

# ポリヒスチジンを利用した次世代育種基盤技術の創生

研究代表者

岩崎 崇 鳥取大学農学部 准教授

共同研究者

上中 弘典 鳥取大学農学部 准教授



## 1. 研究の背景と達成目標

『遺伝子組換え技術』は、基礎・応用研究を問わず多方面で利用されつつあり、現代における必須基盤技術である。しかし、植物を対象とした従来の遺伝子組換え技術では、アグロバクテリウム感染による『植物細胞内への遺伝子導入』を必須のプロセスとしているため、アグロバクテリウムが感染しにくい(または感染しない)植物種では、組換え効率が悪い(または遺伝子組換え技術自体が適用できない)という問題点が挙げられる。

そこで本研究では、上記の律速段階(アグロバクテリウム感染による細胞内への遺伝子導入のプロセス)を、強力な細胞膜透過ペプチド:ポリヒスチジン(PolyHis)で代替することにより、遺伝子を植物細胞内へ直接導入する手法=『直接導入法』を考案した。これにより、『効率』と『汎用性』の二点において優れた次世代育種技術の基盤を確立することを目指した。

## 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・アグロバクテリウム細胞内において産生される遺伝子とタンパク質の複合体(T-DNA 複合体)に PolyHis を融合し、この複合体を抽出後に植物細胞(*N. tabacum* BY-2 細胞)に処理することで、アグロバクテリウム感染に頼らずに遺伝子組換えを実現する『直接導入法』を実証することができた(特許出願:2017-063568)。
- ・直接導入法の条件改良により、PolyHis 融合 T-DNA 複合体を植物細胞(*N. tabacum* BY-2 細胞)に処理してから、わずか3時間後に導入遺伝子を発現させることに成功した(従来のアグロバクテリウム法では3日以上を要する)。本成果は、直接導入法の高い遺伝子導入効率を証明すると同時に、直接導入法が植物遺伝子組換え実験の時間短縮に大きく貢献できることを意味する。

## 3. 研究成果

T-DNA 複合体を構成する VirD2、VirE2 の両タンパク質に、PolyHis(H0, H8, H12, H16, H20 の5通り)を融合した PolyHis 融合 VirD2、VirE2 を発現する組換えアグロバクテリウム(全25種)を構築した。この組換えアグロバクテリウムを破碎し、PolyHis 融合 T-DNA 複合体を滅菌処理(0.22  $\mu$ m 滅菌フィルター処理)した後に植物細胞に処理した(図1)。24時間後に導入遺伝子の発現を確認できたことから、直接導入法を実証することができた(図2)。しかし、初期条件では細胞毒性が発生し、一過的な遺伝子発現を達成できたのみであったため、諸条件を改善した改良法を考案した。改良法では、PolyHis 融合 T-DNA 複合体を植物細胞に処理してから、わずか3時間後には導入遺伝子の発現が確認され、その後も安定した遺伝子発現を実現することができた(図2)。直接導入法ではアグロバクテリウムの感染というプロセスを必要としないため、上記のような効率的(迅速)な遺伝子導入・発現が実現できたと考えられる。

図 1. 直接導入法の概略

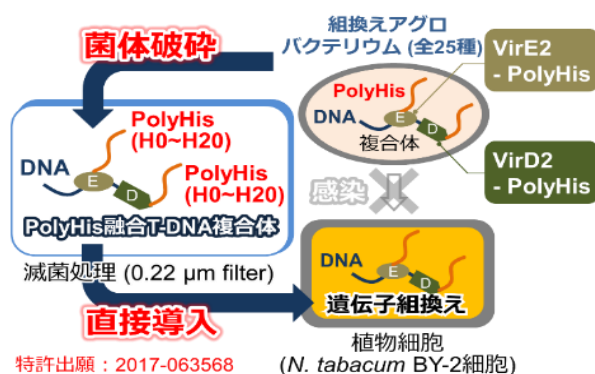
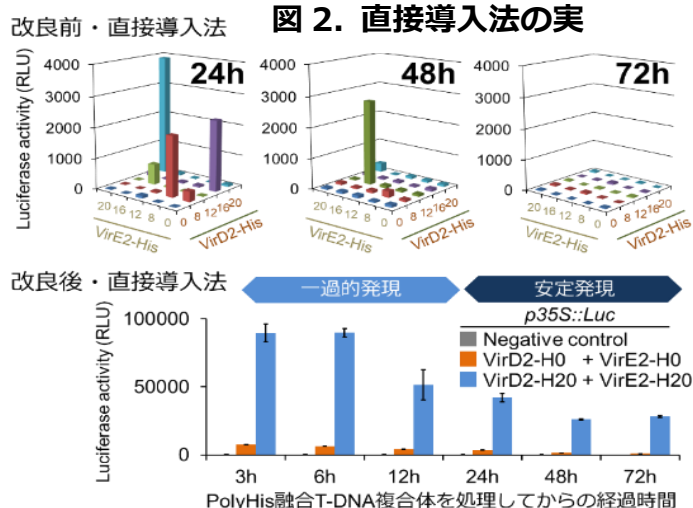


図 2. 直接導入法の実



#### 4. 今後の展開

本研究では、従来よりも効率の高い植物遺伝子組換え技術＝『直接導入法』を開発したが、現時点で本手法の有効性を実証できているのはモデル植物種であるタバコ (*N. tabacum*) のみである。一方で、現在地球上で栽培されている大部分の有用植物種は、いわゆる非モデル植物種に分類されるため、今後は非モデル植物種に対する直接導入法の実証を進めるとともに、各植物種に最適化したプロトコル開発を進める。本研究より得られた知見を基に、非モデル植物種に有効な直接導入法を実現することができれば、従来では不可能であった非モデル植物の分子育種を実現する次世代育種技術が完成する。

#### 5. 発表実績

##### 発表論文

- 1) S. Kimura, T. Kawano, T. Iwasaki. Short polyhistidine peptides penetrate effectively into *Nicotiana tabacum*-cultured cells and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 112-118 (2017)

##### 特許出願

- 1) 特許出願 2017-063568 「植物細胞に遺伝子を導入するための複合体」 発明者: 岩崎 崇、河野 強、上中弘典、三浦千裕、渡辺倫子、山崎明歳 出願人: 鳥取大学 出願日: 2017年3月29日

##### 学会発表・学術講演

- 1) 岩崎 崇: 細胞膜透過ペプチド『ポリヒスチジン』の発見と動物・植物細胞に対する応用研究 日本農芸化学会中四国支部 第26回若手研究者シンポジウム
- 2) A. Yamasaki, S. Kimura, T. Hayashi, K. Omura, T. Kawano, T. Iwasaki: Polyhistidine Peptides-Mediated Molecular Delivery into Plant Cells. AFELiSA 2017
- 3) 山崎明歳、木村さやか、大村昂誠、河野 強、岩崎 崇: 細胞膜透過ペプチド: ポリヒスチジンの植物細胞に対する分子輸送 第35回日本植物細胞分子生物学会
- 4) 山崎明歳、木村さやか、岩崎 崇: 植物細胞に対する細胞膜透過ペプチド『ポリヒスチジン』の有効性 第49回若手ペプチド夏の勉強会
- 5) S. Kimura, T. Kawano, T. Iwasaki: SHORT POLY-HISTIDINE PEPTIDES PENETRATE EFFECTIVELY INTO *NICOTIANA TABACUM* CULTURED CELLS AND *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CELLS. 第53回ペプチド討論会