



岐阜大学応用生物科学部 柳 瀬 笑 子

発酵茶製造時におけるカテキン類の酸化重合反応に関する研究

はじめに

ポリフェノールは、芳香環に多数のフェノール性水酸基が結合した化合物の総称であり、自然界に5000種類以上あるといわれている。主に植物中の苦味や色素成分として知られているが、近年ではその機能性が注目され、盛んに研究が行われている。茶における主要なポリフェノールはカテキン類(図1)であり、茶の持つ機能性の本体であると考えられている。茶は一般的に製造工程の違いにより主に、緑茶と発酵茶(ウーロン茶、紅茶)に分類される。発酵茶においては、元来生葉に含まれるカテキン類が酸化的に変換・重合されることによって大きく変化し、新たなポリフェノールが生成する。これら二次ポリフェノールには、比較的低分子のものから高分子まで存在する。しかし特にこの高分子ポリフェノールについては、含有量が多いにも関わらず非常に複雑な構造の混合物といわれており、未だその詳細は明らかになっていない。その原因として、天然物化学研究で一般的に用いられる HPLC 分析や NMR において高分子ポリフェノールは“瘤状”に観測されることから、分離・構造解析が困難であることがあげられる。筆者は、紅茶中に知られるテアフラビンなどの比較的分子のカテキン酸化重合体は、高分子ポリフェノールの生成中間体であると位置づけ、カテキンの酸化反応について詳細に研究することが、ひいては高分子ポリフェノールの構造解明のための重要な足がかりになると考えて研究を進めてきた。本講演では、最近の成果を中心に紹介したい。

1. 紅茶テアフラビン類の生成機構

紅茶の赤色色素として知られるテアフラビン類は、明るい赤色色調と多彩な生理活性のために広く興味をもたれている。その構造はB環部がカテコールタイプとピロガロールタイプの

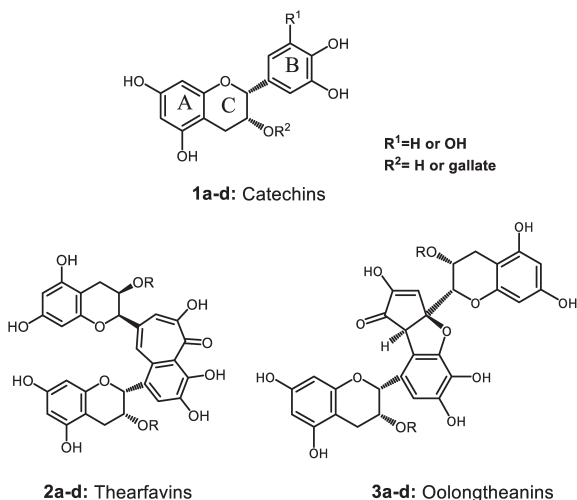


図1. 緑茶及び発酵茶ポリフェノールの化学構造

カテキンが酸化的に縮合した6員環-7員環からなるベンゾトロポロン骨格を持ち、カテキン類の組み合わせにより4種が知られている(図1, 2a-d)。多くの研究者によりその生成機構が提案されてきた<sup>1,2)</sup>。筆者らは、カテキン類のB環部に相当するカテコール誘導体とピロガロール誘導体を用いたモデル酸化反応を詳細に追跡することで、ベンゾトロポロン環の生成メカニズムの解析を行った。その結果、この酸化縮合反応の開始段階がカテコール誘導体の酸化によって生成するo-キノンに対するピロガロールのイオンの求核付加反応であることを明らかにした。さらに、生成中間体として多くの研究者によって推定されてきたビシクロ環骨格を持つ生成中間体の単離に初めて成功した(図2)<sup>3)</sup>。本研究では、モデル化合物を用いてベンゾトロポロン環の生成メカニズムを明らかにしたが、この生成機構はテアフラビン類でも同様であると考えている。

2. ウーロン茶ウーロンテアニン類の生成機構

ウーロンテアニン類は、5員環を含む特徴的な部分構造を有するカテキン2量体である。B環部がピロガロールタイプのカテキン同士が酸化的に縮合することで形成され、カテキン類の組み合わせにより、4種が知られている(図1, 3a-d)<sup>4,5)</sup>。ウーロン茶中の微量成分であり、その化学合成法の報告がなかったことからその検討から行った。テアフラビン類の合成で用いられるフェリシアン化カリウムをはじめとする様々な酸化剤を検討し最終的にテアシネンシンAの合成に用いられていた塩化銅<sup>6)</sup>を用いるとわずかに目的のウーロンテアニンが生成することが明らかとなった。この反応について詳細に検討したところ、

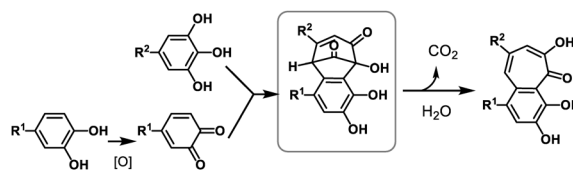


図2. ベンゾトロポロン環の生成機構

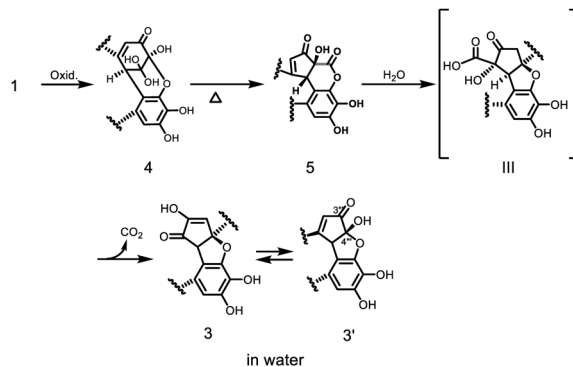


図3. ウーロンテアニン類の生成機構

ウーロンテアニン類がカテキン類から2つの中間体を経た3段階の反応で生成することを明らかにした。これら2つの生成中間体については各種NMR及びMS測定による構造決定を行い、中間体Ⅰはデヒドロテアシネンシン(4)<sup>6)</sup>、中間体Ⅱはプロウロンテアニン(5)<sup>7)</sup>であると決定した。特に、デヒドロテアシネンシンは、ウーロン茶ポリフェノールの一種であるテアシネンシンAの生成中間体としてすでに報告されており、ウーロンテアニンとテアシネンシンが同一の中間体を経て生成していることが明らかとなった。また、プロウロンテアニンからウーロンテアニンへの変換反応をNMRでモニタリングしたところ、開環及び再環化反応によりカルボン酸を分子内に有する中間体Ⅲが存在することが明らかになった。これらの結果からウーロンテアニン類は、①カテキン類の2段階の酸化的縮合反応によるデヒドロテアシネンシンの生成、②脱水及び転位反応を伴ったプロウロンテアニンの生成、③ラク톤の開環反応とそれに続く再環化反応による中間体Ⅲの生成、④脱炭酸及び酸化反応、の4段階を経て生成することが証明できた(図3)<sup>8)</sup>。さらに、反応機構を基にした反応の最適化により4種ウーロンテアニン類合成法を確立した。

### 3. ウーロンテアニン類の化学構造

ウーロンテアニン類は1988年に橋本ら<sup>4)</sup>によってウーロン茶抽出物より単離され、図3の化合物**3'**のように構造決定されたが、最近、化合物**3**のように訂正構造が発表された<sup>5)</sup>。しかし筆者らは上記のような詳細な研究の過程で、ウーロンテアニン類は水溶液中においては、訂正前と訂正後の構造の平衡混合物であることを明らかにした<sup>9)</sup>。その機構は、**3**の真ん中のエーテル環が開環し、上側5員環のケトンへの求核付加により再環化することによって**3'**へ変化するというものである。このような平衡はメタノールやエタノール中では生じなかった。その原因としては、**3'**の構造では、C-4<sup>m</sup>位の水酸基がC-3<sup>m</sup>位のケトン基と同一平面上にないためケトン基と水素結合を作らず水酸基がむき出しになるため、極性の高い水中でこのような構造を取るものと考えている(図3)。また、その**3**と**3'**の存在比は、ガレート基の有無によって異なることも明らかにした。ウーロン茶を摂取するときには、成分が水中に抽出された状態であるため、ウーロンテアニン類は、この2つの平衡混合物として存在すると推察される。そのため、平衡構造のうちどちらか一方の構造か、ウーロンテアニン類の生理的機能に大きく影響している可能性があるのではないかと考えている。

### 4. おわりに

ポリフェノール類は植物中に広く存在する化合物群であり、多くの種類が知られている。クロマトグラフィーや機器分析技術の発展とともに、多彩な化学構造を持つことが明らかにされてきた。近年では、それらの持つ生理活性の化学構造との関係性、いわゆる構造-活性相関研究が盛んに行われてきた。これらの研究では、水酸基の有無やメチル基の有無という小さな違いが生理活性の増強や減衰につながる事が知られている。一方で、紅茶やウーロン茶中で知られる高分子ポリフェノールは構造情報が乏しいにもかかわらず、機能性の研究が先行して行われているという現状がある。筆者は、紅茶やウーロン茶などの発酵茶中で知られるテアフラビンなどの比較的分子のカテキ

ン酸化重合体が、高分子ポリフェノールの生成中間体であると位置づけ、カテキンの酸化反応について詳細に研究することがその解明のきっかけになると考えて研究を進めてきた。しかし研究を進める中で、これらの低分子化合物の反応性が比較的低いこと、茶葉中でマイナー成分であることなどから、酸化重合反応の中間体ではなく、むしろ比較的安定な副生成物であり、酸化重合反応のメインルートからは外れた存在である可能性があるのではないかと考えている。今後は高分子ポリフェノールの構造解明にはこれらとは別の新たな生成中間体の発見が必要ではないかという新たな仮説をもとに研究を進めていきたい。近年では、機能性成分が注目されているが、これらの中には化学的不安定で、保蔵や食品加工中に容易に変化するものもある。そのような化学変化に着目して研究を進め機能性物質の真の姿を明らかにすることで食の安全や機能研究の分野に貢献していければと考えている。

### (引用文献)

- 1) Takino, Y., Imagawa, H., Horikawa, H., Tanaka, A. Studies on the mechanism of the oxidation of tea leaf catechins. part III. Formation of reddish orange pigment and its spectral relationship to some benzotropolone derivatives. *Agr. Biol. Chem.*, 28 (1), 64-71 (1964).
- 2) Tanaka, T., Matsuo, Y., Production Mechanisms of Black Tea Polyphenols. *Chem. Pharm. Bull.* 68, 1131-1142 (2020)
- 3) Yanase, E., Sawaki, K. and Nakatsuka, S.: The isolation of a bicyclo [3.2.1]-intermediate during formation of bezotropolones, a common nucleus found in black tea pigments: theaflavins. *Synlett*, 17, 2661-2663 (2005).
- 4) Hashimoto, F., Nonaka, G., Nishioka, I., Tannins and related compounds. LXIX.: Isolation and structure elucidation of B, B'-linked bisflavanoids, theasinensins D-G and oolongtheanin from oolong tea. (2). *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 1676-1684 (1988).
- 5) 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).
- 6) Shii, T., Miyamoto, M., Matsuo, Y., Tanaka, T., Kouno, I., Biomimetic one-pot preparation of a black tea polyphenol theasinensin A from epigallocatechin gallate by treatment with Copper (II) Chloride and Ascorbic Acid. *Chem. Pharm. Bull.*, 59, 1183 (2011).
- 7) Hirose, S., Tomatsu, K., Yanase, E., Isolation of key intermediates during formation of oolongtheanins. *Tetrahedron Lett.*, 54, 7040 (2013).
- 8) Hirose, S., Kamatari, Y. O., Yanase, E., Mechanism of oolongtheanin formation via three intermediates. *Tetrahedron Lett.* 61 (11): 151601 (2020).
- 9) Hirose, S., Ogawa, K., Yanase, E. Equilibrated structures of oolongtheanins. *Tetrahedron Lett.*, 57, 2067-2069 (2016).

謝辞 本研究は、公益財団法人東洋食品研究所研究助成(2014)、科学研究費などのご支援により行ったものです。本研究ならびに本受賞にあたり、恩師である中塚進一先生(長良サイエンス(株)代表取締役社長、岐阜大学名誉教授)に厚く御礼申し上げます。また、岐阜大学応用生物科学部の先生方、研究を一緒におこなっていただいた生物有機化学研究室の学生の皆様および同大高等研究院科学研究基盤センターの職員及び先生方に深く感謝申し上げます。