

令和 6 年 5 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：2021～2023

課題番号：21K05421

研究課題名(和文) 紅茶の主要な機能性を司るテアルビジンの構造解明

研究課題名(英文) Structure elucidation of tea thearubigin

研究代表者

柳瀬 笑子 (YANASE, EMIKO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：60313912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、紅茶製造工程における成分変化に着目し、テアルビジン生成反応の鍵となる反応中間体を発見することで構造解明の足がかりとすることを旨とした。紅茶の各製造過程でサンプリングを行い、カテキン類及びその関連化合物の定量分析を行った。次に、揉捻・発酵過程で特徴的に増加している成分を検出するため、UPLC-MS測定を行い網羅的分析を行った。得られたデータについて主成分分析を行い、そのローディングプロットから揉捻・発酵過程で特徴的に増加している45成分を選択した。それらのMS/MS分析を行ったところ、そのフラグメントパターンよりそれらの成分がカテキン様の部分構造を持つことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

紅茶テアルビジン類は、古くからその存在が明らかになっているにも関わらず、構造情報については推定の域を出ていない現状がある。一方で多くの機能性報告があるのも事実である。カテキン類に限らず、多くの植物中の機能性成分は構造活性相関研究が盛んにおこなわれており、わずかな構造の違いの機能性に及ぼす影響が報告されている。このことからテアルビジン類の化学構造を明らかにすることは重要であり、本研究の成果は新たな知見を付与した点で重要であると考えられる。また紅茶に限らず多くの植物性食品は収穫後に加工されることが多く、加工時において大きな成分変化が起きていることを示した本研究には社会的な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：During the processing of black tea, enzymatic oxidation converts tea catechins into a complex mixture of oxidative products, including thearubigins. Ultra-performance liquid chromatography was carried out to analyze the tea extracts collected after each processing stage to clarify the quantitative changes in these compounds during black tea processing. Twenty-three compounds containing the known catechins dimers and flavonol glycosides were identified by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). In addition, 45 components whose contents increased significantly between the late rolling and late fermentation stages were extracted using principal components analysis by LC-MS. It was estimated from MS/MS analysis that some of them were dimers or trimers with catechin-like units.

研究分野：食品科学

キーワード：Black tea catechin thearubigin oxidation

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物中に含まれる機能性成分の一部は、食品加工において化学的に変化することが知られている。紅茶の場合、茶の生葉中に含まれる機能性成分として知られるカテキン類が、葉に内在する酸化酵素ポリフェノールオキシダーゼ (EC 1.10.3.1) により酸化的に重合してテアルビジンとよばれる成分になることが知られている。しかしながらテアルビジンは多くの推定構造が提案されているものの、未だ明確な構造は明らかにされていない (e.g. S. Sang, J.D. *et al.*, *Pharmacol. Res.*, 64, 87-99, 2011.)。その原因は、テアルビジンが、HPLC 分析や NMR において「瘤状」に観測され、分離・構造解析が困難なことにある。しかし、テアルビジンは抽出液中の約 60% を占め、紅茶の機能性の本体である可能性が高く、例えばテアルビジン含量の高い紅茶では、抗酸化性、抗糖尿病活性が高いとの報告がある (e.g. Fengfeng Q. *et al.*, *LWT*, 117, 108646, 2020.)。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、立体化学など、わずかな化学構造の違いが機能性の増強や減衰に影響することが知られている。これは、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紅茶の現状と大いに矛盾しているといえる。

一方、テアルビジン生成反応はカテキンの酸化反応のひとつであると位置付けることができる。そのため化学構造を明らかにする目的で、モデル反応系を用いたカテキン類の酸化重合反応に関する研究が多く研究者によって行われてきた。その結果、多くのユニークな化学構造を有するカテキン酸化 2 量体が報告されている。しかしながらそれらは、いずれも 2 量体もしくは 3 量体であり、さらなる重合化反応の進行については報告されていない。これらのことから我々は、これまでに報告のある酸化 2 量体は、テアルビジン生成反応における生成中間体ではなく、紅茶中でマイナー成分であり、テアルビジン生成反応における副生成物ではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、紅茶製造工程をカテキンの酸化反応の場であると位置づけ、その過程における化合物変化に注目することで、新たなテアルビジン生成中間体候補化合物の発見し、テアルビジン類に含まれる新たな結合様式を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

紅茶は、生葉の摘採、萎凋、揉捻、発酵、乾燥の 5 工程を経て製造される。その間の茶葉中のカテキン類及び酸化重合関連物質の生成は、右図のグラフのようであると予想した (図 1)。テアルビジン生成中間体相当する化合物は揉捻から発酵にかけて生成していると考えられる。そこで以下の 3 点に研究をおこなった。

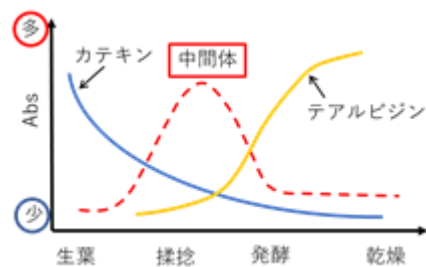


図 1 推定される成分量の変化

#### ① カテキン及び酸化生成物の定量分析

カテキン類は紅茶製造過程で減少し、テアルビジンの原料になると考えられる。また、テアフラビン類は紅茶製造過程においてテアルビジンと競合的に生成する可能性がある。そのため、カテキン類とテアフラビン類の定量を行った。テアルビジン量については、化合物として定量することは困難であったため、Yang らによる比色法 (Yang, C., *et al.*, *Lwt* 141, 110975, 2021) を用いて行い、各製造工程による量的な変化を比較した。

#### ② UPLC-MS を用いた網羅分析

①で採取したサンプルを用いて UPLC-MS を用いた網羅解析を行った。得られたデータをもとに、テアルビジン関連化合物と推定される一定の条件を満たす成分の抽出を行った。

#### ③ テアルビジン関連化合物の構造に関する考察

②で抽出した化合物について、MS/MS 分析を用いた構造解析及び推定を行った。

### 4. 研究成果

#### ① 紅茶製造工程におけるカテキン関連化合物の変化

紅茶の試験加工は、揖斐郡池田町茶業振興センターでおこなった。製造過程ごとにサンプリングを行い、カテキン関連化合物 (4 種カテキン、4 種テアフラビン類) について定量分析を行った。その結果、生葉ではカテキン類では Epigallocatechin (EGC) が最も多く、 $203.3 \mu\text{mol/g DW}$  であった。次いで Epicatechin (EC) が  $141.4 \mu\text{mol/g DW}$ 、Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) が  $119.5 \mu\text{mol/g DW}$  で多く、Epicatechin-3-O-gallate (ECg) が  $46.6 \mu\text{mol/g DW}$  と最も少なかった。カテキンは製造過程の進行とともに減少し、乾燥後にはカテコール型 (EC, ECg) は約 50% 減少したのに対し、ピロガロール型カテキン (EGC, EGCg) は約 80% 減少しており、ピロガロール型カテキンの減少度が大きかった。また、萎凋過程

ではカテキン類の減少はほとんど見られなかった。一方で、揉捻開始後 30 分から発酵開始 15 分にかけて、顕著にカテキン量が減少していた。テアフラビン量はカテキン類の減少とともに、揉捻開始 60 分から発酵開始 60 分にかけて顕著に増加していた。しかし、カテキン類の減少量に対してテアフラビン類は 10% 程度しか生成していなかった。相対的なテアルビジン量の変化を測定すると、揉捻から発酵過程にかけて増加し、発酵開始 15 分で最大になった。これらのことから揉捻後期から発酵にかけてテアルビジン生成反応が開始しており、比較的 low molecular weight の反応中間体が生成している可能性が示唆された。また、この反応がテアフラビンの生成と競合的に起こっていることが示唆された。

② UPLC-MS を用いた網羅分析

製造過程サンプルの抽出液を UPLC-MS を用いた網羅解析に供した。得られたクロマトグラム及び MS データを標準サンプルや文献 (Lee, M. E. *et. al.*, *Eur. Food Res. Technol.*, 2019, 245, 997-1010. 他) と比較することで、カテキン酸化 2 量体、ミリセチンやケルセチンなどのフラボノール配糖体を含む 23 成分を同定した。マスクロマトグラムの面積を用いて同定した化合物について製造工程間での量の違いを比較すると、カテキン酸化 2 量体であるウーロンテアニン類やテアシネンシン類についてもテアフラビン類と同様に揉捻・発酵過程で増加していることが明らかになった。一方、フラボノール配糖体については製造過程での顕著な減少は見られなかった。カテキン類が製造過程で生葉の約 30% まで減少したのに対し、ミリセチン配糖体は約 70% まで減少、ケルセチンやケンフェロール配糖体はほとんど減少していなかった。この違いを有機化学的に考えると、フラボノール配糖体はカテキン類よりも酸化段階が高いため酸化されにくいことが原因であると考えられる。これらの結果から、茶の生葉に含まれるフラボノール類はテアルビジン生成への寄与はない、あるいはカテキン類に比べ非常に小さいと考えられる。

次に、紅茶製造過程、特に揉捻から発酵過程で増加している成分を抽出するために、UPLC-MS のトータルイオンクロマトグラム (TIC) を用いて主成分分析 (PCA) を行った (図 2)。Score plot では、第 1 主成分 (PC1) の寄与率は 47.5%、第 2 主成分 (PC2) の寄与率は 9.9% であり、この 2 つの主成分で全体の 57.4% を説明していた。各製造過程でグループを形成しており、プロットは製造過程の進行とともに PC1 の負の方向に移動しており、発酵から乾燥過程までは PC2 の負の方向に移動していた。Score plot において、揉捻後期から発酵後期のサンプルは PC1 が負、PC2 が正の領域にプロットされていた。Loading plot において、カテキンの既知の酸化 2 量体であるテアフラビン類、ウーロンテアニン類、デスガロリルウーロンテアニンは PC1 の負の領域にプロットされていた。そこで、既知の酸化 2 量体よりも、加工による変化への寄与の高い成分を探索するため、以下の条件で成分選択をした。

- ✓ PC1 が負、PC2 の値が 0.033 (寄与率の高い既知酸化 2 量体の PC2) より大きい
- ✓ m/z が 500 より大きい

その結果、loading plot から 45 成分が抽出された。さらに、それらの成分についてマスクロマトグラムの面積を用いて製造工程中の変化を算出した。その変化と総カテキン量、テアルビジン類、総テアフラビン量、及びテアルビジン量の変化の相関係数を算出した。その結果を基に以下の 4 グループに分けた。

Group	成分数	相関係数		
		Theaflavin 類	Catechin 類	Thearubigin 類
I	3	rTFs $\geq$ 0.7	rCat $\leq$ -0.7	rTR $\geq$ 0.4
II	9	rTFs $\geq$ 0.7	-0.7 < rCat $\leq$ -0.4	rTR $\geq$ 0.4
III	22	0.4 $\geq$ rTFs > 0.7	rCat > -0.4	0.4 $\geq$ rTR > 0.7
IV	11	rTFs > -0.4	rCat > -0.4	0.4 $\geq$ rTR > 0.7

③ テアルビジン関連化合物の構造に関する考察

②で抽出した 45 候補化合物の中には、生成量のわずかなものや、UV 吸収が小さいものなどがあり、全てを紅茶中または製造時のサンプルから単離を行うのは困難であった。そこ

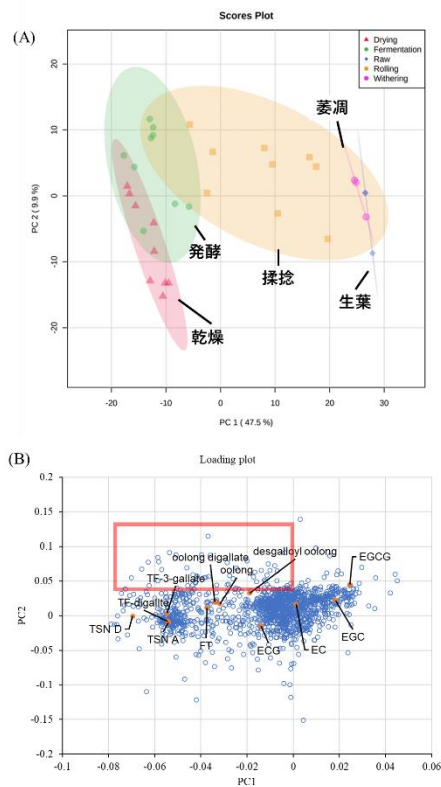


図 2 紅茶製造過程サンプルの PCA (A) score plot, (B) loading plot

でこれらの成分について、構造情報を得るべく MS/MS 分析を行った。カテキン類の MS/MS 分析分析でのフラグメントパターンは以前に報告されており、カテコール型カテキンでは A 環由来の  $m/z$ 139、B 環由来の  $m/z$ 123 及び 165、ピロガロール型カテキンでは A 環由来の  $m/z$ 139、B 環由来の  $m/z$ 139 及び 181、ガレート型カテキンではガレート基由来の  $m/z$ 153 のフラグメントが検出されることが報告されている (Mouls, L., *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, 2012, 47, 1450-1457)。その結果、Group I のうち 2 成分で  $m/z$ 139 及び 153、Group II のうち 6 成分で  $m/z$ 139 が検出された。これらの成分はカテキン様の部分構造をもち、おもに B 環部で反応が進行し、結合に関与しない A 環及びガレート基を分子内に有すると推定した。一方で、3 成分で  $m/z$ 181 検出された。このフラグメントはピロガロール型カテキンの B 環部に由来するフラグメントであることから、これらの成分はカテキン B 環部の構造が反応せず残っており、A 環部やガレート基などが反応して生成した化合物であると考えられた。テアルビジンの生成には B 環部だけでなく、A 環部やガレート基も関与している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ayumi Ito, Emiko Yanase	4. 巻 160
2. 論文標題 Study into the chemical changes of tea leaf polyphenols during apanese black tea processing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food research international	6. 最初と最後の頁 111731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodres.2022.111731	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 Ochiai, Y., Ogawa, K., Sawada, Y., Yanase, E.	4. 巻 73
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 153140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2021.153140	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小玉洋輝 , 落合悠斗, 柳瀬笑子
2. 発表標題 茶カテキン酸化反応における位置選択性に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部 第193 回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤歩未、柳瀬笑子
2. 発表標題 紅茶加工時の茶葉ポリフェノールの変化に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部 第193 回例会
4. 発表年 2022年

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 第15回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayumi Ito, Emiko Yanase
2. 発表標題 Comprehensive analysis of component changes during black tea processing using LC-MS
3. 学会等名 International Food Conference 2021
4. 発表年 2021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 <a href="https://www1.gifu-u.ac.jp/~biochem/">https://www1.gifu-u.ac.jp/~biochem/</a> 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 <a href="https://www1.gifu-u.ac.jp/~biochem/">https://www1.gifu-u.ac.jp/~biochem/</a>
--

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

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