

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26340074

研究課題名(和文) 未利用ゴム資源の活用をめざした植物培養細胞中での高機能ゴム分子生産

研究課題名(英文) Highly functional rubber molecule production by whole vegetable culture cell aiming at utilization of non-use rubber resources

研究代表者

大谷 典正 (Ohya, Norimasa)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号：40302286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゴムノキが生産する天然ゴムは、その優れた物性と高い生産性のため唯一の商業的資源となっている。しかし、ゴムノキは東南アジアのような限られた地域のみ生育でき、商業的適合ゴムを産出するにはおよそ7年もかかる。そこで、雑草の培養細胞中において効率的に小高機能ゴムを生産させることを目的として培養条件を検討した。また、反応場と想定される人工ゴム粒子を合成し、複雑なゴム高分子産生機構の解明を試みた。さらに複雑な三次元高分子構造を形成するアクティブ末端基の存在も見出した。

研究成果の概要(英文)：Hevea brasiliensis is the only commercial natural rubber source at present, due to its high productivity of rubber having excellent physical properties. However, H. brasiliensis can be grown only in the limited areas such as Southeast Asia and it takes for about seven years before extractable of commercial rubber. Therefore, in the cultured cell using the weed, it was intended to find a condition to let you produce high function rubber efficiently. Synthesis of the artificial rubber particle which would become reaction field was tried to elucidate a mechanism of complicated rubber macromolecule production. In addition, I found the existence of the active end group necessary to form a macromolecule having three-dimensional complicated structure.

研究分野：高分子化学

キーワード：植物培養 バイオマス カルス 天然ゴム

1. 研究開始当初の背景

パラゴムノキ由来の天然ゴムは植物が生産する最も有用な高分子材料であるが、単一種であるための病気危険性、需要増大に対する供給不足は深刻である。さらに、昨今の異常気象から採取量も安定せず、受給バランスは極めて不安定な状況にある。

我々は、種々の植物が天然ゴムを生合成することに着目し、天然産出ゴムの詳細なキャラクター化により、チチタケやセイタカアワダチソウ由来ゴムは、アレルゲンを含まないことを見出した。パラゴムノキは成木となるまでに10年かかるが、セイタカアワダチソウ等の雑草は半年足らずで成長するため非常に高効率なゴム産生植物と考えられ、実用化レベルの高分子量体ゴムの合成が可能となれば、アレルギーフリーの天然ゴム創出がかなうほか、天然資源に乏しい我が国にとっては貴重な新規国内資源の獲得にもつながる。

2. 研究の目的

本研究では、雑草が生産する未利用ゴム資源の工業利用に向けた高機能化、及び効率的生産系の構築を最終目標とする。雑草ゴムは、分子量が低いことと産出量が少ない理由から実用に適さない。そこで、培養条件やエリシター添加によってゴム合成酵素系を活性化させ生産性向上、分子量調整に関するモノマー生産酵素の活性化により実用レベルの高分子量体の生合成、モノマー重合酵素の鎖伸調節機構解明のためモデル酵素のシミュレーション解析等から長鎖長ゴム生産の条件を見出す。

3. 研究の方法

(1) 雑草の培養細胞でのゴム合成条件の確立及び遺伝子導入：培養条件(窒素, リン酸, カリウムなどの無機栄養素)や各種ストレス, 植物成長ホルモンのカルス化条件を直交実験により検討する。その後, MS液体培地に移し振とう培養により, 光条件(恒明条件および恒暗条件), ホルモンバランス(オーキシン: サイトカイニン), 窒素源や炭素源, エリシター添加を種々変化させたときのカルスの生育状況およびゴム合成能を観察し高分子量体ゴムを合成する最適条件を見出す。さらに, ゴム生合成に関与している遺伝子群のカルス細胞への導入条件を検討した。

(2) *In vitro* におけるゴム成分から単離したタンパク質によるゴム合成系の確立は, 未だ成功していない。ゴム粒子体のようなエマルジョン体を補因子としてとらえる概念は存在しない。そこで, ゴム粒子がゴム合成に必要な構成成分のひとつであると仮定して人工的ゴム粒子の構築を試みた。

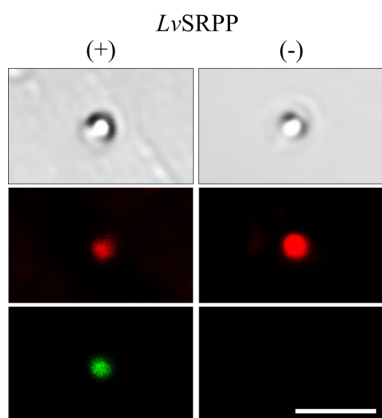
(3) 天然ゴムには高反応性末端基がゴムの分岐構造に関わっていることが推測されているものの, 実際に確認されていない。カツオ肝臓では, 天然ゴムと構造類似のエポキシ体ドリコールが発見された。そこで, イチゴの葉でのエポキシ体ポリプレノール及びエポキシ体ドリコールの検出を試み, ゴムの分岐構造への新たなアプローチとした。

4. 研究成果

(1) 植物生長ホルモンの種類、バランスを変えてカルスの誘導を行ったところ、カルスの形状に違いが見られ、オーキシン(NAA): サイトカイニン(BA)=3ppm: 1ppmでセイタカアワダチソウのカルス誘導に最適条件であることを見出した。Ca²⁺はHMGCoAをメバロン酸に変換する酵素MHGRの転写・翻訳を阻害すると報告されており、低濃度の際にのみゴム生合成が観察された。エリシターとしてジャスモン酸メチル(MJA)等4種類で最適濃度での効果が認められた。ゴム生産最適条件下での培養細胞から得られたゴムの分子量は、平均分子量で25万程度となり、これは、野生で生育する植物由来ゴムの平均分子量5万と比べて5倍以上の高機能化が図れた。

また、遺伝子導入実験ではアグロバクテリウム法を用いてカルスへのゴム生合成関連遺伝子の導入を試み、3種の遺伝子を挿入したベクターで転換バクテリアの作成、カルスを育成する培地へ添加する成分濃度、抗生物質濃度などの条件を検討した。成長観察後、カルスからのゲノム抽出を行い、ベクターのタグRFPを利用してPCRでの導入が確認できた。今後の遺伝子導入後のゴム分子キャラクター化からの効果が期待できる。

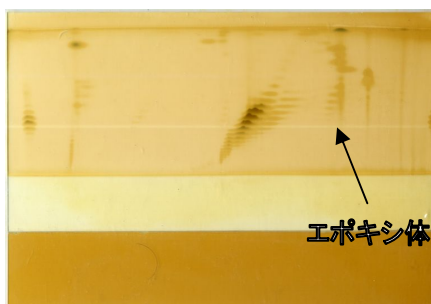
(2) これまでに獲得した遺伝情報から推測されるゴム生合成に関与すると考えられているタンパク質群を単利精製し、それぞれの酵素機能解析を行った。重合に関与する酵素単独では細胞中と同じようなポリマー生成物は見いだせないものの、複数の酵素群を用いることで取り込み活性は飛躍的に大きくなることがわかった。これまで考慮されてきていなかった酵素反応の反応場として、脂質ポリマー粒子に各酵素を結合させた構造体である人工的疑似ゴム粒子(Pseudo-Small Rubber Particle)の作成を試み、天然ゴムのゴム粒子と同程度の大きさの精製に成功した。1次抗体を加えないものをコントロールとし、タンパク質を加えないものも比較対象とした。脂質-ポリマー粒子にLvSRPPを加えた時、FITC由来の蛍光が検出できたため、粒子にLvSRPPが結合したと判断した。また、LvCPTも結合性していることが確認できた水系での有機合成反応を推進する上で期待できるものと考えている。



作成した疑似ゴム粒子の蛍光画像

上段：微分干渉法，中段：ローダミンの蛍光，
下段：FITCの蛍光

(3) 一方、複雑な天然ゴムの分子構造形成の一因と考えられている非ゴム成分とシスポリイソプレンとの結合に関与すると推測される官能基を雑草由来の低分子ゴムから同定した。イチゴには、植物においてこれまで発見されてこなかったエポキシ様のポリプレノールの存在が確認された。エポキシ体のポリプレノールは末端がアクティブとなるため、そこを起点に炭素鎖長を伸ばして行くことが可能となる。天然ゴムの基本骨格は cis-1,4-polyisoprene であり、ポリプレノール同様、イソプレン単位が重合している形となっている。エポキシ体ポリプレノールがゴム生合成に深く関わる可能性を見出すため、イチゴのエポキシ様ポリプレノールの機能解析を行った。ESI マススペクトル解析により、エポキシ体ポリプレノールであることが推測された。シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーによって分離・精製したサンプルの NMR 分析により、エポキシ体ポリプレノールに特有のピークが部分的に確認された。これは、植物体における初めてのエポキシ体ポリプレノールの発見であり、ゴムの分岐構造における分岐の起点となりうるという新たなゴム分子構造への知見となりうる。



イチゴの葉けん化後のヘキサン抽出物の二次元 TLC

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) P.Y. Samori, K. Makabe, N. Ohya, B. Hatano, S. Murakami, T. Kijima, Role of Cys73 in the thermostability of farnesyl diphosphate synthase from *Geobacillus stearothermophilus*, 3 Biotech 7:23 (2017)

(2) N. Ohya and T. Ieda, Cloning, biochemical characterization, and phylogenetic analysis of a novel isopentenyl diphosphate isomerase gene from *Lactarius volemus*, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 8(3):958-966, (2016)

(3) N. Ohya, T. Ichijo, H. Sato, T. Nakamura, S. Yokota, H. Sagami, M. Nagaki, Specificity of geranylgeranyl diphosphate synthase for homoallylic substrate analogs, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 120, 179-182, (2015)

(4) T. Togashi, K. Saito, Y. Matsuda, I. Sato, H. Kon, K. Uruma, M. Ishizaki, K. Kanaizuka, M. Sakamoto, N. Ohya and M. Kurihara, Synthesis of Water-dispersible Silver Nanoparticles by Thermal Decomposition of Water-Soluble Silver Oxalate Precursors, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 14, 6022-6027, (2014)

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) 招待講演，大谷典正，「未利用天然ゴム資源の活用を目指した天然ゴム生合成研究」，平成 29 年度化学系学協会東北大会・生体分子化学セッション，盛岡，(2017)

(2) 山本真歩，大野未来，佐上博，大谷典正，キャベツとホウレンソウのゴム様化合物についての研究，東北植物学会第 6 回大会，(2016)

(3) 齋藤真也，佐上博，大谷典正，イチゴ (*Fragaria ananassa*) のエポキシ様ポリプレノールの機能解析とゴム生合成機構への関連性，東北植物学会第 6 回大会，(2016)

(4) 横田早希，北島佐紀人，大谷典正，後藤猛，イチジク由来 Rubber Elongation Factor 組換えタンパク質の生産と凝集体解析，日本農芸化学会東北支部第 151 回大会，(2016)

(5) Hiroshi Sagami, Adam Jozwiak,

Katarzyna Gawarecka, Ewa Swiezewska, and Norimasa Ohya, セイタカアワダチソウ, アップルミントとレタスでのゴム様化合物, 第26回イソプレノイド研究会例会, (2016)

(6) 招待講演, 大谷典正, 「低炭素社会に向けた天然ゴム資源活用」, 第264回生存研シンポジウム(天然ゴムのケミストリーとバイオロジー), 京都, (2014)

(7) 招待講演, 大谷典正, 「天然ゴムの生合成と分子量制御 ~タンパク質の役割~」, 第117回衛生問題研究分科会, 東京, (2014)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 5 件)

名称: イソプレンオリゴマー、ポリイソプレン、及びこれらの製造方法、ゴム組成物、並びに空気入りタイヤ
発明者: 井之上ゆき乃, 大谷典正
権利者: 住友ゴム工業株式会社, 国立大学法人山形大学
種類:
番号: '201380045290.5
出願年月日: 2015/2/27
国内外の別: 国外

名称: イソプレンオリゴマー、ポリイソプレン、及びこれらの製造方法、ゴム組成物、並びに空気入りタイヤ
発明者: 井之上ゆき乃, 大谷典正
権利者: 住友ゴム工業株式会社, 国立大学法人山形大学
種類:
番号: BR 11 2015 004224 4
出願年月日: 2015/2/26
国内外の別: 国外

名称: イソプレンオリゴマー、ポリイソプレン、及びこれらの製造方法、ゴム組成物、並びに空気入りタイヤ
発明者: 井之上ゆき乃, 大谷典正
権利者: 住友ゴム工業株式会社, 国立大学法人山形大学
種類:
番号: 1501000999
出願年月日: 2015/2/25
国内外の別: 国外

名称: イソプレンオリゴマー、ポリイソプレン、及びこれらの製造方法、ゴム組成物、並びに空気入りタイヤ
発明者: 井之上ゆき乃, 大谷典正
権利者: 住友ゴム工業株式会社, 国立大学法人山形大学

種類:
番号: PI 2015700468
出願年月日: 2015/2/14
国内外の別: 国外

名称: イソプレンオリゴマー、ポリイソプレン、及びこれらの製造方法、ゴム組成物、並びに空気入りタイヤ
発明者: 井之上ゆき乃, 大谷典正
権利者: 住友ゴム工業株式会社, 国立大学法人山形大学
種類:
番号: 2014-110347
出願年月日: 2014/5/28
国内外の別: 国内

取得状況(計 3 件)

名称: イソプレノイドの製造方法、イソプレノイド、カルス、カルスの誘導方法、及びカルスの培養方法
発明者: 上杉明里, 細川友宏, 黒田智, 井之上ゆき乃, 大谷典正
権利者: 住友ゴム工業株式会社, 国立大学法人山形大学
種類:
番号: 6032707
取得年月日: 2016年11月4日
国内外の別:

名称: イソプレノイドの製造方法、イソプレノイド、及びカルス
発明者: 藤谷典志, 服部高幸, 横山結香, 上杉明里, 宮城ゆき乃, 大谷典正
権利者: 住友ゴム工業株式会社, 国立大学法人山形大学
種類:
番号: 5975252
取得年月日: 2016年7月29日
国内外の別: 国内

名称: Isoprene oligomer, polyisoprene, processes for producing these materials, rubber composition, and pneumatic tire
発明者: Y. Miyagi, N. Ichikawa, N. Ohya
権利者: 住友ゴム工業株式会社, 国立大学法人山形大学
種類:
番号: US9,371,342,B
取得年月日: June 21, (2016)
国内外の別: 国外

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
大谷典正 (OHYA Norimasa)
山形大学, 理学部, 准教授
研究者番号: 40302286