

メチル化カテキンの抗酸化作用と抗老化作用

芳野恭士 *1・田中仁貴 *1・村松 勇 *1・宮内佑子 *2

Antioxidant Activity and Anti-aging Activity of Methylated Catechins

YOSHINO Kyoji *1, TANAKA Hitoki *1, MURAMATSU Yu *1, MIYAUCHI Yuko *2

Abstract: In this study, we investigated various antioxidant and anti-glycation effects of some methylated (-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG), which are metabolites of EGCG, a typical tea catechin. It is thought that the triol of the B ring is mainly involved in the radical scavenging effect, and the triol of the gallate group is in the metal chelating effect. (-)-Epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl) gallate (EGCG3"Me), (-)-epigallocatechin-3-*O*-(4-*O*-methyl) gallate (EGCG4"Me), and (-)-epigallocatechin-3-*O*-(3,4-*O*-dimethyl) gallate (EGCG3"4"diMe) in which the OH group of the gallate group is methylated, were used as the methylated EGCG. Methylation of the gallate group in EGCG did not affect DPPH azo-radical scavenging effect, but slightly lowered superoxide anion radical scavenging effect and some iron chelating effects. Regarding the glycation reaction of bovine serum albumin, the inhibitory effect on the formation of Amadori compounds was slightly weakened by methylation of EGCG, but the inhibitory effect on the formation of advanced glycation end products was not affected. From these results, methylated EGCG could have some antioxidant and anti-glycation activities, and they would be responsible for these effects in the body as the metabolites of EGCG.

Key Words: Methylated catechin, Antioxidant activity, Anti-aging activity

1. はじめに

令和3年の総務省の統計では、日本の総人口の28.9%を65歳以上の高齢者が占める。加齢に伴い増加する動脈硬化や糖尿病といった疾病、さらには老化の過程には、体内の酸化ストレスが関係していると考えられている[1-3]。我々の体内には酸化ストレスを制御する抗酸化系があるが[4]、食品中の抗酸化成分を摂取することはそれを補助して酸化ストレスを軽減するのに役立っているものと思われる。日本などで飲用されているチャ (*Camellia sinensis* L.) の葉を加工した緑茶には、ポリフェノール成分としてカテキン類が約15% (w/w 葉) 含まれている[5]。そのうちの約半分は、(-)-エピガロカテキン-3-*O* ガレート (EGCG) である。EGCGはその含量が多だけでなく、*in vitro* における抗酸化力が他のカテキン類よりも強く[6,7]、また、*in vivo* においても抗酸化作用を示すことが確認されている[8]。

in vitro での抗酸化作用とは異なり、*in vivo* における同

作用を理解するためには、動物におけるカテキン類の吸収と代謝を考える必要がある。EGCGなどのカテキン類は、小腸から吸収されたのちにメチル化、グルクロン酸抱合、硫酸抱合、環開裂などの反応を受ける[9]。このうちメチル化を起こす酵素は小腸や肝臓、腎臓等に存在するカテコール-*O*-メチルトランスフェラーゼ(COMT)であり、*in vitro* での実験[10,11]やマウスやラットにEGCGを静脈内投与した*in vivo* での実験等[11-13]で、EGCGから(-)-エピガロカテキン-3-*O*-(3-*O*-メチル)ガレート (EGCG3"Me) や (-)-エピガロカテキン-3-*O*-(4-*O*-メチル)ガレート (EGCG4"Me)、さらには4-*O*-メチル(-)-エピガロカテキン-3-*O* ガレートや4-*O*-メチル(-)-エピガロカテキン-3-*O*-(4-*O*-メチル)ガレートのようなガレート基やB環の水酸基がメチル化されたものが生成されることがわかっている。従って、動物に投与されたEGCGがその体内で抗酸化作用を発揮する場合、EGCG自体の抗酸化作用だけでなく、メチル化体などの代謝物の作用も寄与している可能性がある。EGCG3"MeやEGCG4"Meは、EGCGと比較して動物に経口投与した場合の血中濃度が高く、静脈内投与での血中消失も穏やかであることがわかっており[14,15]、血中でのアルブミンとの結合性もEGCGより低く遊離の状態で存在する可能性が高い[16]。また、我々は、

*1 物質工学科

Department of Chemistry & Biochemistry

*2 専攻科応用物質工学専攻

Advanced Course, Chemistry & Biochemistry Course

これらのメチル化 EGCG にマウスの I 型および IV 型アレルギーに対する強い抗アレルギー作用があることを見出している[17,18]。

本研究では、EGCG のメチル化体として EGCG3''Me および EGCG4''Me を用い、EGCG の抗酸化作用の機序として知られるラジカル消去作用[19]と金属キレート作用[20]について、EGCG との比較を行った。また、抗酸化作用が関与すると予想される終末糖化産物 (AGEs) 形成反応に対する抑制作用[21]についても検討した。化学構造の特性とその作用の関係を確認するため、構造類似の化合物として、(-)-エピガロカテキン-3-*O*-(3,4-*O*-ジメチル)ガレート (EGCG3''4''diMe)、(-)-エピガロカテキン (EGC) および(-)-エピカテキン-3-*O*-ガレート (ECG) についても同様に検討した。

2. 材料および方法

2. 1 用いたカテキン類

EGCG およびそのガレート基の 3''位がメチル化された EGCG3''Me、4''位がメチル化された EGCG4''Me、3''位と 4''位がメチル化を受けた EGCG3''4''diMe、また、EGCG のガレート基がない EGC と EGCG の B 環がトリオールではなく σ -ジオールになっている ECG を用いた。EGC と ECG はシグマ-アルドリッチ社製のものを、また、それ以外の化合物は名古屋女子大学佐野満昭教授より供与していただいたものをそれぞれ用いた。これらの化合物の化学構造を図 1 に示す。

2. 2 ラジカル消去作用の測定

EGCG とメチル化 EGCG、EGC、ECG のラジカル消去作用の強さを、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) アゾラジカル消去反応[22]およびフェナジメトスルフェート-ニトロブルー-テトラゾリウム法を用いたスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) 消去反応[23]を用いて測定した。用いた試料の最終濃度は、それぞれ 25 μ M と 10 μ M とした。結果はそれぞれのラジカル消去率で示し、3 回の実験の平均値±標準偏差で表記した。

2. 3 鉄イオン捕捉作用の測定

EGCG とメチル化 EGCG、EGC、ECG の鉄イオン捕捉作用の強さを、酒石酸鉄法を用いた 2 価鉄キレート反応[24]、デオキシリボース法を用いた 3 価鉄キレート反応[25]、さらにはマウス脳自動酸化反応[26]を用いて測定した。2 価鉄捕捉作用は、最終濃度 165 μ M の試料を用いた時のキレートの発色の強さを、EGCG の発色を 100 として表記

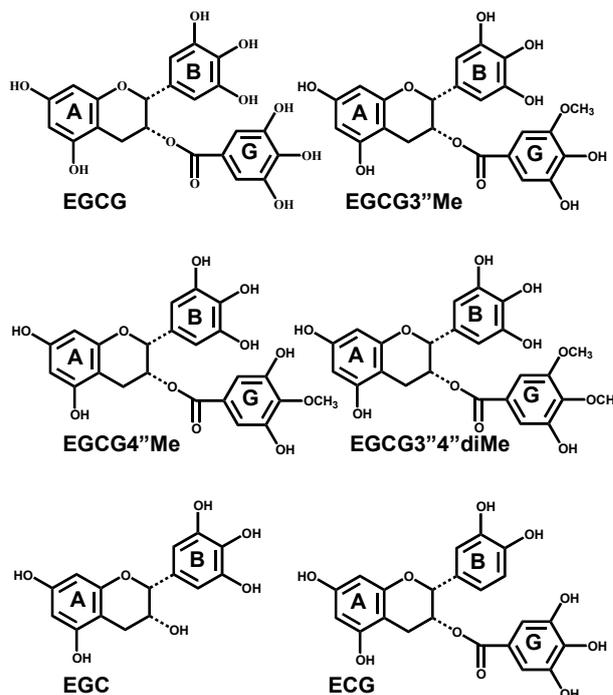


図 1 EGCG およびその関連化合物の化学構造

した。3 価鉄捕捉作用は、15.16 μ M でのカテキン類 1 mol に対して結合した鉄の mol 数で表記した。どちらも 3 回の実験の平均値±標準偏差で表記した。マウス脳自動酸化反応は、用いた試料の濃度とその時の反応抑制率との関係から 50%抑制濃度 (IC₅₀ 値) を算出し、3 回の実験の平均値を求めた。

2. 4 半経験的分子軌道計算法による O 原子の部分電荷の算出

EGCG とメチル化 EGCG、EGC、ECG の B 環およびガレート基の水酸基およびメトキシ基の O 原子の部分電荷を、半経験的分子軌道計算法により算出した。計算にはコンピューターを用い、ソフトウェアとして Cambridge Soft 社製 CS Chem3D Pro ver.5.0 を使用した。このソフトウェアに付属の MOPAC (計算パラメーターは PM3 法) で生成熱の最小化を行った後、拡張ヒュッケル法で部分電荷をそれぞれ計算した。

2. 5 抗糖化作用の測定

EGCG とメチル化 EGCG、EGC、ECG の抗糖化作用の強さを、牛血清アルブミンと D-グルコースの反応で生じるアマドリ化合物と AGEs を測定する評価系[27]で検討した。得られた抑制率と使用した試料の濃度の関係から IC₅₀ 値を算出した。3 回の実験の平均値±標準偏差で表記した。

表 1 EGCG およびその関連化合物の抗酸化作用

	EGCG	EGCG3"Me	EGCG4"Me	EGCG3"4"diMe	EGC	ECG
DPPH 消去作用	47.9 ± 3.7	54.2 ± 5.0	55.3 ± 6.1	52.0 ± 5.8	45.8 ± 0.9	45.0 ± 1.6
O ₂ ⁻ ・消去作用	21.7 ± 7.6	9.7 ± 3.9	12.8 ± 8.2	0.9 ± 2.6	14.4 ± 0.3	27.2 ± 0.1
2 価鉄捕捉作用	100 ± 0.3	64.8 ± 0.6	46.2 ± 0.5	28.7 ± 0.5	68.9 ± 1.2	98.9 ± 3.2
3 価鉄捕捉作用	0.74 ± 0.01	0.70 ± 0.02	0.53 ± 0.02	0.52 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.96 ± 0.01
B 環 O 部分電荷	-0.280~-0.241	-0.280~-0.246	-0.279~-0.242	-0.283~-0.236	-0.278~-0.255	-0.277~-0.269
G 基 O 部分電荷	-0.278~-0.245	-0.260~-0.209	-0.267~-0.193	-0.265~-0.196	—	-0.265~-0.251
Amd 抑制作用	0.16 ± 0.04	0.30 ± 0.06	0.41 ± 0.14	0.26 ± 0.06	1.00 ± 0.28	0.21 ± 0.02
AGEs 抑制作用	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.28 ± 0.05	0.38 ± 0.06	0.34 ± 0.06

平均±標準偏差. G 基:ガレート基.

DPPH 消去作用: 25 μM での消去率(%), O₂⁻・消去作用: 10 μM での消去率(%), 2 価鉄捕捉作用: 165 μM での EGCG を 100 とした相対値, 3 価鉄捕捉作用: 15.16 μM でのカテキン 1 mol に結合する鉄の mol 数, Amd 抑制作用: アマドリ化合物形成抑制作用の IC₅₀ 値(mM), AGEs 抑制作用¹: AGEs 形成抑制作用の IC₅₀ 値(mM).

3. 結果および考察

3. 1 DPPH アゾラジカル消去作用

EGCG とそのメチル化体、EGC および ECG の 25 μM における DPPH アゾラジカル消去作用の測定結果について表 1 に示す。用いたすべてのカテキン類において、著しい作用の強さの違いは見られず、EGCG のメチル化体の作用はわずかに EGCG よりも高い傾向が見られた。

EGCG では、ガレート基と異なり B 環にはエステルカルボニル基がないため、B 環のトリオールは σ キノンとして共鳴構造を取った後さらに残りの OH 基もラジカルとして安定するために、他のラジカルとの反応が速い。一方、ガレート基のトリオールはエステルカルボニル基の共役二重結合のためキノンにならずにラジカルとして安定化することから、他のラジカルとの反応が遅い[28-31]。また、B 環の OH 基に HOMO が、ガレート基の OH 基に LUMO があるため、B 環の OH 基の方が他のラジカルへの電子供与性が高い[32]。そのため、EGCG のガレート基のメチル化は、DPPH ラジカル消去における初期反応にはあまり影響しなかったものと考えられる。B 環が σ ジオールである ECG では、B 環にできる σ キノンが共役しないために、ガレート基のトリオールの方が速やかにラジカルと反応するものと考えられる[30]。β-カロテンの脱色反応を利用したリノール酸の酸化物に対する還元作用において、EGCG と EGCG3"Me の作用の強さに差は見られない[33]。また、ECG とそのガレート基のメチル化体での DPPH ラジカル消去作用の比較でも、その強さに差が見られないという報告がある[34]。

なお、これまでに同様の測定系で EGCG の方が EGCG3"Me よりわずかに作用が強いという報告があるほか[35]、DPPH と同様に水溶性のラジカル発生剤である 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)ニ塩酸塩に対する消去作用でも EGCG>EGCG3"Me>EGCG4"Me>EGCG3"4"diMe の順にその作用が強いという報告もあり[36]、評価系の反応条件等により異なる結果となる可能性がある。特に、反応の初期と後期では、その評価結果が異なる場合があるものと予想される。

3. 2 O₂⁻・消去作用

EGCG とそのメチル化体、EGC および ECG の 10 μM における O₂⁻・消去作用の測定結果について表 1 に示す。DPPH ラジカルの場合と異なり O₂⁻・消去作用では、EGCG のガレート基のメチル化はその作用を弱めた。また、ガレート基を持つ ECG の作用が EGCG と同様に強かったのに対し、ガレート基を持たない EGC の作用は EGCG に比較して弱かった。

先に述べたように、ラジカル消去において EGCG のガレート基よりも B 環のトリオールの方が反応性が速いとされているが、OH 基のメチル化はその化合物の疎水性を高めることが知られている[35,37,38]。O₂⁻・は O₂ 分子が 1 電子還元を受けて生じるラジカルであり、活性酸素種の中では O₂ 分子に次いで疎水性が高いものと考えられる。EGCG のメチル化体は、メチル化によって疎水性の高まったガレート基が O₂⁻・と反応し易くなった一方で、メチル化により OH 基が減少していることで作用の低下が見られた可能性がある。ECG はそのガレート基がメチル化さ

れてはいないが、EGC に比較してベンゼン環が 1 つ増えて疎水性が増したことで、強い作用を示したことが予想される。低比重リポ蛋白の酸化反応において、(+)-カテキンの A 環の 5 位と 7 位がメチル化されたものの方が(+)-カテキンより強い作用を示したという報告がある[37]。

なお、より高い濃度の 22 mM で同様の作用を検討したところ、EGCG、EGCG3"Me、EGCG4"Me のそれぞれの O_2^- 消去率は 68.3 ± 6.6 、 65.9 ± 1.0 、 60.5 ± 1.3 となり、作用の強さに大きな差は認められなかった。そのため、DPPH ラジカルの場合と同様、評価系の実験条件が結果に影響する可能性があるものと考えられる。

3. 3 2 価鉄捕捉作用

鉄などの遷移金属は酸化反応を触媒することが知られており、それを捕捉することで酸化反応を抑制することができる。EGCG とそのメチル化体、EGC および ECG の 165 μM における 2 価鉄捕捉作用の測定結果について表 1 に示す。2 価鉄捕捉作用では、EGCG のガレート基のメチル化はその作用を弱めた。また、ガレート基を持つ ECG の作用が EGCG と同様に強かったのに対し、ガレート基を持たない EGC の作用は EGCG に比較して弱かった。これらの結果は、2 価鉄捕捉作用にも O_2^- 消去作用と同様にガレート基のトリオールが重要であることを示している。

ラジカル消去作用の場合と異なり、脱プロトン化しやすいガレート基の σ ジオールの O 原子は、鉄に電子を供与して配位結合を形成しやすいものと考えられる[32]。ECG においても、B 環の σ ジオールよりガレート基のトリオールが鉄の配位に重要であり、トリオール中の σ ジオールによる鉄の配位は、共鳴構造を取れるためにただの σ ジオールよりも作用が強いものと考えられる[39]。また、ガレート基の存在は、B 環と鉄との複合体形成において立体障害となる可能性もある。脱プロトン化は、ガレート基の 4"位の OH 基で最も起こりやすく、4"位がメチル化されている場合には 3"位の OH 基で起こりやすいものの、4"位のメチル化はその鉄との複合体形成能を著しく低下させるとされている[32]。EGC のようにガレート基がない場合には、B 環のトリオール中の σ ジオールが鉄捕捉作用を示すものと考えられるが、その作用はガレート基を持つ EGCG や ECG と比較して弱かった。

3. 4 3 価鉄捕捉作用

EGCG とそのメチル化体、EGC および ECG の 15.16 μM における 3 価鉄捕捉作用の測定結果について表 1 に示す。2 価鉄捕捉作用の場合と同様、3 価鉄捕捉作用でも

EGCG のガレート基のメチル化はその作用を弱めた。また、ガレート基を持つ ECG の作用が EGCG と同様に強かったのに対し、ガレート基を持たない EGC の作用は EGCG に比較して弱かった。従って、3 価鉄捕捉作用にもガレート基のトリオールが重要であることが確認された。

3 価鉄を還元する作用についても、B 環の 4"位の HOMO が重要であり、EGCG>EGCG3"Me>EGCG4"Me の順に強いことが報告されている[32]。

3. 5 鉄誘発自動酸化反応に対する抑制作用

動物の脳のホモジネートをインキュベートすると、内在する鉄により脳内脂質の自動酸化反応が起こることが知られており、この反応はラジカル消去作用よりも鉄の捕捉作用により効果的に抑制されるものと考えられている[26]。EGCG3"Me の IC_{50} 値は 4.20 μM で、EGCG の 2.06 μM よりも高く、鉄誘発自動酸化反応に対する抑制作用はガレート基のメチル化で低下した。この結果は、2 価鉄や 3 価鉄の捕捉作用の結果と一致していた。

3. 6 B 環とガレート基の OH 基の O 原子の部分電荷

これまでに、MOPAC-PM5 法による半経験的分子軌道計算法を用いて O 原子の電子密度を計算した結果では、EGCG3"Me、EGCG4"Me、EGCG3"4"diMe を含む様々なメチル化 EGCG の構造中に含まれる O 原子の電子密度は、EGCG と大きな違いはないことが報告されている[40]。しかし、前項までの実験結果からメチル化を受けた O 原子の反応性が異なることが予想されたため、MOPAC-PM3 法と拡張ヒュッケル法により、これらの化合物の B 環とガレート基に存在する OH 基の O 原子の部分電荷を計算した。その結果を表 1 に示す。値は、それぞれ 3 回計算した結果の下限と上限を範囲で表示した。B 環の O 原子については、メチル化を受けていないため、どの化合物でも -0.23 以下の高い負電荷が確認された。一方、ガレート基の O 原子については、EGCG や ECG では -0.24 以下の高い負電荷が認められたのに対し、メチル化を受けたものは -0.209 ~ -0.193 と負電荷が低下しており、ガレート基の OH 基の反応性が低下していることが推測された。なお、EGCG の B 環の 4"位がキノンとなった化合物の B 環の部分電荷は -0.529 まで強まり、その反応性がより高い状態にあることが推測された。

計算で得られた O 原子の部分電荷のそれぞれの範囲の中央値と本実験で得られた種々の抗酸化作用との間の相関性を、F 検定で検討した。ガレート基の O 原子の部分電荷と O_2^- 消去作用および 2 価鉄捕捉作用の間で、それぞれ $\gamma = 0.862$ 、 $\gamma = 0.943$ の有意な正の相関が認められた。ま

た、有意ではなかったものの、ガレート基の O 原子の部分電荷と 3 価鉄捕捉作用の間で $\gamma = 0.781$ の正の相関傾向が認められた。これらの結果から、それぞれの抗酸化作用にガレート基の OH 基の反応性が重要であることが再確認された。一方、B 環の OH 基の O 原子の部分電荷については、DPPH アゾラジカル消去作用および O_2^- 消去作用との間の相関係数は、それぞれ $\gamma = -0.723$ 、 $\gamma = 0.681$ となり、B 環の OH 基の O 原子の部分電荷以外の要因が関与していることが推測された。

3. 7 抗糖化作用

加齢とともに体内のタンパク質は糖化反応を受け、不可逆的な最終産物として AGEs が産生、蓄積される。AGEs は、タンパク質と糖類からの Schiff 塩基の形成、アマドリ化合物の形成、反応性の高いカルボニル化合物の形成等を経て形成され、その量は特に糖尿病をはじめとする生活習慣病患者で高まることが知られている[41]。AGEs の形成過程には酸化反応やラジカルが関与する反応が含まれており、抗酸化作用を有する物質は糖化反応の進行を抑制するものと考えられる[21]。緑茶の抽出物とそのカテキン成分もタンパク質の糖化を抑制することが報告されており、その効果には 3 位のガレート基や B 環のトリオール構造の存在が重要とされている[42]。

EGCG とそのメチル化体、EGC および ECG のウシ血清アルブミンの糖化反応に対する抑制作用における IC_{50} 値を表 1 に示す。糖化の中間段階であるアマドリ化合物の形成に対する抑制作用では、EGCG のガレート基のメチル化はその作用を弱めた。また、ガレート基を持つ ECG の作用は EGCG に比較してわずかに弱かったのに対し、ガレート基を持たない EGC の作用はその他のカテキンに比較して極めて弱かった。アマドリ化合物の形成に対する IC_{50} 値とガレート基の OH 基の O 原子の部分電荷の間には、 $\gamma = -0.834$ の負の有意な相関が見られ、 O_2^- 消去作用や鉄捕捉作用の場合と同様にガレート基の重要性が示唆された。次に、最終産物である AGEs の形成に対する抑制作用でも、EGCG のガレート基のメチル化はその作用をわずかに弱めた。また、ECG と EGC の作用も EGCG に比較してわずかに弱かった。これらのカテキンのアマドリ化合物形成抑制作用と AGEs 形成抑制作用の間には、 $\gamma = 0.678$ の弱い相関傾向が見られた。AGEs の形成過程は複雑であることから、それぞれの化合物の作用に大きな差が見られなかった可能性があるが、EGCG 以外の化合物の作用が EGCG よりも弱かったことから、その B 環とガレート基のトリオール構造が総合的に本作用に機能しているものと考えられる。

また、EGCG、EGCG3"Me および EGCG4"Me の抗糖化作用の強さは、ウシ血清アルブミンに対する結合性[43]の強さの順と同じであったことから、EGCG のガレート基のメチル化がアルブミンタンパク質との相互作用を弱めたことでその糖化反応を抑制する効果も低下した可能性が考えられる。カテキンとタンパク質の相互作用の一例として、ヒアルロニダーゼ活性阻害作用がある。ヒアルロン酸を分解する酵素であるヒアルロニダーゼは、皮膚におけるシワやタルミの形成、細菌感染症や炎症などに関与している。ヒアルロニダーゼの活性中心にあるリジンの正電荷とイオン相互作用して複合体を形成できる負電荷を持つ高分子は、その活性を阻害するという報告がある[44]。EGCG は高分子ではないが、ヒアルロニダーゼ活性を阻害する効果があることが知られており[45]、その B 環やガレート基の OH 基の O 原子に負の部分電荷を持っている。そこで EGCG とそのメチル化物等について、鶏冠製ヒアルロン酸ナトリウムをウシ精巣由来ヒアルロニダーゼで分解する反応系[46,47]を使用して、その活性阻害作用を検討した。最終濃度 0.25mM における EGCG、EGCG3"Me、EGCG4"Me、EGCG3"4"diMe の阻害率はそれぞれ $38.6 \pm 0.1\%$ 、 $35.1 \pm 3.4\%$ 、 $31.8 \pm 2.3\%$ 、 $38.0 \pm 2.7\%$ とほぼ違いが見られなかった。そのため、この作用に関してはガレート基のメチル化の影響は受けず、B 環の OH 基の O 原子の負の部分電荷が機能しているものと推測される。

体内における AGEs の分布と量については、高脂食と 60 mg/kg 体重の AGEs を毎日 12 週間摂取したラットの体内では、腎臓や心臓、膵臓などに約 150 $\mu\text{g/g}$ 乾燥臓器重量の AGEs が蓄積したという報告がある[48]。一方で、250 mg/kg 体重の EGCG を 27 日間摂取した後、250 mg/kg 体重の EGCG を静脈内注射して 1 時間後のイヌの血漿中 EGCG およびその代謝物の合計濃度は約 40 $\mu\text{g/mL}$ であり、腎臓、心臓、膵臓における濃度はそれぞれ約 25 $\mu\text{g/g}$ 、約 10 $\mu\text{g/g}$ 、約 10 $\mu\text{g/g}$ であった[49]。また、同研究における 250 mg/kg 体重の EGCG を単回経口投与したイヌの 1 時間後の EGCG およびその代謝物の合計の血中濃度は約 90 $\mu\text{g/mL}$ であった。EGCG およびその代謝物中の遊離の EGCG の量については、100 mg/kg 体重の EGCG を単回経口投与したマウスの 30 分後の EGCG とその抱合体の合計量に対する EGCG そのものの割合は約 29% であるという報告があるため[50]、先述のイヌの場合にも、その 1/3 程度は遊離の EGCG が占めている可能性はある。本実験における EGCG の抗糖化作用における IC_{50} 値は約 0.2 mM であり、これは 91.7 $\mu\text{g/mL}$ に相当する。また、マウスに対して 100 mg/kg 体重を単回経口投与した場合、EGCG3"Me は遊離体で EGCG の約 9 倍、グルクロン酸と

硫酸の抱合体を含めた総量でも約6倍と血漿中濃度が高く、また、EGCG3"Me、EGCG4"Meともに、25 $\mu\text{mol/kg}$ 体重でのマウスへの静脈内注射後の血漿からの消失がEGCGに比較して緩やかであることが報告されている[14]。そのため、EGCGとその代謝物であるメチル化体は、どちらもEGCGを摂取した際の動物体内での抗糖化作用に寄与するものと推測される。

4. まとめ

本研究では、代表的な茶カテキンであるEGCGの体内代謝物の一つであるそのメチル化体について、種々の抗酸化作用と抗糖化作用を検討した。

EGCGの強い抗酸化作用には、そのB環とガレート基のトリオールが機能しており、B環のトリオールは主にラジカル消去作用に、ガレート基のトリオールは主に金属の捕捉作用に関与すると考えられる。今回用いたEGCGのメチル化体は、ガレート基のOH基がメチル化されたEGCG3" Me、EGCG4" MeおよびEGCG3" 4" diMeであることから、DPPHアゾラジカル消去作用に対してはメチル化の影響はほぼ見られなかったが O_2^- ・消去作用に対してはメチル化で作用が弱まり、ラジカル種によって作用の強さが異なることがわかった。鉄の捕捉作用に対しては、ガレート基のOH基のメチル化は作用を弱めた。用いたカテキンのガレート基のOH基のO原子の負の部分電荷が強いほど、 O_2^- ・消去作用および鉄捕捉作用が強かった。

ウシ血清アルブミンの糖化反応に対しては、初期反応であるアマドリ化合物の形成に対する抑制作用は、EGCGのガレート基のメチル化で弱まり、その作用の強さとガレート基のOH基のO原子の部分電荷との間に相関が見られた。一方で、複雑な過程を経て形成される最終的なAGEsについては、EGCGのガレート基のメチル化はその形成抑制作用に大きな影響を与えなかった。AGEsは、その受容体を介して認識された後、それ自身が生体内で酸化ストレスを増長することが知られていることから[51]、カテキンのように強い抗酸化作用を有する化合物は、AGEsの形成の抑制とAGEsによる酸化ストレスの抑制の両方に効果が期待できる。

以上の結果から、ガレート基のOH基がメチル化を受けたEGCGにも抗酸化作用や抗糖化作用が認められ、茶を摂取した際の体内でのこれらの作用には、EGCGの代謝物であるメチル化体も関与していることが推測された。

参考文献

- [1] Tappel, Al. L. (1975): Pathobiology of Cell Membranes 1, Academic Press, pp.145-170.
- [2] Sato, Y., Hotta, N., et al. (1979): *Biochem. Med.*, **21**, 104-107.
- [3] Harman, D. (1956): *J. Gerontol.*, **11**, 298-300.
- [4] 五十嵐 修 (1986): 過酸化脂質と栄養, 光生館, pp.73-92.
- [5] 山本(前田)万里, 佐野満昭, 他 (2001): 日本食品科学工学会誌, **48**, 64-68.
- [6] 松崎妙子, 原 征彦 (1985): 日本農芸化学会誌, **59**, 129-134.
- [7] Yoshino, K., Hara, Y., et al. (1994): *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 146-149.
- [8] 芳野恭士, 涇原 寛, 他 (2006): *J. Technol. Educ.*, **13**, 1-7.
- [9] Sang, S., Lambert, J. D., et al. (2011): *Pharmacol. Res.*, **64**, 87-99.
- [10] Okushio, K., Suzuki, M., et al. (1999): *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 430-432.
- [11] 佐野満昭, 宮瀬敏男, 他 (2000): *FOOD Style* **21**, **4**, 72-74.
- [12] Kohri, T., Nanjo, F., et al. (2001): *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1042-1048.
- [13] Spencer, J. P. E. (2003): *J. Nutr.*, **133**, 3255S-3261S.
- [14] 佐野満昭, 宮瀬敏男, 他 (2000): *Fragrance Journal*, **2000**, 46-52.
- [15] Chen, D., Wang, C. Y., et al. (2005): *Biochem. Pharmacol.*, **69**, 1523-1531.
- [16] Oritani, Y., Setoguchi, Y., et al. (2013): *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 1577-1582.
- [17] Sano, M., Suzuki, M., et al. (1999): *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1906-1910.
- [18] Suzuki, M., Yoshino, K., et al. (2000): *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5649-5653.
- [19] Bors, W., Saran, M. (1987): *Free Radic. Res. Commun.*, **2**, 289-294.
- [20] Morel, I., Lescoat, G., et al. (1993): *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 13-19.
- [21] Yagi, M., Sakiyama, C., et al. (2023): *Glycative Stress Res.*, **10**, 6-15.
- [22] Todaka, D., Takenaka, Y., et al. (1999): *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, **46**, 34-36.
- [23] Nishikimi, M., N.A. Rao, N. A., et al. (1972):

- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 849-854.
- [24] 岩浅 潔, 鳥井秀一 (1962): 茶業技術研究, **26**, 87-91.
- [25] Moran, J. F., Klucas, R. V., *et al.* (1974): *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 861-870.
- [26] Stocks, J., Gutteridge, J. M. C., *et al.* (1974): *Clin. Sci. Mol. Med.*, **47**, 215-222.
- [27] 吉川雅之, Yutana, P., 他 (2003): 薬学雑誌, **123**, 871-880.
- [28] Guo, Q., Zhao, B., *et al.* (1996): *Biochim. Biophys. Acta*, **1304**, 210-222.
- [29] Mochizuki, M., Yamazaki, S., *et al.* (2002): *Biochim. Biophys. Acta*, **1569**, 35-44.
- [30] 澤井祐典 (2007): 野菜茶業研究所研究報告, **6**, 23-58.
- [31] Sang, S., Yang, I., *et al.* (2007): *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 362-371.
- [32] Nakagawa, H., Hasumi, K., *et al.* (2007): *Biochem. Pharmacol.*, **73**, 34-43.
- [33] Kawase, M., Wang, R., *et al.* (2000): *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2218-2220.
- [34] Agbo, M. O., Lai, D., *et al.* (2013): *Fitoterapia*, **86**, 78-83.
- [35] 石山絹子, 西村肅見, 他 (2013): 日本食品科学工学会誌, **60**, 339-346.
- [36] Sano, M., Yoshida, R., *et al.* (2003): *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2912-2916.
- [37] Cren-Olive, C., Teissier, E., *et al.* (2003): *Free Rad. Biol. Med.*, **34**, 850-855.
- [38] Sano, M., Yoshida, R., *et al.* (2004): Proc. 2004 ICOS, pp.524-525.
- [39] Hashimoto, F., Ono, M., *et al.* (2003): *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 396-401.
- [40] Daniel, K., Landis-Piwowar, K. R., *et al.* (2006): *Int. J. Mol. Med.*, **18**, 625-632.
- [41] Dyer, D. G., Dunn, J. A., *et al.* (1993): *J. Clin. Invest.*, **91**, 2463-2469.
- [42] Nakagawa, T., Yokozawa, T., *et al.* (2002): *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2418-2422.
- [43] 渡邊章子, 速水美穂, 他 (2006): 第60回日本栄養・食糧学会総会講演要旨集, p.198.
- [44] 山元裕太, 佐田宏子, 他 (2019): 日本食品科学工学会誌, **64**, 429-436.
- [45] 前田有美恵, 山本政利, 他 (1990): 食品衛生学雑誌, **31**, 233-237.
- [46] 沢辺善之, 岩上正蔵, 他 (1990): 衛生化学, **36**, 314-319.
- [47] 玉川浩司, 飯塚崇史, 他 (1999): 日本食品科学工学会誌, **46**, 521-527.
- [48] Li, M., Zeng, M., *et al.* (2015): *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 10995-11001.
- [49] Swezey, R. R., Aldridge, E. D., *et al.* (2003): *Int. J. Toxicol.*, **22**, 187-193.
- [50] Sano, M., Suzuki, M., *et al.* (2000): Proc. Polyphenols Commun. 2000, p.453.
- [51] Yamagishi, S., Imaizumi, T. (2005): *Curr. Pharm. Des.*, **11**, 2279-2299.