

PRESS RELEASE

2018 年 7 月 19 日

理化学研究所
奈良先端科学技術大学院大学
科学技術振興機構

多様な植物に侵入するペプチドの探索

—植物種に応じた膜透過性ペプチドの最適化が必要—

理化学研究所（理研）環境資源科学研究センターバイオ高分子研究チームの堀井陽子テクニカルスタッフ I、及川和聡研究員、宮城雄特別研究員、沼田圭司チームリーダーと奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域 植物代謝制御研究室の出村拓教授、大谷美沙都助教の共同研究チームは、さまざまな植物細胞に侵入する細胞膜透過性ペプチド（CPP）^[1]の探索を行い、植物種ごとに適した CPP の知見を得ることに成功しました。

本研究成果は、核酸やタンパク質などを多種多様な植物の細胞内へ効果的に輸送できるペプチド設計を可能にし、植物形質転換体の簡便な作出や植物の病気診断マーカーの開発につながると期待できます。

医療分野では、CPP を用いたドラッグデリバリーシステム^[2]などの手法が広く検討されています。しかし、動物細胞とは異なり細胞壁などの特殊な構造を持つ植物細胞では、効率的に細胞に機能する CPP は乏しく、CPP を応用した植物細胞への物質輸送法は確立されていません。また、植物種、組織や生育段階に応じて細胞の性質が異なるために、さまざまな要素に適合したペプチドの設計が必要です。

今回、共同研究チームは、既に生物物理学、生化学的な知見があり、動物細胞などに効率的に侵入することが知られている 55 種の CPP ライブラリーを作製し、タバコ、シロイヌナズナ、トマト、ポプラ、イネなどさまざまな植物を材料として、導入効率と導入様式を評価しました。その結果、植物種や組織によって、CPP の細胞への導入効率や局在性は異なり、研究目的や材料に応じてペプチドを最適化することの重要性が明らかになりました。

本研究は、英国のオンライン科学雑誌『*Scientific reports*』（7 月 20 日付：日本時間 7 月 20 日）に掲載されます。

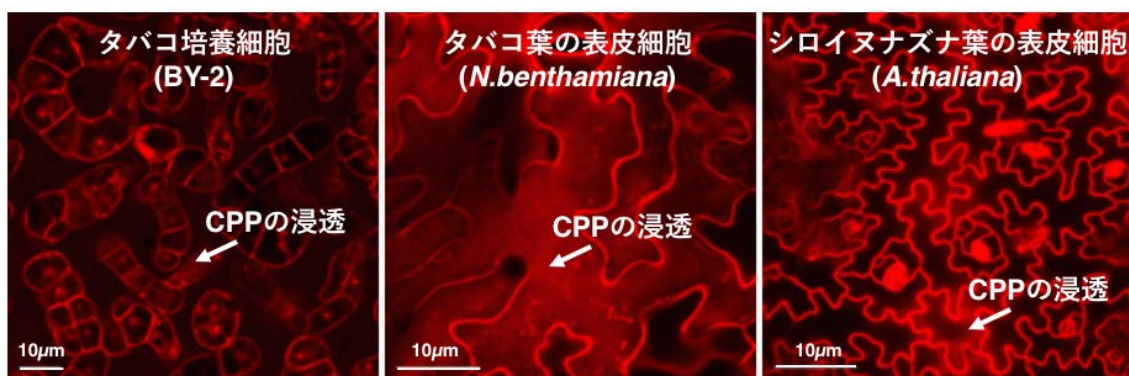


図 植物細胞に透過する細胞膜透過性ペプチド（CPP）（赤色）

※研究支援

本研究は、科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究 ERATO 「沼田オルガネラ反応クラスタープロジェクト（研究総括：沼田圭司）」の一環で実施されました。

1. 背景

細胞膜透過性ペプチド（Cell-penetrating peptide; CPP）は、核酸やタンパク質などの物質を細胞内へ効率的に輸送する有用なツールです。動物細胞では既に多種多様な CPP が開発されており、ドラッグデリバリーシステムなど医療に活用されています。しかし植物細胞では、農業や環境浄化など幅広い分野への応用が期待されているにもかかわらず、現在のところ効率的な細胞内物質輸送に適したペプチドの知見はほとんどありません。

CPP は数十アミノ酸からなり、脂質二重膜からなる細胞膜を不安定化させ、透過する特性を持っています。また、CPP は、その化学構造から、リジンやアルギニンを多数持つ「陽イオン性」、極性と非極性の両方のアミノ酸を持つ「両親媒性」、非極性アミノ酸からなる「疎水性」の 3 種類に大別されます。このような分子特性を持つ CPP は、核酸やタンパク質など輸送する物質と複合体を形成することで、エンドサイトーシス^[3]やピノサイトーシス^[4]などにより輸送物質を細胞外から内部へ送達します（図 1）。

植物の形質転換には、多くの場合、アグロバクテリウム法^[5]やパーティクルガン法^[6]を用います。しかし、植物種が限定されることや、大型の装置が必要になること、細胞内小器官（オルガネラ）^[7]を特異的に標的化することが困難であることが課題として挙げられています。そこで、多種多様な植物種への物質輸送を可能にする CPP の開発が重要です。そのためには、CPP の化学特性と透過効率の相関性を詳しく調べ、植物種ごとに最適化された CPP の開発が必要になります。

2. 研究手法と成果

共同研究チームはまず、既に生物物理学、生化学的な知見があり、動物細胞で効果が認められている 55 種の CPP ライブラリーを作製し、円二色性スペクトル法^[8]などを用いて、その二次構造や機能などの化学特性について調べました。

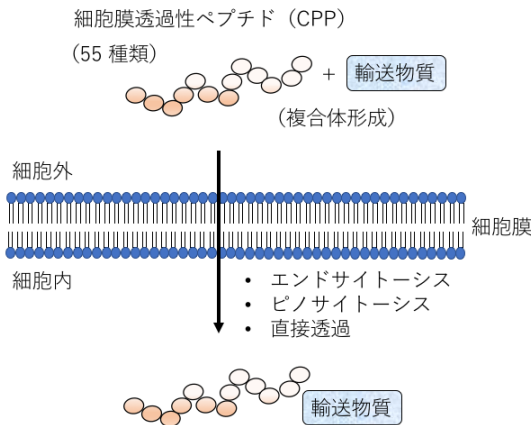


図 1 細胞膜透過性ペプチド (CPP) の概略図

本研究では動物細胞で効果が認められている 55 種類の CPP について、植物を材料として細胞膜透過性を調べた。細胞膜を透過する過程で、いくつかの輸送経路（エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、直接透過）が関与する。実際には、CPP は輸送物質のタンパク質や核酸などと複合体を形成することで、それらを細胞内に送達できる。

次に、これらの CPP に蛍光ラベルを施した後、共焦点顕微鏡^[9]による植物細胞膜透過性解析を行いました。はじめにタバコ培養細胞を用いて、細胞内に効果的に侵入する 8 種類の CPP を同定しました。この 8 種類の CPP は 2 次構造上の共通性はありませんが、リジンに富む配列を共通に持つことが分かりました。しかし、動物細胞では膜透過性が高い CPP が多いのに対し、他の CPP はタバコ培養細胞では膜透過性が低いことが分かりました。これには、植物細胞の膜構造、構成分子や分化の特異性が関係していると考えられます。さらに、一部の CPP では細胞毒性があったり、核に局在したりすることも分かりました。

次に、タバコ培養細胞の結果を踏まえ、膜透過性の違いにより区分した CPP を選抜し、研究によく用いられるタバコ、トマト、シロイヌナズナ、ポプラ、イネ (図 2) を用いて、同様に解析しました。その結果、イネの葉細胞を除く、用いた植物種全てに効果的な CPP として HPV33L2-445/467 を含む複数の CPP を同定しました (図 3)。また、イネの葉細胞の構造特性との関連性を調べるためにイネカルス^[10]を用いた解析を行うと、多くの CPP が有効であり、今後の研究材料としての有用性が強く期待されました。本研究を通して、植物種や組織によって、導入効率は大きく異なり、これらに応じてペプチドを最適化することの重要性が明らかになりました。

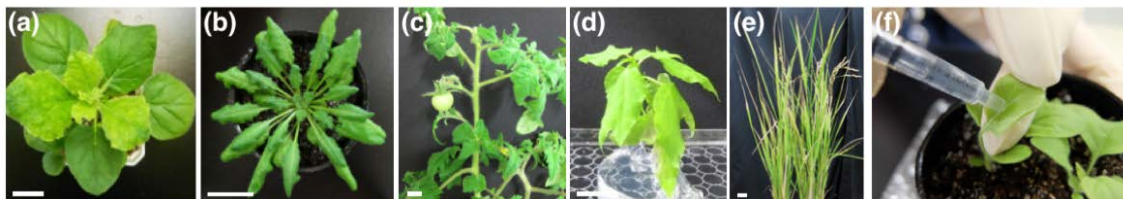


図 2 実験に用いた植物種と導入方法

(a)タバコ、(b)シロイヌナズナ、(c)トマト、(d)ポプラ、(e)イネの生育画像。(f)は蛍光ラベルした CPP をシリンジで葉に導入する場面。スケールバーは 2cm。

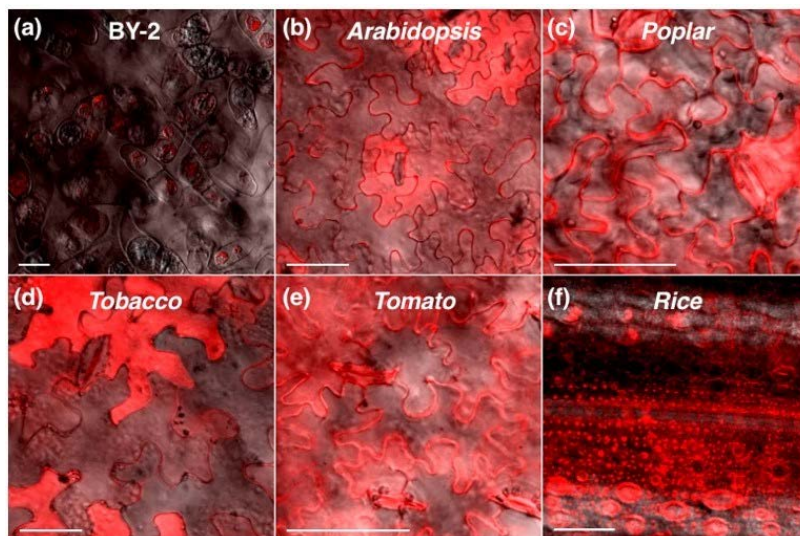


図3 植物細胞内に透過した CPP (HPV33L2-445/467)

蛍光ラベルを施した CPP を導入した 6 種類の植物種細胞の共焦点顕微鏡像。(a) タバコ培養細胞、(b) シロイヌナズナ、(c) ポプラ、(d) タバコ、(e) トマト、(f) イネの表皮細胞。タバコ培養細胞では核周辺と細胞質が、イネを除く植物種では赤色の CPP が細胞内全体とその下層領域に浸透しているのが分かる。イネでは細胞表層の細胞膜のみに蛍光が集積している。葉の表皮細胞はジグソーパズルの様に見える。スケールバーは 50 マイクロメートル (μm 、 $1\mu\text{m}$ は 1000 分の 1mm)。

3. 今後の期待

本研究では、多様な植物細胞の細胞膜透過に効果的な CPP の知見を得ることに成功しました。これまで植物での CPP の利用は限定的でしたが、今後は、植物種ごとに最適化された CPP を開発することで、特殊な機器を必要としない簡便な遺伝子導入やオルガネラ形質転換体作出に寄与すると考えられます。また、CPP とセンサー物質を化学結合させ、作物の病態や細胞の活性を感知する細胞内マーカーとして、幅広く利用されることも期待できます。

4. 論文情報

<タイトル>

Library screening of cell-penetrating peptide for BY-2 cells, leaves of Arabidopsis, tobacco, tomato, poplar, and rice callus

<著者名>

Keiji Numata, Yoko Horii, Kazusato Oikawa, Yu Miyagi, Taku Demura, Misato Ohtani

<雑誌>

Scientific Reports

<DOI>

10.1038/s41598-018-29298-6

5. 補足説明

[1] 細胞膜透過性ペプチド (CPP)

10~100 個程度のアミノ酸からなる、細胞膜を透過できるペプチドの総称。CPP は、Cell-penetrating peptide の略。

[2] ドラッグデリバリーシステム

薬物送達システムの総称。組織や細胞、また病変部などへ、直接に適時適量の薬剤などを運搬する方法。このとき、薬剤などの小分子をリポソーム、高分子ミセルやマイクログラフセルなどに包み込んで導入する方法がある。

[3] エンドサイトーシス

細胞膜の外側に存在する物質やタンパク質を細胞内部へ取り込む現象。受容体との結合、被覆小胞形成から内部での輸送、液胞での分解経路からなる。

[4] ピノサイトーシス

エンドサイトーシスと類似の機構で、細胞外の小粒子を細胞内へ取り込む現象。

[5] アグロバクテリウム法

アグロバクテリウムとは、植物の形質転換体の作出に利用されるバクテリアの総称である。このバクテリアの植物細胞への感染機構を利用して、外来の遺伝子を植物の遺伝子に導入する方法。

[6] パーティクルガン法

ヘリウムなどの高圧ガスを用いて、遺伝子をコーティングした金粒子やタンゲステン粒子を直接、細胞内へ導入する遺伝子組換え技術。

[7] 細胞内小器官 (オルガネラ)

細胞内の膜に囲まれた構造体で、それぞれが定められた機能を果たす。具体的には細胞核、小胞体、ゴルジ体、エンドソーム、リソソーム、ペルオキシソーム、ミトコンドリア、葉緑体、液胞など。

[8] 円二色性スペクトル法

外・可視領域を利用した円偏光二色性スペクトルを測定し、タンパク質の二次構造を調べる手法。

[9] 共焦点顕微鏡

小さく絞ったレーザー光を走査して画像を取得するレーザー走査型蛍光顕微鏡の 1 種。蛍光シグナルを検出する際、集光面にピンホールを設置して焦点面由来の光だけを検出するため、深さ方向にもレーザー走査することで 3 次元的な蛍光像を得ることができる。

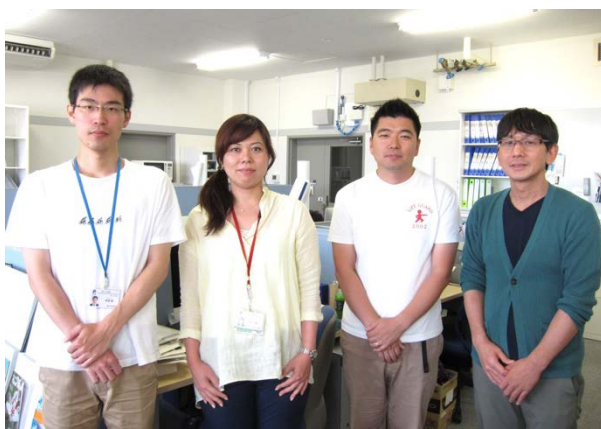
[10] カルス

植物の組織片をオーキシンなどの植物ホルモンを含む培地を用いて培養したときに生じる未分化な細胞塊。その後、適切な条件で培養すると、茎、葉、根などの器官へ

と再分化し、さらには個体全体の再生を誘導することも可能である。

6. 発表者・機関窓口

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせ下さい
 理化学研究所 環境資源科学研究センター バイオ高分子研究チーム
 テクニカルスタッフ I 堀井 陽子 (ほりい ようこ)
 研究員 及川 和聡 (おいかわ かずさと)
 特別研究員 宮城 雄 (みやぎ ゆう)
 チームリーダー 沼田 圭司 (ぬまた けいじ)
 TEL：048-467-9525 (沼田) FAX：048-462-4664
 E-mail：keiji.numata[at]riken.jp (沼田)



(左から) 宮城雄、堀井陽子、沼田圭司、及川和聡

奈良先端科学技術大学院大学
 助教 大谷 美沙都 (おおたに みさと)
 教授 出村 拓 (でむら たく)

<機関窓口>
 理化学研究所 広報室 報道担当
 TEL：048-467-9272 FAX：048-462-4715
 E-mail：ex-press[at]riken.jp

奈良先端科学技術大学院大学
 企画・教育部 企画総務課 広報渉外係
 TEL：0743-72-5026
 E-mail：s-kikaku[at]ad.naist.jp

科学技術振興機構 広報課
 TEL：03-5214-8404 FAX：03-5214-8432
 E-mail：jstkoho[at]jst.go.jp

<JST 事業に関すること>



理化学研究所



NAIST®



報道解禁日：日本時間 2018 年 7 月 20 日午後 6 時・21 日朝刊

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部
内田 信裕（うちだ のぶひろ）
TEL：03-3512-3528 FAX：03-3222-2068
E-mail：eratowww[at]jst.go.jp

※上記の[at]は@に置き換えてください。
