

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14575

研究課題名（和文）細胞壁弛緩ペプチドと核酸運搬ナノミセルを利用した高効率な植物葉緑体への遺伝子導入

研究課題名（英文）Cell wall-loosening agents and DNA-transporting nanomicelles for efficient gene delivery to plant chloroplasts

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・研究員

研究者番号：20804040

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、セルロース可溶化剤（ZILとZIP）を用いた化学処理により、植物細胞壁の透過性を向上させるとともに、葉緑体への高効率なDNA導入を可能にする新手法を開発した。ZILは結晶性セルロース微繊維を部分的に溶解し、細胞壁の透過性を高めることで、ナノミセルによるDNA導入効率を改善した。また、ZIPはZILよりも低濃度で同様の効果を示した。さらに、葉緑体移行ペプチドと細胞膜透過ペプチドのROS除去能を発見した。両者を融合したキメラ型ペプチドにより、葉緑体内のROSを一時的に除去することに成功した。本研究成果は、葉緑体改変に資する有用な化学ツールを提供するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、従来よりも高効率な葉緑体への遺伝子導入が可能となった。ZILとZIPを用いる化学処理手法は、プロトプラストや高価な装置を用いることなく、植物細胞壁の透過性を向上させる新たなコンセプトである。この技術は、葉緑体改変を軸とした植物の形質改良や有用物質生産などの応用研究に貢献できる。さらに本研究では、ある種の葉緑体移行ペプチドと細胞膜透過ペプチドに活性酸素（ROS）除去能があることを発見した。この知見は、植物の酸化ストレスを緩和させる新たな手法の開発につながる。以上の成果は、基礎植物科学のみならず、持続可能な農業や次世代バイオテクノロジーの実現にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A novel method for efficient DNA delivery into plant chloroplasts was developed by combining zwitterionic ionic liquid (ZIL) pretreatment with chloroplast-targeted nanomicelles. ZIL pretreatment increased cell wall permeability by partially dissolving crystalline cellulose microfibrils without damaging the cell membrane, resulting in a 2-fold improvement in DNA delivery efficiency, offering a simpler alternative to existing techniques. Zwitterionic peptides (ZIPs) were developed based on ZILs' structure to further enhance cell wall permeability. ZIPs dissolved crystalline cellulose at lower concentrations than ZILs, potentially improving permeability without reducing regeneration efficiency. Unexpectedly, the chloroplast transit and cell-penetrating peptides used in the nanomicelles exhibited high reactive oxygen species (ROS) scavenging ability. This led to the development of a chimeric peptide that temporarily eliminated ROS inside chloroplasts.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：細胞壁 DNA送達 双性型イオン液体 葉緑体移行ペプチド ナノミセル 活性酸素種 抗酸化ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の葉緑体ゲノムの改変は、光合成能力の向上による作物の増収や、CO₂を原料とした有用物質の生産に重要であり、食料・環境の諸問題を解決し得る技術として注目されている。一般に葉緑体ゲノムの改変は、外来遺伝子の導入により達成される。葉緑体への遺伝子導入には、DNAをコートした金粒子を細胞内へ直接打ち込むパーティクル・ガン法が利用されてきた。しかし、この手法には、金粒子を高圧下で打ち出すための特殊な装置が必要であると共に、遺伝子導入効率が低いという欠点がある。既存手法による葉緑体への高効率な遺伝子導入が難しいために、多くの植物種において葉緑体ゲノムの改変は達成されていない。

応募者は、DNA結合能と葉緑体移行能を併せ持つ融合ペプチドを用いた、葉緑体への選択的な遺伝子導入手法を開発した。この手法は、特殊な装置が不要な点でパーティクル・ガン法よりも優れるが、導入効率の低さが課題であった。応募者は、カチオン性ペプチドによりDNAを内部に凝縮しながら、表面に機能性ペプチドを提示できるコア・シェル型の遺伝子運搬体(ナノミセル)を開発した。ナノミセルに細胞膜透過・オルガネラ移行ペプチドを提示させると、従来の融合ペプチドよりも約4倍高効率な遺伝子導入が可能となる [Miyamoto et al.: Biomacromolecules, 2019 & 2020; Nanoscale, 2021]。しかし、幅広い植物種で葉緑体ゲノムを改変するには、さらなる効率の向上が必要である。

ナノミセルによる植物への遺伝子導入を阻むバリアとして細胞壁が挙げられる。細胞壁はセルロース微繊維を主成分とした網状構造を持つ。細胞壁を高効率に透過できる粒子径の上限は直径50 nmである。ナノミセルは直径30-200 nmの粒子径分布を持つが、その大部分(~70%)は直径50 nm以上であるため、細胞壁を高効率に透過できない。一方、応募者は、植物細胞壁の網状構造を緩める双性イオン型ペプチドを開発した [Tsuchiya et al. Biomacromolecules, 2020]。このペプチドはセルロース可溶化剤の双性イオン液体を基にして設計され、本ペプチドを処理した細胞壁では、直径150 nmを超える小孔の形成が確認されており、細胞壁の透過性が向上していることが予想された。

2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本研究では、植物細胞壁に小孔を形成させる双性イオン型ペプチド(ZIP)および双性イオン液体(ZIL)を利用することで、ナノミセルの細胞壁に対する透過効率を改善するとともに、葉緑体への遺伝子導入効率の向上を目指した。

3. 研究の方法

ZILに関して、細胞壁の透過性向上効果を評価するとともに、ナノミセルによる葉緑へのDNA送達効率が向上できるかを検証した。また、ZIPとZILのセルロースに対する溶解能力を比較した。さらに、当初計画では予期していなかった発見として、ナノミセルの構成要素である葉緑体移行ペプチドと膜透過ペプチドが活性酸素種(ROS)の消去能を示したため、抗酸化活性の詳細な評価を行った。

4. 研究成果

(1) ZILおよびZIPとナノミセルを組合わせた高効率な葉緑体へのDNA送達

モデル植物のシロイヌナズナの芽生えを、0-800 mMに希釈したZIL水溶液に室温下3時間浸漬させた後、Evans blue assayにより細胞生存率を評価した。その結果、ZILは400 mM以下の濃度では細胞毒性を示さないことが分かった。次に、ZIL水溶液(0-400 mM)で2時間処理したセルロース微結晶について広角X線回折(WAXD)を測定し、結晶化度を求めた。コントロール(水で処理したサンプル)では、結晶化度は89%であったが、400 mM ZILで処理したサンプルでは、結晶化度が55%に低下した。この結果から、ZIL処理(400 mM)によってセルロース微結晶を溶解できることが示唆された。ZIL処理後(0-400 mM, 3時間)のシロイヌナズナの子葉について、蛍光染色した細胞壁中のセルロースを共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)で観察した。400 mM ZILで処理した子葉では、0および200 mM ZILで処理した子葉と比較して、セルロース微繊維の密度が局所的に低下していた(図1A)。細胞壁の透過性を蛍光消光アッセイにより定量した結果、400 mM ZILで処理した子葉では、未処理のコントロールと比較して細胞壁の透過性が2倍ほど向上していた。この細胞壁の透過性向上は、ZIL処理(400 mM)によるセルロース微繊維の局所的な溶解によるものと推察される。

ペプチド提示型ナノミセルの葉緑体へのDNA導入効率に対して、ZIL処理が与える影響を検討した。レポーター遺伝子(GFPまたはルシフェラーゼ)をコードするプラスミドDNAを内包し、葉緑体移行ペプチド(CTP)と膜透過ペプチド(CPP)を表面提示したミセル(CTP/CPP-MC)を調製した。動的光散乱測定、ゼータ電位測定、および逆相HPLC分析から、CTP/CPP-MCは直径約120 nmで正のゼータ電位(20 mV)を示し、CTPとCPPがそれぞれ45%と50%の割合でミセル表面のマレイミド基に結合していた。CTP/CPP-MCをZIL処理後(400 mM, 3時間)および未処理のシロイヌナズナ芽生えに導入し、24時間後のレポーター遺伝子の発現量を基準として

葉緑体への DNA 導入効率を定量した。その結果、DNA 導入効率は ZIL 処理により約 2 倍向上することが明らかとなり（図 1B）。この導入効率の向上は ZIL 処理後の芽生えにおいて CTP/ CPP-MC が細胞壁を高効率に透過するためと推察される。以上から、ZIL 処理とペプチド提示型ミセルを組み合わせることにより、植物の多重バリアを打ち破る葉緑体への DNA 導入手法の開発に成功した。

ZIL による遺伝子導入効率の向上効果をより高めるために、双性イオン型の側鎖構造を持つ種々の ZIP を合成し、セルロース溶解能を比較した。その結果、ZIL よりも 1 桁以上低い濃度域でセルロース溶解性を示す ZIP を開発することができた。ZIL の代替として ZIP を利用することにより、さらに効率を高めた葉緑体への DNA 導入が可能になると期待される。

(2) 葉緑体の活性酸素種を消去する抗酸化ペプチドの開発

ナノミセルに修飾していた CPP (KAibA-EED4) および CTP (Chl) がヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) と一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) に対して顕著な消去活性を示した。一方、植物の葉緑体では、強光下で ROS ($\cdot\text{OH}$ や $^1\text{O}_2$) が過剰に生成することにより、光化学系 II (PSII) が酸化的に障害される光阻害が知られている。葉緑体内の ROS を消去できるペプチドを開発できれば、植物を光阻害から保護できるのではないかと考え、上述の Chl と KAibA-EED4 を融合したキメラペプチド (Chl-KAibA-EED4) を合成した。アミノ酸分析や MS/MS 測定から、Trp 残基は主に $\cdot\text{OH}$ の消去に寄与し、Cys および Met 残基は $^1\text{O}_2$ の消去に貢献することが明らかとなった。Chl-KAibA-EED4 は、植物細胞に侵入して葉緑体に到達し、植物葉緑体内で $\cdot\text{OH}$ と $^1\text{O}_2$ を消去した。この抗酸化機能に基づき、Chl-KAibA-EED4 は過剰光条件下でのモデル植物における光阻害を効果的に緩和した。以上の実験結果から、本研究で開発されたキメラペプチドは、植物の光酸化ストレスや緩和するための非遺伝子組換えツールとして利用できることが示された。

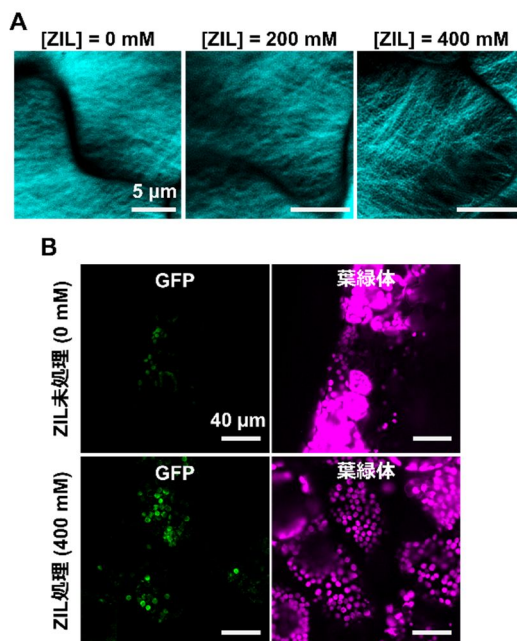


図 1: (A) 細胞壁のセルロース微繊維を観察した CSLM 像。(B) ミセルによって葉緑体へ導入された GFP 遺伝子の発現を観察した CSLM 像。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Miyamoto Takaaki, Numata Keiji	4. 巻 96
2. 論文標題 Advancing Biomolecule Delivery in Plants: Harnessing Synthetic Nanocarriers to Overcome Multiscale Barriers for Cutting-Edge Plant Bioengineering	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1026 ~ 1044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20230147	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 Law Simon Sau Yin, Miyamoto Takaaki, Numata Keiji	4. 巻 59
2. 論文標題 Organelle-targeted gene delivery in plants by nanomaterials	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 7166 ~ 7181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3CC00962A	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 Abe Naoya, Fujita Seiya, Miyamoto Takaaki, Tsuchiya Kousuke, Numata Keiji	4. 巻 24
2. 論文標題 Plant Mitochondrial-Targeted Gene Delivery by Peptide/DNA Micelles Quantitatively Surface-Modified with Mitochondrial Targeting and Membrane-Penetrating Peptides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 3657 ~ 3665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.3c00391	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 Yoshinaga Naoto, Miyamoto Takaaki, Odahara Masaki, Takeda Kamiya Noriko, Toyooka Kiminori, Nara Seia, Nishimura Haruna, Ling Feng, Su'etsugu Masayuki, Yoshida Minoru, Numata Keiji	4. 巻 34
2. 論文標題 Design of an Artificial Peptide Inspired by Transmembrane Mitochondrial Protein for Escorting Exogenous DNA into the Mitochondria to Restore their Functions by Simultaneous Multiple Gene Expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 2306070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adfm.202306070	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 Yoshinaga Naoto, Miyamoto Takaaki, Goto Mami, Tanaka Atsuko, Numata Keiji	4. 巻 4
2. 論文標題 Phenylboronic Acid-Functionalized Micelles Dual-Targeting Boronic Acid Transporter and Polysaccharides for siRNA Delivery into Brown Algae	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 JACS Au	6. 最初と最後の頁 1385-1395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacsau.3c00767	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, Toyooka Kiminori, Goto Yumi, Tateishi Ayaka, Numata Keiji	4. 巻 61
2. 論文標題 Relaxation of the Plant Cell Wall Barrier via Zwitterionic Liquid Pretreatment for Micelle Complex Mediated DNA Delivery to Specific Plant Organelles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202204234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202204234	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9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takaaki Miyamoto & Keiji Numata
2. 発表標題 Peptide-mediated intracellular cargo delivery for plant biomodification
3. 学会等名 第72回高分子年次大会、日台ジョイントセッション (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本昂明、沼田圭司
2. 発表標題 植物の葉緑体で活性酸素種を消去するペプチドを利用した強光ストレス下での光合成機能の保護
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本昂明、沼田圭司
2. 発表標題 植物の形質改変を目指した高機能ペプチド材料の開発とマテリアルDXの融合に向けた展開
3. 学会等名 DxMT 若手WORKSHOP OSAKA 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takaaki Miyamoto & Keiji Numata
2. 発表標題 Peptide-mediated DNA delivery to target organelles in plants: Strategies to overcome plant cellular barriers
3. 学会等名 S-FISNA-NIH-&-NSF~ (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮本昂明、沼田圭司
2. 発表標題 ペプチド提示型ミセルと細胞壁の透過性を向上させる 双性型イオン液体を利用した植物葉緑体への核酸導入
3. 学会等名 第32回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本昂明、沼田圭司
2. 発表標題 核酸を内包するペプチド提示ミセルと細胞壁を緩める双性型イオン液体を組み合わせた植物オルガネラへのDNA送達
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本昂明、沼田圭司
2. 発表標題 植物細胞のバリアを克服するペプチドの設計と核酸・タンパク質デリバリーへの応用
3. 学会等名 第71回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本昂明、沼田圭司
2. 発表標題 ペプチドによる植物への核酸導入
3. 学会等名 FIBER核酸化学ユニバース13 (FIBER FUTURE COLLEGE91) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takaaki Miyamoto, Keiji Numata.
2. 発表標題 Designed antioxidant peptides with cell permeability, chloroplast targeting and ROS scavenging capabilities for plant protection under abiotic stress conditions
3. 学会等名 2023 Gordon Research Conference on Chloroplast Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------