

# 研究成果報告書

事業名（補助金名）	基盤的研究開発育成事業（共同研究補助金）
研究開発テーマ名	コムギシスタチンに内在する新規抗菌ポリペプチドの分子デザイン
研究代表者名	今井 亮三 【農業・食品産業技術総合研究機構／主任研究員】
共同研究者名	佐々木健太郎 【農業・食品産業技術総合研究機構／研究員】
共同研究者名	津田 栄 【産業技術総合研究所／グループリーダー】
共同研究者名	近藤 英昌 【産業技術総合研究所／研究員】

## 1. 背景・目的

コムギ、牧草等の越冬性作物の多雪地帯での安定的生産を脅かす雪腐病は、様々な好冷性糸状菌により引き起こされる。北海道においては、鞭毛菌類に属する褐色雪腐病菌 (*Phytiun iwayamai*)、子のう菌類に属する紅色雪腐病菌 (*Microdochium nivale*)、雪腐大粒菌核病菌 (*Sclerotinia borealis*)、担子菌に属する雪腐黒色小粒菌核病菌 (*Typhla ishikariensis*) 等の病原菌が被害を及ぼしている。雪腐病菌は一般的に低温で多湿の環境を好むため、その感染は、積雪下で長期間をかけて徐々に進行する。この特徴的な感染形態のため、雪腐病抵抗性の機構は分子生理学的にはほとんど解明されていない。また、育種的に利用可能な遺伝資源も限られていることから、抵抗性を賦与する遺伝子の導入など、新たなアプローチが求められている。また、雪腐病菌に対する防除対策として現在、イミノクダジン酢酸塩、チオファネートメチル、有機銅、硫酸銅等の根雪前処理が行われているが、効果が不安定である上、降雨などによる環境中へ汚染が問題になっており、よりクリーンな防除法の開発も望まれている。

コムギや牧草では、晩秋の低温を認識し、越冬に必要な耐凍性を獲得することが知られている。これは低温馴化と呼ばれる低温環境への適応機構であるが、その過程には多くの遺伝子の発現誘導を介した生理的变化が伴う。我々はコムギの低温馴化過程で雪腐病抵抗性が増大することに注目し、低温認識により誘導される抗菌タンパク質遺伝子の探索を行った。その過程で、マルチドメインシスタチンをコードする遺伝子(TaMDC1)を単離した。シスタチンはシステインプロテアーゼ阻害タンパク質であり、植物における機能としては、種子中の発芽プロテアーゼ活性の抑制、虫害抵抗性等が知られている。TaMDC1 (23kD)には2つのドメインが推定され、ドメインIは植物シスタチンと相同性が高く、シスタチン保存モチーフを持つ。ドメインIIは植物シスタチンと全体的に弱い相同性を有するが、シスタチンモチーフを持たない。我々は、マルチドメインシスタチンTaMDC1がコムギにおいて、低温で誘導される病害抵抗性に関与する可能性を検討した。TaMDC1を大腸菌に過剰発現させ、組み換えタンパク質を精製した。組み換えTaMDC1はパパイン阻害活性を示すのに加え、紅色雪腐病菌に対し、50μg/mlの濃度でほぼ完全に菌糸の生長を阻害する活性を有していた(Christova et al. 2006)。更に、TaMDC1のドメインI、ドメインIIのみからなるポリペプチドをそれぞれ精製し、パパイン阻害活性及び抗菌活性を調べ、ドメインIが両活性を持ち、ドメインIIは抗菌活性のみを持つこと明らかにした。これらの結果より、抗菌活性にはプロテアーゼ阻害活性を必要としないこと、ドメインIのみに存在するシスタチンモチーフがプロテアーゼ阻害活性に関与し、ドメインI、ドメインII共通の別の配列が抗菌活性に関与することが示唆されている。本研究では、ドメインI、ドメインIIの1次及び高次構造比較を基に、ドメインIIに対して欠失変異、部位指定変異を実施し、より抗菌活性の強いポリペプチドをデザインすることを目的とした。

## 2. 内容・方法

### (1) TaMDC1のドメインIIにおける最小機能領域の決定

これまでの研究から、TaMDC1のドメインIIを含む領域(D2, 115残基)がシスタチン活性を伴わない抗菌活性を有することが分かっている。本領域をコードする遺伝子に対し、部位指定変異をGeneEditor System (Promega) を用いて導入し、N末端側、C末端側よりそれぞれ欠失させた一連のタンパク質遺伝子を作製した。各欠失遺伝子をpGEX6P-3 (アマシャム) に組み込み、GST融合タンパク質として大腸菌に発現させた。

TaMDC1タンパク質及びその部分ポリペプチドは大腸菌中で可溶性画分に多量に蓄積する性質を持つことが明らかになっており、各欠失体についても高次構造を大きく変えない範囲で可溶化することが期待された。

組み換えタンパク質をコードする遺伝子を大腸菌 (BL21 DE3) に形質転換し大腸菌粗抽出液より、グルタチオンセファロースカラム上のプロテアーゼ消化により、各タンパク質をGSTタグのない形で精製した。抗菌活性は紅色雪腐病菌 *Microdochium nivale* MCW222-7株を供試菌として、液体培養における増殖阻害活性により定量化した。

#### (2) 部位指定変異導入による抗菌活性に重要なアミノ酸残基の決定

3次構造のモデリングはModWebのModeler8v1 web severを利用し、初期パラメータを用いて行った

(<http://alton.compbio.ucsf.edu/modweb-cgi/main.cgi>)。モデルとしてはイネのoryzacystatin OC-I (PDF id: 1EQK) の立体構造を用いた。1次構造及び推定した立体構造を基に、抗菌活性に必要な構造上の重要残基を推定した。GeneEditor kitを用いて、D2Sに対してアミノ酸置換及び欠失を導入した。部位指定変異法により作製された置換体等を大腸菌に発現し、上述の方法により精製した。精製タンパク質の抗菌活性は、マイクロタイヤープレートを用いた濁度測定により定量化した。菌糸の形態観察はラクトフクシン液により染色し、光学顕微鏡 (OLYMPUS BX51) を用いて行った。

#### (3) TaMDC1の結晶化

TaMDC1を大腸菌より組み換えタンパク質として精製し、結晶化条件スクリーニング試薬を用いた結晶化条件を検討した。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法(hanging-drop vapour-difusion method)を用いた。一つの結晶化ドロップあたり0.5μlのサンプル (10.9 mg/ml, または7 mg/ml) を使用し、ドロップはサンプルと等体積の結晶化溶液を混合した。結晶化溶液は、市販されている溶液キット及び自作の溶液キットを用いた。市販品としては以下のものを使用した。Index (Hampton Research製), Basic Kit (Sigma製), Extension Kit (Sigma製), Wizard I (Emerald BioSystems製), Wizard II (Emerald BioSystems製)。キット中の溶液の選択は、スパースマトリックスサンプリング法(sparse-matrix sampling method)で行い、必要に応じて、様々なタンパク質の結晶化条件を参考に、効率的に広範囲の検索ができるような溶液条件を組み合わせた。自作のものとしては、PEG Grid (7種のPEGと4種類のpHのバッファーと硫酸を組み合わせたもの)を用いた。

### 3. 結果・成果

#### (1) TaMDC1のDomain IIにおける最小機能領域の決定

ドメインII (アミノ115残基) にN末端側、C末端側より欠失を導入しドメインIIIs (D2S, 53残基) を作出了した(図1)。D2SをGST融合タンパク質として大腸菌中に高発現させたところ、可溶性画分に回収された。GSTカラムとPrecisionプロテアーゼを用いた精製により、タグを含まない形で精製された。精製D2Sタンパク質を用いて、紅色雪腐病菌 (*Microdochium nivale*) に対する抗菌活性を調べた。D2Sは強い抗菌活性を持ち、50%生育阻害濃度 (EC50) 値はD2のそれより若干高かった(比活性が低かった)がD1のものとはほぼ同じであった(表1)。D2Sが抗菌タンパク質として高いレベルの活性を維持したことから、D2が示す抗菌活性はD2Sの部分に由来すると考えられた。

A

	ZD	4D	5D	6D	LDD
TANDOL	: NOVA ATENDEU CANTO ALLIAZ ALIENAT GOSAIA LIGAM AGENT	: LDD			
DL	:	-GOSAIA	-GOSAIA	-GOSAIA	-LDD
DZ	:				-
DZS	:				-
	LED	L4D	L5D	LED	ZDD
TANDOL	: GOSAIA LIGAM AGENT	: GOSAIA LIGAM AGENT	: GOSAIA LIGAM AGENT	: GOSAIA LIGAM AGENT	: ZDD
DL	: GOSAIA LIGAM AGENT				-LDD
DZ	: GOSAIA LIGAM AGENT	-GOSAIA LIGAM AGENT	-GOSAIA LIGAM AGENT	-GOSAIA LIGAM AGENT	-ZD
DZS	:	-GOSAIA LIGAM AGENT	-GOSAIA LIGAM AGENT	-GOSAIA LIGAM AGENT	-ZD
	ZZD	Z4D			
TANDOL	: ZZD	Z4D			
DL	:	-			
DZ	: ZZD	Z4D			
DZS	:	-			

B



C

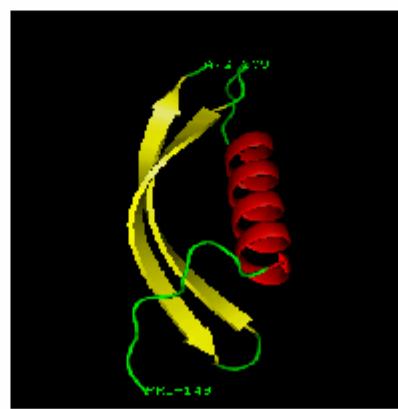


図 1. TaMDC1の各ドメインの1次配列及び高次構造比較  
A. D1, D2, D2Sのアライメント. シスタチン保存配列をボックスで示す.  
B. D1の立体構造モデル. C. D2の立体構造モデル.

表1. TaMDC1各ドメインの抗菌活性

Polypeptide	EC <sub>50</sub> (μM)	95% Confidence Intervals	
		Lower	Upper
D1	0.0990	0.0057	- 1.7300
D2	0.0665	0.0119	- 0.3687
D2S	0.0982	0.0298	- 0.3236

## (2) D2Sに対する部位指定変異

D2Sに見られる抗菌活性を更に詳細に検討するため、部位指定変異法によるアミノ酸置換、内部欠失変異を導入した変異体を作出した（図2）。抗菌性発現に重要なアミノ酸を決定するため、D1とD2Sに保存されているアミノ酸残基に対して置換を導入した。D2S各変異体を組み換えタンパク質として精製し、*M. nivale*に対する抗菌活性を調べた。始めに、30 µg/mlのD2S及びその変異体を用いて、2週間後の試験管内の生育を調べると、図3Aに示すとおり、各タンパク質も一様に抗菌活性を有することが判明した。更に顕微鏡観察により、各タンパク質間での菌糸の伸長阻害過程を観察したところ、抗菌活性に違いが見られ、いくつかの変異体において、菌糸の形態異常の誘発が遅れることが分かった（図3B）。これらの変異体においては、抗菌活性が低下していると考えられた。変異体の示す抗菌活性に関してより定量的な比較を行うために、*M. nivale*の生育をマイクロタイタープレート上でモニターし、7日後のOD492nmより、EC50値（50%生育阻害濃度）を求めた（表2）。D2Sの173番目のGlnをProに置換した変異体（Q173P）、190番目のAlaをArgに置換した変異体（A190R）においては置換による抗菌活性の変化はほとんど観察されなかった。D2SのN末端から10アミノ酸残を欠失した変異体（del\_P159）においては著しい抗菌活性の低下が見られた。また、D2Sの予想されるα-ヘリックスとループの境界にある175番目のArgをAlaに置換した変異体（R175A）、ループとβ-シートの境界にある182番目のTyrをAlaに置換した変異体（Y182A）においても明確な抗菌活性低下が観察された。これらのアミノ酸残基が構造、機能発現上重要であることが示唆された。また、177番目のAsnをAlaに、179番目のLeuをAlaにそれぞれ置換した変異体、C末端5アミノ酸を欠失させた変異体（del\_E193）においては微弱な活性減少が観察された。これまでに、抗菌活性を完全に喪失した変異体は得られていないが、いくつかのアミノ酸置換により活性が大きく変化することが明らかとなった。

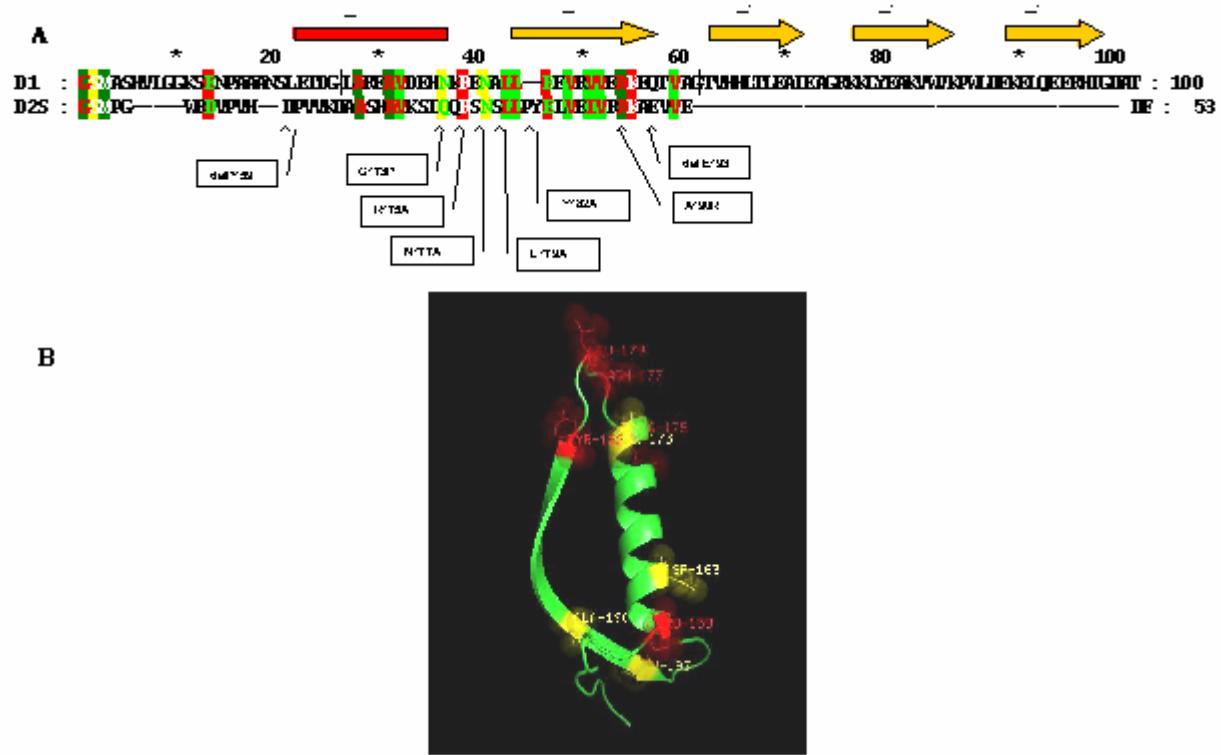


図2. D2Sドメインに対する変異の導入

(A) D1とD2S間の配列比較。保存されている機能的相同アミノ酸を色で示す。推定2次構造をバー( $\alpha$ -ヘリックス)あるいは黄矢印( $\beta$ -シート)で示す。部位指定変異及び欠失変異を導入した部位を黒矢印で示す。(B) D2Sドメインの推定立体構造及び変異導入アミノ酸残基を示す。

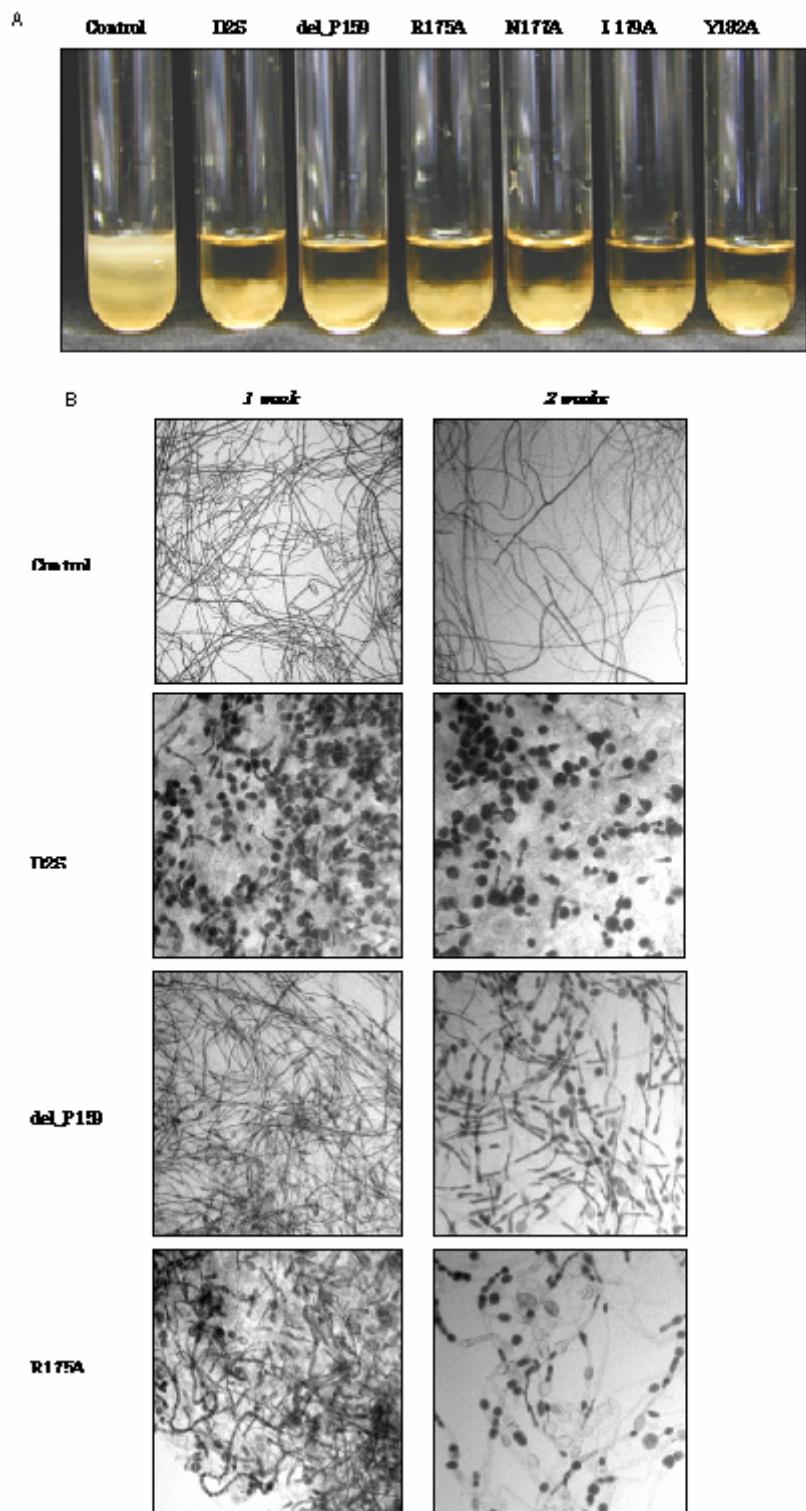


図 3. D2S 及びその変異体の抗菌活性.

(A) 各変異体の液体培養における紅色雪腐病菌の生育阻害効果. *M. nivalis* の菌糸 ( $10^3$ - $10^4$  cfu/ml) を  $30\mu\text{g}/\text{mL}$  の D2S, del\_P159, R175A, N177A, L179A, Y182A を含む培地で  $15^\circ\text{C}$  で 7 日間培養したときの培養液の様子.

(B) 各抗菌ポリペプチド存在下で培養した *M. nivalis* 菌糸の形態の顕微鏡観察. 培養開始 1 週間及び 2 週間後の菌糸をラクトフクシン染色して観察した.

表2. D2S 変異体の *M. nivale*に対する抗菌活性

Polypeptide	EC50 ( $\mu\text{M}$ )	95% Confidence Intervals	
D2S	0.0657	0.0580	- 0.0730
delP159	6.1788 ***	3.1465	- 12.1330
Q173P	0.1522	0.1074	- 2.1569
R175A	2.3562 ***	2.1560	- 2.5740
N177A	0.6692 ***	0.4871	- 0.9192
L179A	0.3318 ***	0.2893	- 0.3804
Y182A	2.4732 ***	1.7246	- 3.5468
A190R	0.1192	0.0892	- 0.1592
delE193	0.4039 ***	0.3373	- 0.4834

\*\*\* F 検定で D2S との間で有意差  $p < 0.01$

### (3) TaMDC1 の結晶化

ドメインIIに対する変異はオリザシスタチンの構造に対するモデリングに基づいて設計、導入したが、より正確な立体構造解明のためにはX線回折による構造解明が必要である。ドメインI, IIがどのように配置で高次構造を形成するのかに関する情報も、3D構造の解明を待たなければならない。そこで、TaMDC1の結晶化を試みた。独立に精製した2種類の精製タンパク質を用いて結晶化実験を行った。サンプル1 (10.9mg/ml) については、Index 96通り (96条件中)、PEG Grid 84通り (84条件中) をテストした。サンプル2 (7mg/ml) については、Index 96通り (96条件中)、Basic Kit 48通り (48条件中)、Extension Kit 17通り (48条件中)、Wizard I 24通り (48条件中)、Wizard II 48通り (48条件中)、延べ数で509種の条件をテストした。しかしながら、これらの条件下で明確な結晶化は観察されなかった。サンプル2のIndex中の一つの条件 (0.1M HEPES pH7.0, 1.0Mコハク酸 pH7.0, 1% PEGMME2000)において小さな結晶の生成が観察されたが、大きさが非常に小さいためタンパク質の結晶であるかどうかの判定はできなかった。今後この条件の再検討が必要である。

### 4. 今後の展開

今回の研究で TaMDC1 のドメインIIにおける抗菌活性決定領域を 53 アミノ酸残基にまで絞り込み、更にいくつかの活性に重要な残基の特定ができた。残念ながら結晶化が困難であり、立体構造解析は進んでいない。今後は、タンパク質の精製法を最検討し、より高純度で高収量な精製試料が供試できるような方法を再検討する必要があるであろう。また、2つのドメイン間のゆらぎが結晶化を阻害している可能性も考えられるので、ドメイン2のみを精製し、その構造を決定するという方向も検討すべきであろう。一方で、更に多くの置換欠失変異体を作出し、抗菌活性に必要なアミノ酸配列を特定するアプローチも進めていく必要がある。