



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

メタボロミクス解析による発酵茶高分子ポリフェノールの構造研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2024-06-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊藤, 歩未 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/0002000734

メタボロミクス解析による発酵茶高分子ポリフェノールの
構造研究

2023 年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学

(岐阜大学)

伊藤 歩未

メタボロミクス解析による発酵茶高分子ポリフェノールの

構造研究

伊藤 歩未

序論	1
1 章 紅茶加工中の茶ポリフェノールの変化	
1-1 カテキン類、テアフラビン類、テアルビジンの定量	7
1-2 紅茶製造過程サンプルの UPLC-MS 測定	12
1-3 主成分分析を用いた候補化合物の探索	16
1-4 候補化合物の反応性の検討	23
2 章 虫の摂食が茶の不揮発性成分に与える影響	
2-1 研究経緯	26
2-2 試験区の設定	27
2-3 害虫の発生状況	27
2-4 カテキン類、テアフラビン類、カフェイン定量	29
2-5 OPLS-DA による無防除区で特徴的な成分の探索	33
2-6 分子ネットワーク解析	36
2-7 紅茶製品に対する虫の摂食の影響	41
結語	46
実験の部	47
参考文献	67
謝辞	74

序論

茶はチャノキ(*Camellia sinensis*)の葉や茎からつくられ、世界中で親しまれている嗜好性飲料である。茶はその製造方法によって、未発酵の緑茶、半発酵のウーロン茶、完全発酵の紅茶に分類される。また、茶の品種は大きく中国種(*var. sinensis*)とアッサム種(*var. assamica*)の2つに分類される。中国種は低木で葉が小さく、アッサム種は高木で葉が大きいという特徴があり、中国種は緑茶向け、アッサム種は紅茶に向くとされている。茶の生産は、中国、インド、日本などのアジア地域に加え、アフリカや南米地域でも行われており、近年ではニュージーランドなどでも生産されている。2019年の世界の茶の生産量は約615万トンであり、そのうち約6割が紅茶、約3割が緑茶であった[1]。また、茶は今後さらなる需要の拡大が見込まれている。一方で、日本国内での緑茶の生産量は近年約8万トンで推移している[2]。日本における主要な産地は静岡県、鹿児島県、三重県などであり、主に緑茶が生産されている。茶は茶期によって価格が変動し、2022年の煎茶では、荒茶1kg当たり1番茶は1944円、2番茶は725円、3番茶は477円であった[3]。そのため、近年2番茶以降の茶に付加価値をつけるために、和紅茶が多く製造されている。

茶には、糖、アミノ酸やたんぱく質、ポリフェノール類、カフェイン、有機酸などの成分を含んでいる。茶に特徴的な成分として、テアニン(アミノ酸)があり、茶のうま味成分として知られている。緑茶においては上級なものほどテアニンの含有量が高い。また、茶には多くのポリフェノールやフェノール酸が含まれており、茶に含まれる主要なポリフェノールとしてエピカテキン(EC)、エピカテキンガレート(ECg)、エピガロカテキン(EGC)、エピガロカテキンガレート(EGCg)の4種類のカテキンが知られている(Fig. 1A)。緑茶に機能性はカテキン類に起因していると考えられている。カテキン、特にガレート型カテキンであるEGCgは基底膜の構成成分もラミニンに結合しているたんぱく質であり、細胞膜上に存在している67kDaラミニンレセプター(67LR)に結合することで、がん細胞の増殖抑制作用やアポトーシス誘導作用を示す[4]。また、EGCgが67LRに結合することで、ミオシン軽鎖のリン酸化を抑制、ヒスタミンの放出が抑制され、抗アレルギー作用を示す。カテキン類は他にも、抗酸化作用や抗菌作用、抗高血圧作用、コレステロール調節作用などが

知られている[5,6]。

発酵茶におけるカテキン類の酸化

カテキン類は紅茶加工中の揉捻・発酵過程において、茶葉自身の持つ酵素によって酸化され、テアフラビンなどの 2 量体やテアルビジンといった様々な重合体に変換される。紅茶は緑茶とは異なる生理活性が報告されており、それはテアルビジンに起因していると推測されている。

テアルビジンは 1958 年に Roberts によって命名された紅茶高分子ポリフェノールであり[7]、分子量 700-40000 Da 程度であるとされている[8-10]。赤褐色の色素成分であり、加工中に変換される重合体のほとんどを占めている。テアルビジンの生成メカニズムについては様々な研究がなされている。Roberts はテアフラビンがテアルビジン生成の中間体であることを示唆している[7]。また、Haslam もテアルビジンの生成は、ポリフェノールオキシダーゼやペルオキシダーゼに触媒され、キノン、テアフラビン、テアシネンシン、他のベンゾトロポロンに由来する可能性が高いと結論付けている[9]。さらに、酵素による酸化重合体の違いも報告されており、ポリフェノールオキシダーゼの触媒する反応では、テアフラビンが多く生成するのに対し、ペルオキシダーゼの触媒する反応では、分子量の大きいテアルビジンが生成する[11]。

Brown らはテアルビジンを酸加水分解すると、cyanidin や delphinidin が生成することから、テアルビジンは高分子プロアントシアニジンであると推定している[12]。しかし、flavan-3-ol を酸化してもプロアントシアニジンは形成されず、加水分解で生じた cyanidin や delphinidin はテアルビジン由来でなく、元々生葉に含まれている少量のプロアントシアニジン由来であるとされた[9]。Ozawa らもテアルビジンの分解反応から、テアルビジンは flavan-3-ol と flavan-3-O-gallate のポリマーであり、flavan-3-ol の C4、C6、C8、C2'、C5' 及び C6'位で結合しているとした[13]。さらに 2010 年には、Kuhnert らはテアルビジンの生成に関して酸化カスケード仮説を提唱した[14]。この仮説では、カテキンの酸化重合体の芳香環にヒドロキシ基が置換され、キノンに変換されることで更なる重合化が進行すると

している。また、Yassin らは紅茶ポリフェノールの酸化反応は B 環とガレート基で主に進行し、テアルビジンが形成するとしている[15]。また、Tanaka らはカテキン類を酵素によって酸化し、様々な重合体の構造決定及び生成メカニズムの研究を行っているが、その多くは 2 量体である[10,16]。

このようにテアルビジンの構造については多くの研究がなされているが、その構造は推定の域を出ず、化学構造については未だに解明されていない部分が多い。テアルビジンにはカテキン類とは異なる機能が期待されており[8,10]、その機能性を評価するためにはテアルビジンの構造を解明することが重要である。

これまで、ウーロンテアニンやテアフラビンといったカテキン酸化 2 量体をテアルビジン生成中間体であると位置づけ研究がなされてきたが、2 量体をさらに酸化しても、さらなる重合化が見られなかったことから、2 量体は重合化の副生成物であり、高分子化には別の経路が存在すると考えられる (Fig. 1B)。そのためテアルビジンの構造を解明するためには新たな鍵生成中間体を発見する必要がある。テアルビジンは紅茶加工中に生成するため、この生成中間体も同様に紅茶加工中に生成する。そのため、紅茶加工時の成分変化を追跡することで、テアルビジン生成中間体を発見することができると考えられる。

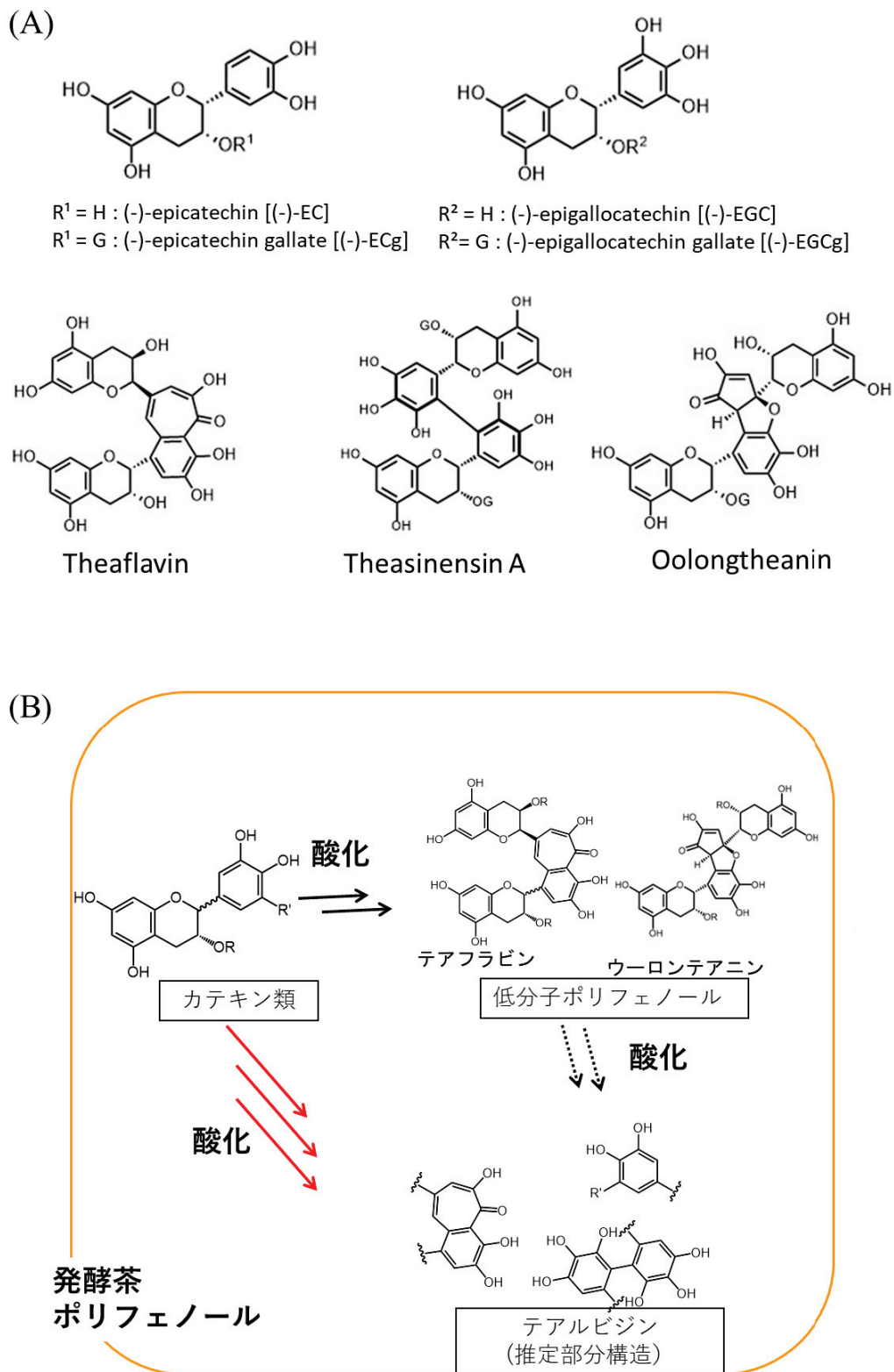


Fig. 1 (A) カテキン類及び2量体の構造 (B) 発酵茶製造時におけるテアルビジンの生成ルート (推定)

メタボロミクス解析

メタボロミクス解析は、代謝物を網羅的に解析する手法である。代謝物は遺伝子などに比べてより表現型に近く、遺伝子よりも種による差が小さいという利点がある。メタボロミクスには、ターゲット分析とノンターゲット分析が存在する。ターゲット分析は、代謝経路に存在する化合物など標的を絞った分析であり、ノンターゲット分析は分析対象を限定せず、注目すべき化合物を探索する際などに用いられる。近年、NMR や MS などの機器分析技術の向上や、データ解析技術の向上によって、メタボロミクスを用いた研究は多く行われるようになった[17]。メタボロミクス解析は疾病等のマーカーの探索や産地偽装の検出などに利用されている。代謝物は親水性や疎水性といった性質が多岐にわたるため、分析対象の代謝物によって NMR や GC-MS、CE-MS、LC-MS などの分析機器を使い分ける、または組み合わせる必要がある[18]。NMR は分離を行わない Fingerprinting に用いられ、サンプルによる装置の汚染がないことや、ライブラリによる成分同定が可能というメリットがある。一方で多くのサンプルが必要なことや、微量成分の分析が難しいというデメリットがある。GC-MS や CE-MS は分解能が高く一度に多くの化合物を分析できる利点がある。CE-MS はイオン性の代謝物の分析に用いられる。また、GC-MS ではライブラリが充実しているという利点がある一方、誘導化が必要である。LC-MS はカラムや移動相の選択で幅広い極性の代謝物が分析できるため、最も汎用的に利用されている。

また、メタボロミクス解析においては扱う変数（代謝物数）は膨大となり、個々の代謝物すべてをひとつひとつ比較するのは困難であるため、そのデータを視覚化し、解釈できるように主成分分析（PCA）をはじめとする多変量解析が用いられる。その中でよく用いられる PCA は多くの変数を持つデータを主成分という新しい軸を作成することで要約する統計学的手法である[19]。PCA はモデルの作成や未知サンプルの分類などによく用いられる。この時サンプル間の差が大きい成分（化合物）は、その寄与率が高くなる。そのため、特定のサンプルグループに特徴的な成分（マーカー）を検出するために用いられる。

茶中についても、膨大な数の代謝物が含まれていると考えられるため、製造過程で増加している代謝物を追跡することに、この手法を用いるのがよいのではないかと考えた。

1 章では、テアルビジン生成中間体の発見を目的とし、メタボロミクス解析によって紅茶製造時の化合物変化を追跡した。2 章では圃場レベルでの虫の摂食が茶の不揮発性成分に与える影響を調査した。

1 章 紅茶加工中の茶ポリフェノールの変化

1-1 カテキン類、テアフラビン類、テアルビジンの定量

紅茶の製造には主に萎凋、揉捻、発酵、乾燥の 4 工程がある。萎凋は、摘採後の茶葉を広げ水分を蒸発させ、茶葉を萎れさせる工程である。一般的に萎凋は、総重量が生葉の総重量の 60~70%になるように行われる。揉捻は、専用の揉捻機によって茶葉を揉む工程である。茶葉に圧力をかけながら揉み、茶葉の組織や細胞を破壊するため、揉捻過程では茶葉の発酵が進行する。発酵過程では、茶葉を広げ、湿度 90%以上の条件で 1~3 時間放置することによって茶葉の発酵をさらに進行させる。茶葉の発酵が適当な段階で茶葉を 100~120 °Cの熱風によって乾燥させる。これにより、酵素が失活し茶葉の発酵が止まる。

2021 年 4 月に岐阜県揖斐郡池田町茶業振興センターにて加工された紅茶（1 番茶）を製造過程ごとにサンプリングを行った (Table 1)。カテキン類は紅茶製造過程で減少し、テアルビジンの原料になると考えられる。また、テアフラビンは紅茶製造過程においてテアルビジンと競合的に生成する可能性がある。そのため、カテキン類とテアフラビン類の定量を行った。さらに、化合物としては定量することは困難であるが、Yang らの方法を用いてテアルビジン量の定量を行った[20]。

含まれるカテキン類の物質量を算出すると、生葉では EGC が最も多く、203.3 $\mu\text{mol/g}$ DW であった。次いで EC が 141.4 $\mu\text{mol/g}$ DW、EGCg が 119.5 $\mu\text{mol/g}$ DW で多く、ECg が 46.6 $\mu\text{mol/g}$ DW と最も少なかった。カテキンは製造過程の進行とともに減少し、乾燥後にはカテコール型 (EC、ECg) は約 50%減少したのに対し、ピロガロール型カテキン (EGC、EGCg) は約 80%減少しており、ピロガロール型カテキンの減少度が大きかった (Fig. 2A)。また、萎凋過程ではカテキン類の減少はほとんど見られなかった。一方で、揉捻開始 30 分から発酵開始 15 分にかけて、顕著にカテキン量が減少していた。このことからテアルビジン生成の初期段階は、機械による茶葉の損傷で細胞外に酸化酵素や基質であるカテキンなどの茶葉成分が放出されることで起こり、揉捻後期から始まっていると考えられる。

テアフラビン量はガレート基を持たない theaflavin が最も多かった。テアフラビン類はカ

テキン類の減少とともに、揉捻開始 60 分から発酵開始 60 分にかけて顕著に増加していた (Fig. 2B)。しかし、カテキン類の減少量に対してテアフラビン類は 10%程度までしか生成していなかったことから、カテキン類はテアフラビン以外の重合体に変化されている可能性がある。

Table 1 紅茶製造過程のサンプル

過程	各過程開始からの 時間(min)	
生葉		
萎凋		
揉捻	初期	15
	中期	30
	後期	60
発酵	初期	15
	中期	30
	後期	60
乾燥	初期	15
	中期	30
	後期	45

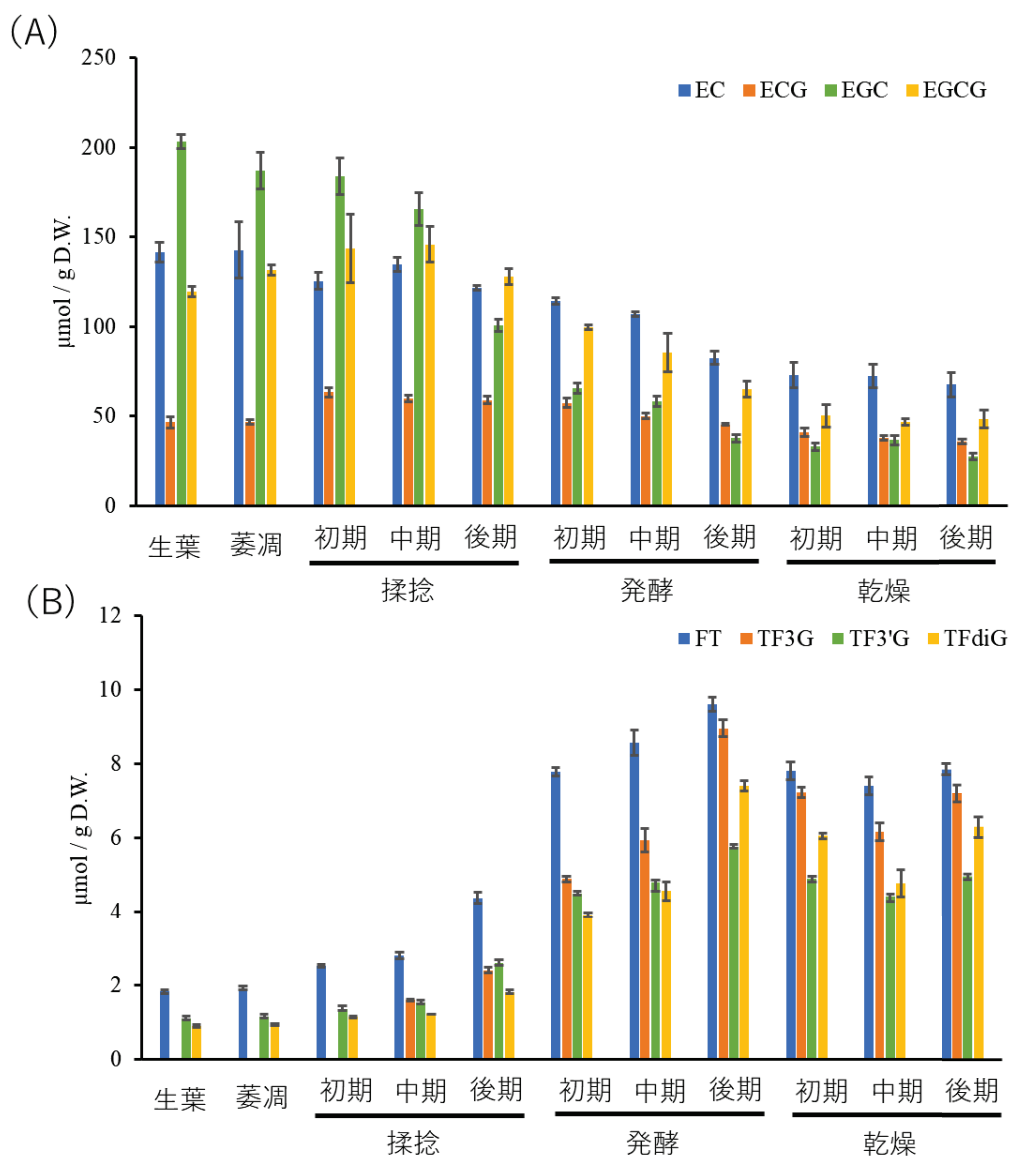


Fig. 2 紅茶製造時の (A) カテキン量、(B) テアフラビン量の変化

(mean ± SD, n = 3)

また、各製造過程のサンプルの熱水抽出液について Yang ら[20]の方法を用いてテアルビジン量 (%) の測定を行った。相対的なテアルビジン量の変化を測定すると、テアルビジンは揉捻・発酵過程にかけて増加し、発酵開始 15 分で最大になった (Fig. 3)。その後の発酵過程から乾燥過程にかけては減少していた。発酵過程までで、テアルビジン量の変化とカテキン量の変化には負の相関が確認でき、テアルビジンがカテキンから生成するという従来の推定を支持していた。また、テアフラビン量の変化と正の相関が確認でき、テアルビジンとテアフラビンは紅茶製造過程で競合的に生成していると考えられる。

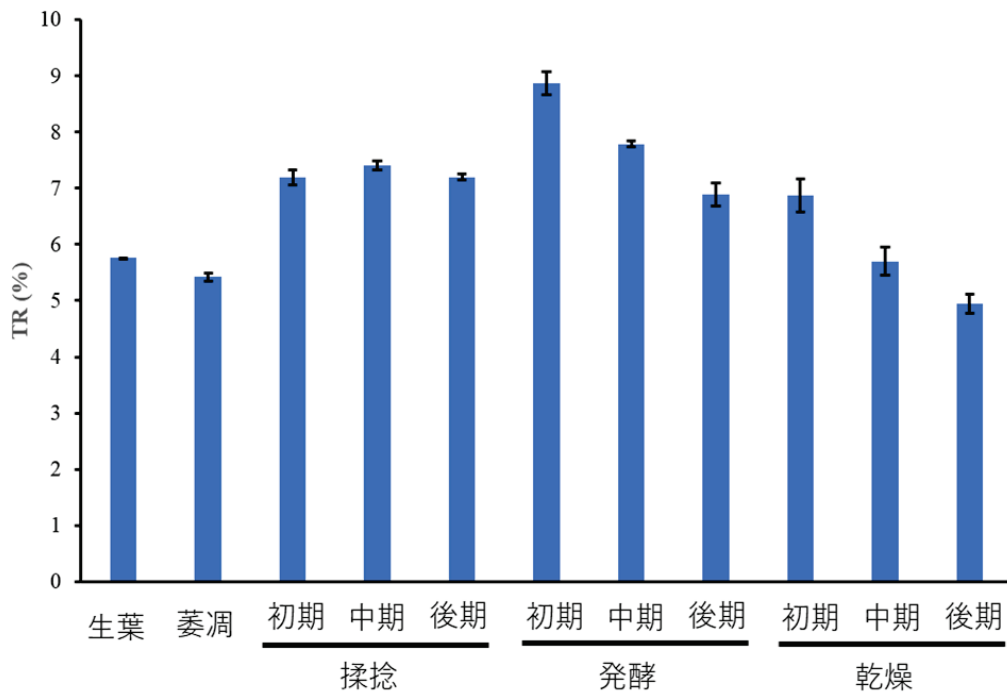


Fig. 3 紅茶製造時中のテアルビジン量 (%) の変化

1-2 紅茶製造過程サンプルの UPLC-MS 測定

次に、テアルビジン生成中間体の探索のために、製造過程サンプルの抽出液を UPLC-MS 測定に供した。UPLC-MS では、標品や文献[21]との比較を行うことで、カテキン類やテアフラビン類をはじめとするカテキン酸化 2 量体、ミリセチンやケルセチンなどのフラボノール配糖体を含む 23 成分を同定した (Fig. 4, Table 2)。マスキロマトグラムの面積を各製造過程のサンプルで比較すると、カテキン酸化 2 量体であるウーロンテアニン類やテアシネンシン類もテアフラビン類と同様に揉捻・発酵過程で増加していることが確認できた (Fig. 5A,B)。これらのカテキン 2 量体についても、テアフラビン類と同様に紅茶加工中にテアルビジンと競合して生成していると考えられる。

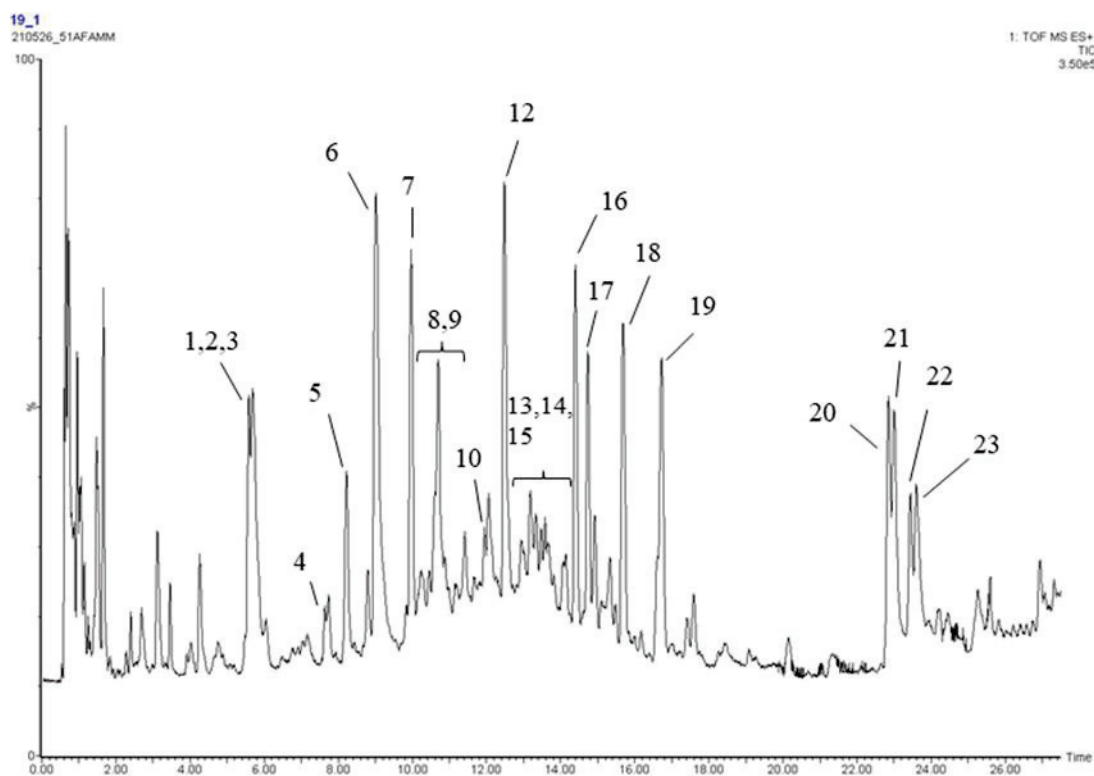


Fig. 4 紅茶加工サンプルの TIC

Table 2 Identification of the components present in the tea extract

ID	RT (min)	<i>m/z</i>	name
1	5.42	307.0605	(-)-epigallocatechin ^a
2	5.51	915.1517	theasinensin A ^b
3	5.56	291.081	(+)-catechin ^a
4	7.49	581.1454	desgalloyl oolongtheanin ^b
5	8.02	195.465	caffeine ^a
6	8.73	459.4492	(-)-epigallocatechin gallate ^a
7	9.72	291.0607	(-)-epicatechin ^a
8	10.02	733.1469	oolongtheanin ^b
9	10.76	915.1551	theasinensin D ^b
10	11.58	885.151	oolongtheanin 3'-gallate ^b
11	11.75	733.1348	desgalloyl oolongtheanin 3'-gallate ^b
12	12.27	443.0729	(-)-epicatechin gallate ^a
13	12.99	481.0966	myricetin 3-O-galactoside ^c
14	13.16	481.0966	myricetin 3-O-glucoside ^c
15	13.91	427.1052	(-)-epiafzelechin 3-O-gallate ^c
16	14.2	773.2073	quercetin 3-O-(3'''-O-galactosyl)rutinoside ^c
17	14.51	773.1896	quercetin 3-O-(3'''-O-glucosyl)rutinoside ^c
18	15.41	757.2109	kaempferol 3-O-(3'''-O-galactosyl)rutinoside ^c
19	16.42	757.2109	kaempferol 3-O-(3'''-O-glucosyl)rutinoside ^c
20	22.44	717.1385	theaflavin-3-gallate ^b
21	22.6	565.1042	theaflavin ^b
22	23.08	717.1361	theaflavin-3'-gallate ^b
23	23.28	869.1447	theaflavin-3,3'-gallate ^b

Identified by ^a; authentic standards, ^b; synthetic samples, ^c; MS/MS spectra and the literature[21]

また、乾燥過程において theasinensin A は顕著に増加していた。これは発酵過程までに EGCg が酸化され、dehydrotheasinensin A が生成し、加熱すると dehydrothaesinensin の不均化反応によって theasinensin が生成すると報告されているため[22,23]、乾燥過程で増加したと考えられる。

フラボノール配糖体についてもマスキロマトグラムの面積を比較すると、製造過程での顕著な減少は見られなかった (Fig. 5C,E,F)。カテキン類は製造過程で生葉の約 30%にまで減少している一方、ミリセチン配糖体は約 70%にまでしか減少しておらず、ケルセチンやケンフェロール配糖体はほとんど減少していなかった。フラボノール配糖体はカテキンよりも酸化段階が高いため酸化されにくいと考えられる。これらのフラボノールの紅茶製造過程に減少率が小さいことから、テアルビジン生成への寄与はカテキン類に比べ小さいものであると考えられる。

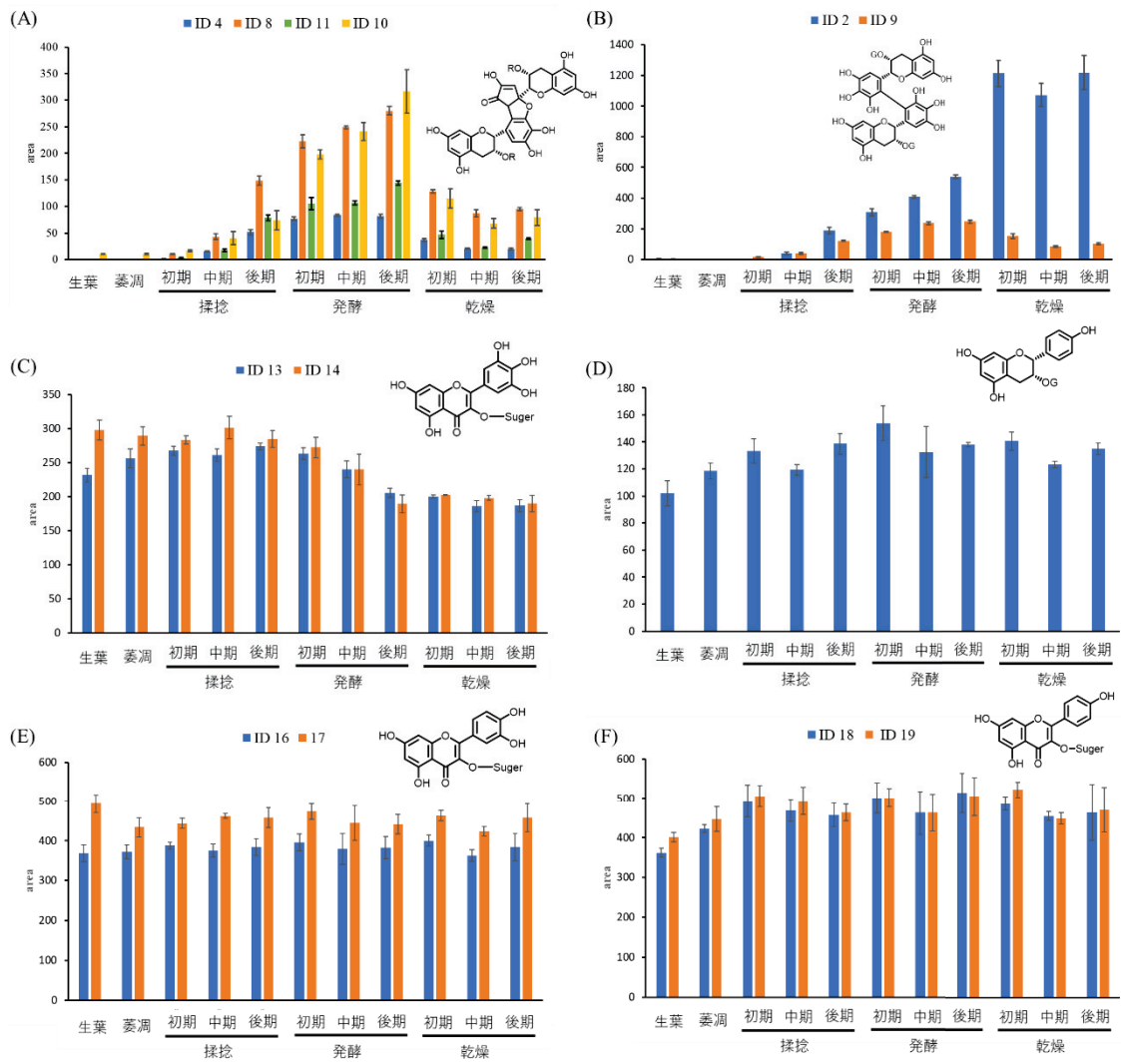


Fig. 5 紅茶製造時中の (A) ウーロンテアニン類、(B) テアシネンシン類、(C) ミリセチン配糖体、(D) エピアフゼレチンガラート、(E) ケルセチン配糖体、(F) ケンフェロール配糖体のマスキロマトグラムの面積変化

1-3 主成分分析を用いた候補化合物の探索

紅茶製造過程、特に揉捻・発酵過程で増加している成分を検出するために、各成分のピーク面積を用いて主成分分析を行った。Score plot (Fig. 6A) では、第1主成分 (PC1) の寄与率は 47.5%、第2主成分 (PC2) の寄与率は 9.9%であり、この2つの主成分で全体の 57.4%を説明していた。各製造過程でグループを形成しており、プロットは製造過程の進行とともに PC1 の負の方向に移動しており、発酵から乾燥過程までは PC2 の負の方向に移動していた。Score plot において、揉捻後期から発酵後期のサンプルは PC1 が負、PC2 が正の領域にプロットされていた。

Loading plot は score plot を特徴づけている成分がプロットされている (Fig. 6B)。カテキン類やテアフラビン類などのカテキン 2 量体は PCA でのサンプルの分離に寄与していると考えられるが、定量分析及び UPLC-MS 測定から、カテキン量の減少に対し、カテキン 2 量体の生成量は少ない。そのため、カテキン類はこれらの既知 2 量体以外の PCA に寄与している化合物にも変換されていると考えられる。テアフラビン類やウーロンテアニン類のカテキン 2 量体は loading plot で PC1 の負の領域にプロットされていた。また、カテキン 2 量体の中では desgalloyl oolongtheanin の PC2 の寄与率が最も高かった (0.033)。そこで、それよりも寄与の高い成分を探索するため、次の条件で抽出を行った (Fig. 6B の赤枠)。

- PC1 が負かつ PC2 が 0.033 より大きい
- m/z が 500 より大きい

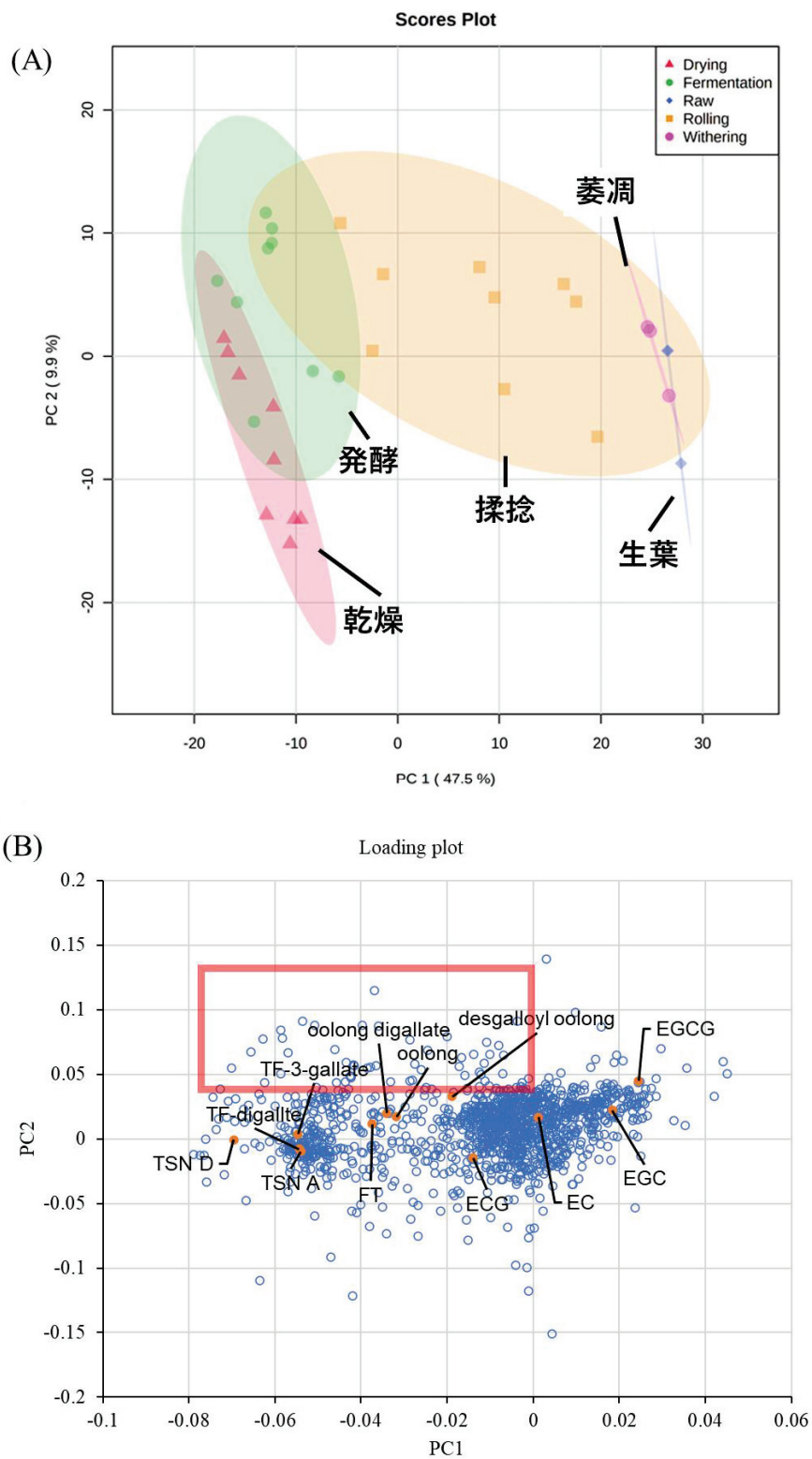


Fig. 6 紅茶製造過程サンプルのPCA (A) score plot、(B) loading plot

その結果、loading plot から 45 成分が抽出された (Table 3, Fig. 7)。テアルビジン生成中間体はカテキンから生成すると考えられる。また、生成中間体はテアフラビン類と競合的に生成すると考えられるため、生成中間体はカテキン量が減少するにつれ増加し、テアフラビン量の変化と同様の挙動を示すと考えられる。そのため、検出された 45 成分の製造過程におけるマスクロマトグラムの面積の変化と総カテキン量、総テアフラビン量の変化の相関係数を計算し、4 つのグループに分けた。さらに、テアルビジン量変化との相関係数についても計算した。テアフラビン量の変化と強い正の相関 ($r_{TFs} \geq 0.7$) が確認できたのは 12 成分あり、そのうちの 3 成分がカテキン量変化と強い負の相関 ($r_{Catechins} \leq -0.7$) を示した (Group I, Fig. 7)。残りの 9 成分についてもカテキン量変化と中程度の負の相関 ($-0.7 < r_{Catechins} \leq -0.4$) を示した (Group II)。また、Group I と II の成分についてはテアルビジン量の変化と中程度の正の相関 ($r_{TR} \geq 0.4$) を示した。さらに、45 成分のうち 22 成分がテアフラビン量変化と中程度の正の相関 ($0.4 \geq r_{TFs} > 0.7$) を示し (Group III)、Group III のうち 10 成分がカテキン量変化と弱い負の相関 ($-0.4 < r_{Catechins}$) を示した。これらの成分は、カテキン類とアミノ酸や他のフラボノイドなどの茶中の成分から生成した代謝物の可能性がある。

テアルビジンの生成中間体は紅茶製造時でさらに酸化され重合化することでテアルビジンに変換されると考えられる。そのため、テアフラビンのように発酵後期まで増加するのではなく、揉捻・発酵過程の間に減少する可能性がある。Group III はテアフラビン量の変化と中程度の正の相関であったが、これらの化合物についてもテアルビジンの生成中間体である可能性がある。

Table 3 テアルビジン候補化合物

Group	Precursor ion		r_{catechin}	r_{TFs}	r_{TR}	MS / MS fragment ion				
	RT	m/z				123	139	153	165	181
I	5.95	779.1401	-0.747	0.873	0.595		○	○		
	11.48	759.1164	-0.702	0.861	0.466		○	○		
	12.9	985.1623	-0.743	0.878	0.472					
II	1.49	627.1289	-0.491	0.702	0.653		○			
	1.51	573.1003	-0.491	0.707	0.606		○			
	2.72	591.1072	-0.589	0.788	0.626		○			
	2.81	801.1241	-0.537	0.745	0.621					
	4.2	785.123	-0.63	0.787	0.738					
	6.76	913.1397	-0.476	0.708	0.482		○	○		
	7.55	603.1131	-0.543	0.742	0.652					
	7.56	563.1101	-0.532	0.727	0.683		○			
	11.73	629.151	-0.565	0.773	0.576		○			
	1.48	808.2017	-0.487	0.698	0.654					
1.53	591.0992	-0.438	0.653	0.642		○			○	
4.74	779.1455	-0.385	0.621	0.555		○	○			
4.76	743.125	-0.401	0.633	0.554		○	○			
5.62	845.2404	-0.359	0.588	0.72						
5.64	623.1372	-0.426	0.641	0.722		○			○	
6.66	931.1584	-0.413	0.633	0.109		○	○			
6.76	787.1103	-0.441	0.67	0.484			○			
6.77	609.119	-0.499	0.672	0.739		○				
8.5	761.1319	-0.491	0.684	0.656		○	○			

III	8.63	797.2386	-0.32	0.542	0.762	○	○	
	8.74	793.1589	-0.434	0.661	0.663	○	○	
	8.74	623.1376	-0.476	0.696	0.669	○		○
	8.74	815.1396	-0.401	0.638	0.671			
	9.83	815.1408	-0.322	0.573	0.664			
	9.89	775.1475	-0.347	0.593	0.588	○	○	
	9.89	793.1539	-0.353	0.593	0.6	○	○	
	11.11	611.1039	-0.203	0.402	0.652	○	○	
	11.18	633.0791	-0.171	0.412	0.623		○	
	11.42	945.1684	-0.461	0.696	0.616	○		
	11.49	967.1485	-0.447	0.692	0.538			
	15.84	627.2403	-0.408	0.555	0.115			
<hr/>								
	1.89	611.1345	-0.163	0.395	0.383			
	3.87	612.1338	0.252	-0.147	0.713			
	4.12	579.1502	0.057	0.028	0.12	○		
	5.95	889.1923	0.046	0.067	0.005	○		
	7.05	764.1417	0.058	0.076	0.841	○		
IV	9.87	639.1306	-0.106	0.315	0.77	○		
	10.61	737.1454	-0.128	0.332	0.563	○		
	12.01	889.1553	-0.039	0.263	0.728			
	12.56	633.0864	0.006	0.233	0.46		○	
	12.67	791.1466	-0.201	0.382	0.838		○	
	17.95	507.1266	-0.327	0.229	0.002			
<hr/>								

これまでの結果及び以前の研究から、テアルビジンはカテキン類から生成していると考えられる。そのため、その生成中間体もカテキン類から生成し、カテキン様の部分構造を持つと推定される。そこで、検出した中間体候補化合物がカテキン様の構造を持つかを確認するために LC-MS/MS 分析を行った。カテキン類の LC-MS / MS 分析でのフラグメントパターンは以前に報告されており[24]、カテコール型カテキンでは A 環由来の m/z 139、B 環由来の m/z 123 及び 165、ピロガロール型カテキンでは、A 環由来の m/z 139、B 環由来の m/z 139 及び 181 のフラグメントが検出される。また、ガレート型カテキンではガレート基由来の m/z 153 のフラグメントが検出される。Group I のうち 2 成分で m/z 139 及び 153、Group II のうち 6 成分で m/z 139 が検出されたことから、これらの成分はカテキン様の部分構造をもつと推定できる。製造過程における減少度はカテコール型に比べ、ピロガロール型カテキンの方が大きかった。これは B 環部のヒドロキシ基の数の違いから生じる電子密度の違いにより、ピロガロール型カテキンの方が酸化反応や求核付加反応に対する反応性が高いためであると考えられる。このことはテアルビジンの生成反応には、B 環部の反応が重要であるということを示唆している。

一方で、3 成分で m/z 181 検出された。このフラグメントはピロガロール型カテキンの B 環部に由来するフラグメントであることから、これらの成分はカテキン B 環部の構造が反応せず残っており、A 環部やガレート基などが反応して生成した化合物であると考えられ、テアルビジンの生成には B 環部だけでなく、A 環部やガレート基も関与している可能性が考えられる。

これまで、発酵過程で生成するカテキン 2 量体がテアルビジン生成反応の重要な中間体の一つであると考え、テアルビジンの化学構造を解明するために、この 2 量体の生成機構を検討してきた。しかし、カテキン 2 量体は、テアルビジン生成の中間体ではなく、化学的に安定な副生成物であると考えられる。これらの成分はカテキン様の部分構造を有し、揉捻から発酵過程にかけて増加することから、テアルビジン生成の中間体または関連化合物であると考えられる。

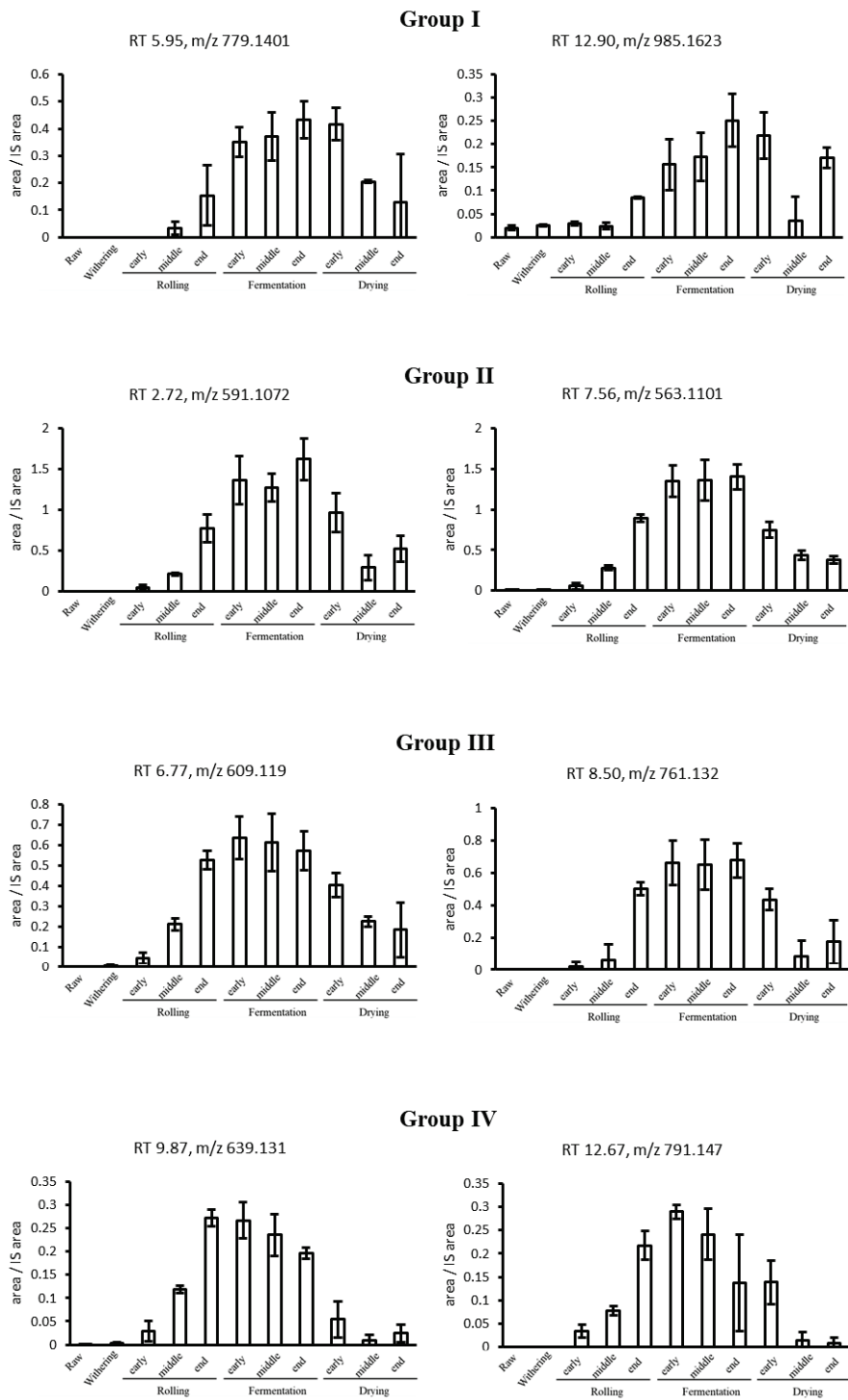


Fig. 7 Group I-IV のマスクロマトグラムの面積変化（一部）

縦軸は各成分のマスクロマトグラムの面積を内部標準のマスクロマトグラムの面積で割った数値

1-4 候補化合物の反応性の検討

1-3 節で検出した候補化合物は RT1.48~17.95 min の間に溶出し、マスキロマトグラムでもピークの溶出が確認できた (Fig. 8)。候補化合物の中には、生成量のわずかなものや、UV 吸収が小さいものなどがあり、候補化合物の全てを紅茶中または製造時のサンプルから単離を行うのは難しいと考えられる。MS/MS 測定から、カテキン由来であることやガラレート基を有することが推定されたので、カテキン類をラッカーゼなどの酸化酵素や銅などの無機触媒で酸化することで、生成するのではないかと考えた。EGC と EGCg をラッカーゼを用いて酸化すると、比較的な大きなピークが 6 つ生成した。この反応液について LC-MS 分析を行うと、紅茶生成時のサンプル中のピークと一致した (Fig. 9)。この生成したピークについて単離・構造決定を行った。このうち m/z 779 のピークは、EGC と EGCg が dehydrotheasinensin (C2-C4 位で結合) と結合位置の異なる C2-C2 で結合した 2 量体 (**1**) であった (Fig. 10)。**1** は 1-3 節で Group I に分類されており、テアルビジンの生成中間体候補化合物である。そこで、**1** が生成中間体であるかを検討するために酸化反応を行うことにした。**1** を合成する時、EGC と EGCg が結合した **1** だけでなく、EGC 同士、EGCg 同士で結合した化合物も生成し、収量が少ないため、反応性の検討には EGCg 同士が C2-C2 で結合した **1'** を用いた。塩化銅を用いて酸化を行うと、原料の減少とともに原料のピークよりもフロントに新たなピークが生成することが確認できた。さらに、原料より後方にもブロードのピークが生成していた。LC-MS 分析を行うと、フロントに生成していたピークは m/z 947 であり、**1'** から 16 Da 増加していたことから、**1** が所置ヒドロキシ基に置換されたと考えられる。これらのピークは酸化剤にラッカーゼを用いた時には生成しなかった。また、dehydrotheasinesin A や theaflavin-3,3'-O-digallate を同様に塩化銅で酸化しても、生成することはなかった。これらのピークの構造決定には至っていないが、他のカテキン酸化 2 量体と反応性が異なることから、新たな生成中間体になり得るのではないかと考えられる。

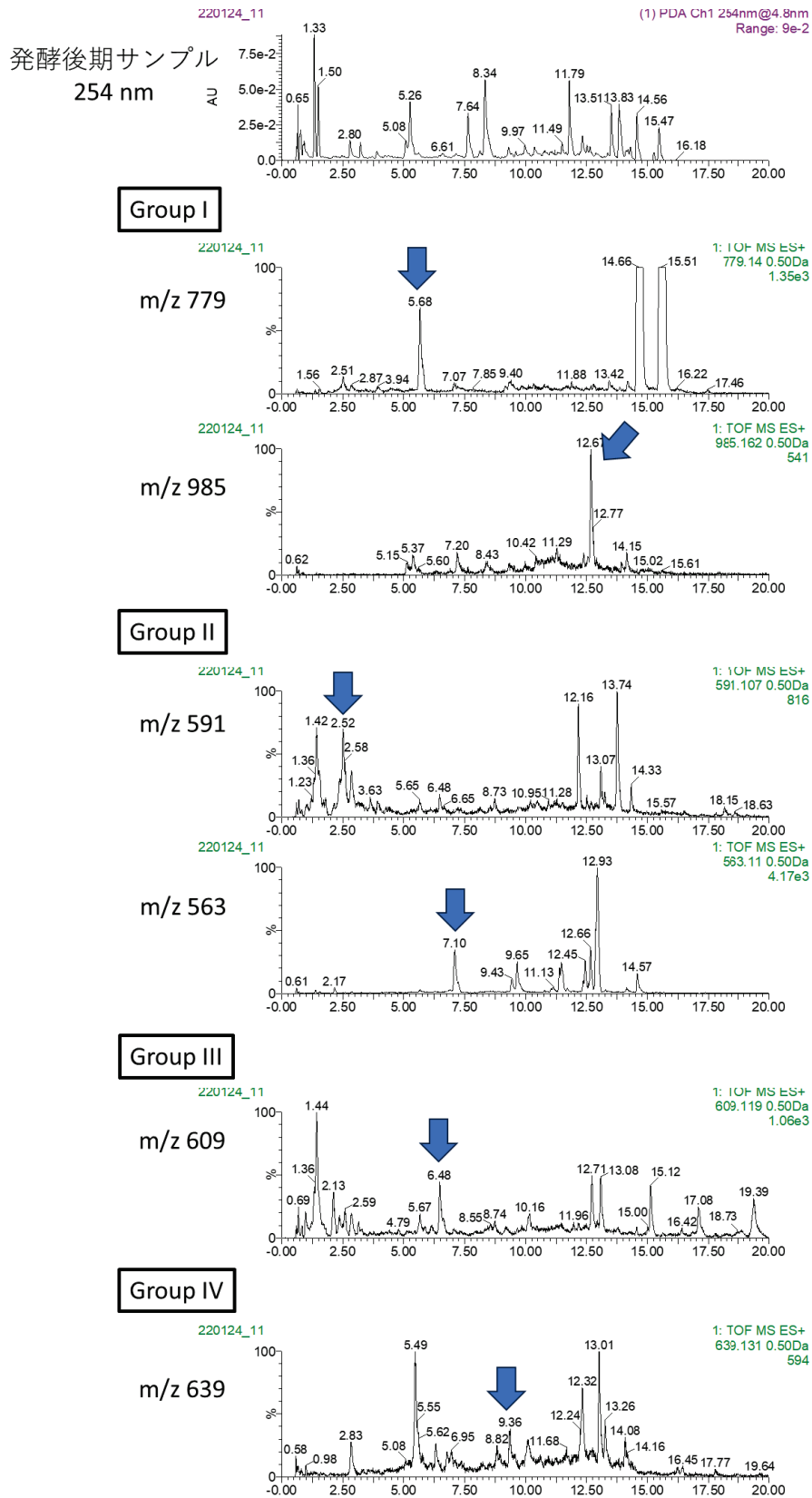


Fig. 8 発酵過程サンプル中の候補化合物のマスキングクロマトグラム

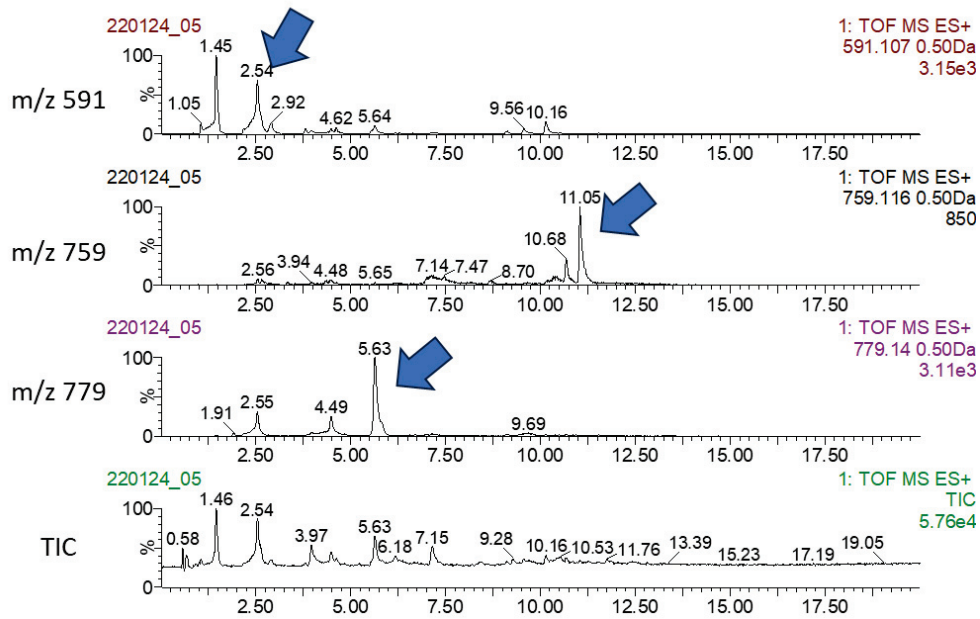
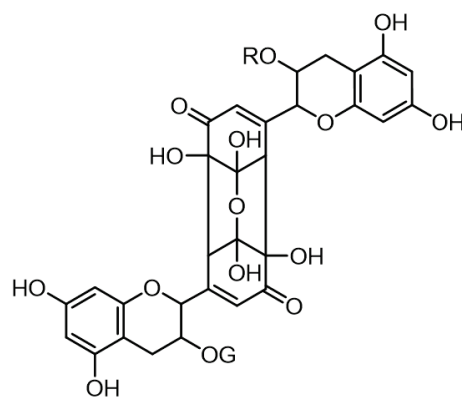


Fig. 9 EGC と EGCg の酸化



R = H: (1)
R = G: (1')

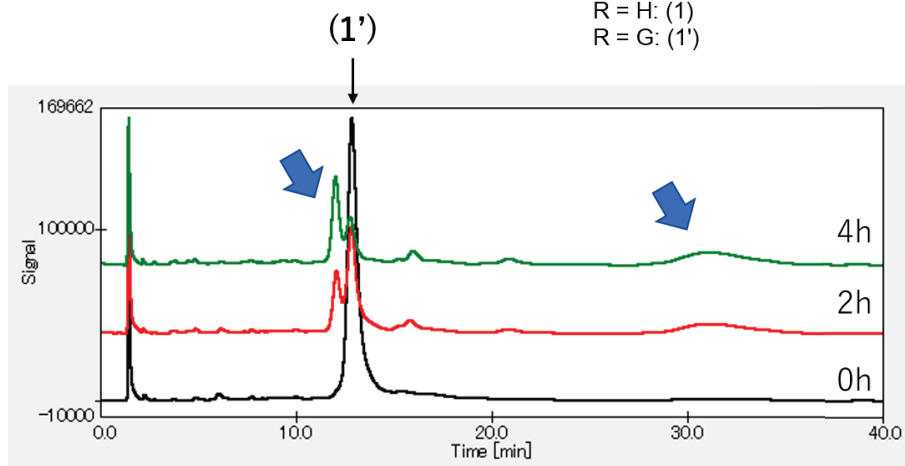


Fig. 10 1'の酸化

2章 虫の摂食が茶の不揮発性成分に与える影響

2-1 研究経緯

植物は動物とは異なり動くことができないため、虫の摂食などに対して二次代謝成分を合成し防御を行う。例として、針葉樹の松脂があり、病原菌や虫などから植物を防御する。さらに、松脂には虫を忌避する作用がある[25]。茶においても同様に、二次代謝成分を合成し防御を行っている。茶の害虫としては、チャノホソガ、チャノコカクモンハマキ、チャノミドリヒメヨコバイ（ウンカ）、ハダニなどが知られている。虫の摂食は茶の品質や収量に影響することから、茶園における問題の1つである[26-28]。そのため、通常は農薬を用いて防除を行う。

虫の摂食による茶の揮発性成分の形成については多くの研究がなされている。これは植物の防御応答として知られており、虫の摂食によって linalool や β -ocimene などの揮発性成分が増加する[29,30]。

ウンカは茶の害虫として古くから知られている。成虫は体長 3 mm 程度、幼虫は 2 mm 程度であり、成虫・幼虫ともに若く柔らかい葉の葉脈付近を加害する[31]。加害された葉脈は赤褐色に変色し、その周辺は黄緑色に変色する。被害が拡大すると、葉の生育が停止し、黒変する。ウンカの唾液中の成分は茶の代謝を変化させ、摂食を受けた葉では特徴的な揮発性成分である Hotrienol が生成する。この香りの変化を利用したものとして台湾のウーロン茶である「東方美人」が知られている[29,32]。

ポリフェノールやアルカロイドなどの不揮発性成分についても植物防御に寄与している[33]。しかし、不揮発性成分に関する報告は多くない。ウンカの密度をコントロールして茶葉を処理したモデル系での研究では、テアフラビン類は増加すると報告されている[27]。しかし、実際の圃場においては様々な虫による摂食を受けるため、必ずしも代謝物の変化が特定の虫を用いた時と一致するとは限らない。そのため、圃場レベルでの虫の摂食による影響の調査が必要である。そこで、圃場に農薬を用いて防除を行う防除区と、農薬を用いない無防除区を設定し、虫の摂食が茶の不揮発性成分へ与える影響を調査することを目的とした。

2-2 試験区の設定

虫の摂食が茶の不揮発性成分に与える影響を調べるために、岐阜県揖斐郡池田町茶業振興センターの圃場に防除区と無防除区を設定した。防除区では農薬を用いて害虫の防除を行った。無防除区では、1番茶の摘採の1か月前(2022年3月)から農薬を使わなかった。1番茶は2022年4月28日、2番茶は6月28日、3番茶は8月12日に茶葉の摘採が行われた。各茶期で防除区・無防除区の茶葉のサンプリングを行った。

2-3 害虫の発生状況

害虫の発生状況については、防除区と無防除区でのチャノミドリヒメヨコバイ(ウンカ)の頭数の調査に加え、岐阜県病害虫防除所が2022年に公表したデータを使用した[34]。チャノコカクモンハマキ、チャハマキ、チャノホソガの頭数はフェロモントラップ法によってカウントされた。ウンカの頭数はそれぞれの処理区で、はたき落とし法によってカウントされた(Fig. 11)。フェロモントラップ法では圃場全体での害虫の発生状況を確認し、はたき落とし法では、各処理区における発生状況の差を見ることにした。チャノコカクモンハマキは5月初旬と6月下旬に増加した。チャハマキは4月中旬に増加し、その後は大きく増加しなかった。チャノホソガは6月初旬に増加し、7月中旬にもわずかに増加していた。ウンカは6月中旬に増加し、その後は増加しなかった。チャハマキは7月の降雨量が多かったため、増加しなかったが、害虫の発生状況はおおむね例年通りであった。害虫の数は季節によって変動し、1番茶に比べ、2番茶・3番茶がより虫の影響を受けていると考えられる。また、ウンカの頭数は2番茶の時期に無防除区で防除区の5倍程度多く、虫の発生数に差があることが確認された。

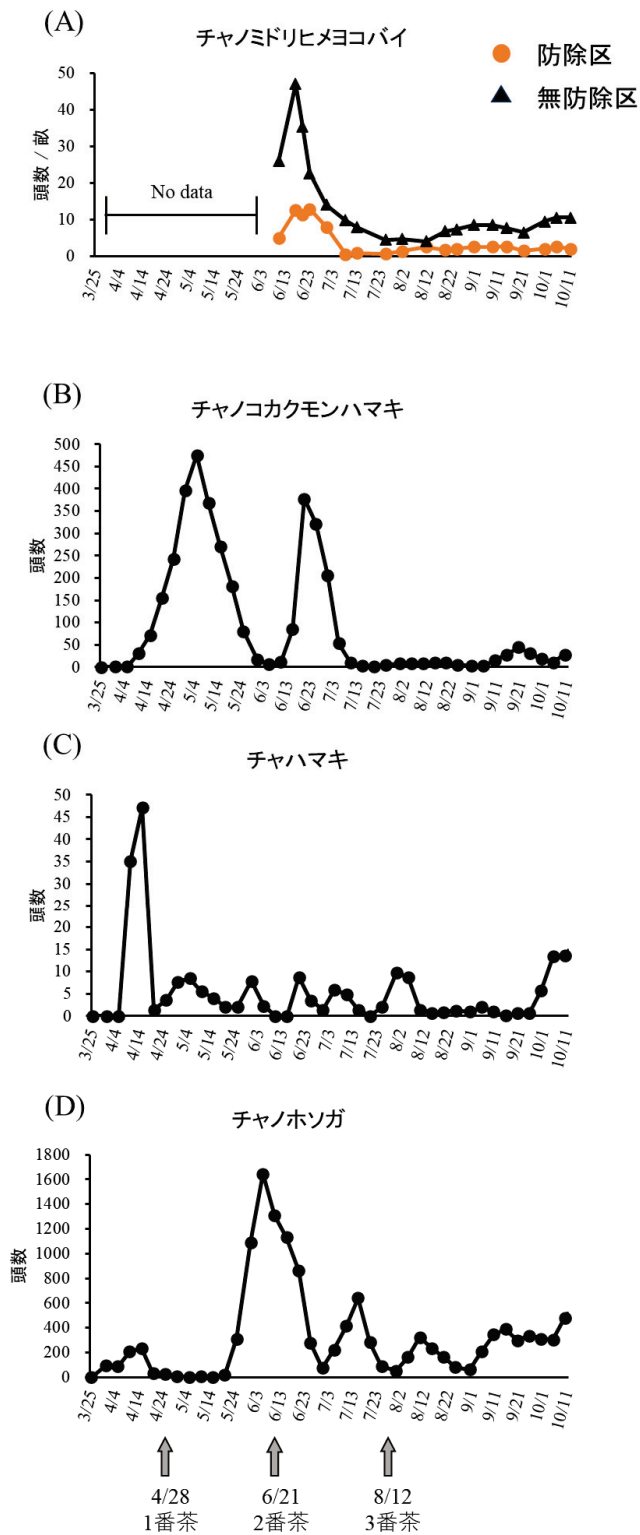


Fig. 11 害虫の発生状況 (A) チャノミドリヒメヨコバイ (ウンカ)、(B) チャノコカクモンハマキ、(C) チャハマキ、(D) チャノホソガ

2-4 カテキン類、テアフラビン類、カフェイン定量

カテキンは茶に豊富に含まれる二次代謝成分であり、虫の摂食の影響を受ける可能性がある。そこで、1番茶から3番茶までのそれぞれの処理区のカテキン類の定量を行った。防除区における総カテキン量を茶期で比べると、1番茶に比べ2番茶の方が多く、2番茶と3番茶は同レベルであった (Fig. 12A)。これは、カテキン量が季節によって変動するという以前の報告と一致する[35-37]。また、総カテキン量を処理区間ごとで比較すると、どの茶期においても有意な差は見られなかった。密度をコントロールして96時間ウンカで処理をしても総カテキン量が変わらなかったことが報告されており[27]、良い一致を示した。しかし、最も虫の影響を受けていると考えられる2番茶において処理区間でカテキン組成に差が見られた (Fig. 12B-E)。無防除区では防除区に比べ、ガレート型カテキン (ECg、EGCg) の割合が高く、非ガレート型カテキンである EGC の割合が低くなっていた。EGC はガレート基転移酵素 (epicatechin:1-O-galloyl- β -d-glucose O-galloyl transferase) によってガレート型である EGCg に変換される[38]。ガレート型カテキンは非ガレート型カテキンよりも抗菌活性が高いことが報告されているため[39]、防御応答として増加したと考えられる。このカテキン組成の差は1番茶や3番茶では見られなかったことから、総カテキン量は季節の影響を受け、カテキン組成は虫の摂食の影響を受けると考えられる。

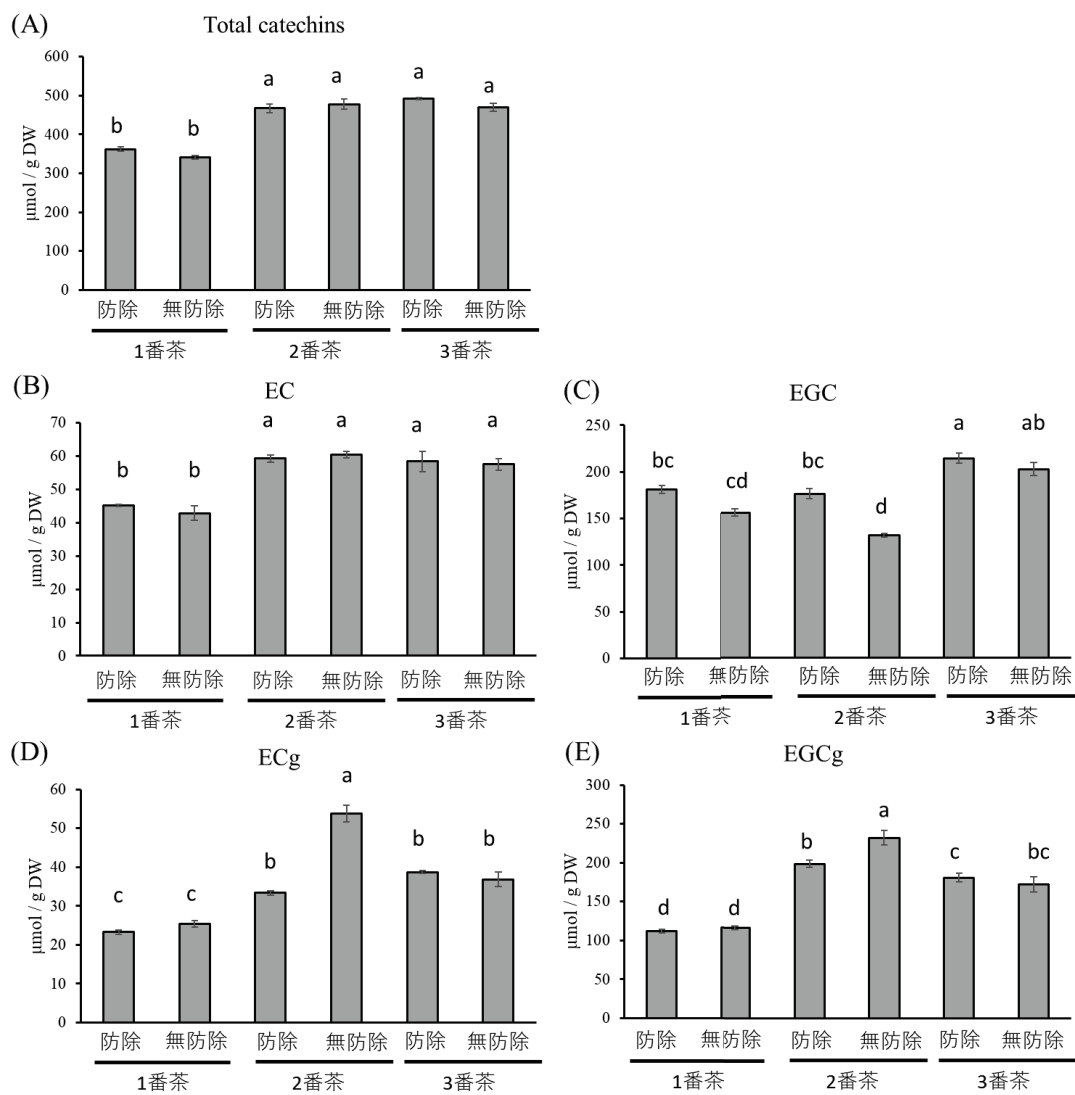


Fig. 12 各処理区でのカテキン量 (A) 総カテキン、(B) EC、(C) EGC、(D) ECg、
(E) EGCg (mean \pm SD, n = 3)

同一のアルファベットは有意差がないことを示す(p > 0.05)

Liao らは茶葉をウンカで処理するとテアフラビンが増加すると報告している[27]。また、害虫の発生状況やカテキン類の定量の結果から 2 番茶が最も虫の摂食の影響を受けていると考えられるため、2 番茶のテアフラビンの定量を行った。生葉のテアフラビン類については、処理区間で有意な差は見られなかった (Fig. 13A)。Liao らは機械的な損傷によってもテアフラビンが増加すると報告している[27]。テアフラビンは茶葉の損傷によって酸化酵素とカテキン類が細胞外に放出され、カテキン類が酸化することで生成する。このことからテアフラビンは虫よりも茶葉への損傷の影響を受けていると考えられる。

カフェインは茶に多く含まれており、植物アルカロイドの 1 種である。アルカロイドは抗菌作用や殺虫作用などが知られており、虫の摂食による影響を受けると考えられるため、カフェインの定量を行った。2 番茶生葉のカフェイン量を比較すると、無防除区で防除区の約 1.2 倍になっていた (Fig. 13B)。虫による摂食でカフェインシンターゼの酵素発現量が増加することが報告されているため[40]、カフェインについても防御応答として増加したと考えられる。

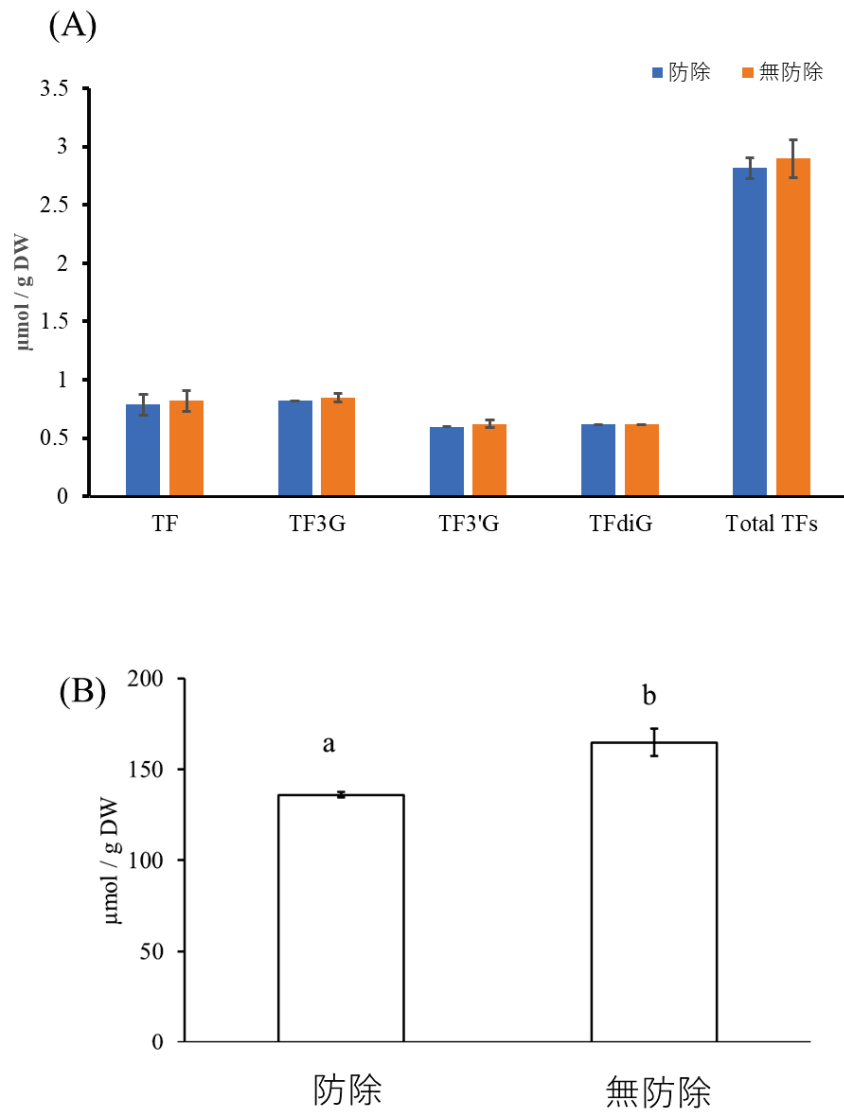


Fig. 13 2 番茶生葉における (A) テアフラビン量、(B) カフェイン量
 (mean \pm SD, n = 3) 同一のアルファベットは有意差がないことを示す(p > 0.05)

2-5 OPLS-DA による無防除区で特徴的な成分の探索

2-4 節ではカテキン類やテアフラビン類、カフェイン量の変化を調査したが、それ以外の成分の変化を調査するために、抽出液を UPLC-MS に供した。得られたデータについて、直交部分的最小二乗判別分析 (OPLS-DA) を行った。OPLS-DA において、防除区と無防除区は明確に分離され、無防除区のサンプルはスコアプロットの負の方向にプロットされていた (Fig. 14)。無防除で増加している成分を探索するために、変数の重要度を示す Variable Importance Projection (VIP) スコアが 1 以上かつ、S-plot での $p(\text{corr}) \leq -0.7$ の範囲の成分を抽出し、84 成分が検出された。UPLC-MS で得られた各成分の MS/MS のフラグメントデータから、GNPS スペクトルライブラリ [41] によってアノテーションを行った。その結果、ECg やプロシアニジン、カフェイン、モノテルペン配糖体などがアノテーションされた (Table 4)。

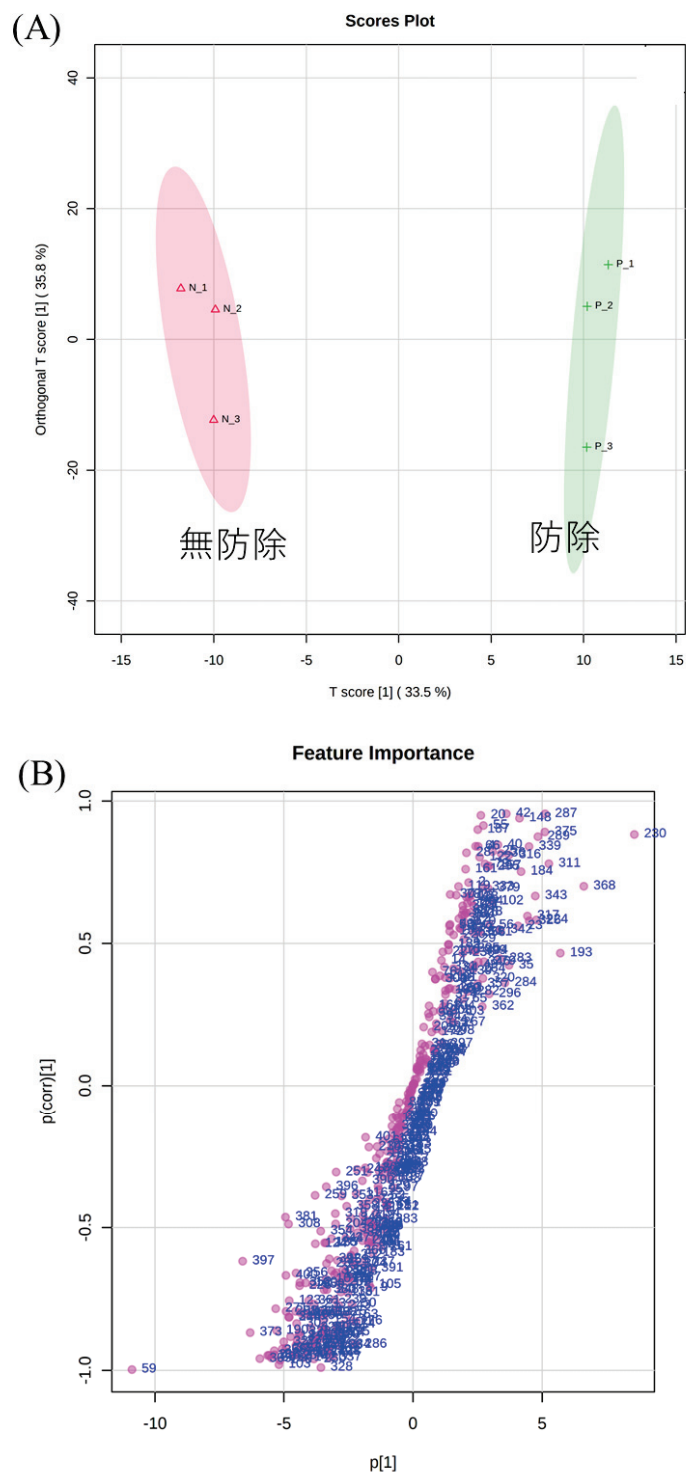


Fig. 14 2 番茶の UPLC-MS データを用いた OPLS-DA (A) score plot、(B) S-plot

Table 4 OPLS-DA で検出した無防除区に多い化合物

ID	RT	Parent mass <i>m/z</i>	MS2 fragmentation ion	annotation	Exact mass <i>m/z</i>
7	12.23	443.0981	291, 273, 153, 139, 123	Epicatechin gallate	443.0973
99	13.72	449.0848	303, 279		
145	13.77	427.1021	275, 257, 153, 139, 107		
176	14.03	289.0703	205, 179, 163, 151, 139		
109	9.90	731.1571	579, 443, 427, 409, 289		
158	10.85	715.1650	579, 443, 393, 273		
163	7.39	747.1565	595, 459, 427, 409, 289		
195	13.12	579.1499	427, 409, 291, 287	Procyanidin B2	579.1497
226	2.37	611.1401	443, 425, 307		
239	9.69	921.1475	751		
242	9.54	899.1673	729, 579, 457, 443, 425, 409		
243	7.20	915.1590	745, 595, 459, 457, 425		
334	12.09	867.1735	697, 547, 443, 425, 393,		
80	15.97	355.1733	203	p-Menth-1-ene-4,7- diol 4-glucoside ^a	355.1727
154	24.56	471.2206	335, 333	Linalyl beta- vicianoside ^a	471.2201
61	5.48	185.0414	153, 126, 125, 107	Methyl gallate	185.0444
1	7.97	195.0855	138, 110	Caffeine	195.0877
131	11.92	659.0836	489		

^a: Na⁺アダクトとしてアノテーション

2-6 分子ネットワーク解析

分子ネットワーク解析は、Watrous らによって開発された解析手法であり [42]、同様の骨格を持つなど構造的に類似した化合物は、類似のフラグメントパターンを持つことに基づいてネットワークを形成する手法である。この手法は、天然物化学の分野で、ターゲットの化合物を絞ることなどに利用されている。

OPLS-DA によって抽出された成分のうち、データベースでアノテーションされなかった成分を推定するために、分子ネットワーク解析を行った。2 番茶生葉について、分子ネットワーク解析を行うと、40 のクラスターが形成され、64 個のノードからなるクラスター (MN I) と 59 個のノードからなるクラスター (MN II) の 2 つの大きなクラスターが形成された (Fig. 15)。アノテーションの結果から MN I は Flavanol 類及びその配糖体のクラスターであり、MN II は Flavan-3-ol のクラスターであった。フラボノール類は 1-3 節の OPLS-DA において虫の影響を受けた化合物としては検出されなかった。また、各成分の面積からパイチャートを作成し、ノード上に表示した。青は防除区、赤は無防除区のサンプルにおける各成分の面積を示している。パイチャートにおいても、MN I のクラスターでは各処理区で差は見られなかった。この結果からフラボノール類に対する虫の摂食の影響は小さいことが示唆された。

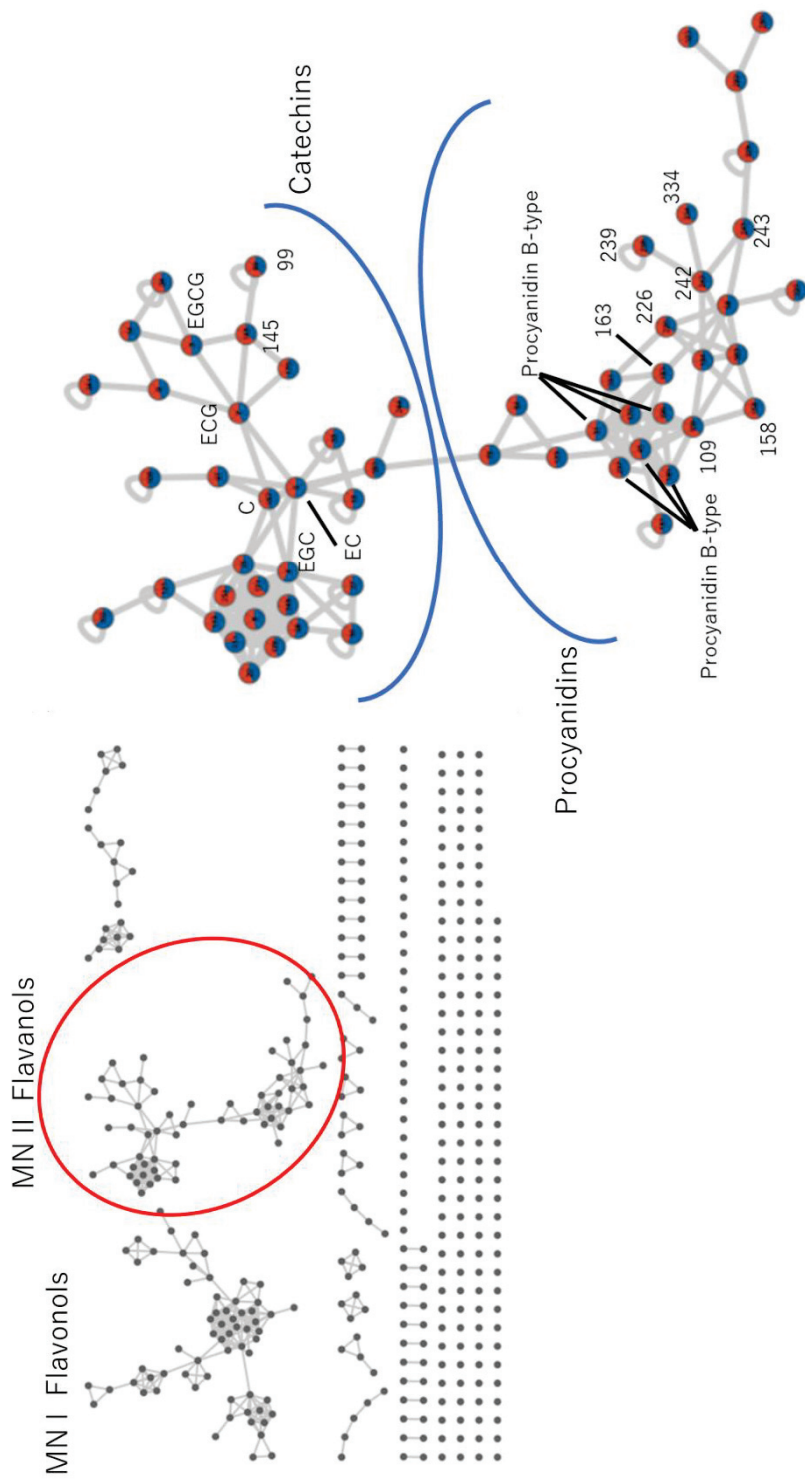
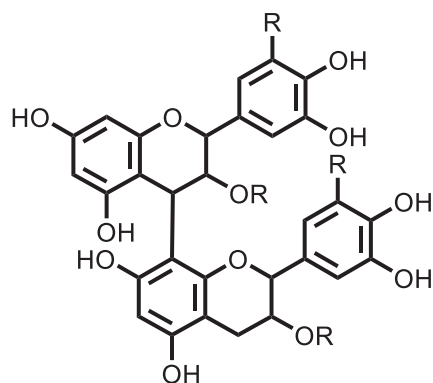


Fig. 15 2 番茶の分子ネットワーク解析

MN II にはカテキン類やプロシアニジン類のノードとしてアノテーションされたノードが見られた。2-4 節で無防除区に多い成分として検出された ID 145 (m/z 427) は ECg と EGCg のノードとネットワークを形成していた。ID 145 の質量電荷比は、ECg よりも 16 Da 小さく、EGCg よりも 32 Da 小さいことから、B 環部のヒドロキシ基が 1 つである epiafzelechin-3-O-gallate であると推定した。また、ID 99 については ID 145 の Na⁺アダクトであると推定した。マスクロマトグラムの面積を比較すると、epiafzelechin-3-O-gallate は無防除区の方が 1.7 倍多かった。2-4 節で行った定量分析において、無防除区でガレート型カテキンである ECg 及び EGCg の割合の増加が確認された。epiafzelechin-3-O-gallate についてもこれらのガレート型カテキンと同様に防御応答として増加したと考えられる。

また、6 つのノードがプロシアニジン B2 とアノテーションされていた。プロシアニジン B2 は EC 同士が C4-C8 位で結合した化合物であるが、構成カテキンが 3 位の立体の異なる (+)-catechin であるものや、C4-C8 の結合の立体が異なるもの、C4-C6 で結合するものと、8 種類の立体異性体または位置異性体が存在する [43]。そのため、この 6 つのノードはプロシアニジン B2 またはその立体異性体、位置異性体であると考えられる。さらに MN II のクラスターには無防除区で多かった 8 成分 (2-5 節) が含まれていた。茶中にはカテコール型のプロシアニジン 2 量体だけでなく、ピロガロール型やガレート型カテキンからなるプロシアニジンも報告されている [43,44]。16 Da の差は B 環のヒドロキシ基、152 Da の差はガレート基によるものと推定される。この 8 成分はプロシアニジン B2 とは構成カテキンの異なる B タイプのプロシアニジンであると推定した (Table 5)。

Table 5 プロシアニジン類の推定



ID	RT	<i>m/z</i>	Predicted annotation
226	2.37	611.1401	prodelphinidin
109	9.90	731.1571	C-CG dimer
163	7.39	747.1565	C-GCG dimer
242	9.54	899.1673	GCG-CG dimer
239	9.69	921.1475	Na adduct of ID242
243	7.20	915.1590	GCG-GCG dimer
158	10.85	715.1650	afzelechin-CG dimer
334	12.09	867.1735	afzelechin gallate-CG dimer

無防除区で多い成分として検出された ID 131 は、ヘキソースにガレート基が 2 つ結合した加水分解性タンニンのノードとネットワークを形成していた。ID 131 はこのノードよりも 152 Da 大きい化合物であることから、ガレート基が 3 つ結合した加水分解性タンニンであると推定した。茶葉中の加水分解性タンニンは微量なものであるが[45]、無防除区では防除区よりも 2.3 倍多かった。

プロシアニジンや加水分解性タンニンは摂食に対する防御物質であり[46,47]、虫に対する防御応答で増加したと考えられる。ヨコバイの摂食はプロシアニジンの生合成にかかわる leucoanthocyanidin reductase の遺伝子発現量を増加させると報告されており[40]、本研究の結果は、この報告と良い一致を示した。

ID 80 と 154 はそれぞれモノテルペン配糖体とリナロール配糖体とアノテーションされており、無防除区でそれぞれ 2.6 倍、1.6 倍多かった。ウンカの摂食はリナロールなどの揮発性成分を増加させることが報告されており[29]、モノテルペンは植物の防御物質であることが知られている[48]。また、その前駆体である揮発性成分の配糖体は貯蔵型であることが知られている[49]。虫の摂食により、無防除区でモノテルペン配糖体が蓄積されたと考えられる。

2-7 紅茶製品に対する虫の摂食の影響

1章では紅茶製造の過程でカテキン類が変化して、様々な重合体に変換されることを明らかにした。これらの反応は酵素による反応であり、茶の成分は大きく変化する。そのため、生葉における成分の違いは、紅茶製造時に起こる反応や、紅茶製品の成分に影響を与えると考えられる。

テアフラビンは紅茶の赤色色素として知られ、品質に関与するため、各処理区の紅茶製品のテアフラビン量の定量を行った。無防除区では防除区に比べ、総テアフラビン量が1.1倍、theaflavin-3-Ogallateが1.3倍、theaflavin-3,3'-O-digallateが1.5倍多かった (Fig. 16)。このテアフラビン量の違いは、生葉の段階のガレート型カテキンの量の差に起因すると考えられる。

さらに、各処理区の紅茶の浸出液の色差を測定した。防除区と無防除区の色差 ΔE は10.48であり、明確に色が異なることを示していた (Table 6)。また、 L^* (明度) a^* (赤-緑) b^* (黄-青) の値から、無防除区の方が暗く、よりオレンジ色を示していた。茶成分は加工中に酵素により大きく変化する。テアフラビンやテアルビジンは主にカテキンから生成され、紅茶の色に寄与することが知られている [50,51]。そのため、生葉でのカテキンなどの成分の違いが紅茶製品の色に影響した可能性がある。

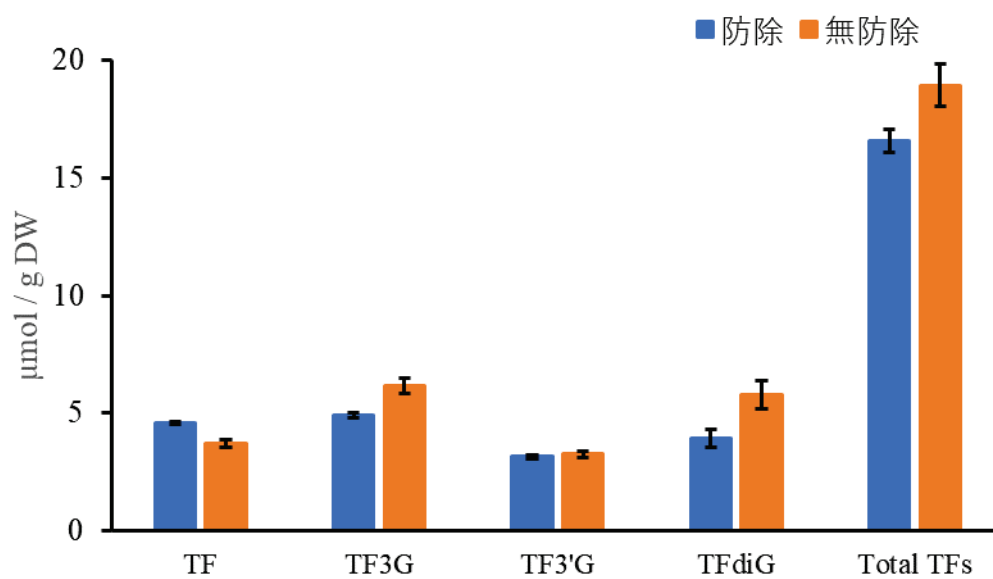


Fig. 16 2 番茶紅茶のテアフラビン量

Table 6 2 番茶紅茶の色差

	L*	a*	b*	ΔE
防除	78.48 ±0.24	11.47 ±0.14	76.57 ±0.49	—
無防除	70.62 ±0.21	17.36 ±0.12	80.24 ±0.38	10.48

そこで各処理区の生葉及び紅茶製品の抽出液を LC-MS に供し、PCA 及び OPLS-DA を行った。PCA では PC1 の寄与率が 55%、PC2 の寄与率が 8.5%、PC3 の寄与率は 4.3% であり、全体の 67.8% を説明していた (Fig. 17)。PC1 及び PC2 では、1 章と同様に製造過程の進行による分離が確認でき、PC3 では、処理区による分離が確認できた。このことから、紅茶製造時の成分変化よりは小さいものの、虫の摂食による成分への影響も大きいと考えられる。さらに OPLS-DA により、各処理区での紅茶製品の成分の違いを 2-4 節と同様の条件で抽出すると、無防除区に多い成分として、72 成分が抽出され、その中には生葉の時にも検出された epiafzelechin-3-O-gallate、プロシアニジン、モノテルペン配糖体が含まれていた。これらの成分は紅茶の製造過程で変化しておらず、生葉の成分の違いは直接紅茶成分に影響すると考えられる。

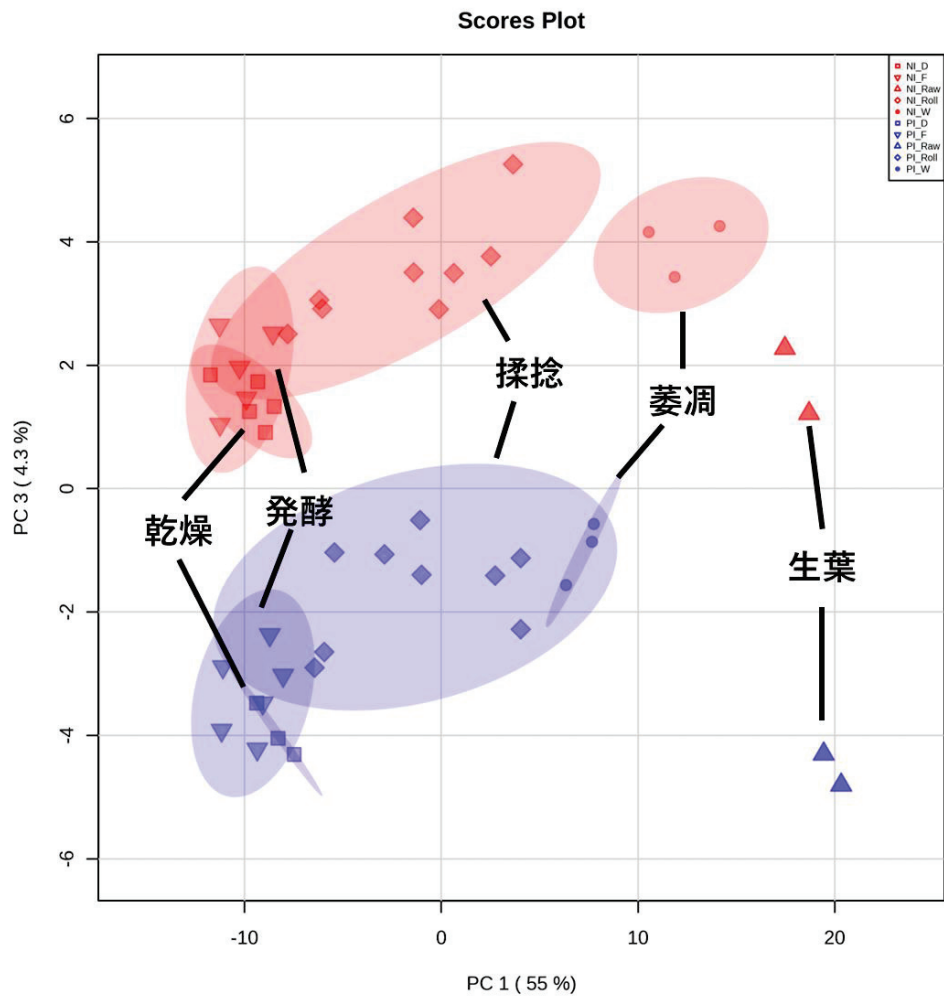


Fig. 17 2番茶紅茶と生葉のPCA score plot (PC1 & PC3)

青：防除区 赤：無防除区

本研究では、実験室レベルのモデル系ではなく、圃場レベルでの虫の摂食の影響を調査した。無防除区では、ガレート型カテキンや、プロシアニジン、モノテルペン配糖体が増加していた。これらの成分の増加は実験室レベルのモデル系を用いた際には報告されていないため、これは特定の虫の影響ではなく、圃場における様々な虫の複合的な影響によるものであると考えられる。虫による摂食の影響は想定よりも大きく、茶の品質において無視できない環境要因の 1 つであった。虫による摂食は、茶の収量の低下や品質の低下を引き起こす一方で、ガレート型カテキンやプロシアニジンなどのポリフェノールは高い機能性を有することから、適切な虫の管理を行うことはより機能性の高い茶の生産につながると考える。

結語

1章では、テアルビジン生成中間体の発見を目的とし、主成分分析を用いて紅茶製造時の化合物変化を追跡した。カテキン、テアフラビン等の2量体、テアルビジン量の製造過程の変化から、テアルビジンはカテキンから生成しており、酸化2量体とは競合的に生成していることが示唆された。さらに主成分分析により、揉捻・発酵過程に増加している成分を検出した。MS / MS測定の結果、これらの成分はカテキン様の部分構造を持つと考えられ、テアルビジン生成中間体または関連化合物の可能性がある。今後、単離・構造決定を行い、反応性の検討を行うことで、テアルビジン生成中間体であるかを確かめる必要がある。

2章では、圃場レベルでの虫の摂食がチャの不揮発性成分に与える影響を調査した。虫は2番茶の時期に多く発生していた。カテキン総量は防除区・無防除区間で差は見られなかったが、2番茶において無防除区の方がガレート型カテキンの割合が高くなった。また、無防除区では、プロシアニジンやモノテルペン配糖体も増加していた。これらの成分は単一の虫でなく、圃場での様々な虫の影響で増加したと考えられた。生葉での成分の違いは紅茶の成分にも影響しており、想定よりも虫の摂食が茶の品質に与える影響は大きいものであったと考えられる。

本研究で着目したカテキン類やその重合体をはじめとするポリフェノールは高い機能性を持つことが知られている。本研究がより高い機能性を持つ茶製品の生産につながることを期待する。

実験の部

分析機器

UPLS-MS	Waters Xevo G2 QTof
UPLC	Waters ACQUITY UPLC H-Class
Column	ACQUITY UPLC BEH C18 2.1 mm ϕ \times 100 mm
HPLC : Detector	JASCO UV-4075
Pump	JASCO PU-4180
Column oven	JASCO CO-2065 Plus
Column	COSMOSIL 5C18-MS-II 4.6 mm ϕ \times 150 mm (ナカライテスク(株))
Software	Masslynx (Waters)
	MZmine 2.37.1
	Cytoscape 3.9.1

実験1 紅茶製造時サンプルの抽出

池田町茶業振興センターにて1番茶のサンプリングを行った(2021年4月)。各製造過程でサンプルを50 mLの遠沈管に回収し、ドライアイスで凍結させた。凍結乾燥後、ミルサーを用いて茶葉を粉碎した。茶葉15 mgにH₂Oを0.2 mL、MeOH: Chloroform=2:1を0.6 mLを加えた。内部標準として0.1 mg/mL sulfisoxazoleメタノール溶液10 µL加え、ボルテックスミキサーで混合した。室温で1時間静置した後、H₂Oを0.2 mL、Chloroformを0.2 mL加え、ボルテックスミキサーで混合した。遠心分離(r.t., 1500 ×g, 5 min)後、上層を綿栓ろ過し、LC用のバイアルに移した。抽出は各サンプル3連で行った。

実験2 カテキン及びテアルビジンの定量

実験1で抽出した上層をUPLCに供し、カテキン量及びテアフラビン量の定量を行った。

UPLC 条件 (カテキン定量)

Solvent A: 1 % formic acid in water, B: acetonitrile

0-3 min: 5%B, 17 min: 12%B, 20 min: 17%B

Detect: 280 nm, Column temperature: 30 °C, Flow rate: 0.5 mL/min, Inject volume: 1 μ L

UPLC (テアフラビン定量)

Solvent A: 1 % formic acid in water, B: acetonitrile

0min: 15%B, 4-11 min: 22%B

Detect: 280 nm, Column temperature: 35 °C, Flow rate: 0.4 mL/min, Inject volume: 1 μ L

実験3 テアルビジンの定量

茶葉 300 mg に H₂O 12.5 mL を加え、95 °C で 10 分間抽出した。室温まで冷却し、ろ過を行った。分液漏斗に抽出液 6 mL を入れ、酢酸エチルを 6 mL を加え抽出した。酢酸エチル層を 0.4 mL 回収し、95%エタノールを 4.6 mL 加え、溶液 A とした。水層 0.4 mL を回収し、飽和シュウ酸水溶液を 0.4 mL、95%エタノールを 4.2 mL 加え、溶液 D とした。酢酸エチル層 3 mL を回収し、2.5%炭酸水素ナトリウム水溶液 3 mL を加え、抽出し、酢酸エチル層 0.8 mL を回収した。そこに、95%エタノールを 4.2 mL 加え、溶液 C とした。茶抽出液 3 mL に 1-ブタノール 3 mL を加え抽出し、水層 0.2 mL を回収し、H₂O 1.2 mL、飽和シュウ酸水溶液 0.4 mL、95%エタノール 3.2 mL を加え、溶液 B とした。95%エタノール reference として、溶液 A,B,C,D の 380 nm における吸光度 (EA,EB,EC,ED) を測定した。テアルビジン量 (%) は以下の式を用いて算出した。

$$\text{テアルビジン量 (\%)} = 7.06 \times (2EA + 2ED - EC - 2EB)$$

実験4 UPLC-MS 測定及び主成分分析

茶抽出液を UPLC-MS 測定に供した。得られた LC-MS について、Masslynx を用いてピークピック及びピークテーブルの作成を行った。その後、MetaboAnalyst 5.0 を用いて主成分分析を行った。

UPLC-MS

Solvent A: 1 % formic acid in water, B: MeOH

0min: 5%B, 8 min: 15%B, 11min: 25%B, 13 min: 32%B, 20 min: 40%B, 26 min: 55%B, 32 min: 95%B

Column temperature: 35 °C, Flow rate: 0.4 mL/min, Inject volume: 1 µL

Positive mode, m/z scan range: 100-2000

ピークテーブル作成 (Masslynx)

RT: 1.3–27.5 min, Mass tolerance: 0.05 Da,

Peak width at 5 % height: automatic (i.e., the software automatically set the value),

Peak-to-peak baseline noise: automatic, Intensity threshold: 100 counts,

Mass window: 0.05, RT window: 1.0 min, Noise elimination level: 6.0

peak area/internal standard peak area ratio を計算し、0.3 より小さいピークを除外した。

MetaboAnalyst 5.0

Scaling: Pareto, Transformation: log

実験5 LC-MS/MS によるピークの同定

生葉サンプル及び発酵後期のサンプル抽出液の LC-MS/MS 測定 (Collision Energy: 15-25eV) を行った。標品 (カテキン類、カフェイン)、合成した標品 (テアシネンシン類、ウーロンテアニン類、テアフラビン類)、文献 (ケンフェロール、ケルセチン、ミリセチン配糖体) とフラグメントパターン及び RT を比較することで、同定を行った。

UPLC-MS 条件

Solvent A: 1 % formic acid in water, B: MeOH

0min: 5%B, 8 min: 15%B, 11min: 25%B, 13 min: 32%B, 20 min: 40%B, 26 min: 55%B, 32 min: 95%B

Column temperature: 35 °C, Flow rate: 0.4 mL/min, Inject volume: 1 µL

Positive mode

実験6 マスクロマトグラムの面積及び相関係数の算出

実験4で作成したピークテーブルから、各サンプルの area / IS area の平均及び標準偏差を計算した。各成分の製造過程での変化と、総カテキン量、総テアフラビン量、テアルビジン量の変化との相関係数をそれぞれ Excel で計算した。相関の強さに基づき、Group I～IV に分類した。

実験7 候補化合物の MS/MS 測定

検出した候補化合物について LC-MS/MS 測定を行った。

UPLC-MS 条件

Solvent A: 1 % formic acid in water, B: MeOH

0min: 5%B, 8 min: 15%B, 11min: 25%B, 13 min: 32%B, 20 min: 40%B, 26 min: 55%B, 32
min: 95%B

Column temperature: 35 °C, Flow rate: 0.4 mL/min, Inject volume: 1 μ L

Positive mode

Collison Energy: 15-25 eV

実験8 EGC と EGCg の酸化

EGC 1mg と EGCg 1 mg に H₂O 1 mL を加え、溶解させた。ラッカーゼが 0.03 mg /mL になりように添加し、40 °C で 4h 加温した。反応終了後 HP20SS によってラッカーゼを除去し、LC-MS 分析を行った。

実験9 1'の合成

EGCg 100 mg に H₂O 100 mL を加え、溶解させた。ラッカーゼ 3 mg を加え、40 °C で 8h 加温した。反応終了後、HP20SS でラッカーゼを除去し、MeOH で溶出した。分取 HPLC によって単離を行い、1'を 32 mg 得た。

実験 10 1'の酸化

1' 2 mg と塩化銅 2 水和物 1 mg に、30%Dioxane 0.8 mL を加え、室温で 4h 攪拌した。

反応後に HP20SS で塩化銅を除去し、LC-MS 測定を行った。

実験 11 処理区の設定とサンプリング

岐阜県揖斐郡池田町茶業振興センターの圃場に防除区と無防除区を設定した。防除区では農薬を用いて害虫の防除を行った。無防除区では、1 番茶の摘採の 1 か月前（2022 年 3 月）から農薬を使わなかった。1 番茶は 2022 年 4 月 28 日、2 番茶は 6 月 28 日、3 番茶は 8 月 12 日に各茶期で防除区・無防除区の茶葉のサンプリングを行った。各製造過程でサンプルを 50 mL の遠沈管に回収し、ドライアイスで凍結させた。凍結乾燥後、ミルサーで茶葉を粉碎した。

実験 12 茶葉の抽出

茶葉 15 mg に H₂O を 0.2 mL、MeOH: Chloroform= 2:1 を 0.6 mL を加えた。内部標準として 0.1 mg/mL sulfisoxazole メタノール溶液 10 μL 加え、ボルテックスミキサーで混合した。室温で 1 時間静置した後、H₂O を 0.2 mL、Chloroform を 0.2 mL 加え、ボルテックスミキサーで混合した。遠心分離 (r.t., 1500 ×g, 5 min) 後、上層を綿栓ろ過し、LC 用のバイアルに移した。

下層 0.2 mL をエッペンチューブに回収し、遠心エバポレーターを用いて溶媒を除去した。MeOH を 0.2 mL 加え、再溶解させ、綿栓ろ過後 LC 用のバイアルに移した。

実験 13 カテキン、テアフラビン、カフェインの定量

実験 12 の上層を UPLC に供し、カテキン類（全茶期）とテアフラビン類（2 番茶のみ）の定量を行った。下層についても UPLC に供し、カフェイン（2 番茶）の定量を行った。

UPLC 条件（カテキン定量）

Solvent A: 1 % formic acid in water, B: MeOH

0–5 min, 5% B; 19 min, 15% B; 23 min, 25% B

Detect: 280 nm, Column temperature: 35 °C, Flow rate: 0.4 mL/min, Inject volume: 1 µL

UPLC 条件（テアフラビン定量）

Solvent A: 1 % formic acid in water, B: acetonitrile

0min: 15%B, 4-11 min: 22%B

Detect: 280 nm, Column temperature: 35 °C, Flow rate: 0.4 mL/min, Inject volume: 1 µL

UPLC 条件（カフェイン定量）

Solvent: 10% acetonitrile/H₂O 0.5% formic acid

Detect: 254 nm, Column temperature: 35 °C, Flow rate: 0.4 mL/min, Inject volume: 1 µL

実験 14 UPLC-MS 測定 (Survey)

実験 12 で抽出した 2 番茶生葉サンプルの上層を UPLC-MS 測定に供した。

UPLC-MS 条件

Solvent A: 1 % formic acid in water, B: MeOH

0min: 5%B, 8 min: 15%B, 11min: 25%B, 13 min: 32%B, 20 min: 40%B, 26 min: 55%B, 32
min: 95%B

Column temperature: 35 °C, Flow rate: 0.4 mL/min, Inject volume: 1 μ L

survey scan

m/z 100–1500, switching intensity threshold: 3000 counts

maximum of 3 precursor ions.

Collision Energy ramp: 15–35 eV

Positive mode

実験 15 データ処理

UPLC-MS で取得したデータについて MZmine を用いてピークピックを行った。

- Mass detection: intensity threshold of 100 (MS1 spectra), 4 (MS/MS spectra)
- MS1 ADAP chromatogram builder function:
min group size; 4, group intensity threshold; 100, Min height; 300, m/z tolerance; 0.02 Da
- Deconvoluted: local minimum search algorithm, chromatographic threshold; 20%, search minimum in RT range; 0.03 min, median m/z center calculation
- Isotope: mass tolerance; 0.02 Da, retention time tolerance; 0.5 min
- Alignment: m/z tolerance; 0.02 Da (MS1), retention time tolerance; 0.5 min; weight of 86 on m/z and 14 on retention time
- Gap filling: mass tolerance; 0.02 Da, retention time tolerance; 0.6 min
- Filtering: minimum peaks in a row; 2,
- MetaCorrelate module: retention time tolerance; 0.5 min, a minimum height; 300, a noise level of 100, Person correlation; 0.85

実験 16 OPLS-DA

MZmine で作成したピークテーブルを用いた。内部標準の面積で各成分の面積を割り、MetaboAnalyst 5.0 にアップロードし、OPLS-DA を行った。

MetaboAnalyst

Scaling: Pareto, Transformation: log

実験 17 分子ネットワーク解析

MZmine で作成したファイルを GNPS にアップロードし、分子ネットワーク解析を行った。

Feature-Based Molecular Networking analysis

The data were filtered by removing all MS/MS fragment ions within ± 17 Da of the precursor m/z . MS/MS spectra were window-filtered by choosing only the top six fragment ions in the ± 50 Da window throughout the spectrum. The precursor ion mass tolerance and the MS/MS fragment ion tolerance were set to 0.02 Da. A molecular network was created where edges were filtered to have a cosine score above 0.7 and more than 5 matched peaks. Edges between two nodes were kept if each node appeared in the other's top 10 most similar nodes. Finally, the maximum size of a molecular family was set to 100, and the lowest-scoring edges were removed until the size was below this threshold. The analog search mode was used by searching against MS/MS spectra with a maximum difference of 100.0 in the precursor ion value. The library spectra were filtered in the same manner as the input data. All matches kept between the network and library spectra were required to have a score above 0.7 and at least 4 matched peaks. DEREPLICATOR annotated the MS/MS spectra [27], and the researcher provided additional edges.

実験 18 2 番茶紅茶のテアフラビン量の定量

2 番茶紅茶 15 mg に H₂O を 0.2 mL、MeOH: Chloroform= 2:1 を 0.6 mL を加えた。内部標準として 0.1 mg/mL sulfisoxazole メタノール溶液 10 μL 加え、ボルテックスミキサーで混合した。室温で 1 時間静置した後、H₂O を 0.2 mL、Chloroform を 0.2 mL 加え、ボルテックスミキサーで混合した。遠心分離 (r.t., 1500 × g, 5 min) 後、上層を綿栓ろ過し、LC 用のバイアルに移し、UPLC に供した。

UPLC 条件 (テアフラビン定量)

Solvent A: 1 % formic acid in water, B: acetonitrile

0min: 15%B, 4-11 min: 22%B

Detect: 280 nm, Column temperature: 35 °C, Flow rate: 0.4 mL/min, Inject volume: 1 μL

実験 19 紅茶浸出液の色差測定

紅茶 200 mg に H₂O を 10 mL 加え、95 °C で 10 min 抽出した。室温まで冷却、ろ過した後、浸出液 7 mL に H₂O を 4.5 mL 加え、色差計で L*a*b*値を測定した。色差 ΔE は下の式により計算した。

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

参考文献

1. 日本経済新聞 茶市場、アジアがけん引 Available online:
<https://www.nikkei.com/article/DGKKZO62020910Y0A720C2TJ1000/> (accessed on 14 November 2023).
2. 全国茶生産団体連合会・全国茶主産府県農協連絡協議会 茶ガイド Available online:
<https://www.zennoh.or.jp/bu/nousan/tea/seisan01a.htm> (accessed on 14 November 2023).
3. 農林水産省 茶をめぐる情勢 Available online:
<https://www.maff.go.jp/j/seisan/tokusan/cha/attach/pdf/ocha-44.pdf> (accessed on 14 November 2023).
4. 立花 宏文 緑茶カテキン受容体 67LR を介した カテキンの機能性発現機構. 日薬理誌 **2008**, *132*, 145–149, doi:10.1039/b912523j.
5. Bae, J.; Kim, N.; Shin, Y.; Kim, S.; Kim, Y. Activity of Catechins and Their Applications. *Biomed. Dermatology* **2020**, *4*.
6. Grzesik, M.; Napařo, K.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartosz, I. Antioxidant Properties of Catechins: Comparison with Other Antioxidants. *Food Chem.* **2018**, *241*, 480–492, doi:10.1016/j.foodchem.2017.08.117.
7. Roberts, E. THE PHENOLIC SUBSTANCES OF MANUFACTURED TEA. II. * -Their Origin as Enzymic Oxidation Products in Fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **1958**, *9*, 212–216, doi:10.1002/jsfa.2740090405.
8. Zhu, K.; Ouyang, J.; Huang, J.; Liu, Z. Research Progress of Black Tea Thearubigins: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 1556–1566, doi:10.1080/10408398.2020.1762161.
9. Haslam, E. Thoughts on Thearubigins. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 61–73, doi:10.1016/S0031-9422(03)00355-8.

10. Tanaka, T.; Matsuo, Y. Production Mechanisms of Black Tea Polyphenols. *Chem. Pharm. Bull.* **2020**, *68*, 1131–1142, doi:10.1248/cpb.c20-00295.
11. Finger, A. In-Vitro Studies on the Effect of Polyphenol Oxidase and Peroxidase on the Formation of Polyphenolic Black Tea Constituents. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *66*, 293–305, doi:10.1002/jsfa.2740660306.
12. Brown, A.G.; Eyton, W.B.; Holmes, A.; Ollis, W.D. THE IDENTIFICATION OF THE THEARUBIGINS. *Phytochemistry* **1969**, *8*, 2333–2340.
13. Ozawa, T.; Kataoka, M.; Morikawa, K.; Negishi, O. Elucidation of the Partial Structure of Polymeric Thearubigins from Black Tea by Chemical Degradation. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **1996**, *60*, 2023–2027.
14. Kuhnert, N.; Drynan, J.W.; Obuchowicz, J.; Clifford, M.N.; Witt, M. Mass Spectrometric Characterization of Black Tea Thearubigins Leading to an Oxidative Cascade Hypothesis for Thearubigin Formation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 3387–3404, doi:10.1002/rcm.
15. Yassin, G.H.; Koek, J.H.; Kuhnert, N. Model System-Based Mechanistic Studies of Black Tea Thearubigin Formation. *Food Chem.* **2015**, *180*, 272–279, doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.108.
16. 田中隆 植物ポリフェノールに関する化学的研究とその紅茶色素生成機構解明への展開. *YAKUGAKU ZASSHI* **2008**, *128*, 1119–1131.
17. Fraser, K.; Lane, G.A.; Otter, D.E.; Harrison, S.J.; Quek, S.-Y.; Hemar, Y.; Rasmussen, S. Non-Targeted Analysis by LC–MS of Major Metabolite Changes during the Oolong Tea Manufacturing in New Zealand. *Food Chem.* **2014**, *151*, 394–403, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2013.11.054.
18. 馬場健史; 松田史生; 平山明由; 津川裕司 *メタボロミクス実践ガイド*; 羊土社, 2021;
19. 石井俊全 *意味が分かる多変量解析*; ベレ出版, 2014;
20. Yang, C.; Zhao, Y.; An, T.; Liu, Z.; Jiang, Y.; Li, Y.; Dong, C. Quantitative Prediction and

- Visualization of Key Physical and Chemical Components in Black Tea Fermentation Using Hyperspectral Imaging. *Lwt* **2021**, *141*, 110975, doi:10.1016/j.lwt.2021.110975.
21. Lee, M.K.; Kim, H.W.; Lee, S.H.; Kim, Y.J.; Asamenew, G.; Choi, J.; Lee, J.W.; Jung, H.A.; Yoo, S.M.; Kim, J.B. Characterization of Catechins, Theaflavins, and Flavonols by Leaf Processing Step in Green and Black Teas (*Camellia Sinensis*) Using UPLC-DAD-QToF/MS. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245*, 997–1010, doi:10.1007/s00217-018-3201-6.
 22. Weerawatanakorn, M.; Hung, W.L.; Pan, M.H.; Li, S.; Li, D.; Wan, X.; Ho, C.T. Chemistry and Health Beneficial Effects of Oolong Tea and Theasinensins. *Food Sci. Hum. Wellness* **2015**, *4*, 133–146, doi:10.1016/j.fshw.2015.10.002.
 23. Tanaka, T.; Mine, C.; Watarumi, S.; Fujioka, T.; Mihashi, K.; Zhang, Y.-J.; Kouno, I. Accumulation of Epigallocatechin Quinone Dimers during Tea Fermentation and Formation of Theasinensins. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1582–1587, doi:https://doi.org/10.1021/np020245k.
 24. Moulis, L.; Fulcrand, H. UPLC-ESI-MS Study of the Oxidation Markers Released from Tannin Depolymerization: Toward a Better Characterization of the Tannin Evolution over Food and Beverage Processing. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 1450–1457, doi:10.1002/jms.3098.
 25. 有村源一郎; 西原昌宏 植物のたくらみ 香りと色の植物学; ベレ出版, 2018;
 26. Dong, F.; Yang, Z.; Baldermann, S.; Sato, Y.; Asai, T.; Watanabe, N. Herbivore-Induced Volatiles from Tea (*Camellia Sinensis*) Plants and Their Involvement in Intraplant Communication and Changes in Endogenous Nonvolatile Metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 13131–13135, doi:10.1021/jf203396a.
 27. Liao, Y.; Yu, Z.; Liu, X.; Zeng, L.; Cheng, S.; Li, J.; Tang, J.; Yang, Z. Effect of Major Tea Insect Attack on Formation of Quality-Related Nonvolatile Specialized Metabolites in Tea (*Camellia Sinensis*) Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 6716–6724,

- doi:10.1021/acs.jafc.9b01854.
28. Shao, C.; Zhang, C.; Lv, Z.; Shen, C. Pre- and Post-Harvest Exposure to Stress Influence Quality-Related Metabolites in Fresh Tea Leaves (*Camellia Sinensis*). *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2021**, *281*, 109984, doi:10.1016/j.scienta.2021.109984.
 29. Mei, X.; Liu, X.; Zhou, Y.; Wang, X.; Zeng, L.; Fu, X.; Li, J.; Tang, J.; Dong, F.; Yang, Z. Formation and Emission of Linalool in Tea (*Camellia Sinensis*) Leaves Infested by Tea Green Leafhopper (*Empoasca (Matsumurasca) Onukii Matsuda*). *Food Chem.* **2017**, *237*, 356–363, doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.124.
 30. Jian, G.; Jia, Y.; Li, J.; Zhou, X.; Liao, Y.; Dai, G.; Zhou, Y.; Tang, J.; Zeng, L. Elucidation of the Regular Emission Mechanism of Volatile β - Ocimene with Anti-Insect Function from Tea Plants (*Camellia Sinensis*) Exposed to Herbivore Attack. **2021**, doi:10.1021/acs.jafc.1c03534.
 31. 岐阜県病害虫防除所 チャノミドリヒメヨコバイ Available online: <https://www.pref.gifu.lg.jp/page/12933.html> (accessed on 5 December 2023).
 32. Zeng, L.; Watanabe, N.; Yang, Z. Understanding the Biosyntheses and Stress Response Mechanisms of Aroma Compounds in Tea (*Camellia Sinensis*) to Safely and Effectively Improve Tea Aroma. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59*, 2321–2334, doi:10.1080/10408398.2018.1506907.
 33. Barbehenn, R. V.; Peter Constabel, C. Tannins in Plant-Herbivore Interactions. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1551–1565, doi:10.1016/j.phytochem.2011.01.040.
 34. Gifu Ken Byogaityu Bozyo Center The Number of Pests (Graph) Available online: <https://www.pref.gifu.lg.jp/page/2979.html> (accessed on 2 March 2023).
 35. Wakamatsu, M.; Yamanouchi, H.; Sahara, H.; Iwanaga, T.; Kuroda, R.; Yamamoto, A.; Minami, Y.; Sekijima, M.; Yamada, K.; Kajiya, K. Catechin and Caffeine Contents in Green Tea at Different Harvest Periods and Their Metabolism in Miniature Swine. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 2769–2778, doi:10.1002/fsn3.1143.

36. Dai, W.; Qi, D.; Yang, T.; Lv, H.; Guo, L.; Zhang, Y.; Zhu, Y.; Peng, Q.; Xie, D.; Tan, J.; et al. Nontargeted Analysis Using Ultraperformance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Uncovers the Effects of Harvest Season on the Metabolites and Taste Quality of Tea (*Camellia Sinensis* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 9869–9878, doi:10.1021/acs.jafc.5b03967.
37. Fang, R.; Redfern, S.P.; Kirkup, D.; Porter, E.A.; Kite, G.C.; Terry, L.A.; Berry, M.J.; Simmonds, M.S.J. Variation of Theanine, Phenolic, and Methylxanthine Compounds in 21 Cultivars of *Camellia Sinensis* Harvested in Different Seasons. *Food Chem.* **2017**, *220*, 517–526, doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.047.
38. Liu, Y.; Gao, L.; Liu, L.; Yang, Q.; Lu, Z.; Nie, Z.; Wang, Y.; Xia, T. Purification and Characterization of a Novel Galloyltransferase Involved in Catechin Galloylation in the Tea Plant (*Camellia Sinensis*). *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 44406–44417, doi:10.1074/jbc.M112.403071.
39. Bansal, S.; Choudhary, S.; Sharma, M.; Kumar, S.S.; Lohan, S.; Bhardwaj, V.; Syan, N.; Jyoti, S. Tea: A Native Source of Antimicrobial Agents. *Food Res. Int.* **2013**, *53*, 568–584, doi:10.1016/j.foodres.2013.01.032.
40. Yang, H.; Xie, S.; Wang, L.; Jing, S.; Zhu, X.; Li, X.; Zeng, W.; Yuan, H. Identification of Up-Regulated Genes in Tea Leaves under Mild Infestation of Green Leafhopper. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2011**, *130*, 476–481, doi:10.1016/j.scienta.2011.07.023.
41. Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D.D.; Watrous, J.; Kapon, C.A.; Luzzatto-Knaan, T.; et al. Sharing and Community Curation of Mass Spectrometry Data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828–837, doi:10.1038/nbt.3597.
42. Watrous, J.; Roach, P.; Alexandrov, T.; Heath, B.S.; Yang, J.Y. Mass Spectral Molecular Networking of Living Microbial Colonies. *PNAS* **2012**, *109*, 1743–1752, doi:10.1073/pnas.1203689109.

43. Hashimoto, F.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Tannins and Related Compounds. XC. : 8-C-Ascorbyl (-)-Epigallocatechin 3-O-Gallate and Novel Dimeric Flavan -3-Ols, Oolonghomobisflavans A and B, from Oolong Tea. (3). *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 3255–3263.
44. Nonaka, G.; Kawahara, O.; Nishioka, I. Tannins and Related Compounds. XV. A New Class of Dimeric Flavan-3-Ol Gallates, Theasinensins A and B, and Proanthocyanidin Gallates from Green Tea Leaf. (1). *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 3906–3914.
45. Zhang, L.; Ho, C.T.; Zhou, J.; Santos, J.S.; Armstrong, L.; Granato, D. Chemistry and Biological Activities of Processed *Camellia Sinensis* Teas: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*, 1474–1495, doi:10.1111/1541-4337.12479.
46. Dixon, R.A.; Xie, D.Y.; Sharma, S.B. Proanthocyanidins - A Final Frontier in Flavonoid Research? *New Phytol.* 2005, *165*, 9–28.
47. Barbehenn, R. V.; Jaros, A.; Lee, G.; Mozola, C.; Weir, Q.; Salminen, J.P. Hydrolyzable Tannins as “Quantitative Defenses”: Limited Impact against *Lymantria Dispar* Caterpillars on Hybrid Poplar. *J. Insect Physiol.* **2009**, *55*, 297–304, doi:10.1016/j.jinsphys.2008.12.001.
48. Liu, Z.; Li, Q.X.; Song, B. Pesticidal Activity and Mode of Action of Monoterpenes. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70*, 4556–4571, doi:10.1021/acs.jafc.2c00635.
49. Yang, Z.; Baldermann, S.; Watanabe, N. Recent Studies of the Volatile Compounds in Tea. *Food Res. Int.* **2013**, *53*, 585–599, doi:10.1016/j.foodres.2013.02.011.
50. Cui, Y.; Lai, G.; Wen, M.; Han, Z.; Zhang, L. Identification of Low-Molecular-Weight Color Contributors of Black Tea Infusion by Metabolomics Analysis Based on UV–Visible Spectroscopy and Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2022**, *386*, 132788, doi:10.1016/j.foodchem.2022.132788.
51. Obanda, M.; Owuor, P.O.; Mang’oka, R.; Kavoi, M.M. Changes in Thearubigin Fractions and Theaflavin Levels Due to Variations in Processing Conditions and Their Influence on

Black Tea Liquor Brightness and Total Colour. *Food Chem.* **2004**, *85*, 163–173,

doi:10.1016/S0308-8146(02)00183-8.

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始適切なお指導と多大な激励を賜りました柳瀬笑子教授に深く感謝致します。

様々な御助言、御協力を頂いた上野義仁教授、河合真吾教授に深く感謝致します。

また、紅茶サンプルを提供して頂いた揖斐農林事務所の神谷仁様、岐阜県農業技術センターの柳生宗紀様、有限会社サポートいびの河瀬英樹様、虫の摂食が茶に与える影響の調査について御助言、御協力頂いた勝野那嘉子准教授と食成分化学研究室の皆様にご深く感謝致します。

最後に生物有機化学研究室の皆様方にも重ねて御礼申し上げます。