

博士論文番号：0381035

## 有用熱帯樹木の分子育種

森本 昌幸

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物細胞工学講座

(佐野 浩 教授)

平成18年1月30日提出

## 目次

|                     |    |
|---------------------|----|
| 序論                  | 3  |
| 第1章 コーキセンダンの分子育種    | 10 |
| コーキセンダンとは           | 10 |
| 1-1. 不定胚培養系の確立      | 12 |
| はじめに                | 12 |
| 材料と方法               | 14 |
| 結果                  | 16 |
| 1-2. 人工種子封入条件の検討    | 22 |
| はじめに                | 22 |
| 材料と方法               | 23 |
| 結果                  | 27 |
| 1-3. 形質転換方法の確立とその応用 | 35 |
| はじめに                | 35 |
| 材料と方法               | 36 |
| 結果                  | 39 |
| 考察                  | 44 |
| 不定胚培養系の確立           | 44 |
| 人工種子封入条件の検討         | 45 |
| 形質転換方法の確立とその応用      | 48 |
| 第2章 カフェインレスコーヒーの作出  | 50 |
| はじめに                | 50 |
| 材料と方法               | 54 |
| 結果                  | 57 |
| 考察                  | 65 |
| 総括                  | 67 |
| 参考文献                | 69 |
| 用語解説                | 81 |
| 付記                  | 85 |
| 謝辞                  | 90 |

## 序論

熱帯雨林は、木材や紙を生産する経済的価値を生む場所だけでなく、そこに生きる人や動物の生活の糧、また地球環境を支えるという大きな役割を担った場所である。しかし近年、過度な乱伐や農地や牧草地などへの転換、焼畑農業に一因がある野火などにより (FAO 2005)、1000 万～1500 万 ha/年という速度で熱帯雨林が減少している (図 1)。熱帯雨林には、地球上の生物種の 50%以上が生存するといわれており、熱帯雨林の減少により約 15% (50-150 万) の生物種が絶滅すると予測されている。また、現在残っている森林も減少し続けており、この現状を打破するために国や国際機関、紙パルプ会社などが植林を行なっているが、2000 年から 2005 年の 5 年間で約 280 万 ha/年という非常に遅い速度であり、植林はあまり進行していない (FAO 2005)。植林には、大きく分けて 2 つの目的がある。一方は、製紙パルプや建築資材など経済価値を生む産業植林と、もう一方は樹木が持つ環境への貢献(CO<sub>2</sub> 固定や土壌改良など)を重視した環境保全植林である。

産業植林で問題となっているのは、”どの樹木を植林に用いるか?”、“植林後どれくらいの期間で伐採が可能になるか?”である。近年”miracle trees”と呼ばれるアカシア属やユーカリノキ属の樹木が植林によく用いられている (RAP 2005)。これらの樹木は、生長が早くパルプに加工できるため産業的価値も高い。このため、プランテーションとして 10 年サイクルで植林され (Cossalter and Pye Smith 2003)、新しいプランテーションの一つとして用いられている。RAP の報告によると、アカシア属とユーカリノキ属だけで、植林に使用されている全樹木の約 2 割を占めることがわかっている (RAP 2003)。特に、ユーカリノキ属の場合は品種が 600 種近くあることから、植林を行なおうとする土地の気温や降雨量、土壌などにあった種を選抜して植林することが可能、言い換えれば、熱帯地域であればどこでもユーカリノキ属の樹木を植林することが可能になる (Srivastava et al. 2003)。また、荒廃した土地でも適応力が高い、他の早生樹と比較して病害虫の発生が少ない、山火事にも比較耐えられる、根からある程度のところで伐採すれば切り株から新しい芽が出て再成長し再植林の手間が省けるなどの特徴を有している。以上のように、アカシア属やユーカリノキ属を用いた植林は、

産業植林として非常に良いメリットがある反面、以下に述べるような問題点も報告されている。早生樹であるため土壌中の養分や地下水などが激しく減少し、短い期間で伐採、植林を繰り返せばその地域の土壌の枯渇や水源機能を低下させる恐れがあり、最終的にはアカシアやユーカリノキですら育成できなくなる可能性もある。これらの問題点は主に NGO から報告されている。土壌の枯渇や水源機能の低下については、科学的な証明または研究報告は少ないが、他の樹木や農作物と比較してほとんど差がないという研究結果も報告されている (Carrasco-Letelier et al. 2004, Morris et al. 2004)。また、これらの樹木は、パルプを生産するためだけに植えられることが多く、それまでの土地にはなかった外来の樹木を一種類だけ植林する”monoculture plantation”として使用されることが多い (RAP 2005)。このため、熱帯雨林の生態系を破壊し種の多様性を維持できないという問題点が示唆されている。この問題点を解決するために、例えば、マレーシアで植林事業を行なっている関西電力グループでは、アカシアなどの早生樹植林区画に隣接して在来種のフタバガキ科樹種を主体とした修復植林区を設けている。以上のように、産業植林を行なう際の問題点である、”どの樹木を植林に用いるか？”については、現在様々な課題を抱えている。もう一方の環境保全を目的とした植林については、黄土高原の砂漠緑化など実地で行なわれているが、産業植林と比較してあまり進んでいないと考えている。植林を行なっている多くの企業は、“CO<sub>2</sub> 固定植林事業”と銘打って事業展開を行なっているが、実際に植えられている樹木のほとんどは、アカシア属やユーカリノキ属の樹木が植えられており、ある程度の期間が過ぎれば伐採され、チップや建材として利用されている。確かに、アカシア属やユーカリノキ属の樹木は早生樹であり CO<sub>2</sub> 固定能は天然林と比較して 2-3 倍は高い。しかし、10 年単位で伐採が行なわれた場合、天然林と比較してどれくらいの効果があるかについては疑問が残る。

熱帯樹木の主な繁殖方法は、種子繁殖や挿し木である。しかし熱帯樹木の種子は、種子成熟時に発芽環境が整っているため、レッドマングローブのように種子が発芽した状態で枝から地上に落ちる種子、つまり休眠ができず保存が困難な種子があり。また挿し木による繁殖も、自生地では挿し木可能だが、自生地以外の環境では発根しない、また、挿し木そのものが困難な種がある、など

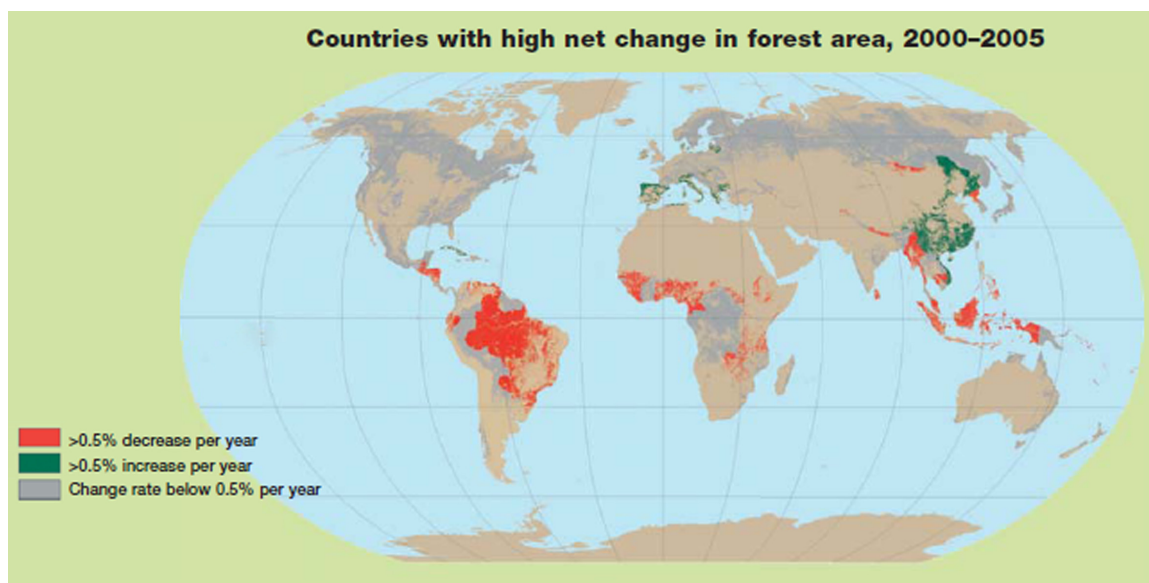


の問題があり、大量繁殖には不向きである。先に述べたユーカリノキ属も種によって多少異なるが、成木を用いて挿し木を行なっても発根しない場合が多い (Watt et al. 1999)。近年、“miracle trees”と同様にフタバガキ科の樹木を植林に用いることができないか研究が進められている。フタバガキは東南アジアの熱帯林に自生する樹木であるが、加工しやすく軽軟なためベニヤ板の材料として経済価値が高い樹木である。フタバガキも“miracle trees”と同様に、種子や挿し木による繁殖が行なわれているが、フタバガキの種子は数年～10年に一度しか結実せず、結実の時期も樹木により異なることから種子による繁殖は困難である。また、成木を用いて挿し木をするのが非常に困難であり、仮に挿し木に成功しても苗が斜行するなどの問題があり品質の良い苗を安定に供給することは難しい (Nakamura 2006)。これらの問題を解決するために、分子育種を用いて繁殖が行なうことができないか検討されている。また、1980年代頃から人工種子を用いた繁殖ができないか研究されている。人工種子とは、将来植物になる組織を外皮膜で包んだ種子で、通常の種子と同様、発芽発根し植物体になるカプセルのことである。

分子育種とは、優良な種苗を大量生産する方法である。分子育種を行なうためには、“組織培養系の確立”や“形質転換系の確立”が必要となる。組織培養とは、植物が持つ分化全能性を利用して組織や器官から植物体を再生させる培養条件を確立し、優良品種のクローン株を大量に生産できる技術である。組織培養を行う際に重要な事は、どの植物ホルモンを単独で、または組み合わせて使用するかといった培地条件を検討することである。用いる植物ホルモンの種類や濃度により、体細胞はカルス、不定胚、不定芽など様々な組織に分化する。一般的に、カルス誘導にはオーキシン単独、またはサイトカイニンと組み合わせ、不定芽誘導にはサイトカイニンとオーキシンの組み合わせ、不定胚形成にはオーキシン単独または、サイトカイニンとの組み合わせが良いと言われている。しかし、用いる植物種によりこれら条件は異なり、植物種によっては再分化そのものが困難な種もある。さらに、同じ植物種であっても品種間の差があり、一つの品種で確立した条件が同じ植物種の異なる品種に適用することが困難な場合がある (Tomes 1985, Brown 1988)。また、カルスや不定胚などを誘導しやすい組織、器官も植物種によってことなる。一般的には、若くて活発に細胞分裂

している未熟胚や胚軸、幼葉、茎頂、葉柄などが用いられている。現在までに、草本植物では、ニンジン、アスパラガス、サツマイモ、カボチャなどの野菜類や、シロイヌナズナ、タバコ、イネなどのモデル植物で組織培養系が確立されている。また、木本植物では、ユーカリ、キリ、カキ、カラマツ、コナラ、コーヒーノキ、ポプラなど幾つか限られた種で組織培養系が確立されているが、草本植物と比較すると数は少ない。特に、熱帯樹木に限定すると、その数はさらに少なくなる。この原因は、樹木に含まれているポリフェノール含量の多さ、有機酸の含有量だと考えられている。もう一方の”形質転換系の確立”とは、組織培養をベースとして、従来の種間交雑では不可能だった外来の遺伝子の導入方法を確立することである。外来遺伝子の導入には、土壌細菌の一種であるアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* または *A. rhizogenes*) を用いたアグロバクテリウム法や、細胞膜に穴を開けて外来遺伝子を植物の細胞に送るエレクトロポレーション法およびマイクロインジェクション法が用いられている。また、一過的発現を観察するために DNA をコーティングした金粒子を圧縮したガスを用いて直接細胞に打ち込むパーティクルガン法がある。エレクトロポレーション法やマイクロインジェクション法、パーティクルガン法などは物理的に遺伝子導入を行なうので、ほとんどの植物種で用いることが可能である。しかし、生物的遺伝子導入のアグロバクテリウム法は、用いる植物によって形質転換が可能かどうかは異なる。現在までに草本植物では、タバコ、イネ、シロイヌナズナなどモデル植物をはじめとして野菜や花卉など多くの草本植物で形質転換方法が確立されている (OECD)。一方の木本植物では、オレンジ、リンゴ、モモなどの果樹では現在までに 20 種報告されているが (Petri and Burgos 2005)、熱帯樹木に限定するとユーカリノキ (MacRae and Staden 1993)、ゴムノキ (Jayashree et al. 2003)、コーヒーノキ (Hatanaka et al. 1999)、ヘンナ (Bakkali et al. 1997) など報告されている数は草本植物と比較して少ない。木本植物の形質転換は、対象となる樹木に付加価値をつける目的で行なわれることが多い。例えばポプラでは、重金属を植物体内に蓄積させるために、重金属結合能を有するグルタチオン (GSH) を導入した形質転換体が作製されている (Bittsanszky et al. 2005)。その他には、耐虫性遺伝子を組み込んだポプラや、除草剤耐性遺伝子を組み込んだポプラ、ユーカリノキなどが報告されている。

本研究では、産業植林が抱えている”どの樹木を植林に用いるか？”という課題に着目した。私は、外来の樹木を植栽するのではなく現地に自生する樹木、または、栽培樹種として植林方法の確立している樹木を植林に用いることで、生態系の破壊や種の多様性などの課題をクリアできるのではないかと考えた。そこで、東南アジアに自生する (図 2)コーキセンダン(*Azadirachta excelsa* Jacobs)と、アフリカに自生し (図 3)商品価値の高い栽培樹種であるコーヒーノキ(*Coffea arabica*, *C. canephora*)を材料に選び研究を行なった。育種目標は、”培養系の確立”と”形質転換を用いた付加価値の付与”である。”培養系の確立”では、組織培養を用いて選んだ樹木の不定胚培養系の確立を行い、種子や挿し木に頼らない繁殖方法の確立を目的とした。また、”形質転換を用いた付加価値の付与”では、形質転換方法の確立を行い、コーキセンダンに除草剤耐性と抗菌性の付与、コーヒーノキにカフェインレスの付与を目的とした。除草剤耐性の付与は、植林後の課題である”weed control”の対策として、抗菌性の付与は、人工種子を野外に播種する時に、雑菌混入による生育阻害の対策として用いた。



(FAO 2005)

図1 過去5年間の熱帯雨林減少および増加度

赤く塗られているところが2000年から2005年の5年間で、年間0.5%以上減少している地域で、緑色に塗られているところが年間0.5%以上増加している地域を示す

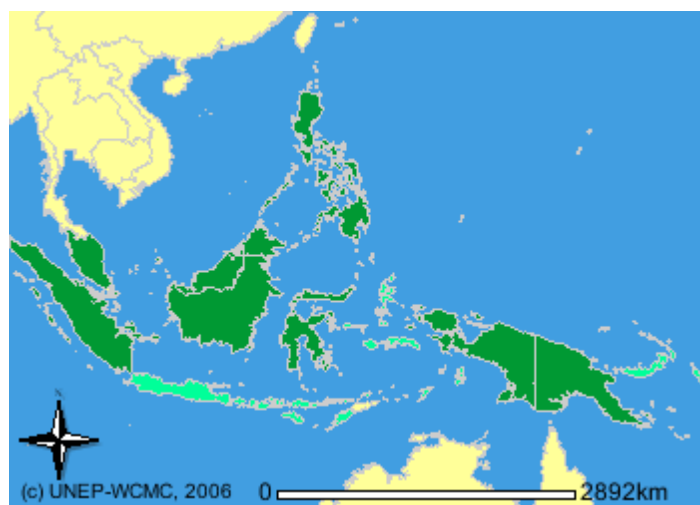


図2 コーキセンダンの自生地域

コーキセンダンは緑色に塗られている地域（インドネシア、マレーシア、パプアニューギニア、フィリピンなど）で自生している

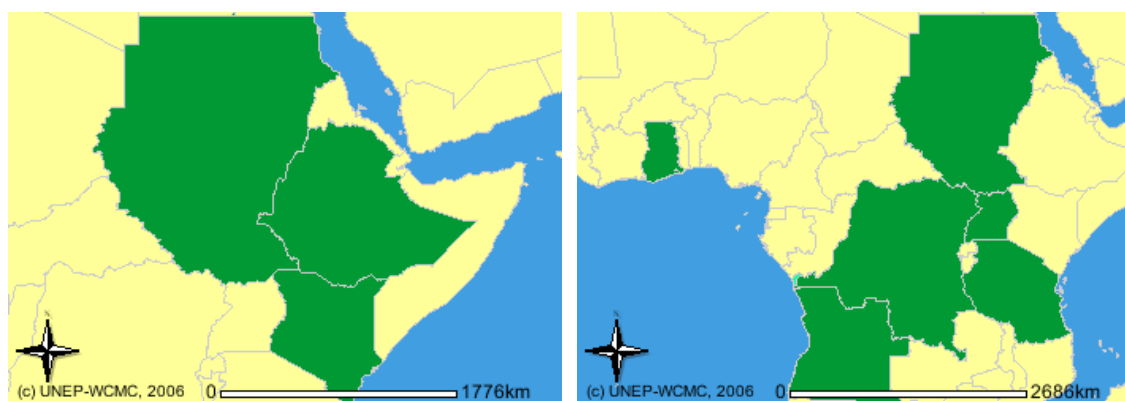


図3 コーヒーノキの自生地域

（左図） *Coffea arabica* が自生している地域。エチオピア、ケニア、スーダン。

（右図） *Coffea canephora* が自生している地域。アンゴラ、コンゴ、ウガンダなど。

## 第1章 コーキセンダンの分子育種

### コーキセンダンについて

コーキセンダン(*Azadirachta excelsa* Jacobs)は、梅檀（せんだん）の1種で、マレーシア、フィリピン、ボルネオ、インドネシアなどの東南アジアに自生する造林木である(図 4)。常緑高木で、全緑の小葉 7-11 対からなる 1 回奇数羽状複葉をもつ。花は緑白色で芳香がある。この樹木は成長が非常に早く、約 10 年以内に、高さ 15-20m、幹の直径 30cm まで達する。木材は、赤褐色で表面に光沢美があり(図 4F)、マホガニーの代価種として家具、内装材(図 4E)などに、また、建築、車両、船舶などに利用されている。種子から取れる油は石鹸やランプの燃料として、また、葉や果実、花などは食材としてサラダなどの料理に利用されている(Lemmens et al. 1995) (図 4B, C)。また近縁種のインドセンダン(*Azadirachta indica* : ニーム)と同様に、葉や果実にはアザディラクチンと呼ばれる耐虫性物質を含み、農薬や薬用として利用されている(Cui et al. 1998; Kanokmedhakul et al. 2005)。現地では、キャベツなどの野菜を虫害から守るために、果実から抽出したアザディラクチンを殺虫剤代わりに利用している。以上のように、有用な樹木であるためマレーシアやタイでは盛んに研究されている。特に、マレーシアでは、伐採は政府によって管理されており、研究または種の保存以外の目的で種子を国外に出すことはできない (By the Planet, Inc.)。また、マレーシアの Forest Research Institute Malaysia (FRIM)では、コーキセンダンをプランテーションに用いることはできないか研究されている。この章では、組織培養を用いて種子や挿し木に頼らない繁殖方法の確立として「1-1. 不定胚培養系の確立」と「1-2. 人工種子封入条件の検討」を、植林後の”weed control”対策として「1-3. 形質転換方法の確立とその応用」を行なった。

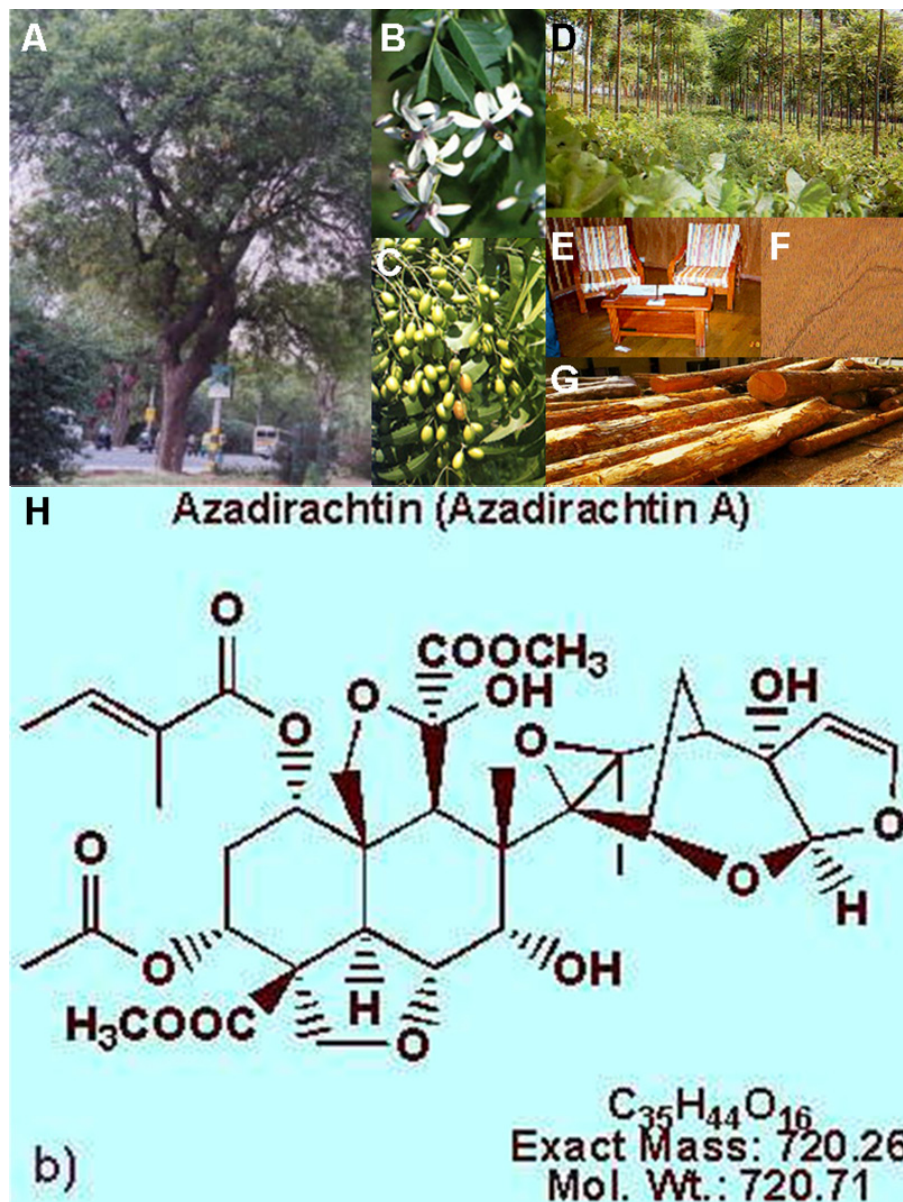


図4 コーキシセンダン

コーキシセンダンは、東南アジアに自生する樹木である(A)。花や果実は食材として(B, C)、木材は、家具や内装材として利用されている(E-G)。また、葉や果実に対虫性物質のアザディラクチンを含む(H)。タイでは、農場の境界として用いられている(D)。

## 1-1. 不定胚培養系の確立

### はじめに

はじめに、分子育種の基盤である培養系の確立を行った。コーキセンダンの培養系については、Liew (1998, 1999)、Te-chato (2000)、Giagnacovo (2001)らにより報告されている。Liew らは、*Azadirachta excelsa* Linn.を、Giagnacovo および Te-chato らは、*Azadirachta excelsa* Jacobs を用いて実験を行なっている。Liew や Giagnacovo らの培養方法は、腋芽から多芽体（用語解説参照 p81）を誘導し、その後発根誘導培地に移植し植物体を再生するという方法を用いている。Te-chato らは、葉柄からカルスを誘導し、誘導したカルスから不定胚（用語解説参照 p81）を形成させる不定胚培養系を報告している。本研究では、なるべく簡便な再分化方法の確立を目指すため、Liew や Giagnacovo らが多芽体を用いて行なった、外植片→地上部→地下部→再分化、という 3 段階の培養方法ではなく、Te-chato らが不定胚を用いて行なった、外植片→地上部+地下部→再分化、という 2 段階の培養条件で再分化を誘導できる不定胚培養を行なった。一般的に不定胚を外植片から誘導するとき、Te-chato らのように外植片から不定胚形成能の高いカルスを誘導し不定胚を形成する間接誘導法と、外植片からカルスを經由せずに直接不定胚を誘導する直接誘導法がある（図 5）。不定胚誘導率は、間接誘導法のほうが高いと言われているが、カルスを誘導する際に遺伝変異が起りやすい、カルスを誘導する培養条件を決定する必要がある等の欠点がある。そこで本研究では、簡便に再分化を誘導できる、新規な直接誘導法を選択し実験を行なった。



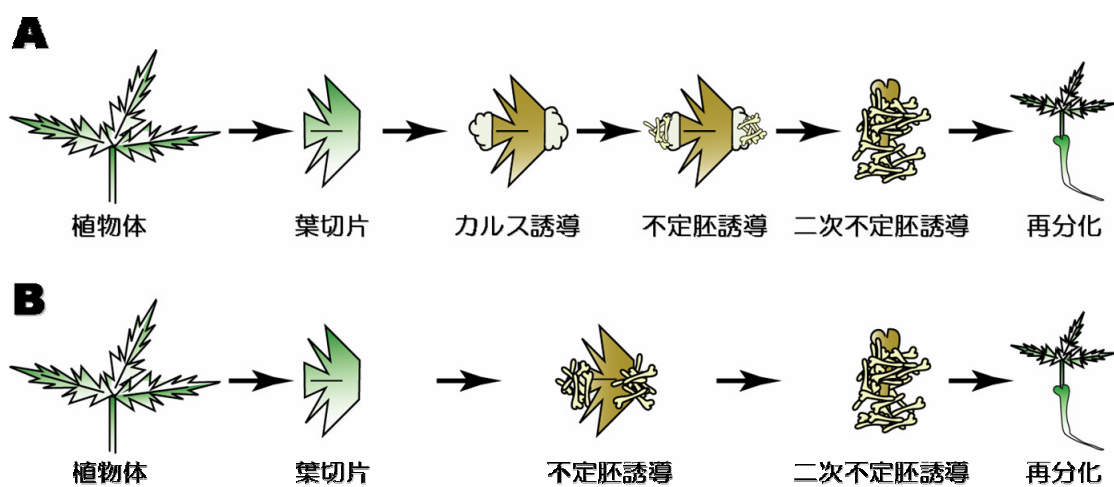


図5 不定胚誘導法

(A)間接誘導法。葉切片からカルスを誘導し、カルスから不定胚を誘導する方法。(B)直接誘導法。葉切片からカルスを経由せずに不定胚を誘導する方法。間接誘導法および直接誘導法ともに、カルスまたは葉切片から誘導した不定胚は、培養を続けることで二次不定胚を誘導できる。

## 材料と方法

### (材料)

コーキセンダン (*Azadirachta excelsa* Jacobs) の植物体および不定胚は、住友林業株式会社 筑波研究所 資源グループから供与

### (方法)

#### サイトカイニンとオーキシンが不定胚誘導に与える影響

サイトカイニンにはベンジルアデニン(BA)をオーキシンにはナフタレン酢酸(NAA)を用いた。培地には、BA を 0、1、5、10  $\mu\text{M}$ 、NAA を 0、1、10  $\mu\text{M}$  の 12 種類の濃度を組み合わせた MS 培地(MS 無機塩、MS ビタミン、スクロース 30g  $\text{l}^{-1}$ 、ゲランガム 3g  $\text{l}^{-1}$ )を用いた。用いた試料は不定胚である。一回の検定につき不定胚を 20 個供試し、30 日後、不定胚誘導率を測定した。これを 3 回繰り返した。培養条件は 25°C、暗条件である。不定胚誘導率は、用いた不定胚のうち、30 日後に二次不定胚を形成した数をパーセンテージで表示した値である。例えば不定胚を 10 個仕込み、30 日後に 10 個のうち 7 個の不定胚から二次不定胚が形成されていれば、不定胚誘導率は 70%である。

#### 不定胚誘導時の BA 濃度依存性

MS 培地に、0、1、5、10、20、30、50、70、90、100、200  $\mu\text{M}$  の BA をそれぞれ添加した。用いた試料は不定胚である。一回の検定につき不定胚を 20 個供試し、30 日後、不定胚誘導率を測定した。これを 3 回繰り返した。培養条件は 25°C、暗条件である。

#### BA 以外のサイトカイニンが不定胚誘導に与える影響

BA 以外のサイトカイニンとして kinetin (KN)と  $N^6$ -(2-isopentenyl)-adenine (2ip)を用いた。MS 培地に、それぞれ 5  $\mu\text{M}$  添加した。用いた試料は不定胚である。一回の検定につき不定胚を 20 個供試し、30 日後、不定胚誘導率を測定した。これを 3 回繰り返した。培養条件は 25°C、暗条件である。

### 不定胚の大きさと光量が不定胚誘導に与える影響

継代培地で増殖させた二次不定胚は、3mm 程度の正常な不定胚と、5mm 以上の肥大化した不定胚に大別される。これら 2 種の不定胚を用いて、どちらが不定胚増殖に適しているか検定を行った。培地には、BA を 5  $\mu$ M 添加した MS 培地を用いた。一回の検定につき不定胚を 20 個供試し、30 日後、不定胚誘導率を測定した。これを 3 回繰り返した。培養条件は 25°C である。

### 組織切片の作製

継代培養で得た正常な魚雷型不定胚と、肥大化した不定胚の茎頂や根端付近が肥大化していないかを観察するために、組織切片を作製した。包埋には Technovit 7100 (Kluzer & Co., Germany)を用いた。実験方法は説明書に順ずる。包埋後、ミクロトームを用いて切片化し、TBO 染色を行い光学顕微鏡下で観察した。

### 再分化系の検定

用いた不定胚は、継代培地で増殖させた不定胚で、再分化に適している魚雷型の胚である。培地は、ホルモンフリーの改変 1/2MS 培地 (1/2MS 無機塩、MS ビタミン、スクロース 30g l<sup>-1</sup>、ゲランガム 3g l<sup>-1</sup>) を用いた。培養条件は 28°C、明条件で 4 週間ごとに新しい培地に植え替えた。また、再分化が見られた不定胚は、ホルモンフリーの改変 1/2MS 液体培地を入れたフロリアライト (Nisshinbo, Japan)上で更に 2-6 ヶ月培養し、その後、バーミキュライト(Nittai Inc., Japan) と Metro-Mix<sup>®</sup> 350 (Sun Gro Horticulture Distribution Inc., USA) (1:1 v/v)を混ぜた土に植え温室で育てた。

## 結果

### サイトカイニンとオーキシンが不定胚誘導に与える影響

不定胚を BA と NAA の濃度を組み合わせ添加した MS 培地に静置し、30 日後、不定胚誘導率を求めた。その結果、NAA を加えずに BA を単独で 5  $\mu$ M 添加した条件下で、不定胚誘導率は約 80%、10  $\mu$ M では約 45%と NAA (約 15%)と比較して、3~5 倍の二次不定胚が誘導された(表 1)。また、培地に高濃度の NAA が入っている条件下では、カルス誘導が起こった。

### 不定胚誘導時の BA 濃度依存性

上記の結果を元に、不定胚を BA の濃度を 0-200  $\mu$ M 添加した MS 培地に静置し、30 日後、不定胚誘導率を求めた。その結果、BA を 5  $\mu$ M 加えた条件下で、約 70% の不定胚誘導率を得ることができた (図 6)。また、BA の濃度が高くなればなるほど不定胚誘導率は減少し、特に 200  $\mu$ M の BA を添加した条件下では、不定胚が誘導されず、枯死している不定胚も観察された。

### BA 以外のサイトカイニンが不定胚誘導に与える影響

BA 以外のサイトカイニン、KN と 2ip を 5  $\mu$ M 添加した MS 培地に静置し、30 日後、不定胚誘導率を求めた。その結果、KN および 2ip を培地に添加した条件下での不定胚誘導率は約 20%であった (図 7)。

### 不定胚の大きさと光量が不定胚誘導に与える影響

二次不定胚増殖には 3 mm 程度の正常な不定胚と、5 mm 以上の肥大化した不定胚のどちらを使用するのが適しているか、明条件と暗条件で差はあるのかについて実験を行った。その結果、不定胚の大きさに関わらず、明条件よりも暗条件の方が二次不定胚誘導率は高かった。また、暗条件において、5 mm 以上の不定胚を用いた時の誘導率は 56%で、3 mm 程度の不定胚を用いた時の 28%と比べて、2 倍の二次不定胚誘導率を得た(図 8)。

### 組織切片の作製

組織切片を作製し細胞の肥大化を観察した結果、正常な魚雷型不定胚では、茎頂、根端付近に存在する細胞に肥大化などの異常は見られず、細胞の並びも規則的であった (図 9A, B)。一方、肥大化した魚雷様の不定胚では、細胞の肥大化や空隙などが多く観察され、また、細胞の並びも不規則であった(図 9C, D)。

### 再分化条件の検定

葉切片または不定胚を用いて誘導した(二次)不定胚のうち (図 10A, B)、ハート型または魚雷型の不定胚を再分化させるため、再分化条件の検定を行った。その結果、ホルモンフリーの改変 1/2MS 培地上で発芽発根 (図 10C)が見られた。再分化した不定胚は、2-3 ヶ月間シャーレで培養し、さらに、ホルモンフリーの改変 1/2MS 液体培地を入れたフロリアライト上で更に 2-6 ヶ月培養することで幼植物体に成長することがわかった (図 10D)。その後、バーミキュライト(Nittai Inc., Japan) と Metro-Mix® 350 (Sun Gro Horticulture Distribution Inc., USA) (1:1 v/v)を混ぜた土に植え温室で育てた(図 10E)。

表 1 サイトカイニンとオーキシンを添加したときの不定胚誘導率

BA と NAA を組み合わせた MS 培地に不定胚を移植し、1 ヶ月後、不定胚誘導率を求めた。灰色セルはカルス化が見られた条件である。1 回の検定に用いたサンプル数は各 20 個で、これを 3 回繰り返した。

| 不定胚誘導率 (%)        |               |             |             |            |
|-------------------|---------------|-------------|-------------|------------|
| NAA<br>( $\mu$ M) | BA ( $\mu$ M) |             |             |            |
|                   | 0             | 1           | 5           | 10         |
| 0                 | 18 $\pm$ 12   | 12 $\pm$ 8  | 83 $\pm$ 10 | 45 $\pm$ 5 |
| 1                 | 15 $\pm$ 5    | 17 $\pm$ 3  | 18 $\pm$ 12 | 17 $\pm$ 3 |
| 10                | 8 $\pm$ 7     | 20 $\pm$ 15 | 23 $\pm$ 7  | 2 $\pm$ 3  |

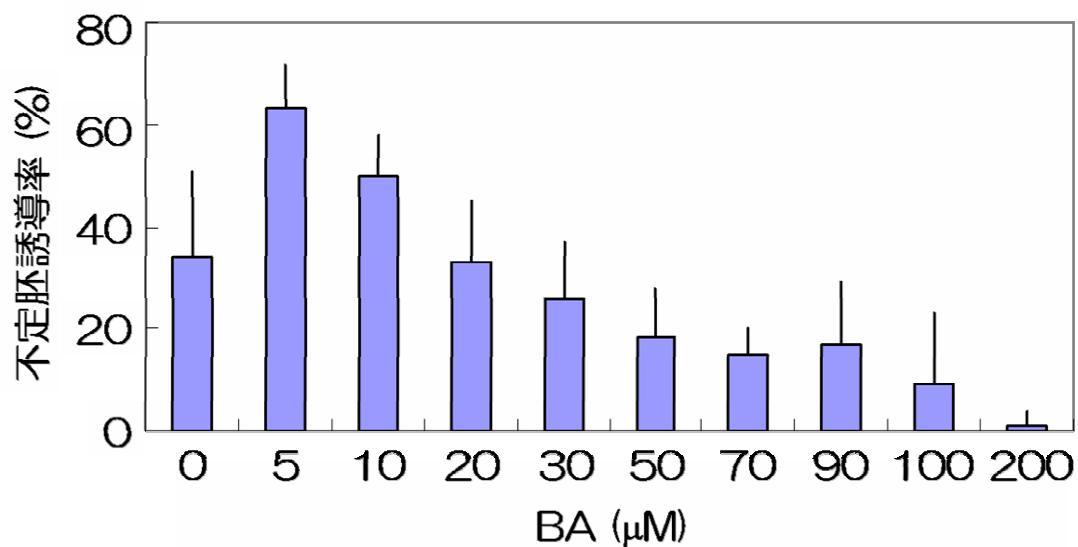


図 6 不定胚誘導時の BA 濃度依存性

BA を 0-200  $\mu\text{M}$  添加した MS 培地に不定胚を移植し、1 ヶ月後、不定胚誘導率を求めた。1 回の検定に用いたサンプル数は各 20 個で、これを 3 回繰り返した。

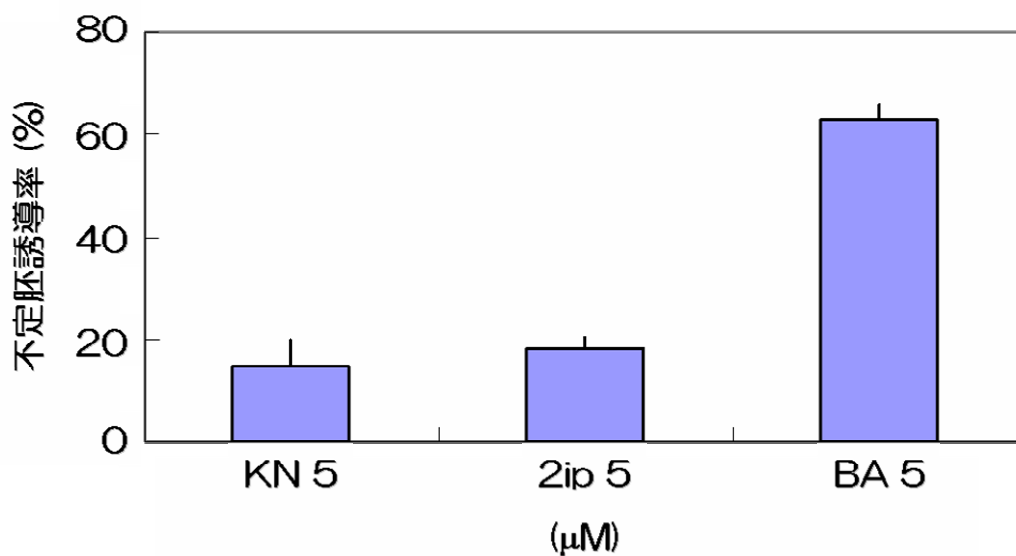


図 7 BA 以外のサイトカイニンを添加したときの不定胚誘導率

KN と 2ip を添加した MS 培地に不定胚を移植し、1 ヶ月後、不定胚誘導率を求めた。1 回の検定に用いたサンプル数は各 20 個で、これを 3 回繰り返した。

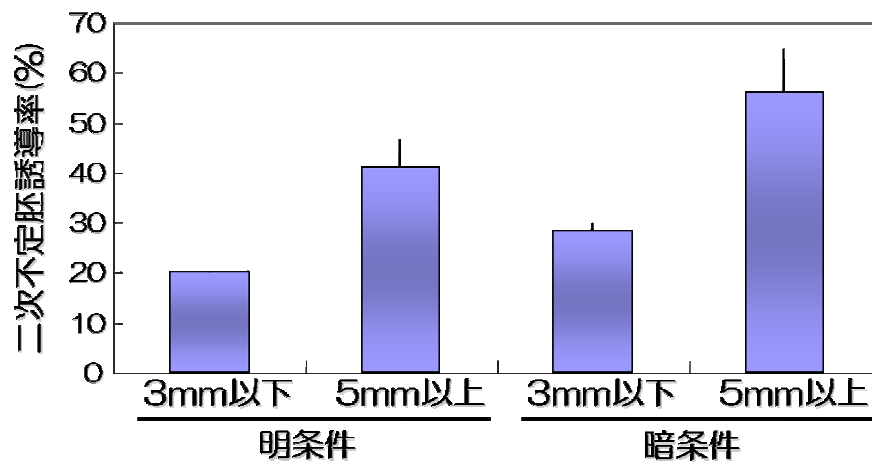


図 8 不定胚の大きさと光量による不定胚誘導率への影響

3 mm 以下の不定胚と 5 mm 以上の肥大化した不定胚を、MS 培地に 5  $\mu$ M BA を添加した条件に移植し、明条件下と暗条件下に静置した。1 ヶ月後、二次不定胚誘導率を測定した。1 回の検定に用いたサンプル数は各 20 個で、これを 3 回繰り返した。

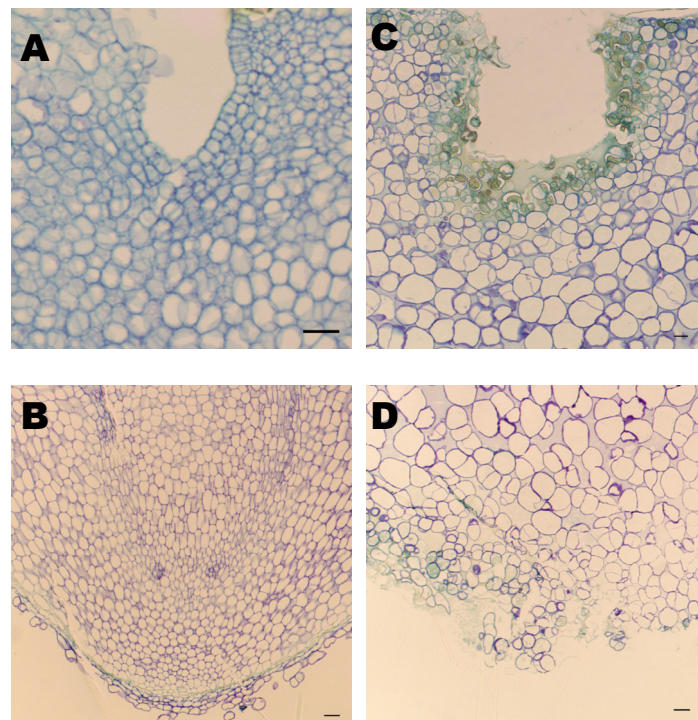


図 9 魚雷型不定胚と肥大化した不定胚の組織切片

魚雷型不定胚または肥大化した魚雷様の不定胚を用いて組織切片を作成した。染色方法は TBO 染色である。魚雷型不定胚の茎頂 (A)や根端 (B)付近では細胞の肥大化や、空隙は見られなかったが、肥大化した不定胚の茎頂 (C)や根端 (D)付近では細胞が肥大し、空隙も多数見られた。緑色の染色部位は、リグニンが蓄積している部位である (C)。Scale bars : 50  $\mu$ m



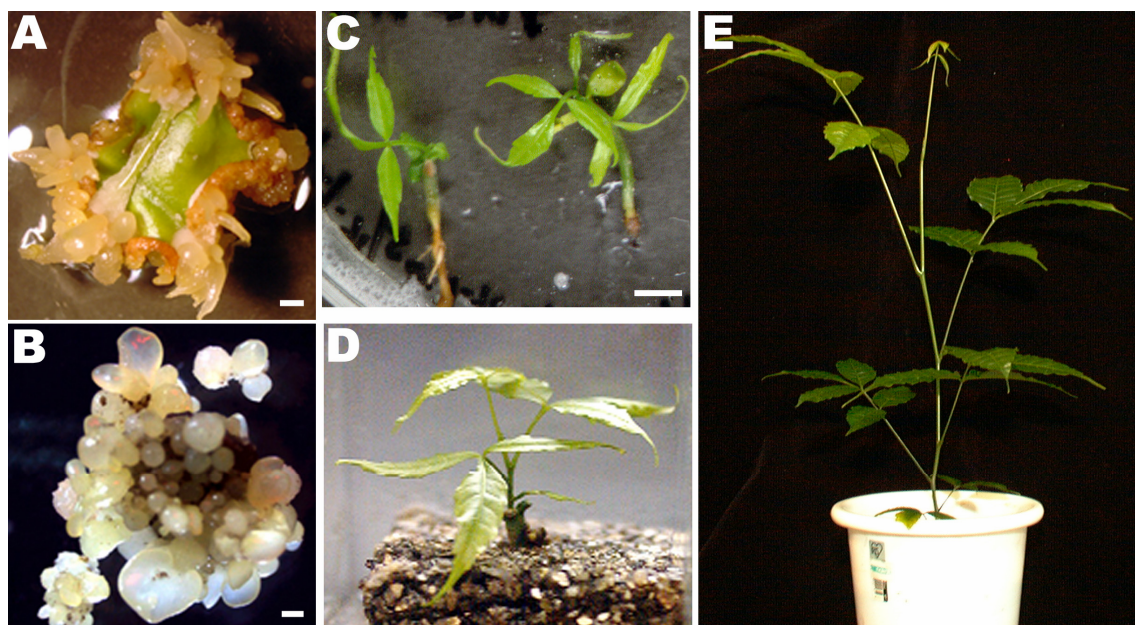


図 10 不定胚培養系の確立

(A) 葉切片からの不定胚誘導。5  $\mu$ M BA を添加した MS 培地上に移植後約 40 日目。(B) 不定胚からの二次不定胚誘導。5  $\mu$ M BA を添加した MS 培地上に移植後約 120 日目。(C) 不定胚の再分化誘導。二次不定胚を改変 1/2MS 培地に移植後、約 60 日目。(D) 馴化。発芽および発根が見られた不定胚をフロリアライトに移植した。写真は移植後、約 60 日目。(E) 鉢上げ。幼植物体を鉢上げし約 60 日目の写真。Scale bars : (A), (B) 1mm, (C) 1cm.

## 1-2. 人工種子封入条件の検討

### はじめに

コーキセンダンの繁殖方法は、種子繁殖や挿し木である。しかし、種子は 3 ヶ月以上保存すると発芽できなくなり、挿し木も熱帯地域以外の環境下では発根させにくい、などの問題点がある。そこで、人工種子を用いた繁殖方法について検討を行なった。前項で誘導した不定胚は、肥大化しやすく一回の実験で得られる不定胚の数も少ない。また、培養中に褐変化も起こりやすいという欠点がある。これらの不定胚をそのまま人工種子に封入すると、再分化率の低下を引き起こすと考えられる。そこで、「肥大化を抑制する不定胚誘導条件の検討」と「褐変化防止条件の検討」を行い、「人工種子封入条件の検討」を行なった。「肥大化を抑制する不定胚誘導条件の検討」では、アスコルビン酸 (AsA) を培地に添加した。AsA は、細胞分裂を促進させ肥大化を抑える働きがあり、通常の組織培養では、再分化処理に用いられることが多い。褐変化は、ポリフェノールオキシダーゼ活性による酸化ストレスが原因で起こると考えられている。そこで、「褐変化防止条件の検討」では、ポリビニルピロリドン (PVP) (Chevre et al. 1983)、アスコルビン酸 (D'Silva 1991)、1,4-ジチオスレイトール (DTT) (Krikorian 1994)、クエン酸 (Nambiar and Iyer 1988)、システイン塩酸塩 (CH) (Nambiar and Iyer 1988) を培地に添加した。これらの試薬は、褐変化防止剤または抗酸化剤として組織培養でよく用いられている試薬である。

## 材料と方法

### 1. 肥大化を抑制する不定胚誘導条件の検討

#### 植物材料

不定胚誘導条件である、5  $\mu\text{M}$  BA を含む MS 培地で誘導したコーキセンダンの二次不定胚を用いた。

#### アスコルビン酸の不定胚肥大化抑制への影響

不定胚誘導条件 (MS 培地+5  $\mu\text{M}$  BA) に、AsA を 0, 0.1, 1, 5, 10, 100  $\mu\text{M}$  それぞれ添加した培地を作製した。一回の検定につき不定胚を 20 個供試し、魚雷型不定胚誘導率を求めた。これを 3 回繰り返した。培養条件は 25°C、暗条件である。魚雷型不定胚誘導率は、取れた全ての二次不定胚のうち魚雷型不定胚 (3mm 程度) が何%占めるかを数値化した値である。例えば、二次不定胚が 100 個誘導され、そのうち 50 個が 3mm 程度の魚雷型不定胚だと、魚雷型不定胚誘導率は 50% になる。この数値が高ければ高いほど、効率よく魚雷型不定胚を誘導可能な条件である。

#### サイトカイニンとアスコルビン酸の不定胚肥大化抑制への影響

表 2 に示す培地 (サイトカイニンの種類と AsA の有無、計 62 条件) をそれぞれ作製した。一回の検定につき不定胚誘導条件で得た不定胚を 20 個供試し、30 日後、魚雷型不定胚誘導率を求めた。培養条件は 25°C、暗条件である。

#### BA または Zeatin とアスコルビン酸の不定胚肥大化抑制への影響

表 3 に示す培地をそれぞれ作製した。一回の検定につき不定胚誘導条件で得た不定胚を 20 個供試し、30 日後、シャーレ一枚あたりの魚雷型不定胚 (3mm 程度) の総生重量を測定した。これを 3 回繰り返した。培養条件は 25°C、暗条件である。

### 継代条件の検討

MS 培地に 5  $\mu$ M Zeatin と 5 $\mu$ M AsA を添加した培地を作製した。用いた不定胚は、不定胚誘導条件で得た不定胚と、肥大化抑制不定胚誘導条件 (MS 培地 + 5  $\mu$ M Zeatin + 5 $\mu$ M AsA) で得た不定胚である。1 回の検定につき不定胚をそれぞれ 50 個供試し、30 日後、魚雷型不定胚誘導率と魚雷型不定胚 (3mm 程度) の総生重量を測定した。これを 3 回繰り返した。培養条件は 25°C、暗条件である。

## **2. 褐変化防止条件の検討**

### 植物材料

前項の「肥大化を抑制する不定胚誘導条件の検討」で誘導した、3 mm 程度の魚雷型不定胚を用いた。

### 24 穴プレートを用いた擬似人工種子化

24 穴プレート (1 穴の直径は 16mm) を用いて擬似人工種子化を行った。1 穴に、改変 1/2MS 液体培地を 2 ml と魚雷型不定胚 (3mm 程度) を 1 つ入れ、パラフィルム (American National Can Company, USA) で 2 重にシールし、1、2、3 ヶ月間、25°C、暗条件下で保存した。保存後、再分化培地 (改変 1/2MS 培地、ホルモンフリー) に移植し 2-3 ヶ月後に再分化率を測定した。培養条件は 28°C、明条件である。

### 褐変化防止剤の選択

改変 1/2MS 液体培地に褐変化防止剤である PVP を 10, 100, 200, 500 mg l<sup>-1</sup>、AsA、DTT、クエン酸、CH を 0.1, 1, 10, 100 mM になるように添加した液体培地を作製した。24 穴プレートの 1 ウェルにつき、上記の液体培地 2 ml と不定胚を 1 つ入れ、1、2、3 ヶ月間、25°C、暗条件下で保存した。1、2、3 ヶ月後、不定胚を取り出し、非褐変化率を測定した。1 回の検定につき不定胚をそれぞれ 5 個供試した。非褐変化率は、仕込んだ不定胚のうち何パーセントの不定胚が褐変化しなかったかを測定した値である。例えば、10 個仕込み、1 ヶ月後、3 個の不定胚が褐変化していなければ、非褐変化率は 30% である。この数値が高ければ高いほど、褐変化を抑制している条件である。

#### 褐変化防止処理後の再分化検定

改変 1/2MS 液体培地に AsA と CH を 0.1, 1, 10, 100 mM になるように添加した液体培地を作製した。24 穴プレートの 1 ウェルにつき、上記の液体培地 2 ml と不定胚を 1 つ入れ、1、2、3 ヶ月間保存した。1、2、3 ヶ月後、不定胚を取り出し、再分化培地に移植し 2-3 ヶ月後、再分化率を測定した。1 回の検定につき不定胚をそれぞれ 20 個供試し、これを 3 回繰り返した。培養条件は 25℃、暗条件である。

表 2 肥大化抑制実験に用いたサイトカイニンとアスコルビン酸の濃度

| 基本培地      | 植物ホルモン (μM) | アスコルビン酸 (5μM)の有無 |
|-----------|-------------|------------------|
| 改変1/2MS培地 | BA          | 5 + (1μM)        |
| 改変1/2MS培地 | BA          | 5 +              |
| MS培地      | BA          | 0.1 + / -        |
|           |             | 1 + / -          |
|           |             | 5 + / -          |
|           |             | 10 + / -         |
|           |             | 20 + / -         |
| MS培地      | 2ip         | 0.1 + / -        |
|           |             | 1 + / -          |
|           |             | 5 + / -          |
|           |             | 10 + / -         |
|           |             | 20 + / -         |
| MS培地      | KN          | 0.1 + / -        |
|           |             | 1 + / -          |
|           |             | 5 + / -          |
|           |             | 10 + / -         |
|           |             | 20 + / -         |
| MS培地      | Zea         | 0.1 + / -        |
|           |             | 1 + / -          |
|           |             | 5 + / -          |
|           |             | 10 + / -         |
|           |             | 20 + / -         |
| MS培地      | TDZ         | 0.1 + / -        |
|           |             | 1 + / -          |
|           |             | 5 + / -          |
|           |             | 10 + / -         |
|           |             | 20 + / -         |
| MS培地      | 4-CPPU      | 0.1 + / -        |
|           |             | 1 + / -          |
|           |             | 5 + / -          |
|           |             | 10 + / -         |
|           |             | 20 + / -         |

BA: 6-benzyladenine, 2ip: N<sup>6</sup>-(2-isopentenyl)-adenine, KN: kinetin, Zea: zeatin, TDZ: thidiazuron, 4-CPPU: N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea

表 3 肥大化抑制実験に用いた BA または Zeatin とアスコルビン酸の濃度

| 基本培地      | 植物ホルモン (μM) | アスコルビン酸 (5μM)の有無 |
|-----------|-------------|------------------|
| 改変1/2MS培地 | BA          | 5 + (1μM)        |
| 改変1/2MS培地 | BA          | 5 +              |
| MS培地      | BA          | 1 +              |
|           |             | 5 +              |
|           | Zea         | 1 + / -          |
|           |             | 5 + / -          |

## 結果

### 1. 肥大化を抑制する不定胚誘導条件の検討

#### アスコルビン酸の不定胚肥大化抑制への影響

継代培養で得られるコーキセンダンの魚雷型不定胚は、5 mm 前後と肥大化傾向にあり、一回の培養で取れる量も少ない。そこで、不定胚誘導条件 (MS 培地 + 5  $\mu$ M BA) に、AsA を 0, 0.1, 1, 5, 10, 100  $\mu$ M 添加し実験を行った。その結果、AsA を 1 または 5  $\mu$ M 添加した条件下では、魚雷型不定胚誘導率が約 60%で、AsA を添加しなかった条件と比較して 3 倍近く効率よく魚雷型不定胚を誘導できた (図 11A)。また、詳細な観察を行った結果、アスコルビン酸を 5  $\mu$ M 添加した条件下で得られる不定胚の方が、写真 (図 11B)に示したように、より形の良い不定胚を得られた。

#### サイトカイニンとアスコルビン酸の不定胚肥大化抑制への影響

BA 以外のサイトカイニンとアスコルビン酸を組み合わせることで、3 mm 程度の魚雷型不定胚を誘導できるかどうかについての検定を行った。その結果、サイトカイニンの種類に関係なく AsA を添加することで魚雷型不定胚誘導率は 3 倍上昇した。また、AsA を添加した条件下について詳細に見てみると、BA または Zeatin を用いた条件下で、効率よく 3 mm 程度の魚雷型不定胚を誘導できた (図 12)。

#### BA または Zeatin とアスコルビン酸の不定胚肥大化抑制への影響

AsA と組み合わせるサイトカイニンには BA と Zeatin を選択し、シャーレー一枚あたりの魚雷型不定胚 (3mm 程度) の総生重量を求めた。その結果、3 mm 程度の魚雷型不定胚がコントロール (MS 培地 + 5  $\mu$ M BA)では 47 mg (約 5 個) であったのに対して、5  $\mu$ M Zeatin + 5  $\mu$ M AsA の条件では 125 mg (約 14 個) と、3 倍多く目的の魚雷型不定胚を得た (表 4、図 13)。

### 継代条件の検討

MS 培地に 5  $\mu$ M Zeatin と 5  $\mu$ M AsA を添加して継代培養を行なっていたが、1 回、2 回、3 回と継代し続けていくうちに、3 mm 程度の魚雷型不定胚の量が減少し、継代 3 回目では 1 回目と比較して約 1/10 に減少した (図 14A)。そこで、不定胚誘導条件で誘導した不定胚と、肥大化抑制不定胚誘導条件 (MS 培地 + 5  $\mu$ M Zeatin + 5  $\mu$ M AsA) で誘導した不定胚の、どちらが 3mm 程度の魚雷型不定胚をより多く誘導できるかについて検討を行なった。その結果、肥大化抑制不定胚誘導条件で前処理した不定胚を用いた場合、つまり、同じ条件で継代し続けた場合は、シャーレー一枚あたり 71 mg の 3 mm 程度の魚雷型不定胚を得たが、不定胚誘導条件で前処理した不定胚を用いた場合は、141 mg と約 2 倍の不定胚を得られた (図 14B)。

## **2. 褐変化防止条件の検討**

### 24 穴プレートを用いた擬似人工種子化と褐変化防止剤の選択

24 穴シャーレの 1 穴に液体培地と不定胚を入れ、擬似人工種子化を行った。その結果、再分化率は 1 ヶ月間保存で 20%、2 ヶ月で 14%、3 ヶ月では 0% と低い値であった (表 5, control)。1-3 ヶ月間保存し再分化しなかった不定胚の多くは褐変化していることがわかった。そこで、再分化率をある程度維持したまま、褐変化を抑制する条件の検定を行った。用いた試薬は、褐変化防止剤として植物組織培養で頻繁に用いられている試薬 5 種である。その結果、AsA または CH を添加した培地で、褐変化をある程度抑えられた (図 15)。特に、100 mM CH を添加した条件では、3 ヶ月保存しても 60% 以上の不定胚が褐変化しなかった。

### 褐変化防止処理後の再分化検定

褐変化防止剤を AsA または CH に絞り、非褐変化率や再分化率などをさらに詳しく調べた。AsA を 10 mM、100 mM 添加した条件下では、3 ヶ月間保存するとほとんどの不定胚が褐変化し、再分化も見られなかった。CH を 10 mM、100 mM 添加した条件下では、3 ヶ月間保存しても褐変化はほとんど起こらなかったが、再分化は全く見られなかった (表 5、図 16)。しかし、CH を 0.1 mM 添加した条



件では、1 または 2 ヶ月保存では約 40%の不定胚が再分化し、3 ヶ月間保存しても再分化率は 22%であった(表 5、図 16)。以上の結果から、肥大化を抑制した不定胚と CH を 0.1 mM 添加した改変 1/2MS 液体培地を用いることで、人工種子に利用することができることがわかった。

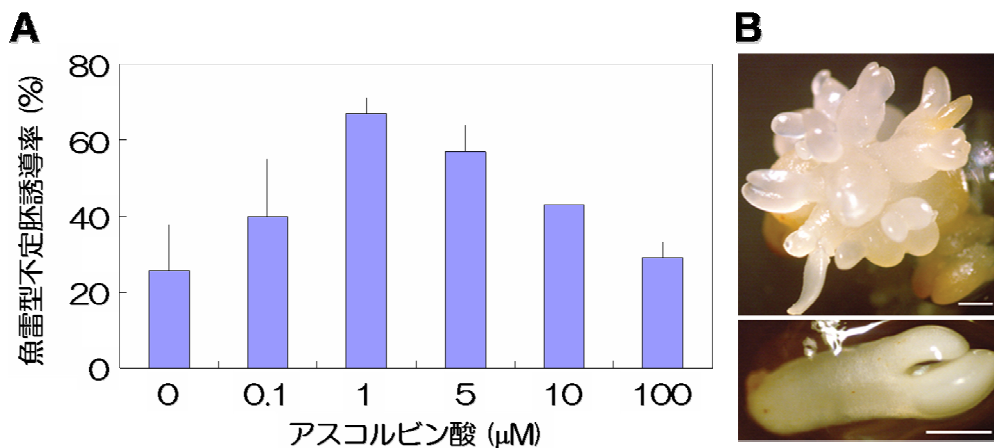


図 11 アスコルビン酸の肥大化抑制効果

(A)不定胚を継代培地(MS 培地+5 μM BA)に AsA を 0, 0.1, 1, 5, 10, 100 μM 添加した培地に移植し、1 ヶ月後、魚雷型不定胚誘導率を測定した。(B)アスコルビン酸を 5 μM 添加した条件で誘導した魚雷型不定胚。1 回の検定に用いたサンプル数は各 20 個で、これを 3 回繰り返した。Scale bars : 1mm.

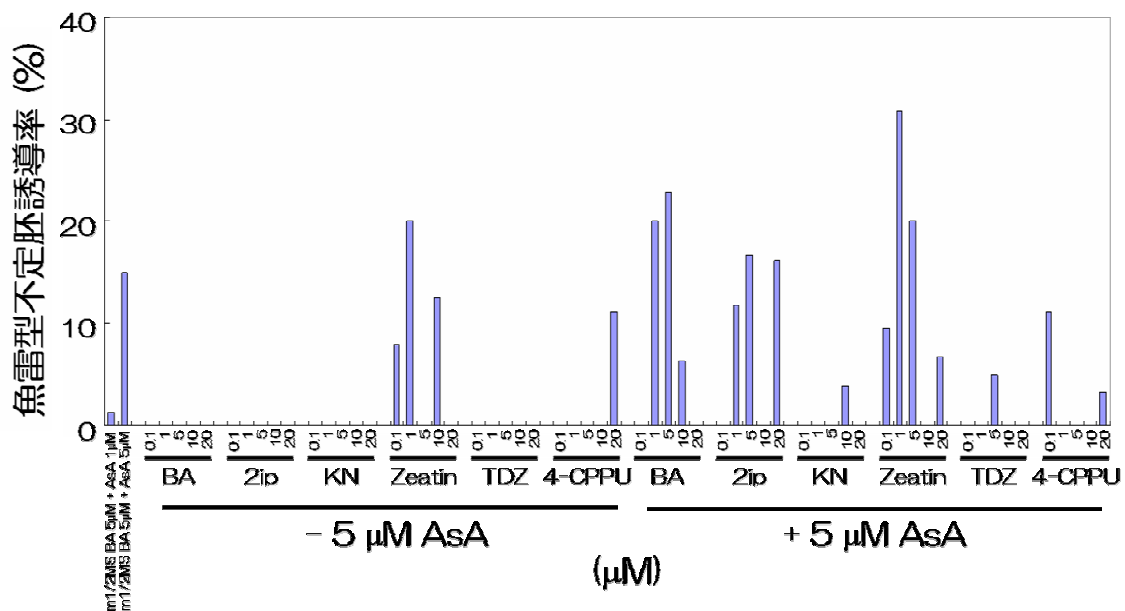


図 12 サイトカイニンとアスコルビン酸の肥大化抑制効果

表 2 に示した培地を作成し、不定胚を移植した。1 ヶ月後、魚雷型不定胚誘導率を測定した。

表 4 BA または Zeatin とアスコルビン酸の肥大化抑制効果

| 培養条件 (μM)           | 不定胚誘導率 (%)  | 魚雷型不定胚誘導率 (%) | シャーレー一枚あたりの3mm程度魚雷型不定胚生重量 (mg) |
|---------------------|-------------|---------------|--------------------------------|
| Control (BA 5)      | 89.0 ± 4.3  | 3.6 ± 0.8     | 47.0 ± 7.57                    |
| m1/2MS BA 5 + AsA 1 | 100.0 ± 0.0 | 1.3 ± 0.7     | 5.8 ± 2.9                      |
| m1/2MS BA 5 + AsA 5 | 88.9 ± 11.1 | 14.9 ± 4.7    | 20.3 ± 5.8                     |
| BA 1 + AsA 5        | 75.5 ± 10.0 | 8.9 ± 3.2     | 37.4 ± 15.3                    |
| BA 5 + AsA 5        | 77.3 ± 1.5  | 6.5 ± 5.0     | 26.1 ± 21.9                    |
| Zeatin 1            | 66.4 ± 1.4  | 6.0 ± 3.5     | 14.5 ± 10.4                    |
| Zeatin 1 + AsA 5    | 78.1 ± 6.2  | 10.8 ± 5.5    | 52.2 ± 30.1                    |
| Zeatin 5            | 84.1 ± 4.1  | 13.2 ± 2.0    | 107.3 ± 16.2                   |
| Zeatin 5 + AsA 5    | 91.7 ± 6.0  | 17.8 ± 1.5    | 124.7 ± 11.6                   |

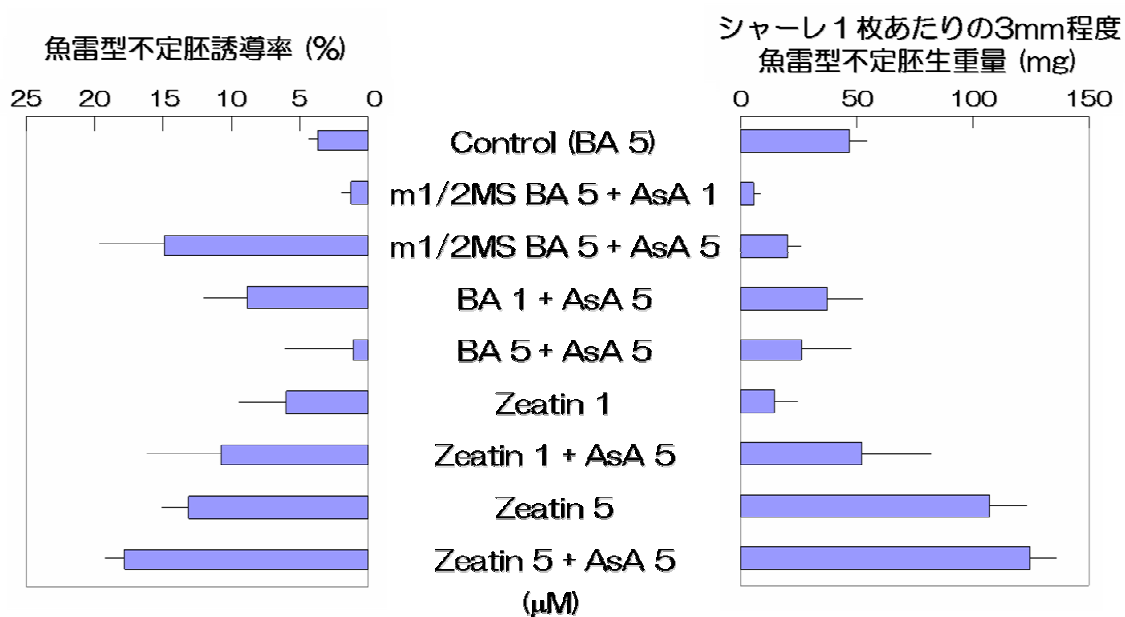


図 13 BA または Zeatin とアスコルビン酸の肥大化抑制効果

表 4 のうち、魚雷型不定胚誘導率とシャーレー一枚あたりの 3 mm 程度魚雷型不定胚生重量をグラフ化した。表 3 に示した培地を作製し、不定胚を移植した。また、コントロールとして、不定胚誘導条件 (MS 培地 + 5 μM BA) を用いた。1 ヶ月後、魚雷型不定胚誘導率やシャーレー一枚あたりの生重量を測定した。1 回の検定に用いたサンプル数は各 20 個で、これを 3 回繰り返した。

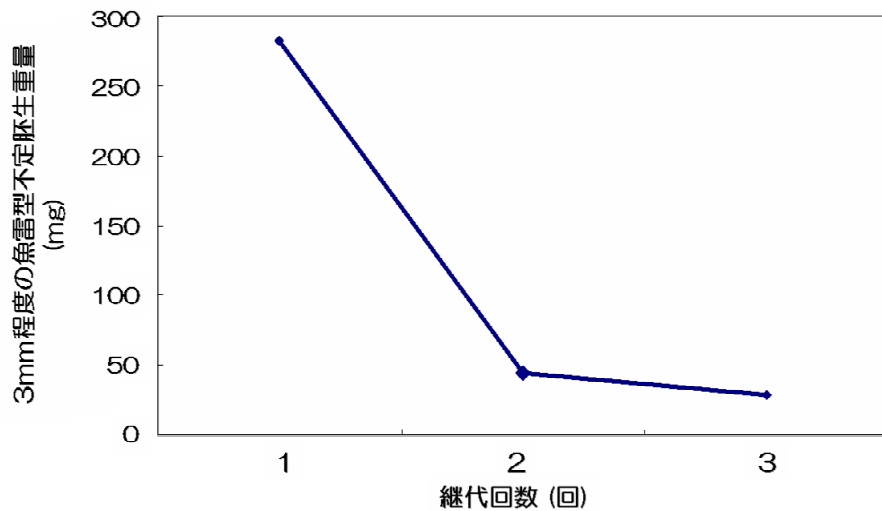
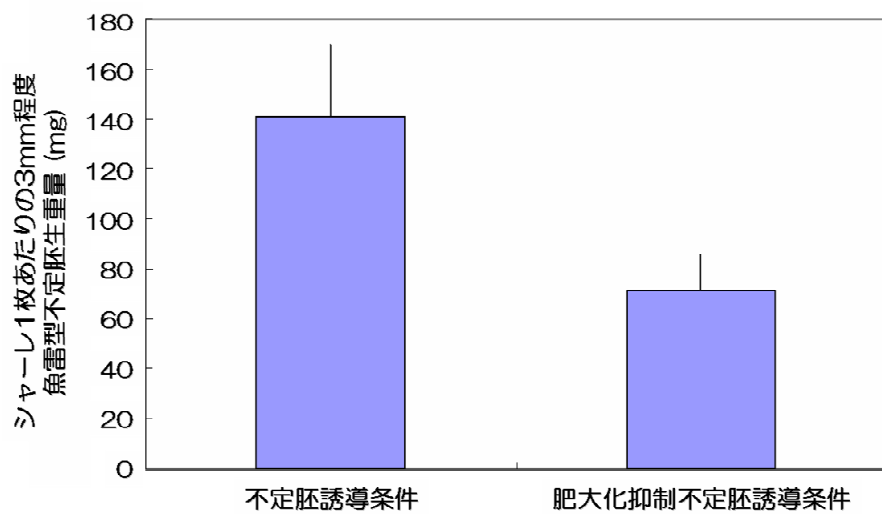
**A****B**

図 14 継代条件の検討

(A) 5  $\mu$ M zeatin と 5  $\mu$ M AsA を添加した条件で継代培養を行った。継代 1 回目、2 回目、3 回目にそれぞれ 3mm 程度の魚雷型不定胚生重量を測定した。(B) 不定胚誘導条件 (5  $\mu$ M BA) で誘導した不定胚と、肥大化抑制不定胚誘導条件 (5  $\mu$ M Zeatin + 5 $\mu$ M AsA) で誘導した不定胚を、肥大化抑制不定胚誘導条件に移植し、1 ヶ月後、3mm 程度の魚雷型不定胚生重量を測定した。1 回の検定に用いたサンプル数は各 20 個で、これを 3 回繰り返した。

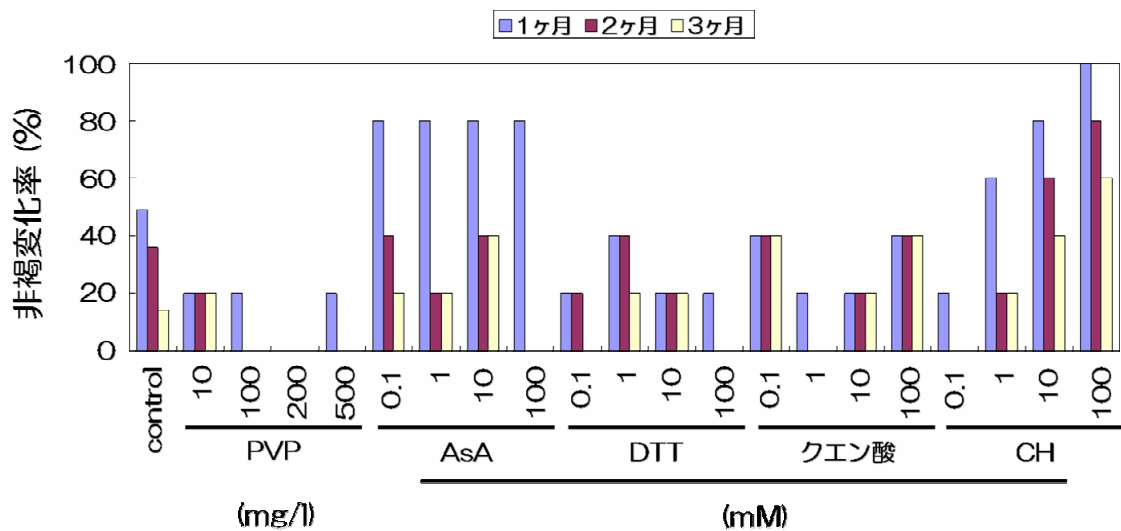


図 15 褐変防止剤の選択

改変 1/2MS 液体培地に PVP, AsA, DTT, クエン酸, CH を添加した培地を作製し、24 穴シャーレの 1 ウェルに各 2 ml ずつ入れ、不定胚を 1 個移植した。1, 2, 3 ヶ月後に、それぞれの非褐変率を測定した。1 回の検定に用いたサンプル数は各 20 個で、これを 3 回繰り返した。

表 5 褐変化防止処理後の再分化検定

| 褐変化防止剤                         | 濃度<br>(mM) | 褐変化がおこらなかった不定胚数 (%) |            |            | 再分化がみられた不定胚数 (%) |           |          |
|--------------------------------|------------|---------------------|------------|------------|------------------|-----------|----------|
|                                |            | 1ヶ月保存               | 2ヶ月保存      | 3ヶ月保存      | 1ヶ月保存            | 2ヶ月保存     | 3ヶ月保存    |
| Control                        |            | 10/20 (50)          | 7/20 (35)  | 3/20 (15)  | 2/10 (20)        | 1/7 (14)  | 0/3 (0)  |
| Ascorbic acid<br>(AsA)         | 0.1        | 11/20 (65)          | 10/20 (50) | 6/20 (30)  | 3/11 (27)        | 3/10 (30) | 0/6 (0)  |
|                                | 1          | 16/20 (80)          | 13/20 (65) | 9/20 (45)  | 2/16 (13)        | 1/13 (8)  | 1/9 (11) |
|                                | 10         | 15/20 (75)          | 9/20 (65)  | 5/20 (25)  | 0/15 (0)         | 0/9 (0)   | 0/5 (0)  |
|                                | 100        | 3/20 (15)           | 0/20 (0)   | 0/20 (0)   | 0/3 (0)          | 0/0 (0)   | 0/0 (0)  |
| Cysteine hydrochloride<br>(CH) | 0.1        | 13/20 (65)          | 13/20 (65) | 9/20 (45)  | 5/13 (38)        | 5/13 (38) | 2/9 (22) |
|                                | 1          | 19/20 (95)          | 14/20 (70) | 12/20 (60) | 5/19 (26)        | 2/14 (14) | 1/12 (8) |
|                                | 10         | 19/20 (95)          | 17/20 (85) | 17/20 (85) | 0/19 (0)         | 0/17 (0)  | 0/17 (0) |
|                                | 100        | 19/20 (95)          | 19/20 (95) | 19/20 (95) | 0/19 (0)         | 0/19 (0)  | 0/19 (0) |

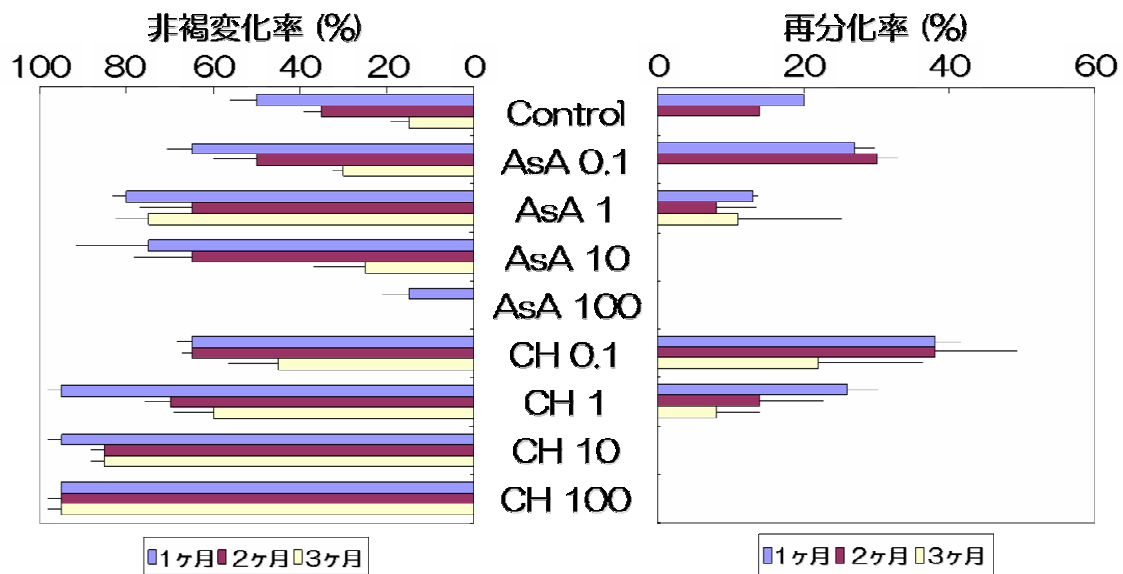


図 16 褐変化防止処理後の再分化検定

表 5 のうち、非褐変化率と再分化率をグラフ化した。改変 1/2MS 液体培地に AsA と CH を添加した培地を作製し、24 穴シャーレの 1 ウェルに各 2 ml ずつ入れ、不定胚を移植した。1, 2, 3 ヶ月後に、それぞれの非褐変化率を測定した。その後、再分化培地 (改変 1/2MS 培地、ホルモンフリー) に不定胚を移植し、2-3 ヶ月後に再分化率を測定した。

### 1-3. 形質転換方法の確立とその応用

#### はじめに

現在までに、コーキセンダンについて形質転換方法の確立に成功したという報告はない。しかし、植林後の課題の一つに”weed control”があり、特に、苗木が小さい間は雑草が生えやすく、雑草が原因となり苗木の生育不良がおこる (Llewellyn 2000)。また、人工種子を野外に播種する時に、雑菌混入による生育阻害が起こる可能性がある。これらの問題をクリアするために、形質転換方法を確認する必要があると考えた。そこで、GFP と GUS をレポーター遺伝子として用いて形質転換方法の確立を行なった。その条件をもとにして、除草剤耐性遺伝子である *Bar* を用いて形質転換を行なった（用語解説参照 p82）。

## 材料と方法

### 形質転換

#### (材料)

アグロバクテリウム : *A. tumefaciens* LBA4404 (Hiei et al. 1994)、*A. tumefaciens* EHA101 (Hood et al. 1986)

コンストラクト : pSMAB (Toki 1997), sGFP (Ito et al. 2003), pBI121 (Clontech)

外植片 : 葉切片、葉柄 (無菌化で育成した再分化個体)

共存培地 : MS 培地, 5  $\mu$ M BA

除菌培地 : MS 培地, 5  $\mu$ M BA, 300 mg l<sup>-1</sup> Cefotaxim, 5 mg l<sup>-1</sup> bialaphos  
または kanamycin

選抜培地 : MS 培地, 5  $\mu$ M BA, 5-25 mg l<sup>-1</sup> bialaphos または kanamycin

#### (方法)

4 種のコンストラクトで *A. tumefaciens* LBA4404 株と *A. tumefaciens* EHA101 株にそれぞれ形質転換し、コロニーPCR で導入を確認した。導入を確認できた株を、50mg l<sup>-1</sup> の spectinomycin または kanamycin を含む LB 液体培地に植菌し、28°C で OD<sub>600</sub>=0.5-0.8 になるまで培養した。遠心により集菌後、上清を取り除きペレットをホルモンフリーの改変 1/2MS 液体培地に懸濁し、感染用アグロバクテリウム懸濁液とした。あらかじめ用意した葉切片と葉柄を感染用アグロバクテリウム懸濁液に室温で 10 分間浸し、オートクレーブした紙の上に葉切片と葉柄を置き、余分なアグロバクテリウム溶液を取り除いた。葉切片と葉柄は、共存培地に静置し 2 日間共存培養を行った。培養条件は 28°C、暗条件である。その後、除菌培地に移植し、除菌を行った。培養条件は 25°C、暗条件で行い、2 週間毎に培地交換を行なった。除菌後、葉切片と葉柄は選抜培地に移植した。培養条件は 25°C、暗条件で行い、3 週間毎に培地交換した。bialaphos と kanamycin の濃度は、培養初期は 5 mg l<sup>-1</sup> で行い、二次不定胚形成後 25 mg l<sup>-1</sup> まであげた。



### Total RNA の単離

形質転換不定胚の Total RNA は、マツの成葉から RNA を単離した Chang らの方法を参考に抽出した (Chang et al. 1993)。不定胚を液体窒素で凍らせ、乳鉢などを用いて粉末状にしてマイクロチューブに移した。試料の 10 倍量 (w/v) の 2 × CTAB 液に溶かし、65°C で 10 分間放置した。等量の CIA (24:1) を加え、遠心 (15000rpm, 10min, RT) し水層を回収した。再び水層と等量の CIA (24:1) を加え、遠心 (15000rpm, 10min, RT) し水層を新しいマイクロチューブに移した。取れた水層の 1/4 量の 10 M LiCl を加え、-30°C に 2 時間以上放置した。遠心 (15000rpm, 10min, 4°C) 後、沈殿物を適量の TE に溶かした。この液体を遠心 (15000rpm, 10min, 4°C) し上清を回収することで多糖類を除いた。等量の飽和フェノールを加え攪拌後、遠心 (15000rpm, 10min, RT) し水層を回収した。等量の PCI (25:24:1) を加え攪拌後、遠心 (15000rpm, 10min, RT) し水層を回収した。水層と等量の CIA (24:1) を加え、遠心 (15000rpm, 10min, RT) し水層を新しいマイクロチューブに移した。回収した水層に 1/4 量の 10 M LiCl を加え、-30°C に 2 時間以上または 4°C に一晩放置した。遠心 (15000rpm, 10min, 4°C) 後、沈殿物を 70% エタノールで洗浄し、上清を取り除き沈殿物を乾燥させた。沈殿物を滅菌水 20μl に溶かし、total RNA 抽出物とした。

### RT-PCR

RT-PCR は、RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (Takara, Japan) を用いた。プライマーは、以下の通りである。Bar; 5'-GGTCTGCACCATCGTCAA-3' and 5'-TCCAGCTGCCAGAAACC-3'; GFP; 5'-GGAGAAGAAGCTTTTCACTGG-3' and 5'-GTGGTCTCTCTTTTCGTTGG-3'; GUS; 5'-CGGGGAAGCTCAGCAAG-3' and 5'-ACATATCCAGCCATGCAC-3'; 18S rRNA gene (accession number AY695594); 5'-GAGGAAGGAGAAGTCGTAAC-3' and 5'-CTCGAGAGGCTTGTTCTCAC-3'。PCR の条件は 96°C 30 秒, 58°C 30 秒, 72°C 30 秒, 40 サイクルである。PCR 産物は、1% TBE アガロースゲルで電気泳動を行い増幅断片の確認を行った。

### GFP 蛍光の観察

GFP 蛍光観察は、蛍光実体顕微鏡 (MZ FLⅢ; Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) を用いて行ない、また写真撮影は。CCD カメラ (Hamamatsu Photonics Co. Ltd., Japan) を使用した。用いた試料は不定胚で、野生株、形質転換株ともに 10 ラインずつ蛍光観察を行なった。

### GUS 染色

Jefferson らの方法を参考にして GUS 染色を行なった(Jefferson et al. 1987)。染色後、GFP 蛍光の観察で使用した実体顕微鏡を用いて写真を撮影した。用いた試料は不定胚で、野生株、形質転換株ともに 12 ラインずつ GUS 染色を行なった。

### 除草剤抵抗性の確認

確認方法は、改変 1/2MS 培地に  $25 \text{ mg l}^{-1}$  bialaphos を添加した培地を作成し、野生株と形質転換体の不定胚をそれぞれ 5 株ずつ培養した。約 2-4 ヶ月後、それぞれの個体が再分化しているかどうか観察した。

## 結果

### 形質転換方法の確立

形質転換方法を確立するために、*GFP* と *GUS* を用いて実験を行った。はじめに、アグロバクテリウム EHA101 株を用いて外植片に感染させ形質転換を行なった。しかし、感染約 1-2 ヶ月後に全ての外植片は茶色く褐変化し、不定胚形成は見られなかった(図 17A)。次に、アグロバクテリウム LBA4404 株を用いて形質転換を行なったところ、EHA101 と同様、感染約 1 ヶ月後に外植片の褐変化が見られたが、さらに 1-3 ヶ月培養し続けることで、切断面から不定胚を形成できた(図 17B)。用いた外植片の不定胚誘導率を求めた結果、葉切片が 9%、葉柄は 36% で、4 倍差があった(表 6)。得た不定胚は、選抜培地上でさらに培養し以下の実験に用いた。選抜培地の kanamycin 濃度は、不定胚誘導後 3-6 ヶ月間は  $5 \text{ mg l}^{-1}$  に設定し、それ以降は  $25 \text{ mg l}^{-1}$  の濃度で培養をおこなった。

### mRNA の確認

Total RNA を野生株と形質転換株から調整し、RT-PCR に用いた。RT-PCR を用いて *GFP*、*GUS* の発現を確認した結果、転写産物の蓄積を確認できた (図 18)。

### 導入遺伝子産物の発現

*GFP* の蛍光観察を行った結果、野生株の全てのラインが黄色く発光したのに対し、形質転換体は、ラインごとに多少の発光強度の差はあったが緑色の蛍光を観察することができた(図 19A)。野生株の黄色い自家蛍光は、細胞壁への多糖類の沈着が多いためである。同様に、*GUS* 染色を用いて発現を確認した結果、形質転換体でのみ濃青色の染色を観察できた(図 19B)。

### *Bar* を用いた形質転換

*GFP* と *GUS* を用いて確立した形質転換方法を用いて実験を行った。*Bar* を用いた形質転換に関しては *GFP* と *GUS* を用いたときと同様、感染約 1 ヶ月後に葉切片または葉柄の褐変化が見られ、さらに 1-3 ヶ月培養し続けることで、切断面から不定胚の形成がみられた。得た不定胚は、選抜培地上でさらに培養し二次不

定胚を増殖させた(図 21A, B)。選抜培地の bialaphos 濃度は、不定胚誘導後 3-6 ヶ月間は  $5 \text{ mg l}^{-1}$  に設定し、それ以降は  $25 \text{ mg l}^{-1}$  の濃度で培養をおこなった。

#### mRNA の確認

Total RNA を野生株と *Bar* 形質転換株から単離し、RT-PCR に用いた。その結果、*Bar* の転写産物蓄積を確認できた (図 20)。

#### 導入遺伝子産物の発現

*Bar* の発現は、bialaphos 存在下で再分化できるかどうか検定を行なった。その結果、野生株では bialaphos 存在下で約 1 ヶ月後、全てのラインが褐変化し枯死した (図 21E)。一方の形質転換株では、褐変化などは見られず、処理後 2 ヶ月で発芽、発根を観察できた (図 21D)。

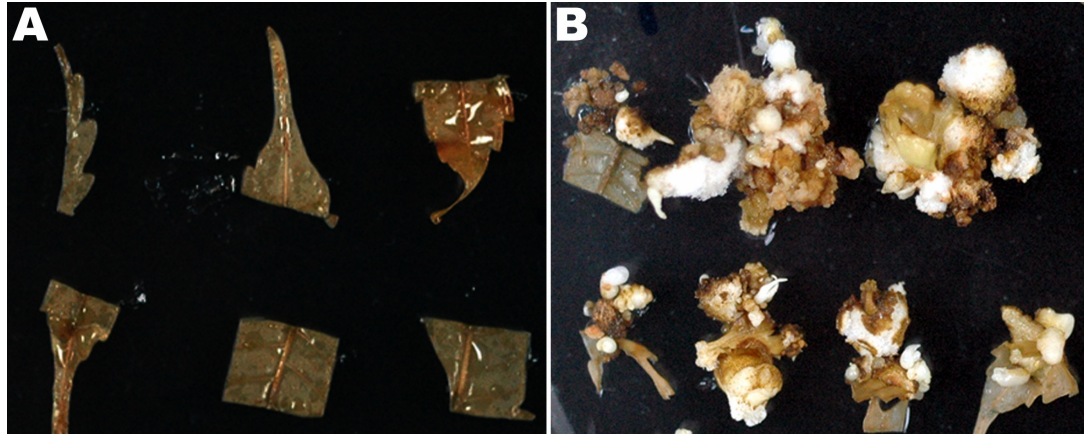


図 17 アグロバクテリウム EHA101 株と LBA4404 株を用いたときの不定胚形成  
 (A) 葉切片にアグロバクテリウム EHA101 株を感染後約 2 ヶ月目。葉切片は褐変化し、その後培養を続けても不定胚形成は見られなかった。(B) 葉切片にアグロバクテリウム LBA4404 株を感染後約 5 ヶ月目。EHA101 株と同様に、感染後約 1-2 ヶ月で葉切片は褐変化するが、培養を続けることで不定胚形成が見られた。

表 6 外植片による形質転換効率の差

|       | 不定胚誘導が見られた葉切片の数 / 総葉切片数 (%) | 不定胚誘導が見られた葉柄の数 / 総葉柄数 (%) |
|-------|-----------------------------|---------------------------|
| GFP   | 1 / 23 (4.3)                | 1 / 3 (33.3)              |
| GUS   | 3 / 20 (15.0)               | 3 / 8 (37.5)              |
| Total | 4 / 43 (9.3)                | 4 / 11 (36.3)             |

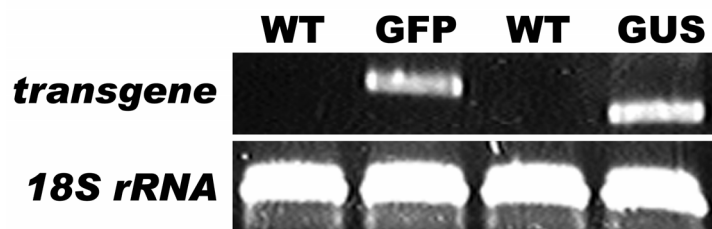


図 18 mRNA の確認

Total RNA を野生株と形質転換株から単離し、*GFP*、*GUS* 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行なった。コントロールとして用いた *18S rRNA* は、全ての株で発現していることを確認した。

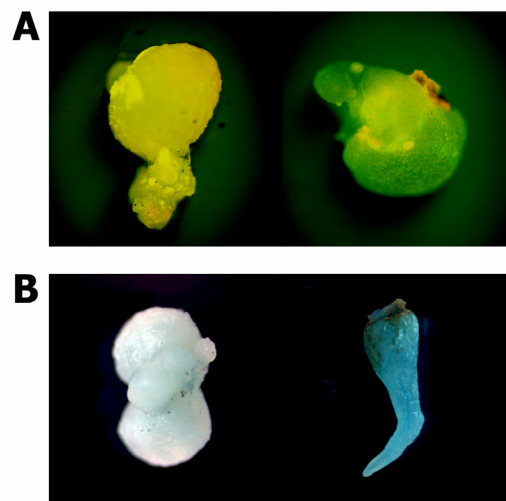


図 19 導入遺伝子産物の発現

(A) GFP 蛍光観察。形質転換体の不定胚（右）と、野生株の不定胚（左）を用いて *sGFP* の発現を確認した。野生株が黄色く発現しているのは、自家蛍光である。(B) GUS 染色観察。*GUS* の発現を確認するために形質転換体の不定胚（右）と、野生株の不定胚（左）を用いて GUS 染色を行なった。観察を行なった不定胚のうち、最も強く発現を確認できたラインのみ表示している。

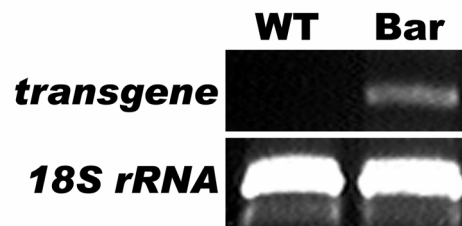


図 20 mRNA の確認

Total RNA を野生株と形質転換株から単離し、*Bar* 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行なった。コントロールとして用いた *18S rRNA* は、全ての株で発現していることを確認した。

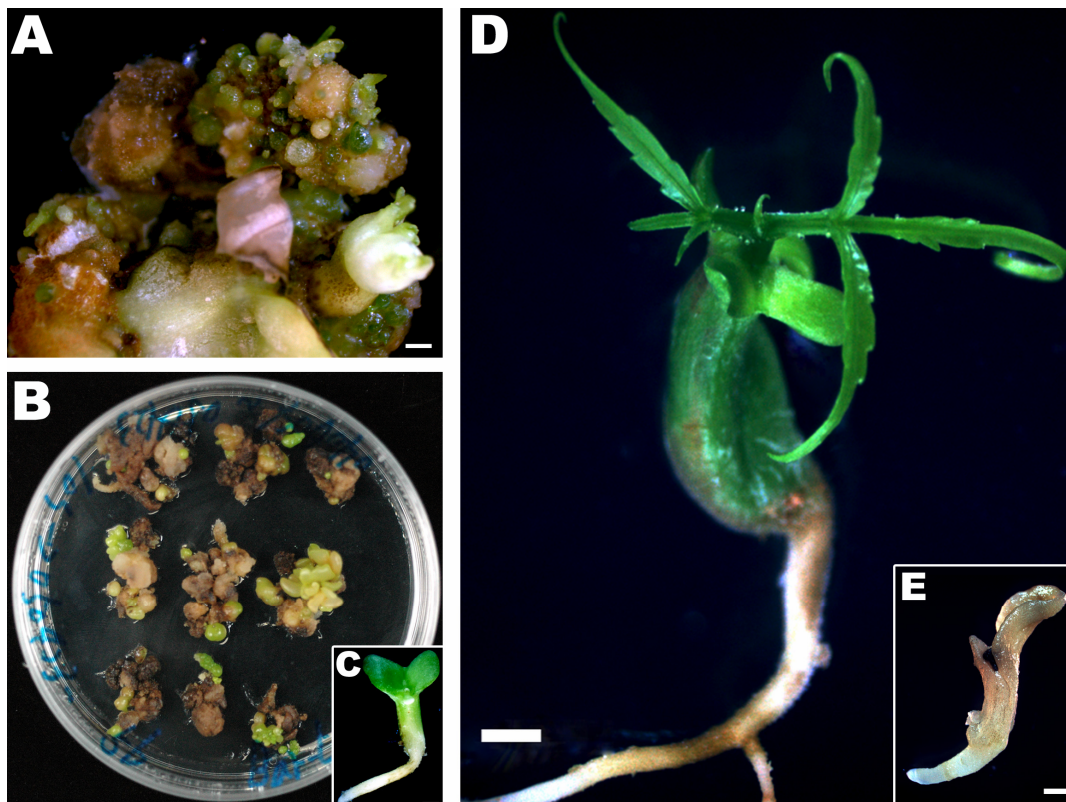


図 21 *Bar* コンストラクトを用いた形質転換

(A, B) bialaphos 存在下で二次不定胚増殖を確認。感染後約 1 年。 (C) 二次不定胚増殖で得られた魚雷型不定胚。 (D, E) bialaphos 存在下で行った発芽検定。Bar 組換え体では発芽発根が観察できたが (D)、野生型では褐変化し枯死した (E)。Scale bars : 1 mm

## 考察

### 不定胚培養系の確立

コーキセンダンの葉切片または不定胚からカルスを経由せずに不定胚または二次不定胚を誘導、再分化させる条件の検定を行った。その結果、MS 培地に 5  $\mu\text{M}$  BA を添加した条件に、肥大化した不定胚または葉切片を静置し暗条件で不定胚を誘導でき、また、再分化は改変 1/2MS 培地で誘導できることがわかった。

オーキシンの NAA とサイトカイニンの BA を組み合わせた実験を行なったとき、NAA を含む条件下では、カルスの形成がおこった。そこで、NAA の代わりに 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)を用いて実験を行ったが、どの濃度でも不定胚は誘導できず、カルス化が見られた。これは、Te-chato らの報告と一致する(Te-chato et al. 2000)。Te-chato らの報告によると、培地に 2,4-D を添加するとカルスが誘導されやすく、NAA を添加したときよりもカルス誘導率が高いことを示唆している。一方、サイトカイニンに関しても BA 以外の KN や 2ip を培地に添加し検定を行ったが、BA と比較して、より効果的な条件は無かった。また、BA について 5  $\mu\text{M}$  以外の濃度を用いて検定を行なったが、誘導される不定胚のほとんどが球状型不定胚で、再分化しやすいハート型や魚雷型不定胚に分化する胚はなかった。外植片から不定胚を誘導する際、一般的にはサイトカイニンとオーキシンを組み合わせた条件で不定胚誘導が起こるといわれている。しかし、コーキセンダンの場合は、サイトカイニン単独で不定胚を誘導できた。これは今までに、コーヒーノキ (Ogita et al. 2004)などで報告があるように、特別な例ではない。これには、内在性の植物ホルモンが関わっており、内在性の植物ホルモンは、植物種や個体間で差がある。以上のことから、不定胚形成に限らず組織培養を行うとき、培地に添加した植物ホルモンだけで各種の形態形成が起こるのではなく、内在性の植物ホルモンとの兼合いにより形態形成が起こっていることを示唆した。

肥大化した不定胚の組織切片を作成し茎頂や根端を観察したところ、ほとんどの細胞が肥大化し、細胞の並びも不規則であった。胚発生時に茎頂や根端組織の形成が見られない胚は、その後の子葉の展開や発根などの分化が起こりにくい。また、ワタを用いた研究から肥大化した不定胚のほとんどが、未熟な子



葉や幼根を形成し再分化しないという報告がある (Chaudhary et al. 2003)。このことから、肥大化した不定胚は、再分化に適していないと考えている。よって、再分化率を上げるためには、いかに肥大化を抑えた魚雷型不定胚を多く誘導できるかが鍵になると示唆している。以上のことから、今回確立した不定胚培養系は、不定胚の肥大化という問題点が残っているが、葉切片からカルスを経由することなく不定胚を誘導できる系を確立できた。また、この培養系は、Liew、Te-chato、Giagnacovo らが外植片から再分化まで 3 種の培養条件を用いているのに対して、2 種の培養条件で再分化可能な、より簡便な培養方法を確立できたといえる。

#### 人工種子封入条件の検討

人工種子を作成する際に課題となるのは、保存と再分化率である。そのため、「肥大化を抑制する不定胚誘導条件の検討」と「褐変防止条件の検討」を行ない、人工種子封入条件について検討した。

「肥大化を抑制する不定胚誘導条件の検討」では、アスコルビン酸 (AsA) を用いて、肥大化を抑えた不定胚を多く誘導可能な培地条件の検討を行なった。その結果、5  $\mu$ M Zeatin と 5  $\mu$ M AsA を添加した MS 基本培地で 3 mm 程度の不定胚を誘導できることがわかった。アスコルビン酸 (ビタミンC) は、植物の中に mM 単位で存在する水溶性の抗酸化剤の一つである (Buettner and Schafer. 2004)。アスコルビン酸の機能や生合成については、以下のことがわかっている。①主に光合成により生じる過酸化水素の除去や、外的環境による酸化ストレスの防御に参与している。この反応にはアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) が関っており、 $2\text{AsA} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{monodehydroascorbate} + \text{H}_2\text{O}$  を触媒する (Smirnoff 1996)。②タマネギやソラマメにアスコルビン酸の生合成阻害剤を添加した研究より、アスコルビン酸が細胞分裂を促進させる機能を有することが示唆された (Liso et al. 1984)。これは、アスコルビン酸が細胞周期の G1 期を短縮することにより、細胞分裂を継続させる働きによるものである。また、根端分裂組織の中央にある静止中心は、細胞周期が G1 期で停止し細胞分裂がほとんど行われていない。この静止中心には、アスコルビン酸がほとんど無いことがわかった (Kerk and Feldman 1995)。③エズマツを用いた研究から、培地にアスコルビン酸を添加

することで再分化率、発根率が上昇した (Stasolla and Yeung 1999)。これは、アスコルビン酸が可溶性糖類の貯蔵流動に関わっていることと (Thorpe et al. 1986)、②で述べた細胞分裂の調整が関与していると考えている。Thorpeらの研究により糖類が芽の形成に関与していることがわかっており、可溶性の糖類は芽や根の成長に必須の物質ではないかと示唆されている。④アスコルビン酸の生合成制御については、あまり詳しく解明されていない。アスコルビン酸は、L-GalactinolactoneからL-galactonolactone dehydrogenase (L-GalLDH)により合成される。シロイヌナズナを用いた研究により、このL-GalLDHの活性は光の強度により変わることがわかっており、光の強度が強いほど活性が上昇する (Smirnoff 2000, Gatzek et al. 2002)。以上のことから、アスコルビン酸を添加した条件で3 mm程度の不定胚を誘導できたのは、以下のような理由ではないかと考えている。通常の継代培養(MS培地+5  $\mu$ M BA)は暗条件、つまり、アスコルビン酸の合成量はかなり少ないと考えられる。よって、酸化ストレスに対応できない、細胞分裂が促進されにくいなどが原因で、不定胚の肥大化がおこりやすくなった。しかし、アスコルビン酸を培地に添加することで、細胞分裂が促進され、肥大化が起こらない正常な不定胚を誘導できたのではないかと考えている。また、5  $\mu$ Mという濃度については、以下のように示唆している。たとえば、光合成由来の過酸化水素によるストレスを多く受けている。一方の不定胚は、暗条件で培養しているため光に晒されることがほとんどなく、光合成由来の過酸化水素によるストレスがほとんどないと考えられる。実際にアルファルファを用いた研究から、葉と根のアスコルビン酸濃度が異なるという結果がFranceschiらによって発表されている (Franceschi and Tarlyn 2002)。

肥大化を抑制した不定胚の継代条件を検討した結果、5  $\mu$ M BAを含む培地で処理した不定胚を5  $\mu$ M Zeatin + 5  $\mu$ M AsAを含む培地に移植することで、約2倍の肥大化を抑制した魚雷型不定胚を誘導できることがわかった。これは、5  $\mu$ M BAを含む培地条件のほうが、不定胚を形成するのに必要なembryogenic tissuesをより多く誘導できるのではないかと考えている。実際に、5  $\mu$ M BAを含む培地条件で得られる総不定胚数は、平均168個で、5  $\mu$ M Zeatin + 5  $\mu$ M AsAを含む培地で得られる総不定胚数は、平均83個である。この結果からも、5  $\mu$ M BAを含む培地条件の方が、より不定胚を形成しやすい条件であることを示唆している。以上の

結果を元に、現在は5  $\mu$ M BAと5  $\mu$ M Zeatin + 5  $\mu$ M AsAの条件を1ヶ月交代で繰り返し、継代培養を行なっている。

通常、組織培養でAsAを添加する目的は、再分化率を向上させるために用いられている (Stasolla and Yeung 1999)。本研究でも当初は、肥大化した魚雷型不定胚の再分化率を上げる目的でAsAを用いていた。しかし、再分化率は向上せず、代わりに小さな形の良い不定胚を誘導できることがわかった。この結果を元に、AsAを培地に添加することで、不定胚の肥大化を抑制できるのではないかと考え、この実験を行なった。以上のように、不定胚の肥大化を抑制するためにAsAを使用するという報告はほとんど無く、新しい知見を得られたと考えている。

「褐変化防止条件の検討」では、5種の褐変化防止剤を用いて褐変化を抑制する条件の検討を行なった。はじめに、24穴シャーレを用いて擬似人工種子化を行った結果、ほとんどの不定胚が褐変化し再分化できないことがわかった。褐変化は、ポリフェノールなどのフェノール系化合物が植物内に大量に存在し、これら化合物が起こすポリフェノールオキシダーゼ活性による酸化ストレスにより、メラニンやタンニンなどが蓄積し茶色く変色することが原因と考えている。なお、褐変化がおこった細胞のほとんどは壊死している (Vaughn and Duke 1984, D'Silva and D'Souza 1993)。そこで、抗酸化剤 (褐変化防止剤) である PVP、AsA、DTT、クエン酸、CH を用いて、実験を行った。その結果、CH を 0.1 mM 添加した条件では、3ヶ月間保存しても再分化率が約 22%あった。この値は、培地中に何も加えていないコントロール (再分化率 0%) と比較して十分高い値であった。CH を 10 または 100 mM 加えた条件では、ほとんどの不定胚が褐変化せずに乳白色のまま保存出来た。しかし、保存期間に関係なく再分化は見られなかった。これらの不定胚をピンセットでつまむと、全ての不定胚がつまんだ所から半分に千切れた。つまり、不定胚という細胞の塊を維持できなかったと考えている。この現象の決定的な原因はわからないが、浸透圧の関係で細胞骨格が破壊され、このような現象が起こったのではないかと考えている。今回の実験で得た新たな知見は、CH を 0.1 mM 添加した条件で 3ヶ月間保存ができ、再分化も起こったということである。

通常、不定胚を保存、休眠させる時は、植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) で処理し、不定胚を休眠状態にさせる。しかし今回の実験では、ABA 処理をせ

ずに3ヶ月間保存でき、再分化も起こった。CHが、細胞に対してどのような機構で働きかけ、保存が可能になったのかについては今後の課題であるが、酸化ストレスの抑制が重要になるのではないかと考えている。予備実験として10  $\mu$ M ABAで処理を施した不定胚と未処理の不定胚の組織切片をつくり、休眠時に上昇するデンプン粒をヨウ素溶液で染色し調べた。その結果、ABA処理を施した不定胚は未処理の不定胚と比較して、デンプン粒が多く存在していることがわかった。以上のことから、ABA処理を施した不定胚を0.1 mM CHを含む培地で保存させることで、再分化率を上昇させることが可能ではないかと考えている。

以上のことから、AsAとCHで処理した不定胚は、大きさや褐変化、保存など人工種子封入時に課題となる項目を解決できたと考えている。さらに今回の研究から、組織培養におけるAsAとCHの新しい利用方法を示唆できた。

#### 形質転換方法の確立とその応用

コーキセンダンの形質転換方法を確立するために、2種類のアグロバクテリウムと2種類の外植片を用いて実験を行なった。その結果、アグロバクテリウム LBA4404株を用いることで形質転換が可能であることがわかった。

アグロバクテリウム EHA101を用いて形質転換を行った結果、不定胚形成は全く見られなかったが、アグロバクテリウム LBA4404を外植片に感染させると、高効率で不定胚形成が見られた。これには、アグロバクテリウムと植物の間にある相互関係が原因と考えられる。アグロバクテリウムが植物に感染するとき、アグロバクテリウムは植物から放出されるアセトシリンゴンなどのフェノール系化合物やモノサッカロイドなどの糖を認識し、植物細胞の傷口に接着する (Winans 1992, Binns and Howitz 1994)。接着後、アグロバクテリウムはVir領域由来のVir遺伝子など様々な化学物質を植物に放出し、アグロバクテリウムの栄養源となるオパインを合成させる (Gelvin 2000)。この、アグロバクテリウムと植物間で起こる化学物質のやり取りや、オパインの種類、そもそもアグロバクテリウムが傷口を認識し接着できるのか、などが重要なのではないかと考えている。LBA4404株のchromosomal backgroundはTiAch5でオパインにはオクトピンを用いている。一方の、EHA101株のchromosomal backgroundはC58でオパインにはノパリンを用いている (Hellens et al. 2000)。これらのアグロバクテリウム間の

差が、コーキセンダンに感染できるかどうかに関わっているのではないかと考えている。

一般的に形質転換を行う時は、アセトシリンゴンを培地やアグロバクテリウム溶液に添加する (Taniguchi et al. 2005)。アセトシリンゴンは、*Vir* 遺伝子群の発現を誘導することがわかっている (Ashby et al. 1987)。今回の実験でも当初は、アセトシリンゴンを入れて形質転換を行っていたが、アグロバクテリウム EHA101 株、アグロバクテリウム LBA4404 株のどちらを用いても不定胚形成は見られず、アセトシリンゴンを添加せずにアグロバクテリウム LBA4404 株を形質転換に用いた場合でのみ、不定胚形成が見られた。コーキセンダンを分子育種に用いるときの課題は、組織の褐変化である。組織の褐変化は、高濃度のフェノール系化合物による酸化ストレスが原因で起こる (D'Silva and D'Souza 1993)。つまり、コーキセンダンには元々高濃度のフェノール系化合物が含まれていると推測でき、アセトシリンゴンを添加しなくても形質転換が起こったと考えている。

除草剤抵抗性の確認や GFP 蛍光、GUS 染色の結果から、導入した遺伝子が不定胚または植物体レベルで発現していることを確認できた。ただし、培地条件を再検討することで形質転換効率を向上できるのではないかと考えている。例えば、肥大化を抑えた不定胚誘導条件を用いることで、細胞分裂が促進されより高頻度に不定胚を誘導できるのではないかと考えている。

本研究から、コーキセンダンの形質転換方法の基礎を築くことができたと考えている。特に、除草剤耐性を付与したコーキセンダンは、形質転換効率や、安全性の評価など課題はあるが、植林に使用できる可能性は高いと考えている。

なお、抗菌性を付与するために、抗菌ペプチドをコードする *MsrA1* 遺伝子の導入も行なった。しかし、現在のところ不定胚形成にいたっていないので、本文からは割愛した。詳細は巻末の付記を参照。

## 第2章 カフェインレスコーヒーの作出

### はじめに

熱帯雨林の破壊を止めるには、植林が有効である。しかし、経済価値の低い樹木は、植林の対象になりにくいのが現状である。そこで、植林をさらに推進させるために、対象となる樹木に付加価値を付け経済価値を上げることが望ましい。そのため、本研究ではモデル系として材料にコーヒーノキを選び、付加価値を高めるためカフェインの合成を抑えたカフェインレスコーヒーの作出を目指した。

コーヒーノキは飲料用として、また、光沢のある葉や「コーヒーチェリー」と呼ばれる赤い果実など、その美しい容姿から観賞用植物としての人気も高い(図 22)。コーヒーノキは 40 種以上に分類されるが、現在、世界で取引されているコーヒーノキのおよそ 75%は、アラビカ種 (*Coffea arabica*)で、ついで、およそ 25%を占めるのが、カネフォラ種 (*C. canephora*, 別名ロブスタ種)である (Berthouly and Etienne 1999)。コーヒーの特徴は、プリンアルカロイドであるカフェインを含むことである。植物内におけるカフェインの役割は、“昆虫忌避性”、“植物間相互作用”である。昆虫忌避性に関しては、若葉や果実、花芽に含まれるカフェインが、アオムシなどの幼虫や甲虫類に対して忌避性があると言われてしている (Hewavitharanage et al. 2000, Hollingsworth et al. 2002)。一方の植物間相互作用は、地面に落ちた種子の種皮に含まれるカフェインが土壤中に滲みだし、他植物の種子の発芽を阻害すると考えられている (Waller 1989)。ヒトに対するカフェインの働きは、中枢神経を刺激し、目覚まし効果や血行促進、利尿作用、脂肪分解の促進などの効果があるといわれる (Ashihara and Crozier 2001)。コーヒーと同様に飲用として用途の高いチャやココアなどにもカフェインが含まれており、私たちは日常的にカフェインを摂取している。一方、特に刺激性物質に敏感な人がカフェインを摂取すると、個人差はあるが頭痛や動悸、めまい、倦怠感を引き起こし、健康に悪影響をおこすことがわかっている (Ashihara and Crozier 2001)。このような背景から、欧米などではカフェインレスコーヒーの需要が高い。現在飲まれているカフェインレスコーヒーのカフェイン抽出方法は、

有機溶媒を用いてカフェインを抽出する化学抽出法や、超臨界二酸化炭素を用いてカフェインを抽出する超臨界抽出技術を用いているが、香りや味に関する成分も同時に取り除かれてしまうため、コーヒーとしての味が極度に落ちるという欠点がある。このため、カフェインのみを効率よく除いた、カフェインレスコーヒーの生産が望まれている。

カフェインの生合成系は、*xanthosine* を前駆体として 3 回のメチル化と 1 回の脱リボース化によって生合成されることがわかっている(図 23) (Ashihara and Crozier 2001)。第 1 段階は、*xanthosine methyltransferase* (XMT)により *xanthosine* がメチル化され *7-methylxanthosine* に、第 2 段階は、脱リボース化反応により *7-methylxanthine* に、第 3 段階は *7-N-methylxanthine methyltransferase* (MXMT or *theobromine synthase*)によりメチル化され *3,7-dimethylxanthine* (テオブロミン)、第 4 段階は、*3,7-dimethylxanthine methyltransferase* (DXMT or *caffeine synthase*)によりメチル化され *1,3,7-trimethylxanthine* (カフェイン) が合成される。私たちの研究室では、コーヒーのカフェイン生合成に関わる *N*-メチル化酵素の cDNA を単離し (Ogawa et al. 2001)、*degenerate PCR* などを用いて 4 つのメチル化酵素、*CaXMT1* (accession number AB048793)、*CaMXMT1* (AB048794)、*CaMXMT2* (AB084126)、*CaDXMT1* (AB084125)をクローニングした (図 24) (Ogawa et al. 2001; Uefuji et al. 2003)。また私達は、RNA 干渉法(RNAi 法)を用いて *CaMXMT1* の発現を抑えたカフェインレスコーヒーを、カネフォラ種で作製した (Ogita et al. 2003, 2004)。その結果、幼植物体の葉内でカフェイン含量が、コントロールと比較して約 50-70%減少していることがわかった (表 7)。

これらの結果を元に、本章では、より商業価値の高いアラビカ種を用いて、カフェインレスコーヒーの植物体作出を行なった。



図 22 コーヒーノキ

コーヒーノキは、アカネ科の樹木で主にアラビカ種とカネフォラ種が栽培されている(A)。コーヒーノキの花はジャスミンに似た香りを放ち(B)、果実はコーヒーチェリーと呼ばれ(C)、観葉植物としての人気も高い。主な繁殖方法は、種子からの発芽(D)と挿し木である。

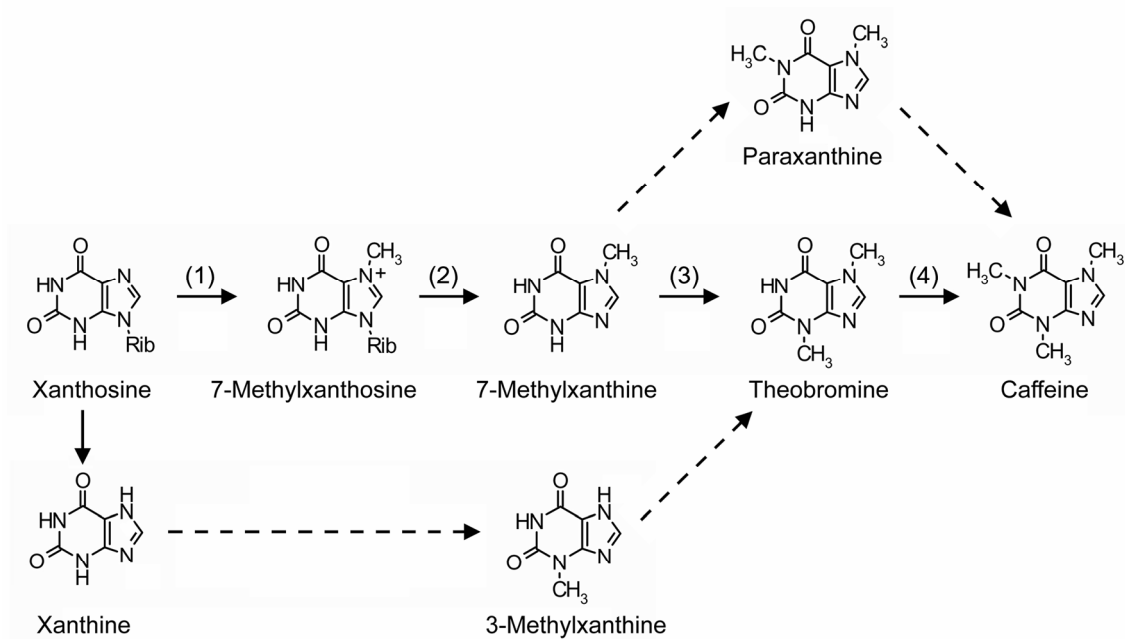


図 23 カフェイン生合成系

カフェインは、xanthosine を出発材料として3回のメチル化(1), (3), (4)と、1回の脱リボース化(2)を受け生合成される。実線は主な生合成系、点線は生合成に関与すると予想されている系である。



CaMXMT1 MELQEVLMHNEGEGDTSYAKNASYN-LALAKVKPFLLEQCIRELLRANLPNINKCIKVADLGCASGPNTLLTVRDIVQSID 79  
CaMXMT2 MELQEVLMHNEGEGDTSYAKNASYN-LALAKVKPFLLEQCIRELLRANLPNINKCIKVADLGCASGPNTLLTVRDIVQSID 79  
CaXMT1 MELQEVLMHNGEGDTSYAKNASYN-LALAKVKPFLLEQCIRELLRANLPNINKCIKVADLGCASGPNTLLTVRDIVQSID 80  
CaDXMT1 MELQEVLMHNGEGDTSYAKNSFYN-LFLERVKPFLLEQCIRELLRANLPNINKCIKVADLGCASGPNTLLTVRDIVQSID 79

CaMXMT1 KVGQEEKNELERPTIQIFLNDLFQNDFNSVFKLLPSFYRKLEKENGRIKIGSCLISAMPGSFYGRLPFEESMHFLHSCYSV 159  
CaMXMT2 KVGQEEKNELERPTIQIFLNDLFQNDFNSVFKLLPSFYRKLEKENGRIKIGSCLISAMPGSFYGRLPFEESMHFLHSCYSV 159  
CaXMT1 KVGQEEKNELERPTIQIFLNDLFQNDFNSVFKLLPSFYRKLEKENGRIKIGSCLISAMPGSFYGRLPFEESMHFLHSCYCL 160  
CaDXMT1 KVGQEEKNELERPTIQIFLNDLFQNDFNSVFKLLPSFYRKLEKENGRIKIGSCLISAMPGSFYGRLPFEESMHFLHSCYCL 159

CaMXMT1 HWLSQVPSGLVIELGICANKGSIYSSKGCRRPPVQKAYLDQFTKDFTTFLRIHSEELFSRGRMLLTICICKVDEFDENPLD 239  
CaMXMT2 HWLSQVPSGLVIELGICANKGSIYSSKASRPPVQKAYLDQFTKDFTTFLRIHSEELFSRGRMLLTICICKVDEYDENPLD 239  
CaXMT1 QWLSQVPSGLVIELGISTNKGSIYSSKASRPPVQKAYLDQFTKDFTTFLRIHSEELFSHGRMLLTICICKGVELDARNAID 240  
CaDXMT1 HWLSQVPSGLVIELGICANKGSIYSSKASRPPVQKAYLDQFTKDFTTFLRIHSEELFSRGRMLLTICICKVDEFDENPNSID 239

CaMXMT1 LLDMAINDLIVEGLLEEEKLDSEFNIPFFTPSAEEVKCIVEEESCEILYLETFKAHYDAAFSIDDYDYPVR-----SHHQ 313  
CaMXMT2 LLDMAINDLIVEGLLEEEKLDSEFNIPFFTPSAEEVKCIVEEESCEILYLETFKAHYDAGFSIDDYDYPVRSHFQVYGDDEH 319  
CaXMT1 LLEMAINDLIVEGLLEEEKLDSEFNIPVYIPSAEEVKCIVEEESCEILYLETFKVLVDAGFSIDDYDYPVRSHFQVYGDDEH 310  
CaDXMT1 LLEMAINDLIVEGLLEEEKLDSEFNIPVYIPSAEEVKCIVEEESCEILYLETFKVLVDAGFSIDDYDYPVRSHFQVYGDDEH 319

CaMXMT1 IKAEEYVASLIRSVYEPILASHFGEAIMPDLFHRRLAKHAAKVLHMGKGCYNNLIISLAKKPEKSDV 378  
CaMXMT2 IKAEEYVASLIRSVYEPILASHFGEAIMPDLFHRRLAKHAAKVLHMGKGCYNNLIISLAKKPEKSDV 384  
CaXMT1 IKAEEYVASLIRSVYEPILASHFGEAIMPDLFHRRLAKHAAKVLHMGKGCYNNLIISLAKKPEKSDV 372  
CaDXMT1 ARAAHVASVVRSEFEPILASHFGEAIMPDLFHRRLAKHAAKVLHMGKGCYNNLIISLAKKPEKSDV 384

図 24 カフェイン合成に関わる 4 つのメチル化酵素

CaMXMT1, 2 は図 6 の(3)を、CaXMT1 は図 6 の(1)を、CaDXMT1 は図 6 の(4)をそれぞれメチル化する (Uefuji et al. 2003 より)。

表 7 葉内のテブロミンとカフェイン含量の測定(カネフオラ種)

| Lines                     | Theobromine | Caffeine  |
|---------------------------|-------------|-----------|
| Control #1 (wild type #1) | 0.97±0.11   | 7.54±0.04 |
| Control #2 (wild type #2) | 0.93±0.04   | 8.82±0.22 |
| Control #3 (sGFP #1)      | 1.11±0.02   | 7.73±0.05 |
| Control #4 (sGFP #2)      | 0.90±0.09   | 9.66±0.21 |
| Average                   | 0.98±0.07   | 8.44±0.12 |
| RNAi-S #1                 | 0.30±0.05   | 4.07±0.11 |
| RNAi-S #2                 | 0.22±0.01   | 2.53±0.17 |
| RNAi-S #3                 | 0.29±0.01   | 4.88±0.02 |
| RNAi-S #4                 | 0.25±0.01   | 4.63±0.10 |
| RNAi-S #5                 | 0.31±0.01   | 4.35±0.06 |
| Average                   | 0.27±0.02   | 4.09±0.09 |
| RNAi-L #1                 | 0.66±0.01   | 2.77±0.06 |
| RNAi-L #2                 | 0.59±0.12   | 3.94±0.04 |
| RNAi-L #3                 | 0.58±0.08   | 4.70±0.23 |
| RNAi-L #4                 | 0.54±0.03   | 3.88±0.03 |
| RNAi-L #5                 | 0.47±0.03   | 3.94±0.04 |
| Average                   | 0.57±0.05   | 3.85±0.07 |

Results are expressed as mg g<sup>-1</sup> fresh tissue.

## 材料と方法

### 植物材料

実験に用いた葉(5-9cm)は、温室で育てているアラビカ種 (*Coffea arabica* Caturra) の木から採取した。採取した葉は、70%エタノールで 1 分間殺菌した後、2% NaClO で 10 分間さらに殺菌処理を行なった。その後、滅菌水で最低 3 回洗浄し滅菌した紙の上で乾燥させ、以下の実験に用いた。

### 不定胚培養系の確立

コーヒーノキの不定胚培養に用いた基本培地は、コーキセンダンの不定胚培養で使用した改変 1/2MS 培地と同様の組成である。植物ホルモンは、カネフォラ種に用いたサイトカイニンの *N*<sup>6</sup>-(2-isopentenyl)-adenine (2ip)を 20  $\mu$ M 添加した。この培地に滅菌処理を施した葉を、約 5-7mm<sup>2</sup>に切り静置した。培養条件は、25°C、暗条件で 3 週間ごとに新しい培地に植え替えた。誘導した不定胚は、改変 1/2MS 培地に BA を 10  $\mu$ M 添加した培地、または、ホルモンフリーの培地に移植し、再分化条件を検定した。

### 形質転換

形質転換は、Hatanaka らの方法を元に行った(Hatanaka et al. 1999)。用いたコンストラクトは、カネフォラ種と同様の RNAi-L、sGFP コンストラクトである (図 25)。RNAi-L コンストラクトは、*CaMXMT1* の 332bp (946-1277)と、スパーサーとして *GUS* 遺伝子の 517bp (3436-3952)を用いて作成した (Ogita et al. 2004)。RNAi-L コンストラクト、sGFP コンストラクトは、アグロバクテリウム EHA101 株 (Hood et al. 1986)に導入した。感染させる外植片は、滅菌処理を施した葉切片を用いた。およそ OD<sub>600</sub>=0.5 まで培養したアグロバクテリウム溶液を集菌して、改変 1/2MS 液体培地に 20  $\mu$ M 2ip と 50 mg l<sup>-1</sup>アセトシリンゴンを加えた液体培地に懸濁した。外植片を懸濁液に 10 分間浸し、アグロバクテリウム懸濁液を除いた後、除菌培地（改変 1/2MS 培地に、20  $\mu$ M 2ip、300 mg l<sup>-1</sup> Cefotaxim、50 mg l<sup>-1</sup> hygromycin を添加）に移植した。2-4 ヶ月培養した後、選択培地（改変 1/2MS 培地に、20  $\mu$ M 2ip、20-100 mg l<sup>-1</sup> hygromycin を添加）に移植し不定胚を誘導した。選択培地中の hygromycin 濃度は、最終的に 100 mg l<sup>-1</sup>に設定した。

## RT-PCR

Total RNA は、コーキセンダンで使った Chang らの方法を用いて、若葉から単離した (Chang et al. 1993)。RT-PCR は、RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (Takara, Japan) を用いた。プライマーは、以下の通りである。 *CaXMT1*; 5'-ATCAACTGGTTCTCGCCAAG-3' と 5'-CTGCTCTAACGGAAGATGCA-3'、*CaMXMT1*; 5'-TCCTACAATCTGGCTCTTGC-3' と 5'-TTCATCGCCGTATACTTGGA-3'、*CaDXMT1*; 5'-TCATTCTACAATCTGTTTCTCATCAG-3' と 5'-TATGGAATTCGGGTCTCGA-3'、*α-tubulin* (AF363630); 5'-GAGAGTGCATCTCCATCCAT-3' and 5'-CTGCTCAGGGTGGGAAGAGT-3'。PCR の条件は 94°C 30 秒, 58°C 30 秒, 72°C 1 分, 35 サイクルである。PCR 産物は、1% TBE アガロースゲルで電気泳動を行い、デンシトグラフを用いて定量化を行った。これを 3 回繰り返し、最終的なデータを求めた。

## カフェインおよびテオブロミン含量の測定

カフェインおよびテオブロミン含量の測定は、Ashihara らの方法を元に行った (Ashihara et al. 1996)。約 10-20 mg の若葉を液体窒素下で粉末化し、約 2ml の蒸留水に溶解する。この溶液を、80°C で 10 分間 2 回処理した。遠心分離 (10000 × g, 10 分間) し、上清を 0.2 μm のフィルター (DISMIC-25cs; ADVANTEC, Japan) でろ過した後、蒸留水で希釈した。20 μl の希釈した液体は、HPLC で解析した (Waters, USA)。用いたカラムは、Puresil C18 column (4.5 mm-i.d.×250mm, Waters, USA) である。サンプル 1 つにつき、6 回測定し平均値を測定した。

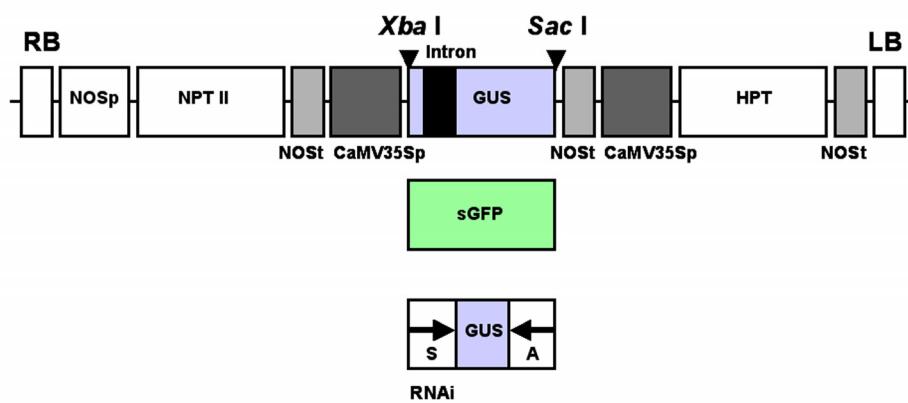


図 25 形質転換に用いたコンストラクト

pBIH1-IG ベクターの intron-*GUS* 領域に *Xba* I、*Sac* I 制限酵素サイトを用いて、*sGFP*、*RNAi-S*、*RNAi-L* 断片を挿入した。

## 結果

### アラビカ種の不定胚培養系確立

木本植物の迅速で効率のよい形質転換は、いかに効果の良い不定胚培養系を確立できるかにかかっており、これらの条件は植物種によって異なる。コーヒーノキのこれら培養条件を確立するために、初めに不定胚培養系の確立を行った。改変 1/2MS 培地に 2ip を 20  $\mu$ M 添加した培地に葉切片を移植すると、2-4 ヶ月以内に切断面が褐変化する。しかし、この褐変化した部位から不定胚を誘導できることがわかった(図 26A)。得た不定胚は 3 週間に 1 度継代培養を行い、二次不定胚を誘導した(図 26B)。誘導した不定胚は、改変 1/2MS 培地に BA を 10  $\mu$ M 添加した条件下に移植して 3-6 ヶ月培養することで、再分化を誘導できることがわかった。再分化した幼植物体は、ホルモンフリーの改変 1/2MS 液体培地を入れたフロリアライト (Nisshinbo, Japan) 上で更に 2-6 ヶ月培養した(図 26C, D)。

### 形質転換

アラビカ種の葉切片を用いて、RNAi コンストラクトと sGFP コンストラクトの形質転換を行った。選択培地上に移植した葉切片は、感染後約 1-2 ヶ月で切断面から褐変化が徐々に起こる。しかし、そのまま培養を続けることで、切断面に不定胚を誘導できる細胞(embryogenic tissues)が形成されることを確認した (図 27A)。その後、感染約 4-6 ヶ月後に不定胚形成が始まり、感染後約 6-8 ヶ月後には、安定した不定胚増殖が見られた (図 27B)。GFP を導入した形質転換不定胚は、蛍光実体顕微鏡を用いて GFP の発現を確認した (図 28)。誘導した不定胚は、改変 1/2MS 培地に BA を 10 $\mu$ M 添加した培地上で再分化を誘導できることがわかった。再分化誘導後、バーミキュライトと Metro-Mix® 350 (1:1 v/v)を混ぜた土に植え順化を行なった (図 31)。

### RT-PCR

Total RNA は、再分化させた幼植物体の葉切片から調整した。用いた株は、野生株 1 種と RNAi-L 株 3 種である。これら total RNA を用いて RT-PCR を行なった。その結果 RNAi-L 株では、*CaXMTI* と *CaMXMTI* の発現が野生株と比較して平均

50%減少し、*CaDXMT1* の発現は平均 75%減少していることがわかった (図 29)。特に、RNAi-L #2 株では、*CaXMT1*、*CaMXMT1*、*CaDXMT1* 全てにおいて、野生株と比較して 60%以下であることがわかった。

#### テオブロミンおよびカフェイン含量の測定

形質転換カルスを用いて、テオブロミンおよびカフェイン含量を測定した。その結果、テオブロミン含量は野生株では fresh weight 1g あたり平均 88.5 $\mu$ g、RNAi-L 株では 40.7 $\mu$ g (約 55%減少) し、カフェインは野生株で平均 20.7 $\mu$ g、RNAi-L 株では 5.6 $\mu$ g (約 70%減少) であることがわかった。特に、RNAi-L #a 株ではカフェインを検出することができなかった (図 30)。

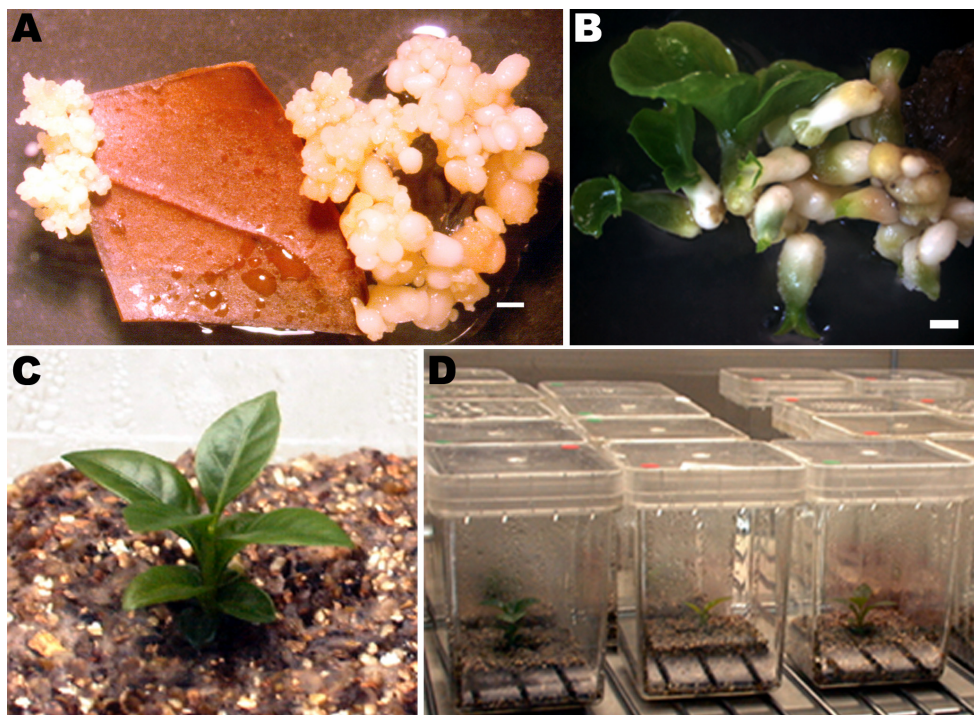


図 26 不定胚培養系の確立

改変 1/2MS 培地に 2ip を 20  $\mu\text{M}$  添加した培地で不定胚誘導を確認 (A)。その後、培養を続けることで二次不定胚を誘導できる (B)。誘導した不定胚は発芽処理後、フロリアライトに移植し順化を行なった (C, D)。

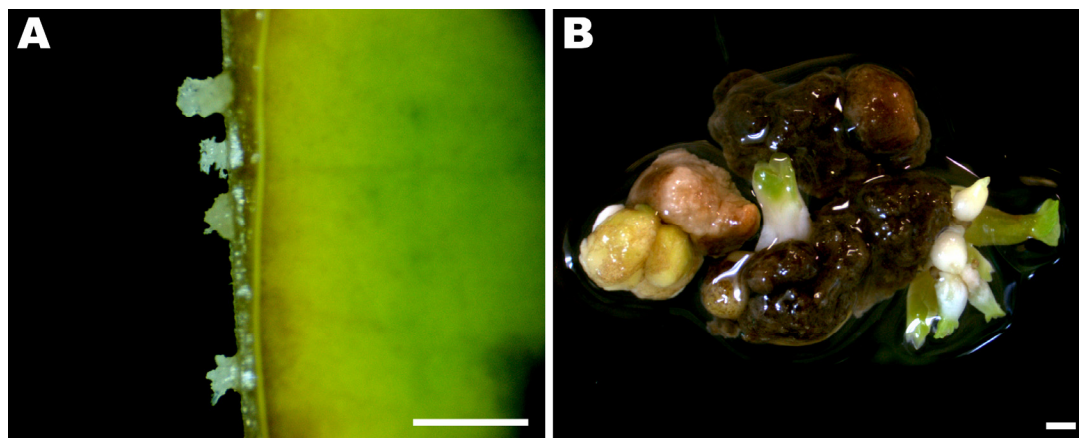


図 27 葉切片から誘導した不定胚

改変 1/2MS 培地に 20  $\mu$ M の 2ip を添加した培地で誘導した RNAi-L 株の不定胚。(A) 葉の切断面に形成された embryogenic tissues (感染後 2 ヶ月)、(B) 不定胚増殖 (感染後 8 ヶ月目)。

Scale bars : 1mm

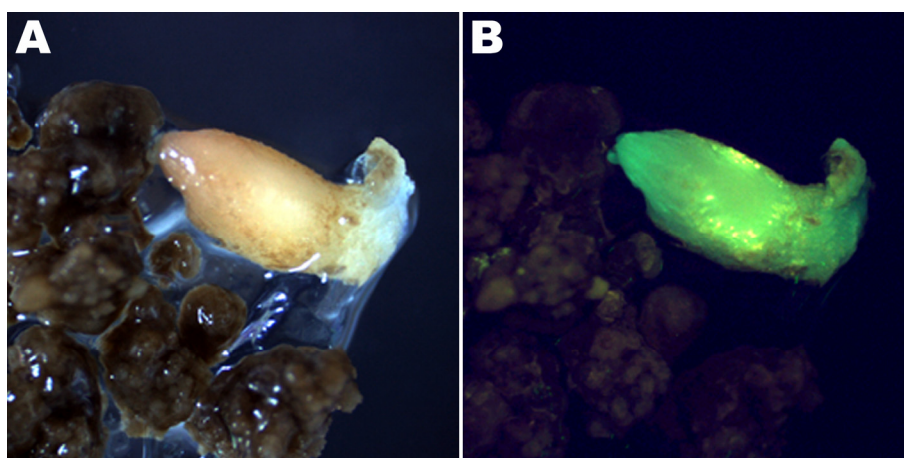


図 28 不定胚の GFP 蛍光観察

GFP を導入した形質転換不定胚は、蛍光実体顕微鏡で GFP 蛍光を観察した。(A)白色光下、(B)励起光下で観察。



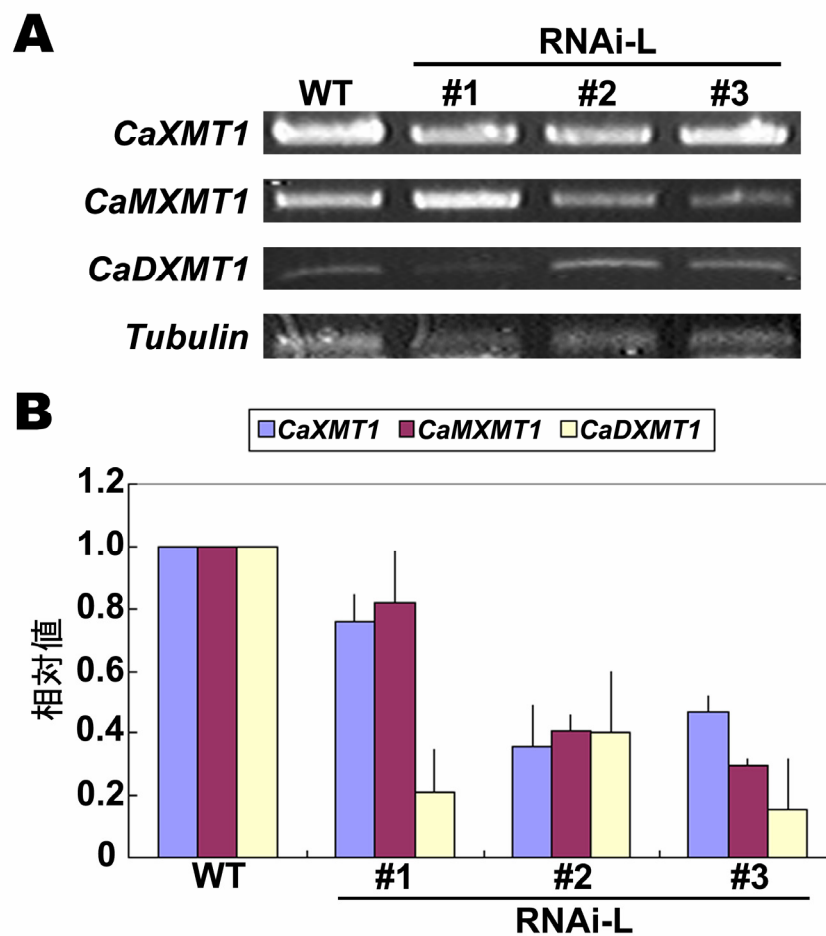


図 29 RT-PCR

(A) 幼植物体の若葉から total RNA を抽出し RT-PCR を行なった。Tubulin は、コントロールとして用いた。(B) RT-PCR 後、デンストグラフを用いて定量化を行なった。

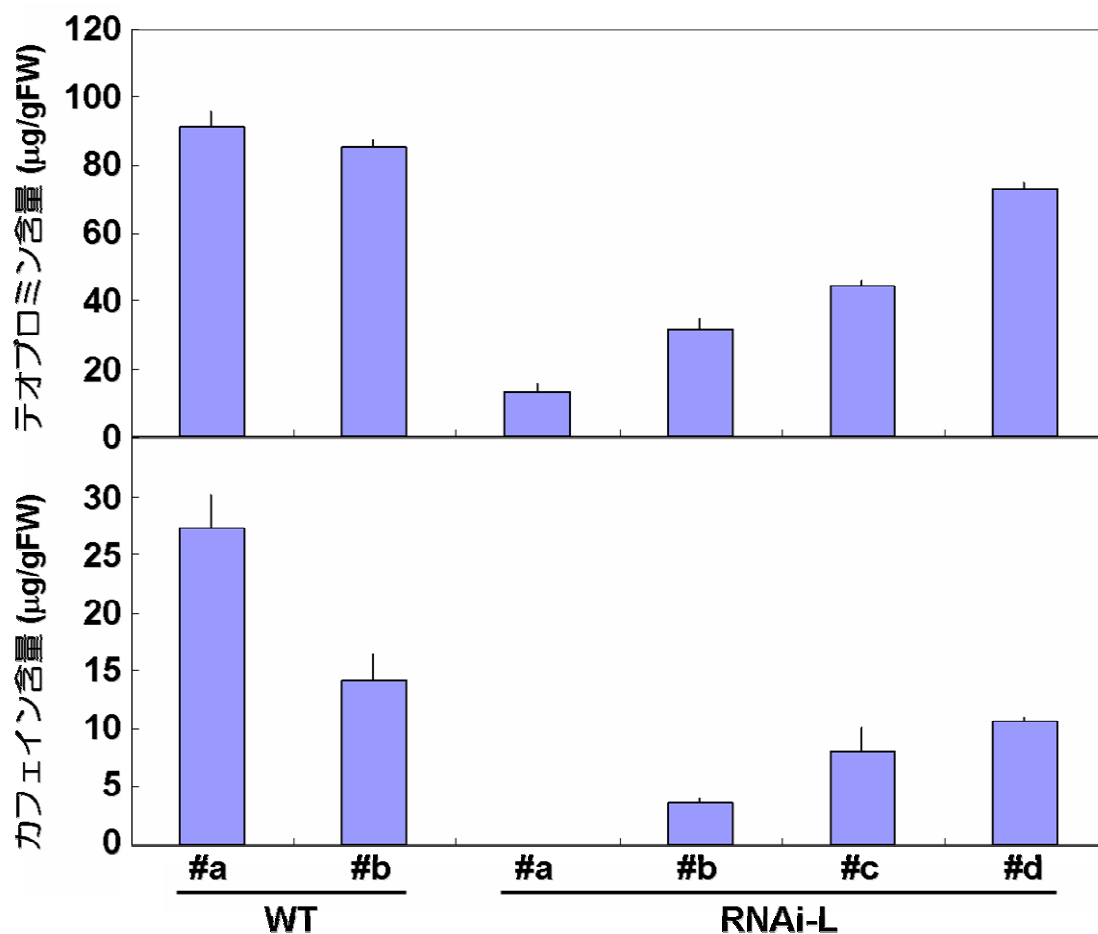


図 30 テオブロミンおよびカフェイン含量の測定

カルスを用いてテオブロミンおよびカフェイン含量を測定した。その結果、テオブロミン含量は野生株と比較して RNAi-L 株では平均 55%減少し、カフェインは野生株と比較して平均 70%減少していることがわかった。特に、RNAi-L #a 株ではカフェインを検出することができなかった。

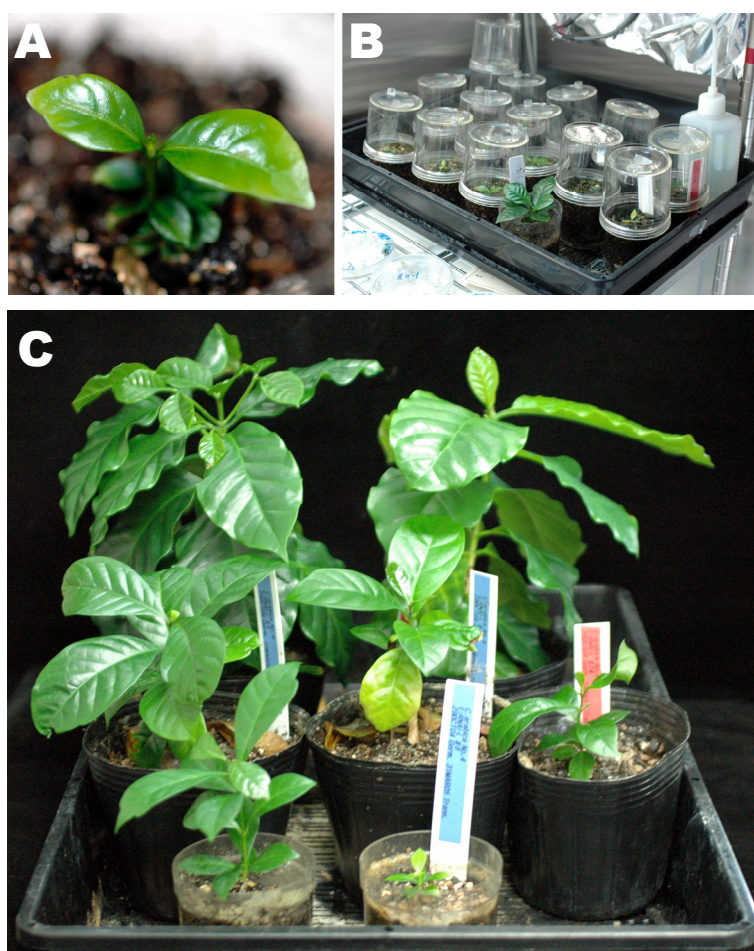


図 31 アラビカ種の RNAi-L 株

(A) 形質転換植物は、改変 1/2MS 培地に  $10\ \mu\text{M}$  BA を添加した培地で発芽処理を行なったあと、バーミキュライトと Metro-Mix® 350 (1:1 v/v) を混ぜた土に植え順化を行なった。(B) 順化中の植物体。(C) 発芽処理後、1 年半から 2 年の植物体。一番奥にある株は野生型。

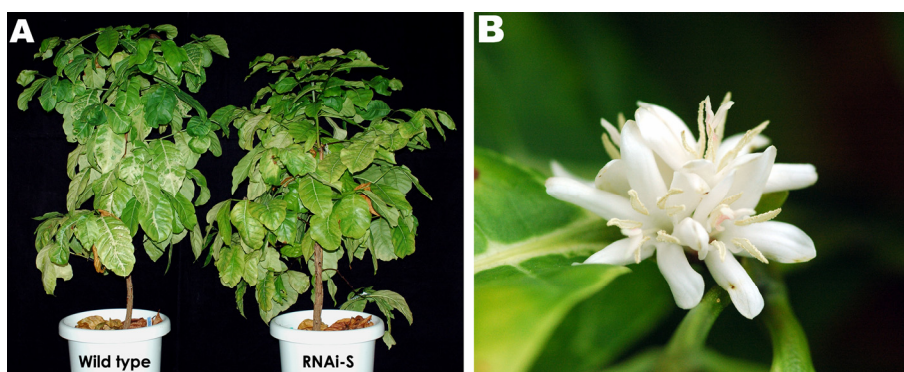


図 32 温室で栽培しているカネフォラ種

(A) 発芽処理後、約 4 年の植物体、(B) RNAi-S 株の開花

|         |                                                                                                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|         | 10                                                                                                       | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100  |
| CaXMT1  | CTTTGGCAGTCCCAATTGATTTATGTACAAGTCCCTGCATATGAATGGAGCTCCAAGAAGTCCCTGCGATGAATGGAGGCCAAGGCCATACAAGCTACGC     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | ---AGCAGTCGCAATTGCGATT---GTCTGCGATATGAATGGAGCTCCAAGAAGTCCCTGCATATGAATGAGGGAAGGCCATACAAGCTACGC            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | -----ATGGAGCTCCAAGAAGTCCCTGCATATGAATGGAGGCCAAGGCCATACAAGCTACGC                                           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 110                                                                                                      | 120  | 130  | 140  | 150  | 160  | 170  | 180  | 190  | 200  |
| CaXMT1  | CAAGAATTCACCTCAATCAACTGGTCTCGCCAAAGGTGAAACCTTCTCTTGAACAATGCTACGGAATTGTTGCGGGCCAACTTGCCCAACATCAAC         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | CAAGAATCATCTTACAATCTGGTCTCGCCAAAGGTGAAACCTTCTCTTGAACAATGCTACGGAATTGTTGCGGGCCAACTTGCCCAACATCAAC           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | CAAGAAATCATCTACAATCTGGTCTCGCCAAAGGTGAAACCTTCTCTTGAACAATGCTACGGAATTGTTGCGGGCCAACTTGCCCAACATCAAC           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 210                                                                                                      | 220  | 230  | 240  | 250  | 260  | 270  | 280  | 290  | 300  |
| CaXMT1  | AAGTGCATTAAAGTTGCGGATTGGGATGCGCTTCGGACCAACACACACTTTTAAACAGTTCGGGACATTGTCAAAGATTGACAAAGTTGGCCAGGAAA       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | AAGTGCATTAAAGTTGCGGATTGGGATGCGCTTCGGACCAACACACACTTTTAAACAGTTCGGGACATTGTCAAAGATTGACAAAGTTGGCCAGGAAA       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | AAGTGCATTAAAGTTGCGGATTGGGATGCGCTTCGGACCAACACACACTTTTAAACAGTTCGGGACATTGTCAAAGATTGACAAAGTTGGCCAGGAAA       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 310                                                                                                      | 320  | 330  | 340  | 350  | 360  | 370  | 380  | 390  | 400  |
| CaXMT1  | AGAAGAATGAATTAGAACGTCGCCACCATTCAGATTTTTCTGAATGATCTTTTCCAAATGATTTCAGTTCGTTTCAAGTTGCTGCCAAGCTTCTACCG       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | AGAAGAATGAATTAGAACGTCGCCACCATTCAGATTTTTCTGAATGATCTTTTCCAAATGATTTCAGTTCGTTTCAAGTTGCTGCCAAGCTTCTACCG       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | AGAAGAATGAATTAGAACGTCGCCACCATTCAGATTTTTCTGAATGATCTTTTCCAAATGATTTCAGTTCGTTTCAAGTTGCTGCCAAGCTTCTACCG       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 410                                                                                                      | 420  | 430  | 440  | 450  | 460  | 470  | 480  | 490  | 500  |
| CaXMT1  | CAAACCTTGAGAAAGAAAATGGACGCAAAATAGGATCGTGCTTAATAGGCGCAATGCCGGCTCTTTCTACGCAGACTCTTCCCGAGGAGTCCATGCAT       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | CAAACCTTGAGAAAGAAAATGGACGCAAAATAGGATCGTGCTTAATAGGCGCAATGCCGGCTCTTTCTACGCAGACTCTTCCCGAGGAGTCCATGCAT       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | CAAACCTTGAGAAAGAAAATGGACGCAAAATAGGATCGTGCTTAATAGGCGCAATGCCGGCTCTTTCTACGCAGACTCTTCCCGAGGAGTCCATGCAT       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 510                                                                                                      | 520  | 530  | 540  | 550  | 560  | 570  | 580  | 590  | 600  |
| CaXMT1  | TTTTTACACTCTTGTTACTGTTTTCATGGTATCTCAGGTTCCAGCGGTTTGGTGACTGAATTGGGGATCAGTCCGAACAAAGGAGCATTTACTCTT         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | TTTTTCACTCTTGTTACTGTTTTCATGGTATCTCAGGTTCCAGCGGTTTGGTGACTGAATTGGGGATCAGTCCGAACAAAGGAGCATTTACTCTT          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | TTTTTCACTCTTGTTACTGTTTTCATGGTATCTCAGGTTCCAGCGGTTTGGTGACTGAATTGGGGATCAGTCCGAACAAAGGAGCATTTACTCTT          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 610                                                                                                      | 620  | 630  | 640  | 650  | 660  | 670  | 680  | 690  | 700  |
| CaXMT1  | CCAAAGCAAGTCGCTGCCCGTCCAGAAAGGCATATTGGATCAATTTACGAAAGATTTTACCACATTTCTAAGGATTCATTCGGAAGAGTTGTTTTACG       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | CCAAAGCAAGTCGCTGCCCGTCCAGAAAGGCATATTGGATCAATTTACGAAAGATTTTACCACATTTCTAAGGATTCATTCGGAAGAGTTGTTTTACG       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | CCAAAGCAAGTCGCTGCCCGTCCAGAAAGGCATATTGGATCAATTTACGAAAGATTTTACCACATTTCTAAGGATTCATTCGGAAGAGTTGTTTTACG       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 710                                                                                                      | 720  | 730  | 740  | 750  | 760  | 770  | 780  | 790  | 800  |
| CaXMT1  | TGGCCGAATGCTCCTTACTTGCATTGTAAAGAGTGAATTCGAGCCGGAATCCATAGACTTACTTGAGATGGCAATAAACGACTTGGTTGTTGAG           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | TGGCCGAATGCTCCTTACTTGCATTGTAAAGAGTGAATTCGAGCCGGAATCCATAGACTTACTTGAGATGGCAATAAACGACTTGGTTGTTGAG           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | TGGCCGAATGCTCCTTACTTGCATTGTAAAGAGTGAATTCGAGCCGGAATCCATAGACTTACTTGAGATGGCAATAAACGACTTGGTTGTTGAG           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 810                                                                                                      | 820  | 830  | 840  | 850  | 860  | 870  | 880  | 890  | 900  |
| CaXMT1  | GGACATCTGGAGGAAGAAAATGGATAGTTTCAATTTCCACTCTATACCTTCAGCAGAAAGTAAAGTGCATAGTTGAGGAGGAAGGTTCTTTTG            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | GGACATCTGGAGGAAGAAAATGGATAGTTTCAATTTCCACTCTATACCTTCAGCAGAAAGTAAAGTGCATAGTTGAGGAGGAAGGTTCTTTTG            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | GGACATCTGGAGGAAGAAAATGGATAGTTTCAATTTCCACTCTATACCTTCAGCAGAAAGTAAAGTGCATAGTTGAGGAGGAAGGTTCTTTTG            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 910                                                                                                      | 920  | 930  | 940  | 950  | 960  | 970  | 980  | 990  | 1000 |
| CaXMT1  | AAATTTTATACCTGGAGACTTTTAAGGTCCTTATGATGCTGCTCTCTATTGAGATGA                                                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | AAATTTTATACCTGGAGACTTTTAAGGTCCTTATGATGCTGCTCTCTATTGATGATGATTACCAAGGAAGATCCCATTTCCCGGATATCTCGCATGA        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | AAATTTTATACCTGGAGACTTTTAAGGTCCTTATGATGCTGCTCTCTATTGATGATGATTACCAAGGAAGATCCCATTTCCCGGATATCTCGCATGA        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 1010                                                                                                     | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 |
| CaXMT1  | ACATATTAAAGCAGAGTATGTCATCTTCGTTAGACAGTTTACGAACCCATCCTCGCAAGTCATTTTGGAGAAGCTATTATCCTGACTTATCCAC           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | ACATATTAAAGCAGAGTATGTCATCTTCGTTAGACAGTTTACGAACCCATCCTCGCAAGTCATTTTGGAGAAGCTATTATCCTGACTTATCCAC           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | ACATATTAAAGCAGAGTATGTCATCTTCGTTAGACAGTTTACGAACCCATCCTCGCAAGTCATTTTGGAGAAGCTATTATCCTGACTTATCCAC           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 1110                                                                                                     | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| CaXMT1  | AGGTTTGGCAAGCATGCGCAAAAGGTTCTCCCTTGGGCAAAAGGCTCTATAATAATCTTATCATTTCTCTCGCCAAAAGCCAGAGAAGTCAGACGTGT       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | AGGTTTGGCAAGCATGCGCAAAAGGTTCTCCCTTGGGCAAAAGGCTCTATAATAATCTTATCATTTCTCTCGCCAAAAGCCAGAGAAGTCAGACGTGT       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | AGGTTTGGCAAGCATGCGCAAAAGGTTCTCCCTTGGGCAAAAGGCTCTATAATAATCTTATCATTTCTCTCGCCAAAAGCCAGAGAAGTCAGACGTGT       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 1210                                                                                                     | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 | 1260 | 1270 | 1280 | 1290 | 1300 |
| CaXMT1  | AAAAAGTTTGTITTTTGTGTTGCAAAAGGAATAGTGCCGTTGGGGGCTTTTCGGGTATTGTGCTTTTAAAGGAATAGTGCCGTTGGGGGCTTTTCGGGTATTGT |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | AAAAAGTTTGTITTTTGTGTTGCAAAAGGAATAGTGCCGTTGGGGGCTTTTCGGGTATTGTGCTTTTAAAGGAATAGTGCCGTTGGGGGCTTTTCGGGTATTGT |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | AAAAAGTTTGTITTTTGTGTTGCAAAAGGAATAGTGCCGTTGGGGGCTTTTCGGGTATTGTGCTTTTAAAGGAATAGTGCCGTTGGGGGCTTTTCGGGTATTGT |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 1310                                                                                                     | 1320 | 1330 | 1340 | 1350 | 1360 | 1370 | 1380 | 1390 | 1400 |
| CaXMT1  | TATTATATTGTTTGTATCGTAATAAAAGTGCTGTAAGAAATAGATATTTTACATAATTATTTTCAAAAAA                                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | TATTATATTGTTTGTATCGTAATAAAAGTGCTGTAAGAAATAGATATTTTACATAATTATTTTCAAAAAA                                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | TATTATATTGTTTGTATCGTAATAAAAGTGCTGTAAGAAATAGATATTTTACATAATTATTTTCAAAAAA                                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 1410                                                                                                     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaXMT1  | AAAAAAAAAAAA                                                                                             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | AAAAAAAAAAAA                                                                                             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| CaDXMT1 | AAAAAAAAAAAA                                                                                             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |

図 33 カフェイン合成に関わるメチル化酵素の相同性

## 考察

より経済価値の高いアラビカ種を用いて、カフェインの合成を抑えた形質転換体を作成した。その結果、*CaXMT1* と *CaMXMT1* の発現が野生株と比較して平均 50%減少し、*CaDXMT1* の発現は平均 75%減少していることがわかった。

カフェインの合成を抑制するために *CaMXMT1* の発現を RNAi 法で抑制したが、その他のメチル化を触媒する酵素 *CaXMT1*、*CaDXMT1* の発現も抑制されていた。このことは、*CaMXMT1*-RNAi コンストラクトが *CaXMT1* と *CaDXMT1* の発現を抑制したと考えている。*CaMXMT1* と *CaXMT1* の遺伝子配列を比較した結果、相同性が 85%あり、*CaMXMT1* と *CaDXMT1* の遺伝子配列を比較した結果、相同性が 93%あることがわかった (図 33)。RNA 干渉法について今までの研究から、RNAi の誘導に必要な相同性は、70-95%以上あれば効果的に対象となる遺伝子群 (ファミリー遺伝子) の発現を抑制できるという報告がある (Sato et al. unpublished)。このことから、*CaMXMT1* の発現を RNAi で抑制した結果、*CaXMT1* と *CaDXMT1* の発現も抑制されたと考えている。

カフェイン含量については、測定を行っていないが、カネフォラ種の結果を元に以下のように考えている。第 1 に、カネフォラ種を用いた RT-PCR とカフェイン含量測定の結果、RNAi-S #4 株では、*CaMXMT1* の発現がコントロールと比較して 60%減少し、カフェイン含量は 50%減少していた。RNAi-L #4 株では、*CaMXMT1* の発現がコントロールと比較して 60%減少し、カフェイン含量は 55%減少していた。さらに、アラビカ種のカルスを用いた結果では、RNAi-L #a 株で *CaMXMT1* の発現、カフェイン含量ともに検出することはできなかった。このことは、アラビカ種ではカネフォラ種よりも RNAi の作用が有効であることを示している。第 2 に、カフェイン合成酵素 DXMT には、テオブロミン合成に関与することがわかっている (Uefuji et al. 2003; Mizuno et al. 2003)。このことから、DXMT が MXMT の代わりにテオブロミン合成酵素として働く可能性もあるが、RT-PCR の結果より、DXMT の発現がコントロールと比較して 75%減少していることから、あまり影響がないと考えている。以上のことから、今回 RT-PCR に用いた RNAi-L 株のカフェイン含量は、コントロールと比較して減少しているのではないかと考えている。今回の結果から、より経済価値の高いアラビカ種で

形質転換体の作出ができたと考えている。一方、カネフォラ種の RNAi 株は開花しており (図 32)、受粉を行っている。

本章では、熱帯樹木に付加価値を付け経済価値を上げることが目標とし、コーヒーノキを選んで研究を行った。このために、形質転換が困難な熱帯樹木で形質転換方法を確立し、カフェイン含量を減少させたカフェインレスコーヒーの作出を行った。このことから、本研究の意義は大きく、熱帯樹木を用いた分子育種の発展に貢献できたと考えている。



## 総括

熱帯雨林の再生には、経済価値は高い樹木を用いることが重要である。しかし、それらの樹木には繁殖が困難な種もある。これを解決するために分子育種を用いて研究が行われているが、限られた種でしか研究は進んでいない。本研究により、有用樹木だが今まで研究対象として用いるのが困難な樹木でも、分子育種の対象になることが示唆され、熱帯樹木の分子育種に貢献できたと考えている。特に本研究では、産業植林が抱えている”どの樹木を植林に用いるか？”という課題に着目し、コーキセンダンとコーヒーノキを材料に選び、”培養系の確立”と”形質転換を用いた付加価値の付与”を目的とし研究を行った。

コーキセンダンの分子育種では、不定胚培養系の確立、人工種子封入条件の検討、形質転換方法の確立を行った。これらの実験結果から、現在までに報告されている培養系よりも簡便な培養系を確立できた。また、人工種子として必要な小型化や褐変防止を促すために、組織培養におけるアスコルビン酸や CH の利用を開発した。本樹種の形質転換法は、これまでに報告されていない。本研究では、その方法を確立し、今後の分子育種の基礎を築いた。その成果を利用して、実用しても有効である除草剤耐性形質を付与することに成功した。このような形質転換法の確立は、付加価値の付与だけでなく、培養細胞を用いてアザディラクチンなどの有用物質を大量に生産させるなどに応用できる。今後は、形質転換体の安全性評価などを行なうことで、より経済価値の高い植林が可能になると考えている。

現在世界で行われている植林の大半は、外来の樹木を一種類だけ植林する”monoculture plantation”である。しかし、この植林方法では、土壌の枯渇や水源機能の低下、熱帯雨林の生態系を破壊し種の多様性を維持できないなどの問題点がある。このことから本研究では、”外来の樹木を植栽するのではなく現地に自生する樹木を植林に用いる”ことも目的のひとつとして研究を行なった。その結果、現地に自生している樹木で繁殖方法が困難な樹木でも、分子育種を用いることで植林が可能であることを示唆した。また、組織培養を用いた繁殖方法の一つである人工種子は、世界中の研究室や企業が研究を行なっているが、実用化には至っていない。しかし、年間 1000 万～1500 万ヘクタール、日本の面

積の 25~40%という速度で減少している熱帯雨林を再生させるためには、必須の繁殖方法だと考えている。インドネシアのカリマンタンでは、1 ヘクタールあたり 400 本の樹木を植えている。これを元に計算を行なうと、1 年間で減少した熱帯雨林を再生させるには、40 億本から 60 億本の樹木が必要になる。これだけの数を種子繁殖や挿し木だけで準備できるとは考えられない。人工種子を用いた繁殖方法の必要性は、今後ますます高まるものと思われる。

カフェインレスコーヒーの作出では、経済価値の高いアラビカ種を用いて RNAi 形質転換体の作出を行った。その結果、カフェインの合成に関わる遺伝子群の発現が、抑制されていることがわかった。このことから、材料に他の熱帯樹木を用いても、RNA 干渉法で特定の遺伝子群を抑制できることが示唆された。今回はコーヒーノキを用いて系を確立したが、例えば、パルプを生産するときには不要な物質であるリグニンの発現を、RNA 干渉法で抑制した樹木の生産などに応用が可能であると考えている。また、植林を行なうための重要な項目に、用いる樹木の経済価値の高さと収入の維持がある。本研究で用いたコーヒーノキは、それ単体でもある程度経済価値は高いが、カフェインレスという付加価値を付けることで、さらに経済価値の高いコーヒーノキを作出することができた。またコーヒーノキは、アカシアやユーカリノキとは異なり、樹木を伐採することで収入になるのではなく、果実を採取して収入を得ることができる。言い換えれば、一度コーヒーノキを植えれば何十年間かは毎年収入を得られることになる。これらのことから、安全性の評価などクリアしなければいけない課題はあるが、カフェインレスコーヒーは植林対象になりうる樹木だと考えている。

これらの研究結果が、近い将来に何らかの形で実用化され、熱帯雨林の再生と熱帯雨林を生活の糧にしている地域社会に役立てることを期待する。



## 参考文献

Asada, M. (2002) New Biotechnology utilizing Seamless Capsules. *Bio Industry* 19: 13-19

Ashby, A.M., Watson, M.D. and Shaw, C.H. (1987) A Ti-plasmid determined function is responsible for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards the plant wound product acetosyringone. *FEMS Microbiol. Lett.* 41: 189-192

Ashihara, H., Monterio, A.M., Moritz, T., Gillies, F.M. and Crozier, A. (1996) Catabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of *Coffea arabica* L. *Planta* 198: 334-339.

Ashihara, H. and Crozier, A. (2001) Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends Plant Sci.* 6: 407-413

Bakkali, A.T., Jaziri, M., Foriers, A., VanderHeyden, Y., Vanhaelen, M. and Homès, J. (1997) Lawsone accumulation in normal and transformed cultured of henna, *Lawsonia inermis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cul.* 51: 83-87

Berthouly, M. and Etienne, H. (1999) Somatic embryogenesis of coffee. *Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Volume 5*, Jain, S.M., Gupta, R.J. and Newton, R.J. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 259-288

Bevan, M. (1984) Abstract Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12: 8711-8721

Binns, A.N. and Howitz, V.R. (1994) The genetic and chemical basis of recognition in the *Agrobacterium* : plant interaction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 192: 119-138

Bittanszky, A., Komives, T., Gullner, G., Gyulai, G., Kiss, J., Heszky, L., Radimszky, L. and Rennenberg, H. (2005) Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc(2+) stress. *Environ. Int.* 31: 251-254

Boman, H.G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 61-92

Brown, D. (1988) Germplasm determination of in vitro somatic embryogenesis in Alfalfa. *HortScience* 23: 526-531

Buettner, G.R. and Schafer, F.Q. (2004) Ascorbate as an antioxidant. *Vitamin C. Function and Biochemistry in Animals and Plants*, Asard, H., May, J.M. and Smirnoff, N. (eds), Bios Scientific Publishers, Oxford, pp. 173-188

By the Planet, Inc. Neem - Botanical Description and Cultivation.  
<http://www.bythepplanet.com/Neem/WhatIsNeem/botanicaldescription.htm>

Carrasco-Letelier L., Eguren G., Castineira C., Parra O. and Panario D. (2004) Preliminary study of prairies forested with Eucalyptus sp. at the northwestern Uruguayan soils. *Environ. Pollut.* 127: 49-55

Cellerino, G.P. (1999) Review of fungal diseases in Poplar. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J. (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116

Chaudhary, B., Kumar, S., Prasad, K.V.S.K., Oinam, G.S., Burma, P.K. and Pental, D. (2003) Slow desiccation leads to high-frequency shoot recovery from transformed somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 310 FR). *Plant Cell Rep.* 21: 955-960

Chevre, A.M., Gill, S.S., Mouras, A. and Salesses G. (1983) In vitro vegetative multiplication of chestnut. *J. Hortic. Sci.* 58: 23-29

Christensen, B., Fink, J., Merrifield, R.B. and Mauzerall, D. (1988) Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 5072-5076

Cossalter, C. and Pye Smith, C. (2003) Fast-wood forestry: myths and realities. Center for International Forestry Research and Forest Trends, Bogor, Indonesia.

Cui B., Chai H., Constant H.L., Santisk T., Reutrakul V., Beecher C.W.W., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezutto J.M. and Kinghorn A.D. (1998) Limonoids from *Azadirachta excelsa*. *Phytochemistry* 47: 1283-1287

De Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gossele, V., Movva, N.R., Thompson, C., Van Montagu, M. and Leemans J. (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of detoxifying enzyme. *EMBO. J.* 6: 2513-2518

D'silva, I. (1991) Micropropagation of *Ailanthus* and *Anacardium occidentale* L. through tissue culture. PhD Thesis, Mangalore Univ, India

D'silva, I. and D'Souza, L. (1993) Controlling contamination and browning of in vitro cultures of cashew. *J. Plant Crops* 21: 22-29

FAO (2005) Global forest resources assessment 2005. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Franceschi, V.R. and Tarlyn, N.M (2002) L-ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiol.* 130: 649-656

Gatzek, S., Wheeler, G.L. and Smirnoff, N. (2002) Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *The plant Journal* 30: 541-553

Gelvin, S.B. (2000) Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 223-256

Giagnacovo, G., Pasqua, G., Monacelli, B., Van, Der, Esch, S, A., Maccioni, O. and Vitali, F. (2001) Organogenesis and embryogenesis from callus cultures of *Azadirachta excelsa*. *Plant Biosystem.* 135: 13-18

Hultmark, D. (1993) Immune reaction in *Drosophila* and other insects. : A model for innate immunity. *TIG.* 9: 178-183

Hancock, R.E.W., Brown, M.H. and Piers, K. (1992) Cationic peptides and method of preparation. US Patent application serial No.07/913, 492, filed August 21, 1992

Hatanaka, T., Choi, Y.E., Kusano, T. and Sano, H. (1999) Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 19: 106-110

Hellens, R., Mullineaux, P. and Klee, H. (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5: 446-451

Hewavitharanage, P., Karunaratne, S. and Kumar, N.S. (2000) Effect of caffeine on shot-hole borer beetle (*Xyleborus fornicatus*) of tea (*Camellia sinensis*). *Phytochem.* 51: 35-41

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271-282

Hollingsworth, R.G., Armstrong, J.W. and Campbell, E. (2002) Caffeine as a repellent for slugs and snails: At high concentrations this stimulant becomes a lethal neurotoxin to garden pests. *Nature* 417: 915-916

Hood, E.E., Halmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region pTIB0542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168: 1291-1301

Ito, M., Koike, A., Koizumi, N. and Sano, H. (2003) Methylated DNA-binding proteins from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 1747-1754

Jayashree, R., Rekha, K., Venkatachalam, P., Uratsu, S.L., Dandekar, A.M., Kumari Jayasree, P., Kala, R.G., Priya, P., Sushma Kumari, S., Sobha, S., Ashokan, M.P., Sethuraj, M.R. and Thulaseedharan, A. (2003) Genetic transformation and regeneration of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) transgenic plants with a constitutive version of an anti-oxidative stress superoxide dismutase gene. *Plant Cell Rep.* 22: 201-209

Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Prajuabsuk, T., Panichajakul, S., Panyamee, P., Prebpai, S. and Kongsaree, P. (2005) Azadirachtin derivatives from seed kernels of *Azadirachta excelsa*. *J. Nat. Prod.* 68: 1047-1050

Kerk, N.M. and Feldman, L.F. (1995) A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organization of root meristems. *Development* 121: 2825-2833

Kitto, S.L. and Janick, J. (1982) Polyox as an artificial seed coat for a sexual embryos. *HortScience* 17: 448

Krikorian, A.D. (1994) *In vitro* culture of plantation crops. *Plant cell and tissue culture*, Vasil, I.K. and Thorpe, T.A. (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 497-537

Lavid, N., Barkay, Z. and Tel-Or, E. (2001) Accumulation of heavy metals in epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*). *Planta* 212: 313-322

Lemmens, R.H.M.J., Soerianegara, I. and Wong, W.C. (eds) (1995) Timber trees: minor commercial timbers. Plant resources of South-East Asia No. 5 (2), Backhuys Publishers, Bogor, Indonesia, pp. 72-77

Liew, T.K. and Teo, C.K.H. (1998) Multiple shoot production in vitro of the tropical timber tree, Sentang (*Azadirachta excelsa* Linn.). *HortScience* 33: 1073-1075

Liew, T.K., Chan, L.K. and Teo, C.K.H. (1999) In vitro rooting of Sentang shoots (*Azadirachta excelsa* L.) and acclimatization of the plantlets. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 35: 396-400

Liso, R., Calabrese, G., Bitonti, M.B. and Arrigoni, O. (1984) Relationship between ascorbic acid and cell division. *Experimental cell Research* 150: 314-320

Llewellyn, D.J. (2000) Herbicide tolerant forest trees. *Molecular Biology of Woody Plants Volume 2*. Jain, S.M., Minocha, S.C. (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 439-466

MacRae, S. and van Staden, J. (1993) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation to improve rooting ability of eucalypts. *Tree Physiol.* 12: 411-418

Mentag, R., Luckevich, M., Morency, M.J. and Seguin, A. (2003) Bacterial disease resistance of transgenic hybrid poplar expressing the synthetic antimicrobial peptide D4E1. *Tree Physiol.* 23: 405-411

Miyanoshita, A. and Yamakawa, M (1996) Protein engineering for the development of new peptide. *Bio Industry* 13: 28-39

Mizuno, K., Okuda, A., Kato, M., Yoneyama, N., Tanaka, H., Ashihara, H. and Fujimura, T. (2003) Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Lett.* 534: 75-81

Morris, J., Ningnan, Z., Zengjiang, Y., Collopy, J. and Daping, X. (2004) Water use by fast-growing *Eucalyptus urophylla* plantations in southern China. *Tree Physiol.* 24: 1035–1044

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497

Murashige, T. (1978) The impact of plant tissue culture on agriculture. *Frontiers of plant tissus culture 1978*. Thorpe, T (ed.). Intl. Assn. For Plant Tissue Cult. Univ. of Calgary, Alb. Canada.

Nakamura, K. (2006) Micropropagation of *Shorea roxburghii* and *Gmelina arborea* by shoot-apex culture. *Plantation Technology in Tropical Forest Science*, Suzuki, K., Ishii, K., Sakurai, S. and Sasaki, S. (eds), Springer-Verlag, Tokyo, pp. 137-150

Nambiar, M.C. and Iyer, R.D. (1988) Tissue culture in cashew: Potential, priorities and applications. *Proc. Natl. Sem. Plant Tissue Cult.* CPCRI, Wadhwani, A.M. and Tata, S.N. (eds), Kasaragod, pp. 149-155

OECD. BioTrack Field Trial Database. <http://webdomino1.oecd.org/ehs/biotrack.nsf>

Ogita, S., Uefuji, H., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. and Sano, H. (2003) Producing decaffeinated coffee plants. *Nature* 423: 823.

Ogawa, M., Herai, Y., Koizumi, K., Kusano, T. and Sano, H. (2001) 7-methylxanthine methyltransferase of coffee plants. *J. Biol. Chem.* 276: 8213-8218.

Ohta, S., Mita, S., Hattori, T. and Nakamura, K. (1990) Construction and expression in tobacco of a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31: 805-813.

Osusky, M., Zhou, G., Osuska, L., Hancock, R.E., Kay, W.W. and Misra, S. (2000) Transgenic plants expressing cationic peptide chimera exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature biotechnology*. 18: 1162-1166

Petri, C. and Burgos, L. (2005) Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Transgenic Res.* 14: 15-26.

RAP (2003) State of forestry in Asia and the Pacific – 2003 Status, changes and trends. Regional centre for Asia and the Pacific, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Bangkok.

RAP (2005) Helping forests take cover. Regional centre for Asia and the Pacific, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Bangkok.

Redenbaugh, K., D.Slade, P. and Viss y J. Fujii. (1987) Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *HortScience* 22: 803-809



Silvatolla, M.B., Mazafera, P. and Fazuoli, L.C. (2004) A naturally decaffeinated arabica coffee. *Nature* 429: 826

Smirnoff, N. (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669

Smirnoff, N. (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences* 355: 1455-1464

Srivastava, R.J., Kumar, A. and Prasad, K. (2003) Studies on soil moisture variations under *Eucalyptus* plantation. <http://www.fao.org/docrep/article/wfc/xii/0500-b2.htm>

Stasolla, C. and Yeung, E.C. (1999) Ascorbic acid improves conversion of white spruce somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35: 316-319

Takahata, K., Takeuchi, M., Fujita, M., Azuma, J., Kamada, H. and Sato, F. (2004) Isolation of putative glycoprotein gene from early somatic embryo of carrot and its possible involvement in somatic embryo development. *Plant Cell Physiol.* 45: 1658-1668

Taniguchi, T., Kurita, M., Ohmiya, Y. and Kondo, T (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic tissue and transgenic plant regeneration in *Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc. *Plant Cell. Rep.* 23: 796-802

Te-chato, S. and Rungnoi, O-u. (2000) Induction of somatic embryogenesis from leaves of Sadao Chang (*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs). *Scientia Horticulturae* 86: 311-321

Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M. and Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6: 2519-2523

Thorpe, T.A., Joy, R.W., IV. and Leung, D.W.M. (1986) Starch turnover in shoot-forming tobacco callus. *Physiol. Plant* 66: 58-62

Toki, S. (1997) Rapid efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 16-21

Tomes, D.T. (1985) Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. *Cereal tissue and cell culture* Bright, S.M.J. and Jones, M.G.K. (eds), Martinus Nijhoff/Junk, Amsterdam, pp. 175-203

Uefuji, H., Ogita, S., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. and Sano, H. (2003) Molecular cloning and functional characterization of three distinct *N*-methyltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. *Plant Physiol.* 132: 372-380.

Vaughn, K.C. and Duke, S.O. (1984) Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant* 60: 106-112

Waller, G.R. (1989) Biochemical frontiers of allelopathy. *Biol. Plant* 31: 418-447

Watt, M.P., Blakeway, F.C., Termignoni, R. and Jain, S.M. (1999) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunni*. *Somatic Embryogenesis in Woody Plants volume 5*, Jain, S.M., Gupta, P.K. and Newton, R.J. (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 63-78

Winans, S.C. (1992) Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* 56: 12-31

浜 逸男、余吾 由紀、西村 実 (1986) 人工種子、公開特許公報(A)、昭 61-40708

平林 保治、今中 嘉彦、市川 弥太郎 (1988) 人工種子、公開特許公報(A)、昭  
63-152905

### 学位論文の主たる部分を公表した論文

Morimoto, M., Nakamura, K. and Sano, H. (2006) Regeneration and genetic engineering of a tropical tree, *Azadirachta excelsa*. *Plant Biotech.* 23: 123-127

Ogita, S., Uefuji, H., Morimoto, M. and Sano, H. (2004) Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Mol. Biol.* 54: 931-941

### その他発表論文

Ogita, S., Uefuji, H., Morimoto, M. and Sano, H. (2005) Metabolic engineering of caffeine production (review). *Plant Biotech.* 22: 461-468

Uefuji, H., Tatsumi, Y., Morimoto, M., Kaothien-Nakayama, P., Ogita, S. and Sano, H. (2005) Caffeine production in tobacco plants by simultaneous expression of three coffee *N*-methyltransferases and its potential as a pest repellent. *Plant Mol. Biol.* 59: 221-227

Ashihara, H., Zheng, X.-Q., Katahira, R., Morimoto, M., Ogita, S. and Sano, H. (2006) Caffeine biosynthesis and adenine metabolism in transgenic *Coffea canephora* plants with reduced expression of *N*-methyltransferase genes. *Phytochem.* (accepted)

## 用語解説

### 多芽体

多芽体とは、シュート（5mm 以上に伸長した芽）の伸長を抑制し、側芽を多数形成させた組織であり、根の形成能は無く、別途誘導する必要がある。

### 不定胚

不定胚とは、受精卵由来の胚（種子胚）と同様な機能、形態形成能をもつが、種子胚は受精卵由来なのに対して不定胚は体細胞由来の胚様体である。体細胞から誘導された不定胚は、種子胚と同様に球状胚、心臓型胚、魚雷型胚と形態を変え、最終的に植物個体へと成長する（図 34）。種子胚と不定胚の違いは、種子胚が成熟の後期で乾燥、休眠するのに対して、不定胚は誘導した状態では休眠しないことが、大きな違いである。不定胚は、本研究のように繁殖を目的として用いられているが、胚形成時のメカニズムの解析にも利用されている（Takahata et al. 2004）。

### 人工種子

人工種子は、Murashige や Kitto らにより提唱され（Murashige 1978, Kitto et al. 1982）、1983 年に PlantGenetics 社が初めて作製した（Redenbaugh et al. 1983）。その方法は、不定胚や不定芽を海藻の多糖類であるアルギン酸ナトリウムを MS 培地やショ糖に溶解した溶液に混入し、塩化カルシウム溶液に滴下することでカプセル化させるという方法である（図 35）。しかし、これらの人工種子は、室温での乾燥に対して耐性がなく、乾燥を防ぐためには冷蔵保存または培養液中などに保存する必要がある。そこで、アルギン酸カルシウムゲル内に高分子の保水剤を混入したカプセルなども作製されている（浜ほか, 1986）。しかし、カプセル内にショ糖などの栄養物を多く含むため、無菌条件下でしか蒔けないという問題点がある。この問題点を克服するために、カプセル内に抗生物質などの農薬を混入させたもの（浜ほか, 1986）、抗菌性の外膜を人工種子に取り付けたカプセルなどが開発されている（平林ほか, 1988）。現在も、大学や国内外の種苗会社などで研究が行われ、実用化に耐えうる人工種子の開発が進められている。

### 除草剤耐性遺伝子 (*bialaphos resistance* 遺伝子)

除草剤耐性遺伝子は、*Streptomyces hygroscopicus* から単離され、phosphinothricin acetyltransferase (PAT) をコードしている。除草剤の有効成分である phosphinothricin (PPT) は、植物の窒素代謝由来のアンモニアを無毒化する酵素 glutamine synthetase (GS) の活性を特異的に阻害するため、植物内にアンモニアが蓄積し植物が枯死する。しかし、PAT は PPT をアセチル化し GS に対する阻害作用を不活化させる作用があるため、*Bar* 遺伝子を導入した植物体は、除草剤 (*bialaphos*) 存在下でも生育することが可能である (Thompson et al. 1987)。*Bar* 遺伝子は、草本植物ではトマトやジャガイモなど (De Block et al. 1987)、また、木本植物ではポプラ、ユーカリノキなどで行なわれている。

### 抗菌ペプチド

抗菌ペプチドとは、細菌に感染した動物や昆虫で産生されるタンパク質である。抗菌ペプチドは、細菌感染後数時間で発現し、2、3 日活性を持続させることができる。また、ペニシリン、メチシリンなど従来の抗生物質と異なり、耐性菌が出来にくいのが特徴である (Boman 1995, Hultmark 1993)。近年、昆虫から多くの抗菌ペプチドが単離されており、その構造からセクロピン、ディフェンシン、アタシン、高グリシン含有、高プロリン含有タイプに分けることが出来る (Miyano-shita et al. 1996)。本研究で用いた抗菌ペプチドは、セクロピンタイプの  $\alpha$ -helix 構造をとる。セクロピンタイプの抗菌作用は、Christensen 他により仮説が立てられており (Christensen et al. 1988)、電位依存性のイオンチャンネルを細胞質膜にすることで、K や H イオンがチャンネルから漏れだし膜構造を破壊し抗菌性を示す。抗菌作用の仮説モデルは、次に示すとおりである (図 36)。

- 1)  $\alpha$ -helix 構造をとる両親媒性ペプチドのプラス荷電面がマイナスに荷電している細胞質膜の表面と結合する
- 2) ペプチドの疎水性 C 末端がリン脂質膜に作用し侵入する
- 3) 複数の両親媒性ペプチドが集まり親水性面が内側になり膜に穴の内面にプラスに荷電した部位が集まり穴を形成する
- 4) 結果的に、穴の内面に水が溜まり親水性になり電位依存性のイオンチャンネルを形成する

抗菌性の付与は、樹木に限定するとポプラで報告がある (Mentag et al. 2003)。土壌中に存在する病原菌 *Hypoxylon mammatum* は、ポプラやその他樹木に感染し、

がん腫病を起こす。がん腫病にかかった株は、ゆっくりと生育が悪くなり、最終的には枯死する (Cellerino 1999)。現在、がん腫病に対する効果的な治療法は見つかっていない。このため、ポプラに抗菌性を付与し病原菌に対する抵抗性を高めたポプラが作製されている。

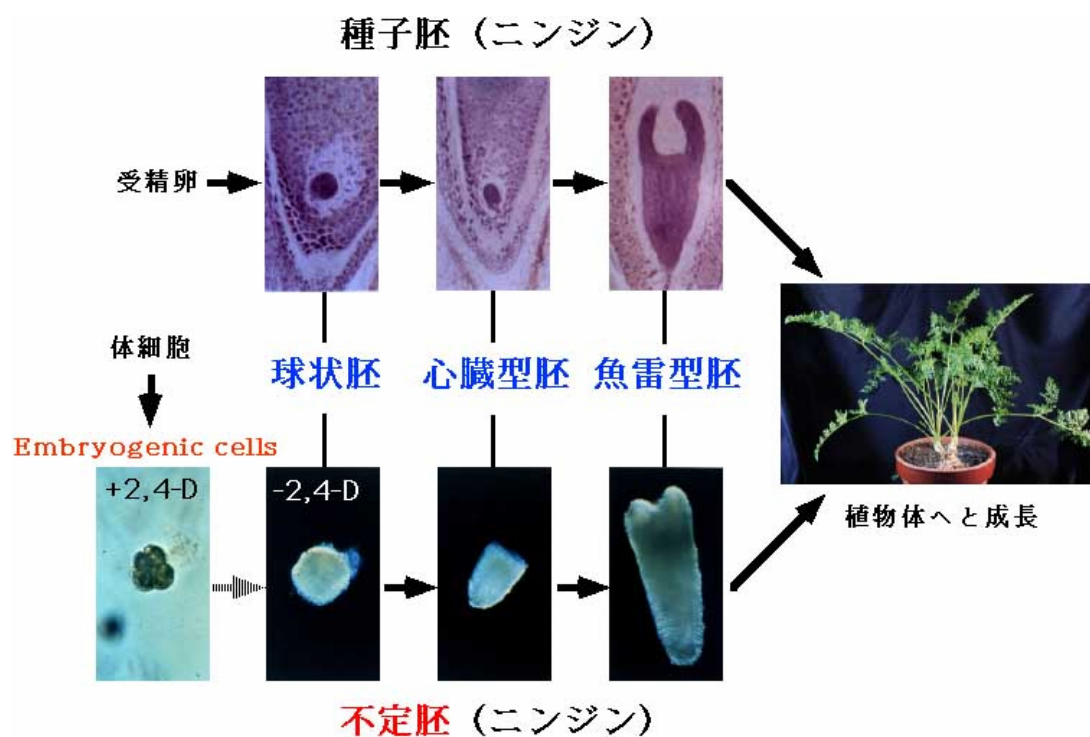


図 34 胚の発達様式

不定胚は、種子胚と同様の形態変化を経て植物へと分化する

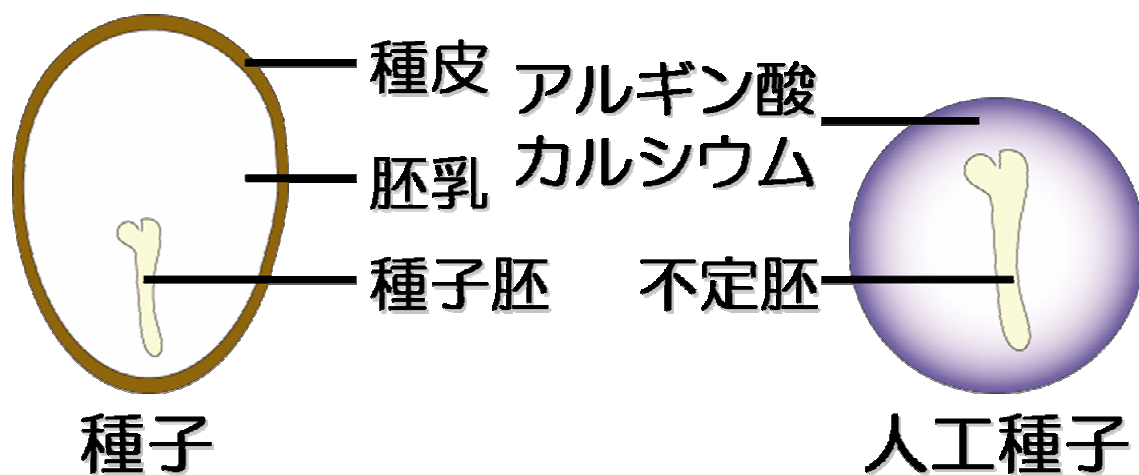


図 35 人工種子

不定胚をアルギン酸カルシウムゲルで封入した不定胚。  
 種子の種皮と胚乳にあたる部分をアルギン酸カルシウムが補っている。

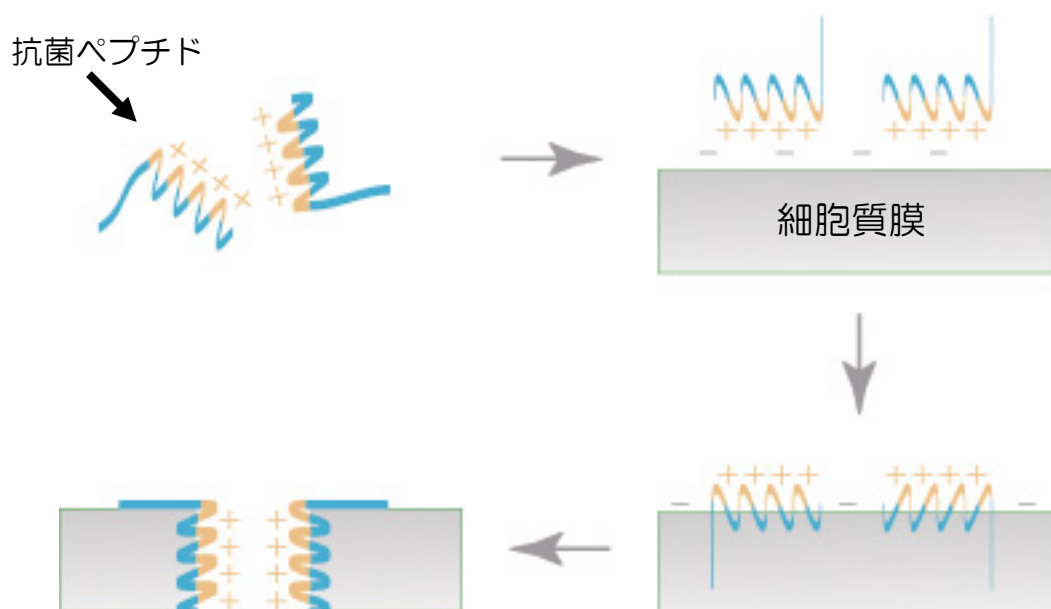


図 36 セクロピンタイプの抗菌作用仮説モデル



## 付記

### はじめに

コーキセンダンの形質転換には *Bar* の他に、抗菌ペプチドの MsrA1 を用いて (図 37)、形質転換を行なっている (用語解説参照 p82)。MsrA1 は、Osusky らが作製した抗菌ペプチドで (Osusky et al. 2000)、カイコの抗菌ペプチド cecroin A (KWKLFFKKIGIGAVLKVLT) とミツバチの毒素 melittin (TGLPALKLTK) を融合させたペプチド CEMA の N 末端に 6 個のアミノ酸を付加し、植物に対する毒性を弱めたペプチドである。

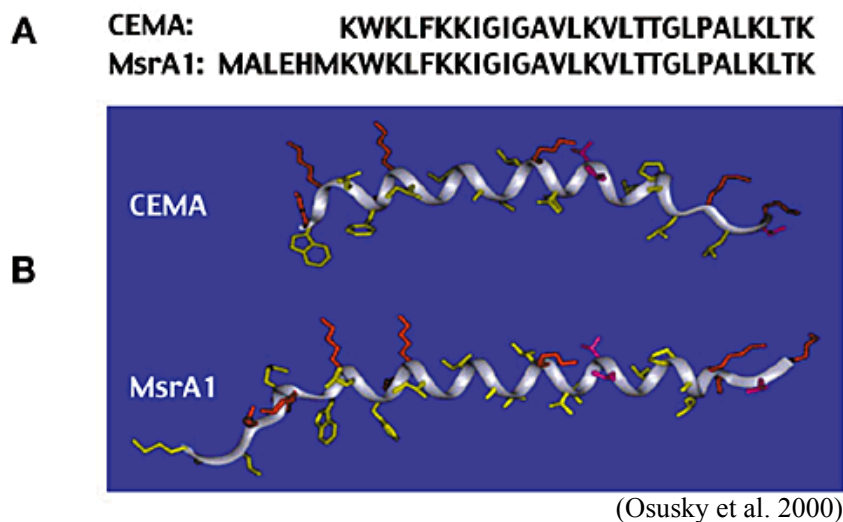


図 37 MsrA1 のアミノ酸配列と立体構造

(A) CEMA と MsrA1 のアミノ酸配列。(B) CEMA と MsrA1 の立体構造。

## 材料と方法

### MsrA1 の合成

MsrA1 の合成は、Osusky らの報告を元にプライマー (図 38)を設計し、PCR を行なった。プライマーの両端には *Xba* I /*Bam*HI、*Sac* I の制限酵素部位を付加した。反応液組成及び反応条件を以下に示す。

| 反応液組成                  |         | 反応条件          |        |
|------------------------|---------|---------------|--------|
| 10×LA buffer           | 5 µl    | 98°C          | 1 min  |
| 25mM MgCl <sub>2</sub> | 3 µl    | 96°C          | 30 sec |
| dNTP MIX               | 5 µl    | 65°C          | 30 sec |
| MsrA1-F                | 10 µl   | 72°C          | 30 sec |
| MsrA1-med              | 5 µl    | 72°C          | 1 min  |
| MsrA1-R                | 10 µl   |               |        |
| LA Taq polymerase      | 0.5 µl  |               |        |
| 滅菌水                    | 11.5 µl |               |        |
| 総量                     |         | 50 µl (/tube) |        |

PCR 後、1%TBE アガロースゲルで電気泳動を行い増幅断片の確認を行った

### クローニングおよび大腸菌への導入

増幅させた断片に変異が入っていないかをシーケンスで確認するために、pGEM®-T Easy Vector (Promega)を用いてTA クローニングを行った。反応条件は、16°C 1時間である。クローニング後、大腸菌コンピテントセル DH5αに導入し、37°Cに一晩静置した。

### プラスミドの確認

アンピシリンを用いて選抜後、シングルコロニーを用いてコロニーPCR を行なった。用いたプライマーは sp6 (5'-CATACGATTAGGTGACACTATAG-3')と t7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3')である。PCR 条件は、変性 96°C 30 秒、アニーリング 55°C 30 秒、伸長 72°C 60 秒を 25 サイクルで行った。酵素には Ex Taq polymerase を用いた。PCR 後、1%TBE アガロースゲルで電気泳動を行い増幅断片の確認を行った。

### プラスミドの単離

コロニーPCR でインサートの確認が出来たコロニーを ampicillin (最終濃度 50 µg / ml)を加えた LB 液体培地に植菌し、37℃で一晩培養した。プラスミドの単離は、アルカリ-SDS 法を用いて行った。

### 塩基配列の解析

単離したプラスミドを鋳型に BigDye™ Terminator V3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction を用いてシーケンス反応を行った。反応後、エタノール沈殿を用いて精製し、Hi-Di Formamide 20 µl に溶解した。調製したサンプルを ABI 310 シーケンサーを用いて、塩基配列の解析を行った。

### 制限酵素処理

単離したプラスミドおよび pIG121-Hm を *Xba* I、*Sac* I で制限酵素処理を行った。反応条件は、37℃ 5 時間で行った。処理後、1%TAE アガロースゲルで泳動を行い、目的のバンドを切り出した。切り出したゲルから Suprec-01 (Takara, Japan) を用いて DNA を抽出し、クローニングサンプルとした。

### pIG121-Hm ベクターへのクローニング

ligation には、pGEM®- T Easy cloning system に付属している、ligation solution と T4 DNA ligase を用いた。ベクター (pBIH1-IG; Ohta et al, 1990)とインサート (*MsrA1*)のモル比が、1:3~1:5 になるように調製した。反応条件は、16℃ 1 時間で行った。クローニング後、大腸菌コンピテントセル DH5αにトランスフォーメーションし、kanamycin (最終濃度 50µg/ml)と hygromycin (最終濃度 50µg/ml)を添加した LB 寒天培地上で一晩増殖させた。

### インサートの確認

用いたプライマーは CaMV35S (5'-GACGTTCCAACCACGTCTTC-3') と NOS-TER (5'-TAACATAGATGACACCGCGC-3')である。PCR 条件は、変性 96℃ 30 秒、アニリング 55℃ 30 秒、伸長 72℃ 60 秒を 25 サイクルで行った。酵素には Ex Taq polymerase を用いた。PCR 後、1%TBE アガロースゲルで電気泳動を行い増幅断片の確認を行った。

### プラスミドの単離

コロニーPCR でインサートの確認が出来たコロニーを kanamycin (最終濃度 50µg/ml)と hygromycin (最終濃度 50µg/ml)を加えた LB 液体培地に植菌し、37℃で一晩培養した。プラスミドの単離は、アルカリ-SDS 法を用いて行った。

## 形質転換

実験方法は、*GFP*, *GUS*, *Bar* と同様の方法である (p36 参照)

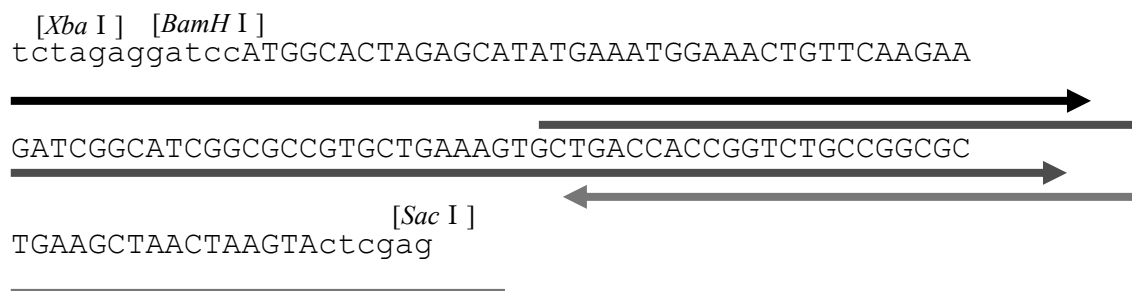


図 38 *MsrA1* の合成に用いたプライマー

下線矢印は作製したプライマーの位置を示す。黒色の矢印が *MsrA1*-F、濃灰色の矢印が *MsrA1*-med、灰色の矢印が *MsrA1*-R である。大文字が *MsrA1* の配列、小文字は付加した制限酵素部位を示す。

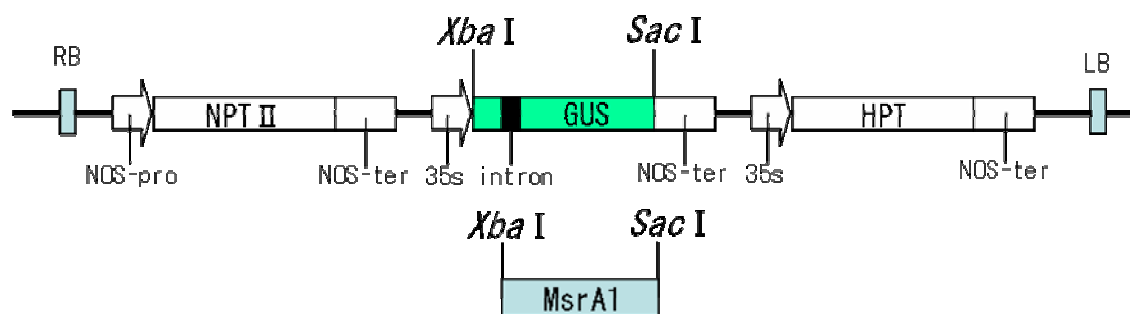


図 39 *MsrA1* コンストラクトの作成

pBIH1-IG ベクターの intron-*GUS* 領域に *Xba* I、*Sac* I 制限酵素サイトを用いて、PCR で合成した *MsrA1* 断片を挿入した。

## 結果および考察

*GFP* と *GUS* を用いて確立した形質転換方法を用いて実験を行った。*MsrA1* コンストラクト (図 39)を用いた形質転換は、*GFP* や *GUS*、*Bar* のときと同様に感染約 1 ヶ月後に外植片の褐変化が見られたが、不定胚が誘導されずにカルスが誘導されることがわかった。*MsrA1* は CEMA (Hancock et al. 1992)の N 末に 6 個のアミノ酸を付け足したペプチドである。CEMA の抗菌活性は、非常に高いことが Hancock らの報告によりわかっており (Hancock unpublished results)、予備実験から CEMA が植物に対して毒性があることを示唆した (Osuska et al. unpublished results)。この結果から、Osusky らは CEMA の $\alpha$ -ヘリックスの構造を維持したまま、N 末に 6 個のアミノ酸を付加することで毒性を弱めた *MsrA1* を作成した。このことから、不定胚を誘導できずにカルスが誘導されたのは、*MsrA1* の毒性がコーキセンダンに対して強く、不定胚誘導を阻害されたのではないかと考えている。また、形質転換方法が確立されている *Coffea canephora* にも、今回作成した *MsrA1* コンストラクトで形質転換を行ったが、コーキセンダンと同様に不定胚は誘導されずに、カルス誘導または葉切片の褐変化後に枯死が起こった。今後は、さらに植物に対する毒性を弱めたコンストラクトなどを作成し、形質転換を行う必要がある。

## 謝辞

本研究を進めるに当たって、多大なるご指導いただきました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物細胞工学講座の佐野 浩教授に深く感謝いたします。また、本研究を遂行するに当たってご助言をいただきました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物細胞工学講座の小泉望助教授、山口 夕助手、和田 七夕子助手、依田 寛助手に深く感謝します。また、副指導教官として様々なご助言をいただきました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物代謝調節学講座の新名 惇彦教授、吉田 和哉助教授、細胞機能学講座の谷 吉樹教授に深く感謝いたします。

コーキセンダンを供与下さいました住友林業株式会社 筑波研究所 資源グループの中村 健太郎様に深く感謝いたします。また、実験や、その他いろいろな面でご指導、ご助言いただきました、荻田 信二郎博士、上藤 洋敬博士に深く感謝いたします。また、バイテクグループの皆様、研究室の方々にも色々とお世話になりました。ありがとうございます。

末筆ながら、5年間心体を支えていただいた祖母、母、姉と、畑仕事を通じて「生き物」というものに興味を持たせていただき、このような道に進むことを後押ししていただいた祖父、父に心から感謝いたします。