のクロロホルム-イソアミルアルコールを加えローテーターで 15 分間精製した。ついで遠心して得られた上清に、同量のクロロホルム-イソアミルアルコールと 10% CTAB 液を加え再び精製し、遠心後の上清に約 2.5 倍容の沈殿用緩衝液を加え -80℃で 5 分間冷却し、沈殿を生成させた。遠心で沈殿を回収し、1M NaCl を含む TE に溶解し、等量のイソプロピルアルコールを添加した。転倒混和した後、遠心し沈殿を TE に溶解して 55℃で 30 分間 RNase 処理を行った。これに等量の中性フェノールを加え精製し、遠心後得た上清に 0.2 M の NaCl と 2.5 倍容の冷エタノールを加えて DNA を沈殿させ、90% エタノールで

洗浄後 TE に溶解し鑄型 DNA とした。

日本酒 (市販の純米吟醸酒、精米歩合 55%) 25ml をアイラ製 FD-1 を用いて凍結乾燥した粉末の 0.2g に、0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を 300 μ L 加え、*Bacillus licheniformis* 由来の耐熱性 α -アミラーゼ (シグマ製、790U/mg 固体、1 mg/ml) を 100 μ L 加え、80℃で 1 時間反応させ、澱粉を分解した。次いで、プロテアーゼ K (*Tritirachium album* 由来、ワーシントン・バイオケミカル社製 20mg/mL) 100 μ L に 10% SDS 30 μ L を加え、55℃で 1 時間反応させ、タンパク質を分解した。これを遠心分離した上清に冷却エチルアルコールを加え、氷上で 15 分間沈殿を形成させた。これを遠心分離した沈殿を 300 μ L の TE (EDTA を含むトリス塩酸緩衝液) に溶解し、RNase 処理の後、等量のフェノールで 3 回、タンパク質の分離除去を繰り返した後、クロロホルム / イソアミルアルコールで精製し、エチルアルコールで沈殿させて鑄型用精製 DNA を調製した。

上記のようにして精米及び酒から調製した鑄型 DNA を用いて PCR 法による DNA の増幅を行った。すなわち、滅菌水 10.8 μ L、Taq Polymerase (5U/ μ L) 0.2 μ L、反応用緩衝液 2.0 μ L、25 mM の $MgCl_2$ 2.0 μ L、鑄型 DNA (400 ng/ μ L) 1 μ L、dNTPs 2 μ L を混合して調製し、コシヒカリ判別用のプライマーセット (タカラバイオ製、米判別キット I、5pmol/ μ L) 2 μ L を加えて液量を 20 μ L とし、PCR を行った。PCR 条件は、変性を 96℃で 1 分間、アニーリングを 62℃で 1 分間、伸長を 72℃で 2 分間行い、これを 40 回反復した。

PCR および電気泳動を行った結果を図 2 に示す。図 2 に示すように、酒造好適米および酒から本発明の方法によって抽出精製した DNA を鑄型として行った PCR で増幅 DNA の多型が現れ、試験に用いた市販吟醸酒の原料米には、八反や雄町の型ではなく、山田錦や兵庫夢錦の型の酒米が使用されていることが明らかになった。

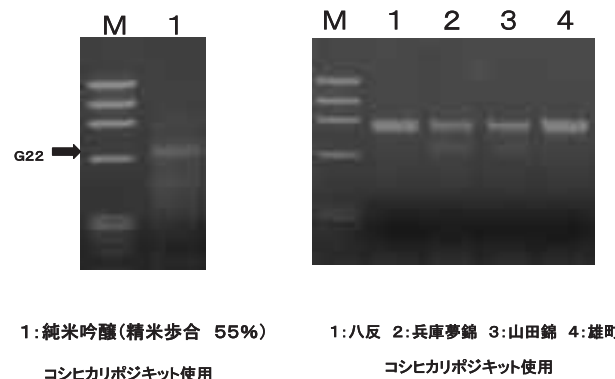


図 2. 3 種類のプライマーセット共存下での PCR の結果

(2) 葉緑体由来のプライマーの例

次に、葉緑体 DNA 由来の反復配列プライマーによる例を示す。3 種類の酒 (雄町、五百万石、山田錦) および麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を試料とし、(1) と同様にして鑄型 DNA を調製した。PCR 条件は、鑄型 DNA を 20ng 使用し、アニーリング温度を 38℃とし、葉緑体反復配列 (SSR) 由来のプライマーを各 0.8 μ l 使用した以外は (1) と同じ装置、方法で行った。結果を図 3 に示す。図 3 に示されるように、酒米から調製した鑄型 DNA

の場合は増幅 DNA バンドが 400bp 付近の低分子領域に明瞭に出現した。一方、麹菌から調製した鑄型 DNA の場合には、増幅 DNA バンドが全く出現しなかった。このことから、葉緑体 DNA の反復配列由来のプライマーは、醸造酒中に残存する麹菌の鑄型 DNA の影響を受けずに醸造酒原料米を判別するための PCR 用プライマーとしてきわめて有用であることが示された。

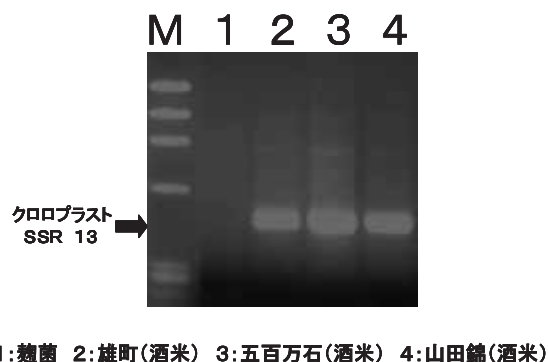
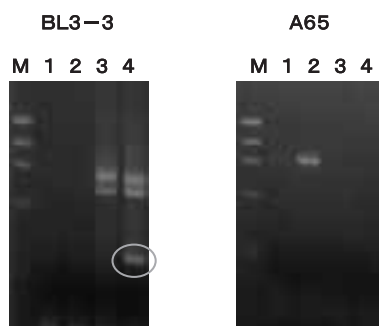


図 3. 葉緑体由来のプライマーによる PCR の結果

(3) いもち病抵抗性遺伝子関連プライマーによる PCR

筆者らが開発したいもち病抵抗性関連プライマー (中村ら, 2006) による PCR の例を図 4 に示す。酒造好適米である山田錦、八反、兵庫夢錦、雄町の原料米 (粳) を試料とし、前述の方法で DNA を抽出・精製して鑄型 DNA とし、米品種判別用のプライマーを共存させて PCR を行った。図 4 に示すように、稲のいもち病抵抗性遺伝子関連プライマーである BL3-3 および A65 をプライマーとして用いた場合に酒造好適米同士を識別することが可能であった。一方、酵母から抽出した鑄型 DNA の場合は、これらのプライマーによる増幅 DNA が出現しなかった。



1: 八反 2: 兵庫夢錦 3: 山田錦 4: 雄町

図 4. いもち病抵抗性関連遺伝子由来のプライマーによる判別例

(4) 「コシヒカリ 100% 使用」と表示された日本酒の判別例

次に、「コシヒカリ 100% 使用」と表示した酒の試験例を示す。もちろん、全国には数十の「コシヒカリ 100%」と表示した酒が製造販売されているので、今回の例は、それらのうちの表示

が違っていた数少ない例とお考えいただければ幸いである。当該試料から、前述の方法で鑄型 DNA を調製し、筆者らがコシヒカリ判別用に開発した 3 種類のプライマーを用いて PCR を行った。その結果、M11 および B43 では増幅 DNA バンドが出現したが、G22 では増幅バンドが出現しなかった (図 5)。別の実験において、G22 は日本酒が試料の場合でも DNA バンドの出現が認められることから、G22 バンドの出現しなかった当該酒の場合は、コシヒカリではない原料米を使用している可能性が高い (Ohtsubo et al, 2008)。

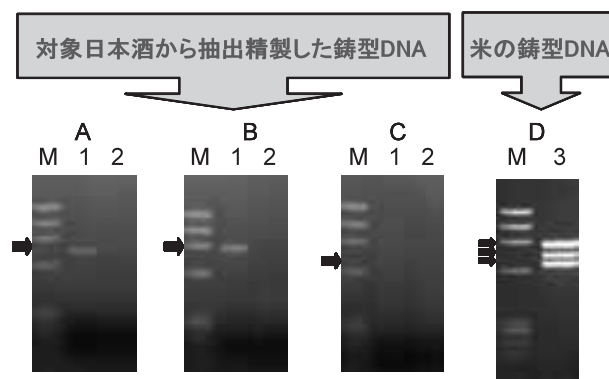


図 5. 「コシヒカリ 100%」表示の酒の判別例

M: DNA 分子量マーカー、1: CTAB 法で調製した鑄型 DNA による PCR 結果、2: 図 1 に示す方法で調製した鑄型 DNA による PCR 結果、3: コシヒカリ生米から CTAB 法で調製した鑄型 DNA による PCR 結果

A: プライマー B43 による PCR 結果

B: プライマー M11 による PCR 結果

C: プライマー G22 による PCR 結果

D: コシヒカリ判別キットによるコシヒカリ(生米)の PCR 結果

(5) 3 種類のプライマーによる酒米および日本酒の判別例

前述の方法によって清酒 10 製品から DNA を抽出し、米の品種判別および食味判別用に開発した STS 化マーカー (大坪ら, 2001) (中村ら, 2004a) (大坪ら, 2002) (中村ら, 2007) (中村ら, 2004b) 20 個およびいもち病真性抵抗性遺伝子由来のマーカー (中村ら, 2006) 5 個を用い、麹菌および酵母菌には識別バンドが出現せず、原料酒米および酒にのみ識別バンドが出現するマーカーを選抜した。この結果を図 6 の (A), (B) および (C) に示す。図 6 において、No. 1 は麹菌、No. 2 は酵母、No. 3 は山田錦 (酒米)、No. 4 は五百万石 (酒米)、No. 5 は雄町 (酒米)、No. 6 は美山錦 (酒米)、No. 7 は酒 A、No. 8 は酒 B、No. 9 は酒 C、No. 10 は酒 D を示す。

図 6 の (A) は品種判別用プライマー A7 を用い、麹菌、酵母菌、酒米および酒の各 DNA を 30ng/μl 使用して PCR を行ったもので、酒米の五百万石、雄町、美山錦と酒 D に識別バンドが出現した。この酒 D に出現した増幅バンドをクローニングした結果、酒米に増幅した塩基配列と全く同じ結果が得られ、酒の DNA が明らかに米由来のものであることが判明した。

図 6 の (B) は品種判別用プライマー B43 を用い、麹菌、酵母菌、酒米および酒の DNA を 30ng/μl 使用して PCR を行ったもので、酒米の山田錦、雄町と酒 A、酒 B、酒 C に識別バ

ンドが出現した。この酒 A、B、C に出現した増幅バンドをクローニングした結果、酒米に増幅した塩基配列と全く同じ結果が得られ、酒の DNA が明らかに米由来のものであることが判明した。

図 6 の (C) は、食味判別用に開発したデンプンの合成に関連する Branching enzyme と相同性の高い G4 マーカーを用いて PCR を行った結果、本来の分子量より大きい位置に美山錦と 2 種類の酒に識別バンドが出現したため、新たにこの増幅 DNA をクローニングし塩基配列を決定した。この開発したプライマー NG4 を用い、PCR を行った結果、酒米の美山錦と酒 A、C、D に識別バンドが出現した。以上の結果、清酒から抽出し PCR により増幅した DNA は、明らかに米由来のものであり、A7、B43 および NG4 の各プライマーは作付け上位品種の酒米（山田錦、五百万石、美山錦、雄町）を使用した醸造酒の原料米（掛米も同品種の場合）の判別に有望であることが確認された。

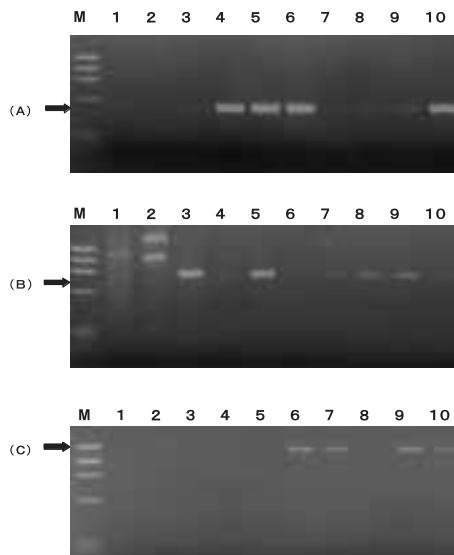


図 6. 3 種類のプライマーによる PCR の結果

M : DNA 分子量マーカー、1 : 麹菌、2 : 酵母、3 : 山田錦 (米)、4 : 五百万石 (米)、5 : 雄町 (米)、6 : 美山錦 (米)、7 : 市販日本酒 A、8 : 市販日本酒 B、9 : 市販日本酒 C、10 : 市販日本酒 D

A: プライマー A7 による PCR 結果
B: プライマー B43 による PCR 結果
C: プライマー NG4 による PCR 結果

表 1. PCR による酒造好適米の判別結果

試料米	プライマー		
	A7 520bps	B43 827bps	NG4 1320bps
麹菌	—	—	—
酵母	—	—	—
山田錦	—	+	—
五百万石	+	—	—
雄町	+	+	—
美山錦	+	—	+

(6) 酒造好適米の相互識別例

酒造好適米である山田錦、五百万石、雄町、美山錦を試料とし、前述の (1) と同じ方法で DNA を抽出・精製して鋳型 DNA とし、3 種類の米品種判別用のプライマー (A7、B43、NG4) を共存させて PCR を行った。その結果を表 1 に示す。表 1 より、主要な酒米 4 品種の相互識別の可能性が示された。

7. ワインから抽出した DNA の検定

ワインの原料のブドウの品種はヨーロッパ種で、学名は *Vitis vinifera* と言われている。ブドウの品種判別は、Kim ら (Kim et al, 2002) および Jung ら (Jung et al, 2004) により報告されている。また、Garcia ら (Garcia-Beneytez, 2002) がマイクロサテライトマーカーを用い、ワインからの品種判別の可能性を示しているが、抽出方法や幾つかのマーカーの使用に問題点を残している。

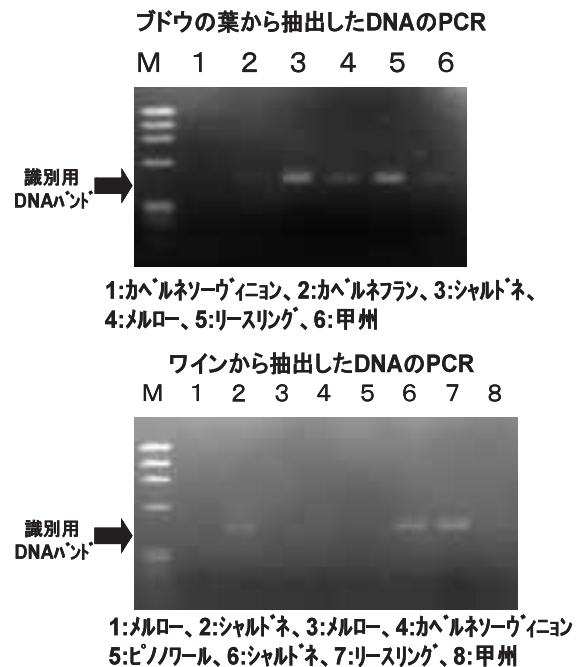


図 7. 各種のブドウの葉及び市販ワインから調製した DNA による PCR 結果

前述の方法を用いて抽出した赤ワインおよび白ワインの DNA を鋳型とし、Islas-Osuna ら (Islas-Osuna, 2006) の報告したブドウのミトコンドリアチトクローム b 遺伝子の塩基配列より設計したプライマー GM を用い、PCR を行った結果を図 7 に示す。ワインに出現した増幅 DNA バンドをクローニングし、塩基配列を決定した結果、Islas-Osuna ら (Islas-Osuna, 2006) の報告したブドウのミトコンドリアチトクローム b 遺伝子の塩基配列とほぼ一致した。この結果、ワインから抽出して PCR により増幅した DNA は、明らかに酵母等の微生物由来のものでなく、原料のブドウ由来のものであることが確認された。同様に、図 8 には、約 1kbp の増幅 DNA が得られ、ブドウの葉および市販ワインから抽出した DNA を鋳型として増幅した DNA の塩基配列が一致していることを示している。

一方、図 9 は、増幅 DNA の塩基配列を確認しないと結果の判断を誤る可能性のあることを示す例である。ブドウの葉 (A)

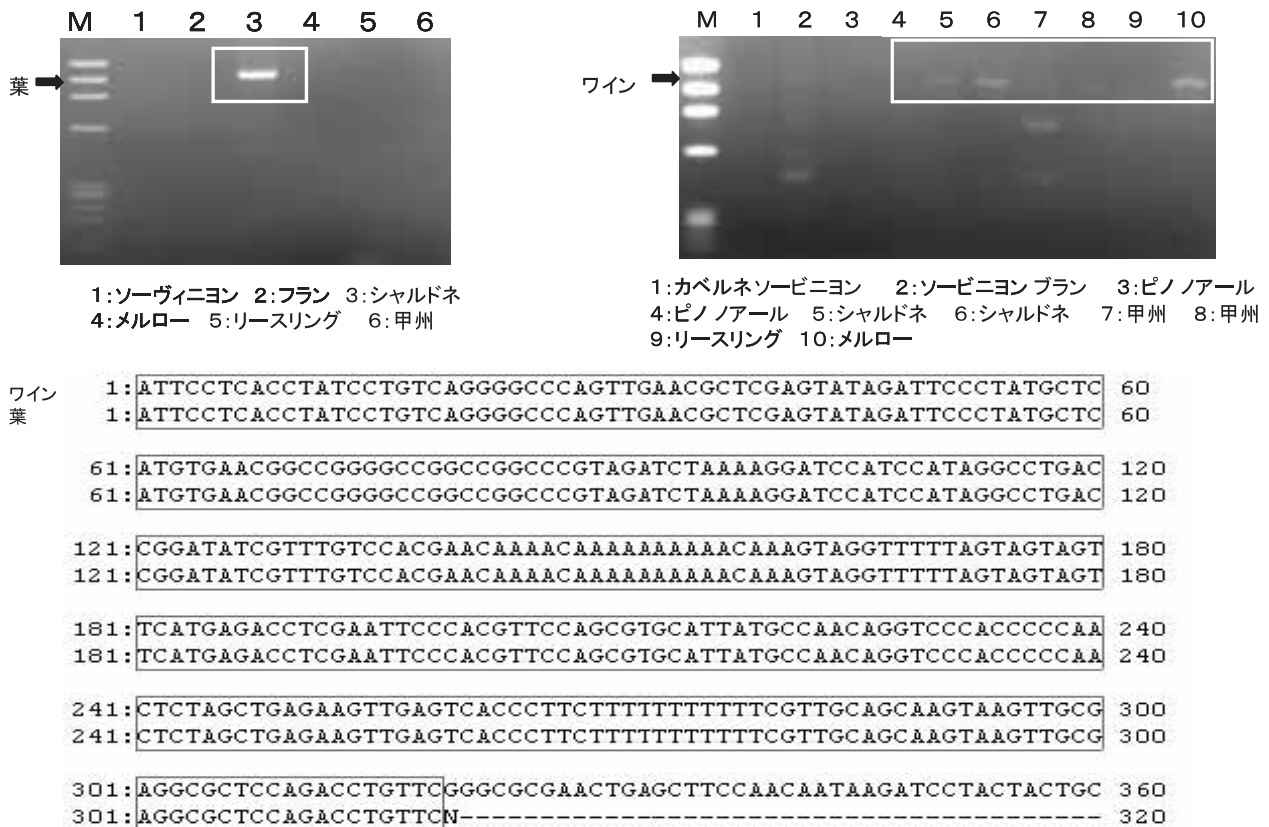


図 8. 各種のブドウの葉及びワインから調製した DNA による P C R の結果及び増幅 DNA バンドの塩基配列の比較

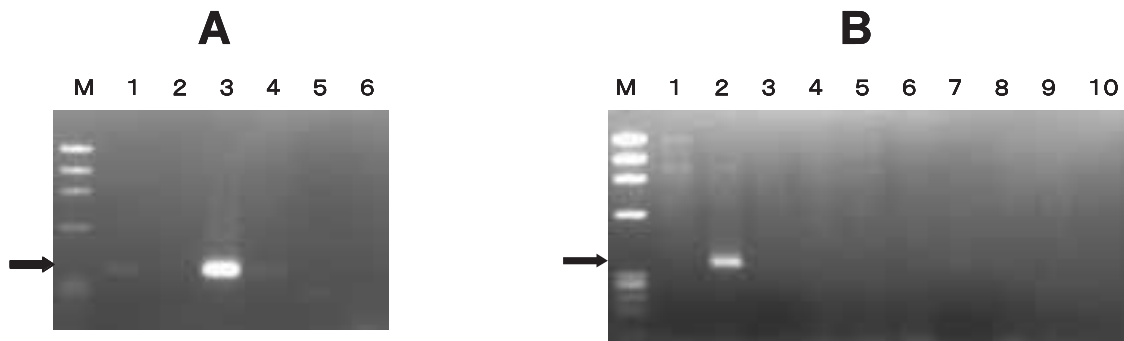


図 9. 各種のブドウの葉及びワインから調製した DNA による P C R の結果(増幅 DNA の分子量は近いが塩基配列が異なっていた例)

及びワイン (B) からそれぞれ抽出して P C R を行った結果、分子量の近い増幅 DNA が得られた。しかし、それぞれの DNA をクローニングして塩基配列を決定した結果、プライマー近傍のみの配列が一致し、その他の配列は異なっていた。ホモロジー検索の結果、ワインから増幅した DNA は、ブドウ由来の物ではなく、微生物由来の DNA であることがわかった。このようなプライマーは、原料植物の判別用を使用することができない。

次いで、世界各国のシャルドネ 8 種類について、共通的な DNA バンドが出現するプライマーを開発した (Nakamura et

al. 2007) (図 10)。図 A は各種のブドウの葉から抽出した DNA、図 B は各種の市販ワインから抽出した DNA、図 C は各種の市販ワイン (8 種類のシャルドネ) から増幅した DNA を P C R 用鋳型として使用した。図 A、B および C より、開発したプライマーはシャルドネ特有であり、クローニングして決定した塩基配列は、シャルドネの葉から抽出した鋳型 DNA による増幅 DNA と一致した。

今後、醸造研究機関と協力して、ワイン原料ブドウの判別用プライマーを増やしていきたいと考えている。

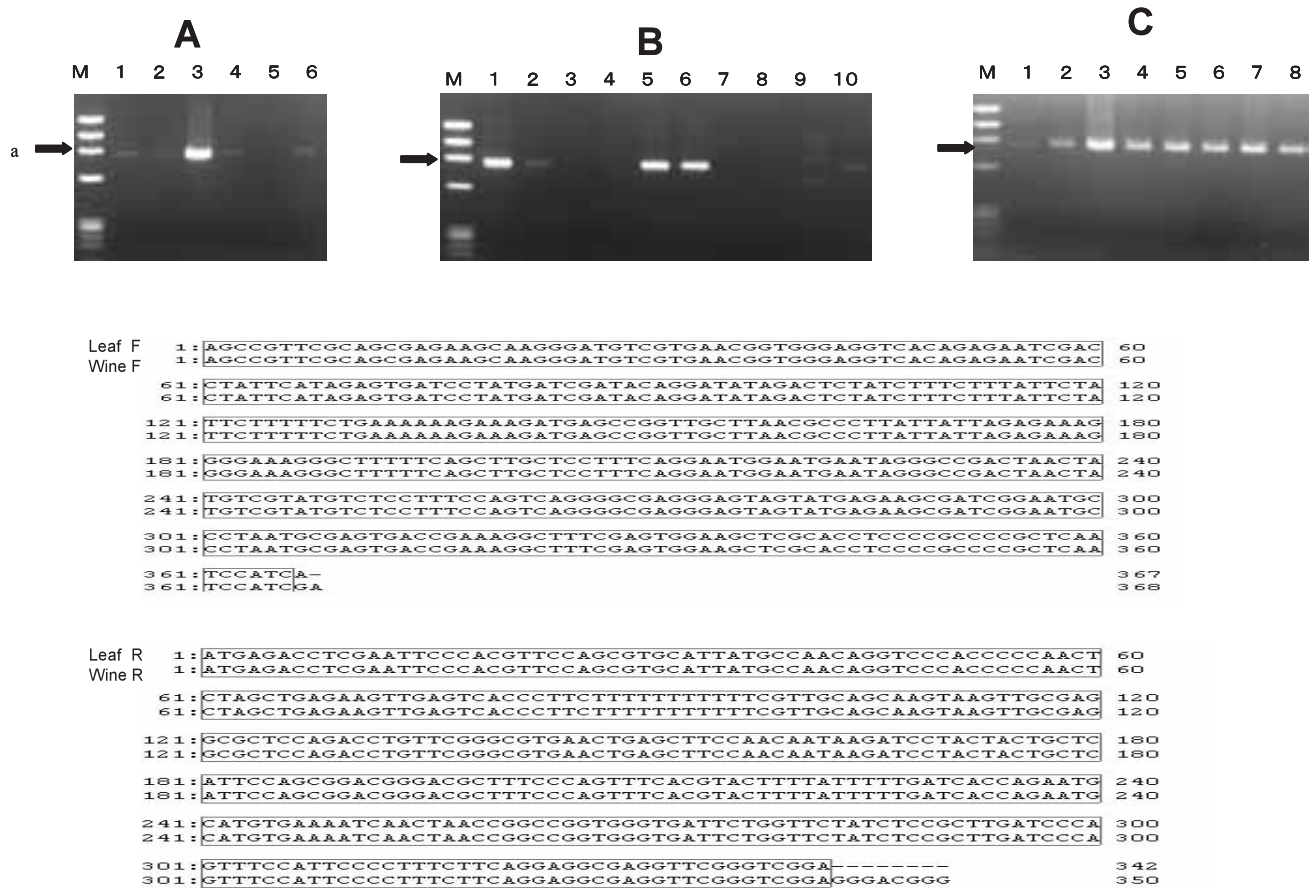


図10. シャルドネ特有のプライマーによるPCRの結果及び増幅DNAの塩基配列の比較

A: ブドウの葉から調製した鋳型DNAによるPCR結果

B: 各種のワインから調製した鋳型DNAによるPCR結果

C: 8種類の市販シャルドネワインから調製した鋳型DNAによるPCR結果

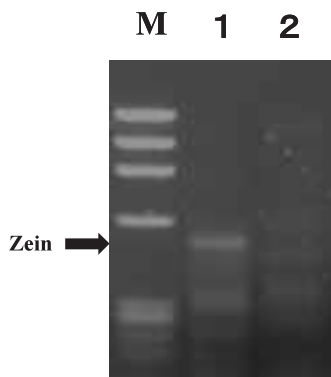


図11. 市販の2種類のビールから調製した鋳型DNAによるPCR結果

M: DNA分子量マーカー

1: 市販ビールA

2: 市販ビールB (麦芽100%と表示)

8. ビールへの適用例

市販のビール（ビール A）および麦芽 100%のビール（ビール B）を凍結乾燥し、6.（1）と同様の方法でPCRの鋳型DNAを調製し、トウモロコシの主要タンパク質であるゼインの遺伝子由来のプライマー共存下でPCRを行い、電気泳動によって、増幅DNAの比較を行った。その結果を図11に示す。

図11に示すように、ビールAでは、ゼイン由来のDNAの増幅が認められたが、麦芽100%のビールBではゼイン遺伝子の増幅は認められなかった。これはそれぞれのビールの原料表示と一致する結果であった。

9. まとめ

発酵食品は、発酵過程におけるDNAの分解及び発酵微生物のDNAの混在のため、原料植物のDNA品種検定は困難とされていたが、醸造酒（清酒、ワイン、ビール）における抽出方法（各種醸造酒を凍結乾燥し、粉末試料としてから酵素処理し、回収した沈殿から70%エタノールを用いDNAを溶出させると同時に、色素成分を除去し、CTABあるいはフェノールを用いて抽出液中の多糖類およびタンパク質を除去し、その精製した抽出液にエタノールを加え、DNAを沈殿として回収する）

を開発し、増幅した各醸造酒からの DNA の塩基配列を決定した結果、各原料植物に由来するものであることが確認された。

酒米の作付け面積の 7 割を占める山田錦、五百万石、美山錦および雄町を原料酒米とする清酒において、麹菌、酵母には出現せず、原料酒米同士の品種判別に有望なプライマーを開発した。

本研究により、日本酒、ワイン、ビール等の醸造酒の試料のみからその原料植物の種類を判別することが可能となり、表示と内容物原料の異同を科学的に判定することが可能となる。また、醸造酒を試料とし、その原料植物の品種が判別されるため、醸造酒の原料表示の偽装が防止される。さらに、醸造酒の酒質と原料植物との関係が明確になり、良質の原料植物を選定することにより、酒質の向上が可能となる。

また、本研究により、醸造原料植物と醸造酒の酒質との関係が明らかになる可能性が高いので、稲やブドウ等の育種関係の試験研究分野や生産農家及びその団体等において、長期間にわたって醸造酒の品質向上を目的として産業的に利用される可能性がきわめて高い。さらに、本技術は、酒造企業にとっても、原料植物の品種特性と酒質との関係を示す指標を得る手段となるので、原料の選定や他社製品の原料調査、消費者の嗜好と醸造原料との関係の把握などに活用することが可能であり、本技術の実用面の利点が大きいため、産業的に利用される可能性がきわめて高い。

本技術は、酒を試料とする原料米の判別に関する基礎技術であり、今後、醸造や酒米の専門研究機関と共同で、酒米の多型や本技術の適用性について検討する必要がある。また、本技術は、ビールやワイン等の日本酒以外の醸造酒の原料植物の判別にも適用できる可能性がある。ここで示した実験例は、表示と内容が異なっていた一部の例であり、全国の大部分の蔵元や酒造企業では、表示通りの適正な原料米を使用していることに留意する必要がある。また、他の手法とも共同し、輸入酒の判別にも適用できる可能性がある。

本研究の一部は、食品総合プロジェクト「米加工品における品種・産地判別」の中で実施された。本研究の遂行に当たり、試料の入手にご尽力いただきました秋田県総合食品研究所の高橋 仁主任研究員、作物研究所の安東郁男チーム長、果樹研究所の三谷宣仁主任研究員、原料の明らかな日本酒とワインを提供いただきました、本田商店、駿河屋酒店および藪口酒店に感謝申し上げます。

10. 文献

東 和男, 「発酵と醸造 II」, 光琳, pp. 1-36, 227-274, 275-293 (2003).

Garcia-Beneytez Eva, V. Moreno-Arribas Maria, Borrego Joaquin, C. Polo Maria, and Ibanez Javier., Application of a DNA analysis method for the cultivar identification of grape musts and experimental and commercial wines of *Vitis vinifera* L. using microsatellite markers, *J. Agric.*

Food Chem. **50**, 6090-6096 (2002).

Islas-Osuna, M.A., Silva-Moreno, B., Caceres-carrizosa, N., Garcia-Robles, J.M., Sotelo-Mundo, R.R., Yepiz-Plascencia, G.M., Editing of the grapevine mitochondrial cytochrome b mRNA and molecular modeling of the protein, *Biochimie*, **88**, 431-435 (2006).

Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars, *Theor Appl Genet.*, **109**, 1448-1458 (2004).

大坪研一, 中村澄子, 奥座宏一, 宍戸功一, 餅を試料とする原料米の DNA 品種判別, 食科工, **48**, 306-310 (2001).

大坪研一, 中村澄子, 今村太郎, 米の PCR 品種判別によるコシヒカリ用判別プライマーセットの開発, 農化, **76**, 4, 388-397 (2002).

Ohtsubo, K., Suzuki, K., Haraguchi, K., Nakamura, S., Novel method for preparation of the template DNA and selection of primers to differentiate the material rice cultivars of rice wine by PCR, *J. Biochem, Biophys. Methods*, **70**, 1020-1028 (2008).

中村澄子, 鈴木啓太郎, 原口和朋, 奥座宏一, 奥西智哉, 松井崇晃, 石崎和彦, 吉井洋一, 大坪研一, 加工品における糯米の品種判別および異種穀類の混入検出技術の開発, 農化, **78**, 10, 984-993 (2004b).

中村澄子, 鈴木啓太郎, 原口和朋, 大坪研一, PCR 法による清酒の原料米品種の識別技術, 食科工, **54**, 233-236 (2007).

中村澄子, 岡留博司, 奥座宏一, 原口和朋, 奥西智哉, 鈴木啓太郎, 佐藤 光, 大坪研一, PCR 法による世界の広範囲な特性の米の識別および食味要因の探索, 農化, **78**, 8, 764-779 (2004a).

中村澄子, 鈴木啓太郎, 伴 義之, 西川恒夫, 徳永國男, いもち病抵抗性に関する同質遺伝子系統「コシヒカリ新潟 BL」の DNA マーカーによる品種判別, 育種学研究, **8**, 79-87 (2006).

Nakamura, S., Haraguchi, K., Mitani, N., Ohtsubo, K., Novel preparation method of template DNAs from wine for PCR to differentiate grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 10388-10395 (2007).

Nishikawa, T., Vaughan, D.A., Kadowaki, K., Phylogenetic analysis of *Oryza* species, based on simple sequence repeats and their flanking nucleotide sequences from the mitochondrial and chloroplast genomes, *Theor. Appl. Genet.*, **110**, 696-705 (2005).

Kim, S-H, Jeong, J-H, Kim, S-K, Paek, K-Y, Parentage identification of 'Daebong' Grape (*Vitis* spp.) using RAPD analysis, *Plant Biotechnology*, **4**, 67-70 (2002).

Authentication method for material plant of brewed beverages by PCR

Ken'ichi OHTSUBO^{1*}, Sumiko NAKAMURA², and Kazutomo HARAGUCHI²

(Received July 20, 2008)

Summary

As cultivar identification methods on DNA analysis have been developed, it is hard to apply them to the processed products from which DNA preparation is difficult. Especially, it has been impossible to authenticate the material rice cultivars of rice wine because of the decomposition of DNAs during the fermentation, co-existence of DNAs from the microorganisms, and contamination of the PCR inhibitors. It became possible to identify the material rice cultivars by PCR because we developed the method to extract and purify only the rice-derived DNAs, as the template for PCR, from rice wine, sake. It is possible to apply this method to the cultivar identification of grape vine for the wine brewery.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 61(1):1-9, 2008

Key words : rice, rice wine, cultivar identification, PCR, DNA

¹Faculty of Agriculture, Niigata University

²National Food Research Institute

*Corresponding author: ohtsubok@agr.niigata-u.ac.jp