

ツバキ葉のサポニン分析法開発および エラジタンニン代謝に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 辻田 高明

[目的]

ツバキ (*Camellia japonica*, ツバキ科)は、日本の温暖な地方に分布する常緑広葉樹で、観賞用に広く栽培され種子からは高級化粧品が製造される。ツバキが多く自生する長崎の五島列島では地域活性化を目的として産学官連携によるツバキを使った新たな農産加工品の開発が行われており、その中で茶とツバキ葉を混合揉捻して製造する新しい機能性発酵茶が開発され販売されている。この発酵茶は、血小板凝集作用や胃粘膜保護作用などの機能性を持ち独特のえぐ味を呈するツバキ特有のサポニンを含んでおり、機能性と品質管理の観点から、著者はその簡便な定量法の開発を企図した。また、発酵茶を開発する過程でツバキ葉のエラジタンニンが4月の柔らかい新葉では主成分として検出されるが、7月の成長した硬葉ではほとんど検出されないことが分かった。エラジタンニン代謝は植物化学の分野で未解明のまま残されていることから、著者は、ツバキ葉におけるエラジタンニンの代謝を化学的に解明することを目的に研究を行った。

[方法と結果]

第1章 ツバキの成分分析

まず、花、葉、混合発酵茶、種子を搾油した後の油粕について、これまで検討されていない画分の成分について分離構造解析を行った。ツバキの花からは1種の新化合物 (**1**)と第2章でサポニンの定量に用いる camellioside A を分離した。また、混合発酵茶、ツバキ葉、油粕からはそれぞれ2種、3種、6種の既知化合物を分離した。

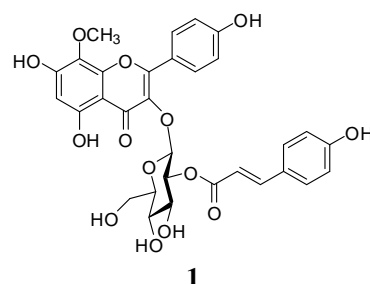


Fig. 1 Structure of **1**

第2章 ツバキサポニンの定量法

ここではツバキサポニンの定量法開発を行った。サポニンは紫外吸収が弱く、多量のポリフェノールが共存すると通常の HPLC では検出できない。また、茶葉にも構造の異なるサポニンが多種存在し、HPLC での保持時間が類似している。そこでツバキの主要なサポニンである camellioside A (**2**)を酸加水分解して得られる maragenin II (**3**)を検出する定量法を開発した (Fig. 2)。定量法で得られたツバキサポニンの含有量は実際にツバキ葉から分離したサポニンの収量とほぼ一致し、混合発酵茶製品中のサポニン定量に応用した。

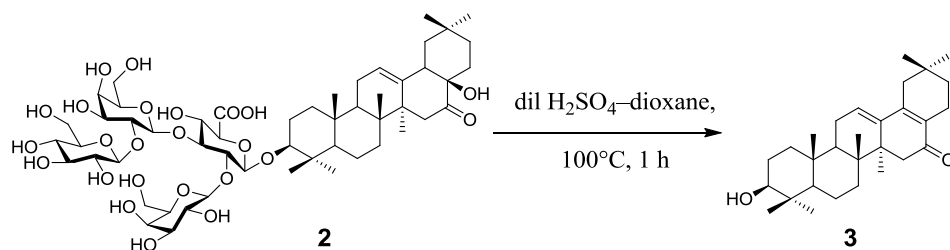


Fig. 2 Hydrolysis of camellioside A (**2**)

第3章 ツバキ葉のエラジタンニンの代謝

4月下旬の展開時期分析すると、葉の成長に伴い pedunculagin (4) と catechin (5) が減少していた (Fig. 3, 4)。成長したツバキ葉を分離しても 4 の代謝産物は検出できなかった。著者は、4 が酸化分解されていると考えて、試験管内でポリフェノール酸化酵素を持つナシ果実ホモジネートで 4 を処理したがほとんど分解しなかった。しかし、ツバキ葉中で 4 と共に減少する 5 を共存させて同様に酵素処理すると 4 は速やかに分解して複雑な混合物が生成した。そのうち2種の生成物 7 と 8 の分離に成功した (Fig. 5)。これらの構造は、各種スペクトルの解析と計算化学的手法

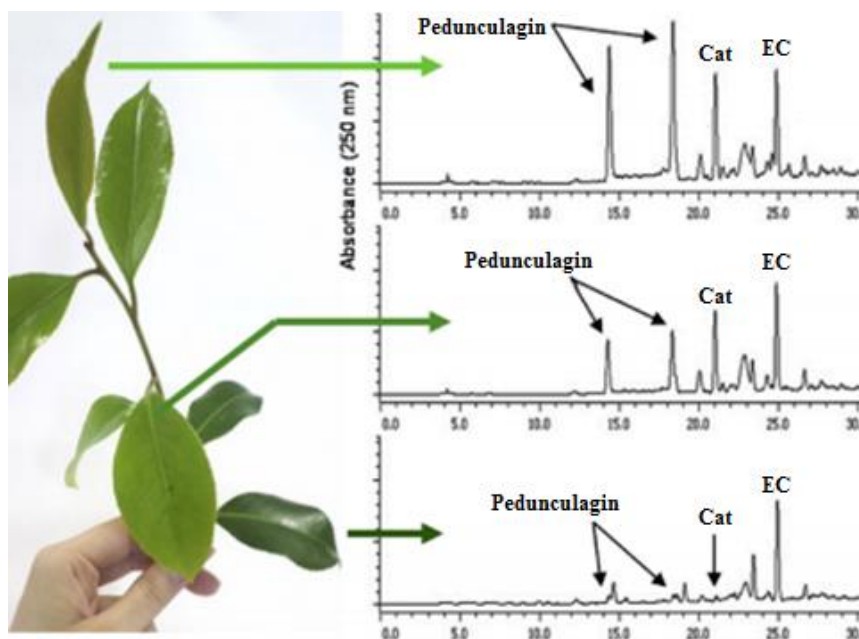


Fig. 3 HPLC profiles of 60% ethanol extracts of the leaves of *C. japonica*. Compound labels are: Cat, catechin; EC, epicatechin.

を応用して決定した。化合物 7 および 8 の生成機構については Scheme 1 のように、カテキンが酸化されて生じる *o*-キノンが 4 を酸化していると推定した。これらの化合物はナシ果実の代わりにツバキ葉の粗酵素を用いても生成した。

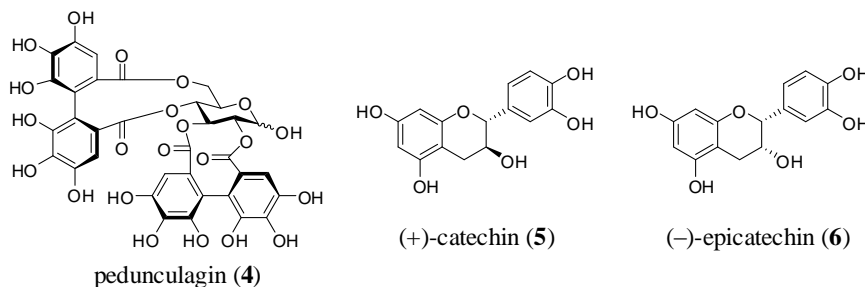


Fig. 4 Structures of 4-6

を応用して決定した。化合物 7 および 8 の生成機構については Scheme 1 のように、カテキンが酸化されて生じる *o*-キノンが 4 を酸化していると推定した。これらの化合物はナシ果実の代わりにツバキ葉の粗酵素を用いても生成した。

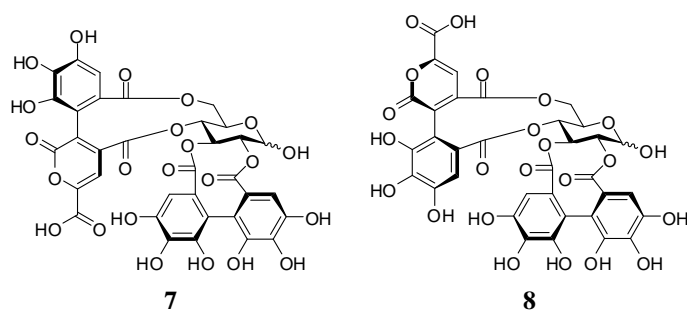
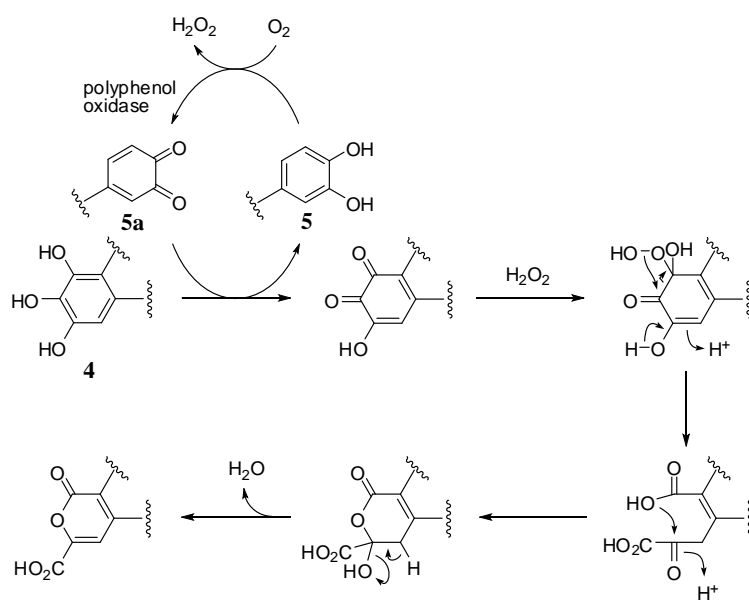


Fig. 5 Structures of 7 and 8

次に、この酸化分解がツバキ葉中でも実際に起こっているかを確かめるために、4 が減少し始める 5 月のツバキ葉の成分分離を行った。予想に反して 7 と 8 は検出されなかったが、ピロガロール環が同様の酸化開裂を起こした化合物 9 と 10 を分離した。このうち化合物 9 は新化合物であり、二次元 NMR スペクトル、計算化学的手法により構造を決定して、*camelliatannin I* と命名した。この結果から、7 と 8 から予想される反応機構とは異なるものの、ツバキ葉での 4 の減少には酸化的代謝が関係していることが示唆された。

次に、酸化酵素で 4 を処理した時に 7、8 と同時に生成していた高分子化合物に着目した。この高分子化合物は ^{13}C -NMR スペクトルとチオール分解、酸加水分解して

得られた生成物を HPLC で分析することにより、**4** とカテキン類の重合により生成したものと推定された。そこで **4** をほとんど含まない 7 月のツバキ成葉中から高分子ポリフェノールを分離し、同様の方法で構造を検討した。その結果、成葉中の高分子化合物は **4** の酵素処理により得られた高分子生成物と類似の ^{13}C -NMR スペクトルを示し、また、チオール分解と酸加水分解により、構成するはエラジタンニンとカテキン・プロシアニジンであることがわかった。次に成長度の異なる 4 月のツバキ新葉について精密な成分分析を行って、生葉における **4** の代謝を検討したところ、成長に伴い **4** を含む画分の量は減少していた一方で、量が増えた画分ではカテキン類が重合したプロシアニジン主成分であり、わずかにエラジタンニンの存在も確認された。



Scheme 1 Plausible oxidation mechanism.

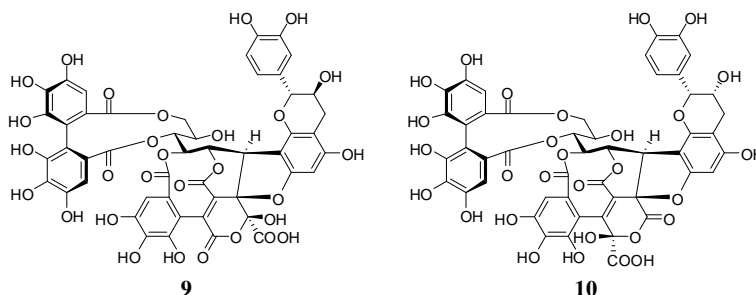


Fig. 6 Structures of **9** and **10**

[結論]

長崎県のツバキによる地域振興プロジェクトに貢献する目的で、ツバキの成分について研究を行った。まず、茶ツバキ混合発酵茶の品質管理を目的として、ツバキサポニンに特異的な反応性を応用した選択的かつ簡便なサポニン定量法を開発した。この方法は、今後ツバキの葉や花を機能性素材として利用する際に活用できると考えている。また、ツバキ葉の成長に伴い主成分のエラジタンニンが急激に減少する理由を化学的に明らかにするために、エラジタンニンの酵素酸化を検討した。その結果、ツバキ葉で共存するカテキンが酸化されて生成する *o*-キノンが間接的にエラジタンニンを酸化する反応機構を明らかにした。その反応をツバキ葉中で確認することはできなかったが、同様に酸化代謝で生成する新規エラジタンニンを分離して構造を決定した。さらにツバキ葉中ではエラジタンニンがカテキンやプロシアニジンと結合して高分子ポリフェノールに代謝されている可能性を明らかにした。他のポリフェノール類に比べてエラジタンニンの生合成や代謝についてはほとんど分かっていないことから、本研究で得られた結果は植物化学の分野で意義のあるものである。

[基礎となった学術論文]

1. Tsujita T, Matsuo Y, Saito Y, Tanaka T. Enzymatic oxidation of ellagitannin and a new ellagitannin metabolite from *Camellia japonica* leaves. *Tetrahedron*, **73**, 500–507 (2017).