

藤森科学技術振興財団 研究実施概要報告書

(西暦)2024年5月31日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長 藤森 明彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関 鳥取大学 農学部

職名 准教授

氏名 岩崎 崇 印

【提出書類】

(1) 研究実施概要報告書(本紙)

添付書類(A4版3枚以内): 研究状況を示す写真等の資料

(2) 収支報告書

添付書類: 助成金を充当した経費の領収書

領収書を添付しない場合: 支払一覧表と支払部門担当者確認署名

(1)テーマ

脱炭素社会を目指した樹木細胞の高速ゲノム育種法の開発

(2)本研究の期間

(西暦) 2023年4月 ~ 2024年3月

(3)本研究の目的

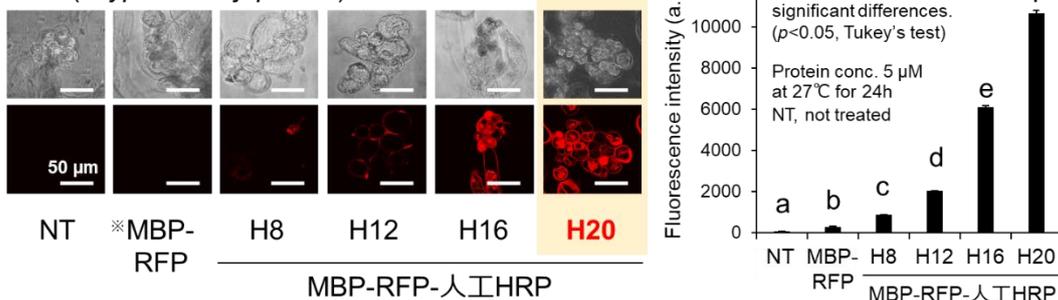
脱炭素社会の構築は喫緊の課題であり、全球規模でその実現が声高に叫ばれている。脱炭素社会を実現する鍵のひとつとして「樹木植物の品種改良」が挙げられる。品種改良によって樹木の成長速度やバイオマスを強化し、栽培しやすい品種を作出することで、大気中の CO2 吸収を促進し、再生可能エネルギーの増産を実現することができる。しかし、樹木植物は樹齢が非常に長いため、古典的な育種法に依存した品種改良は時間がかかりすぎるため現実的ではない。そこで本研究では、迅速な脱炭素社会の構築を目指し、樹木を迅速に品種改良する「樹木細胞の高速ゲノム育種法」の技術基盤を開発する。

具体的には、古典的な育種法(交配や遺伝子組換えによる品種改良)に代わる新しい高速育種法として、「非遺伝子組換えゲノム編集技術」を利用した樹木植物の育種法を開発する。ゲノム編集酵素(タンパク質)を樹木細胞内へ直接かつ効率的に導入することで、遺伝子組換えを使わずに、樹木細胞の性質を自在に改良する技術を創出する。この手法を実現するために、本研究では、樹木細胞内にタンパク質を効率的に輸送することができるタンパク質輸送キャリアーの探索・開発を目的とする。

本研究では、タンパク質輸送キャリアーとしてヒスチジンを高度に含有するヒスチジンリッチペプチド/タンパク質(Histidine-rich peptide/protein: HRP)に着目した。これまでに我々は、ヒスチジンのみを連続して人工合成した HRP(人工 HRP)が植物細胞に対するタンパク質輸送キャリアーとして有効であることを報告している(特許第 6202707 号、Tanaka, et al. 2021, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*) (図1)。人工 HRP の中でも、ヒスチジンが 20 残基連続した H20 配列を融合したタンパク質は、樹木細胞(スギ細胞)の細胞壁と細胞膜を通過して細胞内へ取り込まれることから、人工 HRP である H20 配列は樹木細胞に対する有力なタンパク質輸送キャリアーである。さらに我々は、この人工 HRP(H20 配列)をゲノム編集酵素に融合することで、遺伝子組換えを使わずに樹木細胞をゲノム編集する「非遺伝子組換えゲノム編集技術」の概念実証に成功している(国際出願 PCT/JP2021/046845)。しかし、上記技術はゲノム編集効率が低い(最大効率: 7.95%)ため、実用化にまでは至っていない。その原因として、上記技術は人工 HRP を利用しているため、植物細胞の HRP 取込み機構の本来のポテンシャルを存分に引き出せていない(人工 HRP では植物細胞の HRP 受容体との結合親和性が不十分である)可能性が挙げられる。上記技術を実用化レベルにまで改善するために、植物細胞の HRP 取込み機構の本来のリガンド(植物由来の天然 HRP)を利用する必要がある。そこで、本研究提案では、「高い分子輸送能を有する植物由来の天然 HRP を探索し、ゲノム編集酵素の輸送キャリアーとして利用する」ことを目指し研究開発を行った。

図 1. 植物細胞に対する人工 HRP のタンパク質輸送能

スギ (*Cryptomeria japonica*) の培養細胞



※MBP-RFP: Maltose binding protein fused with red fluorescent protein (65 kDa)

特許第6202707号「新規細胞膜透過ペプチド」、Tanaka, et al. 2021, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 85

(4) 本研究の概要

本研究では、植物に存在する複数の天然 HRP の中から、タンパク質(ゲノム編集酵素)の効率的な輸送キャリアーとして利用可能な分子を探索した。主に、下記の二通りの計画により研究を遂行した。

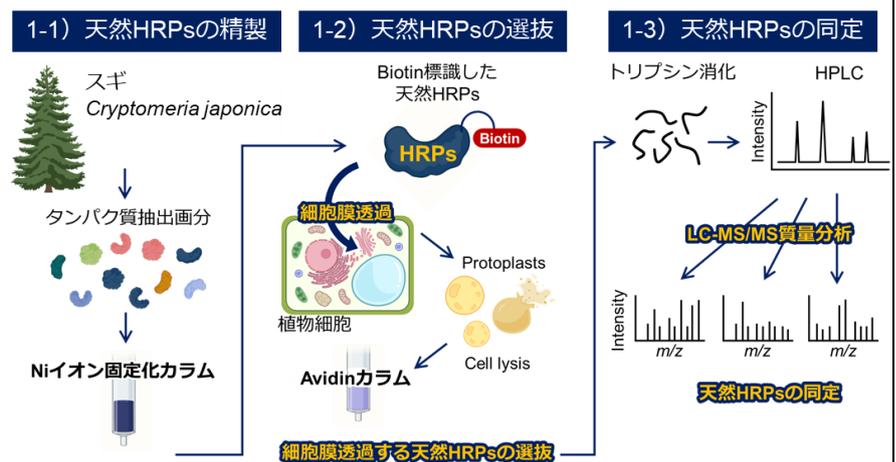
1) スギ由来天然 HRP の探索 樹木に内在する複数の天然 HRP に着目し、生化学的なアプローチにより高いタンパク質輸送能を有する天然 HRP を探索し、その同定を試みた。

1-1) 天然 HRP の精製 スギの植物組織からタンパク質抽出画分を調製した。次いで、Ni イオン固定化カラムを用いたアフィニティー精製により、ヒスチジンを高度に含有する天然 HRP 画分を得た(図2)。

1-2) 天然 HRP の選抜 計画 1-1) で得られた天然 HRP 画分を Biotin 標識し、スギ培養細胞に添加することで、Biotin 標識天然 HRP を細胞内へ取り込ませた。その後、スギ細胞の細胞壁を除去し(プロトプラスト化し)、細胞破碎液を Avidin カラムにてアフィニティー精製することで、細胞内に取り込まれた Biotin 標識天然 HRP を回収した(図2)。

1-3) 天然 HRP の同定 計画 1-2) にて得られた Biotin 標識天然 HRP 画分を LC-MS/MS 質量分析によりアミノ酸配列を決定し、分子輸送キャリアーとして利用可能な天然 HRP の同定を試みた(図2)。

図 2. スギ由来天然 HRP の探索の概略図

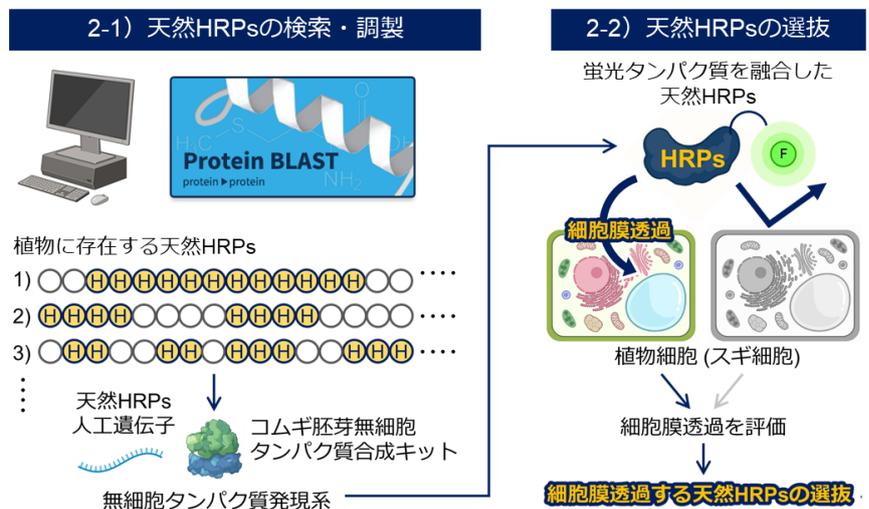


2) 植物由来天然 HRP の探索 植物全般に存在する複数の天然 HRP に着目し、バイオインフォマティクス解析と生化学的なアプローチにより高いタンパク質輸送能を有する天然 HRP を探索し、その同定を試みた。

2-1) 天然 HRP の検索・調製 NCBI Protein BLAST 検索により、植物全般に存在する天然 HRP のアミノ酸配列情報を得た。これら天然 HRP をコードする人工遺伝子を合成し、無細胞タンパク質発現系により、蛍光タンパク質を融合した天然 HRP を調製した(図3)。

2-2) 天然 HRP の選抜 計画 2-1) で得られた「蛍光タンパク質を融合した天然 HRP」を、スギ細胞に添加し、天然 HRP の細胞内取込みを定量した。人工 HRP と比較をすることで、人工 HRP を超える細胞膜透過能を有する天然 HRP (分子輸送キャリアーとして利用可能な天然 HRP) の同定を試みた(図3)。

図 3. 植物由来天然 HRP の探索の概略図



(5)本研究の内容及び成果

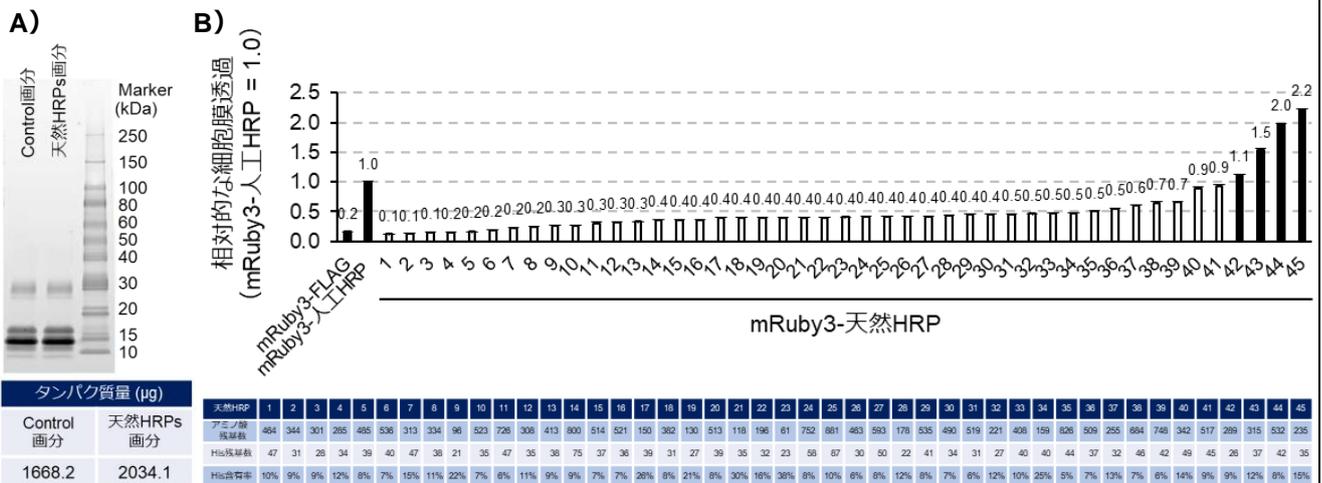
本研究では、下記の二通りのアプローチにより、植物に存在する複数の天然 HRP の中から、タンパク質 (ゲノム編集酵素) の効率的な輸送キャリアーとして利用可能な分子を探索した。それぞれの結果を示す。

1) スギ由来天然 HRP の探索 樹木(スギ)に内在する複数の天然 HRP をアフィニティー精製により回収し、Biotin 標識した後に、スギ細胞に対して Biotin 標識天然 HRP を取り込ませた。次いで、Biotin 標識天然 HRP を添加していない未処理細胞と、Biotin 標識天然 HRP を取り込ませた細胞をそれぞれ破碎し、Avidin カラムを用いて膜透過を示す Biotin 標識天然 HRP を回収した。その結果、未処理細胞由来の Control 画分と Biotin 標識天然 HRP を処理した細胞由来の天然 HRP 画分から、それぞれ 1668.2 μ g と 2034.1 μ g のタンパク質を検出した(図4A)。この結果から、両者の差である 365.9 μ g が細胞膜透過を示す Biotin 標識天然 HRP であることが示唆された。しかしながら、SDS-PAGE にて解析したところ、両者に明確な差異(天然 HRP 画分に特異的なバンド)は見られなかったことから、以降に予定していた LC-MS/MS 質量分析によるアミノ酸配列解読を断念した。

2) 植物由来天然 HRP の探索 上記計画 1)による計画遂行が困難になったため、異なるアプローチ(バイオインフォマティクス解析)を用いて、植物全般に存在する複数の天然 HRP を対象として、高いタンパク質輸送能を有する天然 HRP の探索を試みた。NCBI Protein BLAST 検索により、ヒスチジンの連続配列を有する計 45 種類の天然 HRP を選出した。これら 45 種類の天然 HRP をコードする人工遺伝子を合成し、蛍光タンパク質を融合した天然 HRP を調製した。45 種類の天然 HRP について、スギ細胞内へのタンパク質輸送能(細胞膜透過能)を評価した結果、従来の分子輸送キャリアーである人工 HRP と比べて 1.1 倍、1.5 倍、2.0 倍、2.2 倍高いタンパク質輸送能(細胞膜透過能)を有する天然 HRP をそれぞれ見出した(図4B)。

※特許出願を控えているため、天然 HRP の詳細情報は非公開とさせていただきます。

図 4. タンパク質輸送キャリアーとして利用可能な天然 HRP の探索



A) スギ植物組織から抽出した天然 HRP を Biotin 標識し、スギ細胞に取り込ませた後に、Avidin カラムにより再回収した。Control 画分と天然 HRP 画分に含まれるタンパク質について、SDS-PAGE 解析およびブラッドフォード法によりタンパク質量を定量した。**B)** 植物に存在する天然 HRP を赤色蛍光タンパク質 mRuby3 に融合した組換え天然 HRP を調製し、スギ細胞に対するタンパク質輸送能(細胞膜透過能)を評価した。非膜透過性の mRuby3-FLAG を negative control、膜透過性の mRuby3-人工 HRP (H20 配列) を positive control として使用した。mRuby3-天然 HRP のタンパク質輸送能(細胞膜透過能)は、mRuby3-人工 HRP を 1.0 とした場合の相対値で評価した。また、評価に使用した各天然 HRP のアミノ酸残基数、ヒスチジン残基数、全体におけるヒスチジン残基含有率を表に示す。

(6) 本研究の考察

本研究では、植物に存在する天然 HRP の中から、樹木細胞に対するタンパク質(ゲノム編集酵素)の効率的な輸送キャリアーとして利用可能な分子を探索した。その結果、4 種類の天然 HRP(天然 HRP42, HRP43, HRP44, HRP45 と呼称する)が、従来の輸送キャリアーである人工 HRP よりも高い輸送効率を示すことが明らかになった。本研究において新たに見出された 4 種類の天然 HRP は、樹木細胞に対するタンパク質(ゲノム編集酵素)輸送キャリアーとして利用が期待できる。特に、もっとも高いタンパク質輸送効率を示した天然 HRP45 は、全長 235 残基のアミノ酸配列から構成され、分子量は約 24 kDa の比較的 low molecular weight のタンパク質であることから(図4B)、代表的なゲノム編集酵素 CRISPR-Cas9(分子量約 160 kDa)に輸送キャリアーとして融合した場合でも、タンパク質全体における分子量の影響は少なく、樹木細胞内への効率的な輸送が期待できる。

また、本研究において見出された 4 種類の天然 HRP(天然 HRP42, HRP43, HRP44, HRP45)をリード分子として、さらに分子改変をすることで、より高効率なタンパク質(ゲノム編集酵素)の輸送キャリアーが創出できる可能性が示唆される。具体的には、天然 HRP42, HRP43, HRP44, HRP45 を断片化した低分子ペプチドを作出し、それぞれのタンパク質輸送効率を評価することで、より効率化したタンパク質(ゲノム編集酵素)の輸送キャリアー開発が期待できる。

本研究成果は特許出願を控えているため、本研究において得られた天然 HRP の詳細情報は非公開とさせていただきますが、本研究では「植物細胞の HRP 取込み機構の本来のポテンシャルを最大限引き出すために、天然 HRP を利用する」という戦略の有用性を実証することができた。

(7) 共同研究者(所属機関名、役職、氏名)

該当なし

(8) 本研究の成果の公表先

該当なし

[注]この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。