

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02893

研究課題名(和文)メタボローム技術を活用した“和野菜”の風味因子の解明と生成制御

研究課題名(英文) Determination and characterization of aroma compounds in vegetable ingredients used for Washoku by metabolomics approach

研究代表者

飯島 陽子 (IIJIMA, Yoko)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号：90415456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：和食は近年世界的に注目を浴びており、そこに使われる薬味や食材は独特の風味を持つ。本研究では、和食で用いられる和野菜の、主に香気特性に着目し、メタボロミクス手法を用いてその特徴成分の特定および生成制御に関する因子を解明することを目的とした。ショウガ、サンショウ、ゴボウ、ミツバの香気特性に寄与する成分の特定、その生成制御について調べた。ショウガ、サンショウについては、その香気を担うテルペン系香気成分の生合成に関する酵素群の活性を確認し、いくつかのコードする候補遺伝子の機能同定ができた。ゴボウ、ミツバについては香気寄与度の高い香気成分の特定し、使用部位によりその含量が異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Japanese traditional cuisine “Washoku” is very popular in the world. One of the reasons of its attracting many people is attributed to its characteristic flavor from ingredients and spices specifically used in Washoku. In this study, we determined the aroma compounds contributing to characteristic flavor of vegetable ingredients frequently used in Washoku, such as ginger, Japanese pepper, burdock and Japanese honeywort. In addition, their biosynthesis and accumulation sites in each whole body were investigated. In ginger and Japanese pepper, biosynthesis of monoterpene compounds contributing as their characteristic aroma, were confirmed. In burdock and Japanese honeywort, volatile compounds contributing to each characteristic aroma were determined and they are differently accumulated in the sites for use.

研究分野：食品化学

キーワード：食品香気成分 薬味 和野菜 メタボローム

### 1. 研究開始当初の背景

和食は、その栄養バランス、おいしさ、独特の食文化的意義において近年世界的に注目を浴びている。特に和食に使用される薬味や食材は独特の風味を持つものが多いのも特徴である。しかし、これらの和食材の産地や育成法は様々であるため、その特徴成分の詳細やその生成制御については不明であるのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では、和食で用いられる和野菜の嗜好特性のうち主に香気特性に着目し、その特徴成分の特定および生成制御に関与する因子を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### シウガの香気特性とその生成

シウガの主要香気成分は citral であり、同位体ラベルを用いた代謝研究からその予想生合成経路、最終段階の geraniol dehydrogenase (GeDH) の特性および酵素遺伝子を単離していた。そこで、その前段階である geranyl acetate 加水分解酵素 (GeACh) および geraniol acetyltransferase (GeAT) をコードする遺伝子を独自に RNAseq 法により作成した EST データベースに対し、既知の他植物の同機能を持つ酵素遺伝子配列を用いた BLAST サーチにより候補 cDNA 断片を検索した。さらに完全長 cDNA を得、大腸菌を用いてタンパク誘導を行いその酵素活性を調べた。また、GeACh 活性については、シウガ植物体を用い、各部位 (葉、茎、新根茎、古根茎、ひげ根) から粗酵素を抽出し、部位による酵素活性の強さと関与する geraniol 関連香気成分の定量値を比較し、その相関について調べた。すでに同定した GeDH については、ペプチド抗体の作成を試み、シウガ植物体部位による GeDH タンパク発現量の比較を行った。

#### サンショウのテルペン系香気成分の生成

サンショウ特有のテルペン系香気成分の生成を調べるため、ブドウ山椒果皮を用いて total RNA を抽出した。精製後、次世代シーケンサーを用いた RNAseq 法によって EST データベースを作成し、他の植物における既知のモノテルペンおよびセスキテルペン合成酵素遺伝子配列情報をもとに、サンショウにおけるテルペン合成酵素遺伝子の単離を試みた。さらに大腸菌での発現系およびタバコでの一過的発現系において、揮発性テルペンの生成を確認した。

ゴボウおよびゴボウスプラウトの特徴成分と部位による生成制御

ゴボウの香気特性を調べた。ゴボウはスーパーで購入し、ゴボウスプラウトは種子を 2 週間既定条件で栽培した。それぞれのサンプルを液体窒素で凍結粉砕し、これを分析サンプルとした。そのヘッドスペースガスにおける香気成分を SPME 法で捕集し、GC-MS 分析を

行った。また、GC-MS で検出された各成分については GC-0 においかぎ (GC-0) を行い、香気特性を調べた。また、ゴボウスプラウトはえぐ味が強く、不揮発性のフェノール化合物を多く含むと予想された。そのため、HPLC によりフェノール化合物の分析を行った。

#### ミツバの香気特性

部位別の香気成分分析はヘッドスペースマイクロ固相抽出 (HS-SPME) 法で行った。ミツバを葉と茎に分けたものを凍結粉砕した。それぞれ一定量量りとり、塩化カルシウム、超純水、内部標準を加え 3 分間超音波処理後、GC-MS 分析を行った。得られたマスプロトグラムを MetAlign 及び Aloutput ソフトウェアを用いて、化合物の同定を行った。特徴成分の探索は溶媒抽出法を用いて調べた。ミツバを刻み、ジクロロメタンを加え一晩浸漬した。ジクロロメタン抽出液をろ過、脱水、Solvent-assisted flavor evaporation (SAFE) 法による抽出、ペンタンおよびペンタン:ジエチルエーテル 1:1 画分に分画し、窒素濃縮後、GC-0 による分析を行った。

### 4. 研究成果

#### シウガの香気特性とその生成

葉と古根に citral, geraniol を多く含み、茎と新根に geranyl acetate を多く含んでいた。また、ひげ根にはほとんど含まれていなかった。葉と根茎では、geranyl acetate の有無で判別でき、両方とも citral が蓄積するものの、その生成過程は異なることが予想された。そこで、根茎で特異的に起こると判断された geranyl acetate の生成および分解について着目し、各根茎の mRNA から RNAseq 法で作成した EST データベースから GeACh および GeAT をコードする cDNA の単離を行った。トマト果実で報告があるエステル加水分解酵素およびバラ花卉での報告がある GeAT をコードする cDNA 情報を用いて、Blast サーチによって候補遺伝子の探索を行った。その結果、6 種の GeACh および 4 種の GeAT 候補遺伝子断片をスクリーニングし、RACE 法によってそれぞれ 2 種については完全長 cDNA を得ることができた。しかし、大腸菌を用いてタンパク誘導を行い、可溶化画分を用いて酵素活性を調べたところ、いずれもコントロールに対して有意な活性を得ることができなかった。

部位別における GeACh 活性は、葉と茎において強かったが、根茎にも活性は認められた。新根茎粗酵素を用いて GeACh の基質特異性について調べたところ、酢酸-3-メチル-2-ブチニル、酢酸アミル、酢酸ブチルでは反応が見られなかった。今回反応が見られた中で最も活性が強かったのは酢酸フェニルであり、その次に活性が強かったのが geranyl acetate であった。GeAT 活性については、至適 pH が GeACh とほぼ同じであるため、十分に活性を調べることができなかった。

#### サンショウのテルペン系香気成分の生成

サンショウのテルペン系香気成分の生成について調べるために、既知のテルペン合成酵素との相同性を元にしたサンショウの RNA-Seq データ解析から、3つの遺伝子 ZpTPS1, ZpTPS2, ZpTPS3 を選抜した。大腸菌発現系を用いて組換え酵素を作製し、*in vitro* で酵素アッセイを行った結果、farnesyl diphosphate (FPP) を基質として ZpTPS1 は *-caryophyllene* を、ZpTPS2 は *germacrene D* を生成した。一方、ZpTPS3 では *geranyl diphosphate* (GPP) を基質として *-phellandrene* を生成する活性が検出された。同様の結果が、ペンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いた一過的な過剰発現系においても得られた。このことから、ZpTPS1 は *-caryophyllene* を、ZpTPS2 は *germacrene D* を生成するセスキテルペン合成酵素をコードし、ZpTPS3 は *-phellandrene* を生成するモノテルペン合成酵素をコードすることが分かった。いずれも生成物もサンショウ果実の香気成分として見出されていることから、これらの成分の生成は、特有のテルペン合成酵素の働きによっておこることが考察された。

ゴボウおよびゴボウスプラウトの風味特徴成分と部位による生成制御

ゴボウ根を用いて得た香気抽出液は、ゴボウらしい香りを再現していた。主な成分として、phenylacetaldehyde, 2-methoxy-3-(1-methylpropyl)-pyrazine (Pyrazine:1), 2-methoxy-3-(2-methylpropyl)-pyrazine (Pyrazine:2), methyl salicylate が検出された。このうち、GC-0 及び AEDA 法より、Pyrazine:1, Pyrazine:2 がゴボウの持つ独特な土臭い香気を感じさせ、FD ファクターが最も高かった。また、新鮮な花様の香気を持つ phenylacetaldehyde も FD ファクターが高かった。これらについてゴボウ中の含量を、検量線を作成して定量したところ、Pyrazine:1 は  $0.56 \pm 0.31$  (Ave.  $\pm$  S.D.)、Pyrazine:2 は  $3.21 \pm 0.79$  (Ave.  $\pm$  S.D.) であった。ゴボウの部位別で比較すると、いずれの成分も細い部位より葉元に近い太い部位の方が含量が多く、素材別では含量に大きな違いはみられなかった。次に、主成分分析によってごぼうとごぼうスプラウトの香気組成を比較したところ、ごぼうスプラウトでは、ごぼうの特徴香気である Pyrazine 類の他に、ごぼうには検出されない *cis*-3-Hexenal や *cis*-3-hexenylacetate など青臭さを感じさせる香気成分が多く検出されスプラウトのフレッシュ香に關与するものと考えられた。また、ごぼうスプラウトの葉と茎を比較したところ、ごぼうスプラウトの葉の特徴的な香気成分は Hexenal が多く含まれることがわかった。茎の特徴的な香気成分としては、pyrazine:2 が含まれ、ごぼう特有の土臭い香りはスプラウトの茎から由来すると考えられた。ごぼうスプラウトについて他の市販のスプラウトと比較したところ、

ごぼうスプラウトの香気組成はもやしと似ていることが分かった。一方、不揮発性のフェノール化合物組成はスプラウトとゴボウでは異なっていた。

ミツバの香気特性

葉では 47 種、茎では 14 種の化合物の同定ができたがピークが多く検出されたため、特徴的な香気成分を特定するまでには至らなかった。溶媒抽出物の GC-0 の結果、7 つの化合物において FD ファクターが高かった。これらがミツバの香気寄与成分であると考えられた。分画後の試料に対し行った官能評価では、ペンタン分画試料が「ミツバに似た香り」、ペンタン：ジエチルエーテル試料の方が「雑草・土臭い・ゴボウに似た香り」と答えた人が多かった。そのためペンタン分画のほうがミツバの特徴的な香りを示すと考察された。さらに詳細なペンタン分画試料の GC-0 では、*-pinene* がスーとするミツバの特有の香りを感じさせ、FD ファクターが 3 と最も高かった。また保持時間 35 分から 40 分においても香りが感じられたことから、これらがミツバ特有の香りを構成していると考察された。

## 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 8 件)

飯島陽子, 食品の香気分析技術についての最近の話題, 調理科学会誌 印刷中

Fujita, Y., Koeduka, T., Aida, M., Suzuki, H., Iijima, Y., & Matsui, K. (2017). Biosynthesis of volatile terpenes that accumulate in the secretory cavities of young leaves of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum*): Isolation and functional characterization of monoterpene and sesquiterpene synthase genes. *Plant Biotechnology*, 34(1), 17-28.

飯島陽子, 櫻井望, メタボロミクスによる食品の質的評価技術の進展, 食品と開発, 52, 4-7 (2017)

飯島陽子, 和食のサイエンス フードメタボロミクスによる展開, 化学と生物, 55, 593-594 (2017)

飯島陽子, 肥塚崇男, 香辛植物の香りの生合成とバイオテクノロジー, 香料, 270, 31-39 (2016)

飯島陽子, 香辛料を主とした植物食材における品質特性関連二次代謝成分の食品分析学研究, 日本食品科学工学会誌, 63, 190-198 (2016)

飯島陽子, 食品の質的評価に有用なフードメタボロミクスにおける LC-MS の活用, バイオインダストリー, 32, 10, 38-45 (2015)

飯島陽子, 葉味の化学-ショウガの風味特性とその生成-, 化学と教育, 454-455 (2015)

〔学会発表〕(計 3件)

藤田芳勸, 飯島陽子, 相田光宏, 鈴木秀幸, 松井健二, 肥塚崇男, サンショウ油胞特異的に蓄積する揮発性テルペンの生成に関する研究, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 17 日, 京都女子大学 (京都府京都市)

飯島陽子, 長尾望美, 小池理奈, 岩本嗣, ゴボウおよびゴボウスプラウトの香気特性とその比較, 日本家政学会第 68 回大会, 2016 年 5 月 29 日, 金城学院大学 (愛知県名古屋)

飯島陽子, 大場 香織, 藤田 芳勸, 肥塚崇男, 鈴木 秀幸, サンショウ属 (Zanthoxylum) 植物の揮発性成分組成の比較とそれに関わるテルペン合成酵素遺伝子のクローニング, 第 30 回香辛料研究会 2015 年 12 月 12 日, 龍谷大学 響都ホール (京都府京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

研究室 HP  
<https://kait-iijimalab.jimdo.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯島陽子 (IIJIMA, Yoko)  
神奈川工科大学, 応用バイオ科学部, 教授  
研究者番号 : 90415456

### (2) 研究分担者

鈴木秀幸 (SUZUKI, Hideyuki)  
公益財団法人かずさ DNA 研究所, バイオ研究開発部, グループ長  
研究者番号 : 80276162

### (3) 連携研究者

久保田紀久枝 (KUBOTA, Kikue)  
東京農業大学総合研究所, 教授  
研究者番号 : 90008730