

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14833

研究課題名（和文）高効率物質生産植物体の開発

研究課題名（英文）Production of gene silencing-related genes-edited *Nicotiana benthamiana*

研究代表者

松尾 幸毅（MATSUO, Kouki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：10358012

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、組換えタンパク質等の大量生産が可能な「高効率物質生産植物体」の作出を実施した。

植物に導入した組換え遺伝子由来mRNAは植物の防御機構であるRNAサイレンシング機構により分解されるため、組換えタンパク質の生産性が低下する。そこで、ゲノム編集技術により各種RNAサイレンシング関連遺伝子をノックアウトしたタバコ植物体を作成し、物質生産性等の性状解析を実施した。作出した植物体において組換えタンパク質を一過性生産させた結果、野生型植物体に比べ組換えタンパク質の生産性が大幅に向上した。このことから、これら植物体は植物による物質生産における「高効率物質生産植物体」として利用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物による有用組換えタンパク質の生産技術は実用化されており、多くの植物生産組換えタンパク質が既に市販されている一方、その生産性の向上が課題とされている。本研究で開発された「高効率物質生産植物体」は、野生型植物体に比べ組換えタンパク質生産性が大幅に向上している。本植物体を用いることで、特許制限下にある特殊なベクターなどを使用することなく大量の組換えタンパク質の生産が可能であり、植物の物質生産技術の産業応用に大きく寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：The production of recombinant proteins in plants has many advantages, such as safety and reduced costs. However, there are several problems with this technology, especially low levels of protein production. The repression of the RNA silencing mechanism in plant cells would be effective to improve recombinant protein production because the RNA silencing mechanism efficiently degrades transgene-derived mRNAs. To overcome this problem, CRISPR/Cas9 technology was used to develop RNA silencing-related gene knockout transgenic *Nicotiana benthamiana* plants. The transgenic plants produced in this study could produce larger amounts of recombinant proteins than wild-type plants, thus would be useful for recombinant protein production and understanding the contributions of RNA silencing-related genes to genetic and physiological events in plants.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：物質生産 遺伝子サイレンシング ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物による有用組換えタンパク質の生産技術は既に実用化されており、多くの植物生産組換えタンパク質が既に市販されている。医療用タンパク質の植物生産についても実用化されており、イスラエルの Protalix 社はニンジン培養細胞で生産したゴースェ病治療薬であるグルコセレブロシダーゼについて FDA より販売承認を受けており（販売はファイザー製薬）、2014年には、タバコの一つである *Nicotiana benthamiana* により生産した抗エボラウイルス抗体製剤である Zmapp が、エボラ出血熱患者に投与され良好な結果を得ている。現在、多くの植物生産医療用組換えタンパク質の臨床試験が実施されており、そのニーズは今後ますます高まると予想される。

植物による物質生産の高効率化のため、様々なアプローチがなされており、特に、「転写・翻訳を強化、安定化」するための研究が広く行われてきた。その結果、より良好なプロモーター、ターミネーターの探索や、植物ウイルスベクターの開発へとつながってきた。また、組換えタンパク質を植物細胞内の小胞体等の特定の場所に貯留させる方法も試みられており、その効果が報告されている。一方植物は、植物ウイルス等に対応する基本的な防御機構として、「RNA サイレncing機構」を有する。これは、ウイルス由来 RNA を分解することで、ウイルスタンパク質の合成を阻止し、ウイルスの増殖を防ぐものである。RNA サイレncing機構は、組換えタンパク質遺伝子由来 mRNA に対しても働き、組換えタンパク質の生産性を著しく低下させることが知られている。RNA サイレncing機構が働かないようにすることで、組換えタンパク質遺伝子由来 mRNA の分解を防ぎ、目的タンパク質の生産性を向上させることが可能である。これまでの我々の研究で、*N. benthamiana* において RNA サイレncing機構の主要遺伝子である *DCL2* 及び *DCL4* 遺伝子を RNAi 法により抑制することで、組換えタンパク質の生産性が向上する結果が得られている [Matsuo et al., *J Biosci Bioeng.* 124 (2017) 215-220] しかし、RNAi 法ではその抑制度が安定しない場合があり、実用化に支障が生じる可能性がある。そこで、より安定して物質生産能が向上した植物体の作出が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、先行研究の RNAi 法による遺伝子ノックダウンに替わり、ゲノム編集技術により RNA サイレncing 関連遺伝子がノックアウトされた植物体、すなわち高効率に組換えタンパク質の生産が可能なる「高効率物質生産植物体」の開発を実施することを目的とした（図1）。

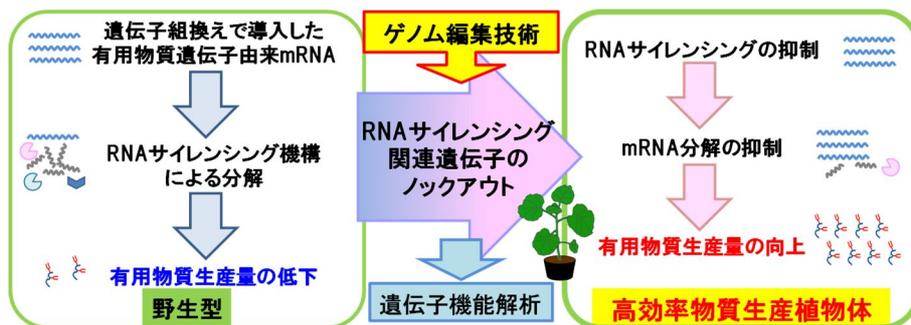


図1. 「高効率物質生産植物体」の概要

3. 研究の方法

植物による物質生産において世界で主に用いられている *N. benthamiana* に対して、ゲノム編集技術により RNA サイレncing 関連遺伝子のノックアウトを実施した。形質転換の結果得られた再分化植物体についてノックアウト対象遺伝子への変異導入を確認する等の遺伝子機能解析を実施し、植物体の選抜を行った。獲得したノックアウト植物体を用いて、アグロインフィルトレーション法等による組換えタンパク質一過性発現試験を行い、各組換え植物体のタンパク質発現能や性状解析を実施した（図2）。

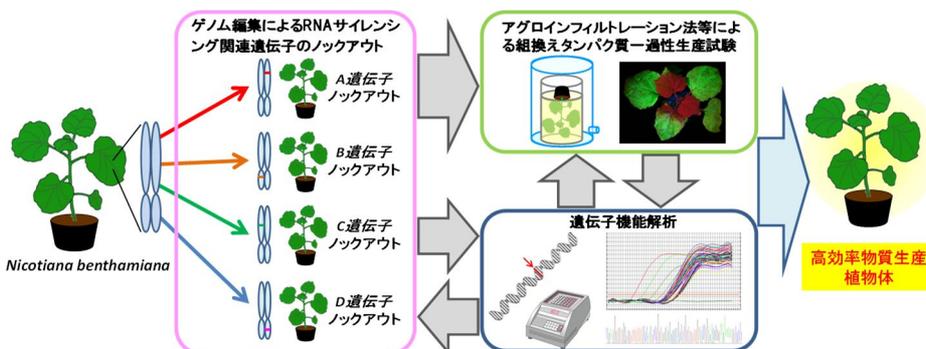


図2. 研究の概要

4. 研究成果

(1) RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6) 遺伝子ノックアウト *N. benthamiana* の作出

本研究のモデル植物体である *N. benthamiana* 由来する遺伝子サイレンシング関連遺伝子について、各種ソフトウェアにより CRISPR/Cas9 システムにおける標的配列を検索し、ガイド RNA 発現のためのコンストラクトを複数設計した。RDR6 遺伝子については、Niben101Scf12609Ctg016 と Niben101Scf03832Ctg041 配列において標的配列を設定した。

Streptococcus pyogenes 由来 Cas9 遺伝及び RDR6 遺伝子ノックアウトのためのガイド RNA 発現カセットを、植物遺伝子組換えのためのバイナリーベクターである pBE2113 へと組み込んだ。本ベクターを用いて *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株の形質転換を行い、RDR6 遺伝子変異導入のためのアグロバクテリウムを得た。本アグロバクテリウムにより *N. benthamiana* の形質転換を実施した。

形質転換の結果得られた再分化個体 (T0 植物体) 葉試料よりゲノム DNA を抽出後、標的周辺 DNA 配列をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅した。増幅した標的周辺 DNA 配列のシーケンス解析を実施した結果、複数の再分化個体中の標的配列において塩基の挿入もしくは欠失が認められた。このことから、再分化個体中において Cas9 タンパク質とガイド RNA が機能し、標的配列に対するゲノム編集が行われていることが明らかとなった。ただし、塩基の挿入もしくは欠失されたゲノム DNA を有する細胞と、されていない DNA を有する細胞とが再分化個体中にモザイク状に存在していると推定された。そこで自家受粉により種を採取し、標的とした RDR6 遺伝子に変異が導入された形質転換第 2 世代植物体 (T2 植物体) (RDR6 植物体) を獲得した (図 3)

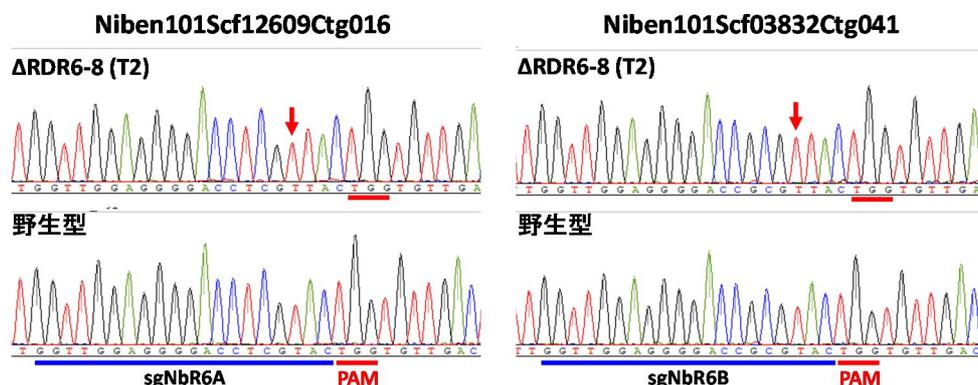


図 3. T2 植物体における標的配列周辺の DNA シーケンス解析結果

赤矢印：塩基が挿入された位置、青線：標的配列、PAM：protospacer adjacent motif

(2) RDR6 植物体の性状解析

形質転換第 2 世代 (T2) の RDR6 植物体を用いて、アグロインフィルトレーション法による緑色蛍光タンパク質 (GFP) の一過性発現試験を実施した。その結果、GFP 遺伝子に由来する mRNA 量及び GFP 発現量が、野生型植物体を用いた場合に比べて約 2.5 倍へと増加することが明らかとなった (図 4)。また、small RNA シーケンス解析の結果、RDR6 植物体では野生型植物体に比べて GFP 遺伝子に対する small interfering RNA 量が、大幅に減少していることが明らかとなった。このことから、RDR6 植物体では、RDR6 遺伝子のノックアウトにより RNA サイレncing 系が機能不全になることで、外来遺伝子に由来する mRNA の安定性が増し、結果として組換えタンパク質の生産が増加することが明らかとなった。本成果は論文として公表済みである [Matsuo et al., *Planta* 250 (2019) 463-473]

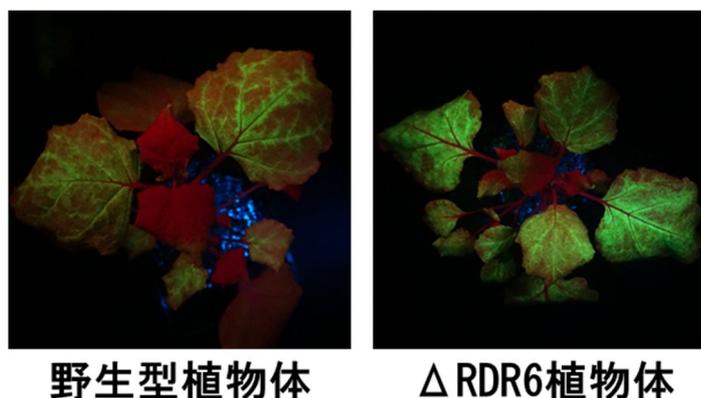


図 4. インフィルトレーション 3 日目における GFP 発現の様子

(3) その他の遺伝子サイレンシング関連遺伝子ノックアウト植物体の作出

RDR6 植物体はシロイヌナズナ *RDR6* 遺伝子変異体と同様に不稔であったため、物質生産のために RDR6 植物体を大量に得ることは非常に煩雑である。そこで、*RDR6* 遺伝子とは別種の遺伝子サイレンシング関連遺伝子に対するノックアウト植物体の作出を行った（未発表のため X 植物体とする）。形質転換の結果得られた再分化個体葉試料よりゲノム DNA を抽出後、標的周辺 DNA 配列を PCR により増幅した。増幅した標的配列のシーケンス解析を実施した結果、複数の再分化個体中の標的配列において塩基の挿入もしくは欠失が認められた。

変異は形質転換第 3 世代 (T3) において固定できたため、その次世代である T4 植物体を用いてアグロインフィルトレーション法による GFP 一過性発現試験を実施した。その結果、RDR6 植物体と同様に X 植物体も、野生型植物対に比べ組換えタンパク質生産能が大幅に向上していることが明らかとなった。X 植物体は RDR6 植物体と異なり稔性を有するため、一度に多くの植物体を育成することが可能であることから、物質生産への応用が容易である。現在、本植物体に関して更なる性状解析を実施中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kouki Matsuo, Go Atsumi	4. 巻 250
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated knockout of the RDR6 gene in <i>Nicotiana benthamiana</i> for efficient transient expression of recombinant proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 463-473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-019-03180-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松尾 幸毅	4. 巻 3
2. 論文標題 導入遺伝子高発現植物の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 61-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松尾 幸毅、厚見 剛
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムによるRDR6遺伝子ノックアウト <i>Nicotiana benthamiana</i> の作出
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾 幸毅、厚見 剛、松村 健
2. 発表標題 Repression of RNA silencing for efficient expression of recombinant proteins
3. 学会等名 Kick-OFF Conference for Osaka University -University of California, Davis Collaboration Project（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----