

## 論文の内容の要旨

論文題目      コエンザイム Q10 を高蓄積するイネの開発

氏      名      高   橋   咲   子

コエンザイムQ(CoQ)は、微生物から高等動植物に至るまで生物に普遍的に存在する物質である。CoQは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年代から医薬品として使用されてきたが、近年食品や化粧品としての利用が認められたことから、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。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、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、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。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。

第1章では、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*) を、翻訳産物がミトコンドリアに局在するよう設計 (S14:*ddsA* コンストラクト) してイネ (品種: 日本晴) に導入することにより、イネのCoQ側鎖長を本来の9から10へ改変することに成功した。作出したN-S14:*ddsA* イネの種子には非形質転換体の10倍以上に当たる12 µg/gのCoQ10が蓄積されており、CoQ10強化イネの作出に成功した。この結果から、DdsA酵素を内生酵素の局在部位と推定されるER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効率的に改変できることが示された。

またCoQ10強化イネ (N-S14:*ddsA* イネ) の種子では、CoQ9とCoQ10の合計量であるCoQ総量が野生型の2-3倍に増加しており、イネにおいてはDdsAが触媒するポリプレニル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。そこで、*ddsA* 遺伝子発現の増強により、CoQ10強化イネの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含量をさらに増加させることが出来た。

別なアプローチとして、DdsAが行うポリプレニル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含量に差違は見られなかった。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が触媒するポリプレニル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、野生型及び 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し、また未熟種子 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、その後減少すること、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とが明らかになった。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* が行うポリプレニル 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。

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、さらに CoQ は強い抗酸化作用を持つが、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から、ストレス耐性の一例として耐塩性について解析した。その結果、CoQ 種や CoQ 含量の変化にもかかわらず、CoQ10 強化イネの生育特性、収量特性及び耐塩性は野生型と大きな差がない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。なお生育及び収量特性調査より、CoQ10 強化イネ (N-S14:ddsA イネ) の玄米収量は野生型である日本晴の 80%程度と推定された。

第2章で明らかにした通り、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。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。

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。CoQ は米のぬかおよび胚芽に主に蓄積するため、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。食品サプリメントとして使用する場合の CoQ10 の最適摂取量は未だ決定されていないが、原則的には医薬品として用いる場合の規定量である 30 mg/日以下の CoQ10 摂取が推奨されている。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、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  $\mu\text{g/g}$ 、デンプン合成変異体型で最大 34.5  $\mu\text{g/g}$  と、望ましい値のそれぞれ 1/3 以下であった。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 摂取量である 4.5 mg/日に匹敵している。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、通常の食事から十分量を摂取することは不可能である。本研究で開発した CoQ10 強化イネは、現在すぐに遺伝子組換え作物の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を進めることで、サプリメントに頼らない、食品からの十分量の CoQ10 摂取に道を開くと考えている。