The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	メタボローム解析を用いた品質評価に基づく高品質茶人工栽培技術の開発
Author(s)	宮内, 俊輔
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61789
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士学位論文

メタボローム解析を用いた品質評価に基づく高品質茶人工栽培技術の開発

宮内　俊輔

2017 年 1 月

大阪大学大学院　工学研究科
生命先端工学専攻　生物工学コース
生物資源工学領域

目次

略号 1

第一章　緒論 2

1.1. 農産物の品質評価 2

1.1.1 「農業の工業化」と農産物の品質評価 2
1.1.2 農産物の品質特性 3
1.1.3 品質特性の選択とその効果 4
1.1.4 品質評価における課題とメタボロミクスの可能性 6

1.2. 日本茶 (緑茶) 7

1.2.1 日本茶の種類と特徴 7
1.2.2 緑茶の品質評価 7
1.2.3 チャの人工栽培の可能性 9

1.6. 本研究の目的 13

第二章　アミノ酸プロファイルに基づく品質評価モデルの構築と碾茶用原料茶葉の人工栽培技術の開発 14

2.1. 諸言 14

2.2. 実験材料および実験方法 16

2.2.1. 試薬および茶葉サンプル 16
2.2.2. 分析条件 16
2.2.3. データ解析条件 18
2.2.4. チャの栽培条件 20

2.3. 結果 26

2.3.1. 品評会出品茶の分析・解析と品質評価モデルの構築 26
2.3.2. 基本栽培条件の検討 31
2.3.3. 光環境を改善した人工栽培 33
2.3.4. 人工栽培茶の品質評価・検証 34

2.4. 考察 35

2.5. 小括 41

第三章　GC/MS を用いた茶の多成分一斉分析・解析による人工栽培茶葉の品質評価 42
3.1. 諸言 42
3.2. 実験材料および実験方法 43
3.2.1. 試薬および茶葉サンプル 43
3.2.2. 分析条件 43
3.2.4. データ解析条件 44
3.2.5. チャの栽培条件 45
3.3. 結果 48
3.3.1. 品評会出品茶の分析・解析 48
3.3.2. 人工栽培茶の品評会順位予測 52
3.3.3. 暗黒下で FR 光照射を行った人工栽培茶の代謝物プロファイル 53
3.3.4. UV-A 光と FR 光照射下で栽培した人工栽培茶の代謝物プロファイル 54
3.4. 考察 56
3.5. 小括 59
第四章　総括と展望 60
4.1. 本研究の総括 60
4.2. 今後の展望 61
謝辞 63
引用文献 64
発表論文 72
本学位論文に関与する論文 72
特許 72
学会発表 74
国内会議 74

略号

AA: amino acid

CO_2: carbon dioxide

FR: far red

GC: gas chromatography

GC/MS: gas chromatography/mass spectrometry

LED: light emitting diode

LC: liquid chromatography

LC/MS: liquid chromatography/mass spectrometry

MeOH: methanol

MS: mass spectrometry or mass spectrometer

NMR: nuclear magnetic resonance analysis or nuclear magnetic resonator

ODS: octadecylsilyl

PLS-R: partial least squares projection to latent structures-regression

RSD: relative standard deviation

RT: retention time

SD: standard deviation

SE: standard error

TOF MS: time of flight mass spectrometer

UV: ultraviolet

UV/VIS: ultraviolet-visible

第一章　緒論

1.1. 農産物の品質評価

1.1.1「農業の工業化」と農産物の品質評価

農産物の品質評価は日常的・一般的に行われているが，その評価指標は外部品質 (主に外観) と内部品質 (成分やテクスチャー等) が関わる複雑なものであり，いまだ熟練者の官能評価に頼る部分が大きい．こうした品質評価指標を数値化・可視化したいという要望は常に存在しており，多くの研究がなされてきた (堀江, 2006) ．

特に近年，人工光源を用いた植物工場 (高辻, 2001; Goto, 2003; Massa et al., 2008) やセンサ類を活用して高度に環境を制御する施設園芸など，工業的な見地から農業を発展させようという取組みが盛んになっており，これに伴って農産物においても工業製品のような明確な評価指標を設定することが求められてきている．例えば植物工場においては高度な環境制御によって各種パラメータ (X) を制御することが可能であるが，その制御環境下で何を目標 (Y) とするかがなくては，開発・改善の計画を建てることすらままならない．以下，本研究では，環境パラメータ X を制御することで生産される農産物に付与される性質や価値のうち，制御の目標となるものを目標 Y と呼ぶこととし，目標 Y の設定について論じていきたい．

農産物における目標 Y を一言で表せば，「品質」と表現することができるだろう．しかし幅広い解釈が可能な「品質」という言葉の背後には様々な評価指標が存在しており，それらが明確に独立しておらず，複合的に使用されている場合も多い．また，審査者など人に依存する評価指標も多く，これらは工業的・工学的な取組みを妨げる要素となる．現在用いられている品質の評価指標を整理・把握し，必要に応じて代替手法を導入して，誰が測っても同じ結果が出ること，個々の農産物の性質と評価結果の関係を理解可能とすることが必要であ

る. すなわち, 現在盛んに叫ばれる「農業の工業化」「農業の生産性向上」といった変革の重要な鍵を握るのが, 農産物の品質評価指標であり, その可視化である.

1.1.2 農産物の品質特性

ここでは, 品質評価指標を構成する具体的要素を, 品質特性と呼ぶこととする. 農産物の品質特性として, 一般的には収量性, 安全性, 安定性, 保存性, 機能性 (1 次機能:栄養機能, 2 次機能:味・美味しさ, 3 次機能:生体調節機能) などが挙げられる. 例えばオランダでは, 栽培品目を数種に限定したうえで, 収量に特化した開発を進め, 現在では施設園芸分野で世界のトップを走っている. 特に欧米地域では収量を重視する傾向が強く, 理論上の最大収量を明らかにしたうえで育種から総合的に取り組むアプローチが見られる (Bugbee, 1988) .

一方, 日本の農産物の強みとしては味・美味しさが挙げられることが多い. 農産物の海外輸出に係る調査でも, 日本産農産物は食味の面で優位性が認められている (JETRO, 2010) . 味覚・美味しさは食品機能の分野では 2 次機能と呼ばれるが, 農産物の品質特性の評価については, 収量性などの数値データが得られるもの以外については専門の訓練を受けたベテランの経験に基づく評価が最も一般的であり, 2 次機能も官能評価によって判断されているのが現状である.

また, 簡便な評価としては糖度等の計測もよく用いられている. 例えば, 試料中の糖含量を概算するために, ショ糖の屈折率をもとに算出した数値 (Brix 値) がよく用いられている. その他, 可視光や赤外光の分光分析による糖度, 熟度, 外傷の有無等の検査が実際の生産現場で実用されている.

ベテランの官能評価に近い, あるいは官能評価のキーファクターを探索するという点で, メタボロミクスが注目を集めている. メタボロミクスとは, 対象の生物試料の代謝物を網羅的に分析・解析 (メタボローム解析) し, 多種多様な代謝物の定量的情報を取得する学問領域であり, その情報の活用方法としてバイオマーカーの探索や代謝経路の解明, 食品の品

質や機能の評価が期待される. 農産物の評価においては, 屋外環境や農業・食品産業の現場には室内実験系では再現できない多様かつ重要な環境要因があり, 現場の試料を分析することが重要である (関山, 2016) . この点において, 食品の品質に関係の深い物質を取扱い, 得られた大量の情報を人間が理解しやすい形に圧縮・表現 (可視化) するメタボロミクスは高い親和性を持つと考えられる.

1.1.3 品質特性の選択とその効果

農産物の品質評価指標の構成要素として, その作物の品質を表現する最適な品質特性を選択することができるかは, その後の育種や栽培技術の開発に大きな影響を与える. 前述の通り, オランダでは施設園芸での栽培品目をトマト・パプリカ・キュウリなどの少数に絞り, 収量を第一の品質特性として育種と栽培技術の開発を進めた. その結果 1980 年には 20 t·10 a^{-1} に満たなかったトマトの収量は現在では 50 t·10 a^{-1} に到っている (施設園芸に限れば 60 t·10 a^{-1} とも言われる) (図 1-1) . その一方で, 内部品質に対する評価は低く, 1990 年代には味のしないトマトを評して"water bomb"と呼ばれたこともあった (Tesfaye et al., 2013) . この反省から, 味にも配慮した開発が進められているが,「オランダのトマトは美味しくない」というイメージを払拭するには至っておらず, いまだ味の面で消費者の評価を得ることはできていない (Causse et al., 2003) . このことは品質特性を限定的に選択することの効果と危険性を表す好例と言えるだろう.

品質特性の組合せによって構築されたある品質評価指標が公に受容・採用された場合, 育種や栽培技術は緩やかに最適化されていくものと考えられる. 作物が発揮するパフォーマンスは植物の遺伝的要因と環境要因から影響を受けることは明白であるが, 育種によって遺伝形質や環境への耐性・応答性が改良され, 栽培技術の発展によって植物が生育する環境条件や受ける刺激が改良されていく. 一例として日本茶を挙げると, 日本茶はその品質評価指標が明確に規定されており, 訓練を受けた熟練者によって官能評価される. 高い評価を受けた製品は品評会で高い順位を与えられる, あるいは流通において高価格で取引さ

れるため，生産者もその評価指標に見合った製品を生産する選択圧を受ける．この結果，採用される品種，用いられる栽培方法がともに，評価指標を満たすものに自然と置き換わっていくこととなる．日本茶の評価指標を形成する品質特性として味，特にアミノ酸と関係の深い味が関与していることが知られているが，後年に育種された品種ほどアミノ酸含有量が多い傾向があり（森田ら，2004），また収穫直前に覆いをして遮光によってアミノ酸含有量を高める栽培方法が広く普及していることから，評価指標に沿った改良が進んでいることがわかる．

以上のように，農産物における品質とは評価指標であると同時に，その後の技術開発の方向性を決定するものである．味・美味しさに重きを置いた品質評価指標を採用すれば，技術の発展に伴いより美味しい農産物が作られることになる．適切な品質特性を選択することは，農産物そのものの需要や競争力へと影響していく．例に挙げた日本茶のように現在まで発展を続けている農産物においては，適切な品質特性を選びその評価方法を確立することに成功していると考えてよいだろう．

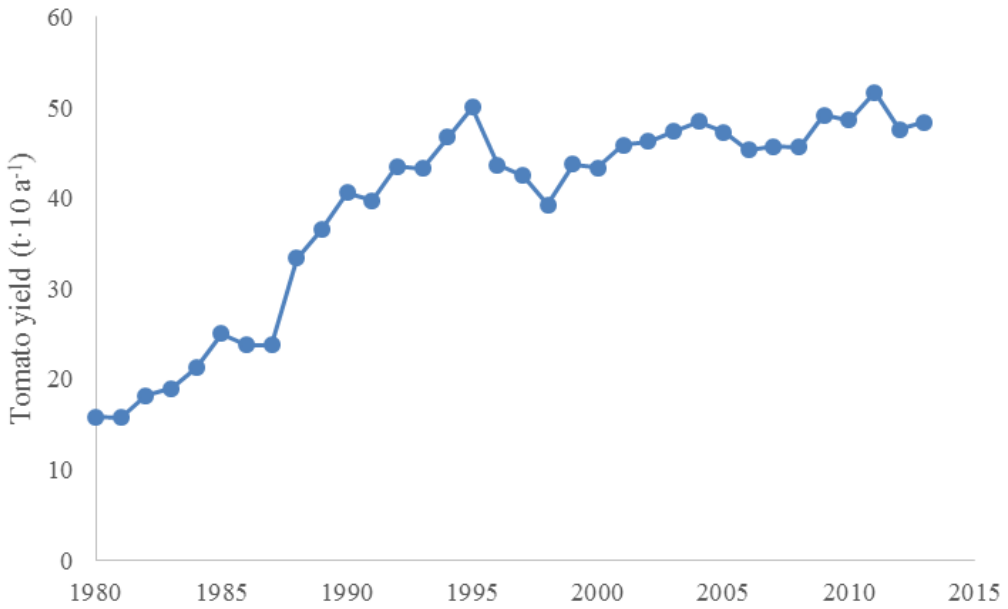

図 1-1. オランダ国内でのトマト生産の収量推移 **(FAOSTAT** より作成**)**

1.1.4 品質評価における課題とメタボロミクスの可能性

日本の農業において農産物の品質に大きく関わってくる要素として，2 次機能すなわち味・美味しさは不可欠な品質特性であり，これを第一とした品質評価指標が求められている．そこで本研究では，特に 2 次機能に着目して農産物の品質を議論していくこととする．しかしながら味・美味しさの評価はいまだ官能評価に依存しており，収量や糖度のような数値化・可視化が難しい．また官能評価には訓練を受けたベテランの審査者が必要となり，生産現場や実験室での評価・管理に用いることは現実的でない．そこでこうしたベテラン審査者の官能評価を他の手法で再現することが可能となれば，その利用用途は極めて大きい．

その手法の一つとして先述のメタボロミクスが挙げられる．例えば Tarachiwin et al. (2008) は ^{1}H NMR スペクトロメトリーを用いたスイカの分析結果に基づくマルチマーカープロファイリングが，品質評価において有効であることを報告している．また同様に，Cho et al. (2007) は ^{1}H NMR スペクトロメトリーと PCA 解析を用いて，mushroom の成分バランスから異なるグレードの識別を行っている．これらの結果は，2 次機能のように複雑な成分バランスに関係する評価尺度を解析する手法としてメタボローム解析が有効であることを示している．

日本農業の発展あるいは農業の工業化の原動力として，メタボローム解析を用いて，農産物の官能評価の把握と，人の手によらず評価できるシステムを構築すること，これらが実現されれば，育種や栽培技術開発の目標 Y が明確に設定され，緩やかに最適化に向かっていくことだろう．さらには，ただそれを待っているのではなく，その評価システムを用いて得られた知見をもとに，育種・栽培技術の開発を加速・促進していく取組みが求められている．

1.2. 日本茶 (緑茶)

1.2.1 日本茶の種類と特徴

日本茶は日本の伝統的な農産物であると同時に，官能評価の基準が厳格に設定された嗜好品である．世界には多種多様な製茶法があり，茶の種類分けについても定説はないが，緑茶はその発酵程度から不発酵茶とされることが多い (岩淺，1991) ．すなわち，茶葉の摘採直後に加熱によって酵素を失活させ，成分の酸化を防ぎ，緑色を保たせた茶である．さらに加熱に蒸気を用いるか，釜で炒るかによって分類することができるが，日本茶の多くは蒸気を使う蒸し製茶である．蒸し製茶には，煎茶，玉露，碾茶 (抹茶) ，玉緑茶，番茶が含まれる．このうち玉露，碾茶とかぶせ茶 (煎茶の一種であり，分類の定義は未だ曖昧である) はおおい下茶と呼ばれ，高級茶として取り扱われる．これらの茶種の特徴は，茶葉の摘採前の一定期間，茶樹に覆いをし，遮光を行うことである．かぶせ茶で約 7 日，玉露で約 20 日，碾茶・抹茶では約 30 日にも達する期間，光を弱めた栽培を行うことで，前述の旨味や海苔のような香りが強くなり，茶葉の品質が向上するとされる．特に玉露，抹茶は手間をかけて栽培される高級茶であるが故，流通する製品は高い品質を備えており，これはかぶせ茶を含む煎茶や番茶などの他の茶種とは一線を画すものである．

1.2.2 緑茶の品質評価

緑茶の評価方法は，専門の審査員が茶葉について外観，香気，水色，滋味 (碾茶の場合はこれに加え，から色) の各項目を採点し，総合得点によって品質の優劣を判定するというものである．外観とは，茶葉の乾燥状態での見た目であり，深みのある濃い緑色で艶のある茶葉が良いとされる．香気とは茶葉を熱湯抽出した際の香りであり，茶種により異なるが，海苔のような旨味を感じさせる香りが重要視される．水色とは，抽出した液体の見た目であり，澄んだ蛍光緑色が良いとされる．滋味とは抽出液を口に含んだ場合に感じられる味覚のこと

を表し，旨味が最も重要とされるが，カテキン等に由来する渋味も一部の茶種では必要とされる．から色は，熱湯抽出した後の茶葉の見た目であり，碾茶の場合は石臼によって挽いて抹茶として飲用されるため，抽出後の濡れた状態での茶葉の色が鮮やかな緑色であることが良いとされる．以上のような品質評価方法について，特に品評会においてはこの官能審査が厳正に運用されているほか，流通段階でも共通の基準に基づいて品質評価および価格付けが行われている．審査項目の中でも香気・滋味の比重が高いことから，品評会での審査結果は味・美味しさに重きを置いた品質評価指標となっていると言える．

緑茶の官能評価に関わる成分を解明しようという試みはこれまで数多くなされており，アミノ酸，中でもテアニンやアルギニンが品質との相関が強いことが報告されている (向井ら，1992; 後藤，1992; 矢島ら，1999) ．また，カテキン類も品質に大きな影響を与えることが報告されている (辻，2001) ．カテキン類は抗菌作用や生体調節機能を持つことで知られ，有用な成分であるが，味の面では強い苦渋味を示す．上述の通り，苦渋味を必要な要素とする茶種 (煎茶や玉緑茶等) では一定量のカテキン類が必要であるが，旨味を最重要視する茶種，玉露や抹茶・碾茶では忌避される．このことは茶の抽出方法にも影響を与えており，玉露は 60℃程度の低温で抽出されるが，これは温度に依存して抽出率が大きくなるカテキン類の抽出を抑え，アミノ酸の含有割合を大きくするためである．一方，抹茶・碾茶では茶葉そのものを摂取するため，茶葉のカテキン含有量がそのまま苦渋味に影響し，カテキン類を忌避する度合いはさらに高まると考えられる．

また，前述のメタボローム解析を用いて煎茶品評会での品質評価に関わる成分が解明されている (Pongsuwan et al., 2007 & 2008; Tarachiwin et al., 2007) ．この中ではキナ酸，アミノ酸 (特にテアニン) ，糖類が品質評価に影響を与えていること，品評会順位の低い茶にはフェノール由来の成分が多く含まれていることが明らかとなっている．さらに煎茶であるため，順位の高い茶にもカテキン類 (エピカテキン，エピカテキンガレート，エピガロカテキン，エピガロカテキンガレート) が重要であることが示されている．

1.2.3 チャの人工栽培の可能性

1.1.4 項で述べた通り，品質評価の面ではメタボローム解析による官能評価の代替システムを構築すること，そしてその知見に基づき，栽培技術開発の面では実験室内の人工環境下でチャを栽培し，高品質碾茶の人工栽培技術を開発すること，という品質評価と栽培技術開発の両輪からなる試みは，農業の工業化を実践する優れたモデルケースになると考えられる.

緑茶向けのチャの栽培方法における特徴は主に 3 つあり，最大の特徴は遮光栽培である. これは収穫直前の一定期間，茶樹に当たる日光を遮り，弱光下で栽培する方法である (図 1-2) . 遮光栽培によって茶葉に含まれるアミノ酸量が大きく増加し，カテキン類が明確に減少することが知られている (岩浅，1968) . そのメカニズムにはまだ不明なところも多いが，光によって促進されるカテキン合成経路 (Punyasiri et al., 2004; 西條，2012) が阻害され，その前駆物質であるアミノ酸，特にテアニンが葉に蓄積すると考えられている (竹内・松元，2003; 小西ら，1969; 図 1-3 & 1-4) . また，光量が低下することで，すでに茶葉を構成しているタンパク質が分解され，遊離アミノ酸量が増加するという報告もある (青木，1980; 小林ら，2011) .

図 1-2. 遮光栽培の様子 (左：遮光資材による被覆，右：よしずによる被覆)

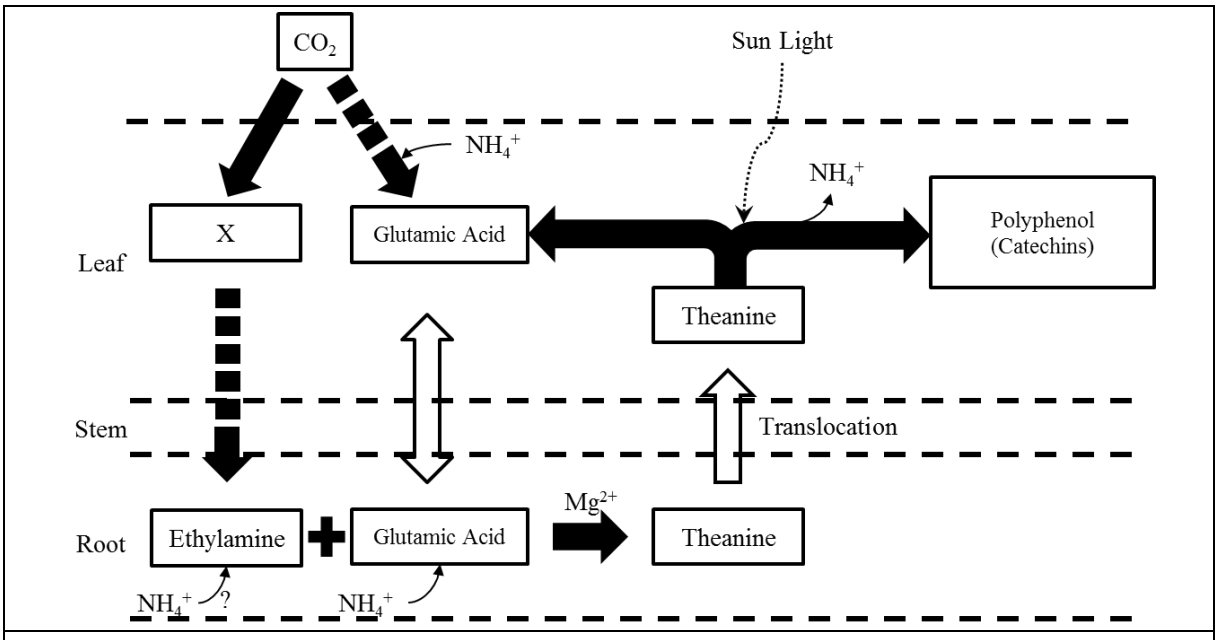

図 **1-3.** 茶樹におけるテアニンの関わる代謝系 (『茶の科学』村松敬一郎編より作成)

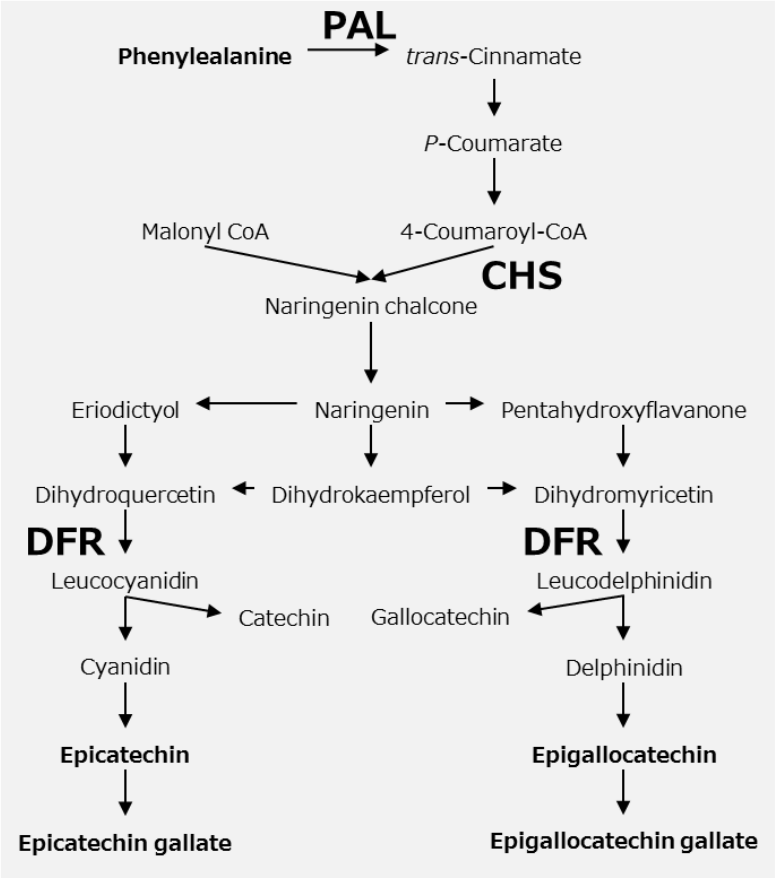

図 **1-4.** 茶樹におけるカテキン合成経路

PAL: フェニルアラニンアンモニアリアーゼ，CHS: カルコンシンターゼ，DFR: ジヒドロフラボノールレダクターゼ

二つ目の特徴は窒素肥料を非常に多く与える点である. 茶園では 100 kg·10 a^{-1} を超える極めて多量の窒素肥料を施肥している (吉川ら, 1985) . チャは窒素分を好み, また酸性土壌で良い生育を示す植物である (小西, 1987) . このため窒素分を多く与えたほうが茶葉品質が良くなると考えられており, さらには一度多肥条件に順化してしまうと, 減肥はアミノ酸含有量の低下を招くことから, 生産者が肥料使用量を低減することは容易ではない (橘ら, 1995) . また, 肥料を多く与えることで栄養成長状態を維持し, 生殖成長へ移行することを抑えるよう奨励されている. これは, 生殖成長へ移行し, 開花してしまった茶樹では茶葉の品質が落ちるとされているためである. しかし, こうした窒素過多の状態は周辺環境に大きな負荷を与え, 水質汚染が深刻となっている (廣野ら, 2005) .

三つ目の特徴は, 休眠期間が必要な点である. 茶樹は 4 月下旬から 5 月上旬ごろにその年の一番茶を収穫し, 通常は数か月ごとに二番茶, 三番茶と収穫を続けていく. そして気温が低下する前に茶畑の畝の形状を刈り揃え, 冬期の休眠に備える. 休眠期間中は芽の生育が停止し, 樹形が保たれる. 翌年の春先に気温の上昇とともに休眠が打破され, 新たな一番茶のための新芽が萌芽する. 放射性同位元素 ^{14}C を用いた観察から, この休眠期間中には光合成産物は主として根に蓄積し, 翌年の萌芽に伴って新芽生育のエネルギーとして利用されることが分かっている (袴田・酒井, 1981) . このため, 加温や気温の上昇により休眠が妨げられると, 一番茶茶葉の含有成分が減少し, 品質が低下してしまう. 露地栽培においては, 冬期は翌年の一番茶のための休眠期間として, 十分な低温に晒されることが必要とされており, 他の栽培品目でしばしば見られる, ハウスで加温して収穫時期をずらすような栽培方法は成立しない.

以上のように, 緑茶は明確な品質評価指標を持ち, その指標に深く関わるアミノ酸やカテキン類を制御する栽培方法が考案されている. 栽培の目標 Y が明瞭に設定され, それに向けて栽培方法の改善が進められた作物と言えるだろう. 先に述べたとおり, 官能評価を人の手によらず行える品質評価システムを構築し, その評価に基づいて育種や栽培技術開発を進めることは農業の工業化に資する試みである. そのモデルケースとして, 緑茶向け, 特に碾茶向けのチャの人工栽培技術を開発していくことは以下の点でメリットがあると考えられる.

①評価指標の明確さから，メタボローム解析を用いて重要な成分の探索と品質評価モデル構築ができる可能性がある．②遮光栽培の例に見られるように，作物品質に光環境が大きな影響力を持っており，人工光源による光の強度，照射時間，波長の変化によって茶葉の品質を制御できる可能性がある．③露地において窒素肥料を多量に与えることが茶畑周辺の環境汚染を招いており，閉鎖環境で栽培する技術の開発はこの社会課題の解決につながる．④休眠期間が必要なために露地では不可能となっている季節によらない栽培，周年栽培を実現できれば，既存の露地栽培作物に対するアドバンテージとなりうる．⑤碾茶は極めて付加価値の高い農産物であり，これを人工環境で安定的に周年栽培することができれば，農業の工業化あるいは植物工場技術開発の事例としてインパクトが大きい．

チャを人工環境下で栽培するという試みはこれまでいくつか報告されている．小西 (1987) はアクリルハウス内でチャを水耕栽培し，適切な培養液組成を明らかにするとともに，「誠にすばらしい味」の緑茶の生産に成功した．チャの人工栽培に関するこれまでの報告 (荒井ら，1989; 太田・原田，1996; 中原，2009) から，一定以上の品質を備えた茶葉を生産することは十分可能であると考えられ，またアミノ酸等の個別の成分含有量を指標にすれば，個々の条件の良否を判定することも可能であると思われる．しかしながら，ここまで述べてきたように農産物の品質評価指標を明確に設定し，これに沿った育種・栽培技術開発を進めていくことが日本農業の発展，農業の工業化に寄与するものと考えられ，そのモデルケースとしてチャの人工栽培環境を検討していくことが求められる．このためには，茶の品質評価指標を可視化し，光，水 (培養液) ，温度を総合的に管理して，それら環境制御が茶葉の品質特性に与える影響を評価しながら改善していくアプローチをとる必要がある．

1.6. 本研究の目的

ここまで述べてきたように，日本型農業の発展や農業の工業化を考えるうえで農産物の目標 Y となる品質特性を評価できる体系が求められている．その品質評価体系として，メタボローム解析を用いた官能評価の把握と，人の手によらず評価できる体制の構築が必要である．日本の伝統的な嗜好品である緑茶は，明確かつ厳格な官能評価指標を持ち，その部分的な解明が進められているとともに，官能評価に合わせた栽培技術が開発されてきた農産物でもある．特に光や季節 (すなわち日長や温度) の影響が大きいことが知られ，人工的にこれらの環境を制御することで品質特性を大きく変化／向上できる可能性がある．メタボローム解析による官能評価指標の解明と品質評価モデルの構築，そこから得られた知見に基づく栽培環境の改善・最適化という，農業の工業化を志向する農産物の評価から栽培技術の開発に到る一連のアプローチにおいて，緑茶は優れたモデル農産物であると言える．

そこで本研究では，官能評価の解析による緑茶 (碾茶) の品質評価モデルの構築と，このモデルに基づく高品質な原料茶葉の人工栽培技術の開発を目的とした．まず第二章では，品評会に出品されランク付けされた碾茶サンプルについて，含有アミノ酸によるメタボローム解析を行い，影響が大きいアミノ酸プロファイルの特定と，品質評価モデルの構築を行った．続いてチャの人工栽培について，基本的な環境設計を行い，得られた茶葉の含有アミノ酸を分析した．さらに人工栽培茶サンプルを品質評価モデルで評価し，適した光環境について検討した．第三章では，同じ品評会出品茶のサンプルを用いて，アミノ酸以外の幅広い親水性化合物に分析の範囲を広げ，GC/MS を用いた茶の多成分一斉分析・解析 (Pongsuwan et al., 2007) による代謝物プロファイリングを行い，栽培後期の光質を変化させることが品質特性にどのような影響を与えるのか，そこから高級茶の人工栽培の可能性を検討した．

第二章　アミノ酸プロファイルに基づく品質評価モデルの構築と碾茶用原料茶葉の人工栽培技術の開発

2.1. 諸言

本章では，①アミノ酸組成から碾茶の品質を評価するモデルの構築と，②この知見に基づく高品質碾茶生産のためのチャの人工栽培技術の開発を目的とした．そのために必要な情報として，メタボローム解析に基づく多成分のマルチマーカープロファイリングによって 2 次機能に寄与するアミノ酸組成を特定し，栽培時の光環境と 2 次機能の相関を明らかにすることを目指した．具体的には，品評会出品レベルの高品質茶の開発を目的として，1)品評会出品茶の分析・解析，2)チャの人工栽培，3)人工栽培茶の品質評価を試みた．チャは日本において伝統的に遮光栽培が行われてきた作物であり，光環境が成分および 2 次機能に影響することが知られている (酒戸, 1950; 向井ら, 1992) ．さらに 2 次機能の品質評価においても厳格な審査基準を持ち，データ解析の際に重要となる官能評価の信頼性が高い．

従来の茶品質評価の品質特性として，遊離アミノ酸およびテアニンが挙げられる．周知の通りアミノ酸は味に関与する成分であり，茶の味および品質に直接関わっている．なかでもテアニンは茶の遊離アミノ酸の 50-60%を占め，主たる旨味成分と考えられている．遊離アミノ酸量あるいはテアニン含有量は茶品質との相関が非常に高いことが知られている (向井ら, 1992) が，その相関は高品質茶ほど弱くなる (後藤ら, 1992-1996; 矢嶋ら, 1999; 辻, 2001) ．そのため，本章で用いるような品評会出品茶のレベルでは別の指標が必要となると考え，アミノ酸の組成に着目した．これまで，個別アミノ酸を分析した報告は多い (後藤ら, 1992-1996; 木幡, 2002) が，アミノ酸組成に関する議論は少なく，一部テアニン以外のアミノ酸の重要性を訴える報告 (中川ら, 1981) が見られる程度に留まっている．そこで 1)品評会出品茶の分析・解析については，品評会により順位付けされた碾茶の含有アミノ酸を分

析し、マルチマーカープロファイリングによって高順位茶に特徴的なアミノ酸組成の解明を試みた.

次に 2)チャの人工栽培においては, 基本的な栽培条件は露地の環境を参考に設定し, いくつかの条件間での比較を行った. 品種に関しては, アミノ酸含有量が多い傾向がある (池田ら, 1993) 玉露・碾茶用品種を使用する方が合理的であるが, 人工栽培による影響が不明である現状では, 主要品種“やぶきた”を選択することで過去の膨大な蓄積データを活かすことが望ましいと考えた. 光環境に関しては光質と光量を検討する必要があり, 本章では, それぞれ露地環境と 1)の高品質茶解析の結果を参考に設定した. この結果得られた茶葉を供して 3)人工栽培茶の品質評価を行い, 栽培時の光環境と 2 次機能の関係を明らかにすることを試みた.

2.2. 実験材料および実験方法

2.2.1. 試薬および茶葉サンプル

本章の分析ではすべて特級グレードの試薬を用いた. またチャの栽培の培養液では, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (2 水和物) および硫酸アルミニウム (14～18 水和物) は特級グレードを, それ以外は 1 級グレードを用いた. 培養液調製に用いた試薬は硫酸アンモニウム, 硝酸カルシウム (4 水和物) , リン酸二水素カリウム, 硫酸カリウム, 塩化カルシウム (2 水和物) , 硫酸マグネシウム (7 水和物) , ほう酸, 硫酸マンガン (Ⅱ) (5 水和物) , 硫酸亜鉛 (7 水和物) , 硫酸銅 (Ⅱ) (5 水和物) , モリブデン酸ナトリウム (2 水和物) , 硫酸鉄 (Ⅱ) (7 水和物) [第一] , エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) (2 水和物) , 硫酸アルミニウム (14～18 水和物) で, すべてキシダ化学より購入した.

茶葉サンプルは 2012 年関西茶品評会てん茶の部にて, 官能審査の結果順位づけされた茶葉のうち 18 点を供した. また, 後述の人工栽培茶サンプルは, いずれも茶葉摘採後直ちにマイクロウェーブ処理により失活・乾燥させ, 分析まで-80°C で冷凍保管した.

2.2.2. 分析条件

2.2.2.1. HPLC

アミノ酸の分析には高速液体クロマトグラフィー (HPLC; Waters Alliance 2695 HPLC system, Waters Co., Milford, MA, USA) を用いた. 高柳ら (1989) の方法に従い, 粉砕試料 0.1 g を 80°C の熱湯 100 mL で 30 分間抽出し, 内部標準物質として 0.4 mg の L-ノルバリン (キシダ化学株式会社, 大阪, 日本) を添加した. 茶葉抽出液を 20 倍希釈し, これを 0.143 g のオルトフタルアルデヒド (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を 10 mL の 0.1

M ホウ酸バッファ (pH 10) に溶解した溶液に 2-メルカプトエタノール (キシダ化学) 0.25 mL を加えた蛍光体化試薬と 2:1 (v/v) の割合で混合し蛍光誘導体化した. 混合後直ちに混合液 15 μL を HPLC システムに注入し, ODS カラム (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size; GL Science Inc.) によりアミノ酸誘導体を分離した. 移動相の流量は 1 mL·min^{-1} とし, A 液 (12% v/v エタノール, pH 6.0) と B 液 (50% v/v エタノール, pH 6.0) を用いて 100% A 液から 100% B 液まで 60 分で切り替わるグラジエントとした. 溶離液は蛍光検出器 (Waters 474, Waters Co.; λex = 340 nm, λem = 455 nm) でモニタリングし, 遊離アミノ酸を検出した. 分析の対象としたのは, アスパラギン酸, グルタミン酸, アスパラギン, セリン, グルタミン, アルギニン, スレオニン, テアニン, アラニン, チロシン, アミノ酪酸, メチオニン, バリン, フェニルアラニン, イソロイシン, ロイシン, リジンの 17 種の遊離アミノ酸であり, これらをそれぞれ定量含んだ検量線作成用スタンダードを同時に分析し, 各ピーク面積からそれぞれのアミノ酸含有量を算出した.

2.2.2.2. GC/MS

茶品質に相関が深いと想定される 6 種の化合物 (テアニン, アスパラギン, カフェイン, アスコルビン酸, エピカテキン, エピガロカテキン) について, GC/MS を用いて一斉分析した.

マイクロウェーブ処理した乾燥茶葉を 2 mL 容エッペンドルフチューブに 15 mg (±1%) 秤量後, ジルコニアボールとともに液体窒素に浸して凍結した. これをボールミル器 (ボールミル MM301, Retsch GmbH, Haan, Germany) を用いて 20 Hz, 1 分で凍結粉砕した. これに混合溶液 (メタノール/水/クロロホルム:2.5/1/1 (v/v/v)) 1000 μL を添加し, さらに内部標準物質としてリビトール (和光純薬) 水溶液 (最終濃度 0.02 mg·mL^{-1}) 60 μL を加え, 5 分間振とう抽出した. その後, 16000 rcf, 4°C で 3 分間遠心分離し, 上清 900 μL を 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに移した. これに蒸留水 (HPLC 用, 和光純薬) 400 μL を添加し, ボルテックスでよく混和した. さらに, 遠心分離機で二相分離 (16000 rcf, 4°C, 3 分間) し, 上相液 400 μL を別の 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに移した. この上相液を遠心濃

縮 (Spin Dryer Standard VC-96R, TAITEC, Saitama, Japan; Dry Vacuum Pump DTC-41, ULVAC, Kanagawa, Japan; Freeze Trap VA-500R, TAITEC）後，液体窒素で凍らせて凍結乾燥器 (FREEZE DRYER VD-800F, TAITEC) で一晩供よく乾固させた.

抽出操作後，乾固させたサンプルにメトキシアミン (Sigma–Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) -ピリジン (インフィニティピュア，和光純薬) 溶液 (20 mg·ml^{-1}-pyridine) を 100 μL 加え，インキュベーター (Thermomixer comfort, Eppendorf) にて 1200 rpm, 30°C で 90 分間メトキシ化反応させた. その後，MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, ジーエルサイエンス株式会社，東京，日本) を 50 μL 加え，インキュベーターにて 1200 rpm, 37°C で 30 分間シリル化反応させた.

誘導体化反応後，サンプルを GC/MS 用サンプルバイアル (クリンプトップバイアル, Chromacol Ltd, London, UK) に 200 μL 移し，GC/MS 分析に供した. GC/MS 分析は GCMS-QP2010 ultra (株式会社島津製作所，京都，日本) を用いて行った. カラムはフューズドシリカカラム (CP-SIL 8 CB low bleed, 30 m × 0.25 mm I.D., d_f = 0.25 μm; Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA) ，オートサンプラーは AOC-20i (島津製作所) を用いた. 気化室温度は 230°C に設定し，キャリアガスは高純度ヘリウム，流量は 1.12 mL·min^{-1} とした. カラム温度は 80°C, 2 分に保ったのち，15°C·min^{-1} の速さで 330°C まで昇温し 6 分間保持した. MS 部のインターフェイス温度は 250°C, イオン源温度は 200°C で導入し，EI (electron impact) 70 kV でイオン化し，スキャン速度 20 scan·sec^{-1} でマス範囲 85-500 *m/z* についてスキャンした.

2.2.3. データ解析条件

HPLC および GC/MS より得られた結果は，行列データに変換した後，多変量解析に用いた.

HPLC の結果については RT から各ピークの同定を行った後，各ピーク面積を計算した行

列データを用いて AIoutput (Tsugawa et al., 2011) による PLS 回帰分析を行い，アミノ酸組成 (X variables) と順位 (Y variables) の相関を解析する回帰モデルを作成した．モデルの評価には R^2 値，Q^2 値を用いた．

GC/MS の結果については GCMS solution (島津製作所) から AIA 形式で出力した生データを用いた．アライメントには GC/MS 用にインターネットで公開されているソフトウェア MetAlign (ver.041011) を，化合物同定には AIoutput を用いた．AIoutput による自動同定結果を目視により in-house ライブラリーのマスクロマトグラムと比較して確認した後，各化合物のグラフを出力した．

人工栽培茶についてのデータも同様に扱い，品評会出品茶の解析で得た順位予測モデルに AIoutput を使って適用し，後述の人工栽培茶の予測順位を得た．

2.2.4. チャの栽培条件

茶樹は‘やぶきた’挿し木苗 (1年生苗) を用いた. 根部を洗浄した後, ガラス温室で水耕栽培を開始した. 培養液は Konishi et al. (1985) の培養液組成 (表 2-1) を元に, 主要元素 (単位:mM) NH4-N (2.1), NO3-N (0.7), P (0.1), K (1.0), Ca (0.7), Mg (1.0) および微量元素 (単位:μM) Fe (6.3; EDTA 錯体として), B (9.3), Mn (18.2), Zn (1.5), Cu (0.4), Mo (0.5), Al (400)を含む組成とした. この 1/4 濃度で 3 週間栽培し, その後は標準濃度で水耕順化した. 培養液は常時通気を行い, 2 週間毎に交換した. 水耕栽培開始から 7 週間以上の順化期間の後, 人工栽培実験に供した.

表 2-1. 培養液組成

Elements		Forms	Concentration (mM)
N	NH_4-N	$(NH_4)_2SO_4$	2.1
	NO_3-N	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0.7
P		KH_2PO_4	0.1
K		KH_2PO_4, K_2SO_4	1
Ca		$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.7
Mg		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1
Fe		Fe-EDTA	0.0063
B		H_3BO_3	0.0093
Mn		$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0182
Zn		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0015
Cu		$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0004
Mo		$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.0005
Al		$Al_2(SO_4)_3 \cdot 14\text{-}18H_2O$	0.4

2.2.4.1. 人工栽培の基本栽培条件探索

上述の通り水耕順化期間を経た苗を人工気象器 (LPH-220SPC, 日本医化器械製作所, 大阪, 日本) 内に移植し, 人工栽培を開始した. 茶樹は 1 区画当たり 10-15 本で栽培した. 各区の栽培条件は, 図 2-1 に示す通りである. 第 1 回の栽培実験では, AC-P5 (最終光量 48 μmol·m^{-2}·s^{-1}, FR 光添加, 青色光＋赤色光, 湿度 50%RH) , AC-P8 (最終光量 48 μmol·m^{-2}·s^{-1}, FR 光添加, 青色光＋赤色光, 湿度 80%RH) , AC-A5 (最終光量 48 μmol·m^{-2}·s^{-1}, FR 光添加なし, 青色光＋赤色光, 湿度 50%RH) の 3 条件で栽培した.

培養液は常時通気を行い, 1 週間毎に交換した. 培養液組成は表 2-1 に示す組成で栽培した.

光量の測定は波長別スペクトロメーター (StellarNet Inc, Florida, USA) を用いて, 新芽の位置 (樹冠面から 10 cm 上方の位置) での光量を測定した. 波長 400-499 nm を青色, 500-599 nm を緑色, 600-699 nm を赤色, 700-799 nm を遠赤色 (FR) として光子数の合計を計測した. 光源は人工気象器付属の蛍光灯, Red LED (シチズン電子株式会社, 富士吉田, 日本) , Blue LED (昭和電工株式会社, 東京, 日本) を用いた. 各光源のスペクトル形状を図 2-2 に示す. FR 光は FR LED (ウシオ オプトセミコンダクター株式会社, 東京, 日本) を用いて明期のみの添加とし, 暗期には照射しなかった.

日長制御と温度については, 露地の観測データに基づき設定した. 休眠期は露地の冬期に当たるため, 明期/暗期は 10 h/14 h, 7°C/5°C とした. 萌芽期, 遮光期は明期/暗期は 12 h/12 h, 25°C/15°C とした. 湿度は 50%RH または 80%RH で制御した.

以上のような条件で人工栽培を行い, 6 週間の休眠期間の後, 萌芽条件に移行した. 新芽が伸長し, 第 2 葉が開葉したころに遮光条件に移行し, 遮光を開始した. 所定の遮光期間を終えた後, 新芽を摘採した.

	Dormancy period			Budbreak period			Cover-culture period		
Red+Blue+FR, 50%RH (AC-P5)	3 w			4 w			2 w		
	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR
	0	150	0	0	320	100	0	160→48	100→24
	10 h	14 h		12 h	12 h		12 h	12 h	
	7℃	5℃		25℃	15℃		25℃	15℃	
	50%RH			50%RH			50%RH		
Red+Blue+FR, 80%RH (AC-P8)	3 w			4 w			2 w		
	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR
	0	150	0	0	320	100	0	160→48	100→24
	10 h	14 h		12 h	12 h		12 h	12 h	
	7℃	5℃		25℃	15℃		25℃	15℃	
	80%RH			80%RH			80%RH		
Red+Blue, no FR, 50%RH (AC-A5)	3 w			4 w			2 w		
	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR
	0	150	0	0	320	0	0	160→48	0
	10 h	14 h		12 h	12 h		12 h	12 h	
	7℃	5℃		25℃	15℃		25℃	15℃	
	50%RH			50%RH			50%RH		
White+FR, high shading (AC-HS)	6 w			3 w			5 w		
	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR
	0	240	100	0	320	100	0	160→16	100→12
	10 h	14 h		12 h	12 h		12 h	12 h	
	7℃	5℃		22℃	10℃		22℃	10℃	
	50%RH			50%RH			50%RH		
White+FR, low shading (AC-LS)	6 w			3 w			5 w		
	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR
	0	240	100	0	320	100	0	160	100
	10 h	14 h		12 h	12 h		12 h	12 h	
	7℃	5℃		22℃	10℃		22℃	10℃	
	50%RH			50%RH			50%RH		
Red+Blue, no FR (AC-BR)	6 w			3 w			5 w		
	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR
	0	240	0	0	480	0	0	160→48	0
	10 h	14 h		12 h	12 h		12 h	12 h	
	7℃	5℃		25℃	15℃		25℃	15℃	
	50%RH			50%RH			50%RH		

Length of period	
Amount of light	
Light period	Dark period
Relative humidity (RH)	

図 2-1. チャの人工栽培条件

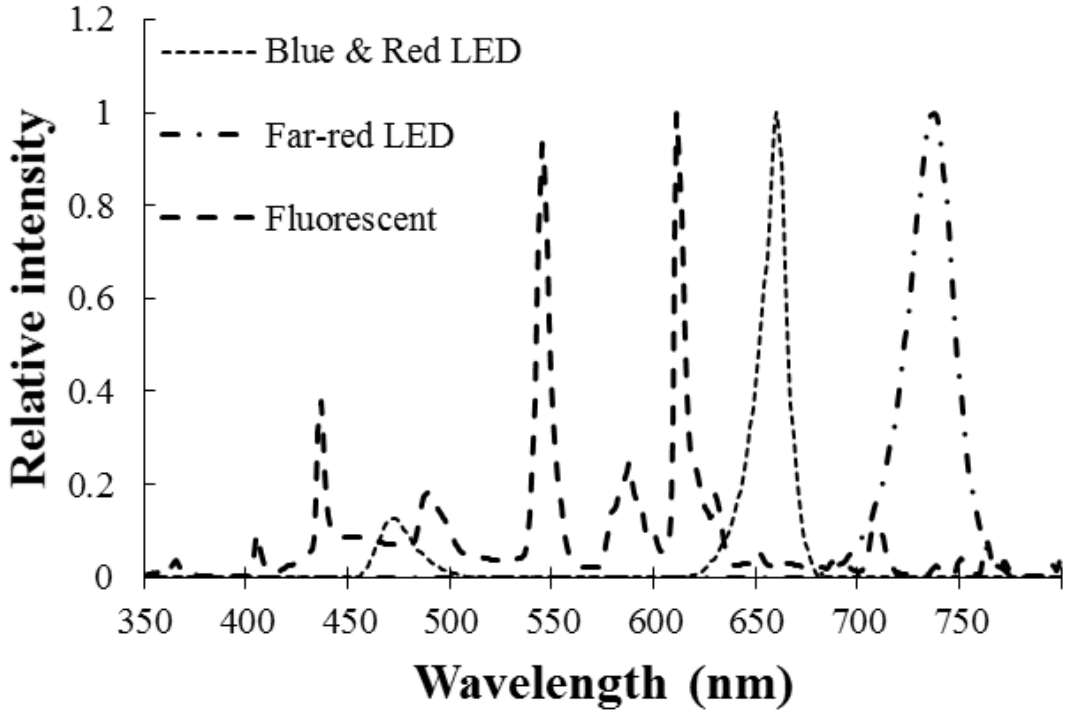

図 **2-2.** 第 **1** 回栽培で用いた光源のスペクトル形状

2.2.4.2. アミノ酸プロファイルを考慮した光環境構築

続いて第 2 回の栽培では，第 1 回の結果を受けて AC-HS (最終光量 16 μmol·m^{-2}·s^{-1}，FR 光添加，白色光) ，AC-LS (最終光量 160 μmol·m^{-2}·s^{-1}，FR 光添加，白色光) ，AC-RB (最終光量 48 μmol·m^{-2}·s^{-1}，FR 光添加なし，青色光＋赤色光) の 3 条件とした．また，AC-HS に関しては確認のためさらに 5 区画の反復実験を行った．培養液は常時通気を行い，1 週間毎に交換した．培養液組成は AC-HS と AC-LS については表 2-2 に示す組成で，AC-BR は摘採まで表 2-1 の組成で栽培した．

光量の測定は 2.2.4.1.に準じる．光源は AC-HS と AC-LS は白色 LED (シャープ株式会社，堺，日本) ，FR LED および人工気象器付属の蛍光灯，AC-BR は Red LED，Blue LED と蛍光灯を用いた．各光源のスペクトル形状を図 2-3 に示す．また，2.2.4.1.同様，FR 光は明期のみの添加とし，暗期には照射しなかった．

日長制御と温度について，休眠期は明期/暗期を 10 h/14 h，7°C/5°C とした．萌芽期，遮光期は明期/暗期は 12 h/12 h，25°C/15°C または 22°C/10°C とした．湿度は全条件，全期間を通して 50%RH で制御した．

2.2.4.1.と同様，休眠期間，萌芽条件，遮光期間のステップで栽培した後，新芽を摘採した．

表 **2-2.** 培養液組成

Elements		Forms	Concentration (mM)
N	NH_4-N	$(NH_4)_2SO_4$	4.2
	NO_3-N	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	1.4
P		KH_2PO_4	0.1
K		KH_2PO_4, K_2SO_4	1
Ca		$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.1
Mg		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1
Fe		Fe-EDTA	0.0063
B		H_3BO_3	0.0093
Mn		$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0182
Zn		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0015
Cu		$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0004
Mo		$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.0005
Al		$Al_2(SO_4)_3 \cdot 14\text{-}18H_2O$	0.4

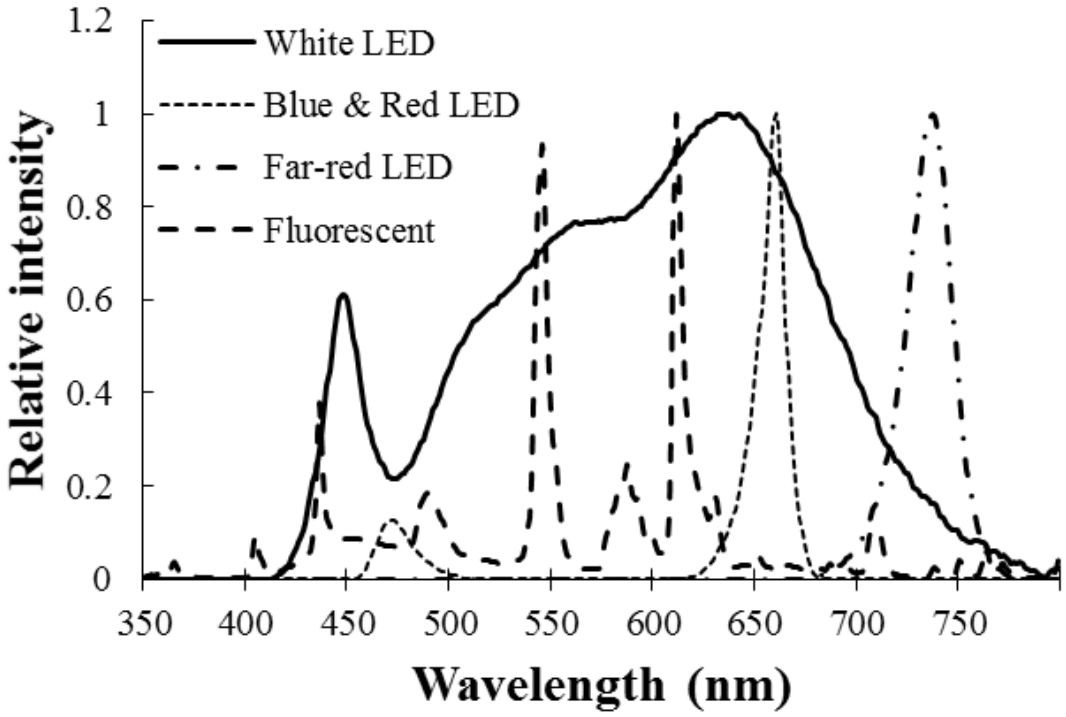

図 **2-3.** 第 **2** 回栽培で用いた光源のスペクトル形状

2.3. 結果

2.3.1. 品評会出品茶の分析・解析と品質評価モデルの構築

2012 年の品評会出品茶 18 点を HPLC により分析した結果，11 個のピークが検出され，うち 10 個のアミノ酸を同定，1 個の未知ピークが得られた（表 2-3）．茶葉品質に相関が高いことが知られているテアニンの含有量と順位の決定係数は $R^2 = 0.2389$ であった（図 2-4）．

表 **2-3.** 検出された遊離アミノ酸

Retention time (min)	Free amino acid
2.3	Unknown_01
3.0	Aspartic acid
4.5	Glutamic acid
7.7	Asparagine
9.4	Serine
10.2	Glutamine
13.3	Arginine
14.6	Threonine
18.1	Theanine
19.9	Alanine
36.6	Norvaline (internal standard)

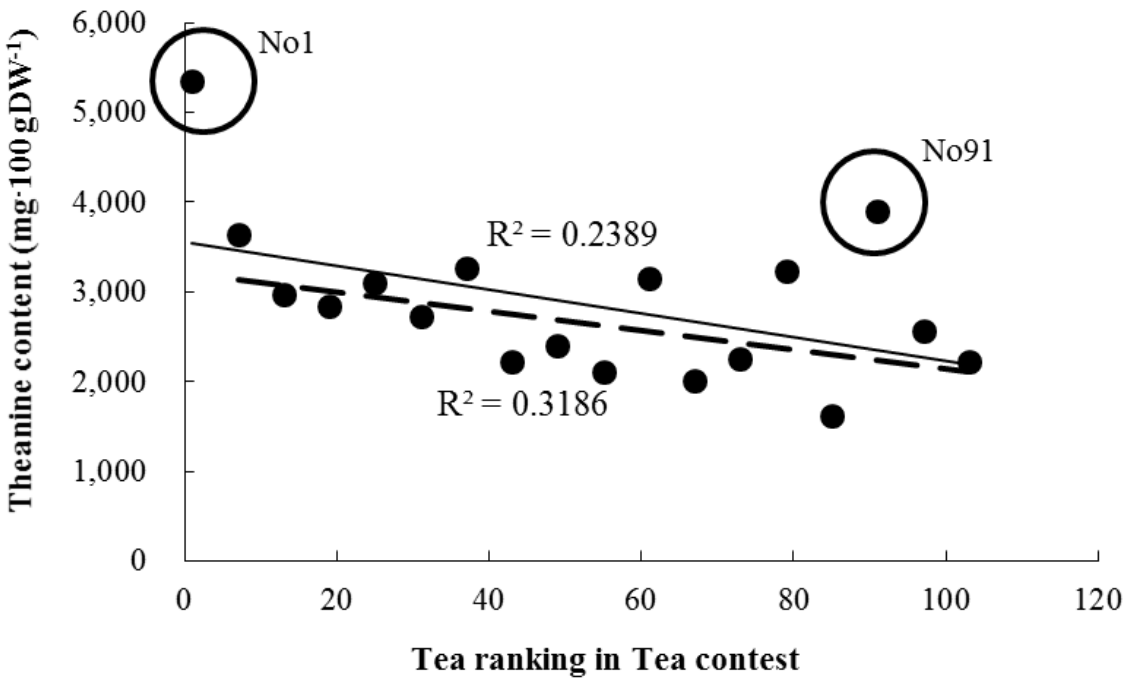

図 **2-4.** テアニン含有量と品評会順位の関係

(上**:1** 位と **91** 位を含む近似直線**,** 下**:1** 位と **91** 位を含まない近似直線**)**

HPLC 分析により得られたアミノ酸のプロファイルと順位との関係を表すため，表 2-3 に示すアミノ酸の含有量を説明変数，品評会順位を応答変数として PLS 回帰分析によって作成した順位予測モデルの結果を図 2-5A に示す．横軸に実際の順位，縦軸に予測順位を示している．R^2 値は 0.5628，Q^2 値は 0.7171 であった．R^2 値 $(0 < R^2 < 1)$ はモデルの直線性を表し，Q^2 値 $(0 < Q^2 < 1)$ はモデルの予測性能を表しており，ともに 1 に近いほど優れている．

図 2-5A において，No.91 が他のサンプルの検量線から大きく外れていることが明らかになった．そこで，各成分のピーク強度および品評会順位をパラメータに主成分分析 (PCA) を行いアウトライヤーの確認を行った（図 2-6）．

PCA の結果，PC1 軸で No.1 が，PC2 軸で No.91 がそれぞれ他のサンプルから外れたアウトライヤーであることが示唆された．PC1 の寄与率は 73.9%，PC2 は 11.5%だった．このことから，No.1 と No.91 を除外した 16 サンプルで再度 PLS 解析を行った．

この結果，R^2 値は 0.8167，Q^2 値は 0.7759 と大きく改善された (図 2-5B) ．一方，同じく No.1 と No.91 を除外した 16 サンプルでテアニン含有量と順位の相関を見た場合，R^2 = 0.3186 と低い値を示した (図 2-4) ．

PLS 回帰分析における coefficient 値を図 2-7 に示す．図の上方が低順位茶への寄与，図の下方が高順位茶への寄与を表し，バーの高さが寄与の大きさを表している．この結果，今回分析したアミノ酸の中では，unknown_1，グルタミン，アルギニン，テアニンが高順位茶に多く，アスパラギン酸，アラニンが低順位茶に多いことがわかった．

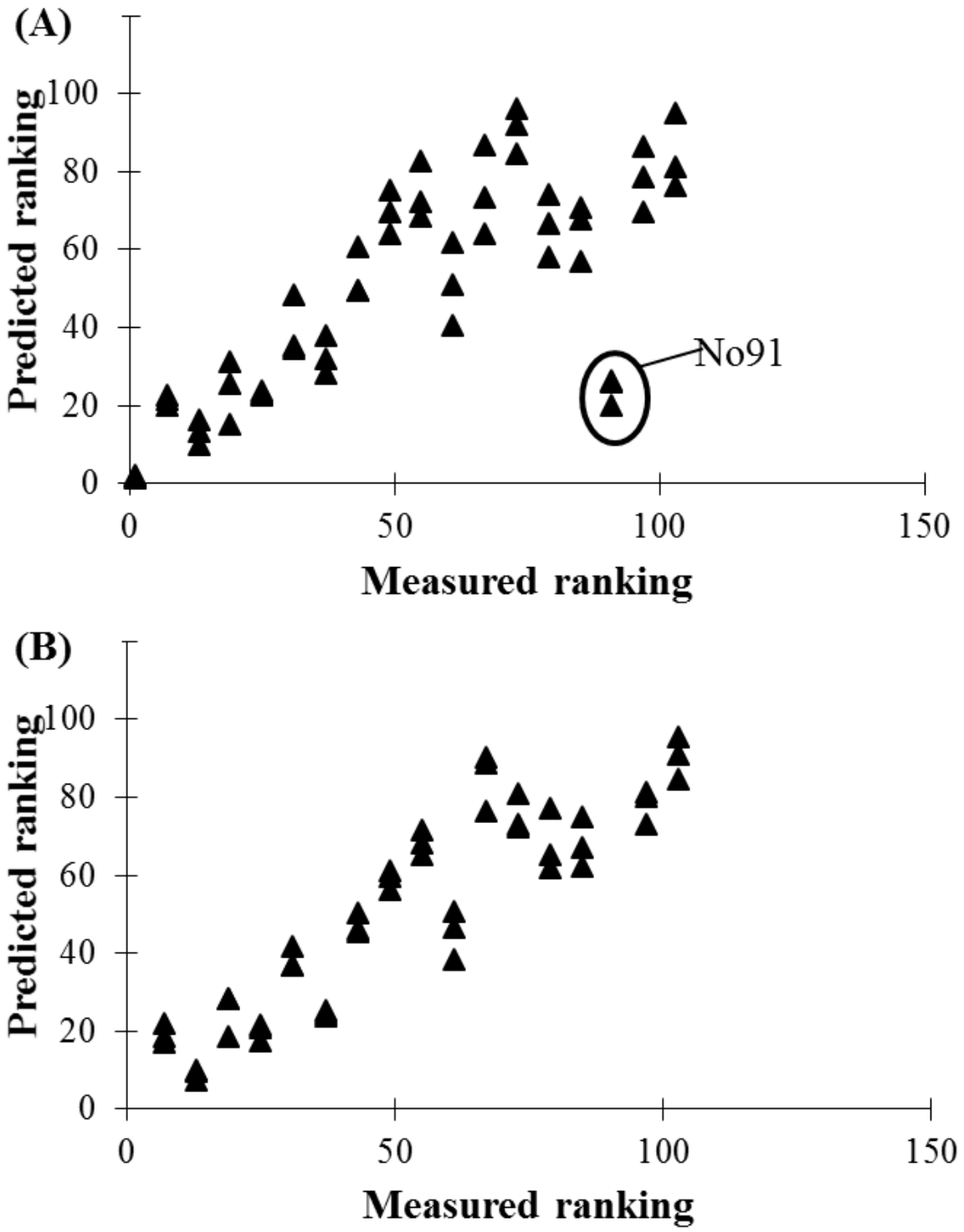

図 **2-5.** アミノ酸組成からの順位予測モデル

横軸：実際の品評会順位，縦軸：予測された順位，左下に向かうほど高順位

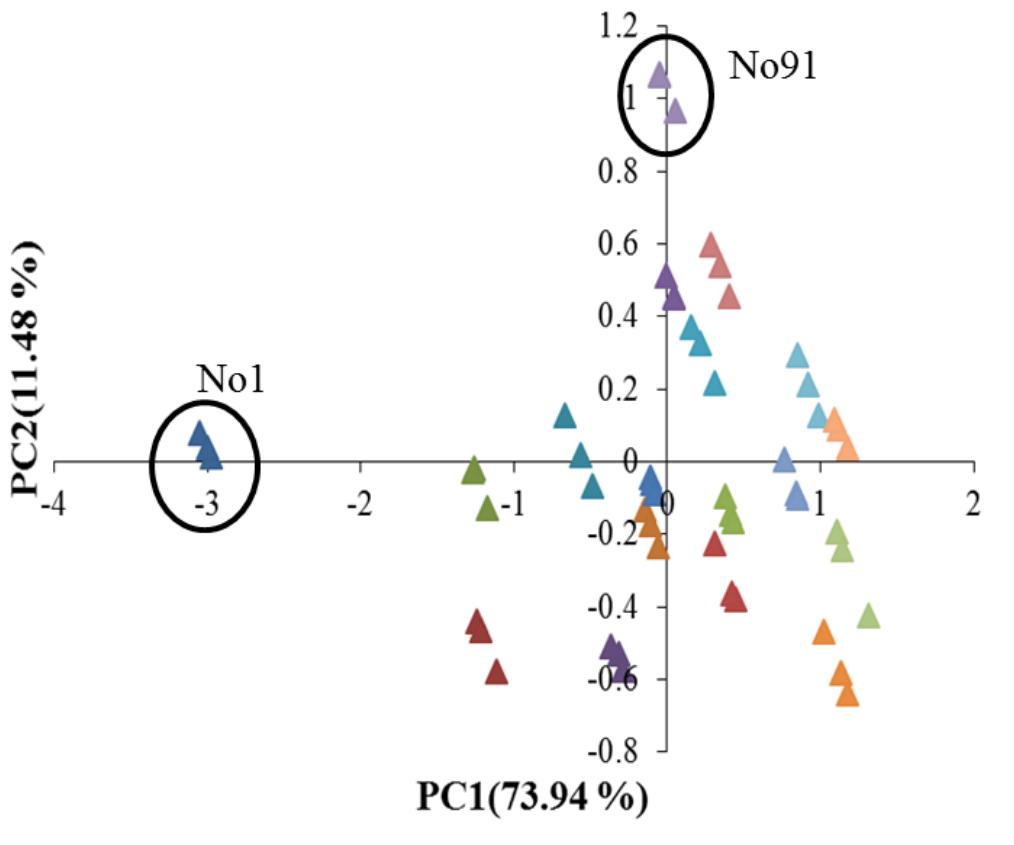

図 2-6. 品評会出品茶の PCA スコアプロット

No1, No91 はそれぞれ第 1 位，第 91 位の茶を表す

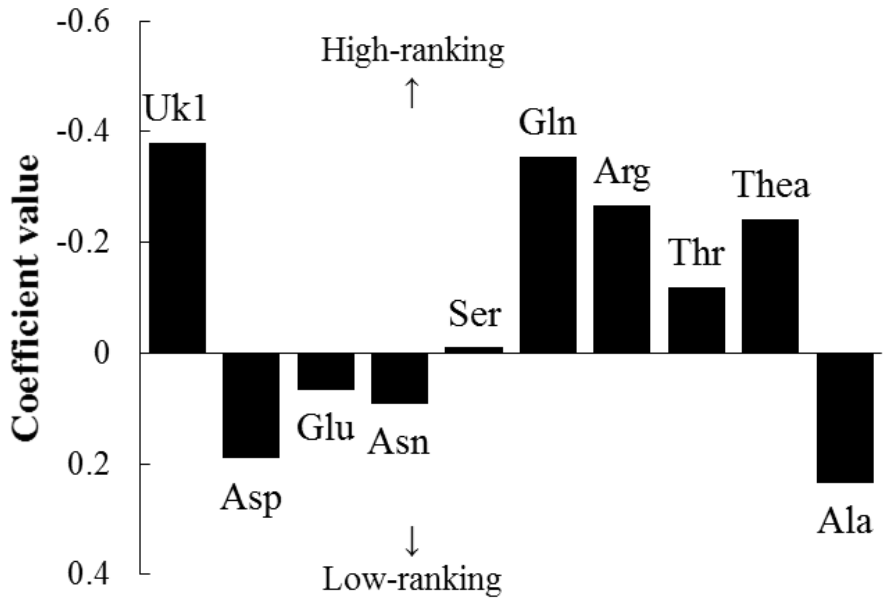

図 2-7. 各アミノ酸の PLS モデルでの Coefficient 値

Uk1: unknown_01, Asp: aspartic acid, Glu: glutamic acid, Asn: asparagine, Ser: serine, Gln: glutamine, Arg: arginine, Thr: threonine, Thea: theanine, Ala: alanine.

2.3.2. 基本栽培条件の検討

チャの人工栽培の基本的な栽培条件を確立するため，栽培条件を変えてチャを栽培し，得られた茶葉に含まれる成分から栽培方法の評価を進めた．ここでは，茶葉品質に相関が高いことが知られているテアニンに着目し，その含有量を比較した．

第 1 回の栽培において得られた茶葉では，いずれの条件でも，テアニン含有量は比較に用いた市販の碾茶よりも低い結果となった (図 2-8) ．受光強度の違いから，上位葉（条件名の後ろに U を付記），下位葉（条件名の後ろに L を付記）を分けて分析した．比較に用いた市販碾茶は 2 種類で，20g 当たりの卸価格が 300 円のもの (S3) ，600 円のもの (S6) である．別途 HPLC を用いた定量分析から市販碾茶 S3 のテアニン含有量は 2150 mg·100 gDW^{-1} と測定されており，これを元に概算すると含有量が最も高い P5L で 901 mg·100 gDW^{-1}，最も低い A5L では 33 mg·100 gDW^{-1} であった．AC-P5 と AC-P8 では栽培中の相対湿度が違っているが，その影響は見られなかった．また AC-A5 区では FR 光を照射せずに栽培を行ったが，AC-A5 区の茶樹は茶葉摘採後の新葉 (露地での 2 番茶に当たる) の生育が停止してしまった．この現象は FR 光を照射した AC-P5 区，AC-P8 区では見られなかった．

続いて，第 2 回の栽培では，第 1 回の結果を踏まえて栽培条件を見直した．その結果，いくつかの茶葉サンプルでは市販碾茶を凌ぐテアニン含有量を示した (図 2-9) ．第 1 回と同様，市販碾茶 S3 の含有量を 2150 mg·100 gDW^{-1} として概算したところ，最も高い LSL で 5114 mg·100 gDW^{-1}，最も低い BRU (栽培条件は第 1 回の A5U と同じもの)でも 1392 mg·100 gDW^{-1} となった．

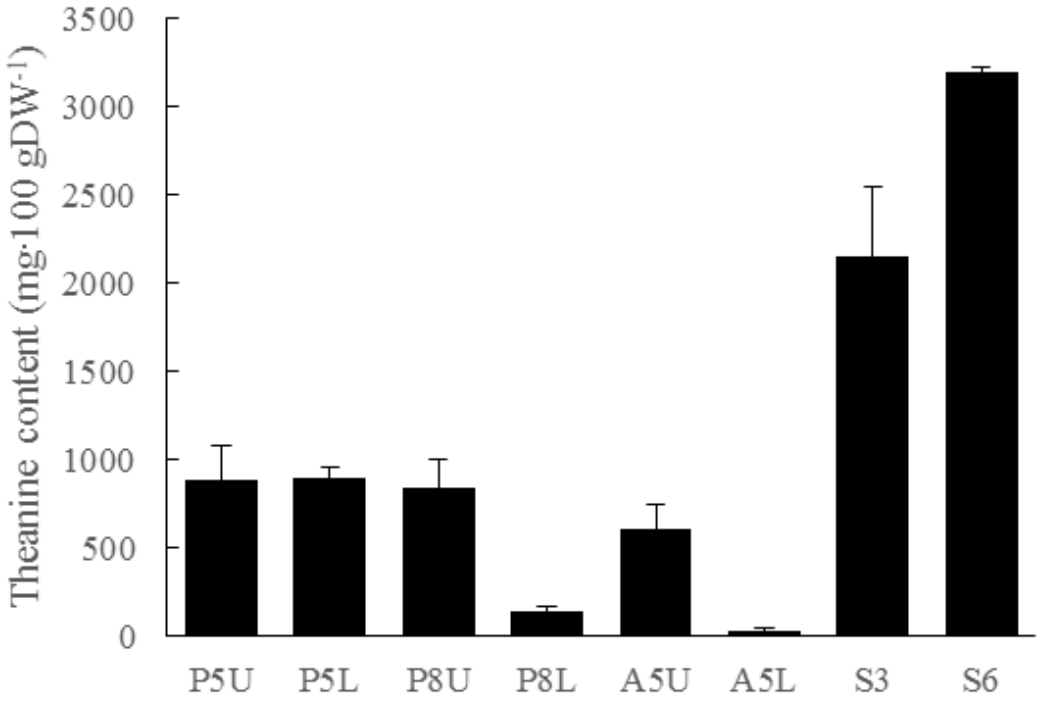

図 2-8. 第 1 回栽培で得られた茶葉のテアニン含有量

(Mean ± SD, n = 3)

各条件名の後ろの U は各区の上位葉, L は各区の下位葉を示す.

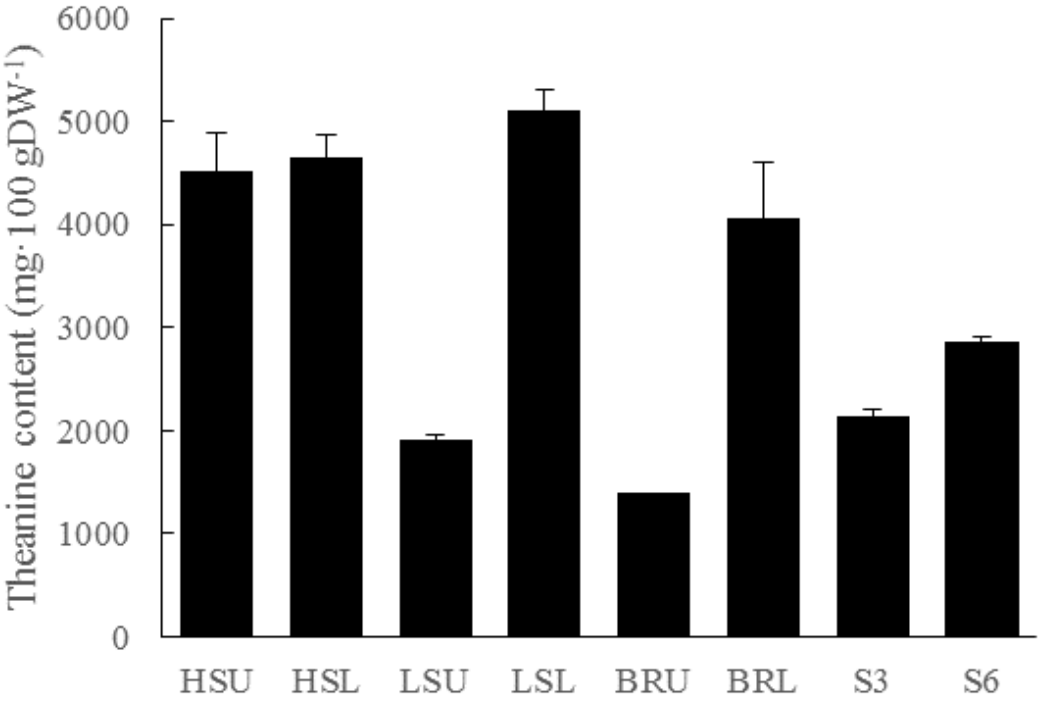

図 2-9. 第 2 回栽培で得られた茶葉のテアニン含有量

(Mean ± SD, n = 3)

各条件名の後ろの U は各区の上位葉, L は各区の下位葉を示す.

2.3.3. 光環境を改善した人工栽培

第 2 回の人工栽培条件に基づいて，光環境を改善し，AC-HS と同様の条件下でチャの人工栽培を繰り返した．各区から得られた茶葉のアミノ酸含有量を表 2-4 に示す．AC-HS は安定的に高いアミノ酸含有量を示し，特にテアニン，アルギニンは品評会出品茶の平均と比較しても多量に含まれていた．人工栽培茶の各条件は上位葉・下位葉を区別せず，混合して分析した．

表 2-4. 茶葉のアミノ酸含有量

	mg·100 gDW^{-1}								
	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	Arg	Thr	Thea	Ala
High-ranking teas (Nos.7, 13, 19, 25, and 31)	727	784	179	140	283	1102	91	3058	79
Low-ranking teas (Nos.73, 79, 85, 97, and 103)	666	764	130	85	115	626	65	2381	66
AC-HS (n=4)	439	396	627	225	566	1713	112	4686	135
AC-LS (n=1)	191	272	85	78	386	574	36	2666	39
AC-BR (n=1)	203	181	359	140	173	655	66	2342	64

Asp: aspartic acid, Glu: glutamic acid, Asn: asparagine, Ser: serine, Gln: glutamine, Arg: arginine, Thr: threonine, Thea: theanine, and Ala: alanine.

2.3.4. 人工栽培茶の品質評価・検証

得られた人工栽培茶サンプルは品評会出品茶と同様に HPLC によるアミノ酸分析を行い，アミノ酸プロファイルを得た．このプロファイルを前述の順位予測モデルに適用し，人工栽培茶の予測順位が算出された．図 2-10 が順位予測結果である．AC-HS は 1 位と同等の品質を備えていると予測された．

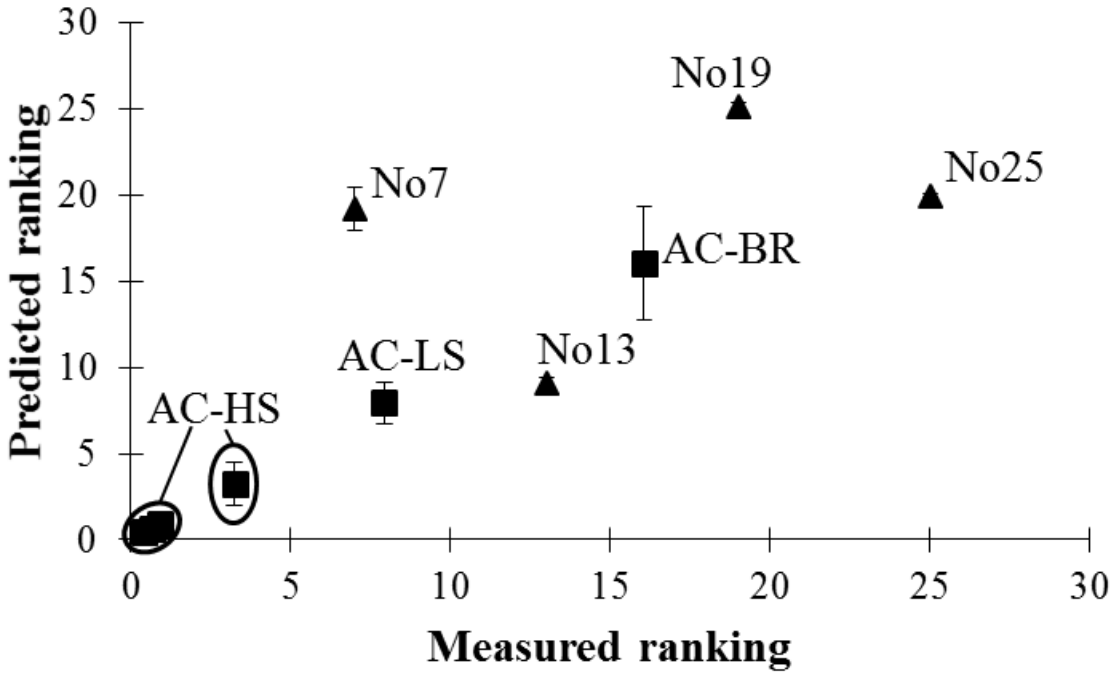

図 2-10. アミノ酸組成からの順位予測モデル

(Mean ± SD, n = 3)

横軸：実際の品評会順位，縦軸：予測された順位，左下に向かうほど高順位．

No**：品評会第**の茶葉，AC-**：人工栽培茶．

人工栽培茶の横軸は縦軸と同じ点にプロット (y = x 上にプロット)した．

2.4. 考察

本章ではまず，品評会出品茶の分析・解析および順位予測モデルの組み立てを行った．HPLC によって得ることのできる 11 成分の含有量から，品評会での順位を予測するモデルを構築し，R^2 値 0.8167，Q^2 値 0.7759 を示す水準まで改善できた．例えばこれと比較してテアニン含有量による予測精度は低く (R^2 = 0.3186) ，茶葉の品質を安定的に評価する信頼できるモデルが構築できたと言える．

品評会においては，1.2.2 項において詳述した各項目において点数がつけられるが，特に内質と呼ばれる香気，滋味が重要となっており，品評会や茶種により多少の差はあるが，200 点満点中のそれぞれ 65 点を占める．遊離アミノ酸が関与するのはおそらく滋味がほとんどであろうことから，滋味得点に着目して相関を取るほうが合理的である．しかしながら品評会ではその採点方法が独特であり，最も優れた出品茶を満点とし，そこからの相対評価 (減点評価) で各出品茶の得点を決めている．このような採点プロセスの影響を考慮して，シンプルに総合得点 (すなわち順位) を茶葉の品質，特に味・美味しさに重きを置いた品質評価の結果として応答変数に用いることとした．

このようにして得られた順位予測モデルについて，coefficient 値から各成分含有量の影響を評価すると，unknown_1，グルタミン，アルギニン，テアニンが高順位茶に多く，アスパラギン酸，アラニンが低順位茶に多いことがわかった．すなわち，栽培における目標としてグルタミン，アルギニン，テアニンを通常よりも増加させることが，高品質につながると考えられる．過去の研究から，玉露，碾茶は煎茶に比べアルギニン，テアニンを多く含むことが知られており (木幡，2002) ，今回の結果はこうした知見と符合するものであった．

次にチャの人工栽培の基本的な栽培条件を確立するため，テアニン含有量に着目していくつかの条件間での比較を行った．第 1 回の栽培では市販の碾茶よりも含有量が低く，最も多いものでも S3 の半分以下の含有量であった．また光強度によって茶葉中のテアニン含有量が変動する (Deng et al., 2013) ことから，植物群落の中で上位にある葉と下位にある葉

では含有量に違いがあると考えたが，こちらは一貫した傾向は確認できなかった．テアニン含有量が低かった原因として，まず光質の影響が考えられた．本検討のように，R 光と B 光のみを使って効率的に光合成させる取り組みはレタスなどの葉菜類では多く見られるが，チャの成分を高めるという目的には適さない可能性がある．また生育を観察しながら条件探索を進めたこともあり，各栽培段階で生育が安定するまでに時間がかかってしまったほか，想定よりも早く次の段階に移行せざるを得ない場合もあった．具体的には，人工環境へ移す前の水耕順化段階では，培養液濃度の探索で生育が停滞し，順化に長い時間がかかってしまった．休眠条件下では新芽の生育を休止させ，成分を蓄積させることが必要であるが，今回の栽培では3週間と短かったため，この休止が十分でなかったことが考えられる．さらに遮光期間は前述の通り高級な茶種ほど長くとり，碾茶では 30 日に達するものだが，本検討では新芽の生育が進んでしまい，2 週間しかとることができなかった．

また，光質に関係する別の検討項目として，FR 光の有無 (AC-P5 と AC-A5 の違い) による検討を行った．FR 光添加すなわち R/FR 率の低減は，植物に shade avoidance 反応を引き起こすことが知られている (Smith & Whitelam, 1997，Vandenbussche et al., 2005，Stamm & Kumar, 2010) ．遮光下でアミノ酸含有量が増加するというチャの性質から，FR 光によるテアニン含有量の変化が見られないかと考えたが，FR 有無による差は明確でなく，FR 光によるテアニン含有量への影響は見られなかった．しかしながら FR 光を照射しなかった AC-A5 区では，その後の葉の展開に影響が現れ，新芽の生育が停止する現象が見られたため，FR 光はチャが人工環境下で生育していくうえで重要な波長成分であることが窺われた．このことから，以降の人工栽培実験においても引き続き FR 光の添加を検討した．

このような考察を踏まえ，第 2 回の栽培条件を設定し，栽培を行った．第 1 回からの変更点は以下の通りである．①安定的な水耕順化条件で順調な生育を確認した，②人工環境移植後の培養液組成を変更し窒素含有量を高めた，③人工光源としてブロードなピーク波長を持つ白色 LED を用いた，④休眠条件下の栽培を 6 週間と長くとった，⑤萌芽条件・遮光条件での温度制御を 22°C/10°C として生育の進行をゆるめた，⑥遮光条件下の栽培を 5 週間と長くとった．こうした条件改善の結果，テアニン含有量は大きく向上した．AC-HS の上位

葉・下位葉，AC-LS の下位葉，AC-BR の下位葉で市販高級茶を凌ぐ量のテアニンを含有していた．AC-HS では上位・下位の差が見られず，その他 2 区では下位葉の含有量が高いことは，本検討で測定した光量で言えば 16-160 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ の間に茶葉のテアニン含有量が大きく変化するスレッシュホールドが存在することを示唆している．この効果を引き出すためには，収穫前の一定以上の期間，十分に光量を下げた遮光条件で栽培する必要がある．またその条件を満たせば，上位葉下位葉の区別なく多量のテアニンを含むものと考えられる．

栽培中のチャの様子を図 2-11 に示す．第 2 回の栽培環境下では休眠打破から摘採まで約 8 週間と，露地と遜色ない生育を示した．ここで用意した各環境条件は，茶樹の生育にとって問題ないものと思われた．前述のように水耕栽培への順化も速やかに進行し，“やぶきた”における人工栽培技術はある程度確立できた．順化の開始や人工環境への移行の季節は，実験によって様々だったが，いずれも影響は見られず周年行うことが可能であった．栽培中の光量が茶葉の成分に大きく影響することが示唆され，特に収穫前に光量を低減することが重要であると考えられる．その一方で今回の人工環境下での光量は最大時でも露地に比べて低く，樹勢の低下が見られる場合もあった．長期栽培を試みる場合には，茶葉品質と比較検討しながら適切な光量を選択することが必要であると思われる．

図 **2-11.** 人工環境下で栽培中のチャの様子

基本的な栽培条件が確立した後，上記の順位予測モデル構築に寄与する成分の考察から，AC-HS（最終光量 16 μmol·m^{-2}·s^{-1}，FR 光添加，白色光）が最も高品質碾茶生産に適した環境であると考えられた．そこで同様の条件で人工栽培を行い，得られた茶葉のアミノ酸含有量を表 2-4 に示す．AC-HS では茶品質に重要と考えられるアミノ酸，グルタミン，アルギニン，テアニンの含有量はいずれも高い値を示していた．そしてこの成分含有量を元に順位予測モデルによって品評会順位を予測すると，いずれも非常に高い順位の茶葉に近いアミノ酸組成を備えていることがわかった．光環境ごとの予測順位を見ると，AC-HS は 1-3 位と予測されたのに対し，AC-LS（最終光量 160 μmol·m^{-2}·s^{-1}，FR 光添加，白色光）は 7-9 位，AC-BR（最終光量 48 μmol·m^{-2}·s^{-1}，FR 光添加なし，RB 光）は 13-20 位と予測された．この結果から，テアニン含有量からの考察と同じく，人工環境での遮光栽培が品質向上を促進する傾向が見られた．人工環境における遮光栽培について，太田ら (1996) はガラスハウス内でチャの栽培検討を行っており，チャの光補償点を 100 μmol·m^{-2}·s^{-1} と報告している．また鈴木ら (2012) は 100 μmol·m^{-2}·s^{-1} の光環境下でチャ葉に陰葉化の傾向 (光沢やエピナスティ) が見られたとしている．これらと比較して本章の実験では，これまでに報告のない，光量によるアミノ酸集積の違いが見られたと言える．過去の報告および今回の結果を統合すると，光量 100 μmol·m^{-2}·s^{-1} 前後にチャ葉が陰葉化し，高品質化する閾値が存在するものと考えられた．

成分の面から予測順位を見直してみると，AC-HS の予測順位が高かった理由として，アミノ酸組成の違いが大きい (表 2-4) ．品評会順位の高い茶に特異的に多く含まれるアミノ酸の含有量が多く，順位の低い茶にも含まれるアミノ酸含有量が少なかったことが，高い予測順位につながっている．人工栽培茶は，窒素の輸送・貯蔵形態とされるテアニン，アルギニンが多く含まれており，露地では受光に伴い分解されるこれらの成分が，遮光によって多量に維持されていることが窺えた (小西・高橋, 1969; 岡野ら, 2003) ．しかしながら，順位の上下に関わらず品評会出品レベルの茶は，栽培時に入念な遮光管理がなされていると考えられる．そのため，人工的に遮光条件を制御する栽培方法は，露地に比べ効率よくテアニンやアルギニンを蓄積できる可能性が示唆された．

一方，人工栽培茶において，品評会順位が下位の茶により多く含まれる成分が少なかったことは，より興味深い特徴である．第一章で触れたように，テアニンは葉において受光時にグルタミン酸とエチルアミンに分かれ，グルタミン酸は窒素代謝系へ，エチルアミンはポリフェノール類へと取り込まれるとされる．今回の結果では，順位が上位の茶と下位の茶のグルタミン酸含有量に違いはなく，人工栽培茶のみが低いという現象が見られた．また，遮光によって増加する (分解が抑制される) という報告がある (阿南・中川，1974）アスパラギン酸も，グルタミン酸と同様の傾向が見られた．これらは人工環境における特異な反応である可能性がある．

2.5. 小括

以上のように，本章では品評会出品茶のアミノ酸組成解析から高品質茶に必要な組成を明らかにするとともに，人工環境下でのチャの栽培技術を確立，人工栽培茶の品質評価を行った．その結果，きわめて高品質と予測される人工栽培茶を得ることができた．これは多成分のマルチマーカープロファイリングによる 2 次機能の解析から，光環境・栽培環境の最適化を行うアプローチの有効性を示唆するものである．今回の実験は 2 次機能と成分，さらには栽培技術とを結びつける試みであり，マルチマーカープロファイリングの有用性とともに，今後植物工場等人工環境下での植物栽培技術の開発手法に一つの道筋を示すものであると考える．

第三章　GC/MS を用いた茶の多成分一斉分析・解析による人工栽培茶葉の品質評価

3.1. 諸言

第二章で述べた通り，日本型農業において高品質な作物を生産するうえでは官能品質の向上は不可避の課題であり，官能品質の分析および評価と，栽培時の光環境条件へのフィードバックを実現する体系が必要である．このためには，メタボローム解析を行い，得られた知見に基づき高品質作物の人工栽培技術を開発する取り組みが有効である．具体的には，市場において高品質と評価される作物の多成分一斉分析を行い，その特徴を捉えて栽培環境構築の手掛かりとする．また，特殊な人工環境下での栽培が農産物の品質にどのような影響を及ぼすかを計測する．第二章ではこれらのアプローチのモデルケースとして，品評会出品茶の HPLC 分析結果からアミノ酸プロファイルに着目し，代謝物プロファイリングによって出品茶の順位予測モデルを構築するとともに，上位茶に重要なアミノ酸を明らかにした．またアミノ酸を増やすべく人工栽培環境を設定，人工栽培茶の栽培に成功し，その茶葉は極めて高い品質を誇ると予測された．この結果，栽培環境，特に栽培後期の光質によりアミノ酸組成が大きく変化することを明らかにした．

アミノ酸が茶品質に大きな影響を及ぼすことは，これまで様々な報告から明らかとなっており，第二章の検討結果には一定の価値があると考えられる．一方で，本研究で対象とする碾茶は抹茶の原料であり，最終的には茶葉を直接摂取するため，他の茶種に比べて苦渋味の低減要求が高いなどの違いが予想される．アミノ酸以外の成分の品質に対する貢献・寄与についても調査を進める必要性が高い．そこで本章では，アミノ酸以外の幅広い親水性化合物に分析の範囲を広げ，すでに報告されている GC/MS を用いた茶の多成分一斉分析・解析 (Pongsuwan et al., 2007) を用いた代謝物プロファイリングを行い，栽培後期の光環境が茶葉の品質特性にどのような影響を与えるのか，そこから高級茶の人工栽培の可能

性を検討した.

3.2. 実験材料および実験方法

3.2.1. 試薬および茶葉サンプル

分析および栽培に用いた試薬は第二章に準ずる.

茶葉試料として第二章と同じく 2012 年品評会出品茶を用いた. 順位づけされた茶葉から等間隔で 36 点の茶葉を選抜し, 分析に供した. また後述の人工栽培を経た茶葉はマイクロウェーブにて十分に乾燥させ, 分析に供した.

3.2.2. 分析条件

使用した分析装置, 分析条件, MS イオン化条件は第二章に準ずる.

3.2.2.1. GC/MS

分析条件はすべて第二章に準ずる．サンプルは繰り返し数 n=3 とし，分析は連続して行った．分析の順番はランダムになるように設定した.

3.2.2.2. HPLC

アミノ酸含有量の分析は第二章に準ずる.

カテキン類 (エピカテキン，エピガロカテキン，エピカテキンガレート，エピガロ

カテキンガレート) の含有量は HPLC を用いた測定手法に基づき測定した (末松ら, 1995; 堀江ら，2002) ．粉砕した茶葉サンプル 50 mg を 5 mL のアセトニトリル／蒸留水の混合液 (50% v/v) に加え，室温で 60 分間振とう抽出した．抽出液は 3000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離した．上清 100 µL を 0.45 µm フィルターで濾過し，HPLC (Prominence CBM-20A；島津製作所) 分析に供した．カラムは TSKgel ODS-80TS (東ソー株式会社，東京，日本) を使用し，移動相は移動相 C (10 mM リン酸バッファ，pH 2.1) と移動相 D (100%アセトニトリル) を用いた．移動相 C と D はグラジエントで C 99%/D 1%の初期状態から C 85%/D 15%まで 30 分間直線的に変化させ, その後 C 10%/D 90%の状態で 10 分間保持した後，初期状態に戻して 25 分間保持した．それ故，1 サイクルは 65 分とし，分析の間，流量は 1 mL·min^{-1} 一定に保った．検出器は SPD-20A UV/vis detector (島津製作所) を用いて，検出波長 280 nm で測定した．

3.2.4. データ解析条件

多変量解析のためのデータとして, GCMS solution から AIA（Andi）形式で出力した生データを用いた. アライメントには GC/MS 用にインターネットで公開されているソフトウェア MetAlign（ver.041011）を, 化合物同定には改良型 AIoutput2（ver.1.29）を用いた. AIoutput2 による自動同定結果を目視により in-house ライブラリーのマスクロマトグラムと比較して確認した.

多変量解析には, 各サンプル中のアノテートされた化合物のピークおよびピーク強度 1000 以上の未知ピークの内部標準リビトールに対するピーク強度比をデータとして用い, 市販の解析用ソフトウェア SIMCA-P+（ver.12）を用いた.

その他のデータ解析条件は第二章に準ずる.

3.2.5. チャの栽培条件

すべての実験はやぶきた 1 年生苗を使用し，植物体のロットによる変動を排除するため，実験ごとに同じロットの植物体を供し，同時に水耕順化を行い，同時に栽培したものを比較した．苗は，まず根部を洗浄した後，ガラス温室で水耕栽培を開始した．培養液は Konishi et al. (1985) の培養液組成を参考に主要元素 (単位：mM) NH4-N (2.1), NO3-N (0.7), P (0.1), K (1.0), Ca (0.7), Mg (1.0) および微量元素 (単位：μM) Fe (6.3; EDTA 錯体として), B (9.3), Mn (18.2), Zn (1.5), Cu (0.4), Mo (0.5), Al (400)を含む組成とした．この 1/4 濃度で 3 週間栽培し，その後は標準濃度で水耕順化した．常時通気を行い，2 週間毎に交換した．水耕栽培開始から 7 週間以上の順化期間の後，人工栽培実験に供した．

水耕順化期間を経た苗を人工気象器 (LPH-220SPC，日本医化器械製作所，大阪，日本) 内に移植し，休眠条件で栽培を開始した．各実験での栽培環境を図 3-1 に示す．基本的な栽培条件として，6 週間の休眠条件，萌芽条件（第 2 葉開葉まで；4-8 週間），4 週間の遮光条件の 3 つの生育ステージを経て新芽を採取した．上位葉・下位葉の区別はせず，樹冠面より上方に伸長している新梢を中心に摘採を行った．培養液は常時通気を行い，1 週間毎に交換した．培養液組成は移植後から主要元素 (単位：mM) NH4-N (4.2), NO3-N (1.4), P (0.1), K (1.0), Ca (1.1), Mg (1.0) および微量元素 (単位：μM) Fe (6.3; EDTA 錯体として), B (9.3), Mn (18.2), Zn (1.5), Cu (0.4), Mo (0.5), Al (400)に変更した．

光量の測定は波長別スペクトロメーター (StellarNet Inc, Florida, USA) を用いて，新芽の位置（樹冠面から 10 cm 上方の位置）での光量を測定した．波長 315-399 nm を近紫外色 (UV-A) ，波長 400-499 nm を青色，500-599 nm を緑色，600-699 nm を赤色，700-799 nm を遠赤色 (FR) として光子数の合計を計測した．光源は条件に応じて白色 LED，UV-A LED (ウシオ オプトセミコンダクター株式会社，東京，日本) ，FR LED，人工気象器付属の蛍光灯および UV 蛍光灯 (株式会社東芝，東京，日本) を組み合わせて用いた．各光源の照射スペクトルを図 3-2 に示す．また FR 光，UV 光は明期のみの添加とし，暗期には照射しなかった．

日長制御と温度については，露地の観測データに基づき設定した．休眠期は露地の冬期に当たるため，明期/暗期は 10 h/14 h，7°C/5°C とした．萌芽期，遮光期は明期/暗期は 12 h/12 h，22°C/10°C とした．湿度は全条件，全期間を通して 50%RH で制御した．

	Dormancy period			Budbreak period			Cover-culture period		
	6 w			7 w			4 w		
	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR	UV	PPFD	FR
Dark+FR (DF)	0	240	100	0	320	100	0	0	100
	10 h	14 h		12 h	12 h		12 h	12 h	
	7℃	5℃		22℃	10℃		22℃	10℃	
White+FR (WF)	0	240	100	0	320	100	0	16	100
	10 h	14 h		12 h	12 h		12 h	12 h	
	7℃	5℃		22℃	10℃		22℃	10℃	
No FR (NF)	0	240	100	0	320	100	0	16	0
	10 h	14 h		12 h	12 h		12 h	12 h	
	7℃	5℃		22℃	10℃		22℃	10℃	
UV-A irradiation (UV+)	0	240	100	0	320	100	10	16	100
	10 h	14 h		12 h	12 h		12 h	12 h	
	7℃	5℃		22℃	10℃		22℃	10℃	
Control (CTL)	0	240	100	0	320	100	0	16	100
	10 h	14 h		12 h	12 h		12 h	12 h	
	7℃	5℃		22℃	10℃		22℃	10℃	

Length of period	
Amount of light	
Light period	Dark period

図 3-1. チャの人工栽培条件

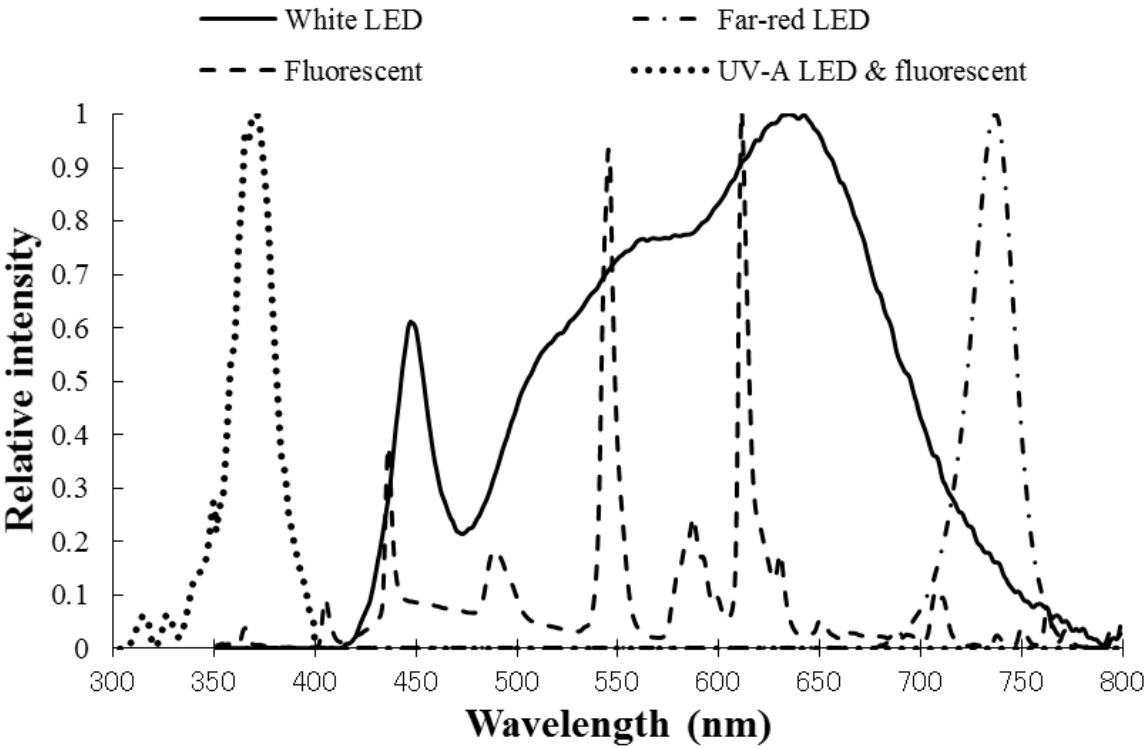

図 **3-2.** 人工栽培で用いた光源のスペクトル形状

3.3. 結果

3.3.1. 品評会出品茶の分析・解析

品評会出品茶 36 点を分析し，AIoutput2 および目視により 42 の成分をアノテートした（表 3-1）．次にこのデータを用いて PLS 解析による順位予測を行ったところ，順位が高い茶は精度よく予測できたが，低い茶はばらつきが大きくなる傾向が見られた (図 3-3) ．そこでこのデータのうち，品評会順位が高い 18 点に関して PLS 解析を行い，順位予測モデルを組み立てた (図 3-4) ．順位予測モデル (transform: 1/4root, scaling: Auto scale, 潜在変数 2) は Q^2 = 0.7978, R^2 = 0.8628, RMSEE = 6.05 と良い精度を示した．さらにこのモデルに寄与する成分について，図 3-5 に各成分の coefficient 値を示す．coefficient 値は成分のピーク強度から順位を回帰する場合に，回帰式において各ピーク強度に係る係数である (Wold et al., 2001) ．品評会順位が高い茶にはアミノ酸が多く，低い茶にはカテキン，有機酸が多い傾向が見られた．特に，coefficient 値が±0.1 を超えた成分では，順位が高い茶にはグルタミン，グルタミン酸，イノシトール，リン酸が多く，低い茶にはシュウ酸，エピガロカテキンが多く含まれていることがわかった．

表 3-1. GC/MS でアノテートされた成分

Retention time (min)	Compound
4.50	2-Hydroxypyridine
5.20	Alanine
5.53	Oxalic acid
5.97	2-Aminobutyric acid
6.32	Malonic acid
6.43	Valine
6.73	Urea
6.97	2-Aminoethanol
6.98	Phosphoric acid
7.00	Leucine

7.22	Isoleucine
7.30	Proline
7.37	Glycine
7.83	Serine
8.65	Homoserine
8.98	Malic acid
9.27	Aspartic acid
9.31	Methionine
9.35	Pyroglutamic acid
10.04	Arginine
10.08	Glutamic acid
10.20	Phenylalanine
10.48	Asparagine
11.26	Glutamine
11.36	Theanine
11.45	Shikimic acid
11.54	Citric acid + Isocitric acid
11.56	Ornithine
11.62	Citrulline
11.81	Quinic acid
11.88	Fructose
12.06	Caffeine
12.29	Lysine
12.31	Histidine
12.43	Tyrosine
12.50	Gallic acid
13.37	Inositol
14.22	Tryptophan
14.36	Octadecanoic acid
16.35	Sucrose
17.48	Epicatechin
17.80	Epigallo catechin

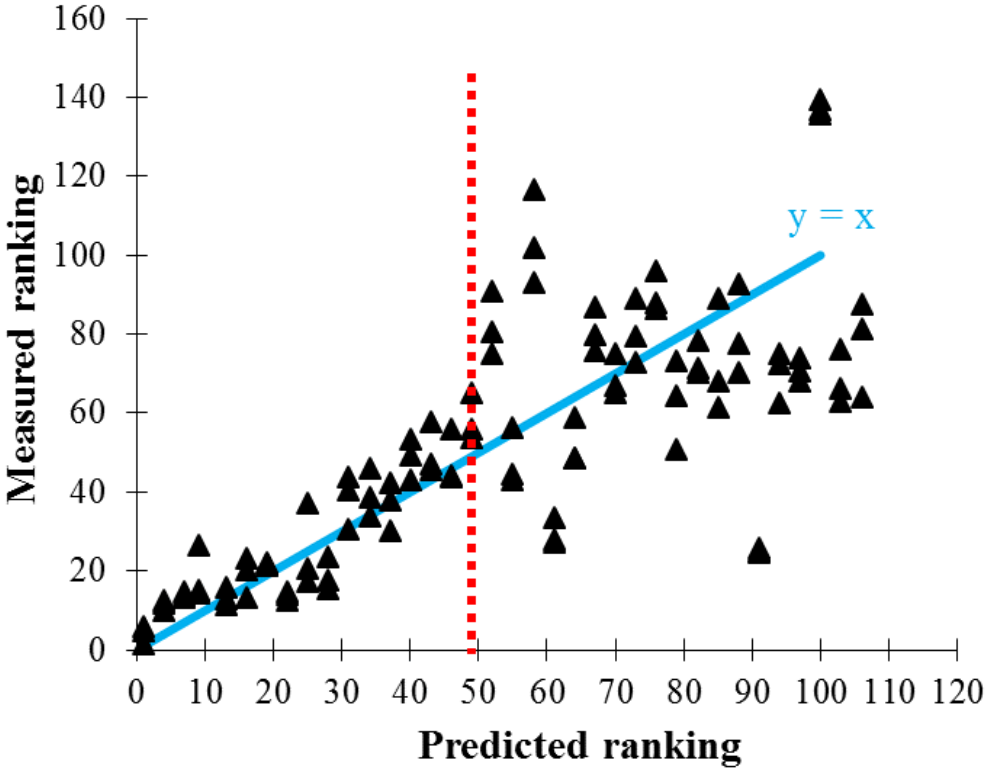

図 3-3. 品評会出品茶サンプル 36 点から構築された順位予測モデル

縦軸：実際の品評会順位，横軸：予測された順位，左下に向かうほど高順位.

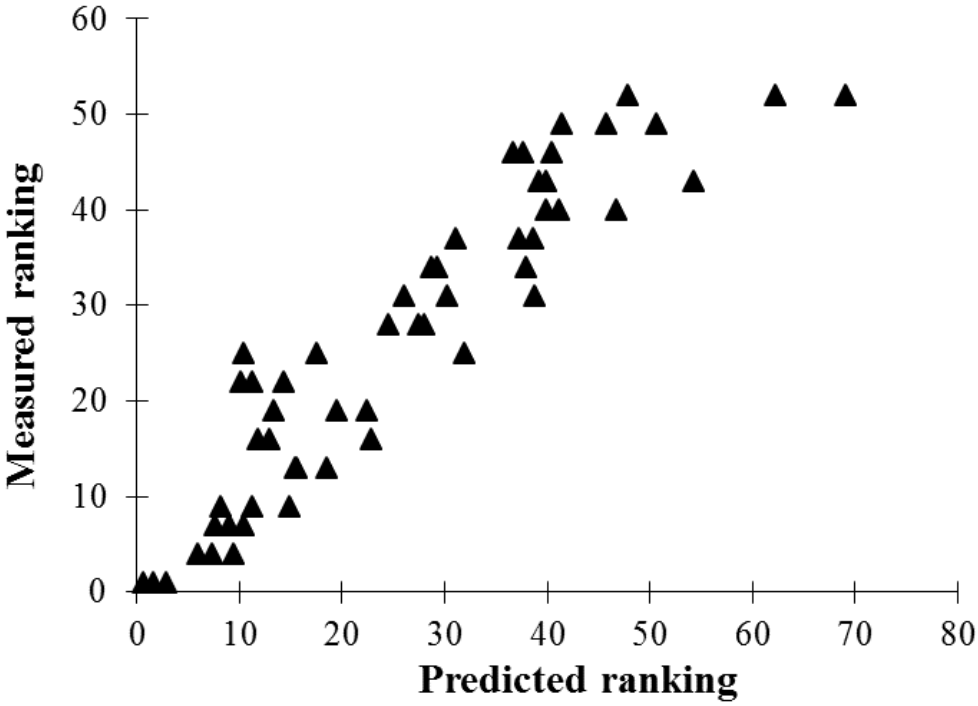

図 3-4. 品評会出品茶サンプル上位 18 点から構築された順位予測モデル

縦軸：実際の品評会順位，横軸：予測された順位，左下に向かうほど高順位.

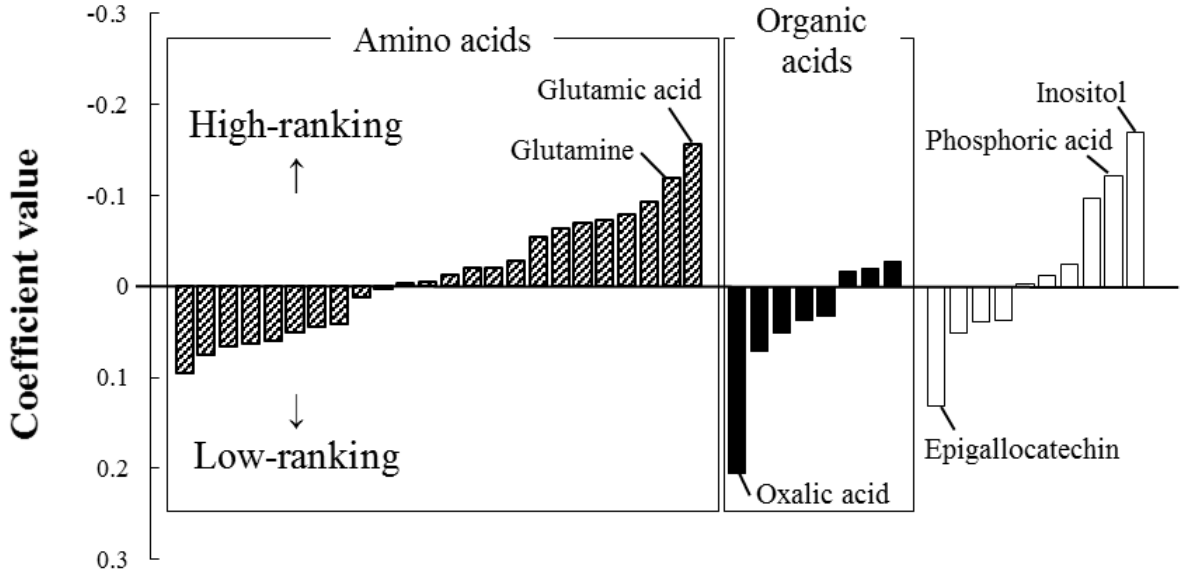

図 **3-5.** 順位予測モデル構築に用いた成分の **coefficient** 値

3.3.2. 人工栽培茶の品評会順位予測

前項で構築した順位予測モデルに，人工栽培茶の GC/MS 分析結果を入力し，その予測順位を得た．本章の実験で得られた人工栽培茶 (DF, WF, NF および UV+, CTL) の予測順位を図 3-6 に示す．

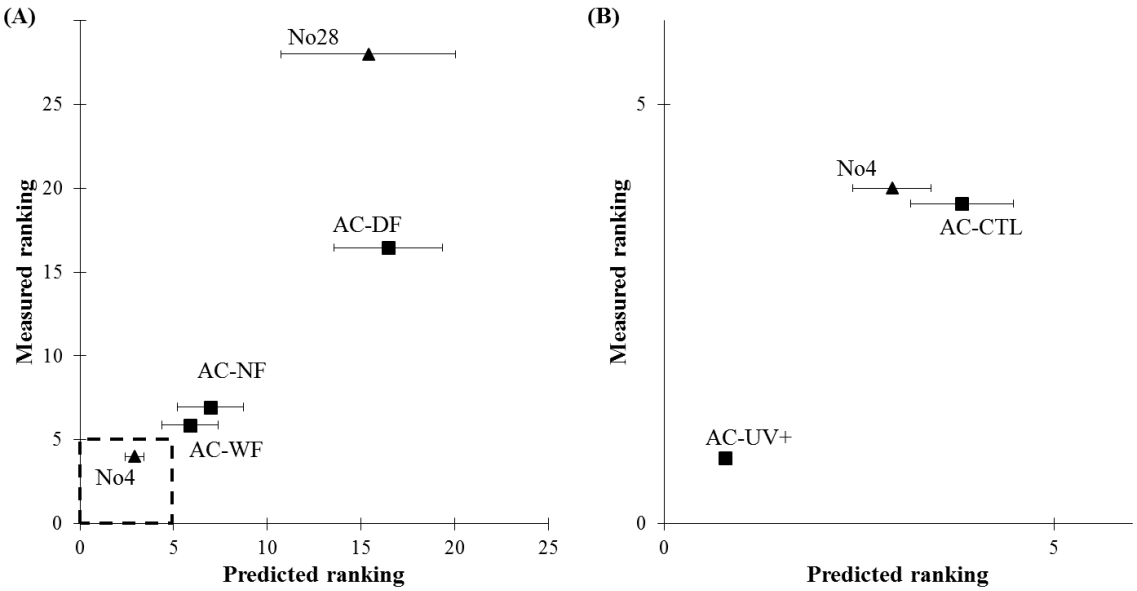

図 3-6. 人工栽培茶の順位予測

(Mean ± SD, n = 3)

縦軸：実際の品評会順位，横軸：予測された順位，左下に向かうほど高順位．

No**：品評会第**の茶葉，AC-**：人工栽培茶．

人工栽培茶の横軸は縦軸と同じ点にプロット (y = x 上にプロット)した．

(B)図は(A)図内の破線で囲われた部分を拡大．

3.3.3. 暗黒下で FR 光照射を行った人工栽培茶の代謝物プロファイル

各条件から得られた茶葉について，アミノ酸含有量の分析結果を表 3-2 に示す．DF (暗黒下 FR 光照射) 条件の茶葉はアミノ酸含有量の合計で他の 2 条件 (WF:白色光，FR 光照射あり；NF：白色光，FR 光照射なし) よりも多量のアミノ酸を含んでいることが示された．また，順位予測モデルに大きく寄与する 6 成分の変動を図 3-7 に示す．DF 条件の茶葉はシュウ酸に関しては最も含有量が少なかったものの，エピガロカテキンが 3 条件で最も多かった．

表 3-2. 暗黒下で FR 光照射を行った人工栽培茶の茶葉のアミノ酸含有量

	mg·100 gDW^{-1}								
	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	Arg	Thea	Ala	Total
DF	570	348	2047	347	839	3793	5395	146	13486
WF	412	387	1022	285	845	3129	5388	124	11592
NF	426	345	1293	310	562	3046	5389	124	11495

Asp: aspartic acid, Glu: glutamic acid, Asn: asparagine, Ser: serine, Gln: glutamine, Arg: arginine, Thea: theanine, and Ala: alanine.

All measurements were performed in triplicate.

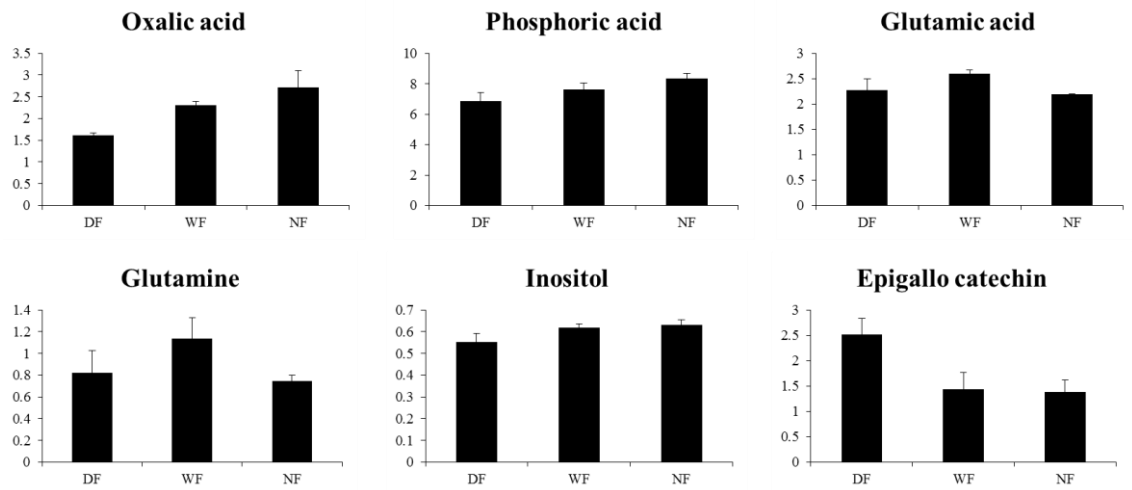

図 3-7. 順位予測モデルに大きく寄与する 6 成分の変動

縦軸：ピーク強度．(Mean ± SD, n = 3)

3.3.4. UV-A 光と FR 光照射下で栽培した人工栽培茶の代謝物プロファイル

UV+ (白色光, UV 光照射あり) , CTL (白色光, UV 照射なし) の 2 条件から得られた茶葉の成分の変動について, アミノ酸含有量の分析結果を表 3-3 に示す. 2 条件の間で顕著な違いは見られなかった. またモデルに寄与する 6 成分について, 図 3-8 のグラフに表す. UV+では, CTL と比較してエピガロカテキン含有量が低くなっていた. そのほかの成分ではイノシトールが若干増加している以外は, 大きな差は見られなかった.

また, カテキン類の含有量の定量分析結果を図 3-9 に示す. UV+条件下の茶葉は 4 種のカテキン類 (エピカテキン, エピガロカテキン, エピカテキンガレート, エピガロカテキンガレート) すべての含有量について, CTL 条件下の茶葉に比べて低下していることが確認された.

表 3-3. UV-A 光と FR 光照射下で栽培した人工栽培茶の茶葉のアミノ酸含有量

	mg·100 gDW^{-1}								
	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	Arg	Thea	Ala	Total
UV+	365	423	457	160	726	1972	5853	131	10087
CTL	426	386	555	206	709	2193	4470	128	9074

Asp: aspartic acid, Glu: glutamic acid, Asn: asparagine, Ser: serine, Gln: glutamine, Arg: arginine, Thea: theanine, and Ala: alanine. All measurements were performed in triplicate.

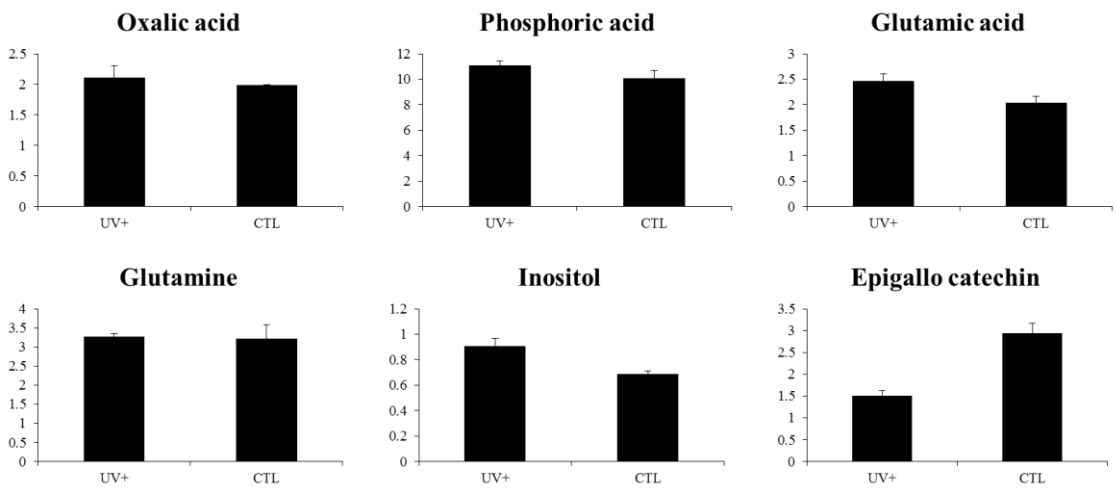

図 3-8. 順位予測モデルに大きく寄与する 6 成分の変動

縦軸：ピーク強度. (Mean ± SD, n = 3)

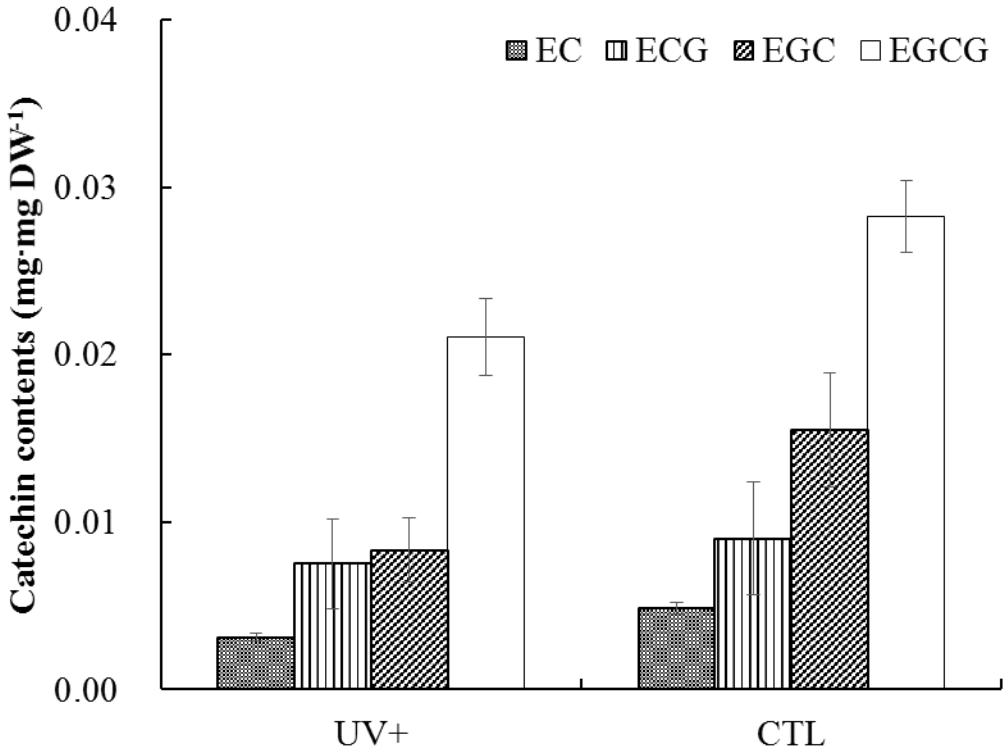

図 3-9. カテキン類の含有量

(Mean ± SD, n = 3)

EC: epicatechin, ECG: epicatechin gallate, EGC: epigallocatechin, EGCG: epigallocatechin gallate.

3.4. 考察

本章ではまず GC/MS を用いた茶の多成分一斉分析・解析によって，分析の範囲を幅広い親水性化合物に広げた品質評価モデルを構築することと，それに寄与する代謝物プロファイリングを行うことを目指した．品評会出品茶 36 点の分析結果から 42 の成分をアノテートすることができ，第二章の 11 成分から大きく範囲を拡大することができた．これら 42 成分にはアミノ酸の他，有機酸が数多く含まれており，また茶の官能評価に影響が大きいとされるカテキン類も 2 種 (エピカテキン，エピガロカテキン) 含まれていた．

これらの成分から順位予測モデルを組み立てたところ，順位の高い茶と低い茶で大きく異なる傾向が観察された．すなわち，順位の高い茶ではその予測精度が高いのに対し，順位の低い茶では予測順位に大きなばらつきが現れていた．この原因の一つとして考えられることは，順位の低い茶というのは，内質と呼ばれる品質特性 (滋味や香気) の評価のみでなく，外観の瑕疵によって評価を落としている場合が多いということである．たとえ原料として優れた茶葉を使っていても，その加工工程で過失があると，極端に官能評価は悪くなってしまう．そうした外観でのマイナス点は，成分からの品質評価モデルでは検知することができないため，順位の低い茶の評価についてずれが大きくなってしまうということは十分に考えられる．本研究で分析してきた主要な茶葉成分は，加工工程の前後での変化がそれほど大きくないことが知られている (山本ら，1996) ．紅茶などに較べ，緑茶は摘採直後に失活させ発酵工程を経ないことから，原料茶葉が持っている成分組成が最終品質に及ぼす影響が大きく，加工工程ではむしろ品質低下を招く可能性が高い．つまり原料茶葉の成分によって碾茶の品質評価を行うことは，加工工程で問題が起こらずに順調な製茶がなされた場合の潜在的な茶葉品質を評価していることに相当する．こうした考察から，本章では供したサンプルのうち順位が高い 18 点のみを使って順位予測モデルを構築し，満足できる予測精度を得ることができた．

順位予測モデルに寄与する成分として，順位が高い茶にはグルタミン，グルタミン酸，イノ

シトール，リン酸が多く，低い茶にはシュウ酸，エピガロカテキンが多く含まれていることがわかった．グルタミンと茶品質の相関については，前章でも同様に示唆されており，今回改めて確認できた．一方で，前章で品質との相関が高いとされたアルギニン，テアニンに関しては，coefficient 値は低く，品質との相関はそれほど高くなかった．このように GC/MS を用いた代謝物プロファイリングから，茶の高品質化を目指すうえでは，①グルタミンを中心にアミノ酸を増加させること，②エピガロカテキンとシュウ酸等の有機酸を低減させることが重要であるとの知見が得られた．

続いて，人工栽培環境において栽培後期の光質を変化させることが茶葉の品質にどのような影響を与えるのかを検討した．上述の通り，品評会出品茶の代謝物プロファイリングによって，茶の栽培において高品質化を目指すうえで，グルタミンを中心にアミノ酸を増加させ，エピガロカテキンとシュウ酸等有機酸を低減させるという目標が明確となったため，これらのうち光質によって制御可能と思われる要素に着目し，暗黒下（可視光がゼロの状態）栽培とFR 光照射によるアミノ酸増加と，UV 光照射によるカテキン類の低減を図った．そしてその結果としての高品質化，すなわち予測モデルにおいて高順位と予測される茶葉の生産を目指した．第二章と同じく，休眠条件および萌芽条件は同じ環境で，その後摘採までの遮光条件でそれぞれ違った光環境下で栽培を行った茶葉サンプルについて，本章で構築した順位予測モデルで評価した．その結果，暗黒下条件では予測順位は低下し，FR 光照射の有無では順位は変化しなかった．一方 UV 照射では予測順位が上昇し，高品質な茶葉が生産できていると考えられた．

それぞれの栽培目的ごとに含有成分を比較していくと，暗黒下栽培の DF 条件の茶葉は，当初の考えの通り多量のアミノ酸を含有していた．青木（1980）や小林ら（2011）はチャを暗黒下で栽培することにより，茶葉のタンパク質が分解されアミノ酸含有量が大きく増加することを報告しており，Yang et al. (2012) によって代謝物プロファイリングも行われている．この暗黒処理により，端的にいえばアスパラギンとアルギニンが大きく増加し，また従来から遮光によって増加することが知られるテアニンも多く含まれることとなる．これは今回の DF 条件の茶葉でも確認された（表 3-2）．しかしながら，これらのアミノ酸が増加した一方で予測順位

が低下したことは，今回の順位予測モデルにおいてこれらアミノ酸の影響度が小さく，エピガロカテキンの増加分の影響の方が大きかったと解釈できる．すなわち，代謝物プロファイリングによって，暗黒下栽培によるアミノ酸増加が必ずしも茶品質の向上につながっていないことが明らかになった．この知見に基づいて考えれば，DF 条件によるアミノ酸増加を品質向上につなげるには，グルタミンやグルタミン酸への分配を大きくするような条件や，カテキン類の含有量を低減させる条件の探索が必要と言える．また，本検討では FR 光の添加によりグルタミン，グルタミン酸に多少の増加が見られるものの，全体として代謝変動への影響は少なく，WF と NF の予測順位に差は見られなかった．FR 光の照射量や照射のタイミングによってグルタミンやグルタミン酸の含有量に影響がある可能性も考えられ，前述の通りそれらへのアミノ酸分配を増加させることができれば，茶葉の高品質化が期待される．

UV 照射下で栽培した UV+条件の茶葉は，コントロールとほぼ等しいアミノ酸含有量を示し，またエピガロカテキン含有量が低下していた．木村・神田 (2013) は，人工光下で UV-A 光を添加すると，従来考えられていた仮説に反してカテキン類が減少し，一部のアミノ酸が減少することを報告している．また竹内・松元 (2003) はチャの葉に UV-A,B 光を照射してもカテキン合成 (Punyasiri et al., 2004; 西條, 2012) に関わる酵素 (フェニルアラニンアンモニアリアーゼ，カルコンシンターゼ，ジヒドロフラボノールレダクターゼ) の遺伝子発現は起こらなかったと報告しており，こちらも従来の仮説とは一致しない．本章の UV+条件はこれらの報告に基づき設定したものであるが，その条件下においた茶葉は木村・神田の報告とも違った結果を示した．そしてこの結果から推測できる通り，順位予測モデルによる予測順位も高いものとなっていた．従来，UV 光はアミノ酸を減少させカテキン類の合成を促進すると考えられてきたが，今回の分析および代謝物プロファイリングの結果から判断すると，人工栽培における UV-A 光添加は原料茶葉の品質を向上させる可能性があると言える．確認のため，GC/MS ではアノテートされないガレート態を含めた 4 種のカテキン類について含有量を測定したところ，UV+条件ではすべてのカテキン類の含有量がコントロールよりも低下していた．このことからも，人工栽培環境下での UV-A 光には何らかの作用によってカテキン類の含有量を低下させ，それが結果として碾茶用茶葉の品質を高める効果をもたらした可能性がある．

しかしながら，本検討は同一ロットの茶樹をUV-A光照射有無の2区に分けて比較した1回の実験の結果であることから，UV-A 光照射効果はあくまで可能性を示したにすぎず，その確認のためにはさらなる検討が必要である．

以上のように本章では，GC/MS 分析・解析による品評会茶の順位予測モデルの構築と，その代謝物プロファイリングから得られた知見に基づいて，チャの人工栽培における光環境の改善を行うというアプローチをとった．人工栽培茶葉について得られた予測順位とその成分の相関から，今後の栽培環境改善につながる知見を得ることができた．

3.5. 小括

本章では品評会出品茶 36 点の GC/MS 分析から 42 の成分をアノテートすることができた．36 点のうち上位 18 点の分析データを用いて PLS 解析により精度のよい品評会順位予測モデルを構築し，アミノ酸を増加させること，カテキン・有機酸を低減させることが品評会順位の向上につながることを明らかにした．

そしてこの知見に基づき，人工栽培環境下で遮光条件の光質を変化させることで，様々な代謝変動を制御できる可能性が示唆された．アミノ酸を増加させることを目的とした暗黒下栽培では，アミノ酸を増やすことが出来たが，予測順位は対照区に比べて低下した．より高品質化するにはグルタミン，グルタミン酸等への配分の増加，カテキン類の低減が必要と考えられた．また，UV-A 光を添加することでカテキン含有量を減少させることができ，アミノ酸もほとんど減少しないことから，この処理は原料茶葉の品質を向上させる可能性があることがわかった．これらの結果により，高品質茶葉生産のための人工光環境の最適化に向けてUV-A光照射を中心に立案することが可能となり，プロセスの改善に方向性を持たせることが出来た．

第四章　総括と展望

4.1. 本研究の総括

本研究では，官能評価の解析による碾茶品質評価モデルの構築と，このモデルに基づく高品質な原料茶葉の人工栽培技術の開発を目的とした．

第二章では，品評会で順位づけされた碾茶の HPLC 分析から，茶葉のアミノ酸プロファイルによって品評会での順位を予測する順位予測モデルを構築した．その過程で得られた知見を踏まえ，基本的な栽培条件の探索を行い，3 ステップの条件変化，特に摘採前に光量を低下させるとともに照射波長の調整によって茶葉品質に影響を与えることができる遮光条件を設けたことを特徴とする栽培プロセスを構築した．また順位予測モデルが人工栽培茶葉の品質評価システムとして活用できることを示し，人工栽培茶葉は高い品質を備えている可能性を明らかにした．

続く第三章では，分析手段として GC/MS を採用し，分析の範囲をアミノ酸を含む幅広い親水性化合物に拡大した．第二章と比較してより多くの品評会サンプル，より多くの成分を用いて順位予測モデルを構築し，その精度の向上を図った．この予測モデルに寄与する代謝物プロファイリングを通して，碾茶品質に重要なアミノ酸としてグルタミン，グルタミン酸，そしてエピガロカテキンの影響が明らかとなった．こうした知見に基づき，人工栽培の遮光条件における照射波長として，アミノ酸を増加させる暗黒下 FR 光照射条件と，カテキンを低減させる UV 光照射条件を設定し，それぞれの環境下で栽培された茶葉の品質評価を行った．その結果，アミノ酸総量が大きく増加したもののエピガロカテキン含有量が増加した暗黒下 FR 光照射条件の茶葉は予測順位が低くなり，エピガロカテキン含有量を低減しアミノ酸含有量も維持された UV 光照射条件の茶葉は予測順位が高くなった．人工栽培における光環境の最適化に向けての知見が得られるとともに，単純な成分含有量の比較からは判断できない品質の良否を，品質評価システムによって可視化することができたと言える．

以上から本研究では，官能評価として碾茶品評会の結果を用いて，これを解析した品質評価モデルを構築することに成功し，このモデルにおいて極めて高い品質を備えると評価される原料茶葉を生産する人工栽培技術を開発した．開発段階で，品質評価モデルに寄与する成分プロファイルをもとに，栽培環境やプロセスを探索・最適化していくアプローチは，他の作物においても応用可能なモデルケースであると考えられる．そしてこうしたアプローチは，農産物の 2 次機能を強みとする日本型農業の発展，農業の工業化や植物工場技術の拡大につながる根幹であり，本ケースは実験室レベルでこれを実証した試みであったと言えるだろう．

4.2. 今後の展望

本研究では，実験室レベルの人工環境下で高品質な作物を生産するための手法として，緑茶 (碾茶) を用いて，官能評価の解析から品質評価システムを構築し，その過程で得られた知見に基づいて人工栽培環境・プロセスの最適化を進めるアプローチを実証した．同様のアプローチは多くの作物で有効であると考えられ，特に日本型農業で生産される高品質作物の品目拡大に貢献することが期待される．この際に重要なことは，品質評価指標として何を用いるか，である．緑茶と同じように厳格な評価指標があり，訓練された専門家によって評価されている作物であれば，その官能評価を利用すれば速やかに品質評価システムを組み立てることができるだろう．一方でそうした官能評価が確立されていないものであっても，広く研究されている定量的記述分析法 (Quantitative Descriptive Analysis；QDA 法) を利用したり，糖度や酸度，硬度といった品質特性を組み合わせて代替とすることによって，初期的な品質評価モデルとすることは十分可能である．そのようにして目標 Y となる品質指標を仮設定して，人工栽培環境のパラメータ X の決定根拠とすることは，闇雲に栽培を進めるよりも効率的であり，出てきた結果に基づいて品質評価モデルを見直す，目標 Y を見直すという試行錯誤を繰り返すことで品質評価モデルと栽培技術の両方を改善していくことができ

るだろう.

品質特性や目標 Y については仮決定でよいが, 品質評価全体の方針, 柱となる指標についてはその後の技術開発の方向性そのものを決めてしまうため, 慎重になる必要がある. 本研究では特に 2 次機能が重要と考え, これを中心とした品質評価指標, すなわち品評会でのベテラン審査者による順位評価を用いることとした. 品評会の審査基準では滋味は重要な意味を持つことから, 構築した順位予測モデルおよび人工栽培技術のどちらにおいても味・美味しさは重要な品質特性となっていると考えられる. 農産物ごとに重視される品質特性は変化するため, 適切な品質評価指標を選ぶ必要がある.

また本研究の第二章では, 品質への寄与が大きい成分として未同定成分 (unknown_1) が存在した. 本研究では優先的に検討すべき成分があったため, 第三章に示したようにより多くの成分を含んだ品質評価モデルを構築することを選択したが, このような影響の大きい未同定成分を発掘 (マイニング) しながら同定を進めていくことも一つの選択肢である. 重要な代謝マーカーである場合や, 測定が容易な成分である場合には, より迅速かつ高精度な品質評価を可能とし, 栽培技術開発を大いに助けることにつながる.

以上のように, 本研究で取り組んできた栽培技術開発のアプローチは, 今後多くの農産物で検討されうるものであり, 植物工場のような完全人工環境のみならず栽培環境を制御する施設園芸全般において活用されることが期待される.

謝辞

本論文は，著者が大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻において行った研究をまとめたものです．

本研究の遂行並びに本論文の執筆に関し，終始温かいご指導ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科　福崎英一郎教授に深い感謝の意を表します．企業との共同研究の頃より貴重なご助言を賜り，各論文の執筆に丁寧なご指導を賜りました九州大学生体防御医学研究所　馬場健史教授に厚く御礼申し上げます．また，本論文を精読してくださり有用なご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科　藤山和仁教授，大阪大学大学院工学研究科　村中俊哉教授に心より感謝申し上げます．そして，日頃より研究活動全般にわたりご支援とご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科　新間秀一准教授，小野比佐好助教に深く感謝致します．

共同研究の遂行，日常の業務と研究活動の両立にご理解とご協力を頂いたシャープ株式会社の上司，同僚の皆様に御礼申し上げます．本研究の着想と遂行に当たっては米谷力　元顧問，石井裕博士のご助言とご支援がなければ到底実現できるものではありませんでした．改めて深い感謝の意を表します．研究の方向性について多くの議論を交わし，深い洞察に基づくご助言を頂いた先輩諸氏，小嶋邦男博士，太田敏博氏，藤寛氏，結城貴之氏に感謝申し上げます．また共同研究から独立した後も，本論文の執筆に対し温かいご支援を頂いた湯浅貴之所長，大塚雅生部長に厚く御礼申し上げます．

研究活動および研究室生活全般において大変お世話になりました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物資源工学領域の皆様に心から感謝致します．特に冨尾紋子研究員には，常日頃より分析について鋭いご指摘と温かい励ましの言葉を頂きました．厚く御礼申し上げます．

最後に，私の博士課程進学に伴う不便に耐え，いつも支えてくれた妻と息子に深い感謝の意を表して謝辞と致します．

引用文献

Bugbee, B. G., & Salisbury, F. B.: Exploring the limits of crop productivity I. Photosynthetic efficiency of wheat in high irradiance environments. *Plant Physiology*, **88(3)**, 869-878 (1988).

Causse, M., Buret, M., Robini, K., & Verschave, P.: Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. *Journal of Food Science*, **68(7)**, 2342-2350 (2003).

Cho, I. H., Kim, Y. S., & Choi, H. K.: Metabolomic discrimination of different grades of pine-mushroom (Tricholoma matsutake Sing.) using 1 H NMR spectrometry and multivariate data analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43(3)**, 900-904 (2007).

Deng, W. W., Fei, Y., Wang, S., Wan, X. C., Zhang, Z. Z., & Hu, X. Y.: Effect of shade treatment on theanine biosynthesis in Camellia sinensis seedlings. *Plant Growth Regulation*, **71(3)**, 295-299 (2013).

Goto, E.: Effects of light quality on growth of crop plants under artificial lighting. *生物環境調節*, **41(2)**, 121-132 (2003).

Konishi, S., Miyamoto, S., & Taki, T.: Stimulatory effects of aluminum on tea plants grown under low and high phosphorus supply. *Soil Science and Plant Nutrition*, **31(3)**, 361-368 (1985).

Massa, G. D., Kim, H. H., Wheeler, R. M., & Mitchell, C. A.: Plant productivity in response to LED lighting. *HortScience*, **43(7)**, 1951-1956 (2008).

Pongsuwan, W., Fukusaki, E., Bamba, T., Yonetani, T., Yamahara, T., & Kobayashi, A.: Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55(2)**, 231-236 (2007).

Pongsuwan, W., Bamba, T., Yonetani, T., Kobayashi, A., & Fukusaki, E.: Quality prediction of Japanese green tea using pyrolyzer coupled GC/MS based metabolic fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56(3)**, 744-750 (2008).

Punyasiri, P. A. N., Abeysinghe, I. S. B., Kumar, V., Treutter, D., Duy, D., Gosch, C., Martens, S., Forkmann, G., & Fischer, T. C.: Flavonoid biosynthesis in the tea plant Camellia sinensis: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **431(1)**, 22-30 (2004).

Smith, H., & Whitelam, G. C.: The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell & Environment*, **20(6)**, 840-844 (1997).

Stamm, P., & Kumar, P. P.: The phytohormone signal network regulating elongation growth during shade avoidance. *Journal of Experimental Botany*, **61(11)**, 2889-2903 (2010).

Tarachiwin, L., Ute, K., Kobayashi, A., & Fukusaki, E.: ^{1}H NMR based metabolic profiling in the evaluation of Japanese green tea quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55(23)**, 9330-9336 (2007).

Tarachiwin, L., Masako, O., & Fukusaki, E.: Quality evaluation and prediction of Citrullus

lanatus by 1H NMR-based metabolomics and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56(14)**, 5827-5835 (2008).

Tesfaye, L. M., Bink, M. C., van der Lans, I. A., Gremmen, B., & van Trijp, H. C.: Bringing the voice of consumers into plant breeding with Bayesian modelling. *Euphytica*, **189(3)**, 365-378 (2013).

Tsugawa, H., Tsujimoto, Y., Arita, M., Bamba, T., & Fukusaki, E.: GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinformatics*, **12(1)**, 131 (2011).

Vandenbussche, F., Pierik, R., Millenaar, F. F., Voesenek, L. A., & Van Der Straeten, D.: Reaching out of the shade. *Current Opinion in Plant Biology*, **8(5)**, 462-468 (2005).

Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L.: PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **58(2)**, 109-130 (2001).

Yang, Z., Kobayashi, E., Katsuno, T., Asanuma, T., Fujimori, T., Ishikawa, T., Tomomura, M., Mochizuki, K., Watase, T., Nakamura, Y., & Watanabe, N.: Characterisation of volatile and non-volatile metabolites in etiolated leaves of tea (Camellia sinensis) plants in the dark. *Food Chemistry*, **135(4)**, 2268-2276 (2012).

青木智: 暗黒下で誘導された茶葉の衰退現象. *茶業技術研究*, **59**, 1-5 (1980).

阿南豊正, & 中川致之: 茶葉の化学成分含量に及ぼす光の影響. *日本農芸化学会誌*, **48(2)**, 91-96 (1974).

荒井昌彦, 松浦孝宣, 角田隆己, 佐々木恭助, & 山中敏彦: 茶樹の養液栽培における収量および葉中成分の変化. *日本土壌肥料學雑誌*, **60(2)**, 157-159 (1989).

池田奈実子, 堀江秀樹, 向井俊博, & 後藤哲久: 各茶種用チャ品種の一番茶及び秋芽の個別アミノ酸含量の特徴. *茶業研究報告*, **78**, 67-75 (1993).

岩淺潔: 茶葉カテキン組成に及ぼすしゃ光栽培の影響. *茶業研究報告*, **29**, 68-74 (1968).

岩淺潔: 茶の加工科学. 村松敬一郎 (編), *茶の科学*, 朝倉書店, 52-84(1991).

太田敬子, & 原田和夫: 水耕栽培茶の環境条件に関する研究 遊離アミノ酸含量や生長におよぼす日射量および夜温の影響. *生物環境調節*, **34(3)**, 179-190 (1996).

岡野邦夫, 松尾喜義, & 近藤貞昭: チャ及び近縁ツバキ属植物における木部樹液中のアミノ酸組成. *茶業研究報告*, **95**, 16-23 (2003).

木村泰子, & 神田真帆: 本ず被覆内の分光スペクトル特性と紫外線照射および除去が茶新芽の品質に及ぼす影響. *茶業研究報告*, **116**, 1-13 (2013).

後藤正: 近赤外法による茶生葉及び荒茶の成分分析と品質評価に関する研究. *茶業研究報告*, **76**, 51-61 (1992).

後藤哲久, 堀江秀樹, & 向井俊博: 全国茶品評会入賞茶の化学成分 (第 1 報) 玉露, てん茶, かぶせ茶の全窒素, 遊離アミノ酸, タンニン, カフェイン及びアスコルビン酸. *茶業研究報告*, **76**, 27-32 (1992).

後藤哲久, 堀江秀樹, & 向井俊博: 全国茶品評会入賞茶の化学成分 (第 3 報) 個別アミノ酸の含有量. *茶業研究報告*, **78**, 29-35 (1993).

小西茂毅, & 高橋英一: 茶幼苗におけるテアニンの代謝と代謝産物の再移動: 茶樹におけるテアニンおよびその関連物質の代謝と制御 (第 6 報). *日本土壌肥料學雜誌*, **40(11)**, 479-484 (1969).

小西茂毅: チャの栄養特性と養液栽培の実際. *農業および園芸*, **62(1)**, 223-232 (1987).

木幡勝則: 緑茶研究と分析化学. *分析化学*, **51(7)**, 479-485 (2002).

小林栄人, 中村順行, 鈴木利和, 大石哲也, & 稲葉清文: 光強度がチャ新芽の葉色および成分に及ぼす影響. *茶業研究報告*, **111**, 39-49 (2011).

西條了康:フラボノイドの代謝マップ. *茶業研究報告*, **114**, 79-88 (2012).

酒戸彌二郎: 茶の成分に關する研究. *日本農芸化学会誌*, **23(6)**, 262-267 (1950).

末松伸一, 久延義弘, 西郷英昭, 松田良子, & 小松美博: 緑茶中のカフェイン, カテキン類の測定のための新しい抽出法. *日本食品科学工学会誌*, **42(6)**, 419-424 (1995).

関山恭代: 農業・食品研究における NMR メタボロミクスの利用. *農業食料工学会誌*, **78(4)**, 283-285 (2016).

高辻正基: 植物工場システム. 高辻正基 (編), *植物工場システム*, シーエムシー, 1-9

(2001).

高柳博次, 阿南豊正, & 池ヶ谷賢次郎: 高速液体クロマトグラフィーによる茶のアミノ酸類の定量. *茶業研究報告*, **69**, 29-34 (1989).

竹内敦子, & 松元哲: チャ葉でのカテキン合成系酵素の遺伝子発現に与える光の影響. *茶業研究報告*, **96**, 27-32 (2003).

橘尚明, 吉川重彦, & 池田勝彦: 多肥茶園土壌中の無機態窒素の動態ならびに減肥過程における一番茶アミノ酸含量の変化. *日本作物學會紀事*, **64(3)**, 523-528 (1995).

辻正樹: てん茶の化学成分含有率と品質の関連性. *茶業研究報告*, **90**, 1-7 (2001).

独立行政法人日本貿易振興機構 (JETRO): わが国農林水産物・食品の輸出拡大に向けての阻害要因と対応策. (2010).

中川致之, 阿南豊正, & 石間紀男: 緑茶の味と化学成分との関係. *茶業試験場研究報告*, **17**, 69-123 (1981).

中原光久: 覆い下夏茶生産における光利用に関する技術開発. *農業電化*, **62(10)**, 48-53 (2009).

袴田勝弘, & 酒井慎介: 幼茶樹における秋季 $^{14}CO_2$ 光合成産物の転流と再分布. *茶業技術研究*, **61**, 11-21 (1981).

廣野祐平, 渡部育夫, & 野中邦彦: 茶園における窒素収支と茶園地帯周辺水系の硝酸

性窒素濃度の推移. *茶業研究報告*, **100**, 42-44 (2005).

堀江秀樹, 向井俊博, & 後藤哲久: 全国茶品評会入賞茶の化学成分 第 2 報 普通煎茶, 深むし煎茶, むし製玉緑茶, かまいり製玉緑茶の全窒素, 遊離アミノ酸, タンニン, カフェイン及びアスコルビン酸. *茶業研究報告*, **77**, 23-28 (1993).

堀江秀樹, 木幡勝則, 向井俊博, 天野いね, & 後藤哲久: 全国茶品評会入賞茶の化学成分 (第 4 報) 1994 年審査会入賞茶の分析. *茶業研究報告*, **83**, 29-36 (1996).

堀江秀樹, 山本万里, 氏原ともみ, & 木幡勝則: 茶葉中カテキン類分析のための抽出方法の検討. *茶業研究報告*, **94**, 60-64 (2002).

堀江秀樹: 野菜の品質評価の現状と展望. *野菜茶業研究所野菜茶業研究集報*, **3**, 123-127 (2006).

向井俊博, 堀江秀樹, & 後藤哲久: 煎茶の遊離アミノ酸と全窒素の含量と価格との関係について. *茶業研究報告*, **76**, 45-50 (1992).

村松敬一郎 (編) : 茶の科学, 朝倉書店 (1991).

森田明雄, 小西茂毅, 中村順行, 清水絹恵, & 横田博実: チャ品種の育成年度に応じた茶葉中の各種成分含量の変化. *育種学研究*, **6(1)**, 1-9 (2004).

矢嶋雄二, 米山誠一, & 桑原紀之: 茶成分による品質評価法. *岐阜県農業総合研究センター研究報告*, **12**, 5-11 (1999).

山本万里, 田原常史, 山口優一, & 辻顕光: 茶葉中食物繊維等品質成分の熟度および製茶法による変動. *日本食品科学工学会誌*, **43(12)**, 1309-1313 (1996).

吉川重彦, 橘尚明, & 松田兼三: 北勢地域における多肥栽培茶園の土壌溶液法による実態解析-1-調査圃場の土壌条件と土壌溶液濃度と土壌成分濃度との関係. *三重県農業技術センター研究報告*, **13**, 65-76 (1985).

発表論文

本学位論文に関与する論文

1) **Shunsuke Miyauchi, Takayuki Yuki, Hiroshi Fuji, Kunio Kojima, Tsutomu Yonetani, Ayako Tomio, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki**: High-quality green tea leaf production by artificial cultivation under growth chamber conditions considering amino acids profile. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **118(6)**, 710-715 (2014).

2) **Shunsuke Miyauchi, Tsutomu Yonetani, Takayuki Yuki, Ayako Tomio, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki**: Quality evaluation of green tea leaf cultured under artificial light condition using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (2016). **in press.**

特許

1) 発明の名称：茶樹育成方法及び茶樹育成装置
発明者：結城貴之，宮内俊輔，米谷力，福崎英一郎，馬場健史，冨尾紋子
出願番号：特願 2013-166814，出願日：2013/08/09

2) 発明の名称：栽培方法、茶葉および栽培装置
発明者：宮内俊輔，伊奈弘善
出願番号：特願 2015-119594，出願日：2015/06/12

3) 発明の名称：植物の栽培装置、栽培方法及び茶葉
発明者：宮内俊輔，結城貴之

出願番号：PCT/JP2015/073730，出願日：2015/08/24

学会発表

国内会議

1) ○宮内俊輔, 伊奈弘善, 結城貴之, 小嶋邦男, 米谷力, 馬場建史, 福﨑英一郎

"高品質茶生産を目的とした人工栽培において暗黒条件および遠赤色光照射がアミノ酸組成に与える影響"

日本茶業学会平成 26 年度研究発表会, 八女, 2014 年 11 月