

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05471

研究課題名(和文) バニリン生合成系酵素群の解明と国産バニラビーンの開発

研究課題名(英文) The characterization of enzymes involved in vanillin biosynthesis and the production of vanilla beans in Ogasawara

研究代表者

根岸 紀 (NEGISHI, Osamu)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号：00228280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： バニリン生合成におけるUDPG-トランスフェラーゼおよび  $\alpha$ -グルコシダーゼについて調べた。7ヶ月間のバニラグリーンビーン(生豆)の生長でグルコバニリンは1.8 g/100 g(新鮮重量)蓄積し、24週間のキュアリングでは、 $\alpha$ -グルコシダーゼにより加水分解しバニリンが0.5 g/100 g(新鮮重量)となった。部分精製したUDPG-トランスフェラーゼはバニリンおよび4-ヒドロキシベンズアルデヒドを配糖化し、相対活性は100:84であった。本研究成果をもとに小笠原父島のバニラ植物栽培農家は当初の計画通りに2020東京五輪の年に『小笠原バニラビーンズ』の製造・販売を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バニリン生合成における配糖化を触媒するUDPG-トランスフェラーゼの働きを明らかにした。部分精製した本酵素は、バニリンおよび4-ヒドロキシベンズアルデヒドに対して高い基質特異性を持ち、バニラグリーンビーン中のそれぞれの配糖体の存在を説明することができた。キュアリング開始後、比較的高い  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が見られ、キュアリング中におけるグルコバニリンの加水分解が効率良く起こることが示唆された。これらの基礎的な研究成果を東京都小笠原村におけるバニラビーンズ製造に応用し、栽培農家を支援することができた。

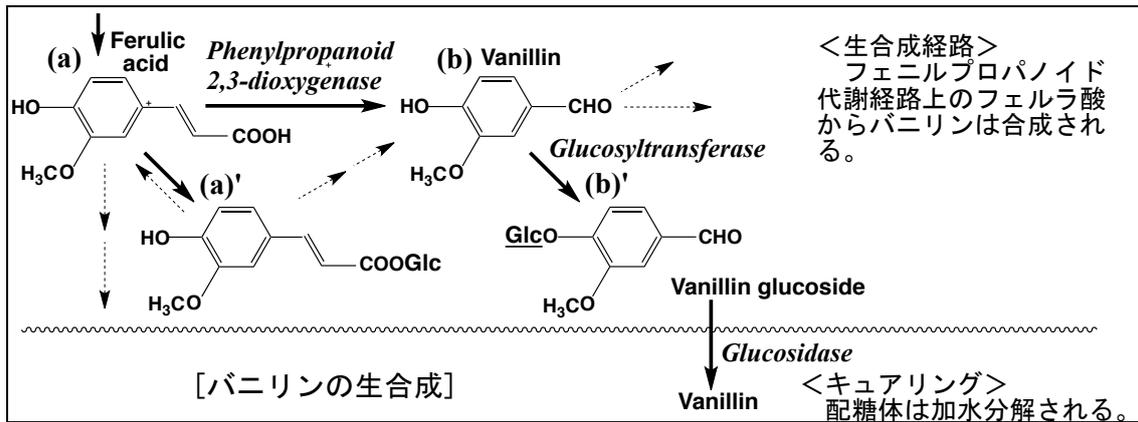
研究成果の概要(英文)： UDPG-transferase and  $\alpha$ -glucosidase involved in vanillin biosynthesis were investigated. In the growth of vanilla pods for 7 months, 1.8 g of glucovanillin was accumulated in 100 g fresh weight of the pods. By the succeeding curing of the pods for 24 weeks, 0.5 g of vanillin was produced in 100 g of the vanilla beans. Partially purified UDPG-transferase glucosylated vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde to their respective glucosides by the relative activity of 100:84. Based on these results, a farmer who has cultivated vanilla plants in Ogasawara Island has started to produce and sell "Ogasawara Vanilla Beans" in the year of the Tokyo 2020 Olympics, just as planned.

研究分野：生物有機化学・食品科学・食生活学

キーワード：バニリン 生合成 バニラビーン キュアリング 小笠原

## 1. 研究開始当初の背景

(1) バニリンの生合成経路は、4-クマル酸→コーヒー酸→フェルラ酸→バニリンである（文献1, 2）。バニリンは、先ず、フェニルプロパノイド-2,3-ジオキゲナーゼによりフェルラ酸側鎖の二重結合が切断されて生成する。バニリンは植物中では毒であるため、グルコシルトランスフェラーゼ (UDPG-トランスフェラーゼ) の作用によりバニリン配糖体 (グルコバニリン) に変換され貯蔵されている。一方、生のバニラグリーンビーンに傷が付いたり、バニラビーンズ製造のためにキュアリング (伝統的な方法は、生のビーンを熱湯処理し長時間保温したのち乾燥する操作) することにより、バニリン配糖体 (グルコバニリン) はグルコシダーゼの作用により加水分解されて再びバニリンが生成する (下図)。これら一連の酵素の含量はあまり高くないのに対し、十分な活性発現により多量のバニリンを生成・貯蔵しているのは不思議であり、一連の反応メカニズムを解明する必要がある。



(2) 現在、化学合成バニリンに比べ、天然バニリンの需要は非常に高いので、バニリン生合成系酵素群の反応特性を解明し、バニラビーンズの生産に応用することは学術的にも産業上でも重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、フェルラ酸からバニリンの生成に関わる酵素系 (フェニルプロパノイド-2,3-ジオキゲナーゼ・UDPG-トランスフェラーゼ・グルコシダーゼ) の反応性や安定性などを詳細に調べ、その結果を応用して高含量のグルコバニリンを含むバニラグリーンビーンズの生産およびキュアリングを効率よく行える条件を探究する。即ち、グルコバニリンの生成に関わるフェニルプロパノイド-2,3-ジオキゲナーゼ及びUDPG-トランスフェラーゼの反応特性を明らかにし、生のバニラグリーンビーンズ中のグルコバニリン含量を高め、さらには、グリーンビーンズ生長段階やキュアリング中のグルコシダーゼ活性を詳細に調べることによって、バニリン含量の高い優良な (黒褐色の) バニラビーンズの作製が可能になると考えている。

バニラ植物の栽培に関しては、東京都小笠原村では一軒の栽培農家が試験的に行っている。我々は、バニラグリーンビーンズ中の成分分析を通して国産バニラビーンズの開発を支援し、2020年の東京五輪までに小笠原バニラビーンズを流通させる計画である。

## 3. 研究の方法

### (1) バニラビーンズの成分分析

東京都小笠原村父島では、バニラ植物は5月に開花・受粉後、バニラグリーンビーンズが約7ヶ月間生長し収穫となる。バニラ栽培農家からグリーンビーンズを収穫後2日目に入手した。受粉後

2ヶ月目から7ヶ月目及びキュアリング2週間目から24週間目の期間に経時的に抽出した。

バニラビーン1本を冷80%アセトン80 mLで2回磨砕抽出して200 mLに定容した。次の条件でHPLC分析を行った。カラムには、TSKgel ODS80Ts (4 mm×250 mm)を用い、1 mM リン酸を含むメタノールの濃度勾配 (3%→80%) 及び0.6 mL/minの流速により溶出し280 nmで検出した。

さらに、抽出残渣は、冷80%アセトン100 mLに2回懸濁・デカンテーションすることで細かい種子を取り除いた。次に、真空デシケーター中で乾燥して酵素原料(アセトンパウダー)とした。

## (2) キュアリング

本研究では、受粉後7ヶ月目にグリーンビーンを収穫し1ヶ月間凍結保存した。解凍後、消毒用80%エタノールを用いて1分間殺菌しビニール袋に入れて25°Cのインキュベーター中に放置した。

## (3) トレーサー実験

受粉後6ヶ月目のグリーンビーンのディスク(厚さ2 mm)に<sup>14</sup>C-バニリンの水溶液(14.8 kBq/20μL/ディスク)を吸収させた。0、1、2、4、および6時間目に5ディスクずつ磨砕抽出した後、ペーパークロマトグラフィー(20 cmのWhatman No.1 filter paper, ブタノール:酢酸:水=4:1:2)により成分を分離してグルコバニリンへの<sup>14</sup>Cの取り込みを調べた。

## (4) 酵素活性の測定

酵素反応生成物をHPLCにより分離分析することによって活性を算出した。

### ① フェニルプロパノイド-2,3-ジオキゲナーゼ

アセトンパウダー20 mgに最終濃度2 mM フェルラ酸、0.5 mM FeSO<sub>4</sub>、10 mM DTT、5 mM ATP及び0.1M MES-KOH緩衝液(pH 6.5)を含む水溶液600μLを添加して40°Cで攪拌・反応した。30分後、6N HCl 20μL及びメタノール180μLを加えて反応を停止した。次に、3,500 rpm、10分間遠心分離した後、上精をメンブレンフィルターで濾過してHPLCで分析した。分析カラムにはIntact CD-C18 Gadenza (4 mm×250 mm)を用い、1%酢酸を含む40%メタノール溶液を用いて0.5 mL/minの流速で溶出し、280 nmで検出した。

### ② UDPG-トランスフェラーゼ

アセトンパウダー20 mg及び最終濃度2 mM バニリン、10 mM UDPG、10 mM DTT、0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5.5)を含む水溶液600μLを添加して40°Cで2時間攪拌・反応した。その後は、上記酵素と同様に処理した。HPLCカラムにはTSKgel ODS-80Ts (4 mm×250 mm)を用いて、1 mM リン酸を含むメタノールの濃度勾配 (3%→80%) 及び0.6 mL/minの流速により溶出し270 nmで検出した。

### ③ グルコシダーゼ

①②同様に酵素活性を測定した。アセトンパウダー20 mgの他に2 mM グルコバニリン、0.2 M MES-KOH緩衝液(pH 6.5)を含む600μL中、40°Cで30分間、攪拌し反応した。HPLC分析は①と同様に行った。

#### (5) 酵素の精製

過去に輸入し凍結保存してあったインドネシア産バニラグリーンピーン 500 g を冷 80%アセトン中で磨砕・抽出さらに洗浄した残渣であるアセトンパウダーから界面活性剤 (Triton X-100)、1 mM DTT および 0.6% アスコルビン酸入りの 0.1 M リン酸溶液 (pH 7.0) で抽出した。硫酸 (80%飽和) 塩析後、100 mL の 0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) で抽出後、さらに透析によって脱塩して粗酵素液とした。次に、DEAE-トヨパール 650M-イオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。2.5 cm×25 cm のカラムに酵素液を添加後、1 mM DTT 入りの 0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) でよく洗浄し、NaCl 濃度勾配 (0→0.3M) により酵素を溶出した。酵素活性の測定では、上記 (4) の方法におけるアセトンパウダーをカラム溶出酵素液に変えた。

### 4. 研究成果

#### (1) バニラグリーンピーン生長段階及びキュアリング過程における主要成分の変化

バニラピーン中のバニリン配糖体 (グルコバニリン) 及びバニリンを HPLC により定量分析した。その結果、生長段階のグルコバニリン含量は7ヶ月目には最大になり、約 1.8 g/100 g 新鮮重量であった。2週間から 24 週間のキュアリングでは、グルコシダーゼの作用によりグルコバニリンの加水分解が起こりバニリン含量は約 0.5 g/100 g 新鮮重量であった。乾燥重量に換算すると、約 5% の高バニリン含量である。

#### (2) バニラグリーンピーン中における <sup>14</sup>C-バニリンのグルコバニリンへの取り込み

<sup>14</sup>C-バニリンの吸収 6 時間後には <sup>14</sup>C がグルコバニリンへ約 80%取り込まれ、生体中では配糖化を触媒する UDPG-トランスフェラーゼが非常に効率よく働いていることが分かった。

#### (3) 3種類の酵素活性

アセトンパウダーを用いて 3種類の酵素活性を測定した。フェニルプロパノイド-2,3-ジオキシゲナーゼ (フェルラ酸→バニリン) では、活性は測定できるものの、アセトンパウダーの影響が出てしまい、正確さに欠けた。UDPG-トランスフェラーゼ (バニリン→グルコバニリン) では、緩衝液の pH によってはグルコシダーゼ (グルコバニリン→バニリン) の作用が強くなってしまった。さらに、グルコシダーゼでは、他の影響を受けずに測定でき、キュアリング初期に活性が上がる傾向にあったが、再検討する必要がある。

#### (4) UDPG-トランスフェラーゼの部分精製および基質特異性

UDPG-トランスフェラーゼは陰イオン交換体に吸着し、NaCl 濃度勾配により溶出したが、グルコシダーゼ活性も一部分重なってしまった。DEAE-イオン交換カラムクロマトグラフィーに続きゲル濾過による精製も試みたが、酵素活性が非常に減少してしまうために、ゲル濾過による精製は行わないことにした。部分精製 UDPG-トランスフェラーゼの基質特異性を調べた結果、4-クマル酸およびフェルラ酸に対しては活性がなく、バニリン (100%) および 4-ヒドロキシベンズアルデヒド (84%) に対して配糖化活性があった。本酵素の高い基質特異性から、バニラグリーンピーン中におけるバニリンおよび 4-ヒドロキシベンズアルデヒドそれぞれに対応する配糖体の存在 (文献 3) を説明することができた。

#### (5) バニラビーンズの生産およびバニラ菓子の試作

小笠原村父島のバニラ植物栽培農家では、収穫したバニラグリーンビーンズのキュアリングを実施して、当初の計画通りに 2020 東京五輪の年に『小笠原バニラビーンズ』の販売を開始した。

香料会社による小笠原バニラビーンズの評価は、熟成感に欠けるが、バニリン含量が従来品よりも高く、利用の仕方によっては評価できるということであった。

小笠原バニラビーンズを用いたバニラ菓子（バニラキップェル）を試作した。キュアリング開始後 2 週間でもバニリン含量がほぼ最高に達したので、キュアリング時間が異なるバニラビーンズ 3 種類（2 週間、12 週間、24 週間）および既製品 1 種類を用いた。試作は調理製菓専門学校製菓科に、官能評価は、栄養と調理を専門とする大学および香料会社に依頼した。

大学教員および香料会社社員（非専門パネル）による簡易的な官能評価の結果には同様の傾向があり、24 週間キュアリング処理の小笠原バニラビーンズを用いた菓子に最もバニラの特徴が出ている（バニリンの匂いが強い）という評価であった。さらに試作・官能評価を重ねたいと考えている。

今後の研究では、キュアリング方法やバニラビーンズの利用法を改良し、国産バニラビーンズ（小笠原バニラビーンズ）の生産および利用を拡大する予定である。

#### <引用文献>

- (1) Osamu Negishi and Yukiko Negishi, Phenylpropanoid 2,3-dioxygenase involved in the cleavage of the ferulic acid side chain to form vanillin and glyoxylic acid in *Vanilla planifolia*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81** (9), 1732-1740 (2017).
- (2) Osamu Negishi, Kenji Sugiura and Yukiko Negishi, Biosynthesis of vanillin via ferulic acid in *Vanilla planifolia*, *J. Agric. Food Chem.*, **57** (21), 9956-9961 (2009).
- (3) Osamu Negishi and Tetsuo Ozawa, T. Determination of hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids, hydroxybenzaldehydes, hydroxybenzyl alcohols and their glucosides by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **756**, 129-136 (1996).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

『バニラに関する研究』（根岸）のホームページ <a href="http://www7a.biglobe.ne.jp/~negichan/vanilla_001.html">http://www7a.biglobe.ne.jp/~negichan/vanilla_001.html</a>
---

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------