

コエンザイム Q10 を 高蓄積するイネの開発

高橋咲子

目次

緒言	1
第 1 章 CoQ10 強化イネの作出.....	5
第 1 節 デカプレニル 2 リン酸合成酵素遺伝子 (<i>ddsA</i>) 発現イネの作出	6
材料及び方法	8
結果	12
第 2 節 新たな CoQ 抽出法の開発.....	18
材料及び方法	18
結果	20
第 3 節 <i>ddsA</i> 発現の増強と種子 CoQ10 含量への影響.....	23
材料及び方法	24
結果	26
第 4 節 <i>coq2</i> 発現イネの作出	29
材料及び方法	30
結果	35
考察	42
第 2 章 CoQ10 量の増加等がイネの生理・生態的特性に及ぼす影響.....	46
第 1 節 イネ各器官における <i>ddsA</i> 発現と CoQ10 含量との関係.....	46
材料及び方法	47
結果	50
第 2 節 CoQ10 量の増加がイネの生育及び収量に及ぼす影響.....	58
材料及び方法	58
結果	60

第3節 CoQ10 量の増加がイネの耐塩性に及ぼす影響.....	63
材料及び方法	63
結果	65
考察	68
第3章 さまざまなイネ品種・系統を利用した CoQ10 強化イネの作出.....	72
第1節巨大胚系統を利用した CoQ10 強化イネの作出.....	72
材料及び方法	72
結果	76
第2節 <i>sugary</i> 及び <i>shrunk</i> 変異体を利用した CoQ10 強化イネの作出.....	81
材料及び方法	81
結果	84
考察	89
総合考察	92
摘要	100
謝辞	105
引用文献	106

緒言

世界各国で生産・販売されている遺伝子組換え作物の総耕地面積は2009年度には1億3400万haと、世界の総耕地面積の9%に達している(ISAAA 2009)。2009年11月には我が国でも遺伝子組換えバラの商業栽培が始まったが、現在国内で食品・飼料向け遺伝子組換え作物の商業栽培は行われていない。しかしながら、年間約2600万トンもの穀物を海外から輸入する我が国において、遺伝子組換え作物は既に身近な存在となっている。例えば消費量の95%を輸入するダイズは、2009年度世界全体の栽培面積の75%以上が遺伝子組換えダイズとなっている(ISAAA 2009)。また消費量の全量を輸入に頼る採油用ナタネ及び飼料用トウモロコシについては、2009年度はナタネについては93%をカナダから、トウモロコシについては96%を米国から輸入しているが(財務省 2009)、2009年度にカナダで栽培されたナタネの93%、米国で栽培されたトウモロコシの86%が遺伝子組換え品種であった(ISAAA 2009; USDA 2010)。これらの統計資料から、2009年度に我が国に輸入・消費されたダイズの70%以上、採油用ナタネ及び飼料用トウモロコシのそれぞれ80%以上が遺伝子組換え品種であると概算される。このように、我が国には既に相当量の遺伝子組換え作物が輸入・消費されていると推定される。

このような現状にもかかわらず、我が国の消費者の遺伝子組換え作物への懸念は根強い。例えば、農水省が一般消費者約1万2000人を対象として2007年に行った「遺伝子組換え農作物等に関する意識調査」(農林水産省 2007)では、71%が「遺伝子組換え農作物は不安である」と回答している。我が国は大量の遺伝子組換え作物を輸入・消費しつつも、遺伝子組

換え作物に対する消費者の拒否感が強い、という奇妙な状態となっている。上記の農水省の調査では、遺伝子組換え技術に対する「理解度」が高い回答者は遺伝子組換え技術や農作物に対する「受容度」が高いという傾向がみられた。また同調査において、「遺伝子組換え技術（農作物）に関する行政機関からの情報提供満足度」について尋ねたところ42.6%が「不満である」と回答している。遺伝子組換え作物に関する正確な情報の不足が、消費者の拒否感の一因となっていると推察できる。

消費者が拒否感を抱く別な要因として、遺伝子組換え作物が消費者にもたらすメリットがわかりにくいことが挙げられる。現在までに開発された遺伝子組換え作物の大部分は病虫害抵抗性や除草剤耐性能力を付与した作物であり、主に生産者にメリットをもたらす作物であった。これに対し近年では、機能性成分や医薬成分を含む農作物など、消費者がメリットを感じやすいと考えられる遺伝子組換え作物が開発されている。コレステロール低下に役立つ高オレイン酸ダイズや β -カロチンを多く含むビタミンA欠乏症を防ぐゴールデンライス等がその例であり、我が国でもアレルギー症状の緩和効果を持つスギ花粉症緩和米等が開発されつつある。

遺伝子組換え作物への懸念が強い一方、現在我が国では食品の健康機能性への関心が高まっており、農作物についてもその健康機能性が改めて見直されてきている。抗アレルギー作用を持つメチル化カテキンを含むべにふうき緑茶、抗酸化作用を持つアントシアニンを多く含む紫サツマイモ、発芽処理により血圧降下等の作用を持つギャバ(γ -アミノ酪酸)をより多く含むようになった発芽玄米など、特定の機能性成分を含む品種や栽培法が開発され、人気を集めている。健康機能増進に役立つ遺伝

子組換え作物のように、生産者・消費者双方がメリットを感じられるような遺伝子組換え作物が開発されれば、消費者の遺伝子組換え作物に対する理解や受容も進むと考えられる。実際、民間会社が2007年に花粉症の家族を持つ主婦400人を対象に行った「花粉症緩和米」についてのニーズ調査では、約半数が「スギ花粉症緩和米が販売されたら購入してみたい」と回答している(ネットエイジアリサーチ 2007)。

このような社会情勢を踏まえ、本研究では、健康機能成分を増強した遺伝子組換え作物の開発を行った。候補者の所属する研究グループでは、イネのミトコンドリア全ゲノムの決定や、ミトコンドリア標的化配列の機能解析等、ミトコンドリアを対象とした一連の研究を進めていたことから、ミトコンドリアに含まれる健康機能成分であるコエンザイムQ10 (CoQ10)に注目した。また宿主には、我が国における主食であり、遺伝子組換え技術や分子生物学的知見の豊富な蓄積があるイネを用いることとし、CoQ10を高含有するイネ（米）の開発を目指した。

CoQ10は植物由来の原料を用いた化学合成法、または微生物を用いた発酵法のいずれかにより生産されているが、本研究ではこれらとは異なり、CoQ合成酵素遺伝子をイネに導入することにより、米でのCoQ10高生産を試みた。当時我が国において、CoQ10は医薬品として使用されていた。そこで本研究でも、当初は開発したイネをCoQ10抽出原料として利用することを想定していた。その後2001年にCoQ10の食品としての利用が認められたことから、CoQ10強化イネ（米）を直接食べる利用法も視野に入れ、研究を進めた。第1章ではCoQ10強化イネの作出と導入コンストラクトの改変によるCoQ10含量増加の可能性を検討した。第2章では作出したCoQ10強化イネについて各部のCoQ含量測定等の詳細解析を

行った。第3章では巨大胚系統やデンプン合成変異体など、様々なイネ系統を利用したCoQ10強化イネの改良を行った。

第1章 CoQ10 強化イネの作出

ユビキノンとも呼ばれるコエンザイムQ(CoQ)は、微生物から高等動物に至るまで生物に普遍的に存在する物質である。CoQはミトコンドリア内の電子伝達系においてエネルギー産生に関わる必須成分であり、またその還元型は生体内で抗酸化機能を担っている。CoQはベンゾキノン骨格とイソプレノイド側鎖から構成されるが、イソプレノイド側鎖の長さは生物種によって異なり、例えばヒトは主に側鎖長10単位のCoQ10、イネは主に側鎖長9単位のCoQ9を持つ。

ヒト型のCoQ10は、日本では1970年代から虚血性心筋症の治療薬として使用されてきたが、厚生労働省が2001年に食品、2004年に化粧品としてのCoQ10の利用を認めたことから、近年CoQ10を含むサプリメントや飲料、化粧品など多数の商品が開発され、疲労回復や美肌等の効果があると人気を集めている。海外においても同様に、各国でサプリメントや化粧品として幅広く利用されている。CoQ10はヒトの体内で合成できるが、加齢や疲労、ストレスによって細胞内濃度が減少するため(Kalen et al. 1989)、健常者であっても補給することが望ましい。CoQ10は肉や青魚、野菜ではダイズなどの食品に比較的多く含まれるが、その含量は限られている。そのため現在ではサプリメントによる摂取が主流となっている。

現在CoQ10は植物由来の原料を用いた化学合成法、または微生物を用いた発酵法、のいずれかの方法により生産されている。本研究では、これらの方法とは異なり、遺伝子組換え技術を用いてCoQ10を高蓄積するイネ（米）を作出し、そのまま食品として、あるいはCoQ10の抽出原料と

して用いることを目指した。まず、第1節でグルコン酸菌由来のCoQ合成酵素遺伝子であるデカプレニル2リン酸合成酵素遺伝子 (*ddsA*) の導入によるCoQ10強化イネの作出を行い、第2節ではCoQ定量法の改良、第3節及び第4節では導入コンストラクトの改変による形質転換イネ種子のCoQ10含量増加を試みた。

第1節 デカプレニル2リン酸合成酵素遺伝子 (*ddsA*) 発現イネの作出

CoQの生合成経路に関しては、大腸菌 (*Escherichia coli*) と出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) で最も研究が進んでいる (Kawamukai 2002; Meganathan 2001; Szkopinska 2000)。CoQ生合成の主要部分は、ベンゾキノン骨格へのイソプレノイド側鎖となるプレニル2リン酸の転移反応で始まる (Fig. 1-1A)。最終的に合成されるCoQのイソプレノイド側鎖長は、転移反応に用いられるプレニル2リン酸の長さと同じになる。プレニル2リン酸は、ジメチルアリル2リン酸にイソペンテニル2リン酸が次々に重合することによって合成される (Fig. 1-1B)。3イソプレン単位 of ファルネシル2リン酸はステロイドやコレステロールの前駆体、4イソプレン単位 of ゲラニルゲラニル2リン酸はカロテノイドやクロロフィルの前駆体としても用いられ、このような短鎖のプレニル2リン酸は幅広い生物種に存在する。一方CoQの側鎖に用いられる長鎖のプレニル2リン酸については、生物種により固有の長さのプレニル2リン酸のみが合成される。長鎖のプレニル2リン酸は、2～4イソプレン単位 of 短鎖のプレニル2リン酸を初発物質とした一連の重合反応により、ポリプレニル2リン酸合成酵素により合成され、その長さは酵素の特性により決定される。つまり、ポリプレニル2リン酸合成酵素

が生物種に固有の長さのプレニル2リン酸を合成することにより、結果として生物種に固有のCoQ種を決定している。例えば、グルコン酸菌 (*Gluconobactor suboxydans*) のデカプレニル2リン酸合成酵素 (DdsA)は10イソプレニユニットを合成し、最終産物としてのCoQ10の合成を規定している (Fig. 1-1B)。グルコン酸菌由来の*ddsA*遺伝子が大腸菌で発現させると、内生のCoQ8に加え、ある程度の量のCoQ10が生産される (Okada et al. 1998b)。

植物においては、1~4イソプレニユニットから成る短鎖のプレニル2リン酸の代謝については研究が進んでいる (McGarvey and Croteau 1995)。しかしながら、CoQの構成要素でもある、5~10イソプレニユニットから成る長鎖のプレニル2リン酸の生合成経路については、あまりよくわかっていない。また、植物におけるCoQ生合成経路の大部分は未解明である。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において、出芽酵母のCoQ合成に関わる酵素の遺伝子とよく似た遺伝子が複数単離されたことから (Kawamukai 2002)、植物にも出芽酵母と似たCoQ合成経路が存在すると考えられている。出芽酵母から単離されたCoQ生合成関連酵素の遺伝子は、全てミトコンドリア移行シグナルと推定される配列をコードしており (Turunen et al. 2004)、酵母においてはミトコンドリアがCoQ生合成の場であることが推察された。一方ホウレンソウを用いた生化学的な解析からは、CoQ生合成が小胞体(ER)/ゴルジ体で起こることが示唆されている (Swiezewska et al. 1993)。

本節では、*ddsA*遺伝子の発現によりイネのCoQ側鎖長を9から10へ改変することにより、CoQ10を高生産するイネの作出を目指した。

材料及び方法

プラスミド構築

グルコン酸菌由来の*ddsA*遺伝子を植物で発現させるため、*ddsA*の開始コドンと推定されるGTG(Okada et al. 1998b)をATGに置換した。本研究ではこれ以降、改変配列を*ddsA*遺伝子として用いた。DdsAを目的部位へ局在させるため、イネミトコンドリア型*rps14*遺伝子のミトコンドリア標的化配列(S14配列:アミノ酸 1-48)(Kubo et al. 1999b)のコード領域、またはタバコ*GnT1*遺伝子のゴルジ体標的化配列(CTS配列:アミノ酸 1-77)(Essl et al. 1999)のコード領域を改変*ddsA*配列のATG開始コドンの上流にイン-フレームで連結した。また遺伝子発現にはCaMV35Sプロモーター(35S- Ω)(Sheen et al. 1995)とNOSターミネーターを用いた。構築したプラスミドのHindIII-EcoRI断片をバイナリーベクターpCAMBIA1301 (アクセッション No. AF234297)のマルチクローニング部位に挿入した。

植物の形質転換と栽培

構築したプラスミドをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105株に導入した。アグロバクテリウムを介したイネ(*Oryza sativa* L., 品種: 日本晴)の形質転換を、Tokiら(1997)の方法に従って行った。形質転換植物をハイグロマイシン(50 mg/L)を含むN6D寒天培地上で選抜し、ゲノムへの*ddsA*遺伝子の挿入をPCR増幅により確認した。PCR反応にはプライマーセット DDSA-D (5'-GGTGCAGGAGTCGACAGCGCGCTAT-3') と DDSA-G (5'-CAGTGTGGCGGTATGAATGAAC-3')、及び0.5 UのrTaqポリメラーゼ(東

洋紡、東京、日本) を用いた。PCR増幅は94℃30秒、55℃1分、72℃1分、を30サイクル行った。形質転換初代 (T₀個体) の幼植物を培養土を充填したポットに移植し、自然光の温室(27℃)で栽培した。T₀個体及び自殖後代をその後の実験に用いた。

ウェスタンブロット解析

形質転換イネの成葉を新鮮重10 mg当たり 80 µlの抽出バッファー(50 mM トリス-HCl [pH 6.8]; 2% SDS; 6% 2-メルカプトエタノール; 10%グリセロール) 中で十分に粉砕した。サンプルを13,000 ×g、4℃で5分遠心し、上清を回収した。タンパク質を12.5%アクリルアミドゲルで分離し、イモビロンポリビニリデンジフルオリド膜 (ミリポア、Billerica、米国) に転写した。タンパク質の検出にはECLプラスウェスタンブロッティング検出システム (アマシャムバイオサイエンス、東京、日本) を用いた。DdsAタンパク質に対する抗血清は以下の通りに調製した。*ddsA*遺伝子のタンパク質コード領域全体をPCRにより増幅し、pGEX 4T-3ベクター (アマシャムバイオサイエンス) に挿入後、大腸菌JM109株に導入した。1 mM イソプロピル-β-D (-)-チオガラクトピラノシドの添加によりGST-DdsA融合タンパク質を誘導し、Ausubelら(1995)の方法により精製した。ポリクローナル抗体を作成するため、精製済み融合タンパク質をウサギに2週間間隔で6回注射し、その後全採血を行った。

CoQ 測定

CoQ抽出は、Okadaら(1998)の方法を一部改変して行った。サンプルには葉、玄米、または白米を用い、白米の測定には玄米を精米器 (パーレスト、

ケット科学研究所、東京、日本)で40秒精米して使用した。0.1-0.2 g のサンプルを乳鉢と乳棒を用いて(葉は液体窒素中で)細かく粉碎し、2 mlの3% H₂Sと20 µlの250 µg/ml CoQ6(内部標準)を加えて120℃、1気圧で30分、その後4 mlの14% NaOHを加えて120℃、1気圧で15分前処理を行った。前処理後、3 mlの*n*-ヘキサン/イソプロパノール (5:1, v/v)でCoQを抽出し、2.5 mlの*n*-ヘキサン層のうち1.5 mlを回収した。粗CoQ抽出液をベンゼンを溶媒に用いてKiesel gel 60 F254 TLCプレート(メルク、東京、日本)に展開し、ヘキサン/イソプロパノール (1:1, v/v)でTLCプレートからCoQを溶出した。抽出したCoQは以下の条件で、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析した。カラム:C18 逆相カラム(150 mm × 60 mm、YMCパック ODS-A、YMC、京都、日本)、移動相:エタノール、流速:1 ml/分。測定波長: 275 nm (SPD-20A UV/VIS検出器、島津製作所、京都、日本)。CoQの分子量を確認するため、大気圧イオン化イオン源を装備したLCT LC/MSシステム(マイクロマス、Milford、米国)を用いたLC/MS解析を行った。カラムは、Inertsil ODS3 カラム (3 µm; 4.6 mm x 150 mm、GLサイエンス、東京、日本)を用い、流速1 ml/分で使用した。移動相であるメタノール/イソプロパノール (3 : 1, v/v) で平衡化したカラムに注入後、イソクラティック条件で30分間分析した。

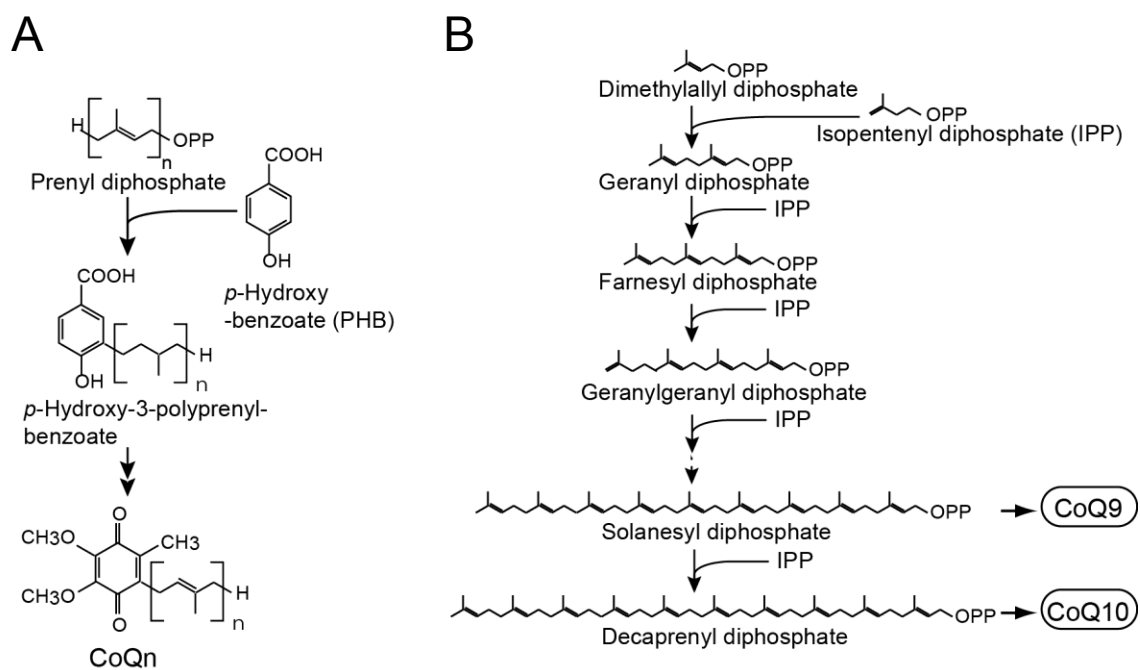


Figure 1-1. コエンザイムQの合成経路

(A) コエンザイムQ特異的な経路。

(B) コエンザイムQの側鎖部分となるプレニル2リン酸の合成経路。

結果

DdsA タンパク質をミトコンドリア、ゴルジ体、または細胞質に局在させるため、3 種類の遺伝子コンストラクト S14:ddsA、CTS:ddsA、及び ddsA (Fig. 1-2A) をデザインし、これらのコンストラクトをアグロバクテリウムを介した方法によりイネに導入した。各コンストラクトについて、それぞれ 30 個体以上の形質転換初代 (T_0 個体) で遺伝子の導入が認められた (PCR 増幅により確認、データ不掲載)。抗 DdsA 抗体を用いた T_0 個体のウェスタンブロット解析により、S14:ddsA イネ及び CTS:ddsA イネにおける DdsA タンパク質の蓄積が確認された。一方、ddsA イネでは DdsA タンパク質は検出されなかった (Fig. 1-2B)。ノザン解析により、ddsA イネでは *ddsA* mRNA もごくわずかしかな存在しないことが確認された (データ不掲載)。ウェスタンブロット解析における、S14:DdsA と CTS:DdsA タンパク質の見かけの大きさはそれぞれ 41 kDa 及び 45 kDa であった (Fig. 1-2B)。Okada ら(1998)が報告した His⁶-DdsA の見かけの大きさから、本研究で用いた DdsA の見かけの大きさは 41 kDa、S14 配列あるいは CTS 配列が付加した未切断の S14:DdsA 及び CTS:DdsA タンパク質の見かけの大きさはそれぞれ 45.7 kDa 及び 50 kDa と推定された。ウェスタンブロット解析で得られた S14:DdsA 及び CTS:DdsA タンパク質の見かけの大きさが推定分子量より小さいサイズであったことから、両タンパク質について、N-端のシグナル配列の切断が起こっていると推察された。

S14:ddsA イネは稔性があり、野性型同様の表現形を示した (詳細な解析については第 2 章第 2 節参照)。一方、中から高レベルに DdsA タンパク質を蓄積する CTS:ddsA イネでは、明らかな生育不良が観察された。DdsA タ

ンパク質を蓄積しない CTS:ddsA イネ 7 個体の出穂期の草丈は 81.6 ± 2.4 cm であり、同時期に同条件で栽培した野性型イネ(1 個体)の草丈(77.5 cm)と同程度であった。これに対し、DdsA タンパク質を中程度に蓄積する CTS:ddsA イネ 3 個体及び高度に蓄積する CTS:ddsA イネ 10 個体の草丈はそれぞれ 51.8 ± 5.9 cm、 54.6 ± 2.7 cm であり、ゴルジ体標的化シグナルをもつ DdsA の蓄積が形質転換イネの生育に抑制的な効果を持つことが示唆された。

S14:ddsA イネ及び CTS:ddsA イネの葉について、HPLC により CoQ 側鎖長を解析した (Fig. 1-3A-C)。CTS:ddsA イネは野性型である日本晴と同じく主に CoQ9 を生産した (Fig. 1-3A, B)。対照的に、S14:ddsA イネでは CoQ9 はごく少量しか含まれず、主に CoQ10 が生産された (Fig. 1-3C)。野性型 (Fig. 1-3D) 及び S14:ddsA イネ (Fig. 1-3E) で生産された CoQ 分子の分子量を LC-MS により分析したところ、それぞれ CoQ9 及び CoQ10 であることが確認され、S14:ddsA イネにおいて CoQ 側鎖長をうまく改変できたことが明らかとなった。

S14:ddsA イネの後代を用いて CoQ 含量を測定した。サザン解析によりそれぞれ 1、2、1 コピーの *ddsA* 遺伝子をゲノムに保持することが確認された 3 つの独立な S14:ddsA イネ T₀ 個体 (S14:ddsA 3, 81 及び 91 ; データ不掲載) を自家受粉させ、得られた T₁ 個体からホモ接合体を選抜し、これらを自家受粉して得られた種子 (T₂ 世代) の CoQ 含量を測定した (Fig. 1-4)。S14:ddsA イネ種子は、非形質転換体の 10 倍以上に相当する約 18 $\mu\text{g/g}$ の CoQ10 を蓄積していた (Fig. 1-4 ; ただし次節で述べる通り、実際は 10 $\mu\text{g/g}$ 程度)。このように、CoQ10 を種子に高蓄積するイネの作出に成功した。驚いたことに、この値は非形質転換体の総 CoQ 含量 (CoQ9 と CoQ10 の合計量) より 2-3 倍多く、*ddsA* 遺伝子のミトコンドリアでの発現により種子の

総 CoQ 含量が大幅に増加することが示された。

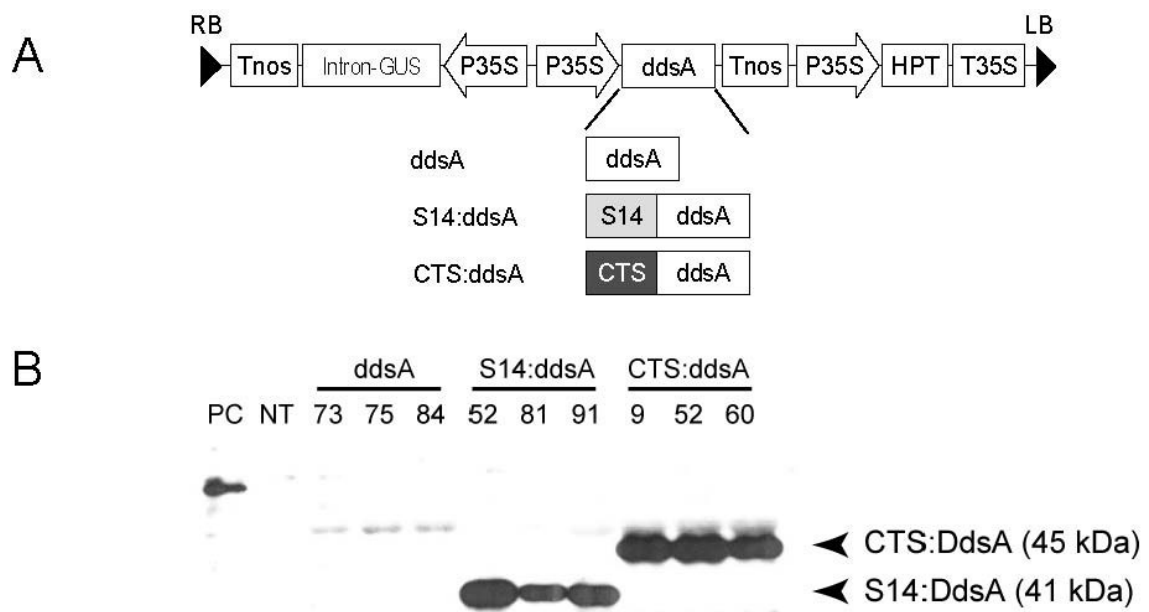


Figure 1-2. 形質転換イネにおけるDdsA発現

(A) 形質転換に用いたコンストラクト。

(B) 形質転換イネのウェスタンブロット解析。ddsA, S14:ddsA, CTS:ddsAをそれぞれ導入したT₀個体及び非形質転換体(NT)の葉由来の可溶性タンパク質を抗DdsA抗体を用いて解析した。矢頭はCTS:DdsAとS14:DdsAタンパク質の位置を示す。PC(ポジティブコントロール)はGST-DdsAを発現する*E. coli*由来の全タンパク質。

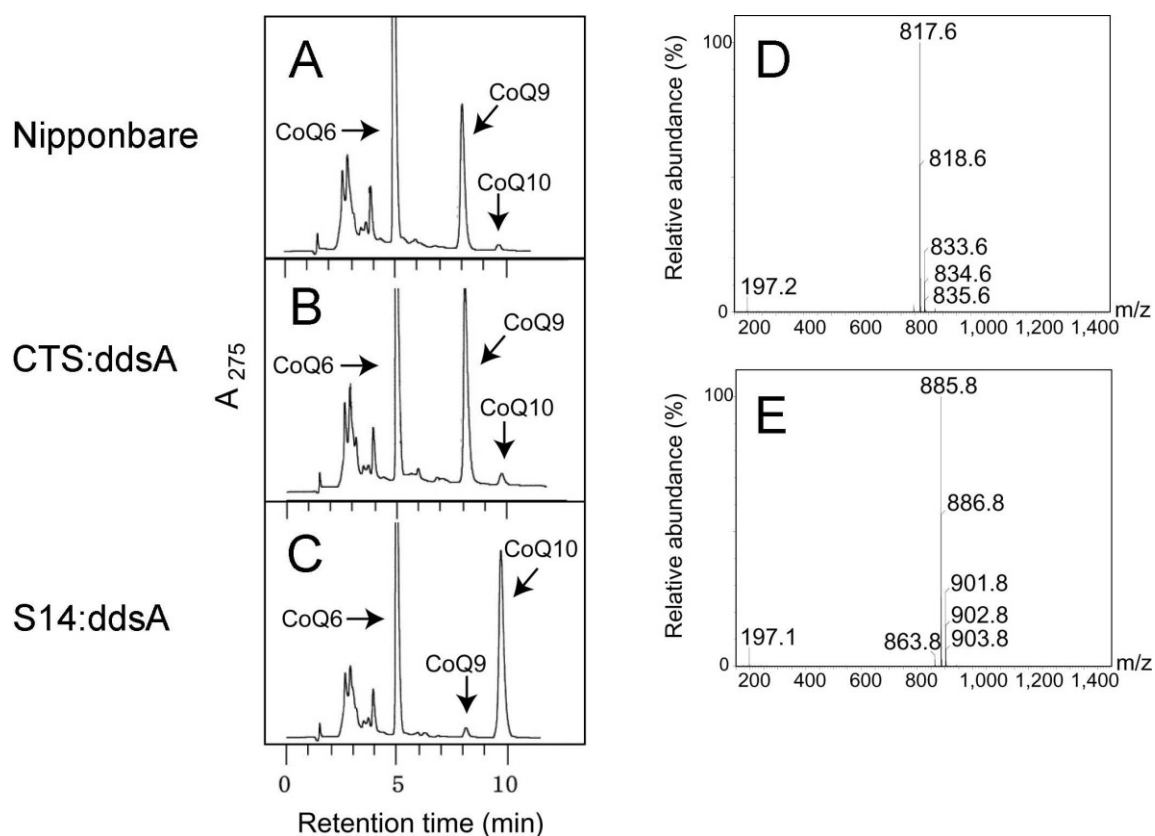


Figure 1-3. CoQ側鎖長の解析

(A)-(C) HPLCによる各種イネのCoQ側鎖長の解析。各形質転換体 (T_0 個体) 及び非形質転換体の葉よりCoQを抽出し、HPLCにより側鎖長を解析した。CoQ6 (内部標準として測定時に添加)、CoQ9、及びCoQ10を矢印で示した。

(D), (E) LC-MS解析。(A)で8分、(C)で9.7分に溶出したCoQの分子量をそれぞれ(D), (E)に示した。(D)のピークはCoQ9 [m/z 818 ($M + Na$)⁺]、(E)のピークはCoQ10 [m/z 886 ($M + Na$)⁺]であることを示している。

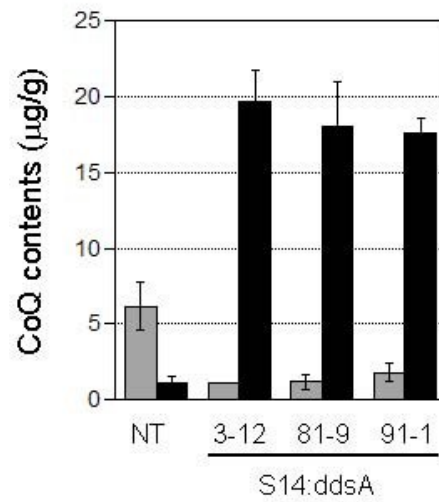


Figure 1-4. S14:ddsA イネ種子のCoQ含量
 種子10粒よりCoQを抽出し3回の測定の平均値と標準偏差を示した。グレーと黒のバーはそれぞれCoQ9含量及びCoQ10含量を表している。NTは非形質転換体。

第2節 新たな CoQ 抽出法の開発

第1節で用いた CoQ 抽出法では、最少でも種子 5-10 粒に相当する 100 mg のサンプルが必要であった。そのため、個々の S14:ddsA イネの種子 CoQ 含量を評価するには、*ddsA* ホモ接合体の T₁ 個体を選抜し、その自殖種子 (T₂ 種子) で測定を行う必要があった。そこで本節では、ホモ、ヘミ、ヌル個体が混在する T₁ 種子での正確な CoQ 含量評価を可能にするために、種子 1 粒に相当する微量 (10-20 mg) サンプルからの抽出が可能な新しい CoQ 抽出法を開発し、旧法との比較を行った。

材料及び方法

植物材料

イネ (品種: 日本晴) 及び第1節において作出・選抜した S14:ddsA イネホモ系統 (91-1) の自殖後代 (T₂ 種子) を用いた。植物は芽出し後培養土を充填したポットに移植し、自然光の温室 (27°C) で栽培した。

CoQ 測定

旧法による CoQ 抽出は、第1節の材料及び方法に記載した方法から TLC 展開による精製を省略して行った。前処理ありの旧法による CoQ 抽出では、マルチビーズショッカー (安井器械、大阪、日本) を用いて 100 mg の種子 (玄米) を 2000 rpm、7 秒で 5 回粉碎し、2 ml の 3% H₂S と内部標準の 20 µl の 250 µg/ml CoQ6 を加えて 120°C、1 気圧で 30 分、その後 4 ml の 14% NaOH による前処理を加えて 120°C、1 気圧で 15 分前処理を行った。その

後、3 ml の *n*-ヘキサン/イソプロパノール (5:1, v/v) で CoQ を 1 回抽出し、2.5 ml の *n*-ヘキサン層のうち 1.5 ml を回収した。また、前処理なしの旧法による CoQ 抽出では、100 mg の粉碎済み種子を 6 ml の H₂O と 20 µl の 250 µg/ml CoQ6 に懸濁した。CoQ を 3 ml の *n*-ヘキサン/イソプロパノール (5:1, v/v) で 1 回抽出し、2.5 ml の *n*-ヘキサン層のうち 1.5 ml を回収した。

新法による CoQ 抽出では、10-20 mg のサンプルから CoQ を以下のように抽出した；粉碎済み種子を 1 ml の 20-100 U のセルラーゼ (*Aspergillus niger* 由来、シグマ-アルドリッチ、St. Louis、米国) を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で 37°C、16-18 時間種子を消化した。その後、内部標準として 20 µl の 250 µg/ml CoQ6 または 50 µl の 0.22 mM ビタミン k₁ (Vk₁) を添加し、CoQ を 3 ml の *n*-ヘキサンで 3 回抽出した。

全ての方法において、抽出物を蒸発乾固後に 1 ml のメタノール/アセトニトリル(1:1, v/v)に溶解した。抽出した CoQ は HPLC (LC-20A システム、島津製作所；カラム、カプセルパック C8 UG120、4.6 mm i.d. × 250 mm、資生堂ファインケミカルズ、東京、日本；移動相、メタノール/アセトニトリル(4:1, v/v)；温度 40°C；流速：1 ml/分；検出、275 nm、SPD-20A UV/VIS 検出器、島津製作所)により分析した。

結果

新旧の CoQ 抽出法の比較を Table 1-1 に示した。旧法による 100 mg の日本晴種子からの CoQ 抽出においては、内部標準の CoQ6 の回収率は 61.9%（2 回測定の平均値）であった（Table 1-1, 実験 1）。対照実験として、同じサンプルから前処理なしの旧法により CoQ を抽出した場合は、CoQ6 の回収率はほぼ 100%であったことから（Table 1-1, 実験 2）、前処理中の CoQ6 分解が示唆された。実験 1 で CoQ6 の回収率が 100%であったと仮定すると、CoQ9 含量は $5.2 \pm 0.0 \mu\text{g/g}$ と算出されるが、この値は前処理なしの旧法で得られる CoQ9 含量値よりずっと高い（Table 1-1, 実験 1 カッコ内 vs. 2）。この結果は、旧法においてサンプルに含まれる CoQ9 は前処理中にほとんど分解されず、むしろ前処理により抽出効率が高まること、また実験 1 で得られた CoQ9 含量（おそらくは CoQ10 含量も）の値が過大に見積もられていることを示唆している。第 1 節では旧法（前処理あり）により CoQ 抽出を行っているため、得られた CoQ 含量値は過大に見積もられていると推定される。

旧法による 100 mg の S14:ddsA イネ（ホモ系統 91-1）種子からの CoQ 抽出においては、内部標準の CoQ6 の回収率は 97.7%（2 回測定の前平均値）であり（Table 1-1, 実験 5）、旧法による抽出において CoQ6 回収率がサンプルにより大きく(30%以上)変動することを示している。旧法により 10 mg の日本晴種子から CoQ を抽出した場合、CoQ6 の回収率は 10%以下で、得られた CoQ9 含量値は同じ方法による 100 mg スケールの抽出から得られた値よりずっと高く（データ不掲載）、旧法が少量スケールでの CoQ 抽出に不向きであることが示された。一方、10 mg の日本晴または S14:ddsA イネ

(91-1) の種子から新法により CoQ を抽出した場合は、CoQ6 の回収率は約 90-100%であった。また算出された CoQ9 及び CoQ10 の含量値は、旧法による 100 mg スケールの抽出で CoQ6 の回収率が 100%であったと仮定した場合と近い値であり (Table 1-1, 実験 3 vs. 1 カッコ内及び実験 6 vs. 5)、新法の少量スケールの CoQ 抽出における有用性が示された。新法による少量スケールの CoQ 抽出においてビタミン K₁ (V_{k1})を内部標準として用いた場合、ほぼ 100%の V_{k1} が回収され、また算出された CoQ9 及び CoQ10 の含量値は、新法で CoQ6 を内部標準として用いた場合と非常に近い値であった (Table 1-1, 実験 4 vs. 3 及び実験 7 vs. 6)。HPLC チャート上において、CoQ6 ピークよりも V_{k1} ピークの方がノイズピークからの分離がよいことから、以後の解析には全て V_{k1} を内部標準として用いた新法による少量スケールの CoQ 抽出を用いた。第 1 節においては、S14:ddsA 91-1 T₂ 種子の CoQ10 含量を約 18 µg/g としたが、同じサンプルの CoQ10 含量は新抽出法を用いた分析では約 9 µg/g であった (Table 1-1, 実験 7)。この差は、おそらくは第 1 節において CoQ 含量値が過大に見積もられたことより生じている。

このように、種子 1 粒に相当する微量サンプルを用いた新しい CoQ 抽出法を開発した。種子 1 粒を用いた新法による分析で、ホモ、ヘミ、ヌル個体が混在する T₁ 種子での正確な CoQ 含量評価が可能になった。なお新法により抽出した CoQ の分析では、HPLC チャート上に CoQ9 ピークにオーバーラップするノイズピークが存在し、その大きさは CoQ9 約 0.2 µg/g 相当であった (データ不掲載)。そこで種子における CoQ9 の検出限界をノイズピークの 10 倍相当の 2 µg/g と設定し、次節以降の分析に適用した。

Table 1-1. 新旧のCoQ抽出法の比較

実験 番号	試料		抽出法	内部標準		CoQ 含量 (μg/g) ^a	
	タイプ	量 (mg)		タイプ	回収率 (%) ^a	CoQ9	CoQ10
1	日本晴	100	旧	CoQ6	61.9 (56.8, 67.0) ^b	8.4 (9.2, 7.7)	1.7 (2.0, 1.4)
1'	日本晴	100	旧	CoQ6	100	5.2 (5.2, 5.1) ^c	1.0 (1.1, 0.9) ^c
2	日本晴	100	旧(前処理 なし)	CoQ6	105.7 (105.0, 106.3) ^b	1.3 (1.4, 1.2)	0.0 (0.0, 0.0)
3	日本晴	10	新	CoQ6	89.6 (72.8, 106.4)	4.6 (4.4, 4.7)	1.5 (1.5, 1.5)
4	日本晴	10	新	Vk ₁	101.9 (101.5, 102.2)	3.7 (3.6, 3.8)	0.4 (0.4, 0.4)
5	S14:ddsA	100	旧	CoQ6	97.7 (99.1, 96.3) ^b	4.6 (4.8, 4.4)	8.6 (8.7, 8.5)
6	S14:ddsA	10	新	CoQ6	98.3 (105.4, 91.3)	1.2 (1.2, 1.2)	12.2 (11.2, 13.3)
7	S14:ddsA	10	新	Vk ₁	107.6 (106.0, 109.2)	0.9 (0.9, 0.9)	9.4 (9.7, 9.2)

^a 2回の試験結果の平均値及び実測値（カッコ内）。

^b *n*-ヘキサン層の回収率（60%）により補正。

^c 内部標準の回収率を100%と仮定して算出。

第3節 *ddsA* 発現の増強と種子 CoQ10 含量への影響

第1節で述べたように、S14:*ddsA* イネ種子では *ddsA* 遺伝子の発現により CoQ9 と CoQ10 の量比が転換するだけでなく、CoQ の総量 (CoQ9 と CoQ10 の合計量) が非形質転換イネの 2-3 倍に増加していた。上記の結果から、イネ種子においては DdsA が行うプレニル 2 リン酸合成反応が CoQ 生合成の律速ステップとなっていることが示唆された。言い換えれば、*ddsA* 遺伝子発現の増強により、形質転換イネ種子の CoQ10 含量をさらに高められる可能性が示された。

S14:*ddsA* コンストラクトにおいては *ddsA* 遺伝子の発現に構成的な CaMV35S プロモーター(35S- Ω)を用いている。本節では、これを種子でより強く発現するプロモーターに置き換えることにより、種子での *ddsA* 遺伝子の発現増強を目指した。具体的には、種子特異的に強く発現するプロモーターとしてイネ 18kDa オレオシンプロモーター(Ole18 プロモーター) (Qu and Takaiwa 2004)を、構成的に強く発現するプロモーターとしてイネユビキチンプロモーターを利用した。第1節で述べたように、CoQ はイネ種子の胚芽を含めたぬか部分に多く含まれるが、Ole18 プロモーターは未熟種子の胚芽(=胚)及びぬか(=アリューロン層)で強く発現することが Ole18 プロモーター::*GUS* 遺伝子コンストラクトを導入した形質転換イネの解析により明らかにされている(Qu and Takaiwa 2004)。またイネユビキチンプロモーターは、代表的な構成プロモーターであるトウモロコシユビキチンプロモーター(Christensen et al. 1992)と同様、未熟種子を含むイネの各組織で強い発現を示すことが確認されている (M. Kuroda 私信)。

材料及び方法

植物材料

イネ（品種：日本晴）及び第 1 節において作出した S14:ddsA イネの T₀ 個体と自殖後代（T₁ 種子）を用いた。植物は芽出し後培養土を充填したポットに移植し、自然光の温室(27℃)で栽培した。

プラスミド構築

Ole18-S14:ddsAは、第 1 節において作成したS14:ddsAコンストラクトから、*ddsA*遺伝子の上流のCaMV35Sプロモーターを1.3kbのイネ18kDaオレオシンプロモーター(Ole18プロモーター)へ置き換えることにより構築した。一方Ubi-S14:ddsAの構築は、Gatewayシステム（インビトロジェン、Carlsbad、米国）を利用して行った。S14:ddsAコンストラクトから制限酵素処理によりS14配列と*ddsA*遺伝子を含む断片を切り出してイネユビキチンプロモーター（OsmUbiP）と10 kDaプロラミンターミネーター(アクセッションNo. X17074)の間に配置し、エントリーベクターpKS221MCS(Wakasa et al. 2006)のマルチクローニング部位に挿入した。構築したUbi-S14:ddsA発現カセットを含むエントリーベクターを、LRクロナーゼ反応により*mALS*発現カセットを含むデスティネーションバイナリーベクター(CSP:*mALS*-GW)(Wakasa et al. 2009)に導入し、Ubi-S14:ddsAを構築した。

植物の形質転換と栽培

アグロバクテリウムを介したイネ（品種：日本晴）の形質転換を、第 1 節の材料及び方法に記述した方法で行った。形質転換植物を50 mg/l のハ

イグロマイシンまたは1-3 mMのピリミノバックを含む培地上で選抜し、ゲノムへの*ddsA*遺伝子の挿入をPCR増幅により確認した。PCR反応にはプライマーセットDDSA-E2 (5'-GACATGCTGGCCTGCAAC-3') 及びDDSA-H (5'-GCCTTGTTGCCGAACAC-3')と0.5 UのExTaqポリメラーゼ（タカラバイオ、大津、日本）を用いた。PCR増幅は94℃30秒、55℃1分、72℃1分、を30サイクル行った。形質転換初代（T₀個体）を培養土に移植し、自然光の温室(27℃)で栽培した。T₀個体及び自家受粉後代をその後の実験に用いた。

ウェスタンブロット解析

形質転換イネの葉または未熟種子から、1 g（新鮮重）当たり8 mlの抽出バッファーを用いて第1節の材料及び方法に記載した方法により可溶タンパク質を抽出し、12.5%アクリルアミドゲルで分離後、イモビロンポリビニリデンジフルオリド膜（ミリポア）に転写した。タンパク質の検出にはECLプラスウェスタンブロッティング検出システム（アマシャムバイオサイエンス）を用いた。DdsAタンパク質に対する抗血清調製については第1節の材料及び方法に記載している。

CoQ 測定

CoQ 抽出は、第2節の材料及び方法に記載した新法で行った。内部標準には50 ml の0.22 mM ビタミン k₁を用いた。抽出した CoQ は第2節の材料及び方法に記載した条件で HPLC により分析した。なお第2節で述べたとおり、CoQ9 は2 µg/g を検出限界とした。

結果

種子特異的に強い発現を示すイネ Ole18 プロモーター、または構成的に強い発現を示すイネユビキチンプロモーターを用いて *S14:ddsA* 遺伝子を発現する 2 種のコンストラクト、Ole18-*S14:ddsA* 及び Ubi-*S14:ddsA* を作成し (Fig. 1-5A)、アグロバクテリウムを介した方法によりイネに導入した。双方のコンストラクトについて、それぞれ 20 個体以上の形質転換初代 (T_0 個体) で遺伝子の導入が認められた (PCR 増幅により確認、データ不掲載)。Ubi-*S14:ddsA* イネについては T_0 個体の葉、Ole18-*S14:ddsA* イネについては T_1 未熟種子からタンパク質を抽出し抗 DdsA 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。その結果、Ubi-*S14:ddsA* イネ及び Ole18-*S14:ddsA* イネ双方で DdsA タンパク質を蓄積する個体が複数得られた (Fig. 1-5B)。ただし Ole18-*S14:ddsA* イネでは *ddsA* 遺伝子導入個体の半数以上で DdsA タンパク質が蓄積していたのに対し、Ubi-*S14:ddsA* イネにおいては、50 以上の *ddsA* 遺伝子導入個体中、DdsA タンパク質の蓄積が確認されたのは 4 個体のみであった。Ole18-*S14:ddsA* イネは稔性があり、野性型同様の表現形を示した。一方 Ubi-*S14:ddsA* イネのうち、最も高レベルに DdsA タンパク質を蓄積する Ubi-*S14:ddsA* 129 は半不稔の形質を示した。

第 2 節で開発した CoQ 抽出法を用いて、DdsA タンパク質を蓄積する全ての *S14:ddsA* イネ、Ole18-*S14:ddsA* イネ及び Ubi-*S14:ddsA* イネの自家受粉種子 (T_1 種子) について、CoQ 含量を測定した (Fig. 1-5C)。 *S14:ddsA* イネ及び Ole18-*S14:ddsA* イネについては、CoQ10 の高含有を示した上位各 10 個体のデータを示した。 T_1 種子には、CoQ10 を優先的に蓄積する種子と、野性型同様 CoQ9 を優先的に蓄積する種子が混在していた。 *S14:ddsA* イネ

の一部 (S14:ddsA 50, 72, 73, 83) について、PCR 解析により種子 1 粒毎に *ddsA* 遺伝子の有無を確認したところ、*ddsA* 遺伝子を保持する T₁ 種子では CoQ10 が優先的に蓄積し、*ddsA* 遺伝子を保持しないヌルの T₁ 種子では CoQ9 が優先的に蓄積していた(データ不掲載)。そこで、ヌルと推定される (CoQ9 を優先的に蓄積する) 種子のデータを除き、平均的な種子 CoQ9 含量及び CoQ10 含量を個々の形質転換イネ毎に計算した。全ての形質転換イネにおいて、平均 CoQ9 含量は検出限界(2 µg/g)以下であったことから、以下は平均 CoQ10 含量についてのみ述べる。S14:ddsA イネでは S14:ddsA 73 が最も高い種子 CoQ10 含量を示し、その値は 12.2 ± 0.3 µg/g であった。S14:ddsA イネにおいては、1 から 3 コピーの *ddsA* 遺伝子が挿入した個体が得られているが、*ddsA* 遺伝子挿入コピー数、葉の DdsA タンパク質蓄積量、及び種子の CoQ10 含量の間に明確な関連は見いだされなかった(データ不掲載)。Ole18-S14:ddsA イネの種子 CoQ10 含量は最大で Ole18-S14:ddsA 57 の 10.9 ± 2.4 µg/g であり、S14:ddsA イネの値と同程度であった。一方 Ubi-S14:ddsA イネについては、Ubi-S14:ddsA 129 が最も高い種子 CoQ10 含量を示し、その値は 15.8 ± 1.1 µg/g と、S14:ddsA イネの値の 1.3 倍であった(Fig. 1-5)。このように、イネユビキチンプロモーターを用いた *ddsA* 遺伝子発現の増強により、種子 CoQ10 含量 (≒CoQ 総量) をさらに増加させることが出来た。

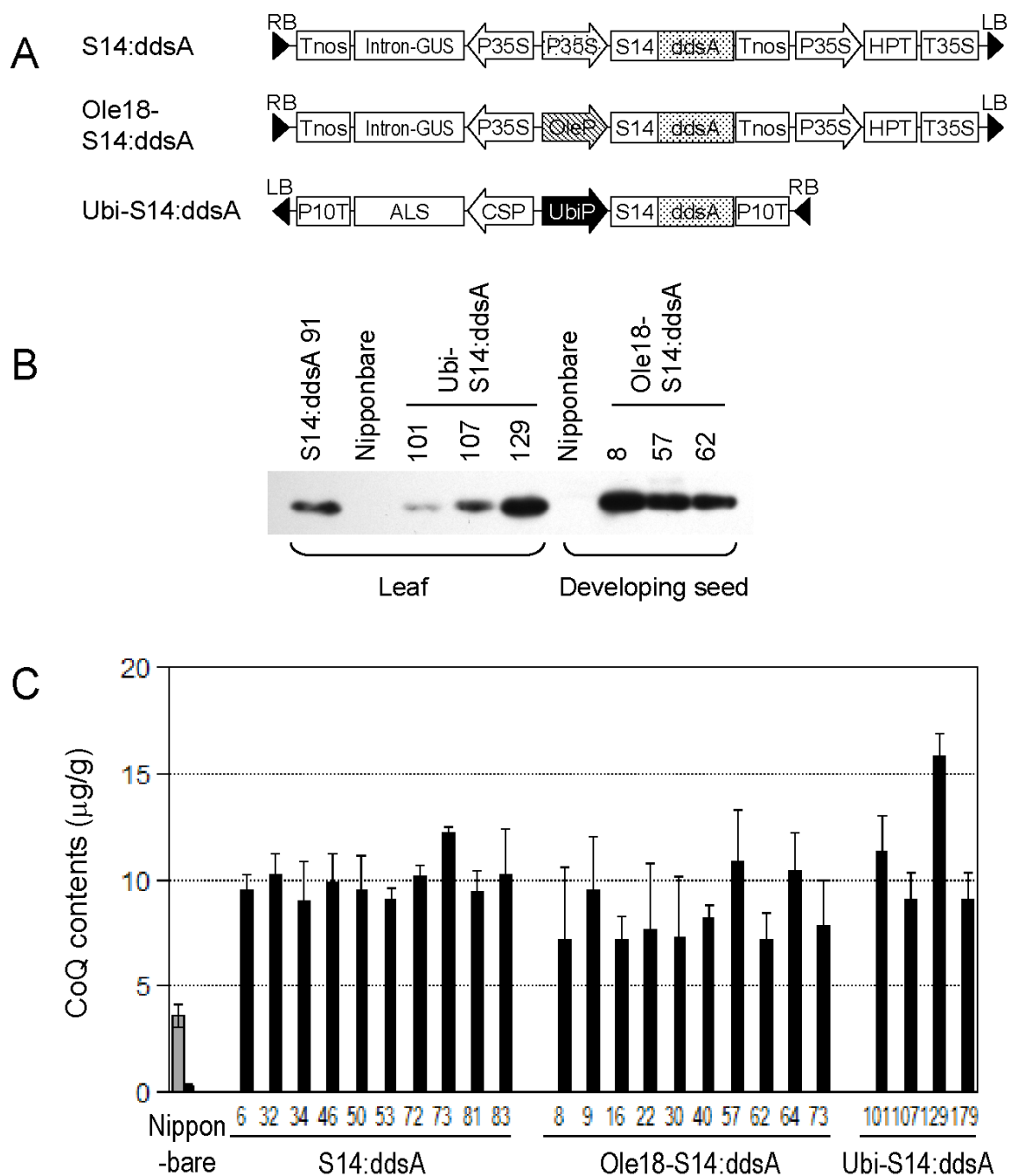


Figure 1-5. 異なるプロモーターを用いたCoQ10強化イネの解析

(A) 形質転換に用いたコンストラクト。

(B) 形質転換イネのウェスタンブロット解析。各形質転換イネのT₀個体の葉またはT₁未熟種子（受粉16-18日後）及び野性型である日本晴の葉または未熟種子（受粉16-18日後）より抽出した可溶タンパク質を抗DdsA抗体を用いて解析した。S14:ddsA 91はポジティブコントロール。

(C) 形質転換イネT₁種子のCoQ含量。種子1粒よりCoQを抽出した。各個体3～8粒の種子を解析し、平均値と標準偏差を示した。グレーと黒のバーはそれぞれCoQ9含量及びCoQ10含量を表している。

第 4 節 *coq2* 発現イネの作出

第 1 節や前節の結果からは、イネ種子において、DdsA が行うプレニル 2 リン酸の合成反応が CoQ 生合成の律速ステップであることが示唆された。一方、タバコにおいては、その次のステップを触媒する PHB: ポリプレニルトランスフェラーゼ (PPT) の活性を遺伝子導入により増強したところ、葉の CoQ 含量が最大 6 倍に増加したことから (Ohara et al. 2004)、PPT による転移反応 (Fig. 1-1A) が CoQ 生合成の律速ステップであることが示唆された。そこで本節では、PPT 活性の増強により、*ddsA* 発現イネの種子の CoQ10 含量をさらに増加することを目指し、酵母の PPT 遺伝子である *coq2* と *ddsA* を同時に発現するイネの作出を行った。また PPT 活性増強が単独でイネの CoQ 生合成に与える影響について調べるため、*coq2* を単独で発現するイネの作出も行った。

PPT はアラビドプシスから遺伝子 (*AtPPT1*) が単離されており、AtPPT1 タンパク質がミトコンドリアに局在することが報告されている (Okada et al. 2004)。一方、上述の *coq2* 遺伝子発現タバコについては、ER 局在型 COQ2 とミトコンドリア局在型 COQ を発現する 2 種類を作出し比較したところ、ミトコンドリア局在型 COQ2 を発現するタバコがより高い CoQ 含量を示すことが報告されている (Ohara et al. 2004)。そこで本節では、ER 局在型 COQ2 またはミトコンドリア局在型 COQ2 の遺伝子を発現するイネを作出し、双方の比較を行った。

材料及び方法

植物材料

イネ（品種：日本晴）及び第3節において作出した Ubi-S14:ddsA イネの T₀ 個体と自殖後代（T₁ 種子）を用いた。植物は芽出し後培養土を充填したポットに移植し、自然光の温室(27℃)で栽培した。

プラスミド構築

形質転換に用いるバイナリーベクターの構築は、全て Gateway システムまたは MultiSite Gateway システム（インビトロジェン）を利用して行った。*coq2* 遺伝子を単独に発現するコンストラクト（ER:coq2 及び S14:coq2）の構築は次のように行った。酵母の *coq2* 遺伝子 (Ashby et al. 1992) の遺伝子産物は、N 末端にミトコンドリア標的化配列と推定される配列を持つ（アミノ酸 1-23）。COQ2 を ER に局在させるため、推定ミトコンドリア標的化配列のコード領域を欠失させた *coq2* 遺伝子の 5' 側にインゲン (*Phaseolus vulgaris*) の α -アミラーゼインヒビター遺伝子の ER 輸送シグナル（ER 配列: アミノ酸 3-23）(Moreno and Chrispeels 1989) のコード領域をイン-フレームで連結し、また 3' 側に ER 係留シグナルである 'KDEL' のコード配列を付加した。また COQ2 をミトコンドリアへ局在させるために、推定ミトコンドリア標的化配列のコード領域を欠失させた *coq2* 遺伝子の 5' 側にイネミトコンドリア標的化配列 (S14 配列: アミノ酸 1-48) (Kubo et al. 1999b) のコード領域をイン-フレームで連結した。改変した 2 種類の *coq2* 遺伝子を 35SCaMV プロモーターと 10 kDa プロラミンターミネーターの間に配置して ER:coq2 発現カセットまたは S14:coq2 発現カセットとし、エントリーベクター

pKS221MCS(Wakasa et al. 2006)のマルチクローニング部位に挿入した。構築したER:coq2発現カセットまたはS14:coq2発現カセットを含むエントリーベクターを、LR クロナーゼ反応により*mALS*発現カセットを含むデスティネーションバイナリーベクター (CSP:*mALS*-GW) (Wakasa et al. 2009)に導入した。*coq2*遺伝子と*ddsA*遺伝子を同時に発現するコンストラクト(ER:coq2-*ddsA*及びS14:coq2-*ddsA*)の構築は以下の通りに行った。イネユビキチンプロモーター、*S14:ddsA*遺伝子、10 kDaプロラミンターミネーターから成るUbi-S14:*ddsA*発現カセット(第3節で作成)を、エントリーベクターpKS4-1MCS(Wakasa et al. 2006)のマルチクローニング部位に挿入した。構築したS14:*ddsA*発現カセットを含むエントリーベクターと、ER:coq2発現カセットまたはS14:coq2発現カセットを含むエントリーベクターをLR clonase Plusを用いたLRクロナーゼ反応により*mALS*発現カセットを含むデスティネーションバイナリーベクターCSP:*mALS*-24GW (Wakasa et al. 2009)に導入した。

植物の形質転換と栽培

アグロバクテリウムを介したイネ(品種:日本晴)の形質転換を、第1節の材料及び方法に記述した方法で行った。形質転換植物を1-3 μ Mのピリミノバックを含む培地上で選抜し、ゲノムへの*coq2*遺伝子及び*ddsA*遺伝子の挿入をPCR増幅により確認した。*ddsA*遺伝子については第3節の材料及び方法に記載した条件で増幅を行い、*coq2*遺伝子についてはPCR反応にプライマーセット coq2-BamHI (5'-ACCATCGGATCCTTTTTGGATAGAAAGTTGG-3') 及び coq2-860R (5'-TGTAGGCCAGCTCATTAC-3')と0.5 UのExTaqポリメラーゼ(タカラバ

イオ) を用い、PCR増幅は94℃30秒、52℃1分、72℃1分、を30サイクル行った。形質転換初代 (T₀個体) を培養土に移植し、自然光の温室(27℃)で栽培した。T₀個体及び自家受粉後代をその後の実験に用いた。

ノザン解析

形質転換イネの葉から、RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン、Valencia、米国) を用いてトータルRNAを抽出した。5 µgのトータルRNAを1%(w/v)のアガロースを含むフォルムアミドゲルで分離後、HybondN⁺ナイロンメンブレン (アマシャムバイオサイエンス)に転写した。ジゴキシゲニン(DIG)標識された600 ntの*coq2*アンチセンスプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、DIG 発酵検出キット (ロシュアプライドサイエンス、東京、日本) を用いてノザンハイブリダイゼーションを行った。

ウェスタンブロット解析

DdsAタンパク質の検出には、形質転換イネの葉から1 g (新鮮重) 当たり8 mlの抽出バッファーを用いて第1節に記載した方法により可溶タンパク質を抽出した。ミトコンドリアマーカであるCOXIIタンパク質及びERマーカであるBiPタンパク質の検出には、次項に記載の方法で調製したミトコンドリア画分タンパク質及びミクロソーム画分タンパク質を用いた。抽出したタンパク質を12.5%アクリルアミドゲルで分離後イモビロンポリビニリデンジフルオリド膜 (ミリポア) に転写した。抗体は抗DdsA抗血清 (調製については第1節の材料及び方法に記載)、抗COXII抗体(Agrisera、Vännäs、スウェーデン)及び抗イネBiP抗体(Yasuda et al. 2009)を用い、検出はECLプラスウェスタンブロッティング検出システム (アマシャムバイオ

サイエンス) により行った。

イネカルスからの膜画分の調製

イネ種子からTokiらの方法(1997)に従いN6D培地上でカルスを誘導した。継代後、1週間から10日経過したカルスを採取し、液体窒素にて凍結後-80℃にて保存したものを膜画分調製の材料に用いた。一回の膜画分調製には、新鮮重3 g程度のイネカルスを用いた。イネカルスを氷冷した乳鉢中に移し、1 gのカルスに対し3 mlの100 mM マグネシウムリン酸緩衝液 (pH 6.5; 0.1 g/ml ポリビニルポリピロリドン, 10 mM DTTを含む)を加え、乳鉢を用いて細胞を破碎した。破碎液を氷冷した15 ml容遠沈管に移し、5,200 rpm、4℃にて5分間遠心し、細胞残渣を沈澱させた。上清を氷冷した15 ml容のポリプロピレン遠沈管に移し、10,100 rpm、4℃にて5分間遠心し、得られたペレットをミトコンドリア画分とした。この時の上清を、さらに50,000 rpm、4℃にて30分間超遠心して得られたペレットをミクロソーム画分とした。ミトコンドリア画分、及びミクロソーム画分は氷冷した1 ml容ダウンス型ホモジナイザーを用いて300 µlの100 mM Tris-HCl (pH7.6; 10 mM DTTを含む)に懸濁した。このうち85 µlを粗酵素とし、次項に記載の方法にてCOQ2の酵素活性測定を行った。

COQ2 酵素活性測定

COQ2 の酵素活性測定には、一反応当り 85 µl の粗酵素液を用い、各 5 µl の 200 mM MgCl₂, 8 mM *p*-ヒドロキシベンゾエート(PHB), 8 mM グラニル 2 リン酸(GPP)を加え 100 µl とし (終濃度 10 mM MgCl₂, 0.4 mM PHB, 0.4 mM GPP)、30℃にて 60 分間反応させた。5 µl のギ酸を加えて反応を停止

し、内部標準として 10 μ l (0.5 nmol) の 50 μ M プロピオン酸テストステロンを添加した。更に 150 μ l の酢酸エチルを加え、激しく攪拌後、6,000 rpm にて 5 分間遠心分離し、上層の酢酸エチル層を回収した。酢酸エチル層を濃縮乾固後、200 μ l のメタノールに溶解し HPLC 用のサンプルとした。反応生成物である *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoate 及び内部標準であるプロピオン酸テストステロンを、HPLC (SPD-M10A ダイオードアレイ、島津製作所; カラム、LiChrospher 100 RP-18、4 mm i.d. \times 250 mm、メルク; 移動相、メタノール/水/酢酸 (80 : 20 : 0.3, v/v); 温度: 40°C; 流速: 1 ml/分; 検出、254 nm)により分析した。*m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoate の保持時間は 5.3 分、テストステロンプロピオン酸は 9.2 分であった。

CoQ 測定

種子はマルチビーズショッカー (安井器械) で 2000 rpm、7 秒で 5 回粉碎し、第 1 章第 2 節の材料及び方法に記載した新法により CoQ 抽出を行った。内部標準には 50 μ l の 0.22 mM ビタミン k_1 を用いた。カルスについては、20-30 mg のカルスを 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で粉碎後、50 μ l の 0.22 mMV k_1 を添加し、CoQ を 3 ml の *n*-ヘキサンで 3 回抽出した。種子、カルスいずれについても、抽出物を蒸発乾固後に 1 ml のメタノール/アセトニトリル(1:1, v/v)に溶解し、抽出した CoQ を第 1 章第 2 節の材料及び方法に記載した条件で HPLC により分析した。第 2 節で述べたとおり、種子の分析では HPLC チャート上で CoQ9 ピークにオーバーラップするノイズピーク (CoQ9 約 0.2 μ g/g 相当) が存在したことから、ノイズピークの 10 倍相当の 2 μ g/g を CoQ9 の検出限界とした。カルスの分析ではノイズピークが見られなかったため、検出限界は設定しなかった。

結果

coq2 遺伝子を単独、または *ddsA* 遺伝子と同時に発現するコンストラクトを作成した。*coq2* 単独型、同時発現型それぞれについて、COQ2 を ER に蓄積するようデザインした ER:*coq2* 発現カセットまたはミトコンドリアに蓄積するようデザインした S14:*coq2* 発現カセットを含む各 2 種類のコンストラクトを作成した(Fig. 1-6A)。構築したコンストラクトをアグロバクテリウムを介した方法でイネに導入したところ、各コンストラクトについて 20 個体以上の *coq2* 遺伝子(同時発現型については *coq2* 遺伝子及び *ddsA* 遺伝子の両方)が導入された形質転換イネが得られた(PCR 増幅により確認、データ不掲載)。得られた各種の形質転換イネについて *coq2* 遺伝子発現をノザンブロットで解析し、さらに同時発現型については *ddsA* 遺伝子発現を抗 DdsA 抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した(Fig. 1-6B)。*coq2* 単独型の形質転換イネについては、ER:*coq2* イネでは 1.4 kb、S14:*coq2* イネでは 1.5 kb の *coq2* mRNA の蓄積が確認された。また同時発現型の形質転換イネ(ER:*coq2*-*ddsA* イネ及び S14:*coq2*-*ddsA* イネ)については、*coq2* 単独型同様 ER:*coq2* 遺伝子を発現する場合は 1.4 kb、S14:*coq2* 遺伝子を発現する場合は 1.5 kb の *coq2* mRNA の蓄積が確認され、さらに DdsA タンパク質の蓄積が確認された(Fig. 1-6B)。第 3 節で作出した Ubi-S14:*ddsA* イネにおいては、*ddsA* 遺伝子導入個体中 10%以下の個体でしか DdsA タンパク質の蓄積が見られなかった。同時発現型の形質転換イネには同じ Ubi-S14:*ddsA* 発現カセットが含まれるが、ER:*coq2*-*ddsA* イネ及び S14:*coq2*-*ddsA* イネのいずれにおいても、*coq2*、*ddsA* 両遺伝子が導入された個体のうち半数以上で DdsA タンパク質の蓄積が確認された。得られた

各種の形質転換イネはいずれも稔性があり、野性型同様の表現形を示した。

各種形質転換イネについて T₁ 種子からカルスを誘導し、COQ2 の酵素活性を測定した(Fig. 1-7A, B)。各カルスについて *coq2* 遺伝子（同時発現型については *coq2* 遺伝子及び *ddsA* 遺伝子）の有無を PCR 増幅により確認し（データ不掲載）、導入遺伝子を含むカルスを解析に用いた。COQ2 の酵素活性が狙い通りの細胞内局在を示すか確認するため、ミトコンドリア画分及び ER が含まれるミクロゾーム画分の酵素活性を測定した。*coq2* 単独型では、野生型である日本晴のカルス、ER:*coq2* カルス、S14:*coq2* カルスのいずれも、ミトコンドリア画分でミクロゾーム画分より高いプレニルトランスフェラーゼ活性（COQ2 酵素活性）が示された。ミトコンドリア画分の COQ2 酵素活性は、日本晴カルスが 0.21 ± 0.03 nmol/h/mg protein であったのに対し ER:*coq2* カルスでは 1-1.2 nmol/h/mg protein、S14:*coq2* カルスでは 43-46 nmol/h/mg protein であり、それぞれ日本晴カルスの値の約 5 倍及び 200 倍以上であった(Fig. 1-7A)。同時導入型においても、全てミトコンドリア画分でミクロゾーム画分より高い COQ2 酵素活性が観察された。ミトコンドリア画分の COQ2 酵素活性は、*ddsA* 遺伝子のみを導入した Ubi-S14:*ddsA* カルスが 0.1-0.2 nmol/h/mg protein であったのに対し、ER:*coq2*-*ddsA* カルスでは 0.9-2.4 nmol/h/mg protein、S14:*coq2*-*ddsA* カルスでは 13-21 nmol/h/mg protein であり、Ubi-S14:*ddsA* カルスの値を最大値の 0.2 nmol/h/mg protein とすると、ER:*coq2*-*ddsA* カルス及び S14:*coq2*-*ddsA* の値はそれぞれその、4-12 倍及び 65-105 倍であった。(Fig. 1-7B)。ミトコンドリアマーカー(COXII)及び ER マーカー(BiP)タンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロット解析から、各サンプルのミクロゾーム画分へのミトコンドリア画分の混入は少ない一方、ミトコンドリア画分にはミクロゾーム画分が相

当量混入していることが示されている(Fig. 1-7C,D)。ER:coq2 カルス及び ER:coq2-ddsA カルスのミトコンドリア画分における高い COQ2 酵素活性は、ミクロゾーム画分の混入によるものかもしれない。このように、COQ2 酵素活性の細胞内局在については明瞭な結果が得られなかったものの、*coq2* 単独型、同時導入型いずれの形質転換イネカルスにおいても、COQ2 酵素活性の明らかな増加が確認された。

COQ2 酵素活性測定に用いたカルス (各コンストラクトにつき 2 ライン) について、CoQ 含量を測定した(Fig. 1-7E, F)。*coq2* 単独型の ER:coq2 カルス及び S14:coq2 カルスでは、どちらも野生型の日本晴同様、主に CoQ9 が蓄積していた。日本晴カルスの CoQ9 含量が $13.0 \pm 2.0 \mu\text{g/g}$ であったのに対し、ER:coq2 カルス及び S14:coq2 カルスの CoQ9 含量は、それぞれ高い方で $24.7 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ 及び $23.0 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ であり、どちらも日本晴カルスの 1.8-1.9 倍の値に増加していた (Fig. 1-7E)。一方、同時導入型の ER:coq2-ddsA カルス及び S14:coq2-ddsA カルスではどちらも、*ddsA* 遺伝子のみを発現する Ubi-S14:ddsA カルスと同じく、主に CoQ10 が蓄積していた。Ubi-S14:ddsA カルスの CoQ10 含量が高い方で $36.7 \pm 6.9 \mu\text{g/g}$ であったのに対し、ER:coq2-ddsA カルスの CoQ10 含量は高い方で $39.2 \pm 6.5 \mu\text{g/g}$ (ER:coq2-ddsA 40) と、ほぼ Ubi-S14:ddsA カルスと同程度であった。S14:coq2-ddsA カルスの CoQ10 含量は高い方で $51.6 \pm 17.5 \mu\text{g/g}$ (S14:coq2-ddsA 39) であり、Ubi-S14:ddsA カルスの 1.4 倍の値に増加していた(Fig. 1-7F)。予備的な実験において、日本晴カルスの CoQ9 含量が同様の培養条件においても実験間で $10\text{-}30 \mu\text{g/g}$ と大きく変動することが確認されている。そのため、カルスで見られた CoQ9 及び CoQ10 含量の差の有意性については、液体培養カルス等のより均一な条件下での比較検討が必要と考えられる。

次に、*coq2* 単独型及び同時導入型の各種形質転換イネの T₁ 種子において、CoQ 含量測定を行った。*coq2* 単独型の ER:*coq2* イネ及び S14:*coq2* イネの T₁ 種子は、どちらも主に CoQ9 を蓄積しており、また CoQ9 含量も野生型である日本晴と同程度だった(Fig. 1-8)。同時導入型の ER:*coq2*-*ddsA* イネ及び S14:*coq2*-*ddsA* イネの T₁ 種子は、どちらも主に CoQ10 を蓄積していた。これらのイネ種子の CoQ10 含量は、ER:*coq2*-*ddsA* イネで最大 15.1±3.3 µg/g (ER:*coq2*-*ddsA* 112)、S14:*coq2*-*ddsA* イネで最大 11.7±1.4 µg/g (S14:*coq2*-*ddsA* 39) であり、Ubi-S14:*ddsA* イネ(15.8±1.1 µg/g; Ubi-S14:*ddsA* 129)と同程度か、それ以下であった(Fig. 1-8)。このように、*coq2* 遺伝子を単独、あるいは *ddsA* 遺伝子と同時に発現させた形質転換イネにおける種子の CoQ9 含量及び CoQ10 含量は、それぞれの対照である日本晴、あるいは Ubi-S14:*ddsA* イネと同程度であった。

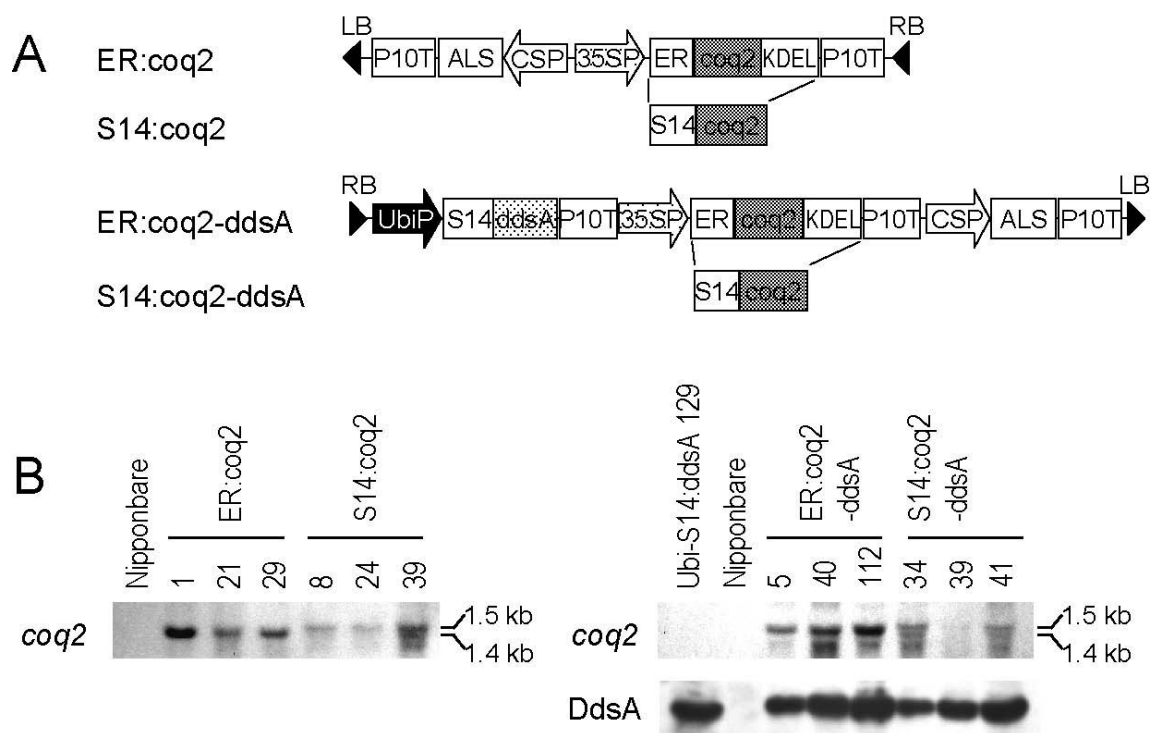


Figure 1-6. *coq2*導入イネの解析

(A) 形質転換に用いたコンストラクト。

(B) 形質転換イネにおける*coq2* mRNA及びDdsAタンパク質の検出。各形質転換イネ (S14:coq2 8, 24及びER:coq2-ddsA 112についてはT₁個体、他はT₀個体)及び野生型である日本晴の葉よりRNA及び可溶タンパク質を抽出した。*coq2* mRNAについては*coq2* アンチセンスプローブを用いたノザンブロットにより、またDdsAタンパク質については抗DdsA抗体を用いたウェスタンブロットにより解析を行った。Ubi-S14:ddsA 129はDdsA蓄積のポジティブコントロール。

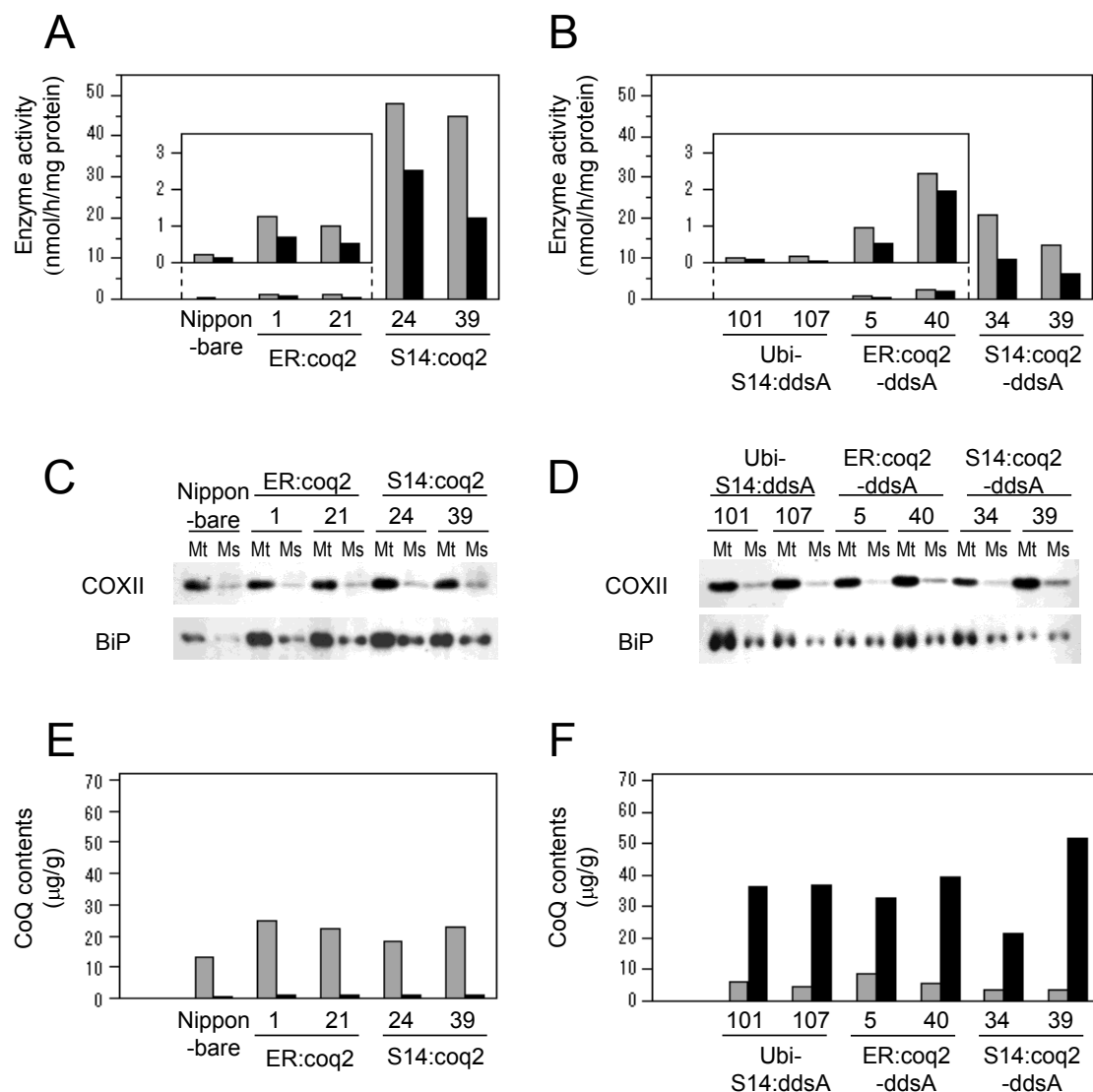


Figure 1-7. *coq2* 導入イネカルの解析

coq2 導入イネ (ER:coq2, S14:coq2, ER:coq2-ddsA, 及び S14:coq2-ddsA) と Ubi-S14:ddsA の T₁ 種子及び野生型である日本晴の種子からカルスを誘導し、COQ2 の酵素活性と CoQ 含量について解析した。日本晴及び Ubi-S14:ddsA はネガティブコントロールとして用いている。

(A, B) COQ2 の酵素活性。各系統について 2 個の独立な種子由来のカルスについて測定し、平均値を示した。グレーと黒のバーはそれぞれミトコンドリア画分及びミクロゾーム画分の活性を表している。A 及び B の挿入図はそれぞれ日本晴と ER:coq2 (A) 及び Ubi-S14:ddsA と ER:coq2-ddsA (B) の拡大図を示している。

(C, D) 酵素活性測定に用いた画分の、マーカータンパク質に対する抗体を用いたウェスタン解析。ミトコンドリアマーカーとして COXII、ER マーカーとして BiP を用いた。Mt, Ms はそれぞれミトコンドリア画分及びミクロゾーム画分を表している。

(E, F) CoQ 含量。各系統について 2 個の独立な種子由来のカルスについて測定し、平均値を示した。グレーと黒のバーはそれぞれ CoQ9 含量及び CoQ10 含量を表している。

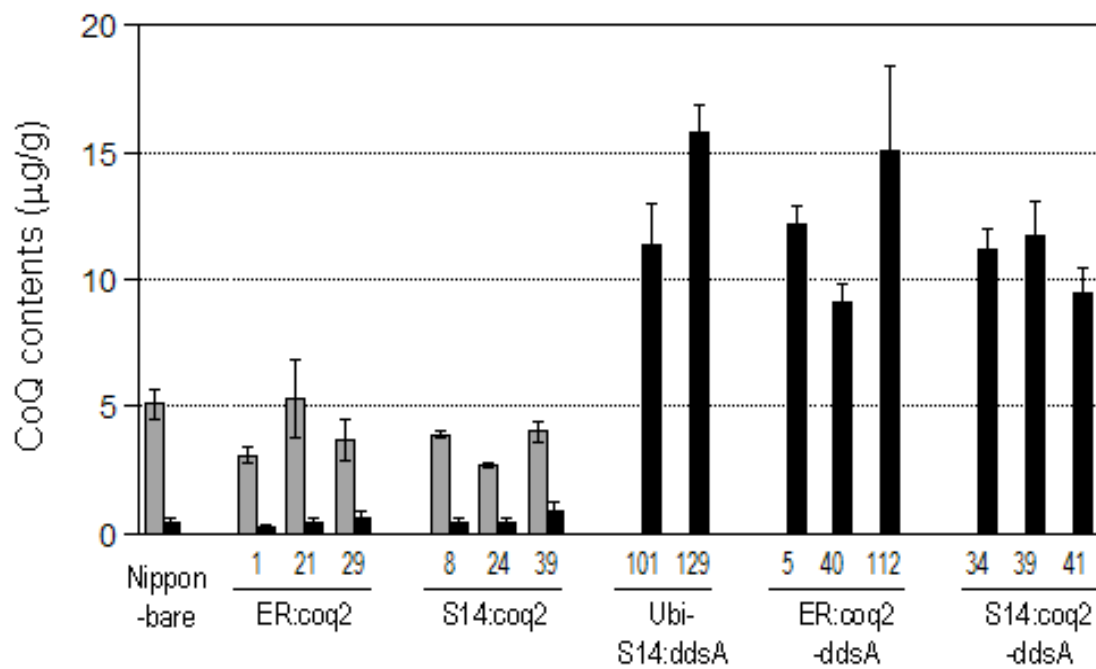


Figure 1-8. *coq2*導入イネT₁種子のCoQ含量
 種子1粒よりCoQを抽出した。各個体3～8粒の種子を解析し、平均値と標準偏差を示した。グレーと黒のバーはそれぞれCoQ9含量及びCoQ10含量を表している。Ubi-S14:ddsAについては、Fig. 1-5から高CoQ10含量を示す2個体のデータを引用した。

考察

本章第 1 節では、デカプレニル 2 リン酸合成酵素遺伝子 (*ddsA*) の発現によりイネの CoQ 側鎖長を 9 から 10 へ改変し、CoQ10 を高生産するイネの作出を試みた。DdsA タンパク質をそれぞれミトコンドリア、ゴルジ体、または細胞質に局在させるようデザインした 3 種類の遺伝子コンストラクト S14:ddsA、CTS:ddsA 及び ddsA をイネに導入した結果、ミトコンドリア局在型の S14:ddsA イネにおいて、CoQ 側鎖長の改変に成功した (Fig. 1-3)。S14:ddsA イネ種子には、非形質転換体の 10 倍以上の CoQ10 が蓄積しており (Fig. 1-4)、CoQ10 を種子に高蓄積するイネの作出に成功した。

出芽酵母において、ポリプレニル 2 リン酸合成酵素遺伝子 (*COQ1*) の欠損株に *ddsA* 遺伝子を導入すると、形質転換酵母は本来の CoQ6 に代わってほぼ CoQ10 のみを蓄積する (Okada et al. 1998a)。一方、大腸菌において内生のポリプレニル 2 リン酸合成酵素遺伝子 (*ispB*) には改変を加えずに、*ddsA* 遺伝子を導入すると、形質転換大腸菌は内生の CoQ8 に加え、少量の CoQ10 (と CoQ9) を生産する (Okada et al. 1998b)。本研究で作出した S14:ddsA イネにおいては、内生のポリプレニル 2 リン酸合成酵素遺伝子には改変を加えず、*ddsA* 遺伝子のみを導入していることから、大腸菌の例のように、CoQ10 に加え内生の CoQ9 も相当程度生産されると予想した。しかし大腸菌の結果とは対照的に、S14:ddsA イネは CoQ10 を優先的に生産し、CoQ9 はごくわずかしかなかった (Fig. 1-3)。このような結果が得られた原因としては、CoQ 合成の細胞内局在の影響があげられる。最近シロイヌナズナにおいて、2 種のポリプレニル 2 リン酸合成酵素のうち、CoQ 生合成に関わると推定される酵素が ER に局在し (もう一方は葉緑体

に局在)、またプレニル 2 リン酸のベンゾキノン骨格への転移反応を行う PPT はミトコンドリアに局在することが報告された(Jun et al. 2004; Okada et al. 2004)。そのため、プレニル 2 リン酸は ER で合成され、その後 CoQ 合成のためにミトコンドリアへ運ばれると考えられる。S14:ddsA イネで得られた結果は、プレニル 2 リン酸の合成が、本来の部位である ER よりも、ミトコンドリアで行われる方が CoQ 生合成にとってはより効率的であることを示唆している。一方 DdsA をゴルジ体に局在するようデザインした CTS:ddsA イネにおいては、DdsA タンパク質が蓄積したにも関わらず CoQ 側鎖長の変化が見られなかった。その原因についてはさらなる解析が必要であるが、デカプレニル 2 リン酸が CoQ 合成以外に用いられた可能性がある。CoQ 生合成に用いられる長鎖のプレニル 2 リン酸は、プラストキノン生合成にも用いられる。シロイヌナズナにおける知見からは、プラストキノン生合成に用いられるプレニル 2 リン酸は葉緑体で合成されると推定されるが(Jun et al. 2004)、CTS:ddsA イネでは DdsA によりゴルジ体で合成されたデカプレニル 2 リン酸が、CoQ 生合成ではなくプラストキノン生合成に用いられたのかもしれない。

第2節では、種子1粒相当の微量サンプルからの抽出が可能な新しいCoQ抽出法を開発した。新法の導入により種子1粒を用いた分析が可能になり、以後の分析においてホモ、ヘミ、ヌル個体が混在する T₁ 種子での正確なCoQ 含量評価が可能となった。また新旧の抽出法の比較過程において、旧抽出法による CoQ 含量測定では、CoQ 含量値が過大に見積もられている可能性が示された。そこで第3節で新法を用いて S14:ddsA イネ種子の CoQ₁₀ 含量を再評価し、最大 12 µg/g であることを明らかにした (Fig. 1-5C)。

S14:ddsA イネ種子においては、総 CoQ 含量が非形質転換体の値の 2-3

倍に増加していた (Fig. 1-4)。 *ddsA* 遺伝子発現によるデカプレニル 2 リン酸合成能の付与はプレニル 2 リン酸合成能の増強でもあり、上記の結果から、イネにおいては DdsA が行うプレニル 2 リン酸の合成反応が CoQ 合成の律速ステップとなっていることが示唆された。そこで第 3 節では *ddsA* 遺伝子発現の増強により、形質転換イネ種子の CoQ10 含量の一層の増加を試みた。S14:*ddsA* コンストラクトで *ddsA* 遺伝子の発現に用いている CaMV35S プロモーター(35S- Ω)を、Ole18 プロモーターまたはイネユビキチンプロモーターに改変したコンストラクト (Ole18-S14:*ddsA* 及び Ubi-S14:*ddsA*) を作成し、イネに導入した。各種形質転換イネ種子の CoQ9 含量はいずれも検出限界以下で、種子に蓄積する CoQ の大部分が CoQ10 であった。形質転換イネ種子の CoQ10 含量は、Ole18-S14:*ddsA* イネは最大でも S14:*ddsA* イネと同程度であったが、Ubi-S14:*ddsA* イネでは最大で S14:*ddsA* イネの値の 1.3 倍に増加していた(Fig. 1-5C)。このように、イネユビキチンプロモーターを用いた *ddsA* 遺伝子発現の増強により、種子 CoQ10 含量 (\equiv CoQ 総量) をさらに増加させることが出来た。

DdsA を蓄積する Ubi-S14:*ddsA* イネは 4 個体が得られたが、そのうち最も CoQ10 含量が高い Ubi-S14:*ddsA* 129 は半不稔の形質を示した。一般的に、培養過程を経る形質転換体作出においては、培養変異に起因する稔生低下や矮化等の表現形変化を示す個体が一定数得られる事が知られており (Phillips et al. 1994)、実際、本章で作出した各種の形質転換イネにおいても、全種類で不稔・半不稔個体が一定数得られている (データ不掲載)。第 4 節で作出した ER:*coq2-ddsA* イネ及び S14:*coq2-ddsA* イネは Ubi-S14:*ddsA* イネと同じ *ddsA* 発現カセットを含むが、これらのイネでは DdsA 及び CoQ10 を高蓄積し、かつ正常な稔性を示す個体が複数得られていることから、

Ubi-S14:ddsA 129 が示す半不稔の形質は、導入遺伝子の影響ではなく培養変異に起因していると推定される。

Ole18 プロモーターはイネ未熟種子においてトウモロコシユビキチンプロモーターと同等以上の強い活性を持ち、また CoQ が多く蓄積するアリュロン層 (=ぬか) で強い活性を示す(Qu and Takaiwa 2004)。それにも関わらず、Ole18-S14:ddsA イネ種子の CoQ10 含量値が S14:ddsA イネ種子の値と同程度に留まった原因としては、Ole18-S14:ddsA イネ未熟種子における *ddsA* 遺伝子の発現時期が挙げられるかも知れない。この点については 2 章でさらに考察する。

第 4 節では、PPT をコードする *coq2* 遺伝子と *ddsA* 遺伝子との同時発現により、*ddsA* 発現イネの種子の CoQ10 含量のさらなる増加を目指した。しかしながら、同時発現型の形質転換イネはコントロールの Ubi-S14:ddsA と同様の種子 CoQ10 含量を示し (Fig. 1-8)、*coq2* 遺伝子発現による CoQ10 含量の増加は見られなかった。また *coq2* 遺伝子の単独での発現がイネの CoQ 生合成に与える影響についても調べたが、*coq2*(単独) 発現イネと野性型の日本晴間で種子 CoQ9 含量に差違は見られなかった (Fig. 1-8)。これらの結果は、PPT(=COQ2)活性増強により CoQ 含量が増加するタバコ(Ohara et al. 2004)とは異なり、イネにおいては PPT が行うプレニル 2 リン酸の PHB への転移反応が CoQ 合成の律速ステップではないことを示唆している。

第2章 CoQ10 量の増加等がイネの生理・生態的特性に及ぼす影響

第1章で作出した CoQ10 強化イネは、CoQ10 強化米としての種子の利用の他、CoQ10 抽出原料としてのイネ各器官の利用が期待される。また、CoQ10 強化イネでは主な CoQ 種が CoQ9 から CoQ10 に改変され、種子においては総 CoQ 含量の増加も確認されていることから、人為的に CoQ 種や CoQ 含量を変化させたことがイネの生理・生育特性にどのような影響を与えるかに興味をもたれる。例えば、CoQ は強い抗酸化作用を持つことから、CoQ 含量が増加した植物において環境ストレス耐性の向上が期待される。そこで本章では、第1節で CoQ10 強化イネの各器官における CoQ10 含量について解析し、第2節で CoQ10 強化イネの生育及び収量特性、第3節では CoQ10 強化イネのストレス耐性について調べ、*ddsA* 遺伝子の発現及び CoQ 種や CoQ 含量の改変がイネの生理・生態的特性に与える影響について検討した。

第1章では S14:ddsA イネ、Ole18-S14:ddA イネ、Ubi-S14:ddsA イネの3種類の *ddsA* 遺伝子を発現する CoQ10 強化イネを作出したが、本章では、構成的に *ddsA* 遺伝子を発現するイネとして S14:ddsA イネ、種子特異的に *ddsA* 遺伝子を発現するイネとして Ole18-S14:ddsA イネを解析に用いた。

第1節 イネ各器官における *ddsA* 発現と CoQ10 含量との関係

CoQ は全ての組織や細胞に含まれるが、ヒトやラットにおいては、臓器によって重量当たりの CoQ 含量が異なる(Turunen et al. 2004)。植物の各部位における CoQ 含量については、食品としての観点からイネの玄米 (=種

子全体)、白米とぬか、及びコムギの種子全体、小麦粉 (=胚乳部分) と胚芽を比較した例がある(Kamei et al. 1986)。さらにイネについては、葉、茎、根、種子の CoQ 含量についての報告があるものの(Ohara et al. 2006)、情報が非常に限られている。

そこで本節では、野性型である日本晴と CoQ10 強化イネを用いてイネ各器官における CoQ 含量について解析し、野性型のイネにおける CoQ 含量の基本プロファイルを得るとともに、*ddsA* 遺伝子発現がイネの CoQ 含量等に与える影響について解析した。

材料及び方法

植物材料

イネ (品種: 日本晴) 及び第 1 章第 1 節において作出、選抜した S14:*ddsA* イネホモ系統 (3-12 及び 91-1) の自殖後代 (T_2 及び T_3 個体) を用いた。また第 1 章第 3 節において作出した Ole18-S14:*ddsA* イネの自殖後代 (T_1 個体) からホモ接合体 (Ole18-S14:*ddsA* 62-3) を選抜し、その自殖後代 (T_2 個体) を用いた。植物は芽出し後培養土を充填したポットに移植し、自然光の温室(27°C)で栽培した。完熟種子、受粉 20, 30, 40 日後の未熟種子、発芽 14 日後の根、及び茎葉を実験に用いた。葉及び茎のサンプリングは以下のように行った。上位葉: 発芽 14, 30, 60 日後及び出穂期 (発芽 80 日後) にそれぞれ最上位展開葉である第 3, 6, 10 葉及び止葉(第 12 葉)の葉身を採取、下位葉: 出穂期に第 9 葉の葉身を採取、茎: 出穂期の葉身および穂を除いた地上部全体 (=稈及び葉鞘) を採取。

CoQ 測定

種子全体（＝完熟玄米）及び受粉 20, 30, 40 日後の未熟種子はマルチビーズショッカー（安井器械）で 2000 rpm、7 秒で 5 回粉碎した。ぬか及び胚芽の測定には玄米を精米器（パーレスト、ケット科学研究所）で 40 秒精米し、回収したぬかと胚芽をふるいで分離後、ぬかはそのまま、胚芽は乳鉢と乳棒で粉碎して抽出に用いた。受精 5 及び 10 日後の未熟種子、根、葉、茎は乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で粉碎した。茎、発芽後 30, 60, 80 日後の上位葉、及び下位葉サンプルについては、サンプル全体を粉碎して均一化し一部(20-30 mg)を抽出に用いた。玄米、白米、ぬか、胚芽及び開花 20, 30, 40 日後の未熟種子の粉碎済みサンプルから、第 1 章第 2 節の材料及び方法に記載した新法により CoQ 抽出を行った。内部標準には 50 μ l の 0.22 mM ビタミン k_1 (Vk₁)を用いた。開花 5 及び 10 日後の未熟種子、根、葉、及び茎については、粉碎したサンプルを 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で懸濁後、50 μ l の 0.22 mM Vk₁ を添加し、CoQ を 3 ml の *n*-ヘキサンで 3 回抽出した。全てのサンプルについて、抽出物を蒸発乾固後に 1 ml のメタノール/アセトニトリル(1:1, v/v)に溶解し、抽出した CoQ を第 1 章第 2 節の材料及び方法に記載した条件で HPLC により分析した。種子（玄米）及び白米の分析においては、HPLC チャート上で CoQ9 ピークにオーバーラップするノイズピーク（CoQ9 約 0.2 μ g/g 相当）が存在した。そこで未熟種子を含む種子（玄米）及び白米の分析については、2 μ g/g を CoQ9 の検出限界とした。他のサンプルの分析ではノイズピークが見られなかったため、検出限界は設定しなかった。

ウェスタンブロット解析

形質転換イネの未熟種子（開花 5-30 日後）または根、茎、葉（葉身）を液体窒素中で乳鉢を用いて粉碎した。開花 40 日後の未熟種子は、マルチビーズショッカー（安井器械）を用いて 2000 rpm、7 秒で 5 回粉碎した。粉碎済みサンプルに未熟種子及び根は新鮮重 10 mg 当たり 80 μ l、茎及び葉は新鮮重 10 mg 当たり 160 μ l の抽出バッファーを加え、第 1 章第 1 節の材料及び方法に記載した方法で可溶性タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を 12.5%アクリルアミドゲルで分離後、イモビロンポリビニリデンジフルオリド膜（ミリポア）に転写した。タンパク質の検出には ECL プラスウェスタンブロッティング検出システム（アマシャムバイオサイエンス）を用いた。DdsA タンパク質に対する抗血清調製については第 1 章第 1 節の材料及び方法に記載している。

結果

イネ種子中の CoQ 分布について調べるため、CoQ9 と CoQ10 の含量を野生型である日本晴の玄米（種子全体）、ぬか、胚芽で測定した(Fig. 2-1A)。白米での CoQ9 及び CoQ10 の含量測定も行ったが、どちらも検出感度以下であった。日本晴種子では CoQ9 が主に蓄積しており、玄米の CoQ9 含量は $3.6 \pm 0.5 \text{ } \mu\text{g/g}$ であった。ぬか及び胚芽の CoQ9 含量はそれぞれ $19.0 \pm 1.3 \text{ } \mu\text{g/g}$ 及び $57.9 \pm 6.4 \text{ } \mu\text{g/g}$ であり、これらの値は玄米の値のそれぞれ 5 倍及び 16 倍であった(Fig. 2-1A)。白米の低い CoQ9 含量については第 1 節で記載しており、また、ぬかの高い CoQ9 含量については Kamei らにより報告されている(Kamei et al. 1986)。今回得られた結果から、ぬかに加え胚芽も高い CoQ9 含量を持つことが示された。次に 1g の玄米当たりのぬか及び胚芽に分布する CoQ9 量を推計した。一般的に、日本で食用として販売されている白米の白米/玄米重量比は 90-91%であり(Hagiwara 2001)、ここで分析したサンプルでは 90%であった。また日本晴の胚芽（=胚）/玄米重量比は約 3%であり(Matsushita et al. 2008)、今回分析したサンプルでは 2.9%であったことから、ぬか/玄米重量比は 7.1%と算出された。この重量比（白米：ぬか：胚芽=90:7.1:2.9）を適用すると、1g の玄米当たりのぬか及び胚芽に分布する CoQ9 量は $1.3 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{g}$ 及び $1.7 \pm 0.2 \text{ } \mu\text{g}$ と推計され(Fig. 2-1B)、その値は 1g の玄米に含まれる CoQ9 総含量のそれぞれ 37%及び 48%であった。このように、日本晴種子において、CoQ9 の 85%がぬか及び胚芽に蓄積することが明らかになった。

CoQ10 強化イネである S14:ddsA イネでも種子中の CoQ 分布について解析した。CoQ9 と CoQ10 の含量を 2 つのホモ系統(3-12 及び 91-1)の玄米、

ぬか及び胚芽で測定した(Fig. 2-1A)。どちらのホモ系統の種子でも CoQ10 が主に蓄積しており、これらのホモ系統の玄米の CoQ10 含量は S14:ddsA 3-12 で $11.0 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$ 、S14:ddsA 91-1 で $7.7 \pm 0.9 \mu\text{g/g}$ であった。S14:ddsA 3-12 の場合、ぬか及び胚芽の CoQ10 含量はそれぞれ $63.3 \pm 3.6 \mu\text{g/g}$ 及び $180.2 \pm 8.1 \mu\text{g/g}$ であり(Fig. 2-1A)、これらの値は当該系統の玄米の値のそれぞれ 6 倍及び 16 倍であった。また、S14:ddsA 91-1 のぬか及び胚芽の CoQ10 含量は当該系統の玄米の値のそれぞれ 7 倍及び 17 倍であった(Fig. 2-1A)。これらの結果は S14:ddsA イネのぬか及び胚芽が CoQ10 を高含有することを示している。次に S14:ddsA 系統の 1g の玄米中のぬか及び胚芽に分布する CoQ10 量を、日本晴と同じ方法で算出した。S14:ddsA 3-12 では、1g の玄米に含有される $11.0 \mu\text{g}$ の CoQ10 のうち、 $4.5 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ (41%) 及び $5.2 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ (48%)の CoQ10 がそれぞれぬか及び胚芽に分布すると推定され(Fig. 2-1B)、また S14:ddsA 91-1 では、1g の玄米に含有される $7.7 \mu\text{g}$ の CoQ10 のうち、 $4.0 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$ (52%)及び $3.7 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ (48%)の CoQ10 がそれぞれぬか及び胚芽に分布すると推定された(Fig. 2-1B)。このように、S14:ddsA では CoQ9 に代わって CoQ10 が主に蓄積するものの、日本晴と同様 CoQ がぬか及び胚芽に優先的に蓄積することが明らかになった。

次に種子における CoQ の蓄積パターンと *ddsA* 遺伝子発現との関係について調べるため、日本晴、S14:ddsA イネ及び Ole18-S14:ddsA イネの未熟種子において DdsA 蓄積量と CoQ 含量を経時的に解析した。S14:ddsA イネホモ系統(S14:ddsA 91-1)及び Ole18-S14:ddsA イネホモ系統(Ole18-S14:ddsA 62-3)の受粉後 5, 10, 20, 30, 40 日後の未熟種子からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットにより DdsA 蓄積量を調べた(Fig. 2-2A)。S14:ddsA イネの未熟種子においては受粉 5 日後で中程度の DdsA 蓄積が確認され、10 日

後には蓄積量が増加し、その後 40 日後まで同程度の蓄積がみられた。一方 Ole18-S14:ddsA イネの未熟種子においては、受粉 5 日後はごく少量しか DdsA の蓄積がみられず、受粉 10 日後以降は S14:ddsA の受粉 10 日後以降と同レベルの蓄積が確認された。次に日本晴及び S14:ddsA イネ、Ole18-S14:ddsA イネの受粉後 5, 10, 20, 30, 40 日後の未熟種子において CoQ 含量を測定した(Fig. 2-2B)。日本晴の未熟種子では、どの時期においても CoQ9 が優先的に蓄積していた。新鮮重当たりの CoQ9 含量は、受粉 5-20 日後までは 8-9 $\mu\text{g/g}$ 程度ではほぼ一定で、その後半減していた(Fig. 2-2B 左側)。一方種子 1 粒当たりの CoQ9 含量は、受粉 5 日後は $52.0 \pm 11.0 \text{ ng/seed}$ であるのに対し、受粉 20 日後には約 4 倍の $212.7 \pm 7.0 \text{ ng/seed}$ となり、その後半減していた(Fig. 2-2B 右側)。この結果から、イネ未熟種子においては、少なくとも受粉 20 日後頃まで CoQ 合成が行われていること、また種子に含まれる CoQ 量は受粉 20 日後頃に最大となることが明らかになった。前述した種子中の CoQ 分布の解析において、日本晴の（完熟）玄米 1 粒当たりの CoQ9 含量は $80.3 \pm 12.7 \text{ ng/seed}$ であり、受粉 20 日後の種子にはその 2.6 倍の CoQ9 が含まれていた。一方 S14:ddsA イネの未熟種子では、どの時期においても CoQ10 が優先的に蓄積していた。S14:ddsA イネ未熟種子の新鮮重当たりの CoQ10 含量は、受粉 5 日後は $7.3 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$ で、受粉 10 日後には $14.2 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$ と倍増し、その後受粉 30 日後まではほぼ一定で受粉 40 日後に減少した(Fig. 2-2B 左側)。種子 1 粒当たりの CoQ10 含量は、日本晴の CoQ9 含量と同様に、受粉 20 日後に最大 ($342.3 \pm 39.2 \text{ ng/seed}$) となり、その後減少していた(Fig. 2-2B 右側)。この結果から、S14:ddsA イネ未熟種子においても、野性型と同様に少なくとも受粉 20 日後頃まで CoQ 合成が行われており、また種子に含まれる CoQ10 量が受粉 20 日後頃に最大とな

ることが明らかになった。種子中の CoQ 分布の解析において、S14:ddsA イネの(完熟)玄米 1 粒当たりの CoQ10 含量は 146.4 ± 52.9 ng/seed であり、受粉 20 日後の種子にはその 2.3 倍の CoQ10 が含まれていた。Ole18-S14:ddsA イネの未熟種子では、S14:ddsA イネとは異なるパターンが得られた。Ole18-S14:ddsA イネ未熟種子では、受粉 5 日後には CoQ10 がほとんど蓄積しておらず、受粉 10 日後から CoQ10 の高蓄積が始まっていた。Ole18-S14:ddsA イネ未熟種子の新鮮重当たりの CoQ10 含量は、受粉 5 日後から 20 日後まで増加し、その後は $8-9$ $\mu\text{g/g}$ でほぼ一定であった。一方新鮮重当たりの CoQ9 含量は、全期間を通じて減少した(Fig. 2-2B 左側)。種子 1 粒当たりの CoQ10 含量は、受粉 5 日後から 30 日後 (201.9 ± 16.2 ng/seed) まで増加を続け、その後一定であった(Fig. 2-2B 右側)。

種子以外の器官での CoQ 蓄積と *ddsA* 遺伝子発現の関係について調べるため、日本晴と S14:ddsA イネ (ホモ系統 S14:ddsA 91-1) の根、茎、葉における DdsA 蓄積量と CoQ 含量について解析した。S14:ddsA イネの根、茎、葉(上位葉及び下位葉)では、解析した全ての器官で DdsA タンパク質が蓄積していた(Fig. 2-3A)。日本晴の根、茎、葉における CoQ 含量を測定したところ、どの器官でも CoQ9 が主に蓄積しており、その CoQ9 含量は解析を行ったサンプル間では $5-6$ $\mu\text{g/g}$ とほぼ一定であった(Fig. 2-3C)。一方 S14:ddsA イネにおいては、根、茎、葉全ての器官で CoQ10 が主に蓄積しており、その CoQ10 含量は $7-9$ $\mu\text{g/g}$ の範囲であった。S14:ddsA イネの根、茎、上位葉及び下位葉における CoQ9 含量と CoQ10 含量の合計値(総 CoQ 量)は、日本晴の同じ器官のそれぞれ 1.7 倍、1.5 倍、1.3 倍及び 1.6 倍であった。第 1 章第 1 節で述べたとおり、S14:ddsA イネの種子では日本晴の種子と比べ総 CoQ 量が 2 倍以上に増加しているが、今回の解析から、

S14:ddsA イネでは根、茎、葉など種子以外の器官でも総 CoQ 量が増加していることが確認された。次に各生育時期の葉における CoQ 含量と *ddsA* 遺伝子発現の関係について調べるため、同じイネ系統を用いて発芽後 14 日後から 80 日後 (=出穂期) の最上位展葉における DdsA 蓄積量と CoQ 含量について解析した。S14:ddsA イネでは解析した全ての時期の葉で DdsA タンパク質が蓄積していた(Fig. 2-3B)。日本晴の各時期の葉における CoQ 含量を測定したところ、どの時期でも CoQ9 が主に蓄積しており、その含量は発芽 14 日後には $6.5 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ であったが発芽 30 日後には半減し、その後増加して発芽 80 日後には 14 日後と同じレベル ($6.4 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$) に戻った(Fig. 2-3D)。S14:ddsA イネの葉ではどの時期にも CoQ10 が主に蓄積していた。日本晴の CoQ9 含量と同様、S14:ddsA イネ葉の CoQ10 含量は、発芽 14 日後に最大値($9.6 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$)を示して発芽 30 日後に半減し、その後増加して発芽 80 日後には 14 日後と同レベルに戻った。

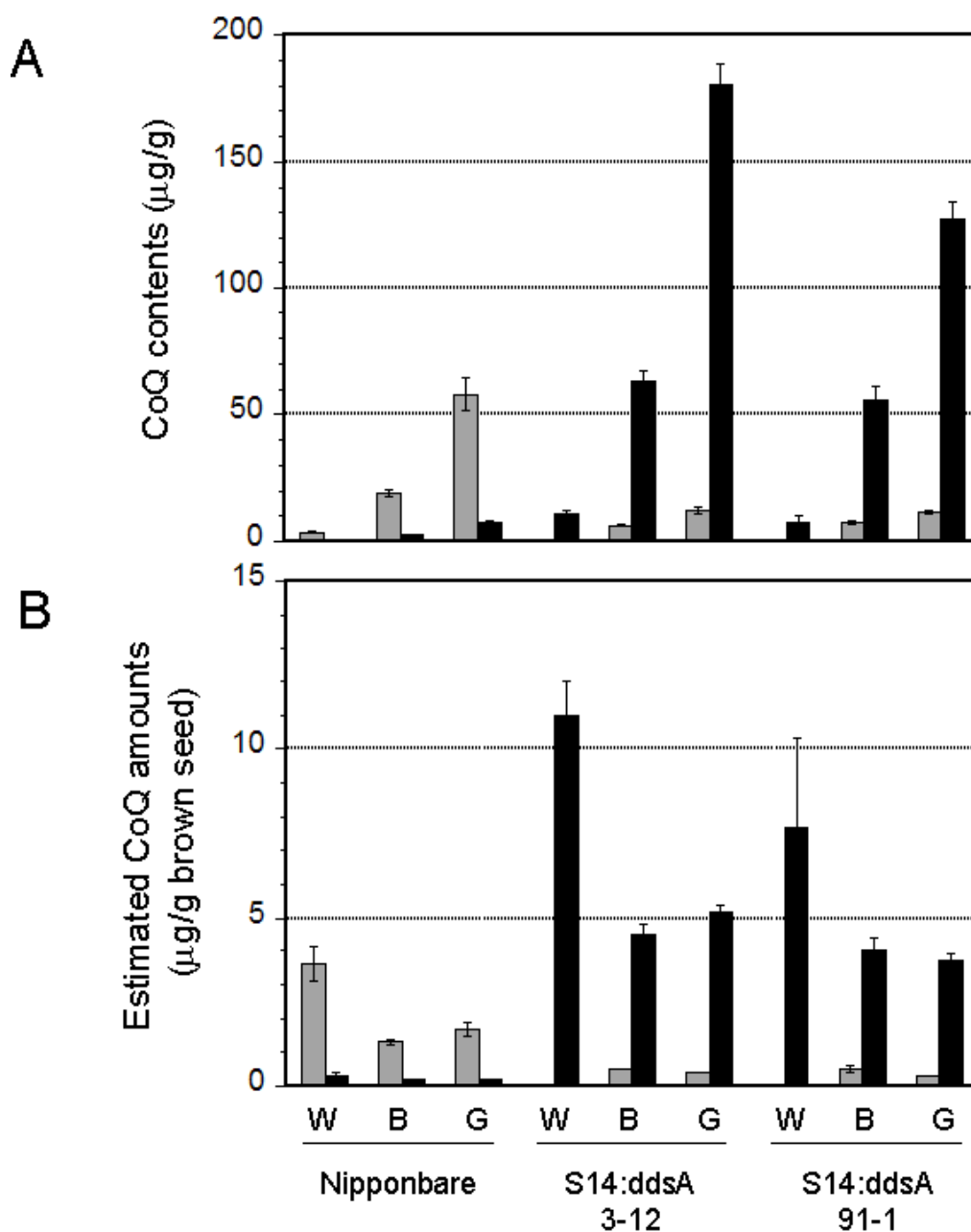


Figure 2-1. 種子中のCoQ分布

(A) 種子各部のCoQ含量。種子全体(W)、ぬか(B)及び胚芽(G)のCoQ9とCoQ10の含量を、野生型（日本晴）の種子及びS14:ddsA ホモ系統の種子（3-12系統T₃種子及び91-1系統T₂種子）で測定した。種子全体（＝玄米）については種子1粒からCoQを抽出し、ぬか及び胚芽については10-20 mgのサンプルからCoQを抽出した。8回（種子全体）または4回（ぬか及び胚芽）の測定の平均値と標準偏差を示す。グレーと黒のバーはそれぞれCoQ9含量及びCoQ10含量を表している。

(B) 玄米1g中の各部位に含まれるCoQ量。1 gの玄米当たりの、種子全体(W)、ぬか(B)及び胚芽(G)に含まれるCoQ9及びCoQ10 の量を各部位のCoQ含量より算出した。グレーと黒のバーはそれぞれCoQ9量及びCoQ10量を表している。

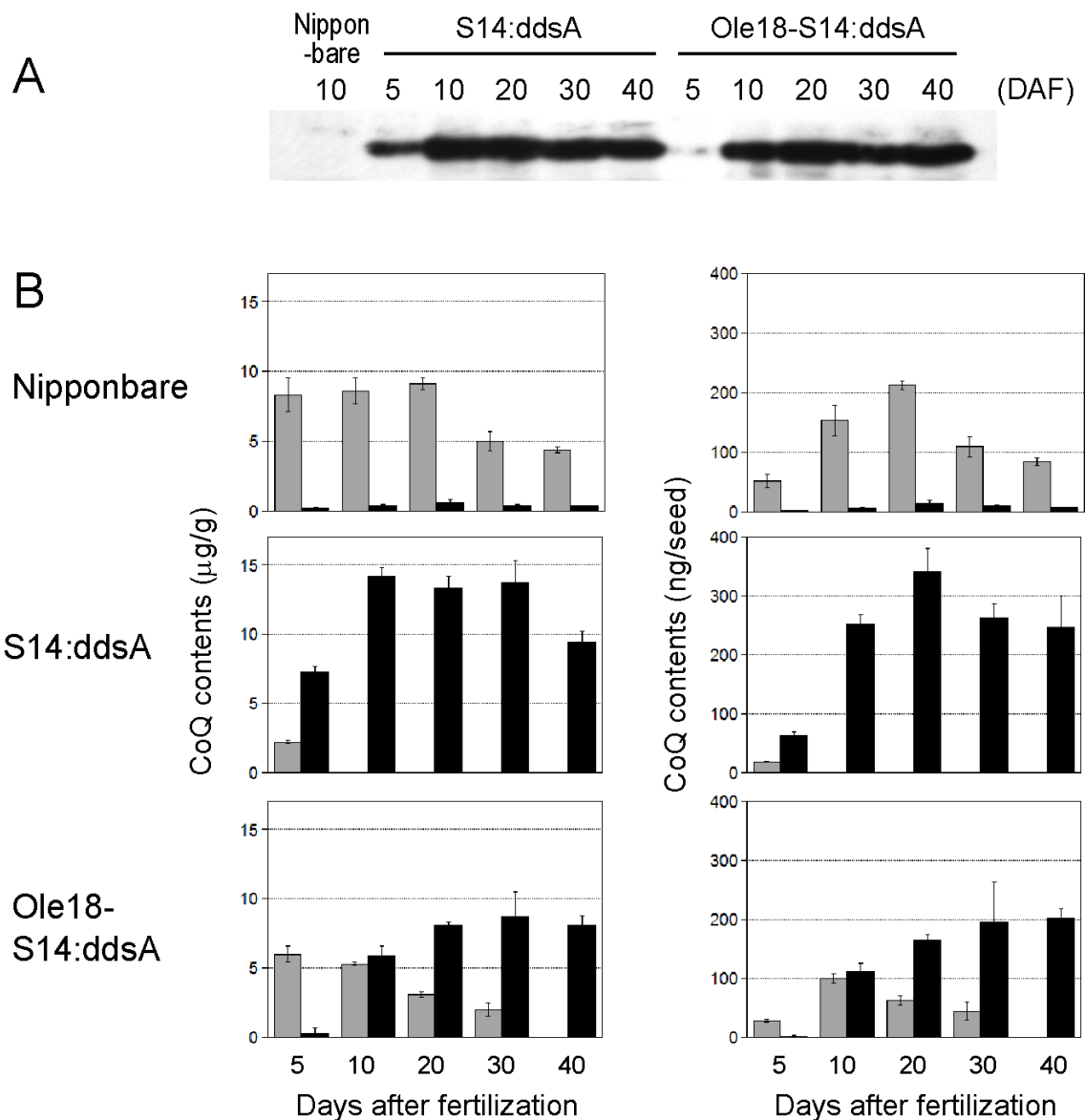


Figure 2-2. 未熟種子のDdsA蓄積量とCoQ含量
 野性型（日本晴）及びS14:ddsAとOle18-S14:ddsAのホモ系統(S14:ddsA 91-1及び
 Ole18-S14:ddsA 62-3)の未熟種子を受粉5-40日後に採取し、DdsAタンパク質の蓄積量
 とCoQ含量について解析した。(A) ウェスタンブロットによるDdsAタンパク質の蓄積
 量の解析。未熟種子より抽出した可溶性タンパク質を、抗DdsA抗体を用いて解析した。
 各レーンには未熟種子0.2 mg（新鮮重）相当量のタンパク質をロードした。DAF；受粉
 後日数。
 (B) 種子1g当たり（左列）及び種子1粒当たり（右列）のCoQ含量。種子1粒よりCoQを
 抽出した。各サンプル3粒の種子を解析し、平均値と標準偏差を示した。グレーと黒の
 バーはそれぞれCoQ9含量及びCoQ10含量を表している。

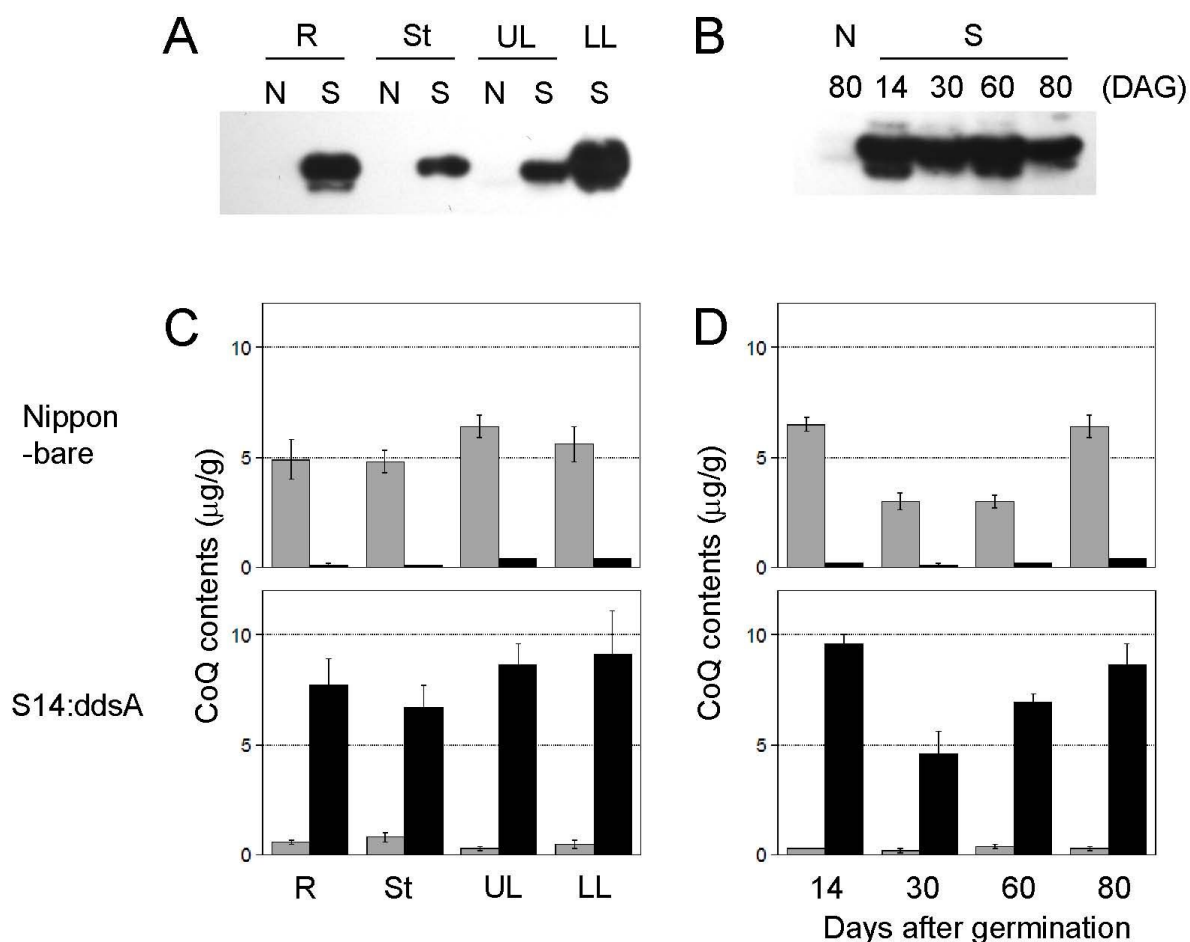


Figure 2-3. 根、茎、葉におけるDdsA蓄積量とCoQ含量

野性型（日本晴）及びS14:ddsAのホモ系統(S14:ddsA 91-1)から、発芽後14日後の根(R)、及び出穂期の茎(St)、上位葉(UL)、下位葉 (LL) または発芽後14-80日後の上位葉を採取し、DdsA蓄積量とCoQ含量について解析した。(A, B) ウェスタンブロットによるDdsAタンパク質の蓄積量の解析。各サンプルより抽出した可溶性タンパク質を、抗DdsA抗体を用いて解析した。各レーンにはサンプル0.2 mg（新鮮重）相当量のタンパク質をロードした。N；日本晴、S；S14:ddsA、DAG；発芽後日数。(C, D) CoQ含量の解析。サンプル全体を粉砕により均一化後、20-50 mgを分取しCoQを抽出した。各部位3個体から採取したサンプルを解析し、平均値と標準偏差を示した。グレーと黒のバーはそれぞれCoQ9含量及びCoQ10含量を表している。

第 2 節 CoQ10 量の増加がイネの生育及び収量に及ぼす影響

植物で有用物質を生産する最大の利点として、大量生産の容易さとコストの低さがあげられるが、効率的な栽培には植物の生育特性及び収量特性の把握が必要となる。構成的に *ddsA* 遺伝子を発現する S14:*ddsA* イネは稔性があり、予備的な観察では野性型である日本晴と同様の表現形を示していた。本章第 1 節で示したとおり、S14:*ddsA* イネでは種子に加え根、茎、葉を含む各器官で CoQ10 が高蓄積しており、また、野生型と比べ総 CoQ 量も増加している。本節では、CoQ 種や CoQ 含量の変化がイネの生育に与える影響を評価するため、S14:*ddsA* イネの生育特性及び収量特性について日本晴と詳細な比較を行った。調査は 2008 年と 2010 年の 2 回行った。

材料及び方法

植物材料

イネ(品種:日本晴)、及び第 1 章第 1 節において作出、選抜した S14:*ddsA* イネホモ系統(3-12 及び 91-1)の自殖後代(T_3 個体)を用いた。

栽培条件

植物は催芽後 1/5000a ワグネルポットに 1 本植えし、自然光の網室で栽培した。圃場の土に、2008 年はチッソ(N)、リン酸(P)、カリウム(K)各 0.28 g/ポット、2010 年は 2008 年の 5 倍量の N, P, K 各 1.4 g/ポットの化成肥料を施用した。2008 年は当該地の晩植期(6 月下旬)より遅い 7 月中旬、2010 年は普通栽培期である 5 月下旬に移植を行い、常時湛水条件で栽培した。

2008 年は追肥を行わなかった。2010 年は 7 月下旬に N, P, K 各 0.57 g/ポットの追肥を行った。

結果

生育調査結果を Table 2-1 に示す。2008 年は 2010 年より 7 週間遅く移植を行ったため、出穂日が全体的に約 3 週間遅くなった。また各調査年ごとで比較すると、S14:ddsA イネの出穂日は日本晴より 2008 年で 1-3 日、2010 年で 7-9 日遅かった。S14:ddsA イネの稈長は日本晴より 10 cm 程短い傾向があり、穂長及び穂重は日本晴と同程度だった。ただし 2010 年は S14:ddsA イネ、日本晴共に後述の稔実・登熟不良により穂重が軽くなった。S14:ddsA イネの穂数は 2008 年の調査では日本晴の 50-60%、2010 年の調査では日本晴の 75-85%であった。次に収量調査結果を Table 2-2 に示す。2010 年は、おそらくは高温障害により、全サンプルで稔実率が 15-40%と著しく低下し完熟種子がほとんど得られなかった。そこで 2008 年の結果のみを示した。1 穂粒数、登熟歩合及び玄米重については、S14:ddsA イネと日本晴で有意な差はみられなかった。S14:ddsA イネの玄米収量は日本晴の 40-50%であり、日本晴より有意に低かった。

Table 2-1. 生育調査結果

調査年	品種・系統		出穂日	稈長 (cm)	穂数	穂長 (cm)	穂重 (g)
2008年	S14:ddsA	3-12	9/6±0.0**	65.0±5.8**	5.5±2.1	16.7±1.1	0.9±0.2
		91-1	9/4±0.6*	66.5±4.8**	4.3±1.3**	17.8±1.1*	1.2±0.2
	日本晴		9/3±0.6	77.5±8.3	8.8±0.5	15.5±1.5	1.1±0.1
2010年	S14:ddsA	3-12	8/19±2.9**	57.0±6.7*	9.0±2.2	15.8±1.3	0.3±0.1**
		91-1	8/17±1.9**	61.0±6.3	10.0±2.9	17.2±0.3	0.4±0.0**
	日本晴		8/10±1.0	69.3±3.3	11.8±3.9	15.6±1.3	0.5±0.1

稈長、穂数は株あたりの値、穂長及び穂重は1穂当たりの値である。

*及び**はそれぞれ日本晴に対する有意差 $P<0.05$ 及び $P<0.01$ （スチューデントの t 検定）を示す。

Table 2-2. 収量調査結果

品種・系統		1 穂粒数	登熟歩合 (%)	玄米千粒重 (g)	玄米収量 (g/株)
S14:ddsA	3-12	34.3±10.0	82.3±7.9	20.3±1.3*	3.0±1.8*
	91-1	41.6±8.1	79.8±4.5*	21.4±0.8	2.8±0.9**
日本晴		39.3±3.1	88.9±0.7	22.4±0.6	6.3±0.5

*及び**はそれぞれ日本晴に対する有意差 $P<0.05$ 及び $P<0.01$ （スチューデントの t 検定）を示す。

第3節 CoQ10 量の増加がイネの耐塩性に及ぼす影響

植物が様々な環境ストレスで損傷を受ける際、ストレスにより過剰の活性酸素種が生じ、損傷の主要な原因となっていると考えられており、グルタチオンペルオキシダーゼやスーパーオキシドジスムターゼ等の抗酸化酵素の遺伝子を過剰発現する植物では、低温や塩等の環境ストレスへの耐性が向上することが知られている(Zhu 2001)。CoQ は強い抗酸化作用を持つことから、CoQ 含量が増加した植物においても環境ストレス耐性の向つことから、CoQ 含量が増加した植物においても環境ストレス耐性の向上が期待される。例えば、*coq2* 遺伝子の発現により葉の CoQ 含量が野性型の 3-6 倍に増加した形質転換タバコにおいて、酸化ストレスに加え塩ストレス耐性が向上することが報告されている(Ohara et al. 2004)。本章第1節で述べたとおり、構成的に *ddsA* 遺伝子を発現する CoQ10 強化イネ(S14:ddsA イネ)では、種子に加え根、茎、葉を含む各器官で総 CoQ 量が日本晴に対し 1.3 ~1.7 倍に増加していた。そこで本節では、S14:ddsA イネの塩ストレス耐性について野性型である日本晴との比較を行った。

材料及び方法

植物材料

イネ(品種:日本晴)、及び第1章第1節において作出、選抜した S14:ddsA イネホモ系統(3-12 及び 91-1)の自殖後代(T₂ 個体)を用いた。

塩処理

発芽後蒸留水中で1週間育苗したイネ幼植物を、1/4 濃度の吉田氏液 (Yoshida et al. 1976) 中で3日間、その後1/2 濃度の吉田氏液で4日間水耕栽培した。その後、0mM または 50 mM の NaCl を含む 1/2 濃度の吉田氏液で2週間処理 (0mM 及び 50 mM NaCl 処理)、あるいは 100mM NaCl を含む 1/2 濃度の吉田氏液で1週間処理した後に NaCl を含まない 1/2 濃度の吉田氏液に移し1週間回復処理 (100mM NaCl 処理) した。育苗及び NaCl 処理は自然光の網室で行った。

CoQ 測定

イネ幼植物の地上部を乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で粉碎し、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で懸濁後 50 μ l の 0.22 mM のビタミン k_1 を添加した。CoQ を 3 ml の *n*-ヘキサンで3回抽出し、抽出物を蒸発乾固後に 1 ml のメタノール/アセトニトリル(1:1, v/v)に溶解した。抽出した CoQ は第1章第2節の材料及び方法に記載した条件で HPLC により分析した。

結果

野性型である日本晴と S14:ddsA イネのホモ系統(3-12 及び 91-1)について、0 mM, 50 mM または 100m NaCl 処理を行った幼植物の地上部乾物重、根乾物重及び枯葉数を比較した(Fig. 2-4A-C)。日本晴では、NaCl 濃度に依存して地上部乾物重及び根乾物重の減少及び枯葉数の増加がみられた。100mM NaCl 処理区では、地上部乾物重及び根乾物重はそれぞれ 0mM NaCl 処理区の値の 45.9%及び 48.1%に減少し、一方枯葉数は 0mM NaCl 処理区の 0 枚に対し 100mM NaCl 処理区では 3 ± 0.5 枚に増加した(Fig. 2-4A-C)。S14:ddsA イネにおいても日本晴と同様の結果が得られた。100mM NaCl 処理区においては、地上部乾物重及び根乾物重は 0mM NaCl 処理区の値のそれぞれ 41.7-49.4%及び 45.4-47.3%に減少し、また枯葉数は 0mM NaCl 理区の 0.1-0.4 枚に対し 100mM NaCl 処理区では 3.3-3.5 枚に増加した(Fig. 2-4A-C)。また新鮮重と乾物重より各サンプルの水分含量を算出したところ、全処理区、全系統で地上部では 81.3-84.4%、根では 89.6-90.3%とほぼ一定の値を示した。このように、日本晴と S14:ddsA イネで塩ストレス耐性に差はみられなかった。

塩処理終了後の地上部について、新鮮重当たりの CoQ 含量を測定した。全処理区において日本晴では CoQ9、2 つの S14:ddsA イネ系統では CoQ10 が主に蓄積していた。また全処理区を通じて、日本晴地上部の CoQ9 含量は 5-6 μ g/g でほぼ一定、S14:ddsA 3-12 イネ地上部の CoQ10 含量は 8 μ g/g でほぼ一定であった(Fig. 2-4D)。S14:ddsA 91-1 イネ地上部については、50 mM NaCl 処理区で他の処理区 (7-8 μ g/g) の値の 1.7 倍の CoQ10 含量 (12.2 ± 1.3 μ g/g)を示した。0mM, 50 mM 及び 100mM の NaCl 処理区における S14:ddsA

イネ地上部の総 CoQ 量は、同じ処理を行った日本晴イネ地上部のそれぞれ 1.4-1.5 倍、1.4-2.0 倍、及び 1.5 倍であった。

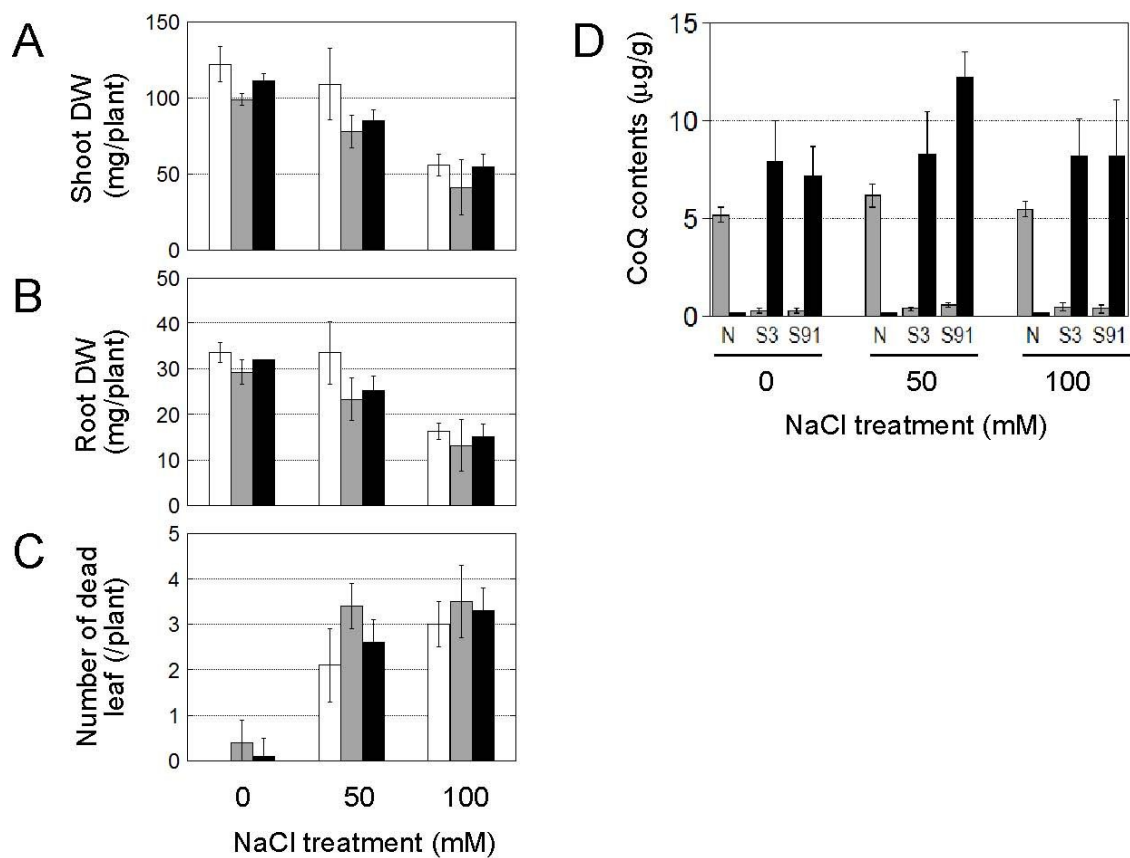


Figure 2-4. S14:ddsA イネの耐塩性の解析

野性型である日本晴とS14:ddsA イネのホモ系統 (S14:ddsA 3-12及びS14:ddsA 91-1)について、塩処理終了時の地上部乾物重(A)、根乾物重(B)、枯葉数(C)、及び地上部のCoQ含量(新鮮重当たり ; D)を測定した。(A)-(C)において、白いバーは日本晴、グレーと黒のバーはそれぞれS14:ddsA 3-12及びS14:ddsA 91-1のデータを表している。(A)と(B)は4個体、(C)は8個体の平均値と標準偏差を示している。(D)においては、グレーと黒のバーはそれぞれCoQ9含量及びCoQ10含量を表し、またN、S3、S91はそれぞれ日本晴、S14:ddsA 3-12、及びS14:ddsA 91-1を表す。4個体の平均値と標準偏差を示している。

考察

本章第 1 節では、野性型である日本晴及び CoQ10 強化イネ(S14:ddsA イネ)について、各器官における CoQ 含量を解析した。その結果、以下の点が多明らかになった。1)日本晴及び CoQ10 強化イネどちらも、CoQ は種子中のぬか及び胚芽に主に蓄積する(Fig. 2-1)、2) 日本晴及び CoQ10 強化イネどちらも、未熟種子 1 粒当たりに含まれる CoQ 量は受粉 20 日後頃に最大となり、その後減少する(Fig. 2-2B)、3) CoQ10 強化イネでは根、茎、葉においても CoQ10 が蓄積しており、これらの器官における総 CoQ 量は日本晴の対応する器官の値の 1.3-1.7 倍に増加している(Fig. 2-3C)。これらの結果から、S14:ddsA イネは *ddsA* を構成的に発現するにもかかわらず、野性型とほぼ同じ CoQ 分布および CoQ 増減パターンを持つことが示された。第 1 章では、イネにおいて DdsA が行うプレニル 2 リン酸の合成反応が CoQ 合成の律速ステップとなっていると考察したが、ここで得られた結果からは、イネにおける CoQ 合成の律速ステップは他にもあることが強く示唆された。また上記 1)-3)の情報は、CoQ10 強化イネの改良や、食用及び CoQ10 の抽出用素材としての CoQ10 強化イネの最適な利用法を検討する際の基礎データとして非常に有用である。例えば、2)の結果からは CoQ10 の抽出材料とする場合、受粉 20 日後頃が収穫適期であることが示され、1)の結果からは種子 CoQ10 含量のさらなる増加には胚乳での生産の必要性が示唆された。

本章第 1 節では、Ole18-S14:ddsA イネ未熟種子の CoQ 含量についても解析した。Ole18-S14:ddsA イネで *ddsA* 遺伝子発現に用いている Ole18 プロモーターは、受粉 12-17 日後のイネ未熟種子において胚及びアリューロン層

に限定的な強い活性を持つことが確認されているが(Qu and Takaiwa 2004)、Ole18-S14:ddsA イネの受粉 20 日後の未熟種子では CoQ10 が CoQ9 の 2 倍以上蓄積し、この時点で蓄積する主な CoQ 種となっていた(Fig. 2-2B)。この結果から、受粉 20 日後の未熟種子における CoQ 合成が、完熟種子での CoQ 蓄積部位と同じ胚及びアリューロン層 (=ぬか) で主に行われていることが示唆された。Ole18 プロモーターはまた、受粉 7 日後のイネ未熟種子においては活性が弱いことが確認されており(Qu and Takaiwa 2004)、Ole18-S14:ddsA イネにおいても受粉 5 日後では DdsA タンパク質の蓄積がほとんどみられず、CoQ10 の蓄積も日本晴並みのレベルであった (Fig. 2-2A, B)。Ole18-S14:ddsA イネ各個体の完熟種子の CoQ10 含量が、最大でも S14:ddsA イネ完熟種子の CoQ10 含量と同等以下であったことは第 1 章で述べたが、未熟種子における *ddsA* 遺伝子発現が Ole18-S14:ddsA イネでは S14:ddsA イネより遅れて始まることがその一因と考えられた。

本章第 2 節では、CoQ10 強化イネ(S14:ddsA イネ)と日本晴について生育調査及び収量調査を行った。S14:ddsA イネは野生型である日本晴より出穂が遅く、短稈の傾向が見られた。また S14:ddsA イネの穂数は、2008 年の調査では日本晴の 50%程度であり、2010 年の調査では日本晴の 80%程度であった(Table 2-1)。2010 年は普通期、2008 年は晩植期より 1 ヶ月遅い時期に栽培を行った。2008 年は CoQ10 強化イネ、日本晴共に 2010 年より穂数が減少しており、両調査年の生育時期の差が S14:ddsA イネで穂数により強く影響したと考えられる。2008 年に行った収量調査において、S14:ddsA イネの株当たりの玄米収量は日本晴の約 1/2 であった (Table 2-2)。収量構成要素である穂数、1 穂粒数、登熟歩合、玄米千粒重のうち、穂数以外は S14:ddsA イネと日本晴で有意な差がみられなかったことから(Table 2-2)、

穂数減少が S14:ddsA イネの低収の主な原因であると考えられた。2008 年の生育調査で行った普通期の栽培では S14:ddsA イネでも日本晴の 80%程度の穂数が得られていることから、適期の栽培を行えば S14:ddsA イネでも日本晴の 80%程度の収量が得られると推定された。出芽酵母において、ジーンターゲットイングにより CoQ5-CoQ10 を主に生産する形質転換酵母株を作出し増殖速度を比較したところ、各株間に大きな差はないものの、内生の CoQ6 を生産する株が最も速い増殖を示すことが報告されている (Okada et al. 1998a)。S14:ddsA イネも上記の形質転換酵母株と同様、イネ本来の CoQ9 がほとんど蓄積せずほぼ CoQ10 のみが蓄積している。そのために S14:ddsA イネは穂数減少等、野生型より生育がやや悪くなったと推定される。

2010 年の収量調査においては、S14:ddsA イネ、日本晴共に稔実率が著しく低下した。2010 年の開花期 (8/13-9/2) における当該地の平均最高気温は 35℃と、2008 年及び 2009 年の同時期の平均最高気温より 6℃高く (農業環境技術研究所 気象データより ; <http://niaesaws.ac.affrc.go.jp/weatherdata.htm>)、また 2010 年の開花期には、網室内の最高気温は 39℃に達した。Matsui らは、日本晴に対し開花期 5 日間の昼温 (8 時間) について 37.5℃または 40℃の処理を行うと、稔実率がそれぞれ 85.3%または 35.0%に低下することを報告しており (Matsui 2009)、2010 年の調査においては高温により稔実率が低下したと考えられる。

coq2 遺伝子を発現するタバコにおいては、葉の CoQ 含量が野性型の 3-6 倍に増加すると共に塩ストレス耐性が向上していた (Ohara et al. 2004)。そこで本章第 2 節では、構成的に *ddsA* 遺伝子を発現する CoQ10 強化イネである S14:ddsA イネの塩ストレス耐性について解析した。その結果、*coq2*

発現タバコとは異なり、CoQ10 強化イネの塩ストレス耐性は野生型と同程度であった。その理由の一つとして、処理を行った CoQ10 強化イネ地上部の総 CoQ 量は、同じ処理を行った日本晴イネ地上部の 1.5 倍程度と *coq2* 発現タバコに比べて低かったため、CoQ 量増加による耐塩性増強効果が得られなかったと推定された。また蓄積する CoQ 種の違いによる影響も考えられる。*coq2* 発現タバコでは内生と同じ CoQ10 の蓄積量が増加していたのに対し、CoQ10 強化イネでは内生 (CoQ9) とは異なる CoQ10 が主に蓄積し、CoQ9 の蓄積量は野生型の数分の 1 量に減少していた (Fig. 2-4D)。生育調査についての考察でも述べたが、出芽酵母において、本来の CoQ6 以外を生産する形質転換酵母株は CoQ6 生産株よりも増殖速度が低下することが報告されている (Okada et al. 1998a)。CoQ10 強化イネでは CoQ 総量は野生型より増加しているものの、大部分が内生と異なる CoQ 種であったために耐塩性増強効果が得られなかったと考えられる。

第3章 さまざまなイネ品種・系統を利用した CoQ10 強化イネの作出

第1章第3節及び第4節では、日本晴を宿主品種として用い、これに導入する遺伝子コンストラクトを改良することにより、CoQ10 強化イネの CoQ10 含量増加の可能性を探った。これに対し本章では、巨大胚品種やデンプン合成変異系統といった、日本晴より種子の CoQ 含量が高いと想定される品種や系統を用いて CoQ10 強化イネを作出することにより、形質転換イネ種子のさらなる CoQ10 含量増加を試みた。

第1節巨大胚系統を利用した CoQ10 強化イネの作出

第2章第1節で述べたように、イネ種子の CoQ は野生型及び CoQ10 強化イネ (S14:ddsA イネ) いずれにおいても主にぬか及び胚芽部分に蓄積する。この結果から、大きな胚芽を持つイネ系統を用いて CoQ10 強化イネを作出することにより、形質転換イネ種子の CoQ10 含量が増加することが示唆された。そこで本節では、通常の 2-3 倍の大きさの胚芽を持つ巨大胚系統を用いて CoQ10 強化イネを作出し、種子 CoQ10 含量の増加を目指した。

材料及び方法

植物材料

材料として、イネ品種はいいぶき (Matsushita et al. 2008) 及び育成系統 (中系特 70 号、以下特 70) の 2 種類のイネ巨大胚系統を用いた。特 70 は巨大胚品種であるはいみのり (Maeda et al. 2001) と小粒を特徴とする育成系統で

ある中国 152 の交配により育成された (S. Iida、私信)。また、通常サイズの胚を持つ品種である日本晴を対照として用いた。日本晴型の S14:ddsA イネ (N-S14:ddsA イネ) の作出については第 1 章第 1 節で記述しており (第 1 章では S14:ddsA イネと表記)、本節では T₀ 個体及び T₁ 種子を用いた。植物は催芽後培養土を充填したポットに移植し、自然光の温室(27°C)で栽培した。胚芽重量の測定は、玄米を精米器 (パーレスト、ケット科学研究所) で 40 秒精米し、回収したぬかと胚芽の混合物より胚芽をふるいで分離して行った。

プラスミド構築

第 1 章第 3 節で作出した Ubi-S14:ddsA イネにおいては、種子の CoQ10 含量値が S14:ddsA イネの値の最大 1.3 倍に増加したが、*ddsA* 遺伝子導入個体中 10%以下でしか DdsA タンパク質が蓄積しないという問題があった。一方、第 1 章第 4 節で構築した ER:coq2-ddsA コンストラクトは Ubi-S14:ddsA 発現カセットを含み、日本晴に導入した際に DdsA 蓄積個体が問題なく得られ、また形質転換イネ種子の CoQ10 含量は Ubi-S14:ddsA イネと同程度に増加した。そこで本節におけるはいいぶきの形質転換には、ER:coq2-ddsA コンストラクトをベースに、選抜マーカーを *mALS* 遺伝子からより選抜効率の良い *HPT* 遺伝子に変更した ER:coq2-ddsA-HPT を用いた。ER:coq2-ddsA-HPT の構築は、Multisite Gateway システム (インビトロジェン) を利用して行った。第 1 章第 4 節で作成したイネユビキチンプロモーター、*S14:ddsA* 遺伝子、10 kDa プロラミンターミネーターから成る Ubi-S14:ddsA 発現カセットを含むエントリーベクターと、35SCaMV プロモーター、*ER:coq2* 遺伝子、10 kDa プロラミンターミネーターから成る

ER:coq2 発現カセットを含むエントリーベクターを、LR clonase Plus を用いた LR クロナーゼ反応により HPT 発現カセットを含むデスティネーションバイナリーベクター 35S:HPT-24GW (Wakasa et al. 2006) に導入した。

植物の形質転換と栽培

第 1 章第 1 節において構築した S14:ddsA コンストラクト及び ER:coq2-ddsA-HPT コンストラクトをエレクトロポレーションによりアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 株に導入した。アグロバクテリウムを介したイネの形質転換を、Toki ら (1997) の方法に次の改変を加えて行った; 選抜と再分化のステップに使用する培地を、Fukuoka らの報告 (2000) に記載されているものに変更した。はいいぶきには S14:ddsA コンストラクト及び ER:coq2-ddsA-HPT コンストラクトを、特 70 には S14:ddsA コンストラクトを導入した。形質転換植物を 50 mg/l のハイグロマイシンを含む培地上で選抜した。S14:ddsA コンストラクトの導入の際は、450 個のはいいぶきカルス、1400 個の特 70 カルスを選抜し、はいいぶき 6 個、特 70 については 5 個の再分化個体を得た。また ER:coq2-ddsA-HPT コンストラクトの導入の際は、600 個のはいいぶきカルスを選抜し、3 個の再分化個体を得た。再分化個体について第 1 章第 3 節の材料及び方法に記載した条件で PCR 増幅によりゲノムへの *ddsA* 遺伝子の挿入を確認したところ、S14:ddsA コンストラクトについては、はいいぶき 5 個体及び特 70 各 5 個体、ER:coq2-ddsA-HPT コンストラクトについては、はいいぶき 3 個体の *ddsA* 遺伝子挿入個体を得られた (データ不掲載)。形質転換初代 (T_0 個体) を培養土を充填したポットに移植し、自然光の温室 (27°C) で栽培した。 T_0 個体及び自殖種子 (T_1) を実験に用いた。

ウェスタンブロット解析

形質転換イネの葉または完熟種子から、葉は10 mg当たり80 μ l、完熟種子は10 mg当たり50 μ lの抽出バッファーを用いて第1章第1節の材料及び方法に記載した方法により可溶性タンパク質を抽出し、12.5%アクリルアミドゲルで分離後、イモビロンポリビニリデンジフルオリド膜（ミリポア）に転写した。タンパク質の検出にはECLプラスウェスタンブロッティング検出システム（アマシャムバイオサイエンス）を用いた。DdsAタンパク質に対する抗血清調製については第1章第1節の材料及び方法で記載している。

CoQ 測定

CoQ 抽出は、第1章第2節の材料及び方法に記載した新法で行い、また抽出した CoQ は第1章第2節の材料及び方法に記載した条件で HPLC により分析した。CoQ9 は 2 μ g/g を検出限界とした。

結果

2種の巨大胚系統であるはいいぶきと中系特70号(特70)及び日本晴の玄米を Fig. 3-1A に示す。はいいぶき及び特70の胚芽/玄米重量比はそれぞれ6.9%及び9.5%で、その値は日本晴(2.9%)の2~3倍であった。特70はいいぶきと同程度の巨大な胚を持つが(Fig. 3-1A)、玄米重は日本晴やはいいぶきの55-57%である(Fig. 3-1B)ため、胚芽/玄米重量比がはいいぶきのそれより大きくなっている。はいいぶきと特70の種子CoQ9含量は日本晴のそれぞれ1.9倍及び2.8倍であり(Fig. 3-1C)、これら巨大胚系統の種子にCoQ9が高含有されていることが確認された。

アグロバクテリウムを介した形質転換により、S14:ddsA コンストラクト(Fig. 3-2A; 第1章第1節で構築)をはいいぶき及び特70へ導入した。その結果、5個体のはいいぶき型のS14:ddsA (Hi-S14:ddsA)形質転換初代(T₀)植物及び5個体の特70型のS14:ddsA (T70-S14:ddsA) T₀植物が得られた。両系統の形質転換効率(*ddsA* 遺伝子が導入された再分化個体数/選抜カルス数)は、はいいぶきで1.3%、特70で0.4%であった。S14:ddsA コンストラクトにおいては、*ddsA* 遺伝子発現に構成的なCaMV35Sプロモーターを用いていることから、葉におけるDdsAタンパク質の蓄積を調査した。その結果、Hi-S14:ddsA イネ2個体及びT70-S14:ddsA イネ2個体において、DdsA タンパク質の蓄積が確認された(Fig. 3-2B)。Hi-S14:ddsA イネ及びT70-S14:ddsA イネはいずれも稔性があり、野性型同様の表現型を示した。

DdsA タンパク質を蓄積するHi-S14:ddsA イネ及びT70-S14:ddsA イネ全個体について、自家受粉種子(T₁種子)のCoQ含量測定を行い、第1章1節で作出した日本晴型のN-S14:ddsA イネのT₁種子におけるCoQ含量と比

較した (Fig. 3-2C)。N-S14:ddsA イネについては、第 1 章第 3 節の Fig. 1-5 から、CoQ10 を高含有する上位 2 個体のデータを引用した。PCR 解析により種子 1 粒毎に *ddsA* 遺伝子の有無を確認し(データ不掲載)、*ddsA* 遺伝子を保持する種子を CoQ 含量測定に用いた。全ての *ddsA* ポジティブの T₁ 種子において、CoQ10 が優先的に蓄積していた。第 1 章第 3 節で述べた通り、N-S14:ddsA イネでは、N-S14:ddsA 73 が最も高い種子 CoQ10 含量を示し、その値は $12.2 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ であった。これに対し Hi-S14:ddsA イネでは Hi-S14:ddsA 5、T70-S14:ddsA イネでは T70-S14:ddsA 1 が最も高い種子 CoQ10 含量を示し、それぞれ $16.8 \pm 4.5 \mu\text{g/g}$ 及び $22.1 \pm 8.3 \mu\text{g/g}$ であった (Fig. 3-2C)。このように、Hi-S14:ddsA イネ及び T70-S14:ddsA イネの種子 CoQ10 含量は、最大で N-S14:ddsA イネの値のそれぞれ 1.4 倍または 1.8 倍であり、巨大胚系統の利用により、種子 CoQ10 含量の増加が可能であることが示された。

はいいぶきについては、Ubi-S14:ddsA 発現カセットの導入により種子 CoQ10 含量のさらなる増加を試みた。第 1 章第 4 節で構築した ER:coq2-ddsA コンストラクトをベースに、選抜マーカーを *mALS* 遺伝子からより選抜効率の良い *HPT* 遺伝子に変更した ER:coq2-ddsA-HPT を構築し (Fig. 3-2A)、アグロバクテリウムを介した形質転換を行った。その結果、3 個体の *ddsA* 遺伝子導入個体 (Hi-ER:coq2-ddsA イネ、T₀ 個体) が得られた。これらの形質転換イネには全て *coq2* 遺伝子も導入されていた (PCR 増幅により確認、データ不掲載)。ウェスタンブロットにより Hi-ER:coq2-ddsA イネの自家受粉種子 (T₁ 種子) における DdsA タンパク質蓄積について解析した。PCR 解析により種子 1 粒毎に *ddsA* 遺伝子の有無を確認し(データ不掲載)、*ddsA* 遺伝子を保持する種子からタンパク質を抽出し解析に用いた。

その結果、全ての T_0 個体由来の種子で DdsA タンパク質の蓄積が確認された(Fig. 3-2B)。Hi-ER:coq2-ddsA イネは稔性があり、野性型同様の表現型を示した。

Hi-ER:coq2-ddsA イネの T_1 種子について CoQ 含量を測定し、Hi-S14:ddsA 及び N-ER:coq2-ddsA イネの T_1 種子の CoQ 含量と比較した (Fig. 3-2C)。N-ER:coq2-ddsA イネについては、第 1 章第 4 節の Fig. 1-8 から、CoQ10 を高含有する上位 2 個体のデータを引用した。PCR 解析により種子 1 粒毎に *ddsA* 遺伝子の有無を確認し(データ不掲載)、*ddsA* 遺伝子を保持する種子を CoQ 含量測定に用いた。全ての *ddsA* ポジティブの T_1 種子において、CoQ10 が優先的に蓄積していた。Hi-ER:coq2-ddsA イネでは Hi-ER:coq2-ddsA 3 が最も高い種子 CoQ10 含量を示したが、その値は $15.9 \pm 3.8 \text{ } \mu\text{g/g}$ であり(Fig. 3-2C)、Hi-S14:ddsA イネ及び N-ER:coq2-ddsA イネ種子の最大値と同程度であった。このように、今回得られた 3 個体の Hi-ER:coq2-ddsA イネの解析からは、改良型 S14:ddsA コンストラクトの導入による種子 CoQ10 含量の増加は確認されなかった。

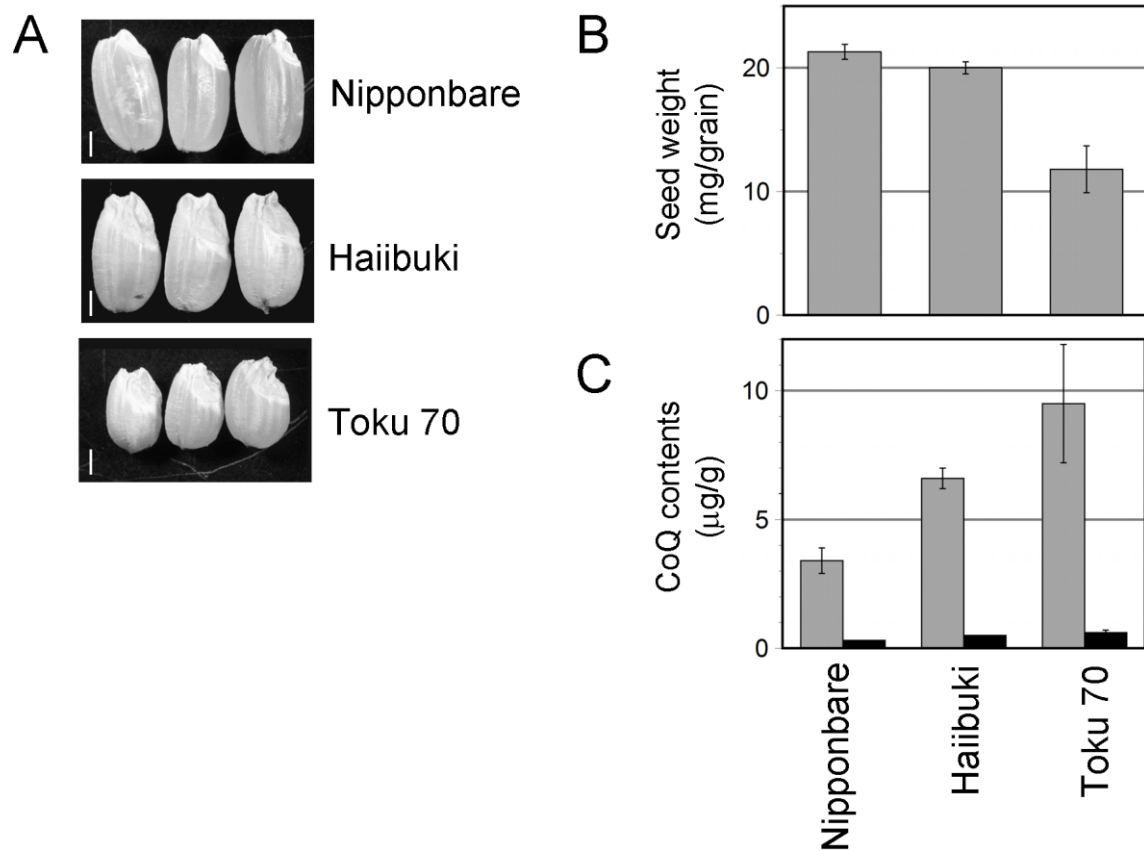


Figure 3-1. 本章で用いた巨大胚イネ系統

(A) 種子(玄米)の写真。バーは1 mm。

(B) 種子1粒重。

(C) 種子のCoQ含量。種子1粒よりCoQを抽出し、4回の測定の平均値と標準偏差を示した。グレーと黒のバーはそれぞれCoQ9含量及びCoQ10含量を表している。

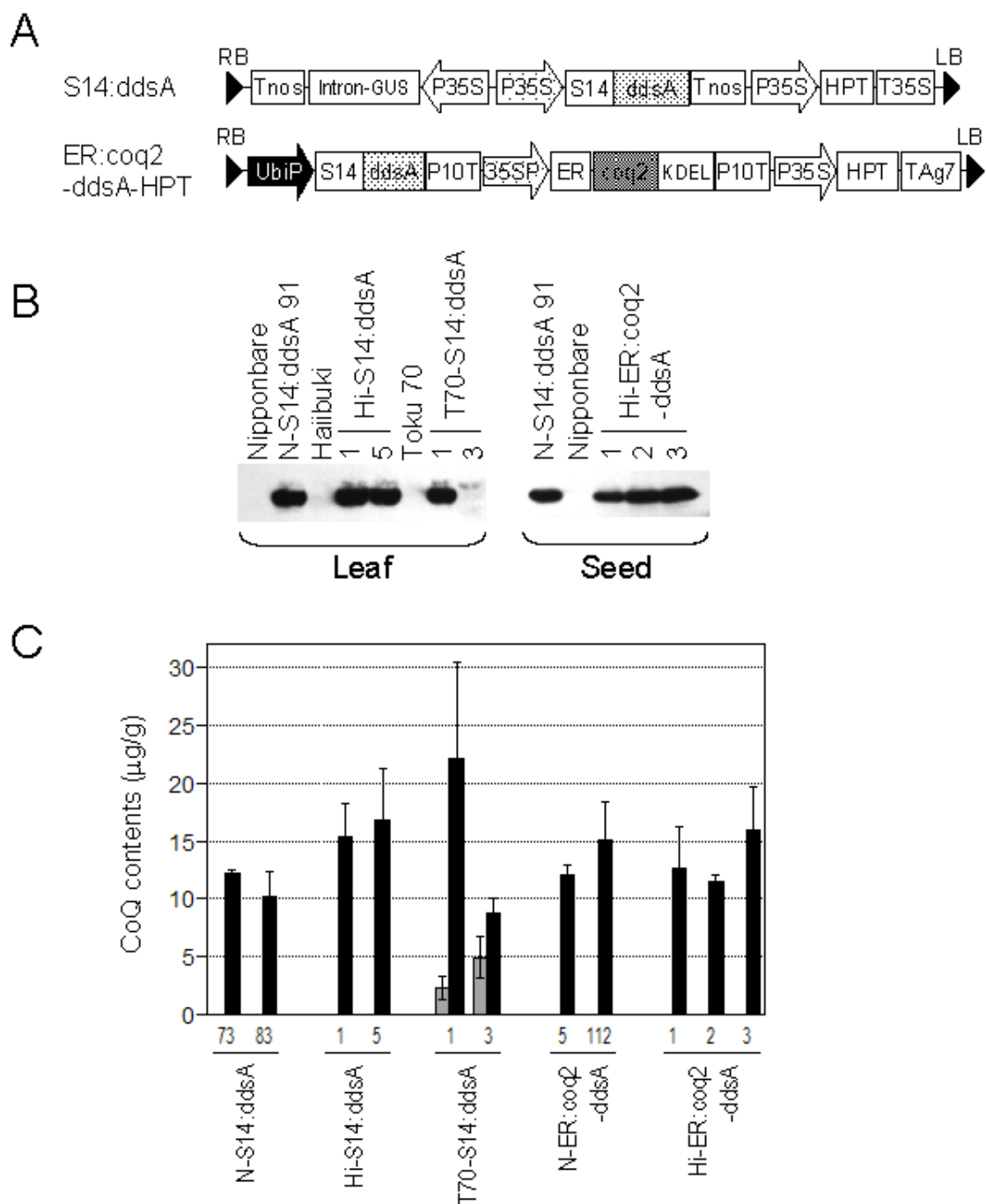


Figure 3-2. 巨大胚系統型のCoQ10強化イネの解析

(A) 形質転換に用いたコンストラクト。

(B) 形質転換イネのウェスタンブロット解析。各形質転換イネのT₀個体の葉またはT₁種子、及び対応する宿主系統の葉または種子より抽出した可溶タンパク質を、抗DdsA抗体を用いて解析した。N-S14:ddsA 91はポジティブコントロール。

(C) 形質転換イネT₁種子のCoQ含量。種子1粒よりCoQを抽出した。各個体4~5粒の種子を解析し、平均値と標準偏差を示した。グレーと黒のバーはそれぞれCoQ9含量及びCoQ10含量を表している。N-S14:ddsA及びN-S14:ddsA,ER:coq2については、それぞれFig. 1-5及び1-6から高CoQ10含量を示す2個体のデータを引用した。

第 2 節 *sugary* 及び *shrunk* 変異体を利用した CoQ10 強化イネの作出

前章第 1 節で示したように、イネ種子の CoQ は主にぬか及び胚芽部分に蓄積する。本章第 1 節では、巨大胚系統を利用して CoQ10 強化イネを作出し、通常サイズの胚を持つ日本晴型の CoQ10 強化イネと比べ、巨大胚系統型の CoQ10 強化イネでは種子の CoQ10 含量が最大 1.8 倍に増加することを示した。この結果から、巨大胚系統以外でも胚乳部分が小さく、相対的に種子重量中に占めるぬか及び胚の比率が大きいイネ系統は、CoQ10 強化イネの種子 CoQ10 含量増加に利用できるのではないかと考えた。本節ではこの作業仮説に基づき、デンプン生合成の欠陥により種子の乾物重が大きく減少する *sugary* 変異体及び *shrunk* 変異体を用いて CoQ10 強化イネの作出を行った。

材料及び方法

植物材料

材料として *N*-メチル-*N*-ニトロソウレア処理されたイネ（品種：金南風）(Yano et al. 1984)から分離された *sugary* 変異体（変異系統 EM5）及び *shrunk* 変異体（変異系統 EM22）を用いた。これらはデンプン生合成に欠陥があり、*sugary* 変異体ではデンプン枝切り酵素である ISA1、*shrunk* 変異体では ADP-グルコースピロフォスフォリラーゼの活性が低下している(Kawagoe et al. 2005; Kubo et al. 1999a)。その結果どちらの変異体でも乾物重当たりの種子デンプン含量及び種子の乾物重の双方が野性型と比べ大きく減少し、種子にはしわがよっている(Matsuo et al. 1987)。対照としては

N- S14:ddsA イネの宿主系統である日本晴を用いた。N- S14:ddsA イネの作出については第 1 章第 1 節で記述しており(第 1 章では S14:ddsA イネと表記)、本節では自殖後代の種子 (T_1) を解析に用いた。

植物の形質転換と栽培

アグロバクテリウムを介したイネ*sugary*変異体及び*shrunk*変異体の形質転換を、第1章第1節の材料及び方法に記述した方法で行った。形質転換植物を 50 mg/l のハイグロマイシンを含む培地上で選抜し、ゲノムへの *ddsA* 遺伝子の挿入を第1章第3節の材料及び方法に記載した条件のPCR増幅により確認した。形質転換初代 (T_0 個体) を培養土を充填したポットに移植し、自然光の温室(27°C)で栽培した。 T_0 個体及び自殖後代を実験に用いた。

ウェスタンブロット解析

形質転換イネの完熟種子から、1 mg 当たり 20 μ l の抽出バッファーを用いて第1章第1節の材料及び方法に記載した方法により可溶性タンパク質を抽出し、12.5%アクリルアミドゲルで分離後、イモビロンポリビニリデンジフルオリド膜 (ミリポア) に転写した。タンパク質の検出にはECLプラスウェスタンブロッティング検出システム (アマシャムバイオサイエンス) を用いた。DdsAタンパク質に対する抗血清調製については第1章第1節の材料及び方法に記載している。

CoQ 測定

CoQ 抽出は第 1 章第 2 節の材料及び方法に記載した新法で行い、また抽

出した CoQ は第 1 章第 2 節の材料及び方法に記載した条件で HPLC により分析した。CoQ9 は 2 $\mu\text{g/g}$ を検出限界とした。

結果

日本晴、*sugary* 及び *shrunk* の種子（玄米）を Fig. 3-3A に示す。2 種の変異系統の玄米は野性型である日本晴と比べ扁平でしわがよっている (Fig. 3-3A)。また *sugary* 及び *shrunk* の種子重量は日本晴のそれぞれ 2/3 及び 1/2 であった (Fig. 3-3B)。日本晴、*sugary* 及び *shrunk* の種子について CoQ9 及び CoQ10 の含量を測定したところ、3 種全てのイネ種子で CoQ9 が主に蓄積していた。*sugary* 及び *shrunk* の種子 CoQ9 含量の値は日本晴種子の CoQ9 含量値のそれぞれ 3.4 倍及び 3.2 倍であった (Fig. 3-3C)。第 3 章第 1 節で用いた 2 つの巨大胚系統（はいいぶきおよび中系特 70）では、種子の CoQ9 含量はそれぞれ $6.6 \pm 0.4 \text{ } \mu\text{g/g}$ 及び $9.5 \pm 2.3 \text{ } \mu\text{g/g}$ であり (Fig. 3-1C)、*sugary* 及び *shrunk* の種子 CoQ9 含量の値は中系特 70 の当該値のそれぞれ 1.2 倍及び 1.1 倍であった。このように、両変異系統の種子が高い CoQ9 含量を示すことが確認された。

アグロバクテリウム法により、*sugary* 及び *shrunk* へ S14:ddsA コンストラクト（第 1 章第 1 節で構築）を導入した。14 個体の *sugary* 型 S14:ddsA イネ (Sug-S14:ddsA イネ) 及び 18 個体の *shrunk* 型 S14:ddsA イネ (Shr-S14:ddsA イネ) の形質転換初代 (T_0) 植物が得られた。これらのうち、十分な稔性を示した 10 個体の Sug-S14:ddsA イネ及び 4 個体の Shr-S14:ddsA イネを以後の解析に用いた。自家受粉種子 (T_1 種子) における DdsA タンパク質の蓄積を解析した。PCR 解析により種子 1 粒毎に *ddsA* 遺伝子の有無を確認し (データ不掲載)、*ddsA* 遺伝子を保持する種子からタンパク質を抽出し解析に用いた。解析した全ての *ddsA* ポジティブの Sug-S14:ddsA イネ及び Shr-S14:ddsA イネの T_1 種子において、DdsA タンパク質が検出された

(Fig. 3-4A)。また、Sug-S14:ddsA イネ及び Shr-S14:ddsA イネはいずれも、野性型同様の表現型を示した。

5 個体の Sug-S14:ddsA イネ(10 個体の内、予備的な実験において高い CoQ10 含量を示した個体)及び 4 個体の Shr-S14:ddsA イネについて T₁ 種子の CoQ 含量を測定し、日本晴型の N-S14:ddsA イネ T₁ 種子の CoQ 含量と比較した (Fig. 3-4C)。N-S14:ddsA イネについては、第 1 章第 3 節の Fig. 1-5 から、CoQ10 を高含有する上位 2 個体のデータを引用した。種子 1 粒毎に *ddsA* 遺伝子の有無を確認し(PCR 解析により確認、データ不掲載)、*ddsA* 遺伝子を保持する種子を CoQ 含量測定に用いた。全ての *ddsA* ポジティブの T₁ 種子において、CoQ10 の高蓄積が確認された。第 1 章第 3 節で述べた通り、N-S14:ddsA イネの種子 CoQ10 含量は最大で $12.2 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ であった。これに対し、Sug-S14:ddsA イネでは、Sug-S14:ddsA 17、また Shr-S14:ddsA イネでは Shr-S14:ddsA 6 が最も高い種子 CoQ10 含量を示し、その値はそれぞれ $34.5 \pm 15.3 \mu\text{g/g}$ 、及び $28.1 \pm 14.3 \mu\text{g/g}$ であった(Fig. 3-4B)。このように、Sug-S14:ddsA イネ及び Shr-S14:ddsA イネの種子 CoQ10 含量は最大で N-S14:ddsA イネの値のそれぞれ 2.9 倍または 2.3 倍であった。本章第 1 節で得られた巨大胚系統型の CoQ10 強化イネの種子 CoQ10 含量は、Hi-S14:ddsA で最大 $16.8 \pm 4.5 \mu\text{g/g}$ 、T70-S14:ddsA で最大 $22.1 \pm 8.3 \mu\text{g/g}$ であった(Fig. 3-2C)。このように、Sug-S14:ddsA イネ及び Shr-S14:ddsA イネの種子 CoQ10 含量値は、最も高い個体で T70-S14:ddsA イネの値のそれぞれ 1.6 及び 1.3 倍であった。Sug-S14:ddsA イネ及び Shr-S14:ddsA イネの正確な評価には *ddsA* ホモ接合体の T₁ 個体の選抜とホモ個体由来の T₂ 種子の分析が必要であるものの、ここで得られた結果から、*sugary* 及び *shrunk* 変異体の利用が、重量当たりの種子 CoQ10 含量増加に有効であることが示さ

れた。

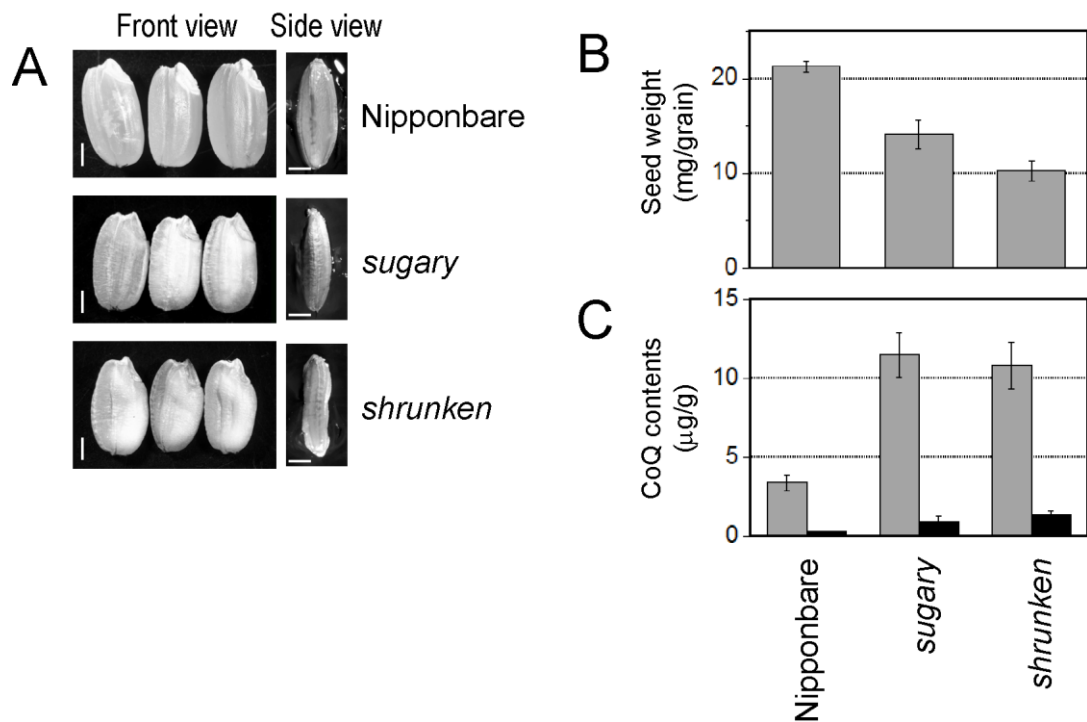


Figure 3-3. 本章で用いたイネ変異体系統

(A) 種子(玄米)の写真。バーは1 mm。

(B) 種子1粒重。

(C) 種子のCoQ含量。種子1粒よりCoQを抽出し、4回の測定の平均値と標準偏差を示した。グレーと黒のバーはそれぞれCoQ9含量及びCoQ10含量を表している。

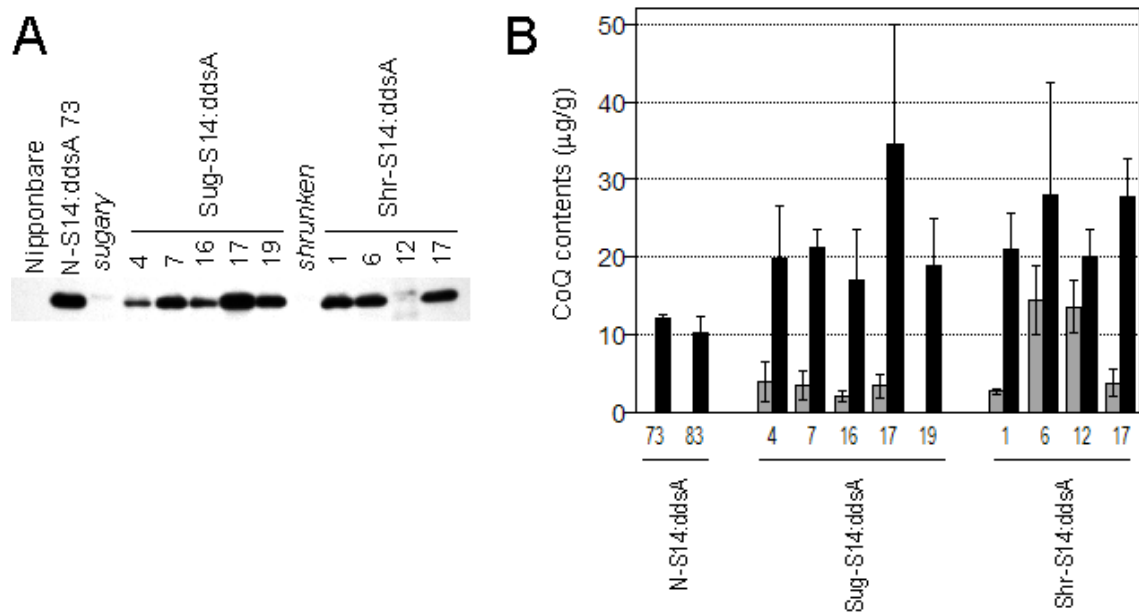


Figure 3-4. Sug-S14:ddsA イネ及び Shr-S14:ddsA イネの解析

(A) 形質転換イネのウェスタンブロット解析。N-S14:ddsA 73（ポジティブコントロール）、Sug-S14:ddsA イネ及び Shr-S14:ddsA イネの T_1 種子及び対応する宿主系統（日本晴、*sugary* 及び *shrunk*）の種子由来の可溶性タンパク質を抗DdsA抗体を用いて解析した。

(B) 形質転換イネ T_1 種子のCoQ含量。種子1粒よりCoQを抽出した。各個体4または5粒の種子を解析し、平均値と標準偏差を示した。グレーと黒のバーはそれぞれCoQ9含量及びCoQ10含量を表している。N-S14:ddsAについては、Fig. 1-5から高CoQ10含量を示す2個体のデータを引用した。

考察

第2章で述べたように、イネ種子の CoQ は野生型及び CoQ10 強化イネ (S14:ddsA イネ) いずれにおいても主にぬか及び胚芽部分に蓄積する。そこで本章では、巨大胚系統やデンプン生合成の欠陥により胚乳部分の重量が大きく減少した変異体 (デンプン合成変異体) といった、種子重量中に占めるぬか及び胚芽の比率が大きい品種・系統を用いて CoQ10 強化イネを作出し、種子 CoQ10 含量の増加を目指した。巨大胚系統型及びデンプン合成変異体型の CoQ10 強化イネの種子 CoQ10 含量は、最も多い個体で日本晴型の CoQ10 強化イネの値のそれぞれ 1.8 倍及び 2.9 倍に増加した。このように、種子の外観や食味が通常品種より劣ることから、混米での利用等、用途が限られる可能性はあるものの、これらの系統の利用が種子 CoQ10 含量の増加に有効であることが示された。

はいいぶきと特 70 の種子に含まれる内在性の CoQ9 含量はそれぞれ日本晴の 1.9 倍及び 2.8 倍であった (Fig. 3-1C)。しかしながら、巨大胚系統型 (はいいぶき型及び特 70 型) と日本晴型の CoQ10 強化イネ種子の CoQ10 含量の差は CoQ9 含量の差に比べると小さいものだった (1.4 倍及び 1.8 倍、Fig. 3-2C)。同様に、デンプン合成変異体である *sugary* 及び *shrunk* 変異体の種子 CoQ9 含量はそれぞれ日本晴の値の 3.4 倍及び 3.2 倍である (Fig. 3-3C) のに対し、*sugary* 型及び *shrunk* 型の CoQ10 強化イネ種子の CoQ10 含量の差は日本晴型の値のそれぞれ 2.9 倍及び 2.3 倍 (Fig. 3-4B) と、宿主系統間の CoQ9 含量の差より小さかった。日本晴型の CoQ10 強化イネ (N-S14:ddsA イネ) においては、その種子 CoQ10 含量 (T_1 種子) は T_0 個体間の差が大きく、予備的な測定において 24 の N-S14:ddsA イネ T_0 個体のう

ち5個体のみが比較的高い(>10 µg/g) T₁種子 CoQ10 含量(T₁種子)を示した。巨大胚系統型やデンプン合成変異体型の CoQ10 強化イネについても、より多く形質転換イネを作出することにより、より高濃度に CoQ10 を蓄積する個体を得られる可能性が考えられた。

第1章第3節で述べたように、日本晴型の CoQ10 強化イネにおいては *ddsA* 遺伝子発現の増強により種子 CoQ10 含量のさらなる増加に成功している。そこで本章第1節では、巨大胚系統型（はいいぶき型）の CoQ10 強化イネについて、同様の戦略による種子 CoQ10 含量のさらなる増加を試みた。日本晴においては、イネユビキチンプロモーターを用いて *ddsA* 遺伝子を発現する N-Ubi-S14:*ddsA* イネの種子 CoQ10 含量は CaMV35S プロモーターを用いる従来型の N-S14:*ddsA* イネの値の最大 1.3 倍に増加した(第1章第3節; Fig. 1-5)。また Ubi-S14:*ddsA* 発現カセットを含む ER:*coq2-ddsA* コンストラクトを導入したイネ(N-ER:*coq2-ddsA* イネ)でも種子 CoQ10 含量が N-S14:*ddsA* イネの値の 1.2 倍に増加した(Fig. 3-2C)。しかし、はいいぶきにおいては、ER:*coq2-ddsA* コンストラクトを導入したイネ (Hi-ER:*coq2-ddsA* イネ) と従来型コンストラクトを導入した Hi-S14:*ddsA* イネの間で、種子 CoQ10 含量の最大値は同程度であり(Fig. 3-2C)、*ddsA* 遺伝子発現の増強による種子 CoQ10 含量の増加は確認されなかった。日本晴型の N-ER:*coq2-ddsA* イネでは、DdsA タンパク質を蓄積する 19 の T₀ 個体のうち、T₁ 種子で N-S14:*ddsA* イネの値より 10%以上高い 13 µg/g 以上の種子 CoQ10 含量を示したのは2個体であった。一方、Hi-ER:*coq2-ddsA* イネは3個体しか DdsA タンパク質を蓄積する T₀ 個体を得られていない。そのため、はいいぶきにおける *ddsA* 遺伝子発現の増強による CoQ10 含量増加効果について評価するには、より多くの Hi-ER:*coq2-ddsA* イネの作出及び

解析が必要と考えられた。

本章で用いたイネ品種・系統のうち、はいいぶきは胚芽米用の品種として既に市場で流通している。そのため他の系統より種子 CoQ 含量が低めではあるものの、実用的な CoQ10 強化米開発の宿主としてははいいぶきが有望であると考えられた。

総合考察

本研究では健康機能性の増進に資する遺伝子組換え作物として、CoQ10 を高含有する米の開発を目指した研究を行った。その結果、デカプレニル 2 リン酸合成酵素遺伝子(*ddsA*)の導入によりイネの CoQ 側鎖長を 9 から 10 へ改変し、非形質転換体の 10 倍以上の CoQ10 を蓄積するイネの作出に成功した。

本研究第 1 章で作出した CoQ10 強化イネ(N-S14:*ddsA* イネ)の結果から、DdsA 酵素をミトコンドリアに局在させることにより CoQ10 合成系路が強化されることが強く示唆された。N-S14:*ddsA* イネでは、内生の CoQ9 合成経路も同様に機能していると考えられる。にもかかわらず、N-S14:*ddsA* イネでは CoQ10 が優先的に蓄積され、CoQ9 含量は減少していた。シロイヌナズナとの類似性から、イネの CoQ 生合成に関わるポリプレニル 2 リン酸合成酵素は ER に局在すると推定されている。本研究の結果は、DdsA 酵素を内生酵素とは異なる細胞内器官に配置することにより、CoQ 代謝を目的とする方向により効率的に改変できることを示している。第 1 章の考察で述べたように、植物においてプレニル 2 リン酸は ER で合成され、その後 CoQ 合成のためにミトコンドリアへ運ばれると考えられており、N-S14:*ddsA* イネでは、プレニル 2 リン酸が本来の部位である ER ではなくミトコンドリアで合成されることにより、より効率的に CoQ 合成に用いられたと推定された。

また N-S14:*ddsA* イネ種子においては、総 CoQ 含量が野性型である日本晴の値の 2 倍以上に増加していることから、イネにおいては DdsA が触媒するプレニル 2 リン酸の合成反応が CoQ 合成の律速ステップになり得るこ

とが示唆された。一方、タバコにおいてはプレニル 2 リン酸の PHB への転移反応を行う PPT が CoQ 合成の律束酵素だと考えられているが、PPT をコードする *coq2* 遺伝子をイネで発現しても CoQ 含量の増加は確認されなかった。

第 2 章では主に N-S14:ddsA イネを用いて CoQ10 強化イネの各部位・各生育時期における CoQ10 含量を測定した。その結果、N-S14:ddsA イネは各部位に CoQ10 が高蓄積し、また各部位で野生型より総 CoQ 量が増加していること、N-S14:ddsA イネは *ddsA* を構成的に発現するにもかかわらず、CoQ 総量としては野生型とほぼ同じ分布および増減パターンを持つことが示され、イネにおいて DdsA が触媒するプレニル 2 リン酸の合成反応以外にも CoQ 合成の律速ステップがあることが強く示唆された。

また第 2 章では、N-S14:ddsA イネを用いて CoQ10 強化イネの生育及び収量特性について解析した。CoQ10 強化イネは野生型と比べ出穂が遅く、短稈の傾向が見られた。また CoQ10 強化イネの穂数は、調査年により異なるが野生型の 50-80%程度に低下し、その結果 CoQ10 強化イネでは収量が野生型と比べ低下していた。さらにストレス耐性の一例として CoQ10 強化イネ (N-S14:ddsA イネ) の耐塩性について解析したところ、CoQ10 強化イネの耐塩性は野生型と同程度であることが明らかとなった。CoQ10 強化イネの各器官における総 CoQ 量が野生型の 2 倍以内程度であったことが、大きな相違がみられなかった主な原因と考えられる。

CoQ10 強化イネの種子である CoQ10 強化米は食品として利用することが出来る。第 2 章で述べたように、CoQ は米のぬかおよび胚芽に主に蓄積する。そのため CoQ10 強化米は玄米または胚芽を残した分つき米として食べる必要がある。日本においては、CoQ10 を心臓病の薬として用いる場合、

30 mg/日の摂取が規定されている。食品サプリメントとして使用する場合は CoQ10 の最適摂取量は未だ決定されていないが、原則的には 30 mg/日以下の CoQ10 摂取が推奨されており、これを超えるレベルの CoQ10 摂取の安全性については、現在食品安全委員会で検討されている。そこで、CoQ10 強化米からの CoQ10 摂取の目標値を 20-30 mg/日と設定した。日本人の日常食における米(種子)の平均摂取量は 162 g/日(2008 年)であることから(農林水産省 2010)、種子 CoQ10 含量の目標値を 120-190 $\mu\text{g/g}$ と算出した。本研究で開発した CoQ10 強化米の CoQ10 含量は、3 章で作出した CoQ10 含量を増強したタイプでも、巨大胚系統型で最大 22.1 $\mu\text{g/g}$ (T70-S14:ddsA 1)、デンプン合成変異体型で最大 34.5 $\mu\text{g/g}$ (Sug-S14:ddsA 17) と、望ましい値のそれぞれ 12-18%及び 18-29%であった。しかしながら、162 g の巨大胚系統型またはデンプン合成変異体型の CoQ10 強化イネの種子には、それぞれ 3.6 mg 及び 5.6 mg の CoQ10 が含まれ、この値は日本人の食事からの平均 CoQ10 摂取量 (4.5 mg/日) (Kubo et al. 2008)のそれぞれ 80%及び 124%に相当する。この観点から見れば、本研究で開発した CoQ10 強化米は実用上十分意義のあるレベルの CoQ10 を含むと言える。

CoQ10 は肉や青魚、野菜ではダイズなどの食品に比較的多く含まれるが、30 mg の CoQ10 を摂取するには 950 g の牛肉, 6 匹のイワシまたは 1.5 kg のダイズを食べる必要があり(Kamei et al. 1986 を元に算出)、通常の食事から十分量を摂取するのは不可能である。CoQ10 強化米の開発は、サプリメントに頼らない食品からの十分量の CoQ10 摂取に道を開くものである。3 章で用いたイネ品種・系統のうち、はいいぶきは胚芽米用の品種として既に市場で流通しており、実用的な CoQ10 強化米開発の宿主として有望と考えられる。

CoQ10 強化イネは CoQ10 の抽出用素材としても用いることができる。

工業的な CoQ10 生産においては、光合成細菌や酵母を用いた CoQ10 の発酵法による生産が広く行われており(Kawamukai 2009)、アグロバクテリウムを用いたプラントスケールの培養で最大 458 mg/l 培養液 (=458 µg/ml , ≈ 1 g 培養液) の CoQ10 含量が達成されている(Ha et al. 2007)。その結果、2009 年時点の原料としての CoQ10 の価格は 130,000 円/kg (=0.13 円/mg) 程度、また最終製品であるサプリメントの価格は CoQ10 含量 1mg 当たり 1-2 円程度となっている。CoQ10 強化イネ各部位の CoQ10 含量はアグロバクテリウム培養液のそれよりずっと低い、イネを用いた CoQ10 生産は 1) 公的な承認が得られた後には、植物体は通常のイネと同じ方法で栽培することが出来るため、大量生産の費用を非常に低く抑えられる、2) 種子を抽出材料として用いる場合は、元来食品であることから高度な精製を必要とせず、抽出コストを抑える事が出来る、等の複数の潜在的な利点を持っている。

CoQ10 強化イネを用いた CoQ10 生産のコストを以下のように試算した。まず種子を利用する場合について検討した。食用ではなく抽出用途であることから、飼料米の生産費を参考とした。第 2 章で行った収量調査の結果を基に各種 CoQ10 強化米の収量を飼料米の一律 80%と仮定し、平均飼料米の kg あたり平均生産費(調査情報部 2009)から、CoQ10 強化米の生産費を 156.3 円/kg と算出した。CoQ10 強化米の CoQ10 含量は、それぞれ最大で日本晴型で 12.2 µg/g (=12.2 mg/kg, N-S14:ddsA 73)、巨大胚系統型で 22.1 µg/g (=22.1mg/kg)、デンプン合成変異体型で 34.5 µg/g (=34.5mg/kg) であることから、各種 CoQ10 強化米を用いた CoQ10 の生産コストは 1 mg 当たり日本晴型で 12.8 円、巨大胚系統型で 7.1 円、デンプン合成変異体型で 4.5 円と推定された。ただし第 2 章で示したように、日本晴型 CoQ10 強化米

(N-S14:ddsA)では種子 1 粒あたりの CoQ10 含量は受粉 20 日後に最大となり、この時期の種子には完熟種子の 2 倍以上の CoQ10 が含まれる。各種 CoQ10 強化米において、収穫時期の最適化により CoQ10 収量の増加及び生産コストの低下が可能と考えられる。

次に日本晴型の CoQ10 強化イネについて、稲発酵粗飼料の生産と同様、黄熟期に種子と茎葉を含む地上部全てを収穫し利用する場合の CoQ10 生産コストについて試算した。CoQ10 強化イネの生産費を、食用品種を利用した場合の稲発酵粗飼料の生産費と同じ乾物 1 kg 当たり 100 円(農業・食品産業技術総合研究機構 2009)とした。日本晴型の CoQ10 強化米の CoQ10 含量は、12.2 mg/kg である。また第 2 章で示したとおり、出穂期茎葉の CoQ10 含量は新鮮重当たり約 8 μ g/g であるが、含水率 80%程度(農業・食品産業技術総合研究機構 2004)のため乾物換算では約 40 μ g/g (=40mg/kg) となる。日本晴では全重の 34%を玄米重、57%をわら (=茎葉) 重が占める(クサノホシ収量調査結果; <http://ineweb.narcc.affrc.go.jp/index.html> 中の日本晴収量より算出) ことから、CoQ10 強化イネの地上部に含まれる CoQ10 含量は、乾物 1 kg 当たり玄米分 4.1 mg とわら分 22.8 mg の合計 26.9 mg と見積もられた。これに基づき、地上部を利用する場合の CoQ10 の生産コストは 1 mg 当たり 3.7 円と試算された。上記に加え、種子と地上部のいずれを利用する場合も原材料からの CoQ10 抽出コストがかかる。このようにイネを用いた CoQ10 生産は、微生物発酵による生産より高コストとなる。実際に生産に用いるためには、CoQ10 含有量の増加や、イネに含まれる CoQ10 以外の有用成分との同時抽出・利用等の工夫が必要と考えられる。

トウモロコシ、コムギといった主要穀物はイネ科に属し、イネ同様主に CoQ9 を生産している(Kamei et al. 1986)。そのため CoQ10 強化イネ作出に

用いた方法はこれらの植物にそのまま応用可能である。実際、飼料の高付加価値化やバイオマス植物での CoQ10 生産を目的として、CoQ10 を強化したイネ科牧草ギニアグラス近縁のパニカム属植物(*Panicum meyerianum*)が本研究と同じ手法により作出されており (Takamizo 私信)、本研究で開発した「植物における CoQ10 高生産法」の有効性を示している。

今後、CoQ10 強化イネの CoQ10 含量をさらに増加させるためには、*ddsA* に加え他の CoQ 合成酵素の利用が有効であると考えられる。大腸菌では CoQ の合成経路がほぼ解明されており (Meganathan 2001)、複数の CoQ 合成酵素遺伝子の過剰発現による大規模な代謝改変が行われている。大腸菌においては、PPT による転移反応と、PHB 合成反応の増強が CoQ 含量増加に効果的であることが報告されている (Cluis et al. 2007)。PPT については、本研究でイネでは効果がないことが明らかにされたことから、次に試みるべき代謝改変は PHB 合成反応の増強であると考えられる。植物における PHB の合成経路は未解明であるが、大腸菌では PHB はコリスミ酸リアーゼである UbiC によりコリスミ酸から直接合成される (Meganathan 2001)。コリスミ酸はトリプトファン等のアミノ酸合成の前駆物質であり、植物にも含まれている。実際、*UbiC* 遺伝子の導入により、コリスミ酸を基質として PHB を高生産するタバコが作出されている (Viitanen et al. 2004)。

一方種子の含量増加については、胚乳での生産も視野に入れる必要がある。本研究ではイネの内生の CoQ(9)合成経路を利用し、イネに CoQ9 の代わりに CoQ10 を合成させた。種子重量の 90%を占める胚乳部分には CoQ9 が蓄積せず、CoQ10 強化イネにおいても胚乳には CoQ10 が蓄積していなかった。胚乳には *DdsA* が行うプレニル 2 リン酸の合成反応の初発基質となるゲラニルゲラニル 2 リン酸(GGPP)及びコリスミ酸が

蓄積することが確認され、GGPP は組換えイネ胚乳におけるカロテノイド生産、コリスミ酸は葉酸生産の基質として利用されている (Burkhardt et al. 1997; Storozhenko et al. 2007; Ye et al. 2000)。前述の通り、大腸菌では CoQ 合成経路がほぼ解明され PHB から CoQ に至る 9 ステップ、8 種類の合成酵素の遺伝子が特定されており (Meganathan 2001)、また PHB は UbiC によりコリスミ酸から合成できる。Multisite Gateway システムを利用したイネの形質転換用ベクターの開発等によりイネへの複数遺伝子の導入も容易になってきており (Wakasa et al. 2006)、技術的にはイネ胚乳における CoQ 合成経路の構築が可能になりつつある。

我が国では、消費者の遺伝子組換え食品への懸念が根強く、また遺伝子組換え作物の商業栽培の承認に際して厳しい安全性評価及び環境影響性評価が科される。そのため遺伝子組換え作物の商業化のハードルは非常に高く、現在までに食用の遺伝子組換え作物の商業栽培が行われた例はない。ただし少しずつではあるが、状況は変わりつつある。ビタミン A 欠乏症を防ぐゴールデンライスは 2008 年からフィリピンでの野外試験が行われており、遺伝子組換えイネとしては世界で初めて、2012 年にも同国での一般栽培が実現する予定である (ISAAA 2009)。またハワイではウィルス耐性を付与した組換えパパイヤが生産され流通しているが、2009 年に日本の食品安全委員会がこの組換えパパイヤの食品としての安全性を認めたことから、数年内にも我が国への組換えパパイヤの輸入が始まると予想される。また緒言でも遺伝子組換え作物に関する情報不足が消費者の不安の一因となっていると述べたが、この点への対応も研究者や行政によって始まっている。近年では、消費者が新しい技術を受容するには、単に不足している情報を供給するだけでなく、参加

体験型のイベントやコミュニケーションを伴う対話の場を通じて新しい技術に「なじむ」プロセスが必要と考えられるようになってきている (Sassa and Watanabe 2006)。こうした考えに基づき、2003 年から農業生物資源研究所が隔離圃場の見学会を行ったり、また 2007 年から農水省が参加者との意見交換も含む遺伝子組換え農作物に関するコミュニケーション活動を行うなど、参加型、双方向型の情報提供の取り組みが少しずつ進んでいる。遺伝子組換え米の実用化や、パパイヤのように生食する遺伝子組換え作物の国内での流通、また対話を通じた情報発信の取り組みにより、消費者が遺伝子組換え技術や遺伝子組換え食品に抱く印象が変化していくと予想される。

本研究では、ミトコンドリアに局在するよう設計した S14:DdsA タンパク質を作らせることにより、植物で初めてイネの CoQ 鎖長改変に成功し、非形質転換体の 10 倍以上の CoQ10 を蓄積するイネの作出に成功した。本研究の結果は、DdsA 酵素を内生酵素とは異なる細胞内器官に配置することにより、CoQ 代謝を目的とする方向により効率的に改変できることを示している。また本研究で開発した CoQ10 強化イネは、CoQ10 強化米として利用することで消費者がメリットを感じられ、またイネ（米）の付加価値を高めるため生産者もメリットを感じられる遺伝子組換え作物である。CoQ10 強化イネは現在すぐに実用化のための安全性評価及び環境影響性評価に着手できる状況ではないが、CoQ10 含量の増加等の改良により CoQ10 強化イネの価値を高め、将来的に新たな機能性米として実用化できるよう、開発を進めたい。

摘要

本論文は、遺伝子組換え技術による健康機能成分であるコエンザイム Q10 (CoQ10) を高含有するイネの開発について記述したものである。得られた結果の概要は以下の通りである。

第 1 章

CoQ10強化イネを作出し、導入コンストラクトの改変によるCoQ10含量の増加を試みた。

第 1 節

グルコン酸菌由来の CoQ 合成酵素遺伝子であるデカプレニル 2 リン酸合成酵素遺伝子 (*ddsA*) の導入により、CoQ10 を高蓄積するイネを作出した。DdsA タンパク質をミトコンドリアに局在させるようデザインしたコンストラクト S14:ddsA をイネ (品種: 日本晴) に導入した結果、イネの CoQ 側鎖長を 9 から 10 に改変することに成功した。N-S14:ddsA イネ種子には、非形質転換体の 10 倍以上の CoQ10 が蓄積していた。さらに N-S14:ddsA イネ種子では、総 CoQ 含量が非形質転換体の値の 2-3 倍に増加していた。これらの結果から、プレニル 2 リン酸の合成が、本来の部位である ER よりもミトコンドリアで行われる方が CoQ 生合成にとってはより効率的であること、またイネにおいてプレニル 2 リン酸の合成反応が CoQ 合成の律速ステップとなっていることが示唆された。

第 2 節

種子 1 粒相当の微量サンプルからの抽出が可能な新しい CoQ 抽出法を開

発した。新法の導入により種子 1 粒を用いた分析が可能になり、以後の分析においてホモ、ヘミ、ヌル個体が混在する T₁ 種子での正確な CoQ 含量評価が可能となった。

第 3 節

第 1 章第 1 節の結果よりイネにおいて DdsA が行うプレニル 2 リン酸の合成反応が CoQ 合成の律速ステップとなっていることが示唆された。そこで第 3 節では、*ddsA* 遺伝子発現の増強により種子 CoQ10 含量の一層の増加を試みた。S14:*ddsA* コンストラクトで *ddsA* 遺伝子の発現に用いている CaMV35S プロモーターを、Ole18 プロモーターまたはイネユビキチンプロモーターに改変したコンストラクト (Ole18-S14:*ddsA* 及び Ubi-S14:*ddsA*) をイネ (品種：日本晴) に導入した。形質転換イネ種子の CoQ10 含量は、N-Ole18-S14:*ddsA* イネは最大でも N-S14:*ddsA* イネと同程度であったが、N-Ubi-S14:*ddsA* イネでは最大で N-S14:*ddsA* イネの値の 1.3 倍に増加した。このように、*ddsA* 遺伝子発現の増強により種子 CoQ10 含量を増加させることが出来た。

第 4 節

DdsA が行うプレニル 2 リン酸の合成反応の次のステップを触媒する PHB: ポリプレニルトランスフェラーゼ (PPT) をコードする *coq2* 遺伝子と *ddsA* 遺伝子との同時発現により、CoQ10 含量のさらなる増加を目指した。しかしながら、同時発現型の形質転換イネはコントロールの N-Ubi-S14:*ddsA* と同様の種子 CoQ10 含量を示し、*coq2* 遺伝子発現による CoQ10 含量の増加は見られなかった。また *coq2* 遺伝子単独での発現がイネの CoQ 生合成に与える影響についても調べたが、*coq2*(単独) 発現イネ

と野性型の日本晴間で種子 CoQ9 含量に差は見られなかった。これらの結果から、PPT(=COQ2)活性増強により CoQ 含量が増加するタバコとは異なり、イネにおいては PPT が触媒するプレニル 2 リン酸の PHB への転移反応が CoQ 合成の律速ステップではないことが示唆された。

第 2 章

CoQ10 強化イネの各器官における CoQ10 含量について解析すると共に、CoQ10 強化イネの生育及び収量特性、さらに CoQ10 強化イネの塩ストレス耐性について調べ、*ddsA* 遺伝子の発現及び CoQ 種や CoQ 含量の改変がイネの生理・生態的特性に与える影響について解析した。

第 1 節

CoQ10 強化イネ(N-S14:*ddsA* イネ)の各器官における CoQ10 含量を解析し、以下の結果を得た。

1. 日本晴及び CoQ10 強化イネどちらでも、CoQ は種子中のぬか及び胚芽に主に蓄積する。
2. 日本晴及び CoQ10 強化イネどちらでも、未熟種子 1 粒あたりに含まれる CoQ 量は受粉 20 日後頃に最大となり、その後減少する。
3. CoQ10 強化イネでは根、茎、葉においても CoQ10 が蓄積しており、これらの器官における総 CoQ 量は日本晴の対応する器官の値の 1.3-1.7 倍に増加している。

これらの結果から、N-S14:*ddsA* イネは *ddsA* を構成的に発現するにもかかわらず、野性型とほぼ同じ CoQ 分布および CoQ 増減パターンを持つことが示され、イネにおいて *DdsA* が行うプレニル 2 リン酸の合成反応以外にも CoQ 合成の律速ステップが存在することが強く示唆され、また CoQ10

強化イネの改良や、最適な利用法を検討する際に有用な基礎データが得られた。

第 2 節

CoQ10 強化イネ (N-S14:ddsA イネ) と日本晴について生育調査及び収量調査を行い、以下の結果を得た。調査は 2008 年と 2010 年に行ったが、2010 年は稔実率が著しく低下したことから、収量調査は 2008 年のみ行った。

1. N-S14:ddsA イネは野生型である日本晴より出穂が遅く、短稈の傾向が見られた。
2. N-S14:ddsA イネの穂数は、晩植期より 1 ヶ月遅い時期に栽培を行った 2008 年の調査では日本晴の 50%程度、普通期に栽培した 2010 年の調査では日本晴の 80%程度であった。
3. N-S14:ddsA イネの株当たりの玄米収量は日本晴の約 1/2 であった。収量構成要素である穂数、1 穂粒数、登熟歩合、玄米千粒重のうち、穂数以外は N-S14:ddsA イネと日本晴で有意な差がみられないことから、穂数減少が 2008 年の調査における N-S14:ddsA イネの低収の主な原因であると考えられた。

第 3 節

抗酸化酵素の遺伝子を過剰発現する植物では、低温や塩等の環境ストレスへの耐性が向上することが知られているが、CoQ もまた強い抗酸化作用を持つ。第 2 章第 1 節の結果から、CoQ10 強化イネ(S14:ddsA イネ)では、各器官の総 CoQ 量が野生型に対し 1.3~1.7 倍に増加していることが確認されたことから、第 2 節では CoQ10 強化イネの塩ストレス耐性について解析した。その結果、CoQ10 強化イネの塩ストレス耐性は野生型と同程度であ

ることが明らかとなった。

第 3 章

第 2 章第 1 節で述べたように、イネ種子の CoQ は主にぬか及び胚芽部分に蓄積する。そこで第 3 章では、巨大胚系統や、デンプン生合成の欠陥により胚乳部分の重量が大きく減少した変異体（デンプン合成変異体）といった、種子重量中に占めるぬか及び胚芽の比率が大きい品種・系統を用いて CoQ10 強化イネを作出し、種子 CoQ10 含量の増加を試みた。第 1 節では巨大胚系統、第 2 節ではデンプン合成変異体を用いて CoQ10 強化イネを作出した。巨大胚系統型及びデンプン合成変異体型の CoQ10 強化イネの種子 CoQ10 含量は、最も多い個体で日本晴型の CoQ10 強化イネの値のそれぞれ 1.8 倍及び 2.9 倍に増加し、これらの系統の利用が種子 CoQ10 含量の増加に有効であることが示された。

謝辞

本論文をまとめるに当たり、熱心なご指導とご校閲を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科教授 大杉立博士に深く感謝し、お礼申し上げます。

また、スーパーバイザーとして *ddsA* 遺伝子の供与を始め多くの有益なご指導と助言を賜りました島根大学教授の川向誠博士、*coq2* 遺伝子を供与いただいた京都大学教授の矢崎一史博士、イネユビキチンプロモーターを供与いただいた農業研究機構の黒田昌治博士、巨大胚イネ系統を供与いただいた農業研究機構の飯田修一博士をはじめとする旧中国農業研究所・作物開発部の皆様、デンプン合成変異体を供与いただいた九州大学教授の佐藤光博士、CoQ 分析についてご助言を賜りましたクミアイ化学工業の清水力博士をはじめとする生物科学研究所・バイオテクノロジー研究室の皆様に厚くお礼申し上げます。

研究の機会を賜りました農業生物資源研究所・旧遺伝子多様性研究チーム長の門脇光一博士、及び研究の推進と取り纏めに十分にご理解とご支援を賜りました農業生物資源研究所・遺伝子組換え作物開発センター長の高岩文雄博士に衷心より感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するに当たり、多大なご協力をいただいた農業生物資源研究所・旧遺伝子多様性研究チーム及び遺伝子組換え作物開発センターの皆様には深く感謝いたします。

引用文献

- Ashby, M.N., Kutsunai, S.Y., Ackerman, S., Tzagoloff, A. and Edwards, P.A. (1992) COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J. Biol. Chem.* 267: 4128-4136.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1995) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Burkhardt, P., Beyer, P., Wünn, J., Klöti, A., Armstrong, G., Schledz, M., von Lintig, J. and Potrykus, I. (1997) Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant J* 11: 1071-1078.
- Christensen, A.H., Sharrock, R.A. and Quail, P.H. (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.
- Cluis, C., Burja, A. and Martin, V. (2007) Current prospects for the production of coenzyme Q10 in microbes. *Trends Biotechnol* 25: 514-521.
- Essl, D., Dirnberger, D., Gomord, V., Strasser, R., Faye, L., Glossl, J. and Steinkellner, H. (1999) The N-terminal 77 amino acids from tobacco *N*-acetylglucosaminyltransferase I are sufficient to retain a reporter protein in the Golgi apparatus of *Nicotiana benthamiana* cells. *FEBS Lett.* 453: 169-173.
- Fukuoka, H., Ogawa, T., Mitsuhara, I., Iwai, T., Isuzugawa, K., et al. (2000)

- Agrobacterium-mediated transformation of monocot and dicot plants using the NCR promoter derived from soybean chlorotic mottle virus. *Plant Cell Rep.* 19: 815-820.
- Ha, S.J., Kim, S.Y., Seo, J.H., Oh, D.K. and Lee, J.K. (2007) Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for coenzyme Q10 production by *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 974-980.
- Hagiwara, K. (2001) Standard Tables of Food Composition in Japan 5th Revised Edition. *J. Integrated Study Dietary Habits* 12: 86-89.
- ISAAA (2009) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009.
- Jun, L., Saiki, R., Tatsumi, K., Nakagawa, T. and Kawamukai, M. (2004) Identification and Subcellular Localization of Two Solanesyl Diphosphate Synthases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45: 1882-1888.
- Kalen, A., Appelkvist, E.L. and Dallner, G. (1989) Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids* 24: 579-584.
- Kamei, M., Fujita, T., Kanbe, T., Sasaki, K., Oshiba, K., Otani, S., Matsui-Yuasa, I. and Morisawa, S. (1986) The distribution and content of ubiquinone in foods. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 56: 57-63.
- Kawagoe, Y., Kubo, A., Satoh, H., Takaiwa, F. and Nakamura, Y. (2005) Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis in rice endosperm. *Plant J.* 42: 164-174.
- Kawamukai, M. (2002) Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *J. Biosci. Bioeng.* 94: 511-517.
- Kawamukai, M. (2009) Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by

- yeasts and other organisms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 53: 217-226.
- Kubo, A., Fujita, N., Harada, K., Matsuda, T., Satoh, H. and Nakamura, Y. (1999a) The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol* 121: 399-410.
- Kubo, H., Fujii, K., Kawabe, T., Matsumoto, S., Kishida, H. and Hosoe, K. (2008) Food content of ubiquinol-10 and ubiquinone-10 in the Japanese diet. *J. Food Comp. Anal.* 21: 199-210
- Kubo, N., Harada, K., Hirai, A. and Kadowaki, K. (1999b) A single nuclear transcript encoding mitochondrial RPS14 and SDHB of rice is processed by alternative splicing: common use of the same mitochondrial targeting signal for different proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9207-9211.
- Maeda, H., Nemoto, H., Iida, S., Ishii, T., Nakagawa, N., Hoshino, T., Sakai, M., Okamoto, M., Shinoda, H. and Yoshida, T. (2001) A new rice variety with giant embryos, "Haiminori". *Breed. Sci.* 51: 211-213.
- Matsui, T. (2009) Floret sterility induced by high temperature at the flowering stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Jpn. J. Crop. Sci.* 78: 303-311.
- Matsuo, T., Yano, M., Satoh, H. and Omura, T. (1987) Effects of sugary and shrunken mutant genes on carbohydrates in rice endosperm during ripening period. *Japan. J. Breed.* 37: 17-21.
- Matsushita, K., Sunohara, Y., Iida, S., Maeda, H., Nemoto, H., Ishii, T., Yoshida, T., Nakagawa, N. and Sakai, M. (2008) A new rice cultivar with giant embryo, "Haiibuki". *Bull. Natl. Agric. Res. Cent. Western Reg.* 7: 1-14.
- McGarvey, D.J. and Croteau, R. (1995) Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7:

1015-1026.

- Meganathan, R. (2001) Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 203: 131-139.
- Moreno, J. and Chrispeels, M.J. (1989) A lectin gene encodes the alpha-amylase inhibitor of the common bean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7885-7889.
- Ohara, K., Kokado, Y., Yamamoto, H., Sato, F. and Yazaki, K. (2004) Engineering of ubiquinone biosynthesis using the yeast *coq2* gene confers oxidative stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant J.* 40: 734-743.
- Ohara, K., Yamamoto, K., Hamamoto, M., Sasaki, K. and Yazaki, K. (2006) Functional characterization of OsPPT1, which encodes p-hydroxybenzoate polyprenyltransferase involved in ubiquinone biosynthesis in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* 47: 581-590.
- Okada, K., Kainou, T., Matsuda, H. and Kawamukai, M. (1998a) Biological significance of the side chain length of ubiquinone in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 431: 241-244.
- Okada, K., Kainou, T., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H. and Kawamukai, M. (1998b) Molecular cloning and mutational analysis of the *ddsA* gene encoding decaprenyl diphosphate synthase from *Gluconobacter suboxydans*. *Eur. J. Biochem.* 255: 52-59.
- Okada, K., Ohara, K., Yazaki, K., Nozaki, K., Uchida, N., Kawamukai, M., Nojiri, H. and Yamane, H. (2004) The AtPPT1 gene encoding 4-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase in ubiquinone biosynthesis is required for embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 55: 567-577.
- Phillips, R.L., Kaeppler, S.M. and Olhoft, P. (1994) Genetic instability of plant

- tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5222-5226.
- Qu, L.Q. and Takaiwa, F. (2004) Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. *Plant Biotechnol. J.* 2: 113-125.
- Sassa, Y. and Watanabe, K. (2006) The present situation of the public acceptance in genetically modified and food products. *Breed. Res.* 8: 99-105.
- Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H. and Galbraith, D.W. (1995) Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* 8: 777-784.
- Storozhenko, S., De Brouwer, V., Volckaert, M., Navarrete, O., Blancquaert, D., Zhang, G., Lambert, W. and Van Der Straeten, D. (2007) Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nat Biotechnol* 25: 1277-1279.
- Swiezewska, E., Dallner, G., Andersson, B. and Ernster, L. (1993) Biosynthesis of ubiquinone and plastoquinone in the endoplasmic reticulum-Golgi membranes of spinach leaves. *J. Biol. Chem.* 268: 1494-1499.
- Szkopinska, A. (2000) Ubiquinone. Biosynthesis of quinone ring and its isoprenoid side chain. Intracellular localization. *Acta. Biochim. Pol.* 47: 469-480.
- Toki, S. (1997) Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 16-21.
- Turunen, M., Olsson, J. and Dallner, G. (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochem. Biophys. Acta.* 1660: 171-199.
- USDA (2010) Adoption of Genetically Engineered Crops in the U.S.: Corn

Varieties.

- Viitanen, P., Devine, A., Khan, M., Deuel, D., Van Dyk, D. and Daniell, H. (2004) Metabolic engineering of the chloroplast genome using the *E. coli* *ubiC* gene reveals that chorismate is a readily abundant plant precursor for p-hydroxybenzoic acid biosynthesis. *Plant Physiol* 136: 4048-4060.
- Wakasa, Y., Ozawa, K. and Takaiwa, F. (2009) Higher-level accumulation of foreign gene products in transgenic rice seeds by the callus-specific selection system. *J. Biosci. Bioeng.* 107: 78-83.
- Wakasa, Y., Yasuda, H. and Takaiwa, F. (2006) High accumulation of bioactive peptide in transgenic rice seeds by expression of introduced multiple genes. *Plant Biotechnol. J.* 4: 499-510.
- Yano, M., Isono, Y., Satoh, H. and Omura, T. (1984) Gene analysis of sugary and shrunken mutants of rice. *Japan. J. Breed.* 34: 43-49.
- Yasuda, H., Hirose, S., Kawakatsu, T., Wakasa, Y. and Takaiwa, F. (2009) Overexpression of BiP has inhibitory effects on the accumulation of seed storage proteins in endosperm cells of rice. *Plant Cell Physiol.* 50: 1532-1543.
- Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. and Potrykus, I. (2000) Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.
- Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H. and Gomez, K.A. (1976) *Laboratory manual for physiological studies of rice*. IRRI, Manila, Philippines.
- Zhu, J.K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 66-71.
- ネットエイジアリサーチ (2007) 「花粉症緩和米」についてのニーズ調査.
http://www.mobile-research.jp/investigation/2007_08_ji.html

調査情報部 (2009) 飼料用米生産の現状とコストダウンの可能性～平成 20 年度共同調査～. 畜産の情報 10 月号.

財務省 (2009) 貿易統計.<http://www.customs.go.jp/toukei/>

農林水産省 (2007) 遺伝子組換え農作物等に関する意識調査報告書.
<http://www.biotech-house.jp/investigation/2007/>

農 林 水 産 省 (2010) 食 糧 需 給 表 .
<http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/index.html>

農業・食品産業技術総合研究機構 (2004) 稲発酵粗飼料としてのクサホナ
ミ の 収 穫 適 期 と そ の 判 断 指 標 .
<http://www.mate.pref.mie.jp/MARC/seika/H16/05seikaH16.pdf>.

農業・食品産業技術総合研究機構 (2009) 多収技術による飼料イネ生産利
用 コ ス ト の 低 減 と 収 益 向 上 効 果 .
<http://www.naro.affrc.go.jp/top/seika/2009/01narc/narc09-25.html>