

<平成 22 年度助成>

香辛料の薬味としての“さわやかさ”に關与する 香気生成と維持に關する研究

飯 島 陽 子

(神奈川工科大学応用バイオ科学部栄養生命科学科)

1. 緒 言

香辛料は、他の食品のにおいのマスキングや香りの付加、それにともなう食欲増進作用、食品の防腐効果など、様々な目的で料理に利用されてきた。世界的には、その手軽さから乾燥して使用されることが多いが、日本を中心としたアジア諸国では、香辛料を生のまま、時には野菜として扱うこともよくある。そのような香辛野菜の中で、日本ではショウガは最もポピュラーな香辛野菜といえる。ショウガのさわやかな香りとシャープな辛味は、日本では古来から魚料理や寿司などの口直しや臭いのマスキングの目的で使用されてきた。ショウガのさわやかな香気的主要成分は、citralを中心としたモノテルペン類であることが分っている¹⁾(図1)。一方、辛味成分は、6-gingerolが主要成分であり、乾燥保存により6-shogaolが生成することが知られている。加熱や調理加工に対して、辛味成分は比較的安定であるのに対し、

citralなどの香気寄与成分は不安定であるため、ショウガの新鮮な香りの維持は難しいとされている。また、ショウガの種類や成熟度、倍数体によっても香気組成が異なり、その組成がショウガの品質に与える影響も大きい²⁻⁴⁾。

このような背景から、本研究ではショウガの主要香気成分である citral を中心にした香気の生成およびその制御について解明することを目的としている。そのために、まず citral の生成に着目し、citral および関連する geraniol 類縁成分との生体内変換により、新鮮ショウガ根茎ではどのように香気成分組成のバランスが保たれているのかを調べ、今回 citral 生合成酵素遺伝子およびその特性について詳細に調べたので報告する。

2. 研究方法

2.1. 安定同位体ラベル geraniol を用いたショウガ根茎への取り込み実験による変換成分の分析

重水素ラベルした geraniol は、geranic acid よ

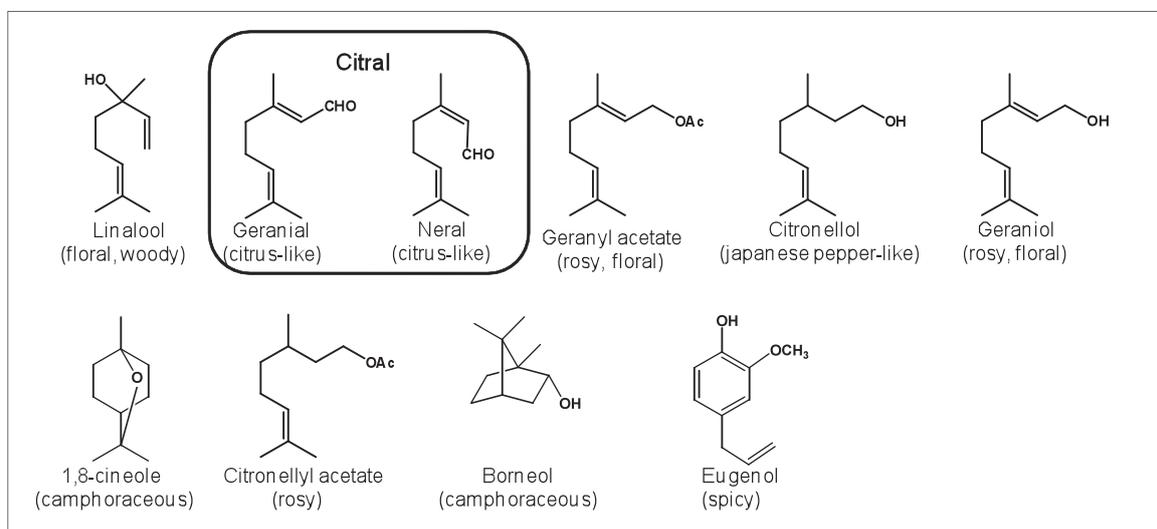


図1 ショウガの主要な香気寄与成分

り合成した。LiAlD₄ (5g) を脱水 THF (130ml) に溶かし冷却後、11g/20ml THF の geranic acid を滴下しながら加え、水中で 4hr 攪拌し、その後室温で 3hr 攪拌した。TLC で生成物を確認し、セライトでろ過後、脱水し、濃縮した。濃縮物には [1,1-²H₂]-geraniol および [1,1-²H₂]-nerol が混在していることを GC-MS で確認した。その後、分取 HPLC により [1,1-²H₂]-geraniol を精製し、取り込み実験に用いた。

市販の金時ショウガの根茎 (未熟根茎) を葉がついたまま、8 ~ 10 株ずつサンプルに用いた。1.95 mM の [1,1-²H₂]-geraniol を加えた 0.6 mg/ml Tween 80 を含む水溶液 (200 ml) を調製し、サンプルを 24 hr 浸漬した。コントロールとしては、[1,1-²H₂]-geraniol を除去した水溶液を用い、同様に浸漬した。その後、根茎のみを十分水で洗浄後、表皮をむいてから液体窒素中で粉碎した。得られたパウダー 10 g を内部標準として methyl decanoate 0.2 mg を含むジエチルエーテル (50 ml) で二回抽出し、脱水濃縮後、GC-MS 分析に供した。

GC-MS 条件は以下の通りである。

GC-MS 装置 : Agilent Technologies 7890A-5975C

カラム : HP-5MS, 30 m x 0.25 mm (I.D.) x 0.25 μm (film thickness)

流速 : 1.0 ml/min

注入口温度 : 250°C

イオン源温度 : 230°C

四重極温度 : 150°C

昇温条件 : 50°C (2 min hold), 5°C/min (180°C まで), 15°C/min (250°C まで), 250°C (4 min hold)

2.2. 粗酵素系におけるゲラニオール類縁成分の相互変換における酵素活性測定による生成物の確認

ショウガ根茎 (未熟根茎) 1 g に酵素抽出用バッファ (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 % glycerol,

10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM mercaptoethanol, Complete protease inhibitor カクテル) 5 ml を加えて 4°C でホモジナイズ、遠心分離後、上清を粗酵素液とした。タンパク量を測定し、30 μg タンパク量相当を各酵素活性に用いた。粗酵素系における geraniol 類縁成分の相互変換についての反応測定は以下のように行った。各反応後 (23°C, 4hr)、それぞれ 300 μl の MTBE (methyl t-butyl ether) で抽出し、GC-MS 分析した。

ゲラニオール脱水素酵素活性測定 :

1 mM geraniol および 1 mM NADP を含む 50 mM Glycine-NaOH バッファ (pH 9.0) に粗酵素を加えて反応させた。

ゲラニオールアセチル変換酵素活性測定 :

1 mM geraniol および 0.2 mM Acetyl CoA を含む 50 mM Tris-HCl バッファ (pH 7.0) に粗酵素を加えて反応させた。

Geranyl acetate esterase 活性 :

1 mM geranyl acetate を含む 50 mM Tris-HCl バッファ (pH 7.0) に粗酵素を加えて反応させた。

2.3. ショウガ根茎における EST データベースからの酵素遺伝子のスクリーニング

ショウガのゲノム情報として、すでに EST (Expression Sequence Tags) データベースが公開されている (Ginger and Turmeric EST database, <http://www.agcol.arizona.edu/cgi-bin/pave/GT/index.cgi>)。本データベースより配列既知の alcohol dehydrogenase, alcohol acetyltransferase, esterase を用いて BLAST サーチを行い、候補となる遺伝子断片を探索した。

2.4. ショウガにおけるゲラニオールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*GeDH*) のクローニングと機能同定

2.3. の結果から、alcohol dehydrogenase とアノテーションされた 1 遺伝子について、詳細に調べた。ショウガ根茎から抽出した RNA より cDNA を調製した。EST データベースにおける配列か

らプライマーを作成し、RACE 法により完全長 cDNA を得た。配列を確認後(1104bp)、pET 28a ベクターにクローニングし、大腸菌 Rosetta (DE3) pLys S を用いて、タンパク誘導を行った(0.5mM IPTG, 18°C, 18hr)。超音波による可溶化を行い、遠心分離後、上清について活性を確認した。さらに、ニッケルキレートカラムにより精製し、酵素の各種性質を調べた。

2.5. ショウガにおける *GeDH* 遺伝子の発現

ショウガ植物体において、葉、茎 1(上部)、茎 2(下部)、未熟根茎、親根茎、根の 6 部位をそれぞれ分離し、各部位から RNA を調製し、cDNA を調製した。*GeDH* 遺伝子の発現について、定量的リアルタイム PCR により調べた。また同時に、各部位から香気成分を抽出し、GC-MS 分析を行い、各部位の citral 含量と *GeDH* 遺伝子発現の相関について調べた。

3. 研究結果および考察

3.1. ショウガ根茎生体内での安定同位体ラベルゲラニオールの変換

ショウガ根茎に [1,1-²H₂]-geraniol 処理した際の取り込み量について、コントロールとの同位体比率の比較から求めた。図 2 にコントロールでの geraniol のマスプロファイルと、[1,1-²H₂]-

geraniol 処理後のショウガ根茎中の geraniol のマスプロファイルを示した。[1,1-²H₂]-geraniol 処理すると、m/z 154 と m/z 156 のイオンが検出されたことより、内在性の geraniol とともに重水素ラベルした geraniol が蓄積していることが分かる。

マススペクトルにおける同位体検出から、geraniol 以外のモノテルペン成分を解析すると、[1,1-²H₂]-geraniol 処理により、citral, geranyl acetate, citronellol で安定同位体比率がコントロールに比べて変動することから、これらの化合物に [1,1-²H₂]-geraniol が代謝されることが分かった。重水素同位体を示すマスプロファイル

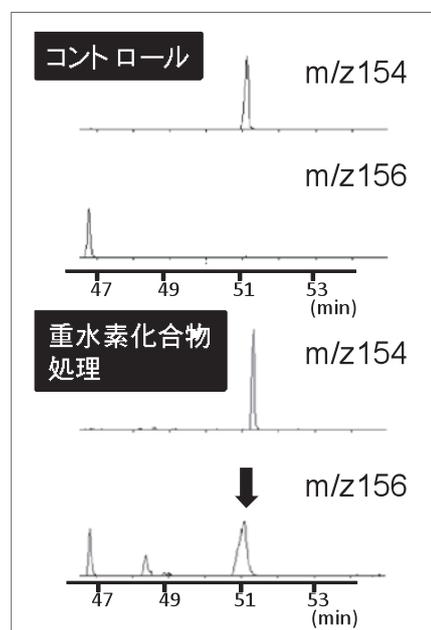


図 2 ショウガ根茎における重水素ラベルゲラニオールの検出

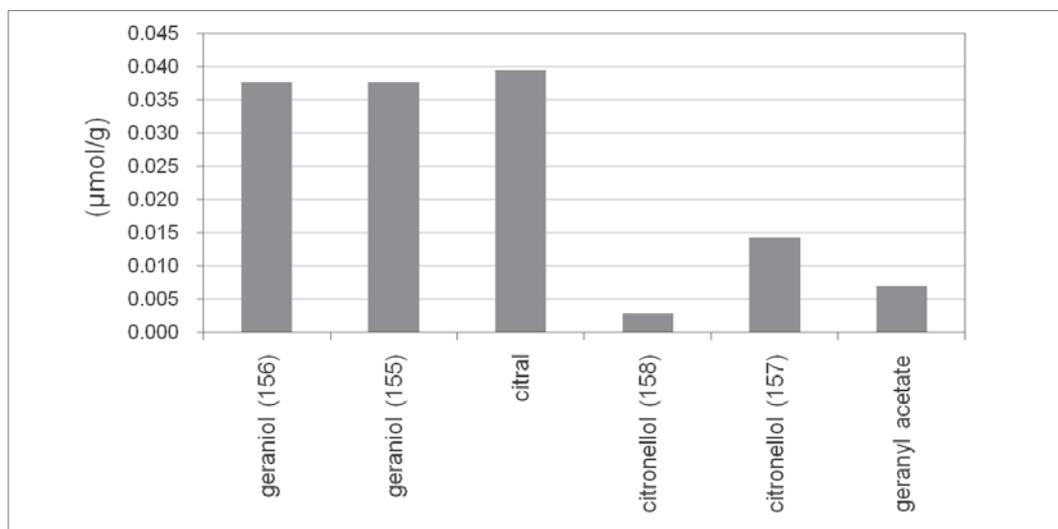


図 3 重水素 geraniol 処理したショウガ根茎において検出された重水素ラベル成分 (geraniol および citronellol については、2 つの水素が重水素であるもの(156 および 158)と、1 つの水素が重水素であるもの(155 および 157) が検出された。

により定量を行った結果を図3に示す。その蓄積量は、geraniol、citralで0.035-0.040 $\mu\text{mol/g}$ と多かった。一方、geranyl acetateやcitronellolも量は少ないものの、 $[1,1-^2\text{H}_2]$ -geraniolから生成することが確認された。特にgeraniolとcitronellolでは、 $[1,1-^2\text{H}_2]$ -geraniolおよび $[1,1-^2\text{H}_2]$ -citronellolだけではなく、1か所だけ重水素ラベルされた $[1-^2\text{H}]$ -geraniolおよび $[1-^2\text{H}]$ -citronellolも検出された。特に、citronellolについては、そのほとんどが $[1-^2\text{H}]$ -citronellolであると考えられた。これらの化合物の推定変換スキームについて図4に示す。まず、 $[1,1-^2\text{H}_2]$ -geraniol (m/z 156) から、geraniol dehydrogenase (*GeDH*) の作用で citral (m/z 153) が生成する。しかし、この反応は可逆的であり、生成した citral の一部は還元反応により geraniol に還元し、 $[1-^2\text{H}]$ -geraniol (m/z 155) が蓄積すると考えた。同様に、citronellol については、おそらく citral の段階で citronellal に geraniol double bond reductase (*DBR*) が作用し、その後 citronellol dehydrogenase (または

geraniol dehydrogenase) の働きで還元し、 $[1-^2\text{H}]$ -citronellol (m/z 157) が検出すると考えられた。

3.2. 粗酵素系における geraniol 代謝酵素の活性確認

3.1. の安定同位体ラベル geraniol の代謝を確認したことから、推定代謝経路に基づく粗酵素系における酵素活性を調べた。Geraniol を基質とした geraniol acetyltransferase (*GeAT*)、geraniol dehydrogenase (*GeDH*)、geraniol double bond reductase (*GeDBR*)、geranyl acetate を基質とした geranyl acetate esterase (*GeACh*) について調べた。生成物の検出結果について図5に示す。*GeDBR* 以外の酵素活性測定において活性を確認でき、予想される生成物が検出された。以上の結果から、geraniol からの citral および geranyl acetate の生成機序、geranyl acetate からの geraniol への酵素的加水分解が確認できたので、それらに関与する酵素遺伝子のクローニングを進めることにした。

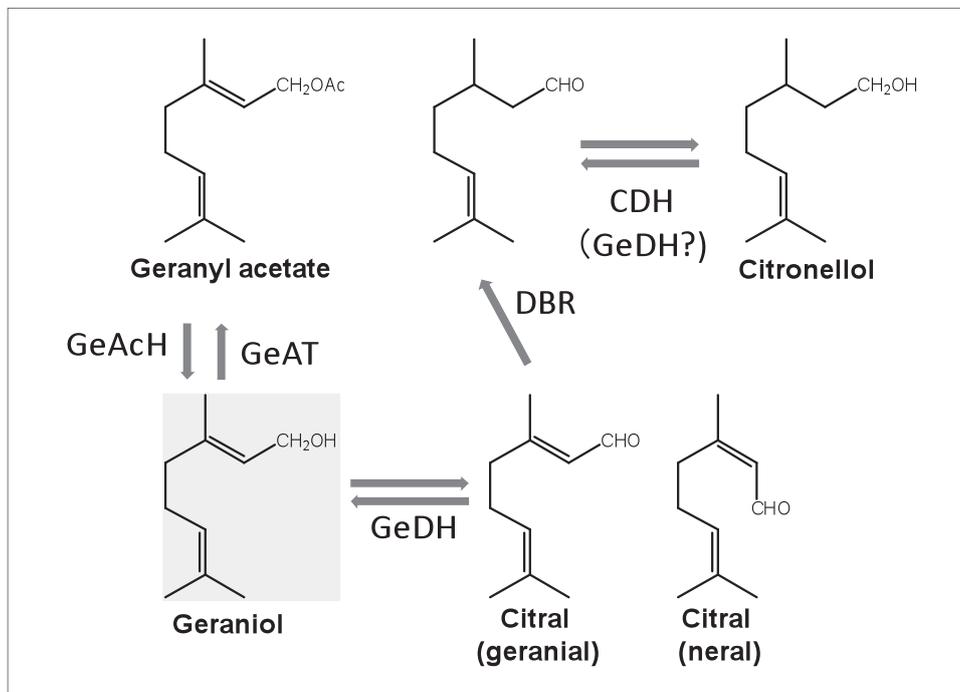


図4 GC-MSの結果から推定したショウガにおけるgeraniolを中心とした変換スキームとそれに関与すると考えられる酵素系 (GeAT: geraniol acetyltransferase, GeDH: geraniol dehydrogenase, GeDBR: geraniol double bond reductase, GeACh: geranyl acetate esterase)

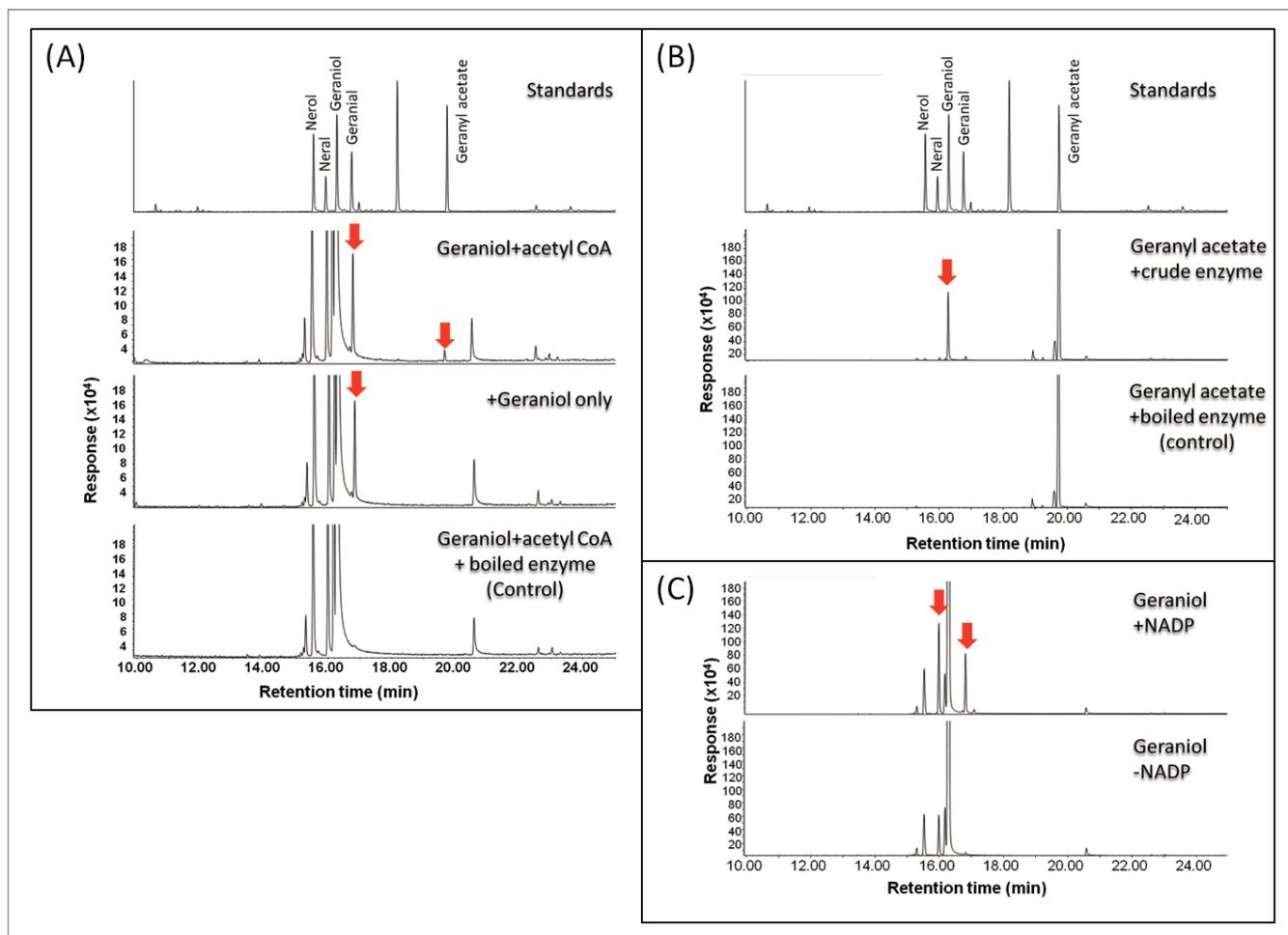


図5 粗酵素系において得た反応物のガスクロマトグラム (A: GeAT, B: GeAcH, C: GeDH, A 上段: 標品, 中段: 粗酵素 + geraniol + アセチル CoA の反応物, 下段: 失活酵素 + geraniol + アセチル CoA の反応物 B 上段: 標品, 中段: 粗酵素 + geranyl acetate の反応物, 下段: 失活酵素 + geranyl acetate の反応物 C 上段: 粗酵素 + geraniol + NADP の反応物, 下段: 粗酵素 + geraniol の反応物)

3.3. ショウガ *GeDH* 遺伝子のクローニングと *GeDH* の酵素的キャラクタリゼーション

ショウガ根茎から作成した EST データベースに対して、他の植物で単離された *GeAT* (バラ花卉⁵⁾)、*GeDH* (バジル葉⁶⁾)、*DBR* (raspberry ketone/zingerone synthase, ラズベリー⁷⁾)、esterase (Acetylajmalan esterase, *Rauvolfia verticillata*⁸⁾) の配列を用いて BLAST 検索を行い、相同性の高い EST 断片についてスクリーニングを行った。次に、それぞれの遺伝子断片からプライマーを設計し、金時ショウガ根茎から調製した total RNA を逆転写後鋳型として用い、RACE 法により各遺伝子の全長 cDNA の作成を試みた。増幅

が見られないもの、ストップコドンの存在により全長が得られないものも多く、現在のところ、*GeDH* 様遺伝子 (*ZoGeDH*) および *DBR* 様遺伝子 (*ZoDBR1*, *ZoDBR2*) が全長として得られている。これらの遺伝子から大腸菌においてタンパク誘導を試みた。*ZoGeDH* については、His tag タンパク質として、可溶性画分に得ることができたが、*ZoDBR1*, *ZoDBR2* については、タンパク発現は確認できたものの、可溶化することができず、現在も検討中である。

次に、大腸菌より得られた *ZoGeDH* について精製後、活性測定を行い、その特徴を調べた。結果を図 6 に示す。pH 9.5 において、geraniol

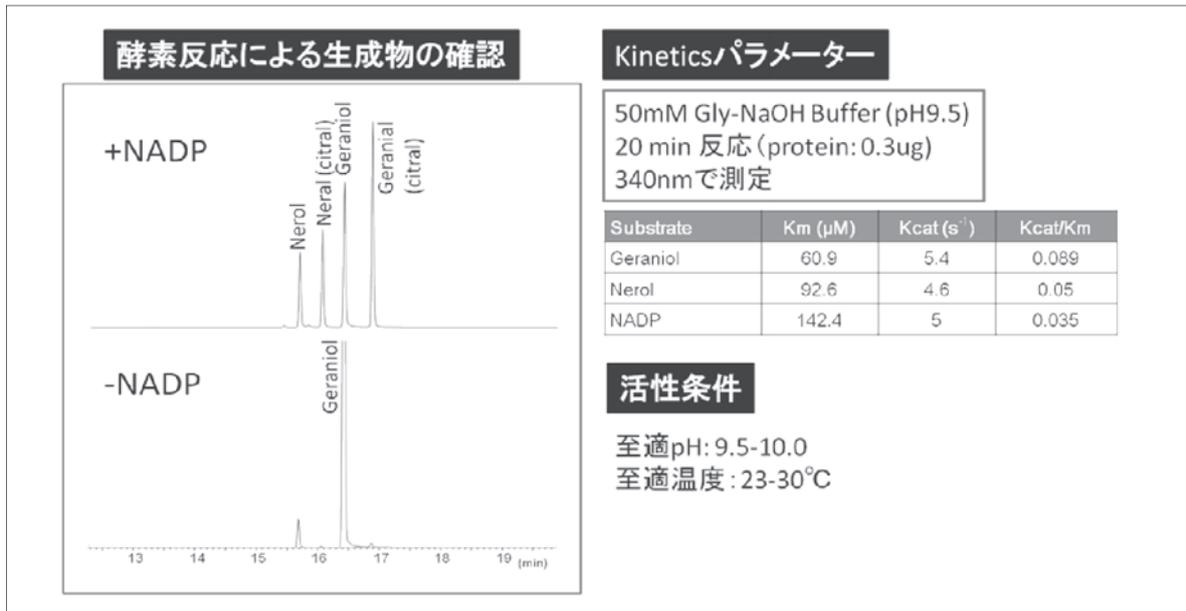


図6 ZoGeDH 酵素のキャラクタリゼーション

を基質として補酵素 NADP を添加すると citral (geranial+neral) が検出された。一方、NADP 非存在下、または NAD 存在下では citral 生成は見られなかった。基質特異性を確認したところ、ZoGeDH は、geraniol および nerol に対してほぼ同等の活性を示したが、それ以外にも cinnamylalcohol などにも活性を示し、基質特異性はあまり強くないことが分かった。この結果は、スイートバジルから単離された GeDH の性質と同様であった⁶⁾。また、geraniol, nerol および NADP に対する Km 値はそれぞれ 61 μM , 93 μM , 142 μM であり、Kcat/Km は、0.09, 0.05, 0.035 であった。

また、ショウガ植物体の部位別における citral 含量と ZoGeDH の発現について比較した。葉、茎上部、茎下部、新根茎、古根茎、根について total RNA および citral を抽出し、分析を行った。Citral は根茎のみならず葉や茎においても含まれており、これらの部位においても ZoGeDH の発現がみられた。しかしながら、アントシアニンを多く蓄積する茎下部では ZoGeDH の発現は小さかった。根においては、citral は存在せず、ZoGeDH の発現もほとんどみられなかった。これ

らの結果から、ZoGeDH が発現 citral 生成に相関があることが考察できた。しかし、古根茎については、citral が多いにもかかわらず、ZoGeDH の発現は小さかった。これはおそらく、根茎が未熟であった状態で citral が生成し、根茎が成熟、老化していく過程で ZoGeDH は発現しなくなるものの、すでに生成した citral がずっと貯蔵蓄積されているからであろうと考えられた。通常、ショウガの根茎は未熟な状態で収穫され(新ショウガ)、貯蔵により成熟して市場に出回ることが多い(ひねショウガ)。そして、ひねショウガのほうが新ショウガより citral が多い傾向にあるが、今回の ZoGeDH の発現挙動の結果から、成熟中に citral が生成が進み、ZoGeDH の発現がなくなると同時に citral 生成が止まり、それまでに生成した citral が長期間組織内に蓄積するものと考えられる。今後、貯蔵中の経時的な成分変動の要因についても調べていきたいと考えている。

4. まとめ

本研究では、ショウガ根茎における citral を中心とした geraniol 関連成分の相互変換、挙動について、化学的見地、分子生物学的見地から調

べた。その結果、geraniolを中心とし、geranyl acetate、citral、citronellol間において内在性酵素の関わりにより変化することが分かり、その性質を同定できた。特にgeraniol、citral間では、geraniol dehydrogenaseが關与することが分かり、その責任遺伝子の単離に成功した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、貴重な研究助成を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団および関係者の皆様に心より感謝申し上げます。貴財団の益々のご発展をお祈りいたします。

文 献

- 1) Nishimura O., Identification of the Characteristic Odorants in Fresh Rhizomes of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Using Aroma Extract Dilution Analysis and Modified Multidimensional Gas Chromatography-Mass Spectroscopy., *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2941-2945 (1995)
- 2) 「ショウガ」香り百科事典, 日本香料協会, 朝倉書店, pp267-270 (2006)
- 3) Sekiwa-Iijima Y., Aizawa Y. and Kubota K., Geraniol Dehydrogenase Activity Related to Aroma Formation in Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5902-5906 (2001)
- 4) Wohlmuth H., Smith M.K., Brooks L.O., Myers S.P. and Leach D.N., Essential oil composition of diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) grown in Australia., *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1414-1419 (2006)
- 5) Shalit M., Guterman I., Volpin H., Bar E., Tamari T., Menda N., Adam Z., Zamir D., Vainstein A., Weiss D., Pichersky E. and Lewinsohn E., Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A. Geraniol/Citronellol acetyltransferase in developing rose petals., *Plant Physiol.*, 131, 1868-1876 (2003)
- 6) Iijima Y., Wang G., Fridman E. and Pichersky E., Analysis of the enzymatic formation of citral in the glands of sweet basil., *Arch. Biochem. Biophys.*, 448, 141-149 (2006)
- 7) Koeduka T., Watanabe B., Suzuki S., Hiratake J., Mano J. and Yazaki K., Characterization of raspberry ketone/zingerone synthase, catalyzing the alpha, beta-hydrogenation of phenylbutenones in raspberry fruits., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 412, 104-108 (2011)
- 8) Ruppert M., Woll J., Giritch A., Genady E., Ma X. and Stöckigt J., Functional expression of an ajmaline pathway-specific esterase from *Rauvolfia* in a novel plant-virus expression system., *Planta*, 222, 888-898 (2005)

Generation of acyclic monoterpenoids responsible for pleasant aroma in ginger rhizome

Yoko Iijima

Department of Nutrition and life science, Kanagawa Institute of Technology

The characteristics of fresh ginger rhizome is pleasant citrus aroma with its pungent flavor. Although volatiles (or essential oil) of ginger rhizome include various monoterpenes, sesquiterpenes and phenyl propanoids, the key compounds contributing to ginger aroma are occupied by some monoterpenoids and eugenol. In these compounds, geraniol derivatives, such as citral, geranyl acetate and citronellol, are quantitatively and qualitatively responsible for fresh citrus and floral aroma of ginger. Furthermore, their composition is changeable and different by cultivars, storage of rhizome and harvest place. However, it is unclear how their compositional balance is regulated in ginger rhizome. In this study, we confirmed enzymatic inter-conversion of geraniol derivatives by isotope incorporation experiment and crude enzymatic assay. Furthermore, we isolated and characterized a cDNA encoding geraniol dehydrogenase (*ZoGeDH*), which catalyzed NADP-dependent redox reaction between geraniol and citral.

At first we synthesized D₂-geraniol to use for the experiment. The detected m/z values representing these labeled compounds shifted to +2 as comparing with endogenous compounds. In the case of citral, dehydrogenation of D₂-geraniol gave +1 shift of m/z value from endogenous citral. In all geraniol derivatives in ginger rhizome, D-labeled compounds were detected, indicating that these are biosynthesized from geraniol by continuous reactions. In particular, in geraniol and citronellol, D₁-labeled compounds were also detected. This suggests that both of oxidation and reduction occurs between alcohol and aldehyde. Furthermore, our data suggested that double bond reduction from geraniol to citronellol is done by two routes, direct reduction or via reduction of citral. Crude enzyme extract was prepared from young ginger rhizome. Enzymatic assays for geraniol acetyltransferase (*GeAT*), geranylacetate hydrolase (*GeAcH*) and geraniol dehydrogenase (*GeDH*) were performed using appropriate substrates. *GeDH* catalyzed geraniol oxidation to produce citral under reaction with NADP. Furthermore, it was suggested that the relation between geraniol and geranyl acetate is dependent on the activities of *GeAT* and *GeAcH*.

Next, we screened responsible genes involved in these metabolic reaction, using opened EST databases for ginger. After full length cDNA of each candidate was obtained, we induced protein from each cDNA and analyzed their enzymatic characteristics. Among them, we isolated and confirmed geraniol dehydrogenase (*ZoGeDH*) responsible for the reaction between geraniol and citral. Comparative quantitative real-time PCR analysis and citral content analysis in ginger plant tissues, indicated that the expression of *ZoGeDH* is correlated with the content of citral.