

論文内容の要旨

消化酵素阻害活性を有する 紅茶高分子ポリフェノールに関する化学的研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 草野 リエ

[目的]

紅茶は、世界の茶生産量の約8割を占め、水の次に多く飲まれているとも言われる身近な飲料である。緑茶や烏龍茶と同じ植物を原料とするが、茶葉を揉捻した後に酸化発酵させる製造工程の中で、もとの茶葉に含まれる4種のカテキン類が酵素酸化され、赤い色素の theaflavin 類をはじめとする紅茶に特有の成分が生成する。これらの酸化生成物が紅茶の品質を左右するため、化学的、商業的にも関心がもたれ、古くから研究対象とされてきた。

しかし、主要な成分である紅茶ポリフェノールのうち、構造が解明されているものはカテキン類やその酸化二量体など6%程度にとどまっており、抽出液の固形成分のうち60%は構造が未解明とされている。したがって、4種のカテキンを主成分とする緑茶に比べて、紅茶のポリフェノールについては生理活性に関する研究報告も少ない。世界的に需要の大きいことを考慮すると、紅茶成分の生理活性および構造の解明は、健康維持効果を明確にするうえで重要であり、人々の生活の質の向上に貢献できるものと思われる。

以上のことから、生理活性を指標として紅茶成分について検討し、特に構造の明らかでない成分について構造解明することを目的として研究を行った。生理活性については、成人病予防の観点から、カロリー吸収を抑制することを期待し、脂肪分解酵素のリパーゼに対する阻害活性を検討した。

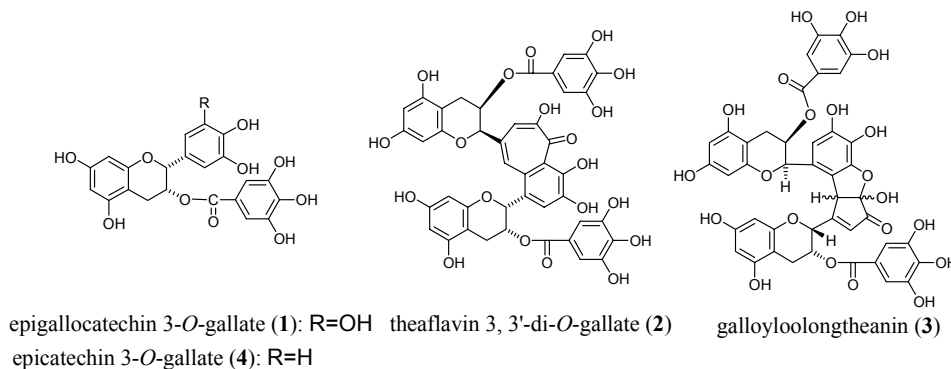


Fig. 1. 紅茶のポリフェノール成分 単量体および二量体

[結果と考察]

1. 紅茶の抽出とリパーゼ阻害活性

市販の紅茶を抽出した後、溶媒分配や各種クロマトグラフィーにより分画して各フラクションのリパーゼ阻害活性を比較した。その結果、溶媒分配によって得られた *n*-ブタノール層から得られた成分が活性を示し、その活性はリパーゼ阻害活性をもつことが報告されている theaflavin 3, 3'-di-O-gallate (2) や galloylloolongtheanine (3)(Fig. 1)

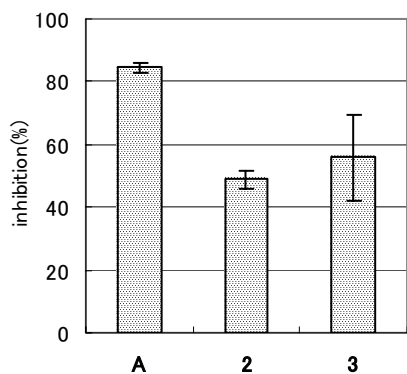


Fig. 2 リパーゼ阻害活性の比較

よりも強かった(Fig. 2-A)。この成分は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析でベースラインの盛り上がりとして検出され、高分子成分であると推定された(Fig. 3)。



Fig. 3. 活性成分の HPLC クロマトグラム

2. 活性成分の構造についての検討

n-ブタノール層から得られたリパーゼ阻害活性成分の構造について検討した。ゲルろ過法により平均分子量が 9700 と推定され、¹³C-NMR スペクトル測定では epigallocatechin 3-*O*-gallate (**1**) の A 環、C 環および galloyl 基のものと類似したブロードなシグナルが観察された (Fig. 4)。活性を示す画分が、**1** を構成ユニットとしていると仮定すると 21 分子程度が縮合したものとなるが、¹³C-NMR スペクトルで B 環由来のシグナルがほとんど認められないので、B 環部分で縮合反応が起こっていることが示唆された。Galloyl 基の存在は tannase による加水分解により確認され、チオール分解により flavan-3-ol の C-4-C-8 結合がわずかに存在すること、酸加水分解により galloyl 基以外にも芳香族エステルが存在することが分かった。

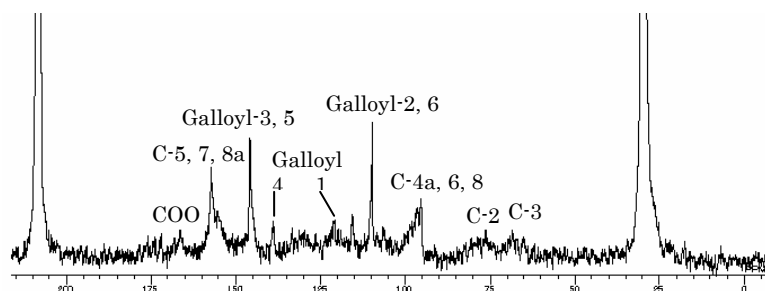
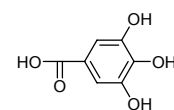
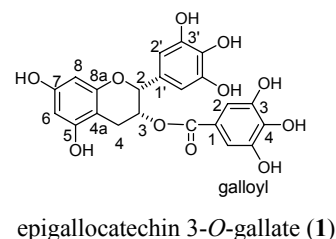


Fig. 4. ¹³C-NMR spectrum of active substance (100 MHz in acetone-*d*₆+D₂O).



3. 茶発酵の再現

活性を示す画分の高分子ポリフェノールがどのように生成しているかを明らかにする目的で、カテキン類を *in vitro* で酵素酸化して高分子ポリフェノールを生成させる実験を行った。新鮮茶葉に含まれる 4 種のカテキンをそれぞれ単独で酵素酸化したところ、epicatechin 3-*O*-gallate (**4**) を酸化した場合にだけ活性物質と類似の HPLC クロマトグラムを示す生成物が得られ、その ¹³C-NMR スペクトルも活性物質のものと類似していた。また同じ実験で、**4** の二量体

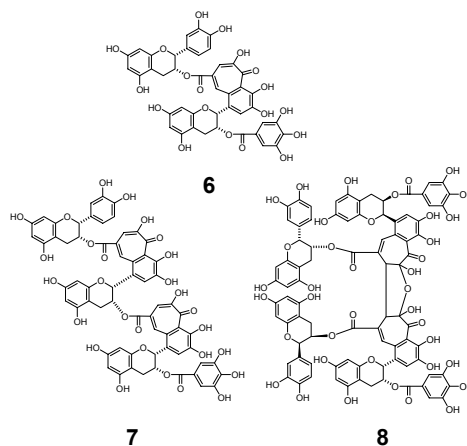


Fig. 5. **4** の酸化縮合により生成した二量体、三量体および四量体

(6)、三量体 (7) が分離されたことから、重合体生成のメカニズムとして B 環と galloyl 基が酸化縮合に関与することが示された。MALDI-TOFMS で反応混合物を測定したところ、同様のメカニズムで生成したと考えられる五量体の存在も明らかになった。また四量体 (8) が得られたことから、benzotropolone 環の二量化も重合に寄与している可能性がある。

4. ビワ葉添加による茶発酵促進と成分の変異

茶葉とビワ葉を混合し、揉捻発酵させて製造する混合発酵茶が開発され、血糖値上昇抑制作用を持つことが動物実験により確認された。その製造過程で、ビワ葉添加がカテキン酸化にどのように影響しているのかについて調べた。その結果、ビワ葉のポリフェノール酸化酵素がビワ葉に多く含まれるクロロゲン酸を酸化し、生じたキノンが茶カテキンを酸化すると同時にクロロゲン酸が再生する共役酸化機構が存在し、これにより発酵の初期においてカテキンの酸化が促進されていることが分かった。また HPLC 分析で、ビワ葉を添加して製造した混合発酵茶と添加しないで製造したものとで抽出物の水溶性成分について比較したところ、ビワ葉を添加した混合発酵茶においてベースラインの盛り上がり部分の増加が観察され(Fig. 6)、この成分が混合発酵茶の活性に寄与している可能性も示唆された。

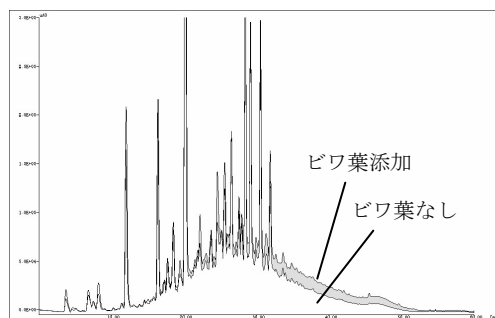


Fig. 6. ビワ葉混合発酵茶とビワ葉を加えないで製造した茶の抽出物水溶性成分の比較

[結論]

紅茶から得られたリパーゼ阻害活性を有する物質は、茶のカテキンが 20 個相当縮合した高分子のポリフェノールで、カテキンが酸化されて生成したものであると推測した。これまで茶のポリフェノールといえばカテキン類などの低分子化合物についての研究が主であったが、より高分子のポリフェノールが生理活性をもつことが示され、その重要性を示唆する結果が得られた。

本研究ではこれまで紅茶成分として存在は認められていながら化学的に取り扱えないものとしてほとんど研究されてこなかった高分子ポリフェノールが、紅茶の生理活性を考える上で非常に重要であることを明らかにした。またその分離分析法を検討し、化学的な性質や生成機構についての知見を得た。1950 年以來の紅茶研究の歴史の中で紅茶の水溶性高分子成分を分離して化学的に詳細な検討を行った研究は極めて希少であり、得られた結果は今後紅茶ポリフェノールをさらに解明していく上での化学的基盤になりうるものとする。