

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

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