

機関番号：32692

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580024

研究課題名 (和文) ブドウにおける香り成分蓄積の分子機構解析

研究課題名 (英文) Mechanism of accumulation of aroma constituents in grape berries.

研究代表者

高柳 勉 (TAKAYANAGI TSUTOMU)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：00252007

研究成果の概要 (和文)：ブドウ果実における香り成分の蓄積機構を解明する第一段階として、ブドウ果実の遊離の香り成分とその配糖体の種類と量を分析し、さらに香り成分の配糖化反応を触媒する酵素を探索した。ブドウ果実の香り成分を分析した結果、遊離の成分としてアルデヒド類とアルコール類、配糖体としてベンジルアルコール配糖体が量的に多く検出された。香り成分の配糖化酵素を探索した結果、マスカット・ベリーA ブドウの葉にフラネオールに対する配糖化活性を見出した。ブドウの葉からフラネオール配糖化酵素を抽出し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離した結果、複数のアイソザイムの存在が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：To investigate the mechanism of accumulation of aroma constituents in grape berries, we analyzed free and glycosidically bound volatile compounds and searched for the glycosylation enzyme in grapes. The major volatile compounds detected in grape berries were aldehydes and alcohols (free volatile compounds) and benzyl alcohol glycoside (bound volatile compounds). Glycosylation activity for furaneol was found in Muscat Bailey A leaves. The elution pattern obtained by anion-exchange chromatography of the enzyme extract of the leaves suggested the presence of several isozymes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：ブドウ、香り成分、糖転移酵素

1. 研究開始当初の背景

果実の香りのもととなる物質の多くは揮発性の代謝産物であり、その化学構造は多岐にわたっている。これら揮発性香り化合物は、

自然界の他生物との相互作用、すなわち昆虫や微生物の攻撃に対する防御や動物の誘因などに関与し、植物の生存に重要な役割を持つと考えられている。

これら揮発性香り化合物の生合成と蓄積は、果実の成熟現象の中でも多様で未解明の分野である。特に、ブドウに代表される果樹に関しての情報は乏しい。ブドウの揮発性香り化合物は、糖などの親水性化合物と複合体を形成することにより、安定して果実に蓄積すると推測されている。

本研究では、ブドウの香り成分、すなわち揮発性香り化合物とその配糖体に着目した。ブドウの香り成分蓄積機構を解明する第一段階として、ブドウの各部位（果実や葉）に蓄積する遊離の香り成分（揮発性香り化合物）とその配糖体（香り成分とグルコースが結合した配糖体）を分析した。次に、香り成分の配糖化反応を触媒する糖転移酵素（配糖化酵素）を探索した。香り成分の配糖化は、果実組織における香り成分の安定した蓄積と密接に関連していると推測される。この配糖化反応を触媒する酵素を見出し、その性質を明らかにすることは、ブドウ果実における香り成分蓄積メカニズムの解明に大きく寄与すると期待される。

さらに、ブドウ果実の香りは、果実の品質やブドウ品種の特徴を決定する重要な要素であり、得られた基礎的情報を、高品質なブドウ果実を生産するための栽培実践に活かすことが期待される。

2. 研究の目的

ブドウに蓄積する遊離の香り成分とその配糖体を、ブドウの各部位（果皮、果汁、葉）において、果実の成熟前期と後期に測定し、各部位に蓄積する香り成分の種類と量を明らかにする。次に、香り成分の配糖化酵素を、ブドウ組織において探索し、その抽出と分離を行う。さらに、配糖化酵素遺伝子をクローニング後、大腸菌により酵素を生産し、その性質を解析する。

3. 研究の方法

(1) ブドウの果皮・果汁・葉の香り成分の分析

赤ワイン用ブドウ5品種（マスカット・ベリーA、ピノ・ノワール、メルロー、シラー、カベルネ・ソービニオン）を使用し、ブドウの各部位（葉、果皮、果汁）における遊離の香り成分とその配糖体の種類と量をブドウ果実の成熟前期（開花後約3ヵ月）および後期（開花後約4ヵ月）に測定した。各部位の抽出液から、疎水性カラムを用いた固相抽出法により、遊離の香り成分およびその配糖体を分離した。分離した遊離の香り成分を（配糖体は β -グルコシダーゼ処理後に）GC-FIDおよびGC-MSにより分析した。

(2) 配糖化酵素の抽出と活性測定

ブドウ葉試料を液体窒素で凍結後、粉末化した。この粉末を緩衝液（500 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM 亜硫酸、1% PVPP、10% Glycerol）により洗浄した。洗浄後の粉末から、界面活性剤 Triton X-100 を含む緩衝液を用いて配糖化酵素を抽出した。酵素活性測定は、糖供与体として UDP-グルコース、香り成分としてフラネオールを用い、酵素反応後の生成物を、ODS カラムを装備した HPLC により分析した。

(3) 配糖化酵素遺伝子のクローニングと大腸菌による生産

ブドウの遺伝子データベースから、配糖化酵素の候補遺伝子 11 種類を選択し、プライマーセットを作成した。マスカット・ベリーA およびピノ・ノワールの葉から RNA を抽出し、cDNA を作成した。この cDNA と作成した 11 種類のプライマーセットを用いて PCR を行った。増幅した DNA を pTAC ベクターに挿入し、大腸菌に形質転換した。目的の遺伝子が挿入されたことを確認後、この遺伝子を pCold I DNA に挿入し、大腸菌に形質転換した。形質転換体を IPTG 添加培地で培養し、酵素タンパク質を生産した。生産された酵素タンパク質は、His-Tag アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGE により確認した。

4. 研究成果

(1) ブドウの果皮・果汁・葉の香り成分の分析

ブドウの各部位（葉、果皮、果汁）における遊離の香り成分およびその配糖体の種類と量を測定した。今回用いた方法では、葉、果皮、果汁のいずれにおいても、遊離の香り成分としてアルデヒド類およびアルコール類、配糖体としてベンジルアルコール配糖体が量的に多く検出された。これら主な香り成分の組織あたりの量を、各部位の間で比較すると、葉と果皮において多く、果汁において少ない傾向を示した。

マスカット・ベリーA 果実の場合、果皮において量的に多く検出された遊離の香り成分は 2-ヘキセナルやヘキサナルなどの草の香りを持つ化合物であった。一方、配糖体で最も多かったのは、ベンジルアルコール配糖体であった。マスカット・ベリーA の果汁においては、遊離の香り成分として 3-ヘキセン-1-オールや 2-ヘキセナルなどの草の香りを持つ化合物、配糖体としてベンジルアルコール配糖体が量的に多く検出された。収穫時期で比較すると、ベンジルアルコール配糖体は、成熟前期に比べ、後期において増加する傾向を示した。フラネオール（イチゴの香り）は、マスカット・ベリーA の成熟後期

の果実に検出された。

今回の研究で分析したブドウ 5 品種の間で香り成分を比較すると、各品種において検出される遊離の香り成分および配糖体の種類は相互に類似していた。

(2) 配糖化酵素の抽出と分離

ブドウ果実の香り成分の配糖化を触媒する酵素を探索した。マスカット・ベリーA ブドウの葉の凍結粉末から得た酵素抽出液の糖転移活性を、UDP-グルコースとフラネオールを基質として測定したところ、フラネオール配糖体のピークが検出された。フラネオール配糖体を含むフラクションをβ-グルコシダーゼで処理し、フラネオール配糖体のピークが消失することを確認した(図1、2)。

酵素抽出液を陰イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap Q HP) にかけて、配糖化酵素を分離した。陰イオン交換体に吸着したタンパク質を直線的な塩濃度勾配により溶出したところ、糖転移活性が、広い範囲のフラクションで認められ、複数のアイソザイムの存在が示唆された。

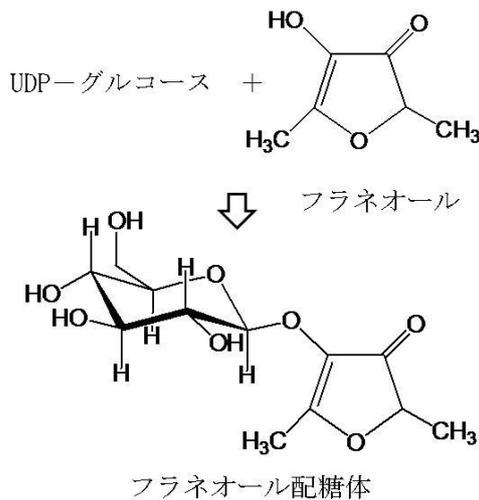


図1. フラネオールの配糖化反応

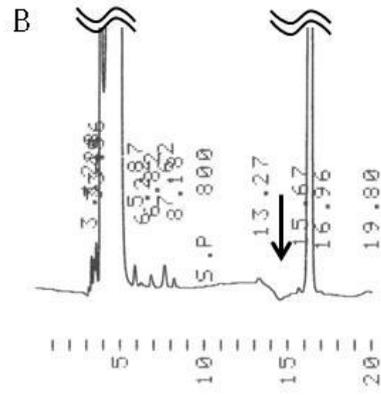
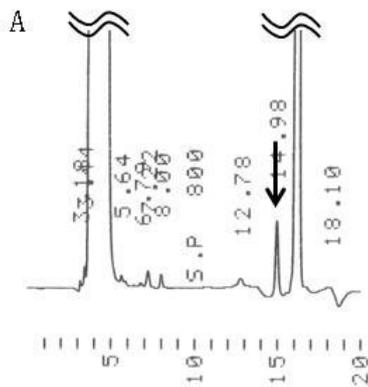


図2. 酵素反応液の HPLC パターン (A)。矢印はフラネオール配糖体のピーク位置を示している。β-グルコシダーゼ処理後の HPLC パターン (B)

(3) 配糖化酵素遺伝子のクローニングと大腸菌による生産

ブドウの配糖化酵素遺伝子をクローニングし、それを大腸菌で発現させ、酵素タンパク質を生産した。ブドウゲノムの塩基配列より、候補となる 11 種類のプライマーセットを設計した。マスカット・ベリーA およびピノ・ノワールブドウの葉から RNA を分離し、cDNA を合成した。この cDNA と 11 種類のプライマーセットを用いて PCR を行った。増幅が確認された DNA の電気泳動バンドの塩基配列を解析したところ、幾つかのバンドが既知の配糖化酵素の配列と高い相同性を示した。

マスカット・ベリーA ブドウの葉から得られた配糖化酵素の候補遺伝子 (Mba2, Mba4, Mba5, Mba6) を pColD I ベクターに挿入した後に大腸菌へ形質転換し、酵素タンパク質を生産した。生産された Mba2, Mba4, Mba5, Mba6 の酵素タンパク質をアフィニティークラムにより精製した。得られたフラクションが酵素タンパク質を含むことを SDS-PAGE により確認した。

得られた酵素タンパク質に対して、UDP-グルコース (糖供与体) とブドウの香り化合物 (フラネオール、2-フェニルエタノール、ベンジルアルコール) およびポリフェノール化合物 (カテキン、ケルセチン) を基質として糖転移活性を測定したが、配糖化生成物を確認できなかった。本研究において、候補遺伝子由来の酵素タンパク質を大腸菌で生産し、その配糖化活性を測定する段階まで研究を進めることができた。今回の研究結果をもとに、さらに研究を進め、活性を持つ配糖化酵素を得ることができれば、ブドウの香り成分の配糖化機構に関する重要な知見が得られると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

①高柳勉、曾根あゆみ、鈴木俊二、‘マスクット・ベリーA’ブドウの香気成分分析、園芸学会平成23年度春季大会、2011年3月20日、宇都宮大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高柳 勉 (TAKAYANAGI TSUTOMU)
東京工科大学・応用生物学部・教授
研究者番号：00252007

(2) 研究分担者

鈴木 俊二 (SUZUKI SHUNJI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
准教授
研究者番号：60372728