

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：24405

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18928

研究課題名（和文）生分解性キャリアナノ粒子を用いた農薬送達システムの構築

研究課題名（英文）Construction of pesticide delivery system using biodegradable carrier nanoparticles

研究代表者

野村 俊之（Nomura, Toshiyuki）

大阪公立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：00285305

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、農薬や遺伝物質を封入したキャリア粒子を合成し、植物病原菌の防除効果を検討した。その結果、siRNAを封入したエクソソームが植物細胞内に取り込まれ、サイレンシング効果によりGFP遺伝子の発現が抑制されることを明らかにした。また、RNAを封入した生分解性ポリマーPLGAナノ粒子では、未封入の場合と比べて1/10程度のRNA量で病害虫の防除効果が得られることも明らかにした。さらに、農薬原体を封入したPLGAナノ粒子では、植物病原菌に対して市販農薬と比較して90%減農薬できることを明らかにした。以上より、キャリア粒子を用いた農業分野における農薬送達システムの有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病害の防除に用いられる農薬のうち、植物病原菌に到達する農薬は0.1%にも満たない。そのため、農薬を繰り返し散布しなければならず、環境汚染や人体への悪影響が危惧されている。この課題を解決するため、キャリア粒子を用いた農薬送達システムに着目した。化学農薬をキャリア粒子に封入すると、化学農薬の使用量を大幅に削減することができ、環境影響の低減に貢献することができる。また、遺伝物質をキャリア粒子に封入すると、RNA干渉により病害の原因となるたんぱく質の生成を阻害することができ、標的的特異的で遺伝子組み換えフリーの理想的な農薬として期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, carrier particles encapsulating pesticides and genetic materials were synthesized and their efficacy in controlling plant pathogens was investigated. The results showed that exosomes encapsulating siRNA were taken up into plant cells and suppressed GFP gene expression by silencing effect. It was also found that the RNA-encapsulated biodegradable polymer PLGA nanoparticles can control pests with about 1/10 of the amount of RNA compared to the unencapsulated RNA. Furthermore, the pesticide-encapsulated PLGA nanoparticles showed 90% reduction of pesticides against plant pathogens compared to commercial pesticides. These results suggest the usefulness of pesticide delivery systems using carrier particles in the agricultural field.

研究分野：薬物封入ナノ粒子の合成

キーワード：植物病原菌 農薬 食糧 農薬送達システム キャリアナノ粒子 生分解性ポリマー エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

食糧の安定供給はエネルギーとならび、人類繁栄のための重要かつ喫緊の世界規模の課題である。植物病害による食糧被害は、世界の農業生産の 10~20%を占めており、8億人の食糧に相当すると言われている(例えば、ジャガイモ疫病菌による被害額は年間 67 億ドル)。したがって、食糧生産において植物病害による食糧被害の軽減は最重要課題である。近代農業では、病害の予防や対策、除草の簡素化などを目的として大量の農薬が使用されている。しかし、揮発、光分解、降雨などにより、その約 90%は無駄になっており、ターゲットの植物病原菌に到達する農薬はわずか 0.1%にも満たないと言われている。したがって、農薬を繰り返し散布しなくてはならず、土壌や水質汚染、耐性菌の発生の原因となることが危惧されている。これらの解決策として、医療分野における薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) と同様に、農業分野においても農薬送達システム (Pesticide Delivery System, PDS) が提唱されている。しかし、医療分野と異なり、開放系であること、環境変動が大きいこと、植物細胞は堅牢な細胞壁を有しているなどの要因により、PDS 技術は医療分野の DDS 技術と比較すると基礎研究レベルにおいてもほとんど検討されていないのが現状である。

動物細胞以外の細胞は細胞壁を有しているため、ナノ粒子を細胞内に送達することは困難と考えられていた。筆者は、環境ナノリスクの網羅的研究において、ナノ粒子の分散環境を制御するとポリスチレンナノ粒子が細胞壁を有した酵母の細胞内に取り込まれることを CLSM 観察により見出した。この知見の農業分野への応用を目指し、生分解性 PLGA (乳酸・グリコール酸共重合体) ナノ粒子やリポソームが植物の培養細胞に導入できることを見出した。さらに、農薬送達にキャリア粒子を用いることで、葉には取り込まれず植物病原菌にのみ選択的に送達することができ、同時に降雨による農薬の流出も抑制できる新たな植物病害の防除法の可能性を見出した。以上のような学術的背景と筆者らの知見に基づき、『目的に応じた機能性成分(農薬、遺伝子、肥料など)を封入したキャリア粒子を創製し、種・部位特異的に目的物質を送達できれば、医療分野との相違点を考慮した農業分野における薬物送達システム(農業 DDS = PDS)の構築が可能となり、工学分野におけるナノテクノロジー技術を駆使した革新的な次世代農工連携技術に繋がる』と考えたのが本研究の着想に至った背景である。

## 2. 研究の目的

植物病害の防除に用いられる農薬のうち、植物病原菌に到達する農薬は 0.1%にも満たない。そのため、農薬を繰り返し散布しなければならず、環境汚染や人体への悪影響が危惧されている。この課題を解決するため、農薬や遺伝物質を封入したキャリア粒子を合成し、農業分野における PDS 技術の実現に挑戦することを本研究の目的とした。遺伝物質を封入したキャリア粒子では、RNA 干渉により病害の原因となるたんぱく質の生成を阻害することで、標的特異的で遺伝子組み換えフリーの理想的な農薬について検討を行った。化学農薬を封入したキャリア粒子では、化学農薬の使用量の削減について検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝物質を封入したエクソソームを用いた遺伝子サイレンシングの誘導

モデル植物細胞として、タバコ培養細胞 BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2)、アクチンフィラメント架橋タンパク質に結合した緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する形質転換 BY-2 細胞 (GF11) を用いた。BY-2 細胞は、300 mL 容三角フラスコに分注した Murashige and Skoog (MS) 培地 100 mL に 7 日間培養後の細胞懸濁液 1~3 mL を植え継ぎ、28°C、暗所、130 rpm で継代培養した。dsRNA キャリアとして、ウシ生乳から超遠心分離法により回収された牛乳由来エクソソーム (Milk-Exo) を使用した。Milk-Exo の物性は、中位径  $158 \pm 4$  nm、ゼータ電位  $-13.0 \pm 0.3$  mV、個数濃度  $1.5 \times 10^{11}$  particles/mL であった。また、Milk-Exo 懸濁液は必要に応じて 10 kDa 限外ろ過により濃縮後に実験に使用した。RNA 干渉を誘導する dsRNA のモデルとして、GFP 遺伝子の発現をサイレンシングする人工合成 siRNA (siGFP, 21 塩基対) を使用した。また、ネガティブコントロールとしてどの遺伝子も標的としない siRNA を使用した。

エクソソームへの核酸導入試薬 Exo-Fect (System Biosciences) を使用して、Milk-Exo に siRNA を封入した。1 nmol siRNA と 10  $\mu$ L Exo-Fect 試薬を混合し、室温で 15 min インキュベートした。その後、 $6.6 \times 10^{11}$  particles/mL の Milk-Exo を 100  $\mu$ L 添加し、37°C で 1 h インキュベートしたものを Exo-siRNA とした。3-4 日培養した BY-2 細胞を遠心分離 (500 $\times$ g, 5 min) にて回収し、MS 培地で洗浄後、MS 培地に分散させ、終濃度  $1.4 \times 10^4$  cells/mL の細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液とエクソソーム懸濁液を 1.5 mL 容エッペンチューブ内で体積比 9:1 で混合し、チューブローターを用いて 1-24 h 撹拌した (60 rpm, RT)。その後、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて蛍光標識 Milk-Exo の局在および GF11 細胞の GFP 発現を観察した。

### (2) 農薬封入 PLGA ナノ粒子を用いた灰色かび病菌の感染防除

農薬原体としてペンチオピラドを用いた。有効成分としてペンチオピラドを含有した市販の

フロアブル剤を比較対象として用いた。植物はトマト、植物病原菌は灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) を用いた。実験には、ポテトデキストロース (PDB) に寒天 1.5wt% を加えた寒天培地 (PDA) を用いて、25°C、暗所で培養した。1 週間培養後、胞子を形成した寒天プレートに 1/2PDB を加えて、T 字スプレッターで胞子をこすりとり、ヘマトメータを用いて胞子濃度  $1 \times 10^6$  conidia/mL の懸濁液を調整した。キャリア粒子として PLGA ナノ粒子を用いた。

ペンチオピラド封入 PLGA ナノ粒子は貧溶媒希釈法により合成した。ペンチオピラド原体 (0 ~ 40 mg) と PLGA (5 mg) を溶かしたアセトン溶液 500  $\mu$ L を、2w/v% PVA 水溶液 19.5 mL に滴下し、スターラを用いて室温で 30 分間攪拌 (200 rpm) した。得られた粒子は遠心分離 (10 分間、15,000 rpm) 後、上澄み液をデカンテーションし、未封入のペンチオピラドを除去した。遠心分離後、純水に再分散し、所定のペンチオピラド濃度に調整してから使用した。また、PLGA 粒子の挙動を観察するため、ペンチオピラドの代わりに緑色蛍光試薬クマリン 6 をアセトンに溶解し、上記と同じ手順で蛍光付与した緑色蛍光 PLGA ナノ粒子を合成した。灰色かび病菌の菌糸および胞子懸濁液に蛍光付与した PLGA ナノ粒子を加えて 30 分暴露後、カルコフロールホワイトで細胞壁を染色し、CLSM を用いて PLGA ナノ粒子の局在を観察した。

スプレーで農薬 0.1 mL を PDA 培地に噴霧して風乾した。次に、PDA 培地の中央に灰色かび病菌の胞子を含んだペーパーディスクを置き、25°C、暗所で静置した。3 日間経過後から 1 日ごとにデジタルカメラで PDA 培地を撮影し、ImageJ を用いて画像解析により感染面積を算出した。灰色かび病菌の成長阻害率は、DW を用いたときの菌叢面積を基準 (100%) として算出した。農薬には、ペンチオピラド濃度を 0 ~ 100 mg/L に調整したペンチオピラド封入 PLGA 粒子懸濁液を用いた。また、市販のフロアブル剤 (FL)、純水 (DW) についても同様に実験を行うことで防除効果を比較した。さらに、ポット栽培したトマトを用いて感染予防実験を行った。葉 1 枚あたり農薬 0.1 mL を噴霧して風乾後、1/2PDB に分散した胞子懸濁液 ( $1 \times 10^6$  conidia/mL) を各枝あたり 0.1 mL を噴霧し、人工気象器で 25 °C、相対湿度 80%、明所 12 時間、暗所 12 時間の条件で栽培し、発病度から防除効果を比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝物質を封入したエクソソームを用いた遺伝子サイレンシングの誘導

GFP を標的とする siGFP を Exo-Fect 試薬および Milk-Exo と混合し、GFP 発現 GF11 細胞に暴露することで、遺伝子サイレンシングの誘導を試みた。Exo-siGFP、Exo-control siRNA、Exo (-) control (siGFP と Exo-Fect 試薬の混合物) を 1-24 h 暴露した CLSM 時の GF11 細胞の CLSM 像、および画像解析から得られた蛍光強度を Fig. 1 に示す。Exo-siGFP と Exo-control siRNA の結果より、Exo-siGFP の暴露後 1 h 以降で GFP シグナルの抑制が確認され、9 h で最大 (79% 減) となった後、若干のシグナル回復が見られた。以上より、siRNA の配列特異的なサイレンシング効果の誘導が可能であることが示唆された。また、Exo (-) control を暴露した場合、GFP シグナルの明らかな抑制は見られなかった。このことから、Milk-Exo の非存在下では siGFP はほとんど細胞に取り込まれなかったと推察される。以上の結果から、Milk-Exo の存在により siRNA が細胞内に効率的に送達され、配列特異的なサイレンシング効果を誘導することが可能であることが示唆された。

本研究では、植物細胞外からの dsRNA 送達による RNAi 誘導方法の確立を目的として、まず dsRNA キャリアとしてエクソソームが使用可能であるかを検討した。膜標識色素を用いて Milk-Exo を蛍光標識することで、植物細胞内への Milk-Exo の取込が確認された。また、取込実験において混入する可能性のある色素凝集物および非小胞夾雑物は取込結果に影響しないことを確認し、結果の妥当性を示した。次に、Exo-Fect 試薬を用い、Milk-Exo を介した siRNA の植物細胞への送達および GFP 遺伝子のサイレンシングの誘導を試みた。その結果、暴露後 1 h 以降で GFP 遺伝子が配列特異的にサイレンシングされることが示された。さらに、Milk-Exo の存在により siRNA が細胞内に効率的に送達され、サイレンシング効果をもたらしたことが示唆された。また、RNA を封入した PLGA キャリア粒子では、サイレンシング誘導により目的病害虫の防除効果は、封入しなかった場合と比べて 1/10 程度の RNA 量で同程度の防除効果が得られることも明らかにした。以上より、植物細胞への dsRNA の送達キャリアとしてバイオナノ粒子であるエクソソームが有用であり、環境に優しい遺伝子組み換えフリーの RNAi 農薬の確立の可能性が示された。

##### (2) 農薬封入 PLGA ナノ粒子を用いた灰色かび病菌の感染防除

緑色蛍光 PLGA ナノ粒子を灰色かび病菌の菌糸と胞子に暴露したときの CLSM 像を Fig. 2 に示す。灰色かび病菌の菌糸と胞子のいずれに対しても、青色に蛍光させた細胞壁の内部に緑色に蛍光した PLGA ナノ粒子が局在していることが観察された。これより、生分解性 PLGA ナノ粒子は、糸状菌に対して農薬を送達するキャリア粒子として有効であることが分かった。

アセトンに溶かしたペンチオピラド濃度を変化させて、貧溶媒希釈法により合成したペンチオピラド封入 PLGA ナノ粒子の個数基準の中位径  $D_{p50}$  とペンチオピラドの封入効率を Fig. 3 に示す。生成粒子の中位径はペンチオピラド濃度が 4 ~ 20 g/L の条件では 100 nm 程度であったが、40 g/L 以上になると大きくなることが分かった。幾何標準偏差  $\sigma_g$  はペンチオピラド濃度によらず 1.2 ~ 1.3 であった。ペンチオピラドの封入効率は、ペンチオピラド濃度が 10 g/L の条件では最も高く約 76% であった。4 g/L の条件で封入効率が低かったのは、ペンチオピラドの水溶媒へ

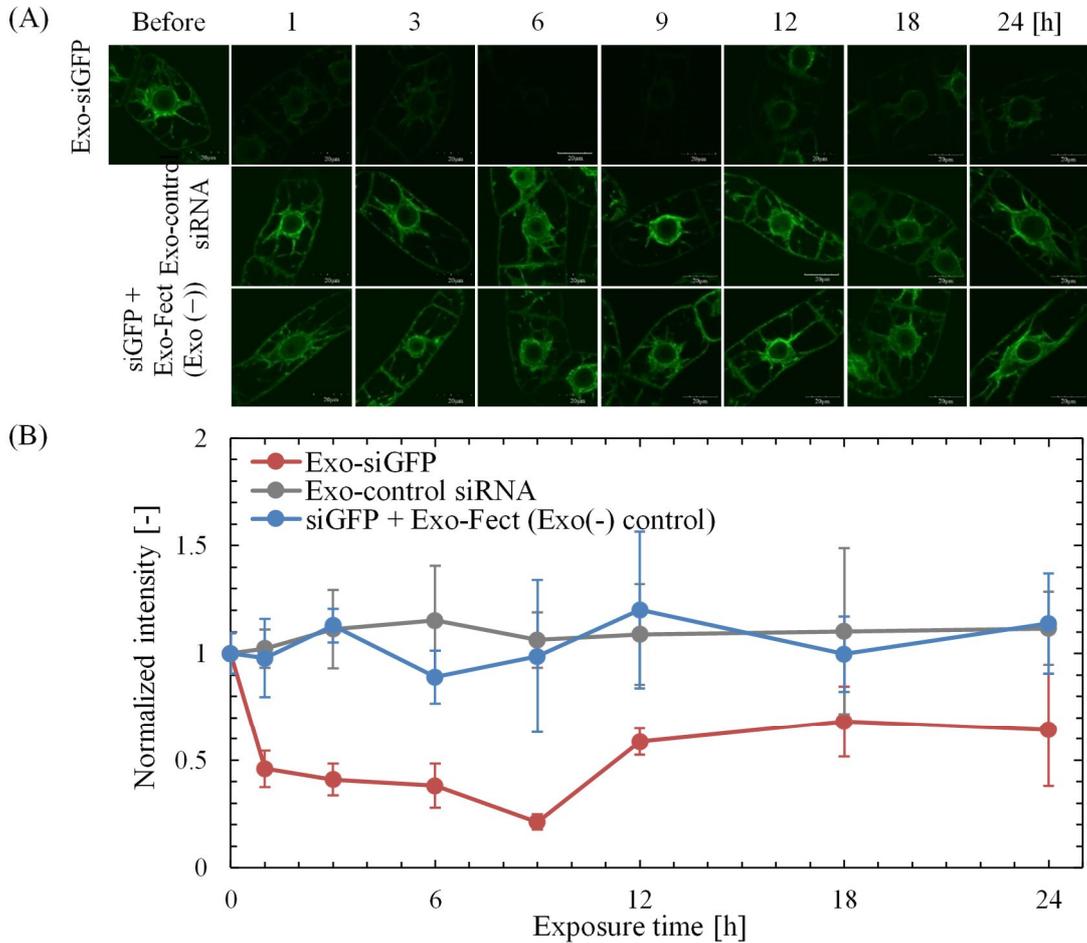


Fig. 1 (A) CLSM images of GF11 cells exposed to Exo-control siRNA (non-targeting siRNA control, top lane), mixture of Exo-Fect reagent and siGFP (Milk-Exo (-) control, bottom lane) and Exo-siGFP (top lane). Green: GFP expression of GF11 cells. (B) GFP fluorescence intensity normalized with GF11 cells before exposure.

の溶解により析出率が低かったため推察される。一方、ペンチオピラド濃度が 40 g/L 以上になると、PLGA に封入されなかったペンチオピラドが粒子化して、PLGA 粒子と凝集することで粒子径が大きくなったものと推察される。以上より、生成粒子が小さく、封入効率が高かった、アセトン溶液のペンチオピラド濃度が 10 g/L の条件でペンチオピラド封入 PLGA ナノ粒子を合成することとした。ペンチオピラド封入 PLGA ナノ粒子は、個数基準の中位径  $D_{p50} = 110 \pm 9$  nm、幾何標準偏差  $\sigma_g = 1.20$ 、表面電位は  $-17 \pm 1$  mV、ペンチオピラドの封入効率は 76% であった。

ペンチオピラド封入 PLGA ナノ粒子に封入されたペンチオピラド濃度を变化させて PDA 寒天培地に散布した。3 日後の灰色かび病菌の感染面積を計測し、農薬を散布していない DW の感染面積を 100% とした成長阻害率をペンチオピラド濃度に対してプロットした結果を Fig. 4 に示す。ペンチオピラドを PLGA に封入することで、灰色かび病菌の成長阻害率が明らかに向上することが分かった。また、市販農薬 FL の推奨濃度 100 mg/L と同じ成長阻害率 (85%) となる時の PLGA に封入したペンチオピラド濃度は約 1 mg/L であった。したがって、ペンチオピラドを PLGA に封入すると、約 99% 減農薬できることが示唆された。さらに、植物体への灰色かび病菌の感染予防に及ぼす農薬原体の PLGA ナノ粒子への封入効果について、ポット栽培したトマトを用いて検討を行った。ペンチオピラド封入 PLGA ナノ粒子を散布したポット栽培したトマトに灰色かび病菌の胞子を接種したときの発病度を計測した。DW の発病度を 100% として算出した 4 日目の感染予防率を Fig. 5 に示す。寒天培地を用いた成長阻害実験と同様にポット栽培したトマトにおいても、ペンチオピラドの PLGA への封入効果が高いことが実証された。また、FL において、防除実験を比較すると、ポット栽培において FL の防除率が約 15% 減少していることが分かった。一方、ペンチオピラドを封入した PLGA ではほとんど減少していなかった。これは、葉の傾斜により、液体の散布農薬は自重で流下し易いが、PLGA をキャリア粒子として用いることで、付着性が向上したためと考えられる。したがって、PP を PLGA 粒子に封入すると、植物病原菌の細胞内に PP を送達できるだけでなく、付着性が向上することも利点として挙げられる。以上より、化学農薬を生分解性ポリマーに封入すると、植物病原菌への送達効率および付着率が向上し、植物病原菌の防除効果の向上による化学農薬の使用量の大幅な削減が期待できることを明らかにした。

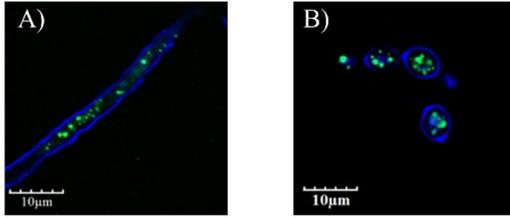


Fig. 2 Confocal images of *Botrytis cinerea* exposed to PLGA NPs in water: (A) Hypha, (B) Spore. Fluorescent blue: cell wall, fluorescent green: PLGA NPs.

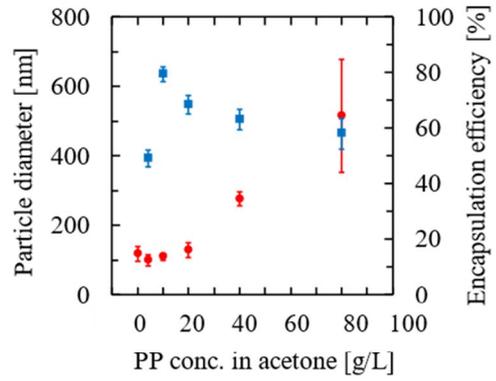


Fig. 3 Synthesis of penthiopyrad encapsulated PLGA NPs: Red: Median diameter, Blue: Encapsulation efficiency.

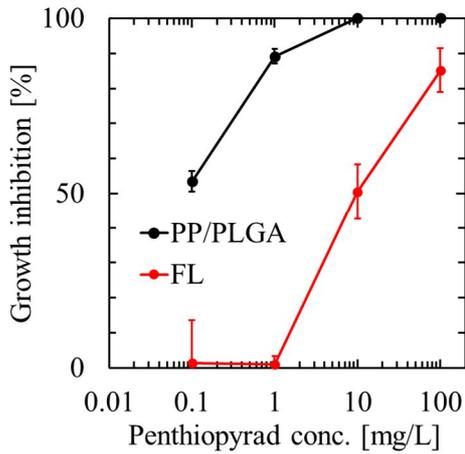


Fig. 4 Growth inhibition of *B. cinerea* experiments using penthiopyrad encapsulated PLGA NPs on agar plates.

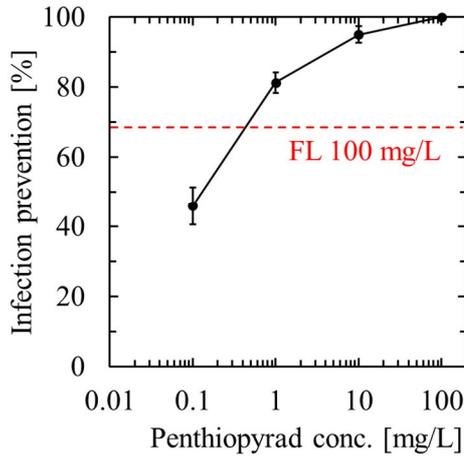


Fig. 5 Prevention infection of *B. cinerea* experiments using penthiopyrad encapsulated PLGA NPs on potted tomatoes.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 野村俊之	4. 巻 77
2. 論文標題 微粒子工学的技法を用いた農薬送達システムの開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 植物防疫	6. 最初と最後の頁 305-310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本一勝, 野村俊之
2. 発表標題 ベンチオピラド封入PLGAナノ粒子を用いた灰色かび病菌の感染防除
3. 学会等名 化学工学会福井大会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本幸永, 野村俊之
2. 発表標題 生分解性キャリア粒子を用いたナノ農薬の開発
3. 学会等名 第26回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 I. Matsumoto, M. Tokumaru, T. Nomura
2. 発表標題 Size effect of pesticide microparticles on control of Botrytis cinerea
3. 学会等名 7th International Conference on the Characterization and Control of Interfaces for High Quality Advanced Materials (ICCCI2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野村俊之
2. 発表標題 微粒子工学的技法を用いた農薬送達システムの開発
3. 学会等名 第39回農薬環境科学研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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