

茶発酵過程におけるカテキン類の分子構造変換に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 四位 拓也

[目的]

チャ [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] は、中国南部を原産とするツバキ科ツバキ属の多年性常緑樹で、その葉は緑茶や紅茶など様々な茶製品に加工され、世界中で飲用される。茶葉にはポリフェノールが豊富に含まれており、主に(-)-epicatechin、(-)-epigallocatechin、およびそれらの galloyl エステルから構成される。日本や中国などで広く飲まれている緑茶は、茶葉収穫直後に加熱処理して茶葉中の酵素を失活させて製造するため、その成分は新鮮茶葉のものと同様である。一方、世界の茶生産の 8 割を占める紅茶は、その製造過程で茶カテキン類が酵素により酸化されて複雑な組成の混合物となるため、大部分の成分は化学的に未だに明らかになっていない。また、近年になって輸入量が増加しているプアール茶、いわゆる微生物発酵茶に関しても、製法や発酵に関わる微生物が産地により異なる上、カテキンが複雑に代謝されることから、化学的研究は限られている。成分が比較的シンプルな緑茶については膨大な機能性研究があるが、最近はその他の茶製品についても機能性が報告されるようになった。しかし上記の理由のため、それらの成分研究はあまり進んでいないのが現状である。本研究ではまず、紅茶製造時のカテキン類の反応を明らかにする目的で、紅茶と同じ成分を含むが製造工程が短く成分分離がしやすいと考えられた茶ビワ葉混合発酵茶の成分解析を行った。次に、紅茶製造工程におけるカテキン類の酵素酸化を模倣した反応を開発し、生物活性に供するに十分な量の紅茶成分 theasinensin A の調製法を確立するとともに、その他の生成物について詳細に検討した。さらに、茶葉の嫌氣的微生物発酵により製造されるミャンマーの漬物茶ラペソーの成分について研究を行うとともに、緑茶ラペソーの混合発酵による成分変化を検討した。

[方法と結果]

第一章 茶ビワ葉混合発酵茶の成分に関する研究¹

ビワ葉の強いポリフェノール酸化能力を利用して茶葉ポリフェノールを酵素酸化させることで製造される混合発酵茶の aq. acetone 抽出物を各種カラムクロマトで分離精製し、3 種の新規化合物 **1** – **3** を含む 25 種の化合物を得た (Figure 1)。新化合物の構造は各種スペクトルの解析および化学的検討により決定した。Acetonyl theacitrin A (**1**) は acetone が付加した artifact ではあるが、カテキン酸化で生成する不安定中間体 theacitrin A の安定誘導体として位置付けられる。Theasinensin H (**2**) は theasinensin B のアトロプ異性体であり、これまで存在が推測されて

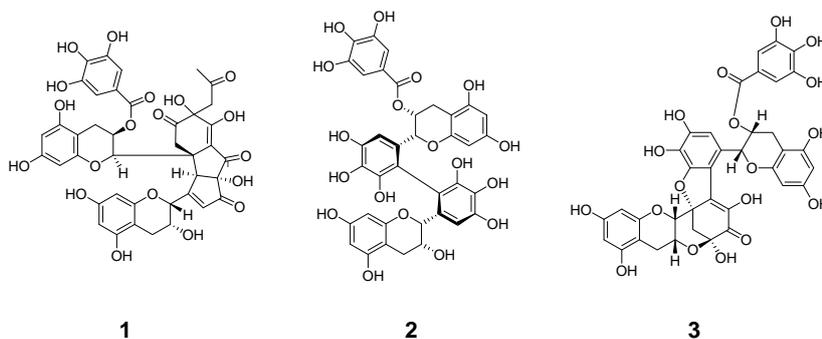


Figure 1. Structures of **1**, **2**, and **3**.

いながら分離されていなかった物質である。また、3'-*O*-galloyl dehydrotheasinensin E (**3**) は新しい黄色色素であり、dehydrotheasinensin B の異性化により生成したと考えられる。

第二章 茶カテキン類の生体模倣的酸化反応生成物の構造に関する研究²

紅茶の主要ポリフェノールである theasinensin A (**6**) の生成メカニズムを Chart 1 に示す。まず、原料となる epigallocatechin-3-*O*-gallate (**4**) が酵素により酸化されてキノン **4a** となる。次に、**4a** と **4** の立体選択的な酸化的カップリングにより dehydrotheasinensin A (**5**) が生成する。次いで、不安定な **5** は非酵素的に酸化還元不均化反応を起こして還元生成物である **6** と oolongtheanin 類などの酸化生成物に分解する。本研究では、生物活性試験に供するに十分な量の **6** を調製する目的で開発を行った。

ポリフェノール酸化酵素は活性中心に銅イオンを持つことから、始めに、数種の重金属塩を用いて **4** から **5** への酸化的二量化反応を検討した。その結果、CuCl₂ を用いることで収率良く **5** が生成することが分かった。次に、**5** を効率的に **6** に還元するために、反応溶液に直接 ascorbic acid を加えて加熱すると **6** (53%) を得ることに成功した。この方法はこれまでの酵素法に比べて収率が高く操作も極めて簡便である。

さらに、この反応の副生成物について詳細な検討を行った。緑茶主カテキンである **4** を水溶液中単独で CuCl₂ と攪拌すると、**5** と共に生成する主な副生成物は重合ポリフェノールであり、¹³C NMR スペクトルの解析から主に pyrogallol 環同士の酸化的結合により重合していることが明らかになった。一方、catechol 型カテキンの epicatechin を共存させて **4** の重合反応を行うと、catechol 環と phloroglucinol 環の間でも酸化的結合を形成することが明らかになった (Figure 2)。この **4** と epicatechin の混合物から得られる重合ポリフェノールの ¹³C NMR および UV スペクトルは、紅茶から分離した重合ポリフェノールのものと非常に良く類似していた。紅茶の重合ポリフェノールは紅茶浸出液中のポリフェノールの 70% を占めるが、その構造は未だに分かっていない。本研究はその化学構造解明に大きく寄与するものと考えられる。

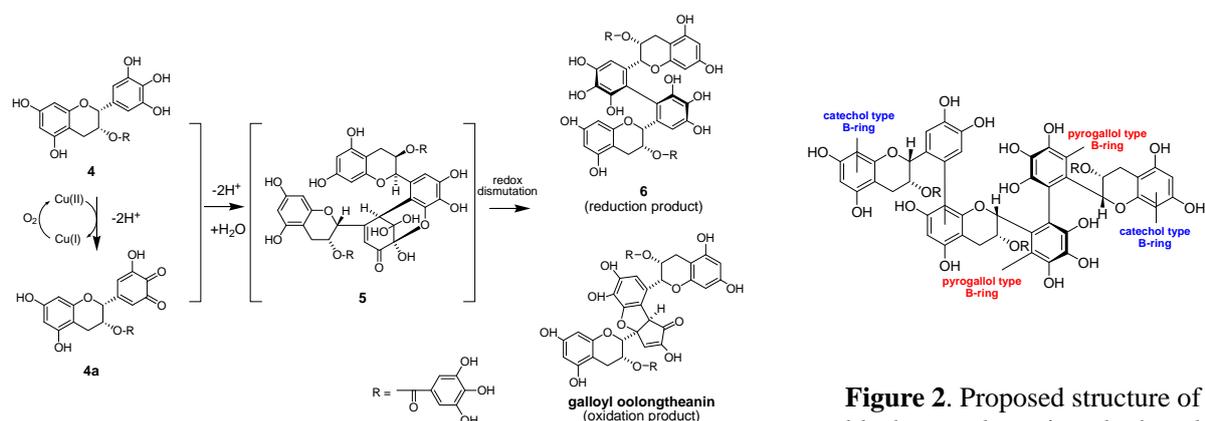


Chart 1. Production mechanism of **6**.

Figure 2. Proposed structure of black tea polymeric polyphenols.

第三章 嫌氣的微生物発酵茶に含まれるカテキン代謝物に関する研究³

茶カテキン類は経口投与で多くの生物活性が報告されているにもかかわらず、腸管からの吸収は数%に過ぎない。このことから、茶カテキン類の生物活性発現には、腸内細菌代謝により生成した代謝産物が関与している可能性が指摘されている。最近、当研究室において日本産の嫌氣的微生物発酵茶に、茶カテキンのヒト腸内細菌代謝産

物として知られている **11** および **12** (Chart 2) が含まれていることが見出され、それらが嫌氣的微生物発酵茶に特有の成分であることが明らかにされた。そこで、同様に茶葉の嫌氣的微生物発酵により製造されるミャンマーの伝統食品ラペソーについて成分検討を行ったところ、**11**、**12**、および新規化合物 **10** (Chart 2) を含む 5 種の化合物が得られた。主成分は日本産のものと同様 **11** と **12** であった。

一方当研究室では、緑茶に微生物発酵茶を混合することで残存する微生物による発酵が起こり、同様のカテキン代謝を再現できることを見出している。ミャンマーから輸入されるラペソーは油とともに密閉包装され、嫌氣性が保たれているので発酵に関与する微生物が残存している可能性がある。そこで、緑茶葉をラペソーと嫌氣的条件下で 10 週間混合発酵させてその成分を検討した。その結果、新規化合物 **13** および **14** を含む 6 種の化合物を得た。化合物 **10**、**13**、および **14** の平面構造は各種スペクトルデータの解析により決定した。水酸基の付け根の立体化学については、いずれの化合物も 3-*R* 配置の茶カテキンから生成すると考えられるため Chart 2 に示すように結論した。

以上、緑茶葉とラペソーを混合発酵することで、茶カテキンのヒト腸内細菌代謝産物 **11** や **12** への変換が可能となり、今後茶カテキンの機能性発現メカニズム解明に寄与できるものと考えられる。

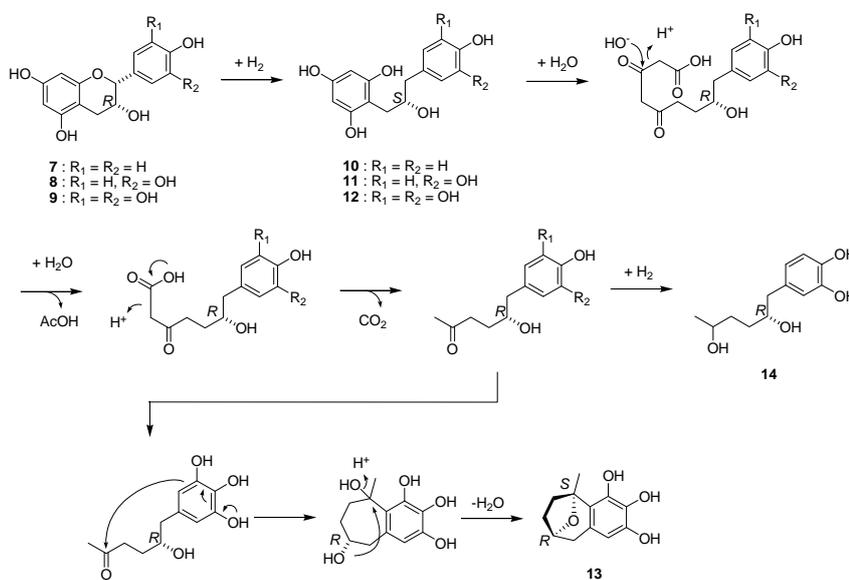


Chart 2. Plausible production mechanism of tea catechin metabolites.

[まとめ]

本研究で紅茶および微生物発酵茶製造過程におけるカテキン類の構造変換について多くの知見を得た。また、ポリフェノール酸化酵素を模した金属塩を用いた酸化で紅茶ポリフェノール *theasinensin* の簡易製造法を開発すると共に、同じ反応で紅茶の主成分である構造不明の重合ポリフェノールと類似のスペクトルの特徴を持つ重合体も合成できることを見出した。カテキン類を含めてポリフェノールの機能性については多くの報告があるが、化学的には未解明な部分が未だに多く残されている。ここで得られた知見は茶カテキン類の酸化や微生物代謝での反応機構、さらに機能性発現のメカニズムの解明に大きく寄与するものと考えている。

[基礎となった学術論文]

1. Shii, T., Tanaka, T., Watarumi, S., Matsuo, Y., Miyata, Y., Tamaya, K., Tamaru, S., Tanaka, K., Matsui, T., Kouno, I., *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 7253-7260 (2011).
2. Shii, T., Miyamoto, M., Matsuo, Y., Tanaka, T., Kouno, I., *Chem. Pharm. Bull.*, **59**, 1183-1185 (2011).
3. Shii, T., Asada, C., Matsuo, Y., Saito, Y., Tanaka, T. *J. Nat. Med.*, accepted.