

|            |   |
|------------|---|
| 氏名(本国籍)    | 坂井美和 (静岡県)  |
| 学位の種類      | 博士(農学)  |
| 学位記番号      | 農博甲第479号  |
| 学位授与年月日    | 平成20年3月13日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第3条第1項該当  |
| 研究科及び専攻    | 連合農学研究科<br>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     | Studies on the Biosynthesis Pathway and Emission Mechanism of 2-Phenylethanol, a Dominant Scent Compound of Rose Flowers<br>(バラ主要香気成分 2-phenylethanol の生合成経路および発散制御機構の解明) |
| 審査委員会      | 主査 静岡大学 教授 渡邊修治<br>副査 静岡大学 准教授 轟泰司<br>副査 信州大学 教授 廣田満<br>副査 岐阜大学 教授 木曾真<br>副査 静岡大学 教授 原正和  |

### 論文の内容の要旨

2-phenylethanol (2PE)は香りの閾値は高いものの甘い芳香を有し、バラの香りを特徴づける重要な香気成分の一つである。無傷植物への [ $^2\text{H}_8$ ] L-phenylalanine の投与実験から、我々は [ $^2\text{H}_8$ ]-2PE が [ $^2\text{H}_8$ ] phenylacetaldehyde を経て [ $^2\text{H}_8$ ]-2PE へと変換されることを明らかにした。また 2PE の一部は、2-phenylethyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (2PE  $\beta$ -Glc) として花卉に蓄積された後、必要に応じて  $\beta$ -glucosidase による加水分解を受け再度 2PE へ変換されることも明らかにしてきた。本研究では、これまでの研究結果をもとにバラ花卉における L-phenylalanine (L-Phe) から 2PE への変換経路を明らかにすること、およびバラ花卉における 2PE 発散制御機構の解明を目的としている。

第1章では L-Phenylalanine (L-Phe) から 2PE への変換経路の特定した。さらに、L-Phe を phenylacetaldehyde (PAld) に変換する aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) について述べた。バラ花卉凍結乾燥花卉から抽出したセルフリー系を用い、L-Phe から 2PE への生合成経路に関わる補酵素の要求性を検討したところ、L-Phe から PAld への変換には PLP が必要であり、PAld から 2PE への変換には NADPH (または NADH) が必要であることがわかった。この結果から、L-Phe から PAld への変換には aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) が、PAld から 2PE への変換には dehydrogenase または reductase が関与することが示唆された。AADC による L-Phe から 2PE への変換反応を詳細に調べたところ、副生成物として  $\text{NH}_3$  を生成すること、酸素要求性の反応であること、monoamine oxidase の関与が否定されたことによ

り、L-Phe は花卉に含まれる AADC により PAld へ直接変換されることが確認された。また、バラ EST よりデカルボキシラーゼと相同性のある遺伝子配列を検索し、それをもとにプライマーを設計し大腸菌で組み換えタンパク質を発現させた。組み換えタンパク質の反応機構は花卉由来の AADC と一致しており、また、L-Phe に高い基質特異性を示した。

第 2 章では PAld を 2PE へ変換する酵素である phenylacetaldehyde reductase (PAR) を分離し、補酵素の要求性、反応の方向性および基質特異性について検討した。その結果、この酵素は NADPH および NADH を補酵素とすることが確認された。また、反応の方向性は reductase 活性が dehydrogenase 活性の約 10 倍であることがわかった。PAR は PAld、2-phenylpropionaldehyde 等に対する活性は高かったものの、benzaldehyde やケトン類に対する活性は示さなかった。PAR の反応機構およびバラ花卉中での役割を明確にするために、PAR タンパクを更に精製し、LC-MS/MS 分析により部分アミノ酸配列の解析を行った。その結果、得られた部分アミノ酸配列は既知の cinnamyl alcohol dehydrogenase およびトマトの PAR と高い相同性を示した。

第 3 章では香気発散における  $\beta$ -glucosidase の役割を検証する前段階として、バラ花卉中の  $\beta$ -glucosidase の単離、同定を試みた。バラ花卉より部分精製酵素を調製し、BN-PAGE に供した。活性染色および色素染色の結果から、160 kDa および 155 kDa のバンドが得られた。これらのバンドのタンパク質を LC-MS/MS で解析し、部分アミノ酸配列を決定したところ、Family 1 の糖加水分解酵素に属する prunasin hydrolase [*Prus serotina*] および  $\beta$ -glucosidase [*Hordeum vulgare*] に対して高い相同性を示した。この酵素は glucoside を glycone とする配糖体に対して高い基質特異性を示したことから、 $\beta$ -glucosidase であることが確認された。

第 4 章ではバラ花卉を用いた香気発散機構解明のための実験系の構築について述べる。これまで無傷植物の実験系の諸問題を解決するために、バラ花卉のみを用いた実験系を確立することとした。花卉を用いた実験系には市場から入手できる R. 'Yves Piaget' を用いることとした。花卉のみでの香気発散リズムを確認したところ、12 時間周期の明暗条件では明期に高く暗期に低いという発散リズムが見られた。一方、明期のみの条件では香気発散が抑制される結果となった。以上の結果に基づき、今後本実験系を利用して、バラの香気発散の明暗変化の制御に果たす各分子の役割を追及しようとしており本実験系の有効性に期待が持たれる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

バラ (*R. damascena* Mill., R. 'Hoh-Jun') の主要香気成分 2-phenylethanol (2PE) は香りの閾値は高いものの甘い芳香を有し、バラの香りの特徴づける重要な香気成分の一つである。無傷植物への [ $^2\text{H}_8$ ] L-phenylalanine の投与実験から、我々は [ $^2\text{H}_8$ ]-2PE が [ $^2\text{H}_8$ ] phenylacetaldehyde を経て [ $^2\text{H}_8$ ]-2PE へと変換されることを明らかにした。また 2PE の一部は、2-phenylethyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (2PE  $\beta$ -Glc) として花卉に蓄積された後、必要に応じて  $\beta$ -glucosidase による加水分解を受け再度 2PE へ変換されることも明らかにしてきた。本研究は、これまでの研究結果をもとにバラ花卉における L-phenylalanine (L-Phe) から 2PE への変換経路を明らかにすることおよびバラ花卉における 2PE 発散制御機構の解明を目的としているものである。

第 1 章では L-Phenylalanine (L-Phe) から 2PE への変換経路の特定した。さらに、L-Phe を phenylacetaldehyde (PAld) に変換する aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) について述べた。バラ花卉凍結乾燥花卉から抽出したセルフリー系を用い、L-Phe から 2PE への生合成経路に関わる補酵素の要求性を検討したところ、L-Phe から PAld への変換には PLP が必要であり、PAld から 2PE への変換には NADPH (または NADH) が必要であることがわかった。この結果から、L-Phe から PAld への変換には aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) が、PAld から 2PE への変換には dehydrogenase または reductase が関与することが示唆された。AADC による L-Phe から 2PE

への変換反応を詳細に調べたところ、副生成物として NH<sub>3</sub> を生成すること、酸素要求性の反応であること、monoamine oxidase の関与が否定されたことにより、L-Phe は花卉に含まれる AADC により PAld へ直接変換されることが確認された。また、バラ EST よりデカルボキシラーゼと相同性のある遺伝子配列を検索し、それをもとにプライマーを設計し大腸菌で組み換えタンパク質を発現させた。組み換えタンパク質の反応機構は花卉由来の AADC と一致しており、また、L-Phe に高い基質特異性を示した。

第 2 章では PAld を 2PE へ変換する酵素である phenylacetaldehyde reductase (PAR) を分離し、補酵素の要求性、反応の方向性および基質特異性について検討した。その結果、この酵素は NADPH および NAD を補酵素とすることが確認された。また、反応の方向性は reductase 活性が dehydrogenase 活性の約 10 倍であることがわかった。PAR は PAld、2-phenylpropionaldehyde 等に対する活性は高かったものの、benzaldehyde やケトン類に対する活性は示さなかった。PAR の反応機構およびバラ花卉中での役割を明確にするために、PAR タンパクを更に精製し、LC-MS/MS 分析により部分アミノ酸配列の解析を行った。その結果、得られた部分アミノ酸配列は既知の cinnamyl alcohol dehydrogenase およびトマトの PAR と高い相同性を示した。

第 3 章では香気発散における  $\beta$ -glucosidase の役割を検証する前段階として、バラ花卉中の  $\beta$ -glucosidase の単離、同定を試みた。バラ花卉より部分精製酵素を調製し、BN-PAGE に供した。活性染色および色素染色の結果から、160 kDa および 155 kDa のバンドが得られた。これらのバンドのタンパク質を LC-MS/MS で解析し、部分アミノ酸配列を決定したところ、Famyl 1 の糖加水分解酵素に属する prunasin hydrolase [*Prus serotina*] および  $\beta$ -glucosidase [*Hordeum vulgare*] に対して高い相同性を示した。この酵素は glucoside を glycone とする配糖体に対して高い基質特異性を示したことから、 $\beta$ -glucosidase であることが確認された。

第 4 章ではバラ花卉を用いた香気発散機構解明のための実験系の構築についてのべる。これまで無傷植物の実験系の諸問題を解決するために、バラ花卉のみを用いた実験系を確立することとした。花卉を用いた実験系には市場から入手できる R. 'Yves Piaget' を用いることとした。花卉のみでの香気発散リズムを確認したところ、12 時間周期の明暗条件では明期に高く暗期に低いという発散リズムが見られた。しかしながら明期のみでの条件では香気発散が抑制される結果となった。

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

Production of 2-phenylethanol in roses as the dominant floral scent compound from L-phenylalanine by two key enzymes, a PLP-dependent decarboxylase and a phenylacetaldehyde reductase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71 (10), 2408-2419 (2007).

Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase involved in the emission of 2-phenylethanol from rose flowers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. (Accepted October 11, 2007).