

氏 名 (本 国 籍)	渡 邊 修 造 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 267 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 3 月 13 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	バラの主要香気成分 2-phenylethanol の生成、発散 機構に関する生物有機化学的研究
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 渡 邊 修 治 副査 静岡大学 助教授 轟 泰 司 副査 信州大学 助教授 廣 田 満 副査 岐阜大学 教授 木 曾 眞

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主要香気成分である 2-phenylethanol (2) の生成、発散機構の解明を目的とし、2 の配糖体の単離およびその存在意義の解明、開花時における加水分解酵素の香気生成への寄与、2 の生合成経路の解明、2 の配糖体および加水分解酵素の花弁細胞内の局在性、さらに、香気が発散と光周期との関連性について検討した。

ブルガリアンローズ (*Rosa damascena* Mill.) の 70% MeOH 抽出物から今回初めて 2 の二糖配糖体である 2-phenylethyl α -L-arabinofuranosyl- β -D-glucopyranoside (7) および 2-phenylethyl β -D-xylopyranosyl- β -D-glucopyranoside (8) を単離した。続いて、7 および 8 の存在意義を解明するために開花に伴うそれらの量的変動について 2 および 2-phenylethyl β -D-glucopyranoside (3) と共に比較検討した。開化に伴い 3 が減少するのに対し、二糖配糖体 7 および 8 は 2 と共に増加した。この結果から、二糖配糖体である 7 および 8 は 2 の直接的な香気前駆体ではないという結論に至った。

芳純 (*Rosa* 'Hoh-Jun') の花において実際に 3 が加水分解されることで 2 が生成するかどうかを明らかにするために、重水素標識化した $[1\text{-}^2\text{H}_1]2\text{-phenylethyl } \beta\text{-D-glucopyranoside}$ ($[1\text{-}^2\text{H}_1]\text{-3}$) を合成し、これを芳純の花に吸収させ、 $[1\text{-}^2\text{H}_1]\text{-3}$ が加水分解され重水素標識された $[1\text{-}^2\text{H}_1]2\text{-phenylethanol}$ ($[1\text{-}^2\text{H}_1]\text{-2}$) が生成、発散されるかどうかを検証した。4 日間 $[1\text{-}^2\text{H}_1]\text{-3}$ を吸収させた後に、発散される香気を SPME で、花弁に蓄積している香気画分を pentane で抽出しそれぞれ GC-MS 分析に供した結果、双方に約 10% の $[1\text{-}^2\text{H}_1]\text{-2}$ が検出された。この結果から、芳純の花の開花前後 4 日間において $[1\text{-}^2\text{H}_1]\text{-3}$ は

加水分解され $[1\text{-}^2\text{H}_1]\text{-2}$ を生成し、さらに発散されることが明らかになった。このことから 3 が香気前駆体としての役割を果たしている可能性が強く示唆された。

2-Phenylethanol (2) の生成における β -glucosidase の役割を検討する目的で、 β -glucosidase の特異的阻害剤である β -glucosylamidine をブルガリアンローズに吸収させ、2 および 3 の量的変動を検証することにより 3 が β -glucosidase の作用によって 2 へと変換されるかどうかを検証した。その結果、花卉に蓄積されている配糖体量は、ブランクでは開花後約 1/6 量まで急激に減少したのに対し、 β -glucosylamidine を取り込ませた花では、逆に開花後に配糖体の増加が認められた。一方、花卉に蓄積されている 2 の量は、開花後ブランクで徐々に増えているのに対して、 β -glucosylamidine を取り込ませた花ではほぼ同じ値を示した。 β -Glucosylamidine は β -glucosidase の特異的阻害剤であることから、少なくとも花卉に蓄積されている 2 の生成には、 β -glucosidase が関与していることが強く示唆された。

2-Phenylethanol (2) はその構造から L-phenylalanine (1) を出発物質とし、フェニルプロパノイド系生合成経路により生成されることが予測された。そこで $[^2\text{H}_8]\text{L-phenylalanine}$ ($[^2\text{H}_8]\text{-1}$) をブルガリアンローズおよび芳純の花に数日間吸収させた後、花卉から香気画分および配糖体画分を抽出した。香気画分はそのまま、配糖体画分は酵素による加水分解処理後、GC-MS 分析に供した。その結果、双方の花から抽出した全ての画分において重水素標識された 2 を検出した。また、その MS のイオンピークを検証した結果、あらかじめ生成が予想された 8 個重水素標識された $[1,2,2,4,5,6,7,8\text{-}^2\text{H}_8]\text{-2-phenylethanol}$ (2a)、7 個重水素標識された $[2,2,4,5,6,7,8\text{-}^2\text{H}_7]\text{-2-phenylethanol}$ (2b)、 $[1,2,4,5,6,7,8\text{-}^2\text{H}_7]\text{-2-phenylethanol}$ (2c)、および 6 個重水素標識された $[2,4,5,6,7,8\text{-}^2\text{H}_6]\text{-2-phenylethanol}$ (2d) が混合していることが明らかとなった。4 種類の重水素標識された 2a ~ 2d のうち最も生成量の多かったのは 2b であり、これは phenylpyruvic acid (5) を経て生合成されると想定されることから、主要な経路は 5 を介した経路であることが示唆された。芳純およびブルガリアンローズの双方において、香気画分と配糖体画分中の重水素標識された 2 の生成量の比率や MS のイオンピークパターンに相違がほとんど見られなかった。ここで、 $[^2\text{H}_8]\text{-1}$ の重水素 8 個が全て保持された 2a が、香気画分のみならず配糖体のアグリコン部分でも確認されたため、2 は phenylethylamine (4) を経て生成された後、2 を経て 3 へと変換されることが明らかとなった。3 の生成経路としては、そのような 2 が配糖体化されることにより生じる経路のほか、phenyllactic acid から 2 を介さずに生成される経路が考えられた。先に述べたように 2a が配糖体のアグリコン部分に確認されたことにより 2 を経て 3 が生成される経路の存在は確認できたが、その量は非常に少量であり、さらに花卉中では平衡化反応が起こっていることが推測されることから、たとえ香気画分と配糖体画分中の重水素標識された 2 の MS のイオンピークパターンが同じであったとは言え、最終的には phenyllactic acid から 2 を介さずに生成される経路の存在を否定するには至らなかった。

続いてバラ花卉細胞における 3 およびその加水分解酵素である β -D-glucosidase の局在を調べることを目的として、疎水性溶媒を用いた密度勾配細胞分画法により芳純の花弁細胞を分画した。得られた Fr. 1 ~ 7 を、細胞質 (NAD-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)、液胞 (α -mannosidase) およびアポプラスト (cellulase) のマーカー酵素で各

画分の分布を調べた結果、液胞は中密度画分に、細胞質は低密度画分に、アポプラストは全画分にほぼ均一に検出された。続いて 3 および β -D-glucosidase の定量を行なった結果、 β -D-glucosidase はアポプラスト画分の分布パターンとほぼ一致した。しかし中密度画分が少し高かったことから、液胞にも少量であるが分布していると考えられた。また 3 は液胞画分の分布パターンとほぼ一致した。この結果から、 β -D-glucosidase は主にアポプラスト画分に、3 は主に液胞画分に存在していることが強く示唆された。

ブルガリアンローズの近隣種である *Rosa damascena bifera* をやや低温の恒温条件下 (15°C) で開花させることにより開花現象自体が非常に緩やかになり、また香気の発散パターンも明確な昼夜リズムを示すようになった。さらにこの現象は連続暗期下でも確認され、香気の発散とサーカディアンリズムとの関連が示唆された。また、 β -glucosidase の特異的阻害剤である β -glucosylamidine を *Rosa damascena bifera* に取り込ませた結果、香気の発散リズムが消失したことから香気の発散リズムと β -glucosidase との関連性が示唆された。また、 $[1,1,2,4,5,6,7,8, -^2\text{H}_8]$ -2-phenylethanol ($[^2\text{H}_8]$ -2) を *Rosa damascena bifera* に吸収させ、その発散および花弁中での配糖体への変化量について検討した結果、2 は明期に発散され、暗期では配糖化されること、また再び明期になると配糖体は分解されることが確認された。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は重要な香料植物であるバラの主要香気成分 2-phenylethanol (2) の生成、発散機構の解明を目的とし、2 の二糖配糖体の単離およびその存在意義の解明、開花時における加水分解酵素の香気生成への寄与、2 の生合成経路の解明、2 の配糖体および加水分解酵素の花弁細胞内の局在性、さらに香気の発散と光周期との関連性について検討したものである。

ブルガリアンローズ (*Rosa damascena* Mill.) から 2 の二糖配糖体である 2-phenylethyl α -L-arabinofuranosyl- β -D-glucopyranoside (7) および 2-phenylethyl β -D-xylopyranosyl- β -D-glucopyranoside (8) を単離し、さらにそれらの存在意義を解明するために開花に伴うそれらの量的変動について 2 および 2-phenylethyl β -D-glucopyranoside (3) と共に比較検討した。開化に伴い 3 が減少するのに対し、二糖配糖体 7 および 8 は 2 と共に増加した。この結果から、二糖配糖体である 7 および 8 は 2 の直接的な香気前駆体ではないという結論に至った。

芳純 (*Rosa* 'Hoh-Jun') の花において 3 が 2 へと分解されるかを明らかにするために、重水素標識化した $[1\text{-}^2\text{H}]_2$ -2-phenylethyl β -D-glucopyranoside ($[1\text{-}^2\text{H}]_2$ -3) を合成し、これを 4 日間芳純の花に吸収させ検証した。その結果、発散される香気画分、および花弁に蓄積している香気画分中の双方に約 10% の $[1\text{-}^2\text{H}]_2$ が検出された。この結果から、花において 3 は加水分解され 2 を生成し、さらに発散されることが明らかになった。

続いて 2 の生成における β -glucosidase の役割を検討する目的で、 β -glucosidase の特異的阻害剤である β -glucosylamidine をブルガリアンローズに吸収させ、2 および 3 の量的変動を検証した。その結果、花弁に蓄積されている配糖体量は、ブランクでは開花後約 1/6 量まで急激に減少したのに対し、 β -glucosylamidine を取り込ませた花では、逆に開花後に配糖体の増加が認められた。一方、花弁に蓄積されている 2 の量は、開花後ブランクで徐々に増えているのに対して、 β -glucosylamidine を取り込ませた花ではほぼ同じ値を示した。 β -Glucosylamidine は β -glucosidase の特異的阻害剤であることから、少なくとも花弁に蓄積されている 2 の生成には、 β -glucosidase が関与していることが強く示唆された。

2-Phenylethanol (2) の生合成経路を解明するために、 $[^2\text{H}_8]$ -L-phenylalanine ($[^2\text{H}_8]$ -1) をブルガリアンローズおよび芳純の花に数日間吸収させた後、花卉から香気画分および配糖体画分を抽出し GC-MS にて分析した。その結果、双方の花から抽出した全ての画分において重水素標識された 2 を検出した。また、その MS のイオンピークを検証した結果、8 個重水素標識された $[1,2,2,4,5,6,7,8,^2\text{H}_8]$ -2-phenylethanol (2a)、7 個重水素標識された $[2,2,4,5,6,7,8,^2\text{H}_7]$ -2-phenylethanol (2b)、 $[1,2,4,5,6,7,8,^2\text{H}_7]$ -2-phenylethanol (2c)、および 6 個重水素標識された $[2,4,5,6,7,8,^2\text{H}_6]$ -2-phenylethanol (2d) が混合していることが明らかとなった。その中で最も生成量の多かったのは 2b であり、主要な経路は phenylpyruvic acid (5) を介した経路であることが示唆された。また、 $[^2\text{H}_8]$ -1 の重水素 8 個が全て保持された 2a が、香気画分のみならず配糖体のアグリコン部分でも確認されたため、phenylethylamine (4) を介した経路の存在も確認され、さらには生成した 2 は 3 へと変換されることが明らかとなった。3 の生成経路としては、2 が配糖体化されることにより生じる経路のほか、phenyllactic acid から 2 を介さずに生成される経路が考えられたが、その経路については特定するに至らなかった。

続いてバラ花卉細胞における 3 およびその加水分解酵素である β -D-glucosidase の局在を調べることを目的として、疎水性溶媒を用いた密度勾配細胞分画法により芳純の花卉細胞を分画した。分画により液胞は中密度画分に、細胞質は低密度画分に、アポプラストは全画分にほぼ均一に分画された。続いて 3 および β -D-glucosidase の定量を行なった結果、 β -D-glucosidase は主にアポプラスト画分におよび液胞にも少量存在し、3 は主に液胞画分に存在していることが示唆された。

ブルガリアンローズの近隣種である *Rosa damascena bifera* をやや低温の恒温条件下 (15°C) で開花させることにより開花現象自体が非常に緩やかになり、また香気の発散パターンも明確な昼夜リズムを示すようになった。さらにこの現象は連続暗期下でも確認され、香気の発散とサーカディアンリズムとの関連が示唆された。また、 β -glucosidase の特異的阻害剤である β -glucosylamidine を *Rosa damascena bifera* に取り込ませた結果、香気の発散リズムが消失したことから香気の発散リズムと β -glucosidase との関連性が示唆された。また、 $[1,1,2,4,5,6,7,8,^2\text{H}_8]$ -2-phenylethanol ($[^2\text{H}_8]$ -2) を *Rosa damascena bifera* に吸収させ、その発散および花卉中での配糖体への変化量について検討した結果、2 は明期に発散され、暗期では配糖化されること、また再び明期になると配糖体は分解されることが確認された。

上記のように本論文はこれまで未解明であったバラの主要香気成分である 2-phenylethanol の二糖配糖体の存在意義、2-phenylethanol の生成機構および生合成経路を解明した点、また、2-phenylethyl β -D-glucopyranoside およびその加水分解酵素の局在を解明した点、さらには香気の発散とサーカディアンリズムとの関連性および発散リズムと β -glucosidase との関連性について解明した点において優れており、本学博士の学位にふさわしい内容である。

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

Isolation and Identification of 2-Phenylethyl Disaccharide Glycosides and Mono Glycosides from Rose Flowers, and Their Potential Role in Scent Formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65 (2) 442-445, 2001.

Biogenesis of 2-Phenylethanol in Rose Flowers: Incorporation of $[^2\text{H}_8]$ -L-Phenylalanine into 2-Phenylethanol and its β -D-Glucopyranoside during the Flower Opening of *Rosa* 'Hoh-Jun' and *Rosa damascena* Mill. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (Accepted in Jan. 17, 2002).