

京都大学	博士（工学）	氏名	阿部 直哉
論文題目	Studies on Peptide-Mediated Efficient Gene Delivery to Plant Mitochondria (ペプチドを利用した植物ミトコンドリアへの効率的な遺伝子導入に関する研究)		
（論文内容の要旨） 急激に進む人口増加に伴い、食糧需要が地球全体で逼迫している。その中で、葉緑体やミトコンドリアといった植物細胞内で代謝に重要なオルガネラの機能改変による、生産性の高い植物個体の開発が注目を集めている。特にミトコンドリアはエネルギー生産で非常に重要であるにも関わらず、その融合と分裂を繰り返す動的な特性により、機能改変に必要な核酸等の生理活性物質のミトコンドリアを標的とした直接導入が妨げられており、ミトコンドリアを標的化する方法が求められる。天然には、タンパク質をミトコンドリアへ輸送するミトコンドリア標的ペプチド（MTP）が存在する。MTPは両親媒性のヘリックス構造を形成し、このヘリックス構造がミトコンドリア外膜のトランスロカーゼ（TOM）に認識されることで、ミトコンドリア内部への取り込みが進行する。過去の研究では、酵母 Cytochrome c oxidase subunit IV の MTP である Cytcox を利用した植物ミトコンドリアへの遺伝子導入が報告されているが、その効率は依然として低く、遺伝子導入効率の向上が求められる。また、植物への遺伝子導入においては、核酸との複合体形成により遺伝子キャリアを構築するカチオン性ペプチドや、細胞取り込みを促進する細胞透過性ペプチド（CPP）を利用した例も数多く報告されている。植物で高い細胞透過機能を示す CPP の例として、非天然アミノ酸の 2-Aminoisobutylic acid (Aib) を含む KAibA が挙げられる。KAibA は Aib 導入によるヘリックス構造の安定化により、高い細胞透過機能を発現する。このような機能性ペプチドを適切に利用することで、植物ミトコンドリアへの遺伝子導入効率を向上できると考えられる。 本論文は、機能性ペプチドを合理的に設計、活用し、植物ミトコンドリアへの効率的な遺伝子導入を実現した結果をまとめたものであり、6 章から構成されている。 第 1 章は序論であり、遺伝子導入を介して植物ミトコンドリア改変を行う意義と、ペプチドによる植物ミトコンドリアへの遺伝子導入に関する世界的な研究状況と課題を概説した。これらを踏まえ、本研究の目的を明示した後、得られた成果を要約した。 第 2 章では、MTP と CPP を表面に修飾した遺伝子キャリアを開発し、これによる植物ミトコンドリアへの遺伝子導入を報告した。遺伝子キャリアはマレイミド基を N 末端に持つカチオン性ペプチドとプラスミド DNA との複合体を基盤とし、その表面に、修飾率を制御して MTP と CPP を修飾したプラスミド DNA とペプチドの複合体を合成した。異なる Cytcox 修飾率において植物ミトコンドリアへの遺伝子導入効率を評価したところ、核等のオルガネラへのオフターゲット効果も見受けられたものの、Cytcox 修飾率が 30%を超えると、核よりもミトコンドリアでの発現量が優勢となった。ペプチド修飾率を定量化した遺伝子キャリアを開発したことで、MTP 修飾率とミトコンドリアへの遺伝子導入効率やオフターゲット効果との関係を明らかにした。 第 3 章では、二次構造予測に基づき、Cytcox よりも植物細胞でミトコンドリア選択性の高い MTP を開発した。第 2 章では、Cytcox の修飾率が高い条件でも、核などの他のオルガネラへのオフターゲットが見られ、選択性が低いことが明らかとなった。この低い選択性の原因を、①酵母由来の Cytcox のミトコンドリア選択性が植物細胞で低い、②細胞取り込みに必須の細胞透過機能が取り込み後に他のオルガネラの膜と			

の非特異的相互作用を誘発するため、の 2 点と考え、第 3 章では①に対してアプローチした。従来遺伝子導入に使用していた Cytcox は、元来の 25 残基の配列から、ミトコンドリア標的に重要な二次構造を無視して短縮した 12 残基の配列であった。この過程で植物細胞におけるミトコンドリア標的機能が一部失われていることを、Cytcox を N 末端に持つ GFP の細胞内局在解析により明らかとした。一方で、植物由来の MTP は高い標的機能を示し、その中でも、*Nicotiana Tabacum* の Heat Shock Protein 60 (HSP60) の MTP は他のモデル植物との保存性も高く、多くの植物種で効率の高い MTP だと考えられた。HSP60 の MTP は 34 残基と化学合成には長く、効率を維持した配列短縮が求められた。C 末端側から配列短縮した配列の構造を AlphaFold 3 で予測し、ヘリックス構造の安定性が変化する箇所を中心に候補配列を設計し、MTP-GFP の細胞内局在解析を行ったところ、N 末端から 15 残基の配列が、短縮前の配列と同等の標的機能を示した。さらに高い水溶性も示したことから、この 15 残基の植物由来の MTP (Plant-derived MTP, PMTP) は、植物ミトコンドリアへの遺伝子導入において有効な MTP だと考えられる。

第 4 章では、選択性の低い原因②に対して、UV 応答性の MTP/PPP 融合ペプチドを開発し、細胞取り込み後の細胞透過性を外部刺激で制御することで、遺伝子導入におけるミトコンドリア選択性を改善した。第 3 章で開発した PMTP と KAibA を UV 照射下で結合が切れるリンカー (Photo-linker, PL) で融合した KAibA-PL-PPMP を合成した。KAibA-PL-PPMP は UV 照射下で結合が切れ、設計通り PMTP から KAibA が放出されたことを LC-MS で確認した。KPL-PPMP を第 2 章で開発した遺伝子キャリアに修飾し、ミトコンドリアと核への遺伝子導入効率をそれぞれ評価した。その結果、ミトコンドリアへの導入量は、UV 照射した条件で向上した一方で、核への導入量は UV 照射をした条件では抑制された。この結果から、UV で細胞取り込み後の遺伝子キャリアの細胞透過機能を制御したことで、ミトコンドリア選択性を向上したと考えられる。

第 5 章では、PPMP のヘリックス構造を安定化するように配列に変異もしくは化学修飾を加え、ミトコンドリア標的機能の高い MTP の開発を行った。MTP のヘリックス構造が TOM に認識される際、まず Tom20 と MTP のヘリックス構造の疎水面が相互作用することでミトコンドリア内部への取り込みが進行する。また、PPMP の細胞透過機能は低く、遺伝子導入への応用には細胞透過機能を付与する必要がある。そこで、PPMP の疎水性面に、疎水性を上げつつ両親媒性ヘリックス構造を安定化するように Aib 置換や側鎖架橋を行うことで、より Tom20 との親和性が高く、細胞透過機能の高い MTP の開発を目指した。設計した配列はいずれも高いヘリックス性を示し、変異を導入した位置により酵素分解挙動が変化した。また、5 残基目と 9 残基目の Ala を架橋したペプチド (A5-stap-A9) が高い細胞取り込み量とミトコンドリア標的機能を示した。これは、側鎖架橋により両親媒性ヘリックス構造が安定化したことで細胞膜透過機能が向上し、Tom20 との親和性も向上したためと考えられる。さらに、ミトコンドリア標的には MTP の特に N 末端側の配列が重要であり、側鎖架橋によりこの N 末端が酵素分解から保護されたことも、高いミトコンドリア局在効率に寄与したと考えられる。

第 6 章は結論であり、本論文で得られた成果について要約した。

本論文では、ペプチドベースのミトコンドリア標的遺伝子キャリアを開発し、これに開発した効率的な MTP や PPP リリースによる細胞透過機能制御技術を組み合わせることで、ミトコンドリアへの効率的な遺伝子導入が達成された。今回得られた成果は、植物ミトコンドリア機能改変のためのプラットフォームとなる技術を提供し、これを通じた生産性の高い植物個体の開発に貢献すると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ミトコンドリア標的ペプチド (MTP) や細胞透過性ペプチド (CPP) を合目的的に設計、活用することで、植物ミトコンドリアへの遺伝子導入効率の向上やその選択性の向上を達成した研究成果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. MTP と CPP の表面修飾率を制御した遺伝子キャリアを開発し、これを利用した植物ミトコンドリアへの遺伝子導入を達成した。MTP の修飾率が高い条件でも、核へのオフターゲットが見られた一方で、MTP の修飾率が 30%を超えると、ミトコンドリアでの遺伝子発現量が核よりも優勢となったことを明らかにした。
2. 従来の酵母由来の MTP に代わる、植物細胞でミトコンドリア選択性の高い植物由来新規 MTP を、構造予測に基づいて開発した。植物で高い標的機能を示すタバコ Heat Shock Protein 60 の MTP を、構造予測上のヘリックス構造の安定性に着目して短縮したところ、N 末端から 15 残基の配列が短縮前の 34 残基と同等の標的機能を示すことを明らかにした。また、構造予測に基づく MTP の配列短縮戦略は、大規模なスクリーニングを省略できる点で効果的であることも明らかにした。
3. UV 応答性 MTP/CPP 融合ペプチドを開発し、UV 照射により細胞取り込み後の細胞透過機能を制御したことで、遺伝子導入におけるミトコンドリア選択性を向上した。開発した融合ペプチドを修飾した遺伝子キャリアは、UV 照射下ではミトコンドリアへの導入量が向上し、非照射下では核へのオフターゲット効果が増大したことから、遺伝子導入において、細胞透過機能制御によりミトコンドリア選択性を向上したことを明らかにした。
4. PMTP に Aib 置換または側鎖架橋を施したペプチドは、ミトコンドリア標的性能に重要なヘリックス構造を安定化し、一部のペプチド (A5X, A9X, A5-stap-A9) で細胞透過機能が向上したことを明らかにした。その中でも特に、側鎖架橋した A5-stap-A9 は細胞内でのミトコンドリア局在率も高く、優れたミトコンドリア標的機能を有することを明らかにした。

以上、本論文は、機能性ペプチドを合理的に設計し、これらを適切に活用することで、植物ミトコンドリアへの効率的な遺伝子導入を達成した重要な成果であり、学術上、実用上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 8 年 1 月 22 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。