

実験成績証明書

平成16年10月14日

1. 実験日： 平成12年9月～平成13年3月
2. 実験場所：中央農業総合研究センター稲機能解析実験棟およびイネ開発温室
3. 実験者： 農業・生物系特定産業技術研究機構
中央農業総合研究センター 北陸地域基盤研究部
川田 元滋

4. 実験の目的

本願発明のキャベツ由来ディフェンシタンパク質とダイコン (*Raphanus sativus*) 由来のディフェンシタンパク質のアミノ酸配列及び抗菌活性の比較を行う。

また、種々の種に由来するディフェンシタンパク質のアミノ酸配列及びいもち病抵抗性系統の出現頻度の比較を行う。

5. 実験内容

(1) 緒論

本願発明のキャベツ由来ディフェンシタンパク質は、従来のダイコン由来のディフェンシタンパク質と比較して、複数の種類の病原菌に対する抵抗性（複合病害抵抗性）を植物に付与することができるという極めて優れた性質を有する。

そこで本実験では、本願発明のディフェンシタンパク質とダイコン由来のディフェンシタンパク質のアミノ酸配列を比較し、また病原菌に対する抵抗性（抗菌活性）を比較した（実験1）。

また、ディフェンシタンパク質は、1アミノ酸の差異が抗菌活性に影響を及ぼすことを示すため、種々の種に由来するディフェンシタンパク質のアミノ酸配列を比較し、またいもち病抵抗性系統の出現頻度を比較した（実験2）。

(2) 実験方法

実験1：

a) アミノ酸配列の比較

本願発明のキャベツ由来ディフェンシタンパク質のアミノ酸配列とダイコン由来のディフェンシタンパク質のアミノ酸配列を比較した。本願発明のキャベツ由来ディフェンシタンパク質のアミノ酸配列は、本願明細書に示される配列番号2のうち、シグナル配列部分（アミノ酸1～29）を除いたアミノ酸30～80までの51残基である。また、ダイコン由来のディフェンシタンパク質のアミノ酸配列は、Terras FR, Schoofs HM, De Bolle MF, Van Leuven F, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem.* 1992 Aug 5;267(22):15301-9. に報告されているダイコン由来ディフェンシタン Rs-AFP2 のアミノ酸配列を用いた。なお、このアミノ酸配列は、引用文献2 (TERRAS, FRG et al., *Plant Cell*, vol.7,

pp. 573-588 (1995)) に開示されるアミノ酸配列の+1~+51のアミノ酸に相当する(引用文献2、第577頁、Figure 5)。

b) 病原菌の調製

病原菌として、真菌であるイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) 及びイネ紋枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、並びに細菌である大腸菌を使用した。

いもち病菌は、病原性を保持していることを確認した菌糸集団をオートミール固形培地に接種し、培養して得られた胞子を蒸留水に懸濁して調整した。

イネ紋枯病菌は、病原性を保持していることを確認した菌糸集団をオートミール固形培地に接種し、培養して得られた胞子を蒸留水に懸濁して調製した。

大腸菌は、ディフェンシン遺伝子を連結したプラスミドを導入し、37℃で培養してO.D. 600の吸光度が0.5になるように調整した。

c) 抗菌活性の評価

抗菌蛋白質の抗菌活性は、I.C. 50(対照区と比較して50%の増殖抑制程度を示す濃度)を用いて定量化することができる。

いもち病菌については、精製したディフェンシン蛋白質の希釈系列を用意して培養液に添加し、25℃で96時間培養後、培養液の吸光度を測定して定量化した。

イネ紋枯病菌については、精製したディフェンシン蛋白質の希釈系列を用意して培養液に添加し、28℃で96時間培養後、培養液の吸光度を測定して定量化した。

また大腸菌については、O.D. 600の吸光度が0.5の時点でプラスミド内のディフェンシン遺伝子の発現を誘導し、37℃で培養後1時間ごとに5時間後まで、培養液の吸光度を測定した。

実験2

a) アミノ酸配列の比較

キャベツ、コマツナ、ノザワナ、ハクサイ、カブ、カラシナ、ワザビダイコン及びナタネ由来の8種類のディフェンシントタンパク質を単離し、各ディフェンシントタンパク質のシグナル配列を比較した。なお、これらのディフェンシントタンパク質は実験者により単離されたものである。

b) 組換え植物の作出

上記a)で単離した各ディフェンシントタンパク質をコードする遺伝子を導入した組換え植物の作出を行った。組換え植物は、本願明細書【0050】~【0054】の項に記載の方法に従って、イネ品種「どんとこい」を用いて作出した。

c) 病原菌の接種

病原菌として、イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) を使用した。いもち病菌は、病原性を保持していることを確認した菌糸集団をオートミール固形培地に接種し、培養して得られた胞子を界面活性剤を含む蒸留水に懸濁して調製した。

いもち病菌は、組換え植物を土壌に蒔き、4-5葉期に病原菌液を噴霧して感染させた。

d) いもち病抵抗性系統の出願頻度の評価

接種7日後に組換え植物に発生した発病程度を、下記に示す、一般的に用いられているいもち病抵抗性指数を基準として調査し、指数として3以下（病斑面積率としてはおおむね5%以下、原品種は今回の条件下では指数でおおむね6から7となる）の系統をいもち病抵抗性系統として、供試系統の総数に対する割合を算出した。また、病徴の調査により、強抵抗性型病斑（R型病斑）を示す系統数を調査し、供試系統の総数および抵抗性系統の総数に対する割合を算出した。

病斑指数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
病斑面積率(%)	0	1	2	5	10	20	40	60	80	90	100

6. 結果

上記実験1のアミノ酸配列の比較により得られた結果を図1に示す。その結果、本願発明のキャベツ由来ディフェンシンとダイコン由来ディフェンシンでは、シグナル配列を除く成熟タンパク質の部分が2アミノ酸異なることがわかった。

また、上記実験1のイネいもち病菌及びイネ紋枯病菌に対する抗菌活性の比較により得られた結果を以下の表1に示す。

	イネいもち病菌 <i>Pyricularia oryzae</i>	イネ紋枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>
ダイコン由来ディフェンシン	0.3	100
キャベツ由来ディフェンシン	0.4	7

ディフェンシンの各病原菌に対する抗菌活性は、(対照区と比較して50%の増殖抑制程度を示す濃度(I.E.50、単位はug/ml)で示した。各病原菌の培養は、1/2PD培地を用いた。

表1から、本願発明のキャベツ由来ディフェンシンは、ダイコン由来ディフェンシンと比較して、イネいもち病菌及びイネ紋枯病菌の両方に対する抗菌活性を示すことが明らかになった。また、イネ紋枯病菌に対する抗菌活性は、ほとんど抗菌活性を示さないダイコン由来ディフェンシン(I.E.50=100)に対して約14倍のI.E.50=約7ug/mlを示した。

また、実験1の大腸菌に対する抗菌活性の比較により得られた結果を図2に示す。図2においては、縦軸の数値が低いほど、大腸菌の増殖程度が低い(培養液中の濁度が低い)ことを表しており、発現したキャベツ由来ディフェンシンの増殖抑制効果が大きいことが示される。また、ダイコン由来ディフェンシンは、細菌である大腸菌に対しては安定的に有効な抗菌活性を示さない(すなわち大腸菌の増殖を抑制しない)のに対し、本願発明のキャベツ由来ディフェンシンは、大腸菌に対して安定して有効な抗菌活性を示すことがわかる。

従って、本願発明のキャベツ由来ディフェンシンは、複数の病原菌に対する抵抗性(複合病害抵抗性)を示し、かつ、従来のダイコン由来ディフェンシンと比較して顕著な抗菌活性を示すことが明らかにされた。

さらに、上記実験2のアミノ酸配列の比較により得られた結果を図3に示す。その

結果、8種の植物に由来するディフェンシタンパク質のシグナル配列は、数アミノ酸が異なることが明らかにされた。

また、上記実験2のいもち病抵抗性系統の出現頻度の比較により得られた結果を以下の表2に示す。

表2 シグナル配列の異なる8種類のディフェンシ遺伝子を導入した組換えイネ系統におけるいもち病抵抗性系統の出現頻度

	いもち病抵抗性系統の出現頻度(%)	抵抗性系統のうち、強抵抗性型(R型病斑)を示す系統の割合(%)	供試系統全体のうち、強抵抗性型(R型病斑)を示す系統の割合(%)
カラシナ	22.4	54.5	12.2
キャベツ	20.2	40.8	8.2
コマツナ	24.3	28.1	6.8
ワサビダイコン	18.2	25.3	4.6
ハクサイ	14.4	31.1	4.5
ノザワナ	13.7	27.3	3.7
カブ	13.3	17.1	2.3
ナタネ	8.8	11.9	1.1

表2から、各ディフェンシタンパク質のシグナル配列がわずかでも異なることによって、病害抵抗性の付与効果（抵抗性系統の出現頻度）が有意に異なることがわかった。

従って、本実験により、本願発明のキャベツ由来ディフェンシタンパク質は、従来ディフェンシタンパク質と比較して、種々の病原菌に対する抵抗性を付与し、またその抵抗性も植物における病害防除にとって有効な程度に高いものであることが確認された。また、ディフェンシタンパク質は、そのアミノ酸配列又はシグナル配列に数個の異なるアミノ酸が存在することで、その活性が有意に影響を受けることが確認された。

図1

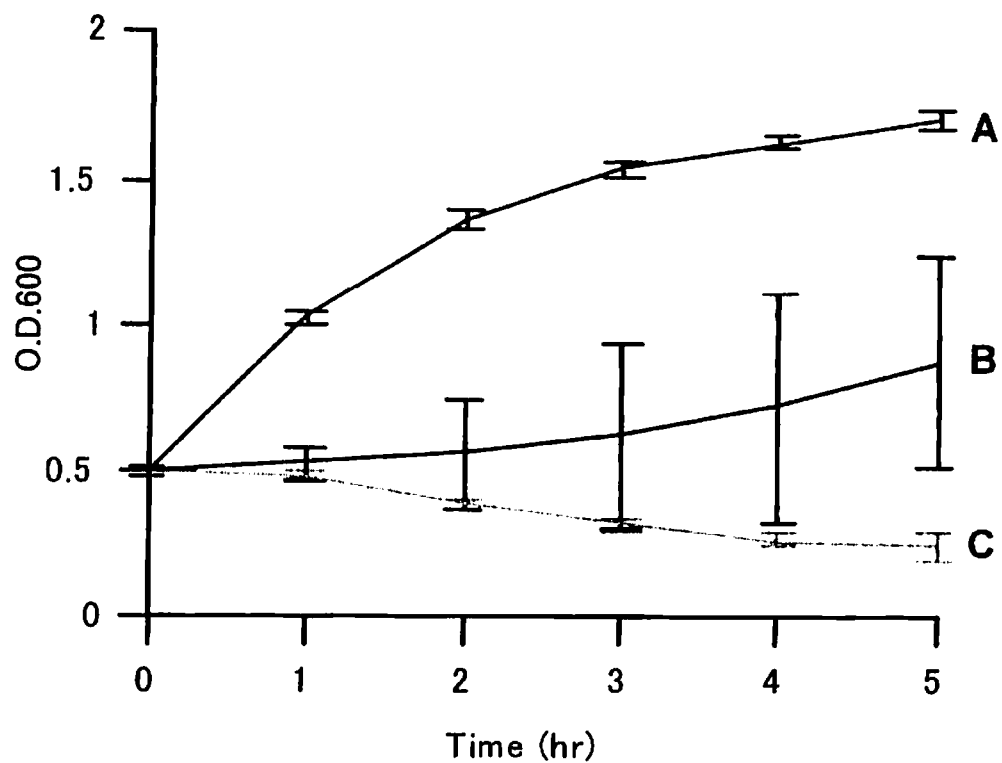
	1	10	20	25
キャベツ由来ディフェンシン	QKLCERPSGT	WSGVCGNNA	CKNQC	
ダイコン由来ディフェンシン	QKLCQRPSGT	WSGVCGNNA	CKNQC	

↑

	26	30	40	50
キャベツ由来ディフェンシン	INLEK	ARHGSCNYVF	PAHKCICYFP	C
ダイコン由来ディフェンシン	IRLEK	ARHGSCNYVF	PAHKCICYFP	C

↑

図2 ダイコン由来およびキャベツ由来ディフェンシン蛋白質の大腸菌に対する増殖抑制効果の比較



A: ディフェンシン蛋白質が発現していない大腸菌
B: ダイコン由来ディフェンシンが発現した大腸菌
C: キャベツ由来ディフェンシンが発現した大腸菌

図3

カテシナ	M	A	K	F	A	S	I	I	A	P	L	F	A	A	L	V	L	L	A	F	E	A	P	T	M	V	E	A	Q	K	L	C	E	R	P	S	G	T	W	S	
キャベツ	M	A	K	F	V	S	I	I	A	L	L	F	A	A	L	V	L	F	A	A	L	E	A	P	T	M	V	E	A	Q	K	L	C	E	R	P	S	G	T	W	S
コマツナ	M	A	K	F	V	S	I	I	A	P	L	F	A	A	L	V	L	L	A	F	E	A	P	T	M	V	E	A	Q	K	L	C	E	R	P	S	G	T	W	S	
ワサビダイコン	M	A	K	F	A	S	I	V	S	L	L	F	A	A	L	V	L	F	T	A	F	E	A	P	A	M	V	E	A	Q	K	L	C	E	R	P	S	G	T	W	S
ハクサイ	M	A	K	F	V	S	I	I	A	P	L	F	A	A	L	V	L	F	A	A	F	E	A	P	T	M	V	E	A	Q	K	L	C	E	R	P	S	G	T	W	S
ノザワナ	M	A	K	F	V	S	I	I	A	L	L	F	A	A	L	A	L	F	A	A	F	E	A	P	T	M	V	E	A	Q	K	L	C	E	R	P	S	G	T	W	S
カブ	M	A	K	F	V	S	I	I	A	P	L	F	A	A	L	V	L	F	A	A	F	E	A	P	T	M	V	E	A	Q	K	L	C	E	R	P	S	G	T	W	S
ナタネ	M	A	K	F	A	S	I	V	I	L	L	F	A	A	L	V	L	F	A	A	F	E	A	P	T	M	V	E	A	Q	K	L	C	E	R	P	S	G	T	W	S