

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05718

研究課題名（和文）植物ミトコンドリア移行性を示す膜透過性ペプチドの創製

研究課題名（英文）Development of cell-permeable peptides with mitochondrial targeting ability for plant cells

研究代表者

寺田 佳世（Terada, Kayo）

京都大学・工学研究科・特定助教

研究者番号：00547911

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）：ミトコンドリア移行シグナルのコンセンサス配列をもとに、疎水性アミノ酸としてロイシンやアラニン、あるいは γ -アミノイソブタン酸（Aib）、塩基性アミノ酸としてアルギニンを含むペプチドを設計した。Aibを導入したペプチドはミトコンドリアに選択的に集積し、ミトコンドリア移行におけるペプチドへのAib導入の有効性が明らかとなった。またセリンやヒスチジン、アルギニンの化学酵素重合を行い、上述のペプチドを合成する際の基礎的な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続可能なものづくりに向けて、植物を反応場とした物質生産システムに強い関心が寄せられている。植物内での物質生産の効率化には、細胞のエネルギー生産を担うミトコンドリアへ有用な遺伝子を導入する必要があり、本研究で得られたミトコンドリア移行ペプチドの設計指針と合成手法は、低炭素社会の実現や二酸化炭素の資源化など環境分野への貢献が期待されるものである。また、酵素を利用したポリペプチド合成は水中で反応が進行し、モノマーの保護・脱保護反応も必要ないことから、環境低負荷な合成法と言える。大量合成への展開も可能で、持続可能なものづくりを支える重要な基盤技術としての展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：Based on the consensus sequence of the mitochondrial targeting signal, peptides were designed incorporating hydrophobic amino acids such as leucine, alanine, or γ -aminoisobutyric acid (Aib), as well as basic amino acids like arginine. The peptide containing Aib was selectively accumulated in mitochondria, demonstrating the effectiveness of Aib incorporation into peptides for mitochondrial targeting. Furthermore, by performing chemoenzyme polymerization of serine, histidine, and arginine, fundamental insights were obtained for the synthesis of the aforementioned peptides.

研究分野：機能性高分子

キーワード：ミトコンドリア移行ペプチド γ -アミノイソブタン酸 両親媒性 α -ヘリックス

1. 研究開始当初の背景

植物による物質生産システムの確立は、サステナブル社会の実現に向けた重要課題の一つであるが、物質生産過程における植物内の物質やエネルギーの枯渇に起因する、生産性の低さが課題となる。これを改善すべく、エネルギー生産を担うミトコンドリアに有用遺伝子を導入する手法の開発が求められる。

従来の植物への遺伝子導入法では、適用可能な植物種が限定される、特殊な大型装置が必要になる、遺伝子導入時の細胞ダメージが大きい、さらにミトコンドリアへの標的化は非常に効率が低いという問題があった。一方、ペプチドを用いた遺伝子導入法(ペプチド法)は、安全で簡便な手法として期待され、主に動物細胞を対象に研究が展開されている(Koren, E. et al. *Trends Mol. Med.* 2012)。しかし植物細胞には細胞壁が存在し、動物細胞のようにペプチドが機能しない場合が多い。実際、多様な植物種に対して高効率な膜透過性ペプチド(CPP)はない(Numata, K. et al. *Sci. Rep.* 2018)。ミトコンドリア移行ペプチド(MTP)に関しても同様と考えられ、検討されたのは、酵母由来のMTP(Cytcox)とポリカチオン配列から成る融合ペプチドの一例のみである。

ペプチド法は現時点で、植物ミトコンドリアへの物質送達が可能である唯一の手法であるが、ペプチド法による植物細胞への物質輸送法は確立されていない。その確立に向け、植物細胞に対して有効に機能するミトコンドリア移行ペプチドの構造的特徴は何か?人工的に創製可能か?という点を、本研究を通して明らかにできれば、植物による物質生産システムの発展に寄与するものと考えられる。

2. 研究の目的

植物細胞に対して高効率な、細胞膜透過性とミトコンドリア移行性を併せ持つペプチドを開発し、設計指針を得ることが本研究の目的である。機能と化学構造との相関を解明するためには分子設計の簡略化が必須であり、本研究でもCPPとMTPを単に融合するのではなく両機能を単一分子で実現するMTCPPを創出する。本研究では特に、両親媒性、カチオン性のバランスだけでなく、らせん構造の寄与について着目し、 α -アミノイソブタン酸(Aib)の導入によりらせん構造を誘起・安定化する。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア移行シグナルの設計

Cytcoxを始めとした多くのMTSは、ヘリックス構造を形成することが知られている。MTSは、ミトコンドリアタンパク質をミトコンドリア内に輸送する際、ミトコンドリア外膜に存在するTOM複合体を構成するTom20によって認識される。Tom20が認識するMTSのコンセンサス配列として、(σ : 親水性, φ : 疎水性, χ : 任意のアミノ酸残基, β : 塩基性) の6残基が報告されている(Figure 1a)。本研究では、MTSに代わるミトコンドリア移行性人工ペプチドの開発を目的に、コンセンサス配列から(LARL)₃を設計した(Figure 1b)。また、ヘリックス構造の安定化によるミトコンドリア移行性の向上を目指し、Aib(U)を導入した(LURL)₃、(LURR)₃、(LURS)₃を設計した。顕微鏡による観察のため、全てのペプチドはフルオレセイン(FAM)により蛍光ラベル化して用いた。ペプチドのミトコンドリア移行性の評価として、金粒子の表面にFAM-ラベル化ペプチドをコートし、遺伝子銃法を用いてタマネギ表皮細胞の細胞質に導入した。その後、MitoTracker® Red CMXRos (MTR)を用いてミトコンドリアを染色し、共焦点レーザー顕微鏡により細胞内局在を観察した。

(2) 水溶性アミノ酸・塩基性アミノ酸の化学酵素重合

(1)で得られた高効率なミトコンドリア移行性を示すポリペプチドを、化学酵素重合により合成することを目的に、細胞膜透過性ペプチドとミトコンドリア移行ペプチドに共通して存在する親水性アミノ酸や塩基性アミノ酸の重合について検討した。化学酵素重合法は、タンパク質分解酵素を用いてアミノ酸エステルからポリペプチドを得る手法で、ポリペプチドを水中で簡単に大量合成できることから、環境負荷が低く優れたポリペプチド合成法と言える。酵素の優れた立体選択性、基質特異性を活用することで、リジンやシステインなどの反応性側鎖を有するモノマーの重合においても、側鎖保護を要さずポリペプチドを合成可能である。MTPには親水性アミノ酸や塩基性アミノ酸などの反応性側鎖を有するアミノ酸が含まれることから、本手法を用いた合成法の確立はグリーンケミストリーの観点からも重要と考えられる。また、ジペプチド、

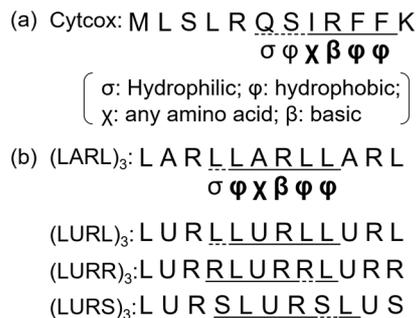


Figure 1. (a) CytcoxにおけるTom20認識モチーフ (b) 本研究のペプチド設計

トリペプチドをモノマーとすることで繰り返し配列を有するポリペプチドの合成も可能であり、人工設計した MTP の合成に適用可能と考えられる。そこでまずは、親水性アミノ酸としてセリン、塩基性アミノ酸としてヒスチジンの重合を検討した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア移行シグナルの設計

CD スペクトルや分子モデリング計算から、(LARL)₃、(LURL)₃ は安定な α -ヘリックス構造の形成が示されたが、特に(LURL)₃ は疎水性相互作用によりバンドル化していることが分かった (Figure 2)。各種ペプチドのミトコンドリア移行性は、FAM-ラベル化したペプチドをコートした金粒子を遺伝子銃法によりタマネギ表皮細胞に導入し、評価した。(LARL)₃ は、FAM 由来の蛍光が MTR の蛍光と共局在している一方で、細胞全体に広がった蛍光が観察された。一部の(LARL)₃ はミトコンドリアへ移行しているものの、大部分は液胞に局在していた。(LURL)₃ では、FAM 由来の蛍光と MTR の蛍光が高い頻度で共局在した。さらに、液胞など他のオルガネラに FAM 由来の蛍光は観察されず、(LURL)₃ はミトコンドリアに選択的に移行することが分かった (Figure 3)。また、Tom20 に対する免疫染色などにより、(LURL)₃ はミトコンドリア外膜タンパク質 Tom20 と疎水性相互作用することで、ミトコンドリアに選択的に集積することが明らかとなった。また、Aib 導入によって酵素分解に対する安定性が向上したことも分かった。

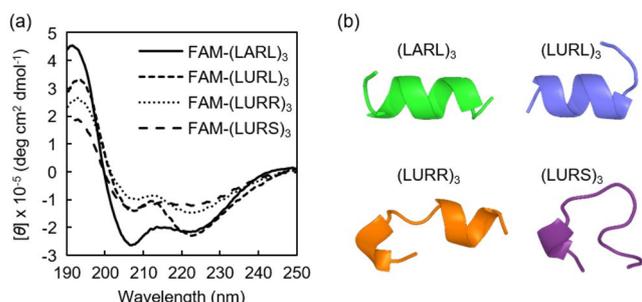


Figure 2. (a) FAM ラベルペプチドの CD (1.0% SDS 水溶液中、 $c = 25 \mu\text{M}$ 、 25°C) (b) GaMD (AMBER ff14SB) を用いて計算した (LARL)₃、(LURL)₃、(LURR)₃、and (LURS)₃ の構造

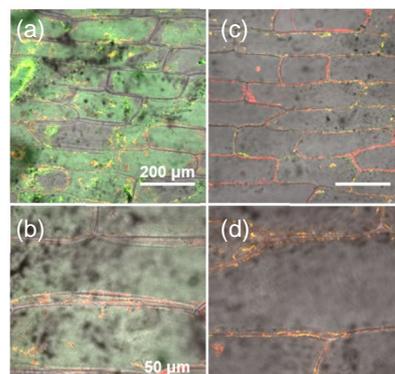


Figure 3. ペプチド導入 1 時間後のタマネギ表皮細胞の共焦点レーザー顕微鏡像 (a, b) (LARL)₃ (c, d) (LURL)₃

(2) 水溶性アミノ酸・塩基性アミノ酸の化学酵素重合

セリンエチルエステルをパピインを用いて重合すると、pH を 8.5 のとき最大で重合度が 5 - 22 のポリセリンが得られることが分かった (Figure 4)。赤外分光法や広角 X 線回折法により、このポリセリンは ストランド構造をとっており、重合溶液中で沈殿として現れることが分かった。同様に、セリンメチルエステルの重合も塩基性条件で進行し、側鎖の水酸基を保護することなく、ポリセリンを合成できることが分かった。

一方で、ヒスチジン(His)エチルエステルを単独で重合に用いたところ沈殿は得られず、パピインで重合は進行しないことが分かった。非天然アミノ酸などの酵素認識能が低いアミノ酸は、両末端ヘグリシンやアラニンなどの天然アミノ酸を導入した

トリペプチドエステルをモノマーとして用いて化学酵素重合を行うことで、ポリペプチド主鎖に組み込むことが可能である。そこで、His をグリシン (Gly) と結合させたモノマーについて重合を検討した。HisGly の重合では、最大重合度が 35 を超えるヒスチジン含有ポリペプチドを合成可能であった。これに対し、GlyHis は重合しないという配列依存性が見られた。得られた HisGly 交互配列を有するポリペプチドは、赤外分光法や広角 X 線回折法により ストランド構造をとることが示され、ストランド構造に基づく高い熱安定性を有することが分かった。以上のことから、His 含有モノマーの化学酵素重合において、His 残基はパピインへの親和性に乏しいものの、パピインによる酵素認識性の高い Gly 残基を C 末端側に修飾することで高い重合活性を付与できることが分かった。

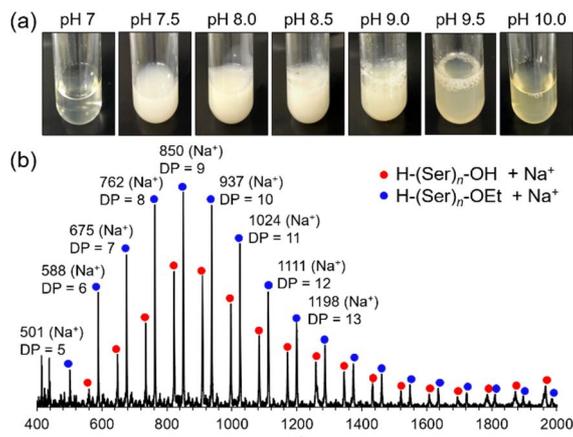


Figure 4. (a) 重合溶液の様子 (b) pH 8.5 で合成したポリセリンの MALDI-TOF-MS スペクトル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takumi Watanabe, Kayo Terada, Shogo Takemura, Hiroyasu Masunaga, Kousuke Tsuchiya, Alexandros Lamprou, and Keiji Numata	4. 巻 -
2. 論文標題 Chemoenzymatic Polymerization of L-Serine Ethyl Ester in Aqueous Media without Side-Group Protection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Polymers Au	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/acspolymersau.1c00052	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 該当する

1. 著者名 Kayo Terada, Joan Gimenez-Dejoo, Taichi Kurita, Kazusato Oikawa, Hirotaka Uji, Kousuke Tsuchiya, and Keiji Numata	4. 巻 7(4)
2. 論文標題 Synthetic Mitochondria-Targeting Peptides Incorporating γ -Aminoisobutyric Acid with a Stable Amphiphilic Helix Conformation in Plant Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials SCIENCE & ENGINEERING	6. 最初と最後の頁 1475-1484
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsbmaterials.0c01533	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Terada Kayo, Kurita Taichi, Gimenez-Dejoo Joan, Masunaga Hiroyasu, Tsuchiya Kousuke, Numata Keiji	4. 巻 55
2. 論文標題 Papain-Catalyzed, Sequence-Dependent Polymerization Yields Polypeptides Containing Periodic Histidine Residues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromolecules	6. 最初と最後の頁 6992 ~ 7002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.macromol.2c01036	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kayo Terada, Taichi Kurita, Kousuke Tsuchiya, and Keiji Numata
2. 発表標題 Synthesis of histidine-containing polypeptide by chemoenzymatic polymerization
3. 学会等名 第70回高分子年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田佳世・栗田太一・土屋康佑・Joan Gimenez-Dejoz・沼田圭司
2. 発表標題 細胞壁の透過性を向上させるペプチド処理剤の合成を目指したヒスチジン誘導体の化学酵素重合
3. 学会等名 第31回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田佳世・栗田太一・Joan Gimenez-Dejoz・土屋康佑・沼田圭司
2. 発表標題 化学酵素重合を用いた塩基性アミノ酸含有ポリペプチドの合成
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田佳世・土屋康佑・沼田圭司
2. 発表標題 ミトコンドリア移行性 -アミノブタン酸含有ペプチドの創製
3. 学会等名 第30回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺田佳世
2. 発表標題 細胞内輸送効率の向上を目指した -アミノブタン酸含有キャリアペプチドの創製
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺田佳世・Liu Zhiwei・中理沙・増永啓康・土屋康佑・沼田圭司
2. 発表標題 反応性官能基を側鎖に有するアミノ酸の化学酵素重合
3. 学会等名 第72回高分子年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺田佳世・渡邊拓巳・武村翔吾・増永啓康・土屋康佑・沼田圭司
2. 発表標題 側鎖の保護を必要としない化学酵素重合を用いたポリセリンの合成
3. 学会等名 第71回高分子年次大会
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
---------	---------