

## 植物ポリフェノールの立体構造及び酸化機構解析への計算化学の適用

松尾 洋介

## Study of the Stereochemistry and Oxidation Mechanism of Plant Polyphenols, Assisted by Computational Chemistry

Yosuke Matsuo

Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University; 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan.

(Received July 18, 2016)

In recent years, plant polyphenols have attracted great attention due to their wide range of biological activities. Certain kinds of polyphenols have complex structures; therefore, it is difficult to elucidate their total structure, including stereochemistry. In this study, we reinvestigated the stereostructures of two major C-glycosidic ellagitannins contained in Quercus plants, vescalagin and castalagin, and revised their stereostructures based on theoretical calculations of spectroscopic data. We also determined the structures of quercusnins A and B, isolated from the sapwood of *Quercus crispula*, based on theoretical calculations of NMR data. The oxidation mechanism of polyphenols has not been entirely elucidated. Therefore, we have also studied the oxidation mechanism of tea catechins during black tea production. Our investigation of the oxidation mechanism of black tea pigment theaflavins revealed that the difference in the position of the galloyl ester affords different oxidation products of theaflavins. In addition, oxidation products of pyrogallol-type catechins could be classified into three types—dehydrotheasinensins, theacitrins, and proepitheafagallins; their detailed production and degradation mechanisms were also examined.

**Key words**—polyphenol; stereochemistry; black tea; catechin; oxidative coupling

## 1. はじめに

植物ポリフェノールは抗酸化作用や酵素阻害作用などの多様な生物活性を持つことから、機能的食品成分として世界中で注目を集めている。<sup>1-3)</sup> ポリフェノールは一般的な天然有機化合物と比較して分子量が大きい場合が多く、複雑な構造を持つことも多い。そのため、NMR や MS などの様々なスペクトルデータを解析しても、平面構造・立体構造を正確に決定することが困難な場合がある。また、ポリフェノールは反応性が高く、生薬や食品の加工工程での組織破壊や乾燥、あるいは微生物感染などが起こると、酵素的・非酵素的な酸化反応や共存物質との縮合反応などにより構造が多様に変化する。なかでもポリフェノールの酸化反応機構についてはほとんど明らかとなっていない。筆者はこれまでに、複

雑な構造を有するポリフェノールについて各種スペクトルデータの理論計算を利用した立体構造の解析を行うとともに、カテキン類の酸化機構解明へと研究を展開している。本稿では、これまでの研究で得られた知見について紹介する。

## 2. 計算化学を利用した植物ポリフェノールの立体構造決定

化学計算には様々な種類があるが、その中でも密度汎関数法 (density functional theory; DFT) は比較的 low cost で高精度の結果が得られることから、近年広く使われるようになってきている。DFT 計算では、構造最適化だけでなく様々なスペクトルの理論計算が可能である。特に、電子円偏光二色性 (electronic circular dichroism; ECD) スペクトルや NMR スペクトルの理論計算は、ポリフェノールの構造解析において非常に有用である。

Vescalagin (1) 及び castalagin (2) はブナ科コナラ属植物に広く分布する C-配糖体型エラジタンニンである。オーク樽中で熟成することによって作られるワインやウイスキーなどの嗜好飲料にも含ま

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (〒852-8521 長崎市文教町 1-14)

e-mail: y-matsuo@nagasaki-u.ac.jp

本総説は、平成 27 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

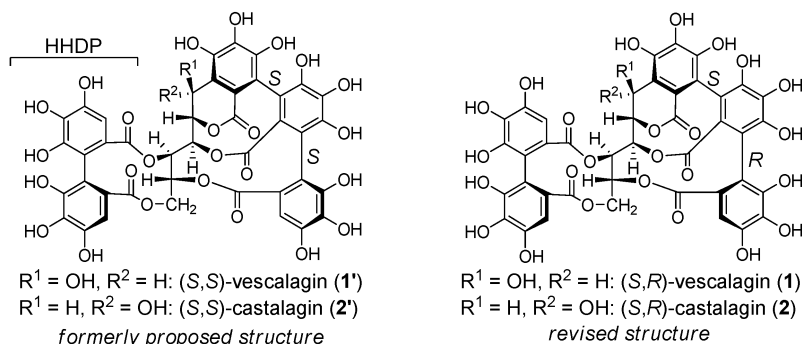


Fig. 1. Structures of Vescalagin and Castalagin

れていることからその生物活性が注目されており、これまでに抗酸化活性や抗ウイルス活性などが報告されている。<sup>4-6</sup> その構造については、これまで **1'** 及び **2'** に示す構造であると提唱されていたが (Fig. 1),<sup>7,8</sup> 立体構造については十分な証拠が示されていなかったことから、計算化学的手法を用いて立体構造の再検討を行った。<sup>9</sup> ここで、hexahydroxydiphenoyl (HHDP) 基は ECD スペクトルに大きく影響することから、<sup>10</sup> vescalagin の加水分解によって得られる des-HHDP 体の vescalin について、アトロプ異性がいずれも *S* の (S,S)-体 (**3'**、以前提唱されていた構造) と (S,R)-体 (**3**) の時間依存密度汎関数法 (time-dependent DFT; TDDFT) による ECD スペクトル理論計算を行った (Fig. 2). Vescalin の実測 ECD スペクトルでは、295 nm 及び 240 nm において正の Cotton 効果、263 nm 及び 218 nm において負の Cotton 効果が観察され、(S,R)-体 (**3**) の計算スペクトルにおいても実測スペクトルとよく類似した Cotton 効果が認められた。特に、(S,R)-体 (**3**) の計算スペクトルでは 218 nm 付近において実測スペクトルと同じく負の Cotton 効果を示したが、(S,S)-体 (**3'**) の計算スペクトルでは正の Cotton 効果が観察された [Fig. 2(B)]. さらに、vescalagin について (S,S)-体 (**1'**) 及び (S,R)-体 (**1**) の <sup>1</sup>H 及び <sup>13</sup>C NMR ケミカルシフト並びに <sup>1</sup>H NMR 結合定数の DFT 計算を行った結果、(S,R)-体 (**1**) の計算結果の方が実測データとよい一致を示した。Castalagin についても vescalagin の場合と同じく検討を行った結果、同様の計算結果が得られたことから、vescalagin 及び castalagin の正しい立体構造は **1** 及び **2** に示すものであると結論した。<sup>9</sup>

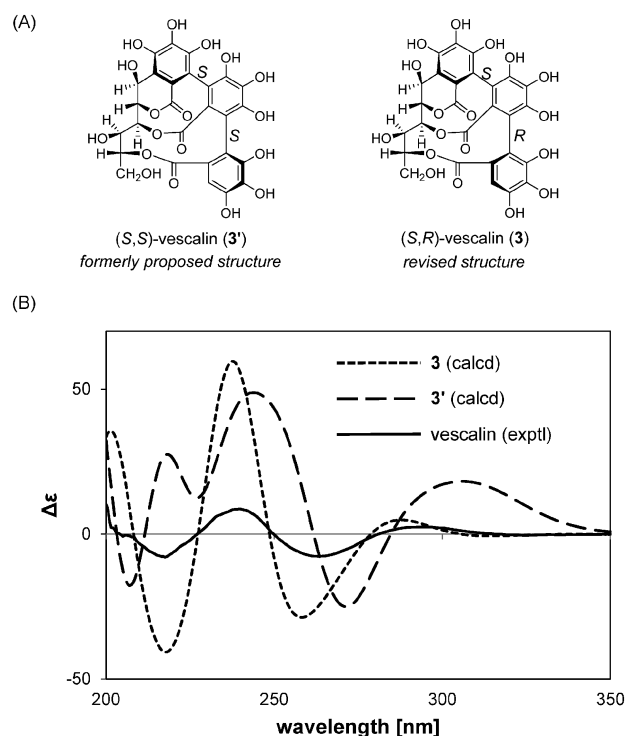


Fig. 2. Structure of Vescalin (A) and Its Experimental and Calculated ECD Spectra (B)

Quercusnin A (**4**) 及び B (**5**) は、ミズナラ (*Quercus crispula*) の辺材より単離された特異な構造を有する新規エラジタンニンである。<sup>11</sup> さらに、vescalagin (**1**) をシイタケ菌で処理すると **4** が生成したことから、**4** 及び **5** は **1** の菌代謝産物であると考えられた。<sup>11</sup> これらの構造決定において、2D-NMR スペクトル等に基づき Fig. 3 に示す平面構造であると推定されたが、HMBC スペクトルからは十分な証拠が得られなかった。化合物 **4** 及び **5** はそれぞれ四種の立体配置 [(1'R,8R), (1'R,8S), (1'S,8R), (1'S,8S)] の可能性が考えられる。そこで、

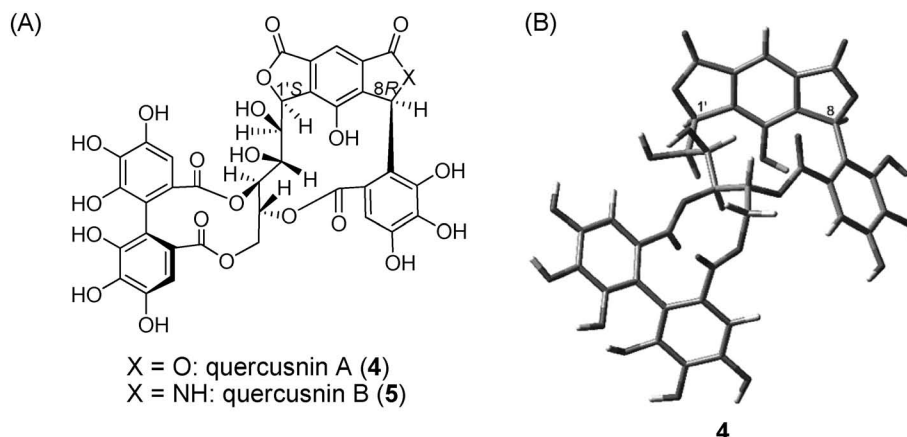


Fig. 3. Structures of Quercusnins A (4) and B (5) (A) and Lowest-energy Conformer of 4 (B)

これらの構造について NMR ケミカルシフト及び  $^1\text{H}$  NMR 結合定数の計算を行った結果、いずれも (1'S,8R) の計算結果が実測データと最もよい一致を示した。このことから、Fig. 3 に示す平面構造が正しいことが裏付けられるとともに、その立体構造も決定することができた。<sup>11)</sup>

### 3. 紅茶ポリフェノール生成におけるカテキン類の酸化機構解析

ポリフェノールを豊富に含む紅茶は、茶葉 (*Camellia sinensis*) を萎凋・揉捻後、「茶発酵」と呼ばれる酸化酵素が働く工程を経て製造される。この過程で、茶葉に豊富に含まれるカテキン類は酸化酵素によって酸化を受け、二量体やさらに重合が進んだオリゴマーが生じる。このため、紅茶ポリフェノールの組成は非常に複雑であり、その大部分は化学的に解明されていない。<sup>12-14)</sup>

茶カテキン類は、B 環の構造の違いからカテコール型カテキン [epicatechin (6), epicatechin-3-O-gallate (7)] とピロガロール型カテキン [epigallocatechin (8), epigallocatechin-3-O-gallate (9)] の二種類に分類される。これらが紅茶製造過程において酸化を受けると、まず B 環が *o*-キノン体へと変化した後、B 環同士で様々な縮合反応を起こす (Fig. 4)。茶カテキン類の酸化的二量化機構は、カテコール型カテキンとピロガロール型カテキンとの間での酸化的カップリングと、二分子のピロガロール型カテキン間での酸化的カップリングの二種類のタイプに分類することができる。

カテコール型カテキンとピロガロール型カテキンとの間で酸化的カップリングが起こると、特徴的な

ベンゾトロポロン環を持つ赤橙色色素テアフラビン類 (10-13) が生成する。<sup>12,13)</sup> テアフラビン類は、カテコール型カテキンの酸化によって生成する *o*-キノン体とピロガロール型カテキンとの縮合によってビシクロ [3.2.1] オクタン型中間体が生成後、水和・脱炭酸等を経て最終的にベンゾトロポロン環を形成することにより生成する (Fig. 4)。<sup>15)</sup> テアフラビン類は紅茶の品質や風味に大きく影響することから重要な成分の 1 つであるが、紅茶製造過程においてその一部がさらに酸化を受けることが知られていた。<sup>16)</sup> しかし、その詳細は明らかとなっていなかったことから、筆者はテアフラビン類の詳細な酸化反応機構について検討した。<sup>17)</sup>

テアフラビン類 (10-13) 単独をポリフェノール酸化酵素で処理しても酸化を受けなかったが、epicatechin (6) 共存下では容易に酸化を受けて様々な酸化生成物が生じた。ガロイル基を持たない theaflavin (10) からは、ベンゾトロポロン環が酸化を受けてナフトキノン環へと変化した theanaphthoquinone (14)<sup>18)</sup> や、ベンゾトロポロン環と 6 が酸化的に縮合した flavantheaflavin A (15)<sup>19)</sup> が生成する。3 位ヒドロキシ基にガロイル基がエステル結合した theaflavin-3-O-gallate (11) からも同様の反応が起こって theanaphthoquinone-3'-O-gallate (16) 及び flavantheaflavin B (17) が生成するとともに、11 のガロイル基と 6 との間で新たなベンゾトロポロン環を形成した theadibenzotropolone A (18)<sup>20)</sup> が生成した。一方、3' 位ヒドロキシ基にガロイル基がエステル結合した theaflavin-3'-O-gallate (12) 並びに 3 位及び 3' 位ヒドロキシ

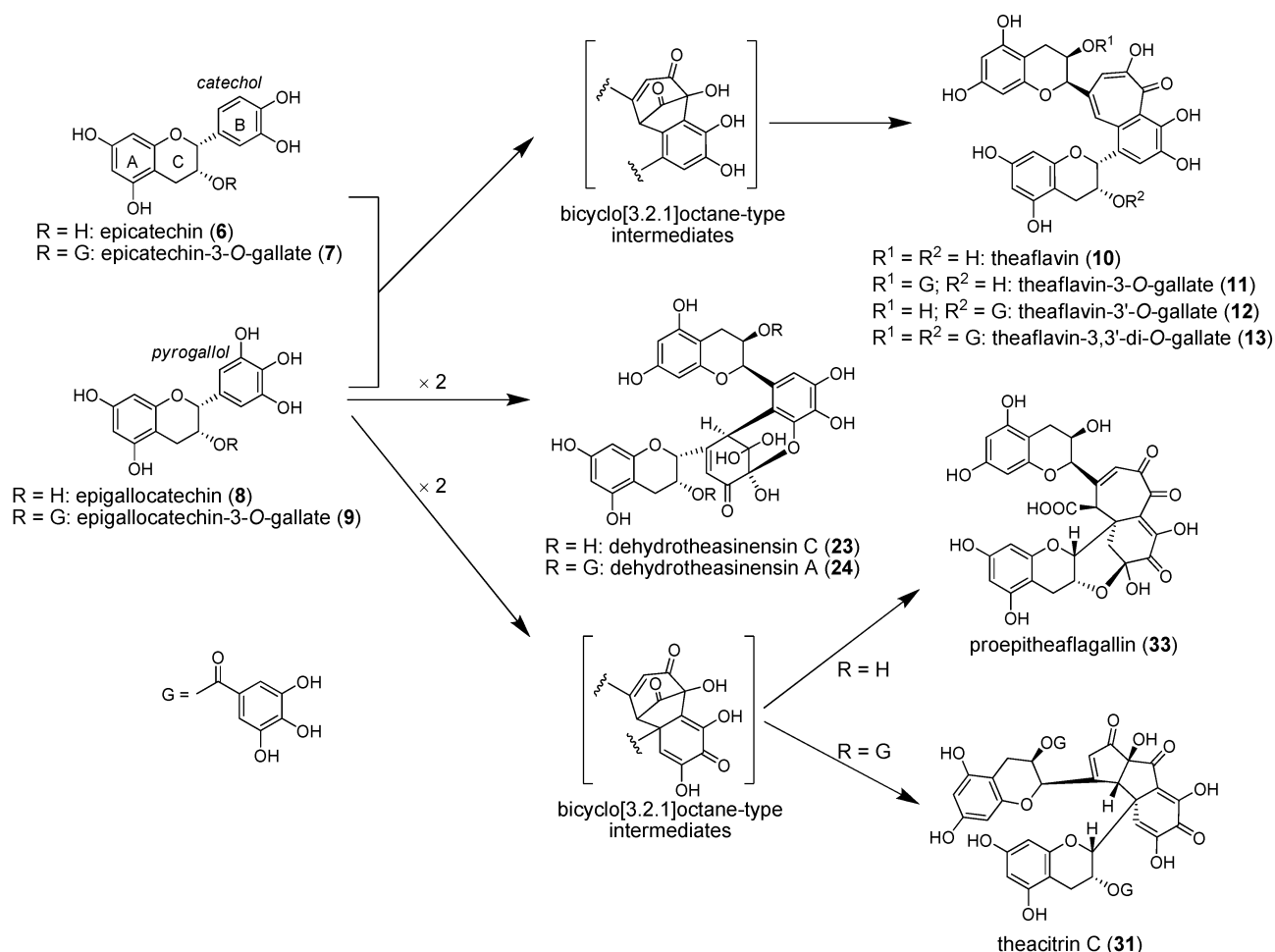


Fig. 4. Major Enzymatic Oxidation Pathways of Tea Catechins

基にガロイル基がエステル結合した theaflavin-3,3'-*di-O*-gallate (13) の場合はベンゾトロポロン環が反応せず、ガロイル基と 6 との間でベンゾトロポロン環を形成した theadibenzotropolones D (19),<sup>21)</sup> E (20),<sup>21)</sup> F (21) 並びに theatribenzotropolone A (22)<sup>21)</sup> が得られた。以上の結果から、3' 位に遊離ヒドロキシ基を持つ 10 及び 11 の場合、まず 6 が酸化を受けて *o*-キノン体 6a が生成後、10 及び 11 のベンゾトロポロン環と 6a が反応し、酸化や縮合を起こして 14–17 が生成すると思われる (Fig. 5)。一方、3' 位ヒドロキシ基にガロイル基がエステル結合した 12 及び 13 では、立体障害のためベンゾトロポロン環が 6a と反応することができず、ガロイル基のみが 6a と反応して新たなベンゾトロポロン環を形成した 19–22 が生成したと考えられた。さらに、6 共存下におけるテアフラビン類の酵素酸化での反応開始直後において、10 及び 11 では反応液の

長波長シフトが認められたが、12 及び 13 ではそのようなシフトは認められなかった。この長波長シフトは、ベンゾトロポロン環と 6a の *o*-キノン環との電荷移動相互作用によるものと考えられ、このことは DFT 最適化によって得られた 10/6a 錯体 (Fig. 6) の UV/Vis スペクトルについての TDDFT 計算及び分子軌道解析によって裏付けられた。テアフラビン類のベンゾトロポロン環の酸化において、このような電荷移動相互作用が重要な役割を果たしており、3' 位ヒドロキシ基にガロイル基がエステル結合している場合は *o*-キノン環との分子間相互作用が妨げられていると考えられる。

ピロガロール型カテキン同士が酸化的に縮合する場合、主生成物としてデヒドロテアシネンシン類 (23, 24) が生成する (Fig. 4).<sup>22,23)</sup> デヒドロテアシネンシン類は不安定なため、加熱や中性条件下では容易に酸化還元不均化反応を起こして紅茶やウーロ

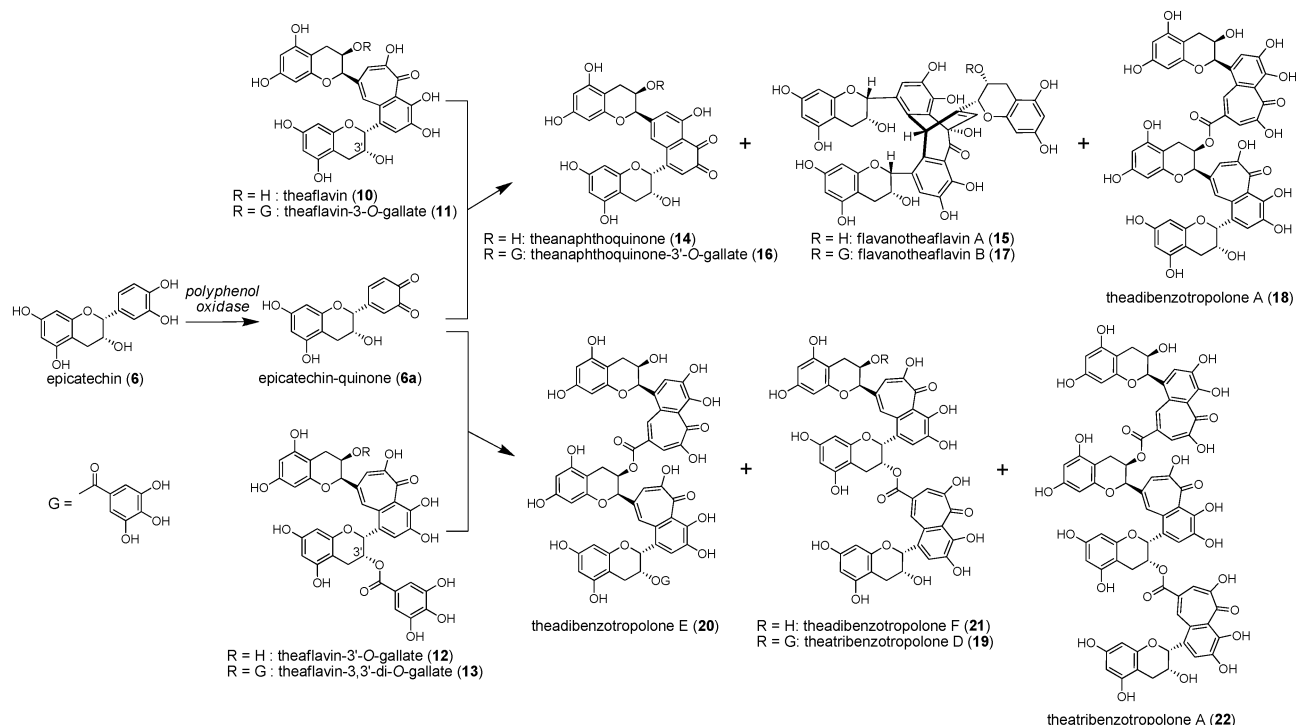


Fig. 5. Enzymatic Oxidation of Theaflavins (10–13) in the Presence of Epicatechin (6)

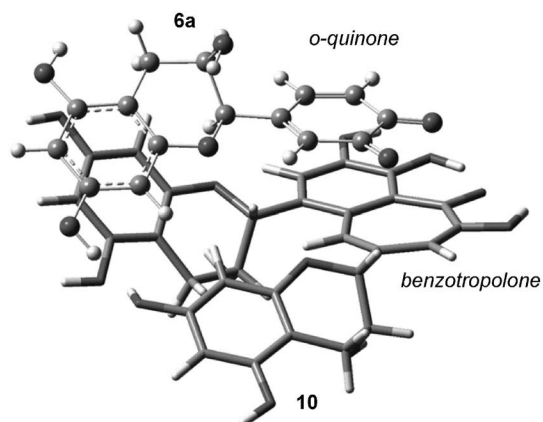
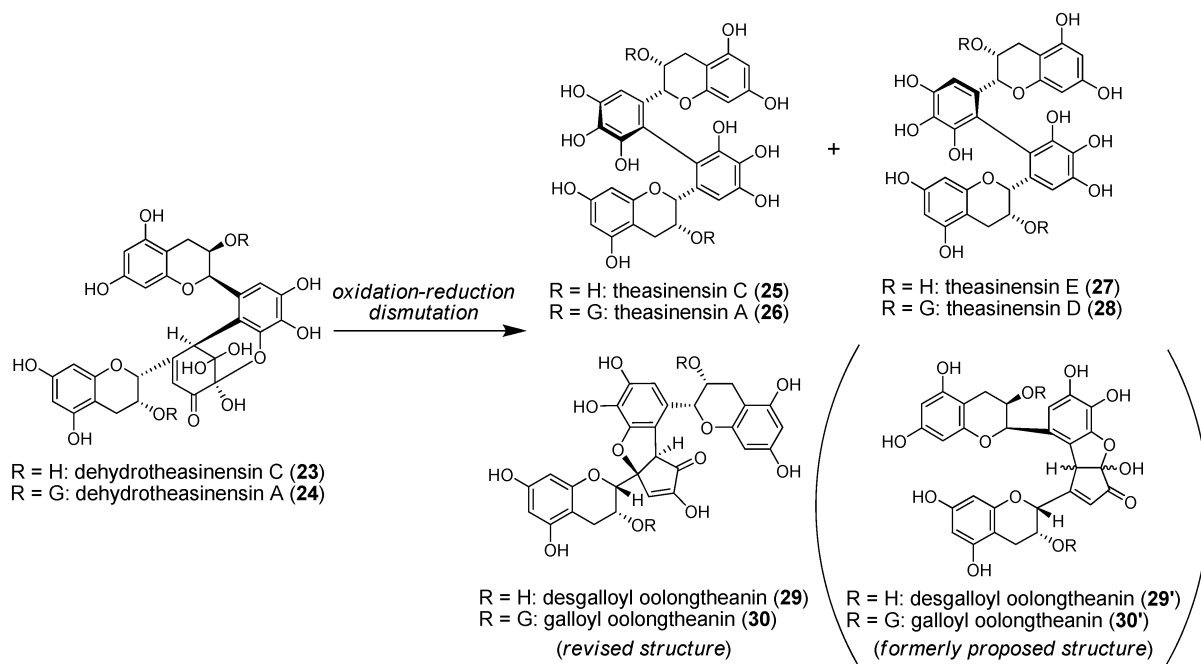
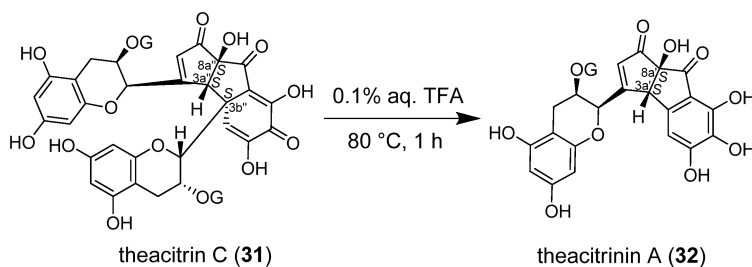


Fig. 6. Lowest-energy Conformer of Theaflavin (10)/Epicatechin-quinone (6a) Complex

ン茶特有のポリフェノールであるテアシネンシン類 (25–28)<sup>24,25</sup> やウーロンテアニン類 (29, 30)<sup>24</sup> などの様々な分解生成物が生じる (Fig. 7).<sup>22,23,26</sup> ウーロンテアニン類の構造は 29', 30' に示すようなものであると提唱されていたが,<sup>24</sup> 有機溶媒中における NMR スペクトルデータの再解析並びに ECD スペクトルの理論計算によって、正しい構造は 29, 30 に示すものであることを明らかにした.<sup>27</sup> なお最近、ウーロンテアニン類は有機溶媒中では 29, 30

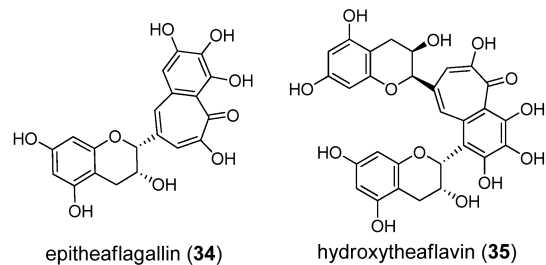
の構造として存在するが、水中では 29, 30 と 29', 30' との平衡状態として存在することが報告されている。<sup>28</sup>

ピロガロール型カテキン類の酸化的二量化機構としては、このほかにビシクロ [3.2.1] オクタン型中間体を経由する経路が重要である。デヒドロテアシネンシン類は C 環 3 位ヒドロキシ基のガロイルエステルの有無にかかわらず生成するが、ビシクロ [3.2.1] オクタン型中間体を経由する経路ではガロイル基の有無が最終的な生成物の構造に影響する。ガロイル基を持つ epigallocatechin-3-O-gallate (9) からはビシクロ [3.2.1] オクタン型中間体を経て炭素骨格の転位が起こり、theacitrin C (31) が生成する。<sup>29</sup> Theacitrin C (31) を含むテアシトリン類は紅茶の黄色色素成分として知られていたが、3a,8a-dihydrocyclopenta [a]indene-1,6,8-trione 部分の 3 つの不斉炭素 (3a'' 位, 3b'' 位, 8a'' 位) の立体構造は解明されていなかった。<sup>30</sup> テアシトリン類は不安定であり、31 を酸性条件下で加熱するとフラバン-3-オール A, C 環ユニットが脱離して theacitrinin A (32) が生成する (Fig. 8).<sup>29</sup> そこで、32 の立体構造を ECD スペクトルの理論計算によって決定することにより 31 の 3a'' 位及び 8a'' 位の立

Fig. 7. Oxidation-Reduction Dismutation of Dehydrotheasinensins (**23**, **24**)Fig. 8. Formation of Theacitrinin A (**32**) by Heat Treatment of Theacitrin C (**31**)

体配置はそれぞれ *S* であると明らかにした. さらに残りの  $3b''$  位については NMR ケミカルシフト計算並びに nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) スペクトルより *S* であると決定した.<sup>31)</sup>

ガロイル基を持たない epigallocatechin (**8**) の場合, ビシクロ [3.2.1] オクタン部分と C 環ヒドロキシ基との間でヘミアセタールを形成するためテアシトリン型化合物は生成せず, 代わりに proepitheafagallin (**33**)<sup>23)</sup> が生成する. Proepitheafagallin (**33**) もテアシトリン類と同様に不安定であり, 加熱によって flavan-3-ol A, C 環ユニットの脱離あるいは転位が起こってベンゾトロポロン環を形成することにより, 紅茶色素 epitheafagallin (**34**)<sup>32)</sup> や hydroxytheaflavin (**35**) が生成する (Fig. 9).<sup>23)</sup> ビシクロ [3.2.1] オクタン型中間体を経てベンゾ

Fig. 9. Structures of Epitheafagallin (**34**) and Hydroxytheaflavin (**35**)

トロポロン環を持つ **34** や **35** が生成するのはテアフラビン類の生成機構と類似しているが, テアフラビン類の場合は最終的なベンゾトロポロン環まで反応が一気に進行するカスケード反応であるのに対して, プロエピテアフラガリン経路の場合は B 環由来部

分の置換基の位置の違いのためにビシクロ [3.2.1] オクタン型中間体の安定性・反応性が異なると考えられる。そのため、炭素骨格の転位が起こって **31** が生成したり、ヘミアセタール形成を経て **34** や **35** の前駆体である **33** が生成したりすると考えられる。

#### 4. おわりに

本稿ではまず、計算化学を利用したポリフェノールの立体構造解析について紹介した。従来の天然物の構造決定においては、1D-, 2D-NMR や MS などの各種スペクトルデータ解析がスタンダードな手法として行われていたが、それだけでは絶対配置の決定に至らないことも多い。スペクトル計算を取り入れることによって、より正確な構造決定が可能となるとともに、詳細な立体配座についても知ることができることから、このような手法が今後ますます重要になってくると思われる。

本稿ではさらに、複雑なポリフェノール組成を有する紅茶について、その製造過程における茶カテキン類の酸化反応機構についてこれまでに得られた知見を紹介した。カテキン類の二量化だけでも多様な生成物が生じることが、紅茶ポリフェノールが複雑な組成を有する1つの原因であると考えられる。実際の紅茶中では、カテキン二量体よりもさらに重合が進行したオリゴマーが大部分を占めているが、その詳細はいまだ明らかとなっていない。これまでに明らかとなったカテキン類の酸化反応機構は、更なる重合化機構解明の手がかりとなることが期待される。

**謝辞** 本研究は、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・天然物化学研究室で行われたものであり、御指導・御鞭撻を賜りました河野 功 名誉教授並びに田中 隆 教授に心から感謝致します。また、本研究にご協力頂きました齋藤義紀 准教授並びに大学院生・学部生に感謝致します。さらに、本研究における化学計算の一部は九州大学情報基盤研究開発センター・研究用計算機システムを利用させて頂きました。ここに感謝致します。

**利益相反** 開示すべき利益相反はない。

## REFERENCES

- 1) Crozier A., Jaganath I. B., Clifford M. N., *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 1001–1043 (2009).
- 2) Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouységu L., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **50**, 586–621 (2011).
- 3) Cheynier V., *Phytochem. Rev.*, **11**, 153–177 (2012).
- 4) Fernandes A., Fernandes I., Cruz L., Mateus N., Cabral M., de Freitas V., *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 11154–11160 (2009).
- 5) Alañón M. E., Castro-Vázquez L., Díaz-Maroto M. C., Gordon M. H., Pérez-Coello M. S., *Food Chem.*, **128**, 997–1002 (2011).
- 6) Vilhelmova N., Jacquet R., Quideau S., Stoyanova A., Galabov A. S., *Antiviral Res.*, **89**, 174–181 (2011).
- 7) Nonaka G., Ishimaru K., Watanabe M., Nishioka I., Yamauchi T., Wan A. S. C., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 217–220 (1987).
- 8) Nonaka G., Sakai T., Tanaka T., Mihashi K., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2151–2156 (1990).
- 9) Matsuo Y., Wakamatsu H., Omar M., Tanaka T., *Org. Lett.*, **17**, 46–49 (2015).
- 10) Okuda T., Yoshida T., Hatano T., Koga T., Toh N., Kuriyama K., *Tetrahedron Lett.*, **23**, 3937–3940 (1982).
- 11) Omar M., Matsuo Y., Maeda H., Saito Y., Tanaka T., *Org. Lett.*, **16**, 1378–1381 (2014).
- 12) Drynan J. W., Clifford M. N., Obuchowicz J., Kuhnert N., *Nat. Prod. Rep.*, **27**, 417–462 (2010).
- 13) Li S., Lo C.-Y., Pan M.-H., Lai C.-S., Ho C.-T., *Food Funct.*, **4**, 10–18 (2013).
- 14) Haslam E., *Phytochemistry*, **64**, 61–73 (2003).
- 15) Yanase E., Sawaki K., Nakatsuka S., *Synlett*, 2661–2663 (2005).
- 16) Davies A. P., Goodsall C., Cai Y., Davis A. L., Lewis J. R., Wilkins J., Wan X., Clifford M. N., Powell C., Parry A., Thiru A., Safford R., Nursten H. E., “Basic Life Sciences, Vol. 66, Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology,” ed. by Gross G. G., Hemingway R. W., Yoshida T., Kluwer Academic/Plenum, New York, 1999, pp. 697–724.

- 17) Matsuo, Y., Oowatashi R., Kusano R., Saito Y., Tanaka T., "Polyphenols Communications 2014, XXVIIth International Conference on Polyphenols & 8th Tannin Conference, Nagoya, September 2–6, 2014," ed. by Yoshida K., Ozeki Y., Fukushima K., Terao J., Abe I., Hatano T., 2014, pp. 639–640.
- 18) Tanaka T., Betsumiya Y., Mine C., Kouno I., *Chem. Commun.*, 1365–1366 (2000).
- 19) Li Y., Shibahara A., Matsuo Y., Tanaka T., Kouno I., *J. Nat. Prod.*, **73**, 33–39 (2010).
- 20) Sang S., Tian S., Meng X., Stark R. E., Rosen R. T., Yang C. S., Ho C.-T., *Tetrahedron Lett.*, **43**, 7129–7133 (2002).
- 21) Sang S., Tian S., Stark R. E., Yang C. S., Ho C.-T., *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 3009–3017 (2004).
- 22) Tanaka T., Watarumi S., Matsuo Y., Kamei M., Kouno I., *Tetrahedron*, **59**, 7939–7947 (2003).
- 23) Matsuo Y., Tanaka T., Kouno I., *Tetrahedron*, **62**, 4774–4783 (2006).
- 24) Hashimoto F., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1676–1684 (1988).
- 25) Hashimoto F., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1383–1389 (1992).
- 26) Matsuo Y., Hayashi T., Saito Y., Kouno I., Tanaka T., *Tetrahedron*, **69**, 8952–8958 (2013).
- 27) Matsuo Y., Tadakuma F., Shii T., Saito Y., Tanaka T., *Tetrahedron*, **71**, 2540–2548 (2015).
- 28) Hirose S., Ogawa K., Yanase E., *Tetrahedron Lett.*, **57**, 2067–2069 (2016).
- 29) Matsuo Y., Li Y., Watarumi S., Tanaka T., Kouno I., *Tetrahedron*, **67**, 2051–2059 (2011).
- 30) Davis A. L., Lewis J. R., Cai Y., Powell C., Davis A. P., Wilkins J. P. G., Pudney P., Clifford M. N., *Phytochemistry*, **46**, 1397–1402 (1997).
- 31) Matsuo Y., Okuda K., Morikawa H., Oowatashi R., Saito Y., Tanaka T., *J. Nat. Prod.*, **79**, 189–195 (2016).
- 32) Nonaka G., Hashimoto F., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 61–65 (1986).