

2021年度

東京農業大学 博士論文

青葉アルデヒドを利用した GABA 高含有緑茶製造方法
の検討および生理的メカニズムの解明

内田 一臣

指導教員 小塩 海平

緒言

角山栄の名著『茶の世界史 緑茶の文化と紅茶の文化 改版』（2017、中公新書）¹⁾によれば、お茶の歴史は古く、日本には奈良・平安時代に遣唐使に伝えられ、鎌倉初期には禅僧の栄西によってもたらされた種子をもとに栽培が始まったといわれている。当時は薬用、上流階級の人が口にできたものであったが、徐々に社交の道具として武士階級に広まり、15世紀後半には千利休らにより茶道が始まった。現在一般化している緑色の煎茶は江戸中期に永谷宗円によって考案された製法が始まりといわれている。この製法によりこれまで茶葉を煎じただけで茶色かったお茶がこれまでにない緑色と味、香りとなり、この製法が全国に広まるようになった。江戸末期までは山間部などで生産されていたが、明治初期には土族授産事業などをきっかけに静岡などの平坦な土地に集団茶園が作られるようになった。

鎖国後の開港を機に日本茶は生糸とならぶ重要な輸出品となっていたが、集団茶園の形成により、流通の発展、機械化などが進み茶業を中心とした関連産業の成立に影響を与えた。

明治中期ごろまで花形輸出品として発展してきたが、インド、セイロン紅茶の台頭で、輸出は次第に停滞し、代わりに国内の消費が増え、お茶は国内向け嗜好飲料に変わり、大衆化したと言われている。

一方、世界のお茶の生産量については、図1に示すように、中国、インド、ケニアの順で多く、日本は10位となっている（FAO/EST, 2022）²⁾。ケニアを筆頭にアフリカ諸国を含む開発途上国の生産量が近年増加していることは注目に値する。

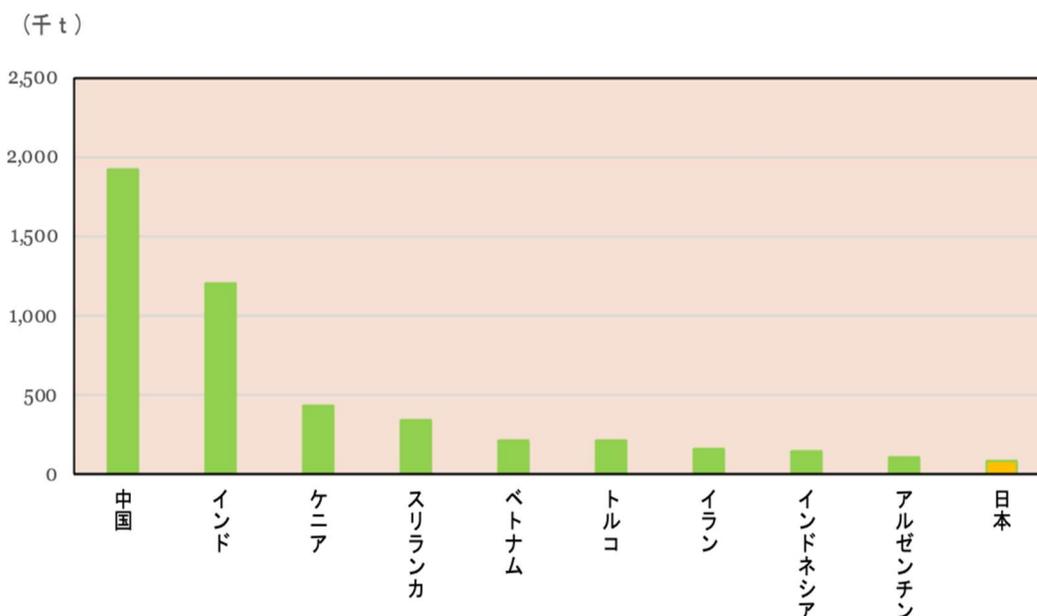


図1. 世界のお茶の生産量（出展：FAO/EST 2022）

また、世界のお茶の消費量については、図2に示すように、生産量と同じく1位が中国、2位がインドとなっており、中国・インドに関しては8割近く国内生産によるものである（Basu Majumder, 2010）³⁾。

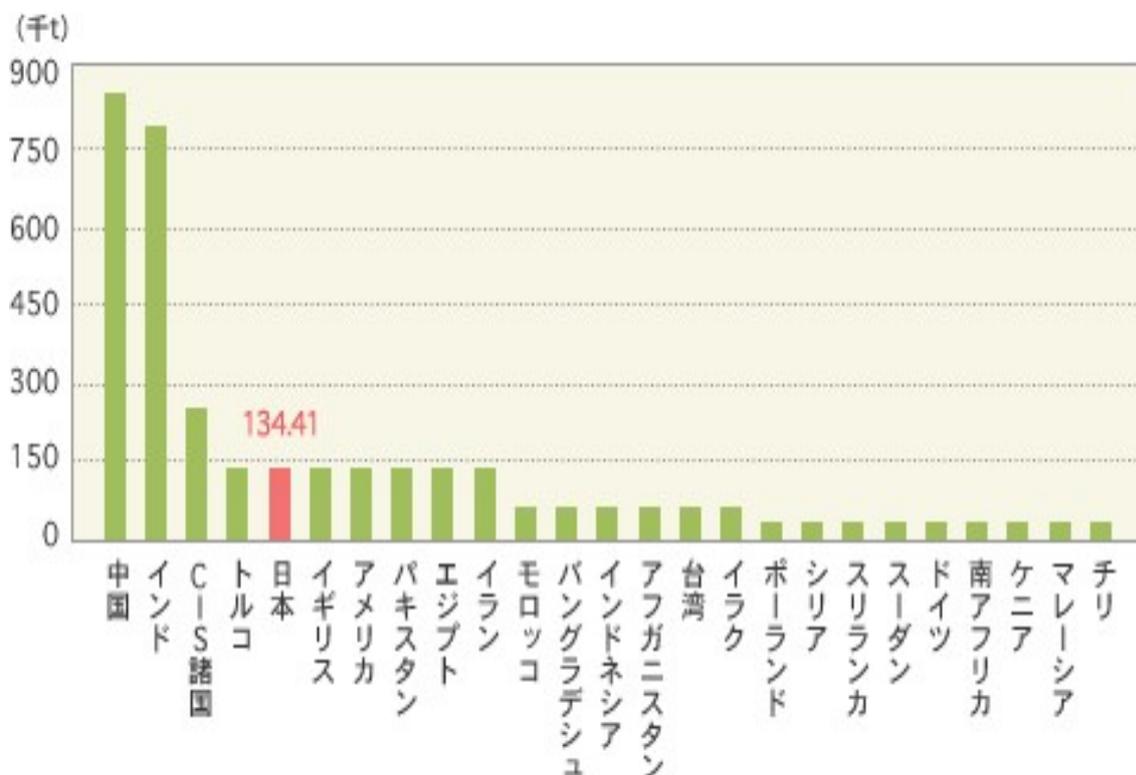


図2. 世界のお茶の消費量（出展：FAO/EST 2022）

ケニア等のアフリカ諸国を含む開発途上国では、消費量としては少なく、ほとんどが輸出に回されているのが実態である（Chimoita, 2015）⁴⁾。

このような状況を鑑みれば、発展途上国では、お茶が換金作物として重要な位置づけであることがわかる。

すでに21世紀になる前から、お茶のニーズにも変化が起きており、それまでは味や風味のようなお茶本来の品質に関わるものや価格等が主要因であったが、健康志向の高まりを受けて、プラスアルファの価値が求められるようになっており、お茶本来の機能だけではなく、お茶由来の成分や別のさらなる機能が求められるようになってきている（西條, 1993, 原, 2000）^{5, 6)}。商品の差別化や付加価値の観点から、機能性を謳った商品が通常のお茶よりも高い価格で販売されているにもかかわらず、消費者に受け入れられている現状は注目に値する。

このような背景もあり、日本においては、政策として、積極的に効果を謳える健康や栄養に関する表示の制度を作ってきた。つまり、科学的根拠があれば機能性を表示できる機能性表示食品制度や、からだの生理学的機能などに影響を与える特定の保健の目的

が期待できる旨の表示ができる特定保健用食品制度がそれである（滝本，1996；中垣，2001；林ら，2007；高橋，2010；千葉ら，2014；山田ら，2017）^{7~12}）。

機能性を謳って差別化を図り付加価値を上げている商品としては、例えば、図3に示すように、機能性表示食品として、テアニン・茶カテキンの成分で、認知機能（注意力・判断力）の精度向上の効果を謳っている商品名「濃いお抹茶」（販売元：伊藤園）がある。また、特定保健用食品（略称：トクホ）として、茶カテキンの成分で、内臓脂肪低減の効果を謳っている商品名「ヘルシア緑茶」（販売元：KAO）や食物繊維の成分で、脂肪・糖の吸収抑制の効果を謳っている商品名「綾鷹 特選茶」（販売元：コカ・コーラ）がある。

機能性表示食品



成分：テアニン・茶カテキン

効果：認知機能（注意力・判断力）の精度向上

商品名：濃いお抹茶

販売元：伊藤園

特定保健用食品（トクホ）



成分：茶カテキン

効果：内臓脂肪低減

商品名：ヘルシア緑茶

販売元：KAO

特定保健用食品（トクホ）



成分：食物繊維

効果：脂肪・糖の吸収抑制

綾鷹 特選茶

コカ・コーラ

図3. 機能性を謳った商品例（各社ホームページより引用）

このように、機能性を謳うことで、味や価格以外で商品の差別化を図ることができるとともに、さらに高い価値を付加することができ、価格競争から外れた商品販売を行うことができる。

なかでも、近年、機能性を謳った商品の成分として、 γ -アミノ酪酸（ γ (gamma)-aminobutyric acid:GABA）が注目されている。GABAは γ -アミノ酪酸（ガンマ-アミノらくさん、gamma-Aminobutyric acid）または4-アミノ酪酸（IUPAC名 4-aminobutanoic

acid) の省略形であり、アミノ酸のひとつで、主に抑制性の神経伝達物質として機能している物質である。アミノ酪酸にはアミノ基のつく位置により α -、 β -、 γ -の 3 種類の構造異性体が存在するが、 γ -アミノ酪酸は、そのうちのひとつである。正式名称は γ -アミノ酪酸であるが、英語名の γ (gamma)-aminobutyric acid の頭文字をとった略称 GABA (ギャバ) が一般的に広く用いられている。

GABA は、茶に含まれるアミノ酸の一つであるが、血圧降下作用があり、人体の脳や脊髄などの中枢神経系に滞在し、主に抑制機能を持つ神経伝達物質として知られている (佐々木・河野, 2010) ¹³⁾。GABA 含量が多いギャバロン茶は睡眠を助けることが報告されており (Cheng and Tsai, 2009) ¹⁴⁾、ストレプトゾトシン誘導糖尿病マウスにおける大脳皮質のアポトーシスやオートファジーを緩和することが知られている (守田ら, 1996) ¹⁵⁾。

さらに脊椎動物の中枢神経系では、主に海馬、小脳、脊髄などに存在し、また節足動物・甲殻類でも神経伝達物質として用いられている (田中, 1985; 蔵本, 1984) ^{16・17)}。シナプスでは、シナプス前膜から放出され、後膜の膜上にある GABA に対する GABA 受容体タンパク質と結合して作用を発揮する (齋藤・鈴木, 2007) ¹⁸⁾。GABA は、脳内でグルタミン酸の α 位のカルボキシル基がグルタミン酸脱炭酸酵素との反応により除かれることによって生成されることが知られている (植野, 2015) ¹⁹⁾。 γ -アミノ酪酸と結合する GABA 受容体としては 3 つのサブタイプが知られており、それぞれ GABAA 受容体、GABAB 受容体、GABAC 受容体と呼ばれている (Taniyama and Kumoi, 2000) ²⁰⁾。さらに GABA は、グルタミン酸が基本的に興奮性の神経伝達物質であるのに対し、基本的に抑制性の神経伝達物質であることが知られている (黒岩ら, 2019) ²¹⁾。GABA 作動性のニューロンとしては大脳基底核の線条体からの投射ニューロン (中型有棘細胞) や、小脳のプルキンエ細胞などがある (上窪ら, 2008) ²²⁾。

GABA は、1950 年に哺乳類の脳から発見された、たんぱく質を構成しないアミノ酸の一種である (Robinson・Olsen, 1988) ²³⁾。その後の研究で動植物界に広く分布していることがわかってきた (Sarasa ら, 2020) ²⁴⁾。高等動物においては、抑制性の神経伝達物質として機能していることが知られている (Capti ら, 2013) ²⁵⁾。また、脳機能改善効果や高めの血圧を改善する作用なども認められており、これを利用した医薬品・食品も開発されている (山本, 2013) ²⁶⁾。

血圧は交感神経の活動が高まると上昇するが、GABA はこの交感神経の亢進を抑え、血管の収縮に働くノルアドレナリンの分泌を抑えることにより血圧を低下させると考えられている (吉川ら, 2020) ²⁷⁾。GABA を産生する能力を持つ乳酸菌を利用して調製された発酵乳製品は、血圧が高めの人に適した「特定保健用食品」として承認されている (早川, 2005) ²⁸⁾。

GABA は食べ物では、野菜 (トマトやケール、パプリカなど) や果物 (メロンやブドウ、バナナなど)、乳酸菌発酵製品 (漬物やヨーグルトなど) といった食品に多く含まれ、

経口摂取によって血圧対策、ストレス・睡眠対策などの健康効用を得られることが分かっている (Ramos-Ruiz et al., 2018)²⁹⁾。特定保健用食品 (トクホ) では GABA を関与成分とする血圧対策の商品が 11 品目あり、例えば、ヤクルト本社が 04 年から発売している乳製品乳酸菌飲料「プレティオ」がある (水澤, 2008)³⁰⁾。

機能性表示食品では 320 件以上の届け出があり、半数ほどが販売中である。そのうち生鮮食品では、トマトやケール、メロン、パプリカ、ブドウなどに次いでバナナの届け出を行ったドールが、2020 年 5 月から血圧対策を訴求する機能性表示バナナの販売を開始した (山本, 2020)³¹⁾。筑波大学発ベンチャーのサナテックシード (東京・港) は、ゲノム編集技術を用いた品種改良により GABA 含有量を高めたトマトの事業化を進めている (安本, 2022)³²⁾。なお、GABA の規格は、図 4 のとおりである。

<規格>

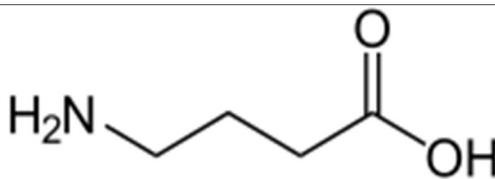
慣用名 : GABA	化学名 : γ -アミノ酪酸 gamma-Aminobutyric acid
化学式	C ₄ H ₉ NO ₂
分子量	103.12
構造式	

図 4. GABA (γ アミノ酪酸の構造式)

このように GABA は、ストレス低減、睡眠導入効果があり、リラックスを目的とした場面に適している一方、血圧を下げる効果もあり、これは健康増進を目的とした場面に適している。お茶の場合、香りやテアニンのリラックスに加え、カテキンや食物繊維における脂肪低減効果や糖吸収抑制効果による健康増進を目的とする同様の場面があり、GABA 高含有緑茶を開発する意義は大きいと期待される。

即ち、組み合わせの効果を利用して、製品差別化や製品単価を上げ、さらに高い価値を生みだせる可能性がある。

GABA を多く含んだお茶の製造は、以前から行われており (袴田ら, 1988)³³⁾、例えば、1) 赤外線処理, 2) マイクロ波処理, 3) グルタミン酸ナトリウム溶液への浸漬処理, 4) 嫌気処理のような製造方法が報告されている。

1) 赤外線処理は、処理を施すための装置が必要となり、かつ、簡単な作業とはならないというデメリットがあった (白木, 1998)³⁴⁾。

2) マイクロ波処理、特別な装置が必要となり、かつ、簡単な作業とはならないというデメリットがあった（白木，1999）³⁵⁾。

3) グルタミン酸ナトリウム液への浸漬処理は、溶液の管理が必要であり、処理工程が煩雑となるというデメリットがあった（白木，2001）³⁶⁾。

4) 嫌気処理は、処理を施すための装置が必要である上に、処理工程が煩雑となるデメリットがあったが、他の方法に比べて、比較的簡単であったことから、商品化されており、図5に示すように、現在でも販売されている（竹内ら，1994）³⁷⁾。



- ・収穫した茶葉に高濃度窒素ガスで嫌気処理して製造
→嫌気処理によりグルタミン酸（緑茶のうまみ成分）がGABAに転換
半発酵状態：ウーロン茶に似た独特の風味
GABA（ギャバ）+ウー“ロン”茶=ギャバロン茶

カテキンの含量が低下、独特の風味→敬遠

図5. 嫌気処理により製造されたお茶の商品例（山本漢方ホームページより）

嫌気処理の方法は、1986年に農水省茶業試験場で開発され、ウーロン茶に似た独特の臭気を発する特徴があり、GABA（ギャバ）とウーロン茶の”ロン”とを組み合わせ「ギャバロン茶」と呼ばれている（津志田，1990）³⁸⁾。

このギャバロン茶は、GABAの含有量が多い代わりに、カテキン含量が低くなることが報告されている。また、嫌気処理により半発酵状態となってしまう、独特の臭気を発するため、消費者に敬遠されているという実態がある（中田ら，1988）³⁹⁾。

そこで、本研究では、機能性成分のGABAと緑茶の効能の好適な組み合わせによって高付加価値のお茶としての可能性を見出すとともに、ギャバロン茶として普及が進まなかったデメリットを解消する製造方法を探索することを目的とした。さらに、製造方法に関しては、茶の生育方法を変えずに、収穫後の茶葉に対する処理を行い、かつ、誰でも簡単に製造することができ、資材も安価であり、環境負荷もなく健康被害もなく安全な製造方法であることも、大前提の条件として据えた。

このような製造方法の条件とすることで、発展途上国の技術導入の可能性を見出し、GABAを多く含むお茶を製造できれば、高付加価値の換金作物となり、輸出や自国消費での商品の差別化を図ることができ、農家の収入が増えるとともに、女性などの雇用創出の一助となり、さらに、お茶を消費することによっても健康維持が可能となる。

東京農業大学 熱帯園芸学研究室では、青葉アルデヒド（*trans*-2-hexenal）の植物における機能について包括的に研究を進めており、その成果の一つとして、青葉アルデ

ヒド (*trans*-2-hexenal) を収穫後のトマト果実に処理することにより、トマト果実の GABA 含量が高まることを見出した (Terada et al., 2017) ⁴⁰⁾。

青葉アルデヒド処理では、青葉アルデヒドを、GABA 含量を増加させたい対象に曝露するため、嫌気的な状況が生じず、ギャバロン茶とは異なるメカニズムで GABA の生成が見込め、カテキン含量の低下を伴わずに、GABA 含有量の高いお茶を製造できる可能性がある。即ち、ギャバロン茶に代わる製造方法となり得るのではないかと考えた。

さらに、青葉アルデヒドは、天然物質のため健康や環境にやさしく、液体のため輸送が楽で特殊な技術が不要である等、資材に用いる処理剤としては、好適な条件も揃えている。

なお、畑中顯和の研究成果に基づき (『みどりの香り—植物の偉大な知恵』、2005、丸善) ⁴¹⁾、以下に青葉アルデヒドおよびみどりの香りについて略述しておきたい。

<青葉アルデヒド>

ラインケにより、青臭い香りの物質がアルデヒドである可能性が指摘され (Reinke, 1881) ⁴²⁾、その後、クルチウスにより、シデの葉から精製した精油の抽出液中から 2-ヘキセナールが同定され、青葉アルデヒド (Blätter aldehyd) と名付けられた (Crutius and Franzen, 1912) ⁴³⁾。

茶生葉からは、武居三吉により青葉アルデヒドとともに青葉アルコールが発見された (Takei, 1938) ⁴⁴⁾。畑中顯和は、青葉アルデヒドおよび青葉アルコールがリノレン酸に由来することを発見し、合計 8 つの香りを総称して「みどりの香り」とした (畑中, 1993) ⁴⁵⁾。なお、青葉アルデヒドの規格は、図 6 のとおりである。

<規格>

慣用名：青葉アルデヒド	化学名： <i>trans</i> -2-ヘキセナール <i>trans</i> -2-hexenal
化学式	C ₆ H ₁₀ O
分子量	108.17
その他の名称	リーフアルデヒド、ジエチルアセター ル、1, 1-ジエトキシ- <i>trans</i> -2-ヘキ セン、 <i>trans</i> -3-Propylacrolein、 <i>trans</i> - 3-プロピルアクロレイン、 Leafaldehyde、(E)-2-Hexen-1-al、(E)- 2-Hexenal、(2E)-2-Hexenal、(2E)-2- Hexen-1-al

化学式	
外観	無色透明な液体
香気	特有の香気を有する
比重 (d ₂₀ /20)	0.847~0.853
屈折率 (n ₂₀ /D)	1.419~1.425
ガスクロ含量 (%)	98.0以上 (異性体合計) (面積百分率法)
酸価	1.0以下

図6. 青葉アルデヒド (*trans*-2-ヘキセナールの構造式)

青葉アルデヒドは、みどりの香り (Green leaf volatiles, GLVs) の主たる成分の一つである。みどりの香りとは、オキシリピン代謝におけるヒドロペルオキシドリアーゼ経路により生成される、炭素数6のアルデヒド、アルコール、およびそれらのエステルの総称で、いわゆる緑葉香や青臭さの主成分である (畑中, 2007)⁴⁶⁾。みどりの香り分子としては、リノレン酸由来の青葉アルデヒド: (E)-2-ヘキセナール、(Z)-2-ヘキセナール、(Z)-2-ヘキセノール、青葉アルコール: (Z)-3-ヘキセノール、(E)-3-ヘキセノール、さらにリノール酸由来の n-ヘキサナールと n-ヘキサノールの8つの化合物が知られている (畑中, 2003)⁴⁷⁾。各々香りは異なり、植物の葉の臭いを嗅ぐときには、これらの合成臭を感知していることになる。例えば、青葉アルデヒドと青葉アルコールとを比較したときには、青葉アルデヒドでは果実様臭となり青葉アルコールでは緑葉様臭が特徴的とされる。また、新鮮さの印象は両者ともに大きい、青葉アルデヒドでより高いとされている (畑中, 2000)⁴⁸⁾。

みどりの香り分子は濃度の違いにより官能効果が変わり、低濃度で柔らかい香りであるが、高濃度では刺激臭となる。眼を刺激して涙を分泌させ、鼻に刺すような痛みを生じさせる。みどりの香りは、ほぼすべての被子植物が生成するとされる (Hatanaka, 1993)⁴⁹⁾。

青葉アルデヒドの生合成においては、例えば、リノレン酸を基質とする場合、リノレン酸はリポキシゲナーゼ (lipoxygenase: LOX) による酸化と脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ (hydroperoxide lyase: HPL) による開裂を受けて、まず (Z)-3-ヘキセナールが合成され、さらに、その後の酵素反応により青葉アルデヒド: (E)-2-ヘキセナールが生成する (Matsu et al., 2006)⁵⁰⁾。

青葉アルデヒドは、人間の嗅覚によっても感じ取ることができる。化学構造と匂いの相関 (Chemical structure-odor relationships) 調査では、青葉アルデヒド (*trans*-2-hexenal) は 2E、-C=C-C=O 構造により新鮮なイメージを与え、二重結合の位置が ω 位に移動すると官能評価が上がる傾向にある (畑中, 2000)⁴⁸⁾。

ヒトに青葉アルデヒドを曝露すると α 波は0.03%の濃度で最快適性（鎮静作用）を呈することが知られている（畑中，2005）⁵¹⁾。

本研究では、以上に略述した機能性成分である GABA と青葉アルデヒドに着目し、安価・簡易・安全な GABA 茶製造方法の可能性を探索・実証すべく、以下の研究を企図し遂行した。

まず、第 1 章にて、青葉アルデヒドがチャの緑葉中の GABA 含量に及ぼすについて調査し、緑茶葉の GABA 含量が高くなる好適な条件を検討した。

第 2 章では、密封低温条件下における青葉アルデヒド処理がチャの緑葉中 GABA 含量に及ぼす影響について調査し、青葉アルデヒドの茶葉への処理方法として、密封低温条件下に置いた場合について、緑茶葉の GABA 含量が高くなる好適な条件を検討した。

第 3 章では、通風乾燥中における青葉アルデヒド処理が茶の緑葉中 GABA 含量に及ぼす影響について調査し、青葉アルデヒドの茶葉への処理方法として、通風乾燥中に置いた場合について、緑茶葉の GABA 含量が高くなる好適な条件を検討した。

ギャバロン茶に関しては、GABA 含量が高く健康に良いとして商品化されたが、香りや味わいが敬遠されて利用が促進されなかったという経緯がある。飲用を考慮すると単に緑茶葉の GABA 含量だけでは利用可能性が高くないため、GABA 以外の成分や香り、味わい等についても考慮する必要がある。

そこで、第 4 章では、第 1 章～第 3 章の検討に基づいて決定した好適な青葉アルデヒド処理により製造された GABA 含量が多い緑茶葉（GABA リッチ緑茶）の品質について、香りの面から調査及び検討を行なった。

最後に、第 5 章では、青葉アルデヒドが茶の緑葉中の GABA 含量に及ぼす影響について考察するために、青葉アルデヒド処理による GABA 含量向上メカニズムの解析について検討を行なった。

第1章 青葉アルデヒドがチャの緑葉中 GABA 含量に及ぼす影響

本章では、青葉アルデヒドの曝露処理の効果の確認と、緑茶葉中の GABA が高含有となる、好適な青葉アルデヒドの処理濃度及び曝露時間に関する検討を *in vitro* で行った。

[供試材料]

静岡県静岡市清水区吉川 112 の石上製茶の茶畑（「静岡県石上茶園」）に植栽されている樹齢 30 年のヤブキタ茶(キク類:Asterids、ツツジ目:Ericales、ツバキ科:Theaceae、ツバキ属:Camellia、チャノキ:C. sinensis)。

供試するチャは、静岡県静岡市清水区吉川 112 の石上製茶の茶畑（「静岡県石上茶園」）に植栽されている樹齢 30 年のヤブキタを用いた。供試材料には、2017 年 5 月 2 日に収穫適期となった一番茶を用いた。



写真 1. 石上茶園



写真2. 茶園の風景



写真3. 供試材料採取の様子

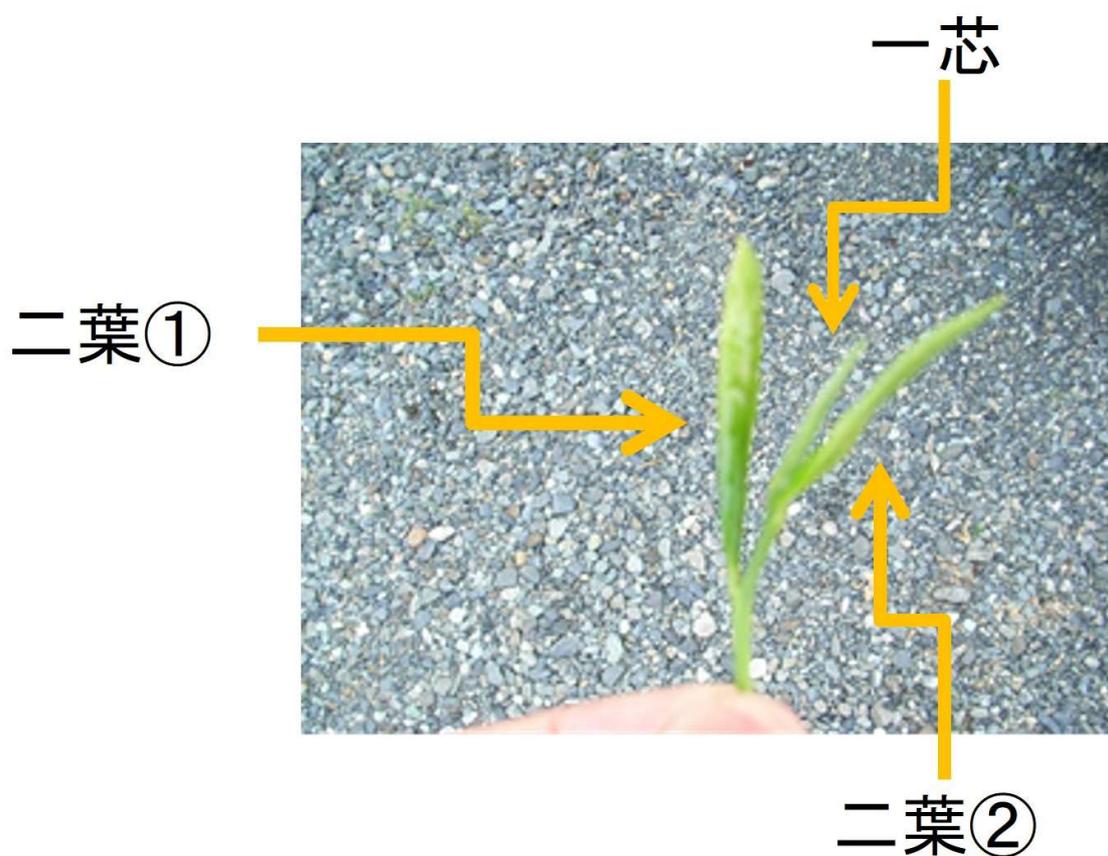


写真4. 供試材料の摘み方：一芯二葉摘み

[材料および方法]

採取した茶葉を 600ml のガラス瓶に封入し、ガラス瓶内で青葉アルデヒドに曝露した。所定の時間放置後に茶葉を液体窒素に入れて、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用いて、茶葉の GABA を含むメタボローム解析を行った。

青葉アルデヒドの処理濃度は 1ppm, 10ppm, 100ppm とし、曝露時間は 1 時間、3 時間、6 時間とした。すなわち、青葉アルデヒドの処理濃度 1ppm において、曝露時間を 1 時間、3 時間および 6 時間の処理区とし、青葉アルデヒドの処理濃度 10ppm において、曝露時間を 1 時間、3 時間および 6 時間の処理区とし、青葉アルデヒドの処理濃度 100ppm において、曝露時間を 1 時間、3 時間および 6 時間の 9 処理区とし、無処理の対照区と比較した。なお、ポジティブコントロールとして、ギャバロン茶の製造を模した窒素充填による嫌気処理を設けた。

曝露時間経過後は、ただちにファルコンチューブに入れ、液体窒素内で保蔵した。

なお、ポジティブコントロールは、摘み取った茶葉をすぐさまアルミバックに詰め、内部を窒素で置換しシーリングした。無処理区は、ガラスジャーに入れ、1時間、3時間および6時間後に液体窒素に入れ保蔵した。

その後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010 Plus, 株式会社島津製作所製) を用いてメタボローム解析を行い、多変量解析ソフト (Pirouette 4.5, GL Sciences 製) を使用して GABA 含量の測定を行った。

なお、ガスクロマトグラフ質量分析計は、Yin et al. (2010) 5 2) および Iijima and Aoki (2009) 5 3) に従って以下の条件および手順で測定した。

茶葉のサンプルを液体窒素で凍らせたのち、乳鉢と乳棒でパウダー状になるまで粉碎した。粉末サンプルは分析まで -80°C で保存した。粉末サンプルを 2ml のプラスチックチューブに 100mg 量りとり、250 μl のメタノールとクロロホルムを加え、ボルテックスで攪拌抽出を行った。その後内部標準として 2mg/ml の濃度のリビトール 50 μl および 175 μl のイオン交換水を添加後十分に攪拌し、抽出液とした。抽出液は 14,000rpm にて 10 分間室温条件で遠心分離を行い、80 μl の上澄み液を回収した。上澄み液は遠心エバポレーター (CVE-200D 型、EYELA 製) および凍結乾燥機 (Modulyo type 4K 型、Edwards 製) を用いオーバーナイトで乾燥させた。乾燥後サンプルに 20mg/ml の濃度の methoxylamine- pyridine 溶液を 40 μl 添加し、 37°C に設定したドライブロックバス (EB-603, AS ONE 製) で 90 分加熱し、メトキシム化した。その後 50 μl の N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA) を添加し、 37°C に設定したドライブロックバス (EB-603, AS ONE 製) で 30 分加熱し TMS 化

(Trimethylsilylation) を行なったものを分析用のサンプルとした。サンプルの分析はスプリットキャピラリーインレットおよび 30 m の DB-5 キャピラリーカラム (0.25 mm ID, 1 μm film thickness, J&W Scientific 製) を装着した GCMS を用いた。GC の条件はインジェクター 280°C 、ディテクター 200°C に設定し、カラムオーブンは初期温度 100°C で 4 分間ホールド後、 320°C まで 1 分間あたり 4°C の速度で昇温プログラムを組み、69 分の分析時間に設定した。キャリアーガスは He を用い、流速は 1.1ml/min に設定した。MS の条件はイオン源温度 200°C 、インターフェース温度 280°C に設定した。スキャンは分析開始後 4.48 分から 69 分までの 45 m/z から 600 m/z までとし、スキャニングスピードは 2000 とした。代謝物の同定は、化合物データベースの標準化合物のフラグメントパターンおよび保持指標と比較して行った。なお、代謝物の同定は標準溶液を用いて確認し、シミラリティーが 70%以上であったものを採用した。

[結果および考察]

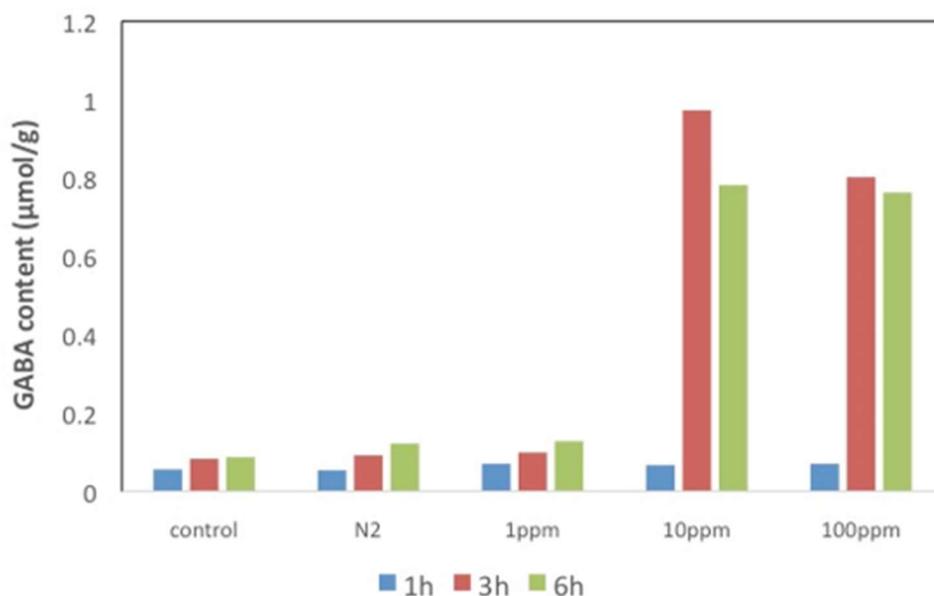


図 7. 青葉アルデヒド処理が緑茶葉の GABA 含量に及ぼす影響

なお、縦軸は GABA 含量を示し、横軸は処理区 (コントロール, ポジティブコントロール(N2), 処理濃度 1 ppm, 10ppm, 100ppm) を示す。各処理区：青色 (曝露時間 1 時間), 茶色 (曝露時間 3 時間), 緑色 (曝露時間 6 時間) を示す。

図 7 に示すように、青葉アルデヒドの曝露時間 1 時間 [1h] においては、青葉アルデヒド 1ppm 区、10ppm 区、100ppm 区で GABA の含量 [GABA content (μmol/g)] がコントロール及びポジティブコントロール区よりも高くなった。

また、青葉アルデヒドの曝露時間 3 時間 [3h] においては、青葉アルデヒド 1ppm 区・青葉アルデヒド 10ppm 区・青葉アルデヒド 100ppm 区で GABA の含量 [GABA content (μmol/g)] がコントロール及びポジティブコントロール区よりも高くなった。GABA の含量では、青葉アルデヒド 10ppm 区・青葉アルデヒド 100ppm 区で大幅に高くなり、青葉アルデヒド 10ppm 区では、コントロール区よりも約 10 倍程度高くなった。

また、青葉アルデヒドの曝露時間 6 時間 [6h] においては、青葉アルデヒド 1ppm 区・青葉アルデヒド 10ppm 区・青葉アルデヒド 100ppm 区で GABA の含量 [GABA content (μmol/g)] がコントロール及びポジティブコントロール区よりも高くなった。GABA の含量では、青葉アルデヒド 10ppm 区・青葉アルデヒド 100ppm 区で大幅に高くなった。

すなわち、青葉アルデヒド 10ppm 区・青葉アルデヒド 100ppm 区において、青葉アルデヒドの曝露時間 3 時間 [3h] ・6 時間 [6h] で、顕著に GABA 含量が増加することが分かった。

上記の結果から、緑茶中の GABA 含量と高めるためには、青葉アルデヒドの処理を 10ppm 以上の濃度で 3 時間以上行うことが必要であり、この条件を満たせばコントロール区に比べて GABA 含量を約 8 倍～10 倍高めることができることが明らかとなった。

第2章 密封低温条件下における青葉アルデヒド処理がチャの緑葉中 GABA 含量に及ぼす影響

第1章において、10ppm以上の濃度の青葉アルデヒドで3時間以上処理すれば、緑茶葉のGABAの含量を高められることがわかったため、第2章では、GABAの含量を高めた緑茶葉を簡易かつ大量に製造できる方法について検討を行った。

具体的には、簡易かつ大量製造を可能とするために、密閉空間となるような袋体内で緑茶葉の曝露処理を行うような、図8に模式的に示す製造方法を試みた。袋体であれば、密閉空間を構成でき、袋体内に緑茶葉と青葉アルデヒドを投入することで簡単に曝露処理を行うことができる。また、袋体を市販のビニル袋とすることにより、安価で入手しやすい資材で構成することができる。

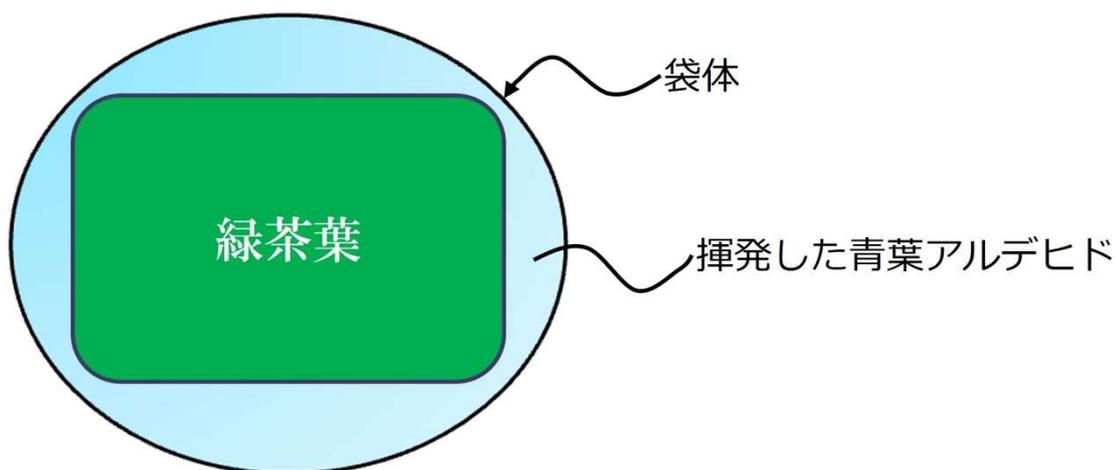


図8. GABA 高含有の緑茶葉の製造方法

[供試材料]

本検討において供試するチャは、埼玉県狭山市加佐志36の奥富園に植栽されているヤブキタを用いた。試験においては、2017年8月4日に収穫適期となった一番茶を用いた。

[材料および方法]

採取直後の茶葉を70リットルのポリエチレンビニル袋に入れ、青葉アルデヒドの内部濃度が100ppm (w/v) となるように、7gの青葉アルデヒドを濾紙に滴下して、袋内に投下し袋を密閉し、葉の褐変を防止するため、4℃の保冷库内に静置した。



写真5. 青葉アルデヒド処理の様子

3時間および4時間曝露した後、以下の(1)～(7)の製茶処理を行った。

- (1) 送風・加湿：水分保持・呼吸熱低下
- (2) 蒸気加熱：酵素の働きを止める
- (3) 冷却：常温に戻して品質保持
- (4) プレス：加熱→非加熱
- (5) 圧延：茶葉の組織破壊
- (6) ねじり：整形
- (7) 乾燥：茶葉の水分含量5%



写真6. 製茶過程1 (蒸気加熱・冷却)



写真7. 製茶過程 (粗揉)



写真 8. 製茶過程 (揉捻)



写真9．製茶過程4

GABAの測定は、製茶後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010 Plus, 株式会社島津製作所製) を用いてメタボローム解析を行い、多変量解析ソフト (Pirouette 4.5, GL Sciences 製) を使用して GABA 含量の測定を行った。ガスクロマトグラフ質量分析計は、Yin et al. (2010)^{5 2)} および Iijima and Aoki (2009)^{5 3)} に従って以下の条件および手順で測定した。

茶葉のサンプルを液体窒素で凍らせたのち、乳鉢と乳棒でパウダー状になるまで粉碎した。粉末サンプルは分析まで -80°C で保存した。粉末サンプルを 2ml のプラスチックチューブに 100mg 量りとり、250 μl のメタノールとクロロホルムを加え、ボルテックスで攪拌抽出を行った。その後内部標準として 2mg/ml の濃度のリビトール 50 μl および 175 μl のイオン交換水を添加後十分に攪拌し、抽出液とした。抽出液は 14,000rpm にて 10 分間室温条件で遠心分離を行い、80 μl の上澄み液を回収した。上澄み液は遠心エバポレーター (CVE-200D 型、EYELA 製) および凍結乾燥機 (Modulyo type 4K 型、Edwards 製) を用いオーバーナイトで乾燥させた。乾燥後サンプルに 20mg/ml の濃度の methoxylamine- pyridine 溶液を 40 μl 添加し、 37°C に設定したドライブロックバス (EB-603, AS ONE 製) で 90 分加熱し、メトキシム化した。その後 50 μl の N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA) を添加し、 37°C に設定したドライブロ

ックバス (EB-603、AS ONE 製) で 30 分加熱し TMS 化 (Trimethylsilylation) を行なったものを分析用のサンプルとした。サンプルの分析はスプリットキャピラリーインレットおよび 30 m の DB-5 キャピラリーカラム (0.25 mm ID, 1 μ m film thickness、J&W Scientific 製) を装着した GCMS を用いた。GC の条件はインジェクター 280°C、ディテクター 200°C に設定し、カラムオーブンは初期温度 100°C で 4 分間ホールド後、320°C まで 1 分間あたり 4°C の速度で昇温プログラムを組み、69 分の分析時間に設定した。キャリアガスは He を用い、流速は 1.1 ml/min に設定した。MS の条件はイオン源温度 200°C、インターフェース温度 280°C に設定した。スキャンは分析開始後 4.48 分から 69 分までの 45 m/z から 600 m/z までとし、スキャニングスピードは 2000 とした。代謝物の同定は、化合物データベースの標準化合物のフラグメントパターンおよび保持指標と比較して行った。なお、代謝物の同定は標準溶液を用いて確認し、シミュラリティーが 70% 以上であったものを採用した。

[結果および考察]

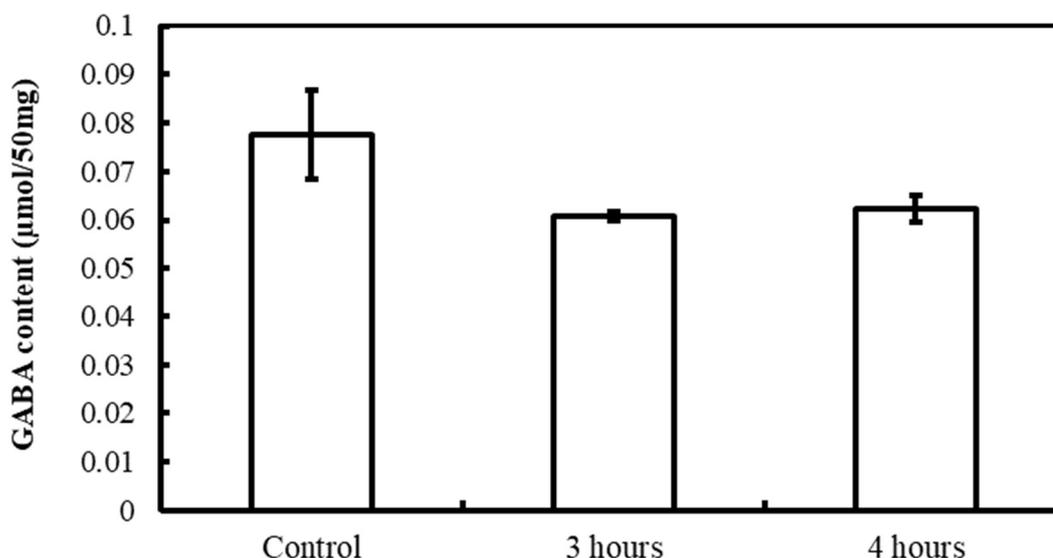


図9. 密封低温条件下における青葉アルデヒドの曝露処理がチャの緑葉中のGABA含量に及ぼす影響

なお、縦軸はGABA含量を示し、横軸は処理区（無処理、曝露時間3時間、曝露時間6時間）を示す。

図9に示すように、青葉アルデヒドの曝露処理を3時間行った区（3 hours）と、青葉アルデヒドの曝露処理を4時間行った区（4 hours）ともに、無処理区（Control）よりもGABAの含量が低かった。すなわち、密封低温条件下においての製造は、GABAの含量は増加せず、処理として好適ではないことが明らかとなった。

本試験では、安価かつ簡易な製造を目的として、ビニル袋にて密封条件を作り出して青葉アルデヒドの曝露処理を行ったが、商品の前提として茶葉の褐変を防ぐ必要があったため、低温状態で青葉アルデヒドの曝露処理を行っていた。GABAの含量が増加するはずの期間に低温状態としたため、緑茶葉の褐変は防ぐことができたものの、GABAの生成に關与する緑葉内の酵素活性が低下したものと推察された。緑茶葉の製茶においては、商品として茶葉の褐変を考慮する必要があるため、GABAの生成に影響を与えない低温以外の方法で褐変を回避する必要があることが明らかとなった。

第3章 通風乾燥中における青葉アルデヒド処理がチャの緑葉中 GABA 含量に及ぼす影響

密閉低温条件下では緑茶葉の褐変は抑えられたものの GABA 生成が促進されなかったことから、常温で褐変を生じない方法として、図10に模式的に示すように、採取直後の茶葉を大量に通風乾燥しながら青葉アルデヒドに曝露する製造方法を検討した。

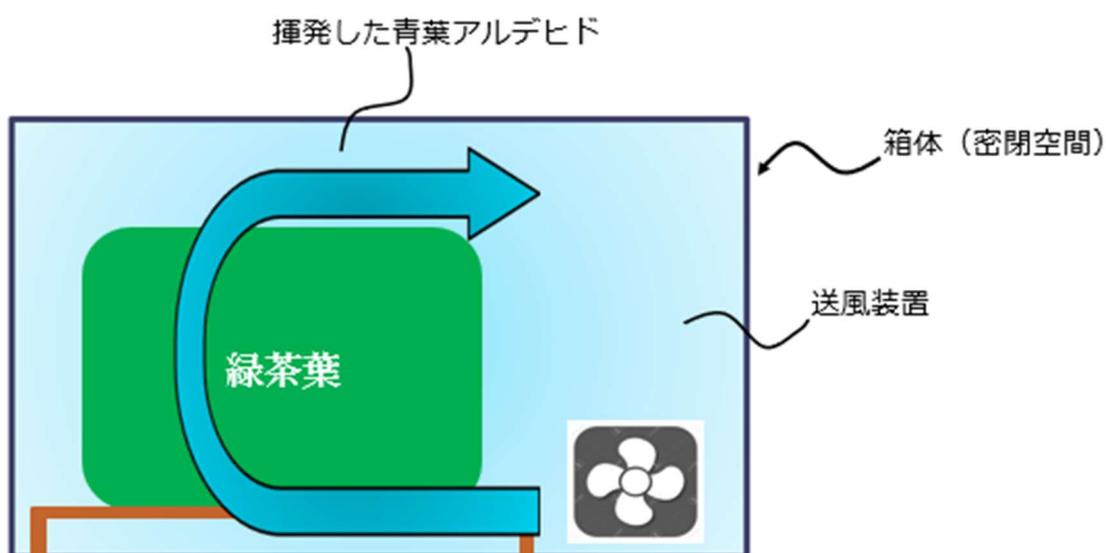


図10. GABA 高含有の緑茶葉の製造方法

[供試材料]

本検討において供試するチャは、茨城県古河市大堤 1181 の吉田茶園に植栽されているヤブキタを用いた。試験においては、2018年6月23日に収穫適期となった一番茶を用いた。

[材料および方法]

新鮮な収穫された茶葉を収穫し、ブルーシートで覆われた換気システムを備えた容器で、0、10、および100ppmのトランス-2-ヘキセナールで1、3、または6時間処理した。その後、茶葉を取り出して蒸気加熱、冷却、プレス、圧延、ねじり、乾燥させて処理した。GABA含有量は、GC-MSによって測定し、主成分分析（PCA）を行った。



写真10. コンテナに茶葉を投入した状態



写真11. 茶葉と青葉アルデヒドを投入後にコンテナをシートで密封した状態

[結果および考察]

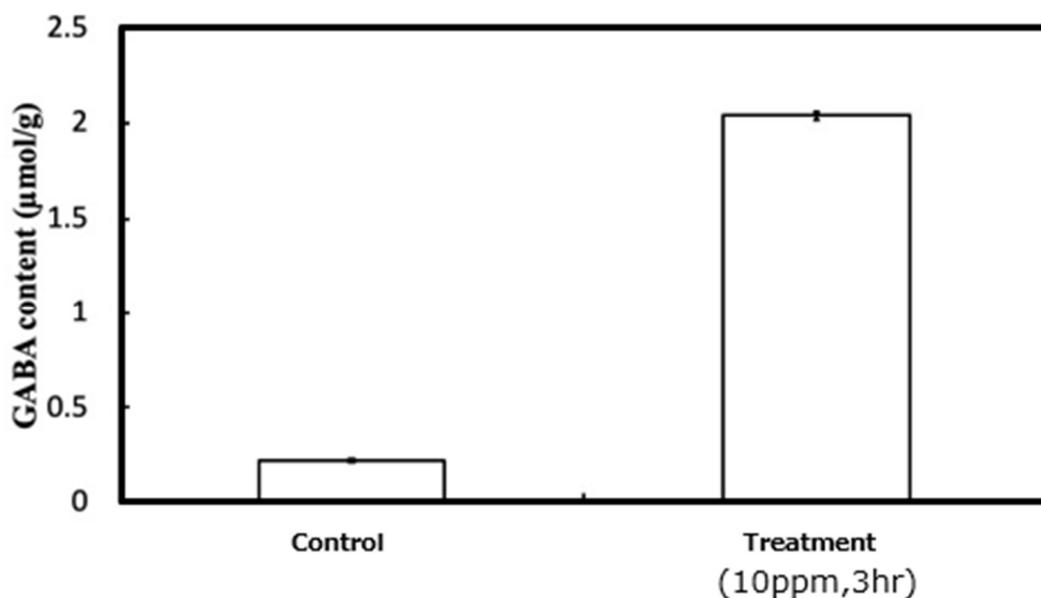


図 1 1. 通風乾燥中における青葉アルデヒドの曝露処理がチャの緑葉中の GABA の含量に及ぼす影響

なお、縦軸は GABA 含量を示し、横軸は処理区（無処理，濃度 10ppm・曝露時間 3 時間）を示す。Tukey test で 1%で有意差が認められた。

図 1 1 に示すように、無処理区（control）に比べて、青葉アルデヒドの曝露処理を行った区（treatment）で 1%水準で有意に GABA 含量が多かった（約 10 倍）。なお、測定した茶葉では、褐変は生じていなかった。

結果として、通風乾燥中に緑茶葉を置くことで、褐変が生じることもなく、さらに、GABA 含量も増加させることができることがわかった。通風乾燥であれば、特別な設備や作業も必要なく、大量の茶葉を同一環境下に置くことができ、青葉アルデヒドの曝露処理も同じタイミングで行うことができる。このため、簡易かつ安全な方法において、高い GABA 含量の緑茶葉を大量に製造することが可能となる。また、青葉アルデヒドを茶葉に曝露する空間を人が入れるサイズにすれば、作業性が向上するとともに、より多くの茶葉を処理することができる。また、市販の扇風機を送風装置に使用することもでき、より安価に処理装置が構成できると考えられた。

第4章 青葉アルデヒド処理で製造した GABA 高含有な緑茶の香気成分の解析

第3章で製造した GABA 高含有緑茶に関して、Gas Chromatography-Olfactometry (GC-0) 分析および GC-MS による定性・定量分析により香気成分の解析を行った。

GC-0 は、GC のカラムから溶出する香気成分を人間の鼻で嗅ぎ分けて検出し、GC カラムにて成分を分離後、カラム出口で検出器側とにおい嗅ぎ口に分岐して、におい嗅ぎ口にて、人がにおいを嗅いで、においの特徴を記録する装置である。具体的には以下の方法で実験を行った。

<香り成分の分析方法>

嗅覚ポート (OP275、GL Science) を装備した Agilent 7890 A ガスクロマトグラフ (Agilent Technology, CA, USA) を用いて実施した。カラムは DB-FFAP および DB-5 (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness, J&W Scientific) を使用した。サンプル(1.0 μL)はコールドオンカラム法で注入した。カラム温度は 40 °C で 2 分間保持し、6 °C/分の速度で 230 °C まで昇温し、その後 230 °C で 5 分間保持した。キャリアーガスにはヘリウムを用い、流速は 2.0 mL/min とした。炎イオン化検出器と嗅覚ポートの流量分割比は 1:1 であった。各臭気物質の直線保持指数 (RI) は、n-アルカン C6-C26 によって算出した。

<ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS) 分析>

各臭気成分の同定には、5975C 質量分析計を搭載した Agilent 7890 A ガスクロマトグラフを使用しました。DB-FFAP および DB-5 カラム (30 m x 0.32mm i.d., 0.25μm film thickness, J&W Scientific) を使用した。サンプル(1.0 μL)は 40 °C でコールドオンカラム法により注入した。カラム温度は 40 °C で 5 分間保持した後、6 °C/min の速度で 230 °C まで昇温し、230 °C で 5 分間保持した。キャリアーガスにはヘリウムを用い、流速は 2.0 mL/min とした。このときの電子衝撃のイオンエネルギーは 70eV であった。DB-FFAP および DB-5 カラムのキャピラリーカラムで C6-C26 n-アルカンの保持時間との関係から算出した GC RI により、化合物を同定した。化合物の同定は、フラグメンテーションパターンと RI を比較し、真正化合物がある場合は共打ちすることにより行った。

[結果及び考察]

本方法で製造された GABA 高含有の緑茶の官能特性については、GC-MS によるフレーバープロファイリングと官能データを下記の表 1 と表 2 に示した。

表 1. GC-MS によるフレーバープロファイリング

RT	compound	control	10 ppm <i>trans</i> -2-hexenal
12. 886	undecane	○	○
14. 956	1-methylethylbenzene	n. d.	○
15. 976	2-hexenal	n. d.	○
17. 442	tridecane	n. d.	○
17. 756	1,2-diethyl-benzene	n. d.	○
17. 978	1,4-diethyl-benzene	n. d.	○
19. 178	1-metyl-2-benzene	n. d.	○
19. 241	tetradecane	○	○
19. 763	(E)-2-hexen-1-ol	n. d.	○
20. 784	1-ethenyl-4-ethyl-benzene	n. d.	○
21. 209	pentadecane	○	○
23. 076	hexadecane	○	○
24. 851	heptadecane	○	○
25. 712	4-ethyl-benzaldehyde	n. d.	○
26. 268	4-ethyl-benzaldehyde	n. d.	○
26. 539	octadecane	○	○
	heptadecane	n. d.	○
27. 453	4-ethyl-benzoic acid	n. d.	○
27. 618	hexanoic acid	n. d.	○
27. 749	1-(4-ethylphenyl)-ethanone	n. d.	○
27. 869	4-ethylbanzoic acid	n. d.	○
	3.5-dimethyl-benzoic acid	n. d.	○
28. 160	eicosane	○	n. d.
	nonadecane	○	n. d.
28. 406	1-(4-ethylphenyl)-ethanone	n. d.	○
28. 948	phenylethylalcohol	n. d.	○
29. 320	(E)-2-hexenoic acid	○	○
	2-hexenoic acid	n. d.	○
29. 698	eicosane	○	○

30. 738	E-15-heptadecenal	n. d.	○
33. 020	14-methyl-pentadecanoic acid	○	n. d.
	hexadecanoic acid	○	○
33. 717	2-(tetradecyloxy)-ethanol	n. d.	○
	2-(hexadecyloxy)-ethanol	n. d.	○
35. 318	2-methoxy-4-(1-propenyl)-phenol	n. d.	○
36. 101	16-methyl-heptadecanoic acid	○	○
	octadecanoic acid	○	○
36. 377	19-methyl-heptadecanoate	n. d.	○
36. 808	trans-13-octadecanoic acid	n. d.	○
	cis-13-octadecanoic acid	n. d.	○
36. 808	16-octadecanoic acid	n. d.	○
36. 812	indole	○	○
37. 103	4-methyl-benzonitrile	n. d.	○
37. 291	2H-1-benzopyran-2-one	○	○
38. 268	1, 4, 7, 10, 13, 16-hexaoxacyclooctadecane	○	n. d.
39. 187	vanillin	○	n. d.
39. 889	1, 4, 7, 10, 13, 16-hexaoxacyclooctadecane	○	○
42. 370	tetradecanoic acid	n. d.	○
42. 853	1.2-benzenedicarboxylic acid	n. d.	○

○=検出、n. d. =非検出

表 2. GC-MS による官能データ

RI	compounds	Cont.	Treatment	aroma discription
975	methylbutanoate	n. d.	○	yogurt
1110	methyl-3-methylbutanoate	n. d.	○	sweet
1130	2-methyl-pentane-1-thiol	n. d.	○	green
1240	(<i>E</i>)-6-decenal	n. d.	○	green, Matcha
1275	unidentified	○	n. d.	peanut
1290	1-octene-3-one	n. d.	○	mushroom
1300	propyl-2-methylhexanoate	n. d.	○	lemone
1330	Hexyl-2-methylpropanoate	○	n. d.	green
1360	dimethyltrisulfide	n. d.	○	pungent
1380	(<i>Z</i>)-3-hexenol	n. d.	○	green cut grass
1440	2-methyl-2, 3-dimethylpyrazine	○	○	earthy
1440	hexyl-3-methylbutanoate	○	○	sweet
1470	5-nonene-7-one	n. d.	○	green, green tea
1510	2-isobutyl-3-methoxy pyrazine	n. d.	○	cucumber, green pepper
1530	(<i>Z</i>)-4-decenal	○	○	green
1570	(<i>E, Z</i>)-2, 6-nonadienal	n. d.	○	cucumber, green
1635	1-terpinene-4-ol	○	n. d.	green tea
1665	3-methylbutanoicacid	n. d.	○	sweaty
1700	geranial	n. d.	○	black tea
1735	(<i>E</i>)-2-undecenal	n. d.	○	green, oily
1800	(<i>E, E</i>)-2, 4-decadienal	n. d.	○	green, fatty
1887	unidentified	n. d.	○	green tea
1900	2-phenylethanol	○	n. d.	honey, rose
1927	β -ionone	n. d.	○	rose, flowery
1947	(<i>E</i>)-2-tridecanal	○	n. d.	green
1967	maltol	○	n. d.	sweet, cotton candy

1980	1-mercaptioctane-3-ol	n. d.	○	sweaty
2033	4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanone	○	○	sweet, cotton candy
2120	4-hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanone	○	○	sweet
2147	γ -decalactone	n. d.	○	peach, coconuts
2180	γ -(<i>Z</i>)-decenolactone	○	○	peach
2240	3-propylphenol	○	○	phenol, leather
2280	δ -undecalactone	○	n. d.	flowery,
2313	α -sinensal	n. d.	○	green, metallic
2333	2-furfuryl-2-methyl-3-furyldisulfide	○	n. d.	smoky
2461	cumarine	○	○	sakuramochi
2500	unidentified	○	n. d.	sweet
2550	phenylacetate	○	○	honey, rose
2580	vanilline	n. d.	○	vanillia
>2600	unidentified	n. d.	○	flowery
>2600	unidentified	n. d.	○	green tea

なお、「RI」は臭気物質の直線保持指数を示し、「compounds」臭気物質を示し、コントロール (Cont.)、青葉アルデヒド処理区 (Treatment) における検出結果が丸印で示す。また、臭気物質が何の香りを呈するかを「aroma description」に示す。

結果としては、青葉アルデヒドで処理することにより、アルデヒド、ケトン、エステル、酸基などの匂いが増加した。Ekrison(1968)によれば、アルデヒドを解毒化するアルコールデヒドロゲナーゼは、アルデヒド→アルコールの反応とともに、アルコール→アルデヒドの反応も触媒するが、とくに種々のアルデヒドの中でも青葉アルデヒドとの親和性が高いことを報告しており、高濃度の青葉アルデヒドが存在する場合、他のアルデヒドがアルコールに代謝されずに残存するものと推測される⁵⁴⁾。評価としては、香調として豆臭 (C9 や C10 のアルデヒド由来) の上に、熟したイチゴ感が香る通常の緑茶に近い雰囲気呈することが明らかとなった。豆臭はおそらく *trans*-2-nonadienal に由来し⁵⁵⁾、イチゴ臭は γ -decalactone に由来すると考えられる⁵⁶⁾。青葉アルデヒド処理で製造することで、ギャバロン茶のような敬遠される匂いは発生せず、消費者に受け入れられる可能性の香りであることがわかった。

第5章 青葉アルデヒド処理による GABA 含量向上メカニズムの解析

本章では、青葉アルデヒド処理における GABA の生成メカニズムの解析を行った。具体的には、緑茶葉内の代謝産物の増減と、GABA 合成に関与する酵素の活性（増減）を特定して、GABA 生成に関わる経路を探索すべく、代謝物を調べるメタボローム解析及び酵素の発現量を調べるトランスクリプトーム解析を行った。サンプルは、第3章で製造した青葉アルデヒド処理による GABA 高含有緑茶および通常の緑茶を供試した。

<メタボローム解析>

メタボローム解析は、Yin et al. (2010)^{5 2)} および Iijima and Aoki (2009)^{5 3)} に修正を加え、GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Japan) を用いた。手法は、電子イオン化法により非極性相カラム (DB-5, Agilent Technologies, USA) を供試して行った。

各サンプル (0.1g の凍結組織粉) は 250 μ l のメタノールとクロロホルムで順次抽出した。内部標準として 2.0 mg/ml のリビトール溶液 50 μ l と超純水 175 μ l を加えた後、試料を攪拌し、試料を 12000rpm で 10 分間、室温で遠心分離した。

その後、各サンプルの上澄み液 80 μ l を 1.5ml プラスチックチューブに分けた。これらの試料を遠心分離機エバポレーター (CVE-200D, TOKYO RIKAKIKAI CO, LTD, Japan) で 3 時間蒸発乾固させた。

その後、これらのサンプルを凍結乾燥容器 (Modulyo 4K, Edwards, USA) を用いて一晚凍結乾燥させた。

メチル化には、メトキシルアミン (20 mg/ml ピリジン) 40 μ l を試料に加え、37 $^{\circ}$ C で 90 分間インキュベートした。

トリメチルシリル化は、N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA) 溶液 50 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベーションした。キャリアーガスとしてヘリウムガスを 2.0mL/min で使用した。カラムオープン温度は、100 $^{\circ}$ C で 4 分間保持した後、320 $^{\circ}$ C まで毎分 4 $^{\circ}$ C ずつ上昇させた。

その後、320 $^{\circ}$ C で 10 分間保持した。代謝物の同定は、フラグメントパターンや保持指標をデータベース上の標準化合物と比較することで行った。

<検出した代謝物のデータの主成分分析 (Principal Component Analysis; PCA) >

1) 解析前に mean-center で均一化

2) Log10 algorithm にて変換後、分析

・ケモメトリックスソフトウェア (Pirouette 4.5、GL Sciences 製)

[結果及び考察]

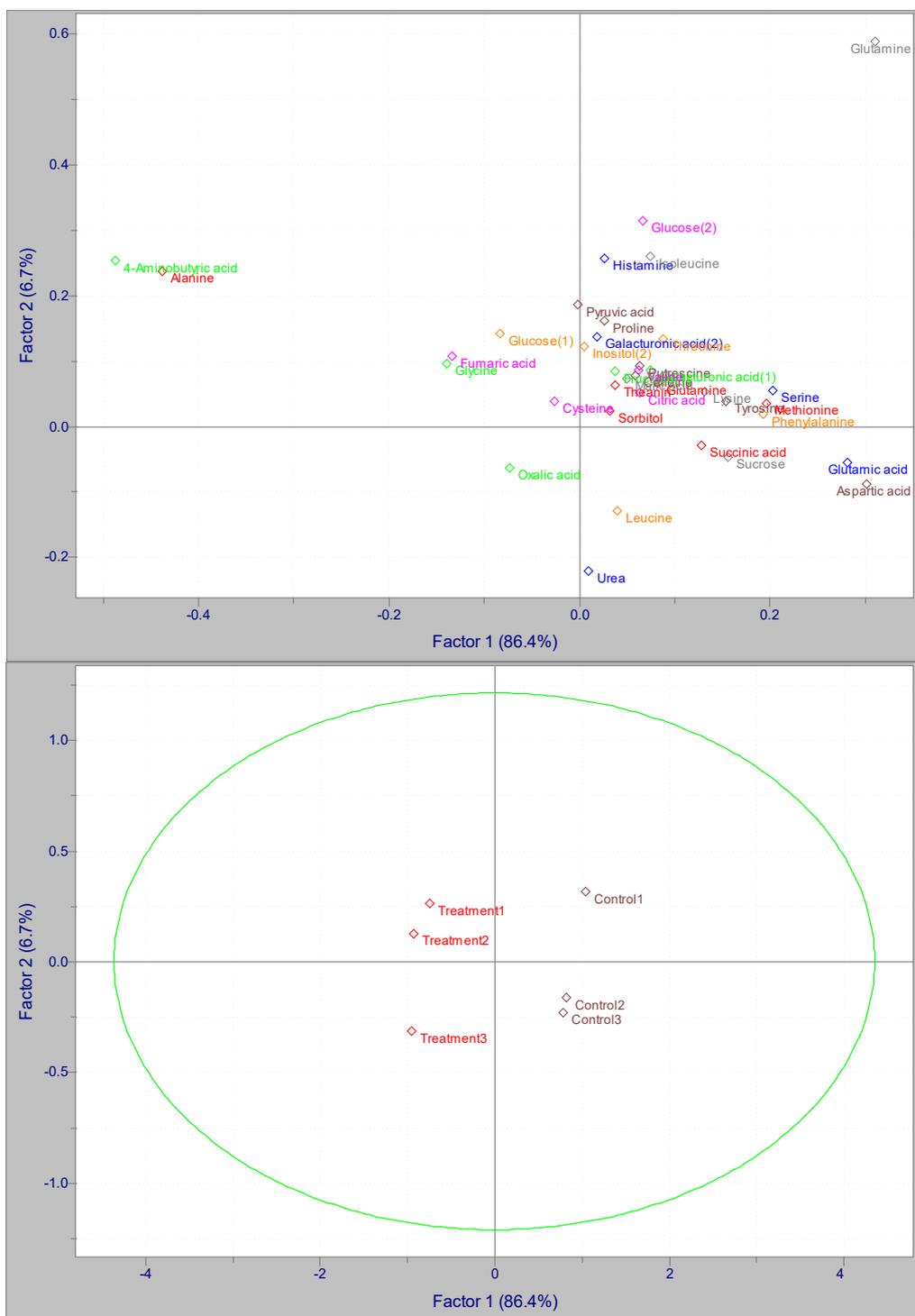


図1 2. 無処理区 (Control) と 100ppm の青葉アルデヒドの曝露処理区 (treatment) における PCA 分析結果

図12に示すように、PCA分析によると、第一種成分で、GABAや α ケトグルタル酸、グルタミン酸等を指標に、対照区と青葉アルデヒド区との差異がGABA成分等で明確に出る結果となった。PCA分析の結果でも示すように、青葉アルデヒド処理によって、GABA成分の増加が認められる結果になった。

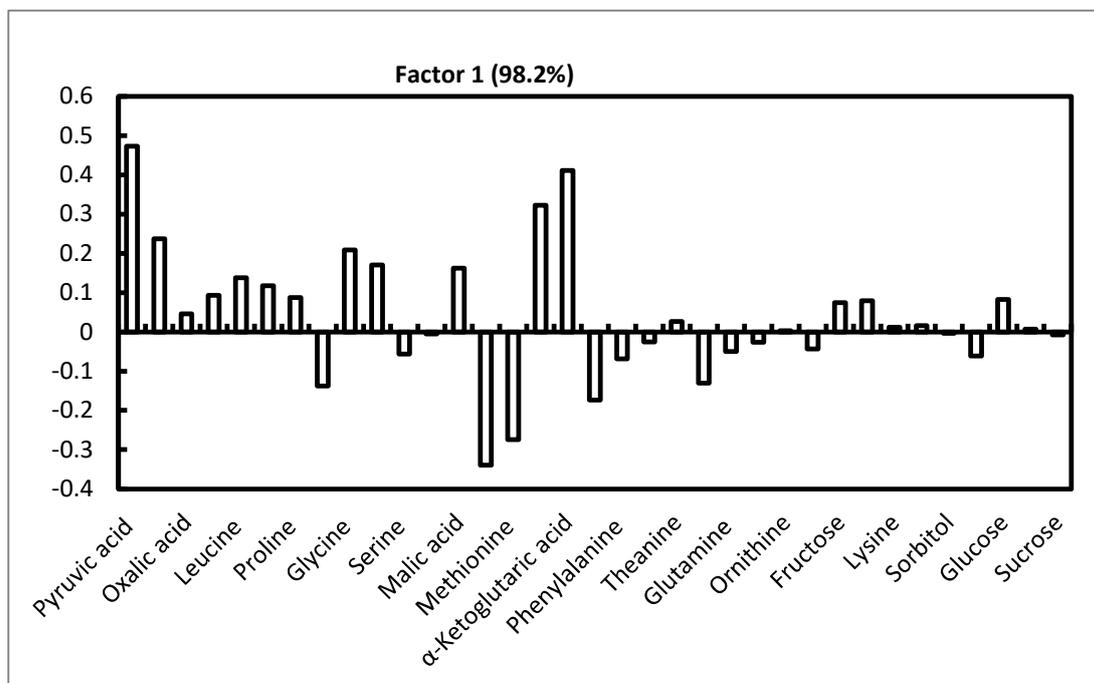


図13. 青葉アルデヒド処理がメタボロームに及ぼす影響

なお、縦軸は0を基点とした相対値を示し、プラス側が増加、マイナス側が減少を示す。横にはGABAとの関連がある代謝物を示す。

これらの結果を対照区との比較で示すと、図13のように、青葉アルデヒド処理によってGABA、ピルビン酸、 α ケトグルタル酸は正に増強され、グルタミン酸、コハク酸、アスパラギン酸は負に減少することが明らかとなった。これらの増減する成分の相互関係について考察すべく、関連酵素の発現について、トランスクリプトーム解析を行うこととした。

第6章 青葉アルデヒド処理による GABA 代謝関連酵素活性一斉解析

本章では、青葉アルデヒド処理における GABA の生成メカニズムの解析を、GABA 代謝に関係している酵素の RNA 発現量を調査することによって行った。

[材料と方法]

サンプルは、第3章で製造した青葉アルデヒド処理による GABA 高含有緑茶および通常の緑茶を供試した。処理区は、対照区（無処理 1 時間、3 時間、6 時間）、*trans*-2-hexenal 10ppm 処理（1 時間、3 時間、6 時間）、*trans*-2-hexenal 100ppm 処理（1 時間、3 時間、6 時間）の 7 処理区である。

トランスクリプトーム解析は、シークエンス解析によって DNA 配列上で遺伝子と推定された部分について細胞レベルで mRNA 量を測定・解析し、生体細胞内における遺伝子の発現状況を網羅的に把握することを目的として行う。本解析を用いて、各アノテーションがどのような代謝経路に関与しているかを調査することを目的とした。方法は、KEGG データベース (https://www.genome.jp/kegg/kegg_ja.html) アノテーション情報を基に、BLAST 解析を行い、各トランスクリプト配列に対してアノテーション付けして行なった。なお、抽出した RNA の純度をはじめ、一連の作業行程について、その精度を検討した結果を合わせて付記しておくことにする。

トランスクリプトームの解析手順を以下に示す。

1) サンプル粉砕：サンプル破砕装置(Tissue Lyser II、Qiagen 社製)

サンプル約 100mg をサンプル破砕装置(Tissue Lyser II、Qiagen 社製) を用いて、30Hz, 1 分間、粉砕を行ってサンプルを得た。

2) RNA の抽出：RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社製)

RNeasy Plant Mini Kit には、粘性の高い植物や菌類のライセートの微小遠心操作によるホモジナイゼーションおよびろ過用の QIAshredder カラムと、組み合わせて使用する RNA 精製用の RNeasy Mini Spin Column が付属している。グアニジンイソチオシアネート溶解と、シリカゲルメンブレンによる迅速な精製を組み合わせた RNeasy テクノロジーにより、トータル RNA 精製を簡便に行なうことができる簡易キットである。RNeasy Kit で精製した高品質の RNA はほとんど DNA を含まず、微量の DNA に敏感なアプリケーションを行なう場合、DNase 処理によって RNeasy 操作中に残存する DNA を除去できる。

1) で得たサンプルをキットに溶解し、QIAshredder カラムでホモジナイズ後、ライセートにエタノールを添加して最適な結合条件をつくり、その後、ライセートを RNeasy シリカメンブレンで処理を行った。RNA は結合するので、全ての夾雑物が洗浄除去される。高純度で濃縮された RNA を水で溶出し、以下の分析に供試した。

3) ライブラリー作製

ライブラリー作製には、NEBNext Ultra RNA library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs)を用い、ライブラリーの定量には、Kapa Library Quantification Kit(Kapa Biosystems)を使用した。

まず、2)で作成したRNAの濃度および品質を、Agilent 2100 Bio analyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) と Agilent RNA 6000 Pico kit を用いて測定し、10–1000 ng/50・1、RIN \geq 8 の条件で有効性を判定し、図14の通り、推奨されているRIN値を超えたクオリティーの高い試料であることが確認できた。

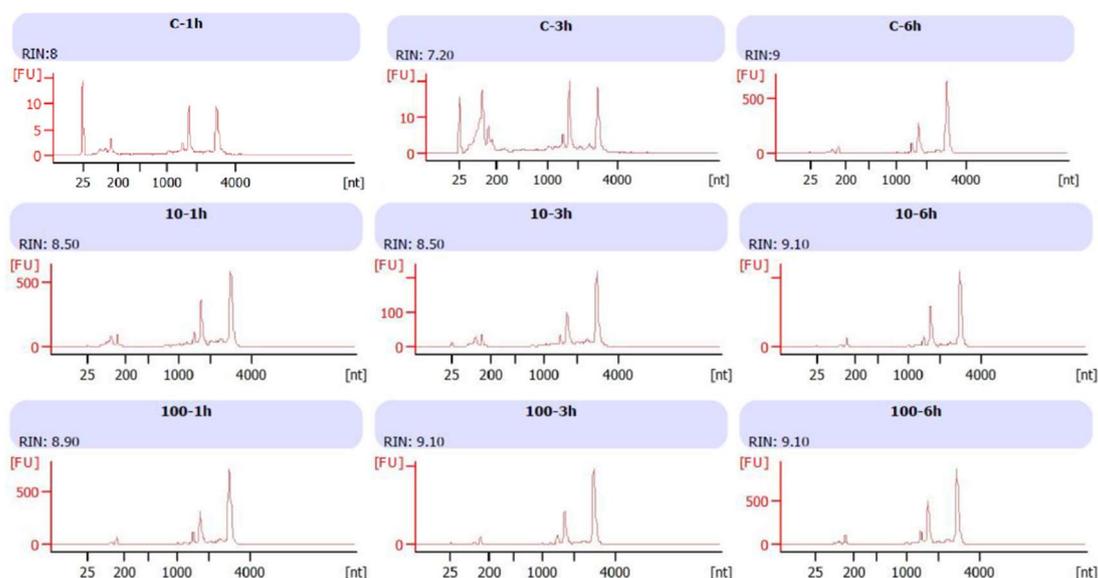


図14. バイオアナライザーによるトータルRNAの純度測定

さらに、polyA-RNAの精製、断片化、プライマー結合、一本鎖cDNA合成、二本鎖cDNA合成、精製については、NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illuminaのキット付属マニュアルに従って行った(<http://international.neb.com/~media/Catalog/All-Products/5601629C7791467AB43AAE7A5B361C21/Datacards%20or%20Manuals/manualE7530.pdf>)。ライブラリー作製手順については、<https://www.neb.jp/products/detail/1301>を参照した。最終的なライブラリーサイズを200bp以上にするために、RNA Fragmentation and Random Primingの工程では、94°C・10分でインキュベートを行った(付属マニュアル p42より)。二本鎖cDNA合成後、Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter Genomics)を用いて精製した。平滑末端化、3'末端アデニン付加、アダプターライゲーションも付属マニュアルに従って行い、Agencourt AMPure XP beadsを用いて精製した。続いて、インデックス付きプライマーを用いたPCRを付属マニュアルに従って8サイクル分行い、

Agencourt AMPure XP beads を用いて精製した。作製したライブラリーの濃度及び品質を確認するために、Agilent 2100 Bio analyzer と Agilent DNA 1000 kit を用いて測定したのが図 1 5 である。

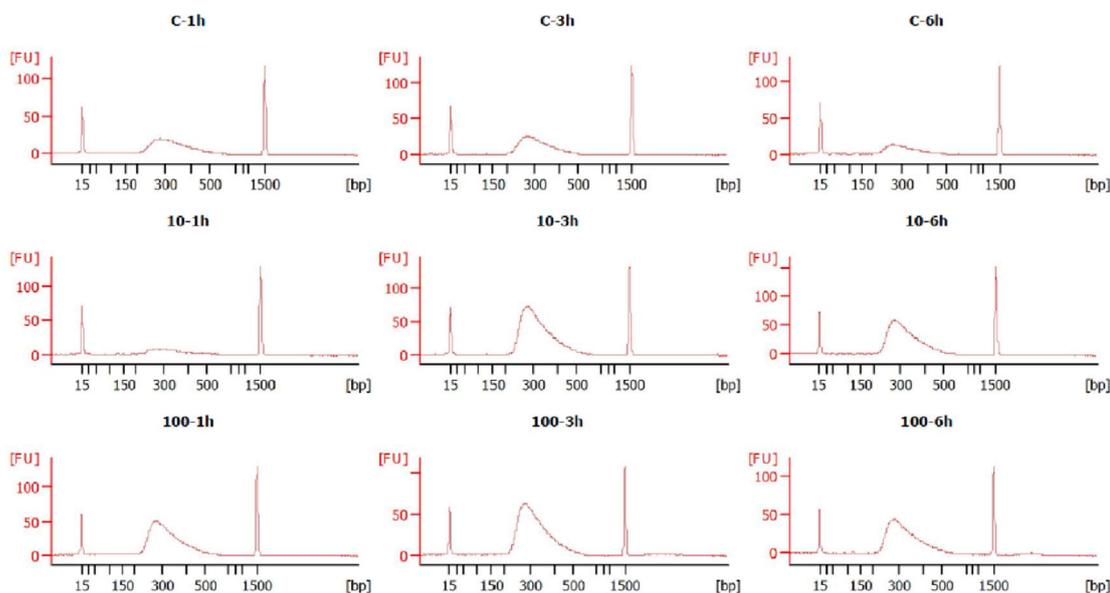


図 1 5. バイオアナライザーによって作製したライブラリーの平均断片長と濃度

4) シーケンシング:シーケンス、fastq ファイル生成

HiSeq2500(illumina)及び bcl2fastq2 シリーズ pipeline(illumina) を使用した。

各サンプルのライブラリーを適正濃度に等しく調製した後、等量で混合し変性処理を行った。シーケンスランの際に塩基の偏りを防ぐために 1%の PhiX ライブラリーをサンプルに Spike-in した。続いて、cBOT (illumina) を用いてフローセル内のクラスター形成を行い、HiSeq2500 (illumina) を用い、2×100 bp Paired-end read の条件でシーケンスとベースコールを行った。

Fastq ファイルの生成については、bcl2fastq2 pipeline (illumina) を用い、fastq ファイルの生成、アダプター配列の除去、データの品質を確認した。シーケンスデータの詳細情報は、表 3 に提示した。

表 3. シーケンス情報の詳細データ

サンプル	Reads (Paired-end read)	Yield (Mbases)	% Of \geq Q30 Bases (PF)	Mean Quality Score (PF)
C-1h	2 x 48,056,401	9,612	93.6	36.615
C-3h	2 x 33,561,378	6,713	94.55	36.975
C-6h	2 x 35,380,535	7,076	94.21	36.89
10-1h	2 x 31,724,104	6,345	92.77	36.54
10-3h	2 x 25,352,340	5,071	93.77	36.67
10-6h	2 x 28,442,278	5,689	94.31	36.87
100-1h	2 x 26,805,279	5,361	94.66	37.005
100-3h	2 x 24,557,082	4,911	94.41	36.9
100-6h	2 x 25,774,137	5,154	93.6	36.695

Yield (Mbases) : 総塩基数。

Reads : 総リード数。

% of \geq Q30 Bases (PF) : Q30 以上を記録した塩基の割合。

Q30 とは、シーケンスエラーが生じる確率が 10^{-3} 、すなわち 0.1%であることを示す値。

逆に言えば、精度が 99.9%であることを示している。

Mean Quality Score (PF) : クオリティスコアの平均値。

この結果、各サンプルで 2400 万から 4800 万ペアリードが得られたことがわかり、*de novo* RNA-seq では許容範囲のデータが得られた。

5) 一次解析

前処理として、Trimmomatic version 0.36 を用いて、アダプター配列を除去し、FASTX-Toolkit version 0.0.13.2 を用いて、各リードから頭 13 塩基をカットし（ライブラリー作製の際に一本鎖 cDNA 合成に用いたランダムプライマーによる非特異的な配列が影響しているため）、N 塩基（検出不可）を含むリードを除去し、それから Minimum quality score to keep:20、Minimum percent of bases that must have [-q] quality: 80 の条件で、クオリティフィルタリングを行った。上記のトリミング及びフィルタリングを経て、ペアリードのうち片側だけ除かれてしまった アンペアリードを除去した。

de novo アセンブリ は Bridger version r2014-12-01 を用いて、default コマンドにより *de novo* アセンブリを行った。得られたコンティグ配列に関しては、ABYSS version 1.3.6 を用いて確認した（表 4）。

表 4. de novo アセンブリの結果

サンプル	n	n:N50	min	N80	N50	N20	max	sum
C-1h	56,652	11,759	201	819	1,726	2,873	8,662	56,652
C-3h	60,016	12,173	200	827	1,756	2,980	9,275	60,016
C-6h	64,922	12,202	201	767	1,763	3,140	12,607	64,922
10-1h	58,113	11,366	201	825	1,783	3,098	11,972	58,113
10-3h	53,451	10,784	201	804	1,712	2,944	10,218	53,451
10-6h	61,886	12,106	201	802	1,760	3,012	16,872	61,886
100-1h	67,783	12,336	201	747	1,772	3,167	22,200	67,783
100-3h	62,601	11,963	201	799	1,798	3,126	14,813	62,601
100-6h	60,819	11,903	201	806	1,761	3,047	14,092	60,819

n : 総コンティグ数。

n:N50 : N50 以上の配列長を示すコンティグ数。

min : 最も短いコンティグの配列長。

N80 : コンティグを長い配列順に整列させた際に、全コンティグ配列長総和の 80%に位置するコンティグの配列長。

N50 : コンティグを長い配列順に整列させた際に、全コンティグ配列長総和の 50%に位置するコンティグの配列長。

N20 : コンティグを長い配列順に整列させた際に、全コンティグ配列長総和の 20%に位置するコンティグの配列長。

max : 最も長いコンティグの配列長。

sum : 総塩基数。

次に、Transdecoder を用いて、default コマンドで ORF (コーディング領域) 予測を行った。予測された ORF を伴うコンティグ配列に関しては、ABYSS version 1.3.6 を用いて確認し、結果を表 5 に示した。

表 5. O R F 予測の結果

サンプル	n	n:N50	min	N80	N50	N20	max	sum
C-1h	39,042	9,828	297	708	1,317	2,226	7,197	3.97E+07
C-3h	40,818	10,109	297	705	1,329	2,298	8,937	4.18E+07
C-6h	40,895	9,815	297	717	1,374	2,427	11,778	4.28E+07
10-1h	39,246	9,641	297	738	1,383	2,394	11,241	4.15E+07
10-3h	36,877	9,194	297	699	1,314	2,244	7,665	3.74E+07
10-6h	41,115	10,205	297	702	1,326	2,256	11,253	4.19E+07
100-1h	40,848	9,836	297	738	1,404	2,469	14,325	4.35E+07
100-3h	40,753	9,983	297	720	1,371	2,370	11,238	4.27E+07
100-6h	40,535	9,981	297	702	1,338	2,304	11,778	4.15E+07

通常、de novo アセンブリは、総コンティグ数およびN50の値を踏まえて評価するが、今回の場合、総コンティグ数が数万、N50が1.3kbp規模であり、安定したアセンブリが行われたことがわかる。

配列クラスタリングに関しては、構築した各サンプルのコンティグ配列を統合し、類似する配列間を一つの配列セットに纏めるために、CD-HIT version 4.6 と TGICL version 2.1 を用いて、2通りの配列クラスタリングを行った。

クラスタリングされたコンティグ配列に関して、AbySS version 1.3.6 を用いて確認した結果を表6に示した。

表 6. 配列クラスタリングの結果

クラスタリング	n	n:N50	min	N80	N50	N20	max	sum
CD-HIT	62,671	14,325	297	693	1,413	2,544	14,325	6.48E+07
TGICL	57,235	14,375	287	1,071	1,866	3,096	14,337	8.27E+07

次にクラスタリングにより纏められた各配列セットの質について BUSCO を用いて評価した結果を表7に示した。

表 7. BUSCO による各配列セットの評価

クラスタリング	Complete BUSCOs (C)	Complete and single-copy BUSCOs (S)	Complete and duplicated BUSCOs (D)	Fragmented BUSCOs (F)	Missing BUSCOs (M)
CD-HIT	1,308 (90.9%)	970 (67.4%)	338 (23.5%)	40 (2.8%)	92 (6.3%)
TGICL	1,343 (93.3%)	969 (67.3%)	374 (26.0%)	32 (2.2%)	65 (4.5%)

Complete BUSCOs (C) : 完全配列で一致した配列数の総和 (S+D)。

Complete and single-copy BUSCOs (S) : 完全配列で一致したうち、シングルコピーの配列数。

Complete and duplicated BUSCOs (D) : 完全配列で一致したうち、複数コピーの配列数。

Fragmented BUSCOs (F) : 部分配列で一致した配列数。

Missing BUSCOs (M) : 一致しなかった配列数。

発現量比較解析を行うための Reference 配列を構築するために、各サンプルに対して得られた転写配列セットを一つに纏めて統合配列としたが、類似した配列が存在するため、配列クラスタリングを行った。今回は、アルゴリズムが異なる CD-HIT と TGICL の 2 種類のクラスタリングツールを使用した。表 6 および表 7 にみられるように、CD-HIT より TGICL の方がコンティグが纏まりやすい傾向にあった。また、BUSCO により、生物にとって必要とされるコア遺伝子が配列セット中、どれだけ含まれるかを調査し、クラスタリングした各コンティグセットの品質を評価したところ、わずかながら CD-HIT より TGICL の方が品質の高いことが明らかとなった。

次にアノテーション付けについて検討した。配列クラスタリングにより得られたコンティグ配列に対して遺伝子アノテーション付けを行い、結果を表 8 に示した。プログラムは blastx、データベースは “nr database”、“チャノキゲノム (Csa) のアミノ酸配列” “アッサムチャゲノム (Csa) のアミノ酸配列” をそれぞれ使い、BLAST を実行する際のパラメータとしては、e-value を $1e-4$ 、トップヒットのみを出力とした。

表 8. 各データベースに対してヒットしたコンティグ数
(括弧内は、総コンティグ数に対してヒットしたコンティグの割合)

	CD-HIT	TGICL
nr database	57,562 (91.9%)	54,894 (95.9%)
チャノキ(Css)	55,168 (88.0%)	53,021 (92.6%)
アッサムチャ(Csa)	52,555 (83.9%)	50,908 (88.9%)

さらに CLC Genomics Workbench プラグインの BLAST2GO PRO を用いて、配列クラスタリングによって得られたコンティグ配列に対して GO アノテーション付けを行った結果を表 9 に示した。

表 9. 各 GO カテゴリーに対してヒットしたコンティグ数
(括弧内は、総コンティグ数に対してヒットしたコンティグの割合)

	CD-HIT	TGICL
GO - Biological Process	7,534 (12.0%)	8,096 (14.1%)
GO - Cellular Component	6,226 (9.9%)	6,724 (11.5%)
GO - Molecular Function	8,787 (14.0%)	9,224 (16.1%)

GO(Gene Ontology) : 遺伝子機能に関する情報について共通語彙および階層化したもの。

最も大きい階層で大別する場合、生物学的プロセス(Biological Process)、細胞の構成要素(Cellular Component)、分子機能(Molecular Function)の3つとなる。

これらの結果、アノテーション付けにおいても、CD-HIT よりも TGICL の方がヒットしやすい傾向にあることがわかった。

二次解析に関して、まず発現量比較解析の結果を以下に示す。CLC Genomics Workbench 10 を用いて配列クラスタリングにより得られたコンティグに対してリードデータをマッピングしたのが表 10 である。なお、マッピングのパラメータは以下のとおり。

Mismatch cost: 2、Insertion cost: 3、Deletion cost: 3、Length fraction: 0.8、Similarity fraction: 0.8、Maximum number of hits for a read: 10、Expression value: Total counts, TPM

- ※Mismatch cost、Insertion cost、Deletion cost : ミスマッチ、挿入、欠失の許容数、
- Length fraction : マッチする際に考慮するリード長の割合、
- Similarity fraction : Length fraction で指定した長さのうち、一致するべき割合
- Maximum number of hits for a read : 1つのリードが複数のコンティグ配列へヒットする許容数
- Expression value : 発現量指標 (TPM(Transcripts per million)は、マッピングされたカウントデータに対して、総リード数が 100 万リードとした場合の換算値)

サンプル間の有意差検定は、Control をベースに Kal' s test (Z-test)を行った。

表 10. 各コンティグをリファレンスとしたマッピング結果

CD-HIT	C-1h	C-3h	C-6h	10-1h	10-3h
使用したリード数	92,432,686	64,948,244	68,232,824	59,291,206	48,898,584
リファレンス遺伝子数	62,671	62,671	62,671	62,671	62,671
マップしたリード数	39,346,942 (42.57%)	40,236,274 (61.95%)	43,117,904 (63.19%)	41,259,326 (69.59%)	22,950,862 (46.94%)
CD-HIT	10-6h	100-1h	100-3h	100-6h	
使用したリード数	55,080,138	51,999,944	47,606,512	49,250,920	
リファレンス遺伝子数	62,671	62,671	62,671	62,671	
マップしたリード数	30,882,940 (56.07%)	32,740,594 (62.96%)	27,151,148 (57.03%)	27,634,670 (56.11%)	
TGICL	C-1h	C-3h	C-6h	10-1h	10-3h
使用したリード数	92,432,686	64,948,244	68,232,824	59,291,206	48,898,584
リファレンス遺伝子数	57,235	57,235	57,235	57,235	57,235
マップしたリード数	38,624,760 (41.79%)	39,792,800 (61.27%)	42,585,284 (62.41%)	41,110,642 (69.34%)	22,743,786 (46.51%)
TGICL	10-6h	100-1h	100-3h	100-6h	
使用したリード数	55,080,138	51,999,944	47,606,512	49,250,920	
リファレンス遺伝子数	57,235	57,235	57,235	57,235	
マップしたリード数	30,611,134 (55.58%)	31,176,630 (59.96%)	26,999,676 (56.71%)	27,113,820 (55.05%)	

次に GO enrichment 解析の結果について、比較発現量解析結果に基づき、Fold change 2 以上または-2 以下、FDR 補正による P-value 0.05 未満を条件として、各時間における control vs 10ppm、control vs 100ppm でそれぞれ有意に遺伝子発現差異のあるコンティグ（遺伝子）（DEGs）を表 1 1 に纏めた。

表 1 1. 各時間における control、10ppm 処理、100ppm 処理のそれぞれ DEGs 数

	CD-HIT	TGICL
1h control vs 10ppm		
Control	3,734	94
10ppm	8,972	257
1h control vs 100ppm		
Control	3,240	110
100ppm	10,161	424
3h control vs 10ppm		
Control	5,707	406
10ppm	4,737	747
3h control vs 100ppm		
Control	5,496	671
100ppm	8,319	1,078
6h control vs 10ppm		
Control	11,044	1,396
10ppm	6,810	1,464
6h control vs 100ppm		
Control	9,524	1,275
100ppm	7,025	1,394

CLC Genomics Workbench プラグインの BLAST2GO PRO を用いて、各 DEGs において意味のある GO term があるかを調べるために、Fisher's Exact Test による GO Enrichment を行った結果を表 1 2 に示した。

表 1 2. 各組織・ステージの DEG's に対して GO Enrichment を行った結果

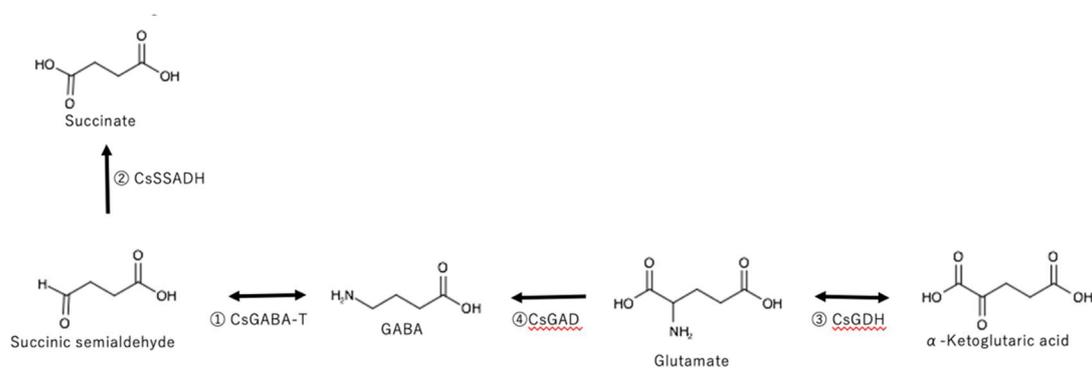
CD-HIT	Biological process	Cellular component	Molecular function
1h control vs 10ppm			
Control	30	8	4
10ppm	16	11	13
1h control vs 100ppm			
Control	32	1	5
100ppm	37	9	29
3h control vs 10ppm			
Control	0	0	1
10ppm	10	0	6
3h control vs 100ppm			
Control	0	0	0
100ppm	14	1	14
6h control vs 10ppm			
Control	7	14	16
10ppm	27	1	5
6h control vs 100ppm			
Control	6	2	3
100ppm	26	1	6

表 1 2. 各組織・ステージの DEG' s に対して GO Enrichment を行った結果 (続き)

TGICL	Biological process	Cellular component	Molecular function
1h control vs 10ppm			
Control	0	0	0
10ppm	4	3	3
1h control vs 100ppm			
Control	1	0	0
100ppm	29	24	4
3h control vs 10ppm			
Control	0	0	0
10ppm	3	0	3
3h control vs 100ppm			
Control	0	0	0
100ppm	6	10	6
6h control vs 10ppm			
Control	0	0	0
10ppm	34	3	6
6h control vs 100ppm			
Control	0	0	0
100ppm	34	3	6

これらの二次解析の結果としては、一時解析で構築した CD-HIT および TGICL に基づいて各コンティグ配列をリファレンスにして解析した場合、比較発現量解析から DEG' s を検出し、そこから GO Enrichment 解析を行うことにより、両リファレンスともにマッピング効率はほとんど変わらなかったものの、検出した DEG' s は、CD-HIT をリファレンスとした方が圧倒的に多く検出されることが明らかとなった。

リアルタイム RNA 分析に用いた GABA shunt に関係のある酵素とそれぞれのプライマーのシーケンス情報は、次の補足図 Fig. S1 に示した。



- ① CsGABA-T 1 F 5'-TTCACAGATAACAAGTCACCTAAT-3'
R 5'-TCTCACACTCTGCTCCAA-3'
2 F 5'-TAGTATGTTGGCACCATTAC-3'
R 5'-ACCATAGACCAGCGAGAG-3'
3 F 5'-CGCAGTAGAAGTAGCAGTTG-3'
R 5'-GTCGGTTGTAAGAGATGTGAAT-3'
- ② CsSSADH 1 F 5'-CCACCAAGTTCAGAGATAC-3'
R 5'-GCAAGTCCACAGGTAAGG-3'
2 F 5'-ACATTCGCTATAACTTCACCAT-3'
R 5'-TCCTCTCTCGGCAGATTAG-3'
- ③ CsGDH 1 F 5'-AGGTGGAGTTACGGTTAGTTA-3'
R 5'-GCACGAGCAACACGATTA-3'
2 F 5'-TTGTCCTCCTATTACCTCCAT-3'
R 5'-GAATCCAAGCCGAGAATGT-3'
- ④ CsGAD 1 F 5'-AGTGACATCCAGAAAGTCTTGCT-3'
R 5'-CACCATTAGTCTTCTTCTACTGAG-3'
2 F 5'-TTCGACA TCTGCAAGGTGCTCCA-3'
R 5'-ACTTGTGTTTTCTAGCCAAGAC-3'
3 F 5'-TTTCACATAACAAATGCAACGTC-3'
R 5'-CTCCCTTTGTCTTACCACCCATA-3'

Fig. S1 リアルタイム PCRのための GABA 代謝関連酵素の RNA プライマー情報

なお、得られた RNA-Seq の情報は、日本 DNA データバンク (DDBJ) に以下のアクセシオン番号で登録された。

Submission: DRA013348 (tomohiro-0491_Submission)

BioProject: PRJDB12914 (PSUB016606)

BioSample: SAMD00439333-SAMD00439341 (SSUB020458)

Experiment: DRX327085-DRX327093 (tomohiro-0491_Experiment_0001-0009)

Run: DRR338129-DRR338137 (tomohiro-0491_Run_0001-0009)

ここで、トランスクリプトーム解析を、GABA 代謝に関連する物質の含有量と関連付けて検討するため、前章で分析したメタボローム解析の結果の中から、GABA 代謝に関連する物質の量を、表 13 に掲載しておく。

表 13. 青葉アルデヒド処理が GABA に関係する代謝産物に与える影響

	Control (0 hours)	Treatment (3 hours)	Ratio
GABA	0.06	0.93	15.1
Pyruvic acid	4.85	57.5	11.9
Alanine	0.12	1.02	8.5
α -Ketoglutaric acid	0.45	1.10	2.4
Succinic acid	0.22	0.18	0.8
Aspartic acid	0.53	0.20	0.4
Glutamine	1.62	0.39	0.2

なお、上段左側は、物質名、下段は、酵素名です。対照区と青葉アルデヒド区の比率を右側に示す。

表 13 に示されたように、無処理区よりも青葉アルデヒド区において、GABA、ピルビン酸、アラニン、 α ケトグルタル酸が増加する一方で、コハク酸、アルパラギン酸、グルタミン酸が減少することは前章で述べたとおりである。

次に、GABA 代謝に関連する酵素に関連する RNA 発現量に関して、トランスクリプトーム解析の結果を表 14 に掲載しておく。結果としてグルタミン酸デカルボキシラーゼが特に増加したことが明らかとなった一方、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼが減少することがわかった（表 14）。

表 14. 青葉アルデヒド処理が GABA に関係する酵素の RNA 発現量に与える影響

	Control (0 hours)	Treatment (3 hours)	Ratio
GABA transaminase①	3.22	1.78	0.6
Succinic Semialdehyde dehydrogenase②	1.34	0.91	0.7
Glutamate dehydrogenase③	0.77	0.50	0.6
Glutamate decarboxylase④	0.93	3.67	4.1

なお、上段左側は、物質名、下段は、酵素名です。対照区と青葉アルデヒド区の比率を右側に示す。

以上の結果について、青葉アルデヒド処理における物質や酵素の増減を TCA 回路と GABA 側路に当てはめて図 1 6 として提示する。

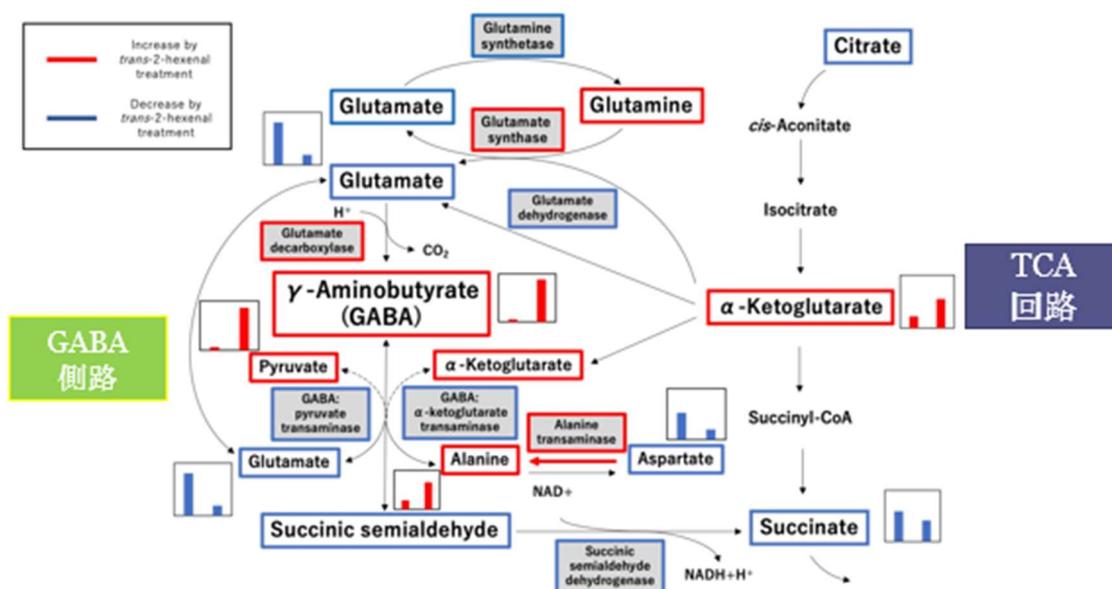


図 1 6. 青葉アルデヒド処理が緑茶葉の GABA 側路における生成物資及び酵素に及ぼす影響

なお、青葉アルデヒド処理によって、増加した物質/酵素を赤、減少したものを青で示す。また、無処理区との量的な比較の図も物質/酵素近傍に配置して示す。

結果として、 α ケトグルタル酸と GABA が増加していたことから、TCA 回路から供給された α ケトグルタル酸から生成されたグルタミン酸から、グルタミン酸デカルボキシラーゼによって GABA が生成されていることがわかった。グルタミン酸デカルボキシラーゼは青葉アルデヒド処理により 4 倍以上高まっていた (表 1 4)。グルタミン酸デカルボキシラーゼは嫌気性発酵によるギャバロン茶の生成過程⁵⁷⁾ や赤外線照射⁵⁸⁾、マイクロ波照射⁵⁹⁾ でも観察されている。Mei ら (2016) によれば、チャのストレス反応としての GABA 蓄積は、シロイヌナズナとは違う機構になっており、カルモジュリンによって制御される CsGAD1 (Cs グルタミン酸デカルボキシラーゼ 1) の活性化とともに、CsGAD2 の mRNA の蓄積が関与していることが報告されている⁶⁰⁾。また、トマト果実は、嫌気状態におかれると GABA 含量が高まることが知られているが、この場合は、グルタミン酸デカルボキシラーゼの活性が高まるのと同時に、 α ケトグルタル酸依存 GABA トランスアミナーゼ活性が低下することが報告されており、本実験の結果と一致している⁶¹⁾。

なお、本研究の結果、GABA の経路よりも先のコハク酸セミアルデヒド、TCA 回路に戻るコハク酸が減少しており、さらにコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性も減少していたことから、生成された GABA からのコハク酸セミアルデヒドが減少していることも、青葉アルデヒド処理区による GABA 含量の増加に貢献しているものと推察された。

上記のことから、青葉アルデヒド処理により、グルタミン酸合成酵素とグルタミン酸デカルボキシラーゼが活性化されるとともに、グルタミン酸デヒドロゲナーゼと GABA トランスアミナーゼが不活性化することで GABA の生成が促進されるとともに、代謝が抑制されて GABA が高含有の緑茶葉が製造できるものと推察された。

まとめ

青葉アルデヒドを緑茶葉に 10ppm 以上の濃度で、3 時間以上曝露する最適条件とすることで、略茶葉の GABA 含量を飛躍的に高めることに成功した。

収穫した緑茶葉を密閉可能な空間内で、青葉アルデヒド処理の最適条件下において、曝露し、同時に通風乾燥を行うことで、褐変が生じることなく、GABA が高含有の緑茶葉を製造することができる。

青葉アルデヒド処理により製造された茶葉は、高い GABA 含量であるが故に商品の差別化を図ることができるため、販売に有利あり、商品の価格競争にも巻き込まれない。また、緑茶に似た芳香を呈するため、消費者にも敬遠されることなく利用され得る。

また、青葉アルデヒドを処理剤として用いるため、環境や人体に安全なものであり、扱いも容易で、少量で多くの茶葉の処理を行うことができる。また、青葉アルデヒドを茶葉に曝露すればよく、最適条件も濃度帯や曝露時間帯において幅があり、製造に係る知識がなくても、製造が可能であり、ラフな製造にも耐えうる簡便さを持っている。茶葉の移動以外は、特に労働を強いられる作業もなく、女性等でも対応可能な製造方法を開発でき、利用可能性、販売優位性、製造容易性を備えた製造方法であると考えられる。

また、青葉アルデヒド処理によって、グルタミン酸合成酵素とグルタミン酸アミノトランスフェラーゼが活性化され、グルタミン酸デヒドロゲナーゼと GABA トランスアミナーゼが不活性化することで、GABA 生成され、代謝されずに GABA が高含有の緑茶葉が製造できると推察された。

補遺 本研究の成果として特許登録を行った記録を以下に付しておく。

審査記録：特許出願 2017-157291（公開 2019-033697）

特許願	2017/8/17
明細書	
請求の範囲	
要約書	
図面	
手続補正指令書（出願）	2017/10/31
手続補正書	2017/11/30
出願審査請求書	2020/9/2
検索報告書	2021/6/28
拒絶理由通知書	2021/8/3
非特許文献送付書	2021/8/3
非特許文献送付書	2021/8/3
非特許文献送付書	2021/8/3
期間延長請求書	2021/9/2
審査官面談	2021/10/12
手続補正書	2021/12/1
意見書	2021/12/1

【書類名】 特許願
【整理番号】 I N V 1 - 0 0 0 1
【提出日】 平成 2 9 年 8 月 1 7 日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A 2 3 L 1 / 3 0
【発明者】
【住所又は居所】 東京都世田谷区桜丘 1 丁目 1 番 1 号 東京農業大学内
【氏名】 小塩 海平
【発明者】
【住所又は居所】 東京都世田谷区桜丘 1 丁目 1 番 1 号 東京農業大学内
【氏名】 寺田 順紀
【発明者】
【住所又は居所】 東京都世田谷区桜丘 1 丁目 1 番 1 号 東京農業大学内
【氏名】 内田 一臣
【特許出願人】
【識別番号】 7 1 7 0 0 4 4 6 7
【氏名又は名称】 内田 一臣
【手数料の表示】
【納付番号】 4 9 1 7 - 0 0 0 3 - 0 6 8 8 - 1 1 8 1
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 植物体内の含有物質増加剤、及び植物体内の含有物質を増加させる方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物体内の含有物質増加剤、及び植物体内の含有物質を増加させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来より、植物体において特定の物質の含有量を増加させようとするニーズがある。このような物質としては、特定のアミノ酸類（例えば、システイン、GABA（ γ [Gamma] - Amino butyric Acid： γ -アミノ酪酸）、L-カルニチン、ビタミンU）やペプチド類（例えば、カルノシン、アンセリン、バリニルチロシン、チロシニルプロリン、GSH：グルタミルシステイニルグリシン）が挙げられる（特許文献1等を参照）。

特許文献1に記載の技術では、収穫直前のスプラウト（植物体）を、増加させようとする物質を特定の濃度で含む溶液中に、特定の温度・照度等の環境下で、特定の時間浸漬することで、植物体における特定の物質の含有量を高めることができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特許第4635159号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、上述した特許文献1に記載の技術は、植物体の蒸発散機能を利用して植物体の地上部内に含有量を高めようとする物質を溶液から吸収させて留まらせているに過ぎず、植物体内で該物質を生成させて含有量を高めているわけではない。このような方法においては、含有量を高める目的で外部から取り込んで留まっている物質が、植物体内で生成された他の物質へ影響を及ぼしてしまうことが懸念される。

また、含有量の増加に係る作業においても、所定期間にわたって植物を栽培した後、別途浸漬作業を行ってから収穫したり、浸漬作業中において諸環境（温度・照度等）を調整しなければならないため、煩雑であり、かつ、植物体が置かれる環境を調整するための設備が必要となる。

【0005】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、増加させようとする物質を植物体内で生成させることを前提としつつ、工程数が少なく、かつ、簡便な作業によって植物体内の含有物質を増加させることを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記目的を達成するため、本発明の一態様の植物体内の含有物質増加剤は、少なくとも、アルデヒド基を有する化合物を含むことを特徴とする。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、工程数が少なく、かつ、簡便な作業によって植物体内の含有物質を増加させることができる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

- 【図1】 トマト果実に青葉アルデヒドを処理した場合のエチレンの生成量に対する影響を示す図である。
- 【図2】 トマト果実に青葉アルデヒドを曝露処理した場合の主要代謝産物の含有量に対する影響を示す図である。
- 【図3】 茶葉に青葉アルデヒドを曝露処理した場合のGABAの含有量に対する影響を示した図である。
- 【図4】 茶葉に青葉アルデヒドを曝露処理した場合の主要代謝産物の含有量に対する影響を示した図である。
- 【図5】 青葉アルデヒドであるトランス-2-ヘキセナールの構造式を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

以下、本発明の実施形態について説明するが、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

【0010】

(植物体内の含有物質増加剤)

本発明の植物体内の含有物質増加剤(以下、「本発明の増加剤」ともいう。)は、アルデヒド基を有する化合物を少なくとも含む。アルデヒド基を有する化合物としては、2位に二重結合をもつアルデヒドであることが好ましく、本発明の効果を特に奏しやすいという観点から、後述する青葉アルデヒドが最も好ましい。

【0011】

発明者らは、鋭意研究の結果、アルデヒド基を有する化合物を収穫後の植物体(トマト等)に対して曝露処理することで、植物体内の所望の物質の含有量を増加させることができる点を見出した。

【0012】

ここで、青葉アルデヒドについて説明する。

青葉アルデヒドは、トランス-2-ヘキセナール(trans-2-hexenal)とも称され、脂肪族アルデヒドの一種である。

また、青葉アルデヒドは、図5に示す構造式によって表すことができ、化学式はC₆H₁₀Oである。

【0013】

本発明の増加剤には、本発明の効果を阻害しない範囲で、アルデヒド基を有する化合物以外の物質が含まれていてもよい。本発明の増加剤は青葉アルデヒドからなることが好ましい。

【0014】

本発明の増加剤によって増加させることができる物質(以下、「植物体内の含有物質」ともいう。)としては、植物体内に存在する任意の物質が挙げられ、例えば、エチレン、グルコース、GABA、及び有機酸(クエン酸、リンゴ酸)を例示できる。

【0015】

上記物質のうち、エチレンは、公知のエチレン促進剤(エスレル)を用いることで、増加させることができる。しかし、天然物質である青葉アルデヒドは、生体や環境に優しい上に、液体を気化させて使用するため、取り扱い易い点でエチレン促進剤(エスレル)よりも有効であり得る。

【0016】

本発明の増加剤によって植物体としては特に限定されないが、トマト、茶葉、ナス、ピーマン、トウガラシ、カボチャ、キュウリ、ニガウリ、スイカ、レタス、キャベツ、ハクサイ、ダイズ、リョクトウ、アズキ、ソラマメ、ダイコン、ニンジン、シソ、オオバ、ミョウガ、アスパラガス、キウイ、リンゴ、ナシ、カンキツ、カキ等が挙げられる。これらのうち、トマト、茶葉が特に本発明の効果を奏しやすい点で好ましい。植物の成熟度は特に限定されない。本発明の効果が特に奏されやすい点で、植物体としては完熟してないトマトが好ましい。

【0017】

(植物体内の含有物質を増加させる方法)

本発明の増加剤を、上記の植物体に曝露することで植物体内の含有物質を増加させることができる。なお、本発明において、「植物体内の含有物質が増加する」とは、植物体内の特定の物質について、本発明の増加剤に曝露しない場合に比べて、本発明の増加剤に曝露した場合において該物質の植物体内濃度が増加していることを意味する。

【0018】

上記の曝露工程の条件は、得ようとする効果に応じて適宜設定できる。例えば、曝露時間は3時間以上が好ましい。曝露温度は -5°C ~ 50°C が好ましい。

【0019】

本発明の増加剤の植物体への曝露量は過度でなくとも本発明の効果が奏される。そのため、例えば、本発明の増加剤が好ましくは 50 ppm 以下、さらに好ましくは 20 ppm 以下、より好ましくは 15 ppm 以下、最も好ましくは 10 ppm 以下となる雰囲気下に植物体を曝露してもよい。本発明の増加剤の植物体への曝露量の下限値は 0 ppm 超となる雰囲気下であればよく、 0.5 ppm 以上が好ましく、 1 ppm 以上がより好ましい。

【実施例】

【0020】

以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0021】

<実施例1：本発明の増加剤によるトマト果実の成熟促進効果及び含有物質の増加効果>

トマト果実に青葉アルデヒドを曝露処理することで成熟度や含有物質の生成量に及ぼす効果を検討した。

ガラス瓶内にトマト果実を入れて密閉し、トマト果実に0、1、10、100、又は1000 ppmの濃度の青葉アルデヒドを1時間曝露した。その後、暗所条件下で、 25°C で保存した後に、ガラス瓶内の空気を取り出して、1時間の曝露によるエチレンの増加量を測定し、次いで、保存後5時間後における植物体内の主要な代謝産物の分析を行った。本試験の結果を図1及び2に示す。

【0022】

図1は、トマト果実に青葉アルデヒドを処理した場合のエチレンの生成量に対する影響を示す図である。

図1に示すように、 10 ppm をピークとして青葉アルデヒドの濃度と比例して、エチレン生成が促進される結果となった。一方で、 100 ppm よりも高い濃度では、エチレン生成が抑制される結果となった。

【0023】

図2は、トマト果実に青葉アルデヒドを曝露処理した場合の主要代謝産物の含有量に対する影響を示す図である。

図2に示すように、グルコース、GABA、クエン酸、及びリンゴ酸においては、青葉アルデヒドを処理することによって、それぞれ増加することがわかった。

詳細には、グルコースは、1 ppm濃度の青葉アルデヒドによって特に増加することがわかった。

GABAは、青葉アルデヒドの濃度が高いほど、増加することがわかった。有機酸であるクエン酸及びリンゴ酸は、青葉アルデヒドの濃度に関係なく増加することがわかった。

【0024】

<実施例2：本発明の増加剤による茶葉における含有物質（GABA）の増加効果>

収穫した茶葉を、10 ppmの濃度となるように青葉アルデヒドを1時間密閉空間で曝露処理し、曝露後のGABA生成量を分析した。試験は、各処理区に対して5回繰り返して行った。その結果を図3に示す。

【0025】

図3は、茶葉に青葉アルデヒドを曝露処理した場合のGABAの含有量に対する影響を示した図である。

図3に示すように、青葉アルデヒドを茶葉に処理することで、GABAの含有量が大幅に増加することがわかった。

【0026】

従来のGABA含有量の高い茶葉の製造方法では、例えば、茶葉を好気条件下に所定時間置く処理（以下、「好気処理」という。）と、茶葉を嫌気条件下に所定時間置く処理（以下、「嫌気処理」という。）を所定回数交互に施して、茶葉のGABA含有量を増加させていた。

この場合では、各処理において装置等が必要であること、複数の処理工程が存在し作業が煩雑である。また、嫌気処理を施すことで、茶葉や半発酵状態となり、烏龍茶のような風味になってしまい、緑茶としての味わいを損ねる等の問題があった。

【0027】

しかしながら、上述した本手法を用いることで、単に青葉アルデヒドが所定濃度となる空間を設ければよく、また作業工程も曝露処理のみである上に、茶葉が嫌気条件下に曝されないために半発酵状態とならずに烏龍茶化せず、緑茶としての風味等を損ねることがない。また、青葉アルデヒドを用いているため、液体を気化させて利用すればよく薬剤としての取り扱いも容易である。

【0028】

上記の結果から推察される、青葉アルデヒドの曝露処理によるエチレン生成のメカニズムは、エチレンの前駆物質であるアミノシクロプロパンカルボン酸を非酵素的に開裂させることによって生じる。なお、この反応は、30分以上の曝露処理で効果を発揮し、3時間以上曝露すれば、より好適となる。

【0029】

また、青葉アルデヒドの曝露処理によるGABAの含有量増加のメカニズムは以下の通りである。

図4は、青葉アルデヒドの曝露処理後の代謝産物の含有量を示す図である。

図4に示すように、GABA含有量が増加する際に、同時にピルビン酸、アラニン、 α ケトグルタル酸が増加した。GABAとピルビン酸からアミノ基を転移してグルタミンを生成する酵素（GABA : pyruvate transaminase）の活性が低下すること、またグルタミンを脱炭酸してGABAを生成するglutamate decarboxylase活性が向上するためである。酵素活性の変化については、酵素タンパク質中のSH残基などがアルデヒド基による修飾を受けて立体構造が変化するためである。

【0030】

なお、本発明は、上述の実施形態に限定されるものではなく、本発明の目的を達成できる範囲での変形、改良等は本発明に含まれるものである。

【0031】

上述の実施形態では、青葉アルデヒドを例として説明したが、アルデヒド基を有する化合物であればよく、特に2位に二重結合をもつアルデヒドであればより好適であり、例えば、trans-2-hexenalを含むtrans-2-alkenal、ベンズアルデヒド、シナモンアルデヒドなどを用いることができる。

【0032】

以上、本発明のいくつかの実施形態について説明したが、これらの実施形態は、例示に過ぎず、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明はその他の様々な実施形態を取ることが可能であり、さらに、本発明の要旨を逸脱しない範囲で、省略や置換等種々の変更を行うことができる。これら実施形態やその変形は、本明細書等に記載された発明の範囲や要旨に含まれるとともに、特許請求の範囲に記載された発明とその均等の範囲に含まれる。また、本発明は、上述した各実施形態及び実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献及び特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項1】

少なくとも、アルデヒド基を有する化合物を含む、植物体内の含有物質増加剤。

【請求項2】

前記アルデヒド基を有する化合物は、2位に二重結合をもつアルデヒドである、請求項1に記載の植物体内の含有物質増加剤。

【請求項3】

前記アルデヒド基を有する化合物は、青葉アルデヒドである、請求項2に記載の植物体内の含有物質増加剤。

【請求項4】

前記植物体は、トマト、又は茶葉である、請求項1乃至3に記載の植物体内の含有物質増加剤。

【請求項5】

アルデヒド基を有する化合物に植物体を曝露する工程を含む、植物体内の含有物質を増加させる方法。

【請求項6】

前記植物体は、トマト、又は茶葉である、請求項5に記載の方法。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 作業工程が少なく、かつ、作業自体も簡単に植物体内の含有物質を増加させること。

【解決手段】 少なくとも、アルデヒド基を有する化合物を含む植物体内の含有物質増加剤であり、アルデヒド基を有する化合物は、2位に二重結合をもつアルデヒドである。さらに、アルデヒド基を有する化合物は、青葉アルデヒドからなる植物体内の含有物質増加剤である。このように含有物質増加剤を構成することにより、作業工程が少なく、かつ、作業自体も簡単に植物体内の含有物質を増加させることができる。

【選択図】 図2

【書類名】 手続補正書

【提出日】 令和3年12月1日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願 2017-157291

【補正をする者】

【識別番号】 717004467

【氏名又は名称】 内田 一臣

【手続補正1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項1】

少なくとも、青葉アルデヒドを含む、茶葉の含有GABA増加剤。

【請求項2】

前記青葉アルデヒドは、1ppmから10ppmとなる範囲の濃度である、請求項1に記載の茶葉の含有GABA増加剤。

【請求項3】

青葉アルデヒドに茶葉を曝露する工程を含む、茶葉の含有GABAを増加させる方法。

【請求項4】

前記青葉アルデヒドは、1ppmから10ppmとなる範囲の濃度である、請求項3に記載の茶葉の含有GABAを増加させる方法。

【請求項5】

前記曝露の時間は、3時間以上である、請求項3又は4に記載の茶葉の含有GABAを増加させる方法。

【請求項6】

前記曝露の温度は、 -5°C ～ 50°C の範囲である、請求項3乃至5の何か1項に記載の茶葉の含有GABAを増加させる方法。

【書類名】 意見書
【提出日】 令和3年12月1日
【あて先】 特許庁審査官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願 2017-157291

【特許出願人】

【識別番号】 717004467

【氏名又は名称】 内田 一臣

【意見の内容】

(1) 拒絶理由について

審査官殿は、本願請求項1～6に係る発明は、下記引用文献1～3に記載された発明に基づいて、当該引用文献に記載された発明及び当業者が容易に発明をすることができたものであるから、特許法第29条第1項及び第2項の規定により特許を受けることができない、と認定されました。

引用文献1: Effects of a trans-2-hexena treatment on plant metabolome alterations - a case study with tomato fruit, I SHS Acta Horticulturae 1169: II In P. 4 ternational Symposium on Pyrethrum, 2017年07月25日, p. 1-2

引用文献2: The Plant Journal, 2008年, Vol. 53, p. 197-213

引用文献3: 特開2012-213358号公報 引用文献4: Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1987年, Vol. 61, No. 7, p. 817-822

また、出願の発明の詳細な説明は、当業者が請求項1に係る発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されたものでない。また、出願時の技術常識に照らしても、請求項1に係る発明の範囲まで、発明の詳細な説明に開示された内容を拡張ないし一般化できるとはいえないから、請求項1に係る発明は、発明の詳細な説明に記載したものでないから、特許法第36条第4項第1号及び第6項第1号に規定する要件を満たしていない、と認定されました。

(2) 本願発明について

本願出願人は、上記の認定に鑑み、本意見書と同時に提出した手続補正書において、出願当初明細書の[0010]～[0029]の記載に基づいて特許請求の範囲を補正し、引用文献1及び2に対して本発明の新規性及び進歩性を明瞭に致し、明確性及び発明の詳細な説明の開示の範囲となりました。また、出願当初明細書の[0010]～[0029]の記載に基づいて、請求項1に従属する請求項2及び請求項3に従属する請求項4～6を追加致しました。よって、特許請求の範囲の補正は、新規事項を追加するものではない。

(3) 拒絶理由1及び2（特許法第29条第1項及び第2項）について

引用文献1には青葉アルデヒドがトマトにおいてGABA等の含量を高める作用を示す技術が記載されています。

また、引用文献2に青葉アルデヒドがシロイズナズナにおいてGABAの含量を高める作用を示す技術が記載されています。

これに対して本願請求項1に係る発明は、上記補正により茶葉に限定されており、この点に関して引用文献1及び2の技術とは異なるものです。

また、トマトに関して、“Effectsoftrans-2-hexenaltreatmentonplantmetabolomealterations - acasestudywithtomatofruit” (引用文献1) では、エチレンが果実成熟のトリガーになるトマトのようなクライマクテリック果実において、trans-2-hexenal 処理がエチレン生成を誘導することによって一連の成熟代謝を促進し、結果としてグルコース、クエン酸、リンゴ酸、GABA などの代謝産物の生成量を向上させることが述べられている。この論文の主旨は、131 ページの最後の段落で“The 10ppm trans-2-hexenal treatment clearly enhanced ethylene production from tomato fruit, with increase in glucose, GABA, citric acid, and malic acid concentrations”、と述べられているように、trans-2-hexenal がエチレン生成を促し、その結果として一連の代謝産物の濃度に影響を及ぼすという点にある。GABA は一般に未熟果では少なく、成熟果で含有量が増加するため、trans-2-hexenal 処理の有無にかかわらず、トマト果実の成熟の指標の一つになっている。たとえば、Yin,Y.G., Tominaga,T., Iijima,Y., Aoki,K., Shibata,D., Ashihara,H., Nishimura,S., Ezura,H.,and Matsukura,C. (2010). Metabolic alterations in organic acids and gamma-amino butyric acid in developing tomato (Solanum lycopersicum L.) fruits. Plant Cell Physiol.51(8),1300 - 1314 <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcq090>.PubMed を参照のこと。

しかし、茶葉を用いた本願発明の場合、クライマクテリック果実の成熟生理とはまったく作用機作が異なり、エチレン生成を経由しない。しかも、上記論文の技術における GABA 含量の増加は、わずか 1.5 倍にすぎず、GABA 茶作成分に必要な 10 倍増加には、ほど遠く、上記論文 (引用文献 1) 記載の技術から、本願発明を連想することは不可能である。

また、シロイヌナズナに関して、“The Arabidopsis her1 mutant implicates GABA in E-2-hexenal responsiveness” (引用文献 2) ではシロイヌナズナの突然変異株 her1 において、trans-2-hexenal を処理しても根の生育が阻害されない現象が述べられており、そのメカニズムとして、her1 突然変異体では、野生株に trans-2-hexenal を処理すると同様に、GABA トランスアミナーゼ活性が失われ、GABA 含量が減らないために根の生育が正常に保たれることを示している。つまり、本論文 (引用文献 2) では、trans-2-hexenal 感受性を喪失した特殊な突然変異体について、trans-2-hexenal 処理により GABA 含量が野生株程度にまで回復することを述べたものであり、野生株に trans-2-hexenal を処理して、GABA 含量が高まるという論旨ではない。したがって野生株において trans-2-hexenal 処理が GABA 分解を阻止し、GABA 含量の低下を補償する可能性を示唆するものの、野生株程度にまで GABA 含量を回復する以上のことは想像され得ず、また、実際、本願発明の作用機序は GABA トランスアミナーゼとは関係がなく、上記論文 (引用文献 2) の技術から、本願発明を連想することは不可能である。

上述したように、当該技術的な背景を鑑みると、当業者がトマトやシロイヌナズナに代えて茶葉を選択することを容易に想到し得るものではないと思料致します。

(4) 拒絶理由 3 及び 4 (特許法第 36 条第 4 項第 1 号及び第 6 項第 1 号) について

当該手続補正書において、化合物を青葉アルデヒドに限定致しました。これにより、当業者が請求項 1 に係る発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されたものとなり、請求項 1 及び 3 に係る発明は、発明の詳細な説明に記載したものとなりました。よって、請求項 1 及び 3 に係る発明は、特許法第 36 条第 4 項第 1 号及び第 6 項第 1 号に規定する要件を満たしております。

(5) まとめ

以上のように、本願請求項に係る発明は、特許されるべきものであるため、再度の審査をお願い致します。

引用文献

- 1) 角山栄, 茶の世界史 緑茶の文化と紅茶の文化 改版』, 2017. 中公新書
- 2) FAO, 2022, International Tea Market: market situation, prospects and emerging issues.
- 3) Basu Majumder, A., Bera, B. and Rajan, A., 2010. Tea statistics: global scenario. Inc J Tea Sci, 8(1), pp.121-4.
- 4) Chimoita, E.L., Gatahi, D.M., Olila, D.O. and Onyango, J.P., 2015. The role of farmer field schools approach in improving tea production among smallholding in Kenya.
- 5) 西條了康, 1993. 茶の機能性研究の現状と将来展望. 農林水産技術研究ジャーナル 16(6):35-39
- 6) 原征彦, 2000. 茶カテキン類の機能性とそれらの応用例. 日本食品保蔵科学会誌, 26(1), pp. 47-54.
- 7) 滝本浩司, 1996. 特定保健用食品の現状. 農林水産技術研究ジャーナル 19(6):30-40
- 8) 中垣英明, 2001. 保健機能食品制度について. 栄養学雑誌, 59(1), pp. 41-42.
- 9) 林浩孝, 大野智, 太田康之, 新井隆成 and 鈴木信孝, 2007. 特定保健用食品の許認可について. 日本補完代替医療学会誌, 4(3), pp. 103-112.
- 10) 高橋久仁子, 2010. 特定保健用食品の現状. 群馬大学教育学部紀要, 45, pp. 113-20.
- 11) 千葉剛, 佐藤陽子, 中西朋子, 横谷馨倫, 狩野照誉, 鈴木祥菜 and 梅垣敬三, 2014. 特定保健用食品の利用実態調査. 日本栄養・食糧学会誌, 67(4), pp. 177-184.
- 12) 山田和彦, 田中弘之, 石見佳子, 梅垣敬三 and 井出留美, 2017. 保健機能食品の課題と展望. 日本栄養・食糧学会誌 70(3): pp. 91-99.
- 13) 佐々木泰弘 and 河野元信, 2010. ギャバ (GABA) の効能と有効摂取量に関する文献的考察. 美味技術研究会誌, 2010(15), pp. 32-37.
- 14) Cheng, T.-C., & Tsai, J.-F., 2009. GABA tea helps sleep. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 15(7), 697-698.
- 15) 守田裕啓, 佐島三重子 and 佐藤方信, 1996. 演題 2. 老化促進モデルマウス (SAM) の舌粘膜上皮の加齢変化に関する病理学的検討. 岩手医科大学歯学雑誌, 21(2), pp. 177-178.
- 16) 田中啓司, 1985. GABA 支配の神経シナプス 殺虫剤のターゲット?. *Journal of Pesticide Science*, 10(3), pp. 555-567.
- 17) 蔵本武照, 1984. 甲殻類における神経伝達物質の所在とその働き. 動物生理, 1(2), pp. 63-71.
- 18) 齋藤文仁 and 鈴木秀典, 2007. 小脳皮質における GABA 作動性シナプス伝達. 日本医科大学医学雑誌, 3(2), pp. 56-57.
- 19) 植野洋志, 2015. GABA 合成酵素グルタミン酸デカルボキシラーゼの発現場所での役割分担. *Journal of Japanese Biochemical Society*, 87(3), pp. 333-336.

- 2 0) Taniyama, K. and Kumoi, K., 2000. GABA Receptors in the Neuronal Circuit Involved in the Vestibulo-ocular Reflex. *Equilibrium Research*, 59(4), pp.247-253.
- 2 1) 黒岩義之, 平井利明, 鈴木可奈子, 馬場泰尚 and 西岡久寿樹, 2019. 視床下部・脳幹における GABA の制御的役割: 睡眠, 飲水・摂食行動, 飢餓反応, 体温, 性腺・乳汁分泌機能, 心拍, ストレス反応 (特集 抑制性神経伝達物質: 基礎と臨床). *脳神経内科 = Neurology*, 90(4), pp.419-431.
- 2 2) 上窪裕二, 田端俊英, 柿澤昌, 川上大輔, 渡辺雅彦, 小倉明彦, 飯野正光 and 狩野方伸, 2008. 代謝型 GABA 受容体 - 代謝型グルタミン酸受容体クロストークによる小脳プルキンエ細胞 LTD の増強. *日本生理学会大会発表要旨集*, 2008, pp.120-120.
- 2 3) Robinson, T.N. and Olsen, R.W., 1988. Gaba. In *Comparative invertebrate neurochemistry* (pp. 90-123). Springer, Boston, MA.
- 2 4) Sarasa, S.B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Thankappan, B., Selta, D.R.F. and Angayarkanni, J., 2020. A brief review on the non-protein amino acid, gamma-amino butyric acid (GABA): its production and role in microbes. *Current microbiology*, 77(4), pp.534-544.
- 2 5) Caputi, A., Melzer, S., Michael, M. and Monyer, H., 2013. The long and short of GABAergic neurons. *Current opinion in neurobiology*, 23(2), pp.179-186.
- 2 6) 山本(前田)万里, 2013. 機能性を持つ農林水産物・食品の開発について. *日本食生活学会誌*, 24(3), pp.143-148.
- 2 7) 吉川弥里, 田中牧子, 末丸克矢, 若林敬二 and 渡辺雅彦, 2020. GABA の血圧降下作用に対する系統的レビューおよびメタアナリシス. *就実大学薬学雑誌*, 7, pp.1-9.
- 2 8) 早川和仁, 2005. γ -アミノ酪酸を含む乳製品乳酸菌飲料の血圧降下作用. *Milk Science* 54(3): 137-140.
- 2 9) Ramos-Ruiz, R., Poirot, E. and Flores-Mosquera, M., 2018. GABA, a non-protein amino acid ubiquitous in food matrices. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1), p.1534323.
- 3 0) 水澤進, 2008. 乳酸菌による高血圧予防飲料の開発. *日本醸造協会誌*, 103(10), pp.757-762.
- 3 1) 山本(前田)万里, 2020. 5 年目を迎えた機能性表示食品制度と農林水産物での活 *Functional Food Research*, 16, pp.FFR2020_p11-20.
- 3 2) 安本周平, 2022. 身近になりつつあるゲノム編集植物. *生物工学会誌*, 100(6), pp.302-305.
- 3 3) 袴田勝弘, 中田典男, 向井俊博, 福島裕和, 山口良 and 仲田智史, 1988. 嫌気処理緑茶 (ギャバロン茶) の製法改善. *茶業研究報告*, 1988(68), pp.8-13.
- 3 4) 白木与志也, 1998. チャの攪拌・赤外線照射による γ -アミノ酪酸の蓄積. *神奈川県農業総合研究所研究報告*. 138:41-47.

- 35) 白木与志也, 1999. チャへのマイクロ波照射による γ -アミノ酪酸の蓄積. 神奈川県農業総合研究所研究報告. 139:49-55.
- 36) 白木与志也, 2001. チャ生葉における γ -アミノ酪酸の効率的蓄積方法の開発. 神奈川県農業総合研究所研究報告. 141:39-47.
- 37) 竹内敦子, 澤井祐典, and 深津修一. “茶葉中のアミノ酸量に及ぼす嫌気処理の温度と時間の影響.” 茶業研究報告 1994, no. 80 (1994): 13-16.
- 38) 津志田藤二郎. “茶生葉におけるアミノ酸代謝の解明とその利用による新製品 (ギャバロン茶) の開発.” 茶業研究報告 1990, no. 72 (1990): 43-51.
- 39) 中田典男, 袴田勝弘, 向井俊博, and 福島裕和. “火入れ処理による嫌気処理緑茶 (ギャバロン茶) の品質改善.” 茶業研究報告 68 (1988): 40-42.
- 40) Terada, N., A. Sanada, H. Gemma, and K. Koshio. “Effect of trans-2-hexenal vapor pretreatment on alleviation of heat shock in tomato seedlings (micro tom).” Journal of ISSAAS (International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences) 23, no. 2 (2017): 1-7.
- 41) 畑中顯和『みどりの香り—植物の偉大な知恵』丸善, 2005
- 42) Reinke, J., 1881. Über aldehydartige Substanzen in chlorophyllhaltigen Pflanzenzellen. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 14(2), pp.2144-2150.
- 43) Curtius, T. and Franzen, H., 1912. Über den chemischen Bestandteile grüner Pflanzen. Über den Blätteraldehyd. Justus Liebigs Annalen der Chemie, 390(1), pp.89-121.
- 44) 武居三吉, 酒戸彌二郎, 大野稔 and 黒岩芳郎, 1938. 青葉アルコール (第一報) 青葉アルコールの植物界に於ける分布. 日本農芸化学会誌, 14(6), pp.709-716.
- 45) 畑中顯和, 1993. 植物起源の “みどりの香り” の発現と生理的意義の解明に関する研究. 日本農芸化学会誌, 67(10), pp.1391-1398.
- 46) 畑中顯和, 2007. “みどりの香り” の研究-その神秘性にせまる. におい・かおり環境学会誌, 38(6), pp.415-427.
- 47) 畑中顯和, 2003. 植物起源の “みどりの香り”: 化学と生化学. 生化学, 75(11), pp.1414-1428.
- 48) 畑中顯和, 2000. 第3回 ヒトは何故みどりの香りによってリフレッシュされるのか! 報告. 日本農芸化学会誌, 74(4), pp.533-535.
- 49) Hatanaka, A., 1993. The biogeneration of green odour by green leaves. Phytochemistry, 34(5), pp.1201-1218.
- 50) Matsui, K., 2006. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. Current opinion in plant biology, 9(3), pp.274-280.
- 51) 畑中顯和, 2005. みどりの香りの研究の今昔. 第87回応用化学セミナー資料

- 5 2) Yin, Y.G. Tominaga, T. Iijima, Y. Aoki, K. Shibata, D. Ashihara, H. Nishimura, S. Ezura, H. and Chiaki, M. 2010. Metabolic alterations in organic acids and gamma-aminobutyric acid in developing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits. *Plant Cell Physiol.* 2010, 51, 1300-1314.
- 5 3) Iijima, Y. and Koh, A. 2009. Application of metabolomics to improve tomato fruit productivity and quality. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 78, 14-22.
- 5 4) Eriksson, C. E. 1968. "Alcohol: NAD oxidoreductase (EC 1.1. 1.1.) from peas." *Journal of Food Science.* 33(1): 525-532.
- 5 5) Kaneko, S., Kumazawa, K. and Nishimura, O., 2011. Studies on the key aroma compounds in soy milk made from three different soybean cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 59(22): 12204-12209.
- 5 6) Larsen, M., Poll, L. and Olsen, C.E., 1992. Evaluation of the aroma composition of some strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) cultivars by use of odour threshold values. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung.* 195(6): 536-539.
- 5 7) TSUSHIDA, Tojiro; MURAI, Toshinobu. Conversion of glutamic acid to γ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1987, 51.11: 2865-2871.
- 5 8) 白木与志也. チャの攪拌・赤外線照射による γ -アミノ酪酸の蓄積. 1998.
- 5 9) 白木与志也. チャへのマイクロ波照射による γ -アミノ酪酸の蓄積. 1999.
- 6 0) MEI, Xin; XU, Xinlan; YANG, Ziyin. Characterization of two tea glutamate decarboxylase isoforms involved in GABA production. *Food chemistry*, 2020, 305: 125440.
- 6 1) MAE, Nobukazu, et al. Accumulation mechanism of γ -aminobutyric acid in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) under low O₂ with and without CO₂. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2012, 60.4: 1013-1019.

謝辞

本研究を行うにあたり、熱帯園芸学研究室にて始終御懇篤なる研究遂行、御指導、貴重な御助言を賜りました東京農業大学 国際食料情報学部 国際農業開発学科 熱帯園芸研究室の小塩海平教授に心から感謝申し上げます。貴重なご助言、激励を頂きました東京農業大学 国際食料情報学部 国際農業開発学科 熱帯園芸研究室真田篤史准教授、寺田順紀助教、大穂清隆氏に厚く御礼申し上げます。

更に本研究はたくさんの人達からのご協力・ご厚意のおかげで完成に至りました。茶葉の品質分析を行なって下さいました東京農業大学 食香粧化学科 妙田貴生先生、東京農業大学 遺伝子解析を行って頂きました生物資源ゲノム解析センター田中啓介先生、深く感謝の意を表します。

同時期に実験、論文作成に取り組んだ熱帯園芸学研究室の同期の皆さんとは互いに意見を交わし作業し、切磋琢磨した仲間でありどんなときも楽しく時を過ごせた事に感謝いたします。そして後輩のみなさんにも様々なご支援をいただき感謝しています。