



国立大学法人

東京農工大学

Tokyo University of Agriculture and Technology

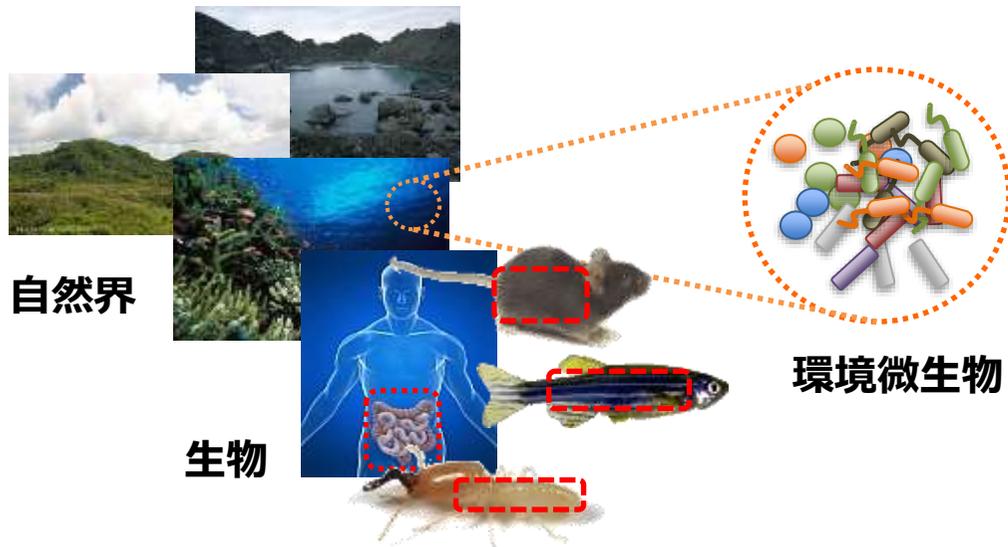
新技術説明会  
New Technology Presentation Meetings

# 多様多様な微生物への生体分子の 導入は膜透過性ペプチドが有効！

大学院工学研究院

生命機能科学部門

准教授 モリ テツシ



## 重要性

- 環境と相互作用しその環境のバランス（健康、疾患）に深い関わりを持つ
- 進化過程を得て特殊な性質や機能を持つ → 重要な遺伝子資源（高活性酵素、天然化合物など）

## 新規天然化合物（リード化合物）の発見



Image borrowed from the SCSIO website

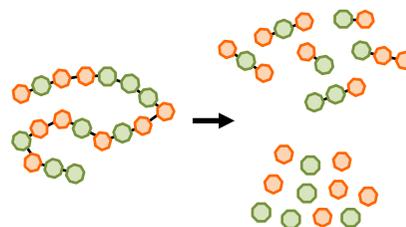
## 高活性酵素の発見



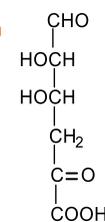
バイオマス・天然資源



Formosa sp. Shewanella sp. Vibrio sp.  
Rheinheimera sp. Cobetia sp. Falsirhodobacter sp.



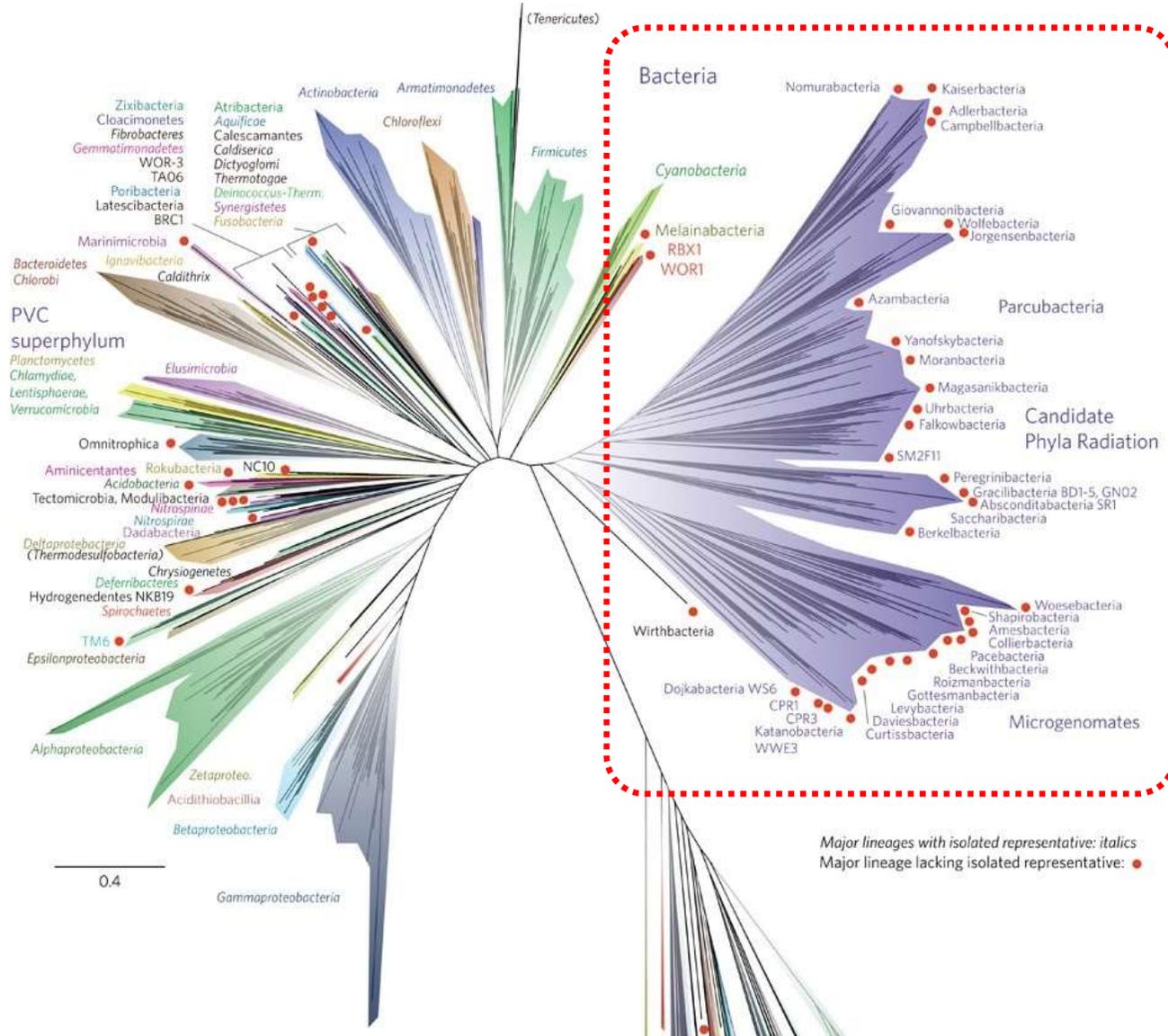
高分子分解酵素



## 応用

- 生理活性物質
- 新バイオマテリアル
- 食品、品質の向上
- リード化合物

# 新技術の紹介 (背景)



環境中に生息している多くの微生物種はまだ単離、分離されておらず  
→ 有用性は解明されていない

Hug et al., *Nature microbiology*, 2016

## 直接分離培養・共培養

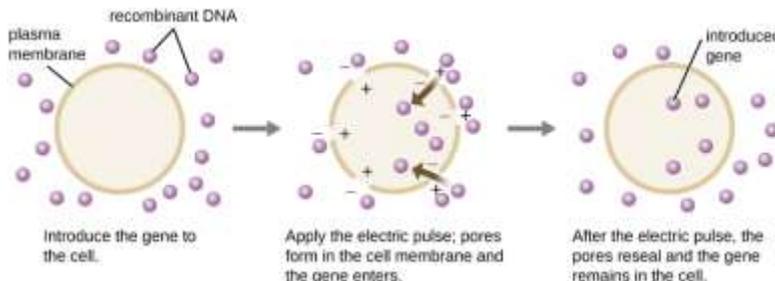


<https://www.istockphoto.com>

長所：

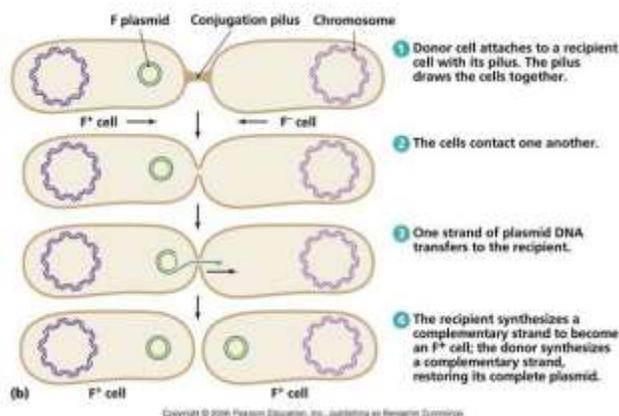
- 標的形質を持つ微生物の単離
- 生きて保存可能

## エレクトロポレーション・形質転換

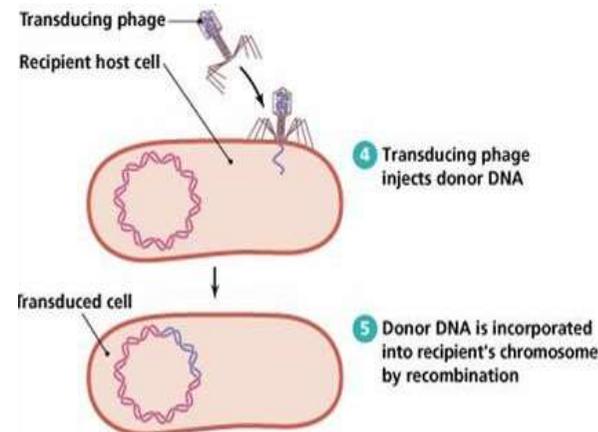


- 特定の細菌種にしか応用できない
- 煩雑、最適が必要
- 導入効率が低い
- 核酸に限定される

## コンジュゲーション

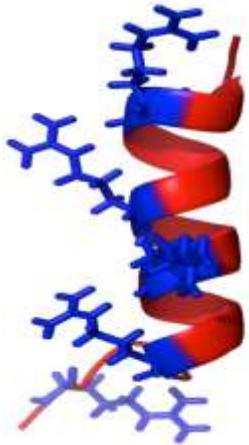


## トランスダクション



汎用性が高い多様多種の微生物に生体分子を導入できる手法が必要

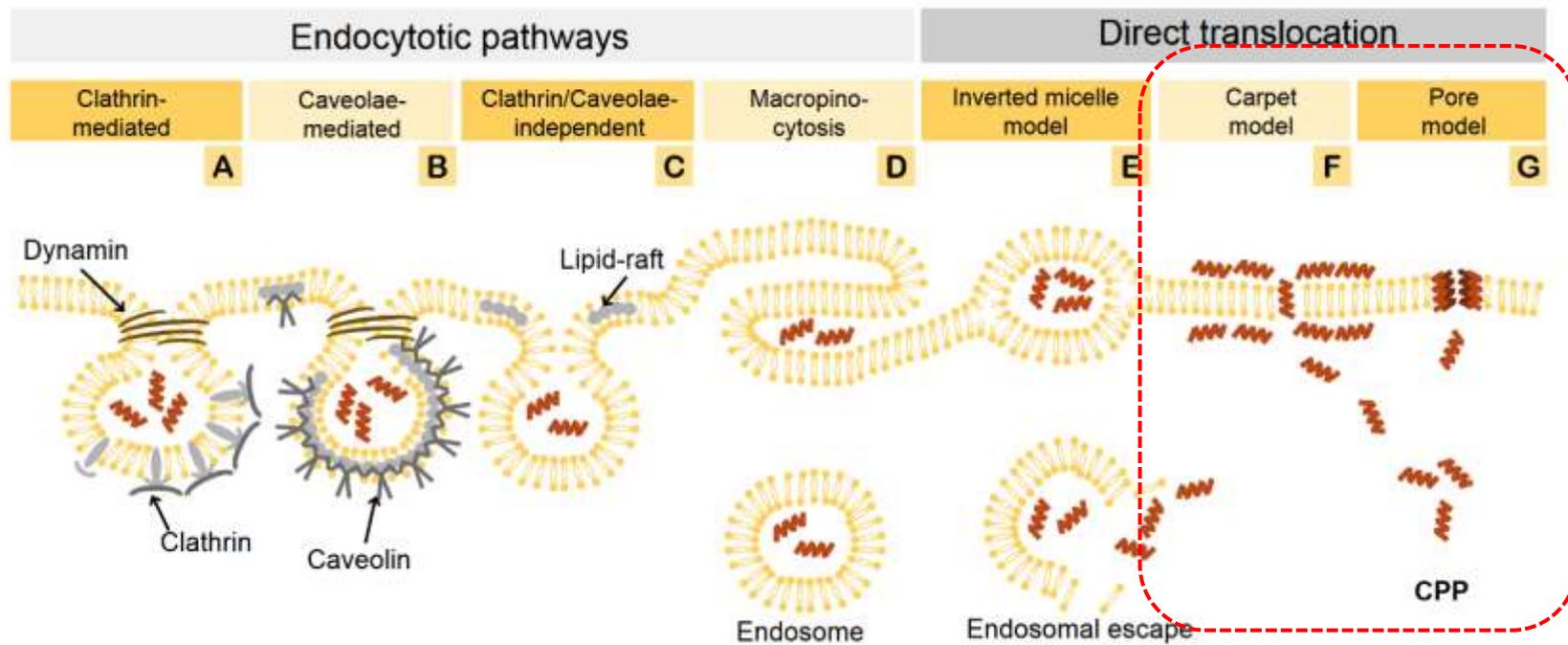
# 新技術の紹介 (膜透過性ペプチド(CPP))



## CPPの性質

- 自然界に存在し、生体分子のキャリアとして利用されている
- **細胞表面のリセプターあるいは膜タンパク質を介さずに細胞膜を透過できる**
- 主に両親媒性、カチオン性、疎水性に分類され、**プラスチャージを持つのが特徴**
- ペプチドの長さは短く、多くが40アミノ酸以下である
- 導入する細胞の性質に依存せず、また**細胞へ毒性はない**

<http://crdd.osdd.net/raghava/cppsite/>



Mickan et al., *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2014

# 新技術の紹介 (膜透過性ペプチド(CPP))

BPP Sequence	Peptide Length	Native function	Reference
(KFF) <sub>3</sub>	9	-	①-③
(RFF) <sub>3</sub>	9	-	④,⑤
RTRTRFLRRT	10	-	④
(RXX*) <sub>3</sub>	9	-	④
(RX) <sub>6</sub>	12	-	⑤
(RXR) <sub>4</sub>	12	-	⑤
(RXRRBR) <sub>2</sub>	12	-	⑤
(RFR) <sub>4</sub>	12	-	⑥
MINWKLRLKNK	11	<i>Streptococcus pneumoniae</i> phage holing protein	⑦
YGRKKRRQRRR	11	HIV-1 Tat (47-57)	⑦
RQIKIWFQNRRMKWKK	16	Antennapedia (43-58)	⑥
GRKKKKRRQRRRYK	13	HIV-1 Tat (48-61)	⑥
VLTNENPPFSD	11	Receptor recycling signal	⑧
YKKSNNPFSD	10	EH domain affinity	⑧
RSNNPFRAR	9	EH domain affinity	⑧
CMVSCAMPNPF	11	Vesicle recycling signal	⑧
LMDLAD	6	Receptor recycling signal	⑧
CFFKDEL	7	Endoplasmic reticulum localization	⑧
IKFLKFLKFL	10	-	⑨
KRLKWYKYGKF	11	-	⑨
KTKCKFLKCC	10	-	⑨
IRTRCRFLRRC	11	-	⑨

様々な種類が存在し、微生物を初め、真核細胞に対しても応用可能

特定の細菌種にしか  
応用できない

① Liam Good et al, Nature, 2001, ② Magdalena Eriksson et al, The Journal of Biological Chemistry, 2002, ③ Ravi R. Patel et al, Frontiers in Microbiology, 2017, ④ Lucas D. Tilley et al, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, ⑤ Brett L. Mellbye et al, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, ⑥ Mostafa F. N. Abushahba et al, Scientific Report, 2016, ⑦ Shan Goh et al, BMS Microbiology, 2015, ⑧ Gunaratna Kuttuva Rajarao et al, FEMS Microbiology Letters, 2002, ⑨ Martti Vaara et al, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996.

ACS APPLIED  
BIO MATERIALS

www.acsabm.org

## Critical Side Chain Effects of Cell-Penetrating Peptides Transporting Oligo Peptide Nucleic Acids in Bacteria

Go Inoue, Daichi Toyohara, Tetsushi Mori,\* and Takahiro Murauchi

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acsabm.1c00023>

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendation

**ABSTRACT:** Of various methods for delivering functional molecules into cells, a chemical approach using cell-penetrating peptides (CPPs) is facile and highly efficient. Currently, however, there are few examples of CPPs highly efficient with bacteria in contrast to CPPs targeting animal cells, and thus our understanding of the structural effects of these bacteria-efficient CPPs, termed as BCPPs, on permeation efficiency is limited. Herein, we report a comprehensive investigation on the permeation efficiencies of cationic short peptides through bacterial cell membranes. We observed that elongating the length of the main chain increased permeation efficiency. More interestingly, the length of the peptide side chain critically affected permeation efficiency; shortening the side chain significantly enhanced efficiency. Among the BCPPs investigated, 2,3-diaminopropionic acid nonamer showed the highest permeation efficiency, allowing the transport of oligo peptide nucleic acids and subsequent growth inhibition in bacteria. This study provides insights into the molecular design of efficient BCPPs for manipulating bacterial growth.

**KEYWORDS:** bacteria, *Escherichia coli*, cell-penetrating peptides, growth inhibition, molecular design



TAT 国立大学法人  
東京農工大学  
Tokyo University of Agriculture and Technology

災害等による休講

受験生の皆様

在学生の皆様

卒業生の皆様

大学案内

学部・大学院

研究・産官学連携

国際交流

学生生活

[HOME](#) > [大学案内](#) > [広報・社会連携](#) > [プレスリリース](#) > [2020年度 プレスリリース一覧](#) > (2021年3月23日リリース) 高い効率で細菌の細胞内へ透過するペプチドを開発—多種の細菌へ簡便に薬剤を導入し、細菌操作や殺菌を可能にする新物質—

## 高い効率で細菌の細胞内へ透過するペプチドを開発—多種の細菌へ簡便に薬剤を導入し、細菌操作や殺菌を可能にする新物質—

シェア

ツイート

LINEで送る

高い効率で細菌の細胞内へ透過するペプチドを開発  
多種の細菌へ簡便に薬剤を導入し、細菌操作や殺菌を可能にする新物質

国立大学法人東京農工大学大学院工学府応用化学専攻の井上豪大学院生、生命工学専攻の豊原大智大学院生、グローバルイノベーション研究院のモリテツシ准教授、村岡貴博教授は、高い効率で多種細菌の細胞内へ透過する新たなペプチドの開発に成功しました。細胞を覆う細胞膜を透過する「細胞膜透過性ペプチド (Cell-Penetrating Peptides: CPP)」は、細胞に対して振りかけるだけ、という簡便な操作で、薬剤などの細胞内導入を可能にする機能性物質として注目を集めています。これまで、動物細胞に対して透過性を持つCPPは数多く開発されてきましたが、細菌に対するCPPは例が極めて少ないのが現状です。今回我々は、カチオン性アミノ酸からなるペプチドに注目し、その側鎖長を短くすることによって、細菌への導入効率が飛躍的に向上することを発見しました。開発したペプチドは、細菌への毒性も低いことが確認され、生きた細菌へ様々な薬剤や殺菌剤、ラベル化剤などを導入し、殺菌や検出、機能改変、操作を可能にする新物質として注目されます。

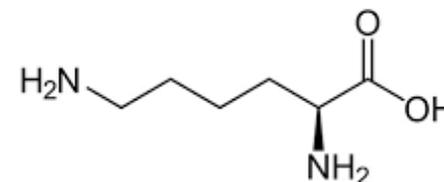
本研究成果は、米国アメリカ化学会 (米国American Chemical Society) のACS Applied Bio Materials誌電子版 (2021年3月15日付) に掲載されました。

多様多様な微生物に生体分子を導入できるCPPを開発した

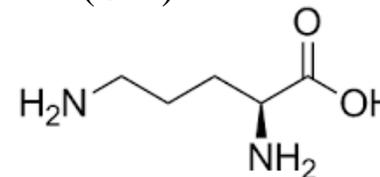
# 新技術の紹介 (研究成果)

Name	Sequence
(KFF)3	H-KFFKFFKFF-K*-NH <sub>2</sub>
K3	H-KKK-K*-NH <sub>2</sub>
K6	H-KKKKKK-K*-NH <sub>2</sub>
K9	H-KKKKKKKKK-K*-NH <sub>2</sub>
K12	H-KKKKKKKKKKKKK-K*-NH <sub>2</sub>
R3	H-RRR-K*-NH <sub>2</sub>
R6	H-RRRRRR-K*-NH <sub>2</sub>
R9	H-RRRRRRRRR-K*-NH <sub>2</sub>
R12	H-RRRRRRRRRRRRR-K*-NH <sub>2</sub>
εK9	H-εKεKεKεKεKεKεKεKεK-K*-NH <sub>2</sub> <sup>d</sup>
Orn9	H-Orn <sub>9</sub> -K*-NH <sub>2</sub>
Dab9	H-Dab <sub>9</sub> -K*-NH <sub>2</sub>
Dap9	H-Dap <sub>9</sub> -K*-NH <sub>2</sub>

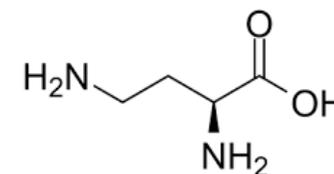
a) Lysine (K)



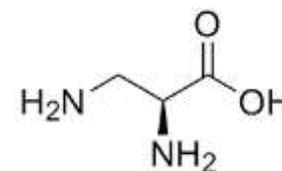
b) Ornithine (Orn)



c) Diaminobutyric acid (Dab)



d) Diaminopropionic acid (Dap)



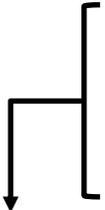
Cationic charge

Weakest

Strongest

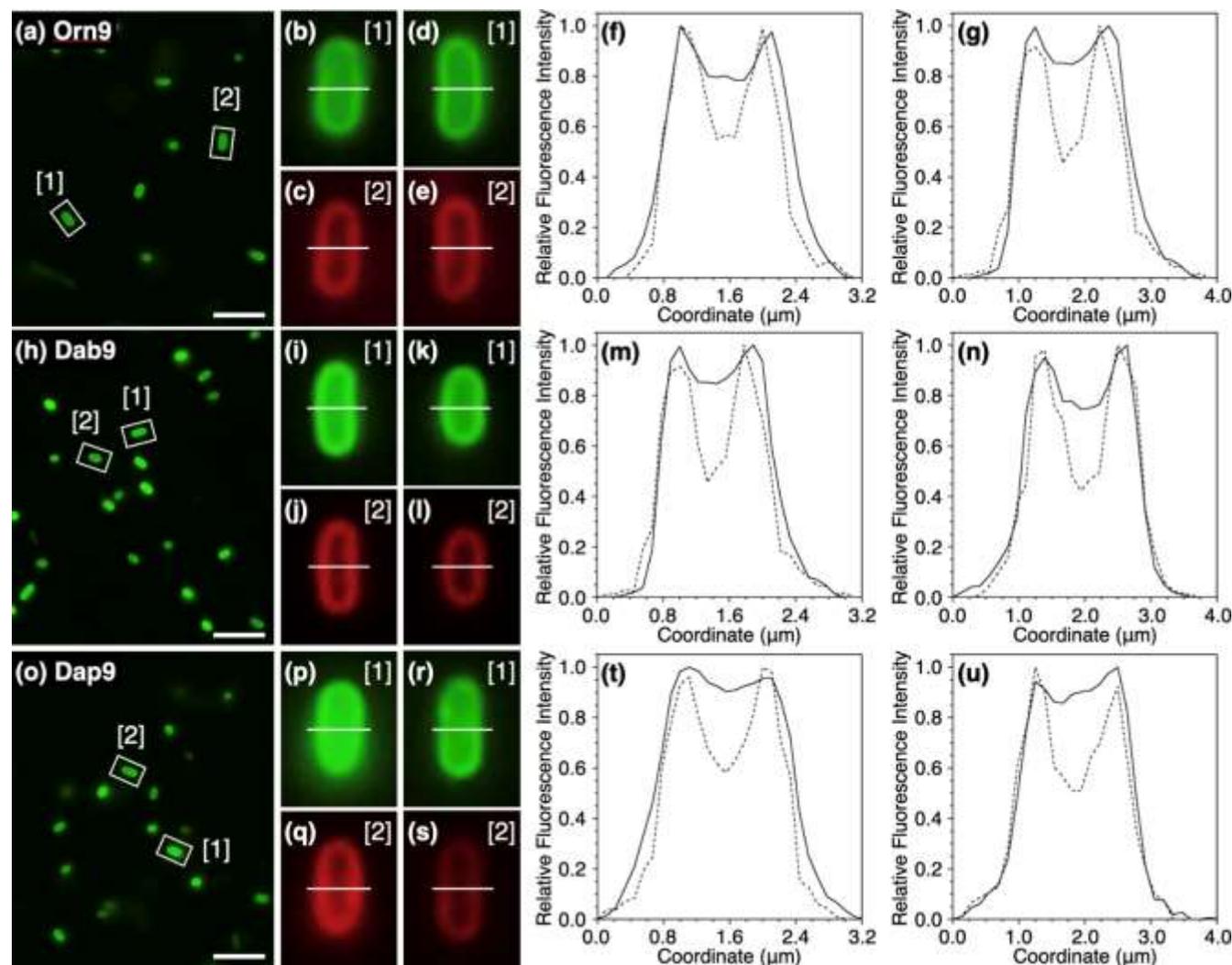
1. Inoue, Mori, Muraoka et al., *Applied Bio Materials*, 2021

# 新技術の紹介 (研究成果)

Name	Sequence	Permeability (%)	
(KFF)3	H-KFFKFFKFF-K*-NH <sub>2</sub>	48	
K3	H-KKK-K*-NH <sub>2</sub>	0.1	
K6	H-KKKKKK-K*-NH <sub>2</sub>	0.7	
K9	H-KKKKKKKKK-K*-NH <sub>2</sub>	40	
K12	H-KKKKKKKKKKKKK-K*-NH <sub>2</sub>	84	
R3	H-RRR-K*-NH <sub>2</sub>	0.2	
R6	H-RRRRRR-K*-NH <sub>2</sub>	58	
R9	H-RRRRRRRRR-K*-NH <sub>2</sub>	68	
R12	H-RRRRRRRRRRRRR-K*-NH <sub>2</sub>	78	
εK9	H-εKεKεKεKεKεKεKεKεK-K*-NH <sub>2</sub> <sup>d</sup>	75	
	Orn9	H-Orn <sub>9</sub> -K*-NH <sub>2</sub>	>99
	Dab9	H-Dab <sub>9</sub> -K*-NH <sub>2</sub>	>99
	Dap9	H-Dap <sub>9</sub> -K*-NH <sub>2</sub>	>99

1. Inoue, Mori, Muraoka et al., *Applied Bio Materials*, 2021

リジンのアナログで合成されたCPPが最も高い導入効率を示す



1. Inoue, Mori, Muraoka et al.,  
*Applied Bio Materials*, 2021

細胞内への導入が認められている

# 新技術の紹介（用途・応用例①）

Bacterial Strains	Permeability (%)		
	(KFF)3	Dab9	Dap9
<i>E. coli</i>	48	>99	>99
<i>E. hormaechei</i>	<5	>99	81
<i>P. hauseri</i>	<5	74	55
<i>S. grimesii</i>	<5	>99	76
<i>T. guamensis</i>	<5	>99	93
<i>Y. bercovieri</i>	XX	>99	>99

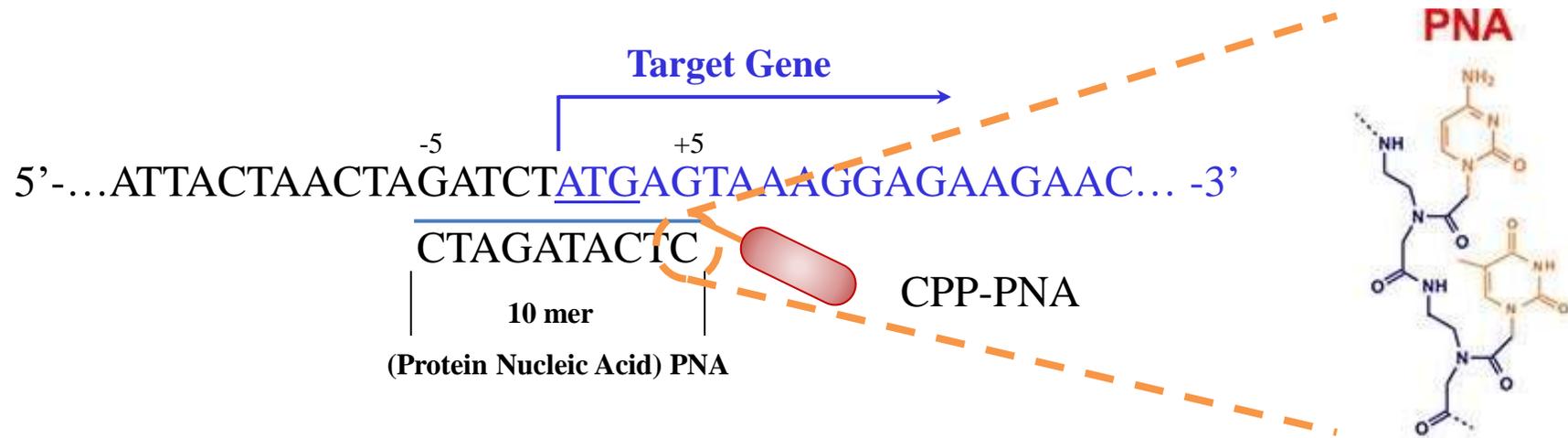
従来報告されたCPPに比べ、本研究で開発したCPPの方が圧倒的に導入率が高い→汎用性あり

真核細胞（微細藻類）に対しても高い導入効率を示す

1. Inoue, Mori, Muraoka et al., *Applied Bio Materials*, 2021

# 新技術の紹介（用途・応用例②）

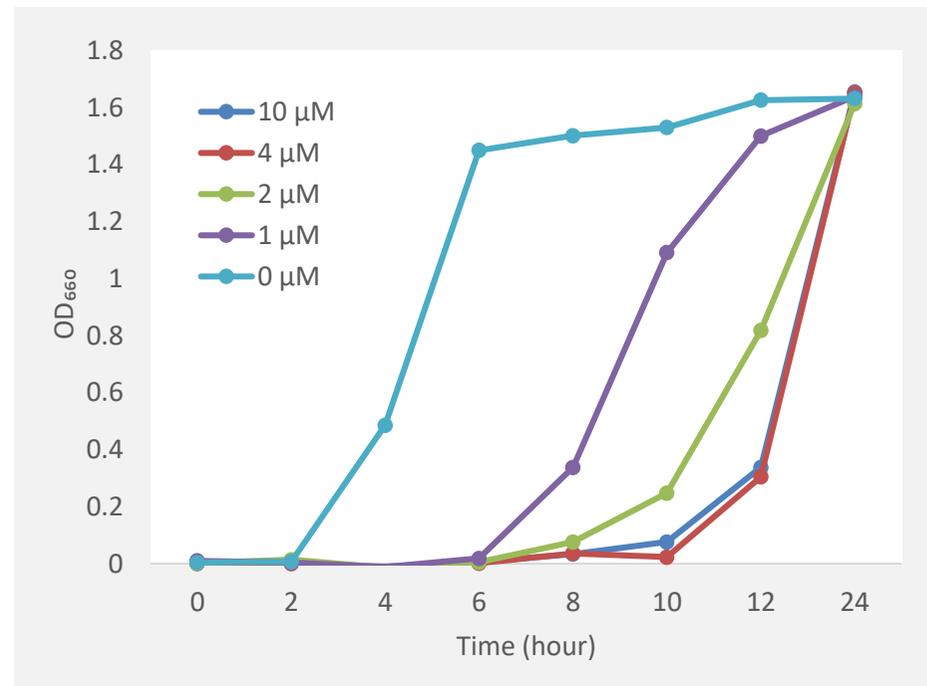
## CPPを利用した新規遺伝子制御系の構築



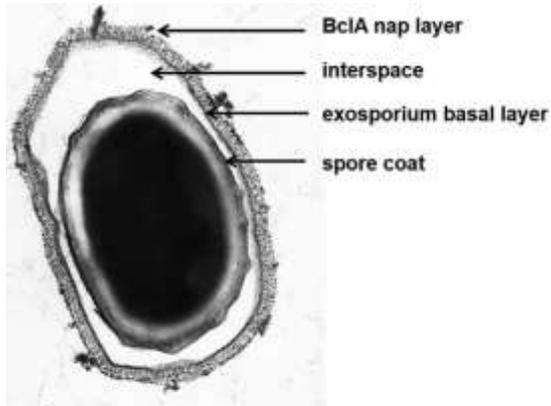
遺伝子発現制御への効果あり



- 化合物生産向上に向けて代謝経路の解明
- 未知タンパク質の解明

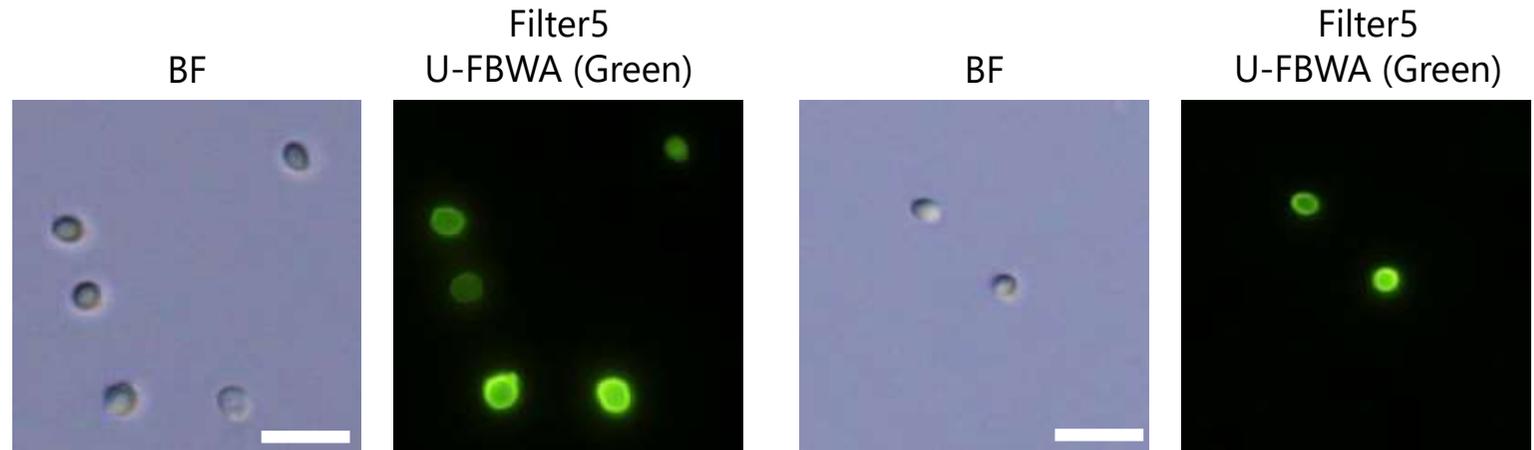


# 新技術の紹介 (用途・応用例③)



*Bacillus anthracis* spore

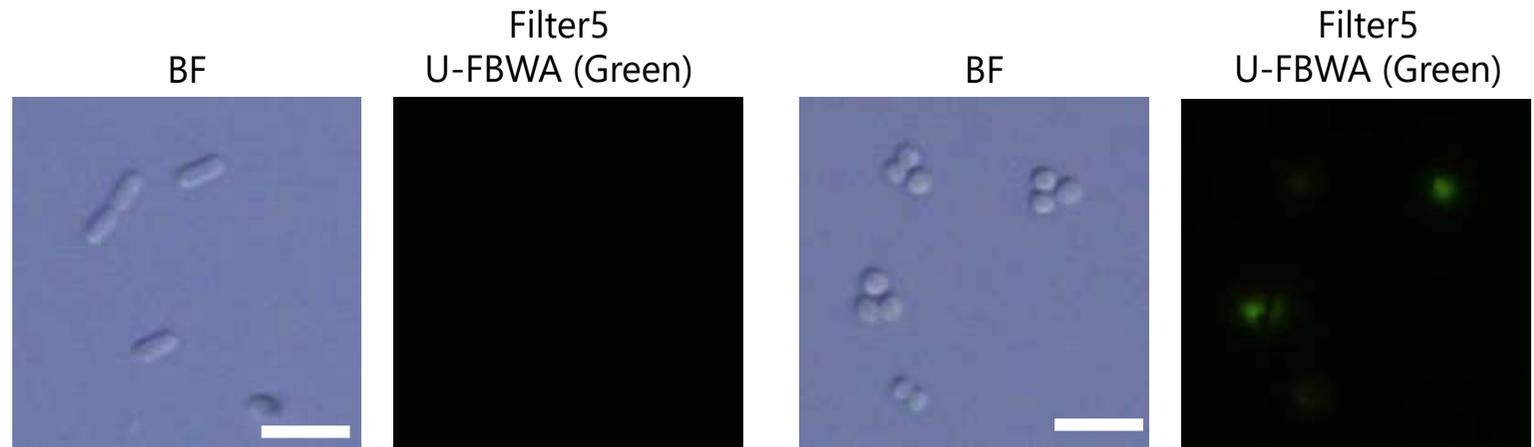
## 微生物の芽胞



*Bacillus megaterium*

*Bacillus subtilis*

芽胞のみを  
特異的に検  
出可能



*Lactobacillus plantarum*

*Staphylococcus saprophyticus*

研究①

多様多様な微生物（原核および真核細胞）へ生体分子の応用



- 様々な微生物種に対して導入評価および実績が必要（実証開始）
- 核酸以外の生体分子の導入の実証例が必要（実証開始）

研究②

遺伝子発現制御系の構築



- 遺伝子発現制御した代謝経路の実証例（実証開始）
- より多くの未知タンパク質の機能解明実績が必要（実証開始）

研究③

芽胞の特異的検出系の開発



- モデル細菌に対して実証済み。環境サンプルへの応用が必要

- CPPを利用した遺伝子制御の系は研究室レベル（小スケール）での実証は成功しているが、産業の現場で実際にその利用性を実証したい → **ラージスケールでの応用は可能かどうか、有効性と実現性。**
- 芽胞の検出系はモデル微生物レベルでは可能と証明されているが、食品や医療現場での応用性を探りたい → **可能であることが実証できた場合、商品開発へのつながること期待したい。**
- CPPにおける他の応用法についても相談化

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 微生物膜透過剤、複合体、これを用いた微生物細胞に化合物を送達する方法、殺菌剤、抗菌剤及びびラベル化剤
- 出願番号 : 特願2020-25607
- 出願人 : 国立大学法人東京農工大学
- 発明者 : モリ テツシ、村岡 貴博、井上 豪、豊原 大智、三浦 恵理香

## 東京農工大学 先端産学連携研究推進センター

T E L    042 – 388 – 7550

F A X    042 – 388 – 7553

e-mail    [suishin@ml.tuat.ac.jp](mailto:suishin@ml.tuat.ac.jp)



SHRINKS  
MORE  
SENSE

Tokyo University of  
Agriculture and Technology

