

大腸菌を宿主としたイネチオニン蛋白質Osthi1の 生産と抗菌活性の評価

提箸祥幸*1・高久洋暁*2・矢頭 治*3

目 次

I はしがき	29	III 結果	32
II 材料および方法	30	1. 成熟型Osthi1蛋白質の発現と精製	32
1. Osthi1蛋白質発現株の作製	30	2. Osthi1蛋白質の抗菌活性の特性	32
2. Osthi1蛋白質の発現・精製方法	30	IV 考察	33
3. Tricine SDS-PAGE	31	V 摘要	34
4. 精製Osthi1蛋白質の質量分析	31	謝辞	35
5. 抗菌活性試験に供した微生物	31	引用文献	35
6. 抗菌活性測定方法	31	Summary	37

I はしがき

病原菌の作物への感染とそれに続く病徴の発生は、作物の減収の主要な原因となる。しかし、作物も自身を病原菌から守る方法を進化させてきた。病原菌の感染に素早く応答する蛋白質のひとつにPR (pathogenesis-related) 蛋白質がある^(7,9)。PR蛋白質は、生物活性やアミノ酸配列から現在では少なくとも17のファミリーに分類されている。イネでは細菌や糸状菌の感染で発現するものとしてPR1, PR8, PR10が報告されているが^(17,22,25)、他のPR蛋白質については病原菌種特異的に発現するという報告がいくつもあるのみである⁽⁶⁾。PR蛋白質には、分子量が小さく抗菌活性を有するものが存在し、それらのなかにPR13ファミリーとしてチオニンが含まれる。

チオニンは一般的に塩基性度が高くシステインを比較的多く含む45-47アミノ酸から構成され、分子量はおおよそ5 kDa程度である⁽²⁾。チオニン遺伝子はN末端シグナルペプチド、チオニン、C末端酸性ドメインの3つの部位から構成され、N末端シグナルペプチドおよびC末端酸性ドメインがプロセシング

を受けて、成熟チオニン蛋白質となる。チオニンと名の付くものには、 α/β -チオニンと γ -チオニンの2種類があり、 γ -チオニンはディフェンシン (PR12ファミリー) として現在では分類されている^(29,31)。 α/β -チオニン (以下、チオニンと記載) は、C-C-x5-(R, K)-x2-(F, Y)-x2-Cというコンセンサス配列を有し、その長さ、ジスルフィド結合の数、電荷などによって5種類 (I, II, III, IV, V) に分類される^(2,29)。チオニンは細菌や糸状菌、酵母に対して抗菌活性を示すことが知られているが、その機構については種々提案されているものの未だ確定していない。

イネにおいて、幼苗の子葉鞘にチオニン mRNA が局在することが確認されており、mRNA量は発芽直後の子葉鞘で非常に高く、その後経時的に低下し、発現が認められなくなることから、チオニンは発芽初期の病原菌感染に対する抵抗性に関与しているものと考えられる⁽¹⁹⁾。しかし、チオニン蛋白質の抵抗性への関与には不明な点が多く、その抗菌活

平成27年9月8日受付 平成27年12月16日受理

*1 現 農研機構 北海道農業研究センター

*2 新潟薬科大学

*3 農研機構 中央農業総合研究センター 作物開発研究領域

性や作用機構について解析することは、植物の持つ防御機構の解明だけでなく、各種病原菌に対する抵抗性を有する作物の作出につながる可能性がある。一方でイネには少なくとも非常に相同性の高い12のチオニン遺伝子が、ゲノム上の近い領域に存在しており⁽¹⁹⁾、相互のDNA塩基配列の相同性が高いため、RT-PCRやノーザン解析等の方法による発現解析あるいは抗チオニン抗体によるウエスタンブロット解析等では個々のチオニン蛋白質を識別できない可能性が高く、その特性解析には異種蛋白質発現系

を利用する必要があると考えた。

本研究では、大腸菌を利用してこれまで抗菌特性の不明であったイネ由来のチオニンのひとつであるOsthi1蛋白質を発現・精製するシステムを確立した。さらにそのシステムを利用し生産したOsthi1蛋白質を用いて抗菌特性の評価を行った。その結果、イネいもち病菌とヒト病原性真菌のカンジダに抗菌活性が確認され、将来的な抗菌成分としての利用の可能性が考えられたので報告する。

II 材料および方法

1. Osthi1蛋白質発現株の作製

Osthi1遺伝子はイネゲノム情報 (Accession No. AB072337) を基にthionin領域⁽¹¹⁾(図1)のN末端にBamHI, C末端にEcoRI制限酵素部位を導入したDNAを人工合成し、pIDTSMART-AMPベクターに導入したプラスミドを作製した(株式会社 医学生物学研究所)。グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) とOsthi1の融合蛋白質を作製するため、このプラスミドからOsthi1遺伝子を制限酵素BamHI およびEcoRIで切り出し、pGEX6P-1ベクター (GE Healthcare) のEcoRI-BamHI部位に導入し、pGEX6P-1/Osthi1を作製した。pGEX6P-1/Osthi1ベクターを大腸菌Rosetta-gami B (DE3) pLysS (Novagen) に形質転換した。

2. Osthi1蛋白質の発現・精製方法

Osthi1蛋白質の発現および精製方法は、Sagehashiらの方法に従った⁽²⁶⁾。

pGEX6P-1/Osthi1を保持するRosetta-gami B (DE3) pLysS株は、1リットル容のフラスコに400 mlの改変型Davis培地 (1リットルあたり、 K_2HPO_4 7 g, KH_2PO_4 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g, yeast extract 83 g, glucose 30 g, ampicillin 100 mg) を用いてOD₆₀₀が0.6になるまで37℃にて培養した。この時点でOsthi1蛋白質の発現を誘導するために、isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度1 mMで添加し、23℃で18時間培養した後、遠心分離にて菌体を回収した。

培養液3.2リットルから回収した大腸菌体を150 mlのPBSバッファー (1リットルあたり、NaCl 8 g,

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9 g, KCl 0.2 g, KH_2PO_4 0.2 g, pH 7.5) で均一に懸濁し、500 μlのTriton X-100を添加し、菌体溶液を70 rpmで30分間振とうすることで大腸菌の細胞膜を崩壊させた。さらにDNaseI (Roche Applied Science) を200 units加えて70 rpmで30分振とうした。遠心分離後、上清を回収し、0.45 μmのフィルター (IWAKI GLASS) でろ過を行った。この溶液を5 ml容量のGSTrap FFカラム (GE Healthcare) に通液し、GST-Osthi1の融合蛋白質をカラム内に結合させた後、5 mlのプロテアーゼ反応溶液 (1リットルあたり、Tris (hydroxymethyl) aminomethane 6.06 g, NaCl 2.92 g, EDTA 0.186 g, pH 7.3) に20 unitsのPreScission Protease (GE Healthcare) を混合した溶液をカラム内に満たし、4℃条件下でPreScission Proteaseを18時間反応させOsthi1蛋白質をGSTから切断した。反応後に、カラム内にプロテアーゼ反応溶液を送液することでOsthi1蛋白質をカラムから溶出させて回収した。溶出したOsthi1蛋白質溶液を透析により50 mM MES (pH 6.0) で平衡化後、同様に50 mM MES (pH 6.0) で平衡化した5 ml容量のHiTrap CM FFカラム (GE Healthcare) を用いてAKTA-FPLC (GE Healthcare) により分画した。その際のカラムに吸着したOsthi1蛋白質の溶出は、塩化ナトリウムによる濃度勾配を利用し行った。分画Osthi1蛋白質の確認はTricine SDS-PAGEで行い、その後YM-10およびYM-3スピニングカラム (Amicon) で限外ろ過 (14,000 × g, 4℃) を行い、高分子夾雑物を除去するとともに溶媒を超純水に置換した。得られたものを精製Osthi1蛋白質とした。

3. Tricine SDS-PAGE

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⁽²⁸⁾。

4. 精製 Osthil 蛋白質の質量分析

精製 Osthil 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 μ l の精製 Osthil 蛋白質とマトリックスであるシナピン酸 (20 mg/ml) 1 μ l 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。

5. 抗菌活性試験に供した微生物

Osthil 蛋白質の抗菌活性測定に、イネいもち病菌 *M. oryzae* Guy11、ヒト病原性真菌であるカンジダ *Candida albicans* CAI4、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A (ATCC:208352)、大腸菌 *Escherichia coli* JM109、イネ白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (MAFF210559)、イネ褐条病菌 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (MAFF106618) を使用した。*M. oryzae* Guy11 は国立研究開発法人農業生物資源研究所西村麻里江博士から、*C. albicans* CAI4 は千葉大学真菌医学センターから、イネ白葉枯病菌およびイネ褐条病菌は国立研究開発法人農業生物資源研究所ジーンバンクから分譲を受けた。大腸菌 JM109 はカラバイオ株式会社より購入した。

6. 抗菌活性測定方法

抗菌活性の測定は Tecan 社の safire² 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, 23, 26)。方法を以下に示す。精製 Osthil 蛋白質は 90°C で 10 分間加熱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 胞子/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、濃度が 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3,

5, 10 μ g/ml となるように調製した Osthil 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 Osthil 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吸光度 (OD₅₉₅ 値) 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) カンジダおよび出芽酵母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、濃度が 1, 3, 5, 10, 30 μ g/ml となるように調製した Osthil 蛋白質溶液を 20 μ l 添加し、同時にカンジダの場合は、ウリジン (和光純薬) を 25 μ g/ml になるように添加し、また出芽酵母の場合には、アデニン、ヒスチジン、ウラシル、ロイシン、トリプトファンを添加し、30°C で静置培養を行った。対照区は Osthil 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吸光度 (OD₆₀₀ 値) を 30 分毎に測定し、カンジダおよび出芽酵母の生育量を推定した。カンジダは 12 時間後、出芽酵母は 17 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。

3) 大腸菌、イネ白葉枯病菌、イネ褐条病菌の抗菌活性測定方法

抗菌活性測定培地は 4 倍に希釈したポリペプトン培地 (1 リットルあたり、yeast extract 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g) 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、濃度が 10, 30, 50, 100, 140 μ g/ml となるように調製した Osthil 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 Osthil 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吸光度 (OD₆₀₀ 値) を 30 分毎に測定し、生育量を推定した。大腸菌は 12 時間後、イネ白葉枯病菌およびイネ褐

条病菌は18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。

Ⅲ 結果

1. 成熟型 Osthil 蛋白質の発現と精製

Osthil 蛋白質は、他のチオニンと同じようにN末端側のシグナル配列とC末端側の酸性ドメインが除去され成熟型となる⁽¹¹⁾(図1A)。成熟型のOsthil蛋白質は、6つのシステイン残基を含む45アミノ酸からなり、分子内で3つのジスルフィド結合を形成すると考えられた⁽²⁾(図1B)。このため、強い還元状態が保たれている大腸菌体内で発現させると、安定なジスルフィド結合が形成されずに分解されるか、封入体を形成する可能性を有する^(20,27)。そこで発現蛋白質の溶解性を高めることを目的に、可溶性の高いGSTを融合した蛋白質としてOsthilを発現させる方法に加えて、大腸菌細胞内のレドックス制御機構を破壊して酸化状態を高めたRosetta-gami B (DE3) pLysS株を宿主として利用する方法を選択した。この発現系では、最終的な精製蛋白質として、培養液1リットルあたり70-100 µgのOsthil蛋白質が得られた。また、Tricine SDS-PAGEおよび質量分析の結果、Osthil蛋白質は単一の蛋白質として精製されていることを確認し(図2)、さらに還元剤であるDTT処理により質量数が6増加することから(表1)、3つ

のジスルフィド結合が形成されていることが考えられた。

2. Osthil 蛋白質の抗菌活性の特性

精製したOsthil蛋白質を用いてイネいもち病菌 (*M. oryzae* Guy11), カンジダ (*C. albicans* CAI4), 出芽酵母 (*S. cerevisiae* W303-1A), 大腸菌 (*E. coli* JM109), イネ白葉枯病菌 (*X. oryzae* pv. *oryzae*), イネ褐条病菌 (*A. avenae* subsp. *Avenae*) の6種の微生物に対する抗菌活性を評価した(表2)。Osthil蛋白質は、イネいもち病菌, カンジダ, 出芽酵母に抗菌活性を示した。イネいもち病菌に対しては1.75 µg/ml, カンジダには4.37 µg/ml, 出芽酵母には4.74 µg/mlのIC₅₀値であった。イネいもち病菌に対してのOsthil蛋白質の抗菌活性レベルは、抗イネいもち病菌の薬剤成分として知られるカスガマイシンの2.5 µg/mlと同等であった⁽²⁶⁾。その一方で、大腸菌, イネ白葉枯病菌, イネ褐条病菌に対しては、調査した140 µg/ml濃度の範囲内では増殖の阻害効果はなく、抗菌活性を示さなかった。

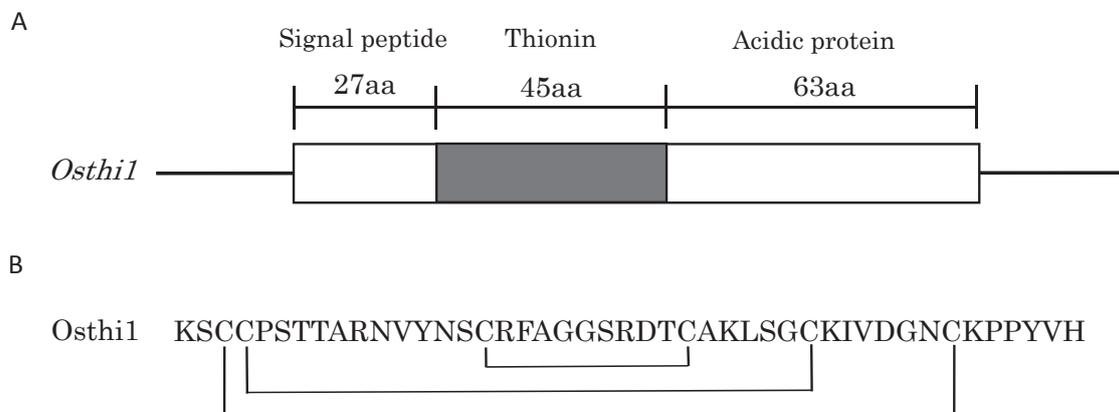


図1 Osthil 遺伝子の構成と Osthil 蛋白質のアミノ酸配列

注) A: Osthil 遺伝子は Signal peptide, Thionin, Acidic protein の3領域から構成されている。

図はIwaiら(2002)のものを参考に一部を改変して作成した。

B: Osthil 蛋白質のアミノ酸配列と予想されるジスルフィド結合の位置。

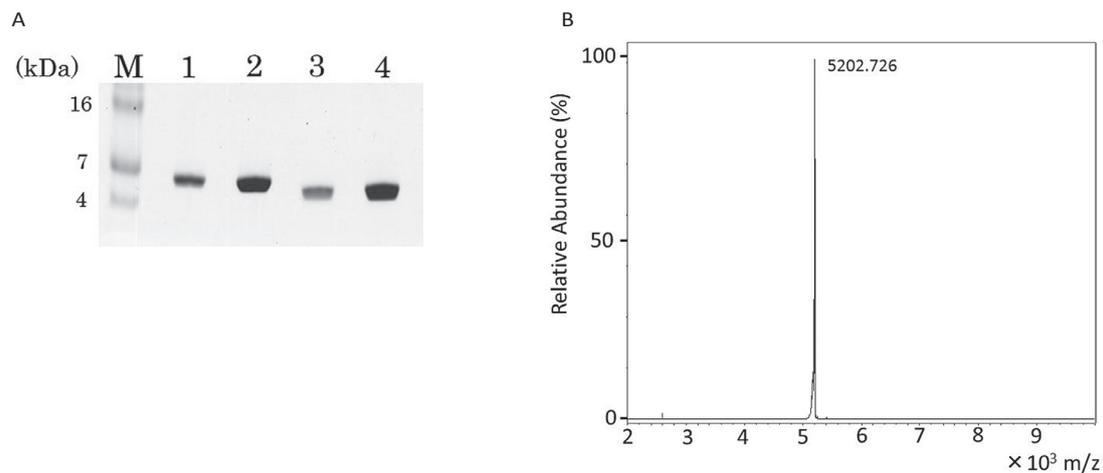


図2 大腸菌を宿主とした Osthil 蛋白質の精製

注) A: 精製した Osthil のトリシン SDS-PAGE の泳動. M は分子量マーカー, 1 は AFP1 (1.5 µg), 2 は AFP1 (4.5 µg), 3 は Osthil (1.5 µg), 4 は Osthil (4.5 µg) の蛋白質試料. AFP1 はアブラナ科植物由来のディフェンシン蛋白質で, 51 アミノ酸で構成され, 分子内に 4 つのジスルフィド結合を有する抗菌性蛋白質である. 本研究の Osthil と同様に pGEX6P-1 ベクターを用い, Rosetta-gami B (DE3) pLysS を宿主として発現・精製したものであり, Osthil 蛋白質の Tricine SDS-PAGE の比較として用いた.
B: 精製した Osthil 蛋白質の質量分析のチャート.

表1 Osthil 蛋白質の DTT 処理の有無による質量数の変化

DTT 処理	質量数
-DTT	5201.726
+DTT	5207.652

注) -DTT は DTT 無処理, +DTT は 5 mM の DTT で 30 分間処理した.

表2 Osthil 蛋白質の抗菌活性

検定微生物	IC ₅₀ 値 (µg/ml)
イネいもち病菌 (<i>Magnaporthe oryzae</i>)	1.75 (± 0.40)
カンジダ (<i>Candida albicans</i>)	4.37 (± 0.46)
出芽酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	4.74 (± 1.16)
大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	>140
イネ白葉枯病菌 (<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)	>140
イネ褐条病菌 (<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>)	>140

注) IC₅₀ 値は 3 回の測定の平均値で示し, 括弧内の数値は標準偏差を示す.

IV 考察

本研究では, イネの防御蛋白質の一種であるチオニンについての知見を得るため, 大腸菌でイネのチオニン Osthil 蛋白質を生産し, Osthil 蛋白質の種々の微生物に対する抗菌活性を評価した.

これまでイネ由来のチオニン蛋白質を単離もしくは異種蛋白質発現系を利用して生産し, その機能について解析した報告例はなく, 他の植物でい

くつか報告があるのみである^(1,24). チオニンは細菌, 糸状菌, 酵母に抗菌活性を示すものが報告されているが⁽²¹⁾, イネ由来チオニンのひとつである Osthil 蛋白質の抗菌特性に関してはこれまで報告がなされていない. Iwai らは当時細菌病に対する防御効果があると考えられていたチオニンの一種である Osthil 遺伝子がイネ子葉鞘で発現している

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な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. *matthiolae*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、より効率的かつ低コストでの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 Osthil 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、Osthil 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

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-AMPI* 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.,

- Oikawa, T., Fukumoto, F. and Kuroda, S. (2003) Genetic Engineering for Disease Resistance in Rice (*Oryza sativa* L.) Using Antimicrobial Peptides. *JARQ*, 37, 71-76.
17. Kim, S.T., Yu, S., Kang, Y.H., Kim, S.G., Kim, J.Y., Kim, S.H. and Kang, K.Y. (2008) The rice pathogen-related protein 10 (*JIOsPR10*) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity. *Plant Cell Rep.*, 27, 593-603.
 18. Kim, V., Cammue, B.P. and Thevissen, K. (2014) Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules*, 19, 12280-12303.
 19. Kitanaga, Y., Jian, C., Hasegawa, M., Yazaki, J., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Nakamura, H., Ichikawa, H., Asami, T., Yoshida, S., Yamaguchi, I. and Suzuki, Y. (2006) Sequential regulation of gibberellin, brassinosteroid, and jasmonic acid biosynthesis occurs in rice coleoptiles to control the transcript levels of antimicrobial *thionin* genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2410-2419.
 20. Lilie, H., Schwarz, E. and Rudolph, R. (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 497-501.
 21. Loeza-Angeles, H., Sagraero-Cisneros, E., Lara-Zarate, L., Villagomez-Gomez, E., Lopez-Meza, J.E. and Ochoa-Zarzosa, A. (2008) Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotechnol. Lett.*, 30, 1713-1719.
 22. Mitsuhashi, I., Iwai, T., Seo, S., Yanagawa, Y., Kawahigashi, H., Hirose, S., Ohkawa, Y. and Ohashi, Y. (2008) Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Mol. Genet. Genomics*, 279, 415-427.
 23. 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.
 24. Oita, S. (2003) Synergistic bactericidal effect of α -purothionin and chelating agents for Gram-negative food-poisoning bacteria. 近畿中国四国農業研究センター研究報告, 2, 59-66.
 25. Park, C.H., Kim, S., Park, J.Y., Ahn, I.P., Jwa, N.S., Im, K.H. and Lee, Y.H. (2004) Molecular characterization of a pathogenesis-related protein 8 gene encoding a class III chitinase in rice. *Mol. Cell*, 17, 144-150.
 26. Sagehashi, Y., Oguro, Y., Tochihara, T., Oikawa, T., Tanaka, H., Kawata, M., Takagi, M., Yatou, O. and 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.
 27. 提箸祥幸・栃原孝志・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
 28. 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.
 29. Stec, B. (2006) Plant thionins-the structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63, 1370-1385.
 30. Stotz, H.U., Thomson, J.G. and Wang, Y. (2009) Plant defensins: defense, development and application. *Plant Signal Behav.*, 4, 1010-1012.
 31. 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., Cammue, B.P. and Broekart, W.F. (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, 7, 573-588.
 32. Thevissen, K., Ghazi, A., De Samblanx, G.W., Brownlee, C., Osborn, R.W. and Broekart, W.F. (1996) Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.*, 271, 15018-15025.

Production of the recombinant rice thionin peptide Osthi1 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 Osthi1 peptide that contains three disulfide bounds, and has a molecular weight of approximately 5 kDa, as a recombinant peptide in *Escherichia coli*. Recombinant Osthi1 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 Osthi1 could act as a potent antifungal agent. To our knowledge, this is the first report of a system of rice thionin Osthi1 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