



Title	トチュウポリイソプレン生産に資するポリイソプレン定量法の開発
Author(s)	武野, 真也
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1147
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

トチュウポリイソプレン生産に資する
ポリイソプレン定量法の開発

工学研究科生命先端工学専攻

小林研究室（細胞工学領域）

武野 真也

目次

第1章	緒論	1
第2章	トチュウ葉からのポリイソプレン抽出および絶対定量法	6
2-1	緒言	6
2-2	実験方法	7
2-2-1	試薬	7
2-2-2	植物材料	8
2-2-3	トチュウ葉からのポリイソプレン抽出法	8
2-2-4	トチュウ葉からのポリイソプレン簡便抽出	9
2-2-5	サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)	9
2-2-6	フーリエ変換赤外分光分析法 (FT-IR)	9
2-3	結果と考察	10
2-3-1	ソックスレー抽出法	10
2-3-2	2-ml 抽出法	11
2-3-3	トチュウポリイソプレンのフーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR)	12
2-3-4	正確さと精度	13
2-3-5	トチュウポリイソプレン量の季節変動	15

第3章	熱分解ガスクロマトグラフィー/質量分析によるトチュウポリイソプレン迅速相対定量法	18
3-1	緒言	18
3-2	実験方法	19
3-2-1	植物材料	19
3-2-2	試薬	20
3-2-3	熱分解ガスクロマトグラフィー/質量分析 (PyGC/MS 分析)	20
3-3	結果と考察	21
3-3-1	抽出・精製ポリイソプレンの PyGC/MS 分析による定量法	21
3-3-2	ポリイソプレン生産, 非生産植物の葉の熱分解物	25
3-3-3	ポリプレノール, ポリイソプレン熱分解物の測定	28
3-3-4	キノン, カロテノイド, クロロフィルの熱分解物の測定	28
3-3-5	PyGC/MS 直接分析によるポリイソプレン定量の検討	32
第4章	近赤外分光分析によるトチュウポリイソプレン簡易定量法	36
4-1	緒言	36
4-2	実験方法	37
4-2-1	植物材料	37
4-2-2	トチュウ葉中ポリイソプレン絶対量の測定	37
4-2-3	ポリイソプレンを含まない試料の調製	37
4-2-4	フーリエ変換近赤外分光分析 (FT-NIR)	38
4-2-5	PLS 回帰分析	38
4-3	結果と考察	38
4-3-1	トチュウ葉のフーリエ変換近赤外分光 (FT-NIR) スペクトル	38
4-3-2	ポリイソプレンを含まない試料の FT-NIR 分析	39

4-3-3 PLS 回帰直線	41
第 5 章 総括と展望	45
謝辞	48
引用文献	49
発表論文	55

第1章 緒論

ポリイソプレン (polyisoprene) は、イソプレンユニット(C_5H_8)を基本単位とするジエン系ポリマーである。ポリイソプレンは立体構造からシス型ポリイソプレンとトランス型ポリイソプレンに分類できる (Fig. 1-1)。それぞれ特有の物性があり、シス型ポリイソプレンは、耐摩耗性、反発弾性、熱分散効果などを有している。一方、トランス型ポリイソプレンは、熱可塑性、耐薬品性、絶縁性などの物性を有している。さまざまな植物がシス型、トランス型ポリイソプレンを生産することが知られている (Mooibroek and Cornish, 2000; Warneke *et al.*, 2007)。

シス型の天然ポリイソプレンは2000種以上の植物で生合成されていることが知られている。産業的には、*Hevea brasiliensis* (パラゴムノキ, Fig. 1-2A ; Hosler *et al.*, 1999) や *Parthenium argentatum* (グアユレー ; Mooibroek and Cornish, 2000) によって産生されるポリイソプレンが利用されている。また、天然ポリイソプレン生産植物のモデルとして *Ficus erecta* (イヌビワ, Fig. 1-2B ; Cornish and Siler, 1996 ; Espy *et al.*, 2006) や *Lactuca sp.* (レタス ; Bushman *et al.*, 2006) が活用され、生化学的にそのポリイソプレン生合成機構が研究されている。シス型天然ポリイソプレンはタイヤやグローブなど、40000種類以上の製品に使われている産業的に極めて重要なポリマーの一つである (Mooibroek and Cornish, 2000)。

トランス型の天然ポリイソプレンを生産する植物は少なく (Buchanan *et al.*, 1979), 東南アジア原産の *Palaquium gutta* (グッタペルカノキ), *Mimusops balata* (バラタゴムノキ ; Schlesinger and Leeper, 1951), 東アジア原産の *Eucommia ulmoides* (トチュウ, Fig. 1-2C ; Tangpakdee *et al.*, 1997), アメリカ原産の木である *Garrya flavescens*, *Garrya wrightii* (Roth *et al.*, 1985) などがトランス型ポリイ

ソブレンを産生する植物として知られている。用途としては、海底ケーブルやコンベヤーベルト、ゴルフボール、装飾品、チューイングガム、歯の充填剤などに使われてきた (Warneke *et al.*, 2007)。

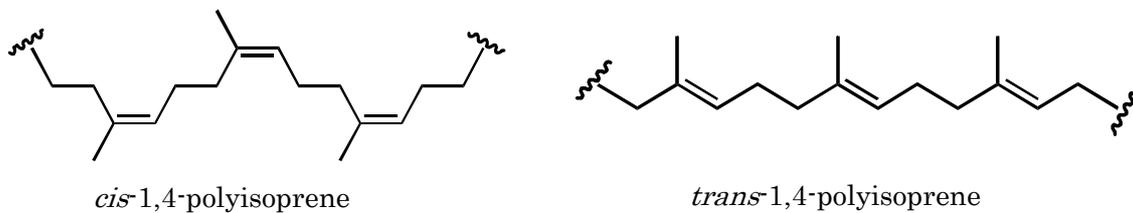


Fig. 1-1 天然ポリイソプレンの構造

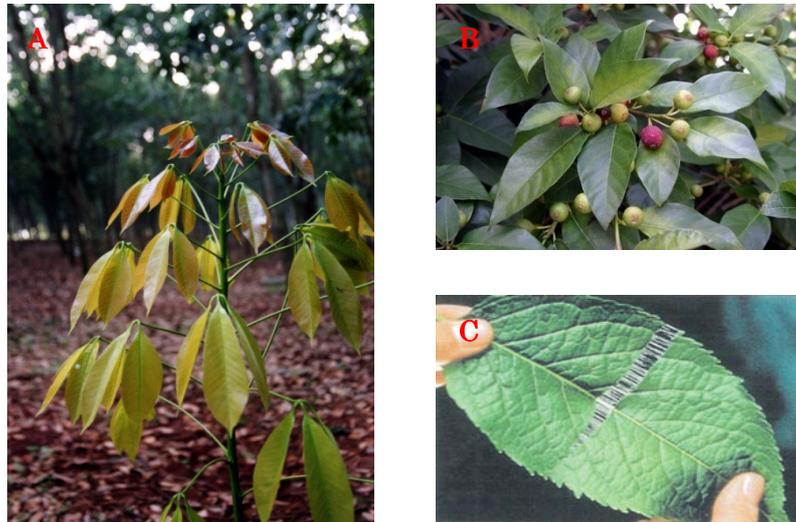


Fig. 1-2 ポリイソブレン生産植物

A : *Hevea brasiliensis* (パラゴムノキ), B : *Ficus erecta* (イヌビワ),
C : *Eucommia ulmoides* (トチュウ)

トチュウ (*Eucommia ulmoides* Oliver) は中国四川省を起源とする落葉性の喬木であり、古くからその樹皮は滋養強壮および高血圧症の民間治療薬として用いられ、薬用植物として栽培されてきた。トチュウに含まれるトランス型ポリイソブレン (トチュウポリイソブレン) は葉や樹皮、根などに分布しており、繊維状物質として細胞間隙に存在することが明らかにされている (Bamba *et al.*, 2002)。トチュウは温帯地域でも生育が可能であり、ポリイソブレンを豊富に含

むなどの理由から、近年、トチュウポリイソプレンが新たな生物由来高分子素材として注目されており、大阪大学の小林らは、トチュウ由来ポリイソプレンの産業的利用を目指して研究を進めている（小林, 2001）。

トチュウポリイソプレンを産業的に利用するためには、そのポリイソプレン生産能力の優れた品種の選定ならびに品種改良、更にそのポリイソプレン生産量を最大限に増大させるための栽培条件の検討が必要である。これらの検討を行うためには、多数の樹から植物組織を回収し、それら組織から迅速、簡便にポリイソプレン量を測定するスクリーニング法が必要である。

また、近年、トチュウポリイソプレンの増産、品質向上を目指して、ポリイソプレン生合成機構の解析や、その知見をもとにした形質転換体の作出が試みられている（西河, 2003, 2005）。これらの研究開発を行う上で、形質転換体のポリイソプレン含量を測定することは必須である。しかし、パラゴムノキやイヌビワなどを用いたポリイソプレン生合成遺伝子解析から、ポリイソプレン生合成経路に直接あるいは間接的に関わる遺伝子は多いことが知られている（van Beilen and Poirier, 2007）。そのため、トチュウのポリイソプレン生合成に関わる遺伝子を特定するためにはポリイソプレン含量を指標として、多種の形質転換体をスクリーニングする必要がある。しかし、トチュウは成長速度が極めて遅く、試料を大量に得ることが難しいため、ポリイソプレン含量測定に供する形質転換体試料量は最小限に抑えることが望ましい。これらのことから、形質転換体のスクリーニングには、少量の試料から迅速にポリイソプレン含量を測定する分析法が求められている。

これまでに、様々なポリイソプレン生産植物中のポリイソプレン定量法が報告されているが、トチュウのようにラテックスを生産しないポリイソプレン生産植物では、溶媒等でポリイソプレンを抽出・精製し、NMR で定量する方法

(Hayman *et al.*, 1994), または秤量する方法 (Peng *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008) が主流であった。これらの方法は抽出・精製法が煩雑で長時間を要し、ポリイソプレンの検出感度が低く必要試料量が多いなどの問題点があり、優良品種・栽培条件の選定、形質転換体の評価のためのポリイソブレン量スクリーニング法として使用することは困難である。そこで、本論文では、少量のトチュウ葉中のポリイソブレン量を迅速かつ簡便にスクリーニングする方法 (第 3 章)、ならびに少ない試料から迅速にポリイソブレン量をスクリーニングする方法 (第 4 章)、さらにこれらのスクリーニング法により選抜された試料からポリイソブレン絶対量を測定する方法 (第 2 章) を確立することを目的とした。

第 2 章では、これまでトチュウ葉からポリイソブレンを抽出・精製する方法として用いられてきたソックスレー抽出法に代わる方法として、少量のトチュウ葉からポリイソブレンを再現性よく精製、抽出する方法を確立した。また、精製したポリイソブレンをフーリエ変換近赤外分光 (FT-IR) 分析に供することで、従来、用いられてきたポリイソブレン定量法 (ソックスレー抽出法/秤量法) よりも迅速で高感度な定量分析法を開発した。本定量分析法を開発したことで、第 3 章、第 4 章で述べるスクリーニングにより選抜された試料のポリイソブレン量の絶対的評価法を確立した。

第 3 章では、微量の試料からポリイソブレンを迅速に定量する方法として、ポリマーを低分子化し、ガスクロマトグラフィーに供する熱分解ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (PyGC/MS) に着目した。抽出・精製したポリイソブレンを定量することによって、第 2 章で確立した赤外分光法による定量法と比較したところ、赤外分光法よりも正確さ、ならびに精度とも優れていることが明らかとなった。さらに、煩雑なサンプル調製を行わず、葉を直接 PyGC/MS 分析に供することで、葉中のポリイソブレン含量を相対的に定量できることを明ら

かにし、本分析法がポリイソプレレン量のスクリーニング法として有用であることがわかった。

第 4 章では、近年、簡便な定量分析法として注目されているフーリエ変換近赤外分光分析法 (FT-NIR) に着目した。FT-NIR は簡便なサンプル調製で目的化合物を測定できるので、実験室だけでなく、生産現場などでも広く利用されている分析法である。そこで、FT-NIR の植物葉中のポリイソプレレン量のスクリーニングへの適用可能性について検討し、検量線モデルの最適化を行った。

第 5 章、総括では、本研究で開発した分析法を感度、試料量、正確さ、簡便性について比較した。さらにトチュウポリイソプレレン生産性向上の今後の展望ならび課題を述べた。

第2章 トチュウ葉からのポリイソプレン抽出および絶対定量法

2-1 緒言

植物に含まれるポリイソプレンの定量分析法は植物によって異なる。また、同じ植物であっても求める精度、スループットによって異なる方法が用いられてきた（緒論参照）。これまでに報告されている植物中ポリイソプレンの定量分析法は、他成分の影響を無視できない方法や、極めてスループットの低い方法であり、本学位論文のテーマである迅速定量分析法の標準法としては不適である。加えて、第3章（熱分解ガスクロマトグラフィー/質量分析法による相対定量法）、第4章（近赤外分光分析法による定量モデル）で報告する定量法でスクリーニングし選抜された試料から、トチュウポリイソプレン含量を詳細に測定するためには、既存の定量法（ソックスレー抽出法）と同等の正確さ、精度をもった定量法が必要である。

低分子代謝産物の一般的な定量法では、有機溶媒による目的化合物の粗抽出の後、液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーにより目的成分を分離し、ピーク面積より定量を行う（Fig. 2-1）。一方、植物中のポリイソプレンはカラムによって他成分と分離することが困難であり、定量を行うためには予め精製する必要がある。しかし、ポリイソプレンを溶解する溶媒（クロロホルム、トルエン、テトラヒドロフランなど）は疎水性低分子代謝物（クロロフィル、カロテノイドなど）も溶解する。そのため、ポリイソプレンの精製の前段階でポリイソプレンを溶解しない溶媒を用い、ポリイソプレンを損失することなく、疎水性低分子代謝物を除去する必要がある。

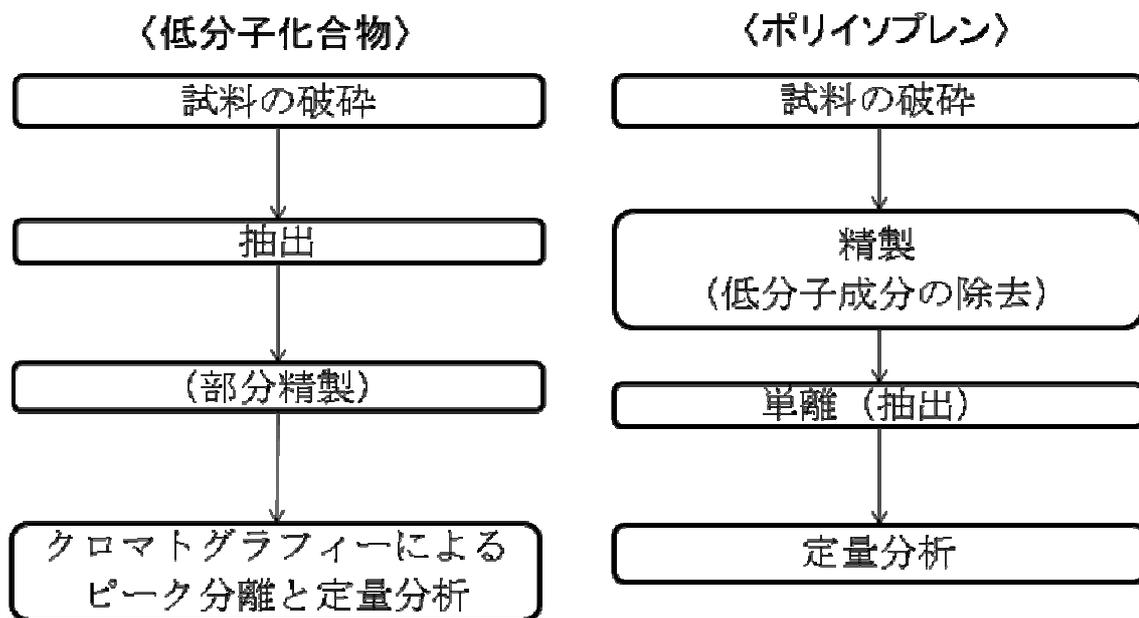


Fig. 2-1 低分子化合物とポリイソプレンの抽出，定量法の違い

本章では，微量のトチュウ葉から再現性よくポリイソプレンを精製，抽出する方法を確立した．また，秤量法やNMRによる定量法よりも高感度にポリイソプレンを定量する方法としてフーリエ変換赤外分光（FT-IR）分析を採用し，定量性および検出感度を調べた．さらに，本定量法と従来法（ソックスレー抽出法/秤量法）を正確さ，精度の点で比較した．本定量法の有用性を検証するため，当該定量法を用いて，トチュウポリイソプレン含量の季節変動と分子量分布の変化を調べた．

2-2 実験方法

2-2-1 試薬

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）に用いたHPLC用テトラヒドロフラン（THF）は和光純薬（大阪）より購入した．SECの分子量分布の検量線はシス

型ポリイソプレン (\overline{M}_n 1,199,400, $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ 1.10; \overline{M}_n 138,000, $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ 1.05; \overline{M}_n 30,000, $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ 1.04; \overline{M}_n 12,000, $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ 1.04; \overline{M}_n 6000, $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ 1.04; \overline{M}_n 2560, $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ 1.08; \overline{M}_n 1150, and $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ 1.11; Polymer Source, Montreal, Canada) を用いた. 定量分析の内部標準物質としてポリブタジエン (\overline{M}_n 6000, more than 90% of 1,4 units, some 1,2 units contained, Polymer Source) を使用した.

2-2-2 植物材料

ソックスレー抽出法と当該定量法 (2 ml 定量法) を比較するため, トチュウの葉を実験材料として用いた. トチュウ葉は九州大学 (2006 年 10 月) で採取した. 採取した葉を凍結乾燥し, ワーリングブレンダー (WB-1; 大阪ケミカル, 大阪) を用いて微粉末にした. トチュウポリイソプレン含量の季節変動を調べるため, トチュウポリイソプレン含量が高いとされている精英樹 (3, 10, 18, 21, 24 番, 西北農林科技大学, 陝西省, 中国) の葉を採取し, 減圧乾燥, ボールミル (20 Hz, 1 分; .Mixer Mill MM 301; Restch, Haan, Germany) による粉砕の後, ポリイソプレン含量を定量した.

2-2-3 トチュウ葉からのポリイソプレン抽出法

凍結乾燥し, 粉砕した葉 (150 mg) からエタノール (100 ml, 120°C, 12 時間) で色素成分を除去し, 次いでトルエン (50 ml, 150°C, 15 時間) で粗ポリイソプレン画分を抽出した. トルエン画分をエバポレーターで留去し, 残滓をメタノールで洗浄した後, 再度, エバポレーターで乾燥した. 乾燥物の重量をポリイソプレン量とした. 以下, この方法をソックスレー抽出法と呼ぶ.

2-2-4 トチュウ葉からのポリイソプレン簡便抽出

凍結乾燥した葉 (15 mg) を 2 ml のエッペンドルフチューブに移し、エタノール 1.2 ml を加え、ボルテックスにて攪拌した。次いで、遠心分離 (14,000 rpm, 1 分) を行い、上清を除去した。このステップを上清が無色となるまで繰り返した。このように脱脂された粉碎物を遠心濃縮機で乾燥させた。残滓にトルエンに溶解したポリブタジエン (内部標準物質; 1 mg/ml) を加え、遠心分離を行い、ポリイソプレンを抽出した。トルエン抽出物を遠心濃縮により乾燥し、ポリイソプレン画分を得た。秤量分析や SEC 分析にはブタジエンを溶解させていないトルエンで抽出したポリイソプレン画分を用いた。以下、この方法を 2-ml 抽出法と呼ぶ。

2-2-5 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

トチュウポリイソプレンの SEC 分析は、直列した 2 本の 4.6 mm i.d. x 250 mm カラム (packed with nonpolar poly-(styrene-co-divinylbenzene) gel ; PL gel MiniMIX-B; particle size, 10 μm ; maximum porosity, 1×10^7 ; Polymer Laboratories, Essex, UK) を用いた。THF に溶解したポリイソプレン試料は、孔径 0.45- μm のメンブレンフィルターでろ過した後、SEC 分析に供した。測定は、カラムオープン温度 40°C, 移動相 (THF), 流速 0.2 ml min⁻¹ で行い、UV 検出器 (210 nm) でポリイソプレンをモニタリングした。検出器から得られたシグナルを SIC-480II data station (System Instruments, Tokyo) で記録した。分子量分布に関する検量線は *cis*-1,4-polyisoprene 標品を用いて分析した結果を SIC-480II GPC software で解析することにより得た。

2-2-6 フーリエ変換赤外分光分析法 (FT-IR)

フーリエ変換赤外分光分析法 (FT-IR ; FTIR-2400S, Shimadzu, Kyoto) を用いてトチュウポリイソプレン含量を測定した。試料調製としてトチュウポリイソプレンとポリブタジエン (BR) をクロロホルムに溶解し、均質な溶液を NaCl セル上に滴下し、クロロホルムを蒸発させた。このようにして得たブレンドゴムのフィルムを FT-IR 分析に供した。

2-3 結果と考察

2-3-1 ソックスレー抽出法

植物に含まれる大量の色素は、ポリイソプレンの精製度に大きく影響を与える。そのため、ソックスレー抽出法では、色素成分が可溶であるが、ポリイソプレンが不溶であるエタノールを用いて 10 時間 120 °C、色素成分を除いた。次に、ポリイソプレンが可溶であるトルエンで 12 時間 150 °C 抽出し、ポリイソプレン画分を回収した。トルエン抽出物には、わずかに植物色素が含まれたので、トルエン留去物をメタノールで洗浄し乾燥後、ポリイソプレンを秤量した。

トチュウ葉から抽出したポリイソプレンの分子量分布は二峰性を示す (Fig. 2-2) (Tangpakdee *et al.*, 1997)。シス型ポリイソプレン標品の検量線から、トチュウポリイソプレンの数平均分子量はそれぞれ、 $\overline{M}_n = 6.0 \times 10^3, 1.2 \times 10^6$ であることが推定された。

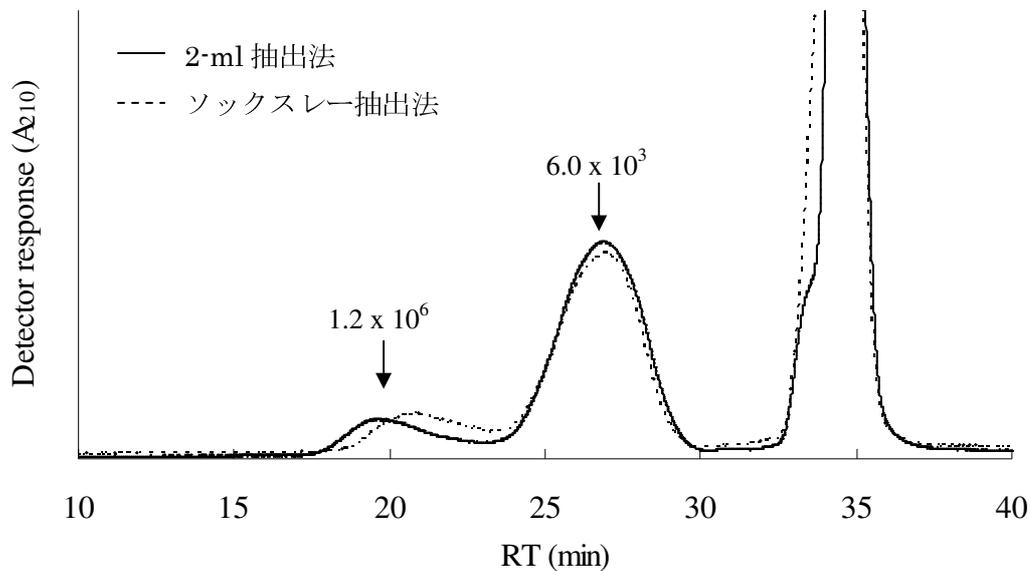


Fig. 2-2 トチュウ葉から抽出したポリイソプレンの分子量分布.
 グラフ中の矢印は数平均分子量 (\overline{M}_n) を示す.

2-3-2 2-ml 抽出法

ソックスレー抽出法は多くの試料を必要とし、抽出・精製に長時間を要する。そこで、少量のサンプルから、迅速で再現性よくポリイソプレンを抽出できる方法を検討した。

トチュウ葉からポリイソプレンを再現性よく抽出する為には試料を粉砕し、有機溶媒を試料に浸透させやすくする必要がある。しかし、試料に過度に損傷を与えると、ポリイソプレンが物理的に分解される。そのため、試料の破砕方法を検討した。

各方法の比較は、破砕後の粒子を目視で確認し、その試料から抽出したポリイソプレンの分子量分布を調べることにより行った。乳棒と乳鉢を使った破砕法では、細かい粉末まで破砕できるが破砕中に試料を損失する上、破砕に時間を要した。ポリトロンを使った破砕法では、迅速に破砕できるが細かい粉末に破砕できなかった。一方、ボールミルを使った破砕法では、少量の試料を迅速

に再現性よく破碎できた。また、ボールミルの破碎時間を最適化することにより、ポリイソプレンを分解することなく、試料を粉碎することができた。

粉末化したトチュウ葉からポリイソプレンを抽出する方法として、エタノールによる精製を行い、色素成分がなくなるまで洗浄抽出を繰り返した。エタノールによって脱脂された不溶性沈殿からポリイソプレンを抽出する溶媒としてクロロホルム、ならびにトルエンを試した。クロロホルムはペレットを浮揚させ、ポリイソプレンの抽出を困難にした。そのため、ポリイソプレンを抽出する溶媒としてトルエンを採用した。

各抽出法によるポリイソプレン分子量分布の差異を比較する為、ソックスレー抽出法、2-ml 抽出法により得たトチュウポリイソプレンを SEC 分析に供した (Fig. 2-2)。これらの抽出法により得たトチュウポリイソプレンの分子量分布にはほとんど差がなかった。また、2-ml 抽出法により得たトチュウポリイソプレンの分子量分布は、再現性があることを確認した。

2-3-3 トチュウポリイソプレンのフーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR)

植物由来ポリイソプレンの相対定量のために天然ポリイソプレン、ポリブタジエン、それぞれに特徴的なバンドを選択した。Kaushik らは、ポリブタジエンのバンドとして 1316 cm^{-1} を選んでいる (Kaushik and Sharma, 1985) が、本実験で用いたポリブタジエンでは 1316 cm^{-1} のバンドは他のバンドと重なっていたために、 912 cm^{-1} のバンドを採用した。このバンドは、1,4-ポリブタジエン中に含まれる 1,2-ポリブタジエン C=C 結合に由来すると考えられる。また、天然ポリイソプレン由来の特異的なバンドとして、 1380 cm^{-1} を採用した (Fig. 2-3)。

FT-IR 分析による検量線の直線性、検出限界 (LOD)、および定量限界 (LOQ) の測定は、 $100\text{ }\mu\text{g}$ のポリブタジエンに対するトチュウポリイソプレン由来のバ

ンドの高さ，および，面積値から決定した．各濃度のポリイソプレンをそれぞれ3回分析し，得られた分析値の平均値を測定値として使用した (TABLE 2-1)．

どちらの検量線とも良好な直線性を示したが，近赤外光が照射された位置にポリイソプレンが少ない場合，ベースラインが大きく波打ち，バンドの高さを基にした検量線の直線性が悪化した (data not shown)．そのため，以降の定量分析ではバンドの面積を基にした検量線を使用した．

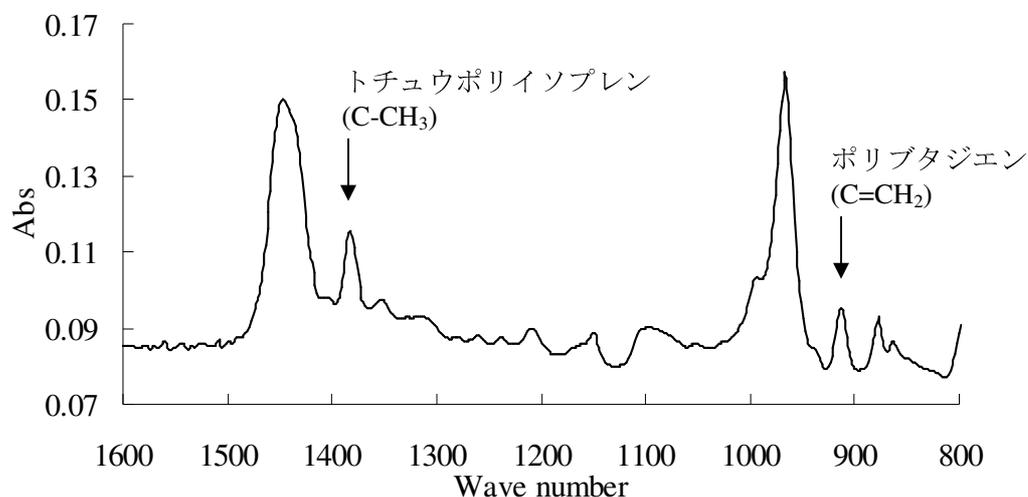


Fig. 2-3 内標 (ポリブタジエン) を加えたトチュウポリイソプレンの FT-IR スペクトル

2-3-4 正確さと精度

ソックスレー抽出法によって得たポリイソプレンの秤量，2-mL 抽出法によって得たポリイソプレンの秤量，2-mL 抽出法によって得たポリイソプレンの FT-IR 分析の定量結果を比較した (TABLE 2-1)．ソックスレー抽出法による秤量と 2-mL 抽出法による秤量では，ほぼ同じポリイソプレン含量，相対標準偏差 (RSD) (%) が得られていることから，ソックスレー抽出法と 2-mL 抽出法はほぼ同じ抽出効率であると考えられる．一方，FT-IR 法は秤量法に比べ，測定誤差が大きくなった．この理由の一つは，FT-IR 分析においてポリブタジエントチュウポ

ポリソブレンが塩化ナトリウムセル上で均質に分布していないことによる測定間誤差が生じている為と考えられる。

TABLE 2-1 各定量法の正確さおよび精度

	ソックスレー抽出法/ 秤量法	2-ml 抽出法/ 秤量法	2-ml 抽出法/ FT-IR
% ポリソブレン ^a	4.01 ± 0.25	4.03 ± 0.29	3.73 ± 0.44
RSD (%)	6.29	7.11	11.7

^a 平均値 ± 標準偏差 (n=3)

FT-IR の LOD は 12.5 µg, LOQ は 27.1 µg である (TABLE 2-2). LOD はピークとして検出される最小量とした. LOQ は様々な濃度のポリソブレンを分析し, 検量線の範囲内に含まれるピーク面積を検量線の式に代入し, ポリソブレン量を算出した. また, 直線範囲は 25 - 200 µg であった.

TABLE 2 FT-IR 分析の直線性, 検出限界 (LOD), 定量限界 (LOQ)

Method	R	直線性 (µg)	LOD (µg)	LOQ (µg)
FT-IR	0.998	25 - 200	12.5	27.1

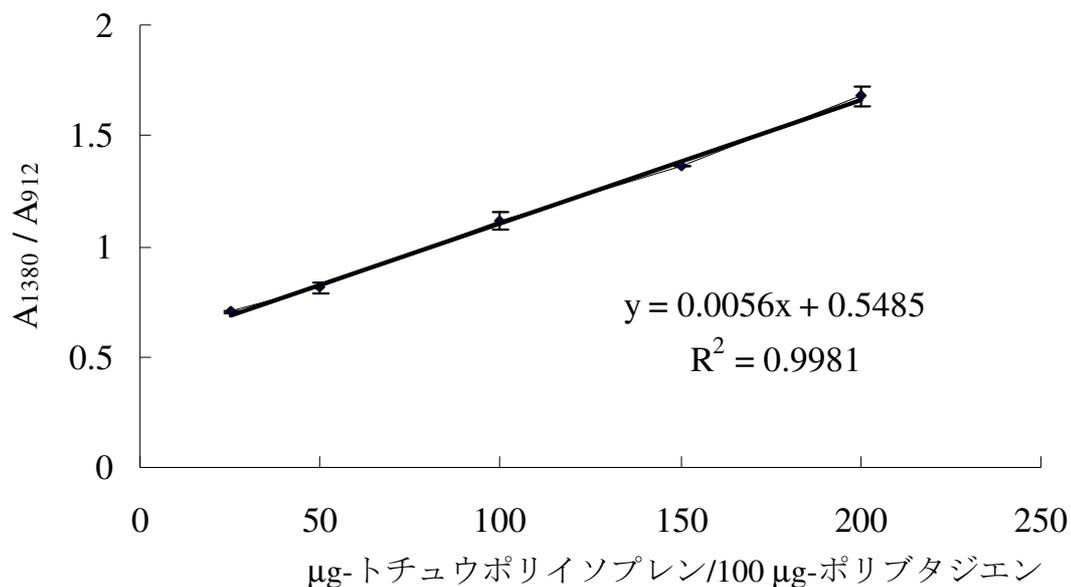


Fig. 2-4 FT-IR によるトチュウポリイソプレンの検量線

2-3-5 トチュウポリイソプレン量の季節変動

トチュウは落葉性の樹木で4月から10月にかけて葉がつく。トチュウ木 (no. 3, 10, 18, 21, 24) から採取した葉のポリイソプレン含量の変動, 分子量分布の変化を FT-IR, SEC により分析した。ポリイソプレン含量は初夏から秋にかけて経時的に蓄積する傾向を見せた (Fig. 2-5)。また, ポリイソプレン分子量分布は初夏から秋にかけて, 低分子量ポリイソプレン ($\overline{M}_n = 6.0 \times 10^3$) の割合が高くなっていることから, 低分子量ポリイソプレンが優先的に蓄積していると考えられた (Fig. 2-6)。no. 3 と 24 の 8 月では, ポリイソプレン含量が減少しているが, トチュウ葉の個体差, もしくはサンプリング時の誤差と考えられる。

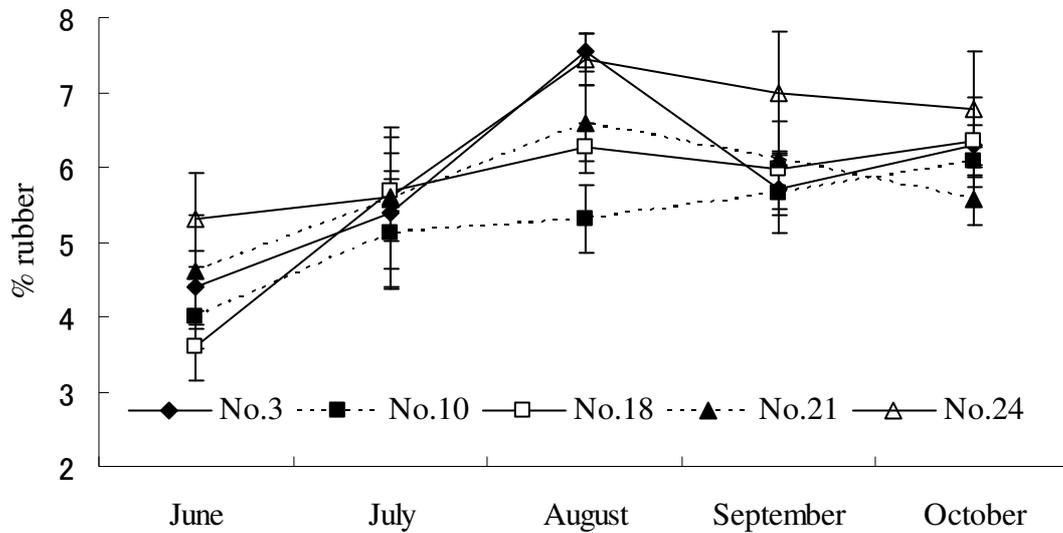


Fig. 2-5 トチュウ葉ポリイソプレン含量の季節変動

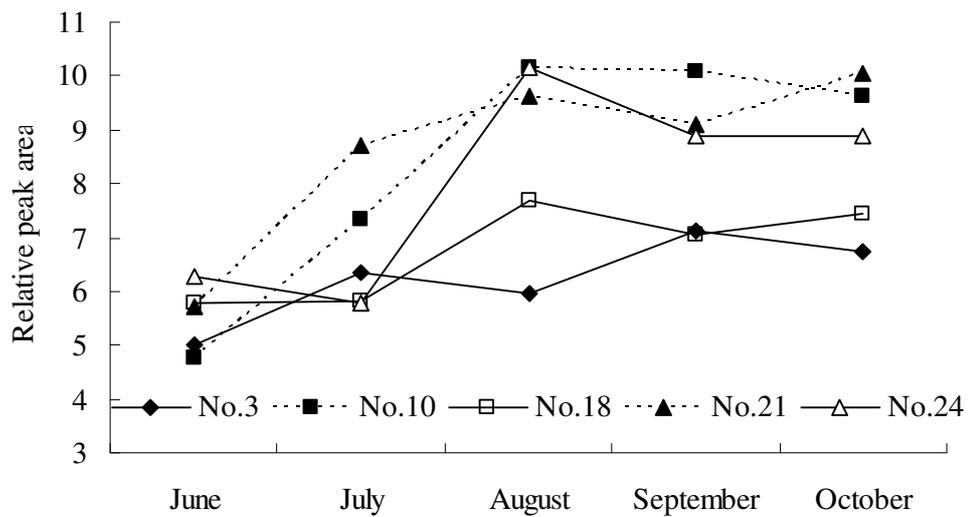


Fig. 2-6 トチュウ葉ポリイソプレン分子量分布の季節変動.
 \overline{M}_n : 6.0×10^3 ポリイソプレンのピーク面積を
 \overline{M}_n : 1.2×10^6 ポリイソプレンのピーク面積で除算した.

以上のように，本章では，多数で少量の植物葉 ($n=3$, 5 か月 \times 5 種類の木 $\times n=75$) からポリイソプレンを精製，抽出し，ポリイソプレン含量の季節変動と分子量分布の変化を明らかにした．従来法であるソックスレー抽出法では，必要となる試料が多だけでなく，抽出・精製操作に手間がかかり，多サンプルを測定することは困難である．本章で開発した方法は，少量の植物試料から迅速かつ高感度に定量できる方法であるので，多サンプルの測定に有用であると考えられる．

第3章 熱分解ガスクロマトグラフィー/質量分析による トチュウポリイソプレン迅速相対定量法

3-1 緒言

近年、天然ポリイソプレンの増産、品質向上を目指して、天然ポリイソプレンの生合成機構の解析やその知見をもとにした分子育種が試みられている (Veatch *et al.*, 2005; Venkatachalam *et al.*, 2006). これらの研究開発を行う上で、ポリイソプレン生合成経路に関わる遺伝子で形質転換した植物の作出は重要であり、またそのポリイソプレン含量を測定することが必須である。また、ポリイソプレン生合成経路に関わる因子は非常に多い (van Beilen and Poirier, 2007) ことが知られていることから、多種の形質転換植物のポリイソプレン含量を測定しなければならない。加えて、形質転換植物の評価においては、ポリイソプレン含量測定に必要な植物試料の量が少量であることが望ましい。これらのことから、最小限の試料から、迅速にポリイソプレン含量を測定する分析法が必要である。

熱分解ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (以下、PyGC/MS) は定性定量的に再現性が高い熱分解により、高分子化合物を GC で分析できる分子量に低分子化し、GC カラムで熱分解物を分離した後、MS で質量電荷比を測定することで化合物を特定する分析法であり、数 mg の試料から分析できる感度の高い方法である。PyGC/MS は、材料の組成分析において非常に有用な方法であり、2 成分や 3 成分の混合ポリマーの定性、定量分析に利用されている (Lee *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2000). また、植物由来のサンプルでは、タバコやハーブのリグニンの成分分析に利用されている (Faix *et al.*, 1992; Marques *et al.*, 2007).

イソプレンユニットの繰り返し構造から成る天然ポリイソプレンから発生する熱分解物はモノマー、ダイマー、トリマー、テトラマー、ペンタマー、ヘキ

サマーなど様々である (Groves and Lehrle, 1991). しかし, その割合としてはモノマー, ダイマーがほとんどであることが知られており (Lee *et al.*, 2007), モノマー/ダイマーの割合は, 熱分解温度やサンプル量に応じて変化する (Groves and Lehrle, 1991). PyGC/MS は熱分解の後にカラムによって熱分解物を分離するので, さまざまな成分を含んだ植物葉から, ポリイソプレンに由来する化合物を分離し, 定量することできると考えられた.

しかし, 植物中には高分子ポリイソプレンと構造的に相同, あるいは部分的に相同する化合物が多数存在する. 構造的に相同する化合物としては, 鎖長の短いポリプレノールやドリコールが挙げられる. これらは高分子ポリイソプレンと同様に, 直鎖状のイソプレンユニットから構成されている. 特にポリイソプレン生産植物は, 低分子から, 高分子まで連続的にポリプレノール, ポリイソプレンを含んでいる (Bamba *et al.*, 2001). また, 部分的に相同する化合物としては, β -カロテンなどのカロテノイド類, 側鎖として直鎖状ポリイソプレンを有するキノン類がある.

本章では, 抽出・精製したポリイソプレンの PyGC/MS による定量法について検討した. また, 高分子ポリイソプレンと構造的に相同, 部分的に相同する化合物から発生する熱分解物とポリイソプレンから発生する熱分解物を定性的, 定量的に比較した. これらの結果を基に, 微量の植物葉中のポリイソプレン含量を PyGC/MS 分析によって, 迅速に相対定量する分析法を開発した.

3-2 実験方法

3-2-1 植物試料

トチュウ葉は, 大阪大学内の成木から 10 月か 12 月にかけて採取した. イヌ

ビワ (*Ficus erecta*) の葉は、大阪大学内の成木から採取した。パラゴム (*Hevea brasiliensis*) の葉は、購入した苗木から採取した。植物試料は蒸留水で洗浄した後、主葉脈をメスで切り取り、凍結乾燥に供した。その後、サンプルをワーニングブレンダーで粉碎し、孔径 0.5-1.0 mm のアルミ製ふるいにかけた。

植物試料からのポリイソプレン抽出、定量は第 2 章で述べたとおりである。

3-2-2 試薬

ポリプレノール、ポリイソプレンの熱分解物を調べるため、ソラネソール (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、ウンデカプレノール (Larodan fine chemicals AB, Malmo, Sweden)、ノナデカプレノール (Larodan fine chemicals AB)、シス型ポリイソプレン標準品 (\overline{M}_n 1,199,400, \overline{M}_n 6000, $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ 1.04; \overline{M}_n 2560, $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ 1.08; Polymer Source, Montreal, Canada)、トランス型ポリイソプレン (Kuraray trading Co, Osaka, Japan) を PyGC/MS で測定した。植物に含まれるイソプレノイドの熱分解物を調べるため、ユビキノン-10、ゼアキサニン、リコペン、 β -シトステロール (Wako Pure Chemical Industries, Osaka)、クロロフィル、スティグマステロール (Sigma-Aldrich) を測定した。ポリブタジエン (\overline{M}_n 6000, more than 90% of 1,4 units, some 1,2 units contained; Polymer Source) を PyGC/MS 分析の内部標準物質として使用した。

3-2-3 熱分解ガスクロマトグラフィー/質量分析 (PyGC/MS 分析)

PyGC/MS システムは Trace GC ultra, Trace DSQ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA., USA) を使用し、熱分解装置は Double-Shot Pyrolyzer PY-202 (Frontier Lab, Fukushima) を用いた。450°C で試料の熱分解を行った。熱分解物の分離には THERMO TR-WaxMS column (60 m x 0.25 mm, 0.25- μ m-thick film;

Thermo Fisher Scientific) を用いた。ガスクロマトグラフィーのインジェクト、質量分析機トランスファーライン、イオンソースの温度はそれぞれ 180, 250, 200°C に設定した。クロマトグラフィーの温度は 40°C で 5 分保持し、8°C min⁻¹ で 130°C まで昇温した後、14 分保持した。スプリット比は 10:1 に設定した。マスレンジは 50–650 m/z に設定した。ポリイソプレン、ポリブタジエン、植物葉の熱分解物は NIST MS Search 2.0 で同定した。

抽出・精製したポリイソプレンは、100 µg の内標ポリブタジエンを加えた後、分析に供し、ポリイソプレンより発生するリモネンとポリブタジエンより発生する 4-ビニルシクロヘキセンのピーク面積比より定量を行った（以降、抽出/精製定量法）。植物葉の直接分析については、粉末状の葉 1 mg に 100 µg の内標ポリブタジエンを加えた後、分析に供し、植物葉より発生したリモネンとポリブタジエンより発生する 4-ビニルシクロヘキセンのピーク面積比より定量を行った（以降、直接定量法）。熱分解物の同定は、NIST MS Search 2.0 を用いて行った

3-3 結果と考察

3-3-1 抽出・精製したポリイソプレンの PyGC/MS 分析による定量法

本実験では、微量のポリイソプレンを正確に定量するため、PyGC/MS 分析の内部標準物質としてポリブタジエンを使用した。

ポリイソプレンの熱分解で発生する分解産物は、主にモノマーであるイソプレンとダイマーであるリモネンであることが知られている。一方、内標のポリブタジエンからも同様にモノマーとダイマー（4-ビニルシクロヘキセン）が発生する。本実験ではピーク分離の良さ、ピーク面積の大きさからポリイソプレン、ポリブタジエンのダイマーの熱分解物であるリモネン、4-ビニルシクロヘキセン

を定量分析に使用した (Fig. 3-1).

熱分解温度は、発生する熱分解物に定性的、定量的に影響を与える。熱分解温度とポリイソプレンの熱分解物であるリモネン発生量とポリブタジエンの熱分解物である 4-ビニルシクロヘキセンの相関関係を調べた (Fig. 3-2)。4-ビニルシクロヘキセンは 550°C でピーク面積が最大になったのに対し、リモネンは 450°C においてピーク面積が最大となった。ポリイソプレンの定量限界を最大にするため、熱分解温度は 450°C とした。

PyGC/MS 分析による抽出・精製したポリイソプレン定量の正確さ、精度を調べるため、第 2 章で説明した秤量法、FT-IR 分析法の結果と比較した (TABLE 3-1)。2-mL 抽出法/秤量、2-mL 抽出法/PyGC/MS 分析では、ほぼ同じポリイソプレン含量、RSD (%) が得られていることから、PyGC/MS 分析による定量法の正確さ、精度は、秤量法の正確さ、精度とほぼ同等であることを示している。さらに、PyGC/MS では、FT-IR よりも小さい RSD (%) となったことから、FT-IR よりも再現性に優れた定量法と考えられる。

PyGC/MS 分析による検量線の直線性、LOD、LOQ の測定は、100 µg のポリブタジエン熱分解物に対するトチュウポリイソプレン熱分解物のピークの面積値から決定した (Fig. 3-3, TABLE 3-1)。FT-IR、PyGC/MS それぞれの LOD は 12.5, 0.78 µg, LOQ は 27.1, 1.46 µg であり、PyGC/MS の方が、約 10 倍感度が高かった。FT-IR では一サンプルを数分で定量でき、PyGC/MS では一サンプルの定量に約 30 分要することから、試料の数や試料中のポリイソプレン量に応じて、それぞれの分析法を使い分ける必要がある。

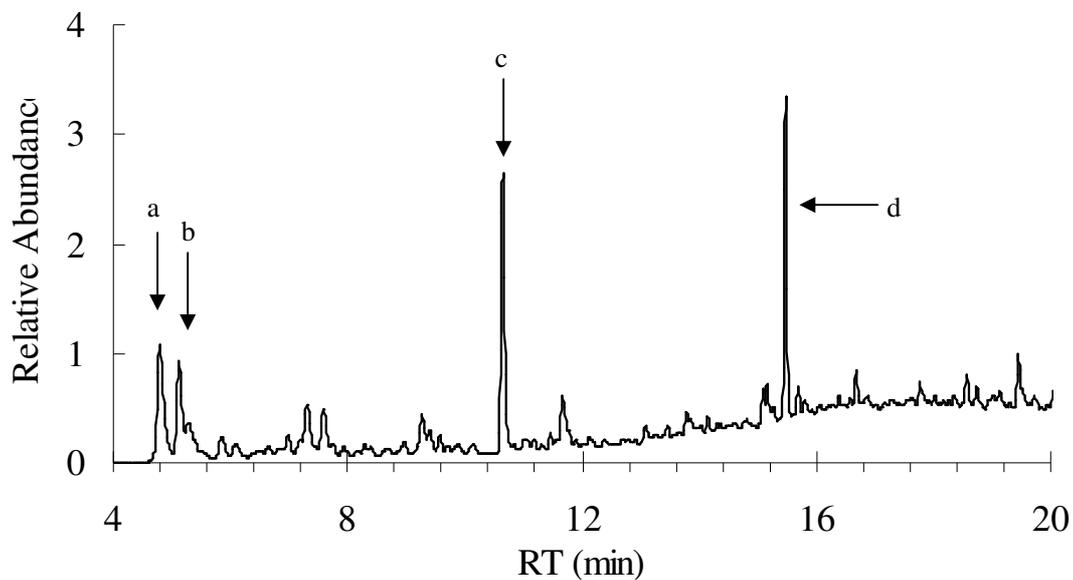


Fig. 3-1 トチュウ由来ポリイソプレンの PyGC/MS クロマトグラム.
 a : ポリブタジエン由来ダイマー, b : ポリイソプレン由来イソプレン
 c : ポリブタジエン由来ダイマー (4-ビニルシクロヘキセン)
 d : ポリイソプレン由来ダイマー (リモネン)

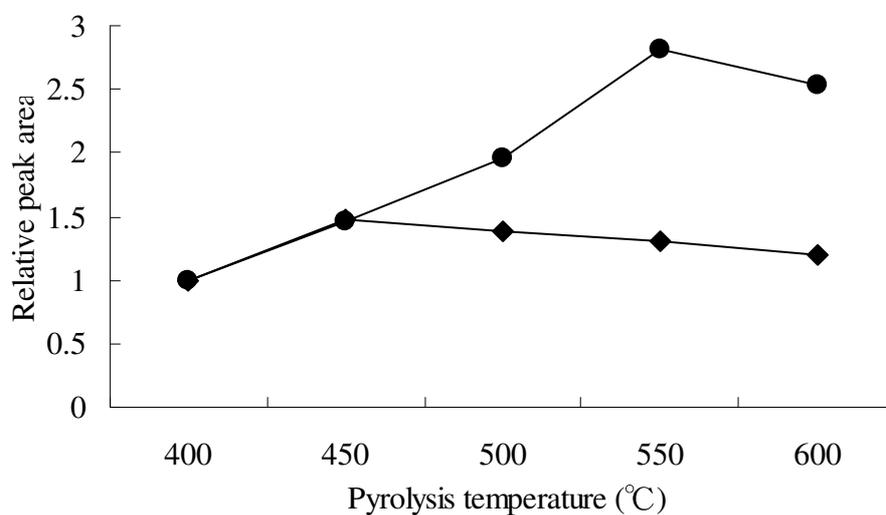


Fig. 3-2 熱分解温度とポリブタジエン由来 4-ビニルシクロヘキセン (●), ポリイソプレン由来リモネン発生量 (◆) の関係. 400°Cの時の面積を基準とした相対面積で表した.

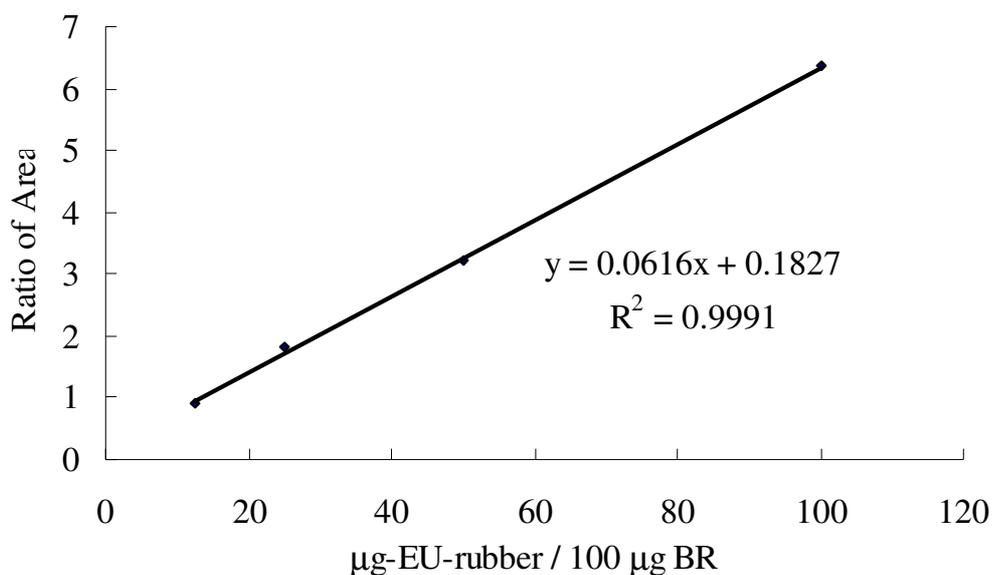


Fig. 3-3 PyGC/MS によるポリイソプレンの検量線

TABLE 3-1. 各分析法の正確さと精度

	2-ml 抽出法/ 秤量法	2-ml 抽出法/ PyGC/MS	2-ml 抽出法/ FT-IR
% ポリイソプレン ^a	4.03 ± 0.29	3.95 ± 0.28	3.73 ± 0.44
RSD (%)	7.11	7.07	11.7

^a 平均値 ± 標準偏差 (n=3)

TABLE 3-2 FT-IR, PyGC/MS 分析の直線性, 検出限界 (LOD), 定量限界 (LOQ)

Method	R	直線性 (μg)	LOD (μg)	LOQ (μg)
FT-IR	0.998	25 - 200	12.5	27.1
PyGC/MS	0.999	1.5 - 200	0.78	1.46

3-3-2 ポリイソプレン生産，非生産植物の葉の熱分解物

イソプレンとリモネンは，ポリイソプレンの主要な熱分解物である．植物の葉から熱分解によって，イソプレンおよびリモネンが生じるかどうかについて，ポリイソプレン生産植物と非生産植物の葉で調べた．ポリイソプレンが豊富に含まれるトチュウ (*Eucommia ulmoides*)，イヌビワ (*Ficus erecta*)，パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) の葉では，イソプレンとリモネンのピークが顕著に検出された (Fig. 3-4, TABLE 3-3)．一方，ポリイソプレンがあまり含まれないシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)，ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) の葉ではリモネンもイソプレンのピークも検出されなかった．9 量体トランス型ポリプレノール (ソラネソール) が豊富に含まれているタバコ (*Nicotiana tabacum*) では，リモネンとイソプレンのピークが検出された．これらのことから，植物葉由来の熱分解物であるリモネン，イソプレンはポリプレノールやポリイソプレンに由来すると示唆された．

TABLE 3-3 ポリイソプレン生産, 非生産植物 1 mg から熱分解により発生するイソプレン, リモネンの内部標準物質 (100 μ g ポリブタジエン) に対する相対量

	ポリイソプレンの種類	イソプレン ^a	リモネン ^a
シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	n.d. ^b	n.d. ^b	n.d. ^b
ハウレンソウ (<i>Spinacia oleracea</i>)	n.d. ^b	n.d. ^b	n.d. ^b
タバコ (<i>Nicotiana tabacum</i>)	トランス型 9 量体 ポリプレノール	0.22	0.63
トチュウ (<i>Eucommia ulmoides</i>)	トランス型	0.25	0.94
イヌビワ (<i>Ficus erecta</i>)	シス型	0.33	0.68
パラゴムノキ (<i>Hevea brasiliensis</i>)	シス型	0.26	0.87

^a 平均値 (2 回測定) ; ^b 未検出

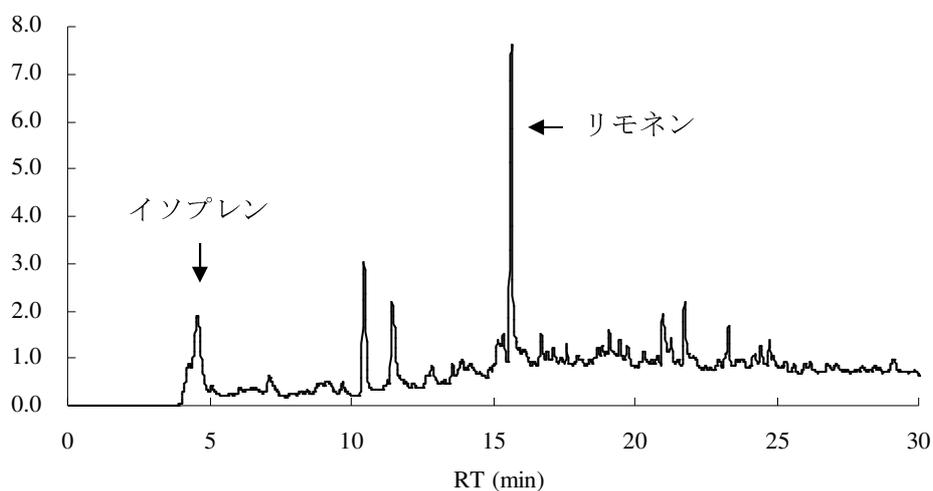


Fig. 3-4 トチュウ葉の PyGC/MS クロマトグラム

TABLE 3-4 トチュウ葉から発生する熱分解物

RT (min)	%Area	compounds	MW
4.28	4.39	2-butyne	54
4.58	18.4	isoprene	68
6.7	0.34	2-propenal	56
7.15	1.91	2-(2-methyl-1-propenyl)cyclobutanone	124
9.25	0.89	1-methyl-1,4-cyclohexadiene	94
10.41	8.09	4-vinyl-cyclohexene	108
12.81	1.64	1-methyl-4-(1-methylethenyl)-cyclohexene	136
13.91	1.1	1,3-dimethyl-benzene	106
14.18	0.54	3-methyl-6-(1-methylethyl)-cyclohexene	138
15.36	1.75	2,5,6-trimethyl-1,3,6-hepatatriene	136
15.65	36.44	limonene	136
15.89	1.12	2,5-dimethyl-3-methylene-1,5-heptadiene	136
16.66	0.89	styrene	104
17.58	0.57	acetic acid methyl ester	74
18.78	0.57	1,2,4-triethenyl cyclohexene	162
19.68	1.32	8-methylene-dispiro[2.0.2.5]undecane	162
20.13	0.51	1,2,4,5-tetramethyl benzene	134
20.94	2	methyl formate	60
21.25	0.54	isopropenyltoluene	132
21.74	2.77	3-furaldehyde	96
22	1.31	10-oxocyclodec-2-enecarboxylic, methyl ester	210
23.12	0.74	oxacyclotetradeca-4,11-diyne	190
23.29	0.78	2-methyl-hex-2-yn-4-one	110
26.14	0.54	5-methyl-2-furancarboxaldehyde	110
26.73	0.89	tricyclo[7,3,0,0,(2,6)]-8-dodecen-3-ol	178
29.09	2	tricyclo[3,3,0,0,(2,8)]octane-3,7-dione, 4-methyl-4-(propan-2-on-1-ny)-	206

3-3-3 ポリプレノール，ポリイソプレン熱分解物の測定

ポリプレノール，ポリイソプレンの鎖長（分子量）と熱分解物の発生量の関係を TABLE 3-5 に示した．イソプレン，リモネンとも，鎖長（分子量）が減少するにともない発生量が減少した．また，シス型，トランス型に関わらずこの傾向が認められた．イソプレンでは，分子量が 1310 であるノナデカプレノールで高分子ポリイソプレン（トチュウポリイソプレン (\overline{M}_n : 6000, 1,200,000)，シス型ポリイソプレン (\overline{M}_n : 2560, 6000, 1,192,000)，トランス型ポリイソプレン)と同程度の発生が見られた．一方，リモネンではシス型ポリイソプレン (\overline{M}_n : 6000) 以上でポリイソプレンと同程度の発生が見られた．これらのことから，ポリイソプレンの熱分解によるイソプレン，リモネンの発生量は鎖長に依存すること，特に，リモネン発生量の方がイソプレンよりも鎖長の長さに影響を受けることが明らかとなった．熱分解によるリモネンは，熱分解によって生じたイソプレンが Diels-Alder type reaction により，ダイマー形成することによって生じると考えられている (Faix *et al.*, 1992)．鎖長の短いポリプレノールでリモネン発生量がイソプレンに比べ相対的に減少したのは，ダイマー形成に必要なイソプレンの発生量が減少したためだと考えられる．

3-3-4 キノン，カロテノイド，クロロフィルの熱分解物の測定

植物中にはポリプレノール以外にもイソプレンユニットからなる多種のイソプレノイドが含まれている (Fig. 3-5)．これらイソプレノイドから発生する熱分解物を調べ，それぞれの熱分解物に含まれるイソプレン，リモネン量とそれらの比率を測定した (TABLE 3-6)．

ユビキノン-10 (CoQ-10) は，側鎖として直鎖状のイソプレンユニットをもつ．ユビキノンから発生したイソプレンは，同程度のイソプレンユニットであるソ

TABLE 3-5 100 μg のポリプレノールおよびポリイソプレンから発生するイソプレン，リモネンの発生量の割合（トチュウポリイソプレンより発生するリモネン，イソプレンを100とした）

	分子量	イソプレン (%) ^{a,c}	リモネン (%) ^{a,c}
トチュウ ポリイソプレン	6000 ^b , 1,200,000 ^b	100.0 \pm 6.6	100.0 \pm 6.7
ソラネソール	630	83.1 \pm 7.3	56.8 \pm 2.0
ウンデカ プレノール	767	90.8 \pm 2.5	68.8 \pm 3.5
ノナデカ プレノール	1310	99.9 \pm 10.9	79.6 \pm 3.6
シス型	2560 ^b	96.7 \pm 3.2	91.0 \pm 0.5
ポリイソプレン	6000 ^b	97.7 \pm 4.4	100.7 \pm 2.9
	1,192,000 ^b	103.9 \pm 6.9	102.3 \pm 3.5
トランス型 ポリイソプレン	6000-1,200,000 ^b	96.4 \pm 8.3	102.9 \pm 1.3

^a 平均値（2または3回測定）； ^b 数平均分子量； ^c 平均値 \pm 標準偏差

TABLE 3-6 100 μg のキノン，カロテノイド，クロロフィルから発生するイソプレレン，リモネンの発生量の割合（トチュウポリイソプレレンより発生するリモネン，イソプレレンを100とした）^a

	分子量 (イソプレレンユニット数)	イソプレレン (%) ^b	リモネン (%) ^b
ユビキノン-10	862 (10)	78.7 \pm 2.8	81.1 \pm 3.0
β -カロテン	536 (8)	n.d.	n.d.
ゼアキササンチン	568 (8)	n.d.	n.d.
リコペン	536 (8)	n.d.	n.d.
クロロフィル	893 (4)	n.d.	n.d.
β -シトステロール	414 (6)	n.d.	n.d.
ステイグマステロール	412 (6)	n.d.	n.d.

^a 平均値 (2回測定) ; ^b 平均値 \pm 標準偏差, n.d. 未検出

以上の結果から、植物中には多様な構造のイソプレノイド化合物が存在するが、 (C_5H_8) のイソプレノユニットを持つイソプレノイドのみ、イソプレンやリモネンを発生すると考えられる。また、低分子ポリイソプレンから発生する熱分解物は、分子量が小さくなるほどイソプレンの発生量の割合が高まり、リモネンの割合は低くなる。したがって、ポリイソプレン生産植物の熱分解 GC/MS 分析において検出されるリモネンは、ポリイソプレンより多く由来していると考えられる。

3-3-5 PyGC/MS 直接分析によるポリイソプレン定量の検討

熱分解により発生するイソプレンは、長鎖ポリプレノールからも多く発生することから、トチュウ葉の熱分解のイソプレンはこれらポリプレノールからも多く発生していると考えられる。一方、ポリプレノールから発生するリモネンはイソプレンに比べ少ないので、葉の熱分解から発生するリモネンは高分子ポリイソプレンから多く発生していると考えられる。従って、トチュウ葉の熱分解により発生するリモネン量はイソプレンに比べ、葉中のポリイソプレン含量をより反映しているのではないかと考えられた。

溶媒により抽出・精製したポリイソプレンの分析により得た葉中のポリイソプレン含量と、葉を直接分析することにより得たポリイソプレン量の相関を Fig. 3-6 に、それぞれのポリイソプレン含量範囲とデータのばらつきを TABLE 3-7 に示した。比較するために使用した葉のポリイソプレン含量は、0.6-5.3%であり、ポリイソプレン含量は狭い範囲に集中しているが、 R^2 は 0.97 で良好な相関性を示した。また、最も含量の高い点を除いた相関図でも相関性は 0.96 を示した。抽出したポリイソプレンの定量結果と葉の熱分解による結果のばらつきはほぼ同じであった (1.4, 1.6)。このことから、葉の熱分解において、葉に含まれる

他の成分がリモネンの発生に影響を及ぼさないと考えられる。

溶媒抽出法のポリイソプレン量の平均値が 2.3%であるのに対し、葉の熱分解による結果では、4.3%であった。各点における両手法のポリイソプレン量の差は平均 1.9 で標準偏差は 0.3 であった。すなわち、溶媒抽出したポリイソプレンと葉の熱分解による結果の差は、各点でほぼ同じである。したがって、当該手法はポリイソプレンの相対定量法として有用である。

TABLE 3-7 抽出/精制定量法および直接定量法より得たトチュウポリイソプレン含量 (9 試料) の範囲と 9 試料のポリイソプレン含量の平均値

	ポリイソプレン含量の範囲 (%)	平均値 (%) ^a
抽出/精制定量法	0.6 - 5.3	2.3 ± 1.4
直接定量法	2.1 - 7.4	4.3 ± 1.6
差	1.4 - 2.2	1.9 ± 0.3

^a 平均値 ± 標準偏差

また、他のポリイソプレン生産植物においても、本相対定量法が適用できるかを検討した (TABLE 3-8, Fig. 3-7, 3-8)。シス型ポリイソプレンを含む *Ficus erecta* では精製したポリイソプレン含量 (0.011–0.032) の範囲において、良好な相関性 ($R^2=0.97$) を示した。一方、同じくシス型ポリイソプレンを含む *Hevea brasiliensis* では、精製ポリイソプレン量 (0.038–0.056) の範囲において、 $R^2=0.90$ の相関性を示した。

以上の結果より、ポリイソプレン生産植物葉の熱分解から発生するリモネンは、主にポリイソプレンに由来することが明らかとなった。また、この結果に基づいて、ポリイソプレン生産植物の葉を直接 PyGC/MS 分析し、発生するリモネン量を定量することで、ポリイソプレン含量を相対的に定量できることが明らかとなった。また、実用的な面では、本相対定量法では、煩雑な抽出操作や

危険な有機溶媒をほとんど必要とせず、環境や実験者に負荷の少ないポリイソプレン定量分析法である。

TABLE 3-8 抽出/精製定量法および直接定量法より得たポリイソプレンの平均値および範囲

	n ^a	ポリイソプレン含量の範囲 (%)		R ²
		抽出/精製定量法 ^b	直接定量法 ^b	
イヌビワ				
<i>Ficus erecta</i>	5	0.011 - 0.032	0.35 - 1.42	0.97
パラゴムノキ				
<i>Hevea brasiliensis</i>	5	0.038 - 0.056	1.41 - 1.57	0.90

^a 試料数 ; ^b 平均値 (3 回測定)

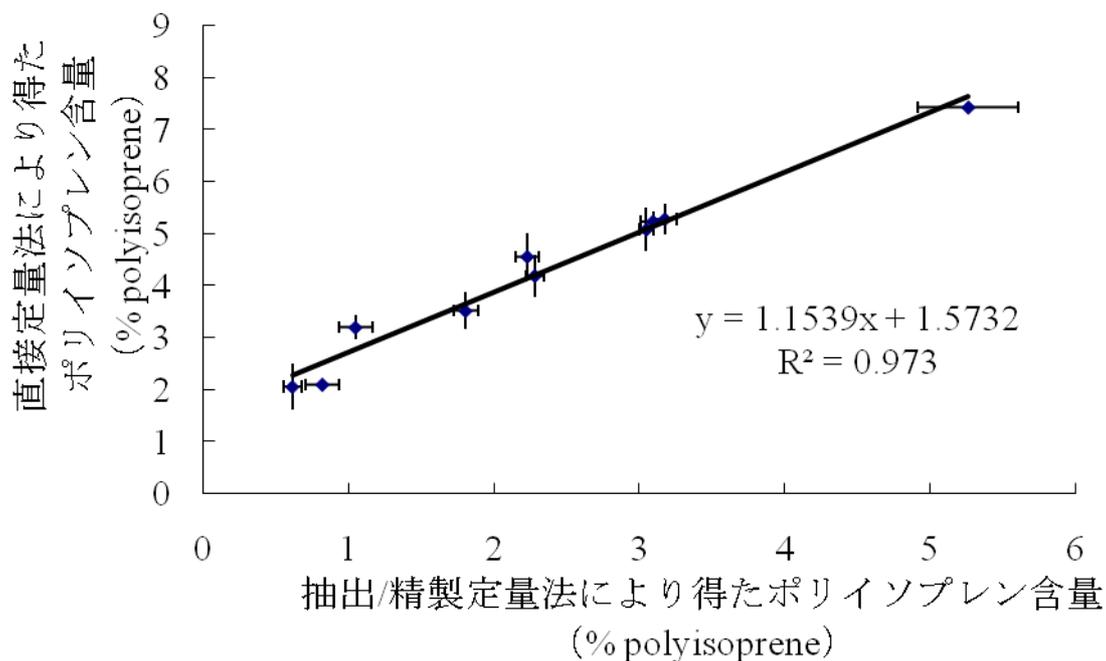


Fig. 3-6 抽出/精製定量法と直接定量法より得たトチュウポリイソプレン含量の相関関係

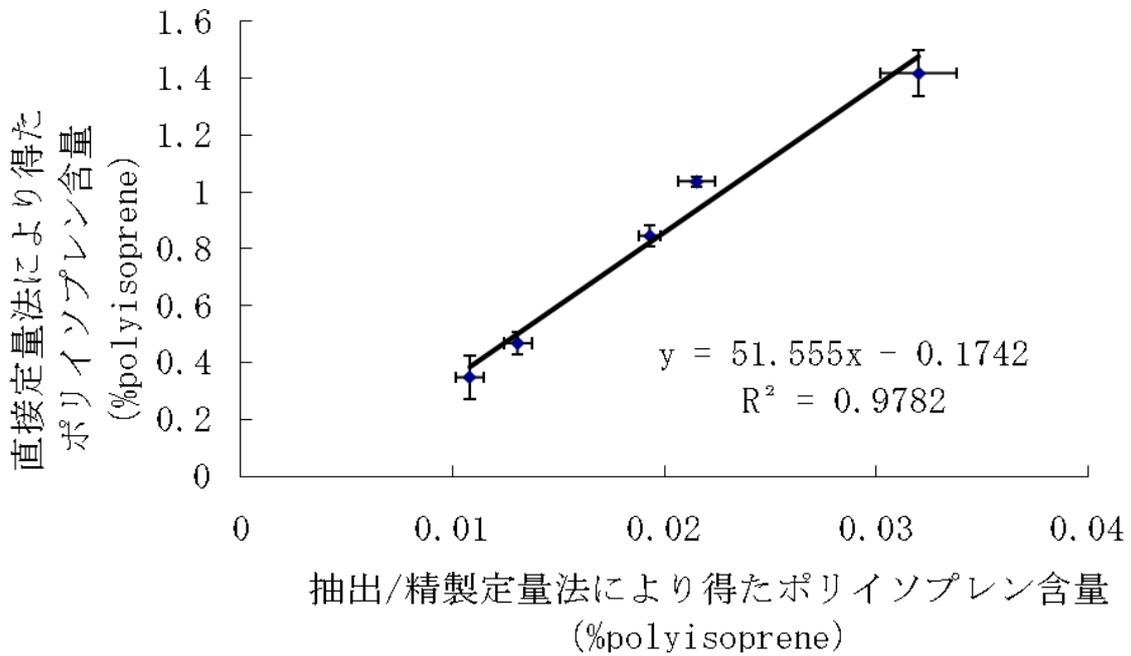


Fig. 3-7 抽出/精製定量法と直接定量法より得たイヌビワポリイソプレン含量の相関関係

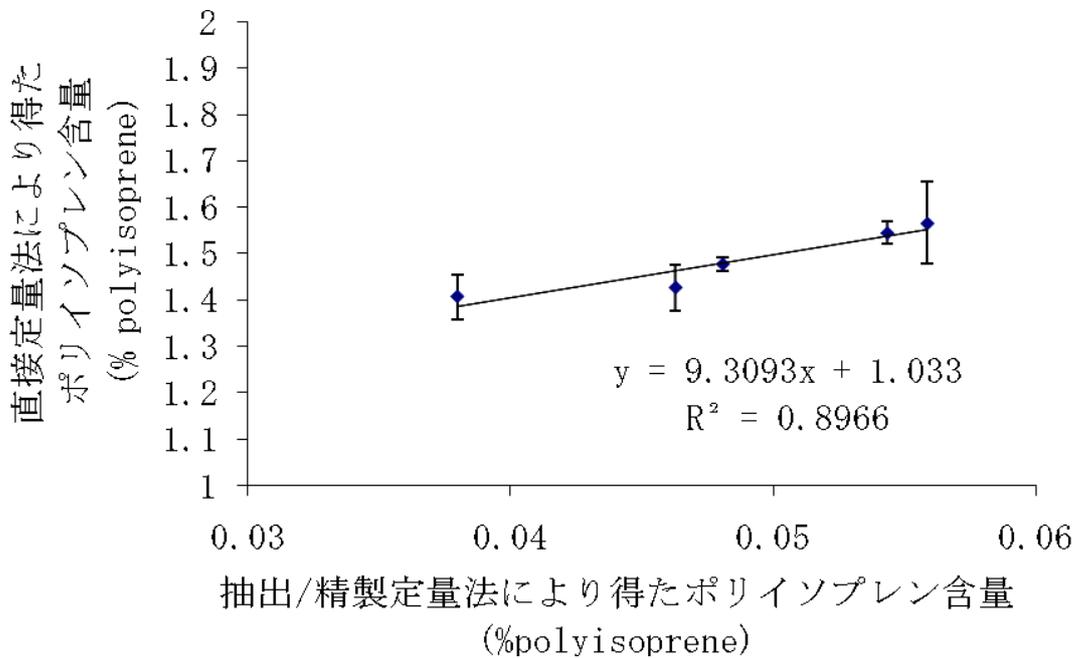


Fig. 3-8 抽出/精製定量法と直接定量法より得たパラゴムノキポリイソプレン含量の相関関係

第4章 近赤外分光分析によるトチュウポリイソプレン簡易定量法

4-1 緒言

第2章では、植物に含まれるポリイソプレンを定量する方法として、ポリイソプレンを抽出・精製し、FT-IR分析に供する方法を開発した。この定量法を用いることで、試料中のポリイソプレン量を絶対値として知ることができるが、煩雑な抽出操作を必要とし、多量の有機溶媒を必要とする。一般的に、低分子代謝物では、各種有機溶媒で抽出、粗精製した後、液体クロマトグラフィー（HPLC）やガスクロマトグラフィー（GC）などのクロマトグラフィーで目的代謝物を分離し、ピーク面積から定量を行う。しかし、有機溶媒で抽出したポリイソプレンを含む画分から、ポリイソプレンと低分子成分（色素成分など）をクロマトグラフィー（サイズ排除クロマトクロマトグラフィー：SEC）で分離することは困難である。そのため、迅速なポリイソプレン量スクリーニング法を開発する上で、溶媒抽出を経ない定量法が必要である。

近赤外光は、波長 0.8-2.5 μm を範囲とする光で、化合物の C-H, N-H, C-O, O-H 結合に吸収される。また、近赤外分光分析は拡散反射光が利用でき、溶媒による抽出の必要がない。このことから、非侵襲の定量分析法として、食品（Nørgaard *et al.*, 2005; Cen *et al.*, 2007; Ikeda *et al.*, 2007）、材料（Corish, 1959; Vilmin *et al.*, 2006; Marinho *et al.*, 2000）、薬品（Bodson *et al.*, 2006; Barajas *et al.*, 2007）などの迅速定量分析法に応用されている。また、小型化が容易であることから、医療や農業において携帯型の NIR の実用性が検証されている。

近赤外分光によるスペクトルは赤外分光と異なり、明瞭なバンドが得られることは少なく、視認しにくいスペクトルから目的成分に関わりのあるバンド領域を見つけ出す必要がある。Partial least squares (PLS) 回帰分析により、そのよ

うな視認しにくいスペクトルから、目的成分量に関わりのあるバンド領域を抽出し、回帰直線を得ることができる。しかし、これら PLS 回帰の直線性はスペクトルの前処理と深く関わっている。本章では、トチュウ葉に含まれるポリイソプレンを FT-NIR で分析し、得られた NIR スペクトルの前処理を検討し、高い予測性能をもつ PLS モデルの構築を試みた。また、本方法を用いて、抽出を必要としない迅速で簡便なポリイソプレン定量分析系を開発した。

4-2 実験方法

4-2-1 植物試料

様々な条件で生育したトチュウから 42 サンプルの葉を採取した。11 サンプルは温室で育てた発芽後 3 か月の苗木から採取した。28 サンプルは大阪大学内の成熟した木から 10 月から 12 月にかけて採取した。3 サンプルは九州大学内の木から 10 月に採取した。サンプルは蒸留水で洗浄した後、主葉脈をメスで切り取り、凍結乾燥に供した。その後、サンプルをワーニングブレンダーで粉砕し、孔径 0.5-1.0 mm のアルミ製ふるいにかけた。

4-2-2 トチュウ葉中ポリイソプレン絶対量の測定

葉中のポリイソプレンの絶対量は、PyGC/MS で調べた。詳細は第 3 章で述べたとおりである。

4-2-3 ポリイソプレンを含まない試料の調製

乾燥、粉砕した葉をエタノールに懸濁し、色素成分に富む可溶性画分をろ過により除去した。このステップを可溶性画分が無色透明になるまで繰り返した。

すべてのエタノール画分を回収し、一つにあわせた。エタノール不溶性画分から、ポリイソプレンをトルエンで 5 回抽出した。ポリイソプレンを含まない粉砕物 (polyisoprene-free homogenate: PIFH) は、トルエン抽出後の残滓にエタノール画分を加え、エバポレーターで乾燥させることにより、調製した。PIFH に既知量のポリイソプレンを加え、実験に使用した。

4-2-4 フーリエ変換近赤外分光分析 (FT-NIR)

0.5から1.0 mgの粉砕した葉をガラス製バイアル (直径 20 mm, 厚み 1.0 mm) に入れ、ガラス製の棒でサンプルを押し付け、サンプル中の間隙を極力、除いた。各サンプルは、FT-NIR (Thermo Electron K.K., Kanagawa, Japan) で 3 回ずつ反射測定した。各スペクトルは、波長 1.67-2.5 μm を 64 回スキャンして得た。FT-NIR は Smart Near-IR UpDRIFT (CaF₂ beamsplitter, InGaAs detector) を使用した。また、ミラー速度は 1.2659 cm s^{-1} である。各スペクトルのデータポイントは 1557 である。

4-2-5 PLS回帰分析

各 3 回の分析で得られたスペクトルを OMNIC 7.2a (Thermo Electron K.K.) で平均化し、PLS回帰分析に使用した。PLS回帰分析は SIMCA-P (version 11.0; Umetrics, Umea, Sweden)を用いて行った。

4-3 結果と考察

4-3-1 トチュウ葉のフーリエ変換近赤外分光 (FT-NIR) スペクトル

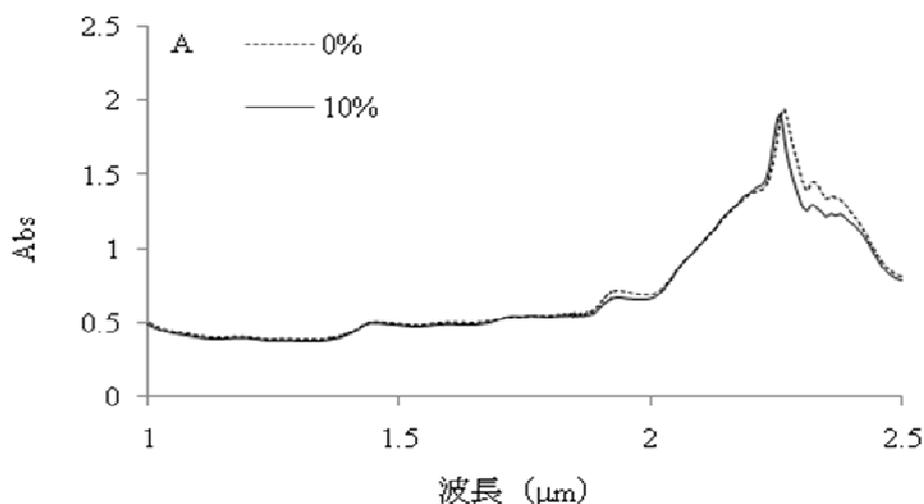
乾燥し、粉砕したトチュウ葉の NIR スペクトルを示した (Fig. 4-1A)。2.0-2.5

μm にかけて、大きなバンドが得られた以外には、特徴的なバンドは観察されなかった。

4-3-2 ポリイソプレンを含まない試料の FT-NIR 分析

不必要なスペクトル領域は、PLS モデルの性能を損なう。データ解析のために使用するトチュウ葉粉砕物のスペクトル領域を絞り込むためには、スペクトル中のトランス型ポリイソプレンのバンド範囲を限定する必要がある。そのため、ポリイソプレンを含まない粉砕物 (polyisoprene free homogenate : PIFH) より得られる NIR スペクトルとこれに既知量のトランス型ポリイソプレンを加えた PIFH のスペクトルを比較することで、トランス型ポリイソプレンのバンド領域を特定した。

PIFH と 10% ポリイソプレンを加えた PIFH の NIR スペクトル、ならびにこのスペクトルを一次微分、また、二次微分したスペクトルを Fig. 4-1A, 1B, 1C に示した。



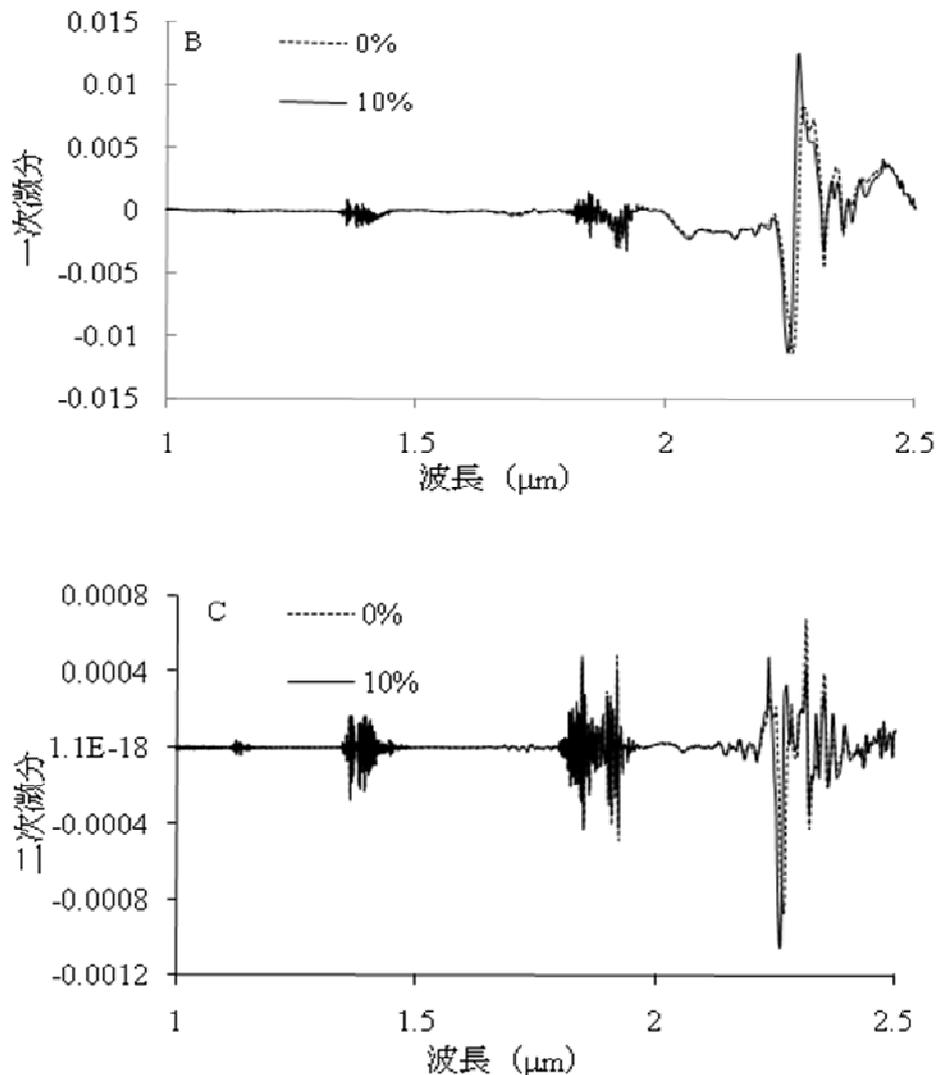


Fig.4-1 ポリイソプレン不含粉砕物 (PIFH) と 10% ポリイソプレンを加えた PIFH のスペクトルの生データ (A), 一次微分 (B), 二次微分 (C).

これらのスペクトルにおいて、PIFH より得られたものとポリイソプレンを加えた PIFH より得られたものとの差異が波長 4000 から 5000 μm に見られた。また、この差は、二次微分スペクトルでより鮮明となった (Fig. 4-1C)。この領域には、CH 伸縮振動や、CH, CH₂, CH₃ の第一結合音が含まれる (Corish, 1959)。また、波長 5000 から 6000 μm にもわずかに差が見えたが、6000 から 10000 μm ではほとんど差が見られなかった。これらのことから、波長 4000 から 5000 μm

がポリイソプレンに由来するバンドが現れる領域と考えられた。

4-3-3 PLS 回帰直線

FT-NIR の未処理スペクトル、一次微分スペクトル、二次微分スペクトルを用いて、PLS 回帰直線を作ることができるか検証した。ケモメトリクスを使った予測のため、0.6 から 5.3%のポリイソプレンを含む 42 のトチュウ葉を FT-NIR 分析に供した (TABLE 4-1. サンプルはキャリブレーションセットとバリデーションセットにそれぞれ 36 セットと 6 セットのデータに分けた。それぞれの平均値と標準偏差がほぼ同じとなり、また、トチュウポリイソプレン含量の範囲を網羅するように分けた (TABLE 4-1)。それぞれの NIR スペクトルデータは autoscale (unit variance scaling) により前処理した。PLS モデルの最適な因子数は、クロスバリデーションにより決定した。

TABLE 4-1 PLS に用いたキャリブレーションおよびバリデーションセット

	サンプル数	ポリイソプレン 含量 (%)	平均	標準偏差
キャリブレーションセット	36	0.6 - 5.3	2.40	1.10
バリデーションセット	6	1.0 - 4.0	2.30	1.30

未処理スペクトル、一次微分スペクトル、二次微分スペクトルの 1.67-2.5, 2.0-2.5 μm の範囲で作成した PLS モデルを検証した (TABLE 4-2)。各モデルの結果は、相関係数 (R²_Y, Q²_Y) と RMSEE (root-mean-square error of estimation) で評価した。また、各モデルの予測能力は RMSEP (root-mean-square error of prediction) で評価した。

未処理スペクトルの 1.67-2.5 μm の領域では、PLS モデルは相関性 (R²_Y) が

極めて低くなった (0.27). トチュウポリイソプレン由来のバンドが現れると予測された領域 (2.0-2.5 μm) では PLS 回帰直線を作成することができなかった. このことから, 未処理のスペクトルでは, PLS 回帰直線を作成できるほど, トチュウポリイソプレン由来のバンドが明確に現れていないと考えられる.

一次微分, 二次微分した 1.67-2.5 のスペクトル, 一次微分した 2.0-2.5 μm のスペクトルとも良好な相関性の PLS モデルを与えたが, RMSEE と RMSEP の差が大きい結果となった. このことは, このモデルの予測性能は低いことを示している. これらのスペクトルの中では, 二次微分した 2.0-2.5 μm のモデルは相関性が高く, RMSEE と RMSEP の差が小さいので, 最も良好なモデルとなった.

二次微分したスペクトル領域で更に, 最適なモデルを作成するため, 2.0-2.5 μm , 1.6-2.0 μm , 1.6-2.5 μm , 1.28-1.54 μm , ならびに 1.67-2.5 μm の二次微分スペクトルに基づく PLS モデルを作成した (TABLE 4-3). 各モデルの結果は, 相関係数と RMSEE で評価した. また, 各モデルの予測能力は RMSEP で評価した. 1.67-2.5 μm のスペクトル領域を使った PLS では, もっとも高い相関性 ($R^2Y=0.99$, $Q^2Y=0.89$), 最も低い RMSEE (0.08) を示したが, もっとも高い RMSEP (0.57) を示した. 一方で, 1.6-2.5 μm のスペクトル領域を使った PLS は高い相関性 ($R^2Y=0.95$, $Q^2Y=0.88$), 低い RMSEE (0.25), RMSEP (0.37) でもっとも性能がよいモデルであった. また, 1.28-1.54 μm のスペクトルでは PLS モデルを構築できなかった. 以上のことから, 1.6-2.5 μm の CH, CH₂, CH₃ 第一倍音や, CH 伸縮振動が PLS モデル構築に重要であると考えられる. 1.6-2.5 μm のスペクトル領域を使って PLS モデル (Fig. 4-2) の相関図を示した.

TABLE 4-2 波長範囲と前処理の最適化

前処理	波長 (μm)	R2Y	Q2Y	RMSEE	RMSEP	Latent ^a
未処理	1.67-2.5	0.27	0.13	0.95	1.03	2
	2.0-2.5 ^b	-	-	-	-	-
一次微分	1.67-2.5	0.99	0.88	0.09	0.35	6
	2.0-2.5	0.92	0.79	0.32	0.90	3
二次微分	1.67-2.5	0.99	0.89	0.08	0.57	3
	2.0-2.5	0.94	0.83	0.28	0.38	2

^a潜在変数の数 ^bモデル作成できず

TABLE 4-3 二次微分スペクトルと波長範囲

波長 (μm)	R2Y	Q2Y	RMSEE	RMSEP	Latent ^a
2.0-2.5	0.94	0.83	0.28	0.38	2
1.6-2.0	0.92	0.85	0.31	0.42	2
1.6-2.5	0.95	0.88	0.25	0.37	2
1.28-1.54 ^b	-	-	-	-	-
1.67-2.5	0.99	0.89	0.08	0.57	3

^a潜在変数の数 ^bモデル作成できず

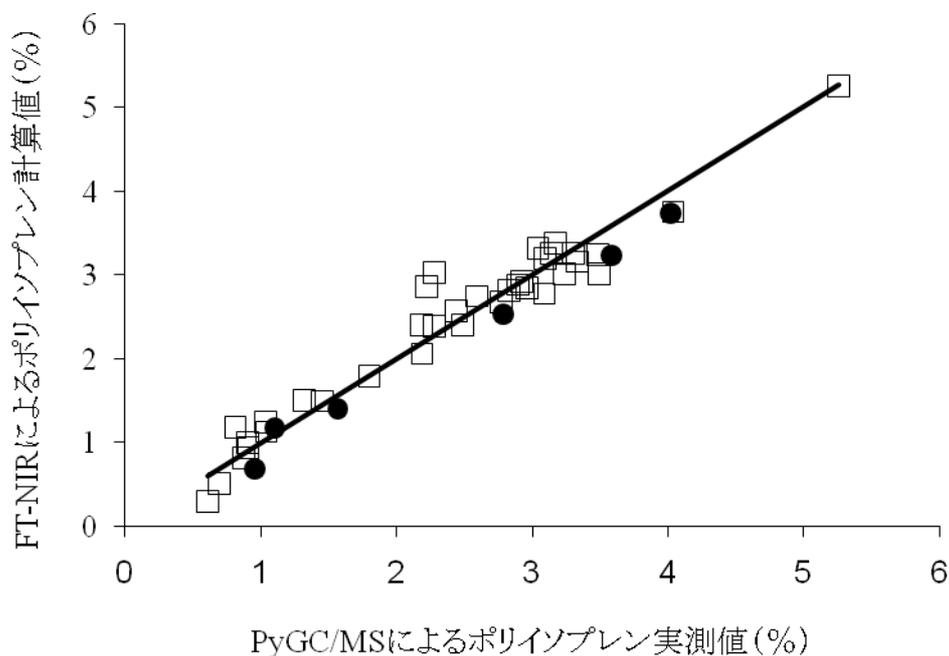


Fig.4-2 PLS 回帰直線 (□) キャリブレーションセット, (●) バリデーションセット

本章では、FT-NIR 分析を用いたトチュウ葉に含まれるトランス型ポリイソプレンの定量分析法を確立した。PLS モデルから、1.6-2.5 μm のスペクトル領域がトチュウポリイソプレンの定量に重要であることが示された。実用的な観点からいえば、FT-NIR 分析は一試料あたり約 3 分と短く、煩雑な抽出操作も必要としない。加えて、FT-NIR 分析は溶媒使用量を減らすことができるので、環境や実験者にとっても負荷の少ない方法である。また、当該手法は、トチュウポリイソプレンだけでなく、パラゴムノキなどのラテックス生産植物中のポリイソプレンの分析にも利用できる有用な手法であると考えられる。さらに、携帯型の NIR を用いることにより、圃場でのポリイソプレン含量の測定が可能になり、栽培条件の検討や品種改良などに効果的に利用できると期待される。

第5章 総括と展望

第2章では、少量のトチュウ葉から再現性よく、ポリイソプレンを抽出する系を確立し、当該抽出系が従来法であるソックスレー抽出法と同等の抽出効率であることを示した。また、フーリエ変換赤外分光分析（FT-IR）を利用することで、簡便で感度の高い植物由来ポリイソプレン定量分析法を開発した。開発した定量分析法を用いることで、トチュウ葉ポリイソプレン含量の季節変動を明らかにし、分子量分布に季節変動があることをポリイソプレン生産植物で初めて明らかにした。当該定量分析法は絶対定量法であり、これまで絶対定量法として使用されてきたソックスレー抽出法よりも迅速かつ感度がよくトチュウポリイソプレン量を定量することが可能となった。

第3章では、熱分解ガスクロマトグラフィー/質量分析法（PyGC/MS）を用いて、植物に含まれるポリプレノールや高分子ポリイソプレン、カロテノイド、ユビキノン-10、ステロールの熱分解物を調べた。ポリプレノール、高分子ポリイソプレンの主な熱分解物であるイソプレンとリモネンは、カロテノイドおよびステロールでは発生しないことを明らかにした。さらに、ポリプレノールと高分子ポリイソプレンから発生するイソプレンとリモネンの量は、ポリプレノールと高分子ポリイソプレンの分子量に応じて変化することを明らかにした。これらの知見を基に、微量（1 mg）の植物乾燥試料を抽出することなく、ポリイソプレン含量をする分析法を確立した。当該分析法は、微量試料中のポリイソプレン量を迅速にスクリーニングできる方法であるので、試料が限られる形質転換植物中のポリイソプレン量を測定するのに適した方法である。

第4章では、近年、注目されているフーリエ変換近赤外分光分析（FT-NIR）を利用して、試料からポリイソプレンを抽出することなく、ポリイソプレン含

量を測定する方法を試みた。FT-NIR によって得られたスペクトルは PLS モデルを作成した。これらのモデルに使用するスペクトルの範囲および微分処理を最適化することで、FT-NIR により植物中ポリイソプレン量を迅速、簡便にスクリーニングする分析法を確立した。当該分析法は抽出を必要とせず、簡便なサンプル調製でポリイソプレン量を測定できることから、生産の現場などで利用できる方法と考えられる。

以上のように、本研究では、これまで迅速で正確な測定、簡便な測定が困難であった植物中ポリイソプレンの定量法を開発し、トチュウポリイソプレンの生産性を向上させる上で必須となる評価法を確立した。それぞれの定量法の比較を TABLE 5-1 に示す。

TABLE 5-1 本論文で開発した定量法の比較

	ソックスレー抽出法/ 秤量法	2-ml 抽出法/FT-IR	FT-NIR	PyGC/MS
試料量 (mg)	150	15	500-1000	1
正確さ	◎	◎	○	△
感度	△	○	△	◎
迅速性	△	○	◎	○
簡便さ	△	○	◎	◎

効果の程度 ◎：高，○：中程度，△：低

次に、本研究で開発した技術を基にして、今後の課題と展望について述べる。

近年、環境問題に対する関心が高まり、地球温暖化の原因と考えられている大気中の炭素を固定する必要性が強く求められている。そのため、生合成を通

して長期的に大気中炭素を固定する植物ポリイソプレンに関心が集まっている。現在、産業的に利用されているポリイソプレンはパラゴム (*H. brasiliensis*)、グアユレー (*Parthenium argentatum*) から採取されているが、我々の研究グループでは、トチュウ (*E. ulmoides*) 由来トランス型ポリイソプレンの産業的利用を目指し、研究を進めている。

植物中のポリイソプレン量は植物の個体差、ならびに生育環境などによって変動するため、合成ポリマーのように同じ収率で得ることは困難である。そのため、工業的に天然ポリイソプレンを利用するためには、葉や果皮などの植物試料中のポリイソプレン量を測定し、収率を把握しておく必要がある。そのため定量法としては、生産性の観点からハイスループット、簡便であることが求められる。第4章で説明した近赤外分光分析を用いた定量法は、これらの要求性能を満たしており、生産の場に応用されれば、定量に要する労力を軽減し、生産性が向上すると期待される。また、当該定量法は、トチュウだけではなく、すでに実用化されている植物であるパラゴムノキおよびグアユレーなどのポリイソプレンでも適用できると考えられる。

植物に由来するポリイソプレンを安定的に生産し、さらに量産するための一つの方法として、ポリイソプレンの生合成機構を解明し、分子育種によってポリイソプレン生合成量を増大させた植物の育種が考えられる。

これまでにパラゴム、グアユレー、イヌビワ (*Ficus erecta*)、トチュウなどのポリイソプレン生産植物において、組織学的、生化学的、分子生物学的にポリイソプレン生合成の研究が行われてきた (Cornish *et al.*, 1990; Cornish, 2001; Kang *et al.*, 2000; Bamba *et al.*, 2002; Madhavan and Benedict, 1984; Espy *et al.*, 2006)。これらの研究を通して、ポリイソプレン生合成にはプレニルトランスフェラーゼだけでなく、ラバーエロンゲーションファクターなどの因子も必要であるこ

とが明らかにされている。

分子育種によりポリイソプレン生合成量を増大させた植物を育種するためには、プレニルトランスフェラーゼだけでなく、その他の因子も必要となる。これらの因子を特定し、ポリイソプレン生合成機構を解明するために、ポリイソプレン生産植物の EST 解析が報告されている (Chow *et al.*, 2007; Ko *et al.*, 2003)。今後は、EST 解析により推定されたポリイソプレン生合成関連遺伝子で形質転換植物をつくり、そのポリイソプレン含量をスクリーニングすることが求められる。しかし、ポリイソプレン生合成機構が研究されている植物の多くは木本植物であり、生育速度が遅いため、ポリイソプレン量のスクリーニングのために多量の試料を確保することは困難である。そのため、第 4 章では微量試料 (植物乾燥試料 1 mg) からポリイソプレン量を相対的に定量できる分析法を熱分解ガスクロマトグラフィー/質量分析器を用いて開発した。この分析法を用いることで、ポリイソプレン量を基に、微量の試料をスクリーニングすることが可能となり、本分析法はポリイソプレン生合成研究の一助となると期待される。

今後、本研究で開発した定量法が活かされ、天然ポリイソプレン生産の改善や、生合成研究が進展することを期待したい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました小林昭雄教授（大阪大学大学院工学研究科）に心から感謝申し上げます。

本論文作成にあたり，懇切なるご助言，ご教示を賜りました福崎英一郎教授（大阪大学大学院工学研究科），金谷茂則教授（大阪大学大学院工学研究科）に深く感謝申し上げます。

再三にわたり貴重なご助言を頂きました馬場健史准教授（大阪大学大学院工学研究科），岡澤敦司先生（大阪大学大学院工学研究科）に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたって，貴重な試料だけではなく，様々なご助言を頂きました中澤慶久博士（日立造船株式会社），原田（中堂菌）陽子研究員（日立造船株式会社）に厚くお礼申し上げます。

日頃より支援して頂いた大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻小林研の諸先輩方，学生の諸氏，事務の方々に感謝の意を表します。

引用文献

- Bamba, T., Fukusaki, E., Kajiyama, S., Ute, K., Kitayama, T., and Kobayashi, A.:** The occurrence of geometric polyprenol isomers in the rubber-producing plant, *Eucommia ulmoides* Oliver. *Lipids*, **36**, 727-732 (2001).
- Bamba, T., Fukusaki, E., Nakazawa, Y. and Kobayashi, A.:** In-situ chemical analysis of *trans*-polyisoprene by histochemical staining and Fourier transform infrared microscopy in a rubber-producing plant, *Eucommia ulmoides* Oliver. *Planta*, **215**, 934-939 (2002)
- Barajas, M., Cassiani, R., Vargas, W., Conde, C., Roperro, J., Figueroa, J., and Romanach, J.:** Near-infrared spectroscopic method for real-time monitoring of pharmaceutical powders during voiding. *Appl. Spectrosc.*, **61**, 490-496 (2007).
- Bodson, C., Dewe, W., Hubert, Ph., and Delattre, L.:** Comparison of FT-NIR transmission and UV-vis spectrophotometry to follow the mixing kinetics and to assay low-dose tablets containing riboflavin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 783-790 (2006).
- Buchanan, R., Swanson, C., Weisleder, D., and Cull, I.:** Gutta-producing grasses. *Phytochemistry*, **18**, 1069-1071 (1979).
- Bushman, B., Scholte, A., Cornish, K., Scott, D., Brichta, J., Vederas, J., Ochoa, O., Michelmore, R., Shintani, D., and Knapp, S.:** Identification and comparison of natural rubber from two *Lactuca* species. *Phytochemistry*, **67**, 2590-2596 (2006).
- Cen, H., Bao, Y., He, Y., and Sun, D.:** Visible and near infrared spectroscopy for rapid detection of citric and tartaric acids in orange juice. *J. Food Eng.*, **82**, 253-260 (2007)
- Chow, K., Wan, K., Isa, M., Bahari, A., Tan, S., Harikrishna, K. and Yeang, H.:** Insights into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* latex.

J. Exp. Bot., **58**, 2429-2440 (2007).

Corish, P.: Analysis of *cis*- and *trans*-1:4 contents of polyisoprenes by near infra-red spectroscopy. Spectrochim. Acta, **15**, 598-604 (1959).

Cornish, K. and Backhaust, R.: Rubber transferase activity in rubber particles of guayule. Phytochemistry, **29**, 3809-3813 (1990).

Cornish, K. and Siler, D.: Characterization of *cis*-prenyl transferase activity localised in a buoyant fraction of rubber particles from *Ficus elastica* latex. Plant Physiol. Biochem., **34**, 377-384 (1996).

Cornish, K., Chapman, M., Nakayama, F., Vinyard, S. and Whitehand, L.: Latex quantification in guayule shrub and homogenate. Ind. Crop. Prod., **10**, 121-136 (1999)

Cornish, K.: Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. Phytochemistry, **57**, 1123-1134 (2001).

Espy, S., Keasling, J., Castellón, J., and Cornish, K.: Initiator-independent and initiator-dependent rubber biosynthesis in *Ficus elastica*. Arch. Biochem. Biophys., **448**, 13-22 (2006).

Faix, O., Bremer, J., Meier, D., and Fortmann, I.: Characterization of tobacco lignin by analytical pyrolysis and Fourier transform-infrared spectroscopy. J. Anal. Appl. Pyrolysis, **22**, 239-259 (1992).

Groves, S. and Lehrle, R.: Natural rubber pyrolysis: study of temperature- and thickness-dependence indicates dimer formation mechanism. J. Anal. Appl. Pyrolysis, **19**, 301-309 (1991).

Hayman, E., Yokoyama, H., Bai, K.: Stimulation of plant growth and gutta content in *Eucommia ulmoides* Oliv. by 2-diethylaminoethyl-3,4-dichlorophenylether[DCPTA]. Plant Growth Regulation, **14**, 79-82 (1994).

- Hosler, D., Burkett, S., Tarkanian, M.:** Prehistoric polymers: rubber processing in ancient Mesoamerica. *Science*, **284**, 1988-1991 (1999).
- Ikeda, T., Kanaya, S., Yonetani, T., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.:** Prediction of Japanese green tea ranking by Fourier transform near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9908-9912 (2007).
- Kang, H., Kang, M. and Han, K.:** Identification of natural rubber and characterization of rubber biosynthetic activity in fig tree. *Plant Physiology*, **123**, 1133-1142 (2000).
- Kaushik, V. and Sharma, Y.:** Quantitative analysis of natural rubber, polybutadiene rubber and styrene/butadiene rubber blends by infra-red spectroscopy. *Polym. Bull.*, **13**, 373-377 (1985).
- Ko, J., Chow, K. and Han, K.:** Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Mol. Biol.*, **53**, 479-492 (2003)
- Lee, Y., Lee, W., Cho, S., Kim, I., and Ha, C.:** Quantitative analysis of unknown compositions in ternary polymer blends: A model study on NR/SBR/BR system. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **78**, 85-94 (2007).
- Madhavan, S. and Benedict, C.:** Isopentenyl pyrophosphate *cis*-1,4-polyisoprenyl transferase from guayule (*Parthenium argentatum* Gray). *Plant Physiol.*, **75**, 908-913 (1984).
- Marinho, J. and Moteiro, E.:** Analysis of natural *cis*- and *trans*-polyisoprene mixtures by near-infrared spectrophotometry. *Polym. Test.*, **19**, 667-672 (2000).
- Marques, G., Gutiérrez, A., and del Río, J.:** Chemical characterization of lignin and lipophilic fractions from leaf fibers of curaua (*Ananas erectifolius*). *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1327-1336 (2007).

- Mooibroek, H. and Cornish, K.:** Alternative sources of natural rubber. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 355-365 (2000).
- Nørgaard, L., Hahn, M., Knudsen, L. Farhat, I., Engelsen, S.:** Multivariate near-infrared and Raman spectroscopic quantifications of the crystallinity of lactose in whey permeate powder. *Int. Dairy J.*, **15**, 1261-1270 (2005).
- Peng, J., Su, Y., Sun, Q., Yue, J., Nakazawa, Y. and Sun, R.:** Content and molecular-weight distribution of EU rubber from *Eucommia ulmoides* leaves. *Forest Prod. J.*, **57**, 65-67 (2007).
- Roth, W., Carr, M., Davis, E., and Bagby, M.:** New sources of gutta-percha in *Garrya flavescens* and *G. wrightii*. *Phytochemistry*, **24**, 183-184 (1985).
- Schlesinger, W. and Leeper, H.:** Chicle. *cis*- and *trans*-polyisoprenes from a single plant species. *J. Ind. Eng. Chem.*, **43**, 398-403 (1951).
- Suwanmanee, P., Sirinupong, N. and Suvachittanont, W.:** Regulation of the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene in *Hevea brasiliensis* (B.H.K.) Mull. Arg. *Plant Science*, **166**, 531-537 (2004).
- Tangpakdee, J., Tanaka, Y., Shiba, K., Kawahara, S., Sakurai, K., and Suzuki, Y.:** Structure and biosynthesis of *trans*-polyisoprene from *Eucommia ulmoides*. *Phytochemistry*, **45**, 75-80 (1997).
- van Beilen, JB. and Poirier, Y.:** Establishment of new crops for the production of natural rubber. *Trends Biotechnol.*, **25**, 522-529 (2007).
- Wang, F., Dettloff, M., Null, M., and White, J.:** Qualitative and quantitative analysis of a thermoset polymer, poly(benzoxazine), by pyrolysis-gas chromatography. *J. Chromatogr A*, **886**, 217-224 (2000).
- Veatch, M., Ray, D., Mau, C., and Cornish, K.:** Growth, rubber, and resin evaluation

of two-year-old transgenic guayule. *Ind. Crop. Prod.*, **22**, 65-74 (2005).

Venkatachalam, P., Jayashree, R., Rekha, K., Sushmakumari, S., Sobha, S., Jayasree, P., Kala, R., and Thulaseedharan, A.: Rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg). *Methods in Molecular Biology*, **344**, 153-164 (2006).

Vilmin, F., Dussap, C., and Coste, N.: Fast and robust method for the determination of microstructure and composition in butadiene, styrene-butadiene, and isoprene rubber by near-infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, **60**, 619-630 (2006).

Warneke, S., Arenskötter, M., Tenberge, K., and Steinbüchel, A.: Bacterial degradation of poly(*trans*-1,4-isoprene) (*gutta percha*). *Microbiology*, **153**, 347-356 (2007).

Zhang, X., Cheng, C., Zhang, M., Lan, X., Wang, Q., and Han, S.: Effect of alkali and enzymatic pretreatments of *Eucommia ulmoides* leaves and barks on the extraction of gutta percha. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 8936-8943 (2008).

小林昭雄, 福崎英一郎, 馬場健史: トチュウ (*Eucommia ulmoides* Oliver) の工業原料, ポリイソプレノイド. 日本農芸化学会 2001 年度大会

西河貴史, 村吉美智子, 中澤慶久, 馬場健史, 玉泉幸一郎, 福崎英一郎, 小林昭雄: トランス型ゴム産生植物トチュウの形質転換. 日本農芸化学会 2003 年度大会

西河貴史, 福崎英一郎, 山下敦士, 服部正平, 小笠原直毅, 中澤慶久, 馬場健史, 小林昭雄: トランス型ゴム産生植物トチュウ (*Eucommia ulmoides*) の EST 解析. 日本農芸化学会 2005 年度大会

発表論文

Takeo, S., Bamba, T., Nakazawa, Y., Fukusaki, E., Okazawa, A. and Kobayashi, A.: Quantification of *trans*-1,4-polyisoprene in *Eucommia ulmoides* by Fourier transform infrared spectroscopy and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. J. Biosci. Bioeng., **105**, 355-359, 2008

Takeo, S., Bamba, T., Nakazawa, Y., Fukusaki, E., Okazawa, A. and Kobayashi, A.: A high-throughput and solvent-free method for measurement of natural polyisoprene content in leaves by Fourier transform near infrared spectroscopy. J. Biosci. Bioeng., **106**, 537-540, 2008

Takeo, S., Bamba, T., Fukusaki, E., Okazawa, A. and Kobayashi, A.: Rapid screening method to compare polyisoprene content in plants by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. (submitted to Biosci. Biotechnol. Biochem.)

Fukusaki, E., Takeo, S., Bamba, T., Okumoto, H., Katto, H., Kajiyama, S. and Kobayashi, A.: Biosynthetic pathway for the C45 polyprenol, solanesol in tobacco. Biosci. Biotechnol. Biochem., **68**, 1988-1990, 2004

Sando, T., Takeo, S., Watanabe, N., Okumoto, H., Kuzuyama, T., Fukusaki, E. and Kobayashi, A.: Cloning and Characterization of Non-Mevalonate Pathway Genes in Natural Rubber Producing Plant, *Hevea brasiliensis*. Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 2903-2917, 2008

Hasunuma, T., Takeno, S., Hayashi, S., Sendai, M., Bamba, T., Yoshimura, S., Tomizawa, K., Fukusaki, E. and Miyake, C.: Overexpression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene in chloroplast contributes to increment of isoprenoid production. *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 518-526, 2008