

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

提箸祥幸*¹・栃原孝志*²・川田元滋*³・高久洋暁*⁴・矢頭 治*⁵

目 次

I. はしがき	1	操作を加える精製方法の検討	5
II. 材料および方法	3	3. AFP1 蛋白質立体構造再生操作におけるアルギ ニンおよびグルタチオンの効果について	6
1. AFP1 蛋白質発現株の作製	3	4. 精製 AFP1 蛋白質のイネいもち病菌に対す る抗菌活性の特性	6
2. AFP1 蛋白質の発現・精製方法	3	IV. 考察	6
3. Tricine SDS-PAGE と Western-blot 解析	4	V. 摘要	9
4. 抗菌活性試験に供した微生物	4	謝辞	9
5. 抗菌活性測定方法	4	引用文献	9
III. 結果	5	Summary	13
1. pLEX ベクターを用いた大腸菌蛋白質発現シス テムにより精製した AFP1 蛋白質の特性	5		
2. AFP1 蛋白質精製過程において立体構造再生			

I. はしがき

イネいもち病は農林水産統計（農林水産省大臣官房統計部，平成 24 年 12 月 7 日公表）によると，日本の稲作における病害による全被害面積の 34%，被害量の 46% を占める最大にして最重要な病害であり，その防除には発生予察システムによる注意報が発令されるなど細心の注意がなされている．イネいもち病の防除には化学農薬を使用することが一般的になっており，発生予察などによる適切な農薬散布が心がけられているが，化学農薬の使用は環境への負荷の増大につながる懸念もある．そのため，農薬使用を減少させる抵抗性品種の育種により多くの品種が開発されているが，抵抗性崩壊の問題が発生しているのが現状である．そこで，環境負荷の低い新規抗菌剤の開発が期待されている．

抗菌性蛋白質は植物，動物を問わず広く生物種間に分布し，病原菌などに対抗するための防御機構としての役割を担ってきた．これまで多種多様な生物から多くの抗菌性蛋白質が単離・解析されてきたが，

その構造および機能上の特性は多様である^(1,4,8,11)．

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，世界中の多くの植物を材料に解析が進められている．植物ディフェンシンは 45-54 アミノ酸残基からなるシステインに富む比較的分子量の小さな塩基性蛋白質で，多くの植物種で報告がある^(3,12,13,15,20,22)．植物ディフェンシンは生物学的活性特性から，①抗菌活性を有し，対象微生物の形態を変化させる，②抗菌活性を有するが，対象微生物の形態は変化させない，③抗菌活性を持たず， α -アミラーゼの阻害活性を有する，の大きく 3 グループに分けることができる⁽⁹⁾．植物ディフェンシンのアミノ酸配列は植物種により多種多様ではあるが，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⁽¹⁰⁾．

筆者らは，イネいもち病菌に強い抗菌活性を示す

ディフェンシン蛋白質をカラシナから単離している⁽²³⁾。このディフェンシンはシステインを分子内に8つ有する分子量 5,670 のディフェンシン蛋白質である。質量分析とアミノ酸配列決定法により、アミノ酸配列はカブの Rs-AFP1 蛋白質と一致した⁽²⁵⁾。このディフェンシン蛋白質を、以降 AFP1 蛋白質とする。AFP1 蛋白質はシステインの結合によって図1に示したような立体構造をとることが予想され⁽¹⁰⁾、AFP1 蛋白質においてもその抗菌活性にはこの立体構造が重要と推定されている。AFP1 蛋白質はイネいもち病菌をはじめとする多くのイネ病原糸状菌に対し強い抗菌活性を示し、イネいもち病菌に対する抗菌活性強度 (IC₅₀ 値) はイネいもち病菌防除剤の主成分であるカスガマイシンと同程度である⁽²³⁾。さらに熱や広い pH 条件でもこの活性を維持することができることから抗菌剤としての幅広い利用が期待できる⁽²³⁾。また植物成分由来の蛋白質である AFP1 蛋白質はカスガマイシン等の従来の抗菌剤と作用機序が異なることが予想されることから、既存の薬剤に耐性となった微生物に対しても効果を発揮する可能性がある⁽²¹⁾。

AFP1 蛋白質はアブラナ科植物の種子に比較的多量に存在していると考えられるが、植物や種子から

の精製は操作が煩雑であり精製効率も悪い。また、類似の他のディフェンシン蛋白質も混在することから、AFP1 蛋白質のみを大量に純化することは困難が伴い、コストがかかる⁽²³⁾。このため AFP1 蛋白質の抗菌剤としての利用を想定した場合、植物から抽出するよりも微生物による大量生産が最も効率的と考えられる。

しかしながら、これまで筆者らが行った AFP1 蛋白質の微生物生産は生産量が低く、また生産した AFP1 蛋白質の抗菌活性も安定しなかった。まず、従来の pGEX6P-1 ベクター (GE Healthcare) を用いた方法⁽²³⁾での AFP1 蛋白質生産量は、培養 1 リットルあたり最大でも 50 μg 程度と生産量が低く、解析研究に用いる十分量が得られなかった。また、酵母 *Phicia pastoris* を宿主とした AFP1 蛋白質発現系では、精製された AFP1 蛋白質の抗菌活性が安定しないなどの問題が発生した。今後 AFP1 蛋白質の解析を進めるために、蛋白質の効率的な生産方法を改善するだけでなく、新たに開発・確立する必要がある。

微生物を宿主とした蛋白質生産を行う際には、宿主の生育を抑制させない必要がある。しかし AFP1 蛋白質のように抗菌作用の範囲が広い物質を生産す

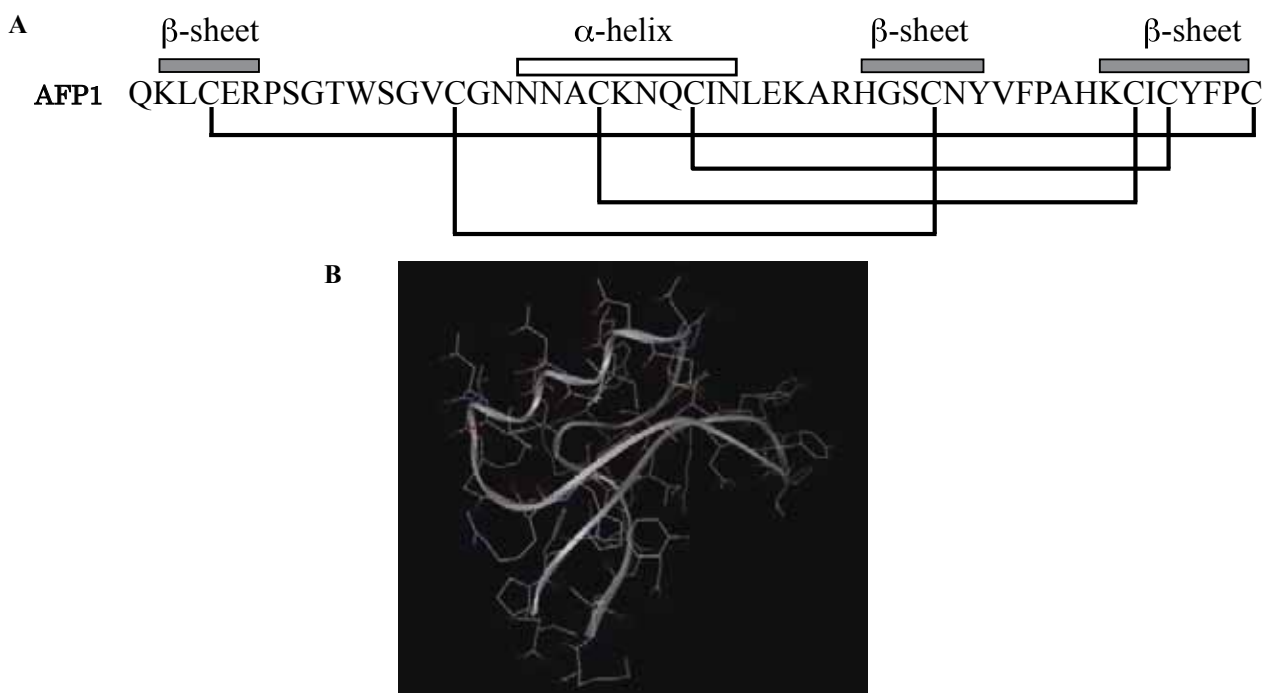


図1 AFP1 蛋白質の成熟領域のアミノ酸配列 (A) と予測される立体構造 (B)

注) A: システインを結ぶ線はジスルフィド結合の相手を示す。

B: 蛋白質立体構造予測ソフト PDAMS (日本 SGI) を使って AFP1 蛋白質の立体構造を予測したものであり、主鎖構造をリボン状の線で表した。

る際には、生産する蛋白質に非感受性の宿主を選択できない場合が予想される。川田らは、AFP1 蛋白質を大腸菌で発現させた場合、大腸菌の生育を抑制することを報告している⁽¹⁸⁾。一方、AFP1 蛋白質をはじめとするディフェンシンのように正しい立体構造の保持に依存して抗菌活性が発揮される蛋白質の場合、大腸菌を宿主として菌体内の封入体に正しい立体構造を持たない蛋白質として作らせることで宿主への影響を最小限に抑えることができると考えられる。その場合、封入体の中で正しい立体構造を持たず不溶化した蛋白質の可溶化と、立体構造の再構

成による活性再生のための操作（リフォールディング操作）が不可欠となる⁽²⁹⁾。

本研究では、抗菌成分として将来的に利用できる可能性のある、アブラナ科植物由来のディフェンシン AFP1 蛋白質の、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。さらには正しい立体構造が再生して高い抗菌活性を持つ AFP1 蛋白質の分離選別方法の検討を行い、その方法を確立したので報告する。

II. 材料および方法

1. AFP1 蛋白質発現株の作製

ディフェンシン AFP1 の発現株は作物研究所（大島正弘氏、高島新一郎氏）が pLEX (Invitrogen) プラスミドに AFP1 蛋白質の抗菌活性領域をコードする遺伝子配列を組み込み、大腸菌 GI724 株 (Invitrogen) に導入して形質転換させたものであり、ヒスチジンタグ融合蛋白質として AFP1 蛋白質が発現するようにしたものである。

2. AFP1 蛋白質の発現・精製方法

1) AFP1 蛋白質発現株の培養

AFP1 蛋白質発現株の培養方法は P_L Expression System (Invitrogen) の説明書に従った。また、宿主大腸菌の液体培養は RMG 培地（培地 1 リットルにつき、Na₂HPO₄ 6 g, KH₂PO₄ 3 g, NaCl 0.5 g, NH₄Cl 1 g, Casamino Acids 20 g, Glucose 5 g, MgCl₂ 0.203 g）に終濃度 100 µg/ml の Ampicillin を添加して 30℃ で 180 rpm にて振とう培養を行い、595 nm における吸光度が 0.5 になった段階で AFP1 蛋白質の発現誘導のためにトリプトファンを終濃度 100 µg/ml になるように培養液に添加して 5 時間誘導培養を行った。誘導培養の後、遠心分離にて菌体を回収した。

2) 蛋白質立体構造再生方法を行わない

AFP1 蛋白質の精製方法

精製方法は ProBond™ Purification System (Invitrogen) を用い付属手順書に従った。菌体に Guanidine Lysis Buffer（6 M Guanidine Hydrochloride, 20 mM Sodium Phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.8）を加え凍結・融

解により菌体の破碎を行った。Denaturing Binding Buffer（8 M Urea, 20 mM Sodium Phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.8）を十分に送液したカラムに菌体破碎液を添加し、AFP1 蛋白質をカラム樹脂に結合させた。カラムを洗浄の後、Denaturing Elution Buffer（1 M Imidazole, 8 M Urea, 500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.0）にて AFP1 蛋白質をカラムから溶出させた。蛋白質の立体構造再生方法を用いない場合は、AFP1 蛋白質は透析膜 Spectra/Por (Spectrum Laboratories, MWCO:3,500) を使用し、外液を 2 リットルの超純水にて一昼夜透析した後、Microcon YM-10 (MWCO:10,000)、YM-3 (MWCO:3,000) (Millipore) を用いて限外濾過を行い溶媒を超純水に置換して、精製 AFP1 蛋白質とした。また、立体構造再生を行う場合は、後述する透析法あるいは希釈法によった。

3) 蛋白質立体構造再生方法を行う

AFP1 蛋白質の精製方法

・透析法による AFP1 蛋白質立体構造再生方法

2.2) よりカラムから溶出した AFP1 蛋白質画分を、400 mM アルギニンと尿素を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 溶液を外液として以下の通り透析した。400 mM アルギニンを含む外液中の尿素濃度を、8 M から 4 M, 2 M, 1 M, 0 M と順次下げたものと交換しながら透析を継続し、0 M になった段階で 2 mM の還元型グルタチオンと 0.2 mM の酸化型グルタチオンを含む外液に交換し、一昼夜透析を行った。透析の後、形成された沈殿を除去し、溶媒を 50 mM

Tris-HCl (pH 9.2) 溶液に置換した。

・希釈法による AFP1 蛋白質立体構造再生方法

2.2)よりカラムから溶出したAFP1蛋白質画分を、アルギニンおよびグルタチオンを含む溶液で希釈することでAFP1蛋白質画分に含まれる尿素濃度を低下させ、その中でAFP1蛋白質の立体構造の再構成を試みた。この時のグルタチオンは還元型2 mMと酸化型5 mMを混合したものをを用いた。AFP1蛋白質画分を4倍に希釈した後、生成した沈殿を除去し、溶媒を50 mM Tris-HCl (pH 9.2) 溶液に置換した。

・立体構造再生処理した蛋白質からのAFP1蛋白質の分離方法

50 mM Tris-HCl (pH 9.2) で平衡化したHiTrap Q sepharose 5 ml カラム (GE Healthcare) を用いて、同じく50 mM Tris-HCl (pH 9.2) で平衡化したAFP1蛋白質溶液を、AKTA-FPLC (GE Healthcare) で分画した。その際、吸着した蛋白質の溶出には塩化ナトリウムによる図2に示す濃度での濃度勾配を用いた。分画後の試料は後述するWestern-blot解析によりAFP1蛋白質が含まれることを確認した後、Microcon YM-10 (MWCO:10,000)、YM-3 (MWCO:3,000) (Millipore) を用いて限外濾過により溶媒を超純水に置換した。得られたものを精製AFP1蛋白質とした。

3. Tricine SDS-PAGE と Western-blot 解析

Tricine SDS-PAGE は、Schagger と Jagow の方法に従い、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⁽²⁴⁾。Western-blot 解析は、泳動後のゲルをPVDF膜 (Bio-Rad) に転写し、一次抗体にはウサギ由来の抗AFP1抗体 (SIGMA-ALDRICH) を、二次抗体にはウサギのIgGに対するヤギ抗体にアルカリホスファターゼが結合したGoat Anti-Rabbit IgG:AP (Stressgen Biotechnologies) を用いた。検出にはアルカリホスファターゼの発色基質であるBCIP/NTB (Kirkegaard & Perry Laboratories) を用いた。

4. 抗菌活性試験に供した微生物

AFP1蛋白質の抗菌活性測定における検定菌として、ヒト病原性真菌であるカンジダ *Candida*

albicans CAI4、また、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* Guy11 を使用した。*C. albicans* CAI4 は千葉大学真菌医学センターから、*M. oryzae* Guy11 は独立行政法人農業生物資源研究所西村麻里江博士から分譲を受けた。

5. 抗菌活性測定方法

抗菌活性の測定は Tecan 社のマイクロプレートリーダー safire² を使用し、以下に示したマイクロプレートを用いた小スケール培養法で行った⁽²⁾。使用するAFP1蛋白質は雑菌を不活化するために90℃にて10分間加熱処理を行ったものを試験に供した。AFP1蛋白質は100℃で30分処理しても抗菌活性が90%近く維持されることを筆者らは明らかにしている⁽²³⁾。

・カンジダの抗菌活性測定方法

カンジダ *C. albicans* CAI4 の生育には Potato dextrose broth (Difco) を1/2に希釈した培地を用いた。96穴マイクロプレート (丸底) のウェルに菌溶液のOD₆₀₀が0.001となるように調製した培地溶液を80 μl 加え、定められた濃度のAFP1蛋白質溶液を20 μl 添加し、同時にウリジン (和光純薬) を25 μg/ml になるように添加し、30℃にて静置培養を行った。対照区はAFP1蛋白質溶液の代わりに滅菌水20 μl を加えたものとした。吸光度測定直前には毎回30秒の攪拌を行った。マイクロプレートリーダーにて各ウェルの吸光度 (OD₆₀₀ 値) を30分毎に測定して生育量の指標とし、生育阻害率が50%に抑制される濃度 (IC₅₀ 値) を算出した。

・イネいもち病菌の抗菌活性測定方法

イネいもち病菌 *M. oryzae* Guy11 の生育には Potato dextrose broth を1/2に希釈した培地を用いた。96穴マイクロプレート (平底) のウェルに2 × 10⁴ 胞子/ml となるように調製した培地溶液を80 μl 加え、定められた濃度のAFP1蛋白質溶液を20 μl 添加し25℃にて静置培養を行った。対照区はAFP1蛋白質溶液の代わりに滅菌水20 μl を加えたものとした。マイクロプレートリーダーにて各ウェルの吸光度 (OD₅₉₅ 値) を1時間毎に測定して生育の指標とし、生育阻害率が50%に抑制される濃度 (IC₅₀ 値) を算出した。

Ⅲ. 結 果

1. pLEX ベクターを用いた大腸菌蛋白質発現システムにより精製した AFP1 蛋白質の特性

従来から筆者らが用いてきた pGEX6P-1 ベクター系よりも高生産で、また生産蛋白質の精製も容易である pLEX ベクター系を用いた大腸菌蛋白質発現システムを用いて生産し精製した AFP1 蛋白質は、精製ロットごとに抗菌活性強度が大きく変動した。また、このときの精製 AFP1 蛋白質のカンジダに対する IC₅₀ 値は常に 5 µg/ml 以上であり、カラシナ種子から単離・精製した天然の AFP1 蛋白質の IC₅₀ 値である 2.5 µg/ml には及ばない活性強度であった⁽²³⁾。また、本発現システムを用いた AFP1 蛋白質の精製過程においては、しばしば透析による変性剤除去操作時に透析チューブ内の AFP1 蛋白質を含む複数種

類の蛋白質の凝集が観察された(写真1)。AFP1 抗体を用いた Western-blot によってこの凝集蛋白質中に AFP1 蛋白質の存在が確認できた。

2. AFP1 蛋白質精製過程において立体構造再生操作を加える精製方法の検討

これまで筆者らは、pLEX ベクターを用いた大腸菌蛋白質発現システムで発現させた AFP1 蛋白質精製過程では、透析によって蛋白質を可溶化させた尿素やグアニジン塩酸塩等の変性剤を段階的に希釈・除去する方法をとってきた。しかし、単に変性剤のみを除去した時には、前述のとおり AFP1 を含む蛋白質の凝集が観察された。このことから、この方法では正しい位置でジスルフィド結合せず、天然物と異なる立体構造を持つ AFP1 蛋白質を生じさせ、その結果、凝集によって多くの AFP1 蛋白質を損失している可能性が高いと考えた。そこで、変性剤除去と同時に AFP1 蛋白質の立体構造再生操作を行うことを検討することとした。

この目的で、従来の方法と同様に AFP1 蛋白質精製を進めた後、梅津らの方法^(28, 29)を参考に変性剤除去時の透析溶液に、これまでの Tris 溶液に加え、アルギニンと還元型および酸化型グルタチオンを添加し透析操作を行った。さらに、透析後の AFP1 蛋白質を陰イオン交換クロマトグラフィーに供することで、カラムの非吸着と吸着の2つの蛋白質画分に分離した(図2)。Western-blot の結果から、カラム

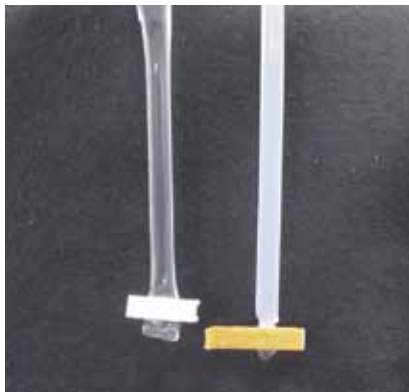


写真1 変性剤除去時の試料溶液の様子
注) 試料溶液の比較。
左が透析開始時、右が AFP1 蛋白質析出の試料。

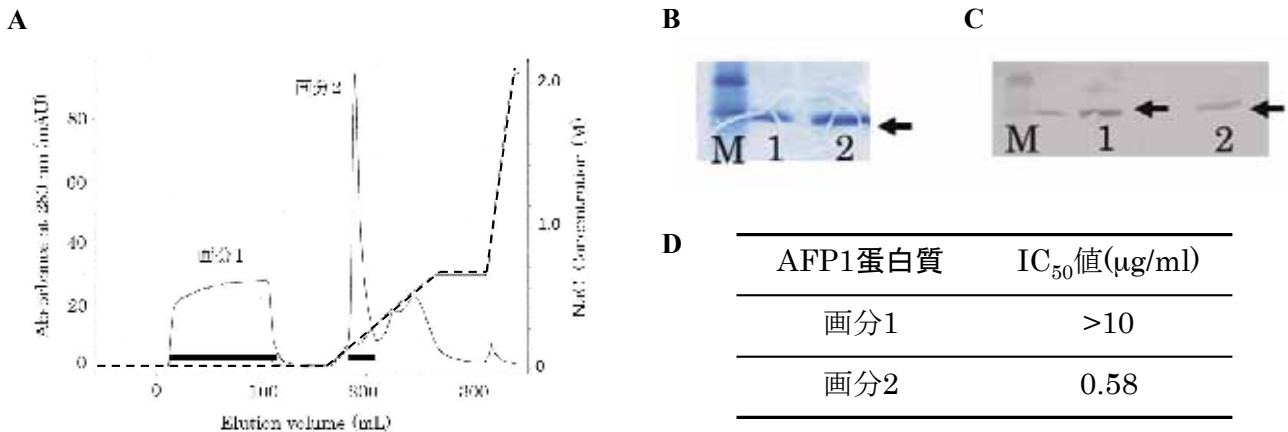


図2 陰イオン交換クロマトグラフィーによる活性型 AFP1 の分離

注) A: 陰イオン交換クロマトグラフィーのチャート。画分1 および画分2 はバーで示した範囲の試料を回収した。点線は溶液中の NaCl の割合を示す。
B: 画分1 と画分2 の蛋白質の SDS-PAGE の結果。M は分子量マーカー、1、2 はそれぞれ画分1、画分2 の蛋白質試料。
C: 画分1 と画分2 の蛋白質の AFP1 抗体を用いたウエスタンブロットの結果。M は分子量マーカー、1、2 はそれぞれ画分1、画分2 の蛋白質試料。
D: 画分1 と画分2 の AFP1 蛋白質のカンジダに対する抗菌活性。

に吸着しないカラム通過画分（画分1）と、カラムからNaClにより溶出される画分（画分2）の2つの異なる画分の両方からAFP1蛋白質が確認された。また、図2に示したように、画分1のAFP1蛋白質はカンジダに対するIC₅₀値が10 µg/ml以上であったが、画分2のAFP1蛋白質はIC₅₀値0.58 µg/mlであり画分1と比較して画分2は強い抗菌活性を示した。

3. AFP1蛋白質立体構造再生操作におけるアルギニンおよびグルタチオンの効果について

精製過程でのアルギニンおよびグルタチオンのAFP1蛋白質溶液への添加が、抗菌活性の高いAFP1蛋白質を増加させることを希釈法による蛋白質立体構造再生方法によって確認した。アルギニンとグルタチオンの添加の有無の組合せによるAFP1蛋白質の精製量を比較した。精製過程の変性剤濃度を希釈する際の溶液に、アルギニンとグルタチオン（酸化型および還元型）を組合せて加える操作を行い、最

終的に得られた活性型AFP1蛋白質（図2における画分2）について定量を行った（表1）。表1の結果より、アルギニンとグルタチオンを共に加えた処理区4が最も高い活性型AFP1蛋白質の回収量を示し、無添加の処理区1と比較しておよそ2倍の回収量であった。この回収量は、従来のpGEX6P-1ベクターを用いた方法⁽²³⁾の7倍を上回る値であった。

4. 精製AFP1蛋白質のイネいもち病菌に対する抗菌活性の特性

カンジダに強い抗菌活性を示した画分2のAFP1蛋白質を用いて、イネいもち病菌に対する抗菌活性の測定を行った。その結果、精製したAFP1蛋白質のイネいもち病菌に対するIC₅₀値は2.1 µg/mlであり、天然のAFP1蛋白質のIC₅₀値である2.0 µg/mlと同程度の抗菌活性を有していた⁽²³⁾。この時のイネいもち病菌の菌体を顕微鏡観察すると、AFP1蛋白質添加区では写真2に示したように菌糸がバルーン状になる異常な形態が見られた。

表1 アルギニンおよびグルタチオンを処理した活性型AFP1（画分2）の回収量

処理区	アルギニン	グルタチオン	画分2回収量 (µg)
1	-	-	167
2	-	+	144
3	+	-	211
4	+	+	355

注) アルギニンは400 mM, グルタチオンは酸化型5 mMと還元型2 mMの混合。

画分2の回収量は、培養1リットルあたりのAFP1蛋白質の回収量 (µg) を示す。

IV. 考察

本研究では、大腸菌で生産したアブラナ科植物由来のディフェンシンAFP1蛋白質の抗菌活性を示す立体構造を再生するとともに、その蛋白質の分離選別方法を確立することを目指した。

AFP1蛋白質は多種の糸状菌に抗菌活性を示すため広い範囲での利用可能性があり、農業分野のみならず医薬分野においてもその利用が期待される。しかしこの蛋白質のより詳細な解析を進めるためには、AFP1蛋白質を大量に調製する必要があるが、植物体から大量に精製するのは技術的困難が伴いコストもかかる。そこで微生物を宿主とした異種蛋白質発現系を利用したAFP1蛋白質の大量生産が必須

である。

これまでの筆者らの研究では、pGEX6P-1ベクターを用いてAFP1蛋白質をグルタチオンとの融合蛋白質として発現させる方法を用いてきたが、AFP1遺伝子導入大腸菌のAFP1蛋白質発現量が少ないことが問題となっていた。また、酵母*Phicia pastoris*を宿主としたAFP1蛋白質発現系では、精製されたAFP1蛋白質の抗菌活性が安定しない問題が発生し、AFP1蛋白質生産に適した微生物発現系を見つけれられていなかった。そこで、生産したAFP1蛋白質が宿主に何らかの影響を与えている可能性を考慮し、活性を持たない封入体として大腸菌体内でAFP1蛋

白質を発現する pLEX ベクターを用いたシステムを採用することとした。

しかしながら本研究の当初においてこの新しいシステムを導入することで AFP1 蛋白質の発現量は向上したものの、精製過程で透析液の白濁および沈殿となって蛋白質が多量に析出することが観察され（写真 1）、最終的な AFP1 蛋白質の生産量も発現量を反映したものではなかった。析出および沈殿した蛋白質を回収し、AFP1 抗体を用い Western-blot を行ったところ、AFP1 蛋白質を含むことが明らかになった。この AFP1 蛋白質の回収量の低下の原因は、透析操作中の変性剤除去時における AFP1 蛋白質の不溶化による凝集であると考えられた。

また、本研究の当初の精製工程で精製した AFP1 蛋白質の抗菌活性は筆者らの従来の蛋白質発現系によるものと比較して低かった。従来の pGEX6P-1 ベクターを用い GST との融合蛋白質として発現させる方法では、カンジダに対する IC₅₀ は 2.6 μg/ml と天然 AFP1 蛋白質の 2.5 μg/ml と同等であったが、pLEX ベクターを用いた当初の精製工程で得られた AFP1 蛋白質の IC₅₀ 値は生産ロットごとに安定せず、いずれの場合も 5.0 μg/ml 以上であった。精製蛋白質の抗菌活性低下の原因は図 2 にあるように、陰イオン交換樹脂への結合特性の違いから、立体構造が異なる複数の AFP1 蛋白質が混在したことによるものと推定された。図 2 の画分 1 と画分 2 の 2 つの AFP1 蛋白質は同じ分子量を持つものの、陰イオン交換クロマトグラフィーの条件下でカラム通過とカ

ラム吸着の異なる挙動を示し、それぞれの画分でカンジダに対する抗菌活性が異なっていた（図 2D）。図 2 の画分 1 の AFP1 蛋白質は 10 μg/ml でもカンジダに抗菌活性を示さなかったが、画分 2 は IC₅₀ 値が 0.58 μg/ml と強い抗菌活性を示した。また、画分 2 由来の AFP1 蛋白質はイネいもち病菌に対しても天然の AFP1 蛋白質と同様の抗菌活性を示した。この AFP1 蛋白質を処理したイネいもち病菌はバルーン状の形態を示すなどの異常が見られた（写真 2）。

以上の結果から、この精製過程で得られた AFP1 蛋白質は「抗菌活性を有し、対象微生物の形態を変化させる」タイプのディフェンシンであり、筆者らが単離した天然 AFP1 蛋白質および筆者らによる他の蛋白質発現系で発現させた AFP1 蛋白質と同一の特性であった。したがって、この画分 2 の AFP1 蛋白質は正常な立体構造を有する AFP1 蛋白質であると考えられた。

本研究では当初の精製過程に改良を加え、正しい立体構造を持つ AFP1 蛋白質の形成を誘導させる目的で透析の過程でアルギニンとグルタチオンを用いた。この結果、正しい立体構造を持つと推定される AFP1 蛋白質を含む画分 2 の回収量が増え（表 1）、筆者らがそれまで行っていた pGEX6P-1 ベクターを用いた方法⁽²³⁾での 1 リットルあたり最大で 50 μg 程度だった生産量を 7 倍以上に向上させることに成功した。また、活性のある AFP1 蛋白質を安定して分離することが可能となったことから、均一な活性を持った AFP1 蛋白質の継続した生産が可能になっ

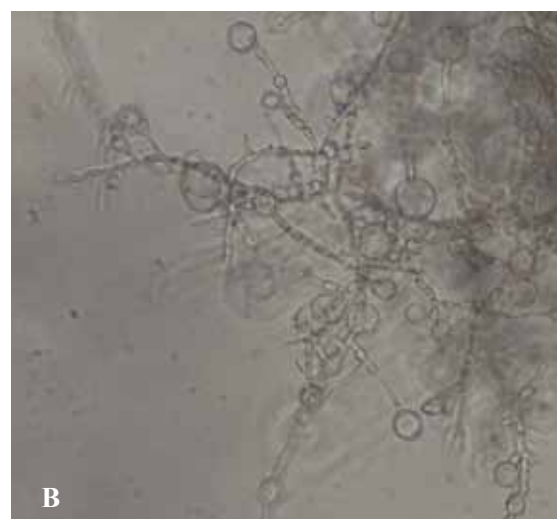
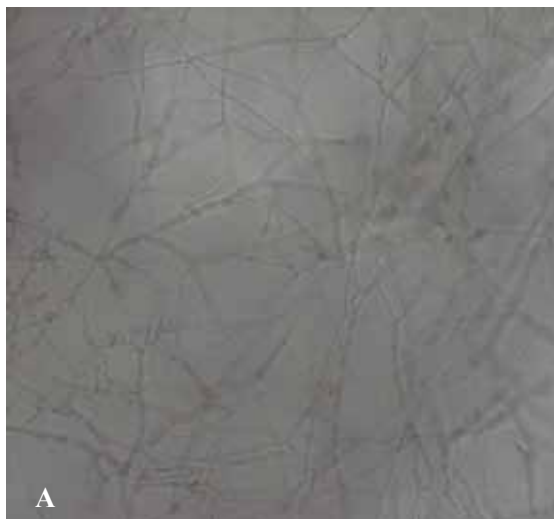


写真 2 AFP1（画分 2）処理によるイネいもち病菌の形態変化

注) A : AFP1 無添加 B : AFP1 添加 (5 μg/ml)

た。

今回の AFP1 蛋白質の活性再生の工程におけるアルギニンとグルタチオンの役割を図3にまとめた。

①封入体として発現された AFP1 蛋白質は、正しい位置のジスルフィド結合による天然物と同一の立体構造を持たない不溶化の状態で大腸菌体内に蓄積される。

②封入体を菌体破碎後、グアニジン塩酸塩溶液および尿素溶液などの変性剤にて可溶化する。

③透析にて変性剤である尿素等を除去するが、写真1にあるように変性剤濃度低下に伴い AFP1 蛋白質の不溶化が起こる。

④ここでアルギニンを透析液中に添加することで、変性剤除去による AFP1 蛋白質の凝集を防ぐ。

⑤変性剤除去後、アルギニン溶液中にて酸化型および還元型グルタチオンを添加し、分子内のジスルフィド結合の形成を促進させる。

⑥天然物と同一の正しい立体構造を有する AFP1 蛋白質は不溶化しないため、アルギニン除去後にも不溶化して沈殿となることなく回収できる。

分子内にジスルフィド結合を持つ蛋白質の精製過程において、一定量のアルギニンとグルタチオンを使用することにより可溶化率を上げることは既に報告されている^(27,28)。グルタチオンによるジスルフィド結合の形成促進において、蛋白質の疎水領域露出による折りたたみ中間体の凝集をアルギニンが抑制することが、可溶化率および活性回復率の著しい上昇につながっていることを梅津らが明らかにしている⁽²⁹⁾。表1の実験において、アルギニンとグルタ

チオンの単独使用では、アルギニンのみの使用がグルタチオンのみの使用よりも効果がある結果になった。また、グルタチオンのみの使用は、無処理の試験区よりもやや回収率が低い結果となった。このことはグルタチオンの強いジスルフィド結合形成効果のために、折りたたみ中間体の不正確なジスルフィド結合形成が促進され、結果的に不溶画分となり損失した AFP1 蛋白質が増えてしまったと考えられた。

日比らは、活性再生を行った AFP1 蛋白質を用いてレースの異なるイネいもち病菌に対する抗菌活性を調べている⁽¹⁴⁾。AFP1 蛋白質は調べた全てのレースのイネいもち病菌に対して抗菌活性を示した。また筆者らは、AFP1 蛋白質のイネ病原微生物に対する抗菌スペクトルを調査している⁽²³⁾。AFP1 蛋白質はイネいもち病菌の他、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*) の糸状菌に対して強い抗菌活性を示した。このため AFP1 蛋白質は抗菌物質としての利用範囲は広いものと考えられる。さらに本報の AFP1 蛋白質、ダリア由来のディフェンシン Dm-AMP1 蛋白質、また AFP1 蛋白質と類似しているカブ由来のディフェンシン Rs-AFP2 蛋白質のそれぞれの遺伝子を導入して各種蛋白質を発現させたイネが、イネいもち病等の糸状菌病に強くなることが報告されている⁽¹⁶⁻¹⁹⁾。このようなことから、AFP1 蛋白質に限らずディフェンシンに分類される多くの蛋白質が広範な抗菌活性物質

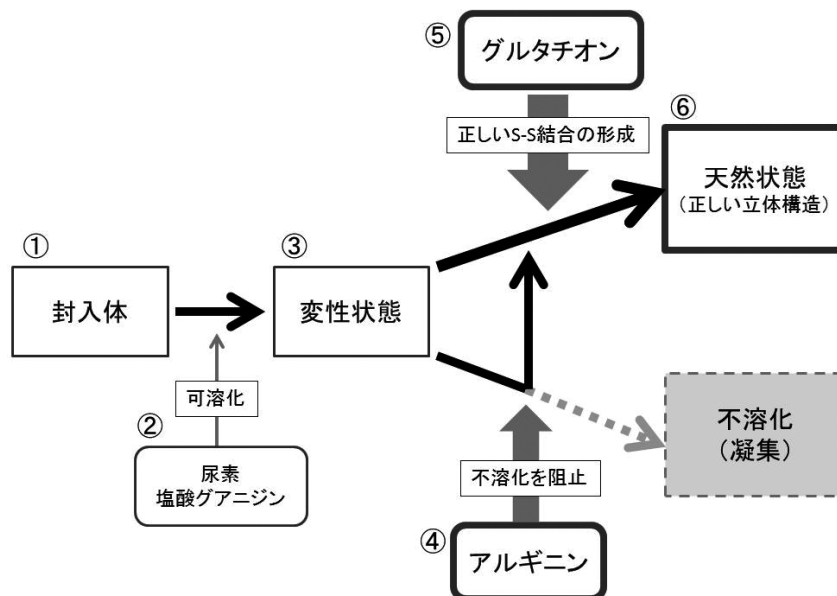


図3 AFP1 蛋白質の立体構造再生におけるアルギニンとグルタチオンの効果

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⁾、農薬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

- protein 1 by 1H NMR, *J. Mol. Biol.*, 279, 257-270.
- 11) Florack, D.E., Stiekema, W.J. (1994) Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol. Biol.*, 26, 25-37.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 日比忠晴・栃原孝志・提箸祥幸・森 浩一・森脇文治・矢頭 治・平八重一之・川田元滋 (2008) 大腸菌で発現させたカラシナ由来ディフェンシン (Bj-AFP1) の抗菌活性. 中央農研研究報告, 10, 1-8.
 - 15) DO, H.M., Lee, S.C., Jung, H.W., Sohn, K.H. and Hwang, B.K. (2004) Differential expression and *in situ* localization of a pepper defensin (*CADEF1*) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Sci.*, 166, 1297-1305.
 - 16) Jha, S., Tank, H.G., Prasad, B.D., Chattoo, B.B. (2009) Expression of *Dm-AMP1* in rice confers resistance to *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. *Transgenic Res.*, 18, 59-69.
 - 17) Jha, S., Chattoo, B.B. (2010) Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. *Transgenic Res.*, 19, 373-384.
 - 18) 川田元滋・中島敏彦・松村葉子・及川鉄男・黒田 秧 (2003) アブラナ科野菜がもつ抗菌タンパク質ディフェンシン遺伝子群の解析. 農業および園芸, 78 (4), 470-476.
 - 19) Kawata, M., Nakajima, T., Yamamoto, T., Mori, K., Oikawa, T., Fukumoto, F., Kuroda, S. (2003) Genetic Engineering for Disease Resistance in Rice (*Oryza sativa* L.) Using Antimicrobial Peptides. *JARQ*, 37, 71-76.
 - 20) Meyer, B., Houlné, 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.
 - 21) Nakajima, Y., Ishibashi, J., Yukuhiro, F., Asaoka, A., Taylor, D., Yamakawa, M. (2003) Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1624, 125-130.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) Schägger, H., Aquila, H., Von Jagow, G. (1988) Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 173, 201-205.
 - 25) Terras, F.R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torrekens, S., Van Leuven, F., Vanderleyden, J. (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, 7, 573-588.
 - 26) Thevissen, K., Warnecke, D.C., François, I.E., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zähringer, U., Thomma, B.P., Ferket, K.K., Cammue, B.P. (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.*, 279, 3900-3905.
 - 27) Tsumoto, K., Shinoki, K., Kondo, H., Uchikawa, M., Juji, T., Kumagai, I. (1998) Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent application to a human single-chain Fv fragment. *J.*

Immunol. Methods, 219, 119-129.

- 28) 津本浩平・三沢 悟・熊谷 泉 (2001) 凝集蛋白質を再生する - 効率的な凝集抑制手法の開発 -. 蛋白質 核酸 酵素, 46, 1238-1246.

- 29) Umetsu, M., Tsumoto, K., Hara, M., Ashish, K., Goda, S., Adschiri, T., Kumagai, I. (2003) How Additives Influence the Refolding of Immunoglobulin-folded Proteins in a Stepwise Dialysis System. J. Biol. Chem., 278, 8979-8987.

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

Yoshiyuki Sagehashi*¹, Takashi Tochihara*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

