

Title	パラゴムノキにおける天然ゴムの生合成と蓄積に関する研究
Author(s)	山東, 智紀
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49581">https://hdl.handle.net/11094/49581</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	山 東 智 紀
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 22892 号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	パラゴムノキにおける天然ゴムの生合成と蓄積に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 小林 昭雄 (副査) 教授 福崎英一郎 教授 福井 希一 教授 原島 俊 教授 仁平 卓也 教授 野地 博行 教授 金谷 茂則

## 論文内容の要旨

パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) は 2000 種以上存在するゴム産出植物の中で、最もゴムの生産性が高く、東南アジアを中心に広く栽培されている。本種の樹皮を傷つけるタッピングにより得られた樹液 (latex) を凝固させたものは天然ゴムと呼ばれ、主成分のシスポリイソプレンと、数%の非ゴム成分が含まれている。天然ゴムは、合成ゴムでは代替できない優れた物理的特性を有し、工業原料として必要不可欠なものである。近年の BRICs 諸国の自動車産業の発展に伴い、ゴムの消費量が増大しており、天然ゴムの生産量増大が強く求められている。我々の研究室では NEDO プロジェクトの一環として、代謝工学的手法による天然ゴムの高機能化・生産性向上を目指した基盤技術開発に取り組んでいる。パラゴムノキにおいて代謝工学的手法を活用するには、ゴム生合成に関与する分子生物学的知見と天然ゴムの産生・蓄積に関わる組織・細胞レベルでの細胞組織学的知見が必要不可欠である。しかしながら、パラゴムノキの樹の中における天然ゴムの生合成メカニズムや産生・蓄積部位などに関して、未だに不明な点が多かった。そこで、本研究では、1. 天然ゴムの基質となるイソペンテニルニリン酸 (IPP) の 2 つの生合成経路であるメバロン酸 (MVA) 経路と非メバロン酸 (MEP) 経路の生合成遺伝子を明らかにし、天然ゴム合成への関与を明らかにすることと、2. 天然ゴムの蓄積に重要な乳管組織の詳細な構造観察に資する手法を開発することを目的とした。

第2章のパラゴムノキの MVA 経路遺伝子群の単離と特性解析では、パラゴムノキの EST 情報および RACE 法により、IPP 生合成に関与する MVA 経路酵素遺伝子の候補配列 6 種類 10 個の全長配列を取得した。組織別の遺伝子発現解析により、MVA 経路遺伝子が他の組織に比べて latex で高発現していることを明らかにし、本経路のゴム合成への関与が示唆された。また、酵母の MVA 経路遺伝子破壊株を用いた相補性試験により、*HbMVK* と *HbMGR5* を除き、パラゴムノキの MVA 経路遺伝子が酵母内で機能することを確認した。

第3章のパラゴムノキの MEP 経路遺伝子群の単離と特性解析では、同様にパラゴムノキの EST 情報と degenerate PCR により、近年新たに発見された IPP 生合成経路である MEP 経路遺伝子の候補配列 7 種類 10 個の全長配列を取得した。アライメント解析により、いずれの MEP 経路遺伝子もプラスチド移行配列を保持していることが明らかとなった。また、大腸菌の MEP 経路遺伝子破壊株を用いた相補性試験により、*HbDXR*、*HbCMS1* & 2、*HbMCS1* & 2 が大腸菌内で機能することを確認した。組織別の遺伝子発現解析により、*HbDXS2* 遺伝子が他の MEP 経路遺伝子と比較して latex で高発現していることを明らかにした。

また、MEP 経路の中間体である [1-<sup>13</sup>C]1-deoxy-D-xylose triacetate を用いた取込み実験により、MEP 経路遺伝子は天然ゴム生合成に関与しないことを明らかにした。

第4章のパラゴムノキにおける乳管組織の詳細構造解析とゴム生合成関連タンパク質の局在解析では、Nile red 染色組織のスペクトル共焦点レーザー顕微鏡 (SCLSM) 観察により画像取得し、蛍光スペクトルの相違に基づいて蛍光分離することにより、シスポリイソプレン特異的な蛍光の分離が可能となった。また、厚試料を断層撮影後、蛍光分離し三次元構築することにより、これまで観察が困難であった層別の乳管組織の全体構造を抽出することが可能となった。これにより、乳管組織や放射組織の画像解析が可能となり、組織学的観察結果の定量的解析が可能となった。さらに本手法と抗 SRPP 抗体を用いた免疫染色法により、乳管組織の構造とゴム合成能の関係性を明らかにした。乳管組織は、形成層近傍では構造的に未発達であるが、代謝物の供給が活発でゴム合成能が高く、その後、形成層からの移行距離の増加に伴い、乳管間の吻合の増加によりネットワーク構造が発達するが、放射組織の過度な分裂生長により代謝物供給が減り、ゴム合成能が減少する。さらに師部組織の二次分裂に伴う横方向の張力により、乳管組織は最終的に引き裂かれ、ゴム合成能も消失することが示された。

本研究の第2章、第3章において、パラゴムノキにおいて、MVA 経路、MEP 経路の関連遺伝子を単離し、その発現ならびに取り込み実験より、ゴムの生合成は latex 中で MVA 経路由来の IPP を用いて生合成されることを明らかにした。また、第4章において、乳管組織の発生から生長、崩壊までの様子を詳細に捉え、構造変化に伴う内部のゴム合成能の低下を初めて明らかにした。また、latex の効率的な産生には、乳管間の連結の増加によるネットワーク構造の充実と代謝物供給に関与する放射組織の分裂生長のバランスが重要であることが示唆された。

本研究で確立した新しい乳管組織観察法を用い、ゴム産生能の異なる品種間や個体間における組織構造と産生能の関係の情報を集積することで、パラゴムノキにおける天然ゴム生産性の早期評価への貢献が期待できる。さらに、今後、レーザーマイクロダイセクションや顕微質量分析等の技術を用いて、同一植物体内の乳管組織を対象に遺伝子発現やゴム分子量を層別に比較解析することで、ゴム生合成機構解明に繋がる新知見が得られるものと期待される。さらに、パラゴムノキにおける遺伝子組換え技術の確立や乳管特異的なプロモーターが利用可能となれば、MVA 経路遺伝子を乳管特異的に高発現させることにより、天然ゴムの増産が期待できる。また、同様に MEP 経路遺伝子を乳管特異的に発現させることで、非ゴム成分で酸化防止剤として有用なトコトリエンオールやカロテノイドを増産し、天然ゴムの高機能化への貢献も期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

天然ゴムは、合成ゴムでは得られない特有の物性を有した重要な原材料である。そのため、近年の自動車産業の発展に伴い、天然ゴムの生産量増大が強く求められている。本論文は、パラゴムノキの代謝工学的手法による天然ゴムの高機能化・生産性向上を目指す上で必要不可欠なゴム生合成の解明と天然ゴムの産生・蓄積に関わる組織・細胞レベルでの構造を明らかにすることを目指している。まず、天然ゴムを含むイソプレノイドの構成単位となるイソペンテニルニリン酸 (IPP) の生合成に関与するメバロン酸 (MVA) 経路と非メバロン酸 (MEP) 経路の 2 経路に関わる遺伝子群を網羅的にクローニングし、その機能確認を試みている。次に <sup>13</sup>C ラベル化合物を用いた取込み実験を行うと共に、組織毎の遺伝子発現解析によりパラゴムノキの天然ゴムの構造単位である IPP の生合成経路の特定を試みている。さらに、天然ゴムの産生・蓄積に重要な役割を果たしている乳管組織の詳細な発生課程を明らかにするため、新しい組織観察手法の確立を試み、当該技術を用いて新知見を得ている。これら成果を要約すると以下のとおりである。

- (1) パラゴムノキの IPP 生合成経路である MVA 経路遺伝子群 6 種類 10 個をクローニングし、酵母変異株を用いた相補性試験により 8 個について機能を確認している。
- (2) 同様に別の IPP 生合成経路である MEP 経路遺伝子群 7 種類 10 個をクローニングし、大腸菌変異株を用いた相補性試験により 5 個について機能を確認している。ラベル化合物を用いた取込み実験により、パラゴムノキの天然ゴムは MVA 経路のみに由来し、MEP 経路は関与しないことを明らかにしている。しかし、MEP 経路が、Latex 中のカロテノイドの生合成に関与することを明らかにしている。
- (3) 蛍光プローブ Nile red を用いるスペクトル共焦点レーザー顕微鏡 (SCLSM) 観察の有為性を示し、乳管組織の立体画像抽出により定量的な組織学的観察を可能としている。
- (4) 上記手法を用い、乳管組織の発生から生長・崩壊までの構造的な変化を明らかにしている。

(5) ゴム合成に関与する **Small Rubber Particle Protein (SRPP)** に対する抗体を用いた免疫染色により、組織内でのゴム合成部位を明らかにしている。

以上のように、本論文は、パラゴムノキの天然ゴム生成に関与する IPP 生合成経路が MVA 経路であることを特定するとともに、新しい組織学的な観察手法を確立し、乳管組織の構造とゴム合成能の関連性を明らかにしており、本研究で確立した新しい乳管組織観察法を用い、ゴム産生能の異なる品種間や個体間における組織構造と産生能に関する情報を集積することで、パラゴムノキの天然ゴム生産性の迅速な評価系として期待できる。さらに、パラゴムノキの遺伝子組換え技術の確立や乳管特異的なプロモーターが利用可能となれば、MVA 経路遺伝子を乳管特異的に高発現させることにより、天然ゴムの増産が期待できる。また、同様に MEP 経路遺伝子を乳管特異的に発現させることで、非ゴム成分で酸化防止剤として有用なトコトリエノールやカロテノイドの増産を可能とし、天然ゴムの質的向上に貢献できるものと期待される。また、これら一連の研究は、パラゴムノキの代謝工学的研究の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。