

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06059

研究課題名（和文）植物病原菌防除を目的に分離した抗菌タンパク質の同定と作用機構の解明

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of antibacterial proteins isolated for plant pathogen control.

研究代表者

浴野 圭輔 (Ekino, Keisuke)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：30310030

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：植物病原菌の防除を目的に分離した*Bacillus thuringiensis*のうち、A297株はジャガイモそうか病菌に対して抗菌活性を示す。本菌株が生産する抗菌タンパク質を精製した結果、2種類の抗菌タンパク質を産生していることが明らかとなった。これら抗菌タンパク質はこれまでに機能が解明されているタンパク質との相同性はなく、新規な機能性タンパク質であることが明らかとなった。膜損傷の有無を指標とした蛍光染色により抗菌タンパク質の作用機構を解析した。顕微鏡観察の結果、本研究課題で単離した抗菌タンパク質はジャガイモそうか病菌の細胞膜を損傷し、生育を阻害していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病原菌の微生物防除を目的に、ジャガイモそうか病の病原菌に対して抗菌活性を示す微生物を分離した。この微生物が生産する2種類の抗菌タンパク質が、ジャガイモそうか病菌の生育を阻害することが明らかとなった。また、今回発見した抗菌タンパク質はこれまで知られていない新規なタンパク質であり、その作用機構はジャガイモそうか病菌の細胞膜の損傷であることが示唆された。微生物による植物病の防除は、化学農薬の低減に寄与し、環境への負荷を減らすことができる。

研究成果の概要（英文）：Among *Bacillus thuringiensis* isolated for the purpose of controlling plant pathogenic fungi, strain A297 exhibits antibacterial activity against the potato scab pathogenic *Streptomyces* strains. As a result of purifying the antibacterial protein produced by this strain, it became clear that it produced two kinds of antibacterial proteins. These antibacterial proteins have no homology with proteins whose functions have been elucidated so far, and were found to be novel functional proteins. The mechanism of action of the antibacterial protein was analyzed by fluorescence staining using the presence or absence of membrane damage as an index. As a result of microscopic observation, it was suggested that the antibacterial protein isolated in this research project damaged the cell membrane of the potato scab pathogenic *Streptomyces* strains and inhibited its growth.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Bacillus thuringiensis 植物病原菌 そうか病 抗菌タンパク質

1. 研究開始当初の背景

***Bacillus thuringiensis* (BT)** は菌体内にタンパク質のかたまり (結晶性タンパク質) を形成する。この結晶性タンパク質に殺虫活性を示すタンパク質を生産する菌株が発見されて以来、これまでに様々な昆虫に作用する多数の殺虫タンパク質が発見されている。これら殺虫タンパク質は非常に多様性に富んでいることから興味深い研究対象として多くの基礎研究が行われてきた。一方、これらの殺虫活性は微生物農薬として実用化されるとともに、農作物に病害虫耐性を付与するためのツールとして、遺伝子組換え作物に利用されている。

微生物は、非常に多種多様な二次代謝産物を生産することから、生物活性物質の探索対象として、これまで数多くの有用物質を供給してきた。近年、次世代シーケンサーの勃興により、微生物のゲノム解析が容易に行えるようになってきた。さらに、ゲノム情報から二次代謝産物の生産に特徴的な遺伝子配列を探索するためのソフトウェア「**antiSMASH**」などが開発され、それら生産関連遺伝子群を容易に推定できるようになっている。このようなゲノムマイニングの結果、二次代謝産物生産関連遺伝子群は存在するが、発現していない所謂“眠っている”遺伝子群が多数存在することが明らかになってきた。これら“眠っている”遺伝子群を活性化することは重要な研究課題のひとつとなっている。***Bacillus***属細菌にも、放線菌同様、多くの二次代謝産物を生産する菌株が存在することが次第に明らかとなってきた。

我々はこれまで**BT**の結晶性タンパク質中に存在する培養細胞損傷タンパク質に関する研究を実施しているが、上記のような状況から植物病原菌に対する抗菌作用を示す**BT**菌の探索を行った結果、いくつかの植物病原菌に対して有効な**BT**菌株を単離することに成功している。

ジャガイモの主要な植物病のひとつであるそうか病は、表皮にかさぶたのような病斑が現れることから見た目が劣るため商品価値を失う。その主な原因菌である***Streptomyces scabies***は、寄主作物に依存せずに土壤中で長期間生存して土壌伝染するため難防除土壌病害の代表とされている。我々が分離した**BT**菌株のうち、**A297**株がそうか病菌に有効であることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

微生物の二次代謝産物は有用な生物活性を示す一方、その生産には多数の遺伝子産物が関わっているため、遺伝子組換え作物に適応するのは非常に困難である。一方、タンパク質性の生物活性であれば、遺伝子組換え作物への利用が容易である。上述したような研究背景のもと、我々が単離した植物病原菌に効果を示す菌株のうち、ジャガイモそうか病の病原菌である***S.scabies***に対して抗菌活性を示す**A297**株は、その培養上清に抗菌性のタンパク質を産生することが示されている (図 1)。また、これまで ***Bacillus***

属細菌が生産する **iturin A**、**surfactin**、**macrolactin A** などの二次代謝産物が、ジャがいもそうか病菌に対して抗菌活性を示すことは知られているが、タンパク質性のもは報告されていない。従って、遺伝子組み換え作物の作出のツールとして有効であるだけでなく、新規性が高いことが予想されたことから、本抗菌タンパク質の詳細を明らかにすることを目的とした。

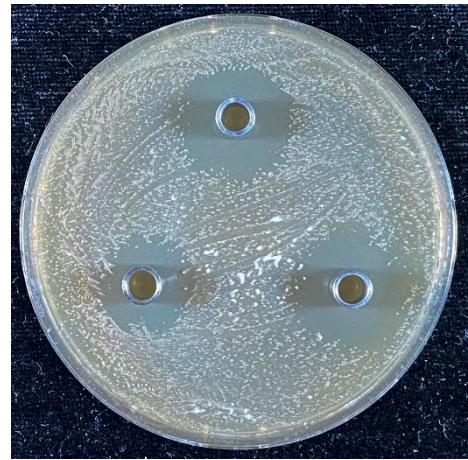


図1 A297の抗菌活性

S.scabies NBRC 13767 をブイヨン平板培地に塗布し、A297 株の培養上清をペニシリンカップに添加後、30℃にて培養した。

3. 研究の方法

(1) 抗菌タンパク質の精製と遺伝子クローニング

A297 株をブイヨン液体培地で振とう培養した培養上清をサンプルとして、以下の検定による活性を指標に抗菌タンパク質の精製を行った。ジャガイモそうか病菌 *S.scabies* NBRC 13767 をマルトースベネット培地で液体培養した培養液を同平板培地の一面に広げた検定培地を作成し、その培地上にサンプルを添加することで、抗菌活性を検定した。精製の検定は、**SDS-PAGE** による電気泳動で単一のタンパク質であることを確認した。精製タンパク質はアミノ酸配列分析により、**N** 末端のアミノ酸配列を決定した。そのアミノ酸配列を基に目的タンパク質の遺伝子を取得した。取得した抗菌タンパク質の一次構造については、相同性解析を行った。

(2) 抗菌タンパク質の組換えタンパク質の発現

抗菌タンパク質の大腸菌、*Bacillus subtilis*、*Brevibacillus choshinensis* による発現系を構築した。抗菌タンパク質遺伝子を **PCR** で増幅し、**pET32** ベクターに挿入することで発現ベクターを構築した。この発現ベクターを **BL21(DE3)** に導入することで大腸菌による組換えタンパク質発現系を構築した。同様に、**pHT254** で構築した発現ベクターを用いて *B. subtilis* の発現系を、**pBIC1** で構築した発現ベクターで *Brevibacillus* の発現系をそれぞれ構築した。

(3) そうか病菌に対する抗菌作用の解析

抗菌タンパク質の作用機構を解析する目的で、膜損傷の有無を指標とした蛍光染色法による細菌の生死判定を解析した。そうか病菌を液体培養した菌体を **PBS** で洗浄した後、抗菌タンパク質を添加し、**30℃** で反応させた。次に、**-Bacstain- Bacterial Viability Detection Kit - DAPI/PI** で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 抗菌タンパク質の精製と遺伝子クローニング

A297 株の培養上清から、そうか病菌に対する抗菌活性を指標に抗菌タンパク質の精製を行った。CM Sepharose Fast Flow、TSKgel CM-5PW のカラムクロマトグラフィーにより、約 15kDa (AMP24) と約 8kDa (AMP28) の 2 種類の異なる精製標品を得ることができた。次に、アミノ酸シーケンサーによる N 末端配列を解析し、13 から 16 アミノ酸残基の配列を明らかにした。

一方で、受託解析による PacBio シーケンスによって A297 株のゲノム配列を明らかにした。その結果、精製した抗菌タンパク質はゲノム上の遺伝子 297_1_00824 および 297_1_03861 のものと一致した。これら遺伝子配列について、BLAST による同源性検索を行った結果、いずれのタンパク質も hypothetical protein としてアノテーションされているタンパク質と一致した。機能が明らかな配列と同源性を示すものはなかったことから、これまで配列は既知であったが、機能が不明であったタンパク質の機能が明らかとなったことを示した。つまり、これまで知られている抗菌タンパク質には該当せず、非常に新規性の高い抗菌タンパク質であることが明らかとなった。

(2) 抗菌タンパク質の組換えタンパク質の発現

SignalP 解析から AMP24 には 30 残基のシグナル配列が、AMP28 には 23 残基のシグナル配列と 16 残基のプロ配列が存在していた。pET32b による大腸菌による異種発現系の構築を行った。全長の配列、活性型配列、シグナル配列のみを除いた配列それぞれの遺伝子の発現系を構築した。その結果、AMP24 はシグナル配列を除いた遺伝子において、AMP28 はシグナル配列を除いたプロ配列と成熟配列を含む遺伝子による発現系においてタンパク質の発現を確認した。また、37、25、18 による発現誘導の結果、18 においてのみ発現が見られ、そうか病菌に対する抗菌活性を確認した。しかしながら、SDS-PAGE による結果から発現量が低いことがわかった。

大腸菌による異種タンパクの発現系を構築したが、発現量が非常に少なかったことから、大腸菌とは異なる宿主による発現系を検討した。AMP24 は、シグナル配列を含む構造遺伝子の全長を pHT254 に挿入した発現プラスミドを構築し、*B.subtilis* 1012wt に導入することで菌体外に目的タンパク質を分泌発現することができた。一方、AMP24 はシグナル配列を除いた成熟タンパク質に該当する遺伝子断片を、pBIC1 にあらかじめ保持されているシグナル配列

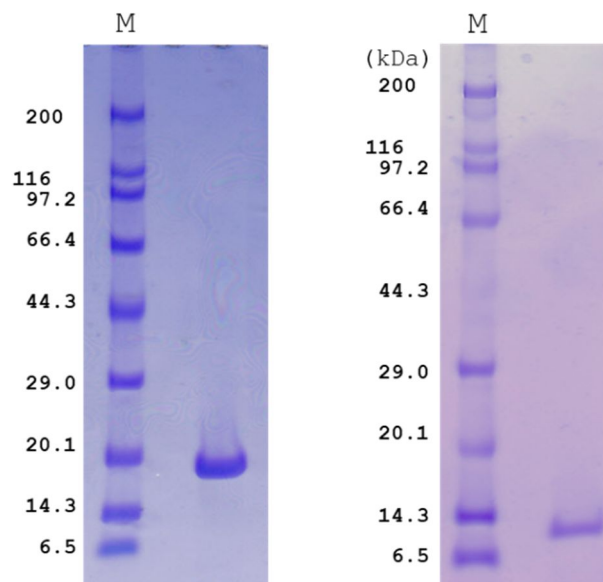


図 2 AMP24, AMP28 発現タンパク質の SDS-PAGE

AMP24 の *B.subtilis* 1012wt による発現タンパク質の Ni 精製したサンプル (左) および、AMP28 の *Brevibacillus* による発現タンパク質の Ni 精製したサンプル (右) の SDS-PAGE

の下流に挿入した。構築した発現プラスミドを *Brevi bacillus* に導入し、菌体外に目的タンパク質を分泌発現することを確認した(図 2)。図 2 は AMP24 および AMP28 それぞれの発現タンパク質を Ni 樹脂による精製したサンプルの SDS-PAGE を示した。

(3) そうか病菌に対する抗菌作用の解析

これらの抗菌タンパク質の作用機構を解析することを目的に、細菌の生死判定などでよく用いられる膜損傷の有無を指標とした蛍光染色を行った。顕微鏡観察の結果、細胞膜損傷時において染色されるヨウ化プロピジウム (PI) の蛍光が検出された(図 3)。したがって、本研究課題で単離した抗菌タンパク質はジャガイモそうか病菌の細胞膜を損傷し、生育を阻害していることが示唆された。

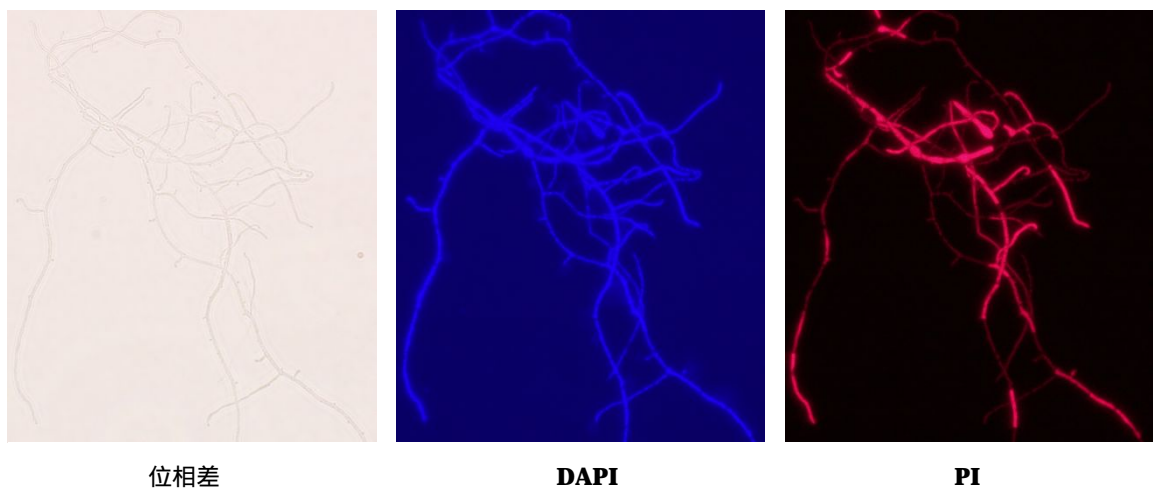


図 3 ジャガイモそうか病菌に対する抗菌タンパク質の作用

抗菌タンパク質をジャガイモそうか病菌に添加添加し、蛍光染色を行った。細胞膜に損傷がある場合に検出される PI の蛍光が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 S. Hirota, Y. Nakayama, H. Itokazu, K. Ekino, M. Nishizawa, S. Harashima	4. 巻 133
2. 論文標題 Novel breeding method, mat 2-PBT, to construct isogenic series of polyploid strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Biosci Bioeng	6. 最初と最後の頁 515-523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2022.02.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hassan N, Easmin F, Ekino K, Harashima S.	4. 巻 11
2. 論文標題 PCR-mediated One-day Synthesis of Guide RNA for the CRISPR/Cas9 System.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Protoc.	6. 最初と最後の頁 e4082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.4082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hassan N, Easmin F, Sasano Y, Ekino K, Taguchi H, Harashima S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Systematic approach for assessing whether undeletable chromosomal regions in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> are required for cell viability.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-67911-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松川木仁未, 坂西歩, 齋藤浩之, 三田光章, 阿部雄一, 原島俊, 浴野圭輔
2. 発表標題 黒斑病菌に抗菌活性を示す <i>Bacillus thuringiensis</i> の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本支部大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

崇城大学生物生命学部生物生命学科生物機能科学研究室
<https://btls.bio.sojo-u.ac.jp/microbial-lab/harashima.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------