

# 2020年度 TIA 連携プログラム探索推進事業「かけはし」

## 調査研究報告書(公開版)

### 【研究題目】

品種改良を加速する植物遺伝子編集技術のためのナノピッケルの開発

### 【整理番号】

TK20-033

### 【代表機関】

KEK

### 【調査研究代表者(氏名)】

篠田 晃

### 【TIA 内連携機関：連携機関代表者】

産総研：中村 彰良

筑波大：岩崎 憲治

### 【TIA 外連携機関】

NIMS、東大、理研

### 【報告書作成者】

篠田 晃

### 【報告書作成年月日】

2021年3月30日

### 【連携推進(具体的な連携推進活動内容とその活動の効果等)】

本課題では植物の遺伝子編集技術の開発を目指して複数の異なる分野の拠点と連携を拡大しながら研究を進めている。従来の遺伝子組み換え植物は外来 DNA を植物に導入する技術で既に実用化されているが、自然界では起こり得ない外来遺伝子を取り込んでいるため野外での栽培が多くの国で規制されている。そこで、外来 DNA を用いる従来法に代わり、遺伝子編集タンパク質を利用する手法の開発を行っている。本手法により植物の遺伝子編集を実現するためには、一定量の遺伝子編集タンパク質を植物細胞内に直接導入する技術開発が必要である。本課題では、植物細胞の強固な細胞壁を貫通もしくは透過するマテリアル(ナノピッケル)に遺伝子編集タンパク質を結合した融合マテリアルを開発し、植物遺伝子編集技術への応用を目標としてきた。しかし、そのためには数十ナノメートルの大きさを持つタンパク質と数十から数千ナノメートルの大きさを持つナノピッケルの実像を同時に測定し、相互作用を最適化する技術が重要となる。2020年度はナノサイズで十分な強度を備える有機ナノピッケルを中心に研究を進めてきた。これまでに、放射光や 200kV クライオ電子顕微鏡を含めた様々な物質の観測・分析技術を有する KEK を中心とし、120kV 電子顕微鏡および蛍光顕微鏡観察の環境が整った筑波大、タンパク質工学および植物生理学を得意とする産総研が連携することで、タンパク質-ナノピッケル融合マテリアルの評価系を確立した。しかし、計測技術と生化学の2つの分野の融合だけでは植物遺伝子編集技術の確立は成し遂げられないと考えた。そこで材料分野との連携拡大のために複数の研究室を訪問し情報交換を行いながら連携拡大の活動を行ってきた。そして、NIMS 深田研究室が開発したシリコンナノピッケル(無機ナノピッケル)に着目し、植物遺伝子編集技術への応用を視野に 2020 度から連携を開始した。シリコンナノピッケルは NIMS が有する半導体微細加工技術により、複雑な形状を高精度に設計できる事に加え、表面修飾など拡張性が高く、遺伝子編集への応用が可能である。そして、遺伝子編集タンパク質は機能性ドメインを融合することによって、局所的な特定金属との結合性の向上などシリコンナノピッケルに合わせた改変が可能である。コロナ禍のため、オンサイトを利用した連携拡大は困難であった。そこで知人の紹介等、個別に面会またはオンラインで連

携を図ってってきた。また、本課題では電子顕微鏡を利用した測定が重要な立ち位置を持っており、電子顕微鏡用のサンプル凍結手法の開発で東大や理研との連携拡大を2020年度から開始している。本事業を通じて連携拡大が進んだと共に遺伝子編集の研究体制の基盤をつくる事が出来た。

【調査研究内容（実験等中心に背景・課題と実行された課題解決の内容と結果）】

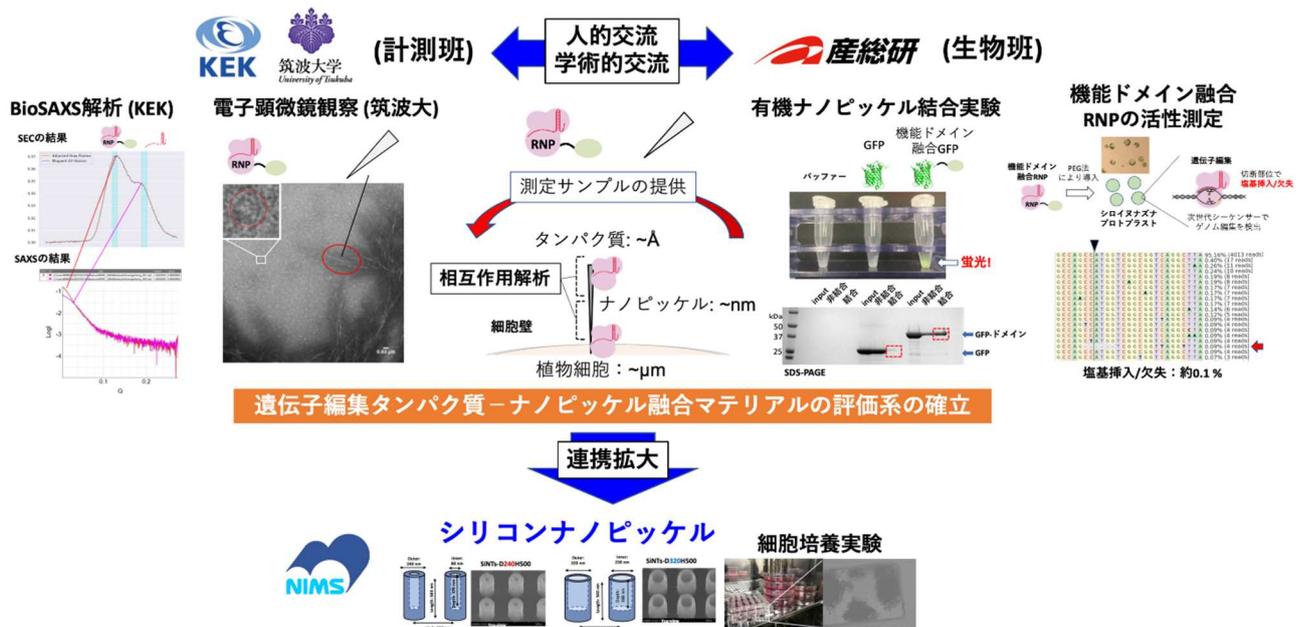
#### 背景

近年の目まぐるしい気候変動の中、食物生産の農業分野も激しい変化への適応が必要となっている。気候環境の変化や室内でのLED栽培等の栽培環境の変化に対応するために、農作物の品種改良を短期間で行う需要が世界的に高まっている。しかし、従来の品種の掛け合わせによる品種改良では数十年単位の長期間を要する。一方で生化学の研究が進んだ現在では、目的の遺伝子をピンポイントで改変可能な遺伝子編集技術が開発され急速な発展を遂げている。この手法は外来DNAを植物に導入する技術で既に実用化されているが、自然界では起こり得ない外来遺伝子を取り込んでいるため組換え植物として野外での栽培が多くの国で規制されている。そこで、DNAを用いる従来法に代わり、遺伝子編集タンパク質を利用する方法が注目されている。遺伝子編集タンパク質を直接導入し遺伝子を編集した植物は外来DNAが組換えられておらず、規制の対象外である事から迅速な品種改良が可能となる画期的な技術と期待されている。この新たな遺伝子編集技術は農作物の生産量を増やす事や、室内での栽培に最適化された作物の改良、また特定の栄養素の含有量を増やした作物の生産などに繋がる夢の技術である。しかし、本手法により植物の遺伝子編集を実現するためには、一定量の遺伝子編集タンパク質を植物細胞内に直接導入する技術開発が急務である。

#### 課題解決

本課題は植物細胞の強固な細胞壁を貫通もしくは透過するマテリアル（ナノピッケル）に遺伝子編集タンパク質を結合した融合マテリアルを開発し、植物遺伝子編集技術への応用を目標としている。植物遺伝子編集を可能とするタンパク質-ナノピッケル融合マテリアルの開発には、遺伝子編集タンパク質とナノピッケルを同時に観測し、相互作用を最適化する技術が重要となる。2020年度は有機ナノピッケルを中心に研究を開始し、生物班（産総研）により機能ドメインを融合した遺伝子編集タンパク質を設計・調製した。その後、生化学実験により融合した機能ドメインが有機ナノピッケルに特異的に結合し、調製した遺伝子編集タンパク質が植物遺伝子編集活性を有することを、細胞壁を取り除いた植物細胞を用いた実験により明らかにした。次に、調製した遺伝子編集タンパク質および有機ナノピッケルを計測班（KEK、筑波大）へ提供し、電子顕微鏡による同時観測を行った。始めに個別に溶液条件や測定濃度等の測定条件を決定し、その後のさらなる条件最適化により、遺伝子編集タンパク質と有機ナノピッケルの電子顕微鏡による同時観測を達成した。加えて、KEKの放射光を利用したX線溶液散乱（BioSAXS）にて、遺伝子編集タンパク質の溶液状態での構造情報の評価に成功した。以上の生化学解析、X線溶液散乱、電子顕微鏡観察を統合することにより、遺伝子編集タンパク質-ナノピッケル融合マテリアルの評価系を確立することができた。

加えて本課題では、NIMS 深田研究室が開発したシリコンナノピッケルに着目し、植物遺伝子編集技術への応用を視野に2020度からNIMSとの連携を開始している。これまでの予備実験でシリコンナノピッケルが植物細胞壁を貫通しうること及び、タンパク質と結合する金ナノ粒子がシリコンナノピッケル表面に結合する事を電子顕微鏡で観察している。また、細胞がシリコンナノピッケル上でも良好に成長可能であることも確認している。遺伝子編集タンパク質を導入してから実際に遺伝子が編集されるまでに24時間以上要するためシリコンナノピッケル上での細胞成長は重要であった。今後は、まず細胞壁のない細胞を対象に遺伝子編集タンパク質の導入実験に取り組み、順を追って細胞壁のある細胞の遺伝子編集に取り組む。



### 【今後の活動予定】

植物の遺伝子編集を行うべく NIMS との連携を本格的に拡大して研究体制を構築する。2021 年度は実際に植物細胞の遺伝子編集を行うと共に、遺伝子編集の効率を次世代シーケンサーで詳細に評価しながら高効率な植物の遺伝子編集手法の確立を目指す。農作物への実用を見据えて見据えて農研機構との連携拡大を視野に活動していく。これらの活動のために 2021 年度の TIA かけはし事業に継続して応募する。また、本課題は、材料科学と生物科学の融合のための計測・解析技術開発を基盤とし、その成果を細胞や生物への物質導入技術として展開することを目的としている。複数領域を融合し植物の新規品種改良技術の開発を目指す本研究は、生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）のイノベーション創出強化研究推進事業の趣旨と合致している。TIA かけはしにより構築する研究体制を基盤とし、基礎研究ステージ（3000 万/3 年）への応募を検討する。予め連携し予備検討を進めることは競争的資金の獲得において非常に重要である。また、若手研究者が中心となり連携を構築することで、次世代若手研究者の育成にも貢献できる。基礎研究ステージに採択された場合には、本研究体制を中心にさらに連携を拡大し、応用研究、開発研究ステージとステップアップを目指す。

また、本研究で確立する計測・解析技術を、新規な物質導入技術へ展開するためにも、新たな発見が得られた場合は積極的に知的財産化を進める。コアとなる知的財産の取得に成功した場合は、本研究体制を中心とする A-STEP 産学育成型（JST：上限 1500 万/年、最長 2.5 年）の獲得を目指し、企業との共同研究体制を構築する。その後は、連携企業とともに研究成果の実用化のためにも、A-STEP 産学本格型（上限 1 億円/年、最長 4.5 年）もしくは企業資金の獲得を目指す。

以上