

から資源の枯渇が懸念され、日本において安定的に生産する技術の開発が求められる。

カンゾウの国内栽培化における最大の問題点は、栽培品のグリチルリチン酸含量が野生品よりも顕著に低く、JP16の規定値2.5%を安定的に満たさないことである。このことから、本研究部では主として利用されるウルルカンゾウについて、国内における通常の栽培方法によってもグリチルリチン酸含量が2.5%を安定的に満たすカンゾウの品種を育成することを目的とし、種子から通常栽培した5年生株を対象に選抜試験を2008年に実施した⁶⁾。約600個体のカンゾウを収穫後、生育等を指標として100個体を選抜し、それら主根の基部から12cmまでの部位（最もグリチルリチン酸含量が低い部位）を対象として、グリチルリチン酸含量を測定した。

その結果、個体（以後、系統）間でグリチルリチン酸含量に大きな変異（0.46-4.67%、平均2.11%）が認められ、グリチルリチン酸含量が4%以上であったグリチルリチン酸高含有系統（7系統）と、グリチルリチン酸含量が3%以上で根重が高かった高収量系統（2系統）が選抜された。これらについては、優良系統として特許出願（特願2009-200179）を行った。現在、各系統を増殖中であり、今後、形質の再現性を評価した上で更なる選抜を加え、品種登録を目指す。

おわりに

品種の育成開始から登録に至るまでの期間は、ハトムギ、シャクヤクともに20～30年を要した。野生種に限りなく近い状態から育種が開始される薬用植物は、前述したカンゾウの成分変異で示されるように極めて多様に富んでおり、また栽培期間が複数年のものが多く、このため、各系統の評価、選抜および遺伝的固定には多くの年月と労力を伴うのが現実である。しかし、冒頭で述べたように、生薬資源の安定的な確保のためには有用な栽培品種の育成が不可欠であり、今後とも継続して取り組むべき課題である。

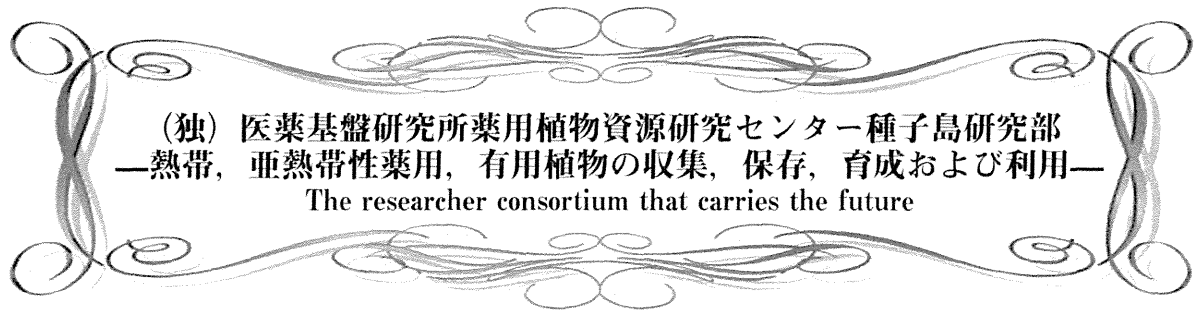
同時に、遺伝的な多様性を考慮した種の保存も必要とされる。ダイズの生産量が世界で最も多い北アメリカでは、栽培化、原産地からの伝播、強い人為的選抜により、現存する優良系統から原種に対して遺伝的多様性が50%、稀な対立遺伝子が80%も

失われていることに警鐘が打ち鳴らされている⁷⁾。この失われた遺伝子に農業上有用な形質を有する可能性がある。例えば、ダイズシスト線虫抵抗性を持つのは選抜した9,000以上の個体中45個体、ダイズ落葉病抵抗性を有するのは2,000以上の個体中僅か1個体のみであった。このことから、薬用植物における種の保存については、病虫害や気象変化等の未知なる危機に備えて、また品質評価基準の変更に対応できるような育種材料を確保しておく必要がある。そのためには、表現型が異なる、遺伝距離が遠い等の多様性を持った系統について、5%以上の頻度で存在する対立遺伝子をすべて採集するために必要な個体数である50個体⁸⁾以上を目標に維持することが望ましいと考える。

参考文献

- 1) 薬事工業生産動態統計調査, 厚生労働省
- 2) 日本漢方生薬製剤協会, 原料生薬使用量等調査報告書 - 平成20年度の使用量 - (2011)
- 3) 柴田敏郎, 道楽誌, 26 (12), 7-11 (2009)
- 4) 畠山好雄ら, Nat. Med., 52 (2), 103-108 (1998)
- 5) 林茂樹ら, 生薬学雑誌, 65 (2), 129-133 (2011)
- 6) Kojoma M. et al, Biol. Pharm. Bull., 34 (8), 1334-1337 (2011)
- 7) David L. H. et al, PNAS, 103 (45), 16666-16671 (2006)
- 8) 鶴飼保雄, 植物育種学, 東京大学出版会, 東京, 1-455 (2003)

次号は当センター種子島研究部の飯田修リーダーから寄稿していただく予定です。



(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部
—熱帯、亜熱帯性薬用、有用植物の収集、保存、育成および利用—
The researcher consortium that carries the future

(独) 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 種子島研究部 研究リーダー 飯田 修

1. はじめに

種子島研究部は、表題に掲げた熱帯、亜熱帯性薬用、有用植物の収集、保存、育成および利用に関する試験研究を行うことを主たる業務としています。本稿では、植物資源の保存と育成に関する研究や業務を紹介し、次回、杉村康司研究員が植物資源の収集と利用に関する研究を紹介します。

2. 種子島研究部の概要

当研究部は、昭和28年11月に国立衛生試験所薬用植物園種子島分場として業務を開始し、翌29年11月25日に開庁式が行われました。その後、組織の改変等があり、平成17年4月1日から現在の体制になりました。なぜ、種子島で熱帯植物の研究を行うことになったのかと設立の経緯をよく聞かれますが、当時の日本の南端で、大面積が確保出来たのが種子島でした(奄美群島が日本に返還されたのが、昭和28年12月25日でした)。

種子島研究部の敷地面積は約11ha、職員は研究員2名、技術専門員2名、事務・技術補助員4名で業務に当たっています。研究員が2名体制になったのは、つい最近の平成18年4月からで、それまでの長い間、研究員は栽培試験場長1名のみで、孤軍奮闘されてきました。

当地の夏の最高気温は32～33℃、冬の最低気温が4～5℃の夏涼冬暖という比較的温かな気候で、特に研究部周辺は無霜地帯のため、熱帯性植

物であるウコン属やインドジャボクなどが野外で越冬します。

3. 植物資源の保存

種子島研究部で保存している植物数は2000系統を超え、研究部内の天然林に自生している種を加えると、正確な数は不明です。主な保存植物はショウガ科、ニッケイ属、クチナシ属、柑橘類、チョウジ、カンラン、カギカズラなどであり、種子を付けないため、栄養体で保存する種が多いことが特徴です。そのため、株分け、挿し木、取り木法等の効率的な増殖法を検討しています。

最も多い保存種はウコン属で、大学、企業等から提供された系統数が100系統を超えます。それらの葉鞘の色、葉の毛の有無や花序などの外部形態、草丈、根茎重量(主根茎、側根茎)や増殖率などの成長特性さらには根茎のクルクミノイド含量等の成分特性について調査を行い、データベース化を図っています。これらの多くは未だ未同定で、種名が不明です。種の同定に当たり、遺伝子解析による手法が有用であり、外部形態の特徴と併せて、種の同定を進めて行く予定です。

ウコン属の保存は、ハウス内や野外で行っていますが、前述のとおり、当地は無霜かつ土が凍らないため根茎は腐らず、野外でも植えた状態でそのまま越年栽培が出来ます。株の増殖に伴い、数年ごとに株分けと移植を行う必要がありますが、掘り残した



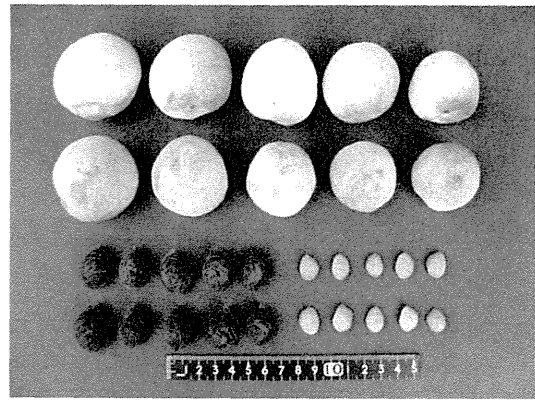
種子島研究部庁舎



ウコン属植物の保存



インドジャボク



モモ種子島在来種

根茎が腐らずそのまま残ってしまうため、株の更新時には同じ場所での保存栽培が出来ず、栽培できる場所が制限されてしまう問題があります。効率的な保存を行うためにも、植物種を同定し、保存系統数を厳選する必要があります。

インドジャボクは代表的な熱帯性植物で、根を血圧降下剤として利用されます。本種の栽培は4年以上必要ですが、寒さに弱いため国内では野外での越冬が困難です。種子島研究部ではよく生育し（冬期には地上部は枯れるが、根は生存）、過去に精力的に栽培研究が行われました。本種は種子を付けるため、種子での保存が可能です。多量の種子を得るには経年株が必要です。

現在、インドジャボクや前述のウコン属（ガジュツやウコン）の国内栽培の需要はほとんどない状態です。資源の保存は、利用や活用するための保存です。保存している資源を大いに利活用していただきたいものです。

4. 植物の育成

育成の中には、保存植物の育成、栽培および育種試験を含めています。栽培試験の主な目的は栽培指針を作成することで、種子島研究部がこれまでに担当した植物はガジュツ（Part 2、以下Part略）、カギカズラ（3）、ウコン（4）、インドジャボク（5）、ドクダミ（6）、オオカラスウリ（7）、クチナシ（8）、ヒキオコシ（9）、ウツボグサ・テンダイウヤク（10）、オミナエシ（11）、トウガン（12）で、現在モモ、ニッケイ、ゴシュユについて、栽培試験を行っています。Part12までは前任者が1名で担当され、曰く「種子島の担当植物は初めてのものが多く、栽培試験と指針の作成が難しい」と奮闘されていました。

種子島は生食用のモモの産地ではありませんが、家々の庭先には在来種のモモの木がよく見られ、「イゲモモ」や「盆モモ」と呼ばれ、自家用に食されています。在来種の来歴は種々様々と思われませんが、いずれも果実は小さく、核は離核性で果肉離れがよ

く、核中の種子（仁）は比較的大きいことなどの特徴があります。そこで、在来種を用いて栽培試験を行い、生産性を確認するとともに、種子の生薬としての品質を検討しました。その結果、種子中のアミグダリン含量は2.45～3.41%であり、日局16の規格の1.2%以上に適合し、生薬として有用であることが明らかとなりました。しかしながら、加工調製の困難さや生薬の価格面から生薬「トウニン」の生産はほとんど期待出来ません。生薬トウニンの供給元としての資源（モモの木）を残し、いつでも生薬の供給が可能な状況を如何に構築するか、思案中です。ニッケイは定植後5年間を目途に栽培を開始し、今年度最終年を迎えます。ニッケイの利用部位は根皮で、栽培上の一番の課題は根の収穫と根皮の剥離・採取です。定植後4、5年生株はまだ大木ではありませんが、根の収穫にはバックホーなどの重機が必要です。そのため、ニッケイの栽培では山の斜面を利用した方法は困難と思われます。ゴシュユは3種類の種を用いて栽培試験を行い、主に果実の収穫時期について検討しています。

栽培試験関係では上記の他、マオウの国内生産を指向した栽培試験を行っており、3種類のマオウを用い、生育と成分について検討しています。

熱帯性植物の耐寒性を確認するため、種々の植物について露地栽培を行っています。これまでに、ジャクダン、トウシキミ、シナジンコウ、ニッケイ属（シナニッケイ、セイロンニッケイ）、キナノキ等の露地栽培を試み、それぞれほぼ順調に生育していますが、シナニッケイは場所にもよりますが、生育が困難です。

ニンジン属やトウキ、センキュウなど北方系の植物は、種子島研究部では生存が困難です。種子島研究部における植物種の適応性について、まだ十分に確認を行っておらず、今度さらにいろいろな植物種を導入、検証し、情報提供して行きたいと思っています。

薬用植物資源研究センター種子島研究部におけるソロモン諸島未利用植物資源の探索研究と絶滅危惧種タカクムラサキの保存育成研究
The researcher consortium that carries the future

独立行政法人医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 種子島研究部 杉村 康司

はじめに

薬用植物の成分研究や遺伝子研究を進めるためには、まず材料となる植物自体を確保することが重要です。世界には未研究あるいは未利用の植物が多く残されており、そのような植物の中には、新たな薬用素材となりうる潜在的な価値を持った種が含まれていると考えられます。このような植物資源を見つけ出し導入することは、今後の薬用植物研究を発展させていく上で大きな意味を持つと考えられます。

しかし、近年では自国の植物資源を他国に流出させないように管理し、自国で開発する動きが高まってきています。また、生物多様性条約により、資源利用国に対して生物多様性の保全と構成種の持続的利用、遺伝子資源の公正な利益配分が求められています。そのため、外国から新規の植物を導入することは、とても困難になってきています。

一方、薬用植物の詳細な成分研究を行うためには、分析に必要な十分な量を満たした研究試料を採取する必要があります。また、野生種の採取に多くを依存している薬用植物では、種の絶滅による資源の枯渇が懸念されています。このように、大量の研究試料を必要とする種や絶滅の危機に瀕している種については、まず、自生地における野生種の現状を調査した上で、種を保存し、育苗、増殖する栽培試験研究を行うことが重要であると考えられます。

こうした状況の中、種子島研究部では、2008年からソロモ

ン諸島における有用植物、特に薬用植物に着目した未利用植物資源の探索研究を行っています。さらに、種子島内に自生する絶滅危惧種であるタカクムラサキについては、生育状況を確認するモニタリング調査を実施するとともに資源保存と有効活用を検討するための育成研究を進めています。本稿ではこれらの研究について紹介します。

1. ソロモン諸島未利用植物資源の探索研究

ソロモン諸島は、南太平洋地域の中でも熱帯林が多く分布する場所として知られています。生育が確認されている植物が多いことに加えて、固有植物もたくさんみられます。また、ラン科植物の種類が多いことでも有名です。さらに、南太平洋最大の無人島テテパレ島では、手つかずの熱帯雨林が国際的な保護地区として残されています。このように、ソロモン諸島は、自然が豊かで植物の種多様性が極めて高い地域となっています。しかし、これまで有用植物に重点をおいた本格的な植物資源探索研究が行われていないため、未利用植

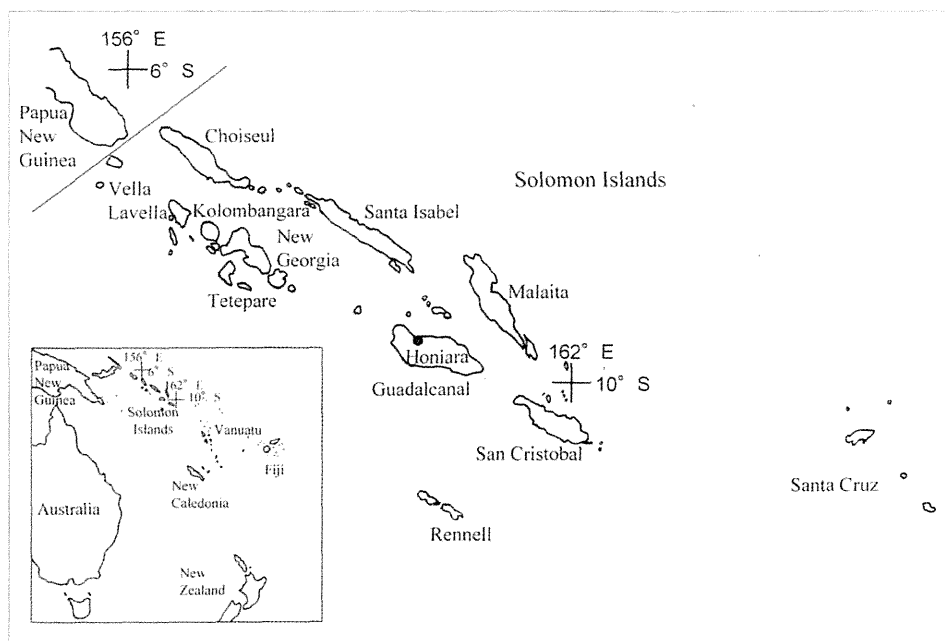


図1 ソロモン諸島の位置と調査地

物資源が豊富に残されていると思われます。本稿では、日本における植物の導入事例が少ないため、ほとんど知られていないソロモン諸島の有用植物について、基礎データを中心にとりまとめた研究成果の一部を紹介します。

1) 調査地の概要

ソロモン諸島は南太平洋のメラネシア地域に属する大小約 1,000 の島々からなる国です。

オーストラリアの北東部から約 1,800km の所に位置します。隣国には、東にツバル、南東にフィジー、南にバヌアツ、西にパプアニューギニア、北にはナウルがあります。面積は 29,785 km²、年平均気温は 26.5℃、最高気温は沿岸域で 32℃、内陸域で 35℃、最低気温は 21℃、年降水量は 2,048mm、雨季が 1～4 月、乾季が 5～12 月となっています。海岸域はココナツのプランテーションになっている所が多く見られますが、内陸域には熱帯低地林が広く分布しています。

2) 調査方法

ソロモン諸島のヴェララヴェラ島、コロバンガラ島、ニュージョージア諸島、サントイザベル島、ガダルカナル島、マライタ島、マキラ島、サントクルーズ諸島、テテパレ島などの島(図 1)において、2008 年から 2011 年にかけて毎年約一ヶ月間の有用植物探索調査を行って、さく葉標本、生植物、種子、ケミカルサンプルを採集しました。さく葉標本は、花や実などがある植物、胞子をつけているシダ植物ならびに有効活用が期待される植物を重点的に作製しました。種の同定に関しては、さく葉標本を基に各種文献を用いて行いました。生植物は、ラン科植物、シダ植物などを重点的に採取し、種子は、完熟したもののみを採取しました。ケミカルサンプルは、基本的にさく葉標本を作製した植物の中から有効活用が期待される植物のみ作製しました。

3) 研究結果

(1) 研究成果の概要

アカネ科、ラン科、クワ科、トウダイグサ科、マメ科などの植物について、さく葉標本を 8,222 点(複製標本を含む)、ケミカルサンプルを 613 点作製しました。加えて、ラン科、アカネ科、ヒカゲノカズラ科、ウラボシ科の生植物 298 点、マメ科、トウダイグサ科、ショウガ科などの種子 72 点を導入し、種子島研究部にて栽培育成研究を継続中です。

(2) テテパレ島における有用植物の分布と生育環境との関係

南太平洋最大の無人島テテパレ島では、274 点の植物標本を採取し、74 科、124 属、175 種の植物を同定しました。有用植物の分布と生育環境との関係では、地形環境別の有用植物の出現種数が



図 2 *Dendrobium gouldii* (ラン科セッコク属)



図 3 *Huperzia phlegmaria* (ヒカゲノカズラ科ナンカクラン属)

川沿い域 15 種<内陸域 78 種<海岸域 111 種と多くなること、有効活用が期待される植物の分布と生育環境との関係では、樹幹着生のセッコク属植物(図 2)とナンカクラン属植物(図 3)が海岸域で最も多く出現することを明らかにしました。

(3) 伝統医が民間薬として使用しているラン科植物とシダ植物

伝統医の聞き取り調査によって、民間薬として解熱剤、強心剤、抗腫瘍薬に使用されているラン科のセッコク属(*Dendrobium*)植物が明らかになりました。さらに、シダ植物では、ケホシダ属(*Thelypteris*)の一種が糖尿病、イノモトソウ属(*Pteris*)の一種が痛風、キクシノブ属(*Humata*)の一種が前立腺肥大、ツルキジノオ属(*Lomariopsis*)の一種が黄熱病の治療に用いてい

ることが明らかになりました。これらの植物については、現在、生薬素材としての品質に関する研究を進めています。研究成果の詳細については、別の機会に譲りたいと思います。

4) 考察

ソロモン諸島の伝統医によって各種疾病の治療薬に使用されている民間薬については、今後も成分分析を行って、新規薬用素材の可能性を検討する研究を進めていくことが重要であると考えられます。さらに、未同定種ならびに既存の文献に未記載の不明種については、ハーバリウムでの標本調査を行うとともに、現地の研究者と協力して、種を正確に同定する必要があります。また、これまでの資源探索研究によって収集してきた世界的に希少なソロモン諸島のさく葉標本、ケミカルサンプル、生植物標本、種子標本などを十分に活用して、研究を継続していくことが重要であると考えています。

なお、本研究は、文部科学省科学研究費補助金基盤研究(A)海外学術研究・課題番号20256003「ソロモン諸島における有用植物、特に薬用植物資源の探索と天然物化学研究(研究代表者:渡邊高志)」の研究費の一部によって実施さ

れました。また、研究成果は「植物研究雑誌 86: 26-35 (2011)」に発表しました。

2. 絶滅危惧種タカクマムラサキの保存育成研究

タカクマムラサキ(*Callicarpa longissima* (Hemsl.) Merr., クマツヅラ科)は中国南部に広く分布しており、民間薬として葉や根を祛風消腫・止血などに利用されています。しかし、日本では絶滅危惧IA類(環境省)に選定されている稀少植物です。国内における分布や生態の詳細は、ほとんど明らかになっておらず、本種の明確な特徴である植物体全体に見られる腺点、粘着性および独特なおいについても諸文献でほとんどふれられていません。本稿では、種子島におけるタカクマムラサキの分布と生態、さらに香気成分の組成特性を明らかにした研究成果を紹介します。

1) 調査方法

(1) 種子島自生地の現地調査

タカクマムラサキの生育個体数、生育地の環境(地形、水分、土壌、日照など)を記録しました。

(2) 香気成分の組成分析

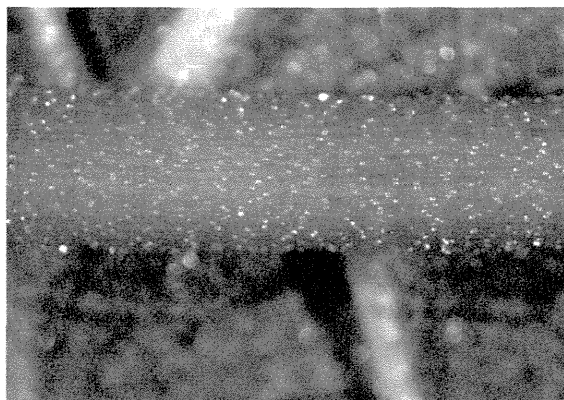
分析試料は、種子島産タカクマムラサキ4枝を使用しました。実験方法は、葉と茎を液体窒素で凍結後、ブレンダーにて粉碎し、試料粉末にエー



a: 花



b: 白く肥大した果実



c: 葉裏主脈上の腺点

図4 タカクマムラサキ *Callicarpa longissima* (Hemsl.) Merr.

テル：ペンタン = 2 : 1 の混合溶液を加え攪拌，超音波振動器に1分間かけ，抽出後ろ過しました。さらに，ろ液を蒸溜装置にかけた後1 mLまで濃縮し，GC / MSによる分析を行いました。分析カラムの温度条件は，50 °C - 220 °C，3°C / minです。

2) 研究結果

(1) 分布と生態

種子島南部の標高50～70mにおいて，樹高2～5m，胸高直径5～15cmの低木12個体を沢沿いで確認しました。これらの生育環境は，空中湿度がやや高く，土壌はやや肥沃で保水・排水が良く，少し開けた明るい場所でした。種子島での花期は7月～9月で紫色のととてもきれいな花を咲かせます(図4a)。果期は9月～2月で，果実の色は白緑色から紫色，さらに成熟果は急速に肥大し白色に変化しました(図4b)。

(2) 香気成分の組成

葉と茎ともに腺点(図4c)が多数あり，揮発成分の主成分はmonoterpene類とsesquiterpene類でした。その他，華やかで清涼感のある香り成分(1,8-cineole, linalool, methyl salicylate)やフルーツ香成分(2-pentanone)などが含まれていました。葉と茎の香気を比較すると，茎の方がほんのり漂う清涼なwoody香が強い傾向が見られました。このように，種子島産タカクマムラサキを特徴づける香り成分には，人間にとって良い香りと感じさせる清涼感がある香りとフルーツ香が含まれていました。

3) 考察

タカクマムラサキの自生地を保全して資源を確保するためには，沢沿いでかつ空中湿度がやや高く，土壌はやや肥沃で保水・排水が良く，少し開けた明るい場所という条件を全て満たした特殊な環境を残していくことが重要であると考えられます。また，種子島産タカクマムラサキに特徴的な清涼感がある香気成分は，今後，芳香剤，化粧品，アロマセラピーなど多方面での利用が期待されます。

なお，研究成果は「植物研究雑誌85：90-98(2010)」に発表しました。

おわりに

近年，海外から有用な植物を新規に導入すること自体が非常に難しくなっています。このような状況の中，ソロモン諸島から様々な可能性をもった植物を我が国に一つでも多く導入し保存することは，植物資源の確保という観点からとても重要なことだと考えられます。今後の研究課題として，これまでに収集してきたソロモン諸島産の貴重な植物資源について，具体的な有効活用法を検討できるように，筑波研究部ならびに北海道研究部と

連携し，遺伝子解析や成分分析を行う研究を進めていく予定です。

一方，絶滅危惧種であるタカクマムラサキという貴重な植物資源を十分に活用していくためには，まず，資源の枯渇を防ぐため，自生地の環境全体を保全し，現在確認されている個体群を維持していくこと，自生個体を用いた増殖試験研究を行っていくことが必要であると思います。さらに，今後の活用については，香り成分の利用にとどまらず，生薬原料としての活用も検討していくことが重要であると考えています。

薬用植物の研究では，高精度測定が可能な最新式の分析機器を用いた遺伝子解析や成分分析などが数多く行われ，脚光を浴びています。これらの研究では，これまで知られていなかった薬用成分や構造などを比較的短期間で発見することも稀ではありません。加えて，研究成果として新規性が高くアピールしやすい面があるため，ますます盛んになってきています。それに対して，薬用植物の栽培試験研究は，気温，降水量，風向・風速，日照など，常に変化していく自然環境の影響を強く受けるため，諸先輩方によって築かれた長年のデータと経験の蓄積が必要とされる研究です。また，このような栽培試験研究は，遺伝子解析，成分分析，新薬開発などの出発点となる研究材料を入手するために必要不可欠な研究です。しかし，近年では最先端の研究ばかりに目が向けられることが多く，それらを支える基盤的研究が軽視される傾向があるように思えます。この傾向は，これからの薬用植物研究の発展に大きな支障をきたす危険性があると思われる。

このような厳しい状況を少しでも変えていけるように，薬用植物資源研究センターの一員として，種子島研究部で今後も熱帯・亜熱帯性の薬用植物ならびに有用植物の資源収集，保存，育成および有効活用法の関する研究に取り組み，薬用植物研究の基盤を支える一助となれるよう努力したいと思っています。合わせて，植物資源の探索ならびに保存の必要性和栽培試験研究の重要性についても広く知ってもらえるよう努めていきたいと考えています。

次号は京都大学大学院薬学研究科の伊藤美千穂先生から寄稿していただく予定です。

Article

Genetic and Phenotypic Analyses of a *Papaver somniferum* T-DNA Insertional Mutant with Altered Alkaloid Composition

Noriaki Kawano ^{1,*}, Fumiya Kiuchi ², Nobuo Kawahara ¹ and Kayo Yoshimatsu ¹

¹ Division of Tsukuba, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, 1-2 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan;

E-Mails: kawahara@nibio.go.jp (N.K.); yoshimat@nibio.go.jp (K.Y.)

² Faculty of Pharmacy, Keio University, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan;

E-Mail: kiuchi-fm@pha.keio.ac.jp

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: nkawano@nibio.go.jp;

Tel.: +81-29-838-0571; Fax: +81-29-838-0575.

Received: 29 November 2011; in revised form: 15 January 2012 / Accepted: 17 January 2012 /

Published: 2 February 2012

Abstract: The *in vitro* shoot culture of a T-DNA insertional mutant of *Papaver somniferum* L. established by the infection of *Agrobacterium rhizogenes* MAFF03-01724 accumulated thebaine instead of morphine as a major opium alkaloid. To develop a non-narcotic opium poppy and to gain insight into its genetic background, we have transplanted this mutant to soil, and analyzed its alkaloid content along with the manner of inheritance of T-DNA insertion loci among its selfed progenies. In the transplanted T₀ primary mutant, the opium (latex) was found to be rich in thebaine (16.3% of dried opium) by HPLC analysis. The analyses on T-DNA insertion loci by inverse PCR, adaptor-ligation PCR, and quantitative real-time PCR revealed that as many as 18 copies of T-DNAs were integrated into a poppy genome in a highly complicated manner. The number of copies of T-DNAs was decreased to seven in the selected T₃ progenies, in which the average thebaine content was 2.4-fold that of the wild type plant. This may indicate that the high thebaine phenotype was increasingly stabilized as the number of T-DNA copies was decreased. In addition, by reverse transcription PCR analysis on selected morphine biosynthetic genes, the expression of codeine 6-*O*-demethylase was clearly shown to be diminished in the T₀ *in vitro* shoot culture, which can be considered as one of the key factors of altered alkaloid composition.

Keywords: *Papaver somniferum* L.; opium alkaloid; *Agrobacterium rhizogenes*; T-DNA insertional mutant

1. Introduction

Many attempts have been made to use breeding or molecular biological methods to modify the ability to produce secondary metabolites in medicinal plants. Among the challenges being addressed, manipulations of the morphine biosynthesis in the opium poppy (*Papaver somniferum* L.), particularly the conversion of narcotic morphine to codeine, which is of high importance as an antitussive and a synthetic source of dihydrocodeine, or to thebaine, which is also an important starting material for the semi-synthesis of the analgesic oxycodone, will contribute to the control of narcotics, and to the supply of useful alkaloids for the production of pharmaceuticals.

The gradual elucidation of enzymology of the alkaloid biosynthesis in *P. somniferum* led to genetical engineering of alkaloid biosynthetic pathway using native genes. The first report was on the introduction of a gene encoding berberine bridge enzyme (BBE) to *P. somniferum* in antisense orientation [1]. To date, several reports on metabolic engineering of *P. somniferum* have appeared, such as RNAi-mediated gene silencing of codeinone reductase (COR) [2], overexpression of COR [3], overexpression and antisense co-suppression of (*S*)-*N*-methylcoclaurine-3'-hydroxylase (CYP80B3) [4], overexpression and RNAi-mediated gene silencing of salutaridinol-7-*O*-acetyltransferase (SalAT) [5], and RNAi-mediated gene silencing of SalAT [6]. Mutant poppy *top1* [7] which accumulates thebaine and oripavine as major alkaloids instead of morphine was also established by the treatment of mutagen (ethyl methanesulphonate) and screening of progeny plants.

The T-DNA insertional mutant clone of *P. somniferum* PsM1-2, which we developed by the infection of the *Agrobacterium rhizogenes* strain MAFF03-01724, regenerated shoots from embryogenic callus that lacked the ability to produce morphine. Codeine was detected as a major alkaloid in this *in vitro* shoot culture [8]. By the improvement of the alkaloid analysis and proceeding studies on this mutant, thebaine (*ca.* 55 µg/g dry weight) and codeine (*ca.* 20 µg/g dry weight) were found to be the major opium alkaloids in the *in vitro* regenerated shoots [9]. The information provided from this mutant, which shows an altered alkaloid composition, might make an important contribution to the further modification of alkaloid production in *P. somniferum*, and therefore we carried out genetic and phenotypic analyses on this mutant.

Recently, long unidentified enzymes involved in the two demethylation steps in the conversion of thebaine to morphine were successfully identified as non-heme dioxygenases [10]. These two enzymes, namely, thebaine 6-*O*-demethylase (T6ODM) and codeine *O*-demethylase (CODM), represent the first known 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases that catalyze *O*-demethylation. The altered alkaloid composition in the PsM1-2 mutant may be due to the genetic mutation in the conversion steps from thebaine to morphine. In the present study, an expression analysis of these two enzymes together with selected genes involved in the morphine biosynthesis was carried out to reveal the molecular mechanism of the mutation.

2. Results and Discussion

2.1. Morphological Characteristics of the PsM1-2 Mutants

The days to flowering, number of petals, appearance of split on the boundary of the petal, and height of the aerial part at the seed-filling stage of soil-cultivated T₀ mutant and selfed progenies are summarized in Table 1. The T₀ primary mutant showed delay of flowering and dwarfness. In addition, a deep split was observed on the boundary of the petal (Figure 1). Delay of flowering was consistently observed in the progenies. The number of petals, which was not altered at the T₀, varied in the T₁, T₂ and T₃ progenies. A deep split at the boundary of the petal was observed in 45% of T₁ plants, 33% to 83% of T₂ plants, and 8.3% and 10% of T₃ plants.

Table 1. Summary of the morphological characteristics of PsM1-2 T₀ mutant, selfed progenies, and WT plant.

Progenies	Lines	Number of Plants	Days to Flowering (Mean ± SD) (days)	Number of Petals: Percentage (%)	Split on Petal Boundary (%)	Plant Height (Aerial Part) (Mean ± SD) (cm)
T ₀	WT	1	47 * ¹	4: 100	0	60.0
	T ₀	1	71 * ¹	4: 100	100	38.0
T ₁	WT	6	53.5 ± 4.8	4: 100	0	42.4 ± 5.8
	T ₁	60	100.6 ± 14.6 #####	3: 1.7, 4: 41.7, 5: 35.0, 6: 16.7, 7: 3.3, 8: 1.7	45.0	52.1 ± 8.5 ##
T ₂	WT	12	53.3 ± 4.0	3: 25.0, 4: 75.0	8.3	36.0 ± 7.6
	#1-27(HT)	15	90.8 ± 12.6 #####	5: 60.0, 6: 33.3, 10: 6.7	60.0	44.7 ± 5.4 ##
	#2-17(HT)	6	79.8 ± 2.5 #####	5: 50.0, 6: 33.3, 8: 16.7	83.3	45.1 ± 3.4 #
	#2-1(LT)	12	83.3 ± 6.8 #####	5: 66.7, 6: 16.7, 7: 8.3, 8: 8.3	33.3	35.6 ± 7.8
	#2-6(LT)	10	76.4 ± 3.6 #####	5: 10.0, 6: 40.0, 7: 30.0, 8: 10.0, 12: 10.0	80.0	39.4 ± 3.1
T ₃	WT	6	109.4 ± 0.9 * ²	4: 100	0	80.3 ± 5.8
	#1-27(HT) L#2	10	129.2 ± 11.9 * ³ , ###	4: 40.0, 5: 50.0, 6: 10.0	10.0	45.8 ± 7.9 #####
	#2-17(HT) #2-1	12	131.1 ± 7.3 * ⁴ , #####	3: 8.3, 4: 75.0, 5: 16.7	8.3	47.0 ± 13.4 #####

*¹: Days after transplanting; *²: n = 5; *³: n = 9; *⁴: n = 11; # p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.005; and ##### p < 0.001 vs. WT.

2.2. Alkaloid Composition in the PsM1-2 Mutants

The soil-cultivated PsM1-2 T₀ primary mutant accumulated 16.3% (% dry weight) of thebaine as a major opium alkaloid in the latex, which was not detected in the WT (Figure 2; Table 2). The

morphine content in the mutant was 1.3%, which was *ca.* one tenth of that in the WT, and the codeine content was 4.2% in the mutant, *vs.* 1.3% in the WT.

Figure 1. Appearances of the PsM1-2 T₀ primary mutant and WT *P. somniferum* soil-cultivated in the phytotron. (A) WT, (B) PsM1-2 T₀. Upper left: flower; right: grown plant; bottom left: petals with deep splits (PsM1-2 T₀ only).

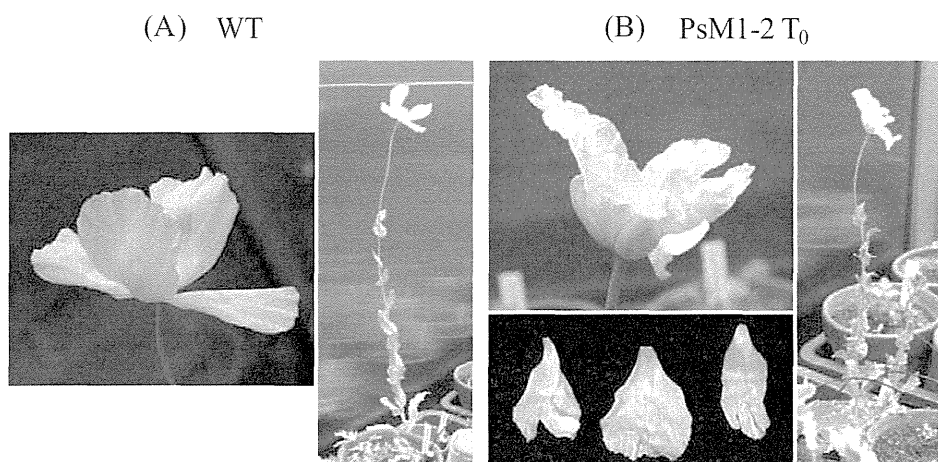
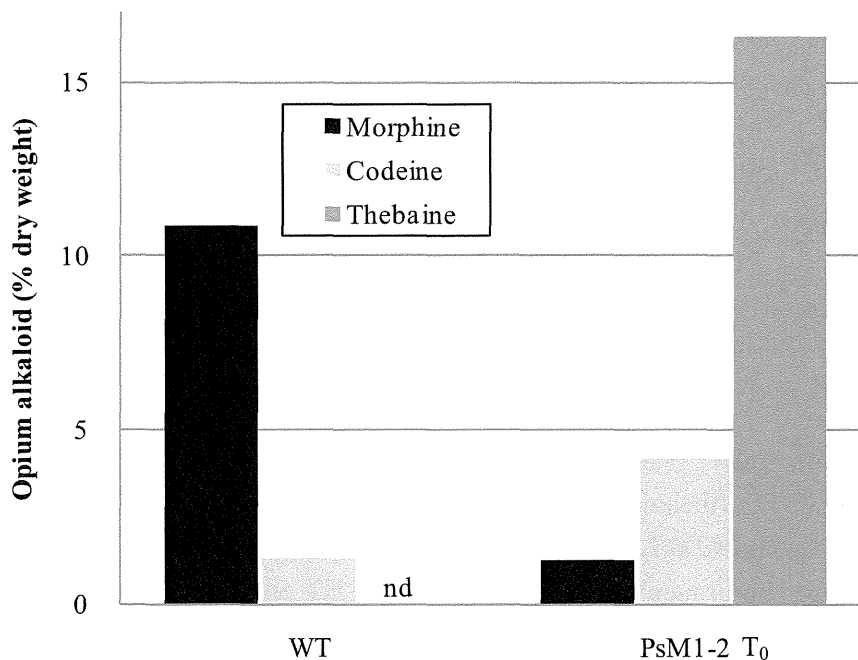


Figure 2. Alkaloid content in the latex from the soil-cultivated WT and PsM1-2 T₀ mutant. nd: Not detected.



The alkaloid compositions in the dried opium of selected progenies are summarized in Table 2, and the morphine and thebaine contents of the T₁, T₂ and T₃ plants are plotted on a scatter diagram (Figure 3). The HPLC chromatograms of the representative lines of the T₁ plants, WT plant, and authentic standards are shown in the Supplementary Figure 1.

Table 2. Opium alkaloid contents in PsM1-2 T₀ mutant and selfed progenies.

Progenies	Lines	Number of plants	Morphine	Codeine	Thebaine	Papaverine	Noscapine
T ₀	WT	1	10.9	1.3	nd *	2.0	9.2
	T ₀	1	1.3	4.2	16.3	2.3	10.2
T ₁	WT	6	11.2 ± 4.0	2.6 ± 2.1	0.3 ± 0.2	2.4 ± 0.7	11.6 ± 4.3
	T ₁	60	6.3 ± 4.6 [#]	3.8 ± 1.5	11.1 ± 6.1 ^{###}	1.6 ± 0.5	7.9 ± 2.1 ^{###}
Selected lines (T ₁)	#1-27(HT)	-	4.3	5.1	23.1	2.3	7.2
	#2-17(HT)	-	5.5	3.7	24.4	1.9	6.8
	#2-1(LT)	-	23.0	1.3	0.3	1.8	8.4
	#2-6(LT)	-	13.6	2.1	1.0	1.5	6.9
T ₂	WT	11	18.4 ± 3.3	1.5 ± 0.9	0.4 ± 0.2	2.7 ± 1.0	18.4 ± 4.3
	#1-27(HT)	15	7.0 ± 4.1 ^{###}	5.8 ± 1.6 ^{####}	19.1 ± 7.3 ^{###}	2.2 ± 0.4	9.6 ± 2.4 ^{###}
	#2-17(HT)	6	9.8 ± 8.1 [#]	6.0 ± 0.5 ^{####}	14.5 ± 6.1 ^{###}	3.0 ± 0.4	9.2 ± 1.7 ^{###}
	#2-1(LT)	12	7.6 ± 3.3 ^{####}	5.8 ± 1.1 ^{####}	15.9 ± 7.2 ^{###}	2.8 ± 0.8	8.0 ± 2.0 ^{###}
	#2-6(LT)	10	7.6 ± 6.8 ^{####}	4.6 ± 1.3 ^{####}	13.4 ± 6.7 ^{###}	2.7 ± 0.5	11.7 ± 2.7 ^{###}
Selected lines (T ₂)	#1-27(HT) L#2	-	4.9	6.1	29.6	2.4	9.4
	#2-17(HT) #2-1	-	3.7	6.5	20.0	3.1	10.4
	#2-1(LT) #2-4	-	5.3	4.3	29.4	3.1	9.1
	#2-6(LT) #2-2	-	3.1	4.9	21.1	2.7	13.2
	T ₃	WT	6	11.1 ± 4.1	1.5 ± 0.5	3.3 ± 2.1	1.9 ± 0.5
#1-27(HT) L#2		10	2.5 ± 0.6 ^{###}	4.3 ± 0.4 ^{####}	7.7 ± 1.9 ^{##}	1.2 ± 0.1 ^{####}	5.1 ± 0.7
#2-17(HT) #2-1		12	1.8 ± 0.5 ^{###}	2.9 ± 0.5 ^{####}	8.1 ± 2.3 ^{###}	1.1 ± 0.2 ^{####}	4.1 ± 0.8

Mean value of the alkaloid content (% dry weight) with standard deviation (mean ± SD) for each line and the alkaloid content of selected lines are summarized. nd *: Not detected; [#] $p < 0.05$; ^{##} $p < 0.005$; and ^{###} $p < 0.001$ vs. WT.

The thebaine content in T₁ plants varied widely, from 0.3% to 26.5%. From these plants, two high thebaine lines, #1-27(HT) (thebaine content: 23.1%) and #2-17(HT) (24.4%), and two low thebaine lines, #2-1(LT) (0.3%) and #2-6(LT) (1.0%), were selected and subjected to analysis of the T₂ progeny. Interestingly, most of the progeny plants from both the HT and LT lines showed the high thebaine phenotype. From the T₂ lines, two lines, #1-27(HT)L#2 (thebaine content: 29.6%) and #2-17(HT)#2-1 (20.0%), were selected for the analysis of T₃ progeny.

The thebaine content in T₃ plants ranged from 4.2% to 10.0% in #1-27(HT)L#2 and from 3.7% to 10.9% in #2-17(HT)#2-1. The average thebaine content in T₃ plants (two lines combined) was 2.4-fold of that in the WT; in contrast, the average morphine content decreased to *ca.* one fifth of that in the WT (Figure 4).

Figure 3. Alkaloid content in the latex from the soil-cultivated WT and PsM1-2 T₀ mutant. nd: Not detected. Scatter diagram of the morphine (x-axis) and thebaine (y-axis) contents in (A) PsM1-2 T₁ plants (n = 60) and WT plants (n = 6), (B) four lines of PsM1-2 T₂ plants and WT plants, and (C) two lines of PsM1-2 T₃ plants and WT plants.

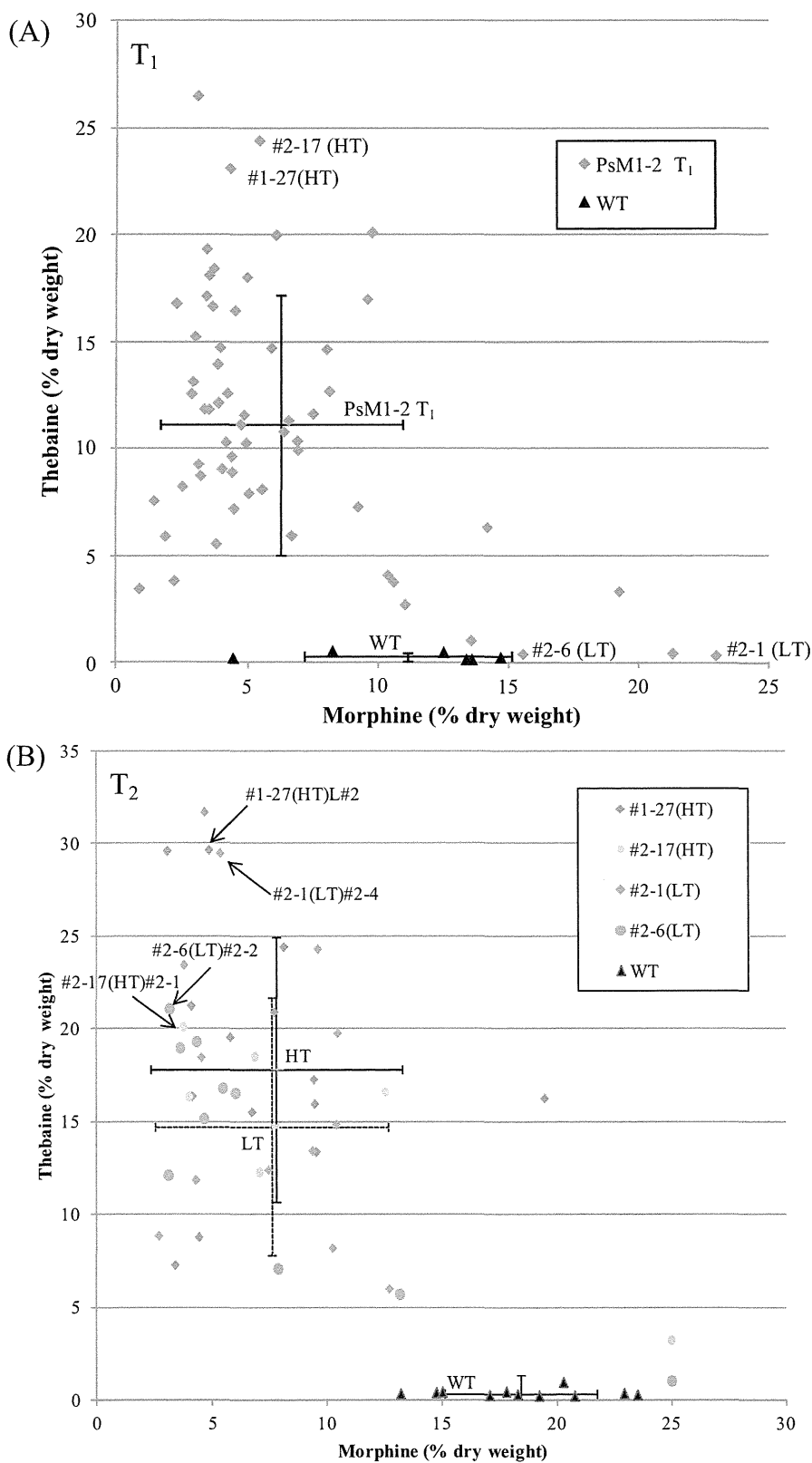
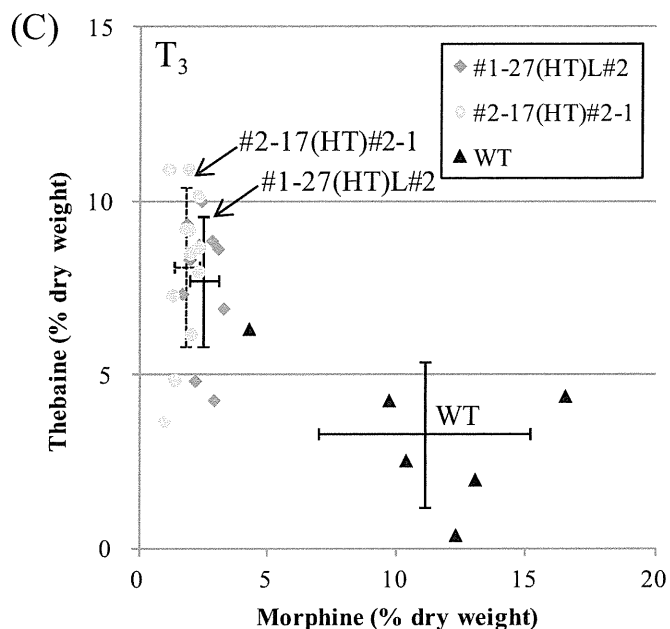
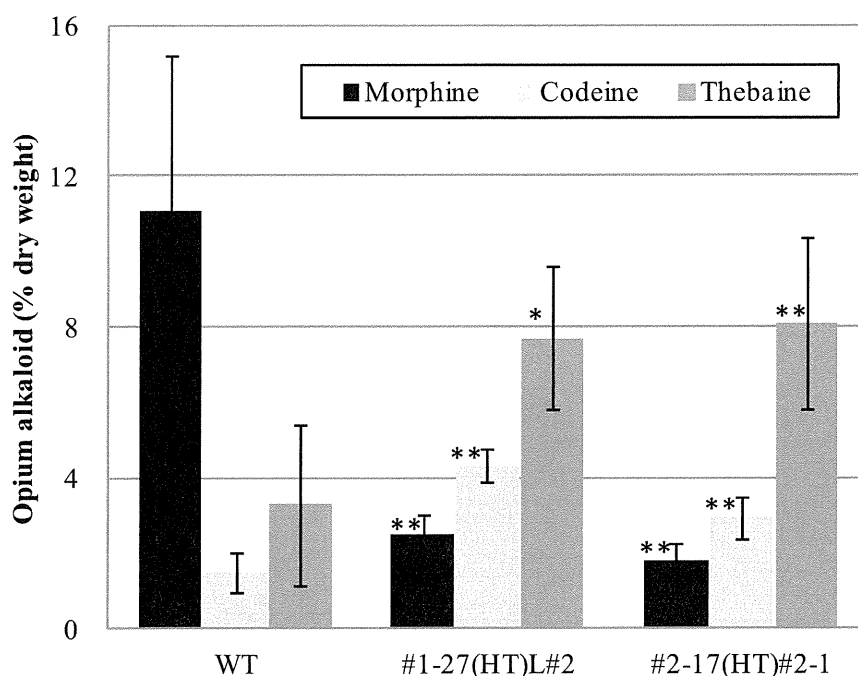


Figure 3. Cont.



Crossed bars indicate the mean value (crossed point) and standard deviations for morphine (horizontal bar) and thebaine (vertical bar) contents in (A) PsM1-2 T₁ plants and WT plants, (B) HT (#1-27 and #2-17 were combined) and LT (#2-1 and #2-6 were combined, dotted) lines, and (C) WT, #1-27(HT)L#2, and #2-17(HT)#2-1 (dotted) plant lines. (A) Lines #1-27(high thebaine, HT), #2-17(HT), #2-1(low thebaine, LT), and #2-6(LT) were used for analyses on T₂ progeny. (B) Lines #1-27(HT)L#2 and #2-17(HT)#2-1 were used for analyses on T₃ progeny.

Figure 4. Morphine, codeine, and thebaine contents in T₃ progeny. Mean value of six (WT), 10 [#1-27(HT)L#2], and 12 [#2-17(HT)#2-1] plants. Bars indicate standard deviation. * $p < 0.005$ and ** $p < 0.001$ vs. WT.



2.3. T-DNA Insertion Loci Analysis by IPCR and AL-PCR

The genomic DNA regions adjacent to the inserted T-DNA borders were analyzed by the IPCR and AL-PCR methods. The obtained DNA fragments are summarized in Supplementary Table 1 and Figure 5 along with the PCR methods, the combination of template circular or adaptor-ligated genome DNA libraries, and the primer sets. Sequence analysis of the amplified products revealed that the fragments were classified into three types, (A) T-DNAs connected with *P. somniferum* genome DNA, (B) T-DNAs connected in tandem, and (C) T-DNAs connected with T-DNA internal fragments, as shown in Figure 5.

Type (A) includes four types of genome DNA fragments adjacent to T-DNA LB, and six types of genome DNA fragments adjacent to T-DNA RB. Of these fragments, LB1g and RB2g, LB3g and RB6g were confirmed to be both ends of single genomic loci, by PCR over the LB and RB genomic regions. Although the tally of paired border for other fragments were not found, at least eight independent T-DNA integrated sites, namely RB1, RB2 (LB1-RB2), RB3, RB4, RB5, LB2, LB3 (LB3-RB6), and LB4 were estimated to exist in the T₀ plant.

A DNA fragment homologous (59% identity at the amino acid level) to the WRKY4 transcription factor (DDBJ/EMBL/GenBank accession no. AF425835) from *A. thaliana* was found in the LB1g region, at 695–952 bp 5' upstream of the junction. The DNA sequence of LB1g, which included a WRKY-like gene, was deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank under accession No. AB574419.

No other gene with significant homology was found by the BLAST search tool in the genomic DNA regions adjacent to the inserted T-DNA.

Figure 5. Schematic diagram of amplified fragments obtained in the analyses of T-DNA insertion loci in T₀. (A) T-DNAs connected with *P.somniferum* genome (10 types, eight sites), (B) T-DNAs connected in tandem (six types), (C) T-DNAs connected with orf13 fragments (four types).

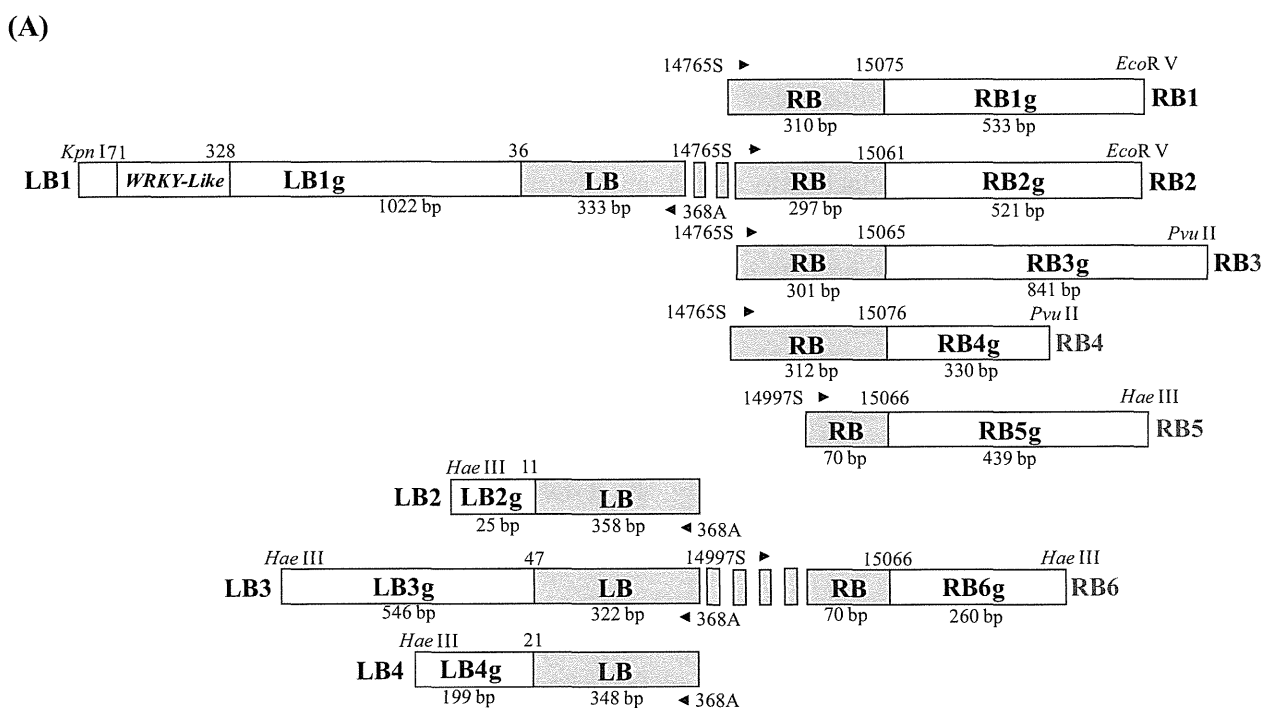
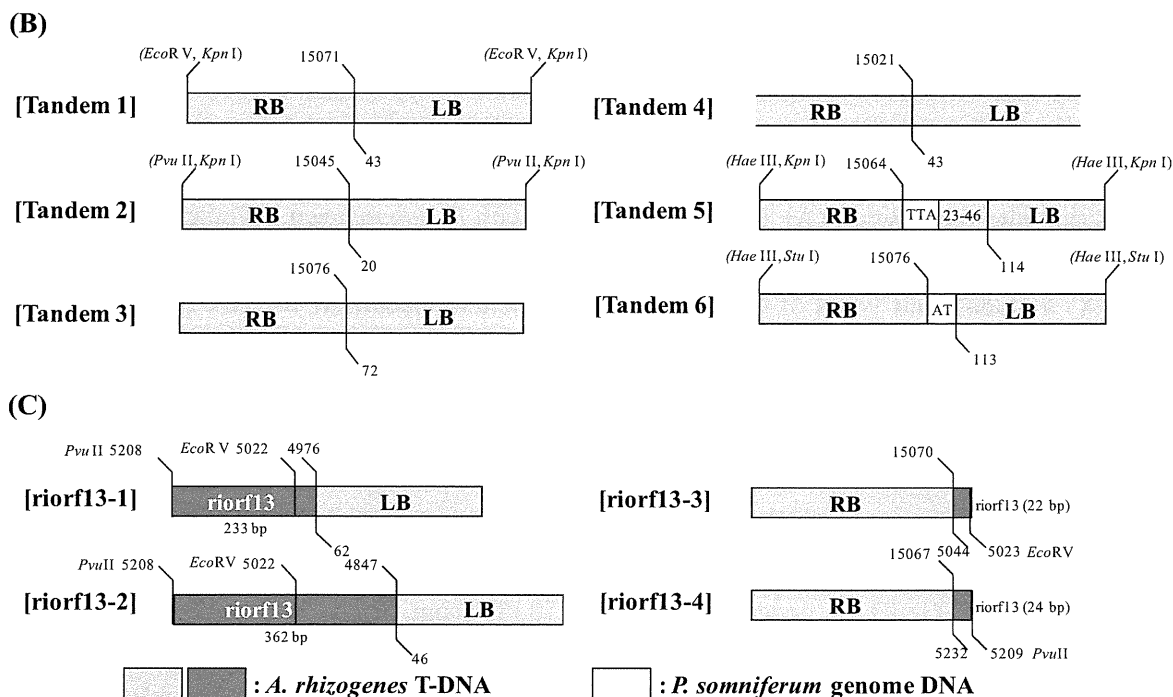


Figure 5. Cont.



Numbers correspond to the nucleotide positions in the T-DNA. Names of restriction enzymes used for the library construction and primers used for PCR are also shown. Fragment names with “g” indicate the fragments derived from the *P. somniferum* genome DNA. LB and RB correspond to the left and right border of T-DNA, respectively. Fragment “TTA” and “23–46” found in: “Tandem 5” were three nucleotide TTA and the complementary 24 bp sequence of the T-DNA left border (nucleotide number 23 to 46). Fragment “AT” found in “Tandem 6” was two bp nucleotides. “Riorf13” is the partial T-DNA fragment annotated as riorf13.

Type (B) includes six types of DNA fragments. RB and LB were connected in a tail-to-head manner at different junctions, or short DNA fragments were sandwiched. The fragment “Tandem 3” was found only in the genome direct amplification of T-DNA borders.

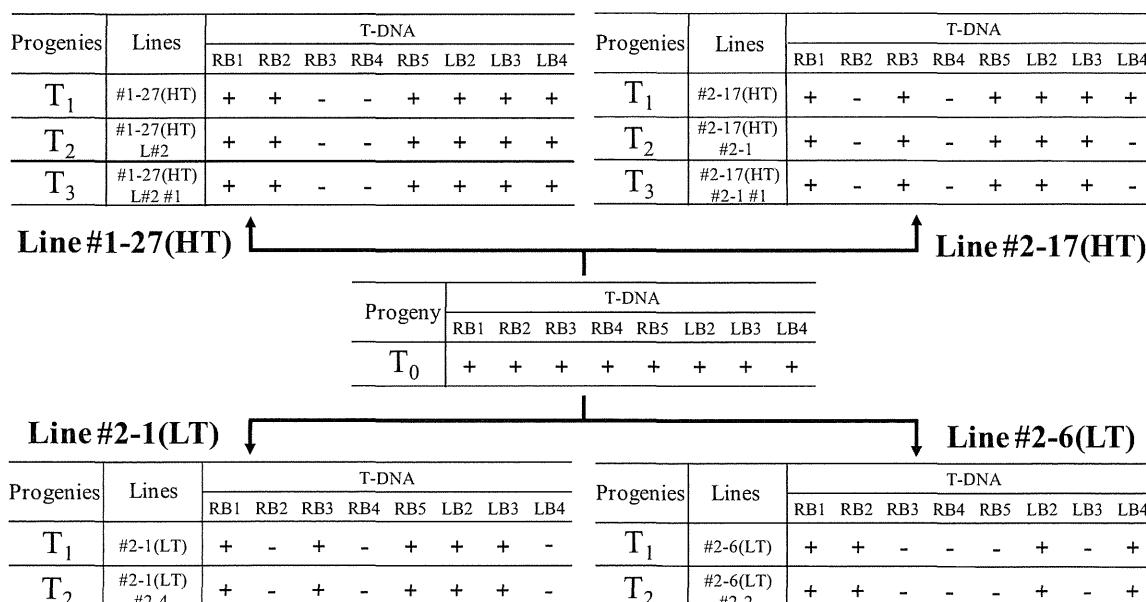
Type (C) consists of four DNA fragments. Two of the fragments were made up of short partial fragments of T-DNA riorf13 attached to an LB, and the other two were made up of RB attached to a fragment of T-DNA riorf13. In summary, T-DNA border fragments found were at eight independent sites of T-DNA integration, six borders of T-DNAs connected in tandem, and four borders connected with T-DNA internal fragments.

As for the copy numbers, types (A) and (B) corresponded to eight and six copies of T-DNAs, respectively. In the case of type (C), LB and RB connected with riorf13 were possibly borders of independent T-DNAs or borders of the same T-DNA. Therefore, the copy number can be estimated as two at minimum to four at maximum. Finally, the T-DNA copy number in the PSM1-2 T₀ primary mutant could be estimated as 16 to 18.

2.4. Analysis of the Heredity Manner of T-DNA Inserted Loci

The PCR analysis over T-DNA border and the adjacent genomic DNA found in the IPCR and AL-PCR analyses revealed that several T-DNA inserted loci were eliminated by selfing (Figure 6).

Figure 6. Inheritance of the eight independent T-DNA insertion loci (RB1, RB2, RB3, RB4, RB5, LB2, LB3, and LB4) in the representative four lines of selfed progenies. (+: Insertion locus detected; -: insertion locus not detected.)



In the high thebaine line #1-27(HT), of the eight loci that were suggested to be independent T-DNA integration sites, RB3 and RB4 were eliminated in T₁ progeny; in addition, in the high thebaine line #2-17(HT), RB2, RB4 were eliminated in T₁ progeny and the additional elimination of LB4 was observed in T₂ progeny. On the other hand, with respect to the LT lines that showed low thebaine content at T₁ progeny, sites RB2, RB4, and LB4 were eliminated in #2-1(LT), and sites RB3, RB4, RB5, and LB3 were eliminated in #2-6(LT).

Notably thebaine content in these LT lines increased again in the T₂ progeny to 29.4% in #2-1(LT)#2-4 and to 21.1% in #2-6(LT)#2-2 (Table 2) without a change in the T-DNA insertion pattern (Figure 6). These results imply that none of the eight T-DNA integrated loci were indispensable for the high thebaine phenotype.

2.5. T-DNA Copy Number Analysis by Real-Time PCR

Standard curves for the quantification of the T-DNA copy number in T₀ and selected progenies were prepared for each target region, LB1g, LB1j and orf2. The formulae and correlation coefficients were as follows: LB1g: $y = -1.39\ln(x) + 23.82$ ($r^2 = 0.991$); LB1j: $y = -1.44\ln(x) + 23.38$ ($r^2 = 0.994$); and orf2: $y = -1.43\ln(x) + 23.75$ ($r^2 = 0.997$). The relative abundances of each region in the samples were calculated by these formulae from the value of Delta Rn. The relative abundances in whole numbers, when the abundance of LB1g was set as 2, were LB1g:LB1j:orf2 = 2:1:15 in T₀. And for T₁[#1-27(HT)] and its progenies, the abundances were as follows (in the order of LB1g:LB1j:orf2): T₁[#1-27(HT)], 2:2:6; T₂[#1-27(HT)L#2], 2:2:7; and T₃[#1-27(HT)L#2#1], 2:2:7. And for T₁[#2-17(HT)] and its progenies, the values were as follows: T₁[#2-17(HT)], 2:nd:10; T₂[#2-17(HT)#2-1], 2:nt:10; and T₃[#2-17(HT)#2-1#1], 2:nt:7 (nd: not detected; nt: not tested). These results are summarized in Figure 7.

Figure 7. Shift of the relative abundance of target regions LB1g, LB1j, and orf2 of T-DNA insertion locus LB1-RB2 analyzed for two selfed lines, #1-27(HT) and #2-17(HT) by quantitative real-time PCR.

Line #1-27(HT)				Line #2-17(HT)			
Progeny	LB1g genome	LB1j border	orf2 T-DNA	Progeny	LB1g genome	LB1j border	orf2 T-DNA
T ₀	2	1	15	T ₀	2	1	15
T ₁	2	2	6	T ₁	2	nd	10
T ₂	2	2	7	T ₂	2	nt	10
T ₃	2	2	7	T ₃	2	nt	7

The numbers in the column of orf2 represent the estimated copy number of T-DNA. (nd: Not detected; nt: not tested.) “Homo” indicates that the LB1-RB2 locus became homozygous at the T₁ progeny in #1-27(HT) and “eliminated” indicates that the LB1-RB2 locus was eliminated at the T₁ progeny in #2-17(HT).

For the abundance of LBj and orf2 in the #1-27(HT) series, the LB1-RB2 T-DNA insertion locus was estimated to become homozygous at the T₁ progeny, as indicated by the doubled abundance of LB1j in T₁. And the T-DNA copy number, estimated by the abundance of the orf2 region, was drastically decreased from 15 to six in T₁, then increased to seven in T₂ and kept at seven in T₃. These data imply that more than half of the total T-DNA copies were eliminated in the first selfing. For the #2-17 series, the LB1j region was not detected in T₁, which was consistent with the elimination of the LB1-RB2 T-DNA insertion loci in T₁ revealed by the T-DNA insertion loci analysis (Figure 6). The abundance of orf2 was decreased from 15 to 10 in T₁, and then decreased again from 10 to seven in T₃, which implies that more than half of the T-DNA copies in the #2-17(HT) series were also eliminated by repeated selfing.

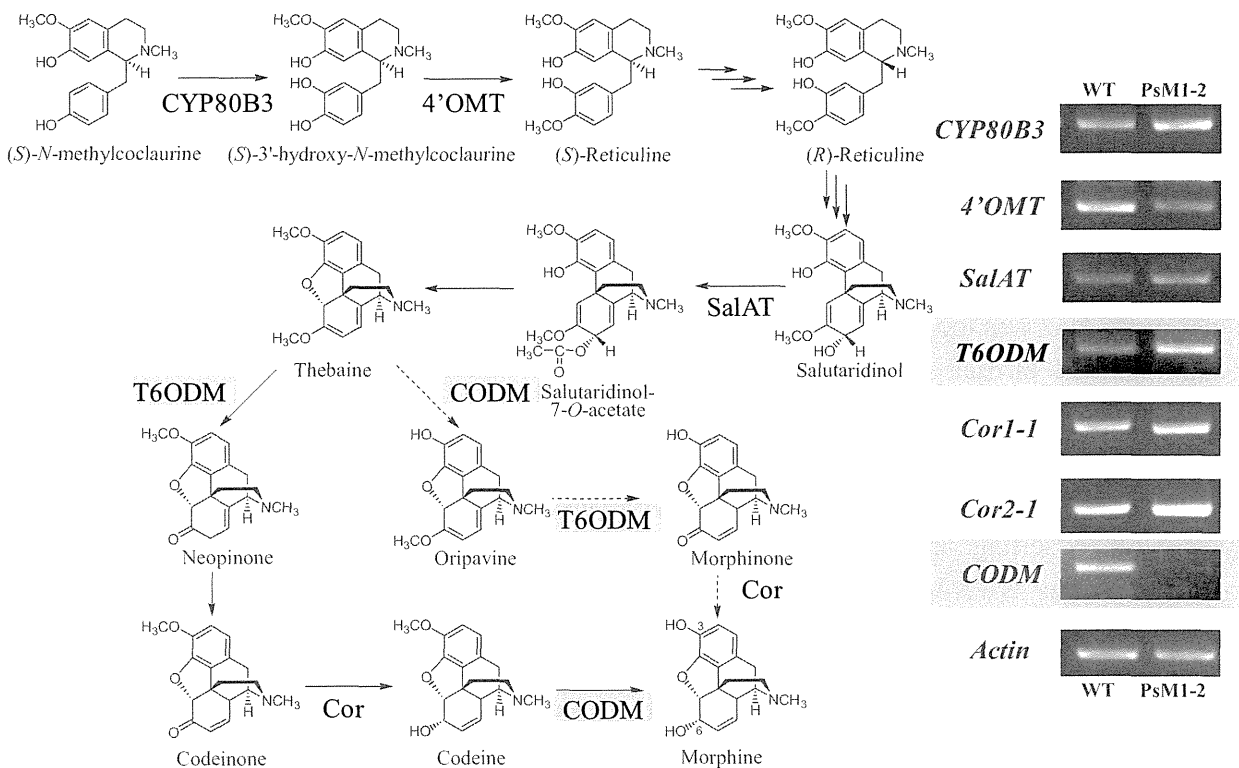
2.6. Expression Analyses on Morphine Biosynthetic Genes by RT-PCR

Firstly we tried to apply realtime-PCR for the expression analysis of morphine biosynthetic genes including *T6ODM*, *CODM* using the primer sequence reported by Hagel and Facchini [10]. However, prior to run the realtime-PCR, we found that PCR with these primers using our cDNA as a template gave multiple products. Although we have designed several primers, they could not make the PCR product as a single band. It may be attributed to the relatively high sequence homology of coding region among *T6ODM*, *CODM*, and *DIOX2*. Therefore we hired the semi-quantitative RT-PCR method for the expression analysis. To distinguish RT-PCR products between *T6ODM* and *CODM*, primers were designed to give different product size, *i.e.*, 549 bp for *T6ODM* and 411 bp for *CODM*.

Expression analysis on selected morphine biosynthetic genes downstream of (*S*)-*N*-methylcochlorine revealed that the expression of *CODM* was completely diminished in PsM1-2 (Figure 8). On the other hand, the expression of *T6ODM* seemed to be slightly up-regulated in the PsM1-2 compared with the WT plant. Specific amplification of these two genes was confirmed by the comparison of the size of the bands and their calculated amplicon size. In PsM1-2, the expression levels of *CYP80B3* and *SalAT*

seem to be slightly higher than WT, whereas 4'OMT seems to be down-regulated. No significant difference in the expression level of genes was observed between PsM1-2 and WT for *Cor1-1* or *Cor2-1*.

Figure 8. The morphine biosynthetic pathway downstream of (*S*)-*N*-methylcoclaurine with the results of expression analysis of selected morphine biosynthetic genes, *CYP80B3*, 4'OMT, *SalAT*, *T6ODM*, *COR* (alleles *Cor1-1* and *Cor2-1*), and *CODM* by RT-PCR. Actin was used as an experimental control. Presumably, the pathway via oripavine (dotted pathway) does not exist in the *P. somniferum* Japanese cultivar “Ikkanshu” which we have used in this study [11,12].



2.7. Discussion

Morphological abnormalities, such as varied numbers of petals and splits on the boundary of petals, were frequently observed in the selfed progenies in the present study. However, no clear correlation was found between these morphological abnormalities and altered alkaloid compositions. Therefore, these findings were thought to be independent of the mutation in the secondary metabolism.

At the T₂ generation, difference between high thebaine line and low thebaine line which was obvious at T₁ generation, has disappeared. If the high thebaine phenotype is caused by the single mutation of the locus by T-DNA insertion, low thebaine phenotype should be dominant in the progeny plants. However, as observed in Figure 3, most of the progeny plants of low thebaine T₁ lines have gained high thebaine phenotype again, which indicates that the multiple loci are responsible for the high thebaine phenotype. For the reason of this phenomenon, it is also possible that, methylation or suppression has occurred in unstable manner on the alkaloid biosynthesis related genes caused by the multiple T-DNA insertion events.

The content of thebaine, which was the major alkaloid in the latex of the mature plants of the mutants, varied widely in the T₁ progeny. But by repeated selfing, in the T₃ progeny, although the maximum content of thebaine (10.9%) was not particularly high, the range of thebaine content was much narrower than that in the T₁ and T₂ progenies. When the value of CV (coefficient of variation: standard deviation/average value) for the thebaine content was compared among T₁, T₂, and T₃ progenies, it was 0.54 in T₁, 0.40 in T₂ (two HT lines combined), and 0.26 in T₃ (two lines combined). And the CV for the morphine content was 0.74 in T₁, 0.70 in T₂ (two HT lines combined), and 0.28 in T₃ (two lines combined). These lines of evidence indicate that the high thebaine (2.4-fold and 2.5-fold of WT in T₃ #1-27(HT)L#2 and #2-17(HT)#2-1, respectively) and low morphine (0.2-fold of WT in both T₃ #1-27(HT)L#2 and #2-17(HT)#2-1, respectively) phenotypes were stabilized by repeated selfing.

Analyses of the T-DNA integration sites and T-DNA copy number on the primary T₀ mutant revealed that at least eight integration sites exist and as many as 18 copies of T-DNAs were estimated to be integrated into the genomic DNA in a highly complicated manner. Considering the complexity of the T-DNA integration, the IPCR, AL-PCR, and real-time PCR methods employed in this study can be considered as the most suitable methods for T-DNA insertional analysis, and more suitable than Southern blotting, whose signals may be beyond interpretation in this context. The number of T-DNA copies in PsM1-2 was too large for the transgenes integrated by genetical transformation. The presence of high numbers of transgenic insertions can lead to poor expression of transgenes through silencing. In this study, we tried to simplify the T-DNA integration structure and stabilize the high thebaine phenotype, and then to gain insight into the genetic factors for the altered alkaloid composition by obtaining selfed progenies. The T-DNA integration sites in PsM1-2 were paired to be homozygous or dropped off by selfing, and finally became half of the T₀ in the selected T₃ progenies. Although it is possible that other T-DNA copies were not detected, no correlation was found between any of the T-DNA integration sites and the altered alkaloid composition, by considering these data together, a reduction in the T-DNA copy number seems to have resulted in the stabilization of the high thebaine phenotype. Although it is hard to confirm, there is also a possibility that genome reorganization independent of T-DNA insertion has occurred during shoot regeneration or long term maintenance of *in vitro* culture. As we have accomplished the stabilization of high thebaine phenotype by selfing up to T₃ generation, backcross experiment utilizing these selfed progeny plants is in progress.

In this study, the only gene homologous to the known gene found at the T-DNA integration loci was the *AtWRKY4* gene homologue found in the 5' upstream region of LB1g. As some type of WRKY transcription factor may function as a transcriptional regulator of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica* Makino [13], the contribution of this locus to the altered alkaloid composition in the mutant was suspected. However, analysis of the T-DNA heredity manner indicated that the T-DNA insertion at LB1-RB2 region was not essential for the high thebaine phenotype.

The expression analyses on selected morphine biosynthetic genes, including two novel demethylases, *T6ODM* and *CODM*, between the *in vitro* shoot culture of the PsM1-2 mutant and seedlings of the WT plant revealed that the expression of *CODM* was fully suppressed in the mutant. Although the correlation between the transcript level of biosynthetic genes in young organs, such as seedling or *in vitro* shoot culture, and the alkaloid composition in the latex of mature plant needs to be clarified, the observed differences between the wild type plant and the mutant can be correlated to the alkaloid