

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500955

研究課題名(和文) 風味の向上を目指す香辛野菜の香りの発現・分解制御に対する多面的解析

研究課題名(英文) Pleiotropic analysis for flavor compounds to resolve generation of pleasant flavor characteristics in Japanese spices

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・准教授

研究者番号：90415456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：香辛野菜の香辛特性を制御する因子の解明を目的とし、ショウガとサンショウについて次のことを明らかにした。(1)ショウガの成熟の違いによる成分組成の違いをメタボローム解析で調べ、ショウガの黄色色素がcurcumin、demethoxycurcumin、6-dehydrogingerdioneであることを明らかにした。(2)ショウガ根茎の香気に寄与するgeranialの生成について、鍵となるgeraniol dehydrogenaseのcDNAの単離、機能同定、発現パターンを明らかにした。(3)サンショウ香気組成は種類によって異なり、食用種ではcitronellalが鍵であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It is popular to use fresh herbs and spices as “Yakumi” for Japanese cuisine, because their fresh flavor improves pleasant aroma or inhibit unsatisfied flavor of other foods. In this study, we focused on the flavor generation of ginger and Japanese pepper, and performed comprehensive analysis and clarified contributing factors for generation of their flavor. (1) Comparative analysis of immature and mature ginger rhizomes screened some key compounds which differentiate flavor profiles of them. Furthermore, yellow pigment of ginger rhizomes was dependent on the contents of curcumin, demethoxycurcumin and 6-dehydrogingerdione. (2) We isolated and confirmed geraniol dehydrogenase (ZoGeDH) responsible for generation of geranial, a characteristic aroma compound in ginger. (3) Multivariate analyses of volatile profiles from eight kinds of Zanthoxylum leaves showed that Z. piperitum (Japanese pepper) lines were differentiated by high content of citronellal.

研究分野：食品化学

キーワード：香辛野菜 香気成分 色素成分 ショウガ サンショウ ゲラニオール脱水素酵素

1. 研究開始当初の背景

香辛料は、世界的には乾燥したものが主に使用されるが、日本では新鮮なまま“薬味”として用いられることが多い。特に日本食においては、料理への彩りや香りの付加、口直しとして、その役割は大きい。そのため、香辛野菜の食材としての品質は、香りや味の強さ、またそれらのバランスによって決まるといえる。しかし、香辛野菜は季節もの、“旬”があるものも多い。独特の新鮮な香辛特性、特に香りの維持は難しく、調理加工によって変質しやすいものもある。そのため、乾燥物はもとより、チューブ製品、瓶詰めなどの加工の観点では、いかに新鮮な香辛特性を維持するかが課題となっている。申請者らは、過去に香辛、香味野菜について香りや辛味、色などの成分分析や構造決定、香気成分生合成遺伝子の機能同定、機能性評価など、多面的に研究を行ってきた。また近年、網羅的成分分析による食品の成分複雑性による新しい食品評価方法を確立してきた。そこで本研究では、本手法を香辛野菜に応用し、収穫時期の違いや調理加工中などの変化を網羅的成分プロファイルから検証し、香辛特性を制御する因子を明らかにしようという着想に至った。そのためには、食材そのものにおける香辛成分の生合成や代謝の理解、遺伝的背景の理解が必要である。本研究では遺伝子発現データベースを作成し、特に香気成分の生合成遺伝子をスクリーニングし、香辛野菜の蓄積成分とその生成に関わる遺伝子発現情報を得、食材自体の品質評価や品質向上に役立てられると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、香辛野菜の香気成分の生成蓄積や調理加工による消長に着目し、食する立場からの香辛機能を制御する因子を解明することを目的としている。薬味として日本食独特に使用されるショウガ、サンショウをサンプル対象とし、第一にメタボローム解析による成分比較解析により、香辛野菜における香気成分組成の品種や収穫時期の違い、調理加工の影響を調べることにした。第二に香気成分の生成に関与する酵素遺伝子の機能同定を行い、香りの生成量や強さと遺伝子発現の相関を調べることにした。これらをまとめて、香辛成分の消長を包括的に調べ、高品質な香辛野菜、香辛野菜の嗜好の上での効果的な食べ方のための基礎的現象を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下の研究を進めた。

(1)メタボローム解析によるショウガの収穫時期の違いにおける成分組成の変化とその成分構造

産地が異なる未熟なショウガ根茎(新ショウガ)と成熟したショウガ根茎(ひねショウガ)を調達し、香気成分および不揮発性成分

について網羅的成分比較解析を行った。各凍結粉碎サンプルを調製し、香気成分については、固相マイクロ抽出法により香気成分を捕集し、GC-MS によって分析した。不揮発性成分については、80%メタノール抽出を行い、LC-MS により分析を行った。多サンプルデータを比較解析ソフトを用いて一括比較し、検出された 273 成分を対象に多変量解析を行い、各サンプルの成分組成特徴を調べた。

(2)ショウガ黄色色素成分の構造と栽培地、品種の異なるショウガにおける比較解析

(1)で見出された成分群について詳細に調べると、これまでに知られていなかった黄色色素成分が含まれていることが分かった。そこで、この成分を単離し、各種機器分析で構造決定を行った。また、品種や産地における含量の比較を LC によって行った。

(3)品種の異なるサンショウのメタボローム解析による香気成分組成の比較解析

サンショウはミカン科サンショウ属に分類されるが、品種による香気組成の違いについてはよく分かっていない。そこで6種の異なるサンショウ属植物を入手し、その若葉を用いて香気成分のメタボローム解析により組成を比較した。香気捕集法は、固相マイクロ抽出法により行い、GC-MS によって分析した。

(4)ショウガおよびサンショウの特有香気成分の生合成に関与する遺伝子スクリーニングと機能同定

ショウガおよびサンショウのいずれも geraniol 関連のモノテルペン化合物が香気に大きく寄与する。これらの香気生成機構を調べるため、ショウガ根茎およびサンショウ果実より RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより EST データベースを作成した。

ショウガについては、重水素ラベルした geraniol を用いて geraniol からの代謝経路について推定した。その結果、ショウガの主要香気成分であるゲラニアルは、geraniol からの geraniol 脱水素酵素の働きで生成することが予測された(図3)。そのため、この酵素遺伝子配列について、既知のアルコール脱水素酵素遺伝子(スイートバジル由来 geraniol 脱水素酵素遺伝子)をもちいたホモロジー検索によって候補遺伝子をスクリーニングし、完全長 cDNA を得、大腸菌によるタンパク誘導を行い、酵素活性を測定した。サンショウについては、モノテルペン合成酵素遺伝子のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1)ショウガの収穫時期の違いによる成分組成変化

新ショウガとひねショウガの成分組成を比較したところ、特に香気組成の違いが大きく、新ショウガにおいて、geranyl acetate、citronellyl acetate、bornyl acetate など、アセチル化合物が多く存在していることが分かった。また、不揮発性成分についても同様

に調べたところ、ほとんどの成分に顕著な違いがなかったが、いくつかのフェノール化合物の組成に変化が見られた。

(2) ショウガ黄色色素成分の構造

フェノール化合物のうち、HPLC による 420nm で吸収を持つ 3 種の成分に違いがみられ、これらはショウガの黄色に関係すると考えられた。そこでこれらの 3 種の成分について構造を調べたところ、2 種については curcumin と demethoxycurcumin の標準品と LC-MS における溶出時間や MS パターンが一致した。もう 1 種は構造が分からなかったため、ショウガ根茎より分取し、MS および NMR によって構造決定をおこなったところ、6-dehydrogingerdione であることが分かった(図 1)。各成分について、検量線を作成し、定量分析を行ったところ、curcumin、demethoxycurcumin、6-dehydrogingerdione の 100g あたりの平均値は、それぞれ 2.2mg、1.6mg、20.0mg であった。黄色の強い金時ショウガでは curcumin、demethoxycurcumin が多い傾向にあったが、品種や産地で大きく異なっていた。同じ土壌で栽培した新ショウガとひねショウガを比較すると、いずれも新ショウガよりひねショウガで多い傾向を示し、ひねショウガの黄色化に関与していることが考察された。

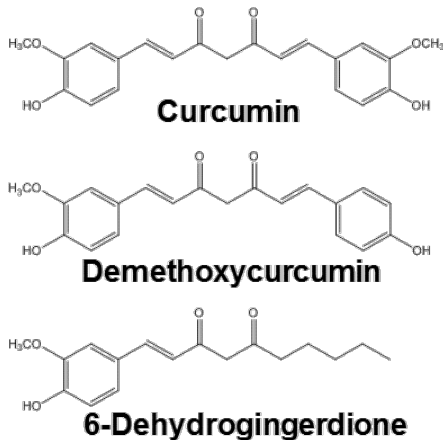


図 1. ショウガの黄色色素成分の構造

(3) 品種の異なるサンショウの香り成分の組成比較

6 種のサンショウから検出された香り成分組成をもとに主成分分析および階層的クラスタ解析により、サンプル間の類似性を調べた。解析は各検出成分の log₁₀ 値を用いた。主成分分析の結果、第一主成分 26.6%、第二主成分 20.7% でサンプルが分離された(図 2)。食用に用いられるサンショウに属する種は、いずれも近いクラスターを形成した。食用サンショウ種の香り寄与度の高い成分をローディングプロットにより精査すると、モノテルペン類の種類が多く、他の種に比べて citronellal、citraonellyl acetate が多く検出された。

各ピーク面積値の log₁₀ 値を解析に使用。

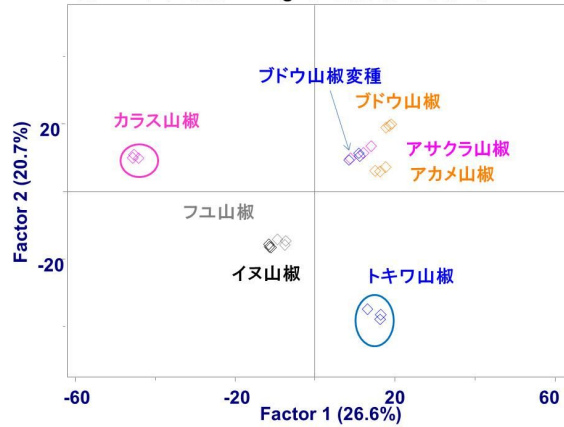


図 2. サンショウ葉の香りプロファイルに基づく主成分分析(スコアプロット)

(4) ショウガおよびサンショウの特有香気の生合成に関与する遺伝子スクリーニングと機能同定

ショウガについては、レモン様の香り成分である geranial の生合成経路を重水素ラベルした geraniol の挙動から図 3 のように推定し、geraniol 脱水素酵素が関与することを考察した。完全長 cDNA のクローニングを行い、大腸菌でタンパク誘導、酵素活性反応により、geraniol 脱水素酵素をコードする遺伝子を単離することができた。この遺伝子の発現パターンを調べたところ、未熟な根茎や葉では発現が強いものの、ひねショウガではほとんど発現がみられなかった。これらの結果より、根茎成熟中に geranial は生成され、根茎に蓄積するが、根茎が古くなるとその反応性は低くなり、それまでに生成した geranial がそのまま高蓄積されていると考察した。ショウガの根茎の成熟中は、geranylacetate が減少し、geranial が増加することから、geraniol を基軸として成熟中に geranyl acetate を基質とした加水分解反応、酸化反応で geranial が生成すると考えた。今回、esterase 酵素遺伝子の単離を行ったがまだ活性のあるものを見出していない。

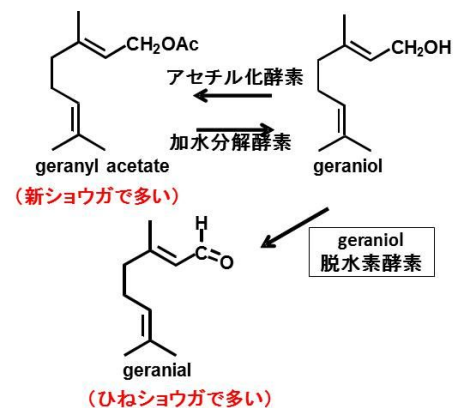


図 3. ショウガ主要香気の構造変換と関与する酵素

今後、geranyl acetate の加水分解反応と geraniol のアセチル化反応のバランスを制御する因子について精査する予定である。

サンショウについては、D-limonene および geraniol の生成に関わるモノテルペン合成酵素の探索を行った。現在までに完全長 cDNA を 2 種見出ししており、活性を測定し、機能同定を試みる予定である。

以上のことから、ショウガやサンショウの香気成分の生成、消長について、成分レベル、遺伝子レベルで検証を行った。近年食品の風味に対する消費者の興味やこだわりは強く、風味の強さは食品の付加価値として大きい。本研究の成果は、食品加工においても応用可能であり、さらに香辛野菜の最適な収穫時期や風味を保つことが可能な保存法なども世界に発信できると考えている。

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)

[雑誌論文](計 8 件)

Iijima Y, Joh A (2014) Pigment composition responsible for the pale yellow color of ginger (*Zingiber officinale*) rhizomes., *Food Sci Tech Res*, 20: 971-978. 査読有

Iijima Y, Koeduka T, Suzuki H, Kubota K (2014) Biosynthesis of geraniol, a potent aroma compound in ginger rhizome (*Zingiber officinale*): molecular cloning and characterization of geraniol dehydrogenase., *Plant Biotechnol.* 31, 525-534. 査読有

飯島陽子 (2014) 香辛料・ハーブとその香り～香気生成メカニズムとその蓄積、におい・かおり環境学会誌, 45:132-142. 査読無

Iijima Y (2014) Recent advances in the application of metabolomics to studies of biogenic volatile organic compounds (BVOC) produced by plant. *Metabolites*, 4:699-721. 査読有

飯島陽子 (2014) 食品の香気成分複雑性に基づく解析技術と食品の質的評価への応用, *バイオインダストリー*, 31(8): 9-14. 査読無

及川彰, 飯島陽子 (2014) 食品分析におけるメタボローム解析 香りや風味の一斉評価, *生物の科学-遺伝*, 58-62. 査読無

飯島陽子, 和食と薬味, *自動車技術会関東支部報*, 63, 24-27. 査読無

飯島陽子 (2013) メタボロミクスに基づく多成分解析の食品の質的評価に対する有用性, *食品と開発*, *UBMメディア*, 48:7-9. 査読無

[学会発表](計 11 件)

飯島陽子, 大場香織 サンショウ

(*Zanthoxylum*) 属植物葉における揮発性成分組成の比較, 第 58 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2014 年 9 月 20 日:和歌山大学(和歌山県和歌山市)

飯島陽子, 食品の品質評価におけるメタボローム解析技術の有用性, 食品分析研究会(招待講演), 2014 年 9 月 5 日:東洋大学(東京都文京区)

飯島陽子, 城彩 ショウガ根茎の黄色色素成分について, 日本食品科学工学会第 61 回大会, 2014 年 8 月 30 日:中村学園大学(福岡県福岡市)

飯島陽子 質量分析を用いた網羅的成分解析の食品加工への応用, 第 29 回茶学術研究会講演会特別講演(招待講演), 2014 年 3 月 14 日:ホテルアソシア静岡(静岡県静岡市)

飯島陽子, 肥塚崇男, 鈴木秀幸, 久保田紀久枝 ショウガの主要香気である geraniol 化合物類生成の分子機構について, 第 57 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2013 年 10 月 6 日:埼玉大学(埼玉県さいたま市)

Yoko Iijima, Takao Koeduka, Hideyuki Suzuki, Kikue Kubota. Characterization of the acyclic monoterpene biosynthesis responsible for pleasant aroma in fresh ginger rhizome., 10th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology 2013 年 4 月 16 日: Eisenach (Germany)

飯島陽子, 櫻井望, 鈴木秀幸, 柴田大輔 新ショウガとひねショウガの多面的成分組成の比較, 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 27 日:東北大学(宮城県仙台市)

飯島陽子 生鮮野菜の品質評価に対するメタボローム解析の応用, 2012 年度日本生物工学会技術セミナー「食品加工技術と食のメタボロミクス最前線」2013 年 3 月 23 日:せんだいメディアテーク(宮城県仙台市)

飯島陽子, 櫻井望, 鈴木秀幸, 柴田大輔 多様な成分の包括的解析による新ショウガとひねショウガの比較, 2012 年 10 月 26 日:日本大学(神奈川県藤沢市)

飯島陽子, 肥塚崇男, 鈴木秀幸, 久保田紀久枝 ショウガ根茎の香気寄与モノテルペノイドの生成について, 第 30 回日本植物細胞分子生物学会, 2012 年 8 月 4 日:奈良先端科学技術大学院大学(奈良県生駒市)

飯島陽子, 櫻井望, 鈴木秀幸, 柴田大輔 LC-FTICR-MS を用いたメタボローム解析に基づく新ショウガとひねショウガの比較, 食品科学工学会第 59 回大会, 2012 年 8 月 31 日:藤女子大学(北海道札幌市)

〔図書〕(計1件)

Iijima Y, Koeduka T, Suzuki H, Kubota K.
(2014) Biotransformation of the acyclic
monoterpenoids responsible for the pleasant
aroma in fresh ginger rhizome. In Current
Topics in Flavor Chemistry & Biology,
p328-332. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

<http://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・准教授

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