

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07427

研究課題名(和文) ウーロン茶ポリフェノールの分子構造解明と生理機能発現機構の分子解析

研究課題名(英文) Chemical studies of oolong tea polyphenol and molecular mechanism of its bioactivity

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウーロン茶アニンが高分子ポリフェノール生成の鍵中間体であると位置づけ、その酸化反応を検討した。ウーロン茶アニンのみを酸化すると、重合化ではなく分子内環化が起こること、またカテキンとの競合酸化反応ではカテキンの酸化のみが得られることから、ウーロン茶アニン自体は酸化重合反応の中間体ではなく安定な副産物である可能性が示唆された。EGCgのコレステロール吸収抑制メカニズムの解明を目指し、人工ミセル成分との相互作用解析を行った。その結果、EGCgはミセル成分のタウロコール酸のステロイド骨格と空間的に近い位置に特異的に配置されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We thought the dimeric catechin is one of the important intermediates of polymeric polyphenol generation from catechin, and to clarify the chemical structure of polymeric polyphenol, the oxidation of oolongtheanin were investigated. New intramolecular bond was formed by the oxidation of oolongtheanin, no polymerization reaction was caused. Oxidation of oolongtheanin was performed with coexistence of catechin. However, because reactivity of catechin is higher than oolongtheanin under oxidative condition, oxidation products from catechin were only produced. These result suggests that the known dimeric catechin such as oolongtheanin were not so much key intermediate of polymeric polyphenol formation but byproduct. In order to clarify the decreasing mechanism of the micellar solubility of cholesterol, we investigated the interaction between tea polyphenols and cholesterol micelles. The data indicated a regiospecifically interaction of EGCg with taurocholic acid.

研究分野：天然物化学

キーワード：Polymeric polyphenol Oolong tea Catechin Oxidation Oolongtheanin

1. 研究開始当初の背景

心臓疾患, 脳血管疾患は, ガンについて日本人の死因の上位を占めている疾患であり, 高脂血症, 肥満, 糖尿病, 高血圧などのいわゆる生活習慣病はそのリスクを高めているといわれている。近年, これらの疾患の予防を目的とした特定保健用食品や機能性食品の開発研究が盛んに行われており, なかでもウーロン茶は, 脂質異常症の予防・改善作用, 具体的には抗脂質血症や抗コレステロール血症, 抗肥満作用があるとして注目されている茶のひとつである。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的に変換・重合することによって高分子化した特徴的なウーロン茶ポリフェノール(二次ポリフェノール)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ことが報告されており機能性の本体であると考えられている。しかし, ウーロン茶ポリフェノールは, 複雑な混合物として存在し, 化学構造は十分に分かっていない。そのため, 様々な機能性の報告の多くは, 混合物として議論している現状があり, それは科学的に問題である。

上記の高コレステロール血症については, カテキン類のコレステロール吸収抑制に関するメカニズムが報告されている。その報告では, カテキン分子内のガレート基がミセル成分であるホスファチジルコリンと相互作用することにより胆汁酸ミセルへのコレステロール溶解性を低下させるとしている。しかしその一方, ガレート基を持たないカテキンの2量体のプロシアニジン A1 や3量体に同様な活性が見られるという報告もある。大変興味深い点は, 今回の申請課題で取り扱うウーロン茶ポリフェノールの機能性発現メカニズムに関する報告はない。

2. 研究の目的

以上を踏まえて, ウーロン茶高分子ポリフェノールの構造と機能性の詳細を明らかにすることをめざして, 以下の2点について行うことにした。

(1)カテキン及びウーロンテアニン類を用いた酸化反応から, 3量体以上の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。

(2)コレステロールミセルとの相互作用をNMR等の機器分析を用いて解析することで, コレステロール吸収抑制の分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ウーロンテアニン及びカテキン類の酸化反応

ウーロンテアニン類等のカテキン2量体がウーロン茶高分子ポリフェノールの鍵中間体であると推測し, ウーロンテアニン類の酸化反応を検討することにした。さらに, その際にカテキンモノマーを共存させることに

より2量体との酸化重合が進行する可能性があるかと推測した。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(¹H, ¹³C, 2D-NMR)及び質量分析を用いた。

(2)ウーロンテアニン合成の副生成物の探索

これまでの研究で, ウーロンテアニンのカテキン類からの合成法を報告している。しかしながらその収率は, 最も良いもので40%程度であった。これは, カテキンの酸化反応の多様性があることを示しており, 目的物以外の生成物が高分子ポリフェノールの構造の複雑さに関わっている可能性があると考えた。そのため, 副生成物の単離構造決定を行なうことにした。

(3)ウーロン茶ポリフェノールのコレステロール吸収抑制メカニズムの解明

ウーロン茶中に含まれるウーロンテアニン類を用いてコレステロールミセル溶解性試験を行い, ウーロンテアニン-3'-O-ガレートに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見られ, EGCの2量体であるデスガロリルウーロンテアニンにも, 比較的強い活性が見られることを発見している。その作用機構は例えば疎水性の高いステロイド骨格と親水性のスルホン基を合わせ持つタウロコール酸と相互作用しているのではないかと推測し

ている。そこでこれらの成分とミセル成分の相互作用についてHPLC及びNMRを用いて分析し明らかにすることにした。

4. 研究成果

(1)ウーロンテアニン及びカテキン類の酸化反応

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, カテキン及びウーロンテアニンの酸化反応を行った。酸化反応生成物はHPLCにより分離・精製し, MS及び各種NMR測定を行った。その結果, ウーロンテアニンの酸化反応により得られた化合物は酸化重合体ではなく, 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であることが明らかとなっ

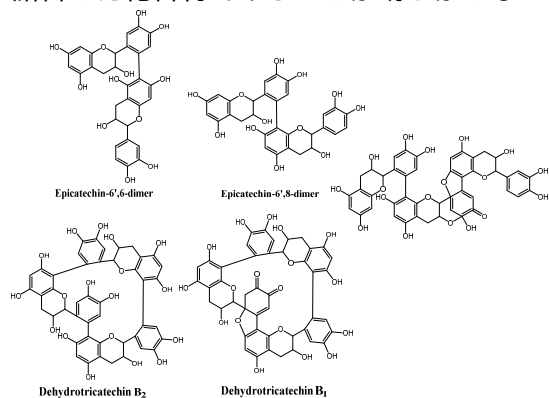


Fig.1 カテキン酸化物

た。また、カテキンの酸化反応では生成物 5 種の構造決定 (Fig. 1) を達成したが、いずれも B 環 A 環の結合が新たに形成された 2 量体あるいは 3 量体であった。次に、カテキンとウーロンテアニンを共存下で酸化反応を行うことで、カテキン - ウーロンテアニン複合体ができると推定し酸化反応を行った。その結果、反応開始直後からカテキンが速やかに減少したのに対し、ウーロンテアニンの減少は見られず、カテキンが消失後に減少する様子が観察された。このことはウーロンテアニンの反応性が相対的に低い (カテキン >> ウーロンテアニン) ことを示している。また、新しく生成したピークはいずれも、それぞれの酸化物であり、予想された縮合物の生成はみられなかった。これらの結果から、ウーロンテアニン自体は酸化重合反応の中間体ではなく、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にある可能性が示唆された (Fig. 2)。

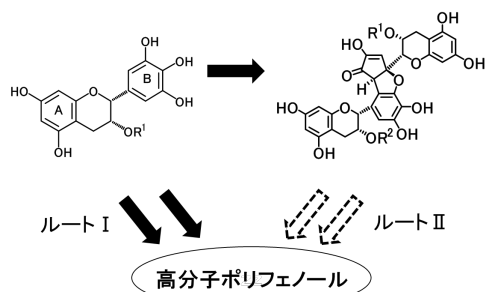


Fig. 2 ウーロン茶高分子ポリフェノールの新推定生成機構

(2) ウーロンテアニン合成の副生成物の探索

ウーロンテアニンの合成反応はその収率が 40% 程度であり、副生成物が多く生成していると予想される。それらが高分子化に関わっていると推測し、その単離を検討した。そのうちの 1 種類については、構造決定には至らなかったが、水中で生成するが不安定であり NMR 測定中に速やかに減衰することが明らかとなった。その生成物は濃茶褐色を呈しており、NMR 等の結果から高分子化合物であると推測した。そのため、単離した化合物は高分子化の前駆体であると推測している。また、EGC 由来のデスガロリルウーロンテアニンの合成において反応を HPLC で追跡すると、目的以外にもピークが一つ検出された。このピークを副生成物と予想して単離・構造解析をおこなった。しかしながらこのピークは副生成物ではなく、デスガロリルウーロンテアニン自身であった。さらに検討を行なうため、デスガロリルウーロンテアニンを各種溶媒

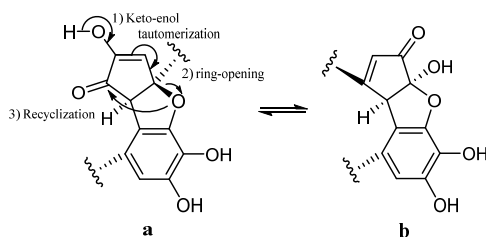


Fig. 3 水中における平衡反応

に溶解し、その安定性について検討した。その結果、この化合物はメタノールなどの有機溶媒中では 1 種類の化合物で存在するのに対し、水溶液中では環の開裂および再環化を伴う 2 種類の構造を示し、平衡混合物として存在することが明らかとなった (Fig. 3)。

ウーロンテアニン類はカテキンから 3 段階の反応で生成するが、各段階の生成収率について詳細に検討したところ、1 段階目の反応の収率が全体収率の低下につながっていることが明らかとなった。2 段階目及び 3 段階目の反応がいずれも分子内反応であるのに対し、一段階目の反応は 2 分子のカテキン類が酸化的に縮合する段階であるため、縮合位置の違う副生成物が多数生成している可能性が示唆された。これは 1 段階目の副生成物が高分子化に関与している可能性があることを示している。そのため、1 段階目の反応の際に生成する副生成物の探索を行ない 2 種類の化合物の分離に成功した。MS 分析の結果、それはいずれも 2 量体であった。残念ながらいずれも構造決定には至らなかったが、NMR 分析の結果、そのうちの 1 種については、分子内にラクトン構造を有し、他方については A 環、C 環及びガレート基は保持され、分子内に 4 つのエステル結合を持つ二量体であり誘導体化等から構造推定を行なった。

(3) ウーロン茶ポリフェノールのコレステロール吸収抑制メカニズムの解明

タウロコール酸、ホスファチジルコリン及びコレステロールで調製した人工ミセルに対して EGCg またはウーロンテアニンガレートを添加しその上清部及び沈殿部の HPLC 分析を行った。その結果、沈殿部には添加した EGCg またはウーロンテアニンガレートは含まれていないことが明らかとなった。またその上清部について NMR 測定を行ったところ、そのケミカルシフトの濃度依存的な変化から EGCg またはウーロンテアニンガレートはタウロコール酸と位置特異的に相互作用していることが強く示唆された。また、その相互作用にはステロイド骨格が重要であり、ROESY 測定により、特にガレート基及び 3 位がタウロコール酸と空間的に近い位置に配置されていることが明らかになった。そこでより詳細な検討を行なうために、NMR 等が比較的単純な EGCg を用いてこの後の実験を行うことにした。

茶のクリームダウン現象のメカニズムとして、2 分子の EGCg とカフェインが混合結晶を形成することが報告されている。この知見とこれまでの結果から、そのメカニズムがガレート基と A 環部から形成される疎水性領域への胆汁酸の取り込みによるミセル構造の変化にあると推測した。そのため、混合結晶を作成し、単結晶 X 線構造解析を目指した。一般的にタンパク質の結晶化に用いられ多くの結晶化条件の検討が容易なハンギングドロップ蒸気拡散法を用い、カテキン類と胆

汁酸の一種であるタウロコール酸ナトリウムの混合結晶の作成を検討した。得られた結晶を X 線構造解析及び HPLC 分析等を行なった結果、目的とする混合結晶を得るには至らなかった。

この相互作用の位置特異性をより詳細に明らかにするために、タウロコール酸及びカテキン類の各種誘導体を調製し、相互作用に及ぼす影響について NMR を用いて研究した。その結果、タウロコール酸についてはイオニックな相互作用を推定していた側鎖のスルホ基については、除去した誘導体でも変化がなかったことから相互作用に関与しないことが明らかとなった。一方、ステロイド骨格中に存在する水酸基の数を減らすと、NMR によるケミカルシフトの変化が小さくなることから、水酸基の存在が相互作用に重要であることが示唆された。次に、カテキンの 2 位及び 3 位の立体化学の相互作用への影響について、3 種異性体を合成して NMR による相互作用解析を行った。その結果、立体の違いによりケミカルシフトの変化率に差が見られ、その差はそれぞれの立体化学ではなく、2 位 3 位の配座に依存しトランス配座の方が、シス配座より相互作用が弱い可能性が示唆された。さらに、これまで NMR による相互作用解析に $^1\text{H-NMR}$ を用いてきたが、 $^{13}\text{C-NMR}$ を用いた検討を行なった。 $^{13}\text{C-NMR}$ は、感度は低いものの炭素骨格の直接情報が得られるという利点がある。 $^1\text{H-NMR}$ の場合と同様に、C 環 3 位の変化率が最も大きく、ついでガレート 1 位、4 位、カルボニル炭素の順であった。一方、同じフェノール性水酸基を持つ A 環及び B 環部に関しては、あまり変化が見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Hirose, S., Ogawa, K., Yanase, E.: Equilibrated structures of oolongtheanins. *Tetrahedron Lett.* 査読有, 57: 2067-2069, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.03.092>

Uchida, K., Ogawa, K., Yanase, E.: Structure Determination of Novel Oxidation Products from Epicatechin: Thearubigin-Like Molecules. *Molecules*, 査読有, 21: 273, 2016.

<https://doi.org/10.3390/molecules21030273>

Ogawa, K., Hirose, S., Nagaoka, S., Yanase, E.: Interaction between Tea Polyphenols and Bile Acid Inhibits Micellar Cholesterol Solubility. *J. Agric. Food Chem.*, 査読有, 64: 204-209, 2016. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05088

〔学会発表〕(計 4 件)

Sakakibara, T., Ogawa, K., Nagaoka, S.,

Yanase, E.: Interaction between bile acid and tea catechins inhibits micellar cholesterol solubility, international symposium on natural medicines, 2017 (Indonesia).

小川 和樹, 廣瀬 紗弓, 内田 和宏, 長岡 利, 柳瀬 笑子: 茶ポリフェノール類のコレステロールミセル溶解阻害活性とその分子機構に関する研究, 日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集, 3B075, 2016 札幌コンベンションセンター (札幌・北海道)。

廣瀬 紗弓, 小川 和樹, 柳瀬 笑子: ウーロンテアニン類の生成機構と平衡反応, 日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集, 3B077, 2016 札幌コンベンションセンター (札幌・北海道)。

内田 和宏, 小川 和樹, 柳瀬 笑子: 紅茶テアルビジン類の構造解明に向けた茶カテキン類の酸化反応に関する研究, 4B0735, 2016 札幌コンベンションセンター (札幌・北海道)。

〔その他〕

柳瀬笑子, 烏龍茶ポリフェノールの分子構造解明と生理機能発現機構の分子解析, アグリバイオ, 1(4), 470-473, 2017 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

<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