

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780123

研究課題名(和文)生理機能解明を指向したウーロン茶ポリフェノールの生成機構解明及びその合成

研究課題名(英文)Elucidation of formation mechanism of oolong tea polyphenol: Oolongtheanins

## 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ウーロン茶ポリフェノールの一つであるウーロンテアニン類の生成機構の解明を目指し、茶カテキン類での酸化反応を行いその変化について詳細に追跡を行った。その結果、ウーロンテアニンはカテキンから3つの生成中間体 - を経た4段階の反応で変換されることが明らかとなった。それぞれの構造を決定することで生成機構を明らかにした。さらにこの生成機構をもとに、有機化学的に4種類のウーロンテアニン類を合成する方法を開発した。得られた化合物を用いてその機能性について評価したところ、ウーロンテアニン類には元のカテキン類より強いコレステロール吸収抑制作用がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oolongtheanins are the catechin dimers found in oolong tea leaves. To clarify the formation mechanism, the oxidation of EGC was investigated. As a result, the formation mechanism was proposed on the basis of isolated three intermediates. 1) After one pyrogallol type catechin was oxidized to form o-quinone, another pyrogallol type catechin attacked on o-quinone. 2) Resulting dimer is oxidative cyclized, then hydrated, generating bicyclo type intermediate I (dehydrotheasinensins). 3) Transformation of I to lactone type intermediate II (pro-oolongtheanins) by dehydration and rearrangement reaction. 4) Generation of intermediate III by hydrolysis of lactone moiety and recyclization. 5) Oolongtheanins are formed by decarboxylation and oxidation. Effective synthetic method of oolongtheanins was investigated based on this mechanism. In addition, the micellar solubility of cholesterol with them were measured in vitro, and Oolongtheanin-3'-O-gallate showed a strong inhibitory ability.

研究分野：天然物化学

キーワード：ウーロン茶ポリフェノール ウーロンテアニン カテキン 酸化反応 反応機構 コレステロール吸収阻害

### 1. 研究開始当初の背景

ポリフェノール類は植物の二次代謝成分の一種で、茶においてはカテキン類とその縮合物のことを指す。その含有量や成分、成分比などは茶葉の種類や加工方法によって様々である。ウーロン茶においては、元来茶葉に含まれるカテキン類(一次ポリフェノール)に加えて、ウーロン茶製造時に茶の生葉中のカテキン類が、茶葉に含まれる酸化酵素によって酸化的に変換・重合されることによって生じる新たなポリフェノール(二次ポリフェノール)が含まれる。これらが持つ中性脂肪の低下、活性酸素の除去などの機能性から、近年では健康食品や特定保健用食品として利用されている。

二次ポリフェノールは、ウーロン茶等の発酵茶特有の成分で、比較的低分子のものから含有量で大半を占める高分子ポリフェノールまで存在する。しかしこの高分子ポリフェノールについては、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り、クロマトグラフィー等による分離精製や NMR 等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。現在では分離可能な低分子ポリフェノールの構造や質量分析法による解析、また高分子ポリフェノールの分解反応生成物の構造から高分子ポリフェノールの構造推定がなされている。しかし、人工的な合成ポリマーと異なり、構成単位や結合様式が多様であり、化学的な根拠が十分とはいえない。

### 2. 研究の目的

以上を踏まえて、本研究ではウーロン茶高分子ポリフェノールの化学構造、性質を明らかにすることをめざして、以下の3点について行うことにした。

(1) ウーロン茶中における高分子ポリフェノールの化学構造を明らかにするための一つのアプローチとして、ウーロン茶ポリフェノールのうち比較的低分子であるウーロンテアニン類の、カテキン類からの生成メカニズムを有機化学的に解明することを目的とした。

(2) (1)で明らかになった生成反応機構を元に、ウーロンテアニン類の合成法を確立する。カテキン類の組み合わせにより4種類のウーロンテアニン類の合成を行う。

(3) (2)で合成したウーロンテアニン類とその関連物質を用いて、ウーロン茶で知られるコレステロール吸収抑制作用について評価し、構造と生理活性の関係を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) ウーロンテアニン生成機構解明のためのモデル反応系の構築

生成機構の証明には、反応の制御や追跡、解析を容易にするために、モデル化合物を用いて行うことにした。そのために、まずモデル反応系の構築を検討した。ウーロンテアニ

ンは、2分子のカテキン類のB環部の酸化的縮合反応によって生成する。そのため、モデル化合物としてカテキン類のB環部に相当する各種ピロガロール誘導体を用い、反応条件の検討を行った。反応の追跡には、逆相系 HPLC を用い、得られた化合物の構造決定には NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D-NMR) 及び質量分析を用いた。

(2) ウーロンテアニン類の生成機構の解明  
カテキン類のひとつである EGCg の酸化反応について、HPLC を用いた詳細な反応追跡を行った。研究開始当初、ウーロンテアニンの化学反応機構は、2分子のイオニックなカップリング反応 酸化に伴う分子内環化反応 一酸化炭素の脱離反応の三段階であると推定していた。各段階に相当する反応中間体の単離・構造決定を行うことで反応機構を明らかにした。なお、得られた化合物の構造決定には NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D-NMR) 及び質量分析を用いた。

(3) ウーロンテアニン類の合成

カテキン4種の組み合わせにより4種のウーロンテアニン類を(2)で明らかになった反応機構をもとに、反応条件を検討して合成した。

(4) 機能性の評価

ウーロン茶の機能性の一つとしてコレステロール吸収抑制作用が知られている。(3)で合成したウーロンテアニン類と、その原料である EGCg 及び EGC を用いて、コレステロール吸収抑制効果のひとつの指標として知られるコレステロールミセル溶解性試験を用いて評価した。得られた結果から、構造活性相関について考察した。

### 4. 研究成果

(1) モデル反応系の構築

モデル化合物として、図1に示したようにピロガロール5位に各種置換基を持つ化合物 1a~1e を用いた。市販されている 1c と 1d 以外は 1d より5段階の反応をへてそれぞれ合成した。それぞれを  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_2\text{CO}_3$  で酸化し

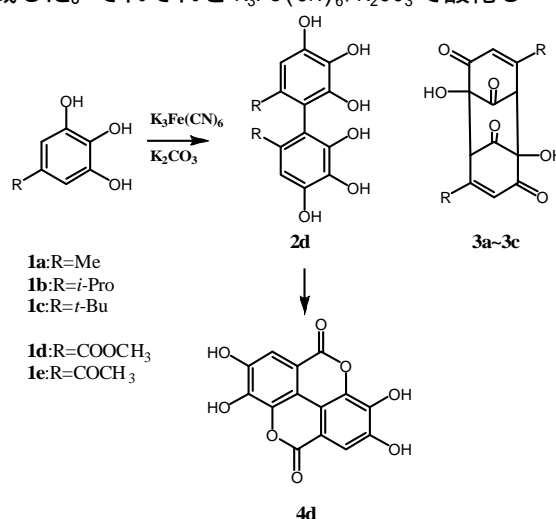


図1 モデル化合物の酸化反応

たところ、化合物 1a~1c では反応開始直後に白色沈殿が生成した。得られた沈殿について構造決定を行ったところ、目的の2量体(2)ではなくジケト体(3a~3c)であることが明らかとなった。化合物 1d を原料とした場合には、目的の 2d が得られたが、2d はさらに分子内エステル交換反応により速やかにエラグ酸 4d となることがわかった。一方、原料として EGCg を用い同様に酸化反応を行ったところ、目的の 2 が低収率ながら得られ、ジケト体 3 は全く得られなかった。

目的の 2 とジケト体 3 の違いは、1 段階目の結合位置が異なり、さらに 3 では酸化縮合後に酸化されて分子内環化反応が起こっている。この違いが生じる原因としては、EGCg の場合には 2 分子が A 環部の芳香環間での相互作用により会合し B 環部が固定されるため、モデル化合物のような自由度がなくなり目的の結合のみが生成したのではないかと推察している(図 2)。

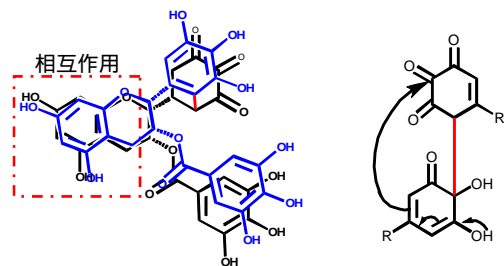


図 2 EGCg とモデル化合物の結合の違い

## (2) ウーロンテアニン類の生成機構の解明

次に、EGCg または EGC を用いてウーロンテアニン類の生成反応について詳細に検討することにした。酸化剤として、塩化銅(II)を用いて反応を行い、反応中の変化について HPLC を用いて詳細に観察した結果、EGCg または EGC は、3 段階の反応を経てウーロンテアニン類へ変換されており、2 種の間mediate I、

の存在が明らかとなった。それぞれを機器分析及び誘導体化して構造解析を行ったところ、Intermediate I は Dehydrotheasinensin C または A であった。これは、ウーロンテアニン類と同様にウーロン茶中から単離されているテアシネンシン類の生成中間体として報

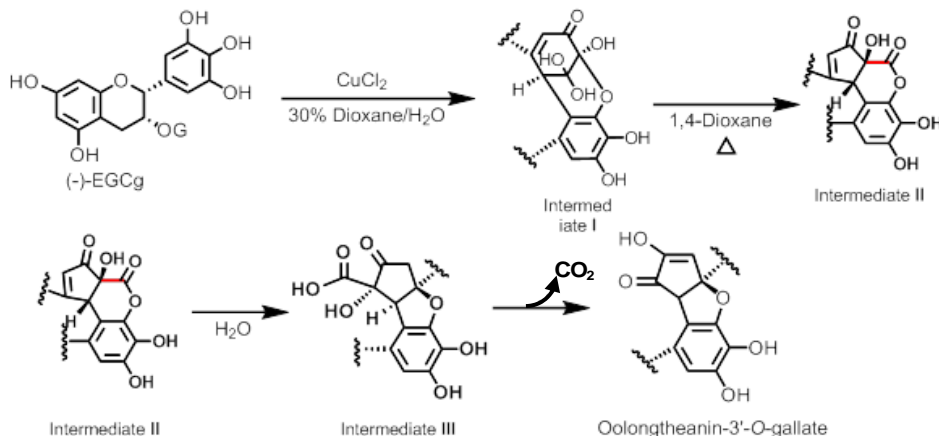


図 3 ウーロンテアニン類の生成機構

告されている化合物であり、この 2 種類が同じ中間体を経て生成していることを示している。また、Intermediate I は、分子内にラクトン構造を有する新規化合物であり、Prooolongtheanin 類と命名した。これは、Intermediate I から脱水が起こり、分子内転位反応によって環の組み換えが起こることで生じたものと推測される。さらに、Intermediate I を NMR サンプルチューブ中で水と反応させ、反応の様子を NMR で観察したところ、Intermediate I の存在が明らかとなった。Intermediate I は、非常に不安定であり、単離には至らなかったが、混合物での NMR 測定の結果、Intermediate I のラクトン構造の加水分解による開環と、その後の閉環反応により、分子内にカルボン酸構造を持つ図 3 に示した構造であることが明らかとなった。また、Intermediate I からウーロンテアニンへの反応をバイアル中で行い、そのヘッドスペースガスの GC-MS 分析を行うことにより、このステップにおいて脱二酸化炭素が起こっていることを確認した。以上の結果から、EGC 及び EGC g からウーロンテアニン類への生成機構は、以下のとおりであることが明らかとなった(図 3)。

カテキンの酸化的カップリングと分子内環化による Intermediate I の生成

脱水及び転位反応による Intermediate I の生成  
ラクトン部の加水分解及び再環化反応による Intermediate II の生成

脱二酸化炭素及び酸化反応によるウーロンテアニン類の生成

## (3) ウーロンテアニン類の合成

EGCg 及び EGC の組み合わせにより、4 種類のウーロンテアニン類(5a-d, 図 4)の合成を行った。EGCg または EGC のみからなる、ホモ型のウーロンテアニン類(5ab)は、反応条件の検討の結果、それぞれ 40%の収率で得られた。一方、EGCg と EGC からなるヘテロ型のウーロンテアニン(5cd)の合成法を検討したところ、水中にて低温下で反応を行うことにより、部ユニットが EGC 由来のヘテロ型ウーロンテアニン(5d)を優先的に得ることに成功した。この反応性の差は、反応 1 段階目の酸化反応に起因しており、それは EGC の方が

EGCg よりもわずかに酸化されやすいためであることがわかった。さらに、もう一方の、つまり上部ユニットが EGCg 由来ヘテロ型ウーロンテアニン(5c)については、EGCg 由来 5b の酵素タンナーゼを用いた脱ガレート反応によって得られることが明らかとなった。以上の各方法を用いることにより、ウーロンテアニン類 4 種の合成に成功した。

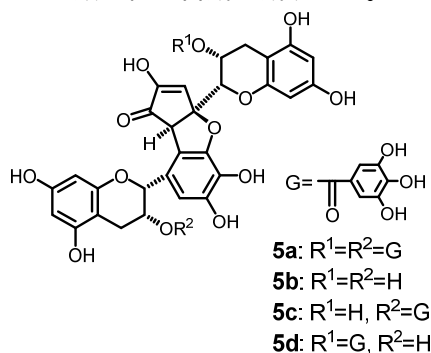


図4 ウーロンテアニン類

#### (4) ウーロンテアニン類のコレステロール吸収抑制効果

合成したウーロンテアニン 5ab とその原料である EGCg 及び EGC を用いて、コレステロール吸収抑制に対する効果を評価した。評価系として、コレステロール吸収の評価に一般的に用いられているコレステロールミセル溶解性試験を用いた。その結果、EGCg の 2 量体である 5a で高コレステロール血症薬として知られるコレステラミンに匹敵する非常に強い阻害活性が観察された。このことからウーロンテアニンには、コレステロール吸収抑制効果があることが示唆された。また、EGCg にはコレステロールミセル溶解性を低下させる効果が報告されており、その作用はガレート部のミセルとの相互作用によることが報告されている。しかしながら、本研究で用いたガレート部を持たない 5b においても強い活性が見られたことから、EGCg とは異なる作用機構、たとえば新たに構築されたウーロンテアニン類に特徴的な 5-5-6 員環構造が活性に寄与している可能性があるかと推測している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- Ogawa, K., Hirose, S., Yamamoto, H., Shimada, M., Nagaoka, S. and Yanase, E.: Synthesis of oolongtheanins and their inhibitory activity on micellar cholesterol solubility in vitro. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有, 25: 749-752, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.01.002>
- Hirose, S., Tomatsu, K., Yanase, E.: Isolation of key intermediates during formation of oolongtheanins. *Tetrahedron Lett.* 査読有, 54 (51):

7040-7043, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.10.069>

[学会発表](計 7 件)

- 小川和樹, 廣瀬紗弓, 柳瀬 笑子: ウーロンテアニン類の化学的合成, 日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集, 2E21p13, 2015 岡山大学 (岡山市・岡山).
- 内田和宏, 小川和樹, 柳瀬 笑子: テアフラビン類の合成収率の改善, 日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集, 2E21p14, 2015 岡山大学 (岡山市・岡山).
- 廣瀬 紗弓, 柳瀬 笑子: ウーロンテアニン類の生成機構の証明, 日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集, 3A07p09, 2014 明治大学 (川崎市・神奈川).
- Hirose, S. and Yanase, E.: Formation mechanism of oolongtheanins: *The XXVII<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols & The 8th Tannin Conference*, p167-168, 2014 名古屋大学 (名古屋市・愛知).
- 廣瀬 紗弓, 柳瀬 笑子: 茶カテキン B 環部の酸化生成物に関する研究, 日本農芸化学会 2013 年度大会講演要旨集, 2013 東北大学 (仙台市・宮城).
- Hirose, S., Tomatsu, K., Yanase, E.: Formation Mechanism of Oolong Tea Polyphenol: Oolongtheanins, *The 5th international conference on O-CHA culture and science*, HB-P-40, 2013 静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ (静岡市・静岡).
- 廣瀬 紗弓, 戸松 薫, 柳瀬 笑子: ウーロン茶ポリフェノールの生成機構に関する研究, 第 55 回天然有機化合物討論会講演要旨集, P-19, 2013 同志社大学 (京都市・京都).

[その他]

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~biochem/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 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

##### (2) 研究協力者

長岡 利 (NAGAOKA Satoshi)  
 岐阜大学・応用生物科学部・教授  
 研究者番号: 50202221