

烏龍茶の香りに、魅せられて

— 茶の香気生成の分子基盤を探る —

坂田 完三*

1. はじめに

チャ樹（ツバキ科 *Camellia sinensis*）の新鮮葉を様々な加工することで、種々の茶が製造され、世界中で楽しまれている。緑茶、紅茶、烏龍茶など一般に良く知られているもの以外にもその製造方法の違いにより、様々な茶がつけられている[1]。その中で良く知られている緑茶、烏龍茶、紅茶の製造法を図1に示す。これらの茶はチャ葉（チャ樹の葉）の加工法を変えればつくることができる。緑茶はチャ葉中の酵素の働きを利用しない「不発酵茶」であり、摘採後すぐに蒸すか釜炒りすることで内生酵素を失活させてつくる。烏龍茶と紅茶はチャ葉の内生酵素を利用する「発酵茶」であり、酵素作用を最大限に利用する紅茶は発酵茶、軽度の利用による「烏龍茶」は半発酵茶とよばれている。発酵とは本来微生物の酵素による物質代謝であるが、上記発酵茶の製造工程時にはほとんど微生物は関与しておらず、この用語は誤ったものであるが、茶の世界では慣習としてそのまま使われている。茶にも微生物発酵を積極的に利用したプアール茶や阿波晩（番）茶などがあり[1, 2]、これらは後発酵茶と呼ばれてきたが、我々はむしろ微生物発酵茶とよぶことを提唱している。

茶の香はその品質を決める最も重要な因子と言われ、それぞれのお茶は特有の香気を有している。前任地の静岡大学勤務当時、中国から留学してきた烏龍茶の研究者に高級烏龍茶を初め

て飲ませてもらい、その花のような香りに驚いた。この香りがその茶の製造工程で生まれると聞きますますこの茶に興味を覚え、その香気生成機構の分子基盤を明らかにすべく研究に取り組んだ。その結果、烏龍茶の香気生成はチャ樹のストレス応答を最大限に利用したものであることが明らかとなった。緑茶は日本料理の極意のように、チャ葉のもつ新鮮な緑の香りと色を最大限製品に著すよう工夫されたもので、摘採後速やかに加熱することで酵素活性を止めてつくられる。その対極にある紅茶の場合はチャ葉を強く揉捻して組織を破壊し、チャ葉に含まれる酵素と基質との反応を促進し、あの華やかな色と特有の香りをもつ茶となる。烏龍茶では紅茶の様に早い段階で組織を破壊してしまうことなく、つまるところ、チャ葉を虐め続けて、乾燥や傷害などの外部ストレスに対するチャ葉の応答を見事に利用して、あの香気を生み出していることが明らかとなった。その過程を以下に紹介する。

2. 茶の製法による香気の違い

山西らは烏龍茶の香気を詳細に調べ、geraniol, linalool, benzyl alcohol, 2-phenylethanolなどのアルコール系香気を多量に含んでいて、これらの香気成分がこの茶の新鮮な花香に寄与していることを明らかにしている[3]。そしてこれらの香気成分は、烏龍茶の製造工程で多量に生成することが竹尾により示され、茶

*京都大学名誉教授

の製法の違いにより香気の生成に大きな違いがあることがすでに示されていた[4].

3. 茶のアルコール系香気の生成機構

3-1. Geraniol 等の香気前駆体

烏龍茶用品種（水仙種と毛蟹種）のチャ葉を摘採後直ちに釜炒り法により加熱し、酵素活性を停止させた後、乾燥したものの熱水抽出液を各種クロマトグラフィーにより分画し、各画分を新鮮チャ葉より調製した粗酵素で処理して生成する香気成分をGC分析により検出し、各香気成分の香気前駆体を追跡した結果、烏龍茶や紅茶の花様の香りに寄与するアルコール系香気成分のほとんどは、二糖配糖体β-プリメベロシド（6-O-β-D-xylopyranosyl-β-D-glucopyranoside）（図2）としてチャ葉中に蓄積されていることが明らかとなった[5].

3-2. 香気生成酵素β-プリメベロシダーゼの精製

まず予備検討として、緑茶用品種やぶきた種を用いて、これらの配糖体からの香気生成にかかわる酵素の精製を行なった。常法により新鮮葉から得たアセトン粉末を0.1Mクエン酸

緩衝液（pH 6.0）に可溶化後、硫酸沈殿（20-80%）の後、CM-Toyopearl 650M [20mMクエン酸緩衝液（pH 6.0）；NaCl濃度勾配溶出]により分画し、二糖配糖体加水分解活性を示す酵素画分を精製した。そして、チャ葉中には香気前駆体β-プリメベロシドを特異的に加水分解する新規なグリコシダーゼであるβ-プリメベロシダーゼが存在していることが明らかになった[6].

3-3. β-プリメベロシダーゼの酵素化学的性質

β-プリメベロシダーゼの精製標品はSDS-PAGE電気泳動で分析すると61kDaに単一バンドを示し、ゲルろ過およびMOALDI-TOFMSの結果、分子量61,000であることから、β-プリメベロシダーゼは単量体として存在することが明らかになった。一方、精製標品はPAS染色で陽性を示し、またグリコペプチダーゼFで処理すると61kDaから56kDaへ減少することから、本酵素はN型糖タンパク質であることも明らかになった。β-プリメベロシダーゼの基質特異性について詳細に解析した結果、本酵素は単糖配糖体（β-グルコシドやβ-キ

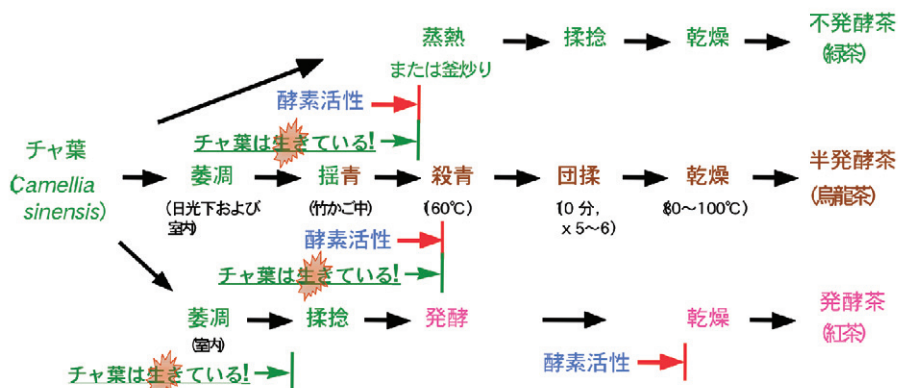


図1. 緑茶，烏龍茶，紅茶の製造法の概略

シロシド)をほとんど加水分解しないのに対して、特に天然基質である β -プリメベロシドに対してきわめて高い基質特異性を示し、 β -1,6結合を有する天然由来の二糖配糖体にも弱いながら活性を示すことが明らかとなった[7]。また、 β -プリメベロシドとの反応生成物のTLCおよびMS分析の結果から、単糖は生成せず二糖のプリメベロースだけが生成していることから、本酵素は β -プリメベロシドの二糖とアグリコンの間の β -グリコシド結合を特異的に加水分解するジグリコシダーゼであることが分った。さらに、NMR管中で本酵素と β -プリメベロシドを反応させて $^1\text{H-NMR}$ で追跡したところ、先ずプリメベロースの $\alpha\text{-H(H-1a)}$ に帰属できるシグナルが δ 4.43付近に観察され、次いで $\beta\text{-H(H-1e)}$ に帰属できるシグナルが δ 5.03付近に現れたことから、本酵素は立体保持型の機構で加水分解することが明らかとなった[7]。

3-4. チャ葉 β -プリメベロシダーゼのクローニング

精製標品から決定された部分アミノ酸配列を利用して、やぶきた種チャ葉のcDNAライブラリーから β -プリメベロシダーゼcDNAをクローニングした[8]。cDNA配列から推定されるアミノ酸配列をBlastホモロジー検索した結果、青酸配糖体を加水分解する β -グルコシダーゼや多くの植物由来 β -グルコシダーゼと50%程度の相同性を示し、ファミリー1グリコシダーゼに分類された。また、28残基目まではシグナルペプチド(細胞外輸送シグナル)で、28残基目と29残基目の間で翻訳後切断されると推定された。予想される成熟タンパク質の分子量は54,324であるのに対し精製酵素の分子量は約61,000であり、アミノ酸配列中には5カ所の

アルギニン残基が糖鎖修飾残基として推定されることから、本酵素はN-グリコシド糖鎖修飾されたのち、細胞外へ分泌されると推定された。実際、本酵素をバキュロウイルス-昆虫細胞系で大量発現させたところ、組換え酵素は糖鎖修飾され培地中に分泌された[8]。

3-5. β -プリメベロシダーゼによる香気生成機構とチャ葉中での役割

やぶきた種の新芽(一葉、二葉、三葉、四葉、莖)の β -プリメベロシダーゼを分析した結果、一葉から四葉へと葉の成熟度が上がるにつれて減少し、莖にも相当量の β -プリメベロシダーゼが存在することが分かった[8,9]。同様に、チャ葉中の全香気前駆体量も一葉で最も多く、成熟するにつれて減少する[9]。茶の製造には三葉までの新芽が使われ、本酵素と茶の香気生成機構の関わりを示唆するものである。次に、 β -プリメベロシダーゼの細胞レベルでの存在部位を免疫組織染色により解析したところ、細胞間隙とその周囲の細胞の外側に反応が見られた。本酵素の推定アミノ酸配列から細胞外輸送シグナルペプチドを持つと推測されるので本酵素は細胞外(細胞壁)に局在すると考えられる。一方、基質である β -プリメベロシドは細胞内(液胞など)に存在するので、両者は通常隔離されて存在し、傷害などのストレスにより組織が破壊されたときのみ遭遇して反応すると考えられる。遊離される香気成分の多くが抗菌性[10]などの生理活性を示すことから、本来、本酵素はチャ樹において生体防御機構に関わる重要な酵素であると考えられる。

4. ジグリコシダーゼ(二糖配糖体特異的グリコシダーゼ)の本来の役割

茶の香気生成酵素として見いだされた β -プ

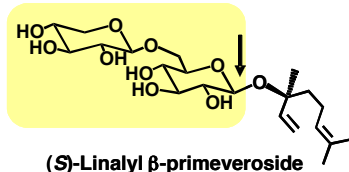
リメベロシダーゼは二糖部分を高い特異性をもって認識して、相当する二糖と香気成分のアグリコンに加水分解することが明らかにされたが、天然には香気成分だけではなく、フラボノイドやキサントンなどの色素や種々の二次代謝産物が二糖 (β 1-6) 配糖体として蓄積する植物があり、そのうち数種の植物からは、その二糖配糖体を特異的に加水分解するジグリコシダーゼ [ムシカリ (*Viburnum furcatum*) のフルカチン (*p*-allylphenyl β -acuminoside) 加水分解酵素, ソバのイソフラボン配糖体加水分解酵素, カラスノエンドウの青酸配糖体であるビシアニン (β -visianoside) 加水分解酵素など (図2)] の存在が古くから知られているが [11,12], 驚いたことにこれらの酵素については精製標品の酵素学的性質もほとんど明らかにされておらず、遺伝子まで明らかにされたのは β -プリメベロシダーゼ (PD) が最初のものである [11].

4-1. その他の植物ジグリコシダーゼ遺伝子のクローニング

ムシカリの葉から新規にフルカチンヒドロラーゼ (FH) の cDNA を単離した結果、その推定アミノ酸配列は β -プリメベロシダーゼと最も高い相同性 (64%) を示し、多くの植物由来のファミリー 1 β -グルコシダーゼとも高い相同性 (50%前後) を示した。大腸菌で発現させた組換え FH は、*p*-アリルフェノールと二糖の間の β -グリコシド結合を特異的に加水分解した [13]。また FH の N 末シグナル配列と G F P の融合酵素を植物で発現させた結果、FH は葉緑体に局在することがわかった。

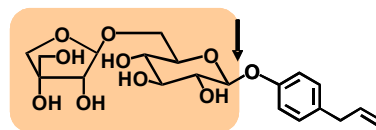
さらに、カラスノエンドウ未熟種子からビシアニンヒドロラーゼ (VH) を精製し cDNA をクローニングした。その N-末端には分泌タンパク質であることを示すシグナル配列があり、成熟タンパク質の N 末端アミノ酸配列は、精製酵素から決定した配列と完全に一致した。また VH の推定アミノ酸配列はファミリー 1 グルコ

(a) β -Primeverosidase in tea leaves



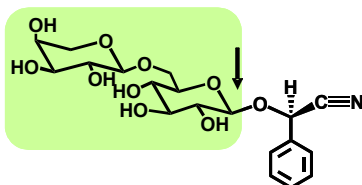
(S)-Linalyl β -primeveroside
(6-O- β -D-xylopyranosyl- β -D-glucopyranoside)

(b) Furcatin hydrolase in *Viburnum furcatum*



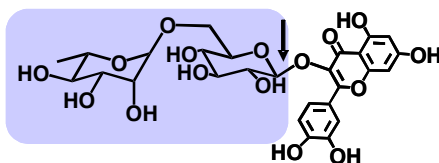
Furcatin (*p*-Allylphenyl β -acuminoside)
(6-O- β -D-apiofuranosyl- β -D-glucopyranoside)

(c) Vicianin hydrolase in *Vicia angustifolia*



Vicianin [(*R*)-Mandelonitrile β -vicianoside]
(6-O- α -L-arabinopyranosyl- β -D-glucopyranoside)

(d) Rutin hydrolase in *Fagopyrum tataricum*



Rutin (Quercetin β -rutinoside)
(6-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside)

図2. 主な植物由来のジグリコシダーゼとその基質

シダーゼと50%以上の相同性を示し、VHがファミリー1に分類されることが確認された[14]. RT-PCRを行った結果、種子にVHが多量に発現しており、また、花にも発現が確認されたが、葉、茎、根においては、発現していないことが確認された。全長のVH cDNAを昆虫細胞において発現させ、組換え酵素を作製した。VHもFHと同様にチャ葉のPDに対する抗体と反応することが確認された。種子精製VHと組換えVHの二糖配糖体に対する加水分解様式をTLC分析で調べた。その結果、両VHともビシアニンを二糖のビシアノースとマンデロニトリルに加水分解したことから、VHも二糖配糖体を特異的に加水分解するジグリコシダーゼであることが確認された。

4-2. PD, FHおよびVHの基質特異性

これら3種の基質特異性を解析した(表1)[14,15]. 各ジグリコシダーゼは対応する天然基質以外の二糖配糖体もある程度加水分解できることが分かった。一方、ゲンチオビオシドを基質とした場合、三種の酵素はほとんど加水分解しなかった。ゲンチオビオシドでは二糖目がグルコースでありペントースに比べC-5'位にヒドロキシメチル基が余分に突き出ているため、ジグリコシダーゼの活性部位に納まることができなくなると考えられる。興味深いことに、ジグリコシダーゼはβ-グルコシダーゼと高い相同性を示すが、それぞれのジグリコシダーゼに対応する天然基質と同じアグリコンを持っている単糖配糖体はある程度加水分解するのに対し、それ以外の単糖配糖体をほとんど加水分解できない。ジグリコシダーゼの基質認識ポケッ

表1. PD, FH, VHの基質特異性

Substrate	Structure	Relative activity (%)		
		PD	FH	VH
pNP β-primeveroside		100	87	75
pNP β-gentiobioside		4.7	4.1	0.1
pNP β-glucopyranoside		0.3	3.3	3.4
2-phenylethyl β-primeveroside		53	14	59
2-phenylethyl β-gentiobioside		0.3	0.4	0.2
2-phenylethyl β-glucopyranoside		0.1	0.2	1.8
vicianin		19	4.9	100
amygdalin		6.5	0.5	0.1
prunasin		0.9	0.8	33
furcatin		2.8	100	15
p-allylphenyl β-glucopyranoside		0.4	43.0	3.9

トは二糖グリコンを認識する subsite-1, -2 とアグリコンを認識する subsite+1 の3つの subsite から構成されると予想される。このモデルをもとにジグリコシダーゼの基質特異性は以下のように説明できる。ジグリコシダーゼは subsite-2 と subsite-1 により二糖のペントースとグルコースをそれぞれ認識することにより基質を捉え、加水分解する。FHおよびVHの場合、天然基質と同じアグリコンを持つ単糖配糖体は subsite-1 と subsite+1 により認識されるため、ある程度加水分解される。一方、各ジグリコシダーゼに対応する天然基質と異なるグリコンを有する非天然型β-グルコシドは subsite-1 のみでしか認識されず、しっかり固定できないため加水分解されないと理解できる。また、アグリコン特異性の広いPDの場合も、単糖配糖体は subsite-1 のみで認識されるため、加水分解されない。以上のように、ジグリコシダーゼの二糖認識に関わるタンパク質構造がどのようにβ-グルコシダーゼから進化したのか興味深い[15]。

5. 植物のファミリー1 β-グリコシダーゼの分子進化の解析

我々が明らかにしたジグリコシダーゼ（チャ樹、ムシカリ、カラスノエンドウ）および最近明らかにされたジグリコシダーゼ（ダットンソバとセイヨウアカネ）のアミノ酸配列をもとに作製した、ファミリー1グリコシダーゼの進化系統樹を図3に示した。β-プリメベロシダーゼ（PD：チャ樹）に続いてフルカチンヒドロラーゼ（FH：ムシカリ）のジグリコシダーゼのアミノ酸配列を明らかにし進化系統樹を作製すると、それらは隣に位置したことから、ジグリコシダーゼはファミリー1の中でサブファミリーを形成しているのではないかと考えていた

が、図3に示すように、各植物でそれぞれに進化したβ-グルコシダーゼが植物の防御機構に組み込まれるという特別の役割を担うことで、6'-位が修飾されたβ-グルコシドを基質とできるジグリコシダーゼにさらに平行進化したものと理解できる[15]。

6. β-プリメベロシダーゼ（PD）のX線結晶構造解析

上記のことを確認するため、独自に開発した基質アナログ阻害剤であるβ-プリメベロシラルアミジン（表2）をリガンドとして用いたアフィ

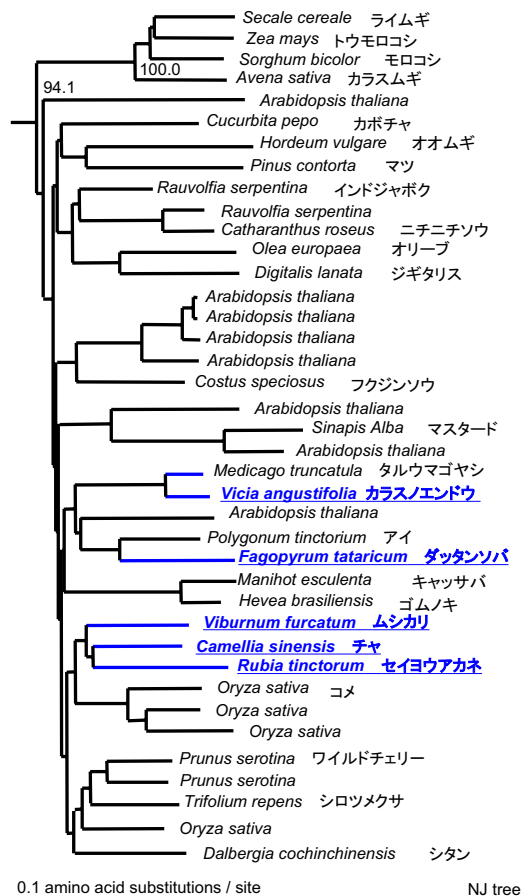


図3. ファミリー1グリコシダーゼの進化系統樹解析

ニティークロマトグラフィーでチャ葉β-プリメベロシダーゼ (PD) を精製した[16]. これを用いてX線結晶構造解析を行った.

β-プリメベロシルアミジンを取り込んだPDとファミリー1に属するトモロコシ由来のβ-グルコシダーゼ (1E1F; 阻害剤の *p*-Nitrophenyl β-D-thio-glucopyranoside を取り込んでいる) の基質ポケット開口部の構造を図4に示す. 活性残基付近の構造はほとんど同じであるが, ポケットの開口部に大きな違いが見られた. 1E1Fの開口部には, かさ高いアミ

ノ酸残基 Phe198, Trp378, Phe466が存在するが, PDでは Gly210, Ala387, Leu472に置換されていた (図4). その結果, 開口部の幅は1E1FよりもPDの方が約3 Å広がっていた. この大きな開口部によって, PDは単糖配糖体よりも大きな二糖配糖体を結合することができると思われる[15].

次に, ジグリコシダーゼが, なぜ単糖配糖体を加水分解できないのか, 得られた構造から考察した. PDと1E1Fのグルコース認識残基と活性残基は, 側鎖の立体配座までほとんど一致している. つまり, PDが単糖配糖体のβ-グルコシドをほとんど加水分解しないのは, グルコース部分の認識が問題ではなく, 他に何らかの原因があると考えられた. 1E1Fの Phe198, Trp378, Phe466はアグリコンの認識に関わる重要なアミノ酸である. ファミリー1のβ-グルコシダーゼは subsite-1でのグルコースとの水素結合以外に, subsite+1でのアグリコン部分によっても単糖配糖体を認識している. 特に1E1Fの Trp378は, アグリコンの芳香環と subsite+1でπ-πスタッキングするアミノ酸であることが報告されている. この Trp

表2. β-グリコシルアミジンの構造とPDに対する阻害活性

Inhibitor	K_i (mM)
1	ND
2a	0.14
2b	0.026

ND: no inhibitory activity was detected.

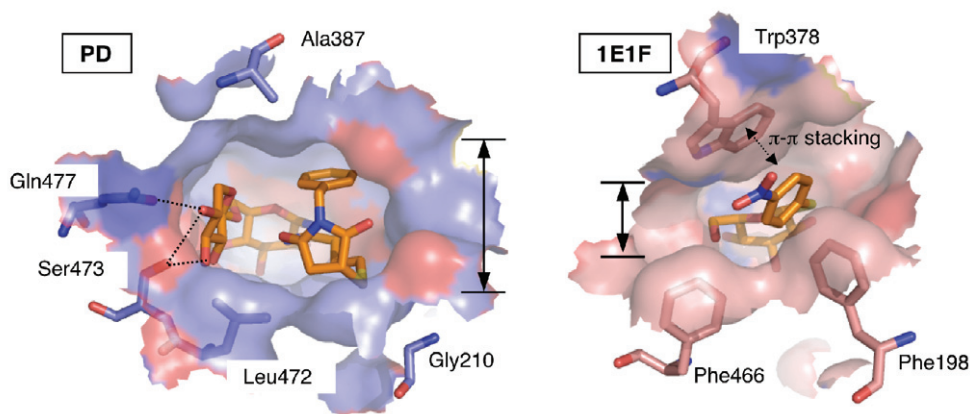


図4. PDおよび1E1Fの基質ポケット開口部の構造

はファミリー 1 β -グルコシダーゼに強く保存されており、 π - π スタッキングが単糖配糖体を安定に結合するために必要であると考えられる。しかし前述したように、PDでは Trp378が Ala387に置換されており、その置換が原因で subsite+1 でのアグリコンの認識が弱く、グルコース部分の水素結合だけでは単糖配糖体を安定に結合できないため、その結果として単糖配糖体に対する活性が低いと考えられる。こうして、ジグリコシダーゼの基質特異性実験から推測された基質認識機構がX線結晶構造解析により確かめられた。

7. おわりに

我々が茶の香気生成の鍵酵素として見出した β -プリメベロシダーゼ (EC 3.2.2.149) はそのアミノ酸配列にもとづく進化系統樹解析により、植物 β -グルコシダーゼが属するファミリー 1 に属することが明らかとなった。しかしながら、チャ樹 β -プリメベロシダーゼは詳細な基質特異性解析により、二糖配糖体特異的酵素 (ジグリコシダーゼ) で、 β -グルコシダーゼ活性はほとんど有していなかった。

この特異な基質特異性に興味を抱き、今までほとんど研究がされていなかったジグリコシダーゼに着目し、天然物化学、有機合成化学、生化学、分子生物学、構造生物学の研究手法を総合して、チャ樹の β -プリメベロシダーゼを初めとするジグリコシダーゼを詳細に研究した結果、上記のようにこれらジグリコシダーゼはファミリー 1 の数種の β -グルコシダーゼが植物の自己防御などの特別の役割を担うことにより新しい機能 (6'-位に修飾を受けた β -グルコシドを加水分解できる) を持つように平行進化した一群のグリコシダーゼと定義できることを明らかにすることができた。ジグリコシダーゼは相

当広く植物界に分布していることが予想され、これらが今後明らかにされることにより、新しい視点からの栽培作物の虫害や病害からの防御法の開発に繋がることも期待される。

烏龍茶の香気生成機構の研究から始まった研究が、新しいグリコシダーゼの機能の発見へと発展した。そして、烏龍茶のあの素晴らしい花香を生み出す伝統技術は、実はチャ樹がその進化の過程で備えた自己防衛機能をフルに活用したものであったことを実証できた。しかし、茶の世界はまだ奥が深く、虫害を受けたチャ葉をわざわざ用いてつくる茶がある。これぞチャ樹のストレス応答を利用した香気生成技術の極みと言わなければならない。我々は数年前から台湾 (東方美人茶) やインド (ダーズリンセカンドフラッシュ) の茶の研究者と共同研究を始め、この仮説の証明に取り組み、興味ある成果を挙げつつあるがその紹介は誌面の都合により割愛させていただいた。

謝辞：本研究は大変多くの方々のご支援を賜り、静岡大学農学部応用生物化学科食品・天然物化学研究グループおよび京都大学化学研究所生体触媒化学研究分野の関係教官および学生諸君がなし遂げてくれたものであり、皆様のご支援とご尽力に深甚の謝意を表します。

引用文献

- 1) 伊奈和夫, 坂田完三, 南条文雄, 鈴木壮幸: 新版 緑茶・紅茶・烏龍茶の化学と機能, アイ・ケイコーポレーション, 2007.
- 2) 呂毅, 坂田完三, 駱少君, 郭ぶん飛: 中国黒茶のすべて, 幸書房, 2003.
- 3) 山西貞: FFI ジャーナル, No. 168, 23-34 (1996).
- 4) Takeo T., Tsushida T., Mahanta P. K.,

- Tashiro M., and Imamura Y.: Bulletin of National Research Institute of Tea, 20, 91-180 (1985).
- 5) 坂田完三, 水谷正治: FFI ジャーナル**208** (12), 991-1003 (2003).
 - 6) Guo, W., Ogawa, K., Yamauchi, K., Watanabe, N., Usui, T., Luo, S. and Sakata, K.: *Biosci Biotechnol Biochem*, **60**: 1810-1814 (1996).
 - 7) S.-J. Ma, Mizutani M., Hiratake J., Hayashi K., Yagi K., Watanabe N., and Sakata K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2719-2729 (2001).
 - 8) Mizutani, M., Nakanishi, H., Ema, J., Ma, S.-J., Noguchi, E., Inohara-Ochiai, M. Fukuchi-Mizutani, M., Nakao, M., Sakata, K.: *Plant Physiol.* **130**, 2164-2176 (2002)
 - 9) Ogawa K., Moon J.-H., Guo W., Yagi A., Watanabe N., and Sakata K.: *Z. Naturforsch.*, **50C**, 493-498 (1995).
 - 10) Zhang Z, Li Y., Qi L, Wan X.: *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3936-3940 (2006).
 - 11) K. Sakata, Mizutani M., S.-J. M., and Hiratake J.: *Methods in Enzymology*, **363**, 444-459 (2003).
 - 12) Nakanishi, F., Nagasawa, Y., Kabaya, Y., Sekimoto, H., and Shimomura, K.: *Plant Physiol. Bioch.*, **43**, 921-928 (2005).
 - 13) Ahn, Y.-O.; Mizutani, M.; Sakata, K.: *J. Biol. Chem.*, **279**(22), 23405-414 (2004)
 - 14) Ahn Y-O, Saino H, Mizutani M, Shimizu B, Sakata K: *Plant Cell Physiol.*, **48**(7), 983-947 (2007).
 - 15) 坂田完三: ジグリコシダーゼの触媒機構の解明から植物 β -グルコシダーゼの分子進化をたどる. 平成16年度~平成18年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書(2007).
 - 16) Saino H, Mizutani M, Hiratake J, Sakata K; Expression and biochemical characterization of β -primeverosidase and application of β -primeverosylamidine to affinity purification. *Biosci. Biotech. Biochem.*, in press.