

イネいもち病菌およびカンジダに抗菌活性を有する ディフェンシン蛋白質のカラシナ種子からの単離

提箸祥幸*1・栃原孝志*2・高久洋暁*3・矢頭 治*4

目 次

I はしがき	13	III 結 果	16
II 材料および方法	14	1. カラシナ種子からディフェンシン蛋白質 の単離	16
1. 抗菌活性を有する蛋白質のカラシナ種子 からの単離・精製	14	2. 単離した蛋白質の抗菌活性	16
2. 質量分析	14	3. カラシナ種子からディフェンシン遺伝子 の取得	16
3. Tricine SDS-PAGE	14	IV 考 察	19
4. 蛋白質のN末端配列解析	15	V 摘 要	21
5. 抗菌活性試験に供した微生物	15	謝 辞	22
6. 抗菌活性測定方法	15	引用文献	22
7. cDNAクローニング	15	Summary	24
8. 塩基配列の解析	16		

I. はしがき

抗菌薬に対する耐性菌の出現と蔓延は世界的な問題となっている。1928年のフレミングの発見によるペニシリンの出現以降、人類は抗菌薬による多大な恩恵を受けてきた。抗菌薬は適正に使用されれば耐性菌が出現する可能性は極めて低いが、抗菌薬の乱用に起因する耐性菌の出現が報告されてきている。そこで、これまでの抗菌剤と作用機序の異なる新たな抗菌薬の開発が期待されている。

植物には自身を病原菌から守るためのシステムが備わっている。病原菌の感染に応答して素早く発現が誘導される蛋白質としてPR (pathogenesis-related) 蛋白質がある^(4,6)。PR蛋白質は、キチナーゼやグルカナーゼなどの分解酵素、チオニンやディフェンシンなどの抗菌性蛋白質を含み、生物活性やアミノ酸配列から現在では少なくとも17のファミ

リーに分けられている⁽¹⁸⁾。それらのなかにディフェンシンで構成されるPR12ファミリーがある⁽²⁴⁾。

植物ディフェンシンは植物が産生する抗菌性蛋白質の一種であり、45-54アミノ酸残基からなるシステインに富む塩基性蛋白質で、多くの植物種での報告がある^(2,7,8,10,14)。植物ディフェンシンの間でシステイン残基の位置は高度に保存されており、システイン残基間で形成される分子内ジスルフィド結合により保持される立体構造が抗菌活性の発揮に重要であるとされている⁽⁵⁾。様々な植物種から抗菌性蛋白質が単離されているが、アブラナ科植物は強い活性を有する抗菌性蛋白質を持つことが知られている⁽²⁾。このうち、カラシナは独特の辛味を持つアブラナ科の植物で、日本でも古くから食用として栽培され、種子は和ガラシの材料として、中国では全草

平成28年3月15日受付 平成29年1月24日受理

*1 現 北海道農業研究センター

*2 現 酪農学園大学

*3 新潟薬科大学

*4 中央農業研究センター作物開発研究領域

や種子が薬用として利用されている⁽⁹⁾。また、植物の種子蛋白質は種子を微生物から守る重要な働きを有しているとされる⁽¹¹⁾。このように、食経験があり薬用として利用されてきたカラシナ種子は、抗菌性を有する物質を単離する材料として適していると考えられる。

我々は、これまでにカラシナの種子からディフェンシンAFP1蛋白質およびAFP1遺伝子を単離し、抗菌活性に関する蛋白質レベルでの詳細な解析を行ってきた⁽¹⁵⁾。AFP1はイネいもち病菌を含む複数

のイネ病原糸状菌とヒト病原菌であるカンジダに抗菌活性を示すことを確認している^(13,15,16)。植物病原菌でないカンジダに植物由来の抗菌性蛋白質であるディフェンシンが抗菌活性を有することは、ディフェンシンの利用可能性の広さを示すものである。そこで本研究では、植物病害防除だけでなくヒトの治療薬としての応用を期して、カンジダに対する抗菌活性を指標として、カラシナ種子に存在するAFP1以外のディフェンシン蛋白質の単離と遺伝子の取得を行ったので報告する。

II 材料および方法

1. 抗菌活性を有する蛋白質のカラシナ種子からの単離・精製

カラシナ種子（品種セリフォン，サカタのタネ）からのディフェンシン蛋白質の単離は，Sagehashiらの方法⁽¹⁵⁾に従い，一部を改変して行った。400 gのカラシナ種子を粉碎し，1,600 mlの抽出バッファ（10 mM Na₂ HPO₄，15 mM NaH₂ PO₄，100 mM KCl，2 mM EDTA）に4錠のProtease inhibitor cocktail tablets（Roche Diagnostics：Cat. No. 1 697 498）を加え，1時間浸漬した。遠心分離（10,000 g，30分）にて残渣を除いた後，80℃で15分処理し，変性し不溶化した蛋白質を含む沈殿を再度遠心分離（10,000 g，30分）にて除去した。得られた上清に対して，硫酸アンモニウムを用いて20℃における飽和パーセントが30%-40%の沈殿画分を遠心分離（10,000 g，30分）にて回収した。沈殿を100 mlの50 mM Tris-HCl（pH9.0）に溶解後，50 mM Tris-HCl（pH9.0）で平衡化したHiTrap Q FFカラム（GE Healthcare，5 ml）に通液し，カラムを通過する蛋白質画分を280 nmのUV波長でモニタリングしながら回収した。回収した画分を透析により50 mM MES（pH6.0）で平衡化後，同様に50 mM MES（pH6.0）で平衡化したHiTrap CM FFカラム（GE Healthcare，5 ml）を用いて分画した。カラムに吸着し，0から0.5 M NaClを含む50 mM MES（pH6.0）溶液の通液により溶出される蛋白質画分を280 nmのUV波長でモニタリングしながら回収した。カラム処理はAKTA FPLC（GE Healthcare）を用い，流速は2 ml/分とした。HiTrap CM FFカラム処理でピークとして得られた蛋白質画分を

COSMOSIL/COSMOGELカラム（ナカライ）を用いて逆相クロマトグラフィーに供した。0.5 ml/分の流速でバッファA（2% acetonitrile，0.1% TFA）を24分間，10%-60%のバッファB（80% acetonitrile，0.1% TFA）を150分間以上流した。得られた蛋白質を含む試料は，Microcon YM-3 スピンカラム（Amicon）を用いて限外ろ過（14,000 × g，4℃）を行い，超純水に置換し，濃縮した。蛋白質の精製過程で得られる全ての画分の試料は，その一部をカンジダ *Candida albicans* CAI4 に対する生育阻害効果を抗菌活性としてマイクロプレートで評価し，精製を進めた。*C. albicans* CAI4 は千葉大学真菌医学センターから分譲を受けた。このときの培地組成および供試微生物の調製方法は，後述のII-6の抗菌活性測定方法に従った。

2. 質量分析

ディフェンシン蛋白質の質量分析にはBruker Autoflex III time-of-flight mass spectrometer（Bruker Daltonics）を用いた。全てのサンプルはpositive ion reflector modeにて測定を行った。1 μl（0.15-0.30 μg/μl）の精製ディフェンシン蛋白質とマトリックスである20 mg/mlのシナピン酸1 μlをサンプルプレート上で混合・乾固させ，共結晶を形成させた。337 nmのnitrogen laserを照射し，イオン化したサンプルに20 kVの電圧をかけ加速させ，その飛行時間の差から質量を測定した。

3. Tricine SDS-PAGE

Tricine SDS-PAGEは，SchaggerとJagowの方法⁽¹⁷⁾

に従い、2-メルカプトエタノールによる還元条件にて15%のポリアクリルアミドゲルを用いて行った。

4. 蛋白質のN末端配列解析

1) 試料の調製

蛋白質試料 20 μ l について Tricine SDS-PAGE を行い、泳動後のゲルを PVDF 膜 (Bio-Rad) に 150 mA で 60 分間転写し、超純水で洗浄後、一晩クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色した。メタノールに短時間浸して CBB 染色液の青色を適度に抜いた後、風乾し蛋白質のバンド部分を切り出した。

2) デブロッキング酵素処理

切り出した PVDF 膜をサンプルチューブに入れ、1 ml の 60% メタノールで 2 回、1 ml の 90% メタノールで 1 回振とう洗浄を行った。0.5% (w/V) の polyvinylpyrrolidone (PVP) K-30 を含む 100 mM 酢酸溶液 1 ml に 37°C で 30 分の処理をした。PVDF 膜を蒸留水で 10 回攪拌洗浄後、メタノールで湿らせ酵素消化反応を行った。酵素消化反応は 25 μ l の Pfu Polyglutamate Aminopeptidase (5 mU)、150 μ l の buffer、600 μ l の蒸留水を混合したものと一緒試料を転写した PVDF 膜を 50°C で 5 時間処理した。PVDF 膜を蒸留水で 3 回攪拌洗浄した後、風乾した。

3) N末端配列解析

デブロッキング酵素処理を終えた試料を転写した PVDF 膜を (株) 北海道システムサイエンス社に送付し、N末端配列解析に供した。

5. 抗菌活性試験に供した微生物

単離したカラシナディフェンシンの抗菌活性測定に、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* Guy11、ヒト病原性真菌であるカンジダ *C. albicans* CAI4 を使用した。*M. oryzae* Guy11 は農研機構本部企画調整部西村麻里江博士から分譲を受けた。

6. 抗菌活性測定方法

抗菌活性の測定は safire² (Tecan) を使用し、マイクロプレートを用いた小スケール培養法にて行った^(3,13,15)。方法を以下に示す。使用するディフェンシン蛋白質は、活性測定前に 90°C で 10 分間加熱により殺菌処理を行ったものを試験に供した。

1) イネいもち病菌の抗菌活性測定方法

抗菌活性測定培地は 2 倍に希釈した potato dextrose broth (Difco) を用いた。培地で 2×10^4 孢子/ml 濃度に調製した菌液 80 μ l を 96 穴マイクロプレート (平底) のウェルに加え、定められた濃度のディフェンシン蛋白質溶液を 20 μ l 添加し、25°C で静置培養を行った。対照区はディフェンシン蛋白質溶液の代わりに滅菌水 20 μ l を加えた。マイクロプレートリーダーで各ウェルの 595 nm における吸光度を 1 時間毎に測定し、イネいもち病菌の生育量を推定した。96 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 (IC₅₀ 値) を Dose-Response Curve により算出した。

2) カンジダの抗菌活性測定方法

抗菌活性測定培地は 2 倍に希釈した potato dextrose broth (Difco) を用いた。培地で OD₆₀₀ が 0.01 となるように調製した菌液 80 μ l を 96 穴マイクロプレート (丸底) のウェルに加え、定められた濃度のディフェンシン蛋白質溶液を 20 μ l 添加し、同時にウリジン (和光純薬) を 25 μ g/ml になるように添加し、30°C で静置培養を行った。対照区はディフェンシン蛋白質溶液の代わりに滅菌水 20 μ l を加えた。吸光度測定時に毎回 30 秒の攪拌を行った。マイクロプレートリーダーで各ウェルの 600 nm における吸光度を 30 分毎に測定し、カンジダの生育量を推定した。12 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 (IC₅₀ 値) を Dose-Response Curve により算出した。

7. cDNA クローニング

全 RNA はカラシナ種子から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。cDNA は 5 μ g の全 RNA と Oligo (dT) primer を用いて、Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare) を使用して合成した。ディフェンシンの cDNA は、5'-ATGGCTAAGTYTGCTTCYATC-3' (Y=C or T) を 5' 側⁽¹⁹⁾、NotI-(dT)₁₈ primer を 3' 側のそれぞれのプライマーとして PCR による増幅を行った。増幅された PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離し、ゲルから SUPREC-EZ (TaKaRa) を用いて純化し、pT7Blue ベクター (Novagen) にクローニングした。

8. 塩基配列の解析

pT7Blueベクターにクローニングしたディフェンシン遺伝子は、GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (BECKMAN

COULTER)を用いたPCR反応の後、遺伝子解析システム (CEQ™ 8000 Genetic Analysis System :BECKMAN COULTER)により塩基配列の解析を行った。

III 結果

1. カラシナ種子からのディフェンシン蛋白質の単離

我々はこれまでにカラシナ種子からAFP1を単離したことを報告している⁽¹⁵⁾。AFP1単離の際にはイネいもち病菌に対する抗菌活性をディフェンシン蛋白質単離の指標としたが、本研究では植物防除だけでなくヒトの治療薬としての応用を期して、ヒト病原菌のカンジダを抗菌活性の指標とした。全体の精製工程は、AFP1単離の報告⁽¹⁵⁾に若干の変更を加えた(図1A)。80℃の熱処理を工程の初期の段階で行い、カンジダに対する抗菌活性の結果を参考に硫酸アンモニウム沈殿での回収画分を30%~40%飽和画分に絞った。以降の工程はAFP1単離の報告⁽¹⁵⁾に従った。陰イオン交換クロマトグラフィーではカラムに吸着せずに通過する画分に抗菌活性が、陽イオン交換クロマトグラフィーにおいてはカラムに吸着し塩化ナトリウム溶液の通液により溶出される画分に抗菌活性が観察されたので回収した。逆相クロマトグラフィーにより分離される画分について質量分析に供すると、ディフェンシンAFP1の質量数を示す蛋白質を含む3種の蛋白質のピークが観察された(図1B)。この画分を再度逆相クロマトグラフィーに供し、試料の画分をより細かく行うことで、混在していた3種の蛋白質を単一の蛋白質として分離することに成功した(図1C, D, E)。

このように、カンジダに対する抗菌活性を指標に、カラム処理を中心とした蛋白質精製の工程を経て、カラシナ種子から3種の蛋白質を単離した。それぞれの蛋白質について質量分析を行ったところ、5628, 5669, 5711であった。この3種の蛋白質は逆相クロマトグラフィーにおいて5628, 5669, 5711の順に溶出された。5669の質量数を持つ蛋白質は前報に示したようにAFP1であった⁽¹⁵⁾。AFP1以外の2つの蛋白質は質量数が5711と5628で、還元剤DTT処理によって分子量が処理前と比較して8増加したことから、どちらもジスルフィド結合

を4つ分子内に形成するディフェンシン蛋白質であると考えられた。AFP1以外のディフェンシン蛋白質を、Bj-AFP2(質量数:5711)とBj-AFP3(質量数:5628)とした(表1)。Bj-AFP3のN末端配列解析の結果、N末端からのアミノ酸配列は「KLXEKPSGTW SGVXG NSNAA (Xはシステインの可能性が高い)」であった。また、N末端配列解析の際にBj-AFP3のデブロッキング処理をしており、N末端はピログルタミン化したQ(グルタミン)であることが予想された。

2. 単離した蛋白質の抗菌活性

Bj-AFP2とBj-AFP3のイネいもち病菌およびカンジダに対する抗菌活性を測定した(表2)。Bj-AFP2はイネいもち病菌に対して0.8 µg/ml、カンジダに対して1.4 µg/ml、Bj-AFP3はイネいもち病菌に対して1.0 µg/ml、カンジダに対して3.6 µg/mlのIC₅₀値を示し、両微生物に対して抗菌活性を有していた。AFP1のカンジダに対する抗菌活性は2.5 µg/mlであった。また、AFP1のイネいもち病菌に対する抗菌活性はすでに報告したとおり2.0 µg/mlであった⁽¹⁵⁾。以上のことから、カラシナ種子内にはイネいもち病菌およびカンジダに抗菌活性を示す3種のディフェンシン蛋白質が存在すると考えられた。

3. カラシナ種子からディフェンシン遺伝子の取得

カラシナ種子からRNAを抽出しディフェンシン蛋白質をコードする遺伝子の取得を試みた。Solisらの方法⁽¹⁹⁾に従い、種々のディフェンシン遺伝子のN末端およびC末端に共通する配列情報を元にプライマーを設計し、カラシナ種子から3種のディフェンシン遺伝子を取得した。遺伝子配列から予想されるディフェンシン蛋白質のアミノ酸配列を図2に示す。3種のうちの1つはAFP1蛋白質をコードする遺伝子AFP1であった。残りの2つについて、Def2

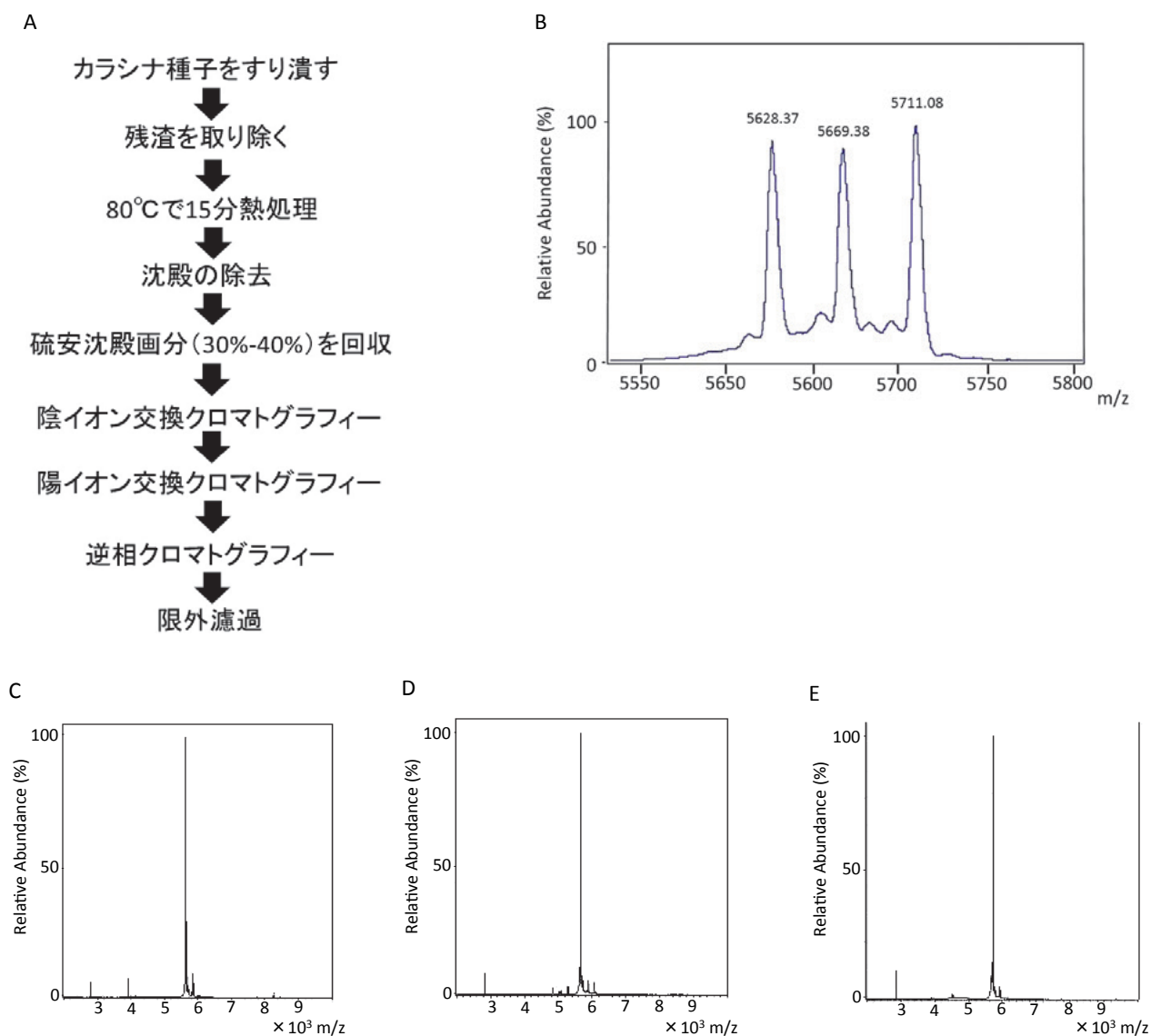


図1 カラシナ種子からのディフェンシン蛋白質の単離

注) A: カラシナ種子からのディフェンシン蛋白質精製工程の概要。

B: 逆相クロマトグラフィーにより分離され、抗菌活性が確認された画分の質量分析のチャート。図中の数値は質量数を表す。

C: 単離した質量数 5628 の蛋白質の質量分析のチャート。

D: 単離した質量数 5669 の蛋白質の質量分析のチャート。

E: 単離した質量数 5711 の蛋白質の質量分析のチャート。

と *Def3* とした。 *Def2* がコードする *Def2* は AFP1 蛋白質とは 27 番目のアミノ酸 1ヶ所が異なり、 *Def3* がコードする *Def3* は AFP1 と 6, 18, 27 番目の 3ヶ所のアミノ酸が異なっていた。 *Def2* は *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* clone KBrB026G01 (アクセッション番号 AC189295) と塩基配列が一致し (表 3), アミノ酸配列では *Brassica napus*, *Brassica oleracea* 等の有する蛋白質と一致した他, 多くのアブラナ科

表 1 カラシナ種子より単離した 3 種のディフェンシン蛋白質と質量数

ディフェンシン蛋白質	質量数
Bj-AFP2	5711.08
AFP1	5669.38
Bj-AFP3	5628.37

注) 質量数 5669.38 の蛋白質を AFP1, 5711.08 の蛋白質を Bj-AFP2, 5628.37 の蛋白質を Bj-AFP3 とした。

植物のディフェンシン蛋白質と高い相同性を示した (表4). *Def-3* は, DNA レベルでは *B. napus* のディフェンシン *def2* (アクセッション番号 KC967201) および *Brassica juncea* のディフェンシン *AFP1* (アクセッション番号 AB537492) と最も高い相同性

(91%) を示し (表5), アミノ酸配列では *B. napus*, *B. oleracea*, *B. rapa* のディフェンシン蛋白質と最高で 94% の相同性を示した (表6). *Def-3* は, これまで報告のない新規のアミノ酸配列を有するディフェンシン蛋白質をコードする遺伝子であった.

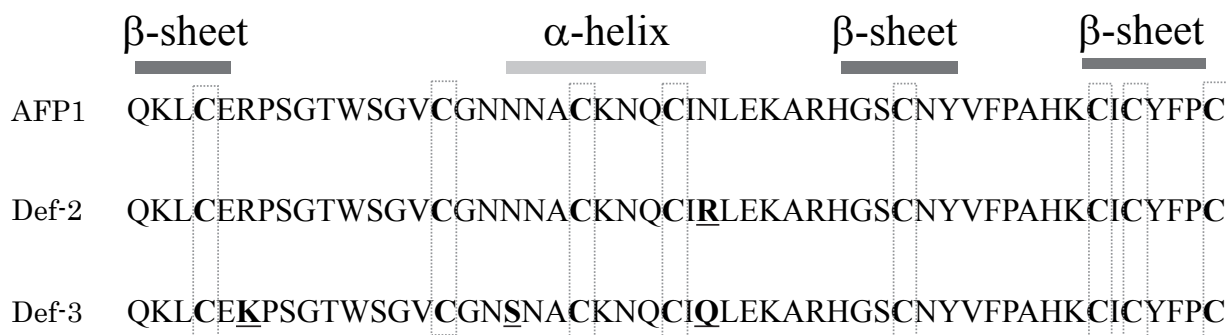


図2 カラシナ種子から取得した3種のディフェンシン遺伝子がコードするアミノ酸配列.

注) *Def-2*, *Def-3* の下線のアミノ酸は *AFP1* のアミノ酸と異なるものを示す.
点線で囲った部分は保存されているシステイン残基を示す.

表2 カラシナ種子より単離したディフェンシン蛋白質の抗菌活性

ディフェンシン蛋白質	イネいもち病菌 (<i>M. oryzae</i>)	カンジダ (<i>C. albicans</i>)
AFP1	2.0 (n=3)	2.5 (n=3)
Bj-AFP2	0.8 (n=1)	1.4 (n=2)
Bj-AFP3	1.0 (n=1)	3.6 (n=2)

注) 表中の数値は抗菌活性強度 IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) を表す. 括弧内の数値は測定の実験回数を示す.

表3 *Def-2* のDNA塩基配列情報を用いた相同性検索の結果

アクセッション番号	名称	Value	相同性(%)
AC189295	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> clone KBrB026G01	5e-81	100
HQ436486	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italic</i> downy mildew resistance-related protein DMR1 mRNA	1e-78	99
DQ979838	<i>Raphanus sativus</i> antifungal <i>rafp2</i> gene	7e-62	94
U18556	<i>Raphanus sativus</i> antifungal protein 2 preprotein (Rs-AFP2) mRNA	7e-62	94
AB683153	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> BoT5 gene for thionin	7e-62	98
DQ191752	<i>Brassica juncea</i> defensin gene	4e-57	93
DQ191751	<i>Brassica juncea</i> defensin mRNA	4e-57	93
KC967201	<i>Brassica napus</i> defensin (<i>def2</i>) mRNA	4e-57	93
AB537492	<i>Brassica juncea</i> Bj-AFP1 mRNA for defensin	4e-57	93
DQ979837	<i>Raphanus sativus</i> antifungal <i>rafp1</i> gene	1e-54	92

注) *Def-2* のDNA塩基配列情報を用いて, DNA Data Bank of Japan のBLASTにより相同性検索を行った. Value は *Def-2* とそれぞれのDNA塩基配列の一致が偶然起こる期待値であり, 数値が小さいほど同一性が高いことを示す.

IV 考察

本研究では、抗菌成分としての将来的な利用を目的に、カラシナ種子からAFP1以外のディフェンシン蛋白質の取得を試みた。SagehashiらによるAFP1蛋白質単離はイネいもち病菌に対する抗菌活性を指標として進めたが⁽¹⁵⁾、本研究の蛋白質単離はヒト病原菌であるカンジダに対する抗菌活性を指標とした。大腸菌や酵母を宿主として生産した組換えAFP1がヒト病原菌のカンジダにも抗菌活性を示したとの報告があり^(13,16)、カンジダに対する抗菌活性を指標にすることは、新たなディフェンシン蛋白質を取得するために有効であると考えられた。カラ

シナからのディフェンシン蛋白質の精製は図1Aに示した手順で行った。カンジダに対する抗菌活性を指標とすることに加えて、熱に強いディフェンシン蛋白質の特性を利用するなど精製工程の効率化を図り、最終的にAFP1, Bj-AFP2, Bj-AFP3の3種類のディフェンシン蛋白質の単離に至った(表1)。

AFP1はこれまでに明らかにした質量数から特定できたが⁽¹⁵⁾、AFP1以外のBj-AFP2およびBj-AFP3については、本研究の蛋白質の質量数の情報のみでは全長のアミノ酸配列を予測することは難しい。しかし本研究では、カラシナ種子からAFP1以外

表4 Def-2のアミノ酸配列情報を用いた相同性検索の結果

アクセッション番号	名称	e-value	相同性(%)
A0A078C8S1	BnaC06g36530D protein, <i>Brassica napus</i>	2e-30	100
A0A0D3D0Z6	Uncharacterized protein, <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>	2e-30	100
D7KT75	Putative uncharacterized protein, <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	2e-30	100
A0A078DF43	BnaC06g22110D protein, <i>Brassica napus</i>	2e-30	100
Q94IN7	Defensin, <i>Brassica oleracea</i>	3e-30	100
A0A078BVB0	BnaA07g21570D protein, <i>Brassica napus</i>	3e-30	100
A0A0D3CWE8	Uncharacterized protein, <i>Brassica oleracea</i>	3e-30	100
J7ENB9	Downy mildew resistance-related protein DMR1, <i>Brassica oleracea</i>	3e-30	100
P30230	Defensin-like protein 2, <i>Raphanus sativus</i>	7e-30	100
A0A078FKT6	BnaC02g23400D protein, <i>Brassica napus</i>	1e-29	98

注) Def-2のアミノ酸配列情報を用いて、DNA Data Bank of JapanのBLASTにより相同性検索を行った。e-valueはDef-2とそれぞれのアミノ酸配列の一致が偶然起こる期待値であり、数値が小さいほど同一性が高いことを示す。

表5 Def-3のDNA塩基配列情報を用いた相同性検索の結果

アクセッション番号	名称	Value	相同性(%)
KC967201	<i>Brassica napus</i> defensin (def2) mRNA	6e-50	91
AB537492	<i>Brassica juncea</i> Bj-AFP1 mRNA for defensin	6e-50	91
DQ979838	<i>Raphanus sativus</i> antifungal raf2 gene	1e-47	91
DQ191752	<i>Brassica juncea</i> defensin gene	1e-47	91
DQ191751	<i>Brassica juncea</i> defensin mRNA	1e-47	91
U18556	<i>Raphanus sativus</i> antifungal protein 2 preprotein (Rs-AFP2) mRNA	1e-47	91
AC189295	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> clone KBrB026G01	1e-47	91
DQ979837	<i>Raphanus sativus</i> antifungal raf1 gene	4e-45	90
U18557	<i>Raphanus sativus</i> antifungal protein 1 preprotein (Rs-AFP1) mRNA	4e-45	90
HQ436486	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> downy mildew resistance-related protein DMR1 mRNA	4e-45	90

注) Def-3のDNA塩基配列情報を用いて、DNA Data Bank of JapanのBLASTにより相同性検索を行った。ValueはDef-3とそれぞれのDNA塩基配列の一致が偶然起こる期待値であり、数値が小さいほど同一性が高いことを示す。

表 6 Def-3 のアミノ酸配列情報を用いた相同性検索の結果

アクセッション番号	名称	e-value	相同性(%)
A0A078C8S1	BnaC06g36530D protein, <i>Brassica napus</i>	9e-29	94
A0A0D3D0Z6	Uncharacterized protein, <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>	9e-29	94
Q94IN7	Defensin, <i>Brassica oleracea</i>	1e-28	94
A0A078BVB0	BnaA07g21570D protein, <i>Brassica napus</i>	1e-28	94
A0A078DF43	BnaC06g22110D protein, <i>Brassica napus</i>	1e-28	94
A0A0D3CWE8	Uncharacterized protein, <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>	1e-28	94
J7ENB9	Downy mildew resistance-related protein DMR1, <i>Brassica oleracea</i>	1e-28	94
P30224	Defensin-like protein 13, <i>Arabidopsis thaliana</i>	1e-28	96
A0A078FKT6	BnaC02g23400D protein, <i>Brassica napus</i>	1e-28	94
A0A0D3AQW4	Uncharacterized protein, <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>	1e-28	94

注) Def-3 のアミノ酸配列情報を用いて, DNA Data Bank of Japan の BLAST により相同性検索を行った. e-value は Def-3 とそれぞれのアミノ酸配列の一致が偶然起こる期待値であり, 数値が小さいほど同一性が高いことを示す.

の 2 種のディフェンシン蛋白質をコードする遺伝子 *Def-2* および *Def-3* を取得したため, これら遺伝子の DNA 配列から推定されるアミノ酸配列を Bj-AFP2 および Bj-AFP3 の部分アミノ酸配列や質量数と比較することが可能となった. Bj-AFP3 の N 末端配列解析を行ったところ, 2 から 21 番目のアミノ酸配列の解読に成功し, N 末端のグルタミンと合わせて 21 アミノ酸が *Def-3* から推定されるアミノ酸配列と同一であった. ここで, カラシナ種子から単離した AFP1 を含む 3 種のディフェンシン蛋白質の質量数を検討してみると, 3 種のディフェンシン蛋白質の質量数は, カラシナ種子から単離した AFP1 遺伝子を含む 3 種のディフェンシン遺伝子がコードすると思われる蛋白質から予測される質量数と一致した. すなわち, Bj-AFP2 は *Def-2* がコードするアミノ酸配列, Bj-AFP3 は *Def-3* がコードするアミノ酸配列をそれぞれ有することが推定された. *Def-2* および *Def-3* を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に Bj-AFP2 (アクセッション番号 LC091393) および Bj-AFP3 (アクセッション番号 LC091394) として登録した.

取得したディフェンシン遺伝子の配列に注目すると, Bj-AFP2 (*Def-2*) は *Brassica rapa* のディフェンシンと遺伝子レベルで完全に一致した (表 3). カラシナ (*B. juncea*) は *B. rapa* と *Brassica nigra* との複 2 倍体種であることから⁽¹²⁾, Bj-AFP2 (*Def-2*) は *B. rapa* 由来の遺伝子の可能性が考えられた. しかし, Bj-AFP2 (*Def-2*) は *B. oleracea* のディフェンシ

ンとも高い相同性 (遺伝子: 99%, アミノ酸: 100%) を有したことから (表 3, 表 4), *Brassica* 属に広く存在する遺伝子である可能性も考えられた. 加えて, Bj-AFP2 (*Def-2*) はアミノ酸レベルでは *Arabidopsis lyrata* や *Raphanus sativus*, *Brassica napus* のディフェンシン蛋白質と同一であったことから (表 4), AFP1 蛋白質のように *Brassica* 属に限らずにアブラナ科植物に広く存在する蛋白質の可能性もある. その一方で, Bj-AFP3 (*Def-3*) は, *B. napus* のディフェンシン *def2* およびカラシナの AFP1 遺伝子と最も高い相同性 (91%) を示すものの, DNA およびアミノ酸レベルで完全に一致するものは存在せず (表 5, 表 6), これまでに報告のない新規の配列を有するディフェンシン遺伝子および蛋白質である可能性が高い. このことから, Bj-AFP3 (*Def-3*) は, 遺伝子およびアミノ酸配列について情報が少なく詳細が不明な *B. nigra* 由来の遺伝子である可能性, もしくは *B. juncea* 成立後の遺伝子変異により生じた可能性が考えられた.

本研究で単離したそれぞれのディフェンシン蛋白質の抗菌特性の多くは明らかになっていないが, AFP1 はこれまでに報告しているように, イネいもち病菌をはじめとしてイネ紋枯病菌 (*Rhizoctonia solani*), イネばか苗病菌 (*Gibberella fujikuroi*), イネごま葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*) の糸状菌に対して抗菌活性を有していた⁽¹⁵⁾. また, 本研究において初めて組換え蛋白質でない天然の AFP1 蛋白質がカンジダに対しても抗菌活性を有してい

ることを確認した(表2)。その一方で、AFP1蛋白質は細菌類についての抗菌活性は見出せなかった^(13, 15)。Bj-AFP2およびBj-AFP3についても、イネいもち病菌およびカンジダに対して抗菌活性を有していた(表2)。ディフェンシン蛋白質については、多くの植物種から様々なディフェンシン遺伝子および蛋白質が単離され解析がなされているが、基本的に植物由来のディフェンシン蛋白質が抗菌活性を有する場合はそのほとんどが真菌に対してである。真菌にディフェンシン蛋白質を作用させると、活性酸素産生や細胞膜の脱分極化が観察される^(1, 13)。ディフェンシン蛋白質の抗菌作用の標的分子に関して、ダイコン(*Raphanus sativus*)由来のRs-AFP2はグルコシルセラミド(GlcCer)^(21, 23)、ダリア(*Dahlia merckii*)由来のDm-AMP1はmannosyl-diinositolphosphorylceramide⁽²²⁾という細胞膜構成成分であることが報告されている。Rs-AFP2と高い相同性を有するAFP1に関してもGlcCerが標的分子であることが明らかになっている⁽¹³⁾。AFP1がGlcCerに結合後、細胞膜脱分極化、活性酸素の蓄積が誘導され、細胞死へと至る。すなわち、AFP1の抗菌活性には対象微生物が細胞膜構成成分としてGlcCerを有することが重要である。そのため、AFP1は糸状菌のみならずカンジダにも抗菌活性を示す。その一方で、GlcCerを持たない出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)や細菌類、GlcCer合成酵素欠損株のカンジダはAFP1に耐性を示す^(13, 15)。ヒトにも恒常性の維持に関与する重要な因子としてGlcCerは存在するが、GlcCer分子のメチル基および二重結合部位の違いによりAFP1非感受性を示すことがわかっている⁽¹³⁾。本研究により単離されたBj-AFP2、Bj-AFP3はそのアミノ酸配列や抗菌特性からAFP1と同様の特性を有する可能性が高いと考えられる。

カンジダのような真菌に対抗するための抗真菌治療薬の種類は抗細菌治療薬と比べて少なく、加え

てこれまでの多用に起因する薬剤耐性菌発生の問題もあることから、現行の抗真菌剤と作用機作の異なる新しい薬剤成分の開発が待たれている。現在使用されている真菌の細胞膜成分の合成に関与する酵素であるP450_{14DM}を標的とする多くの抗真菌剤に対して、AFP1はGlcCerが標的であり、現行薬の耐性菌にも有効である可能性がある。また、AFP1は植物由来で食経験もあり、ヒトのGlcCerを標的としないことからヒトに対して安全性が高いことが考えられる。このような特性から、AFP1は*C. albicans*によるカンジダ症に対する外用薬などの方面での利用が想定できる。また、AFP1は水虫の原因菌*Trichophyton rubrum*にも抗菌作用があることから⁽¹³⁾、その用途はさらに広がる可能性を有する。AFP1、Bj-AFP2、Bj-AFP3はイネの最重要病害のイネいもち病のイネいもち病菌およびヒト病原菌のカンジダに抗菌活性を示すことから、将来、農業分野のみならず医薬の分野で抗菌成分としての利用が期待できる。今後の解析結果次第では、カラシナに食経験があることから、カラシナディフェンシンは食品分野において、例えば添加物としての用途などでの利用の可能性も考えられる。

カラシナ種子からディフェンシン蛋白質を単離・精製することは操作が煩雑でコストがかかるが、本研究ではBj-AFP2およびBj-AFP3をコードする遺伝子を取得しているため、Bj-AFP2およびBj-AFP3を異種蛋白質発現系等により生産し、抗菌成分として利用することが可能になった。ディフェンシン蛋白質の生産に関しても研究が進められており、酵母*Pichia pastoris*を宿主として培養液1lあたり100mg以上もの組換えAFP1の生産に成功したとの報告もある⁽²⁰⁾。このような可能性を実用化へと向けていくためには、今後はより詳細な抗菌特性の解析を進めるとともに、より効率的かつ低コストの蛋白質生産方法を確立する必要がある。

V 摘 要

カラシナは古くから食用・薬用として利用されてきた作物であり、その種子には抗菌作用を示す物質が含まれている可能性がある。我々は、これまでカラシナ種子からイネいもち病菌を含む複数のイネ病

原糸状菌に抗菌活性を示すディフェンシンAFP1蛋白質を単離している。本研究では、AFP1以外の新たな抗菌特性を有するディフェンシン蛋白質の単離を試みた。ヒト病原菌のカンジダに対する抗菌活性

を指標に、カラシナ種子から3種のディフェンシン蛋白質を単離した。そのうちの1つはAFP1蛋白質であった。また、カラシナ種子のRNAを抽出しディフェンシン遺伝子の取得を試み、AFP1遺伝子を含む3種のディフェンシン蛋白質をコードする遺伝子を取得した。取得した3種のカラシナディフェンシン遺伝子から予想される遺伝子産物は、単離した3

種のディフェンシン蛋白質の質量数と理論的に一致した。単離した3種のディフェンシン蛋白質は、イネいもち病菌およびカンジダに対して抗菌活性を示した。このことから、カラシナ種子より単離した3種のディフェンシン蛋白質は抗菌成分として利用できる可能性が考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、イネいもち病菌を農研機構本部企画調整部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. Aerts, A.M., Francois, I.E., Meert, E.M., Li, Q.T., Cammue, B.T. and Thevissen, K. (2007) The antifungal activity of Rs-AFP 2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 13, 243-247.
2. Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P. and Osborn, R. W. (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiol., 108, 1353-1358.
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. Durrant, W. and Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol., 42, 185-209.
5. Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W. and Borremans, F. (1998) Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by ¹H NMR. J. Nul. Biol., 279, 257-270.
6. Fritig, B., Heitz, T. and Legrand, M. (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. Curr. Opin. Immunol., 10, 16-22.
7. Fujimura, M., Ideguchi, M., Minami, Y., Watanabe, K., Tadera, K. (2004) Purification, characterization, and sequencing of novel antimicrobial peptides, *Tu*-AMP 1 and *Tu*-AMP 2, from bulbs of tulip (*Tulipa gesneriana* L.). Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 571-577.
8. Graham, M. A., Silverstein, K. A., Cannon, S. B., VandenBosch, K. A. (2004) Computational identification and characterization of novel genes from legumes. Plant Physiol., 135, 1179-1197.
9. 堀田満・新田あや・柳宗民・緒方健・星川清親・山崎耕宇 (1989) 世界有用植物事典 平凡社 168-169
10. Meyer, B., Houlne, G., Pozueta-Romero, J., Schantz, M. L., Schantz, R. (1996) Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. Upregulation during ripening and upon wounding. Plant Physiol., 112, 615-622.
11. Miller, A. (1975) Biochemistry of legume seed proteins. Annu. Rev. Plant Physiol., 26, 53-72.
12. Mizushima, U. (1980) Genome analysis in *Brassica* and allied genera. In: Tsunoda S., Hinata K. and Gomez-Campo C. (eds.) *Brassica* crops and wild allies: biology and breeding. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, 89-106.
13. Oguro, Y., Yamazaki, H., Takagi, M. and Takaku, H. (2014) Antifungal activity of plant defensin AFP1 in *Brassica juncea* involves the recognition of the methyl residue in glucosylceramide of

- target pathogen *Candida albicans*. *Curr. Genet.*, 60, 89-97.
14. Osborn, R. W., De Samblanx, G. W., Thevissen, K., Goderis, I., S. Torrekens, S., Van Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S. B., Broekaert, W. F. (1995) Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett.*, 368, 257-262.
 15. Sagehashi, Y., Oguro, Y., Tochihara, T., Oikawa, T., Tanaka, H., Kawata, M., Takagi, M., Yatou, O., Takaku, H. (2013) Purification and cDNA cloning of *Brassica juncea* defensin, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its antifungal activity. *J. Pestic. Sci.*, 38, 33-38.
 16. 提箸祥幸・梶原孝志・川田元滋・高久洋暁・矢頭治 (2013) アブラナ科植物由来ディフェンシン蛋白質AFP1の大腸菌生産と抗菌活性再生方法. 中央農研研究報告, 19, 1-13
 17. Schagger, H., Aquila, H. and Von Jagow, G. (1988) Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 173, 201-205.
 18. Sels, J., Mathys J., De Coninck, B.M., Cammue, B.P. and De Bolle, M.F. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) protein: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.*, 46, 941-950.
 19. Solis, J., Medrano, G., Ghislain, M. (2007) Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. *J. Plant Physiol.*, 164, 1071-1082.
 20. 高久洋暁・小黒芳史・山崎晴丈・高木正道 (2016) 酵母 *Pichia pastoris* による植物由来抗菌タンパク質AFP1の生産とAFP1の作用メカニズムの解析. *生物工学会誌*, 94, 255-258.
 21. Thevissen, K., Warnecke, D.C., Francois, I.E., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, I.E., Zahringer, U., Thomma, B.P., Ferket, K.K. and Cammue, B.P. (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.*, 279, 3900-3905.
 22. Thevissen, K., Idkowiak-Baldys, J., Im, Y.J., Takemoto, J., Francois, I.E., Ferket, K.K., Arts, A.M., Meert, E.M., Winderickx, J., Roosen, J. and Cammue, B.P. (2005) *SKN1*, a novel plant defensin-sensitivity gene in *Saccharomyces cerevisiae*, is implicated in sphingolipid biosynthesis. *FEBS Lett.*, 579, 1973-1977.
 23. Thevissen, K., de Mello Tavares, P., Xu, D., Blankenship, J., Vandenbosch, D., Idkowiak-Baldys, J., Govaert, G., Bink, A., Rozental, S., de Groot, P.W., Davis, T.R., Kumamoto, C.A., Vargas, G., Nimrichter, L., Coenye, T., Mitchell, A., Roemer, T., Hannun, Y.A. and Cammue, B.P. (2012) The plant defensin Rs-AFP2 induces cell wall stress, septin mislocalization and accumulation of ceramides in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.*, 84, 166-180.
 24. Thomma, B.P., Cammue, B.P. and Thevissen, K. (2002) Plant defensins. *Planta*, 216, 193-202.

Purification and cDNA cloning of three defensins in *Brassica juncea* and assessment of their antifungal activities

Yoshiyuki Sagehashi^{*1}, Takashi Tochihara^{*2}, Hiroaki Takaku^{*3}, Osamu Yatou^{*4}

Summary

Brassica juncea crops have been used as eating and medical use for a long time. Antifungal things are included in the *B. juncea* seed. We have isolated defensin AFP1 protein indicating the antifungal activity against several rice pathogen fungi including rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. In this study, we tried to isolate new defensin protein with new antimicrobial characteristics. By checking the antifungal activity against human pathogen *Candida albicans* through the purification process, we finally

isolated three defensin proteins from *B. juncea* seed. One of those was AFP1 protein. On other hand, three defensin genes including AFP1 were isolated from mRNA of *B. juncea* seed. The expected gene products theoretically accorded with a mass number of three isolated defensin proteins from *B. juncea* seed. The three isolated defensin proteins indicated antifungal activity against *M. oryzae* and *C. albicans*. Therefore, three defensin proteins isolated from *B. juncea* seed have possibility to use as antifungal agents.

*1 Hokkaido Agricultural Research Center, NARO

*2 Rakuno Gakuen University

*3 Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

*4 Central Region Agricultural Research Center, NARO