

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6337771号
(P6337771)

(45) 発行日 平成30年6月6日(2018.6.6)

(24) 登録日 平成30年5月18日(2018.5.18)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08	
C O 7 K 14/00 (2006.01)	C O 7 K 14/00	
A O 1 H 1/00 (2006.01)	A O 1 H 1/00	A

請求項の数 12 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2014-502429 (P2014-502429)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月27日 (2013. 2. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/056062
 (87) 国際公開番号 W02013/129698
 (87) 国際公開日 平成25年9月6日 (2013. 9. 6)
 審査請求日 平成28年1月25日 (2016. 1. 25)
 (31) 優先権主張番号 61/691, 833
 (32) 優先日 平成24年8月22日 (2012. 8. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 特願2012-40622 (P2012-40622)
 (32) 優先日 平成24年2月27日 (2012. 2. 27)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 503359821
 国立研究開発法人理化学研究所
 埼玉県和光市広沢2番1号
 (73) 特許権者 304036743
 国立大学法人宇都宮大学
 栃木県宇都宮市峰町350番地
 (74) 代理人 110002572
 特許業務法人平木国際特許事務所
 (72) 発明者 沼田 圭司
 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人
 理化学研究所内
 (72) 発明者 吉積 毅
 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人
 理化学研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物細胞に核酸を導入する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的植物細胞に核酸を導入する方法であって、

(1) K K L F K K I L K Y L (配列番号1)、R K K R R Q R R R R K K R R Q R R R (配列番号2)、R K K R R Q R R R (配列番号3)、P L S S I F S R I G D P (配列番号4)、P I S S I F S R T G D P (配列番号5)、A I S S I L S K T G D P (配列番号6)、P I L S I F S K I G D L (配列番号7)、P L S S I F S K I G D P (配列番号8)、P L S S I F S H I G D P (配列番号9)、P L S S I F S S I G D P (配列番号10)、R Q I K I W F Q N R R M K W K K (配列番号11)、D A A T A T R G R S A A S R P T E R P R A P A R S A S R P R R P V D (配列番号12)、A A V A L L P A V L L A L L A P (配列番号13)、A A V L L P V L L A A P (配列番号14)、V T V L A L G A L A G V G V G (配列番号15)、G A L F L G W L G A A G S T M G A (配列番号16)、M G L G L H L L V L A A A L Q G A (配列番号17)、L G T Y T Q D F N K F H T F P Q T A I G V G A P (配列番号18)、G W T L N S A G Y L L K I N L K A L A A L A K K I L (配列番号19)、K L A L K L A L K A L K A A L K L A (配列番号20)、M P G、及びP e p - 1から成る群より選択される細胞透過性配列と、

(2) 5個以上の連続したリシン(K)、アルギニン(R)又はヒスチジン(H)残基；7個以上の連続したリシン(K)、アルギニン(R)及び/又はヒスチジン(H)残基；又は、KHの3~20の繰り返し配列；を含むポリカチオン配列とを含むキャリアペブ

チドを、該キャリアペプチド由来のアミン基の数 / 該核酸由来のリン酸基の数 (N / P 比) が 0.2 以上 2 以下となるように核酸と接触させて、複合体を形成させる工程、及び得られた複合体を標的植物細胞に接触させる工程を含む、前記方法。

【請求項 2】

複合体の平均流体力学的直径が 150 ~ 500 nm である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

複合体を形成させる工程を、MAMAMRSTFAARVGA KP AVRGAR PAS
RMS CMA (配列番号 23)、MQVTMKSSAVSGQRVGGARVATRSV
RRAQLQV (配列番号 24)、MATMVAGISLRGPVMSSSHRTFSVT
KRASLPQSKLSSELSFVTSQLSGLKISSSTHFISSSAPLSV
PFKPSLQPVA (配列番号 25)、MAALQSSFAGLSTSFFFGQRFSS
PPLSLPPLVKSTEGPCLIQ A (配列番号 26)、MAVSFSLVGA F
KGLSLASSSSFLKGD FGA AF PVAPKFSV SFPLKSP L TIES
(配列番号 27)、MASSVLSSAAVATRSNVAQANMVAPFTGLKS
AASFVSRKQNL DITSIASNGGRVQC (配列番号 28)、MAAST
MALSSPAFAGKAVKLS PAASEVLGSGRV TMRKTV (配列番号 29)、
及び M L S L R Q S I R F F K (配列番号 44) から成る群より選択されるオルガ
ネラ移行配列と、5 個以上の連続したリシン (K)、アルギニン (R) 又はヒスチジン (H)
残基; 7 個以上の連続したリシン (K)、アルギニン (R) 及び / 又はヒスチジン (H)
残基; 又は、KH の 3 ~ 20 の繰り返し配列; を含むポリカチオン配列とを含むキャ
リアペプチドの存在下で行う、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

キャリアペプチドが、MAMAMRSTFAARVGA KP AVRGAR PAS RMS
CMA (配列番号 23)、MQVTMKSSAVSGQRVGGARVATRSV RRA
QLQV (配列番号 24)、MATMVAGISLRGPVMSSSHRTFSVT KRA
SLPQSKLSSELSFVTSQLSGLKISSSTHFISSSAPLSV PFK
PSLQPVA (配列番号 25)、MAALQSSFAGLSTSFFFGQRFSS PPL
SLPPLVKSTEGPCLIQ A (配列番号 26)、MAVSFSLVGA F KGL
SLASSSSFLKGD FGA AF PVAPKFSV SFPLKSP L TIES (配列
番号 27)、MASSVLSSAAVATRSNVAQANMVAPFTGLKSAAS
FPVSRKQNL DITSIASNGGRVQC (配列番号 28)、MAASTMAL
SSPAFAGKAVKLS PAASEVLGSGRV TMRKTV (配列番号 29)、
及び M L S L R Q S I R F F K (配列番号 44) から成る群より選択されるオルガネラ
移行配列をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

複合体を標的植物細胞に接触させるインキュベーション時間が 5 ~ 150 時間である、
請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

(1) KKL FKKILKYL (配列番号 1)、RKKRRQR RRR RKKRRQR R
R (配列番号 2)、RKKRRQR RRR (配列番号 3)、PLSSIFSRI GDP (配
列番号 4)、PIS SIFSRT GDP (配列番号 5)、AIS S ILSKT GDP (配
列番号 6)、PILSIFS KIGDL (配列番号 7)、PLSSIFS KIGDP (配
列番号 8)、PLSSIFS HIGDP (配列番号 9)、PLSSIFS S I GDP (配
列番号 10)、RQIKIWFQNR RMKWK K (配列番号 11)、DAATATRG
RSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVD (配列番号 12)、AAVAL
LPAVLLALLAP (配列番号 13)、AAVLLPVLLA AP (配列番号 14)
、VTVLALGALAGVGVG (配列番号 15)、GALFLGWLG AAGSTM
GA (配列番号 16)、MGLGLHLLVLA AALQGA (配列番号 17)、LGT
YTQDFNKFHTFPQTAIGVGA P (配列番号 18)、GWT LNSAGYL
LKINLKAL AALAKKIL (配列番号 19)、KLALKLAL KALKAAL

K L A (配列番号 2 0)、M P G、及び P e p - 1 から成る群より選択される細胞透過性配列と、

(2) 5 個以上の連続したリシン (K)、アルギニン (R) 又はヒスチジン (H) 残基 ; 7 個以上の連続したリシン (K)、アルギニン (R) 及び / 又はヒスチジン (H) 残基 ; 又は、K H の 3 ~ 2 0 の繰り返し配列 ; を含むポリカチオン配列とを含み、核酸と複合体を形成するキャリアペプチドを含む、標的植物細胞への核酸導入剤であって、該キャリアペプチド由来のアミノ基の数 / 該核酸由来のリン酸基の数 (N / P 比) が 0 . 2 以上 2 以下である、前記標的植物細胞への核酸導入剤。

【請求項 7】

M A M A M R S T F A A R V G A K P A V R G A R P A S R M S C M A (配列番号 2 3) 10
)、M Q V T M K S S A V S G Q R V G G A R V A T R S V R R A Q L Q V (配列番号 2
 4)、M A T M V A G I S L R G P V M S S H R T F S V T K R A S L P Q S K L S S E
 L S F V T S Q L S G L K I S S T H F I S S S A P L S V P F K P S L Q P V A (配列
 番号 2 5)、M A A L Q S S F A G L S T S F F G Q R F S P P L S L P P L V K S T E
 G P C L I Q A (配列番号 2 6)、M A V S F S L V G A F K G L S L A S S S S F L K
 G D F G A A F P V A P K F S V S F P L K S P L T I E S (配列番号 2 7)、M A S S
 V L S S A A V A T R S N V A Q A N M V A P F T G L K S A A S F P V S R K Q N L D
 I T S I A S N G G R V Q C (配列番号 2 8)、M A A S T M A L S S P A F A G K A V
 K L S P A A S E V L G S G R V T M R K T V (配列番号 2 9)、及び M L S L R Q S I
 R F F K (配列番号 4 4) から成る群より選択されるオルガネラ移行配列をさらに含む、 20
請求項 6 記載の標的植物細胞への核酸導入剤。

【請求項 8】

請求項 6 又は 7 記載の標的植物細胞への核酸導入剤及び核酸を含む複合体を含む、標的植物細胞への核酸導入用組成物。

【請求項 9】

(i) 請求項 6 記載のキャリアペプチド、(ii) M A M A M R S T F A A R V G A K P A V
 R G A R P A S R M S C M A (配列番号 2 3)、M Q V T M K S S A V S G Q R V G G A
 R V A T R S V R R A Q L Q V (配列番号 2 4)、M A T M V A G I S L R G P V M S S
 H R T F S V T K R A S L P Q S K L S S E L S F V T S Q L S G L K I S S T H F I S
 S S A P L S V P F K P S L Q P V A (配列番号 2 5)、M A A L Q S S F A G L S T S 30
 F F G Q R F S P P L S L P P L V K S T E G P C L I Q A (配列番号 2 6)、M A V S
 F S L V G A F K G L S L A S S S S F L K G D F G A A F P V A P K F S V S F P L K
 S P L T I E S (配列番号 2 7)、M A S S V L S S A A V A T R S N V A Q A N M V A
 P F T G L K S A A S F P V S R K Q N L D I T S I A S N G G R V Q C (配列番号 2 8
)、M A A S T M A L S S P A F A G K A V K L S P A A S E V L G S G R V T M R K T
 V (配列番号 2 9)、及び M L S L R Q S I R F F K (配列番号 4 4) から成る群より選
 択されるオルガネラ移行配列と、5 個以上の連続したリシン (K)、アルギニン (R) 又
 はヒスチジン (H) 残基 ; 7 個以上の連続したリシン (K)、アルギニン (R) 及び / 又
 はヒスチジン (H) 残基 ; 又は、K H の 3 ~ 2 0 の繰り返し配列 ; を含むポリカチオン配
 列とを含み、核酸と複合体を形成するキャリアペプチド、及び(iii) 核酸を含む複合体を 40
含む、標的植物細胞への核酸導入用組成物であって、該キャリアペプチド由来のアミノ基
 の数 / 該核酸由来のリン酸基の数 (N / P 比) が 0 . 2 以上 2 以下である、前記組成物。

【請求項 10】

複合体の平均流体力学的直径が 1 5 0 ~ 3 0 0 n m である、請求項 8 又は 9 記載の組成物。

【請求項 11】

(1) K K L F K K I L K Y L (配列番号 1)、R K K R R Q R R R R K K R R Q R R
 R (配列番号 2)、R K K R R Q R R R (配列番号 3)、P L S S I F S R I G D P (配
 列番号 4)、P I S S I F S R T G D P (配列番号 5)、A I S S I L S K T G D P (配
 列番号 6)、P I L S I F S K I G D L (配列番号 7)、P L S S I F S K I G D P (配 50

列番号 8)、PLSSIFSHIGDP(配列番号 9)、PLSSIFSSIGDP(配列番号 10)、RQIKIWFQNRMRMKWKK(配列番号 11)、DAATATRG RSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVD(配列番号 12)、AAVAL LPAVLLALLAP(配列番号 13)、AAVLLPVLLAAP(配列番号 14)、VTVLALGALAGVGVG(配列番号 15)、GALFLGWLGAA GSTM GA(配列番号 16)、MGLGLHLLVLAALQGA(配列番号 17)、LGT YTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP(配列番号 18)、GWTLSAGYL LKINLKALAAALAKKIL(配列番号 19)、KLALKLALKALKAL KLA(配列番号 20)、MPG、及び Pep-1 から成る群より選択される細胞透過性配列と、

10

(2) 5 個以上の連続したリシン(K)、アルギニン(R)又はヒスチジン(H)残基; 7 個以上の連続したリシン(K)、アルギニン(R)及び/又はヒスチジン(H)残基; 又は、KHの3~20の繰り返し配列; を含むポリカチオン配列とを含み、核酸と複合体を形成するキャリアペプチドを含む、標的植物細胞に核酸を導入するためのキットであって、該キャリアペプチド由来のアミノ基の数/該核酸由来のリン酸基の数(N/P比)が0.2以上2以下である、前記キット。

【請求項 12】

MAMAMRSTFAARVGA KP AVRGAR PASRMSCMA(配列番号 23)、MQVTMKSSAVSGQRVGGARVATRSVRRRAQLQV(配列番号 24)、MATMVAGISLRGPVMS SHRTFSVTKRASLPQSKLSSE LSFVTSQLSGLKISSSTHFISS SAPLSVPFKPSLQPVA(配列番号 25)、MAALQSSFAGLSTSF FGQRFS PPLSLPPLVKSTEGPCLIQ A(配列番号 26)、MAVSFSLVGA FKGLSLASSSSFLK GDFGAAFPVAPKFSVSFPLKSP LTI ES(配列番号 27)、MASSVLS SA AVATRSNVAQANMVAPFTGLKSAASF PVS RKQNL DITSIASNGGRVQC(配列番号 28)、MAASTMALSSPAFAGKAV KLS PA ASEVLGSGRVTMRKT V(配列番号 29)、及びMLS LRQSI RFFK(配列番号 44)から成る群より選択されるオルガネラ移行配列と、5 個以上の連続したリシン(K)、アルギニン(R)又はヒスチジン(H)残基; 7 個以上の連続したリシン(K)、アルギニン(R)及び/又はヒスチジン(H)残基; 又は、KHの3~20の繰り返し配列; を含むポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドをさらに含む、請求項 11 に記載のキット。

20

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、複数の機能的ドメインを含むキャリアペプチドを用いて植物細胞に核酸を導入する方法、該方法に用いるキャリアペプチド、該方法に用いるキット、及び該キャリアペプチドと核酸の複合体に関する。

【背景技術】

【0002】

植物細胞に外来遺伝子を導入することによって、交雑育種では付加できない有用な形質を植物に付与することは、今後の農作物の改良と農業の発展に極めて意義がある。また、石油依存の物質生産に替わる新規の物質生産法として、二酸化炭素を原料とした植物による物質生産を実現するためには、植物の遺伝子組換え技術の利用は不可欠である。

40

植物細胞への遺伝子導入法としては、土壌細菌であるアグロバクテリウムの感染作用を利用したアグロバクテリウム法、パーティクルガン法、及びウイルスベクター法などが知られている。アグロバクテリウム法は、植物細胞への遺伝子導入において、最も一般的に用いられる方法である。しかし、このアグロバクテリウム法では遺伝子導入をすることができない経済的に重要な植物が多く存在するのが現状である。パーティクルガン法は、アグロバクテリウム法と比較して汎用性が高いが、装置コストが高く、遺伝子損傷のリスク

50

があるとともに、形質転換効率も低いという問題がある。ウイルスベクター法は、アグロバクテリウム法と比較して、形質転換効率及び遺伝子発現効率が高いという利点があるが、導入する遺伝子サイズが制限されるとともに、ウイルスの感染能が低いという問題がある。したがって、簡便で、かつあらゆる種類の植物及び遺伝子に広く適用可能な、新しいタイプの遺伝子導入方法が求められていた。

細胞透過性ペプチド（CPP）は、哺乳類及びヒトの細胞株中の生体膜を通して、当該ペプチド及び他の物質（例えばタンパク質、核酸など）を含む複合体を輸送する機能を有することが知られている。しかし、植物細胞におけるCPPの使用は制限される。動物細胞と異なり植物細胞は、CPPを含む複合体の内在化に対し、細胞壁及び細胞膜による二重障害を有するからである。ポリカチオン性ペプチドは、負に荷電したDNAをイオン性相互作用で濃縮し、遺伝子送達に使用しうる複合体を形成すること、当該複合体が動物細胞への遺伝子導入において有用であることが示されている（特許文献1：WO2011/006133）。また、ポリカチオン性ペプチドを植物プロトプラストへの遺伝子導入に用いた例も報告されている（特許文献2：特開平7-213285）。しかし、当該方法では細胞壁の無いプロトプラストを使用しており、また、当該方法における植物細胞への遺伝子導入効率は十分なものとはいえない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】WO2011/006133

【特許文献2】特開平7-213285

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、簡便でかつ様々な種類の植物細胞及び核酸に広く適用可能な、植物細胞への核酸導入方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、細胞透過性配列とポリカチオン配列とを組み合わせた融合ペプチドとしてのキャリアペプチドを構築し、当該キャリアペプチドを核酸と混合して複合体を形成することにより、植物細胞に対して優れたトランスフェクション効率を達成できることを見出し、本発明を完成させるにいたった。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 標的植物細胞に核酸を導入する方法であって、細胞透過性配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドを核酸と接触させて複合体を形成させる工程、及び得られた複合体を標的植物細胞に接触させる工程を含む、前記方法。

(2) キャリアペプチド由来のアミン基の数/核酸由来のリン酸基の数が2以下である、(1)記載の方法。

(3) 複合体の平均流体力学的直径が150～500nmである、(1)又は(2)記載の方法。

(4) 細胞透過性配列がBP100又はTat₂である、(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) ポリカチオン配列がリシン(K)、アルギニン(R)及びヒスチジン(H)から選択される少なくとも3個のアミノ酸残基を含む、(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

(6) ポリカチオン配列がKHの3～20の繰り返し配列又はRの3～20の連続配列を含む、(5)記載の方法。

(7) 複合体を形成させる工程を、オルガネラ移行配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドの存在下で行う、(1)～(6)のいずれかに記載の方法。

(8) キャリアペプチドがオルガネラ移行配列をさらに含む、(1)～(7)のいずれか

10

20

30

40

50

に記載の方法。

(9) 複合体を標的植物細胞に接触させるインキュベーション時間が5～150時間である、(1)～(8)のいずれかに記載の方法。

(10) 標的植物細胞に核酸を導入するためのキャリアペプチドであって、細胞透過性配列とポリカチオン配列とを含む前記キャリアペプチド。

(11) 細胞透過性配列がBP100又はTat₂である、(10)記載のキャリアペプチド。

(12) ポリカチオン配列がリシン(K)、アルギニン(R)及びヒスチジン(H)から選択される少なくとも3個のアミノ酸残基を含む、(10)又は(11)記載のキャリアペプチド。 10

(13) ポリカチオン配列がKHの3～20の繰り返し配列又はRの3～20の連続配列を含む、(10)～(12)のいずれかに記載のキャリアペプチド。

(14) オルガネラ移行配列をさらに含む、(10)～(13)のいずれかに記載のキャリアペプチド。

(15) 標的植物細胞に核酸を導入するための複合体であって、(10)～(14)のいずれかに記載のキャリアペプチド及び核酸を含む前記複合体。

(16) 標的植物細胞に核酸を導入するための複合体であって、(10)～(13)のいずれかに記載のキャリアペプチド、オルガネラ移行配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチド、及び核酸を含む前記複合体。

(17) キャリアペプチド由来のアミノ基の数/核酸由来のリン酸基の数が2以下である、(15)又は(16)記載の複合体。 20

(18) 複合体の平均流体力学的直径が150～300nmである、(15)～(17)のいずれかに記載の複合体。

(19) 標的植物細胞に核酸を導入するためのキットであって、細胞透過性配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドを含む、前記キット。

(20) オルガネラ移行配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドをさらに含む、(19)記載のキット。

(21) 細胞透過性配列がBP100又はTat₂である、(19)又は(20)記載のキット。

(22) ポリカチオン配列がリシン(K)、アルギニン(R)及びヒスチジン(H)から選択される少なくとも3個のアミノ酸残基を含む、(19)～(21)のいずれかに記載のキット。 30

(23) ポリカチオン配列がKHの3～20の繰り返し配列又はRの3～20の連続配列を含む、(19)～(22)のいずれかに記載のキット。

【発明の効果】

【0006】

本発明により、簡便でかつ様々な種類の植物細胞及び核酸に広く適用可能な、植物細胞への核酸導入方法が提供される。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2012-040622号及び米国仮出願No. 61/691, 833の明細書、特許請求の範囲及び図面に記載された内容を参照により組み込むものとする。 40

【図面の簡単な説明】

【0007】

図1は、本発明のキャリアペプチドと核酸との複合体、ならびに該複合体を用いた植物細胞への核酸導入を示す模式図である。

図2は、キャリアペプチド-pDNA複合体のAFMイメージを示す。A、B及びCは、それぞれN/P比0.5、1及び20でのR9-BP100-pDNA複合体のAFMイメージを示す。D、E及びFは、それぞれN/P比0.5、1及び20での(KH)₉-BP100-pDNA複合体のAFMイメージを示す。

図3Aは、様々なN/P比でのR9-BP100-pDNA複合体及び(KH)₉-B 50

P100 - pDNA複合体のゼータ電位測定を示す。図3B及び図3Cは、様々なN/P比でのR9 - BP100 - pDNA複合体(B)及び(KH)₉ - BP100 - pDNA複合体(C)ならびにpDNA単体のアガロースゲル電気泳動の結果を示す。

図4は、種々のN/P比(A)及び様々なインキュベーション時間(B)でのタバコ葉におけるR9 - BP100 - pDNA複合体及び(KH)₉ - BP100 - pDNA複合体のR1uc発現結果を示す。エラーバーは試料の標準偏差を表わす(n=4)。*p<0.05で2群間に有意差。

図5は、R9 - BP100 - pDNA複合体(A)及び(KH)₉ - BP100 - pDNA複合体(B)を解して導入されたGFP遺伝子を発現するベンサミアタバコ葉の表皮細胞の蛍光顕微鏡観察イメージを示す。矢印(1)は核を示し、矢印(2)は孔辺細胞を示す。 10

図6Aは、dsRNA単独(400nM)、キャリアペプチド単独(800nM)及びキャリアペプチド/dsRNAのモル比1~20のキャリアペプチド-dsRNA複合体の流体力学的直径を示す。図6Bは、dsRNA単独(400nM)、キャリアペプチド単独(800nM)及び様々なモル比でのキャリアペプチド-dsRNA複合体のゼータ電位を示す(キャリアペプチド/dsRNAのモル比で1~20)。図6Cは、キャリアペプチド-dsRNA複合体のCDスペクトルによる二次構造の分析結果を示す。図6Dは、キャリアペプチド-dsRNA複合体のRNase耐性を評価した結果を示す。図6Eは、キャリアペプチド-dsRNA複合体を用いた送達系の遺伝子サイレンシング効果を、dsRNA単独(400nM)、キャリアペプチド単独(800nM)、及びキャリアペプチド/dsRNAのモル比1~20の複合体について測定した結果を示す。複合体を添加して12時間後のサイレンシング効果を示す。 20

図7Aは、キャリアペプチド-dsRNA複合体を浸透させる前及び浸透させた後のシロイヌナズナの葉の表皮細胞を上を示す。下は、キャリアペプチドのみを浸透させたシロイヌナズナの葉の表皮細胞を示す。YFP発現(黄色)とDICイメージを重ねて示す。図7Bは、AにおけるYFP発現のみを示す(黄色)。図7Cは、キャリアペプチド-dsRNA複合体又はキャリアペプチドのみ(対照)を浸透させる前及び浸透させた後のシロイヌナズナの葉の溶解物に対し、YFPのウェスタンブロット分析を実施した結果を示す。図7Dは、図7Cのウェスタンブロットのバンド強度を示す。図7Eは、Cy3標識dsRNAとキャリアペプチドの複合体(オレンジ)及びDAPIで染色した核(青)の細胞内分布を示すCLSMイメージを示す。 30

図8左は、ミトコンドリア移行配列を含むキャリアペプチド及びR1uc遺伝子を含むプラスミドで複合体を調製してシロイヌナズナに導入し、種々のN/P比でR1uc発現を測定した結果を示す。図8右は、ミトコンドリア移行配列を含むキャリアペプチド及びR1uc遺伝子を含むプラスミドで複合体を調製してシロイヌナズナに導入し、種々のインキュベーション時間でR1uc発現を測定した結果を示す。エラーバーは試料の標準偏差を表わす(n=4)。*p<0.05で2群間に有意差。

【発明を実施するための形態】

【0008】

一実施形態において本発明は、標的植物細胞に核酸を導入する方法に関し、該方法は、細胞透過性配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドを核酸と接触させて複合体を形成させる工程、及び得られた複合体を標的植物細胞に接触させる工程を含む。標的植物細胞に導入する核酸は線状であってもよいし環状であってもよい。また一本鎖であっても二本鎖であってもよい。さらにDNAであってもRNAであってもDNAとRNAとのハイブリッドであってもよい。DNAは、あらゆるタイプ及び大きさのDNA分子、例えばcDNA、プラスミド、ゲノムDNA及びこれらの誘導体を含むDNAが包含されるものとする。また、これに加えてかかる核酸に対しては、キャリアペプチドのポリカチオン配列へのイオン結合を媒介するホスフェートバックボーンの陰電荷が保存される限り、化学的修飾を施すことも可能である。好適な修飾を行った核酸の例としては、例えばチオエートやジチオエートを挙げることができる。この点に関して、別の好適な核酸誘導体につ 40

いては、例えば、Uhlmann & Peymann, *Chemical Reviews*, 90(4), 544-584, 1990において言及されている。

さらに、ヌクレオチド塩基に化学的修飾を行った核酸も用いることが可能である。例えば、RNA分子における1個から数個のヌクレオチドの2-OH基がO-アルキル基、ハロゲン、その他の修飾基で置換されたものも用いることができる。標的植物細胞に導入すべき核酸は、所望により修飾されるDNA若しくはRNAであることが好ましい。例えば、標的植物細胞に導入される核酸には、該標的植物細胞で発現する遺伝情報を含ませることができる。この方法によって、例えば遺伝子依存性欠陥を除去することが可能である。他方では、該標的植物細胞内で特定の遺伝子の発現を抑制するために、標的植物細胞に導入される核酸はアンチセンスとしての性質（すなわち、核酸が標的植物細胞に現れるmRNAに対して相補的な核酸である）を有していてもよい。対象となる核酸はリボザイムとしての性質を有していてもよく、すなわち標的植物細胞内の特定のRNA分子を開裂する能力を有していてもよい。かかるリボザイムの例としては、例えばハンマーヘッドリボザイムが挙げられる（Rossi & Sarver, *Tibtech*, 8, 179-183, 1990）。

本発明においては、dsRNAとキャリアペプチドとの複合体を標的植物細胞に導入することにより、dsRNAが分解されずにサイレンシング機能を発揮することができる。したがって、遺伝子発現の一過性制御が可能になる。この場合、いわゆる遺伝子組み換えにならないため、組換え作物の実施ができない国等でも実施が可能になり、例えば、農業的な使用の可能性も考えられる。

本発明の核酸導入方法は、核酸の種類やサイズに限定されることなく植物細胞に核酸を導入できることを特徴とし、20塩基対程度のshort-chain RNAから数百キロ塩基対程度の二本鎖DNAを使用することができるが、例えば二本鎖DNAの場合、導入される核酸のサイズは通常20塩基対～20キロ塩基対、好ましくは50塩基対～10キロ塩基対程度である。

本明細書においては植物細胞への核酸の導入について説明するが、本発明を、動物細胞をはじめとする細胞膜を有する任意の細胞に適用することができる。本発明において植物細胞は、動物細胞以外の細胞、換言すれば細胞壁を持つ細胞を意味する。植物細胞の種類は特に制限されず、単子葉植物及び双子葉植物を含む被子植物、裸子植物、コケ植物、シダ植物、草本植物及び木本植物などいずれの植物細胞にも本発明を適用できる。植物の具体例としては、例えば、ナス科[ナス(*Solanum melongena* L.)、トマト(*Solanum lycopersicum*)、ピーマン(*Capsicum annuum* L. var. *angulosum* Mill.)、トウガラシ(*Capsicum annuum* L.)、タバコ(*Nicotiana tabacum* L.)等]、イネ科[イネ(*Oryza sativa*)、コムギ(*Triticum aestivum* L.)、オオムギ(*Hordeum vulgare* L.)、ペレニアルライグラス(*Lolium perenne* L.)、イタリアンライグラス(*Lolium multiflorum* Lam.)、メドウフェスク(*Festuca pratensis* Huds.)、トールフェスク(*Festuca arundinacea* Schreb.)、オーチャードグラス(*Dactylis glomerata* L.)、チモシー(*Phleum pratense* L.)等]、アブラナ科[シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、アブラナ(*Brassica campestris* L.)、ハクサイ(*Brassica pekinensis* Rupr.)、キャベツ(*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)、ダイコン(*Raphanus sativus* L.)、ナタネ(*Brassica campestris* L., *B. napus* L.)等]、マメ科[ダイズ(*Glycine max*)、アズキ(*Vigna angularis* Willd.)、インゲン(*Phaseolus vulgaris* L.)、ソラマメ(*Vicia faba* L.)等]、ウリ科[キュウリ(*Cucumis sativus* L.)、メロン(*Cucumis melo* L.)、スイカ(*Citrullus*

vulgaris Schrad.)、カボチャ (*C. moschata* Duch., *C. maxima* Duch.) 等]、ヒルガオ科 [サツマイモ (*Ipomoea batatas*) 等]、ユリ科 [ネギ (*Allium fistulosum* L.)、タマネギ (*Allium cepa* L.)、ニラ (*Allium tuberosum* Rottl.)、ニンク (*Allium sativum* L.)、アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 等]、シソ科 [シソ (*Perilla frutescens* Britt. var. *crispa*) 等]、キク科 [キク (*Chrysanthemum morifolium*)、シュンギク (*Chrysanthemum coronarium* L.)、レタス (*Lactuca sativa* L. var. *capitata* L.) 等]、バラ科 [バラ (*Rose hybrida* Hort.)、イチゴ (*Fragaria x ananassa* Duch.) 等]、ミカン科 [ミカン (*Citrus unshiu*)、サンショウ (*Zanthoxylum piperitum* DC.) 等]、フトモモ科 [ユーカリ (*Eucalyptus globulus* Labill) 等]、ヤナギ科 [ポプラ (*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne) 等]、アカザ科 [ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.)、テンサイ (*Beta vulgaris* L.) 等]、リンドウ科 [リンドウ (*Gentiana scabra* Bunge var. *buergeri* Maxim.) 等]、ナデシコ科 [カーネーション (*Dianthus caryophyllus* L.) 等] の植物が挙げられる。とりわけナス科植物、中でもタバコが好ましく使用される。

植物細胞としては、任意の組織に由来する植物細胞を使用でき特に制限されないが、例えば、胚、カルス、花粉、葉、葯、根、根端、花、種子、さや、茎及び組織培養物等に由来する植物細胞を使用できる。

本発明で用いるキャリアペプチドは、核酸とのイオン性相互作用によりペプチド - 核酸複合体を形成し、植物細胞への核酸導入を促すキャリアとして機能しうるペプチドである。本発明のキャリアペプチドは、細胞透過性配列とポリカチオン配列とを含むことを特徴とする。本発明においてペプチドは、そのペプチド成分の他に、糖鎖、脂質、及び/又はリン酸残基を含んでいてもよい。

細胞透過性配列とは、細胞透過性ペプチド (CPP) の配列を意味する。細胞透過性ペプチドとしては、例えば、BP100 (*Appl Environ Microbiol* 72 (5), 3302, 2006)、HIV Tat (*Journal Biological Chemistry*, 272, pp. 16010 - 16017, 1997)、Tat₂ (*Biochim Biophys Acta* 1768 (3), 419, 2007)、Penetratin、pVEC、pAntp (*Journal Biological Chemistry*, 269, pp. 10444 - 10450, 1994)、HSV-1 VP22 (*Cell*, 88, pp. 223 - 233, 1997)、MAP (Model amphiphilic peptide) (*Biochimica Biophysica Acta*, 1414, pp. 127 - 139, 1998)、Transportan (*FEBS Journal*, 12, pp. 67 - 77, 1998)、R7 (*Nature Medicine*, 6, pp. 1253 - 1257, 2000)、MPPG (*Nucleic Acid Research* 25, pp. 2730 - 2736, 1997)、及び Pep-1 (*Nature Biotechnology*, 19, pp. 1173 - 1176, 2001) などが挙げられるが、これらに限定されない。これらのペプチド配列に含まれる1個から数個のアミノ酸残基が置換、挿入、及び/又は欠失したペプチド配列を好適に使用できる場合もある。細胞透過性ペプチドとしては2種以上の細胞透過性ペプチドを組み合わせて用いてもよい。キャリアペプチドは、2種以上の細胞透過性配列を含んでいてもよい。目的の特定の細胞に対して特異的な細胞透過性ペプチドを選択することも好ましい。

細胞透過性配列の具体例としては、例えば次の配列を挙げることができる。KKLFK KILKYL (配列番号1)、RKKRRQR RRKRRQR RR (配列番号2)、

R K K R R Q R R R (配列番号3)、P L S S I F S R I G D P (配列番号4)、P I S S I F S R T G D P (配列番号5)、A I S S I L S K T G D P (配列番号6)、P I L S I F S K I G D L (配列番号7)、P L S S I F S K I G D P (配列番号8)、P L S S I F S H I G D P (配列番号9)、P L S S I F S S I G D P (配列番号10)、R Q I K I W F Q N R R M K W K K (配列番号11)、D A A T A T R G R S A A S R P T E R P R A P A R S A S R P R R P V D (配列番号12)、A A V A L L P A V L L A L L A P (配列番号13)、A A V L L P V L L A A P (配列番号14)、V T V L A L G A L A G V G V G (配列番号15)、G A L F L G W L G A A G S T M G A (配列番号16)、M G L G L H L L V L A A A L Q G A (配列番号17)、L G T Y T Q D F N K F H T F P Q T A I G V G A P (配列番号18)、G W T L N S A G Y L L K I N L K A L A A L A K K I L (配列番号19)、K L A L K L A L K A L K A A L K L A (配列番号20)。

ポリカチオン配列は、リシン(K)、アルギニン(R)及びヒスチジン(H)から選ばれる少なくとも3個のアミノ酸残基を含み、かつ生理学的条件下で核酸と安定した結合を形成するペプチド配列である。正に荷電したアミノ酸残基(カチオン性アミノ酸残基)のリシン、アルギニン及びヒスチジンのほかに、ポリカチオン成分は、その全体的な性質が十分にカチオン性を保持して生理学的条件下で核酸と安定した結合を形成するという条件で、中性アミノ酸を含むこともできる。これは核酸を添加する簡単な実験で検査できる。例えば、アガロースゲル電気泳動において核酸バンドの遅延を起こすのに十分なほど安定しているペプチド-核酸複合体を形成するペプチドが適している。この核酸バンドの遅延は、ペプチド-核酸複合体がアガロースゲル電気泳動の間保持されることを示すものである。

キャリアペプチドのポリカチオン配列は少なくとも3個のリシン、アルギニン又はヒスチジンを含まねばならないが、上限を定めることはできない。ポリカチオン配列は最高450個のアミノ酸残基を含むことができ、それでもなお機能することが知られている(P r o c N a t l A c a d S c i U S A 87, 3410-3414, 1990)。しかしながら、ポリカチオン配列の長さは5~100個のアミノ酸残基であることが好ましく、より好ましくは5~50個、さらに好ましくは7~20個のアミノ酸残基である。ポリカチオン配列中のカチオン性アミノ酸残基の割合は、好ましくは40モル%以上であり、より好ましくは60モル%以上、さらに好ましくは80モル%以上、最も好ましくは90モル%以上である。ポリカチオン性アミノ酸残基のみからなるポリカチオン配列が最も好ましく使用される。

ポリカチオン配列は、好ましくは4個以上、より好ましくは5個以上、さらに好ましくは7個以上で、好ましくは30個以下、より好ましくは25個以下、さらに好ましくは20個以下のリシン、アルギニン及び/又はヒスチジン残基を含む。さらに、ポリカチオン配列は、一連の3個以上の連続したリシン、アルギニン及び/又はヒスチジン残基を有することが好ましく、一連の5個以上の連続したリシン、アルギニン及び/又はヒスチジン残基を有することがさらに好ましく、一連の7個以上の連続したリシン、アルギニン及び/又はヒスチジン残基を有することが特に好ましい。カチオン性アミノ酸残基のうち、アルギニンの割合が高いと細胞内への導入が早くなる傾向があり、ヒスチジン及びリシンの割合が高いと細胞内への導入が遅くなる傾向がある。例えば、下記のオルガネラ特異的な導入など本発明の複合体の使用目的に応じて、細胞内への導入速度を、ポリカチオン配列を適宜選択することによって制御することができる。ポリカチオン配列の好ましい例として、KHの繰り返し配列、例えば、KHの3~20の繰り返し配列、より好ましくはKHの5~15の繰り返し配列、さらに好ましくは7~12の繰り返し配列が挙げられる。アルギニン(R)の連続配列、例えば、Rの3~20の連続配列、好ましくはRの5~15の連続配列、さらに好ましくはRの7~12の連続配列、リシン(K)の連続配列、例えば、Kの3~20の連続配列、好ましくはKの5~15の連続配列、さらに好ましくはKの7~12の連続配列、ヒスチジン(H)の連続配列、例えば、Hの3~20の連続配列、好ましくはHの5~15の連続配列、さらに好ましくはHの7~12の連続配列も例と

して挙げられる。

ポリカチオン配列の具体例としては、例えば次の配列を挙げることができる。R R R R R R (配列番号 21)、K H K H K H K H K H K H K H K H (配列番号 22)。

本発明のキャリアペプチドは、細胞透過性配列とポリカチオン配列の線状融合体に相当する構成成分を含む。この融合体においては、ポリカチオン配列が細胞透過性配列のN末端及び/又はC末端に結合されることが好適である。細胞透過性配列に対して上記のポリカチオン配列を1個又は2個以上、好ましくは1個から数個、より好ましくは1個から3個程度結合することができる。特に好ましくは細胞透過性配列に対してポリカチオン配列を1個結合することができる。結合は通常のペプチド結合反応に従い化学的に行ってもよく、あるいはリガーゼのような酵素を用いて生物学的に行うこともできる。例えば、固相法などの一般的なペプチドの合成方法に従って行うこともできる。ポリカチオン配列に対して細胞透過性配列を結合するにあたり、両者の間に適宜のオリゴペプチドリンカーなどを介在させることもできる。例えば、1個から数個のアミノ酸からなるリンカーを介在させることができるが、該リンカーを構成するアミノ酸残基は適宜選択することができる。細胞透過性ペプチドはN末端でその特性を示すので、細胞透過性配列はポリカチオン配列のN末側に結合することが好ましい。本発明のキャリアペプチドは組み換えDNA技術により得ることもできる。例えば、ポリカチオン配列をコードするDNA断片を、細胞透過性配列をコードするDNA断片の一端又は両端に、適当なDNAアダプターとの連結反応により、又は*in vitro*突然変異誘発により結合する。かかる遺伝子操作法は分子生物学の分野で当業者によく知られている。

本発明のキャリアペプチドは、細胞透過性配列及びポリカチオン配列に加えて、オルガネラ移行配列をさらに含むことができる。オルガネラ移行配列は、特定の細胞内オルガネラに対して親和性又は透過性を有するペプチドの配列をさす。ミトコンドリア又は葉緑体に対して親和性又は透過性を有するペプチドの配列を用いるのが好ましい。より具体的には、クラミドモナスフェレドキシン(Cf)及びクラミドモナスRubiscoアクチバラーゼ(CRa)起源の葉緑体移行ペプチド、ミトコンドリアマトリックス標的シグナルペプチド(Biochemical and Biophysical Research Communications, 226, pp. 561-565, 1996)、ミトコンドリア内膜標的シグナルペプチドであるSS01、SS02、SS31、及びSS20(The AAPS Journal, 8, pp. E277-E283, 2006)、50Sリボソームタンパク質L28、50Sリボソームタンパク質L24、50Sリボソームタンパク質L27、Rubiscoスモールチェーン、LHCII type 1などを挙げることができるがこれらに限定されない。

これらのペプチド配列に含まれる1個から数個のアミノ酸残基が置換、挿入、及び/又は欠失したペプチド配列を好適に使用できる場合もある。これらのうちの1種又は2種以上を適宜組み合わせる用いることができる。

細胞透過性配列及びポリカチオン配列を含むキャリアペプチドを核酸と接触させることによる複合体の形成を、オルガネラ移行配列を含む別のキャリアペプチドの存在下で行ってもよい。その場合、オルガネラ移行配列を含むキャリアペプチドも同様に、ポリカチオン配列を含むことが好ましい。このオルガネラ移行配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドは、細胞透過性配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドと一緒に、核酸との複合体を形成することができる。オルガネラ移行配列とポリカチオン配列の相対的な配置に限定はないが、オルガネラ移行配列は、ポリカチオン配列のC末側に結合することが好ましい。オルガネラ移行配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチド、ならびにオルガネラ移行配列とポリカチオン配列と細胞透過性配列とを含むキャリアペプチドは、上記と同様の方法により調製することができる。

オルガネラ移行配列の具体例としては、例えば次の配列を挙げることができる。M A M A M R S T F A A R V G A K P A V R G A R P A S R M S C M A (配列番号 23)、M Q V T M K S S A V S G Q R V G G A R V A T R S V R R A Q L Q V (配列番号 24)、M A T M V A G I S L R G P V M S S H R T F S V T K R A S L P Q S K L S S E L S F V

T S Q L S G L K I S S T H F I S S S A P L S V P F K P S L Q P V A (配列番号 2 5)、M A A L Q S S F A G L S T S F F G Q R F S P P L S L P P L V K S T E G P C L I Q A (配列番号 2 6)、M A V S F S L V G A F K G L S L A S S S S F L K G D F G A A F P V A P K F S V S F P L K S P L T I E S (配列番号 2 7)、M A S S V L S S A A V A T R S N V A Q A N M V A P F T G L K S A A S F P V S R K Q N L D I T S I A S N G G R V Q C (配列番号 2 8)、M A A S T M A L S S P A F A G K A V K L S P A A S E V L G S G R V T M R K T V (配列番号 2 9)、M L S L R Q S I R F F K (配列番号 4 4)。

オルガネラ移行配列を含むキャリアペプチドを用いることにより、植物細胞に導入された核酸を、さらに細胞内オルガネラに特異的に導入することが可能になる。ミトコンドリアゲノムや葉緑体ゲノムは、核ゲノムと比べると数十～数千倍のコピー数を持っており、これらの形質転換により、外来タンパク質を大量に生産可能であることが知られている。そのため、核酸を細胞内オルガネラに特異的に導入することにより、植物が有する物質生産機能を最大限に利用し、石油資源の代替となるバイオ物質やその他の有用物質を大量に生産することが可能になる。

オルガネラ移行配列とポリカチオン配列を含むキャリアペプチドは、細胞透過性配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドと一緒に、核酸との複合体を形成させることにより、効果的に核酸を細胞内オルガネラに特異的に導入することができるが、細胞透過性配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドなしでも、すなわち、オルガネラ移行配列とポリカチオン配列を含むキャリアペプチド単独でも、核酸との複合体を形成させることにより、核酸を細胞内オルガネラに特異的に導入することが可能である。

キャリアペプチドと核酸とを接触させて複合体を形成させる工程においては、キャリアペプチド由来のアミノ基の数/核酸由来のリン酸基の数(N/P比)が2以下となるように接触させることが好ましく、また、N/P比が0.1より大きくなるように接触させることが好ましい。N/P比は、より好ましくは0.2以上、さらに好ましくは0.3以上、特に好ましくは0.4以上である。N/P比はまた、より好ましくは1.5以下、さらに好ましくは1.0以下、特に好ましくは0.6以下である。N/P比0.5で形成される複合体が最も好ましい。本発明者らは、このようなN/P比でキャリアペプチドと核酸とを接触させて複合体を形成することにより、植物細胞に対して高いトランスフェクション効率を達成できることを見出した。なお、細胞透過性配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドとは別に、オルガネラ移行配列を含むキャリアペプチドを核酸に接触させる場合は、すべてのキャリアペプチド由来のアミノ基の数が基準となる。

また、キャリアペプチドとdsRNAとを接触させて複合体を形成させる工程において、キャリアペプチドとdsRNAのモル比(キャリアペプチド/dsRNA)は、5以下となるように接触させることが好ましく、また、モル比が0.1より大きくなるように接触させることが好ましい。モル比は、より好ましくは0.5以上、さらに好ましくは1以上である。モル比はまた、より好ましくは5以下、さらに好ましくは2以下である。モル比1～2で形成される複合体が最も好ましい。本発明者らは、このようなモル比でキャリアペプチドとdsRNAを接触させて複合体を形成することにより、植物細胞に対して高いトランスフェクション効率を達成でき、また高いサイレンシング効果を達成できることを見出した。

キャリアペプチドと核酸とを接触させて複合体を形成させる工程は、例えばキャリアペプチドと核酸とを溶液中で混合することにより実施できるが、その場合、キャリアペプチドの濃度は、通常10ug/mL～10mg/mL、好ましくは100ug/mL～1mg/mLであり、核酸溶液の濃度は、通常1ug/mL～10mg/mL、好ましくは10ug/mL～1mg/mLである。

上記のように形成されるキャリアペプチドと核酸との複合体はキャリアペプチドと核酸とを接触させることにより得られ、その結合様式や形態に限定はないが、通常粒子の形態であり、その平均流体力学的直径は、好ましくは150nm以上、より好ましくは200nm以上、さらに好ましくは300nm以上であり、また、好ましくは500nm以下、

より好ましくは400nm以下、さらに好ましくは350nm以下である。平均流体力学的直径は、動的光散乱(DLS)法によって測定することができる。本発明者らは、このような平均流体力学的直径を有する複合体により、植物細胞に対して高いトランスフェクション効率を達成できることを見出した。

複合体を標的植物細胞に接触させる工程は、当技術分野で公知の方法により実施でき、特に制限されない。例えば本発明のキャリアペプチドと核酸との複合体の溶液を標的植物細胞に浸透させ、20~35の温度で、一日当たり14~18時間の一定光の下、インキュベーター中でインキュベートすることにより実施できる。インキュベーション時間は、好ましくは5~150時間、より好ましくは10~20時間である。本発明の核酸導入方法は、比較的短時間にトランスフェクションを行うために特に優れている。

本発明はまた、標的植物細胞に核酸を導入するためのキットに関する。本発明のキットは、細胞透過性配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドを含むことを特徴とする。本発明のキットはオルガネラ移行配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドをさらに含んでもよい。また、キットは、取り扱い説明書、複合体形成や細胞導入のための試薬、器具などを含んでもよい。

以下、実施例に基づいて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0009】

実施例1 キャリアペプチドの合成

細胞透過性配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドとして、

R9-BP100 (RRRRRRRRRRKKKLFKKILKYL-NH₂ (配列番号30)、理論pI/Mw: 12.55/2827.56Da)、

(KH)₉-BP100 (KHKHKHKHKHKHKHKHKHKKLFKKILKYL-NH₂ (配列番号31)、理論pI/Mw: 10.81/3809.71Da)、及び

R9-Tat₂ (RRRRRRRRRRKKRRRQRRRRKKRRRQR-NH₂ (配列番号32)、理論pI/Mw: 13.28/3910.72Da)

を標準的な9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)固相ペプチド合成を使用して合成した(G.B.Fields and R.L.Noble, Int J Pept Protein Res 35(3), 161(1990))。

さらに、オルガネラ移行配列とポリカチオン配列とを含むキャリアペプチドとして、クラミドモナスフェレドキシン(Cf)及びクラミドモナスRubiscoアクチバゼ(CRa)起源の葉緑体移行ペプチドもまたポリカチオン配列(KH)₉と組み合わせた。すなわち、

Cf-(KH)₉ (MAMAMRSTFAARVGAKPAVRGARPASRMSCMAKHKHKHKHKHKHKHKHKHKH-NH₂ (配列番号33)、理論pI/Mw: 12.20/5729.89Da)、及び

CRa-(KH)₉ (MQVTMKSSAVSGQRVGGARVATRSVRRALQVKHKHKHKHKHKHKHKHKH-NH₂ (配列番号34)、理論pI/Mw: 12.62/5803.82Da)

を固相ペプチド合成によって合成した。

下線部分がポリカチオン配列をさす。ポリペプチドを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使用して精製し、そして分子量をマトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析により確認した。(KH)₉、R9、BP100及びTat₂もまた、コントロール用に合成した。

実施例2 種々のN/P比でのキャリアペプチド-pDNA複合体の調製及び特徴付け

様々なN/P比で、キャリアペプチド(R9-BP100及び(KH)₉-BP100)と、レポーター遺伝子をコードするpDNAとのイオン性複合体を調製し、そしてこれを動的光散乱(DLS)、原子間力顕微鏡(AFM)、ゼータ電位計、及びアガロースゲ

10

20

30

40

50

ル電気泳動を使用して特徴付けした。ここで、N/P比は、キャリアペプチド由来のアミノ基の数/pDNA由来のリン酸基の数を指す。

緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするP35S-GFP(S65T)-TNOS及びウミシイタケルシフェラーゼ(RLuc)をコードするP35S-RLuc-TNOSの2つの型のpDNAをレポーター遺伝子として使用した。全てのpDNAをコンピテントDH5 E. coli (Takara)中で増幅し、そしてEndofree Plasmid Giga Kit(Qiagen)を使用して精製した。キャリアペプチド-pDNA複合体を調製するために、0.5g/Lのキャリアペプチドを、pDNA溶液(約1.0mg/mL)と、種々のN/P比(0.5、1、2、5、10及び20)で25で混合した。複合体を混合の直後にゼータ電位計(Zetasizer Nano-ZS、Malvern Instruments Ltd)及び原子間力顕微鏡(Seko Instruments)によって特徴付けした。

複合体を含有する溶液を、超純水(MilliQ)を使用して800µLの最終容量に希釈し、そしてゼータ電位及びサイズの測定のために使用した。試料のゼータ電位及びゼータ偏位をゼータ電位計によって3回測定し、そして平均データをZetasizerソフトウェアver 6.20(Malvern Instruments Ltd)を使用して得た。動的光散乱(DLS)を行って流体力学的直径を決定し、そして多分散指数(PDI)をゼータナノサイザー(Zetasizerソフトウェアver 6.20)を用いて、633nm He-Neレーザーを使用して、25で、173°の後方散乱検出角度で決定した。AFMによる観察は、複合体溶液を切断した雲母上に固定し、そして空気中室温でシリコンカンチレバーを使用し、1.3N/mのスプリング定数でタッピングモードで行った。カンチレバーチップ回転効果を算出して、複合体の真の寸法を以前に報告した方法を使用して得た(K. Numata, Y. Kikkawa, T. Tsuge et al., Macromol Biosci 6(1), 41, 2006; K. Numata, T. Hirota, Y. Kikkawa et al., Biomacromolecules 5(6), 2186, 2004)。ゲル遅延度アッセイのために、1.0µgのpDNAを含有する各々の試料40µLをローディングバッファーと混合し、そして1%アガロースゲル上で分析し(TAEバッファー、100V、30分)、臭化エチジウムで染色した。

DLSの結果(表1)に基づくと、R9-BP100-pDNA複合体及び(KH)。-BP100-pDNA複合体の両方の平均流体力学的直径は、0.1~20の範囲でN/P比が増加するに従って減少した。平均流体力学的直径に基づくと、0.5より大きなN/P比で調製したpDNA複合体は首尾よく形成された。他方、N/P比0.1のpDNA複合体は二峰性分布を示した。このことは、pDNA複合体の不均一な形成を示唆する。N/P比0.5及び1で調製した複合体の直径は約300nmを示し、一方、N/P比5、10及び20の複合体は約120nmの直径を示した。

【表 1】

表 1

種々の N/P 比で調製した R9-BP100-pDNA 複合体及び
(KH)₉-BP100-pDNA 複合体のサイズ及び PDI

N/P 比	R9-BP100		(KH) ₉ -BP100	
	サイズ (nm)	PDI	サイズ (nm)	PDI
0.1	508, 4720*	-*	348, 4240*	-*
0.5	319	0.34	291	0.31
1	321	0.38	322	0.30
2	151	0.21	139	0.23
5	127	0.21	106	0.23
10	114	0.23	96	0.23
20	116	0.25	114	0.24

*二峰性分布、有用な PDI なし

pDNA 複合体を雲母上に固定し、そしてその形態を AFM によってイメージングした (図 2)。全ての複合体は均一な球状の複合体を形成し、そして N/P 比 0.5、1 及び 20 での pDNA 複合体はそれぞれ幅 190 ± 21 nm、高さ 12.8 ± 5.3 nm、幅 98 ± 17 nm、高さ 7.7 ± 1.6 nm、及び幅 123 ± 13 nm、高さ 9.1 ± 2.2 nm を示した ($n = 10$)。pDNA 複合体の体積に基づく、DLS によって決定した寸法は AFM によるものより若干大きかった。これは、雲母上の pDNA 複合体が空気中での乾燥によって収縮したからである (K. Numata, Y. Kikkawa, T. Tsuge et al., *Macromol Biosci* 6(1), 41, 2006)。DLS 及び AFM の結果により、両方のキャリアペプチドについて複合体が形成され、そしてそのサイズが N/P 比の増加に従って明らかに減少することが確認された。

R9-BP100 及び (KH)₉-BP100 両方の pDNA 複合体についてのゼータ電位は、0.5 及び 1 の N/P 比では負の値を示したが、2 ~ 20 の範囲の N/P 比では正の値に増加した (図 3A)。このゼータ電位の飽和は、5 の N/P 比でペプチドが pDNA 複合体の表面を覆ったことを示している。アガロースゲル電気泳動による複合体のイオン性相互作用及び電解安定性の評価結果を図 3B 及び C に示す。0.5 ~ 2 の N/P 比で調製した R9-BP100 の複合体は、複合体無しのフリーの pDNA と同様にアガロースゲル電気泳動において pDNA の移動を示した。移動した pDNA の量は N/P 比が増加するに従って減少し、N/P 比 10 及び 20 では移動は示されなかった。N/P 比の増加とともにウェル中のバンドの強度が増加することは、pDNA がキャリアペプチドと結合して安定な複合体を形成したことを示している。(KH)₉-BP100 の複合体も同じ挙動を示したが、少量の pDNA の移動が N/P 比 10 まで依然として観察された (図 3C)。複合体の負の又は低い正のゼータ電位によって、R9-BP100 の pDNA 複合体については N/P 比 0.5 ~ 5 での、(KH)₉-BP100 については N/P 比 0.5 ~ 10 での、電気泳動の間のアガロースゲル中への pDNA の移動が説明される。より低い N/P 比でより少量のキャリアペプチドによっても pDNA との複合体は依然として形成されたが、これは電気泳動の間十分安定ではなく、いくらかの pDNA が複合体から遊離した。一方、キャリアペプチドと複合体を形成した pDNA はウェル中に固着した。より高い N/P 比でより多量のペプチドによって、より安定な pDNA 複合体が形成され、pDNA のアガロース中への遊離は少なく、より多くの pDNA 複合体がウェル中に固着した。R9-BP100 の pI 及び分子量は 12.55 及び 2827.56 Da であり、(KH)₉-BP100 の pI 及び分子量 (10.81 及び 3809.71 Da) とは若干異なるので、両方の複合体のイオン性相互作用及び安定性は異なる。

実施例 3 pDNA 複合体による葉の処理

キャリアペプチド - pDNA 複合体により DNA を導入する標的としてベンサミアナタ

バコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉を選択した。葉は植物の形質転換において複合的な役割を果たすからである。葉は葉緑体などの色素体 (安定形質転換及び一過性形質転換を達成するために植物生物学者によって広く使用されている (Pal Maligna, *Annu Rev Plant Biol*, 55, 289, 2004)、ミトコンドリア (Val Romain, Eliza Wyszko, Clarisse Valentin et al., *Nucleic Acids Res.* 1(13), 2011) 及び核 (Zouhair Elghabi, Stephanie Ruf, and Ralph Bock, *The Plant Journal* 67, 941, 2011) などの豊富な資源を含有している。

タバコ葉を用いたインビトランスフェクション実験を行って、キャリアペプチド - p DNA 複合体が細胞壁を透過して植物細胞中へ遺伝子送達する能力を評価した。レポーター遺伝子としての RLuc 及び GFP をコードする pDNA と、R9 - BP100 及び (KH) - BP100 との複合体をベンサミアナタバコ葉中に直接浸透させた。pDNA 複合体の最も効率的な N/P 比を 0.1 ~ 2.0 の間で決定するために、トランスフェクション効率を、RLuc アッセイを使用して定量的に特徴付けした。

標的となる植物は次のように調製した。ベンサミアナタバコの種子を、土壌 (Promix) 及びパーミキュライトの 2 : 1 混合物を含有する栽培媒体を含むポット中で発芽させた。ベンサミアナタバコ植物を、植物インキュベーター (Biotron NK System) 中、24 時間一定光の下で、29 °C の温度で、3 週間まで成長させた。

緑色蛍光タンパク質 (GFP) 及びウミシイタケルシフェラーゼ (RLuc) をコードする pDNA を含有する複合体溶液約 100 μ L を、針無しシリンジを使用してベンサミアナタバコの十分に広げた葉に直接浸透させた。処理したベンサミアナタバコをそれぞれ 29 °C 及び 21 °C で一日当たり 16 時間の一定光の下、植物インキュベーター中で 6 日間までインキュベートした。RLuc 遺伝子発現を定量的に評価するために、ウミシイタケルシフェラーゼアッセイ (Promega) を製造業者のプロトコルに従って行った (n = 4)。

簡潔に記載すると、浸透させた葉を、12 時間から 144 時間で定期的に、浸透させた区画の周囲 1 cm^2 を切除することによってサンプリングし、そして Renilla Luciferase Assay Lysis Buffer (Promega) を用いて溶解した。溶解物を手短に遠心分離し、そして上清を Renilla Luciferase Assay Substrate 及び Renilla Luciferase Assay Buffer (Promega) と混合した。遺伝子発現を、マルチモードマイクロプレートリーダー (Spectra MAX M3, Molecular Devices Corporation) を使用して、光ルミネセンスの強度 (相対的光単位) に基づいて評価した。上清中のタンパク質量を BCA タンパク質アッセイ (Pierce Biotechnology) を使用して決定し、そして相対的光単位 / タンパク質重量 (RLU/mg) を得た。RLuc 遺伝子をコードする pDNA でのアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介形質転換を、本実験におけるポジティブコントロールとして使用した。

トランスフェクション効率の統計的な差を、両側分布を用いる独立 t 検定によって決定し、そして $p < 0.05$ で統計的有意差ありとみなした。細胞生存性実験におけるデータを平均 \pm 標準偏差として表わす (n = 4)。

N/P 比 0.1 で調製した複合体は有意なトランスフェクションを示さなかった。一方、0.5 より高い N/P 比で調製した複合体のトランスフェクション効率は N/P 比の増加とともに低下した。N/P 比 0.5 で調製した R9 - BP100 及び (KH) - BP100 両方の複合体は、他の N/P 比に比較して最高のトランスフェクション効率を示した (図 4A)。このことは、動物細胞の場合と同様に (D. Fischer, T. Bieber, Y. Li et al., *Pharm Res* 16(8), 1273, 1999)、過剰のポリカチオンが植物細胞に細胞毒性を誘発し、トランスフェクション効率を低下させたことを意味する。

10

20

30

40

50

以前の研究によれば (K. Numata, J. Hamasaki, B. Subramanian et al., *J Control Release* 146 (1), 136, 2010; K. Numata and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules* 11 (11), 3189, 2010; K. Numata, A. J. Mieszawska-Czajkowska, L. A. Kvenvold et al., *Macromol Biosci*, 2011; K. Numata, M. R. Reagan, R. H. Goldstein et al., *Bioconjugate Chemistry* 22 (8), 1605, 2011)、動物細胞中へのトランスフェクションのために最適な複合体は、より小さなそして僅かに正に荷電した複合体であった。しかし、本研究において、N/P比0.5で調製したキャリアペプチド-pDNA複合体(これは負に荷電しており、そして直径約300nmである)がタバコ葉中への最良のトランスフェクション効率を示した。細胞壁及び細胞膜の層構造を考慮すると、比較的小さくそして正に荷電したpDNA複合体(2より大きなN/P比)はイオン性相互作用及びサイズ効果により細胞壁中に捕捉され、N/P比0.5で調製した複合体よりも低いトランスフェクション効率が低くなったものと考えられる。

また、種々の時点で、R9-BP100及び(KH)₉-BP100とpDNAとの複合体によるトランスフェクション効率を測定し、本発明の遺伝子送達システムのための至適インキュベーション時間を決定した(図4B)。R9-BP100及び(KH)₉-BP100両方のpDNA複合体は12時間で最高のトランスフェクション効率を示し、そしてそのトランスフェクション効率は144時間まで徐々に低下した。この経時変化の結果から、本発明のキャリアペプチドによる遺伝子送達が、比較的短時間にトランスフェクションを行うための傑出したシステムであることが示された。R9-BP100及び(KH)₉-BP100を用いた場合の全体的な傾向はほぼ同一であったが、そのトランスフェクション効率の経時変化は若干異なっていた(図4B)。R9-BP100は、(KH)₉-BP100と比較してより早くそしてより短いトランスフェクション挙動を示した。トランスフェクション挙動におけるこの差は、細胞内でのプロテアーゼによる(KH)₉配列の分解がR9ペプチドに比較して遅いことに起因し得る。キャリアペプチドにおいて適切なアミノ酸配列を選択することにより、トランスフェクション挙動を変化させ、制御できることは注目すべきことである。

コントロール実験として、細胞透過性ペプチドBP100のみ、又はポリカチオン(KH)₉のみを用いてベンサミアタバコ葉中へのpDNAのトランスフェクションを、0.5のN/P比を使用して12時間行った。その結果、それぞれ120±70及び340±60RLU/mgが示された。これらの値は図4に示すような本発明のキャリアペプチドによる遺伝子送達に比較して有意に低かった。コントロールの結果に基づくと、細胞透過性配列とポリカチオン配列とを組み合わせた本発明のキャリアペプチドは、トランスフェクション効率を、細胞透過性ペプチド単独と比較して明らかに、約12倍増強する。これは、DNAが、キャリアペプチドにおける細胞透過性配列よりもポリカチオン配列と相互作用し、従って、イオン性複合体の表面に細胞透過性配列が優先的に存在し、そして細胞膜を透過するように機能するためと考えられる。

細胞内部のトランスフェクション挙動をさらに調べるために、GFPをコードするpDNAのトランスフェクションを、ベンサミアタバコ葉を用いて蛍光顕微鏡法によっても観察した。葉において発現されたGFPを蛍光顕微鏡によって直接観察し(Axio Observer Z1、100x対物; Carl Zeiss)、イメージは、CCDカメラを使用して、AxioVision Rel 4.8ソフトウェア(Carl Zeiss)を用いて得た(図5)。複合体溶液を浸透させた表皮細胞を、両方のペプチドを使用して部分的にトランスフェクトした。細胞内部を観察したところ、トランスフェクトした表皮細胞の核において最高のGFP発現が観察された(図5、矢印1)。核におけるGFP発現もまた、本発明の遺伝子送達システムのトランスフェクション機能を示すものである。

実施例4 キャリアペプチド-dsRNA複合体の調製及び特徴付け

実施例 1 で合成したキャリアペプチド ((K H)₉ - B P 1 0 0) と d s R N A の複合体を調製し、サイズ、表面電荷、ペプチドの二次構造、R N a s e 耐性を評価した。また、動物細胞 H E K における R N A i 実験を実施した。

s i R N A を合成するために、以下の表に示す D N A オリゴヌクレオチドを設計した (J . Y . Y u , S . L . D e R u i t e r , D . L . T u r n e r , P r o c N a t l A c a d S c i U S A 9 9 , 6 0 4 7 , 2 0 0 2) 。

【表 2】

表 2

プライマー	配列
T7-GFP5S-Fw	5´-GGATCCTAATACGACTCACTATAGAAGCAGACGACTTCTTC-3´ (配列番号 3 5)
T7-GFP5S-Rev	5´-AAGAAGAAGTCGTGCTGCTTCTATAGTGAGTCGTATTAGGATCC-3´ (配列番号 3 6)
T7-GFP5AntiS-Fw	5´-GGATCCTAATACGACTCACTATAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3´ (配列番号 3 7)
T7-GFP5AntiS-Rev	5´-ATGAAGCAGCAGCAGCTTCTTCTATAGTGAGTCGTATTAGGATCC-3´ (配列番号 3 8)

s i R N A 合成は、T 7 R i b o M A X E x p r e s s R N A i S y s t e m (P r o m e g a) を用いて実施した。RNA 生成物を、Q I A q u i c k N u c l e o t i d e R e m o v a l k i t (Q i a g e n) 及びイソプロパノール沈殿を用いて精製し、2 0 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、s i R N A マーカー (N e w E n g l a n d B i o L a b s) を用いて解析した。d s R N A (s i R N A 二本鎖) の形成のために、s i R N A 鎖を 9 5 ° C で 5 分間加熱し、続いてゆっくりと 2 5 ° C に冷却した。

2 種類の d s R N A 、すなわち、G F P の発現をサイレンシングする G F P 5 s i R N A と、蛍ルシフェラーゼ (L u c) の発現をサイレンシングする G L 3 s i R N A (Q i a g e n) を使用した (表 3) 。

【表 3】

表 3

RNA	配列
GFP5-sense	5´-CUUCGUCGUGCUGAAGAAGUU-3´ (配列番号 3 9)
GFP5-antisense	5´-CUUCUUCAGCAGCAGCAAGAU-3´ (配列番号 4 0)
Luc-sense	5´-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3´ (配列番号 4 1)
Luc-antisense	5´-UCGAGGUACUCAGCGUAAGdTdT-3´ (配列番号 4 2)

キャリアペプチド - d s R N A 複合体を調製するために、8 0 0 n M のキャリアペプチドを d s R N A 溶液 (4 0 0 n M) と、種々のキャリアペプチド / d s R N A モル比で (0 . 5 、 1 、 2 、 5 、 1 0 及び 2 0) 、 2 5 ° C で混合した。各サンプルにおける最終 d s R N A 量は、2 0 p m o l とした。複合体を、ゼータ電位計、円偏光二色性分析 (C D 、 J - 8 2 0 、 J A S C O) 及び原子間力顕微鏡 (A F M) を用いて特徴づけした。ゼータ電位の測定、A F M による観察及びサイズ (流体力学的直径) 測定は、実施例 2 と同様に実施した。

キャリアペプチド - d s R N A 複合体の二次構造を解析するため、d s R N A と複合体を形成する前及び形成した後のキャリアペプチドの C D スペクトルを 2 5 ° C で測定した。C D スペクトルは、1 2 n m ⋅ s e c⁻¹ のスピード及び 1 n m の解像度で記録し、3 回スキャンした。データは、キャリアペプチドの分子量と濃度をそれぞれ 3 8 0 9 . 7 1 g / m o l 及び 0 . 8 μ M として、残基モル楕円率で表した (図 6 C) 。

30

40

50

複合体のRNase耐性を評価するために、複合体をRNase (50ユニット、New England Biolabs) により、25℃で12時間処理した。RNase処理後のdsRNAを、アガロースゲル電気泳動 (1%アガロースゲル、TAEバッファ、100V、30分) で分析し、臭化エチジウムで染色した (図6D)。

HEK細胞に、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて蛍ルシフェラーゼをコードするpDNAをトランスフェクトした。6時間後、培地を交換し、dsRNA (20 pmol) とキャリアペプチドを添加した。37℃で12時間細胞をインキュベートした後、ルシフェラーゼ遺伝子発現を評価するために、ルシフェラーゼアッセイを実施した (n = 4)。マルチモードマイクロプレートリーダー (Spectra MAX M3; Molecular Devices Corporation) を用いて、光ルミネセンスの強度 (相対的光単位) に基づいて、遺伝子発現を評価した。各ウェル中のタンパク質量は、BCAタンパク質アッセイ (Pierce Biotechnology) で測定した。そして相対的光単位/タンパク質量 (RLU/mg) を得た。測定値は、PBSで処理した細胞におけるルシフェラーゼ発現 (Mock) に対する%で示した (図6E)。ルシフェラーゼアッセイの統計的な差は、両側分布を用いる独立t検定によって決定し、そしてp < 0.05で統計的有意差ありとみなした。

結果を図6A~図6Eに示す。dsRNA及びキャリアペプチドの混合モル比が1:2の場合において、直径300nm程度、わずかに正の表面電荷を有するキャリアペプチド-dsRNA複合体が得られた (図6A-B)。ペプチドの二次構造は、複合体の形成に伴い、ヘリックスからランダムコイルへと転移することがわかった (図6C)。さらにキャリアペプチド量が増えるにつれてRNaseによる分解から保護されたことが示され (図6D)、RNaseに対し高い耐性を示し、RNAキャリアとしての高い可能性を示した。RNAi試験では、70%程度のサイレンシング効率が示され、キャリアペプチド/dsRNAのモル比が1~2で最大のルシフェラーゼに対するサイレンシング効果が観察された (図6E)。

実施例5 キャリアペプチド-dsRNA複合体によるシロイヌナズナの葉の処理

dsRNAとキャリアペプチド ((KH)₉-BP100) からなる複合体 (混合モル比1:2) を用いて、YFPを過剰発現するシロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) の葉に対するRNAi試験を行った

YFP遺伝子を、アグロバクテリウム株MP90に導入し、さらに、野生型シロイヌナズナに導入した。トランスジェニック植物の種子を回収した。野生型シロイヌナズナ及びYFPトランスジェニックシロイヌナズナの種子を、土壌 (Pro-Mix) 及びパーミキュライトの2:1混合物を含有する栽培媒体を含むポット中で発芽させ、植物インキュベーター (Biotron NK System) 中、16時間/8時間の明/暗条件下、21℃の温度で、成長させた。

dsRNA (20 pmol) を含む約100µLの複合体溶液を、針無しのシリンジを使用してシロイヌナズナの十分に広げた葉に直接浸透させた (図7D)。処理したシロイヌナズナを21℃で一日当たり16時間の一定光の下、植物インキュベーター中で36時間までインキュベートした。

浸透させた葉を、浸透させた区画の周囲1cm²を切除することによってサンプリングし、そしてRenilla Luciferase Assay Lysis Buffer (Promega) を用いて溶解した。YFP遺伝子発現を、共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM, Leica Microsystems) で直接観察した。dsRNAをCy3で標識した。標識したdsRNA (20 pmol) と (KH)₉-Bp100 (キャリアペプチド/dsRNAモル比は2.0) の複合体を、シロイヌナズナの葉に浸透させた。12時間インキュベートした後、葉を回収してPBSで2回洗浄し、4',6'-ジアミジノ-2'-フェニルインドール (DAPI, Lonza Walkersville, Inc.) のPBS溶液 (300nM) とともに10分間、減圧下 (約0.06MPa) でインキュベートした。Cy3標識dsRNA-キャリアペプチド複合体及びDAPIで染色した核の細胞内における分布を、CLSMにより、405nm、488nm及び

の幅広い分野の物質生産を、植物及び二酸化炭素を活用した新しい物質生産技術で代替し、新バイオ産業及び低炭素社会の構築を同時に実現できる可能性がある。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参照により本明細書中に組み込むものとする。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

- <110> RIKEN
Utsunomiya University
- <120> Method for introducing nucleic acids into plant cells
- <130> PH-5369-PCT
- <150> JP 2012-040622
<151> 2012-02-27
- <150> US 61/691,833
<151> 2012-08-22
- <160> 44
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial
- <220>
<223> Synthetic
- <400> 1
- Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10
- <210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial
- <220>
<223> Synthetic
- <400> 2

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 3

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 4

Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro
1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 5

Pro Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Thr Gly Asp Pro
1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 6

Ala Ile Ser Ser Ile Leu Ser Lys Thr Gly Asp Pro
1 5 10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 7

Pro Ile Leu Ser Ile Phe Ser Lys Ile Gly Asp Leu
1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 8

Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Lys Ile Gly Asp Pro
1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 9

Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser His Ile Gly Asp Pro
1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 10

Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Ser Ile Gly Asp Pro
1 5 10

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 11

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 12

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 12

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr
 1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro
 20 25 30

Val Asp

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 13

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

<210> 14

<211> 12

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 14

Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 15

Val Thr Val Leu Ala Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly
1 5 10 15

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 16

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 17

Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Leu Gln Gly
1 5 10 15

Ala

<210> 18
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 18

Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
20

<210> 19
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 19

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Lys Ile Asn Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
 20 25

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 20

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ala

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 21

Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 22
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic

<400> 22

Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His
 1 5 10 15

Lys His

<210> 23
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic

<400> 23

Met Ala Met Ala Met Arg Ser Thr Phe Ala Ala Arg Val Gly Ala Lys
 1 5 10 15

Pro Ala Val Arg Gly Ala Arg Pro Ala Ser Arg Met Ser Cys Met Ala
 20 25 30

<210> 24
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 24

Met Gln Val Thr Met Lys Ser Ser Ala Val Ser Gly Gln Arg Val Gly
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Val Ala Thr Arg Ser Val Arg Arg Ala Gln Leu Gln Val
 20 25 30

<210> 25

<211> 74

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 25

Met Ala Thr Met Val Ala Gly Ile Ser Leu Arg Gly Pro Val Met Ser
 1 5 10 15

Ser His Arg Thr Phe Ser Val Thr Lys Arg Ala Ser Leu Pro Gln Ser
 20 25 30

Lys Leu Ser Ser Glu Leu Ser Phe Val Thr Ser Gln Leu Ser Gly Leu
 35 40 45

Lys Ile Ser Ser Thr His Phe Ile Ser Ser Ser Ala Pro Leu Ser Val
 50 55 60

Pro Phe Lys Pro Ser Leu Gln Pro Val Ala
 65 70

<210> 26

<211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic

<400> 26

Met Ala Ala Leu Gln Ser Ser Phe Ala Gly Leu Ser Thr Ser Phe Phe
 1 5 10 15

Gly Gln Arg Phe Ser Pro Pro Leu Ser Leu Pro Pro Leu Val Lys Ser
 20 25 30

Thr Glu Gly Pro Cys Leu Ile Gln Ala
 35 40

<210> 27
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic

<400> 27

Met Ala Val Ser Phe Ser Leu Val Gly Ala Phe Lys Gly Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Ser Phe Leu Lys Gly Asp Phe Gly Ala Ala Phe Pro
 20 25 30

Val Ala Pro Lys Phe Ser Val Ser Phe Pro Leu Lys Ser Pro Leu Thr
 35 40 45

Ile Glu Ser
50

<210> 28
<211> 57
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 28

Met Ala Ser Ser Val Leu Ser Ser Ala Ala Val Ala Thr Arg Ser Asn
1 5 10 15

Val Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Ala
 20 25 30

Ala Ser Phe Pro Val Ser Arg Lys Gln Asn Leu Asp Ile Thr Ser Ile
 35 40 45

Ala Ser Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys
 50 55

<210> 29
<211> 39
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 29

Met Ala Ala Ser Thr Met Ala Leu Ser Ser Pro Ala Phe Ala Gly Lys
1 5 10 15

Ala Val Lys Leu Ser Pro Ala Ala Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Arg
 20 25 30

Val Thr Met Arg Lys Thr Val
 35

<210> 30
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic

<400> 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile
 1 5 10 15

Leu Lys Tyr Leu
 20

<210> 31
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic

<400> 31

Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His
 1 5 10 15

Lys His Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
 20 25

<210> 32
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic

<400> 32

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 20 25

<210> 33
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic

<400> 33

Met Ala Met Ala Met Arg Ser Thr Phe Ala Ala Arg Val Gly Ala Lys
 1 5 10 15

Pro Ala Val Arg Gly Ala Arg Pro Ala Ser Arg Met Ser Cys Met Ala
 20 25 30

Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His
 35 40 45

Lys His

50

<210> 34
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic

<400> 34

Met Gln Val Thr Met Lys Ser Ser Ala Val Ser Gly Gln Arg Val Gly
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Val Ala Thr Arg Ser Val Arg Arg Ala Gln Leu Gln Val
 20 25 30

Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His
 35 40 45

Lys His
 50

<210> 35
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic

<400> 35

ggatcctaatacgaactcaactatagaagcagacgaattcttc

41

<210> 36
 <211> 44

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 36
aagaagaagt cgtgctgctt ctatagtgag tegtattagg atcc 44

<210> 37
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 37
ggatcctaat acgactcact atagaagaag tegtgctgct tc 42

<210> 38
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 38
atgaagcagc acgacttctt ctatagtgag tegtattagg atcc 44

<210> 39
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> GFP5 siRNA

<400> 39

cuucgucgug cugaagaagu u

21

<210> 40
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> GFP5 siRNA

<400> 40

cuucuucage acgacgaaga u

21

<210> 41
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> GL3 siRNA

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(19)

<400> 41

cuuacgcuga guacuucgat t

21

<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> GL3 siRNA

<220>
<221> misc_RNA

<222> (1).. (19)

<400> 42

ucgagguacu cagcguaagt t

21

<210> 43

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 43

Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Lys His Lys His

1 5 10 15

Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His

 20 25 30

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 44

Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys

1 5 10

【 図 1 】

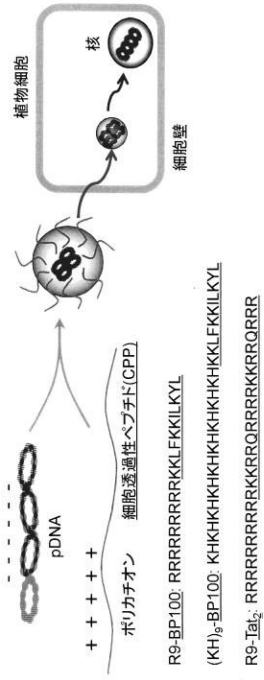


図 1

【 図 3 】

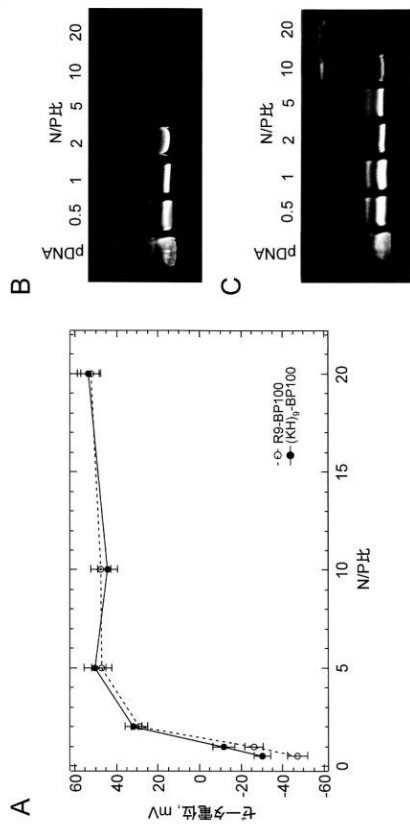
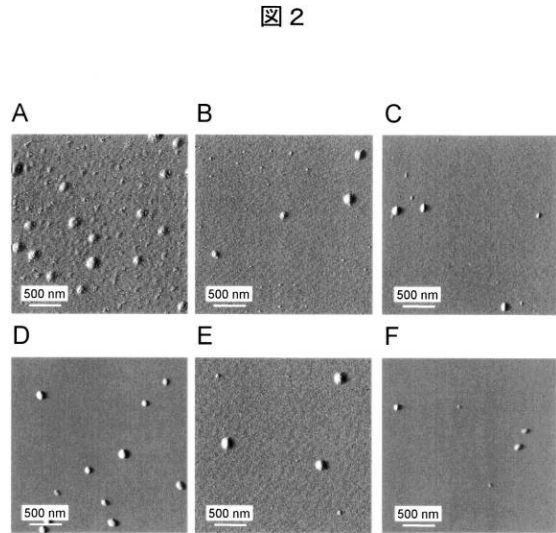
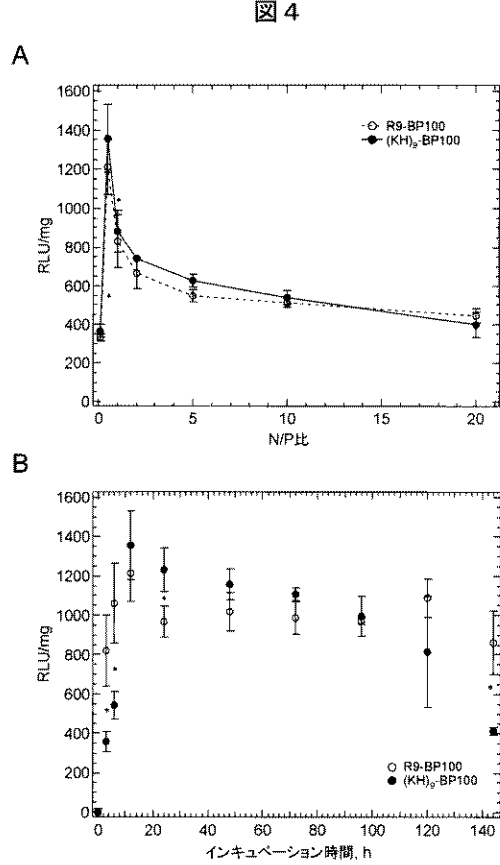


図 3

【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 5 】

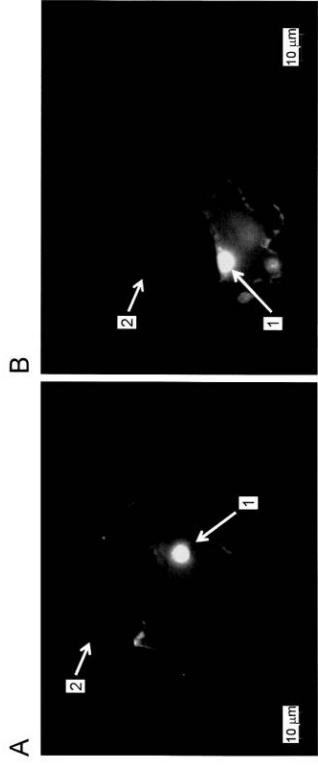


図 5

【 図 7 】

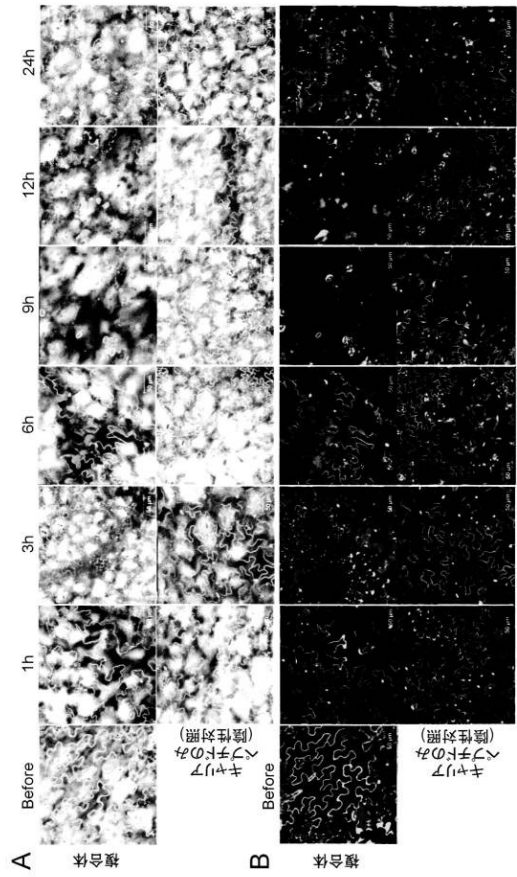


図 7

【 図 6 】

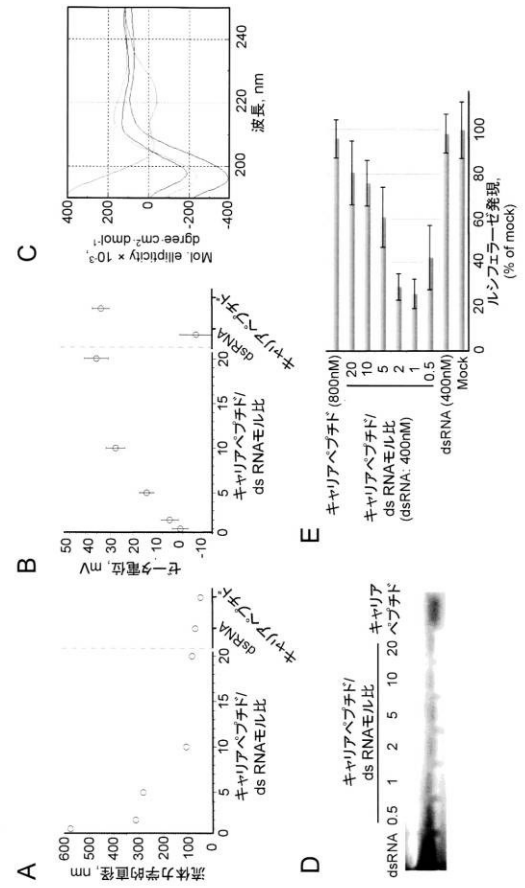


図 6

【 図 7 - 2 】

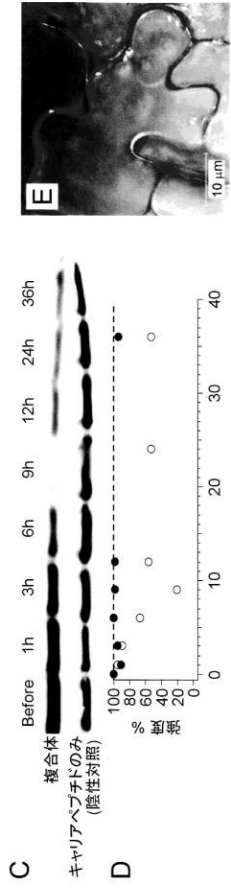
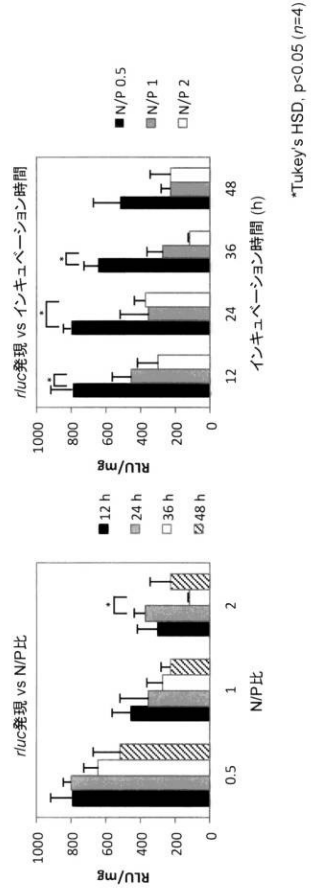


図 7 (続き)

【 8 】

8



フロントページの続き

特許法第30条第1項適用 電子通信回線での発表、掲載アドレス：<http://www.nedo.go.jp/content/100166084.pdf>、掲載日：平成23年8月25日

前置審査

- (72)発明者 児玉 豊
栃木県宇都宮市峰町350番地 国立大学法人宇都宮大学内
- (72)発明者 大谷 美沙都
埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内
- (72)発明者 出村 拓
埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 国際公開第2009/079635(WO, A1)
国際公開第2005/054464(WO, A1)
特表2010-532159(JP, A)
特開平07-213285(JP, A)
ChemBioChem, 2011年, Vol. 12, P. 132-137
J Gene Med., 2006年, Vol. 8, P. 468-476
ChemBioChem, 2009年, Vol. 10, P. 2504-2512

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09
C07K 7/06
C07K 7/08
C07K 14/00
C07K 19/00
A01H 1/00
CA/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq