

DNA修飾金ナノ粒子結晶を用いた 新規パーティクルガン担体の開発



研究ノート

鈴木隼人*

"Development of novel particle bombardment carriers using
DNA-functionalized colloidal crystals"

Key Words : *Arabidopsis thaliana*, CRISPR-Cas9,
DNA-functionalized colloidal crystals, Genome editing, Particle bombardment

はじめに - 植物バイオものづくり -

持続可能な社会の実現に向け、動物や特定地域でしか採取できない植物に依存した原料供給から脱却し、微生物、植物、培養細胞などを活用して食品、医薬品、工業製品などを生産する「バイオものづくり」が注目を集めている。この分野は、2024年6月に制定されたバイオエコノミー戦略^[1]の主要な柱の一つとなっている。

バイオものづくりの象徴的な例として、Amyris社(米国)により開発され、2014年にはSanofi社(仏国)によって上市された半合成アルテミシニン(複雑な代謝改変を施した組換え酵母を用いて前駆体であるアルテミシニン酸を25 g/Lの収量で生産し、それを化学合成でアルテミシニンに変換したもの)があげられる。アルテミシニンは、抗マラリア薬として需要が高いものの、クソニンジン(*Artemisia annua*)が唯一の供給源であるため、需要や収穫量による市場価格の変動が問題視されていた。半合成アルテミシニンは2012-2015年にかけてのアルテミシニン価格の下落もあり当初の予想ほど活発な生産は行われなかった^[2]が、今後クソニンジンの供給の不安定化が起きたときの代替生産手法として重要であると共に、合成生物学の可能性を示した先駆的な例である。

これ以外にもステビア甘味料^[3]、抗がん剤ビンブラスチン^[4]のように、植物由来の低分子化合物(植物特化代謝産物)の微生物による代替生産が可能になりつつあるが、植物体からの抽出精製による生産と比べてコスト面や付加価値でメリットがある例はそれほど多くない。また、木材、天然ゴム、綿花、作物など植物でしか効率的な生産ができないものも存在するため、植物個体あるいは組織を用いたバイオものづくりも依然重要である。

植物の形質改変

植物個体・組織を用いたバイオものづくりの効率を上げるためには、外来遺伝子の導入や内生遺伝子の機能欠失を引き起こすことで、ある物質の生産量を増大させる、あるいは特定の物質を貯蔵する組織を肥大させるなど、植物の形質を改変する必要がある。土壌細菌アグロバクテリウムを用いた形質転換(植物に外来遺伝子を導入する技術)と植物ホルモンの添加による再分化(カルスと呼ばれる未分化な細胞塊から、葉や茎を持つ植物組織を再生する技術)を組み合わせることで、形質転換植物を作製することができる。さらに外来遺伝子としてCRISPR-Cas9などのゲノム編集酵素を導入することで植物ゲノムの狙った位置に変異を導入することができる。この手法は主に再分化の難易度が植物種や品種に大きく依存するため適用が難しい場合がある。植物の生長点(茎頂)に存在する将来生殖細胞に分化する限られた細胞層(L2層)に直接DNAやタンパク質を導入するin planta Particle Bombardment法(iPB法)は難易度の高い再分化過程を要しないため、より広範な植物種の改変に適用できる可能性がある^[5,6]。一方で、1細胞あたりに導入できるタンパク質の量が少ないことに起因し、



* Hayato SUZUKI

1994年2月生まれ
大阪大学大学院 工学研究科 生命先端
工学専攻博士後期課程(2021年)
現在、国立研究開発法人 産業技術総合
研究所 生命工学領域 バイオものづく
り研究センター 植物分子生産研究チ
ーム 研究員 博士(工学)
専門/植物代謝工学
TEL: 050-3522-8883
E-mail: suzuki-hayato@aist.go.jp

ゲノム編集効率が低く、目的の改変が施された植物体を取得するために多くの実験を繰り返す必要がある。

DNA 修飾金ナノ粒子結晶のパーティクルガン担体への応用

パーティクルガン（遺伝子銃）では、金マイクロ粒子の表面に Cas9-リボヌクレオタンパク質複合体（RNP）を吸着させた状態で乾燥させ、これを高圧ヘリウムガスによって銃弾のように打ち出すことで、堅牢な植物細胞壁を突破し、細胞内へ RNP を導入する。筆者らは、担体の内部に RNP を封入することができれば、一度により多くの RNP を細胞内に導入可能となり、ゲノム編集効率の向上が期待できると着想した。リボソームや DNA オリガミといった構造体は分子封入が可能であるものの、乾燥や高速での打ち出しに耐える物理的強度に欠けると予想された。この課題を克服するために、我々は DNA 修飾金ナノ粒子結晶に着目した。DNA 修飾金ナノ粒子結晶は、表面を一本鎖 DNA で修飾した金ナノ粒子とリンカー DNA を混合し、加熱・徐冷することで、ナノ粒子が規則的に配向した結晶構造へと成長する。そのため、一般的な DNA 構造体と比べて高い機械的強度を持ちながら、内部に空孔を有するという特性を示す。しかしながら、これまでの

研究は主にナノ粒子の配置制御といった結晶学的な側面に焦点が当てられており、高分子の内部封入やドラッグデリバリーシステム（DDS）への応用についてはほとんど検討されてこなかった。そこで我々は、この DNA 修飾金ナノ粒子結晶の設計最適化、分子封入、そしてパーティクルガン担体としての応用を試みた^[7]。

2種類の DNA 修飾ナノ粒子からなる結晶の場合、ナノ粒子が体心立方格子状に配置され、菱型十二面体の結晶が形成される（図1A）。末端をビオチン修飾したリンカーあるいはリガンド DNA を用いて結晶を作製し、蛍光修飾ストレプトアビジンを外部添加した結果、共焦点顕微鏡による観察で結晶内部からも蛍光が観察されたことから、温和な条件での分子封入が可能であることが確認された（図1B）。一方で、GFP 融合 Cas9-RNP（SpCas9~7.5 nm, sgRNA 5.5 nm^[8], GFP 4.2 nm^[9]）を同様に添加したところ、RNP が結晶内部まで取り込まれず、GFP 蛍光は結晶表面に集中していた（図2）。

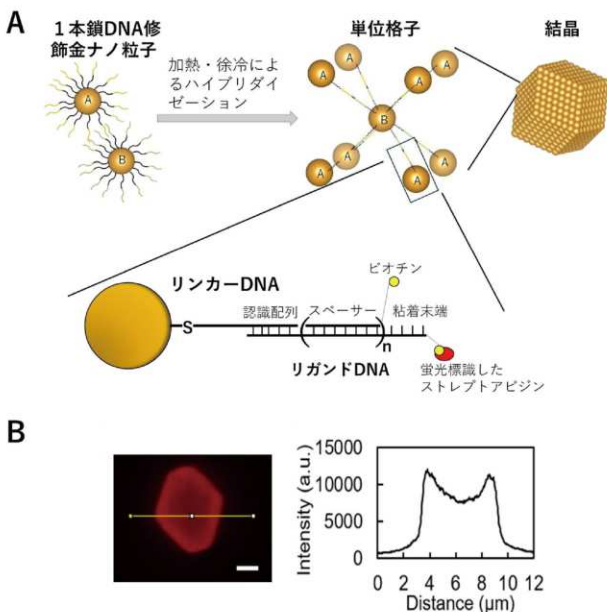
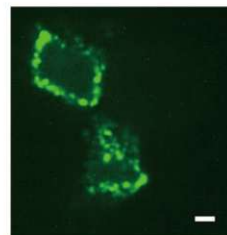
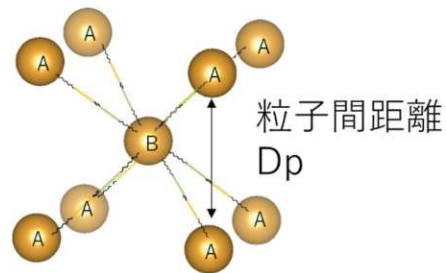
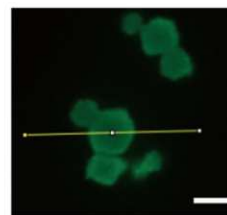


図1. DNA 修飾金ナノ粒子結晶作製と分子封入。A. 結晶作製のスキーム。B. 共焦点レーザー顕微鏡で観察した結晶横断面の蛍光画像とラインプロファイル。



Dp=26 nm
表面にのみ吸着



Dp=73 nm
内部からも蛍光が検出

図2. 粒子間距離の制御による分子封入の変化。出来上がった結晶に GFP 融合 Cas9-RNP を添加して常温で1時間インキュベートした。長いスペーサー配列を用いて粒子間距離を広くした結晶でのみ内部から GFP 蛍光が検出された。

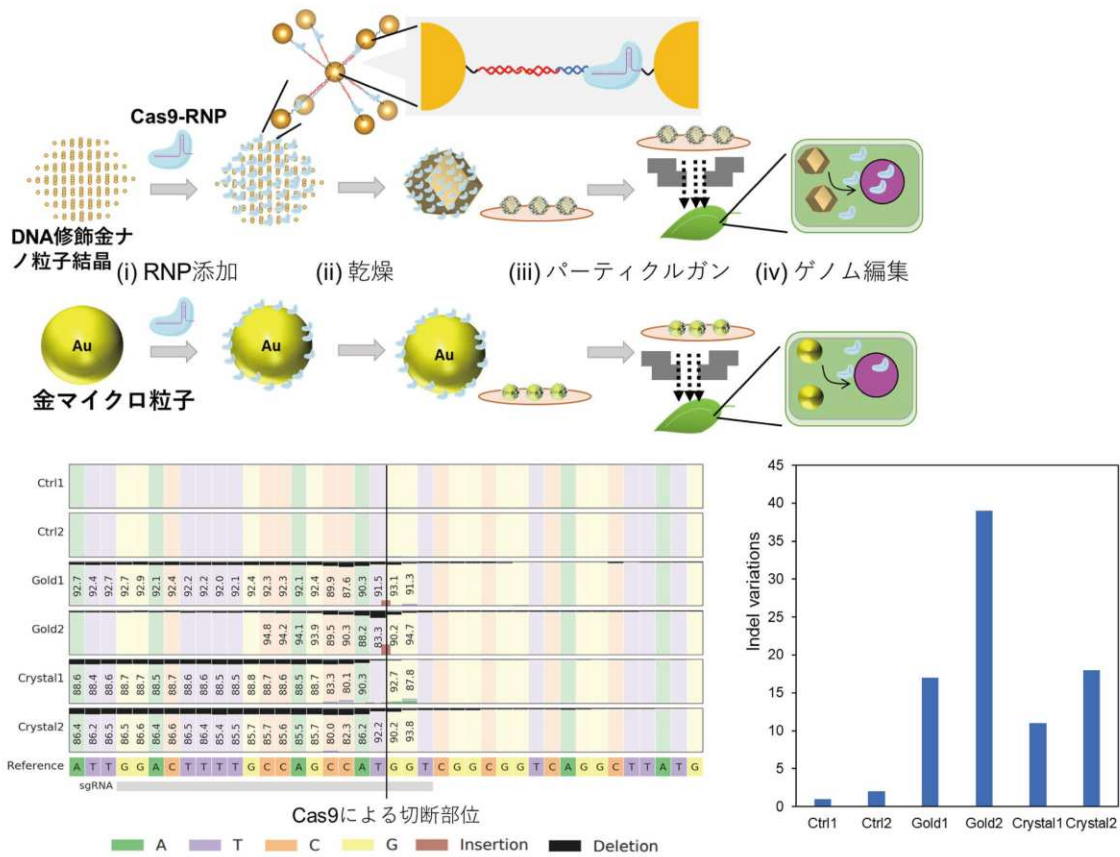


図3. パーティクルガンによるゲノム編集. A. パーティクルガンのスキーム. B. アンプリコンシーケンシングによるゲノム編集効率の解析.

鎖の長さを変更することで、粒子間距離を拡張した結晶の作製に成功し、GFP 融合 Cas9-RNP の封入を可能にした。この RNP 封入結晶は乾燥状態でもその形状を保っていたことから、パーティクルガンによるシロイヌナズナ葉への導入とアンプリコンシーケンシングによる評価を行ったところ、従来の金粒子と同様にゲノム配列上の標的部位に変異が起きていることが確認された (図 3)。これにより DNA 修飾ナノ粒子結晶がパーティクルガンの担体として利用可能なことが示された。

DNA 修飾ナノ粒子結晶の特徴は、本研究で達成した粒子間距離の制御による封入効率の改善のように、そのプログラマブルな性質である。現状は新規材料をパーティクルガン担体を使用することができたという萌芽的な結果であるが、DNA 鎖への修飾など改良を加えることで、Cas9 封入量やゲノム編集効率を更に改善できると期待される。また、特異な光学特性や剛性、生体分子との親和性を持つ本材料は、そのほかの DDS キャリアやバイオセンサー、

新規材料創成などへの応用も期待される。

おわりに

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 (AIST) バイオものづくり研究センターは、2025 年 4 月に生物プロセス研究部門から改組され、バイオものづくり分野の研究推進を強化しました。本センターは、茨城県つくば市のつくばセンターと北海道札幌市の北海道センターの 2 拠点を構え、微生物や植物を活用した研究を展開しています。特に筆者が所属する植物分子生産研究チームは、大規模な植物栽培設備^[10]を有し、タバコ、ポプラ、エリアンサス、テンサイ、キヌアなど、多様な植物種を対象とした有用物質、有用植物材料生産の研究に取り組んでいます。北海道センターは、大和ハウス プレミストドーム (旧札幌ドーム) に近く、地下鉄を利用すれば札幌中心部へ、高速バスを利用すれば新千歳空港へのアクセスも良好です。お近くにお越しの際は、ぜひお立ち寄りください。



写真. 北海道センターに住み着いているキツネ.

謝辞

本項で紹介した研究^[7]は、名古屋大学未来材料システム研究所の横森真麻特任助教（現・東京大学大学院総合文化研究科・特任助教）、田川美穂准教授（現・教授）らとの共同研究の成果であり、深く感謝申し上げます。また、本研究は、JST CREST「電界誘起気泡及びDNAナノ粒子結晶による長鎖DNAの導入・操作技術の研究」（研究代表者：山西陽子 九州大学大学院工学研究院 教授）、ソロプチミスト日本財団女性研究者賞研究助成（研究代表者：田川美穂）、名古屋大学 CIRFE 若手活性化支援事業（研究代表者：横森真麻）の支援を受けて実施されました。ここに記して感謝申し上げます。

参考文献

- [1] 内閣府科学技術・イノベーション推進事務局「バイオエコノミー戦略」
<https://www8.cao.go.jp/cstp/bio/index.html>
- [2] Peplow, M. Synthetic biology's first malaria drug meets market resistance. *Nature* **530**, 389–390 (2016). <https://doi.org/10.1038/530390a>
- [3] Olsson, K., Carlsen, S., Semmler, A. *et al.* Microbial production of next-generation stevia

sweeteners. *Microb Cell Fact* **15**, 207 (2016).
<https://doi.org/10.1186/s12934-016-0609-1>

- [4] Zhang J, Hansen LG, Gudich O, *et al.* A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine. *Nature*. 2022;609(7926):341-347. doi:10.1038/s41586-022-05157-3
- [5] Hamada, H., Linghu, Q., Nagira, Y. *et al.* An *in planta* biolistic method for stable wheat transformation. *Sci Rep* **7**, 11443 (2017).
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-11936-0>
- [6] Hamada, H., Liu, Y., Nagira, Y. *et al.* Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables *in planta* genome editing in wheat. *Sci Rep* **8**, 14422 (2018).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-32714-6>
- [7] Yokomori M, Suzuki H, Nakamura A, Sugano SS, Tagawa M. DNA-functionalized colloidal crystals for macromolecular encapsulation. *Soft Matter*. 2022;18(36):6954-6964. Published 2022 Sep 21. doi:10.1039/d2sm00949h
- [8] Mout R, Ray M, Lee YW, Scaletti F, Rotello VM. In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. *Bioconjug Chem*. 2017;28(4):880-884. doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00057
- [9] Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*. 1996;273(5280):1392-1395. doi:10.1126/science.273.5280.1392
- [10] 国立研究開発法人産業技術総合研究所 バイオものづくり研究センター「密閉型植物工場を活用した有用物質生産」
<https://bprc.aist.go.jp/project/4930>