

特集1

植物の細胞内小器官を自在に制御 多様な産業イノベーション創出へ

光合成をはじめ、植物は効率的に有用な物質を生産する仕組みを持っている。こうした植物の性質を産業に活用しようとする研究が、近年盛んに行われている。中でも、細胞内小器官であるオルガネラに着目するのは、ERATO「沼田オルガネラ反応クラスタープロジェクト」を率いる、京都大学大学院工学研究科の沼田圭司教授だ。オルガネラを自在に制御する技術を確立することで、物質生産に最適な機能を持つ植物を生み出す基盤技術を構築し、植物を起点とした多様な産業におけるイノベーション創出を目指す。



ぬまた けいじ
沼田 圭司

京都大学 大学院工学研究科 教授／
理化学研究所 バイオ高分子研究チーム
チームリーダー
2016年よりERATO研究総括

ゲノム編集よりも手軽に 目標は高機能の新物質生産

二酸化炭素削減やエネルギー問題の解決に向け、近年、生物を利用した物質生産が注目を集めている。光合成に代表されるように、植物は有用な物質を効率よく生産できるため、この仕組みを食料やエネルギーだけでなく、材料や医薬品などの生産に活用できれば、さまざまな社会課題の解決にもつながると期待されているのだ。しかし、生物が持つ物質生産の仕組みは非常に複雑で、根本からそのメカニズムを解明するまでには至っていない。そのため、望みの物質を生産するのに最適な生物を、自在に設計する段階にはいまだ達していない。

ERATO「沼田オルガネラ反応クラスタープロジェクト」を率いる、京都大学大学院工学研究科教授で、理化学研究所環境資源科学研究センターバイオ高分子研究チームの沼田圭司チームリーダーも、生物を利用した物質生産の研究に取り組む1人だ。沼田さんは博士課程で高分子の結晶構造解析を学んだ後、米国に留学し、再生医療や生体材料として用いられる絹たんぱく質に含まれるベータシート構造の毒性評価や、細胞内に目的の分子を送り込む手法開発などを手掛けてきた。「高分子科学に軸足を置きながら、細胞の扱いやさまざまな物質の導入手法を習得していきました」と当時を振り返る。

帰国した沼田さんは理化学研究所



図2 ペプチドの様々な機能を活かして、目的の物質を植物の特定の場所へ送り届ける。

で、植物細胞にバイオプラスチックの一種であるポリヒドロキシアルカン酸を作らせる研究に着手した。しかし、核DNAを改変しても、期待したほどの量は得られなかった。理由を調べたところ、オルガネラの1つであるミトコンドリア由来の物質が不足していることが原因だった。「いくら核DNAを操作しても、オルガネラの機能が高まらないと、実際に生物に必要な物質を大量に作らせることは難しいと考え、遺伝子を改変する分子を送り込む対象にオルガネラを加える必要があると考えました」と語る。

オルガネラの改変では使い勝手の良い手法がなく、研究も進んでいなかったことから、手法開発は必須だった。一方で、DNAの改変も新たな手法が必要だったと沼田さんは語る。「核DNAの改変ではCRISPR-Cas9などのゲノム編集技術が広く利用されるようになりました。しかし、植物細胞の場合、CRISPR-Cas9で核

DNAを編集した後、そのCas9遺伝子を核DNAから抜く必要があります。もっと手軽な手法が必要だろうと考えました」と説明する。

最終目標は植物で高機能な新物質を作り、新規材料を創出することと語る沼田さん。核DNAやオルガネラなどの改変技術を個々に確立するだけでは、目標を達成することは難しいと考え、より大きな目標を新たに打ち立てた(図1)。植物の物質生産に関わるあらゆる機構を、オルガネラの機能や相互作用から解き明かし、植物の形質改良の基盤技術を確立したいと、ERATOのプロジェクトを立ち上げた。

人工細胞膜透過性ペプチド創出 葉緑体、ミトコンドリアにDNA導入

ERATOでは当初、「融合ペプチド設計グループ」、「オルガネラ改変グループ」、「オルガネラ相互作用グループ」の3グループを組織して研究を進めていた。融合ペプチド設計グループは、高分子化学の知識を生かして細胞内に分子を運ぶペプチドの設計を担う。得られたペプチドを使って、オルガネラ改変グループが核やオルガネラのDNAを改変し、その遺伝子発現をオルガネラ相互作用グループがさまざまな機器を用いて確認していく。現在は、他の研究機関との共同研究を見据え、藻類やヒトの細胞を扱う研究者が参加する「融

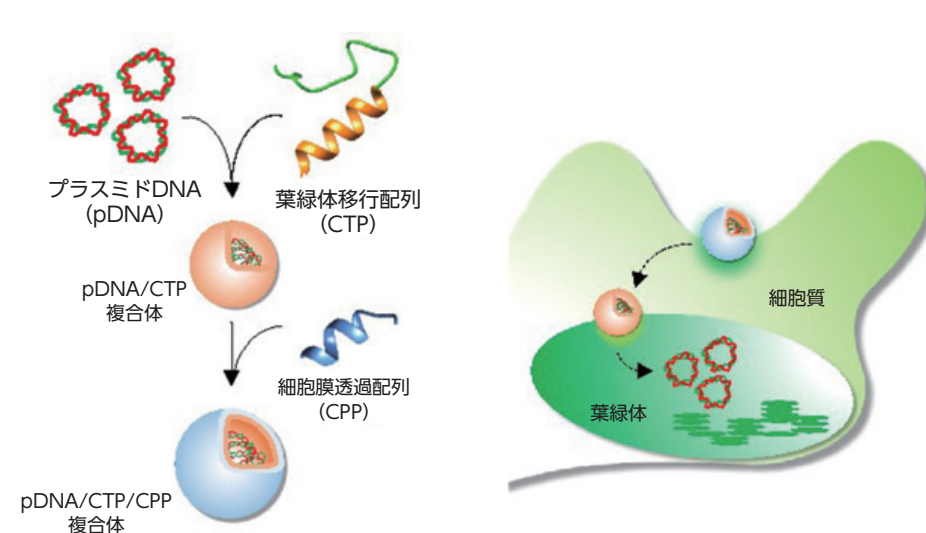


図3 プラスミドDNAと葉緑体移行配列を含むペプチドを複合化し、さらにCPPを含むペプチドを添加することで、2つの機能性ペプチドを含むクラスターを形成し、それを植物内部の色素体へ導入することに成功した。

合ペプチド利活用グループ」も加えた4グループで研究を進めている。

すでに植物ミトコンドリアへの選択的DNA導入に成功していた沼田さんは、さまざまな植物細胞により効率よく侵入する細胞膜透過性ペプチド (CPP) の探索を行った(図2)。動物細胞でよく使われるペプチドを中心とした55種のCPPからなるライブラリーを作製し、タバコ、シロイヌナズナ、トマト、ポプラ、イネなどの植物を材料として、導入効率と導入様式を評価した。その結果、植物種や組織によって、CPPの導入効率や局在性が異なること、さらに用いた植物種全てに効果的なCPPも複数種同定した。

次に、得られた知見を基に植物や藻類が持つ色素体へDNA導入を試みた。色素体へ送り込みたい環状のプラスミドDNAと葉緑体への取り込みを促進する葉緑体移行配列を持つ

ペプチド、プラスに帯電したペプチドの複合体にCPPを添加したクラスターを作り、モデル植物のシロイヌナズナの葉に注入した。その結果、もくろみ通りDNAを葉緑体に導入することに成功した(図3)。

この成功を受けて、同様の手法を使い、タバコの葉の葉緑体、トマト果実、ジャガイモの地下茎にそれぞれ存在する色素体のクロモプラスト、アミロプラストに、DNAの導入を試みた結果、効率や導入時間に差はあったものの、全ての実験に成功し、導入したDNAの発現を確認することができた(図4)。狙い通り、目指した技術の1つを実現した形だが、課題もあったと沼田さんは語る。「この実験で使ったCPPや複合体は導入効率が低かったんです。植物細胞を用いて物質生産しようと思うと、導入効率を大幅に上げる必要があります」。そこで

次に沼田さんはCPPの改良に取り組んだ。

効率的なCPPを見つけるために、過去、同様の働きがあると報告されているペプチドを全て試してみたが、対象となる細胞によって透過しやすさにばらつきがあった。そこで沼田さんは天然には存在しない人工のアミノ酸を加えることで、ペプチドを分解する酵素に対する安定性を高めることに成功した。

また、細胞への取り込まれ方によって、標的とするオルガネラに運ばれるかどうかが変わるという。例えば、細胞膜にくぼみができて、そのくぼみに囲まれるように取り込まれるエンドサイトーシスは、植物細胞なら液胞に、動物細胞ならリソソームに運ばれてほとんどが分解されてしまう。これでは細胞内に分子を送り込む効率を高められたところで、狙ったオルガネラに到達して、そこでDNAを操作するなどの機能を動かせることは難しい。

たんぱく質の直接導入に成功 人工ペプチドで効率も20倍に

こうした課題は、植物に限ったものではないと沼田さんは指摘する。狙った臓器の細胞に薬剤を送り届けるナノキャリアの開発でも、エンドサイトーシスを回避する方法の確立は同様に課題となっているという。「効率的な細胞膜透過性配列を目指してさまざまな人工の機能性ペプチドを合成していたところ、あるペプチドがたまたまエンドサイトーシスではな

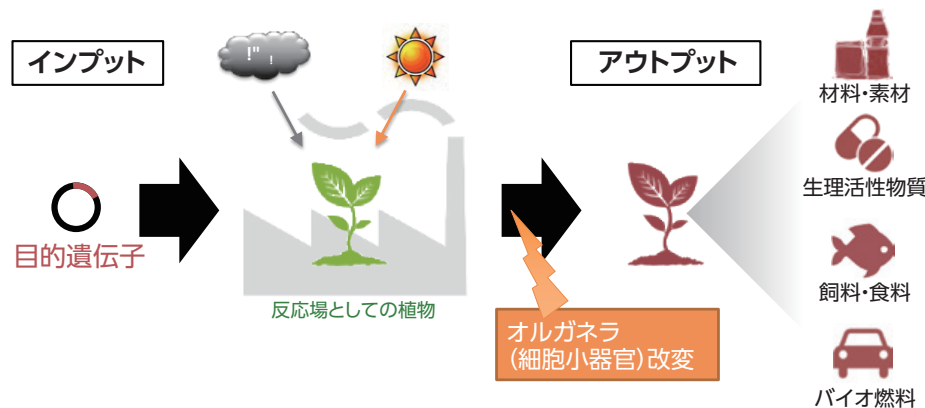


図1 植物オルガネラを利用した物質生産

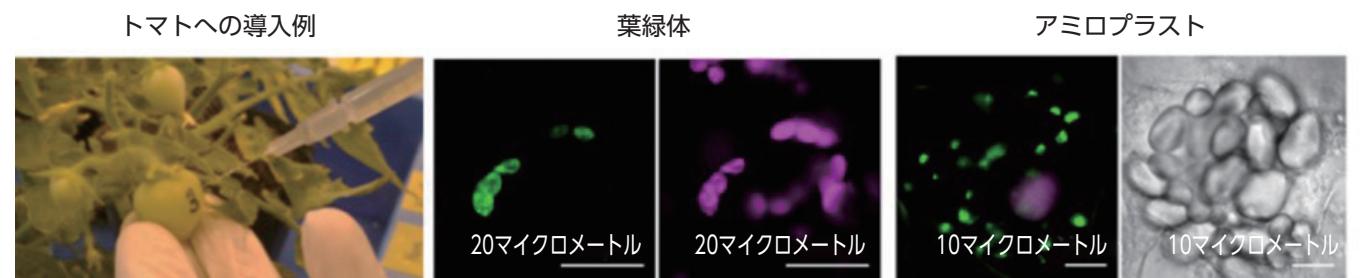


図4 トマト果実にペプチドとDNAのクラスターを導入している様子(左)。タバコ葉の葉緑体の共焦点レーザー顕微鏡画像(中央)。左側の緑がレポーター遺伝子の発現を示す。ピンク色が葉緑体。ジャガイモの地下茎のアミロプラストの画像(右)。左側の共焦点レーザー顕微鏡画像では、ピンク色がレポーター遺伝子の発現、緑色がクロロフィルを示し、右側の明視野像で無色のアミロプラストが集まっている様子を示している。

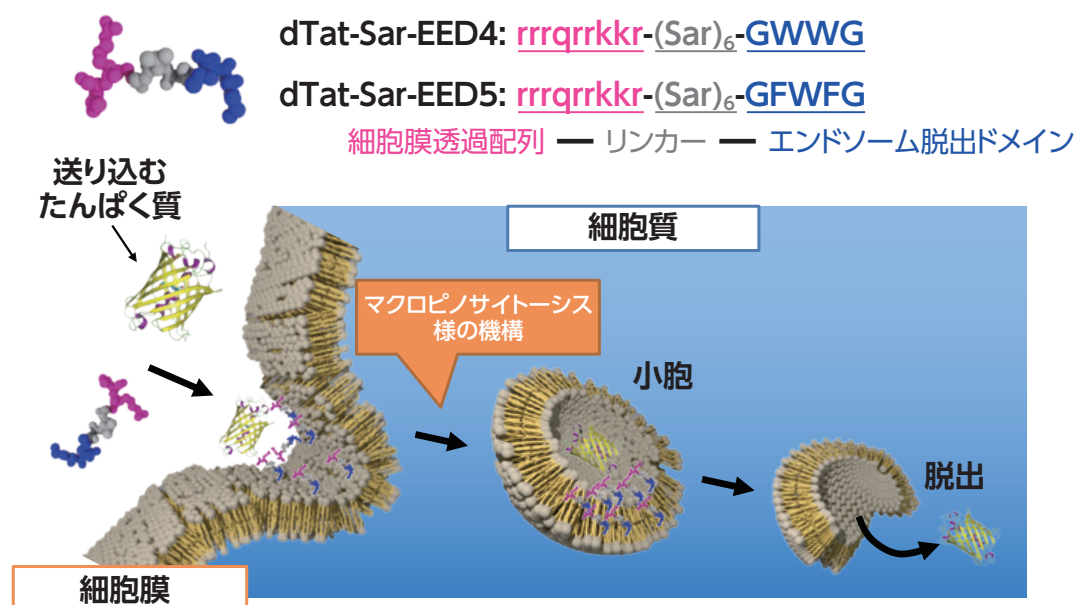


図5 マクロピノサイトーシスは、細胞外の物質を細胞内へと取り込む機構の一種で、取り込みの過程で特徴的な細胞膜の突出構造と直径200ナノ(10億分の1)メートルを超える細胞内小胞の形成が見られる。

い経路で入っていることがわかりました」と笑顔を見せる。解析した結果、これまで植物細胞では報告のなかったマクロピノサイトーシスという取り込み機構に似た現象を誘起して、細胞内に侵入していたことを明らかにした(図5)。

こうして得られた機能性ペプチド(dTat-Sar-EED4)を使い、植物へ機能性たんぱく質の直接導入にも挑戦した。dTat-Sar-EED4と加水分解酵素との複合体を作成し、タバコの培養細胞やシロイヌナズナの子葉などのモデル植物に導入できるかどうかを試したところ、細胞内で酵素が発現する様子を蛍光顕微鏡で確認することができた(図6)。「これまで植物細胞に用いられてきたCPPと比較して、最大で20倍も導入効率が高いことも確かめられました。今後、オルガネラを改変する上で強い武器になりそうです」と手応えを口にする。

一方、植物細胞の核DNAを簡便に改変する技術の研究でも成果が得られている。沼田さんらはCRISPR-Cas9でゲノムを切断する働きを持つたんぱく質のCas9を直接、細胞に導入する技術の研究に取り組んだ。たんぱく質を内包できるナノサイズのカプセルを利用し、この表面

にCPPを取り付けて、シロイヌナズナの組織から作成した未分化細胞の塊であるカルスに導入したところ、効率的に細胞内に侵入でき、標的の遺伝子に典型的な変異を生じさせることに成功した(図7)。

従来のCRISPR-Cas9で必要となる遺伝子を組み込み、細胞内部で発現させてDNAを改変する方法よりも簡便になっただけでなく、狙った遺伝子以外も破壊してしまうオフターゲット

トが少なくなったという。より安全な植物のゲノム編集技術として期待されている。また、最新の研究でスプレーを噴霧することで核酸を植物に導入し、植物の改変を行うという、より簡便な手法の開発にも成功したという(図8)。「これらの手法は汎用性の高い安全なゲノム編集技術として、さまざまな実用植物の品種改良にも使われていくことになるでしょう」と語る。

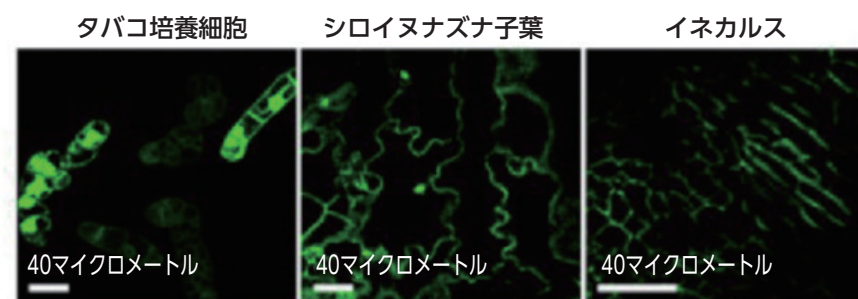


図6 人工膜透過ペプチド(dTat-Sar-EED4)により加水分解酵素β-グルクロニダーゼ(GUS)が活性な状態で、三つのモデル植物へそれぞれ導入されたことを示す蛍光顕微鏡画像。



図7 ナノカプセルに内包したCas9 RNPを植物カルス細胞内へ送達し、ゲノム編集を行う。

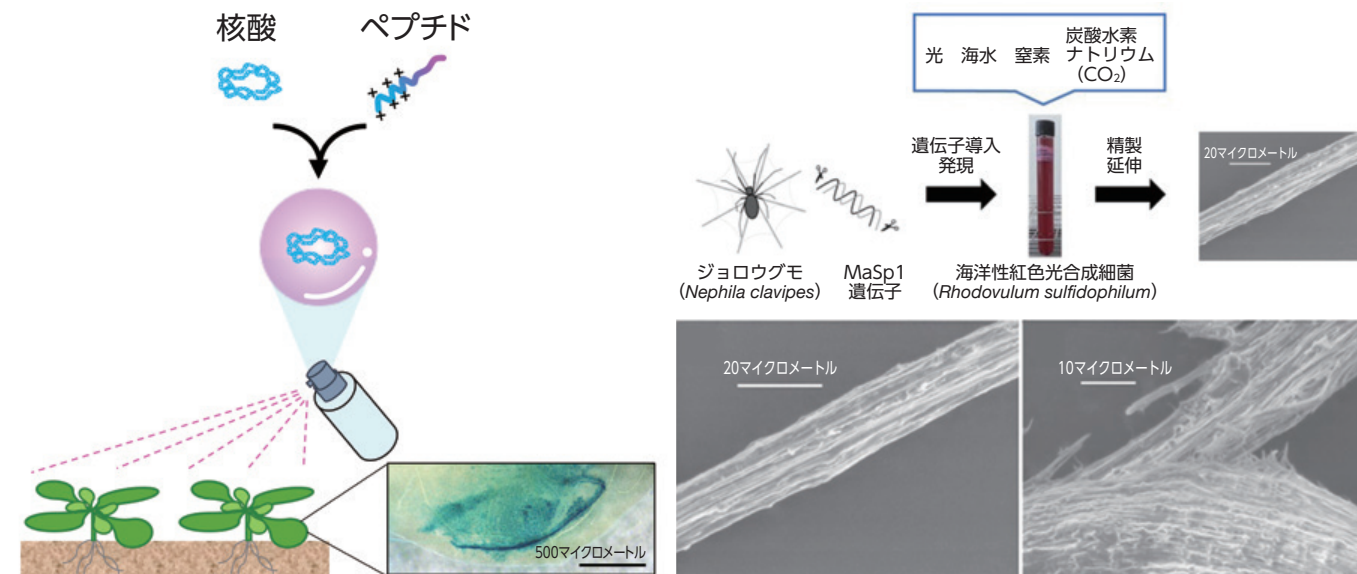


図8 スプレーによる植物体への核酸-ペプチド複合体の噴霧

図9 海洋性の紅色光合成細菌を730ナノメートルの赤外LED照射下、人工海水中で炭素源となる炭酸水素ナトリウムと窒素源となる窒素ガスを加えながら培養すると、クモ糸シルクが得られる。MaSp1たんぱく質から得られたファイバーの走査型電子顕微鏡像(左下)。ファイバーの破断面の走査型電子顕微鏡像(右下)。

産業応用見据えクモ糸を合成 相互作用の解析が次なる課題

これらの基盤技術を用いた応用研究もすでに始まっている。その一例が、クモの糸を光合成細菌に作らせる研究だ。クモが作り出すシルクは軽量でありながら鋼鉄にも匹敵する韧性を持つことから、強い衝撃への耐性が求められる建築構造材料への応用も期待されている。しかし建築構造材料に利用できるほど大量のクモ糸シルクを、飼育しているクモからの抽出だけで得ることは難しく、さまざまな生物の細胞に遺伝子を導入して大量生産する技術の開発が進められている。

沼田さんらは、ジョロウグモの糸の主成分であるMaSp1たんぱく質の遺伝子を、紅色光合成細菌に導入して作らせることに成功している。得られたMaSp1を有機溶媒の中で延伸したところ、クモの糸によく似た繊維になり、電子顕微鏡で観察すると、破断面から内部が繊維構造となることを確認した(図9)。9リットルの大型培養槽での試験も進んでおり、実用化されれば、温室効果ガスを削減しながら有用な物質を合成できると期待されている。

他にも培養細胞を利用した天然ゴムの合成や、均質な人工木材を生産する研究も始まっている。しかし、実際に産業応用するためには、さらなる

生産効率の向上が欠かせない。「そのためにはオルガネラ同士の複雑な相互作用を解明していく必要があるでしょう」と沼田さんは次の課題を見据える。

その手がかりの1つとして、すでに葉緑体との相互作用によりミトコンドリアが小刻みに揺れる現象を報告している(図10)。細胞内では異なる性質のオルガネラが相互作用し、物質の代謝に関与していることが明らかになっている。こうした知見が蓄積され、個々のオルガネラの機能を高めるだけでなく、相互作用を制御することで細胞の代謝能力も向上できれば、沼田さんの描く未来への確かな一歩となるに違いない。

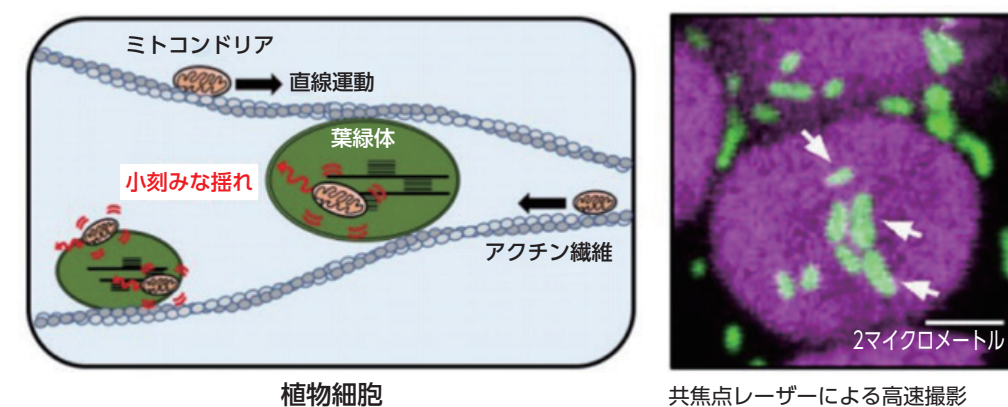


図10 シロイヌナズナ葉肉細胞内におけるミトコンドリア運動のイメージ(左)とその様子を共焦点レーザー顕微鏡で高速撮影した画像(右)。直線的な運動とは異なる小刻みな揺れが葉緑体との相互作用に相関することを明らかにした。