

機能性リポソームを利用したオルガネラ育種技術の開発

鳥取大学 農学部
岩崎 崇

1. 研究の目的と背景

『ゲノム編集技術』は、狙ったゲノム領域を編集することで生物機能を改変する革新的技術として、基礎研究から応用研究（例：医療や農作物品種改良）までの幅広い分野で利用されつつある^{1,2}。しかし、植物（農作物）を対象とした従来のゲノム編集技術には、『汎用性の低さ』と『操作に多大なる時間と煩雑さを伴う』という二つの致命的な課題が存在している。この最大の理由として、従来の植物ゲノム編集技術は遺伝子組換え技術に依存している点が挙げられる。従来の植物ゲノム編集技術では、遺伝子組換えによりゲノム編集酵素 Cas9 遺伝子を植物細胞内に導入し、ゲノム編集を誘導した後に、ゲノム編集酵素 Cas9 遺伝子を欠失した個体を選抜することで、ゲノム編集個体を取得するという煩雑な手法が用いられる。しかし、遺伝子組換え技術が適用できない植物種にはゲノム編集酵素 Cas9 遺伝子が導入できないため、現在ゲノム編集が可能な植物種は一部に限られている。また、外来遺伝子であるゲノム編集酵素 Cas9 遺伝子を植物細胞に一度導入するため、この外来遺伝子を除去しない限りは遺伝子組換え生物として扱われる（カルタヘナ法の規制対象となり、そのままでは実用化は不可能である）。さらに、外来遺伝子の除去は交配を繰り返すことでのみ可能であり、ゆえにゲノム編集酵素 Cas9 遺伝子の除去には多大なる時間を要するという問題点が存在する。これらの問題点が、ゲノム編集を利用した農作物育種の爆発的普及を妨げている要因である。

しかしその一方で、2018年9月には環境省から「ゲノム編集（遺伝子欠失・置換）は遺伝子組換えに該当しない」旨の方針が発表され、ゲノム編集を利用した農作物の社会的受容が一気に高まりつつあるのも事実である。さらに続いて、2019年3月には厚生労働省から「ゲノム編集技術を応用した食品のうち、外来遺伝子が残っていないものについては、開発者が届け出のみすれば、国の安全性検査を受けなくても流通・販売できる」とする方針が発表されている。このように、ゲノム編集技術により開発された農作物（食品）に関する規則と市場が構築されていく中で、「遺伝子組換えに頼らない（外来導入遺伝子が残らない）農作物ゲノム編集技術」の開発は急務であると言える。

そこで本研究では、遺伝子組換え技術に頼らない植物ゲノム編集技術の開発を試みた。具体的な手法として、植物細胞内にゲノム編集酵素 Cas9 を直接導入する手法を開発

することで、遺伝子組換え技術を使わずに植物細胞をゲノム編集する技術の開発に挑戦した。しかしながら、植物細胞は強い負電荷を帯びた細胞壁を有しているため、タンパク質を植物細胞内へ導入しようとした場合、塩基性タンパク質は細胞壁にトラップされ、一方で酸性タンパク質は細胞壁にはじかれてしまう。パーティクルガンのように、特殊・高価な専用装置を使用することで、強制的に植物細胞内にタンパク質を導入する手法も存在するが³⁻⁵、植物細胞内に簡便にタンパク質を導入する手法は現在ほぼ皆無である。

そこで本研究では、『植物細胞膜透過ペプチド』と『リポソーム』を組み合わせた独自の分子輸送キャリアーを構築して、植物細胞内の標的オルガネラにゲノム編集酵素 Cas9 を直接輸送することで、遺伝子組換え技術に頼らない植物オルガネラゲノム編集技術の開発を目指した。我々はこれまでに、植物細胞に有効な細胞膜透過ペプチド『ポリヒスチジンペプチド』を開発した^{6,7}。特に、ヒスチジンが20残基連続したポリヒスチジンペプチド (His20) は植物細胞に対して高い細胞膜透過性を有しており⁸、リポソーム（リン脂質膜小胞）にポリヒスチジンペプチド (His20) を修飾することで、リポソームを植物細胞内に効率的に導入できることを確認している (Figure 1)。本研究では、『ポリヒスチジンペプチド修飾リポソーム (His20+Lipo)』を分子輸送キャリアーとして利用することで、植物細胞内の核やミトコンドリアといった標的オルガネラにゲノム編集酵素 Cas9 を直接輸送し、遺伝子組換え技術を使わずにオルガネラゲノム編集を実現する手法の開発を目指した。

2. 研究の方法

2-1. 供試細胞

本研究では植物細胞としてタバコ (*Nicotiana tabacum*) 培養細胞 (rpc00001) を供試細胞として用いた。タバコ培養細胞は Linsmaier and Skoog (LS) 培地中にて 27℃ で振とう (120 rpm) 培養した。培地組成は以下の通りである。

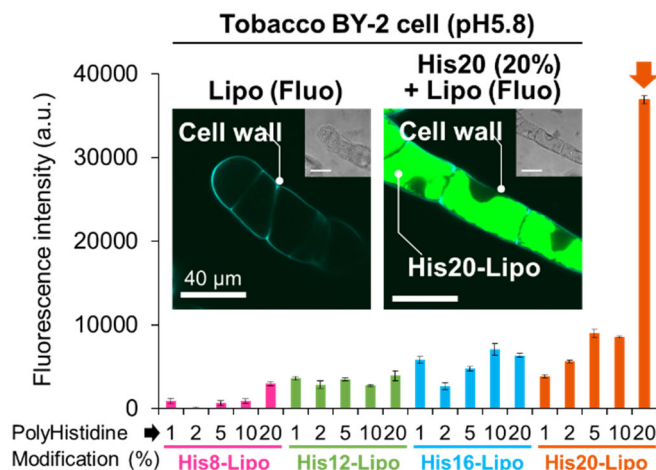


Figure 1. Cellular uptake of polyhistidine peptides (His8-His20)-modified liposomes in tobacco cultured cells.

ポリヒスチジンペプチド (His8, His12, His16, His20) 修飾リポソームのタバコ培養細胞における細胞膜透過。緑色蛍光色素 (Fluorescein) を内包したリポソーム (Lipo) に、ステアリル基を修飾した細胞膜透過ペプチド ($C_{17}H_{35}CONH$ -His8, His12, His16, His20) をリポソームの疎水領域に導入することで、ポリヒスチジンペプチド修飾リポソーム (His8, His12, His16, His20-Lipo) を調製した。特に、His20-Lipo は極めて効率的にタバコ培養細胞内に移行する。

LS 培地	
Murashige and Skoog Plant Salt Mixture	1 袋
Sucrose	30 g
Thiamine-HCl	1 mg
myo-inositol	100 mg
KH_2PO_4	200 mg
2,4-dichlorophenoxyacetic acid	0.2 mg
D.W. up to	1 L

2-2. リポソーム作製

(1) 蛍光色素内包リポソーム

リポソーム構成脂質 Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) と Cholesterol をクロロホルムに溶解させ、それぞれ 500 nmol, 50 nmol となるように試験管内で混合した。その後デシケーターで減圧乾燥し、さらに凍結乾燥機で 2 h 乾燥することで、試験管内で脂質フィルムを形成した。試験管内の脂質フィルムに対して、Phosphate-buffered saline (PBS, pH7.4) に溶解した Fluorescein (10 mM) を 100 μ L 添加し、水和させた。ボルテックスミキサーにより懸濁した後、超音波を 1 min 照射し、室温・暗所で 30 min 静置させた。ドライアイスとエタノールを混合した容器内で凍結融解を 5 回行い、PBS で調製した Fluorescein (10 mM) を 400 μ L 添加して、Avanti Polar Lipids 社のリポソーム調製器 (Mini-Extruder) を使用し、100 nm フィルターに 19 回通過させリポソーム溶液を調製した。調製したリポソーム溶液を Cytiva 社のゲル濾過カラム (IllustraTM MicroSpinTM S-300 HR Columns) に供し、800 $g \times 5$ min 遠心することで、リポソームと遊離 Fluorescein を分離し、Fluorescein 内包

リポソームを精製した。

ラボアッセイTM りん脂質キット (富士フィルム和光純薬株式会社) を使用して、精製したリポソームのりん脂質 (DOPC) 濃度を定量した。精製したリポソーム溶液に対して、ステアリル基を修飾したポリヒスチジン ($C_{17}H_{35}CONH$ -His20) をりん脂質濃度比 10%-20% となるように添加し、室温・暗所で 1 h 反応させることで、His20 修飾 Fluorescein 内包リポソーム {His20+Lipo(Fluo)} を調製した。

(2) ゲノム編集酵素内包リポソーム

核移行シグナル (NLS) を融合した NLS-Cas9 (New England Biolabs 社) と蛍光修飾した gRNA-ATTO550 (Integrated DNA Technologies 社) を mol 比が 1 : 1 となるように SEC buffer (20 mM HEPES, 500 mM KCl, 2 mM dithiothreitol, pH7.5) 中で混合し、Ribonucleoprotein 複合体 (RNP) を調製した。前述と同様の方法で調製した DOPC と Cholesterol の脂質フィルムに対して、RNP 溶液 (50 μ M) を添加した。以降の操作は前述と同様の手順に従い、His20 修飾 RNP 内包リポソーム {His20+Lipo(RNP)} を調製した。

2-3. 細胞内局在解析

終濃度 100 μ M (りん脂質濃度換算) の His20 修飾 Fluorescein 内包リポソーム {His20+Lipo(Fluo)} または His20 修飾 RNP 内包リポソーム {His20+Lipo(RNP)} を含んだ LS 培地中にて、タバコ培養細胞 (湿重量 20 mg/mL) を 27 $^{\circ}C$, 24 h, 120 rpm で振とう培養した。その後、LS 培地で 3 回洗浄を行い、遠心分離 (300 $g \times 3$ min) によりタバコ培養細胞を回収した。

His20+Lipo(Fluo) または His20+Lipo(RNP) の植物細胞膜透過ならびに細胞内局在の解析をするために、OLYMPUS社の共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV10i を用いた蛍光観察を行った。

2-4. ゲノム編集効率の評価

(1) 細胞処理

タバコ培養細胞の核ゲノムに存在するカロテノイド生合成酵素 phytoene desaturase 遺伝子 (NtPDS 遺伝子) を標的とした gRNA を設計・合成した (Integrated DNA Technologies 社)。NtPDS 遺伝子に対する gRNA を含有した RNP を調製し、さらに前述の手法に従い His20+Lipo(RNP) を調製した。終濃度 100 μM (リン脂質濃度換算) の His20+Lipo(RNP) を含んだ LS 培地中にて、タバコ培養細胞 (湿重量 20 mg/mL) を 27 °C, 24 h, 120 rpm で振とう培養した。

(2) ゲノム抽出

His20+Lipo(RNP) 処理後のタバコ培養細胞を、遠心分離 (300 g × 3min) により回収した。DNA すいすい-P (株式会社リーゾ) を使用し、タバコ培養細胞からゲノム DNA を抽出した。回収したタバコ培養細胞に DNA すいすい-P 抽出液を 100 μL 添加し、オートクレーブ済みのマイクロペッセルを使用して破碎した。マイクロペッセルを取り出し、さらに DNA すいすい-P 抽出液 100 μL を加え転倒混合した。その後、37 °C にて 20 min インキュベーションした。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 混合液を 200 μL 加えて転倒混合した。遠心分離 (15,000 rpm, 10 min, 4 °C) により、上清 200 μL を回収した。イソプロパノール 200 μL を添

加し、よく混合した。遠心分離 (15,000 rpm, 10 min, 4 °C) により上清を除去し沈殿を回収した。沈殿に氷冷した 70% EtOH 800 μL を添加し、よく混合した。遠心分離 (15,000 rpm, 10 min, 4 °C) により上清を除去した後、沈殿を風乾し、D.W. 20 μL に溶解することでゲノム DNA 溶液を得た。抽出したゲノム DNA 溶液は -20 °C で保存した。

(3) 標的遺伝子領域の PCR 増幅

抽出したゲノム DNA 溶液をテンプレートとして、標的遺伝子 (NtPDS 遺伝子) を PCR により増幅した。タカラバイオ社の Tks Gflex DNA Polymerase を PCR 酵素と、次世代シーケンス (NGS) 解析用のプライマー (Table 1) を使用し、下記の PCR 反応液・条件により、標的遺伝子 (NtPDS 遺伝子) を増幅した。

PCR 反応液		
Tks Gflex DNA Polymerase		0.2 μL
Primer Fw (10 μM)		0.3 μL
Primer Rv1-10 (10 μM)		0.3 μL
2 × Gflex PCR Buffer		2.0 μL
抽出ゲノム DNA 溶液 (<50 ng)		1.0 μL
D.W. up to		10.0 μL
PCR 条件		
Pre-Heat	94 °C	2 min
Denature	98 °C	10 sec
Anneal	68 °C	1 min
Post-Extension	72 °C	5 min

30 cycles

Table 1. Primers used in NGS analysis.

Primer	Adaptor sequences for NGS analysis	Barcodes	Specific sequences for NtPDS gene
Fw	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	--	GCAGTCACCAAGAATCTAGTTGTATAGGC
Rv1	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	AT	GGCAAGGCAGAATACAGATCGACTG
Rv2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	CG	GGCAAGGCAGAATACAGATCGACTG
Rv3	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	TT	GGCAAGGCAGAATACAGATCGACTG
Rv4	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	TG	GGCAAGGCAGAATACAGATCGACTG
Rv5	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	AC	GGCAAGGCAGAATACAGATCGACTG
Rv6	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	GC	GGCAAGGCAGAATACAGATCGACTG
Rv7	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	CA	GGCAAGGCAGAATACAGATCGACTG
Rv8	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	AA	GGCAAGGCAGAATACAGATCGACTG
Rv9	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	GA	GGCAAGGCAGAATACAGATCGACTG
Rv10	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	TA	GGCAAGGCAGAATACAGATCGACTG

(4) 次世代シーケンス解析

PCR 反応液を株式会社生物技研のアンプリコンシーケンス解析に提出した。PCR 産物中に含まれる標的遺伝子 (NtPDS 遺伝子) の塩基配列を網羅的に解読することで、ゲノム編集 (塩基欠失) の誘導率を評価した。

3. 研究内容

本研究ではまず、リポソーム・ポリヒスチジンペプチド (His20) ・ゲノム編集酵素 Cas9 から構成される His20 修飾 RNP 内包リポソーム {His20+Lipo(RNP)} を調製し、タバコ培養細胞の核ゲノムを標的とした『遺伝子組換え技

術に頼らない植物ゲノム編集技術』の確立と実証を試みた。次いで、標的オルガネラを核からミトコンドリアへ変更し、植物細胞のミトコンドリアへリポソームを輸送する手法の確立を試みた。得られた知見に基づき、植物の核ならびにミトコンドリアゲノムを標的とした『遺伝子組換え技術に頼らない植物ゲノム編集技術』の実現性について議論する。

ゼータ電位および表面テクスチャも測定し、エマルションのゼータ電位と粒径から吸着ダイナミクスについて議論する。

4. 研究の実施経過

現在の農作物育種分野においては、『遺伝子組換えに頼らない植物ゲノム編集技術』の実現が強く望まれている。そこで本研究では、ゲノム編集酵素 Cas9 を内包したリポ

ソームに、独自に開発した植物細胞膜透過ペプチド：ポリヒスチジンペプチド (His20) を組み合わせることで、遺伝子組換え技術を使わずにゲノム編集酵素 Cas9 を植物細胞中に直接導入する『遺伝子組換え技術に頼らない植物ゲノム編集技術』の開発に挑戦した。

まず、ゲノム編集酵素 Cas9 と蛍光修飾 gRNA-ATTO550 を含んだ RNP 内包リポソーム {Lipo(RNP)} を調製した。この Lipo(RNP) 中にゲノム編集酵素 Cas9 が内包されていることを確認するために、Lipo(RNP) 破砕液を調製し、抗 Cas9 抗体を用いた Western blotting にて、Lipo(RNP) 中からゲノム編集酵素 Cas9 を検出した (Figure 2A)。さらに、Lipo(RNP) 中から gRNA-ATTO550 由来の蛍光を検出した (Figure 2B)。この作業により、Lipo(RNP) 中には RNP が内包されていることを確認した。

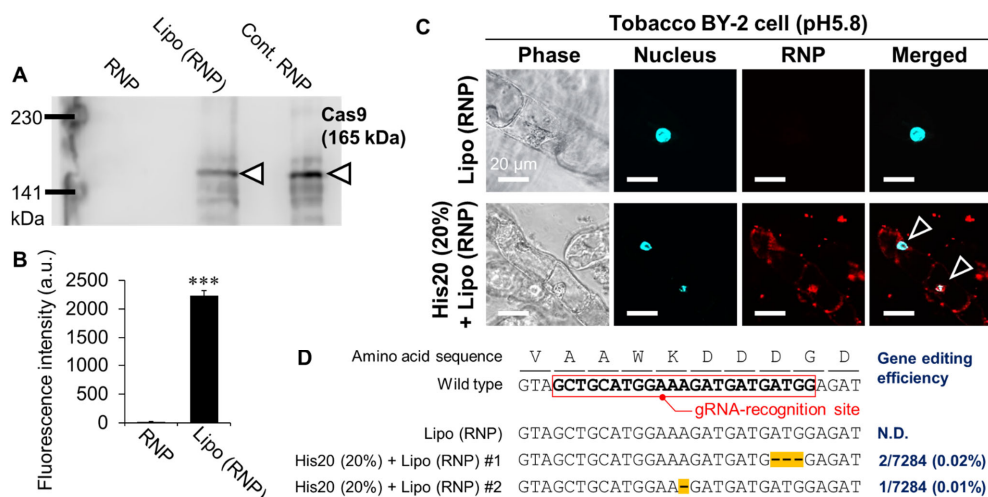


Figure 2. Genome editing for nucleus in tobacco cultured cells using His20+Lipo(RNP).

His20+Lipo(RNP) を利用した植物核ゲノム編集. (A) RNP を内包したリポソーム Lipo(RNP) の Western blotting 写真. 矢頭は抗 Cas9 抗体により検出された Cas9 のバンドを示す. (B) Lipo(RNP) に内包された gRNA-ATTO550 由来の蛍光強度. (C) His20 修飾 RNP 内包リポソーム {His20(20%)+Lipo(RNP)} のタバコ培養細胞に対する細胞膜透過と核移行. 青色蛍光は Hoechst で染色した核, 赤色蛍光はリポソームに内包された RNP 中の gRNA-ATTO550 を示す. 矢頭は核に局在した gRNA-ATTO550 を示す. (D) His20(20%)+Lipo(RNP) によるタバコ培養細胞の核ゲノム (NtPDS 遺伝子) におけるゲノム編集 (塩基欠失) の誘導. 黄色ハイライトはゲノム編集 (塩基欠失) 領域を示す.

次いで、His20 修飾 RNP 内包リポソーム {His20+Lipo(RNP)} をタバコ培養細胞に添加し、共焦点レーザー走査型顕微鏡にて蛍光観察を実施したところ、タバコ培養細胞の核内に RNP が輸送されることを確認した (Figure 2C)。そこで、His20+Lipo(RNP) を利用して、タバコ培養細胞の核ゲノムに存在するカロテノイド合成酵素 phytoene desaturase 遺伝子 (NtPDS 遺伝子) を標的としたゲノム編集を試みた。His20+Lipo(RNP) を処理したタバコ培養細胞からゲノム DNA を抽出し、NtPDS 遺伝子領域を PCR 増幅した後に、次世代シーケンズ解析により塩基配列を解読した。その結果、His20+Lipo(RNP)

処理細胞により、NtPDS 遺伝子領域に 2 パターンのゲノム編集 (塩基欠失) が誘導されていることを確認した (Figure 2D)。

上記では His20 修飾リポソーム (His20+Lipo) を利用することで、タバコ培養細胞の核ゲノムに RNP を輸送し、遺伝子組換えに頼らない核ゲノム編集を実証した。そこで次は、遺伝子組換えに頼らないミトコンドリアゲノム編集を実現させるべく、His20+Lipo を利用したミトコンドリアへの分子輸送ツールの開発を試みた。蛍光色素を内包させた His20+Lipo(Fluo) はタバコ培養細胞に対して細胞膜透過を示した後に、液胞に局在することが分かっている

(Figure 1). His20+Lipo(Fluo) をミトコンドリアへ輸送するためには, His20+Lipo(Fluo) の細胞内局在を制御し, 液胞から (ミトコンドリアが存在する) 細胞質へ移行させる必要があると考えられた. そこで, His20+Lipo(Fluo)

をタバコ培養細胞に処理する際の培地条件を検討した結果, 培地 pH を中性 (pH6.6 または pH7.4) にすることで, His20+Lipo(Fluo) はタバコ培養細胞の細胞質に移行することが確認された (Figure 3).

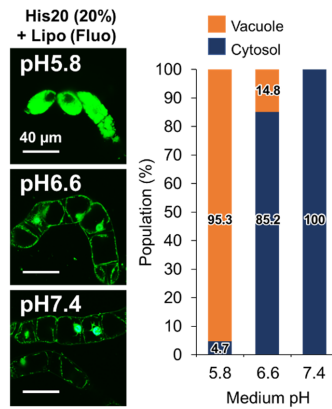


Figure 3. Cellular uptake and cytosolic localization of His20+Lipo(Fluo) under neutral pH condition.

中性条件下における His20+Lipo(Fluo) の細胞膜透過と細胞質移行. pH5.8, pH6.6, pH7.4 の条件下で His20+Lipo(Fluo) をタバコ培養細胞に取り込ませ, 共焦点レーザー走査型顕微鏡下で蛍光観察した. 緑色蛍光はリポソームに内包された Fluorescein を示す. また, 各 pH 条件につき 300 個の細胞を観察し, His20+Lipo(Fluo) の液胞/細胞質への局在をカウントした. グラフは各 pH 条件における液胞/細胞質局在の割合を示す.

次いで, His20+Lipo(Fluo) に対してステアリル基を修飾したミトコンドリア移行シグナル(C₁₇H₃₅CONH-MLS) (MLS のアミノ酸配列: MLSLRQSRFFK) を修飾した His20+MLS+Lipo(Fluo) を調製し, リポソームのミトコンドリア輸送を解析した. この際, リポソームに対するポリヒスチジンペプチド (His20) とミトコンドリア移行シ

グナル (MLS) の修飾条件を検討するとともに, 培地 pH 条件についても検討した. その結果, 培地 pH7.4 の条件下において, His20(10%)+MLS(30%) 修飾リポソームが細胞膜透過ならびにミトコンドリア移行を示すことを確認した (Figure 4).

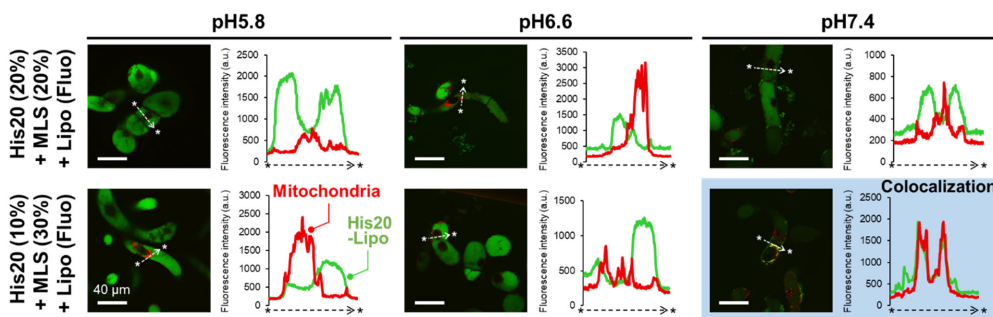


Figure 4. Cellular uptake and mitochondrial localization of His20+MLS+Lipo(Fluo) under neutral pH condition.

中性条件下における His20+MLS+Lipo(Fluo) の細胞膜透過とミトコンドリア移行. 緑色蛍光はリポソームに内包された Fluorescein, 赤色蛍光は MitoTracker Red で染色したミトコンドリアを示す. ヒストグラムは, 各視野のアスタリスク間の破線部位における蛍光分布 (定量解析) を示す.

以上の結果から, ポリヒスチジンペプチド (His20) とミトコンドリア移行シグナル (MLS) を利用することで, リポソームを植物細胞内のミトコンドリアへ送達させることに成功した. 今後は, RNP を内包した His20+MLS 修飾リポソームを利用することで, 世界初の遺伝子組換えに頼らないミトコンドリアゲノム編集の実現を目指す.

5. 研究から得た結論・考察

本研究では, ポリヒスチジンペプチド (His20) 修飾 RNP 内包リポソーム {His20+Lipo(RNP)} を使用することで, 遺伝子組換え技術を使わずにタバコ培養細胞の核ゲノム編集に成功した. His20+Lipo(RNP) を処理したタバコ培養細胞よりゲノム DNA を抽出し, 次世代シークエ

ンス解析により塩基配列を解読した結果、標的遺伝子である NtPDS 遺伝子領域に 2 パターンのゲノム編集 (塩基欠失) が誘導されていることを確認した。両変異ともに、ゲノム編集効率は 0.02% および 0.01% と低い数値ではあったが、本研究成果は遺伝子組換えに頼らずに植物細胞の核ゲノム編集に成功した稀有な例であり、His20+Lipo が植物細胞の核ゲノム編集において有力なツールであることを示唆している。

一方で、本研究では His20+Lipo を利用したミトコンドリアゲノム編集を実現するために、His20+Lipo の細胞内局在の制御にも挑戦した。その結果、蛍光色素を内包させた His20+Lipo(Fluo) をタバコ培養細胞に処理する際の培地条件を酸性 (pH5.8) から中性 (pH6.6 または pH7.4) に変えることで、His20+Lipo(Fluo) の細胞内局在を液胞から細胞質へ変えることにも成功した。この現象は、ヒスチジン残基のプロトンスポンジ効果により解釈することができる。ヒスチジン残基は pH6.0~5.8 付近において側鎖のイミダゾール基がプロトン化されることが知られている。ゆえに、酸性 (pH5.8) 培地中では、His20+Lipo のヒスチジンはプロトン化された状態であり、一方で中性 (pH6.6 または pH7.4) 培地中では、His20+Lipo のヒスチジンは脱プロトン化された状態であると考えられる。His20+Lipo がタバコ培養細胞内に透過する際、エンドソームにより取り込まれるが、エンドソームは液胞まで輸送される過程において内部が酸性化することが知られている。この際、脱プロトン化された状態の His20+Lipo は、エンドソーム内においてプロトンと結合し、エンドソーム内の酸性化を阻害すると同時に、エンドソーム内外のイオン濃度勾配に大きな偏りを発生させ、最終的にエンドソームを破壊していることが推測される。これら一連の現象 (プロトンスポンジ効果) により、中性 (pH6.6 または pH7.4) 培地中でタバコ培養細胞に取り込まれた His20+Lipo は、エンドソームを破壊し、細胞質へ移行していると考えられる。実際に、酸性 (pH5.8) 培地条件下では His20+MLS 修飾リポソームはミトコンドリアに一切移行しないが、中性 (pH7.4) 培地条件下においては、His20+MLS 修飾リポソームがミトコンドリアに移行することが確認されている。すなわち、ヒスチジン残基のプロトンスポンジ効果とオルガネラ移行シグナルを利用することで、ミトコンドリアを含む様々なオルガネラへ His20+Lipo を送達できると考えられる。本知見は、遺伝子組換えに頼らないオルガネラゲノム編集=オルガネラ育種においても、His20+Lipo は有力なツールであることを示唆するものである。

特にミトコンドリアゲノムは、植物の雄性不稔に関する分子を制御していることから、植物の機能改変において魅力的な標的である。2019 年に東京大学の有村らが、遺伝子組換え技術を使用して、イネ・ナタネでミトコンドリアのゲノム編集 (塩基欠失) に世界で初めて成功したが⁹,

遺伝子組換え技術を使わない方法では未だ成功例は報告されていない。今後は、RNP を内包した His20+MLS 修飾リポソームを利用することで、世界初の遺伝子組換えに頼らないミトコンドリアゲノム編集の実現を目指す。

6. 残された問題、今後の課題

本研究において、His20+Lipo(RNP) を利用することで遺伝子組換え技術を使わずに植物細胞の核ゲノム編集に成功した。しかし、その際のゲノム編集効率は低いため、実用段階まではまだ遠いと言える。今後は『His20+Lipo(RNP) のゲノム編集効率の改善』が必須の課題である。

課題改善策の一つとして、RNP のリポソーム内包率の向上が挙げられる。リポソーム調製時に加温することで、リポソームへの分子内包率を改善できることは広く知られているため、RNP のリポソーム内包においても有効な手段になり得る可能性はある。しかし、RNP はゲノム編集酵素 Cas9 と gRNA の複合体であり、過剰な加温はゲノム編集酵素 Cas9 の失活や RNP を崩壊させる危険性もあるため、慎重な検討が必要である。

一方で、His20+Lipo(RNP) を植物細胞に処理する際に、細胞自体を一時的に加温することも有効な手段になると考えている。RNP が導入された細胞を一時的に加温することで、ゲノム編集効率が上昇することが報告されている¹⁰。

このように、リポソームまたは細胞自体を加温することで、『His20+Lipo(RNP) のゲノム編集効率の改善』を試みる。この課題を克服することができれば、His20+Lipo(RNP) にシグナル配列を応用したオルガネラゲノム編集についても、実用的なレベルまで改良することができることを期待している。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人東洋食品研究所から多大なるご支援を賜りました。関係者の皆様に心より深く感謝申し上げます。

8. 参考文献

- 1 Aili, Bao; David, J. Burritt; Haifeng, Chen; Xinan, Zhou; Dong, Cao; Lam-Son, Phan, Tran: The CRISPR/Cas9 system and its applications in crop genome editing. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2019, **39**(3), p. 321-336. doi: 10.1080/07388551.2018.1554621.
- 2 Kunling, Chen; Yanpeng, Wang; Rui, Zhang; Huawei, Zhang; Caixia, Gao: CRISPR/Cas

- Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 2019, **70**, p. 667-697. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100049.
- 3 Sergei, Svitashv; Christine, Schwartz; Brian, Lenderts; Joshua, K. Young; A. Mark, Cigan: Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 2016, **7**, 13274. doi: 10.1038/ncomms13274.
- 4 Ryozo, Imai; Haruyasu, Hamada; Yuelin, Liu; Qianyan, Linghu; Yuya, Kumagai; Yozo, Nagira; Ryuji, Miki; Naoaki, Taoka: In planta particle bombardment (iPB): A new method for plant transformation and genome editing. *Plant Biotechnol.* 2020, **37**(2), p. 171-176. doi: 10.5511/plantbiotechnology.20.0206a
- 5 Zhen, Liang; Kunling, Chen; Tingdong, Li; Yi, Zhang; Yanpeng, Wang; Qian, Zhao; Jinxing, Liu; Huawei, Zhang; Cuimin, Liu; Yidong, Ran; Caixia, Gao: Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 2017, **8**, 14261. doi: 10.1038/ncomms14261.
- 6 Takashi, Iwasaki; Yoshihisa, Tokuda; Ayaka, Kotake; Hiroyuki, Okada; Shuji, Takeda; Tsuyoshi, Kawano; Yuji, Nakayama: Cellular uptake and in vivo distribution of polyhistidine peptides. *J. Control. Release.* 2015, **210**, p. 115-124. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.05.268.
- 7 Sayaka, Kimura; Tsuyoshi, Kawano; Takashi, Iwasaki: Short polyhistidine peptides penetrate effectively into *Nicotiana tabacum*-cultured cells and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2017, **81**(1), p. 112-118. doi: 10.1080/09168451.2016.1234925.
- 8 Yoshino, Tanaka; Yoshihiko, Nanasato; Kousei, Omura; Keita, Endoh; Tsuyoshi, Kawano; Takashi, Iwasaki: Direct protein delivery into intact plant cells using polyhistidine peptides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2021, **85**(6), p. 1405-1414. doi: 10.1093/bbb/zbab055.
- 9 Tomohiko, Kazama; Miki, Okuno; Yuta, Watari; Shungo, Yanase; Chie, Koizuka; Yu, Tsuruta; Hajime, Sugaya; Atsushi, Toyoda; Takehiko, Itoh; Nobuhiro, Tsutsumi; Kinya, Toriyama; Nobuya, Koizuka; Shin-Ichi, Arimura: Curing cytoplasmic male sterility via TALEN-mediated mitochondrial genome editing. *Nat. Plants.* 2019, **5**(7), p. 722-730. doi: 10.1038/s41477-019-0459-z.
- 10 Matthew, J. Milner; Melanie, Craze; Matthew, S. Hope; Emma, J. Wallington: Turning Up the Temperature on CRISPR: Increased Temperature Can Improve the Editing Efficiency of Wheat Using CRISPR/Cas9. *Front. Plant Sci.* 2020, **11**, 583374. doi: 10.3389/fpls.2020.583374. eCollection 2020.