

Production of the recombinant rice thionin peptide Osth1 in *Escherichia coli* and assessment of its antimicrobial activity

Yoshiyuki Sagehashi^{*1}, Hiroaki Takaku^{*2} and Osamu Yatou^{*3}

Summary

Thionins are small, basic, and cysteine-rich antimicrobial plant peptides. We produced the rice thionin Osth1 peptide that contains three disulfide bounds, and has a molecular weight of approximately 5 kDa, as a recombinant peptide in *Escherichia coli*. Recombinant Osth1 exhibited antifungal activity against the rice blast pathogen *Magnaporthe oryzae*, the human pathogen *Candida albicans* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, although its antimicrobial activity against the rice pathogen bacteria was less pronounced than that against fungi. These results suggest that recombinant Osth1 could act as a potent antifungal agent. To our knowledge, this is the first report of a system of rice thionin Osth1 production in *E. coli*, and the subsequent evaluation of its antimicrobial activity.

*1 NARO Tohoku Agricultural Research Center

*2 Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

*3 NARO Agricultural Research Center

ものの細菌病に犯されることを報告し、Osthi1蛋白質が細菌に効果がない可能性について考察している⁽¹¹⁾。本研究ではOsthi1蛋白質の大腸菌を宿主とした生産に成功し、Osthi1蛋白質が糸状菌や酵母の真菌類に抗菌活性を有し、その一方で細菌に対しては抗菌活性を示さないことを初めて明らかにした。このことは、Iwaiらが提示したOsthi1蛋白質の抗菌スペクトルの疑問に答えるものであった。

糸状菌に対する抗菌性蛋白質としてはディフェンシンの報告例が多く^(18,30)、イネでも同様の分子が働いていると考えられるが、Osthi1蛋白質も糸状菌であるイネいもち病菌に対して抗いもち病菌の薬剤成分であるカスガマイシンと同じレベルの抗菌活性を有していた。加えて、ヒト病原菌であるカンジダに抗菌活性を示したことは、Osthi1蛋白質の利用可能性が農業分野に限定されず医薬分野にも広がることを示すものであり、Osthi1蛋白質は抗菌剤として高い潜在的能力を有すると考えられた。

これまでの研究から、チオニンの抗菌性のメカニズムとして、リン脂質が多く存在し陰性にチャージしている細胞膜に静電相互作用により結合し、細胞膜の不安定化を引き起こすと考えられている。このため、カルシウムイオンやカリウムイオンの流入・流出の制御バランスの崩壊、蛋白質や核酸、他の細胞構成成分の流出が引き起こされる⁽³²⁾。また、一部のチオニンには微生物の蛋白質合成を阻害する効果があることも報告されている⁽¹⁰⁾。しかし、他のチオニンの抗菌作用のメカニズムの詳細については明らかになっていないことが多い。Osthi1蛋白質が糸状菌および酵母に対して抗菌活性を有したことから、真菌類に共通する分子に結合して作用する可能性が考えられる。加えてOsthi1蛋白質の等電点は8.77と予想されることから中性条件下では正電荷を帯びており、陰性にチャージしている分子に作用する可能性が高い。今後Osthi1蛋白質と結合する分子をスクリーニングする実験系を構築できれば、Osthi1蛋白質の抗菌作用メカニズムの一端を明らかにできるかもしれない。

チオニンの持つ抗菌特性を利用した取り組みも進められている。その一例として、チオニン遺伝子を発現させた組換え植物において糸状菌もしくは細菌への抵抗性が向上した報告がある。オオムギ由来のチオニン遺伝子を高発現させたタバコは、細菌 *Pseudomonas syringae* に抵抗性を示し⁽⁴⁾、シロイヌナズナのチオニン *Thi2.1* 遺伝子を高発現させたシロイヌナズナは、糸状菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiolariae* に抵抗性を示した⁽⁸⁾。また、*Thi2.1* 遺伝子をトマトに導入して糸状菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* と細菌 *Ralstonia solanacearum* に対する抵抗性を付与した報告例もある⁽⁵⁾。加えて、イネではエンバク由来の *Asthi1* の高発現によりイネ苗立枯細菌病の原因菌 *Burkholderia plantarii* およびイネもみ枯細菌病の原因菌 *Burkholderia glumae* に対する抵抗性が付与される⁽¹¹⁾。さらに、*Osthi7* をイネで高発現させることで、ネコブセンチュウ *Meloidogyne graminicola* および糸状菌 *Pythium graminicola* への抵抗性が向上することが報告されている⁽¹⁴⁾。Osthi1蛋白質と構造的に類似したディフェンシン蛋白質をイネで高発現させ、イネいもち病菌等の糸状菌病に対する抵抗性を付与した例も報告されていることから^(12,13,15,16)、それらのディフェンシン類と同程度の抗菌活性強度を有するOsthi1蛋白質をコードする *Osthi1* にも、糸状菌病抵抗性を付与する遺伝子としての利用の可能性があると考えられる。

本研究では、イネチオニンOsthi1の蛋白質レベルでの機能解析を目的として、大腸菌を宿主としたOsthi1蛋白質生産系を開発した。Osthi1はイネの最重要病害であるイネいもち病のイネいもち病菌、加えてヒト病原性真菌であるカンジダに抗菌活性を有することから、農薬および医薬分野における抗菌成分としての幅広い利用可能性が明らかとなった。抗菌成分としての将来的な利用のためには、今後は、より効率かつ低コストでのOsthi1蛋白質の生産方法の確立とより詳細なOsthi1蛋白質の特性解析が重要となる。

V 摘要

チオニンは塩基性でシステインに富む低分子の抗菌性蛋白質である。我々は、およそ5 kDaの分子

量で分子内に3つのジスルフィド結合を有するイネのチオニン蛋白質Osthi1を、大腸菌を宿主として発

現・精製するシステムを開発した。組換えOsthi1蛋白質は、イネいもち病菌、ヒト病原菌のカンジダ、出芽酵母と真菌類に対して抗菌活性を示した。その一方で、大腸菌、イネ白葉枯病菌、イネ褐条病菌の細菌類に対しては効果が見られなかった。すなわ

ち、Osthi1蛋白質は有力な抗真菌剤である可能性が考えられる。本報告はイネのチオニン蛋白質の大腸菌を宿主とした生産方法を確立し、抗菌活性について評価した最初のものである。

謝 辞

本研究を行うにあたり、イネいもち病菌を国立研究開発法人農業生物資源研究所西村麻里江博士より御提供いただいた。また、新潟薬科大学応用生命科

学研究科小黒芳史博士と中央農業総合研究センター池田由美氏には技術的なサポートをいただいた。ここに記し厚く御礼を申し上げる。

引用文献

1. Abbas, A., Plattner, S., Shah, K.H. and Bohlmann, H. (2013) Comparison of periplasmic and intracellular expression of *Arabidopsis* thionin proproteins in *E. coli*. *Biotechnol. Lett.*, 35, 1085-1091.
2. Bohlman, H. and Apel, K. (1991) Thionins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 227-240.
3. Broekaert, W.F., Terras, F.R., Cammue, B.P. and Vanderleyden, J. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.*, 69, 55-59.
4. Carmona, M.J., Molina, A., Fernandez, J.A., Lopez-Fando, J.J. and Garcia-Olmedo, F. (1993) Expression of the alpha-thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant J.*, 3, 457-462.
5. Chan, Y.L., Prasad, V., Sanjaya, K., Chen, K.H., Liu, P.C. Chan, M.T. and Cheng, C.P. (2005) Transgenic tomato plants expressing an *Arabidopsis* thionin (Thi2.1) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack. *Planta*, 22, 386-393.
6. Chen, X. and Ronald, P.C. (2011) Innate immunity in rice. *Trends Plant Sci.*, 16, 451-459.
7. Durrant, W. and Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 185-209.
8. Epple, P., Apel, K. and Bohlmann, H. (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*, 9, 509-520.
9. Fritig, B., Heitz, T. and Legrand, M. (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.*, 10, 16-22.
10. Garcia-Olmedo, F., Carbonero, P., Hernandez-Lucas, C., Paz-Ares, J., Ponz, F., Vicente, O., Vicente, O. and Sierra, J.M. (1983) Inhibition of eukaryotic cell-free protein synthesis by thionins from wheat endosperm. *Biochim. Biophys. Acta*, 740, 52-56.
11. Iwai, T., Kaku, H., Honkura, S., Ochiai, H., Sasaki, T. and Ohashi, Y. (2002) Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 15, 515-521.
12. Jha, S., Tank, H.G., Prasad, B.D. and Chattoo, B.B. (2009) Expression of *Dm-AMP1* in rice confers resistance to *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. *Transgenic Res.*, 18, 59-69.
13. Jha, S. and Chattoo, B.B. (2010) Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. *Transgenic Res.*, 19, 373-384.
14. Ji, H., Gheysen, G., Ullah, C., Verbeek, R., Shang, C., De Vleeschauwer, D., Hofte, M. and Kyndt, T. (2015) The role of thionins in rice defence against root pathogens. *Mol. Plant Pathol.*, DOI: 10. 1111/mpp. 12246.
15. 川田元滋・中島敏彦・松村葉子・及川鉄男・黒田 稔 (2003) アブラナ科野菜がもつ抗菌タンパク質 デイフェンシン遺伝子群の解析。農業および園芸, 78 (4), 470-476.
16. Kawata, M., Nakajima, T., Yamamoto, T., Mori, K.,