

## ■ 研究課題名

### 植物由来のディフェンシン蛋白質を利用した新規抗菌剤の開発

## ■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①ディフェンシン遺伝子を導入した高発現微生物系統の開発  
（大島 正弘、◎川田 元滋／(独)農研機構 作物研究所）
- ②抗菌活性に関わる構造解析と機能増強型ディフェンシン蛋白質の開発  
（◎川田 元滋、提箸 祥幸／(独)農研機構 中央農業総合研究センター）
- ③ディフェンシン蛋白質の分子生化学的特性と作用機作の解明  
（高久 洋暁／新潟薬科大学）
- ④ディフェンシン蛋白質の活性スペクトラム解析と製剤化のための技術開発  
（清水 カノクミアイ化学工業株式会社）
- ⑤ディフェンシン蛋白質の大量培養による生産・精製の確立  
（加藤 秀樹、堀内 達也／ケイ・アイ化成株式会社）

## ■ 研究の目的

昨今、農作物生産場面での農薬使用には環境負荷低減が求められており、また消費者の購買マインドへの対応の面からも、従来の化学製剤に替わる天然物由来の製剤に対する需要が高まっている。本研究では、植物の持つ抗菌蛋白質(BJ-AFP1)を安く大量に増産し、従来の化学製剤に替わり、安心できる農薬成分として利用する研究を行う。

BJ-AFP1を生産する本研究ではBJ-AFP1を①安く大量に作る②なぜ効くのか、その仕組みを調べる③安全性を確認する④適する用途を見極める、ことを目指し、農業・産業・家庭における農薬や抗菌剤としての用途で実用可能性を見出すことを目指す。

## ■ 主要な成果

- ①カラシナが持っている抗菌蛋白質(BJ-AFP1)は、糸状菌（カビの仲間）や菌類（バクテリアの仲間）に広く効果があることが判明した（図1）。
- ②メタノールで増殖するピキア酵母にBJ-AFP1遺伝子を導入することで、より高いレベルの発現が期待でき、BJ-AFP1蛋白質を1.2g/L以上生産可能となった（図2、3）。これは研究当初と比較すると約12,000倍にあたる。現在の生産スケールは90L培養槽（有効液量45L）で、1回あたり54g以上のBJ-AFP1が生産可能である。製剤化に向けたBJ-AFP1の特性として高い熱安定性・PH変化に対する安定性・高い常温保存性等の利点を確認した。また実用場面で想定される展着剤との混用条件下で活性が維持されることを確認した。
- ③BJ-AFP1が効果を示す過程の第一段階である、病原菌への着地点（細胞膜上の標的分子）は、類似の既知蛋白質と同じグルコシドセラミドであると判明した。BJ-AFP1存在下で病原菌の細胞膜では、能動輸送に関わる膜電位のバランスが崩れること（脱分極化）、および、細胞の機能低下につながる活性酸素濃度が上昇することを見出した（図4）。BJ-AFP1は、二形成酵母において酵母型から菌糸型への形態変化を誘導することを見出した。この形態変化誘導に関する新知見を糸口に、BJ-AFP1の作用の第2段階である、病原菌における細胞内情報伝達経路の解析が進んだ。
- ④ピキア酵母で生産された高純度BJ-AFP1について、急性毒性、皮膚刺激性、眼刺激性をはじめとする農薬用途向け安全性評価試験に着手し、現時点で実用化には問題無しと判定できる（表1）。
- ⑤農薬としての利用：BJ-AFP1は稲いもち病に加え、キュウリベト病やコムギうどんこ病にも一定の防除効果を示すが、他用途と比較してもっとも低コストが求められる農薬用途

(図5)では、BJ-AFP1 単独施用に限定すると効果・生産効率の両面でなお改善を図る必要がある。しかし稲作体系の変化にともない「高価でも従来の農薬にかわるもの」をもとめる新需要は拡大しており、BJ-AFP1 と微生物農薬との混用で実用化を見通すことができる(表2)。

- ⑥農薬以外の利用として、産業(製紙工程等で問題となる藻類)・家庭(水垢の原因となる藻類)に対する有効性を *in vitro* 実験で確認した。また薬剤用途として、副作用のない新薬が待望されているヒト日和見感染菌 *C. albicans* や、水虫の原因菌である白癬菌 *T. rubrum* に対する有効性を *in vitro* 実験で確認した。

#### ■ 公表した主な特許と論文

- ①特願 2006-318851：藻類防除剤及び藻類防除方法：クミアイ化学工業(株)、(独)農業・食品産業技術総合研究機構、ケイ・アイ化成(株)

#### ■ 今後の展開方向

- ①農薬用途：稲作体系の変化にともなう新需要にマッチした BJ-AFP1  
ポジティブリスト制度の施行や減農薬栽培の普及により、大規模な共同防除や液剤散布が制約される現状において、これまでの主力化学製剤にかわる新規防除剤を求める新需要に、BJ-AFP1 の特性はマッチしており、商業的設備投資が実現すれば、従来の化学製剤に対する優位性をもって、適剤不在の市場へ商品投入が可能と考える。
- ②農薬用途：成果をもとにさらなる低コスト生産の余地とアイデア  
BJ-AFP1 が 1000ppm 含まれる安定的な大量培養システムが確立できており、BJ-AFP1 の培養液を直接利用できれば精製にかかる工程およびコストを省いた生産が可能となる。成分カウントゼロの天然物と認可されるかどうかポイントになる。
- ③薬剤用途：カンジダ症や水虫の新薬候補  
副作用のない新薬が待望されているヒト日和見感染菌 *C. albicans* が BJ-AFP1 高感受性であることを見出した。また、白癬菌 *T. rubrum* に対する効果を検討したところ感受性を示し、BJ-AFP1 の薬剤としての利用に期待が寄せられる。

#### ■ 問い合わせ先

- ①稲作体系の変化にともなう新需要にマッチした BJ-AFP1：クミアイ化学工業株式会社  
(0537-23-6721)
- ②成果をもとにさらなる低コスト生産の余地とアイデア：ケイ・アイ化成株式会社  
(0538-58-1000)
- ③カンジダ症や水虫の新薬候補：新潟薬科大学 (0250-25-5119)

■ 研究成果の具体的図表

用途	対象病害	効果	用途	対象病害	効果
農業	稲いもち病	◎	産業・家庭	緑藻	○
	稲紋枯れ病	○		藍藻	○
	稲ごま葉枯れ病	○		珪藻	○
	キュウリ苗立枯れ病	○	医薬	カンジダ症原因菌	◎
	トマト葉かび病	◎		水虫の主要原因菌	◎
	キュウリ灰色かび病	◎			
	リンゴ斑点落葉病	◎			

供試したBJ-AFP1は研究段階の試料を使用した

図1 BJ-AFP1の各種病害に対する効果

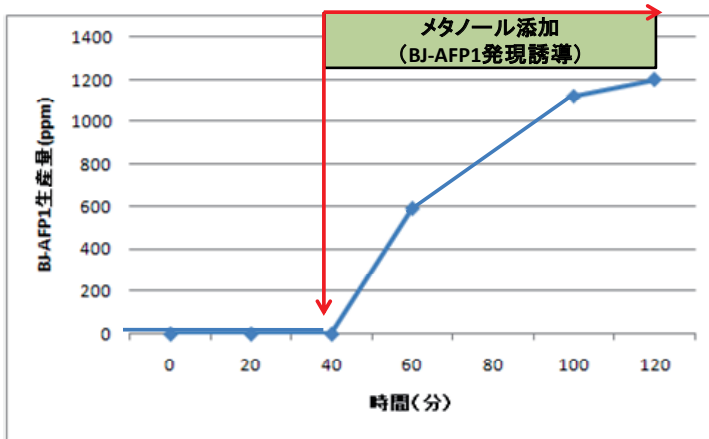


図2 10L容ジャーファーマーターによるBJ-AFP1生産の経時的増加



図3 BJ-AFP1生産のための培養装置: ジャーファーマーター(写真は90L容)

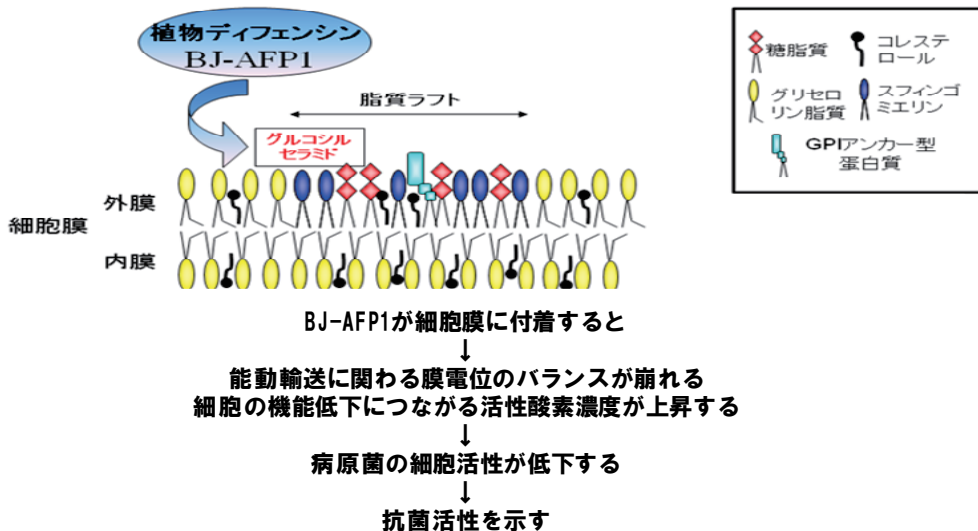


図4 BJ-AFP1の作用機構

表1 *Pichia* BJ-AFP1 (SA-1) の安全性評価試験結果

試験項目	供試生物	試験結果
急性経口毒性	マウス (Slc:ddY)	LD <sub>50</sub> : 300mg/kg以上 (雄雌とも) 300mg/kg : 死亡, 中毒症状なし
眼刺激性	ウサギ (日本白色種)	中等度
皮膚刺激性	ウサギ (日本白色種)	なし
復帰突然変異	Bacteria (TA100, TA98株)	陽性 (S9±とも) ただし、SA-1中のヒスチジンによるコロニー数の増加と考えられるので、実際は陰性だと考えられる
コイ急性毒性	コイ ( <i>Cyprinus carpio</i> )	LC <sub>50</sub> (96時間) : 10.0mg/L以上



図5 BJ-AFP1の防除効果  
上:キュウリべと病菌防除効果(ポット試験)  
下:コムギうどんこ病防除効果(ポット試験)  
供試したBJ-AFP1は研究段階の試料を使用した

表2 農薬有効成分の比較

	化学製剤	新規天然型蛋白質	生物由来成分混合剤
	現在の主力剤	BJ-AFP1	BJ-AFP1+微生物農薬
生産コスト	◎	×→△	○△
効果	○	△	△→○
安全性	○	○	○
施用マインド	○△	◎	◎