

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460125

研究課題名(和文)キノン二量化と非酵素的酸化還元不均化を鍵反応とするエラジタンニン新規生合成機構

研究課題名(英文)Ellagitannin biosynthesis via non-enzymatic quinone dimerization and redox dismutation

研究代表者

田中 隆 (TANAKA, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：90171769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：エラジタンニン(ET)の基本構成ユニットであるヘキサヒドロキシジフェノイル(HHDP)基は、二つのガロイル基の単純な酸化的カップリングで生合成されると考えられていた。しかし我々はクマシデ葉では成長に伴ってまずデヒドロヘキサヒドロキシジフェノイル(DHHDP)基が生成し、それが還元されてHHDP基になることを発見した。同様の現象がナンキンハゼやザクロなどでも観察された。クマシデやアカシデのDHHDP基を持つETを精製して水に溶かしておくだけで還元が起こりHHDP基を持つETになることから、この反応は非酵素的な酸化還元不均化反応と推測され、従来とは異なるET合成機構の存在が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Ellagitannins have hexahydroxydiphenoyl (HHDP) esters, and biogenesis of which was thought to be simple oxidative couplings between two galloyl esters. However, the HHDP esters in the leaves of *Carpinus* sp. were generated reductively from dehydrohexahydroxydiphenoyl (DHHDP) esters. Similar reductive metabolism were also observed in the leaves of *Sapium* sp. and *Punica* sp. Purified DHHDP esters isolated *Carpinus* sp. and *Sapium* sp. were spontaneously decomposed to give HHDP esters in aqueous solution. The reaction is non-enzymatic and probably proceed by the reduction-oxidation dismutation mechanism. The results may propose a new biosynthetic mechanisms of ellagitannins.

研究分野：天然物化学

キーワード：エラジタンニン 生合成 酸化還元不均化 キノン 紅茶 ポリフェノール タンニン

### 1. 研究開始当初の背景

エラジタンニンはポリフェノールの中の一類で、一般に知られるところではラズベリーなどキイチゴ類、ザクロ、ゲンノショウコなどに含まれる。本来は植物の防御物質と考えられており、他のポリフェノールと同様にヒトの健康維持に役立つ生物活性も多く報告されていて、今後機能性食品成分としてさらに注目されることが予測される物質群である。

エラジタンニンは極めて構造多様性に富んだ分子構造を持つが、その生合成はグルコースに結合する複数のガロイル基(3,4,5-トリヒドロキシ安息香酸)の酸化代謝によると考えられていて、非常に複雑な構造のエラジタンニンでも、それぞれ生合成機構が推測されている。すべてのエラジタンニンの生合成で最初の反応は、二つのガロイル基が酸化的に炭素-炭素結合を形成してヘキサヒドロキシジフェノイル(HHDP)基となるものである(図1)。G. Grossらはこの反応を触媒する酵素について報告しているが、報告には反応メカニズムは示されていない。エラジタンニンの生合成については彼らの研究がほぼ唯一と言ってよい状況で、他の植物成分に比べるとその生合成についての情報はほとんどないのが現状である。ゲンノショウコやザクロ葉にはHHDP基がさらに酸化された構造をもつデヒドロヘキサヒドロキシジフェノイル(DHHDP)基をもつエラジタンニンが主成分として含まれる。ポリフェノールは酸化されやすいことから、このDHHDP基もHHDP基が酸化されて生合成されると考えられている。しかし現時点でその証拠はなく、すべてのエラジタンニン生合成は紙の上での推測に過ぎない(図1)。

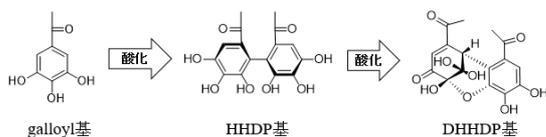


図1 従来のエラジタンニン生合成仮説

最近我々はクマシデ葉のエラジタンニンの季節変化を検討する過程で春の葉ではDHHDP基を持つエラジタンニンが主成分であるのに、葉の成長に伴ってそれが減少しHHDP基を持つ還元生成物が増加することを発見した。DHHDP基の基本構造は、茶カテキンから紅茶ポリフェノールが生成する際の代謝中間体デヒドロテアシネンシン類のものと同じである(図2)。我々は、以前デヒドロテアシネンシン類が水溶液中で非酵素的酸化還元不均化反応を起こして還元生成物と酸化生成物を与えることを報告している。このことからクマシデ葉でもDHHDP基の酸化還元不均化反応が起こっている可能性が示唆された。

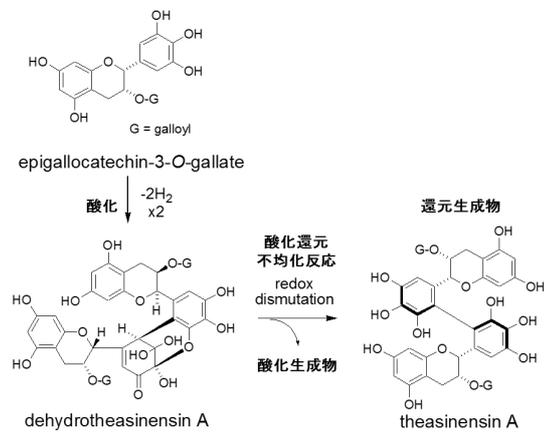


図2 茶カテキンから紅茶ポリフェノールの生成における酸化還元不均化反応

### 2. 研究の目的

本研究では、これまで「酸化的」に進行すると推測されてきたエラジタンニンの生合成について化学的に検証する。

- (1) エラジタンニンを含む植物の新芽と成葉について HPLC 分析で比較し、成長に伴うエラジタンニンの変化を検討する。
- (2) クマシデ葉のエラジタンニンの反応性を詳細に検討し、茶カテキン酸化でのキノン二量体形成と非酵素的酸化還元不均化反応と同様の反応がエラジタンニン生合成で起こることを実験的に示す。
- (3) 未だ完全には解明されていないカテキン酸化での酸化還元不均化反応機構を検討する。
- (4) グルコースに結合する2つのガロイル基の酵素的および非酵素的カップリング反応を検討する。

### 3. 研究の方法

長崎県多良山系で4-8月に採集したクマシデおよびアカシデ新鮮葉のエラジタンニンの HPLC による比較と各段階での主要なエラジタンニンを分離精製して、その試験管内での反応を検討した。

長崎大学構内で採集したナンキンハゼ、ホルトノキ、ザクロなどの4月の新芽だけに含まれるエラジタンニンについて HPLC による分析比較と成分分離を行った。

さまざまな条件下での茶カテキンの酸化について検討して、酸化還元不均化反応についての詳細な検討を行った。

HPLC 分析は日本分光社製のシステムを用いて行った。エラジタンニン類の分離精製は Sephadex LH-20、Diaion HP20SS、各種 ODS などを用いて行った。

### 4. 研究成果

- (1) 葉の成長に伴うエラジタンニンの変化  
すでにエラジタンニン組成が報告されている植物について、春に枝先に展開する新芽の成分を分析した。常緑樹としてツバキ、シイ、アラカシ、ホルトノキ、落葉樹として、アカシデ、ナンキンハゼ、アカギ、ザクロお

よびクマシデについて検討した。

ツバキ (ツバキ科常緑樹) については、新たに展開する葉には pedunculagin が主成分であるのに、7 月には消失することを見出した。Pedunculagin が酸化的に分解するものと仮定してその酵素酸化を検討した。その結果、pedunculagin は直接酵素酸化されることはないが、ツバキ葉にも共存する catechin を加えると直ちに酸化され、ベンゼン環が開裂することを明らかにした (図3)。その他ツバキ葉からは新規エラジタンニン を分離した。反応はまずカテキンが酸化されて  $\alpha$ -キノンとなり、そのキノンが pedunculagin の HHDP 基を酸化していることが示唆された。

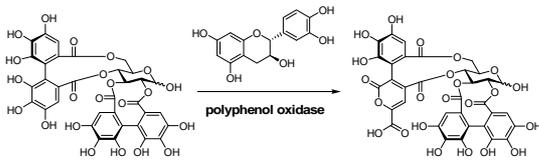


図3 Pedunculagin の酵素酸化

アラカシ (ブナ科常緑樹) アラカシの新芽にはエラジタンニンの vescalagin が主成分として含まれるが、成長に伴って減少することが分かった。Vescalagin も酸化酵素では酸化されないがツバキと同様にカテキンが共存すると減少した。酸化生成物の構造を決定し、さらにそれが若葉にも存在することを確認した。また、その酸化生成物は非酵素的にカテキンと結合することが分かった。カテキンとの反応は夏の葉に多量生成されるプロシアニジン類とも反応することを意味し、vescalagin の減少との関連が示唆される。

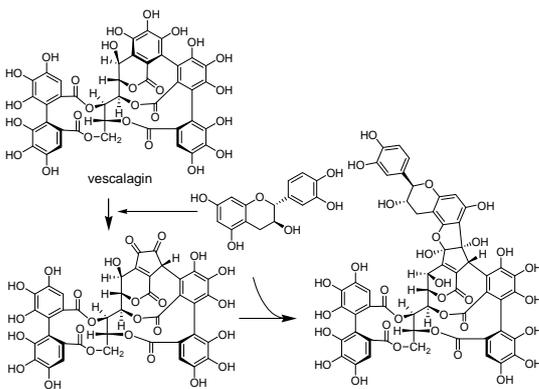


図4 アラカシ新葉でのエラジタンニン代謝

シイ (ブナ科常緑樹) の葉には HHDP 基がトリテルペンに結合しているエラジタンニンが含まれるが、新芽だけに存在する不安定な物質を発見した。不安定化合物の分離の分離精製はできなかったが、 $\alpha$ -phenylenediamine で処理したところ不安定化合物由来の誘導体が得られ、その構造を決定した。その構造は不安定化合物が DHHDP 基を持つ物質であることを示していた。現在、その反応性について検討を行っている。

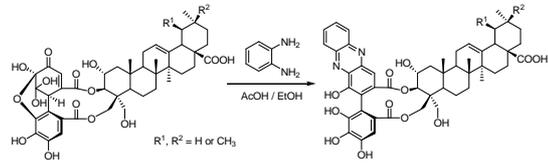


図5 シイの新芽の不安定化合物とその誘導体の構造

アカシデ (カバノキ科落葉樹) ナンキンハゼ (トウダイグサ科落葉樹) アカギ (トウダイグサ科落葉樹) ホルトノキ (ホルトノキ科常緑樹) はいずれも geraniin を主エラジタンニンとする。これらの新芽を HPLC 分析したところ、共通する非常にブロードなピークが観察され、アカシデからその物質を分離したところ DHHDP 基を 2 つ持つ amariin であることが分かった。さらに amariin は水溶液中で放置するだけで分解して geraniin が生成することも分かった。Geraniin の生成量はほぼ 50% 弱であり、この反応は酸化還元不均化反応と推測された。現在、詳細な反応機構を解析中である。

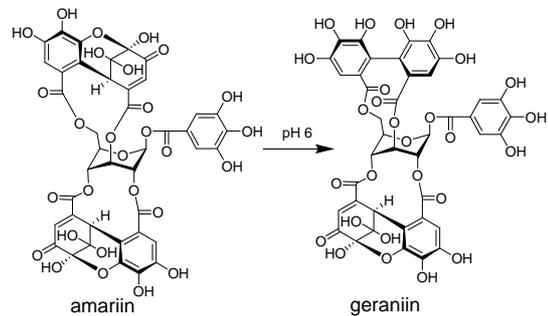


図6 Amariin から geraniin の生成

ザクロ (ザクロ科落葉樹) の葉は geraniin の異性体に相当する granatin B を主成分として含むが、その新芽を分析したところ不安定な化合物が新芽だけに存在することが分かった。分離精製には至らなかったが新芽を  $\alpha$ -phenylenediamine 処理して得られる物質の構造決定したところ、不安定物質は granatin B の 3,6 位の HHDP 基が DHHDP 基となっていることが分かった。Amariin と geraniin の反応から類推すると、この不安定化合物は granatin B の前駆体の可能性がある。

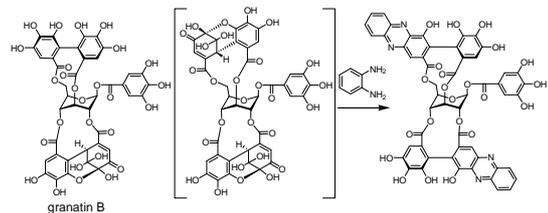


図7 Granatin B の推定前駆体とその誘導体

(2) クマシデ葉の新芽では DHHDP 基を持つ carpinin E および F が主要なエラジタンニンであるが、夏になると E と F がほとんど消失して DHHDP 基が還元された carpinin A と isocarpinin A が増加する。

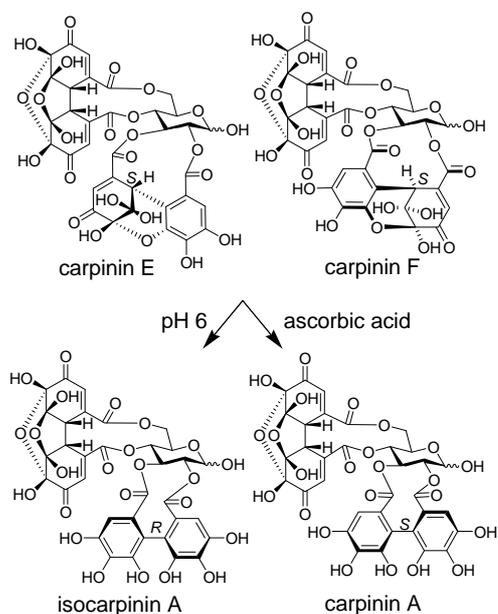


図 8 Carpinin 類の構造と立体選択的還元

本研究では carpinin E と F を精製して様々な条件下でその反応性を調べた。まず、還元剤であり植物中にも存在する可能性があるアスコルビン酸水溶液に溶解すると、いずれから DHHDP 基が (S)-HHDP 基に還元され carpinin A が生成した。一方、非常に興味深いことに pH 6 の水溶液中に溶かしておくだけでいずれから (R)-HHDP 基を持つ isocarpinin A が生成した。立体選択的な還元が起こっていることが分かる。Carpinin E と F はグルコースの 2,3 位に結合する DHHDP 基の向きが異なる異性体であるが、DHHDP 基の向きは反応に影響しない。

前述の amariin と同様、中性水溶液中での還元反応は酸化還元不均化反応と推定され、酸化生成物が同時に生成しているはずであるが、現時点でメカニズムは明らかにすることはできていない。現在、酸化生成物を同定すべく検討を行っている。

### (3) カテキン酸化での酸化還元不均化反応

Amariin や carpinin 類で起こっていると推定される酸化還元不均化反応は、紅茶製造時に生成する不安定物質デヒドロテアシネンシン類から紅茶ポリフェノールのテアシネンシン類が生成する過程でも起こる (図 2)。デヒドロテアシネンシン類は DHHDP 基と同じ水和したトリケトン構造を有しており、その分解メカニズムを明らかにすることができれば DHHDP 基の反応も理解できると考えられる。すでにデヒドロテアシネンシン類から生成する様々な酸化生成物を分離してその生

成機構を推測できている。しかし DHHDP 基の場合と同様、還元生成物の単純さに対して、酸化生成物は多種のものが微量存在しており、その全容は未だつかめていない。現在さらなる検討を継続している。

### (4) グルコースに結合する 2 つのガロイル基の酵素的および非酵素的カップリング反応

これまでの研究により、エラジタンニンの HHDP 基は図 1 のように galloyl 基から直接できるのではなく、図 9 に示すように galloyl 基から一旦 DHHDP 基が生成し、それがアスコルビン酸などで還元されるか、あるいは非酵素的酸化還元不均化反応によって還元されて生成しているのではないかと推測される。

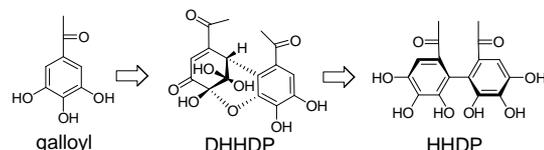


図 9 新しいエラジタンニン生合成仮説

そこで本研究ではグルコースに結合する 2 つの galloyl 基の酸化的カップリングによる DHHDP 基生成を再現すべく、様々な条件で反応を検討しているが、現時点で DHHDP 基生成を確認することはできていない。

以上述べたように、本研究ではエラジタンニン生合成および代謝について新しい知見を多く見出したが、未だ化学的に未解明の部分があり、現在もさらに検討を行っている、

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Tsujita, T., Matsuo, Y., Saito, Y., Tanaka, T., Enzymatic oxidation of ellagitannin and a new ellagitannin metabolite from *Camellia japonica* leaves. *Tetrahedron*, **73**, 500-507 (2017). [査読有]

Li, Y., Matsuo, Y., Saito, Y., Tanaka, T., Three New Oxidation Products Produced from Epigallocatechin-3-O-gallate and Epicatechin-3-O-gallate. *Natural Product Communications*, **11**, 189-192 (2016). [査読有]

Matsuo, Y., Matsuda, T., Sugihara, K., Zhang, Y.-J., Yang, C.-R., Tanaka, T., Theagalloyflavic acid, a new pigment derived from hexahydroxydiphenic acid, and lignan oxidation products produced by aerobic microbial fermentation of green tea. *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 918-923 (2016). [査読有]

Matsuo, Y., Okuda, K., Morikawa, H., Oowatashi, R., Saito, Y., Tanaka, T., Stereochemistry of the Black Tea Pigments, Theacitrins A and C. *Journal of Natural Products*, **79**, 189-195 (2016). [査読有]

Era, M., Matsuo, Y., Shii, T., Saito, Y., Tanaka, T., Jiang, Z.-H., Diastereomeric Ellagitannin Isomers from *Penthorum chinense*. *Journal of Natural Products*, **78**, 2104-2109 (2015). [査読有]

Kusano, R., Matsuo, Y., Saito, Y., Tanaka, T., Oxidation mechanism of black tea pigment theaflavin by peroxidase. *Tetrahedron Letters*, **56**, 5099-5102 (2015). [査読有]

Matsuo, Y., Tadakuma, F., Shii, T., Saito, Y., Tanaka, T., Selective oxidation of pyrogallol-type catechins with unripe fruit homogenate of Citrus unshiu and structural revision of oolongtheanins. *Tetrahedron*, **71**, 2540-2548 (2015). [査読有]

Matsuo, Y., Wakamatsu, H., Omar, M., Tanaka, T. Reinvestigation of the Stereochemistry of the C-Glycosidic Ellagitannins, Vescalagin and Castalagin. *Organic Letters*, **17**, 46-49 (2015). [査読有]

[学会発表](計 20 件)

若松 初実, 辻田 高明, 松尾 洋介, 齋藤 義紀, 田中 隆, C-配糖体型エラジタンニンの立体配座解析ならびに camelliataannin G および I の立体配置, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25-27 日, 東北大学(宮城県・仙台市).

江良 真名美, 松尾 洋介, 齋藤 義紀, 姜志宏, 田中 隆, 薬用植物タコノアシの抗酸化ポリフェノール成分(第 4 報), 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25-27 日, 東北大学(宮城県・仙台市).

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体機構, 第 58 会天然有機化合物討論会, 2016 年 9 月 14-16 日, 東北大学百周年記念会館(宮城県・仙台市).

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体機構の解明, 日本生薬学会第 63 回年会, 2016 年 9 月 24 日~25 日, 富山国際会議場(富山県・富山市).

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 年 9 月 24 日~25 日, 富山国際会議場(富山県・富山市).

Tsujita, T., Matsuo, Y., Saito, Y., Tanaka, T., Ellagitannin Metabolism in the Leaves of *Camellia japonica*, The International Symposium on Natural Products for the Future 2016 (ISNPF2016), 2016 年 9 月 1-4 日, 徳島文理大学(徳島県・徳島市).

Matsuo, Y., Yoshida A., Sugihara, K., Hayashi, T., Mine, C., Saito, Y., Tanaka, T., A New Epigallocatechin Dimer Produced by Enzymatic Oxidation and Production Mechanism of Black Tea Polyphenols, Theasinsins, The International Symposium on Natural Products for the Future 2016 (ISNPF2016), 2016 年 9 月 1-4 日, 徳島文理大学(徳島県・徳島市).

Okuda, K., Matsuo, Y., Saito, Y., Tanaka, T., Unstable Dimer of Pyrogallol-type Catechins Produced in the Early Stage of Oxidation during Tea-fermentation, The International Symposium on Natural Products for the Future 2016 (ISNPF2016), 2016 年 9 月 1-4 日, 徳島文理大学(徳島県・徳島市).

Matsuo, Y., Okuda, K., Morikawa, H., Saito, Y., Tanaka, T., Oxidation mechanism of epigallocatechin-3-O-gallate by polyphenol oxidase, The XXVIIIth International Conference on Polyphenols 2016, 2016 年 7 月 11-15 日, ウィーン工科大学, ウィーン(オーストリア).

Tanaka, T., Matsuo, Y., Katayama, K., Teramoto, S., Saito, Y., Pyrogallol-phloroglucinol coupling: a possible oligomerization mechanism of tea catechins, The XXVIIIth International Conference on Polyphenols 2016, 2016 年 7 月 11-15 日, ウィーン工科大学, ウィーン(オーストリア).

若松 初実, 松尾 洋介, 齋藤 義紀, 田中 隆, スダジイ葉におけるエラジタンニンの季節変化, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

吉田 綾音, 杉原 啓介, 林 利美, 三根 千枝, 松尾 洋介, 齋藤 義紀, 田中 隆, エピガロカテキンの酵素酸化によって生成する新規二量体の構造, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

奥田 慶太, 松尾 洋介, 齋藤 義紀, 田中 隆, Epigallocatechin-3-O-gallate の酸化反応初期に生成する不安定二量体の構造, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

江良 真名美, 松尾 洋介, 齋藤 義紀, 田中 隆, エラジタンニン生成における還

元的代謝について,日本薬学会第136年会,2016年3月26-29日,パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

松尾 洋介,大渡 遼介,草野 リエ,齋藤 義紀,田中 隆,紅茶色素テアフラビン類の酸化機構,第57回天然有機化合物討論会,2015年9月9-11日,神奈川県民ホール(神奈川県・横浜市).

杉原 啓介,山崎 雅亮,松尾 洋介,齋藤 義紀,田中 隆,紅茶ポリフェノール成分テアシネンシン類の立体配座解析と生成機構,日本生薬学会第62回年会,2015年9月11-12日,長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市).

Wakamatsu, H., Matsuo, Y., Saito, Y., Tanaka, T., Ellagitannin Metabolism in the Leaves of *Quercus glauca* and Addition of Catechin to a Vescalagin Oxidation Product, The Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia 2015, 2015年8月31日-9月2日,徳島文理大学(徳島県・徳島市)

Era, M., Matsuo, Y., Saito, Y., Jiang, Z-H., Tanaka, T., Diastereomeric Isomers of Ellagitannins and Its Oxidative Metabolites from *Penthorum chinense*, The Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia 2015, 2015年8月31日-9月2日,徳島文理大学(徳島県・徳島市)

若松 初実,松尾 洋介,齋藤 義紀,田中 隆,アラカシ葉におけるエラジタンニン類の代謝機構の解明,日本薬学会第135年会,2015年3月26-28日,神戸学院大学(兵庫県・神戸市)

兒島 大雪,江良 真名美,親富祖 翔太郎,四位 拓也,松尾 洋介,齋藤 義紀,野中源一郎,田中 隆,シデ類のエラジタンニン季節変化と還元的代謝について,第56回天然有機化合物討論会,2014年10月15-17日,高知県立県民文化ホール(高知県・高知市).

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

田中 隆(TANAKA, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号: 90171769

### (2)研究分担者

無し

### (3)連携研究者

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

齋藤 義紀(SAITO, Yoshinori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号: 30441588

### (4)研究協力者

兒島 大雪(KOJIMA, Daisetu)

若松 初実(WAKAMATSU, Hatsumi)

江良 真名美(ERA, Manami)

辻田 高明(TSUJITA, Takaaki)

四位 拓也(SHII, Takuya)