

植物細胞の核内へのタンパク質導入法

産業技術総合研究所 生命工学領域
バイオメディカル研究部門 構造創薬研究グループ
研究グループ長 加藤 義雄

2021年9月9日

技術分野の背景(1)

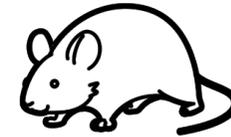
ゲノム編集を実用的に利用する場合、実践的には多くの課題がある。

最終的なゲノム編集効率は、

細胞内のゲノム編集効率 × デリバリー効率

技術分野の背景(2)

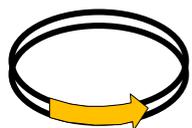
異なる生物種



異なる目的	単一クローンの取得	細胞集団の取得
動物・植物・微生物	細胞株の樹立	多検体並列・複合評価
動物・植物	モデル生物系列	非モデル生物評価
ヒト (動物)	Ex vivo治療	In vivo治療
考慮すべき点	導入効率は重要では無い 細胞毒性は重要では無い 発現ベクターの除去が重要	導入効率は重要 細胞毒性は重要 発現ベクターの除去は必要

技術分野の背景(3)

分子材料



DNA



RNA



タンパク質

×

方法

ウイルス的導入

植物：アグロバクテリウム
動物：AAV, Lentivirus

生化学的導入

植物：プロトプラストPEG
動物：Lipofection

物理的導入

植物：パーティクルガン, iPB
動物：エレクトロポレーション

自発的な導入

植物：DIVE
動物：DIVE

特徴

感染性微生物・ウイルスと対象生物種との関係性に依存。確立された系では高効率。

毒性や免疫原性が問題となる。特定の細胞種・組織への導入が難しい。

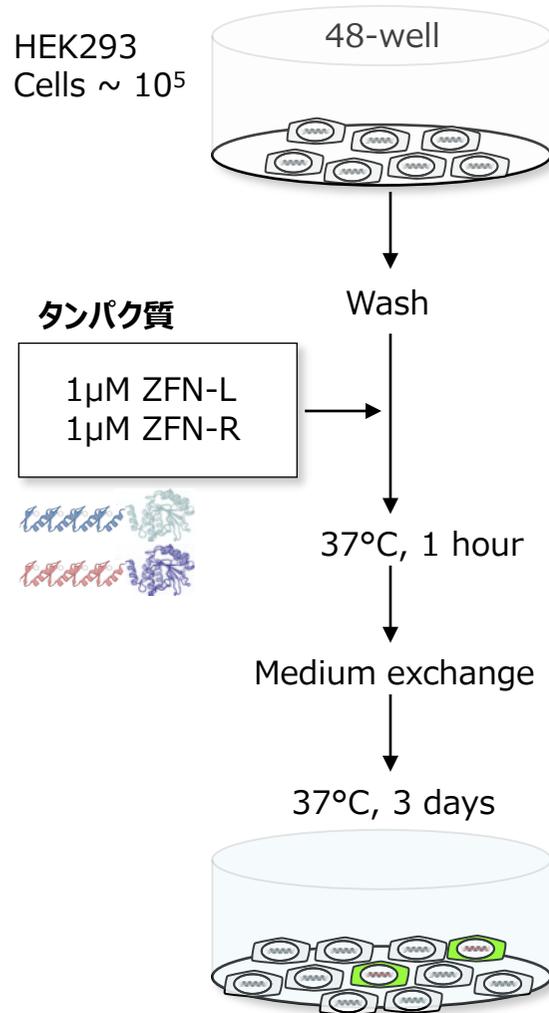
生物種に依存しにくい。細胞毒性と効率がトレードオフ。

導入評価
FACS ?

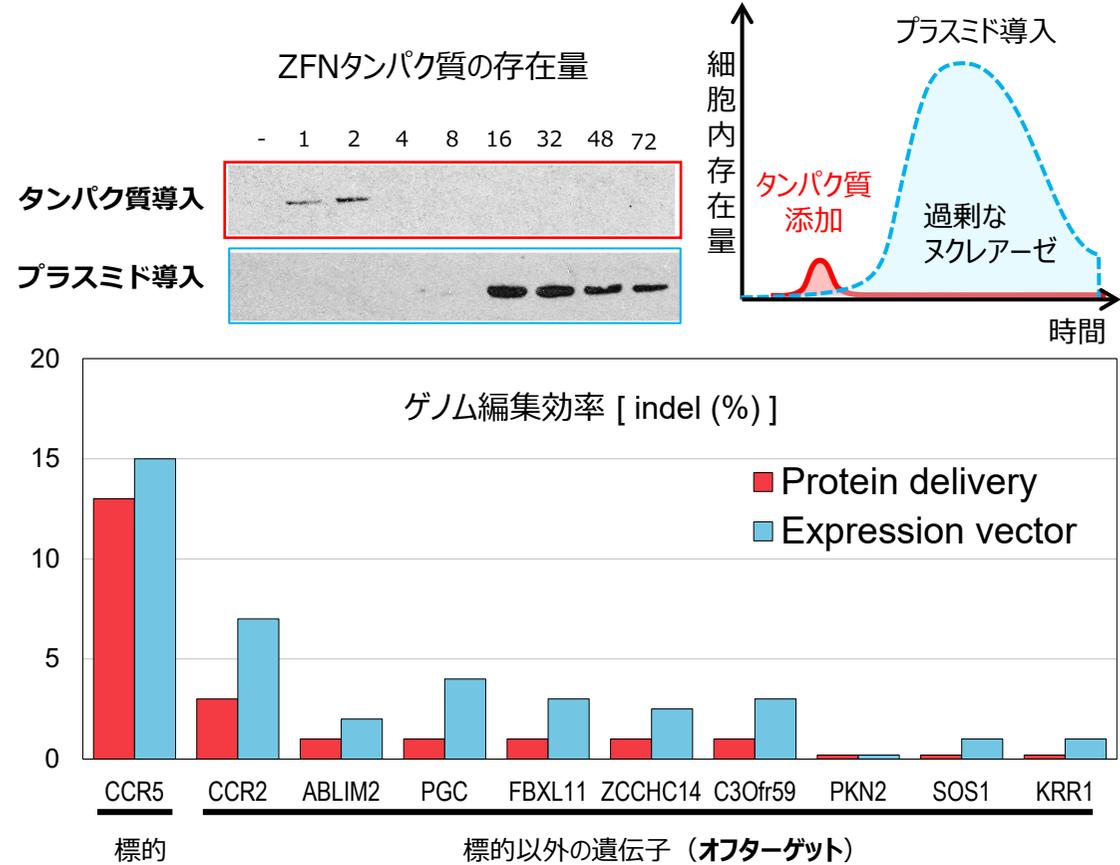
技術分野の背景(4)

デリバリー@動物

DIVE : タンパク質の自発的な取り込み



CCR5 (HIV coreceptor) 遺伝子の破壊



- 哺乳動物細胞内には、タンパク質を導入することができる。
- 遺伝子発現ベクターよりも、タンパク質導入の方が、オフターゲット作用が少なく「安全な」ゲノム編集を行うことができる。
- タンパク質導入の場合、遺伝子組換え生物に該当しない。
- セレクションマーカーが無い場合、導入細胞の濃縮が難しい。

技術分野の背景(5)

- ・異なる生物種由来の遺伝子の挿入を伴わないゲノム編集技術は、遺伝子組換え技術とは異なり、カルタヘナ法における遺伝子組換え体には該当しないため、様々な産業応用が期待されている。
- ・しかし、生物種によっては、ゲノム編集酵素等のデリバリー技術が確立しておらず、ゲノム編集細胞/個体を得ることが難しい。

従来技術とその問題点

- 特に植物を利用したゲノム編集技術の応用においては、細胞壁が文字通りの「障壁」となり、様々な生体分子の導入が難しい。
- 従来技術としては、(i)プロトプラストPEG法が知られているが、植物個体への再生が困難、(2)アグロバクテリウム法では遺伝子挿入を伴うために遺伝子組換え体の法規制に該当してしまう、という問題があった。

新技術の要点

1. **エレクトロポレーション法によるゲノム編集技術**
2. 植物個体に対するタンパク質導入・評価技術
3. 超高効率遺伝子導入法によるハイスループット遺伝子同定(農薬耐性遺伝子での実績)
4. 海外知財に依存しないゲノム編集技術

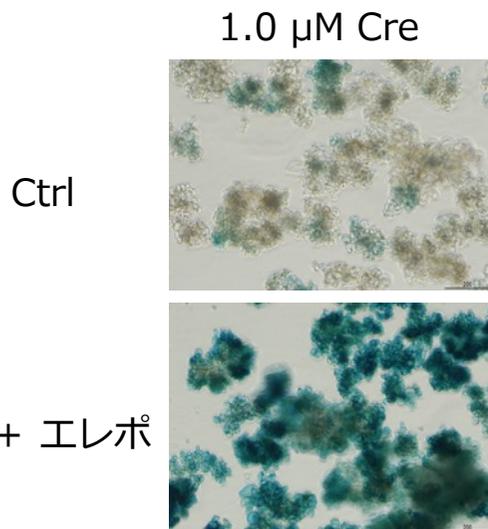
(2.~4. については口頭発表当日に紹介)

新技術(1)

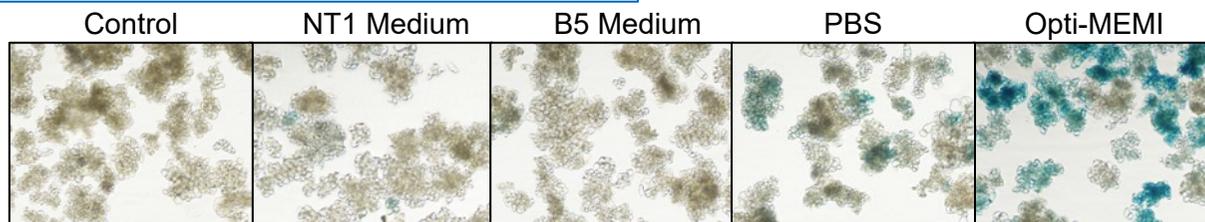
エレクトロポレーション法によるゲノム編集技術



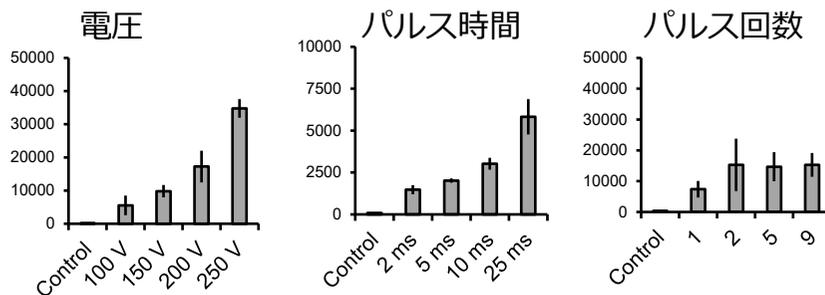
細胞壁があっても導入される



バッファー条件が最も影響を与える



ポアリングパルス：強いほど導入されるが、毒性が高くなる



Furuhata et al.,
Sci. Rep. (2019)

新技術の特徴・従来技術との比較

- 細胞壁を有している植物細胞に対してゲノム改変タンパク質を導入することに成功した。
- 従来のアグロバクテリウム法では、遺伝子挿入を伴い、薬剤マーカーも必要であったが、いずれも不要となった。
- 本技術の適用により、様々なタンパク質の導入が可能となったため、植物における幅広いゲノム編集用途が期待される。

想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、植物における医薬品原料や有用物質の生産、有用形質を示すことができるような植物代謝経路の変換に適用することが想定される。
- 上記以外に、遺伝子組換え体として挿入した遺伝子をリコンビナーゼ技術により除去する手法にも適用することが可能である。

実用化に向けた課題

- 現在、モデル植物種（シロイヌナズナ）について90%の効率でタンパク質導入が可能なところまで開発済み。しかし、他の生物種における適用実績の点が未解決である。
- 今後、他生物種について実験データを取得し、実用生物種に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、ニーズ似合わせたゲノム編集タンパク質にも適用できるように技術を確立する必要もあり。

企業への期待

- 未解決の多生物種への適用については、ナノニードルの技術により克服できると考えている。
- 実際に実用植物での植物ゲノム改編においてマーケットニーズを把握されている企業との共同研究を希望。
- また、農薬を開発中の企業、食糧資源分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 植物細胞の核内へのタンパク質導入法
- 出願番号 : 特願2020-550019、PCT/JP2019/033139
- 出願人 : 国立研究開発法人産業技術総合研究所
- 発明者 : 加藤 義雄、古旗 祐一

産学連携の経歴

- 2016年-2020年 NEDO事業(スマセル)に採択
- 2017年- 医療バイオ器具の製品化(上市)
- 2019年-2021年 診断薬開発企業Aと共同研究実施
- 2021年- 診断薬開発企業Bと共同研究実施

お問い合わせ先

産業技術総合研究所
知的財産部 技術移転室

TEL 029-862-6158

FAX 029-862-6159

e-mail aist-tlo-ml@aist.go.jp