

[2016 年日本ブドウ・ワイン学会 論文賞 受賞講演要旨]

ワインの胡椒様香気成分 rotundone に関する研究

高瀬 秀樹^{1,2}¹キリン株式会社 ワイン技術研究所²山梨大学ワイン科学研究センター

2016 ASEV JAPAN JOURNAL AUTHOR'S AWARD Studies on Peppery Aroma Compound "Rotundone" in Wines

Hideki TAKASE^{1,2}¹Research Laboratories for Wine Technologies, Kirin Company, Limited, Kanagawa, Japan²The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi, Yamanashi, Japan

Rotundone, an oxygenated sesquiterpene, is a molecule responsible for the peppery aroma in wine and grapes. It was first identified in 'Shiraz' wine from Australia. Since this molecule is a potent aroma compound with a low sensory threshold (16 ng L⁻¹ in red wine), even trace levels of rotundone can give a pleasant peppery aroma to wines. First, we developed an effective and simple method to determine trace levels of rotundone in grapes and wines. The method uses stir bar sorptive extraction with heart-cutting two-dimensional GC-MS but without a pre-extraction process, such as solid phase extraction process. Our new method indicated that rotundone concentrations in 'Syrah' grapes and wines from Ueda were higher than the maximal rotundone concentrations in Australian 'Syrah' grapes and wines. The findings indicate that some environmental factors in Japan may have a positive influence on rotundone accumulation in 'Syrah' grapes. Next, we identified VvSTO2 as a α -guaiene 2-oxidase (CYP71BE5) which can transform α -guaiene to rotundone in 'Syrah' grapes. It is a cytochrome P450 (CYP) belonging to the CYP 71BE subfamily, which overlaps with the very large CYP71D family. As a result of gene expression analyses and quantifications of α -guaiene and rotundone, it was suggested that rotundone accumulation is regulated by the *VvSTO2* expression along with the availability of α -guaiene as a precursor. On the basis of these finding, we propose that *VvSTO2* may be a key enzyme in the biosynthesis of rotundone in grapevines by acting as a α -guaiene 2-oxidase.

'Syrah'ワインの香りの特徴を形容する表現としてスパイス、胡椒などの言葉が用いられることが多い。近年、この特徴に起因する化合物としてオーストラリア産'Shiraz'ワインからセスキテルペンの一種である rotundone (C₁₅H₂₀O) が同定された(Wood et al. 2008)。Rotundoneは、官能閾値が 16 ng L⁻¹ (赤ワイン中) であるため、極めて低濃度でワインの品質に貢献する。'Syrah'以外の品種では、欧州で栽培される'Schioppettino', 'Vespolina', 'Grüner Veltliner'等のブドウ品種から醸造されたワインにおいても官能閾値以上に rotundone を含有していることが明らかと

されている(Mattivi et al. 2011)。Rotundoneは、冷涼な地域やより寒冷な年に収穫されたブドウに多く含まれる傾向にあることから(Caputi et al. 2011)、栽培環境の違いがその蓄積量に変動を与えることが示唆されているが、その生合成メカニズムは未だ明らかとされていない。

そこで本研究では、日本で栽培されたブドウ'Syrah'を用い、rotundone 生合成メカニズムを解明することを目的とした。まず、複雑な前処理が必要だった従来法と比較して、より簡便で且つ高感度な新規 rotundone 定量法の開発を目指した。さらに日本で栽培したブドウ'Syrah'と他の

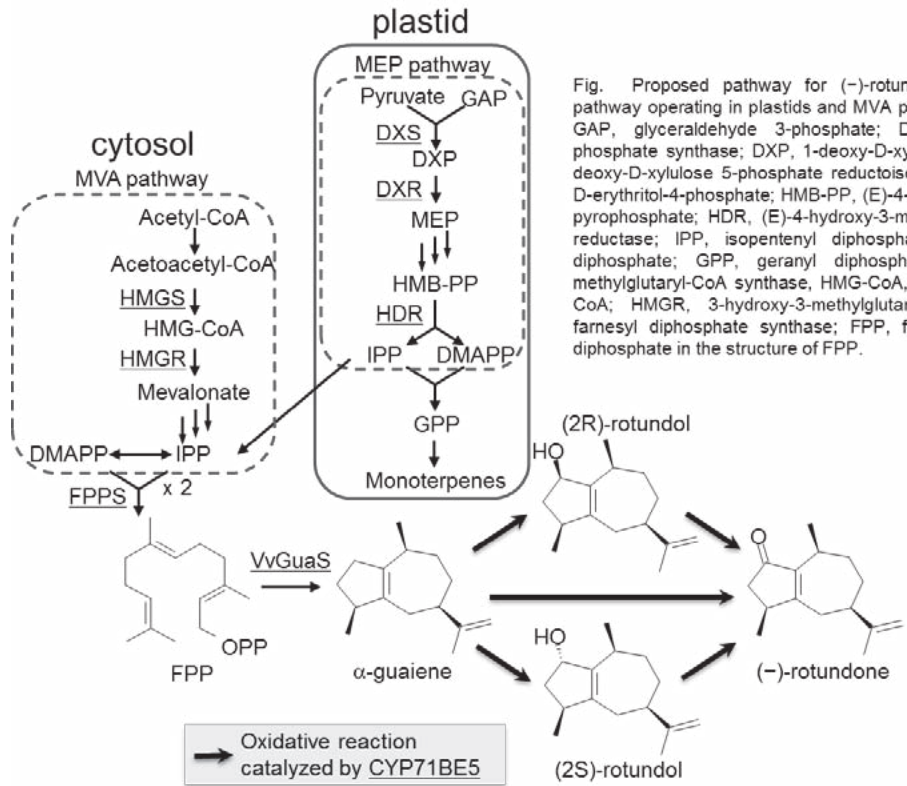


Fig. Proposed pathway for (-)-rotundone biosynthesis. MEP pathway operating in plastids and MVA pathway operating in cytosol. GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; DXS, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXP, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate; DXR, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate; HMB-PP, (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrophosphate; HDR, (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; GPP, geranyl diphosphate; HMGS, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; HMGR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; FPPS, farnesyl diphosphate synthase; FPP, farnesyl diphosphate; OPP, diphosphate in the structure of FPP.

ブドウ品種の rotundone 濃度の定量及び、フランス産及び日本産‘Syrah’ワインの rotundone 濃度の定量を行い、其々の比較を行った。次に、ブドウにおける rotundone 生合成機構上の未同定酵素の単離を目的として、‘Syrah’果実からその候補遺伝子を単離するとともに、単離遺伝子がコードする酵素の機能性解析を試みた。

Rotundone の新規定量方法の開発

これまでの rotundone の定量方法は、rotundone がブドウ果実及びワイン中に極微量にしか含まれていないために固層抽出カラム (SPE) を用いた前処理後に solid phase micro extraction 法による抽出を行うなど、複雑な操作が必要とされてきた(Mattivi et al. 2011, Caputi et al. 2011). 本研究において、我々はブドウ果実及びワイン中に微量に含まれる rotundone を高感度で簡便に定量出来る新規定量法を開発した。この定量法には stir bar sorptive extraction 法を用いた 2 次元ガスクロマトグラフ質量分析計を採用し、SPE を用いた前処理工程を省略した。開発した定量法を用いた分析の結果、マリコヴィンヤードで栽培された‘Syrah’果実を用いて醸造されたワイン中の rotundone 濃度 (2012 年ヴィンテージ:301 ng L⁻¹) は、フ

ランス産‘Syrah’ワインと比較しても高い水準であり、さらにオーストラリア産‘Shiraz’ワインで報告された最大 rotundone 濃度(オーストラリア, グランピアンズ産シラーズワイン:最大値 161 ng L⁻¹)(Qian and Shellhammer 2012)より高かった。これらの結果は、日本に存在する環境要因がそこに育つ‘Syrah’果実中の rotundone 蓄積を促進していることを示唆した。

Rotundone 生合成に関与する酵素の同定及び機能解析

α -Guaiene は、セスキテルペン炭化水素類に属し、様々な植物由来の精油やブドウ果実中に含有されることが報告されている(Coelho et al. 2006, Rakotonirainy et al. 1997). この化合物は rotundone と共通し、特有の構造である五員環と七員環を有していることから、rotundone の前駆物質と考えられている。本研究において、我々は α -guaiene から rotundone への変換と同様な酵素反応を触媒する premnaspirodiene oxygenase (Takahashi et al. 2007) の遺伝子配列を基に、12-fold coverage genome sequence assembly (Pinot Noir PN40024) (Jaillon et al. 2007) から候補遺伝子を選出し、ブドウ‘Syrah’から候補遺伝子を単離するとともに、単離遺伝子がコードする酵素の機能性解

析を行った。その結果、ブドウ‘Syrah’から α -guaiene を rotundone に変換する α -guaiene 2-oxidase VvSTO2 (CYP71BE5) を同定した。この酵素は Cytochrome P450 (CYP) に属し、さらに CYP71D サブファミリーと重複して存在する CYP71BE サブファミリーに属した。VvSTO2 はブドウ果実における rotundone の局在に一致し、‘Syrah’外果皮でより高いレベルで発現した。 α -Guaiene もまたブドウ外果皮中に非常に高い濃度で検出した。これらの結果は、rotundone の蓄積は前駆物質である α -guaiene の利用可能性及び VvSTO2 の発現によって制御されていることを示唆した。果実成熟期間における VvSTO2 の発現は、‘Merlot’外果皮よりも‘Syrah’外果皮でより高く、 α -guaiene 及び rotundone の蓄積と一致した。これらの結果に基づき、VvSTO2 はブドウ中の rotundone 生合成機構における鍵酵素と考えられた。これまでの報告例及び我々の研究結果を踏まえ、rotundone 生合成メカニズムを Fig に示した。

受賞対象論文

1. Hideki Takase, Kanako Sasaki, Hideyuki Shinmori, Akira Shinohara, Chihiro Mochizuki, Hironori Kobayashi, Hiroshi Saito, Hironori Matsuo, Shunji Suzuki, and Ryoji Takata. Analysis of rotundone in Japanese Syrah grapes and wines using Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) with heart-cutting two-dimensional GC-MS. *American Journal of Enology and Viticulture* 2015, 66(3), 398-402.
2. Hideki Takase, Kanako Sasaki, Hideyuki Shinmori, Akira Shinohara, Chihiro Mochizuki, Hironori Kobayashi, Gen Ikoma, Hiroshi Saito, Hironori Matsuo, Shunji Suzuki, and Ryoji Takata. Cytochrome P450 CYP71BE5 in grapevine (*Vitis vinifera*) catalyzes the formation of the spicy aroma compound (-)-rotundone. *Journal of Experimental Botany* 2016, 67(3), 787-798.

文 献

Caputi, L., S. Carlin, I. Ghiglieno, M. Stefanini, L. Valenti, U. Vrhovsek, and F. Mattivi. 2011. Relationship of changes in rotundone content during grape ripening and

winemaking to manipulation of the ‘peppery’ character of wine. *Journal of agricultural and food chemistry* 59:5565-5571.

- Coelho, E., S.M. Rocha, I. Delgadillo, and M.A. Coimbra. 2006. Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. ‘Baga’ ripening. *Analytica Chimica Acta* 563:204-214.
- Jaillon, O., J.-M. Aury, B. Noel, A. Policriti, C. Clepet, A. Casagrande, N. Choisne, S. Aubourg, N. Vitulo, and C. Jubin. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463-467.
- Mattivi, F., L. Caputi, S. Carlin, T. Lanza, M. Minozzi, D. Nanni, L. Valenti, and U. Vrhovsek. 2011. Effective analysis of rotundone at below - threshold levels in red and white wines using solid - phase microextraction gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25:483-488.
- Qian, M.C., and T.H. Shellhammer. 2012. Flavor chemistry of wine and other alcoholic beverages. ACS Publications.
- Rakotonirainy, O., E.M. Gaydou, R. Faure, and I. Bombarda. 1997. Sesquiterpenes from Patchouli (*Pogostemon cablin*) Essential Oil. Assignment of the Proton and Carbon-13 NMR Spectra. *Journal of Essential Oil Research* 9:321-327.
- Takahashi, S., Y.-S. Yeo, Y. Zhao, P.E. O'Maille, B.T. Greenhagen, J.P. Noel, R.M. Coates, and J. Chappell. 2007. Functional characterization of premenaspirodiene oxygenase, a cytochrome P450 catalyzing regio- and stereo-specific hydroxylations of diverse sesquiterpene substrates. *Journal of Biological Chemistry* 282:31744-31754.
- Wood, C., T.E. Siebert, M. Parker, D.L. Capone, G.M. Elsey, A.P. Pollnitz, M. Eggers, M. Meier, T. Vössing, and S. Widder. 2008. From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:3738-3744.