

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K02319

研究課題名(和文) 伝統的後発酵茶「碁石茶」のAGEs生成阻害活性と関与成分の解明

研究課題名(英文) Inhibitory activity of traditional post-fermented tea "Goishi-tea" on AGEs formation and its involved components

研究代表者

島村 智子 (Shimamura, Tomoko)

高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授

研究者番号：50350179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：二段階の発酵を経て製造される後発酵茶の碁石茶には、種々の生体調節機能が報告されている。しかし、機能性関与成分に関する知見は乏しい状況にあった。本研究では、抗糖化活性を指標とし、機能性関与成分の解明を試みた。その結果、碁石茶は高い抗糖化活性を示すことが判明した。加えて、カテキン単量体及びその分解物の活性への寄与は低く、未知の関与成分の存在が示唆された。最終的に、カテキン重合体のプロアントシアニジン(PAs)を機能性関与成分と結論付けた。PAsは、碁石茶の苦味、渋味の発現への寄与も報告されている。従って、碁石茶中のPAsは機能性及び呈味の両方において重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

碁石茶は世界に類を見ない製法で製造される後発酵茶であり、その生体調節機能や機能性関与成分に関する科学的知見の蓄積は、碁石茶の高付加価値化だけでなく、“後発酵茶”という長い歴史を持つ文化の解明にも繋がる重要な事柄である。また、本研究の成果で機能性関与成分であることが示唆されたカテキン重合物は微生物発酵の過程で生成している可能性が高く、二段階発酵の製法が受け継がれてきた意味を紐解く鍵になり得る。

研究成果の概要(英文)：Various biological functions have been reported for Goishi-tea, a post-fermented tea produced through a two-step fermentation process. However, knowledge on the functionally active components has been scarce. In this study, we attempted to elucidate the functional components of Goishi tea by using its anti-glycation activity as an indicator. As a result, it was found that Goishi tea has high anti-glycation activity. In addition, the contribution of catechin monomers and their degradation products to the activity was low, suggesting the presence of unknown involved components. Finally, we concluded that proanthocyanidins (PAs), catechin polymers, are the functional components involved in the activity of Goishi tea. PAs have also been reported to contribute to the development of bitter and astringent tastes in Goishi tea. Thus, it is suggested that PAs in Goishi tea plays an important role in both functionality and taste.

研究分野：食品化学

キーワード：後発酵茶 碁石茶 抗糖化活性 AGEs 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

碁石茶の生産地である大豊町、ならびに大豊町碁石茶生産組合と高知大学、高知県は平成 17 年より産学官の連携関係を結び、積極的に碁石茶の生体調節機能の解明に取り組んできた。400 年にも渡る生産の歴史を持つ碁石茶ではあるが、その生体調節機能については生産者の主観によるところの「暗黙知」に過ぎない状況にあったため、我々は、暗黙知のレベルから市場が求める客観的な「形式知」に変換することを目的とした研究を実施してきた。その成果として、抗酸化活性、動脈硬化予防効果、LDL-コレステロール低下作用、インフルエンザ感染予防効果、メタボリックシンドローム予防効果など様々な機能性を試験管レベル、動物試験、ヒト試験にて段階的に証明し報告してきた。しかし、上記の機能性を説明する関与成分の解明は一部しか進んでおらず、不明な点が残ったままであった。一方、我々は食品中（主に乳製品）で生じるメイラード反応の機構解明に取り組んだ経験があり一定の成果を残している。メイラード反応の機構は食品中と生体内で共通している。食品中のメイラード反応の結果が褐変であるのに対し、生体内メイラード反応の結果は終末糖化産物 (AGEs) の蓄積と疾病の発症である。前述の通り、碁石茶は生活習慣病の予防に有効であることが既に示されており、生活習慣病の発症と関連の深い生体内メイラード反応（糖化反応）に着目した。糖化反応の結果生じる AGEs の生成阻害物質を碁石茶をはじめとする後発酵茶中に見出すことができれば、すなわち、それは既に報告されている機能性を説明できる鍵化合物である可能性が高いと考え、本研究に着手した。

### 2. 研究の目的

高知県長岡郡大豊町で生産されている碁石茶は、世界的に見ても非常に珍しい二段階の発酵を経て製造される微生物発酵茶（後発酵茶）である。前述の通り、我々は碁石茶の生体調節機能に関する研究を進め、種々の機能性を報告してきた。しかし、その関与成分についてはカテキン類、及びその分解物であるピロガロール (Pg) しか明らかになっておらず、各種機能性を説明するには不十分な状態であった。そこで本研究では、生活習慣病と関連の深い AGEs 生成阻害活性（抗糖化活性）を指標とし、碁石茶を含む後発酵茶の活性評価を行うとともに、関与成分の追究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 分析試料

試料として、不発酵茶の緑茶、好気発酵茶のバタバタ茶（富山県産）、プーアル茶（中国産）、嫌気発酵茶のミエン（タイ産）、阿波晩茶（徳島県産）、二段階発酵茶の碁石茶（高知県産）、石鎚黒茶（愛媛県産）を用いた。

#### (2) 茶抽出物の調製

粉碎した各種茶葉 5.0 g に超純水 50.0 g を加え、100℃ で 10 分間熱水抽出を行った。加熱終了後、抽出液に超純水を加えて 55.0 g に調整し、綿ろ過を行った。ろ過後、遠心分離（4000 × g、10 分間）を行い、上清をメンブレンフィルター（孔径 0.45 μm）で再度ろ過を行った（茶抽出液 100 mg eq./mL）。

#### (3) 碁石茶アセトン抽出物の調製

粉碎した茶葉 5.0 g に 80% アセトン 50 mL を加え、24 時間静置抽出を行った。抽出終了後、上清を取り、沈殿に 80% アセトンを 50 mL 添加して吸引ろ過を行い、得られたろ液を上清と合一した（茶抽出液 5 g eq.）。

#### (4) 抗糖化活性測定

抗糖化活性は、フルクトース (Fru)-ウシ血清アルブミン (BSA) 系、及びグリセルアルデヒド (GLA)-BSA 系で行った。Fru-BSA 系は、24 穴マイクロプレートに試料 50 μL、200 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 900 μL、1.25 M Fru 溶液 300 μL、BSA 溶液 (50 mg/mL) 300 μL を順次添加し、プレートカバーをして 38℃ の恒温機で 3 日間インキュベートした。GLA-BSA 系は、試料 50 μL、緩衝液 900 μL、0.02 M GLA 溶液 300 μL、BSA 溶液 (20 mg/mL) 300 μL を順次添加した後、1 日間インキュベートした。標準物質としてアミノグアニジン (Ag) 用いた。両系ともに、24 時間毎にマイクロプレートリーダーを用いて励起波長 370 nm、蛍光波長 440 nm における蛍光強度を測定し、その値から糖化の阻害率 (%) を求めた。

#### (5) 総ポリフェノール量測定

総ポリフェノール量測定は、フォーリン・チオカルト法を一部改変して行った。96 穴マイクロプレートに試料 50 μL、フェノール試液 (20 倍希釈) 50 μL、0.175 M 水酸化ナトリウム溶液

100  $\mu\text{L}$  を順次添加した。マイクロプレートシェーカーを用いて 600 rpm、1 分間、30 で攪拌し、室温で 3 分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーにて 725 nm の吸光度を測定した。標準物質として没食子酸 (GAE)を用い、試料中の総ポリフェノール量を GAE 当量 (mg GAE/mL) として表した。

#### (6) 総プロアントシアニジン量測定

総プロアントシアニジン量測定は、バニリン-硫酸法にて行った。1.5 mL 容チューブに試料 100  $\mu\text{L}$ 、30 で 20 分間予め加熱した 4% (w/v) バニリン-MeOH 溶液 600  $\mu\text{L}$  を順次添加し攪拌した。さらに、30 で 20 分間予め加熱した 13% (w/v) 濃硫酸-MeOH 溶液 300  $\mu\text{L}$  を添加し攪拌した。遮光下で室温にて 15 分間静置後、500 nm における吸光度を測定した。標準物質としてカテキン-水和物を用い、試料中の総プロアントシアニジン量をカテキン当量 (mg CE/g d.w.) として表した。

### 4. 研究成果

#### (1) 各種後発酵茶の抗糖化活性

代表的な抗糖化活性物質である Ag、及び碁石茶、石銚黒茶、プーアル茶、バタバタ茶、ミエン、阿波晩茶の 6 種の後発酵茶、抗糖化素材であることが報告されている不発酵茶の緑茶の抗糖化活性評価を Fru-BSA 系、及び GLA-BSA 系にて行った。各茶の抗糖化活性を Ag 当量 (mg AgE/mL) に換算した結果を図 1、図 2 に示した。Fru-BSA 系では、緑茶が 0.91 mg AgE/mL と最も高い活性を示し、次いで碁石茶が 0.58 mg AgE/mL、石銚黒茶が 0.57 mg AgE/mL と続いた。一方、GLA-BSA 系では、緑茶と石銚黒茶が 0.19 mg AgE/mL と最も高い活性を示し、次いで碁石茶とプーアル茶が 0.12 mg AgE/mL となった。また、Fru-BSA 系で抗糖化活性が認められたミエンは GLA-BSA 系では活性が確認できなかった。

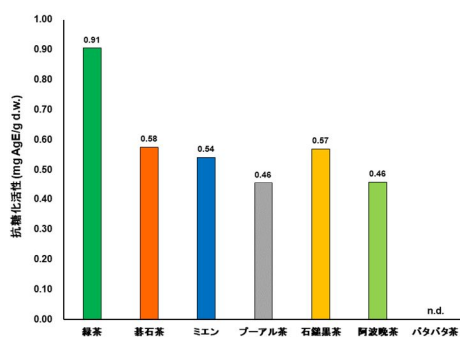


図1 各茶の抗糖化活性 (Fru-BSA系)

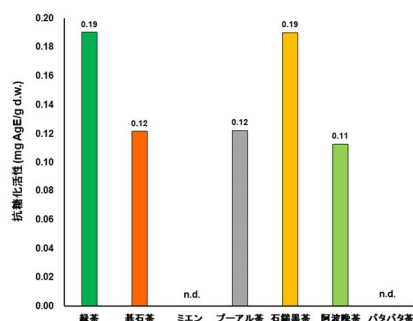


図2 各茶の抗糖化活性 (GLA-BSA系)

#### (2) カテキン類及びカテキン関連物質の抗糖化活性

カテキン類 (C、Cg、EC、ECg、EGC、EGCg、GC、GCg)、及びカテキン関連物質 (カフェイン: Cf、GA、Pg) の抗糖化活性評価を行ったところ、Fru-BSA 系では Cg が 22.5 mg AgE/mg と最も高い活性を示し、次いで EGCg が 14.7 AgE/mg、GCg が 11.2 AgE/mg、ECg が 7.2 AgE/mg、Pg が 6.7 AgE/mg、EC が 5.9 AgE/mg、GA が 5.6 AgE/mg、C が 4.8 AgE/mg、EGC が 4.0 AgE/mg、GC が 1.4 AgE/mg となり、Cf には活性が認められなかった。また、GLA-BSA 系では Pg が 7.9 AgE/mg と最も高く、次いで、EGC が 2.84 AgE/mg、EC が 2.4 AgE/mg、C が 2.1 AgE/mg、GA が 1.8 AgE/mg、GC が 1.8 AgE/mg、GCg が 1.2 AgE/mg、GC が 1.1 AgE/mg、EGCg と ECg が 1.0 AgE/mg という結果となり、この系においても Cf には活性が認められなかった。

以上の結果より、各種茶試料、カテキン類、カテキン関連物質の抗酸化活性は Fru-BSA 系と GLA-BSA 系の両系で傾向が異なることが判明した。この原因としては、Fru と GLA が関与する糖化反応の反応速度の違いが関連しているものと推察された。

#### (3) 各茶試料中のカテキン類、及びカテキン関連物質の抗糖化活性への寄与

各茶試料中のカテキン類、及びカテキン関連物質の抗糖化活性への寄与率を算出した (図 3、図 4)。その結果、カテキン類、及びカテキン関連物質の抗糖化活性への寄与は、Fru-BSA 系では緑茶が 58.2%と最も高く、次いでミエンが 40.5%、石銚黒茶が 34.6%であった。一方、GLA-BSA 系では緑茶が 90.8%と最も高く、次いで石銚黒茶が 73.8%、碁石茶が 55.4%であった。この結果より、不発酵茶である緑茶の抗糖化活性にはカテキン類の寄与が大きいことが明らかとなった。また、各種後発酵茶中で比較的抗糖化活性の高かった碁石茶は、概してカテキン類の寄与率が低い傾向にあった。このことから、碁石茶の抗糖化活性には、既知のカテキン類、及びカテキン関連物質以外の物質の関与が大きいことが示唆された。

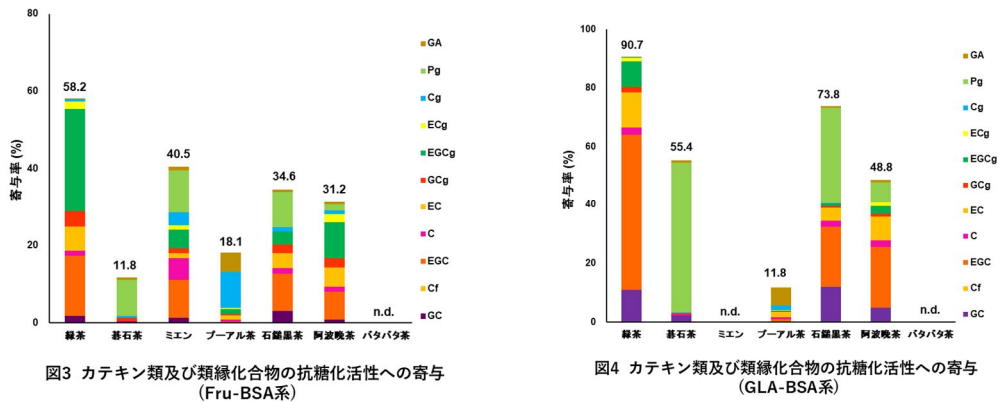


図3 カテキン類及び類縁化合物の抗糖化活性への寄与 (Fru-BSA系)

図4 カテキン類及び類縁化合物の抗糖化活性への寄与 (GLA-BSA系)

#### (4) 碇石茶中の抗糖化成分の追究

先の結果より、碇石茶の抗糖化活性には既知のカテキン類、及びカテキン関連物質以外の物質の関与があることが示唆された。そこで本研究では、抗糖化成分のさらなる追究のために、碇石茶アセトン抽出物を調製後、ODS 中圧クロマトグラフィーによる分画を行い、0%、20%、40%、100% MeOH 画分に分け、抗糖化活性評価を行った。その結果、40% MeOH 画分に最も高い抗糖化活性が認められたため、本画分をゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) に供し、0%、20%、40%、60%、100% MeOH 画分を得た。これらの画分のうち、GPC 60% MeOH 画分に最も高い抗糖化活性が認められたため、さらに HPLC による分画を試みた (図 5)。その結果、Fr. 3 に最も高い抗糖化活性が認められ、加えて、Fr. 3 のポリフェノール含量は他の画分と比較して高い傾向にあることが分かった。そこで、Fr. 3 にカテキン単量体、ならびにカテキン関連物質が含まれるかを調べたところ、これらの既知物質は検出されなかった。このことから、Fr. 3 には抗糖化活性に関与する未知のフェノール性化合物が含まれていると判断した。

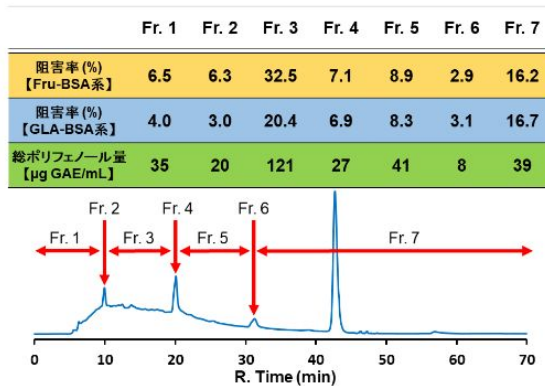


図5 HPLC分画物 抗糖化活性及び総ポリフェノール量

GPC 60% MeOH 画分はその溶媒濃度から比較的高分子量の物質が溶出されると考えられたこと、ならびに、Fr. 3 は HPLC クロマトグラム上でブロードなピークが検出された保持時間に相当することから、カテキン重合体であるプロアントシアニジンが含まれている可能性が高いと推察した。そこで、Fr. 3 を限外ろ過に供し、得られた画分の抗糖化活性を評価したところ、3-10 kDa の画分に最も高い活性が認められた。本画分のプロシアニジン含量は高い傾向にあり、加えて、ポリフェノール吸着剤であるポリビニルポリピロリドンの添加により活性の低下が認められたことから、図5中のFr. 3に含まれる主要抗糖化成分はプロアントシアニジンであると判断した。また、抗糖化活性との関連については現在のところ不明ではあるが、本研究の過程において、碇石茶抽出物中にプロシアニジン B1、B2、B3、B4 の存在を確認した。

過去に、カテキン重合体であるプロアントシアニジンが碇石茶の機能性関与成分として言及されたことはない。本研究の成果は、碇石茶の機能性の全容解明へつながる重要なパーツになり得ると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島村智子
2. 発表標題 土佐の食材とSDGs 土佐の食材の健康機能を農芸化学で解き明かす
3. 学会等名 日本農芸化学会 サイエンスカフェ in 高知（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島村智子
2. 発表標題 後発酵茶「碁石茶」の機能解析
3. 学会等名 第48回BMSコンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島村智子
2. 発表標題 二段階発酵茶「碁石茶」の風味特性の解明
3. 学会等名 日本清涼飲料研究会第31回研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	柏木 丈拡  (Kashiwagi Takehiro)  (60363256)	高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授    (16401)	

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
---------	---------