

レタスにおいて遺伝子組換えタンパク質の発現量を向上させる方法を確立

医薬品などには遺伝子組換えタンパク質がしばしば用いられ、その生産手段の一つに、植物を宿主とした一過的タンパク質発現系の利用があります。本研究では、宿主としてレタスを用いる際、RNA依存性RNAポリメラーゼの発現を抑制することで、遺伝子組換えタンパク質発現量の上昇に成功しました。

医薬品などに用いられる有用な遺伝子組換えタンパク質を生産する手段の一つに、植物を宿主として特定の遺伝子を組み込んだ細菌を感染させ、その遺伝子を持つタンパク質を植物内に蓄積させる方法があります。本研究グループはこれまでに、植物において大量のタンパク質を生産することができる独自のシステム（以下、「つくばシステム」という）を開発しています。これにより、大腸菌などの異種タンパク質発現系に匹敵する量のタンパク質の発現が可能です。

そこで、本研究では、宿主としてレタスを用い、遺伝子組換えタンパク質の発現量を上げることを試みました。植物において外来遺伝子の発現を抑制する際、RNA干渉とよばれる機構がはたらきますが、その中心的な役割を果たす因子としてRDR（RNA依存性RNAポリメラーゼ）があります。このRDR遺伝子の発現を抑制すると、従来の2倍以上の遺伝子組換えタンパク質の発現量の上昇が認められました。この収量は、レタスにおいてこれまでに報告されている発現量としてはトップであり、本手法の有効性を示しています。

通常、タンパク質を生産する際の宿主にはベンサミアナタバコが使用されますが、レタスは植物工場での主要な生産植物であり、これを宿主に用いることで、遺伝子組換えタンパク質の大量生産につながると期待されます。

研究代表者

筑波大学生命環境系

三浦 謙治 教授

研究の背景

医薬品などに用いられる有用な遺伝子組換えタンパク質を大量に作製する手段の一つに、微生物や動植物の細胞などを宿主とし、目的の遺伝子を導入するためのベクター（ウイルスなど）に感染させて細胞内で合成する方法があります。とりわけ、コストや持続可能性の点からは植物の利用が注目されており、本研究グループではこれまでに、アグロインフィルトレーション^{注1)}を用いた植物におけるタンパク質生産システムとして、「つくばシステム」と呼ばれる方法を開発しています。これにより、大腸菌などを用いたシステムに匹敵する収量が得られます。この方法では、遺伝子組換え植物を作出する必要がなく、アグロバクテリウム（土壌細菌）を植物に感染させて3～7日で、目的の遺伝子組換えタンパク質を得ることができます。（<https://sites.google.com/view/tsukubapmcb/research/tsukuba-system>）

このような、植物におけるタンパク質発現システムを用いる場合、通常は、宿主植物としてベンサミアナタバコが用いられますが、収量が高い反面、栽培環境制御などに関する知見は十分ではありません。一方、レタスは、植物工場での生産において数多くの研究や実証が行われているものの、タンパク質の発現に関しては、「つくばシステム」を用いてもベンサミアナタバコを用いた場合の1/8以下であり、宿主として利用することは困難でした。

本研究では、宿主としてレタスを用い、遺伝子組換えタンパク質生産の収量を向上させることを目的としました。

研究内容と成果

植物を含めた真核生物では、ウイルス感染に対する防御機構としてRNAサイレンシングという機構が存在しており、外部から遺伝子が導入された場合に、RNA分解や翻訳抑制などによって、その遺伝子の発現を抑えることが知られています。RNA分解において重要な役割を果たすのがRNA干渉（RNAi）^{注2)}で、特にRDR（RNA依存性RNAポリメラーゼ）^{注3)}のはたらきが大きく関わっています。そこで、本研究ではRDRの発現抑制が、導入遺伝子の発現上昇につながると考えました。

レタスのRDR遺伝子は5種類あり、RDR1およびRDR6遺伝子の発現をRNAiにより一過的に抑制しました。その際に、導入遺伝子として緑色蛍光タンパク質（GFP）をレタス葉にて発現させたところ、約3倍の発現量の増加が認められました（参考図上左）。RDR遺伝子の発現抑制を行った場合、GFPの発現量は約1 mg/g 新鮮重^{注4)}であり、発現抑制を行わない場合（0.3 mg/g 新鮮重）に比べて、発現量が向上していることが明らかとなりました。さらに、スーパーマーケットで購入した市販のレタスを用いた場合でも、RDR遺伝子の発現抑制を行うと、発現量が約2倍に増加しました（参考図上右）。同様の発現量上昇は、導入遺伝子としてシラカバ花粉アレルゲンBet v 1を用いた際にも確認されました。以上のことから、RDR遺伝子の発現抑制により、レタスにおける遺伝子組換えタンパク質の発現が上昇することが示されました。

今後の展開

本研究により、レタスでも十分な量の遺伝子組換えタンパク質を生産できることが分かりました。このことは、植物工場における遺伝子組換えタンパク質生産の可能性を示唆しています。また、RDR1およびRDR6の発現抑制で遺伝子組換えタンパク質の生産量が向上したことから、これらの遺伝子をゲノム編集によりノックアウトさせたレタスを用いれば、より生産性の向上につながると期待されます。

参考図

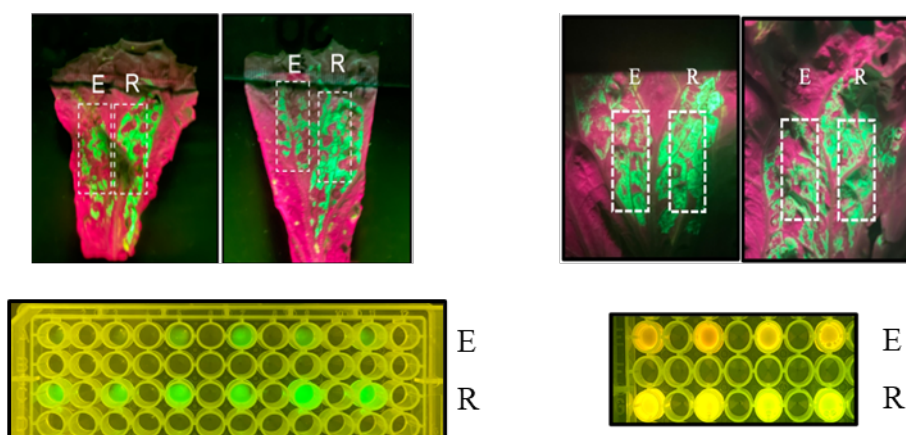


図 レタスにおける遺伝子組換えタンパク質の作製

上図：レタスにおいて、GFP を作製させる際に空ベクター（E）あるいは *RDR* 遺伝子発現抑制用 RNAi ベクター（R）を持つアグロバクテリウムを共に感染させた結果（左：実験的に栽培したレタス、右：市販品レタス）。いずれも *RDR* 遺伝子を発現抑制させると、GFP の発現量が向上した。

下図：レタスからの粗抽出液。GFP の緑色蛍光強度の違いが明らかである。

用語解説

注1) アグロインフィルトレーション

特定の遺伝子を組み込んだアグロバクテリウムを植物体に感染させ、当該遺伝子を発現させる技術。感染後、数日で目的の遺伝子組換えタンパク質を得ることが可能。

注2) RNA 干渉 (RNA interference; RNAi)

mRNA に対して相補的な配列を持つ一本鎖 RNA とその逆鎖である一本鎖 RNA からなる二本鎖 RNA によって、遺伝子発現抑制を行う現象。さまざまな生物で内在性の小分子 RNA が RNA 干渉により遺伝子発現制御に関わっており、生体の恒常性を維持している。さらに、外部から二本鎖 RNA を投与することによっても同様のメカニズムによって遺伝子発現を抑制することができる。

注3) RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase)

鋳型の RNA と相補的な RNA の合成を触媒する酵素。

注4) 新鮮重

水分を含んだ状態での重量。

研究資金

本研究は、JST 産学共創プラットフォーム共同研究推進プログラム (JST-OPERA, JPMJOP1851) の一環として実施されました。

掲載論文

【題名】 Silencing of *RDR1* and *RDR6* genes by a single RNAi enhances lettuce's capacity to express recombinant proteins in transient assays.

(*RDR1* と *RDR6* 遺伝子の RNAi による発現抑制によりレタスにおける一過的組換えタンパク質発現量の向上)

【著者名】 A. Ramadan, K. Oka, K. Miura

【掲載誌】 *Plant Cell Reports*

【掲載日】 2024年9月24日

【DOI】 10.1007/s00299-024-03324-6

問合わせ先

【研究に関すること】

三浦 謙治 (みうら けんじ)

筑波大学 生命環境系 教授

URL: <https://sites.google.com/view/tsukubapmcb>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報局

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp