

令和元年9月3日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07741

研究課題名(和文) 紅茶ポリフェノール生成におけるカテキン類の立体選択的二量化機構の解明

研究課題名(英文) Stereoselectivity in Oxidative Dimerization of Catechins during Tea-fermentation

研究代表者

松尾 洋介 (MATSUO, Yosuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号：10432981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：紅茶製造過程で起こる茶カテキン類の酸化的二量化反応について、詳細なメカニズムを解明することを目的として研究を行った。水中におけるピロガロール型カテキンの二量化ではA環同士の疎水効果や - 相互作用などにより立体選択的に二量化が進行することが分かった。一方、カテコール型カテキンとピロガロール型カテキンの酸化的縮合による紅茶色素テアフラビン類生成においてはそのような相互作用が働かず、非立体選択的に二量化が進行することが分かった。さらに、これらの研究の過程でテアフラビンの非酵素的バイオミメティック合成法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

紅茶製造過程におけるポリフェノール成分の化学変化機構が解明されたことは、有機化学的観点からも高い意義があるだけでなく、紅茶の食品としての生理機能性を解明する基盤となる結果であり、大きな意義を持つ。複雑な組成を有するポリフェノール含有食品の生理機能成分解明が今後さらに進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Detailed mechanism of oxidative dimerization of catechins during black tea manufacturing was investigated. Dimerization of pyrogallol-type catechins affords dehydrotheasinensins stereoselectively. DFT optimization of dehydrotheasinensin C suggested that the selectivity was accounted for intramolecular - stacking between two A-rings in aqueous solution.

On the other hand, oxidative coupling between pyrogallol-type and catechol-type catechins affords theaflavins with a benzotropolone chromophore. Plane structure of the chromophore is produced via a bicyclo[3.2.1]octane-type intermediate, and formation of the intermediate was non-stereoselective coupling between catechol quinone and pyrogallol.

研究分野：天然物化学、食品化学

キーワード：紅茶 カテキン DFT計算 分子間相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ポリフェノールの健康維持・促進効果が大きな注目を集めている。ポリフェノールを豊富に含む茶葉は、緑茶、ウーロン茶、紅茶などのさまざまな形に加工されて、世界中で広く飲用されている。緑茶は生茶葉を加熱処理して作られるため、ほとんど色調・成分は変化しない。一方、紅茶はその製造過程において、茶葉中に含まれる主ポリフェノールのカテキン類が酵素酸化を受け、テアフラビン類などの紅茶特有色素が生成することによって色調が橙色～赤色へと変化する。紅茶の製造過程では、含有成分が大きく変化して非常に複雑なポリフェノール組成となることから、含有成分の大部分の化学構造は明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

ピロガロール型カテキンの二量化では主にデヒドロテアシネンシン類が立体選択的に生成する。デヒドロテアシネンシン類は加熱により容易に酸化還元不均化反応を起こして紅茶成分テアシネンシン類やウーロンテアニン類へと変化するところから、紅茶ポリフェノール生成において重要な鍵中間体である。しかしながら、デヒドロテアシネンシン類生成反応が極めて立体選択的に進行する理由は明らかとなっていない。一方、ピロガロール型カテキンとカテコール型カテキンが酸化的に縮合すると、ビシクロ[3.2.1]オクタン型中間体を経てベンゾトロポロン環を形成することによりテアフラビン類が生成する。この過程において最終的にB環由来部分の不斉が失われるため、テアフラビン類の生成が立体選択的に起こっているかどうかは分かっていない。本研究では、ピロガロール型カテキンからのデヒドロテアシネンシン類の生成における立体制御機構を明らかにするとともに、テアフラビン類生成における立体選択性について検討した。

エラジタンニンは多様で複雑な構造を持つ加水分解型タンニンの一類であるとともに、カテキン類と共通する部分構造 (galloyl 基) を有し、茶葉の微量成分としても含まれている。エラジタンニンは hexahydroxydiphenoyl (HHDP) 基や dehydrohexahydroxydiphenoyl (DHHDP) 基などの特徴的な構造を持つが、それらの生合成機構はいまだ明らかとなっていない。これらの生合成機構を解明する上で、これまでに明らかになったカテキン類の二量化機構が大きく関連していると考えられた。そこで、HHDP 基生成機構の解明を目的として、モデル化合物を用いた galloyl 基の酸化反応機構について検討した。

3. 研究の方法

Epigallocatechin の酵素酸化により dehydrotheasinensin C を調製後、各種溶媒中において NMR や ECD スペクトルにより詳細な立体配座を解析した。さらに、DFT 計算により dehydrotheasinensin C やその生成時に想定される分子間相互作用について検討した。

DPPH を用いた紅茶色素テアフラビン類のバイオミメティック合成法を開発するために、各種条件検討を行った。まずカテコール型カテキンを DPPH で酸化して *o*-キノン体とした後、ピロガロール型カテキンを加え、最終的に反応液に水を加えることで各種テアフラビン類を合成することができた。さらに、最終段階で加える水の代わりに EtOH を加えることで、テアフラビン前駆体の EtOH 付加体を得ることができた。

各種ガロイル誘導体について、CuCl₂ を酸化剤として用い酸化反応を行った。生成物の直接的な分離、あるいは *o*-phenylenediamine 誘導体化や還元反応による誘導体を単離・構造決定することにより、各種ガロイル誘導体の酸化反応機構を調べた。

4. 研究成果

Epigallocatechin (1) をポリフェノール酸化酵素で処理すると主生成物として dehydrotheasinensin C (5) が生成するが、B環のみの誘導体 5-methylpyrogallol を同様に酸化しても 5 に相当する化合物は生じなかった。このことから、5 の生成における立体制御に A, C 環の存在が重要であると考えられる。B環由来部分の立体配置が 5 とは逆のジアステレオマー 5a について DFT 計算による最安定配座を調べて 5 の安定配座と比較した結果、5 では A 環同士でスタッキングした構造が最安定配座として得られた一方、5a ではそのようなスタッキング構造を取れないことが分かった。さらに、acetone-*d*₆ 中での 5 の ¹H NMR スペクトルは A 環シグナルのケミカルシフトが 1 のものとほぼ同じであったのに対して、D₂O 中で測定したスペクトルでは A 環 6, 8'' 位シグナルが大きく高磁場シフトしていた。この結果は、水中において 5 の A 環同士が疎水効果や π-π 相互作用によりスタッキングしていることを強く示唆しており、このことは D₂O 中での NOE 相関からも支持された。水中およびアセトン中での立体配座が異なる理由を考察すると、アセトン中では 2 つの A 環の間の疎水空間に溶媒分子が入り込む可能性が考えられた。そこで、アセトン 1 分子を A 環の間に配置して DFT 最適化を行った結果、得られた構造では A 環同士が大きく広がっていた。したがって、アセトン中においては溶媒分子が A 環の間に挿入されることによって空間が広がり、スタッキング構造をとれないと考えられた。このことは、水中および CH₃CN 中における実測 ECD スペクトルと計算スペクトルとの比較によっても支持された。以上の結果から、水中における 1 の酸化的二量化は、1 とその *o*-quinone 体 (1a) との間で A 環同士の相互作用が働くことにより配座が制御されることで立体選択的に進行すると考

えられた (図 1)。

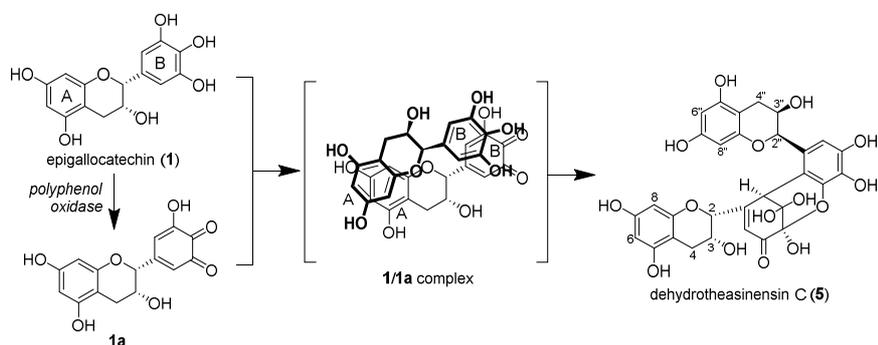


図 1. Dehydrotheasinensin C (5) 生成における epigallocatechin (1) とその *o*-quinone 体 (1a) とのコンプレックス形成

水中でピロガロール型カテキンとカテコール型カテキンが酵素酸化を受けると、ビシクロ[3.2.1]オクタン型中間体が生成後、水の付加等を経て最終的にベンゾトロポロン環が生成する。この一連の反応は自発的に進行するが、非プロトン性溶媒中では水の付加が起こらないためビシクロ[3.2.1]オクタン型中間体の生成で反応が止まる。テアフラビン類生成における立体選択性を解明するためにはビシクロ[3.2.1]オクタン型中間体の立体構造を明らかにすればよいことから、まず非プロトン性溶媒中における theaflavin (6) の合成法について検討した。非プロトン性溶媒中での 6 の合成については、これまでにカテキン A 環ヒドロキシ基保護体の酸化的カップリングによる方法しか報告されていない。そこで、保護基を必要としないラジカル酸化剤 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) を用いたアセトン中における簡易合成法を新たに開発した (6 の収率: 47%)。本方法ではビシクロ[3.2.1]オクタン型中間体が生成後、反応液に水を加えることによって 6 に変換するが、水の代わりに EtOH を加えると B 環由来部分に不斉を残した 2 種の EtOH 付加体 (7, 8) がほぼ同量ずつ得られた。この結果から、デヒドロテアシネンシン類とは異なりテアフラビン類は非立体選択的に生成することが明らかとなった (図 2)。

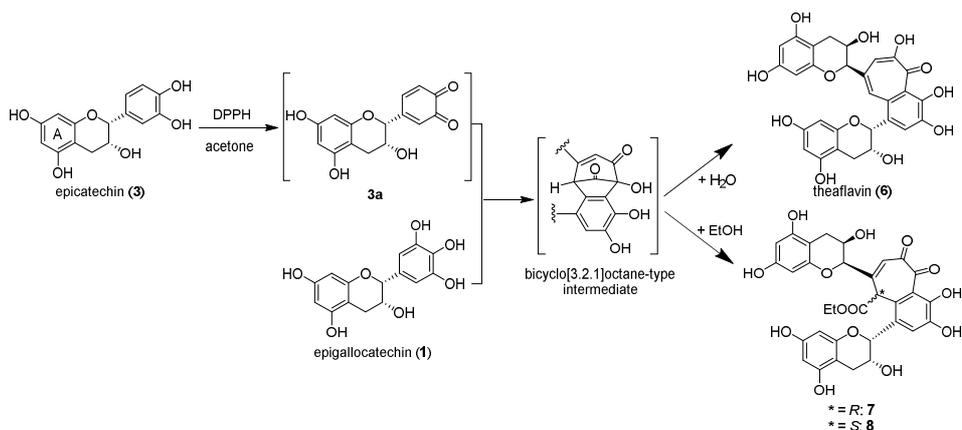


図 2. Theaflavin (6) のバイオミメティック合成および EtOH 付加体の構造

Methyl gallate (9) を $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 混合溶媒中 CuCl_2 で酸化すると 10 が生成したが、不安定なため分離過程で分解して HHDP 型二量体 11 へと変化した。そこで 10 が生成した時点で反応液を $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ またはアスコルビン酸で還元すると 10 が完全に消失して 11 が生成した。また、10 の生成時点で *o*-phenylenediamine 処理するとフェナチン誘導体 12 が得られた(図 3)。これらの結果から、10 は DHHDP 型構造を持つ二量体であると推定された。このことは反応液の LC/MS 分析で 10 の $[\text{M}+\text{H}]^+$ ピークが m/z 383 に観察されたこと、ならびに 10 を含む混合物の 1D, 2D NMR 解析からも裏付けられた。さらに、 CuCl_2 酸化では 11 から 10 への酸化は起こらなかった。これらの結果から、9 を塩化銅で酸化することによって DHHDP 基が生成し、さらに還元処理によって HHDP 基へ変換されることが明らかとなった。

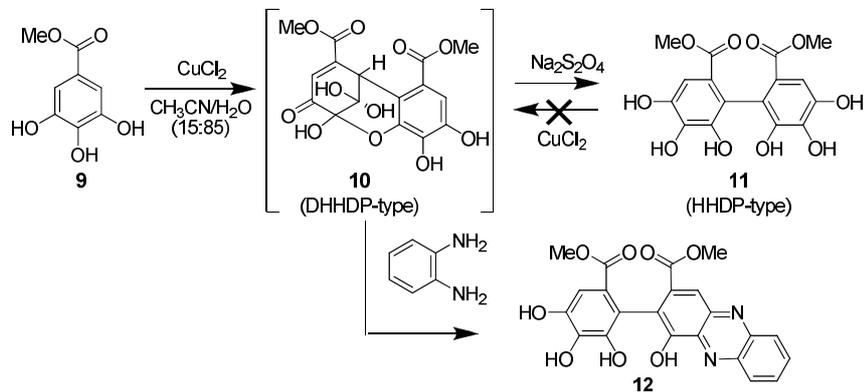


図 3. Methyl gallate (9) の酸化的二量化

つづいて、分子内に 2 つの galloyl 基を持つ化合物でも同様に DHHDP 基を形成するかどうかを調べるため、1,4-butanediol digallate (13) を用いて CuCl_2 酸化生成物を調べた。反応混合物を還元およびフェナチン誘導体化したところ、それぞれ 15 および 16 が得られたことから、13 の酸化によって DHHDP 基を持つ 14 が生成していることが強く支持された。さらに、10 は分離精製の過程で完全に分解したのに対して、14 は単離することができ、その各種 NMR スペクトルから DHHDP 構造を持つと結論した。生成物 10 と比べて 14 はコンフォメーションが固定されることによって安定化されていると考えられる。

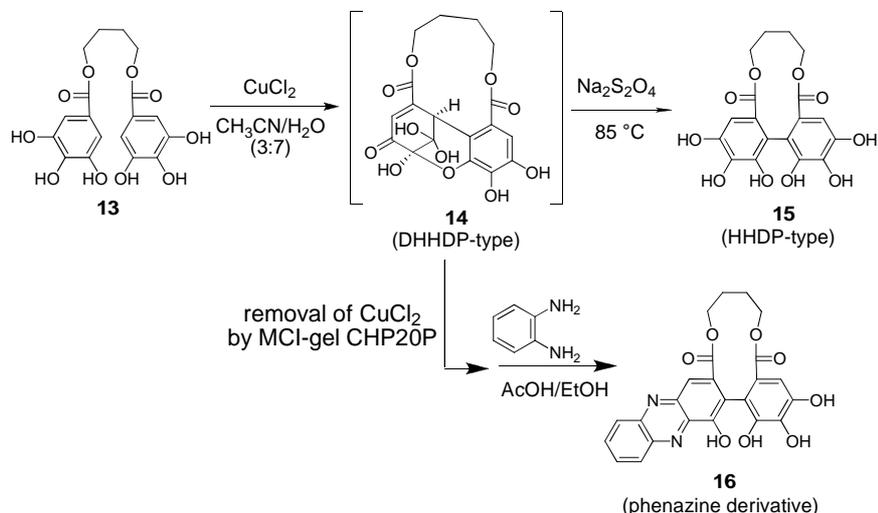


図 4. 1,4-butanediol digallate (13) の酸化による分子内カップリング

多くのエラジタンニンは 1,2,3,4,6-pentagalloyl- β -D-glucose (17) から生合成されることから、17 についても同様に酸化生成物を検討した。化合物 17 を 30% CH_3CN 水溶液中 CuCl_2 で酸化後 *o*-phenylenediamine 処理した結果、三種のフェナチン誘導体 18–20 が得られた (図 5)。これらは分子内で DHHDP 基が生成した後フェナチン誘導体化されたと考えられたことから、 CuCl_2 酸化生成物を直接分離・精製したところ、trapain (isoterchebin) (21) およびその異性体 22 が得られた。化合物 18 は 21 のフェナチン誘導体であり、19 は 22 の誘導体であることが確認された。化合物 17 のグルコース 6 位または 4 位のガロイル基が酸化されて *o*-キノンとなった後、別のガロイル基との間で DHHDP 基を形成することにより 21 および 22 が生成したと考えられる。以上の結果から、植物中においても DHHDP 基がガロイル基の酸化的代謝によって生合成されることが強く示唆された。DHHDP 基が生成後、酸化還元不均化反応によって DHHDP 基が還元的に生合成されると考えられる。

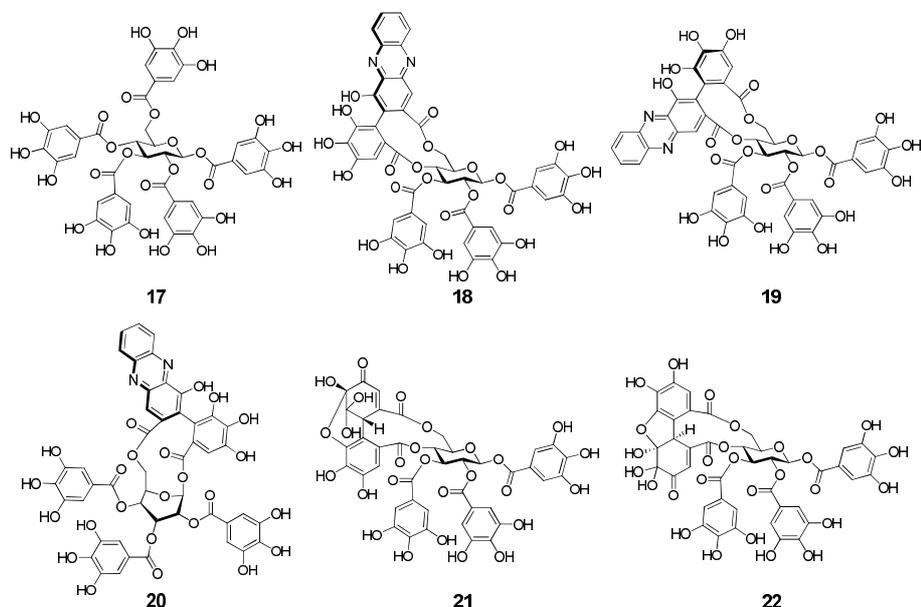


図 5. 化合物 17-22 の構造

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

Manami Era, Yosuke Matsuo, Yoshinori Saito, Koyo Nishida, Zhi-Hong Jiang, Takashi Tanaka, Ellagitannins and Related Compounds from *Penthorum chinense*, *Journal of Natural Products*, 査読有, 2019, 82, 129-135

doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00838

Hitomi Morikawa, Keita Okuda, Yuji Kunihiro, Aoi Inada, Chika Miyagi, Yosuke Matsuo, Yoshinori Saito, Takashi Tanaka, Oligomerization mechanism of tea catechins during tea roasting, *Food Chemistry*, 査読有, 2019, 285, 252-259

doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.163

Takashi Tanaka, Yosuke Matsuo, Yoshinori Saito, Solubility of Tannins and Preparation of Oil-Soluble Derivatives, *Journal of Oleo Science*, 査読有, 2018, 67, 1179-1187

doi: 10.5650/jos.ess18164

Yuki Koga, Yosuke Matsuo, Takashi Tanaka, Conjugation of Vescalagin with Glucose and Phenylpropanoid: Reactions Related to the Insolubilization of Oak Wood Ellagitannins, *Natural Product Communications*, 査読有, 2017, 12, 1291-1294

doi: 10.1177/1934578X1701200836

Yosuke Matsuo, Ayane Yoshida, Yoshinori Saito, Takashi Tanaka, Structural Revision and Biomimetic Synthesis of Goupiolone B, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有, 2017, 56, 11855-11859

doi: 10.1002/anie.201706532

Yosuke Matsuo, Ryosuke Oowatashi, Yoshinori Saito, Takashi Tanaka, Nonenzymatic Biomimetic Synthesis of Black Tea Pigment Theaflavins, *Synlett*, 査読有, 2017, 28, 2505-2508

doi: 10.1055/s-0036-1588529

Takaaki Tsujita, Yosuke Matsuo, Yoshinori Saito, Takashi Tanaka, Enzymatic oxidation of ellagitannin and a new ellagitannin metabolite from *Camellia japonica* leaves, *Tetrahedron*, 査読有, 2017, 73, 500-507

doi: 10.1016/j.tet.2016.12.027

松尾洋介, 植物ポリフェノールの立体構造及び酸化機構解析への計算化学の適用, *YAKUGAKU ZASSHI*, 査読有, 2017, 137, 347-354

doi: 10.1248/yakushi.16-00207

Yosuke Matsuo, Tomoko Matsuda, Keisuke Sugihara, Yoshinori Saito, Ying-Jun Zhang, Chong-Ren Yang, Takashi Tanaka, Theagalloylflavic Acid, a New Pigment Derived from Hexahydroxydiphenoyl Group, and Lignan Oxidation Products Produced by Aerobic Microbial Fermentation of Green Tea, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 査読有, 2016, 64, 918-923

doi: 10.1248/cpb.c16-00098

[学会発表] (計 25 件)

山下貴子, 松尾洋介, 齋藤義紀, 田中 隆, エラジタンニン合成に関わるガロイル基の酸化的カップリング機構, 日本薬学会第 139 年会, 2019

山下貴子, 松尾洋介, 齋藤義紀, 田中 隆, エラジタンニン合成に関わるガロイルエステ

- ルのバイオミメティック酸化, 第 35 回日本薬学会九州支部大会, 2018
- 奥田慶太、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, 茶カテキンとグルコースとの加熱によるスピロケタールの生成, 日本生薬学会第 65 回年会, 2018
- Yosuke Matsuo, Keita Okuda, Ryosuke Oowatashi, Ayane Yoshida, Yoshinori Saito, Takashi Tanaka, STEREOSELECTIVITY IN OXIDATIVE DIMERIZATION OF CATECHINS DURING TEA-FERMENTATION, XXIX International Conference on Polyphenols and the 9th Tannin Conference, 2018
- 木下遼祐、奥田慶太、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, ポリフェノール酸化酵素によるテアシネンシン類の酸化機構, 日本薬学会第 138 年会, 2018
- 奥田慶太、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, 茶カテキン類の酵素酸化における β -シクロデキストリンならびに A 環置換基の影響, 日本薬学会第 138 年会 2018
- 奥田慶太、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, 茶カテキン類の酸化的二量化における A 環の役割, 第 34 回日本薬学会九州支部大会, 2017
- 木下遼祐、奥田慶太、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, 紅茶成分テアシネンシン類の酵素酸化反応, 第 34 回日本薬学会九州支部大会, 2017
- 大渡遼介、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, 紅茶色素テアフラビン類の自動酸化ならびにペルオキシダーゼ酸化機構, 第 7 回食品薬学シンポジウム, 2017
- 松尾洋介, 植物ポリフェノールの酸化的二量化機構に関する研究, 第 7 回食品薬学シンポジウム, 2017
- 奥田慶太、大渡遼介、吉田綾音、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, 紅茶製造過程におけるカテキン類の酸化的二量化反応の立体選択性, 第 59 回天然有機化合物討論会, 2017
- 大渡遼介、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, 紅茶色素テアフラビン類生成におけるビシクロ[3.2.1]オクタン型前駆体の立体構造, 日本生薬学会第 64 回年会, 2017
- 奥田慶太、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, 不安定二量体を經由したピロガロール型カテキンの酸化反応機構, 日本生薬学会第 64 回年会, 2017
- 松尾洋介、吉田綾音、齋藤義紀、田中 隆, DNA 傷害物質 goupilone B のラセミ化, 日本生薬学会第 64 回年会, 2017
- 奥田慶太、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, デヒドロテアシネンシン類の立体選択的生成における π - π 相互作用の影響, 日本薬学会第 137 年会, 2017
- 吉田綾音、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, Goupilone B の構造訂正ならびに合成, 日本薬学会第 137 年会, 2017
- 奥田慶太、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, ビシクロ[3.2.1]オクタン型中間体を經由したピロガロール型カテキン二量化機構の解明, 日本生薬学会第 63 回年会, 2016
- 大渡遼介、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, 生合成機構に基づく紅茶色素テアフラビン類の簡易合成, 日本生薬学会第 63 回年会, 2016
- 松尾洋介、奥田慶太、森川仁美、齋藤義紀、田中 隆, 紅茶ポリフェノール生成におけるピロガロール型カテキンの酸化的二量化機構, 第 58 回天然有機化合物討論会, 2016
- Keita Okuda, Yosuke Matsuo, Yoshinori Saito, Takashi Tanaka, Unstable Dimer of Pyrogallol-type Catechins Produced in the Early Stage of Oxidation during Tea-fermentation, International Symposium on Natural Products for the Future 2016 (ISNPF2016), 2016
- 21 Yosuke Matsuo, Ayane Yoshida, Keisuke Sugihara, Toshimi Hayashi, Chie Mine, Yoshinori Saito, Takashi Tanaka, A New Epigallocatechin Dimer Produced by Enzymatic Oxidation and Production Mechanism of Black Tea Polyphenols, Theasinensins, International Symposium on Natural Products for the Future 2016 (ISNPF2016), 2016
- 22 Yosuke Matsuo, Keita Okuda, Hitomi Morikawa, Yoshinori Saito, Takashi Tanaka, OXIDATION MECHANISM OF EPIGALLOCATECHIN-3-O-GALLATE BY POLYPHENOL OXIDASE, XXVIIIth International Conference on Polyphenols, 2016
- 23 Takashi Tanaka, Yosuke Matsuo, Kohei Katayama, Sena Teramoto, Yoshinori Saito, PYROGALLOL-PHLOROGLUCINOL COUPLING: A POSSIBLE OLIGOMERIZATION MECHANISM OF TEA CATECHINS, XXVIIIth International Conference on Polyphenols, 2016
- 24 松尾洋介, 計算化学的手法を取り入れたポリフェノールの立体構造および酸化機構に関する研究, 日本生薬学会第 63 回年会, 2016
- 25 吉田綾音、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆, Goupilone B の構造訂正, 第 33 回日本薬学会九州支部大会, 2016

〔図書〕(計 2 件)

Yosuke Matsuo, Takashi Tanaka, "Oxidation Mechanism of Polyphenols and Chemistry of Black Tea", Recent Advances in Polyphenol Research, John Wiley & Sons, Vol. 5, 2017, 67-88

松尾洋介, "計算化学を利用したポリフェノールの立体構造解析", ポリフェノール: 機能性成分研究開発の最新動向, 監修: 波多野力, 下田博司, シーエムシー出版, 2016, 26-36