

氏名（本籍）	横田早希（岩手県）
専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	工博甲第256号
学位授与の日付	令和元年9月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工学資源学研究科 資源学専攻
学位論文題目 （英文）	イチジクラテックス由来 Rubber elongation factor および Small rubber particle protein のクローニングと機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 後藤 猛 (副査) 教授 進藤 隆世志 (副査) 教授 村上 賢治 (副査) 教授 尾高 雅文

## 論文内容の要旨

天然ゴムはパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) の乳管細胞における乳液状の細胞質であるラテックスから生産され、合成ゴムでは達成できない優れた物性を持つ。しかしパラゴムノキの栽培は熱帯の一部地域に限定されることから、その安定調達は大きな課題である。そのためグアユレー (*Parthenium argentatum*) やタンポポ (*Taraxacum brevicorniculatum*) などの未利用ゴム資源の研究が進められている。本研究では日本で生育でき、パラゴムノキと同じくラテックス状でゴムを生産するイチジクに着目した。

ラテックス中に存在するゴム粒子には複数のタンパク質が存在し、ゴムの生合成や三次元網目構造の形成に関与していると考えられている。パラゴムノキのゴム粒子に豊富なタンパク質としてRubber elongation factor (REF) とSmall rubber particle protein (SRPP) が知られている。特にREFの発現量はゴム収量と強く相関することからゴム生合成に重要な働きを持つと考えられているが、ラテックス中でのこれらのタンパク質の正確な役割は明らかになっていない。REFとSRPPは高い相同性を示すが、REFはSRPPに比べてアミノ酸配列が短いという特徴を持ち、他のゴム生産植物ではこのようなアミノ酸配列の短いREFは確認されていない。一方、SRPPは他の様々な種で同定されている。これまで、ゴム生合成におけるSRPPの機能を明らかにするためにRNAiを介したサイレンシングがいくつかのゴム生産植物で行

われてきた。しかし、その発現抑制は、植物またはSRPPホモログに依存して、天然ゴム合成に異なる影響を与えた。これらのことからこれまで同定されたパラゴムノキ以外のゴム生産植物におけるSRPPのうち、いくつかはREFとして機能する可能性が考えられ、これらの正確な機能を明らかにするためには、配列長以外の適切な分類基準が必要であると考えられる。一方で、近年、パラゴムノキ由来REFとSRPPは異なる凝集特性を示すことが報告された。そこで本研究では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。以下に各章の概要を記す。

第1章では本研究の背景と目的および構成について述べた。

第2章ではイチジクラテックスの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, -2*) をクローニングした。さらにパラゴムノキ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, -2タンパク質の分類と機能について考察した。

第3章では組換え大腸菌を用いたFcREF/SRPP-1, -2発現系を構築し、各組換えタンパク質を調製した。また、FcREF/SRPP-2の生産には、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 と非誘導時の発現もれを抑制するための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。さらに、パラゴムノキ由来REF (HbREF)とFcREF/SRPP-1, -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案した。

第4章ではイチジクゴムにタンパク質レベルでFcREF/SRPP-1, -2が存在するかを明らかにするため、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、ゴムの相分離構造はゴム物性に影響することが報告されていることから、イチジクゴムの相分離構造を明らかにした。さらにパラゴムノキゴムと比較することで、ゴムに含まれるタンパク質と相分離構造における関係を考察した。

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と類似することに着目しFcREF/SRPP-1, -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。

## 論文審査結果の要旨

天然ゴムはパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) のラテックスから生産され、自動車・航空機・建築産業等において必要不可欠な物質であるが、パラゴムノキの栽培は熱帯の一部地域

に限定されるために将来的な安定調達に大きな課題を抱えている。したがって、パラゴムノキ以外の未利用ゴム資源の利用に向けた研究、さらには天然ゴムの生合成機構ならびにゴム物性発現の仕組みの解明が必要である。本論文は、パラゴムノキの代替資源として同じくラテックス状でゴムを生産するイチジクに着目した。天然ゴムの合成と蓄積の場であるゴム粒子上に存在し天然ゴムの三次元網目構造の形成に関与していると考えられている、Rubber elongation factor (REF) と Small rubber particle protein (SRPP) の遺伝子をイチジクラテックスからクローニングし、それらのタンパク質の凝集特性を調べた。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。本論文は以下の全6章から構成される。

第1章の緒言では、本論文の背景と目的および構成について述べた。

第2章では、イチジクラテックスのRNA-seqデータより推定されたREF/SRPPをコードする2種類の遺伝子 (FcREF/SRPP-1, -2) のクローニングについて述べた。なお、これらの遺伝子は新規遺伝子としてDDBJに登録されたことを記している (登録番号LC279015, LC279016)。さらにパラゴムノキ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から、FcREF/SRPP-1とFcREF/SRPP-2の分類と機能について考察した。

第3章では、組換え大腸菌を用いたFcREF/SRPP-1とFcREF/SRPP-2の発現系の構築と各組換えタンパク質の生産と精製について述べた。さらに、パラゴムノキ由来REFとFcREF/SRPP-1およびFcREF/SRPP-2の凝集特性を解析することにより、この凝集特性はREF/SRPPタンパク質の新しい分類基準になりえると提言した。これにより、FcREF/SRPP-1とFcREF/SRPP-2はそれぞれパラゴムノキ由来のREFとSRPPに相当するタンパク質であると推定した。

第4章では、RNAレベルではイチジクゴムに見いだされたFcREF/SRPP-1とFcREF/SRPP-2のタンパク質レベルでの存在状態と相分離構造との関係について述べた。作製したウサギ抗FcREF/SRPP-1抗体を用いたウェスタンブロット分析、総タンパク質量分析並びにLC-MS/MS解析を行い、イチジクゴムにおけるFcREF/SRPP-1とFcREF/SRPP-2の存在量は極めて少ないこと、これに対してタンパク質分解酵素であるフィシンが大量に含まれることを明らかにした。さらに、ゴム物性に影響する相分離構造をTEMにより調べ、パラゴムノキゴムとの比較によって相分離構造形成におけるREFの役割を考察した。

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と類似することに着目し、微生物工場によるゴム生産の可能性を視野に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を明らかにした。

第6章では第2章から第5章までを総括し展望を述べた。

申請論文の研究成果は、査読付き英語論文3件 (うち審査中論文1件)、招待英語論文1件、国際学会発表1件、国内学会発表9件として、申請者が筆頭著者にて発表している。国

内学会発表には招待講演 1 件，依頼講演 1 件，受賞 1 件（ベストプレゼンテーション賞）が含まれ，申請論文の研究成果が学会において高い評価を得ていることを客観的に裏付けるものである。よって，本論文は博士(工学)の学位に十分値すると判断する。