

「密閉型植物工場を活用した遺伝子組換え植物ものづくり実証研究開発」 プロジェクトの詳細について【実施者発表資料】

1. 密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発
独立行政法人産業技術総合研究所、国立大学法人北海道大学、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学、国立大学法人横浜国立大学、国立大学法人千葉大学
2. 遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発
ホクサン株式会社
3. 組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産
出光興産株式会社
4. ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究
北興化学工業株式会社
5. 新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証
公益財団法人サントリー生命科学財団

「密閉型植物工場を活用した有用物質 高発現システム基盤技術開発」の概要

平成25年11月27日

独立行政法人 産業技術総合研究所

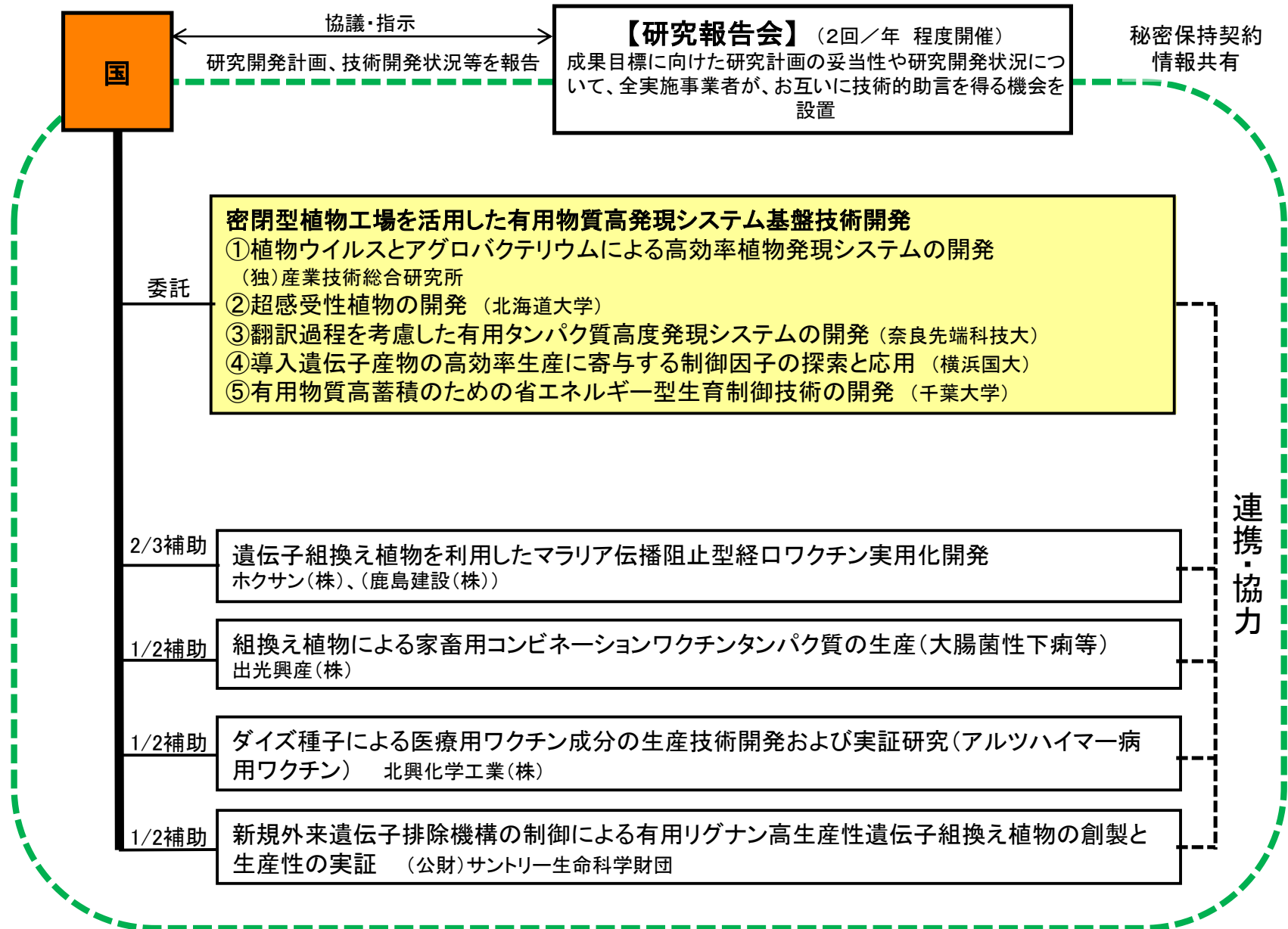
国立大学法人 北海道大学

国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学

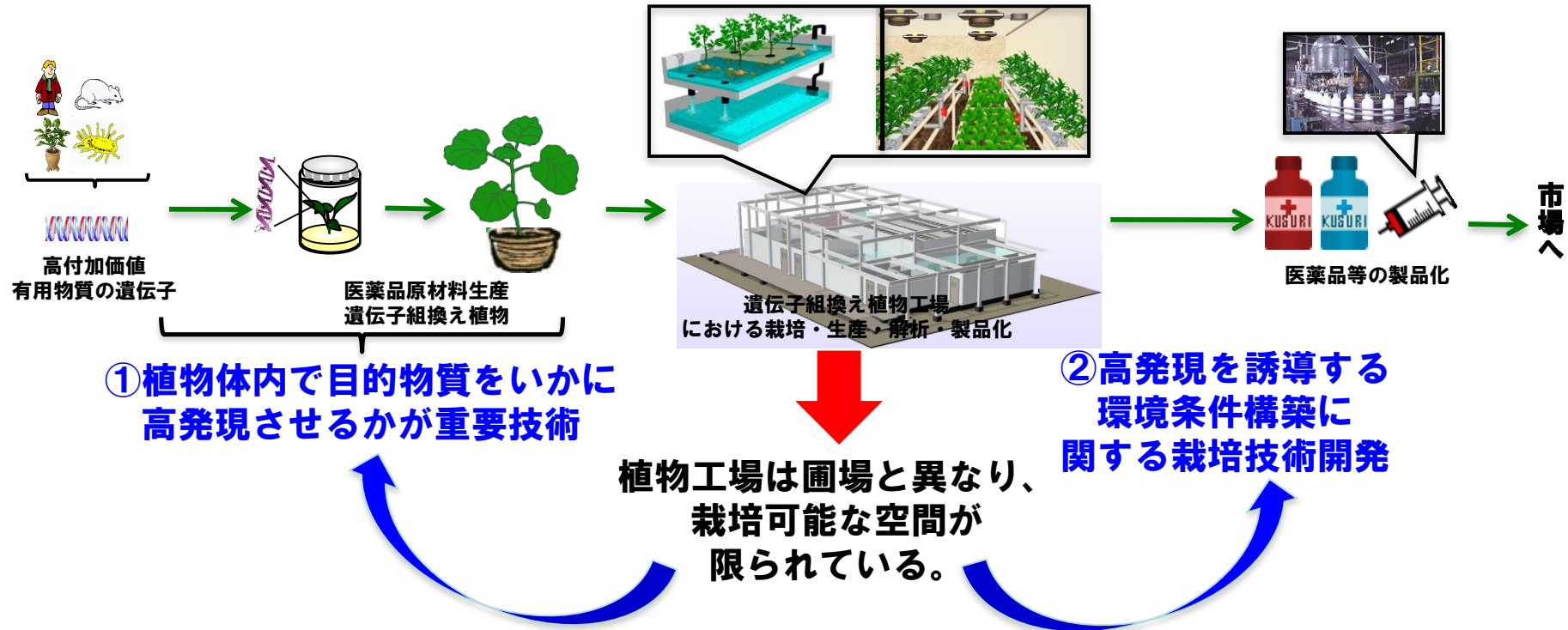
国立大学法人 横浜国立大学

国立大学法人 千葉大学

密閉型植物工場を活用した遺伝子組換え植物ものづくり実証研究開発 実施体制図



密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発



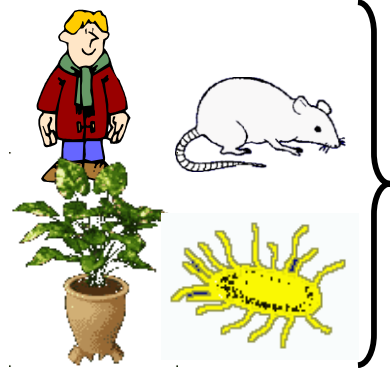
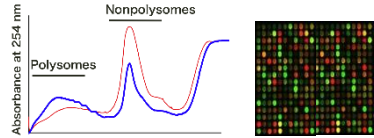
研究開発の目標設定

- ①遺伝子組換え植物に高付加価値物質を高効率に生産させるために必要な遺伝子組換え技術等の基盤技術開発（委託事業 課題1～4）
- ②密閉型遺伝子組換え植物工場における高付加価値物質の製造に必要な省エネルギー型栽培技術開発（委託事業 課題5）

密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

研究開発項目

- ③ 翻訳過程を考慮した有用タンパク質高度発現システムの開発
- ④ 導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用



有用物質生産遺伝子(群)

研究開発項目

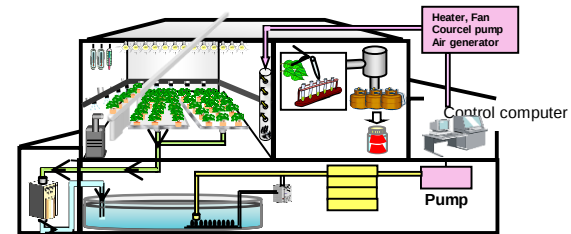
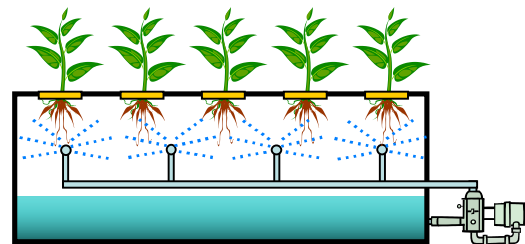
- ① 植物ウイルスとアグロバクテリウムによる高効率発現システムの開発

研究開発項目

- ② 超感受性植物の開発

Vacuum

- ・サイレンシングを抑制した植物
- ・病害抵抗性を弱めた遺伝子導入植物病原体に感受性な植物



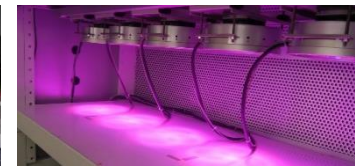
産業化



研究開発項目

- ⑤ 有用物質高蓄積のための省エネルギー型生育制御技術の開発

- ・局所照明技術・装置による省エネルギー化
- ・遺伝子発現に最適な人工環境条件の探索



密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

経済産業省

委託

【研究主体】

独立行政法人産業技術総合研究所:

研究課題名: (1) 植物ウイルスとアグロバクテリウムによる高効率発現システムの開発」及び (2) 超感受性植物の開発 (一部)

実施項目:

(1)-1: CWV分節ゲノム感染性クローンとアグロインフェクションによる一過性高発現ベクターシステムの開発

(1)-2: ウイルス外被タンパク質(CP)抑制型の一過性高発現ベクターシステムの開発

【共同実施先】

国立大学法人北海道大学:

研究課題名: (2) 超感受性植物の開発

実施項目:

(2)-1: サイレシングに係る因子を抑制した導入遺伝子超受容性植物

(2)-2: SAに関わる因子をノックダウンした超感受性植物

(2)-3: AP系をノックダウンした超感受性植物

国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学:

研究課題名: (3) 翻訳過程を考慮した有用タンパク質高度発現システムの開発

実施項目:

(3)-1: 分化組織／環境ストレス下での翻訳に関わる5' UTRの特徴解明及び活用

(3)-2: 新規翻訳エンハンサーの単離と活用

国立大学法人横浜国立大学:

研究課題名: (4) 導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用

実施項目:

(4)-1: 超ハイスループットスクリーニング系の開発

(4)-2: 新規制御因子等による高効率発現系の構築

国立大学法人千葉大学:

研究課題名: (5) 有用物質高蓄積のための省エネルギー型生育制御技術の開発

実施項目:

(5)-1: 省エネ型局所環境制御による生育環境の向上

(5)-2: 環境ストレス付与による有用物質の発現・蓄積の向上

密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

中間評価時目標

(1) 植物ウイルスとアグロバクテリウムによる高効率植物発現システムの開発

CMV-アグロインフェクション法の基本システムの構築および当該手法をより簡便化するための接種用遺伝子組換え植物体を開発し、基本システムと組合せて目的物質の発現を確認する。

(1)-1 で開発する手法を基本として、CP遺伝子に欠失・変異等を導入し、当該領域に目的遺伝子を導入したベクターを構築後、構築した遺伝子が機能するかを解析する。

(2) 超感受性植物の開発

「超感受性植物」作出のため、RNA サイレンシング関連遺伝子を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを作出する。再分化個体として50 株以上の獲得を目標とし、それぞれについて標的遺伝子の抑制度を解析する。

「超感受性植物」作出のため、SA 合成系関連遺伝子であるPAL及びICS を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを作出する。再分化個体として10 株以上の獲得を目標とし、それぞれについて標的遺伝子の抑制度を解析する

「超感受性植物」作出のため、AP系関連遺伝子を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを作出する。再分化個体として10 株以上の獲得を目標とし、それぞれについて標的遺伝子の抑制度を解析する

(3) 翻訳過程を考慮した有用タンパク質高度発現システムの開発

各種条件下で活発に翻訳されているmRNA を探索し、候補5' UTR を選択する。また、プロトタイプの発現システムを構築し、プロジェクト内参加企業等に対して技術連携・供与を行う。

(4) 導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用

超ハイスループットスクリーニング系の確立: 評価系として2倍以上のスループットの向上、高精度内部標準の導入による評価精度の質的向上を目標。

新規制御因子等による高効率発現系の構築: 現有システムと比較して50%程度以上の高効率化を目標。

(5) 有用物質高蓄積のための省エネルギー型生育制御技術の開発

植物工場の人為的環境構築性能を生かし、植物の物質生産能力を最大に引き出せる栽培環境の開発を行い、タバコにおいては、有用物質の生産効率(投入エネルギー当たり)について、従来法と比較して20 % 以上向上させる。実用作物の例として、イチゴについては30 % 以上向上させる。

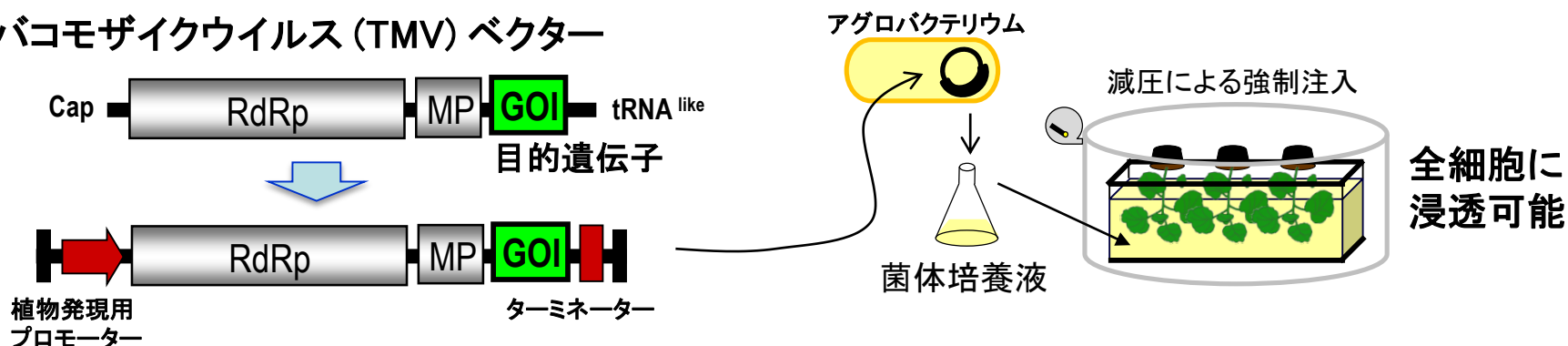
課題(1) 植物ウイルスとアグロバクテリウムによる高効率植物発現システムの開発

独立行政法人 産業技術総合研究所

(1)-1 : CMV 分節ゲノム感染性クローンとアグロインフェクションによる一過性高発現ベクターシステムの開発

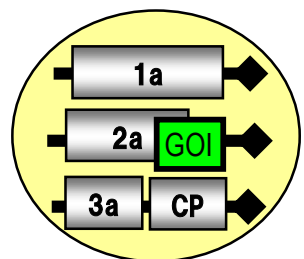
magnICON法: 現在世界的に主流となりつつある、非常に高発現な手法《バイエル社が関連特許保有》

タバコモザイクウイルス (TMV) ベクター

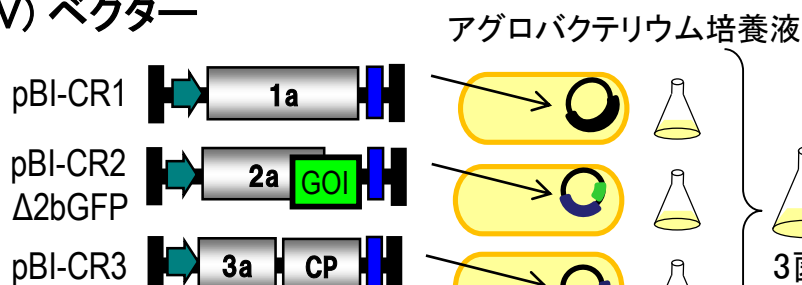
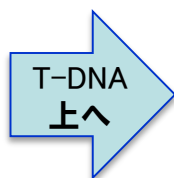


キュウリモザイクウイルス (CMV) ベクター

《当研究Gで国際特許保有》



3本の分節ゲノム

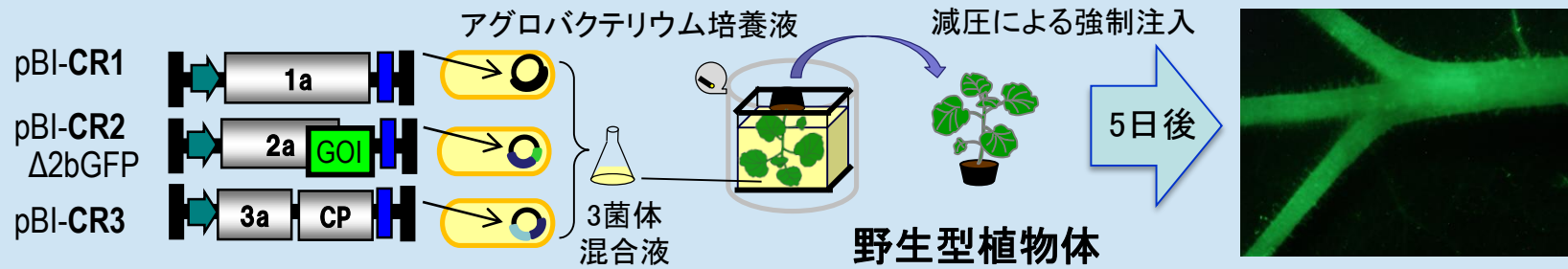


3本必要→簡便化するために組換え植物体から供給する

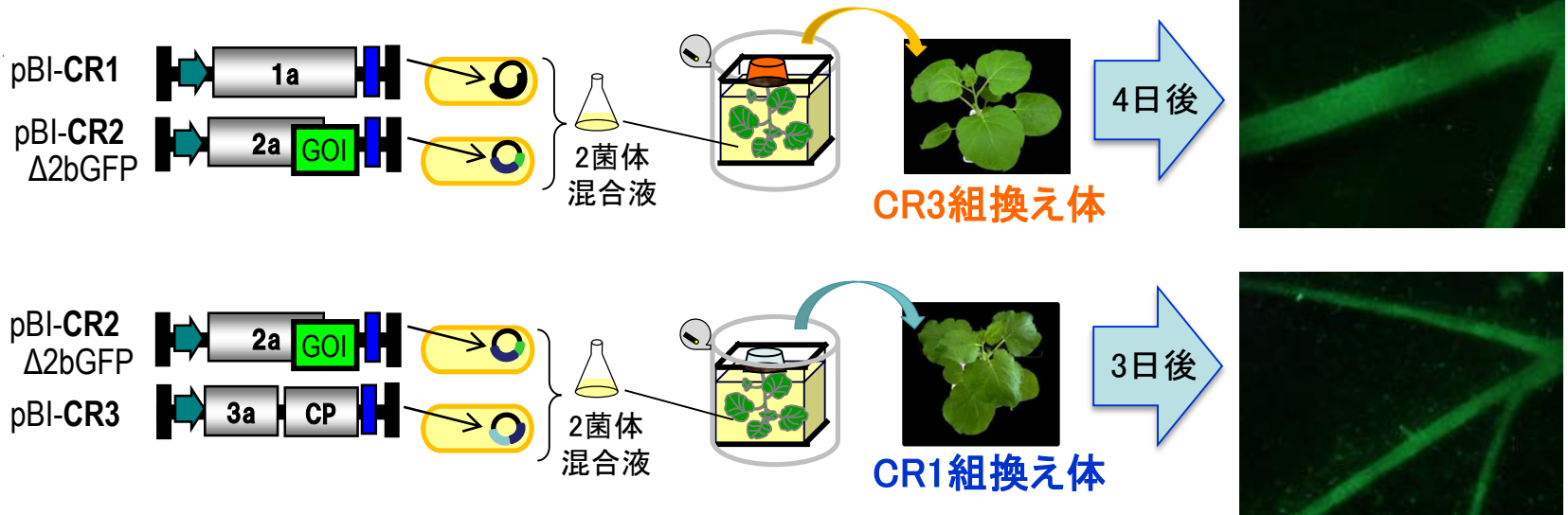
融合することで細胞内での発現量が高く、全細胞に浸透可能な技術が開発できる

課題(1) 植物ウイルスとアグロバクテリウムによる高効率植物発現システムの開発

基本型

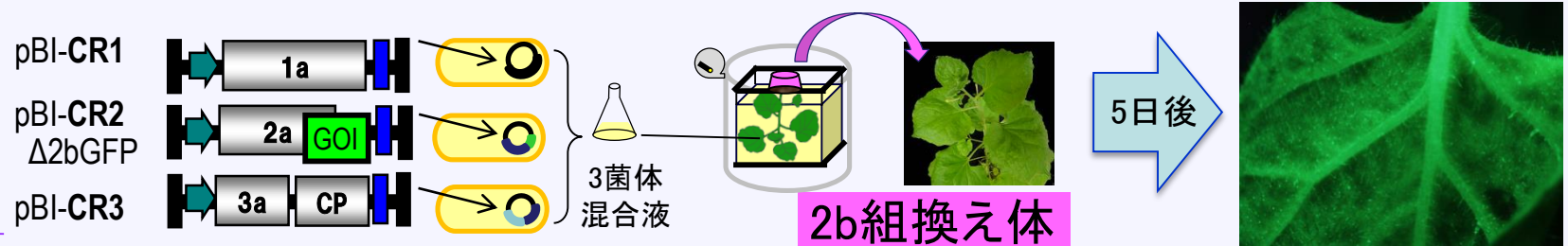


組換え植物体からウイルス遺伝子を提供



葉脈でのみ発現

《特許出願済》

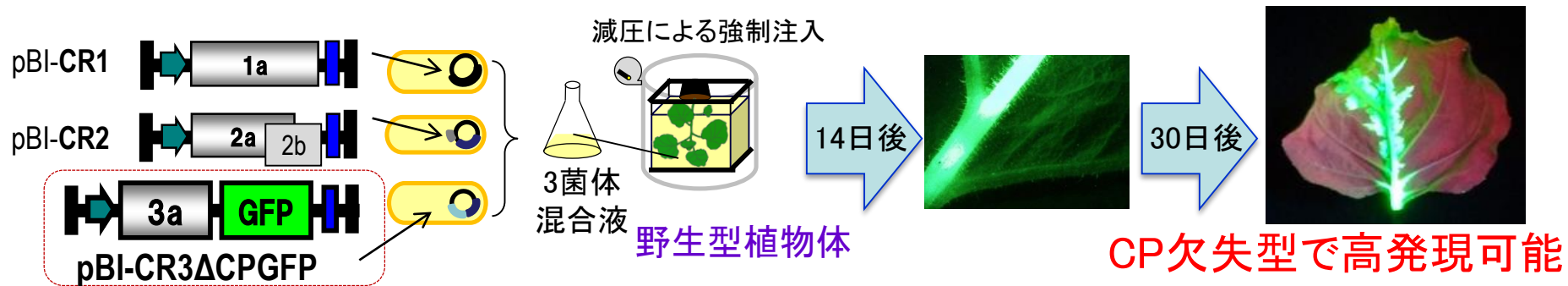
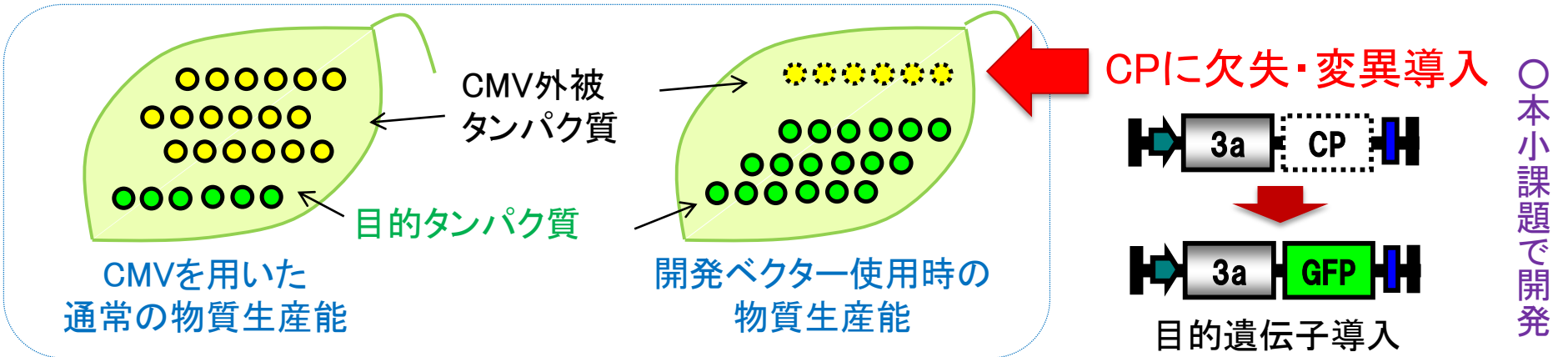


2b 供給により
全身発現

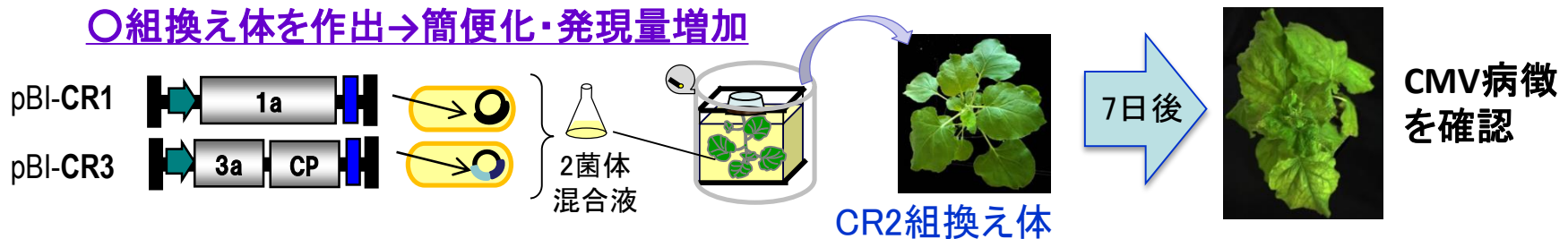
課題(1) 植物ウイルスとアグロバクテリウムによる高効率植物発現システムの開発

(1)-2 : ウイルス外被タンパク質 (CP) 抑制型の一過性高発現ベクターシステムの開発

ウイルスが宿主植物のタンパク質合成系を利用して自身のCPを過剰生産することを抑制



○組換え体を作成→簡便化・発現量増加



課題(2)-1:サイレンシングに関わる因子を抑制した導入遺伝子超受容性植物

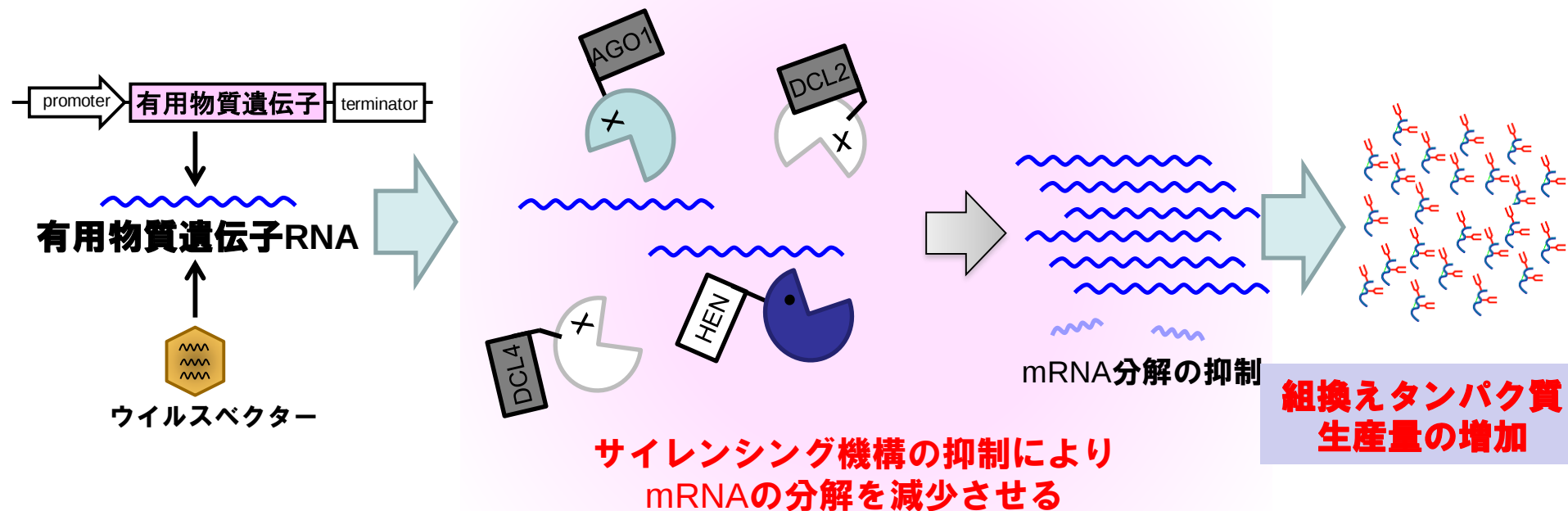
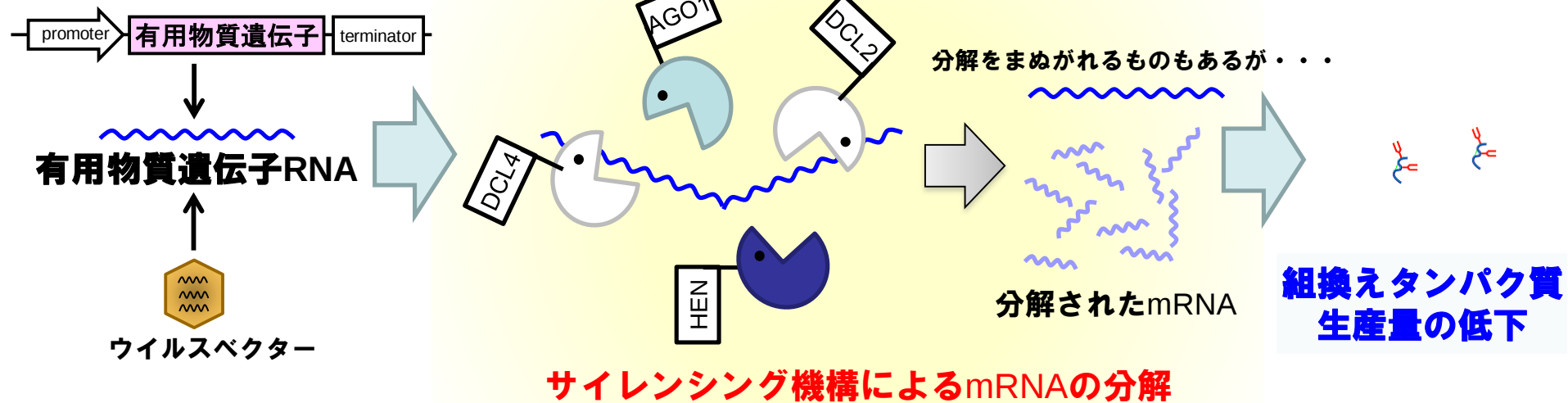
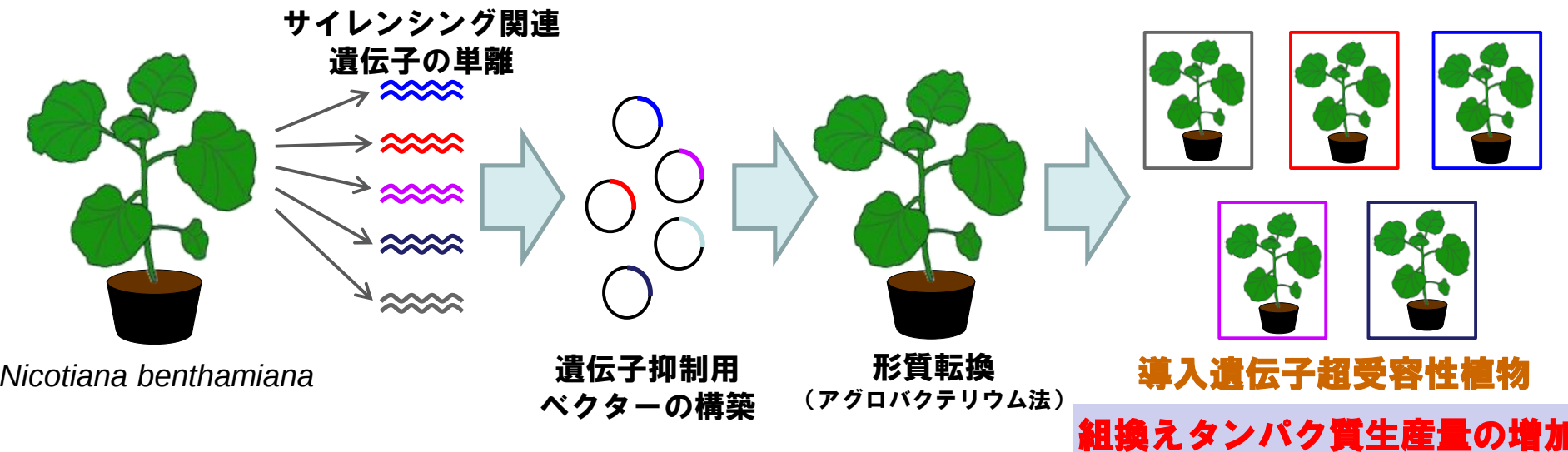


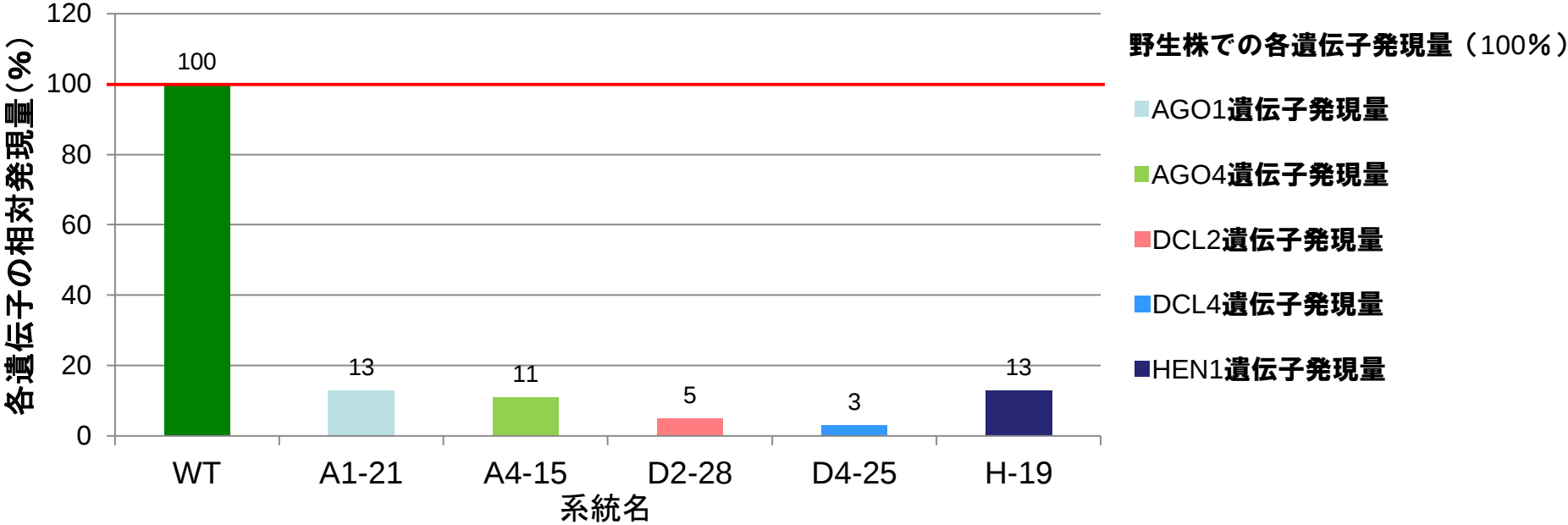
Diagram illustrating the RNA silencing pathway in *Arabidopsis thaliana*:

- Genetic Material:** A construct containing a **promoter**, **外来遺伝子** (exogenous gene), and **terminator**.
- Transcription:** The exogenous gene is transcribed into **外来遺伝子RNA (過剰なRNA)** (exogenous RNA, excess RNA).
- Viral RNA:** **ウイルスRNA** (viral RNA) is also present, derived from a **ウィルスベクター** (viral vector).
- dsRNA Synthesis:** **RdRP** (RNA-dependent RNA polymerase) uses the exogenous RNA as a template to synthesize **2本鎖RNAの合成** (dsRNA synthesis).
- dsRNA Cleavage:** The dsRNA is cleaved by **HEN1** and **DCL4/2** into **21-nt siRNA** (21-nucleotide small interfering RNA).
- siRNA Processing:** The 21-nt siRNA is processed by **AGO1** and **AGO2** (Argonaute proteins) to form the **RISC** (RNA-induced silencing complex).
- Target Cleavage:** The RISC complex targets and cleaves **外来遺伝子、ウイルスRNAの切断** (exogenous gene, viral RNA cleavage).
- Feedback Loop:** The cleavage of viral RNA leads to the formation of **異常RNA** (abnormal RNA), which is then processed by **RDR6** to synthesize more dsRNA, feeding back into the dsRNA synthesis step.
- Silencing Signal:** The pathway also produces a **silencing signal (他細胞へ)** (silencing signal to other cells).

サイレンシング関連遺伝子を抑制することで、目的遺伝子の発現量を植物の開発



課題(2)-1:サイレンシングに関わる因子を抑制した導入遺伝子超受容性植物



Nicotiana benthamiana再分化個体における標的遺伝子抑制度解析結果(リアルタイムPCR)

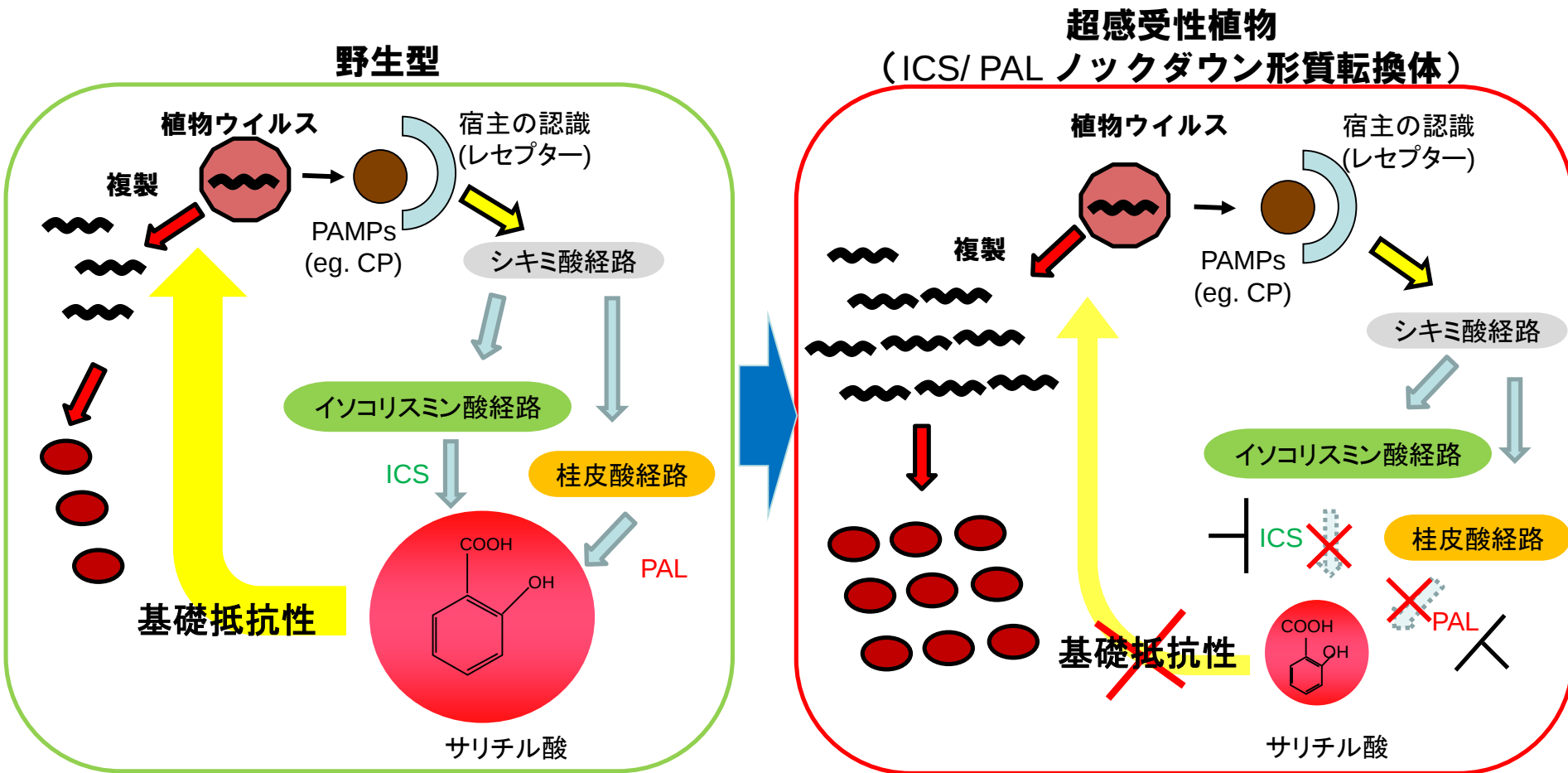
- ・それぞれの植物体において、GAPDH mRNA(内部標準)に対する各遺伝子由来mRNA量を算出。
- ・WTにおける各遺伝子mRNAを100とした場合の各植物体の各遺伝子mRNA量をそれぞれ算出。

標的遺伝子	作出系統名	再分化個体数	標的遺伝子相対発現度(%)	備考
AGO1	A1	25	13～294	
	Alb	20	16～121	A1系統と使用した配列が異なる。
AGO4	A4	26	11～284	AGO4遺伝子が抑制されたT1植物体確認済み。
DCL2	D2	31	5～225	DCL2遺伝子が抑制されたT1植物体確認済み。
DCL4	D4	33	3～143	DCL4遺伝子が抑制されたT1植物体確認済み。
HEN1 (putative)	H	27	13～249	配列はデータベース登録済み(未公開)

課題(2)-2: 2.SAに関わる因子をノックアウトした超感受性植物

国立大学法人北海道大学大学院農学研究院

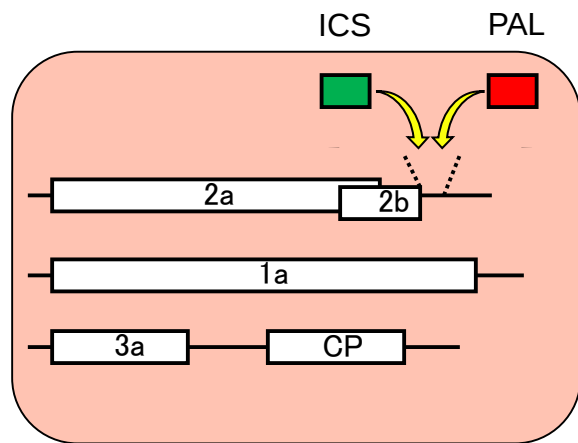
植物はサリチル酸 (SA) の蓄積を介してウイルスに対する防御反応を働かせる



SAの合成を阻害することで、ウイルスベクターが増殖しやすい植物を作出する

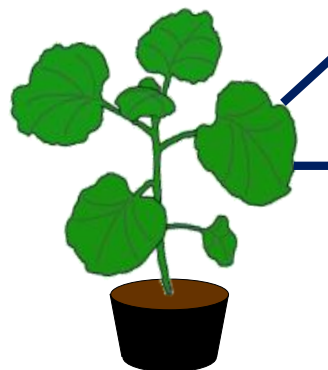
課題(2)-2: 2.SAに関わる因子をノックアウトした超感受性植物

CMVベクターを用いたSA合成遺伝子のサイレンシング誘導 (VIGS)



CMV A1ベクター

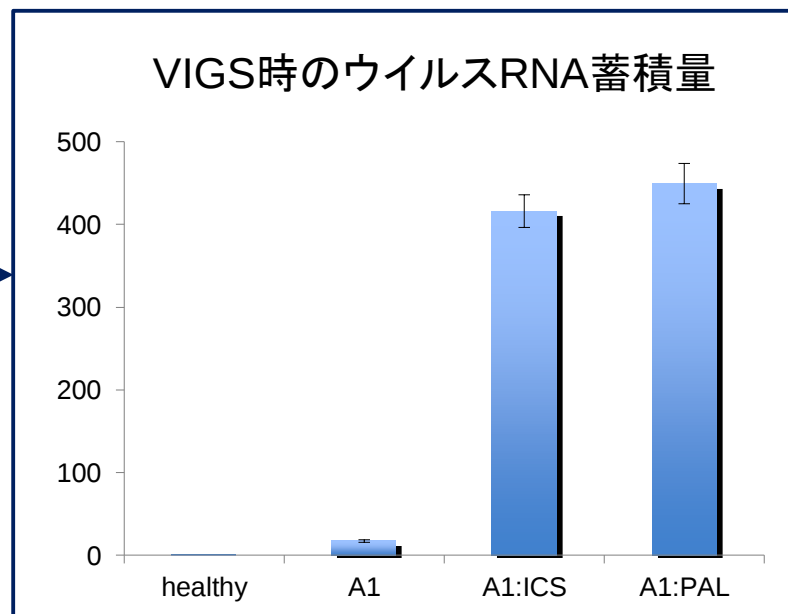
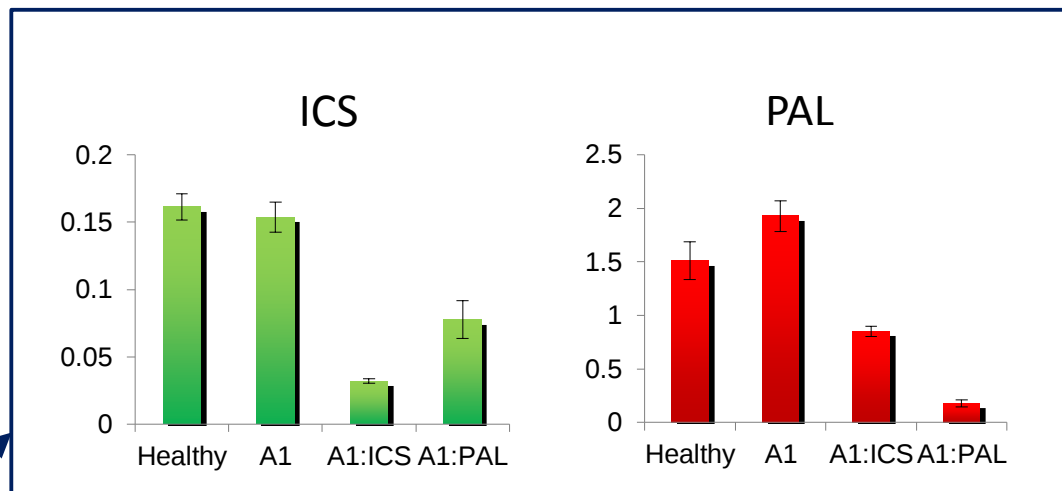
接種



超感受性植物
(VIGS)

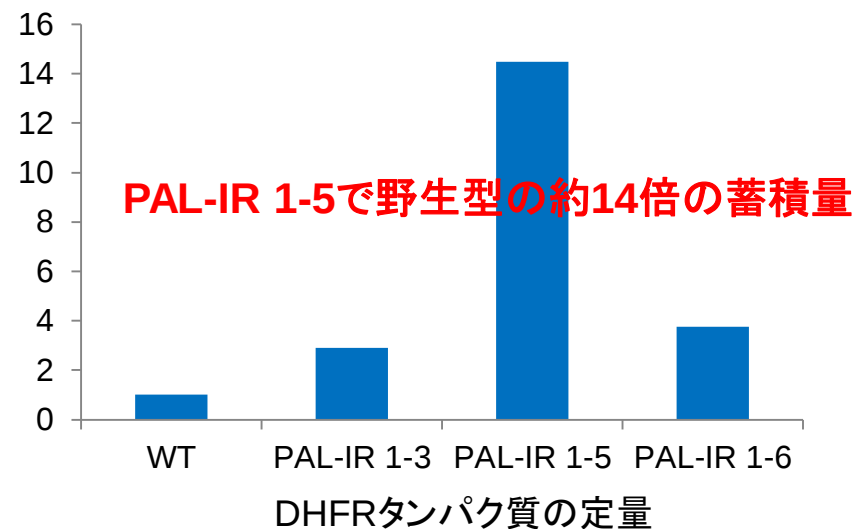
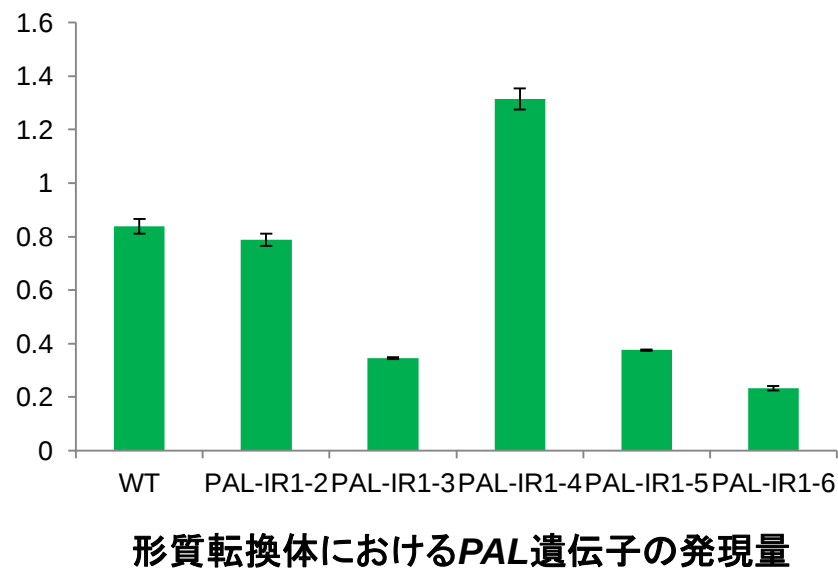
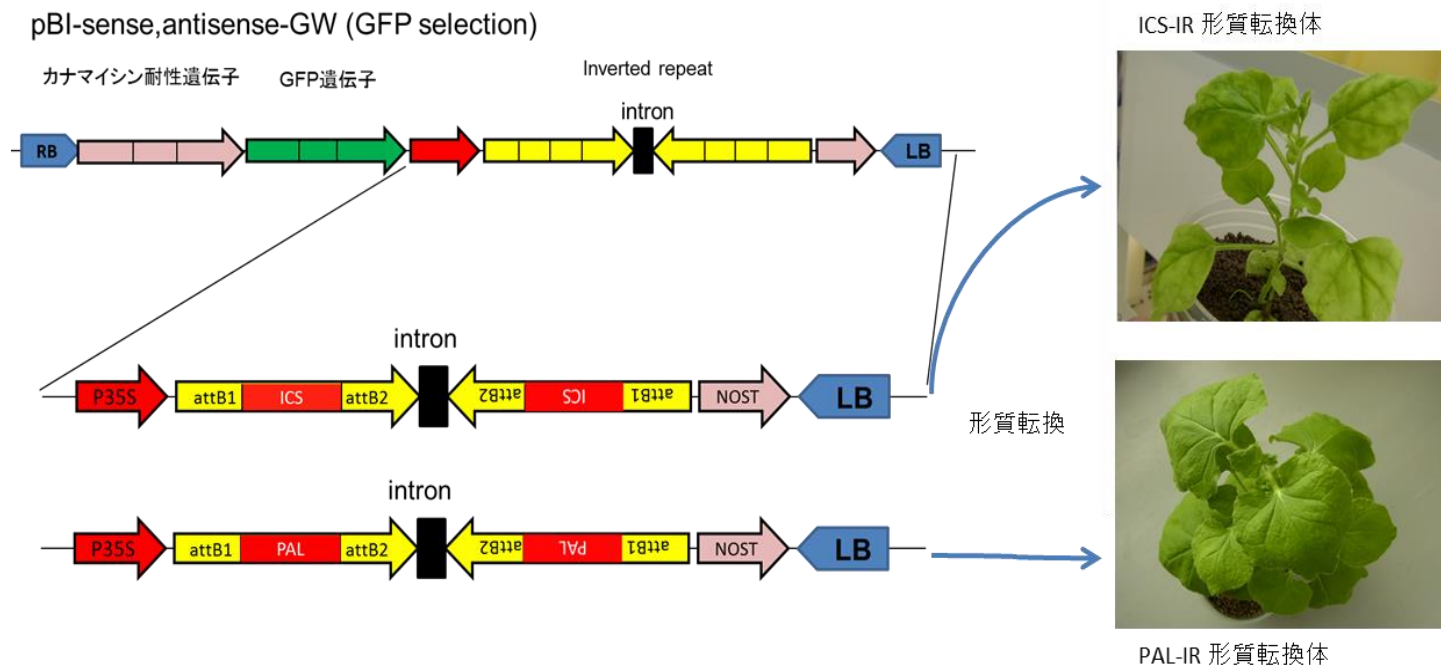
mRNA量解析

CMV RNA量
解析



PAL, ICSのノックダウンはともに10倍以上のウイルス増殖促進効果

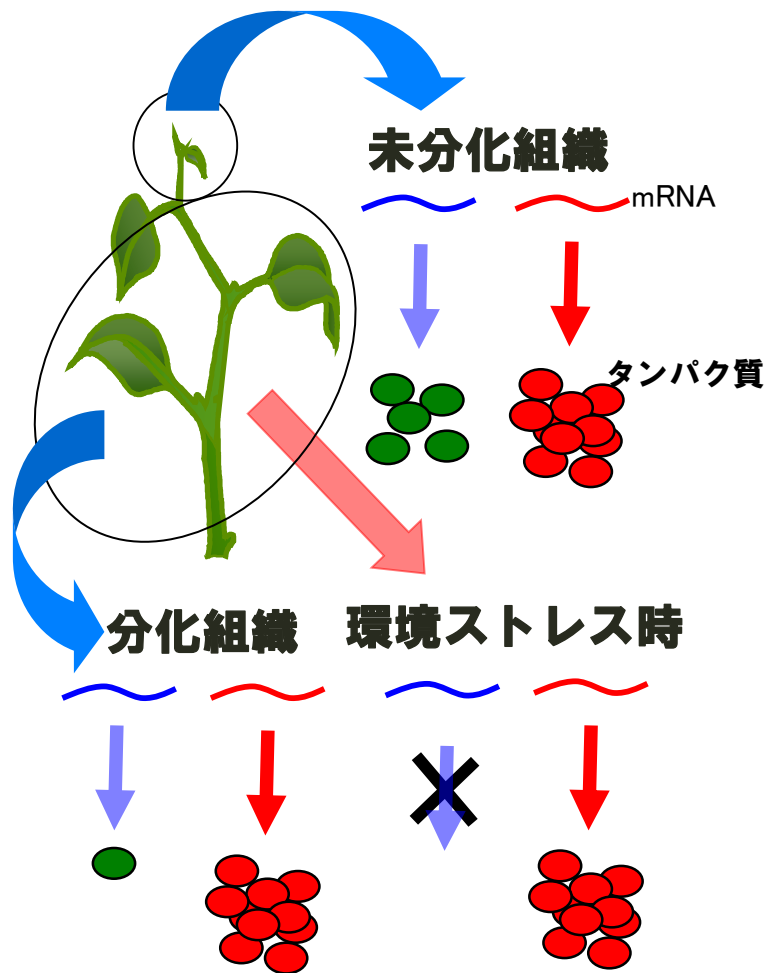
課題(2)-2: 2.SAに関わる因子をノックアウトした超感受性植物



課題(3): 翻訳過程を考慮したタンパク質高度発現システムの開発

国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学

背景／目的



既存の発現システム

- # 未分化組織では**翻訳**
- # 分化組織（成熟葉等）では**低い翻訳活性**
- # 環境ストレス時には**劇的な翻訳抑制**

目的有用タンパク質の低蓄積



有用タンパク質高度発現システム

- # 未分化組織での**更なる高翻訳**
- # 分化組織及び環境ストレス時に**高翻訳活性を維持**

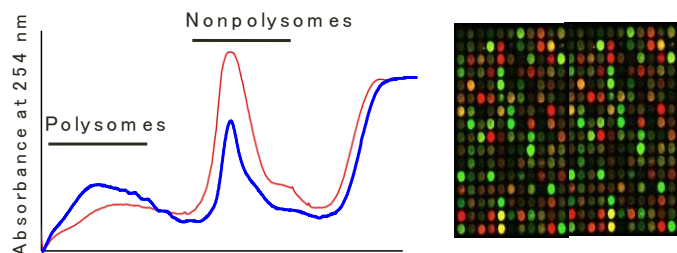
目的有用タンパク質の高蓄積

すべての組換え植物（有用タンパク質生産）作出のためのプラットフォーム技術

課題(3): 翻訳過程を考慮したタンパク質高度発現システムの開発

成果

①ゲノムスケールで全mRNAの翻訳状態を評価
(未分化組織／分化組織／環境ストレス時)



ポリソーム／マイクロアレイ解析

②翻訳制御に関わるmRNA(5' UTR)の
特徴解析



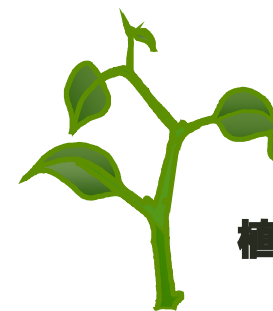
$$y = a_0 + a_{(aaa)}x_{aaa} + a_{(aac)}x_{aac} + \dots + a_{(n)}x_n$$
$$Q^2 = 1 - \frac{\sum (y_{\text{observed}} - y_{\text{predicted}})^2}{\sum y_{\text{observed}}^2}$$

インフォマティクス解析

③候補mRNA (5' UTR) の選択

	PR				CDS
	Y-leaves	M-leaves	heat	salt	
AT1G77120	0.55	0.60	0.93	0.92	1140
AT3G18780	0.33	0.27	0.18	0.53	1134
AT1G34000	0.64	0.67	0.88	0.87	519
AT1G01470	0.65	0.67	0.88	0.82	456
AT4G09650	0.70	0.71	0.84	0.91	705
AT2G47590	0.69	0.69	0.86	0.92	1344
AT5G48180	0.64	0.63	0.92	0.92	981
AT5G62350	0.65	0.62	0.86	0.91	609

④レポーター遺伝子を用いた実証
有用タンパク質遺伝子での応用



植物体での実証試験

プロトタイプの高発現システム構築

プロジェクト内技術連携・供与-北興化学(株)

プロジェクト外技術供与-A社(植物体での有用タンパク質の高発現)

-B社(新規高発現ベクターとして販売予定)

「光る花」の共同開発-NECソフト、花き研、インプラントイノベーションズ、奈良先端大で
プレスリリース

海洋プランクトン由来のYGFPをトレニアの花で高発現、早期の商品化を予定

課題(4): 導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用

国立大学法人 横浜国立大学

背景: 遺伝子発現モニタリング技術, 高効率発現技術の蓄積
ウイルスベクター, アグロインフィルトレーション法の普及

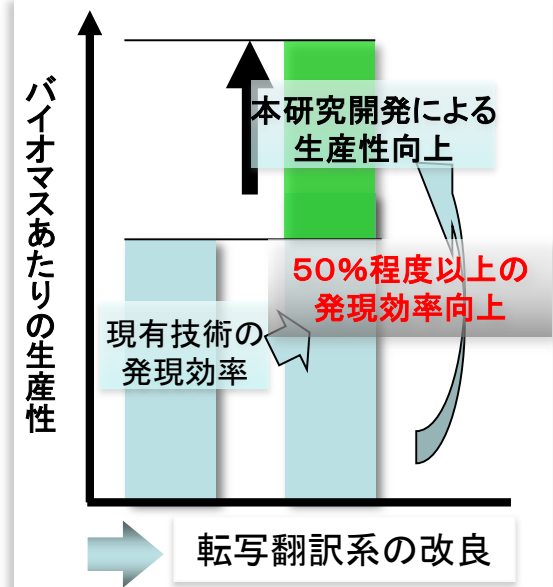
目的: 植物工場における単位容積あたりの導入遺伝子産物生産量の向上

内容: 高精度遺伝子発現評価系を用い, 他に例がない
高効率物質生産に寄与する先進技術を創製する

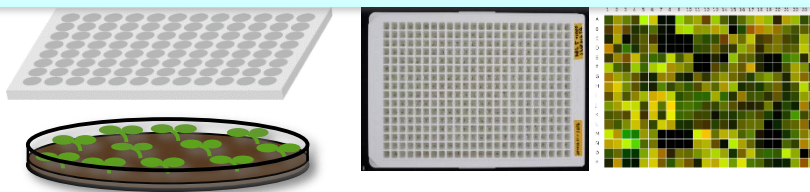
背景となる現有技術と
研究開発実績

=

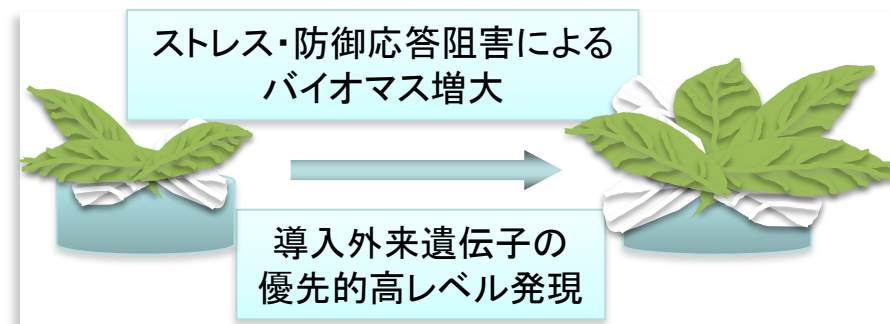
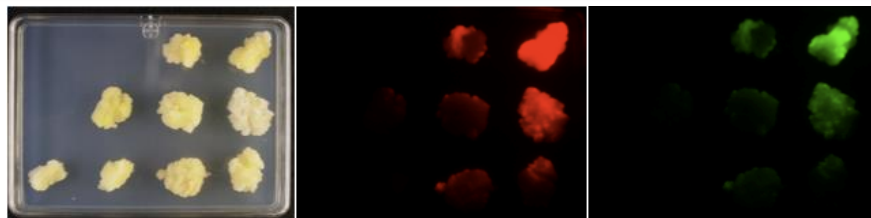
高性能遺伝子発現評価系
防御応答系遺伝子発現モニタリング系
高効率多重遺伝子導入発現系



(4)-1. 超ハイスループットスクリーニング系の確立



(4)-2. 新規制御因子等による高効率発現系の構築



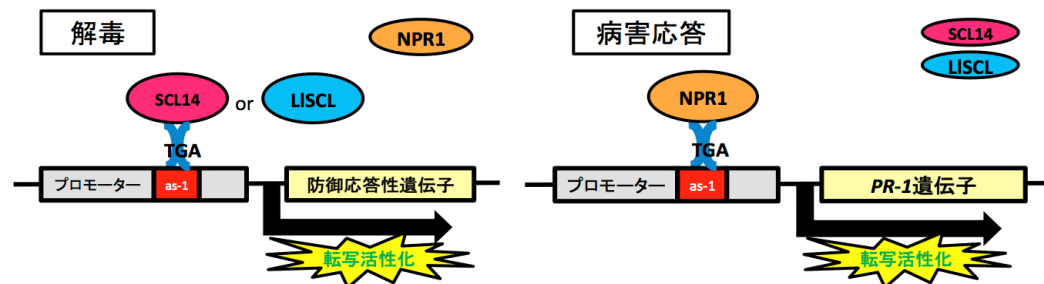
課題(4):導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用

成果と進捗状況

(1) 超ハイスループットスクリーニング系の開発

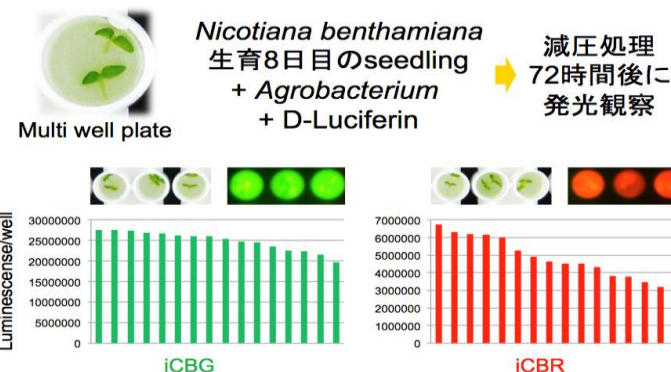
(1)-① 高効率な化合物評価系の構築

- ・防御応答系遺伝子プロモーターを利用した化合物評価系



(1)-② アグロインフィルトレーション系を用いたアッセイ系の改良

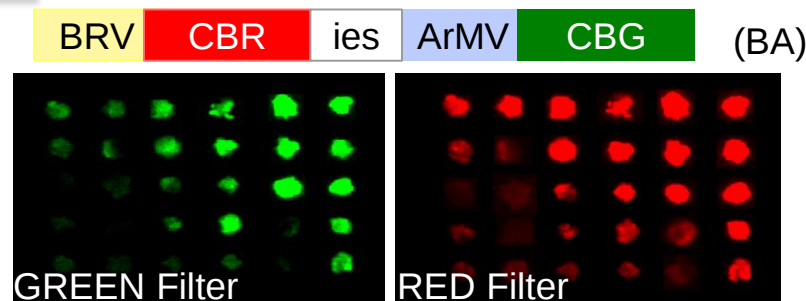
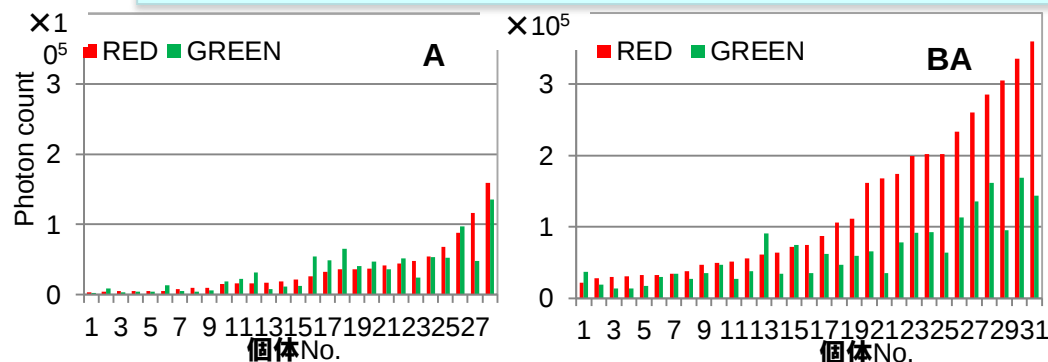
- ・*Nicotiana benthamiana*を用いたハイスループット系の開発
- ・イントロン挿入型多色発光遺伝子を利用した新規アッセイ系



(2) 新規制御因子等による高効率発現系の構築

(2)-① ウイルス由来 5'非翻訳配列の応用

- ・多重遺伝子発現系においても2倍以上の高効率化を達成

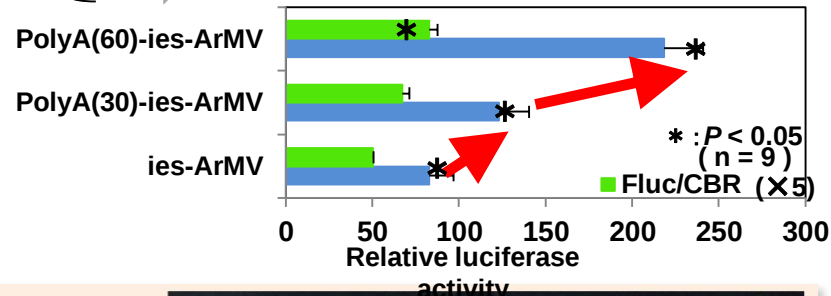
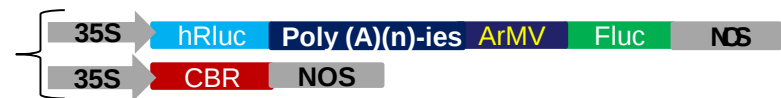
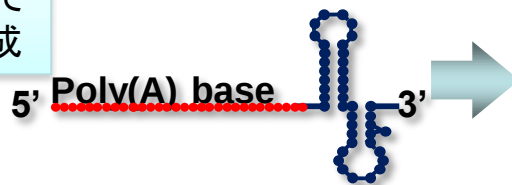


課題(4):導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用

(2) 新規制御因子等による高効率発現系の構築

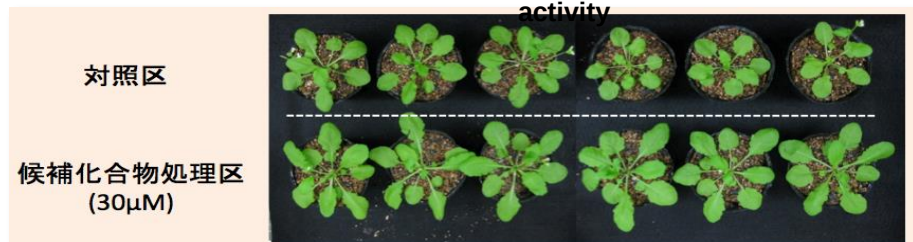
② IRES 上流に挿入する新規介在配列

- 多重遺伝子発現系において2倍程度の高効率化を達成



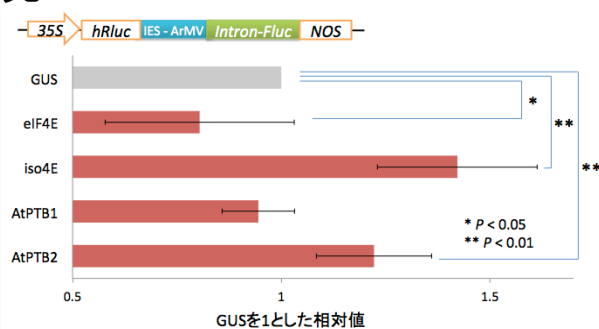
③ 防御応答抑制因子の探索

- 候補化合物を低分子化合物ライブラリーから選抜(1)の成果を活用, 有用化合物候補を同定



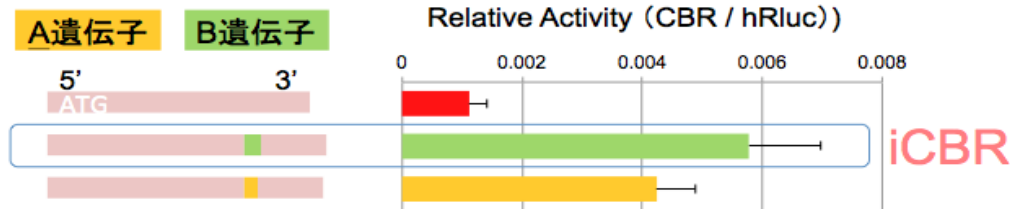
④ 導入遺伝子発現増高に寄与するトランス因子に関する研究

- Nicotiana benthamiana*を用いた発現系を用い翻訳因子, ウイルス由来因子等を評価(1)の成果を活用



⑤ イントロン挿入による発現効率の向上

- 3'側へのイントロン挿入で5倍以上の効率上昇
新規な高効率発現手法としての可能性を示唆
(1)の研究途上の発見



課題(5): 有用物質高蓄積のための省エネルギー型生育制御技術の開発

国立大学法人 千葉大学

(5)-1: 省エネ型局所環境制御による生育環境の向上

(5)-2: 環境ストレス付与による有用物質の発現・蓄積の向上

従来の蛍光灯照明の問題点

—栽培面全体に照射している—
—植物体に当たるのは50～70%程度—



新しい省エネ型のLED照明

—生育に適する光波長を選んで植物葉のみに照射—



照明と空調のランニングコスト削減を目指す



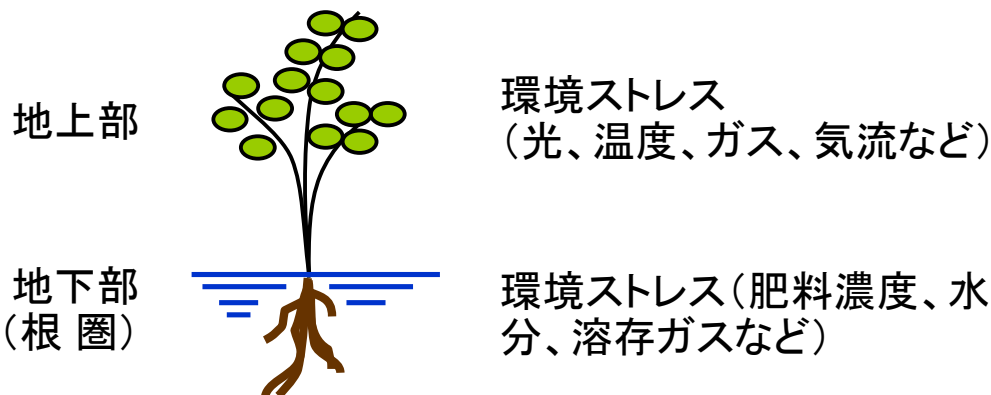
成長するに伴い、照射スポットを広げる

有用物質を目的部位に高蓄積

—栽培方法や生育制御によって
これを実現する方法が未確立—

環境ストレス付与

—環境ストレスを適度に与え、植物の対象部位
での有用成分の発現・蓄積の向上を図る—

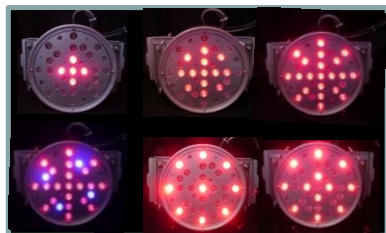


課題(5): 有用物質高蓄積のための省エネルギー型生育制御技術の開発

成果と進捗状況

(5)-1: 省エネ型局所環境制御による生育環境の向上

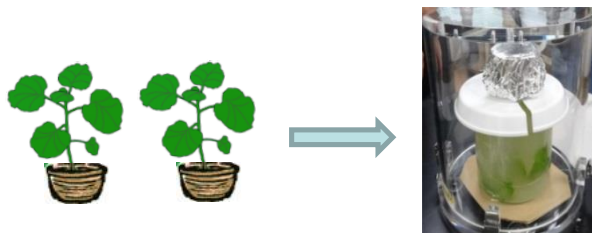
①「植物環境ジェネレータ（通称）」の開発



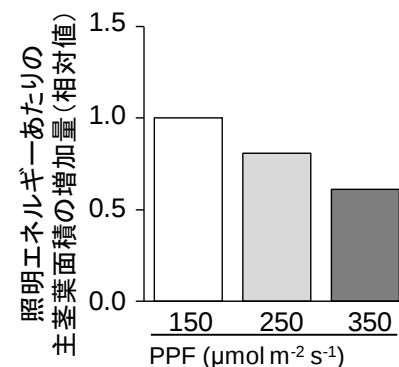
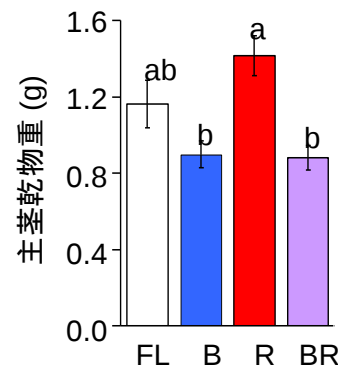
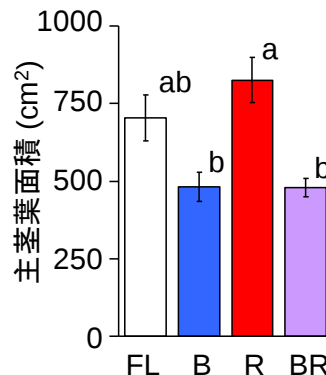
照明と空調を一体化し、多様な点灯モードで照射できるLED光源ユニットを新たに開発した。
現在、省エネ型の照明法を開発中。

(5)-2: 環境ストレス付与による有用物質の発現・蓄積の向上

②-1 アグロ接種までの栽培条件の検討（タバコ）



一過性発現処理に適するベンタミ
アーナタバコ苗の効率的生産



赤色LED単独照射で光強度を $100 \sim 150 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とすれば、照明消費電力を従来法に比べて20%以上削減、かつ10%以上広い葉面積を持つ株を育成を可能

課題(5): 有用物質高蓄積のための省エネルギー型生育制御技術の開発

成果と進捗状況

(5)-2: 環境ストレス付与による有用物質の発現・蓄積の向上

②-2 アグロ接種後の高発現条件の探索 (タバコ)



懸濁液が浸透

葉で発現蓄積

最大展開前後の葉で発現蓄積量が大となり、古い葉では発現量が少となる傾向を確認。「光合成能力の高い葉はタンパク質の合成能力が高い」ことに関係すると推測。

②-3 イチゴの省エネ型有用物質生産技術の開発

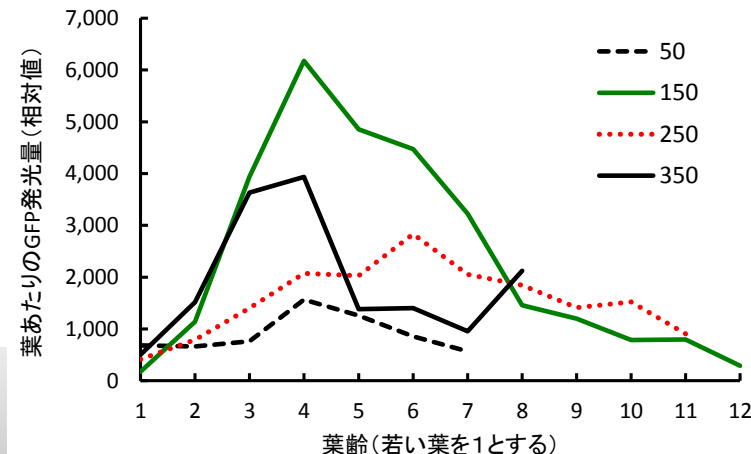


葉の増加

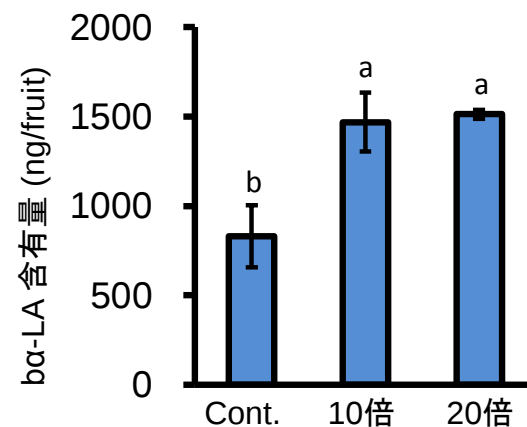
開花

果実成長

- 1) 青色光・連続明期による花成促進により、定植から開花までの期間が現行法に比べて30%以上短縮。
- 2) 長期間の中程度の浸透圧処理により、ウシ α ラクトアルブミン (ba LA) 濃度・含有量を増加できる。



異なる光強度 (PPF、4水準) で育成した株の各葉のGFP総発光量。減圧浸潤処理後3日目。



培養液浸透圧が四季成り性イチゴの果実内baLA量に及ぼす影響

密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

中間評価時目標と成果の達成度

(1) 植物ウイルスとアグロバクテリウムによる高効率植物発現システムの開発

『CMV-アグロインフェクション法』の基本システムの構築および当該手法をより簡便化するための接種用遺伝子組換え植物体を開発し、基本システムと組合せて目的物質の発現を確認する。

100%達成

(1)-1 で開発する手法を基本として、CP遺伝子に欠失・変異等を導入し、当該領域に目的遺伝子を導入したベクターを構築後、構築した遺伝子が機能するかを解析する。

100%達成

(2) 超感受性植物の開発

超感受性植物」作出のため、RNA サイレンシング関連遺伝子を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを作出する。再分化個体として50 株以上の獲得を目標とし、それぞれについて標的遺伝子の抑制度を解析する。

100%達成

超感受性植物」作出のため、SA 合成系関連遺伝子であるPAL及びICS を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを作出する。再分化個体として10 株以上の獲得を目標とし、それぞれについて標的遺伝子の抑制度を解析する

90%達成

超感受性植物」作出のため、AP系関連遺伝子を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを作出する。再分化個体として10 株以上の獲得を目標とし、それぞれについて標的遺伝子の抑制度を解析する

90%達成

(3) 翻訳過程を考慮した有用タンパク質高度発現システムの開発

各種条件下で活発に翻訳されているmRNA を探索し、候補5' UTR を選択する。また、プロトタイプの発現システムを構築し、プロジェクト内参加企業等に対して技術連携・供与を行う。

100%達成

(4) 導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用

超ハイスループットスクリーニング系の確立: 評価系として2倍以上のスループットの向上、高精度内部標準の導入による評価精度の質的向上を目標。

100%達成

新規制御因子等による高効率発現系の構築: 現有システムと比較して50%程度以上の高効率化を目標。

100%達成

(5) 有用物質高蓄積のための省エネルギー型育成制御技術の開発

植物工場の人為的環境構築性能を生かし、植物の物質生産能力を最大に引き出せる栽培環境の開発を行い、タバコにおいては、有用物質の生産効率(投入エネルギー当たり)について、従来法と比較して20 % 以上向上させる。実用作物の例として、イチゴについては30 % 以上向上させる。

100%達成

5. 事業化、波及効果(波及効果)

① 特許取得を一つの目標とする。

取得した特許においては、論文、国内外の学会、シンポジウム等において、その優位性・有用性を発表していくと共に、国内外企業へのプロモーション活動を実施、ライセンスアウトを予定している。

② また、プロジェクト実施期間内に、有用・有効な開発技術は、速やかに同プロジェクト実施企業への技術提供へと連携し、企業実施課題の実用化を加速させる等、を視野に入れて実施する。

委託事業内 特許出願件数： 4件

一部(奈良先端科学技術大学院大学)においては、すでに補助事業者への特許関連技術の連携を実施予定

遺伝子組換え植物を利用した マラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発

ホクサン株式会社

《共同研究》 鹿島建設株式会社
独立行政法人 産業技術総合研究所

（北里第一三共ワクチン株式会社 ～H25. 3）

事業の背景・目的

マラリア撲滅-世界的な課題

感染者:3-5億人
死亡者:100-300万人
経済損失:1.5兆米ドル

薬剤耐性株
感染地域拡大
野生動物保有原虫

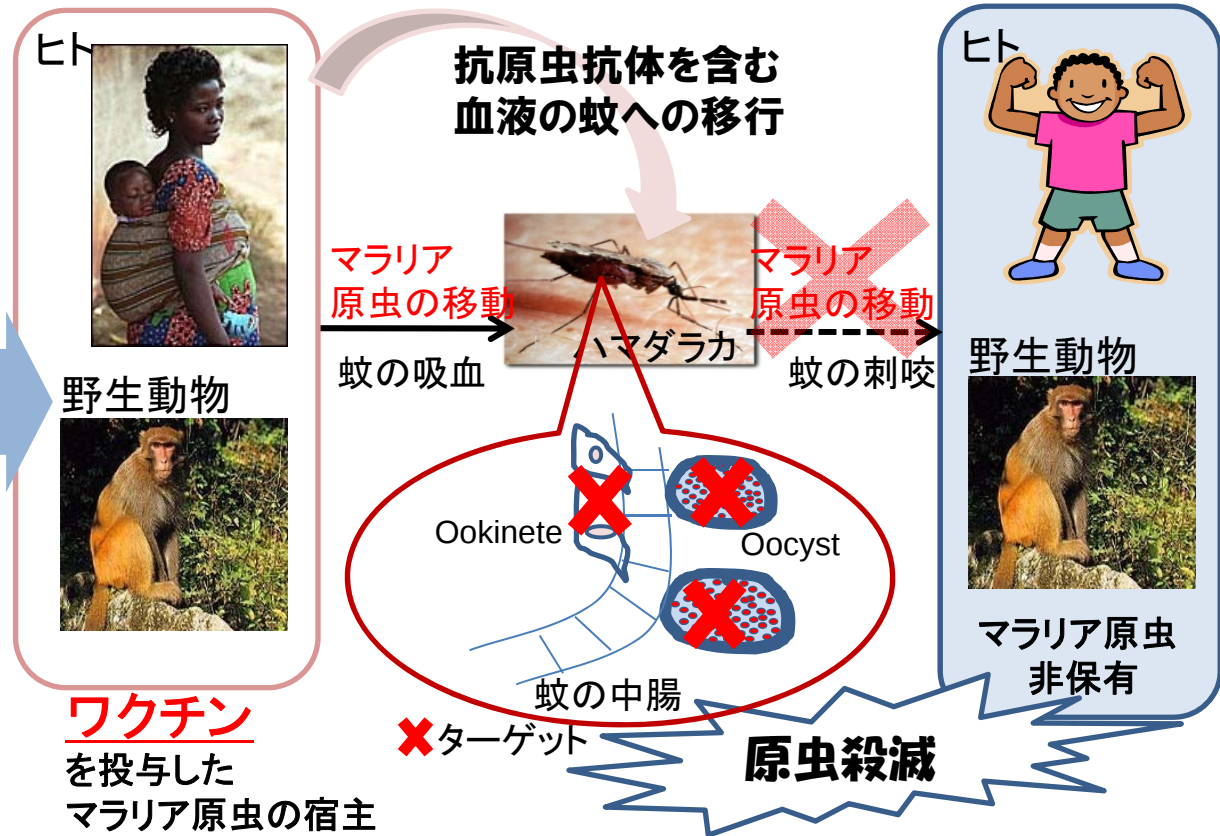
撲滅に有効なワクチンなし

GSKにて開発中
ヒト体内の原虫がターゲット

【開発の障害】

- ・ヒト感染後の原虫に対するワクチンの抗原変異
- ・野生動物が宿主となる

《開発予定ワクチンの作用概要》



開発予定品の利点

- ・ハマダラカ内のマラリア原虫を殺滅することが可能、
- ・高度汚染地域の住民への一斉経口投与可能、
- ・野外散布法による野生動物への経口ワクチネーションが可能、
- ・密閉型植物工場における生産システムの開発により安定した品質管理が可能
- ・原材料の輸送・保存にコールドチェーン不要

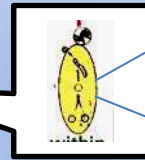
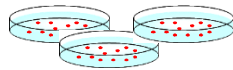
開発概要

研究項目（１）

抗原候補遺伝子のスクリーニング

候補抗原の作成（大腸菌）

・抗体作出



免疫状態を評価できる
抗体検出系を確立



新規
経口アジュバントの活性評価

植物高発現遺伝子の構築

Promoter



抗原遺伝子

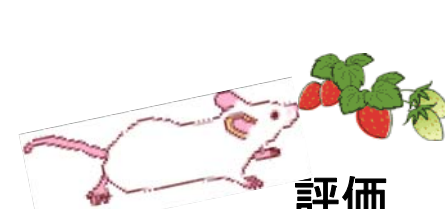
Terminator



目的タンパク質の
発現確認・解析

組換え体の選抜・作出

モデル動物への経口投与試験



評価



研究項目（２）

ワクチン生産における省エネ型栽培技術と衛生管理技術の確立

生産効率向上のための
最適栽培条件の解明



清浄度管理技術の構築

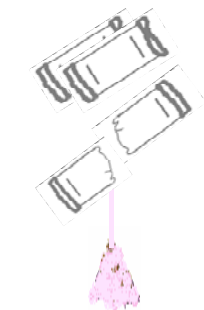
- ・温湿度、微粒子負荷、
- ・微生物負荷モニタリング
- ・評価手法の構築
- ・品質管理方法
- ・製品清浄度評価
- ・SOP確定

製剤化検討



凍結乾燥・粉剤化

医薬品
原材料の
安定供給



経口ワクチン
素材の開発

閉鎖型植物工場での栽培～製剤まで、原薬GMPに対応した医薬品生産における
衛生管理技術の確立

研究項目（1）

遺伝子組換えイチゴを利用したヒトマラリア伝播阻止型経口ワクチン作出

① 遺伝子組換え大腸菌発現等を用いたワクチン抗原の作製

達成目標（プロジェクト終了時）

- ✓ 遺伝子組換え大腸菌発現等を用いたワクチン抗原作製および各種検出系の確立

② 遺伝子組換え大腸菌発現等ワクチン抗原の免疫誘導能ならびに新規経口アジュバントの活性評価と確認

達成目標（プロジェクト終了時）

- ✓ 本ワクチン抗原のモデル動物における免疫誘導能の確認
- ✓ 新規経口ワクチンアジュバントと本ワクチン抗原とを組み合わせた際のモデル動物における免疫賦活効果の確認

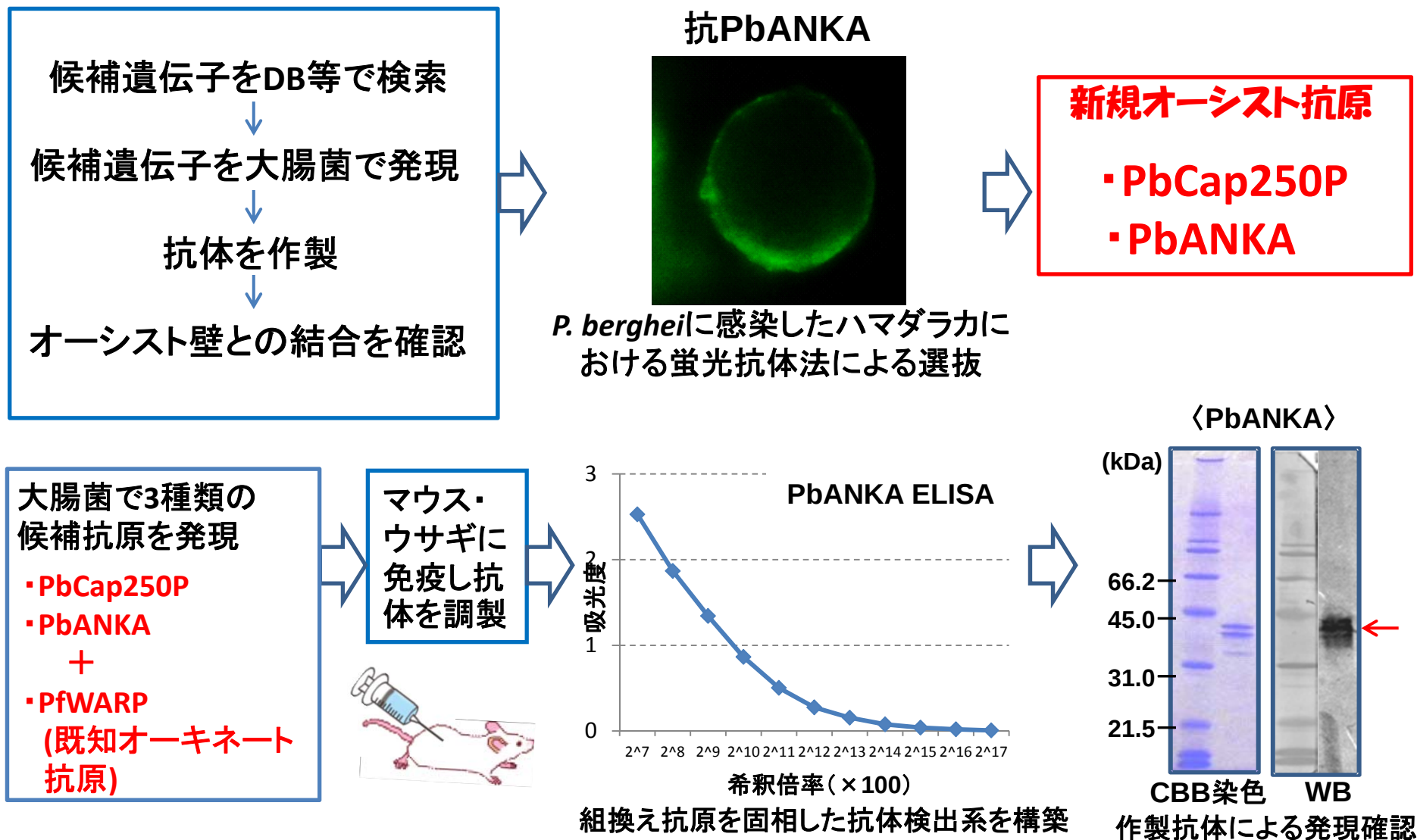
③ 高効率発現イチゴの作出

達成目標（プロジェクト終了時）

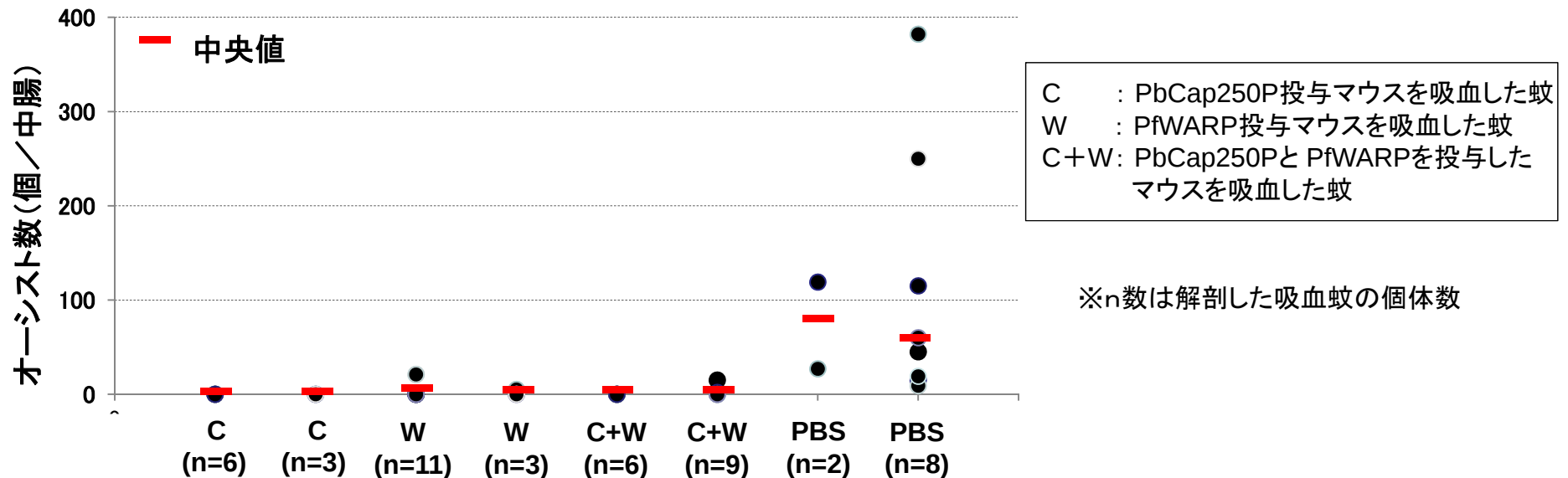
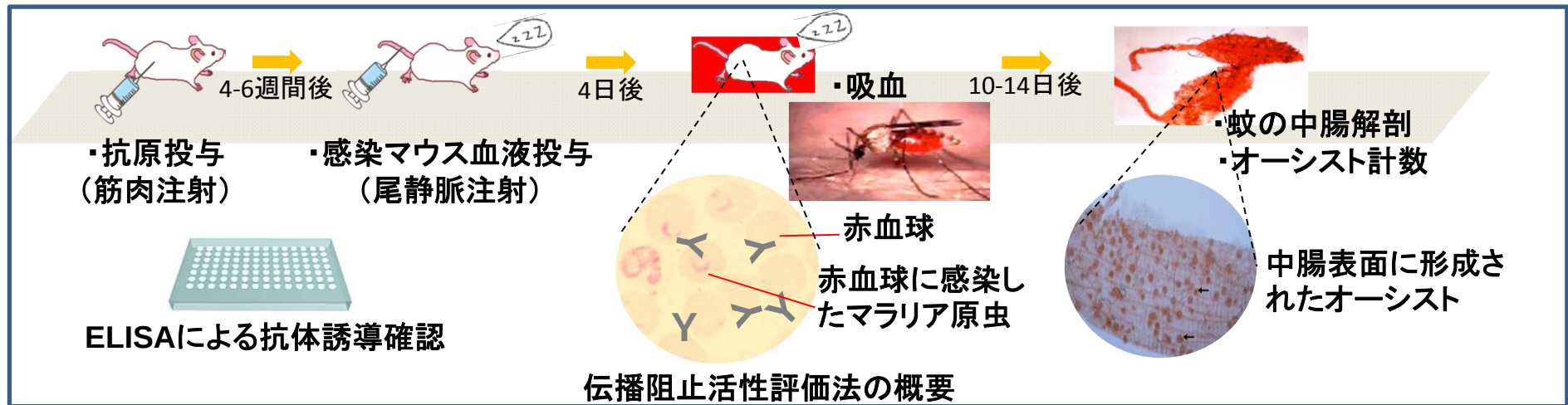
- ✓ ワクチン抗原遺伝子を高発現する遺伝子組換えイチゴ系統の作出・増殖

研究項目（1）①遺伝子組換え大腸菌発現等を用いたワクチン抗原の作製

ワクチン抗原候補として、マラリア原虫の蚊体内のオーシスト壁構成タンパク質を探索



研究項目（１） ②遺伝子組換え大腸菌発現等ワクチン抗原の免疫誘導能ならびに新規経口アジュバントの活性評価と確認



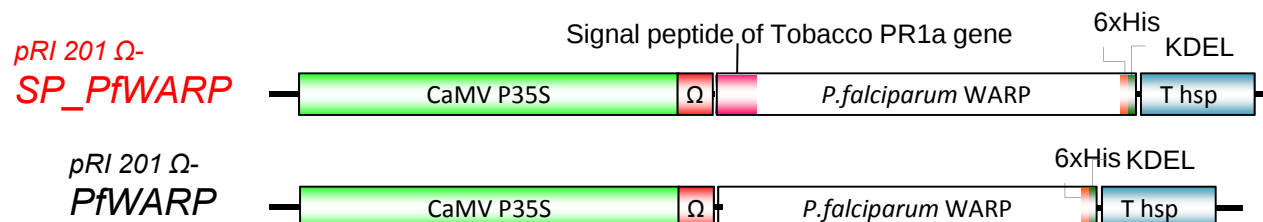
PbCap250p ならびにPfWARP 抗原免疫によるマラリア原虫への伝播阻止活性

PbCap250P, PfWARP共に伝播阻止活性を有する傾向が認められた。

研究項目 (1) ③高効率発現イチゴの作出

Pf WARP

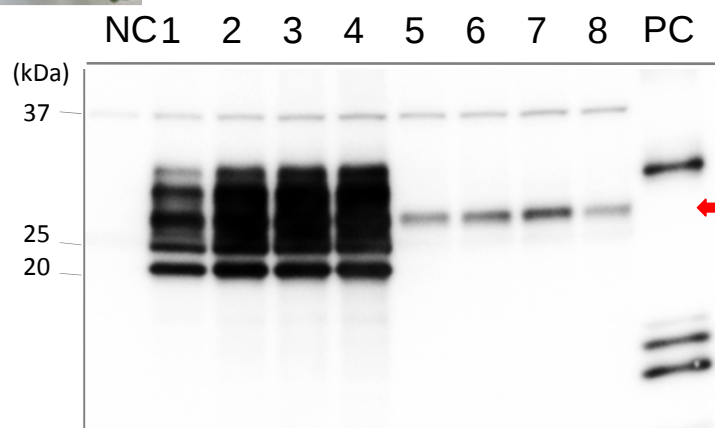
発現コンストラクト



タバコを用いた一過性発現

SP_PfWARP

PfWARP



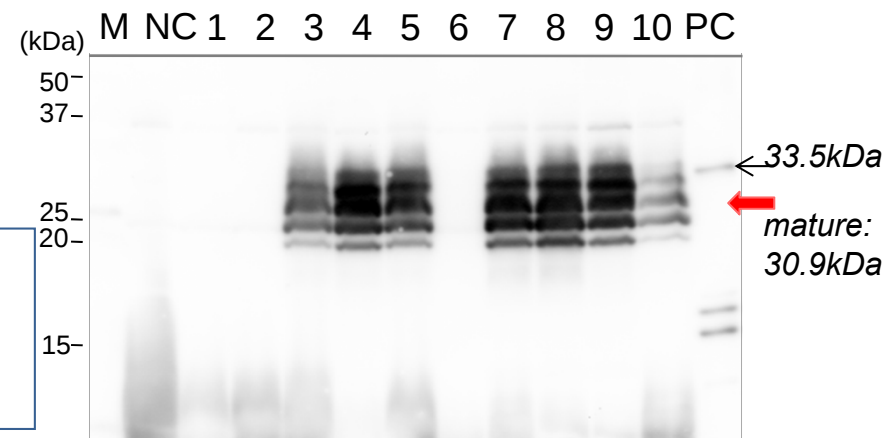
NC: 非形質転換体 PC: 大腸菌発現PfWARP

一過性発現系でタバコPR1a由来シグナルペプチド(SP)を付加することにより、発現量増加が確認された。

形質転換イチゴ



SP_PfWARP



pRI 201 Ω-SP_PfWARP
イチゴ形質転換実験

形質転換イチゴにおいて、抗原候補タンパク質(PfWARP)の発現を確認

果実採取中

研究項目（1）③高効率発現イチゴの作出

抗原発現イチゴの作出

候補抗原		一過性発現確認*	抗生物質耐性イチゴ作出数	遺伝子導入確認	発現確認 (発現系統数)
PbCap 250 F	新規	×	59	○	×
PbCap 250 P	新規	×	118	○	×
Pf WARP	既知	○	138	○	○(80)
Pb ANKA	新規	○	39 (作出中)	○	n.t.

* タバコ一過性発現による植物発現の確認と、遺伝子構築検討

【植物発現ベクター】



高発現検討

RNAサイレンシング・サプレッサー	発現ベクター	抗生物質耐性イチゴ作出数	遺伝子導入確認	発現確認
HC-Pro (Potato Virus Y 由来)	pGPTV-HPT	112	○	×
2b (Cucumber Mosaic Virus 由来)	pGPTV-HPT	50	○	×

サイレンシングサプレッサー遺伝子導入イチゴの作出 → 増殖 → 抗原遺伝子の導入

研究項目 (2)

密閉型植物工場におけるワクチン生産植物の省エネルギー型栽培技術・衛生管理技術の開発

① 省エネルギー型ワクチン生産に適した栽培環境・設備環境の解明

達成目標(プロジェクト終了時)

- ✓ 閉鎖型人工環境下でワクチンを効率的に量産するための省エネルギー型栽培技術の開発

② ワクチン製造のための衛生管理技術の構築

達成目標(プロジェクト終了時)

- ✓ マラリアワクチンイチゴの栽培管理に関する SOP構築、施設・設備の最適仕様の提案
- ✓ 衛生状態に関する簡易迅速評価手法の開発
- ✓ 汚染の抑制に有効な除染、殺菌技術の開発

研究項目 (2)

①省エネルギー型ワクチン生産に適した栽培環境・設備環境の解明

◆アプローチ

省エネ栽培

照明

LED等による効率的な照明装置

空調

制御方法の最適化

栽培

生育促進、発現量向上、スペーシング等

その他 廃棄物抑制及び処理法省エネ化等

◆LEDによる効率的な栽培照明

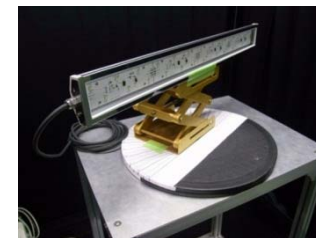
(1)ライン型LEDの基本性能評価

光強度分布のシミュレーションに必要な
基礎データの取得

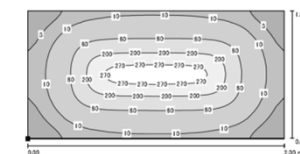
(2)光環境シミュレーションの実施

効率的な器具の配置、配列方法を検討

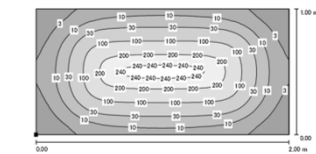
配置及び照射方向の工夫により、
Hf蛍光灯と比較して28%以上の
省エネルギー化が可能である試算結果



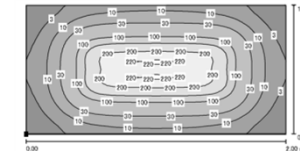
①7本均等配列



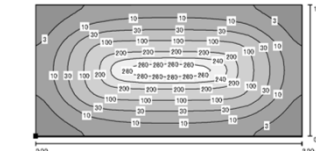
②6本均等配列



③6本 パターン1



④6本 パターン2



研究項目 (2) ②ワクチン製造のための衛生管理技術の構築

◇栽培環境及び果実の衛生状況調査

条件の異なる栽培施設(産総研遺伝子組換え植物工場、一般ビニールハウス)における環境微生物の分布を調査



産総研植物工場

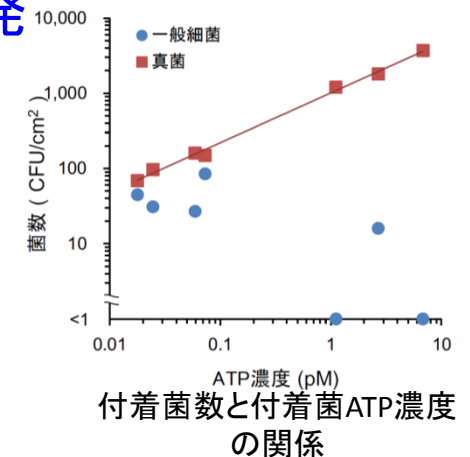


一般ビニールハウス

◇効率的な衛生管理を目的とした簡易迅速評価技術の開発

ATP法による微生物測定実験を実施
培地培養法による真菌数と比較的高い相関

→ 実用化に向けた可能性を確認



◇遺伝子組換え植物工場で利用可能な殺菌技術の開発

弱酸性次亜塩素酸水による居室内空間殺菌実験
14時間処理による $10^3 \sim 10^5$ の殺菌効果

→ 植物工場の空間殺菌法としての
実用性を確認



ミスト噴霧による大腸菌塗布培地の殺菌実験

中間評価目標・達成度

研究項目（１）

遺伝子組換えイチゴを利用したヒトマラリア伝播阻止型経口ワクチンの作出

遺伝子組換え大腸菌発現等を用いたワクチン抗原の作製および免疫誘導能の確認

数種類の候補抗原を作製後、免疫原性（有効性）を確認し、遺伝子組換えイチゴによる伝播阻止型経口ワクチンの開発が可能である見込みが得られた。（100％達成）

研究項目（２）

密閉型植物工場におけるワクチン生産植物の省エネルギー型栽培技術・衛生管理技術の開発

省エネルギー型栽培照明装置の技術開発

ライン型LED照明の配光特性を明らかにした。

→ 光強度分布シミュレーションを用いて、照明器具の配置や光強度調節により、従来装置（蛍光灯）と比較し、省エネルギー化の見込みが得られた。（100％達成）

事業化スケジュール

事業内容	H27 年度	H28 年度	H29 年度	H30 年度	H31 年度	H32 年度	H33 年度	H34 年度	H35 年度
プロジェクト実施期間	→								
パイロットプラント(ワクチン抗原生産、効果等評価)		→	→	→	→	→	→	→	
安全性評価法の検討				→	→	→			
人体薬・動物薬許可申請に必要なデータの蓄積					→	→	→	→	
人体薬・動物薬許可申請・審査・許可							→	→	
実生産									→

波及効果

○甚大な被害をもたらすマラリアの根絶に寄与。

感染者:3-5億人、死亡者:100-300万人、経済損失:1.5兆米ドル、日本でも150-200億円／年
(マラリア対策基金)

○医薬品製造のための密閉型植物工場という、従来にない新しい分野の建設設備投資を生む。

「密閉型植物工場を活用した遺伝子組換え植物ものづくり
実証研究開発」

組換え植物による家畜用コンビネーション ワクチンタンパク質の生産

中間報告

1. 大腸菌性離乳後下痢
2. 豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS)

2013年11月27日

出光興産株式会社

出光



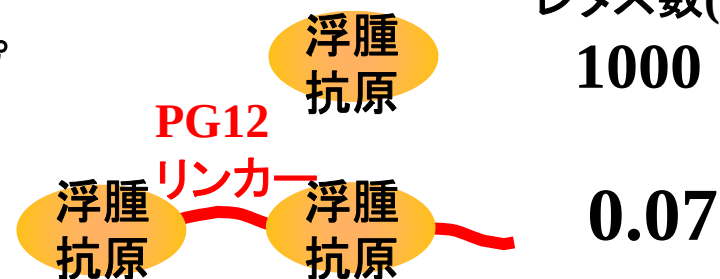
背景

ブタ浮腫病ワクチン

「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発/
植物利用高付加価値物質製造基盤技術開発」(PFpj)(2006-2010)

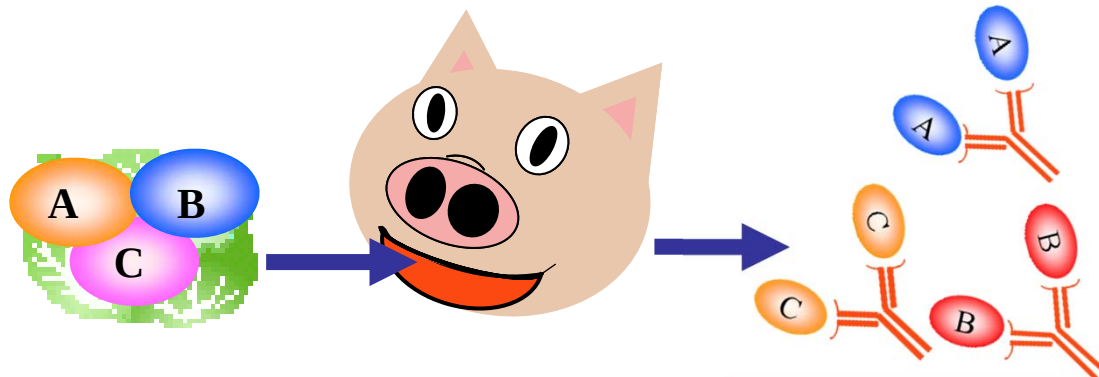
抗原連結による
高蓄積化技術を発明
(特許第5360727号)

プロトタイプ
改良型2



本プロジェクト

コンビネーションワクチン



複数疾病の同時予防

- ・省力化
- ・省コスト化
- ・ストレス軽減

出光

目標：対象疾病の選定

ブタ疾病発症内訳(2012年、国内)

大腸菌症内訳

コンビネーションワクチンの対象:

(1)大腸菌症 (浮腫病 + 大腸菌性下痢症)

(2) 繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS)

ターゲット1： 大腸菌症

疾病名	分娩	母乳を介した免疫 離乳(ストレス) 高事故率 移動(ストレス) 出荷																											
		d21 d50 d70 d100 d160-200																											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	~	28		
浮腫病（ED）																													
大腸菌性下痢症	哺乳期																												
	離乳後																												

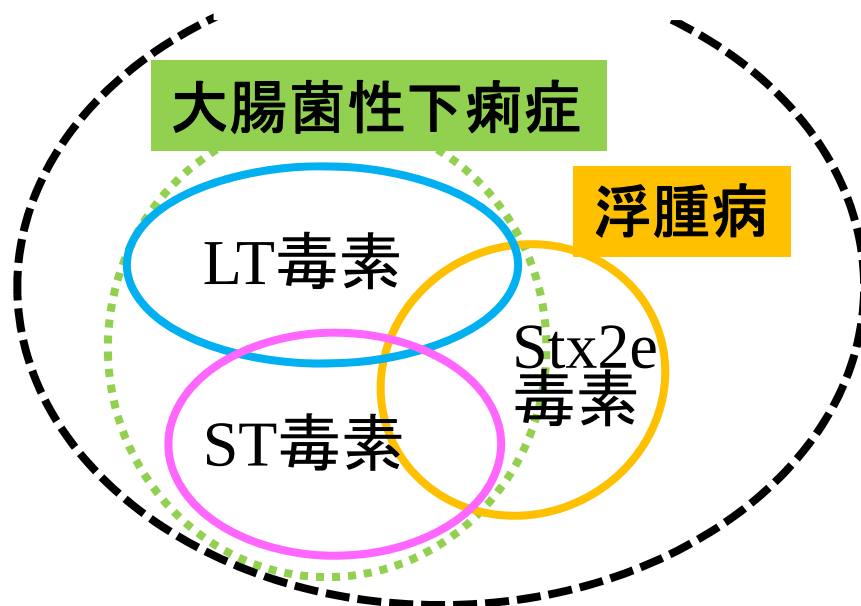
日本市場：10億円

- ・ワクチン：2.3（億円）
- ・抗生物質：4.6
- ・プロバイオティクス：2.5
- ・その他

中国市場：40億円

- ・ワクチン：8（億円）
- ・抗生物質：16
- ・プロバイオティクス：9.6
- ・その他

ブタ大腸菌症



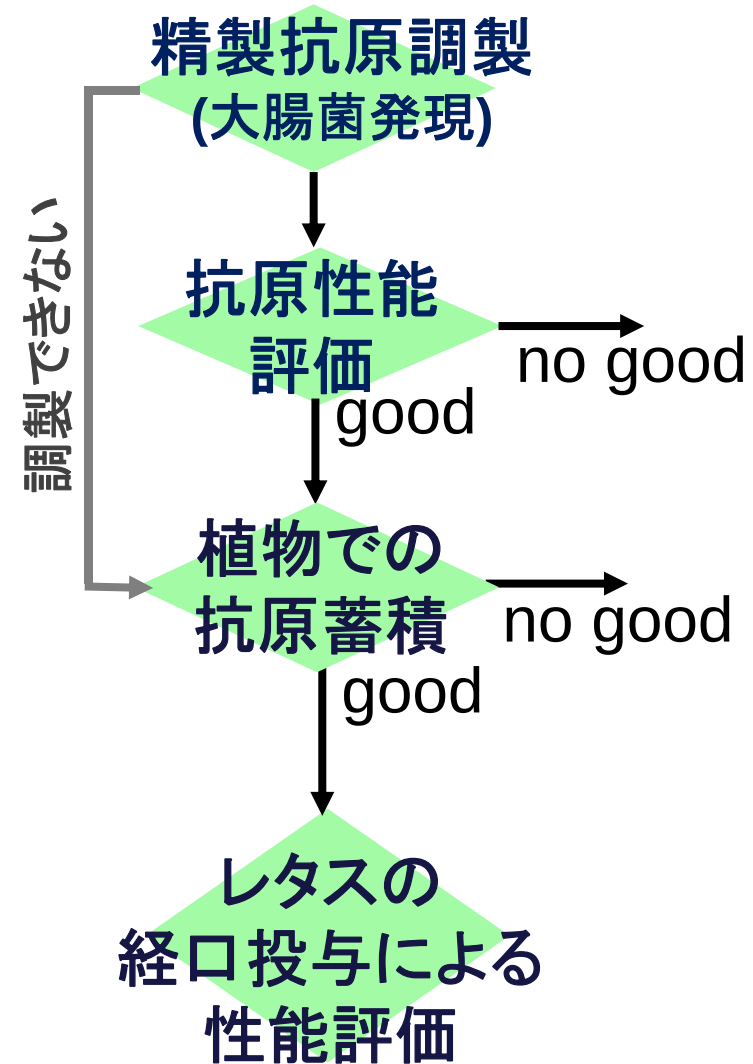
- ❖ 複数大腸菌の同時感染
- ❖ 複数毒素保有大腸菌の出現

個別要素技術課題

1. 個々の候補ワクチン
抗原のデザイン

2. ワクチン抗原の
コンビネーション化・高生産化

3. ワクチンレタス性能評価
小動物モデル実験
ブタ感染防御試験



大日程 (大腸菌症)

【要素技術】

2011

2012

2013

2014

2015

大腸菌症用①

1. 抗原デザイン

2. 高生産化

3. レタス性能評価

小動物評価

ブタ評価

・4種類作製し2種類を選抜

・ウサギ経口投与で
LT中和抗体誘導を確認

・浮腫病菌の予防効果を確認
・LT菌に対する効果確認(2013年度中に実施予定)

大腸菌症用②

1. 抗原デザイン

2. 高生産化

3. レタス性能評価

小動物評価

ブタ評価

・5種類作製し、1種類を選抜
(2種類は評価中)

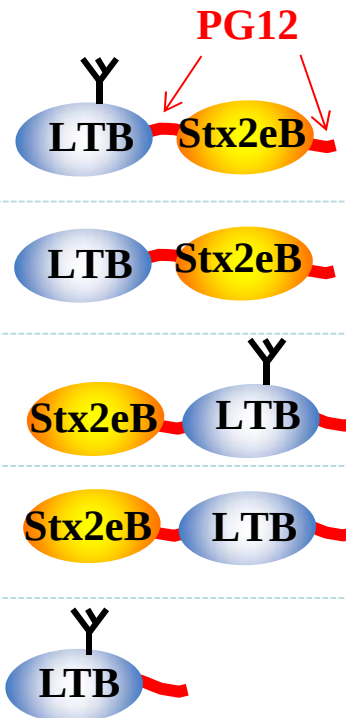
・マウス経口投与で
抗体誘導を確認

大腸菌症用コンビワクチン候補の選抜

大腸菌症用①

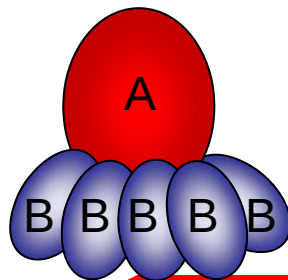
抗原
蓄積

抗LTp抗体



○:浮腫病
ワクチン
レタス並

レタスの
マウス
経口投与



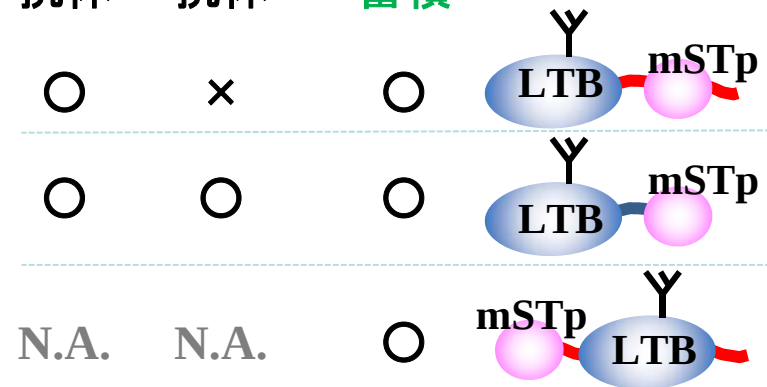
Stx2eB: Stx2e毒素の無毒Bサブユニット
LTB: LTp毒素の無毒Bサブユニット
mST: ST毒素の無毒化変異体 Ala13Leu

大腸菌症用②

精製抗原評価

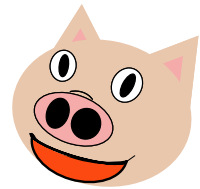
抗LTp 抗体
抗STp 抗体

抗原
蓄積



出光

LTp菌/Stx2e菌用コンビレタスによる 浮腫病菌感染防御試験(ブタ試験)



分娩
(24時間初乳
を与えない)
日齢 0



6



12



18

離乳

21

浮腫病菌

攻撃



25

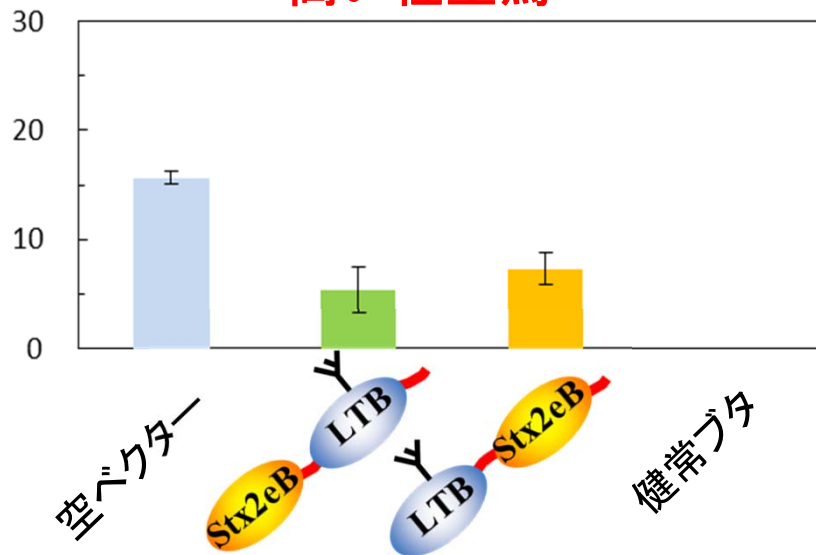
剖検

34

臨床スコア

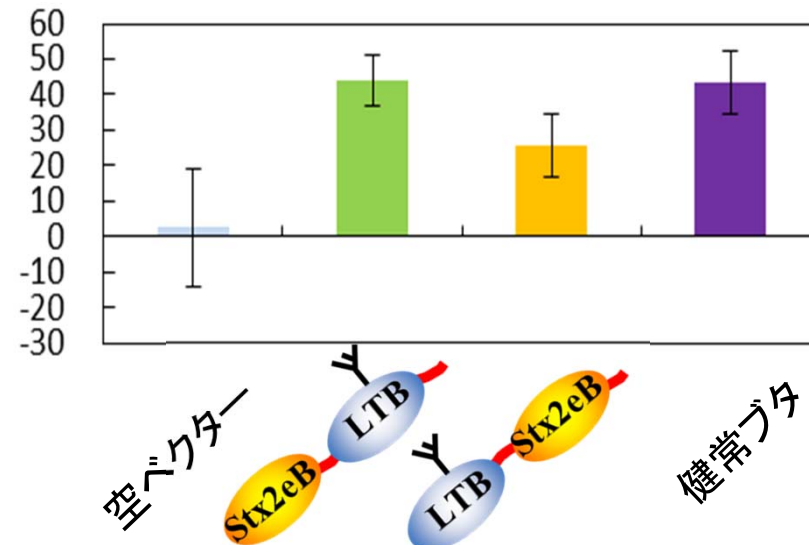
(神経症状、目周囲の浮腫、元気)

高い程重篤



体重伸び率(%)

(攻撃開始-剖検日までの
体重伸び率の平均値)



ブタでの浮腫病予防効果を確認

出光

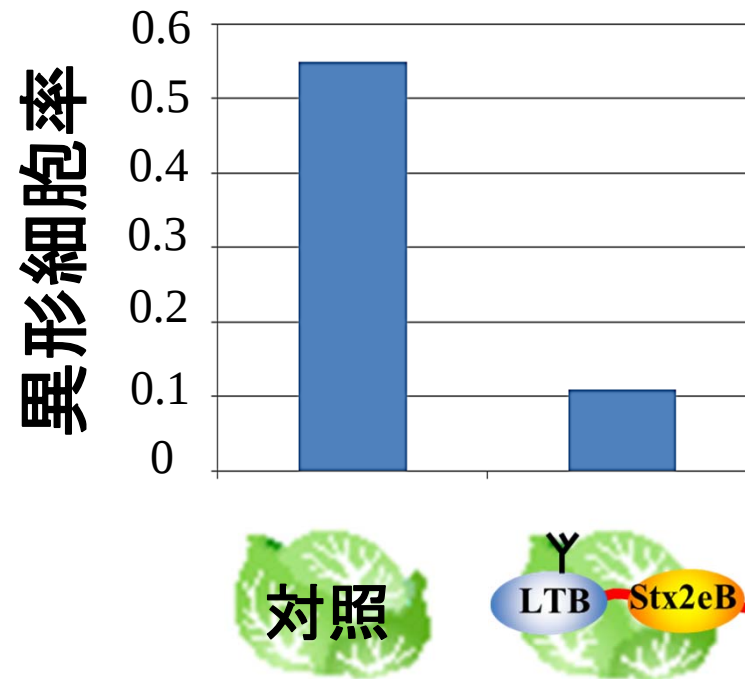
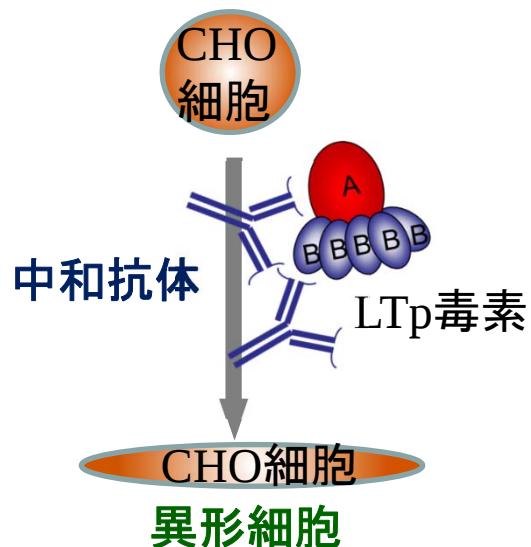
LTp菌/Stx2菌用コンビレタスで LTp毒素中和抗体誘導を確認

1. レタスの経口投与



2. 採血

3. CHOアッセイ

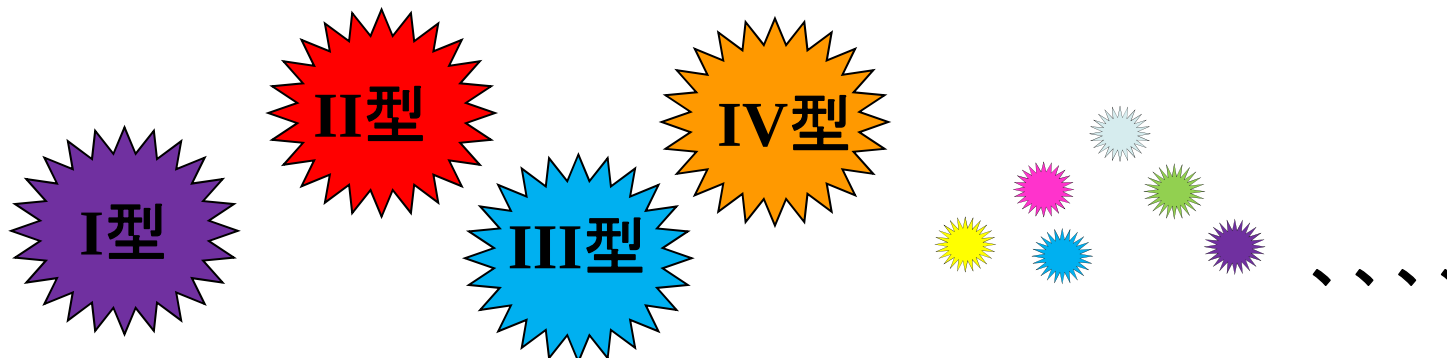


LT毒素中和抗体誘導に成功
ブタでも効果確認を予定(2013年度中)

出光

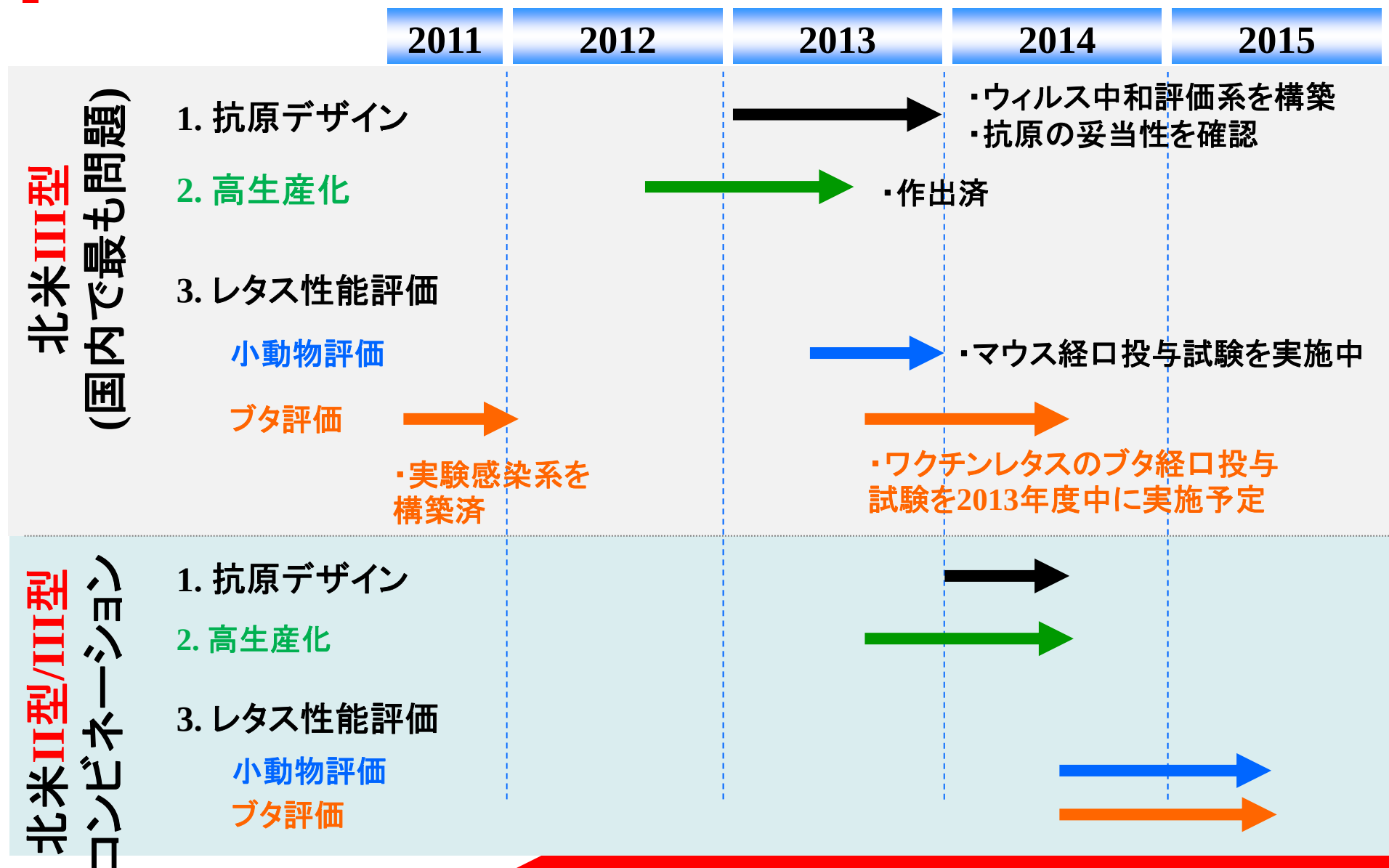
ターゲット2: 豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS)

- ❖ 現在、養豚農家で最も問題となっている疾病(ウィルス)
推定損失額: 280億円/年 (57円/母豚/日)
- ❖ 売上規模(推定): 国内 7億円、海外 30-80億円
- ❖ PRRSウィルスは株のバリエーションが非常に多い!
既存ワクチンはⅡ型のみ対応、
多型対応型ワクチンが望まれている



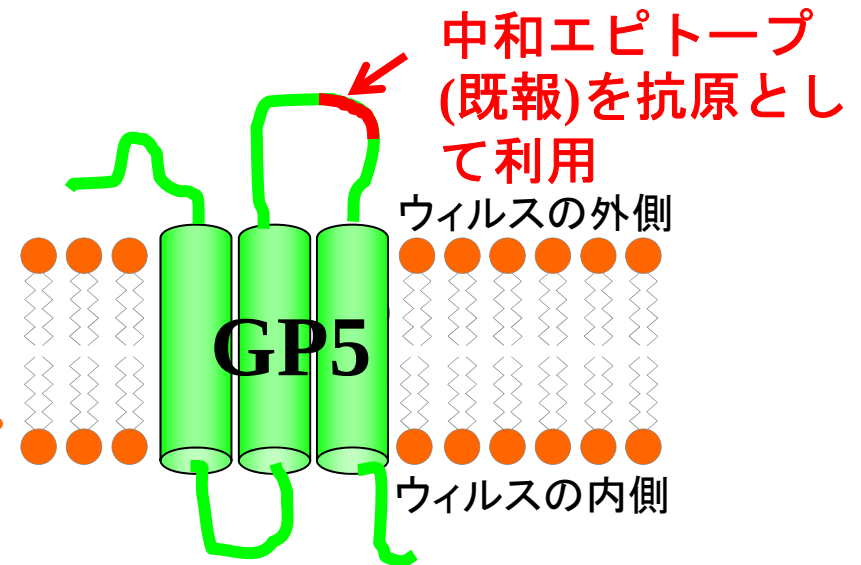
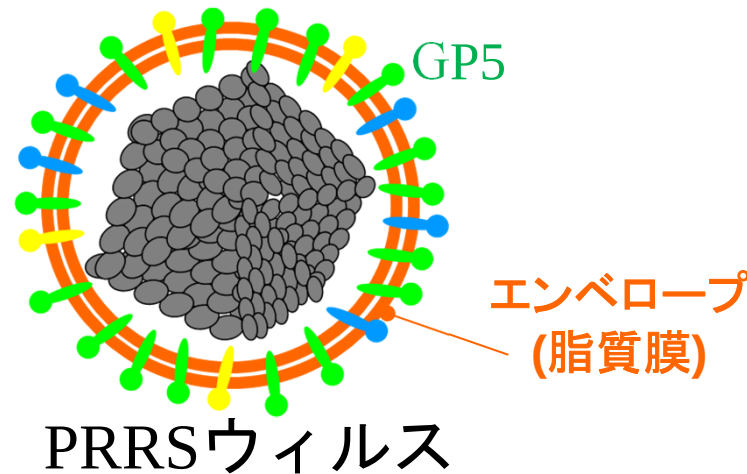
コンビネーション技術で
多型対応可能なワクチン開発を目指す

大日程 (PRRS)



PRRS用ワクチンのデザイン

ウイルス中和抗体誘導を狙う
(細胞への感染阻止)



【成果】

- ❖ PRRSウイルス中和評価系を構築済
- ❖ GP5中和エпитープ免疫ウサギで中和抗体誘導を確認
- ❖ 組換え植物を作出済

中間目標に対する達成度

1. 個々の候補ワクチン
抗原のデザイン

100%
ワクチン抗原を
決定したため

2. ワクチン抗原の
コンビネーション化・高生産化

100%
ワクチン高生産植物を
作出完了したため

3. ワクチンレタス性能評価

75%
LTp菌に対する予防効
果が確認できれば100%、
年度内達成見込み

マイルストーン

波及効果

- ・世界最大の養豚国である中国でもPRRSと大腸菌性下痢は主要疾病であり波及効果は大きい
- ・今後飼育環境の高密度化により当該疾病の発症率増加が予想され、ニーズは高まると考えられる



以上

出光



ダイズ種子による医療用ワクチン成分の 生産技術開発および実証研究

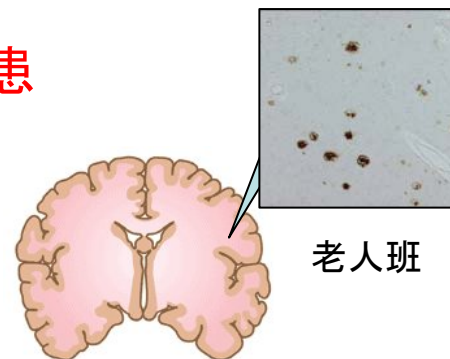
実施機関：北興化学工業(株)

共同研究先：(独)産業技術総合研究所
弘前大学

背景

アルツハイマー病

- β アミロイドの蓄積と老人斑形成による**神経変性疾患**
- 患者数 国内200万人・世界3,500万人以上
高齢化社会 → 患者数増加
- 有効な**予防、治療薬が無い** 免疫療法への期待



ダイズ

- 種子中の貯蔵タンパク質含量が高く**蓄積能に優れる**
ダイズ40%、トウモロコシ9%、イネ7%
- 収穫までの期間が短く、**種子による保管が可能**



今までの成果

ワクチン成分

エピトープペプチド
(抗原決定基)



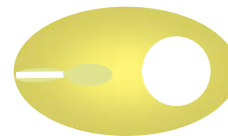
改変型種子貯蔵タンパク質

β アミロイドから副作用の原因となる配列を除いた**エピトープペプチド**を
ダイズ種子貯蔵タンパク質に挿入



独自遺伝子導入法

貯蔵タンパク質欠失変異ダイズを利用してワクチンを安定的に高蓄積させる



JQダイズ

目的物質(ワクチン)を種子中に高蓄積させる技術を確立

目的

ワクチン高蓄積組換えダイズの密閉型植物工場での省エネルギー低コストによる栽培システムを構築し、医薬品としての動物評価、品質管理法等を確立する。



ワクチン高蓄積ダイズ

ワクチン原薬の有効性及び安全性評価技術の開発

- ・免疫誘導技術確立
- ・作用機序の解明
- ・安全性評価試験



弘前大学医学研究科
(共同研究)

臨床試験

ダイズ種子によるワクチン原薬製造技術の開発

- ・規格、品質管理法の確立
- ・加工、製造プロセス



密閉型植物工場での生産性検証

動物試験用サンプル生産試験

密閉型植物工場における組換えダイズ栽培技術の開発

- ・人工環境要因
- ・水耕栽培条件



産業技術総合研究所
北海道センター
(共同研究)

治験用ワクチン原薬の製造

研究開発項目および目標

要素技術	目標・指標	妥当性・設定理由・根拠等
(1)密閉型植物工場における組換えダイズ栽培技術	人工環境下におけるワクチン成分 高蓄積組換えダイズの栽培技術を確立 し、目的物質の生産、蓄積を安定かつ最大化させる 環境条件を解明 する。 ワクチン成分: 2mg/種子1g 以上、種子間差異±20%	ワクチン成分(エプトープを含む改変型貯蔵タンパク質)の経口投与量、期間を1人当たり1mg/日×180日＝180mgと想定すると組換えダイズ種子換算では2～3粒(約0.5g)/人/日となり、経口摂取可能量である。
(2)組換えダイズによるワクチン原薬生産の実証研究	ワクチン成分による 免疫誘導条件の最適化 を行い、経口ワクチンとしての 有効性を確認 し、医薬品としての特性評価法を確立する。	医薬品開発に必要な物性、測定法などの評価基準を設定、評価法確立、疾患マウスによる有効性、作用機序解明が必要。
(3)治験薬GMPに準拠した生産性検証試験	最終評価のみ	

成 果（要素技術1）

成 果（要素技術2）

成 果（要素技術3）

成果まとめ・目標達成度

特許出願1件： 予防・治療用ワクチン組成物

要素技術	目標・指標	成果概要	達成度
(1)密閉型植物工場における組換えダイズ栽培技術	人工環境下におけるワクチン成分高蓄積組換えダイズの栽培技術を確立し、目的物質の生産、蓄積を安定かつ最大化させる環境条件を解明する。ワクチン成分：2mg/種子1g 以上、種子間差異±20%	- 高蓄積JQダイズの水耕栽培、環境制御条件を確立 - 水耕栽培種子中のワクチン含量：3mg/種子1g (種子間差について確認)	95%
(2)組換えダイズによるワクチン原薬生産の実証研究	ワクチン成分による免疫誘導条件の最適化を行い、経口ワクチンとしての有効性を確認し、医薬品としての特性評価法を確立する。	- 疾患マウスで記憶障害改善効果あり、有効性確認 - 種子からのワクチン成分精製法を確立 - 種子中でのワクチンの可溶性、安定性を改善したダイズ新系統を作出	80%
(3)治験薬GMPに準拠した生産性検証試験	最終評価のみ		

事業化計画

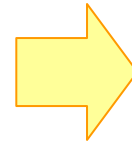
波及効果

密閉型植物工場での ダイズワクチンの製造

省エネルギー・低コスト
高付加価値



新たなバイオ医薬品、
動物用医薬品、
健康食品素材等の製造



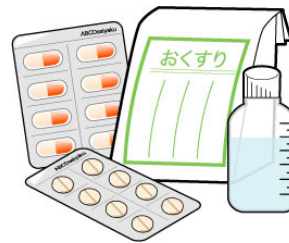
アルツハイマー病薬市場

国内 約1,000億円
世界 約6,000億円

世界の患者数は増加する

2010年 3,560万人
2030年 6,570万人
2050年 1億1540万人

「世界アルツハイマー病報告書」



発症を予防する

発症を数年遅らせる

治療や介護にかかる費用軽減
による経済効果

「エネルギー使用合理化先進的技術開発費補助金
(密閉型植物工場を活用した遺伝子組換え植物ものづくり実証研究開発)」
中間評価検討会

新規外来遺伝子排除機構の制御による
有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証

公益財団法人サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所



レンギョウを利用したセサミンの代謝工学的生産の必要性と合目性



ゴマ

- ・ゴマ油中のセサミン含量は0.5%
- ・**種子**にセサミンを蓄積(葉には微量)
- ・**種子**は一年に一度秋に収穫

セサミン生合成遺伝子

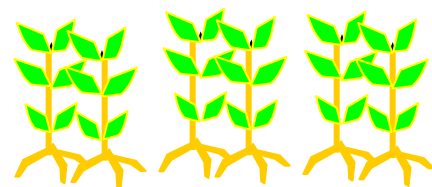
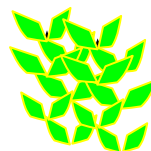
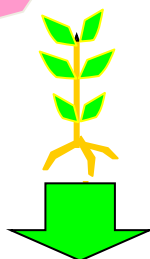


レンギョウ

- ・セサミンの前駆体が**葉**に多量に蓄積
- ・挿し木で容易に繁殖

宿主

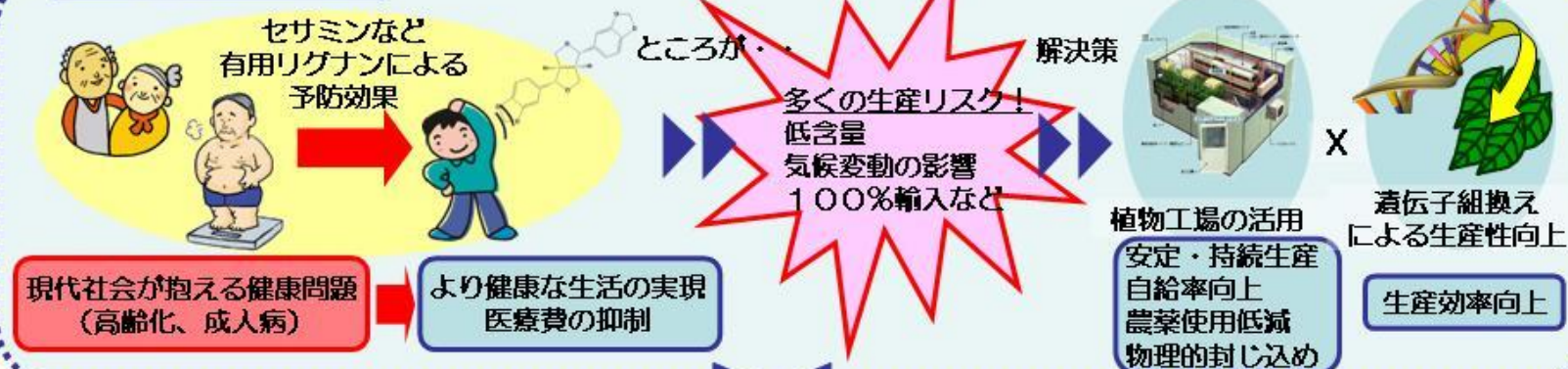
遺伝子組換えレンギョウ
(葉でセサミンを生産)



高効率かつ安定的なセサミンの生産

新規外来遺伝子排除機構の制御による 有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証

研究提案の背景



研究の経緯

○リグナン生産体としてレンギョウを選択
セサミン前駆体ピノレジノールを豊富に含有
挿木でクローン増殖可能→多期作向き特性

○レンギョウ再分化技術の開発

○リグナン生合成経路の解明と代謝経路の人為操作

・レンギョウ培養細胞でセサミン生産に成功！
・植物工場でのレンギョウ栽培基礎技術の確立

ところがレンギョウ植物体の場合では、目的遺伝子の導入効率が極端に低いことが判明。その主要因が外来遺伝子の切断であることが示唆された。

研究計画・目標

1. 新規外来遺伝子切断因子の同定
2. 同因子を抑制した高効率遺伝子組換え性レンギョウの創出
3. 高遺伝子組換え性レンギョウを用いたセサミン高生産性レンギョウの開発と密閉型植物工場におけるセサミン生産の実証
→密閉型植物工場ならではの利点を最大限活用
→有用物質を高効率生産することで植物工場の利用価値の向上へ

研究のアウトカム

次世代型有用リグナン
高効率生産システムの
基盤構築

0.11 kg セサミン/
面積(アール)・年

生産効率の
飛躍的向上

0.5 kg セサミン/
面積(アール)・1回の作付
×10回・年

QOL向上と
医療費の抑制
などに貢献

要素技術

①外来遺伝子排除因子の同定

- i) 次世代シーケンサーによるカルスと葉で発現が高く、培養細胞で低い遺伝子、あるいは、その逆の遺伝子の同定(これを外来遺伝子排除因子の候補とする)
- ii) 同遺伝子の全長決定
- iii) 同遺伝子をシロイヌナズナに導入し、この組換えシロイヌナズナの組換え体作製効率への影響を評価

②同外来遺伝子排除因子を抑制した高効率遺伝子組換え性レンギョウの開発

- i) ①で組換えシロイヌナズナで組換え体作製効率が認められた遺伝子のRNAi配列を導入した「高遺伝子組換え性レンギョウ」の作製と検証

③高遺伝子組換え性レンギョウを用いたセサミン高生産性レンギョウの開発

- i) レンギョウ三重発現培養細胞を用いたセサミン生産促進条件の確立
- ii) 高効率遺伝子「組換えレンギョウを用いたセサミン高生産性レンギョウ」の作製と実証
- iii) 同レンギョウの選抜とセサミン生産の最適化

時間計画

事業内容	23年度		24年度		25年度		26年度		27年度	
①外来遺伝子排除因子の同定										
②外来遺伝子排除因子を抑制した高効率遺伝子組換えレンギョウの開発										
③高遺伝子組換えレンギョウを用いたセサミン高生産性レンギョウ開発	i)									
i) 三重発現レンギョウ培養細胞										
ii) セサミン生産性組換え植物体										
評価・取りまとめ										

25年度末までのタスク

＜25年度末までの目標＞

①外来遺伝子排除因子の同定

- ・外来遺伝子排除因子候補の選抜を完了
- ・シロイヌナズナを用いた外来遺伝子切断因子の機能の検証を実施

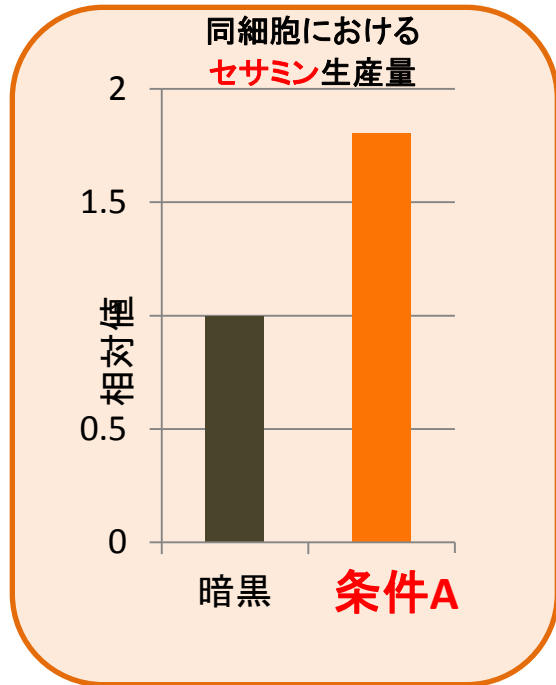
②同外来遺伝子排除因子を抑制した高効率遺伝子組換え性レンギョウの開発

- ・外来遺伝子排除因子候補遺伝子に対するRNAiベクターを構築

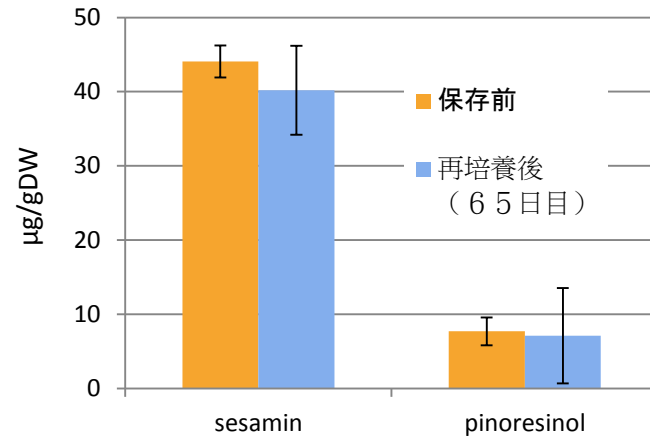
③高遺伝子組換え性レンギョウを用いたセサミン高生産性レンギョウの開発

- ・三重組換えセサミン生産性レンギョウ培養細胞実験の終了

三重組換えレンギョウ葉培養細胞を用いた セサミン生産促進因子(要素技術③)



セサミン合成量が増加する
条件を決定



同培養細胞の長期保存法を確立

特許出願準備中

RNA-Seqで得られた結果からの抽出(要素技術①)

47 contigs(コンティグ平均約1kb)に絞りこんだ

Illumina HiSeq 2000, pair-end sequence (100bp x 2)			
	総リード数	総塩基数	% of >=Q30 Bases
懸濁培養細胞	127M	13G	93
カルス	82M	8.3G	93
葉	95M	9.7G	94

配列情報の確度の
高いコンティグ

Reads Per Kilobase of exon
per Million mapped reads

220,000 contigs
(total 292M bp, コンティグ平均約1.3kb)

カルス／懸濁培養細胞
のRPKM値が5以上

懸濁培養細胞
でのみ発現

6,367 contigs + 143 contigs

合計 6,510 contigs

アノテーションによる選抜

27 contigs

Nuclease 22

PREDICTED: Werner Syndrome-like exonuclease-like [Vitis vinifera]
ribonuclease t2, putative [Ricinus communis]
ap endonuclease, putative [Ricinus communis]
intracellular ribonuclease LX [Solanum lycopersicum]
Endoribonuclease Dicer-like protein [Medicago truncatula]
PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 3a-like [Vitis vinifera]
PREDICTED: ribonucleases P/MRP protein subunit POP1-like [Vitis vinifera]
Flap endonuclease GEN-like protein [Medicago truncatula]
Oligoribonuclease [Medicago truncatula]
PREDICTED: poly(A)-specific ribonuclease PARN-like [Vitis vinifera]
Oligoribonuclease [Medicago truncatula]
Oligoribonuclease [Medicago truncatula]
Exosome complex exonuclease RRP41, putative [Ricinus communis]
endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]
endonuclease precursor-like precursor [Solanum lycopersicum]
PREDICTED: uncharacterized ribonuclease sll1290-like [Vitis vinifera]
PREDICTED: ribonuclease J-like [Vitis vinifera]
PREDICTED: ribonuclease UK114-like [Vitis vinifera]
PREDICTED: 5'-3' exonuclease-like [Vitis vinifera]
PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1-like [Vitis vinifera]
PREDICTED: uncharacterized deoxyribonuclease YabD-like [Vitis vinifera]
ribonuclease E [Solanum lycopersicum]

DNA repair 2

rad25/xp-B DNA repair helicase, putative [Ricinus communis]
PREDICTED: DNA repair protein XRCC4 [Vitis vinifera]

VIP protein 3

PREDICTED: protein vip1-like [Vitis vinifera]
PREDICTED: probable NOT transcription complex subunit VIP2-like [Vitis vinifera]
PREDICTED: protein vip1 [Vitis vinifera]

懸濁培養細胞でのみ発現
RPKM比<0.2

5 contigs

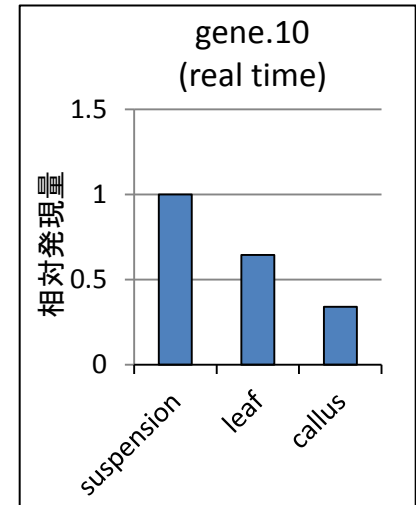
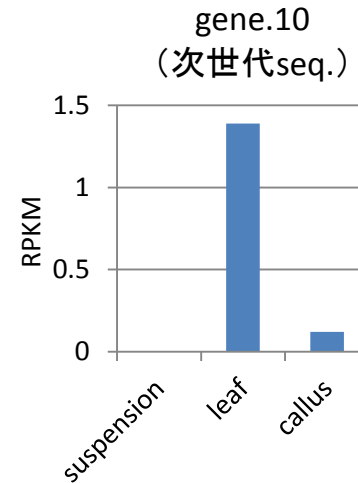
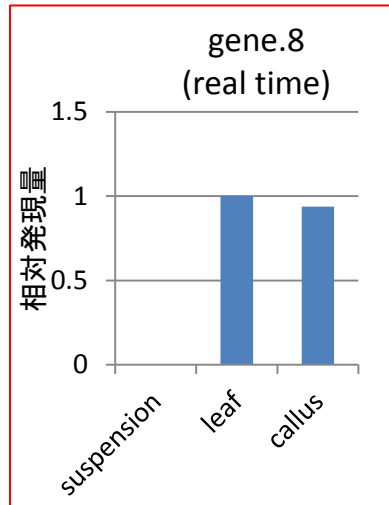
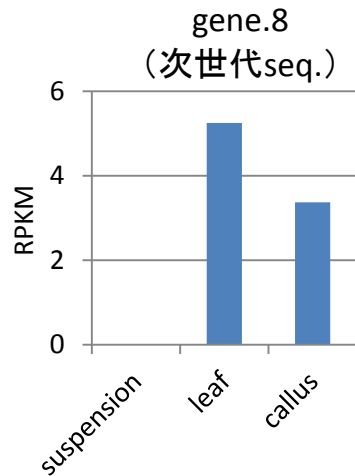
predicted protein [Populus trichocarpa]
Os06g0316600 [Oryza sativa Japonica Group]
Os05g0235100, partial [Oryza sativa Japonica Group]
predicted protein [Populus trichocarpa]
Transcriptional regulator SUPERMAN, putative [Ricinus communis]

カルスおよび
葉でのみ発現
RPKM比TOP15

15 contigs

predicted protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]
PREDICTED: basic form of pathogenesis-related protein 1 [Vitis vinifera]
predicted protein [Populus trichocarpa]
Photosystem II reaction center W protein, putative [Ricinus communis]
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100854914 [Vitis vinifera]
Beta-glucosidase D4 [Medicago truncatula]
PREDICTED: 40S ribosomal protein S3-3 [Vitis vinifera]
hypothetical protein POPTRDRAFT_554508 [Populus trichocarpa]
conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100808799 [Glycine max]
PREDICTED: universal stress protein A-like protein [Vitis vinifera]
uncharacterized protein LOC100305524 [Glycine max]
uncharacterized protein LOC100279820 [Zea mays]
PREDICTED: glycine cleavage system H protein, mitochondrial isoform 1 [Vitis vinifera]
PREDICTED: disease resistance response protein 206 [Vitis vinifera]

RNA-Seqで得られた結果の定量PCRによる検証(要素技術①)

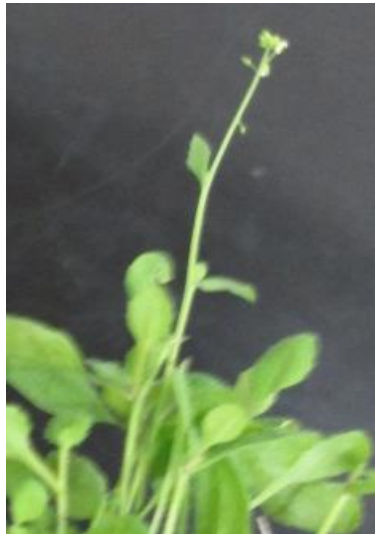
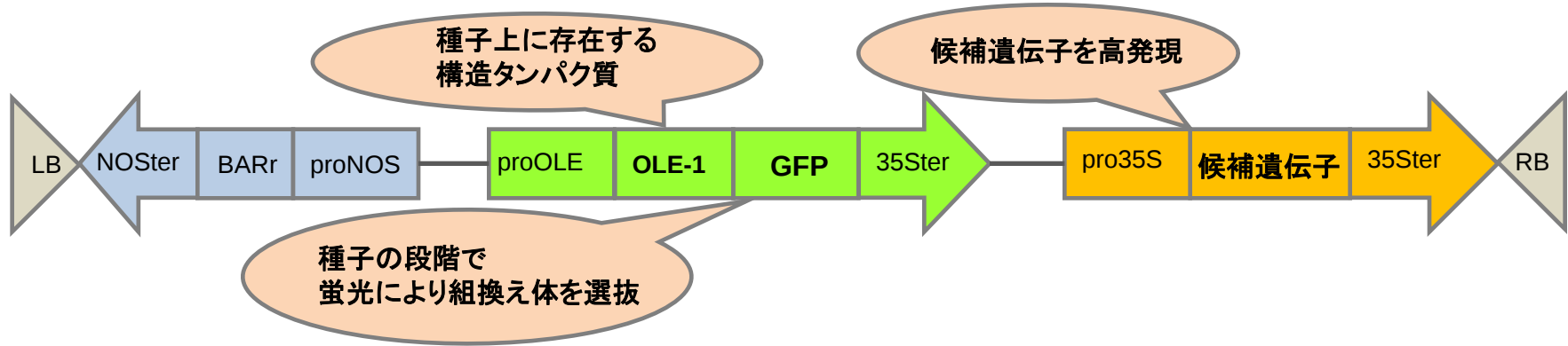


リアルタイムPCRと全長配列解読から外来遺伝子排除因子候補を18個に絞り込んだ。



- ・発現量が検証されたものをシロイヌナズナへ導入(要素技術①)
- ・それぞれの候補遺伝子のRNAiベクターを作製(要素技術③)

外来遺伝子排除因子のシロイヌナズナへの導入(要素技術①)



これまでに、T3世代までを8種、
T2世代を6種獲得



遺伝子の組換え効率は
変化するのか??

まとめ

①外来遺伝子排除因子の同定

- ・外来遺伝子排除因子候補の選抜を完了した(達成度100%)
- ・14種の候補遺伝子シロイヌナズナへ導入完了、遺伝子導入効率への影響に着手(達成度80%、年度末までに終了予定)

②同外来遺伝子排除因子を抑制した高効率遺伝子組換え性レンギョウの開発

- ・外来遺伝子排除因子候補遺伝子に対するRNAiベクターを構築(達成度80%、年度末までに終了予定で計画を先行して実施できる予定)

③高遺伝子組換え性レンギョウを用いたセサミン高生産性レンギョウの開発

- ・三重組換えセサミン生産性レンギョウ培養細胞研究の終了、特許申請準備中(達成度100%)

研究実績

	題目・メディア等	時期
論文	Morimoto K, Satake H. (2013) “ Seasonal alteration in amounts of lignans and their glucosides and gene expression of the relevant biosynthetic enzymes in the <i>Forsythia suspense</i> leaf” <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 36(9) , 1519-1523.	H25.9
招待 執筆	Satake H, Ono E, Murata J. (2013) “Recent advances in metabolic engineering of lignan biosynthesis pathways for the production of transgenic plant-based foods and supplement” <i>J. Agrl. Food. Chem.</i> in press	H25.6
発表（招待講演）	Satake H. “Metabolic engineering of lignan biosynthesis in <i>Forsythia</i> ” 244 th American Chemical Society (ACS) National Meeting, Philadelphia, U.S.A.	H24.8
取材	「サントリー生命科学財団～組換えレンギョウ等による高機能成分の生産」 高機能・高付加価値型次世代植物工場の展望、92-98頁、矢野経済研究所	H25.5
特許	1件出願予定（現在書類作成中）	H26.2 出願予定

事業化へ向けて

・高効率遺伝子組換えレンギョウは特許出願・公開後、現存する密閉型植物工場で生産を検討するとともに、グループ企業などに生産・販売を委託すること、および、ライセンス販売の検討を開始する予定

・現存する密閉型植物工場とともに、北京大学植物研究所には閉鎖型栽培システムを活用し、これまでの栽培施設・精製技術を背景に、リグナン高生産性レンギョウからのリグナンの大規模抽出・精製に伴うコスト評価と安全性評価を行い、平成30年にライセンス販売や工業化の検討を開始する予定