

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660090

研究課題名(和文)花から発散・拡散される揮発成分の空間、時間を測るー化学生態学の新たな研究手法

研究課題名(英文) Estimation of spatial location and velocity of volatile compounds emitted from flowers and the diffusion process - new research approach in chemical ecology

研究代表者

渡辺 修治 (Watanabe, Naoharu)

静岡大学・創造科学技術大学院・教授

研究者番号：90230979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ILIDS(Interferometric Laser Imaging for Droplet Sizing)を用いた計測により、香気成分・水会合体粒子の動きを確認し、その粒径を推定し、香気成分・水会合体粒子の可視化を達成した。花から発散される香気成分の可視化を目的としてクマリン前駆体であるo-ヒドロキシ-p-クマル酸グルコシドを用い、青色デルフィニウムに投与したところ、官能的にも検知できる著量のクマリンの発散を確認した。ILIDSにより、発散された香気成分の可視化を試みたが、検出できなかった。粒子径が測定装置の検出限界である4μm未満であると推定された。

研究成果の概要(英文)：When volatile compounds were vaporized and diffused from a model device in the presence of water, ILIDS (Interferometric Laser Imaging for Droplet Sizing) enabled estimating a size of the particles of volatile compounds associated with water. Visualization of coumarin particles emitted from living flowers was also examined when the flowers of blue Delphinium were fed with o-hydroxy-p-coumaric acid -D-glucopyranoside. The coumarin emission was confirmed by the sensory test as well as the GC-MS analyses. However the particles of coumarin with water were not visualized based on the ILIDS. These results suggested that the particle size is estimated to be less than those detected in the model experiments.

研究分野：生物有機化学

キーワード：香気成分 粒子散乱 クマリン 会合体粒子 ILIDS 植物

1. 研究開始当初の背景

花による昆虫の誘引は受粉のために必要不可欠であり、誘引には花から発散される香気成分が用いられている。従来の香気成分検知方法であるアロマセンサー、GC-MS分析等で、香気成分の拡散到達点の検知や濃度の解析は可能であるものの、香気成分の時間的・空間的な動態の測定法は報告されていない。本研究課題では、香気成分発生源からのその動態をリアルタイムで可視化する手法の開発を目的としている。

森林樹冠には直径0.1~10 μmの粒子(クラスター)が浮遊し、(①, 2002)、そのうち、サブμmレベルの粒子は揮発成分が植物表面の水 1000~10000 分子とクラスターを形成したものであるとされている。すなわち、花から発散される香気成分を粒子として検知し、その粒子径、粒子密度、動きを物理的手法で計測できるとの可能性を示唆している。

2. 研究の目的

花から発散・拡散される香気成分を粒子として計測し、香気成分の動的画像化のために必要な基盤技術を構築するために、本研究では揮散している香気成分と水との会合体(以下、香気成分・水会合体粒子と記述)にレーザーを照射し、香気成分・水会合体粒子の散乱光を撮影することで、リアルタイムで香気成分拡散過程の動態を可視化する手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1)香気成分-水会合体粒子のアロマセンサー、GC-MSによる計測

図1に示す香気成分発散モデル装置を作製し、発散される香気成分量は、アロマセンサー:ハンディにおいてモニターOMX-GR、および、GC-MSにより計測した。

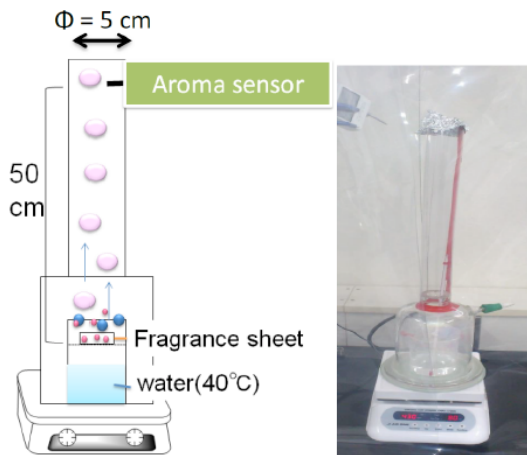


図1 香気成分発散モデル装置

(2) 揮発成分の光散乱測定

光散乱を効果的に検証するための装置(図2)も作製した。香気成分・水会合体粒子の生成を加速する目的で超音波振動子により水を噴霧した。

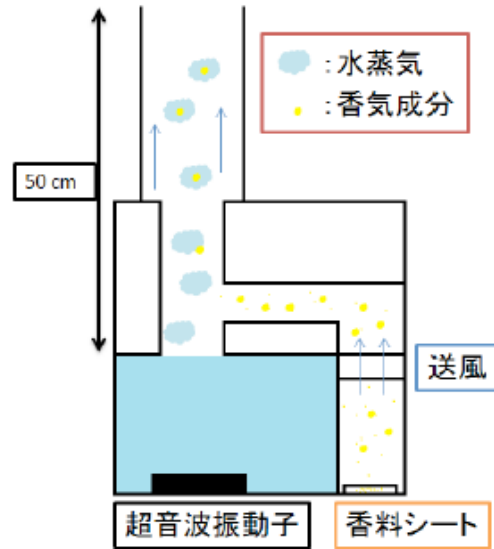


図2 超音波振動子を装備した香気成分-水会合体粒子形成装置

上記装置内部に発散生成される香気成分-水会合体粒子にレーザーシートを照射し、ILIDS (②, 1995) Interferometric Laser Imaging for Droplet Sizing)を用い、超高速 CCD カメラにより散乱光を画像化し、粒径と動態の計測を試みた。本計測では流体力学を専門研究分野とする齋藤隆之教授(静岡大学・グリーン科学技術研究所)に指導、協力を仰いだ。ILIDSとは、微小な球形液滴・気泡にレーザーシートを照射すると、気液界面で反射と屈折が生じる。この時、液滴・気泡内を通過した屈折光と反射光との間に光路差が生じ、液滴・気泡が微小なスリットの役割を果たす。集光レンズによって集光された反射光と屈折光は焦点面で2つの輝点が生じる。一方非焦点面では干渉縞が見られる。この光路差は液滴・気泡の径に依存する。また、干渉縞の明暗の差はにらみ角に依存することが報告されている。ILIDSの原理を図3に、装置の実際を図4に示す。

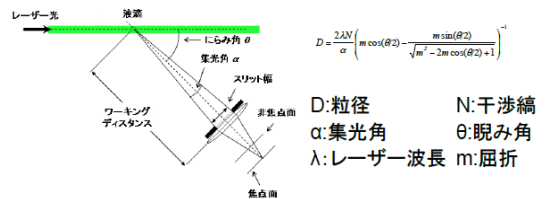


図3 ILIDSの原理

$$D = \frac{2\lambda N}{\alpha} \left( m \cos(\theta/2) - \frac{m \sin(\theta/2)}{\sqrt{m^2 - 2m \cos(\theta/2) + 1}} \right)^2$$

D: 粒径  
 N: 干渉縞  
 α: 集光角  
 θ: 睨み角  
 λ: レーザー波長  
 m: 屈折

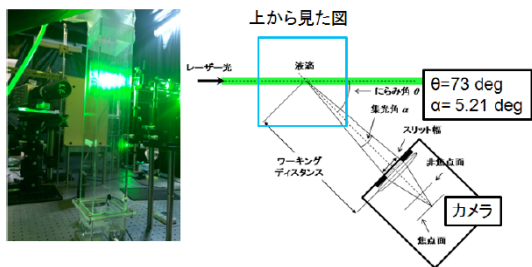


図4 装置の実際

(3) 花から発散される香気成分の可視化の試み

①バラの花から発散される香気成分の観測  
 花卉が展開したバラ *Rosa x hybrida* “Yves Piaget”の花を図2に示す装置の香気成分発生源のかわりに設置した。

②香気成分配糖体投与による高濃度香気成分発散の試み

香気成分濃度を増大する目的で青色デルフィニウム *Delphinium elatum* L. “Blue Bird”の花を香気成分クマリンの前駆体である 2-coumaric acid  $\beta$ -D-glucopyranoside 水溶液に浸漬し、これを吸収させ、高濃度クマリンの発散を目的とした。この前駆体はデルフィニウムの内生酵素 $\beta$ -glucosidase により加水分解されクマリンへと変換されることを、 $\beta$ -glucosidase 阻害剤を共投与して確認した。

#### 4. 研究成果

(1) 液滴噴霧装置を利用した香気成分-水会合体粒子のアロマセンサーによる計測

図5に示すように、植物香気成分として用いた大半の化合物において、水と共存した場合に香気成分単独時に比べアロマセンサーの応答強度、香気成分濃度ともに水共存時に高くなることを確認した。この事実は、水共存時により多くの香気成分が揮散していることを示しており、香気成分-水会合体粒子の形成が強く示唆された。

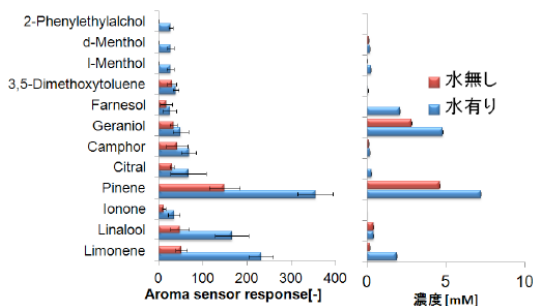


図5 香気成分単独(赤)、水共存時(青)のアロマセンサーの応答強度(左)、および、香気成分濃度(右)

(2) 揮発成分の光散乱測定

図2の装置を用い、ILIDSに基づき発散された香気成分・水会合体粒子の検出を試みた。その結果、図6にあるように水単独の粒子径

は  $4.7 \mu\text{m}$  であったのに対し、干渉縞が多く見られる香気成分-水会合体粒子では粒径  $9.4 \mu\text{m}$  であると計算された。すなわち、植物から発散される香気成分-水会合体粒子がこの程度の大きさに発達していれば、本装置を用い、この解像度で十分計測可能であることが示唆された。

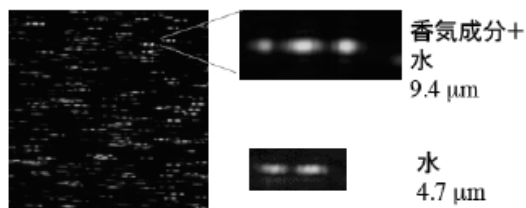


図6 ILIDSによる香気成分と水粒子発散像全体図(左)、香気成分・水会合体粒子雅俗(右上)、水粒子画像(右下)

(3) 花から発散される香気成分の可視化の試み

①バラの花から発散される香気成分の観測

バラ *R. x hybrida* “Yves Piaget”から発散される香気成分(主要香気成分は 2-フェニルエタノール、シトロネロール、3,5-ジメトキシトルエン等)の計測を試みた。しかしながら、粒子の検出には至らなかった。より高い空間分解能  $4.22 \mu\text{m}/\text{pixel}$  が得られるシャドグラフ撮影によっても粒子検出を達成できなかった。発散される香気成分濃度がモデル実験に比べ著しく低いことが主要な理由と考え、花からの高濃度香気成分の発散を目的とした下記②の実験に着手した。

②香気成分配糖体投与による高濃度香気成分発散の試み

研究代表者らは青色デルフィニウム *D. elatum* L. “Blue Bird”に対して 2-coumaric acid  $\beta$ -D-glucopyranoside を投与するとクマリンを発散すること、クマリンの発散は酢酸ナトリウム共投与で 10 倍以上のクマリンを発散させることに成功している (③, 2009)。

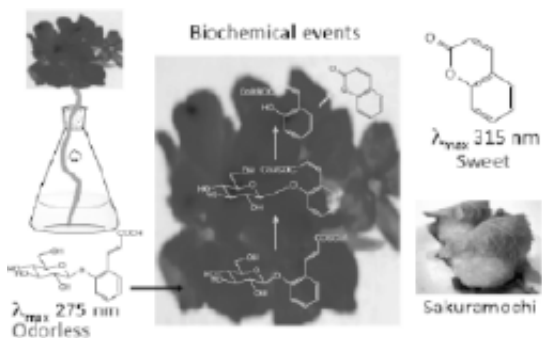


図7 デルフィニウムの花への香りの前駆体投与によるサクラモチの香り:クマリンの発散概念

本事実を活用し、青色デルフィニウムの花から発散される高濃度のクマリンの可視化を試みた。2-Coumaric acid  $\beta$ -D-glucopyranoside を合成し、これをデルフィニウムの花に投与後、発散されるクマリンを GC-MS により定量した(図7)。

$\beta$ -Glucosidase 阻害剤 *N'*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-4-phenylbutylamidine hydrobromide 水溶液を同時に投与することでクマリンの発散阻害を確認できた。しかしながらクマリンの発散量は高いときでもバラからの香気成分量の2倍程度であり、実際 ILIDS によってクマリンの発散を確認することはできなかった。

#### <引用文献>

① 野原秀憲、松金正元、藤倉芳明、瑞々しい花の香りの発現機構の解明、*Aroma Research* **3**, 244-250 (2002).

② Glover, AR, Skippon, SR, Boyle, RD. Interferometric laser imaging for droplet-size measurement in sparse spray systems. *Appl. Opt.*, **34**, 8409-8421 (1995).

③ Yang, Z, Endo, S, Tanida, A, Watanabe, N. Synergy effect of sodium acetate and glycosidically bound volatiles on the release of volatile compounds from the unscented cut flower (*Delphinium elatum* L. "Blue Bird"). *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 6396-6401 (2009).

#### 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)

[雑誌論文] (計 10 件、すべて査読有り)

① Hirata T, Ohnishi T, Watanabe N. Biosynthesis of floral scent 2-phenylethanol in rose flowers. Review paper, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (in press)

② Regulation of biosynthesis and emission of volatile phenylpropanoids/benzenoids in *petunia x hybrida* flowers by multi-factors of circadian clock, light, and temperature. Cheng S, Fu X, Mei X, Zhou Y, Du B, Watanabe N, Yang Z. *Plant Physiol Biochem.*, **107**, 1-8 (2016). doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.026.

③ Recent advances in the emission and functions of plant vegetative volatiles. Dong F, Fu X, Watanabe N, Su X, Yang Z. *Molecules*, **21**, Jan 22, 2016. doi: 10.3390/molecules21020124.

④ Seasonal induction of alternative principal pathway for rose flower scent. Hirata H, Ohnishi T, Tomida K, Ishida H, Kanda M, Sakai M, Yoshimura J, Suzuki, H, Ishikawa T, Dohra H, Watanabe N. *Sci. Rep.* **6**, Article number: 20234

(2016). doi:10.1038/srep20234.

⑤ Characteristic fluctuations in glycosidically bound volatiles during tea processing and identification of their unstable derivatives. Cui, J, Katsuno, T, Totsuka, K, Ohnishi, T, Takemoto, H, Mase, N, Toda, M, Narumi, T, Sato, K, Matsuo, T, Mizutani, K, Yang, Z, Watanabe, N, Tong, H. *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 1151-1157, 2016. doi: 10.1021/acs.jafc.5b05072

⑥ Regulation of formation of volatile compounds on postharvest and preharvest tea (*Camellia sinensis*) leaves by single light wavelength. Fu, X, Chen, T, Mei, X, Katsuno, T, Kobayashi, E, Dong, F, Watanabe, N, Yang, Z. *Sci. Rep.* 2015Nov 16;5:16858. doi: 10.1038/srep16858.

⑦ Does enzymatic hydrolysis of glycosidically bound volatile compounds really contribute to the formation of volatile compounds during the oolong tea manufacturing process? Gui J, Fu, X, Zhou, Y, Katsuno, T, Mei, X, Deng, R, Xu, X, Zhang, L, Dong, F, Watanabe, N, Yang, Z. *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 6905-6914, 2015. doi: 10.1021/acs.jafc.5b02741

⑧ Volatile glycosylation in *tea plants*: Sequential glycosylations for the biosynthesis of aroma  $\beta$ -primeverosides are catalyzed by two *Camellia sinensis* glycosyltransferases. Ohgami, S, Ono, E, Horikawa, M, Murata, J, Totsuka, K, Toyonaga, H, Ohba, Y, Dohra, H, Asai, T, Matsui, K, Mizutani, M, Watanabe, N, Ohnishi, T. *Plant Physiol.*, **168**, 464-477 (2015). doi: 10.1104/pp.15.00403.

⑨ Developmental patterns of emission of scent compounds and related gene expression in roses of cultivar *Rosa x hybrida* cv. 'Yves Piaget' Chen, X, Baldermann, S, Cao, S, Lu, Y, Liu, C, Hirata, H, Watanabe, N. *Plant Physiol. Biochem.* **87**, 109-114 (2015). doi: 10.1016/j.plaphy.2014.12.016.

⑩ Synthesis and characterization of quantum dot nanoparticles bound to plant volatile precursor of hydroxy-apo-10'-carotenal. Tu, VH, Kaga, A, Gericke, KH, Watanabe, N, Narumi, T, Toda, M, Brueckner, Susanne Baldermann, B, Mase, N. *J. Org. Chem.* **79**, 6808-6815 (2014). doi: 10.1021/jo500605c.

[学会発表] (計 10 件)

① 山田優作、土屋諒、廣住操俊、佐藤浩平、鳴海哲夫、戸田三津夫、大西利幸、間瀬暢之、渡辺修治、花芽誘導物質LDS1 構造要求性の解明、日本農芸化学会2016年度大会、札幌コンベンションセンター(札幌市・白石区) 2016/3/30

②岡村拓磨、瀬藤光利、佐藤浩平、鳴海哲夫、渡辺修治、間瀬暢之、化学選択的誘導体化によるイオン強度増大を指向したイメージング質量分析におけるラベル化剤の開発、日本化学会第96春季年会、2B3-29、同志社大学京田辺キャンパス(京都府・京田辺市)、2016/3/25

③増田嗣也、佐藤浩平、鳴海哲夫、渡辺修治、間瀬暢之、化学結合検出用蛍光プローブの開発：エナミン/イミニウム有機分子触媒系の迅速評価、第5回CSJ化学フェスタ2015、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)、P4-061、2015/10/14

④岡村拓磨、小川美香子、間賀田泰寛、佐藤浩平、鳴海哲夫、渡辺修治、間瀬暢之、PETイメージングにおける比放射能向上を指向したトリフルオロメチル化反応の開発、第5回CSJ化学フェスタ2015、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)、P4-057、2015/10/14

⑤大西利幸、井上智宏、渡辺修治、鈴木秀幸、チャ香气に関与するテルペン合成酵素の機能解明、植物化学調節学会第50回大会東京大学農学部(東京都・文京区)、2015/10/1

⑥山田優作、土屋諒、廣住操俊、佐藤浩平、鳴海哲夫、戸田三津夫、大西利幸、間瀬暢之、渡辺修治、花芽誘導物質 LDS1 および構造改変体の合、2015年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会(中部支部第147回例会・関西支部第471回講演会)、富山県立大学(富山県・射水市) 2015/9/20

⑦岡村拓磨、小川美香子、間賀田泰寛、佐藤浩平、鳴海哲夫、渡辺修治、間瀬暢之、比放射能向上を指向したトリフルオロメチル化反応による高感度PETプローブ合成手法の開発、第47回若手ペプチド夏の勉強会、P23、アスティかたおか(長野県・塩尻市)、2015/8/10

⑧平田拓、大西利幸、鈴木秀幸、渡辺修治、バラ香气成分 2-Phenylethanol の高温期特異的な生成に関する転写解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学津島キャンパス(岡山市・北区)、2015/3/25.

⑨神田桃代、平田拓、渡辺修治、大西利幸、バラ香气成分2-Phenylethanolの生合成経路はどのようにして季節変動するのか？植物化学調節学会第48回大会、新潟大学農学部(新潟市・西区)、2013/10/31

⑩ Momoyo Kanda, Hiroshi Hirata, Toshiyuki Ohnishi, Naoharu Watanabe, Rose scent compound 2-phenylethanol was produced via two biosynthetic pathways in response to seasonal change in environment, 6<sup>th</sup> International Symposium on Rose Research and Cultivation, Hannover (Germany), 2013/8/27

[図書] (計 1 件)

①ナノ・バイオテクノロジー 原正和、渡辺

修治、間瀬暢之、河岸洋和、森田達也、丑丸敬史、朴龍洙、猪川洋、岩田太、川田善正、三重野哲、加藤竜也、徳元俊伸、山崎昌一、小林健二、山中正道、静岡大学ナノバイオ科学研究分野編 単行本(ソフトカバー) : 268 ページ 出版社: 静岡学術出版(2016/3/9) 言語: 日本語 ISBN-10: 4864740615 ISBN-13: 978-4864740616 発売日: 2016/3/9

[その他]

ホームページ等

[http://gsst.shizuoka.ac.jp/kyoiku/senko\\_baio](http://gsst.shizuoka.ac.jp/kyoiku/senko_baio) (所属教員紹介ページ)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺 修治 (WATANABE, Naoharu)

静岡大学・創造科学技術大学院・教授

研究者番号: 90230979

### (2) 研究協力者

齋藤 隆之 (SAITO, Takayuki)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号: 10324328