

博士論文

イチジク由来 **Rubber elongation factor** および **Small rubber particle protein** の クローニングと機能解析

2019

秋田大学大学院工学資源学研究科
資源学専攻環境資源サイクル工学講座

横田 早希

目 次

第 1 章 序論	1
1.1 天然ゴム需給の動向	1
1.2 <i>Hevea</i> 天然ゴムについて	3
1.3 <i>Hevea</i> 天然ゴムのモルフォロジー	8
1.4 <i>Hevea</i> 以外のゴム生産植物について	10
1.5 ゴム粒子関連タンパク質 ~REF/SRPP ファミリータンパク質~	13
1.6 RNAi を利用した REF/SRPP ファミリータンパク質の機能解析	16
1.7 <i>Hevea</i> 由来 REF および SRPP の凝集特性について	17
1.8 本研究の目的	18
1.9 論文の構成	20
参考文献	21
第 2 章 イチジクラテックス由来 REF/SRPP 遺伝子 (<i>FcREF/SRPP-1, -2</i>) のクローニング	25
序	25
2.1 実験操作	
2.1.1 イチジクラテックスの採取	27
2.1.2 cDNA の調製	28
2.1.3 <i>FcREF/SRPP-1</i> および <i>FcREF/SRPP-2</i> 遺伝子断片の調製	29
2.1.4 pCold- <i>FcREF/SRPP-1 fragment</i> および pCold- <i>FcREF/SRPP-2 fragment</i> の調製	31
2.1.5 DNA シーケシング	33
2.2 結果と考察	
2.2.1 <i>FcREF/SRPP-1</i> および <i>FcREF/SRPP-2</i> 遺伝子断片の調製	35
2.2.2 pCold- <i>FcREF/SRPP-1 fragment</i> および pCold- <i>FcREF/SRPP-2 fragment</i> の調製	38
2.2.3 DNA シーケシング	40
2.2.4 <i>FcREF/SRPP-1</i> および <i>FcREF/SRPP-2</i> の塩基配列および推定アミノ酸 配列の比較	43

参考文献	59
第3章 組換え大腸菌による FcREF/SRPP-1, -2 の発現と凝集特性解析	60
序	60
3.1 実験操作	
3.1.1 FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 発現プラスミドの調製	61
3.1.2 組換えタンパク質 FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 の 発現と精製	62
3.1.3 組換えタンパク質 HbREF の発現と精製	64
3.1.4 組換えタンパク質 FcREF/SRPP-1, FcREF/SRPP-2 および HbREF の分析	64
3.1.5 FcREF/SRPP-1, FcREF/SRPP-2 および HbREF の凝集特性解析	65
3.1.6 円二色性スペクトルの測定	66
3.2 結果と考察	
3.2.1 組換えタンパク質 FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 の調製	67
3.2.2 FcREF/SRPP-1, FcREF/SRPP-2 および HbREF の凝集特性解析	70
3.2.3 円二色性スペクトルと二次構造予測	74
3.3 まとめ	79
参考文献	80
第4章 anti-FcREF/SRPP 抗体を用いたイチジクゴム中のタンパク質の分析 およびイチジクゴムの相分離構造の解析	81
序	81
4.1 実験操作	
4.1.1 anti-FcREF/SRPP 抗体の作製と確認	82
4.1.2 <i>F. carica</i> 固体ゴムから抽出したタンパク質の分析	82
4.1.3 <i>Hevea</i> 固体ゴムの調製	83
4.1.4 <i>F. carica</i> および <i>Hevea</i> ゴムの元素分析	84
4.1.5 <i>F. carica</i> および <i>Hevea</i> 固体ゴムの相分離構造の観察	84

4.1.6 界面活性剤で洗浄した <i>Hevea</i> ゴムの調製と洗浄画分のタンパク質分析	84
4.1.7 エステル交換 <i>F. carica</i> ゴムの調製と分子量分布の測定	85
4.2 結果と考察	
4.2.1 anti-FcREF/SRPP 抗体の確認	88
4.2.2 <i>F. carica</i> 固体ゴムから抽出したタンパク質の分析	89
4.2.3 <i>F. carica</i> と <i>Hevea</i> ゴムの窒素含有率の比較	92
4.2.4 <i>F. carica</i> および <i>Hevea</i> 固体ゴムの相分離構造の比較	93
4.2.5 界面活性剤で洗浄した <i>Hevea</i> ゴムの TEM 観察とタンパク質の分析	98
4.2.6 <i>F. carica</i> ゴムのエステル交換による分子量分布への影響	100
4.3 まとめ	103
参考文献	107
第 5 章 出芽酵母における HbREF および FcREF, FcSRPP の発現と酵母脂質代謝への影響	109
序	109
5.1 実験操作	
5.1.1 プラスミドの調製	110
5.1.2 出芽酵母の形質転換	116
5.1.3 組換えタンパク質 FcREF, FcSRPP および HbREF の発現確認	116
5.1.4 FcREF, FcSRPP および HbREF の細胞内局在解析	117
5.1.5 フローサイトメトリーによる細胞内脂質蓄積の定量	118
5.1.6 培地中のグルコース濃度の測定	118
5.1.7 脂質分析	119
5.1.8 MTT アッセイ	120
5.1.9 フルコナゾール耐性試験	120
5.2 結果と考察	
5.2.1 組換え酵母の培養と FcREF, FcSRPP および HbREF の発現確認	121
5.2.2 FcREF, FcSRPP および HbREF の細胞内局在解析	123
5.2.3 フローサイトメトリー分析による脂質蓄積量の比較	126
5.2.4 貯蔵脂質の分析	129

5.2.5 フルコナゾール耐性.....	132
5.3 まとめ.....	133
参考文献.....	136
第 6 章 総括.....	138
学位論文を構成する公表論文.....	141
謝辞.....	142

第 1 章

序 論

1.1 天然ゴム需給の動向

天然ゴムおよび合成ゴムは、自動車や航空機のタイヤ、医療用手袋などの様々なゴム製品の原材料として利用されている。天然ゴムは主にトウダイグサ科のパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*, 本論文では以下 *Hevea* と略す) の乳管細胞における細胞質であるラテックスから生産される。*Hevea* 天然ゴムは弾性や耐摩耗性などの機械的特性に優れ、未加硫状態での引っ張り強さであるグリーン強度が高いという特徴を持ち、合成ゴム研究が発達した現在でもゴム消費量のうちの約 4 割は天然ゴムが占める。しかし、*Hevea* の栽培はタイやインドネシアなど熱帯の一部地域に限定され (Fig. 1-1), 我が国の天然ゴム資源は 100% 輸入に依存している。このことから、天然ゴムの国内需給は国内の景気動向のみならず世界需給によっても左右される。また、天然ゴムは農産物であり生産地域も偏っていることから季節変動や自然災害などの影響を受けやすい。一方で、近年、中国やインドをはじめとする新興国では道路インフラが整備されモータリゼーションが急速に進んでおり、世界の天然ゴム需要は今後さらに高まることが予想される。これらの背景から、天然ゴム資源の安定調達世界的に大きな課題である。



Fig. 1-1. Natural rubber-producing areas of the world. (Reprinted with permission from TOCOM. Copyright Tokyo Commodity Exchange, Inc.)

1.2 *Hevea* 天然ゴムについて

天然ゴムはイソプレン単位 (C_5H_8) が直鎖状に *cis* 型に縮合した *cis*-1,4-ポリイソプレンを主骨格とするイソプレノイドであり、ラテックス中ではゴム粒子として存在する。ゴム粒子は *cis*-1,4-ポリイソプレンの疎水性コアがリン脂質一重膜とタンパク質で覆われた構造をしている (Fig. 1-2)。*Hevea* ラテックスでは大きさが約 $1\ \mu\text{m}$ のゴム粒子である Large rubber particle と、 $10\sim 800\ \text{nm}$ 程度の Small rubber particle が共に分散している[1]。*Hevea* より採取されたラテックス (ゴム成分量: $30\sim 40\%$) は、通常、凝固防止のためアンモニアが添加された後、遠心分離によってゴム成分を 60% に濃縮した高アンモニアラテックスとして、もしくは凝固したゴムを洗浄し成型した固形ゴムとして流通している。これらの *Hevea* 天然ゴムにはゴム成分である *cis*-1,4-ポリイソプレンの他に、タンパク質やリン脂質、糖質などの非ゴム成分が含まれ、*Hevea* 天然ゴムは Fig. 1-3 に示すような、タンパク質やリン脂質を介した分岐構造を有していると推定されている[2] [3]。

天然ゴムの分子量測定には、一般に、ゴムをテトラヒドロフラン (THF) などの有機溶媒に溶解し、THF 不溶分をフィルターでろ過して除いた後、基準物質に対する相対分子量をサイズ排除クロマトグラフィー: size exclusion chromatography, SEC (ゲル浸透クロマトグラフィーとも呼ばれる) で決定する方法が取られている[4]。この方法で測定した場合、*Hevea* 天然ゴムは分子量約 30 万と 200 万にピークを持つ二峰性の分子量分布を示す。また、この分子量分布は樹齢によって異なり、成熟した樹木では高分子量側のピークが主要ピークであるのに対し、樹齢 1 ヶ月から 3 年の苗木から取得したゴムは低分子量側のピークが主要ピークであり、樹齢とともに高分子量側のピークが増大することが知られている[5]。また、成熟した樹木より得られた高アンモニアラテックスから調製した *Hevea* ゴムを脱タンパク質すると、低分子量側のピークがわずかに増大し、脱タンパク質とエステル交換を行うと低分子量側のピークが顕著に増大する[6]。さらに、THF などの有機溶媒に不溶なゴム分 (ゲル画分) の含有率は脱タンパク質によっても、エステル交換によっても大幅に減少する。また、ゲル画分を脱タンパク質およびエステル交換することで有機溶媒に溶解させたゴム成分の分子量分布は、元の有機溶媒可溶性画分 (ゾル画分) と比較して低分子量側のピークが大きい[6]。したがって、ゲル画分には Fig. 1-3 のような分岐構造を有するゴムが多く含まれると考えられている[6]。

一方で、SEC 法による分子量測定では、同一の溶出時間に溶出したポリマーでも分子

量が異なることがしばしば起こる。これは構造の異なる試料では分子鎖の屈曲性や溶離液との親和性が異なり、これが溶出時間に影響すること、また、試料とカラム内の充填ゲルとの間で相互作用が生じること等に起因する。このような場合に近年よく用いられる手法として、ポリマーの絶対分子量と回転半径を直接求めることが可能な多角度光散乱検出器を組み合わせた、サイズ排除クロマトグラフィー - 多角度光散乱 (size exclusion chromatography-multi angle light scattering, SEC-MALS) 法がある。近年、*Hevea* 天然ゴムの分子量測定においても本手法を用いた例が報告されており、THF に不溶なゲル画分 (マクロゲル) の他に、THF に可溶なゲル画分にも微細なゲル (マイクロゲル) が含まれ、分析前にカラムを 0.3% tetrabutylammonium bromide (TBABr) を含む THF で処理することでマイクロゲルに由来する 2 つのピークがより速い溶出時間に検出されること (Fig. 1-4)、つまり *Hevea* 天然ゴムのゲル画分にはランダムコイルの *cis*-1,4-ポリイソプレンの他に、おそらく分岐構造を有する *cis*-1,4-ポリイソプレンを含むマイクロサイズの凝集体が存在することが示唆された[7] [8]。今後、マイクロゲルにおける詳細なゴムの構造やマクロゲルとの構造の違い、マイクロゲルの存在がゴム物性に及ぼす影響等を明らかにしていくことが課題として挙げられている。

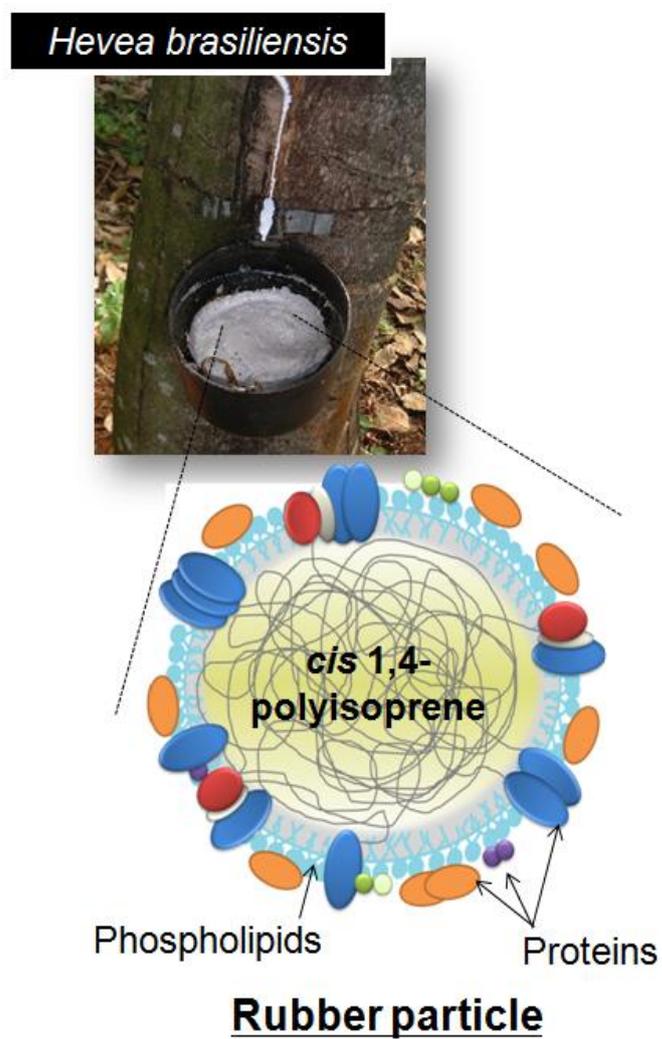


Fig. 1-2. Schematic representation of a rubber particle in latex.

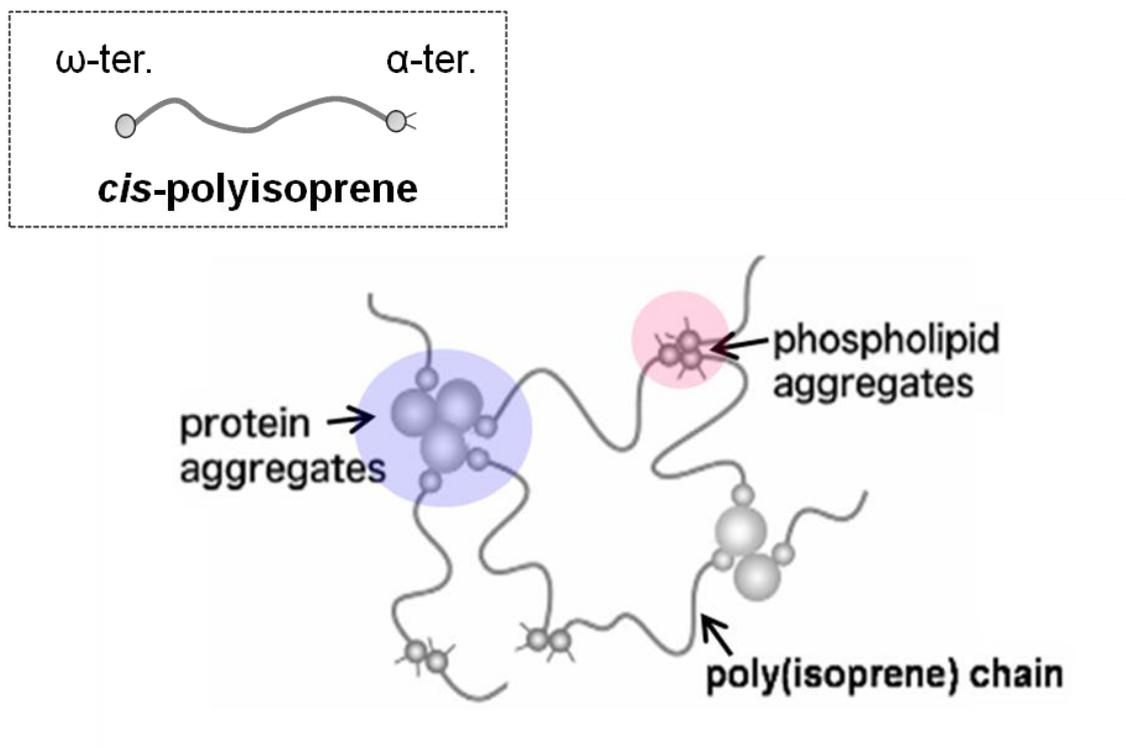


Fig. 1-3. Presumed structure of branching points in natural rubber. (Adapted with permission from Karino, T., et al., *Biomacromolecules*, 2007 [3]. Copyright (2007) American Chemical Society.)

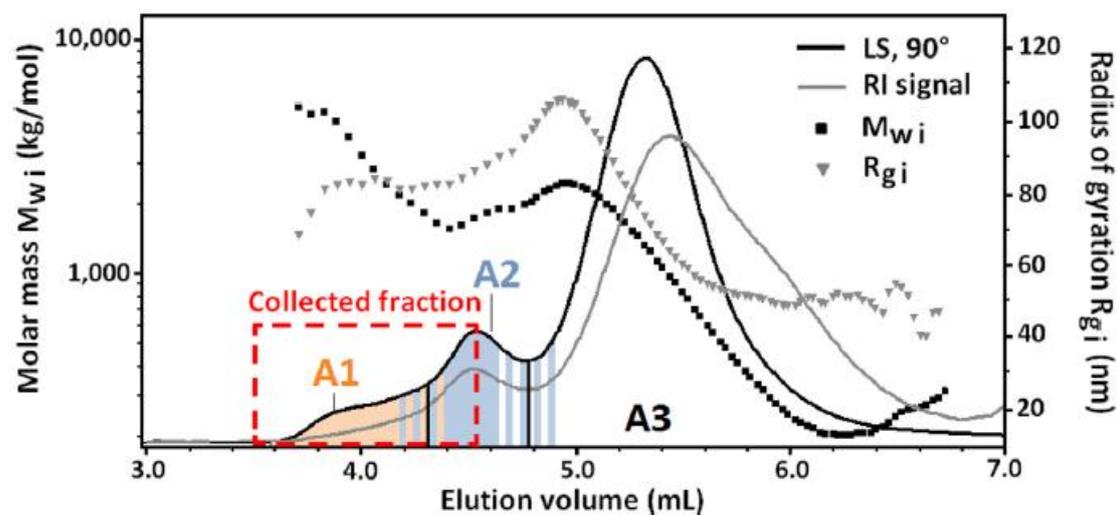


Fig. 1-4. SEC chromatogram showing the refractometer (RI) and light scattering (LS, 90°) signals, in relative scales, the molar masses (M_{wi}) and the radius of gyration (R_{gi}) as a function of the elution volume. NR sample was injected on SEC columns treated for one week with a TBABr solution (0.3% w/v in THF). A1 and A2, populations of microaggregates. Reprinted from Rolere, S., et al., *Euro. Polym. J.* 2016 [8], Copyright (2016), with permission from Elsevier.

1.3 *Hevea* 天然ゴムのモルフォロジー

一般に、多成分ポリマー材料の性質においてマトリックスは重要な役割を果たす。近年、*Hevea* の新鮮ラテックスもしくは高アンモニアラテックスをそのまま乾固させた固形ゴム、および高アンモニアラテックスから調製された固形ゴムをトルエンに溶解し、ゲル画分（マクロゲル）を除去してゾル画分を乾固させた固形ゴムにおいて、非ゴム成分をマトリックスとするナノマトリックス構造が観察された[9]。ナノマトリックス構造とは主成分の分散質と副成分のマトリックスから成り、マトリックスの厚さがナノメートルオーダーの相分離構造を指す[10]。これは Fig. 1-5 に示すように通常のアイランドマトリックス構造とは区別される[11]。モデル化合物による実験から、マイクロメートルオーダーのマトリックス相を有するアイランドマトリックス構造は異種のポリマーをブレンドすることによって得られる[12] [13] [14]のに対し、ナノマトリックス構造はグラフト共重合[10]、化学反応[15] [16] [17] [18]、そして架橋のような化学的なピンニングによって形成させることができると報告されている。また、尿素と SDS によって *Hevea* 天然ゴムを脱タンパク質するとナノマトリックス構造が消失し、その破断時の応力は脱タンパク質前と比べて低下することが知られている[9] [19]。さらに、ナノマトリックス構造を有するモデルゴムであるスチレン共重合脱タンパク質 *Hevea* ゴムにおいて、破断時の応力はスチレン含有量に依存し、これはナノマトリックス構造の形成に起因することが示唆された[19]。これらのことから、タンパク質をはじめとする非ゴム成分をマトリックスとするナノマトリックス構造は、*Hevea* 天然ゴムの優れた機械的特性を制御するための重要な要素であると考えられている。

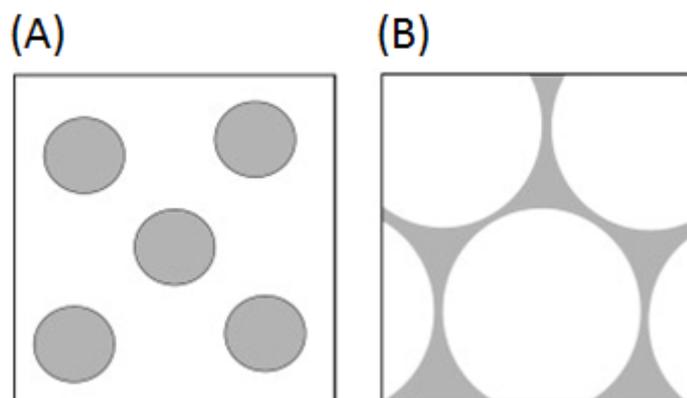


Fig. 1-5. Schematic representation of (A) island-matrix structure and (B) nano-matrix structure. Reprinted from Pukkate, N., et al., *Euro. Polym. J.* 2007 [11], Copyright (2016), with permission from Elsevier.

1.4 *Hevea* 以外のゴム生産植物について

天然ゴムを生産する植物は 2500 種以上と言われ[20], *Hevea* の代替資源の開発を目的に様々な植物が生産する天然ゴムに関する研究が行われている。これまで報告されている主な代替資源候補を Table 1-1 に示す[21]。中でも GPC 法で測定した平均分子量が数百万程度である, *Parthenium argentatum* (グアユール), *Taraxacum brevicorniculatum* と *Taraxacum kok-saghyz* (共にタンポポ), さらに *Lactuca sativa* (レタス) などが生産するゴムについては, 分子量の他にその抽出方法や様々なゴム生合成関連遺伝子・タンパク質の解析に関する研究が行われている。また, 未加硫の *P. argentatum* 天然ゴムについては機械的特性が調べられているが[22] [23], *Hevea* 天然ゴムのような高いグリーン強度は観察されていないことから, *Hevea* と *P. argentatum* ではゴムの天然分岐構造が異なるのではないかと推測される。さらに最近の研究では, 硫黄架橋した *P. argentatum* および *T. kok-saghyz* 天然ゴムの機械的特性も調べられており, 架橋により引張強度が増加することが報告された[24]。しかしながら, これらの硫黄架橋した代替資源天然ゴムと *Hevea* 天然ゴムはそれぞれ異なる伸長結晶化の挙動を示し, この違いは硫黄架橋した各天然ゴムの非ゴム成分を介した架橋構造の違いに起因することが示唆されている (Fig. 1-6)。

本研究において着目した *Ficus carica* (イチジク) は日本で生育可能な比較的ゴム含有率が高いゴム生産植物であり, ラテックス状でゴムを回収できる。*F. carica* 天然ゴムの特性解析は既に報告されており, *Hevea* 天然ゴムと同じく *cis*-1,4-ポリイソプレンを主骨格とする[25]。しかしながら, *F. carica* 天然ゴムはキャスト膜を形成することができないため, ゴムの物性評価に関する報告はない。また, *Ficus* 属由来の天然ゴムに関する生化学的な研究は, 特に *Ficus elastica* (インドゴムノキ) を代表に古くから行われたが, 近年の研究例は少ない。その理由の一つは, Table 1-1 に示すようにゴムの分子量が数十万程度と *Hevea* 天然ゴムに比べて小さいためである。しかし, *F. elastica* や *F. carica* の天然ゴムのように分子量が数十万, もしくは数万程度のゴムを生産する植物は数多く報告されており, これらの未利用ゴム資源を活用するためには天然ゴムの分子量制御機構や分岐構造形成機構を明らかにする必要がある。そのためには, *F. carica* 天然ゴムのような分子量の比較的小さい天然ゴムについての研究が不可欠であると著者は考えた。すなわち, *F. carica* 天然ゴムをモデルとし, その分岐構造やゴムに含まれる非ゴム成分

の量や種類, 天然ゴム生合成のための酵素群などに関して *Hevea* 天然ゴムと比較することが, 天然ゴムの分子量制御機構や分岐構造形成機構の解明に有益であると考えられる。

Table 1-1. Alternative sources of poly-*cis*-isoprene.

Rubber source	Rubber content (%)	Rubber Mw ($\times 10^3$ g/mol)
<i>Hevea brasiliensis</i>	(in latex)	30~50
	(of dried tree)	2
<i>Parthenium argentatum</i>		1280
<i>Taraxacum kok-saghyz</i>		2180
<i>Taraxacum brevicorniculatum</i>	—	4730
<i>Lactuca sativa</i>	—	1500
<i>Euphorbia characias</i>	(in latex)	93
<i>Rubber rabbitbrush</i>		585
<i>Solidago virgaurea minuta</i>	(of dried root)	160~240
<i>Helianthus annuus</i>		279
<i>Ficus carica</i>	(in latex)	4
	(in bark)	0.3
<i>Ficus benghalensis</i>		1500
<i>Ficus elastica</i>		1~10 ^{※1}
		870 ^{※2}
<i>Lactuca serriola</i>	(in latex)	1380

※1 [26] [27]

※2 [28]

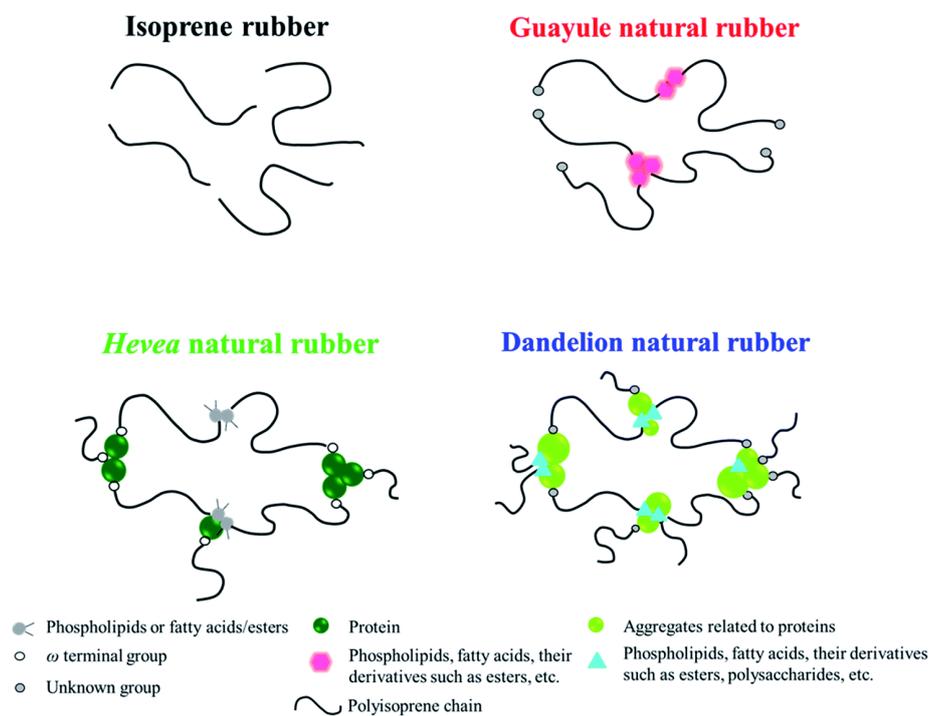


Fig. 1-6. Speculation of physically aggregated non-rubber components in sulphur cross-linked synthetic isoprene rubber, guayule, *Hevea* and dandelion natural rubber. Reprinted from [24] – Published by The Royal Society of Chemistry, 2017.

1.5 ゴム粒子関連タンパク質 ~REF/SRPP ファミリータンパク質~

1.2 で記したように *Hevea* 天然ゴムは天然分岐構造を有すると考えられ、分岐点の一部はタンパク質が担っていると推定されている。また、1.3 でも記したように、脱タンパク質により *Hevea* 天然ゴムのナノマトリックス構造は消失することが報告されている。すなわち、ゴム粒子上のタンパク質は *Hevea* 天然ゴムの天然分岐構造やナノマトリックス構造の形成において重要な因子であると予想される。Rubber elongation factor (REF) とそのホモログである Small rubber particle protein (SRPP) は *Hevea* における主要なゴム粒子関連タンパク質である[1] [29]。当初、REF は“ゴムの主骨格である *cis*-1,4-ポリイソプレンを合成する中心酵素のプレニルトランスフェラーゼ (PT) をトランス型 (TPT) からシス型 (CPT) に機能変換する”と提唱され、その名が付けられた[1]。その後このモデルは Cornish の研究[30]によって否定されたものの、REF という名称は既に定着してしまい混乱を招いているが、REF の実際の機能は明確には分かっていない。また、*Hevea* 由来 REF (HbREF) と SRPP (HbSRPP) のアミノ酸配列は高い相同性を示し、どちらも REF ドメイン (Pfam Accession No. 05755) を有するが、Fig. 1-7 に示すように HbSRPP の方が配列長が長い。本論文では、HbSRPP のアミノ酸配列のうち HbREF と相同性を示さない領域 (およそ 109 番目~173 番目のアミノ酸) を SRPP 特異的領域と呼ぶ。*Hevea* 由来 REF および SRPP と相同な REF/SRPP ファミリータンパク質はゴム生産植物だけでなく他の様々な植物で見ついているが、これらは全て SRPP 特異的領域を有しており、HbREF のように配列長が短い REF は他の植物では見つからない。

最近の研究で、HbREF はゴム生合成に関与することが報告された。Yamashita らは、界面活性剤で洗浄しゴム合成能を失ったゴム粒子に、*Hevea* 由来 CPT の一つである HRT1 と、CPT の活性を増加させる Nogo-B レセプターに相当する HRT1-REF bridging protein (HRBP)を HbREF と共発現させることによってゴム合成能が回復することを報告した[31]。この報告では、HbREF は洗浄されたゴム粒子を安定化し、さらに HbREF と HRBP の同時発現は洗浄ゴム粒子上での HRT1 の安定化に寄与することが示唆されている。一方 Brown らの研究において、*Nicotiana benthamiana* (ベンサミアーナタバコ) の葉における HbSRPP と HRBP の同時発現は、*Hevea* 由来 CPT の一つである HRT2 を細胞質から小胞体 (ER) または原形質膜 (PM) に移動させたが、HRT2 の安定化には寄与しないことが示唆された[32]。これらの違いは HbREF と HbSRPP の違い、HRT1 と

HRT2 の違い, もしくはゴム粒子と *N. benthamiana* の違いに因るものなのかはまだ明らかではない。

ゴム生産植物である *T. brevicorniculatum* 由来の SRPP ホモログ (TbSRPP) も同定されており, *N. benthamiana* に発現させた TbSRPP は主に脂肪滴 (LD) および ER に局在し LD の数やサイズを増加させること, さらに, 人工ポリ (*cis*-1,4-イソプレン) 体への TbSRPP の添加がそのサイズ分布の狭小化をもたらすことが報告された[33]。また, Kim らはゴム生産植物ではない *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) の SRPP ホモログの過剰発現が発芽後の実生において大きな LD の数を増加させること[34], Gidda らは同タンパク質が *A. thaliana* 葉の LD と中性脂質含量を増加させること[35]を報告した。このように, REF/SRPP ファミリータンパク質は, ゴム粒子または LD の構造維持, およびゴム粒子上のゴム生合成複合体の形成促進において重要な役割を果たすことが示唆されている。

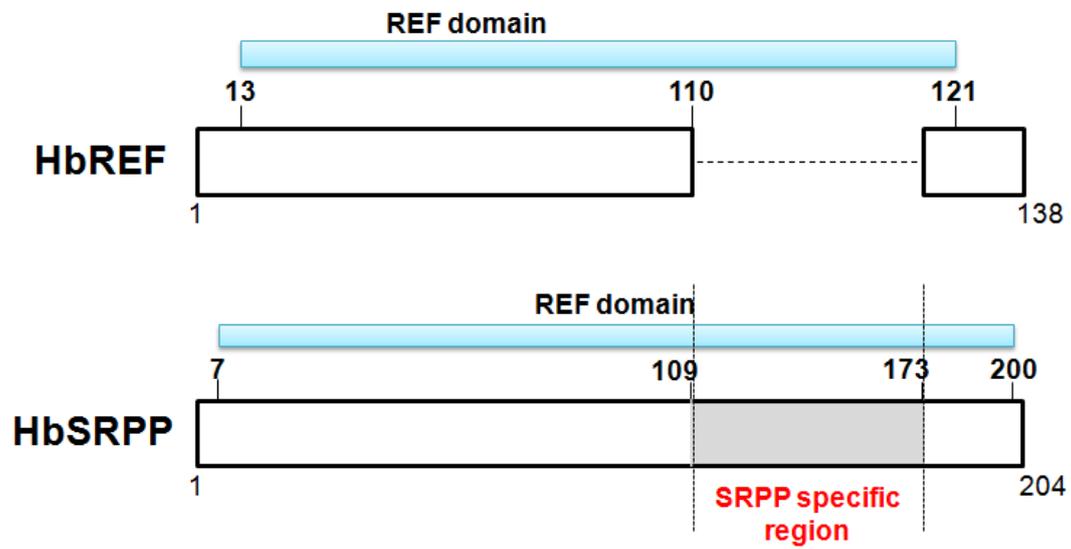


Fig. 1-7. Schematic representation of primary structure of HbREF and HbSRPP.

1.6 RNAi を利用した REF/SRPP ファミリータンパク質の機能解析

ある特定の遺伝子やタンパク質の機能解析を行う場合、その遺伝子をノックアウトした生物を作製し、野生型と比較してその変化を解析するアプローチがある。しかし、ゲノム DNA から特定の遺伝子を欠損させたノックアウト生物を作製するには多くの時間と手間を要する。近年、これをより簡便に実施できる手法として RNA interference (RNAi) がよく利用されるようになった。RNAi とは dsRNA と相補的な配列を持つ mRNA が特異的に分解される現象であり、真核生物で広く保存されている遺伝子抑制機構の一つである。この仕組みを利用した RNAi サイレンシングは 21~25 塩基の dsRNA を導入することで遺伝子発現を抑制（ノックダウン）でき、ターゲット遺伝子およびタンパク質の機能を効率的に解析することができる。*Hevea* は木本植物であり形質転換体の作製およびその生育には長い時間を要するが、ゴム生産植物のうち *T. brevicorniculatum*, *T. kok-saghyz* および *L. sativa* などの草本植物では比較的短時間に形質転換体を作製して遺伝子組換えによる変化を評価することができる。そのため、これまでにこれらの植物を用いた RNAi サイレンシング実験が報告されている。このうち、*T. brevicorniculatum* では TbSRPP3 の発現抑制によりゴム含有量が減少し、ゴム粒子の凝集が観察された。しかしながらゴムの分子量には影響しなかった[36]。一方、*T. kok-saghyz* における SRPP ホモログ (TkSRPP3) の発現抑制では、ゴム含有量を減少させるだけでなく、生合成されるゴムの分子量も小さくなることが報告された[37]。また、*L. sativa* の SRPP ホモログ (LsSRPP4, 8) の発現抑制においては天然ゴムの生合成への影響は観察されなかった[38]。このように、REF/SRPP ファミリータンパク質の発現抑制における天然ゴム生合成への影響は植物ごとに異なる結果となっており、これらのタンパク質の機能は未だ不明確である。

1.7 *Hevea* 由来 REF および SRPP の凝集特性について

最近, Berthelot らは, 組換え大腸菌で調製した HbREF および HbSRPP はバルク溶液中で異なる凝集特性を示すことを報告した[39] [40]。すなわち, HbREF は凝集過程の初期ではアミロイド様の線維状凝集体を形成し, 後期では大きなアモルファス凝集体を形成する。一方, HbSRPP は自己凝集するものの, HbREF のような線維状や大きなアモルファス凝集体の形成は観察されなかった。また, 乾燥させた HbREF および HbSRPP の ATR-FTIR 分析では, HbREF はアミロイドに特徴的な β シートリッチな二次構造を示したが, HbSRPP ではそのような特徴的な二次構造は観察されなかった。また, Wadeesirisak らは, *Hevea* ラテックスから抽出したネイティブな脂質のリン脂質, 糖脂質および中性脂質を, それぞれ Langmuir トラフを用いて空気-水界面に展開して単分子膜を調製し, この脂質膜と HbREF および HbSRPP の相互作用を分析した[41]。その結果, HbSRPP は二次構造を変化させずに各脂質膜の表面で脂質と相互作用することが分かった。一方, HbREF は各脂質膜単層中に深く挿入された。また, 糖脂質で調製された膜上への HbREF の吸着は膜厚を増加させた。これはタンパク質と脂質膜の間の強い凝集または相分離, もしくはその両方が誘導されたことを意味する。さらに中性脂質で調製された膜上において, HbREF は特に β シートリッチな構造に変化し, HbREF の凝集が促進されることが示唆された。以上のように, HbREF と HbSRPP はバルク溶液中および脂質膜上で異なる凝集特性を示し, *Hevea* のラテックス中およびゴム粒子膜上で異なる役割を果たす可能性が示された。

1.8 本研究の目的

Hevea 天然ゴムに特徴的な高いグリーン強度には、ゴムの天然分岐構造やナノマトリックス構造が重要であると考えられ、分岐点およびマトリックスの構成成分であるタンパク質はこれらの構造を形成する上で重要な因子の一つである。また、ゴム粒子上でのゴム生合成においてもゴム粒子関連タンパク質は重要な役割を果たす。これらの背景から、長年その機能が明らかにされてこなかったゴム粒子関連タンパク質 REF および SRPP は近年再び関心を集めている。

最近、Tang ら[42]や Leu ら[43]によるゲノムシーケンスにより、*Hevea* REF/SRPP タンパク質をコードする 18 個の遺伝子が推定され、それらの推定アミノ酸配列における、SRPP に見られて REF に存在しない C 末端領域の存在に基づいて REF1~8 と SRPP1~10 にアノテートされた。その後 Tong らは、このうち *Hevea* ラテックスに豊富な 6 個の REF/SRPP (REF1, 3, 7, 8 と SRPP1, 2) の cDNA をクローニングし、REF₁₃₈ (HbREF), REF₁₇₅, SRPP₁₁₇, REF₂₅₈, SRPP₂₀₄ (HbSRPP), SRPP₂₄₃ と新たに命名した[44]。ここで、ゲノムによるアノテーションでは REF7 と分類された配列が、クローニングによって 2 つのアミノ酸が加えられたただけにもかかわらず、SRPP₁₁₇ として再分類されたことは注目に値する。これは恐らく REF と SRPP の分類が解析のアルゴリズムやアライメントされる配列の数などの条件に左右されるためだと考えられる。また、1.5 で示したように、HbREF と同じサイズ (配列長) で SRPP 特異的領域を持たない HbREF の相同物は他のどの植物でも見つかっていない。これまでに *T. brevicorniculatum* [45], *Populus trichocarpa* (XP_002319520) [46], *Morus alba* (ACV90044) などのいくつかの植物の REF/SRPP ファミリータンパク質は REF と命名されているが、これらは HbSRPP と同じサイズもしくはそれ以上のサイズであり、SRPP 特異的領域を有している。つまり、アミノ酸配列だけから判断するとこれらは SRPP に分類されるべきものであり、外形的には REF は *Hevea* に特異的なものとなっている。このように REF と SRPP を区別する基準は確立されておらず、不確実な基準による分類が REF/SRPP ファミリータンパク質を研究する上で混乱を招いている。また、1.6 で記したように *Hevea* 以外の植物において SRPP の発現抑制はそれらの天然ゴム生合成に異なる影響を及ぼした。これらの事実から、*Hevea* 以外の植物において本来は REF にもかかわらず SRPP に誤分類されている遺伝子 (およびタンパク質) があるのではないかと考えられる。一方で、1.7 に記し

たように、HbREF と HbSRPP は異なる凝集特性を示すことが報告されている。

そこで本研究では、*F. carica* (イチジク) ラテックスより、2種類の *REF/SRPP* 遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させたそれらの組換えタンパク質の凝集特性を分析した。また、イチジクゴムにおける *REF/SRPP* タンパク質の発現解析およびゴムの相分離構造解析、組換え出芽酵母における局在解析を行い、天然ゴムにおけるこれらのタンパク質の役割を考察した。

1.9 論文の構成

本論文は6章から構成され、第1章は序論である。

第2章では *F. carica* ラテックスの RNA-seq より推定された2種類の REF/SRPP をコードする遺伝子 (*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2*) をクローニングした。さらに *Hevea* をはじめとした他の植物における REF または SRPP のアミノ酸配列との比較および系統樹解析を行い、*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* タンパク質の分類について考察した。

第3章では組換え大腸菌を用いた *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* 発現系を構築し、各組換えタンパク質を調製した。さらに、*Hevea* 由来 REF (HbREF) と *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* の凝集特性を比較するとともに、この凝集特性が REF/SRPP タンパク質の新しい分類基準となり得ることを提唱した。

第4章では *F. carica* ゴムにおけるタンパク質レベルでの *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* の存在を調べるため、組換えタンパク質 *FcREF/SRPP-1* を抗原として抗体を作製し、ゴムから抽出したタンパク質について分析した。また、*F. carica* ゴムの相分離構造を明らかにし、さらに *Hevea* ゴムとの比較から、ゴムの分岐構造と相分離構造との関係を考察した。

第5章ではゴム粒子の構造が真核生物に広く見られるオルガネラである脂肪滴 (LD) と類似することに着目し、*FcREF/SRPP-1*、*FcREF/SRPP-2* および HbREF を発現する組換え出芽酵母を作製して各タンパク質の局在解析を行った。さらに、これらのタンパク質の発現が出芽酵母の脂肪滴形態および脂質蓄積に及ぼす影響について明らかにした。

第6章では第2章から第5章までの総括を行い、結論としてまとめた。

参考文献

1. Dennis MS, Light DR: **Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis.** *J Biol Chem* 1989, **264**:18608-18617.
2. Tanaka Y, Kawahara S, Tangpakdee J: **STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF NATURAL-RUBBER** In *Kautschuk und Gummi, Kunststoffe*, vol. 50. pp. 6 - 11 Heidelberg: Huthig; 1997:6 - 11
3. Karino T, Ikeda Y, Yasuda Y, Kohjiya S, Shibayama M: **Nonuniformity in Natural Rubber As Revealed by Small-Angle Neutron Scattering, Small-Angle X-ray Scattering, and Atomic Force Microscopy.** *Biomacromolecules* 2007, **8**:693-699.
4. Subramaniam A: **Gel Permeation Chromatography of Natural Rubber.** *Rubber Chemistry and Technology* 1972, **45**:346-358.
5. Tangpakdee J, Tanaka Y, Wititsuwannakul R, Chareonthiphakorn N: **Possible mechanisms controlling molecular weight of rubbers in *Hevea brasiliensis*.** *Phytochemistry* 1996, **42**:353-355.
6. Tangpakdee J, Tanaka Y: **Characterization of Sol and Gel in *Hevea* Natural Rubber.** *Rubber Chemistry and Technology* 1997, **70**:707-713.
7. Kim C, Morel M-H, Beuve JS, Guilbert S, Collet A, Bonfils F: **Characterization of natural rubber using size-exclusion chromatography with online multi-angle light scattering: Study of the phenomenon behind the abnormal elution profile.** *Journal of Chromatography A* 2008, **1213**:181-188.
8. Rolere S, Cazevielle C, Sainte-Beuve J, Bonfils F: **New insights on Natural Rubber microgel structure thanks to a new method for microaggregates extraction.** *European Polymer Journal* 2016, **80**:117-125.
9. Kawahara S, Chaikumpollert O, Akabori K, Yamamoto Y: **Morphology and properties of natural rubber with nanomatrix of non-rubber components.** *Polymers for Advanced Technologies* 2011, **22**:2665-2667.
10. Kawahara S, Kawazura T, Sawada T, Isono Y: **Preparation and characterization of natural rubber dispersed in nano-matrix.** *Polymer* 2003, **44**:4527-4531.
11. Pukkate N, Kitai T, Yamamoto Y, Kawazura T, Sakdapipanich J, Kawahara S: **Nano-matrix structure formed by graft-copolymerization of styrene onto natural rubber.** *European Polymer Journal* 2007, **43**:3208-3214.
12. Roland CM, Trask CA: **Miscible Elastomer Mixtures.** *Rubber Chemistry and Technology* 1989, **62**:896-907.
13. Akiyama S: **Blends (Amorphous Rubbery Mixtures).** *The Polymeric Materials*

- Encyclopedia* 1996, **699**.
14. Jones KC, Tinker A: **Blends of Natural Rubber**. In *Blends of Natural Rubber, Novel Techniques for Blending with Specialty Polymers*. Springer Netherlands; 1998
 15. Zhamu A, Wingert M, Jana S, Zhong W-H, Stone JJ: **Treatment of functionalized graphitic nanofibers (GNFs) and the adhesion of GNFs-reinforced-epoxy with ultra high molecular weight polyethylene fiber**. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 2007, **38**:699-709.
 16. Aryal S, Bahadur KCR, Dharmaraj N, Kim K-W, Kim HY: **Synthesis and characterization of hydroxyapatite using carbon nanotubes as a nano-matrix**. *Scripta Materialia* 2006, **54**:131-135.
 17. Gorczyńska-Zawiślan W, Benko E, Klimczyk P: **CBN Composites with a Nanosized Binding Phase**. *Solid State Phenomena* 2005, **106**:149-152.
 18. Fröchtenicht R, Kaloudis M, Koch M, Huisken F: **Vibrational spectroscopy of small water complexes embedded in large liquid helium clusters**. *The Journal of Chemical Physics* 1996, **105**:6128-6140.
 19. Zhou Y, Kosugi K, Yamamoto Y, Kawahara S: **Effect of non-rubber components on the mechanical properties of natural rubber**. *Polymers for Advanced Technologies* 2017, **28**:159-165.
 20. Mooibroek H, Cornish K: **Alternative sources of natural rubber**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, **53**:355-365.
 21. van Beilen JB, Poirier Y: **Establishment of new crops for the production of natural rubber**. *Trends Biotechnol* 2007, **25**:522-529.
 22. Thuong NT, Yamamoto O, Nghia PT, Cornish K, Kawahara S: **Effect of naturally occurring crosslinking junctions on green strength of natural rubber**. *Polymers for Advanced Technologies* 2017, **28**:303-311.
 23. Shirin M.A. Monadjemi, McMahan CM, Cornish K: **Effect of Non-Rubber Constituents on Guayule and Hevea Rubber Intrinsic Properties**. *Journal of Research Updates in Polymer Science* 2016, **5**:10.
 24. Junkong P, Cornish K, Ikeda Y: **Characteristics of mechanical properties of sulphur cross-linked guayule and dandelion natural rubbers**. *RSC Advances* 2017, **7**:50739-50752.
 25. Kang H, Kang MY, Han KH: **Identification of natural rubber and characterization of rubber biosynthetic activity in fig tree**. *Plant Physiol* 2000, **123**:1133-1142.
 26. Cornish K: **Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species**. *Phytochemistry* 2001, **57**:1123-1134.
 27. Cornish K, Brichta JL: **Some Rheological Properties of Latex from Parthenium**

- argentatum Gray Compared with Latex from Hevea brasiliensis and Ficus elastica.** *Journal of Polymers and the Environment* 2002, **10**:13-18.
28. Hesham AE-L, Mohamed NH, Ismail MA, Shoreit AAM: **16S rRNA gene sequences analysis of Ficus elastica rubber latex degrading thermophilic Bacillus strain ASU7 isolated from Egypt.** *Biodegradation* 2012, **23**:717-724.
29. Oh SK, Kang H, Shin DH, Yang J, Chow KS, Yeang HY, Wagner B, Breiteneder H, Han KH: **Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from Hevea brasiliensis.** *J Biol Chem* 1999, **274**:17132-17138.
30. Cornish K: **The separate roles of plant cis and trans prenyl transferases in cis-1,4-polyisoprene biosynthesis.** *Eur J Biochem* 1993, **218**:267-271.
31. Yamashita S, Yamaguchi H, Waki T, Aoki Y, Mizuno M, Yanbe F, Ishii T, Funaki A, Tozawa Y, Miyagi-Inoue Y, et al: **Identification and reconstitution of the rubber biosynthetic machinery on rubber particles from Hevea brasiliensis.** 2016, **5**.
32. Brown D, Feeney M, Ahmadi M, Lonoce C, Sajari R, Di Cola A, Frigerio L: **Subcellular localization and interactions among rubber particle proteins from Hevea brasiliensis.** *J Exp Bot* 2017, **68**:5045-5055.
33. Laibach N, Schmidl S, Muller B, Bergmann M, Pruffer D, Schulze Gronover C: **Small rubber particle proteins from Taraxacum brevicorniculatum promote stress tolerance and influence the size and distribution of lipid droplets and artificial poly(cis-1,4-isoprene) bodies.** *Plant J* 2018, **93**:1045-1061.
34. Kim EY, Park KY, Seo YS, Kim WT: **Arabidopsis Small Rubber Particle Protein Homolog SRPs Play Dual Roles as Positive Factors for Tissue Growth and Development and in Drought Stress Responses.** *Plant Physiol* 2016, **170**:2494-2510.
35. Gidda SK, Park S, Pyc M, Yurchenko O, Cai Y, Wu P, Andrews DW, Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT: **Lipid Droplet-Associated Proteins (LDAPs) Are Required for the Dynamic Regulation of Neutral Lipid Compartmentation in Plant Cells.** *Plant Physiol* 2016, **170**:2052-2071.
36. Hillebrand A, Post JJ, Wurbs D, Wahler D, Lenders M, Krzyzanek V, Pruffer D, Gronover CS: **Down-Regulation of Small Rubber Particle Protein Expression Affects Integrity of Rubber Particles and Rubber Content in Taraxacum brevicorniculatum.** *PLOS ONE* 2012, **7**:e41874.
37. Collins-Silva J, Nural AT, Skaggs A, Scott D, Hathwaik U, Woolsey R, Schegg K, McMahan C, Whalen M, Cornish K, Shintani D: **Altered levels of the Taraxacum kok-saghyz (Russian dandelion) small rubber particle protein, TkSRPP3, result in qualitative and quantitative changes in rubber metabolism.** *Phytochemistry* 2012,

- 79:46-56.
38. Chakrabarty R, Qu Y, Ro DK: **Silencing the lettuce homologs of small rubber particle protein does not influence natural rubber biosynthesis in lettuce (*Lactuca sativa*).** *Phytochemistry* 2015, **113**:121-129.
 39. Berthelot K, Lecomte S, Estevez Y, Couлары-Salin B, Bentaleb A, Cullin C, Deffieux A, Peruch F: **Rubber elongation factor (REF), a major allergen component in *Hevea brasiliensis* latex has amyloid properties.** *PLoS One* 2012, **7**:e48065.
 40. Berthelot K, Lecomte S, Estevez Y, Couлары-Salin B, Peruch F: **Homologous *Hevea brasiliensis* REF (Hevb1) and SRPP (Hevb3) present different auto-assembling.** *Biochim Biophys Acta* 2014, **1844**:473-485.
 41. Wadeesirisak K, Castano S, Berthelot K, Vaysse L, Bonfils F, Peruch F, Rattanaorn K, Liengprayoon S, Lecomte S, Bottier C: **Rubber particle proteins REF1 and SRPP1 interact differently with native lipids extracted from *Hevea brasiliensis* latex.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2017, **1859**:201-210.
 42. Tang C, Yang M, Fang Y, Luo Y, Gao S, Xiao X, An Z, Zhou B, Zhang B, Tan X, et al: **The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation.** *Nat Plants* 2016, **2**:16073.
 43. Lau N-S, Makita Y, Kawashima M, Taylor TD, Kondo S, Othman AS, Shu-Chien AC, Matsui M: **The rubber tree genome shows expansion of gene family associated with rubber biosynthesis.** *Scientific reports* 2016, **6**:28594-28594.
 44. Tong Z, Wang D, Sun Y, Yang Q, Meng X, Wang L, Feng W, Li L, Wurtele ES, Wang X: **Comparative proteomics of rubber latex revealed multiple protein species of REF/SRPP family respond diversely to ethylene stimulation among different rubber tree clones.** *International Journal of Molecular Sciences* 2017, **18**.
 45. Laibach N, Hillebrand A, Twyman RM, Prüfer D, Schulze Gronover C: **Identification of a *Taraxacum brevicorniculatum* rubber elongation factor protein that is localized on rubber particles and promotes rubber biosynthesis.** *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2015, **82**:609-620.
 46. Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, et al: **The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray).** *Science* 2006, **313**:1596-1604.

第 2 章

イチジクラテックス由来

REF/SRPP 遺伝子

(FcREF/SRPP-1, -2) のクローニング

序

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科の北島佐紀人准教授よりご供与いただいた *F. carica* (イチジク) 未熟果実ラテックスの RNA-seq データを基に REF/SRPP をコードすると推定される 2 種類の遺伝子 (*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2*) を見出した (Fig. 2-1)。本章ではこれらの遺伝子をクローニングし、正確な塩基配列を決定した。また、これらの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を他の植物における REF または SRPP のアミノ酸配列と比較し考察した。

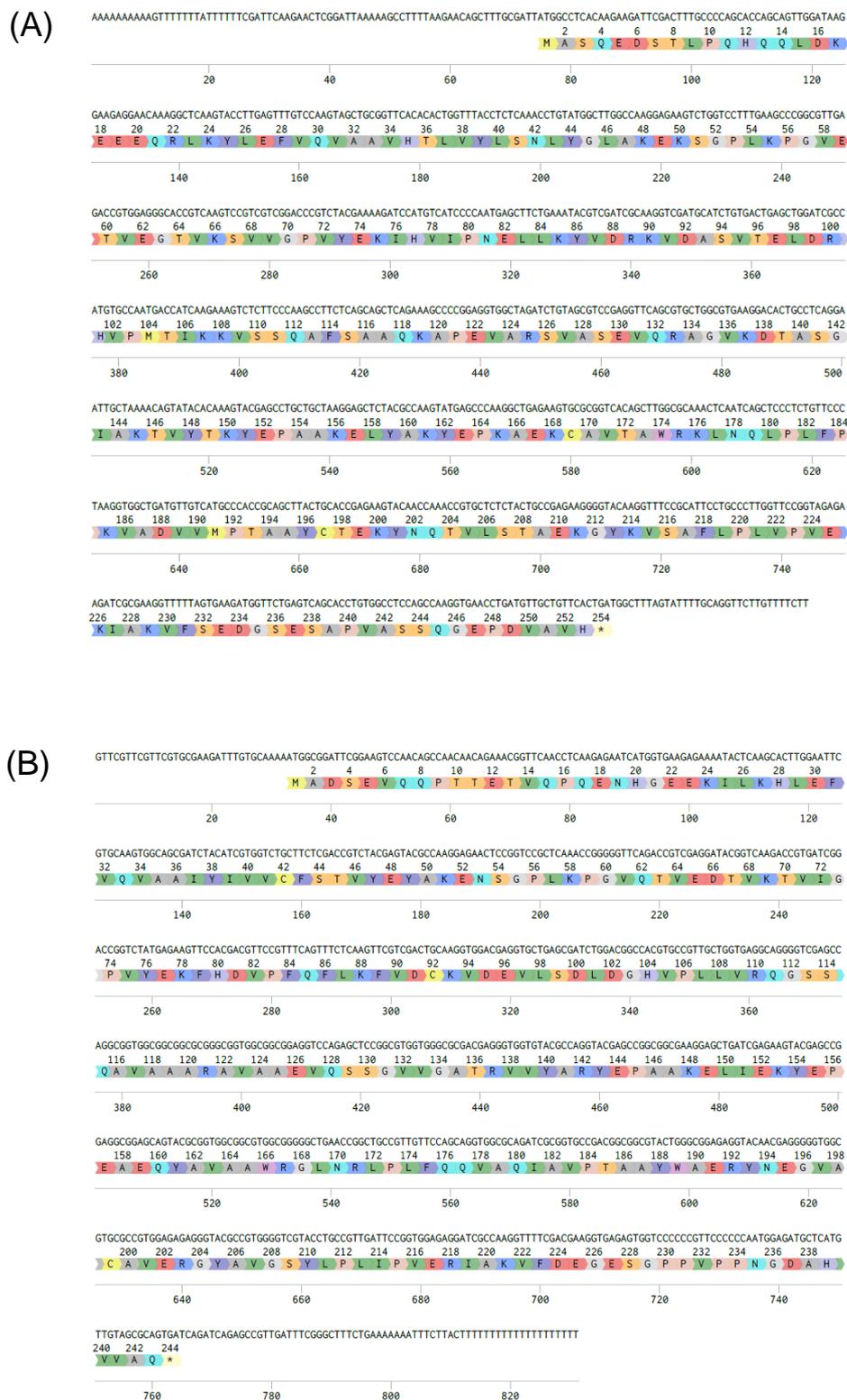


Fig. 2-1. Nucleotide and amino acid sequence of (A) *FcREF/SRPP-1* and (B) *FcREF/SRPP-2* deduced by RNA sequence data.

2.1 実験操作

試薬・キット類

制限酵素と pCold I ベクターはタカラバイオ, 修飾酵素および PCR 酵素は東洋紡より購入した。RNA 抽出キットおよび cDNA 合成キットはバイオラッドの製品を, プラスミド抽出キットおよび DNA 精製キットは FastGene の製品を用いた。DNA サイズマーカーは GeneDireX より, 電気泳動用アガロースはニッポンジーンより, アンピシリンナトリウムは富士フィルム和光純薬より入手した。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

機器類

サーマルサイクラーはバイオラッド MyCycler Thermal Cycler および MJ Mini Thermal Cycler を使用した。遠心分離機は工機ホールディングス (旧: 日立工機) 卓上微量高速遠心機 himac CT15RE および TOMY MC-150 を, 遠心濃縮機は TOMY MV-100 を用いた。恒温槽は BIOSAN Thermo Shaker TS-100 および IWAKI Thermo alumi bath ALB120 を, 恒温振とう水槽はトーマス科学機器 T-2S を使用した。恒温器はヤマト科学 プログラム低温恒温器 IN800 および平沢製作所 テーハー式電気孵卵器を, 振とう機はタイテックロータリーシェイカー NR-2 またはアズワン ロッキングミキサー RM300 を用いた。分光光度計は日本分光 JASCO V-630BIO を利用した。アガロースゲル電気泳動装置はミュージピッド Mupid-2x, コスモバイオ i-MyRun.NC および富士フィルム和光純薬 MARINE22 を使用した。

2.1.1 イチジクラテックスの採取

イチジク生産者の渡辺良一様, 須藤秀明様にご協力いただき秋田県にかほ市のイチジク農園でラテックスを採取した。ラテックスは採取後すぐに Latex collection buffer ver. 1 (0.9% NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM DTT 含有 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) と混合し, -80°C で凍結保存した。なお, 本論文において実ラテックスは秋季 (10 月~11 月中旬) に未熟果実をもぎ取り果柄から採取したラテックスを, 枝ラテックスは冬季 (3 月) に剪定した枝を切りつけて採取したラテックスを指す。

2.1.2 cDNA の調製

・ RNA の抽出

採取した枝ラテックスから AquaPure RNA Isolation Kit (バイオラッド) を用いて RNA を抽出した。枝ラテックス 150 μ L を 1.5 mL チューブに入れ, RNA Lysis Solution を 300 μ L, DNA/Protein Pelleting Solution を 100 μ L 添加し, チューブを 10 回転倒混合した後 1,5000 rpm で 3 分間遠心分離した。新しいチューブに RNA を含む上清を回収し, 100% イソプロパノールを 300 μ L 添加した後, 転倒混合して 15,000 rpm で 3 分間遠心分離した。上清を捨て, 70% エタノール 300 μ L を加え転倒混合し, 15,000 rpm で 3 分間遠心分離した。上清を捨てチューブを逆さまにして静置し乾燥させた後, RNA Hydration Solution を 50 μ L 加え, ピペッティング後 30 分間氷床に静置してペレットを溶解した。得られた RNA 溶液の核酸濃度は吸光度により測定した。

・ cDNA の合成

iScript Select cDNA Synthesis Kit (バイオラッド) 使用し, Oligo(dT)プライマーを用いた RT-PCR により cDNA の合成を行った。Table 2-1 に PCR 溶液の組成を, Table 2-2 に PCR 条件を示す。得られた cDNA 溶液の核酸濃度は吸光度により測定した。

Table 2-1. Composition of reverse transcription PCR mixture.

Reagents	Volume (μ L)
5xiScript select reaction mix	4
Oligo(dT) ₂₀ primer	2
RNA sample (1 μ g total RNA)	13
iScript reverse transcriptase (Bio-Rad)	1
Total	20

Table 2-2. Reverse transcription PCR cycling conditions.

Temp. ($^{\circ}$ C)	Time (min)	Cycles
42	9	1
85	5	1
4	∞	1

2.1.3 *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* 遺伝子断片の調製

・ *FcREF/SRPP-1* 遺伝子断片の調製

Fig. 2-1 に示す *FcREF/SRPP-1* の塩基配列のうち，開始コドンより上流側および終始コドンより下流側の配列を使用してプライマーを設計し，PCR により *FcREF/SSRPP-1* 遺伝子断片を増幅した。なお，各プライマーの 5' 末端には BamHI 認識配列および HindIII 認識配列を付加した。Table 2-3 にプライマーの配列を，Table 2-4 に PCR 溶液の組成を，Table 2-5 に PCR 条件を示す。得られた PCR 産物は電気泳動で確認後，目的とする塩基数付近のバンドを切り出し，Gel/PCR Extraction Kit (FastGene) を用いて DNA を精製した。なお，DNA 精製の操作はキットの説明書に従った。得られた DNA 溶液の核酸濃度は吸光度により測定した。

Table 2-3. Nucleotide sequence primers used for PCR amplification of *FcREF/SRPP-1*.

Primer name	Oligonucleotide sequence (5' - 3')
Fw-fig tree_Fc 1	CGGGATCCTAAGAACAGCTTTGCG
Rv-fig tree_Fc 1	CCCAAGCTTCCTGCAAAATACTAAAGCC

Underlined sequences correspond to restriction endonuclease recognition sites.

Table 2-4. Composition of PCR mixture for amplification of *FcREF/SRPP-1*.

Reagents	Volume (μL)
10×PCR buffer for KOD- Plus-Neo	1.5
2mM dNTPs	1.5
25mM MgSO ₄	0.91
10 μM Forward primer	0.45
10 μM Reverse primer	0.45
cDNA	50,100 or 500 ng
KOD-Plus-Neo (TOYOBO)	0.3
up to	15.0

Table 2-5. PCR cycling conditions for amplification of *FcREF/SRPP-1*.

Temp. (°C)	Time (sec)	Cycles
94	120	1
98	10	35
49.9~65.0	30	
68	30	
4	∞	1

・ *FcREF/SRPP-2* 遺伝子断片の調製

Fig. 2-1 に示す *FcREF/SRPP-2* の塩基配列のうち、開始コドンより上流側および終始コドンより下流側の配列を使用してプライマーを設計し、PCR により *FcREF/SRPP-2* 遺伝子断片を増幅した。なお、各プライマーの 5' 末端には BamHI 認識配列および HindIII 認識配列を付加した。Table 2-6 にプライマーの配列を示す。PCR 溶液の組成および PCR 条件は Table 2-4, Table 2-5 と同様である。

また、cDNA を鋳型にした PCR 産物をアガロースゲル電気泳動すると、3 種類の増幅産物が確認された。そこで目的とする塩基数付近のバンドを切り出し、DNA を精製後、これを鋳型として再度 PCR を行った。Table 2-6 のプライマーを使用し、Table 2-4, Table 2-5 の通り PCR を行った。ただし、切り出した DNA サンプルの濃度が希薄であったため、鋳型量は最大の 9.90 μ L とし、アニーリング温度は 65°C とした。得られた PCR 産物は電気泳動で確認後、目的とする塩基数付近のバンドを切り出して DNA を精製した。得られた DNA 溶液の核酸濃度は吸光度により測定した。

Table 2-6. Nucleotide sequence primers used for PCR amplification of *FcREF/SRPP-2*.

Primer name	Oligonucleotide sequence (5' - 3')
Fw-fig tree Fc 2	<u>CGGGATCCC</u> GTGCGAAGATTTG
Rv-fig tree Fc 2	CCCA <u>AGCTT</u> GAAATCAACGGCTCTG

Underlined sequences correspond to restriction endonuclease recognition sites.

2.1.4 pCold-*FcREF/SRPP-1 fragment* および pCold-*FcREF/SRPP-2 fragment* の調製

・ *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* 遺伝子断片の pCold I ベクターへの挿入

精製した *FcREF/SRPP-1*, *FcREF/SRPP-2* 遺伝子断片および pCold I ベクターを制限酵素 BamHI および HindIII で切断した。Table 2-7 の組成で反応溶液を調製し、37°C で 14 時間インキュベートした後、70°C で 30 分加熱して制限酵素を失活させた。また、pCold I ベクターサンプルには Alkaline Phosphatase CIAP (タカラバイオ) を 30 U 添加し、50°C で 30 分間脱リン酸化処理を行った。各サンプルはエタノール沈殿の後、全量をアガロースゲル電気泳動し、Gel/PCR Extraction Kit (FastGene) を用いてゲル切り出し精製を行った。ベクター：インサートのモル比が 1 : 20 になるように Table 2-8 の組成でライゲーション反応溶液を調製し、16°C で 3 時間反応させた後、4°C で一晩保存した。

Table 2-7. Composition of restriction endonuclease reaction mixture.

Reagents	Volume (μL)
10 × K buffer	20
BamHI (Takara Bio, 15 U/μL)	1
HindIII (Takara Bio, 15 U/μL)	1
pCold I vector	5 μg
or	
<i>FcREF/SRPP-1</i> fragment	1 μg
or	
<i>FcREF/SRPP-2</i> fragment	1 μg
up to	200

Table 2-8. Composition of DNA ligation reaction mixture.

Reagents	<i>FcREF/SRPP-1</i>	<i>FcREF/SRPP-2</i>
pCold I vector after restriction endonuclease reaction	0.42 μL (0.02 pmol)	0.83 μL (0.03 pmol)
<i>FcREF/SRPP-1</i> or -2 fragment after restriction endonuclease reaction	6.14 μL (0.35 pmol)	8.89 μL (0.69 pmol)
Ligation high ver2 (TOYOBO)	6.56 μL	9.72 μL

・ *E. coli* HST08 コンピテントセルの調製

E. coli HST08 (タカラバイオ) のグリセロールストックを白金耳で掻き取り、SOB 培地 20 mL に入れ 37°C で一晩振とう培養した。この前培養液 250 μ L を SOB 培地 25 mL に接種し、OD₆₀₀ が 0.4 程度になるまで 25°C で約 24 時間振とう培養した。遠心分離 (3,000 \times g, 4°C, 10 min) により細胞を回収し、培養液の 1/2 量の冷却した FTB (10 mM CH₃COOK, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 10 mM [Co(NH₃)₆]Cl₃, 100 mM KCl, 10% グリセロール, pH 6.4) を加えて氷上で再懸濁し、そのまま 10 分間冷却した。再度遠心分離して上清を捨てた後、培養液の 1/10 量の冷却した FTB で細胞を懸濁し、DMSO を 7 v/v% 加えた後これを 100 μ L ずつマイクロチューブに分注して液体窒素で凍結後 -80°C で保存した。

・ *E. coli* HST08 の形質転換

E. coli HST08 コンピテントセル 100 μ L にライゲーション産物を全量添加し、氷上で 30 分静置した。42°C で 45 秒間ヒートショックを与えた後、氷上で 2 分間以上静置した。これを抗生物質を含まない LB 培地 1 mL が入った試験管に加え、37°C で 4 時間振とう培養した後、50 μ g/mL アンピシリンナトリウム含有 LB 寒天プレート (LB(Amp)寒天プレート) にコンラージ棒を用いて播き、37°C で一晩培養した。

・ コロニーPCR および形質転換体の保存

LB(Amp)寒天プレートに生えたコロニーをランダムに選び、コロニーPCR を行った。用いたプライマーの配列を Table 2-9 に、反応溶液の組成と反応条件をそれぞれ Table 2-10, Table 2-11 に示す。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* 遺伝子断片の挿入が確認できたコロニーをピックアップして LB(Amp)液体培地に添加し、37°C で 14 時間振とう培養した。培養液と 50%グリセロールを 1 : 1 で混合し、液体窒素で凍結後、-80°C で保存した。

Table 2-9. Nucleotide sequence primers used for colony PCR for bacterial clones transformed with pCold-*FcREF/SRPP-1 fragment* and *-2 fragment*.

Primer name	Oligonucleotide sequence (5' - 3')
pCold I -F2	GTAAGGCAAGTCCCTTCAAGAG
pCold I -R	GGCAGGGATCTTAGATTCTG

Table 2-10. Composition of colony PCR mixture for bacterial clones transformed with pCold-*FcREF/SRPP-1 fragment* and *-2 fragment*.

Reagents	Volume (μL)
One taq 2 \times MN (NEB)	7.5
10 μM pCold I -F2	0.3
10 μM pCold I -R	0.3
up to	15

Table 2-11. Colony PCR cycling conditions for bacterial clones transformed with pCold-*FcREF/SRPP-1 fragment* and *-2 fragment*.

Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Time (sec)	Cycles
94	30	1
94	30	35
55	30	
68	180	
68	300	1
4	∞	1

・プラスミド抽出

得られた組換え大腸菌体を培養し、作製したプラスミド (pCold-*FcREF/SRPP-1 fragment* および pCold-*FcREF/SRPP-2 fragment*) を Plasmid mini kit (FastGene)を用いて抽出した。なお、プラスミド抽出の操作はキットの説明書に従った。得られたプラスミド溶液の核酸濃度は吸光度により測定した。

2.1.5 DNA シーケシング

得られたプラスミドについて、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケシング反応を行った。プライマーの配列を Table 2-12 に、反応溶液の組成と反応条件を Table 2-13, Table 2-14 にそれぞれ示す。3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて両方のストランドの塩基配列を解析し、*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* 遺伝子の正確な塩基配列を決定した。

Table 2-12. Nucleotide sequence primers used for DNA sequencing of *FcREF/SRPP-1* and -2.

Primer name	Oligonucleotide sequence (5' - 3')
pCold I -F1	ACGCCATATCGCCGAAAGG
pCold I -R	GGCAGGGATCTTAGATTCTG

Table 2-13. Composition of reaction mixture for DNA sequencing of *FcREF/SRPP-1* and -2.

Reagents	Volume (μ L)
Ready Reaction Premix	4
Big Dxe 5xsequencing buffer	2
Each plasmid	300 ng
3.2 pmol/ μ L primer (Fw or Rv)	1
up to	20

Table 2-14. PCR cycling conditions for DNA sequencing of *FcREF/SRPP-1* and -2.

Temp. ($^{\circ}$ C)	Time (sec)	Cycles
96	60	1
96	10	25
60	5	
60	240	
4	∞	1

2.2 結果と考察

2.2.1 *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* 遺伝子断片の調製

REF/SRPP-1 遺伝子断片を調製するため、cDNA を鋳型として鋳型量およびアニーリング温度条件を変えて PCR を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した結果を Fig. 2-2 に示す。鋳型量を 500 ng とした場合に目的の塩基数付近にバンドが確認された。このうち、バンドの輝度が比較的高く、非特異的な増幅産物が少ないアニーリング温度 60.3°C の条件で再度 PCR を行い、PCR 産物を大量調製した。これをエタノール沈殿により濃縮し、電気泳動後にゲル切り出し精製を行い、*FcREF/SRPP-1* 遺伝子断片とした。

FcREF/SRPP-2 遺伝子断片を調製するため、cDNA を鋳型として鋳型量およびアニーリング温度条件を変えて PCR を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した結果を Fig. 2-3 に示す。いずれの条件でも主に 3 本のバンドが検出されたが、配列長より 800 bp 付近のバンドが目的とする *FcREF/SRPP-2* 遺伝子断片であると考えられる。そこでこのバンドを切り出し、これを鋳型として再度 PCR を行った。その結果、Fig. 2-4 のようにシングルバンドが得られた。これをゲル切り出し精製し、*FcREF/SRPP-2* 遺伝子断片とした。

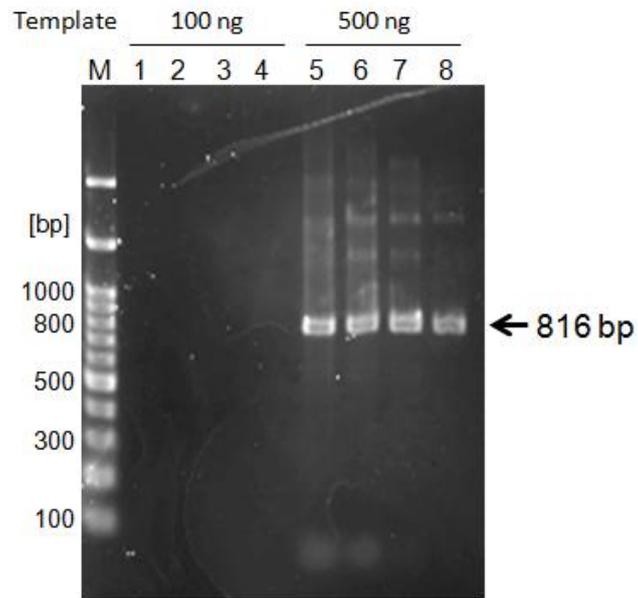


Fig. 2-2. Agarose gel electrophoresis of PCR products of *REF/SRPP-1* fragment. Lane M, GeneDireX 100 bp DNA Ladder H3 RTU. Annealing temperature: lanes 1 and 5, 50.0°C; 2 and 6, 54.3°C; 3 and 7, 60.3°C; 4 and 8, 65.0°C.

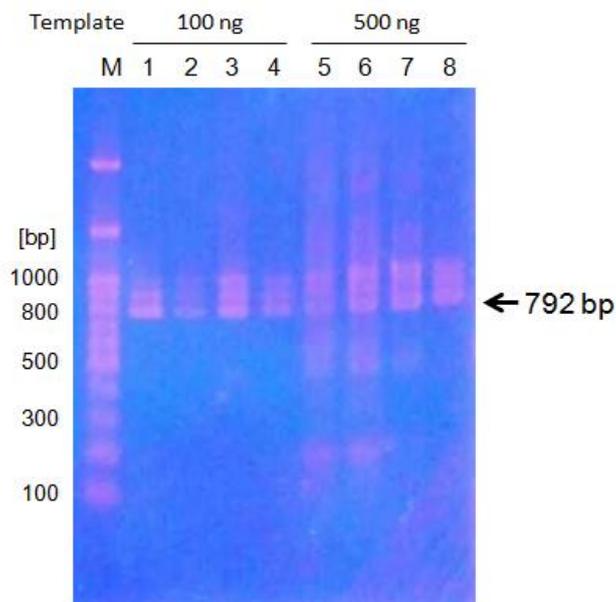


Fig. 2-3. Agarose gel electrophoresis of PCR products of *REF/SRPP-2* fragment. Lane M, GeneDireX 100 bp DNA Ladder H3 RTU. Annealing temperature: lanes 1 and 5, 50.0°C; 2 and 6, 54.3°C; 3 and 7, 60.3°C; 4 and 8, 65.0°C.

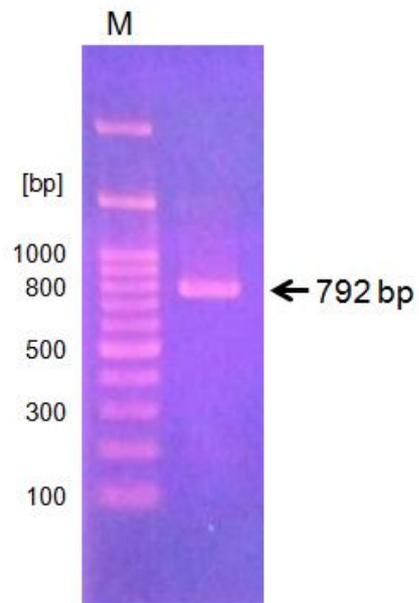
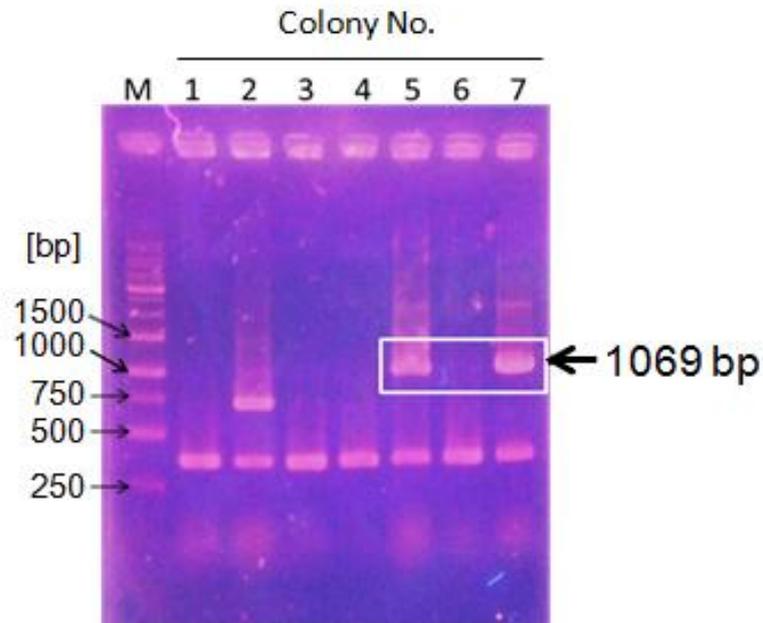


Fig. 2-4. Agarose gel electrophoresis of 2nd PCR product of *REF/SRPP-2* fragment. Lane M, GeneDireX 100 bp DNA Ladder H3 RTU.

2.2.2 pCold-*FcREF/SRPP-1* fragment および pCold-*FcREF/SRPP-2* fragment の調製

各遺伝子断片と pCold I ベクターをライゲーションし、*E. coli* HST08 を形質転換してコロニーPCRを行った。*FcREF/SRPP-1* を挿入した場合のコロニーPCR産物を電気泳動した結果を Fig. 2-5(A)に、*FcREF/SRPP-2* の場合の結果を Fig. 2-5(B)に示す。*FcREF/SRPP-1* の場合はコロニー5番と7番で、*FcREF/SRPP-2* の場合はコロニー2番と12番でそれぞれ目的とする塩基数付近にバンドが確認された。このうち、*FcREF/SRPP-1* のコロニー5番、*FcREF/SRPP-2* のコロニー2番をピックアップして培養し、プラスミド抽出を行って pCold-*FcREF/SRPP-1* fragment および pCold-*FcREF/SRPP-2* fragment を得た。

(A)



(B)



Fig. 2-5. Agarose gel electrophoresis of colony PCR of bacterial clones transformed with (A) *pCold-FcREF/SRPP-1* and (B) *pCold-FcREF/SRPP-2* fragment. Lanes M, GeneDireX 1kb DNA Ladder RTU; M', GeneDireX 100bp DNA Ladder RTU.

2.2.3 DNA シーケシング

各プラスミドを用いて DNA シーケシングを行い、*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* の塩基配列を解析した。DNA シーケシングにより読み取った配列と、元となった RNA-seq の配列を ClastalW で比較した結果を Fig. 2-6 (*FcREF/SRPP-1*) と Fig. 2-7 (*FcREF/SRPP-2*) にそれぞれ示す。これより、どちらも大部分は一致しているが、配列の異なる箇所が数か所見られた。これは RNA-seq の解析エラーのためと考えられる。以上より、*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* の cDNA 配列が決定された。これらの配列はデータベース DNA Data Bank of Japan (DDBJ)に *FcREF/SRPP-1* は LC279015, *FcREF/SRPP-2* は LC279016 の番号で登録した。

RNAseq-Fc1 Seq	TAAGAACAGCTTTGCGATTATGGCCTCACAAGAAGATTCGACTTTGCCCCAGCACCAGCA TAAGAACAGCTTTGCGATTATGGCCTCACAAGAAGATTCGACTTTGCCCCAGCACCAGCA *****
RNAseq-Fc1 Seq	GTTGGATAAGGAAGAGGAACAAAGGCTCAAGTACCTTGAGTTTGTCCAAGTAGCTGCGGT GTTGGATAAGGAAGAGGAACAAAGGCTCAAGTACCTTGAGTTTGTCCAAGTAGCTGCGGT *****
RNAseq-Fc1 Seq	TCACACACTGGTTTACCTCTCAAACCTGTATGGCTTGGCCAAGGAGAAGTCTGGTCCTTT TCACACACTGGTTTACCTCTCAAACCTGTATGGCTTGGCCAAGGAGAAGTCTGGTCCTTT *****
RNAseq-Fc1 Seq	GAAGCCCGGCGTTGAGACCGTGGAGGGCACCGTCAAGTCCGTCGTCGGACCCGTCACGA GAAGCCCGGCGTTGAGACCGTGGAGGGCACCGTCAAGTCCGTCGTCGGACCCGTCACGA *****
RNAseq-Fc1 Seq	AAAGATCCATGTCATCCCCAATGAGCTTCTGAAATACGTCGATCGCAAGGTCGATGCATC AAAGATCCATGTCATCCCCAATGAGCTTCTGAAATACGTCGATCGCAAGGTCGATGCATC *****
RNAseq-Fc1 Seq	TGTGACTGAGCTGGATCGCCATGTGCCAATGACCATCAAGAAAGTCTCTTCCCAAGCCTT TGTGACTGAGCTGGATCGCCATGTGCCAATGACCATCAAGAAAGTCTCTTCCCAAGCCTT *****
RNAseq-Fc1 Seq	CTCAGCAGCTCAGAAAGCCCCGGAGGTGGCTAGATCTGTAGCGTCCGAGGTTACAGCGTGC TTCAGCAGCTCAGAAAGCCCCGGAGGTGGCTAGATCTGTAGCGTCCGAGGTTACAGCGTGC *****
RNAseq-Fc1 Seq	TGGCGTGAAGGACACTGCCTCAGGAATTGCTAAAACAGTATACACAAAGTACGAGCCTGC TGGCGTGAAGGACACTGCCTCAGGAATTGCTAAAACAGTATACACAAAGTACGAGCCTGC *****
RNAseq-Fc1 Seq	TGCTAAGGAGCTCTACGCCAAGTATGAGCCCAAGGCTGAGAAGTGC GCGGTCACAGCTTG TGCTAAGGAGCTCTACGCCAAGTATGAGCCCAAGGCTGAGAAGTGC GCGGTCACAGCTTG *****
RNAseq-Fc1 Seq	GCGCAAACCTCAATCAGCTCCCTCTGTTCCCTAAGGTGGCTGATGTTGTCATGCCACCCGC GCGCAAACCTCAATCAGCTCCCTCTGTTCCCTAAGGTGGCTGATGTTGTCATGCCACCCGC *****
RNAseq-Fc1 Seq	AGCTTACTGCACCGAGAAGTACAACCAAACCGTGCTCTCTACTGCCGAGAAGGGGTACAA AGCTTACTGCACCGAGAAGTACAACCAAACCGTGCTCTCTACTGCCGAGAAGGGGTACAA *****
RNAseq-Fc1 Seq	GGTTCCGCATTCCTGCCCTTGGTTCCGGTAGAGAAGATCGCGAAGGTTTTTAGTGAAGA AGTTCCGCATTCCTGCCCTTGGTTCCGGTAGAGAAGATCGCGAAGGTTTTTAGTGAAGA *****
RNAseq-Fc1 Seq	TGGTCTGAGTCAGCACCTGTGGCCTCCAGCCAAGGTGAACCTGATGTTGCTGTTCACTG TGGTCCGAGTCAGCACCTGTGGCCTCCAGCCAAGGTGAACCTGATGTTGCTGTTCACTG *****
RNAseq-Fc1 Seq	ATGGCTTTAGTATTTTGCAGG ATGGCTTTAGTATTTTGCAGG *****

Fig. 2-6. Comparison of nucleotide sequences corresponding to RNA sequence data (RNAseq-Fc1) and mRNA (Seq) determined as *FcREF/SRPP-1* in *F. carica* latex. Symbols are as follows: *, match; red box, mismatch.

RNAseq-Fc2 Seq	CGTGCGAAGATTTGTGCAAAAATGGCGGATTTCGGAAGTCCAACAGCCAACAACAGAAACG CGTGCGAAGATTTGTGCAAAAATGGCGGATTTCGGAAGTCCAACAGCCAACAACAGAAACG *****
RNAseq-Fc2 Seq	GTTCAACCTCAAGAGAATCATGGTGAAGAGAAAATACTCAAGCACTTGGAAATTCGTGCAA GTTCAACCTCAAGAGAATCATGGTGAAGAGAAAATACTCAAGCACTTGGAAATTCGTGCAA *****
RNAseq-Fc2 Seq	GTGGCAGCGATCTACATCGTGGTCTGCTTCTCGACCGTCTACGAGTACGCCAAGGAGAAC GTGGCAGCGATCTACATCGTGGTCTGCTTCTCGACCGTCTACGAGTACGCCAAGGAGAAC *****
RNAseq-Fc2 Seq	TCCGGTCCGCTCAAACCGGGGGTTTCAGACCGTTCGAGGATACGGTCAAGACCGTGATCGGA TCCGGTCCGCTCAAACCGGGGGTTTCAGACCGTTCGAGGATACGGTCAAGACCGTGATCGGA *****
RNAseq-Fc2 Seq	CCGGTCTATGAGAAGTTCACGACGTTCCGTTTTCAGTTTCTCAAGTTCGTCGACTGCAAG CCCGTCTATGAGAAGTTCACGACGTTCCGTTTTCAGTTTCTCAAGTTCGTCGACTGCAAG ** *****
RNAseq-Fc2 Seq	GTGGACGAGGTGCTGAGCGATCTGGACGGCCACGTGCCGTTGCTGGTGGAGCAGGGGTCG GTGGACGAGGTGCTGCGCGATCTGGACGGCCACGTGCCGTTGCTGGTGGAGCAGGGGTCG *****
RNAseq-Fc2 Seq	AGCCAGGCGGTGGCGGCGGCGGGCGGGTGGCGGCGGAGGTCCAGAGCTCCGGCGTGGTG AGCCAGGCGGTGGCGGCGGCGGGCGGGTGGCGGCGGAGGTCCAGAGCTCCGGCGTGGTG *****
RNAseq-Fc2 Seq	GGCGCGACGAGGGTGGTGTACGCCAGGTACGAGCCGGCGGCGAAGGAGCTGATCGAGAAG GGCGCGACGAGGGCGGTGTACGCCAGGTACGAGCCGGCGGCGAAGGAGCTGATCGAGAAG *****
RNAseq-Fc2 Seq	TACGAGCCGGAGGCGGAGCAGTACGCGGTGGCGGCGTGGCGGGGGCTGAACCGGCTGCCG TACGAGCCGGAGGCGGAGCAGTACGCGGTGGCGGCGTGGCGGGGGCTGAACCGGCTGCCG *****
RNAseq-Fc2 Seq	TTGTTCCAGCAGGTGGCGCAGATCGCGGTGCCGACGGCGGCGTACTGGGCGGAGAGGTAC TTGTTCCAGCAGGTGGCGCAGATCGCGGTGCCGACGGCGGCGTACTGGGCGGAGAGGTAC *****
RNAseq-Fc2 Seq	AACGAGGGGTGGCGTGCGCCGTGGAGAGAGGGTACGCCGTGGGGTCTACCTGCCGTTG AACGAGGGGTGGCGTGCGCCGTGGAGAGAGGGTACGCCGTGGGGTCTACCTGCCGTTG *****
RNAseq-Fc2 Seq	ATTCCGGTGGAGAGGATCGCCAAGGTTTTTCGACGAAGGTGAGAGTGGTCCCCCGTTCCC ATTCCGGTGGAGAGGATCGCCAAGGTTTTTCGACGAAGGTGAGAGTGGTCCCCCGTTCCC *****
RNAseq-Fc2 Seq	CCCAATGGAGATGCTCATGTTGTAGCGCAGTGATCAGATCAGAGCCGTTGATTTTC CCCAATGGAGATGCTCATGTTGTAGCGCAGTGATCAGATCAGAGCCGTTGATTTTC *****

Fig. 2-7. Comparison of nucleotide sequences corresponding to RNA sequence data (RNAseq-Fc2) and mRNA (Seq) determined as *FcREF/SRPP-2* in *F. carica* latex. Symbols are as follows: *, match; red box, mismatch.

2.2.4 FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 の塩基配列および推定アミノ酸配列の比較

決定した *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* の塩基配列について、既に報告されている *F. carica* (var. Horaishi) の RNA-seq (DRA004650) [1] および *F. carica* (var. Dottato) の gDNA-seq (SRP109082) [2] に対して BLAST を用いて検索した結果を Fig. 2-8 (*FcREF/SRPP-1*) と Fig. 2-9 (*FcREF/SRPP-2*) に示す。決定した全配列に対して、バーで表示されている各行がデータベース内の 1 エントリに相当し、各色はスコア（確からしさ）を意味する。これより、*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* の全長がそのまま完全にヒットすることはなかったが、断片的にヒットし、少なくともどちらかのイチジクの配列データにおいてヒットしたエントリが全長をカバーしていた。

決定した *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を BLAST でドメイン検索したところ、どちらも REF ドメイン (Pfam Accession No. 05755) を有していた。*FcREF/SRPP-1* では 20-223 番目のアミノ酸、*FcREF/SRPP-2* では 23-225 番目のアミノ酸の領域がこれに相当し、全長のうちの大部分を占める。また、*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* の推定アミノ酸配列と類似する配列を BLAST 検索し、ヒットした上位 20 位までを Table 2-15 (*FcREF/SRPP-1*), Table 2-16 (*FcREF/SRPP-2*) にそれぞれ示す。これより、これらの配列はクワをはじめとする他の植物の推定 REF/SRPP と類似することが分かった。また、Tong ら[3]によって報告された *Hevea* 由来 REF/SRPP の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を比較した結果を Fig. 2-10 に、他の様々な植物の REF/SRPP と比較した結果を Fig. 2-11 に示す。これより、*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* はどちらも他の植物の REF/SRPP と相同性を示し、どちらも SRPP 特異的領域を有していることが分かった。さらに系統樹解析を行った結果を Fig. 2-12 に示す。*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* は *Hevea* 由来 REF/SRPP で構成されるグループ 1 およびゴム生産植物として知られる *T. brevicorniculatum* (タンポポ) や *L. sativa* (レタス) 由来 REF/SRPP で構成されるグループ 2 のどちらにも含まれなかった。また、*FcREF/SRPP-1* と *FcREF/SRPP-2* のアミノ酸配列は互いに類似するにもかかわらずそれぞれ異なるグループに分類されることが分かった。

これらの配列比較の結果をまとめると、まずクローニングした *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* の推定アミノ酸配列は他の植物の REF/SRPP とよく類似し、REF ドメインを有することからもイチジクの REF/SRPP であると言える。また、どちらも SRPP 特

異的領域を有することから、一次構造から判断すればどちらも **SRPP** に分類されることになる。しかしながら、系統樹解析では **FcREF/SRPP-1** と **FcREF/SRPP-2** が異なるグループに分類され、それぞれ異なる機能を有する可能性が示唆された。したがって、第1章で述べたように、クローニングした **FcREF/SRPP-1** と **FcREF/SRPP-2** を一次構造だけで **SRPP** に分類するべきではないと考えられる。

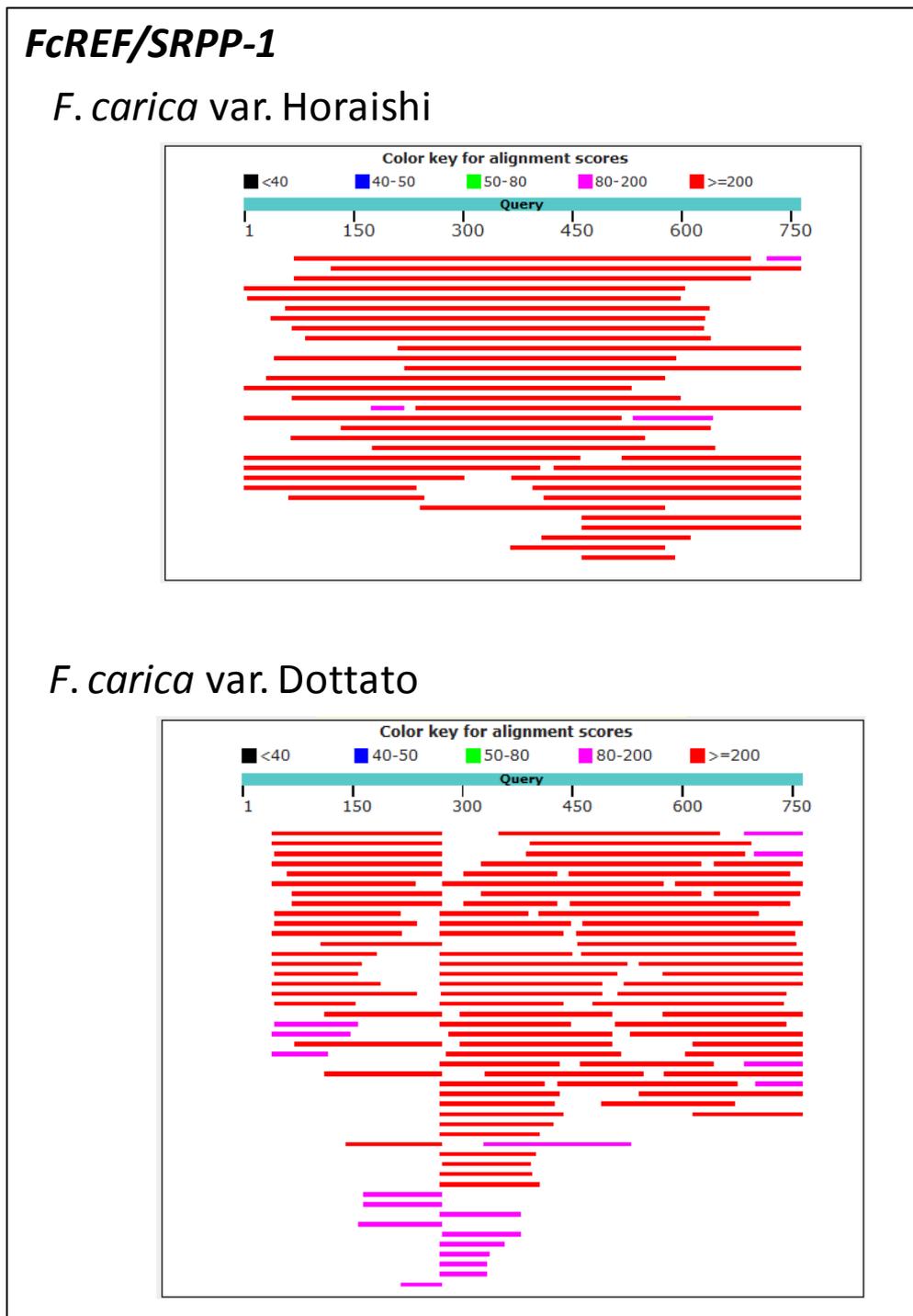


Fig. 2-8. BLAST results of *FcREF/SRPP-1* sequence against genomic sequences of *F. carica* var. Horaishi (DRA004650) and var. Dottato (SRP109082).

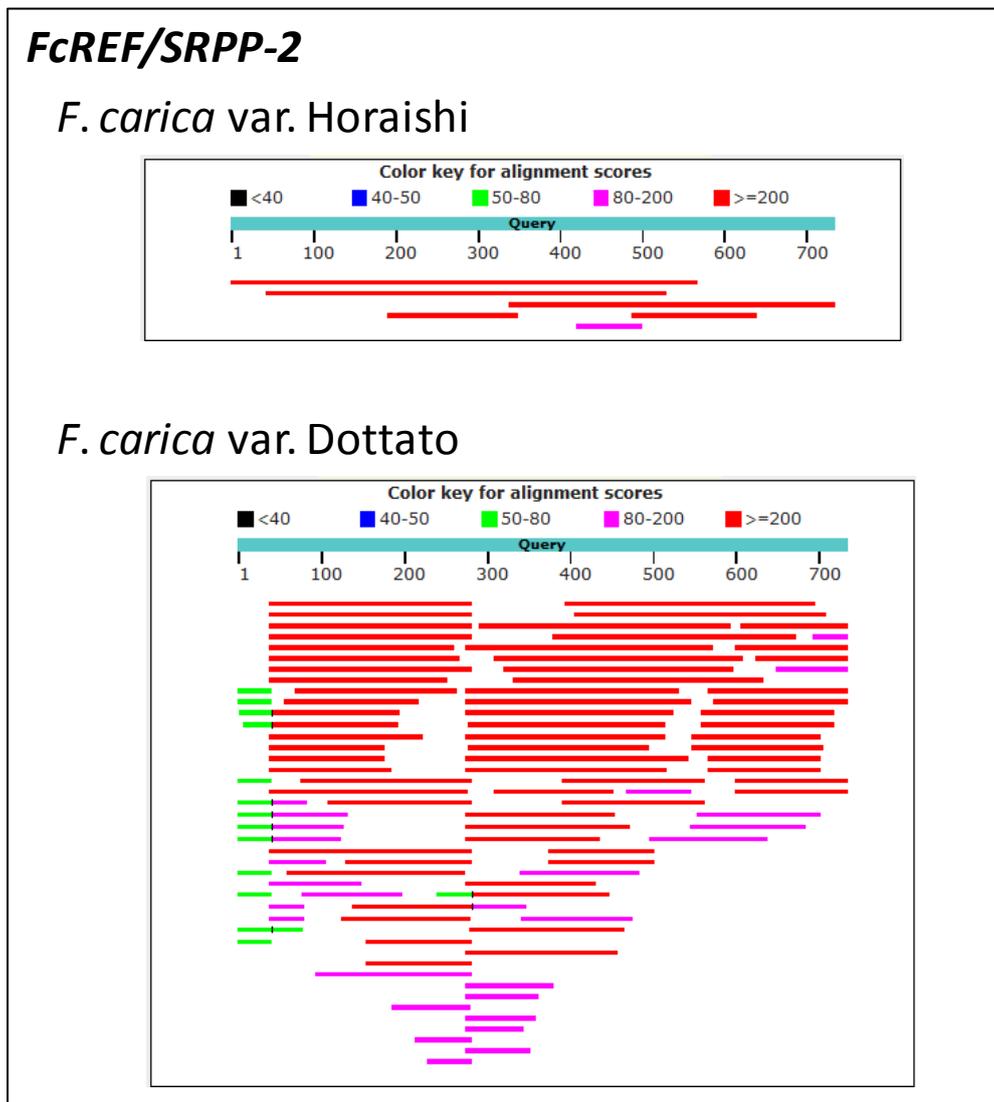


Fig. 2-9. BLAST results of *FcREF/SRPP-2* sequence against genomic sequences of *F. carica* var. Horaishi (DRA004650) and var. Dottato (SRP109082).

Table 2-15. BLAST results of FcREF/SRPP-1 ranked in the top 20.

Description	Query cover	Ident	Accession
rubber elongation factor [<i>Morus alba</i>]	0.98	85%	ACV90044.1
hypothetical protein L484_010823 [<i>Morus notabilis</i>]	0.98	84%	XP_010105659.1
PREDICTED: REF/SRPP-like protein At3g05500 [<i>Juglans regia</i>]	0.93	77%	XP_018850051.1
PREDICTED: REF/SRPP-like protein At3g05500 [<i>Juglans regia</i>]	0.97	75%	XP_018858633.1
PREDICTED: REF/SRPP-like protein At3g05500 [<i>Juglans regia</i>]	0.97	75%	XP_018850055.1
PREDICTED: REF/SRPP-like protein At3g05500 [<i>Ziziphus jujuba</i>]	0.95	73%	XP_015875016.1
REF/SRPP-like protein At3g05500 [<i>Carica papaya</i>]	0.95	74%	XP_021898979.1
PREDICTED: REF/SRPP-like protein At3g05500 [<i>Ziziphus jujuba</i>]	0.92	74%	XP_015870155.1
PREDICTED: REF/SRPP-like protein At3g05500 [<i>Citrus sinensis</i>]	0.98	71%	XP_006472088.1
REF domain-containing protein [<i>Cephalotus follicularis</i>]	0.93	73%	GAV75945.1
PREDICTED: REF/SRPP-like protein At3g05500 [<i>Ricinus communis</i>]	0.91	72%	XP_002512427.1
PREDICTED: REF/SRPP-like protein At3g05500 [<i>Populus euphratica</i>]	0.91	74%	XP_011036864.1
rubber elongation factor family protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	0.91	74%	XP_006382485.1
REF/SRPP-like protein At3g05500 [<i>Manihot esculenta</i>]	0.91	73%	XP_021621261.1
REF domain-containing protein [<i>Cephalotus follicularis</i>]	0.93	73%	GAV75231.1
REF/SRPP-like protein At3g05500 [<i>Herrania umbratica</i>]	0.94	74%	XP_021282623.1
hypothetical protein CICLE_v10003772mg [<i>Citrus clementina</i>]	0.93	73%	XP_006433409.1
Rubber elongation factor [<i>Corchorus olitorius</i>]	0.94	73%	OMP03286.1
REF/SRPP-like protein At3g05500 [<i>Hevea brasiliensis</i>]	0.87	74%	XP_021662186.1
hypothetical protein F383_12676 [<i>Gossypium arboreum</i>]	0.94	71%	KHG30229.1

Table 2-16. BLAST results of FcREF/SRPP-2 ranked in the top 20.

Description	Query cover	Ident	Accession
hypothetical protein L484_009092 [<i>Morus notabilis</i>]	0.92	78%	XP_010090814.1
PREDICTED: stress-related protein [<i>Ziziphus jujuba</i>]	1	64%	XP_015891920.1
PREDICTED: stress-related protein [<i>Vitis vinifera</i>]	1	63%	XP_002263944.1
PREDICTED: stress-related protein [<i>Prunus mume</i>]	0.95	65%	XP_008235050.1
RecName: Full=Stress-related protein	1	62%	Q9SW70.1
Rubber elongation factor [<i>Corchorus capsularis</i>]	0.97	67%	OMO63808.1
Rubber elongation factor [<i>Corchorus olitorius</i>]	0.97	66%	OMO81889.1
REF domain-containing protein [<i>Cephalotus follicularis</i>]	0.91	67%	GAV73864.1
hypothetical protein VITISV_017032 [<i>Vitis vinifera</i>]	0.95	63%	CAN59911.1
PREDICTED: stress-related protein-like [<i>Malus domestica</i>]	1	63%	XP_008386654.1
stress-related protein [<i>Carica papaya</i>]	0.93	66%	XP_021906691.1
stress-related protein [<i>Prunus persica</i>]	1	62%	XP_007201256.1
stress-related protein [<i>Prunus avium</i>]	1	62%	XP_021820033.1
stress-related protein-like isoform X2 [<i>Hevea brasiliensis</i>]	0.96	62%	XP_021675094.1
PREDICTED: stress-related protein-like isoform X1 [<i>Populus euphratica</i>]	0.97	65%	XP_011008041.1
hypothetical protein POPTR_0002s20750g [<i>Populus trichocarpa</i>]	0.97	64%	XP_002301473.1
PREDICTED: stress-related protein-like [<i>Populus euphratica</i>]	0.97	64%	XP_011013203.1
Rubber elongation factor [<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>]	0.97	62%	KVH94476.1
unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	1	60%	CBI36832.3
hypothetical protein PRUPE_8G258700 [<i>Prunus persica</i>]	1	61%	ONH93882.1

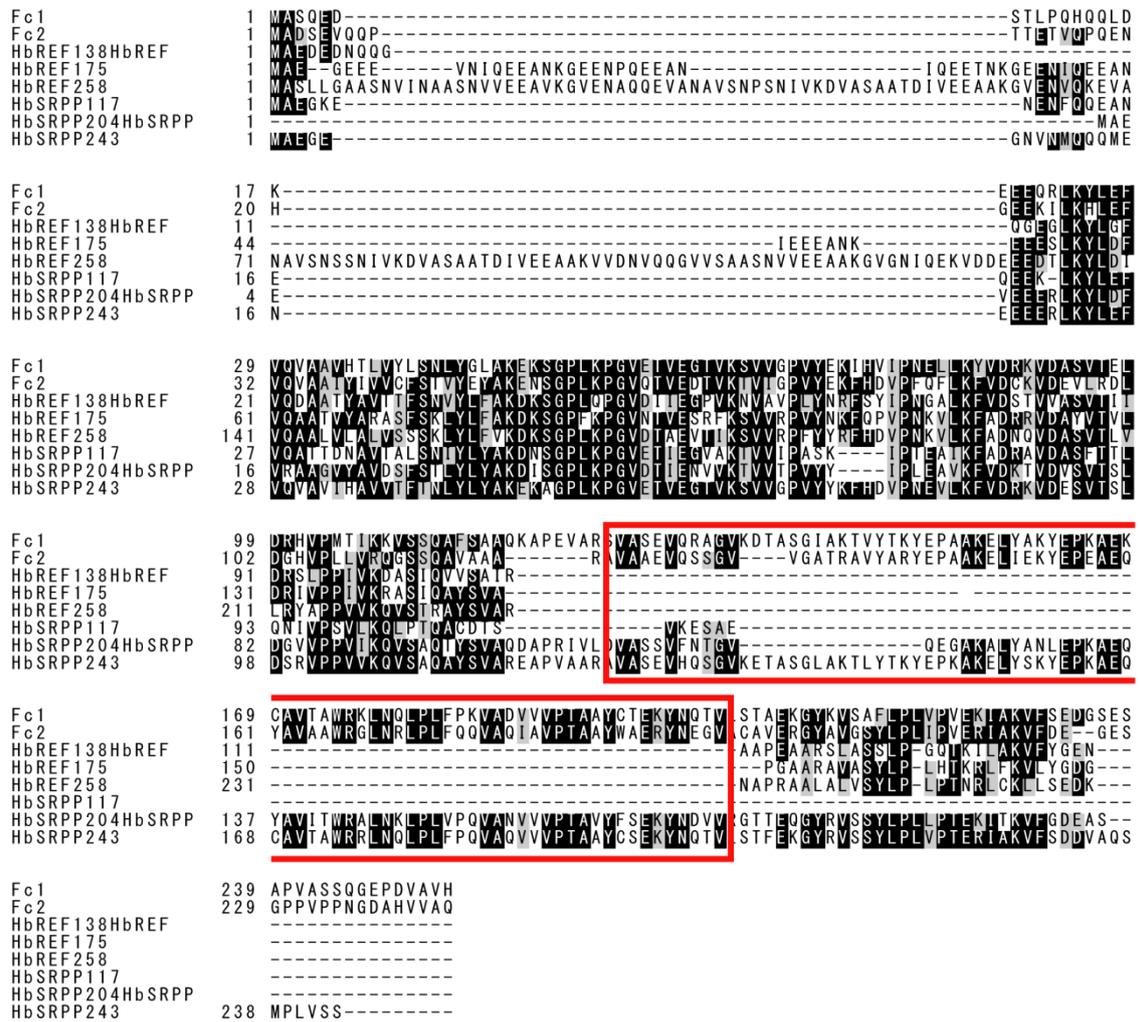


Fig. 2-10. Multiple sequence alignment of REFs and SRPPs from *Hevea brasiliensis* and *F. carica*. Abbreviations and GenBank accession numbers are as follows: Fc1 (FcREF/SRPP-1, FcREF), LC279015; Fc2 (FcREF/SRPP-2, FcSRPP), LC279016; HbREF138 (HbREF), KF734662; HbREF175, KR076813; HbREF258, KT184689; HbSRPP117, AY237009; HbSRPP204 (HbSRPP), HQ640231; HbSRPP243, KR076817. The Red box indicates the SRPP-specific region.

```

Fc1      1 ----MASQEDST-----
Fc2      1 ----MADSEVQQP-----
HbREF138HbREF 1 ----MAEDEDNQQG-----
HbREF175 1 ----MAE--GEEE-----VNIQEEANKGEEENPQEEAN-----I
HbREF258 1 ----MASLLGAASNVINAAASNVEEAVKGVENAAQQEVANAVSNPSNIVKDVASAATDI
HbSRPP117 1 ----MAE--GKEN-----
HbSRPP204HbSRPP 1 ----MAEDEDNQQG-----
HbSRPP243 1 ----MAEGEGNV-----
LsSRPP1_AJC9779 1 ----MAESEANQP-----
LsSRPP2_AJC9779 1 ----MAENA-----
LsSRPP3_AJC9780 1 ----MAEND-----
LsSRPP4_AJC9780 1 ----MSLAD-----
LsSRPP5_AJC9780 1 ----MGLA-----
LsSRPP6_AJC9780 1 ----MAENA-----
LsSRPP7_AJC9780 1 ----MAEND-----
LsSRPP8_AJC9780 1 MDSDEDNVEQGSTELKYLEFLNKIVALFLGLLSNVYTFIKEHIGISEKTIASVESTVGS
TbREF    1 MDSEEAQVNGSTKSKLLDLLKKIFAVYLALVTSVF-----
TbSRPP1_AGE8940 1 ----MADNA-----
TbSRPP2_AGE8940 1 ----MAEND-----
TbSRPP3_AGE8940 1 ----MTDA-----
TbSRPP4_AGE8940 1 ----MADV-----
TbSRPP5_AGE8941 1 ----MADA-----
AtSRP2_Q9FYF7 1 ----MAEDEDNQQG-----
AtSRP1   1 ----MATQTDLA-----
AtSRP3   1 MAEDEIVVEEQSQP-----
CpXP_021898979. 1 ----MAHEDSNS-----
CpXP_021906691. 1 ----MAEEAKQQ-----
Gr_A0A0D2PGY1 1 ----MAQGDSN-----
Jc_A0A067JVA6 1 ----MAEG--EA-----
Lus10015171 1 ----MAETNANP-----
Lus10029892 1 ----MADGNPSP-----
Lus10031493 1 ----MAETNANP-----
Ma_REF_ACV9004 1 ----MAQEDSS-----
Guayule_Q719L3 1 ----MAEPESNQS-----
Pt_REF_family_p 1 ----MAEN--DV-----
Rc_B9RFA8 1 ----MAEQ--NV-----
Tc_REF_isoform1 1 ----MAQGDSN-----
Tc_REF_isoform2 1 ----MAEDEDNQQG-----
Pa_LDAP1_AGQ045 1 ----MAEADAKLQ-----
Pa_LDAP2_AGQ045 1 ----MAEKEGRQQ-----
Rc_B9T0W5 1 ----MAESEVEE-----
Gr_A0A0D2T671 1 --MEKTIIVDADFQKQPV-----
Jc_A0A067JZA9 1 ----MAEAEVKQ-----

```

Fig. 2-11. ClustalW multiple sequence alignment of REF/SRPP proteins from 16 plant species. The alignment was produced with ClustalW and edited with Boxshade. Abbreviations and accession numbers in NCBI database or UniProt database are as follows: Fc1 (FcREF/SRPP-1, FcREF), LC279015; Fc2 (FcREF/SRPP-2, FcSRPP), LC279016; HbREF138HbREF, Q67FW6; HbREF175, A0A182BM80; HbREF258, A0A0S2UQ52; HbSRPP117, Q84T88; HbSRPP204HbSRPP, F8SKC3; HbSRPP243, A0A182BM84; LsSRPP1, AJC97798.1; LsSRPP2, AJC97799.1; LsSRPP3, AJC97800.1; LsSRPP4, AJC97801.1; LsSRPP5, AJC97802.1; LsSRPP6, AJC97803.1; LsSRPP7, AJC97804.1; LsSRPP8, AJC97805.1; TbREF, DR398691 (The sequence was modified, as described in literature [4]); TbSRPP1, AGE89406.1; TbSRPP2, AGE89407.1; TbSRPP3, AGE89408.1; TbSRPP4, AGE89409.1; TbSRPP5, AGE89410.1; AtSRP2, Q9FYF7; AtSRP1, At1g67360; AtSRP3, At3g05500; CpXP 021898979, XP021898979.1; CpXP 021906691, XP 021906691.1; Gr_A0A0D2PGY1, A0A0D2PGY1; Jc_A0A067JVA6, A0A067JVA6; Lus10015171, 10015171; Lus10029892, 10029892; Lus10031493, 10031493; Ma_REF, ACV90044.1; Guayule, Q719L3; Pt_REF family p, B9I7I6; Rc B9RFA8, B9RFA8; Tc_REF_isoform1, A0A061F3K9; Tc_REF_isoform2, A0A061FAH1; Pa_LDAP1, AGQ04593.1; Pa_LDAP2, AGQ04594.1; Rc_B9T0W5, B9T0W5; Gr_A0A0D2T671, A0A0D2T671; Jc_A0A067JZA9, A0A067JZA9. The red box indicates a SRPP-specific region.

```

Fc1          9 -----LPQHQQ-----
Fc2          10 -----TTETVQPQ-----
HbREF138HbREF 11 -----
HbREF175    28 QEETNKGEENIQEEAN-----IEE
HbREF258    55 VEEAAKGVENVQKEVANAVSNSSNIVKDVASAATDIVEEAAKVVDNVQQGVVSAASNVVE
HbSRPP117   8 -----ENFQQEAN-----
HbSRPP204HbSRPP 1 -----MA-----
HbSRPP243   9 -----NMQQQME-----
LsSRPP1_AJC9779 10 -----TEPLVPRD-----
LsSRPP2_AJC9779 6 -----VPVTT-QP-----
LsSRPP3_AJC9780 6 -----VPVTNQQP-----
LsSRPP4_AJC9780 6 -----ASVTDEP-----
LsSRPP5_AJC9780 5 -----ASVTDKP-----
LsSRPP6_AJC9780 6 -----ITVYNQP-----
LsSRPP7_AJC9780 6 -----LPTSNQP-----
LsSRPP8_AJC9780 61 VGELVNKLTDFLQSI L VFVDNKIDEYAPSSLSLLGNLHSQITNPTDTANAALTKTKSLL
TbREF       37 -----QKLEDFLELIHVSVDKVDNYAPSPVKNLHDKFDSHSR-----EAVKTKSLF
TbSRPP1_AGE8940 6 -----VPVSSQPA-----
TbSRPP2_AGE8940 6 -----APVTN-QP-----
TbSRPP3_AGE8940 5 -----ASVTEEP-----
TbSRPP4_AGE8940 5 -----APVTDEP-----
TbSRPP5_AGE8941 5 -----ASVTDEP-----
AtSRP2_Q9FYF7 1 -----METEKKN-----
AtSRP1      9 -----QPKLDMT-----
AtSRP3     16 -----QEITPVPPSSSSSSPSLV-----
CpXP_021898979. 9 -----QKQEMTK-----
CpXP_021906691. 9 -----QAET-----
Gr_A0A0D2PGY1 8 -----FQQDMAK-----
Jc_A0A067JVA6 7 -----NLQKQQ-----
Lus10015171 9 -----ATPAPLT-----
Lus10029892 9 -----PASTPLT-----
Lus10031493 9 -----ATPAPLT-----
Ma_REF_ACV9004 8 -----FPQQMDK-----
Guayule_Q719L3 10 -----AQPVAERD-----
Pt_REF_family_p 7 -----NMQQQLA-----
Rc_B9RFA8    7 -----NLQQQMA-----
Tc_REF_isoform1 8 -----FQQDMAK-----
Tc_REF_isoform2 1 -----MENLKAK-----
Pa_LDAP1_AGQ045 10 -----NDTVQED-----
Pa_LDAP2_AGQ045 10 -----TETVQDR-----
Rc_B9T0W5    9 -----LTLVLPDD-----
Gr_A0A0D2T671 15 --EAESTMKSTVESNHNKQIEAIS-----
Jc_A0A067JZA9 9 -----QTETVQDN-----

```

Fig. 2-11. ClustalW multiple sequence alignment of REF/SRPP proteins from 16 plant species (continued).

```

Fc1 16 -----DKKEEQRLLKYLEFVQVAAVHTLVYLSNLYGLAKEKSGP
Fc2 18 -----ENHGEEKILKHLFVQVAALYIVVCFSTVYIYAKENSGP
HbREF138HbREF 11 -----QGEGRLKYLEFVQDAATYAVTTFSNVYLFKAKKSGP
HbREF175 47 EANK-----EESLKYLDVQAAATVYARASFSLYLFKAKKSGP
HbREF258 115 EAAKGVGNIQEK-----VDDEEDTLKYLDFVQAALVLAIVSSSKLYLFVKKKSGP
HbSRPP117 16 -----EQEEKLLKYLEFVQATTDNVAVTALSNLYLYAKDNSGP
HbSRPP204HbSRPP 3 -----EEVEEERLKYLDVFRAGVYAVDSFSTLYLYAKDISGP
HbSRPP243 16 -----NEEEER-LKYLEFVQVAVTHAVVTFNLYLYAKKAGP
LsSRPP1_AJC9779 18 -----GGEE--HLKYLDVQSAVTFYVVCVCFSTVYIYAKENAGP
LsSRPP2_AJC9779 13 -----EVQTEQERLKYLDVQVAVTHAVVYASRVYGYAKDNSGP
LsSRPP3_AJC9780 14 -----QVQSEQERLKYLDVQVAVTHAVVYASRAYGYAKDNSGP
LsSRPP4_AJC9780 13 -----EVQSEEEKLLKHLDFVEDAVQQVVGIIASSVYDYVKKVKG-
LsSRPP5_AJC9780 12 -----EVQSEDDKLLKHLDFVEDAMQEAAGIASSVYDYVKKVKG-
LsSRPP6_AJC9780 13 -----EAQTEQEKLLKYLTFVQEAAKHAAPYASKAYDYAKENSGS
LsSRPP7_AJC9780 13 -----QDEREQSLKYLDVQKAAQTAVPYVSKAYDYAKENSGP
LsSRPP8_AJC9780 121 GG-IPILGNVGGVTDNISNTTDAAHLLIDKTTSLVTDNPLSQALNTAGKMMEEAQSAG
TbREF 85 VGGIPVLGNVGGITNSIANPKDVANKMIDRTTSLVMDNPVQAQVNSAAEKMMQEAQSAG
TbSRPP1_AGE8940 14 -----EVQSEQEKLLKYLTFVQEAAKQAVPYASKAYDHAKENSGS
TbSRPP2_AGE8940 13 -----EVQTEQEKLLKYLEFVQVAATHAILYATRAYGYAKDNSGP
TbSRPP3_AGE8940 12 -----EVQSEEEKLLKHLDFVEDGVKQAVGYASKAYDYAKDKSGP
TbSRPP4_AGE8940 12 -----EVQSEKETLKHLLDFVEEGIQVAGYASKVYDYAKENAGT
TbSRPP5_AGE8941 12 -----QVQTEGEKLLKYLEFVEEAITQATDYASKVYEFAKEKSGP
AtSRP2_Q9FYF7 8 -----SKEVALKHLAFVRIATTHILASVSNLYEYAKQNSGP
AtSRP1 16 -----KEEKEER-LKYLEFVQAAAVALIRFALTYAKAKKSGP
AtSRP3 33 -----VEDDDEMKLKHLFTQVAAVYFAACFSTLYELAKDNAGP
CpXP_021898799. 16 -----EEE--QRLKYLEFVQVAAFHAVVCVAHLYEKAKEKSGP
CpXP_021906691. 13 -----MEDHDEKLLKHLFVQVAALYIAVCFSSLYEYAKENSGP
Gr_A0A0D2PGY1 15 -----EEEE--QRLKYLEFVQVAAVHAALCFNLYLYAKERLGP
Jc_A0A067JVA6 13 -----IEEEDER-LKYLEFVQVAATHALLAFNLYLYAKKSGP
Lus10015171 16 -----REEEER-LKYLEFVQVAGVHALVTFNLYIYAKDKAGP
Lus10029892 16 -----KEEKEER-LKYLEFVQAAAVALVTFNLYIYAKDKAGP
Lus10031493 16 -----REEEER-LKYLEFVQVAGVHALVTFNLYVYAKDKAGP
Ma_REF_ACV9004 15 -----DKAEEQRLLKYLEFTQVAVTHITIVYLSNLYGKAKEKSGP
Guayule_Q719L3 18 -----GGEEQLHLKYLDFVQNAVTFYVVCVCFSTVYIYAKENAGS
Pt_REF_family_p 14 -----REEEERRLKYLEFVQVAAVHVALVTFNLYIYAKDKAGP
Rc_B9RFA8 14 -----KENEER-LKYLEFVQVAALHAVMTFANLYVYAKDKAGP
Tc_REF_isoform1 15 -----EEE--QSLKYLEFVQVSAVYAVLCFNTLYVYAKERSGP
Tc_REF_isoform2 8 -----EEE--QSLKYLEFVQVSAVYAVLCFNTLYVYAKERSGP
Pa_LDAP1_AGQ045 17 -----EVTTLKYLEFVQIAAVHAVVIVSSTLYDFAKDNSGP
Pa_LDAP2_AGQ045 17 -----EIHSLKYLEFVQLAAVHAIVFVWSTLYNEFAKNSGP
Rc_B9T0W5 17 -----DKKLLKYLDFVQAAAVALVACFSSLYEYAKENSGP
Gr_A0A0D2T671 36 -----NPENIQKLLKYLDFIQVVSIVVVCVSSLYEYAKENSGP
Jc_A0A067JZA9 17 -----DTKLLKYLDFIRVAALYLVVCFSTLYEYAKENSGP

```

Fig. 2-11. ClustalW multiple sequence alignment of REF/SRPP proteins from 16 plant species (continued).

```

Fc1          54 LKPGVETVEGTVKS SVVGPVYEK-----IHLVLPNEILLKLVDR---KVDASVTEILDR
Fc2          57 LKPGVQTVEDTVKTVIGPVYEK-----FHDVVPFQFLKFVDC---KVDEVLRDLDG
HbREF138HbREF 46 LKPGVDIIEGTVKNVAVPLYNR-----FSYTPNGALKFVDS---TVVASVTIILDR
HbREF175     86 FKPGVNTVESRFSKSVVRPVYNK-----FQFVFNKVLKFADR---RVDAYVTVLDR
HbREF258     166 LKPGVDTAEVTLKSVVRPFYYR-----FHDVFNKVLKFADN---QVDASVTIILDR
HbSRPP117    52 LKPGVETIEGVAKTVVIPAS-----KIPTEALKFADR---AVDASFTITLQN
HbSRPP204HbSRPP 41 LKPGVDTIENVVKTVVTPVYY-----IPLAVKVFVDK---TVDVSVTSLDG
HbSRPP243    53 LKPGVETVEGTVKS SVVGPVYYK-----FHDVFNKVLKFVDR---KVDESVTIILDS
LsSRPP1_AJC9779 54 LKPGVHTVESTVKTVIGPVCER-----FHDVPEYELLKFTDL---KVDEALKETLNR
LsSRPP2_AJC9779 52 LKPGVETIEGTLKTVVGPAYVK-----FHDVPEVLLKFVDR---KVDESVTIILDS
LsSRPP3_AJC9780 53 LKPSVETIESTLKTIVVGPAYDK-----FQDVPVDVLLKFVDR---KVDESVTIILDS
LsSRPP4_AJC9780 51 AIPGVETIETTVKNVVGPAIEK-----FQDVPGEVLLKFVDR---KVDEVLPSSVK
LsSRPP5_AJC9780 50 AIPGVETIETTVKS VVGPAIDK-----FQDANVEALKFVDR---KIDEVLPASVK
LsSRPP6_AJC9780 52 LKPGVEAIEGTLKTVISPADCT-----FHNVPGEVLLKFVDR---KVDESVAKAMS
LsSRPP7_AJC9780 52 LKPGVETIESTLKTIVVGPAYDT-----LHEVPEVLLKFADR---QMEESVSKAKS
LsSRPP8_AJC9780 180 KKAALKSVYASITLLLLPLIAEVWYKANTKEWFRRIANLILPLIEKLCNAYNDLVEKLVVD
TbREF        145 KKAALKSVYASITLLLLPLIAELWYKANTKEWFSKLAEVILPLIEKFCWYNDTVDKMEE
TbSRPP1_AGE8940 53 LKPGVEAIEGTLKTVVGPARDT-----FHNVPADVLLKFVDR---KVDESVTKAMA
TbSRPP2_AGE8940 52 LKPSVETIESTLKTIVVGPAYDK-----FHGVPVEVLLKFVDR---KVDESVTIILDS
TbSRPP3_AGE8940 51 LKPHVETLESTIKFPVVGPAIDK-----FQDAHTGVHLLKFVDR---KFDEVMPPAVK
TbSRPP4_AGE8940 51 LKPGVETIETTVKTYGGPAYDT-----LN---GVLKFADNKVAQLDSVLPSSVK
TbSRPP5_AGE8941 51 LKPGVETIETTLKTVVGPAYEK-----YHDVPPVLLKFVDR---KVDES-----
AtSRP2_Q9FYF7 44 LKSAVEKVEGAVTIVVTPVYQK-----FKDVPDSLILVFLDH---KVGEVSYKFE
AtSRP1       53 LKPGVESVEGAVKTVVGPVYEK-----YHDVPEVLLKVMQD---KVDMSVTEILDR
AtSRP3       72 LKLGVENIEDCVRTVLAPLYEK-----FHDVPFKLLLFVDR---KVDDVFFDVET
CpXP_021898979. 52 LKPGVETVEGTVKS SVVGPVYDK-----FHDVPIELLKFVDR---KVDESVTEILDR
CpXP_021906691. 52 LKPGVQTVEGTVKTVIGPVYEK-----FHDVPPFELLKFILDR---KVDESILKEVDK
Gr_A0A0D2PGY1 52 LKPSVETVEGTVKS SVVGPVYDK-----YHDVPEVLLKFVDS---KVGESVTKLDR
Jc_A0A067JVA6 50 LKPGVETVEGTVKS SVVGPVYDK-----FHDVPEVLLKFVDR---KVDESVTIILDR
Lus10015171 53 LKPRVKTMEGTVKNVVGPVYDK-----YQDFPIGVLLKFVDR---KVDESVTIILDS
Lus10029892 53 LKPGVQTVEGTVKS SVVGPVYDK-----LQDVPIEVLLKFVDR---KVDESVTGLDR
Lus10031493 53 LKPRVETMEGNVKS SVVGPVYDK-----YQDFPIGVLLKFVDR---KVDESVTIILDS
Ma_REF_ACV9004 53 LKPGVETVEGTVKS SVVGPVYEK-----VYDIPIELLKFILDR---KVDASVTEILDR
Guayule_Q719L3 56 WKPGVQTVENTVLNVVGPVYEK-----YDYPIEALKFLDV---KVGDLVTEILKR
Pt_REF_family_p 52 LKPGVETVEGTVKS SVVGLVYDK-----FRDVPVIEVLLKFVDR---KVDESVTSLDT
Rc_B9RFA8    51 LKPGVETVEGTVKS SVVGPVYDK-----FHDVPIEVLLKFVDR---KVDESVTKLDR
Tc_REF_isoform1 51 LKPGVETVEGTVKS SVVRPVYDK-----YHDVPEVLLKFVDR---KVGESVTSILDR
Tc_REF_isoform2 44 LKPGVETVEGTVKS SVVRPVYDK-----YHDVPEVLLKFVDR---KVGESVTSILDR
Pa_LDAP1_AGQ045 52 LKPGVQTVEGTVKTVMSPVYEK-----IQDIPLELLKFADR---KVDGFFVQEVDR
Pa_LDAP2_AGQ045 52 LKPGVQTVEGTVKTVVGPVYEK-----FHGVPFKILKFADR---KVDELVHEVDR
Rc_B9T0W5    51 LKPGVKTVETVKTIVIGPVYDK-----FRDIPFELLKFVDR---KIENFLGELGR
Gr_A0A0D2T671 75 LKPGVQTVETVKTIVIGPVYDK-----FRDVPFELLKFVDC---KVDKSLSQLER
Jc_A0A067JZA9 51 LKPGVQAVEGTVKTVIGPVYDM-----FRDVPFELLKFVDH---KVTNNTLSILDR

```

Fig. 2-11. ClustalW multiple sequence alignment of REF/SRPP proteins from 16 plant species (continued).

```

Fc1      101  HVPMTIKKVSSQAFSAAQKAPEVARS-----VASEVQRAGV---
Fc2      104  HVPLLVKQSSQAV-----AAARA-----VASEVQSSG---
HbREF138HbREF 93  STPLIVKDASTQ-----
HbREF175 133  IVPPIVKRASIQ-----
HbREF258 213  YAPPVVKQVSTR-----
HbSRPP117 95  IVPSVLKQLPTQ-----
HbSRPP204HbSRPP 84  VVPPVIKQVSAQTYSVAQDAPRIVLD-----VASSVFNTG---
HbSRPP243 100  RVPPVVKQVSAQAYSVAREAPVAARA-----VASEVHQSGV---
LsSRPP1_AJC9779 101  HVPSSMKQAPSQ-----AKY-----VANNFPEVARDL-
LsSRPP2_AJC9779 99  RVPELLKEVKTA-----GVVETASGLA---
LsSRPP3_AJC9780 100  RVPELLKEVKTA-----GVVETASGLA---
LsSRPP4_AJC9780 98  DATTTAKSFSTE-----VVS DVKN---
LsSRPP5_AJC9780 97  DITATAKSLSTE-----VVS DVKN---
LsSRPP6_AJC9780 99  --TNVAKDIKNH-----GVVETASGLA---
LsSRPP7_AJC9780 99  --ISVAPDIKNV-----GVVETASELM---
LsSRPP8_AJC9780 240  KGYSFFDYLPITPIKEMEAYKLVKTKNDSLAAVAGGIEDVGEMASNVGNIPLVGGIAS
TbREF    205  KGYSFFGYLPTMPILEMETAYKLVKTKNDGIEA----LEDAGEVASGVGNIPIVGGLA-
TbSRPP1_AGE8940 100  --SSVATEIKSH-----GVMETASGFA---
TbSRPP2_AGE8940 99  RVPELLKEVKTA-----GVVETASGLA---
TbSRPP3_AGE8940 98  DATTTARSLSTN-----VASEVKN---
TbSRPP4_AGE8940 97  ---ETAKSLST-----VVS DVKN---
TbSRPP5_AGE8941 93  ---TQIDGVLPP-----IVKDATK---
AtSRP2_Q9FYF7 91  HAPPMAKKVVNQAHVLIYKATEKAQS-----FVKEARTGCP---
AtSRP1   100  RVPPVVKQVSAQAISAAQIPIVARA-----LASEVRRAGV---
AtSRP3   119  YVPSLVKQASSQ-----ALT-----VATEVQRTG---
CpXP_021898979. 99  RMPPVLKQVSAQAFSAAQKAPVMARS-----VASEVHRAGV---
CpXP_021906691. 99  HVPSLVKQAGNH-----AKA-----VANEVHRVG---
Gr_A0A0D2PGY1 99  QVPPVIKQVSTEAILAAQKAPEVARG-----VASEVHRAGV---
Jc_A0A067JVA6 97  RVPPVVRQVSAHAISVARDAPEAARA-----VASEMQLTGV---
Lus10015171 100  HVPTVVKQVSSQALTAQAAPGAARA-----VATEVQRSV---
Lus10029892 100  RVPPVVKQVSAQALSAAQAPGAARA-----VASEVQRSV---
Lus10031493 100  HVPTVVKQVSSQALTATQAAPGAARA-----VATEVQRSV---
Ma_REF_ACV9004 100  HVPATLKQVSSQAFSAAQKAPEVARS-----LASEVQRAGV---
Guayule_Q719L3 103  HVPSLMKQASSQ-----AKY-----TAQNIPEVAKAL-
Pt_REF_family_p 99  HVPELLKQVSAQALSAAQNAPVAARA-----VASEVQRSV---
Rc_B9RFA8 98  RVPPVVKQVSAQAYSVAREAPVAARA-----VASEVQRTGV---
Tc_REF_isoform1 98  RVRPVIKQVSSQAFSVAQKAPGVARG-----VASEVQRAGV---
Tc_REF_isoform2 91  RVRPVIKQVSSQAFSVAQKAPGVARG-----VASEVQRAGV---
Pa_LDAP1_AGQ045 99  HVPELVKQASSQAFSAAHRAPEVARS-----IKSELNRVG---
Pa_LDAP2_AGQ045 99  HVPVVKQVSSQAFSAA-----RS-----VSSEVQRAG---
Rc_B9T0W5 98  LVPSLVKHASN-----ARS-----VACEVQRAG---
Gr_A0A0D2T671 122  HVPVVKQVSSQ-----ART-----VASEVQRVG---
Jc_A0A067JZA9 98  YVPSVVKQASSQ-----ARS-----LASEVQRAG---

```

Fig. 2-11. ClustalW multiple sequence alignment of REF/SRPP proteins from 16 plant species (continued).

```

Fc1      137 -----KDTASGIAKTVYTKYEPAAKELYAKYEPKAEKC
Fc2      132 -----VVGATR----AVYARYEPAAKELIEKYEPAEQY
HbREF138HbREF 105 -----
HbREF175 145 -----
HbREF258 225 -----
HbSRPP117 107 -----
HbSRPP204HbSRPP 119 -----VQEGAKALYANLEPKAEQY
HbSRPP243 136 -----KETASGLAKTLYTKYEPKAKELYSKYEPKAEQC
LsSRPP1_AJC9779 128 -----ALEAFKTARKTANTLYIKYEPTAKELYKSYEPVAEQY
LsSRPP2_AJC9779 121 -----KTAYTKLEPTAKGLYVKYEPVAEQY
LsSRPP3_AJC9780 122 -----KTAYTKLEPTAKGLYVKYEPVAEQY
LsSRPP4_AJC9780 117 -----NGLVETAKELLVKIEPVAEY
LsSRPP5_AJC9780 116 -----NGLVETTKDILLVKIEPAAEY
LsSRPP6_AJC9780 119 -----KSAYTKLEPSAKELLVKYEPVAEQY
LsSRPP7_AJC9780 119 -----KTAYTTIEPTANELLTKYEPVAEQY
LsSRPP8_AJC9780 300 SITETADHMIDNTASLVMDNPLSQAVESAADNMIQGTTEEFATKAALHSVGSALTLLICPA
TbREF    260 ---QTADQVMDNTASLVMDNPLTQAVESAADMIENTTEELATKAALKAVYAALTVLICPA
TbSRPP1_AGE8940 120 -----KTAYTKMEPTAKELHVKYEPVAEQY
TbSRPP2_AGE8940 121 -----KTAYTKLEPAKGLYVKYEPVAEQY
TbSRPP3_AGE8940 117 -----NGVLGTAKELLVKIEPLAEY
TbSRPP4_AGE8940 113 -----VGVVETVKELLLIKMEPTVEDY
TbSRPP5_AGE8941 109 -----VGVVETAKEFLEKIDPVAEKY
AtSRP2_Q9FYF7 127 -----KAAFNYAATEYKFFVVTN
AtSRP1   136 -----VETASGMAKSVYSKYEPAAKELYANYEPKAEQC
AtSRP3   143 -----VVDTTKSIARSVRDKYEP-----AABYY
CpXP_021898979. 135 -----VDTASGFAKSVYTKCEPTAKELYSKYEPKAEQC
CpXP_021906691. 123 -----VVDAAKSITRSVLAKYEPTAKELYESYEPVAEQY
Gr_A0A0D2PGY1 135 -----VNTASGLAKSVYTKYEPTAKELYAKYEPKAEQC
Jc_A0A067JVA6 133 -----KETASGFAKTLYTKYEPKAKELYTKYEPKAEQC
Lus10015171 135 -----VKGLAKTVYTKYEPKAKELYTAYEPKAEQC
Lus10029892 136 -----KETVTGLAKNVYTKYEPKAKELYTEYEPKAEQC
Lus10031493 135 -----VTGLAKAVYTKYEPKAKELYTAYEPKAEQC
Ma_REF_ACV9004 136 -----KDTASGIAKTVFTKYEPAAKELYAKYEPKAEQC
Guayule_Q719L3 130 -----ATEAFKTATNVANTLYVKCEPTAKQLYMNYPVABKY
Pt_REF_family_p 135 -----KGTASELAKTVYAKYEPTAKELYSKYEPKAEQA
Rc_B9RFA8 134 -----KETASGLAKTLYAMYEPKAKELYSKYEPKAEQC
Tc_REF_isoform1 134 -----VSTASGYAKSVYTKYEPAAKGLYAKYEPKAEQC
Tc_REF_isoform2 127 -----VSTASGYAKSVYTKYEPAAKGLYAKYEPKAEQC
Pa_LDAP1_AGQ045 134 -----VVDTATEMTKAAYATLEPTAKDLYIRYEPVABHY
Pa_LDAP2_AGQ045 127 -----VIDTAAELAKVAYTRVQPTVKELYIRYEPVABGY
Rc_B9T0W5 122 -----VVDAAKNIKRVIYEMYEPMAWELVCMYEPVABHY
Gr_A0A0D2T671 146 -----VVDVAKSITRDIYTKYKLTAKAMYDKYERVAEQY
Jc_A0A067JZA9 122 -----VVDATRSIVKIMYSQVELTAKELYCKYEPVABHY

```

Fig. 2-11. ClustalW multiple sequence alignment of REF/SRPP proteins from 16 plant species (continued).

```

Fc1      170 AVTAWRKLNLPLFPKVAQVVVPTAAYCTEKYNQTVLSTAEKGYKVSASFLPLVPVEKIAK
Fc2      162 AVAAWRGLNRLPLFQQVAQIAVPTAAYWAERYNEGVAQAFERGYAVCSYLPLIPVERIAK
HbREF138HbREF 105 -----VVSAIRAAPFAARSLSSSLPGQ-TKILAK
HbREF175 145 -----AYSVA---PGAARAVSYLPLH-TKRLFK
HbREF258 225 -----AYSVARNAPRAALALSYLPLP-TNRLCK
HbSRPP117 107 -----ACDTS--VRESAE-
HbSRPP204HbSRPP 138 AVITWRALNKLPLVPOVANVVVPTAVYFSEKYNQVVRGTTTEGGYRVSSYLPLLPTEKITK
HbSRPP243 169 AVTAWRRLNQLPLFPOVAQVVVPTAAYCSEKYNQTVLSTTEKGYRVSSYL-----
LsSRPP1_AJC9779 165 AVSAWRSMHKLPLVFPQVAQVAVPTAAFVAEKYNYVVCFTAEKGYLVAQYLPLIPTEKIAK
LsSRPP2_AJC9779 146 AASAWHSLNQLPLFFKVANVVVPTAAYYSEKYNQTVQQTAEKGYKVSYSYLPLVPTEKIAK
LsSRPP3_AJC9780 147 AASAWHSLNQLPLFPKVAEIVVVPKAAAYYSEKYNQTVQQTAEKGYKVSYSYLPLVPTEKIAK
LsSRPP4_AJC9780 138 ASSAWETLSQIPLLSKIVNAFAPAAATLVADKYNETVQQTAEKGYKVSFLPLVPTEKIAK
LsSRPP5_AJC9780 137 ASSAWETLSKIPLLTNVAKAFAPAAATLVADKYNETVQQTAEKGYKVSFLPLVPTEKIAK
LsSRPP6_AJC9780 144 AASAWHSLNKMPLFRSVAKVVIPTAAFLSEKYNQTVQQTAEKGYKVSYSYLPLVPTEKIAK
LsSRPP7_AJC9780 144 AASAWQSLNKVPLFRSVAKAVIPTAGYVSQKYNQTVKQTNTEKGYKVSYSYLPLVPTEKIAK
LsSRPP8_AJC9780 360 IAEVCYKLSQYKIIKAMGKATLPLIEKLCEWYNQKLEDLDEGGYSFFGYLPTMPTTEMKV
TbREF    317 IAEVCYKLRFAKALCKMILPLIEELCEWYNQKLELDEKGYSSFFGYLPTVPTITEMKV
TbSRPP1_AGE8940 145 AAAAWHSLNKMPLFRSVAKVVIPTAAFLSEKYNQTVQHTAEKGYQVSSYLPLVPTEKIAK
TbSRPP2_AGE8940 146 AASAWHSLNQLPXFPKVANVVVPTAAYYSEKYNQTVQQTAEKGYKVSYSYLPLVPTEKIAK
TbSRPP3_AGE8940 138 ASSAWKTLNYPYVTTFAKAVAPTASYSEKYNQTVQQTAEKGYKVSYSYLPLVPTEKIAK
TbSRPP4_AGE8940 134 ASSAWKTSIDLPLVAKLAAAIAPLATYITEKYNQTVQQTAEKGYKVSYSYLPLVPTEKIAK
TbSRPP5_AGE8941 130 ASSAWSTVNQLPLVASTVKALTPSAAALVTEKYNQTVKEN-----ASFLPLVPTEKIAK
AtSRP2_Q9FYF7 145 SVKVVAKLNQYKPIHAMGDKALPVAHFSSRYNDLVTDMTNMGYSLVGYLPLVPVDDIVK
AtSRP1   169 AVSAWKKNLQLPLFPRVAQVAVPTAAFCSEKYNQTVVKAEEKGYRVISYMLPLVPTEKISK
AtSRP3   166 AATLWRLNQLPLFPPEVAHLVVIPTAFYWSEKYNDAVRYVGDRTDFGAEYLPMPITEKISD
CpXP_021898979. 168 AASAWRKLNQLPLFPOVAQVVIPTAAYCTEKYNQTVVSTAEKGYRVSSYLPLVPTEKIAK
CpXP_021906691. 157 AVSAWQTLNRLPLFPOVAEIAVPTAAYGSEKYNQVICYTEERGYAVASYLPMIPTEKITA
Gr_A0A0D2PGY1 168 AVSAWRKLNMLPLFPOVASVVVPTAAYCSDKYNETVVSSTAEKGYKVSASYLPLVPTEKIAK
Jc_A0A067JVA6 166 AANAWRKLNQLPLFPOVAQVVVPTAAYCSEKYNQTVVSTAEKGYRVSSYLPLVPTEKIAK
Lus10015171 165 AASAWRRLNQLPLFPOVAHVVVPTAAYWSEKYNQTVSSTAEKGYKVSYSYLPLVPTEKIAK
Lus10029892 169 AVSAWRRLNQLPLFPOVAQVVVPTAAYWSEKYNQTVVSTAEKGYKVSFLPLVPTEKIAK
Lus10031493 165 AASAWRRLNQLALFPOVADVVPVPTAAYWSEKYNQTVSSTAEKGYKVSYSYLPLVPTEKIAK
Ma_REF_ACV9004 169 AVTAWRKLNQLPLFPKVAQVVVPTAAYYTEKYNQTVISTAEKGYKVSYSYLPLVPTEKIVK
Guayule_Q719L3 167 TVSTWRSNLNQLPLFPOVAQIAVPTAAYVLEKYNQVSYTADKGYAVQYLPLVPTEKIAK
Pt_REF_family_p 168 AVSAWRKLNQLPLFPOVAQVVVPTAAFCSEKYNQTVVSTAEKGYRVSSYLPLVPTEKIAK
Rc_B9RFA8 167 AVSAWRKLNQLPLFPOVAQVFVPTAAYCSEKYNQTVVSTAEKGYRVSSYLPLVPTEKIAQ
Tc_REF_isoform1 167 AVSAWRKLNQLPLFPOVASVVVPTAAFCCTDKYNQTVVSSAEKGYKVSASYLPLVPTEKIAE
Tc_REF_isoform2 160 AVSAWRKLNRLPLFPOVASVVVPTAAFCCTDKYNQTVVSSAEKGYKVSASYLPLVPTEKIAE
Pa_LDAP1_AGQ045 168 AVSAWRSLNRLPLFSEVAHIVVPTAAYWTDKYNKGVRYMEVKGFGVASYMPLVPTEKIAK
Pa_LDAP2_AGQ045 161 AVSAWRSLNRLPLFPEVAHIVVPTAAYWSEKYNRSVLHIAKGYMVSAYMPLVPTEKIAK
Rc_B9T0W5 156 AVSVWRCLNRLPLFPOAAQIAVPTAAYWSEKYNQIVCYTADRGYPAAAYLPLIPTEWIAK
Gr_A0A0D2T671 180 AVFAWRSLNRLPLFPOVAQVVLPTAAYWSEKYNQVQHFGENGYVVAAYLPLIPLNRIAK
Jc_A0A067JZA9 156 AVLAWRSLNRLPLFPOAAQIVVPTAAYWSEKYNQAVCHTANRGYTAATYLPPLIPDRITK

```

Fig. 2-11. ClustalW multiple sequence alignment of REF/SRPP proteins from 16 plant species (continued).

```

Fc1      230 VFSED-GSESAP-----VASSQGE PDVA VH-----
Fc2      222 VFDEGESGPPVPPN-----GDAHVVAQ-----
HbREF138HbREF 133 VFYGEN-----
HbREF175 170 VLYGDG-----
HbREF258 253 LLSEDK-----
HbSRPP117 -----
HbSRPP204HbSRPP 198 VFGDEAS-----
HbSRPP243 -----
LsSRPP1_AJC9779 225 VFQEGHHEPTVGQA-----IHVDT-----
LsSRPP2_AJC9779 206 VFNSTPA-----
LsSRPP3_AJC9780 207 VFNPTD-----
LsSRPP4_AJC9780 198 VFTIPEAEPAKAAGGE-----EAAEVAGGEEAAEVPAAEGETVQEE-----
LsSRPP5_AJC9780 197 VFTIPKAEP-----ADVAGGEEAAEVPGVEGEIVVEE-----
LsSRPP6_AJC9780 204 VFKSPEQ-EAEFEPE-----PVVHGGEAGAVVAH-----
LsSRPP7_AJC9780 204 VFKDPES--SEEDPE-----PVSSEGGASGVAR-----
LsSRPP8_AJC9780 420 AYMLVKTANAGLETVG-----SGLSAVGDVVGLNDDEE-----
TbREF    377 AYKLVKMANGGLEVVG-----GGLEAVGGAVGLNDDDD-----
TbSRPP1_AGE8940 205 VFKAPEEPEVELEPE-----HVVHSGEEGAVVAH-----
TbSRPP2_AGE8940 206 VFNPV-----
TbSRPP3_AGE8940 198 VFCIPEPESAGPGGEA-----KDKEVPGGGEGGEEAAAGGDEIVEET-----
TbSRPP4_AGE8940 194 VFSTSTKED-----EEVPGGLGGEEATEVP-----
TbSRPP5_AGE8941 183 VFSIPEKDAEKP-----EPAVVPGGEEAAEVEVAGGGGAE-----
AtSRP2_Q9FYF7 205 AYEKEDARRKKGGDTAG-----KKGETTDAADGDKSSSDSE-----
AtSRP1   229 VFAEKAETEP-----LEFHPLD-----
AtSRP3   226 ILEQ----DQCRAD-----
CpXP_021898979. 228 VFGEEKTEYQP-----MISSSS-----
CpXP_021906691. 217 VFEEGHNGDPVTAT-----TINGKSAMAQ-----
Gr_A0A0D2PGY1  228 VFGEQ--TTEMQP-----LVSES-----
Jc_A0A067JVA6  226 VFRDEEPQYTP-----LVSS-----
Lus10015171    225 VFGGGDQVS-----VSN-----
Lus10029892    229 VFSPPAAGTTP-----LVSN-----
Lus10031493    225 VFGGEDQIPQDVIVDILPRLGTKDLARYSRVSKQWLSMIDHPEFIRGQLHRSLANSNS
Ma_REF_ACV9004  229 VFSEN-GAEFEP-----LVSKQGEADVAVH-----
Guayule_Q719L3 227 VFKKGESGSTVGQS-----G-----
Pt_REF_family_p 228 VFG-EVPESTP-----LISS-----
Rc_B9RFA8      227 VFRNEVPESAP-----IASS-----
Tc_REF_isoform1 227 VFNEE-KPESEP-----LVSHS-----
Tc_REF_isoform2 228 VFNEE-KPESEP-----LVSHS-----
Pa_LDAP1_AGQ045 220 VFGEREIVLEMS-----PMTTSEVVN-----
Pa_LDAP2_AGQ045 221 VFGGEEDGSKLDSGRVEPP-----PSAGADVAVAEE-----
Rc_B9T0W5      216 VFDGGVNGPTISSN-----GEAVTEL-----
Gr_A0A0D2T671  240 VFIDGRAPVVSSN-----GESVLRQ-----
Jc_A0A067JZA9  216 VFDES VNGPNGSIS-----GERITAQ-----

```

Fig. 2-11. ClustalW multiple sequence alignment of REF/SRPP proteins from 16 plant species (continued).

```

Fc1 -----
Fc2 -----
HbREF138HbREF -----
HbREF175 -----
HbREF258 -----
HbSRPP117 -----
HbSRPP204HbSRPP -----
HbSRPP243 -----
LsSRPP1_AJC9779 -----
LsSRPP2_AJC9779 -----
LsSRPP3_AJC9780 -----
LsSRPP4_AJC9780 -----
LsSRPP5_AJC9780 -----
LsSRPP6_AJC9780 -----
LsSRPP7_AJC9780 -----
LsSRPP8_AJC9780 -----
TbREF -----
TbSRPP1_AGE8940 -----
TbSRPP2_AGE8940 -----
TbSRPP3_AGE8940 -----
TbSRPP4_AGE8940 -----
TbSRPP5_AGE8941 -----
AtSRP2_Q9FYF7 -----
AtSRP1 -----
AtSRP3 -----
CpXP_021898979. -----
CpXP_021906691. -----
Gr_A0A0D2PGY1 -----
Jc_A0A067JVA6 -----
Lus10015171 -----
Lus10029892 -----
Lus10031493 285 TLFLQDRKLDHTTLLLETEVWVWRYRLLLQPDPLRFPASEVDGFFSRGMLFSFQLSTWFRSI
Ma_REF_ACV9004 -----
Guayule_Q719L3 -----
Pt_REF_family_p -----
RC_B9RFA8 -----
Tc_REF_isoform1 -----
Tc_REF_isoform2 -----
Pa_LDAP1_AGQ045 -----
Pa_LDAP2_AGQ045 -----
RC_B9T0W5 -----
Gr_A0A0D2T671 -----
Jc_A0A067JZA9 -----

```

Fig. 2-11. ClustalW multiple sequence alignment of REF/SRPP proteins from 16 plant species (continued).

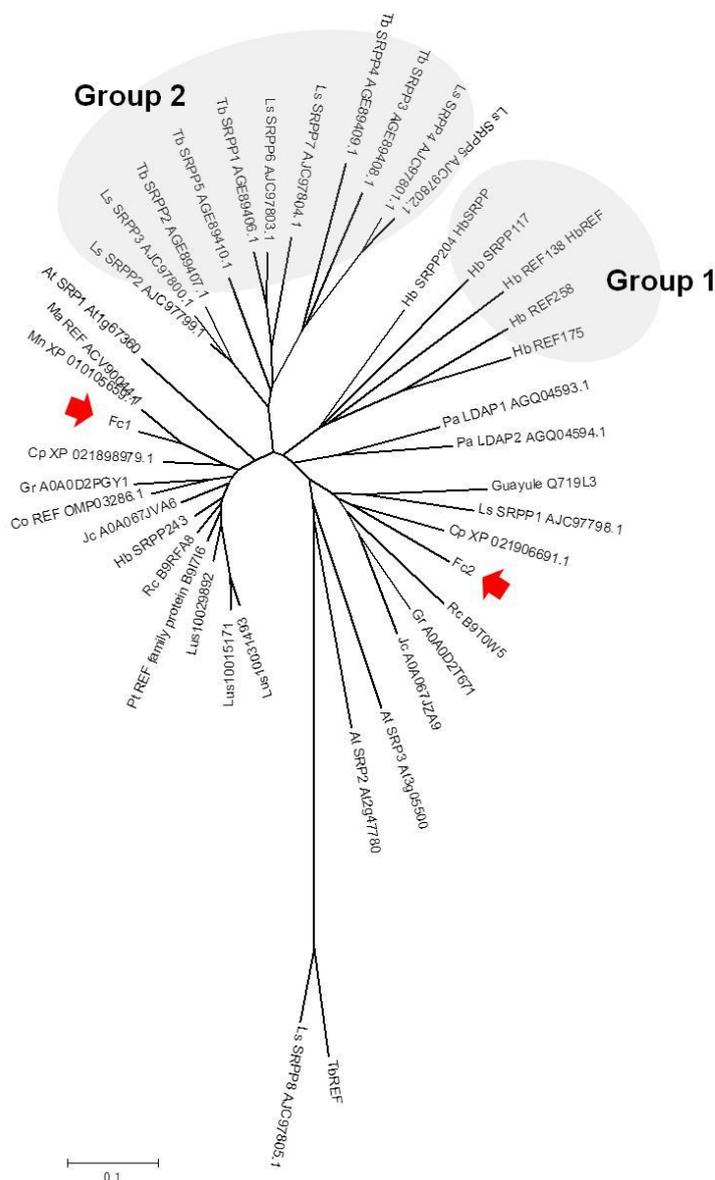


Fig. 2-12. Phylogenetic analysis of the REF/SRPP proteins from 16 plant species. The alignment was produced with ClustalW and the tree was constructed using MEGA6.06. Protein abbreviations are as follows: Fc1 (FcREF/SRPP-1, FcREF), LC279015; Fc2 (FcREF/SRPP-2, FcSRPP), LC279016; HbREF138HbREF, Q67FW6; HbREF175, A0A182BM80; HbREF258, A0A0S2UQ52; HbSRPP117, Q84T88; HbSRPP204HbSRPP, F8SKC3; HbSRPP234, A0A182BM84; LsSRPP1, AJC97798.1; LsSRPP2, AJC97799.1; LsSRPP3, AJC97800.1; LsSRPP4, AJC97801.1; LsSRPP5, AJC97802.1; LsSRPP6, AJC97803.1; LsSRPP7, AJC97804.1; LsSRPP8, AJC97805.1; TbREF, DR398691 (The sequence was modified, as described in literature [4]); TbSRPP1, AGE89406.1; TbSRPP2, AGE89407.1; TbSRPP3, AGE89408.1; TbSRPP4, AGE89409.1; TbSRPP5, AGE89410.1; AtSRP2, Q9FYF7; AtSRP1, At1g67360; AtSRP3, At3g05500; CpXP 021898979, XP021898979.1; CpXP 021906691, XP021906691.1; Gr_A0A0D2PGY1, A0A0D2PGY1; Jc_A0A067JVA6, A0A067JVA6; Lus10015171, 10015171; Lus10029892, 10029892; Lus10031493, 10031493; Ma REF, ACV90044.1; Guayule, Q719L3; Pt REF family p, B9I7I6; Rc B9RFA8, B9RFA8; Pa_LDAP1, AGQ04593.1; Pa_LDAP2, AGQ04594.1; Rc_B9T0W5, B9T0W5; Gr_A0A0D2T671, A0A0D2T671; Jc_A0A067JZA9, A0A067JZA9; Co REF, OMP03286.1; Mn_XP_010105659, XP010105659.

参考文献

1. Mori K, Shirasawa K, Nogata H, Hirata C, Tashiro K, Habu T, Kim S, Himeno S, Kuhara S, Ikegami H: **Identification of RAN1 orthologue associated with sex determination through whole genome sequencing analysis in fig (*Ficus carica* L.)**. *Scientific Reports* 2017, **7**:41124.
2. Solorzano Zambrano L, Usai G, Vangelisti A, Mascagni F, Giordani T, Bernardi R, Cavallini A, Gucci R, Caruso G, D'Onofrio C, et al: **Cultivar-specific transcriptome prediction and annotation in *Ficus carica* L.** *Genom Data* 2017, **13**:64-66.
3. Tong Z, Wang D, Sun Y, Yang Q, Meng X, Wang L, Feng W, Li L, Wurtele ES, Wang X: **Comparative Proteomics of Rubber Latex Revealed Multiple Protein Species of REF/SRPP Family Respond Diversely to Ethylene Stimulation among Different Rubber Tree Clones.** *International Journal of Molecular Sciences* 2017, **18**:958.
4. Laibach N, Hillebrand A, Twyman RM, Prüfer D, Schulze Gronover C: **Identification of a *Taraxacum brevicorniculatum* rubber elongation factor protein that is localized on rubber particles and promotes rubber biosynthesis.** *The Plant Journal* 2015, **82**:609-620.

第3章

組換え大腸菌による FcREF/SRPP-1, -2 の発現と 凝集特性解析

序

第2章でクローニングした FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 の推定アミノ酸配列には、共に C 末端側の SRPP 特異的領域が含まれていた。しかしながら、第1章でも述べたように、SRPP 特異的領域の存在だけでこれらを SRPP に分類するには疑問が残る。一方で、第1章でも記したように、組換え大腸菌で調製された *Hevea* 由来 REF (HbREF) と SRPP (HbSRPP) はバルク溶液中で異なる凝集特性を示すことが近年報告されている。そこで本章では、組換え大腸菌を用いて FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 発現系を構築し、各組換えタンパク質を調製した。また、HbREF も同様に調製し、これらのタンパク質の凝集特性を比較した。

3.1 実験操作

・試薬・キット類

遺伝子組換え実験に必要な試薬, キット類は第2章に記載したものをを用いた。その他, 組換えタンパク質の精製のための Ni アフィニティークロマトグラフィー担体 (profinity IMAC Ni-charged Resin) はバイオラッドより購入した。また, 精製タンパク質からの尿素の除去には GE ヘルスケアのゲルろ過カラム PD-10 を使用した。Bradford 法によるタンパク質濃度測定にはサーモフィッシャーサイエンティフィック社の Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit を用いた。ウェスタンブロットのためのメンブレンはバイオラッド社製の Immun-Blot Poly Vinylidene Di-Fluoride (PVDF)メンブレンおよびニトロセルロースメンブレン 0.45 μm を用いた。タンパク質分子量マーカーはサーモフィッシャーサイエンティフィックおよび GeneDireX の製品を, 抗体は MBL およびプロテインテックの製品を使用した。

・機器類

超音波発生機は TOMY UD-200 を, ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置はバイオラッドのミニプロティアン Tetra セルシステムおよびアトーのパジェラン Ace を使用した。転写装置はバイオラッド社製のトランスブロット SD セルおよびミニトランスブロットセルを用い, 電源装置はバイオラッド社製の PowerPac HC パワーサプライを使用した。また, 円二色性分散計は JASCO J-720 を, 透過型電子顕微鏡 (TEM) は JEOL JEM 1200Ex II を用いた。その他, 第2章と共通する機器は同じ物を使用した。

3.1.1 FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 発現プラスミドの調製

第2章で作製したプラスミド (pCold-FcREF/SRPP-1 fragment, pCold-FcREF/SRPP-2 fragment) においては, コーディング領域の全配列を決定するために開始コドンの上流に余分な DNA 配列が挿入されている。しかし, pCold I ベクターにはマルチクローニングサイトの 5'側に開始コドンおよび His タグ配列があらかじめ挿入されているため, このままでは FcREF/SRPP-1 では翻訳フレームがずれ, FcREF/SRPP-2 では 5'側に余計なコドンが挿入されてしまう。したがって, タンパク質発現用のプラスミドを調製し直す必要がある。そこで, pCold-FcREF/SRPP-1 fragment および pCold-FcREF/SRPP-2 fragment

を鋳型とし、Table 3-1 に示すプライマーセットを用いて開始コドンから終始コドンまで (*FcREF/SRPP-2* は終止コドンの 22 塩基後ろまで) の *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* の cDNA を PCR により増幅した。PCR 産物は Gel/PCR Extraction Kit (FastGene) により精製し、BamHI および HindIII で切断した後、pCold I ベクターの同サイトに挿入した。PCR 溶液の組成と PCR 条件は Table 2-4 および Table 2-5 と同様である。ただし、アニーリング温度は 65°C とした。制限酵素処理およびライゲーションは第 2 章と同様に行った。得られたライゲーション産物を用いて *E. coli* HST08 を形質転換した後、コロニー PCR によって形質転換体を選別し、プラスミド (pCold-REF/SRPP-1 および pCold-REF/SRPP-2) を抽出した。目的遺伝子の挿入を確認するため、得られたプラスミドについて DNA シーケシングを行った。形質転換、コロニー PCR、プラスミド抽出および DNA シーケシングの操作も第 2 章と同様である。

Table 3-1. Nucleotide sequence primers used for PCR amplification of *FcREF/SRPP-1* and -2 cDNAs.

Primer name	Oligonucleotide sequence (5' - 3')	Amplification of
Fw-fig tree_Fc1_Sub	CGGGATCC <u>ATGGCCTCACAAGAAG</u>	<i>FcREF/SRPP-1</i>
Rv-fig tree_Fc 1_Sub	CCCAAGCTT <u>TCAGTGAACAGCAACATC</u>	
Fw-fig tree_Fc 2_Sub	CGGGATCC <u>ATGGCGGATTCG</u>	<i>FcREF/SRPP-2</i>
Rv-fig tree Fc 2	CCCAAGCTT <u>GAAATCAACGGCTCTG</u>	

Underlined sequences correspond to restriction endonuclease recognition sites.

3.1.2 組換えタンパク質 *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* の発現と精製

・ *E. coli* BL21 の形質転換

3.1.1 で調製したプラスミド (pCold-REF/SRPP-1 および pCold-REF/SRPP-2) を *E. coli* BL21 に導入した。コンピテントセルの作製および形質転換の操作は第 2 章と同様である。得られた形質転換体はグリセロールストックとして -80°C 保存した。

・ *E. coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS の形質転換

E. coli Rosetta-gami 2(DE3)pLysS を宿主とし、これを pCold-REF/SRPP-2 で形質転換した。*E. coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS は、ジスルフィド結合の形成を助ける Origami2 株にコドン補充プラスミドである pRARE2 と非誘導時の発現漏れを抑制するための T7 リ

ゾチームプラスミド pLysS が導入された大腸菌である。コンピテントセルおよび形質転換体の作製方法は *E. coli* BL21 を用いた場合と同様である。ただし、コンピテントセルの作製には SOB 培地に、形質転換体の選別および培養には LB (Amp) にそれぞれクロラムフェニコール (Cm) を 30 µg/mL となるように加えた。

・ FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 の発現

作製したグリセロールストック (*E. coli* BL21/pCold-REF/SRPP-1, *E. coli* BL21/pCold-REF/SRPP-2 および *E. coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS/pCold-REF/SRPP-2 を白金耳で掻き取り, LB(Amp)または LB(Amp, Cm)寒天プレートに植菌し 37°C で一晩培養した。形成されたコロニーを掻き取り, LB (Amp) または LB(Amp, Cm)液体培地に接種して 37°C で一晩前培養し, その前培養液を新しい LB (Amp) または LB(Amp, Cm)液体培地に培地の 1/100 量添加して OD₆₀₀ が 0.6 になるまで 37°C で振とう培養した。得られた培養液は氷上で 30 分間冷却し, IPTG を 1 mM 添加した後 15°C で 24 時間振とう培養し, 組換えタンパク質 FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 の発現を誘導した。

・ 大腸菌不溶性画分の回収と不溶性タンパク質の可溶化

遠心分離 (5,000 × g, 4°C, 5 min) により細胞ペレットを回収し, 液体窒素で一度凍結させた後, Buffer A (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0) に懸濁して超音波照射により細胞を破碎した。遠心分離 (20,000 × g, 4°C, 5 min) により不溶性画分を回収し, Buffer A で 2 回洗浄した。得られたペレットに Buffer B (8 M 尿素含有 Buffer A) を添加して不溶性タンパク質を可溶化させた後, 遠心分離 (15,000 × g, 4°C, 10 min) によって細胞デブリを除き, 可溶化した不溶性タンパク質を回収した。

・ Ni アフィニティークロマトグラフィーによる FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 の精製

pCold I ベクターは目的タンパク質の N 末端に His タグが付加されるように設計されている。そこで, 発現させた FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 は Ni アフィニティークロマトグラフィーで精製した。まず, 可溶化させた不溶性タンパク質 (約 50 mL) と profinity IMAC Ni-charged Resin (ベッド体積 5.3 cm³, バイオラッド) を室温で一晩混合した。これをエコノカラム (φ 1.5 × 15 cm, バイオラッド) に充填し, カラム体積の 5

倍量の Buffer B で洗浄した後、カラム体積の 3 倍量の 100 mM イミダゾール含有 Buffer B で組換えタンパク質 FcREF/SRPP-1 または FcREF/SRPP-2 を溶出した。精製した FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 溶液は、PD-10 カラムにより 10 w/v% グリセロール含有 Buffer A に Buffer 置換した。得られた精製 FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 溶液は Bradford 法によりタンパク質濃度を測定した後、0.2 mL チューブに少量ずつ分注し、使用直前まで -80°C で保存した。

3.1.3 組換えタンパク質 HbREF の発現と精製

パラゴムノキ (*H. brasiliensis*) REF 発現プラスミド (pCold-HbREF) は山形大学理学部の大谷典正准教授よりご供与いただいた。これを *E. coli* BL21 に導入して形質転換体を獲得し、前節と同様の操作を行い、精製 HbREF 溶液を得た。

3.1.4 組換えタンパク質 FcREF/SRPP-1, FcREF/SRPP-2 および HbREF の分析

・ SDS-PAGE

SDS-PAGE 用のポリアクリルアミドゲルは、ミニプロテイン Tetra キャスティングモジュール (バイオラッド) およびミニスラブゲル作製キット (アトー) を用いて作製した。タンパク質サンプルは、各タンパク質溶液と 5×または 2×SDS-PAGE Sample buffer を混合し、 90°C で 10 分間加熱することで用意した。1×SDS-PAGE Sample buffer の組成は Table 3-2 の通りであり、5×はこの 5 倍、2×はこの 2 倍の濃度の溶液を意味する。電気泳動は、まず泳動槽に Running buffer (25 mM Tris, 192 mM グリシン, 0.1 w/v% SDS) を入れ、気泡が入らないように注意しながらゲル板をセットした。ゲル板の内側にウェルの上部まで Running buffer を入れた後、タンパク質サンプルを 1 ウェルあたり 10 μL アプライして、0.02 A の定電流で泳動した。

Table 3-2. Composition of 1×SDS-PAGE sample buffer

Final conc.	Reagents
62.5 mM	Tris-HCl (pH 6.8)
5 v/v%	2-Mercaptoethanol
2 w/v%	SDS
10 v/v%	Glycerol
0.025 w/v%	Bromophenol blue

・ウェスタンブロット

【セミドライ式ブロットティング】

ニトロセルロースメンブレンとアブソーベントペーパー（アトー）をゲルと同じ大きさに切り、Transfer buffer（100 mM Tris, 192 mM グリシン, 5% メタノール）に浸した。セミドライ式ブロットティング装置に、下からアブソーベントペーパー3枚、メンブレン、ゲル、アブソーベントペーパー2枚の順に重ね密着させた。ブロットティングは10 Vの定電圧で30分間行った。

【抗体反応】

転写後のメンブレンをPBSで洗浄した後、ブロッキング溶液（5 w/v% スキムミルク）に浸し30分間室温でゆっくり攪拌した。ブロッキング溶液を捨て、PBSで2,000倍に希釈したmouse Anti-His-tag mAb（MBL）の一次抗体溶液にメンブレンを浸し室温で1時間回転混合した。一次抗体溶液を捨て、二次抗体溶液としてブロッキング溶液で2,000倍に希釈したGoat anti-mouse IgG (H+L) antibody, AP conjugate（プロテインテック）にメンブレンを浸し室温で1時間回転混合した。二次抗体溶液を捨て、ブロッキング溶液およびPBSでそれぞれメンブレンを3回洗浄した後、Alkaline phosphatase buffer（100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5）に浸し、5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate と Nitro blue tetrazolium chloride を添加し、室温で20分程度回転混合して発色させた。

3.1.5 FcREF/SRPP-1, FcREF/SRPP-2 および HbREF の凝集特性解析

・Congo red による凝集特性解析

アミロイド染色試薬として知られるCongo redをFcREF/SRPP-1, FcREF/SRPP-2 およ

び HbREF 溶液に加え、凝集体の形成を観察した。20 μM の各組換えタンパク質溶液 200 μL に Congo red を 5 μM になるように加え、30°C で 10~120 分間インキュベートした。この混合液を遠心分離 (20,000 $\times g$, 10 分) し、上清をサンプリングして 490 nm における吸光度を経時的に測定した。

・アガロースゲル電気泳動による分析

各組換えタンパク質をアガロースゲル電気泳動し、凝集体サイズの分析を行った。各組換えタンパク質は Buffer A で 20 μM になるように調製し、直ちに、もしくは 20°C または 30°C で 16 時間インキュベートした後、1.3%アガロースゲルにアプライして TAE Buffer で電気泳動した。ゲル中のタンパク質を PVDF メンブレンにブロットニングし、3.1.4 と同じ条件で抗体反応を行いタンパク質を可視化した。ただし、ブロットニングにはタンク式装置を用いた。PVDF メンブレンは、メタノールに浸した後 Transfer buffer に浸し、上にゲルを重ねた後アブソorbentペーパーで挟み、さらに装置付属のファイバーパッドではさみ込んで密着させ、ゲルホルダーカセットに入れて装置にセットした。ブロットニングは 4°C に設定したインキュベーター内で 15 V で 15 時間行った。

・TEM によるタンパク質凝集体の観察

Buffer A で 20 μM に調製した各組換えタンパク質を 20°C で 10~120 分インキュベートし、エラスチック Bio フィルム支持膜をカーボン補強した銅グリッド (エラスチック Bio フィルム ELB-C10 STEM Cu100P グリッド, 応研商事) の上に 15 μL 滴下して室温で 10 分静置した。ろ紙で水分を吸い取った後、グリッドを超純水で 2 回洗浄し、2 w/v% リンタンングステン酸を 15 μL 滴下して室温で 1 分静置することでネガティブ染色を行った。余分な水分をろ紙でふき取り、グリッドを室温で一晩乾燥させ、加速電圧 120 kV の条件で TEM 観察を行った。

3.1.6 円二色性スペクトルの測定

調製した各組換えタンパク質の二次構造を調べるため、円二色性スペクトルを測定した。各組換えタンパク質溶液 (0.5 mg/mL) をそれぞれキュベットに入れ、スキャンは室温で 250~190 nm の範囲で行った。

3.2 結果と考察

3.2.1 組換えタンパク質 FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 の調製

E. coli BL21 を宿主として、IPTG およびコールドショックによって FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 の発現を誘導し、得られた粗タンパク質溶液を SDS-PAGE, CBB 染色および anti-His タグ抗体を用いたウェスタンブロットにより分析した。その結果を Fig. 3-1 に示す。FcREF/SRPP-1 については発現が誘導され、特に不溶性画分に多く見られた。一方、FcREF/SRPP-2 についてはわずかにバンドが確認されるものの、その発現量は明らかに少なかった。この原因の一つとして使用されるコドンの種類が考えられた。そこで、GenScript 社の Rare Codon Analysis Tool (http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis) により FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 のコドンの大腸菌における使用頻度を調べたところ、大腸菌でほとんど使用されないコドン (相対的なコドン使用頻度の値 = 0~10) が FcREF/SRPP-2 でのみ 2% 使用されていることが分かった (Fig. 3-2)。大腸菌で使用頻度の低いコドンが使用されると tRNA が不足するため、早期の翻訳終了やフレームシフトなどの様々な障害が起こることが知られており、これにより FcREF/SRPP-2 発現量が低い可能性が考えられた。そこで、REF/SRPP-2 の発現には宿主として新たに *E. coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS を使用した。この株は変異によりジスルフィド結合生成能が高く、プラスミドの導入により tRNA 不足を補うと共に非誘導時の発現漏れを抑制している。各大腸菌株を用いた場合の REF/SRPP-2 発現量を比較した結果を Fig. 3-3 に示す。CBB 染色, ウェスタンブロット共に BL21 が宿主の場合は REF/SRPP-2 のバンドがほとんど見られないのに対して、Rosetta-gami 2(DE3)pLysS の場合は濃いバンドが見られ、REF/SRPP-2 発現量が著しく増加したことが分かる。したがって、FcREF/SRPP-1 は BL21, FcREF/SRPP-2 は Rosetta-gami 2(DE3)pLysS を宿主大腸菌としてこれら組換えタンパク質の生産に用いた。また、比較対象として HbREF は BL21 を用いて生産した。各組換えタンパク質を Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGE によって組換え HbREF (17 kDa), FcREF/SRPP-1 (30 kDa), FcREF/SRPP-2 (29 kDa) の単一バンドを確認した (Fig. 3-4)。

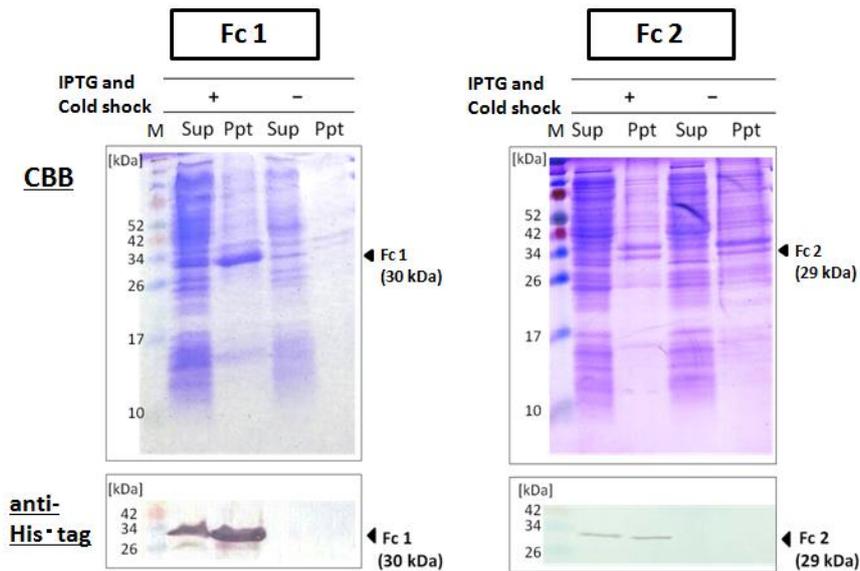


Fig. 3-1. SDS-PAGE (upper panel) and anti-His-tag western blots (lower panel) of recombinant FcREF/SRPP-1 (Fc1) and FcREF/SRPP-2 (Fc2) expressed in *E.coli* BL21. Lanes: M, Thermo Fisher Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; Sup, soluble fraction of recombinant BL21; Ppt, insoluble fraction of recombinant BL21.

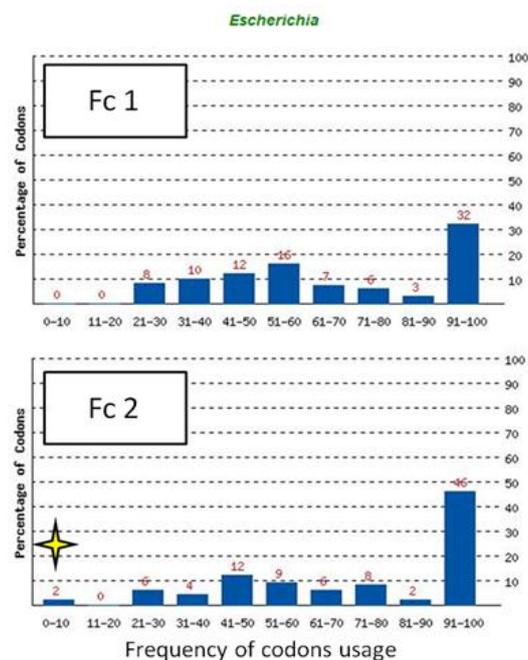


Fig. 3-2. Codon frequency distribution of FcREF/SRPP-1 (Fc1, upper panel) and FcREF/SRPP-2 (Fc2, lower panel).

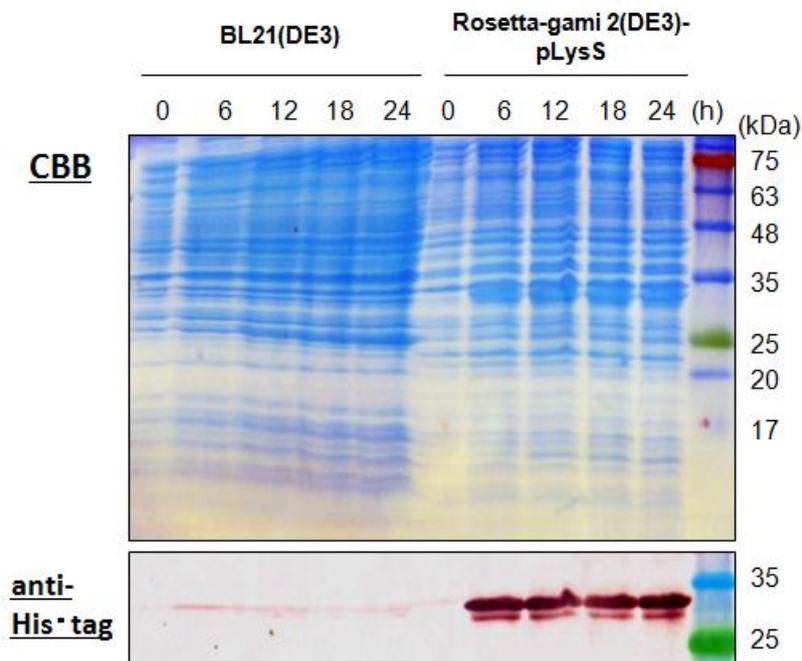


Fig. 3-3. Comparison of recombinant FcREF/SRPP-2 expression between BL21 and Rosetta-gam 2(DE3)pLysS using SDS-PAGE (upper panel) and anti-His-tag Western blot (lower panel). Induction times are indicated above the gel. Lane M, GeneDireX BLUeye Prestained Protein Ladder.

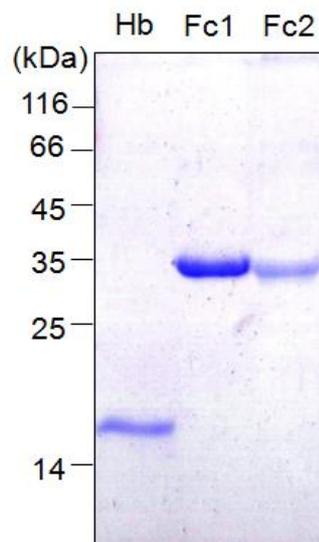


Fig. 3-4. SDS-PAGE of purified recombinant proteins. Lanes: Hb, HbREF (17 kDa); Fc1, FcREF/SRPP-1 (30 kDa); Fc2, FcREF/SRPP-2 (29 kDa).

3.2.2 FcREF/SRPP-1, FcREF/SRPP-2 および HbREF の凝集特性解析

Congo red はアミロイド染色試薬として知られており、HbREF は Congo red と結合した沈殿を形成し、HbSRPP は Congo red と弱く結合するものの明確な沈殿は生じないことがこれまで報告されている[1]。そこで FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 と Congo red を混合し、沈殿形成を経時的に観察した。その結果、FcREF/SRPP-1 は HbREF と同様に Congo red が結合した赤色沈殿を形成した (Fig. 3-5)。しかし、その沈殿形成は HbREF に比べて遅いことが分かった。一方 FcREF/SRPP-2 では、Berthelot らによって報告された HbSRPP の場合と同様に沈殿形成が観察されなかった。

次に、FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 の凝集体形成をアガロースゲル電気泳動により分析した。凍結保存しておいた各組換えタンパク質を融解した直後もしくは融解後に所定の温度でインキュベートした後、アガロース電気泳動泳動した結果を Fig. 3-6 に示す。いずれの組換えタンパク質も融解直後ではゲルの半分より上方の高分子領域にバンドが観察された。また、各組換えタンパク質を等モルずつゲルにアプライしたにも関わらず、HbREF および FcREF/SRPP-1 のウェスタンブロットのバンドの濃さは FcREF/SRPP-2 よりも薄い。また、HbREF の一部はゲルの上端に泳動されずに残っているように見える。これらの結果は、HbREF および FcREF/SRPP-1 の一部が泳動できないほどの巨大な凝集体を形成していることを示唆する。さらに、20°C または 30°C でインキュベートすると HbREF および FcREF/SRPP-1 のバンドは次第に薄くなっていく様子が認められ、これらの凝集体の形成は加温により促進されることが分かる。したがって、HbREF および FcREF/SRPP-1 の凝集体は、はじめに吸熱反応を伴うタンパク質分子内の構造変化が起こり、その後にこの変性したタンパク質モノマーが会合し、凝集体が形成されると推測される。一方、FcREF/SRPP-2 ではこのインキュベートによる電気泳動結果に大きな差異は認められなかった。これまでに Berthelot らは HbREF と HbSRPP の Native-PAGE による分析を行い、HbSRPP は分離ゲルの上部付近でスメア状に泳動されるのに対し、HbREF は濃縮ゲルのウェル底部や分離ゲルの上部に詰まったように観察されほとんど泳動されない、すなわち HbREF は HbSRPP に比べて泳動され難いことを報告している[2]。本実験ではポリアクリルアミドよりも網目構造が大きく、より大きなタンパク質を電気泳動できる低密度のアガロースゲルを用いているが、FcREF/SRPP-1 が FcREF/SRPP-2 よりも泳動されにくいことは、Berthelot らのポリアク

リルアミドゲル電気泳動における HbREF と HbSRPP の関係性に類似する。

これらの組換えタンパク質の凝集体をさらに詳しく調べるため、20°C で所定時間インキュベートした各組換えタンパク質を TEM により観察した。その結果を Fig. 3-7 に示す。HbREF を 10 分間インキュベートすると Berthelot らの報告[1] [2]にあるようなアモルファス凝集体が観察され、インキュベート時間をさらに 20 分に延長するとそのサイズが大きくなっている様子が観察された。しかし、Berthelot らによって報告されている凝集過程初期の線維状の凝集体は本実験では観察されなかった。一方、FcREF/SRPP-1 ではインキュベート 10 分の時点で線維状の構造が観察され始め、20 分ではより明確な線維状の構造体と小さなアモルファス凝集体の 2 つが観察された。インキュベート 120 分ではさらに成長したアモルファス凝集体が観察されたが、その平均的なサイズは HbREF を 10 分間インキュベートした際に形成された凝集体と同程度だった。したがって、アガロースゲル電気泳動実験において HbREF および FcREF/SRPP-1 のインキュベートでバンドが次第に消失したのは、泳動されない程の大きなアモルファス凝集体が形成されたためと考えられる。一方、FcREF/SRPP-2 では 120 分間インキュベートしても凝集体は TEM で観察されなかった。以上の結果より、HbREF と FcREF/SRPP-1 の凝集特性は類似するが FcREF/SRPP-2 は明らかに異なること、そして FcREF/SRPP-1 の凝集速度は HbREF よりも幾分遅いことが分かった。

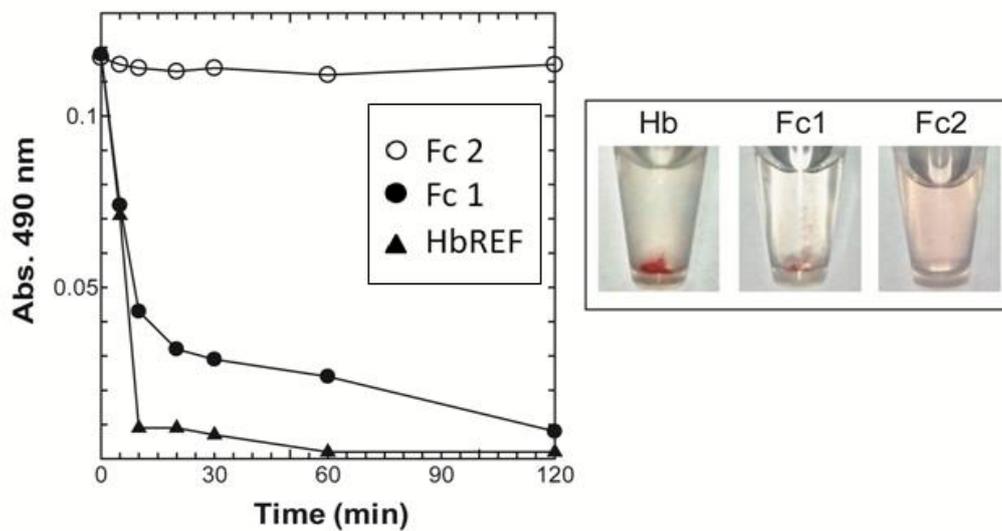


Fig. 3-5. Precipitation behavior of recombinant REF/SRPP proteins. The absorbance of the supernatants of incubation mixture was measured at 490 nm. The right panel shows pictures of the samples incubated for 120 min. Symbols are as follows: solid triangle, HbREF (Hb); solid circle, FcREF/SRPP-1 (Fc1); open circle, FcREF/SRPP-2 (Fc2).

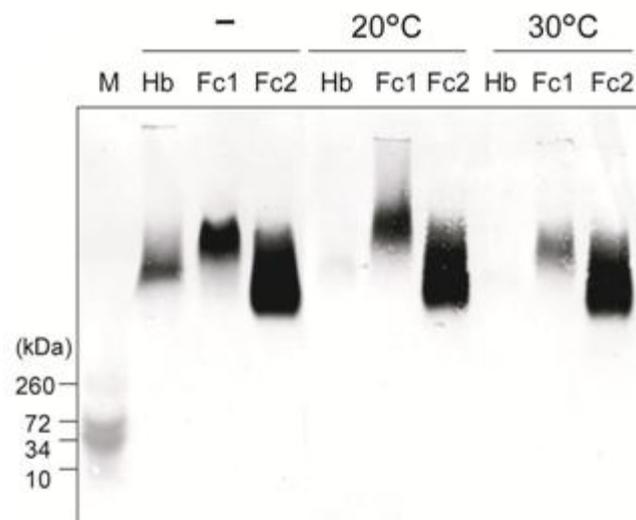


Fig. 3-6. Agarose gel electrophoresis of purified HbREF (Hb) and FcREF/SRPP-1 (Fc1) and -2 (Fc2). Samples of the recombinant REF/SRPP proteins (20 μ M) were loaded immediately after thawed or thawed and incubated at the indicated temperatures.

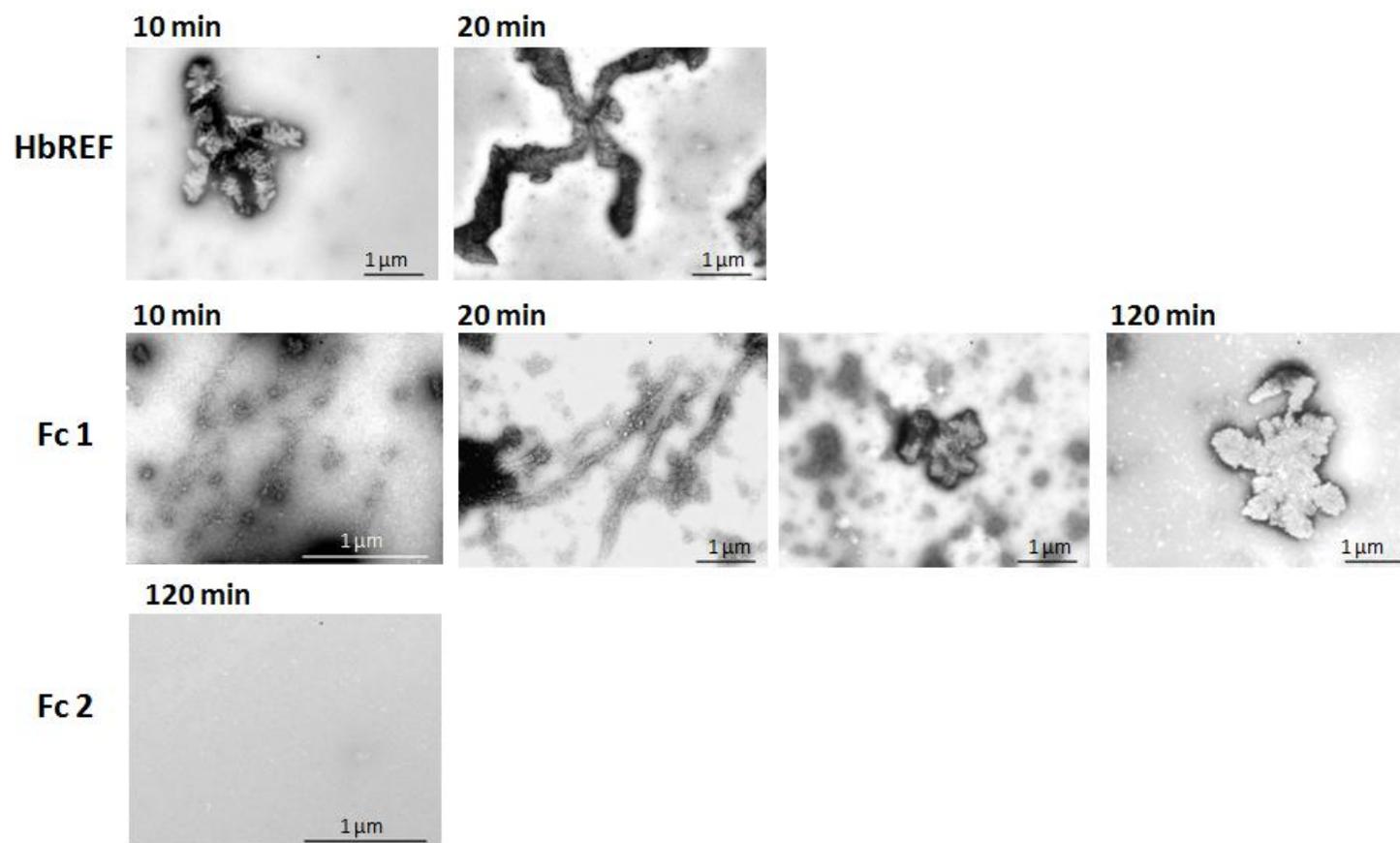


Fig. 3-7. TEM images of recombinant HbREF, FcREF/SRPP-1 (Fc1), and FcREF/SRPP-2 (Fc2). The recombinant proteins were preincubated at 20 °C for 10 min, 20 min, or 120 min, respectively. Scale bars: 1 μm.

3.2.3 円二色性スペクトルと二次構造予測

前節より、HbREF および FcREF/SRPP-1 の凝集体形成過程では、タンパク質分子内での構造変化が生じていると推測された。線維状の凝集体を形成するアミロイドタンパク質であり、アルツハイマー病の原因の一つと考えられているアミロイドベータ ($A\beta$) のフィブリル形成においては、Fig. 3-8 に示す経路が提案されている[3] [4] [5]。これによると、ネイティブ構造からミスフォールドした $A\beta$ は、まず一部の β シートドメインの会合を介して可溶性のオリゴマーを形成し、さらに複数の β シートドメインの会合により安定な β シート構造 (クロス β 構造) を有するプロトフィブリルが形成され、これが多数絡み合い会合してフィブリルが形成される。このとき、フィブリル形成の核としてはたらくオリゴマーの形成がフィブリル形成の律速段階であり、オリゴマーが一旦生成すると次々に凝集が起これりフィブリルが迅速に形成されると考えられている。最近では凝集中間体のオリゴマーやプロトフィブリルが、線維状凝集体よりも強い神経毒性を示すことから、これらの中間体がアルツハイマー病の原因であるという仮説 (オリゴマー仮説) [6] [7] [8] が一般化しており、また、一部のターン構造が毒性オリゴマーの形成に寄与することも提唱されている[9]。このように、線維状タンパク質凝集体の形成には二次構造の変化が大きく関与する。したがって、HbREF, FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 の凝集性の違いにも二次構造が関与するのではないかと考えられる。

Berthelot らは HbREF と HbSRPP の円二色性 (CD) スペクトルを測定し、凝集した HbREF は 217 nm 付近に弱い負のピークを示し、HbSRPP よりも β シートの割合が多いことを報告している[1]。そこで本研究においても、調製した各組換えタンパク質の二次構造を比較するために CD スペクトルの測定を試みた。その結果を Fig. 3-9 に示す。HbREF では二次構造に由来するピークが全く観測されなかったが、これは測定途中で HbREF の凝集が進行し沈殿してしまったためである。前節で記したように、本研究で調製した HbREF の TEM 観察では Berthelot らによって報告されたような凝集過程の線維状凝集体は認められなかったことから、本研究の HbREF は Berthelot らの HbREF よりも早く凝集が進行していると考えられる。この凝集速度の違いにはタンパク質サンプル中にわずかに残存する尿素の濃度の違いが影響した可能性がある。一方、FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 では二次構造に由来するピークが観測され、 α ヘリックスやコイル構造の割合はほぼ同程度であるのに対して、 β シートと β ターンの割合は

それぞれ異なり、FcREF/SRPP-1 と FcREF/SRPP-2 は異なる二次構造を取ることが示唆された。しかしながら、FcREF/SRPP-1 は測定途中に凝集が進行しその一部が沈殿していたのに対し、FcREF/SRPP-2 では沈殿は観察されなかった。先に述べた A β のフィブリル形成機構と同様の経路で FcREF/SRPP-1 と FcREF/SRPP-2 の凝集体が形成されると仮定すると、CD スペクトル測定中にもそれらの二次構造は変化しており、試料中には複数の構造体が混在している可能性もあることに留意すべきである。

そこで、バイオインフォマティクスを利用した HbREF, FcREF/SRPP-1 および FcREF/SRPP-2 の二次構造と凝集予測を試みた。なお、この解析には PASTA 2.0 サーバー (<http://protein.bio.unipd.it/pasta2/>) [10]を使用した。PASTA 2.0 は、既に構造が解明されたアミロイド線維の配列と構造のデータベースを基にしたペプチドスレッディングとエネルギー安定性に基づいてタンパク質の二次構造と凝集性を予測する[10] [11]。Fig. 3-10 に各タンパク質の予測された二次構造を示す。各二次構造の割合を比較すると、HbREF の β ストランドの割合は比較的高いが、FcREF/SRPP-1 と FcREF/SRPP-2 の各構造の割合に大きな違いはなかった。また、Fig. 3-11 に各タンパク質の構造的揺らぎである disorder 性および凝集性のグラフを示す。グラフの横軸はアミノ酸番号、縦軸は disorder 性および凝集性を表し、値が大きいほど構造的揺らぎが大きいか凝集性が高いことを意味する。図より、いずれのタンパク質も凝集性が比較的高い領域を有しているものの、その程度はほとんど同様であることが分かる。これらの結果から、REF と SRPP の凝集特性の違いをアミノ酸配列から予測することは困難であった。この凝集特性の違いに直接関与する領域を決定するには、REF および SRPP を断片化したペプチドや変異体の凝集特性解析、さらには A β の構造解析に最近利用されつつある固体マジックアングル試料回転 NMR 法等による凝集体そのものの二次構造・立体構造解析が必要であると考えられる。

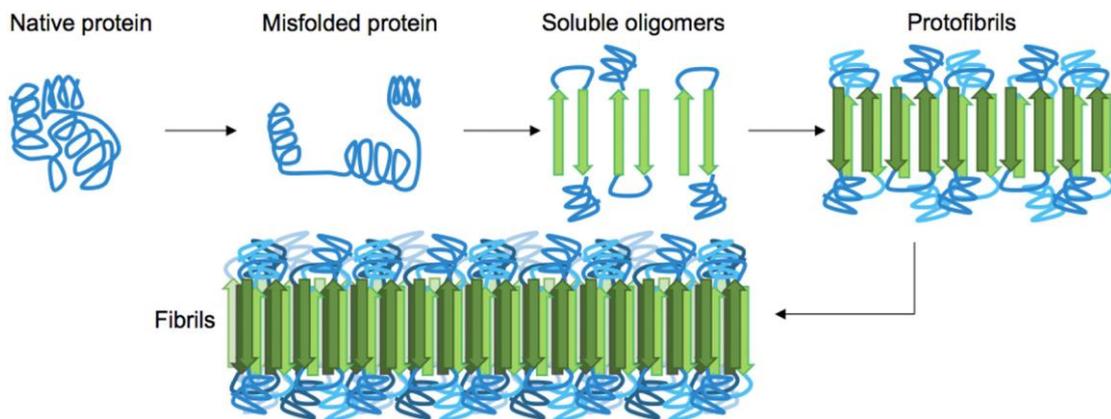
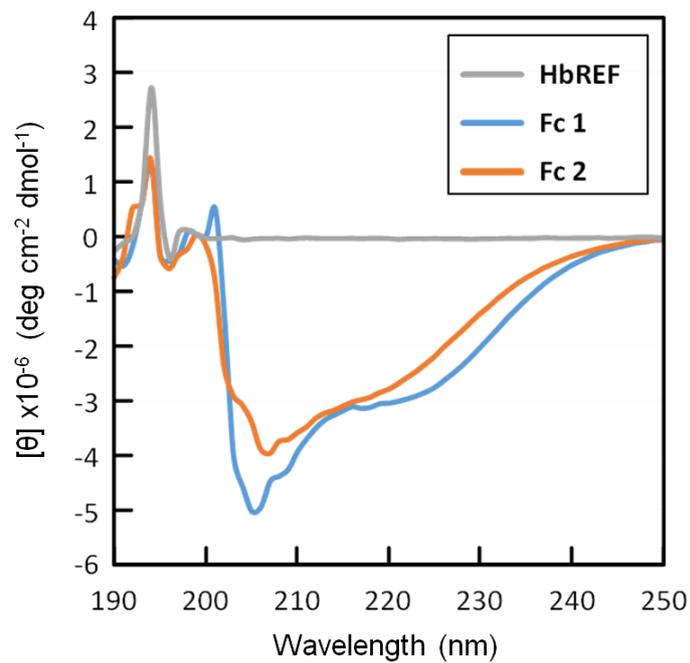


Fig. 3-8. Simplified pathway toward amyloid fibril formation. Reprinted from [3] (DOI: 10.1117/1.NPh.3.4.041807) – Published by SPIE, 2016.



	α -Helix %	β -sheet %	β -turn %	Coile %
HbREF	–	–	–	–
Fc 1	18.6	26.5	20.7	34.3
Fc 2	14.0	40.0	14.2	31.9

Fig. 3-9. CD spectra of HbREF, FcREF/SRPP-1 (Fc1), and FcREF/SRPP-2 (Fc2).

HbREF

```

1      10     20     30     40
MAEDEDNQGGEGELKYLGFVQDAATYAVTTFNNVYLFADKSGPLQPGV
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
CCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHBBBCCCBBBBSBCCCCCCCC
-----
51     60     70     80     90
DIIIEGPKVAVPLYNRFSYIPNGALKFVDSVVASVTIIDRSLPPIVKD
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
BBBBSBCCCCBBBBSBCCCCBBBBSBCCCCBBBBSBCCCCCCCC
-----
101    110    120    130
ASIQVVSIRAAPFAARS LASSLPGQTKILAKVFYGEN
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
CHHBBHHHHHCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCBBBBSBBSBCCC
-----
  
```

P: Parallel aggregation
 -: Non aggregating residue
 D: Disordered residue
 O: Ordered residue
 H: α -Helix residue
 B: β -strand residue
 C: Coiled residue

HbSRPP

```

1      10     20     30     40
MAEEVEEERLKYLDVRAAGVYAVDSFSTLYLYAKDISGPLKPGVDTIEN
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
CCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----
51     60     70     80     90
VVKTVVTVVYIPLAVKFDKTVDSVSTLDGVPVPIKQVSAQYTSVA
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
HHHHCCCCBBBBSBCCCCBBBBSBCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHH
PPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPP
-----
101    110    120    130    140
QDAPRIVLDVASSVNTGVQEGAKALYANLEPKAEQYAVIWRALNKLPL
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
CCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----
151    160    170    180    190
VPQVANVVPVAVYFSEKYNVVRGTTEQGYRVSSYLPLLPTKITEIKVFG
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
CCCCBBBBSBCCCCBBBBSBCCCCBBBBSBCCCCCCCCCHHHHHHHCC
-----
DEAS
DDD
CCC
---
```

Fc 1

```

1      10     20     30     40
MASQEDSTLPQHQQLDKEEERQLKYLEFVQVAAVHTLVVLSNLYLAKEK
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
CCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----
51     60     70     80     90
SGPLKPGVETVEGTVKSIVGVPVYKIHVIPNELLKYVDRKVDASVTELD
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
CCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----
101    110    120    130    140
HVPMTIKKVSQAFAAQAPEVARSVASEVQRAGVKDTASGIATVYTK
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
CCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----
151    160    170    180    190
YEPAAKELYAKYEPKAEKCAVTAHRKLNQLPLFKVADVVPVPTAACTEK
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
CHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----
201    210    220    230    240
YNQTVLSTAEGYKVSFAFLPLVPVEKIAKVFSEDSGESAPVASSQGEPOV
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----
AVH
DDD
CCC
---
```

Fc 2

```

1      10     20     30     40
MADSEVQQTTFETVQPENHGEKILKHLFEVQVAIYIVVCFSTVVEYA
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
CCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----
51     60     70     80     90
KENSGLPKPGVQTVEDTVKTVIGPVYKFKHDPVDFQLKFDCKVDEVLDR
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
HHCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----
101    110    120    130    140
LDGHVPLLRVGGSSQAVAAARAVAAEVQSGVVGATRAVYARYEPAAKEL
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
HCCCCCBBSBCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----
151    160    170    180    190
IEKYEPAEQYVAHAHRLNRLPLFQVAVQIAVPTAAVYAEYNEGVACA
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
HHHCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----
201    210    220    230    240
VERGYAVGSYLPVIPVERIAKVFDEGESGPPVPPNGDAHVVAQ
DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
HHCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----
  
```

	α -Helix %	β -strand %	Coile %
HbREF	22.46	31.16	46.38
HbSRPP	47.06	12.75	40.20
Fc 1	65.22	2.37	32.41
Fc 2	60.49	2.88	36.63

Fig. 3-10. Presumed secondary structures of HbREF, HbSRPP, FcREF/SRPP-1 (Fc1), and FcREF/SRPP-2 (Fc2).

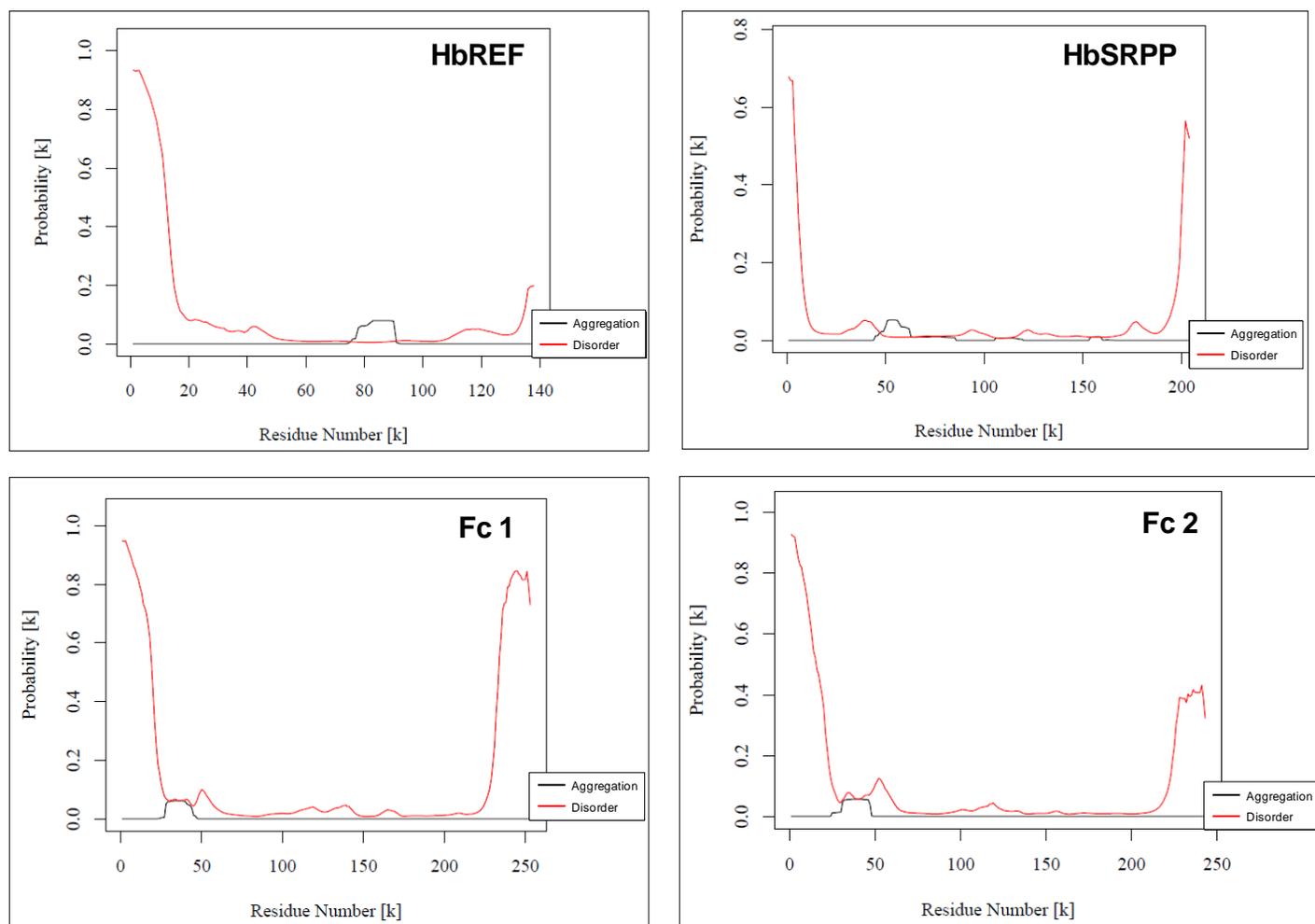


Fig. 3-11. Disorder and aggregation probabilities of HbREF, HbSRPP, FcREF/SRPP-1 (Fc1), and FcREF/SRPP-2 (Fc2).

3.3 まとめ

第2章で記したように、FcREF/SRPP-1とFcREF/SRPP-2は一次構造から判断すればどちらもSRPP特異的領域を持つことから、SRPPに分類されることになる。しかしながら凝集性において、FcREF/SRPP-1はHbREFと、FcREF/SRPP-2はHbSRPPと類似する傾向を示した。したがって、凝集特性から判断すればFcREF/SRPP-1はイチジクのREF、FcREF/SRPP-2はイチジクのSRPPに分類される。FcREF/SRPP-1とFcREF/SRPP-2は共にSRPP特異的領域を有することから、凝集特性の違いはSRPP特異的領域以外のアミノ酸配列および二次構造に起因すると考えられる。本研究においてCDスペクトル測定よりFcREF/SRPP-1とFcREF/SRPP-2は異なる二次構造を取ることが示唆されたが、一方で本手法による凝集性タンパク質の構造解析には限界があり断定は難しい。今後、REFとSRPPの凝集体の構造解析や凝集機構解明に焦点を当てた新たな研究が望まれる。しかしながら、本研究で明らかにしたFcREF/SRPP-1とFcREF/SRPP-2の凝集特性の違いは、これまで曖昧だったREFとSRPPの新しい分類基準となり得ることを示した。本論文では本分類基準を採用し、以降はFcREF/SRPP-1をFcREF、FcREF/SRPP-2をFcSRPPと記載する。

参考文献

1. Berthelot K, Lecomte S, Estevez Y, Couлары-Salin B, Bentaleb A, Cullin C, Deffieux A, Peruch F: **Rubber elongation factor (REF), a major allergen component in *Hevea brasiliensis* latex has amyloid properties.** *PLoS One* 2012, **7**:e48065.
2. Berthelot K, Lecomte S, Estevez Y, Couлары-Salin B, Peruch F: **Homologous *Hevea brasiliensis* REF (Hevb1) and SRPP (Hevb3) present different auto-assembling.** *Biochim Biophys Acta* 2014, **1844**:473-485.
3. Kaminski CF, Kaminski Schierle GS: **Probing amyloid protein aggregation with optical superresolution methods: from the test tube to models of disease.** *Neurophotonics* 2016, **3**:041807-041807.
4. Jaruszewski KM, Omtri RS, Kandimalla KK: **Role of nanotechnology in the diagnosis and treatment of alzheimer's disease.** In *Current Advances in the Medical Application of Nanotechnology*. Bentham Science Publishers Ltd.; 2012: 107-124
5. Rushworth JV, Hooper NM: **Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid-beta Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes.** *Int J Alzheimers Dis* 2010, **2011**:603052.
6. Haass C, Selkoe DJ: **Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**:101-112.
7. Ono K, Yamada M: **Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease.** *J Neurochem* 2011, **117**:19-28.
8. Viola KL, Klein WL: **Amyloid beta oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis.** *Acta Neuropathol* 2015, **129**:183-206.
9. Masuda Y, Uemura S, Ohashi R, Nakanishi A, Takegoshi K, Shimizu T, Shirasawa T, Irie K: **Identification of physiological and toxic conformations in Aβ₄₂ aggregates.** *Chembiochem* 2009, **10**:287-295.
10. Walsh I, Seno F, Tosatto SC, Trovato A: **PASTA 2.0: an improved server for protein aggregation prediction.** *Nucleic Acids Res* 2014, **42**:W301-307.
11. Burdukiewicz M, Sobczyk P, Rödiger S, Duda-Madej A, Mackiewicz P, Kotulska M: **Amyloidogenic motifs revealed by n-gram analysis.** *Scientific Reports* 2017, **7**:12961.

第4章

anti-FcREF/SRPP 抗体を用いた
イチジクゴム中のタンパク質の分析
およびイチジクゴムの
相分離構造の解析

序

第2章, 第3章より, *F. carica* (イチジク) ラテックス中には遺伝子レベルで *FcREF* および *FcSRPP* が発現していることが分かった。そこで本章では, 組換えタンパク質 *FcREF* を抗原として抗体を作製し, *F. carica* ゴムにおけるタンパク質レベルでの *FcREF* および *FcSRPP* の存在を調べた。また, 第1章でも述べたように *Hevea* 固体ゴムはナノマトリックス構造を取るが, 他の植物由来の天然ゴムの相分離構造は報告されておらず, *F. carica* ゴムについても明らかになっていない。そこで, *F. carica* 固体ゴムの相分離構造を TEM で観察し, *Hevea* ゴムと比較した。さらに, これらの結果からゴムに含まれるタンパク質とゴムの分岐構造や相分離構造との関係を考察し, *Hevea* および *F. carica* 固体ゴムの構造モデルを提案する。

4.1 実験操作

・試薬・キット類

タンパク質の分子量マーカーは第3章に記載したものをを用いた。市販の抗体はアブカムおよびプロテインテックの製品を使用した。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

・機器類

TEM は日立 H-7650 を，ウルトラマイクロトームはライカ EM UC6 を，元素分析装置はパーキンエルマー 全自動元素分析装置 2400 II を用いた。また，超遠心分離機は工機ホールディングス（旧：日立工機）卓上小形超遠心機 himac CS150NX を使用した。その他，第2章および第3章と共通する機器は同じ物を使用した。

4.1.1 anti-FcREF/SRPP 抗体の作製と確認

第3章で調製した組換えタンパク質 FcREF を抗原とし，ユーロフィンジェノミクスに委託して抗体を作製した。免疫動物はウサギ（1羽）とし，計4回（0，28，35，42日目）抗原を投与した後，49日目で全採血し，血清を回収した。本論文ではこの抗血清を anti-FcREF/SRPP 抗体と表記する。得られた抗体を確認するために，第3章で調製した組換え FcREF および FcSRPP について本抗体を用いてウェスタンブロットを行った。実験操作は第3章と同様である。ただし，二次抗体は Goat anti-rabbit IgG (H+L), AP conjugate（プロテインテック）を用いた。

4.1.2 *F. carica* 固体ゴムから抽出したタンパク質の分析

・*F. carica* 固体ゴムの調製

第2章と同様に農園で採取し凍結保存していた *F. carica* 実ラテックスのうち，Latex collection buffer ver. 2 (5 mM MgSO₄, 10 mM DTT 含有 Tris-HCl, pH 7.5) を用いて2017年に採取したものをを使用した。第1章で述べたように，市販の *Hevea* 高アンモニアラテックスは通常，凝固防止のためにアンモニアが添加され，遠心分離によりゴム分が濃縮されている。そこで本研究ではこれに倣い，*F. carica* 実ラテックスに 0.7 w/w% となるようにアンモニアを添加した後，遠心分離（10,000 × g, 30 sec）した。しかし，*Hevea* ラテックスとは異なり，そのトップ層のゴム相はクリーム状ではなく個体状で得られた。

そこで、この個体ゴムをスパチュラで回収してドラフト内で1週間乾燥させ、*F. carica* 乾燥ゴムとした。

・ *F. carica* 乾燥ゴムからのタンパク質抽出と分析

40 mg の *F. carica* 乾燥ゴムにタンパク質抽出用溶液（0.1 w/v% 尿素，1 w/v% SDS 含有 PBS）を 200 μ L 添加し，90°C で 2 時間インキュベートした後，上清を回収した。含有タンパク質の分析には SDS-PAGE，CBB 染色および anti-FcREF/SRPP 抗体によるウェスタンブロットを用いた。実験操作は第 3 章と同様であり，使用した抗体は 4.1.1 と同様である。

・ *F. carica* ゴムの主要タンパク質の同定

F. carica ゴムタンパク質の SDS-PAGE，CBB 染色の結果，20~35 kDa 付近に 3 本のバンドが検出されたことから，LC-MS/MS 分析によってこれらのタンパク質の同定を行った。なお，この分析は理化学研究所環境資源科学研究センターの堂前直先生，鈴木健裕専任技師にご協力いただいた。まず，CBB 染色後のゲルから各バンドをそれぞれ切り出し，脱色後，ゲル中のタンパク質を還元アルキル化し，トリプシンでゲル内消化した。ペプチド断片混合物は NTCC-360/75-3-105 カラム（日京テクノス）を使用して流速 300 nl/min で分離し，オンラインで連結した Q Exactive Mass Spectrometer（サーモフィッシャーサイエンティフィック）にアプライした。MS/MS データは Data-dependent Top 10 method を使用して獲得した。得られた MS/MS データを MSCOT ver.2.6 software により NCBI nr database の green plants に対して検索し，同定されたペプチドは Proteome Discoverer 2.2 を用いて定量化した。

4.1.3 *Hevea* 固体ゴムの調製

Hevea ラテックスは市販の高アンモニア天然ゴム（HA-NR）ラテックス（Dry rubber content 60 w/w%，レジテックス）を使用し，これをシャーレにキャストしてドラフト内で1週間乾燥させることで *Hevea* 乾燥ゴムを調製した。

4.1.4 *F. carica* および *Hevea* ゴムの元素分析

F. carica および *Hevea* 固体ゴムに含まれるタンパク質量を比較するために元素分析を行った。精密天秤で各乾燥ゴムの重量を正確に量り取り、スズカプセルに包んで全自動元素分析装置 2400 II (パーキンエルマー) に投入した。1800°C の高温かつ純酸素中で完全燃焼し、フロンタルクロマトグラフィーにより窒素および炭素、水素、硫黄を定量した。

4.1.5 *F. carica* および *Hevea* 固体ゴムの相分離構造の観察

各乾燥ゴムは 0.1 M Cacodylate buffer (pH 7.5) で洗浄し、3% グルタルアルデヒドで一晩または 2 日間固定した後、1% オスミウム四酢酸で 2 時間または 5 日間固定・染色した。その後段階的なエタノール置換により脱水し、Durcupan 樹脂で包埋した後、超薄切片を作成して TEM で観察した。なお、この分析は秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンターの千田進介総括技術長にご協力いただいた。

4.1.6 界面活性剤で洗浄した *Hevea* ゴムの調製と洗浄画分のタンパク質の分析

*Hevea*HA-NR ラテックス 500 μ L にデオキシコール酸ナトリウム (DOC) 含有 Wash buffer (5 mM DOC, 10 mM DTT, 12 w/v% グリセロール, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5) を等量加え混合した後、遠心分離 (21,500 \times g, 30 sec) し、クリーム状のゴム相と、小ゴム粒子を含む白濁した水相に分けた。スパチュラでクリーム状のゴム相を回収し、500 μ L の DOC 含有 Wash buffer に再懸濁した。この操作を 3 回繰り返し、ゴム粒子上のタンパク質を洗浄した。得られたクリーム状のゴムはドラフト内で乾燥させ固体ゴムとし、4.1.5 と同様に樹脂包埋サンプルを作成して TEM で観察した。また、洗浄過程でゴム粒子から剥がされたタンパク質を分析するため、洗浄画分を超遠心分離 (100,000 \times g, 4°C, 35 min) し、透明な水相の一部をシリンジで回収して SDS-PAGE, CBB 染色およびウェスタンブロットを行った。実験操作は第 3 章と同様である。ただし、抗体は mouse anti-Rubber elongation factor protein (*H. brasiliensis*) antibody (アブカム) および goat anti-mouse IgG (H+L) antibody, AP conjugate (プロテインテック) を用いた。

4.1.7 エステル交換 *F. carica* ゴムの調製と分子量分布の測定

F. carica ゴムにおけるリン脂質を介した分岐点の有無を調べるために、*F. carica* ゴムをエステル交換し、SEC-MALS 法により分子量分布を測定した。

・ エステル交換 *F. carica* ゴム-sol (TE-Fc-sol) の調製

4.1.2 に示す方法で *F. carica* 乾燥ゴムを調製した。ただし、実ラテックスは Latex collection buffer ver. 3 (5 mM MgSO₄, 10 mM DTT, 0.1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (セリンプロテアーゼ・システインプロテアーゼ阻害剤) 含有 Tris-HCl, pH 7.5) を用いて 2018 年に採取したものを使用した。*F. carica* 乾燥ゴム 0.5g に 1 w/v%-dry rubber になるようにトルエンを加えて 1 週間室温で浸漬させた。これを遠心分離 (3,000 rpm, 5 min) し、トルエン可溶性画分と不溶性画分 (*Hevea* ゴムとは異なりゲル状ではない) に分け、可溶性画分を回収した。このとき、試験管の底部から可溶性画分を回収すると不溶性画分も浮遊してしまうため、試験管の上方 3 分の 2 程度の可溶性画分を回収した。試験管に残った不溶性画分および可溶性画分を真空乾燥器で乾燥させて重量を測定し、元の乾燥ゴム片の重量との差から、回収した可溶性画分に含まれるゴムの重量を求めた。得られた *F. carica* 可溶性ゴム (0.6 w/v%-dry rubber) 50 mL のうち、25 mL をメスシリンダーで量り取り、ガラス瓶に移した。なお、残りの 25 mL はエステル交換未処理サンプルとして使用した。*Hevea* ゴムのエステル交換に関する文献[1] [2] [3]を参考に、ナトリウムメトキシドを 33.3 mmol/g-dry rubber になるように添加し、遮光しながら 25°C で 3 時間攪拌した後、ジエチルエーテルで 1 M に調製した塩酸を加えて中和した。エステル交換後のゴムは再沈殿精製した。中和後の反応溶液にメタノールを 100 mL 添加してゴムを沈殿させ、遠心分離によりゴムを回収し、少量 (20 mL 以下) のトルエンに再溶解した。これに再びメタノールを 100 mL 加えてゴムを沈殿させ、遠心分離により回収した後トルエンに再溶解し、シャーレに移して真空乾燥器で乾燥させた。また、エステル交換未処理の *F. carica* ゴムについては、前述の *F. carica* 可溶性ゴム (0.6 w/v%-dry rubber) 25 mL にメタノールを 100 mL 加え、同様に再沈殿精製し乾燥させた。エステル交換した *F. carica* ゴムを TE-Fc-sol, エステル交換していない *F. carica* ゴムを Fc-sol と記載する。

・エステル交換 *Hevea* ゴム-gel (TE-*Hevea*-gel) の調製

第1章で述べたように、*Hevea* ゴムの有機溶媒（トルエン等）不溶性であるゲル画分はエステル交換によりトルエン等の有機溶媒に可溶となり、その平均分子量は未処理のゾル画分に比べ低下することが報告されている[4]。そこで、コントロールとして *Hevea* ゴムのゲル画分をエステル交換した。4.1.3 に示す方法で *Hevea* 乾燥ゴムを調製し、1 w/v% になるようにトルエンを加えて1週間室温で浸漬させた。遠心分離 (3,000 rpm, 5 min) ではゲル画分とゾル画分は分離されなかったため、PTFE メンブレンフィルター (3 μm 孔, アドバンテック) を用いてろ過し、ゲル画分とゾル画分に分けた。ゲル画分はドラフト内で室温で乾燥させた後、重量を量って蓋つき試験管に移し、0.6 w/v%-dry rubber になるようにトルエンを加えて3日間静置した。全量をガラス瓶に移し、*F. carica* ゴムと同様の手順でエステル交換と再沈殿精製を行い乾燥させた。また、*Hevea* ゴムを PTFE メンブレンフィルターでろ過した際に得られたゾル画分は、エステル交換未処理のサンプルとして同様の手順で再沈殿精製し乾燥させた。エステル交換した *Hevea* ゴムを TE-*Hevea*-gel, エステル交換していない *Hevea* ゴムを *Hevea*-sol と記載する。

・SEC-MALS による分子量測定

TE-*Fc*-sol および *Fc*-sol 乾燥ゴムは、HPLC グレードのテトラヒドロフラン (THF) で 2 mg/mL になるよう溶解し、一晚遮光して静置した。このゴムサンプル溶液は測定の直前に 1 μm 孔フィルター (Acrodisc glass fibre, ポール) でろ過した後、0.2 μm 孔フィルター (Minisart RC (regenerated cellulose), ザルトリウス) でろ過し、SEC-MALS 分析に用いた。TE-*Hevea*-gel および *Hevea*-sol はフィルターに目詰まりしたため、1 mg/mL になるように THF で溶解した後1週間遮光して静置し、測定の直前に同様にろ過した。SEC-MALS システムは、インテリジェント HPLC ポンプ PU-2080 (日本分光), 示差屈折率測定器 WTREX-02 (WyattTechnology) および多角度光散乱検出器 DAWN HELEOS II 8 (WyattTechnology) から構成される。カラムは shodex 社製 GPC LF-804 (粒径 6 μm , 8.0 \times 300 mm) およびガードカラム GPC LF-G (粒径 6 μm , 4.6 \times 10 mm) を用い、カラムオーブンは 40°C に設定した。溶離液は HPLC グレードの THF, 流速は 1 mL/min とした。サンプルの注入量は 100 μL である。データの解析には ASTRA software

(WyattTechnology) を用いた。絶対分子量を求めるための屈折率濃度増分 (dn/dc) は、Kim らが報告した *Hevea* 天然ゴムの $dn/dc=0.130$ mL/g [5], Michielsen らが報告した合成 *cis*-1,4-ポリイソプレンの $dn/dc=0.124$ mL/g [6]およびこれらの平均値 $dn/dc=0.127$ を用いた。

4.2 結果と考察

4.2.1 anti-FcREF/SRPP 抗体の確認

作製した抗体の反応性を確認するため、組換えタンパク質 FcREF および FcSRPP についてウェスタンブロットを行った。本抗体は組換えタンパク質 FcREF を抗原として作製したが、FcREF だけでなく FcSRPP にも反応することが分かる (Fig. 4-1)。これは FcREF と FcSRPP のアミノ酸配列がよく類似しているためである。

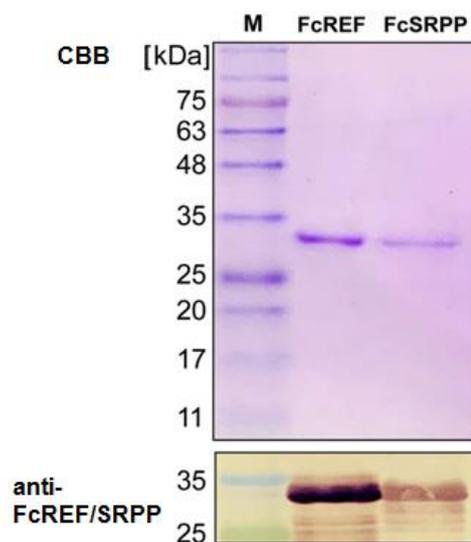


Fig. 4-1. SDS-PAGE (upper panel) and anti-FcREF/SRPP western blot analysis (lower panel) of purified recombinant FcREF (30 kDa) and FcSRPP (29 kDa). Lane M, GeneDireX BLUeye Prestained Protein Ladder.

4.2.2 *F. carica* 固体ゴムから抽出したタンパク質の分析

F. carica ゴムから抽出したタンパク質について、SDS-PAGE と CBB 染色，さらに anti-FcREF/SRPP 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。その結果を Fig. 4-2(A) に示す。CBB 染色では 20~30 kDa 付近に太いメインバンドと 17 kDa 以下の低分子の幅広いバンドが検出された。一方，anti-FcREF/SRPP 抗体を用いたウェスタンブロットではメインバンドに相当する分子量付近に非常に薄いバンドが検出され，FcREF または FcSRPP がわずかに含まれている可能性が考えられた。そこで，CBB 染色で検出された 20~30 kDa 付近のバンドに含まれる主要なタンパク質を同定するために，希釈したタンパク質溶液を再度 SDS-PAGE により分離し，3 本の主要なバンド (Fig. 4-2(B), 矢印) を切り出して LC-MS/MS による分析を行った。その結果，それぞれ複数のタンパク質が同定されたが，いずれのタンパク質バンドにおいても主要なタンパク質はイチジクラテックスに多く含まれるシステインプロテアーゼであるフィシンと同定された (Table 4-1)。したがって，Fig. 4-2(A)の CBB 染色の 20~25 kDa 付近の非常に濃いバンドは，フィシンであると考えられる。一方，Fig. 4-2(A)のウェスタンブロットにおいて非常に薄いながらもバンドが検出されたが，FcREF または FcSRPP は LC-MS/MS では全く検出されなかった。FcREF と FcSRPP は *F. carica* ラテックス中の mRNA からクローニングされたものであるが，それらのタンパク質発現量はそれほど多くないか，または共存する大量のフィシンによって加水分解されてしまっている可能性が考えられる。Fig. 4-2 の CBB 染色で検出された低分子量の幅広いバンドも，*F. carica* ラテックス中の様々なタンパク質のフィシンによる分解物の可能性がある。

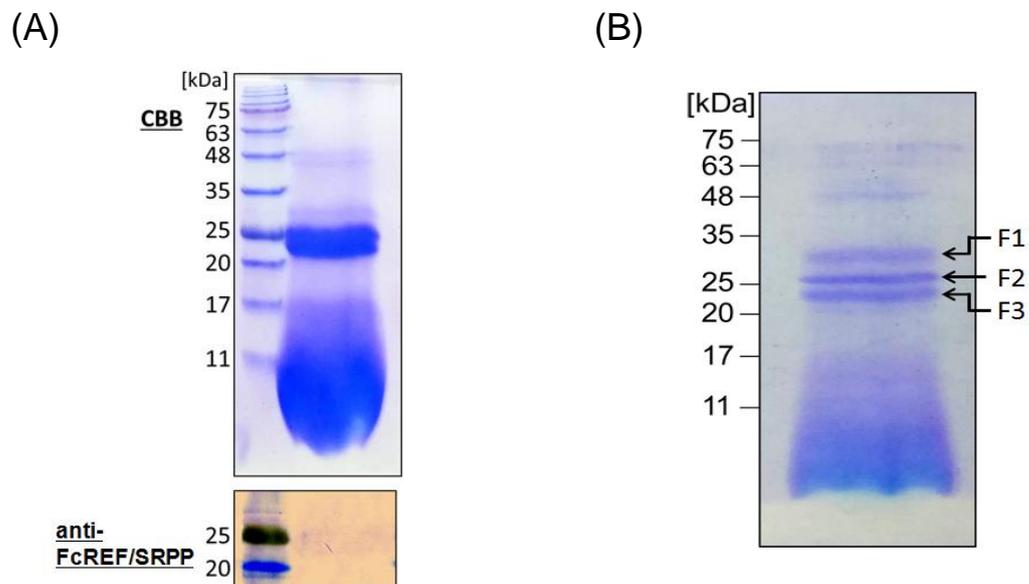


Fig. 4-2. (A) SDS-PAGE (upper panel) and anti-FcREF/SRPP western blot analysis (lower panel) of *F. carica*-rubber proteins. (B) SDS-PAGE of diluted *F. carica*-rubber proteins. Molecular weight marker: GeneDireX BLUeye Prestained Protein Ladder.

Table 4-1. Proteins detected by LC-MS/MS from *F. carica* rubber protein bands.

Accession	Description	Abundance*		
		F1	F2	F3
1018192171	Chain A, Ficin A	716,317,268	2,844,160,974	14,923,998,890
1018192174	Chain A, Ficin B Crystal Form II	43,422,797	194,058,288	1,645,853,488
1018192176	Chain A, Ficin C Crystal Form I	57,435,685	370,027,548	162,986,385
460372104	PREDICTED: zingipain-2-like [Solanum lycopersicum]	19,725,342	60,677,156	492,073,773
30691147	chitinase [Ficus carica]	4,828,831	6,999,899	4,603,953
970000123	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: endochitinase 2-like [Solanum pennellii]	2,087,297	4,213,688	3,003,939
703103695	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, basic vacuolar isoform [Morus notabilis]	7,705,444	31,755,816	30,518,965
566148018	P21 family protein [Populus trichocarpa]	339,547	476,627	
1009107110	PREDICTED: (R)-mandelonitrile lyase 3-like isoform X1 [Ziziphus jujuba]	33,810,096	20,900,608	5,246,844
568884244	PREDICTED: (R)-mandelonitrile lyase-like isoform X1 [Citrus sinensis]	1,895,816	1,551,118	
34223513	oil palm polygalacturonase allergen PEST472 [Elaeis guineensis]			
1040855902	PREDICTED: cysteine proteinase COT44-like [Daucus carota subsp. sativus]	8,367,761	492,498,852	11,447,700
1028962228	PREDICTED: protein P21-like [Gossypium hirsutum]	5,213,194		7,977,098
703103599	Peroxidase 12 [Morus notabilis]	1,549,650		
19110911	peroxidase [Ficus carica]	13,489,293	21,140,048	15,453,400
685375602	PREDICTED: peroxidase 58 [Brassica rapa]		2,243,257	
657954088	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: thiamine thiazole synthase, chloroplastic [Malus domestica]	1,972,974	1,082,004	
1012333064	Endochitinase CH5B [Cajanus cajan]	3,370,316	12,614,288	3,839,577
548851361	hypothetical protein AMTR_s00029p00196710 [Amborella trichopoda]		8,730,159	500,920
82621247	thaumatin-like protein isoform 1 [Ficus pumila var. awkeotsang]			4,877,934
848860328	PREDICTED: glycine-rich RNA-binding protein-like [Erythranthe guttata]			
567873359	hypothetical protein CICLE_v10011117mg [Citrus clementina]		1,625,429	
222613129	hypothetical protein OsJ_32134 [Oryza sativa Japonica Group]	2,689,969	3,407,646	1,428,769
255569554	PREDICTED: endochitinase [Ricinus communis]		5,934,448	2,085,850
565443889	hypothetical protein CARUB_v10005061mg [Capsella rubella]			

*Relative abundance of proteins in each sample.

F1, F2, and F3 refer to the bands indicated by the arrows in Figure 4-2 (B), respectively.

4.2.3 *F. carica* と *Hevea* ゴムの窒素含有率の比較

窒素含有率はタンパク質量に比例することから、これまで多くの天然ゴム研究において天然ゴム試料に含まれるタンパク質量の比較に用いられ、天然ゴムの機械的特性との関連が議論されてきた[7] [8] [9] [10] [11] [12]。そこで、本研究でも *F. carica* ゴムと *Hevea* ゴムの元素分析を行い、窒素含有率からタンパク質量を比較した。その結果、炭素・水素・硫黄の含有率に大きな差は見られなかったが、*F. carica* ゴムの窒素含有率は *Hevea* ゴムの約 2 倍の値を示した (Table 4-2)。これより、*F. carica* ゴムにおいて REF/SRPP 含有量は非常に少ないものの (4.2.2)、全タンパク質量は *Hevea* ゴムに比べて多いことが分かった。

Table 4-2. Elemental analysis of *Hevea* rubber and *F. carica* rubber.

Rubber samples	Contents (w/w%)			
	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur
<i>Hevea</i>	86.2 ± 0.17	13.6 ± 0.63	0.43 ± 0.04	1.72 ± 0.17
<i>F. carica</i>	78.0 ± 0.21	13.4 ± 0.07	0.87 ± 0.08	1.71 ± 0.08

4.2.4 *F. carica* および *Hevea* 固体ゴムの相分離構造の比較

第1章で述べたように、*Hevea* 固体ゴムは非ゴム成分をマトリックスとするナノマトリックス構造を取ることが報告されているが、これらの報告ではクライオマイクロトームにより超薄切片を作成し TEM 観察を行っている[8] [12]。本研究では、まず *F. carica* 固体ゴムおよびその比較対象として *Hevea* 固体ゴムの樹脂包埋法による試料の作製と TEM 観察を試みた。乾燥させた各固体ゴムについて、グルタルアルデヒド固定を一晩、さらにオスミウム固定・染色を2時間行い、樹脂包埋して作製した試料の TEM 像を Fig. 4-3 に示す。*Hevea* ゴムの TEM 像において、明るい領域（薄いグレー）はゴム成分（*cis*-1,4-ポリイソプレン）、暗い領域（黒い線で表される）は非ゴム成分（タンパク質やリン脂質など）にそれぞれ該当し、様々な大きさのゴム粒子が密に集合し、一部融合しながらも非ゴム成分を介して粒子の形状を維持した構造を取っている様子が認められる。また、この網目状に広がった非ゴム成分のマトリックスの厚さはナノメートルスケールであり、その間にゴム成分が分散したナノマトリックス構造が観察される。一方、*F. carica* ゴムでは粒子が大きく変形したような箇所が複数観察された。さらに、Fig. 4-3 の矢印部分に代表される粒子内の明るい領域は、そのコントラストが試料の置かれていないグリットの端の部分と同じであったことから、中空の粒子であると考えられる。これは、樹脂包埋の過程でゴム粒子が崩壊し、内部のゴム成分が抜け出たためと考えられる。

そこで、*F. carica* ゴムについては固定・染色時間を延長して試料を作製し TEM 観察を行った。その結果、内部にゴム成分を保持したままのゴム粒子が観察された (Fig. 4-4)。オスミウム酸は炭素-炭素二重結合に付加する性質があり、ゴム（*cis*-1,4-ポリイソプレン）の染色・固定剤としてしばしば用いられる。一方、動物組織などの生物学的試料の固定では、オスミウム酸とグルタルアルデヒドもしくはパラホルムアルデヒドを組み合わせた二重固定が一般的である。これは、オスミウムはリン脂質、タンパク質の一部や染色体などを固定し、グルタルアルデヒドやパラホルムアルデヒドはタンパク質を架橋固定化できるためである。したがって、*F. carica* ゴムの TEM 観察試料作製の際の固定時間の延長によって非ゴム成分（タンパク質とリン脂質）とゴム成分が共により強く固定され、樹脂包埋過程での変質を防ぐことができたと考えられる。

Hevea ゴムの構造と *F. carica* ゴムの構造を比較すると、ゴム粒子の大きさは *F. carica* の方が大きいことが分かる。*F. carica* ゴム粒子の大きさは以前に Singh らによってゴム

粒子懸濁液の SEM 観察により調べられており、粒径 3.7~6.5 μm の粒子が多く、より小さい粒子 (1.6~3.0 μm) でも *Hevea* の粒径 (0.1~0.8 μm) よりも大きいことが報告されているが[13]、本研究の観察結果もそれと一致している。一方、相分離構造に着目すると、*F. carica* ゴムはゴム粒子が媒体中で独立して離れて存在するアイランドマトリックス構造を取っており、非ゴム成分のマトリックスはマイクロメートルスケールの厚さを有し、ランダムに分布している。また、非ゴム成分を介さず粒子が融合している箇所も多く観察され、乾燥ゴムサンプルを調製する際の遠心分離や乾燥の間にゴム成分と非ゴム成分がそれぞれ集合することで形成された可能性がある。一方最近、ナノダイヤモンドグラフト脱タンパク質天然ゴム (DPNR-ND) の調製が Gannoruwa らにより報告された[14]。これは、tert-butylhydroperoxide (TBHP)/tetraethylene-pentamine (TEPA)開始剤を用いたラジカル反応により、ナノダイヤモンドと脱タンパク質した *Hevea* 天然ゴムラテックス中のゴム粒子との間に化学結合を形成させたゴムであり、ナノダイヤモンドをマトリックスとするナノマトリックス構造 (Fig. 4-5, 左パネル) が観察されている。本研究において観察された *F. carica* ゴムの構造 (Fig. 4-4) は、TBHP/TEPA 開始剤非存在下で調製された、ナノダイヤモンドと天然ゴムの間の化学的結合を欠く DPNR-ND の構造 (Fig. 4-5, 右パネル) の特徴に類似していた。これらの結果から、*F. carica* ゴムにおいてはゴム成分と非ゴム成分の間の強固な化学的結合が欠如していることが示唆される。このことは、TEM 観察の試料作製において、*Hevea* ゴムは短時間の固定で相分離構造が観察できたのに対し、*F. carica* ゴムは明らかに変質してしまうこと、さらに固定時間の延長によってこの変質を防ぐことができたことから支持される。Fig. 4-3 に見られる固定時間の短い *F. carica* ゴムの異常な TEM 像と類似する像は、同じ *Ficus* 属である *F. elastica* のゴム粒子懸濁液においても観察されている[15]。この文献ではその変質の原因として、*F. elastica* ゴムの平均分子量が小さくゴム鎖が短いために TEM 試料作製時にオスmium酸で十分固定されなかった可能性が挙げられている。著者はそれに加えて、TEM 試料作製時の固定化处理以前に、そもそもゴム成分と非ゴム成分が互いに化学結合していないためであると考察した。

以上より、*F. carica* ゴムは、*Hevea* ゴムに見られるようなゴム成分とそれを取り巻くナノメートル厚の非ゴム成分から成るナノマトリックス構造を有していないことが分かった。第 1 章でも述べたように、*Hevea* ゴムのナノマトリックス構造は未加硫状態で

の優れた引張り強さに寄与することが報告されている。したがって、*Hevea* ゴムと *F. carica* ゴムの物性の違いは、これらの相分離構造の違いを反映している可能性が考えられる。

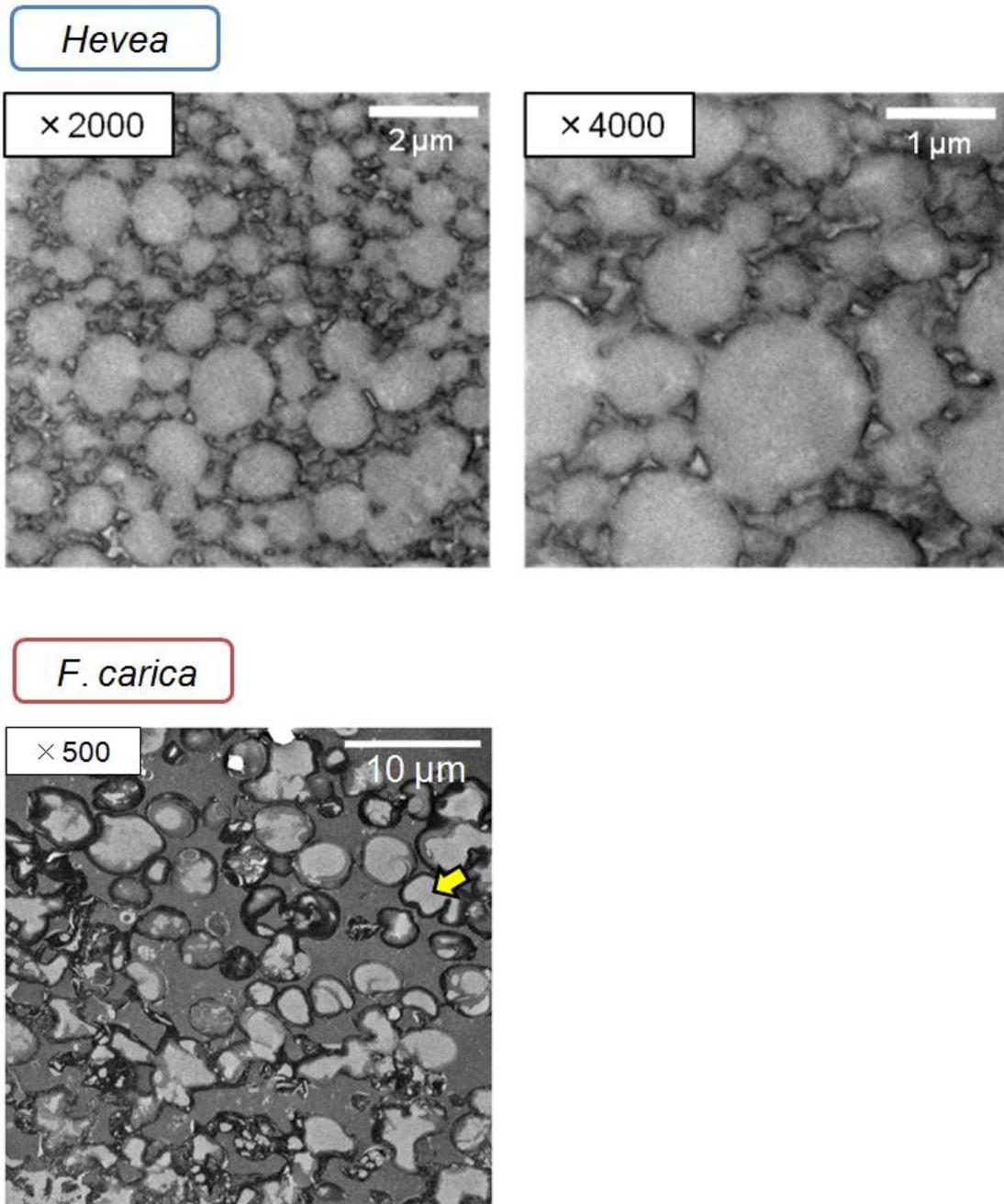


Fig. 4-3. TEM images of *Hevea* rubber and *F. carica* rubber fixed with 3% glutaraldehyde for 16 hours and with 1% osmium tetroxide for 2 hours.

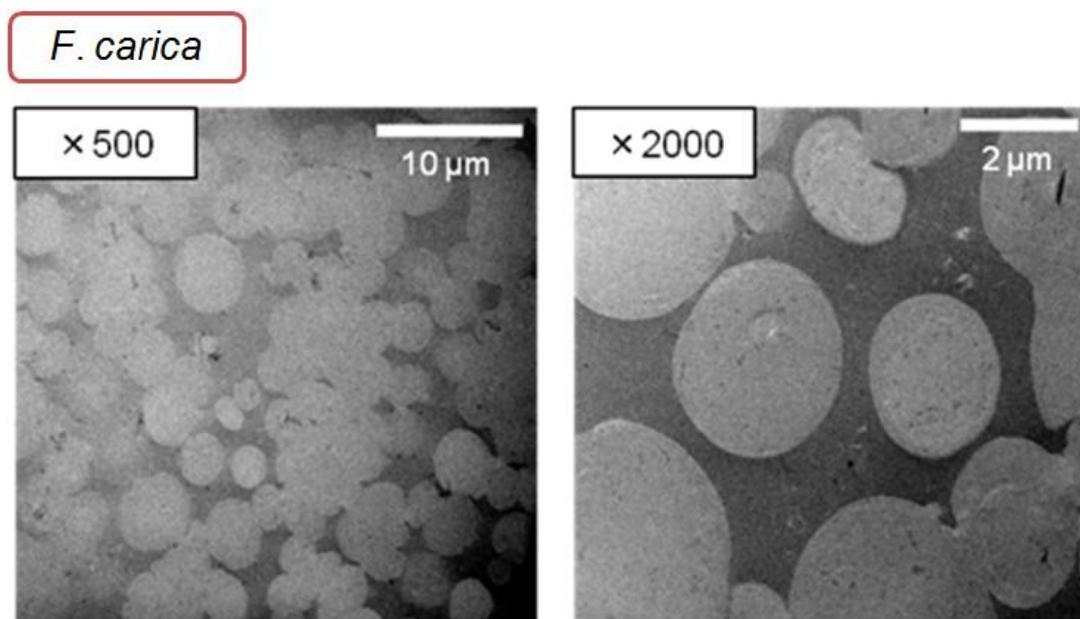


Fig. 4-4. TEM images of *F. carica* rubber fixed with 3% glutaraldehyde for 2 days and with 1% osmium tetroxide for 5 days.

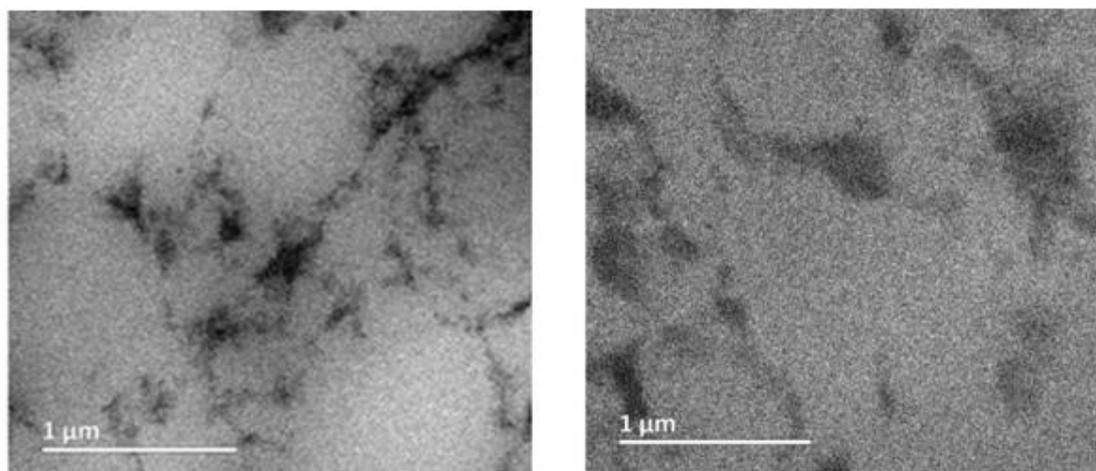


Fig. 4-5. TEM images of DPNR-ND at 10%w/w nanodiamond concentration with (left panel) and without (right panel) a TBHP/TEPA initiator. (Reprinted from Gannoruwa, A., et al., *Polymer* 2017 [14], Copyright (2017), with permission from Elsevier.

4.2.5 界面活性剤で洗浄した *Hevea* ゴムの TEM 観察とタンパク質の分析

前節までの結果から、*F. carica* ゴムのタンパク質含有量は *Hevea* ゴムよりも多いにも関わらず、*F. carica* ゴムではゴム成分と非ゴム成分の間の強固な結合が欠如していることが示唆された。このことから、*Hevea* ゴムの強固なマトリックス構造および分岐点形成には特定のゴム粒子タンパク質の関与が推測される。そこで、*Hevea* HA-NR ラテックスを界面活性剤 DOC で洗浄し、ゴム粒子から剥がされたタンパク質を分析した。また、洗浄後の乾燥ゴムを TEM で観察した。その結果を Fig. 4-6 に示す。TEM 像における明るい領域（薄いグレー）は、試料がないグリットの端部分と同じ明るさであったことから恐らく空洞であり、やや暗い領域（濃いグレー）はゴム成分、特に暗い領域（黒い線で表される）は非ゴム成分にそれぞれ該当すると考えられる。DOC 洗浄後もナノサイズのマトリックスが観察されるが、洗浄前と比較するとこのマトリックスは減少しておりゴム粒子同士がより融合している様子が認められた。また、洗浄画分のタンパク質の SDS-PAGE, CBB 染色において 11 kDa および 15 kDa 付近に濃いバンドが検出され、ウェスタンブロットの結果からこれらのタンパク質は HbREF であると考えられる。これらの結果から、*Hevea* ゴムにおけるナノマトリックス構造の形成には REF が重要な役割を果たすことが示唆された。

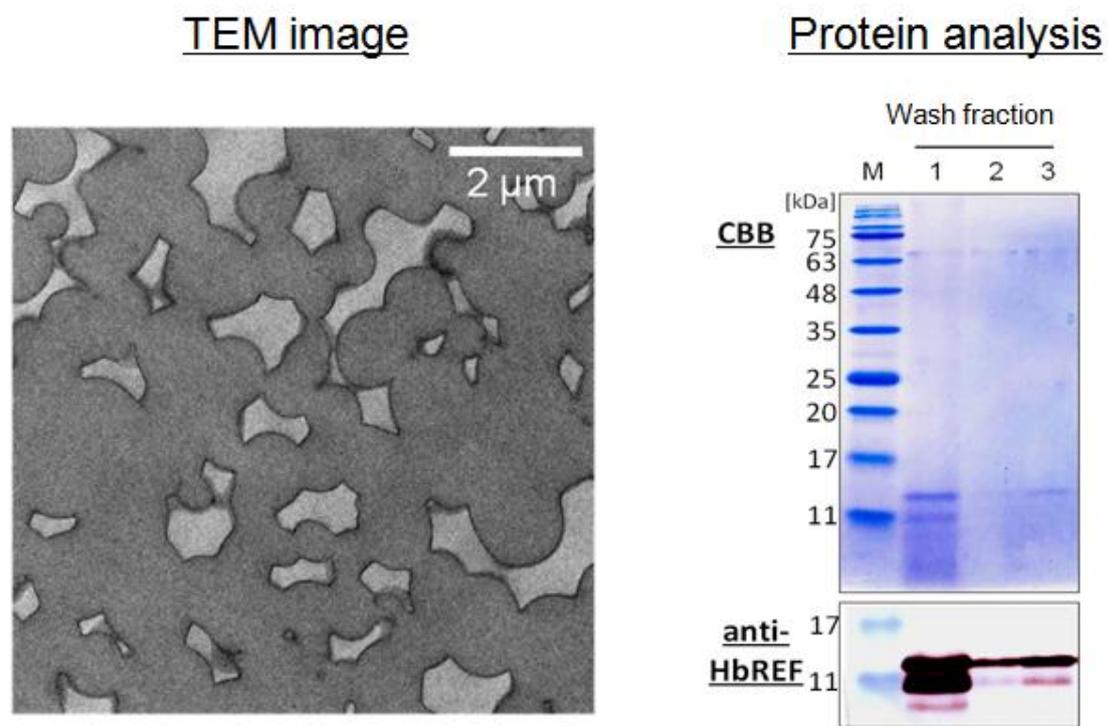


Fig. 4-6. TEM image of *Hevea* rubber washed with detergent (Sodium desoxycholate) and SDS-PAGE and anti-HbREF western blot analysis of the wash fractions.

4.2.6 *F. carica* ゴムのエステル交換による分子量分布への影響

第1章でも述べたように、*Hevea* ゴムの分岐構造形成において、タンパク質の他にリン脂質も分岐点になっていると推定されている。そこで、*F. carica* ゴムにおいてもリン脂質を介した分岐点の有無を調べるために、*F. carica* ゴムをエステル交換し、SEC-MALS 分析によりゴムの分子量分布への影響を調べた。得られたクロマトグラムを Fig. 4-7 に、 dn/dc 値を用いて計算した Fc-sol および TE-Fc-sol の分子量分布を Table 4-3 に示す。また、*Hevea* ゴムのトルエン不溶性であるゲル画分はエステル交換によりトルエン等の有機溶媒に可溶となり、その平均分子量は未処理のゾル画分に比べ低下することが報告されている[4]。そこで、コントロールとして *Hevea* ゴムのゲル画分もエステル交換し、分子量分布を測定した。得られたクロマトグラムを Fig. 4-8 に、Hevea-sol および TE-Hevea-gel の分子量分布を Table 4-4 に示す。*Hevea* ゴムでは溶出量 6.5～8.5 mL において Hevea-sol と TE-Hevea-gel の分子量に大きな違いが見られるが (Fig. 4-8)、この *Hevea* ゴムのゾル画分における高分子量体の溶出遅れは既に報告されている現象であり、これは第1章でも記載したゾル画分に含まれるマイクロゲルに由来することが知られている[5] [16]。*Hevea* ゴムのゲル画分はエステル交換後、THF に溶解した。また Table 4-4 より、TE-Hevea-gel の平均分子量は Hevea-sol よりも明らかに低下している。これに対し、*F. carica* ゴムではエステル交換の前後でその分子量に変化は見られず、重量平均分子量は共に 20 万程度だった (Fig. 4-7 および Table 4-4)。したがって、*F. carica* ゴムは *Hevea* ゴムで推定されているようなリン脂質を介した分岐点をほとんど有していないと考えられる。

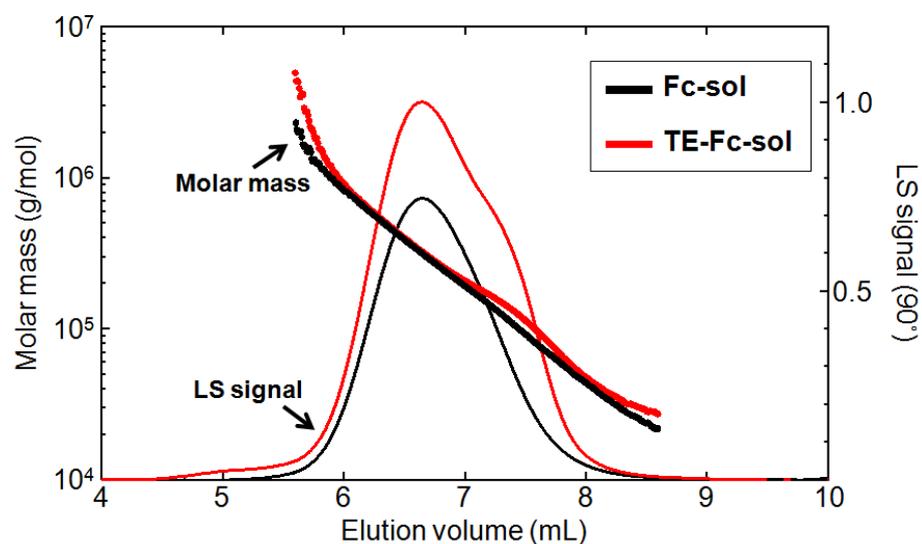


Fig. 4-7. Chromatograms showing the light scattering signals and molar masses as a function of the elution volume of Fc-sol (black) and TE-Fc-sol (red) samples.

Table 4-3. Molecular weight distribution of Fc-sol and TE-Fc-sol measured by SEC-MALS.

	dn/dc: 0.127			dn/dc: 0.130			dn/dc: 0.124		
	Molar mass (kg/mol)			Molar mass (kg/mol)			Molar mass (kg/mol)		
	M_w	M_n	M_w/M_n	M_w	M_n	M_w/M_n	M_w	M_n	M_w/M_n
Fc-sol	210	109	1.9	204	106	1.9	214	111	1.9
TE-Fc-sol	215	120	1.8	209	116	1.8	219	122	1.8

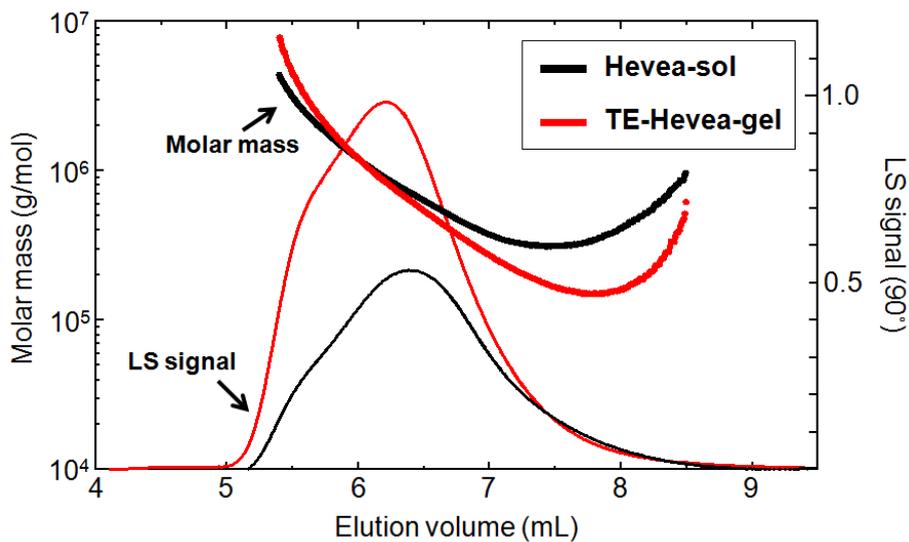


Fig. 4-8. Chromatograms showing the light scattering signals and molar masses as a function of the elution volume of Hevea-sol (black) and TE-Hevea-gel (red) samples.

Table 4-4. Molecular weight distribution of Hevea-sol and TE-Hevea-gel measured by SEC-MALS.

	dn/dc: 0.127			dn/dc: 0.130			dn/dc: 0.124		
	Molar mass (kg/mol)			Molar mass (kg/mol)			Molar mass (kg/mol)		
	M_w	M_n	M_w/M_n	M_w	M_n	M_w/M_n	M_w	M_n	M_w/M_n
Hevea-sol	1006	618	1.6	964	588	1.6	1011	616	1.6
TE-Hevea-gel	663	345	1.9	673	356	1.9	705	373	1.9

4.3 まとめ

本章の結果をまとめると、*F. carica* 固体ゴムは *Hevea* 固体ゴムとは明らかに異なる相分離構造を有しており、ゴムに含まれる全タンパク質量は *F. carica* ゴムの方が多いものの、含有タンパク質の種類は *Hevea* ゴムとは異なることが分かった。

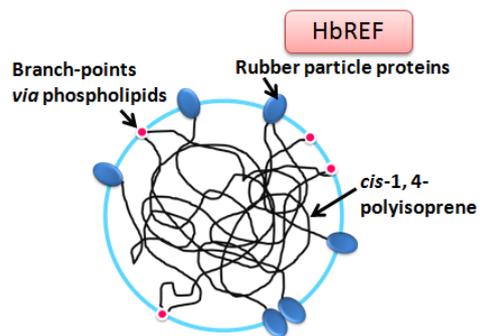
第1章で述べたように、*Hevea* ゴムは *cis*-1,4-ポリイソプレンがタンパク質やリン脂質を介した天然分岐構造 (Fig. 1-2) を取ると推定されており、リン脂質一重膜で覆われたゴム粒子上にこの分岐点となるタンパク質やリン脂質が存在する構造モデル (Fig. 4-8 (A)) が提唱されている[17] [18]。本研究の結果から、このモデルにおいて分岐点となるタンパク質 (Rubber particle proteins) は主に HbREF であると推測される。この HbREF 発現量とラテックス収量には正の相関があり[19]、ラテックス中の HbREF 含有量はゴム収量に比例することが報告されている[20]。また、HbREF はゴム粒子の安定化に寄与することも示唆されている[21]。本研究の結果から予想される *F. carica* ゴム粒子の構造モデルを Fig. 4-8 (B) に示す。*F. carica* ゴム中には FcREF はほとんど存在せず主要なタンパク質はフィシンとそれによる分解物であったこと、また、エステル交換の前後で分子量に差が見られなかったことから、*F. carica* ゴムは *Hevea* ゴムで推定されているような分岐構造をほとんど有していないと考えられる。

第1章でも述べたように、*Hevea* ゴムはナノマトリックス構造を有し、この構造が *Hevea* ゴムの優れた物性に寄与することが報告されているが、本章において *F. carica* ゴムはナノマトリックス構造を有していないこと、第3章において HbREF および FcREF は非常に強い凝集性を持つことが分かった。以上より、*Hevea* および *F. carica* の乾燥させた固体ゴムの構造として、本研究は Fig. 4-9 のようなモデルを提唱する。ここで、HbREF は *Hevea* ゴム粒子上のゴム鎖の分岐点としてだけでなく、ゴム粒子同士の凝集にも関与していると予想される。一方、*F. carica* ゴム粒子上には同様の機能を担う FcREF がほとんど存在しておらず、むしろフィシンやその分解産物による非ゴム成分の厚い層によって粒子の凝集が妨げられていると考えられる。さらにこれらの非ゴム成分とゴム鎖は強固に結合していないためにマトリックスが脆弱で粒子の崩壊や融合が起きやすく、これが *F. carica* ゴムの物性にも影響しているものと推測される。

第2章において、FcREF および FcSRPP は *F. carica* ラテックスの RNA-seq を基にクローニングされたものであることから、これらは *F. carica* ラテックス中で遺伝子レベ

ルではある程度発現していると考えられる。しかし、タンパク質レベルで FcREF および FcSRPP の存在量が極めて少ないことは、*F. carica* ゴムの主要タンパク質であったフィシンと関係している可能性が高い。したがって、フィシン遺伝子をノックアウトすれば FcREF の分解が抑制され、FcREF を介した分岐構造の形成による *F. carica* ゴムの物性の向上が期待できるかもしれない。また、本章において *F. carica* ゴムはリン脂質を介した分岐点もほとんど有していないことが分かった。*Hevea* ゴムにおける天然分岐構造の形成機構は未だ明らかになっておらずその解明が望まれるが、今後例えばリポドミクス研究などを通して *Hevea* ゴムと *F. carica* ゴムを比較することによってそのメカニズムを明らかにできるかもしれない。以上の観点から、天然ゴムの分岐構造の形成並びに物性との相関を明らかにする上で *F. carica* ゴムは良い研究モデルになると考えられる。

(A)



(B)

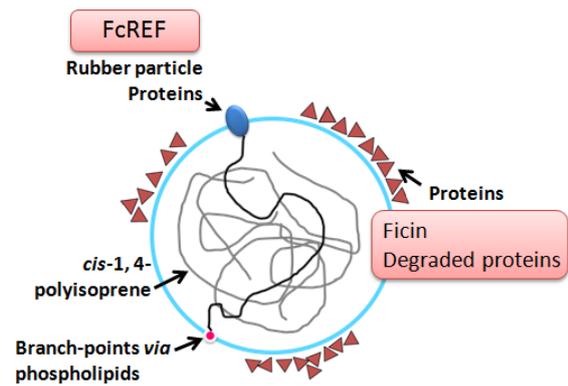


Fig. 4-8. Presumed microstructure of rubber particle from (A) *Hevea* and (B) *F. carica*.

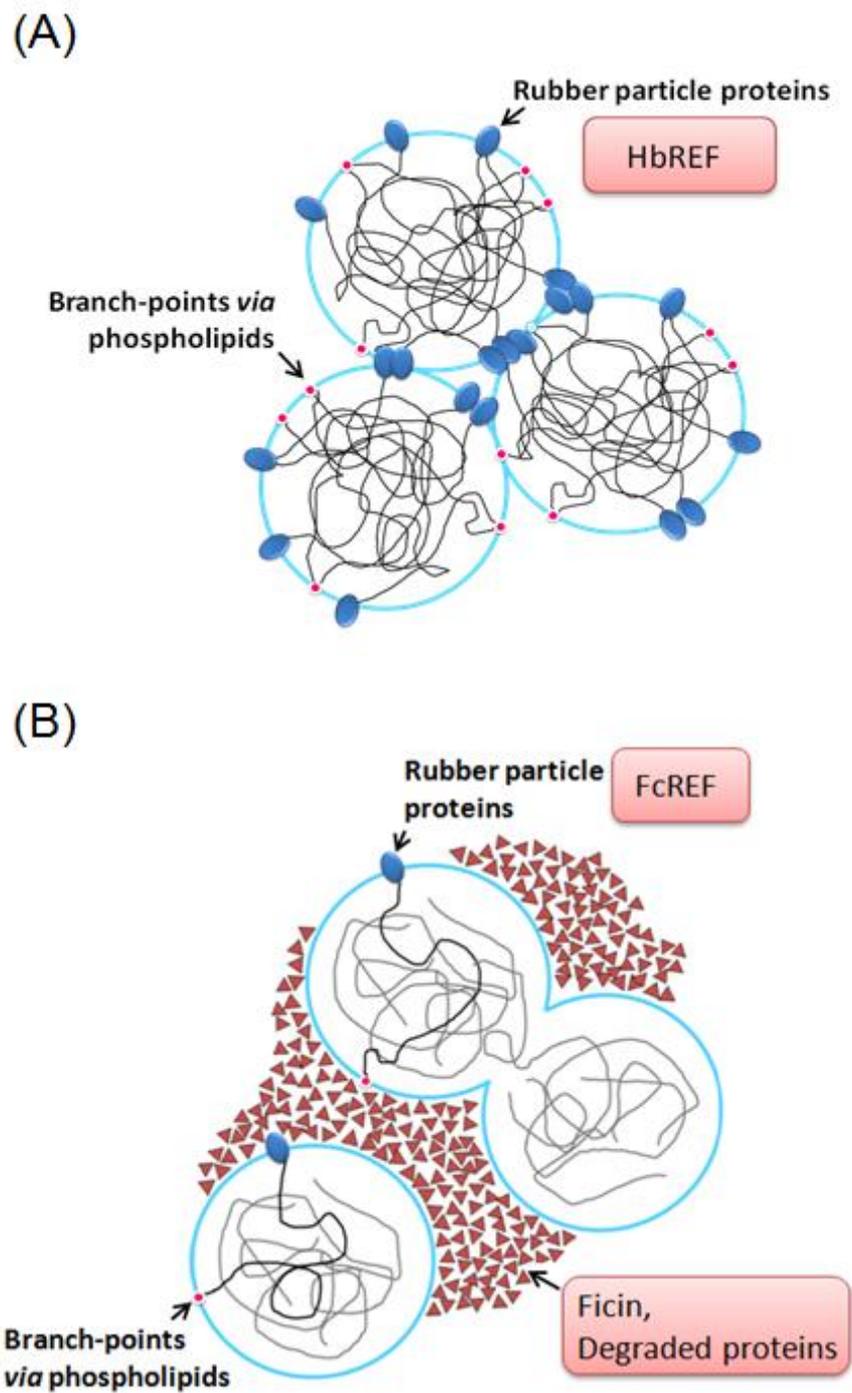


Fig. 4-9. Presumed microstructure of solid rubber from (A) *Hevea* and (B) *F. carica*.

参考文献

1. Ehab EE, Frédéric B: **Novel insight into the gel phase of Hevea natural rubber.** *Journal of Rubber Research* 2011, **14**:1-10.
2. Huang C, Huang G, Li S, Luo M, Liu H, Fu X, Qu W, Xie Z, Wu J: **Research on architecture and composition of natural network in natural rubber.** *Polymer* 2018, **154**:90-100.
3. Mekkiengkrai D, Sakdapipanich JT, Tanaka Y: **Structural Characterization of Terminal Groups in Natural Rubber: Origin of Nitrogenous Groups.** *Rubber Chemistry and Technology* 2006, **79**:366-379.
4. Tangpakdee J, Tanaka Y: **Characterization of Sol and Gel in Hevea Natural Rubber.** *Rubber Chemistry and Technology* 1997, **70**:707-713.
5. Kim C, Morel M-H, Beuve JS, Guilbert S, Collet A, Bonfils F: **Characterization of natural rubber using size-exclusion chromatography with online multi-angle light scattering: Study of the phenomenon behind the abnormal elution profile.** *Journal of Chromatography A* 2008, **1213**:181-188.
6. Michielsen S: *Polymer Handbook (4th ed.)*. New York: Wiley; 1999.
7. Kawahara S, Isono Y, Sakdapipanich JT, Tanaka Y, Aik-Hwee E: **Effect of Gel on the Green Strength of Natural Rubber.** *Rubber Chemistry and Technology* 2002, **75**:739-746.
8. Kawahara S, Chaikumpollert O, Akabori K, Yamamoto Y: **Morphology and properties of natural rubber with nanomatrix of non-rubber components.** *Polymers for Advanced Technologies* 2011, **22**:2665-2667.
9. Monadjemi SMAM, Colleen M.; Cornish, Katrina: **Effect of non-rubber constituents on guayule and hevea rubber intrinsic properties.** *Journal of Research Updates in Polymer Science* 2016, **5**:87-96.
10. Thuong NT, Yamamoto O, Nghia PT, Cornish K, Kawahara S: **Effect of naturally occurring crosslinking junctions on green strength of natural rubber.** *Polymers for Advanced Technologies* 2017, **28**:303-311.
11. McMahan C, Kostyal D, Lhamo D, Cornish K: **Protein influences on guayule and Hevea natural rubber sol and gel.** *Journal of Applied Polymer Science* 2015, **132**.
12. Zhou Y, Kosugi K, Yamamoto Y, Kawahara S: **Effect of non-rubber components on the mechanical properties of natural rubber.** *Polymers for Advanced Technologies* 2017, **28**:159-165.
13. Singh AP, Wi SG, Chung GC, Kim YS, Kang H: **The micromorphology and protein characterization of rubber particles in Ficus carica, Ficus benghalensis and Hevea**

- brasiliensis**. *J Exp Bot* 2003, **54**:985-992.
14. Gannoruwa A, Sumita M, Kawahara S: **Highly enhanced mechanical properties in natural rubber prepared with a nanodiamond nanomatrix structure**. *Polymer* 2017, **126**:40-47.
 15. Wood DF, Cornish K: **Microstructure of Purified Rubber Particles**. *Int J Plant Sci* 2000, **161**:435-445.
 16. Rolere S, Cazevielle C, Sainte-Beuve J, Bonfils F: **New insights on Natural Rubber microgel structure thanks to a new method for microaggregates extraction**. *European Polymer Journal* 2016, **80**:117-125.
 17. Tarachiwin L, Sakdapipanich JT, Tanaka Y: **Relationship between Particle Size and Molecular Weight of Rubber from Hevea Brasiliensis**. *Rubber Chemistry and Technology* 2005, **78**:694-704.
 18. Sriring M, Nimpaiboon A, Kumarn S, Sirisinha C, Sakdapipanich J, Toki S: **Viscoelastic and mechanical properties of large- and small-particle natural rubber before and after vulcanization**. *Polymer Testing* 2018, **70**:127-134.
 19. Priya P, Venkatachalam P, Thulaseedharan A: **Differential expression pattern of rubber elongation factor (REF) mRNA transcripts from high and low yielding clones of rubber tree (Hevea brasiliensis Muell. Arg.)**. *Plant Cell Reports* 2007, **26**:1833-1838.
 20. Dennis MS, Light DR: **Rubber elongation factor from Hevea brasiliensis. Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis**. *J Biol Chem* 1989, **264**:18608-18617.
 21. Yamashita S, Yamaguchi H, Waki T, Aoki Y, Mizuno M, Yanbe F, Ishii T, Funaki A, Tozawa Y, Miyagi-Inoue Y, et al: **Identification and reconstitution of the rubber biosynthetic machinery on rubber particles from Hevea brasiliensis**. 2016, **5**.

第 5 章

出芽酵母における HbREF および FcREF, FcSRPP の発現と 酵母脂質代謝への影響

序

Hevea 天然ゴムは Fig. 1-3 のような天然分岐構造を取ると推定されており、これが *Hevea* 天然ゴムの優れた物性の由来の一つであると考えられているが、この天然分岐構造の詳細な構造は明らかになっていない。一方、天然分岐構造の形成にも関与すると考えられる天然ゴムの生合成機構は完全解明には至っていないものの、その全容が徐々に明らかになってきた。第 1 章で述べたように、ゴムの主骨格 *cis*-1,4-ポリイソプレンを合成するシス型プレニルトランスフェラーゼ (HRT1) に加え、HbREF と HRT1-REF bridging protein (HRBP) (別名 CPT like protein, CPTL) の 3 つのタンパク質をゴム粒子上に再構成することにより、ゴム合成活性が生じる[1]。ゴム粒子は Fig. 1-2 のように疎水性であるシスポリイソプレンコアがリン脂質一重膜とタンパク質によって囲まれた構造をしており、天然ゴム生合成の反応場を提供すると共に、生成した疎水性の巨大な *cis*-1,4-ポリイソプレンの貯蔵器官ともなっている。したがって、天然ゴム合成におけるゴム粒子の役割は極めて重要である。一般に微生物はゴム粒子を有していないが、真核生物の酵母は脂質蓄積の場である脂肪滴 (LD) を有し、その構造はゴム粒子と同様にリン脂質一重膜で覆われたものとなっている。そこでこの LD をゴム合成の反応場として利用できれば、すなわちゴム生合成酵素複合体を形成する CPT と CPTL、さらに REF や SRPP を酵母の LD に共発現できれば、将来的には微生物工場によるゴム合成につながる可能性が期待される。CPT および CPTL については、既に *L. sativa* (レタス) 由来の各遺伝子がクローニングされ、これらを出芽酵母で発現させた場合、LD とその起源である小胞体 (ER) に局在することが報告されている[2]。しかし、REF および SRPP を酵母で発現させた場合の存在部位は明らかになっていない。これらの背景から、本章では微生物によるゴム合成を視野に、FcREF, FcSRPP および HbREF を出芽酵母に発現させ、これらのタンパク質の局在解析を行った。さらに、これらのタンパク質の発現が LD の形態や脂質蓄積に及ぼす影響を調べた。

5.1 実験操作

・試薬・キット類

遺伝子組換え実験に必要な試薬, キット類は第2章に記載したものを, タンパク質の分子量マーカーは第3章に記載したものを使用した。ただし, PCR 酵素はタカラバイオの製品も用いた。また, プラスミドの構築には In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) を利用した。逆転写 PCR は SuperScript IV One-Step RT-PCR System (サーモフィッシャーサイエンティフィック) により実施した。出芽酵母は ATCC から入手した Yeast SNY9 (MAT α , mfa1::ADE2, mfa2::TRP1, bar1::HIS3, ade2, trp1, his3, leu2, ura3, lys2) を用いた。酵母生育用の SD 培地はタカラバイオの製品を使用し, 酵母の形質転換は *S. cerevisiae* Direct Transformation Kit (富士フィルム和光純薬) を用いて行った。酵母細胞壁溶解酵素 Zymolyase はナカライテスクより購入した。抗体は MBL, プロテインテックおよびアブカムより, LD 蛍光色素である BODIPY 493/503 はサーモフィッシャーサイエンティフィックより入手した。薄層クロマトグラフィーの標準物質として, コレステロール (シグマアルドリッチ), オレイン酸コレステロール (東京化成工業), トリオレイン (東京化成工業) を用いた。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

・機器類

共焦点レーザー顕微鏡はカルツァイス LSM 780 を用いた。フローサイトメトリー分析にはベクトンディッキンソン FACS Aria III を使用した。その他, 第2, 3章と共通する機器は同じ物を使用した。

5.1.1 プラスミドの調製

・FcREF, FcSRPP および HbREF 発現プラスミドの構築

バックボーンベクター (GAP プロモーターが挿入された YEp352, YEp352-pGAP) はインバース PCR で線状化し, Gel/PCR Extraction Kit (FastGene) により精製した。PCR の組成と条件を Tables 5-1, 5-2 に示す。FcREF, FcSRPP および HbREF をコードする遺伝子は, 第3章で作製した各プラスミドを鋳型にして PCR により増幅した。この際, 各遺伝子の 3'末端に FLAG タグ配列が付加されるように設計したプライマーを使用した。さらに, 精製した PCR 産物を鋳型とし, ベクターの末端とオーバーラップする 15 bp

の配列を付加したプライマーを用いて 2nd PCR を行った。PCR 溶液の組成と条件は Tables 2-4, 2-5 と同様である。PCR 産物を精製し、得られた各遺伝子断片と線状化ベクターを用いて Table 5-3 の組成で 50°C, 15 分インキュベートすることで In-Fusion 反応を行った。その後、反応溶液全量を *E. coli* DH5 α コンピテントセル 100 μ L と混合して形質転換を行い、コロニーPCR により形質転換体を選別してプラスミド (YEp352-FcREF, YEp352-FcSRPP および YEp352-HbREF) を抽出した。形質転換, コロニーPCR, プラスミド抽出の操作は第 2 章と同様である。

Table 5-1. Composition of inverse PCR for linearization of YEp352-pGAP.

Reagents	Volume (μ L)
Clone Amp HiFi PCR premix (Takara Bio)	12.5
10 μ M Fw primer	0.8
10 μ M Rv primer	0.8
Template DNA	2 ng
up to	25

Table 5-2. Inverse PCR cycling conditions.

Temp. ($^{\circ}$ C)	Time (sec)	Cycles
98	10	} 30
55~65	15	
72	35	
72	35	1
4	∞	1

Table 5-3. Composition of In-Fusion reaction for preparation of REF/SRPP expressing plasmid.

Reagents	Amounts
DNA fragment (HbREF/ FcREF/ FcSRPP)	100 ng
Linearized YEp352-pGAP	100 ng
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	1 μ L
up to	5 μ L

・EGFP 融合 Sec63 発現プラスミドの構築

Sec63 は、出芽酵母由来のタンパク質の輸送に関与する Sec 複合体の一部で、ER 膜タンパク質である。これを ER マーカーとして使用するために、強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を C 末端に融合した Sec63 (Sec63-EGFP) 発現プラスミドを構築した。バックボーンベクター (pBEVY-L) はインバース PCR で線状化し精製した。PCR の組成と条件は Tables 5-1, 5-2 と同様である。Yeast SNY9 を YPD 培地で培養し、第 2 章と同様に AquaPure RNA isolation kit (バイオラッド) を使用して RNA を抽出した。5 μ g の RNA, SuperScript IV One-Step RT-PCR System (サーモフィッシャーサイエンティフィック), さらに特異的なプライマーを使用して RT-PCR により Sec63 cDNA を調製した。PCR 溶液の組成を Table 5-4 に、反応条件を Table 5-5 に示す。この PCR 産物に RNase A (タカラバイオ) を 20 μ g/mL となるように添加して 37°C で 15 分インキュベートすることで鋳型 RNA を分解した後、Gel/PCR Extraction Kit (FastGene)を用いて Sec63 cDNA を精製した。これを鋳型として、線状化したベクターの 3'末端および EGFP 遺伝子の 5'末端とそれぞれオーバーラップする 15 bp の配列を付加したプライマーセットを使用して PCR を行い、In-Fusion cloning のための Sec63 遺伝子断片を調製した。また、pCold I-EGFP プラスミドを鋳型とし、リバースプライマーとしてベクターの 5'末端とオーバーラップする配列を付加したプライマーを用いて PCR を行い、In-Fusion cloning のための EGFP 遺伝子断片を調製した。これらの PCR 溶液の組成および条件は Tables 2-4, 2-5 と同様である。得られた Sec63 遺伝子断片, EGFP 遺伝子断片, 線状化ベクター pBEVY-L を用いて、Table 5-6 の組成で In-Fusion 反応を行った。先のプラスミド調製と同様に、形質転換, コロニー PCR, プラスミド抽出を行い、プラスミド

pBEVY-L-Sec63-EGFP を調製した。5.1.1 で使用したすべてのプライマーの配列を Table 5-7 にまとめて示した。

Table 5-4. Composition of reverse transcription PCR mixture for amplification of Sec63-cDNA.

Reagents	Volume (μ L)
2 x Platinum SuperFi RT-PCR Master Mix	12.5
10 μ M Fw primer	1.25
10 μ M Rv primer	1.25
Super Script IV RT Mix	0.25
Template RNA	5 ng
up to	25

Table 5-5. Reverse transcription PCR cycling conditions for amplification of Sec63-cDNA.

Temp. ($^{\circ}$ C)	Time	Cycles
50	10 min	1
98	2 min	1
98	10 sec	40
60	10 sec	
72	1 min	
72	5 min	1
4	∞	1

Table 5-6. Composition of In-Fusion reaction for preparation of Sec63-EGFP expressing plasmid.

Reagents	Amounts
Sec63 DNA fragment	57 ng
EGFP DNA fragment	21 ng
Linearized pBEVY-L	100 ng
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	1 μ L
up to	5 μ L

Table 5-7. List of oligonucleotide primers used in 5.1.1.

Construction of:	Primer name	Oligonucleotide sequence (5' - 3')	Description
YEp352-HbREF YEp352-FcREF YEp352-FcSRPP	YEp352-pGAP_Fw	AAGCTTGGCACTGGCCGTC	For linearization of YEp352-pGAP.
	YEp352-pGAP_Rv	GGATCCGTCGAAACTAAGTTC	
YEp352-HbREF	HbREF fragment_Fw	agtttcgacggatccATGGCTGAAGACGAAGACA	1st PCR: For amplification of a HbREF gene with FLAG-tag at C-ter.
	HbREF-FLAG_Rv	<u>TCACCTTGT</u> CATCGTCATCTTTATAATCATTCTCTCCATAAAACACC	
	HbREF fragment_Fw	Same as above	2nd PCR: For amplification of a HbREF gene with 15 bp flanking regions overlapping the ends of the linearized YEp352-pGAP.
	FLAG fragment_Rv	gccagtccaagctt <u>TCACCTTGT</u> CATCGTCATCTTT	
YEp352-FcREF	FcREF fragment_Fw	agtttcgacggatccATGGCCTCACAAAGAAAGATTC	1st PCR: For amplification of a FcREF gene with FLAG-tag at C-ter.
	FcREF-FLAG_Rv	<u>TCACCTTGT</u> CATCGTCATCTTTATAATCGTGAACAGCAACATCAGGTTCC	
	FcREF fragment_Fw	Same as above	2nd PCR: For amplification of a FcREF gene with 15 bp flanking regions overlapping the ends of the linearized YEp352-pGAP.
	FLAG fragment_Rv	Same as above	
YEp352-FcSRPP	FcSRPP fragment_Fw	agtttcgacggatccATGGCGGATTCGGAAAGTC	1st PCR: For amplification of a FcSRPP gene with FLAG-tag at C-ter.
	FcSRPP-FLAG_Rv	<u>TCACCTTGT</u> CATCGTCATCTTTATAATCTGCGCTACAACATGAGCAT	
	FcSRPP fragment_Fw	Same as above	2nd PCR: For amplification of a FcSRPP gene with 15 bp flanking regions overlapping the ends of the linearized YEp352-pGAP.
	FLAG fragment_Rv	Same as above	
pBEVY-L-Sec63-EGFP	pBEVY-L_Fw	GTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTTGGA	For linearization of pBEVY-L.
	pBEVY-L_Rv	GGATCCGTCGAAACTAAGTTC	
	Sec63_FW	ATGCCTACAAATTACGAGTATGATG	For amplification of Sec63-cDNA.
	Sec63_RV	TTCTGGTGATTCATCATCTTCAG	
	Sec63-fragment_Fw	agtttcgacggatccATGCCTACAAATTACGAGTAT	For amplification of a Sec63 gene with 15 bp flanking regions overlapping the 3'-end of the linearized pBEVY-L and the 5'-end of EGFP gene.
	Sec63-fragment_Rv	gcccttgctcaccatTTCTGGTGATTCATCATCTTC	
	EGFP-fragment_Fw	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	For amplification of a EGFP gene with 15 bp flanking regions overlapping the 5'-end of the linearized pBEVY-L.
	EGFP-fragment_Rv	tgccctgacgtgcac <u>TTACTTGT</u> TACAGCTCGTCC	

Lower-case letters show a 15 bp overlap region for In-Fusion cloning.

Bold-faced and underlined parts correspond to stop codons and FLAG-tag gene, respectively.

5.1.2 出芽酵母の形質転換

・ FcREF, FcSRPP および HbREF 発現酵母の構築

Yeast SNY9 のグリセロールストックを白金耳で掻き取り、YPD 寒天プレートに塗布して 30°C で 3 日間培養した。形成されたコロニーを取り、YPD 液体培地に懸濁して OD₆₀₀=0.01 に調製した後、OD₆₀₀=3.5~5 になるまで 30°C で振とう培養した。この培養液 12.5 μL に、プラスミド混合液 (Sc Transformation Reagent 10 μL, キャリア DNA 1 μL, プラスミド溶液 (YEp352-FcREF, YEp352-FcSRPP, YEp352-HbREF または空ベクター-YEp352) 各 1.5 μL (0.5 μg 以上)) を加えてボルテックスミキサーでよく混合し、42°C で 2 時間インキュベートした。これに滅菌水を 150 μL 加え、SD-Ura 寒天プレートに塗布して 30°C で 3 日間以上培養した。その後コロニーPCRを行い、形質転換体を選別した。

・ FcREF, FcSRPP および HbREF と Sec63-EGFP 共発現酵母の構築

REF および SRPP の発現部位を確認するために、各 REF/SRPP と ER マーカー Sec63-EGFP を共発現する酵母を作製した。上記で調製した FcREF, FcSRPP および HbREF 発現酵母ならびにコントロールとして空ベクターを導入した細胞 (Mock) に、同様の方法でプラスミド pBEVY-L-Sec63-EGFP を導入した。SD-Leu-Ura 寒天プレートに塗布して培養し、コロニーPCRを行い、形質転換体を選別した。

5.1.3 組換えタンパク質 FcREF, FcSRPP および HbREF の発現確認

酵母細胞からのタンパク質の抽出にはアルカリ溶解法[3]を用いた。培養液0.5 mL 分の細胞を回収し、Resuspension buffer (0.1 M NaOH, 0.05 M EDTA, 2% SDS, 2% 2-メルカプトエタノール) 50 μLに懸濁した後、90°Cで10分間インキュベートした。さらに4 M 酢酸を1.25 μL添加し、ボルテックスミキサーでよく混合して再び90°Cで10分間インキュベートした。Loading buffer (0.25 M Tris-HCl (pH 6.8), 50% グリセロール, 0.05% Bromophenol blue)を12.5 μL添加した後、15,000 rpmで5 min遠心分離し、上清を回収した。これを用いてSDS-PAGE, CBB染色およびanti-FLAG抗体によるウェスタンブロットを行い、各REFおよびSRPPの発現を確認した。これらの操作は第3章と同様である。ただし、一次抗体はmouse anti-DDDDK-tag抗体 (MBL) を

用い、1,250倍に希釈して使用した。

5.1.4 FcREF, FcSRPP および HbREF の細胞内局在解析

・ 蛍光免疫染色

蛍光免疫染色は Robinson らの方法[4]を参考に行った。5.1.2 で作製した FcREF, FcSRPP および HbREF 発現酵母は SD-Ura 液体培地に、FcREF, FcSRPP および HbREF と Sec63-EGFP の共発現酵母は SD-Leu-Ura 液体培地に植菌し、30°C で 12 時間振とう培養した。培養液の OD₆₀₀ を測定し、14 OD₆₀₀ unit の細胞を回収した。なお、1 OD₆₀₀ unit は OD₆₀₀=1 の培養液 1 mL に含まれる細胞量を意味する。回収した細胞を 100 mM KPO₄ buffer (pH 7.5) 300 μL に懸濁し、5000 × g で 1 分間遠心分離して上清を捨てることにより細胞を洗浄した。回収した細胞を 4% パラホルムアルデヒド含有 PBS に再懸濁し、25°C で 15 分間静置することで細胞を固定した。100 mM KPO₄ buffer (pH 7.5) で細胞を 2 回洗浄し、75 μg/mL Zymolyase20-T, 0.002% 2-メルカプトエタノール含有 1 M ソルビトール 500 μL で細胞を懸濁し、30°C で 40 分間インキュベートすることで細胞壁を溶解した。0.2 w/v% になるように SDS を加えて氷上で 10 分間静置した後、スフェロプラスト化された細胞を G1T (1%ゼラチン, 0.5 mg/mL BSA, 150 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.5), 0.1% Tween 20, 1 mM NaN₃) 300 μL で 3 回洗浄した。細胞を G3T (3%ゼラチン, 0.5 mg/mL BSA, 150 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.5), 0.1% Tween 20, 1 mM NaN₃) 500 μL で懸濁して 25°C で 1 時間ブロッキングした後、再び G1T で 3 回洗浄した。続いて、G1T で 50 倍に希釈した一次抗体 (mouse anti-DDDDK-tag 抗体 (MBL)) 溶液を 400 μL 加えて 25°C で 1 時間静置した。再度 G1T で 3 回洗浄し、G1T で 200 倍に希釈した二次抗体 (goat anti-mouse IgG H&L Alexa Fluor 594 (アブカム)) 溶液を 200 μL 加えて 25°C で 30 分間静置した後、G1T で 5 回洗浄した。続いて LD を共染色する場合は、100 mM KPO₄ buffer (pH 7.5) で 5 μM に希釈した BODIPY 493/503 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を 1 mL 加えて 5 分間静置した後、100 mM KPO₄ buffer (pH 7.5) で 3 回洗浄した。

・顕微鏡観察

染色した細胞を 50%グリセロール含有 10 mM HEPES (pH 7.5)で希釈し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 780, カールツァイス) で観察した。

5.1.5 フローサイトメトリーによる細胞内脂質蓄積の定量

5.1.2 で作製した FcREF, FcSRPP および HbREF 発現酵母ならびに Mock をそれぞれ SD-Ura 液体培地で培養し、5.1.4 と同様に 4%パラホルムアルデヒドで固定した。OD₆₀₀=0.5になるように 100 mM KPO₄ buffer (pH 7.5)で希釈した細胞懸濁液 1mL に、BODIPY 493/503 を 5 μM で加えて 5 分間静置した後、100 mM KPO₄ buffer (pH 7.5)で 3 回洗浄した。また、比較として BODIPY 染色していない細胞も用意した。各細胞は測定の前直前にセルストレーナー (35 μm 孔, キャップ付き 5 mL チューブ ; ファルコン) でろ過し、大きな細胞塊を除去した。フローサイトメーターは FACS Aria III (ベクトンディッキンソン) を用い、1 サンプル当たり 10,000 evt とした。平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) の解析には BD FACS-Diva software (ベクトンディッキンソン) を用いた。

5.1.6 培地中のグルコース濃度の測定

グルコース C II -テスト (富士フィルム和光純薬) を用いて、各培養時間における培地中のグルコース量を測定した。本キットはムロターゼとグルコースオキシダーゼを組み合わせた酵素法によりグルコース濃度を測定することができる。5.1.2 で作製した FcREF, FcSRPP および HbREF 発現酵母ならびに Mock をそれぞれ SD-Ura 液体培地で 48 時間培養した。6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 時間目の培養液を 1 mL ずつサンプリングし、遠心分離 (10,000 rpm, 1 min) の後、培地面分を回収した。キット付属のプロトコールに従い、グルコース標準溶液および回収した培地面分と発色試液をよく混合し 37°C で 5 分間インキュベートした後、505 nm における吸光度を測定し、培地に含まれるグルコース濃度を算出した。ただし、培養時間 6~18 時間目の培地には高濃度のグルコースが残存していたため、回収した培地面分を 4 倍希釈したものをを用いた。

5.1.7 脂質分析

・脂質の抽出

脂質の抽出は Folch らの方法[5]を参考にした。5.1.2 で作製した FcREF, FcSRPP および HbREF 発現酵母ならびに Mock を SD-Ura 液体培地で 12 時間培養し、培養液 10 mL 分の細胞を回収した。細胞をクロロホルム/メタノール (2:1 v/v) 750 μ L に懸濁し、直径 0.3 mm のジルコニアビーズを 1.6 g 入れ、マルチビーズショッカー MB755U (安井機械) を用いて 2,500 rpm, 60 秒の振とうを 60 秒おきに 6 回繰り返して細胞を破碎した。さらに食塩水を 100 μ L 加えてボルテックスミキサーでよく混合した後、15,000 rpm で 5 分間遠心分離し、下層の有機相 (約 350 μ L) を回収した。これを 4 本の 1.5 mL チューブに 87.5 μ L ずつ分注し、窒素ガスを吹きつけながら室温で乾燥させた。チューブ 1 本あたり、培養液 2.5 mL 分の細胞から抽出された脂質が含まれることになる。

・薄層クロマトグラフィー

抽出した脂質 (培養液 2.5 mL 分) をクロロホルム/メタノール (2:1 v/v) に再溶解し、全量をシリカゲル 60 TLC プレート (メルク) にスポットした。また、コレステロール 5 μ g, オレイン酸コレステロール 5 μ g, トリオレイン 20 μ g を標準物質としてスポットした。展開は Connerth らの方法[6]に従い、石油エーテル/ジエチルエーテル/酢酸 (70:30:2) によりプレートの約 3 分の 2 の高さまで展開した後、石油エーテル/ジエチルエーテル (49:1) でプレートの上端まで展開した。エルゴステロール (ERG) とステリルエステル (SE) は $MnCl_2$ 染色溶液 (Table 5-8) を吹きつけて 100°C で 15 分加熱することで染色した。トリアシルグリセロール (TAG) はヨウ素蒸気で染色した。プレートの画像をスキャナー (PM A-950, エプソン) で取り込み、ImageJ software で各スポットの脂質の相対量を算出した。

Table 5-8. Composition of MnCl₂ staining solution.

Reagents	Amounts
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.39 g (final conc. 0.5% MnCl ₂)
Methanol	24 mL
H ₂ SO ₄	1.6 mL
up to	50 mL

5.1.8 MTT アッセイ

5.1.7 の脂質分析の結果を細胞内代謝活性あたりで評価するために、Cell Proliferation kit I (MTT) (ロシュ) を用いて MTT アッセイを行った。5.1.2 で作製した FcREF, FcSRPP および HbREF 発現酵母ならびに Mock を SD-Ura 液体培地で 9, 12, 15, 18 時間培養し、OD₆₀₀ を測定した後、3.5 OD₆₀₀ unit 相当の細胞を回収して 100 mM KPO₄ buffer (pH 7.5) 300 μL で 2 回洗浄した。細胞を SD-Ura 液体培地 350 μL に懸濁し、100 μL ずつ 1.5 mL チューブに分注した。これを測定試料とし、キット付属のプロトコールに従ってミトコンドリア活性を測定した。ただし、MTT 標識試薬添加後のインキュベーション時間は 2 時間とした。また、吸光度測定には、マイクロプレートリーダー (Sunrise, テカン) を用いた。

5.1.9 フルコナゾール耐性試験

5.1.2 で作製した FcREF, FcSRPP および HbREF 発現酵母ならびに Mock を SD-Ura 液体培地で指数増殖期まで培養し、OD₆₀₀=0.1 になるように希釈した。さらに、この細胞懸濁液を 10 倍ずつ段階的に 10⁴ 倍まで希釈した。各濃度の細胞懸濁液をそれぞれ 5 μL ずつ取り、50 μg/mL フルコナゾール含有 YPD 寒天プレートおよび通常の YPD 寒天プレートにスポットし、30°C で 6 日間培養した。

5.2 結果と考察

5.2.1 組換え酵母の培養と FcREF, FcSRPP および HbREF の発現確認

作製した組換え酵母の増殖曲線を Fig. 5-1 に示す。HbREF および FcREF 発現細胞は、Mock や FcSRPP 発現細胞よりも増殖が遅い傾向が見られた。また、HbREF および FcSRPP 発現細胞の到達細胞密度は高い傾向にあった。しかしながら、これらの組換えタンパク質の発現によって細胞の増殖が極端に抑制される等の大きな影響は見られなかった。Fig. 5-2 に SDS-PAGE, CBB 染色および anti-FLAG 抗体によるウェスタンブロットの結果を示す。CBB 染色では組換えタンパク質の明確なバンドは認められなかったが、ウェスタンブロットでそれぞれの分子量 (HbREF, 16 kDa; FcREF, 29 kDa; FcSRPP, 28 kDa) 付近にバンドが検出されていることから、これらの組換えタンパク質が発現していることが分かった。また、細胞増殖は培養 24 時間目まで続くが、ウェスタンブロットにおけるどのタンパク質のバンドの濃さも培養 12 時間目あたりをピークとして次第に薄くなる様子が認められることから、増殖後期にはこれらの組換えタンパク質の分解も生じていることが分かった。

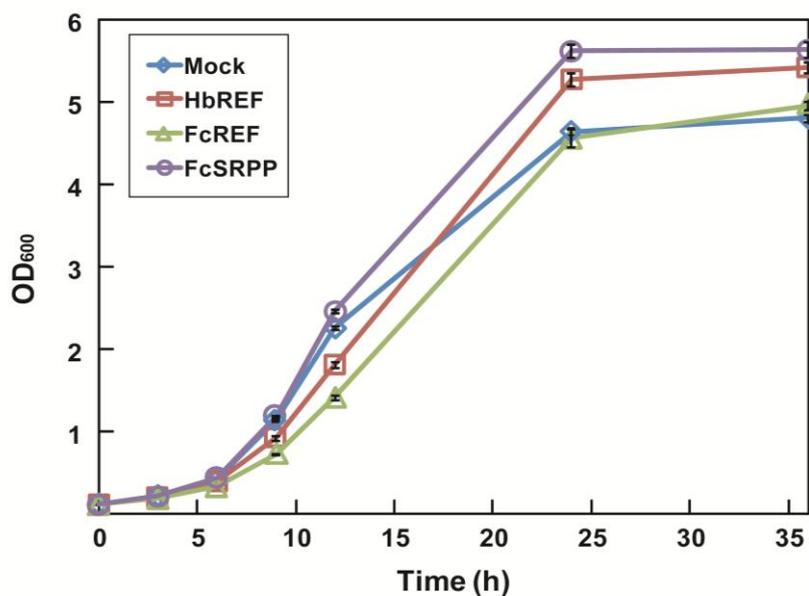


Fig. 5-1. Growth curve of REF/SRPP expressing yeast cells.

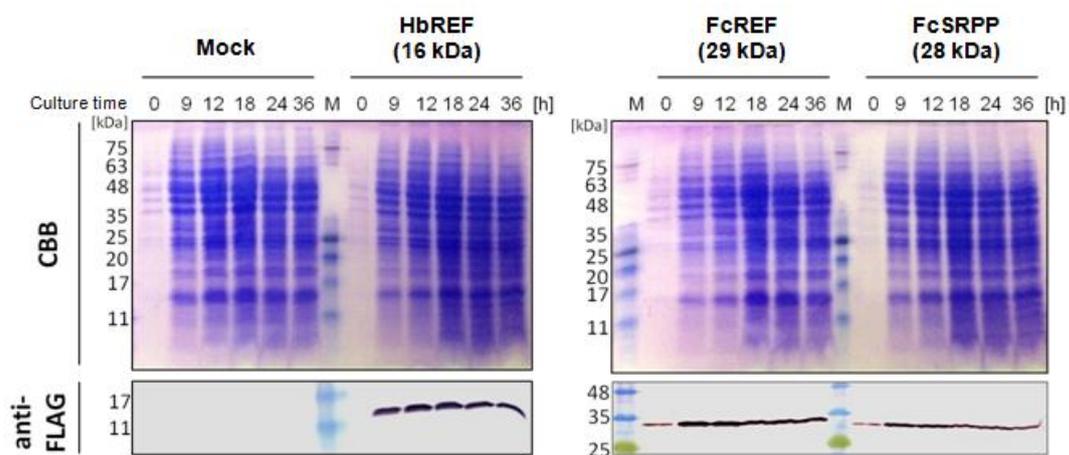


Fig.5-2. SDS-PAGE (upper panel) and anti-FLAG western blot analysis (lower panel) of HbREF (16 kDa), FcREF (29 kDa), and FcSRPP (28 kDa) expression. Lane M, GeneDireX BLUEye Prestained Protein Ladder.

5.2.2 FcREF, FcSRPP および HbREF の細胞内局在解析

FcREF, FcSRPP および HbREF の細胞内発現部位を明らかにするために、最も発現量が多いと考えられる培養 12 時間の細胞を用いて FcREF, FcSRPP および HbREF を蛍光免疫染色し、顕微鏡観察を行った。その結果を Fig. 5-3 に示すが、2 つの異なる発現パターンが観察される。パターン 1 では、BODIPY 493/503 で染色された一つの大きな LD の周りを取り囲むような明確なシグナルが観察される (Fig. 5-3 (A))。一方パターン 2 では、LD と細胞膜の近傍にドット状のシグナルが集まっている様子が観察される (Fig. 5-3 (B))。このパターン 2 のシグナルは既に報告されている酵母の典型的な ER に類似していた[7]。そこで、ER マーカーとしてよく用いられている Sec63[8] [9] [10]に EGFP を融合し、これを FcREF, FcSRPP および HbREF と共発現させた。共発現株の増殖曲線を Fig.5-4 に示す。単独で発現させた場合 (Fig. 5-1) と比較すると細胞増殖はかなり遅くなっている。そこで、先の組換えタンパク質の単独発現株と同じ生理状態の細胞を比較するため、培養 30~36 時間の指数増殖期の共発現株について同様に染色し、顕微鏡観察を行った (Fig. 5-5)。その結果、REF および SRPP と Sec63-EGFP の両方が強く発現している細胞は少ないものの、両方のシグナルが共に確認できた細胞においては、それらのシグナルの位置がほぼ一致している様子が観察された。また、一部一致しない箇所も見られたが、これは Fig. 5-3 から分かるように、REF および SRPP が LD の近傍にも局在するためだと考えられる。したがって、FcREF, FcSRPP および HbREF は酵母において ER と LD に局在することが分かった。また、特にパターン 1 で見られた 1 つの巨大な脂肪滴は Mock では観察されなかったことから、これらの組換えタンパク質の発現は LD の形態にも影響することが示唆された。

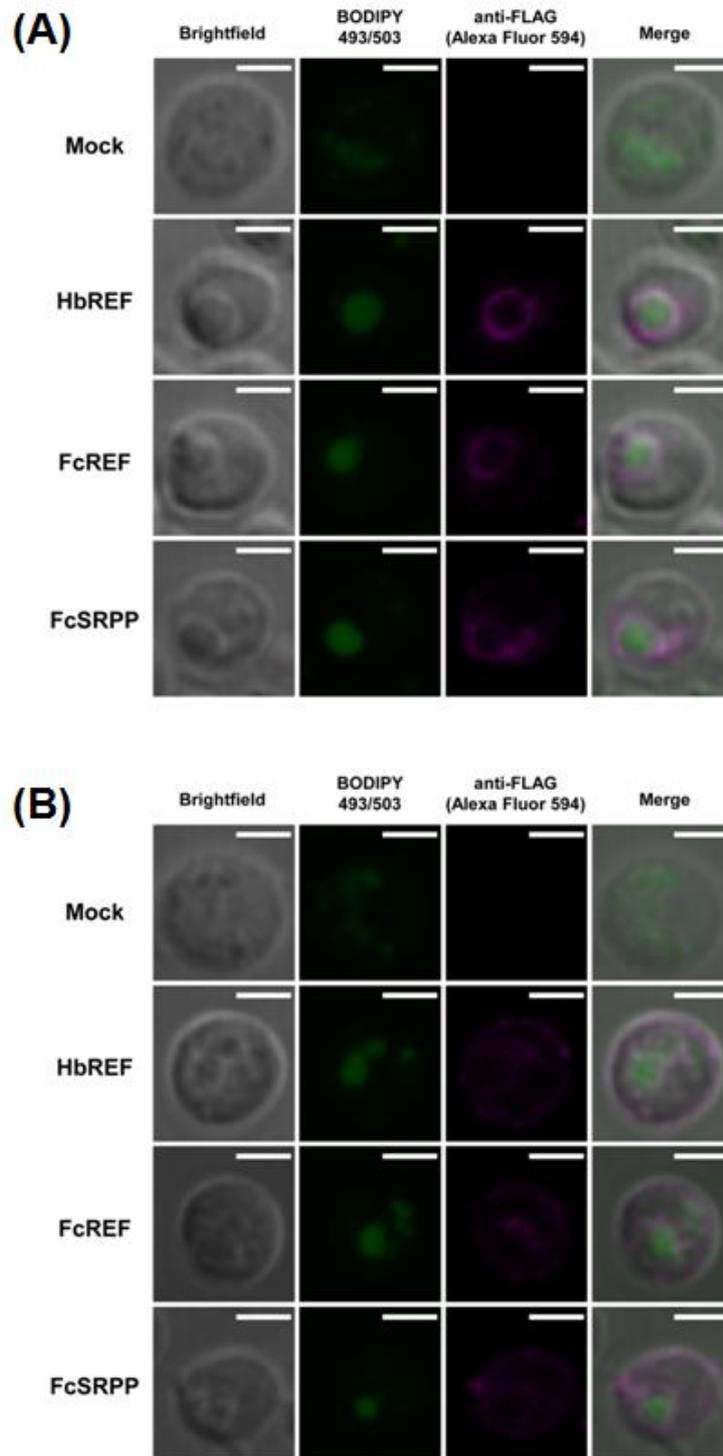


Fig. 5-3. Subcellular localization of HbREF, FcREF, and FcSRPP in yeast cells in an exponential growth phase. Two types of REF/SRPPs localization can be seen: (A) distribution surrounding a large LD and (B) distribution like typical ER. Scale bars: 2 μ m.

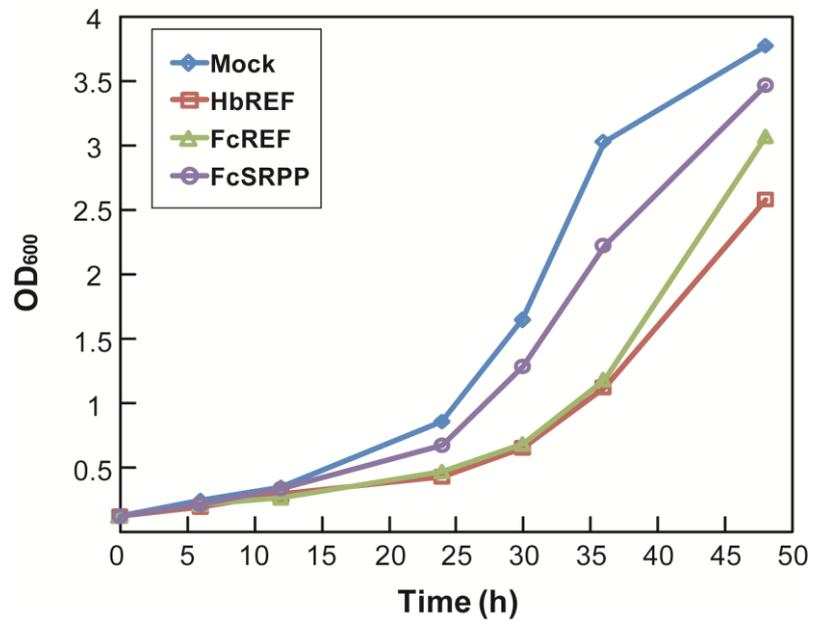


Fig. 5-4. Growth curve of REF/SRPP and Sec63-coexpressing yeast cells.

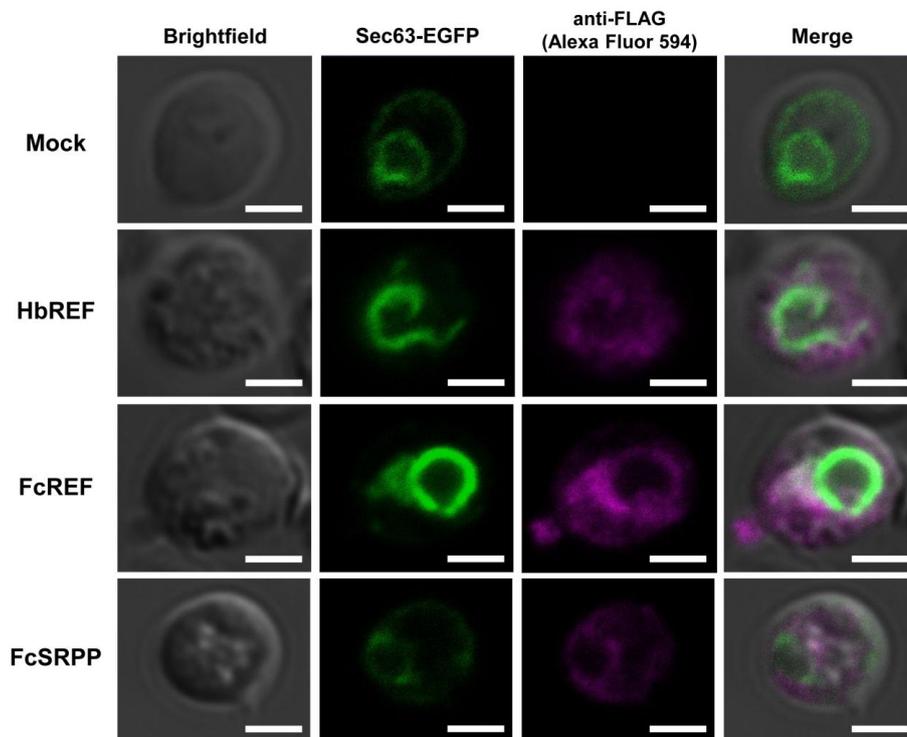


Fig. 5-5. Subcellular localization of HbREF, FcREF, FcSRPP and ER marker Sec63-EGFP in yeast cells in an exponential growth phase. Scale bars: 2 μ m.

5.2.3 フローサイトメトリー分析による脂質蓄積量の比較

細胞内に蓄積された脂質量を比較するため、12 時間および 24 時間培養した各 REF および SRPP 発現株を BODIPY 493/503 で染色し、フローサイトメトリー分析を行った。BODIPY 493/503 蛍光により脂質量を、前方散乱光により細胞の相対的なサイズを比較した。ここで、自家蛍光の強度は細胞の大きさに比例し各サンプルで異なることから、脂質量の比較には Δ MFI を用いた。 Δ MFI は染色した細胞の MFI と未染色細胞の MFI の差である。得られたヒストグラムと Δ MFI を比較したグラフを Fig. 5-6 に示す。また、前方散乱光 (Forward scattered light, FSC) の値を Table 5-9 に示す。FSC は散乱光の中でもレーザービームの光軸に対して前方で検出される光であり、細胞サイズにほぼ比例する。Fig. 5-6 より、培養 12 時間目ではいずれの REF/SRPP 発現株においても Mock と比べて脂質蓄積量が多いことが分かり、特に HbREF および FcREF 発現株で高い値を示した。一方で、培養 24 時間目の REF/SRPP 発現株の脂質蓄積量は 12 時間目に比べて減少していた。ここで、培養液中のグルコース濃度を測定した結果を Fig. 5-7 に示す。これより、培養 24 時間目の培地中のグルコース濃度は約 0.2~0.3% (初期濃度は 2%) であることが分かり、この脂質蓄積量の減少は飢餓応答による脂質分解による可能性が考えられる。また、FSC の比較から、いずれの培養時間においても REF および SRPP 発現株の細胞サイズは Mock に比べて小さいことが分かる (Table 5-9)。最近 Rao らは、出芽酵母の細胞サイズは TAG などの貯蔵脂質の量には関係なく、リン脂質の量に依存することを報告している[11]。したがって、本研究の上記の結果は、REF/SRPP 発現株において細胞内リン脂質量が減少し、TAG などの貯蔵脂質の蓄積は促進されていることを示唆する。

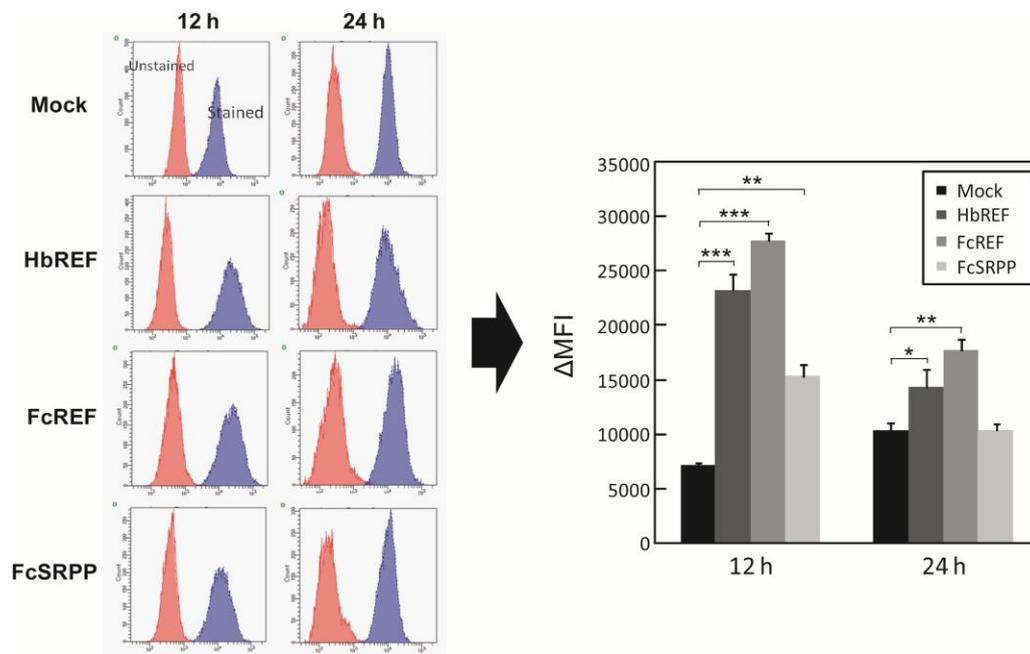


Fig. 5-6. Comparison of LD level among REF/SRPP-expressing yeast cells. Representative flow cytometry histograms of fluorescence signal intensity were shown for BODIPY 493/503-stained (blue) and unstained cells (red) (left panel). Bar graph represented the Δ MFI of the BODIPY fluorescence signal in the recombinant cells (right panel). Δ MFI were calculated using the equation Δ MFI = (MFI_{stained cells} – MFI_{unstained cells}). Data presented are results from three independent experiments, with error bars representing standard deviation. *P* values were calculated using a *t*-test (*, $p < 0.1$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Table 5-9. FSC values of REF/SRPP-expressing yeast cells.

	Mock	HbREF	FcREF	FcSRPP
12 h	128.3 ± 1.9	71.5 ± 0.7	92.7 ± 0.6	70.9 ± 0.3
24 h	152.0 ± 2.3	100.8 ± 1.9	94.7 ± 1.8	89.8 ± 1.0

Values are means of three independent runs with 10,000 events each, \pm standard deviations (SD).

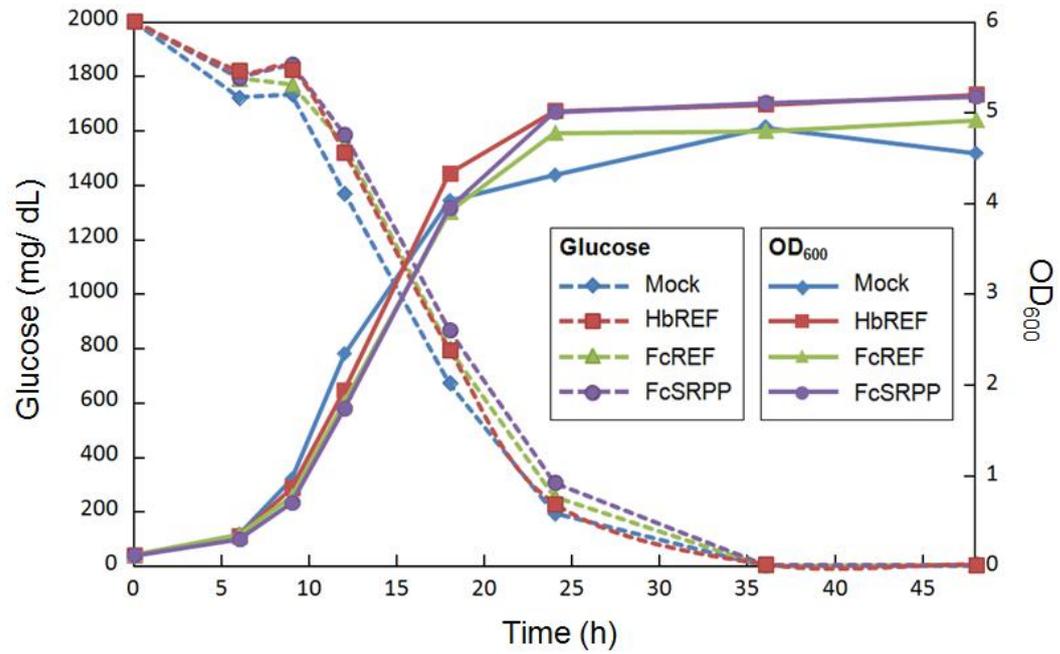


Fig. 5-7. Time course of glucose consumption (dotted lines) and growth (solid lines) of REF/SRPP expressing yeast cells.

5.2.4 貯蔵脂質の分析

前節の結果から、特に脂質蓄積が顕著だった 12 時間目の細胞を用いて、中性脂質の抽出と TLC 分析を行った (Fig. 5-8)。各発現株について等量の培養液から抽出した脂質を用いて TLC を行った画像を Fig. 5-8 (A) に示す。各スポットの濃さを画像解析ソフトで定量し培養液あたりで比較すると、いずれも Mock と大きな差は見られなかった。しかし 5.2.1 で述べたように、Mock と REF および SRPP 発現株では細胞密度に差があることから、OD₆₀₀ あたりに換算して比較すると、特に SE の蓄積が Mock に比べて REF および SRPP 発現株で促進されていることが分かる。また、HbREF 発現株でのみ TAG 量も増加している。一方で、5.2.3 の結果より、REF および SRPP 発現株の細胞サイズは Mock よりも小さいことから、OD₆₀₀ あたりの脂質量も細胞あたりの脂質量を正しく反映していない可能性がある。そこで MTT アッセイを行い、細胞代謝活性あたりで比較した。MTT 吸光度と OD₆₀₀ の相関曲線 (Fig. 5-9) から求めた MTT 吸光度で各相対脂質量を除し、中性脂質量を細胞代謝活性あたりに換算した結果を Fig. 5-8 (B) 右パネルに示すが、いずれの脂質においても OD₆₀₀ あたりの相対脂質量の分布と大きな違いは見られなかった。これらの結果から、REF および SRPP の発現は、細胞あたりの貯蔵脂質量、特に SE の蓄積量を増加させることが分かった。

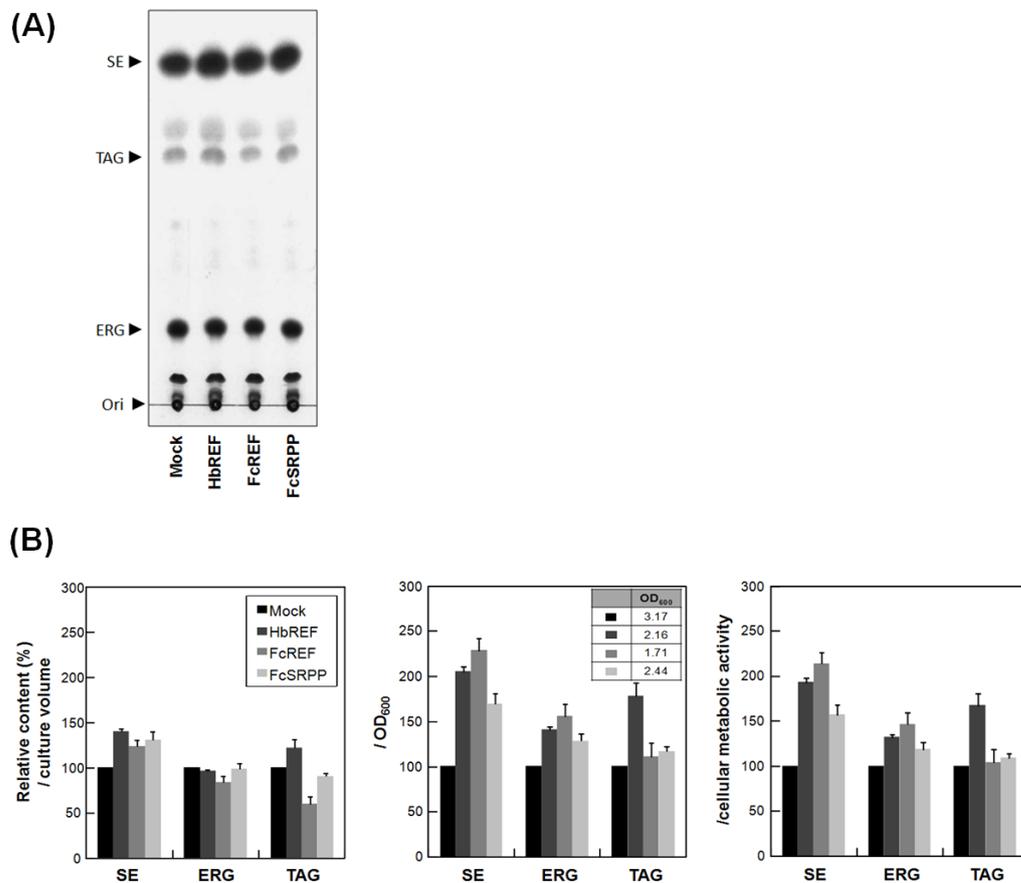


Fig. 5-8. Lipid analysis of REF/SRPP-expressing cells in an exponential growth phase. (A) Lipids were extracted from the recombinant cells during an exponential growth phase and an equal volume of lipid extracts was separated using TLC. Standard mixture was composed of cholesterol, triolein, cholesterol oleate. (B) The relative content of each category of neutral lipid was analyzed using densitometric scanning. The values of relative lipid content were normalized by culture volume (left panel), OD_{600} (middle panel), and cellular metabolic activity (right panel). The box in middle panel shows OD_{600} values of the 12 h cultures. ERG, ergosterol; TAG, triacylglycerols; SE, steryl esters. Data presented are results from three independent experiments with error bars representing standard deviation.

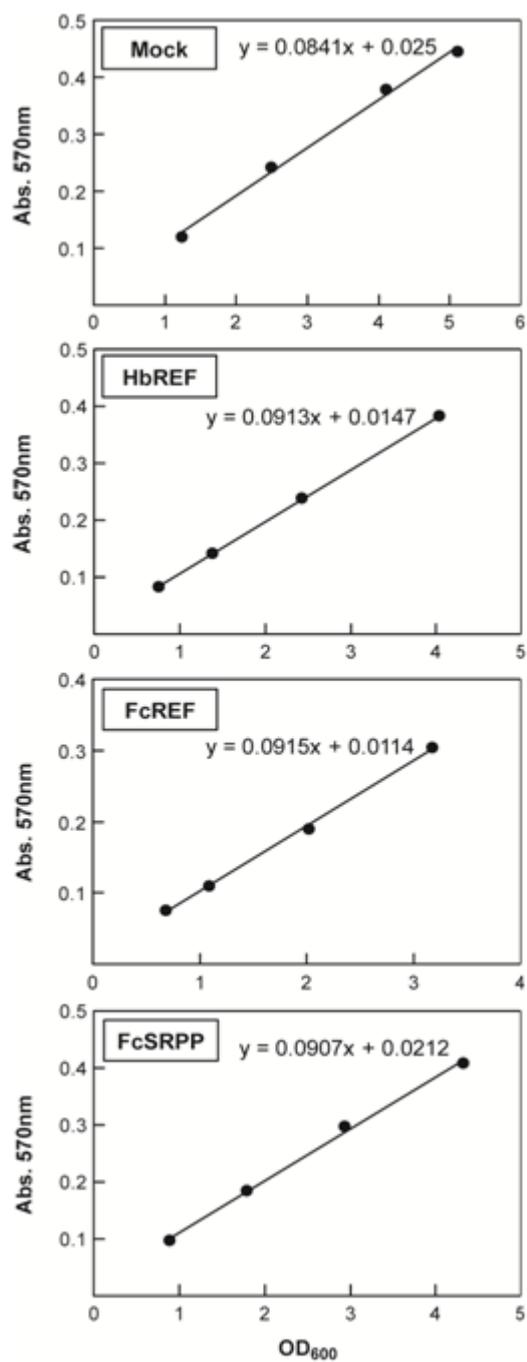


Fig. 5-9. Standard curve in relation to OD₆₀₀ and MTT absorbance. The value of MTT absorbance at 570 nm means relative cellular metabolic activity per 1 mL of culture.

5.2.5 フルコナゾール耐性

5.2.4 の結果から、REF および SRPP の発現は SE の蓄積を促進することが分かった。SE はステロールが小胞体膜上のアシル CoA : ステロールアシル化酵素によって変換されたものであり、LD 内に貯蔵される。一方、フルコナゾールは酵母の主要なステロールでもある ERG の合成経路の 24-メチレンジヒドロラノステロールの脱メチル化反応を阻害する抗真菌剤である。そこで、REF および SRPP 発現株についてフルコナゾール耐性試験を行った。その結果、Mock はフルコナゾール含有培地でほとんど増殖できないのに対し、REF および SRPP 発現酵母はいずれもある程度増殖が認められ、フルコナゾール耐性を有していることが分かった (Fig. 5-10)。したがって、この結果からも REF および SRPP 発現株において ERG および SE の合成が促進されていることが分かった。

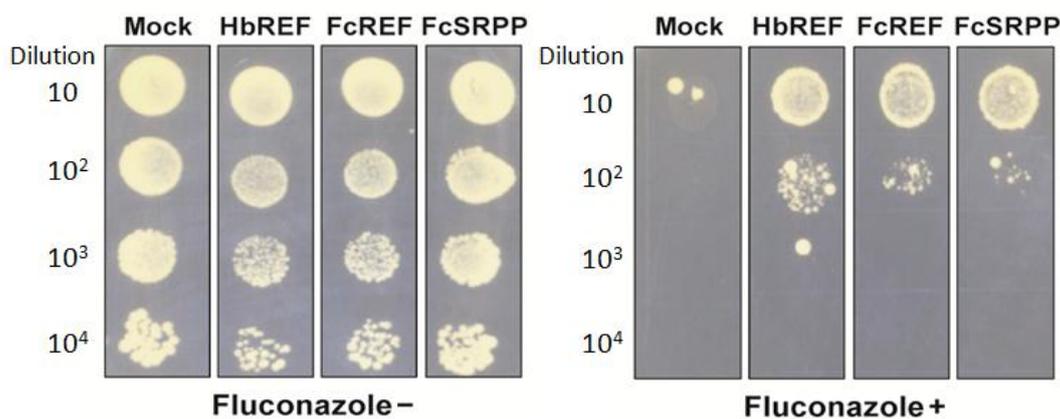


Fig. 5-10. Resistance of REF/SRPP-expressing cells to fluconazole, an antifungal agent. Tenfold serial dilutions of yeast cells were spotted on YPD plates with or without fluconazole (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

5.3 まとめ

N. benthamiana (ベンサミアータバコ) の葉において、これまでに幾つかの REF および SRPP が ER および LD に局在することが報告されているが[12] [13] [14], 本章の結果から、酵母においても同様に、FcREF, FcSRPP および HbREF は ER と LD に局在することが明らかになった。また、FcREF, FcSRPP および HbREF 発現株では Mock と比較して非常に大きな LD が観察されたことから、これらのタンパク質は LD の形態にも影響することが示唆された。第 3 章で述べたように、HbREF と HbSRPP は凝集性を示すことが報告されており、FcREF と FcSRPP もまた同様に凝集性を示すことが分かった。したがって、Laibach らによって提案されているように、これらの REF および SRPP の自己凝集性が LD の大きさの調節に関与しているのかもしれない[13]。

第 3 章の結果より、*in vitro* では HbREF > FcREF > FcSRPP の順に強い凝集能を示した。そこで、REF および SRPP の種類による LD 形態への影響を調べるために、画像解析によって再構築した 3 次元 LD 像を用いて LD 体積の比較を試みたが、共焦点レーザー顕微鏡の倍率では隣接する複数の LD が単一の LD として認識されてしまうため、正確に測定することができなかった。凝集能の異なる REF および SRPP の種類による LD 形態への影響の違いを明らかにするためには、新たな解析手法を用いた検討が必要である。

また、FcREF, FcSRPP および HbREF の発現は、酵母の脂質代謝にも影響することが分かった。これらのタンパク質の発現によって誘導される脂質代謝の変化を Fig. 5-11 に示した。FcREF, FcSRPP および HbREF の発現によってリン脂質の合成が制限され、代わりに ERG, SE (HbREF の発現ではさらに TAG も) の合成が促進されたと考えられる。また、LD サイズが大きくなったことから、Pyc らによって以前に提案されているように、LD 比表面積の減少により、細胞質に存在するリパーゼの LD 内脂質へのアクセスが抑制され、結果として中性脂質の蓄積が促進された可能性も考えられる[15]。このように、REF および SRPP 発現酵母では中性脂質の蓄積が促進されることから、酵母を使った TAG やテルペン類などの重要な脂質の合成生物学的な生産においても、ターゲット脂質の合成酵素と REF/SRPP の共発現によってその生産性を高めることができるのかもしれない。一方で、5.2.3 の結果

において、培養 24 時間目（定常期）では細胞当たりの脂質蓄積量が減少しているが、これはグルコース不足によるアセチル CoA の再生と再利用のための飢餓応答 LD オートファジーによって引き起こされた可能性が高い。そのため、5.2.1 で述べたように、LD に局在する REF および SRPP は培養 12 時間をピークに脂質と共に次第に分解されたと考えられる。したがって、ターゲット脂質、ひいては天然ゴムの生産を目指す際に危惧される、これらのタンパク質分解による培養後期の生産性の低下に関しては、グルコース等の流加培養によって回避できるのではないかと推測される。

本章の冒頭で述べたように、微生物によるゴム合成を視野に REF および SRPP を出芽酵母に発現させた。ゴム生合成酵素複合体の一部である CPT と CPTL は酵母において ER と LD に局在することが既に報告されているが、本章の結果から REF および SRPP も ER と LD に局在することが明らかになった。したがって、CPT と CPTL に加えて REF または SRPP、もしくはその両方を酵母で共発現させることにより、酵母の LD を反応場とする天然ゴム合成の可能性が示された。さらに、REF および SRPP 発現株では ERG 合成経路が促進されたが、Fig. 5-11 に示すようにイソプレノイドポリマーである天然ゴムの生合成出発基質ファルネシルニリン酸は ERG 合成と同一の経路で生合成されることから、ゴム合成酵素複合体の発現と代謝改変による ERG 合成の制限によって、酵母でのゴム合成がさらに促進されるのではないかと考えられる。

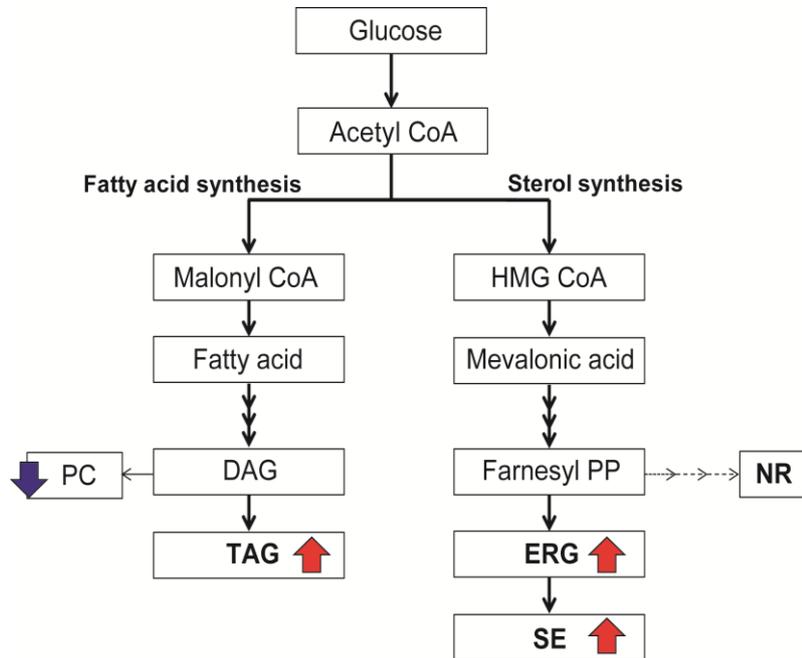


Fig. 5-11. Lipid metabolism induced by the expression of REF/SRPP-family proteins. Expression of REF/SRPP-family proteins expedited not only TAG synthesis but also ERG synthesis and SE accumulation. Conversely, phospholipid synthesis was limited, and consequently the REF/SRPP-expressing cells were smaller than the mock cells.

参考文献

1. Yamashita S, Yamaguchi H, Waki T, Aoki Y, Mizuno M, Yanbe F, Ishii T, Funaki A, Tozawa Y, Miyagi-Inoue Y, et al: **Identification and reconstitution of the rubber biosynthetic machinery on rubber particles from *Hevea brasiliensis*.** *Elife* 2016, **5**.
2. Qu Y, Chakrabarty R, Tran HT, Kwon EJ, Kwon M, Nguyen TD, Ro DK: **A lettuce (*Lactuca sativa*) homolog of human Nogo-B receptor interacts with cis-prenyltransferase and is necessary for natural rubber biosynthesis.** *J Biol Chem* 2015, **290**:1898-1914.
3. von der Haar T: **Optimized protein extraction for quantitative proteomics of yeasts.** *PLoS One* 2007, **2**:e1078.
4. Robinson NG, Guo L, Imai J, Toh EA, Matsui Y, Tamanoi F: **Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:3580-3587.
5. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.** *J Biol Chem* 1957, **226**:497-509.
6. Connerth M, Czabany T, Wagner A, Zellnig G, Leitner E, Steyrer E, Daum G: **Oleate inhibits steryl ester synthesis and causes liposensitivity in yeast.** *J Biol Chem* 2010, **285**:26832-26841.
7. Fehrenbacher KL, Davis D, Wu M, Boldogh I, Pon LA: **Endoplasmic reticulum dynamics, inheritance, and cytoskeletal interactions in budding yeast.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**:854-865.
8. Prinz WA, Grzyb L, Veenhuis M, Kahana JA, Silver PA, Rapoport TA: **Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Cell Biol* 2000, **150**:461-474.
9. Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM, Rapoport TA: **A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum.** *Cell* 2006, **124**:573-586.
10. Schuck S, Prinz WA, Thorn KS, Voss C, Walter P: **Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response.** *J Cell Biol* 2009, **187**:525-536.
11. Rao MJ, Srinivasan M, Rajasekharan R: **Cell size is regulated by phospholipids and not by storage lipids in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Curr Genet* 2018, **64**:1071-1087.
12. Brown D, Feeney M, Ahmadi M, Lonoce C, Sajari R, Di Cola A, Frigerio L:

- Subcellular localization and interactions among rubber particle proteins from *Hevea brasiliensis*.** *J Exp Bot* 2017, **68**:5045-5055.
13. Laibach N, Schmidl S, Muller B, Bergmann M, Prufer D, Schulze Gronover C: **Small rubber particle proteins from *Taraxacum brevicorniculatum* promote stress tolerance and influence the size and distribution of lipid droplets and artificial poly(cis-1,4-isoprene) bodies.** *Plant J* 2018, **93**:1045-1061.
 14. Kim EY, Park KY, Seo YS, Kim WT: **Arabidopsis Small Rubber Particle Protein Homolog SRPs Play Dual Roles as Positive Factors for Tissue Growth and Development and in Drought Stress Responses.** *Plant Physiol* 2016, **170**:2494-2510.
 15. Pyc M, Cai Y, Gidda SK, Yurchenko O, Park S, Kretzschmar FK, Ischebeck T, Valerius O, Braus GH, Chapman KD, et al: **Arabidopsis lipid droplet-associated protein (LDAP) - interacting protein (LDIP) influences lipid droplet size and neutral lipid homeostasis in both leaves and seeds.** *Plant J* 2017, **92**:1182-1201.

第 6 章

総 括

本研究では2種類のイチジク由来 REF/SRPP 遺伝子をクローニングし、それらのタンパク質の凝集特性を分析した。また、イチジクゴムにおける発現解析およびゴムの相分離構造解析、組換え出芽酵母における局在解析を行い、これらのタンパク質の役割を考察した。以下に各章にて得られた結果をまとめ考察する。

第2章では、イチジクラテックスの RNA-seq より推定された REF/SRPP をコードする2種類の遺伝子 (*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2*) をクローニングした。得られた塩基配列から推測されるアミノ酸配列はどちらも REF ドメインを有していること、また、*Hevea* をはじめとする他の植物における REF または SRPP のアミノ酸配列とも高い相同性を示すことが分かった。したがって、クローニングした遺伝子がコードするタンパク質 (*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2*) は REF/SRPP ファミリータンパク質であると言える。さらに、*FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* のどちらのアミノ酸配列にも SRPP 特異的領域が含まれていたことから、一次構造から判断すればどちらも SRPP に分類されることになる。一方で、系統樹解析の結果では、これらはそれぞれ異なるグループに分類され、互いに異なる機能を持つ可能性が示唆された。以上の結果から、クローニングした *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* を一次構造だけで REF と SRPP に分類するのは困難であると考えられた。

第3章では、組換え大腸菌を用いた *FcREF/SRPP-1* および *FcREF/SRPP-2* 発現系を構築し、各組換えタンパク質を調製した。特に、*FcREF/SRPP-2* には大腸菌においてほとんど使用されないレアコドンが含まれていたため、この組換えタンパク質の生産には、ジスルフィド結合形成を助ける *Origami2* 株にコドン補充プラスミド *pRARE2* と非誘導時の発現漏れを抑制する T7 リゾチームプラスミド *pLysS* を導入した *Rosetta-gami2(DE3)pLysS* を宿主として使用することが有効であることを明らかにした。凝集特性解析として、アミロイド染色試薬であるコンゴレッドとの沈殿形成や非変性状態でのアガロースゲル電気泳動、TEM による凝集体観察を行い、*FcREF/SRPP-1* は HbREF、*FcREF/SRPP-2* は HbSRPP と類似する凝集特性を示すことが分かった。したがって、凝集特性から判断すれば *FcREF/SRPP-1* はイチジクの REF (*FcREF*)、*FcREF/SRPP-2* はイチジクの SRPP (*FcSRPP*) に分類される。*FcREF/SRPP-1* と *FcREF/SRPP-2* はどちら

らも SRPP 特異的領域を有するにも関わらず、異なる凝集特性を示したことは非常に興味深い。これまで複数のゴム生産植物の REF および SRPP について天然ゴム生合成におけるそれぞれの役割が様々な観点から調べられてきたが、その結果は混沌として統一的な結論は導き出されていない。しかし、SRPP 特異的領域の存在によってこれまで SRPP に分類されてきた他の植物由来の REF/SRPP ファミリータンパク質の中にも REF に分類されるべきものが含まれている可能性があり、これが結果の解釈を複雑にし、REF と SRPP のそれぞれの機能の解明を阻んできた大きな原因の一つとも考えられる。したがって、REF/SRPP ファミリータンパク質を凝集特性で再分類することは、ゴム生合成における REF と SRPP の機能の解明、さらには天然ゴム生合成機構の解明に有益ではないかと考えられる。特に後述するように、REF の高い凝集性はゴム物性に影響するゴムの相分離構造に直接関わっている可能性が高い。以上より、本章ではタンパク質凝集特性が REF と SRPP の新しい分類基準となることを提案した。

第4章では、*F. carica* ゴムにおけるタンパク質レベルでの FcREF および FcSRPP の存在を調べるため、組換えタンパク質 FcREF を抗原として抗体を作製し、ゴムから抽出したタンパク質について分析した。その結果、*F. carica* ゴムには FcREF および FcSRPP はほとんど含まれておらず、プロテアーゼであるフィシンが主要タンパク質であることが分かった。さらに、*F. carica* ゴムと *Hevea* ゴムの相分離構造を比較したところ、両者には明らかな違いがあることが分かった。この構造の違いは、ゴムの分岐構造に起因すると考えられ、これには *F. carica* ゴムと *Hevea* ゴムに含まれる主要タンパク質の違いが関係しているのではないかと考えられる。すなわち、*Hevea* ゴムの主要タンパク質である HbREF はゴム鎖の分岐点形成およびゴム粒子の凝集に直接関与し、*Hevea* ゴムのナノマトリックス構造の形成に寄与していると考えられる。一方、*F. carica* ゴム中のフィシンはこのような機能を持たず、むしろ RNA レベルでは存在していた FcREF を加水分解してしまうために、*F. carica* ゴムは *Hevea* ゴムに比べて脆いマトリックスを形成していると推測される。また、*F. carica* ゴムはリン脂質を介した分岐点もほとんど有していないことが分かった。これらの結果から、本章では *Hevea* ゴムおよび *F. carica* ゴムの固体ゴムの構造モデルを提案した。今後、天然ゴムの分岐構造形成並びに物性との相関を明らかにする上で *F. carica* ゴムは優れた研究モデルになると期待できる。

第5章では、ゴム粒子の構造が真核生物に広く見られるオルガネラであるLDと類似することに着目し、FcREF, FcSRPP および HbREF を発現する組換え出芽酵母を作製して各タンパク質の局在解析を行った。その結果、これらのタンパク質はLD および ER に局在することを明らかにした。また、これらのタンパク質発現株では FcREF, FcSRPP および HbREF によって囲まれた巨大な単一のLDが観察された。REF と SRPP の凝集性の違いとLD形態との関連性を明らかにするためには今後の詳細な解析が必要であろう。さらに、FcREF, FcSRPP および HbREF の発現は、酵母の脂質代謝にも影響し、リン脂質の合成を制限してコレステロール合成経路（特にSEの蓄積）を促進することを明らかにした。これにはLDの生成促進やLDの形態変化による脂質の分解抑制が関与している可能性がある。以上のことから、REF および SRPP の発現は、酵母を用いたTAG やテルペン類などの脂質生産において生産性を高める手法としても有用であることが示唆される。また、ゴム生合成酵素複合体の一部であるCPTとCPTLは既に酵母においてERとLDに局在することが報告されている。CPT, CPTLと共にゴム合成酵素複合体の構成因子であるREF および SRPP を酵母で共発現させれば、これらが局在するLDはゴム合成の反応場となる可能性があり、微生物培養による天然ゴム合成が期待できる。さらに、ステロイドとイソプレノイドの生合成経路の分岐点に位置するERGの生合成経路の制限もゴム合成に効果的と考えられる。以上、本章では、酵母のFcREF, FcSRPP および HbREF 発現における発現部位ならびに脂質代謝に及ぼす影響を解析し、酵母を用いたゴム合成について代謝改変も含めたアイデアを提案した。

以上をまとめると、REF および SRPP はゴム生合成とゴム構造形成において重要な役割を担っていると考えられる。ゴム生合成においては、既に報告されているようにゴム合成酵素複合体の一部としてはたらく他、酵母においてLDの形態や生成にも影響したことからゴム粒子の形態や発生にも関与している可能性もある。ゴムの構造形成における役割では、REFがゴム鎖の分岐点およびゴム粒子の凝集に関与し、ナノマトリックス構造の形成に寄与している可能性が高い。本研究の知見が、今後のREF および SRPP の機能解明および天然ゴムの分岐構造解明のためのさらなる研究の進展に資することを期待する。

学位論文を構成する公表論文

- (1) Yokota, S., Gotoh, T.: Effects of rubber elongation factor and small rubber particle protein from rubber-producing plants on lipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128, pp. 585-592 (2019).
DOI:10.1016/j.jbiosc.2019.04.018 (掲載予定)

- (2) Yokota, S., Gotoh, T.: Aggregation properties as potential markers for classifying rubber particle proteins, *Atlas of Science*, Electronic file, 2 pages (2019).

- (3) Yokota, S., Suzuki, Y., Saitoh, K., Kitajima, S., Ohya, N., Gotoh, T.: Cloning and aggregation characterization of rubber elongation factor and small rubber particle protein from *Ficus carica*, *Molecular Biotechnology*, 60, pp. 83-91 (2018).
DOI:10.1007/s12033-017-0051-6

謝 辞

本研究を遂行し、まとめるにあたり、適切な御指導、御鞭撻を賜りました秋田大学大学院理工学研究科 後藤猛教授に深く感謝申し上げます。また、本論をご審査くださり、貴重なご教示を賜りました、秋田大学大学院理工学研究科 進藤隆世志教授、村上賢治教授、尾高雅文教授に心より御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にご協力くださった京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 北島佐紀人准教授、山形大学理学部 大谷典正准教授、理化学研究所環境資源科学研究センターユニットリーダー 堂前直先生、鈴木健裕専任技師、秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター 千田進介総括技術長、秋田大学大学院理工学研究科 佐藤幸保副総括技術長に厚く御礼申し上げます。

また、本研究に関連するテーマを卒業課題研究として行っていただいた学生諸君に深く感謝致します。

最後に、研究生生活を支えてくれた家族に感謝致します。

横田 早希