

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15411

研究課題名（和文）機能性ペプチドを修飾したナノミセルによる植物ミトコンドリアへの高効率な遺伝子導入

研究課題名（英文）Micelle complexes displaying multiple functional peptides for efficient DNA delivery to plant mitochondria

研究代表者

宮本 昂明（Miyamoto, Takaaki）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：20804040

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物細胞が持つ細胞壁や細胞膜、エンドソーム膜などの複数のバリアを克服し得る種々の機能性ペプチドと、核酸を所望のオルガネラへ運搬するペプチド提示型ミセルを開発した。本研究で開発した機能性ペプチドとミセルを組み合わせることにより、ミトコンドリアを含む植物オルガネラを標的として、従来よりも高効率な遺伝子導入が可能となった。本研究成果は、オルガネラ改変植物の作出に貢献すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、植物オルガネラへの高効率な遺伝子導入を通じて、食糧・環境・エネルギーの諸問題解決の鍵となるオルガネラ改変植物の作出に貢献すると期待される。また本研究で見出された植物細胞の各種バリアを克服し得る機能性ペプチドは、遺伝子導入のみならず、広範な植物バイオテクノロジーに利用できる可能性があるため、今後の発展によって、植物を対象とする基礎・応用研究への波及効果が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed functional peptides that can overcome multiple barriers in plant cells and peptide-displaying micelle complexes for DNA delivery to specific plant organelles including mitochondrion. The combination of our functional peptides and micelle complexes can enable efficient DNA delivery to plant mitochondria, contributing to plant bioengineering for various purposes.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：植物オルガネラ改変 膜透過ペプチド 双性イオン型ペプチド エンドソーム不安定化ペプチド ペプチド提示型ミセル 遺伝子導入

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

低炭素社会の実現に向け、植物を利用した物質生産技術の開発が望まれている。光合成を行う植物は、CO₂を原料に化成品・医薬品原料などの有用物質を生産できる利点を持つが、生産性の低さが問題となる。生産性を高めるためには、独自のゲノムを持つオルガネラ(核・葉緑体・ミトコンドリア)へ有用遺伝子を導入し、ゲノムを改変する必要がある。既存技術により、植物の核と葉緑体への遺伝子導入は可能であったが、細胞のエネルギー生産を担うミトコンドリアに対しては、有効な遺伝子導入法が確立されていない。我々は、融合ペプチドを用いる植物への遺伝子導入法を開発してきた。融合ペプチドは、DNA結合・細胞膜透過・オルガネラ移行を担う複数のペプチド配列で構成され、DNAとイオン性複合体を形成することにより、核や葉緑体のみならず、ミトコンドリアへDNAを送達することができる。融合ペプチドはオルガネラ選択性が高く、ミトコンドリアへの遺伝子導入が可能な点で既存の導入手法と一線を画している。しかし、融合ペプチドには遺伝子導入効率が低いという解決すべき課題が残されていた。

低効率の原因は、ペプチドを構成する細胞膜透過配列(CPP)やミトコンドリア移行配列(MTS)の正電荷がDNAとの静電相互作用により消費されるためと予想された。CPPの正電荷は負に帯電した細胞膜表面との相互作用、MTSの正電荷は負電荷を蓄積したミトコンドリア内部への移行に重要である。また、ペプチドとDNAから成る複合体の細胞壁透過効率や細胞内への取り込み効率、取り込み後の細胞質への移行効率が最終的な導入効率に大きく影響することが予想された。我々は、マレイミド基を有するテトラエチレングリコールとポリカチオンから成るキャリアペプチドを開発した。キャリアペプチドは、ポリカチオンとDNAの静電相互作用により、表面にマレイミド基を提示した約100 nmのミセルを形成する。ミセル表面は、チオール-マレイミド付加反応により、CPPなどの任意のペプチドを提示できる。申請者は、CPP提示型ミセルにおいて、CPPとDNAの静電相互作用が回避され、植物の核への遺伝子導入効率が従来の約2倍に向上することを明らかにしてきた。本研究では、ミセル表面にCPPとMTSを同時に提示させ、DNAとの相互作用に起因するMTSの正電荷の消費を防ぐことにより、ミトコンドリアへの遺伝子導入効率の向上を目論んだ。さらに、細胞壁透過効率と細胞内取り込み効率、細胞質への移行効率に寄与する機能性ペプチドを開発し、ミセルと組み合わせることで、従来よりも高効率な植物への遺伝子導入が可能であることを検証した。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が開発したペプチド提示型ミセルと、植物細胞の種々の障壁を克服する機能性ペプチドを組み合わせることにより、ミトコンドリアを含む植物オルガネラへの高効率な遺伝子導入を目指した。

3. 研究の方法

植物において、ミセルの高効率な細胞内取り込みを可能にする人工膜透過ペプチドと、細胞壁の透過性向上を目論んだ双性イオン型ペプチドを開発し、各種ペプチドの機能評価と応用可能性の検証を行った。また、CPPに加えて、エンドソームを不安定化するペプチドをミセル表面に提示させることにより、ミセルの細胞質への移行を促し、遺伝子導入効率が向上できるかを調べた。そして、本研究で開発・最適化されたペプチドとMTSを同時に提示するミセルを用い、ミトコンドリアへの遺伝子導入効率を評価した。

4. 研究成果

(1) 植物で高効率な細胞内取り込み機構を誘起する人工ペプチドの開発：植物細胞では、DNAやタンパク質をはじめとする高分子や各種ナノ粒子が、クラスリン依存エンドサイトーシス(CME)という機構で細胞内へ取り込まれると考えられる。一方、動物細胞では、マクロピノサイトーシスと呼ばれる高効率な細胞内取り込み機構が知られており、マクロピノサイトーシスを誘起するある種の膜透過ペプチドが高効率な細胞内への物質送達に利用されている。植物細胞ではマクロピノサイトーシスは未報告であったが、動物細胞のようにマクロピノサイトーシスを誘起ペプチドを開発・利用することができれば、細胞外の高分子やミセルを植物細胞内へ高効

率に取り込ませることができると予想された。本研究では、アミノ酸配列が異なる種々のペプチドを合成し、植物細胞内への取り込み効率を調べた。その結果、複数のドメインから成る人工ペプチド (dTat-Sar-EED4) が高い効率で細胞外のタンパク質やナノ粒子を細胞内へ送達できることを見出した。さらに各種阻害剤を利用した取込み実験や、透過型電子顕微鏡による観察の結果、dTat-Sar-EED4 がマクロピノサイトーシスに類似する機構を植物細胞において誘起できることが明らかになった。また、dTat-Sar-EED4 とペプチド-核酸ミセルを併用すると、植物カルスへの DNA 導入効率が有意に向上することが確認された。この導入効率の向上は、dTat-Sar-EED4 が誘起するマクロピノサイトーシス様の機構によって、ミセルが高効率に植物細胞内へ取り込まれたためと推察され、dTat-Sar-EED4 の遺伝子導入における有用性が示された。

(2) 細胞壁透過性を向上させる双性イオン型ペプチドの開発：植物細胞壁は、セルロース微繊維を主成分とする網状の高次構造を取る。細胞壁は直径 50 nm 以上のナノ粒子を容易に透過させないため、平均粒径が 100 nm であるペプチド提示型ミセルを利用した DNA 導入の障壁となる。我々は、細胞壁を構成するセルロース微繊維を溶解させるペプチドを新たに開発し、細胞壁の透過性向上を試みた。このペプチドは、イミダゾール環が双性イオン型に変換された側鎖を持ち、セルロースの分子間水素結合を乱す機能が期待される。高速原子間力顕微鏡による観察の結果、双性イオン型ペプチドが細胞壁に局所的な小孔を形成させることが明らかになった。さらに、双性イオン型ペプチドは植物に対する毒性が発現しない濃度域で細胞壁に作用できることが確認された。双性イオン型ペプチドの開発と並行して、類似する機能を持った双性イオン液体の前処理による細胞壁透過性の向上を検討した。蛍光色素とクエンチャーを利用した評価系により、双性イオン液体を 400 mM で 3 時間処理すると、シロイヌナズナ芽生えの表皮細胞において、細胞壁透過性が有意に向上することを見出した。また、双性イオン液体処理により、ミセルによる葉緑体と核への DNA 導入効率が向上することが確認された。これらの結果に基づき、今後、双性イオン液体と双性イオン型ペプチドの比較や、ミトコンドリアを標的とした遺伝子導入への適用を検討する。

(3) エンドソーム脱出ペプチドの開発：ミセルは CME によってエンドソームという膜小胞に内包された状態で細胞内へ取り込まれる。多くの場合、エンドソームは液胞へ運ばれて、その内包物は液胞内に豊富に存在する酵素等により分解を受ける。このため、ミセルのエンドソームから細胞質への移行効率が遺伝子導入効率に大きく影響する。我々は、エンドソームの脂質膜を不安定化させるペプチド (EDP) を CPP とともにミセル表面に提示させ、共焦点レーザー顕微鏡により、CPP/EDP 提示型ミセルの細胞内局在を詳細に調べた。その結果、ミセルのエンドソームからの脱出を促すペプチド (EED4 および LAH4-L1) を見出すことに成功した。また、CPP/EDP 提示型ミセルが高い効率で細胞質へ移行するために、遺伝子導入効率が CPP のみを提示するミセルと比較して 2 倍程度向上することも明らかにした。さらに CPP と EDP を融合した dual-domain CPP を新たに開発し、これをミセル表面に提示させることで、核への遺伝子導入効率を最大で 4 倍程度向上させた。

(4) ミセルによる植物ミトコンドリアへの遺伝子導入：(3) で開発した dual-domain CPP と MTS を同時に提示させたミセルを構築し、シロイヌナズナ芽生えに対する DNA 導入を検討した。レポーター遺伝子の発現を定量した結果、ミセルによるミトコンドリアへの遺伝子導入効率は、従来の融合ペプチドと比較して約 5 倍程度高いことが明らかとなり、本研究の目的は達成された。今後、ペプチド提示型ミセルと、(1) で開発したマクロピノサイトーシス誘起ペプチド (dTat-Sar-EED4) や (2) で開発した双性イオン型ペプチドを組み合わせることで、さらなる遺伝子導入効率の向上が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Miyamoto Takaaki, Toyooka Kiminori, Chuah Jo-Ann, Odahara Masaki, Higuchi-Takeuchi Mieko, Goto Yumi, Motoda Yoko, Kigawa Takanori, Kodama Yutaka, Numata Keiji	4. 巻 2
2. 論文標題 A Synthetic Multidomain Peptide That Drives a Macropinocytosis-Like Mechanism for Cytosolic Transport of Exogenous Proteins into Plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JACS Au	6. 最初と最後の頁 223 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacsau.1c00504	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Kenta, Odahara Masaki, Miyamoto Takaaki, Numata Keiji	4. 巻 7
2. 論文標題 Fusion Peptide-Based Biomacromolecule Delivery System for Plant Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 2246 ~ 2254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.1c00227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyamoto Takaaki, Tsuchiya Kousuke, Numata Keiji	4. 巻 13
2. 論文標題 Endosome-escaping micelle complexes dually equipped with cell-penetrating and endosome-disrupting peptides for efficient DNA delivery into intact plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 5679 ~ 5692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0NR08183C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Higuchi-Takeuchi Mieko, Miyamoto Takaaki, Foong Choon Pin, Goto Mami, Morisaki Kumiko, Numata Keiji	4. 巻 21
2. 論文標題 Peptide-Mediated Gene Transfer into Marine Purple Photosynthetic Bacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8625 ~ 8625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228625	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto Takaaki、Tsuchiya Kousuke、Numata Keiji	4. 巻 13
2. 論文標題 Endosome-escaping micelle complexes dually equipped with cell-penetrating and endosome-disrupting peptides for efficient DNA delivery into intact plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 5679 ~ 5692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0NR08183C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto Takaaki、Tsuchiya Kousuke、Numata Keiji	4. 巻 -
2. 論文標題 Dual peptide-based gene delivery system for the efficient transfection of plant callus cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.0c00481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya Kousuke、Yilmaz Neval、Miyamoto Takaaki、Masunaga Hiroyasu、Numata Keiji	4. 巻 21
2. 論文標題 Zwitterionic Polypeptides: Chemoenzymatic Synthesis and Loosening Function for Cellulose Crystals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 1785 ~ 1794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.9b01700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takaaki Miyamoto & Keiji Numata
2. 発表標題 Synthetic peptide-mediated biomacromolecule delivery into plants
3. 学会等名 The VIB-UGent Center for Plant Systems Biology (PSB)-RIKEN CSRS Seminar, @ZOOM Webinar, December 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本昂明、豊岡公德、後藤友美、児玉豊、沼田圭司
2. 発表標題 マクロビノサイトーシス様の取り込み機構を誘起する人工ペプチドを利用した植物へのタンパク質デリバリー
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム、2A-08, web開催、2021年9月
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本昂明、土屋康佑、沼田圭司
2. 発表標題 Micelles dually modified with cell-penetrating and endosome-disrupting peptides for efficient endosomal escape and gene delivery to plants
3. 学会等名 第69回高分子討論会、1ESB09, web開催、2020年9月
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本昂明、土屋康佑、沼田圭司
2. 発表標題 エンドソーム脱出能を付与したペプチド修飾ミセルによる植物への核酸導入
3. 学会等名 第30回バイオ・高分子シンポジウム、2, web開催、2020年7月
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本昂明、土屋康佑、沼田圭司
2. 発表標題 Micelles dually modified with cell-penetrating and endosome-disrupting peptides for efficient endosomal escape and gene delivery to plants
3. 学会等名 第69回高分子討論会、1ESB09, web開催、2020年9月
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takaaki Miyamoto, Kousuke Tsuchiya, Keiji Numata
2. 発表標題 Micelles postmodified with cell penetrating peptides for efficient gene delivery in plants
3. 学会等名 258th ACS National Meeting, PMSE 509, San Diego (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本昂明, 土屋康佑, 沼田圭司
2. 発表標題 細胞膜透過ペプチドとエンドソーム不安定化ペプチドを修飾したミセルによる植物への遺伝子導入
3. 学会等名 第68回高分子討論会, 3N12, 福井
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本昂明, 土屋康佑, 沼田圭司
2. 発表標題 複数種の機能性ペプチドを提示したイオン性複合体による植物への遺伝子導入
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム, 2A-22, 仙台
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本昂明, 土屋康佑, 沼田圭司
2. 発表標題 細胞膜透過ペプチドから成るイオン性複合体を用いた植物への遺伝子導入およびマクロピノサイトーシス誘起ペプチドの協調効果
3. 学会等名 第28回バイオ・高分子シンポジウム, 04, 大岡山
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本昂明, 土屋康佑, 沼田圭司
2. 発表標題 マクロピノサイトーシス誘起ペプチドと核酸運搬ペプチドを組み合わせた植物カルスへの効率的な遺伝子導入
3. 学会等名 第68回高分子年次大会, 3M20, 大阪
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 Polypeptide comprising cell-penetrating sequence and composition comprising same	発明者 沼田圭司, 土屋康佑, 宮本昂明	権利者 国立研究開発法人理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、16/832749	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 バイオマス材料処理剤およびバイオマス材料の処理方法	発明者 沼田圭司, 土屋康佑, 宮本昂明	権利者 国立研究開発法人理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-049180	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 標的細胞への物質の導入法	発明者 沼田圭司, 宮本昂明, 他4名	権利者 国立研究開発法人理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/18861	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------