

薬に過度に依存しない畜産物の健全育成システムの開発

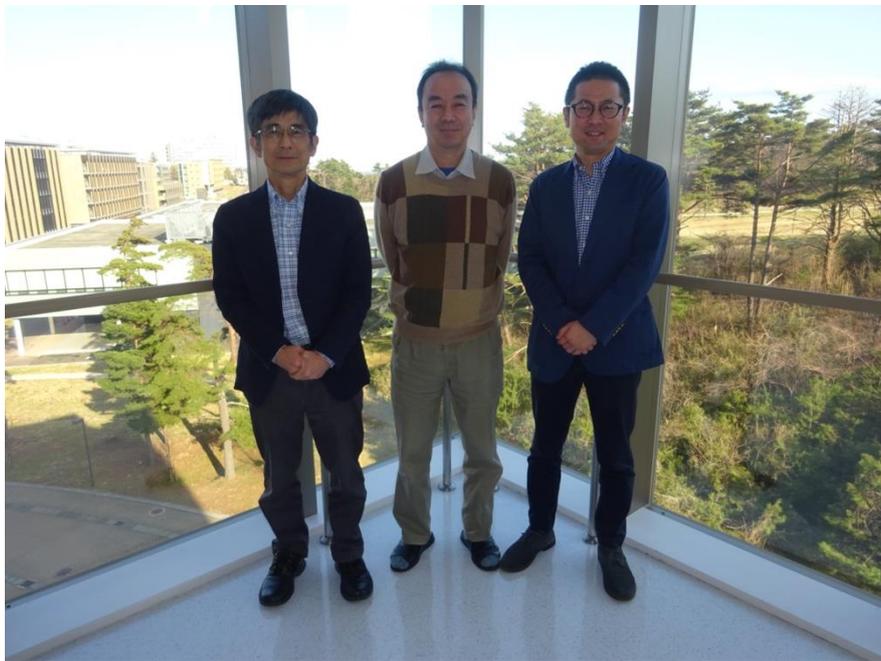
研究代表者

伊藤 幸博 東北大学大学院農学研究科

共同研究者

米山 裕 東北大学大学院農学研究科

野地 智法 東北大学大学院農学研究科



左から米山裕、伊藤幸博、野地智法

1. 研究の背景と達成目標

家畜生産や人の医療での抗生物質の大量使用により多剤耐性菌が発生、蔓延し、人の公衆衛生や家畜生産における脅威となりつつある。この問題の解決には抗生物質使用量を抑制することが必要であり、抗生物質に依存しない治療法の開発が必要である。抗菌タンパク質は、耐性菌が出現しにくく、多剤耐性菌にも効くことから、抗生物質の代替薬として期待されるが、生産コストの高さが問題となっている。本研究は、イネを用いた抗菌タンパク質の超低コスト生産手法を開発することにより、この問題の解決を目指す。そのために、ウィルスの複製機構を用いたタンパク質の大量生産手法の開発と、暗所でイネを発芽、生育させることによる低コスト生産に取り組む。

ウィルスの複製機構を用いたタンパク質の大量生産手法の開発では、植物に感染するウィルスの複製機構を利用することにより抗菌タンパク質遺伝子から転写された mRNA を増幅し、それにより翻訳される抗菌タンパク質量を増加させる手法を開発する。

暗所でイネを発芽、生育させることによる低コスト生産では、抗菌タンパク質遺伝子を導入した遺伝子組換えイネを生育する植物工場の電気コストを大幅に削減するため、暗所でイネを発芽、栽培し、タンパク質を抽出する。しかし、光合成ができない暗所でイネが生産するタンパク質量が不明であり、暗所でイネが生産するタンパク質量及びそれを増加させる条件を明らかにする。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・ウィルスの複製機構の利用に必要な配列とともに抗菌タンパク質遺伝子をイネゲノム中に導入しようとしたが、複製に必要な配列や抗菌タンパク質遺伝子が欠失したイネしか作出できなかった。タバコに導入しようとした場合も同様であった。植物に病徴を引き起こすウィルスの複製機構に関わる配列のゲノム中への挿入は、植物にとって有害であると考えられた。

- ・イネに水だけを与え、暗所で発芽、栽培すると明所で発芽、栽培した場合と同量の総可溶性タンパク質を生産することが分かった。発芽 10 日から 12 日が最も総可溶性タンパク質量が多かった。暗所でも明所と同様に抗菌タンパク質を生産できると考えられた。

- ・暗所で密植して発芽、生育させると、個体あたりの総可溶性タンパク質量は減少するが、面積あたりでは増加することが分かった。温度は 28°C が適しており、高いと総可溶性タンパク質量が減少し、低いと最大値に達するまでの日数がかかることが分かった。

- ・MS 培地（ミネラル）とショ糖を添加して発芽、生育させると、総可溶性タンパク質量が暗所では 2 倍、明所では 3 倍になることが分かった。MS 培地中の成分では硝酸体窒素の効果が大きかった。ショ糖のみの添加は総可溶性タンパク質量を減少させた。暗所では胚乳中のデンプンをタンパク質に変換するが、ミネラルがそのボトルネックになっていることが分かった。

- ・イネが生産した黄色ブドウ球菌特異的抗菌タンパク質リゾスタフィンは大腸菌で生産した市販のリゾスタフィンと同等な抗菌活性を持っていることが分かった。イネで生産したリゾスタフィンには糖鎖が付加されていると考えられたが、抗菌活性に対する糖鎖付加の影響はないと考えられた。

- ・抗菌活性も併せ持つウシのケモカイン CCL28 をコードする遺伝子をイネに導入したところ、CCL28 の RNA は検出されたが、タンパク質は検出されなかった。市販のヒト CCL28 に対する抗体を用いたため検出されなかった可能性と、CCL28 がイネに対しても毒性を示すためタンパク質の蓄積が見られなかった可能性が考えられた。

3. 研究成果

1) ウイルスの複製機構を利用したタンパク質大量生産手法の開発

植物を用いて有用タンパク質を生産する場合、栽培コストの低さや安全性など多くの利点がある一方、動物細胞や微生物と比較してタンパク質生産量が少ないという問題がある。そこで、植物に感染するウイルスの RNA 複製機構を利用して抗菌タンパク質の mRNA を増幅し、それにより抗菌タンパク質量を増加させることを考

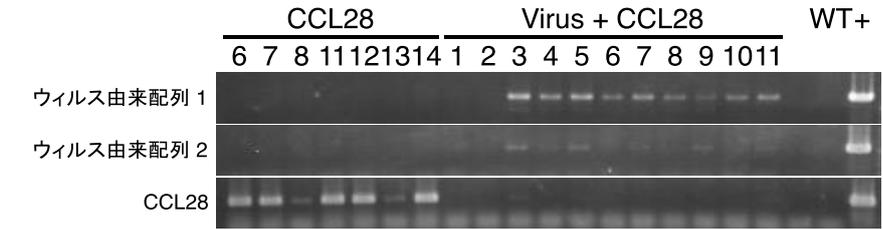


図 1、遺伝子導入イネからのウイルス由来配列と CCL28 の検出
イネゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。CCL28: 通常の遺伝子導入イネ、Virus + CCL28: ウイルスの複製機構を利用するイネ、WT: 非形質転換イネ、+: ポジコン

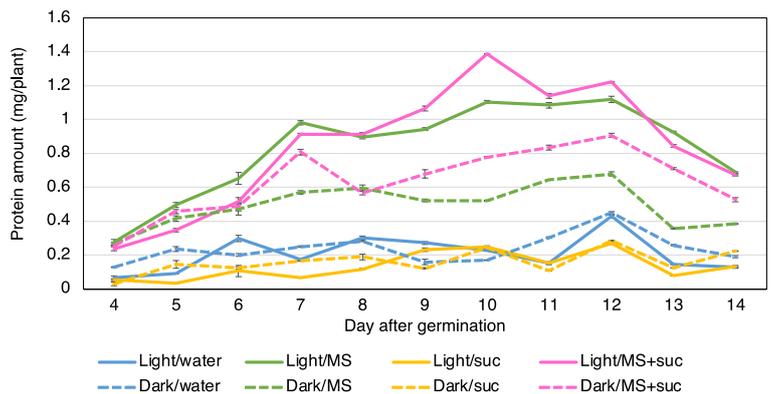
えた。植物に病徴を引き起こすウイルスの RNA 複製に関わる配列とともに抗菌タンパク質遺伝子（リゾスタフィン、CCL28）をイネゲノム中に組み込もうとしたが、作出したイネのゲノム中にウイルス由来の配列の重要な部分や抗菌タンパク質遺伝子の配列が見られなかった（図 1）。タバコゲノム中に組み込もうとした時も同様だった。ウイルス由来の配列は植物にとって有害であると考えられた。

2) 暗所で有用タンパク質を低コストで生産する手法の開発

植物を用いて抗菌タンパク質を生産する場合、遺伝子組換え体の規制と生産管理の問題から植物工場を利用することになる。植物工場では照明のための電気コストとそれに伴う空調の電気コストのため、植物で抗菌タンパク質を作る際の利点の 1 つである生産コストの低さを十分に活かさない。抗菌タンパク質を家畜疾病の利用に使う場合は低価格であることが絶対条件である。そこで、電気コストを大幅に削減できる暗所での生産を考えた。

・イネが暗所で生産する総可溶性タンパク質量

イネを暗所で発芽させ、発芽 4 日目から胚乳中のデンプンを使い切る 14 日目まで総可溶性タンパク質量を調べた。暗所で発芽させると、いわゆる「もやし」になる。その結果、1 個体当たりの総可溶性タンパク質量は発芽 12 日目で最大となり、0.45 mg であった（図 2）。明所では最大で 0.43 mg であり、暗所でも明所と同量の総可溶性タンパク質量になることが分かった（図 2）。



・総可溶性タンパク質量を増加させる条件

総可溶性タンパク質量を増加させる培地条件を調べた。その結果、MS 培地（ミネラル）とショ糖を添加すると暗所で 2 倍、明所で 3 倍に増加することが分

図 2、イネ実生 1 個体当たりの総可溶性タンパク質量
イネ実生を TBS 中で粉碎し、BSA を標品としてブラッドフォード法によりタンパク質濃度を測定した。濃度と溶液量からタンパク質量を計算した。n = 5 (以下の図も)

かった(図2)。MS培地単独でも総可溶性タンパク質量の増加は見られるが、ショ糖とともに添加した場合ほどではなかった(図2)。ショ糖単独の添加では、むしろ減少した(図2)。暗所でタンパク質を生産させるということは、胚乳中のデンプンをタンパク質に変換することであり、ボトルネックになっているミネラルとショ糖の添加により、デンプンからタンパク質への変換が増加すると考えられた。

・総可溶性タンパク質量を増加させるミネラル成分

MS培地には様々な成分が含まれている。そこで、どの成分が総可溶性タンパク質量の増加に貢献しているかを調べた。MS培地の成分を5つのグループに分け、1グループずつを除いて添加したところ、窒素あるいは硫黄を除くと総可溶性タンパク質量がほとんど増加しないことが分かった(図3)。また、窒素あるいは硫黄だけを添加しても総可溶性タンパク質量はほとんど増えないが、両者を添加するとMS培地の全成分を添加した場合と同程度になることが分かった(図4)。

MS培地中の窒素には硝酸体の窒素とアンモニア体の窒素が含まれている。どちらが総可溶性タンパク質量の増加に効果があるかを調べたところ、硝酸体窒素で効果が見られ、アンモニア体では効果が見られなかった(図5)。

・総可溶性タンパク質生産に適した温度

総可溶性タンパク質量に対する温度の影響を調べた。これまでの28°Cに加え、20°Cあるいは35°Cでも発芽、生育させた。その結果、20°Cで発芽、生育させた場合は、最大の総可溶性タンパク質量に差は見られなかったが、最大値を示すまでの日数が20日に伸びた(図6)。35°Cの場合は、日数は変わらなかったが、総可溶性タンパク質量が半減した(図6)。したがって、高温ではタンパク質生産量が減少し、低温では同量生産できるものの生産にかかる日数が伸びるため植物工場の利用効率が悪くなると考えられた。

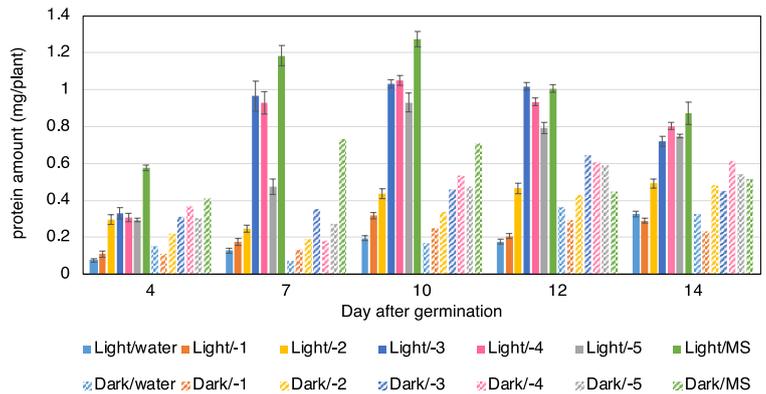


図3、MS培地成分の総可溶性タンパク質量増加への効果
-1~-5: 除外した成分グループ、各グループの成分は以下の通りである。1: NH₄NO₃, KNO₃, 2: MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, CuSO₄, 3: CaCl₂, CoCl₂, KI, 4: KH₂PO₄, H₃BO₃, Na₂MoO₄, 5: Fe(III)-EDTA

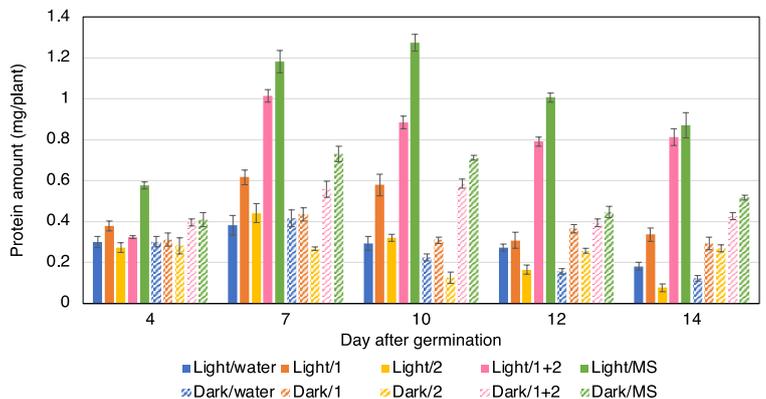


図4、MS培地成分グループ1および2の総可溶性タンパク質量増加への効果

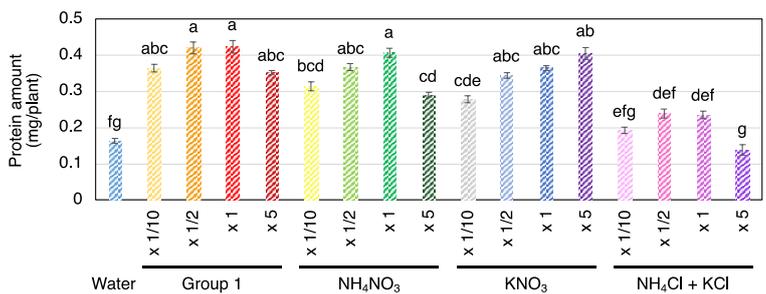


図5、硝酸体窒素およびアンモニア体窒素の総可溶性タンパク質量増加への効果

35°Cの場合、日数は変わらなかったが、総可溶性タンパク質量が半減した(図6)。したがって、高温ではタンパク質生産量が減少し、低温では同量生産できるものの生産にかかる日数が伸びるため植物工場の利用効率が悪くなると考えられた。

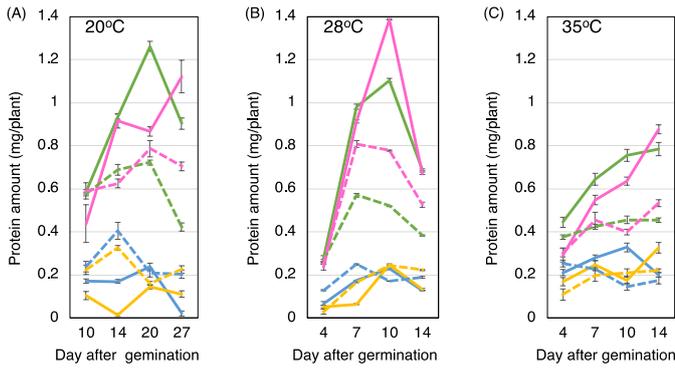


図 6、栽培温度と総可溶性タンパク質量

・栽培密度と総可溶性タンパク質量

栽培密度と総可溶性タンパク質量の関係を調べた。直径 9 cm のシャーレに、3 粒、10 粒、30 粒、100 粒播種したところ、30 粒までは個体当たりの総可溶性タンパク質量に大きな差は見られなかったが、100 粒では 5~6 割程度に減少することが分かった (図 7)。しかし、1 個体当たりの総可溶性タンパク質量にシャーレ 1 枚当たりの粒数をかけ、面積 (シャーレ 1 枚) あたりの総可溶性タンパク質量を計算したところ、100 粒が最も多くなることが分かった (図 7)。密植することにより面積あたりのタンパク質量を増加させることができると考えられた。

・イネで生産した抗菌タンパク質の活性

イネにリゾしたフィン遺伝子を導入し、祖抽出液の黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を調べた。抗リゾスタフィン抗体を用いたウェスタンブロットにより祖抽出液中のリゾスタフィン量を推計し (図 8)、大腸菌で生産した市販のリゾスタフィンと活性を比較した。その結果、イネで生産したリゾスタフィンは市販のリゾスタフィンと同等な抗菌活性を有することが分かった (図 9)。イネで生産したリゾスタフィンには糖鎖

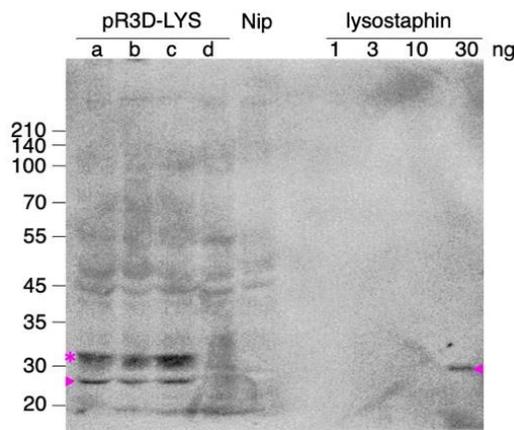


図 8、イネが生産したリゾスタフィンの検出
 ▶: リゾスタフィン、*: 糖鎖が付加されたと考えられるリゾスタフィン、pR3D-LYS: リゾスタフィン遺伝子導入イネ、Nip: 非形質転換イネ、lysostaphin: 市販リゾスタフィン

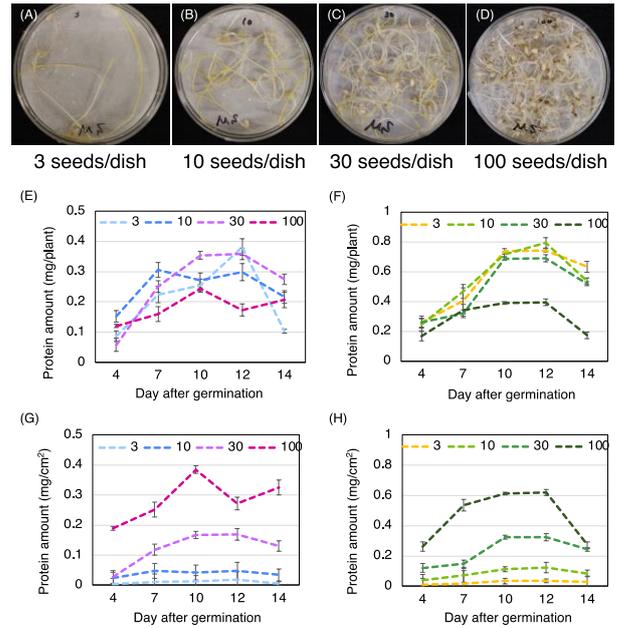


図 7、栽培密度と総可溶性タンパク質量

(A)~(D): イネの実生、(E, F)水だけ(E)および MS 培地添加(F)での個体当たりの総可溶性タンパク質量、(G, H) 水だけ(G)および MS 培地添加(H)での面積当たりの総可溶性タンパク質量

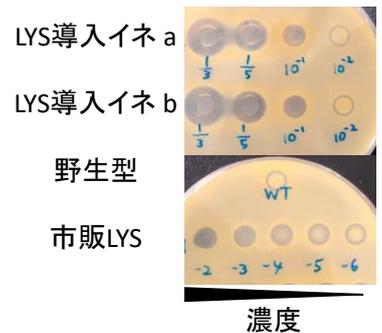


図 9、イネで生産したリゾスタフィンの黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性

図 8 で用いた祖抽出液を用いたペニシリンカップ法で調べた。白く抜けているのが阻止円で、この大きさが抗菌活性の程度を示す。

が付加していると考えられたが、活性に与える影響は見られなかった。

4. 今後の展開

暗所で発芽、生育したイネ実生が生産する総可溶性タンパク質量を調べた結果、暗所でも十分有用タンパク質の生産が可能と考えられた。今後は、各抗菌タンパク質の生産量を調べ、各抗菌タンパク質も十分生産可能であることの実証が必要である。

リゾスタフィン[®]は 100 mg の投与でウシ乳房炎の治療効果がみられるが、現在市販されているものは 1 mg あたり 1 万円前後の価格であり、1 回の治療薬代が 100 万円にもなる。暗所で発芽、生育する植物の代表であるもやしの価格を基にリゾスタフィンを暗所で生産した場合の価格を推計すると、もやしは 1 袋 200 g 入りで 20 円ほどで売られており、新鮮重の 1% がタンパク質、その 0.1% がリゾスタフィンとすると 1 袋 20 円で 2 mg のリゾスタフィンが生産でき、1 回の治療に必要な 100 mg は 1,000 円で生産できると推定される（ただし、精製コストは考慮していない）。本研究で目指しているのはこのようなタンパク質の超低コスト生産手法の開発であり、抗菌タンパク質を用いた家畜の新規疾病治療法の開発に止まらず、全てのタンパク質生産に応用可能であり、新たなタンパク質産業を生み出す基盤となるとともに、それを利用した豊かな社会の実現に貢献できると考えられる。

5. 発表実績

伊藤幸博、鳥山欽哉（2021）植物バイオテクノロジーの基礎知識 ―環境適応生物学入門― 東北大学出版会

大田原有咲、田中浩貴、小関美里、米山裕、伊藤幸博：遺伝子組換えイネ培養細胞を用いた抗菌タンパク質リゾスタフィンの生産、第 16 回東北育種研究集会、2021 年 12 月 4 日

藤田岳、米山裕、伊藤幸博：遺伝子組換えイネを用いた抗菌ペプチドの生産、第 16 回東北育種研究集会、2021 年 12 月 4 日

大田原有咲、田中浩貴、小関美里、米山裕、伊藤幸博：イネ培養細胞を用いた抗菌タンパク質リゾスタフィンの生産、第 44 回日本分子生物学会、2021 年 12 月 1 日-3 日

渡邊明子、畑中佳乃、竹島幸乃、佐々木華凜、高橋乃愛、伊藤幸博：イネが暗条件下で生産する総タンパク質量とタンパク質増加条件の探索、第 44 回日本分子生物学会、2021 年 12 月 1 日-3 日

渡邊明子、畑中佳乃、竹島幸乃、佐々木華凜、高橋乃愛、伊藤幸博：暗条件下でイネの生産するタンパク質量とタンパク質生産量を増加させる条件の探索、第 140 回日本育種学会講演会、9 月 23 日-25 日

渡邊明子、畑中佳乃、竹島幸乃、佐々木華凜、高橋乃愛、伊藤幸博：暗所でのイネのタンパク質生産量とそれを増加させる条件、第 38 回日本植物バイオテクノロジー学会大会、2021 年 9 月 9 日-11 日

渡邊明子、畑中佳乃、竹島幸乃、佐々木華凜、高橋乃愛、伊藤幸博：暗所で栽培したイネの総可溶性タンパク質を増加させる条件の探索、第 43 回日本分子生物学会年会、2020 年 12 月 2 日-4 日

渡邊明子、畑中佳乃、竹島幸乃、佐々木華凜、高橋乃愛、伊藤幸博：イネにおける暗所での総可溶性タンパク質量を増加させる条件の検討、日本育種学会第 138 回講演会、2020 年 10 月 10 日-11 日

Watanabe A, Hatanaka Y, Ito Y: Protein production under the dark condition using rice seedlings. JSOL2019, 26-27 September 2019