

令和元年6月26日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19223

研究課題名（和文）遺伝子銃を用いた新規な高効率遺伝子導入法に関する研究

研究課題名（英文）Study of a novel high efficiency gene delivery method using microprojectile bombardment

研究代表者

尾形 信一（OGATA, Shinichi）

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・准教授

研究者番号：00314542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究提案では、植物細胞における高効率物質生産系に適用する新規遺伝子導入法の創製を目的とした。2017年度ではまず、核移行シグナルの探索を行い、動物細胞で機能することが知られている配列が候補として考えられた。そこで、これら核移行シグナルをコードするDNA断片とGFPとの融合遺伝子の構築を行った。

2018年度はファージディスプレイ法によるDNA結合性ペプチドの探索方法の確立を試みた。具体的には、マルチウエルプレート壁面にDNAを吸着させ、その後ファージ粒子溶液を添加し、DNAとファージ粒子の結合を試みた。しかし、本方法によってDNA結合性のファージクローンを選抜することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究提案では、植物細胞における高効率物質生産系に適用する新規遺伝子導入法の創製を目的とした。具体的には、従来、遺伝子銃の導入担体である金粒子に直接吸着させていた導入DNAに対して、DNA結合能と核移行能を併せ持つペプチド分子を複合化することにより、遺伝子銃を用いて細胞内に遺伝子導入を行った後、能動的に、核に導入遺伝子が移行できる機能を付与し、自律的に核内への導入遺伝子の移行を制御する遺伝子導入法を確立することを目的とした。本提案が可能になれば、従来の遺伝子銃を用いた遺伝子導入法と比較して、導入遺伝子が高効率に核内に移行することが期待され、大幅な遺伝子発現効率の上昇が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research proposal is to create a novel gene transfer method applied to high efficiency substance production system in plant cells. In the first year, we searched for nuclear localization signals that known to function in animal cells. Then, we constructed a fusion gene of a DNA fragment encoding these nuclear translocation signals and green fluorescent protein (GFP).

In the next fiscal year, we attempted to establish a method for searching for DNA binding peptides by phage display screening method. Plasmid DNA was adsorbed onto the wall of a multi-well plate, and then a phage particle solution was added to try to bind the plasmid DNA to the phage particle. However, DNA binding phage clones could not be selected by this method.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：オリゴペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

現在、環境破壊や食糧問題など、全世界レベルで解決策を考えなければならない難題に人類は直面している。これら諸問題を解決する手段として、一次生産者である植物の高機能化が有効であると期待されており、人為的に有用遺伝子の導入を行い、植物の機能改変を行う方法の研究が進められている。さらに、近年、植物の培養細胞や植物個体を使って有用産物を生産する「植物工場」の概念が提唱されている。すなわち、従来、バクテリアや動物培養細胞を用いて生産していたタンパク質製剤などを、植物に生産させようとするものである。これは、低コスト、低環境負荷型の物質生産系として注目されている。

これら植物の機能改変や有用産物の生産系構築に際して鍵となるのは、高効率遺伝子導入法の確立である。現在、遺伝子導入法として、アグロバクテリウムや植物ウイルスベクター、遺伝子銃を用いた方法などがある。中でも、遺伝子銃による導入法は、その簡便さと安全性から注目されている。一方、遺伝子銃を用いた方法の特性として、適切な遺伝子発現のためには、導入 DNA のキャリアである金粒子が、細胞の核内に導入されなければならない。そのため、細胞内に導入されても、細胞質内に金粒子が留まっている場合には、適切な遺伝子発現は望めない。

### 2. 研究の目的

本研究提案では、植物細胞における高効率な新規遺伝子導入法の創製を目的としている。具体的には、従来、遺伝子銃の導入担体である金粒子に直接吸着させていた導入 DNA に対して、DNA 結合能と核移行能を併せ持つペプチド分子を複合化することにより、遺伝子銃を用いて細胞内に遺伝子導入を行った際に、自律的に核内への導入遺伝子の移行が制御される遺伝子導入法を確立する。本提案が可能になれば、従来の遺伝子銃を用いた遺伝子導入法と比較して、導入遺伝子が高効率に核内に移行することが期待され、大幅な遺伝子発現効率の上昇が期待できる。その結果、植物培養細胞における高効率物質生産系の開発、ならびに高効率な形質転換植物の作出が可能になると期待できる。

### 3. 研究の方法

2017年度ではまず、核移行シグナルの探索を行った。文献既知の情報として、SV40の核移行シグナルなど動物細胞で機能することが知られている配列が候補として考えられた。これらペプチドは、塩基性アミノ酸残基のクラスターからなっており、その構造は、単一の塩基性残基のクラスターからなるものや分節型の塩基性残基のクラスターからなるものがある。これら核移行シグナルペプチドを、本来核に移行しないタンパク質に結合した場合、当該タンパク質を核に移行する機能を発現することが知られている。しかし、これら知見は哺乳類培養細胞を用いた系であり、本申請で提案した植物細胞に対して有効か否かの情報は得られなかった。そこで、まずは、これら核移行シグナルをコードするDNA断片とGFPとの融合遺伝子を作製し、遺伝子銃を用いて植物細胞に導入することによって、動物細胞由来の核移行シグナルが植物細胞においても機能するか否かを、GFPの蛍光の核局在を指標に判定することを計画した。そのため今年度は、これらGFP融合遺伝子の作製を行った。

当初の計画では、今年度はDNA結合性ペプチドの探索を行う予定であった。しかし、研究計画の遂行に必要な種々の情報を調査する過程で、核移行シグナルの選抜の際に、動物細胞で機能することが知られている核移行シグナルが、植物細胞においても機能するか否かの調査が先決であると判断した。そこで2017年度は、動物細胞において機能することが知られている核移行シグナルの、植物細胞内における挙動を調査するために、核移行シグナルとGFPの融合遺伝子の作製を行った。これは、当初の計画では2年目に行うものであったが、核移行が本研究の目標の達成に不可欠な素過程であることに加え、もし機能しなかった場合には、植物細胞由来の核タンパク質が持つ核移行シグナルを調査し、それら配列の採用も新たに視野に入れて研究を遂行する必要があると判断され、当初計画よりも前倒しで遂行する必要があると考えた。

2018年度はファージディスプレイ法によるDNA結合性ペプチドの探索方法の構築を試みた。具体的には、プラスミドDNA溶液をマルチウエルプレートに添加し、プレート壁面にDNAを吸着させた。その後、ライブラリーのファージ粒子溶液を添加しプレート壁面に吸着させたDNAとライブラリーのファージ粒子の結合を試みた。添加したファージ粒子の中で、DNAに結合しなかったファージ粒子を除去するために、洗浄バッファーによる洗浄操作を行った。洗浄操作の後、DNAに結合したファージ粒子を遊離させるためにpHを低下した酸性の遊離バッファーによって溶出を試みた。溶出したファージ溶液を使って大腸菌に感染させ、選抜されたファージクローンの選抜と増幅を試みた。しかし、ファージを大腸菌に感染させた際に生じるプラークの出現を認めることができなかった。

#### 4. 研究成果

本研究提案では、植物細胞における高効率物質生産系に適用する新規遺伝子導入法の創製を目的とした。2017年度では先ず、核移行シグナルの探索を行い、動物細胞で機能することが知られている配列が候補として考えられた。そこで、これら核移行シグナルをコードするDNA断片とGFPとの融合遺伝子の構築を行った。現在までに、各移行シグナルを融合したGFP融合遺伝子の作成を行っており、近々、遺伝子銃によって植物培養細胞に導入し、その核移行能を調査する予定である。

2018年度はファージディスプレイ法によるDNA結合性ペプチドの探索方法の確立を試みた。具体的には、マルチウエルプレート壁面にDNAを吸着させ、その後ファージ粒子溶液を添加し、DNAとファージ粒子の結合を試みた。しかし、本方法によってDNA結合性のファージクローンを選抜することができなかった。現在までに、ファージディスプレイ法によって特定のアミノ酸配列を有したDNA結合性オリゴペプチドの単離に成功した例はない。我々も結果的には今回の助成期間中でのDNA結合性オリゴペプチドの単離には至っていない。しかし、今回の研究を通して従来の典型的なファージディスプレイ法の適用では特定の配列を有するDNA結合性のペプチドの単離は難しいことが明らかになった。この原因として、1)マルチウエルプレートに吸着したDNA量が充分ではなかった、2)ファージ粒子の結合の際の各種条件(温度、結合バッファー中の塩濃度・界面活性剤の濃度、結合時間など)が適切ではなかった。3)洗浄過程の各種条件(温度、洗浄バッファー中の塩濃度・界面活性剤の濃度、洗浄の回数など)が適切ではなかった。4)DNAに結合したファージ粒子の遊離条件(温度、遊離バッファーの塩濃度、遊離バッファーのpHの条件など)が適切ではなかった、の4点が主要な原因と考えられた。今後は、上記種々条件を最適化し、DNA結合性ペプチドを提示しているファージクローンの単離を目指す。

今回、挑戦的研究(萌芽)に採択されたことによって、これまで不足していた実験機器、研究試薬を研究室に導入できたことは我々にとって非常にありがたいことであった。まずはこの場をお借りして御礼申し上げたい。2017年度、2018年度で研究室に導入した実験機器を使用して、更なる研究の進展が期待できる。一方で、本研究提案の研究はまだ途上段階にあり、上述した通り、まずはファージディスプレイ法によるDNA結合性ペプチドの単離を成功させる必要がある。言い換えると、DNA結合性ペプチドの単離が今回の研究提案の核であり、その点を克服できれば本研究は一気に進むものと考えられる。そして、本研究提案の成果を取りまとめ、学会発表ならびに原著論文の発表によって研究成果を社会に還元していく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：該当無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：該当無し

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：該当無し

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。