

Refolding Procedure of Antifungal AFP1 Protein, a Defensin of Brassicaceae Plants, from Inclusion Bodies Expressed in *Escherichia coli*

Yoshiyuki Sagehashi*¹, Takashi Tochiara*², Motoshige Kawata*³,
Hiroaki Takaku*⁴ and Osamu Yatou*⁵

Summary

A defensin AFP1 (Antifungal peptide-1) from Brassicaceae plants exhibited antifungal activity against pathogenic filamentous fungi, such as a rice pathogen *Magnaporthe oryzae*. Although AFP1 from seeds exhibited high antifungal activity against *M. oryzae*, it is hard to collect AFP1 from seeds for large scale. We conducted the heterologous production of AFP1 using the *Escherichia coli* expression system, which is an economical and fast procedure for producing AFP1. Because antimicrobial activity of the defensin inhibited the growth of the host *E. coli*, we tried to product the protein in inclusion bodies in the host. However, the resultant protein showed no antifungal activity due to the incorrect tertiary structure. The correct tertiary structure in AFP1 is kept by the four disulfide bonds inside the AFP1 molecule. In this study, arginine and glutathione as refolding enhancers could recover the tertiary structure from the inclusion bodies. Finally, using anion-exchange chromatography, we separated successfully the AFP1 protein exhibiting antifungal activity as native AFP1.

*1 NARO Hokkaido Agricultural Research Center

*2 Rakuno Gakuen University

*3 NARO Institute of Crop Science

*4 Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

*5 Hokuriku Research Center, NARO Agricultural Research Center

として利用可能性を持つものと考えられる。

広い抗糸状菌活性を有する AFP1 蛋白質は、従来の抗菌剤とは異なる作用機序を持つと考えられ⁽²⁶⁾、農業および医薬分野における新規の抗菌成分としての幅広い利用が期待できる。そのためには、より効

率的かつ低コストでの AFP1 蛋白質の生産方法の確立と、より詳細な AFP1 蛋白質の特性解析が重要となる。今後は、本報告で用いた以外の蛋白質生産方法も検討してさらに低コストの大量生産方法を確立する必要がある。

V. 摘要

アブラナ科植物由来のディフェンシン AFP1 蛋白質の、大腸菌を宿主とした封入体を経る蛋白質生産方法を検討するとともに、AFP1 蛋白質の立体構造の再構成による抗菌活性の再生を試みた。変性剤により可溶化した AFP1 蛋白質は、変性剤の除去時にアルギニンとグルタチオンを適量加え立体構造の再構成を促進させることで、高い効率で回収する

ことができた。また、回収した複数の立体構造の混在した AFP1 蛋白質からイオン交換クロマトグラフィーにて天然物と同一の抗菌活性強度を持つ活性型 AFP1 蛋白質を分離することに成功した。本報で得られた AFP1 蛋白質はイネいもち病菌およびカンジダに植物から抽出された AFP1 蛋白質と同様の抗菌活性を示した。

謝辞

本研究を行うに当たり、AFP1 蛋白質発現株並びに精製に関する情報を作物研究所大島正弘博士と高島新一郎氏に御提供いただいた。また、本研究は生

物系産業創出のための異分野融合研究支援事業の支援により行われた。ここに記し厚く御礼を申し上げる。

引用文献

- 1) Arondel, V., Kader, J.C. (1990) Lipid transfer in plants. *Experientia*, 46, 579-585.
- 2) Broekaert, W.F., Terras, F.R., Cammue, B.P., Vanderleyden, J. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.*, 69, 55-59.
- 3) Broekaert, W.F., Terras, F.R., Cammue, B.P., Osborn, R.W. (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.*, 108, 1353-1358.
- 4) Cammue, B.P., Thevissen, K., Hendriks, M., Eggermon, K., Goderis, I.J., Proost, P., Van Damme, J., Osborn, R.W., Guerbet, F., Kader, J.C. (1995) A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.*, 109, 445-455.
- 5) Carvalho Ade, O., Gomes, V.M. (2009) Plant defensins—prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30, 1007-1020.
- 6) Castro, M.S., Fontes, W. (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept. Lett.*, 12, 13-18.
- 7) Craik, D.J. (2010) Discovery and applications of the plant cyclotides. *Toxicon*, 56, 1092-1102.
- 8) Daly, N.L., Rosengren, K.J., Craik, D.J. (2009) Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 61, 918-930.
- 9) De Samblanx, G.W., Goderis, I.J., Thevissen, K., Raemaekers, R., Fant, F., Borremans, F., Acland, D.P., Osborn, R.W., Patel, S., Broekaert, W.F. (1997) Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. *J. Biol. Chem.*, 272, 1171-1179.
- 10) Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W., Borremans, F. (1998) Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal