

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580148

研究課題名(和文)細胞透過性ペプチドを用いた植物免疫機構の解明と新たな免疫活性化剤の創出

研究課題名(英文) Evaluation of cell-penetrating peptides for understanding the plant immune system and its application to a screening method for novel plant defense activators

研究代表者

宮下 正弘 (Miyashita, Masahiro)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80324664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：細胞透過性ペプチドはタンパク質などの親水性分子を細胞内へ直接導入することができる性質をもつ。オリゴアルギニンはその一つであるが、これまでの研究により植物細胞に対しては細胞壁への顕著な吸着が観察され、透過性もやや低い問題があった。そこで本研究では、オリゴアルギニンとは異なる透過性機構をもつと考えられているpVECに注目し、その透過性ならびに細胞壁への吸着を定量的に評価した。その結果、pVECはオリゴアルギニンに比べて透過性が高く、かつ細胞壁への吸着も軽度であることが分かった。このことから、pVECは植物細胞内での病原体認識機構の解明のためのツールとして有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Cell-penetrating peptides (CPPs) can cross the cellular membrane, which is used to carry a functional peptide or protein inside the cell. Oligo-arginine peptides, which consist of 4-12 arginine residues, are one of well-studied CPPs. Oligo-arginine is also able to penetrate into plant cells, but significant adsorption of the peptide to the cell wall was observed, which might hamper the effective penetration. In this study, to obtain more effective CPPs against plant cells we evaluated the cell penetration of pVEC, which is known to penetrate cells in a different fashion to oligo-arginine. As a consequence, pVEC showed approximately 4-times higher penetration into tobacco cells than oligo-arginine. In addition, relatively low adsorption of pVEC to the cell wall was observed, which depends on the N-terminal hydrophobic region. These results indicate that pVEC is a useful tool for understanding the intracellular recognition of pathogen infection.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 生物生産化学・生物有機化学

キーワード：植物 免疫機構 細胞透過 ペプチド plant activator

1. 研究開始当初の背景

植物は病原体による侵入・感染から身を守るための防御能力を備えており、病原体由来の物質(エリシター)を認識することにより、その防御反応を開始する。したがって、防御反応を引き起こす物質は、人為的に植物の防御能力を高める「植物免疫活性化剤」として用いることが可能である。植物免疫活性化剤は直接的に病原体を殺さないため他の有益生物の生態系に影響をほとんど与えず、環境に対する負荷が極めて小さい。また、病原菌が薬剤に対する抵抗性を獲得する可能性が低いという利点がある。

植物による病原菌の認識は、細胞膜上あるいは細胞質の受容体を介して行われる。これまで見出されてきたエリシターは、細胞膜上の受容体で認識されるものが多い。申請者は細胞膜上の受容体をターゲットとした植物免疫活性化ペプチドの探索研究を進め、ランダムペプチドライブラリから新規エリシターペプチドを見出すことに成功している。このペプチドは受容体へ結合した後、主にジャスモン酸シグナル伝達経路によって防御応答を誘導することが分かっている。一方、細胞質には、病原菌が独自の分泌機構を使って注入するタンパク質(エフェクター)を認識する受容体が存在するが、この受容機構については不明な点が多い。

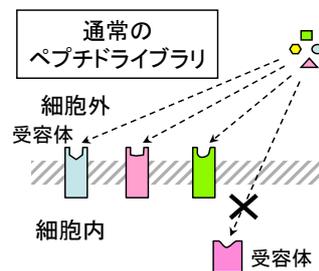
エフェクターの作用を調べるため、現在ではアグロバクテリウムによる遺伝子導入法が広く用いられているが、この手法には以下に挙げるような問題点があることが知られている。

- 1) タンパク質の発現までにタイムラグがあり、その発現量も一定ではない。
- 2) 所定の時間に処理できないため初期応答の測定が難しく経時変化をとらえにくい。
- 3) アグロバクテリウム自身によって誘導される防御応答と区別する必要がある。

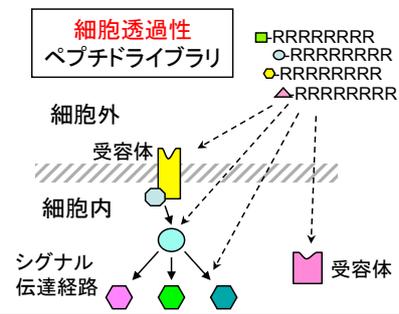
アグロバクテリウムを使う際のこれらの問題が、細胞質における免疫応答機構の解明の妨げとなっており、タンパク質を外部投与によって直接導入することができれば、これらの問題の大部分を回避できると考えられる。近年、細胞透過性ペプチドを用いたタンパク質の細胞内への直接導入法が様々な分野で注目されている。代表例であるオリゴアルギニン₅₋₁₀残基程度の連続するアルギニン残基で構成され、これをタンパク質の末端に付加すると顕著な細胞透過性を付与することができる。細胞透過性ペプチドは特に動物細胞で研究が進んでいるが、植物細胞においても同様に透過性を示すことが研究代表者らによって明らかにされている。

2. 研究の目的

タンパク質は基本的に親水性であるため、通常は細胞膜を透過できない。この問題を解決する細胞透過性ペプチドは、これまで遺伝子発現を介した実験手法によってしかできなかった細胞質でのタンパク質の機能解析を、処理時間や濃度などの条件を厳密に設定して行えるようするものである。これにより、今までは見出すことのできなかった新たな知見が得られるものと考えられる。一方、ペプチドライブラリはコンビナトリアル化学手法によって数百万種類の配列を簡単に作製できるという利点があるが、透過性の問題によりスクリーニングの作用標的が、細胞膜上の受容体に事実上限定されるという問題があった(図1上)。しかし、細胞透過性ペプチドを付加して細胞内へ透過できるように工夫することにより、細胞内受容体を含む幅広い作用標的を対象に植物免疫活性化ペプチドの探索を行うことが可能である(図1下)。このように作用標的が多様になることにより、活性ペプチドの発見確率も向上すると考えられる。そこで本研究では、植物の細胞に対して高い細胞透過性を示すペプチドを見だし、それを利用した新規ペプチドのスクリーニング法を開発することを目的に研究を行った。



細胞膜受容体のみが作用標的



シグナル伝達経路や受容体も標的

図1. 細胞透過性ペプチドライブラリ

オリゴアルギニン、哺乳類細胞に対して高い透過効率を持つことが知られている。植物細胞に関しては研究例が少ないが、代表研究者らによってこれまでにオリゴアルギニンのタバコ懸濁細胞に対する顕著な透過能が確認している。しかしながら顕微鏡観察の結果、オリゴアルギニンは細胞壁に強く吸着しており、このことが透過効率に影響を及ぼしている可能性があった。そこで、オリゴアルギニンとは異なる機構で細胞内に移行すると考えられている *pVEC* の植物細胞への透過性ならびに細胞壁への吸着をオリゴアルギニンと比較し、植物細胞に対する透過性ペプチドとしての適性を評価した。

3. 研究の方法

pVEC およびオリゴアルギニンを、Fmoc 固相合成法により合成した。さらに、*pVEC* の N 末端アミノ基を 5(6)-carboxyfluorescein により (FAM-*pVEC*)、また R8 のシステイン側鎖を fluorescein-5-maleimide により (R8-FI) 蛍光標識した (図 2)。ネガティブコントロールとしては透過性ペプチドを含まない GC-FI を同様に合成した。

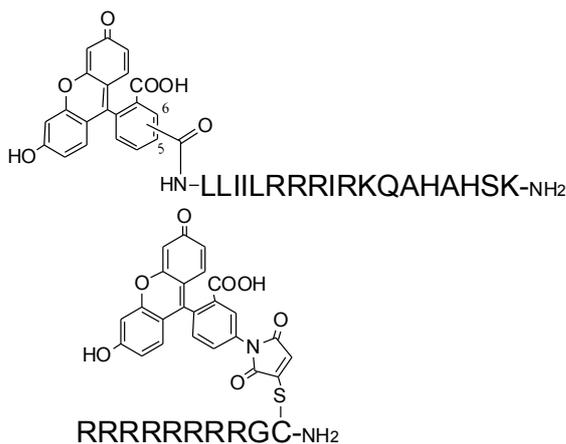


図 2. 透過性評価に用いた蛍光標識ペプチド (上) FAM-*pVEC*、(下) R8-FI

細胞透過性の評価は以下の方法にしたがって行った。タバコ懸濁細胞に各ペプチドを処理して 1 時間回転攪拌した後、そのまま蛍光顕微鏡観察を行い、透過性の定性的評価を行った。定量的測定を行う場合は、トリプシンを加えて細胞壁に吸着したペプチドを除去した後に抽出操作を行い、これを蛍光光度計で測定することにより透過性評価を行った。

4. 研究成果

FAM-*pVEC* と R8-FI の透過性を比較した結果、FAM-*pVEC* の透過性が 4 倍近く高いことが分かった (図 3)。また蛍光顕微鏡観察により、FAM-*pVEC* は細胞壁への吸着が少ないことが示された。これらの結果より、*pVEC* は

R8 よりも植物細胞に対する細胞透過性ペプチドとして優れていることが示された。

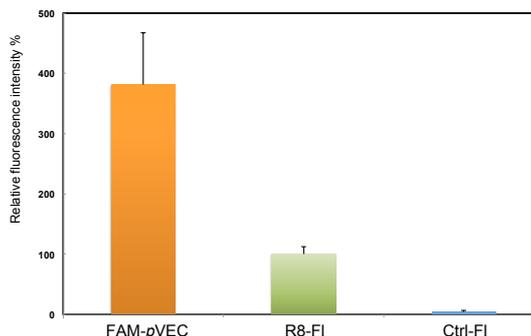


図 3. *pVEC* と R8 の透過性比較

次に、*pVEC* の構造と透過性の関係について調べた。まず、哺乳類細胞の研究によって透過性に大きく関わっていることが示されている N 末端疎水性部分 (LLIIL) を欠損させた類縁体を合成し、その透過性を評価した。その結果、この欠損体の透過性は大幅に低下し、R8 と同程度であった (図 4)。また、この類縁体は細胞壁への吸着が顕著であったことから、植物細胞に対しては、この疎水性部分は吸着を低減させる効果を持ち、これによって透過性を向上させていることが示唆された。さらに、哺乳類細胞において細胞透過能が向上すると報告されている *pVEC* 配列中のアミノ酸残基を置換した 3 種類の類縁体を合成し、細胞透過性を比較した。その結果、8 残基目の Arg を Ala に置換した類縁体 R8A では *pVEC* よりもわずかに透過性が上昇したが、17 残基目の Ser または 6 残基目の Arg を Ala に置換した類縁体 S17A、R6A は *pVEC* よりも低下した。このことから、植物細胞と哺乳類細胞との間では透過に影響する構造的要因がやや異なることが示唆された。

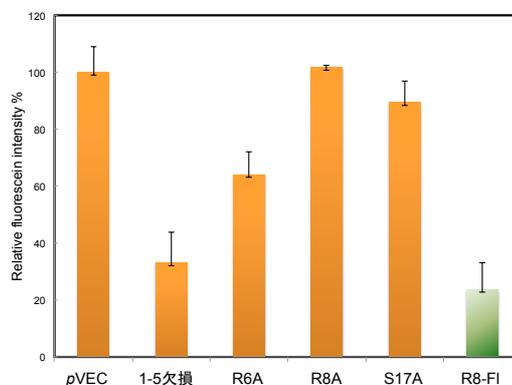


図 4. *pVEC* 類縁体の透過性の比較

以上の結果から、pVEC は植物に対する細胞透過性ペプチドとしてオリゴアルギニンよりも優れていることが明らかとなり、植物免疫活性化ペプチドの探索のための細胞透過性ライブラリに適用可能であることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Miyashita, M., Oda, M., Ono, Y., Komoda, E., and Miyagawa, H., Discovery of a small peptide from combinatorial libraries that can activate the plant immune system by a jasmonic Acid signaling pathway. ChemBioChem, 12, 1323-9 (2011).

[学会発表] (計 6 件)

Miyashita, M., Oda, M., Ono, Y., Komoda, E., and Miyagawa, H., Discovery of a small peptide from combinatorial libraries that can activate the plant immune system from combinatorial random peptide libraries. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe interactions, 2012 年 7 月 31 日、京都国際会館

金容賢、宮下正弘、宮川恒「PIP-1 の分解耐性の向上とその植物防御応答誘導活性に対する影響」日本農薬学会第 38 回大会、2013 年 3 月 15 日、筑波大学

金容賢、宮下正弘、宮川恒「PIP-1 の誘導する防御応答関連二次代謝に關与するシグナル因子」日本農薬学会第 39 回大会、日本農薬学会第 38 回大会、2014 年 3 月 14 日、京都大学

橋野友里恵、宮下正弘、宮川恒「植物細胞に対するオリゴアルギニンと pVEC の透過性の比較」日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日、明治大学生田キャンパス

金容賢、宮下正弘、宮川恒「植物免疫活性化ペプチド PIP-1 の分解と防御応答誘導の關係」日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 30 日、明治大学生田キャンパス

眞重るり、安西友里恵、宮下正弘、宮川恒「植物免疫活性化ペプチド PIP-1 の環状化による分解耐性の向上」日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 30 日、明治大学生田キャンパス

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮下 正弘 (MIYASHITA MASAHIRO)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80324664

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし