

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

今井 亮三 [農業・食品産業技術総合研究機構/主任研究員]

佐々木 健太郎 [農業・食品産業技術総合研究機構/研究員]

津田 栄 [産業技術総合研究所/グループリーダー]

近藤 英昌 [産業技術総合研究所/研究員]

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、好冷性糸状菌により引き起こされる。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、低温で誘導される抗菌タンパク質マルチドメインシスタチン(TaMDC1)を単離した。TaMDC1はシスタチン様ドメインを2つ持ち、システインプロテアーゼ阻害活性と雪腐病菌に対する抗菌活性を同時に持つ。本研究では、抗菌性を示すドメインIIの抗菌活性を決定する配列及び立体構造を明らかにすることを目的とした。

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

TaMDC1のドメインIIを含む領域(D2、115残基)に対し、部位指定欠失変異を導入し、紅色雪腐病菌 *Microdochium nivale* MCW222-7株を供試菌として抗菌活性を調べた。

(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

抗菌活性に必要な構造上の重要残基を推定し、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を定量化した。

(3) TaMDC1の結晶化

結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法を用いた。一つの結晶化ドロップあたり0.5μlのサンプル(10.9μg/ml、または7μg/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。

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(D2、115残基)にN末端側、C末端側より欠失を導入してドメインIIIs(D2S、53残基)を作出し、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。本タンパク質は、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(IC50)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。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。

(2) D2Sに対する部位指定変異

D2Sに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。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。30μg/mlのD2S及びその変異体を用いて、2週間後の試験管内での生育を調べると、各タンパク質もD2Sと同様な抗菌活性を示した。しかし、詳細な顕微鏡観察により、各タンパク質の菌糸伸長阻害過程を観察したところ、いくつかの変異体において、菌糸の形態異常の誘発に遅延が見られた。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。より定量的な比較を行うために、*M. nivale*の培養7日後のOD492nmより、IC50値を求めた。D2Sアミノ酸置換変異体Q173P、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)は抗菌活性が著しく低下した。また、置換変異体R175A、Y182Aにおいても明確な抗菌活性低下が観察された。従って、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。

(3) TaMDC1の結晶化

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を用いた。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。延べ数で509種の条件をテストしたが、これらの条件下で明確な結晶化は観察されなかった。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。

今後の展望

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。残念ながら立体構造解析は進んでいない。今後は、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。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る。また、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行きたい。