

氏 名	馬 勝 雄
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1264 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Enzymatic and Chemical Studies on β -Primeverosidase, A Key Glycosidase in Tea Aroma Formation (茶の香気生成鍵酵素, β -プリメベロシダーゼの酵素化学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 坂 田 完 三 教 授 江 崎 信 芳 教 授 島 田 幹 夫

論 文 内 容 の 要 旨

烏龍茶や紅茶の重要な香気成分である linalool, 2-phenylethanol などは主に配糖体として存在し、発酵過程と呼ばれる製造工程中に内生酵素により加水分解されて生成すると考えられてきたが、その香気生成機構の詳細な分子レベルでの理解は進んでいない。本論文では、まず、やぶきた種チャ葉 (*Camellia sinensis* var. *sinensis* cv. Yabukita) の熱水抽出物中のアルコール系香気前駆体を精査し、新規香気前駆体を単離した。次に、様々な二糖配糖体を合成し、これらのグリコシドを用いてやぶきた種新鮮チャ葉から精製した β -プリメベロシダーゼの基質特異性および加水分解様式を明らかにした。さらに、現在、主に使われている糖加水分解酵素の活性測定では連続測定が不可能であるため、連続測定が可能な新しいアッセイ法を開発した。本論文の主な内容は以下に示すとおりである。

1. やぶきた種チャ葉 (*Camellia sinensis* var. *sinensis* cv. Yabukita) の熱水抽出物に、やぶきた種新鮮チャ葉から調製した粗酵素を作用させたとき生成するアルコール系香気前駆体を精査し、3-hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol および (Z)-3-hexenol の二糖配糖体 (1 と 2) を新規香気前駆体として単離した。各種機器分析の結果、1 は (3R,9R)-3-hydroxy-7,8-dihydro- β -ionyl β -acuminoside (6-O- β -D-apiofuranosyl- β -D-glucopyranoside), 2 は (Z)-3-hexenyl β -primeveroside (6-O- β -D-xylopyranosyl- β -D-glucopyranoside) と同定した。この種の C₁₃-norisoprenoid 類は数多く単離されているが、C-9 位の水酸基の絶対位置はほとんどが不明のままである。そこで、化学的に合成した類縁化合物に Mosher 法を適用し、化合物 1 の絶対構造を決定した。

2. 茶のアルコール系香気生成に重要な役割をされると考えられているが、その酵素学的な特性が未だ明らかでない β -プリメベロシダーゼの基質特異性を調べるため、茶の香気成分である 2-phenylethanol をアグリコン部分とした二糖配糖体および単糖配糖体を合成した。これらの配糖体を用いて、やぶきた種チャ葉由来の粗酵素および精製 β -プリメベロシダーゼ (EC 3.2.1.149) の加水分解活性を調べた結果、 β -プリメベロシダーゼは糖部分 (β -プリメベロース) に対して極めて高い基質特異性を持つことが明らかになった。また、天然に存在するその他の二糖配糖体はわずかに加水分解されたが、非天然型の二糖配糖体や単糖配糖体は全く加水分解されなかった。さらに、本酵素はチャ葉中の香気生成に関わる唯一の二糖配糖体加水分解酵素であることも明らかになった。以上のことから β -プリメベロシダーゼは茶の香気生成の鍵酵素であることが確かめられた。

また、TLC および NMR 分析により本酵素は retention 反応機構で、二糖配糖体を二糖部分とアグリコン部分に加水分解することも明らかにした。

3. 現在、糖加水分解酵素の活性測定には *p*-nitrophenyl (*p*NP) glycoside または *o*NP glycoside を基質とした測定法が主に使われている。一般にグリコシダーゼは弱酸性から中性領域に至適 pH を示すため、これらの測定法では、酵素反応により生成する nitrophenol を発色させるために、反応液をアルカリ性にする操作が必要である。そのため、この時加えたアルカリにより酵素反応が停止し、酵素反応を連続的に追跡することは不可能であった。そこで、2-hydroxy-3-nitropy-

idine が酸性から中性領域でもケト型として存在し、吸収波長が大きくシフトすることに着目し、3-nitro-2-pyridyl glycoside を基質としたグリコシダーゼの連続測定法を検討した。その結果、連続的な酵素反応の追跡が可能であり、3-nitro-2-pyridyl glycoside は従来の基質に代わって連続測定可能な汎用的グリコシダーゼ基質となり得ることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

烏龍茶や紅茶の重要な香気成分であるアルコール系香気は主に配糖体として存在し、製造工程中に内生酵素により加水分解されて生成すると考えられているが、その香気生成機構の理解は進んでいない。本論文は、茶の香気生成機構を分子レベルで明らかにするため、香気前駆体となる二糖配糖体の単離、構造決定を行うとともに様々な二糖配糖体を合成し、茶の香気生成に重要な役割をすると考えられている β -プリメベロシダーゼの酵素学的な特性を明らかにしたものである。さらに、本論文では、現在、糖加水分解酵素の活性測定に主に使われている不連続測定法に代わるものとして、簡便に測定が可能な新しい連続測定法の開発についても記述されている。その評価すべき点は以下に示すとおりである。

1. やぶきた種新鮮チャ葉 (*Camellia sinensis* var. *sinensis* cv. Yabukita) からアルコール系香気前駆体を精査し、新規香気前駆体として 3-hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol および (Z)-3-hexenol の二糖配糖体を単離、同定した。さらに、今まで不明であった 3-hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol の C-9 位の水酸基の絶対位置を、化学的に合成した類縁化合物に Mosher 法を適用して明らかにした。

2. 茶の香気成分である 2-phenylethanol をアグリコン部分とした様々な二糖配糖体および単糖配糖体を合成し、これらの配糖体を用いて、やぶきた種チャ葉由来の粗酵素および精製 β -プリメベロシダーゼ (EC 3.2.1.149) の加水分解活性を調べた結果、 β -プリメベロシダーゼは (1) 糖部分 (β -プリメベロース) に対して極めて高い基質特異性を持つこと、(2) 非天然型の二糖配糖体や単糖配糖体は全く加水分解せず、天然に存在する二糖配糖体のみ加水分解すること、(3) チャ葉中の香気生成に関わる唯一の二糖配糖体加水分解酵素であることを明らかにした。以上の知見は、 β -プリメベロシダーゼが茶の香気生成の鍵酵素であることを明らかにした点において意義深い。さらに、TLC および NMR 分析により本酵素は 'retention' 反応機構で、二糖配糖体を二糖部分とアグリコン部分に加水分解することも明らかにした。

植物には様々なアグリコンをもつ二糖配糖体が存在していることからこれらの二糖配糖体を特別に加水分解する二糖配糖体加水分解酵素が存在すると考えられているが、植物での本来の役割は未だ明らかでない。本論文は二糖配糖体加水分解酵素の一つである β -プリメベロシダーゼの酵素学的な特性を詳細に調べた点においても意義深い。

3. 現在、糖加水分解酵素の活性測定には pNP glycoside または oNP glycoside を基質とした測定法が主に使われている。一般にグリコシダーゼは弱酸性から中性領域に至適 pH を示すため、これらの測定法では、酵素反応により生成する nitrophenol を発色させるための操作が必要であり、この操作により酵素反応が停止するため、酵素反応を連続的に追跡することは不可能である。そこで、2-hydroxy-3-nitropyridine が互変異性により pyridone 型になり、酸性から中性領域でも吸収波長が大きくシフトすることに着目し、3-nitro-2-pyridyl glycoside を基質としたグリコシダーゼの連続測定法を検討した。その結果、弱酸性から中性領域での連続的な酵素反応の追跡が可能であり、3-nitro-2-pyridyl glycoside は従来の基質に代わって連続測定可能な汎用的グリコシダーゼ基質となり得ることを明らかにした。

以上のように本論文は、茶のアルコール系香気生成の分子機構を明らかにした点、さらには糖加水分解酵素研究に極めて重要な新しい活性測定法の開発の手がかりを見つけた点で食品製造学、酵素化学および植物生化学に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。