

バラの香気生成機構に関する生物有機化学的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岡, 憲明 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2535

氏 名 (国 籍)	岡 憲 明 (三 重 県)
学 位 の 種 類	博士 (農 学)
学 位 記 番 号	農博甲第 1 9 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 2 年 3 月 1 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	バラの香気生成機構に関する生物有機化学的研究
審 査 委 員	主査 静岡大学 教授 渡 邊 修 治 副査 静岡大学 教授 衛 藤 英 男 副査 信州大学 助教授 廣 田 満 副査 岐阜大学 教授 木 曾 眞 副査 静岡大学 教授 碓 水 泰 市

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究は重要な香料植物であるバラのアルコール系香気の生成機構の全容の解明を目指して、香気前駆体の解明、植物体の各部位や品種、蕾の成熟ステージにおける香気や香気前駆体、加水分解酵素の変化を調べ、花卉細胞内液胞への香気前駆体の蓄積や、液胞内外における加水分解酵素、配糖化酵素の役割について検討した結果について論述されたものである。

まず、香料採取用の品種「ブルガリアンローズ (*Rosa damascena* var. *bulgaria*)」の水蒸気蒸留後に蒸留装置に残留する滯留水を用い、本研究室で考案した粗酵素試験法により加水分解された香気をGCおよびGC-MS分析し、得られたデータを指標に下記の香気配糖体を単離・精製した。滯留水をAmberlite XAD-2およびODSカラムクロマトグラフィーにより精製し、得られた画分をHPLCおよびrecycle HPLCによりさらに精製・分離し、花からでははじめてgeraniolとcitronellolの二糖配糖体を4種類単離し、構造決定した。

次に、バラの葉や茎等は、花や蕾と同様に香気配糖体を蓄積するのか、これらの部位では加水分解酵素活性はどう異なるのか、また芳香を発する品種と芳香の無い品種との違いについて、芳香のある「ブルガリアンローズ」と芳香を持たない「リトルマーベル (Little marvel)」の2品種を用い、比較検討した。香気配糖体は両品種各部位にて見られたが、芳香のあるブルガリアンローズ種の花と成熟した蕾で多く見られた。一方、加水分解酵素活性は、 β -galactosidase活性は両品種各部位で高かったのに対し、 β -glucosidase活性は香気配糖体の多く含まれているブルガリアンローズ種の花と成熟した蕾で高い活性を示した。このことから、香気前駆体は蕾から花への成熟過程で生合成され、活性の高まる加水分解酵素、特に β -glucosidaseにより切断され、香りが出てくることが示唆された。

さらに、蕾から花への成熟の課程で、発散している香気量、花卉中にフリー

(aglyconeの状態)で存在する香気量、香気前駆体量、および加水分解酵素活性の変化について、「ブルガリアンローズ」種を用いて調べた。発散している香気は、ちょうど開花する時間(ステージ4後半～ステージ5)に発散する香気量は最大になった。また、経時的に香気成分に変化が見られ、ステージ4後半～ステージ5前半ではcitronellol量が多いのに対し、ステージ6の前半になると2-phenylethanolの量が多くなった。Geraniol, citronellol等のmonoterpene類は、フリーの香気量も香気配糖体量も、ステージ4において最高であった。ステージ4における香気配糖体量はフリーの香気量の1/4と極めて低レベルであった。一方、2-phenylethanolの香気前駆体量はステージ4において最大となりその後減少したが、フリーの香気量はステージを追う毎に増加を続けた。また、加水分解酵素活性は、ステージを追う毎に上昇したが、ちょうど開花期のステージ4と5の間に劇的な上昇が見られた。特に、 β -glucosidase活性が著しかった。以上より、geraniol等のmonoterpeneは、開花期花において生合成され、配糖体へ変換されずに直接発散するのに対し、2-phenylethanolは開花前に蕾で配糖化され蓄積し、開花期に加水分解酵素、特に β -glucosidaseにより分解され、発散することが示唆された。

そこで、開花前後に花卉細胞に蓄積されるであろう2-phenylethanolの配糖体に興味を持ち、花卉細胞内での局在、すなわち液胞内外での2-phenylethanol配糖体量、液胞内外における配糖化酵素(glycosyltransferase)および加水分解酵素(主に β -glucosidase)の活性について、芳香のある園芸品種「芳純(Rosa centifolia cv. Hojun)」種を用いて比較検討した。芳純の花弁の表皮を剥ぎ、常法によりプロトプラストを調製し、低張液を加えて細胞膜を破壊し、Ficollの密度勾配で精製したところ、インタクトな液胞はFicoll 2%と10%および10%と20%の境界の層に得られた。液胞画分より2-phenylethanolの配糖体を得られた。液胞に局在していると言われている α -mannosidase活性を指標に、プロトプラストと液胞の回収率を求め、液胞画分に含まれる2-phenylethanolの配糖体量と回収率を考慮に入れて換算すると、2-phenylethanol配糖体のほぼ全量が液胞内に蓄積されていたことになる。

2-Phenylethanol β -D-glucopyranosideに対する β -glucosidase活性の局在を調べる目的で、花卉、ローズヒップ部分(萼、子房等花卉以外の花の部分)、および花卉より単離したプロトプラスト、液胞内液、液胞膜を用いて粗酵素画分を調製し、各粗酵素液の β -glucosidase活性を測定したところ、単位重量当たりの活性の比率は花卉で9.8、ローズヒップ部分では5.6であった。また、プロトプラスト、液胞内液、液胞膜の活性の比率は8.4、9.5、2.0であった。液胞内液の活性は液胞膜の5倍近くあり、プロトプラストよりも高く、花卉細胞全体での活性とほぼ同じであった。これらのことから、細胞内での配糖体の加水分解には液胞内液に含まれる β -glucosidaseの寄与が大きいことが示唆された。

2-Phenylethanol β -D-glucopyranosideに対するglucosyltransferaseの分布を調べる目的で、花卉、ローズヒップ部分を用いて粗酵素画分を調製し、各粗酵素液のglucosyltransferase活性を測定した。単位重量当たり、花卉:ローズヒップ=3.1:0.041で、ほとんどの活性が花卉に認められた。2-Phenylethanolへの糖転移反応はローズヒップ部分よりも花卉細胞で行われていることが示唆された。また予備試験で、花卉細胞のプロトプラストと液胞内液、液胞膜の単位重さ当たりでのglucosyltransferase活性を測定したが、活性はほとんど見られなかった(データ未発表)。すなわち、2-phenylethanolへの糖転移反応はプロトプラスト(細胞質、シンプラスト)内で行われているとは考えにくく、細胞壁や細胞間隙等のアポプラストで行われていることが示唆された。

本研究の結果より、バラの蕾の成熟から開花時期においての、アルコール系香気の生成

メカニズムを推定した。まず、蕾の時期（ステージ1～3）には細胞間隙の glucosyltransferaseが活性化し、主として2-phenylethanolを配糖化し、液胞内に蓄積させる。開花期（ステージ4～5の前半）になると、geranyl pyrophosphateから細胞膜結合型のphosphataseにより変換を受けmonoterpene類は、細胞間隙を通り、表皮細胞より発散する。一方、2-phenylethanolの一部は液胞内の配糖体より、同じ液胞内の β -glucosidaseにより分解され、液胞膜、細胞膜を透過し、細胞間隙を通り、表皮細胞より発散する。開花後になると、主として2-phenylethanolが液胞内の配糖体より分解され発散する一方で、2-phenylethanolおよびmonoterpeneの一部は細胞間隙等のアポプラストで二糖配糖体に変換され、アポプラストに蓄積、あるいはアポトーシスに対する警報物質として他の部位へ運ばれると考えられる。上記の仮説を実証すべく今後さらなる研究の深化と発展が望まれる。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は重要な香料植物であるバラのアルコール系香気の生成機構の全容の解明を目的に、香気前駆体の解明、植物体の各部位や品種、蕾の成熟ステージにおける香気や香気前駆体、加水分解酵素の変化を調べ、花卉細胞液胞への香気前駆体の蓄積や、液胞内外における加水分解酵素、配糖化酵素の役割について検討したものである。

香料採取用の品種「ブルガリアンローズ (*Rosa damascena* var. *bulgaria*)」の水蒸気蒸留後に蒸留装置に残留する滯留水を用い、粗酵素試験法により加水分解された香気をGCおよびGC-MS分析し、得られたデータを指標に香気配糖体を単離・精製した。滯留水をAmberite XAD-2およびODSカラムクロマトグラフィーにより精製し、得られた画分をHPLCおよびrecycle HPLCによりさらに精製・分離し、花からでははじめてgeraniolとcitronellolの二糖配糖体を単離した。

芳香のある「ブルガリアンローズ」と芳香を持たない「リトルマーベル (Little marvel)」の2品種を用い、品種間差と部位間差を比較検討した。香気配糖体は両品種各部位にて見られたが、芳香のあるブルガリアンローズ種の花と成熟した蕾で多く見られた。加水分解酵素活性は、 β -galactosidase活性は両品種各部位で高かったのに対し、 β -glucosidase活性は香気配糖体の多く含まれているブルガリアンローズ種の花と成熟した蕾で高い活性を示した。このことから、香気前駆体は蕾から花への成熟過程で生合成され、活性の高まる加水分解酵素、特に β -glucosidaseにより切断され、香りが出てくることが示唆された。

蕾から花への成熟の過程で、発散している香気量、花卉中にフリーで存在する香気量、香気前駆体量、および加水分解酵素活性の変化について検討した。発散している香気は、ちょうど開花する時間（ステージ4後半～ステージ5）に発散する香気量は最大になり、ステージ4後半～ステージ5前半ではcitronellol量が多いのに対し、ステージ6の前半になると2-phenylethanolの量が多くなった。Monoterpene類は、フリーの香気量も香気配糖体量も、ステージ4で最高であった。ステージ4における香気配糖体量はフリーの香気量の1/4と極めて低レベルであった。一方、2-phenylethanolの香気前駆体量はステージ4において最大となりその後減少したが、フリーの香気量はステージを追う毎に増加を続けた。また、加水分解酵素活性は、ステージを追う毎に上昇したが、ちょうど開花期のステージ4と5の間に劇的な上昇が見られた。特に、 β -glucosidase活性が著しかった。以上より、geraniol等の

monoterpeneは、開花期花において生合成され、配糖体へ変換されずに直接発散するのに対し、2-phenylethanolは開花前に蕾で配糖化され蓄積し、開花期に加水分解酵素、特に β -glucosidaseにより分解され、発散することが示唆された。

液胞内外での2-phenylethanol配糖体、液胞内外におけるglycosyltransferaseおよび β -glucosidaseの活性について、芳香のある園芸品種「芳純 (*Rosa centifolia* cv. Hojun)」種を用いて比較検討した。その結果、細胞内のほぼ全量の2-phenylethanol配糖体が液胞内に蓄積されていたことになる。

花卉の β -glucosidase活性はローズヒップ部分の約1.6倍であり、花卉のプロトプラスト、液胞内液、液胞膜では、それぞれ1:1:0.2であった。液胞内液の活性は液胞膜の5倍近くあり、プロトプラストよりも高く、花卉細胞全体での活性とほぼ同じであった。細胞内での配糖体の加水分解には液胞内液に含まれる β -glucosidaseの寄与が大きいことが示唆された。

花卉のglucosyltransferase活性はローズヒップ部分の約100倍あった。2-Phenylethanolへの糖転移反応は花卉細胞で行われていることが示唆された。また予備試験において、花卉細胞のプロトプラストと液胞内液、液胞膜のglucosyltransferase活性を測定したが、活性はほとんど見られなかった（データ未発表）。すなわち、2-phenylethanolへの糖転移反応はアポプラストで行われていることが示唆された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文：

1. Natural Product Letters 10, 187-192 (1997) First isolation of geranyl disaccharide glycosides as aroma precursors from rose flower.
2. Phytochemistry 47, 1527-1529 (1998) Citronellyl disaccharide glycoside as an aroma precursor from rose flowers.
3. Zeitschrift fur Naturforschung 54c, 889-895 (1999) Aroma evolution during flower opening in *Rosa damascena* Mill.