

令和 3 年 5 月 1 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05486

研究課題名(和文) ウーロン茶の生理機能発現メカニズム解析を指向した高分子ポリフェノールの構造研究

研究課題名(英文) Structure elucidation study of oolong tea polymeric polyphenol

研究代表者

柳瀬 笑子 (Yanase, Emiko)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：60313912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではウーロン茶高分子ポリフェノールの構造解明を目的に、生成メカニズムに注目して研究を行った。まず、ウーロンテアニンの化学合成に着目し、結合様式が異なる副生成物の探索を行った。次に、ウーロンテアニン類の反応に着目し、酸化生成物の探索を行った。4種生成物の構造を明らかにした。

高分子ポリフェノール中の新たな結合様式を探索する目的で、抽出物の高分子画分を分離し、NMR解析を行った。高分子化にはカテキンのA環とB環が関与しており、特にB環部分の影響が大きいことが示唆された。また、ガロイル基を持つカテキンが高分子化の重要な単位であるが、ガロイル基は、高分子化にはあまり関与していないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウーロン茶高分子ポリフェノールは含有量が多いにも関わらず非常に複雑な構造の混合物であるため、分離精製やNMRやMSなどによる構造解析が困難であり、未だその詳細は明らかになっていない。そのため、機能性の多くは混合物で評価されており、詳細な構造活性相関研究はほとんど行なわれていない。しかし化学構造の違いは、その機能性に直結することが知られている。本研究の成果は、高分子ポリフェノールの化学構造の解明に重要な知見を与えるものであると考える。

研究成果の概要(英文)：During fermentation process of oolong tea, polyphenol oxidase present in fresh tea leaves oxidize catechins to various polymeric polyphenols. The aim of this research is clarified the chemical structure of polymeric polyphenol by focusing the chemical mechanism. First, to discover the new type of chemical bonding system, structure determination of byproduct during oolongtheanin synthesis was investigated. Next, reactivity of oolongtheanins, which is assumed one of the key intermediate of polymeric polyphenol generation, was performed. Chemical structures of four products were determined. NMR analysis was performed to polymeric fraction of green tea, oolong tea and black tea. The data was assessed by multivariate analysis. The result suggested that A-ring and B-ring participate in the polymerization of catechins and galloyl catechins was major building unit of polymer.

研究分野：天然物化学

キーワード：高分子ポリフェノール ウーロン茶 カテキン

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウーロン茶は発酵茶の一種であり、抗酸化、抗がん、抗糖尿病、抗高脂血症など様々な機能が報告されている。ウーロン茶には、製造過程で生葉に含まれるカテキン類が酸化・重合することによって生成する特徴的なウーロン茶高分子ポリフェノール(Oolong Tea Polymerized Polyphenols : OTPPs)が含まれており、元のカテキン類と比べて上記のような生理活性が高いと言われている。しかし、OTPPsは単一の化合物ではなく、比較的分子量の低いものから含有量の大半を占める高分子まで含まれる。特にこの高分子化合物については、複雑な構造を持つ化合物の混合物であり、未だその詳細は明らかになっていない。その原因は、高分子ポリフェノールが天然物化学研究で一般的に用いられる HPLC 分析や NMR 分析において“瘧状”に観測され、分離精製や構造解析が困難なことにある。一方、カテキン類に限らずポリフェノールの機能性に関する研究、特に構造-活性相関研究が多数報告されている。そのような報告では、構造中のメチル基や水酸基の有無など、わずかな化学構造の違いが機能性の増強や減衰につながるということが知られている。このことは、構造情報が乏しいまま機能性についての研究が先行して行なわれている OTPPs の現状と矛盾しており、構造不明なまま機能性の議論をすることは妥当ではないことを示している。

2. 研究の目的

以上を踏まえて、科学的根拠に基づく化学構造の提案を最終目的とする。OTPPs が、収穫後の製造工程で生葉中のカテキン類の酸化によって生成することに着目し、その生成中間体及び新たに形成される結合の種類を明らかにする。カテキン類の多量化反応機構は Fig.1 に示したように、カテキン類が直接多量化していく(ルート I)とウーロンテアニンのような 2 量体が生成しそれがさらに酸化重合する(ルート II)の 2 つの可能性がある。申請者はこれまで、ルート I に着目してその反応性について検討してきた。本研究においても引き続きウーロンテアニンの反応性について検討する。一方、ウーロンテアニン等は酸化重合反応の中間体ではなく、むしろ副生成物であり、安定な生成物として重合化反応のメインルートからは外れた存在である可能性がある。そのためルート II が OTPPs の生成に重要であると仮定し、新規生成中間体を発見と酸化により新たに構築される骨格の解明についても行う。

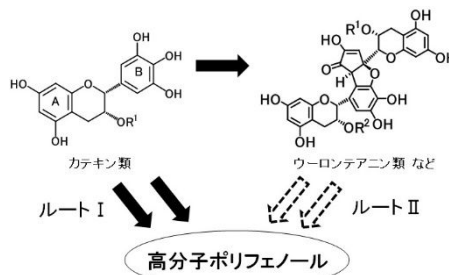


Fig.1 ウーロン茶高分子ポリフェノールの推定生成機構

3. 研究の方法

ルート I における酸化反応

ルート I に由来するウーロンテアニン類等は、カテキンから塩化銅等の酸化剤を用いて合成する方法が開発されているがその収率は 40%程度と低い。その原因は目的以外の結合様式、すなわちルート II 由来の化合物が生成しているためであると予想される。そのため 2 量体の合成時の副生成物の探索を行う。

ルート II における酸化反応

ウーロンテアニン類を用いた酸化反応を行い、その生成物の構造を明らかにする。また、生成機構を明らかにし、その反応性から高分子ウーロン茶ポリフェノールの部分構造を明らかにする。

高分子ポリフェノール画分の構造解析

緑茶、ウーロン茶、紅茶における高分子画分及びカテキン類等の NMR 解析 (^1H , ^{13}C , 2D) を行い比較することで、高分子ポリフェノール中に見られる新たな結合様式を探索する。

4. 研究成果

ルート I における酸化反応

まずカテキンの酸化反応の検討を行った。ウーロン茶中に含まれることが知られるウーロンテアニン類の合成を以前報告している。その生成過程におけるウーロンテアニン類とは結合様式が異なる副生成物は、ウーロン茶高分子ポリフェノールの重要な中間体であると予想しその単離構造決定を目指した。この合成過程におけるウーロンテアニン類の収率は 40%程度にとどまり、多くのマイナー成分の生成が確認された。しかしながら、その構造決定には至らなかった。この結果は、カテキンからウーロンテアニンへの変換反応は 3 段階の変換が起こっているため、その構造推定が難しいことに起因していると推測された。そこで次にエピガロカテキンガレートからウーロンテアニン類を合成する過程のうち、特に 1 段階目の反応が 2 分子間の酸化重合であるため大きな変化がみられると推測し、この段階における追跡を行った。HPLC による追跡では主生成物として生成中間体であるデヒドロテアシネンシン類が観察された。分取 HPLC を用

いて、デヒドロテアシネンシン以外の画分を分離し、NMR による解析を行ったところ、特に低極性画分にデヒドロテアシネンシン類と類似した化合物の生成が観察され、高分子化反応の鍵中間体である可能性が示唆された。残念ながらいずれも構造決定には至っておらず、引き続き構造解析を行っていく予定である。

ルート における酸化反応

ウーロンテアニン類がカテキンの重合化の際の反応中間体の 1 つであると仮定すると、その反応性の解明は高分子ポリフェノールの構造を理解する上で重要である。そこで、ウーロンテアニン 3''-O-ガラート(1)の反応性について検討を行った。ウーロンテアニンを水に溶解し、60℃で4時間反応したところ、4つの新たなピーク(i-iv)が検出された(Fig.2)。反応生成物を HPLC にて単離し、MS 分析を行った結果、それらは酸化重合体ではないことが明らかになった。各種 NMR を行った結果、ピーク i は没食子酸(2)、ピーク iv は以前に構造決定した A 環部の芳香属性が失われ、B 環部と分子内で結合した化合物(3)であった。ピーク ii は、上ユニットのガラート基が失われていること、ウーロンテアニンに特長な 5-5-6 員環骨格が開環により失われているという特徴があり化合物 4 と決定した。ピーク iii は、HMBC 測定により下ユニットはカテキン骨格が残っていること、上ユニットはガラート基が失われていることが確認されたが、それ以上の情報が得られなかった。そのため水素化ホウ素ナトリウムによる還元反応を行ったところ、化合物 4 が生成したことから化合物 5 と決定した(Fig. 3)。

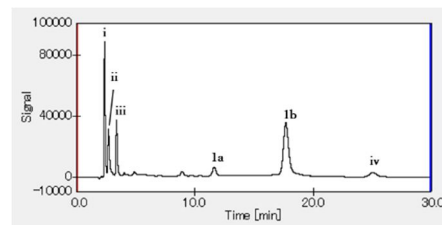


Fig.2 ウーロンテアニンの酸化反応

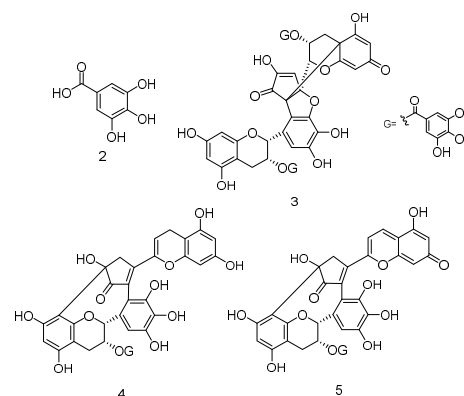


Fig.3 生成物の構造

高分子ポリフェノール画分の構造解析

緑茶、ウーロン茶、紅茶をそれぞれ3種類用い、熱水抽出した。得られた抽出物を逆相及びサイズ排除クロマトグラフィーで高分子ポリフェノール画分を得た。ポリフェノールはポリペプチドなどと比較して水素原子の数が少なく、炭素原子の数が多いため、高分子ポリフェノールの構造解析には¹³C-NMRを用いるのが良いのではないかと考えた。しかし¹³C-NMR測定を行ったところ、十分な数のピークが検出されなかった。そこで¹³C-NMRよりも感度の高い¹H-NMRを用い、得られたデータは主成分分析を行った。主成分分析では、score plotにおいてプロットが緑茶、ウーロン茶、紅茶でグループ化された。また、不発酵茶と発酵茶ではプロットが上部と下部に分かれていた。Loading plotより、緑茶の高分子ポリフェノールは3.2 ppm及び7.7 ppm付近にプロトンを多く持つことが示唆された。また、紅茶の高分子ポリフェノールは5.9 ppm及び6.9 ppm付近にプロトンを多く持つことが示唆された。次に、炭素骨格の情報を得るためにHMQC測定を行った。検出されたピークの数も緑茶と比較して、紅茶は少なかった。これはC-H結合がC-C結合に置換されたことを示しており、高分子化によるものだと考えられた。緑茶と紅茶では主にプロトン/カーボンの3-4 ppm/60-90 ppmと6-8 ppm/100-140 ppmの範囲に大きな変化が見られた。紅茶では6-8 ppm/100-140 ppmのピークの数も少なかった。この範囲は、カテキンのA環とB環、ガロイル基に相当する。そのため、ポリフェノールの高分子化にはカテキンのA環とB環が関与しており、特にB環部分の影響が大きいことが示唆された。また、ガロイル基のピークを確認できたことから、(-)-ECgや(-)-EGCgなどのガロイル基を持つカテキンが高分子化されていることが考えられた。さらにガロイル基は、高分子化にはあまり関与していないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 HIROSE Sayumi, YANASE Emiko	4. 巻 56
2. 論文標題 Chemical Change of Polyphenols during Food Processing: The Elucidation of Oolong Tea Polyphenols	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 665 ~ 670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.56.665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuto Ochiai, Sayumi Hirose, Emiko Yanase	4. 巻 85
2. 論文標題 Understanding the Regioselectivity in the Oxidative Condensation of Catechins Using Pyrogallol-type Model Compounds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 12359 ~ 12366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c01612	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuto Ochiai, Kazuki Ogawa, Yoshiharu Sawada, Emiko Yanase	4. 巻 -
2. 論文標題 Chemical transformation of oolongtheanin 3 -O-gallate in aqueous solution under heating conditions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤歩未、柳瀬笑子
2. 発表標題 LC-MSを用いた紅茶製造時における成分変化に関する網羅的解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中部支部合同神戸大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜大学応用生物科学部生物有機化学研究室ホームページ
<https://www1.gifu-u.ac.jp/~biochem/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長岡 利 (Nagaoka Satoshi) (50202221)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------