

大腸菌で発現させたカラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) の抗菌活性

日比忠晴^{*1}・栃原孝志^{*1}・提箸祥幸^{*1}・森 浩一^{*1,2}
森脇丈治^{*3}・矢頭 治^{*1}・平八重一之^{*4}・川田元滋^{*5}

目 次

I はじめに	1	(2) カスガマイシンおよびフェリムゾンとカラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) との抗菌活性の比較	4
II 材料および方法	2	(3) カラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) のレースの異なるイネいもち病菌 9 菌株に対する抗菌活性	4
(1) カラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) の抗菌活性	2	IV 考察	5
(2) カスガマイシンおよびフェリムゾンとカラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) との抗菌活性の比較	3	V 摘要	6
(3) カラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) のレースの異なるイネいもち病菌 9 菌株に対する抗菌活性	3	謝 辞	6
III 結果	3	引用文献	6
(1) カラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) の抗菌活性	3	Summary	8

I はじめに

いもち病は日本の稲作における最重要病害で、その防除のために大量の化学農薬が施用されており、環境への負荷が問題視されている。こうした現状から、より環境負荷の少ない新規抗菌薬剤の開発、および、使用する農薬量を大幅に減少させる抵抗性品種の開発が注目されている。

ディフェンシンは多様な生物が産生する抗菌タンパク質であり、近年多くの植物で解析が進められている^(2,6,17)。植物ディフェンシンはシステイン残基に富む45-54アミノ酸からなる塩基性タンパク質で、そのアミノ酸配列の一次構造は多様である。システイン残基は植物ディフェンシン間で保存されて

おり、システイン残基間で形成されるジスルフィド結合によって安定な高次構造をとると考えられている。一部の植物ディフェンシンは α -アミラーゼ活性を阻害、あるいはタンパク質合成を阻害する。また多くの植物ディフェンシンは広範囲の抗菌活性を示すことが報告されている^(2,4,6,17)。

アブラナ科植物のダイコンにおいて強い抗菌活性を有するディフェンシン、Rs-AFP1およびRs-AFP2が単離された^(14,15)。また、Rs-AFP2遺伝子を酵母で発現させ、抗菌活性のあるディフェンシンタンパク質が得られている⁽¹⁾。他のアブラナ科植物でも抗菌活性のあるディフェンシンが報告されている⁽¹⁶⁾。

平成19年1月4日受付 平成19年3月27日受理

- *1 稲遺伝子技術研究北陸サブチーム
- *2 現 藤植物ゲノムセンター
- *3 現 北陸水田輪作研究チーム
- *4 現 病害抵抗性研究チーム
- *5 現 作物研究所

これまでに幾つかのディフェンシン遺伝子を導入した形質転換植物の開発とそれを利用した病害抵抗性付与に関する研究が進んでいる^(5, 11, 13, 14)。

川田らはコマツナおよびキャベツのディフェンシン遺伝子を単離し、それぞれを導入した形質転換イネを作出し、いもち病等の複数の病害に対する抵抗性が向上したことを報告した^(7, 8)。さらに、ノザワナ、ハクサイ、カブ、カラシナ、ワサビダイコンおよびナタネからディフェンシン遺伝子を単離した⁽⁷⁾。これら8種類の遺伝子をそれぞれ導入した形質転換イネを作出し、いもち病抵抗性を調査したところ、カラシナ (*Brassica juncea*) のディフェンシン (Bj-AFP1)

遺伝子を導入したイネ系統群において、抵抗性を示す組換え個体が最も高い頻度で得られた (未発表)。また、Bj-AFP1遺伝子の成熟タンパク質の推定アミノ酸配列はRs-AFP1と一致した。大腸菌で発現させたBj-AFP1はいねいもち病菌およびいね紋枯病菌に対して強い抗菌活性を示した⁽⁶⁾。

本研究では、Bj-AFP1の抗菌薬剤としての実用性を検討するとともに、複合病害抵抗性作物の作出に向けた基礎的知見を得るため、大腸菌で発現させたBj-AFP1を供試して各種病原微生物に対する抗菌活性の測定と既存のいもち病防除薬剤との比較を行った。

II 材料および方法

(1) カラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) の抗菌活性

・ディフェンシンの調製

Bj-AFP1遺伝子の成熟タンパク質領域を組み込んだプラスミド pGEX (Amersham) を大腸菌 Rosetta (DE3) pLysS (Novagen) に導入して Glutathione-S-transferase (GST) 融合タンパク質として発現させ、一部改変した GST gene fusion system (Amersham) を用い陰イオンカラム (pH9.2) を通して Bj-AFP1 を精製した。また、作物研究所 (大島正弘氏、高島新一郎氏) が低コスト大量生産に向けて改良したプラスミド pLEX (Invitrogen) を用いるタンパク質精製法に基づき、同遺伝子を組み込んだ pLEX を大腸菌 GI724 株 (Invitrogen) に導入してヒスチジンタグ融合タンパク質として発現させ、一部改変した ProBond Purification System (Invitrogen) を用い陰イオンカラム (pH9.2) を通して Bj-AFP1 を精製した。

・植物病原微生物

Bj-AFP1の抗菌活性の測定には、以下の植物病原微生物を供試した。いねいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) Mu-95 (レース001.2, MAFF101505), Kyu89-246 (003.0, MAFF101506), 稲86-137 (007.0, MAFF101511), 愛79-142 (037.3, MAFF101520), Kyu 9439013 (047.0, MAFF101521), 笹森121 (077.1, MAFF101523), 研53-53 (137.1, MAFF101525), 青92-06-2 (337.1, MAFF101530), 愛74-134 (477.1, MAFF101533), いね白葉枯病菌 (*Xanthomonas*

campestris pv. *oryzae*) T7133, いね苗立枯細菌病菌 (*Burkholderia plantarii*) MAFF301723, いねもみ枯細菌病菌 (*B. glumae*) MAFF301682, いね褐条病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*) AZ8220, オオムギ赤かび病菌 (*Fusarium graminearum*) FK-0304, 蔬菜類軟腐病菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) MAFF 301396, ハクサイ黒斑細菌病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*) MAFF 301175 およびキャベツ黒腐病菌 (*X. campestris* pv. *campestris*) ATTC33913 (T) を使用した。いねの病原細菌は中央農業総合研究センター細菌病害研究室 (現: 病害虫検出同定法研究チーム) の畔上耕児氏より分譲された菌株を、その他の細菌および糸状菌は中央農業総合研究センター (北陸) 病害研究室 (現: 病害抵抗性研究チーム) 保存菌株を供試した。

・抗菌活性測定法

抗菌活性測定は、マイクロプレートを用い^(1, 3)、以下の通り行った。マイクロプレートリーダーは Tecan 社の Sunrise を使用した。病原糸状菌であるいねいもち病菌の生育には、potato dextrose broth (Difco) を1/2に希釈した培地を、オオムギ赤かび病菌には1/32に希釈した培地を用いた。96穴マイクロプレートのウェルに培地溶液80 μ lを加え、 2×10^4 孢子/ml濃度に調製し、所定の濃度の Bj-AFP1 溶液20 μ lを加え25 $^{\circ}$ Cで静置培養した。孢子を含む培地溶液に滅菌水20 μ lを加えたウェルを対照区とした。マイクロプレートリーダーで各ウェルの吸光度 (O.D.595値) を6時間毎に測定し糸状菌の生育量を

推定した。イネいもち病菌は96時間後、オオムギ赤かび病菌は48時間後の測定値を用いて、対照区と比較して生育が50%に抑制される濃度 (I.C.50値) を求めた。

病原細菌であるイネ白葉枯病菌、蔬菜類軟腐病菌およびハクサイ黒斑細菌病菌の生育には0.5%のポリペプトン培地 (日本製薬) を用いた。イネ苗立枯細菌病菌、イネもみ枯細菌病菌およびイネ褐条病菌は0.25%、キャベツ黒腐病菌は0.125%のポリペプトン培地を用いた。これらの細菌は、O.D.595=0.1に調製した細菌を含む培地溶液80 μ lに、BJ-AFP1溶液または滅菌水20 μ lを加え、25 $^{\circ}$ Cで24時間振とう培養した。24時間後のO.D.595値から同様にI.C.50値を求めた。

イネいもち病菌稲86-137株、オオムギ赤かび病菌FK-0304株に対する抗菌活性の比較試験にはpGEXを用いて調製したBj-AFP1を、また、細菌およびレースの異なるイネいもち病菌株に対する抗菌活性の比較試験にはpLEXを用いて調製したBj-AFP1を供試した。

・顕微鏡観察

イネいもち病菌稲86-137株、オオムギ赤かび病菌

FK-0304株をマイクロプレート内で、上記で示した培養方法を用いて培養した。pGEXを用いて調製したBj-AFP1を各々5、10 μ g/ml加えた試験区と滅菌水を加えた対照区の96時間後の生育を、光学顕微鏡 (オリンパスIX70) で観察した。

(2) カスガマイシンおよびフェリムゾンとカラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) との抗菌活性の比較

イネいもち病菌稲86-137株に対するカスガマイシン (和光純薬)、フェリムゾンおよびBj-AFP1のI.C.50値を上記で示した方法を用いて求めた。フェリムゾンは住友武田農業株式会社より分譲されたものを、またBj-AFP1はpGEXを用いて調製したものを使用した。

(3) カラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) のレースの異なるイネいもち病菌9菌株に対する抗菌活性

レースの異なるイネいもち病菌9菌株に対するI.C.50値を上記で示した方法を用いて求めた。Bj-AFP1はpLEXを用いて調製したものを使用した。

Ⅲ 結 果

(1) カラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) の抗菌活性

イネいもち病菌稲86-137株は48時間後から96時間後まで、オオムギ赤かび病菌FK-0304株は12時間後から48時間後まで顕著に増殖した。pGEXを用い

て調製したBj-AFP1を培地に添加した場合、イネいもち病菌、オオムギ赤かび病菌の生育は添加した濃度に応じて抑制された (図1)。

pGEXを用いて調製したBj-AFP1のイネいもち病菌稲86-137株に対するI.C.50値は0.63 μ g/mlであ

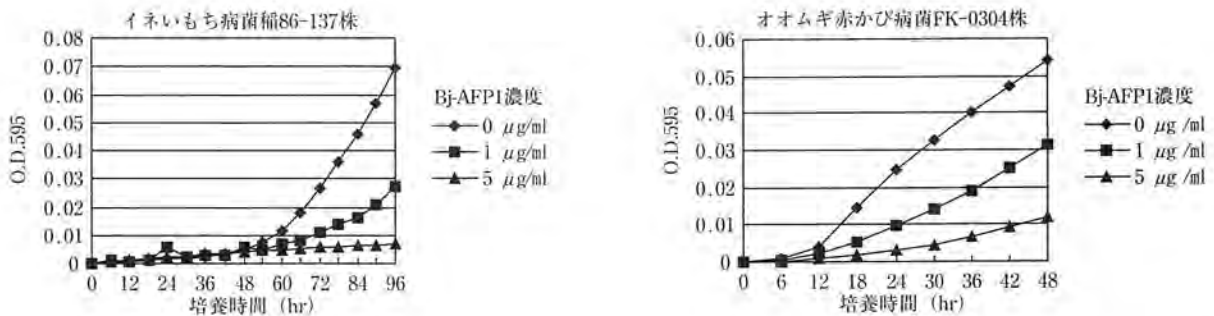


図1 カラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) のイネいもち病菌稲86-137株、オオムギ赤かび病菌FK-0304株に対する生育抑制効果

注) pGEXを用い陰イオンカラムを通して調製したBj-AFP1を使用。

り、オオムギ赤かび病菌に対しては $1.31\mu\text{g/ml}$ を示した(表1)。pLEXを用いて調製したBj-AFP1の同じ稲86-137株に対するI.C.50値は $2.10\mu\text{g/ml}$ であり、pGEXを用いて調製したBj-AFP1よりやや高い値を示した。イネ白葉枯病菌、イネ苗立枯細菌病菌、イネもみ枯細菌病菌、イネ褐条病菌、蔬菜類軟腐病菌、ハクサイ黒斑細菌病菌およびキャベツ黒腐病菌に対するpLEXを用いて調製したBj-AFP1のI.C.50値は $25\mu\text{g/ml}$ 以上と推定された(表1)。

pGEXを用いて調製したBj-AFP1を培地に添加した場合の菌糸の生育を顕微鏡で観察した。イネいもち病菌およびオオムギ赤かび病菌ともに、対照区ではウェル内全てが菌糸で覆われているのに対し、添加区では菌糸は胞子の周囲にのみ部分的に生育しており、菌糸の伸張が抑制されていた。また、両菌とも対照区に比べ、Bj-AFP1添加区では、菌糸の枝分かれが近接して多くみられ、分枝の増加が認められた(図2)。

(2) カスガマイシンおよびフェリムゾンとカラシナ由来ディフェンシン(Bj-AFP1)との抗菌活性の比較

pGEXを用いて調製したBj-AFP1と、いもち病防除薬剤であるカスガマイシンおよびフェリムゾンを用いてイネいもち病菌稲86-137株に対するI.C.50値を測定した。Bj-AFP1を用いた場合のI.C.50値が $0.63\mu\text{g/ml}$ であるのに対して、カスガマイシン、フェリムゾンを用いた場合はそれぞれ $4.84\mu\text{g/ml}$ 、 $1.47\mu\text{g/ml}$ であった(表2)。

(3) カラシナ由来ディフェンシン(Bj-AFP1)のレースの異なるイネいもち病菌9菌株に対する抗菌活性

pLEXを用いて調製したBj-AFP1の各イネいもち病菌株に対するI.C.50値は、 $2.10\mu\text{g/ml}$ から $6.02\mu\text{g/ml}$ までの値を示し、イネいもち病菌のレースにかかわらず安定した抗菌活性を示した(表3)。

表1 カラシナ由来ディフェンシン(Bj-AFP1)の主要植物病原微生物に対する抗菌活性(I.C.50値)

ディフェンシン	病原菌	I.C.50値($\mu\text{g/ml}$)
G	イネいもち病菌(<i>Pyricularia oryzae</i>) 稲86-137 MAFF101511	0.63 ± 0.14
	オオムギ赤かび病菌(<i>Fusarium graminearum</i>) FK-0304	1.31 ± 0.53
L	イネいもち病菌(<i>Pyricularia oryzae</i>) 稲86-137 MAFF101511	2.10 ± 0.79
	イネ白葉枯病菌(<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>) T7133	>25
	イネ苗立枯細菌病菌(<i>Burkholderia plantarii</i>) MAFF301723	>25
	イネもみ枯細菌病菌(<i>Burkholderia glumae</i>) MAFF301682	>25
	イネ褐条病菌(<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>) AZ8220	>25
	蔬菜類軟腐病菌(<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>) MAFF301396	>25
	ハクサイ黒斑細菌病(<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicorae</i>) MAFF301175	>25
	キャベツ黒腐病菌(<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>) ATTC33913(T)	>25

注) 1) G : pGEXを用い陰イオンカラムを通して調製したBj-AFP1を使用。

2) L : pLEXを用い陰イオンカラムを通して調製したBj-AFP1を使用。

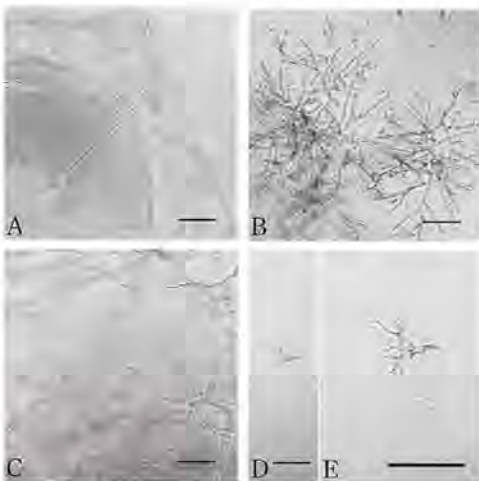


図2 カラシナ由来ディフェンシン(Bj-AFP1)のイネいもち病菌稲86-137株、オオムギ赤かび病菌FK-0304株の菌糸生育に対する影響

注) 1) pGEXを用い陰イオンカラムを通して調製したBj-AFP1を使用し、96時間後に観察。

2) A, B : イネいもち病菌稲86-137株、各々のBj-AFP1濃度 $0\mu\text{g/ml}$ 、 $5\mu\text{g/ml}$ 。

C, D : オオムギ赤かび病菌FK-0304株、各々のBj-AFP1濃度 $0\mu\text{g/ml}$ 、 $10\mu\text{g/ml}$ 。

E : Dの2倍拡大図。

3) バーは $80\mu\text{m}$ を示す。

表 2 カラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1), フェリムゾン, カスガマイシンのイネいもち病菌に対する抗菌活性 (I.C.50 値)

薬 劑	I.C.50値 ($\mu\text{g/ml}$)
Bj-AFP1	0.63 \pm 0.14
フェリムゾン	1.47 \pm 0.17
カスガマイシン	4.84 \pm 0.35

注) 1) 供試菌株: 稲86-137.
2) pGEXを用い陰イオンカラムを通して調製した Bj-AFP1を使用.

表 3 カラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) のレースが異なるいもち病菌株に対する抗菌活性 (I.C.50 値)

菌 株	レース	I.C.50値 ($\mu\text{g/ml}$)
Mu-95	001.2	5.97 \pm 1.25
Kyu 89-246	003.0	6.02 \pm 1.57
稲86-137	007.0	2.10 \pm 0.79
愛79-142	037.3	2.65 \pm 0.97
Kyu 9439013	047.0	2.85 \pm 1.08
笹森121	077.1	2.82 \pm 1.23
研53-53	137.1	3.05 \pm 1.45
青92-06-2	337.1	3.64 \pm 1.05
愛74-134	477.1	4.88 \pm 1.56

注) pLEXを用い陰イオンカラムを通して調製したBj-AFP1を使用.

IV 考 察

これまでの研究で、大腸菌 (pGEX) で発現させた Bj-AFP1はイネいもち病菌に抗菌活性を示した⁽⁶⁾。本研究ではpGEXを用いて調製した Bj-AFP1と pLEXを用いて調製した Bj-AFP1を供試したが、pLEXを用いて調製した Bj-AFP1の I.C.50値はやや高い値が示された。この違いはタンパク質の生産方法が異なることによるものと推測される。アブラナ科植物であるダイコン、セイヨウアブラナ、カブ、シロガラシおよびシロイヌナズナで赤かび病菌に対して抗菌活性を示すディフェンシンが報告されている^(15,16)。今回の研究において、大腸菌で発現させた Bj-AFP1もムギ類の重要病害である赤かび病菌に対して強い抗菌活性を示した。また、ダイコンのディフェンシン同様⁽¹⁵⁾、Bj-AFP1でも添加した試験区で菌糸の伸張抑制および分枝の増加が観察され、明らかな菌の生育阻害が確認された。これらの結果から、大腸菌で発現させた Bj-AFP1は、ムギ類等イネ以外でも防除薬剤として利用できる可能性がある。

一方、イネ白葉枯病菌、イネ苗立枯細菌病菌、イネもみ枯細菌病菌、イネ褐条病菌、蔬菜類軟腐病菌、ハクサイ黒斑細菌病菌およびキャベツ黒腐病菌に対して、Bj-AFP1はイネいもち病菌に効果を示した約10倍の濃度でも抗菌活性が認められなかった。多くの植物ディフェンシンは細菌よりも糸状菌に強い抗菌活性を示すことが報告されているが^(12,17)、ダリア (Dm-AMP1)、チョウマメ (Ct-AMP1)、マロニエ (Ah-AMP1) のディフェンシンは *Bacillus megaterium* に抗菌活性をもち、I.C.50値はそれぞれ150、15および100 $\mu\text{g/ml}$ を示したと報告されている⁽¹⁰⁾。ホウレンソウ

(So-D1,2,6,7) およびジャガイモ (St-PTH) のディフェンシンも、*Clavibacter michiganensis* と *Ralstonia solanacearum* に抗菌活性を有し、換算した I.C.50値は *C.michiganensis* に各々0.4-5.8 $\mu\text{g/ml}$ 、1.1 $\mu\text{g/ml}$ 、*R.solanacearum* に各々4.3-36.1 $\mu\text{g/ml}$ 、16.1 $\mu\text{g/ml}$ を示したと報告されている^(9,12)。また、ダイコンから単離されたディフェンシン Rs-AFP2も *B.megaterium* に抗菌活性を示し、I.C.50値は200 $\mu\text{g/ml}$ であることが報告されている⁽¹⁵⁾。さらに、大腸菌内で Bj-AFP1を発現させた場合、大腸菌の生育を抑制することが明らかとなっている⁽⁷⁾。したがって Bj-AFP1も今回の実験で用いた濃度より高い濃度においては病原細菌の増殖を抑える可能性がある。

いもち病は日本のイネの病害の中で稲作に最大の経済的被害をもたらす重要病害である。Bj-AFP1の抗菌活性は I.C.50値0.63 $\mu\text{g/ml}$ または2.10 $\mu\text{g/ml}$ を示し、既存のいもち病防除薬剤であるフェリムゾン、カスガマイシンとほぼ同等かそれ以上であり、作物成分由来の抗菌物質として新たな農業用途の可能性があると考えられる。

真性抵抗性遺伝子を利用した耐病性育種では、新たな病原菌レースの出現により育成した品種の抵抗性が崩壊する現象が知られている。いもち病菌にも多くのレースが存在するため、近年、圃場抵抗性の利用が図られるとともに、複数の真性抵抗性遺伝子系統を混植するマルチラインの栽培も行われている。Bj-AFP1はいもち病菌のレースにかかわらず抗菌活性を示したことから、この遺伝子を導入したイネは高度ないもち病抵抗性品種となる可能性がある。

V 摘要

- (1) 大腸菌で発現させたカラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) はオオムギ赤かび病菌に対して抗菌活性を示した。イネ白葉枯病菌、イネ苗立枯細菌病菌、イネもみ枯細菌病菌、イネ褐条病菌、蔬菜類軟腐病菌、ハクサイ黒斑細菌病菌およびキャベツ黒腐病菌に対しては、いもち病菌に効果を示した濃度の約10倍までの濃度においては抗菌活性を示さなかった。
- (2) カラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) の、いもち病菌に対する抗菌活性はフェリムゾン、カスガマイシンとほぼ同等かそれ以上であった。
- (3) カラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) は、イネいもち病菌のレースにかかわらず抗菌活性を示した。

謝 辞

本研究を行うに当たり、イネの病原細菌は中央農業総合研究センター細菌病害研究室（現：病害虫検出同定法研究チーム）の畔上耕兒博士より、フェリムゾンは住友武田農薬株式会社より御提供頂いた。

また、農林水産省アグリ・ゲノム研究の総合的な推進プロジェクト (GB-1002) に御支援頂いた。ここに厚く御礼を申し上げる。

引用文献

1. Alves, A. L. V., De Samblanx, G. W., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A. and Broekaert, W. F. (1994) Expression of functional *Raphanus sativus* antifungal protein in yeast. FEBS. Lett., 348, 228-232.
2. Broekaert, W. F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A., and Osborn, R.W. (1995) Plant Defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defence system. Plant Physiol., 108, 1353-1358.
3. Broekaert, W. F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A. and Vanderleyden, J. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. FEMS. Microbiol. Lett., 69, 55-60.
4. Castro, M.S. and Fontes, W. (2005) Plant defence and antimicrobial peptides. Protein and Peptide Lett., 12, 13-18.
5. Kanzaki, H., Nirasawa, S., Saitoh, H., Ito, M., Nishihara, M., Terauchi, R. and Nakamura, I. (2002) Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. Theor. Appl. Genet., 105, 809-814.
6. 川田元滋・黒田 秧・田中有司 (2005) 抗菌蛋白質ディフェンシンの多様な機能特性. 化学と生物, 43, 229-234.
7. 川田元滋・中島敏彦・松村葉子・及川鉄男・黒田 秧 (2003) アブラナ科野菜がもつ抗菌タンパク質ディフェンシン遺伝子群の解析. 農業および園芸, 78 (4), 470-476.
8. Kawata, M., Nakajima, T., Yamamoto, T., Mori, K., Oikawa, T., Fukumoto, F. and Kuroda, S. (2003) Genetic Engineering for Disease Resistance in Rice (*Oryza sativa* L.) using antimicrobial peptides. JARQ, 37, 71-76.
9. Moreno, M., Segura, A. and Garcia-Olmedo, F. (1994) Pseudothionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens. Eur. J. Biochem., 223, 135-139.
10. Osborn, R. W., De Samblanx, G. W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, E., Attenborough, S., Rees, S. B. and Broekaert, W. F. (1995) Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae,

- Hippocastanaceae and Saxifragaceae. FEBS. Lett., 368, 257-262.
11. Parashina, E. V., Serdobinskii, L. A., Kalle, E. G., Lavorova, N.V., Avetisov, V. A., Lunin, V. G. and Naroditskii, B. S. (2000) Genetic engineering of oilseed rape and tomato plants expressing a radish defensin gene. *Rus. J. Plant Physiol.*, 47,417-423.
 12. Segura, A., Moreno, M., Molina, A. and Garcia-Olmedo, F. (1998) Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS. Lett.*, 435, 159-162.
 13. 莊司和明 (2001) カイワレダイコン種子由来の抗菌性ラディシン遺伝子のクローン化と遺伝子組換えイネの作出. 富山県農技セ研報, 19 (別), 1-6.
 14. Terras, F.R.G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S. B., Torrekens, S., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A. and Broekaert, W. F. (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from Radish: Their role in host defense. *Plant Cell*, 7, 573-588.
 15. Terras, F.R.G., Schoofs, H. M. E., De Bolle, M. F. C., Leuven, F. V., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A. and Broekaert, W. F. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from Radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.*, 267, 15301-15309.
 16. Terras, F. R. G., Torrekens, S., Van Leuven, F., Osborn, R.W., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A. and Broekaert, W. F. (1993) A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS. Lett.*, 316, 233-240.
 17. Thomma, B.P., Cammue, B.P.A. and Thevissen, K. (2002) Plant defensins. *Planta*, 216, 193-202.

Antimicrobial Activity of *E.coli*-expressed Defensin (Bj-AFP1) isolated from *Brassica juncea*.

Tadaharu Hibi ^{*1}, Takashi Tochihara ^{*1}, Yoshiyuki Sagehashi ^{*1}, Kouichi Mori ^{*1,2},
Jouji Moriwaki ^{*1}, Osamu Yatou ^{*1}, Kazuyuki Hirayae ^{*1} and Motoshige Kawata ^{*3}.

Summary

Antimicrobial activity of *E. coli*-expressed *Brassica juncea* defensin protein (Bj-AFP1) was evaluated against plant pathogens. The Bj-AFP1 was obtained by the *E. coli* gene expression system of Amersham using pGEX plasmid or the system of Invitrogen using pLEX plasmid with slight modification. Pathogens were cultured in 96 well microplates with Bj-AFP1 protein and I.C.50 values of Bj-AFP1 were calculated from O.D.595 using the Sunrise microplate reader (Tecan)

The Bj-AFP1 protein (expressed by pGEX system) inhibited the growth of *Pyricularia oryzae* and *Fusarium graminearum* with an I.C.50 value of 0.63 and 1.31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively. In the other pathogens, *Xanthomonas campestris*, *Burkholderia plantarii*, *B. glumae*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicora* and *X. campestris* pv. *campestris*, the I.C.50 values of Bj-AFP1 (expressed by pLEX system) were presumed above 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

The inhibitory effect of Bj-AFP1 against rice blast fungi, *P. oryzae*, was not less than those of Kasugamycin and Ferimzone. The I.C.50 values of Bj-AFP1 (expressed by pLEX system) against nine *P. oryzae* strains of different pathogenic races were 2.01 - 6.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

These results suggested that Bj-AFP1 might be a fungicide against the rice blast fungus, *P. oryzae*, and the barley scab fungus, *F. graminearum*. It was also suggested that genetic transformation of a crop with the Bj-AFP1 gene could confer the broad disease resistance on them.

Received 4 January 2007 ; Accepted 27 March 2007

*1 Hokuriku Research Center, National Agricultural Research Center

*2 Plant Genome Center

*3 National Institute of Crop Science