

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05640

研究課題名(和文) イネいもち病菌におけるQoI剤耐性変異メカニズムの解明～いちごっこからの脱却～

研究課題名(英文) Elucidation of QoI resistant mutation mechanism in rice blast fungus

研究代表者

曾根 輝雄 (Sone, Teruo)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：00333633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イネいもち病菌におけるストロビルリン系殺菌剤(QoI剤)耐性変異の発生、遺伝、蔓延のメカニズムを明らかにすることで、薬剤の導入 耐性菌の発生 新薬剤の導入の「いちごっこ」からの脱却を目指すことを目的とした。まず、QoI耐性の原因である mtDNA cytbコドン143変異を、実験室条件で再現することは非常に困難である事が分かった。一方、菌体中のミトコンドリアの定量に成功した。また、GFPを使っているいもち病菌のミトコンドリアを可視化することにより、分生子形成時にミトコンドリアはチューブ状で伝播し、隔壁の形成と同時にドット状に変化する事が分かり、変異の蔓延に分生子形成が関与している事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はイネいもち病の防除において大きな問題となっているQoI剤耐性の発生と蔓延の仕組みを明らかにしようとするものである。本研究により菌の中で少量発生した変異ミトコンドリアが、胞子に分配される際に、急速に自己増殖し、変異株になる過程が明らかにされた。即ち、ミトコンドリアの自己増殖を防ぐことで、変異の蔓延を遅らせる事が出来る可能性が示唆された。また、菌の中のミトコンドリアを可視化する技術や、変異ミトコンドリアを定量する技術も開発され、いもち病菌におけるミトコンドリア生物学の基礎が確立された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanism of emergence, inheritance and distribution of QoI fungicide resistance in rice blast fungus. We could not conclude about the mechanism of mutation emergence, due to the difficulty of mutation induction in vitro. On the other hand, visualization of mitochondria with GFP was succeed, and it enabled to observe that only a few mitochondria were distributed to the conidia as tubule form, and they are divided into dots simultaneously with the septum formation between conidia and conidiophore. It suggested us that conidiation has a role for the rapid distribution of the mutant.

研究分野：植物病理学，応用微生物学

キーワード：イネいもち病 薬剤耐性 突然変異 ミトコンドリア GFP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

いもち病は稲作の全被害の約 15%、病害の半分を占めるイネの最重要病害である。いもち病の防除には、抵抗性品種の有効活用と適切な薬剤による管理が有効とされ、現在の防除体系の根幹を成しているが、依然として耐性菌の脅威に晒されている。既存の薬剤に対する耐性菌の顕在化によってその薬剤の有効性が失われ、新たな薬剤を導入し、さらにその薬剤に対する耐性菌が発生する、「いたちごっこ」の状態から根本的に脱することができていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、

1. mtDNA cytb コドン 143 変異の発生と DNA 損傷乗り越え合成の関係の解析
2. 変異ミトコンドリアの動態の解析
3. ミトコンドリアの可視化による分生子形成におけるミトコンドリアの伝播様式の解明

の 3 つの課題に分けて研究を行い、イネいもち病菌の QoI 剤耐性変異の発生・伝播のメカニズムを明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 変異の発生：いもち病菌の alternative oxidase 欠損株を作成し QoI 剤の殺菌効果を高めることにより、QoI 剤含有培地上で mtDNA cytb コドン 143 変異の誘導を試みた。自然突然変異が困難な場合には、UV 照射による誘導も試みた。

(2) ミトコンドリア動態の解析：野生型及び変異型ミトコンドリアを qPCR により定量する系を用いて、野生型株と変異型株よりプロトプラストを作成し、両者を融合させることで両タイプのミトコンドリアを同一細胞中に共存させた株の変異ミトコンドリアの存在比を測定した。

(3) 分生子形成におけるミトコンドリアの伝搬：クエン酸シンターゼと GFP を融合させ、イネいもち病菌に導入し、GFP により菌体内のミトコンドリアを可視化した。この GFP 発現株について、菌糸内、分生子内のミトコンドリアを蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

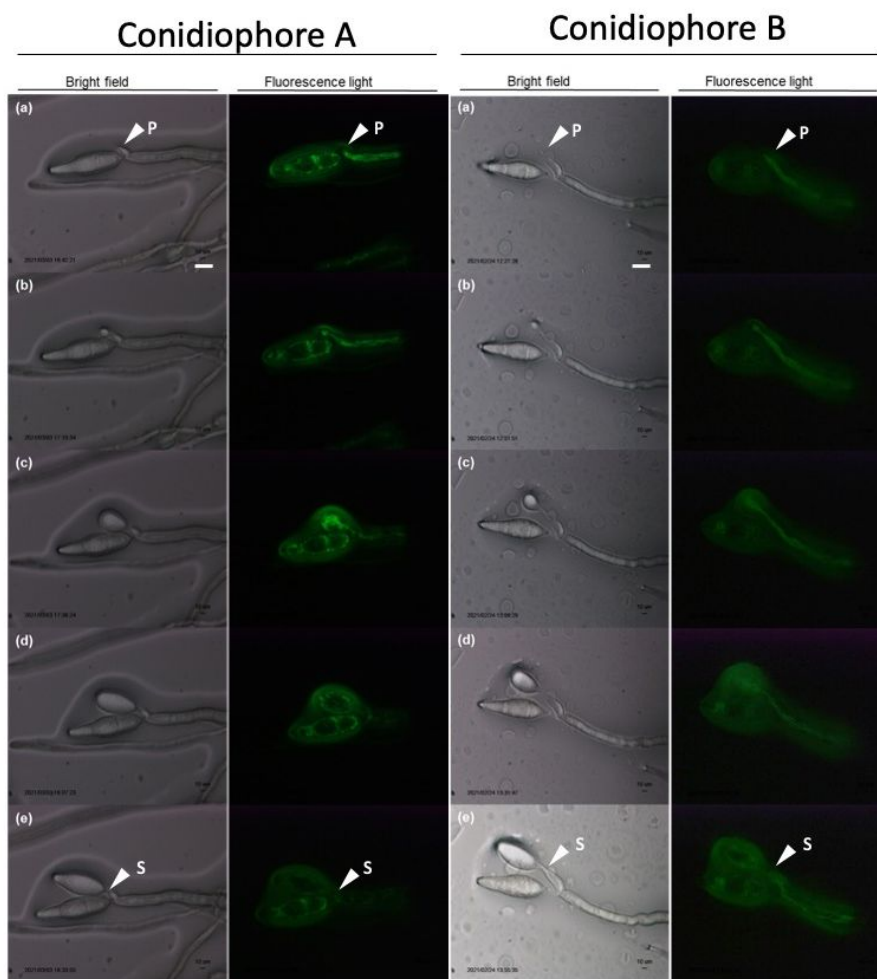
#### (1) 変異の発生の解析：

まず、mtDNA cytb コドン 143 変異の発生と DNA 損傷乗り越え合成の関係の解析のため、いもち病菌のオルタナティブオキシダーゼの欠損株の作成を行った。2 回相同組換えにより遺伝子の破壊に成功した。野生株である Ina86-137 に加え、損傷乗り越え合成系 (TLS) に関与する DNA ポリメラーゼ (ゼータ) 遺伝子 (REV3, REV7)、デオキシシチジルトランスフェラーゼ遺伝子 (REV1)、それぞれの欠損変異株との 2 重欠損変異株を得た。オルタナティブオキシダーゼ欠損株を用いて、mtDNA cytb コドン 143 変異の誘導を行った。通常の培養条件では誘導出来ず、紫外線照射など変異原を処理して誘導を試みた。UV 照射の条件を検討した結果、100 mJ/cm<sup>2</sup> で 50% の死滅率を示した。この強度を用いて異なるタイミング (孢子形成後、孢子形成を始める時期など)、対象 (孢子あるいはプロトプラスト) の UV 照射を試みたがいずれの場合も変異の誘導を行う事が出来なかった。以上のことから、自然界で起きている Az 耐性株の出現を実験室条件で再現することは困難であり、さらなる検討が必要である事が分かった。

(2) ミトコンドリア動態の解析：Az 耐性株と感受性株のプロトプラストを融合させ、野生型、変異型のミトコンドリアが共存している 3 株を得た。融合株を孢子形成させ、単孢子分離した株では全てが野生型か変異型のどちらかのミトコンドリアを保有し、ホモプラスミーが確認されたが、孢子形成をさせず、プロトプラストから再生させた株では 2 種のミトコンドリアの共存が観察された。以上のことにより、分生子形成時にミトコンドリアのホモプラスミー化が起こることが強く示唆された。

(3) 分生子形成におけるミトコンドリアの伝搬：ミトコンドリアの可視化のため、蛍光タンパク質による可視化を行った。ミトコンドリアに局在するタンパク質として、クエン酸シンターゼを用い、eGFP 蛍光タンパク質を C 末端に融合させたタンパク質をイネいもち病菌 Ina86-137 株に発現させた。形質転換株の GFP 蛍光と mitotracker によるミトコンドリアの蛍光染色との比較により、GFP によりいもち病菌のミトコンドリアが可視化できたことがわかった。一方、分生子形成過程におけるミトコンドリアの定量のため、分生子形成初期のタイミングを検討し、培

地上での分生子形成誘導処理後 6 時間後に初期分生子形成が見られることがわかった。さらに、6 時間後の若い分生子をレーザー走査型共焦点顕微鏡で観察し、3 次元画像を再構築した。その結果、イネいもち病菌の分生子内のミトコンドリアは点状、管状、網状など様々な形態をとることがわかった。また、菌糸先端でも点状のミトコンドリアが見られた。以上のことから、若い分生子には少数の点状の分生子が分布し、それが形成過程の進行と共に網状となることが示唆された。さらに初期、即ち分生子柄から分生子が形成される際のミトコンドリアの観察を行ったところ、分生子形成のごく初期には、菌糸からチューブ状のミトコンドリアが初期分生子内に送り込まれ、形成開始後 100 分で、分生子と分生子柄の間に隔壁が形成され、分生子内のミトコンドリアもドット状に分裂する事が観察され、初期に送り込まれた少数のチューブ状ミトコンドリアがドット化し、若い分生子の多数のミトコンドリアとなり、(図)。その際にホモプラスミー化する事が示唆された。以上のことから、いもち病菌ミトコンドリアのホモプラスミー化には分生子形成が大きく関わる事が示唆された。



図．分生子形成初期におけるミトコンドリアの観察．蛍光像で見えるのがミトコンドリア

2 つの連続観察の結果を示している。(a) 分生子形成開始時 (b) 25 分後 (c) 50 分後 (d) 75 分後 (e) 100 分後 P, 分生子柄先端, S 隔壁。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Syib' li Muhammad Akhid, Kodama Aoi, Abe Ayumi, Sone Teruo	4. 巻 86
2. 論文標題 Three-dimensional visualization of mitochondria in conidia of Pyricularia oryzae using green fluorescent protein (GFP) fused with citrate synthase (CitA)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 250 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-020-00928-0	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 -

〔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 Syib' li M A, Abe A and Sone T.
2. 発表標題 3D visualization of conidial mitochondria of Pyricularia oryzae
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分 担 者	阿部 歩  (Abe Ayumi)  (70374626)	北海道大学・農学研究院・技術専門職員    (10101)	

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
---------	---------